

(52) CPC특허분류

C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/2827 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

아드리안, 프란시스코

미국 02139 매사추세츠 캠프리지 퍼트넘 애비뉴
237 하이파이바이오 (에이치케이) 리미티드 내

장, 쉐

미국 02139 매사추세츠 캠프리지 퍼트넘 애비뉴
237 하이파이바이오 (에이치케이) 리미티드 내

라우에, 안드레아스

미국 02139 매사추세츠 캠프리지 헤이스팅스 스퀘어 5

메리, 파스칼린

미국 02139 매사추세츠 캠프리지 퍼트넘 애비뉴
237 하이파이바이오 (에이치케이) 리미티드 내

슈바이처, 리앙

미국 02139 매사추세츠 캠프리지 퍼트넘 애비뉴
237 하이파이바이오 (에이치케이) 리미티드 내

웨이, 쉬

미국 02139 매사추세츠 캠프리지 퍼트넘 애비뉴
237 하이파이바이오 (에이치케이) 리미티드 내

델린스, 마티유

미국 02139 매사추세츠 캠프리지 퍼트넘 애비뉴
237 하이파이바이오 (에이치케이) 리미티드 내

명세서

청구범위

청구항 1

단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 TNFR2에 특이적이고, 상기 단일클론 항체는,

(1a) 서열번호 1의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 2의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 3의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및

(1b) 서열번호 4의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 5의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 6의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 또는

(2a) 서열번호 14의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 15의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 16의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및

(2b) 서열번호 17의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 18의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 19의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 또는

(3a) 서열번호 26의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 27의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 28의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및

(3b) 서열번호 29의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 30의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 31의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 또는

(4a) 서열번호 39의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 40의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 41의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및

(4b) 서열번호 42의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 43의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 44의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 또는

(5a) 서열번호 51의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 52의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 53의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및

(5b) 서열번호 54의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 55의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 56의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 또는

(6a) 서열번호 63의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 64의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 65의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및

(6b) 서열번호 66의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 67의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 68의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR)

을 포함하는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서,

(1A) HCVR 서열은 서열번호 7이고/이거나;

(1B) LCVR 서열은 서열번호 8이거나,

(2A) HCVR 서열은 서열번호 20이고/이거나;

(2B) LCVR 서열은 서열번호 21이거나,

(3A) HCVR 서열은 서열번호 32이고/이거나;

(3B) LCVR 서열은 서열번호 33이거나,

- (4A) HCVR 서열은 서열번호 45이고/이거나;
- (4B) LCVR 서열은 서열번호 46이거나,
- (5A) HCVR 서열은 서열번호 57이고/이거나;
- (5B) LCVR 서열은 서열번호 58이거나,
- (6A) HCVR 서열은 서열번호 69이고/이거나;
- (6B) LCVR 서열은 서열번호 70

을 갖는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단일클론 항체는,

- (1a) 서열번호 9의 중쇄 서열; 및/또는
- (1b) 서열번호 10의 경쇄 서열 또는
- (2a) 서열번호 22의 중쇄 서열; 및/또는
- (2b) 서열번호 23의 경쇄 서열 또는
- (3a) 서열번호 34의 중쇄 서열; 및/또는
- (3b) 서열번호 35의 경쇄 서열 또는
- (4a) 서열번호 47의 중쇄 서열; 및/또는
- (4b) 서열번호 48의 경쇄 서열 또는
- (5a) 서열번호 59의 중쇄 서열; 및/또는
- (5b) 서열번호 60의 경쇄 서열 또는
- (6a) 서열번호 71의 중쇄 서열; 및/또는
- (6b) 서열번호 72의 경쇄 서열

을 갖는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스 항체, 인간-마우스 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, CDR-이식 항체 또는 재표면화된 항체인, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이의 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, F_d, 단일 사슬 Fv 또는 scFv, 이황화 연결된 F_v, V-NAR 도메인, IgNar, 인트라바디, IgGΔCH₂, 미니바디, F(ab')₃, 테트라바디, 트라이아바디, 다이아바디, 단일-도메인 항체, DVD-Ig, Fcab, mAb₂, (scFv)₂ 또는 scFv-Fc인, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 레서스 원숭이 TNFR2와 교차 반응하지만 마우스 TNFR2와는 실질적으로 교차 반응하지 않는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TNFR1과 실질적으

로 교차 반응하지 않는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 약 25nM, 20nM, 15nM, 10nM, 5nM, 2nM 또는 1nM 미만의 K_d 로 TNF α 에 결합하는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, TNF α 와 TNFR2 사이의 결합을 향상시키고/시키거나; (예를 들어, TCR-활성화된 CD8 및/또는 CD4 Tconv T 세포에서) TNF α -매개성 또는 -공동 자극된 NF κ B 신호전달을 향상시키고/시키거나; Treg의 존재하에 TCR-활성화된 효과기 T 세포(예를 들어, CD8 및/또는 CD4 Tconv T 세포) 증식을 촉진시키는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, Treg에서 TNF α -매개성 CD25 발현을 향상시키는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 13 및/또는 101의 에피토프에 결합하는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 12

서열번호 13 및/또는 101의 에피토프에 결합하기 위해 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁하는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 13

서열번호 13 및/또는 101의 에피토프에 특이적으로 결합하는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, TNF α 와 TNFR2 사이의 결합을 향상시키고/시키거나; (예를 들어, TCR-활성화된 CD8 및/또는 CD4 Tconv T 세포에서) TNF α -매개성 또는 -공동 자극된 NF κ B 신호전달을 향상시키고/시키거나; Treg의 존재하에 TCR-활성화된 효과기 T 세포(예를 들어, CD8 및/또는 CD4 Tconv T 세포) 증식을 촉진시키는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 15

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, TNF α 와 TNFR2 사이의 결합을 저해하고/하거나; (예를 들어, TCR-활성화된 CD8 및/또는 CD4 Tconv T 세포에서) TNF α -매개성 또는 -공동 자극된 NF κ B 신호전달을 저해하고/하거나; Treg의 존재하에 TCR-활성화된 효과기 T 세포(예를 들어, CD8 및/또는 CD4 Tconv T 세포) 증식을 저해하는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 16

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, Treg 확장을 촉진시키는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 17

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 자연 살해 세포 활성화를 촉진시키는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 18

동일한 에피토프에 결합하기 위해 제1항 내지 제8항, 제15항 및 제16항 중 어느 한 항의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁하는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 19

단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 101을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 에피토프에서 인간 TNFR2에 특이적으로 결합하고, 선택적으로 상기 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 13으로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 에피토프에서 인간 TNFR2에 결합하지 않는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 20

제19항에 있어서, (1) 종양 침윤 림프구(tumor infiltrating lymphocyte: TIL)에서(예를 들어, 생체내 hTNFR2 녹인 MC38 마우스 종양 모델에서) CD4⁺ T 세포의 활성화 및 증식을 촉진시키지만 조절 T 세포(Treg)는 촉진시키지 않고/않거나; (2) 시험관내 및/또는 생체내에서 NK 세포 활성화를 촉진시키는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 사이노몰구스 원숭이에서 약 150 mg/kg의 최대 허용 용량(maximal tolerance dose: MTD)을 갖는, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 22

암의 치료를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법으로서, 유효량의 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하되, 상기 환자(예를 들어, 암 환자)는,

(a) 전립선암 환자에서의 평균 TNFR2 발현 수준과 비교하여 더 높은 수준의 TNFR2 발현을 나타내고; 선택적으로 상기 TNFR2 발현은 효과기 T 세포(예를 들어, CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ T 세포), 종양 침윤 CD8⁺ T 세포 및/또는 NK 세포에서 평가되고; 그리고

(b) AML 환자에서의 평균 CD8A 발현 수준과 비교하여 더 높은 수준의 CD8A 발현을 나타내는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 환자(예를 들어, 암 환자)는 종양 침윤 CD8A⁺(CD8 알파 사슬 양성) T 세포에서 상기 더 높은 수준의 TNFR2 발현을 나타내는, 방법.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 상기 환자는 EBV⁺ 위암(예를 들어, 위 선암종), 투명세포 신세포 암종, 신장 신 투명세포 암종, 피부 흑색종(예를 들어, 피부 흑색종), 고환 생식 세포 종양 또는 연조직 육종을 갖는, 방법.

청구항 25

제22항 또는 제23항에 있어서, 상기 암은 "높은" 수준의 PD-L1을 발현하는, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 암은 자궁경부암(예를 들어, 자궁경부 편평세포 암종 또는 자궁경내 선암종), 흉막 중피종, 폐 선암종 또는 두경부 편평세포 암종인, 방법.

청구항 27

제22항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) PD-1에 특이적인 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 예컨대, 세미폴리맵, 니볼루맵, 펌브롤리주맵, 스파르탈

리주맙, 캄렐리주맙, 신틸리맙, 티스렐리주맙, 토리팔리맙, 도스탈리맙 및 INCMGA00012;

(b) PD-L1에 특이적인 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 예컨대, 아벨루맙, 더발루맙, 아테졸리주맙, KN035 또는 CK-301, 및/또는

(c) PD-L2에 특이적인 항체 또는 이의 항원 결합 단편

을 상기 환자에게 투여하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 28

제22항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 재발성 또는 난치성 암을 갖고/갖거나 이전에 표준 치료로 치료받은 적이 있는(그리고 선택적으로 이에 반응하지 않거나 이로부터 재발된), 방법.

청구항 29

제22항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 유효량의 상기 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 3주마다 1회(Q3W), 4주마다 1회(Q4W) 또는 5주마다 1회(Q5W)(예를 들어, 4주마다 1회 또는 Q4W) 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 4주마다 1회(Q4W) 약 5mg, 15mg, 50 mg, 100mg 또는 150mg의 용량으로 상기 환자에게 투여(예를 들어, 60분에 걸쳐 정맥내로 투여)하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 31

제22항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

- (1) 상기 투여 단계 전에, 상기 TNFR2 발현 및 CD8A 발현 수준이 더 높은 환자를 선택하는 단계; 또는
- (2) 상기 투여 단계 전에, 상기 환자가 TNFR2 발현 및 CD8A 발현의 수준이 더 높은지 확인하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 32

암의 치료를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법으로서, 유효량의 서열번호 101을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 에피토프에서 인간 TNFR2에 특이적으로 결합하는 상기 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하며, 선택적으로 상기 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 13으로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어지는 에피토프에서 인간 TNFR2에 결합하지 않는, 방법.

청구항 33

암 또는 자가면역 장애의 치료를 필요로 하는 환자에서 암 또는 자가면역 장애를 치료하는 방법으로서, 유효량의 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 암을 치료하기 위한 것으로, 상기 방법은 면역 관문의 길항제를 투여하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 면역 관문은 PD-1/PD-L1 면역 관문인, 방법.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, 상기 면역 관문의 길항제는 PD-1 또는 PD-L1에 특이적인 항체 또는 이의 항원 결

합 단편인, 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 항체는 세미플리맵, 니블루맵, 펌브롤리주맵, 스파르탈리주맵, 캄렐리주맵, 신틸리맵, 티스렐리주맵, 토리팔리맵, 도스탈리맵 및 INCMGA00012와 같은 항-PD-1 항체인, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 항체는 아벨루맵, 더발루맵, 아테졸리주맵, KN035 또는 CK-301과 같은 항-PD-L1 항체인, 방법.

청구항 39

제34항 또는 제35항에 있어서, 상기 면역 관문의 길항제는 AUNP12와 같은 PD-1/PD-L1의 (비-항체) 펩타이드 저해제; CA-170과 같은 PD-L1의 소분자 저해제 또는 BMS-986189와 같은 대환식 펩타이드인, 방법.

청구항 40

제34항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 흑색종, 유방암, 결장암, 자궁경부암, 신암, 간암(예를 들어, 간세포 암종), 폐암(NSCLC), 난소암, 피부암(예를 들어, 편평세포 암종 또는 기저세포 암종), 림프종 또는 백혈병인, 방법.

청구항 41

제22항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 화학치료제, 항-혈관신생제, 성장 저해제, 면역-종양제 및/또는 항-신생물성 조성물을 상기 환자에게 투여하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 42

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 중쇄 또는 경쇄 또는 이의 항원 결합 부분을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 43

제42항에 있어서, 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화된, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 44

제42항 또는 제43항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

청구항 45

제44항에 있어서, 발현 벡터(예를 들어, 포유동물, 효모, 곤충 또는 세균 발현 벡터)인, 벡터.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 참조

[0002] 본 출원은 2021년 7월 7일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/219,175호에 대한 출원일의 이익을 주장하며, 임의의 도면 및 서열 목록을 포함하는 상기 기초 출원의 전체 내용은 각각 참조에 의해 본 명세서에 인용된다.

배경 기술

[0003] 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 1B(Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 1B: TNFRSF1B) 및 CD120b로도 알려져 있는 종양 괴사 인자 수용체 2(Tumor Necrosis Factor Receptor 2: TNFR2)는 4개의 시스테인 풍부 도메인(CRD1 내지 CRD4)을 갖는 세포외 도메인(ECD, 1번 내지 257번 잔기), 막횡단 도메인(TM, 258번 내지 287번 잔기) 및 세포내 도메인(ICD, 288번 내지 461번 잔기)과 TRAF2-결합 도메인을 포함하는 75-kDa의 유형 I 막횡단 단백질이다. TNFR2는 다른 TNF α 수용체인 종양 괴사 인자 수용체 1(Tumor Necrosis

Factor Receptor 1: TNFR1)와 상대적으로 낮은 서열 동일성을 공유하며, 이들의 세포의 도메인 간의 상동성은 28%에 불과하다.

- [0004] TNFR2는 3:3 삼량체화 모드로 TNF α 리간드에 결합한다. TNF α를 포함하는 TNFR2의 공결정 구조는 밝혀져 있으며, 각각의 TNFR2 분자는 2개의 TNF α 리간드에 결합하는 것으로 나타났다. 또한, TNF α는 TNFR1에 대한 결합 ($K_d = 19nM$)보다 약 20배 더 약한 420pM의 K_d 로 TNFR2에 결합한다. 물론, TNF α는 다른 모든 것이 동일하다면 TNFR1에 우선적으로 결합한다.
- [0005] 정상 T 세포에서, TNF α-TNFR2 상호작용은 NFκB 신호전달 경로를 통해 세포 생존 신호를 촉발한다. 그러나, 자가면역 T 세포에서, TNF α-TNFR2 상호작용은 카스페이스 경로를 통해 세포자멸사 신호를 촉발한다.
- [0006] 인간 TNFR2는 마우스 TNFR2와 62%의 아미노산 서열 상동성을 나타내지만, 레서스 원숭이 TNFR2와는 97% 동일하다.
- [0007] TNFR1은 편재적으로 발현되는 반면, TNFR2 발현은 주로 면역 세포로 제한되며 중앙 침윤 면역억제성 $CD4^+FoxP3^+$ 조절 T 세포(Treg)에 의해 주로 그리고 고도로 발현된다. 최근 연구에 따르면 TNFR2는 항중앙 면역 반응의 주요 관문인 Treg의 활성화 및 증식을 자극하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다(Chen and Oppenheim, *Sci Signal* 10:eaal2328, 2017). 리간드 TNF α를 통한 TNFR2의 활성화는 NFκB 신호전달 활성화 및 $TNFR2^+$ Treg의 확장을 초래한다. TNFR2는 CD8 및 CD4 Tconv 세포뿐만 아니라 골수 세포에서도 발현된다. 특히, TNFR2는 임상적으로 검증된 면역 관문과 유사하게 소진된 CD8 T 세포에서 발현된다.
- [0008] T-조절 세포(T-regulatory cell: Treg)는 다양한 임상적 적용이 가능한 T-림프구의 작은 서브세트이다. 한편, $TNFR2^+$ Treg는 고도로 억제적인 $CD103^+$ Treg보다 억제 활성이 더 강력하여 고도로 면역억제적이다(*J Immunol* 179:154-161, 2007; *J Immunol* 180:6467-6471, 2008). 따라서, $TNFR2^+$ Treg는 이식, 알레르기, 천식, 감염성 질환, 이식편 대 숙주 질환(graft versus host disease: GVHD) 및 자가면역에서와 같이 Treg의 면역억제 활성화에 의존하는 요법에 사용될 수 있다. 예를 들어, 실험적 GVHD 마우스 모델에서, $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ 흥선-유래 Treg 고갈은 GVHD를 강화시킬 수 있다(Cohen *et al.*, *JEM* 2002).
- [0009] TNFR2는 유방암, 자궁경부암, 결장암 및 신암과 같은 소정의 암에서도 발현되며(*Front. Immunol.* 9:1170, 2018), 이러한 암에서 면역관용에 관여할 수 있다. 이들 암 세포의 생존 및 성장은 TNFR2의 리간드(TNF α)에 의해 촉진된다. TNFR2는 중앙 세포에서 다양한 신호 경로를 사용하여 다양한 중앙 발달 과정에 참여하는 것으로 나타났다. 예를 들어, 핵 인자-κB(Nuclear Factor-κB: NFκB)는 상피 세포의 TNFR2-관련 악성 형질전환에 관여한다. AKT 신호전달은 발암, 중앙 성장 및 혈관신생에서 TNFR2의 또 다른 매개체인 것으로 나타났다. 한편, 미오신 경쇄 카이네이스(Myosin Light-Chain Kinase: MLCK) 및 세포의 신호 조절 카이네이스(Extracellular signal-Regulated Kinase: ERK)도 위에 언급된 TNFR2 기능에 중요하다. 따라서, TNFR2 기능을 저해하면 Treg 기능을 저해하고 면역항암요법에서 항-중앙 T 세포 반응을 증가시킬 수 있다.
- [0010] 따라서, $TNFR2^+$ Treg에 대한 TNFR2 기능을 자극시킴으로써 자가면역 장애를 치료하기 위해 Treg의 면역억제 기능을 향상시키거나 암과 같은 질환을 치료하기 위해 TNFR2 활성화를 저해할 수 있는 치료 시약의 개발이 필요하다.

발명의 내용

- [0011] 일 양태에서, 본 발명은 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하되, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 TNFR2에 특이적이며, 상기 단일클론 항체는 (1a) 서열번호 1의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 2의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 3의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및 (1b) 서열번호 4의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 5의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 6의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 또는 (2a) 서열번호 14의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 15의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 16의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및 (2b) 서열번호 17의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 18의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 19의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 또는 (3a) 서열번호 26의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 27의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 28의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및 (3b) 서열번호 29의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 30의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 31의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 또는 (4a) 서열번호 39의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 40의 HCVR CDR2

서열 및 서열번호 41의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및 (4b) 서열번호 42의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 43의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 44의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 또는 (5a) 서열번호 51의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 52의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 53의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및 (5b) 서열번호 54의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 55의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 56의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 또는 (6a) 서열번호 63의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 64의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 65의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및 (6b) 서열번호 66의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 67의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 68의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함한다.

- [0012] 소정의 실시형태에서, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서, (1A) HCVR 서열은 서열번호 7이고/이거나; (1B) LCVR 서열은 서열번호 8이거나, (2A) HCVR 서열은 서열번호 20이고/이거나; (2B) LCVR 서열은 서열번호 21이거나, (3A) HCVR 서열은 서열번호 32이고/이거나; (3B) LCVR 서열은 서열번호 33이거나, (4A) HCVR 서열은 서열번호 45이고/이거나; (4B) LCVR 서열은 서열번호 46이거나, (5A) HCVR 서열은 서열번호 57이고/이거나; (5B) LCVR 서열은 서열번호 58이거나 (6A) HCVR 서열은 서열번호 69이고/이거나; (6B) LCVR 서열은 서열번호 70이다.
- [0013] 소정의 실시형태에서, 단일클론 항체는 (1a) 서열번호 9의 중쇄 서열; 및/또는 (1b) 서열번호 10의 경쇄 서열 또는 (2a) 서열번호 22의 중쇄 서열; 및/또는 (2b) 서열번호 23의 경쇄 서열 또는 (3a) 서열번호 34의 중쇄 서열; 및/또는 (3b) 서열번호 35의 경쇄 서열 또는 (4a) 서열번호 47의 중쇄 서열; 및/또는 (4b) 서열번호 48의 경쇄 서열 또는 (5a) 서열번호 59의 중쇄 서열; 및/또는 (5b) 서열번호 60의 경쇄 서열 또는 (6a) 서열번호 71의 중쇄 서열; 및/또는 (6b) 서열번호 72의 경쇄 서열을 갖는다.
- [0014] 소정의 실시형태에서, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간-마우스 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, CDR-이식 항체 또는 재표면화된 항체이다.
- [0015] 소정의 실시형태에서, 이의 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, 단일쇄 Fv 또는 scFv, 이황화 연결된 Fv, V-NAR 도메인, IgNar, 인트라바디, IgG ΔCH2, 미니바디, F(ab')₃, 테트라바디, 트라이어바디, 다이어바디, 단일-도메인 항체, DVD-Ig, Fcab, mAb2, (scFv)₂ 또는 scFv-Fc이다.
- [0016] 소정의 실시형태에서, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 레서스 원숭이 TNFR2와 교차 반응하지만, 마우스 TNFR2와는 실질적으로 교차 반응하지 않는다.
- [0017] 소정의 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체의 개발 가능성 (developability)을 개선하도록 설계된 아미노산 서열의 하나 이상의 점 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 소정의 실시형태에서, 하나 이상의 점 돌연변이는 숙주 세포에서의 발현, 제조 중 정제, 및/또는 제형화 과정 및/또는 대상 환자에 대한 투여 동안 항체를 더욱 안정적이게 한다. 소정의 실시형태에서, 하나 이상의 점 돌연변이는 제조 및/또는 제형화 과정 동안 항체가 응집될 가능성을 낮춘다.
- [0018] 소정의 실시형태에서, 본 발명은 서열에서(예를 들어, CDR 중 하나 이상에서) 하나 이상의 아미노산을 대체함으로써 소수성 및/또는 최적화된 전하의 제거 또는 감소와 같은 개발 가능성 문제가 최소화되거나 감소된 치료 항체를 제공한다.
- [0019] 소정의 실시형태에서, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TNFR1과 실질적으로 교차 반응하지 않는다.
- [0020] 소정의 실시형태에서, 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 약 25nM, 20nM, 15nM, 10nM, 5nM, 2nM 또는 1nM 미만의 K_d로 TNF α에 결합한다.
- [0021] 소정의 실시형태에서, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TNF α와 TNFR2 사이의 결합을 향상시키고; (예를 들어, TCR-활성화된 CD8 및/또는 CD4 Tconv T 세포에서) TNF α-매개성 또는 -공동 자극된 NFκB 신호전달을 향상시키고; 그리고/또는 Treg의 존재하에 TCR-활성화된 효과기 T 세포(예를 들어, CD8 및/또는 CD4 Tconv T 세포) 증식을 촉진한다.
- [0022] 소정의 실시형태에서, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Treg에서 TNF α-매개성 CD25 발현을 향상시킨다.
- [0023] 소정의 실시형태에서, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 13 및/또는 101의 에피토프에 결합한다.

- [0024] 소정의 실시형태에서, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TNFR2에 대한 TNF α 결합을 촉진시키거나; TNFR2에 대한 TNF α 결합을 저해하거나; 또는 TNFR2에 대한 TNF α 결합에 명백하게 영향을 미치지 않는다.
- [0025] 소정의 실시형태에서, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TNFR2에 대한 TNF α 결합을 차단, 저해 또는 그렇지 않으면 실질적으로 길항하지 않는다.
- [0026] 소정의 실시형태에서, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TNFR2의 효능제이거나 (예컨대, TNF α 의 존재하에) TNFR2 신호전달을 자극하되, 효능제 기능은 바람직하게는 Fc-독립적이다.
- [0027] 소정의 실시형태에서, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 시험관내에서 CD4⁺ 효과기 T 세포, CD8⁺ 효과기 T 세포, 다른 효과기 T 세포 및/또는 NK 세포를 활성화한다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 양태는 서열번호 13 및/또는 101의 에피토프에 대한 결합에 대해 대상 항체 중 어느 하나의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 양태는 서열번호 13 및/또는 101의 에피토프에 특이적으로 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0030] 소정의 실시형태에서, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TNF α 와 TNFR2 사이의 결합을 향상시키고; (예를 들어, TCR-활성화된 CD8 및/또는 CD4 Tconv T 세포에서) TNF α -매개성 또는 -공동 자극된 NF κ B 신호전달을 향상시키고; 그리고/또는 Treg의 존재하에 TCR-활성화된 효과기 T 세포(예를 들어, CD8 및/또는 CD4 Tconv T 세포) 증식을 촉진한다.
- [0031] 소정의 실시형태에서, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TNF α 와 TNFR2 사이의 결합을 저해하고; (예를 들어, TCR-활성화된 CD8 및/또는 CD4 Tconv T 세포에서) TNF α -매개성 또는 -공동 자극된 NF κ B 신호전달을 저해하고 그리고/또는 Treg의 존재하에 TCR-활성화된 효과기 T 세포(예를 들어, CD8 및/또는 CD4 Tconv T 세포) 증식을 저해한다.
- [0032] 소정의 실시형태에서, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Treg 확장을 촉진한다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 양태는 동일한 에피토프에 결합하기 위해 본 발명의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 양태는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하되, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 101을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 에피토프에서 인간 TNFR2에 특이적으로 결합하고, 선택적으로 상기 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 13으로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어지는 에피토프에서 인간 TNFR2에 결합하지 않는다.
- [0035] 소정의 실시형태에서, 제19항의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (1) 종양 침윤 림프구(tumor infiltrating lymphocyte: TIL)에서(예를 들어, 생체내 hTNFR2 녹인(knock-in) MC38 마우스 종양 모델에서) CD4⁺ T 세포의 활성화 및 증식을 촉진시키지만 조절 T 세포(Treg)는 촉진시키지 않고/않거나; (2) 시험관내 및/또는 생체내에서 NK 세포 활성화를 촉진시킨다.
- [0036] 소정의 실시형태에서, 본 발명의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 사이노몰구스 원숭이에서 약 150 mg/kg의 최대 허용 용량(maximal tolerance dose: MTD)을 갖는다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 양태는 암의 치료를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 해당 방법은 유효량의 본 발명의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 환자에게 투여하는 단계를 포함하되, 환자(예를 들어, 암 환자)는 (a) 전립선암 환자에서의 평균 TNFR2 발현 수준에 비해 더 높은 수준의 TNFR2 발현을 갖고; 선택적으로 상기 TNFR2 발현은 효과기 T 세포(예를 들어, CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ T 세포), 종양 침윤 CD8⁺ T 세포 및/또는 NK 세포에서 평가되며; 그리고 (b) AML 환자에서의 평균 CD8A 발현 수준에 비해 더 높은 수준의 CD8A 발현을 나타낸다.
- [0038] 소정의 실시형태에서, 환자(예를 들어, 암 환자)는 종양 침윤 CD8A⁺(CD8 알파 사슬 양성) T 세포에서 더 높은 수준의 TNFR2 발현을 나타낸다.

- [0039] 소정의 실시형태에서, 환자는 EBV⁺ 위암(예를 들어, PD-L1/CD274 발현이 높은 경향이 있는 위 선암종), 투명세포 신세포 암종, 신장 신투명세포 암종(예컨대, KIRC.2, KIRC.3 및 KIRC.4 하위유형 또는 투명세포 유형 B(ccB) 하위유형 또는 ccA/ccB 분류되지 않은 하위유형), 피부 흑색종(예를 들어, 핫-스팟 BRAF, N/H/K-RAS 또는 NF1 돌연변이가 없는 소위 삼중-wt 하위유형; BRAF 핫스팟 돌연변이(V600E, V600K 및 V600R 돌연변이 및 K601의 핫스팟 돌연변이 포함)가 있는 하위유형, RAS 핫-스팟 돌연변이(NRAS의 Q61R, Q61K, Q61L, Q61H, 61_62QE > HK, G12R/D/A, HRAS의 G13R/D, G13D, G13S 및 Q61K 및 KRAS의 G12D, G12R 및 Q61R 포함)가 있는 하위유형 및 임의의 NF1 돌연변이가 있는 하위유형과 같은 피부 흑색종), 고환 생식 세포 종양 또는 연조직 육종을 갖고 있다.
- [0040] 소정의 실시형태에서, 암은 평균 수준보다 높은 PD-L1을 발현한다.
- [0041] 소정의 실시형태에서, 암은 자궁경부암(예를 들어, 자궁경부 편평세포 암종 또는 자궁경내 선암종), 흉막 중피종, 폐 선암종 또는 두경부 편평세포 암종(HNSC, 예컨대, 비정형 하위유형(이 중 약 40%가 HPV 양성임) 및 중간엽 하위유형(PD-L1/CD274 발현이 높은 경향이 있음))이다.
- [0042] 소정의 실시형태에서, 방법은 (a) 세미플리맵, 니볼루맵, 켈브롤리주맵, 스파르탈리주맵, 캄렐리주맵, 신틸리맵, 티스렐리주맵, 토리팔리맵, 도스탈리맵 및 INCMGA00012와 같은 PD-1에 특이적인 항체 또는 이의 항원 결합 단편; (b) 아벨루맵, 더발루맵, 아테졸리주맵, KNO35 또는 CK-301과 같은 PD-L1에 특이적인 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및/또는 (c) PD-L2에 특이적인 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 환자에게 투여하는 단계를 더 포함한다.
- [0043] 소정의 실시형태에서, 환자는 재발성 또는 난치성 암을 갖고/갖고 있거나 이전에 표준 치료로 치료를 받은 적이 있다(그리고 선택적으로 이에 반응하지 않거나 재발하였다).
- [0044] 소정의 실시형태에서, 방법은 유효량의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 3주마다 1회(Q3W), 4주마다 1회(Q4W) 또는 5주마다 1회(Q5W)(예를 들어, 4주마다 1회 또는 Q4W) 환자에게 투여하는 단계를 더 포함한다.
- [0045] 소정의 실시형태에서, 방법은 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 4주마다 1회(Q4W) 약 5mg, 15mg, 50mg, 100mg 또는 150mg의 용량으로 환자에게 투여(예를 들어, 60분에 걸쳐 정맥내로 투여됨)하는 단계를 포함한다.
- [0046] 소정의 실시형태에서, 방법은 (1) 투여 단계 전에, 상기 TNFR2 발현 및 CD8A 발현의 수준이 더 높은 환자를 선택하는 단계; 또는 (2) 투여 단계 전에, 환자가 TNFR2 발현 및 CD8A 발현의 수준이 더 높은지 확인하는 단계를 더 포함한다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 양태는 암의 치료를 필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 해당 방법은 유효량의 서열번호 101을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 에피토프에서 인간 TNFR2에 특이적으로 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 환자에게 투여하는 단계를 포함하고, 선택적으로 상기 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 13으로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어지는 에피토프에서 인간 TNFR2에 결합하지 않는다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 양태는 암 또는 자가면역 장애(AID, 예컨대, GVHD(이식편 대 숙주 질환) 및 류마티스 관절염)의 치료를 필요로 하는 환자에서 암 또는 자가면역 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 해당 방법은 환자 유효량의 본 발명의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0049] 소정의 실시형태에서, 방법은 AID를 치료하기 위한 것이되, 방법은 만성 GVHD를 치료하는 저용량 항-IL2 작용제, 또는 류마티스 관절염, 만성 관 건선, 크론병, 강직성 척추염, 건성 관절염, 다관절형 소아 특발성 관절염, IBS, EAE 및 비감염성 포도막염을 치료하는 항-TNF α 작용제(예컨대, 아달리무맵, 인플릭시맵, 에타너셉트, 골리무맵 등)와 같은 제2 작용제를 투여하는 단계를 더 포함한다.
- [0050] 소정의 실시형태에서, 방법은 암을 치료하기 위한 것이되, 방법은 면역 관문의 길항제를 투여하는 단계를 더 포함한다.
- [0051] 소정의 실시형태에서, 면역 관문은 PD-1/PD-L1 면역 관문이다.
- [0052] 소정의 실시형태에서, 면역 관문의 길항제는 PD-1 또는 PD-L1에 특이적인 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0053] 소정의 실시형태에서, 항체는 세미플리맵, 니볼루맵, 켈브롤리주맵, 스파르탈리주맵, 캄렐리주맵, 신틸리맵, 티

스텔리주맵, 토리팔리맵, 도스탈리맵 및 INCMGA00012와 같은 항-PD-1 항체이다.

- [0054] 소정의 실시형태에서, 항체는 아벨루맵, 더발루맵, 아테졸리주맵, KN035 또는 CK-301과 같은 항-PD-L1 항체이다.
- [0055] 소정의 실시형태에서, 면역 관문의 길항제는 AUNP12와 같은 PD-1/PD-L1의 (비항체) 펩타이드 저해제; CA-170과 같은 PD-L1의 소분자 저해제 또는 BMS-986189와 같은 대환식 펩타이드이다.
- [0056] 소정의 실시형태에서, 암은 유방암, 결장암, 자궁경부암, 신암, 간암(예를 들어, 간세포 암종), 폐암(예를 들어, NSCLC), 난소암, 흑색종, 피부암(예를 들어, 편평세포 암종 또는 기저세포 암종), 림프종 또는 백혈병이다. 소정의 실시형태에서, 암은 흑색종이다.
- [0057] 소정의 실시형태에서, 방법은 화학치료제, 항혈관신생제, 성장 저해제, 면역-종양제 및/또는 항신생물 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 더 포함한다.
- [0058] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 중쇄 또는 경쇄 또는 이의 항원 결합 부분을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0059] 소정의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 인간 세포에서의 발현에 최적화된 코돈이다.
- [0060] 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0061] 소정의 실시형태에서, 벡터는 발현 벡터(예를 들어, 포유동물 발현 벡터, 효모 발현 벡터, 곤충 발현 벡터 또는 세균 발현 벡터)이다.

도면의 간단한 설명

- [0062] 도 1은 인간-마우스 키메라 단일클론 항체인 HFB3-1, -3, -6, -14, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24 및 HFB3-25의 VH 및 VL 영역뿐만 아니라 이의 컨센서스 서열에 대한 서열 정렬을 보여준다.
- 도 2a는 재조합 인간 TNFR2의 세포의 도메인에 대해 생성된 선택된 인간-마우스 키메라 단일클론 항체의 결합 친화도를 보여준다. 테스트 항체 및 아이소타입 일치 음성 대조군 항체에 대한 EC₅₀ 및 E_{max} 값은 인간 TNFR2(CHO.hHFB3) 또는 레서스 원숭이 TNFR2(CHO.mkHFB3)를 발현하는 CHO 세포에 대해 측정되었다.
- 도 2b는 다양한 항-TNFR2 단일클론 항체가 TNFR2에 대한 TNF α 결합을 촉진(HFB3-1)하거나, 저해(HFB3-18)할 수 있거나 결합에 영향을 미치지 않을 수 있음(HFB3-6)을 보여준다.
- 도 3은 인간-마우스 키메라 단일클론 항체가 모 CHO 세포주에 결합하지 않고, 마우스 TNFR2를 발현하는 CHO 세포에 결합하지 않음(HFB3-18 및 HFB3-19 항체에 의한 미미한 결합 제외)을 보여준다.
- 도 4a는 TNFR1이 아닌 TNFR2에 대해 특이적인 인간-마우스 키메라 항체의 결합 특이성을 보여준다.
- 도 4b는 His-태깅된 재조합 인간 TNFR2에 대한 인간-마우스 키메라 항체인 HFB3-1, -14 및 -18의 K_d, k_{on} 및 k_{off} 값을 보여준다.
- 도 5는 종양 침윤 림프구, 특히 소진된 CD8 T 세포에서 T 세포 하위유형에 대한 TNFR2의 발현을 보여준다.
- 도 6은 TCR-활성화된(하단 패널) 및 비-TCR-활성화된(상단 패널) 1차 Treg, CD8 및 CD4 Tconv에 대한 항-TNFR2 키메라 단일클론 항체의 세포 결합을 보여준다. CD3/CD28 공동 자극(TCR 활성화)에 의해 활성화된 1차 T 세포는 HFB3 항체에 의해 우선적으로 인식될 수 있다.
- 도 7은 HFB3-1, -14, -18, -23, -24 및 -25를 포함하는 본 발명의 소정의 HFB3 항체가 NF κB 신호전달을 촉발하고, 효과가 TNF α 리간드의 존재하에 향상될 수 있음을 보여준다.
- 도 8은 HFB3-1, -14, -18 및 -25 및 CD3/CD28을 포함하는 소정의 대상 단일클론 항체에 의한 공동 자극이 용량-의존적 방식으로 CD8 및 CD4 Tconv의 증식을 유도하였음을 보여준다.
- 도 9는 본 발명의 항-TNFR2 단일클론 항체(예를 들어, HFB3-1hz6-hG1AA, HFB3-1의 인간화된 버전)가 Treg의 존재하에 용량-의존적으로 효과기 T 세포(CD8 및 CD4 Tconv)에 대한 세포 증식을 선호함을 보여준다.
- 도 10은 대상 항-TNFR2 항체에 대한 ADCC 효과의 기여를 보여준다.
- 도 11a 및 도 11b는 TNF α 결합 부위를 포함하는 TNFR2의 His-태깅된 세포의 도메인(extracellular domain:

ECD)(HFB2003로 지칭됨)의 다양한 특징 및 단일클론 항체 HFB3-1 및 HFB3-14뿐만 아니라 HFB3-18(도 11a) 또는 HFB3-6(도 11b)에 대한 에피토프 매핑의 결과를 보여준다. 이들은 인간 IgG1 Fc 영역을 갖는 마우스 키메라 항체이므로 각각 HFB3-1-hG1, HFB3-14-hG1, HFB3-18-hG1 또는 HFB3-6-hG1로도 지칭된다. 도 11b은 또한 벤치마크 항체 SBT-1 및 SBT-4(벤치마크 1 및 2)에 대한 에피토프 매핑 데이터를 포함한다. HFB3-1 항체는 ECD의 CRD2 영역에 결합하고, HFB3-14 및 HFB3-6은 ECD의 CRD3 영역에 결합하는 반면, HFB3-18은 ECD의 CRD1 영역에 결합한다. 도 11c는 HFB3-1에 대한 더욱 정제된 에피토프 매핑 데이터를 보여주며; 2개의 독립적인 실험에서 확인된 잠재적인 HFB3-1hG1 에피토프 영역(서열번호 101)이 강조되어 있다.

도 11d는 TNFR2-TNF α 복합체 상의 HFB3-1, HFB3-14, HFB3-6뿐만 아니라 HFB3-18의 결합 부위를 보여주는 3-D 모델을 제공한다.

도 12a는 인간 TNFR2(CHO.hTNFR2)를 발현하는 CHO 세포가 키메라 단일클론 항체인 HFB3-1, -14 및 -18의 인간화된 변이체에는 결합하지만 모 CHO 세포에는 결합하지 않음을 보여준다.

도 12b는 선택된 인간화된 항-TNFR2 단일클론 항체의 결합 친화도를 보여준다. 테스트 인간화된 항체 및 모 키메라 항체에 대한 EC₅₀ 값은 인간 TNFR2를 발현하는 CHO 세포(CHO.hHFB3)에 대해 측정되었다.

도 13은 선택된 인간화된 항-TNFR2 단일클론 항체의 결합 친화도를 보여준다. 테스트 인간화된 항체 및 모 키메라 항체에 대한 EC₅₀ 값은 레서스 원숭이 TNFR2를 발현하는 CHO 세포(CHO.mkHFB3)에 대해 측정되었다.

도 14a는 ELISA 검정에서 인간화된 항-TNFR2 항체가 재조합 인간 및 사이노몰구스 TNFR2에는 결합하지만 재조합 인간 TNFR1에는 결합하지 않음을 보여준다.

도 14b는 AHC(항-인간 IgG Fc 포획) 바이오센서 측정을 기반으로 인간화된 변이체 및 모 키메라 단일클론 항체인 HFB3-1 및 -14에 의한 재조합 인간 TNFR2에 대한 결합 친화도의 결과를 보여준다. 값은 서로 다른 두 날짜에 얻은 두 실험의 평균이었다.

도 14c는 모 CHO 세포(Bmk 1: 벤치마크 항체 1)과 비교하여 TNFR2-발현/-양성 CHO 세포(CHO.hTNFR2)에 대한 예시적인 인간화된 항체 HFB3-1hz6-hG1의 결합 특이성을 보여준다.

도 15는 TCR-활성화된 CD8 T 세포에 대한 인간화된 항-TNFR2 단일클론 항체의 세포 결합을 보여준다.

도 16은 TCR-활성화된 CD4 T 세포를 증식시키는 인간화된 항-TNFR2 단일클론 항체의 공동 자극 효과를 보여준다.

도 17a는 소정의 인간화된 변이체 항-TNFR2 항체 및 TNF α 를 사용한 Treg의 공동 자극이 NF κ B 하류 신호전달을 유도하였음을 보여준다.

도 17b는 재조합 인간 TNF α 가 있거나 없는 HFB3-1 항체의 소정의 인간화된 변이체를 사용한 CD8 T 세포에서의 NF κ B 신호전달의 활성화를 보여준다. "*"는 통계적 유의성을 나타낸다.

도 18은 대상 인간화된 변이체 항-TNFR2 항체가 보관 중에 안정적임을 보여준다.

도 19는 1차 T 세포 공동 자극에 대한 항-TNFR2 단일클론 항체 HFB3-18(HFB3-1 및 -14는 아님)에 대한 Fc γ R 가교 의존성을 보여준다.

도 20은 TNF α 의 존재 또는 부재하에 CD8 T 세포를 증식시키는 선택된 인간화된 항-TNFR2 항체의 확증적인 공동 자극 효과를 보여준다.

도 21a는 대상 항-TNFR2 단일클론 항체가 CD3/CD28-매개성 TCR 활성화 및 25 ng/ml TNF α 의 존재하에 인간화된 TNFR2 핵인 CD8 및 CD4 Tconv 세포에서 생체의 하류 NF κ B 신호전달을 공동 자극한다는 것을 보여준다.

도 21b는 인간화된 HFB3-1hz6이 말초 CD4 및 CD8 T 세포에 결합하고(상단 패널), CD3/CD28-매개성 TCR 활성화의 존재하에 시험관내에서 용량 의존적 방식으로 T 세포 증식을 자극함(하단 패널)을 보여준다.

도 22는 가용성 IL-2(10 ng/ml) 및 IL-15(10 ng/ml)로 자극한 후 인간화된 HFB3-1hz6-hG1 항체 및 모 HFB3-1-hG1 항체에 의한 단리된 자연 살해(NK) 세포의 생체의 활성화를 보여준다. 실험의 타임라인은 상단 패널에 나타나 있다. CD107 α 및 TNFR2 발현은 HFB3-1hz6-hG1 및 HFB3-1-hG1에 의해 용량-의존적 방식으로 상향 조절되었지만, 아이소타입 대조군 및 항-OX40 항체(BMS)는 단기 NK 활성화를 촉발시킬 수 없었다.

도 23은 플레이트-결합된 항-CD3(1 μ g/ml) 및 가용성 항-CD28(1 μ g/ml)로 자극한 후 HFB3-1hz6-hG1 및 모 마우

스 HFB3-1-hG1에 의한 전 말초 혈액 단핵 세포 분획 내 자연 살해(NK) 세포의 생체의 활성화를 보여준다. 실험의 타임라인은 상단 패널에 나타나 있다. CD3⁻/CD56⁺ 세포 중에서, CD107a 발현은 HFB3-1hz6-hG1 및 HFB3-1-hG1에 의해 용량 의존적 방식으로 상향 조절되었지만, 대조군 항-OX40 항체(MBS)는 단기 NK 활성화를 촉발시킬 수 없다.

도 24a는 마우스 MC38 종양 모델에서의 약력학적 실험의 타임라인을 보여준다. 0.1 mg/kg, 1mg/kg 및 10 mg/kg 투여량의 HFB3-1-hG1의 2회 용량 또는 10 mg/kg의 아이소타입-일치 대조군 항체(TT)를 3일 간격으로 복강내로 투여하였다.

도 24b는 MC38 종양에서 총 면역 세포수에 대한 항체 투여의 생체내 효과를 보여준다. 10 mg/kg의 HFB3-1-hG1의 투여는 CD45⁺ 세포의 절대 세포수를 증가시켰다. p -값<0.05(*)은 일원 ANOVA 검정을 기반으로 한다.

도 24c는 MC38 종양에서의 다양한 면역 세포의 세포수에 대한 생체내 효과를 보여준다. 10 mg/kg의 HFB3-1-hG1의 투여는 종양 미세환경에서 CD8⁺, 기존의 CD4⁺ T 및 NK 세포의 절대 세포수를 증가시켰지만 T-조절 세포의 수는 변화시키지 않았다. * p -값<0.05는 일원 ANOVA 검정을 기반으로 한다.

도 25a는 종양 침윤 백혈구에서 0.1 mg/kg, 1mg/kg 및 10 mg/kg 투여량의 주입된 항체인 HFB3-1-hG1 또는 10 mg/kg의 대조군 항체가 차지하는 TNFR2 수용체의 백분율을 보여준다. 10 mg/kg의 HFB3-1-hG1만이 약물 수용체 점유를 초래하였다. p -값<0.05(*), 0.01(**) 또는 0.001(***)은 일원 ANOVA 검정을 기반으로 한다.

도 25b는 선택된 말초 혈액 세포에서 0.1 mg/kg, 1mg/kg 및 10 mg/kg 투여량의 주입된 항체인 HFB3-1-hG1 또는 10 mg/kg의 대조군 항체가 차지하는 TNFR2 수용체의 백분율을 보여준다. 10 mg/kg 및 1 mg/kg 용량의 HFB3-1-hG1은 비슷한 약물 수용체 점유를 초래하였다. p -값<0.05(*), 0.01(**) 또는 0.001(***)은 일원 ANOVA 검정을 기반으로 한다.

도 26a는 도 24a의 실험의 4일째 혈액 내 항체 농도를 보여준다. 10 mg/kg 및 1 mg/kg 용량의 HFB3-1-hG1은 혈액에서 검출 가능하였다. p -값<0.001(***) 또는 0.0001(****)은 일원 ANOVA 검정을 기반으로 한다.

도 26b는 도 24a의 실험의 4일째 혈액 내 가용성 TNFR2를 보여준다. 10 mg/kg 및 1 mg/kg의 HFB3-1-hG1을 투여하면 혈액에서 검출 가능한 TNFR2의 양이 증가하였다. p -값<0.001(***) 또는 0.0001(****)은 일원 ANOVA 검정을 기반으로 한다.

도 27a 및 도 27b는 HFB3-1hz6 및 HFB3-18hz1과 같은 인간화된 단일클론 항체가 래트 항-mPD-1 단일클론 항체와 비교하여 유사한 치료 효능을 가짐을 보여준다.

도 28은 인간화된 HFB3-1hz6 단일클론 항체가 마우스 항-mPD-1 단일클론 항체와 마찬가지로 MC38 종양 모델에서 치료 효능을 가짐을 보여준다.

도 29는 인간화된 HFB3-1hz6 단일클론 항체가 두 가지 상이한 용량인 3 mg/kg 및 10 mg/kg 및 HFB3-1hz6과의 병용 치료에서 종양 성장을 저해하고 종양 보유 마우스의 수명을 증가시키고, 항-mPD-1 항체는 항-mPD-1 단독을 사용한 치료보다 생존을 더 연장시키는 것을 보여준다.

도 30a는 인간화된 HFB3-1hz6 단일클론 항체가 시간이 경과함에 따라 사이토카인 수준이 감소되는 것으로부터 제거되고(왼쪽 패널), 주사 후 약 2주 후에 항-약물 항체(ADA)가 관찰되었음(오른쪽 패널)을 보여주며, 이는 비인간 영장류에서 일반적이다.

도 30b는 3 mg/kg 이하의 CD3xCD20 이중특이성 IgG로부터 보고된 데이터(점선)와 비교하여 15 mg/kg, 50 mg/kg 또는 150 mg/kg의 HFB3-1hz6-hG1을 주사한 후 사이토카인의 상승이 관찰되지 않았음을 보여준다.

도 31은 정상적인 원숭이의 과거 데이터 범위와 비교하여 15 mg/kg, 50 mg/kg 또는 150 mg/kg의 HFB3-1hz6-hG1을 주사한 후의 세포 수 분석을 보여준다(각 패널의 왼쪽 및 오른쪽 선).

도 32는 인간화된 HFB3-1hz6 단일클론 항체가 Hepa1-6 종양 모델에서 항-종양 효능을 가짐을 보여준다.

도 33a 내지 도 33c는 TNFR2 수준에 기초한 TCGA 데이터베이스에서의 피부 흑색종(skin cutaneous melanoma: SKCM, 도 33a), 두경부 편평세포 암종(HNSC, 도 33b) 및 흉선종(THYM, 도 33c) 환자의 카플란 마이어 생존 곡선을 보여준다. 더 높은 TNFR2 발현은 흑색종 및 HNSC 환자의 개선된 생존과 유의하게 연관되어 있지만 THYM에서는 유리하지 않다.

도 34a 및 도 34b는 고휘 증양을 갖는 다수의 암 환자의 TCGA 벌크 RNA 분석의 예를 보여준다. 전립선암(PRAD)은 CD8A 및 TNFR2 발현이 낮으며, 선택된 암 유형에서 증가된 TNFR2 발현에 대한 음성 대조군으로서 사용될 수 있다. AML은 CD8A(TNFR2는 아님) 발현이 낮으며, 선택된 암 유형에서 증가된 CD8A 발현에 대한 음성 대조군으로서 사용될 수 있다.

도 35는 TNFR2-높음/CD8A-높음인 환자 샘플의 비율에 기초하여 높은 TNFR2(예를 들어, 전립선암의 것과 비교하여) 및 높은 CD8A 발현(예를 들어, AML의 것과 비교하여)을 갖는 암 유형의 TCGA 순위를 보여준다. ACC = 부신피질 암종; BLCA = 방광 요로상피 암종; BRCA = 유방 침습성 암종; CESC = 자궁경부 편평세포 암종/자궁경내 선암종; CHOL = 담관암종; COAD = 결장 선암종; EBV = 엡스타인-바 바이러스; ESCA = 식도 암종; GBM = 다형성 교아종; HNSC = 두경부 편평세포 암종; KICH = 신장 색소형성세포; KIRC = 신장 신투명세포 암종; KIRP = 신장 신유두 세포 암종; LGG = 뇌 저등급 신경교종; LIHC = 간 간세포 암종; LUAD = 폐 선암종; LUSC = 폐 편평세포 암종; MESO = 흉막 중피종; OV = 난소 장액성 낭선암종; PAAD = 췌장 선암종; PCPG = 크롬친화세포종 및 부신경절종; PD-L1 = 예정사-리간드 1; PRAD = 전립선 선암종; READ = 직장 선암종; SARC = 육종; SKCM = 피부 흑색종; STAD = 위 선암종; TGCT = 고환 생식 세포 종양; THCA = 갑상선 암종; UCEC = 자궁체 자궁내막 암종; UCS = 자궁체 암육종; UVM = 포도막 흑색종.

도 36은 선택된 신세포 암종(RCC), 피부 흑색종(SKCM), 위 선암종/위암(STAD/GI), 폐 선암종(LUAD) 및 두경부 편평세포 암종(HNSC)에 대한 분자 하위유형 분석을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

1. 개요

TNFR2는 최근 면역항암요법의 유망한 치료 표적으로 부상하였다. 종양 미세환경(tumor microenvironment: TME)에서 조절 및 효과기 T 세포에 대한 TNFR2 발현은 T 세포 소진 및 면역 관문 차단에 대한 저항성과 관련이 있다. 본 명세서에 기재된 발명은 항암제로서 사용될 수 있는 인간 TNFR2에 대한 항체를 제공한다. 이론에 얽매이지 않고, 대상 항-TNFR2 항체와 효과기 T 세포의 공동 자극은 효과기 T 세포의 항-종양 활성을 향상시키는 것으로 여겨진다.

본 명세서에 기재된 발명에 따르면, 마우스는 결합, 교차 반응성, 선택성 및 기능적 활성을 특징으로 하는 일련의 다양한 항체를 생산하기 위해 인간 TNFR2(rhTNFR2)의 재조합 세포의 도메인(ECD)으로 면역화되었다. 항체는 Treg 세포의 존재하에 CD8⁺ 및 CD4⁺ 효과기 T 세포 증식을 유도하는 능력 및 증가된 NFκB 신호전달에 대해 선택되었다. 선택된 항체는 또한 바람직하게는 rhTNFR2의 원숭이 오쏘로그에 대해 교차 반응성을 나타내었으며, 이는 동물에서 인간 치료제의 독성 연구에 유익한 특징이 될 것이다. 추가로 목적하는 특징은 TNFR2에 대한 인간 재조합 TNF α의 결합을 향상시키는 대상 항체의 능력을 포함한다.

인간 TNFR2에 대한 서브- 또는 한 자릿수-나노몰 결합 친화도를 갖는 2개의 마우스 항체인 HFB3-1 및 HFB3-14가 추가 특성규명 및 인간화를 위해 초기에 선택되었다. 에피토프 매핑 실험은 이들 두 항체가 TNFR2의 상이한 도메인을 인식하며, HFB3-1은 CRD2 도메인 내 영역에 결합하고 HFB3-14는 CRD3 영역 내에서 결합함을 보여주었다. 그러나, 상이한 결합 부위에도 불구하고, 두 항체는 모두 TNFR2에 대해 선택적이고, 사이노글루스 및 레서스 원숭이 오쏘로그와 교차 반응하고, TNFR2에 대한 인간 재조합 TNF α의 결합을 향상시킬 뿐만 아니라 CD8 및 기존의 CD4 T 세포(Tconv)를 자극한다.

HFB3-1hz6 및 HFB3-14hz1c를 포함하는 이러한 마우스 항체의 여러 인간화된 변이체는 이들 각각의 모 항체의 결합 및 교차 반응성 프로파일을 유지하였다. 인간화된 항체는 비자극된 T 세포에 비해 TCR-활성화된 1차 CD8 및 CD4 T 세포에 우선적으로 결합하고, T 세포의 CD3/CD28-유도성 활성화 및 증식을 향상시킨다. 이러한 공동 자극 작용 메커니즘은 교차 결합 독립적이고, NFκB 신호전달을 향상시키고 NFκB 하류 표적 유전자의 상향 조절을 유도하는 항체의 능력과 일치한다.

또한, 두 인간화된 항체(HFB3-1hz6 및 HFB3-14hz1c)는 모두 양호한 개발 가능성 프로파일을 보여주었으며, 고온, 낮은 pH 조건 및 여러 동결/해동 주기 이후에도 안정적이었다. 리드 항체에 대한 양호한 혈장 노출도 마우스 모델에서 관찰되었다. 마우스 종양 모델에서 이들 항체의 생체내 효능 평가뿐만 아니라 초기 독성 분석도 수행되고 있다.

세 번째 마우스 단일클론 항체인 HFB3-18은 결합 친화도가 약간 낮지만(두 자릿수 nM), 생체내에서 종양 성장을 저해하는 항-mPD-1 단일클론 항체보다 더 우수하지는 않더라도 동일한 능력이 확인되었으며 이의 인간화된 버전

이 생성되었다.

- [0070] 이들 항체의 기능적 프로파일과 유리한 개발 가능성 및 약동학적 프로파일은 암 환자, 특히 TNFR2 및 CD8A의 높은 발현을 보이는 소정의 암 유형 및 하위유형에서 잠재적인 신규한 면역-치료 옵션으로서의 개발을 뒷받침한다.
- [0071] 본 발명의 상세한 양태는 아래의 다양한 부문에서 추가로 그리고 개별적으로 기술된다. 그러나, 실시예 또는 도면에만 기술된 실시형태 및 아래의 한 부문에서만 기술된 실시형태를 포함하는 본 발명의 임의의 하나의 실시형태는 본 발명의 임의의 다른 실시형태(들)와 조합될 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0072] 2. 정의
- [0073] 가장 넓은 의미에서, 용어 "항체"는 단일클론 항체, 다중클론 항체 및 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 항체 구조를 포함한다. 용어 "항체"는 또한 중쇄의 상보성 결정 영역(CDR) 1, CDR2 및 CDR3 및 경쇄의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 분자를 광범위하게 지칭할 수 있되, 분자는 항원에 결합할 수 있다. 용어 "항체"는 또한 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체 및 마우스, 인간, 사노몰구스 원숭이 등과 같은 다양한 종의 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0074] 그러나, 보다 좁은 의미에서, "항체"는 키메라 단일클론 항체, 인간화된 단일클론 항체 및 인간 단일클론 항체, 특히 본 발명의 인간화된 단일클론 항체를 포함하는 다양한 단일클론 항체를 지칭한다.
- [0075] 일부 실시형태에서, 항체는 중쇄 가변 영역(HCVR) 및 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 적어도 하나의 중쇄(HC) 및 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 적어도 하나의 경쇄(LC)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 각각의 중쇄가 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 2개의 중쇄, 각각의 경쇄가 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 2개의 경쇄를 포함한다.
- [0076] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단일쇄 Fv(scFv) 또는, 예를 들어, 6개의 모든 CDR(3개의 중쇄 CDR 및 3개의 경쇄 CDR)를 포함하는 단일 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 임의의 다른 항체가 중쇄 및 경쇄를 갖는 것으로 간주된다. 일부 이러한 실시형태에서, 중쇄는 3개의 중쇄 CDR을 포함하는 항체의 영역이고, 경쇄는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 항체의 영역이다.
- [0077] 본 명세서에서 사용되는 용어 "중쇄 가변 영역(HCVR)"은 최소한 중쇄 CDR1(CDR-H1), 프레임워크 2(HFR2), CDR2(CDR-H2), FR3(HFR3) 및 CDR3(CDR-H3)을 포함하는 영역을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 또한 CDR-H1의 N-말단인 FR1(HFR1)의 적어도 일부(예를 들어, 전체) 및/또는 CDR-H3의 C-말단인 FR4(HFR4)의 적어도 일부(예를 들어, 전체)를 포함한다.
- [0078] 본 명세서에서 사용되는 용어 "중쇄 불변 영역"은 적어도 3개의 중쇄 불변 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 영역을 지칭한다. 비제한적인 예시적인 중쇄 불변 영역은 γ , δ 및 α 를 포함한다. 비제한적인 예시적인 중쇄 불변 영역은 또한 ϵ 및 μ 를 포함한다. 각각의 중쇄 불변 영역은 항체 아이소타입에 상응한다. 예를 들어, γ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgG 항체이고, δ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgD 항체이고, α 불변 영역을 포함하는 항체는 IgA 항체이고, ϵ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgE 항체이고, μ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgM 항체이다.
- [0079] 소정의 아이소타입은 하위클래스로 더 세분될 수 있다. 예를 들어, IgG 항체는 IgG1(γ 1 불변 영역을 포함), IgG2(γ 2 불변 영역을 포함), IgG3(γ 3 불변 영역을 포함) 및 IgG4(γ 4 불변 영역을 포함) 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않고; IgA 항체는 IgA1(α 1 불변 영역을 포함) 및 IgA2(α 2 불변 영역을 포함) 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않으며; IgM 항체는 IgM1(μ 1 불변 영역을 포함) 및 IgM2(μ 2 불변 영역을 포함)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0080] 본 명세서에서 사용되는 용어 "중쇄"는 리더 서열이 있거나 없는 적어도 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 중쇄는 중쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "전장 중쇄"는 리더 서열이 있거나 없고 C-말단 라이신이 있거나 없는 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다.
- [0081] 본 명세서에서 사용되는 용어 "경쇄 가변 영역(LCVR)"은 경쇄 CDR1(CDR-L1), 프레임워크(FR) 2(LFR2), CDR2(CDR-L2), FR3(LFR3) 및 CDR3(CDR-L3)을 포함하는 영역을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 경쇄 가변 영역은 또한 FR1(LFR1)의 적어도 일부(예를 들어, 전체) 및/또는 FR4(LFR4)의 적어도 일부(예를 들어, 전체)를 포함한다.

다.

- [0082] 본 명세서에서 사용되는 용어 "경쇄 불변 영역"은 경쇄 불변 도메인 C_L 을 포함하는 영역을 지칭한다. 비제한적인 예시적인 경쇄 불변 영역은 λ 및 κ 를 포함한다.
- [0083] 본 명세서에서 사용되는 용어 "경쇄"는 리더 서열이 있거나 없는 적어도 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 경쇄는 경쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "전장 경쇄"는 리더 서열이 있거나 없는 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다.
- [0084] 용어 "항체 단편" 또는 (항체의) "항원 결합 부분"은 F_v , 단일쇄 $F_v(scFv)$, Fab, Fab' 및 $(Fab')_2$ 와 같이 항원에 결합할 수 있는 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 소정의 실시형태에서, 항체 단편은 Fab, Fab', $F(ab')_2$, F_d , 단일쇄 F_v 또는 $scFv$, 이황화 연결된 F_v , V-NAR 도메인, IgNar, 인트라바디, $IgG\Delta CH_2$, 미니바디, $F(ab')_3$, 테트라바디, 트라이아바디, 다이아바디, 단일-도메인 항체, DVD-Ig, Fcab, mAb_2 , $(scFv)_2$ 또는 $scFv-Fc$ 를 포함한다.
- [0085] 용어 "Fab"는 분자 질량이 대략 50,000달톤이며 항원에 대한 결합 활성을 갖는 항체 단편을 지칭한다. 이는 중쇄의 N-말단 측면의 대략 절반 및 이황화 브리지에 의해 연결된 경쇄 전체를 포함한다. Fab는 특히 프로테이스 파괴인에 의한 면역글로불린의 처리에 의해 얻을 수 있다.
- [0086] 용어 " $F(ab')_2$ "는 대략 100,000달톤의 단편이며 항원에 대한 결합 활성을 나타낸다. 이 단편은 힌지 영역에서 이황화 브리지를 통해 연결된 2개의 Fab 단편보다 약간 크다. 이 단편은 프로테이스 펩신으로 면역글로불린을 처리함으로써 얻어진다. Fab 단편은 힌지 영역의 이황화 브리지를 절단함으로써 $F(ab')_2$ 단편으로부터 얻을 수 있다.
- [0087] 단일 F_v 사슬 " $scFv$ "는 VL 및 VH 도메인을 코딩하는 유전자 및 이들 도메인에 결합하도록 의도된 펩타이드를 코딩하는 서열을 사용하여 합성된 VH:VL 폴리펩타이드에 해당한다. 본 발명에 따른 $scFv$ 는, 예를 들어, 유전자 재조합 기법을 사용하여 적절한 형태로 유지되는 CDR을 포함한다.
- [0088] " $scFv$ "의 이량체는 펩타이드 결합에 의해 함께 연결된 2개의 $scFv$ 분자에 해당한다. 이 F_v 사슬은 종종 펩타이드를 코딩하는 링커 서열에 의해 연결된 VH 및 VL을 코딩하는 유전자를 포함하는 융합 유전자의 발현의 결과이다. 인간 $scFv$ 단편은 바람직하게는 유전자 재조합 기법의 사용에 의해 적절한 형태로 유지되는 CDR 영역을 포함할 수 있다.
- [0089] " $dsFv$ " 단편은 이황화 브리지에 의해 안정화된 VH-VL 이중이량체이며; 2가($dsFv_2$)일 수 있다. 2가 $Sc(Fv)_2$ 또는 다가 항체의 단편은 1가 $scFv$ 의 회합에 의해 자발적으로 형성되거나 펩타이드 결합 서열에 의해 $scFv$ 단편을 연결시킴으로써 생성될 수 있다.
- [0090] Fc 단편은 항체의 생물학적 특성, 특히 면역 효과기에 의해 인식되거나 보체를 활성화하는 능력을 지원한다. 이는 힌지 영역 너머에 있는 중쇄의 불변 단편으로 구성된다.
- [0091] 용어 "다이아바디"는 2개의 항원 고정 부위를 갖는 작은 항체 단편을 의미한다. 이러한 단편은 동일한 VH-VL 폴리펩타이드 사슬에서 가변 경쇄 도메인 VL에 연결된 가변 중쇄 도메인 VH를 포함한다. 동일한 사슬의 두 도메인을 일치시키기에 너무 짧은 결합 서열을 사용하면, 또 다른 사슬의 두 상보적인 도메인과의 일치가 필연적으로 발생하므로 2개의 항원 고정 부위가 생성된다.
- [0092] 참조 항체와 "동일한 에피토프에 결합하는 항체"는 항체 경쟁 검정에 의해 결정될 수 있다. 이는 경쟁 검정에서 참조 항체와 항원의 결합을 50% 이상 차단하는 항체를 지칭하며, 반대로 참조 항체는 경쟁 검정에서 항체와 항원의 결합을 50% 이상 차단한다. 용어 "경쟁하다"는 동일한 에피토프에 대해 경쟁하는 항체의 맥락에서 사용될 때 항체 간의 경쟁이 테스트되는 항체가 공통 항원에 대한 참조 항체의 특이적 결합을 방지 또는 저해하는 검정에 의해 결정됨을 의미한다.
- [0093] 수많은 유형의 경쟁적 결합 검정, 예를 들어: 고체상 직접 또는 간접 방사면역검정(RIA), 고체상 직접 또는 간접 효소 면역검정(EIA), 샌드위치 경쟁 검정(예를 들어, 문헌[Kirkland *et al.*, 1986, J. Immunol. 137:3614-3619] 참조); 고체상 직접 바이오틴-아비딘 EIA(예를 들어, 문헌[Harlow and

Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press] 참조); I¹²⁵ 표지를 사용하는 고체상 직접 표지 RIA(예를 들어, 문헌[Morel *et al.*, 1988, Molec. Immunol. 25:7-15] 참조); 고체상 직접 바이오 틴-아비딘 EIA(예를 들어, 문헌[Cheung, *et al.*, 1990, Virology 176:546-552] 참조); 및 직접 표지 RIA(Moldenhauer *et al.*, 1990, Scand. J. Immunol.)가 사용될 수 있다.

- [0094] 전형적으로, 이러한 검정은 이러한 표지되지 않은 테스트 항원 결합 단백질 및 표지된 참조 항체 중 하나를 보유하는 고체 표면 또는 세포에 결합된 정제된 항원의 사용을 포함한다. 경쟁적 저해는 테스트 항체의 존재하에 고체 표면 또는 세포에 결합된 표지의 양을 결정함으로써 측정된다. 일반적으로, 테스트 항체는 과잉으로 존재한다. 경쟁 검정에 의해 확인된 항체(경쟁 항체)는 참조 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체 및 입체 장애가 발생하도록 참조 항체에 의해 결합된 에피토프에 충분히 근접한 인접 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 경쟁 항체가 과잉으로 존재하는 경우, 이는 공통 항원에 대한 참조 항체의 특이적 결합을 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75% 저해할 것이다. 일부 예에서, 결합은 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 이상 저해된다.
- [0095] 용어 "항원"은 항체 또는 이의 면역학적 기능 단편과 같은 선택적 결합체에 의해 결합될 수 있으며 추가적으로 해당 항원에 결합할 수 있는 항체를 생산하기 위해 포유동물에서 사용될 수 있는 분자 또는 분자의 일부를 지칭한다. 항원은 항체와 상호작용할 수 있는 하나 이상의 에피토프를 가질 수 있다.
- [0096] 용어 "에피토프"는 항체 또는 이의 단편과 같은 선택적 결합체에 의해 결합되는 항원 분자의 일부이다. 용어는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 결정인자를 포함한다. 에피토프는 연속적이거나 비연속적(예를 들어, 폴리펩타이드에서, 폴리펩타이드 서열에서 서로 연속적이지 않지만 분자의 맥락 내에서 항원 결합 단백질에 의해 결합되는 아미노산 잔기)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 에피토프는 항체를 생성하는 데 사용되는 에피토프와 유사한 3차원 구조를 포함하지만, 항체를 생성하는 데 사용되는 에피토프에서 발견되는 아미노산 잔기를 포함하지 않거나 이의 일부만을 포함한다는 점에서 모방적일 수 있다. 에피토프 결정인자는 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 또는 설폰일기와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 그룹화를 포함할 수 있으며, 특정 3차원 구조적 특징 및/또는 특정 전하 특징을 가질 수 있다.
- [0097] 일부 실시형태에서, "에피토프"는 이를 결정하는 데 사용되는 방법으로 정의된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 항체는 수소-중수소 교환(hydrogen-deuterium exchange: HDX)에 의해 결정된 바와 같이 항원의 동일한 영역에 결합하는 경우, 참조 항체와 동일한 에피토프에 결합한다.
- [0098] 소정의 실시형태에서, 항체는 X-선 결정학에 의해 결정된 바와 같이 항원의 동일한 영역에 결합하는 경우, 참조 항체와 동일한 에피토프에 결합한다.
- [0099] 본 명세서에서 사용되는 "키메라 항체"는 제1 종(예컨대, 마우스, 래트, 사이노몰구스 원숭이 등)으로부터의 적어도 하나의 가변 영역 및 제2 종(예컨대, 인간, 사이노몰구스 원숭이, 닭 등)으로부터의 적어도 하나의 불변 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 키메라 항체는 적어도 하나의 마우스 가변 영역 및 적어도 하나의 인간 불변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 키메라 항체의 모든 가변 영역은 제1 종으로부터 유래하고, 키메라 항체의 모든 불변 영역은 제2 종으로부터 유래한다.
- [0100] 본 명세서에서 사용되는 "인간화된 항체"는 비인간 가변 영역(예컨대, 마우스, 래트, 사이노몰구스 원숭이, 닭 등)의 프레임워크 영역에서 적어도 하나의 아미노산이 인간 가변 영역으로부터의 상응하는 아미노산으로 대체된 항체를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 인간화된 항체는 적어도 하나의 인간 불변 영역 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인간화된 항체 단편은 Fab, scFv, (Fab')₂ 등이다.
- [0101] 본 명세서에서 사용되는 "CDR-이식 항체"는 제1(비인간) 종의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)이 제2(인간) 종의 프레임워크 영역(FR) 상에 이식된 인간화된 항체를 지칭한다.
- [0102] 본 명세서에서 사용되는 "인간 항체"는 인간에서 생성된 항체, XENOMOUSE[®]와 같은 인간 면역글로불린 유전자를 포함하는 비인간 동물에서 생성된 항체 및 항체 레퍼토리는 인간 면역글로불린 서열을 기반으로 하는 파지 디스플레이와 같은 시험관내 방법을 사용하여 선택된 항체를 지칭한다.
- [0103] "숙주 세포"는 벡터 또는 단리된 폴리뉴클레오타이드의 수용자일 수 있거나 수용자인 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 원핵생물 세포 또는 진핵생물 세포일 수 있다. 예시적인 진핵생물 세포는 포유동물 세포, 예컨대, 영장류 또는 비영장류 동물 세포; 진균 세포, 예컨대, 효모; 식물 세포; 및 곤충 세포를 포함한다. 비제한적인 예시적

인 포유동물 세포는 NSO 세포, PER.C6[®] 세포(CruCell) 및 각각 293-6E 및 DG44 세포와 같은 293 및 CHO 세포 및 이의 유도체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0104] 본 명세서에서 사용되는 용어 "단리된"은 자연에서 전형적으로 발견되는 성분 중 적어도 일부로부터 분리되거나 전형적으로 생성되는 성분 중 적어도 일부로부터 분리된 분자를 지칭한다. 예를 들어, 폴리펩타이드는 그것이 생산된 세포의 구성요소 중 적어도 일부로부터 분리될 때 "단리된" 것으로 지칭된다. 폴리펩타이드가 발현 후 세포에 의해 분비되는 경우, 그것을 생산한 세포로부터 폴리펩타이드를 함유하는 상청액을 물리적으로 분리하는 것은 폴리펩타이드를 "단리하는" 것으로 간주된다. 유사하게는, 폴리뉴클레오타이드는 자연에서 전형적으로 발견되는 더 큰 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, DNA 폴리뉴클레오타이드의 경우 게놈 DNA 또는 미토콘드리아 DNA 와 같음)의 일부가 아니거나, 예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드의 경우 생성된 세포의 구성요소 중 적어도 일부로부터 분리될 때 "단리된" 것으로 지칭된다. 따라서, 숙주 세포 내부의 벡터에 포함된 DNA 폴리뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드가 자연의 해당 벡터에서 발견되지 않는 한 "단리된" 것으로 지칭될 수 있다.

[0105] 용어 "대상체" 및 "환자"는 본 명세서에서 인간과 같은 포유동물을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 일부 실시형태에서, 설치류, 유인원, 고양이, 개, 말, 소, 돼지, 양, 염소, 포유류 실험실 동물, 포유류 농장 동물, 포유류 스포츠 동물 및 포유류 반려 동물을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다른 비인간 포유동물을 치료하는 방법이 또한 제공된다. 일부 예에서, "대상체" 또는 "환자"는 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 (인간) 대상체 또는 환자를 지칭한다.

[0106] 본 명세서에서 사용되는 용어 "샘플" 또는 "환자 샘플"은, 예를 들어, 물리적, 생화학적, 화학적 및/또는 생리학 적 특징에 기초하여 특성화되고/되거나 확인될 세포 및/또는 다른 분자 실체(entity)를 포함하는 관심 대상체로부터 얻어지거나 유래되는 물질을 지칭한다. 예를 들어, 어구 "질환 샘플" 및 이의 변형어는 특성화될 세포 및/또는 분자 실체를 포함하는 것으로 예상되거나 알려진 관심 대상체로부터 얻은 임의의 샘플을 지칭한다.

[0107] "조직 또는 세포 샘플"은 대상체 또는 환자의 조직으로부터 얻은 유사한 세포의 집합체를 의미한다. 조직 또는 세포 샘플의 공급원은 신선한, 동결된 그리고/또는 보존된 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물로부터의 고형 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 성분; 체액, 예컨대, 객담, 뇌척수액, 양수, 복막액 또는 간질액; 대상체의 임신 또는 발달 중 임의의 시점으로부터의 세포일 수 있다. 조직 샘플은 또한 1차 또는 배양된 세포 또는 세포 주일 수 있다. 선택적으로, 조직 또는 세포 샘플은 질환 조직/기관으로부터 얻어진다. 조직 샘플은 방부제, 항응고제, 완충액, 고정제, 영양제, 항생제 등과 같이 사실상 조직과 자연적으로 혼합되지 않는 화합물을 포함할 수 있다.

[0108] 본 명세서에서 사용되는 "참조 샘플", "참조 세포" 또는 "참조 조직"은 본 발명의 방법 또는 조성물이 확인을 위해 사용되는 질환 또는 병태에 걸리지 않은 것으로 알려지거나 여겨지는 공급원으로부터 얻은 샘플, 세포 또는 조직을 지칭한다. 일 실시형태에서, 참조 샘플, 참조 세포 또는 참조 조직은 본 발명의 조성물 또는 방법을 사용하여 질환 또는 병태가 확인되는 동일한 대상체 또는 환자의 신체의 건강한 부분으로부터 얻어진다. 일 실시형태에서, 참조 샘플, 참조 세포 또는 참조 조직은 본 발명의 조성물 또는 방법을 사용하여 질환 또는 병태가 확인되는 대상체 또는 환자가 아닌 적어도 한 개체의 신체의 건강한 부분으로부터 얻어진다. 일부 실시형태에서, 참조 샘플, 참조 세포 또는 참조 조직은 질환 또는 병태가 발생하기 전 또는 질환 또는 병태의 초기 단계에서 환자로부터 이전에 얻은 것이다.

[0109] "장애" 또는 "질환"은 본 발명의 하나 이상의 Gal-9 길항제로 치료함으로써 이익을 얻을 수 있는 임의의 병태이다. 이는 포유동물이 문제의 장애에 걸리기 쉬운 병리학 적 상태를 포함하는 만성 및 급성 장애 또는 질환을 포함한다. 본 명세서에서 치료될 장애의 비제한적인 예는 암을 포함한다.

[0110] "조절 T 림프구의 억제 활성화와 관련된 질병"은 조절 T 림프구의 억제 활성화가 특히 질병의 발병 또는 지속을 촉진함으로써 역할을 하는 임의의 질병(자가면역은 아님)을 의미한다. 특히, 조절 T 림프구의 억제 활성화는 종양의 발생을 촉진한다는 것이 입증되었다. 따라서, 본 발명은 특히 T 림프구의 억제 활성화가 중요한 역할을 하는 암을 목표로 한다.

[0111] 용어 "암"은 비정상적으로 높은 수준의 증식 및 성장을 나타내는 세포의 그룹을 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 암은 양성(양성 종양으로도 지칭됨), 전-악성 또는 악성일 수 있다. 암세포는 고형암세포(즉, 고형 종양 형성) 또는 백혈병 암세포일 수 있다. 용어 "암 성장"은 암의 크기 또는 정도의 상응하는 증가를 초래하는 암을 포함하는 세포 또는 세포들에 의한 증식 또는 성장을 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다.

[0112] 암의 예는 암종, 림프종, 아세포종, 육종 및 백혈병을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이러한 암의 보다 특

정한 비제한적인 예는 편평세포암, 소세포 폐암, 뇌하수체암, 식도암, 성상세포종, 연조직 육종, 비소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평 암종, 복막암, 간세포암, 위장관암, 췌장암, 교아세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장암(kidney cancer), 신암(renal cancer), 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 뇌암, 자궁내막암, 고환암, 담관 암종, 담낭 암종, 위암, 흑색종 및 다양한 유형의 두경부암을 포함한다.

[0113] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에서 사용되는 암은 혈액암(예컨대, AML 및 DLBCL) 또는 고형 종양(예컨대, 유방암, 두경부암, 폐암, 흑색종(포도막 흑색종 포함), 결장암, 신 암종, 난소암, 간암 및 전립선암)을 포함한다.

[0114] "화학치료제"는 암의 치료에 유용할 수 있는 화학적 화합물이다. 화학치료제의 예는 알킬화제, 예컨대, 티오테과 및 CYTOXAN[®] 사이클로포스파미드; 알킬 설포네이트, 예컨대, 뷰셀관, 임프로셀관 및 피포셀관; 아지리딘, 예컨대, 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민, 및 알트레타민, 트라이에틸렌멜라민, 트라이에틸렌포스포르아마이드, 트라이에틸렌티오포스포르아마이드 및 트라이메틸올로멜라민을 포함하는 메틸아멜라민; 아세토게닌(특히 블라타신 및 블라타시논); 캄프토테신(합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(아도젤레신, 카젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토포신(특히 크립토포신 1 및 크립토포신 8); 둘라스타틴; 듀오카르마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘류테로빈; 판크라티스 타틴; 사르코디틴; 스펀지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대, 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스 트라마스틴, 아이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비킨, 페 네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 나이트로소우레아, 예컨대, 카무스틴, 클로로조 토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라님누스틴; 항생제, 예컨대, 에네다인 항생제(예를 들어, 칼리케이아 미신, 특히 칼리케이아미신 감마11 및 칼리케이아미신 오메가11(예를 들어, 문헌[Agnew, Chem Int'l. Ed. Engl, 33: 183-186(1994)] 참조); 다이네미신 A를 포함하는 다이네미신; 비스포스포네이트, 예컨대, 클로드로네이트; 에스 페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 발색단백질 에네다인 항생제 발색단), 아클라시노마 이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르 지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아자조-5-옥소-L-노르류신, ADRIAMYCIN[®] 독소루비신(모폴리노-독소루비신, 사이아노모폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 테옥시 독소루비신 포함), 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 마토마이신, 예컨대, 마토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루 비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물질, 예컨대, 메 토트렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 폴산 유사체, 예컨대, 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테롤테린, 트 라이메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대, 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대, 안시타빈, 아자시타딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 사이타라빈, 다이테옥시우리딘, 독시플루리 딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐, 예컨대, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스탄올, 메피티오스테인, 테스토락톤; 항-부신제, 예컨대, 아미노글루테티미드, 미토테인, 트릴로스테인; 폴산 보충제, 예컨대, 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레블린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라 부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 다이아지쿠온; 엘포미틴; 엘립티닙 아세테이트; 에포틸 론; 에토글루시드; 갈륨 나이트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대, 메이 탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 나이트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로 속산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카바진; PSK[®] 다당류 복합체(JHS Natural Products, 오리건주 유진 소재); 라족세인; 리족신; 시조피란; 스피로저마늄; 테누아존산; 트라이아지쿠온; 2,2',2"-트라이클로로트 라이에틸아민; 트라이코테센(특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안퀴딘); 우레탄; 빈테신; 다카바진; 만 노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노사이드("아라-C"); 사이클로포스파미드; 티오테과; 탁소이드, 예를 들어, TAXOL[®] 파클리탁셀(Bristol-Myers Squibb Oncology, 뉴저지주 프린스턴 소 재), ABRAXANE[®] 크레모포르-무함유, 파클리탁셀의 알부민-가공 나노입자 제형(American Pharmaceutical Partners, 일리노이주 샴버그 소재) 및 TAXOTERE[®] 도세탁셀(Rhone-Poulenc Rorer, 프랑스 앙토니 소재); 클로 람부실; GEMZAR[®] 젤시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예컨대, 시스플라틴, 옥 살리플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드(VP-16); 아이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; NAVELBINE[®] 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로 네이트; 이리노테칸(Camptosar, CPT- 11)(5-FU 및 류코보린과 이리노테칸의 치료 양생법 포함); 토포아이소머레

이스 저해제 RFS 2000; 다이플루오로메틸로르니틴(DMFO); 레티노이드, 예컨대, 레티노산; 카페시타빈; 콤브레타스타틴; 류코보린(LV); 옥살리플라틴 치료 양생법(FOLFOX)을 포함하는 옥살리플라틴; 세포 증식을 감소시키는 PKC-알파, Raf, H-Ras, EGFR(예를 들어, 에를로티닙(TARCEVA[®])) 및 VEGF-A의 저해제 및 임의의 상기의 약제학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0115] 추가의 비제한적인 예시적인 화학치료제는, 예를 들어, 타목시펜(NOLVADEX[®] 타목시펜 포함), 랄록시펜, 드롤록시펜, 4-하이드록시 타목시펜, 트라이옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 FARESTON[®] 토레미펜을 포함하는 항-에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM)와 같은 암에 대한 호르몬 작용을 조절 또는 저해하는 작용을 하는 항-호르몬제; 예를 들어, 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, MEGASE[®] 메게스트롤 아세테이트, AROMASIN[®] 엑세메스테인, 포르메스타니, 파드로졸, RIVISOR[®] 보로졸, FEMARA[®] 레트로졸 및 ARIMIDEX[®] 아나스트로졸과 같이 부신에서 에스트로겐 생산을 조절하는 효소 아로마테이스를 저해하는 아로마테이스 저해제; 및 항-안드로젠, 예컨대, 플루타미드, 닐루타미드, 바이칼루타미드, 류프롤라이드 및 고세렐린; 뿐만 아니라 트록사시타빈(1,3-다이옥솔레인 뉴클레오사이드 사이토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 특히, 예를 들어, PKC-알파, Ralf 및 H-Ras와 같은 비정상적인 세포 증식에 연루된 신호전달 경로에서 유전자의 발현을 저해하는 것들; 리보자임, 예컨대, VEGF 발현 저해제(예를 들어, ANGIOZYME[®] 리보자임) 및 HER2 발현 저해제; 백신, 예컨대, 유전자 요법 백신, 예를 들어, ALLOVECTIN[®] 백신, LEUVECTIN[®] 백신 및 VAXID[®] 백신; PROLEUKIN[®] rIL-2; LURTOTECAN[®] 토포아이스머레이스 1 저해제; ABARELIX[®] rmRH; 및 임의의 상기의 약제학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0116] "항혈관신생제" 또는 "혈관신생 저해제"는 혈관신생, 혈관형성 또는 바람직하지 않은 혈관 투과성을 직접 또는 간접적으로 저해하는 저분자량 물질, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 저해 RNA(RNAi 또는 siRNA) 포함), 폴리펩타이드, 단리된 단백질, 재조합 단백질, 항체 또는 이의 접합체 또는 융합 단백질을 지칭한다. 항혈관신생제는 혈관신생 인자 또는 이의 수용체에 결합하여 혈관신생 활성을 차단하는 작용제를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 항혈관신생제는 혈관신생제에 대한 항체 또는 다른 길항제, 예를 들어, VEGF-A(예를 들어, 베바시주맵(AVASTIN[®])) 또는 VEGF-A 수용체(예를 들어, KDR 수용체 또는 Flt-1 수용체)에 대한 항체, 항-PDGFR 저해제, 예컨대, GLEEVEC[®](이마티닙 메실레이트), VEGF 수용체 신호전달을 차단하는 소분자(예를 들어, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT[®]/SU1 1248(수니티닙 말레이트), AMG706 또는, 예를 들어, 국제 출원 WO 2004/113304에 기술되어 있는 것들이다. 항혈관신생제는 또한 천연 혈관신생 저해제, 예를 들어, 안지오스타틴, 엔도스타틴 등을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Klagsbrun and D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39; Streit and Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179](예를 들어, 악성 흑색종의 항혈관신생 요법을 열거하고 있는 표 3); 문헌[Ferrara & Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12): 1359-1364; Tonini *et al.* (2003) Oncogene 22:6549-6556](예를 들어, 공지된 항혈관신생 인자를 열거하고 있는 표 2); 및 문헌[Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200-206](예를 들어, 임상 시험에서 사용된 항혈관신생제를 열거하고 있는 표 1)을 참조한다.

[0117] 본 명세서에서 사용되는 "성장 저해제"는 시험관내 또는 생체내에서 세포(예컨대, VEGF를 발현하는 세포)의 성장을 저해하는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 성장 저해제는 S기에 있는 세포(예컨대, VEGF를 발현하는 세포)의 백분율을 상당히 감소시키는 것일 수 있다. 성장 저해제의 예는 G1 정지 및 M-기 정지를 유도하는 작용제와 같은 (S기 이외의 기에서) 세포 주기 진행을 차단하는 작용제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 고전적 M-기 차단제는 빈카(빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁세인 및 토포아이스머레이스 II 저해제, 예컨대, 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 작용제, 예를 들어, 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토티렉세이트, 5-플루오로우라실 및 아라-C와 같은 DNA 알킬화제는 S-기도 정지시킨다. 추가 정보는 문헌[Mendelsohn and Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami *et al.* (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995)], 예를 들어, 13페이지에서 찾을 수 있다. 탁세인(파클리탁셀 및 도세탁셀)은 둘 다 주목 나무(yew tree)로부터 유래되는 항암 약물이다. 유럽 주목 나무로부터 유래되는 도세탁셀(TAXOTERE[®], Rhone-Poulenc Rorer)은 파클리탁셀(TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb)의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜불린 이량체로부터 미세소관의 조립을 촉진시키고, 해중합을 방지하여 미

세포를 안정화시켜 세포에서의 유사분열을 저해한다.

- [0118] 용어 "항신생물 조성물"은 적어도 하나의 활성 치료제를 포함하는 암을 치료하는 데 유용한 조성물을 지칭한다. 치료제의 예는, 예를 들어, 화학치료제, 성장 저해제, 세포독성제, 방사선 요법에 사용되는 작용제, 항혈관신생제, 암 면역치료제(면역-종양제로도 지칭됨), 세포자멸제, 항튜블린제 및 암을 치료하기 위한 다른 작용제, 예컨대, 항-HER-2 항체, 항-CD20 항체, 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 길항제(예를 들어, 타이로신 카이네이스 저해제), HER1/EGFR 저해제(예를 들어, 에를로티닙(TARCEVA®), 혈소판 유래 성장 인자 저해제(예를 들어, GLEEVEC®(이마티닙 메실레이트)), COX-2 저해제(예를 들어, 셀레코시브), 인터페론, CTLA4 저해제(예를 들어, 항-CTLA 항체 이필리무맙(YERVOY®), PD-1 저해제(예를 들어, 항-PD1 항체, BMS-936558), PDL1 저해제(예를 들어, 항-PDL1 항체, MPDL3280A), PDL2 저해제(예를 들어, 항-PDL2 항체), VISTA 저해제(예를 들어, 항-VISTA 항체), 사이토카인, 다음 표적 ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-베타, BlyS, APRIL, BCMA, PD-1, PDL1, PDL2, CTLA4, VISTA 또는 VEGF 수용체(들), TRAIL/Apo2 중 하나 이상에 결합하는 길항제(예를 들어, 중화 항체) 및 기타 생물 활성 및 유기 화학 작용제 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이들의 조합도 또한 본 발명에 포함된다.
- [0119] "치료"는, 예를 들어, 목적이 표적화된 병리학적 병태 또는 장애를 늦추는 것(감소시키는 것)뿐만 아니라, 예를 들어, 목적이 병태 또는 장애의 재발을 저해하는 것인 치료적 치료를 지칭한다. "치료"는 인간을 포함하는 포유동물의 질환(본 명세서에서 "장애" 또는 "병태"로도 지칭됨)에 대한 치료제의 임의의 투여 또는 적용을 포괄하며, 질환 또는 질환의 진행을 저해하거나, 질환 또는 이의 진행을 저해하거나 늦추거나, 이의 발생을 저지하거나, 질환을 부분적으로 또는 완전히 완화시키거나, 질환의 하나 이상의 증상을 부분적으로 또는 완전히 완화시키거나 소실, 누락 또는 결함이 있는 기능을 회복 또는 복구시키거나; 비효율적인 과정을 자극하는 것을 포함한다. 용어 "치료"는 또한 임의의 표현형 특징의 중증도를 감소시키는 것 및/또는 해당 특징의 발생률, 정도 또는 가능성을 감소시키는 것을 포함한다. 치료를 필요로 하는 사람은 장애가 이미 있는 사람뿐만 아니라 장애의 재발 위험이 있는 사람 또는 장애의 재발을 방지하거나 늦추어야 하는 사람을 포함한다.
- [0120] 용어 "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 데 효과적인 약물의 양을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 유효량은 목적하는 치료적 또는 예방적 결과를 달성하기 위해 필요한 기간 동안 투여량에서 효과적인 양을 지칭한다. 본 발명의 항체의 치료학적 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중 및 개체에서 목적하는 반응을 유도하는 길항제의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 치료학적 유효량은 치료적으로 유의한 효과가 대상 항체의 임의의 독성 또는 해로운 효과보다 더 중요한 양을 포함한다.
- [0121] "예방학적 유효량"은 목적하는 예방적 결과를 달성하기 위해 필요한 기간 동안 투여량에서 효과적인 양을 지칭한다. 전형적으로, 반드시 그런 것은 아니지만, 예방적 용량은 질환의 초기 단계 또는 그 이전 단계에서 대상체에게 사용되기 때문에, 예방학적 유효량은 치료학적 유효량보다 적을 것이다.
- [0122] "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 대상체에게 투여하기 위한 "약제학적 조성물"을 함께 포함하는 치료제와 함께 사용하기 위한 당업계에서 통상적인 무독성 고체, 반고체 또는 액체 충전제, 희석제, 캡슐화 물질, 제형 보조제 또는 담체를 지칭한다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이며, 제형의 다른 성분과 상용성이다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 사용되는 제형에 적합하다. 예를 들어, 치료제가 경구로 투여되는 경우, 담체는 겔 캡슐일 수 있다. 치료제가 피하로 투여되는 경우, 담체는 이상적으로 피부에 자극적이지 않고 주사 부위 반응을 일으키지 않는다.
- [0123] "제조품(article of manufacture)" 적어도 하나의 시약, 예를 들어, 질환 또는 장애의 치료를 위한 약제 또는 본 명세서에 기재된 바이오마커를 특이적으로 검출하기 위한 프로브를 포함하는 임의의 제조물(예를 들어, 패키지 또는 용기) 또는 키트이다. 일부 실시형태에서, 제조물 또는 키트는 본 명세서에 기재된 방법을 수행하기 위한 단위로 관측, 배포 또는 판매된다.
- [0124] 3. 암의 치료 방법
- [0125] 본 명세서에 기재된 발명은 인간 및 다른 비인간 포유동물을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 항-TNFR2 항체를 제공한다.
- [0126] 병리학적 상황에서, Treg는 부적절한 면역 억제를 유발할 수 있으며, 이는, 예를 들어, 종양 성장을 촉진할 수 있다. Treg는 항-종양 면역 반응을 감소시키는 것과 관련이 있으며, 특히 효과기 T 림프구의 활성을 부적절하게 저해함으로써 수많은 암 유형의 발병을 촉진한다.
- [0127] 일부 실시형태에서, 암을 치료 또는 예방하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 유효량의 임의의 대상 항-TNFR2 항

체 또는 이의 항원 결합 단편을 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

- [0128] 일부 실시형태에서, 암을 치료하는 방법이 제공되며, 방법은 임의의 대상 항-TNFR2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암이 있는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0129] 본 발명의 방법/용도로 치료할 수 있는 암은 비교적 많은 양의 조절 T 림프구가 종양 조직 또는 순환계에 존재하는 암과 같은 조절 T 림프구가 억제 활성을 발휘하는 암을 포함한다. 조절 T 림프구의 확장(Treg의 빈도로 측정될 수 있음)은 일반적으로 Treg 활성화의 증가와 상관관계가 있다. 조절 T 림프구의 빈도는 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 종양내 림프구 또는 순환 림프구의 유동 세포(FACS) 분석 또는 종양 조직의 면역조직화학적 염색에 의해 평가될 수 있다.
- [0130] 암종, 림프종, 아세포종, 육종 및 백혈병을 포함하는 임의의 대상 항-TNFR2 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로 치료될 수 있는 비제한적인 예시적인 암이 본 명세서에 제공된다. 이러한 암의 보다 특정한 비제한적인 예는 흑색종, 자궁경부암, 편평세포암, 소세포 폐암, 뇌하수체암, 식도암, 성상세포종, 연조직 육종, 비소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평 암종, 복막암, 간세포암, 위장관암, 췌장암, 교아세포종, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장암, 신암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 뇌암, 자궁내막암, 고환암, 담관 암종, 담낭 암종, 위암, 흑색종 및 다양한 유형의 두경부암을 포함한다.
- [0131] 소정의 실시형태에서, 암은 흑색종, 유방암, 결장암, 자궁경부암, 신암, 간암(예를 들어, 간세포 암종), 폐암(NSCLC), 난소암, 피부암(예를 들어, 편평세포암종 또는 기저 세포 암종), 림프종 또는 백혈병이다.
- [0132] 소정의 실시형태에서, 암은 (a) 종양 샘플에서의 총 CD8 T 세포 수 \times CD8 T 세포에서의 TNFR2 발현; 및 (b) 종양 샘플에서의 총 Treg 세포 수 \times Treg에서의 TNFR2 발현 사이의 비로 정의되는 높은 TNFR2 지수를 갖는다.
- [0133] 소정의 실시형태에서, 암은 1.5 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상 또는 5 이상과 같은 1 이상의 TNFR2 지수를 갖는다. 예를 들어, 소정의 암에 대한 대표적인 TNFR2 지수는 흑색종의 경우 4.57, 유방암의 경우 1.67, NSCLC의 경우 1.05, SCC의 경우 1.03, BCC의 경우 0.78 및 HCC의 경우 0.46을 포함한다.
- [0134] 소정의 실시형태에서, 암은 약 0.5 내지 약 1의 TNFR2 지수를 갖는다.
- [0135] 소정의 실시형태에서, 암은 CD8 TIL(종양 침윤 림프구)의 비율이 높으며, 예컨대, 종양 내 T 세포의 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% 이상이 CD8 T 세포이다.
- [0136] 소정의 실시형태에서, 암은 종양 세포에서 낮은 수준의 TNFR2 발현을 나타낸다.
- [0137] 소정의 실시형태에서, 흑색종, NSCLC, 신세포 암종, 위암, 결장직장암, 요로상피 암, HCC, 두경부 암 및 호지킨 림프종과 같은 암은 면역 요법(예를 들어, 염증)에 취약한 것으로 알려져 있다.
- [0138] 소정의 실시형태에서, 암은 소진된 CD8 T 세포와 같은 종양내 소진된 T 세포에서 높은 수준의 TNFR2 발현을 나타낸다. 이러한 암은, 예를 들어, 임의의 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체(예를 들어, 본 명세서에 구체적으로 기재되어 있거나 당업계에 공지된 것)와 같은 PD-1/PD-L1 경로의 길항제와의 병용 요법으로 치료될 수 있다.
- [0139] 소정의 실시형태에서, 본 발명의 방법/용도는 조절 T 림프구의 수준이 높은 것으로 알려진 암, 및/또는 만성 골수 백혈병(chronic myeloid leukemia: CML), 결장암, 흑색종, 자궁암, 유방암, 췌장암, 위암, 난소암, 중추신경계의 원발성 림프종, 다발성 골수종, 전립선암, 호지킨 림프종 또는 간세포 암종을 포함하여 불량한 예후와 명확하게 연관되어 있는 암/종양을 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0140] 일부 실시형태에서, 암은 혈액암(예컨대, AML 및 DLBCL) 또는 고형 종양(예컨대, 유방암, 두경부 암, 폐암, 흑색종(포도막 흑색종 포함), 결장암, 신 암종, 난소암, 간암 및 전립선암)이다.
- [0141] 일부 실시형태에서, 암은 BCC, SCC, 흑색종, 결장직장암 또는 NSCLC이다.
- [0142] 소정의 실시형태에서, 암은 높은 수준의 TNFR2 발현 및 CD8A 발현을 나타낸다. 소정의 실시형태에서, 높거나 더 높은 수준의 TNFR2 발현은 전립선암 환자에서의 평균 TNFR2 발현 수준과 관련되고/비교되고; 선택적으로 TNFR2 발현은 효과기 T 세포(예를 들어, CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포), 종양 침윤 CD8+ T 세포 및/또는 NK 세포에서 평가되며; 그리고/또는 높거나 더 높은 수준의 CD8A 발현은 AML 환자에서의 평균 CD8A 발현 수준과 관련되고/비교된다.
- [0143] 소정의 실시형태에서, 환자(예를 들어, 암 환자)는 종양 침윤 CD8A⁺(CD8 알파 사슬 양성) T 세포에서 더 높은

수준의 TNFR2 발현을 나타낸다.

- [0144] 소정의 실시형태에서, 환자는 EBV⁺ 위암을 갖고 있다.
- [0145] 소정의 실시형태에서, 환자는 PD-L1/CD274 발현이 증가된/높은 위 선암종과 같은 위 선암종을 갖고 있다.
- [0146] 소정의 실시형태에서, 환자는 투명세포 신세포 암종(RCC)을 갖고 있다.
- [0147] 소정의 실시형태에서, 환자는 신장 신투명세포 암종(KIRC)을 갖고 있다. 소정의 실시형태에서, 환자는 KIRC.2, KIRC.3 또는 KIRC.4 하위유형을 갖고 있다. 소정의 실시형태에서, 환자는 투명세포 유형 B(ccB) 하위유형 또는 ccA(투명세포 유형 A)/ccB 비분류 하위유형을 갖고 있다.
- [0148] 소정의 실시형태에서, 환자는 피부 흑색종을 갖고 있다.
- [0149] 소정의 실시형태에서, 환자는 피부 흑색종(SKCM)을 갖고 있다.
- [0150] 소정의 실시형태에서, 환자는 V600E, V600K 또는 V600R 돌연변이 또는 K601의 핫스팟 돌연변이와 같은 BRAF 핫스팟 돌연변이가 있는 하위유형을 갖고 있다.
- [0151] 소정의 실시형태에서, 환자는 RAS 핫-스팟 돌연변이를 갖고 있다. 소정의 실시형태에서, RAS 핫스팟 돌연변이는 Q61R, Q61K, Q61L, Q61H, G12R/D/A 및 G13R/D와 같은 NRAS 핫스팟 돌연변이이다. 소정의 실시형태에서, RAS 핫스팟 돌연변이는 G12D, G12R 또는 Q61R과 같은 KRAS 핫스팟 돌연변이이다.
- [0152] 소정의 실시형태에서, 환자는 임의의 NF1 돌연변이가 있는 하위유형을 갖고 있다.
- [0153] 소정의 실시형태에서, 환자는 핫-스팟 BRAF, N/H/K-RAS 또는 NF1 돌연변이가 결여되어 있는 SKCM의 삼중-wt 하위유형을 갖고 있다.
- [0154] 소정의 실시형태에서, 환자는 고환 생식 세포 종양을 갖고 있다.
- [0155] 소정의 실시형태에서, 환자는 연조직 육종을 갖고 있다.
- [0156] 소정의 실시형태에서, 암은 평균 수준보다 높은 PD-L1을 발현한다.
- [0157] 소정의 실시형태에서, 암은 자궁경부암(예를 들어, 자궁경부 편평세포 암종 또는 자궁경내 선암종), 흉막 중피종, 폐 선암종 또는 두경부 편평세포 암종(HNSC)이다.
- [0158] 소정의 실시형태에서, 환자는 비정형 하위유형과 같은 HNSC 하위유형을 갖고 있다. 소정의 실시형태에서, 비정형 하위유형 HNSC는 추가로 HPV 양성이다.
- [0159] 소정의 실시형태에서, 환자는 HNSC 중간엽 하위유형을 갖고 있다. 소정의 실시형태에서, 중간엽 하위유형은 높은 PD-L1/CD274 발현을 나타낸다.
- [0160] 소정의 실시형태에서, 조절 T 림프구의 빈도 증가가 이러한 섬유증의 재발을 예측하는 요인이라는 것이 또한 입증되었기 때문에, 본 발명의 방법/용도는 C형 간염으로 인한 섬유증의 재발을 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0161] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항-TNFR2 항체는 단독으로 사용될 수 있거나 대안적으로 질환 또는 적응증을 치료할 수 있는 것으로 알려진 임의의 다른 적합한 화합물, 예를 들어, 항암제와 조합하여 사용될 수 있다.
- [0162] 따라서, 본 발명의 특정 실시형태에 따르면, TNFR2에 대해 지시되고 이전에 정의된 바와 같은 조절 T 림프구의 억제 활성을 저해하는 항체는 조절 T 림프구의 억제 활성과 관련된 질환을 치료하기 위한 제2 치료제, 예를 들어, 항암제와 조합하여 사용된다.
- [0163] 즉, 용도가 암의 치료인 경우, 항체는, 예를 들어, 수술, 방사선요법, 화학요법 또는 이들의 조합과 같은 암에 대한 공지된 요법과 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체는 종양 항원, 특히 EBV 항원에 대한 효과기 림프구의 1회 이상의 주사로 이루어지는 입양 면역요법과 조합하여 사용될 수 있다. 일부 양태에 따르면, 암 요법을 위해 본 발명에 따른 TNFR2에 대한 항체와 함께 사용되는 다른 항암제는 항혈관신생제를 포함한다. 소정의 양태에 따르면, 항체는 사이토카인, 예를 들어, 항종양 면역 반응을 자극하는 사이토카인과 공동 투여될 수 있다.
- [0164] 이러한 병용 요법에서, 본 발명의 항체는 제2 치료제 전, 후 또는 이와 동시에 사용될 수 있다. 병용 요법에 관

한 아래 추가 부문을 참조한다.

[0165] 4. 투여 경로 및 담체

[0166] 다양한 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 피하 또는 정맥내로 투여될 수 있다. 간단하게 하기 위하여, "대상 항-TNFR2 단일클론 항체"는 본 발명의 마우스-인간 키메라 항-TNFR2 항체뿐만 아니라 이의 인간화된 변이체를 지칭한다.

[0167] 일부 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 경구, 동맥내, 비경구, 비강내, 근육내, 심장내, 뇌실내, 기관내, 협측, 직장, 복강내, 흡입에 의한 것, 피내, 국소, 경피 및 경막내 또는 그렇지 않으면, 예를 들어, 이식에 의한 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 경로에 의해 생체내 투여될 수 있다.

[0168] 일부 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 i.v. 또는 s.c.를 통해 투여될 수 있다.

[0169] 대상 항체 조성물은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 연고, 용액, 좌약, 관장제, 주사제, 흡입제 및 에어로졸을 포함하지만 이에 제한되지 않는 고체, 반고체, 액체 또는 기체 형태의 제제로 제형화될 수 있다.

[0170] 다양한 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체를 포함하는 조성물은 매우 다양한 약제학적으로 허용 가능한 담체와 함께 제형으로 제공된다(예를 들어, 문헌[Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed. (2003); Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)] 참조). 비히클, 보조제 및 희석제를 포함하는 다양한 약제학적으로 허용 가능한 담체가 이용 가능하다. 또한, pH 조정제 및 완충제, 조성 조절제, 안정화제, 습윤제 등과 같은 다양한 약제학적으로 허용 가능한 보조 물질도 이용 가능하다. 비제한적인 예시적인 담체는 식염수, 완충 식염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 조합을 포함한다.

[0171] 다양한 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체를 포함하는 조성물은 식물성 또는 기타 오일, 합성 지방족 산 글리세리드, 고급 지방족산의 에스터 또는 프로필렌 글리콜과 같은 수성 또는 비수성 용매; 및 원하는 경우 가용화제, 등장화제, 현탁제, 유화제, 안정화제 및 방부제와 같은 통상적인 첨가제와 함께 이를 용해, 현탁 또는 유화시킴으로써 피하 투여를 비롯한 주사용으로 제형화될 수 있다.

[0172] 다양한 실시형태에서, 조성물은, 예를 들어, 다이클로로다이플루오로메테인, 프로페인, 질소 등과 같은 가압된 허용 가능한 추진제를 사용하여 흡입용으로 제형화될 수 있다.

[0173] 조성물은 또한, 다양한 실시형태에서, 생분해성 또는 비생분해성 중합체와 같은 지속 방출형 마이크로캡슐로 제형화될 수 있다. 비제한적인 예시적인 생분해성 제형은 폴리 락트산-글리콜산(PLGA) 중합체를 포함한다. 비제한적인 예시적인 비생분해성 제형은 폴리글리세린 지방산 에스터를 포함한다. 이러한 제형을 만드는 소정의 방법은, 예를 들어, EP 1125584 A1에 기술되어 있다.

[0174] 대상 항-TNFR2 단일클론 항체의 하나 이상의 용량을 각각 포함하는 하나 이상의 용기를 포함하는 약제학적 투여 팩이 또한 제공된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 추가적인 작용제를 포함하거나 포함하지 않고 미리 결정된 양의 대상 항-TNFR2 단일클론 항체를 포함하는 조성물을 포함하는 단위 투여량이 제공된다. 일부 실시형태에서, 이러한 단위 투여량은 일회용 사전충진형 주사용 주사기로 공급된다. 다양한 실시형태에서, 단위 투여량에 포함된 조성물은 식염수, 수크로스 등; 포스페이트와 같은 완충액 등을 포함할 수 있고; 그리고/또는 안정적이고 효과적인 pH 범위 내에서 제형화될 수 있다. 대안적으로, 일부 실시형태에서, 조성물은 적절한 액체, 예를 들어, 멸균수의 첨가 시 재구성될 수 있는 동결건조된 분말로서 제공될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 수크로스 및 아르기닌을 포함하지만 이에 제한되지 않는 단백질 응집을 저해하는 하나 이상의 물질을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 헤파린 및/또는 프로테오글리칸을 포함한다.

[0175] 약제학적 조성물은 특정 적응증의 치료 또는 예방에 효과적인 양으로 투여된다. 치료학적 유효량은 전형적으로 치료될 대상체의 체중, 그 또는 그녀의 신체적 또는 건강 상태, 치료될 상태의 범위 또는 치료될 대상체의 연령에 따라 달라진다.

[0176] 일부 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 투여당 약 50 µg/kg 체중 내지 약 50 mg/kg 체중 범위의 양으로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 투여당 약 100 µg/kg 체중 내지 약 50 mg/kg 체중 범위의 양으로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 투여당 약 100 µg/kg 체중 내지 약 20 mg/kg 체중 범위의 양으로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일

클론 항체는 투여당 약 0.5 mg/kg 체중 내지 약 20 mg/kg 체중 범위의 양으로 투여될 수 있다.

- [0177] 일부 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 투여당 약 10mg 내지 약 1,000mg 범위의 양으로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 투여당 약 20mg 내지 약 500mg 범위의 양으로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 투여당 약 20mg 내지 약 300mg 범위의 양으로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 투여당 약 20mg 내지 약 200mg 범위의 양으로 투여될 수 있다.
- [0178] 대상 항-TNFR2 단일클론 항체 조성물은 필요에 따라 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체의 유효 용량은 대상체에게 1회 이상 투여된다. 다양한 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체의 유효 용량은, 예를 들어, 2개월마다, 3개월마다 또는 6개월마다와 같이 월 1회, 월 1회 미만으로 대상체에게 투여된다. 다른 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체의 유효 용량은, 예를 들어, 2주마다, 매주, 주당 2회, 주당 3회, 매일 또는 1일 수회와 같이 월 1회 초과하여 투여된다. 대상 항-TNFR2 단일클론 항체의 유효 용량은 적어도 1회 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체의 유효 용량은 적어도 1개월, 적어도 6개월 또는 적어도 1년의 기간을 포함하여 수회 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 병태의 하나 이상의 증상을 완화시키기 위해 필요에 따라 대상체에게 투여된다.
- [0179] 5. 병용 요법
- [0180] 기능적 단편을 포함하는 본 발명의 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 질환의 치료를 위한 다른 생물학적으로 활성인 물질 또는 다른 치료 절차와 함께 이를 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 단독으로 또는 다른 치료 방식과 함께 투여될 수 있다. 이들은 방사선 요법과 같은 다른 치료 방식 이전에, 이와 실질적으로 동시에 또는 이후에 제공될 수 있다.
- [0181] 암의 치료를 위해, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 면역 관문 저해제, 화학치료제, 성장 저해제, 항혈관신생제 또는 항신생물 조성물과 같은 항암제 중 하나 이상과 함께 투여될 수 있다.
- [0182] 소정의 실시형태에서, TNFR2에 특이적으로 결합하는 대상 항-TNFR2 단일클론 항체("TNFR2-결합 길항제"), 예를 들어, TNFR2 길항제 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 면역 관문 저해제(예를 들어, PD-1 또는 PD-L1 경로의 저해제)와 같은 제2 길항제와 함께 면역계의 자극이, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환에 유익할 수 있는 질환을 가진 대상체에게 투여된다. 2개의 길항제가, 예를 들어, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체와 면역-중양제의 조합에 대해 아래 기재된 바와 같이 동시에 또는 연속적으로 투여될 수 있다. 하나 이상의 추가적인 치료제, 예를 들어, 관문 조절제가 암 또는 자가면역성 질환을 치료하기 위해 대상 항-TNFR2 단일클론 항체를 사용한 치료에 추가될 수 있다.
- [0183] 소정의 실시형태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 대상체, 예를 들어, 암이 있는 대상체에게 동시에 또는 연속적으로 또 다른 치료제와 함께 투여된다. 예를 들어, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 방사선요법, 수술 또는 화학요법, 예를 들어, 표적화된 화학요법 또는 면역요법 중 하나 이상과 함께 투여될 수 있다.
- [0184] 소정의 실시형태에서, 암이 있는 대상체의 치료 방법은 본 발명의 대상 항-TNFR2 단일클론 항체 및 면역 관문 저해제와 같은 하나 이상의 면역-중양제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0185] 면역요법, 예를 들어, 면역-중양제를 사용한 요법은 대상체에서 면역 반응을 향상, 자극 및/또는 상향 조절하는데 효과적이다. 일 양태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체를 면역-중양제(예컨대, PD-1 저해제)와 함께 투여하면 암의 치료, 예를 들어, 종양 성장의 저해에 있어서 상승적 효과가 있다.
- [0186] 일 양태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 면역-중양제의 투여 전에 순차적으로 투여된다. 일 양태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 면역-중양제(예컨대, PD-1 저해제)와 동시에 투여된다. 또 다른 하나의 양태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 면역-중양제(예컨대, PD-1 저해제)의 투여 후 순차적으로 투여된다. 두 작용제의 투여는, 예를 들어, 30분, 60분, 90분, 120분, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간, 36시간, 48시간, 3일, 5일, 7일 또는 1주 이상 떨어진 시간에 시작할 수 있거나, 제2 작용제의 투여는, 예를 들어, 제1 작용제가 투여된 후 30분, 60분, 90분, 120분, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간, 36시간, 48시간, 3일, 5일, 7일 또는 1주 이상 후에 시작될 수 있다.
- [0187] 소정의 양태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체 및 면역-중양제(예를 들어, PD-1 저해제)는 환자에게 동시에 투여, 예를 들어, 30분 또는 60분에 걸쳐, 예를 들어, 동시에 주입된다. 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 면역-중

양제(예컨대, PD-1 저해제)와 함께 공동 제형화될 수 있다.

- [0188] 면역-종양제는, 예를 들어, 소분자 약물, 항체 또는 이의 단편 또는 다른 생물학적 또는 소분자를 포함한다. 생물학적 면역-종양제의 예는 항체, 항체 단편, 백신 및 사이토카인을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일 양태에서, 항체는 단일클론 항체이다. 소정의 양태에서, 단일클론 항체는 인간화된 또는 인간 항체이다.
- [0189] 일 양태에서, 면역-종양제는 (i) 자극(공동 자극 포함) 분자(예를 들어, 수용체 또는 리간드)의 효능제 또는 (ii) 항원-특이적 T 세포 반응을 증폭시키는 면역 세포, 예를 들어, T 세포에서 저해(공동 저해 포함) 분자(예를 들어, 수용체 또는 리간드)의 길항제이다. 소정의 양태에서, 면역-종양제는 (i) 자극(공동 자극 포함) 분자(예를 들어, 수용체 또는 리간드)의 효능제 또는 (ii) 선천성 면역에 관여하는 세포, 예를 들어, NK 세포 상의 저해(공동 저해 포함) 분자(예를 들어, 수용체 또는 리간드)의 길항제이며, 여기서 면역-종양제는 선천성 면역을 향상시킨다. 이러한 면역-종양제는 종종 면역 관문 조절자, 예를 들어, 면역 관문 저해제 또는 면역 관문 자극제로 지칭된다.
- [0190] 소정의 실시형태에서, 면역-종양제는 B7-1, B7-2, B7-H1(PD-L1), B7-DC(PD-L2), B7-H2(ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 및 B7-H6을 포함하는 막-결합 리간드의 B7 패밀리의 구성원 또는 B7 패밀리를 구성원에 특이적으로 결합하는 공동 자극 또는 공동 저해 수용체를 표적화(또는 이에 특이적으로 결합)하는 작용제일 수 있다. 면역-종양제는 막 결합된 리간드의 TNF 패밀리의 구성원 또는 이에 특이적으로 결합하는 공동 자극 또는 공동 저해 수용체, 예를 들어, TNF 수용체 패밀리를 구성원을 표적으로 하는 작용제일 수 있다. 면역-종양제에 의해 표적화될 수 있는 예시적인 TNF 및 TNFR 패밀리를 구성원은 CD40 및 CD40L, OX-40, OX-40L, GITR, GITRL, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137(4-1BB), TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LTf α R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, 림프독소 α /TNP β , TNFR2, TNF α , LTf α R, 림프독소 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY 및 NGFR을 포함한다. 암을 치료하기 위해 대상 항-TNFR2 단일클론 항체와 함께 사용될 수 있는 면역-종양제는 작용제, 예를 들어, 위에 기재된 것과 같은 B7 패밀리를 구성원, B7 수용체 패밀리를 구성원, TNF 패밀리를 구성원 또는 TNFR 패밀리를 구성원을 표적으로 하는 항체일 수 있다.
- [0191] 일 양태에서, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 (i) CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM3, CEACAM-1, BTLA, CD69, 갈렉틴-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, B7-H3, B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PDIH, LAIR1, TIM-1, TIM-4 및 PSGL-1과 같은 T 세포 활성화를 저해하는 단백질의 길항제(예를 들어, 면역 관문 저해제) 및 (ii) B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB(CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, CD40, CD40L, DR3 및 CD28H와 같은 T 세포 활성화를 자극하는 단백질의 효능제 중 하나 이상과 함께 투여된다.
- [0192] 일 양태에서, 면역-종양제는 T 세포 활성화를 저해하는 사이토카인(예를 들어, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF 및 다른 면역억제 사이토카인)을 저해하는 작용제(즉, 이의 길항제)이거나 T 세포 활성화를 자극하고 면역 반응을 자극하는 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 및 IFN α (예를 들어, 사이토카인 자체)와 같은 사이토카인의 효능제이다.
- [0193] 면역계를 자극하기 위해, 예를 들어, 암 및 감염성 질환의 치료를 위해 대상 항-TNFR2 단일클론 항체와 조합될 수 있는 다른 작용제는 NK 세포에 대한 저해 수용체의 길항제 또는 NK 세포에 대한 활성화 수용체의 효능제를 포함한다. 예를 들어, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 KIR의 길항제와 조합될 수 있다.
- [0194] 병용 요법을 위한 또 다른 작용제는 RG7155(W011/70024, W011/107553, W011/131407, W013/87699, W013/119716, W013/132044) 또는 FPA008(W011/140249; W013169264; W014/036357)을 포함하는 CSF-IR 길항제 항체와 같은 CSF-IR 길항제를 포함하지만 이에 제한되지 않는 대식세포 또는 단핵구를 저해하거나 고갈시키는 작용제를 포함한다.
- [0195] 면역-종양제는 또한 TGF- β 신호전달을 저해하는 작용제를 포함한다.
- [0196] 대상 항-TNFR2 단일클론 항체와 조합될 수 있는 추가적인 작용제는 종양 항원 제시를 향상시키는 작용제, 예를 들어, 수지상 세포 백신, GM-CSF 분비 세포 백신, CpG 올리고뉴클레오타이드 및 이미퀴모드 또는 종양 세포의 면역원성을 향상시키는 요법(예를 들어, 안트라사이클린)을 포함한다.
- [0197] 대상 항-TNFR2 단일클론 항체와 조합될 수 있는 또 다른 요법은 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 Treg 세포를 고갈시키거나 차단하는 요법, 예를 들어, CD25에 특이적으로 결합하는 작용제를 포함한다.
- [0198] 대상 항-TNFR2 단일클론 항체와 조합될 수 있는 또 다른 요법은 인돌아민 다이옥시게네이스(indoleamine

dioxigenase: IDO), 다이옥시게네이스, 아르기네이스 또는 산화질소 합성효소와 같은 대사 효소를 저해하는 요법이다.

- [0199] 사용될 수 있는 또 다른 클래스의 작용제는 아데노신의 형성을 저해하거나 아데노신 A2A 수용체를 저해하는 작용제를 포함한다.
- [0200] 암을 치료하기 위해 대상 항-TNFR2 단일클론 항체와 조합될 수 있는 다른 요법은 T 세포 무반응(anergy) 또는 고갈을 역전/방지하는 요법 및 종양 부위에서 선천성 면역 활성화 및/또는 염증을 촉발하는 요법을 포함한다.
- [0201] 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 하나 초과면역-종양제(예컨대, 면역 관문 저해제)와 조합될 수 있고, 예를 들어, 다음 중 하나 이상과 같은 면역 경로의 여러 요소를 표적으로 하는 조합 접근법과 조합될 수 있다: 종양 항원 제시(예를 들어, 수지상 세포 백신, GM-CSF 분비 세포 백신, CpG 올리고뉴클레오타이드, 이미퀴모드)를 향상시키는 요법; 예를 들어, CTLA-4 및/또는 PD1/PD-L1/PD-L2 경로를 저해하고/하거나 Treg 또는 다른 면역 억제 세포를 고갈시키거나 차단함으로써 음성 면역 조절을 저해하는 요법; 예를 들어, CD-137, OX-40 및/또는 GITR 경로를 자극하고/하거나 T 세포 효과기 기능을 자극하는 효능제로 양성 면역 조절을 자극하는 요법; 종양 T 세포의 빈도를 전신적으로 증가시키는 요법; 예를 들어, CD25의 길항제(예를 들어, 다클리주맙)를 사용하거나, 생체의 항-CD25 비드 고갈에 의해 종양의 Treg와 같은 Treg를 고갈시키거나 저해하는 요법; 종양에서 억제 골수 세포의 기능에 영향을 미치는 요법; 종양 세포의 면역원성을 향상시키는 요법(예를 들어, 안트라사이클린); 유전적으로 변형된 세포, 예를 들어, 키메라 항원 수용체에 의해 변형된 세포를 포함하는 입양 T 세포 또는 NK 세포 전달(CAR-T 요법); 인돌아민 다이옥시게네이스(IDO), 다이옥시게네이스, 아르기네이스 또는 산화질소 합성효소와 같은 대사 효소를 저해하는 요법; T 세포 무반응 또는 고갈을 역전시키는/방지하는 요법; 종양 부위에서 선천성 면역 활성화 및/또는 염증을 촉발하는 요법; 면역 자극 사이토카인의 투여 또는 면역 억제성 사이토카인의 차단.
- [0202] 예를 들어, 대상 항-TNFR2 단일클론 항체는 양성 공동자극 수용체를 결합하는 하나 이상의 효능성 작용제; 저해 수용체를 통한 신호전달을 약화시키는 하나 이상의 길항제(차단제), 예컨대, 종양 미세환경 내에서 별개의 면역 억제 경로를 극복(예를 들어, PD-L1/PD-1/PD-L2 상호작용을 차단)하는 길항제; T 세포와 같은 항종양 면역 세포의 빈도를 전신적으로 증가시키고, (예를 들어, CD25를 저해함으로써) Treg를 고갈시키거나 저해하는 하나 이상의 작용제; IDO와 같은 대사 효소를 저해하는 하나 이상의 작용제; T 세포 무반응 또는 고갈을 역전/방지하는 하나 이상의 작용제; 및 종양 부위에서 선천성 면역 활성화 및/또는 염증을 촉발하는 하나 이상의 작용제와 함께 사용될 수 있다.
- [0203] 일 실시형태에서, 면역계의 자극으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 갖는 대상체는 대상 항-TNFR2 단일클론 항체 및 면역-종양제를 대상체에게 투여함으로써 치료되되, 면역-종양제는 길항성 CTLA-4 항체와 같은 CTLA-4 길항제이다. 적합한 CTLA-4 항체는, 예를 들어, YERVOY(이필리무맙) 또는 트레멜리무맙을 포함한다.
- [0204] 일 실시형태에서, 면역계의 자극으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 갖는 대상체는 대상 항-TNFR2 단일클론 항체 및 면역-종양제를 대상체에게 투여함으로써 치료되되, 면역-종양제는 길항성 PD-1 항체와 같은 PD-1 길항제이다. 적합한 PD-1 항체는, 예를 들어, OPDIVO(니볼루맙), KEYTRUDA(켄브롤리주맙) 또는 MEDI-0680(AMP-514; WO2012/145493)을 포함한다. 면역-종양제는 또한 피딜리주맙(CT-011)을 포함할 수 있다. PD-1 수용체를 표적화하기 위한 또 다른 접근법은 AMP-224로 불리는 IgG1의 Fc 부분에 융합된 PD-L2(B7-DC)의 세포외 도메인으로 구성된 재조합 단백질이다.
- [0205] 일 실시형태에서, 면역계의 자극으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 갖는 대상체는 본 발명의 항-TNFR2 단일클론 항체 및 면역-종양제를 대상체에게 투여함으로써 치료되되, 면역-종양제는 길항성 PD-L1 항체와 같은 PD-L1 길항제이다. 적합한 PD-L1 항체는, 예를 들어, MPDL3280A(RG7446; WO2010/077634), 더발루맙(MEDI4736), BMS-936559(WO2007/005874), MSB0010718C(WO2013/79174) 또는 rHigM12B7을 포함한다.
- [0206] 일 실시형태에서, 면역계의 자극으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 갖는 대상체는 본 발명의 대상 항-TNFR2 단일클론 항체 및 면역-종양제를 대상체에게 투여함으로써 치료되되, 면역-종양제는 길항성 LAG-3 항체와 같은 LAG-3 길항제이다. 적합한 LAG3 항체는, 예를 들어, BMS-986016(WO10/19570, WO14/08218) 또는 IMP-731 또는 IMP-321(WO08/132601, WO09/44273)을 포함한다.
- [0207] 일 실시형태에서, 면역계의 자극으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 갖는

대상체는 본 발명의 대상 항-TNFR2 단일클론 항체 및 면역-종양제를 대상체에게 투여함으로써 치료되며, 면역-종양제는 효현성 CD137 항체와 같은 CD137(4-1BB) 효능제이다. 적합한 CD137 항체는, 예를 들어, 우렐루맙 또는 PF-05082566(WO12/32433)을 포함한다.

- [0208] 일 실시형태에서, 면역계의 자극으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 갖는 대상체는 본 발명의 대상 항-TNFR2 단일클론 항체 및 면역-종양제를 대상체에게 투여함으로써 치료되며, 면역-종양제는 효현성 GITR 항체와 같은 GITR 효능제이다. 적합한 GITR 항체는, 예를 들어, TRX-518(WO06/105021, WO09/009116), MK-4166(WO 11/028683) 또는 WO2015/031667에 개시된 GITR 항체를 포함한다.
- [0209] 일 실시형태에서, 면역계의 자극으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 갖는 대상체는 본 발명의 대상 항-TNFR2 단일클론 항체 및 면역-종양제를 대상체에게 투여함으로써 치료되며, 면역-종양제는 효현성 OX40 항체와 같은 OX40 효능제이다. 적합한 OX40 항체는, 예를 들어, MEDI-6383, MEDI-6469 또는 MOXR0916(RG7888; WO06/029879)을 포함한다.
- [0210] 일 실시형태에서, 면역계의 자극으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 갖는 대상체는 본 발명의 대상 항-TNFR2 단일클론 항체 및 면역-종양제를 대상체에게 투여함으로써 치료되며, 면역-종양제는 효현성 CD40 항체와 같은 CD40 효능제이다. 소정의 실시형태에서, 면역-종양제는 길항성 CD40 항체와 같은 CD40 길항제이다. 적합한 CD40 항체는, 예를 들어, 루카투무맙(HCD122), 다세투주맙(SGN-40), CP-870,893 또는 Chi Lob 7/4를 포함한다.
- [0211] 일 실시형태에서, 면역계의 자극으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 갖는 대상체는 본 발명의 대상 항-TNFR2 단일클론 항체 및 면역-종양제를 대상체에게 투여함으로써 치료되며, 면역-종양제는 효현성 CD27 항체와 같은 CD27 효능제이다. 적합한 CD27 항체는, 예를 들어, 바를리루맙(CDX-1127)을 포함한다.
- [0212] 일 실시형태에서, 면역계의 자극으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 갖는 대상체는 본 발명의 대상 항-TNFR2 단일클론 항체 및 면역-종양제를 대상체에게 투여함으로써 치료되며, 면역-종양제는 MGA271(B7H3에 대해)(WO11/109400)이다.
- [0213] 일 실시형태에서, 면역계의 자극으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 갖는 대상체는 본 발명의 대상 항-TNFR2 단일클론 항체 및 면역-종양제를 대상체에게 투여함으로써 치료되며, 면역-종양제는 리틸루맙과 같은 KIR 길항제이다.
- [0214] 일 실시형태에서, 면역계의 자극으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 갖는 대상체는 본 발명의 대상 항-TNFR2 단일클론 항체 및 면역-종양제를 대상체에게 투여함으로써 치료되며, 면역-종양제는 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.
- [0215] 일 실시형태에서, 면역계의 자극으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 갖는 대상체는 본 발명의 대상 항-TNFR2 단일클론 항체 및 면역-종양제를 대상체에게 투여함으로써 치료되며, 면역-종양제는 톨-유사 수용체 효능제, 예를 들어, TLR2/4 효능제(예를 들어, 바실러스 칼메트-게랭균); TLR7 효능제(예를 들어, Hiltonol 또는 Imiquimod); TLR7/8 효능제(예를 들어, Resiquimod); 또는 TLR9 효능제(예를 들어, CpG7909)이다.
- [0216] 일 실시형태에서, 면역계의 자극으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 예를 들어, 암 또는 감염성 질환을 갖는 대상체는 본 발명의 대상 항-TNFR2 단일클론 항체 및 면역-종양제를 대상체에게 투여함으로써 치료되며, 면역-종양제는 TGF- β 저해제, 예를 들어, GC1008, LY2157299, TEW7197 또는 IMC-TR1이다.
- [0217] 6. 예시적인 항-TNFR2 단일클론 항체
- [0218] 본 명세서에 기재된 발명은 TNFR2 또는 이의 항원 결합 단편에 특이적인 단일클론 항체를 제공한다.
- [0219] 따라서, 본 발명의 일 양태는 서열번호 13/101 또는 38의 에피토프에 대한 결합 또는 HFB 3 내지 18에 의해 결합된 에피토프에 대한 결합에 대해 본 명세서에 기재된 임의의 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0220] 예를 들어, HFB3-1/HFB3-1-hG1에 대한 에피토프는 도 11a 내지 도 11c에 도시되어 있다(도 11a 및 도 11b에서

서열번호 13 그리고 도 11c에서 서열번호 101).

- [0221] 본 발명의 관련 양태는 서열번호 13/101 또는 38의 에피토프 또는 HFB3-18에 의해 결합된 에피토프에 특이적으로 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0222] 본 발명의 또 다른 관련 양태는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하되, 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 TNFR2에 특이적이고, 상기 단일클론 항체는 (1a) 서열번호 1의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 2의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 3의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및 (1b) 서열번호 4의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 5의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 6의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 또는 (2a) 서열번호 14의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 15의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 16의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및 (2b) 서열번호 17의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 18의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 19의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 또는 (3a) 서열번호 26의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 27의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 28의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및 (3b) 서열번호 29의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 30의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 31의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 또는 (4a) 서열번호 39의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 40의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 41의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및 (4b) 서열번호 42의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 43의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 44의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 또는 (5a) 서열번호 51의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 52의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 53의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및 (5b) 서열번호 54의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 55의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 56의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 또는 (6a) 서열번호 63의 HCVR CDR1 서열, 서열번호 64의 HCVR CDR2 서열 및 서열번호 65의 HCVR CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및 (6b) 서열번호 66의 LCVR CDR1 서열, 서열번호 67의 LCVR CDR2 서열 및 서열번호 68의 LCVR CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함한다.
- [0223] 위에 기재된 본 발명의 임의의 양태에 대해, 일부 실시형태에서, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서: (1A) HCVR 서열은 서열번호 7이고/이거나; (1B) LCVR 서열은 서열번호 8이거나, (2A) HCVR 서열은 서열번호 20이고/이거나; (2B) LCVR 서열은 서열번호 21이거나, (3A) HCVR 서열은 서열번호 32이고/이거나; (3B) LCVR 서열은 서열번호 33이거나, (4A) HCVR 서열은 서열번호 45이고/이거나; (4B) LCVR 서열은 서열번호 46이거나, (5A) HCVR 서열은 서열번호 57이고/이거나; (5B) LCVR 서열은 서열번호 58이거나 (6A) HCVR 서열은 서열번호 69이고/이거나; (6B) LCVR 서열은 서열번호 70이다.
- [0224] 일부 실시형태에서, 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (1a) 서열번호 9의 중쇄 서열; 및/또는 (1b) 서열번호 10의 경쇄 서열, 또는 (2a) 서열번호 22의 중쇄 서열; 및/또는 (2b) 서열번호 23의 경쇄 서열, 또는 (3a) 서열번호 34의 중쇄 서열; 및/또는 (3b) 서열번호 35의 경쇄 서열, 또는 (4a) 서열번호 47의 중쇄 서열; 및/또는 (4b) 서열번호 48의 경쇄 서열, 또는 (5a) 서열번호 59의 중쇄 서열; 및/또는 (5b) 서열번호 60의 경쇄 서열 또는 (6a) 서열번호 71의 중쇄 서열; 및/또는 (6b) 서열번호 72의 경쇄 서열을 갖는다.
- [0225] 본 발명의 항체의 서열 중 일부가 아래에 제공된다.
- [0226] **HFB3-1-hG1(마우스 단일클론 항체)**
- [0227] CDR-H1: .SYSFTDYN (서열번호 1)
- [0228] CDR-H2: .IFPKYGTTSYNQKFKG (서열번호 2)
- [0229] CDR-H3: .ATDGGTWYFDV (서열번호 3)
- [0230] CDR-L1: .SSVTY (서열번호 4)
- [0231] CDR-L2: .LTSNLASGVPA (서열번호 5)
- [0232] CDR-L3: .QQWSSNFPT (서열번호 6)
- [0233] HCVR은 서열번호 7이고, LCVR은 서열번호 8이다.

[0234]

HC:

EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASSYSFTDYNMNVKQSNKGSLEWIGIIFPKYGTTSYNO
KFKGKATLTVQSSSTAYMQLNLSLTSEDSAVYYCATDGGTWFYFDVWGTGTTVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFFPAVLQSSCLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK (서열번호 9)

[0235]

[0236]

LC:

QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVTYMYWYQQKPRSSPKPWIYLTSLASGVPARFS
GSGSGTSYSLTISSEAEADAATYYCQWSSNPPTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 10)

[0237]

GAATTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGCCCCGAGCTGGTTAAGCCTGGCGCCTCTGTGAAGATCAG
CTGCAAGGCCAGCAGCTACAGCTTCACCGACTACAACATGAACTGGGTCAAGCAGAGCAACG
GCAAGAGCCTGGAATGGATCGGCATCATCTTCCCTAAGTACGGCACCACCAGCTACAACCAG
AAGTTCAAGGGCAAAGCCACACTGACCGTGGACCAGAGCAGCAGCACAGCCTACATGCAGCT
CAACAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGTGCTACAGATGGCGGCACCTGGT
ACTTCGATGTGTGGGGCACTGGCACCACCGTGACAGTTAGTTCTGCGTCGACCAAGGGCCCA
TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACTCAGGGGCCCTGACCA
GCGGGCTGCACACCTTCCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
GTGACCGTGGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCC
CACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCCCAAAACCC
AAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
CGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCGCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTG
CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGC
CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAA
GACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCCTGG
ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA (서열번호 11)

[0238]

CAGATTGTGCTGACACAGTCTCCCGCTCTGATGAGCGCTAGCCCTGGCGAGAAAGTGACCAT
 GACATGTAGCGCCAGCAGCAGCGTGACCTACATGTACTGGTATCAGCAGAAGCCCAGAAGCA
 GCCCCAAGCCTTGGATCTACCTGACCAGCAATCTGGCCAGCGGAGTGCCCTGCCAGATTTTCT
 GGCTCTGGCAGCGGCACAAGCTACAGCCTGACAATCAGCAGCATGGAAGCCGAGGATGCCGC
 CACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCAATCCTCCTACATTTGGCTCCGGCACCAGCTGG
 AAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG
 AAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGT
 ACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGG
 ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACCAG
 AAACACAAAGTCTACGCCTCGGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTACAAAAGAG
 CTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (서열번호 12)

[0239]

SCEDSTYTQLWNWVPECLS (서열번호 13)

[0240]

SCEDSTYTQLWNWVPECLSC (서열번호 101)

[0241]

HFB3-1hz6-hG1(인간화된 단일클론 항체)

[0242]

CDR-H1: SYSFTDYN (서열번호 14)

[0243]

CDR-H2: IFPKYGTTSYAQKLGQ (서열번호 15)

[0244]

CDR-H3: ATDGGTWYFDV (서열번호 16)

[0245]

CDR-L1: SSVTY (서열번호 17)

[0246]

CDR-L2: LTSNLASGVPS (서열번호 18)

[0247]

CDR-L3: QQWSSNPPT (서열번호 19)

[0248]

HCVR은 서열번호 20이고, LCVR은 서열번호 21이다.

[0249]

HC:

QVQLVQSGAELKKPGASVKVSKASSYSFTDYNMNVWRQAPGQSLEWMGIIFPKYGTTSYAQ
 KLQGRVLTITDSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATDGGTWYFDVWGTGTTVTVSSASTKGP
 SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH
 NHYTQKSLSLSPGK (서열번호 22)

[0251]

LC:

DIQLTQSPSFLSASVGRVITICRASSSVTYMYWYQQKPKGKAPKPIYLTSNLASGVPSRFS
 GSGSGTEYTLTISSLPEDAATYYCQQWSSNPPTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
 KSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 23)

[0253]

CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAGCTGAAAAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTC
 CTGCAAGGCCAGCAGCTACAGCTTCACCGACTACAACATGAACTGGGTCCGACAGGCCCCTG
 GCCAGTCTCTTGTAGTGGATGGGCATCATCTTCCCTAAGTACGGCACCACCAGCTACGCCAG
 AAAGTGCAGGGAAGAGTGACCCCTGACCACCGACACCAGCACAAGCACCAGCTACATGGAAGT
 GCGGAGCCTGAGATCCGATGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCACAGATGGCGGCACCTGGT
 ACTTCGATGTGTGGGGCACTGGCACCACCGTGACAGTCTCTTCTGGTTCGACCAAGGGCCCA
 TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTG
 CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCA
 GCGGCGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
 GTGACCGTGGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC
 CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCC
 CACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCC
 AAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
 CGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
 CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTG
 CACCAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC
 CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
 TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
 TTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAA
 GACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGG
 ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA (서열번호 24)

[0254]

GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCAAGCTTTCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCAT
 TACATGTAGAGCCAGCAGCAGCGTGACCTATATGTACTGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGG
 CCCCTAAGCCTTGGATCTACCTGACCAGCAATCTGGCCAGCGGCGTGCCAAGCAGATTTTCT
 GGCTCTGGCAGCGGCACCGAGTACACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGATGCCGC
 CACCTACTATTGCCAGCAGTGGTCCAGCAATCCTCTACCTTTGGCTCCGGCACCAAGCTGG
 AAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG
 AAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT
 ACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGG
 ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG
 AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG
 CTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (서열번호 25)

[0255]

[0256] HFB3-14-hG1(마우스 단일클론 항체)

[0257]

CDR-H1: .GYTFDY (서열번호 26)

[0258]

CDR-H2: .INPNDGGITYSQKFKG (서열번호 27)

[0259]

CDR-H3: .AREGNYYAYDVRVWYFDV (서열번호 28)

[0260]

CDR-L1: .QDIITY (서열번호 29)

[0261]

CDR-L2: .STSSLNSGVPS (서열번호 30)

[0262] CDR-L3: QQYSELPYT (서열번호 31)

[0263] HCVR은 서열번호 32이고, LCVR은 서열번호 33이다.

[0264] HC:

EVQLQQSGPELVKPGASVIRISCKASGYTFDYYMNWVKQSHGKSLEWIGDINPNDGGTTYSQ
KFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCAREGNYYAYDVRVWYFDVWGTGTTVTVS
SASTKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS

[0265] VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 34)

[0266] LC:

DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRSSSENIYSNLAWYQQKQKSPQLLVYAATNLADGVPSRF
SGSGSGTQYSLKINSLSQSEDFGSYYCQHFHWGTPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 35)

[0267] :

GAAGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCCGAGCTGGTTAAGCCTGGCGCCTCTGTCAGAATCAG
CTGCAAGGCCAGCGCCTACACCTTCACCGACTACTACATGAACTGGGTCAAGCAGAGCCACG
GCAAGAGCCTGGAATGGATCGGCGACATCAACCCCAATGATGGCGGCACCACCTACAGCCAG
AAGTTCAAGGGCAAAGCCACACTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGGA
GAGAAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTTTTGTGCCAGAGAGGGCAACTACTACG
CCTACGACGTCCGCGTGTGGTACTTTCGATGTGTGGGGCACAGGCACCACCGTGACAGTTAGT
TCTGCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG
GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGT
GGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCTTACAGTCCCTCAGGA
CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT
CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTT
GTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCACACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC
TTCCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATG
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG
GTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT
CTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCC
GAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC
TCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCCTTCTCATGCTCC
GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAA
ATGA (서열번호 36)

[0268] :

GACATCCAGATGACACAGTCTCCAGCCAGCCTGTCCGTGTCTGTGGGAGAGACAGTGACCAT
CACCTGTGCGGAGCAGCGGAGAACATCTACAGCAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCAGGGCA
AGTCTCCTCAGCTGCTGGTGTACGCCGCCACCAATCTTGCTGATGGCGTGCCAGCAGATTT
TCCGGCTCTGGCTCTGGCACACAGTACAGCCTGAAGATCAACAGCCTGCAGAGCGGAGACTT
CGGCAGCTACTACTGCCAGCACTTTTGGGGCACCCCTTGGACATTTGGCGGAGGCACCAAGC
TGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG
TTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA
AGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGC
AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC
GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTACAAA
GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (서열번호 37)

[0269]

CAPLRKCRPGFGVARPGTETSD (서열번호 38)

[0270]

HF3-14hz1c-hG1(인간화된 단일클론 항체)

[0271]

CDR-H1: GYTFDY (서열번호 39)

[0272]

CDR-H2: INPNDGGTTYAQKFOG (서열번호 40)

[0273]

CDR-H3: AREGNYAYDVRVWYFDV (서열번호 41)

[0274]

CDR-L1: QDIITY (서열번호 42)

[0275]

CDR-L2: STSSLNSGVPS (서열번호 43)

[0276]

CDR-L3: QQYSELPYT (서열번호 44)

[0277]

HCVR은 서열번호 45이고, LCVR은 서열번호 46이다.

[0278]

HC:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFDYMMNWRQAPGQGLEWMGDINPNDGGTTYAQ
KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCAREGNYAYDVRVWYFDVWGQGTIVTVS
SASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 47)

[0280]

LC:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCGASQDIITYLNWYQQKPGKAVKLLIYSTSSLNSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYSELPYTFGGGTKVELKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 48)

[0282]

CAGGTTTCAGCTGGTTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTC
 CTGCAAGGCCAGCGGGCTACACCTTTACCGACTACTACATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTG
 GACAGGGACTTGAATGGATGGGCGACATCAACCCCAACGACGGCGGCACAACATACGCCAG
 AAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACGAGTCTACAAGCACCGCTACATGGAAGT
 GAGCAGCCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAGAGGGCAACTACTAGC
 CCTACGACGTCCGCGTGTGGTACTTTCGATGTTTGGGGCCAGGGCACACCGTGACAGTCTCT
 TCTGCGTTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGG
 GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCT
 GAAACTCAGGGCCCTGACCAGCGGGTGCACACCTTCCGGCTGTCTACAGTCTCTCAGGA
 CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT
 CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTT
 GTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCTCTGGGGGGACCGTCAGTC
 TTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG
 CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
 TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG
 GTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGT
 CTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCC
 GAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGC
 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
 GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC
 TCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC
 GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAA
 ATGA (서열번호 49)

[0283]

GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACCAT
 TACATGTGGCGCCAGCCAGGACATCATCACCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCA
 AGGCCGTGAAGCTGCTGATCTACAGCACCAGCAGCCTGAATAGCGGCGTGCCAGCAGATTT
 TCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTT
 CGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCGAGCTGCCCTACACATTTGGCGGAGGCACCAAGG
 TGGAAGTGAAGCGTACGGTTGCTGCCCTTCCGTGTTTCATCTTCCACCTTCCGACGAGCAG
 CTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTGCTGTGCTGCTGAACAACCTTCTACCTCGGGGAAGCCAA
 GGTGCAAGTGGAAAGGTGGACAATGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGC
 AGSACTCCAAGCAGCAGCCTACAGCCTGTCTCCACACTGACCCTGTCCAAGGCCGACTAC
 GAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGACCAA
 GTCTTTCAACCGGGGCGAGTGTTAG (서열번호 50)

[0284]

[0285] HFB3-18-hG1(마우스 단일클론 항체)

[0285]

[0286] CDR-H1: GFTFSDAW (서열번호 51)

[0286]

[0287] CDR-H2: VRNKANNHATYYAESVKG (서열번호 52)

[0287]

[0288] CDR-H3: TRSVGGYGTYYWYFDV (서열번호 53)

[0288]

[0289] CDR-L1: QNLLNSGNQKNY (서열번호 54)

[0289]

[0290] CDR-L2: GASTRESGVDP (서열번호 55)

[0290]

[0291] CDR-L3: QSEHSYPYT (서열번호 56)

[0292] HCVR은 서열번호 57이고, LCVR은 서열번호 58이다.

[0293] HC:

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEVRNKANNHATYY
AESVKGRFTTISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTGIYYCTRSVGGYGTTYWYFDVWGTGTTVTVS
SASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVSFCS
VMHEALHNYHTQKSLSLSPGK (서열번호 59)

[0294]

[0295] LC:

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQNLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPELLIFGASTRES
GVPDRFTGSGSSTDFTLTISVQAEDLAVYYCQSEHSYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 60)

[0296]

GAAGTGAAGCTGGAAGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTATGAAGCTGAG
CTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTTCTGACGCCTGGATGGACTGGGTCCGACAGTCTCCTG
AGAAAGGCCTGGAATGGGTTGCCGAAGTCCGGAACAAGGCCAACCAACCACGCCACCTACTAC
GCCGAGTCTGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACGACAGCAACAGCAGCGTGTACCT
GCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGGCATCTACTACTGCACAAGAAGCGTTGGCG
GCTACGGCACCACCTACTGGTACTTTGATGTGTGGGGCACCAGGACAGTACCGTTAGT
TCTGCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG
GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCT
GGAAGTACAGCGCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGA
CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT
CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTT
GTGACAAAATCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC
TTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATG
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG
GTCAGCGTCCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT
CTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCC
GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGC
CTGACCTGCCCTGTTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC
TCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC
GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAA
ATGA (서열번호 61)

[0297]

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGTGTCTGCCGGCGAGAAAGTGACCAT
 GAGCTGCAAGAGCAGCCAGAACCTGCTGAACAGCGGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGT
 ATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCTTTGGAGCCAGCACCAGAGAAAGC
 GGGCTGCCCGATAGATTTACAGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGTTC
 TGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTGTACTACTGTACAGCGGAGCACAGCTACCCCTACACCT
 TTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC
 CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACAGCCTCTGTTGTGTGCCCTGCTGAATAACTT
 CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC
 AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACG
 CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCCGAAGTCACCCATCAGGGCCT
 GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (서열번호 62)

[0298]

[0299] HFB3-18hz1-hG1(인간화된 단일클론 항체)

[0300] CDR-H1: GFTFSDAW (서열번호 63)

[0301] CDR-H2: VRNKANNHATYYAASVKG (서열번호 64)

[0302] CDR-H3: TRSVGGYGTTYWYFDV (서열번호 65)

[0303] CDR-L1: QNLLNSGNQKNY (서열번호 66)

[0304] CDR-L2: GASTRESGVPD (서열번호 67)

[0305] CDR-L3: QSEHSYPYT (서열번호 68)

[0306] HCVR은 서열번호 69이고, LCVR은 서열번호 70이다.

[0307] HC:

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQASGKGLEWVGEVRNKANNHATYY
 AASVKGFRFTISRDDSKNTAYLQMNLSKTEDTAVYYCTRSVGGYGTTYWYFDVWGQGTITVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
 FLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 71)

[0308]

[0309] LC:

DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQNLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIFGASTRES
 GVPDRFSGSGSTDFLTITSSLAEDVAVYYCQSEHSYPYTFGQGTKLEIKRITVAAPSVEFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 72)

[0310]

GAGGTGCAGCTGGTTGAACTCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAAGCTGTC
 TTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTTTCCGACGCTTGGATGGACTGGGTCCGACAGGCTCTG
 GCAAAGGCCCTTGAGTGGGTGGAGAAGTGGGAACAAGGCCAACCAACCACGCCACCTACTAT
 GCCGCCTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCGCCTACCT
 GCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCAGATCTGTTGGCG
 GCTACGGCACCACCTACTGGTACTTTGATGTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTTTCT
 TCTGCGTCCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG
 GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCT
 GAACTCAGGGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCAGGA
 CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT
 CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAAGTTGAGCCCCAAATCTT
 GTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC
 TTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATG
 CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG
 TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG
 GTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT
 CTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC
 GAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACG
 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
 GCAGCCGGAGAACAACACAAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC
 TCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCTCC
 GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAA
 ATGA (서열번호 73)

[0311]

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGTCTCTGGGAGAGAGCCACCAT
 CAACTGCAAGAGCAGCCAGAACCCTGTGAACAGCGGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGT
 ATCAGCAGAAGCCCGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCTTTGGAGCCAGCACCCAGAGAAAGC
 GGCCTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAATTAGCTC
 CCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGTGCAGAGCGAGCACAGCTACCCCTACACCT
 TTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC
 CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCCTGCTGAATAACTT
 CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC
 AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACACCACTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACG
 CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCCAAGTCACCCATCAGGGCCT
 GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG (서열번호 74)

[0312]

RPGWYCALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFVGVARPGTETSD (서열번호 75)

[0313]

[0314] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간-마우스 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, CDR-이식 항체 또는 재표면화된(resurfaced) 항체이다.

[0314]

[0315] 일부 실시형태에서, 이의 항원 결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, F_d, 단일쇄 Fv 또는 scFv, 이황화 연결된 F_v, V-NAR 도메인, IgNar, 인트라바디, IgGΔCH₂, 미니바디, F(ab')₃, 테트라바디, 트라이머바디, 다이어바디, 단일-도메인 항체, DVD-Ig, Fcab, mAb₂, (scFv)₂ 또는 scFv-Fc이다.

[0315]

[0316] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 면역 효과기 기능을 없애는 조작된 Fc 영역을 갖는다. 예를 들어, 대상 항체의 조작된 Fc 영역은 "LALA" 이중 돌연변이(Leu235A1a와 함께

[0316]

Leu234A1a)를 가질 수 있으므로 효과기 기능이 감소될 수 있다.

- [0317] 이러한 항체는 IgG1에 LALA 이중 돌연변이가 있음을 나타내는 G1AA라는 명칭을 가질 수 있다.
- [0318] Fc γ 수용체(Fc γ R) 및 보체 단백질 C1q에 대한 결합이 부분적으로 또는 완전히 없어 면역 효과기 기능이 폐지된 다른 재조합 인간 IgG 항체(hIgG)는 당업계에 공지되어 있으며, Fc γ R 활성화 및 Fc-매개성 독성을 감소시키기 위해 다양한 치료 응용 분야에 사용된다. 소정의 이러한 Fc-조작된 항체/단편은 이러한 목표를 부분적으로 달성하는 반면, 다른 항체는 Fc γ R 활성화 및 Fc-매개성 독성을 완전히 폐지한다. 소정의 실시형태에서, 본 발명의 항체/단편은 hIgG1-P329G LALA 또는 hIgG4-P329G SPLE(IgG4의 인간 IgG4 S228P/L235E 변이체) 돌연변이를 포함하고, Fc γ R과 C1q 상호작용을 완전히 폐지하며 영향을 받지 않은 FcRn 상호작용 및 Fc 안정성을 갖는 조작된 hIgG Fc 도메인을 갖는다. P329G Fc 돌연변이는 Fc γ R과 함께 프롤린 샌드위치 모티프의 형성을 방해한다. 이 모티프는 모든 IgG Fc/Fc γ R 복합체의 경계면에 존재하기 때문에, 이의 파괴는 모든 인간 및 대부분의 다른 포유동물 IgG 하위클래스에 적용되어 효과기 침묵 IgG 분자를 생성할 수 있다. 따라서, 소정의 실시형태에서, 대상 항체/단편은 이러한 효과기 침묵 Fc 돌연변이를 갖는 임의의 하나의 IgG 하위클래스를 갖는다.
- [0319] 소정의 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 TNFR2에 특이적이며, 예를 들어, 실질적으로 TNFR1과 교차 반응하지 않고/않거나 실질적으로 마우스 TNFR2와 교차 반응하지 않는다. 소정의 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 사이노몰구스 원숭이 또는 레서스 원숭이 TNFR2와 같은 원숭이 TNFR2와 교차 반응한다.
- [0320] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 rhTNFR2에 대해 1 μ M 이하, 100nM 이하, 50nM 이하, 25nM 이하, 20nM 이하, 15nM 이하, 10nM 이하, 5nM 이하, 2nM 이하, 1nM 이하, 0.1nM 이하, 0.01nM 이하 또는 0.001nM 이하(예를 들어, 10⁻⁸ M 이하, 예를 들어, 10⁻⁸ M 내지 10⁻¹³ M, 예를 들어, 10⁻⁹ M 내지 10⁻¹³ M)의 해리 상수(K_d)를 갖는다.
- [0321] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TNFR2의 CRD2 도메인 내의 영역에 결합한다. 소정의 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 HFB3-1에 의해 결합된 에피토프에 결합한다.
- [0322] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TNFR2의 CRD3 도메인 내의 영역에 결합한다. 소정의 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 HFB3-14에 의해 결합된 에피토프에 결합한다.
- [0323] 소정의 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 HFB3-18에 의해 결합된 에피토프에 결합한다.
- [0324] 소정의 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 13/101 또는 38의 에피토프에 결합한다.
- [0325] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TNFR2에 대한 인간 재조합 TNF α 의 결합을 향상시킨다.
- [0326] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TNFR2에 대한 인간 재조합 TNF α 의 결합을 차단한다.
- [0327] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TNFR2에 대한 인간 재조합 TNF α 의 결합에 실질적으로 영향을 미치지 않는다.
- [0328] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NF κ B 신호전달과 같은 TNF α -매개성 신호전달을 저해하고/하거나 NF κ B 하류 표적 유전자의 하향 조절을 유도한다. 그러나, 다른 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 NF κ B 신호전달과 같은 TNF α -매개성 신호전달을 촉진시키고/시키거나 NF κ B 하류 표적 유전자의 상향 조절을 유도한다.
- [0329] 일부 실시형태에서, NF κ B 신호전달은 CD8 및/또는 CD4 Tconv T 세포와 같은 효과기 T 세포에서 자극된다. 일부 다른 실시형태에서, NF κ B 신호전달은 CD8 및/또는 CD4 Tconv T 세포와 같은 효과기 T 세포에서 저해된다.
- [0330] 일부 실시형태에서, NF κ B 신호전달은 Treg에서 자극된다. 일부 다른 실시형태에서, NF κ B 신호전달은 Treg에서 저해된다.

- [0331] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 선택적으로 CD3/CD28에 의한 공동 자극과 함께 또는 없이 그리고/또는 선택적으로 TNF α 공동 자극과 함께 또는 없이 CD8 및/또는 기존의 CD4 T 세포 증식을 자극한다.
- [0332] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 특히 인간화된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 비자극된 1차 CD8 및/또는 CD4 T 세포와 비교하여 (CD3/CD28) TCR-활성화된 1차 CD8 및/또는 CD4 T 세포에 우선적으로 결합한다.
- [0333] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 특히 인간화된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Treg의 존재하에 1차 CD8 및/또는 CD4 T 세포의 활성화 및/또는 증식을 포함하여 1차 CD8 및/또는 CD4 T 세포의 CD3/CD28-유도성 활성화 및/또는 증식과 같은 CD3/CD28-유도성 활성화 및/또는 증식을 향상시킨다.
- [0334] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 특히 인간화된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 교차 결합 독립적 방식으로 1차 CD8 및/또는 CD4 T 세포의 활성화 및/또는 증식을 공동 자극한다.
- [0335] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 특히 인간화된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 교차 결합 의존적 방식으로 1차 CD8 및/또는 CD4 T 세포의 활성화 및/또는 증식을 공동 자극한다.
- [0336] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 TNF α 와 TNFR2 사이의 결합을 향상시키고; (예를 들어, TCR-활성화된 CD8 및/또는 CD4 Tconv T 세포에서) TNF α -매개성 또는 -공동 자극된 NF κ B 신호전달을 향상시키고; 그리고/또는 Treg의 존재하에 TCR-활성화된 효과기 T 세포(예를 들어, CD8 및/또는 CD4 Tconv T 세포) 증식을 촉진한다.
- [0337] 일부 실시형태에서, 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Treg에서 TNF α -매개성 CD25 발현을 향상시킨다.
- [0338] 일부 실시형태에서, 인간화된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 고온(예를 들어, 25°C 또는 40°C), 낮은 pH 조건(예를 들어, 실온 부근에서 pH 3.5) 하에 그리고/또는 여러 라운드의 동결/해동 주기 후에 안정함을 포함하여 양호한 개발 가능성 프로파일을 갖는다.
- [0339] 소정의 실시형태에서, 인간화된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 본 발명의 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체의 개발 가능성을 개선하도록 설계된 아미노산 서열에 하나 이상의 점 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Raybould *et al.* (Five computational developability guidelines for therapeutic antibody profiling, *PNAS* 116(10): 4025-4030, 2019)]은 가변 도메인 서열의 다운로드 가능한 상동성 모델을 구축하고, 이를 5가지 개발 가능성 가이드라인에 대해 테스트하고, 잠재적인 서열 취약점(liability) 및 표준 형식을 보고하는 전산 도구인 치료적 항체 프로파일러(Therapeutic Antibody Profiler: TAP)를 기술하고 있다. 저자는 opig.stats.ox.ac.uk/webapps/sabdab-sabpred/TAP.php에서 무료로 이용 가능한 TAP를 추가로 제공한다.
- [0340] 항원에 대해 목적하는 친화도를 달성하는 것 외에도 치료용 mAb 개발에는 많은 장벽이 있다. 여기에는 내인성 면역원성, 화학적 및 구조적 불안정성, 자가-회합, 높은 점도, 다중특이성 및 불량한 발현이 포함된다. 예를 들어, 높은 수준의 소수성, 특히 높은 가변적 상보성-결정 영역(CDR)이 계속 응집, 점도 및 다중특이성과 관련되어 왔다. 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 순전하의 비대칭성이 또한 고농도에서의 자가-회합 및 점도와 상관관계가 있다. CDR에서 양전하 및 음전하의 패치는 높은 청소율 및 불량한 발현 수준과 관련이 있다. (예를 들어, 산화, 이성질체화 또는 글리코실화를 통한) 제품 이질성은 번역 후 변형 또는 동시 번역 변형이 가능한 특정 서열 모티프에서 발생한다. 서열 취약점의 확인을 용이하게 하기 위해 전산 도구를 이용할 수 있다. 문헌[Warszawski *et al.* (Optimizing antibody affinity and stability by the automated design of the variable light-heavy chain interfaces. *PLoS Comput Biol* 15(8): e1007207. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007207>)]은 또한 가변 경쇄-중쇄 인터페이스의 자동화 설계에 의해 항체 친화성 및 안정성을 최적화하는 방법을 기술하고 있다. 후보 항체의 잠재적인 개발 가능성 문제를 확인하기 위해 추가적인 방법이 이용 가능하며, 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 하나 이상의 점 돌연변이가 통상적인 방법을 통해 후보 항체에 도입되어 이러한 문제를 해결하여 본 발명의 최적화된 치료용 항체를 생성할 수 있다.

[0341] 7. 인간화된 항체

[0342] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체는 인간화된 항체이다. 인간화된 항체는 인간화된 항체가 항체 치료제에 대한 면역 반응을 초래하고 치료 효과를 감소시킬 수 있는 비인간 항체(예컨대, 인간 항-마우스 항체(HAMA) 반응)에 대한 인간 면역 반응을 감소시키거나 제거하기 때문에 치료적 분자로서 유용하다.

[0343] 항체는 임의의 표준 방법에 의해 인간화될 수 있다. 인간화의 비제한적인 예시적인 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제5,530,101호; 제5,585,089호; 제5,693,761호; 제5,693,762호; 제6,180,370호; 문헌[Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-27 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science 239: 1534-36 (1988)]; 및 미국 공개 제US 2009/0136500호에 기술되어 있는 방법을 포함한다. 이들 모두 참조에 의해 인용된다.

[0344] 인간화된 항체는 비인간 가변 영역의 프레임워크 영역의 적어도 하나의 아미노산이 인간 프레임워크 영역의 상응하는 위치의 아미노산으로 대체된 항체이다. 일부 실시형태에서, 비인간 가변 영역의 프레임워크 영역의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 15개 또는 적어도 20개의 아미노산은 하나 이상의 인간 프레임워크 영역에서 하나 이상의 상응하는 위치의 아미노산으로 대체된다.

[0345] 일부 실시형태에서, 치환에 사용되는 상응하는 인간 아미노산의 일부는 상이한 인간 면역글로불린 유전자의 프레임워크 영역으로부터 유래한다. 즉, 일부 이러한 실시형태에서, 비인간 아미노산 중 하나 이상은 제1 인간 항체의 인간 프레임워크 영역으로부터의 상응하는 아미노산으로 대체되거나 제1 인간 면역글로불린 유전자에 의해 암호화될 수 있고, 비인간 아미노산 중 하나 이상은 제2 인간 항체의 인간 프레임워크 영역으로부터의 상응하는 아미노산으로 대체되거나 제2 인간 면역글로불린 유전자에 의해 암호화될 수 있고, 비인간 아미노산 중 하나 이상은 제3 인간 항체의 인간 프레임워크 영역으로부터의 상응하는 아미노산으로 대체되거나 제3 인간 면역글로불린 유전자 등에 의해 암호화될 수 있다. 또한, 일부 실시형태에서, 단일 프레임워크 영역, 예를 들어, FR2에서 치환을 위해 사용되는 모든 상응하는 인간 아미노산은 동일한 인간 프레임워크로부터 유래할 필요는 없다. 일부 실시형태에서, 그러나, 치환에 사용되는 모든 상응하는 인간 아미노산은 동일한 인간 항체로부터 유래하거나 동일한 인간 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된다.

[0346] 일부 실시형태에서, 항체는 하나 이상의 전체 프레임워크 영역을 상응하는 인간 프레임워크 영역으로 대체함으로써 인간화된다. 일부 실시형태에서, 대체되는 비인간 프레임워크 영역에 대해 최고 수준의 상동성을 갖는 인간 프레임워크 영역이 선택된다. 일부 실시형태에서, 이러한 인간화된 항체는 CDR-이식 항체이다.

[0347] 일부 실시형태에서, CDR-이식 후, 하나 이상의 프레임워크 아미노산이 마우스 프레임워크 영역에서 상응하는 아미노산으로 다시 변경된다. 이러한 "역 돌연변이(back mutation)"는 일부 실시형태에서 하나 이상의 CDR 구조에 기여하는 것으로 보이고/보이거나 항원 접촉에 관여할 수 있고/있거나 항체의 전반적인 구조적 온전성에 관여하는 것으로 보이는 하나 이상의 마우스 프레임워크 아미노산을 보유하도록 만들어진다. 일부 실시형태에서, CDR 이식 후 항체의 프레임워크 영역에 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하, 1개 또는 0개의 역 돌연변이가 만들어진다.

[0348] 일부 실시형태에서, 인간화된 항체는 또한 인간 중쇄 불변 영역 및/또는 인간 경쇄 불변 영역을 포함한다.

[0349] 8. 인간 항체

[0350] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 임의의 적합한 방법에 의해 만들어질 수 있다. 비제한적인 예시적인 방법은 인간 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 트랜스제닉 마우스에서 인간 항체를 만드는 것이다. 예를 들어, 문헌[Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551-55 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature 362: 255-8 (1993); onberg *et al.*, Nature 368: 856-9 (1994)]; 및 미국 특허 제 5,545,807호; 제6,713,610호; 제6,673,986호; 제6,162,963호; 제5,545,807호; 제6,300,129호; 제6,255,458호; 제5,877,397호; 제5,874,299호; 및 제5,545,806호를 참조한다.

[0351] 비제한적인 예시적인 방법은 또한 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하여 인간 항체를 만드는 것을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol. 227: 381-8 (1992); Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-97 (1991)]; 및 PCT 공개 제WO 99/10494호를 참조한다.

[0352] 항체 불변 영역

[0353] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 인간화된, 키메라 또는 인간 항체는 하나 이상의 인간 불변 영역을 포

함한다. 일부 실시형태에서, 인간 중쇄 불변 영역은 IgA, IgG 및 IgD로부터 선택되는 아이소타입이다. 일부 실시형태에서, 인간 경쇄 불변 영역은 K 및 λ 로부터 선택되는 아이소타입이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 인간 IgG 불변 영역, 예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 Fc 융합 파트너는, 예를 들어, IgG1 불변 영역에 C237S 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 인간 IgG2 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 이러한 실시형태에서, IgG2 불변 영역은 미국 특허 제6,900,292호에 기술되어 있는 바와 같은 P331S 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 인간 IgG4 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 이러한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 인간 IgG4 불변 영역에 S241P 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Angal *et al.* Mol. Immunol. 30(1):105-108 (1993)]을 참조한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 인간 IgG4 불변 영역 및 인간 κ 경쇄를 포함한다.

[0354] 중쇄 불변 영역의 선택은 항체가 생체내에서 효과기 기능을 가질 것인지 여부를 결정할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 효과기 기능은 항체-의존적 세포-매개성 세포독성(ADCC) 및/또는 보체-의존적 세포독성(CDC)을 포함하며, 항체가 결합된 세포를 죽일 수 있다. 전형적으로, 인간 IgG1 또는 IgG3 중쇄를 포함하는 항체는 효과기 기능을 갖는다.

[0355] 일부 실시형태에서, 효과기 기능은 바람직하지 않다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 효과기 기능은 염증성 병태 및/또는 자가면역성 장애의 치료에 바람직하지 않을 수 있다. 일부 이러한 실시형태에서, 인간 IgG4 또는 IgG2 중쇄 불변 영역이 선택되거나 조작된다. 일부 실시형태에서, IgG4 불변 영역은 S241P 돌연변이를 포함한다.

[0356] 본 명세서에 기재된 임의의 항체는 임의의 적합한 방법에 의해 정제될 수 있다. 이러한 방법은 친화성 매트릭스 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피의 사용을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 적합한 친화성 리간드는 항체가 결합하는 항원 및/또는 에피토프 및 항체 불변 영역에 결합하는 리간드를 포함한다. 예를 들어, 단백질 A, 단백질 G, 단백질 A/G 또는 항체 친화성 칼럼이 불변 영역에 결합시키고 항체를 정제하는 데 사용될 수 있다.

[0357] 일부 실시형태에서, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 예를 들어, 뷰틸 또는 페닐 칼럼이 또한 일부 폴리펩타이드를 정제하는 데 사용된다. 폴리펩타이드를 정제하는 많은 방법이 당업계에 공지되어 있다.

[0358] 대안적으로, 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 무세포 시스템에서 생산된다. 비제한적인 예시적인 무세포 시스템은, 예를 들어, 문헌[Sitaraman *et al.*, Methods Mol. Biol. 498: 229-44 (2009); Spirin, Trends Biotechnol. 22: 538-45 (2004); Endo *et al.*, Biotechnol. Adv. 21: 695-713 (2003)]에 기술되어 있다.

[0359] 9. 본 발명의 항체를 암호화하는 핵산 분자

[0360] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 항체의 하나 이상의 사슬을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 분자를 제공한다. 일부 실시형태에서, 핵산 분자는 본 명세서에 기재된 항체의 중쇄 또는 경쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 핵산 분자는 본 명세서에 기재된 항체의 중쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 경쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 모두 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 핵산 분자는 제1 중쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 제2 핵산 분자는 제2 경쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0361] 일부 이러한 실시형태에서, 중쇄 및 경쇄는 하나의 핵산 분자 또는 2개의 별개의 핵산 분자로부터 2개의 별개의 폴리펩타이드로 발현된다. 항체가 scFv인 경우와 같은 일부 실시형태에서, 단일 폴리뉴클레오타이드는 함께 연결된 중쇄 및 경쇄를 모두 포함하는 단일 폴리펩타이드를 암호화한다.

[0362] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체의 중쇄 또는 경쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 리더 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 이는 번역될 때 중쇄 또는 경쇄의 N-말단에 위치한다. 위에서 논의된 바와 같이, 리더 서열은 천연 중쇄 또는 경쇄 리더 서열일 수 있거나 또 다른 이중성 리더 서열일 수 있다.

[0363] 핵산 분자는 당업계에서 통상적인 재조합 DNA 기법을 사용하여 작제될 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산 분자는 포유동물 세포와 같은 선택된 숙주 세포에서의 발현에 적합한 발현 벡터이다.

[0364] 10. 벡터

[0365] 본 명세서에 기재된 항체의 중쇄 및/또는 경쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터가 제공된다.

이러한 벡터는 DNA 벡터, 파지 벡터, 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 벡터는 중쇄를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드 서열 및 경쇄를 암호화하는 제2 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 중쇄 및 경쇄는 벡터로부터 2개의 별개의 폴리펩타이드로서 발현된다. 일부 실시형태에서, 중쇄 및 경쇄는, 예를 들어, 항체가 scFv인 경우와 같이 단일 폴리펩타이드의 일부로서 발현된다.

[0366] 일부 실시형태에서, 제1 벡터는 중쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 제2 벡터는 경쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 벡터 및 제2 벡터는 유사한 양(예컨대, 유사한 몰량 또는 유사한 질량량)으로 숙주 세포에 형질감염된다. 일부 실시형태에서, 제1 벡터와 제2 벡터의 5:1 내지 1:5의 몰비 또는 질량비로 숙주 세포에 형질감염된다. 일부 실시형태에서, 중쇄를 암호화하는 벡터 및 경쇄를 암호화하는 벡터에 대해 1:1 내지 1:5의 질량비가 사용된다. 일부 실시형태에서, 중쇄를 암호화하는 벡터 및 경쇄를 암호화하는 벡터에 대해 1:2의 질량비가 사용된다.

[0367] 일부 실시형태에서, CHO 또는 CHO-유래 세포 또는 NSO 세포에서 폴리펩타이드의 발현을 위해 최적화된 벡터가 선택된다. 예시적인 이러한 벡터는, 예를 들어, 문헌[Running Deer *et al.*, Biotechnol. Prog. 20:880-889 (2004)]에 기술되어 있다. 일부 실시형태에서, 벡터는 인간을 포함하는 동물에서 대상 항체의 생체내 발현을 위해 선택된다. 일부 이러한 실시형태에서, 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드의 발현은 조직-특이적 방식으로 기능하는 프로모터 또는 프로모터들의 제어하에 있다. 예를 들어, 간-특이적 프로모터가, 예를 들어, PCT 공개 제WO 2006/076288호에 기술되어 있다.

[0368] 11. 숙주 세포

[0369] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체의 중쇄 및/또는 경쇄는 세균 세포와 같은 원핵생물 세포; 또는 진균 세포(예컨대, 효모), 식물 세포, 곤충 세포 및 포유동물 세포와 같은 진핵생물 세포에서 발현될 수 있다. 이러한 발현은, 예를 들어, 당업계에 공지된 절차에 따라 수행될 수 있다. 폴리펩타이드를 발현시키는 데 사용될 수 있는 예시적인 진핵생물 세포는 COS 7 세포를 포함하는 COS 세포; 293-6E 세포를 포함하는 293 세포; CHO-S 및 DG44 세포를 포함하는 CHO 세포; PER.C6® 세포(Cruce11); 및 NSO 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체의 중쇄 및/또는 경쇄는 효모에서 발현될 수 있다. 예를 들어, 미국 공개 제US 2006/0270045 A1호를 참조한다. 일부 실시형태에서, 특정 진핵생물 숙주 세포는 TNFR2 항체의 중쇄 및/또는 경쇄에 대해 목적하는 번역 후 변형을 일으키는 능력에 기초하여 선택된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, CHO 세포는 293 세포에서 생산된 동일한 폴리펩타이드보다 시알릴화 수준이 더 높은 폴리펩타이드를 생산한다.

[0370] 목적하는 숙주 세포로의 하나 이상의 핵산의 도입은 칼슘 포스페이트 형질감염, DEAE-덱스트란 매개 형질감염, 양이온성 지질-매개성 형질감염, 전기천공, 형질도입, 감염 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 방법에 의해 달성될 수 있다. 비제한적인 예시적인 방법이, 예를 들어, 문헌[Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)]에 기술되어 있다. 핵산은 임의의 적합한 방법에 따라 목적하는 숙주 세포에 일시적으로 또는 안정적으로 형질감염될 수 있다.

[0371] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 폴리펩타이드가 임의의 적합한 방법에 따라 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자로 조작되거나 형질감염된 동물의 생체내에서 생산될 수 있다.

[0372] 실시예

[0373] 실시예 1 인간 및 원숭이 TNFR2에 특이적인 단일클론 항체

[0374] 원숭이 오쏘로그 TNFR2에 대한 교차 반응성을 갖는 인간 TNFR2에 특이적인 단일클론 항체를 생성하기 위해, 표준 절차를 사용하여 인간 TNFR2(rhTNFR2)의 재조합 세포의 도메인(ECD)으로 마우스를 면역화하여 일련의 다양한 인간-마우스 키메라 단일클론 항체를 생성하였다.

[0375] 적어도 25개의 이러한 단일클론 항체가 생성되었으며, 선택된 항체의 VH 및 VL 서열을 정렬시켜 도 1에 도시된 바와 같은 컨센서스 서열을 얻었다. H-CDR3 및 L-CDR3 영역은 박스 안에 서열로 표시하였다.

[0376] 그런 다음, 이들 단일클론 항체를 CHO 세포(각각 CHO.hHFB3 및 CHO.mkHFB3 세포)에 의해 발현된 인간 및 원숭이 TNFR2에 결합하는 능력에 대해 테스트하였다. 간략하게는, 약 40,000개의 CHO.hHFB3 또는 CHO.mkHFB3 세포를 조직 배양 웰에 시딩하고, 시작(최고) 농도가 약 66nM 항체인 각 테스트 항체의 연속 1:3 희석액을 각 세포 유형에 첨가하고, 약 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포에 결합된 항체를 AF647(Alexsa Fluor® 647 형광 염료)로

표지된 17nM의 항-인간 Fc 항체를 사용하여 검출하였다. 아이소타입 일치된 음성 대조군 항체도 이 검정에 사용하였다. 각 항체에 대한 EC₅₀ 값 및 E_{max}를 포함하는 데이터를 도 2a에 정리하였다.

- [0377] 열한 개(11)의 테스트 항체는 CHO 세포에서 발현된 hTNFR2에 대해 서브- 또는 한 자릿수-nM 수준의 친화도 (EC₅₀)를 나타내었다. 이들 항체도 CHO 세포에서 발현된 TNFR2의 레서스 원숭이 오쏘로그에 대해 교차 반응성을 나타내었으며, hTNFR2 결합과 비교하여 결합 친화도에 대해 실질적으로 동일한 경향을 나타내었다. 도 2a를 참조한다.
- [0378] 흥미롭게도, 일부 항체(예컨대, HFB3-1 및 -14)는 TNFR2에 대한 TNF α 결합을 촉진시켰고, 다른 항체(예컨대, HFB3-18)는 TNFR2에 대한 TNF α 결합을 저해하였으며, 또 다른 항체(예컨대, HFB3-6)는 TNFR2에 대한 TNF α 결합에 명백하게 효과가 없었다. 도 2b를 참조한다. 구체적으로, CHO.hHFB3 세포에 대한 25 ng/ml TNF α의 결합은 CHO 세포를 각 항체와 함께 약 1시간 동안 사전 인큐베이션한 후 측정하였다. 그런 다음 TNF α(HFB2003L로 표지됨)에 결합된 세포의 백분율을 증가하는 항체의 농도에 대해 플로팅하였다.
- [0379] 마우스 TNFR2를 발현하는 CHO 세포 및 모 CHO 세포주(햄스터 TNFR2를 발현할 수도 있거나 발현하지 않을 수도 있음)에 결합하는 테스트 항체의 능력을 테스트하기 위해 동일한 실험을 또한 설정하였다. 2개의 단일클론 항체(HFB3-18 및 HFB3-19)는 마우스 오쏘로그에 대해 한계 수준의 결합을 나타낸 반면, 다른 항체는 마우스 TNFR2에 대해 검출 가능한 수준의 결합을 나타내지 않았다. 양성 대조군으로서 마우스 TNFR2에 특이적인 HM102 단일클론 항체를 사용하여 마우스 TNFR2를 발현하는 CHO 세포에 대해 양성 결합을 보인 반면, 아이소타입 일치된 대조군 항체는 결합하지 않았다(도 3).
- [0380] 모 CHO 세포주에 대해서는 어떠한 결합도 관찰되지 않았다(도 3).
- [0381] 인간 TNFR2(대 TNFR1 수용체)에 대한 결합 특이성도 재조합 인간 TNFR2 및 TNFR1 단백질을 사용하여 검증하였다.
- [0382] 간략하게는, 조직 배양 플레이트를 0.1 μg/ml의 His-태깅된 재조합 인간 TNFR2 또는 TNFR1로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 그런 다음, 코팅된 플레이트를 시작(최고) 농도가 약 66nM 항체인 각 테스트 항체의 1:3 연속 희석액과 함께 얼음 위에서 약 1시간 동안 인큐베이션하였다. HRP-표지된 항-인간 Fc 항체와 TMB 기질의 1:5000 희석액을 사용하여 세포에 결합된 항체를 검출하였다. 아이소타입 일치된 음성 대조군 항체 F3뿐만 아니라 rhTNFR2에 특이적인 MR2-1 양성 대조군 항체 및 rhTNFR1에 특이적인 양성 대조군 항체도 이 검정에 사용하였다. 각 항체에 대한 EC₅₀ 값을 포함하는 데이터를 도 4a에 정리하였다.
- [0383] 11개의 테스트된 항체 중 6개, 즉, HFB3-1, -14, -21, -23, -24 및 -25는 His-태깅된 단량체성 rhTNFR2에 대해 서브-nM의 친화도(EC₅₀)를 보인 반면, 4개의 추가적인 항체(HFB-3, -6, -19 및 -22)는 동일한 항원에 대해 한 자릿수의 nM 친화도를 나타내었다. HFB3-18은 두 자릿수의 nM 친화도로 단량체성 rhTNFR2에 대해 상대적으로 가장 약한 결합을 보여주었다. 그러나, 11개의 항체 중 어느 것도 His-태깅된 TNFR1 수용체에 대해 임의의 검출 가능한 수준의 결합을 나타내지 않았으며, 이는 TNFR2에 대한 결합 특이성을 입증한다.
- [0384] 재조합 인간 TNFR2 단백질에 대한 인간-마우스 키메라 항체 HFB3-1, 14 및 18의 결합 친화도를 항-인간 IgG Fc 포획(AHC) 바이오센서를 사용하여 검증하였다. AHC 바이오센서는 인간 Fc-함유 단백질(예를 들어, 대상 항체)과 표적 분석물(예를 들어, 재조합 인간 TNFR2) 사이의 거대분자 상호작용의 역학적 특성규명을 가능하게 한다. 인간 Fc-함유 단백질의 고정화는 공장식 고정화(factory immobilized) 항-인간 Fc-특이적 항체를 통해 이루어지며, 인간 Fc 도메인에 대한 높은 친화도는 까다로운 동역학적 적용에 필요한 안정적인 기준선을 제공한다. 이 특정 실험에서, 테스트 항체(인간화됨)를 검정 완충액(PBS(pH 7.4), 0.1% BSA, 0.1% Tween20)에 20 μg/ml의 농도로 로딩하였다. 분석물은 500nM, 167nM 또는 55.7nM의 His-태깅된 재조합 인간 TNFR2였다. 포획 검정을 25°C에서 실행하였다. 테스트된 항체의 K_d는 nM 범위 내에 있다(도 4b 참조).
- [0385] HFB3-1-hG1, HFB3-14-hG1, HFB3-6-hG1 및 HFB3-18-hG1 항체에 대한 에피토프 매핑 실험은 이들 항체가 TNFR2의 상이한 도메인을 인식한다는 것을 보여주었다. TNFR 슈퍼패밀리의 대부분의 구성원에 의해 공유되는 구조적인 특징 중 하나는 약 2개 내지 4개의 시스테인 풍부 도메인(CRD)을 포함한다는 것이다. HFB3-1-hG1은 CRD2 도메인 내의 영역에 결합하는 반면(도 11c), HFB3-18-hG1은 CDR1 내의 구조적 에피토프에 결합한다. HFB3-6-hG1은 CRD3 내의 영역에 결합하고, HFB3-14-hG1도 HFB3-6-hG1의 에피토프보다 더 작은 CRD3 영역 내의 에피토프에 결합한다(도 11b 참조). TNFR2-TNF α 복합체의 3D-모델에서 이들 에피토프의 위치는 도 11d에서 시각화될 수

있다.

[0386] 실시예 2 T 세포 하위유형에서 TNFR2의 발현

[0387] 이 실험은 TNFR2가 다양한 암 유형에서 Treg뿐만 아니라 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포에서 주로 발현된다는 것을 보여준다.

[0388] Treg 및 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포를 포함한 T 세포 하위유형을 다양한 종양 샘플로부터 분리하였으며, 종양 샘플에서의 T 세포 하위유형의 상대 백분율뿐만 아니라 T 세포 하위유형에서의 TNFR2(2 내지 8 규모)의 상대 평균 발현 수준을 RNA 서열 분석을 사용하여 결정하였다. 결과는 도 5에 정리되어 있다.

[0389] BCC 또는 기저세포 암종, SCC 또는 편평세포 암종, 흑색종 및 NSCLC 또는 비-작은 세포 폐암을 포함한 분석된 각각의 종양 샘플에서, TNFR2는 주로 Treg뿐만 아니라 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포에서 주로 그리고 가장 자주 발견되었다. 또한, Treg에서도 가장 높은 상대 발현 수준이 발견되었다. 도 5의 왼쪽 패널을 참조한다. 데이터는 TNFR2가 암 요법에 매력적인 표적임을 시사한다.

[0390] SCC 암 샘플에서 TNFR2의 추가적인 발현 분석도 PD-1, TIM3, CTLA4 및 4-1BB와 같은 여러 면역 관문 유전자의 발현과 함께 수행하였다. 소진된 CD8⁺ T 세포에서, TNFR2의 발현은 이들 면역 관문 유전자의 발현과 일치하는 것으로 밝혀졌으며(도 5, 오른쪽 패널), 항-TNFR2 항체와 이러한 면역 관문 유전자에 대한 저해제를 사용하는 병용 요법이 치료적으로 유익함을 시사한다.

[0391] 실시예 3 1차 Treg, CD8 및 CD4 Tconv 세포에 대한 항-TNFR2 단일클론 항체의 결합

[0392] T 세포 하위유형에 대한 TNFR2의 발현 패턴을 고려할 때(실시예 2 참조), 이 실험은 대상 항-TNFR2 단일클론 항체가 1차 T 세포 하위유형, 우선적으로 활성화된 T 세포에 결합할 수 있음을 보여준다.

[0393] 간략하게는, 넓적 바닥 96-웰 플레이트를 10nM의 항-CD3 항체로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 한편, Treg, CD8 또는 CD4 기준의 T 세포(Tconv)를 포함하는 T 세포 하위유형을 인간 PBMC로부터 분리하였다. 분리된 T 세포 하위유형을 6.6nM의 항-CD28 항체의 존재하에 약 50,000개 세포/웰의 밀도로 시딩하고 약 3일 동안 1차 T 세포를 공동 자극하였다. 그런 다음, 자극된 1차 T 세포를 다양한 농도의 본 발명의 항-TNFR2 인간-마우스 키메라 단일클론 항체의 1:3 연속 희석액으로 얼음 위에서 1시간 동안 처리하였으며, 가장 높은 농도는 66nM이었다. AF647 염료로 표지된 17nM의 항-hFc 항체를 첨가하여 얼음 위에서 1시간 인큐베이션한 후, FACS 분석을 통해 AF647 신호를 검출함으로써 결합된 키메라 항체를 검출하였다.

[0394] 도 6의 상단 패널은 CD4 Tconv가 총 hPBMC의 약 30%로 가장 풍부한 T 세포 하위유형이었으며, CD8 T 세포 10%이고 Treg가 약 1%로 그 뒤를 이었음을 보여준다. 그러나, 비-TCR-활성화된 1차 T 세포는 1차 Treg에서 상대적으로 낮은 수준의 결합이 발생한 것을 제외하고는 대상 항-TNFR2 항체에 검출 가능하게 결합하지 않았다. 전반적으로, 수용체 점유 E_{max}는 Treg에서 가장 높았으며, CD8n CD4 Tconv가 그 뒤를 이었다. CD8 및 CD4 Tconv에 비해 Treg의 상대적으로 낮은 존재비를 감안할 때, Treg에서 TNFR2의 발현은 세포 기준으로 CD8 및 CD4 T 세포보다 훨씬 더 높았다.

[0395] 그러나, TCR-활성화된 T 세포에서 일부 항-TNFR2 항체에 대해 Treg에서 극적인 5배 내지 6배의 증가된 결합이 관찰된 반면, CD8 및 CD4 Tconv에서도 실질적으로 더 높은 결합이 관찰되었다(도 6, 하단 패널).

[0396] 테스트된 항체 중에서, HFB3-1, -6, -24, -25 및 SBT1(양성 대조군)은 서브-nM 수준의 높은 친화도를 나타낸 반면, HFB3-14 및 -19는 한 자릿수의 nM 친화도를 나타내었다. HFB3-18, -21 및 -22는 두 자릿수의 nM 친화도를 나타내었다.

[0397] 실시예 4 1차 CD8 및 CD4 Tconv 세포 공동 자극된 NFκB 신호전달에 대한 소정의 항-TNFR2 단일클론 항체의 결합

[0398] 이 실험은 NFκB 신호전달 경로 유전자의 qPCR 정량화에 의해 입증되는 바와 같이, 본 발명의 항-TNFR2 단일클론 항체가 TNF α-매개성 NFκB 신호전달을 공동 자극한다는 것을 보여준다.

[0399] 간략하게는, 표준 기법 및 상업적으로 입수 가능한 키트를 사용하여 CD4 Tconv(CD4⁺CD25⁻) 또는 CD8⁺ T 세포를 hPBMC로부터 분리하였다. 분리된 T 세포를 25 ng/ml(1.5nM)의 TNF α와 함께 10 μg/ml(66nM)의 본 발명의 다양한 테스트 단일클론 항체 또는 적절한 양성 또는 음성 대조군과 약 24시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음, 자

극된 T 세포를 수거하고, 이의 mRNA를 단리하고, 역 전사시키고, CD25, Foxp3, NF κ B2, RelB 및 LTA와 같은 선택된 NF κ B 신호전달 경로 유전자에 대해 QPCR 분석을 수행하였다. 대상 항체에 의한 공동 자극의 존재 또는 부재하에 이들 유전자의 발현 수준은 도 7의 막대 그래프에 비교되어 있다. 결과는 자극이 없는 대조군(1 \times)과 비교하여 배수 변화로 제시되어 있다.

[0400] 결과는 HFB3-1, -14, -23, -24 및 -25를 포함한 소정의 대상 항체가 NF κ B 신호전달을 유도하였음을 보여주었다. 참고로 HFB3-18이 아닌 HFB3-1 및 -14가 때때로, 특히 NF κ B2, RelB 및 LTA에서 NF κ B 신호전달을 유도하였다는 것이다.

[0401] 실시예 5 항-TNFR2 단일클론 항체의 공동 자극 효과는 단리된 1차 CD8 및 CD4 Tconv 세포의 증식과 연관되어 있다

[0402] 이 실험에서, 넓적 바닥 96-웰 플레이트를 10nM 항-CD3 단일클론 항체뿐만 아니라 20nM 또는 100nM의 대상 항-TNFR2 항체로 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 코팅하였다. 한편, CD8 및 CD4 Tconv 세포를 기재된 바와 같이 hPBMC로부터 단리하고, T 세포 증식을 추적하기 위해 2 μ M의 CTV(Invitrogen의 CELLTRACETM Violet 세포 증식 키트)로 표지하였다. CELLTRACETM Violet 염료는 세포 내로 쉽게 확산되어 세포내 에스테라이스에 의해 절단되어 형광성이 높은 화합물을 생성한 다음, 이는 세포내 아민과 공유 결합하여 알데하이드 고정제로 고정될 수 있는 안정적인 고 잘 유지되는 형광 염색을 생성한다. 과량의 비접합된 시약은 세포의 배지로 수동적으로 확산되며, 여기서 완전 배지로 반응이 중지되고 세척될 수 있다.

[0403] 그런 다음, 표지된 T 세포를 약 3일 동안 공동 자극시키기 위해 6.6nM의 항-CD28 항체의 존재하에 코팅된 96-웰 플레이트에 약 50,000개 세포/웰의 밀도로 시딩하였다. 그런 다음, 형광 신호의 FACS 분석을 위해 세포를 고정시켰다.

[0404] 도 8의 데이터는 소정의 대상 항-TNFR2 항체가 심지어 더 낮은 20nM 농도에서도 CD8 및 CD4 Tconv 증식을 공동 자극하였음을 보여준다. 벤치마크 양성 대조군 항체인 SBT-1 및 -4도 동일한 조건하에 T 세포 증식을 공동 자극하였지만, HFB3-1, -14, -18 및 -25보다 그 정도가 덜하였다.

[0405] 추가적인 실험은 1차 T 세포 증식의 이러한 공동 자극이 HFB3-18과 같은 소정의 단일클론 항체에 대한 Fc γ R 가교에 의존할 수 있는 반면, HFB3-1 및 -14와 같은 다른 항체에 대해서는 구별 가능한 가교 의존성이 없음을 보여주었다.

[0406] 구체적으로, CD8 및 CD4 Tconv를 공여체 KP59095로부터 단리하였으며, 단리된 1차 T 세포를 CD3/CD28 TCR 활성화뿐만 아니라 25 ng/ml의 재조합 인간 TNF α (rhTNF α)의 존재 또는 부재하에 대상 항-TNFR2 단일클론 항체인 HFB3-1, -14 또는 -18로 자극하였다. 항-TNFR2 항체는 플레이트에 결합시키거나 결합 혼합물에 존재하는 가용성 항체로서 공급하였다.

[0407] 25 ng/ml rhTNF α 의 존재하에, 3개의 플레이트-결합된 항-TNFR2 항체(HFB3-1, -14 및 -18)는 모두 CD8 T 세포 증식을 자극하였다(도 19, 왼쪽 하단 모서리 패널 참조). 그러나, 가용성 HFB3-1 및 HFB3-14(가용성 HFB3-18은 아님)만이 CD8 T 세포 증식을 자극할 수 있었으며(도 19, 오른쪽 하단 모서리 패널), 이는 Fc γ R 가교가 HFB3-18-매개성 CD8 T 세포 증식에 필요할 수 있지만 HFB3-1 및 HFB3-14-매개성 CD8 T 세포 증식에는 필요하지 않을 수 있음(즉, 가교 독립적임)을 시사한다.

[0408] 유사한 조건 하에서 CD4 Tconv 증식에 대해서도 유사한 결과가 얻어졌다(데이터 미제시).

[0409] 실시예 6 항-TNFR2 단일클론 항체는 Treg의 존재하에 Teff 세포 말단(CD8 및 CD4 Tconv)에서의 세포 증식을 선호한다

[0410] 이 실험은 대상 항-TNFR2 단일클론 항체가 Treg의 존재하에 CD3/CD28-매개성 TCR 활성화를 통해 Teff 세포(CD8 및 CD4 Tconv) 증식을 공동 자극할 수 있음을 보여준다.

[0411] 간략하게는, CD8 및 CD4 Tconv 효과기 T 세포뿐만 아니라 Treg를 포함한 CD3⁺ T 세포를, 인간 PBMC로부터 단리하고, 실질적으로 위에 기재된 바와 같이 CD3/CD28-매개성 TCR 활성화 및 대상 항-TNFR2 단일클론 항체로 약 4일 동안 공동 자극하였다. Treg의 존재하에 총 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포의 증식은 Invitrogen의 CELLTRACETM Violet 세포 증식 키트(CTV)를 사용하여 결정하였다. CD4⁺ T 세포 CD8⁺ T 세포의 활성화도 각각의 T 세포 집단에서 CD25⁺ T 세포의 백분율을 측정하여 결정하였다.

- [0412] 도 9의 결과는 본 발명의 항-TNFR2 단일클론 항체(예를 들어, HFB3-1hz6-hG1AA, HFB3-1의 인간화된 버전, 아래 참조)는 Treg의 존재하에서도 효과기 T 세포(CD8 및 CD4 Tconv)에서의 세포 증식을 선호함을 보여주었다.
- [0413] **실시예 7 항-TNFR2 단일클론 항체는 HH 림프종 세포에 대해 무시해도 될 정도의 ADCC 효과를 나타낸다**
- [0414] 이 실험은 대상 항-TNFR2 단일클론 항체가 T 세포 림프종에 대해 무시해도 될 정도의 ADCC 효과를 나타냄을 보여주며, 이는 이러한 항체가 T 세포 공동 자극제로서 사용하기에 적합함을 시사한다.
- [0415] 항체-의존적 세포 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC)은 세포-매개성 면역 방어의 메커니즘으로, 이에 의해 면역계의 효과기 세포는 특정 항체에 의해 막-표면 항원이 결합된 표적 세포를 적극적으로 용해시킨다. 이는 체액성 면역 반응의 일부로서 항체가 감염을 제한하고 방지하는 작용을 할 수 있는 메커니즘 중 하나이다. ADCC는 전형적으로 IgG 항체와 상호작용하는 자연 살해(NK) 세포로 알려진 효과기 세포가 필요하다.
- [0416] 이 실험에서는, Jurkat.CD16V/NFAT/luc 세포를 효과기 세포로 사용하고, HH 림프종 세포를 표적 세포로 사용하였다. 효과기 세포 대 표적 세포의 비는 약 6:1이었다. 공동 배양된 효과기 및 표적 세포를 0nM, 0.0066nM, 0.66nM 또는 66nM 농도의 대상 항-TNFR2 단일클론 항체(예를 들어, HFB3-1, -14 또는 -18) 또는 아이소타입 일치된 대조군(hIgG1)의 존재하에 밤새 인큐베이션하였다. 모가놀리주맵 항체를 ADCC에 대한 양성 대조군으로서 사용하였다.
- [0417] 도 10의 결과는 양성 대조군 항체인 모가놀리주맵이 임의의 테스트된 항-TNFR2 단일클론 항체보다 표적 세포에 대해 적어도 120-배 더 강한 ADCC 효과를 나타냈음을 보여주었다. 데이터는 대상 항-TNFR2 항체가 T 세포에 대한 ADCC 효과가 낮거나/없기 때문에 T 세포 공동 자극제로서 사용하기에 적합함을 보여주었다.
- [0418] **실시예 8 TNFR2에 대한 인간화된 항-TNFR2 단일클론 항체의 결합**
- [0419] HFB3-1에 대해 적어도 20개, HFB3-14에 대해 16개 및 HFB3-18에 대해 1개를 포함하여 HFB3-1, -14 및 -18에 대한 여러 인간화된 단일클론 항체를 생성하였다(선택된 인간 생식세포계열이 모 HFB3-18 단일클론 항체 코딩 서열과 매우 유사하기 때문). 인간 CHO 세포에서 발현된 TNFR2에 결합하는 이들 인간화된 단일클론 항체의 능력은 실질적으로 실시예 1에 기술된 바와 같이 결정하였다.
- [0420] 도 12a는 인간화된 HFB3-1hz6, HFB3-14hz1c 및 HFB3-18hz1이 CHO 세포 발현 인간 TNFR2(CHO.hTNFR2)에 결합하지만 모 CHO 세포에는 결합하지 않음을 보여준다. 도 12b는 적어도 7개의 인간화된 HFB3-1 항체, 즉, HFB3-1hz6, -1hz8, -1hz9, -1hz10, -1hz11, -1hz12 및 -1hz14와 적어도 8개의 인간화된 HFB3-14 항체, 즉, HFB3-14hz1c, -14hz2c, -14hz3c, -14hz4c, -14hz6c, -14hz7c, -14hz12c 및 -14hz14c가 CHO 세포-발현된 TNFR2(CHO.hHFB3)에 대해 각각의 모 키메라 항체에 의해 대략 동일한(더 좋지는 않지만) 수준의 결합 친화도를 유지하였음을 보여준다.
- [0421] 대신에 TNFR2(CHO.mkHFB3)의 레서스 원숭이 오쏘로그를 발현하는 CHO 세포를 사용하여 유사한 실험을 반복하였다. 도 13은 원숭이 TNFR2를 발현하는 CHO 세포에 대한 결합의 일반적인 경향이 CHO.hTNFR2에 대한 것과 일치함을 보여준다. 그러나, HFB3-14를 기반으로 한 두 가지 인간화된 변이체, 즉, HFB3-14hz2c 및 -14hz3c에 대해 다소 불안정한 결합이 관찰되었다.
- [0422] 인간화된 항-TNFR2 항체의 결합은 TNFR1이 아닌 TNFR2에는 특이적이다. 도 14a의 ELISA 검정은 인간화된 단일클론 항체 HFB3-1hz6, HFB3-14hz1c 및 HFB3-18hz1이 재조합 인간 TNFR1(hTNFR1-His)을 인식하지 않고 재조합 인간 및 사이노몰구스 TNFR2(각각 hTNFR2-His 및 cynoTNFR2-His)에 결합한다는 것을 보여주었다. 추가적으로, 재조합 인간 및 사이노몰구스 TNFR2에 대한 이들 인간화된 항-TNFR2 항체의 결합 EC50은 서브-나노지 한 자릿수-nM 범위였다.
- [0423] 인간 TNFR2에 대한 인간화된 변이체의 결합 친화도도 재조합 인간 TNFR2 단백질 및 AHC 바이오센서를 사용하여 검증하였다. 항-인간 IgG Fc 포획(AHC) 바이오센서는 인간 Fc-함유 단백질(예를 들어, 대상 항체)과 표적 분석물(예를 들어, 재조합 인간 TNFR2) 사이의 거대분자 상호작용의 역학적 특성규명을 가능하게 한다. 공장식 고정화 항-인간 Fc-특이적 항체를 통해 인간 Fc-함유 단백질의 고정화를 달성하였으며, 이의 인간 Fc 도메인에 대한 높은 친화성은 동역학적 적용에 필요한 안정적인 기준선을 제공한다. 이 특정 실험에서, 테스트 항체(인간화된 대 모 키메라 항체)를 검정 완충액(PBS, pH 7.4, 0.1% BSA, 0.1% Tween20)에 20 µg/ml의 농도로 로딩하였다. 분석물은 500nM, 167nM 또는 55.7nM의 His-태깅된 재조합 인간 TNFR2였다. 포획 검정은 25°C에서 실행하였다.
- [0424] 도 14b에 도시된 바와 같이, 재조합 인간 TNFR2에 대한 친화도의 측면에서 인간화된 변이체를 각각의 키메라 모

항체와 구별하는 데 큰 차이가 없었다.

- [0425] 실시예 3은 키메라 항-TNFR2 항체가 TCR-활성화된 T 세포에 결합한다는 것을 보여준다. 인간화된 변이체에 대해 실질적으로 동일한 실험을 수행하였으며, 그 결과는 도 15에 도시되어 있다.
- [0426] 구체적으로, TCR-활성화된 CD8 세포에 대한 결합의 측면에서, 대부분의 인간화된 HFB3-1 항체는 TCR-활성화된 CD8 세포에 결합하지 않는 것으로 보이는 두 가지 변이체(HFB3-1hz5 및 -1hz7)를 제외하고 서브 nM 수준의 친화도를 나타내었다. 한편, 모든 인간화된 HFB3-14 변이체는 TCR-활성화된 CD8 T 세포에 대해 한 자릿수의 nM 친화도를 나타내었다. 다양한 변이체를 구별하는 데에는 큰 차이가 없다. 참고로, 양성 대조군 항체 SBT-2 및 -3이 1차 CD8 세포에 대한 양호한 결합인자가 아니라는 점이다.
- [0427] **실시예 9 TCR-활성화된 CD4 및 CD8 T 세포를 증식시키는 인간화된 항-TNFR2 단일클론 항체의 공동 자극 효과**
- [0428] 실시예 5는 키메라 항-TNFR2 단일클론 항체의 공동 자극 효과가 단리된 인간 1차 CD8 및 CD4 Tconv 세포를 증식 시킴을 보여주었다. 이 실험은 HFB3-1 및 HFB3-14의 인간화된 변이체를 사용하여 TCR-활성화된 CD4 T 세포에서도 동일한 결과를 보여준다.
- [0429] 구체적으로, 도 16은 인간화된 변이체 HFB3-1hz5, -1hz6, -1hz8, -1hz10, -1hz11 및 -1hz12가 CTV 증식 검정에 기초하여 TCR-활성화된 CD4 T 세포를 각각 모 HFB3-1 키메라 항체와 비교하여 더 큰 정도로 더 강력하게 자극하였음을 보여준다(상기 참조). HFB3-14hz1c 및 -14hz3c 변이체에 대해서도 동일하게 반복하였다.
- [0430] 마찬가지로, CD25⁺ T 세포 집단의 백분율을 기준으로 한 T 세포 활성화도 위의 변이체에 대해 확인되었다.
- [0431] TCR-활성화된 CD8 T 세포(CD3/CD28 자극에 의해 활성화됨)를 증식시키는 공동 자극 효과가 있음을 보여주는 HFB3-1hz6-hG1, -14hz1c-hG1 및 -18hz1-hG1에 대한 확장적인 공동 자극 데이터도 얻었다. 구체적으로, 모 키메라 항체 및 선택된 인간화된 변이체 둘 다 CD3/CD28 TCR 활성화에 의해 자극된 CD8 T 세포 증식을 향상시켰다. 또한, TNF α(오른쪽 패널)의 협력은 항-TNFR2 항체-매개성 CD8 증식을 더 향상시켰다. 도 20을 참조한다.
- [0432] **실시예 10 소정의 인간화된 항-TNFR2 단일클론 항체는 Treg에서 NF κB 신호전달을 유도하였다**
- [0433] 실시예 4는 1차 CD8 및 CD4 Tconv 세포에 대한 소정의 키메라 항-TNFR2 단일클론 항체의 결합이 NF κB 신호전달을 공동 자극함을 보여주었다. 유사한 실험은 소정의 인간화된 변이체 항-TNFR2 항체가 Treg에서 NF κB 신호전달을 유도하였음을 보여준다.
- [0434] 구체적으로, 도 17a는 소정의 인간화된 변이체 항-TNFR2 항체 및 TNF α를 사용한 Treg의 공동 자극이 LTA, TNF 및 TNF AIP3에서 NF κB 하류 신호전달을 유도하였음을 보여준다. 변이체 HFB3-1hz6, -1hz9, -1hz10 및 -1hz11은 모 키메라 항체 HFB3-1보다 더 큰 정도로 NF κB 신호전달을 촉진하였다. 한편, 변이체 HFB3-14hz1c, -14hz2c, -14hz3c 및 -14hz4c(특히, HFB3-14hz1c 및 -14hz3c)도 모 키메라 항체 HFB3-14보다 더 큰 정도로 NF κB 신호전달을 촉진시켰다. 추가적으로, 도 17b는 인간 재조합 TNF α가 있거나 없이 HFB3-1 항체의 소정의 인간화된 변이체를 사용한 CD8 T 세포에서의 NF κB 신호전달의 활성화를 보여준다.
- [0435] **실시예 11 항-TNFR2 항체는 안정적이다**
- [0436] 대상 인간화된 항-TNFR2 항체가 보관 중에 안정하여 치료제로서의 추가 개발에 적합한지 확인하기 위해, 선택된 인간화된 항체에 대해 다양한 개발 가능성 검정을 실행하였다.
- [0437] 첫 번째 실험에서는, 선택된 대상 인간화된 항체를 PBS(pH 7.4)에 25°C 또는 40°C에서 보관하고, 다양한 항체의 안정성을 7일 및 14일에 결정하였다. 도 18의 결과는 1개의 변이체인 HFB3-14hz4c-hG1AA를 제외한 모든 테스트된 항체가 테스트된 조건에서 안정적이었음을 보여주었다.
- [0438] 두 번째 실험에서는, 동일한 항체를 낮은 pH 조건(100mM AcH, pH 3.5, 25°C)하에서 0시간, 3시간 및 6시간 동안 안정성에 대해 테스트하였다. 도 18의 결과는 1개의 변이체인 HFB3-14hz4c-hG1AA를 제외한 모든 테스트된 항체가 테스트된 조건에서 안정적이었음을 다시 보여주었다.
- [0439] 세 번째 실험에서는, 동일한 항체에 1회, 2회 또는 3회의 동결-해동 주기를 적용하였다. 도 18의 결과는 2개의 변이체(HFB3-1hz6-hG1AA 및 HFB3-1hz10-hG1AA)를 제외한 모든 테스트된 항체가 테스트된 조건에서 안정적임을 다시 보여주었다.
- [0440] HFB3-1hz6-hG1, -14hz1c-hG1 및 -18hz1-hG1에 대해 유사한 실험을 반복하였다. HFB3-1hz6-hG1 및 -18hz1-hG1이 14일 후에 분해되기 시작한 것을 제외하고는, 3개의 변이체 모두 위에 개략된 3가지 테스트에서 일반적으로 안

정적이었다.

- [0441] 종합적으로, 데이터는 이들 대상체 변이체 인간화된 항-TNFR2 단일클론 항체가 주요 개발 가능성 문제가 없으며 치료 항체로서 사용하기에 적합하다는 것을 시사한다.
- [0442] **실시예 12 인간화된 TNFR2 네킨(KI) 마우스의 항-TNFR2 항체 및 T 세포에 대한 이의 효과**
- [0443] 대상 항-TNFR2 항체의 치료 효능을 더 잘 입증하기 위해, 상업적 서비스(Biocytogen, 매사추세츠주 웨이크필드 소재)를 통해 C57BL/6 마우스 배경에서 인간화된 TNFR2 네킨(KI) 마우스를 생성하였다.
- [0444] 첫 번째 일련의 실험에서는, 선택된 인간화된 항-TNFR2 항체와 KI 마우스로부터의 CD3 T 세포(TNFR2 KI CD3 T 세포) 사이의 생체의 결합을 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 CD28 및 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 또는 1 $\mu\text{g/ml}$ CD3에 의한 공동 자극하에 분석하였다. 결과는 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 CD3가 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 의 CD3보다 KI 마우스로부터의 비장 세포를 더 잘 활성화시키는 것으로 나타났다. 인간 TNFR2의 발현은 KI CD3⁺ T 세포에서 검출될 수 있으며, 이 발현/검출은 TNF α 에 의해 그리고 가벼운 (0.2 $\mu\text{g/ml}$) CD3 자극에 의해 향상될 수 있다. 또한, 6개의 항-TNFR2 항체(즉, HFB3-1, -14 및 -18뿐만 아니라 이들의 인간화된 변이체인 -1hz6, -14hz1c 및 -18hz1) 각각의 200nM의 단일 용량은 아마도 결합의 포화 수준으로 인해 TNFR2 결합에 대해 식별 가능한 차이를 나타내지 않았다. 데이터는 제시되지 않았다.
- [0445] TNFR2 KI 마우스로부터 단리된 CD8 T 세포에 대해서도 동일한 생체의 결합 실험을 반복하였다. 여기서, TNFR2에 대한 항-TNFR2 단일클론 항체(이의 키메라 및 인간화된 버전)의 결합은 강한 CD3(1 $\mu\text{g/ml}$) 자극하에서 관찰될 수 있다. 한편, TNF α 는 가벼운 CD3(0.2 $\mu\text{g/ml}$) 자극하에서 TNFR2 결합을 향상시켰다. 데이터는 제시되지 않았다.
- [0446] 다음으로, CD3/CD28을 통한 TCR 활성화의 존재 및 TNF α 의 존재하에 생체의 TNFR2 KI CD8 및 CD4 Tconc 세포에서 하류 NF κ B 신호전달을 공동 자극하는 대상 항-TNFR2 항체(키메라 및 인간화된)의 능력을 조사하였다.
- [0447] hTNFR2 네킨(KI) 마우스 T 세포로부터의 신호 반응은 인간 T 세포로부터의 신호 반응만큼 유의미하지는 않았지만, HFB3-1-hG1 및 이의 인간화된 변이체인 HFB3-1hz6-hG1은 다른 항체에 비해 더 많은 반응을 유도하였다(도 21 참조). 참고로, HFB3-18 시리즈에서는 신호 유도가 부족할 것으로 예상된다.
- [0448] C57BL/6 마우스에서 대상 인간화된 항-TNFR2 단일클론 항체(HFB3-1hz6-hG1, HFB3-141c-hG1 및 HFB3-18hz1-hG1)의 약동학적(PK) 프로파일을 조사하였다. 3가지의 인간화된 단일클론 항체는 모두 잘 거동하는 항체에 대한 기대와 일치하는 T_{1/2}를 나타내었다. 아래를 참조한다.

	T _{1/2}	제거 단계
HFB3-1hz6-hG1	4.9 일	6.1 일 내지 무기한
HFB3-141c-hG1	13.0 일	5.7 일 내지 무기한
HFB3-18hz1-hG1	10.6 일	3.5 일 내지 8.6 일

- [0449]
- [0450] **실시예 13 생체의 자연 살해(NK) 세포의 활성화에 대한 인간화된 HFB3-1hz6-hG1의 효과**
- [0451] 이 실험은 대상 인간화된 HFB3-1hz6-hG1 항체가 IL-2/IL-15에 의하거나 CD3/CD28을 통한 NK 세포 활성화의 존재하에 자연 살해(NK) 세포를 공동 자극함을 보여준다.
- [0452] 한 실험에서는, NK 세포 단리 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 2명의 인간 환자가 기증한 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 NK 세포를 단리하였다. NK 세포를 먼저 가용성 IL-2(10 ng/ml) 및 IL-15(10 ng/ml)로 24시간 동안 자극한 다음, 아이소타입 대조군 항체, 마우스 HFB3-1-hG1, 인간화된 HFB3-1hz6-hG1 또는 항-OX40 대조군 항체(BMS)를 각각 22nM, 66nM 또는 200nM로 16시간 동안 처리하였다. 실험 종료 시, NK 세포의 탈과립화 및 활성화를 나타내는 NK 세포 표면의 CD107 α 발현뿐만 아니라 TNFR2 발현을 FACS로 측정하였다.
- [0453] 마우스 HFB3-1-hG1 및 인간화된 HFB3-1hz6-hG1 둘 다 용량 의존적 방식으로 NK 세포 활성화를 크게 증가시켰다. 항-OX40 항체는 OX40 발현이 불충분하기 때문에 NK 단기 활성화(IL-2/IL-15 자극 후 40시간)를 촉진할 수 없었다.
- [0454] 또 다른 실험에서는, 2명의 인간 환자가 기증한 전체 PBMC를 플레이트-결합된 항-CD3(1 $\mu\text{g/ml}$) 및 가용성 항-

CD28(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 48시간 동안 공동 자극한 다음, 아이소타입 대조군 항체인 마우스 HFB3-1-hG1, 인간화된 HFB3-1-hz6-hG1 또는 항-OX40 항체(BMS)를 각각 22nM, 66nM 또는 200nM로 16시간 동안 처리하였다. CD107 α 발현을 CD3-음성/CD56-양성(즉, NK 세포)에 대해 결정하였다. 도 23을 참조한다.

[0455] 유사하게는, HFB3-1-hG1 및 HFB3-1-hz6-hG1은 용량 의존적 방식으로 CD107 α 발현을 크게 증가시켰으며, 이는 이들 항체가 전체 PBMC에서 NK 세포 활성화를 촉진할 수 있음을 나타낸다. 장기 활성화(항-CD3/CD28 자극 후 64 시간)하에서, 항-OX40 항체는 NK 세포를 활성화시킬 수 있었다.

[0456] 이들 데이터는 인간화된 HFB3-1-hz6-hG1 및 모 마우스 HFB3-1-hG1이 둘 다 NK 세포 활성화를 촉진할 수 있음을 보여준다.

[0457] **실시예 14 MC38 종양 모델에서 인간화된 HFB3-1hz6-hG1의 약력학**

[0458] 인간화된 TNFR2-KI 마우스에서 MC38 결장직장암 종양 모델을 사용하여 HFB-1-hG1의 약력학을 조사하였다(도 24a 참조). 간략하게는, 8주령의 인간화된 TNFR2 KI 마우스에게 마우스당 약 5×10^5 개의 MC38 종양 세포를 오른쪽 앞 옆구리에 접종하였다. 마우스를 무작위 배정하고, 7일 후인 제0일에 마우스(각 그룹에 대해 $n=5$)에게 10 mg/kg, 1 mg/kg 또는 0.1 mg/kg의 HFB3-1-hG1 또는 10 mg/kg의 아이소타입 대조군 항체를 복강내로 주입하였다. D3에도 동일한 치료제를 다시 투여하였다. 제4일에, 마우스를 안락사시키고, 종양 및 혈액 샘플에 대해 약력학적 관독을 수행하였다. FACS를 사용하여 종양 침윤 백혈구 및 말초 백혈구를 분류하였을 뿐만 아니라 항체에 의한 수용체 점유를 결정하였다.

[0459] 제0일 및 제3일에 단지 2회 용량의 처리 후에는, 아직 처리들 사이에서 종양 무게의 차이는 없었다(도 24b, 왼쪽 상단 패널). 10 mg/kg의 HFB3-1-hG1의 투여는 종양에 존재하는 CD45+ 세포의 절대 수를 증가시켰지만(도 24b, 하단 왼쪽 패널), 종양의 살아있는 세포 중 CD45+의 백분율은 유의하게 증가되지 않았다(도 24b, 하단 오른쪽 패널). 10 mg/kg의 HFB3-1-hG1의 처리도 종양 미세환경에서 CD8+, 기존의 CD4+ T 및 NK 세포의 절대 세포 수를 증가시켰지만, T-조절 세포의 수는 변화시키지 않았다(도 24c). 다른 저용량의 HFB3-1-hG1의 투여는 임의의 관찰 가능한 효과를 초래하지 않았다.

[0460] 종양 및 말초 혈액에서 CD8 T 세포, 기존의 CD4 T 세포, T-조절 세포 및 NK 세포에 대해 TNFR2 수용체 점유를 결정하였다. 종양에서, 10 mg/kg 용량의 HFB3-1-hG1만이 종양의 T 세포에서 약물 수용체 점유를 초래하였고; 1 mg/kg 및 0.1 mg/kg의 용량에 대해서는 점유가 관찰되지 않았다(도 25a 참조). 그러나, 1 mg/kg 및 10 mg/kg에서는, 종양 NK 세포에서 수용체 점유가 관찰되었다. 말초 혈액에서는, 10 mg/kg 및 1 mg/kg 용량의 HFB3-1-hG1이 비슷한 약물 수용체 점유를 초래하였으며, 0.1 mg/kg의 용량에서는 유의미한 점유가 관찰되지 않았다.

[0461] HFB3-1-hG1의 약동학을 실험 종료 시에 결정하였다. 1 mg/kg 및 10 mg/kg 용량의 HFB3-1-hG1 투여는 혈액에서 제4일에 검출 가능하였다. 놀랍게도, 10 mg/kg 용량의 HFB3-1-hG1은 동일한 용량의 아이소타입 대조군보다 훨씬 더 높은 수준으로 유지되었다(도 26a 참조). 흥미롭게도, HFB3-1-hG1의 10 mg/kg 및 1 mg/kg 투여도 혈액에서 검출 가능한 TNFR2의 양을 증가시켰다(도 26b 참조). 혈액 내 TNFR2는 수용체 shedding(shedding)으로 인한 것으로 추정된다.

[0462] 전반적으로, HFB3-1-hG1를 사용한 마우스의 단기 처리에 대한 데이터는 HFB3-1-hG1이 면역 세포의 활성화 및 증식을 자극하고, 면역 세포의 TNFR2 수용체에 효과적으로 결합하며, 생체내에서 혈액 내 양호한 보유력을 가질 가능성이 있음을 강력하게 시사한다.

[0463] **실시예 15 항-PD-1 항체와의 상승적 항-종양 효능**

[0464] 대상 인간화된 항-TNFR2 단일클론 항체에 대한 항-종양 효능은 인간화된 TNFR2 KI 마우스 배경에서 널리 사용되는 마우스 결장직장암 모델에서 입증되었다.

[0465] 구체적으로, 8주령의 인간화된 TNFR2 KI 마우스에게 마우스당 약 5×10^5 개의 MC38 종양 세포(C57BL6 무린 결장 선암종으로부터 유래됨)를 접종하였다. 약 7일 후인 제0일에, 마우스의 평균 종양 크기는 약 $89\text{mm}^3(74\text{mm}^3$ 내지 $98\text{mm}^3)$ 에 도달하였다. 그런 다음, 다음 중 하나를 투여하기 위해 마우스를 5개의 실험 그룹(그룹 당 $n=8$)으로 무작위 배정하였다: (1) 아이소타입-일치 대조군(TT-hG1AA); (2) 항-mPD-1(RMP-1-14); (3) HFB3-1hz6-hG1; (4) HFB3-14hz1c-hG1; 및 (5) HFB3-18hz1-hG1. 총 7회 투여(Q3D, $\times 7$)에 대해, 0일, 3일, 6일, 9일, 12일, 15일 및 18일에 항체를 약 10 mg/kg의 용량으로 복강내로(*i.p.*) 주사하였다. 연구 과정 동안 실험 그룹에 대한 종양 부피를 측정하였다. 21일 또는 그 무렵에, 아이소타입 대조군 그룹의 경우 평균 종양 부피는 2000mm^3 초과에 도달

하였으며, 실험을 종료하고 모든 마우스를 희생시켰다. 시간 경과에 따른 종양 부피를 도 27a 및 도 27b에 다양한 그룹에 대해 플로팅하였다. 21일에, 종양 성장 저해(tumor growth inhibition: TGI)의 통계적 유의성은 HFB3-1hz6, HFB3-18hz1 및 항-PD-1(RMP-14)을 투여받은 마우스의 그룹에서 달성되었다(도 27b).

[0466] 결과는 인간화된 항체 HFB3-1hz6과 -hG1 및 HFB3-18hz1-hG1이 항-mPD-1 항체만큼 강력하게(그보다 낮지 않더라도) 종양 성장을 저해하는 반면, 다른 인간화된 항체도 약간 덜한 정도로 유사하게 효과적이라는 것을 보여주었다. 실험 마우스의 상이한 그룹 간에는 뚜렷한 체중 차이가 관찰되지 않았다.

[0467] 항-mPD-1 및 HFB3-1hz6-hG1 및 아이소타입 대조군(그룹당 4마리의 마우스)을 Q3d×3(3일에 1회, 총 3회 투여, 10 mg/kg을 *i.p.*로 주사)으로 사용한 또 다른 실험에서도 유사한 결과를 얻었다. 6일에(항체의 마지막 용량), 종양 부피는 아이소타입 대조군 그룹 및 항-mPD-1 그룹 및 HFB3-1hz6-hG1 그룹(2원 ANOVA 검정 기반) 사이에서 통계적으로 유의미하게 상이하였다. 도 28을 참조한다.

[0468] 더욱이, HFB3-1hz6-hG1 및 항-PD-1 항체는 MC38 종양 모델에서 종양 성장을 상승적으로 억제하고 마우스의 수명을 증가시켰다. 구체적으로, 인간화된 TNFR2 KI 마우스에게 -7일에 MC38 암 세포를 접종하였다. 0일부터, 마우스에게 아이소타입 대조군, HFB3-1hz6-hG1 또는 항-mPD-1 항체를 3일마다 단독으로 또는 조합하여 복강내로 주사하였다(그룹당 n=8). 총 7회 투여 동안 3일마다(Q3d×7) 3 mg/kg 및 10 mg/kg의 HFB3-1hz6-hG1로 처리하고, 총 4회 투여 동안 3일마다(Q3d×4) 10 mg/kg의 항-PD-1(RMP-14)로 처리하면 아이소타입 대조군을 사용한 처리와 비교하여 종양 성장을 유의하게 저해하고 마우스의 수명이 연장되었다. 또한, HFB3-1hz6-hG1(10 mg/kg, Q3d×7)과 항-PD-1 항체(10 mg/kg, Q3d×4)의 병용 치료는 항-PD-1 항체 단독을 사용한 처리보다 더 나은 생존을 보였다. 도 29를 참조한다. 처리 그룹을 아이소타입 대조군과 비교하는 ANOVA를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0469] **실시예 16 간종양 동계 마우스 모델에서 HFB3-1hz6-hG1의 항-종양 효능**

[0470] Hepa1-6 동계 마우스 모델에서, 종양 부피가 약 100mm³에 도달하면, 마우스를 아이소타입 대조군 항체, 10 mg/kg의 항-mPD-1 또는 0.3 mg/kg 내지 10 mg/kg 용량의 HFB3-1hz6-hG1로 처리하였다. HFB3-1hz6-hG1은 종양 성장을 억제하는 데 효과적이었다. 10 mg/kg의 용량에서, HFB3-1hz6-hG1은 종양 성장을 제어하는 데 있어서 항-mPD-1보다 훨씬 더 효과적이었다(도 32 참조).

[0471] **실시예 17 비인간 영장류에서 항-TNFR2 항체의 독성학적 평가**

[0472] 인간화된 항-TNFR2 항체의 독성학을 비인간 영장류 모델을 사용하여 조사하였다. 그룹당 2마리의 사이노몰구스 원숭이에게 15 mg/kg(낮음), 50 mg/kg(중간) 및 150 mg/kg(높음)의 인간화된 HFB3-1hz6-hG1 단일클론 항체를 1회 주사한 후, 336시간(14일)까지 다양한 시점에서 혈장을 수집하였다.

[0473] HFB3-1hz6-hG1의 독성 역학 분석은 항체가 시간이 지남에 따라 제거됨을 보여주었다. 3 mg/kg 이하의 CD3×CD20 이중특이성 IgG로부터 보고된 데이터(점선)와 비교하여 15 mg/kg, 50 mg/kg 또는 150 mg/kg의 HFB3-1hz6-hG1을 주사한 후 사이토카인 IL-6, IL-2, IFN- γ 및 TNF- α 의 상승은 관찰되지 않았다(도 30).

[0474] 15 mg/kg, 50 mg/kg 또는 150 mg/kg의 HFB3-1hz6-hG1을 주사한 후 정상적인 원숭이로부터의 과거 데이터 범위와 비교하여 백혈구, 적혈구, 혈소판, 호중구 및 림프구의 수에 이상은 발견되지 않았다(도 31).

[0475] 지금까지의 독성학적 평가에서는 비인간 영장류 대상체를 최대 150 mg/kg의 용량의 HFB3-1hz6-hG1로 처리해도 식별 가능한 독성 효과가 나타나지 않았다.

[0476] 사이노몰구스 원숭이에게 여러 용량의 HFB3-1hz6-hG1을 투여한 용량 범위 찾기 연구(dose range finding study: DRF)에서, 최대 150 mg/kg을 반복 투여한 원숭이에서 IL-2, IL-4, IL-5, TNF α 및 IFN- γ 에 대한 변화는 없었다. 원숭이에서의 4주간의 투여 종료 시 10 mg/kg 및 150 mg/kg 수컷 동물에서 IL-6 수준의 변화가 관찰되었다. 원숭이에게 HFB3-1hz6-hG1을 투여한 후 2주에 호중구 및 혈소판 수의 용량 의존적 감소가 관찰되었다. 원숭이에게 HFB3-1hz6-hG1을 매주 투여한 후 설사(액체 대변 또는 묽은 대변)가 자주 관찰되었다.

[0477] 위의 관찰에 기초하여, 인간에게 1mg/kg의 용량을 1회 주사한 후 약물 반감기는 23일로 예상되며, 항체는 4주마다 1mg/kg으로 투여하는 데 적합할 것이다.

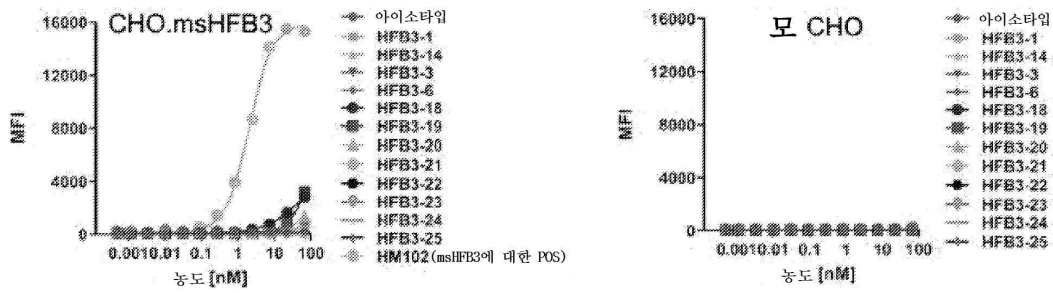
[0478] **실시예 18 TNFR2 발현에 기초한 적응증 선택**

[0479] 이론에 얽매이지 않고, 본 발명의 항-TNFR2 항체의 항-종양 효능은 종양 침윤 T 세포 및 NK 세포에 대한 TNFR2의 자극으로 인해 NK 세포를 활성화하고 CD8+ T 세포 매개성 항-종양 반응을 향상시킴으로써 발생한 것으로 여겨진다. 본 실시예는 본 발명의 항-TNFR2 항체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 가능성이 있는 종양 유형이 높

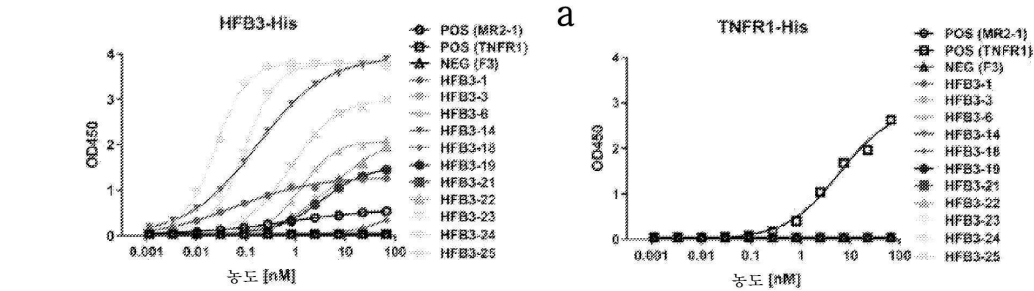
은 TNFR2 및 높은 CD8A를 발현하는 종양을 포함한다는 증거를 제공한다.

- [0480] TCGA 데이터베이스를 사용한 암의 대량 RNA 분석에서, CD8A 컷오프는 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia: AML)에서의 CD8A 수준에 기초하며, 이는 주로 골수 세포로 이루어져 있으며 CD8+ T 세포가 적거나 전혀 없는 것으로 추정된다. TNFR2 컷오프 값은 면역 결핍(immune desert)으로 추정되는 전립선암에서의 TNFR2 수준에 기초한다. 도 34a 내지 도 34b를 참조한다.
- [0481] TNFR2/CD8A 수준에 따른 암 유형의 순위는 도 35에 도시되어 있다. EBV+ 위 선암종/위암, 투명세포 신세포암종, 피부 흑색종, 고환 생식 세포 종양, 연조직 육종, 및 자궁경부 편평세포 암종, 흉막 중피종, 폐 선암종 및 두경부 편평세포 암종을 포함하는 PD-L1이 높은 암이 상위의 높은-TNFR2/높은-CD8A 암으로 확인되었다.
- [0482] TCGA 데이터베이스를 사용한 암 환자의 생존 분석은 종양 유전자 발현 컷오프 값에서, 높은 TNFR2 발현이 피부 흑색종 및 두경부 편평세포 암종에서 더 나은 생존과 유의하게 연관되어 있고(도 33a 및 도 33b), 폐 선암종에서 더 나은 생존을 보이는 경향이 있음을 보여준다(데이터 미제시). 자궁경부 편평세포 암종/자궁경내 선암종, 신장 신투명세포 암종, 고환 생식 세포 종양, 육종, 위 선암종 및 중피종에 대해서는 유의미한 경향이 관찰되지 않았다.
- [0483] 공개적으로 이용 가능한 데이터를 사용하여, 신세포암종(RCC), 피부 흑색종(SKCM), 위 선암종/위암(STAD/GI), 폐 선암종(LUAD) 및 두경부 편평세포 암종(HNSC)의 분자 하위유형에 대해 TNFR2 및 CD8 점수를 추가로 결정하였다(도 36).
- [0484] 테스트된 각각의 암 유형에서, 특징적인(signature) 높은 CD8A 및 높은 TNFR2 발현 패턴을 나타내는 하위유형 내에서 암의 비율이 높은 하위유형이 있고(예를 들어, STAD/GI - EBV+ 암의 약 60%가 이러한 특징적인 높은 발현을 나타냄), 다른 유형(예를 들어, ESCC 하위유형 및 HM-SNV 하위유형은 사실상 CD8A^{hi} TNFR2^{hi} 발현을 나타내지 않음)이 있는 것도 분명하다.
- [0485] 따라서, 특징적인 높은 CD8A 및 높은 TNFR2 발현 패턴을 갖는 테스트된 암 하위유형은 KIRC.2, KIRC.3, KIRC.4, SKCM.Triple_WT, SKCM.BRAF_hotspot_mutants(아마도 SKCM.RAS_hotspot_mutants 및 SKCM.NF1_any_mutants도), LUAD.6과 LUAD.5, HNSC.Atypical(40% HPV 양성) 및 HNSC.mesenchymal(PD-L1/CD274에서 더 높은 경향이 있음)을 포함하여 본 발명의 대상 항체에 의한 유익한 치료를 위한 1차 후보이다.
- [0486] 결장직장암 환자에서, 불일치 복구 결함(deficient mismatch repair: dMMR)/고 미소부수체 불안정적(microsatellite instability-high: MSI-H) 종양은 미소부수체-안정적(microsatellite-stable: MSS)/저 미소부수체 불안정적(microsatellite instability-low: MSI-L) 종양에 비해 면역 관문 저해제(ICI)에 훨씬 더 민감하며, 전자의 환자 그룹은 후자의 환자 그룹보다 면역요법으로부터 더 많은 임상적 이점을 얻었다.
- [0487] MSI 점수 데이터는 모든 암 적응증에 대해 직접적으로 접근할 수 없기 때문에, 출원인은 MSI 점수의 대용물로서 매개변수 돌연변이 수를 사용하여 대상 항체로 치료 가능한 TNFR2^{hi} 및 CD8A^{hi} 종양이 MSI 대 MSS에서 농축되는지 여부를 조사하였다. 이 목적을 위해, 250개 초과 돌연변이 수는 MSI로 간주하고, 250개 미만의 돌연변이 수는 MSS로 간주하였다. 데이터(본 명세서에 제시되지 않음)는 TNFR2^{hi} 및 CD8A^{hi} 발현 패턴이 (암 계놈 아틀라스(TCGA)-CRC 결장 선암종(COAD) 코호트로부터의) COAD 데이터에서 250개 초과 돌연변이 수 대 250개 미만의 돌연변이 수로 더 강력하게 농축되지 않았음을 보여준다. MSI에서는 TNFR2^{hi}와 TNFR2^{lo} 사이에 대략 균등한 분할이 있었다(4% CD8A^{hi}를 제외한 모든 것). 분할은 MSS에서 45% 대 55%가 되었다(모든 CD8A^{lo}).
- [0488] **실시예 19: 인간에서의 HFB3-1hz6-hG1에 대한 투여 연구**
- [0489] 시험관내 사이토카인 방출 검정에 기초한 최소한의 예상된 생물학적 효과 수준, MC38 종양을 보유하는 인간 TNFR2 녹인(hTNFR2 KI) 마우스에서의 최소 약리학적 활성 용량, 및 인간 및 비인간 영장류에서의 심각하지 않은 최고 독성 용량으로부터 데이터가 부분적으로 알려져 있으며, 본 연구에서 HFB3-1hz6-hG1에 대한 시작 용량은 4주마다(Q4W) 60분 IV 주입으로 투여되는 5mg이다.
- [0490] 최대 허용 용량을 결정하기 위해 용량 증량은 150mg까지 수행하였다. 용량 확장은 EBV+ 위암, 투명세포 신세포암종, 피부 흑색종, 연조직 육종, 고환 생식 세포 종양, 및 자궁경부암, 흉막 중피종, 폐 선암종, 두경부 편평세포 암종을 포함하는 PD-L1+ 암에 대해 수행하였다. 제I상 항-종양 활성/효능에 기초하여, 추가적인 환자 코호트를 등록하였다.

도면3



도면4



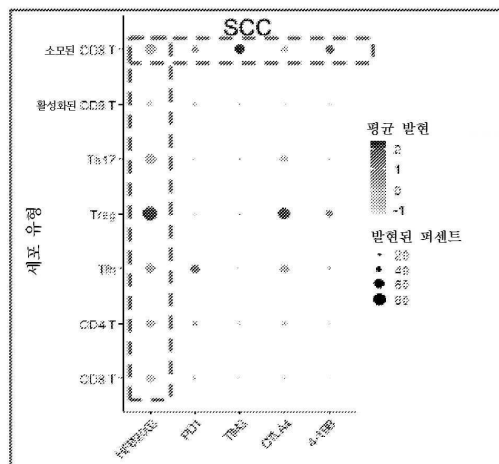
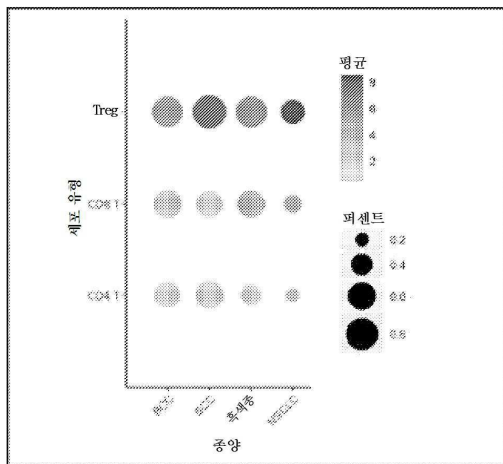
rHFB3-His	POS (MR2-1)	HFB3-1	HFB3-3	HFB3-6	HFB3-14	HFB3-18
EC ₅₀ (nM)	0.67	0.06	4.58	1.28	0.16	49.75

rHFB3-His	HFB3-19	HFB3-21	HFB3-22	HFB3-23	HFB3-24	HFB3-25
EC ₅₀ (nM)	3.38	0.37	5.40	0.09	0.02	0.81

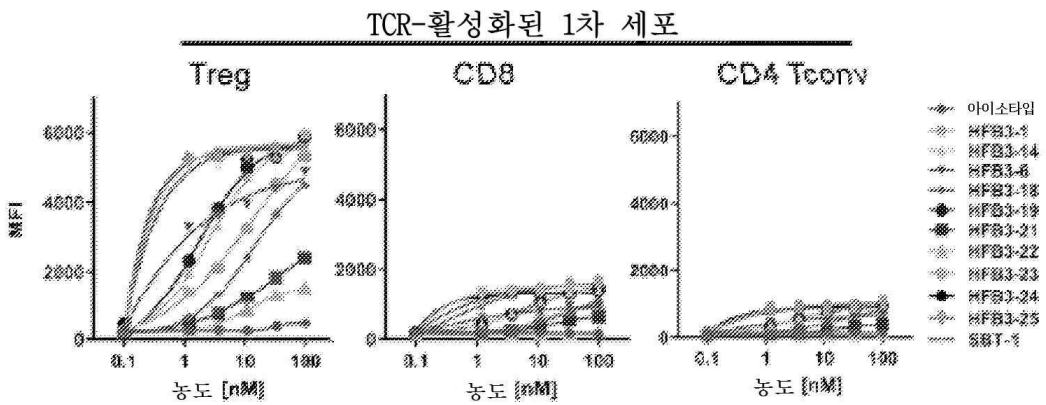
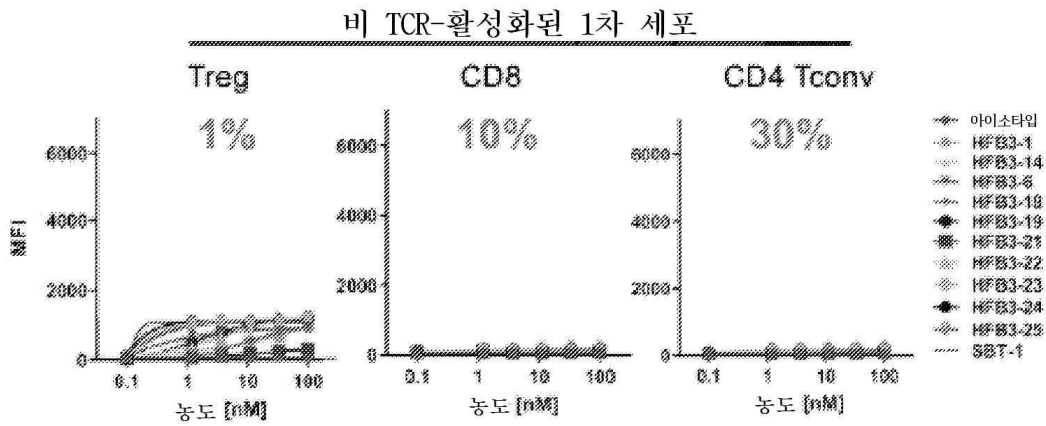
b

	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (75%)	IC ₅₀ (25%)
HFB3-1	1.4	8.22 E+3	1.15 E-5
HFB3-14	5.4	2.38 E+4	1.28 E-4
HFB3-18	4.2	3.77 E+3	1.35 E-5

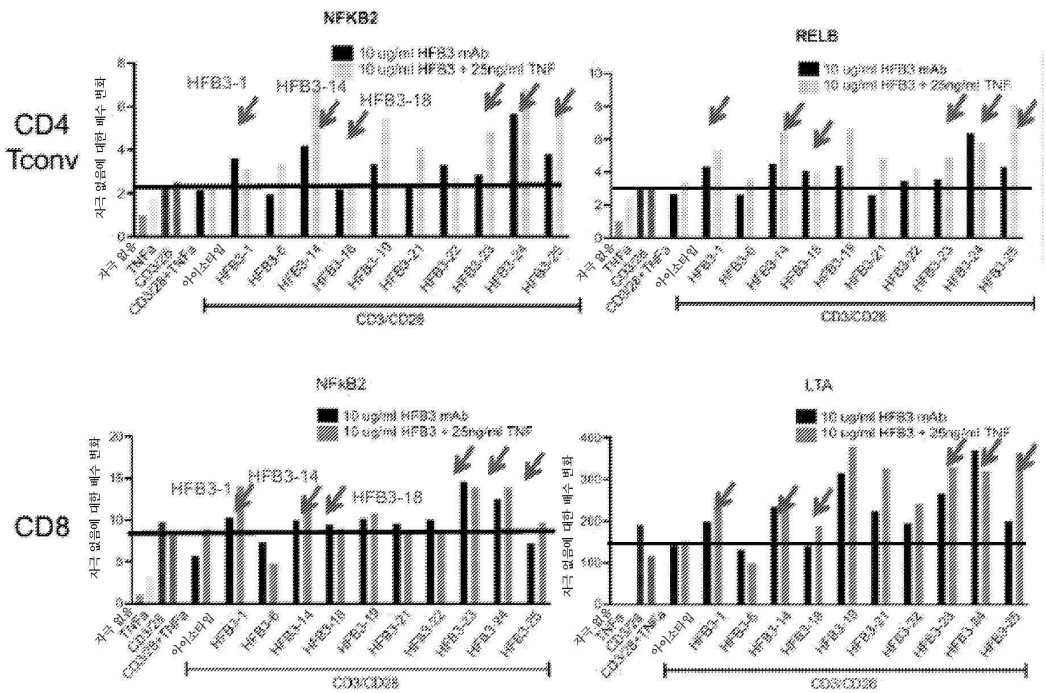
도면5



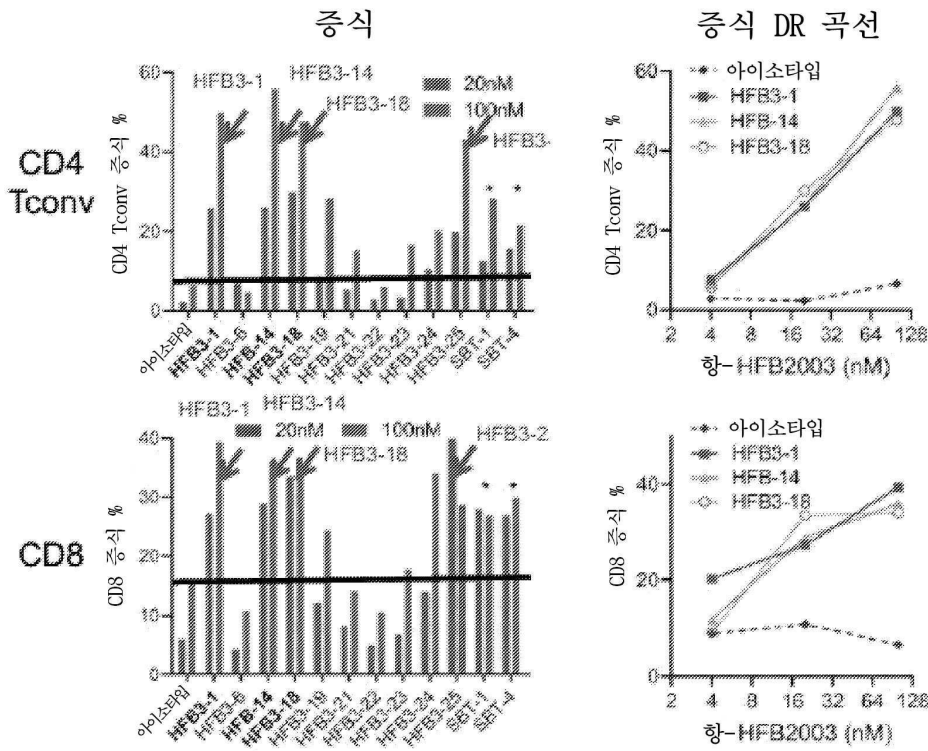
도면6



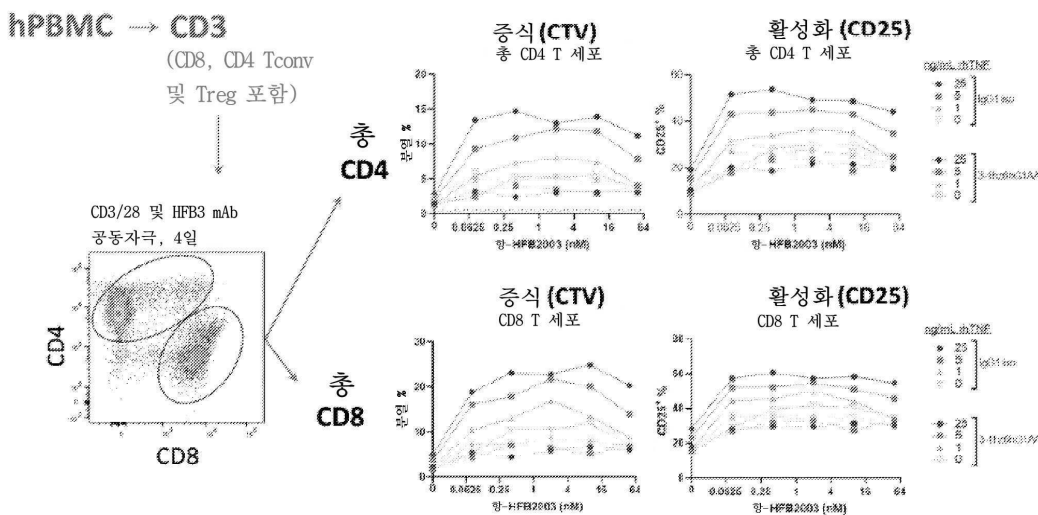
도면7



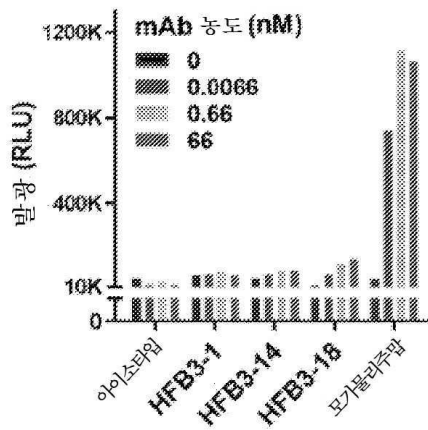
도면8



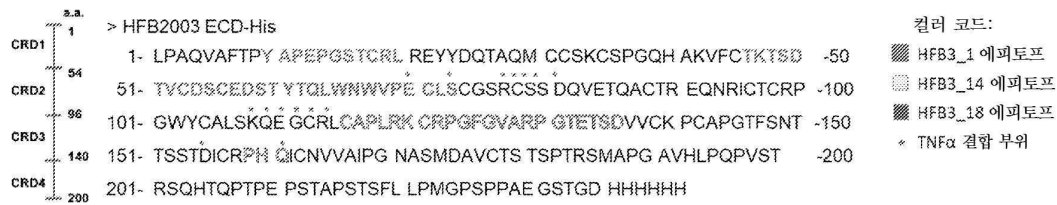
도면9



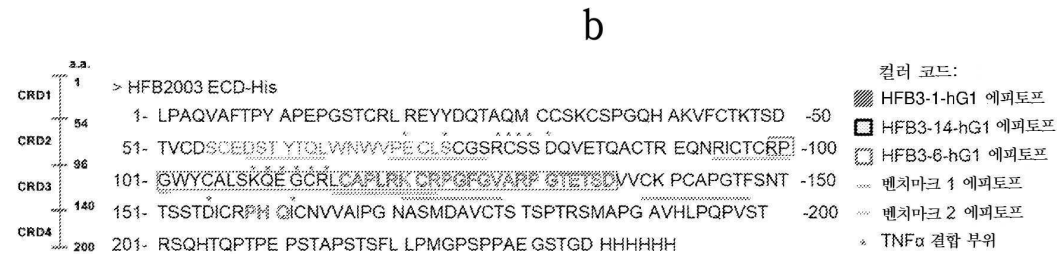
도면10



도면11a



도면11bc

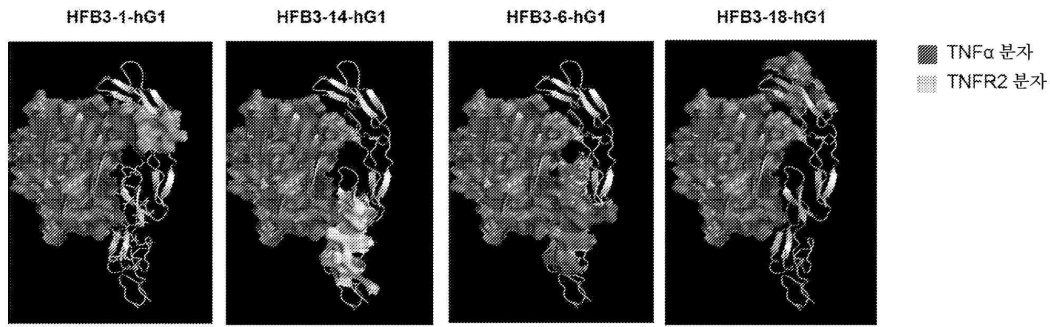


C

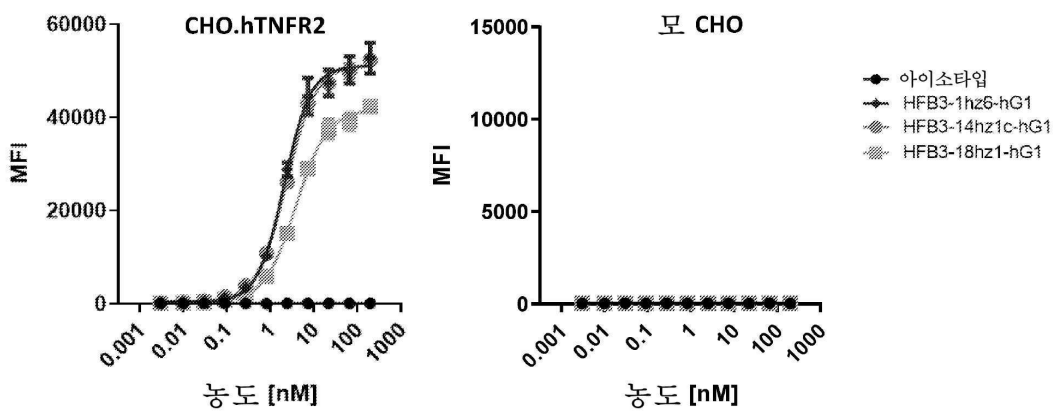
>HFB2003-His
 LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSQDSTVCDSCED
 STYTQLWNWVPECLSCGSRCSQDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRL
 CAPLRKCRPGFGVARGTETSDVVCKPCAPGTFSTNTSSTDICRPHQICNVVAIPGNAS
 MDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQTPPEPSTAPSTSFL LPMGPSPPAEG
 STGDHHHHHH

■ 강조 : 2개의 독립적인 실험에서 확인된 잠재적인 HFB3-1hG1 에피토프 영역
 ■ 밑줄 : 잠재적인 HFB3-1hG1 에피토프가 관찰되었지만 차이/신뢰도가 더 낮음

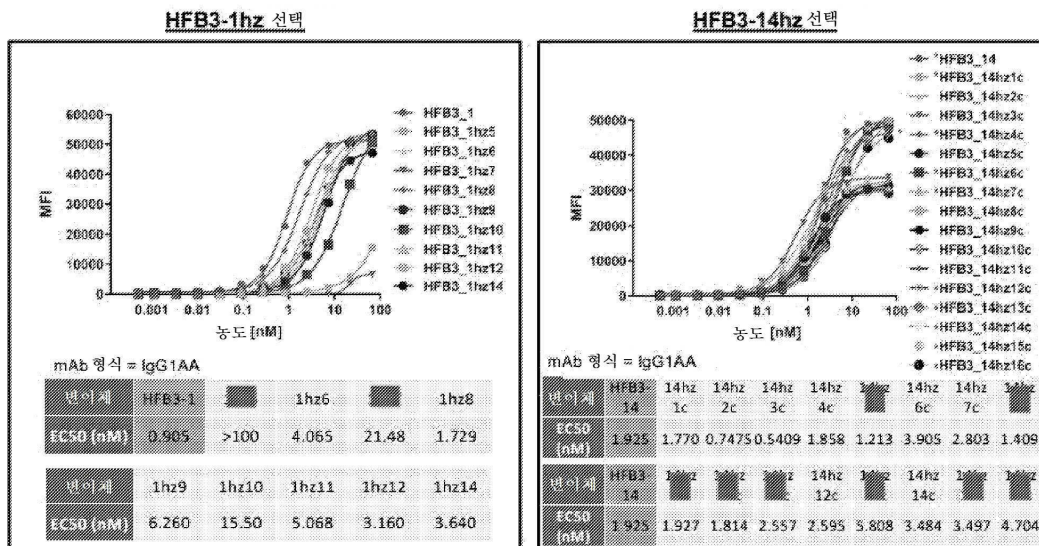
도면11d



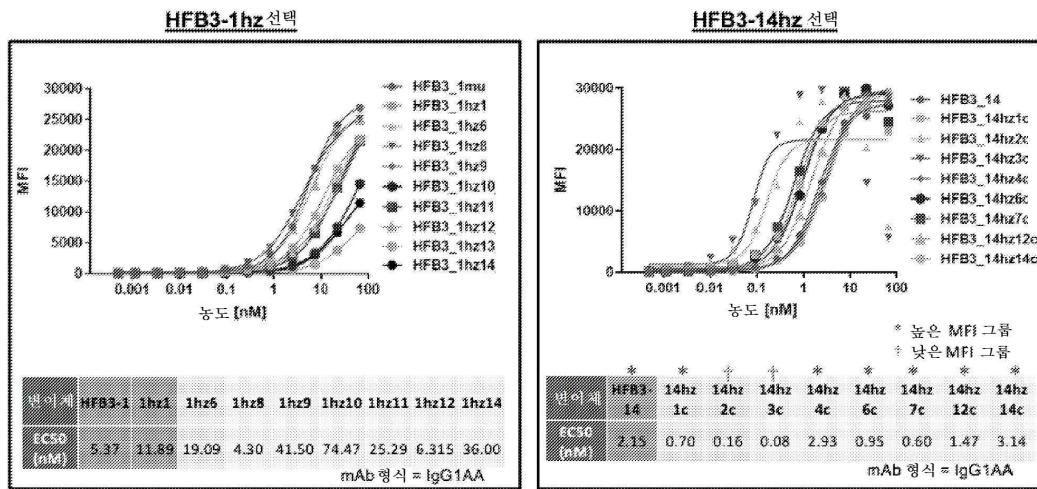
도면12a



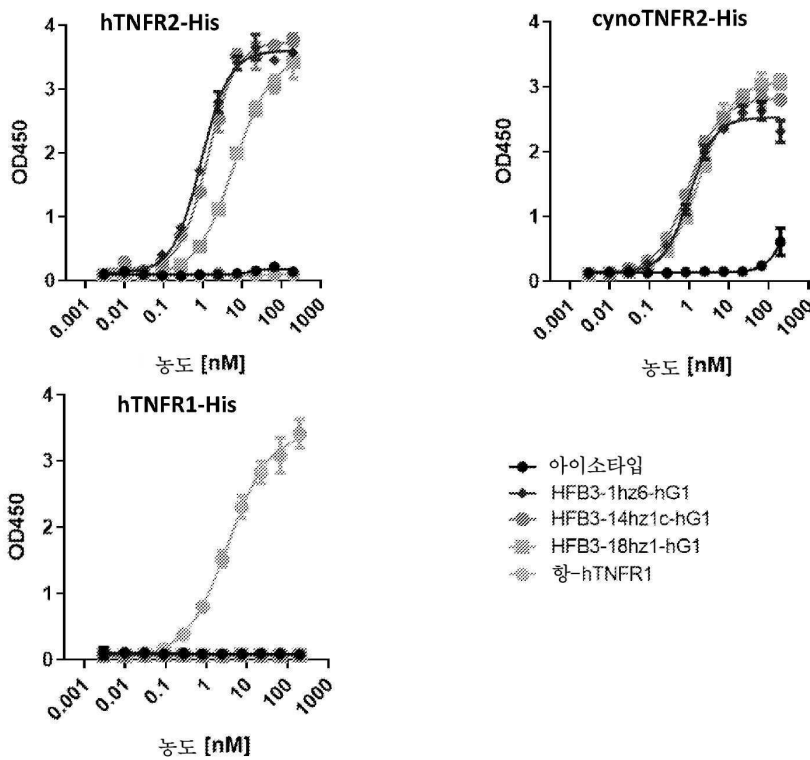
도면12b



도면13



도면14a



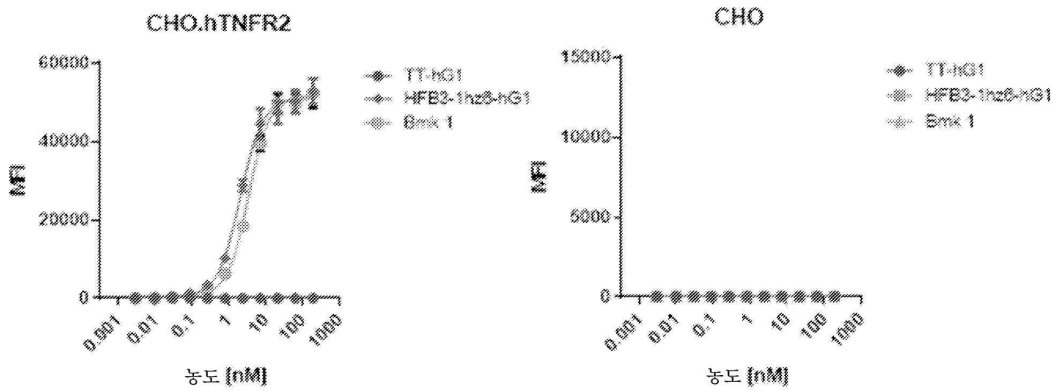
도면14b

HFB3-1hz 선택				HFB3-14hz 선택			
LOT MF20190212	Kd (nM)	kon (1/Ms)	Koff (1/s)	LOT MF20190507	Kd (nM)	kon (1/Ms)	Koff (1/s)
HFB3-1hG1	6.30	1.97E4	1.24E-04	HFB3-14-hG1	5.4	2.38E+04	1.28E-04
HFB3-1hz6hG1AA	15.2	8.57E3	1.28E-04	HFB3-14hz1chG1AA	2.8	4.23E+04	1.17E-04
HFB3-1hz8hG1AA	18.7	6.52E3	1.22E-04	HFB3-14hz2chG1AA	3.0	3.46E+04	1.05E-04
HFB3-1hz10hG1AA	17.1	8.28E3	1.41E-04	HFB3-14hz3chG1AA	2.4	3.92E+04	9.38E-05
HFB3-1hz11hG1AA	16.6	8.34E3	1.40E-04	HFB3-14hz4chG1AA	6.4	2.62E+04	1.67E-04
HFB3-1hz12hG1AA	9.1	7.47E3	6.75E-05	HFB3-14hz6chG1AA	5.3	2.51E+04	1.32E-04
HFB3-1hz14hG1AA	20.7	8.86E3	1.83E-04	HFB3-14hz7chG1AA	4.6	3.38E+04	1.56E-04
				HFB3-14hz12chG1AA	4.5	2.56E+04	1.15E-04
				HFB3-14hz14chG1AA	6.3	2.27E+04	1.43E-04

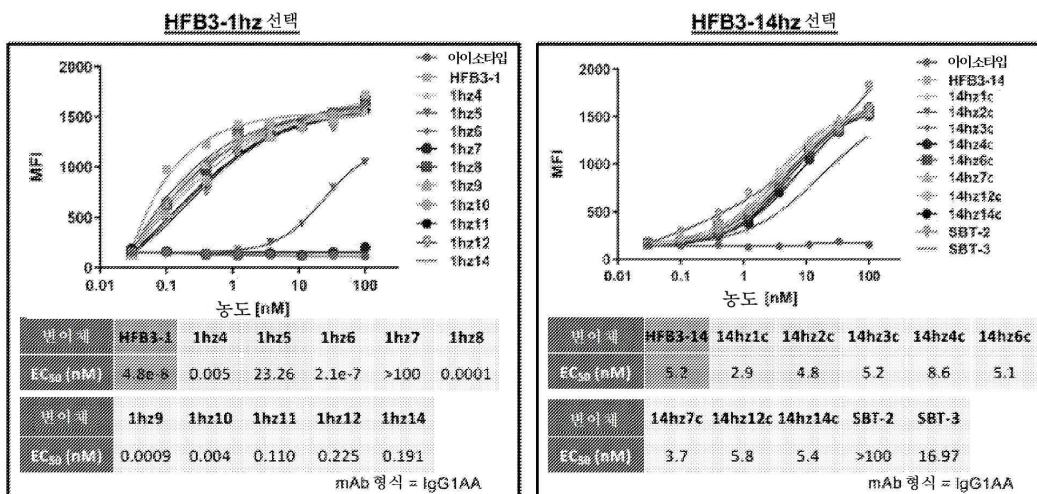
옥텟
 바이오센서: AHC
 센서 로딩: 항체(검정 완충액 중 20 µg/mL)
 검정 완충액: PBS, pH7.4; 0.1%BSA, 0.1%Tween20
 분석물: rhHFB3-His @ 500, 167 및 55.7 nM
 온도: 25도

* 같은 서로 다른 날에 실시된 2회 실험의 평균으로부터의 값임

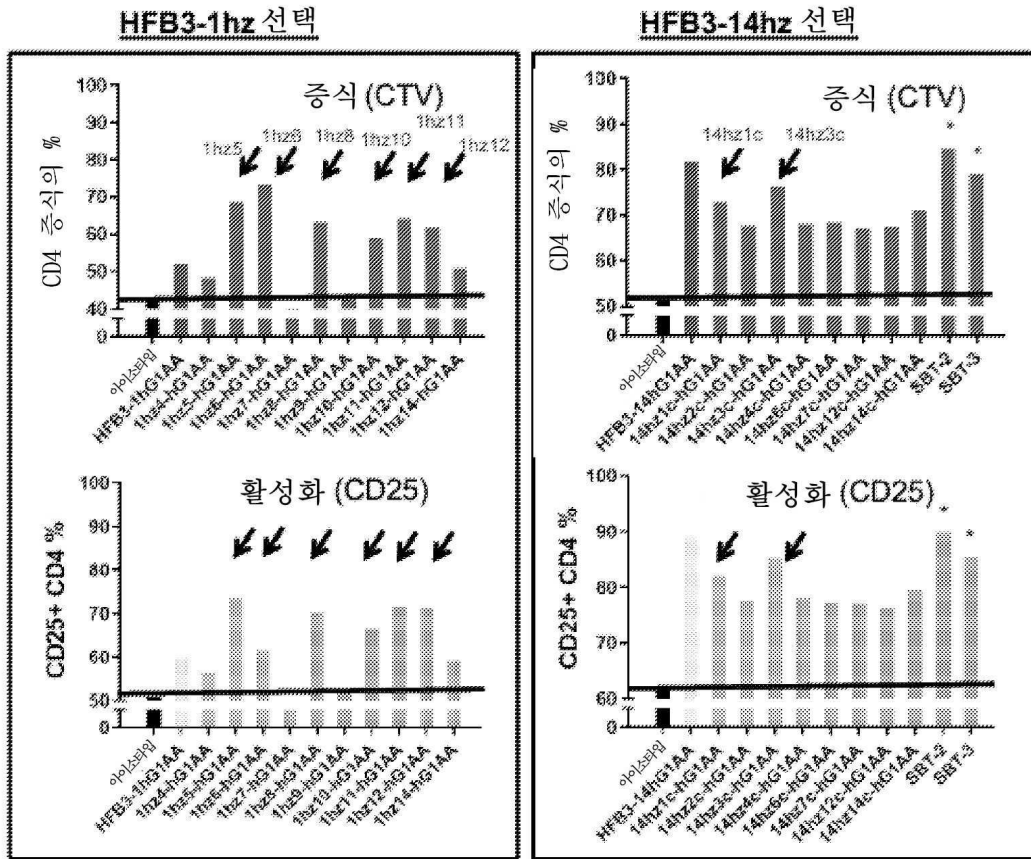
도면14c



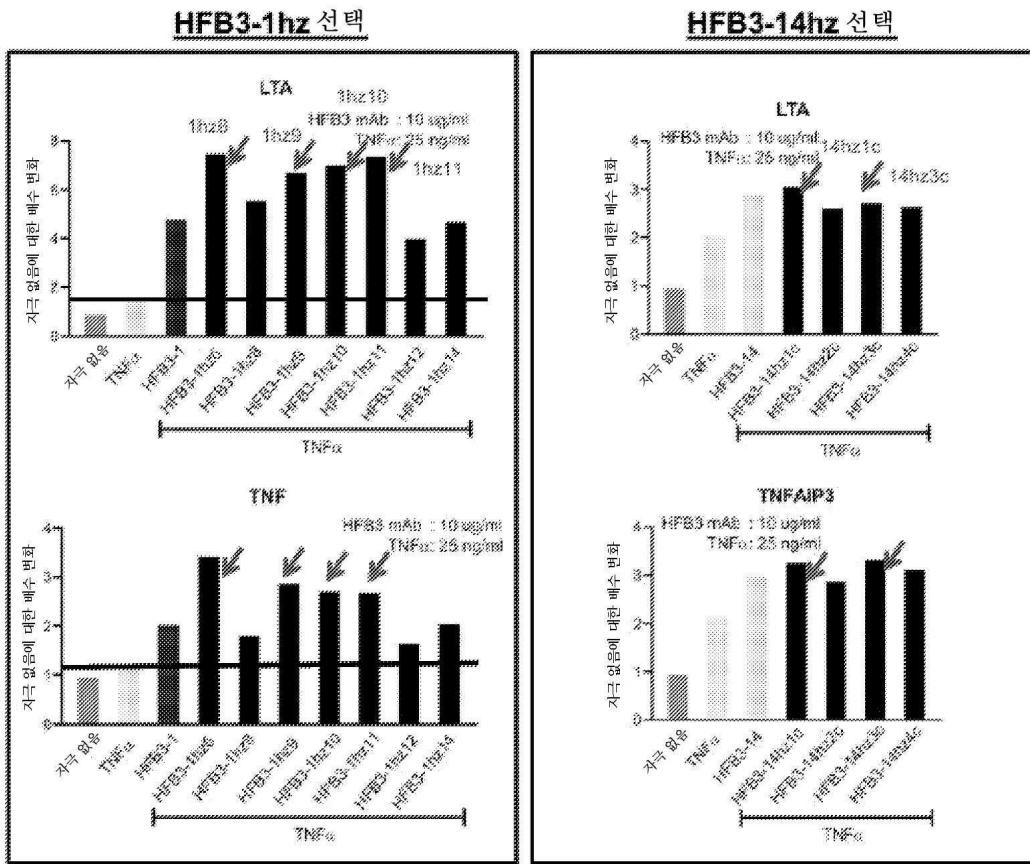
도면15



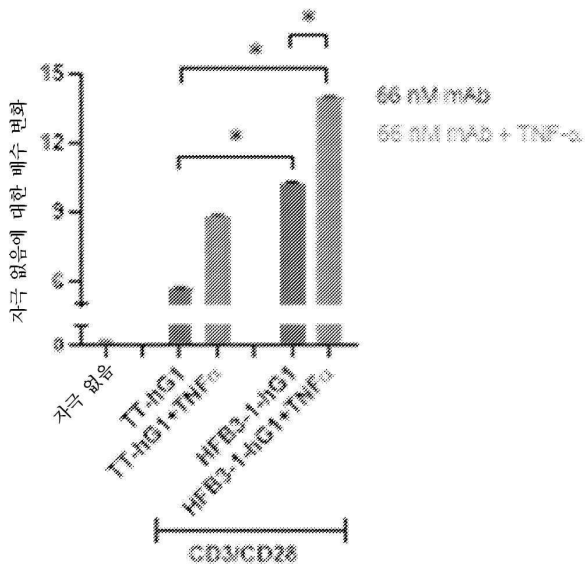
도면16



도면17a



도면17b

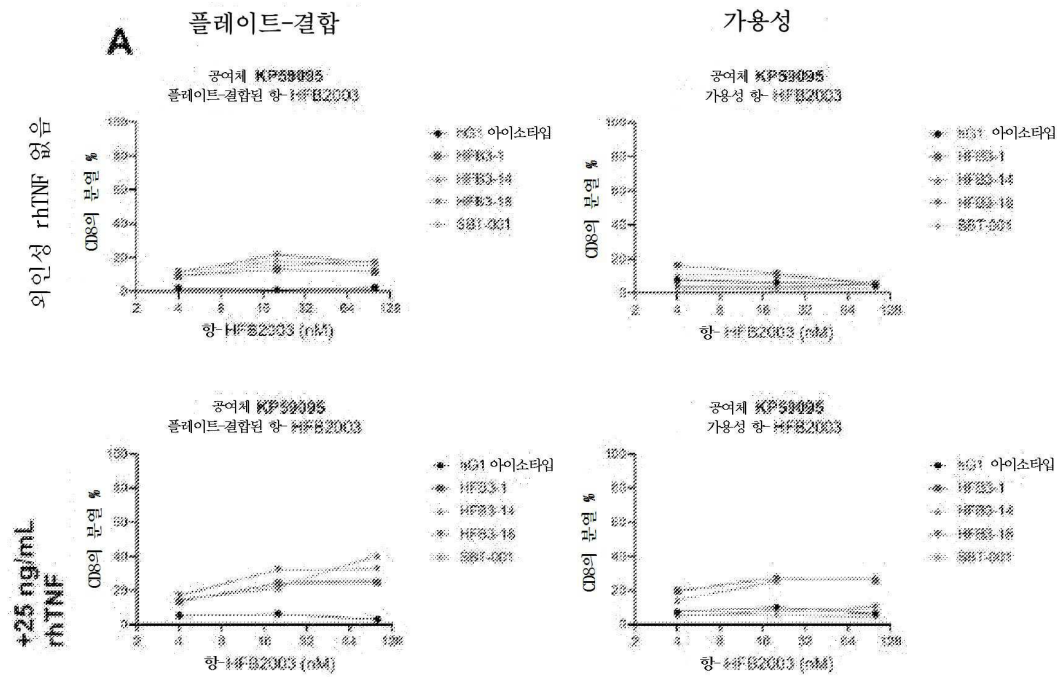


도면18

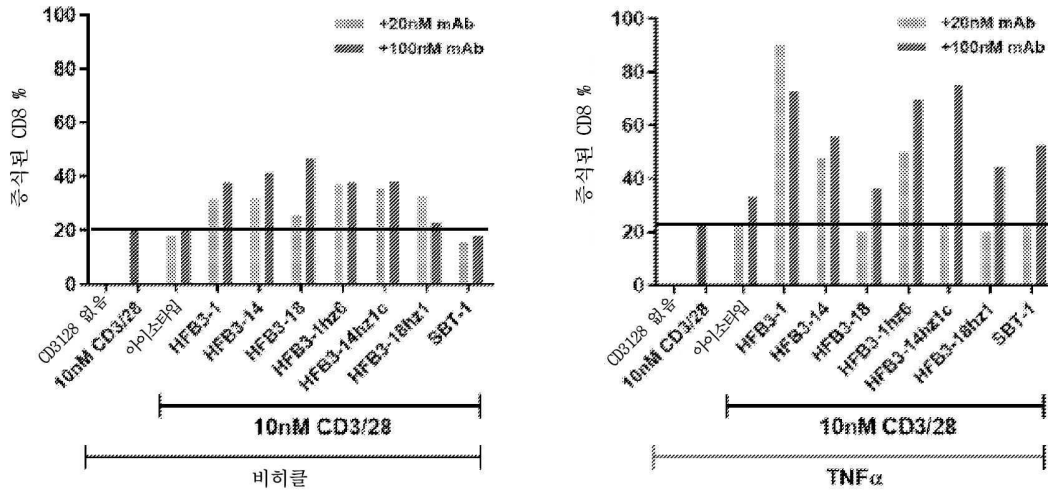
HFB3-1hz 선택				HFB3-14hz 선택			
	26°C 및 40°C에서의 7일 및 14일 안정성	낮은 pH에서의 0시간, 3시간 및 6시간 안정성	동결/해동 안정성		26°C 및 40°C에서의 7일 및 14일 안정성	낮은 pH에서의 0시간, 3시간 및 6시간 안정성	동결/해동 안정성
	[PBS, pH 7.4]	(100 mM AcH pH3.5, 25°C)	(1, 2 및 3 주기)		[PBS, pH 7.4]	(100 mM AcH pH3.5, 25°C)	(1, 2 및 3 주기)
HFB3-1hz4 hG1AA	안정적	안정적	안정적	HFB3-14hz1c hG1AA	안정적	안정적	안정적
HFB3-1hz6 hG1AA	안정적	안정적	3주기 후 점진	HFB3-14hz2c hG1AA	안정적	안정적	안정적
HFB3-1hz9 hG1AA	안정적	안정적	안정적	HFB3-14hz3c hG1AA	안정적	안정적	안정적
HFB3-1hz10 hG1AA	안정적	안정적	3주기 후 점진	HFB3-14hz4c hG1AA	분해	응집/분해	안정적
HFB3-1hz11 hG1AA	안정적	안정적	안정적				

도면19

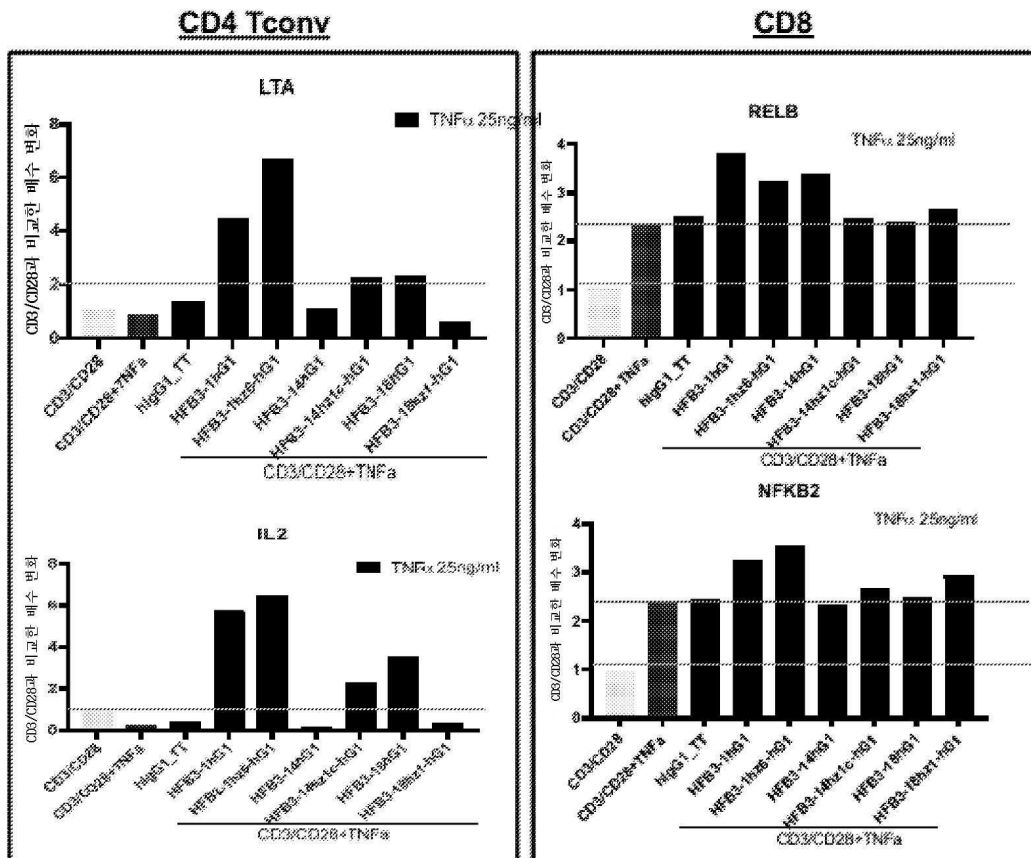
CD8



도면20

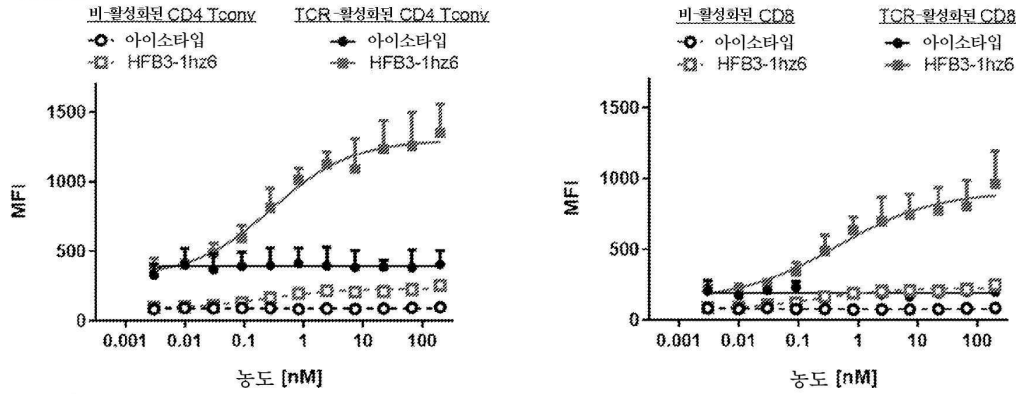


도면21a

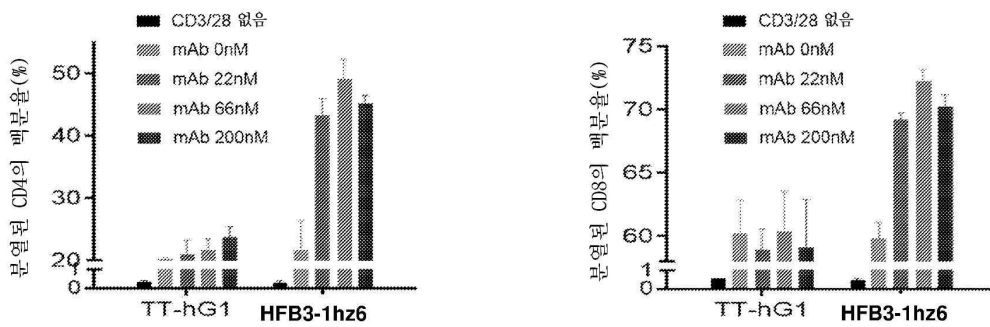


도면21b

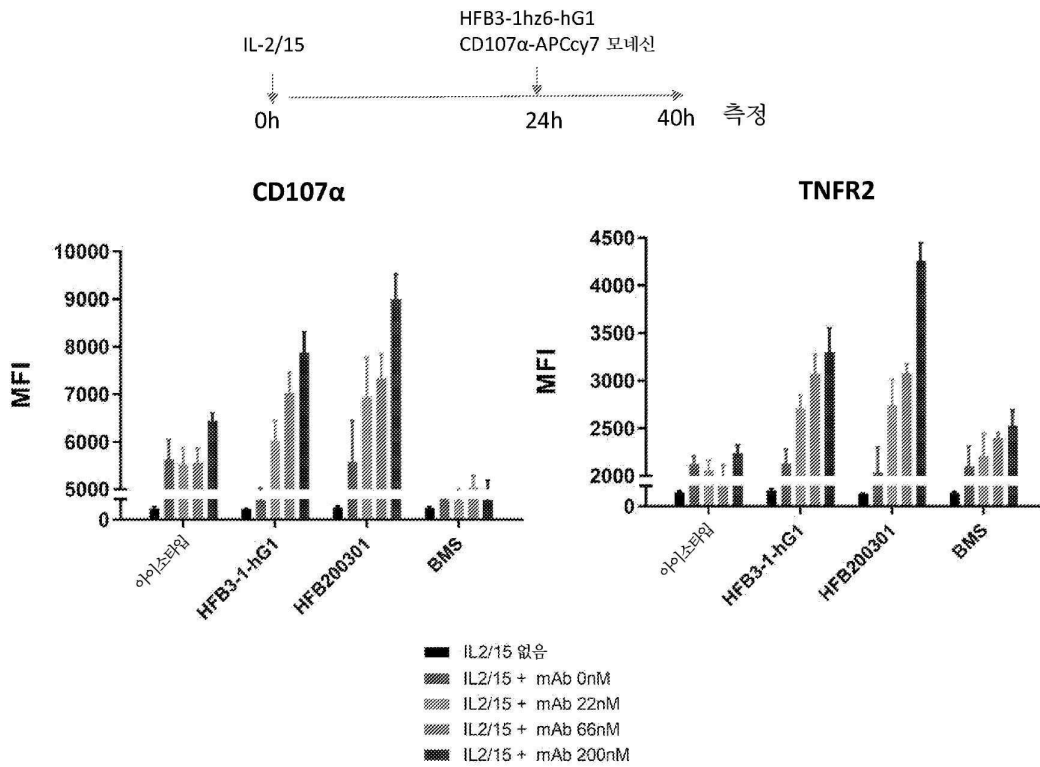
결합



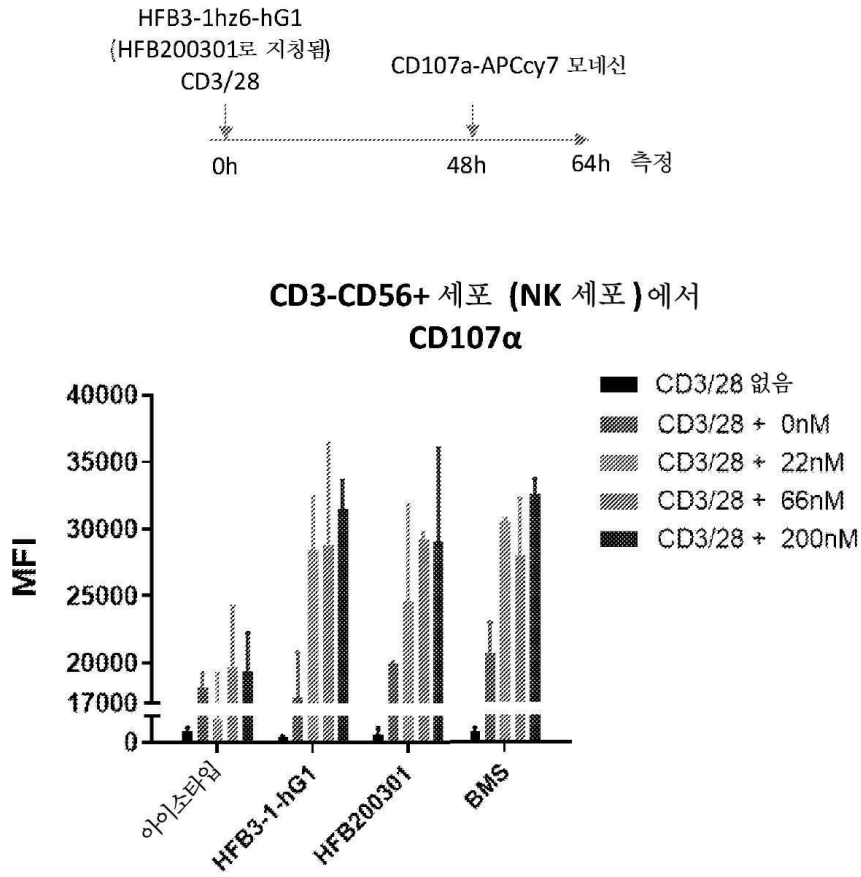
활성화



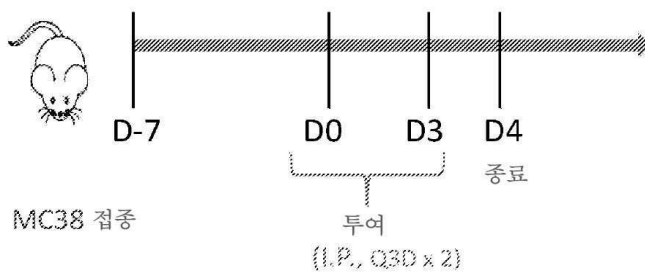
도면22



도면23

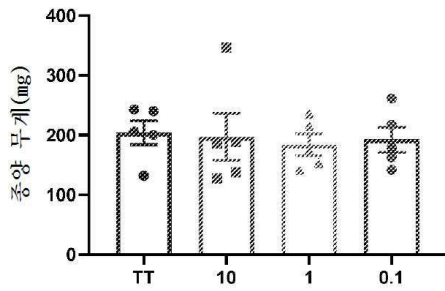


도면24a



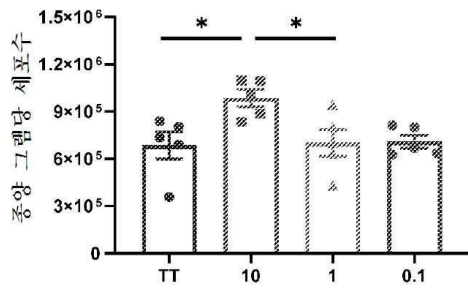
도면24b

총양 무게

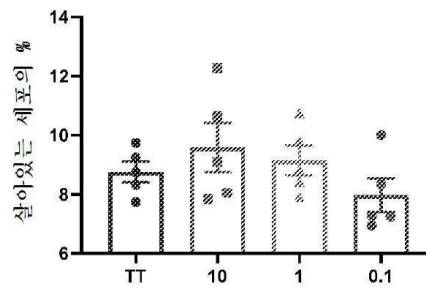


그룹	처리
#1	TT (10mg/kg)
#2	HFB3-1-hG1 (10mg/kg)
#3	HFB3-1-hG1 (1mg/kg)
#4	HFB3-1-hG1 (0.1mg/kg)

CD45⁺ 절대 수

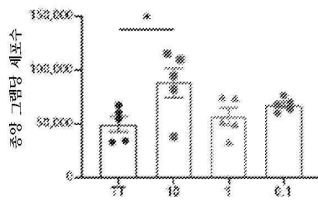


CD45⁺ 세포

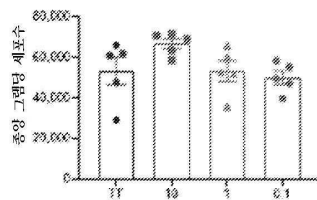


도면24c

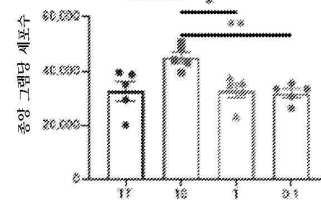
CD8⁺ T 세포 절대 수



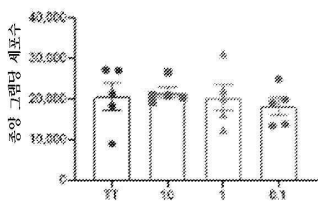
총 CD4⁺ T 세포 절대 수



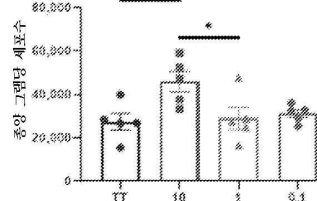
Conv CD4⁺ T 세포 절대 수 (CD4⁺ Foxp3⁻)



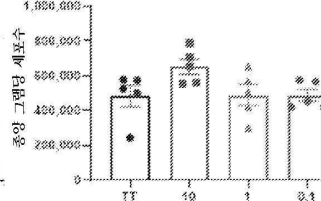
Treg 절대 수 (CD4⁺ Foxp3⁺)



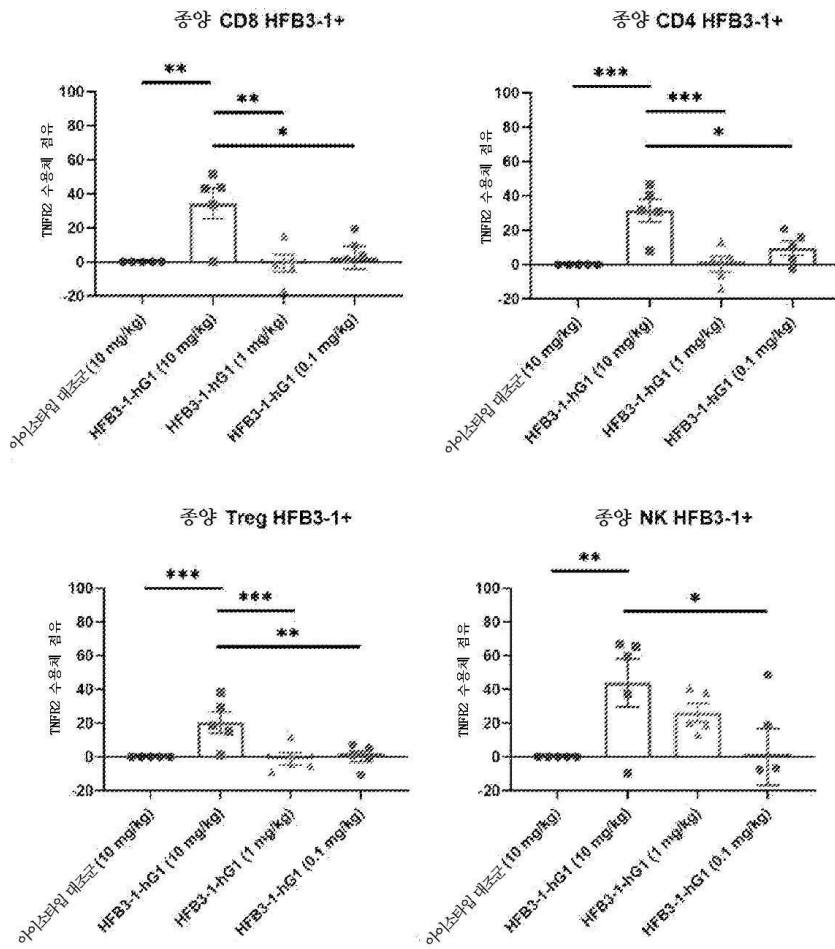
총 NK 세포 절대 수



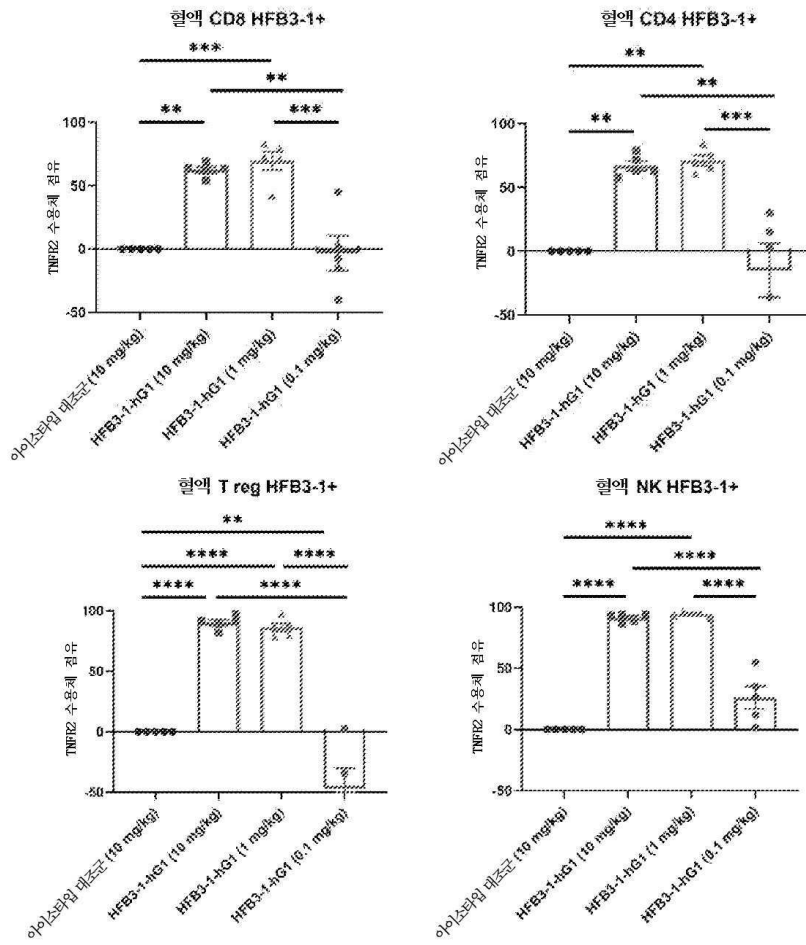
콘수 절대 수 (CD11b⁺)



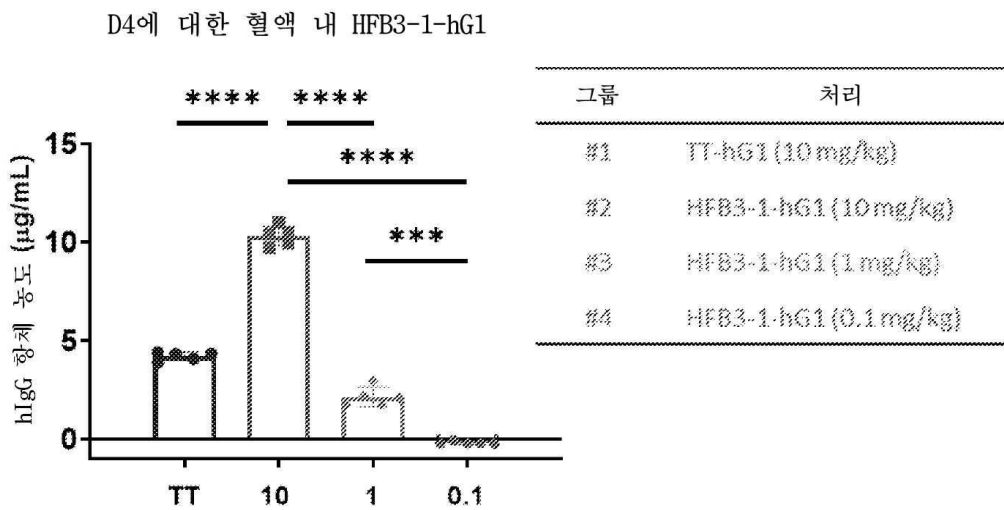
도면25a



도면25b

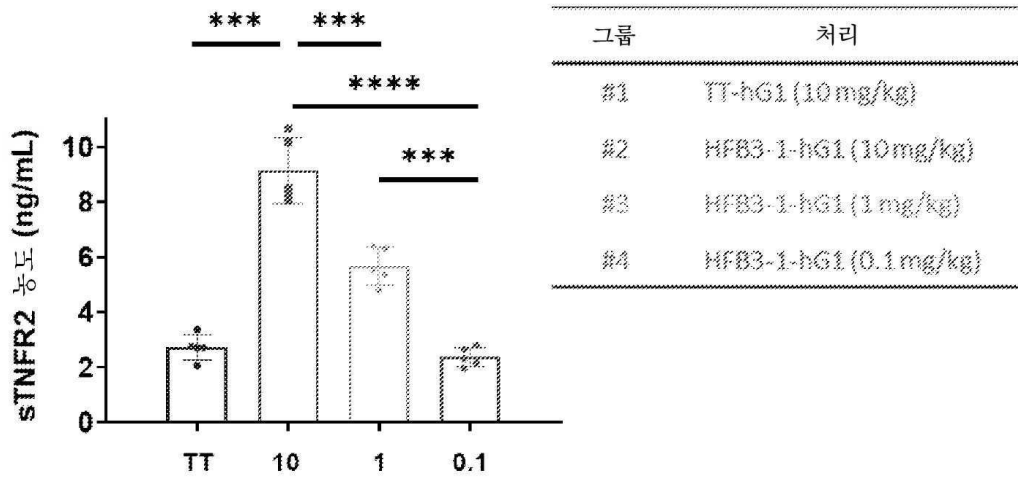


도면26a



도면26b

D4에 대한 혈액 내 가용성 TNFR2



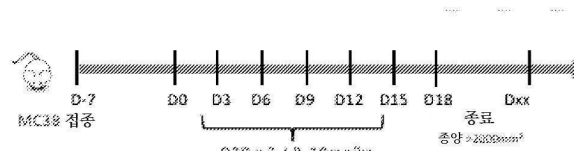
도면27a

7일: 8주령 hIFB3-KI 마우스에의 MC38 종양 세포 접종
 - Biocytogen으로부터의 MC38 세포
 - 마우스당 5×10^5 개 세포 접종

0일: 종양 크기의 평균은 83mm^3 (74mm^3 내지 90mm^3)임

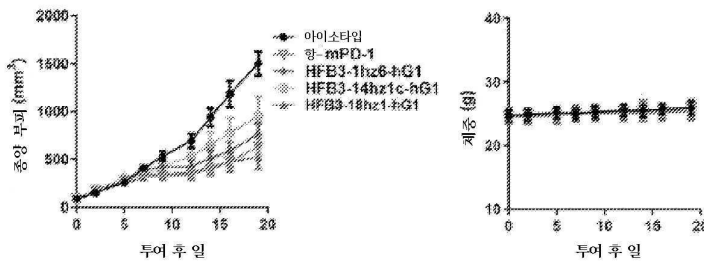
- 그룹당 8x 마우스; 5x 그룹:

- * 아이소타입 (TT-hG1A)
- * 항-mPD-1 (RMP1-14)
- * HF83-1hz6-hG1
- * HF83-14hz1c-hG1
- * HF83-18hz1-hG1

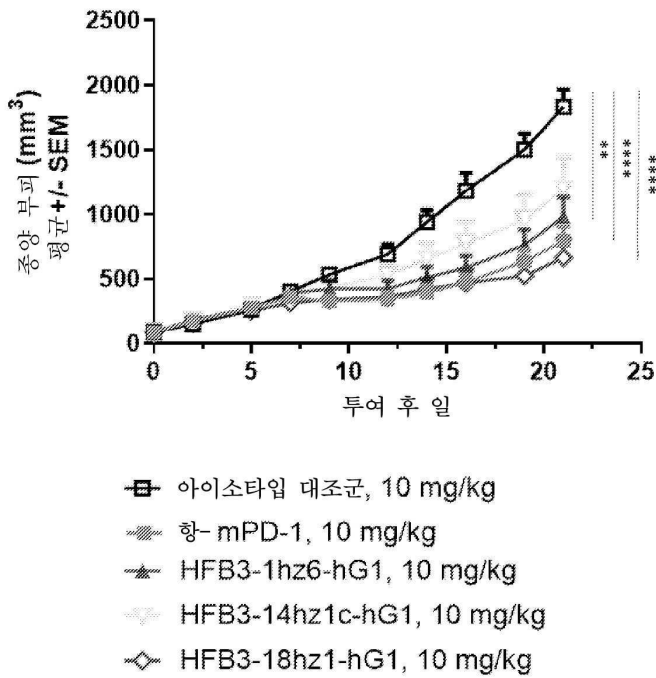


28일: 아이소타입 대조군 그룹의 종양 크기는 2000mm^3 에 도달함. 마우스를 희생시킴.

조직: 종양, 혈액

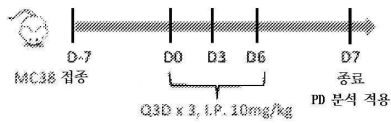


도면27b



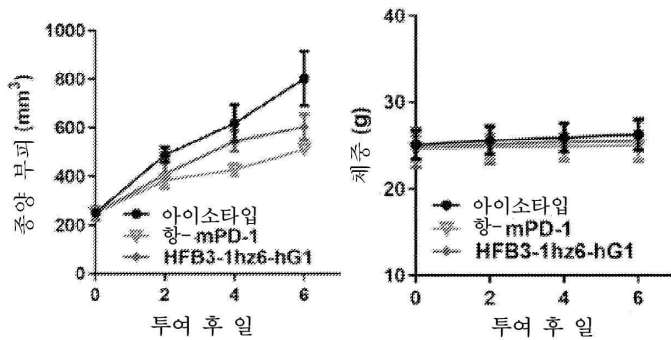
도면28

7일: 8주령 HFB3-K1 마우스에의 MC38 종양 세포 접종
- Biocytogen으로부터의 MC38 세포
- 마우스당 5×10⁵개 세포 접종

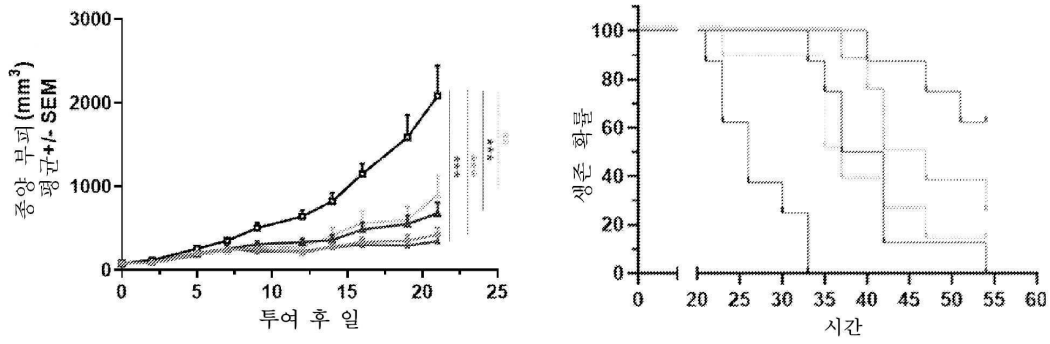


0일: 종양 크기의 평균은 89mm³(74mm³ 내지 98mm³)임
- 그룹당 4x 마우스: 3x 그룹:
* 아이소타입 (TT-hG1AA)
* 항-mPD-1 (RMP1-14)
* HFB3-1hz6-hG1

7일: 마우스를 희생시키고, PD 분석을 위해 조직을 수거함.
조직: 종양, 비장, 혈장

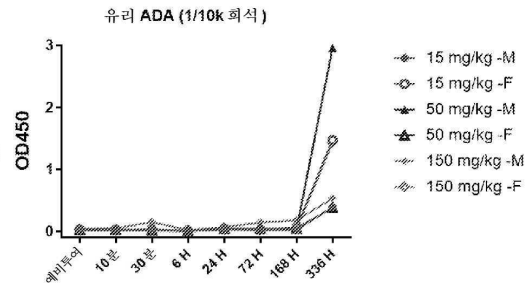
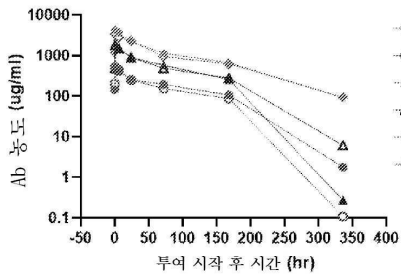
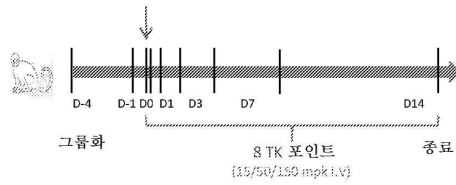


도면29

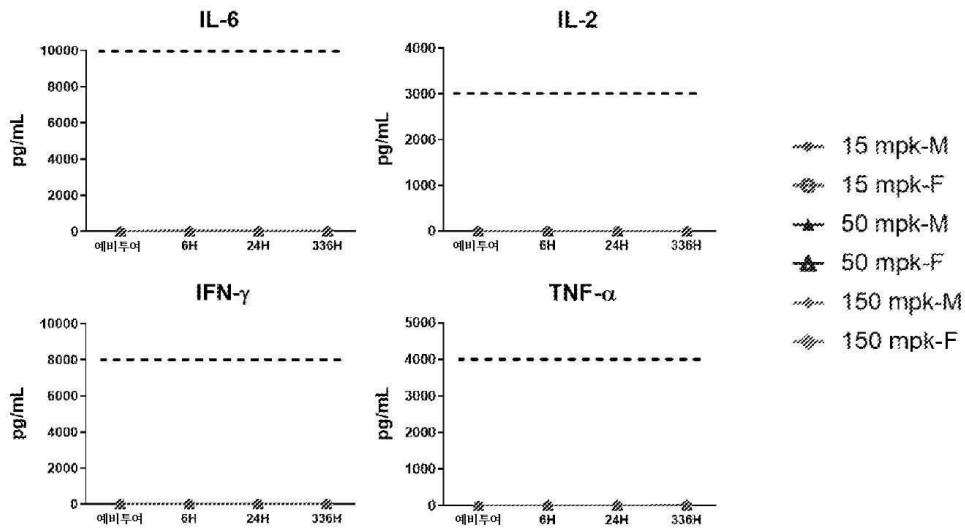


- ▲ 아이소타입 대조군 10 mpk Q3Dx7
- 항-mPD-1, 10 mpk Q3Dx4
- HFB3-1hz6-hG1, 3 mpk Q3Dx7
- △ HFB3-1hz6-hG1, 10 mpk Q3Dx7
- ◇ HFB3-1hz6-hG1, 10 mpk Q3Dx7
- + 항-mPD-1 10mpk Q3Dx4

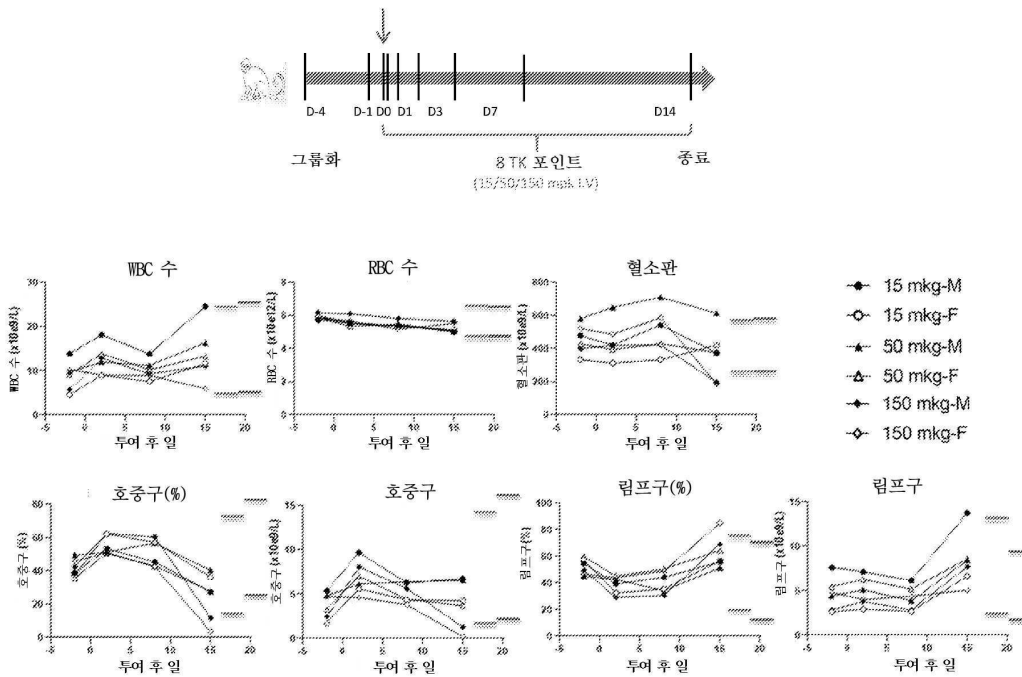
도면30a



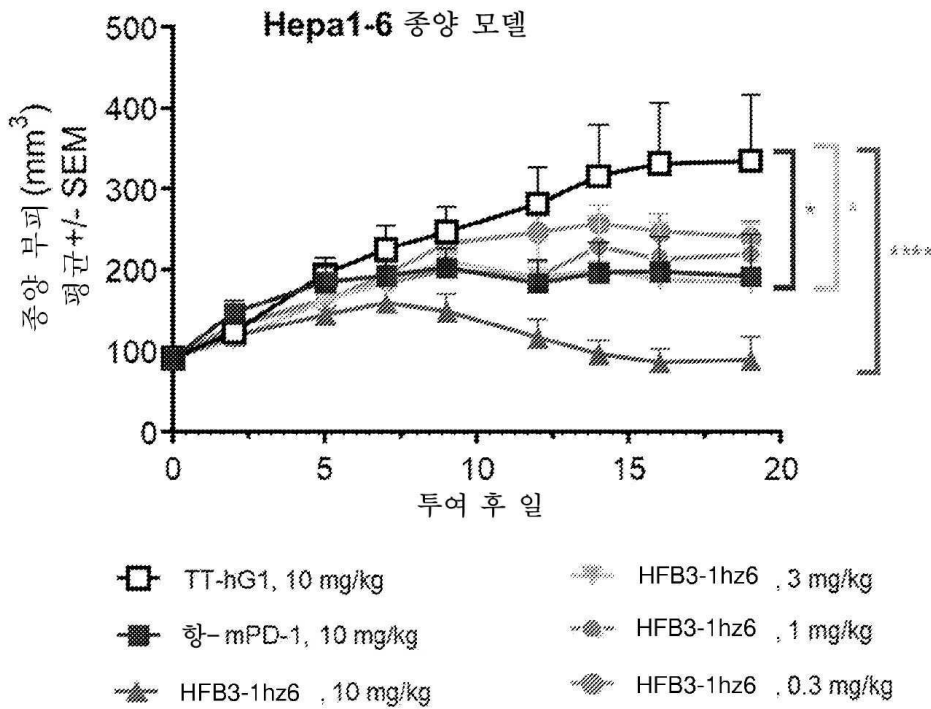
도면30b



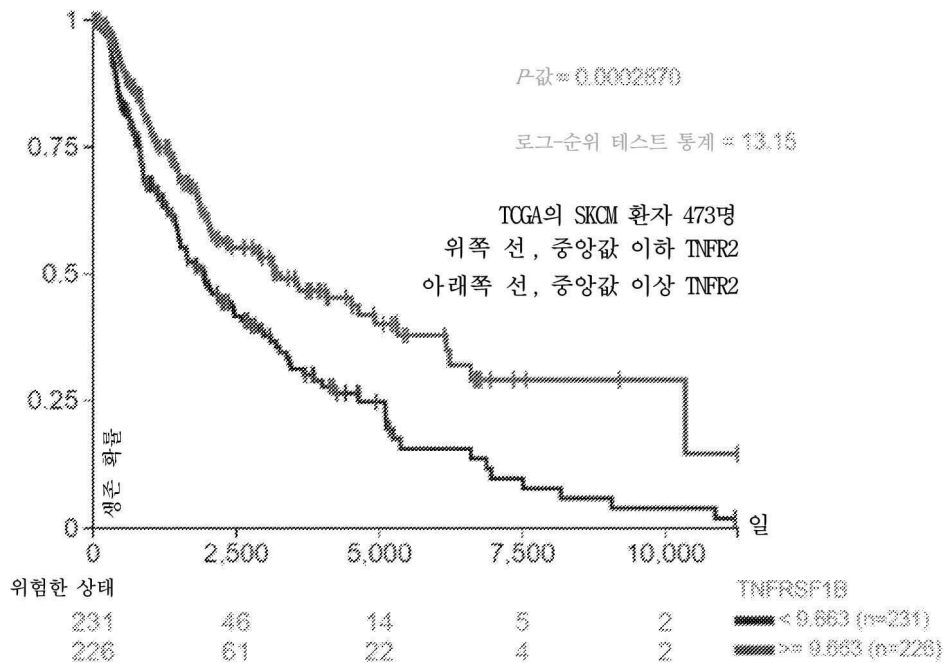
도면31



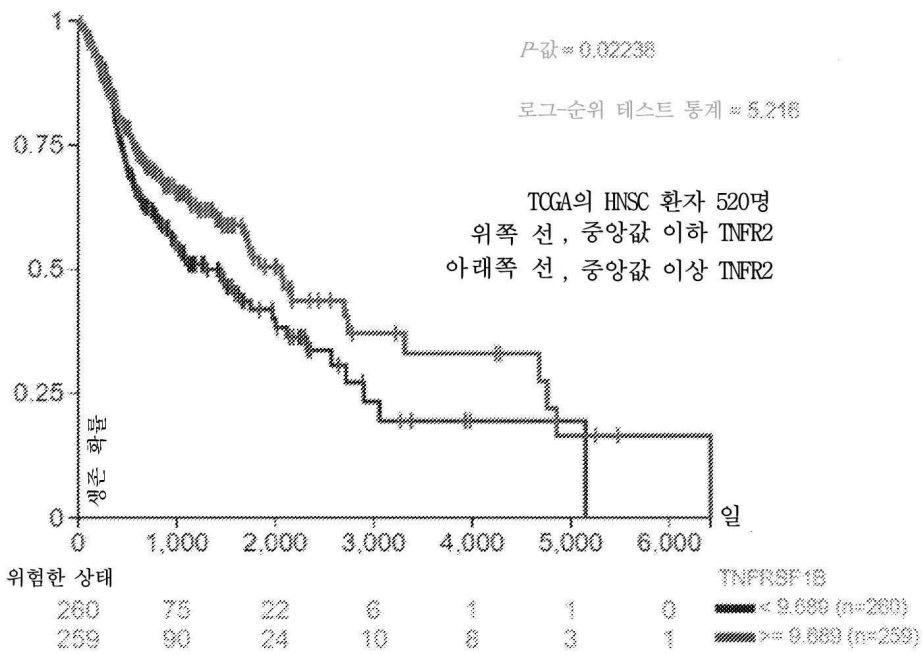
도면32



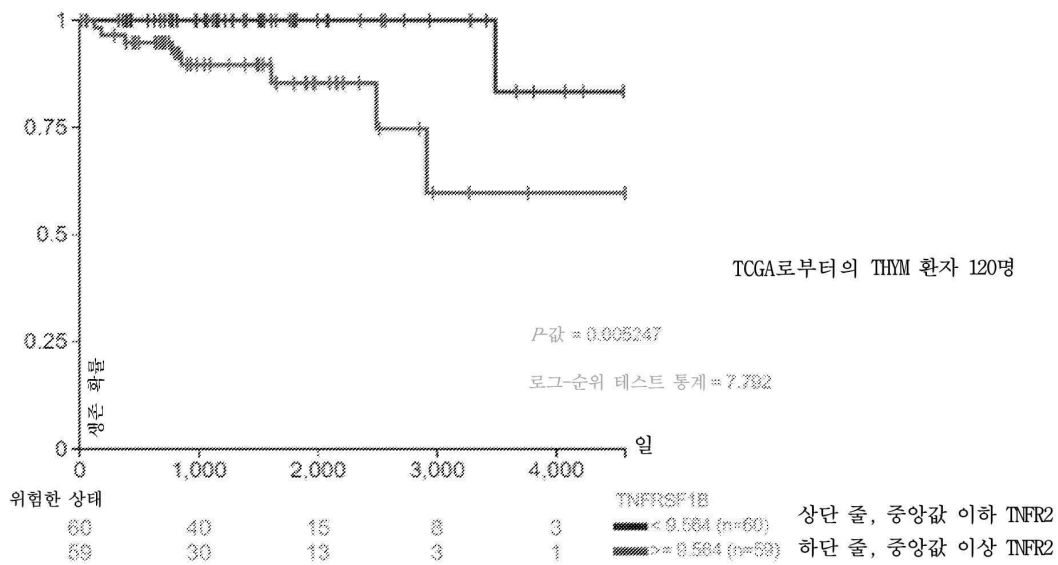
도면33a



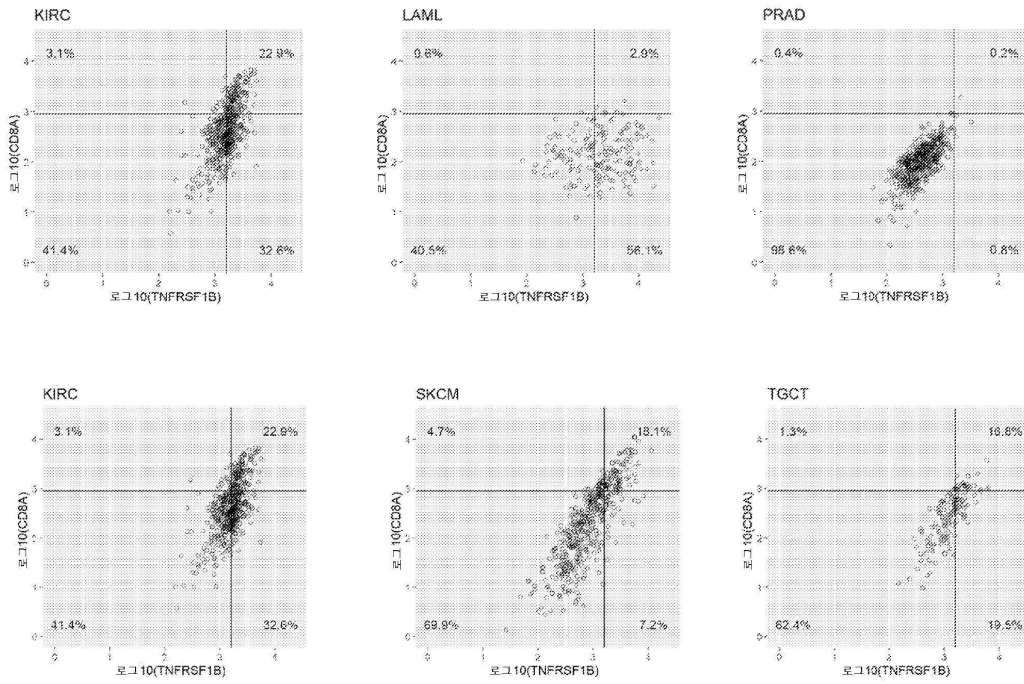
도면33b



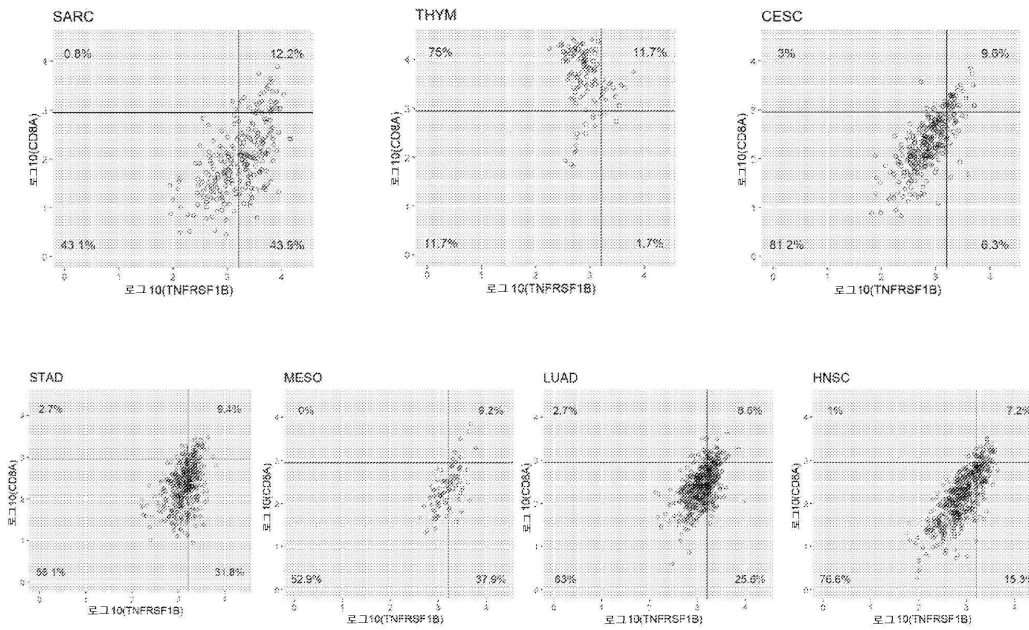
도면33c



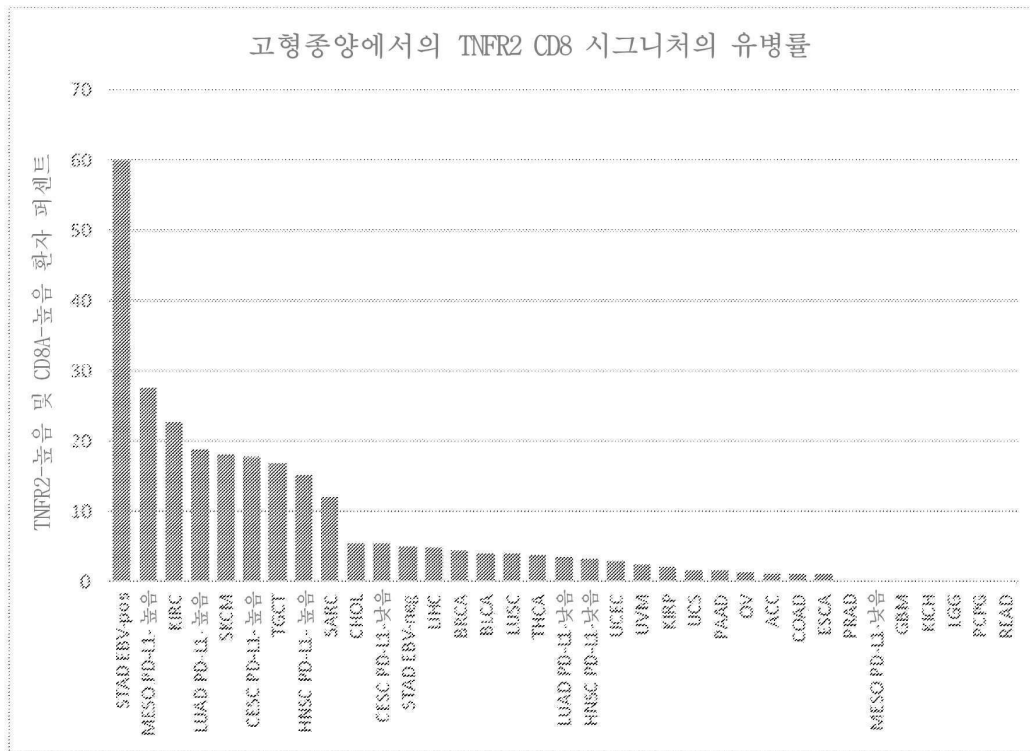
도면34a



도면34b



도면35



도면36

RCC – 분자 하위유형

TNFR2 높음 및 CD8 높음	분자 하위유형	사례	비고
0.04	KIRC.Normal	23	
0.17	KIRC.1	144	* ccA ²
0.34	KIRC.2	88	* ccB
0.29	KIRC.3	89	* ccB
0.32	KIRC.4	85	* ccA/B 미분류

SKCM – 분자 하위유형

TNFR2 높음 및 CD8A 높음	분자 하위유형	사례
0	SKCM.Normal	15
0.19	SKCM.BRAF_Hotspot_Mutants	150
0.15	SKCM.NF1_Any_Mutants	27
0.17	SKCM.RAS_Hotspot_Mutants	92
0.2	SKCM.Triple_WT	46

STAD/GI – 분자 하위유형

TNFR2 높음 및 CD8 높음	분자 하위유형	사례	비고
0.01	GI.CIN	625	
0.6	GI.EBV	30	
0	GI.ESCC	90	
0.06	GI.G5	109	
0.04	GI.HM-Indel	19	
0	GI.HM-SNV	138	

LUAD – 분자 하위유형

TNFR2 높음 및 CD8 높음	분자 하위유형	사례
0	LUAD.1	22
0	LUAD.2	32
0.04	LUAD.3	50
0	LUAD.4	32
0.12	LUAD.5	51
0.28	LUAD.6	40

HNSC – 분자 하위유형

TNFR2 높음 및 CD8 높음	분자 하위유형	사례	비고
0.16	HNSC.Atypical	67	* 40% HPV pos
0.02	HNSC.Basal	87	
0.02	HNSC.Classical	48	
0.11	HNSC.Mesenchymal	74	* PD-L1에서 더 높은 경향이 있음

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.