



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년06월29일

(11) 등록번호 10-2414558

(24) 등록일자 2022년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/54 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/54 (2013.01)

A61K 39/39541 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7032872

(22) 출원일자(국제) 2017년04월18일

심사청구일자 2020년04월10일

(85) 번역문제출일자 2018년11월13일

(65) 공개번호 10-2018-0133493

(43) 공개일자 2018년12월14일

(86) 국제출원번호 PCT/US2017/028162

(87) 국제공개번호 WO 2017/184619

국제공개일자 2017년10월26일

(30) 우선권주장

62/324,170 2016년04월18일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR101017301 B1

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 23 항

심사관 : 김수진

(54) 발명의 명칭 인간 CD40에 결합하는 효능성 항체 및 이의 용도

(57) 요약

인간 CD40에 결합하는 단리된 단일클론 효능성 항체 및 관련 항체 기반 조성물 및 분자가 개시되어 있다. 항체를 사용하기 위한 치료학적 및 진단학적 방법도 개시되어 있다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/715 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/74 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

비탈레 로라 에이

미국 18902 펜실베이니아주 도일스타운 비터스윙
 레인 5574

히 리젠

미국 18104 펜실베이니아주 앨런타운 리지뷰 드라
 이브 1675

오닐 톰

미국 07882 뉴저지주 위싱턴 파운드리 레인 2

크로커 안드레아

미국 18938 펜실베이니아주 뉴 호프 윈디 부시 로
 드 298

선다라판디안 카루나

미국 08824 뉴저지주 켄달 파크 빌리지 로드 38

토마스 로렌스 제이

미국 02375 매사추세츠주 이스턴 폭스 리지 로드 1

위저 제니퍼

미국 08865 뉴저지주 알파 슬라이 애비뉴 498

(56) 선행기술조사문헌

W02002088186 A1
 W02006068953 A2
 W02010032061 A1
 KR100918540 B1*
 R. H. Vonderheide et al., Clinical Cancer
 Research, 19(5), pp.1035-1043(2013.03.01.) 1
 부.*
 KR1020110059755 A
 KR1020140029392 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

각각 서열번호 19, 21, 23을 포함하는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 각각 서열번호 25, 27, 29를 포함하는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는, 인간 CD40에 결합하는 단리된 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 17 및 18과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열번호 17 및 18과 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 각각 서열번호 17 및 18에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 각각 서열번호 135 및 136으로 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 경쇄 영역을 포함하는 항체.

청구항 6

제1항에 있어서,

- (a) 상기 항체가 인간 항체이거나, 또는
- (b) 상기 항체가 인간 불변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 항체가 항원 결합 단편, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, 또는 scFv 단편인, 항체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 항체가 직접적으로 APC를 활성화시키거나, 또는 항원에 대한 면역 반응을 증가시키되:

- (a) Fc 수용체 결합과는 상관 없이;
- (b) CD40 발현 세포의 항체-의존성 세포 독성(ADCC)을 유도하는 것 없이;
- (c) CD40 발현 세포의 보체 의존성 세포 독성(CDC)을 유도하는 것 없이; 또는
- (d) Fc 수용체 결합과는 상관 없이 CD40L과 상승작용할 수 있고,

하기의 성질 중 적어도 하나를 추가로 나타내는 항체:

- (i) 세포 아포토시스를 유도하는 성질;
- (ii) IL-12p40의 발현에서의 증가로 측정되는 세포의 T-세포 자극 활성을 증진시키는 성질;
- (iii) HLA-DR V450, CD54 PE, CD86 APC, 및 CD83 BV510, CD19 V500, CD54 PE, HLA-DR V450, CD23 PerCP-Cy5.5, CD69 APC, CD86 APC, CD38 PerCP-Cy5.5 및 CD71 PE로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 세포-표면 마커의 발현에서의 증가로 측정되는 B-세포 활성화를 증진시키는 성질;

- (iv) 10^{-10} M 이하의 평형 해리 상수 K_d 로 인간 CD40에 결합하는 성질;
- (v) 시노물구스 CD40과 교차 반응하는 성질; 또는
- (vi) NF κ B 구동된 리포터 세포주를 사용하여 측정되는 세포 활성화를 유도하는 인간 CD40에 결합하는 성질.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체의 경쇄 가변 영역, 중쇄 가변 영역, 또는 경쇄와 중쇄 둘 다의 가변 영역을 코딩하는 단리된 핵산 분자.

청구항 10

제9항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 11

제10항의 발현 벡터로 형질전환된 세포.

청구항 12

항원에 연결된, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 분자 접합체.

청구항 13

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항체와는 상이한 결합 특이성을 갖는 제2 분자에 연결된 상기 항체를 포함하는 이특이적 분자.

청구항 14

제13항에 있어서, 제2 분자는 CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, 갈렉틴 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, 갈렉틴-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, B7-H3, B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1, TIM-4, B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB(CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, CD27, DR3 또는 CD28H에 결합하는, 이특이적 분자.

청구항 15

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 항체 및 담체를 포함하는, 개체에서 항원에 대한 면역 반응을 유도하거나 증진시키기 위한 약제학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 보조제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서, 하나 이상의 다른 항체를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 하나 이상의 다른 항체가 CTLA-4, PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, 갈렉틴 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, 갈렉틴 1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, B7-H3, B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1, TIM-4, B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB(CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, CD27, DR3 또는 CD28H에 결합하는, 약제학적 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 항체 및 담체를 포함하는, 개체에서 암을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 암이 만성 림프구 백혈병, 맨틀 세포 림프종, 1차 중추 신경계 림프종, 버킷 림프종 및

변연대 B 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서, 하나 이상의 추가의 치료학적 제제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 하나 이상의 추가의 치료학적 제제가 항-PD-1 항체, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA-4 항체인, 약제학적 조성물.

청구항 23

CD40 발현 세포의 성장을 억제하기 위한 유효량의 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 항체와 상기 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, CD40 발현 세포의 성장을 억제하는 생체외(*ex vivo*) 방법.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2016년 4월 18일자로 출원된 미국 가출원 번호 제62/324,170호에 대한 우선권을 주장한다. 상기 언급된 출원의 내용은 본원에 참조로 인용된다.

배경 기술

[0003] T 세포와 항원-제공 세포 간의 상호작용은 면역 반응의 생성을 촉진시키는 다양한 부속 분자가 관여한다. 하나의 상기 분자는 CD40, 종양 괴사 인자 수용체 (TNF-R) 슈퍼패밀리의 구성원인 CD40이고 이는 CD40L에 결합한다 (Ranheim EA, *et al.*, *Blood*. 1995 June 15;85(12):3556-65). CD40은 277개 아미노산 잔기로 이루어진 막관통 43-48 kDa의 당단백질이다(Braesch-Andersen *et al.*, 1989). CD40은 항원-제공 세포(APC)에 의해 발현되고 T 세포 상의 이의 천연 리간드 (CD40L)의 관여가 수지상 세포와B 세포를 포함하는 APC를 활성화시킴에 따라서 (Khalil and Vonderhide (2007) *Update Cancer Ther*, 2(2): 61-65), 면역 반응을 증진시킨다. CD40은 또한 많은 종양 세포 상에서 발현되고 이러한 세팅에서 이의 연결은 직접적인 세포독성 효과를 매개하고, 예를 들어, 종양 세포 상의 CD40의 관여는 시험관내 아포토시스 및 생체내 손상된 종양 성장을 유도한다(Tai *et al.* (2004) *Cancer Res*, 64(8):2846-52).

[0004] CD40에 대한 모노클로날 항체는 암 치료를 포함하는 다양한 잠재적 치료 목적을 제공한다. 예를 들어, 효능성 CD40 항체는 T 세포-매개된 면역력의 쥐 모델에서 CD4+ 림프구에 의해 제공된 T 세포 도움을 대체하는 것으로 나타났고, 종양-함유 숙주에서, CD40 효능제는 종양-연합 항원에 대해 효과적인 면역 반응을 유발한다(Bennett *et al.* (1998) *Nature*, 393(6684):478-80). 추가로, CD40 항체는 백신에 사용될 전망이 크다(Fransen *et al.* (2014) *Vaccine* 32:1654-1660). 그러나, 면역계를 강하게 조절하는 제제와 연합된 잠재적 부작용 효과가 있다 (Sandin *et al.* (2014) *Cancer Immunol Res*, 2:80-90). 따라서, 질환을 치료하고/하거나 예방하기 위해 사용될 수 있는 CD40에 대해 개선된 치료학적 항체 뿐만 아니라 CD40 항체가 치료학적으로 효과적이게 하는 특이적 성질 및 기작에 대한 추가의 통찰이 필요하다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 유리하고 바람직한 치료 효과와 연관될 수 있는 특정 기능적 성질을 갖는 단리된 항-CD40 항체를 제공한다. 구체적으로, 항원(예를 들어, 세포 상에 발현된 항원)에 대한 면역 반응을 증가시킬 수 있는 효능적 항-CD40 단일클론 항체가 생성되었고 특징 분석되었다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항체"는 전장 항체 및 이의 항원 결합부를 언급한다.

[0006] 하나의 구현예에서, 항-CD40 항체는 예를 들어, T 세포-매개된 면역 반응, B-세포 활성화, 및/또는 사이토킨 생성을 증진시킴에 의해 항원에 대한 면역 반응을 증진시킨다. 항체는 단독으로 또는 병용 요법으로 (예를 들어, 백신 요법 및/또는 화학요법과 함께) 투여될 수 있다.

[0007] 또 다른 구현예에서, 항-CD40 항체는 CD40 발현 세포의 항체-의존성 세포 독성(ADCC)을 유도하고/하거나 CD40

발현 세포의 보체 의존성 세포 독성(CDC)을 유도하는 것 없이 항원에 대한 면역 반응을 증가시킬 수 있다.

- [0008] 또 다른 구현예에서, 항체는 이펙터 없는 불변 영역을 포함한다. 하나의 구현예에서, 불변 영역은 IgG2 이소형(예를 들어, 인간 IgG2)이다.
- [0009] 또 다른 구현예에서, 항-CD40 항체는 하기의 성질 중 하나 이상을 나타낸다:
- [0010] (a) Fc 수용체 결합과는 상관 없이 인간 CD40으로의 CD40L의 결합 차단 부재;
- [0011] (b) Fc 수용체 결합과는 상관 없이 인간 CD40으로의 CD40L의 결합 차단;
- [0012] (c) Fc 수용체 결합과는 상관 없이 항원 제공 세포(APC) 상에 발현된 인간 CD40의 활성화;
- [0013] (d) 종양 세포의 아포토시스의 유도;
- [0014] (e) T-세포 자극 활성화;
- [0015] (f) 증진된 B-세포 활성화; 및/또는
- [0016] (g) CD40L과의 상승작용 가능.
- [0017] 바람직하게, 항체는 Fc 수용체 상호작용과 독립적으로 작용한다. 바람직하게 항체는 IgG2 이소형 항체이다.
- [0018] 하나의 구현예에서, 효능성 항체는 Fc 수용체 결합과는 상관 없이 면역 반응을 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 항체는 Fc γ R과 같은 Fc 수용체와의 교차-연결 없이 강력한 효능성 특성을 나타낼 수 있다. 이들 효능성 특성은 예를 들어, HLA-DR V450, CD54 PE, CD86 APC, CD83 BV510, CD19 V500, CD54 PE, HLA-DR V450, CD23 PerCP-Cy5.5, CD69 APC, CD86 APC, CD38 및 CD71 PE로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포 표면 마커의 발현의 증가에 의한 측정시, 예를 들어 T-세포 활성화의 증가 및/또는 B 세포 활성화의 증가를 포함한다.
- [0019] 또 다른 구현예에서, 항체는 CD40의 CD40-발현 세포 상의 CD40L(CD154)로의 결합을 차단한다. 특정 구현예에서, 항체는 가용성 CD40L의 CD40 발현 세포로의 결합을 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%까지 억제한다. 특정 구현예에서, 항-CD40 항체는 예를 들어, FACS, 바이오-층 간섭계법 (BLI) 또는 바이오코어에 의한 측정시 CD40L의 결합을 적어도 약 70%까지 억제한다. 또 다른 구현예에서, 항-CD40 항체는 예를 들어, FACS, BLI 또는 바이오코어에 의한 측정시 CD40L의 결합을 적어도 약 80%까지 억제한다.
- [0020] 또 다른 구현예에서, 항체는 예를 들어, CD95의 증가된 발현에 의한 측정시 세포의 아포토시스를 유도한다. 항체는 또한 특정 Fc 수용체(예를 들어, Fc γ RI(CD64), Fc γ RIIA(CD32), Fc γ RIIB1(CD32), Fc γ RIIB2(CD32), Fc γ RIIIA(CD16a), Fc γ RIIIB(CD16b), Fc ϵ RI, Fc ϵ RII(CD23), Fc α RI(CD89), Fc α / μ R, 및 FcRn)에 대해 특이성을 갖는 Fc 영역을 포함하도록 작제될 수 있다.
- [0021] 또 다른 구현예에서, 항체는 10^{-10} M 이하, 바람직하게 10^{-11} M 이하의 평형 해리 상수 Kd로 및/또는 시노몰구스 CD40과의 교차-반응으로 인간 CD40에 결합할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 특정 항-CD40 항체는 항체 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK, 3B6-NS, 및 하기된 관련 구현예를 포함한다.
- [0023] 하나의 구현예에서, 항체는 서열번호 9, 10, 23, 24, 37, 38, 51, 52, 65, 66, 65, 66, 79, 80, 93, 94, 107, 108로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 CDR3 서열을 포함하고, 이는 이의 보존성 서열 변형(예를 들어, 보존성 아미노산 치환)을 포함한다. 항체는 서열번호 15, 16, 29, 30, 43, 44, 57, 58, 71, 72, 85, 86, 99, 100, 113, 114로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 가변 영역 CDR3 서열을 추가로 포함할 수 있고, 이는 이의 보존성 서열 변형을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 중쇄 CDR2 및/또는 CDR1 서열은 각각 서열번호 7, 8, 21, 22, 35, 36, 49, 50, 63, 64, 77, 78, 91, 92, 105, 106, 및 서열번호 5, 6, 19, 20, 33, 34, 47, 48, 61, 62, 61, 62, 75, 76, 89, 90, 103, 104로부터 선택되고, 이는 이의 보존성 서열 변형을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 경쇄 CDR2 및/또는 CDR1 서열은 각각 서열번호 13, 14, 27, 28, 41, 42, 55, 56, 69, 70, 84, 85, 97, 98, 111, 112, 및 서열번호 11, 12, 25, 26, 40, 41, 53, 54, 67, 68, 81, 82, 95, 96, 109, 110로부터 선택되고, 이는 이의 보존성 서열 변형을 포함한다.
- [0024] 또 다른 구현예에서, 항체는 서열번호 3, 17, 31, 45, 59, 73, 87, 101로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 이는 이의 보존성 서열 변형을 포함한다. 항체는 서열번호 4, 18,

32, 46, 60, 74, 88, 102로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 이는 이의 보존성 서열 변형을 포함한다.

- [0025] 또 다른 구현예에서, 항체는 각각 하기의 아미노산 서열을 갖는 (보존성 서열 변형을 포함하는) 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함한다:
- [0026] (a) 서열번호 3 및/또는 4;
- [0027] (b) 서열번호 17 및/또는 18;
- [0028] (c) 서열번호 31 및/또는 32;
- [0029] (d) 서열번호 45 및/또는 46;
- [0030] (e) 서열번호 59 및/또는 60;
- [0031] (f) 서열번호 73 및/또는 74;
- [0032] (g) 서열번호 87 및/또는 88; 또는
- [0033] (h) 서열번호 101 및/또는 102.
- [0034] 상기 서열 중 어느 하나와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98%, 또는 적어도 99% 초과 서열 동일성을 갖는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체는 본 발명에 포함된다. 상기 언급된 값의 중간 범위, 예를 들어, 상기 서열 중 어느 하나와 적어도 80-85%, 85-90%, 90-95% 또는 95-100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 또한 본 발명에 의해 포함된다.
- [0035] 여전히 또 다른 구현예에서, 항체는 인간 CD40에 결합하고 각각 하기에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로부터의 CDR 서열을 갖는다:
- [0036] (a) 서열번호 3 및 4;
- [0037] (b) 서열번호 17 및 18;
- [0038] (c) 서열번호 31 및 32;
- [0039] (d) 서열번호 45 및 46;
- [0040] (e) 서열번호 59 및 60; 또는
- [0041] (f) 서열번호 73 및 74;
- [0042] (g) 서열번호 87 및 88; 또는
- [0043] (h) 서열번호 101 및 102
- [0044] (각각의 경우에 하나 이상의 CDR 내 하나의 보존성 서열 변형, 2개의 보존성 서열 변형, 또는 3개 이하, 4개 이하, 또는 5개 이하의 보존성 서열 변형을 포함한다).
- [0045] 또 다른 구현예에서, 항체는 인간 CD40에 결합하고 하기를 갖는다:
- [0046] (a) 각각 서열번호 5, 7 및 9를 포함하는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열 및/또는 각각 서열번호 11, 13 및 15를 포함하는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열;
- [0047] (b) 각각 서열번호 19, 21 및 23을 포함하는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열 및/또는 각각 서열번호 25, 27 및 29를 포함하는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열;
- [0048] (c) 각각 서열번호 33, 35 및 37을 포함하는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열 및/또는 각각 서열번호 39, 41 및 43을 포함하는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열;
- [0049] (d) 각각 서열번호 47, 49 및 51을 포함하는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열 및/또는 각각 서열번호 53, 55 및 57을 포함하는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열;
- [0050] (e) 각각 서열번호 61, 63 및 65를 포함하는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열 및/또는 각각 서열번호 67, 69 및 71을 포함하는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열;

- [0051] (f) 각각 서열번호 75, 77 및 79를 포함하는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열 및/또는 각각 서열번호 81, 83 및 85를 포함하는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열;
- [0052] (g) 각각 서열번호 89, 91 및 93을 포함하는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열 및/또는 각각 서열번호 95, 97 및 99를 포함하는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열; 또는
- [0053] (h) 각각 서열번호 103, 105 및 107을 포함하는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열 및/또는 각각 서열번호 109, 111 및 113을 포함하는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열 (각각의 경우에 하나 이상의 상기 CDR 내 하나의 보존성 서열 변형, 2개의 보존성 서열 변형, 또는 3개 이하, 4개 이하, 또는 5개 이하의 보존성 서열 변형을 포함한다).
- [0054] 또 다른 구현예에서, 항체는 인간 CD40에 결합하고 하기를 갖는다:
- [0055] (a) 각각 서열번호 6, 8 및 10을 포함하는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열 및/또는 각각 서열번호 12, 14 및 16을 포함하는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열;
- [0056] (b) 각각 서열번호 20, 22 및 24를 포함하는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열 및/또는 각각 서열번호 26, 28 및 30을 포함하는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열;
- [0057] (c) 각각 서열번호 34, 36 및 38을 포함하는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열 및/또는 각각 서열번호 40, 42 및 44를 포함하는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열;
- [0058] (d) 각각 서열번호 48, 50 및 52를 포함하는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열 및/또는 각각 서열번호 54, 56 및 58을 포함하는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열;
- [0059] (e) 각각 서열번호 62, 64 및 66을 포함하는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열 및/또는 각각 서열번호 68, 70 및 72를 포함하는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열; 또는
- [0060] (f) 각각 서열번호 76, 78 및 80을 포함하는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열 및/또는 각각 서열번호 82, 84 및 86을 포함하는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열;
- [0061] (g) 각각 서열번호 90, 92 및 94를 포함하는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열 및/또는 각각 서열번호 96, 98 및 100을 포함하는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열; 또는
- [0062] (h) 각각 서열번호 104, 106 및 108을 포함하는 중쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열 및/또는 각각 서열번호 110, 112 및 114를 포함하는 경쇄 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열 (각각의 경우에 하나 이상의 상기 CDR 내 하나의 보존성 서열 변형, 2개의 보존성 서열 변형, 또는 3개 이하, 4개 이하, 또는 5개 이하의 보존성 서열 변형을 포함한다).
- [0063] 또 다른 양상에서, 본 발명은 상기된 특정 항체와 CD40으로의 결합을 위해 경쟁하는 항체를 제공한다. 하나의 구현예에서, 항체는 각각 서열번호 3 및 4, 서열번호 17 및 18, 서열번호 31 및 32, 서열번호 45 및 46, 서열번호 59 및 60, 서열번호 73 및 74, 서열번호 87 및 88, 서열번호 101 및 102에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 CD40으로의 결합을 위해 경쟁한다.
- [0064] 또 다른 양상에서, 본 발명은 상기된 특정 항체의 의해 인지되는 CD40 상의 에피토프와 동일한 에피토프 또는 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다. 하나의 구현예에서, 항체는 각각 서열번호 3 및 4, 서열번호 17 및 18, 서열번호 31 및 32, 서열번호 45 및 46, 서열번호 59 및 60, 서열번호 73 및 74, 서열번호 87 및 88, 서열번호 101 및 102에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체에 의해 인지되는 CD40 상의 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 항체는 항체 3C3 또는 3G5와 동일한 에피토프에 결합한다.
- [0065] 또 다른 양상에서, 본 발명은 인간 CD40(서열번호 133)의 세포외 도메인 (ECD)의 아미노산 잔기 1-5 및 33-36 내에 하나 이상의 잔기에 결합하는 항체를 제공한다. 일부 구현예에서, 항체는 인간 CD40(서열번호 133)의 ECD의 아미노산 25, 26, 28 및 30으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산에 추가로 결합한다. 일부 구현예에서, 항체는 인간 CD40(서열번호 133)의 ECD의 아미노산 5, 33, 34 및 36으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산에 결합한다. 일부 구현예에서, 항체는 인간 CD40(서열번호 133)의 ECD의 아미노산 5, 33 및 36에 결합한다. 일부 구현예에서, 항체는 인간 CD40(서열번호 133)의 ECD의 아미노산 5, 33, 34 및 36에 결합한다.
- [0066] 이전의 어느 양상에서, 본 발명은 인간 CD40(서열번호 133)의 ECD의 위치 5에서 알라닌의 트레오닌으로의 치환

이 인간 CD40(서열번호 133)의 ECD로의 결합에 상대적으로 적어도 30%까지 항체의 결합을 감소시키는 항체를 제공한다. 일부 구현예에서, 인간 CD40의 ECD의 위치 5에서 알라닌의 트레오닌으로의 치환은 인간 CD40(서열번호 133)의 ECD로의 결합에 상대적으로 적어도 50%까지 항체의 결합을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 인간 CD40의 ECD의 위치 5에서 알라닌의 트레오닌으로의 치환은 인간 CD40(서열번호 133)의 ECD로의 결합에 상대적으로 적어도 80%까지 항체의 결합을 감소시킨다.

[0067] 이전의 양상 중 어느 하나에서, 본 발명은 내인성 CD40L일 수 있는 CD40L과 상승작용 효과를 나타내는 항체를 제공한다. 일부 구현예에서, 상승작용 효과는 Ramos 세포로 항온처리되는 경우 CD95 발현의 증가된 유도이다. 일부 구현예에서, 상승작용 효과는 인간 B 세포로 항온처리되는 경우 B 세포 증식에서의 증가이다. 일부 구현예에서, 상승작용 효과는 수지상 세포로 항온처리되는 경우 IL12p40 발현의 증가된 유도이다. 일부 구현예에서, 상승작용 효과는 CD95의 발현 측면에서 측정된다.

[0068] 또 다른 양상에서, 본 발명은 인간 CD40(서열번호 133)의 ECD의 아미노산 잔기 13-15 및 33-36 내에 하나 이상의 잔기에 결합하는 항체를 제공한다. 일부 구현예에서, 항체는 인간 CD40(서열번호 133)의 ECD의 아미노산 33, 34 및 36으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산에 결합한다.

[0069] 본 발명의 항체는 전장, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, 및 IgE 항체 또는 이들의 서열 변이체일 수 있다. 대안적으로, 항체는 Fab, F(ab')₂, Fv, 단일쇄 Fv, 단리된 상보성 결정 영역(CDR) 또는 2개 이상의 단리된 CDR의 조합체와 같은 단편일 수 있다. 항체는 완전한 인간 항체, 인간화된 항체 및 키메라 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 공지된 유형 또는 종의 항체일 수 있다. 바람직하게 항체는 IgG2 항체이다. N-말단 라이신의 결실 및/또는 당업계에 공지된 다양한 다른 돌연변이와 같은 특정 변형이 IgG2 서열 내에 만들어질 수 있는 것으로 인지된다. 따라서, IgG2 항체는 예를 들어, 본래의 인간 IgG2 서열과 적어도 90%, 바람직하게 적어도 95%, 바람직하게 적어도 97% 및 바람직하게 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 불변 도메인을 갖는 항체를 포함한다.

[0070] 본 발명은 또한 종양 항원, 자가항원 또는 병원체의 성분과 같은 항원(단편, 에피토프 및 항원성 결정인자를 포함하는)에 연결된 발명의 항체를 포함하는 분자 접합체를 제공한다. 예를 들어, 항원은 종양 항원, 예를 들어 βhCG, gp100 또는 Pmel17, CEA, gp100, TRP-2, NY-BR-1, NY-CO-58, MN(gp250), 이디오타이프, 티로시나제, 텔로머라제, SSX2, MUC-1, MAGE-A3, 및 고분자량-흑색종 관련 항원(HMW-MAA) MART1, 펠란-A, NY-ESO-1, MAGE-1, MAGE-3, WT1, Her2, 메소텔린 또는 고분자량-흑색종 관련 항원(HMW-MAA)을 포함할 수 있다.

[0071] 또 다른 구현예에서, 분자 복합체는 추가로 치료제, 예를 들어, 세포독성제, 면역억제제 또는 화학치료제를 포함한다.

[0072] 또 다른 양상에서, 본 발명은 상이한 결합 특이성을 갖는 제2 기능성 모이어티에 연결된 본 발명의 항체를 포함하는 이특이적 분자를 제공한다. 예를 들어, 하나의 구현예에서, 제2 분자는 T 세포 수용체(예를 들어, CD3, CD40, 또는 CTLA-4), NK 수용체(예를 들어, CD56), B 세포 수용체(예를 들어, CD20), 또는 또 다른 종양 괴사 인자 수용체(예를 들어, CD95)에 결합할 수 있다.

[0073] 약제학적으로 허용되는 담체와 제형화된, 본원에 기재된 항체, 분자 접합체 또는 이특이적 분자를 포함하는 조성물이 또한 제공된다. 조성물은 추가로 보조제, 면역자극제(예를 들어, CD40 리간드, FLT 3 리간드, 사이토킨, 콜로니-자극 인자, 항-CTLA-4 항체(제한 없이 이필리무맙을 포함하는), 항-PD1 항체(제한 없이 MPDL3280A 또는 두르발루맙을 포함하는), 항-41BB 항체, 항 OX-40 항체, LPS(내독소), ssRNA, dsRNA, 바실레 칼메트 구에린(Bacille Calmette-Guerin) (BCG), 레바미솔 하이드로클로라이드, 정맥내 면역 글로불린 및 톨형 수용체(TLR: Toll-like Receptor) 효능제(예를 들어, TLR3 효능제, 예를 들어 폴리 IC, 또는 TLR4 효능제, TLR5 효능제, TLR7 효능제, TLR8 효능제, 및 TLR 9 효능제), 면역억제제, 또 다른 항체, 또는 항원 또는 STING 효능제를 포함할 수 있다.

[0074] 본 발명의 분자 접합체 또는 조성물에 (예를 들어, 본 발명의 항-CD40 항체와 조합하여 사용되는 백신에) 포함될 수 있는 종양 항원은 종양 세포 상에 (또는 이와 연합된) 존재하고 정상 세포 상에 전형적으로 존재하지 않는 임의의 항원 또는 항원성 결정인자, 또는 정상(비-종양) 세포 보다 큰 양으로 종양 세포 상에 존재하거나 이와 연합된 항원 또는 항원 결정체, 또는 정상(비-종양) 세포 상에 발견된 것과 상이한 형태로 종양 세포 상에 존재하는 항원 또는 항원 결정체를 포함한다. 상기 항원은 종양-특이적 항원을 포함하고, 종양-특이적 막 항원, 종양-연합된 막 항원, 종양 상의 배아 항원, 성장 인자 수용체, 성장 인자 리간드, 및 암과 관련된 임의의 다른 유형의 항원을 포함한다. 종양 항원은 예를 들어, 상피 암 항원, (예를 들어, 유방, 위장, 폐), 전립

선 특이적 암 항원(PSA) 또는 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 방광암 항원, 폐(예를 들어, 작은 세포 폐) 암 항원, 결장 암 항원, 난소암 항원, 뇌암 항원, 위암 항원, 신장 세포 암종 항원, 전립선 암 항원, 간암 항원, 식도암 항원, 두경부암 항원, 또는 결장직장암 항원일 수 있다. 예를 들어, 항원은 종양 항원, 예를 들어 β hCG, gp100 또는 Pmel17, CEA, gp100, TRP-2, NY-BR-1, NY-CO-58, MN(gp250), 이디오타이프, 티로시나제, 텔로머라제, SSX2, MUC-1, MAGE-A3, 및 고분자량-흑색종 관련 항원(HMW-MAA) MART1, 멜란-A, EGFRvIII, NY-ESO-1, MAGE-1, MAGE-3, WT1, Her2 또는 메소텔린을 포함할 수 있다. 본 발명에 의해 사용되는 다른 항원(예를 들어, 본 발명의 항-CD40 항체와 조합하여 사용되는 백신에서)은 이의 예가 본원에 개시된 바이러스, 세균, 기생충 및 진균류와 같은 감염성 질환 병원체로부터의 항원을 포함한다.

[0075] 본 발명의 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역 전부 또는 일부를 암호화하는 핵산 분자, 및 이들 핵산을 포함하는 발현 벡터, 및 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 하나의 구현예에서, 핵산 서열은 각각 서열번호 87-112, 또는 예를 들어, 이들 핵산 서열과 적어도 약 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖는 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0076] 본 발명은 또한 본원에 기재된 효능성 항체를 사용하여 대상체에서 항원에 대한 면역 반응(예를 들어, T 세포-매개된 면역 반응, 및/또는 NK-매개된 반응 및/또는 B 세포-매개된 면역 반응)을 증진시키는 방법을 제공한다. 하나의 구현예에서, 항체는 인간 CD40(다양한 면역 세포 유형 상에서 발현되는 바와 같이)에 결합하고, 따라서 항원 제공 세포(APC), 및 활성화 B-세포, 및 이펙터 및 기억 T-세포의 세포 증식 및 활성화를 유발하여 이는 예를 들어, 종양 세포에 대한 증진된 면역 반응을 유도한다. 따라서, 하나의 구현예에서, 상기 방법은 항원에 대한 면역 반응을 유도하거나 증진시키기에 효과적인 양으로 본 발명의 항체(예를 들어, 전장 항체 또는 이의 항원 결합 부분), 조성물 또는 이특이적 분자를 투여함을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 방법은 추가로, 예를 들어, 항체, 조성물 또는 이특이적 분자와 동시에, 별도로 또는 연속적으로 항원을 투여함을 포함한다.

[0077] CD40 발현 세포의 성장을 억제하기 위한 방법(예를 들어, 암의 치료에서)이 또한 제공된다. 예를 들어, 본 발명의 효능성 항체는 세포 사멸, 예를 들어, 아포토시스를 유도하는 면역 이펙터 세포를 집결시키는 세포-표면 분자의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서, 또 다른 구현예에서, 상기 방법은 세포를, CD40 발현 세포의 성장을 억제하기에 효과적인 양으로 본 발명의 항체(예를 들어, 전장 항체 또는 이의 항원 결합부), 조성물 또는 이특이적 분자와 접촉시킴을 포함한다.

[0078] 추가로, 항원에 연결된 세포 상의 수용체에 결합하는 분자(예를 들어, 이전에 기재된 CD40 항체)를 투여함에 의해 대상체에서 항원을 세포, 예를 들어, 항원 제공할 수 있는 세포(예를 들어, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 단핵구(예를 들어, THP-1), B 림프아구성 세포(예를 들어, C1R.A2, 1518 B-LCL) 및 단핵구-유래된 DC에 표적화시키기 위한 방법이 제공된다.

[0079] 본원에 기재된 방법은 다양한 장애, 특히 암(예를 들어, 백혈병, 급성 림프구 백혈병, 급성 골수구 백혈병, 골수아세포 전골수세포 골수단핵세포 단핵구 적백혈병, 만성 백혈병, 만성 골수세포(과립구세포) 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 맨틀(mantle) 세포 림프종, 1차 중추신경계 림프종, 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), 변연대 B 세포 림프종, 진성다혈구증 림프종, 호지킨 질환, 비-호지킨 질환, 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로블린혈증, 중쇄 질환, 고형 종양, 육종, 및 암종, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 골육종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 운할막종, 증피종, 어빙 종양(Ewing's tumor), 평활근육종, 횡문근육종, 결장 육종, 결장직장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 피지샘암종, 유도암종, 유도모양 선암종, 낭샘종, 수질암종, 기관지유래암종, 신장 세포 암종, 간종양, 담관암종, 융모막암종, 정상피종, 배아암종, 빌름 종양(Wilm's tumor), 자궁경부암, 자궁암, 고환 종양, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 비 소 세포 폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경교종, 성상세포종, 속질모세포종, 두개인두종, 뇌실막세포종, 술방울샘종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기아교세포종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종, 망막아세포종, 코인두암종, 식도암종, 기저 세포 암종, 담관암, 방광암, 골암, 뇌 및 중추신경계(CNS) 암, 자궁경부암, 융모막암종, 결장직장암, 연결 조직 암, 소화계암, 자궁내막암, 식도암, 눈암, 두경부암, 위암, 상피내 신생물, 신장암, 후두암, 간암, 폐암(소세포, 대세포), 흑색종, 신경모세포종; 구강암(예를 들어, 입술, 혀, 입 및 인두), 난소암, 췌장암, 망막모세포종, 횡문근육종, 직장암; 호흡계암, 육종, 피부암, 위암, 고환암, 갑상선암, 자궁암, 및 비뇨계 암으로 이루어진 군으로부터 선택되는)을 치료하는데 유용하다. 특정 암은 만성 림프구 백혈병, 맨틀 세포 림프종, 1차 중추 신경계 림프종, 버킷 림프종 및 변연대 B 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 CD40-발현 종양을 포함한다.

[0080] 또 다른 구현예에서, 방법은 세균, 진균류, 바이러스 또는 기생충 감염을 치료하거나 예방하기 위해 사용될 수

있다.

- [0081] CD40 발현 세포는 수지상 세포(DC), B-세포, 대식세포 및 단핵구를 포함하는, 항원-제공 세포(APC)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 CD40을 발현하는 임의의 및 모든 세포를 포함한다. CD40은 또한 상피 세포, 내피 세포 및 혈소판과 같은 다른 세포 유형 상에서 발현된다. CD40 발현은 B 세포 림프종 및 신장 암 세포를 포함하는 다양한 종양 세포상에서 입증되었다. 특정 구현예에서, CD40 발현 세포는 주르캣(Jurkat) 세포, Raji 세포, Ramos 세포 및 Daudi 세포와 같은 세포주를 포함한다. 또 다른 구현예에서, CD40 발현 세포는 종양 세포 또는 암 세포이다. 또 다른 구현예에서, CD40-발현 세포는 종양 침윤 림프구로도 불리우는 침윤 종양 또는 암 세포인 것으로 밝혀진 B 세포, NK 세포, T 세포를 포함한다.
- [0082] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 항원(예를 들어, 종양 항원)에 대한 면역 반응을 유도하거나 증진시키기 위한 약제의 제조에서 본원에 기재된 항체, 조성물 또는 이특이적 분자의 용도를 제공한다. 추가의 구현예에서, 본 발명은 (1) 항원에 대한 면역 반응을 증가시키고/시키거나 (2) CD40 발현 세포의 성장을 억제하고/하거나 (3) 항원을 APC에 표적화시키기 위한 약제의 제조에서 본원에 기재된 항체 또는 조성물의 용도를 제공한다.
- [0083] 본 발명은 또한 (1) 생물학적 샘플을 본원에 기재된 항체와 접촉시키고(여기서, 상기 항체는 검출가능한 물질로 표시시킨다) 및 (2) CD40에 결합된 항체를 검출함에 의해 생물학적 샘플에서 CD40의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 방법을 제공한다.
- [0084] 또한, 본 발명의 조성물(예를 들어, 항체 및/또는 이특이적 분자), 및 임의로 사용 지침서를 포함하는 키트가 제공된다. 키트는 추가로 적어도 하나의 추가 시약, 예를 들어, 사이토킨 또는 보체, 또는 본 발명의 하나 이상의 추가의 항체를 함유할 수 있다.
- [0085] 본 발명의 다른 특성 및 이점은 하기의 상세한 설명 및 특허청구범위로부터 자명할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0086] 도 1은 제조업체의 지침에 따른 Octet™ QK[®] 장비(Pall ForteBio, Menlo Park, CA)를 사용한 바이오-층 간섭계법(BLI)에 의한 측정시 항체 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 및 6H6에 대한 평형 해리 상수(K_D) 및 운동 결합 속도 상수(K_{on}) 및 해리 속도 상수(K_{off})에 대한 값을 제공한다.
- 도 2는 항체 농도의 함수로서 ELISA 중 흡광도(OD_{450})를 사용한 제조업체 정제된 인간 CD40 코팅된 미세역가 플레이트로의 인간 CD40 항체(3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 및 6H6을 포함하는)의 결합을 보여주는 그래프이다.
- 도 3은 정제된 인간 PBMC(좌측) 및 시노몰구스 마카쿠에 PBMC(우측)에 대한 인간 CD40 항체 농도(3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 및 6H6)의 함수로서 유동 세포측정에 의한 평균 형광 강도(MFI)로서의 결합을 보여주는 그래프이다.
- 도 4a 및 4b는 ELISA에 의해, 가용성 CD40 리간드(sCD40L)의 CD40 단백질로의 결합에 대한 인간 CD40 항체의 효과를 보여주는 그래프이다.
- 도 5는 이들의 표면 상에 인간 CD40을 발현하는 Raji 세포 상의 CD40으로의 인간 CD40 항체(3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 및 6H6)의 유동 세포측정 분석이다.
- 도 6은 이들의 표면 상에 인간 CD40을 발현하는 Ramos 세포 상의 CD40으로의 인간 CD40 항체(3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 및 6H6)의 유동 세포측정 분석이다.
- 도 7a 및 7b는 인간 CD40 항체에 의한 Ramos 세포 상의 CD95의 유도를 보여주는 그래프이다.
- 도 8a 및 8b는 하기의 마커의 발현 수준에서의 변화를 기준으로 인간 CD40 항체(3C3 및 3G5)에 의한 수지상 세포(DC) 활성화를 보여주는 그래프이다: CD54, HLA-DR, CD86, CD83, 및 % CD83 + 지적된 바와 같은 세포.
- 도 9a 및 9b는 인간 CD40 항체(3C3 및 3G5)에 의한 IL-12p40의 유도를 보여주는 그래프이다.
- 도 10a 및 10b는 하기의 마커의 발현 수준에서의 변화를 기준으로 인간 CD40 항체(3C3 및 3G5)에 의한 B 세포 활성화를 보여주는 그래프이다: CD54, HLA-DR, CD23, % CD23 + 세포, 지적된 바와 같은 CD69, CD86, CD38, 및 CD71.
- 도 11a 및 11b는 CD40을 발현하는 루시페라제 리포터 세포주를 사용한 인간 CD40 항체에 의한 NF- κ B 활성화를

도시하는 그래프이다.

도 12는 투여당 0.3 mg의 복강내 투여를 통한 CD40 인간 항체 클론 3C3 및 3G5를 사용한 치료 후 SCID 마우스 종양 모델(Raji 세포)에서 종양 성장 및 생존의 결과를 보여주는 그래프이다.

도 13은 투여 당 0.3 mg의 복강내 투여를 통한 CD40 인간 항체 클론 3C3 및 3G5를 사용한 치료 후 SCID 마우스 종양 모델(Ramos 세포)에서 종양 성장 및 생존의 결과를 보여주는 그래프이다.

도 14a 및 14b는 지적된 바와 같은 CD40 항체 또는 이소형 대조군(IgG2)과 항온처리된 표지된 PBMC의 T-세포 증식을 보여주는 그래프이다.

도 15는 CD40 항체 3C3 및 3G5를 사용한 Fc 수용체 상호작용과는 상관 없는 CD40으로의 결합을 보여주는 그래프이다.

도 16은 CD40 항체 3C3 및 3G5를 사용하는 NF κ b 활성화를 보여주는 그래프이다.

도 17은 CD40 항체 3C3 및 3G5를 사용한 Ramos 세포 상에 CD95 유도를 보여주는 그래프이다.

도 18은 항-CD40/항원 융합 APC 표적화된 백신 작제물의 예의 도식을 보여준다.

도 19는 Ramos 세포에서 CD95 발현에 대한 가용성 CD40L과 CD40 항체 3C3의 상승작용 효과를 보여주는 그래프이다.

도 20은 N-말단 인간 카파 경쇄 및 C-말단 플래그 태그와 함께 전장 세포의 도메인(ECD) 스페닝 아미노산 잔기들 1-173을 암호화하는 가용성 CD40 cDNA의 도식이다.

도 21은 몽키 CD40 ECD 아미노산 서열(서열번호 139)(상부) 및 마우스 CD40 ECD 아미노산 서열(하부)과 인간 CD40 ECD 아미노산 서열(서열번호 133)의 정렬을 보여준다. 생성된 단편은 지적된다. (서열번호 133의 뉴클레오타이드 1-94, 서열번호 140-147).

도 22는 CD40 항체 3C3의 다양한 점 돌연변이 또는 이의 조합을 갖는 인간 CD40 ECD 단편 A(아미노산 잔기 1-5; 상부) 또는 단편 D(아미노산 잔기 33-36; 하부)로의 결합을 보여주는 그래프를 제공한다.

도 23a-23c는 지정된 시점에서 CD40 항체 3C3 또는 3G5를 사용한 치료 전후 몽키에서 측정된, 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST; 23a), 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT; 23b) 및 크레아티닌 키나제(23c)의 수준을 보여주는 그래프이다.

도 24는 지정된 시점에서 CD40 항체 3C3 또는 3G5로 처리된 몽키로부터의 혈류에서 측정된 IL-12(pg/mL)의 수준을 보여주는 그래프이다.

도 25a-25c는 지정된 시점에서 CD40 항체 3C3 또는 3G5를 사용한 치료 전후 몽키에서 측정된, 백혈구 세포(25a), 호중구(25b) 및 림프구(25c)의 양을 보여주는 그래프이다.

도 26은 시간 경과(일수)에 따라 CD40 항체 3C3 또는 3G5로 처리된 몽키에서 B 세포의 양의 기준선으로부터 % 변화를 보여주는 그래프이다.

도 27은 2 mg(좌측) 또는 0.2 mg(우측)의 CD40 항체 3C3(정사각형), 3G5(다이아몬드) 또는 식염수(원형) 후 기준선에 상대적인 B 세포 상의 HLA-DR 발현을 보여주는 그래프를 제공한다.

도 28은 세포가 항-CD40 mAb 3C3의 존재하에 배양되는 경우 B-세포 증식을 보여주는 그래프를 제공한다.

도 29 및 30은 B-세포에서 항-CD40 mAb 3C3 및 CD40L의 조합의 상승작용 효과를 보여주는 그래프를 제공한다.

도 31은 이것이 항-CD40 mAb 3C3과 항온처리되는 경우 전혈에서 사이토킨 반응을 보여주는 표를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0087]

본 발명은 면역 기능의 향상조절(예를 들어, 백신 요법에서와 같이 T 세포 매개된 면역 반응, 암 요법에서 NK 활성화), 세포 성장의 억제(예를 들어, 암 요법에서), 및/또는 APC에 의한 항원의 증진된 프로세싱 및 제공(예를 들어, 백신 요법에서)을 포함하는 상당한 치료 이득과 상호 관련된 특정 기능성 성질을 나타내는 항-CD40 항체를 제공한다. 이들 기능성 특성은 예를 들어, Fc 수용체 결합과는 상관 없고/없거나 항체-의존성 세포 독성(ADCC) 또는 보체 의존성 세포 독성(CDC)의 유도 없이 항원에 대한 증가된 면역 반응을 포함한다. 추가의 기능성 특성은 예를 들어, (1) 적어도 50%, 적어도 60% 또는 적어도 70%까지 CD40L(CD154)의 CD40 발현 세포로의

결합 억제(예를 들어, 완전하거나 부분적인 차단), (2) Fc 수용체 결합과는 상관 없이 CD40L의 인간 CD40으로의 결합 차단, (3) 세포 아폽토시스의 유도(예를 들어, CD95의 발현에서 증가에 의한 측정시), (4) 증가된 T-세포 자극 활성(예를 들어, IL-12p40의 발현 증가에 의한 측정시), 및/또는 (5) 증가된 B-세포 활성화(예를 들어, HLA-DR V450, CD54 PE, CD86 APC, 및 CD83 BV510, CD19 V500, CD54 PE, HLA-DR V450, CD23 PerCP-Cy5.5, CD69 APC, CD86 APC, CD38 PerCP-Cy5.5 및 CD71 PE로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 세포-표면 마커의 발현에서 증가에 의한 측정시)를 포함한다.

[0088] 본 발명이 보다 용이하게 이해되도록 하기 위해 특정 용어가 먼저 정의된다. 추가의 정의는 하기의 상세한 설명에 제시되어 있다.

[0089] 용어 "CD40"(또한 "CD40 분자", "Bp50", "CDW40", "TNFRSF5", "p50," "B 세포 표면 항원 CD40", "B 세포 연합된 분자", "CD40 항원", "TNF 수용체 슈퍼패밀리 구성원 5", "CD40 유형 II 이소형", "CD40L 수용체", "신경 성장 인자 수용체-관련된 B-림프구 활성화 분자", 또는 "중양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 5")은 리간드 CD40L(또한 CD154로서 언급됨)에 결합하는 TNF-수용체 슈퍼패밀리의 구성원인 수용체를 언급한다. CD40은 T 세포-의존성 면역글로불린 부류 스위칭 및 기억 B 세포 발육을 포함하는 광범위하게 다양한 면역 및 염증 반응을 매개한다. 용어 "CD40"은 세포(예를 들어, 승인 번호 P25942를 갖는 GENBANK®로 기탁된 인간 CD40)에 의해 천연적으로 발현되는 CD40의 임의의 변이체 또는 이소형을 포함한다. 따라서, 본 발명의 항체는 인간 이외의 다른 종 기원의 CD40과 교차-반응할 수 있다. 대안적으로, 항체는 인간 CD40에 특이적일 수 있고 다른 종과의 임의의 교차-반응성을 나타내지 않을 수 있다. CD40 또는 이의 임의의 변이체 및 이소형은 천연적으로 이들을 발현하거나 당업계에 널리 공지된 기술 및/또는 본원에 기재된 것들을 사용하여 재조합적으로 제조된 세포 또는 조직으로부터 단리될 수 있다. 바람직하게 항체는 정상의 당화 패턴을 갖는 hCD40에 표적화된다.

[0090] Genbank®(승인 번호 P25942)는 다음과 같이 인간 CD40의 아미노산 서열 (서열번호 1)을 보고한다:

```
MVRLPLQCVL WGCLLTAVHP EPPTACREKQ YLINSQCCSL CQPGQKLVS
DCTFTETECL PCGESEFLDT WNRETHCHQH KYCDPNLGLR VQQKGTSETD
TICTCEEGWH CTSEACESCV LHRSCSPGFG VKQIATGVSD TICEPCPVGF
FSNVSSAFEK CHPWTSCETK DLVVQQAGTN KTDVVCQPQD RLRLVVIPI
IFGILFAILL VLVFIKKVAK KPTNKAPHPK QEPQEINFPD DLPGSNTAAP
VQETLHGCQP VTQEDGKESR ISVQERQ
```

[0091]

[0092] 용어 "CD40L" (또한 "CD40 리간드" "CD407L," 또는 "CD154"로서 언급됨)은 CD40에 대한 리간드를 언급한다(문헌참조: 예를 들어, Schonbeck and Libby (2001) *Cell Mol Life Sci*, 58(1):4-43). CD40L은 주로 활성화된 T 세포 상에 발현되고 분자의 TNF 슈퍼패밀리의 구성원이다. 이것은 항원-제공 세포(APC) 상에서 CD40에 결합하고 이는 표적 세포 유형에 따라 많은 효과를 유도한다(Parham, Peter (2004). *The Immune System* (2nd ed.). Garland Science. Pp. 169-173).

[0093] Genbank®(승인 번호 NP_000065)는 다음과 같이 인간 CD40의 아미노산 서열 (서열번호 2)을 보고한다:

```
MIETYNQTSP RSAATGLPIS MKIFMYLLTV FLITQMIGSA LFAVYLHRR
L DKIEDERNLH EDFVFMKTIQ RCNTGERSLS LLNCEEIKSQ FEGFVKDIML
NKEETKKENS FEMQKGDQNP QIAAHVISEA SSKTTSVLQW AEKGYYTMSN
NLVTLENGKQ LTVKRQGLYY IYAQVTFCSN REASSQAPFI ASLCLKSPGR
FERILLRAAN THSSAKPCGQ QSIHLGGVFE LQPGASVFN VTDPSQVSHG
TGFTSFGLLK
```

[0094]

[0095] 본원에 언급된 바와 같은 용어 "항체"는 전체 항체 및 임의의 항원 결합 단편(즉, "항원-결합부") 또는 이의 단 일쇄를 포함한다. "항체"는 하나의 바람직한 구현예에서 디설파이드 결합에 의해 상호 연결된 적어도 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함하는 당단백질 또는 이의 항원 결합부를 언급한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 V_H로서 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 V_L로서 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, CL로 구성된다. V_H 및 V_L 영역은 추가로 골격 영역(FR)으로 호칭되는 보다 보존된 영역과 상호 배치되어 있는 상보성 결정 영역(CDR)으로 호칭되는 과가변성 영역으로 세분될 수 있다. 각각 V_H 및 V_L은 아미노-말단에서 카복시-말단의 하기의 순서로 배열된 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포(예를 들어, 이펙터 세포) 및 전형적 보체계의 제1 성분(C1q)을 포함

하는 숙주 조직 또는 인자들로의 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0096] 본원에 사용된 바와 같은 항체의 "항원-결합부" (또는 단순히 "항체 부분")라는 용어는, 항원(예를 들어, 인간 CD40)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 언급한다. 상기 "단편"은 예를 들어, 길이가 약 8 내지 약 1500개 아미노산이거나, 적합하게 길이가 약 8 내지 약 745개 아미노산이거나, 적합하게 길이가 약 8 내지 약 300개, 예를 들어 약 8 내지 약 200개 아미노산, 또는 약 10 내지 약 50개 또는 100개 아미노산이다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 나타났다. 항체의 용어 "항원-결합부"에 포괄되는 결합 단편의 예는 (i) Fab 단편, V_L , V_H , CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편; (ii) $F(ab')_2$ 단편, 힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; (iii) V_H 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 V_L 및 V_H 도메인으로 이루어진 Fv 단편, (v) V_H 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546); 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역(CDR) 또는 (vii) 임의로 합성 링커에 연결될 수 있는 2개의 이상의 단리된 CDR의 조합을 포함한다. 추가로, Fv 단편인 V_L 및 V_H 의 2개의 도메인이 별도의 유전자들에 의해 암호되어 있지만, 이들은 이들을 단일 단백질 체로서 만들어질 수 있게 하는 합성 링커에 의한 재조합 방법을 사용하여 연결될 수 있고, 여기서, 상기 V_L 및 V_H 영역은 쌍을 이루어 1가 분자를 형성한다(단일쇄 Fv (scFv)로서 공지됨; 문헌참조: 예를 들어, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). 상기 단일쇄 항체는 또한 항체의 용어 "항원-결합부" 내에 포괄되는 것으로 의도된다. 이들 항체 단편은 당업자에게 공지된 통상적인 기술을 사용하여 수득되고, 단편은 온전한 항체와 동일한 방식으로 용도에 대해 스크리닝된다. 항원-결합부는 재조합 DNA 기술에 의해 또는 온전한 면역글로불린의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 제조될 수 있다.

[0097] "이특이적" 또는 "이기능성 항체"는 2개의 상이한 중쇄/경쇄 쌍 및 2개의 상이한 결합 부위를 갖는 인공 하이브리드 항체이다. 이특이적 항체는 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연결을 포함하는 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌(Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992))을 참조한다.

[0098] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "단클론 항체"는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화성을 나타내는 항체를 언급한다. 따라서, 용어 "인간 단클론 항체"는 단일 결합 특이성을 나타내고 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 임의의 불변 영역을 갖는 항체를 언급한다. 하나의 구현예에서, 인간 단클론 항체는 불멸화된 세포에 융합된 인간 중쇄 전이유전자 및 경쇄 전이유전자를 포함하는 계능을 갖는 유전자전이 비-인간 동물, 예를 들어, 유전자전이 마우스를 포함하는 하이브리도마에 의해 제조된다.

[0099] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나, 단리된 모든 인간 항체, 예를 들어 (a) 인간 면역글로불린 유전자에 대한 유전자전이 또는 전이염색체인 동물(예를 들어, 마우스) 또는 이로부터 제조된 하이브리도마로부터 단리된 항체, (b) 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포로부터, 예를 들어, 형질감염체로부터 단리된 항체, (c) 재조합 조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 및 (d) 인간 면역글로불린 유전자 서열의 다른 DNA 서열로의 스플라이싱을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나, 단리된 항체를 포함한다. 상기 재조합 인간 항체는 생식선 유전자에 의해 암호화된 특정 인간 생식선 면역글로불린 서열을 사용하지만, 예를 들어, 항체 성숙화 동안에 일어나는 후속적 재배열 및 돌연변이를 포함하는 가변 및 불변 영역을 포함한다. 당업계에 공지된 바와 같이(문헌참조: 예를 들어, Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1117-1125), 가변 영역은 재배열하여 외래 항원에 대해 특이적인 항체를 형성하는 다양한 유전자에 의해 암호화된, 항원 결합 도메인을 함유한다. 재배열에 추가로, 가변 영역은 다중 단일 아미노산 변화 (체세포 돌연변이 또는 과돌연변이로서 언급되는)에 의해 추가로 변형시켜 외래 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시킬 수 있다. 불변 영역은 항원에 대한 추가의 반응에서 변화한다(즉, 이소형 스위치). 따라서, 항원에 응답하여 경쇄 및 중쇄 면역글로불린 폴리펩타이드를 암호화하는 재배열되고 체세포적으로 돌연변이된 핵산 분자는 본래의 핵산 분자와 서열 동일성을 가질 수 없지만 대신 실질적으로 동일하거나 유사할 것이다(즉, 적어도 80% 동일성을 갖는다).

[0100] 용어 "인간 항체"는 인간 생식선 면역글로불린 서열의 가변 및 불변 영역 (존재하는 경우)을 갖는 항체를 포함한다. 본 발명의 인간 항체는 인간 생식선 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기(예를 들어, 시험관내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다(문헌참조: Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859); Lonberg, N.

(1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93, and Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764:536-546). 그러나, 용어 "인간 항체"는 마우스와 같은 또 다른 포유동물 종의 생식선으로 유래된 CDR 서열이 인간 골격 서열 상으로 접목된 항체(즉, 인간화된 항체)를 포함하지 않는다.

[0101] 본원에 사용된 바와 같은 "이종성 항체"는 상기 항체를 생성하는 유전자전이가 비-인간 유기체와 관련하여 정의된다. 상기 용어는 유전자전이가 비-인간 동물로 이루어지지 않고 일반적으로 유전자전이가 비-인간 동물의 것 이외의 종으로부터 기원하는 유기체에서 밝혀진 것에 상응하는 아미노산 서열 또는 암호화 핵산 서열을 갖는 항체를 언급한다.

[0102] 본원에 사용된 바와 같은 "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 언급하는 것으로 의도된다(예를 들어, 인간 CD40에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 인간 CD40 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없다). 그러나, 이의 에피토프에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 상이한 종 기원의 다른 CD40 단백질과 교차-반응성을 갖는다. 그러나, 상기 항체는 바람직하게 항상 인간 CD40에 결합한다. 추가로, 단리된 항체는 전형적으로 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없다. 본 발명의 하나의 구현예에서, 상이한 CD40 특이성을 갖는 "단리된" 항체의 조합은 잘 규정된 조성물 중에서 배합된다.

[0103] 용어 "에피토프" 또는 "항원성 결정인자"는 면역글로불린 또는 항체가 특이적으로 결합하는 항원 상의 부위를 언급한다. 에피토프는 단백질의 3차원 폴딩에 의해 인접해 있는 연속 아미노산 또는 비연속 아미노산으로부터 둘 다 형성될 수 있다. 연속 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매에 노출시 유지되는 반면 3차원 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매로의 처리시 상실된다. 에피토프는 전형적으로 특유의 공간적 형태에서 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 아미노산을 포함한다. 어느 에피토프가 소정의 항체에 의해 결합되는지를 결정하기 위한 방법(즉, 에피토프 맵핑)은 당업계에 널리 공지되어 있고 예를 들어, 면역블롯팅 및 면역침전 검정을 포함하고, 여기서, CD40으로부터 중첩 또는 연속 펩타이드는 소정의 항-CD40 항체와의 반응성에 대해 시험된다. 에피토프의 공간적 형태를 결정하는 방법은 당업계의 기술 및 본원에 기재된 것들, 예를 들어, x-선 결정학 및 2차원 핵 자기 공명(참조문헌: 예를 들어, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996))을 포함한다.

[0104] 따라서, 본원에 기재된 특정 항체에 의해 인지되는 에피토프 전부 또는 일부를 포함하는 동일한 에피토프, 또는 CD40 상의 에피토프(예를 들어, 동일하거나 중첩 영역 또는 이들 사이의 영역 또는 영역 스페닝)에 결합하는 항체는 또한 본 발명에 의해 제공된다. 동일한 에피토프, 또는 특정 항체에 의해 인지되는 에피토프 전부 또는 일부를 포함하는 에피토프에 결합하는 항체는 통상의 기술을 사용하여 동정될 수 있다. 상기 기술은 예를 들어, 에피토프 맵핑 방법, 예를 들어, 에피토프의 원자 분리능을 제공하는 항원:항체 복합체의 결정의 x-선 분석을 포함한다. 다른 방법은 항체의 항원 단편 또는 항원의 돌연변이된 변이로의 결합을 모니터링하고 여기서, 항원 서열 내 아미노산 잔기의 변형으로 인한 결합 상실은 흔히 에피토프 성분의 지적으로 고려된다. 추가로, 에피토프 맵핑을 위한 컴퓨터 조합 방법이 또한 사용될 수 있다. 이들 방법은 조합 파라이디스 디스플레이 펩타이드 라이브러리로부터 특이적 단쇄 펩타이드를 친화성 단리하는 목적하는 항체의 능력에 의존한다. 이어서 펩타이드는 펩타이드 라이브러리를 스크리닝하기 위해 사용되는 항체에 상응하는 에피토프의 한정을 위한 리드로서 간주된다. 에피토프 맵핑을 위해, 형태적 불연속 에피토프를 맵핑하기 위해 나타난 컴퓨터 알고리즘이 또한 개발되었다.

[0105] 또한, 본원에 기재된 항체와 인간 CD40으로의 결합에 대해 경쟁하는 항체가 제공된다. 결합에 대해 경쟁하는 항체는 통상의 기술을 사용하여 동정될 수 있다. 상기 기술은 예를 들어, 또 다른 항체의 표적 항원으로의 결합을 차단하는 하나의 항체의 능력을 보여주는 면역검정, 즉 경쟁 결합 검정을 포함한다. 경쟁 결합은 시험 동안 면역글로불린이 통상의 항원, 예를 들어, CD40에 대한 참조 항체의 특이적 결합을 억제하는 검정에서 결정된다. 수많은 유형의 경쟁 결합 검정이 공지되어 있고 예를 들어: 고체상의 직간접적 방사선면역검정(RIA), 고체상의 직간접적 효소 면역검정(EIA), 샌드위치 경쟁 검정(문헌참조: Stahl et al., *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); 고체상 직접적 비오틴-아비딘 EIA(문헌참조: Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); 고형상 직접적 표지된 검정, 고형상 직접적 표지된 샌드위치 검정(문헌참조: Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); I-125 표지를 사용한 고체상의 직접적 표지 RIA(문헌참조: Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); 고체상 직접적 비오틴-아비딘 EIA(Cheung et al., *Virology* 176:546 (1990)); 및 직접적 표지된 RIA(Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990))가 있다. 전형적으로, 상기 검정은 이들 비표지된 시험 면역글로불린 및 표지된 참조 면역글로불린 중 어느 하나

를 함유하는 고체 표면 또는 세포에 결합되는 정제된 항원의 용도를 포함한다. 경쟁 억제 시험은 시범 면역글로불린의 존재하에 고체 표면 또는 세포에 결합된 표지의 양을 결정함에 의해 측정된다. 일반적으로 시범 면역글로불린은 과량으로 존재한다. 일반적으로, 경쟁 항체가 과량으로 존재하는 경우, 이것은 참조 항체의 통상의 항원으로의 특이적 결합을 적어도 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% 이상으로 억제한다.

[0106] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "특이적 결합", "선택적 결합", "선택적으로 결합하는", 및 "특이적으로 결합하는"은 미리 결정된 항원 상의 에피토프로의 항체 결합을 언급한다. 전형적으로, 항체는 Octet™ QK[®] 기구를 사용한 바이오-층 간섭계법(BLI)에 의해 또는 분석물로서 재조합 인간 CD40 및 리간드로서 항체를 사용하는 BIACORE 2000 기구에서 표면 플라스몬 공명(SPR) 기술에 의해 결정되는 경우 대략 10^{-7} M 미만, 예를 들어, 대략적으로 10^{-8} M 미만, 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 또는 심지어 이하의 평형 해리 상수(KD)로 결합하고 결정된 항원 또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 비-특이적 항원(예를 들어, BSA, 카세인)으로 결합에 대한 이의 친화성 보다 적어도 2배 초과인 친화성으로 미리결정된 항원에 결합한다. 용어 "항원을 인지하는 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"는 용어 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"와 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0107] 또한, 인간 CD40에 결합하고 Fc 수용체 결합과 상관 없이 면역 반응을 증가시킬 수 있는 항체가 본 발명에 포함된다. 예를 들어, 상기 항체는 Fc γ R과 같은 Fc 수용체와의 교차-연결 없이 강력한 효능성 특성을 나타낸다. 이들 효능성 특성은 예를 들어, 세포 표면 마커의 발현에서의 증가에 의한 측정시 T-세포 활성화에서의 증가 및/또는 B 세포 활성화에서의 증가를 포함한다.

[0108] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "K_D"는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 언급하는 것으로 의도된다. 전형적으로, 본 발명의 인간 항체는 Octet™ QK[®] 기구를 사용한 바이오-층 간섭계법(BLI)에 의해 또는 분석물로서 재조합 인간 CD40 및 리간드로서 항체를 사용하는 BIACORE 2000 기구에서 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 결정되는 경우 대략적으로 10^{-8} M 이하, 예를 들어, 10^{-9} M 미만, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 또는 10^{-12} M, 또는 심지어 그 이하의 해리 평형 상수(K_D)로 CD40에 결합한다.

[0109] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "kd"는 항체/항원 복합체로부터의 항체의 해리에 대한 오프(off) 속도 상수를 언급하는 것으로 의도된다.

[0110] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "ka"는 항체와 항원의 결합에 대한 온(on) 속도 상수를 언급하는 것으로 의도된다.

[0111] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "EC50"은 최대 반응의 50%, 즉, 최대 반응과 기준선 사이의 중간인 시험관내 또는 생체내 검정에서 반응을 유도하는 항체 또는 이의 항원-결합부의 농도를 언급한다.

[0112] 본원에 사용된 바와 같은 "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 암호화된 항체 부류(예를 들어, IgM 또는 IgG1)를 언급한다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 인간 단클론 항체는 IgG1 이소형의 항체이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 인간 단클론 항체는 IgG2 이소형의 항체이다.

[0113] 용어 "고정화된 CD40에 결합하는"은 예를 들어, 세포 표면 상에 발현되거나 고체 지지체에 부착된 CD40에 결합하는 본 발명의 인간 항체의 능력을 언급한다.

[0114] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "교차-반응한다"는 상이한 종 기원의 CD40에 결합하는 본 발명의 항체의 능력을 언급한다. 예를 들어, 인간 CD40에 결합하는 본 발명의 항체는 또한 CD40의 또 다른 종에 결합할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 교차-반응성은 결합 검정(예를 들어, SPR, ELISA)에서 정제된 항원과의 특이적 반응성을 검출하거나 CD40을 생리학적으로 발현하는 세포와 결합하거나 다르게는 기능적으로 상호작용함에 의해 측정된다. 교차-반응성을 결정하기 위한 방법은 예를 들어, Octet™ QK[®] 기구를 사용한 바이오-층 간섭계법(BLI) 또는 Biacore™ 2000 SPR 기구(Biacore AB, Uppsala, Sweden)를 사용한 Biacore™ 표면 플라스몬 공명(SPR) 분석, 또는 유동 세포측정 기술에 의해 본원에 기재된 바와 같은 표준 결합 검정을 포함한다.

[0115] 본원에 사용된 바와 같은, "이소형 스위칭"은 항체의 부류 또는 이소형이 하나의 Ig 부류에서 다른 Ig 부류 중 하나로 변화하는 현상을 언급한다.

[0116] 본원에 사용된 바와 같은, "비스위칭된 이소형"은 어떠한 이소형 스위칭이 일어나지 않는 경우 생성되는 이소형 부류의 중쇄를 언급하고; 비스위칭된 이소형을 암호화하는 CH 유전자는 전형적으로 기능적으로 재배열된 VDJ 유

전자로부터의 바로 아래 다운스트림의 제1 CH 유전자이다. 이소형 스위칭은 전형적 또는 비-전형적 이소형 스위칭으로서 분류되었다. 전형적 이소형 스위칭은 전이유전자 내 적어도 하나의 스위치 서열 영역을 포함하는 재조합 반응에 의해 일어난다. 비-전형적 이소형 스위칭은 예를 들어, 인간 σ_{μ} 과 인간 Σ_{μ} (δ -연합된 결실) 간의 상동성 재조합에 의해 일어날 수 있다. 대안적 비-전형적 스위칭 기작, 예를 들어, 무엇 보다 상호전이유전자 및/또는 상호염색체 재조합이 일어날 수 있고 이소형 스위칭을 수행할 수 있다.

[0117] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "스위치 서열"은 스위치 재조합에 관여하는 DNA 서열을 언급한다. "스위치 공여자" 서열, 전형적으로 μ 스위치 영역은 스위치 재조합 동안에 결실될 불변 영역의 5'(즉, 업스트림)에 있다. "스위치 수용체" 영역은 결실될 작제물 영역과 대체 불변 영역(예를 들어, γ , ϵ , 등) 사이에 있다. 재조합이 항상 일어나는 어떠한 특이적 부위가 없기 때문에, 최종 유전자 서열은 전형적으로 작제물로부터 예측가능하지 않다.

[0118] 본원에 사용된 바와 같은 "당화 패턴"은 단백질, 보다 구체적으로 면역글로불린 단백질에 공유적으로 부착된 탄수화물 유닛의 패턴으로서 정의된다. 이종성 항체의 당화 패턴이 당업자가 이종성 항체의 당화 패턴을 전이유전자의 CH 유전자가 유래된 종 보다도 비인간 유전자전이된 동물 종에서의 당화 패턴과 보다 유사한 것으로 인지할 경우, 비인간 유전자전이된 동물의 종에 의해 생산되는 항체 상에 천연적으로 존재하는 당화 패턴과 실질적으로 유사한 것으로 특징화될 수 있다.

[0119] 대상에 적용되는 본원에 사용된 바와 같은 용어 "천연적으로-존재하는"은 대상이 천연적으로 발견될수 있다는 사실을 언급한다. 예를 들어, 천연의 공급원으로부터 단리될 수 있고 연구소에서 인간에 의해 의도적으로 변형되지 않은 유기체 (바이러스를 포함하는)에 존재하는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열은 천연적으로 존재한다.

[0120] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "재배열된"은 V 분절이 각각 필수적으로 완전한 V_H 또는 V_L 도메인을 암호화하는 형태로 D-J 또는 J 분절에 바로 인접하게 위치되는 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린 유전자좌의 구성을 언급한다. 재배열된 면역글로불린 유전자좌는 생식선 DNA와 비교함에 의해 동정될 수 있고; 재배열된 유전자좌는 적어도 하나의 재조합된 헵타머/노나머 상동성 요소를 가질 것이다.

[0121] V 분절을 참조로 본원에 사용된 바와 같은 용어 "재배열되지 않은" 또는 "생식선 구성"은 V 분절이 D 또는 J 분절에 바로 인접하도록 재조합되지 않는 구성을 언급한다.

[0122] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "핵산 분자"는 DNA 분자 및 RNA 분자를 포함하는 것으로 의도된다. 핵산 분자는 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있지만 바람직하게 이중가닥 DNA이다.

[0123] CD40에 결합하는 항체 또는 항체 부분(예를 들어, V_H , V_L , CDR3)을 암호화하는 핵산을 참조로 본원에 사용된 바와 같은 용어 "단리된 핵산 분자"는 다른 서열이 인간 게놈 DNA에서 핵산을 천연적으로 플랭킹할 수 있는, CD40 이외의 다른 항원에 결합하는 항체 또는 항체 부분을 암호화하는 다른 뉴클레오타이드 서열이 없는 핵산 분자를 언급하는 것으로 의도된다.

[0124] 본 발명은 또한 서열번호 3 내지 132에 제시된 서열의 "보존성 서열 변형" 즉, 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되거나 아미노산 서열을 함유하는 항체의 항원으로의 결합을 폐지시키지 않는 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 포함한다. 상기 보존성 서열 변형은 뉴클레오타이드 및 아미노산 첨가 및 결실 뿐만 아니라 보존성 뉴클레오타이드 및 아미노산 치환을 포함한다. 예를 들어, 변형은 부위-지시된 돌연변이유발 및 PCR-매개된 돌연변이유발과 같은 당업계에 공지된 표준 기술에 의해 서열번호 3 내지 148에 도입될 수 있다. 보존성 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것을 포함한다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 패밀리는 당업계에 정의되어 있다. 이들 패밀리는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄를 아미노산(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지된 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함한다. 따라서, 인간 항-CD40 항체에서 예측된 비필수 아미노산 잔기는 바람직하게 동일한 측쇄 패밀리 기원의 또 다른 아미노산 잔기로 대체된다. 항원 결합을 제거하지 않는 뉴클레오타이드 및 아미노산 보존성 치환을 동정하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다(문헌참조: 예를 들어, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi *et al.* *Protein Eng.* 12(10):879-884

(1999); and Burks *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

[0125] 보존성 치환은 예를 들어, 하기 표에 따라 만들어질 수 있다. 예를 들어, 제2 칼럼의 동일한 블록에서 그리고 바람직하게 제3 칼럼의 동일한 라인에서의 아미노산은 서로를 치환할 수 있다.

지방족	비-극성	GAP
		ILV
	극성-비하전된:	CSTM
		NQ
	극성-하전된:	DE
		KR
방향족		HFYW

[0126]

[0127] 대안적으로, 또 다른 구현예에서, 돌연변이는 예를 들어, 포화 돌연변이유발에 의해 항-CD40 항체 암호화 서열 전부 또는 일부를 따라 무작위로 도입될 수 있고, 수득한 변형된 항-CD40 항체는 결합 활성에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0128] 핵산에 대해, 용어 "실질적 상동성"은 최적으로 정렬되고 비교되는 경우 2개의 핵산 또는 이의 지정된 서열은 적당한 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실과 함께 적어도 약 80%의 뉴클레오타이드에서, 일반적으로 적어도 약 90% 내지 95%, 및 보다 바람직하게 적어도 약 98% 내지 99.5%의 뉴클레오타이드에서 동일함을 지칭한다. 대안적으로, 실질적 상동성은 분절이 선택적 하이브리드화 조건하에서 가닥의 상보체에 하이브리드화하는 경우 존재한다.

[0129] 2개의 서열 간의 % 동일성은 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이고(즉, % 상동성 = 동일한 위치의 #/위치 총 # x 100), 2개의 서열의 최적의 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭의 수, 및 각 갭의 길이를 고려한다. 서열의 비교 및 2개의 서열 간의 % 동일성의 결정은 하기의 비-제한적인 예에서 기재된 바와 같이 기계적 알고리즘을 사용하여 성취될 수 있다.

[0130] 2개의 뉴클레오타이드 서열 간의 % 동일성은 NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70, 또는 80의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 중량을 사용하여 GCG 소프트웨어 패키지(<http://www.gcg.com>에서 가용한)에서 GAP 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다. 2개의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 간의 % 동일성은 또한 PAM120 중량 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티 및 4의 갭 페널티를 사용한 ALIGN 프로그램(버전 2.0)으로 도입된 이. 메이어(E. Meyers) 및 더블유. 밀러(W. Miller)(CABIOS, 4:11-17 (1989))의 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다. 추가로, 2개의 아미노산 서열간의 % 동일성은 Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 중량을 사용한, GCG 소프트웨어 패키지(<http://www.gcg.com>에서 가용한)에서 GAP 프로그램으로 도입된 니들만 및 분쉬(Needleman and Wunsch) (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)) 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다.

[0131] 본 발명의 핵산 및 단백질 서열은 예를 들어, 관련 서열을 동정하기 위해 공개 데이터베이스에 대한 검색을 수행하기 위한 "문의 서열"로서 추가로 사용될 수 있다. 상기 검색은 문헌(참조: Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10)의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램(버전 2.0)을 사용하여 수행될 수 있다. BLAST 뉴클레오타이드 검색은 본 발명의 핵산 분자와 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 수득하기 위해 NBLAST 프로그램, 스코어 = 100, 워드길이= 12와 함께 수행될 수 있다. BLAST 단백질 검색은 본 발명의 단백질 분자와 상동성인 아미노산 서열을 수득하기 위해 XBLAST 프로그램, 스코어 = 50, 워드길이= 3과 함께 수행될 수 있다. 비교 목적을 위한 갭이 있는 정렬을 수득하기 위해, 갭이 있는 BLAST는 문헌(Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402)에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다. BLAST 및 갭이 있는 BLAST 프로그램을 사용하는 경우, 각각의 프로그램(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터가 사용될 수 있다. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>을 참조한다.

[0132] 핵산은 전체 세포에서, 세포 용해물에서 또는 부분적으로 정제되거나 실질적으로 순수 형태로 존재할 수 있다. 핵산은 알칼린/SDS 처리, CsCl 밴딩, 칼럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기영동 및 당업계 널리 공지된 기타 다른 것들을 포함하는 표준 기술에 의해 다른 세포 성분 또는 다른 오염물, 예를 들어, 다른 세포 핵산 또는 단백질을로부터 정제되는 경우 "단리되거나" 실질적으로 순수하게 된다. 문헌(F. Ausubel, *et al.*, ed. *Current*

Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987))을 참조한다.

- [0133] cDNA, 게놈 또는 이의 혼합물로부터의 본 발명의 핵산 조성은 흔히 고유 서열(변형된 제한 부위 등을 제외하고는)로 있으면서 표준 기술에 따라 돌연변이되어 유전자 서열을 제공할 수 있다. 암호화 서열에 대해, 이들 돌연변이는 경우에 따라 아미노산 서열에 영향을 미칠 수 있다. 특히, 고유한 V, D, J, 불변, 스위치 및 본원에 기재된 바와 같은 다른 상기 서열과 실질적으로 상동성이거나 이로부터 유래된 DNA 서열이 고려된다(여기서, "유래된"은 서열이 또 다른 서열과 동일하거나 이로부터 변형됨을 지적한다).
- [0134] 핵산은 이것이 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 위치되는 경우 "작동적으로 연결된"이다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는 이것이 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 암호화 서열에 작동적으로 연결된다. 전사 조절 서열과 관련하여, 작동적으로 연결된 연결된 DNA 서열이 연속성이고 2개의 단백질 암호화 영역을 연결시킬 필요가 있는 연속성이고 판독 프레임에 있다. 스위치 서열에 대해, 작동적으로 연결된 서열이 스위치 재조합에 영향을 미칠 수 있음을 지적한다.
- [0135] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "벡터"는 이것이 연결되는 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 언급한다. 한가지 유형의 벡터는 추가의 DNA 분절이 연결될 수 있는 환형 이중가닥 DNA 루프를 언급하는 "플라스미드"이다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이고, 여기서, 추가의 DNA 분절은 바이러스 게놈으로 연결될 수 있다. 특정 벡터는 이들이 도입된 숙주 세포에서 자가 복제할 수 있다(예를 들어, 세균 복제 오리진을 갖는 세균 벡터 및 에피솜성 포유동물 벡터). 다른 벡터(예를 들어, 비-에피솜성 포유동물 벡터)는 숙주 세포로의 도입시 숙주 세포의 게놈으로 통합될 수 있고 이로써 숙주 게놈과 함께 복제된다. 더욱이, 특정 벡터는 이들이 작동적으로 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 상기 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 단순히 "발현 벡터")로서 언급된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 사용되는 발현 벡터는 흔히 플라스미드 형태로 있다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 플라스미드가 가장 흔하게 사용되는 벡터 형태이기 때문에 상호교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능으로 작용하는 상기 다른 형태의 발현 벡터, 예를 들어, 바이러스 벡터(예를 들어, 복제 결손 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0136] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "재조합 숙주 세포" (또는 단순히 "숙주 세포")는 재조합 발현 벡터가 도입되는 세포를 언급하는 것으로 의도된다. 상기 용어는 특정 대상체 세포 뿐만 아니라 상기 세포의 후손을 언급하는 것으로 의도됨을 이해해야 한다. 특정 변형이 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 후속 세대에서 일어날 수 있으므로 상기 후손은 사실 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만 본원에 사용된 바와 같은 용어 "숙주 세포"의 범위내에 여전히 포함된다.
- [0137] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항원"은 단백질, 펩타이드 또는 합텐과 같은 임의의 천연 또는 합성 면역원성 물질을 언급한다. 본 발명에서 (예를 들어, 본 발명의 항-CD40 항체와 조합된 백신에서) 사용하기 위해 적합한 항원은 예를 들어 이에 대한 보호 또는 치료 면역 반응이 요구되는 감염성 질환 항원 및 종양 항원, 예를 들어, 종양 세포 또는 병원성 유기체에 의해 발현되는 항원 또는 감염성 질환 항원을 포함한다. 예를 들어, 적합한 항원은 암의 예방 또는 치료를 위한 종양-관련 항원을 포함한다. 종양-관련 항원의 예는 β hCG, gp100 또는 Pmel17, HER2/neu, WT1, 메소텔린, CEA, gp100, MART1, TRP-2, 멜란-A, NY-ESO-1, NY-BR-1, NY-CO-58, MN(gp250), 유전자형, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-A3, 티로시나제, 텔로머라제, SSX2 및 MUC-1 항원, 및 생식 세포 유래된 종양 항원의 전부 또는 일부를 포함하는 서열을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 종양 관련 항원은 또한 혈액 그룹 항원, 예를 들어, Le^a, Le^b, LeX, LeY, H-2, B-1, B-2 항원을 포함한다. 대안적으로, 하나 초과 항원은 본 발명의 항원-항체 작제물 내에 포함될 수 있다. 예를 들어, MAGE 항원은 GM-CSF 또는 IL-12와 같은 보조제와 함께 멜라닌 A, 티로시나제 및 gp100과 같은 다른 항원과 조합되고, 항-APC 항체에 연결될 수 있다.
- [0138] 다른 적합한 항원은 바이러스 질환의 예방 또는 치료를 위한 바이러스 항원을 포함한다. 바이러스 항원의 예는 HIV-1 gag, HIV-1 env, HIV-1 nef, HBV (표면 또는 코어 항원), HPV, FAS, HSV-1, HSV-2, p17, ORF2 및 ORF3 항원을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 세균 항원의 예는 톡소플라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*) 또는 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 항체-세균 항원 접합체는 탄저병, 보툴리눔 독소증, 파상풍, 클라미디아, 콜레라, 디프테리아, 라임 질환, 매독 및 결핵과 같은 다양한 세균 질환의 치료 및 예방에 사용될 수 있다. 바이러스, 세균, 기생충 및 진균류와 같은 감염성 질환 병원체로부터의 다른 적합한 항원은 하기에 기재되어 있다.
- [0139] 이전의 항원의 서열은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, MAGE-3 cDNA 서열의 예는 미국 제6,235,525호

(Ludwig Institute for Cancer Research)에 제공되고; NY-ESO-1 핵산 및 단백질 서열의 예는 미국 제5,804,381호 및 미국 제6,069,233호(Ludwig Institute for Cancer Research)에 제공되고; 펠란-A 핵산 및 단백질 서열의 예는 미국 제US 5,620,886호 및 미국 제5,854,203호 (Ludwig Institute for Cancer Research)에 기재되고; NY-BR-1 핵산 및 단백질 서열의 예는 미국 제6,774,226호 및 미국 제6,911,529호(Ludwig Institute for Cancer Research)에 제공되고 NY-CO-58 핵산 및 단백질 서열의 예는 WO 02090986(Ludwig Institute for Cancer Research)에 제공되고; HER-2/neu 단백질에 대한 아미노산 서열은 GENBANK® 승인 번호 AAA58637에서 가용하고; 인간 암배아 항원 유사 1(CEA-1)에 대한 뉴클레오타이드 서열(mRNA)은 GENBANK® 승인 번호 NM_020219에서 가용하다.

[0140] 본 발명의 조성물 및 방법에 사용될 수 있는 HPV 항원은, 예를 들어 HPV-16 항원, HPV-18 항원, HPV-31 항원, HPV-33 항원 및/또는 HPV-35 항원을 포함할 수 있고; 적합하게 HPV-16 항원 및/또는 HPV-18 항원이다. HPV-16의 게놈은 문헌(Virology, 145:181- 185 (1985))에 기재되어 있고 HPV-18을 암호화하는 DNA 서열은 미국 특허 제5,840,306호에 기재되어 있고, 이의 개시내용은 이들의 전문이 본원에 참조로 인용된다. HPV-16 항원(예를 들어, HPV-16의 E1 및/또는 E2 단백질의 혈청반응성 영역)은 미국 특허 제6,531,127호에 기재되어 있고, HPV-18 항원(예를 들어, HPV-18의 L1 및/또는 L2 단백질의 혈청반응성 영역)은 미국 특허 제5,840,306호에 기재되어 있고, 이의 개시내용은 본원에 참조로 인용된다. 유사하게 HBV에 대한 완전한 게놈은 GENBANK® 승인 번호 NC_003977에서 가용하고, 이의 개시내용은 본원에 인용된다. HCV의 게놈은 유럽 특허 출원 번호 제318 216호에 기재되어 있고 이의 개시내용은 본원에 인용된다. 본원에 참조로 인용되는 PCT/US90/01348은 HCV 게놈의 클론의 서열 정보, HCV 바이러스 단백질의 아미노산 서열 및 이로부터 유래된 HCV 단백질 및 펩타이드를 포함하는 HCV 백신에 대해 상기 조성물을 제조하고 사용하는 방법을 기재한다.

[0141] 단백질의 항원성 펩타이드(즉, T 세포 에피토프를 함유하는 것들)는 당업계에 널리 공지된 다양한 방식으로 동정될 수 있다. 예를 들어, T 세포 에피토프는 이전에 CTL에 의해 정의된 10,000개의 잘 특징 분석된 MHC 결합 펩타이드의 내부 데이터베이스와 일치하는 잠재적 MHC 부류 I 및 II-결합 펩타이드를 생성하기 위한 웹-기반 예측 알고리즘(BIMAS & SYFPEITHI)을 사용하여 단백질 서열을 분석함에 의해 예측될 수 있다. 높은 스코어링 펩타이드는 소정의 MHC 분자에 대한 고친화성을 기준으로 "목적하는"으로서 랭킹되고 선택될 수 있다.

[0142] T 세포 에피토프를 함유하는 항원성 펩타이드를 동정하기 위한 또 다른 방법은 단백질이 화학적 절단에 의해 제조합적으로, 합성적으로 또는 특정 제한된 상황에서 제조될 수 있고 면역원성 성질, 예를 들어, T 세포 반응(즉, 증식 또는 림포킨 분비)을 유발하는 것에 시험되는 목적하는 길이의 비-중첩 펩타이드 또는 목적하는 길이의 중첩 펩타이드로 단백질을 나누는 것이다.

[0143] 예를 들어, 미세 맵핑 기술에 의해 단백질의 정확한 T 세포 에피토프를 결정하기 위해, T 세포 생물학 기술에 의한 결정시 T 세포 자극 활성을 갖고 따라서 적어도 하나의 T 세포 에피토프를 포함하는 펩타이드는 펩타이드의 아미노 또는 카복시 말단에서 아미노산 잔기의 첨가 또는 결실에 의해 변형될 수 있고 변형된 펩타이드에 T 세포 반응성에서 변화를 결정하기 위해 시험될 수 있다. 고유 단백질 서열에서 중첩 영역을 공유하는 2개 이상의 펩타이드가 T 세포 생물학 기술에 의한 결정시 인간 T 세포 자극 활성을 갖는 것으로 밝혀진 경우, 상기 펩타이드 전부 또는 일부를 포함하는 추가의 펩타이드가 제조될 수 있고 이들 추가의 펩타이드는 유사한 과정에 의해 시험될 수 있다. 상기 기술에 따라, 펩타이드는 선택되고 제조합적으로 또는 합성적으로 제조된다. 펩타이드는 펩타이드에 대한 T 세포 반응의 강도(예를 들어, 자극 지수)를 포함하는 다양한 인자를 기준으로 선택된다. 이들 선택된 펩타이드의 물리적 및 화학적 성질(예를 들어, 용해도, 안정성)은 이어서 펩타이드가 치료 조성에 사용하기 위해 적합하지 또는 펩타이드가 변형을 요구하는지를 결정하기 위해 조사될 수 있다.

[0144] 용어 "항원 제공 세포" 또는 "APC"는 이의 표면 상에 MHC와 복합체화된 외래 항원을 나타내는 세포이다. T-세포 또는 T-세포 수용체(TCR)를 사용하여 상기 복합체를 인지한다. APC의 예는 수지상 세포(DC), 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 단핵구(예를 들어, THP-1), B 림프아구성 세포(예를 들어, C1R.A2, 1518 B-LCL) 및 단핵구-유래된 수지상 세포(DC)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 APC는 식세포작용 또는 수용체-매개된 세포내이입에 의해 항원을 내재화한다. APC 수용체의 예는 C-형 력틴, 예를 들어, 인간 수지상 및 상피 세포 205 수용체(DEC-205), 및 인간 대식세포 만노스 수용체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0145] 용어 "항원 제공"은 APC가 항원을 포획하고 예를 들어, MHC-I 및/또는 MHC-II 접합체의 성분으로서 T-세포에 의한 이들의 인지를 가능하게 하는 프로세스를 언급한다.

[0146] "MHC 분자"는 2개 유형의 분자, MHC 부류 I 및 MHC 부류 II를 포함한다. MHC 부류 I 분자는 항원을 특이적 CD8+ T 세포에 제공하고 MHC 부류 II 분자는 항원을 특이적 CD4+ T 세포에 제공한다. 외인성으로 APC에 전달된

항원은 주로 MHC 부류 II와 연합하기 위해 프로세싱된다. 대조적으로, 외인성으로 APC에 전달된 항원은 주로 MHC 부류 I과 연합하기 위해 프로세싱된다.

- [0147] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "면역자극제"는 DC 및 대식세포와 같은 APC를 자극할 수 있는 화합물을 포함하지 만 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 사용하기 위해 적합한 면역자극제는 APC를 자극할 수 있어 APC의 성숙화 프로세스는 가속화되고, APC의 증식은 증가되고/되거나 공동-자극 분자(예를 들어, CD80, CD86, ICAM-1, MHC 분자 및 CCR7) 및 염증 촉진 사이토킨(예를 들어, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-15, 및 IFN- γ)의 집 결 또는 방출은 상향조절된다. 적합한 면역자극제는 또한 T 세포 증식을 증가시킬 수 있다. 상기 면역자극제 는 CD27 리간드; FLT 3 리간드; 사이토킨, 예를 들어, IFN- α , IFN- β , IFN- γ 및 IL-2; 콜로니-자극 인자, 예 를 들어 G-CSF(과립구 콜로니-자극 인자) 및 GM-CSF(과립구-대식세포 콜로니-자극 인자); 항-CTLA-4 항체, 항- PD1 항체, 항-41BB 항체, 또는 항-OX-40 항체; LPS(내독소); ssRNA; dsRNA; 바실 칼메트-구에린(BCG); 레바미 솔 하이드로클로라이드; 및 정맥내 면역글로불린을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 하나의 구현예에서, 면 역자극제는 toll형 수용체(TLR) 효능제일 수 있다. 예를 들어, 면역자극제는 TLR3 효능제, 예를 들어, 이중가닥 이노신:사이토신 폴리뉴클레오타이드(폴리 I:C, 예를 들어, AmpligenTM(제조원: Hemispherx Bipharma, PA, US) 또는 폴리 IC:LC(제조원: Oncovir) 또는 폴리 A:U; TLR4 효능제, 예를 들어, 모노포스포릴 지질 A(MPL) 또는 RC-529(예를 들어, 제조원(GSK, UK)으로부터 가용한)로서 가용한); TLR5 효능제, 예를 들어 플라겔린; TLR7 또 는 TLR8 효능제, 예를 들어 이미다조퀴놀린 TLR7 또는 TLR 8 효능제, 예를 들어 이미퀴모드(예를 들어, AldaraTM) 또는 레시퀴모드 및 관련 이미다조퀴놀린 제제(예를 들어, 제조원(3M Corporation)으로부터 가용한); 또는 TLR 9 효능제, 예를 들어 비메틸화된 CpG 모티프를 갖는 데옥시뉴클레오타이드(소위 "CpG", 예를 들어, 제 조원(Coley Pharmaceutical)으로부터 가용한 것으로서)일 수 있다. 바람직한 면역자극제는 TLR3 효능제, 바람 직하게 폴리I:C이다. 상기 면역자극제는 본 발명의 항체 및 작제물과 동시에, 별도로 또는 연속적으로 투여될 수 있고 또한 물리적으로 항체 및 작제물에 연결될 수 있다.
- [0148] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "연결된"은 2개 이상의 분자의 연합을 언급한다. 연결체(linkage)는 공유 또는 비-공유일 수 있다. 연결체는 또한 유전학적일 수 있다 (즉, 재조합적으로 융합된). 상기 연결체는 화학적 접 합 및 재조합 단백질 생산과 같은 광범위하게 다양한 당업계 인지된 기술을 사용하여 성취될 수 있다.
- [0149] 본원에 사용된 바와 같은 용어 항원 "교차-제공"은 APC 상의 MHC 부류 I 및 부류 II 분자를 통한 T 세포에 외인 성 단백질 항원의 제공을 언급한다.
- [0150] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "T 세포-매개된 반응"은 이펙터 T 세포(예를 들어, CD8⁺ 세포) 및 헬퍼 T 세포 (예를 들어, CD4⁺ 세포)를 포함하는 T 세포에 의해 매개되는 임의의 반응을 언급한다. T 세포 매개된 반응은 예를 들어, T 세포 세포독성 및 증식을 포함한다.
- [0151] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "세포독성 T 림프구(CTL) 반응"은 세포독성 T 세포에 의해 유도되는 면역 반응을 언급한다. CTL 반응은 주로 CD8⁺ T 세포에 의해 매개된다.
- [0152] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "억제한다" 또는 "차단한다"(예를 들어, 세포 상의 CD40으로의 CD40L의 결합의 억제/차단을 언급하는)는 상호교환적으로 사용되고 부분적 및 완전한 억제/차단 둘 다를 포함한다. CD40L의 억 제/차단은 바람직하게 CD40L 결합이 억제 또는 차단 없이 일어나는 활성의 정상 수준 또는 유형을 감소시키거나 변형시킨다. 억제 및 차단은 또한 항-CD40 항체와 접촉되지 않은 CD40L과 비교하여 항-CD40 항체와 접촉하는 경우 CD40L의 결합 친화성에서 임의의 측정가능한 감소를 포함하는 것으로 의도되고, 예를 들어, CD40L의 결합 을 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%까지 억제한다. 특정 구현예에서, 항-CD40 항체는 예를 들어, BLI 또는 SPR(Biacore) 검정에 의한 측정시 CD40L의 결합을 적어도 약 70%까지 억제한다. 또 다른 구현예에서, 항-CD40 항체는 CD40L의 결합을 적어도 약 80%까지 억제한다.
- [0153] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "성장을 억제한다"(예를 들어, 세포를 언급하는)는 세포의 성장에서 임의의 측정 가능한 감소, 예를 들어, 세포 성장의 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 또는 100%까지의 억제를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0154] 용어 "면역 반응을 유도하는", "면역 반응 증가시키는" 및 "면역 반응을 증진시키는"은 상호교환적으로 사용되 고 특정 항원에 대한 면역 반응(즉, 수동성 또는 적응성)의 자극을 언급한다.
- [0155] CDC 또는 ADCC를 유도하는 것과 관련하여 사용된 바와 같은 용어 "유도한다" 및 "증가시킨다"는 특정의 직접적

인 세포 사멸 기작의 자극을 언급한다. 예를 들어, 하나의 구현예에서, 항체는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 CD40 발현 세포의 CDC를 통한 적어도 약 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60% 용해를 유도한다. 바람직한 구현예에서, 상기 항체는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 CD40 발현 세포의 CDC를 통한 적어도 약 40% 용해를 유도한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 CD40 발현 세포의 ADCC를 통한 적어도 약 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 또는 85% 용해(즉, 특이적 용해)를 유도한다. 하나의 구현예에서, 항체는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 CD40 발현 세포의 ADCC를 통한 적어도 약 40% 용해를 유도한다.

[0156] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료한다", "치료하는" 및 "치료"는 본원에 기재된 치료 또는 예방 대책을 언급한다. "치료" 방법은 장애 또는 재발 장애의 하나 이상의 증상을 예방하거나, 치유하거나, 지연시키거나, 이의 중증도를 감소시키거나 개선시키기 위해 또는 상기 치료의 부재하에 예측되는 것 보다 대상체의 생존을 연장하기 위해 예를 들어 특정 항원에 대한 증진된 면역 반응을 필요로 하는 대상체 또는 궁극적으로 상기 장애를 획득할 수 있는 대상체에 상기 치료를 필요로 하는 대상체에 본 발명의 인간 항체의 투여를 사용한다.

[0157] 용어 "유효량" 또는 "유효 투여량"은 목적하는 효과를 성취하기 위해 또는 적어도 부분적으로 성취하기 위해 충분한 양으로서 정의된다. 용어 "치료학적 유효량"은 이미 질환을 앓는 환자에서 질환 및 이의 합병증을 치유하거나 적어도 부분적으로 중지시키기에 충분한 양으로서 정의된다. 상기 사용을 위해 효과적인 양은 장애의 중증도 및 환자 자신의 면역계의 일반 상태에 의존한다.

[0158] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "상승작용"은 2개 약물의 투여가 조합하여 사용되는 경우 2개 성분의 개별 효과로부터 예측되는 것 보다 큰 효과, 예를 들어, 2개 성분의 개별 효과의 부가로부터 예상되는 것의 2배 초과, 3배 초과, 5배 초과 또는 10배 초과 효과의 생성함을 의미한다. 예를 들어, 약물 상호작용은 초우 및 탈라레이(Chou and Talalay)의 메디안 효과 모델을 기준으로 하는 시판되는 소프트웨어 패키지 Calcsyn을 사용하여 분석될 수 있다(Chou, T.C. & Talalay, P. (1984) Adv. Enzyme Regul. 22, 27-55. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors). 1의 조합 지수(C.I.)는 부가적 약물 상호작용을 지적하는 반면 1 초과인 C.I.는 길항성이고 1 미만의 스코어는 상승작용적임을 지적한다. CI 값 정의는 다음과 같다: 1.45-1.2는 중간정도의 길항성이고, 1.2-1.1은 약하게 길항성이고, 1.1-0.9는 부가적이고, 0.9-0.85는 약간의 상승작용성이고, 0.85-0.7은 중간정도의 상승작용성이고 0.7-0.3은 상승작용성이다.

[0159] 용어 "환자"는 예방학적 또는 치료학적 치료를 받은 인간 및 다른 포유동물 대상체를 포함한다.

[0160] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "대상체"는 임의의 인간 또는 비-인간 동물을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 방법 및 조성물은 면역 장애를 갖는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 용어 "비-인간 동물"은 모든 척추동물, 예를 들어, 포유동물 및 비-포유동물, 예를 들어, 비-인간 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류, 파충류 등을 포함한다.

[0161] 본 발명의 다양한 양상은 하기의 하위섹션에서 추가로 상세히 기재된다.

[0162] I. CD40에 대한 항체의 제조

[0163] 본 발명의 항-CD40 항체는 다양한 공지된 기술, 예를 들어, 문헌(Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975))에 기재된 표준 체세포 하이브리드화 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 체세포 하이브리드화 과정이 사용될 수 있지만, 원칙적으로, 모노클로날 항체를 제조하기 위한 다른 기술이 또한 사용될 수 있고, 예를 들어, 인간 항체 유전자의 라이브러리를 사용한 B 림프구 과잉 디스플레이 기술의 바이러스 또는 발암성 형질전환이 있다.

[0164] 특정 (예시된) 구현예에서, 마우스(예를 들어, Harbour® 유전자선이 마우스의 H2L2 종) 또는 다른 적당한 숙주 동물은 적합한 항원으로 면역화시켜 면역화를 위해 사용되는 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 제조하거나 제조할 수 있는 림프구를 유발한다. 대안적으로, 림프구는 시험관내 면역화될 수 있다. 림프구는 이어서 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 용합제를 사용하여 용합시켜 하이브리도마 세포를 형성할 수 있다(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지는 항원에 대해 지시된 단일클론 항체의 생성에 대해 분석된다. 목적하는 특이성, 친화성 및/또는 활성의 항체를 생성하는 하이브리도마 세포가 동정된 후, 클론은 희석 과정을 제한함에 의해 서브클로닝될 수 있고 표준 방법에 의해 성장될 수 있다(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). 상기 목적을 위해 적합한 배양 배지는 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 추가로, 하이브리도마 세포는 동물에서 복수 종양으로서 생체내 성장할 수 있다. 서브

클론에 의해 분비되는 단일클론 항체는 예를 들어, 단백질 A-세파로스, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 희석, 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 통상의 면역글로불린 정제 과정에 의해 배양 배지, 복수 유체 또는 혈청으로부터 분리될 수 있다.

[0165] 또 다른 구현예에서, CD40에 대해 지시된 항체는 마우스에 보다 차라리 인간 면역계의 일부를 함유하는 유전자 전이 또는 염색체전이 마우스를 사용하여 생성된다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 내인성 μ 및 κ 체 유전자좌를 불활성화시키는 표적화된 돌연변이와 함께, 재배열되지 않은 인간 중쇄 (μ 및 γ) 및 κ 경쇄 면역글로불린 서열을 암호화하는 인간 면역글로불린 유전자 소형유전자좌를 함유하는 "HuMAb 마우스"로서 본원에 언급된 유전자전이 마우스를 사용한다(Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). 따라서, 마우스는 마우스 IgM 또는 κ 의 감소된 발현을 나타내고, 면역화에 반응하여 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 전이유전자는 부류스위칭 및 체세포 돌연변이를 진행하여 고친화성 인간 IgGk 단일클론 항체를 생성한다(Lonberg, N. *et al.* (1994), *supra*; reviewed in Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93, and Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764:536-546). HuMAb 마우스의 제조는 하기의 섹션 II에서 및 문헌(Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Lonberg *et al.*, (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93; Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764:536-546; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851)에서 상세히 기재된다. 추가로 문헌(미국 특허 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 제5,789,650호; 제5,877,397호; 제5,661,016호; 제5,814,318호; 제5,874,299호; 및 제5,770,429호; all to Lonberg and Kay, and GenPharm International; U.S. Patent No. 5,545,807 to Surani *et al.*; International Publication Nos. WO 98/24884, published on June 11, 1998; WO 94/25585, published November 10, 1994; WO 93/1227, published June 24, 1993; WO 92/22645, published December 23, 1992; WO 92/03918, published March 19, 1992)을 참조한다.

[0166] 또 다른 구현예에서, 인간 CD40에 결합하는 항체는 예를 들어, 문헌(McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991), Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) and Hoet *et al* (2005) *Nature Biotechnology* 23, 344-348; 미국 특허 제5,223,409호; 제5,403,484호; 및 제5,571,698호(Ladner *et al.*); 미국 특허 제5,427,908호 및 제5,580,717호(Dower *et al.*); 미국 특허 제5,969,108호 및 제6,172,197호 (McCafferty *et al.*); 및 미국 특허 제5,885,793호; 제6,521,404호; 제6,544,731호; 제6,555,313호; 제6,582,915호 및 제6,593,081호 (Griffiths *et al.*))에 기재된 기술을 사용하여 생성되는 항체 파아지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 추가로, 매우 큰 파아지 라이브러리를 작제하기 위한 전략으로서 체 서플링(Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), 및 조합 감염 및 생체내 재조합(Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993))에 의한 고친화성(nM 범위) 인간 항체의 제조가 또한 사용될 수 있다.

[0167] 특정 구현예에서, 인간 CD40에 결합하는 항체는 문헌(Hoet *et al.*, *supra*)에 기재된 파아지 디스플레이 기술을 사용하여 제조된다. 상기 기술은 인간 공여체로부터 단리된 면역글로불린 서열의 고유 조합을 갖고 생성되는 중쇄 CDR 내 합성 다양성을 갖는 인간 Fab 라이브러리의 생성을 포함한다. 상기 라이브러리는 이어서 인간 CD40에 결합하는 Fab에 대해 스크리닝한다.

[0168] 본 발명의 항체를 생성하는 하이브리도마를 생성하기 위해 바람직한 동물계는 쥐계이다. 마우스에서 하이브리도마 생성은 당업계에 널리 공지되어 있고, 이는 면역화된 비장세포를 단리하고 융합시키기 위한 면역화 프로토콜 및 기술을 포함한다.

[0169] CD40에 대한 단일클론 항체를 생성하는 형질감염체의 생성

[0170] 본 발명의 항체는 또한 예를 들어 당업계에 널리 공지된 바와 같은 재조합 DNA 기술 및 유전자 형질감염 방법의 조합을 사용한 숙주 세포 형질감염체에서 생성될 수 있다(Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

[0171] 예를 들어, 하나의 구현예에서, 목적하는 유전자(들), 예를 들어, 인간 항체 유전자들은 WO 87/04462, WO 89/01036 및 EP 338 841에 기재된 GS 유전자 발현체 또는 당업계에 널리 공지된 다른 발현체에 의해 사용되는

것과 같은 진핵세포 발현 플라스미드와 같은 발현 벡터에 연결될 수 있다. 클로닝된 항체 유전자들을 갖는 정제된 플라스미드는 CHO-세포 또는 NSO-세포와 같은 진핵 숙주 세포 또는 대안적으로 식물 유래된 세포, 진균류 또는 효모 세포와 같은 다른 진핵 세포에 도입될 수 있다. 이들 유전자를 도입하기 위해 사용되는 방법은 전기천공, 리포펙틴, 리포펙타민 등과 같은 당업계에 기재된 방법일 수 있다. 숙주 세포에서 이들 항체 유전자를 도입한 후, 항체를 발현하는 세포가 동정되고 선택될 수 있다. 이들 세포는 형질감염체를 나타내고 이는 이어서 이들의 발현 수준을 위해 증폭될 수 있고 항체를 제조하기 위해 스케일업될 수 있다. 재조합 항체는 이들 배양 상등액 및/또는 세포로부터 단리되고 정제될 수 있다.

[0172] 대안적으로 이들 클로닝된 항체 유전자들은 이. 콜라이(*E. coli*)와 같은 다른 발현계에서 또는 완전한 유기체에서 발현될 수 있거나 합성적으로 발현될 수 있다.

[0173] 온전한 항체를 발현하기 위한 부분 항체 서열의 용도

[0174] 항체는 주로 6개 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역(CDR)에 위치한 아미노산 잔기를 통해 표적 항원과 상호작용한다. 이러한 이유 때문에, CDR 내 아미노산 서열은 CDR의 외부 서열 보다는 개별 항체 간에 다양하다. CDR 서열은 대부분의 항체-항원 상호작용에 관여하기 때문에, 상이한 성질을 갖는 상이한 항체로부터 기원하는 프레임워크 서열 상으로 접목된 특이적 천연적으로 존재하는 항체 기원의 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 작제함에 의해 특이적 천연적으로 존재하는 항체의 성질을 모방하는 재조합 항체를 발현할 수 있다(문헌참조: 예를 들어, Riechmann, L. *et al.*, 1998, *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525; and Queen, C. *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033). 상기 프레임워크 서열은 생식선 항체 유전자 서열을 포함하는 공개 DNA 데이터베이스로부터 수득될 수 있다. 이들 생식선 서열은 이들이 B 세포 성숙화 동안에 V(D)J 연결에 의해 형성된 완전히 어셈블리된 가변 유전자를 포함하지 않기 때문에 성숙한 항체 유전자 서열과는 상이하다. 생식선 유전자 서열은 또한 가변 영역에 균등하게 걸쳐있는 개체에서 고친화성 2차 레퍼토리 항체의 서열과는 상이하다. 예를 들어, 체세포 돌연변이는 프레임워크 영역의 아미노-말단부에서 상대적으로 덜 빈번하다. 예를 들어, 체세포 돌연변이는 프레임워크 영역 1의 아미노 말단부 및 프레임워크 영역 4의 카복시 말단부에서 상대적으로 덜 빈번하다. 추가로, 많은 체세포 돌연변이는 항체의 결합 성질을 상당히 변화시키지 않는다. 이러한 이유 때문에, 본래의 항체의 것들과 유사한 결합 성질을 갖는 온전한 재조합 항체를 재생성하기 위해 특정 항체의 온전한 DNA 서열을 수득할 필요가 없다(PCT/US99/05535, 1999년 3월 12일에 출원됨). CDR 영역에 걸쳐 있는 부분 중쇄 및 경쇄 서열은 전형적으로 상이 목적을 위해 충분하다. 부분 서열을 사용하여 어느 생식선 가변 및 연결 유전자 분절이 재조합된 항체 가변 유전자에 기여하는지를 결정한다. 이어서 생식선 서열을 사용하여 가변 영역의 소실된 부분을 충전한다. 중쇄 및 경쇄 리더 서열은 단백질 성숙화 동안에 절단되고 최종 항체의 성질에 기여하지 않는다. 소실된 서열을 첨가하기 위해, 클로닝된 cDNA 서열은 연결 또는 PCR 증폭에 의해 합성 올리고뉴클레오타이드와 조합할 수 있다. 대안적으로, 전체 가변 영역은 짧고 중첩된 올리고뉴클레오타이드 세트로서 합성될 수 있고 PCR 증폭에 의해 조합하여 전체적으로 합성 가변 영역 클론을 생성할 수 있다. 상기 프로세스는 특정 코돈의 제거, 또는 포함 또는 특정 제한 부위, 또는 최적화와 같은 특정 이점을 갖는다.

[0175] 하이브리도마로부터 중쇄 및 경쇄 전사체의 뉴클레오타이드 서열을 사용하여 중첩 세트의 합성 올리고뉴클레오타이드를 디자인하여 천연 서열과 동일한 아미노산 암호화 능력을 갖는 합성 V 서열을 생성한다. 합성 중쇄 및 카파쇄 서열은 3가지 방식에서 천연 서열과 상이할 수 있다: 반복된 뉴클레오타이드 염기 스트링은 중단되어 올리고뉴클레오타이드 합성 및 PCR 증폭을 촉진시키고; 최적의 해독 개시 부위는 코작(Kozak)의 법칙에 따라 혼입되고(Kozak, 1991, *J. Biol. Chem.* 266:19867-19870); HindIII 부위는 해독 개시 부위의 업스트림에서 가공된다.

[0176] 중쇄 및 경쇄 가변 영역 둘 다에 대해, 최적화된 암호화, 및 상응하는 비-암호화 가닥 서열은 대략적으로 상응하는 비-암호화 올리고뉴클레오타이드의 중간지점에 30 내지 50개 뉴클레오타이드로 나누어진다. 따라서, 각각의 쇄에 대해, 올리고뉴클레오타이드는 150 내지 400개 뉴클레오타이드의 분절을 포괄하는 중첩 이중 가닥 세트로서 어셈블리될 수 있다. 풀은 이어서 150 내지 400개 뉴클레오타이드의 PCR 증폭 생성물을 생성하기 위해 주형으로서 사용된다. 전형적으로, 단일 가변 영역 올리고뉴클레오타이드 세트는 2개의 풀로 나누고 이를 별도로 증폭시켜 2개의 중첩 PCR 생성물을 생성한다. 이들 중첩 생성물은 이어서 PCR 증폭에 의해 조합하여 완전한 가변 영역을 형성한다. 이것은 또한 PCR 증폭에서 중쇄 또는 경쇄 불변 영역의 중첩 단편(카파 경쇄의 BbsI 부위 또는 감마 중쇄의 AgeI 부위를 포함하는)을 포함하여 발현 벡터 작제물로 용이하게 클로닝될 수 있는 단편을 생성시키는 것이 요구될 수 있다.

- [0177] 재구성된 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 이어서 클로닝된 프로모터, 리더 서열, 해독 개시, 리더 서열, 불변 영역, 3' 비해독된, 폴리아데닐화, 및 전사 종결, 발현 벡터 작제물을 형성하기 위한 서열과 조합된다. 중쇄 및 경쇄 발현 작제물은 단일 벡터에 조합될 수 있고, 이는 숙주 세포로 동시-형질감염되거나, 연속으로 형질감염되거나 별도로 형질감염되고 이는 이어서 융합되어 2개의쇄를 발현하는 숙주 세포를 형성한다.
- [0178] 발현 벡터의 구성에 사용하기 위한 플라스미드는 PCR 증폭 V 중쇄 및 V 카파 경쇄 cDNA 서열이 완전한 중쇄 및 경쇄 소형 유전자들을 재구성하기 위해 사용될 수 있도록 작제된다. 이들 플라스미드를 사용하여 완전한 인간 IgG₁k 또는 IgG₄k 항체를 발현할 수 있다. 본 발명의 완전한 인간 및 키메라 항체는 또한 IgG2, IgG3, IgE, IgA, IgM, 및 IgD 항체를 포함한다. 유사한 플라스미드는 다른 중쇄 이소형의 발현을 위해 또는 램다 경쇄를 포함하는 항체의 발현을 위해 작제될 수 있다.
- [0179] 따라서, 본 발명의 또 다른 양상에서, 본 발명의 항-CD40 항체의 구조적 특성을 사용하여, 예를 들어 다음과 같은 본 발명의 항체의 적어도 하나의 기능성 성질을 보유하는 구조적으로 관련된 항-CD40 항체를 생성한다:
- [0180] (a) Fc 수용체 결합과는 상관 없이 항원에 대한 면역 반응을 유도하거나 증진시키는 성질;
- [0181] (b) CD40 발현 세포의 항체-의존성 세포 독성(ADCC)을 유도하는 것 없이 항원에 대한 면역 반응을 유도하거나 증진시키는 성질;
- [0182] (c) CD40 발현 세포의 보체 의존성 세포 독성(CDC)을 유도하는 것 없이 항원에 대한 면역 반응을 유도하거나 증진시키는 성질; 및/또는
- [0183] (d) CD40L과의 상승작용할 수 있는 성질.
- [0184] 추가의 특성은 예를 들어 다음을 포함할 수 있다:
- [0185] (d) CD40L의 결합을 억제하지 않거나 차단하지 않고/않거나;
- [0186] (e) CD40L의 결합을 억제하거나 차단하고/하거나;
- [0187] (f) Fc 수용체 결합과는 상관 없이 인간 CD40으로의 CD40L의 결합을 억제하거나 차단하고/하거나;
- [0188] (g) 종양 세포의 세포 아포토시스를 유도하거나 증진시키고/시키거나;
- [0189] (h) 세포의 T-세포 자극 활성을 유도하거나 증진시키고/시키거나(예를 들어, IL-12p40의 발현에서의 증가에 의한 측정시);
- [0190] (i) B-세포 활성화를 유도하거나 증진시킨다(예를 들어, HLA-DR V450, CD54 PE, CD86 APC, 및 CD83 BV510, CD19 V500, CD54 PE, HLA-DR V450, CD23 PerCP-Cy5.5, CD69 APC, CD86 APC, CD38 PerCP-Cy5.5 및 CD71 PE로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 세포-표면 마커의 발현에서의 증가에 의한 측정시).
- [0191] 하나의 구현예에서, 본 발명의 항체의 하나 이상의 CDR 영역은 공지된 프레임워크 영역 및 CDR과 재조합적으로 조합되어 본 발명의 추가의 재조합적으로 가공된 항-CD40 항체를 생성할 수 있다. 중쇄 및 경쇄 가변 프레임워크 영역은 동일하거나 상이한 항체 서열로부터 유래될 수 있다. 항체 서열은 천연적으로 존재하는 항체의 서열일 수 있거나 여러 항체의 컨센서스 서열일 수 있다. 문헌(Kettleborough *et al.*, *Protein Engineering* 4:773 (1991); Kolbinger *et al.*, *Protein Engineering* 6:971 (1993) and Carter *et al.*, WO 92/22653)을 참조한다.
- [0192] 따라서, 또 다른 구현예에서, 본 발명은 (1) 중쇄 프레임워크 영역 및 중쇄 CDR(여기서, 중쇄 CDR의 적어도 하나는 서열번호 5, 6, 7, 8, 9, 10, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 47, 48, 49, 51, 52, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 103, 104, 105, 106, 107, 108에 나타낸 CDR의 아미노산 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다); 및 (2) 경쇄 프레임워크 영역 및 경쇄 CDR(여기서, 경쇄 CDR의 적어도 하나는 서열번호 11, 12, 13, 14, 15, 16, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 109, 110, 111, 112, 113, 114에 나타낸 CDR의 아미노산 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다)를 포함하는 항체(여기서, 상기 항체는 CD40에 결합하는 능력을 보유한다)를 제조함을 포함하는 항-CD40 항체를 제조하기 위한 방법을 제공한다. 항체가 CD40에 결합하는 능력은 실시예에서 제시된 것들과 같은 표준 결합 검정(예를 들어, ELISA 또는 FLISA)을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0193] 항체 중쇄 및 경쇄 CDR3 도메인은 항원에 대한 항체의 결합 특이성/친화성에서 특히 중요한 역할을 수행하는 것으로 당업계에 널리 공지되어 있다(문헌참조: Hall *et al.*, *J. Immunol.*, 149:1605-1612 (1992); Polymenis *et*

al., *J. Immunol.*, 152:5318-5329 (1994); Jahn *et al.*, *Immunobiol.*, 193:400-419 (1995); Klimka *et al.*, *Brit. J. Cancer*, 83:252-260 (2000); Beiboer *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 296:833-849 (2000); Rader *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:8910-8915 (1998); Barbas *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 116:2161-2162 (1994); Ditzel *et al.*, *J. Immunol.*, 157:739-749 (1996)). 따라서, 상기 제시된 바와 같이 제조된 본 발명의 재조합 항체는 바람직하게 항체 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK, 및 3B6-NS의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3을 포함한다. 상기 항체는 또한 항체 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK, 및 3B6-NS의 CDR2를 추가로 포함할 수 있다. 상기 항체는 항체 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK, 및 3B6-NS의 CDR1을 포함할 수 있다. 항체는 추가로 CDR의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0194] 따라서, 또 다른 구현예에서, 본 발명은 추가로 (1) 중쇄 프레임워크 영역, 중쇄 CDR1 영역, 중쇄 CDR2 영역, 및 중쇄 CDR3 영역(여기서, 상기 중쇄 CDR3 영역은 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK, 또는 3B6-NS의 CDR3으로부터 선택된다), 및 (2) 경쇄 프레임워크 영역, 경쇄 CDR1 영역, 경쇄 CDR2 영역 및 경쇄 CDR3 영역(여기서, 상기 경쇄 CDR3 영역은 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK, 또는 3B6-NS의 CDR3으로부터 선택된다)을 포함하는 항-CD40 항체를 제공하고, 상기 항체는 CD40에 결합한다. 항체는 항체 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK, 또는 3B6-NS의 중쇄 CDR2 및/또는 경쇄 CDR2를 추가로 포함할 수 있다. 항체는 항체 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK, 또는 3B6-NS의 중쇄 CDR1 및/또는 경쇄 CDR1을 추가로 포함할 수 있다.

[0195] 변형된 서열을 갖는 항체의 생성

[0196] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체의 가변 영역 서열 또는 이의 부분은 변형시켜 결합(즉, 비변형된 항체와 동일한 에피토프로의 결합)을 보유하고 따라서 기능적으로 동등한 구조적으로 관련된 항-CD40 항체를 생성한다. 항원 결합을 제거하는 것 없이 변형될 수 있는 잔기를 동정하기 위한 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다(문헌참조: 예를 들어, Marks *et al.* (*Biotechnology* (1992) 10(7):779-83 (경쇄 가변 영역, 이어서 고정된 CDR3 서열 변화를 갖는 중쇄 가변 영역을 서플링함에 의한 단일클론 항체 다양성), Jespers *et al.* (1994) *Biotechnology* 12(9):899-903 (항원의 단일 에피토프에 대한 파아지 디스플레이 레퍼토리로부터 인간 항체의 선택), Sharon *et al.* (1986) *PNAS USA* 83(8):2628-31 (항체의 가변-다양성 분절 연결에서 영구 아미노산 잔기의 부위-지시된 돌연변이유발); Casson *et al.* (1995) *J. Immunol.* 155(12):5647-54 (항체 중쇄 가변 영역의 무작위 돌연변이유발로부터 비롯된 특이성의 소실 및 변화의 전개)).

[0197] 따라서, 본 발명의 하나의 양상에서, 상기된 가공된 항체의 CDR1, 2, 및/또는 3 영역은 본원에 개시된 항체 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK, 또는 3B6-NS의 것들과 정확하게 동일한 아미노산 서열(들)을 포함할 수 있다. 그러나, 발명의 다른 양상에서, 항체는 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK, 또는 3B6-NS의 정확한 CDR 서열로부터의 유도체를 포함하고, 여전히 CD40에 효과적으로 결합하는 능력을 보유한다. 상기 서열 변형은 상기된 바와 같이 하나 이상의 아미노산 첨가, 결실 또는 치환, 예를 들어, 보존성 서열 변형을 포함할 수 있다. 서열 변형은 또한 항체 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK, 또는 3B6-NS의 특정 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열에 대해 상기된 컨센서스 서열을 기준으로 할 수 있다.

[0198] 따라서, 또 다른 구현예에서, 가공된 항체는 예를 들어, 항체 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK, 또는 3B6-NS의 하나 이상의 CDR과 90%, 95%, 98% 또는 99.5% 동일한 하나 이상의 CDR로 구성될 수 있다. 중간 내지 상기된 값의 범위이고, 예를 들어, 하나 이상의 상기 서열과 90-95%, 95-98%, 또는 98-100% 동일한 동일성인 CDR은 또한 본 발명에 의해 포괄되는 것으로 의도된다.

[0199] 또 다른 구현예에서, CDR의 하나 이상의 잔기들은 최적화된 결합 상수가 성취되도록 결합의 보다 선호된 온-레이트, 보다 선호된 오프-레이트 또는 둘 다를 성취하기 위한 결합을 변형시키기 위해 변화될 수 있다. 상기 잔기를 사용하여, 예를 들어, 10^{10} M^{-1} 이상의 초고 결합 친화성을 갖는 항체가 성취될 수 있다. 당업계에 널리 공지된 친화성 성숙화 기술 및 본원에 기재된 것들을 사용하여 CDR 영역(들)을 변화시킴에 이어서 결합에서 목적하는 변화를 위해 수득한 결합 분자를 스크리닝할 수 있다. 따라서, CDR(들)이 변화되기 때문에, 면역원성 뿐만 아니라 결합 친화성에서의 변화는 최상의 조합된 결합 및 낮은 면역성을 위해 최적화된 항체가 성취되도록 모니터링될 수 있고 스코어링될 수 있다.

[0200] CDR 내 변형에 추가로 또는 이 대신에, 변형은 또한 이들 변형이 항체의 결합 친화성을 제거하지 않는 한, 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 프레임워크 영역의 하나 이상, FR1, FR2, FR3 및 FR4 내에 만들어질 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 프레임워크 영역에서 하나 이상의 비-생식선 아미노산 잔기들은 생식선 아미노산 잔기, 즉, 항체가 이와 서열 동일성을 갖는 중쇄 또는 경쇄 가변 영역에 대

한 인간 생식선 서열에서 상응하는 아미노산 잔기로 치환된다. 예를 들어, 항체쇄는 이것이 상당한 서열 동일성을 공유하는 생식선 항체쇄에 정렬될 수 있고, 항체 프레임워크 서열과 생식선 프레임워크 사이에 일치하지 않는 아미노산 잔기들은 생식선 서열 기원의 상응하는 잔기들로 치환될 수 있다. 아미노산이 항체 가변 프레임워크 영역과 동등한 인간 생식선 서열 가변 프레임워크 영역 간에 상이한 경우, 항체 프레임워크 아미노산은 일반적으로 이것이 합리적으로 아미노산이 하기의 카테고리 중 하나에 있는 것으로 예상되는 경우 동등한 인간 생식선 아미노산에 의해 치환되어야만 한다:

- [0201] (1) 항원에 비공유적으로 직접 결합하는 아미노산 잔기,
- [0202] (2) CDR 영역에 인접한 아미노산 잔기,
- [0203] (3) CDR 영역과 다르게 상호작용하는 아미노산 잔기(예를 들어, 컴퓨터 모델링에 의한 결정시 CDR 영역의 약 3-6 Å 내에 있는) 또는
- [0204] (4) VL-VH 계면에 관여하는 아미노산 잔기.
- [0205] "항원에 비공유적으로 직접 결합하는" 잔기는 확립된 화학적 힘, 예를 들어, 수소 결합, 반데르 발스 힘, 소수성 상호작용 등에 따라 항원 상의 아미노산과 직접적으로 상호작용하는 양호한 가능성을 갖는 프레임워크 영역 내 아미노산을 포함한다. 따라서, 하나의 구현예에서, 본 발명의 항체의 프레임워크 영역 내 아미노산 잔기는 항원에 비공유적으로 직접 결합하는 상응하는 생식선 아미노산 잔기로 치환된다.
- [0206] "CDR 영역에 인접한" 잔기들은 항체의 1차 서열에서 CDR의 하나 이상에 바로 인접한 위치에서, 예를 들어, 캐벳에 의해 정의된 바와 같은 CDR 또는 쇼티아에 의해 정의된 바와 같은 CDR에 바로 인접한 위치에서 아미노산 잔기를 포함한다(문헌참조: 예를 들어, Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987)). 따라서, 하나의 구현예에서, 본 발명의 항체의 프레임워크 영역 내 아미노산 잔기는 CDR 영역에 인접한 상응하는 생식선 아미노산 잔기로 치환된다.
- [0207] "CDR 영역과 다르게 상호작용하는" 잔기들은 CDR 영역에 영향을 주기에 충분한 공간적 배향에 있도록 2차 구조적 분석에 의해 결정되는 것들을 포함한다. 상기 아미노산은 일반적으로 CDR 내 일부 원자의 약 3 옴스트롱 유닛(Å) 내 측쇄 원자를 갖고 확립된 화학적 힘, 예를 들어, 상기 열거된 것들에 따라 CDR 원자와 상호작용할 수 있는 원자를 함유해야만 한다. 따라서, 하나의 구현예에서, 본 발명의 항체의 프레임워크 영역 내 아미노산 잔기는 다르게 CDR 영역과 상호작용하는 상응하는 생식선 아미노산 잔기로 치환된다.
- [0208] 프레임워크 내 여러 위치에서 아미노산은 많은 항체에서 CDR 형태를 결정하기 위해 중요한 (예를 들어, CDR과 상호작용할 수 있는) 것으로 공지되어 있다(Chothia and Lesk, *supra*, Chothia *et al.*, *supra* and Tramontano *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:175 (1990), 이 모두는 본원에서 참조로 인용된다). 이들 저자는 여러 공지된 항체의 구조의 분석에 의해 CDR 형태를 위해 중요한 보존된 프레임워크 잔기를 동정하였다. 분석된 항체는 CDR의 형태를 기준으로 제한된 수의 구조적 또는 "카노니컬" 부류에 속한다. 카노니컬 부류의 구성원 내 보존된 프레임워크 잔기들은 "카노니컬" 잔기들로서 언급된다. 카노니컬 잔기들은 경쇄의 잔기 2, 25, 29, 30, 33, 48, 64, 71, 90, 94 및 95, 및 중쇄의 잔기 24, 26, 29, 34, 54, 55, 71 및 94를 포함한다. 추가의 잔기들(예를 들어, CDR 구조-결정 잔기)은 문헌(Martin and Thornton (1996) *J. Mol. Biol.* 263:800)의 방법에 따라 동정될 수 있다. 주지할만하게, 경쇄의 위치 2, 48, 64 및 71에서 및 중쇄의 위치 26-30, 71 및 94(캐벳에 따른 넘버링)에서 아미노산은 많은 항체에서 CDR과 상호작용할 수 있는 것으로 공지되어 있다. 경쇄의 위치 35 및 중쇄의 위치 93 및 103에서 아미노산은 또한 CDR과 상호작용할 가능성이 있다. CDR의 형태에 영향을 줄 수 있는 추가의 잔기들은 문헌(Foote and Winter (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487)의 방법에 따라 동정될 수 있다. 상기 잔기들은 "버니어" 잔기들로 호칭되고 CDR(즉, 이 아래에서 "플랫폼"을 형성하는)에 인접하게 아래에 있는 프레임워크 영역 내 잔기들이다.
- [0209] "VL-VH 계면에 관여하는" 잔기들 또는 "패킹(packing) 잔기들"은 예를 들어, 문헌(Novotny and Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:4592-66 (1985) or Chothia *et al.*, *supra.*)에 의해 정의된 바와 같이 VL과 VH 사이의 계면에서의 잔기들을 포함한다.
- [0210] 때로는, 특정 아미노산이 하나 이상의 상기 언급된 카테고리 내에 속하는지에 대한 일부 모호함이 있다. 상기 경우에, 대안적 변이 항체가 제조되고 이의 하나는 특정 치환을 갖지만 다른 하나는 갖지 않는다. 이와 같이 제조되는 대안적 변이 항체는 목적하는 활성 및 선택된 바람직한 항체에 대해 본원에 기재된 임의의 검정에서 시험될 수 있다.

- [0211] 프레임워크 영역 내 치환을 위한 추가의 후보물은 상기 위치에서 항체에 대해 범상하지 않은 "회귀"한 아미노산이다. 이들 아미노산은 인간 생식선 서열의 동등한 위치로부터 또는 보다 전형적 항체의 동등한 위치로부터의 아미노산으로 치환될 수 있다. 예를 들어, 치환은 항체의 프레임워크 영역 내 아미노산이 상기 위치에 대해 회귀하고 생식선 서열 내 상응하는 아미노산이 면역글로불린 서열에서 상기 위치에서 통상적인 경우; 또는 항체 내 아미노산이 상기 위치에 대해 회귀하고 생식선 서열에서 상응하는 아미노산이 또한 다른 서열과 비교하여 회귀한 경우 요구될 수 있다. 범상하지 않은 아미노산을 항체에 대해 전형적인 것으로 나타난 생식선 서열로부터의 아미노산으로 대체함에 의해 상기 항체가 덜 면역원성이 되게 할 수 있는 것으로 고려된다. 치환은 또한 예를 들어, 쌍을 형성하지 않는 시스템인 잔기 또는 추정 N-연결된 당화 부위의 경우에 요구될 수 있다.
- [0212] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "회귀"는 서열의 대표적인 샘플 중 서열의 약 20% 미만, 바람직하게 약 10% 미만, 보다 바람직하게 약 5% 미만, 심지어 보다 바람직하게 약 3% 미만, 심지어 보다 바람직하게 약 2% 미만 및 심지어 보다 바람직하게 약 1% 미만의 위치에 존재하는 아미노산을 지적하고, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "통상적인"은 대표적인 샘플에서 서열의 약 25% 초과이지만 일반적으로 약 50% 초과로 존재하는 아미노산을 지적한다. 예를 들어, 모든 경쇄 및 중쇄 가변 영역 서열은 각각 특히 서로 상동성이고 특정 임계적 위치에서 동일한 아미노산을 갖는 서열의 "서브그룹"으로 분류된다(Kabat *et al.*, *supra*). 항체 서열 중 아미노산이 서열 중에서 "회귀성" 또는 "통상적"인지를 결정하는 경우, 흔히 항체 서열과 동일한 서브그룹 내 상기 서열만을 고려하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0213] 일반적으로, 항체의 프레임워크 영역은 일반적으로 실질적으로 동일하고, 보다 일반적으로 이들이 유래되는 인간 생식선 서열의 프레임워크 영역과 동일하다. 물론, 프레임워크 영역 내 많은 아미노산은 항체의 특이성 또는 친화성에 거의 어떠한 직접적인 기여를 하지 않는다. 따라서, 프레임워크 잔기의 많은 개별 보존성 치환은 수득한 면역글로불린의 특이성 또는 친화성의 감지할만한 변화 없이 용인될 수 있다. 따라서, 하나의 구현예에서 항체의 가변 프레임워크 영역은 인간 생식선 가변 프레임워크 영역 서열 또는 상기 서열의 컨센서스와 적어도 85%의 서열 동일성을 공유한다. 또 다른 구현예에서, 항체의 가변 프레임워크 영역은 인간 생식선 가변 프레임워크 영역 서열 또는 상기 서열의 컨센서스와 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 공유한다.
- [0214] 단순히 CD40에 결합하는 것에 추가로, 항체는, 예를 들어, 다음과 같은 본 발명의 항체의 다른 기능성 성질의 이의 보유를 위해 선택될 수 있다:
- [0215] (a) Fc 수용체 결합과는 상관 없이 항원에 대한 면역 반응을 유도하거나 증진시키고/시키거나;
- [0216] (b) CD40 발현 세포의 항체-의존성 세포 독성(ADCC)을 유도하는 것 없이 항원에 대한 면역 반응을 유도하거나 증진시키는 성질;
- [0217] (c) CD40 발현 세포의 보체 의존성 세포 독성(CDC)을 유도하는 것 없이 항원에 대한 면역 반응을 유도하거나 증진시키는 성질; 및/또는
- [0218] (d) CD40L과 상승작용할 수 있는 성질.
- [0219] 추가의 특성은, 예를 들어, 다음을 포함할 수 있다:
- [0220] (e) Fc 수용체 결합과는 상관 없이 인간 CD40으로의 CD40L의 결합 차단 부재;
- [0221] (f) Fc 수용체 결합과는 상관 없이 인간 CD40으로의 CD40L의 결합 차단;
- [0222] (g) Fc 수용체 결합과는 상관 없이 APC 상에 발현된 인간 CD40의 활성화;
- [0223] (h) 종양 세포의 아포토시스의 유도;
- [0224] (i) T-세포 자극 활성화; 및/또는
- [0225] (j) 증진된 B-세포 활성화
- [0226] *CD40에 대한 단일클론 항체의 특징 분석*
- [0227] 본 발명의 단일클론 항체는 다양한 공지된 기술을 사용하여 CD40으로 결합하는 것에 대해 특징 분석될 수 있다. 일반적으로, 상기 항체는 처음에 ELISA에 의해 특징 분석된다. 간략하게, 미세역가 플레이트는 PBS 중 정제된 CD40으로 코팅될 수 있고 이어서 PBS 중에 희석된 소 혈청 알부민(BSA)과 같은 비관련 단백질로 차단될 수 있다. CD40-면역화된 마우스로부터의 혈장 희석은 각각의 웰에 첨가되고 37 °C에서 1 내지 2시간 동안 항온처

리한다. 상기 플레이트는 PBS/Tween 20으로 세척하고 이어서 37 °C에서 1시간 동안 알칼린 포스파타제에 접합된 염소-항-인간 IgG Fc-특이적 다클론 시약으로 항온처리한다. 세척 후, 플레이트는 ABTS 기질로 전개하고 405의 OD에서 분석한다. 바람직하게, 최고 역가를 전개하는 마우스는 융합을 위해 사용된다.

[0228] 상기된 바와 같은 ELISA 검정을 사용하여 항체 및 이어서 CD40 면역원과의 양성 반응성을 보여주는 항체를 생산하는 하이브리도마를 스크리닝할 수 있다. 이어서 바람직하게 고친화성으로 CD40에 결합하는 하이브리도마는 서브클로닝되고 추가로 특징 분석될 수 있다. 모 세포의 반응성(ELISA에 의한)을 보유하는 각각의 하이브리도마로부터의 하나의 클론은 이어서 세포 배양을 위해 그리고 항체 정제를 위해 선택될 수 있다.

[0229] 항-CD40 항체를 정제하기 위해, 선택된 하이브리도마는 물러 병, 2리터 스피너-플라스크 또는 다른 배양 시스템에서 성장시킬 수 있다. 상등액은 단백질을 정제하기 위해 단백질 A-세파로스(Pharmacia, Piscataway, NJ)를 사용한 친화성 크로마토그래피 전 여과하고 농축시킬 수 있다. PBS로 완충액 교환 후, 농도는 1.43 흡광 계수를 사용한 OD₂₈₀에 의해 또는 바람직하게 비탁 분석에 의해 결정될 수 있다. IgG는 겔 전기영동에 의해 및 항원 특이적 방법에 의해 점검될 수 있다.

[0230] 선택되는 항-CD40 단일클론 항체가 고유 에피토프에 결합하는지를 결정하기 위해, 각각의 항체는 시판되는 시약(Pierce, Rockford, IL)을 사용하여 비오틴화될 수 있다. 비오틴화된 Mab 결합은 스트렙타비딘 표지된 프로브를 사용하여 검출될 수 있다. 정제된 항체의 이소형을 결정하기 위해, 이소형 ELISA는 당업계에 인지도된 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 미세역가 플레이트의 웰은 4 °C에서 밤새 10 µg/ml의 항-Ig로 코팅될 수 있다. 5% BSA로 차단시킨 후, 플레이트는 2시간 동안 주위 온도에서 10 µg/ml의 단일클론 항체 또는 정제된 이소형 대조군과 반응시킨다. 웰은 이어서 IgG 또는 다른 이소형 특이적 접합된 프로브와 반응시킬 수 있다. 플레이트를 전개하고 상기된 바와 같이 분석된다.

[0231] 단일클론 항체의 CD40을 발현하는 생존 세포로의 결합을 시험하기 위해, 유동 세포측정을 사용할 수 있다. 간략하게, 막-결합된 CD40을 발현하는 세포주 및/또는 인간 PBMC(표준 성장 조건하에서 성장됨)는 1시간 동안 4 °C에서 0.1% BSA를 함유하는 PBS 중에서 다양한 농도의 단일클론 항체와 혼합한다. 세척 후, 세포는 1차 항체 염색과 동일한 조건하에서 형광-표지된 항-IgG 항체와 반응시킨다. 샘플은 단일 세포를 출입하는 빛 및 측면 스캐터 성질을 사용한 FACScan 기구에 의해 분석될 수 있고 표지된 항체의 결합을 결정한다. 유동 세포측정 검정(예 추가로 또는 대신에) 형광성 현미경을 사용한 대안적 검정이 사용될 수 있다. 세포는 상기된 바와 같이 정확하게 염색될 수 있고 형광성 현미경에 의해 조사될 수 있다. 상기 방법은 개별 세포의 가시화를 가능하게 하지만 항원의 밀도에 따라 민감성을 감소시킬 수 있다.

[0232] 항-CD40 IgG는 웨스턴 블롯팅에 의한 CD40 항원과의 반응성에 대해 추가로 시험될 수 있다. 간략하게, CD40을 발현하는 세포로부터의 세포 추출물이 제조될 수 있고 나트륨 도데실 설페이트 폴리알킬아미드 겔 전기영동에 적용하였다. 전기영동 후, 분리된 항원은 니트로셀룰로스 막으로 전달되고, 20% 마우스 혈청으로 차단시키고, 시험될 단일클론 항체로 탐지한다. IgG 결합은 항-IgG 알칼린 포스파타제를 사용하여 검출할 수 있고 BCIP/NBT 기질 정제로 전개하였다(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

[0233] 다양한 항-CD40 항체의 결합 친화성, 교차-반응성 및 결합 역학을 분석하기 위한 방법은 당업계에 공지된 표준 검정, 예를 들어, Biacore™ 2000 SPR 기구(Biacore AB, Uppsala, Sweden)를 사용한 Biacore™ 표면 플라즈몬 공명(SPR) 분석, 또는 실시예에 기재된 바와 같은 Octet™ QKe 기구를 사용한 바이오-층 간섭계법(BLI)을 포함한다.

[0234] 항-CD40 항체 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK, 및 3B6-NS(소정의 에피토프 맵핑 기술에 의해 결정된 바와 같은)의 것과 동일한 에피토프에 결합하는 효능성 항-CD40 항체는 또한 본원에 제공된다. 예를 들어, 실시예 17에 기재된 바와 같이, 본 발명의 항체(예를 들어, 항체 3C3)는 인간 CD40(서열번호 133)의 세포외 도메인(ECD)의 아미노산 잔기 1-5 및 33-36 내의 하나 이상의 잔기, 예를 들어, 인간 CD40(서열번호 133)의 ECD의 아미노산 5, 33, 34 및/또는 36에 결합한다. 항체 3C3은 또한 인간 CD40(서열번호 133)의 ECD의 하나 이상의 아미노산 26, 28 및/또는 30, 예를 들어, 인간 CD40(서열번호 133)의 아미노산 5, 33, 34 및 36 또는 인간 CD40(서열번호 133)의 ECD의 아미노산 5, 33 및 36에 추가로 결합하는 것으로 나타난다.

[0235] 발명의 다른 항체(예를 들어, 항체 3G5)는 인간 CD40(서열번호 133)의 ECD의 아미노산 잔기 13-15 및 33-36 내의 하나 이상의 잔기, 예를 들어, 인간 CD40(서열번호 133)의 ECD의 아미노산 5, 33, 34 및 36에 결합한다.

[0236] 본원에 기재된 인간 CD40 상의 에피토프(예를 들어, 예시된 항체와 동일한 에피토프)에 결합하는 항체는 치료학

적으로 유리한 성질을 나타낸다. 예를 들어, 실시예 16 및 20에 입증된 바와 같이, 항체 3C3은 예를 들어, Ramos 세포로 항온처리되는 경우 CD95 발현의 유도에서의 증가, 인간 B 세포와 항온처리되는 경우 B 세포 증식에서의 증가 및/또는 수지상 세포로 항온처리되는 경우 IL12p40 발현의 유도에서의 증가에 의한 측정시 가용성 CD40 리간드(sCD40L)를 사용한 상승작용 효능성 효과를 나타낸다.

[0237] 따라서, 3C3과 동일한 에피토프에 결합하는 항체는 인간 CD40의 리간드 결합 부위에 결합하는 것들을 포함하는, 다른 치료학적 제제와 상승작용하는 능력을 갖는다. 대표적인 상승작용 효과는 예를 들어 면역 기능의 상황조절(예를 들어, 백신 요법에서와 같이 T 세포 매개된 면역 반응, 암 요법에서 NK 활성화), 세포 성장의 억제(예를 들어, 암 요법에서), 및/또는 APC에 의한 항원의 증진된 프로세싱 및 제공(예를 들어, 백신 요법에서)을 포함한다.

[0238] 본원에 기재된 바와 같은, 본원에 기재된 항체와 함께 "CD40 상의 동일한 에피토프"에 결합하는 항체를 결정하기 위한 기술은 예를 들어, 에피토프 맵핑 방법, 예를 들어, 에피토프의 원자 분리능을 제공하는 항원:항체 복합체의 결정의 x-선 분석을 포함한다. 다른 방법은 항체의 항원 단편 또는 항원의 돌연변이된 변이로의 결합을 모니터링하고 여기서, 항원 서열 내 아미노산 잔기의 변형으로 인한 결합 상실은 흔히 에피토프 성분의 지적으로 고려된다. 추가로, 에피토프 맵핑을 위한 컴퓨터 조합 방법이 또한 사용될 수 있다. 방법은 또한 조합과 아지 디스플레이 펩타이드 라이브러리로부터 특이적 짧은 펩타이드(본래의 3차원 형태 또는 변형된 형태로)를 친화성 단리하는 목적하는 항체의 능력에 의존할 수 있다. 이어서 펩타이드는 펩타이드 라이브러리를 스크리닝하기 위해 사용되는 항체에 상응하는 에피토프의 한정을 위한 리드로서 간주된다. 에피토프 맵핑을 위해, 형태적 불연속 에피토프를 맵핑하기 위해 나타난 컴퓨터 알고리즘이 개발되었다.

[0239] II. 분자 접합체/면역독소

[0240] 본 발명은 항원, 예를 들어, APC 상의 수용체에 결합하는 항체, 예를 들어, CD40에 결합하는 항체에 연결된 종양 또는 바이러스 항원을 포함하는 다양한 치료학적 분자 접합체(예를 들어, 백신 접합체)를 제공한다. 이것은 항원의 APC, 예를 들어, CD40을 발현하는 세포(예를 들어, 수지상 세포, B 세포 및 대식세포)로의 표적화를 가능하게 하여 프로세싱, 제공 및 궁극적으로 항원(들)에 대한 면역 반응을 증진시킨다. 상기 접합체의 도식은 도 18에 나타내고, 여기서, 예를 들어, 항원은 유전학적으로 실질적으로 완전한 항-CD40 항체의 중쇄 각각의 CH3 도메인에 융합된다. 그러나, 항원은 대안적으로 상기 항체 또는 이의 단편의 다른 부분으로 연결될 수 있고 화학적 접합과 같은 다른 형태의 접합은 또한 추가로 하기에 논의된 바와 같이 사용될 수 있는 것으로 인지된다.

[0241] 분자 접합에 사용하기 위해 적합한 항원은, 예를 들어, 이에 대한 보호 또는 치료 면역 반응이 요구되는 감염성 질환 항원 및 종양 항원, 예를 들어, 종양 세포 또는 병원성 유기체에 의해 발현되는 항원 또는 감염성 질환 항원을 포함한다. 예를 들어, 적합한 항원은 암의 예방 또는 치료를 위한 종양-관련 항원을 포함한다. 종양-관련 항원의 예는 β hCG, gp100 또는 Pmel17, HER2/neu, WT1, 메소텔린, CEA, gp100, MART1, TRP-2, 멜란-A, NY-ESO-1, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), 유전자형, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-A3, 티로시나제, 텔로머라제, SSX2 및 MUC-1 항원, 및 생식 세포 유래된 종양 항원의 전부 또는 일부를 포함하는 서열을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 종양 관련 항원은 또한 혈액 그룹 항원, 예를 들어, Le^a, Le^b, LeX, LeY, H-2, B-1, B-2 항원을 포함한다. 대안적으로, 하나 초과 항원은 본 발명의 항원-항체 작제물 내에 포함될 수 있다. 예를 들어, MAGE 항원은 GM-CSF 또는 IL-12와 같은 보조제와 함께 멜란인 A, 티로시나제 및 gp100과 같은 다른 항원과 조합되고, 항-APC 항체에 연결될 수 있다.

[0242] 다른 적합한 항원은 바이러스 질환의 예방 또는 치료를 위한 바이러스 항원을 포함한다. 바이러스 항원의 예는 HIV-1 gag, HIV-1 env, HIV-1 nef, HBV (표면 또는 코어 항원), HPV, FAS, HSV-1, HSV-2, p17, ORF2 및 ORF3 항원을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 세균 항원의 예는 톡소플라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*) 또는 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 항체-세균 항원 접합체는 탄저병, 보툴리눔 독소증, 과상풍, 클라미디아, 콜레라, 디프테리아, 라임 질환, 매독 및 결핵과 같은 다양한 세균 질환의 치료 및 예방에 사용될 수 있다.

[0243] 상기된 항원의 서열은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, MAGE-3 cDNA 서열의 예는 미국 제6,235,525호(Ludwig Institute for Cancer Research)에 제공되고; NY-ESO-1 핵산 및 다핵질 서열의 예는 미국 제5,804,381호 및 미국 제6,069,233호(Ludwig Institute for Cancer Research)에 제공되고; 멜란-A 핵산 및 단백질 서열의 예는 미국 제US 5,620,886호 및 미국 제5,854,203호(Ludwig Institute for Cancer Research)에 기재되고; NY-BR-1 핵산 및 단백질 서열의 예는 미국 제6,774,226호 및 미국 제6,911,529호(Ludwig Institute for

Cancer Research)에 제공되고 NY-CO-58 핵산 및 단백질 서열의 예는 WO 02090986(Ludwig Institute for Cancer Research)에 제공되고; HER-2/neu 단백질에 대한 아미노산 서열은 GENBANK® 승인 번호 AAA58637에서 가용하고; 인간 암배아 항원 유사 1(CEA-1)에 대한 뉴클레오타이드 서열(mRNA)은 GENBANK® 승인 번호 NM_020219에서 가용하다.

[0244] 하나의 구현예에서, 항원은 HPV 항원, 예를 들어, HPV-16 항원, HPV-18 항원, HPV-31 항원, HPV-33 항원 및/또는 HPV-35 항원이다. HPV-16의 게놈은 문헌(Virology, 145:181- 185 (1985))에 기재되어 있고 HPV-18을 암호화하는 DNA 서열은 미국 특허 제5,840,306호에 기재되어 있고, 이의 개시내용은 이들의 전문이 본원에 참조로 인용된다. HPV-16 항원(예를 들어, HPV-16의 E1 및/또는 E2 단백질의 혈청반응성 영역)은 미국 특허 제 6,531,127호에 기재되어 있고, HPV-18 항원(예를 들어, HPV-18의 L1 및/또는 L2 단백질의 혈청반응성 영역)은 미국 특허 제5,840,306호에 기재되어 있고, 이의 개시내용은 본원에 참조로 인용된다. 유사하게 HBV에 대한 완전한 게놈은 GENBANK® 승인 번호 NC_003977에서 가용하고, 이의 개시내용은 본원에 인용된다. HCV의 게놈은 유럽 특허 출원 번호 제318 216호에 기재되어 있고 이의 개시내용은 본원에 인용된다. 본원에 참조로 인용되는 PCT/US90/01348은 HCV 게놈의 클론의 서열 정보, HCV 바이러스 단백질의 아미노산 서열 및 이로부터 유래된 HCV 단백질 및 펩타이드를 포함하는 HCV 백신에 대해 상기 조성물을 제조하고 사용하는 방법을 기재한다.

[0245] 단백질의 항원성 펩타이드(즉, T 세포 에피토프를 함유하는 것들)는 당업계에 널리 공지된 다양한 방식으로 동정될 수 있다. 예를 들어, T 세포 에피토프는 이전에 CTL에 의해 정의된 10,000개의 잘 특징 분석된 MHC 결합 펩타이드의 내부 데이터베이스와 일치하는 잠재적 MHC 부류 I 및 II-결합 펩타이드를 생성하기 위한 웹-기반 예측 알고리즘(BIMAS & SYFPEITHI)을 사용하여 단백질 서열을 분석함에 의해 예측될 수 있다. 높은 스코어링 펩타이드는 소정의 MHC 분자에 대한 고친화성을 기준으로 "목적하는"으로서 랭킹되고 선택될 수 있다.

[0246] T 세포 에피토프를 함유하는 항원성 펩타이드를 동정하기 위한 또 다른 방법은 단백질이 화학적 절단에 의해 재조합적으로, 합성적으로 또는 특정 제한된 상황에서 제조될 수 있고 면역원성 성질, 예를 들어, T 세포 반응(즉, 증식 또는 림포킨 분비)을 유발하는 것에 시험되는 목적하는 길이의 비-중첩 펩타이드 또는 목적하는 길이의 중첩 펩타이드로 단백질을 나누는 것을 포함한다.

[0247] 예를 들어, 미세 맵핑 기술에 의해 단백질의 정확한 T 세포 에피토프를 결정하기 위해, T 세포 생물학 기술에 의한 결정시 T 세포 자극 활성을 갖고 따라서 적어도 하나의 T 세포 에피토프를 포함하는 펩타이드는 펩타이드의 아미노 또는 카복시 말단에서 아미노산 잔기의 첨가 또는 결실에 의해 변형될 수 있고 변형된 펩타이드에 T 세포 반응성에서 변화를 결정하기 위해 시험될 수 있다. 고유 단백질 서열에서 중첩 영역을 공유하는 2개 이상의 펩타이드가 T 세포 생물학 기술에 의한 결정시 인간 T 세포 자극 활성을 갖는 것으로 밝혀진 경우, 상기 펩타이드 전부 또는 일부를 포함하는 추가의 펩타이드가 제조될 수 있고 이들 추가의 펩타이드는 유사한 과정에 의해 시험될 수 있다. 상기 기술에 따라, 펩타이드는 선택되고 재조합적으로 또는 합성적으로 제조된다. 펩타이드는 펩타이드에 대한 T 세포 반응의 강도(예를 들어, 자극 지수)를 포함하는 다양한 인자를 기준으로 선택된다. 이들 선택된 펩타이드의 물리적 및 화학적 성질(예를 들어, 용해도, 안정성)은 이어서 펩타이드가 치료 조성물에 사용하기 위해 적합하지 또는 펩타이드가 변형을 요구하는지를 결정하기 위해 조사될 수 있다.

[0248] 추가로, 백신 접합체는, 또한 항원에 대한 면역 반응을 증진시키는 하나 이상의 면역조절제를 포함할 수 있다. 발명의 항체-항원 백신 접합체는 유전학적으로 또는 화학적으로 제조될 수 있다. 어느 경우에, 접합체의 항체부는 전체 항체 또는 항체 부분, 예를 들어, Fab 단편 또는 단일쇄 Fv로 이루어질 수 있다. 추가로, 하나 이상의 항원 및/또는 면역자극제는 접합체에 포함될 수 있다.

[0249] 화학적으로 작제된 항체-항원 접합체는 다양한 널리 공지되고 용이하게 가용한 교차-연결 시약을 사용하여 제조될 수 있다. 이들 교차 연결 시약은 동중기능성 또는 이종기능성 화합물, 예를 들어, 항-수지성 항체 및 선택된 항원 상의 상이한 반응성 아미노산 또는 탄수화물과의 공유 연결을 형성하는 N-숙신이미딜-3-(2-피리디닐티오)프로피오네이트(SPDP), N-숙신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트 (SATA), 설포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카복실레이트(설포-SMCC), 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산) (DTNB)일 수 있다. 다른 커플링 및 교차-연결제를 또한 사용하여 단백질 A, 카보디이미드, 및 o-페닐렌디말레이미드(oPDM)와 같은 공유 연결을 생성할 수 있다; (문헌참조: 예를 들어, Karpovsky *et al.* (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). 다른 방법은 문헌(참조: Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78, 118-132); Brennan *et al.* (Science (1985) 229:81-83), and Glennie *et al.* (J. Immunol. (1987) 139: 2367-2375))에 기재된 것들을 포함한다. 바람직한 접합체는 SATA 및 설포-SMCC이고, 이 둘 다는 제조원(Pierce Chemical Co. (Rockford, IL))으로부터 가용하다. 면역자극제는 또한 상기된

동일한 연결 방법을 사용하여 본 발명의 분자 접합체에 화학적으로 연결될 수 있다.

[0250] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 항체는, 세포독소, 약물 또는 방사능동위원소와 같은 치료학적 모이어티에 연결된다. 세포독소에 접합되는 경우, 이들 항체 접합체는 "면역독소"로서 언급된다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 해로운 (예를 들어, 사멸시키는) 임의의 제제를 포함한다. 이의 예는 탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 액티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 푸로마이신 및 이들의 유사체 또는 동족체를 포함한다. 치료제는 항대사물(예를 들어, 메토타렉세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카바진), 알킬화제(예를 들어, 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카무스틴(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 사이클로토스파미드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 플라티늄(II) (DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린(예를 들어, 다우노루비신(이전에는 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예를 들어, 다크티노마이신(이전에는 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신(AMC)), 및 항-유사분열제(예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 항체는 방사능동위원소, 예를 들어, 방사능활성 요오드에 접합시켜 수지상-관련 장애, 예를 들어, 자가면역 또는 염증 질환 또는 이식편대숙주 질환을 치료하기 위한 세포독성 방사능약제를 제조한다.

[0251] 본 발명의 항체 접합체를 사용하여 소정의 생물학적 반응을 변형시킬 수 있고 약물 모이어티는 전형적인 화학적 치료제로 제한되는 것으로서 해석되지 말아야 한다. 예를 들어, 약물 모이어티는 목적하는 생물학적 활성을 소유한 단백질 또는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 단백질은 예를 들어, 효소적 활성 독소, 또는 이의 활성 단편, 예를 들어, 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 또는 디프테리아 독소; 단백질, 예를 들어, 종양 괴사인자 또는 인터페론- γ ; 또는, 생물학적 반응 개질제, 예를 들어, 림포킨, 인터류킨-1("IL-1"), 인터류킨-2("IL-2"), 인터류킨-6("IL-6"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자("GM-CSF"), 과립구 콜로니 자극 인자("G-CSF"), 또는 다른 성장 인자를 포함할 수 있다.

[0252] 상기 치료학적 모이어티를 항체에 접합시키기 위한 기술은 널리 공지되어 있고 예를 들어, 문헌[Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)]을 참조한다.

[0253] III. 조성물

[0254] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 조성물, 예를 들어, 담체(예를 들어, 약제학적으로 허용되는 담체)와 함께 제형화된 본 발명의 하나 이상의 조합된 단일클론 항체를 함유하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 항체를 포함하는 이특이적 분자를 함유하는 조성물이 제공된다. 하나의 구현예에서, 조성물은 본 발명의 다중(예를 들어, 2개 이상)의 단리된 항체의 조합을 포함한다. 바람직하게, 조성물의 항체 각각은 CD40의 특유한 예비 선택된 에피토프에 결합한다.

[0255] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 즉, 다른 제제와 조합된 조합 요법으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 조합 요법은 적어도 하나 이상의 추가의 치료제, 예를 들어, 소염제, DMARD(질환-개질 항-류마티스 약물), 면역억제제 및 화학치료제와 함께 본 발명의 조성물을 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 방사선 요법과 연계하여 투여될 수 있다. 다른 항체와의 동시 투여는 또한 본 발명에 의해 포함된다.

[0256] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "담체" 및 "약제학적으로 허용되는 담체"는 생리학적으로 상용성인, 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항세균 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척수 또는 상피 투여(예를 들어, 주사 또는 주입에 의해)를 위해 적합하다. 투여 경로에 의존하여, 활성 화합물, 즉, 항체, 이특이적 및 다중특이적 분자는, 상기 화합물을 불활성화시킬 수 있는 산 및 다른 천연 조건의 작용으로부터 화합물을 보호하기 위해 물질에 코팅될 수 있다.

- [0257] 본 발명의 항체 및 작제물과 함께 사용될 수 있는 보조제의 예는 다음을 포함한다: 프론트 불완전 보조제 및 완전한 보조제(Difco Laboratories, Detroit, Mich.); 머크 보조제(Merck Adjuvant) 65(Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.); AS-2(SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa.); 알루미늄 염, 예를 들어, 수산화알루미늄 겔(알룸(alum)) 또는 인산알루미늄; 칼슘, 철 또는 아연 염; 아실화된 티로신의 불용성 현탁액; 아실화된 당; 양이온적으로 또는 음이온적으로 유도체화된 폴리사카라이드; 폴리포스파젠; 생분해성 미소구; 사이토킨, 예를 들어 GM-CSF, 인터류킨-2, -7, -12, 및 다른 인자; 3D-MPL; CpG 올리고뉴클레오타이드; 및 모노포스포릴 지질 A, 예를 들어, 3-데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A.
- [0258] MPL 보조제는 제조원(Corixa Corporation (Seattle, Wash; 문헌참조, 예를 들어, 미국 특허 제4,436,727호; 제 4,877,611호; 제4,866,034호 및 제4,912,094호)으로부터 가용하다. CpG-함유 올리고뉴클레오타이드(여기서, CpG 디뉴클레오타이드는 메틸화되어 있지 않다)는 널리 공지되어 있고 예를 들어, WO 96/02555, WO 99/33488 및 미국 특허 제6,008,200호 및 제5,856,462호에 기재되어 있다. 면역자극 DNA 서열은 또한 예를 들어, 문헌(참조: Sato et al., Science 273:352, 1996)에 기재되어 있다.
- [0259] 추가의 대안적 보조제는 예를 들어, 사포닌, 예를 들어, QS21 및 QS7을 포함하는 Quil A, 또는 이의 유도체(Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, Mass.); 에신(Escin); 디기토닌; 또는 짐소필라 또는 체노포디움 퀴노아 사포닌; 몬타니드(Montanide) ISA 720(Seppic, France); SAF(Chiron, California, United States); ISCOMS(CSL), MF-59(Chiron); SBAS 계열의 보조제(예를 들어, SBAS-2 또는 SBAS-4, 제조원(SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium)으로부터 가용한); Detox (EnhancynTM) (Corixa, Hamilton, Mont.); RC-529(Corixa, Hamilton, Mont.) 및 다른 아미노알킬 글루코사미나이드 4-포스페이트(AGP); 폴리옥시에틸렌 에테르 보조제, 예를 들어, WO 99/52549A1에 기재된 것들; 합성 이미다조퀴놀린, 예를 들어, 이미퀴모드(imiquimod)[S-26308, R-837], (Harrison, et al., Vaccine 19: 1820-1826, 2001; 및 레시퀴모드[S-28463, R-848] (Vasilakos, et al., Cellular immunology 204: 64-74, 2000; 항원 제공 세포 및 T-세포 표면 상에 항상성으로 발현되는 카보닐 및 아민의 시프 염기, 예를 들어, 투카레졸(Rhodes, J. et al., Nature 377: 71-75, 1995); 예를 들어 염증 촉진 사이토킨, 예를 들어, 인터페론, GM-CSF, IL-1 알파, IL-1 베타, TGF-알파 및 TGF-베타, Th1 유도제, 예를 들어 인터페론 감마, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 및 IL-21, Th2 유도제, 예를 들어 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 및 IL-13 및 다른 케모킨 및 동시 자극 유전자, 예를 들어, MCP-1, MIP-1 알파, MIP-1 베타, RANTES, TCA-3, CD80, CD86 및 CD70을 포함하는 단백질 또는 펩타이드로서 사이토킨, 케모킨 및 동시-자극 분자; 면역자극제 표적화 리간드, 예를 들어 CTLA-4 및 L-셀렉틴, 아포토시스 자극 단백질 및 펩타이드, 예를 들어 Fas; 합성 지질계 보조제, 예를 들어, 백스펙틴, (Reyes et al., Vaccine 19: 3778-3786, 2001) 스쿠알렌, 알파-토코페롤, 폴리소르베이트 80, DOPC 및 콜레스테롤; 내독소, [LPS], (Beutler, B., Current Opinion in Microbiology 3: 23-30, 2000); Th1-유도 사이토킨을 생성하기 위해 톨 수용체를 유발하는 리간드, 예를 들어, 합성 미코박테리아성 지단백질, 미코박테리아성 단백질 p19, 펩티도글리칸, 테이코산 및 지질 A; 및 CT(콜레라 독소, 서브유닛 A 및 B) 및 LT(이. 콜라이로부터의 열 불안정 장독소, 서브유닛 A 및 B), 열 쇼크 단백질 계열(HSPs), 및 LLO(리스테리올라이신 O; WO 01/72329)를 포함한다. 이들 및 다양한 추가의 톨형 수용체(LTR) 효능제는 예를 들어, 문헌(Kanzler et al, Nature Medicine, May 2007, Vol 13, No 5)에 기재되어 있다. 본 발명의 항-CD40 항체와 조합하여 사용하기 위해 바람직한 면역자극제는 폴리 IC와 같은 TLR3 효능제이다.
- [0260] "약제학적으로 허용되는 염"은 모 화합물의 목적하는 생물학적 활성을 보유하는 염을 언급하고 임의의 목적하지 않은 독성학적 효과를 부여하지 않는다(문헌참조: 예를 들어, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). 상기 염의 예는 산 부가염 및 염기 부가염을 포함한다. 산 부가염은 비독성 무기산으로부터 유래된 것들, 예를 들어, 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드수소산, 인산 등, 및 비독성 유기산으로부터 유래된 것들, 예를 들어, 지방족 모노- 및 디카복실산, 페닐-치환된 알카노산, 하이드록시 알카노산, 방향족산, 지방족 및 방향족 설폰산 등을 포함한다. 염기 부가염은 알칼린 토금속으로부터 유래된 것들, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등, 및 비독성 유기 아민으로부터 유래된 것들, 예를 들어, N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등을 포함한다.
- [0261] 본 발명의 조성물은 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 목적하는 결과에 따라 다양하다. 활성 화합물은 신속한 방출에 대해 화합물을 보호하는 담체와 함께 제조될 수 있고, 예를 들어, 조절 방출 제형이 있고, 이는 이식체, 경피 패치 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 포함한다. 생분해성 생체적합한 중합체가 사용될 수 있고, 예를 들어, 에틸렌 비닐 아세테이

트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산이 있다. 상기 제형의 제조를 위한 많은 방법은 특허되었거나 일반적으로 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌(*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978)을 참조한다.

[0262] 특정 투여 경로에 의해 본 발명의 화합물을 투여하기 위해서는 화합물을 이의 불활성화를 예방하기 위해 물질로 코팅하거나 이와 동시 투여할 필요가 있을 수 있다. 예를 들어, 화합물은 적당한 담체에서, 예를 들어, 리포솜 또는 희석제에서 대상체에게 투여될 수 있다. 허용되는 희석제는 식염수 및 수성 완충 용액을 포함한다. 리포솜은 수중유중수 CGF 에멀전 및 통상적인 리포솜(*Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27*)을 포함한다.

[0263] 담체는 멸균 주사가 가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 물질에 대한 상기 매질 및 제제의 용도는 당업계에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 활성 화합물과 비상용성인 경우를 제외하고는, 본 발명의 약제학적 조성물 중의 용도가 고려된다. 보충 활성 화합물은 또한 조성물에 혼입될 수 있다.

[0264] 치료학적 조성물은 전형적으로 멸균성이고 제조 및 저장 조건하에서 안정해야만 한다. 상기 조성물은 용액, 미세에멀전, 리포솜 또는 높은 약물 농도에 적합할 수 있는 다른 정렬된 구조물로서 제형화될 수 있다. 상기 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적당한 유동성은 예를 들어, 렉시틴과 같은 코팅의 사용으로, 분산 경우에 요구되는 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용으로 유지될 수 있다. 많은 경우에, 조성물 중에 등장성 제제, 예를 들어, 당, 폴리알콜, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 주사가 가능한 조성물의 지연 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴에 의해 성취될 수 있다.

[0265] 멸균 주사가 가능한 용액은 요구되는 바와 같이 상기 계수된 성분들 중 하나 또는 이의 조합으로 적당한 용매 중에서 요구되는 양으로 활성 화합물을 혼입시킴에 있어서 멸균 미세여과에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산 매질, 및 상기 열거된 것들로부터 요구되는 다른 성분들을 함유하는 멸균 비히클로 혼입시킴에 의해 제조된다. 멸균 주사가 가능한 용액의 제조를 위한 멸균 산제의 경우에, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조(동결건조)이고 이는 활성 성분 및 이의 이전의 멸균-여과된 용액으로부터 임의의 추가의 목적하는 성분의 분말을 생성시킨다.

[0266] 투여 용법은 최적의 목적하는 반응(예를 들어, 치료학적 반응)을 제공하기 위해 조정된다. 예를 들어, 단일 볼러스가 투여될 수 있고, 여러 분할 용량이 시간 경과에 따라 투여될 수 있거나 상기 용량은 치료학적 상황의 긴급 사태에 의해 지적된 바와 같이 비례적으로 감소되거나 증가될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 피하 또는 근육내 주사에 의해 매주 1회 또는 2회로 투여될 수 있거나 피하 또는 근육내 주사에 의해 매월 1회 또는 2회로 투여될 수 있다.

[0267] 특히, 투여를 용이하게 하고 투여의 균일성을 위한 투여 단위 형태로 비경구 조성물을 제형화하는 것이 유리하다. 본원에 사용된 바와 같은 투여 단위 형태는 치료될 대상체에 대한 단위 투여 형태로서 적합한 물리적으로 구분된 단위를 언급하고; 각각의 단위는 요구되는 약제학적 담체와 연합하여 치료학적 효과를 생성하는 것으로 계산된 활성 화합물의 미리결정된 양을 함유한다. 본 발명의 투여 단위 형태를 위한 세부 사항은 (a) 활성 화합물의 고유 특징 및 성취될 특정 치료학적 효과, 및 (b) 개체에서 민감성의 치료를 위한 상기 활성 화합물을 혼합하는 당업계에 고유한 한계에 의해 그리고 직접적으로 이에 의존하여 지시된다.

[0268] 약제학적으로 허용되는 항산화제의 예는 다음을 포함한다: (1) 수용성 항산화제, 예를 들어, 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 이황화나트륨, 나트륨 메타바이설파이트, 나트륨 설파이트 등; (2) 지용성 항산화제, 예를 들어, 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화된 하이드록시아니졸(BHA), 부틸화된 하이드록시톨루엔(BHT), 렉시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤, 등; 및 (3) 금속 킬레이팅제, 예를 들어, 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등.

[0269] 치료학적 조성물을 위해, 본 발명의 제형은 구강, 비강, 국소(협착 및 설하를 포함하는), 직장, 질내 및/또는 비경구 투여를 위해 적합한 것들을 포함한다. 제형은 간편하게 단위 투여 형태로 제공될 수 있고 제약 산업에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 단일 투여 형태를 제조하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료받을 대상체 및 특정 투여 방식에 따라 다양하다. 단일 투여 형태를 제조하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료학적 효과를 생성하는 조성물의 양이다. 일반적으로, 100%를 기준으로 상기 양은 활성 성분의 약 0.001% 내지 약 90%, 바람직하게, 약 0.005% 내지 약 70%, 가장 바

람직하게 약 0.01% 내지 약 30%의 범위이다.

- [0270] 질내 투여를 위해 적합한 본 발명의 제형은 또한 좌약, 탐폰, 크림, 젤, 페이스트, 발포제 또는 적당한 것으로 당업계에 공지된 바와 같은 상기 담체를 함유하는 분무 제형을 포함한다. 본 발명의 조성물의 국소 또는 경피 투여를 위한 투여 형태는 분말, 분무, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치제 및 흡입제를 포함한다. 활성 화합물은 요구될 수 있는, 약제학적으로 허용되는 담체 및 임의의 보존제, 완충제, 또는 추진제와 멸균 조건하에 혼합될 수 있다.
- [0271] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "비경구 투여" 및 "비경구 투여된"은 일반적으로 주사에 의한 장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하고 제한없이 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 캡슐내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 캡슐하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.
- [0272] 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물, 식물성유, 예를 들어, 올리브유, 및 주사가 가능한 유기 에스테르, 예를 들어, 에틸 올레에이트를 포함한다. 적당한 유동성은 예를 들어, 렉시틴과 같은 코팅 물질의 사용으로, 분산 경우에 요구되는 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용으로 유지될 수 있다.
- [0273] 이들 조성물은 또한 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 미생물의 존재의 예방은 상기 멸균화 과정에 의한 그리고 다양한 항세균 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 콜레스테롤, 페놀 소르브산 등의 내포에 의한 둘 다로 보장될 수 있다. 또한 등장성제, 예를 들어, 당, 염화나트륨 등을 조성물에 포함시키는 것이 요구될 수 있다. 추가로, 주사가 가능한 약제학적 형태의 지연 흡수는 암모늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제를 포함하여 성취될 수 있다.
- [0274] 본 발명의 화합물이 약제로서 인간 및 동물에게 투여되는 경우, 이들은 단독으로 또는 예를 들어, 0.001 내지 90%(보다 바람직하게, 0.005 내지 70%, 예를 들어 0.01 내지 30%)의 활성 성분을 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 함유하는 약제학적 조성물로서 주어질 수 있다.
- [0275] 선택된 투여 경로와는 상관 없이, 적합한 수화된 형태로 사용될 수 있는 본 발명의 화합물 및/또는 본 발명의 약제학적 조성물은 당업자에게 공지된 통상의 방법에 의해 약제학적으로 허용되는 투여 형태로 제형화된다.
- [0276] 본 발명의 약제학적 조성물 중에 활성 성분의 실제 투여 수준은 환자에게 독성 없이, 특정 환자에 대한 목적하는 치료학적 반응, 조성물 및 투여 방식을 성취하기 위해 효과적인 활성 성분의 양을 수득하기 위해 다양할 수 있다. 선택된 투여 수준은 사용되는 본 발명의 특정 조성물, 이의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 분비율, 치료의 지속기간, 사용되는 특정 조성물과 조합하여 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 연령, 성별, 체중, 병태, 치료받는 환자의 일반 건강 및 사전 병력 등을 포함하는 다양한 약동학적 인자 및 의료 분야에서 널리 공지된 인자에 의존한다. 통상의 기술을 갖는 의사 또는 수의사는 요구되는 약제학적 조성물의 유효량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 목적하는 치료학적 효과를 성취하기 위해 요구되는 것 보다 낮은 수준에서 약제학적 조성물 중에 사용되는 본 발명의 화합물의 투여를 개시하여 목적하는 효과가 성취될때까지 용량을 점진적으로 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 조성물의 적합한 하루 용량은 치료학적 효과를 생성하기 위해 효과적인 최저 용량인 화합물의 양일 것이다. 상기 유효량은 일반적으로 상기된 인자에 의존할 것이다. 투여가 정맥내, 근육내, 복강내 또는 피하 투여이고, 바람직하게 표적 부위에 인접하게 투여되는 것이 바람직하다. 요구되는 경우, 치료학적 조성물의 효과적인 하루 용량은 하루 전반에 걸쳐 임의로 단위 투여 형태로 적당한 간격으로 별도로 투여되는 2회, 3회, 4회, 5회, 6회 이상의 서브-용량으로 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물이 단독으로 투여될 수 있지만, 약제학적 제형(조성물)으로서 화합물을 투여하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0277] 치료학적 조성물은 당업계에 공지된 의학적 장치로 투여될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 구현예에서, 본 발명의 치료학적 조성물은 미국 특허 제5,399,163호, 제5,383,851호, 제5,312,335호, 제5,064,413호, 제4,941,880호, 제4,790,824호, 또는 제4,596,556호에 기재된 장치와 같은 바늘 없는 피하 주사 장치로 투여될 수 있다. 본 발명에 유용한 널리 공지된 이식체 및 모듈의 예는 다음을 포함한다: 조절된 비율로 분배 의약처리를 위한 이식가능한 마이크로-주입 펌프를 개시하는 미국 특허 제4,487,603호; 피부를 통해 의약을 투여하기 위한 치료학적 장치를 개시하는 미국 특허 제4,486,194호; 정확한 주입 비율로 의약을 전달하기 위한 의약처치 주입 펌프를 개시하는 미국 특허 제4,447,233호; 연속 약물 전달을 위한 다양한 유동 이식가능한 주입 장치를 개시하는

미국 특허 제4,447,224호; 다중-챔버 격실을 갖는 삼투압 약물 전달 시스템을 개시하는 미국 특허 제4,439,196호; 및 삼투압 약물 전달 시스템을 개시하는 미국 특허 제4,475,196호. 많은 다른 상기 이식체, 전달 시스템 및 모듈은 당업자에게 공지되어 있다.

[0278] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체는 생체내 적당한 분배를 보장하기 위해 제형화될 수 있다. 예를 들어, 혈뇌장벽(BBB: blood-brain barrier)은 많은 고도의 친수성 화합물을 배제한다. 본 발명의 치료학적 화합물이 BBB를 통과하도록 (요구되는 경우) 보장하기 위해, 이들은 예를 들어, 리포솜에 제형화될 수 있다. 리포솜을 제조하는 방법을 위해, 예를 들어, 미국 특허 제 4,522,811호; 제5,374,548호; 및 제5,399,331호를 참조한다. 리포솜은 특정 세포 또는 기관으로 선택적으로 수송되어 표적화된 약물 전달을 증진시키는 하나 이상의 모이어티를 포함할 수 있다(문헌참조: 예를 들어, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). 예시적 표적화 모이어티는 플레이트 또는 비오틴(문헌참조: 예를 들어, 미국 특허 제5,416,016호 (Low *et al.*)); 만노시드 (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); 항체(P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); 계면활성제 단백질 A 수용체 (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134), 본 발명의 분자의 성분 뿐만 아니라 본 발명의 제형을 포함할 수 있는 이의 상이한 중; p120(Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090)을 포함하고; 또한 문헌 (K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273)을 참조한다. 본 발명의 하나의 구현예에서, 본 발명의 치료학적 화합물은 리포솜에 제형화되고; 보다 바람직한 구현예에서, 리포솜은 표적화 모이어티를 포함한다. 가장 바람직한 구현예에서, 리포솜 내 치료학적 화합물은 종양 또는 감염에 인접한 부위의 볼러스 주사에 의해 전달된다. 조성물은 용이한 주사능이 존재할 정도로 유체이어야만 한다. 제조 및 저장 조건하에서 안정해야만 하고 세균 및 진균류와 같은 미생물의 오염 작용에 대하여 보존되어야만 한다.

[0279] 암을 억제하는 화합물의 능력은 인간 종양에서 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 대안적으로, 상기 조성물의 성질은 당업자에게 공지된 검정에 의한 시험관내 억제와 같은 화합물이 억제하는 능력을 조사함에 의해 평가될 수 있다. 치료학적 화합물의 치료학적 유효량은 대상체에서 종양 크기를 감소시킬 수 있거나 다르게는 증상을 개선시킬 수 있다. 당업자는 대상체의 크기, 대상체 증상의 중증도 및 선택된 특정 조성물 또는 투여 경로와 같은 인자를 기준으로 상기 양을 결정할 수 있다.

[0280] 조성물은 멸균성이어야 하고 조성물이 주사기에 의해 전달될 수 있을 정도로 유체이어야만 한다. 상기 담체는 물 뿐만 아니라, 등장성 완충 식염 용액, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜, 등) 및 이들의 적합한 혼합물일 수 있다. 적당한 유동성은 예를 들어, 렉시틴과 같은 코팅의 사용으로, 분산 경우에 요구되는 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용으로 유지될 수 있다. 많은 경우에, 조성물 중에 등장성 제제, 예를 들어, 당, 폴리알콜, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨, 및 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 주사가 가능한 조성물의 장기 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴에 의해 성취될 수 있다.

[0281] 활성 화합물이 상기된 바와 같이 적합하게 보호되는 경우, 상기 화합물은 예를 들어, 불활성 희석제 또는 동화 가능한 식용 담체와 함께 경구적으로 투여될 수 있다.

[0282] IV. 본 발명의 용도 및 방법

[0283] 본 발명의 항체, 분자 접합체, 이특이적 분자 및 조성물은 다양한 질환 및 병태를 치료하고/하거나 예방(예를 들어, 이에 대해 번역화시키는)하기 위해 사용될 수 있다.

[0284] 1차 질환 증상 중 하나는 암이다. 암의 유형은 백혈병, 급성 림프구 백혈병, 급성 골수구 백혈병, 골수아세포 전골수세포 골수단핵세포 단핵구 적백혈병, 만성 백혈병, 만성 골수세포(과립구세포) 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 맨틀 세포 림프종, 1차 중추신경계 림프종, 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), 변연대 B 세포 림프종, 진성다혈구증 림프종, 호지킨 질환, 비-호지킨 질환, 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄 질환, 고형 종양, 육종, 및 암종, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 골육종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 운할막종, 중피종, 어빙 종양(Ewing's tumor), 평활근육종, 횡문근육종, 결장 육종, 결장직장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 피지샘암종, 유도암종, 유두모양 선암종, 낭샘종, 수질암종, 기관지유래암종, 신장 세포 암종, 간종양, 담관암종, 융모막암종, 정상피종, 배아암종, 빌름 종양(Wilm's tumor), 자궁경부암, 자궁암, 고환 종양, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 비 소 세포 폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경교종, 성상세포종, 속질모세포종, 두개인두종, 뇌실막세포종, 술방울샘종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기아교세포종, 수막종, 흑색종,

신경모세포종, 망막아세포종, 코인두암종, 식도암종, 기저 세포 암종, 담관암, 방광암, 골암, 뇌 및 중추신경계 (CNS) 암, 자궁경부암, 용모막암종, 결장직장암, 연결 조직 암, 소화계암, 자궁내막암, 식도암, 눈암, 두경부암, 위암, 상피내 신생물, 신장암, 후두암, 간암, 폐암(소세포, 대세포), 흑색종, 신경모세포종; 구강암 (예를 들어, 입술, 혀, 입 및 인두), 난소암, 췌장암, 망막모세포종, 횡문근육종, 직장암; 호흡계 암, 육종, 피부암, 위암, 고환암, 갑상선암, 자궁암, 및 비뇨계 암을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특정 암은 만성 림프구 백혈병, 맨틀 세포 림프종, 1차 중추 신경계 림프종, 버킷 림프종 및 변연대 B 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 CD40-발현 종양을 포함한다.

[0285] 본 발명의 항체 및 접합체는 또한 세균, 진균류, 바이러스 및 기생충 감염 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0286] 요법에 사용되는 경우, 본 발명의 항체는 단독으로 또는 면역자극제, 백신, 화학요법 또는 방사선요법과 같은 다른 요법과 함께 직접적으로 (즉, 생체내) 대상체에게 투여될 수 있다. 모든 경우에, 항체, 접합체, 이특이체, 조성물 및 면역자극제 및 다른 요법은 이들의 목적하는 치료학적 효과를 나타내는 유효량으로 투여된다. 용어 "유효량"은 목적하는 생물학적 효과를 실현하기에 필요하거나 충분한 양을 언급한다. 예를 들어, 유효량은 종양, 암, 또는 세균, 바이러스 또는 진균류 감염을 제거하는데 필요한 양일 수 있다. 임의의 특정 적용을 위한 유효량은 치료될 질환 또는 병태, 투여되는 특정 항체, 대상체의 크기 또는 질환 또는 병태의 중증도와 같은 인자에 의존하여 다양할 수 있다. 당업자는 경험적으로 과도한 실험을 필요로 하지 않으면서 특정 분자의 유효량을 결정할 수 있다.

[0287] 바람직한 투여 경로는 예를 들어, 주사(예를 들어, 피하, 정맥내, 비경구, 복강내, 척추강내)를 포함한다. 주사는 볼러스 또는 연속 주입일 수 있다. 다른 투여 경로는 경구 투여를 포함한다.

[0288] 또 다른 구현예에서, 항체는 백신 항원, 예를 들어, 종양 항원 (이에 의해 종양에 대한 면역 반응을 증진시키기 위해) 또는 감염 질환 병원체로부터의 항원 (이에 의해 감염 질환 병원체에 대한 면역 반응을 증진시키기 위해)에 대한 면역 반응을 증진시키기 위해 백신 항원과 조합하여 투여된다. 백신 항원은 종양에 대한, 또는 바이러스, 세균, 기생충 또는 진균류와 같은 감염성 질환 병원체에 대한 면역 반응을 유발할 수 있는 임의의 항원 또는 항원성 조성물일 수 있다. 또한 예를 들어, 환자의 종양의 서열분석으로부터 유래된 것들과 같은 신생항원일 수 있다. 항원 또는 항원들은 예를 들어, 펩타이드/단백질, 폴리사카라이드 및/또는 지질일 수 있거나 생체내 발현될 수 있는 펩타이드 또는 단백질 항원을 암호화하는 핵산(예를 들어, DNA)으로서 투여될 수 있다. 항원 또는 항원들은 본원에서 이전에 기재된 다양한 종양 항원과 같이 종양으로부터 유래된다. 대안적으로, 항원 또는 항원들은 바이러스, 세균, 기생충 및/또는 진균류와 같은 병원체로부터 유래될 수 있고, 예를 들어, 본원에 이전에 개시된 다양한 병원체 항원들이 있다. 적합한 병원체 항원의 추가의 예는 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다:

[0289] 바이러스 항원 또는 항원성 결정인자는 예를 들어, 다음으로부터 유래할 수 있다: 사이토메갈로바이러스(특히 인간, 예를 들어, gB 또는 이의 유도체); 엡슈타인 바르 바이러스(Epstein Barr virus) (예를 들어, gp350); 플라비바이러스(예를 들어, 황열 바이러스, 뎅기 바이러스, 진드기-매개 뇌염 바이러스, 일본 뇌염 바이러스); 간염 바이러스, 예를 들어, B형 간염 바이러스(예를 들어, B형 간염 표면 항원, 예를 들어 EP-A-414 374; EP-A-0304 578, 및 EP-A-198474에 기재된 PreS1, PreS2 및 S 항원), A형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스 및 E형 간염 바이러스; HIV-1, (예를 들어, tat, nef, gp120 또는 gp160); 인간 헤르페스 바이러스, 예를 들어 gD 또는 이의 유도체 또는 이미디어트 어얼리 단백질, 예를 들어 HSV1 또는 HSV2로부터의 ICP27; 인간 파필로마 바이러스(예를 들어 HPV6, 11, 16, 18); 인플루엔자 바이러스(전체 생존 또는 불활성화된 바이러스, 난황 또는 MDCK 세포, 또는 배로 세포 또는 전체 플루 바이러스(문헌(Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920)에 기재된 바와 같이)에서 성장한 스플릿 인플루엔자 바이러스 또는 이의 정제되거나 재조합 단백질, 예를 들어 NP, NA, HA, 또는 M 단백질); 홍역 바이러스; 메르스 바이러스; 파라인플루엔자 바이러스; 광견병 바이러스; 호흡기 세포융합 바이러스(예를 들어, F 및 G 단백질); 로타바이러스(생존 약독화된 바이러스를 포함하는); 천연두 바이러스; 바리셀라 조스터 바이러스(예를 들어 gpI, II 및 IE63); 및 자궁경부암에 관여하는 HPV 바이러스(예를 들어, HPV 16 으로부터 단백질 D-E6 또는 E7 융합을 형성하기 위해 단백질 D 캐리어와 융합된 어얼리 단백질 E6 또는 E7, 또는 이의 조합; 또는 E6 또는 E7과 L2의 조합(문헌참조: 예를 들어 WO 96/26277)).

[0290] 세균 항원 또는 항원성 결정인자는 예를 들어, 다음으로부터 유래할 수 있다: 비. 안트라시스(B. anthracis)를 포함하는 바실러스 종(예를 들어, 보툴리눔 독소); 비. 페르투시스(B. pertussis)를 포함하는 보르데텔라 종(예를 들어 퍼탁틴, 페르투시스 독소, 필라멘타스 헤마글루티닌, 아데닐레이트 사이클라제, 펄브리에); 비. 부르그

도르페리(*B. burgdorferi*)(eg OspA, OspC, DbpA, DbpB), 비. 가리니(*B. garinii*) (eg OspA, OspC, DbpA, DbpB), 비. 아프젤리(*B. afzelii*) (eg OspA, OspC, DbpA, DbpB), 비. 안데르소니(*B. andersonii*) (eg OspA, OspC, DbpA, DbpB), 비. 헤름시(*B. hermsii*)를 포함하는 보렐리아 종; 씨. 제주니(*C. jejuni*) (예를 들어, 독소, 어드헤신 및 인베이션) 및 씨. 콜리(*C. coli*)를 포함하는 캄필로박터 종; 씨. 트라코마티스(*C. trachomatis*) (eg MOMP, 헤파린-결합 단백질), 씨. 뉴모니에(*C. pneumonie*) (eg MOMP, 헤파린-결합 단백질), 씨. 프시타시(*C. psittaci*)를 포함하는 클라미디아 종; 씨. 테타니(*C. tetani*) (예를 들어, 파상풍 독소), 씨. 보툴리눔(*C. botulinum*) (예를 들어, 보툴리눔 독소), 씨. 디피실(*C. difficile*) (eg 클로스트리디움 독소 A 또는 B)를 포함하는 클로스트리디움 종; 씨. 디프테리아(*C. diphtheriae*) (eg 디프테리아 독소)를 포함하는 코리네박테리움 종; 이. 에쿠이(*E. equi*)를 포함하는 에를리히아 종 및 인간 과립구 에를리히아종의 제제; 알. 리케치(*R. rickettsii*)를 포함하는 리케치아 종; 이. 파에칼리스(*E. faecalis*), 이. 파에시움(*E. faecium*)을 포함하는 엔테로코커스 종; 장독소 이. 콜리(*E. coli*) (예를 들어 콜로니화 인자, 열-불안정 독소 또는 이의 유도체, 또는 열-안정성 독소), 장출혈 이. 콜리, 장병원성 이. 콜리(예를 들어, 쉬가 독소형 독소)를 포함하는 에스케리치아 종; 에이취. 인플루엔자 B형(*H. influenzae* type B) (eg PRP), 비-분류성 에이취. 인플루엔자(*H. influenzae*), 예를 들어, OMP26, 고분자량 어드헤신, P5, P6, 단백질 D 및 지단백질 D, 및 펄브린 및 펄브린 유래된 펩타이드(예를 들어 미국 제5,843,464호 참조)를 포함하는 헤모필러스 종; 에이취. 필로리(*H. pylori*) (예를 들어 우레아제, 옥탈라제, 액포 있는 독소)를 포함하는 헬리코박터 종; 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*)를 포함하는 슈도모나스 종; 엘. 뉴모필라(*L. pneumophila*)를 포함하는 레지오넬라 종; 엘. 인터로간스(*L. interrogans*)를 포함하는 레프토스피라 종; 엘. 모노사이토게네스(*L. monocytogenes*)를 포함하는 리스테리아 종; 엠 카타르할리스 (*M. catarrhalis*), 또한 브란하멜라 카타르할리스(*Branhamella catarrhalis*)로서 공지된 것(예를 들어, 고분자량 및 저분자량의 어드헤신 및 인베이션)을 포함하는 모락셀라 종; 모레셀라 카타르할리스(*Morexella Catarrhalis*) (이의 외막 소포체, 및 OMP106 (예를 들어 W097/41731) 참조를 포함하는); 엠. 튜버쿨로시스(*M. tuberculosis*) (예를 들어, ESAT6, 항원 85A, -B 또는 -C), 엠. 보비스(*M. bovis*), 엠. 레프라(*M. leprae*), 엠. 아비움(*M. avium*), 엠. 파라튜버쿨로시스(*M. paratuberculosis*), 엠. 스메그마티스(*M. smegmatis*)를 포함하는 마이코박테리움 종; 엔. 고노레아 (*N. gonorrhea*) 및 엔. 메닝기티디스(*N. meningitidis*) (예를 들어, 캡슐 폴리사카라이드 및 이의 접합체, 트랜스페린-결합 단백질, 락토페린 결합 단백질, PilC, 어드헤신)을 포함하는 나이세리아 종; 나이세리아 멘기티디스 B(*Neisseria meningitidis* B) (이의 외막 소포체 및 NspA (예를 들어 W0 96/29412를 참조한다)를 포함하는); 에스. 타이피(*S. typhi*), 에스. 파라타이피(*S. paratyphi*), 에스. 콜레라에수이스(*S. choleraesuis*), 에스. 엔테리티디스(*S. enteritidis*)를 포함하는 살모넬라 종; 에스. 소네이(*S. sonnei*), 에스. 디센테리아(*S. dysenteriae*), 에스. 플렉스네리(*S. flexnerii*)를 포함하는 쉬겔라 종; 에스. 아우레우스(*S. aureus*), 에스. 에피더미디스(*S. epidermidis*)를 포함하는 스탕필로코쿠스 종; 에스. 뉴모니에(*S. pneumonie*) (eg 캡슐 폴리사카라이드 및 이의 접합체, PsaA, PspA, 스트렙토라이신, 콜린-결합 단백질) 및 단백질 항원 뉴모라이신(*Biochem Biophys Acta*, 1989,67,1007; Rubins et al., *Microbial Pathogenesis*, 25,337-342), 및 이의 돌연변이체 탈독성화된 유도체(문헌참조: 예를 들어 W0 90/06951; W0 99/03884)를 포함하는 스트렙토코커스 종; 티. 팔리둠(*T. pallidum*) (eg 외막 단백질), 티. 덴티콜라(*T. denticola*), 티. 하이오디센테리아(*T. hyodysenteriae*)를 포함하는 트레포네마 종; 브이. 콜레라(*V. cholera*) (예를 들어, 콜레라 독소)를 포함하는 비브리오 종; 및 와이. 엔테로콜리티카(*Y. enterocolitica*) (예를 들어, Yop 단백질), 와이. 페스티스(*Y. pestis*), 와이. 슈도튜버쿨로시스(*Y. pseudotuberculosis*)를 포함하는 예르시니아 종.

[0291] 기생충/진균류 항원 또는 항원성 결정인자는 예를 들어, 다음으로부터 유래할 수 있다: 비. 마이크로티(*B. microti*)를 포함하는 바베시아 종; 씨. 알비칸스(*C. albicans*)를 포함하는 캔디다 종; 씨. 네오포르만스(*C. neoformans*)를 포함하는 크립토코커스 종; 이. 히스톨리티카(*E. histolytica*)를 포함하는 엔타모에바 종; 지. 람블리아(*G. lamblia*)를 포함하는 지아르디아 종; 엘. 메이저(*L. major*)를 포함하는 레슈마니아 종; 플라스모디움. 파시파룸(*Plasmodium. faciparum*) (플라스모디움 종에서 MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, 세쿠에스트린, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXPI, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 및 이들의 유사체); 피. 카리니(*P. carinii*)를 포함하는 뉴모시스티스 종; 에스. 만소니(*S. mansoni*)를 포함하는 쉬소스토마 종; 티. 바기날리스(*T. vaginalis*)를 포함하는 트리코모나스 종; 티. 곤디(*T. gondii*)를 포함하는 토크소플라스마 종(예를 들어, SAG2, SAG3, Tg34); 티. 크루지(*T. cruzi*)를 포함하는 트리파노소마 종.

[0292] 본 발명의 상기 양상에 따라 항원 및 항원성 결정인자는 많은 상이한 형태로 사용될 수 있는 것으로 인지될 것이다. 예를 들어, 항원 또는 항원성 결정인자는 단리된 단백질 또는 펩타이드(예를 들어, 소위 "서브유닛 백신"에서)로서 또는, 예를 들어, 세포-연합된 또는 바이러스-연합된 항원 또는 항원성 결정인자(예를 들어, 생존

또는 사멸된 병원체 균주에서)로서 존재할 수 있다. 생존 병원체는 바람직하게 공지된 방식으로 약독화된다. 대안적으로, 항원 또는 항원성 결정인자는 항원 또는 항원성 결정인자(소위 "DNA 백신화"에서와 같이)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 사용함에 의해 대상체에서 동일계에서 생성될 수 있지만, 상기 방법과 함께 사용될 수 있는 폴리뉴클레오타이드는 DNA에 제한되지 않고 또한 상기 논의된 바와 같이 RNA 및 변형된 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있는 것으로 인지된다.

[0293] 요법에 사용되는 경우, 본 발명의 분자 접합체(즉, 백신 접합체)는 단독으로 또는 면역자극제와 함께 직접적으로(즉, 생체내) 대상체에게 투여될 수 있다. 하나의 양상에서, 면역자극제는 접합체에 연결된다. 대안적으로, 접합체는 접합체를 수지상 세포와 같은 APC로 먼저 접촉시킴에 의해(예를 들어, 배양하거나 항온처리함에 의해) 이어서 상기 세포를 대상체에게 투여함에 의해(즉, 생체외) 간접적으로 대상체에게 투여될 수 있다. 이들이 투여 전 APC에 의해 소유되고 가공되도록 접합체의 APC로의 접촉 및 전달은 또한 항원 또는 세포 "로딩"으로서 언급된다. 항원을 APC로 로딩하기 위한 기술은 당업계에 널리 공지되어 있고 예를 들어 문헌(Gunzer and Grabbe, Crit Rev Immunol 21 (1-3):133-45 (2001) and Steinman, Exp Hematol 24(8): 859-62 (1996))의 방법을 포함한다.

[0294] 모든 경우에, 백신 접합체 및 면역자극제는 이들의 목적하는 치료학적 효과를 나타내는 유효량으로 투여된다.

[0295] 본 발명의 항체, 분자 접합체, 이특이적 분자 및 조성물은 또한 보조제 및 다른 치료학적 제제와 동시 투여될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "동시투여된"은 투여 용법의 일부로서 투여를 포함하는, 보조제 및 다른 제제와 함께 본 발명의 항체 및 접합체의 임의의 모든 동시, 별도의 또는 후속적 투여를 포함하는 것으로 인지된다. 항체는 전형적으로 단독으로 또는 상기 제제와 함께 담체에 제형화된다. 상기 담체의 예는 용액, 용매, 분산 매질, 지연제, 에멀전 등을 포함한다. 약제학적 활성 물질에 대한 상기 매질의 용도는 당업계에 널리 공지되어 있다. 분자와 함께 사용하기 위해 적합한 임의의 다른 통상적인 담체는 본 발명의 범위내에 있다.

[0296] 항체, 접합체, 이특이체 및 조성물과의 동시 투여를 위해 적합한 제제는 보조제, 면역자극제 및/또는 면역억제제 뿐만 아니라 다른 항체, 세포독소 및/또는 약물을 포함한다. 하나의 구현예에서, 제제는 화학치료제이다. 항체, 이특이체 및 조성물은 방사선과 함께 투여될 수 있다.

[0297] 종양의 치료에서 본 발명의 항체 및 접합체와의 동시 투여를 위해 적합한 화학치료제는 예를 들어 다음을 포함한다: 탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 액티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 푸로마이신 및 이들의 유사체 또는 동족체. 추가의 치료제는 예를 들어, 항대사물(예를 들어, 메토타렉세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 테카바진), 알킬화제(예를 들어, 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카무스틴(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 사이클로토스파미드, 부셀판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 플라티늄(II)(DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린(예를 들어, 다우노루비신(이전에는 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예를 들어, 다크티노마이신(이전에는 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신(AMC)), 및 항-유사분열제(예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)을 포함한다.

[0298] 예를 들어, 면역 세포(예를 들어, 조절 T-세포, NKT 세포, 대식세포, 골수-유래된 서프래서 세포, 미성숙 또는 억제 수지상 세포)에 의한 면역 억제 활성을 결실시키거나 억제하는 제제 또는 종양의 국부 미세환경에서 종양 또는 숙주 세포에 의해 생성되는 억제 인자(예를 들어, TGF β , 인돌아민 2,3 디옥시게나제 - IDO)는 또한 본 발명의 항체 및 접합체와 함께 투여될 수 있다. 상기 제제는 항체 및 1 메틸 트립토판 또는 유도체와 같은 IDO 억제제와 같은 소형 분자 약물을 포함한다.

[0299] 면역 반응의 유도 또는 증진을 위한 본 발명의 항체, 접합체 및 이특이체와 동시 투여하기 위해 적합한 제제는 예를 들어, 보조제 및/또는 면역자극제를 포함하고, 이의 비제한적인 예는 이전에 기재되었다. 바람직한 면역자극제는 TLR3 효능제, 바람직하게 폴리 IC이다.

[0300] V. 조합 요법

[0301] 본원에 기재된 항-CD40 항체는 또한 예를 들어, 암을 치료하기 위해 조합 요법으로 사용될 수 있다. 따라서, 본원에서 조합 요법의 방법이 제공되고, 여기서, 항-CD40 항체는 면역 반응을 자극시켜 대상체에서 면역 반응을 추가로 증진시키거나, 자극하거나 상향조절하는데 효과적인 하나 이상의 추가의 제제, 예를 들어, 소형 분자 약

물, 항체 또는 이의 항원 결합부와 동시 투여된다. 더욱이, 본원의 실시예에 나타난 바와 같이, 효능제 항-CD40 항체 및 가용성 CD40 리간드의 투여는 예를 들어, 종양 세포에서 CD95의 발현에서의 증가에 의해 나타난 바와 같이 T-세포 수용체-매개된 신호를 유도하는데 상승작용 효과를 가졌다.

[0302] 예를 들어, 본원에 기재된 항-CD40 항체는 (i) 자극 (예를 들어, 동시 자극) 분자(예를 들어, 수용체 또는 리간드)의 효능제 및/또는 (ii) T 세포와 같은 면역 세포 상의 억제 신호 또는 분자(예를 들어, 수용체 또는 리간드)의 길항제와 조합될 수 있고, 이 둘 다는 항원-특이적 T 세포 반응과 같은 면역 반응을 증폭시킨다. 특정 양상에서, 면역-항암제는 순수 면역력에 관여하는 세포 상의 (i) 자극 (동시-자극을 포함하는) 분자(예를 들어, 수용체 또는 리간드)의 효능제 또는 (ii) 억제 (동시-억제를 포함하는) 분자(예를 들어, 수용체 또는 리간드)의 길항제이고, 여기서, 상기 면역-항암제는 순수 면역력을 증진시킨다. 상기 면역-항암제는 흔히 면역 체크포인트 조절제, 예를 들어, 면역 체크포인트 억제제 또는 면역 체크포인트 자극인자로서 언급된다.

[0303] 하나의 구현예에서, 항-CD40 항체는 면역글로불린 슈퍼 패밀리(IgSF)의 구성원인 자극 또는 억제 분자를 표적화하는 제제와 함께 투여된다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 항-CD40 항체는 면역 반응을 증가시키기 위해 IgSF 패밀리의 구성원을 표적화하는 제제와 함께 대상체에 투여될 수 있다. 예를 들어, 항-CD40 항체는 B7 패밀리의 구성원에 특이적으로 결합하는 B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA), 및 B7-H6 또는 동시-자극 또는 동시-억제 수용체를 포함하는 막-결합된 리간드의 B7 패밀리의 구성원을 표적화 (하거나 이에 특이적으로 결합하는)하는 제제와 함께 투여될 수 있다.

[0304] 항-CD40 항체는 또한 CD40 및 CD40L(예를 들어, 인간 CD40 및 인간 CD40L), OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDA1, EDA2, TNFR1, 림프구독소 α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT β R, 림프구독소 α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, 및 NGFR과 같은 분자 (리간드 또는 수용체)의 TNF 및 TNFR 패밀리의 구성원을 표적화하는 제제와 함께 투여될 수 있다(문헌참조: 예를 들어, Tansey (2009) Drug Discovery Today 00:1).

[0305] T 세포 반응은 본원에 기재된 항-CD40 항체, 예를 들어, 3C3 및 3G5, 및 상기된 바와 같이 CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, 및 LAG-3과 같은 T 세포 활성화(예를 들어, 면역-체크포인트 억제제)를 억제하는 단백질 및 임의의 하기의 단백질의 하나 이상의 길항제(억제제 또는 차단제)의 조합에 의해 자극될 수 있다: TIM-3, 갈렉틴 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, 갈렉틴-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, B7-H3, B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1, 및 TIM-4, 및/또는 T 세포 활성화를 자극하는 단백질, 예를 들어, B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB(CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, CD27, CD40, DR3 및 CD28H의 하나 이상의 효능제.

[0306] 상기 단백질 중 하나를 조절하고, 효능제 항-CD40 항체, 예를 들어, 암을 치료하기 위해 본원에 기재된 것들과 조합될 수 있는 예시적 제제는 다음을 포함한다: YervoyTM(이필리무맵) 또는 트레멜리무맵(CTLA-4에 대한), 갈릭 시맵(B7.1에 대한), BMS-936558/니볼루맵(PD-1에 대한), MK-3475/렘브롤리주맵(PD-1에 대한), AMP224(B7DC에 대한), BMS-936559(B7-H1에 대한), MPDL3280A/아테졸리주맵(B7-H1에 대한), MEDI-570(ICOS에 대한), AMG557(B7H2에 대한), MGA271(B7H3에 대한), IMP321(LAG-3에 대한), BMS-663513(CD137에 대한), PF-05082566(CD137에 대한), CDX-1127(CD27에 대한), 항-OX40(Providence Health Services), huMAbOX40L(OX40L에 대한), 아타시셉트(Atacicept) (TACI에 대한), CP-870893(CD40에 대한), 루카투무맵(CD40에 대한), 다세투주맵(CD40에 대한), 무로모넵-CD3(CD3에 대한), 이필리무맵(CTLA-4에 대한).

[0307] 암의 치료를 위해 효능제 항-CD40 항체와 조합될 수 있는 다른 분자는 NK 세포 상의 억제 수용체의 길항제 또는 NK 세포 상의 수용체를 활성화하는 효능제를 포함한다. 예를 들어, 항-CD40 효능제 항체는 KIR의 길항제(예를 들어, 리틸루맵)와 조합될 수 있다.

[0308] T 세포 활성화는 또한 가용성 사이토킨에 의해 조절되고, 항-CD40 항체는 예를 들어, T 세포 활성화를 억제하는 사이토킨의 길항제 또는 T 세포 활성화를 자극하는 사이토킨의 효능제와 함께 대상체에 투여될 수 있다.

[0309] 또 다른 구현예에서, 항-CD40 항체는 면역 반응을 자극하기 위해, 예를 들어, 증식성 질환, 예를 들어, 암을 치료하기 위해, (i) T 세포 활성화를 억제하는, IgSF 패밀리의 또는 B7 패밀리의 또는 TNF 패밀리의 단백질의 길항제 (또는 억제제 또는 차단제) 또는 T 세포 활성화를 억제하는 사이토킨 (예를 들어, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF; "면역억제 사이토킨")의 길항제 및/또는 (ii) T 세포 활성화를 자극하는, IgSF 패밀리의, B7 패밀리의 또는 TNF 패밀리의 또는 사이토킨의 자극 수용체의 효능제와 조합하여 사용될 수 있다.

[0310] 조합 요법을 위한 다른 제제는 대식세포 또는 단핵세포를 억제하거나 고갈시키는 제제를 포함하고, 상기 제제는

SF-1R 길항제, 예를 들어, RG7155 (W011/70024, W011/107553, W011/131407, W013/87699, W013/119716, W013/132044) 또는 FPA-008 (W011/140249; W013169264; W014/036357)을 포함하는 CSF-1R 길항제 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

- [0311] 항-CD40 항체는 또한 TGF- β 신호 전달을 억제하는 제제와 함께 투여될 수 있다.
- [0312] 항-CD40 항체와 조합될 수 있는 추가의 제제는 종양 항원 제공을 증진시키는 제제, 예를 들어, 수지상 세포 백신, GM-CSF 분비 세포 백신, CpG 올리고뉴클레오타이드, 및 이미쿠이모드, 또는 종양 세포의 면역원성을 증진시키는 요법(예를 들어, 안트라사이클린)을 포함한다.
- [0313] 항-CD40 항체와 조합될 수 있는 다른 요법은 Treg 세포를 고갈시키거나 차단시키는 요법, 예를 들어, CD25에 특이적으로 결합하는 제제를 포함한다.
- [0314] 항-CD40 항체와 조합될 수 있는 또 다른 요법은 인돌레아민 디옥시게나제 (IDO), 다이옥시게나제, 아르기나제 또는 산화질소 신타타제와 같은 대사 효소를 억제하는 요법이다.
- [0315] 항-CD40 항체와 함께 사용될 수 있는 또 다른 부류의 제제는 아데노신의 형성을 억제하거나 아데노신 A2A 수용체를 억제하는 제제를 포함한다.
- [0316] 암을 치료하기 위해 항-CD40 항체와 함께 조합될 수 있는 다른 요법은 T 세포 아네르기 또는 탈진을 역전하고/예방하는 요법 및 종양 부위에서 순수 면역 화령화 및/또는 염증을 유발하는 요법을 포함한다.
- [0317] 항-CD40 항체는 하나 이상의 면역-항암제와 조합될 수 있고, 예를 들어, 하기 중 하나 이상과 같은 면역 경로의 다중 요소들을 표적화하는 조합 접근법과 조합될 수 있다: 종양 항원 제공을 증진시키는 요법(예를 들어, 수지상 세포 백신, GM-CSF 분비 세포 백신, CpG 올리고뉴클레오타이드, 이미쿠이모드); 예를 들어, CTLA-4 및/또는 PD1/PD-L1/PD-L2 경로를 억제하고/하거나 Tregs 또는 다른 면역 억제 세포를 고갈시키거나 차단함에 의해 음성 면역 조절을 억제하는 요법; 예를 들어, CD-137, OX-40, 및/또는 GITR 경로를 자극하고/하거나 T 세포 이펙터 기능을 자극하는 효능제와 함께 양성 면역 조절을 자극하는 요법; 전신적으로 항-종양 T 세포의 빈도를 증가시키는 요법; 예를 들어, CD25의 길항제(예를 들어, 다클리주맵)을 사용하거나 생체의 항-CD25 비드 고갈에 의해 종양 내 Tregs와 같은 Tregs를 고갈시키거나 억제하는 요법; 종양 내 서프레스 골수 세포의 기능에 영향을 주는 요법; 종양 세포의 면역원성을 증진시키는 요법(예를 들어, 안트라사이클린); 유전학적으로 변형된 세포, 예를 들어, 키메라 항원 수용체에 의해 변형된 세포를 포함하는 적응성 T 세포 또는 NK 세포 전달(CAR-T 요법); 인돌아민 디옥시게나제 (IDO), 디옥시게나제, 아르기나제, 또는 산화질소 신타타제와 같은 대사 효소를 억제하는 요법; T 세포 아네르기 또는 탈진을 역전하고/예방하는 요법; 종양 부위에서 순수 면역 활성화 및/또는 염증을 유발하는 요법; 면역 자극 사이토킨의 투여; 또는 면역 억압 사이토킨의 차단.
- [0318] 본원에 기재된 효능제 항-CD40 항체는 양성 동시자극 수용체에 결합하는 하나 이상의 효능성 제제, 억제 수용체를 통해 신호 전달을 약독화시키는 차단제, 길항제, 및 전신적으로 항-종양 T 세포의 빈도를 증가시키는 하나 이상의 제제, 종양 미세환경 내 고유 면역 억제 경로를 극복하는 제제(예를 들어, 억제 수용체 관여를 차단하는 (예를 들어, PD-L1/PD-1 상호작용), Tregs를 고갈시키거나 억제하는 (예를 들어, 항-CD25 모노클로날 항체(예를 들어, 다클리주맵)를 사용하여 또는 생체의 항-CD25 비드 고갈), IDO와 같은 대사 효소를 억제하거나, T 세포 아네르기 또는 탈진을 역전시키고/예방하는) 및 종양 부위에서 순수 면역 활성화 및/또는 염증을 유발하는 제제와 함께 사용될 수 있다.
- [0319] 본원에서는 효능제 항-CD40 분자, 예를 들어, 항체, 및 하나 이상의 추가의 면역자극 항체, 예를 들어, 항-PD-1 길항제, 예를 들어, 길항제 항체, 항-PD-L1 길항제, 예를 들어, 길항제 항체, 길항제 항-CTLA-4 길항제, 예를 들어, 길항제 항체 및/또는 항-LAG3 길항제, 예를 들어, 길항제 항체를 대상체에 투여하여 면역 반응이 대상체에서 예를 들어, 종양 성장을 억제하거나 항-바이러스 반응을 자극하기 위해 자극되도록 함을 포함하는 대상체에서 면역 반응을 자극하기 위한 방법이 제공된다. 하나의 구현예에서, 추가의 면역자극 항체(예를 들어, 길항제 항-PD-1, 길항제 항-PD-L1, 길항제 항-CTLA-4 및/또는 길항제 항-LAG3 항체)는 인간 항체이다.
- [0320] 또한 본원에서는 효능제 항-CD40 항체 및 길항제 DP-1 항체를 대상체에게 투여함을 포함하는, 과증식성 질환(예를 들어, 암)을 치료하기 위한 방법이 제공된다. 하나의 구현예에서, 대상체는 인간이다. 또 다른 구현예에서, 항-PD-1 항체는 인간 서열 단일클론 항체이고 항-CD40 항체는 인간 서열 단일클론 항체, 예를 들어, 본원에 기재된 3C3 및 3G5의 CDR 또는 가변 영역을 포함하는 항체 또는 본원에 기재된 또 다른 효능제 항-CD40 항체이다.

- [0321] 본원에 기재된 방법에 사용하기 위해 적합한 PD-1 길항제는 제한 없이 리간드, 항체(예를 들어, 단일클론 항체 및 이특이적 항체), 및 다가 제제를 포함한다. 하나의 구현예에서, PD-1 길항제는 융합 단백질, 예를 들어, Fc 융합 단백질, 예를 들어 AMP-244이다. 하나의 구현예에서, PD-1 길항제는 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체이다.
- [0322] 예시적 항-PD-1 항체는 니블루맵(BMS-936558) 또는 WO 2006/121168에 기재된 항체 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 7D3, 5F4 및 4A11의 하나의 CDR 또는 가변 영역을 포함하는 항체이다. 특정 구현예에서, 항-PD1 항체는 WO2012/145493에 기재된 MK-3475 (람브롤리주맵); 및 WO 2012/145493에 기재된 AMP-514이다. 추가의 공지된 PD-1 항체 및 다른 PD-1 억제제는 WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009/114335, WO 2011/066389, WO 2011/161699, WO 2012/145493, 미국 특허 제7,635,757호 및 제8,217,149호, 및 미국 특허 공개번호 제 2009/0317368호에 기재된 것들을 포함한다. WO2013/173223에 개시된 임의의 항-PD-1 항체가 또한 사용될 수 있다. 이들 항체 중 하나와 동일한 PD-1 상의 에피토프에 결합하는 것에 대해 경쟁하고/하거나 결합하는 항-PD-1 항체가 또한 조합 치료에 사용될 수 있다. PD-1 수용체를 표적화하기 위한 또 다른 접근법은 AMP-224로 불리는 IgG1의 Fc 부분과 융합된 PD-L2 (B7-DC)의 세포외 도메인으로 구성된 재조합 단백질이다.
- [0323] 본원에서는 효능제 항-CD40 항체 및 길항제 DP-L1 항체를 대상체에게 투여함을 포함하는, 과증식성 질환(예를 들어, 암)을 치료하기 위한 방법이 제공된다. 하나의 구현예에서, 대상체는 인간이다. 또 다른 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 인간 서열 단일클론 항체이고 항-CD40 항체는 인간 서열 단일클론 항체, 예를 들어, 본원에 기재된 3C3 및 3G5의 CDR 또는 가변 영역을 포함하는 항체 또는 본원에 기재된 또 다른 효능제 항-CD40 항체이다.
- [0324] 하나의 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 BMS-936559(WO 2007/005874 및 미국 특허 제7,943,743호에서 12A4로서 언급됨), 또는 PCT 공보 WO 07/005874 및 미국 특허 제7,943,743호에 기재된 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 및 13G4의 CDR 또는 가변 영역을 포함하는 항체이다. 특정 구현예에서 항-PD-L1 항체는 MEDI4736(또한 항-B7-H1로서 공지된), MPDL3280A (또한 RG7446으로서 공지된), MSB0010718C (WO2013/79174), 또는 rHigM12B7이다. WO2013/173223, WO2011/066389, WO2012/145493, 미국 특허 제 7,635,757호 및 제8,217,149호 및 미국 공개 번호 제2009/145493호에 개시된 임의의 항-PD-L1 항체가 또한 사용될 수 있다. 이들 항체 중 하나의 것과 동일한 PD-L1 상의 에피토프에 결합하는 것에 대해 경쟁하고/하거나 결합하는 항-PD-L1 항체가 또한 조합 치료에 사용될 수 있다.
- [0325] 본원에서는 효능제 본원에 기재된 항-CD40 항체 및 CTLA-4 길항제 항체를 대상체에게 투여함을 포함하는, 과증식성 질환(예를 들어, 암)을 치료하기 위한 방법이 제공된다. 하나의 구현예에서, 대상체는 인간이다. 또 다른 구현예에서, 항-CTLA-4 항체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체이다: YervoyTM(이필리무맵 또는 항체 10D1, PCT 공보 WO 01/14424호에 기재됨), 트레멜리무맵(이전에 티실리무맵, CP-675,206), 하기의 임의의 공개 문헌에 기재된 단일클론 또는 항-CTLA-4 항체: WO 98/42752; WO 00/37504; 미국 특허 제6,207,156호; Hurwitz et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(17):10067-10071; Camacho et al. (2004) *J. Clin. Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675206); and Mokyr et al. (1998) *Cancer Res.* 58:5301-5304. WO2013/173223에 기재된 임의의 항-CTLA-4 항체가 또한 사용될 수 있다.
- [0326] 본원에서는 항-CD40 항체 및 항-LAG-3 항체를 대상체에게 투여함을 포함하는, 과증식성 질환(예를 들어, 암)을 치료하기 위한 방법이 제공된다. 하나의 구현예에서, 대상체는 인간이다. 또 다른 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 인간 서열 단일클론 항체이고 항-CD40 항체는 인간 서열 단일클론 항체, 예를 들어, 본원에 기재된 3C3 또는 3G5의 CDR 또는 가변 영역을 포함하는 항체 또는 본원에 기재된 또 다른 효능제 항-CD40 항체이다. 항-LAG3 항체의 예는 미국 특허 공개 번호 제US2011/0150892호, WO10/19570 및 WO2014/008218에 기재된 항체 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 또는 17E5의 CDR 또는 가변 영역을 포함하는 항체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 항-LAG-3 항체는 BMS-986016이다. 사용될 수 있는 다른 당업계에 인지된 항-LAG-3 항체는 US 2011/007023, WO08/132601, 및 WO09/44273에 기재된 IMP731 및 IMP-321를 포함한다. 이들 항체 중 하나의 것과 동일한 LAG-3 상의 에피토프에 결합하는 것에 대해 경쟁하고/하거나 결합하는 항-PD-L1 항체가 또한 조합 치료에 사용될 수 있다.
- [0327] 본원에 기재된 항-CD40 항체 및 LAG-3 및/또는 CTLA-4 및/또는 PD-1 및/또는 PD-L1과 같은 하나 이상의 제2 표적 항원에 대한 길항제, 예를 들어, 길항제 항체의 투여는 환자에서 암성 세포에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있다. 본원의 개시내용의 항체를 사용하여 이의 성장이 억제될 수 있는 암은 전형적으로 면역요법에 반응하는 암 및 전형적으로 면역요법에 반응하지 않는 것들을 포함한다. 본원의 개시내용의 조합 요법과 함께 치료하기 위한 암의 대표적인 예는 본원에 열거된 암을 포함한다.

- [0328] 특정 구현예에서, 본원에 논의된 치료학적 항체의 조합은 약제학적으로 허용되는 담체 중 단일 조성물로서 동시에 또는 약제학적 허용되는 담체 중 각각의 항체와 별도의 조성물로서 동시에 투여될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 치료학적 항체의 조합은 연속적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 항-CTLA-4 항체 및 항-CD40 항체는 연속적으로 투여될 수 있고, 예를 들어, 항-CTLA-4 항체는 첫번째로 투여되고 항-CD40 항체는 2번째로 투여되거나 항-CD40 항체는 첫번째로 투여되고 항-CTLA-4 항체는 2번째로 투여된다. 추가로 또는 대안적으로, 항-PD-1 항체 및 항-CD40 항체는 연속적으로 투여될 수 있고, 예를 들어, 항-PD-1 항체는 첫번째로 투여되고 항-CD40 항체는 2번째로 투여되거나 항-CD40 항체는 첫번째로 투여되고 항-PD-1 항체는 2번째로 투여된다. 추가로 또는 대안적으로, 항-PD-L1 항체 및 항-CD40 항체는 연속적으로 투여될 수 있고, 예를 들어, 항-PD-L1 항체는 첫번째로 투여되고 항-CD40 항체는 2번째로 투여되거나 항-CD40 항체는 첫번째로 투여되고 항-PD-L1 항체는 2번째로 투여된다. 추가로 또는 대안적으로, 항-LAG-3 항체 및 항-CD40 항체는 연속적으로 투여될 수 있고, 예를 들어, 항-LAG-3 항체는 첫번째로 투여되고 항-CD40 항체는 2번째로 투여되거나 항-CD40 항체는 첫번째로 투여되고 항-LAG-3 항체는 2번째로 투여된다.
- [0329] 추가로, 하나 이상의 조합 요법의 용량이 연속적으로 투여되는 경우, 연속 투여의 순서는 각각의 투여 시점에서 역전되거나 동일한 순서로 유지될 있고, 연속 투여는 동시 투여와 조합될 수 있거나 이의 임의의 조합일 수 있다. 예를 들어, 조합 항-CTLA-4 항체 및 항-CD40 항체의 제1 투여는 동시일 수 있고, 제2 투여는 항-CTLA-4 항체를 첫번째로 그리고 항-CD40 항체를 두번째로 하는 등으로 연속적일 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 조합 항-PD-1 항체 및 항-CD40 항체의 제1 투여는 동시일 수 있고, 제2 투여는 항-PD-1 항체를 첫번째로 그리고 항-CD40 항체 두번째로 하여 연속적일 수 있고 제3 투여는 항-CD40 항체를 첫번째로 그리고 항-PD-1 항체를 2번째로 하는 등으로 연속적일 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 조합 항-PD-L1 항체 및 항-CD40 항체의 제1 투여는 동시일 수 있고, 제2 투여는 항-PD-L1 항체를 첫번째로 그리고 항-CD40 항체 두번째로 하여 연속적일 수 있고 제3 투여는 항-CD40 항체를 첫번째로 그리고 항-PD-L1 항체를 2번째로 하는 등으로 연속적일 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 조합 항-LAG-3 항체 및 항-CD40 항체의 제1 투여는 동시일 수 있고, 제2 투여는 항-LAG-3 항체를 첫번째로 그리고 항-CD40 항체 두번째로 하여 연속적일 수 있고 제3 투여는 항-CD40 항체를 첫번째로 그리고 항-LAG-3 항체를 2번째로 하는 등으로 연속적일 수 있다. 또 다른 대표적인 투여 계획은 항-CD40를 첫번째로 그리고 항-CTLA-4 항체(및/또는 항-PD-1 항체 및/또는 항-PD-L1 항체 및/또는 항-LAG-3 항체)를 두번째로 하여 연속적인 제1 투여를 포함할 수 있고 연속 투여는 동시일 수 있다.
- [0330] 하나의 구현예에서, 면역계의 자극이 이득이 될 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 앓는 대상체는 항-CD40 항체 및 면역-항암제를 상기 대상체에 투여함에 의해 치료되고, 여기서, 상기 면역-항암제는 CD137(4-1BB) 효능제, 예를 들어, 효능성 CD137 항체이다. 적합한 CD137 항체는 예를 들어, 우렐루맵 또는 PF-05082566 (W012/32433)이다.
- [0331] 하나의 구현예에서, 면역계의 자극이 이득이 될 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 앓는 대상체는 항-CD40 항체 및 면역-항암제를 상기 대상체에 투여함에 의해 치료되고, 여기서, 상기 면역-항암제는 OX40 효능제, 예를 들어, 효능성 OX40 항체이다. 적합한 OX40 항체는, 예를 들어 MEDI-6383, MEDI-6469 또는 MOXR0916(RG7888; W006/029879)을 포함한다.
- [0332] 하나의 구현예에서, 면역계의 자극이 이득이 될 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 앓는 대상체는 항-CD40 항체 및 면역-항암제를 상기 대상체에 투여함에 의해 치료되고, 여기서, 상기 면역-항암제는 제2 CD40 효능제, 예를 들어, 또 다른 효능성 CD40 항체이다.
- [0333] 하나의 구현예에서, 면역계의 자극이 이득이 될 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 앓는 대상체는 항-CD40 항체 및 면역-항암제를 상기 대상체에 투여함에 의해 치료되고, 여기서, 상기 면역-항암제는 CD27 효능제, 예를 들어, 효능성 CD27 항체이다. 적합한 CD27 항체는 예를 들어, 바를리루맵(CDX-1127)을 포함한다.
- [0334] 하나의 구현예에서, 면역계의 자극이 이득이 될 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 앓는 대상체는 항-CD40 항체 및 면역-항암제를 상기 대상체에 투여함에 의해 치료되고, 여기서, 상기 면역-항암제는 MGA271(B7H3에 대한) (W011/109400)이다.
- [0335] 하나의 구현예에서, 면역계의 자극이 이득이 될 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 앓는 대상체는 항-CD40 항체 및 면역-항암제를 상기 대상체에 투여함에 의해 치료되고, 여기서, 상기 면역-항암제는 KIR 길항제, 예를 들어, 리릴루맵이다.
- [0336] 하나의 구현예에서, 면역계의 자극이 이득이 될 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 앓는 대상체

는 항-CD40 항체 및 면역-항암제를 상기 대상체에 투여함에 의해 치료되고, 여기서, 상기 면역-항암제는 IDO 길항제이다. 적합한 IDO 길항제는 예를 들어 INCB-024360(WO2006/122150, WO07/75598, WO08/36653, WO08/36642), 인독시모드, NLG-919(WO09/73620, WO09/1156652, WO11/56652, WO12/142237) 또는 F001287을 포함한다.

[0337] 하나의 구현예에서, 면역계의 자극이 이득이 될 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 앓는 대상체는 항-CD40 항체 및 면역-항암제를 상기 대상체에 투여함에 의해 치료되고, 여기서, 상기 면역-항암제는 toll형 수용체 효능제, 예를 들어, TLR2/4 효능제(예를 들어, 바실러스 칼메트-구에린(*Bacillus Calmette-Guerin*); TLR2 효능제(예를 들어, 힐토놀 또는 이미쿠이모드); TLR7/8 효능제(예를 들어, 레시쿠이모드); 또는 TLR9 효능제(예를 들어, CpG7909)이다.

[0338] 하나의 구현예에서, 면역계의 자극이 이득이 될 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 앓는 대상체는 항-CD40 항체 및 면역-항암제를 상기 대상체에 투여함에 의해 치료되고, 여기서, 상기 면역-항암제는 TGF- β 억제제, 예를 들어, GC1008, LY2157299, TEW7197, 또는 IMC-TR1이다.

[0339] 하나의 양상에서, 항-CD40 항체는 제2 제제, 예를 들어, 면역-항암제의 투여 전에 연속적으로 투여된다. 하나의 양상에서, 항-CD40 항체는 제2 제제, 예를 들어, 면역-항암제와 동시에 투여된다. 여전히 하나의 양상에서, 항-CD40 항체는 제2 제제의 투여 후 연속적으로 투여된다. 2개의 제제의 투여는 예를 들어, 30분, 60분, 90분, 120분, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간, 36시간, 48시간, 3일, 5일, 7일, 또는 몇주 이상 이격된 시점에서 개시할 수 있거나, 제2 제제의 투여는 예를 들어, 제1 제제를 투여한지 예를 들어, 30분, 60분, 90분, 120분, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간, 36시간, 48시간, 3일, 5일, 7일 또는 몇주 이상 후에 개시할 수 있다.

[0340] 특정 양상에서, 항-CD40 항체 및 제2 제제, 예를 들어, 면역-항암제는 동시 투여되고, 예를 들어, 30 내지 60분의 시간 동안 환자에게 동시에 주입된다. 대안적으로, 항-CD40 항체는 제2 제제, 예를 들어, 면역-항암제와 함께 동시에 제형화될 수 있다.

[0341] 임의로, 항-CD40은 유일한 면역치료제로서 또는 항-CD40 항체의 조합으로서 투여될 수 있고 하나 이상의 추가의 면역치료학적 항체(예를 들어, 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 및/또는 항-LAG-3 항체)는 추가로 면역원성 제제, 예를 들어, 암성 제제, 정제된 종양 항원(재조합 단백질, 펩타이드 및 탄수화물 분자를 포함하는), 세포 및 면역 자극 사이토킨을 암호화하는 유전자로 형질감염된 세포와 추가로 조합될 수 있다(He et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). 사용될 수 있는 종양 백신의 비제한적인 예는 흑색종 항원의 펩타이드, 예를 들어, gp100, MAGE 항원, Trp-2, MART1의 펩타이드 또는 사이토킨 GM-CSF를 발현하도록 형질감염된 종양 세포(하기에서 추가로 논의된)를 포함한다. 항-CD40 항체 및 하나 이상의 추가의 항체(예를 들어, 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 및/또는 항-LAG-3 항체)는 또한 표준 암 치료와 추가로 조합될 수 있다. 예를 들어, 항-CD40 항체 및 하나 이상의 추가의 항체(예를 들어, 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 및/또는 항-LAG-3 항체)는 화학치료학적 용법과 효과적으로 조합될 수 있다. 이들 경우에, 본원에 개시된 것들과의 조합으로 투여되는 다른 화학치료학적 시약의 용량을 감소시킬 수 있다(Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). 상기 조합의 예는 흑색종의 치료를 위해 데카바진과 조합된 항-CD40 효능제 항체의 조합(추가 항체, 예를 들어, 항-CTLA-4 항체 및/또는 항-PD-1 항체 및/또는 항-PD-L1 항체 및/또는 항-LAG-3 항체의 존재 또는 부재)이다. 또 다른 예는 흑색종의 치료를 위해 인터류킨-2(IL-2)와 조합된 항-CD40 항체의 조합(항-CTLA-4 항체 및/또는 항-PD-1 항체 및/또는 항-PD-L1 항체 및/또는 LAG-3 항체의 존재 또는 부재)이다. 항-CD40 항체 및 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 및/또는 항-LAG-3 항체와 화학요법의 조합된 용도 이상의 과학적 이상적인 것은 대부분의 화학치료학적 화합물의 세포독성 작용의 결과인 세포 사멸이 항원 제공 경로에서 종양 항원의 증가된 수준을 유도해야만 한다는 것이다. 다른 조합 치료요법은 항-CD40 항체와 상승작용을 유도할 수 있는 다른 조합 요법(항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 및/또는 항-LAG-3 항체의 존재 또는 부재)은 방사선, 수술 또는 호르몬 상실을 포함한다. 이들 프로토콜 각각은 숙주 내 종양 항원의 공급원을 생성시킨다. 혈관형성 억제제는 또한 조합된 항-CD40 항체 및 항-CTLA-4 항체 및/또는 항-PD-1 항체 및/또는 항-PD-L1 항체 및/또는 항-LAG-3 항체와 조합될 수 있다. 혈관형성의 억제는 숙주 항원 제공 경로로 공급되는 종양 항원의 공급원일 수 있는 종양 세포사를 유도한다.

[0342] 유일한 면역치료제로서 또는 CD40 효능제 및 CTLA-4 및/또는 PD-1 및/또는 PD-L1 및/또는 LAG-3 차단 항체의 조합으로서 항-CD40 효능제 항체는 또한 Fc α 또는 Fc γ 수용체-발현 이펙터 세포를 종양 세포로 표적화하는 이특이적 항체와 조합하여 사용될 수 있다(문헌참조: 예를 들어, 미국 특허 제5,922,845호 및 제5,837,243호). 이 특이적 항체는 2개의 별도의 항원을 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 이들 반응의 T 세포 아암은 조합된 항-

CD40 항체 및 항-CTLA-4 항체 및/또는 항-PD-1 항체 및/또는 항-PD-L1 항체 및/또는 항-LAG-3 항체의 사용에 의해 증강된다.

- [0343] 또 다른 예에서, 유일한 면역치료제 또는 항-CD40 항체 및 추가의 면역자극제의 조합, 예를 들어, 항-CTLA-4 항체 및/또는 항-PD-1 항체 및/또는 항-PD-L1 항체 및/또는 LAG-3 제제, 예를 들어, 항체로서의 항-CD40 효능제 항체는 항-신생물 항체, 예를 들어 Rituxan®(리투시맵), Herceptin®(트라스투주맵), Bexxar®(토시투모맵), Zevalin®(이브리투모맵), Campath®(알렘투주맵), Lymphocide®(에프르투주맵), Avastin®(베바시주맵), 및 Tarceva®(에틀로니닙), 등과 함께 사용될 수 있다. 예를 들어 및 이론에 의해 제한하려는 것은 아니지만, 항-암 항체 또는 독소에 접합된 항-암 항체를 사용한 치료는 면역자극제, 예를 들어, CD40, CTLA-4, PD-1, PD-L1 또는 LAG-3 제제, 예를 들어, 항체에 의해 매개된 면역 반응을 강화시키는 암 세포사(예를 들어, 종양 세포)를 유도할 수 있다. 예시적 구현예에서, 과증식성 질환(예를 들어, 암 종양)의 치료는 숙주에 의한 항-종양 면역 반응을 강화시킬 수 있는, 항-CD40 및 임의로 추가의 면역자극제, 예를 들어 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 및/또는 항-LAG-3 제제, 예를 들어, 항체와 동시에 또는 연속적으로 또는 이들의 조합으로 조합된 항-암 제제, 예를 들어, 항체를 포함할 수 있다.
- [0344] 종양은 다양한 기작에 의해 숙주 면역 감시를 회피한다. 많은 이들 기작은 종양에 의해 발현되고 면역억제성인 단백질의 불활성화에 의해 극복될 수 있다. 이들은 무엇 보다 TGF- β (Kehrl et al. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10(Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), 및 Fas 리간드(Hahne et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365)를 포함한다. 이들 실제 각각에 대한 항체는 추가의 면역자극제, 예를 들어, 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 및/또는 항-LAG-3 제제, 예를 들어, 항체의 존재 또는 부재하에 항-CD40 항체와 추가로 조합되어 면역억제제의 효과에 대응하고 숙주에 의한 항-종양 면역 반응을 선호하게 할 수 있다.
- [0345] 숙주 면역 반응을 활성화시키기 위해 사용될 수 있는 다른 제제, 예를 들어, 항체는 추가로 추가의 면역자극제, 예를 들어, 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 및/또는 항-LAG-3 항체의 존재 또는 부재하에 항-CD40 항체와 조합하여 사용될 수 있다. 이들은 DC 기능 및 항원 제공을 활성화시키는 수지상 세포의 표면 상의 분자를 포함한다. 항-CD40 항체(Ridge et al., supra)는 항-CD40 항체 및 임의로 추가의 면역자극제, 예를 들어, 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 및/또는 항-LAG-3 제제, 예를 들어, 항체와 함께 사용될 수 있다. T 세포 동시 자극 분자에 대한 다른 활성화 항체(Weinberg et al., supra, Melero et al. supra, Hutloff et al., supra)는 또한 T 세포 활성화의 증가된 수준을 제공할 수 있다.
- [0346] 상기 논의된 바와 같이, 골수 이식은 현재 다양한 조혈 기원의 종양을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 단독의 또는 항-CTLA-4 항체 및/또는 항-PD-1 항체 및/또는 항-PD-L1 항체 및/또는 항-LAG-3 항체와 조합된 항-CD40 면역요법을 사용하여 공여자 접목된 종양 특이적 T 세포의 효과를 증가시킬 수 있다.
- [0347] 여러 실험적 치료 프로토콜은 생체의 활성화 및 항원 특이적 T 세포의 확대 및 이들 세포의 수용자로의 적응성 전달에 관여하여 종양에 대한 항원-특이적 T 세포를 증가시킬 수 있다(Greenberg & Riddell, supra). 이들 방법을 또한 사용하여 CMV와 같은 감염성 제제에 대한 T 세포 반응을 활성화시킬 수 있다. 항-CD40의 존재하에 추가의 면역자극 요법, 예를 들어, 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 및/또는 항-LAG-3 항체와 함께 또는 이것 없이 생체의 활성화는 적응적으로 전달된 T 세포의 빈도 및 활성을 증가시킬 것으로 예상될 수 있다.
- [0348] 본원에서는 면역자극제를 사용한 과증식성 질환(예를 들어, 암)과 연관된 부작용을 변화시키기 위한 방법이 제공되고, 상기 방법은 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 및/또는 항-LAG-3 제제, 예를 들어, 항체의 존재 또는 부재하에 항-CD40 항체를 대상체에게 투여함을 포함한다. 예를 들어, 본원에 기재된 항체는 비-흡수성 스테로이드를 환자에게 투여함에 의해 면역자극 치료학적 항체-유도된 장염 또는 설사의 발병률을 감소시키는 방법을 제공한다. 본원에 사용된 바와 같은 "비-흡수성 스테로이드"는 확장성 제1 통과 대사를 나타내어 간에서 대사 후 스테로이드의 생물유용성이 낮고, 즉 약 20% 미만이도록 하는 글루코코르티코이드이다. 본원에 기재된 하나의 구현예에서, 비-흡수성 스테로이드는 부데소니드이다. 부데소니드는 국부적으로 작용하는 글루코코르티코스테로이드이고 이는 경구 투여 후 주로 간에 의해 광범위하게 대사된다. ENTOCORT EC®(아스트라-제네카)는 약물의 회장으로 및 결장 전반으로의 전달을 최적화하기 위해 개발된 부데소니드의 pH- 및 시간-의존적 경구 제형이다. ENTOCORT Ec®는 회장 및/또는 상부 결장을 포함하는 약하거나 중간 정도의 크론 질환의 치료를 위해 미국에서 승인되었다. 크론 질환의 치료를 위한 ENTOCORT Ec®의 통상의 경구 투여량은 6 내지 9 mg/일이다. ENTOCORT Ec®는 흡수되기 전에 장에서 방출되고 관 점막에서 보유된다. 일단 이것이 내장 점막 표적 조직을 통과하면, ENTOCORT Ec®는 간에서 시토크롬 P450 시스템에 의해 무시할만한 글루코코르티코이드 활성을

갖는 대사물로 광범위하게 대사된다. 따라서, 생물유용성은 낮다(약 10%). 부테소니드의 낮은 생물유용성은 덜 광범위한 제1-통과 대사를 갖는 글루코코르티코이드와 비교하여 개선된 치료학적 비율을 유도한다. 부테소니드는 전신적 작용 코르티코스테로이드 보다 덜한 시상하부-뇌하수체 억제제를 포함하는 보다 소수의 부작용을 유도한다. 그러나, ENTOCORT Ec®의 만성 투여는 부신피질항진증 및 부신 억제와 같은 전신 글루코코르티코이드 효과를 유도할 수 있다. 문헌(PDR 58th ed. 2004; 608-610)을 참조한다.

[0349] 여전히 추가의 구현예에서, 면역자극 치료학적 항체 항-CD40 및 임의로 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 및/또는 항-LAG-3 항체의 존재 또는 부재하에, 비-흡수성 스테로이드와 연계된 항-CD40 항체는 추가로 살리실레이트와 조합될 수 있다. 살리실레이트는 예를 들어, 다음과 같은 5-ASA 제제를 포함한다: 설파살라진 (AZULFIDINE®, Pharmacia & UpJohn); 올살라진 (DIPENTUM®, Pharmacia & UpJohn); 발살라지드(COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.); 및 메살라민 (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA®, Shire US; CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA®, Solvay).

[0350] 본원에 기재된 방법에 따라, 살리실레이트는 면역자극 항체에 의해 유도된 장염의 발병률을 감소시키는 목적을 위해 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 및/또는 LAG-3 항체의 존재 또는 부재하에 항-CD40, 및 비-흡수성 스테로이드와 조합하여 투여된다. 따라서, 예를 들어, 본원에 기재된 면역자극 항체에 의해 유도된 장염의 발병률을 감소시키기 위한 방법은 살리실레이트 및 비-흡수성 물질을 동시에 또는 연속으로(예를 들어, 살리실레이트는 비-흡수성 스테로이드 후 6시간 켜에 투여된다) 또는 이들의 조합으로 투여함을 포함한다. 추가로, 살리실레이트 및 비-흡수성 스테로이드는 동일한 경로에 의해(예를 들어, 2개는 경구로 투여된다) 또는 상이한 경로에 의해(예를 들어, 살리실레이트는 경구로 투여되고 비-흡수성 스테로이드는 직장으로 투여된다) 투여될 수 있고, 이것은 항-CD40 및 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 및/또는 항-LAG-3 항체를 투여하기 위해 사용되는 경로(들)과는 상이할 수 있다.

[0351] 본원에 기재된 항-CD40 항체 및 조합 항체 요법은 또한 치료될 징후 (예를 들어, 암)에 대한 이들의 특정 유용성 때문에 선택된 다른 널리 공지된 요법과 함께 사용될 수 있다. 본원에 기재된 항-CD40 항체의 조합은 공지된 약제학적으로 허용되는 제제(들)과 연속적으로 사용될 수 있다.

[0352] 예를 들어, 본원에 기재된 항-CD40 항체 및 조합 항체 요법은 추가의 치료, 예를 들어 조사, 화학요법(예를 들어, 캄포테신(CPT-11), 5-플루오로우라실 (5-FU), 시스플라틴, 독소루비신, 이리노테칸, 파클리탁셀, 겐시타빈, 시스플라틴, 파클리탁셀, 카보플라틴-파클리탁셀(탁솔), 독소루비신, 5-fu, 또는 캄프토테신 + apo21/TRAIL(6X 콤보)을 사용하여), 하나 이상의 프로테아좀 억제제(예를 들어, 보르테조미드 또는 MG132), 하나 이상의 Bcl-2 억제제(예를 들어, BH3I-2'(bcl-x1 억제제), 인돌아민 디옥시게나제-1 억제제(예를 들어, INCB24360, 인독시모드, NLG-919, 또는 F001287), AT-101 (R-(-)-고시폴 유도체), ABT-263 (소분자), GX-15-070 (오바토클렉스), 또는 MCL-1 (골수 백혈병 세포 분화 단백질-1) 길항제), iAP (아포토시스 단백질의 억제제) 길항제(예를 들어, smac7, smac4, 소분자 smac 모사체, 합성 smac 펩타이드(Fulda *et al.*, *Nat Med* 2002;8:808-15), ISIS23722 (LY2181308), 또는 AEG-35156 (GEM-640)), HDAC (히스톤 데아세틸라제) 억제제, 항-CD20 항체(예를 들어, 리툽시맵), 혈관형성 억제제(예를 들어, 베바시주맵), VEGF 및 VEGFR을 표적화하는 항-혈관형성 제제(예를 들어, 아바스틴), 합성 트립테르페노이드(Hyer *et al.*, *Cancer Research* 2005;65:4799-808), c-FLIP(세포 FLICE-억제 단백질) 조절제(예를 들어, PPAR γ 의 천연 및 합성 리간드 (피옥시좀 증식인자-활성화된 수용체 γ), 5809354 또는 5569100), 키나제 억제제(예를 들어, 소라페닙), 트라스투주맵, 세톡시맵, 템시롤리무스, mTOR 억제제, 예를 들어, 라파마이신 및 템시롤리무스, 보르테조미드, JAK2 억제제, HSP90 억제제, PI3K-AKT 억제제, 레날틸도미드, GSK3 β 억제제, IAP 억제제 및/또는 유전자독성 약물과 조합하여(예를 들어, 동시에 또는 별도로) 사용될 수 있다.

[0353] 본원에 기재된 항-CD40 항체 및 조합 항체 요법은 추가로 하나 이상의 항-증식 세포독성 제제와 조합하여 사용될 수 있다. 항-증식성 세포독성 제제로서 사용될 수 있는 화합물 부류는 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다:

[0354] 알킬화제(제한 없이 질소 머스타드, 에틸렌이민 유도체, 알킬 설포네이트, 니트로소우레아 및 트리아젠): 우라실 머스타드, 클로르메틴, 사이클로포스파미드 (CYTOXANTM) 포스파미드, 멜팔란, 클로람부실, 피포브로만, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌티오포스포르아민, 부설판, 카무스틴, 로무스틴, 스트렙토조신, 다카바진, 및 테모졸로미드.

[0355] 항대사물(제한 없이, 폴산 길항제, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체 및 아데노신 데아미나제 억제제): 메토트렉세

이트, 5-플루오로우라실, 플록스우리딘, 시타라빈, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 플루다라빈 포스페이트, 펜토스타틴, 및 겐시타빈.

[0356] 효능제 항-CD40 항체와 조합하기 위해 적합한 항-증식 제제는 제한 없이 탁산, 파클리탁셀(파클리탁셀은 상업적으로 TAXOLTM로서 가용하다), 도세탁셀, 디스코데르몰리드(DDM), 디티오스타틴(DCT), 펠로루시드 A, 에포틸론, 에포틸론 A, 에포틸론 B, 에포틸론 C, 에포틸론 D, 에포틸론 E, 에포틸론 F, 푸라노에포틸론 D, 테스옥시에포틸론 B1, [17]-데하이드로테스옥시에포틸론 B, [18]데하이드로테스옥시에포틸론 B, C12,13-사이클로프로필-에포틸론 A, C6-C8 브릿지된 에포틸론 A, 트랜스-9,10-데하이드로에포틸론 D, 시스-9,10-데하이드로에포틸론 D, 16-테스메틸에포틸론 B, 에포틸론 B10, 디스코데르몰리드, 파투필론(EPO-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, ABJ-789, XAA296A(디스코데르몰리드), T2T-1027(소글리도틴), ILX-651(타시도틴 하이드로클로라이드), 할리콘드린 B, 에리볼린 메실레이트(E-7389), 헤미아스테를린(HTI-286), E-7974, 시르프토피신스, LY-355703, 메이트랜스 이노이드 변역접합체(DM-1), MKC-1, ABT-751, T1-38067, T-900607, SB-715992(이스피네시집), SB-743921, MK-0731, STA-5312, 엘레우테로빈, 17베타-아세톡시-2-에톡시-6-옥소-B-호모-에스트라-1,3,5(10)-트리엔-3-올, 사이클로스트렙틴, 이솔라울리말리드, 라울리말리드, 4-에피-7-데하이드록시-14,16-디테메틸-(+)-디스코데르몰리드, 및 크립토티론 1, 및 당업계에 공지된 다른 마이크로튜불린 안정화제를 포함한다.

[0357] 비정상적 증식성 세포를 본원에 기재된 항-CD40 항체와 연계하거나 이를 사용한 치료 전에 잠재우는 것이 요구될 수 있는 경우에, 호르몬 및 스테로이드(합성 유사체를 포함하는), 예를 들어, 17a-에티닐에스트라디올, 디에틸stil베스트롤, 테스토스테론, 프레드니손, 플루옥시메스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 테스톨락톤, 메게스트롤아세테이트, 메틸프레드니솔론, 메틸-테스토스테론, 프레드니솔론, 트리암시놀론, 클로로트리아니센, 하이드록시프로게스테론, 아미노글루테티미드, 에스트라무스틴, 메드록시프로게스테론아세테이트, 류프롤리드, 플루타미드, 토레미펜, ZOLADEXTM은 또한 환자에게 투여될 수 있다. 본원에 기재된 방법 또는 조성물을 사용하는 경우, 임상 세팅에서 종양 성장 또는 전이에 사용되는 다른 제제, 예를 들어, 항모사제는 또한 요구되는 경우 투여될 수 있다.

[0358] 화학치료제의 안전하고 효과적인 투여 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 추가로, 이들의 투여는 표준 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 많은 화학치료제의 투여는 문헌(Physicians' Desk Reference (PDR), e.g., 1996 edition (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA); 이의 내용은 본원에 참조로 인용된다)에 기재되어 있다.

[0359] 화학치료제(들) 및/또는 방사선 요법은 당업계에 널리 공지된 치료학적 프로토콜에 따라 투여될 수 있다. 화학치료제(들) 및/또는 방사선 요법이 치료될 질환 및 화학치료제(들)의 공지된 효과 및/또는 상기 질환에 대한 방사선 요법에 따라 다양할 수 있음은 당업자에게 자명하다. 또한, 당업자의 지식에 따라, 치료학적 프로토콜(예를 들어, 투여량 및 시간)은 환자에게 투여된 치료제의 관찰된 효과의 측면 및 상기 투여된 치료제에 대한 질환의 관찰된 반응의 측면에서 다양할 수 있다.

[0360] VI. 결과

[0361] 본원의 실시예에 나타난 바와 같이, 항-CD40 항체와 하나 이상의 추가의 치료제(예를 들어, 가용성 CD40 리간드 또는 또 다른 항체, 예를 들어, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA-4 항체, 및/또는 항-LAG-3 항체)의 동시 투여는 단독으로 또는 항체 요법의 부재하에 하나 이상의 추가의 치료제를 사용한 항체와의 치료와 비교하여 개선된 효능을 제공한다. 바람직하게, 항-CD40 항체와 하나 이상의 추가의 치료제의 조합은 치료학적 상승작용을 나타낸다.

[0362] "치료학적 상승작용"은 치료제의 조합을 사용한 환자의 치료가 이의 최적의 용량을 사용되는 조합의 각각의 개별 성분에게 의해 성취되는 결과 보다 치료학적으로 우수한 결과를 나타내는 경우의 현상을 언급한다(T. H. Corbett et al., 1982, Cancer Treatment Reports, 66, 1187). 이와 관련하여, 치료학적으로 우수한 결과는 환자가 a) 조합의 개별 성분들이 각각 단독요법으로서 조합에서와 같이 동일한 용량으로 투여되는 경우와 동일하거나 보다 큰 치료학적 이득을 받으면서 부작용의 덜한 발병률을 나타내거나, b) 각각의 성분이 개별 성분들로서 투여되는 바와 같이 조합(들)에서 동일한 용량으로 투여되는 경우 조합의 각각의 개별 성분을 사용한 치료의 것 보다 큰 치료학적 이득을 받으면서 용량-제한 독성을 나타내지 않는 결과이다. 이중이식편 모델에서, 성분의 각각이 일반적으로 이의 개별 최대 관용성 용량을 초과하지 않는 이의 최대 관용성 용량으로 사용되는 조합은 예를 들어, 종양 성장에서의 감소가 조합이 단독으로 투여되는 경우 최상의 성분의 종양 성장에서의 감소 값 보다 큰 조합의 투여에 의해 성취되는 경우 치료학적 상승작용을 나타낸다.

- [0363] 따라서, 조합에서, 상기 조합의 성분들은 항-CD40 항체를 사용한 단독요법 또는 항체 요법의 부재하에 추가의 치료제(들)를 사용한 치료와 비교하여, 종양 성장을 억제하는 것에 대한 부가적 또는 초부가적 효과를 갖는다. "부가적"이란, 각각의 개별 성분을 사용한 단독요법에 의해 성취되는 최상의 별도의 결과 보다 큰 정도 (예를 들어, 종양 유사분열 지수 또는 종양 성장의 감소 정도에서 또는 증상 부재 또는 증상 감소된 기간에서 종양 수축 또는 빈도 및/또는 증상 부재 또는 증상 감소된 지속기간의 정도)의 결과를 의미하고 "초부가적"은 상기 각각의 별도의 결과의 합의 정도를 초과하는 결과를 지적하기 위해 사용된다. 하나의 구현예에서, 부가적 효과는 종양 성장의 서행 또는 중단으로서 측정된다. 부가적 효과는 또한 예를 들어, 종양 크기의 감소, 종양 유사분열 지수의 감소, 시간 경과에 따른 전이 병변 수의 감소, 전체 반응율의 증가, 또는 메디안 또는 전체 생존율에서의 증가로서 측정될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 부가적 효과는 Ramos 세포로 항온처리되는 경우 CD95 발현의 유도를 증가시키고/시키거나, 인간 B 세포로 항온처리되는 경우 B 세포 증식을 증가시키고/시키거나 수지상 세포로 항온처리되는 경우 I112p40의 증가된 유도를 증가시키는 것으로 측정된다.
- [0364] 치료학적 치료의 효과가 정량될 수 있는 측정의 하나의 비제한적인 예는 하기의 방정식에 따라 측정되는 log10 세포 사멸을 계산함에 의한 것이다:
- [0365] $\log_{10} \text{ 세포 사멸} = T/C (\text{일수})/3.32 \times T_d$
- [0366] 여기서, T/C는 세포의 성장에서의 지연을 나타내고, 이는 소정의 값(예를 들어, 1g, 또는 10 mL)에 도달하기 위한 처리된 그룹 (T)의 종양 및 대조군 그룹(C)의 종양에 대한 일수에서의 평균 시간이고, T_d는 대조군 동물에서 이배체화되는 종양의 용적에 필요한 일수에서의 시간을 나타낸다. 상기 측정을 적용하는 경우, 생성물은 log10 세포 사멸이 0.7 이상인 경우 활성인 것으로 고려되고 생성물은 log10 세포 사멸이 2.8 초과인 경우 매우 활성인 것으로 고려된다. 상기 측정을 사용하여, 성분의 각각이 일반적으로 이의 최대 관용성 용량 이하의 용량으로 존재하는 이 자체의 최대 관용성 용량으로 사용되는 조합은 log10 세포 사멸이 이것이 단독으로 투여되는 경우 최상의 성분의 log10 세포 사멸의 값 보다 큰 경우 치료학적 상승작용을 나타낸다. 예시적 경우에, 조합의 log10 세포 사멸은 적어도 0.1 log 세포 사멸, 적어도 0.5 log 세포 사멸 또는 적어도 1.0 log 세포 사멸에 의한 조합의 최상의 성분의 log10 세포 사멸의 값을 초과한다.
- [0367] 본 발명은 추가의 제한으로서 해석되지 말아야 하는 하기의 실시예로 추가로 설명한다. 서열 목록, 도면 및 본원의 전반에 걸쳐 인용된 모든 참조문헌, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 명백하게 참조로 본원에 인용된다.
- [0368] **실시예**
- [0369] **실시예 1**
- [0370] **CD40-특이적 인간 단일클론 항체의 생성**
- [0371] 인간 항-CD40 단일클론 항체는 Harbour® 유전자전이 마우스의 H2L2 종을 가용성 인간 CD40 항원으로 면역화시킴에 의해 생성시켰다. Harbour® 유전자전이 마우스는 내인성 마우스 중쇄(HC) 및 카파 경쇄(κ -쇄) DNA 서열이 녹아웃되었고 마우스 계놈으로 안정하게 혼입된 인간 가변(V) 영역 및 래트 불변(C) 영역에 대한 서열을 가졌다.
- [0372] 항원 및 면역화: 항원은 항체 Fc 도메인과 융합된 CD40 세포의 도메인을 포함하는 가용성 융합 단백질(R&D Systems), 또는 재조합 인간 CD40-mSG2a 키메라 단백질(메이드 인-하우스)이다. 항원은 제1 면역화를 위해 완전한 프룬트(Sigma) 보조제와 혼합하였다. 이후, 항원은 불완전 프룬트(Sigma)와 혼합하였다. 추가의 마우스는 MPL + TDM 보조제 시스템(Sigma) 중에 가용성 CD40 단백질로 면역화시켰다. PBS 중 5-25 마이크로그램의 가용성 재조합 CD40 항원 또는 PBS 중 인간 CD40의 표면 발현을 위해 형질감염된 5×10^6 NSO 세포를 보조제와 1:1로 혼합하였다. 마우스에 14일 마다 200 마이크로리터의 제조된 항원을 복강으로 주사하였다. 항-CD40 역가를 나타내는 동물에게 융합 3일 내지 4일 전 5-10 마이크로그램의 가용성 재조합 CD40 항원을 iv 주사하였다. 마우스 비장을 수거하고 단리된 비장 세포는 하이브리도마 생성을 위해 사용하였다.
- [0373] 하이브리도마 제조: P3x63Ag8.653 쥐 골수종 세포주(ATCC CRL 1580)는 융합을 위해 사용하였다. 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640(Invitrogen)을 사용하여 골수종 세포를 배양하였다. 추가의 배지 보충물을 HAT(Sigma; 1.0×10^{-4} M 하이포크산틴, 4.0×10^{-7} M 아미노프테린, 1.6×10^{-5} M 티미딘 배지와 함께 하이브리도마 성장 배지에 첨가하였고 상기 성장 배지는 다음을 포함하였다: 10% 이하의 하이브리도마 증진 보충물(Sigma), 10%

FBS(Sigma), L-글루타민(Gibco) 0.1% 겐타마이신(Gibco), 2-머캅토에탄올(Gibco).

[0374] 비장 세포는 6:1의 비율로 P3x63Ag8.653 골수종 세포와 혼합하였고 원심분리에 의해 펠렛화하였다. 폴리에틸렌 글리콜은 주의깊은 혼합과 함께 적가하여 융합을 촉진시켰다. 하이브리도마는 가시적 콜로니가 확립될때까지 1 주 내지 2주 동안 성장하도록 방치하였다. 상등액을 수거하고, 인간 가용성 CD40 융합 단백질 및 래트 Fc 특이적 검출을 사용한 ELISA를 통해 래트 IgG에 대한 초기 스크리닝을 위해 사용하였다. IgG 양성 상등액은 이어서 유동 세포측정을 통해 CD40 특이성에 대해 분석하였다. 하이브리도마는 또한 시노몰거스 마카쿠 CD40과의 교차 반응성에 대해 스크리닝하였고 모두는 결합에 대해 양성이었다.

[0375] 하이브리도마 세포는 증식시키고 세포 펠렛은 RNA 단리 및 서열 분석을 위해 동결시켰다. 인간 mAb의 V_H 및 V_L 암호화 영역은 상응하는 하이브리도마로부터의 RNA를 사용하여 동정하였다. RNA는 cDNA로 역전사시키고, V 암호화 영역은 PCR에 의해 증폭시키고 PCR 생성물을 서열 분석하고 인간 IgG2 벡터에 삽입하고, 일시적으로 발현 시키고 단백질 A 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 특정 목적하는 다수의 항체를 단리시키고, 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK(중쇄의 FR3 상에 N75K 변형 후 후자 경우에), 및 3B6-NS(N-연결된 당화 부위를 제거하기 위한 경쇄 상의 FR3 상의 항체 3B6의 N63S 변형 후)로 지정하였다.

[0376] 표 1, 2, 및 3은 인간 mAb의 V_H 및 V_L 영역의 생식선 정보 및 아미노산 서열을 요약한다(아미노산 서열의 경우에, 상보성 결정 영역(CDR)은 밑줄쳐져 있다). 상응하는 핵산 서열은 이들 실시예의 종점에서 "서열 목록의 요약"이라는 표제의 서열 표에서 제공된다.

[0377] 표 1 - 생식선 데이터

mAb	VH/VL	생식선		
		V	D	J
3G5	H	IGHV3-33*01 F (VH3-33)	IGHD3-10*01 F (D3-10)	IGHJ4*02 F (JH4b)
	L	IGKV3-15*01 F (L2)		IGKJ5*01 F (JK5)
3C3	H	IGHV3-33*01 F (VH3-33)	IGHD3-10*02 F (D4-b)	IGHJ4*02 F (JH4b)
	L	IGKV1-27*01 F (A20)		IGKJ3*01 F (JK3)
3B6	H	IGHV3-23*01 F (VH3-23)	IGHD2-15*01 F (D2-15)	IGHJ6*02 F (JH6b)
	L	IGKV2-28*01 F (A19)		IGKJ1*01 F (JK1)
6H6	H	IGHV3-33*01 F (VH3-33)	IGHD3-10*01 F (D3-10)	IGHJ4*02 F (JH4b)
	L	IGKV3-15*01 F (L2)		IGKJ4*01 F (JK4)
1B4	H	IGHV3-23*01 F (VH3-23)	IGHD1-26*01 F (D2-15)	IGHJ6*02 F (JH6b)
	L	IGKV2-28*01 F (A19)		IGKJ1*01 F (JK1)
1B5- NK	H	IGHV3-33*03 F (VH3-33)	IGHD6-19*01 F (D2-15)	IGHJ2*01 F (JH2)
	L	IGKV1-27*01 F (A20)		IGKJ2*01 F (JK2)
2 E1.2	H	IGHV3-33*01 F (VH3-33)	IGHD3-10*01 F (D3-10)	IGHJ4*02 F (JH4B)
	L2	IGKV3-15*01 F (L2)		IGKJ4*01 F (JK4)
3B6- NS	H	IGHV3-23*01 F (VH3-23)	IGHD2-15*01 F (D2-15)	IGHJ6*02 F (JH6b)
	L2	IGKV2-28*01 F (A19)		IGKJ1*01 F (JK1)

[0378]

[0379] 표 2 - CDR 서열

mAb	VH/ VL	캐뱃 CDR (쵸티아(Chothia))					
		CDR1	서열 번호	CDR2	서열 번호	CDR3	서열 번호
3G5	H	SNGIH (GFTFSSN)	5, 6	VIWSDGSNKFYADS VKG (WSDGSN)	7, 8	ASGSGSYYNFFDY (ASGSGSYYNFFDY)	9, 10
	L	RASQSVRSNLA (RASQSVRSNLA)	11, 12	GASTRAT (GASTRAT)	13, 14	QQHNKWIT (QQHNKWIT)	15, 16
3C3	H	RYGMY (GFISRY)	19, 20	VIWYDGSYKYYADS VKG (WYDGSY)	21, 22	ESPWYYFDY (ESPWYYFDY)	23, 24
	L	RASQGISNYLA (RASQGISNYLA)	25, 26	AASTLQS (AASTLQS)	27, 28	QKYKSAPFT (QKYKSAPFT)	29, 30
3B6	H	SYAMS (GFTFSSY)	33, 34	GITGTGGSTYYADS VKG (TGTGGS)	35, 36	RAGGSFYYYYGMDV (RAGGSFYYYYGMD V)	37, 38
	L	RSSQSLHSTGYN YLD (RSSQSLHSTGYN YLD)	39, 40	LGSNRAS (LGSNRAS)	41, 42	MQALQTPWT (MQALQTPWT)	43, 44
6H6	H	SYGMH (GFTLSSY)	47, 48	VIWDDGSNKYYADS VKG (WDDGSN)	49, 50	AGSGRYYNYFDY (AGSGRYYNYFDY)	51, 52
	L	RASQSVRSNLA (RASQSVRSNLA)	53, 54	GASTRAT (GASTRAT)	55, 56	QQHNNWLT (QQHNNWLT)	57, 58
1B4	H	SYAMT (GFTFSSY)	61, 62	GITGSGANTFYTDSV KG (TGSGAN)	63, 64	RNGGSYYYYYGMDV (RNGGSYYYYYGMD V)	65, 66
	L	RSSQSLHSSGYN YLD (RSSQSLHSSGYN YLD)	67, 68	LGSNRAS (LGSNRAS)	69, 70	MQALQIPWT (MQALQIPWT)	71, 72
1B5- NK	H	SFGMH (GFTFSSF)	103, 104	LIWFDGSSKYYADS VKG (WFDGSS)	105, 106	GFAAVAGWYFDF (GFAAVAGWYFDF)	107, 108
	L	RASQGVRYLA (RASQGVRYLA)	109, 110	AASTLQS (AASTLQS)	111, 112	QKYFSAPYT (QKYFSAPYT)	113, 114
2E1.2	H	SYGMH (GFTFSSY)	89, 90	VIWDDGSNKYYADS VKG (WDDGSN)	91, 92	AGSSGRYYNYFDY (AGSSGRYYNYFDY)	93, 94
	L	RASQSVRSNLA (RASQSVRSNLA)	95, 96	GASTRAT (GASTRAT)	97, 98	QQYNKWL (QQYNKWL)	99, 100
3B6- NS	H	SYAMS (GFTFSSY)	75, 76	GITGTGGSTYYADS VKG (TGTGGS)	77, 78	RAGGSFYYYYGMDV (RAGGSFYYYYGMD V)	79, 80
	L	RSSQSLHSTGYN YLD (RSSQSLHSTGYN YLD)	81, 82	LGSNRAS (LGSNRAS)	83, 84	MQALQTPWT (MQALQTPWT)	85, 86

[0380]

[0381] 표 3 - 전장 가변 영역 서열

mAb	VH/VL	서열 번호	서열
3G5	H	3	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSS <u>NGIH</u> WVRQAPGKGLEWVAVI <u>WSDGSNKFYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>ASG</u> <u>SGSYYNFFDY</u> WGQGLTVTVSS
	L	4	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVRSNLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GAS</u> <u>TRAT</u> GIPARFSGSGSGTEFTLTINSLQSEDAVYYC <u>QOHNKWIT</u> FGQGTRLEI K
3C3	H	17	QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAGSGFIF <u>RYGMY</u> WVRQAPGKGLEWVAV <u>IWYDGSYKYYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE <u>S</u> <u>PWYYFDY</u> WGQGLTVTVSS
	L	18	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>RASOGISNYLA</u> WYQQKPGKVPKLLIY <u>AAS</u> <u>TLOS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC <u>CQKYKSAPFT</u> FGPGTKV DIK
3B6	H	31	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS <u>SYAMS</u> WVRQAPGKGLEWVSV <u>GI</u> <u>TGTGGSTYYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLYVQMNSLRAEDTAVYYCAK <u>RAG</u> <u>GSFYYYGMDV</u> WGQGLTVTVSS
	L	32	DIVMTQSPSLPVTTPGEPASIS <u>RSSQSLLHSTGYNLYD</u> WYLQKPGQSPQLLI Y <u>LGSNRAS</u> GVPDFRFGSGSGTDFTLKISRVEAEDFVYYC <u>MQALQIPWT</u> F GHGKVEIK
6H6	H	45	QVQLVESGGGVVQGRSLRFSCAASGFTLS <u>SYGMH</u> WVRQAPGKGLEWVAV <u>IWDDGSNKYYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>AG</u> <u>GSGRYNNYFDY</u> WGQGLTVTVSS
	L	46	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVRSNLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GAS</u> <u>TRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISLQSEDAVYYC <u>QOHNWLT</u> FGGGTKVE IK
1B4	H	59	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS <u>SYAMT</u> WVRQVPGKGLEWVSV <u>GI</u> <u>TGSGANTFYTDSVKGR</u> FTISRDN <u>SN</u> SLYLQMNSLRADDTAVYYCAK <u>RNG</u> <u>GSYYYYGMDV</u> WGQGLTVTVSS
	L	60	DIVMTQSPSLPVTTPGEPASIS <u>RSSQSLLHSSGYNLYD</u> WYLQKPGQSPQLLI Y <u>LGSNRAS</u> GVPDFRFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYC <u>MQALQIPWT</u> FG QGTKVEIK
1B5- NK	H	101	QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSS <u>SFGMH</u> WVRQAPGKGLEWV <u>TL</u> <u>IWFDGSSKYYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR <u>GF</u> <u>AAVAGWYDF</u> WGRGTLTVTVSS
	L	102	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>RASQGV RKYLA</u> WYQQKPGKVPKLLIY <u>AA</u> <u>STLOS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC <u>CQYFSAPYT</u> FGQGTKL EIK
2E1.2	H	87	QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSS <u>SYGMH</u> WVRQAPGKGLEWVAV <u>IWDDGSNKYYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>AG</u> <u>SSGRYYNYFDY</u> WGQGLTVTVSS
	L	88	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVRSNLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GAS</u> <u>TRAT</u> GIPDRFSGSGSGTEFTLTISLQSEDAVYHC <u>QOYNKWLI</u> FGGGTKVEI K
3B6- NS	H	73	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS <u>SYAMS</u> WVRQAPGKGLEWVSV <u>GI</u> <u>TGTGGSTYYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLYVQMNSLRAEDTAVYYCAK <u>RAG</u> <u>GSFYYYGMDV</u> WGQGLTVTVSS
	L	74	DIVMTQSPSLPVTTPGEPASIS <u>RSSQSLLHSTGYNLYD</u> WYLQKPGQSPQLLI Y <u>LGSNRAS</u> GVPDFRFGSGSGTDFTLKISRVEAEDFVYYC <u>MQALQIPWT</u> FG HGTKVEIK

[0382]

[0383] 항체 3C3의 중쇄 및 경쇄의 전체 아미노산 서열은 다음과 같다:

[0384] 경쇄 서열 (리더 서열이 제거됨) (서열번호 136)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYKSAPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

[0385]

[0386] 중쇄 서열 (리더 서열이 제거됨) (서열 번호 135)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAGSGFIFSRGYMYWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSGYKYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESPWYFFDYWGQGTLVTVSSAST
KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCAPP
VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTFRVYVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
MLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0387]

[0388] 각각의 경우에, 가변 서열은 이탤릭으로 나타내고 불변 도메인은 볼드체로 나타낸다. 불변 도메인 서열은 이로부터 C-말단 라이신이 제거된 IgG2 서열이다.

[0389] 동일한 불변 도메인 서열은 상기 열거된 바와 같은 이들의 각각의 가변 서열을 갖는 다른 항체를 위해 사용하였다.

[0390] **실시예 2**

[0391] **바이오-층 간섭계법(BLI)에 의한 인간 mAb의 친화성 및 속도 상수의 결정**

[0392] 다양한 인간 항-CD40 항체의 결합 친화성 및 결합 역학은 Octet™ QK^e 기구(Pall ForteBio, Menlo Park, Ca)를 제조업자의 지침에 따라 사용하여 바이오-층 간섭계법에 의해 조사하였다.

[0393] 실시예 1로부터의 정제된 항체는 항-인간 Fc 포획(AHC) 바이오센서(Fortebio Product No. 18-5060)상에 포획하였다. 각각의 항체는 희석 완충액(10mMPO4+150mM NaCl+1mg/mL BSA+ 0.5%Tween 20, pH 7.2) 중에서 0.5 µg/mL로 제조하고 25 °C에서 및 1000 rpm 플레이트 진탕 속도에서 35 내지 50초 동안 새롭게 수화된 AHC 바이오센서상에 로딩하여 0.2 nm의 표적 반응을 성취하였다. 저수준의 리간드는 역학적 파라미터에 대한 분석물의 질량 수송의 임의의 효과를 제한하기 위해 포획하였다. 하나의 분석을 위해, 8개의 바이오센서에는 동일한 항체가 로딩되어 있다.

[0394] 결합은 항체 로딩된 바이오센서 중 6개를 분석물: 가용성 인간 CD40-MsIgG2a (Celldex, SDS-PAGE에 의한 60kD)에 노출시킴에 의해 결정하였다. 친화성 측정은 25 °C에서 및 1000 rpm 플레이트 진탕 속도에서 희석 완충액 중 3.13 내지 0.098 nM 범위의 분석물의 2배 연속 희석물을 사용하여 결정하였다. 분석물 웰에서 항체 로딩된 바이오센서의 결합은 1200초 동안 수행하였고, 이어서 상기 바이오센서는 해리 측정을 위해 2.5시간(9000초) 동안 희석 완충액 웰로 이동시켰다.

[0395] 상응하는 대조군은 각각의 경우에 결합 및 해리 단계를 위해 포획된 항체와 함께 2개의 나머지 바이오센서를 희석 완충액 중에서 유지시킴에 의해 수행하였다. 대조군 바이오센서를 위한 데이터는 백그라운드를 공제하고 바이오센서로부터 바이오센서 드리프트 및 항체 해리를 설명하기 위해 사용하였다.

[0396] 포르테바이오(Fortebio)의 데이터 분석 소프트웨어 버전 8.2.0.7(Pall ForteBio, Menlo Park, Ca)은 각각의 경우에 포획된 항체에 결합하는 희석 완충액 중 일련의 농도의 분석물로부터 역학적 파라미터를 유도하기 위해 사용하였다. 결합 및 해리 곡선은 제조업자의 지침에 따라 데이터 분석 소프트웨어를 사용한 1:1 결합 모델에 피팅하였다.

[0397] 결정된 바와 같은 친화성 및 역학적 파라미터(백그라운드 공제와 함께)는 도 1에 나타내고, 여기서, Kon = 회합 속도 상수이고, Kdis = 해리 속도 상수이고, K₀ = 비율 kdis/kon에 의해 결정된 해리 평형 결합 상수이다.

[0398] **실시예 3**

[0399] **CD40에 대한 인간 mAb 결합 특징을 결정하기 위한 분석**

[0400] 미세역가 플레이트는 PBS 중 제조합 인간 CD40-Fc로 코팅하고 이어서 PBS 중 5% 소 혈청 알부민으로 차단하였다. 실시예 1로부터의 단백질 A 정제된 인간 mAb 및 이소형 대조군은 다양한 농도로 첨가하고 37 °C에서 항온처리하였다. 상기 플레이트는 PBS/Tween 20으로 세척하고 이어서 37 °C에서 서양고추냉이 퍼옥시다제에 접합된 염소-항-인간 IgG F(ab')₂-특이적 다클론 시약으로 항온처리하였다. 세척 후, 플레이트는 HRP 기질과 함께 전개하였고 미세역가 플레이트 판독기를 사용하여 OD 450-650에서 분석하였다. 대표적인 결합 곡선은 도 2에 나타낸다.

[0401] 시노몰구스 막꾸에(cynomolgus macques)가 항-CD40 mAb를 시험하기 위해 적절한 모델임을 확립하기 위해, 정제된 막꾸에 PBMC 또는 인간 PBMC를 플레이트 진탕기 상에서 실온에서 20분 동안 항-인간 CD40 mAb의 농도로 항온처리하였다. 세포를 이어서 0.1% BSA 및 0.05% NaN₃(PBA)를 함유하는 PBS로 2회 세척하였다. 염소 항-인간 IgG Fc-PE 항체는 플레이트 진탕기 상에서 실온에서 20분 동안 첨가하였다. B 세포는 알로피코시아닌(APC) 접합된 CD20 항체를 사용한 후속적 염색에 의해 동정하였다. 세포는 유동 세포측정에 의해 분석하고 결합 곡선은 마카꾸에 및 인간으로부터의 CD40으로의 유사 결합을 지적하는 도 3에 나타낸다.

[0402] **실시예 4**

[0403] **ELISA에 의한 sCD40L 결합의 차단**

[0404] CD40 단백질로의 가용성 CD40 리간드(sCD40L)의 결합에 대한 실시예 1로부터의 인간 mAb의 효과는 ELISA에 의해 측정하였다. 미세역가 플레이트는 제조원 (R&D System)으로부터의 2 µg/ml의 가용성 재조합 인간 CD40/Fc 키메라로 코팅한 다음 5% PBA로 차단시켰다. 항-CD40 항체 ([최종] = 100 µg/mL)는 플레이트에 첨가하고 이어서 제조원(Immunex)으로부터 가용성 인간 재조합 CD40L-비오틴 ([최종] = 0.5 µg/mL)을 첨가하였다. CD40-포획된 rCD40L은 스트렙타비딘-HRP 및 기질 슈퍼 블루 TMB로 검출하였다. 상기 결과는 지적된 바와 같은 대조군과 함께 도 4a 및 4b에 나타낸다.

[0405] **실시예 5**

[0406] **CD40 세포로의 결합**

[0407] 이들의 표면 상에 인간 CD40을 발현하는 세포 상에 CD40에 결합하는 항-CD40 인간 mAb의 능력은 다음과 같이 유동 세포측정에 의해 조사하였다:

[0408] 실시예 1로부터의 항체는 이들의 표면 상에 인간 CD40을 발현하는 인간 세포주에 결합하는 것에 대해 시험되었다. 단배질 A 정제된 인간 mAb 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 및 6H6은 플레이트 진탕기 상에서 실온에서 인간 CD40을 발현하는 Raji 및 Ramos 세포와 함께 항온처리하였다. 20분 후, 세포는 0.1% BSA 및 0.05% NaN₃ (PBA)를 함유하는 PBS로 세척하고 결합된 항체는 세포를 PE 표지된 염소 항-인간 IgG Fc-특이적 프로브로 항온처리함에 의해 검출하였다. 과량의 프로브는 PBA를 사용하여 세포로부터 세척하고 세포 연합된 형광성은 FACSCanto II™ 기구(BD Biosciences, NJ, USA)를 제조업자의 지침에 따라 사용하는 분석에 의해 결정하였다.

[0409] 도 5(Raji 세포에 결합하는) 및 도 6(Ramos 세포에 결합하는)에 나타난 바와 같이, 인간 mAb는 항체 농도의 함수로부터 인간 CD40을 발현하는 세포로의 고수준 결합을 입증하였다.

[0410] **실시예 6**

[0411] **Ramos 세포 상에 CD95 유도**

[0412] Ramos 세포는 실시예 1로부터의 2 ug/mL의 인간 항-CD40 mAb와 37 °C, 6% CO₂에서 밤새 항온처리하였다. 이어서 다음 날, 이들은 PBA로 1회 세척하고 진탕과 함께 실온에서 20분 동안 PE-접합된 항-CD95 항체(Becton Dickinson)로 염색시켰다. 과량의 표지된 항체는 세척 제거하고 샘플은 FACSCanto II™ 기구(BD Biosciences, NJ, USA) 상에서 판독하였다. 도 7a 및 7b에 나타난 바와 같이(여기서, 상기 음영된 플롯은 비처리된/대조군 세포를 나타내고 검정 라인은 지적된 바와 같은 항체로 처리된 세포를 나타낸다), 3C3 및 1B5-NK 항체는 CD95에서의 증가를 보여주고 다른 항체 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 및 3B6-NS는 표면 발현된 CD95의 발현에서 강한 증가를 유도할 수 있었다.

[0413] **실시예 7**

[0414] **수지상 세포 활성화**

[0415] 수지상 세포는 다음과 같이 인간 단핵구로부터 유래하였다:

[0416] PMBC는 T175 cm² 플라스크에 첨가하고 단핵구는 37 °C, 6% CO₂에서 약 2시간 동안 정착하도록 방치하였다. 세포를 제거하고 단핵구는 10% FBS, 10 ng/mL IL-4(R&D Systems) 및 100 ng/mL GM-CSF(R&D Systems)를 함유하는 RPMI에서 7일 동안 배양하였다. 세포를 수거하고 CD11c의 발현에 의해 수지상 세포인 것으로 확인하였다(나타내지 않음).

- [0417] 세포는 이어서 37 °C, 6% CO₂에서 실시예 1로부터의 10 ug/mL 3C3 및 3G5 인간 항-CD40 항체 및 적당한 대조군의 존재하에 항온처리하였다. 72시간 후, 세포를 수거하고 상등액을 수집하고 사이토킨 분석을 위해 저장하였다. 세포는 진탕시키면서 실온에서 20분 동안 하기의 표지된 항체로 염색시켰다: HLA-DR V450, CD54 PE, CD86 APC, 및 CD83 BV510(모두 BD로부터). 세포는 이어서 2회 세척하고 FACSCanto II™ 기구(BD Biosciences, NJ, USA) 상에서 분석하였다. 도 8a는 지정된 항체 또는 대조군으로 항온처리되는 경우 이들 마커 각각에 대한 발현 수준을 보여준다.
- [0418] IL-12p40의 유도는 ELISA(R&D Systems)에 의해 이들 72시간 배양으로부터의 상등액에서 평가하였다. 도 9a는 지적된 바와 같은 대조군에 상대적으로 3C3 및 3G5 항-CD40 항체와 함께 IL-12p40 생성에서의 증가를 보여준다.
- [0419] 추가의 실험에서, 세포는 이어서 37 °C, 6% CO₂에서 실시예 1로부터의 10, 1 및 0.1 ug/mL 3C3 및 3G5 인간 항-CD40 항체 및 적당한 대조군의 존재하에 항온처리하였다. 48시간 후, 세포를 수거하고 상등액을 수집하고 사이토킨 분석을 위해 저장하였다. 세포는 진탕시키면서 실온에서 20분 동안 CD54 표지된 항체(BD)로 염색시켰다: 세포는 이어서 2회 세척하고 FACSCanto II™ 기구(BD Biosciences, NJ, USA) 상에서 분석하였다. 도 8b는 지정된 항체 또는 대조군으로 항온처리되는 경우 CD54에 대한 발현 수준을 보여준다.
- [0420] IL-12p40의 유도는 ELISA(R&D Systems)에 의해 이들 48시간 배양으로부터의 상등액에서 평가하였다. 도 9b는 지적된 바와 같은 대조군에 상대적으로 3C3 및 3G5 항-CD40 항체와 함께 IL-12p40 생성에서의 증가를 보여준다.
- [0421] **실시예 8**
- [0422] **B 세포 활성화**
- [0423] 전혈은 37 °C, 6% CO₂에서 밤새 실시예 1으로부터의 10 ug/mL의 3C3 및 3G5 항-CD40 항체로 항온처리하였다. 다음 날, 하기의 표지된 항체를 사용하여 B 세포 및 활성화 마커를 염색하였다: CD54 PE, HLA-DR V450, CD23 PerCP-Cy5.5, CD69 APC, CD86 APC, CD38 PerCP-Cy5.5 및 CD71 PE. 세포는 실온에서 20분 동안 진탕시키면서 염색시킴에 이어서 2회 세척하고 FACSCanto II™ 기구(BD Biosciences, NJ, USA) 상에서 판독하였다. 도 10a는 지적된 바와 같은 대조군과 비교하여 이들 마커 각각에 대한 발현 수준에서의 변화를 보여준다.
- [0424] 추가의 실험에서 전혈은 37 °C, 6% CO₂에서 밤새 실시예 1로부터의 10, 1 및 0.1 ug/mL의 3C3 및 3G5 항-CD40 항체로 항온처리하였다. 다음 날, 하기의 표지된 항체를 사용하여 B 세포 및 활성화 마커를 염색하였다: CD19 V500, HLA-DR V450, CD86 APC (모두 (BD)로부터). 세포는 실온에서 20분 동안 진탕시키면서 염색시킴에 이어서 2회 세척하고 FACSCanto II™ 기구(BD Biosciences, NJ, USA) 상에서 판독하였다. 도 10b는 지적된 바와 같은 대조군과 비교하여 이들 마커 각각에 대한 발현 수준에서의 변화를 보여준다.
- [0425] **실시예 9:**
- [0426] **NFκB 활성화**
- [0427] CD40을 발현하는 루시퍼라제 리포터 세포주는 37 °C, 6% CO₂에서 6시간 동안 실시예 1로부터의 다양한 농도의 인간 항-CD40 항체로 항온처리하였다. 루시퍼라제 발현은 제조업자의 지침에 따라 프로메가에 의한 루시퍼라제 검정 시스템으로 검출하였다. 도 11a 및 11b는 항체 농도의 함수로서 3C3, 3G5, 1B4, 3B6, 6H6, 2E1.2, 1B5-NK, 및 3B6-NS 항체에 의해 유도된 NFκB 활성화의 고수준을 보여준다.
- [0428] **실시예 10**
- [0429] **Raji 이중이식편 SCID 마우스 모델에서 종양 사멸**
- [0430] CB.17 SCID 마우스(제조원(Taconic Biosciences, Inc.)으로부터 시판됨)는 병원체-부재 마우스 설비에서 유지시켰다. 림프종 Raji 세포(1x10⁶)는 SCID 마우스, 그룹당 5마리 마우스로 정맥내 주사하였다. 1일, 5일 및 11일 제에, 이들 마우스는 그룹 당 0.3 mg으로 복강내 투여를 통해 CD40 인간 mAb 클론 3C3 및 3G5로 처리하였다. 종양 성장은 1주에 2회 캘리퍼로 측정하였다. 종양 성장 및 생존 분석 결과는 도 12에 나타내고, 이로부터 종양 켈린지된 마우스에서 항-CD40 항체를 사용한 치료가 식염수 처리된 대조군과 비교하여 종양의 성장을 억제하고 생존을 상당히 지연시킴을 알 수 있다.

- [0431] **실시예 11**
- [0432] **Ramos 이종이식편 SCID 마우스 모델에서 종양 사멸**
- [0433] CB.17 SCID 마우스(제조원(Taconn Biosciences, Inc.)으로부터 시판됨)는 병원체-부재 마우스 설비에서 유지시켰다. 인간 림프종 Ramos 세포(1×10^6)는 0일째 SCID 마우스, 그룹당 5마리 마우스로 정맥내 주사하였다. 1일, 5일 및 11일 째에, 이들 마우스는 그룹 당 0.3 mg으로 복강내 투여를 통해 항-CD40 인간 mAb 클론 3C3 및 3G5로 처리하였다. 종양 성장은 1주에 2회 캘리퍼로 측정하였다.
- [0434] 도 13에 나타난 결과는 항-CD40 mAb가 식염수 처리된 대조군과 비교하여 종양 용적에서의 성장을 크게 억제하여 종양 켈린지된 마우스의 100%(3G5) 또는 80% (3C3)의 생존을 유도함을 지적한다.
- [0435] **실시예 12**
- [0436] **T-세포 증식**
- [0437] 버피 코트 제제로부터 단리된 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 5분 동안 회전시키면서 실온에서 0.5 uM 카복실플루오레세인 숙신이미딜 에스테르(CFSE)로 표지시켰다. CFSE 표지된 PBMC(1.5×10^6)는 0.2 ug/mL로 항-CD3 항체(OKT3)로 코팅된 건조 웰에 분배하였다.
- [0438] CD40 항체(3G5, 3C3, 1412) 또는 이소형 대조군(IgG2)은 10 ug/mL의 최종 농도로 가용성 형태로 웰에 분배하였다. 플레이트는 37 °C (5% CO₂)에서 항온처리하였다. 6일 째에, 세포를 수거하고 항-CD3-APC 또는 이소형 대조군으로 염색시키고 유동 세포측정으로 분석하였다. 대표적인 플롯을 도 14a에 나타내고, 이로부터 항체가 CD3+ 게이트에서 CFSE 염색의 감소된 강도에 의해 입증된 바와 같이 T 세포 증식을 상당히 증진시킴을 알 수 있다. 반복 실험으로부터의 결과는 도 14b에 나타내고 이는 이소형 대조군과 상대적으로 항-CD40 항체의 사용으로 분열 세포의 증가를 보여준다.
- [0439] **실시예 13**
- [0440] **Fc 수용체 상호작용과는 상관 없이 CD40으로의 결합**
- [0441] 미세역가 플레이트는 PBS 중 재조합 인간 CD40-Fc로 코팅하고 이어서 PBS 중 5% 소 혈청 알부민으로 차단하였다. 단백질 A 정제된 인간 mAb(지적된 바와 같이 전체 IgG 및 F(ab')₂ 단편)는 다양한 농도로 첨가하고 37 °C에서 항온처리하였다. 상기 플레이트는 PBS/Tween으로 세척하고 이어서 37 °C에서 서양고추냉이 퍼옥시다제에 접합된 염소-항-인간 IgG F(ab')₂-특이적 다클론 시약으로 항온처리하였다. 세척 후, 플레이트는 HRP 기질과 함께 전개하였고 미세역가 플레이트 판독기를 사용하여 OD 450-650에서 분석하였다. 상기 결과는 도 15에 나타낸다. 각각의 항체의 IgG2 및 F(ab')₂ 버전은 CD40-Fc로의 결합에 대해 유사한 농도 의존성을 보여준다.
- [0442] **실시예 14**
- [0443] **Fc 수용체 상호작용과는 상관 없는 CD40 활성화**
- [0444] 상기 실시예 9로부터 CD40을 발현하는 루시퍼라제 리포터 세포주는 37 °C, 6% CO₂에서 6시간 동안 다양한 농도의 인간 항-CD40 항체(지적된 바와 같은 전체 IgG 및 F(ab')₂ 단편 둘 다)로 항온처리하였다. 루시퍼라제 발현은 제조업자의 지침에 따라 프로메가 루시퍼라제 검정 시스템으로 검출하였다. 상기 결과는 도 16에 나타낸다. 이들은 Fc 수용체로의 결합이 3C3 및 3G5에 의한 리포터 세포주의 CD40 매개된 활성화를 위해 요구되지 않는 데 그 이유는 Fc 도메인을 갖는 온전한 항체 및 Fc 도메인이 없는 이들의 상응하는 F(ab')₂ 버전 둘 다가 리포터 세포주에서 NFκB를 활성화시킬 수 있기 때문이다.
- [0445] **실시예 15**
- [0446] **Fc 수용체 상호작용과는 상관 없는 CD95 유도**
- [0447] Ramos 세포는 다양한 농도의 인간 항-CD40 mAb(지적된 바와 같이 전체 IgG 및 F(ab')₂ 단편 둘 다)와 37 °C, 6% CO₂에서 밤새 항온처리하였다. 다음 날, 이들은 PBA로 1회 세척하고 진탕과 함께 실온에서 20분 동안 PE-접합된 항-CD95 항체(Becton Dickinson)로 염색시켰다. 과량의 표지된 항체는 세척 제거하고 샘플은 FACSCanto

IITM 기구(BD Biosciences, NJ, USA) 상에서 관독하였다. 상기 결과는 도 17에 나타낸다. 이들 데이터는 Fc 수용체 상호작용이 CD40+ 인간 림프구아구성 세포주 Ramos 상에서 CD95의 발현을 유도하기 위해 3G5에 의해 요구되지 않음을 지적한다.

실시예 16

sCD40L과의 상승작용

Ramos 세포는 항체 3C3 플러스 또는 마이너스 0.1 mg/ml의 가용성 CD40 리간드로 밤새 항온처리하였다. 세포는 이어서 항-CD95-PE 항체로 염색시키고 유동 세포측정에 의해 분석하였다. 결과는 도 19에 나타내고 항-CD40 항체 3C3이 sCD40L과 함께 상승작용적으로 작용함을 지적한다. 따라서, 항체 3C3(및 3C3과 동일한 에피토프에 결합하는 항-CD40 항체)은 가용성 CD40 리간드(sCD40L)와의 상승작용 효능성 효과를 나타내고, 따라서, 인간 CD40의 리간드 결합 부위에 결합하는 것들을 포함하는 다른 치료제와 상승작용하는 능력을 갖는다. 대표적인 상승작용 효과는 예를 들어 면역 기능의 상향조절(예를 들어, 백신 요법에서와 같이 T 세포 매개된 면역 반응, 암 요법에서 NK 활성화), 세포 성장의 억제(예를 들어, 암 요법에서), 및/또는 APC에 의한 항원의 증진된 프로세싱 및 제공(예를 들어, 백신 요법에서)을 포함한다.

실시예 17

항-CD40 인간 항체 3C3 및 3G5 및 sCD40의 에피토프 맵핑

i) 가용성 CD40(sCD40)의 절단되고 돌연변이된 단편의 생성.

전장 세포의 도메인(ECD)을 포괄하는 아미노산 잔기 1 내지 173(서열번호 133)을 암호화하는 가용성 CD40(sCD40) cDNA, 및 아미노산 1 내지 94, 36 내지 130 및 84 내지 173을 암호화하는 3개의 보다 작은 단편은 GenScript에 의해 합성하였고 N-말단 인간 카파 경쇄 및 C-말단 플래그 태그를 갖는 포유동물 발현 벡터에 프레임 내 삽입하였다. 수득한 카파-sCD40-플래그 융합 단백질은 ExpiCHO-S 세포 (SAFC)로의 일시적 형질감염에 의해 발현시켰다. CD40 항체 3C3은 인간 및 몽키를 인지하지만 마우스 CD40을 인지하지 않기 때문에, 일련의 돌연변이된 sCD40aa 1-94 cDNA는 도 20 및 21에서의 정렬에 나타낸 바와 같이 인간과 마우스 서열 간의 차이를 기준으로 디자인하였다. 돌연변이체를 합성하였고 GenScript에 의해 클로닝하였다. 모든 이들 절단되거나 돌연변이된 단편은 동일한 벡터에 클로닝하고 상기 언급된 바와 동일한 세포주에 의해 발현시켰다.

ii) ELISA에 의한 결합 결정

3C3의 일련의 sCD40 단편으로의 결합은 ELISA에 의해 시험되었다. scCD40 융합 단백질을 함유하는 1 µg/ml의 정제된 카파-sCD40-플래그 융합 단백질 또는 CHO 세포 상등액은 PBS 중에서 5 µg/ml 마우스 항-플래그 항체 (Sigma)로 예비 코팅되고 PBS 중 5% 소 혈청 알부민으로 차단된 미세역가 플레이트에 포획하였다. CD40 항체와의 항온처리 후, 마이크로플레이트를 PBS/Tween으로 세척하고 서양고추냉이 퍼옥시다제에 접합된 염소 항-인간 IgG Fc 폴리클로날 시약으로 항온처리하였다. 세척 후, 플레이트는 HRP 기질과 함께 전개하였고 미세역가 플레이트 판독기를 사용하여 OD 450-650에서 분석하였다. 카파-쇄 결합을 측정하기 위한 염소 항-인간 IgG Fab2-HRP를 사용한 ELISA를 병행 수행하여 상이한 형질감염으로부터 sCD40 융합 단백질 발현을 확인하였다.

~ 1 µg/ml의 전장 sCD40 및 3개 절단된 단편을 사용한 ELISA 분석은 sCD40 N-말단 잔기 1-94가 3C3의 결합을 위해 필수적이고 충분함을 결정하였는데 그 이유는 아미노산 잔기 1 내지 94를 암호화하는 단편은 3C3 및 전체 ECD에 결합하지만 상기 서열의 아미노산 잔기 36 내지 130 또는 84 내지 173을 암호화하는 단편은 전혀 결합하지 않기 때문이다(표 4 참조).

표 4

평균 OD		
단편 아미노산 잔기	3C3	α Fab2HRP
1-173	1.264	1.264
1-94	1.803	1.720
36-130	0.024	1.695
84-173	0.024	1.669
아미노산 1 내지 94 의 돌연변이 단편		
A (1-5)	0.189	1.718
B (13-15)	2.032	1.730
C (25, 26, 28, 30)	1.487	1.685
D (33-36)	0.092	1.631

이들 결과를 기준으로, 3C3에 대해 중요한 인지 부위는 아미노산 1-35 내에 있다.

3C3의 결합 부위의 형태적 인지를 위해 중요한 영역 및 아미노산 잔기를 추가로 동정하기 위해, ~ 2 ug/mL의 13개 돌연변이된 sCD40(아미노산 잔기 1 내지 94) 단편 (4개의 영역 다중 돌연변이 및 9개 단일 돌연변이)은 ELISA로 시험하였다(별도의 실험 및 도 22로부터의 결과를 보여주는 표 5 및 6을 참조한다).

표 5

평균 OD		
단편 아미노산 잔기	3C3	α Fab2HRP
1-94	2.157	1.473
아미노산 1 내지 94 의 돌연변이 단편		
A (1-5)	0.167	1.489
D (33-36)	0.124	1.429
점 돌연변이		
E1G	1.965	1.487
P2Q	2.077	1.490
P3S	2.011	1.489
T4V	2.152	1.519
A5T	1.126	1.517
E33A	1.620	1.521
F34L	1.883	1.500
T35E	2.072	1.487
E36K	1.369	1.433
PBA	0.031	0.011

표 6

OD			
단편 아미노산 잔기	3C3	3G5	α Fab2HRP
전장 1-173	2.364	2.214	1.525
1-94	2.151	2.170	1.755
36-130	0.029	0.048	1.716
84-173	0.024	0.038	1.599
아미노산 1 내지 94 의 돌연변이 단편			
A (1-5)	0.250	2.139	1.699
B (13-15)	2.375	1.876	1.710
C (25, 26, 28, 30)	2.016	2.161	1.604
D (33-36)	0.233	0.042	1.548
점 돌연변이			
E1G	2.011	2.083	1.720
P2Q	2.197	2.158	1.754
P3S	2.012	2.188	1.712
T4V	2.213	2.210	1.664
A5T	1.511	2.201	1.698
E33A	1.695	0.074	1.709
F34L	1.845	1.192	1.686
T35E	2.102	2.128	1.682
E36K	1.689	1.930	1.674
<0.25			
0.25<x<1.2			
1.2<x<1.9			

[0462]

[0463]

잔기 1 내지 5의 다중 돌연변이는 거의 완전히 3C3을 폐지시켰다. 잔기 1 내지 4의 점 돌연변이는 3C3으로의 결합을 감소시키지 않았다. 잔기 5의 점 돌연변이는 결합을 급격히 감소시켰지만 다중 돌연변이 단백질의 정도로는 아니다.

[0464]

잔기 13 내지 15의 다중 돌연변이는 3C3 결합을 감소시키지 않았다. 잔기 25, 26, 28 및 30의 다중 돌연변이는 3C3에서 약간의 감소를 유발하였다. 점 돌연변이는 이들 영역에서 시험되지 않았다.

[0465]

잔기 33 내지 36의 다중 돌연변이는 거의 완전히 3C3 결합을 폐지시켰다. 잔기 35의 점 돌연변이는 결합에 대해 어떠한 효과를 갖지 않았다. 잔기 33, 34 및 36의 점 돌연변이는 3C3 결합을 급격히 감소시켰지만 다중 돌연변이 단백질의 정도로는 아니다. 대안적 CD40 항체, 3G5는 모든 단편 및 돌연변이체로의 결합에 대해 시험되었고 3C3과는 상이한 것으로 나타났다(표 6). 잔기 1 내지 5의 다중 돌연변이는 결합을 감소시키지 않지만 잔기 33 내지 36의 돌연변이는 결합을 제거하였다. 3C3과 같지 않게, 잔기 33의 점 돌연변이는 결합을 완전히 제거하였고 34의 돌연변이는 결합을 상당히 감소시켰다.

[0466]

실시예 18

[0467]

생물학적 및 독성 프로파일

[0468]

비-GLP 파일럿 연구는 순수 시노물구스 마카루에서 수행되었다. 상기 연구는 3C3의 생물학적 및 독성 프로파일에 대한 예비 데이터를 제공하기 위해 디자인하였다. 대안적 항-CD40 항체(3G5) 또한 평가하였다. 시험 제품은 1일제(0.2 mg/kg 또는 비히클) 및 다시 29일제(2 mg/kg 또는 비히클)에 복제 정맥에서 정맥내 주사에 의해 투여하였다. 동물은 또한 1일제 및 29일 제에 키홀 림프 헤모시아닌(KLH)의 피하(1 mg) 주사를 받았다. 잠재적 시험 제품 관련 효과에 대한 평가는 임상 징후, 체온, 임상 병리학 파라미터(혈액학, 응고, 임상 화학 및 노분석), 항-약물 항체, 사이토킨, T-세포 의존성 항체 반응 분석(TDAR), 유동 세포측정 및 독성역학 파라미터를 기준으로 하였다. 체중은 시험 제품 투여 전 및 이후 1주마다 1회 기록하였다. 이것은 어떠한 계획된 감시 없이 생존 연구로서 디자인하였다.

[0469]

본 연구에서 3C3 또는 3G5의 투여는 대조군 수준을 상당히 벗어나고도 독성 파라미터 없이 시노물스에서 매우 관용성이었다. 주지할만한 것은 3C3을 투여받은 몽키에서 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST), 알라닌 아

미노트랜스퍼라제 (ALT) 및 크레아티닌 키나제의 최소 평가였다(도 23a-23c). IL-12(도 24), 백혈구 세포(도 25a), 호중구(도 25b) 및 림프구(도 25c)에서 약리학적 감소는 2개의 항-CD40 투여받은 동물에서 나타났고 대부분 상당히 B 세포에서 일시적 감소를 갖는다(도 26 및 27). 결론적으로, 이러한 조건하에 3C3 및 3G5는 독성의 최소입증을 보여주었다.

[0470] 실시예 19

[0471] Fc 상호작용과는 상관없는 B 세포 증식

[0472] 인간 B 세포는 CD19 비드를 사용한 자기 선택에 의해 말초 혈액 단핵 세포로부터 분리하였다. 세포는 5분 동안 회전시키면서 0.5 μ M 카복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르(CFSE)로 표지시켰다. 표지된 세포는 6일 동안 항-CD40 mAb 3C3 또는 이소형 대조군(전체 IgG 및 F(ab')₂ 단편 둘 다)의 존재하에 배양하였다. 세포는 이어서 수거하고 증식을 위한 유동 세포측정에 의해 분석하였다. 결과는 도 28에 나타내고 Fc 수용체로의 결합이 3C3 과 함께 CD40 매개된 증식을 위해 요구되지 않음을 지적하는데 그 이유는 Fc 도메인을 갖는 온전한 항체 및 Fc 도메인이 없는 이들의 상응하는 F(ab')₂ 버전이 둘 다 B 세포의 증식을 유도할 수 있기 때문이다.

[0473] 실시예 20

[0474] 인간 B 세포에서 CD40L과의 상승작용

[0475] 인간 B 세포를 분리하고 실시예 19에서와 같이 표지시켰다. 0.1 μ g/mL에서 항-CD40 mAb 3C3 또는 이소형 대조군은 0.1 μ g/mL 가용성 CD40L(Immunex)의 존재 또는 부재하에 6일 동안 세포로 항온처리하였다. 도 29는 어떠한 상당한 증식이 단독의 3C3 또는 CD40L과 조합된 이소형 대조군 항체를 사용하여 관찰되지 않았지만 상기 증식은 CD40L이 배양 중에 3C3과 조합되는 경우 유도됨을 보여준다.

[0476] 수지상 세포를 제조하고 0.1 μ g/mL 가용성 CD40L을 첨가하거나 첨가하는 것 없이 실시예 7에서와 같이 0.5 μ g/mL의 3C3으로 항온처리하였다. IL-12p40 생성은 ELISA(R&D Systems)에 의해 측정하였다. 도 30은 단독의 3C3 또는 CD40L과 이소형 대조군에 의한 저수준의 생성과 상대적으로 3C3과 CD40L의 조합이 보다 높은 수준의 IL-12p40을 유도함을 보여준다.

[0477] 실시예 21

[0478] 전혈에서 사이토킨 반응

[0479] 전혈은 10 μ g/mL의 이소형 대조군 또는 3C3 또는 양성 대조군으로서 LPS와 밤새 항온처리하였다. 다음 날, 혈장을 수거하고 사이토킨은 ELISA(R&D Systems)에 의해 측정하였다. 상기 결과는 도 31에 나타내고 어떠한 상당한 염증 사이토킨의 생성을 지적하지 않는다.

[0480] 평가물

[0481] 당업자는 단지 통상의 실험, 본원에 기재된 개시내용의 특정 구현예에 대한 많은 평가물을 사용하여 인지하거나 확인할 수 있다. 상기 평가물은 하기의 청구항에 의해 포함되는 것으로 의도된다.

서열 목록의 요약

서열 번호	기재사항
1	인간 CD40 (GenBank 승인 번호: P25942) MVRLPLQCVL WGCLLTAVHP EPPTACREKQ YLINSQCCSL CQPGQKLVS DCTEFTETECL PCGESEFLDT WNRETHCHQH KYCDPNLGLR VQKGTSETD TICTCEEGWH CTSEACESCV LHRSCSPGFG VKQIATGVSD TICEPCPVGF FSNVSSAFEK CHPWTSCEK DLVVQQAGTN KTDVVCGPQD RLRALVVIPI IFGILFAILL VLVFIKKVAK KPTNKAPHPK QEPQEINFPD DLPGSNTAAP VQETLHGCQP VTQEDGKESR ISVQERQ
2	인간 CD40L (GenBank 승인 번호: NP_000065) MIETYNQTSF RSAATGLPIS MKIFMYLLTV FLITQMIGSA LFAVYLHRL DKIEDERNLH EDFVFMKTIQ RCNTGERSLS LLNCEEIKSQ FEGFVKDIML NKEETKKENS FEMQKGDQNP QIAAHVISEA SSKTTSVLQW AEKGYTMSN NLVTLENGKQ LTVKRQGLYY IYAQVTFCSN REASSQAPFI ASLCLKSPGR FERILLRAAN THSSAKPCGQ QSIHLGGVFE LQPGASVFN VIDPSQVSHG TGFTSFGLLK
3	3G5 - VH QQVLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSNGIHVVRQAPGKGLEWVAVIWSGDSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARASGSGSYNFFDYWGQGLVTVSS
4	3G5 - VL EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNLA WYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLT INSLQSEDFAVYYCQHNKWI TFGQGTRLTIK
5	3G5 - VH CDR1 (KABAT) SNGIH
6	3G5 - VH CDR1 (CHOTHIA) GFTFSSN
7	3G5 - VH CDR2 (KABAT) VIWSGDSNKFYADSVKG
8	3G5 - VH CDR2 (CHOTHIA) WSDGSN
9	3G5 - VH CDR3 (KABAT) ASGSGSYNFFDY
10	3G5 - VH CDR3 (CHOTHIA) ASGSGSYNFFDY
11	3G5 - VL CDR1 (KABAT) RASQSVRSNLA
12	3G5 - VL CDR1 (CHOTHIA) RASQSVRSNLA
13	3G5 - VL CDR2 (KABAT) GASTRAT
14	3G5 - VL CDR2 (CHOTHIA) GASTRAT
15	3G5 - VL CDR3 (KABAT) QQHNKWI
16	3G5 - VL CDR3 (CHOTHIA)

[0482]

서열 번호	기재사항
	QQHNKWIT
17	3C3 - VH QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAGSGFIFSRVGMVVRQAPGKGLEWVAVIWDGSYKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESPWYFDYWGQGLTVTVSS
18	3C3 - VL DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGIDFTLT ISLQPEDVATYYCQKYKSAFPTFGPGTKVDIK
19	3C3 - VH CDR1 (KABAT) RYGMV
20	3C3 - VH CDR1 (CHOTHIA) GFIFSRV
21	3C3 - VH CDR2 (KABAT) VIWDGSYKYYADSVKG
22	3C3 - VH CDR2 (CHOTHIA) WYDGSY
23	3C3 - VH CDR3 (KABAT) ESPWYFDY
24	3C3 - VH CDR3 (CHOTHIA) ESPWYFDY
25	3C3 - VL CDR1 (KABAT) RASQGISNYLA
26	3C3 - VL CDR1 (CHOTHIA) RASQGISNYLA
27	3C3 - VL CDR2 (KABAT) AASTLQS
28	3C3 - VL CDR2 (CHOTHIA) AASTLQS
29	3C3 - VL CDR3 (KABAT) QKYKSAFPT
30	3C3 - VL CDR3 (CHOTHIA) QKYKSAFPT
31	3B6 - VH EVQLLESQGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSVVRQAPGKGLEWVSGITGTGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYVQMNSLRAEDTAVYYCAKRAGGSFYYYGMDVWGQGTITVTVSS
32	3B6 - VL DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLHSTGVNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPRFNGSGSGT DFTLKISRVEAEDFQVYCMQALQTPWTFGHGKVEIK
33	3B6 - VH CDR1 (KABAT) SYAMS
34	3B6 - VH CDR1 (CHOTHIA) GFTFSY
35	3B6 - VH CDR2 (KABAT) GITGTGGSTYYADSVKG
36	3B6 - VH CDR2 (CHOTHIA) TGTGGS
37	3B6 - VH CDR3 (KABAT)

[0483]

서열 번호	기재사항
	RAGGSFYYYGMDV
38	3B6 - VH CDR3 (CHOTHIA) RAGGSFYYYGMDV
39	3B6 - VL CDR1 (KABAT) RSSQSLHSTGYNLYD
40	3B6 - VL CDR1 (CHOTHIA) RSSQSLHSTGYNLYD
41	3B6 - VL CDR2 (KABAT) LGSNRAS
42	3B6 - VL CDR2 (CHOTHIA) LGSNRAS
43	3B6 - VL CDR3 (KABAT) MQALQTPWT
44	3B6 - VL CDR3 (CHOTHIA) MQALQTPWT
45	6H6 - VH QVQLVESGGGVVQPGRSLRFSCAASGFTLSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGGSGRYNYFDYWGQGTILVTVSS
46	6H6 - VL EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISLQSEDFAVYYCQQHNNWLTFGGGTKVEIK
47	6H6 - VH CDR1 (KABAT) SYGMH
48	6H6 - VH CDR1 (CHOTHIA) GFTLSSY
49	6H6 - VH CDR2 (KABAT) VIWDDGSNKYYADSVKG
50	6H6 - VH CDR2 (CHOTHIA) WDDGSN
51	6H6 - VH CDR3 (KABAT) AGGSGRYNYFDY
52	6H6 - VH CDR3 (CHOTHIA) AGGSGRYNYFDY
53	6H6 - VL CDR1 (KABAT) RASQSVRSNLA
54	6H6 - VL CDR1 (CHOTHIA) RASQSVRSNLA
55	6H6 - VL CDR2 (KABAT) GASTRAT
56	6H6 - VL CDR2 (CHOTHIA) GASTRAT
57	6H6 - VL CDR3 (KABAT) QQHNNWLT
58	6H6 - VL CDR3 (CHOTHIA) QQHNNWLT
59	1B4 - VH

[0484]

서열 번호	기재사항
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQVPGKLEWVSGITGSGANTFYTDSVKGRFTISRDN SNNSLYLQMNSLRADDTAVYYCAKRNNGSYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
60	1B4 - VL DIVMTQSPLSLPVTGPGEFASISCRSSQSLHSSGYNLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQIPWTFGQGTKVEIK
61	1B4 - VH CDR1 (KABAT) SYAMT
62	1B4 - VH CDR1 (CHOTHIA) GFTFSSY
63	1B4 - VH CDR2 (KABAT) GITGSGANTFYTDSVKG
64	1B4 - VH CDR2 (CHOTHIA) TGSGAN
65	1B4 - VH CDR3 (KABAT) RNGGSYYYYGMDV
66	1B4 - VH CDR3 (CHOTHIA) RNGGSYYYYGMDV
67	1B4 - VL CDR1 (KABAT) RSSQSLHSSGYNLD
68	1B4 - VL CDR1 (CHOTHIA) RSSQSLHSSGYNLD
69	1B4 - VL CDR2 (KABAT) LGSNRAS
70	1B4 - VL CDR2 (CHOTHIA) LGSNRAS
71	1B4 - VL CDR3 (KABAT) MQALQIPWT
72	1B4 - VL CDR3 (CHOTHIA) MQALQIPWT
73	3B6-NS - VH EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSGITGTGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYVQMNSLRAEDTAVYYCAKRAGGSFYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
74	3B6-NS - VL DIVMTQSPLSLPVTGPGEFASISCRSSQSLHSTGYNLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDFGVYYCMQALQTPWTFGHGHTKVEIK
75	3B6-NS - VH CDR1 (KABAT) SYAMS
76	3B6-NS - VH CDR1 (CHOTHIA) GFTFSSY
77	3B6-NS - VH CDR2 (KABAT) GITGTGGSTYYADSVKG
78	3B6-NS - VH CDR2 (CHOTHIA) TGTGGS
79	3B6-NS - VH CDR3 (KABAT) RAGGSFYYYYYGMDV
80	3B6-NS - VH CDR3 (CHOTHIA)

[0485]

서열 번호	기재사항
	RAGGSFYYYGMDV
81	3B6-NS - VL CDR1 (KABAT) RSSQSLLHSTGYNVLD
82	3B6-NS - VL CDR1 (CHOTHIA) RSSQSLLHSTGYNVLD
83	3B6-NS - VL CDR2 (KABAT) LGSNRAS
84	3B6-NS - VL CDR2 (CHOTHIA) LGSNRAS
85	3B6-NS - VL CDR3 (KABAT) MQALQTPWT
86	3B6-NS - VL CDR3 (CHOTHIA) MQALQTPWT
87	2E1.2 - VH QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWDGGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARAGSSGRYYNYFDYWGGTILVTSS
88	2E1.2 - VL2 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDFAVYHCQQYNKWLIFGGGKVEIK
89	2E1.2 - VH CDR1 (KABAT) SYGMH
90	2E1.2 - VH CDR1 (CHOTHIA) GFTFSSY
91	2E1.2 - VH CDR2 (KABAT) VIWDDGSNKYYADSVKG
92	2E1.2 - VH CDR2 (CHOTHIA) WDDGSN
93	2E1.2 - VH CDR3 (KABAT) AGSSGRYYNYFDY
94	2E1.2 - VH CDR3 (CHOTHIA) AGSSGRYYNYFDY
95	2E1.2 - VL2 CDR1 (KABAT) RASQSVRSNLA
96	2E1.2 - VL2 CDR1 (CHOTHIA) RASQSVRSNLA
97	2E1.2 - VL2 CDR2 (KABAT) GASTRAT
98	2E1.2 - VL2 CDR2 (CHOTHIA) GASTRAT
99	2E1.2 - VL2 CDR3 (KABAT) QQYNKWL I
100	2E1.2 - VL2 CDR3 (CHOTHIA) QQYNKWL I

[0486]

서열 번호	기재사항
101	1B5-NK - VH QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHVVRQAPGKGLEWVTLIWFDGSSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRGFAAVAGWYFDFWGRGTLTVSS
102	1B5-NK - VL DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGVRYLAWYQQKPKGVKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFLT ISLQPEDVATYYCQKYFSAPYTFGQGTKLEIK
103	1B5-NK - VH CDR1 (KABAT) SFGMH
104	1B5-NK - VH CDR1 (CHOTHIA) GFTFSSF
105	1B5-NK - VH CDR2 (KABAT) LIWFDGSSKYYADSVKG
106	1B5-NK - VH CDR2 (CHOTHIA) WFDGSS
107	1B5-NK - VH CDR3 (KABAT) GFAAVAGWYFDF
108	1B5-NK - VH CDR3 (CHOTHIA) GFAAVAGWYFDF
109	1B5-NK - VL CDR1 (KABAT) RASQGVRYLA
110	1B5-NK - VL CDR1 (CHOTHIA) RASQGVRYLA
111	1B5-NK - VL CDR2 (KABAT) AASLTQS
112	1B5-NK - VL CDR2 (CHOTHIA) AASLTQS
113	1B5-NK - VL CDR3 (KABAT) QKYFSAPYT
114	1B5-NK - VL CDR3 (CHOTHIA) QKYFSAPYT
115	밀줄쳐진 리더 서열을 갖는 3G5 VH <u>Atggagtttgggctgacctgggttttctcgtgctcttttaagagggtgccagtgtcaggtgcagttggtgga</u> atct Gggggaggcgtggtccagcctgggaagtcctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtagcaa tg Gcattcactgggtccgccaggtccaggcaaggggctggagtggtggcagttatctggtctgatggaagtaataa aa Attctatgcagactccgtgaagggcgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctatatctgcaaa tga Acagcctgagagccgaggacacggctgtatattactgtgcgagagcctctggttcggggagttattataacttc tttg actactggggccagggaaccctggtcacgtctcctca
116	밀줄쳐진 리더 서열을 갖는 3G5 VL <u>Atggaagccccagcgagcttctcttctcctgctactctggtctccagatagcactggagaaatagtgtatgac</u> gcag Tctccagccacctgtctgtgtctccaggggaaagagccacctctcctgcagggccagtcagagtgttagaag

[0487]

서열 번호	기재사항
	<p>taac</p> <p>Ttagcctgggtaccagcagaacacctggccaggctcccaggctcctcatctatggtgcatccaccagggccactgg</p> <p>tatcc</p> <p>Cagccagggttcagtgccagtggtctgggacagagttcactctcaccatcaacagcctgcagtcgaagat</p> <p>gagtg</p> <p>ttattactgtcagcagcataataagtggtacaccttcggccaaggacacgactggagattaaa</p>
117	<p>밀줄쳐진 리더 서열을 갖는 3C3 VH</p> <p><u>Atggagtttgggctgagctgggttttcctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgtcagggtgcagctggtgga</u></p> <p><u>gtctgg</u></p> <p>Gggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagggtctggattcattttcagtcgctatg</p> <p>gcatg</p> <p>Tactgggtccgccaggctccaggcaagggtggagtggtggcagttatggtatgatggaagtataaata</p> <p>ctat</p> <p>Gcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacag</p> <p>cctg</p> <p>Agagccgaggacacgctgtgtattactgtgcgagagaatcaccatggtactactttgactactggggccaggg</p> <p>aacc</p> <p>ctggtcaccgtctcctct</p>
118	<p>밀줄쳐진 리더 서열을 갖는 3C3 VL</p> <p><u>Atggacatgaggggtccctgctcagctcctgggactcctgctgctctggctcccagataccagatgtgacatcca</u></p> <p><u>gatgac</u></p> <p>Ccagtcctccatcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggagtgaggccattg</p> <p>gcaatta</p> <p>Tttagcctggtatcagcagaaccagggaagtccctaagctcctgatctatgctgcatccatttgcaatcag</p> <p>gggtccc</p> <p>Atctcggttcagtgccagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatgtg</p> <p>caactta</p> <p>ttactgtcaaaagtataagagtgccccattcactttcgccctgggaccaagtggatatcaaa</p>
119	<p>밀줄쳐진 리더 서열을 갖는 3B6 VH</p> <p><u>Atggagtttgggctgagctggctttttcttgtggctattttaaaagggtgtccagtgtagggtgcagctgttga</u></p> <p><u>gtctgggg</u></p> <p>Gaggcttggtacagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctttagcagctatgcc</p> <p>atgagct</p> <p>Gggtccgccaggctccagggaagggtggagtggtctcaggtataaactggtactggtggtagcacatactac</p> <p>gcag</p> <p>Actcgtgaagggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatgtgcaaatgaacagcctg</p> <p>agagc</p> <p>Cgaggacacggccgtatattactgtgcgaaaagggtgggtgggagcttctactactactacggtatggagctct</p> <p>ggggcc</p> <p>aaggggaccacggtcaccgtctctctca</p>
120	<p>밀줄쳐진 리더 서열을 갖는 3B6 VL</p> <p><u>Atgaggctccctgctcagctcctggggctgctaatgctctgggtctctggatccagtggggatatttgtgatgac</u></p> <p><u>tcagtcctc</u></p> <p>Cactctccctgcccgctcaccctggagagccggcctccatctcctgcagggtctagtcagagcctcctgcatagt</p> <p>actggata</p> <p>Caactatttggattggtacctgcagaagccagggcagctccacagctcctgatctatttgggttctaatcggg</p> <p>cctccggg</p>

[0488]

서열 번호	기재사항
	Gtccctgacaggttcaatggcagtgatcaggcacagattttacactgaaatcagcagagtgaggctgagga ttttgg ggttttattactgcatgcaagctctacaaactccgtggacgttcggccacgggaccaagtggaatcaaa
121	밀줄쳐진 리더 서열을 갖는 6H6 VH <u>Atggagtttgggctgagctgggtattctctgttgcctcttttaagaggtgtccagtgtcagggtgcagctggtgga</u> gtctgggg Gaggcgtgggtccagcctgggaggtccctgagattctctgtgcagcgtctggattcacctcagtagctatggc atgcactg Ggtccgccaggtccagccaagggtcgtgagtggtggcagttatatgggatgatggaagtaataaatactatg cagact Ccgtgaaggccgattcacatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaga gccgagg Acacggctgtctattactgtgcgagagcggggggttcggggaggtattataactactttgactactggggccag ggaacct ggtcacgtctctca
122	밀줄쳐진 리더 서열을 갖는 6H6 VL <u>Atggaagccccagcgagcttctcttctcctgctactctggctccagataccactggagaaatagtgatgac</u> gcagttctcc Agccacctgtctgtgtctccaggggaaagagccacctctcctgcagggccagtcagagtgttagaagcaact tagcctgg Taccagcagaacctggccaggtcccaggtcctcatctatggtgcatccaccagggccactggtatcccagc caggttcag Tggcagtggtctctgggacagacttcactctcaccatcagcagcctgcagctgaagattttgcagtttattact gtcagcagca Taataactggctcactttcggcggaggaccaaggtggagatcaaa
123	밀줄쳐진 리더 서열을 갖는 1B4 VH <u>Atggagtttgggctgagctggctttttctgtggctattttaaaggtgtccaatgtgaggtgcagctgttggga</u> atctggggga Gccttggtacagcctggggggtccctgagactctctgtgcggcctctgggttcacctttagcagctatgccat gacctgggtc Ggccaggttcagggaaggccctggagtggtctcagggtattactggtagtgggtgctaacacattctacacaga ctcgtga Agggccgggttcacatttccagagacaattccaataatcgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgat gacacggc Cgtatactactgtgcgaaaagaaatgggtgggagttactactactactacggcatggacgtctggggccaaggga ccacggtc accgtgtctca
124	밀줄쳐진 리더 서열을 갖는 1B4 VL <u>Atgaggctccctgctcagctcctggggctgctaagctctgggtctctggatccagtggggatattgtgatgac</u> tcagttccac Tctccctgccgtcaccctggagagccggcctccatctcctgcaggtcaagtgcagcctcctgcatagtgt ggatacaacta Tttggattggtacctgcagaagccagggcagttccacaactcctgatctatttgggttctaactcgggcctccg gggtccctgac Aggttcagtggtcagtgatcaggcacagattttacactgaaatcagcagagtgaggctgaggatgttgggt ttattactg catgcaagctctacaaattccgtggacgttcggccaagggaaccaagtggaatcaaa

[0489]

서열 번호	기재사항
125	<p>밀줄쳐진 리더 서열을 갖는 2E1.2 VH</p> <p><u>Atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagctggtgga</u> <u>gtctgggggaggcgtggtCcagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagta</u> <u>gctatggcatgcactgggtccgcccaggctccaggcaAggggctggagtgggtggcagtatatgggatgatgga</u> <u>agtaataaatactatgcagactccgtgaaggccgattcaccatctccagagAcaattccaagaacacgctgta</u> <u>tctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagcgggaagttcggggagggt</u> <u>attataactactttgactactggggccagggaacctgggtaccgtctcctca</u></p>
126	<p>밀줄쳐진 리더 서열을 갖는 2E1.2 VL2</p> <p><u>Atggagccccagcgagcttctcttccctcgtgctactctgggtcccagataccactggagaaatagtgtatgac</u> <u>gcagcttccagccacctgtctgtgtctccaggggaaagagccacctctcctgcagggccagtgcaggtgtta</u> <u>ggagcaacttagcctggtatcagcagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgggtgcattccaccagg</u> <u>gccactgggtatcccagacaggttcagtgccagtggtctgggacagagttcactctcaccatcagcagcctgca</u> <u>gtctgaagattttgcagttatcactgtcagcagataataagtgggtcattttcggcggaggggaccaaggtgg</u> <u>agatcaaa</u></p>
127	<p>밀줄쳐진 리더 서열을 갖는 1B5 VH</p> <p><u>Atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagctggtgga</u> <u>gtctgggggaggcgtggtcagcCtgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagta</u> <u>gctttggcatgcactgggtccgcccaggctccaggcaaggggctggaGtgggtgacacttatatggtttgatgga</u> <u>agtttctaatactatgcagactccgtgaaggccgattcaccatctccagagacaactccaacaacacGctgta</u> <u>tctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtatattactgtgtgagaggttttcagcagtggtctg</u> <u>ggtggtacttcgatttctggggccgtggcacctgggtcactgtctcctca</u></p>
128	<p>밀줄쳐진 리더 서열을 갖는 1B5 VL</p> <p><u>Atggacatgagggtccctcgtcagctcctgggactcctgctgctgggtcccagataccagatgtgacatcca</u> <u>gatgaccagctctccatcctcccTgtctgcactgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcgagtcagg</u> <u>gcgttagaaagtatttagcctggtatcagcagaaaccagggaAgttccctaagctcctgactctatgctgcattcc</u> <u>actttgcaatcaggggtcccactctcgggtcagtgccagtggtatcgggacagatttcactctaccaTcagcag</u> <u>cctgcagcctgaagatgttgcaacttattactgtcaaaagtatttcagtgccccgtacacttttgccaggggga</u> <u>ccaaactggagatcaaa</u></p>
129	<p>밀줄쳐진 리더 서열을 갖는 3B6-NS VH</p> <p><u>Atggagtttgggctgagctgggttttcttgggtattttaaaaggtgtccagtgtgaggtgcagctgttggga</u> <u>gtctgggggaggcgttggtacagcctggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttagca</u> <u>gctatgccatgagctgggtccgcccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcaggtataactggtactggt</u> <u>ggtgacacatactacgcagactccgtgaaggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgta</u> <u>tgtgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggcgtatattactgtgcgaaaagggtggtgggagcttct</u> <u>actactactacggtatggagctctggggccaagggaaccacgggtaccgtctcctca</u></p>
130	<p>밀줄쳐진 리더 서열을 갖는 3B6-NS VL</p> <p><u>atgaggctccctgctcagctcctggggctgctaatactctgggtctctggatccagtggggatattgtgatgac</u> <u>tcagttccactctccctgcccgtcacccctggagagccggcctccatctcctgcaggtctagtgcagcctcc</u> <u>tgcatagtactggatacaactatttggattggtacctgcagaagccagggcagttccacagctcctgatctat</u> <u>ttgggttctaatacgggctccggggtccctgacaggttcagtgccagtggtcaggcacagattttacactgaa</u> <u>aatcagcagagtgaggctgaggattttggggtttattactgcatgcaagctctacaactccgtggacgttcg</u> <u>gccacgggaccaaggtggaaatcaaa</u></p>
131	<p>밀줄쳐진 리더 서열을 갖는 1B5-NK VH</p> <p><u>atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagctggtgga</u> <u>gtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagta</u> <u>gctttggcatgcactgggtccgcccaggctccaggcaaggggctggagtgggtgacacttatatggtttgatgga</u> <u>agtttctaatactatgcagactccgtgaaggccgattcaccatctccagagacaactccaagaacacgctgta</u></p>

[0490]

서열 번호	기재사항
	tctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtatattactgtgtgagaggttttgcagcagtggtctg ggtggtacttctgatttctggggccgtggcaccctggctactgtctctca
132	밀줄쳐진 리더 서열을 갖는 1B5-NK VL Atggacatgagggctcctgctcagctcctgggactcctgctgctctggctcccagataaccagatgtgacatcca gatgaccagctctccatctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgcggggcagtcagg gcgttagaaagtatttagcctggatcagcagaaccagggaagtctcctaagctcctgactatgctgcatcc acttgcacatcaggggtcccatctcgggtcagtgccagtggaatctgggacagatttcaactctcaccatcagcag cctgcagcctgaagatgttgaactattactgtcaaaagtatttcagtgccccgtacacttttggccaggga ccaaactggagatcaaa
133	인간 CD40 세포외 도메인 EPPTACREKQYLINSQCCSLQPGQKLVSDETEFTETELPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGRVQK GTSETDTICTEEGWHTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSAFEKCHPWTSC TKDLVVQAGTNKTDVVCQGDRLR
134	면역글로불린 중쇄 불변 감마 2 (IgHG2) (Uniprot P01859) ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGV HTFP AVLQSSGLYSLSSVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV KCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPETCVVVDVSHEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDISVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
135	이델릭체의 가변 영역 및 볼드체의 불변 도메인을 갖는 3C3 중쇄 QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAGSGFIFSRYGMVWRQAPGKGLEWVAVIWDGSIYKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARESPWYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKCCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPETCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VSVLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
136	이델릭체의 가변 영역 및 볼드체의 불변 도메인을 갖는 을 갖는 3C3 경쇄: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDVATYYCQKYKSAFTFGPGTKVDIARTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
137	밀줄쳐진 리더 서열, 이델릭체의 가변 영역 및 볼드체의 불변 도메인을 갖는 3C3 중쇄 MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAGSGFIFSRYGMVWRQAPGKGLEWVAVIWDG SIYKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARESPWYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSNFGTQTYTCNV DKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPETCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEAL HNHYTQKSLSLSPG
138	밀줄쳐진 리더 서열, 이델릭체의 가변 영역 및 볼드체의 불변 도메인을 갖는 3C3 경쇄 MGWSCIILFLVATATGHS DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASLTQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYKSAFTFGPGTKVDIARTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT

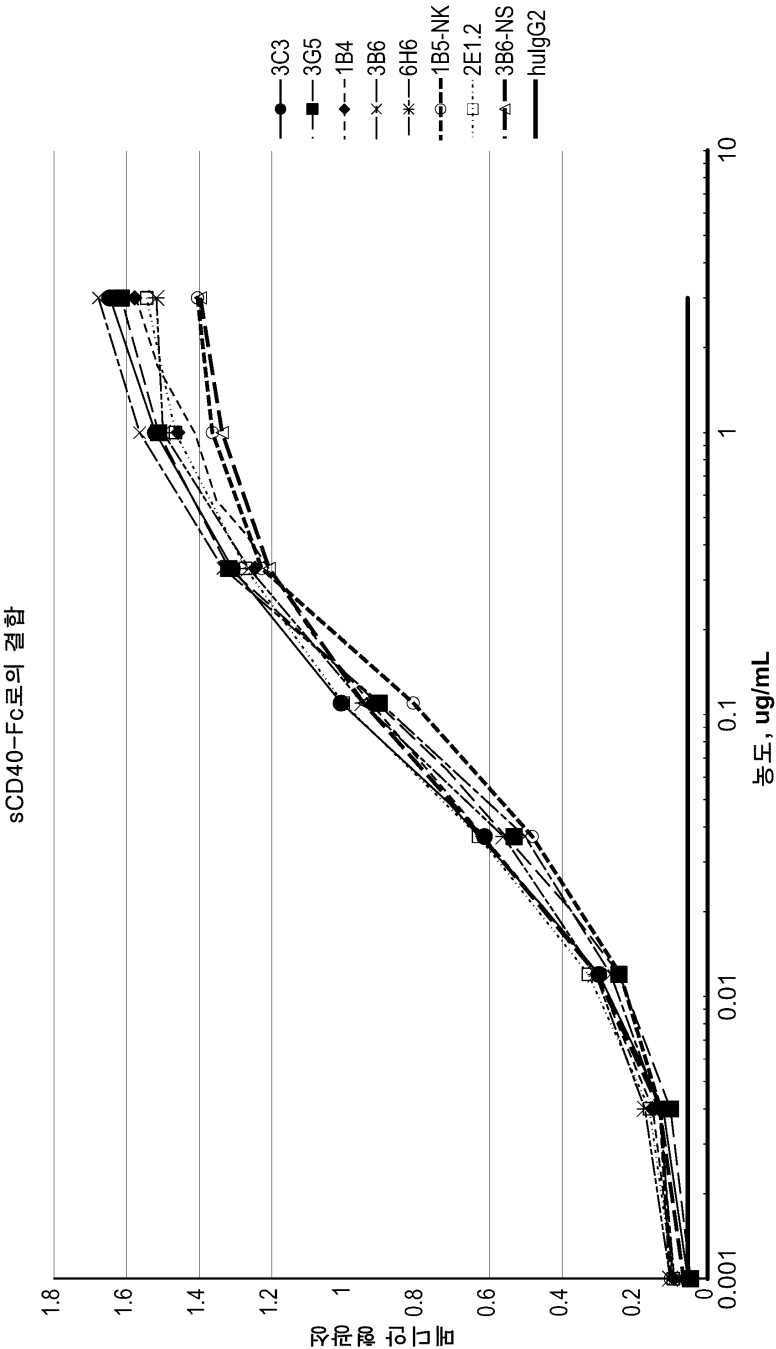
서열 번호	기재사항
	ASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

도면

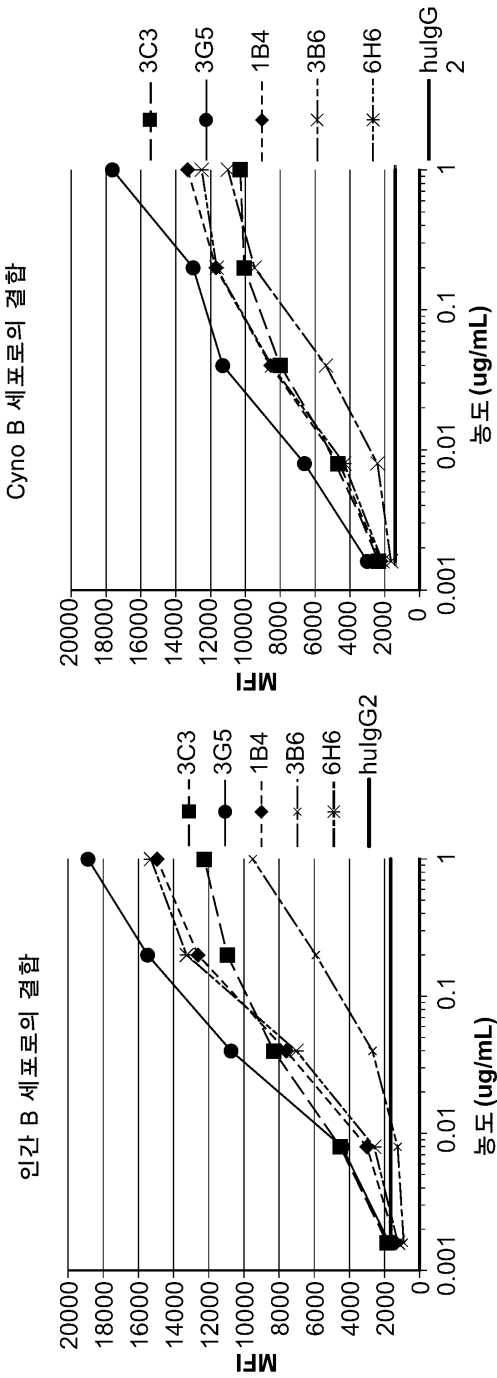
도면1

클론	KD (pM)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
3C3	10.7	8.13E+05	8.67E-06
3G5	3.3	9.05E+05	2.97E-06
1B4	10.5	8.32E+05	8.76E-06
3B6	7.9	7.82E+05	6.14E-06
6H6	2.8	9.05E+05	2.49E-06

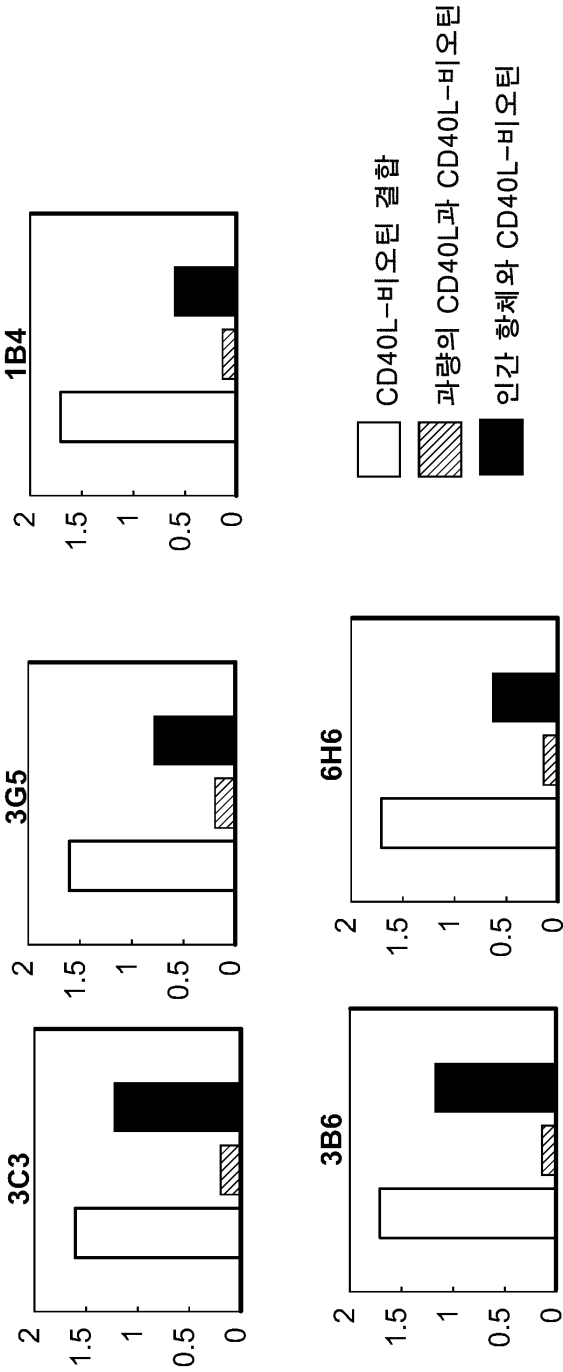
도면2



도면3

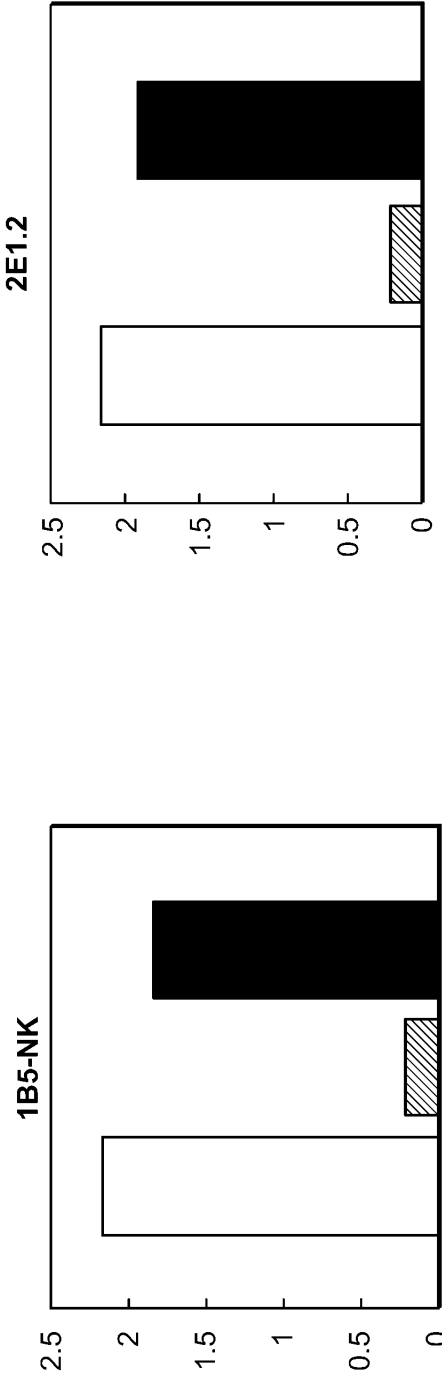


도면4a

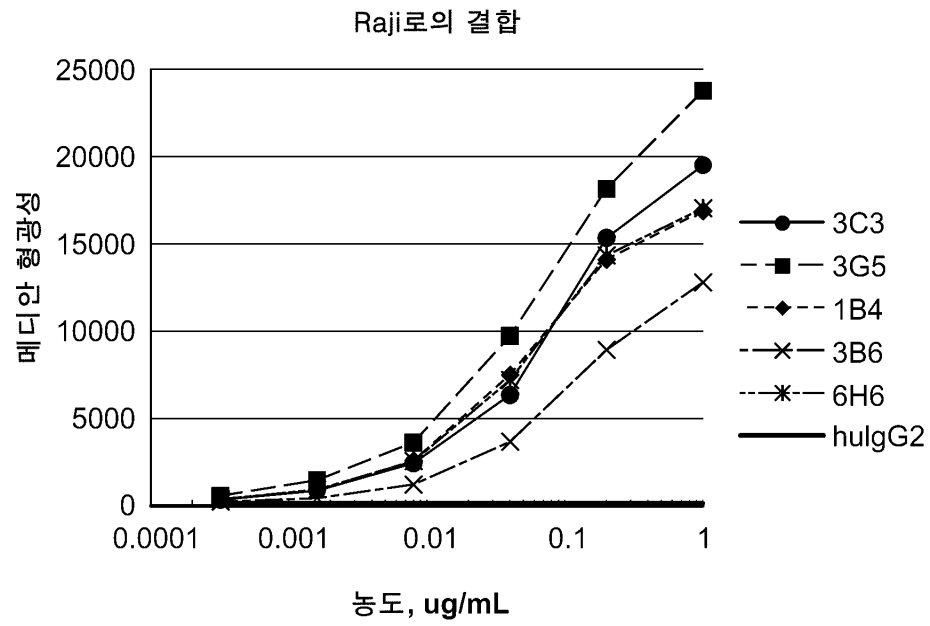


도면4b

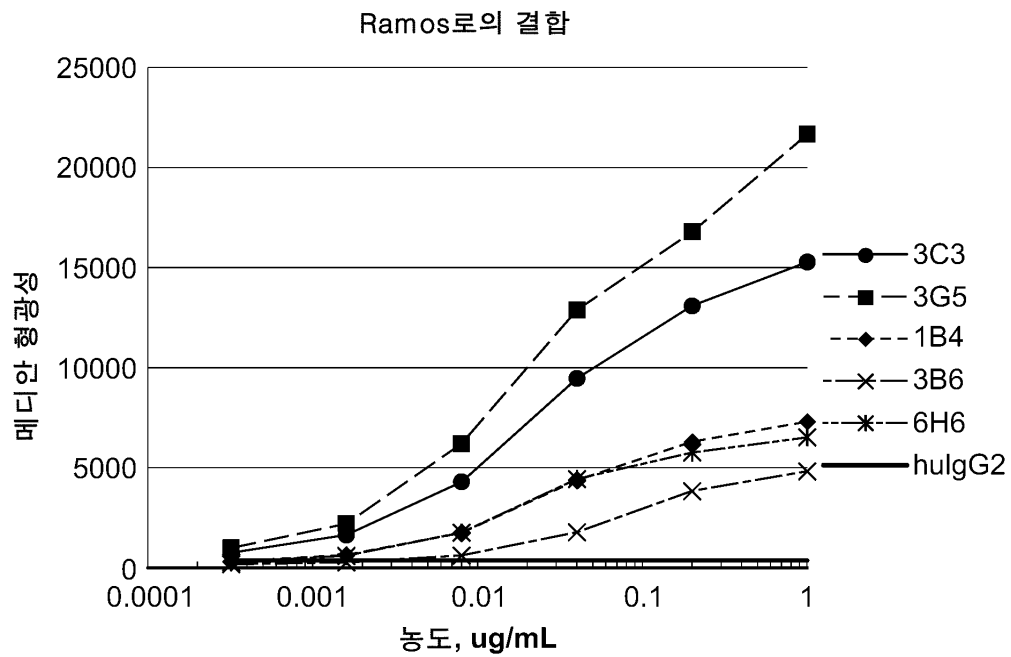
CD40L 차단



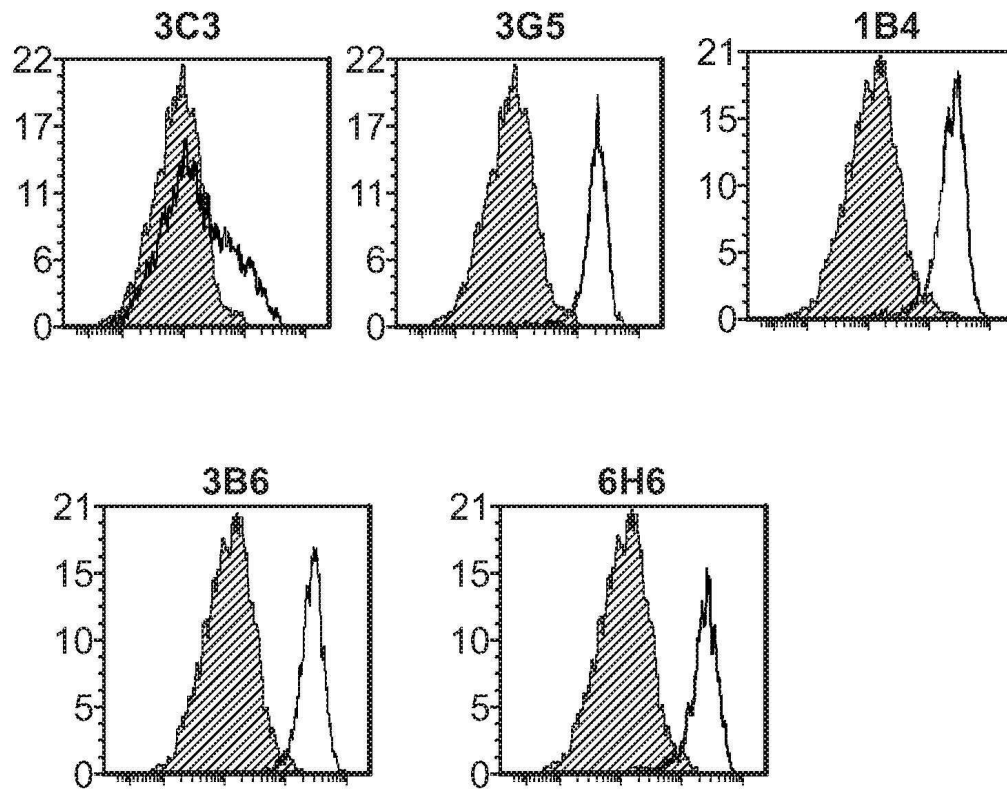
도면5



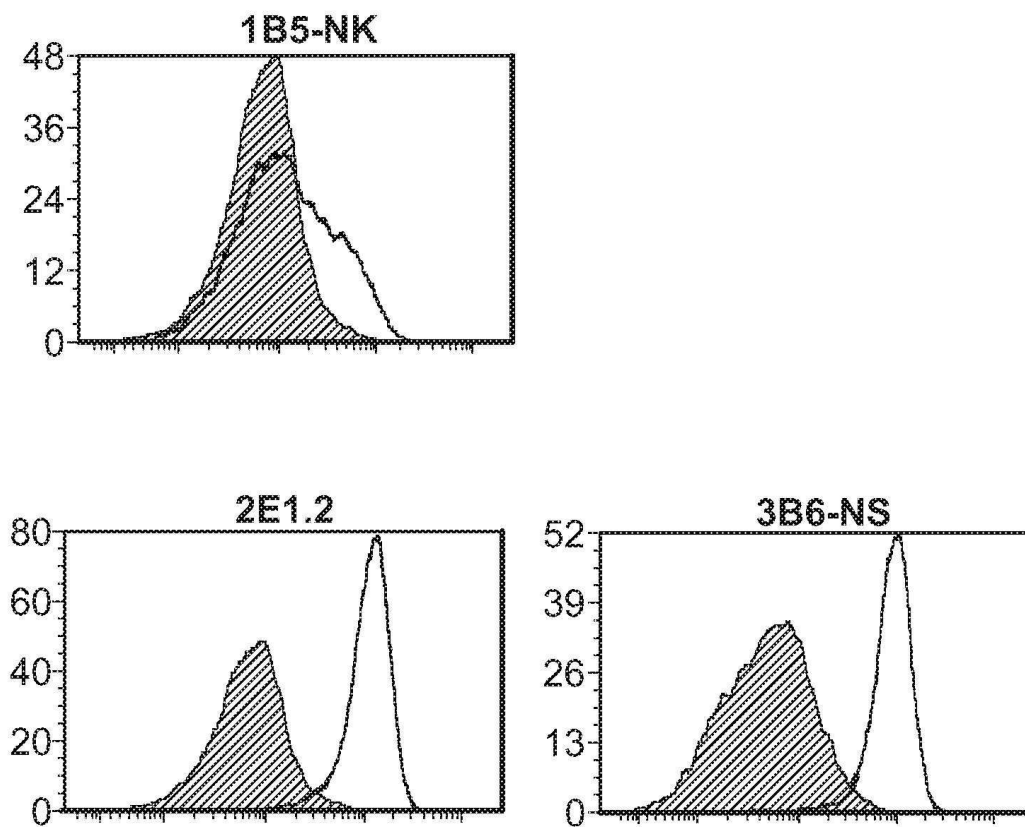
도면6



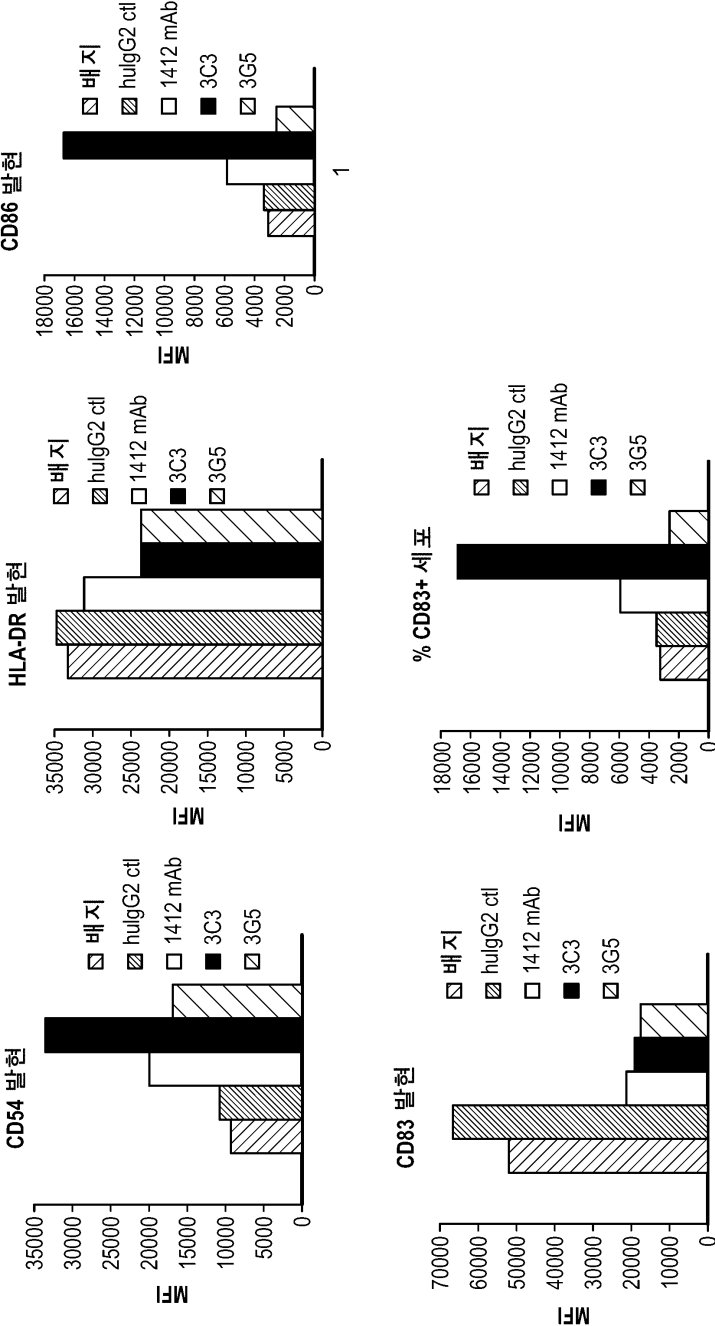
도면7a



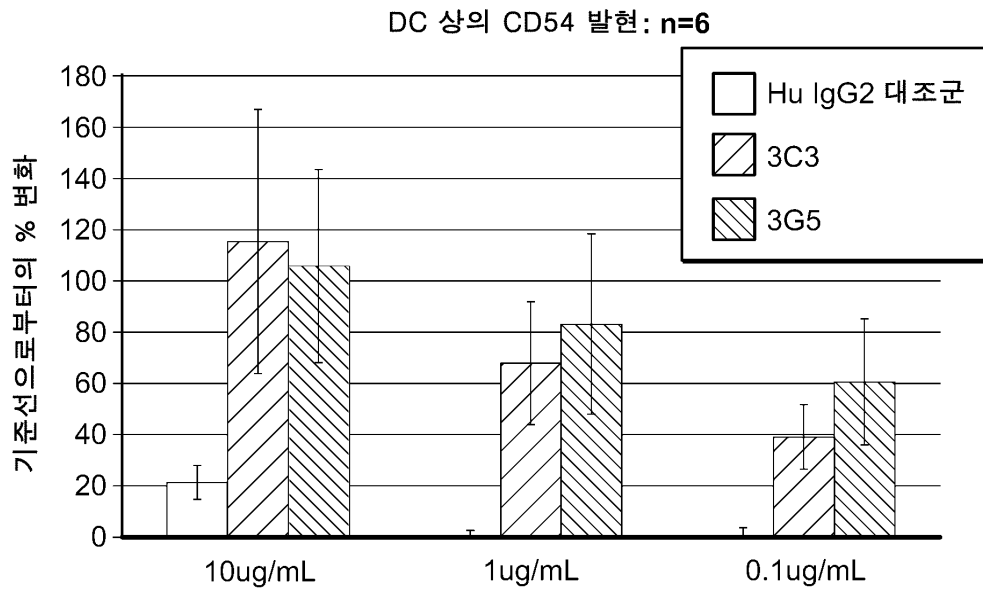
도면7b



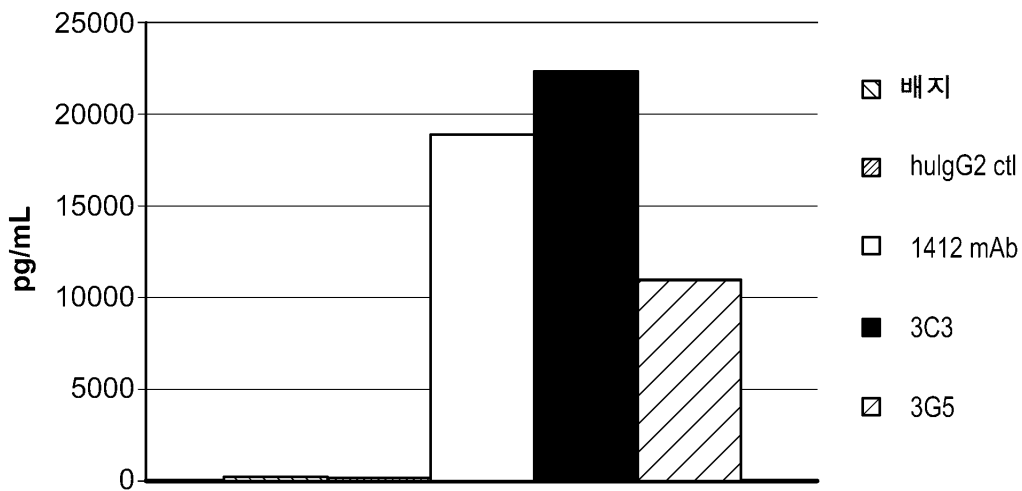
도면8a



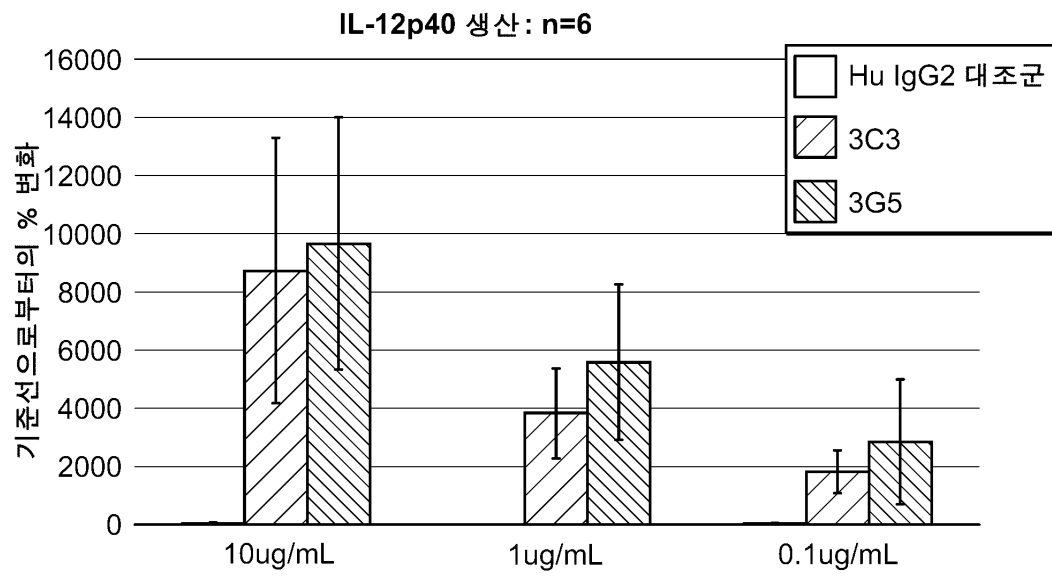
도면8b



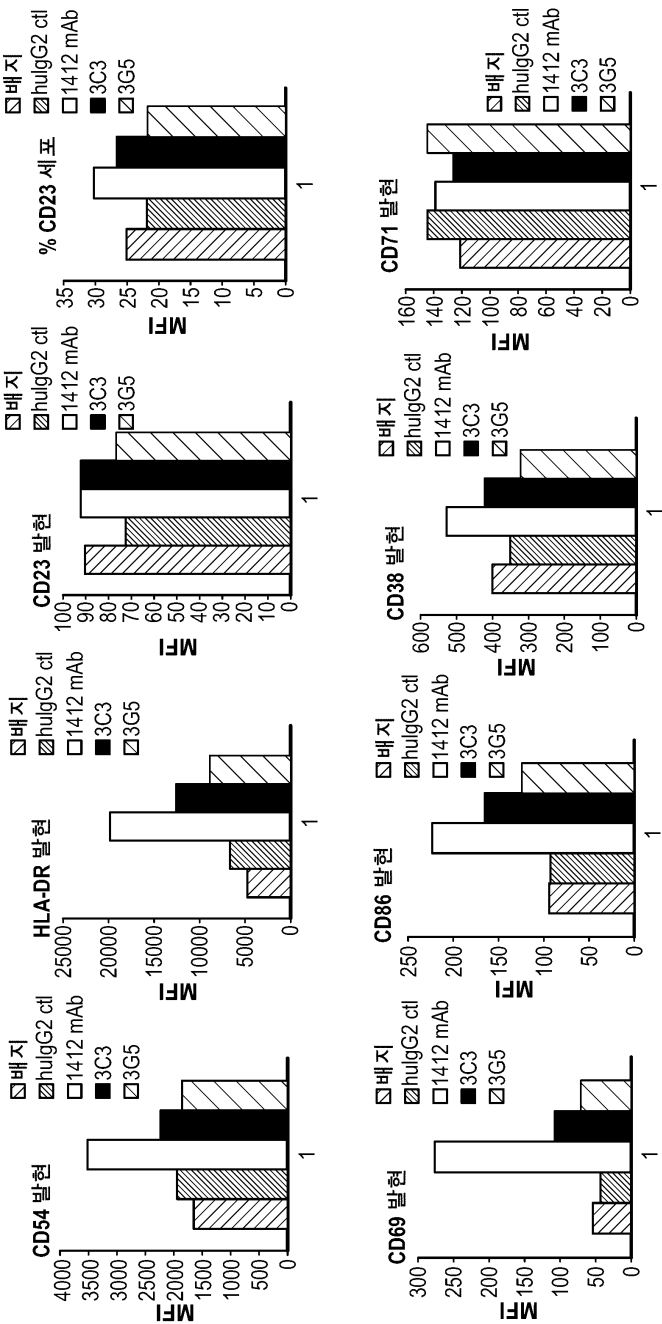
도면9a



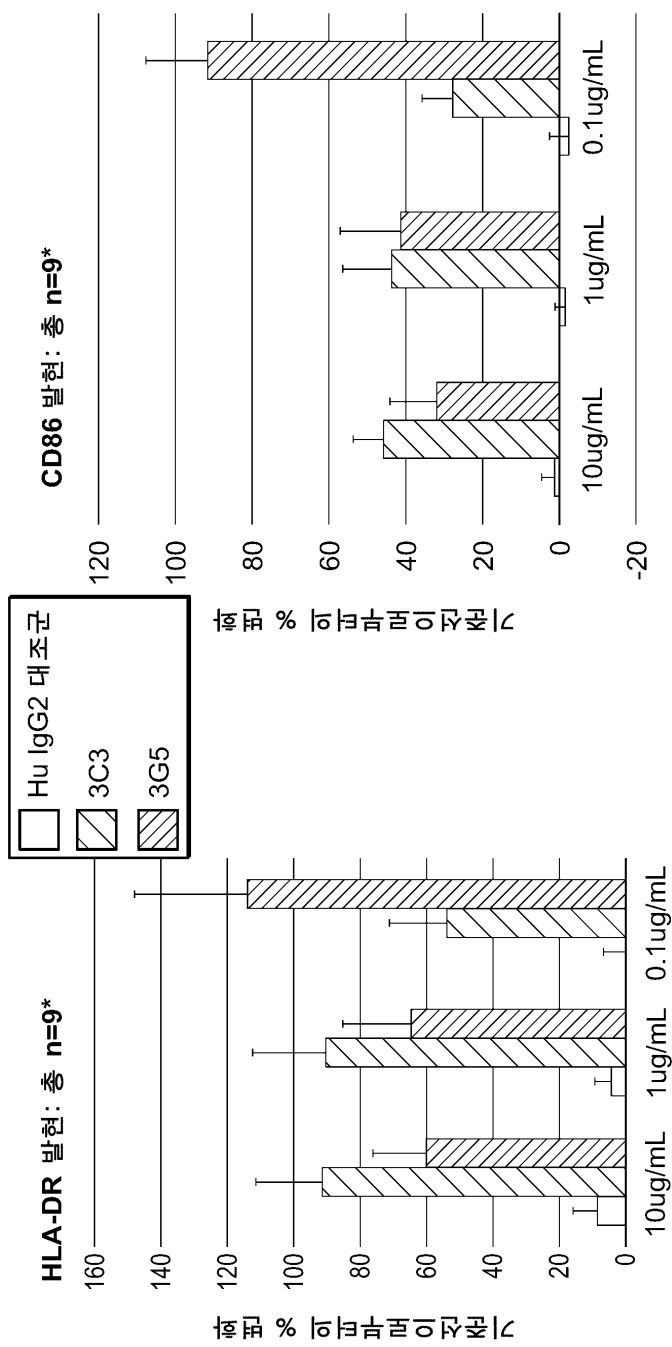
도면9b



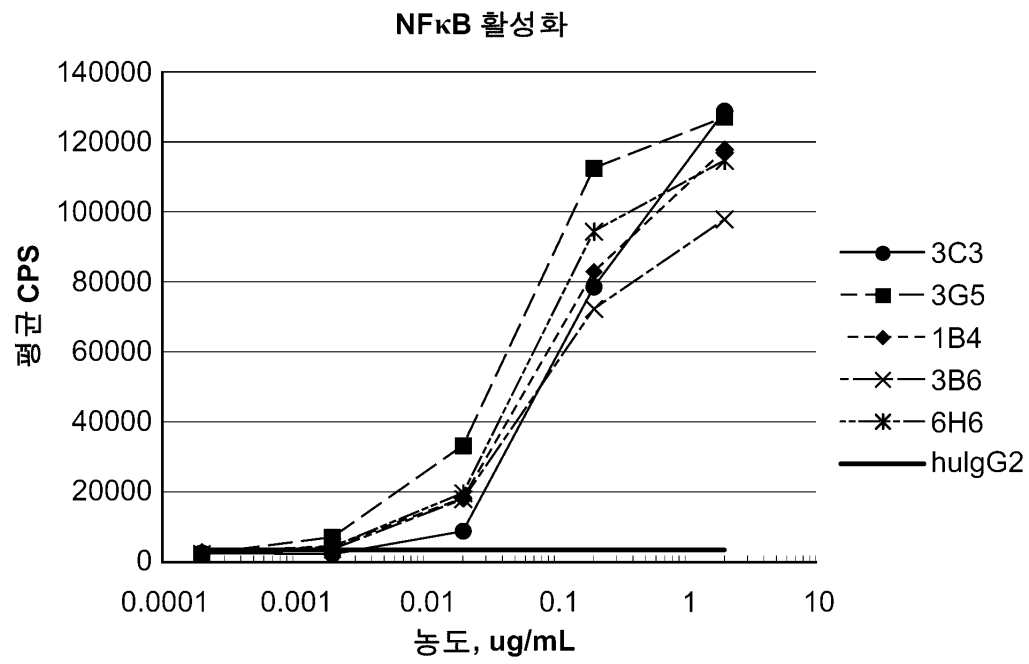
도면10a



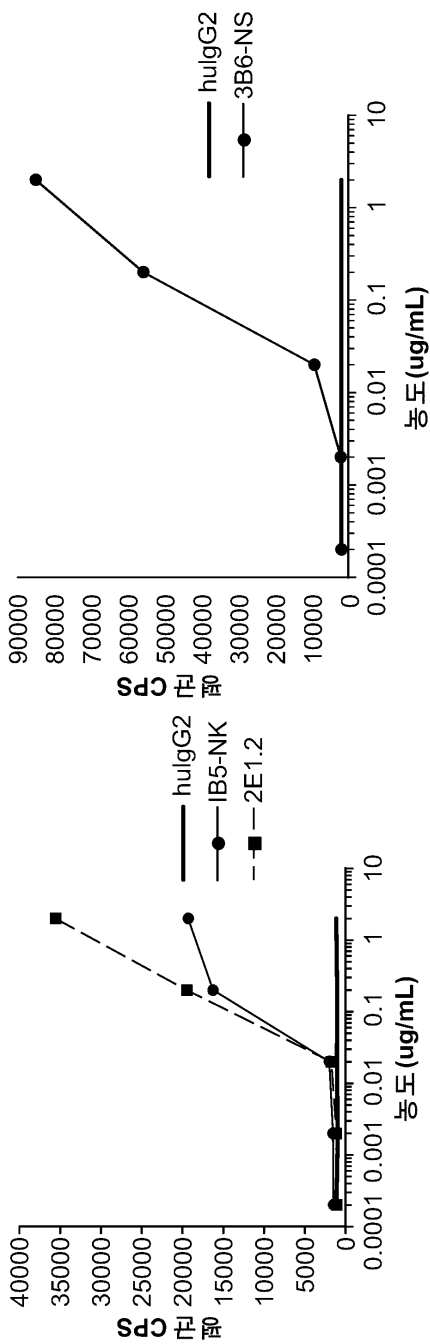
도면10b



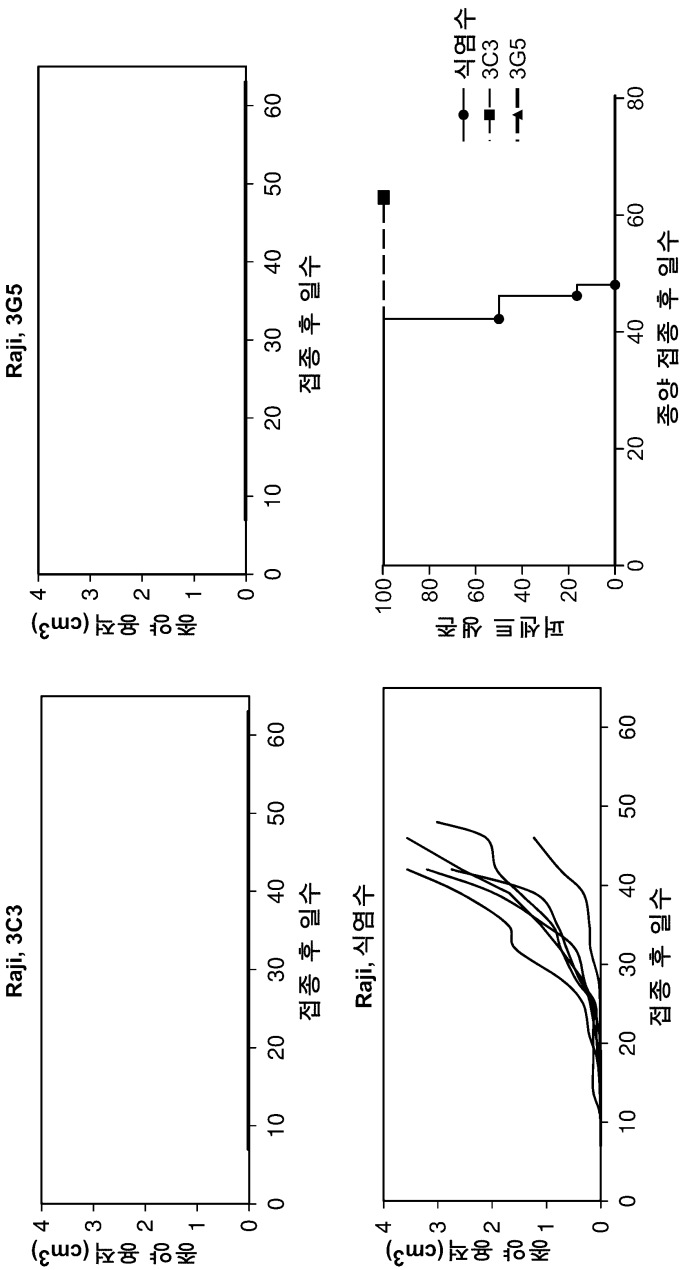
도면11a



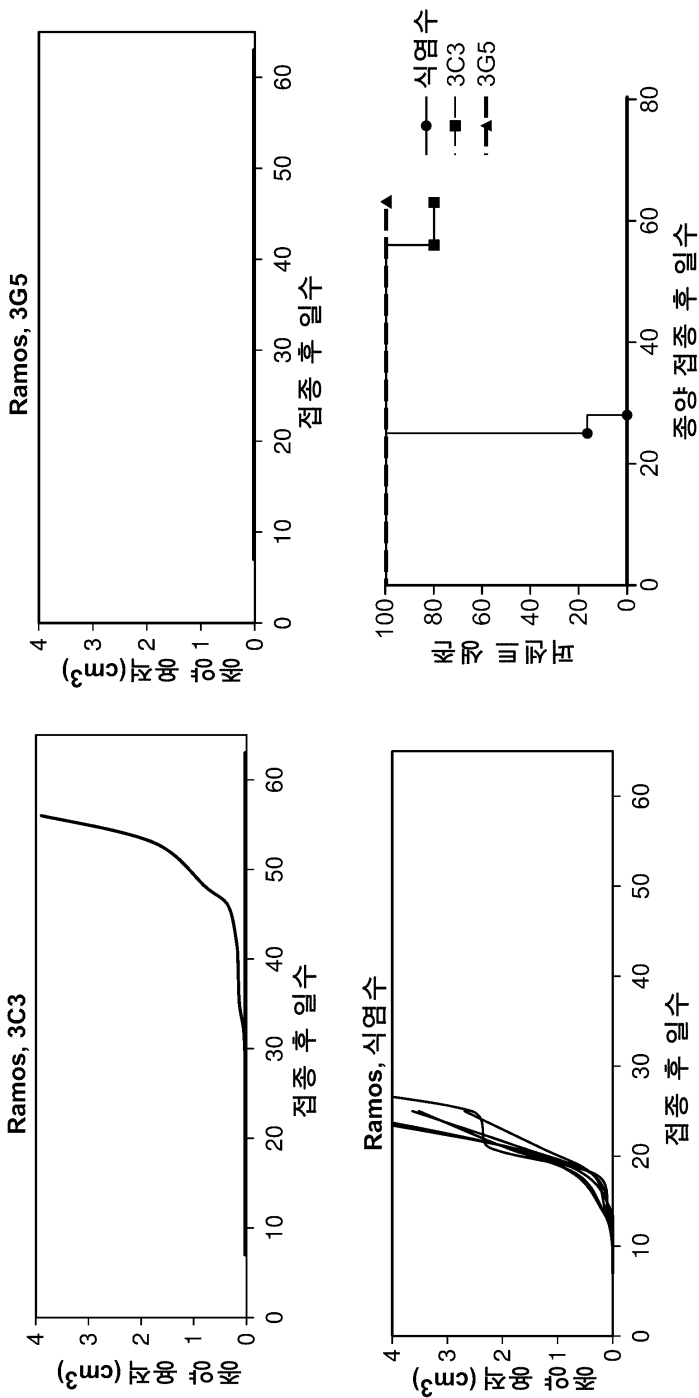
도면11b



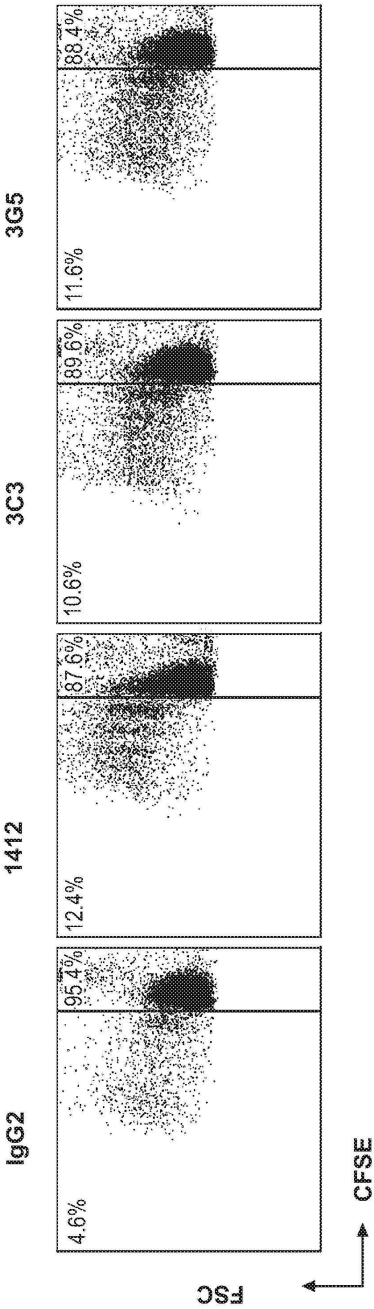
도면12



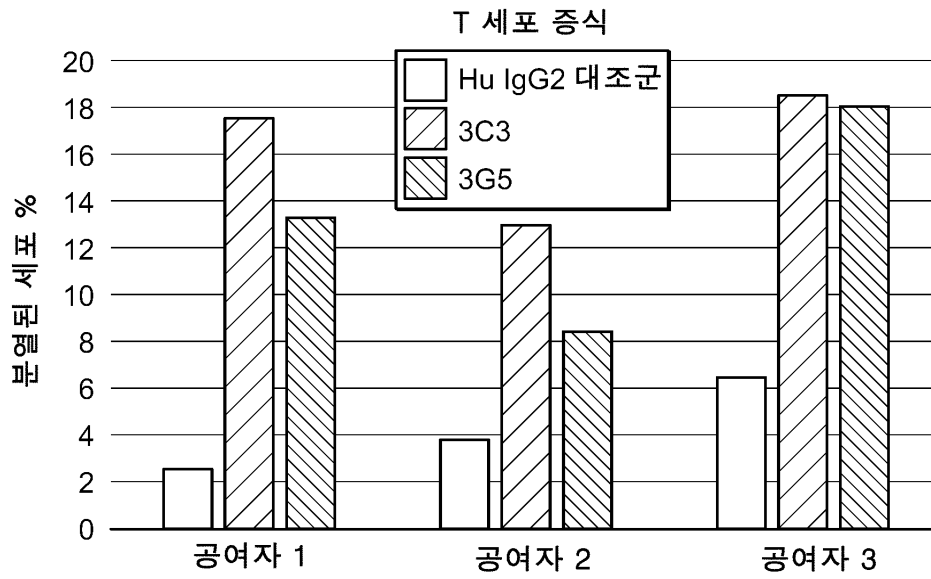
도면13



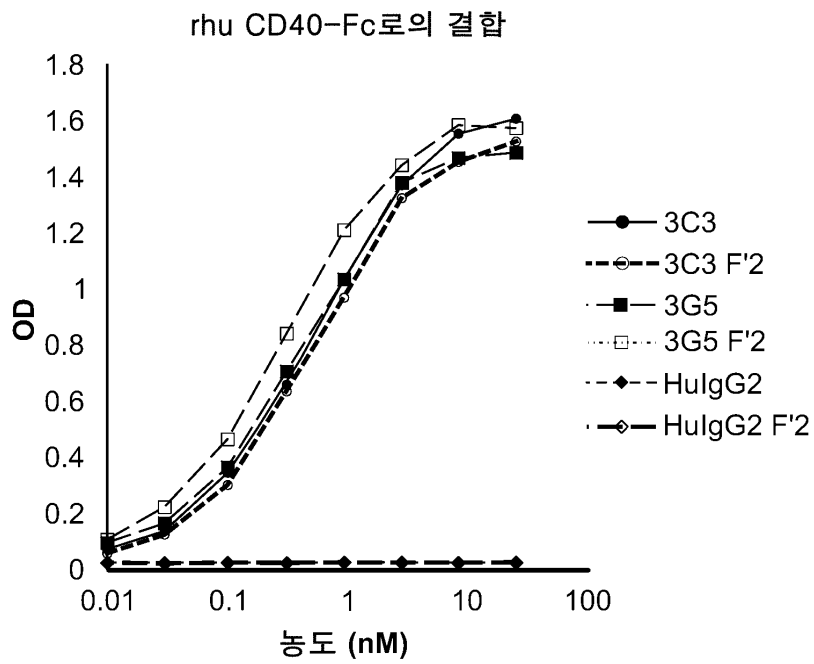
도면14a



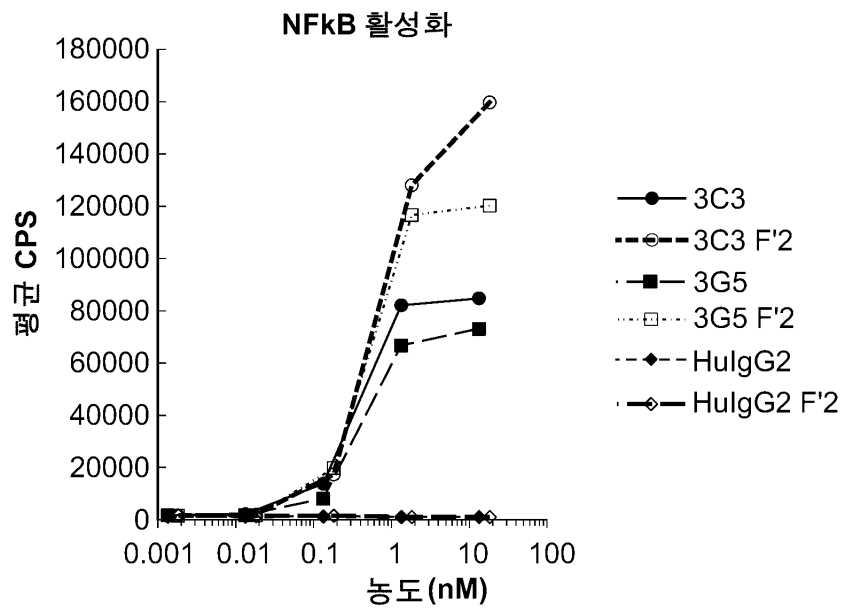
도면14b



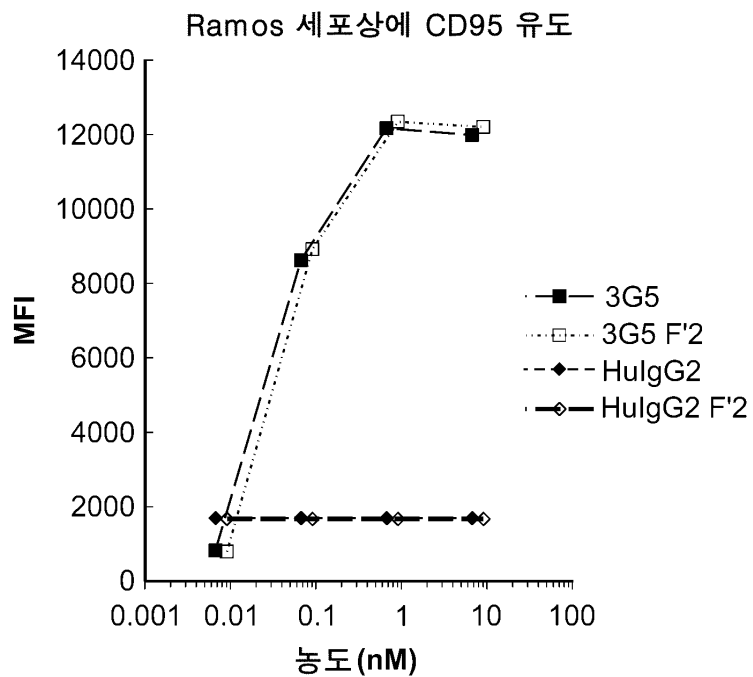
도면15



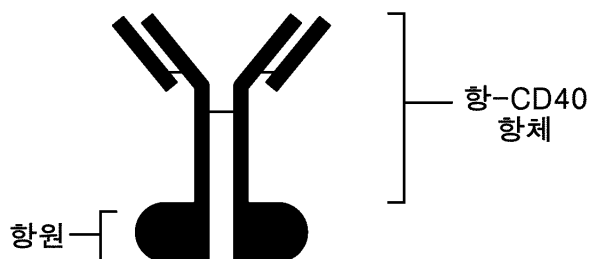
도면16



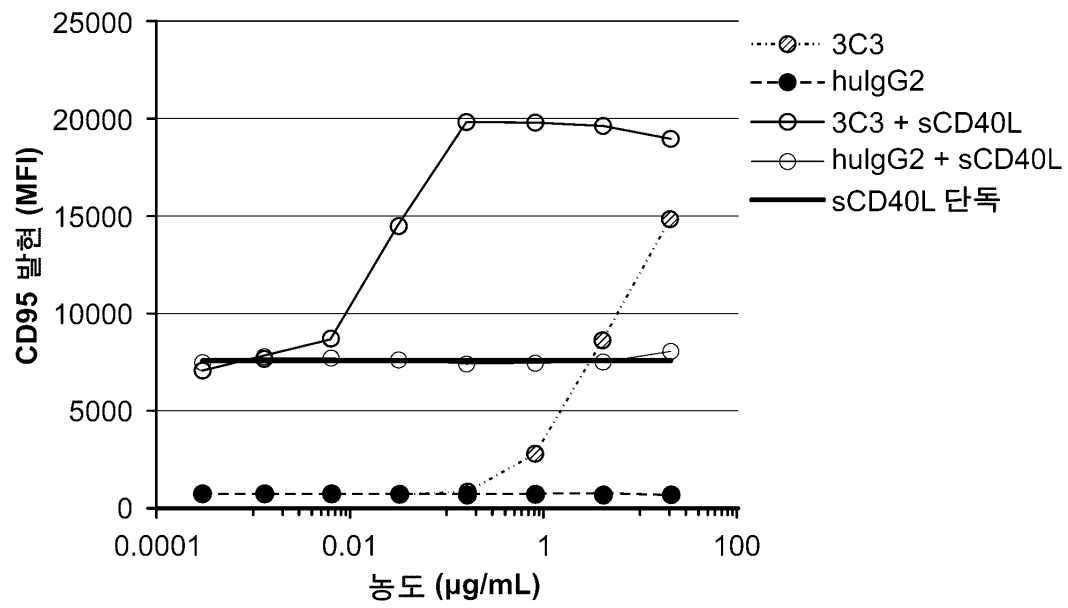
도면17



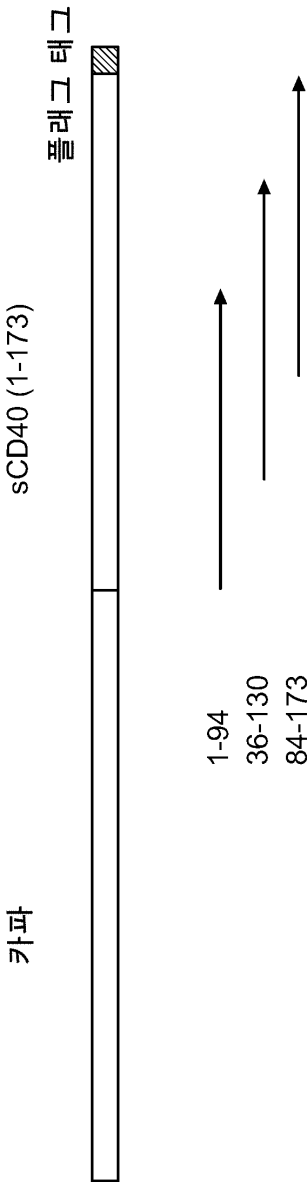
도면18



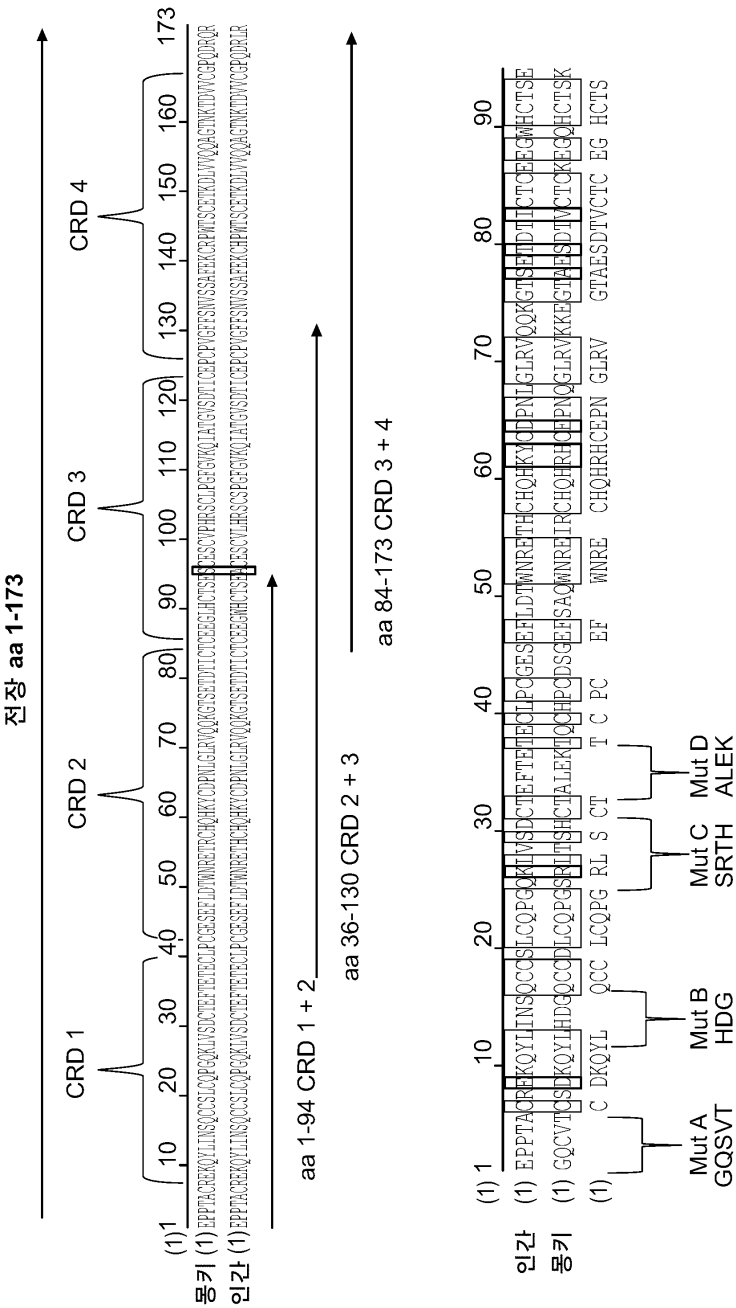
도면19



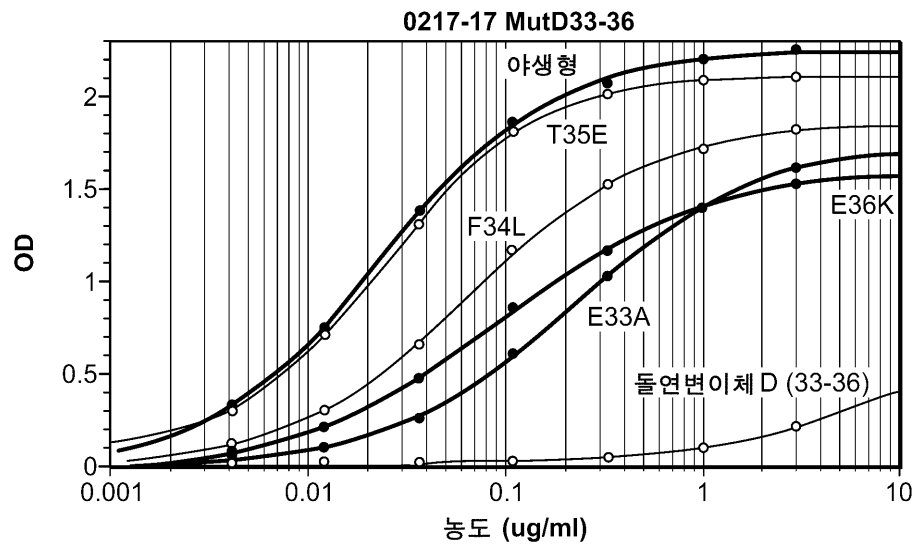
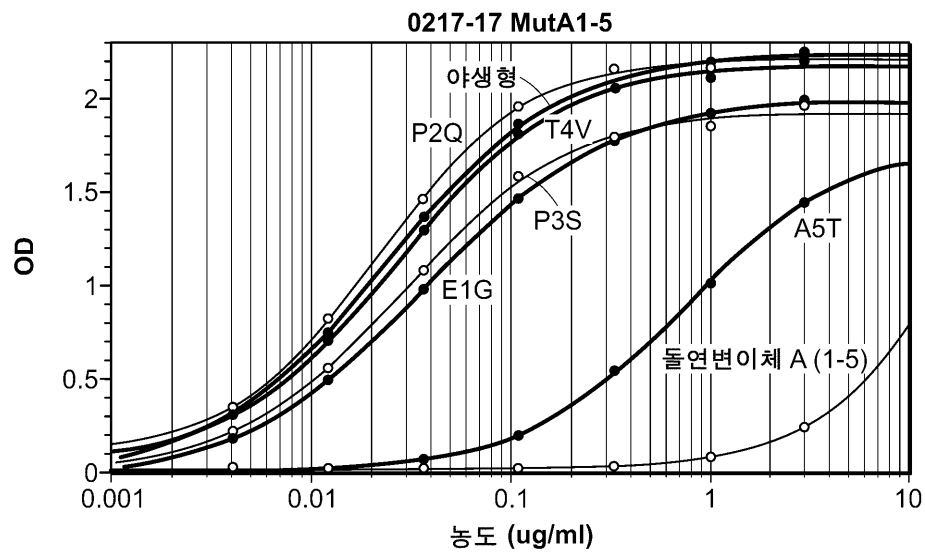
도면20



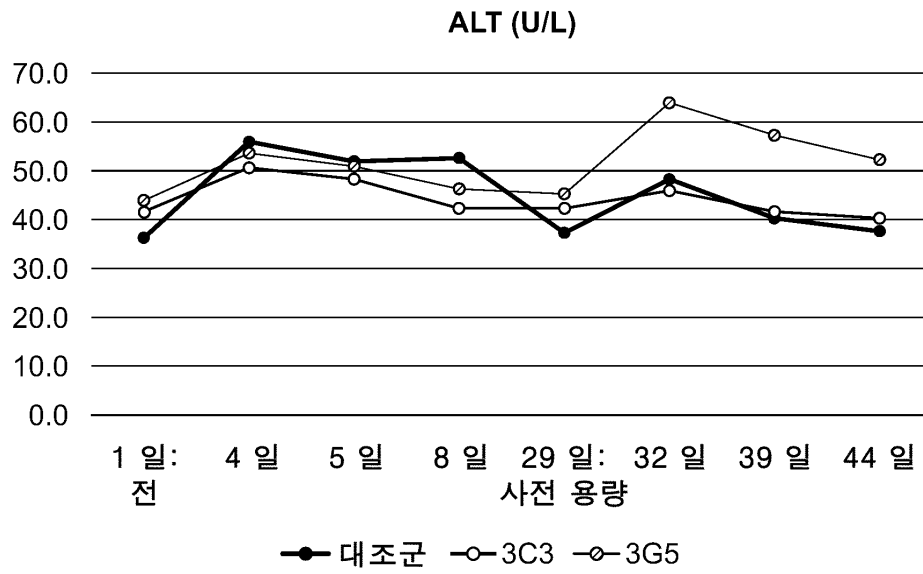
도면21



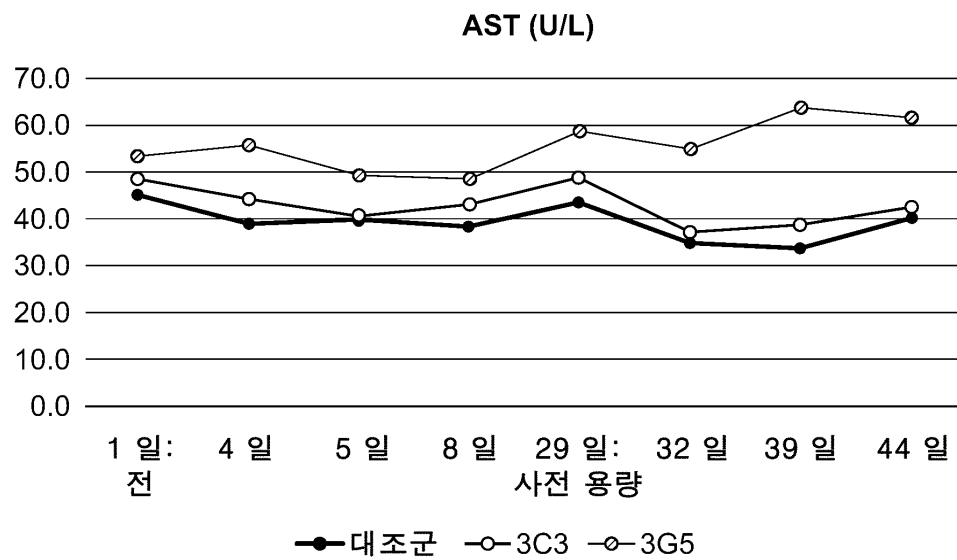
도면22



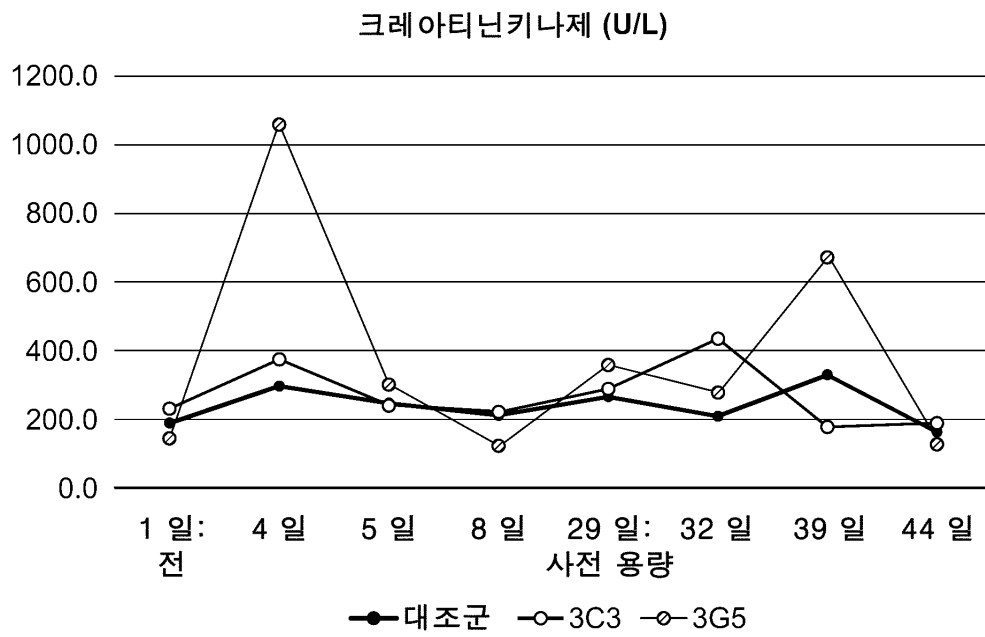
도면23a



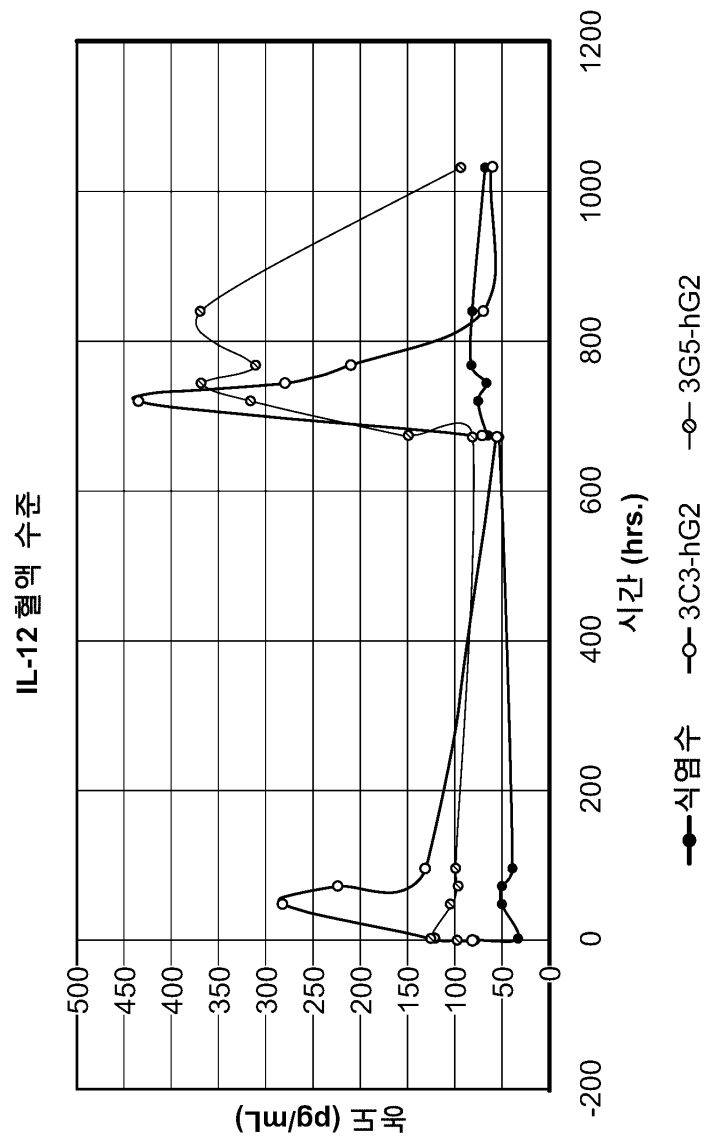
도면23b



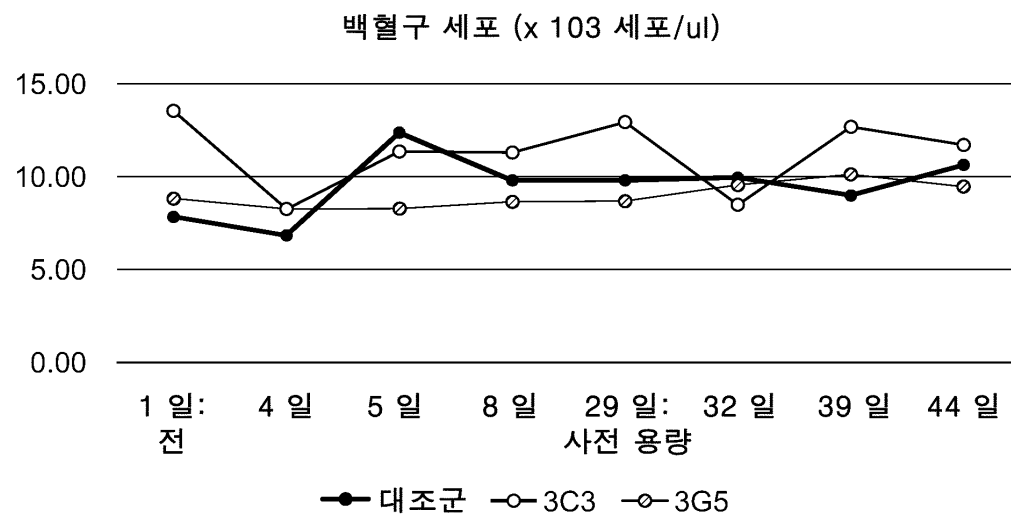
도면23c



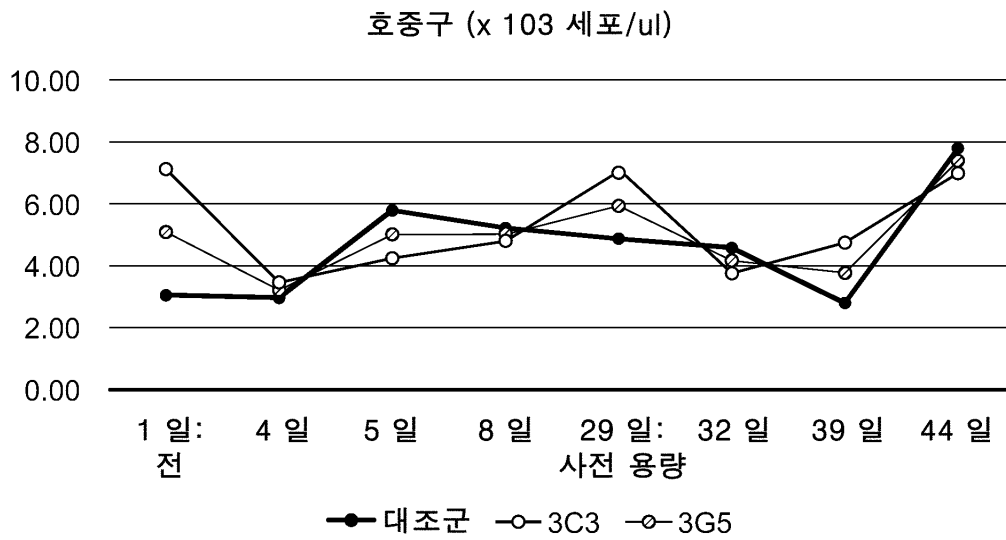
도면24



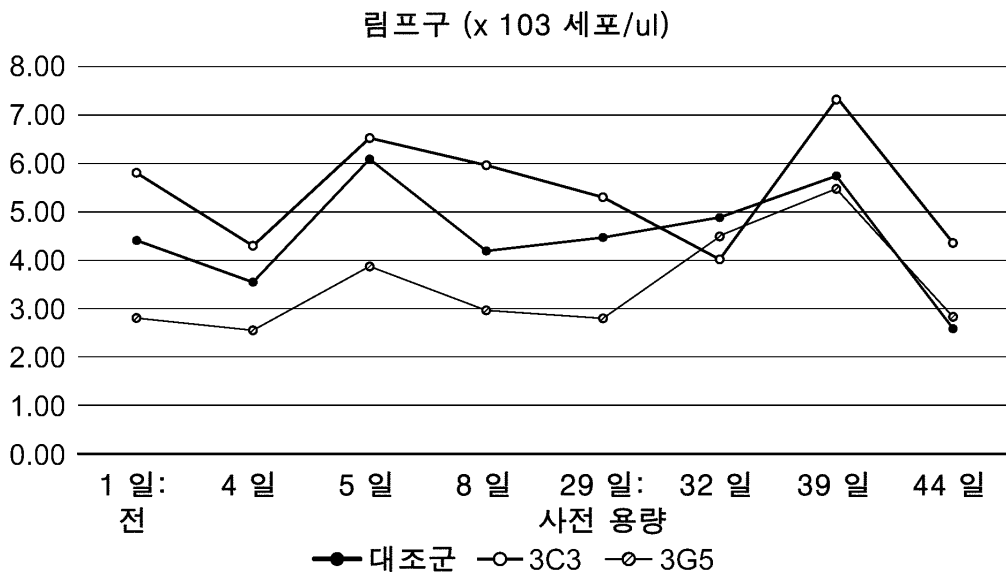
도면25a



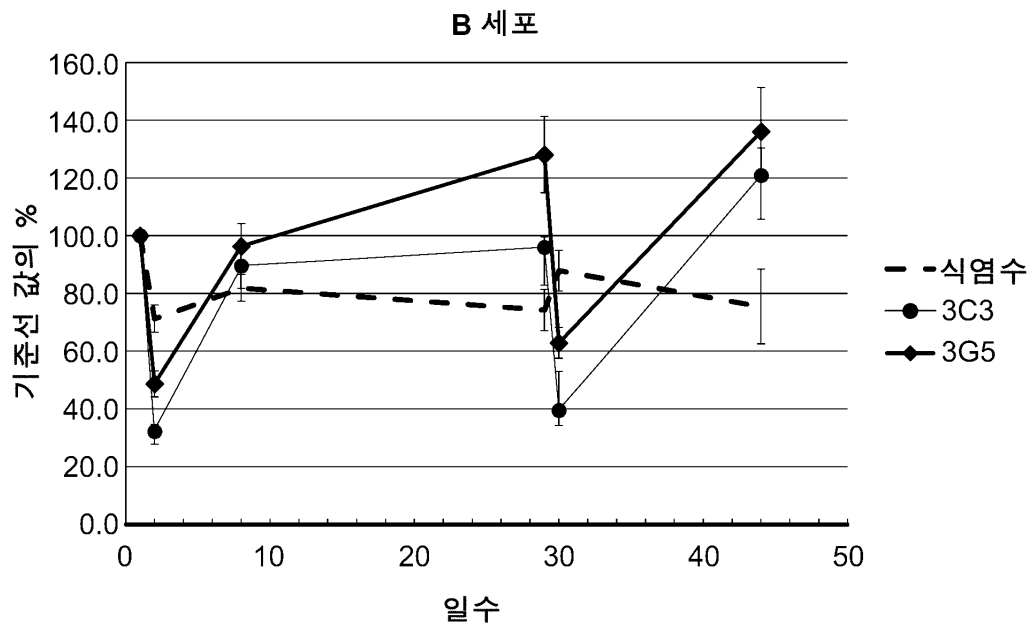
도면25b



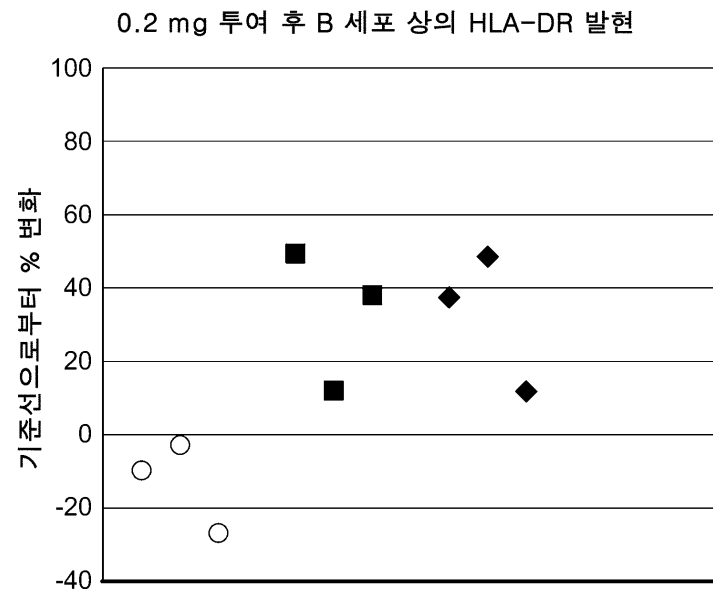
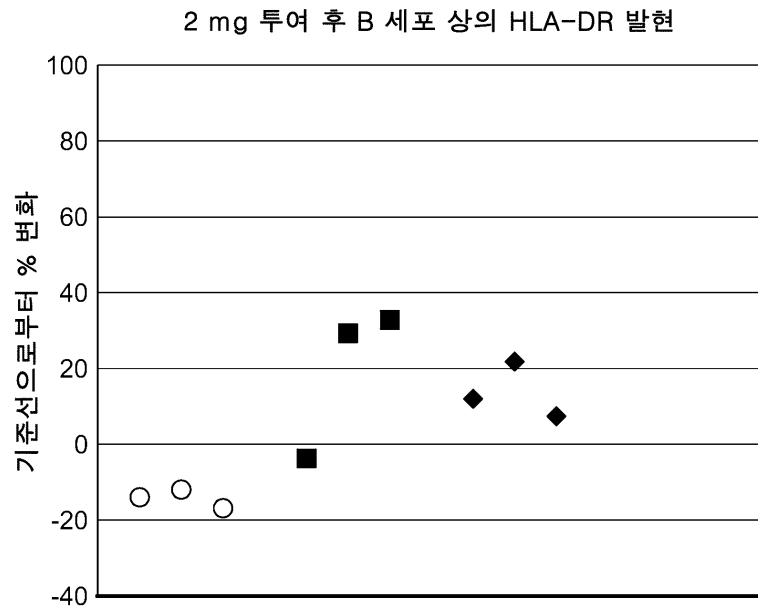
도면25c



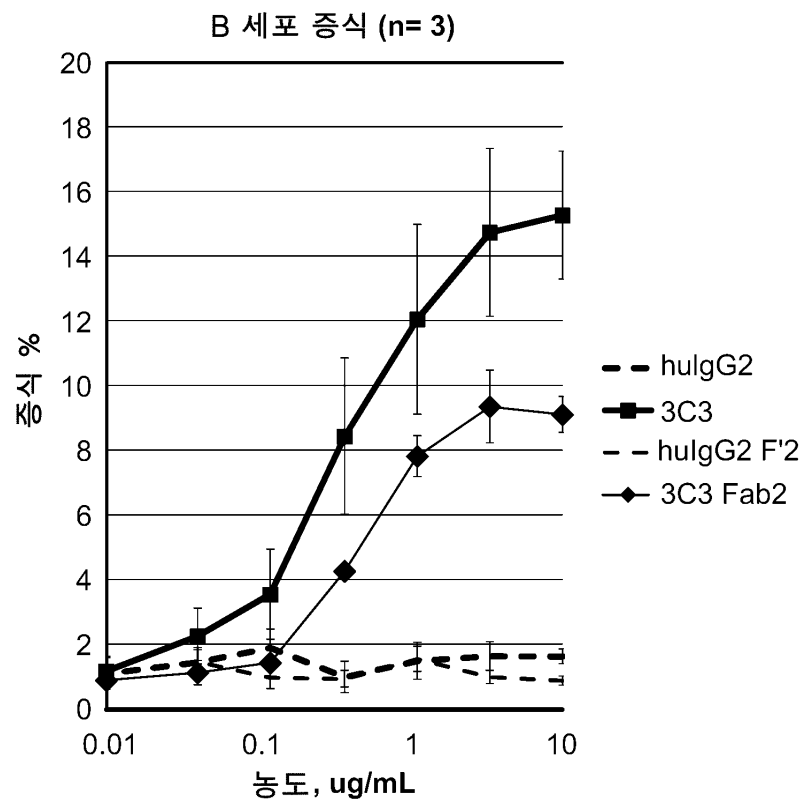
도면26



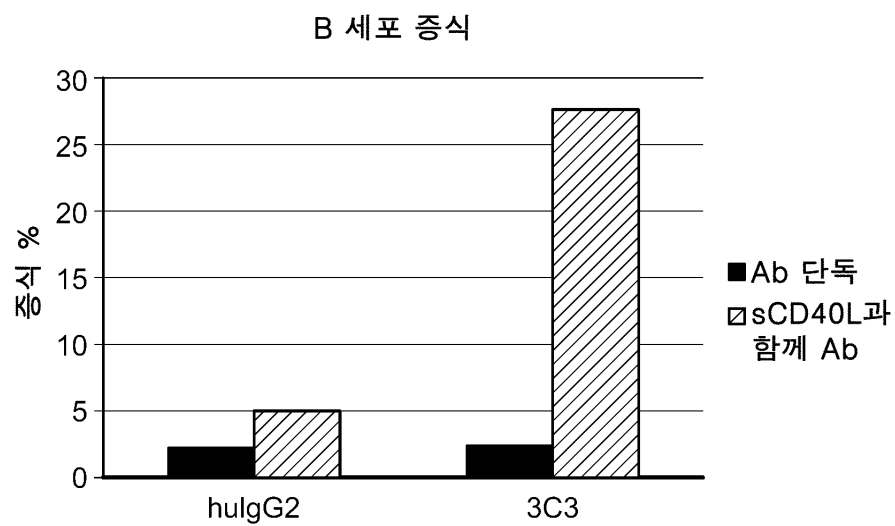
도면27



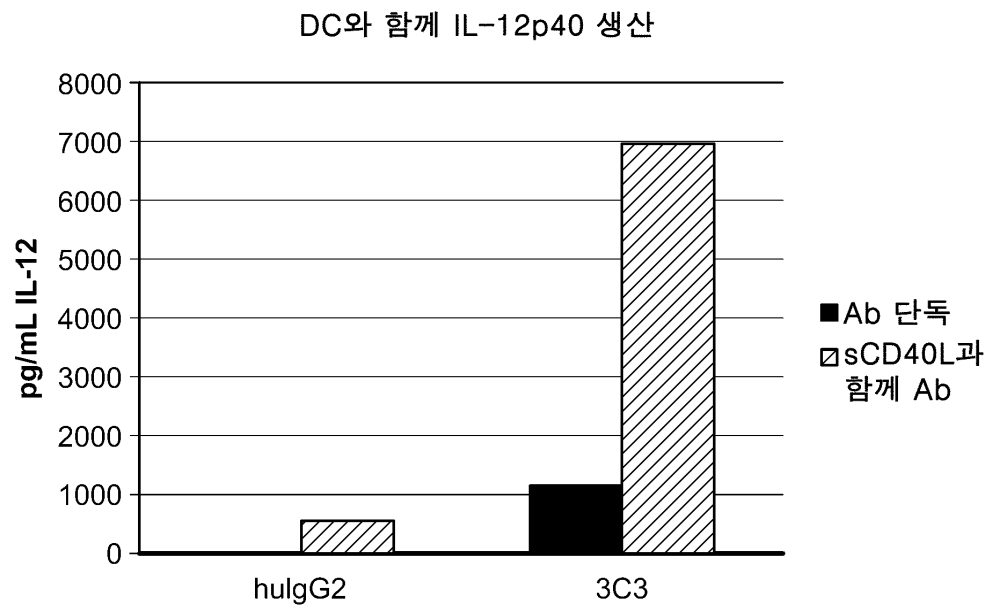
도면28



도면29



도면30



도면31

전혈 검정에서 사이토킨 반응

	IL-1 β				
	공여자 1	공여자 2	공여자 3	공여자 4	공여자 5
hulgG2 대조군	0.2	1.4	1.6	13	4.5
LPS	682	697	885	882	858
3C3	0.1	1.3	1	11.3	5.6
	IL-6				
	공여자 1	공여자 2	공여자 3	공여자 4	공여자 5
hulgG2 대조군	2.1	1	12.3	1.3	2.9
LPS	12.5	12.6	11.6	11.7	16
3C3	1.9	0.9	11	1.2	2.5
	TNF α				
	공여자 1	공여자 2	공여자 3	공여자 4	공여자 5
hulgG2 대조군	0.6	0.7	1.4	1	1.3
LPS	45.2	43.9	48.7	45.6	27.5
3C3	0.7	1.2	1.5	1.1	1.6
	IFN γ				
	공여자 1	공여자 2	공여자 3	공여자 4	공여자 5
hulgG2 대조군	BD	BD	BD	BD	0.5
LPS	BD	BD	BD	49.8	BD
3C3	BD	BD	BD	BD	1.3

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> CELLDEx THERAPEUTICS, INC.

<120> AGONISTIC ANTIBODIES THAT BIND HUMAN CD40 AND USES THEREOF

<130> CDJ-393PC

<140> PCT/US2017/028162

<141> 2017-04-18

<150> US 62/324,170

<151> 2016-04-18

<160> 147

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<223> Human CD40

<400> 1

Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr

1 5 10 15

Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu

20 25 30

Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val

35 40 45

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

50 55 60

Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln

165 170 175

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

180 185 190

Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile
195 200 205

Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn
210 215 220

Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
225 230 235 240

Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His
245 250 255

Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
260 265 270

Val Gln Glu Arg Gln
275

<210> 2

<211> 260

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<223> Human CD40L

<400> 2

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu

100	105	110	
Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser			
115	120	125	
Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly			
130	135	140	
Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln			
145	150	155	160
Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr			
165	170	175	
Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser			
180	185	190	
Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala			
195	200	205	
Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His			
210	215	220	
Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn			
225	230	235	240
Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe			
245	250	255	
Gly Leu Leu Lys			
260			
<210>	3		
<211>	122		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Synthetic: 3G5 VH		
<400>	3		
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Lys			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn			
20	25	30	

Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Asn Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 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 Ala Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Phe Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3G5 VL

<400> 4

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3G5 VH CDR1 (KABAT)

<400> 5

Ser Asn Gly Ile His

1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3G5 VH CDR1 (CHOTHIA)

<400> 6

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn

1 5

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3G5 VH CDR2 (KABAT)

<400> 7

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

1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3G5 VH CDR2 (CHOTHIA)

<400> 8

Trp Ser Asp Gly Ser Asn

1 5

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3G5 VH CDR3 (KABAT)

<400> 9

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

1 5 10

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3G5 VH CDR3 (CHOTHIA)

<400> 10

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

1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3G5 VL CDR1 (KABAT)

<400> 11

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3G5 VL CDR1 (CHOTHIA)

<400> 12

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3G5 VL CDR2 (KABAT)

<400> 13

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3G5 VL CDR2 (CHOTHIA)

<400> 14

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3G5 VL CDR3 (KABAT)

<400> 15

Gln Gln His Asn Lys Trp Ile Thr

1 5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3G5 VL CDR3 (CHOTHIA)

<400> 16

Gln Gln His Asn Lys Trp Ile Thr

1 5

<210> 17

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 VH

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 - VL

<400> 18

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 Gly Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Lys Ser Ala Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 VH CDR1 (KABAT)

<400> 19

Arg Tyr Gly Met Tyr

1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 VH CDR1 (CHOTHIA)

<400> 20

Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr

1 5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 VH CDR2 (KABAT)

<400> 21

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

1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 VH CDR2 (CHOTHIA)

<400> 22

Trp Tyr Asp Gly Ser Tyr

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 VH CDR3 (KABAT)

<400> 23

Glu Ser Pro Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 VH CDR3 (CHOTHIA)

<400> 24

Glu Ser Pro Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 VL CDR1 (KABAT)

<400> 25

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 VL CDR1 (CHOTHIA)

<400> 26

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 VL CDR2 (KABAT)

<400> 27

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 VL CDR2 (CHOTHIA)

<400> 28

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 VL CDR3 (KABAT)

<400> 29

Gln Lys Tyr Lys Ser Ala Pro Phe Thr

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 VL CDR3 (CHOTHIA)

<400> 30

Gln Lys Tyr Lys Ser Ala Pro Phe Thr

1 5

<210> 31

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6 VH

<400> 31

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Arg Ala Gly Gly Ser Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6 VL

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

85 90 95

Leu Gln Thr Pro Trp Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6 VH CDR1 (KABAT)

<400> 33

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6 VH CDR1 (CHOTHIA)

<400> 34

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

1 5

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6 VH CDR2 (KABAT)

<400> 35

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

1 5 10 15

Gly

<210> 36

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6 VH CDR2 (CHOTHIA)

<400> 36

Thr Gly Thr Gly Gly Ser

1 5

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6 VH CDR3 (KABAT)

<400> 37

Arg Ala Gly Gly Ser Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6 VH CDR3 (CHOTHIA)

<400> 38

Arg Ala Gly Gly Ser Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 39

<211> 16

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6 VL CDR1 (KABAT)

<400> 39

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Thr Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6 VL CDR1 (CHOTHIA)

<400> 40

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Thr Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 41

<211> 7

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6 VL CDR2 (KABAT)

<400> 41

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6 VL CDR2 (CHOTHIA)

<400> 42

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6 VL CDR3 (KABAT)

<400> 43

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6 VL CDR3 (CHOTHIA)

<400> 44

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 45

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 6H6 - VH

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 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 Ala Gly Gly Ser Gly Arg Tyr Tyr Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 46

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 6H6 - VL

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Asn Trp Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 6H6 VH CDR1 (KABAT)

<400> 47

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 6H6 VH CDR1 (CHOTHIA)

<400> 48

Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr

1 5

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 6H6 VH CDR2 (KABAT)

<400> 49

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

1 5 10 15

Gly

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 6H6 VH CDR2 (CHOTHIA)

<400> 50

Trp Asp Asp Gly Ser Asn

1 5

<210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 6H6 VH CDR3 (KABAT)

<400> 51

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

1 5 10

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 6H6 VH CDR3 (CHOTHIA)

<400> 52

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

1 5 10

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 6H6 VL CDR1 (KABAT)

<400> 53

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 6H6 VL CDR1 (CHOTHIA)

<400> 54

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 6H6 VL CDR2 (KABAT)

<400> 55

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210>

56

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 6H6 VL CDR2 (CHOTHIA)

<400> 56

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 6H6 VL CDR3 (KABAT)

<400> 57

Gln Gln His Asn Asn Trp Leu Thr

1 5

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 6H6 VL CDR3 (CHOTHIA)

<400> 58

Gln Gln His Asn Asn Trp Leu Thr

1 5

<210> 59

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B4 - VH

<400> 59

Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Lys Arg Asn Gly Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 60

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B4 - VL

<400> 60

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

	100	105	110
<210>	61		
<211>	5		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Synthetic: 1B4	VH CDR1 (KABAT)	
<400>	61		
	Ser Tyr Ala Met Thr		
	1	5	
<210>	62		
<211>	7		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Synthetic: 1B4	VH CDR1 (CHOTHIA)	
<400>	62		
	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
	1	5	
<210>	63		
<211>	17		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Synthetic: 1B4	VH CDR2 (KABAT)	
<400>	63		
	Gly Ile Thr Gly Ser Gly Ala Asn Thr Phe Tyr Thr Asp Ser Val Lys		
	1	5	10 15
	Gly		
<210>	64		
<211>	6		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Synthetic: 1B4	VH CDR2 (CHOTHIA)	
<400>	64		
	Thr Gly Ser Gly Ala Asn		

1 5

<210> 65

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B4 VH CDR3 (KABAT)

<400> 65

Arg Asn Gly Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 66

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B4 VH CDR3 (CHOTHIA)

<400> 66

Arg Asn Gly Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 67

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B4 VL CDR1 (KABAT)

<400> 67

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

1 5 10 15

<210> 68

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B4 VL CDR1 (CHOTHIA)

<400> 68

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

1 5 10 15

<210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: 1B4 VL CDR2 (KABAT)
 <400> 69
 Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5
 <210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic: 1B4 VL CDR2 (CHOTHIA)
 <400> 70
 Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5
 <210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: 1B4 VL CDR3 (KABAT)
 <400> 71
 Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: 1B4 VL CDR3 (CHOTHIA)
 <400> 72
 Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 73

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6-NS VH

<400> 73

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Arg Ala Gly Gly Ser Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 74

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6-NS VL

<400> 74

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

100 105 110

<210> 75

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6-NS VH CDR1 (KABAT)

<400> 75

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6-NS VH CDR1 (CHOTHIA)

<400> 76

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

1 5

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6-NS VH CDR2 (KABAT)

<400> 77

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

1 5 10 15

Gly

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6-NS VH CDR2 (CHOTHIA)

<400> 78

Thr Gly Thr Gly Gly Ser

1 5

<210> 79

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6-NS VH CDR3 (KABAT)

<400> 79

Arg Ala Gly Gly Ser Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 80

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6-NS VH CDR3 (CHOTHIA)

<400> 80

Arg Ala Gly Gly Ser Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 81

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6-NS VL CDR1 (KABAT)

<400> 81

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Thr Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 82

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6-NS VL CDR1 (CHOTHIA)

<400> 82

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Thr Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6-NS VL CDR2 (KABAT)

<400> 83

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 84

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6-NS VL CDR2 (CHOTHIA)

<400> 84

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6-NS VL CDR3 (KABAT)

<400> 85

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6-NS VL CDR3 (CHOTHIA)

<400> 86

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 87

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 2E1.2 - VH

<400> 87

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 88

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 2E1.2 VL2

<400> 88

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr His Cys Gln Gln Tyr Asn Lys Trp Leu Ile

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 89

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 2E1.2 - VH CDR1 (KABAT)

<400> 89

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 90

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 2E1.2 - VH CDR1 (CHOTHIA)

<400> 90

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

1 5

<210> 91

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 2E1.2 - VH CDR2 (KABAT)

<400> 91

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

1 5 10 15

Gly

<210> 92

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 2E1.2 - VH CDR2 (CHOTHIA)

<400> 92

Trp Asp Asp Gly Ser Asn

1 5

<210> 93

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 2E1.2 - VH CDR3 (KABAT)

<400> 93

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

1 5 10

<210> 94

<211>

> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 2E1.2 - VH CDR3 (CHOTHIA)

<400> 94

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

1 5 10

<210> 95

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 2E1.2 VL2 CDR1 (KABAT)

<400> 95

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 96

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: 2E1.2 VL2 CDR1 (CHOTHIA)

<400> 96

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 97

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 2E1.2 VL2 CDR2 (KABAT)

<400> 97

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 98

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 2E1.2 VL2 CDR2 (CHOTHIA)

<400> 98

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 99

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 2E1.2 VL2 CDR3 (KABAT)

<400> 99

Gln Gln Tyr Asn Lys Trp Leu Ile

1 5

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 2E1.2 VL2 CDR3 (CHOTHIA)

<400> 100

Gln Gln Tyr Asn Lys Trp Leu Ile

1 5

<210> 101

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B5-NK - VH

<400> 101

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Gly Phe Ala Ala Val Ala Gly Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly
 100 105 110
 Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 102
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: 1B5-NK VL

<400> 102
 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 Gly Val Arg Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Phe Ser Ala Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 103
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: 1B5-NK - VH CDR1 (KABAT)
 <400> 103

Ser Phe Gly Met His

1 5

<210> 104

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B5-NK - VH CDR1 (CHOTHIA)

<400> 104

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

1 5

<210> 105

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B5-NK - VH CDR2 (KABAT)

<400> 105

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

1 5 10 15

Gly

<210> 106

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B5-NK - VH CDR2 (CHOTHIA)

<400> 106

Trp Phe Asp Gly Ser Ser

1 5

<210> 107

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B5-NK - VH CDR3 (KABAT)

<400> 107

Gly Phe Ala Ala Val Ala Gly Trp Tyr Phe Asp Phe

1 5 10

<210> 108

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B5-NK - VH CDR3 (CHOTHIA)

<400> 108

Gly Phe Ala Ala Val Ala Gly Trp Tyr Phe Asp Phe

1 5 10

<210> 109

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B5-NK VL CDR1 (KABAT)

<400> 109

Arg Ala Ser Gln Gly Val Arg Lys Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 110

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B5-NK VL CDR1 (CHOTHIA)

<400> 110

Arg Ala Ser Gln Gly Val Arg Lys Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 111

<211

> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B5-NK VL CDR2 (KABAT)

<400> 111

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 112

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B5-NK VL CDR2 (CHOTHIA)

<400> 112

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B5-NK VL CDR3 (KABAT)

<400> 113

Gln Lys Tyr Phe Ser Ala Pro Tyr Thr

1 5

<210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B5-NK VL CDR3 (CHOTHIA)

<400> 114

Gln Lys Tyr Phe Ser Ala Pro Tyr Thr

1 5

<210> 115

<211> 423

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3G5 VH

<400> 115

atggagtttg ggctgacctg ggttttcttc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtag 60

gtgcagttgg tggaaatctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaagtcct gagactctcc 120

tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtagc aatggcattc actgggtccg ccaggctcca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttatc tggctgatg gaagtaataa attctatgca 240

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctatatctg 300

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtatatt actgtgcgag agcctctggt 360

tcggggagtt attataactt ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 420

tca 423

<210> 116

<211> 156

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3G5 VL underline

<400> 116

atggaagccc cagcgcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga tagcactgga 60

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 120

ctctcctgca gggccagtc gagtgtaga agtaac 156

<210> 117

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 VH

<400> 117

atggaagccc cagcgcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga tagcactgga 60

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 120

ctctcctgca gggccagtc gagtgtaga agtaacttag cctggtacca gcagaaacct 180

ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatccagcc 240

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcaacag cctgcagtct 300

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cataataagt ggatcacctt cggccaaggg 360

acacgactgg agattaaa 378

<210> 118

<211> 387

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 VL

<400> 118

atggacatga gggtcctctg tcagctcctg ggactcctgc tgctctggct ccagataacc 60

agatgtgaca tccagatgac ccagctctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120

gtcaccatca cttgcggggc gagtcagggc attagcaatt atttagcctg gtatcagcag 180

aaaccaggga aagttcctaa gctcctgac tatgctgcat ccactttgca atcaggggtc 240

ccatctcggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300

cagcctgaag atgttgcaac ttattactgt caaaagtata agagtgcctc attcactttc 360

ggccctggga ccaaagtga tatcaaa 387

<210> 119

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6 VH

<400> 119

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaagggtg ccagtgtgag 60

gtgcagctgt tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggtcct gagactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac ctttagcagc tatgcatga gctgggtccg ccaggctcca 180

gggaaggggc tggagtgggt ctgaggtata actggtactg gtggtagcac atactacga 240

gactcctga agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatgtg 300

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa aagggtggt 360

gggagcttct actactacta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 420

tcctca 426

<210> 120

<211> 396

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6 VL

<400> 120

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggctctctg atccagtggg 60

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc 120

atctcctgca ggcttagtca ggcctcctg catagtactg gatacaacta ttggattgg 180
 tacctgcaga agccaggga gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcgggcc 240
 tccgggtcc ctgacaggtt caatggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 300

agcagagtgg aggctgagga ttttggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactccg 360
 tggacgttcg gccacgggac caaggtggaa atcaaa 396

<210> 121
 <211> 423
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: 6H6 VH
 <400> 121

atggagtttg ggctgagctg ggtattcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagattctcc 120
 tgtgcagcgt ctggattcac cctcagtagc tatggcatgc actgggtccg ccaggtctca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tgggatgatg gaagtaataa atactatgca 240

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
 caaatgaaca gctgagagc cgaggacacg gctgtctatt actgtgcgag agcgggggggt 360
 tcggggagggt attataacta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 420
 tca 423

<210> 122
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: 6H6 VL
 <400> 122

atggaagccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccactgga 60
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 120

ctctcctgca gggccagtca gagtgttaga agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 180
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcattcacca gggccactgg tatccagcc 240
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 300
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cataataact ggctcacttt cggcggaggg 360
 accaaggtgg agatcaaa 378

<210> 123

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B4 VH

<400> 123

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaaggtgt ccaatgtgag 60

gtgcagctgt tggaaatctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggtcct gagactctcc 120

tgtgcggcct ctgggttcac ctttagcagc tatgcatga cctgggtccg ccagggtcca 180

gggaagggcc tggagtgggt ctcaggtatt actggtagtg gtgctaacac attctacaca 240

gactccgtga agggccggtt caccatttcc agagacaatt ccaataattc gctgtatctg 300

caaatgaaca gcctgagagc cgatgacacg gccgtatact actgtgcgaa aagaaatggt 360

gggagttact actactacta cggcatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcacctg 420

tcctca 426

<210> 124

<211> 396

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B4 VL

<400> 124

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggctctctg atccagtggg 60

gatatgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtea cccctggaga gccggcctcc 120

atctcctgca ggicaagtc gagcctcctg catagtagtg gatacaacta ttggattgg 180

tacctgcaga agccaggga gtctccacaa ctctgatct atttgggttc taatcgggcc 240

tccgggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 300

agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaaattccg 360

tggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaa 396

<210> 125

<211> 423

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 2E1.2 VH

<400> 125

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc	120
tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg ccaggtcca	180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tgggatgatg gaagtaataa atactatgca	240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg	300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agcgggaagt	360
tcggggaggt attataacta ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc	420
tca	423

<210> 126

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 2E1.2 VL2

<400> 126

atggaagccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccactgga	60
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc	120
ctctctgca gggccagtc gagtgtagg agcaacttag cctggtatca gcagaaacct	180
ggccaggtc ccaggtcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatccagac	240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct	300
gaagattttg cagtttatca ctgtcagcag tataataagt ggctcatttt cggcggaggg	360
accaaggtgg agatcaaa	378

<210> 127

<211> 420

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B5 VH

<400> 127

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc	120
tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtagc tttggcatgc actgggtccg ccaggtcca	180
ggcaaggggc tggagtgggt gacattata tggtttgatg gaagttctaa atactatgca	240

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaact ccaacaacac gctgtatctg 300

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtatatt actgtgtgag aggttttgca 360

gcagtggctg ggtggactt cgatttctgg ggccgtggca ccctggtcac tgtctcctca 420

<210> 128

<211> 387

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B5 VL

<400> 128

atggacatga gggtcctgc tcagctcctg ggactcctgc tgctctggct cccagatacc 60

agatgtgaca tccagatgac ccagctctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120

gtcaccatca ctgcccgggc gagtcagggc gttagaaagt atttagcctg gtatcagcag 180

aaaccaggga aagttcctaa gctcctgac tatgtgcat ccactttgca atcaggggtc 240

ccatctcggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300

cagcctgaag atgttgcaac ttattactgt caaaagtatt tcagtgcctc gtacactttt 360

ggccagggga ccaaactgga gatcaaa 387

<210> 129

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6-NS VH

<400> 129

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatatt taaaaggtgt ccagtgtgag 60

gtgcagctgt tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggtcct gagactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac ctttagcagc tatgccaatga gctgggtccg ccaggtctca 180

gggaaggggc tggagtgggt ctcaggtata actggtactg gtggtagcac atactacgca 240

gactccgtga agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatgtg 300

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa aagggtggt 360

gggagcttct actactacta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcacgctc 420

tcctca 426

<210> 130

<211> 396

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3B6-NS VL

<400> 130

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggctctctg atccagtggg	60
gatatgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc	120
atctctgca ggictagta gagcctcctg catagtactg gatacaacta ttggattgg	180
tacctgcaga agccaggga gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcgggcc	240
tccgggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagatcttac actgaaaatc	300
agcagagtgg aggctgagga ttttggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactccg	360
tggacgttcg gccacgggac caaggtggaa atcaaa	396

<210> 131

<211> 420

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B5-NK VH

<400> 131

atggagtttg ggctgagctg gggtttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc	120
tgtgcagcgt ctggattcac ctccagtagc tttggcatgc actgggtccg ccaggtccca	180
ggcaaggggc tggagtgggt gacacttata tggtttgatg gaagttctaa atactatgca	240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaact ccaagaacac gctgtatctg	300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtatatt actgtgtgag aggttttgca	360
gcagtggctg ggtgggtactt cgatttctgg ggccgtggca ccctgggtcac tgtctcctca	420

<210> 132

<211> 387

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 1B5-NK VL

<400> 132

atggacatga gggtcctctg tcagctcctg ggactcctgc tgctctggt cccagatacc	60
agatgtgaca tccagatgac ccagctccca tctccctgt ctgcatctgt aggagacaga	120

gtcaccatca cttgccgggc gagtcagggc gttagaaagt atttagcctg gtatcagcag 180
 aaaccaggga aagttcctaa gtcctgcat tatgctgcat ccactttgca atcaggggtc 240
 ccattctcgt tcaagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
 cagcctgaag atgttgcaac ttattactgt caaaagtatt tcagtgcctc gtacactttt 360
 ggccagggga ccaaactgga gatcaaa 387

<210> 133

<211> 173

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<223> Human CD40 Extracellular Domain

<400> 133

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

1 5 10 15
 Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr

20 25 30
 Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu

35 40 45
 Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp

50 55 60
 Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp

65 70 75 80
 Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys

85 90 95
 Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val Lys

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

115 120 125
 Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys Cys His Pro Trp

130 135 140
 Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln Ala Gly Thr Asn

145 150 155 160
Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu Arg

165 170

<210> 134

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<223> Immunoglobulin heavy constant gamma 2 (IGHG2)

<400> 134

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

1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

115 120 125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

130 135 140
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

145 150 155 160
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255
Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325
<210> 135
<211> 443
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: 3C3 heavy chain
<400> 135
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Ile Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Gly Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35	40	45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Glu Ser Pro Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys		
210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
225	230	235
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
245	250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe		
260	265	270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
275	280	285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 136

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 light chain

<400> 136

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 Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Lys Ser Ala Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

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

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

210

<210> 137

<211> 462

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 heavy chain

<400> 137

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

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

20	25	30	
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Ile Phe			
35	40	45	
Ser Arg Tyr Gly Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
50	55	60	
Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Ala			
65	70	75	80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn			
85	90	95	
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val			
100	105	110	
Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Pro Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly			
115	120	125	
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser			
130	135	140	
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala			
145	150	155	160
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
165	170	175	
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
180	185	190	
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
195	200	205	
Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His			
210	215	220	
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys			
225	230	235	240
Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val			
245	250	255	
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
260	265	270	

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

450

455

460

<210> 138

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 3C3 light chain

<400> 138

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1

5

10

15

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
20 25 30
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile
35 40 45
Ser Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys
50 55 60
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95
Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Lys Ser
100 105 110
Ala Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr
115 120 125
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 139

<211> 173

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<223> Mouse CD40 ECD amino acid sequence

<400> 139

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170

<210> 140

<211> 94

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 140

Gly Gln Cys Val Thr Cys Ser Asp Lys Gln Tyr Leu His Asp Gly Gln

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

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

<210> 141

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: consensus sequence

<400> 141

Asp Lys Gln Tyr Leu

1 5

<210> 142

<211> 5

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: consensus sequence

<400> 142

Leu Cys Gln Pro Gly

1 5

<210> 143

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: consensus sequence

<400> 143

Trp Asn Arg Glu

1

<210> 144

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: consensus sequence

<400> 144

Cys His Gln His Lys His Cys Asp Pro Asn

1 5 10

<210

> 145

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: consensus sequence

<400> 145

Gly Leu Arg Val

1

<210> 146

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: consensus sequence

<400> 146

Gly Thr Ala Glu Ser Asp Thr Ile Cys Thr Cys

1 5 10

<210> 147

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: consensus sequence

<400> 147

His Cys Thr Ser

