



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0145337
(43) 공개일자 2022년10월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61P 31/12 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7028593
(22) 출원일자(국제) 2021년01월21일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년08월18일
(86) 국제출원번호 PCT/IL2021/050064
(87) 국제공개번호 WO 2021/149053
국제공개일자 2021년07월29일
(30) 우선권주장
272194 2020년01월22일 이스라엘(IL)

(71) 출원인
예다 리서치 앤드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드
이스라엘 레호보트 7610002 피오 박스 95 앳 더
웨이즈만 인스티튜트 오브 사이언스
(72) 발명자
다한, 로니
이스라엘 레호보트 7630243 하나시 하리손 스트리트 54/14
살로몬, 란
이스라엘 레호보트 7610002 피.오. 박스 95 앳 더
웨이즈만 인스티튜트 오브 사이언스 예다 리서치
앤드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드 내
(74) 대리인
특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 질병 치료용 다중특이적 항체

(57) 요약

다중특이적 항체가 제공된다. 이 항체는 CD40에 결합하고 CD40을 활성화하는 제1 모이어티, 수지상 세포 (DC)에 특이적으로 결합하는 제2 모이어티, 및 FcγRIIb에의 결합의 특이도 및 친화도를 향상시키기 위한 다중특이적 항체의 변형된 Fc 영역을 포함하는 제3 모이어티를 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2845 (2013.01)

C07K 16/2851 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/526 (2013.01)

C07K 2317/72 (2013.01)

C07K 2317/75 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

다중특이적 항체로서, CD40에 결합하고 CD40을 활성화하는 제1 모이어티, 수지상 세포(dendritic cell; DC)에 특이적으로 결합하는 제2 모이어티, 및 FcγRIIb에의 결합의 특이도 및 친화도를 향상시키기 위한 상기 다중특이적 항체의 변형된 Fc 영역을 포함하는 제3 모이어티를 포함하는, 다중특이적 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 다중특이적 항체는 3기능성 항체인, 다중특이적 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제2 모이어티는 CD11c, CD11b, DEC-205, BDCA-1, CD8, CD8α, CD103 및 MHC-ClassII (예를 들면, HLA-DR), CD141, FLT3, CD13, CD1c, Clec9a, PD-L1, 및 XCR1로 이루어진 군으로부터 선택된 DC 마커에 결합하는 것인, 다중특이적 항체.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제2 모이어티는 CD11c에 결합하는 것인, 다중특이적 항체.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제2 모이어티는 DEC-205에 결합하는 것인, 다중특이적 항체.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제2 모이어티는 Clec9a에 결합하는 것인, 다중특이적 항체.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제2 모이어티는 XCR1에 결합하는 것인, 다중특이적 항체.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중특이적 항체는 중쇄에 N에서 C 방향으로 서열 번호 19 내지 21에 제시된 상보성 결정 영역들을 포함하고 경쇄에 N에서 C 방향으로 서열 번호 22 내지 24에 제시된 상보성 결정 영역들을 포함하는, 다중특이적 항체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 Fc 영역은 서열 번호 2에서와 같은 돌연변이를 포함하는 것인, 다중특이적 항체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중특이적 항체는 낚-인투-홀(knobs-into-holes) 돌연변이들을 포함하는, 다중특이적 항체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 돌연변이들은 Y349C/T366S/L368A/Y407V를 포함하는 상기 이중특이적 항체의 제1 항체의 CH3 도메인, 및 S354C/T366W를 포함하는 상기 다중특이적 항체의 제2 항체의 CH3 도메인에 있는 것인, 다중특이적 항체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중특이적 항체는 서열 번호 5 및 6을 포함하고, 서열 번호 37 및 38; 서열 번호 39 및 40; 서열 번호 15 및 16; 또는 서열 번호 17 및 18;을 포함하는, 다중특이적 항체.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 다중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 중쇄 및/또는 경쇄를 인코딩하는 핵산 서열.

청구항 15

제14항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 16

제15항의 발현 벡터로 형질전환된 세포.

청구항 17

다중특이적 항체를 제조하는 방법으로서, 상기 방법은:

- (a) 상기 다중특이적 항체의 발현을 가능하게 하는 조건 하에서 제16항의 세포를 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 세포로부터 상기 다중특이적 항체를 분리하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 18

면역 반응을 자극하는 것을 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 자극하는 방법으로서, 상기 방법은 제13항의 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 투여하여, 상기 대상체에서 면역 반응을 자극하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 대상체는 종양을 가지며 상기 종양에 대한 면역 반응이 자극되는 것인, 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 대상체는 만성 바이러스 감염을 가지며 상기 바이러스 감염에 대한 면역 반응이 자극되는 것인, 방법.

청구항 21

암을 치료하는 것을 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 제13항의 억제학적 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 투여하여, 상기 대상체에서 암을 치료하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 암은: 방광암, 유방암, 자궁/자궁경부암, 난소암, 전립선암, 고환암, 식도암, 소화기암, 췌장암, 결장직장암, 결장암, 신장암, 두경부암, 폐암, 위암, 생식세포암, 골암, 간암, 갑상선암, 피부암, 중추신경계의 신생물, 림프종, 백혈병, 골수종, 육종, 및 바이러스-관련 암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 23

만성 바이러스 감염을 치료하는 것을 필요로 하는 대상체에서 만성 바이러스 감염을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 제13항의 억제학적 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 투여하여, 상기 대상체의 만성 바이러스 감염을 치료하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 24

암 및/또는 만성 바이러스 감염의 치료에 사용하기 위한 제13항의 억제학적 조성물.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 상기 방법 또는 용도는 체크포인트 조절제(checkpoint modulator)의 사용 또는 투여를 더 포함하는, 방법 또는 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 2020년 1월 22일 출원된 이스라엘 특허 출원 번호 제272194호의 우선권 이익을 주장하며, 이의 전문은 본 명세서에 참조로 통합된다.

[0003]

서열 목록에 대한 진술

[0004]

2021년 1월 21일에 생성되고, 57,172 바이트를 포함하며, 85611 Sequence Listing.txt 라는 파일명을 갖는 ASCII 파일은 본 출원의 출원과 동시에 제출되고, 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0005]

본 발명은, 이의 일부 구현예에서, 질병 치료용 다중특이적 항체에 관한 것이다.

배경 기술

- [0006] 종양 세포를 근절하기 위해 면역 시스템을 활성화하는 것은 PD-1과 같은 억제성 체크포인트 분자들을 차단(blocking)하거나, CD40과 같은 자극성 분자들을 활성화함으로써 달성될 수 있다 [1][2]. CD40이 천연 리간드 CD40L에 의해 가교결합되는 경우에, 종양 괴사 인자 수용체(tumor necrosis factor receptor; TNFR) 패밀리의 구성원인 CD40은 세포독성 T 세포의 생성을 포함하는 면역 반응들을 자극한다 [3][4]. CD40L을 모방하는 작용제 항-CD40 Ab들은 CD40을 가교결합시키고 이에 따라 DC들의 성숙 및 종양 항원 특이적 세포독성 T 세포들의 후속 생성을 촉진시키는 효율적인 접근으로 제안되었다. 기계적으로는, CD40 활성화는 T 세포 프라밍에서 근위 이벤트(proximal event)이며, 따라서, 항-CD40 Ab들은 콜드 튜머(cold tumor)를 핫 튜머(hot tumor)로 전환시키며 효과적인 T 세포 면역을 생성하는데 중요할 수 있다 [3]. 실제로 작용제 항-CD40 Ab들은 상이한 종양들의 수많은 동물 모델들에서 효과적인 것으로 입증되었다 [5].
- [0007] 수많은 이전의 간행물들은 억제성 Fc γ RIIB의 결합(engagement)이, 마우스 CD40, 및 TNFR 패밀리의 다른 구성원들을 표적화하는 작용제 Ab들의 생체 내(in-vivo) 항종양 활성에 대한 절대적인 요구사항임을 입증했다. 이는 인접 세포들 상에서 발현된 Fc γ RIIB에 의한 CD40 항체의 고차(high-order) 가교결합으로 인한 것이다. 이러한 가교결합은 세포 표면 상의 CD40의 클러스터링(clustering)을 향상시켜 향상된 CD40 신호전달을 초래한다 [6][7]. 하지만, 인간 Ab들에 대한 유사한 요구사항에 대하여 최근 여러 연구들에서 의문이 제기되었다. 이 연구들의 한계는 시험관 내(in vitro) 실험 시스템이 사용되었다는 것이다. 또는, 이 인간 Ab들은 야생형 마우스에서 평가되어, 인간 Fc γ R들의 복잡하고 고유한 세포적 분포, 결합 친화도, 및 기능성을 모방하는 능력이 제한됐다.
- [0008] CP-870,893은 인간 IgG2 동형 상에 항-CD40 클론 2141로 구성된 임상 평가 중인 인간 항-CD40 Ab이다. 이는 강력한 작용제 항-인간 CD40 Ab이지만, 놀랍게도, 췌관 선암(pancreatic ductal adenocarcinoma; PDA) 또는 기타 고형 종양들을 갖는 환자들에서 미미한 항종양 활성만을 나타냈다 [8][9]. CP-870,893의 미미한 생체 내 활성은 이의 Fc 도메인이 인간 IgG2 동형의 Fc 도메인이고 인간 Fc γ RIIB과 약하게만 상호작용한다는 사실에 기인할 수 있음이 확인되었다 [10]. 특히 중요한 것은, 작용제 항-CD40 Ab들의 항종양 활성이 Fc γ RIIB-표적화된 Fc-조작을 통해 향상될 수 있다는 관찰이다. 이전 연구에서, 수많은 2141의 Fc-조작 변이체들이 CD40 및 Fc γ R 수용체의 마우스 동족체가 결핍된 배경에서 CD40 및 Fc γ R들에 대해 완전히 인간화된 동계(isogenic) 마우스 모델에서 테스트되었고, 최적의 임상 후보로서, 선택적으로 Fc γ RIIB 결합을 향상시킨 "V11" Fc 변이체를 선택했다. 2141의 Fc-조작 V11 버전은 2141의 원래의 IgG2 아형과 비교해 여러 유형의 무인 종양 모델에서 뛰어난 항-종양 역가도로 해석되는 생체 내에서 상당히 향상된 면역자극 활성을 가졌다 [10]. 환자들에서 각각의 최대 허용 용량(maximum tolerated dose; MTD)으로 사용되는 경우에, 모 IgG2 버전에 비해 증가된 치료적 항종양 면역성이 Fc-조작 2141-V11에 의해 달성될 수 있지만, 이들 각각의 MTD로 사용되는 경우에 인간에서 두 아형에 대한 최적 용량에 도달할 수 없다. 2141 항체의 Fc-조작 버전의 임상 연구를 준비하기 위해, 투여 및 전달 요법은 최적의 항종양 활성과 함께 최소화된 독성을 일으키도록 최적화되었다. Fc-조작 2141의 종양내 투여는 모 2141 Ab 및 전신 Ab 투여와 비교해 이러한 최대 치료적 윈도우(therapeutic window)를 나타냈다 [11]. 이러한 연구들에 기초하여, 2141의 2세대 Fc-조작 버전 (Fc-조작 "F11")이 개발되었고 고형 종양들을 갖는 환자들에 종양내 주사로 투여되었다 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04059588). 종양내 투여는 일부 환자들에게 유망하지만, 모든 환자들에게 적합한 것은 아니며, 피부에 대한 국소 및 전이성 고형 종양 및 방사선학 관련 요법에 접근할 수 있는 종양을 갖는 환자들에 제한될 수 있다.
- [0009] 추가적인 배경기술은 하기와 같다:
- [0010] U.S. 20160376371;
- [0011] U.S. 20170253659;
- [0012] WO2017004016;
- [0013] WO2018213747;
- [0014] Mazor, Yariv, et al. "Improving target cell specificity using a novel monovalent bispecific IgG design." MAb. Vol. 7. No. 2. Taylor & Francis, 2015.

발명의 내용

- [0015] 본 발명의 일부 구현예의 일 측면에 따르면, CD40에 결합하고 CD40을 활성화하는 제1 모이어티, 수지상 세포(수지상 세포; DC)에 특이적으로 결합하는 제2 모이어티를 포함하는 다중특이적 항체가 제공된다.
- [0016] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 다중특이적 항체는 이중특이적 항체이다.
- [0017] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 제2 모이어티는 CD11c, CD11b, DEC-205, BDCA-1, CD8, CD8 α, CD103 및 MHC-ClassII (예를 들면, HLA-DR), CD141, FLT3, CD13, CD1c, Clec9a, 및 XCR1로 이루어진 군으로부터 선택된 DC 마커에 결합한다.
- [0018] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 제2 모이어티는 CD11c에 결합한다.
- [0019] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 제2 모이어티는 DEC-205에 결합한다.
- [0020] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 제2 모이어티는 Clec9a에 결합한다.
- [0021] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 제2 모이어티는 XCR1에 결합한다.
- [0022] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 다중특이적 항체는 중쇄에서 N에서 C 방향으로 서열 번호 19 내지 21에 제시된 상보성 결정 영역들을 포함하고 경쇄에서 N에서 C 방향으로 서열 번호 22 내지 24에 제시된 상보성 결정 영역들을 포함한다.
- [0023] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 다중특이적 항체는 3기능성 항체이다.
- [0024] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 다중특이적 항체는 FcγRIIb에의 결합의 특이도 및 친화도를 향상시키기 위한 상기 다중특이적 항체의 변형된 Fc 영역을 포함하는 제3 모이어티를 포함한다.
- [0025] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 상기 변형된 Fc 영역은 서열 번호 2에서와 같은 돌연변이들을 포함한다.
- [0026] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 다중특이적 항체는 낚-인투-홀(knobs-into-holes) 돌연변이들을 포함한다.
- [0027] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 상기 돌연변이들은 Y349C/T366S/L368A/Y407V를 포함하는 이중특이적 항체의 제1 항체의 CH3 도메인, 및 S354C/T366W를 포함하는 다중특이적 항체의 제2 항체의 CH3 도메인에 있다.
- [0028] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 다중특이적 항체는 서열 번호 5 및 6을 포함하고, 서열 번호 37 및 38; 서열 번호 39 및 40; 서열 번호 15 및 16; 또는 서열 번호 17 및 18;을 포함한다.
- [0029] 본 발명의 일부 구현예의 일 측면에 따르면, 다중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.
- [0030] 본 발명의 일부 구현예의 일 측면에 따르면, 다중특이적 항체의 경쇄 및/또는 중쇄를 인코딩하는 핵산 서열이 제공된다.
- [0031] 본 발명의 일부 구현예의 일 측면에 따르면, 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터가 제공된다.
- [0032] 본 발명의 일부 구현예의 일 측면에 따르면, 상기 발현 벡터로 형질전환된 세포가 제공된다.
- [0033] 본 발명의 일부 구현예의 일 측면에 따르면, 다중특이적 항체를 제조하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은:
- [0034] (a) 다중특이적 항체의 발현을 가능하게 하는 조건 하에서 세포를 배양하는 단계; 및
- [0035] (b) 세포로부터 다중특이적 항체를 단리(isolate)하는 단계를 포함한다.
- [0036] 본 발명의 일부 구현예의 일 측면에 따르면, 면역 반응을 자극하는 것을 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 자극하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 투여하여, 대상체에서 면역 반응을 자극하는 것을 포함한다.
- [0037] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 상기 대상체는 종양을 가지며 상기 종양에 대한 면역 반응이 자극된다.
- [0038] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 상기 대상체는 만성 바이러스 감염을 가지며 상기 바이러스 감염에 대한 면역 반응이 자극된다.
- [0039] 본 발명의 일부 구현예의 일 측면에 따르면, 암을 치료하는 것을 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 투여하여, 대상체에서 암을 치료하는 것을 포함한다.
- [0040] 본 발명의 일부 구현예에 따르면, 상기 암은: 방광암, 유방암, 자궁/자궁경부암, 난소암, 전립선암, 고환암, 식

도암, 소화기암, 췌장암, 결장직장암, 결장암, 신장암, 두경부암, 폐암, 위암, 생식세포암, 골암, 간암, 갑상선암, 피부암, 중추신경계의 신생물, 림프종, 백혈병, 골수종, 육종, 및 바이러스-관련 암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0041] 본 발명의 일부 구현예의 일 측면에 따르면, 만성 바이러스 감염을 치료하는 것을 필요로 하는 대상체에서 만성 바이러스 감염을 치료하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 투여하여, 대상체에서 만성 바이러스 감염을 치료하는 것을 포함한다.

[0042] 본 발명의 일부 구현예의 일 측면에 따르면, 암 및/또는 만성 바이러스 감염의 치료에 사용하기 위한 약제학적 조성물이 제공된다.

[0043] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용되는 모든 기술적 및/또는 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 분야의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법들 및 물질들이 본 발명의 구현예들의 실시 또는 테스트에 사용될 수 있지만, 예시적인 방법들 및/또는 물질들이 하기에 기술된다. 충돌하는 경우에, 정의들을 포함하는 본 특허의 명세서가 우선할 것이다. 또한, 물질들, 방법들, 및 예시들은 단지 예시적인 뿐이고 반드시 제한적인 것으로 해석해서는 안 된다.

도면의 간단한 설명

[0044] 본 발명의 일부 구현예들이 첨부된 도면을 참조하여 단지 예시로서 본 명세서에 설명된다. 도면에 대해 구체적인 상세한 참조와 관련하여, 나타난 세부사항들은 예시이고 본 발명의 구현예들의 예시적인 논의를 목적으로 함을 강조한다. 이러한 점에서, 도면과 함께 취해진 설명은 본 발명의 구현예들을 어떻게 실시할 수 있는지를 당업자에게 명백하게 한다.

하기 도면에서:

도 1aa 및 1ab는 다중특이적 항체의 구성에서 본 발명의 일부 구현예에 따라 사용된 항체들 (Abs)의 가변 도메인 서열들을 나타낸다. N418 및 HD-109 Ab들의 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 경쇄 가변 도메인 (VL)의 서열은 각 하이브리도마의 RNA로부터 cDNA 말단의 증폭 방법 ("고정(anchored)" PCR)에 의해 시퀀싱되었다. 2142의 서열은 2141 Ab의 특허 출원으로부터 이전에 식별되었다. CDR들의 서열은 밑줄 그어져 있다. 2141에 대한 서열식별번호는 서열 번호 78 및 38이고, N418에 대한 서열식별번호는 서열 번호 7 및 8이고, HD109에 대한 서열식별번호는 서열 번호 39 및 40이며, 10B4에 대한 서열식별번호는 서열 번호 15 및 16이다.

도 1ba 내지 1be는 본 발명의 일부 구현예에 따라 사용될 수 있는 항체들 또는 이들의 단편들의 서열들을 나타낸다.

도 2a 및 2b는 단일특이적 Ab들 및 이중특이적 Ab들의 제조를 위해 생성된 구조체들을 나타낸다. 도시된 바와 같이, 가변 도메인들은 하이브리도마의 cDNA로부터 증폭되거나 (N418 및 HD-109) 드노보(de-novo) 합성되었고 (2141), 발현 벡터들 내부에서 IgG1 불변 도메인과 인-프레임(in-frame) 클로닝되었다. VH, 중쇄 가변 도메인; VL, 경쇄 가변 도메인; CH1-3, 중쇄 불변 도메인 1-3; CL, 경쇄 불변 도메인; KiH, 낚-인투-홀 돌연변이.

도 3a 및 3b는 단일특이적 Ab들 및 이중특이적 Ab들의 SDS-PAGE 및 분석적 크기-배제 크로마토그램(Analytical size-exclusion chromatogram)을 나타낸다. (도 3a) 5개의 Ab들의 SDS-PAGE 분석. 비환원 샘플의 동종성 밴드는 N418 및 HD-109가 2141 Ab와 하나의 이중이량체로 조립되었음을 확인시킨다. 샘플의 환원은 이중특이적 이중이량체가 각 파트너 Ab로부터 2개인, 4개의 Ab 사슬로 구성되어 있음을 확인시킨다. (도 3b) 단일특이적 Ab들 및 이중특이적 Ab들의 분석적 크기-배제 크로마토그램, 숫자들은 Ab들의 분자량을 나타낸다.

도 4a 내지 4d는 이중특이적 Ab들의 이중 항원 결합 특성들을 나타낸다. (도 4a) hCD40에의 ELISA 결합. 재조합 huCD40 단백질에의 항-CD40 (적색) 단일특이적 Ab 및 항-CD40/CD11c (검정색) -CD40/DEC-205 (청색) 이중특이적 Ab의 표준 결합 ELISA 적정 검정. 항-CD40/CD11c -CD40/DEC-205 이중특이적 Ab들은 모 단일특이적 항-CD40 Ab와 유사하게 huCD40을 인식한다. (도 4b) DEC-205 또는 CD11c에의 ELISA 결합. 재조합 DEC-205 또는 CD11c 단백질에의 항-CD40 (적색) -DEC-205 또는 CD11c (검정색) 단일특이적 Ab 및 항-CD40/DEC-205 또는 CD40/CD11c (청색) 이중특이적 Ab의 표준 결합 ELISA 적정 검정. 항-CD40/DEC-205 또는 CD40/CD11c 이중특이적 Ab 및 모 단일특이적 항-DEC-205 또는 CD11c Ab 모두 각각 DEC-205 또는 CD11c를 각각 인식하지만, 단일특이적 항-CD40 Ab은 DEC-205 또는 CD11c를 인식하지 않았다. (도 4c) DEC-205 또는 CD11c 및 huCD40에의 동시적인 ELISA 결합. 재조합 DEC-205 또는 CD11c 및 huCD40 단백질에의 항-CD40 (적색) -DEC-205 또는 CD11c (검정색) 단일특이적 Ab 및 항-CD40/DEC-205 또는 CD40/CD11c (청색) 이중특이적 Ab의 동시적인 결합 샌드위치

ELISA 적정 검정. 오직 항-CD40/DEC-205 및 CD40/CD11c 이중특이적 Ab만이 두 단백질에 각각 동시에 결합한다. (도 4d) CD40/CD11c (2141/N418) bsAb 및 2141은 인간화된 CD40/FcγR 마우스의 비장세포를 염색하는데 사용되었다. 이 bsAb는 DC들에 대해 선호되는 결합을 가지며 CD19 게이팅(gating)에 의해 측정시, B 세포들에 대해 CD40 mAb에 비해 감소된 결합을 가진다.

도 5는 항 인간 CD40 이중특이적 Ab들로 DC들을 시험관 내(in vitro) 자극하는 것을 나타낸다. 인간 DC들은 CD40/DEC-205 bsAb에 의해 활성화된다. 활성화는 표시된 bsAb들과 배양된 미성숙 인간 DC들의 활성 상향조절에 의해 검출된다. 활성화는 상이한 표면 활성화 마커들 (CD86 및 CD54를 나타냄)의 상향조절에 의해 결정된다. 4 공여자들로부터 대표적인 데이터를 얻었다.

도 6a 및 6b는 FcγR-매개 가교결합이 CD40/DCs bsAb 활성화에 필요함을 나타낸다. (도 6a) 미성숙 인간 DC들은 항-인간 CD40/DEC-205 또는 CD40/CD11c bsAb의 표시된 Fc 변이체들의 증가된 용량으로 인큐베이션되었다. CD86 및 CD54 활성화 마커의 상향조절은 유세포 측정에 의해 분석되었다. 4 공여자들 중 하나로부터의 대표적인 데이터가 나타난다. (도 6b) 표시된 CD40/DC bsAb들의 표시된 Fc 변이체들의 존재 하에 OVA로 면역화된 hCD40/FcγR 마우스의 혈액에서 OVA-특이적인 CD8⁺ T 세포의 유세포 측정으로 T 세포 활성화가 결정된다. 각 점은 개별 마우스를 나타낸다. 데이터는 평균값 ± SEM으로 표시된다. *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01.

도 7a 내지 7d는 bsAb들을 사용하여 간 독성을 감소시키고, 활성을 증가시킴으로써 치료적 윈도우(therapeutic window)가 개선되는 것을 나타낸다. (도 7a) 표시된 항-CD40 mAb 또는 bsAb의 존재 하에 OVA로 면역화된 인간화된 CD40/FcγR 마우스의 혈액에서 OVA-특이적인 CD8⁺ T 세포의 유세포 측정 분석에 의해 용량 의존적 T 세포 활성화 검정이 결정됨. 각 점은 개별 마우스를 나타낸다. (도 7b) 항-CD40 항체의 증가하는 수준에 반응하는 간 트랜스아미나제의 용량 의존적 독성. 마우스에 항-CD40 mAb 또는 bsAb의 증가하는 용량으로 치료했고 간 트랜스아미나제들 (AST 및 ALT)가 측정되었다. 각 점은 개별 마우스를 나타낸다. (도 7c) CD40/DC bsAb들은 단일특이적 2141 CD40 Ab에 비해 개선된 간 독성 프로파일을 갖는다. 효능 측은 인간화된 CD40/FcγR의 혈액에서 OVA-특이적 CD8⁺ T 세포의 평균값을 나타내며 도 7a에 표시되어 있다. 간 독성 측은 AST, ALT 트랜스아미나제의 평균값을 나타내며 도 7b에 표시되어 있다. (도 7d) 인간화된 마우스에서 간 독성의 MTD 결정은 단일특이적 CD40 mAb과 비교해, CD40/CD11c bsAb의 과도한 독성 없이 개선된 T 세포 활성을 상당히 개선시킬 수 있다. T 세포 활성화 검정은 표시된 항-CD40 mAb 또는 bsAb의 존재 하에 OVA로 면역화된 인간화된 CD40/FcγR 마우스의 혈액에서 OVA-특이적인 CD8⁺ T 세포들의 유세포 측정에 의해 결정되었다. (상단). 항-CD40 항체들에 반응한 간 트랜스아미나제들. 마우스에 항-CD40 mAb 또는 bsAb들을 치료했고 간 트랜스아미나제들 (AST 및 ALT)가 측정되었다. 각 점은 개별 마우스를 나타낸다. (하단).

도 8a 내지 8h는 CD40 mAb의 효능 및 독성을 매개하는 세포 집단들을 나타낸다. (도 8a, 8b) CD40 mAb 치료 후 T 세포 활성화는 OVA (도 8a)로 면역화된, 또는 B16-OVA 종양이 접종된 (도 8b) C57BL/6 (녹색) 및 Batf3^{-/-} (청색) 마우스의 OVA-특이적 CD8⁺ 혈액 T 세포들의 유세포 측정에 의해 결정되었다. 좌측: CD8⁺ 세포들에서 게이팅(gating)된 대표적인 흐름도(flow plot)로서 평균값 ± SEM으로 나타냄. 우측: 게이팅된 세포들의 백분율; 각 점은 개별 마우스를 나타냄. (도 8c) C57BL/6 및 Batf3^{-/-} 마우스에 MC38 또는 MCA-205 종양 세포들이 접종되었고 CD40 mAb가 치료됐다. 결과는 평균값 ± SEM (그룹당 n=8-13)으로 제시된다. (도 8d) 표시된 군주들에서 CD40 mAb 주사 후 간 트랜스아미나제 혈액 수준. (도 8e+8f) CD40 mAb 주사 24시간 전에, hCD40/FcγR 마우스에 클로드로네이트 리포솜들 (도 8e), 또는 항-CD42b (도 8f)가 주입되었다. 혈중 AST 및 ALT 수준들이 측정되었고 (좌측), 간들은 수거되어 분석되었다 (우측, 대표적인 간 H&E 색전; 스케일 바 = 200 μm). (도 8g) CD40 mAb 주사 24시간 전에 hCD40/FcγR 마우스에 클로드로네이트 리포솜들이 주입되었다. 24시간 후에 혈중 혈소판 카운트. (도 8h) hCD40/FcγR 마우스에 CD40 mAb가 주입되었고, 2.5 시간 후에, LN 및 비장이 수거되었고; 단일 세포 현탁액들은 세포내 IL-6 발현에 대해 유세포 측정으로 분석되었다. 상단: 대표적인 세포 분류 플롯. 하단: 그루핑된 IL-6 염색 강도. 데이터는 평균값 ± SEM을 나타낸다. *P ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001, ****P ≤ 0.0001, ns; 유의하지 않음.

도 8i는 MC38 종양-보유 마우스에서 표시된 세포들 상의 CD40 발현을 나타낸다. 종양, 배출 림프절(drainage lymph node; LN), 비장 및 간이 수거되어 유세포 측정 분석되었다. Kupffer 세포들 (KCs), 대식세포들 (MFs), 수지상 세포들 (DCs), cDC1 (conventional type 1 DC), cDC2 (conventional type 2 DC). 델타 기하 평균 형광강도(ΔMFIs)가 나타난다.

도 8j 및 8k는 bsAb 표적 선택을 나타낸다. 종양-보유 마우스의 MC38 종양, 배출 림프절 (LN), 비장 및 간에서

표시된 세포 유형들 상의 CD11c 및 DEC-205 발현, 및 나이트(naïve) 마우스의 혈소판 상에서 CD11c 및 DEC-205 발현. CD41은 혈소판에 대한 양성 대조군 마커로 역할했다. DEC-205 기하 평균 형광 강도 (MFIs) 및 CD11c 델타 기하 평균 형광 강도 (Δ MFIs) 가 나타난다. 각 점은 개별 마우스를 나타낸다 (도 8j). 대표적인 마우스의 FACS 분석이 나타난다 (도 8k).

도 8l 내지 8r은 CD40 mAb의 효능 및 독성을 매개하는 세포 집단들을 나타낸다. (도 8l) C57BL/6 (녹색) 또는 Batf3^{-/-} (청색) 마우스의 간에서의 Kupffer 세포양이 유세포 측정으로 분석되었다. (도 8m) C57BL/6 마우스에 클로드로네이트 리포솜들이 주입되었다. 24hr 후에, 간들이 수거되었고; 단일 세포 현탁액들이 표시된 세포 집단들의 빈도에 대해 유세포 측정으로 분석되었다. (도 8n) CD40 mAb 주입 24hr 이전에 C57BL/6 마우스에 클로드로네이트 리포솜들이 주입되었다. 24hr 이후에, 혈중 AST 및 ALT 수준이 측정되었다. (도 8o 및 8p) CD40 mAb 주입 24hr 이전에 hCD40/Fc γ R 마우스에 항-CD42b가 주입되었다. 24hr 이후에 혈소판들이 측정되었고 (도 8o), 간들이 수거되어 분석되었다 (도 8p). 대표적인 간 H&E 색전; 스케일 바 = 100 μ m. (도 8q) CD40 mAb 주입 후에 혈청 IL-6 및 TNF- α 수준. hCD40/Fc γ R 마우스에 2141 CD40 mAb이 주입되었고, 3hr 후에 혈청이 수거되었다. 사이토카인 수준이 ELISA에 의해 결정되었다. (도 8r) CD40 mAb 주입 후 세포내 IL-6 발현. hCD40/Fc γ R 마우스에 2141 CD40 mAb가 주입되었다. 2.5hr 이후에, 혈액이 유세포 측정으로 분석되었다. Kupffer 세포들 (KCs), 대식세포들 (MFs), 수지상 세포들 (DCs), cDC1(conventional type 1 DC), cDC2(conventional type 2 DC). 각 점은 개별 마우스를 나타내고, 데이터는 평균값 $\pm$ SEM으로 표시된다. *P < 0.05, **p $\leq$ 0.01, ***P $\leq$ 0.001, ****P $\leq$ 0.0001, ns; 유의하지 않음.

도 9a 및 9b는 Fc γ R-매개 가교결합이 CD40/DCs bsAb 활성화에 필요함을 나타낸다. (도 9a) T 세포 활성화는 표시된 CD40/DCs bsAb들의 Fc 변이체들의 존재 하에 OVA로 면역화된 hCD40/Fc γ R 마우스의 혈액에서 OVA-특이적인 CD8⁺ T 세포의 유세포 측정으로 인해 결정되었다. 각 점은 개별 마우스를 나타낸다. 데이터는 평균값 $\pm$ SEM으로 표시된다. *p $\leq$ 0.05, **p $\leq$ 0.01. (도 9b)는 인간 Fc γ RIIB에 대한 인간 bsAbs Fc 변이체들의 결합을 나타낸다. 재조합 hFc γ RIIB에 대한 표시된 항-CD40/DC bsAb들의 Fc 변이체들의 결합은 ELISA로 평가되었다.

도 10a 내지 10e는 안정 용량(safe dose)이 투여될 때 CD40/CD11c bsAb에 의한 항종양 반응이 CD40 mAb보다 뛰어남을 나타낸다. (도 10a) CD40 mAb 또는 CD40/CD11c bsAb의 표시된 용량으로 치료된 hCD40/Fc γ R 마우스의 간들의 대표적인 H&E 염색 (그룹당 n = 4). (도 10b) CD40 mAb 또는 CD40/CD11c bsAb 치료 후 IL-6 및 TNF- α 분비. (도 10c) T 세포 활성화는 표시된 mAb 또는 bsAb 존재 하에 OVA로 면역화된 인간화된 CD40/Fc γ R 마우스의 혈액에서 OVA-특이적 CD8⁺ T 세포의 유세포 측정 분석으로 결정되었다. (도 10d) hCD40/Fc γ R 마우스에 MC38 또는 B16-F10 종양 세포가 접종되었다. 종양들이 확립되고 50 mm3의 평균 부피에 도달하면, 마우스는 CD40 mAb 또는 CD40/CD11c bsAb를 이들의 미리결정된 MTD로 치료됐다. 종양 부피는 3 내지 4일마다 캘리퍼(caliper)를 통해 측정되었다 (그룹당 n = 9-11). (도 10e) hCD40/Fc γ R 마우스에 B16-F10 종양 세포가 접종되었다. 확립된 종양들을 갖는 마우스에 표시된 mAb/bsAb가 치료됐다. 종양 부피는 3 내지 4일마다 캘리퍼를 통해 측정되었다 (그룹당 n = 9-11). 각 점은 개별 마우스를 나타내고, 데이터는 평균값 $\pm$ SEM으로 표시된다. *P < 0.05, **p $\leq$ 0.01, ***P $\leq$ 0.001, ****P $\leq$ 0.0001.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] 본 발명은, 이의 일부 구현예에서, 질병 치료용 다중특이적 항체들에 관한 것이다.
- [0046] 본 발명의 적어도 하나의 구현예를 상세히 설명하기 이전에, 본 발명은 하기 설명에서 제시되거나 실시예들에 의해 예시된 이의 적용에 반드시 제한되는 것은 아님을 이해해야 한다. 본 발명은 다른 구현예들로 구현될 수 있고 다양한 방식으로 실시 또는 수행될 수 있다.
- [0047] 작용제 항-CD40 단일클론 항체들(mAbs)의 치료적 사용은 종양을 근절하기 위한 면역 반응의 역가(potency)를 이용하는 것을 목적으로 하는 접근이다. 이 접근은 상이한 종양들의 수 많은 동물 모델들에서 효과적인 것으로 입증되었다. 하지만, 인간 항 CD40 mAb들은 고형 종양들을 갖는 환자들에서 미미한 항종양 활성만을 나타냈다.
- [0048] 본 발명의 구현예들을 구상하면서, 본 발명자들은 수지상 세포 특이적 방식으로 CD40을 표적화하는 다중특이적 분자를 설계했다. Fc γ RIIB 결합 선호도를 갖는 이러한 항체들 또한 설계했다.
- [0049] 이하에서 그리고 뒤따른 실시예 섹션에서 예시되는 바와 같이, 본 발명자들은 항 CD40 항체들의 효능 및 독성을

매개하는 세포적 경로를 확립했다. 본 발명자들은 용량 제한 독성을 낮춤으로써 최대 항종양 활성을 갖는 CD40 작용제 mAb들을 설계했다. 본 발명자들은 CD40 및 수지상 세포 마커 둘 모두를 표적화하는, Fc-조작 다중특이적 (이중특이적) 항체 형태의 새로운 유형의 분자들을 설계했다. 구체적으로는, 2141- V11 변이체 (Fc γ RIIb에 대한 향상된 특이도를 가짐)는 항종양 활성을 매개하는 세포 집단인 DC들에 특이적이며, 다른 세포 집단에서 CD40에의 결합이 감소된다. 이러한 특이적인 전달을 달성하기 위해, 본 발명자들은 전체 IgG 스캐폴드(scaffold)로서 이중특이적 Abs 포맷을 활용한 신규한 전략을 설계했다. 이러한 설계는 정의된 세포 집단에 대한 증가된 특이도라는 이점을 가지면서 적절한 Fc γ R 경로에 관여할 수 있는 능력을 유지시킨다. 본 항체들은 (i) 이중 인간 Fab 인식에 의해 매개되는 정의된 세포적 특이도, (ii) Fc 조작에 의해 매개되는 향상된 Fc γ RIIB 결합을 포함하는 많은 유익한 특성들이 부여된다. 원하는 이중특이적 Ab 조합을 생성하기 위해, 2개의 기존 Ab들의 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 올바르게 조립하는 것이 필요하다. 이를 위해, 본 발명자들은 각 bsAb를 형성할 4개의 사슬들을 합성했다. 접-인투-홀 기술 (중쇄의 CH3 도메인 내의 식별된 점 돌연변이들)을 활용하여 원하는 중쇄의 이중이량체화를 가능하게 했다 [12]. CrossMab 기술 (bsAb를 구성하는 2개의 Ab들 중 하나의 중쇄 CH1 및 경쇄 CL1 도메인의 교환)을 적용하여 경쇄들 및 이들의 동족 중쇄들(cognate heavy chains)의 올바른 결합을 보장했다. 2141의 가변 도메인들은 이전에 생성된 단일특이적 Ab로부터 이중특이적 Ab 구조체들로 클로닝되었다. 항-DEC-205 (HD-109), CD11c (N418), Clec9a, 및 XRC1 (MARX10) Ab들의 가변 도메인들은 시퀀싱되었고 각각 HD-109 [13] 및 N418 [14] 하이브리도마(hybridoma)로부터 클로닝되었다. Clec9a (10B4), 및 XRC1 (MARX10)의 가변 도메인들을 각각 특허 출원 번호 제US20130273150A호 및 제EP2641915A1호에 기재된 서열들에 기초하여 합성했다. 야생형 (WT), 및 생체 내 CD40 활성화에 필요한 Fc γ RIIB에 의한 최적의 고차 가교결합을 보존하기 위한 "V11" Fc 스캐폴드 (PCR에 의한 부위 특이적 돌연변이발생을 사용하여 점 돌연변이가 도입됨)로 제작된 이중특이적 Ab.

[0050] 본 발명자들은 생체 내(*in vivo*)에서 CD40 결합 모이어티, DC 표적화 및 Fc γ RIIB의 결합 사이의 상승작용(synergy)을 확립하였고, 이는 최적의 항종양 활성, 최소 독성, 및 체크포인트 조절, 예를 들면 항 PD-L1로 개선된 치료를 나타냈다.

[0051] 본 발명의 일부 구현예의 항체들은 개선된 특이도 이에 따른 치료적 효능이 부여되고 그 결과 임상에서 성공적으로 사용될 수 있다.

[0052] 따라서, 본 발명의 일 측면에 따르면, CD40에 결합하고 CD40을 활성화하는 제1 모이어티 및 수지상 세포(DC)에 특이적으로 결합하는 제2 모이어티를 포함하는 다중특이적 항체가 제공된다.

[0053] 본 발명의 일 측면에 따르면, CD40에 결합하고 CD40을 활성화하는 제1 모이어티, 수지상 세포(DC)에 특이적으로 결합하는 제2 모이어티, 및 Fc γ RIIB에의 결합의 특이도 및 친화도를 향상시키기 위한 다중특이적 항체의 변형된 Fc 영역을 포함하는 제3 모이어티를 포함하는 다중특이적 항체가 제공된다.

[0054] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "CD40"은 "TNF 수용체 슈퍼패밀리 구성원 5" (TNFRSF5)를 지칭한다.

[0055] 20개의 아미노산 신호 서열을 포함하는, 인간 CD40의 서열 (NP_001241.1)은 서열 번호 41에 제공된다.

[0056] CD40는 TNFSF5, gp39 및 CD154로도 지칭되는 CD40 리간드 (CD40L)와 상호작용한다. 달리 지시되거나, 문맥상 명백한 것이 아닌 한, 본 명세서에서 CD40L에 대한 언급은 인간 CD40L ("huCD40L")을 지칭한다. 인간 CD40L은 MIM: 300386에 추가로 기술되어 있다. 인간 CD40L의 서열 (NP_000065.1)은 서열 번호 42에 제공된다.

[0057] CD40에 대한 항체들이 인간 CD40 및/또는 마우스 CD40에 결합하는 것이 이해될 것이다. 인간 및 마우스 둘 모두에 결합하는 항체들은 일반적으로 "범-특이적 항체(pan-specific antibodies)"로 지칭한다.

[0058] 언급한 바와 같이, 제1 모이어티는 CD40에 결합하고 CD40을 활성화하므로 (CD40L을 모방) "작용제(agonistic)"로 명명된다. 작용 활성은 인간 수지상 세포들에서 CD54 또는 CD86의 상향 조절을 테스트하거나 생체 내 T 세포 활성화 검정들 (예를 들면, ELISA에 의해 확인된 CD40에의 결합)을 테스트함으로써 검정될 수 있다.

[0059] 본 발명의 일부 구현예에 따라 다중특이적 항체에 사용될 수 있는 제1 모이어티 상보성 결정 서열들 (CDRs)은 이하에 나열된 항체들에서 확인할 수 있다:

[0060] • 항 CD40 2141 (CP870,893로도 알려짐) 서열들은 서열 번호 5, 6, 11 및 12에 나타난다.

[0061] 따라서, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 중쇄에 N에서 C 방향으로 서열 번호 19 내지 21에 제시된 상보성 결정 영역을 포함하고 경쇄에 N에서 C 방향으로 서열 번호 22 내지 24에 제시된 상보성 결정 영역을 포함하는 제1 모이어티를 포함한다. Fc γ RIIB 결합을 최적화하기 위한 돌연변이를 포함하는 CD40 V11 및 이중특이적 조립체가

서열 번호 5 및 6 (각각, V_H 및 V_L)에 제공된다.

- [0062] · 항 CD40 항체: 12D6 및 5F11은 WO20170253659에 기재되어 있고, 이의 전문은 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0063] · APX005M (Apexigen)- Johnson M, Fakih M, Bendell J, et al. 2017. First in human study with the CD40 agonistic monoclonal antibody APX005M in subjects with solid tumors. *J. ImmunoTher. Cancer* 5(Suppl. 3):89 (Abstr.)
- [0064] · SGN-40 - C.-L. Law *et al.*, "Preclinical antilymphoma activity of a humanized anti-CD40 monoclonal antibody, SGN-40.," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 18, pp. 8331-8338, Sep. 2005.
- [0065] · SEA-CD40 - DOI: 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.3093 *Journal of Clinical Oncology* 36, no. 15_suppl (May 20, 2018) 3093-3093.
- [0066] 다른 CD40 작용제 항체 또한 당업계에서 입수가능하다.
- [0067] 언급한 바와 같이, 다중특이적 항체는 수지상 세포들 (DCs)에 특이적으로 결합하는 제2 모이어티를 포함한다.
- [0068] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "특이적으로"는 다른 세포들 또는 혈소판들, 예컨대, 말초 혈액 세포들과 비교한 DC들에 대한 결합 선호도를 지칭한다. 일부 구현예에 따르면, "특이적으로"는 유세포 측정 분석에 의해 결정시 DC들과 비교해 표적이 발현되지 않거나 더 낮은 밀도로 발현되기 때문에 대식세포 (Kupffer 또는 비-Kupffer) 및 혈소판에 대해 결합하지 않음을 의미한다.
- [0069] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "특이적으로 결합하는," "선택적으로 결합하는," "선택적으로 결합한다," 및 "특이적으로 결합한다,"는 다른 항원이 아닌 미리결정된 항원 상의 에피토프에 항체가 결합하는 것을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 (i) 예를 들면, 분석물질로서 미리결정된 항원, 예를 들면, 재조합 DC 마커, 및 리간드로서 항체를 사용한 BIAcore®. 2000 표면 플라즈몬 공명 기구의 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기술, 또는 항원 양성 세포에 대한 항체 결합의 Scatchard 분석에 의해 결정시, 대략 10^{-7} M 미만의 평형 해리 상수 (K_D), 예컨대, 대략 10^{-8} M, 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 미만, 또는 이보다 더 작은 평형 해리 상수로 결합하고, (ii) 미리결정된 항원 또는 이와 밀접하게 관련된 항원 이외의 비-특이적 항원 (예를 들면 BSA, 카세인)에의 결합 친화도보다 적어도 2배 더 큰 친화도로 미리결정된 항원에 결합한다. 따라서, "인간 CD40 또는 DC 마커에 특이적으로 결합하는" 항체는 10^{-6} M 이하의 K_D , 예컨대, 대략 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 미만, 또는 이보다 더 작은 K_D 로 가용성 또는 세포 결합 인간 CD40 또는 DC 마커에 결합하는 항체를 지칭한다.
- [0070] 본 명세서에 사용된 바와 같이 "수지상 세포" (DC) 또는 복수의 "수지상 세포들" (DC들)은 전문 항원 제시 세포들 (APCs)로 불리는 세포군에 속하는 세포들을 지칭한다. DC들은 얇은 시트들 (라멜리포디아)이 DC 몸체로부터 여러 방향으로 뻗어 있는 특징적 형태를 가진다. 몇 가지 표현형 기준들 또한 일반적이지만, 수지상 세포의 공급원에 따라 달라질 수 있다. 이들은 높은 수준의 MHC 분자들 (예를 들면, I형 및 II형 MHC) 및 공동자극 분자들 (예를 들면, B7-1 및 B7-2)을 포함하고, 과립구들, NK 세포들, B 세포들, 및 T 세포들에 특이적인 마커들이 결핍되어 있다. 많은 수지상 세포들은 하기 나열된 것과 같은 특정한 마커들을 발현한다. 수지상 세포들은 시험관 내 및 생체 내에서 1차 T 세포 반응들을 개시할 수 있다. 이러한 반응들은 항원 특이적이다. 수지상 세포들은 말초 혈액 백혈구들, 비장세포들, B 세포들 및 단핵구들에 비해 강력한 혼합 림프구 반응 (MLR)을 지시한다. 수지상 세포들은 선택적으로는 세포에 의한 사이토카인 발현의 패턴을 특징으로 한다 (Zhou and Tedder (1995) *Blood* 3295-3301). 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체는 미성숙 DC들에 결합하고 이들의 성숙 및 활성화를 매개할 수 있다.
- [0071] 특정한 일 구현예에 따르면, 수지상 세포들은 cDC1 또는 cDC2이다.
- [0072] 특정한 일 구현예에 따르면, 수지상 세포들은 cDC1 및 cDC2이다.
- [0073] 특정한 일 구현예에 따르면, 수지상 세포는 상기 제2 모이어티가 CD11c, CD11b, Clec9a, XCR1, DEC-205, BDCA-1, CD8, CD8 α , CD103 및 MHC-Class II (예를 들면, HLA-DR), CD141, FLT3, CD13 및 CD1c로 이루어진 군으로부터 선택되는 DC 마커에 결합하는 것으로 이루어진 군으로부터 선택된 마커 발현을 특징으로 한다.
- [0074] 특정한 일 구현예에 따르면, DC들은 인간 DC들이다.
- [0075] 특정한 일 구현예에 따르면, 제2 모이어티는 CD141, FLT3, CD13, CD1c 및 HLA-DR (MHC II)로 이루어진 군으로

부터 선택되는 DC 마커에 결합한다.

- [0076] 특정한 일 구현예에 따르면, 제2 모이어티는 CD11c, CD11b, Clec9a, XCR1, DEC-205, BDCA-1, CD8, CD8 α , CD103, MHC-Class II (예를 들면, HLA-DR), CD141, CD13 및 CD1c, LI LRA4, LAMP5, CLEC4C, I L3RA 및 SIGLEC6으로 이루어진 군으로부터 선택된 DC 마커에 결합한다.
- [0077] 특정한 일 구현예에 따르면, DC 마커는 LI LRA4, LAMP5, CLEC4C, I L3RA, CLEC9A, XCR1, FLT3, 또는 SIGLEC6이 아니다.
- [0078] 특정한 일 구현예에 따르면, 제2 모이어티는 CD11c 또는 DEC-205에 결합한다.
- [0079] 특정한 일 구현예에 따르면, 제2 모이어티는 CD11c에 결합한다.
- [0080] 따라서, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 중쇄에 N에서 C 방향으로 서열 번호 25 내지 27에 제시된 상보성 결정 영역들을 포함하고 경쇄에 N에서 C 방향으로 서열 번호 28 내지 30에 제시된 상보성 결정 영역들을 포함하는 제 2 모이어티를 포함하는 다중특이적 항체가 제공된다.
- [0081] 특정한 일 구현예에 따르면, 제2 모이어티는 DEC-205에 결합한다.
- [0082] 따라서, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 중쇄에 N에서 C 방향으로 서열 번호 31 내지 33에 제시된 상보성 결정 영역들을 포함하고 경쇄에 N에서 C 방향으로 서열 번호 34 내지 36에 제시된 상보성 결정 영역들을 포함하는 제 2 모이어티를 포함하는 다중특이적 항체가 제공된다.
- [0083] 특정한 일 구현예에 따르면, 제2 모이어티는 Clec9a에 결합한다.
- [0084] 따라서, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 중쇄에 N에서 C 방향으로 서열 번호 52 내지 54에 제시된 상보성 결정 영역들을 포함하고 경쇄에 N에서 C 방향으로 서열 번호 55 내지 57에 제시된 상보성 결정 영역들을 포함하는 제 2 모이어티를 포함하는 다중특이적 항체가 제공된다. (10B4의 CDR들).
- [0085] 특정한 일 구현예에 따르면, 제2 모이어티는 XCR1에 결합한다.
- [0086] 따라서, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 중쇄에 N에서 C 방향으로 서열 번호 58 내지 60에 제시된 상보성 결정 영역들을 포함하고 경쇄에 N에서 C 방향으로 서열 번호 61 내지 63에 제시된 상보성 결정 영역들을 포함하는 제 2 모이어티를 포함하는 다중특이적 항체가 제공된다. (MARX10의 CDR들).
- [0087] CD11c에 결합할 수 있는 항체들은 당업계에 익히 공지되어 있다. N418은 ATCC로부터 입수가가능하다 [14].
- [0088] DEC-205에 결합할 수 있는 항체들은 당업계에 익히 공지되어 있다. HD-109는 록펠러 대학교(Rockefeller University)로부터 입수가가능하다 [13] HD-20, HD-24, HD-71, HD-73, HD-77 및 HD-83.
- [0089] Clec9a에 결합할 수 있는 항체들은 당업계에 익히 공지되어 있다. 10B4 및 다른 항체들은 미국 특허 출원 번호 제US20130273150A에 기술되어 있다 [15] (예를 들면, 1F6, 397, 및 7H11은 [16]에 기술되어 있다).
- [0090] XCR1에 결합할 수 있는 항체들은 당업계에 익히 공지되어 있다. MARX10은 EP EP2641915A1 [17]에 기술되어 있다.
- [0091] 모이어티들 중 어느 하나가 Fc γ RIIB에의 결합을 증가시킬 수 있는 Fc 변형들, 예컨대, 제한 없이, 인간 IgG1 서열에 대응하는 V11 돌연변이 (서열 번호 2), S267E ("SE"), S267E/L382F ("SELF"), G237D/P238D/P271G/A330R ("V9"), 및/또는 E233D/G237D/P238D /H268D/P271G/A330R ("V12") (서열 번호 1에 대응하는 위치)을 포함할 수 있음이 이해될 것이다.
- [0092] 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체는 서열 번호 5 및 6, 및 서열 번호 37 및 38을 포함한다.
- [0093] 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체는 서열 번호 5 및 6, 및 서열 번호 39 및 40을 포함한다.
- [0094] 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체는 서열 번호 5 및 6, 및 서열 번호 15 및 16을 포함한다.
- [0095] 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체는 서열 번호 5 및 6, 및 서열 번호 17 및 18을 포함한다.
- [0096] 본 발명에서 사용되는 용어 "항체"는 온전한 분자들 뿐만 아니라 이들의 기능적 단편들 (항원의 에피토프에 결합할 수 있음)을 포함한다.
- [0097] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "에피토프"는 항체의 파라토프(paratope)가 결합하는 항원 상의 임의의 결정기를 지칭한다. 에피토프 결정기는 일반적으로 아미노산 또는 탄수화물 측쇄와 같은 분자들의 화학적 활성

표면 그룹들로 이루어지며 특이적인 3차원 구조적 특성, 및 특이적 전하 특성을 갖는다.

- [0098] 특정한 일 구현예에 따르면, 항체 단편은 단일쇄, Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편, Fd, Fcab, Fv, dsFv, scFvs, 디아바디(diabodies), 미니바디(minibodies), 나노바디(nanobodies), Fab 발현 라이브러리 또는 HLA 제한 방식으로 항원의 에피토프에 결합할 수 있는 VH 및 VL과 같은 단일 도메인 분자를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0099] 본 발명을 일부 구현예를 실시하기에 적합한 항원 단편들은 이뮤노글로불린 경쇄 (본 명세서에 "경쇄"로 지칭함)의 상보성 결정 영역 (CDR), 이뮤노글로불린 중쇄 (본 명세서에서 "중쇄"로 지칭함)의 상보성 결정 영역, 경쇄의 가변 영역, 중쇄의 가변 영역, 경쇄, 중쇄, Fd 단편, 및 경쇄 및 중쇄 둘 모두의 전체 가변 영역들을 필수적으로 포함하는 항체 단편, 예컨대, Fv, 단일쇄 Fv (scFv), 이황화-안정화 Fv (dsFv), Fab, Fab', 및 F(ab')₂, 또는 항체의 Fc 영역을 포함하는 항체 단편을 포함한다.
- [0100] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 가변 영역 내에 발견된 항원 결합 영역들을 지칭하는 것으로 상호교환적으로 사용된다. 일반적으로는, 항체들은 각각의 VH에 3개의 CDR들을 포함하고 (CDR HI 또는 HI; CDR H2 또는 H2; 및 CDR H3 또는 H3) 각각의 VL에 3개의 CDR들을 포함한다 (CDR LI 또는 LI; CDR L2 또는 L2; 및 CDR L3 또는 L3).
- [0101] 가변 영역 또는 CDR을 구성하는 특정 항체의 아미노산 잔기들의 동일성은 Kabat et al에 의해 정의된 서열 가변성 (예를 들면, Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. 참고), Chothia et al.에 의해 정의된 구조적 루프 영역의 위치 (예를 들면, Chothia et al., Nature 342:877-883, 1989. 참고), Oxford Molecular's AbM 항체 모델링 소프트웨어를 사용한 Kabat 및 Chothia 사이의 타협 (현재 Accelrys®, Martin et al., 1989, Proc. Natl Acad Sci USA. 86:9268; 및 웹사이트 [www\(dot\)bioinf-org\(dot\)uk/abs](http://www(dot)bioinf-org(dot)uk/abs) 참고), 접촉 정의(contact definition)에 의해 정의된 바와 같은 이용가능한 복합체 결정 구조 (MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745, 1996 참고) 및 "구성적 정의(conformational definition)" (예를 들면, Makabe et al., Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166, 2008 참고)와 같은 당업계에 익히 공지된 방법들을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0102] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "가변 영역들" 및 "CDR들"은 접근들의 조합들을 포함하여, 당업계에 공지된 임의의 접근에 의해 정의된 가변 영역들 및 CDR들을 지칭할 수 있다.
- [0103] 경쇄 및 중쇄 둘 모두의 전체 가변 영역들을 포함하거나 경쇄 및 중쇄 둘 모두의 전체 가변 영역들로 필수적으로 이루어진 기능적 항체 단편들은 하기와 같이 정의된다:
- [0104] (i) Fv, 2개의 사슬들로 발현된 경쇄의 가변 영역 (VL) 및 중쇄의 가변 영역 (VH)으로 이루어진 유전자 조작 단편으로 정의됨;
- [0105] (ii) 단일쇄 Fv ("scFv"), 유전적으로 융합된 단일쇄 분자로서 적합한 폴리펩티드 링커에 의해 연결된, 경쇄의 가변 영역 및 중쇄의 가변 영역을 포함하는 유전자 조작 단일쇄 분자.
- [0106] (iii) 이황화-안정화 Fv ("dsFv"), 유전자 조작 이황화 결합에 의해 연결된, 경쇄의 가변 영역 및 중쇄의 가변 영역을 포함하는 유전자 조작 항체.
- [0107] (iv) Fab, 온전한 경쇄, 및 중쇄 가변 도메인 및 중쇄 CH1 도메인으로 이루어진 중쇄의 Fd 단편을 생산하기 위해 효소 파파인(papain)으로 전체 항체를 처리함으로써 얻을 수 있는 항체 분자의 1가 항원 결합 부분을 함유하는 항체 분자의 단편;
- [0108] (v) Fab', 효소 펩신으로 전체 항체를 처리한 후에, 환원시킴으로써 얻을 수 있는 항체 분자의 1가 항원 결합 부분을 함유하는 항체 분자의 단편 (항체 분자당 2개의 Fab' 단편들이 얻어짐);
- [0109] (vi) F(ab')₂, 효소 펩신으로 전체 항체를 처리함으로써 얻을 수 있는 항체 분자의 1가 항원 결합 부분을 함유하는 항체의 단편 (즉, Fab' 단편들의 이량체는 2개의 이황화 결합들에 의해 함께 고정된다);
- [0110] (vii) 항원에 대한 충분한 친화도를 나타내는 단일 VH 또는 VL로 구성된 단일 도메인 항체들 또는 나노바디들; 및
- [0111] (viii) Fcab, 항체의 Fc 영역에 항원 결합 능력을 도입함으로써 항원 결합 도메인으로 개발된 항체의 Fc 부분을 함유하는 항체 분자의 단편.
- [0112] 다중클론 항체 및 단일클론 항체, 및 이들의 단편들을 제조하는 방법들은 당업계에 익히 공지되어 있다 (예를

들면, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988 참고, 본 명세서에 참조로 포함됨).

[0113] 항체들을 생성하기 위한 예시적인 방법들은 항체 분자들의 생체 내 생성 유도, 이뮤노글로불린 라이브러리의 스크리닝 (Orlandi D.R. et al., 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86:3833-3837; Winter G. et al., 1991. Nature 349:293-299) 또는 배양물에서 연속 세포주에 의한 단일클론 항체의 생성을 포함한다. 이들은, 하이브리도마 기술, 인간 B-세포 하이브리도마 기술, 및 엡스타인-바 바이러스 (EBV)-하이브리도마 기술 (Kohler G. et al., 1975. Nature 256:495-497; Kozbor D. et al., 1985. J. Immunol. Methods 81:31-42; Cote RJ. et al., 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:2026-2030; Cole SP. et al., 1984. Mol. Cell. Biol. 62:109-120)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0114] 표적 항원이 너무 작아 생체 내에서 항체를 생성할 때 적절한 면역원성 반응을 유도하지 못하는 경우에, 이러한 항원 (합텐)들은 항원적으로 중성인 담체, 예컨대, 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin; KLH) 또는 혈청 알부민 [예를 들면, 소 혈청 알부민 (BSA)] 담체에 커플링될 수 있다 (예를 들면, US 특허 번호 제 5,189,178호 및 제5,239,078호 참고). 합텐을 담체에 커플링하는 것은 당업계에서 익히 공지된 방법들을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들면, 아미노기에 대한 직접 커플링이 수행될 수 있고 선택적으로는 형성된 이미노 결합(imino linkage)의 환원이 뒤따를 수 있다. 대안적으로는, 담체는 디사이클로헥실 카르보디이미드와 같은 축합제 또는 다른 카르보디이미드 탈수제를 사용하여 커플링될 수 있다. 링커 화합물들 또한 커플링을 수행하기 위해 사용될 수 있고; 동종이기능성 및 이종이기능성 링커 둘 모두 Pierce Chemical Company, Rockford, IL에서 입수가능하다. 이어서, 생성된 면역원성 복합체는 적합한 포유동물 대상체들, 예컨대, 마우스, 토끼 등에 주사될 수 있다. 적합한 프로토콜은 혈청에서 항체의 생산이 부스팅되는 일정에 따라 아쥬반트의 존재 하에서 면역원을 반복 주사하는 것을 포함한다. 면역 혈청의 역가는 당업계에 익히 공지된 면역검정 절차를 사용하여 쉽게 측정될 수 있다.

[0115] 얻어진 항혈청은 직접 사용되거나 단일클론 항체가 상기 기재된 바와 같이 얻어질 수 있다.

[0116] 본 발명의 일부 구현예에 따른 항체 단편들은 항체의 단백질 가수분해, 또는 상기 단편을 인코딩하는 DNA의 E. coli 또는 포유동물 세포 (예를 들면, 중국 햄스터 난소 세포 배양물 또는 다른 단백질 발현 시스템)에서의 발현에 의해 제조될 수 있다.

[0117] 항체 단편들은 기존 방법들에 의한 전체 항체들의 펩신 또는 파파인 분해에 의해 얻어질 수 있다. 예를 들면, 항체 단편들은 펩신으로 항체들이 효소적 절단되어 F(ab')₂로 표시된 5S 단편을 제공함으로써 제조될 수 있다. 이 단편은 티올 환원제를 사용하여 더 절단될 수 있고, 선택적으로는 이황화 결합의 절단으로 생성된 셸프히드릴기의 차단기로 3.5S Fab' 1가 단편들을 제조한다. 대안적으로는, 펩신을 사용한 효소적 절단은 직접 2개의 1가 Fab' 단편들 및 Fc 단편을 생성한다. 이 방법들은 예를 들면, Goldenberg, 미국 특허 제4,036,945호 및 제4,331,647호에 기술되어 있고, 이 특허들의 전문은 참조로 본 명세서에 포함된다. Porter, R. R. [Biochem. J. 73: 119-126 (1959)] 또한 참조. 항체를 절단하는 다른 방법들, 예컨대, 중쇄들을 분리시켜 1가 경쇄 단편들을 형성하는 것, 단편들을 추가로 절단하는 것, 또는 다른 효소적, 화학적, 또는 유전적 기술 또한 단편들이 온전한 항체에 의해 인식된 항원에 결합하는 한 사용될 수 있다.

[0118] 본 명세서의 상기에 기재된 바와 같이, Fv 단편들은 VH 및 VL 사슬들의 결합을 포함한다. 이 결합은 Inbar et al. [Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69:2659-62 (1972)]에 기재된 바와 같이, 공유결합이 아닐 수 있다. 대안적으로는, 이 가변 사슬들은 분자내 이황화 결합 또는 글루타르알데히드와 같은 화학물질들에 의한 가교결합에 의해 연결될 수 있다. 바람직하게는, Fv 단편들은 펩티드 링커에 의해 연결된 VH 및 VL 사슬을 포함한다. 이 단일-사슬 항원 결합 단백질들(single-chain antigen binding proteins; sFv)은 VH 및 VL 도메인을 인코딩하는 DNA 서열들을 포함하는 구조 유전자를 제작함으로써 제조될 수 있다. 이 구조 유전자는 발현 벡터에 삽입되고, 이어서, E. coli와 같은 숙주 세포에 도입된다. 이 제조할 숙주 세포들은 2개의 V 도메인들을 연결(bridging)하는 펩티드 링커를 갖는 단일 펩티드 사슬을 합성한다. sFv들을 제조하는 방법들은, 예를 들면, [Whitlow and Filpula, Methods 2: 97-105 (1991); Bird et al., Science 242:423-426 (1988); Pack et al., Bio/Technology 11:1271-77 (1993); 및 미국 특허 번호 제4,946,778호에 기재되어 있고, 이의 전문은 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0119] 항체 단편의 또 다른 형태는 단일 상보성-결정 영역 (CDR)을 코딩하는 펩티드이다. CDR 펩티드들 ("최소 인식 유닛")은 관심 항체의 CDR을 인코딩하는 유전자를 제작함으로써 얻을 수 있다. 이러한 유전자들은, 예를 들면, 중합효소 연쇄 반응을 이용하여 항체-생산 세포들의 RNA로부터 가변 영역을 합성함으로써 제조된다. 예를

들면, Larrick and Fry [Methods, 2: 106-10 (1991)] 참조.

[0120] 언급한 바와 같이, 항체 단편은 "Fcab"로 명명된 항체의 Fc 영역을 포함할 수 있다. 이러한 항체 단편들은 일반적으로 항체의 CH2-CH3 도메인을 포함한다. Fcab들은 항체의 구조적 루프 영역, 즉 중쇄의 CH3 영역에서 적어도 하나의 변형이 포함되도록 조작될 수 있다. 이러한 항체 단편들은 예를 들면 하기와 같이 생성될 수 있다: 적어도 하나의 구조적 루프 영역 (예를 들면, Fc 영역)을 포함하는 항체를 인코딩하는 핵산을 제공하고, 적어도 하나의 구조적 루프 영역의 적어도 하나의 뉴클레오티드 잔기를 변형시키고, 변형된 핵산을 발현 시스템에 옮기고, 변형된 항체를 발현시키고, 발현된 변형된 항체를 에피토프에 접촉시키고, 변형된 항체가 에피토프에 결합하는지 결정한다. 예를 들면, 미국 특허 번호 제9,045,528호 및 제9,133,274호 참조, 이들의 전문은 본 명세서에 참조로 포함됨.

[0121] 비-인간 (예를 들면, 무린) 항체들의 인간화된 형태들은 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래한 최소 서열을 함유한, 이뮤노글로불린들, 이뮤노글로불린 사슬들 또는 이들의 단편들 (예컨대, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 다른 항체들의 항원-결합 서열들)의 키메라 분자들이다. 인간화된 항체들은 인간 이뮤노글로불린들 (수용자 항체)를 포함하되, 수용자의 상보성 결정 영역 (CDR)을 형성하는 잔기들은 원하는 특이도, 친화도 및 성능을 갖는 비-인간 종들 (공여자 항체), 예컨대, 마우스, 랫트 또는 토끼의 CDR 잔기들로 대체된다. 일부 예시에서, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 잔기들은 대응하는 비-인간 잔기들로 대체된다. 인간화된 항체들은 또한 수용자 항체 및 수입 CDR 또는 프레임워크 서열에 발견되지 않는 잔기들을 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 일반적으로 2개의 가변 도메인들을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 이때, 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역들이 비-인간 이뮤노글로불린에 대응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역들이 인간 이뮤노글로불린 공통 서열이다. 인간화 항체는 또한 최적으로, 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc), 일반적으로 인간 이뮤노글로불린 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다 [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)].

[0122] 비-인간 항체들을 인간화하는 방법들은 당업계에 익히 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간인 공급원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이러한 비-인간 아미노산 잔기를 흔히 수입 잔기 (import residue)로 지칭하며, 이는 일반적으로 수입 가변 도메인(import variable domain)으로부터 취한다. 인간화는 인간 항체의 대응하는 서열을 설치류 CDR들 또는 CDR 서열들들로 치환함으로써, 하기 Winter 및 동업자의 방법 [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)]에 따라 필수적으로 수행될 수 있다. 따라서, 이러한 인간화 항체들은 키메라 항체들이며 (U.S. 특허 번호 제4,816,567호), 이때, 온전한 인간 가변 도메인보다 실질적으로 작은 도메인이 비-인간 종의 대응하는 서열에 의해 치환되었다. 실제로, 인간화 항체들은 일반적으로 일부 CDR 잔기들 및 가능하게는 일부 FR 잔기들이 설치류 항체들의 유사 부위(analogous sites)에 의해 치환된 인간 항체들이다.

[0123] 인간 항체들은 또한 파지 디스플레이 라이브러리를 포함하는, 당업계에 공지된 다양한 기술들을 사용하여 제조될 수 있다 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]. Cole et al. 및 Boerner et al.의 기술 또한 인간 단일클론 항체들의 제조에 사용될 수 있다 (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) 및 Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]. 마찬가지로, 인간 항체들은 인간 이뮤노글로불린 유전자위(loci)를 형질전환 동물들, 예를 들면, 마우스에 도입함으로써 만들어질 수 있으며, 이때, 내인성 이뮤노글로불린 유전자들은 부분적으로 또는 완전히 불활성화되었다. 챌린지(challenge)하였더니, 유전자 배열, 조립, 항체 레파토리(antibody repertoire)를 포함하는 모든 관점에서 인간에서 보이는 것과 매우 유사한 인간 항체 생성이 관찰된다. 이 접근은 예를 들면, 미국 특허 번호 제5,545,807호; 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 제5,661,016호, 및 하기 과학 간행물에 기재되어 있다: Marks et al., Bio/Technology 10,: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); 및 Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13, 65-93 (1995).

[0124] 달리 나타내지 않는 한, 이뮤노글로불린은 IgA, 분비 IgA, IgG 및 IgM을 포함하나, 이에 제한되지 않는 일반적으로 알려진 동형들 중 임의의 것으로서 유래할 수 있다. IgG 동형은 특정 종들에서 아형들로 나뉜다: 인간에서 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4, 및 마우스에서 IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3. 이뮤노글로불린들, 예를 들면, 인간 IgG1은 기껏해야 적은 개수의 아미노산들이 서로 상이한 여러 개의 알로타입(allotype)들로 존재한다.

- [0125] 특정한 일 구현예에 따르면, 항체는 IgG1 동형의 항체이다. 항체들이 얻어지는 경우에, 이들은 예를 들면, ELISA, 웨스턴 블롯팅(Western blotting), FACS, 닷 블롯(dot blot) 및 항체 정량화를 위한 임의의 다른 방법을 통해 활성이 테스트될 수 있다.
- [0126] 특정한 일 구현예에 따르면, 항체는 Fc γ , CD40 및 DC에의 결합으로 3기능성이다.
- [0127] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "다중특이적 항체"는 언급한 바와 같이, 하나는 CD40, 그리고 적어도 하나는 DC 상에 있는 2개의 상이한 항원들 또는 2개의 상이한 에피토프들인, 적어도 2개의 상이한 구조의 표적들에 동시에 결합할 수 있는 항체이다.
- [0128] 특이도는 항체가 얼마나 많은 항원 또는 에피토프에 결합할 수 있는지를 나타낸다; 즉, 이중특이적, 삼중특이적, 사중특이적. 특정한 일 구현예에 따르면, 항체는 이중특이적 항체이다.
- [0129] 이러한 정의들을 사용하면, 천연 항체, 예를 들면, IgG는 2개의 결합 아암(arm)을 가지고 있기 때문에 2가이고, 하나의 에피토프에 결합하기 때문에 단일특이적이다.
- [0130] "이중특이적 항체"는 하나는 CD40 그리고 또 다른 적어도 하나는 DC 상에 있는, 2개의 상이한 구조의 표적들에 동시에 결합할 수 있는 항체이다.
- [0131] 결합가(Valency)는 단일 항원 또는 에피토프에 대해 항체가 얼마나 많은 결합 아암 또는 부위를 가지고 있는지를 나타낸다; 즉, 1가, 2가, 3가 또는 다가. 항체의 다중결합가(multivalency)는 항체가 항원에 결합하는데 다양한 상호작용을 활용하여, 항원 결합의 결합력(avidity)을 증가시킬 수 있음을 의미한다.
- [0132] 다중특이적, 다가 항체들은 상이한 특이도의 하나 초과와 결합 부위를 갖는 구조체들이다. 예를 들면, 하나의 결합 부위는 하나의 항원에 반응하고 다른 결합 부위는 또 다른 항원에 반응하는 디아바디가 있다.
- [0133] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "모이어티"는 표시된 표적에 결합할 수 있는 다중특이적 (예를 들면, 이중특이적) 항체의 항체 구성성분을 지칭한다.
- [0134] 본 발명의 일부 구현예의 다중특이적 항체를 제조하기 위해, 본 발명의 모이어티들은 당업계에 익히 공지된 바와 같이 Fc 영역, 예를 들면, CH3 도메인 (Kabat에 따름)에서 변형될 수 있다. 이러한 변형은 중쇄들을 통한 다중특이적 항체의 올바른 조립을 보장한다.
- [0135] 따라서, 한 중쇄의 CH3 도메인은 변경되어, 한 중쇄의 CH3 도메인이 원래의 인터페이스 내에서 다중특이적 항체 내의 다른 중쇄의 CH3 도메인의 원래의 인터페이스와 만나기 위하여, 아미노산 잔기는 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체되어, 한 중쇄의 CH3 도메인의 인터페이스 내에서 돌기(protruberance)를 생성함으로써 다른 중쇄의 CH3 도메인의 인터페이스 내의 공동(cavity)에 위치할 수 있고; 다른 중쇄의 CH3 도메인은 변경되어, 제2 CH3 도메인의 원래의 인터페이스 내에서 3가의 이중특이적 항체 내의 제1 CH3 도메인의 원래의 인터페이스를 만나기 위하여, 아미노산 잔기는 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산으로 대체되어, 제2 CH3 도메인의 인터페이스 내에 공동을 생성함으로써, 이 공동 내에서 제1 CH3 도메인의 인터페이스 내의 돌기가 위치할 수 있다 (Genentech에 의한 "놉-인투-홀" 접근으로도 알려짐).
- [0136] 특정한 일 구현예에 따르면, 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기는 아르기닌 (R), 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0137] 특정한 일 구현예에 따르면, 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기는 알라닌 (A), 세린 (S), 트레오닌 (T), 발린 (V)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0138] 특정한 일 구현예에 따르면, CH3 도메인 둘 모두는 각 CH3 도메인의 대응하는 위치들에서 아미노산으로서 시스테인 (C)를 도입하여 두 CH3 도메인들 사이에 이황화 다리가 형성되도록 추가로 변경된다.
- [0139] 특정한 일 구현예에서, 이중특이적 항체는 "놉 사슬"의 CH3 도메인에서 T366W 돌연변이를 포함하고 "홀 사슬"의 CH3 도메인에서 T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함한다. 추가적인 CH3 도메인들 사이의 사슬내 이황화 다리는 또한 예를 들면, "놉 사슬"의 CH3 도메인 내에 Y349C 돌연변이를 도입하고 "홀 사슬"의 CH3 도메인 내에 E356C 돌연변이 또는 S354C 돌연변이를 도입함으로써 사용될 수 있다 (Merchant, A. M., et al., Nature Biotech 16 (1998) 677-681). 따라서, 또 다른 바람직한 일 구현예에서, 이중특이적 항체는 2개의 CH3 도메인들 중 하나에 Y349C, T366W 돌연변이를 포함하고 2개의 CH3 도메인들 중 다른 하나에 E356C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함하거나 이중특이적 항체는 2개의 CH3 도메인들 중 하나에 Y349C, T366W 돌연변이를 포함하고 2개의 CH3 도메인들 다른 하나에 S354C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함한다 (한 CH3 도메인에서 추가의

Y349C 돌연변이 및 다른 CH3 도메인에서 추가의 E356C 또는 S354C 돌연변이는 사슬간 이황화 다리를 형성함) (넘버링은 항상 Kabat의 EU 인덱스에 따름). 하지만, EP1 870 459A1에 기재된 다른 노-인투-홀 기술 또한 대안적으로 또는 추가적으로 사용될 수 있다. 이중특이적 항체에 대한 특정한 일 예시는 "노 사슬"의 CH3 도메인에서 R409D; K370E 돌연변이 및 "홀 사슬"의 CH3 도메인에서 D399K;E357K 돌연변이다 (넘버링은 항상 Kabat의 EU 인덱스에 따름).

[0140] 또 다른 구현예에서, 이중특이적 항체는 "노 사슬"의 CH3 도메인에 T366W 돌연변이를 포함하고 "홀 사슬"의 CH3 도메인에 T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함하며 추가적으로는 "노 사슬"의 CH3 도메인에 R409D; K370E 돌연변이 및 "홀 사슬"의 CH3 도메인에서 D399K;E357K 돌연변이를 포함한다.

[0141] 또 다른 구현예에서, 이중특이적 항체는 2개의 CH3 도메인들 중 하나에 Y349C, T366W 돌연변이를 포함하고 2개의 CH3 도메인들 중 다른 하나에 S354C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함하거나, 이중특이적 항체는 2개의 CH3 도메인들 중 하나에 Y349C, T366W 돌연변이를 포함하거나 2개의 CH3 도메인들 중 다른 하나에 S354C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함하고 추가적으로는 "노 사슬"의 CH3 도메인에서 R409D; K370E 돌연변이를 포함하고 "홀 사슬"의 CH3 도메인에서 D399K; E357K 돌연변이를 포함한다.

[0142] 특정한 일 구현예에 따르면, Y349C/T366S/L368A/Y407V 돌연변이는 1st mAb (예를 들면, 항 DC)에 도입되고 S354C/T366W 돌연변이는 2nd mAb (예를 들면, 항 CD40)에 도입된다 (Merchant et al., 1998; Ridgway et al., 1996).

[0143] 대안적으로는 또는 추가적으로는, 올바른 중쇄 사슬 페어링(pairing)을 위해, 모이어티들 중 적어도 하나는 CrossMab 포맷 (CH1-CL 교환)으로 발현될 수 있다.

[0144] CrossMab 기술의 기초는 올바른 사슬 결합(association)을 가능하게 하는 이중특이적 IgG 항체의 하나의 아암 내의 항체 도메인들의 교차인 반면에, 올바른 중쇄들의 이중이량체화는 상기에 기재된 노-인투-홀 기술 또는 전하 상호작용에 의해 달성될 수 있다. 이는 Fab-단편 내의 상이한 도메인들의 교환에 의해 달성될 수 있다. Fab 도메인들 (CrossMab^{Fab} 포맷으로), 또는 Fab-단편 내의 오직 가변 VH-VL 도메인들 (CrossMab^{VH-VL} 포맷) 또는 불변 CH1-CL 도메인들 (CrossMab^{CH1-CL} 포맷)이 이 목적을 위해 교환될 수 있다. 실제로, CrossMab^{CH1-CL} 포맷의 경우 각각의 원래의 경쇄 및 새로운 VL-CH1 경쇄는 각각의 원래의 중쇄 및 VH-CL 함유 중쇄와 원하지 않은 상호작용을 초래하지 않고, 어떠한 이론적 부산물도 생성될 수 없다. 대조적으로, CrossMab^{Fab} 포맷의 경우 비기능적 1가 항체 (monovalent antibody; MoAb) 및 비기능적 Fab-단편이 생성될 수 있다. 이 부산물들은 크로마토그래피 기술에 의해 제거될 수 있다. CrossMab^{VH-VL} 포맷의 경우 Bence-Jones 단백질들에서 알려진 VL-CH1/VL-CL 도메인 결합을 갖는 원하지 않은 부산물은 VL-CH1 함유 중쇄 및 원래의 변형되지 않은 VL-CL 경쇄 사이에 일어날 수 있다. 야생형 항체 프레임워크에 존재하는 보존된 전하 쌍에 기초한 반발 전하 쌍을 야생형 비-교차 Fab-단편의 불변 CH1 및 CL 도메인들 내에 도입하는 것은 CrossMab^{VH-VL/+}에서 Bence-Jones-유사 부산물을 형성하는 것을 극복할 수 있다. CrossMab 기술에 대한 더 상세한 내용은 Klein et al. Methods 154, 1 February 2019, Pages 21-31c에서 찾을 수 있다.

[0145] 대안적으로는, 본 명세서에 기재된 다중특이적, 예를 들면, 이중특이적 항체들은 당업계에 공지된 방법들을 사용하여 모이어티들을 접합시킴으로써 제조될 수 있다. 예를 들면, 다중특이적 항체의 각 모이어티를 개별적으로 생성한 다음에, 서로 접합할 수 있다. 다양한 커플링 제제 또는 가교결합제가 공유결합 접합을 위해 사용될 수 있다. 가교결합제의 예시는 단백질 A, 카르보이미드, N-석신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트 (SATA), 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산) (DTNB), o-페닐렌디말레이미드 (oPDM), N-석신이미딜-3-(2-피리디리티오)프로피오네이트 (SPDP), 및 설포석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카르복실레이트 (설포-SMCC)를 포함한다 (예를 들면, Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, M A et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:8648 참조). 기타 방법들은 Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83, 및 Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375)에 기재된 방법들을 포함한다. 바람직한 접합제는 SATA 및 설포-SMCC이며, 이들 모두 Pierce Chemical Co. (Rockford, Ill.)로부터 입수가능하다.

[0146] 대안적으로는 또는 추가적으로는, 다중특이적 항체의 각 모이어티의 접합은 2개의 중쇄들의 C-말단 힌지 영역들의 설프히드릴 결합에 의해 수행될 수 있다. 특정한 일 구현예에서, 힌지 영역은 접합 이전에, 홀수 개수의 설프

프히트릴 잔기, 바람직하게는 하나의 설프히트릴 잔기를 함유하도록 변형된다.

- [0147] 특정한 일 구현예에 따르면, 제3 모이어티는 $Fc\gamma RIIb$ 수용체에 대해 향상된 특이도를 부여한다.
- [0148] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 이뮤노글로불린의 Fc 영역에 결합하는 수용체이다. IgG 항체에 결합하는 FcR들은, 대립유전자 변이체(allelic variants) 및 대안적으로는 스플라이싱된 형태를 포함하여 $Fc\gamma R$ 패밀리의 수용체들을 포함한다. $Fc\gamma R$ 패밀리는 3개의 활성화 (마우스에서 $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIII$, 및 $Fc\gamma RIV$; 인간에서 $Fc\gamma RIA$, $Fc\gamma RIIA$, 및 $Fc\gamma RIIIA$) 수용체들 및 1개의 억제성 ($Fc\gamma RIIb$, 또는 동등하게는 $Rc\gamma RIIb$) 수용체로 이루어진다. 인간 $Fc\gamma R$ 의 다양한 특성들은 US20170253659 (및 이의 표 1)에 요약되어 있다.
- [0149] 대부분의 선천적 이펙터 세포 유형들은 하나 이상의 활성화 $Fc\gamma R$ 및 억제성 $Fc\gamma RIIb$ 를 공동-발현하는 반면에, 자연 살해 (NK) 세포들은 선택적으로 하나의 활성화 Fc 수용체 (마우스에서 $Fc\gamma RIII$ 및 인간에서 $Fc\gamma RIIIA$)를 발현하고 마우스 및 인간에서 억제성 $Fc\gamma RIIb$ 를 발현하지 않는다. 인간 IgG1은 대부분의 인간 Fc 수용체들에 결합하고, 결합하는 활성화 Fc 수용체들의 유형들과 관련하여 무린 IgG2a와 동등한 것으로 간주된다.
- [0150] 인간 $Fc\gamma RIIb$ 는 인간 IgG에 낮은 친화도를 갖는다. 앞서 언급한 바와 같이, 수많은 이전의 간행물들은 억제성 $Fc\gamma RIIb$ 의 결합이 마우스 CD40, 및 TNFR 패밀리의 다른 구성원들을 표적화하는 작용제 Ab들의 생체 내 항종양 활성에 절대적 요구사항인 것을 입증하였다. 이는 주위 세포들 상에서 발현된 $Fc\gamma RIIb$ 에 의한 CD40 항체의 고차 가교결합으로 인한 것이다. 이러한 가교결합은 세포 표면 상의 CD40의 클러스터링을 향상시키고 향상된 CD40 신호전달을 초래한다 [6][7].
- [0151] 따라서, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체는 $Fc\gamma RIIb$ 에의 결합의 특이도 및 친화도를 향상시키기 위한 다중특이적 항체의 변형된 Fc 영역을 포함한다.
- [0152] 변형된 (돌연변이체) Fc 영역은 N297A, S267E ("SE"), S267E/L382F ("SELF"), G237D/P238D/P271G/A330R ("V9"), 또는 G237D/P238D/H268D/P271G/A330R ("V11") (서열 번호2), 또는 ("V12")로 이루어진 군으로부터 선택되는 인간 IgG 중쇄 (서열 번호 1)에서의 하나 이상의 돌연변이에 대응하는 하나 이상의 돌연변이를 갖는다.
- [0153] 특정한 일 구현예에 따르면, 변형된 Fc는 V11 돌연변이체이다. 하기의 실시예 섹션에서 나타난 바와 같이, 시험관 내 및 생체 내 실험들은 다중특이적 항체들이 DC들 및 T 세포들을 효과적으로 활성화하기 위해 $Fc\gamma RIIb$ 결합으로부터 이익을 얻는 것을 나타냈다 (도 6a 및 6b).
- [0154] 본 명세서에 기재된 또 다른 측면은 본 명세서에 기재된 항체들을 인코딩하는 핵산 분자들에 관한 것이다. 이 핵산들은 전체 세포에서, 세포 용해물에서, 부분적으로 정제된 형태로 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있다. 핵산은, 알칼린/SDS 처리, CsCl 밴딩(CsCl banding), 컬럼 크로마토그래피, 제한 효소, 아가로스 겔 전기영동 및 당업계에 익히 공지된 다른 기술들을 포함하는 표준 기술들에 의해 다른 세포 구성성분들 또는 기타 오염물질들, 예를 들면, 기타 세포 핵산 (예를 들면, 기타 염색체 DNA, 예를 들면, 자연에서 분리된 DNA와 연결된 염색체 DNA) 또는 단백질로부터 정제되는 경우에, "단리된" 또는 "실질적으로 순수하게 처리된 (rendered substantially pure)" 것이다. F. Ausubel, et al, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York을 참고한다. 본 명세서에 기재된 핵산은 예를 들면, DNA 또는 RNA일 수 있고 인트론 서열들을 함유하거나 함유하지 않을 수 있다. 특정한 일 구현예에서, 핵산은 cDNA 분자이다.
- [0155] 본 명세서에 기재된 핵산들은 표준 분자 생물학 기술들을 사용하여 얻을 수 있다. 하이브리도마 {예를 들면, 추가로 하기에 기술되는 바와 같이 인간 이뮤노글로불린 유전자들을 보유하는 형질전환 마우스로부터 제조된 하이브리도마}에 의해 발현되는 항체들의 경우, 하이브리도마에 의해 만들어진 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 cDNA들은 표준 PCR 증폭 또는 cDNA 클로닝 기술에 의해 얻을 수 있다. 이뮤노글로불린 유전자 라이브러리 {예를 들면, 파지 디스플레이 기술을 사용한}로부터 얻어진 항체들의 경우에, 항체를 인코딩하는 핵산은 이 라이브러리로부터 회수될 수 있다.
- [0156] V_H 및 V_L 세그먼트를 인코딩하는 DNA 단편들이 얻어지면, 이 DNA 단편들은 예를 들면, 가변 영역 유전자들을 전장 항체 서열 유전자들, Fab 단편 유전자들 또는 scFv 유전자로 전환시키는 표준 재조합 DNA 기술들에 의해 추가로 조작될 수 있다. 이 조작들에서, V_L - 또는 V_H - 인코딩 DNA 단편은 또 다른 단백질, 예컨대, 항체 불변 영역 또는 플렉서블 링커(flexible linker)를 인코딩하는 DNA 단편에 작동가능하게 연결된다. 본 맥락에서 사용된 바와 같이, 용어 "작동가능하게 연결된"은 2개의 DNA 단편들이 연결(join)되어 2개의 DNA 단편들에 의해 인코딩되는 아미노산 서열들이 인-프레임으로 남아 있는 것을 의미함을 의도한다.

- [0157] VH 영역을 인코딩하는 단리된 DNA는 VH-인코딩 DNA를 중쇄 불변 영역들 (힌지, CH1, CH2 및/또는 CH3)을 인코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결함으로써 전장 중쇄 유전자로 전환될 수 있다. 인간 중쇄 불변 영역 유전자들의 서열들은 당업계에 공지되어 있고 (예를 들면, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 참조) 이 영역들을 포함하는 DNA 단편들은 표준 PCR 증폭에 의해 얻을 수 있다. 중쇄 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역, 예를 들면, IgG1 영역일 수 있다. Fab 단편 중쇄 유전자의 경우, VH-인코딩 DNA는 중쇄 CH1 불변 영역만을 인코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결될 수 있다.
- [0158] VL 영역을 인코딩하는 단리된 DNA는 VL-인코딩 DNA를 경쇄 불변 영역인 CL을 인코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결함으로써 전장 경쇄 유전자 (및 Fab 경쇄 유전자)로 전환될 수 있다. 인간 경쇄 불변 영역 유전자들의 서열들은 당업계에 공지되어 있고 (예를 들면, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 참조) 이 영역들을 포함하는 DNA 단편들은 표준 PCR 증폭에 의해 얻을 수 있다. 경쇄 불변 영역은 카파(kappa) 또는 람다(lambda) 불변 영역일 수 있다.
- [0159] 다양한 원핵생물 또는 진핵생물 세포들이 본 발명의 일부 구현예의 항체들을 발현시키기 위한 숙주-발현 시스템들로서 사용될 수 있다. 이들은 미생물, 예컨대, 코딩 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아; 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터들로 형질전환된 효모; 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터들 (예를 들면, 콜리플라워모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염되거나 코딩 서열을 함유하는 Ti 플라스미드와 같은 재조합 플라스미드 발현 벡터들로 형질전환된, 식물 세포 시스템들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 포유동물 발현 시스템들 또한 본 발명의 일부 구현예의 항체들을 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 배양물에서 발현 조건은 사용된 발현 시스템에 따라 달라진다.
- [0160] 배양물로부터 항체를 회수하는 것은 배양물에서 적절한 시간 후에 수행된다. 어구 "재조합 항체를 회수하는 것"은 상기 항체를 함유하는 전체 발효 배지를 수집하는 것을 지칭하고 분리 또는 정제의 추가 단계를 암시할 필요는 없다. 상기에도 불구하고, 본 발명의 일부 구현예의 항체들은 다양한 단백질 정제 기술들, 예컨대, 제한 없이, 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 여과, 전기영동, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 콘카발린 A 크로마토그래피, 크로마토포커싱(chromatofocusing) 및 차등 가용화(differential solubilization)를 사용하여 정제될 수 있다.
- [0161] 본 명세서에 기재된 항체들, 항체 조성물들 및 방법들은 예를 들면, CD40 신호전달을 작동시킴으로써 면역 반응을 향상시키는 것을 포함하여, 수많은 시험관 내 및 생체 내 유용성을 가진다. 바람직한 일 구현예에서, 본 명세서에 기재된 항체들은 인간 항체 또는 인간화된 항체이다. 예를 들면, 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들은 다양한 질병에서 면역성을 향상시키기 위해, 배양물 내, 시험관 내 또는 생체 외(ex vivo), 또는 인간 대상체, 예를 들면, 생체 내에서, 배양물의 세포들에 투여될 수 있다.
- [0162] 따라서, 대상체에서 면역 반응을 변형시키기 위한 방법들이 제공되는데, 상기 방법들은 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체를 대상체에 투여하여, 대상체에서 면역 반응이 향상, 자극 또는 상향 조절되는 것을 포함한다.
- [0163] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대상체"는 포유동물, 예컨대, 질환, 예를 들면 암, 만성 바이러스 감염을 앓고 있는 임의의 연령의 인간을 포함한다. 특정한 일 구현예에 따르면, 이 용어는 질환이 발생될 위험이 있는 개체들을 포함한다.
- [0164] 특정한 일 구현예에 따르면, 상기 대상체는 면역 반응의 향상이 바람직한 인간 환자를 포함한다. 상기 방법들은 면역 반응 (예를 들면, T 세포 매개 면역 반응)을 강화함으로써 치료될 수 있는 질환을 갖는 인간 환자들을 치료하는데 특히 적합하다. 특정한 일 구현예에서, 상기 방법들은 암 치료에 특히 적합하다. 항원 특이적 면역 향상을 달성하기 위해, 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들은 관심 항원과 함께 투여되거나 항원은 치료될 대상체 (예를 들면, 종양-보유 대상체 또는 바이러스-보유 대상체)에 이미 존재할 수 있다. CD40에 대한 항체들이 또 다른 제제와 함께 투여되는 경우, 이 둘은 별도로 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [0165] 대상체에서 면역 반응 (예를 들면, T 세포 매개 항 종양 면역)을 향상시키는 방법들이 추가로 포함되는데, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들을 대상체에 투여하여 대상체에서 면역 반응이 향상되는 것을 포함한다. 바람직한 일 구현예에서, 상기 대상체는 종양-보유 대상체이고 종양에 대한 면역 반응이 향상된다. 종

양은 고형 종양 또는 액체 종양, 예를 들면, 혈액 악성 종양일 수 있다. 특정한 구현예들에서, 상기 종양은 면역원성 종양이다. 특정한 구현예들에서, 종양은 비-면역원성이다. 특정한 구현예들에서, 종양은 PD-L1 양성이다. 특정한 구현예들에서 종양은 PD-L1 음성이다. 대상체는 또한 바이러스-보유 대상체일 수 있고 바이러스에 대한 면역 반응이 향상된다.

[0166] 대상체에서 종양 세포의 성장을 억제하는 방법이 추가로 제공되는데, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들을 대상체에 투여하여 대상체에서 종양의 성장이 억제되는 것을 포함한다. 대상체에서 만성 바이러스 감염을 치료하는 방법 또한 제공되는데, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들을 대상체에 투여하여 대상체에서 만성 바이러스 감염이 치료되는 것을 포함한다.

[0167] 특정한 구현예에서, 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들은 보조 요법(adjunctive therapy)으로 대상체에 제공된다. 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들로 암을 갖는 대상체를 치료하는 것은 현재의 의료 표준(standard of care)에 비해 장기간 지속가능한 반응으로서; 적어도 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 10년 또는 그 이상의 장기간의 생존, 적어도 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 또는 10년 또는 그 이상의 무재발 생존으로 이어질 수 있다. 특정한 구현예에서, 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들로 암을 갖는 대상체를 치료하는 것은 예를 들면, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 또는 10년 또는 그 이상으로 암의 재발을 예방하거나 암의 재발을 지연한다. 항-CD40 치료는 1차 치료 또는 2차 치료로 사용될 수 있다.

[0168] 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법들이 본 명세서에 제공되는데, 상기 방법들은 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들을 대상체에 투여하여, 대상체가 치료되는 것, 예를 들면, 암성 종양이 억제 또는 감소되는 것 및/또는 종양이 퇴행하는 것을 포함한다. 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들은 암성 종양의 성장을 억제하기 위해 단독으로 사용될 수 있다. 대안적으로는, 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들은 또 다른 제제, 예를 들면, 하기에 기재된 다른 면역원성 제제, 표준 암 치료제, 또는 다른 항체들과 함께 사용될 수 있다.

[0169] 따라서, 대상체에서 예를 들면, 종양 세포의 성장을 억제함으로써 암을 치료하는 방법들이 본 명세서에 제공되는데, 상기 방법들은 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들의 치료적 유효량을 대상체에 투여하는 것을 포함한다.

[0170] 본 발명의 항체들을 사용하여 성장이 억제될 수 있는 암들은 면역요법에 반응성이 있는 암들을 포함한다. 치료를 위한 암들의 비제한적 예는 편평 세포 암종, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 편평 비소세포 폐암 (NSCLC), 비 NSCLC, 신경교종, 소화기암, 신장암 (예를 들면, 투명 세포 암종), 난소암, 간암, 결장직장암, 자궁내막암, 신장암 (예를 들면, 신장 세포 암종 (RCC)), 전립선암 (예를 들면, 호르몬 불응성 전립선암), 갑상선암, 신경모세포종, 췌장암, 교모세포종 (다형성 교모세포종), 자궁경부암, 위암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장 암종, 및 두경부암 (또는 암종), 위암, 생식 세포 종양, 소아 육종, 비부비동 자연살해자(sinonasal natural killer), 흑색종 (예를 들면, 전이성 악성 흑색종, 예컨대, 피부 악성 흑색종 또는 안구내 악성 흑색종), 골암, 피부암, 자궁암, 항문 부위의 암, 고환암, 나팔관의 암종, 자궁내막의 암종, 자궁경부의 암종, 질의 암종, 외음부의 암종, 식도의 암, 소장암, 내분비계의 암, 부갑상선의 암, 부신의 암, 연조직의 육종, 요도의 암, 음경의 암, 소아의 고형 종양, 요관의 암, 신우의 암종, 중추신경계의 신생물 (CNS), 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 척수 종양(spinal axis tumor), 뇌간 교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 표피암(epidermoid cancer), 편평 세포암, T-세포 림프종, 식면에 의해 유도된 암들을 포함하는 환경적으로 유도된 암들, 바이러스-관련 암들 (예를 들면, 인간 유두종 바이러스 (HPV)-관련 종양), 및 2개의 주요 혈액 세포 계통들, 즉, 골수 세포주 (과립구, 적혈구, 혈소판, 대식세포 및 비만 세포를 생산) 또는 림프 세포주 (B, T, NK 및 형질 세포를 생산) 중 어느 하나로부터 유래한 혈액 악성 종양들, 예컨대, 백혈병, 림프종 및 골수종의 모든 유형들, 예를 들면, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 림프구 백혈병 및/또는 골수성 백혈병들, 예컨대, 급성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 림프구 백혈병 (CLL), 및 만성 골수성 백혈병 (CML), 미분화 AML (M0), 골수아세포 백혈병 (M1), 골수아세포 백혈병 (M2; 세포 성숙), 전골수성 백혈병 (M3 또는 M3 변이체 [M3V]), 골수단핵구 백혈병 (M4 또는 호산구 증가증을 갖는 M4 [M4E]), 단핵구 백혈병 (M5), 적백혈병 (M6), 거대아구 백혈병 (M7), 단독 과립구 육종(isolated granulocytic sarcoma), 및 녹색종; 림프종들, 예컨대, 호지킨 림프종 (HL), 비-호지킨 림프종 (NHL), B-세포 림프종들, T-세포 림프종들, 림프형질세포 림프종, 단핵구성 B-세포 림프종, 점막-연관 림프 조직(mucosa-associated lymphoid tissue; MALT) 림프종, 역형성 (예를 들면, Ki 1+) 거대-세포 림프종, 성인 T-세포 림프종/백혈병, 맨틀 세포 림프종, 혈관 면역모세포 T-세포 림프종, 혈관중심성 림프종, 장 T-세포 림프종, 원발성 종격동 B-세포 림프종, 전구 T-림프모구 림프종, T-림프모구 림프종; 및 림프종/백혈병 (T-Lbly/T-ALL), 말초 T-세포 림프종, 림프모구 림프종, 이식 후 림프증식성 질환, 진성 조직구성 림프종(true histiocytic lymphoma), 원발성 중추 신경계 림프종, 원발성 삼출 림프종, 림프모구 림프종 (LBL), 림프 계통의

조혈모세포 종양, 급성 림프모구 백혈병, 미만성 거대 B-세포 림프종, 버킷 림프종, 여포 림프종, 미만성 조직구성 림프종 (DHL), 면역모세포성 거대 세포 림프종, 전구 B-림프모구 림프종, 피부 T-세포 림프종 (CTLC) (균상식육종 또는 세자리 증후군(Sezary syndrome)으로도 불림), 및 발덴스트롬 거대글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia)을 갖는 림프형질세포 림프종 (LPL); 골수종들, 예컨대, IgG 골수종, 경쇄 골수종, 비분비성 골수종, 무증상 골수종(smoldering myeloma) (무증상 골수종(indolent myeloma)으로도 불림), 고립성 형질세포종, 및 다발성 골수종들, 만성 림프구 백혈병 (CLL), 털세포 림프종; 골수 계통의 조혈모세포 종양, 섬유육종 및 횡문근육종을 포함하는 간엽 기원의 종양들; 정상피종, 기형암종, 성상세포종 및 신경초종을 포함하는 중추신경 및 말초 신경의 종양들; 섬유육종, 횡문근육종, 및 골육종을 포함하는 간엽 기원의 종양들; 및 흑색종, 색소성 건피증, 정상피종, 갑상선 여포암(thyroid follicular cancer) 및 기형암종, 림프 계통의 조혈모세포 종양들, 예를 들면, 소세포형 및 대뇌양(cerebriform) 세포형 T-전립모구성 백혈병 (T-PLL)과 같은 T-세포 질환들을 포함하나, 이에 제한되지 않는 T-세포 및 B-세포 종양들을 포함하는, 기타 종양들을 포함하는, 기타 종양들; 바람직하게는, T-세포형의 거대 과립 백혈구 백혈병 (LGL); a/d T-NHL 간비장 림프종; 말초/후-흉선 T 세포 림프종(다형성 아형 및 면역모세포 아형); 혈관중심성 (비강) T-세포 림프종; 두부 또는 경부(head or neck)의 암, 신장암, 직장암, 갑상선의 암; 급성 골수성 림프종, 및 상기 암들의 임의의 조합들을 포함한다. 본 명세서에 기재된 방법들은 또한 전이성 암, 불응성 암들 (예를 들면, 이전의 면역 요법들, 예를 들어, 차단 CTLA-4 또는 PD-1 항체를 이용한 면역요법에 불응성인 암들), 및 재발성 암들의 치료에 사용될 수 있다.

[0171] 특정한 일 구현예에 따르면, 암은: 방광암, 유방암, 자궁/자궁경부암, 난소암, 전립선암, 고환암, 식도암, 소화기암, 췌장암, 결장직장암, 결장암, 신장암, 두경부암, 폐암, 위암, 생식세포암, 골암, 간암, 갑상선암, 피부암, 중추신경계의 신생물, 림프종, 백혈병, 골수종, 육종, 및 바이러스-관련 암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0172] 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들은 단일 요법으로서, 또는 오직 면역자극 요법으로서 투여될 수 있고, 또는 암 백신 전략의 면역원성 제제, 예컨대, 암성 세포들, 정제된 종양 항원들 (제조합 단백질, 펩티드, 및 탄수화물 분자를 포함함), 세포들, 및 면역 자극 사이토카인들을 인코딩하는 유전자들로 형질감염된 세포들과 병용될 수 있다 (He et al. (2004) J. Immunol. 173:4919-28). 사용될 수 있는 종양 백신들의 비제한적인 예시는 흑색종 항원 펩티드들, 예컨대, gp100, MAGE 항원들, Trp-2, MART1 및/또는 티로시나제 펩티드, 또는 사이토카인 GM-CSF를 발현하도록 형질감염된 종양 세포들을 포함한다. 종양에 대한 백신화를 위한 많은 실험적 전략들이 고안되었다 (Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; see also Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita et al. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition 참고). 이 전략들 중 하나에서, 백신은 자가 종양 세포(autologous tumor cell) 또는 동종 종양 세포(allogeneic tumor cell)를 사용하여 제조되었다. 이 세포 백신들은 종양 세포들이 GM-CSF를 발현하도록 형질도입될 때 가장 효과적인 것으로 나타났다. GM-CSF는 종양 백신화를 위한 항원 제시의 강력한 활성화제인 것으로 나타났다. Dranoff et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90: 3539-43.

[0173] 다른 종양 백신들은 인간 암들과 관련된 바이러스의 단백질들, 예컨대, 인간 유두종 바이러스들 (HPV), 간염바이러스들 (HBV 및 HC) 및 카포시 헤르페스 육종 바이러스 (KHSV)를 포함할 수 있다. CD40 활성화와 함께 사용될 수 있는 종양 특이적 항원의 또 다른 형태는 종양 조직 자체에서 단리된 정제된 열 충격 단백질(heat shock protein; HSP)들이다. 이 열 충격 단백질들은 종양 세포들의 단백질 단편들을 함유하고 이 HSP들은 종양 면역을 유도하기 위해 항원 제시 세포로 전달하는데 매우 효율적이다 (Suot & Srivastava (1995) Science 269:1585-1588; Tamura et al. (1997) Science 278:117-120).

[0174] 수지상 세포들 (DC)은 항원-특이적 반응을 프라이밍(priming)하는데 사용될 수 있는 강력한 항원 제시 세포들이다. DC들은 생체 외(ex vivo)에서 제조되고 다양한 단백질 및 펩티드 항원들 및 종양 세포 추출물이 로딩될 수 있다 (Nestle et al. (1998) Nature Medicine 4: 328-332). DC들은 또한 이러한 종양 항원들을 발현하기 위해 유전적 수단들에 의해 형질도입될 수 있다. DC들은 또한 면역화의 목적으로 종양 세포들에 직접 융합되었다 (Kugler et al. (2000) Nature Medicine 6:332-336). 백신화 방법으로서, DC 면역화는 CD40 작용(agonism)과 효과적으로 조합되어 더 강력한 항-종양 반응을 활성화(촉발)시킬 수 있다. 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들은 표준 암 치료들 (예를 들면, 수술, 방사선, 및 화학요법)과 조합될 수 있다. CD40의 작용은 화학치료 요법과 더 효과적으로 조합될 수 있다. 이러한 경우, 이는 투여되는 화학요법제의 용량을 감소시킬 수 있다

(Mokyr et al. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304). 이러한 조합의 예시는 흑색종 치료를 위한 데카르바진(dacarbazine)과 조합된 항-huCD40 항체이다. 이러한 조합의 또 다른 예시는 흑색종 치료를 위한 인터류킨-2(IL-2)와 조합된 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들이다. CD40 작용제와 화학요법의 병용 사용에 대한 과학적 원리는 대부분의 화학요법 화합물의 세포독성 작용의 결과인 세포 사멸이, 항원 제시 경로에서 종양 항원의 증가된 수준을 일으켜야 한다는 것이다. 세포 사멸을 통해 CD40 작용제와 상승작용을 일으킬 수 있는 다른 병용요법은 방사선, 수술, 및 호르몬 차단(hormone deprivation)이다. 각각의 이러한 프로토콜은 숙주에서 종양 항원의 공급원을 생성한다. 혈관신생 억제제는 CD40 작용제와 조합될 수 있다. 혈관신생의 억제는 종양 세포의 사멸로 이어져 숙주 항원 제시 경로에 종양 항원을 공급할 수 있다.

[0175] 종양들은 매우 다양한 메커니즘으로 숙주 면역 감시를 회피한다. 많은 이러한 메커니즘들은 종양들에 의해 발현된 면역억제성 단백질들의 불활성화에 의해 극복될 수 있다. 여기에는 TGF- β , (Kehrl et al. (1986) J. Exp. Med. 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) Immunology Today 13: 198-200), 및 Fas 리간드 (Hahne et al. (1996) Science 274: 1363-1365)가 포함된다. 이 엔티티(entity)들 각각에 대한 항체들은 면역억제제의 효과를 상쇄하고 숙주에 의한 종양 면역 반응을 선호시키기 위해 항-huCD40 항체들과 조합하여 사용될 수 있다.

[0176] 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들은 T 세포 도움 활성(helper activity)을 효과적으로 대체할 수 있다. Ridge et al. (1998) Nature 393: 474-478, CTLA-4 (예를 들면, U.S. Pat. No. 5,811,097), OX-40 (Weinberg et al. (2000) Immunol 164: 2160-2169), CD137/4-1BB (Melero et al. (1997) Nature Medicine 3: 682-685 (1997), 및 ICOS (Hutloff et al. (1999) Nature 397: 262-266)와 같은 T 세포 공동자극 분자들에 대한 항체들을 활성화시키는 것은 또한 증가된 수준의 T 세포 활성화를 제공할 수 있다. PD1 또는 PD-L1의 억제제들이 또한 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들과 함께 사용될 수 있다.

[0177] 또한, 종양에 대한 항원 특이적 T 세포를 자극하기 위한 항원 특이적 T 세포의 생체 외 활성화 및 항원 특이적 T 세포들의 확장(expansion) 및 이 세포들의 수용자들로의 입양 전달(adoptive transfer)을 포함하는 여러 개의 실험적 치료 프로토콜이 있다 (Greenberg & Riddell (1999) Science 285: 546-551). 이 방법들은 또한 CMV와 같은 감염성 제제에 대한 T 세포 반응을 활성화하기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들의 존재 하에서 생체 외 활성화는 입양적으로 전달된 T 세포의 빈도 및 활성을 증가시킬 수 있다.

[0178] 또 다른 측면에서, 본 명세서에 기재된 발명은 대상체에서 감염성 질병을 치료하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들을 대상체에 투여하여, 대상체가 감염성 질병으로부터 치료되는 것을 포함한다.

[0179] 상기 논의된 종양에 대한 이의 적용과 유사하게, 항체-매개 CD40 작용은 단독으로, 또는 아쥬반트(adjuvant)로서 다른 백신과 조합하여 사용되어 병원체, 독소, 및 자가-항원에 대한 면역 반응을 향상시킬 수 있다. 이 치료적 접근이 특히 유용할 수 있는 병원체의 예시는, 현재 효과적인 백신이 없는 병원체, 또는 기존의 백신이 완전히 효과적이지 않은 병원체를 포함한다. 이 병원체는, HIV, 간염 (A, B, & C), 인플루엔자, 헤르페스, 편모충, 말라리아, 리슈마니아(Leishmania), 황색포도상 구균(Staphylococcus aureus), 녹농균(Pseudomonas aeruginosa)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. CD40 작용은 감염 과정에 걸쳐 변경된 항원을 제시하는 HIV와 같은 인자에 의한 확립된 감염에 특히 유용하다. 이 신규한 에피토프들은 항-인간 CD40 항체 투여시 외래물질로 인식되어, 강력한 T 세포 반응을 유발한다.

[0180] 본 명세서에 기재된 방법들에 의해 치료가 가능한 감염을 유발하는 병원성 바이러스들의 일부 예시는 HIV, 간염 바이러스(A, B, 또는 C), 헤르페스 바이러스 (예를 들면, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, 및 CMV, 엡스타인 바(Epstein Barr) 바이러스), 아데노바이러스, 인플루엔자 바이러스, 플라비바이러스들, 에코바이러스, 리노바이러스, 콕사키바이러스, 코로나바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 메르스 바이러스, 로타바이러스, 홍역 바이러스, 루벨라 바이러스, 파르보바이러스, 백시니아 바이러스, HTLV 바이러스, 뎅기 바이러스, 유두종바이러스, 몰로스크 바이러스(molluscum virus), 폴리오바이러스, 광견병 바이러스, JC 바이러스 및 아르보바이러스성 뇌염 바이러스를 포함한다.

[0181] 본 명세서에 기재된 방법들에 의해 치료가 가능한 병원성 박테리아의 일부 예시는 클라미디아(chlamydia), 리케차균(rickettsial bacteria), 미코박테리아, 포도상구균, 연쇄상구균, 폐렴구균, 수막염균 및 임질구균, 클렙시엘라(klebsiella)균, 프로테우스(proteus)균, 세라티아(serratia)균, 뉴모나스균, 레지오넬라(legionella)균, 디프테리아균, 살모넬라균, 간균, 콜레라균, 파상풍균(tetanus), 보툴리즘(botulism)균, 탄저균, 페스트(plague)균, 렙토스피라균(leptospirosis), 및 라임병(Lyme disease)균을 포함한다.

- [0182] 본 명세서에 기재된 방법들에 의해 치료가능한, 감염을 유발하는 병원성 진균의 일부 예시는 칸디다 (알비칸스, 크루세이, 글라브라타, 트로피칼리스 등), 크립토코커스 네오포르만스, 아스페르길루스 (푸미가투스 (fumigatus), 니제르 등), 털곰팡이속(Genus Mucorales) (무코르, 압시디아, 리조푸스), 스포로트릭스 쉐키 (Sporothrix schenckii), 블라스토마이세스 데르마티티디스(Blastomyces dermatitidis), 파라코시디오이디스 브라질리엔시스(Paracoccidioides brasiliensis), 콕시디오이데스 이미티스(Coccidioides immitis) 및 히스토플라즈마 캡슐라툼(Histoplasma capsulatum)을 포함한다.
- [0183] 본 명세서에 기재된 방법들에 의해 치료가능한 감염을 일으키는 병원성 기생충의 일부 예시는 엔트아메바 히스톨리카(Entamoeba histolytica), 발란티디움 콜리(Balantidium coli), 나에글레리아포울레리(Naegleria fowleri), 아칸타모에바속(Acanthamoeba sp.), 지아르디아 잠비아(Giardia Zambia), 크립토스포리디움속(Cryptosporidium sp.), 뉴모시스티스 카리니(Pneumocystis carinii), 플라스모디움 비박스(Plasmodium vivax), 바베시아 미크로티(Babesia microti), 트리파노소마 브루세이(Trypanosoma brucei), 트리파노소마 크루지(Trypanosoma cruzi), 리슈마니아 도노바니(Leishmania donovani), 톡소플라즈마 곤디(Toxoplasma gondii), 니포스트롱길루스 브라질리엔시스 (Nippostrongylus brasiliensis)를 포함한다.
- [0184] 상기 방법들 모두에서, CD40 작용은 다른 형태의 면역 요법, 예컨대, 사이토카인 치료 (예를 들면, 인터페론, GM-CSF, G-CSF, IL-2), 또는 중앙항원의 향상된 제시를 제공하는 이중특이적 항체 요법과 조합될 수 있다. 예를 들면, Holliger (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90:6444-6448; Poljak (1994) Structure 2:1121-1123 참고.
- [0185] 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들은, 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체 및 관심 항원, 예를 들면, 백신의 공동-투여에 의해 항원-특이적 면역 반응을 향상시키기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 대상체에서 항원에 대한 면역 반응을 향상시키는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은: (i) 항원; 및 (ii) 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들을 대상체에 투여하여, 대상체에서 항원에 대한 면역 반응이 향상되는 것을 포함한다. 항원은, 예를 들면, 중앙 항원, 바이러스 항원, 박테리아 항원 또는 병원체의 항원일 수 있다. 이러한 항원들의 비제한적인 예시는, 상기에서 논의된 중앙 항원들 (또는 중앙 백신들), 상기 기재된 바이러스들, 박테리아 또는 다른 병원체의 항원들과 같은, 상기 섹션에서 논의된 항원들을 포함한다.
- [0186] 앞서 기재된 바와 같이, 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들은 하나 이상의 다른 치료제, 예를 들면, 세포독성제, 방사성독성제(radiotoxic agent)와 공동-투여될 수 있다. 항체는 상기 제제와 연결되거나 (면역-복합체로서) 상기 제제와 별개로 투여될 수 있다. 후자의 경우에 (별개 투여), 항체는 제제가 투여되기 이전, 이후 또는 동시에 투여될 수 있고 또는 다른 공지된 요법제, 예를 들면, 항암 요법제, 예를 들면 방사선 요법제와 공동-투여될 수 있다. 이러한 치료제는, 항신생물제, 예컨대, 독소루비신 (아드리아마이신), 시스플라틴 블레오마이신 설페이트(cisplatin bleomycin sulfate), 카르무스틴, 클로람부실, 다카르바진 및 사이클로포스파미드 하이드록시우레아 등을 포함하며, 이들은 그 자체로 환자에게 독성 또는 아독성(subtoxic)인 수준에서만 효과적이다. 시스플라틴은 4주마다 1 번 100 mg/ml 용량으로 정맥내 투여되고 아드리아마이신은 21일마다 1 번 60 내지 75 mg/ml 용량으로 정맥내 투여된다. 본 명세서에 기재된 다중특이적 항체들 및 화학요법제의 공동-투여는 인간 중앙 세포에서 상이한 메커니즘을 통해 작동하는 2개의 항암제를 제공한다. 이러한 공동 투여는 약물에 대한 내성의 발달 또는 항체와 반응하지 않게 만드는 중앙 세포의 항원성의 변화로 인한 문제들을 해결할 수 있다.
- [0187] 다중특이적 항체 ("다중특이적 항체들"의 복수 형태로도 지칭됨)는 대상체에 그 자체(per se)로 제공되거나, 적합한 담체 또는 부형제와 혼합된 약제학적 조성물로 제공될 수 있다.
- [0188] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "약제학적 조성물"은 생리학적으로 적합한 담체 및 부형제와 같은 다른 화학적 구성성분들과 본 명세서에 기재된 활성 성분들 중 하나 이상의 제제를 지칭한다. 약제학적 조성물의 목적은 유기체로 화합물의 투여를 용이하게 하기 위함이다.
- [0189] 본 명세서에서, 용어 "활성 성분"은 생물학적 효과에 책임이 있는 다중특이적 항체를 지칭한다.
- [0190] 이하에서, 상호교환적으로 사용될 수 있는 어구 "생리학적으로 허용가능함 담체" 및 "약제학적으로 허용가능한 담체"는 유기체에 상당한 자극을 일으키지 않고 투여되는 화합물의 생물학적 활성 및 성질을 폐기하지 않는 담체 또는 희석제를 지칭한다. 이 어구들에 아드juvant(adjuvant)가 포함된다.
- [0191] 본 명세서에서, 용어 "부형제"는 활성 성분의 투여를 더 용이하게 하기 위해 약제학적 조성물에 첨가되는 불활성 물질을 지칭한다. 부형제의 예시는, 제한 없이, 탄산 칼슘, 인산 칼슘, 다양한 당류 및 다양한 유형의 전분,

셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 식물성 오일 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.

- [0192] 약물의 제형화 및 투여를 위한 기술들은 "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition에서 확인할 수 있고, 이는 참조로 본 명세서에 포함된다.
- [0193] 적합한 투여 경로는, 예를 들면, 경구, 직장, 경점막, 특히 경비강(transnasal), 장내 또는 비경구 전달을 포함하며, 근육내, 피하 및 연수내 주사, 및 척수강내, 직접적인 심실내, 심장내, 예를 들면, 우심실강내 또는 좌심실강내, 총관상동맥(common coronary artery)내, 정맥내, 복강내, 비강내, 또는 안구내 주사를 포함한다.
- [0194] 중추 신경계 (CNS)로의 약물 전달을 위한 기존의 접근은 하기를 포함한다: 신경외과 전략 (예를 들면, 뇌내 주사 또는 뇌실내 주입); BBB의 내인성 수송 경로들 중 하나를 이용하는 시도에서 제제의 분자적 조작 (예를 들면, 그 자체로 BBB를 통과할 수 있는 제제와 조합한 내피 세포 표면 분자에 대한 친화도를 갖는 수송 단백질을 포함하는 키메라 융합 단백질의 제조); 제제의 지질 용해도를 증가시키기 위해 설계된 약리학적 제제 (예를 들면, 지질 또는 콜레스테롤 담체에의 수용성 제제의 접합); 및 고삼투압 파괴 (경동맥으로의 만니톨 용액의 주입 또는 안지오텐신 펩티드와 같은 생물학적 활성 제제의 사용으로부터 일어남)에 의한 BBB의 온전성의 일시적인 파괴. 하지만, 이러한 전략들 각각은, 예를 들면, 침습 수술 절차와 관련된 내재적 위험, 내인성 수송 시스템의 고유한 제한에 의해 부과되는 크기 제한, CNS의 외부에서 활성이 있을 수 있는 담체 모티프가 포함된 키메라 분자의 전신 투여와 관련된 잠재적으로 바람직하지 않은 생물학적 부작용, 및 BBB가 파괴된 뇌 영역 내의 가능한 뇌 손상 위험이라는 한계를 가지므로, 최적이 아닌 전달 방법이다.
- [0195] 대안적으로는, 예를 들면, 직접 환자의 조직 영역 내로 약제학적 조성물을 주사하는 것을 통해, 약제학적 조성물을 전신적 방법이 아닌 국소적 방식으로 투여할 수 있다.
- [0196] 본 발명의 일부 구현예의 약제학적 조성물은 당업계에 익히 공지된 과정, 예를 들면, 기존의 혼합, 용해, 과립화, 드라제-제조, 분쇄(levigating), 유화, 캡슐화, 포획(entrapping) 또는 동결건조 과정에 의해 제조될 수 있다.
- [0197] 따라서, 본 발명의 일부 구현예에 따라 사용하기 위한 약제학적 조성물은 약제학적으로 사용될 수 있는, 제제 내 활성 성분의 가공을 용이하게 하는 부형제 및 보조제를 포함하는 하나 이상의 생리학적으로 허용가능한 담체를 사용하여, 기존의 방식으로 제형화될 수 있다. 적절한 제형은 선택된 투여 경로에 따라 달라진다.
- [0198] 주사를 위해, 약제학적 조성물의 활성 성분은 수성 용액, 바람직하게는, Hank 용액, Ringer 용액, 또는 생리학적 염 완충액과 같은 생리학적으로 양립가능한 완충액으로 제형화될 수 있다. 경점막 투여의 경우, 침투될 장벽에 적절한 침투제가 제형에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 당업계에 공지되어 있다.
- [0199] 경구 투여를 위해, 약제학적 조성물은 활성 성분을 당업계에 익히 공지된 담체와 조합함으로써 쉽게 제형화할 수 있다. 이러한 담체는 약제학적 조성물을 정제, 환제, 드라제, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁액 등으로 제형화하여 환자에 의한 경구 섭취를 가능하게 한다. 경구용 약리학적 제제는 고형 부형제를 사용하여 만들 수 있으며, 선택적으로는 생성된 혼합물을 분쇄하고, 원하는 경우 적합한 보조제를 첨가한 후, 과립 혼합물을 가공하여 정제 또는 드라제 코어를 얻을 수 있다. 적합한 부형제는, 특히, 충전제, 예컨대, 락토오스, 수크로스, 만니톨, 또는 소르비톨; 셀룰로오스 제제, 예컨대, 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 트라가칸트 검(gum tragacanth), 메틸 셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스; 및/또는 생리학적으로 허용가능한 폴리머, 예컨대, 폴리비닐피롤리돈 (PVP)이다. 원하는 경우, 붕해제, 예컨대, 가교결합 폴리비닐 피롤리돈, 아가, 또는 알긴산 또는 알긴산 나트륨과 같은 알긴산염이 첨가될 수 있다.
- [0200] 드라제(Dragee cores)에 적합한 코팅이 제공된다. 이를 위해, 선택적으로 아라비아 검, 탈크, 폴리비닐 피롤리돈, 카르복시 젤, 폴리에틸렌 글리콜, 이산화 티타늄, 농축된 당 용액, 라카 용액(lacquer solution) 및 적합한 유기 용매 또는 용매 혼합물을 함유할 수 있는 농축된 당 용액들이 사용될 수 있다. 상이한 조합의 활성 화합물 용량을 확인하거나 특성화하기 위해 염료 또는 안료가 첨가될 수 있다.
- [0201] 경구적으로 사용될 수 있는 약제학적 조성물은 젤라틴으로 만들어진 푸쉬-핏 캡슐(push-fit capsule), 및 젤라틴 및 가소제(plasticizer), 예컨대, 글리세롤 또는 소르비톨로 만들어진 연질(soft) 밀봉 캡슐을 포함한다. 푸쉬-핏 캡슐은, 락토오스와 같은 충전제, 전분과 같은 결합제, 탈크 또는 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제, 및 선택적으로는, 안정화제와 혼합된 활성 성분을 함유할 수 있다. 연질 캡슐에서, 활성 성분은 적합한 액체, 예컨대, 지방 오일, 액체 파라핀, 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜에 용해되거나 현탁될 수 있다. 또한, 안정화제가 첨가될 수 있다. 모든 경구 투여용 제형들은 선택된 투여 경로에 적합한 투여량이어야 한다.

- [0202] 협측 투여의 경우, 조성물은 기존의 방식으로 정제 또는 로렌지의 형태를 취할 수 있다.
- [0203] 비강 흡입에 의한 투여의 경우, 본 발명의 일부 구현예에 따라 사용하기 위한 활성 성분들은 적절한 추진제, 예를 들면, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로-테트라플루오로에탄 또는 이산화탄소를 사용하여 가압 팩(pressurized pack) 또는 네블라이저로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달된다. 가압 에어로졸의 경우에, 투여 단위는 계량화된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 예를 들면, 디스펜서에 사용하기 위한 젤라틴의 캡슐 및 카트리지는 화합물 및 락토오스 또는 전분과 같은 적합한 분말 베이스의 분말 믹스를 함유하여 제형화될 수 있다.
- [0204] 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 예를 들면, 일시 주사(bolus injection) 또는 연속 주입에 의해 경구 투여용으로 제형화될 수 있다. 주사용 제형은 단일 투여 형태, 예를 들면, 앰플, 또는 선택적으로 첨가된 보존제와 함께 다중투여 용기로 제공될 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 에멀전일 수 있고, 현탁액, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화 제제를 함유할 수 있다.
- [0205] 비경구 투여용 약제학적 조성물은 수용성 형태의 활성 제제의 수성 용액을 포함한다. 추가적으로, 활성 성분의 현탁액은 적절한 유성 또는 수성 주사 현탁액으로 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클은 참깨 오일과 같은 지방 오일, 또는 에틸 올레이트, 트리글리세라이드 또는 리포솜과 같은 합성 지방산 에스터를 포함한다. 수성 주사 현탁액은 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 소르비톨 또는 텍스트란과 같은, 현탁액의 점성을 증가시키는 물질들을 포함할 수 있다. 선택적으로, 현탁액은 또한 고농축 용액의 제조를 가능하게 하는 활성 성분의 용해도를 증가시키는 적합한 안정화제 또는 제제를 함유할 수 있다.
- [0206] 대안적으로는, 활성 성분은 사용 전에, 적합한 비히클, 예를 들면, 멸균 발열원 제거수(pyrogen-free water) 기반의 용액과 구성하기 위한 분말 형태로 있을 수 있다.
- [0207] 본 발명의 일부 구현예의 약제학적 조성물은 또한 예를 들면, 코코아 버터 또는 기타 글리세라이드와 같은 기존의 좌약 베이스(suppository base)를 사용하여 좌약 또는 정제 관장과 같은 직장 조성물(rectal composition)로서 제형화될 수 있다.
- [0208] 본 발명의 일부 구현예의 맥락에서 사용하기에 적합한 약제학적 조성물은 활성 성분들이 의도된 목적을 달성하기에 효과적인 양으로 함유된 조성물들을 포함한다. 보다 구체적으로는, 치료적 유효량은 질환 (예를 들면, 암)의 증상을 예방, 완화 또는 악화하거나, 치료되는 대상체의 생존을 연장시키기에 효과적인 활성 성분들 (다중특이적 항체)의 양을 의미한다.
- [0209] 치료적 유효량의 결정은, 특히 본 명세서에 제공된 상세한 개시에 비추어 당업자의 능력 범위 내에 있다.
- [0210] 본 발명의 방법에 사용되는 임의의 제제에 대해, 치료적 유효량 또는 유효 용량은 시험관 내(in vitro)에서 및 세포 배양 검정으로부터 초기에 추정될 수 있다. 예를 들면, 원하는 농도 또는 역가를 달성하기 위해 동물 모델에서 용량이 공식화될 수 있다. 이러한 정보는 인간에서 유용한 용량을 더 정확히 결정하는데 사용될 수 있다.
- [0211] 본 명세서에 기재된 활성 성분들의 독성 및 치료 효능은 시험관 내에서, 세포 배양물에서 또는 실험 동물에서 표준 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 이러한 시험관 내 검정, 세포 배양 검정, 및 동물 연구로부터 얻어진 데이터는 인간에 사용하기 위한 복용량의 범위를 공식화하는데 사용될 수 있다. 복용량은 사용되는 투여 형태 및 사용되는 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. 정확한 제형, 투여 경로 및 복용량은 환자의 상태에 비추어 개별 의사에 의해 선택될 수 있다 (예를 들면, Fingl, et al., 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1 참고).
- [0212] 투여량 및 투여 간격은 활성 성분의 조직 수준이 활성 성분이 생물학적 효과를 유도하거나 억제하기에 충분하도록 (최소 유효 농도, minimal effective concentration; MEC) 개별적으로 조정될 수 있다. MEC는 각 제제마다 다르지만, 시험관 내 데이터로부터 추정될 수 있다. MEC를 달성하기에 필요한 투여량은 개체의 특성 및 투여 경로에 따라 달라질 것이다. 검출 검정은 혈장 농도를 결정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0213] 표적화된 특이도로 인해, 단일특이적 CD40 Ab에서 사용되는 용량 보다 더 많은 용량이 다중특이적 항체에 대해 사용될 수 있다 (도 7a 내지 7d 참고).
- [0214] 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 0.1-100 mg/kg일 수 있다.
- [0215] 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 0.1-100 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 0.1-80 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는

0.1-60 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 0.1-50 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 0.1-40 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 0.1-30 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 0.1-20 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 0.1-10 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 1-100 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 10-100 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 20-100 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 30-100 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 40-100 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 50-100 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 60-100 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 70-100 mg/kg일 수 있다.

[0216] 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 1-20 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 1-15 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 1-10 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 1-5 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 2-20 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 4-20 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 6-20 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 8-20 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 10-20 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 12-20 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 15-20 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 18-20 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 1-5 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 2-10 mg/kg일 수 있다. 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 투여는 5-10 mg/kg일 수 있다.

[0217] 특정한 일 구현예에 따르면, 다중특이적 항체의 용량은 항 CD40 단일특이적 항체에 의해 허용되는 것보다 적어도 5배, 10배, 15배, 20배 또는 그 이상이다.

[0218] 치료될 병태의 중증도 및 반응성에 따라, 치료의 과정이 수일 내지 수주 동안 지속되거나, 또는 완치가 달성되거나 질병 상태의 감소가 달성될 때까지, 투여는 단일 또는 복수의 투여일 수 있다.

[0219] 투여될 조성물의 양은 물론 치료되는 대상체, 고통의 중증도, 투여 방식, 처방한 의사의 판단 등에 따라 달라질 수 있다.

[0220] 본 발명의 일부 구현예의 조성물은, 원하는 경우, 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단일 투여 형태를 함유하는 팩 또는 디스펜서 장치, 예컨대, FDA 승인된 키트로 제공된다. 예를 들면, 팩은 금속 또는 플라스틱 호일, 예컨대, 블리스터 팩(blister pack)을 포함할 수 있다. 팩 또는 디스펜서 장치는 투여를 위한 지침이 수반될 수 있다. 팩 또는 디스펜서는 의약품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부기관에 의해 규정된 형태의 용기와 관련된 고지가 수반될 수 있고, 이러한 고지는 조성물의 형태 또는 인간 또는 수의학적 투여에 대한 기관의 승인을 반영한다. 이러한 고지는, 예를 들면, 처방약에 대해 미국 식품의약국(FDA)에서 승인된 라벨 또는 승인된 제품 삽입물일 수 있다. 양립가능한 약제학적 담체로 제형화된 본 발명의 제제를 포함하는 조성물은 제조되고, 적절한 용기에 배치되고, 상기에 추가로 상세히 설명된 표시된 병태의 치료에 대해 라벨링될 수 있다.

[0221] 또한, 본 교시의 다중특이적 항체와 함께 약물 병용이 고려되며, 예를 들어, 면역 체크포인트 조절제, 예컨대, 항-CTLA4, 항-CD40, 항-41BB, 항-OX40, 항-PD1 또는 항-PDL1과의 약물 병용이 고려된다. 특정한 일 구현예에 따르면, 면역 체크포인트 조절제는 항-PD1 또는 항-PDL1이다.

[0222] 본 출원으로부터 등록된 특허 기간 동안에 많은 관련 작용제 CD40 항체들이 개발될 것이고 용어 항 CD40 항체의 범위는 *선행하여* 이러한 모든 새로운 기술을 포함하는 것을 의도한다.

[0223] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 $\pm 10\%$ 를 지칭한다.

[0224] 용어 "포함하다", "포함하는", "포괄하다", "포괄하는", "갖는" 및 이들의 활용형은 "포함하나, 이에 제한되지 않는다"를 의미한다.

[0225] 용어 "이루어지는"은 "포함하고 이에 제한된다"를 의미한다.

[0226] 용어 "필수적으로 이루어지는"은 조성물, 방법 또는 구조가 추가의 성분, 단계 및/또는 부분을 포함할 수 있음을 의미하나, 단, 추가의 성분, 단계 및/또는 부분은 청구된 조성물, 방법 또는 구조의 기본적인이고 신규한 특징

들을 실질적으로 변경시키지 않아야 한다.

- [0227] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태 "하나", "한" 및 "이(the)"는 문맥에서 달리 명시하지 않는 한 복수 대상을 포함한다. 예를 들면, 용어 "하나의 화합물" 또는 "적어도 하나의 화합물"은 복수의 화합물, 및 이들의 혼합물들을 포함할 수 있다.
- [0228] 본 출원 전체에 걸쳐, 본 발명의 다양한 구현예들은 범위 형식으로 제공될 수 있다. 범위 형식의 설명은 단지의 및 간결함을 위한 것임을 이해해야 하고 본 발명의 범위를 확고하게 제한하는 것으로 해석해서는 안 된다. 따라서, 범위의 설명은 가능한 모든 하위 범위와 범위 내의 개별 수치를 구체적으로 개시한 것으로 간주해야 한다. 예를 들면, 1 내지 6과 같은 범위의 설명은 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과 같은 하위범위, 및 범위 내의 개별 숫자, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 및 6을 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 이는 범위의 폭과 관계없이 적용된다.
- [0229] 본 명세서에 수치 범위가 표시될 때마다, 이는 표시된 범위 내의 임의의 인용된 수치 (분수 또는 정수)를 포함함을 의미한다. 어구 제1 표시 숫자 및 제2 표시 번호 "사이의 범위/사이의 범위인" 및 어구 제1 표시 숫자 "에서" 제2 표시 숫자까지의 "범위/범위인"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되며 제1 표시 숫자 및 제2 표시 숫자와 두 숫자 사이의 모든 분수 및 정수를 포함하는 것을 의미한다.
- [0230] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "방법"은 주어진 과제를 달성하기 위한 방식, 수단, 기술 및 절차를 지칭하며, 화학, 약학, 생물학, 생화학 및 의학 분야의 실무자들에 의해 알려진 방식, 수단, 기술 및 절차, 또는 이러한 방식, 수단, 기술 및 절차로부터 쉽게 개발된 방식, 수단, 기술 및 절차를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0231] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하는"은 병태의 진행을 폐기(abrogating), 실질적으로 억제, 지연 또는 역전시키는 것을 포함하고, 병태의 임상적 증상 또는 외적 증상(aesthetical symptoms)을 실질적으로 완화하거나 병태의 임상적 증상 또는 외적 증상의 출현을 예방하는 것을 포함한다.
- [0232] 특정 서열 목록에 대해 언급할 때, 이러한 언급은 예를 들면, 시퀀싱 오류, 클로닝 오류, 또는 염기 치환, 염기 결실 또는 염기 부가를 일으키는 다른 변형들로부터 초래된 작은 서열 변이들을 포함하는 상보적인 서열에 실질적으로 상응하는 서열들을 또한 포함하는 것으로 이해해야 하며, 단, 이러한 변이들의 빈도는 50개의 뉴클레오타이드들 중 1개 미만, 대안적으로는, 100개의 뉴클레오타이드들 중 1개 미만, 대안적으로는, 200개의 뉴클레오타이드들 중 1개 미만, 대안적으로는, 500개의 뉴클레오타이드들 중 1개 미만, 대안적으로는, 1000개의 뉴클레오타이드들 중 1개 미만, 대안적으로는, 5,000개의 뉴클레오타이드들 중 1개 미만, 대안적으로는, 10,000개의 뉴클레오타이드들 중 1개 미만이다.
- [0233] 명확성을 위해, 별개의 실시예의 맥락에서 설명된 본 발명의 특정한 특징들은 또한 단일 실시예와 조합하여 제공될 수 있음이 이해된다. 반대로, 간결함을 위해 단일 구현예의 맥락에서 설명된 본 발명의 다양한 특징들은 또한 개별적으로 또는 임의의 적합한 하위조합 또는 설명된 임의의 다른 본 발명의 구현예에 적절하게 제공될 수 있다. 다양한 구현예들의 맥락에서 설명된 특정한 특징들은 그 실시예가 이러한 요소들 없이 작동되지 않는 것이 아니라면, 이러한 실시예들의 필수적인 특징들로 간주되지 않는다.
- [0234] 상기에서 기술되고 하기 청구범위 섹션에서 청구된 다양한 구현예들 및 측면들은 하기 실시예에서 실험적인 뒷받침이 확인된다.
- [0235] **실시예**
- [0236] 이제 하기 실시예를 참조하며, 상기 설명과 함께 비제한적인 방식으로 본 발명의 일부 구현예들을 예시한다.
- [0237] 일반적으로, 본 명세서에 사용된 명명법 및 본 발명에 사용된 실험 절차는 분자적, 생화학적, 미생물학적 및 재조합 DNA 기술들을 포함한다. 이러한 기술들은 문헌에 자세히 설명되어 있고. 예를 들면, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 미국 특허 번호 제4,666,828호; 제4,683,202호; 제4,801,531호; 제5,192,659호 및 제5,272,057호에 제시된 방법론; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed.

(1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); 특허 및 과학 문헌에 광범위하게 기재된 이용가능한 면역검정들, 예를 들면, 미국 특허 번호 제 3,791,932; 제3,839,153; 제3,850,752; 제3,850,578; 제3,853,987; 제3,867,517; 제3,879,262; 제3,901,654; 제3,935,074; 제3,984,533; 제3,996,345; 제4,034,074; 제4,098,876; 제4,879,219; 제5,011,771 및 제 5,281,521 참조; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996);을 참조하며, 이들 모두는 본 명세서에 완전히 제시된 것처럼 참조로 포함된다. 다른 일반적인 참고문헌들은 상기 문헌 전체에 걸쳐 제공된다. 상기 문헌에 있는 절차들은 당업계에 익히 공지된 것으로 믿어지고 독자의 편의를 위해 제공된다. 여기에 함유된 모든 정보들은 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0238] **실시예 1**

[0239] **재료 및 방법**

[0240] **마우스**

[0241] 인간 Fc 수용체들 (Fc γ Ranull, hFc γ RI+, Fc γ RIIaR131+, Fc γ RIIb+, Fc γ RIIIaF158+, 및 Fc γ RIIb+) 및 인간 CD40을 함유하는 인간화된 마우스를 생성하고 이전에 기술된 바와 같이 특성했다 [10][15]. 8-10 주령의 마우스를 모든 실험에서 사용했다. 모든 마우스는 Weizmann Institute of Science Animal Facility Center에서 유지되었다.

[0242] **항-CD40/DC 단일 또는 이중-특이적 Ab의 Fc 변이체의 생성**

[0243] 항-인간 CD40 항체 2141은 특허 제US7338660호에서 언급된 클론 21.4.1 이다 (ATCC 등록 번호 PTA-3605, 천연 Fc). 2141의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 합성되었다 (Genewiz). 모 마우스 IgG1 항-인간/마우스 DEC-205 항체인 클론 HD-109 및 모 아르메니아 햄스터(Armenian Hamster) IgG 항-마우스 CD11c 항체인 N418을 생성하는 하이브리도마들을 각각 Rockefeller University 및 ATCC로부터 제공받았다. HD-109 및 N418의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 서열을 제조업체의 지침에 따라 RLM-RACE (ThermoFisher)를 사용하여 cDNA 말단의 증폭 방법 ("고정" PCR)에 의해 하이브리도마 RNA로부터 시퀀싱했다. 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 증폭을 위해, 하기 바깥쪽 올리고뉴클레오타이드(outer oligonucleotide) 및 안쪽 올리고뉴클레오타이드(inner oligonucleotide)를 사용하여 PCR을 수행했다: 클론 HD-109 중쇄의 경우 바깥쪽 마우스 IgG1 중쇄 5'-TCATTACCAGGAGAGTGG (서열 번호 43) 및 안쪽 마우스 IgG1 중쇄 5'-AGAGGCTCTTCTCAGTATGGTGGTTGTGC (서열 번호 44), 클론 N418 중쇄의 경우 바깥쪽 햄스터 IgG 중쇄 5'-GCTCAGTCCACCACCACATGT (서열 번호 45) 및 안쪽 햄스터 IgG 중쇄 5'-GAAATAGCCCTTGACCAGGCATCC (서열 번호 46), 클론 HD-109 경쇄의 경우 바깥쪽 마우스 IgG1 카파 경쇄 5'-AACACTATTCCTGTGAAG (서열 번호 47) 및 안쪽 마우스 IgG1 카파 경쇄 5'-GCTCTTGACAATGGGTGAAGTTGATGTC (서열 번호 48), 클론 N418 경쇄의 경우 바깥쪽 햄스터 IgG 경쇄 5'-CTAACACTCATTCCTGTTCAGGGTCTTG (서열 번호 49) 및 안쪽 햄스터 IgG 경쇄 5'-GCTGCTCAGGCTGTAGGTGCTGTC (서열 번호 50). 모 Ab의 가변 영역 서열들을 하이브리도마들로부터 클로닝하고 단일 인간 IgG1 또는 인간 카파 Fc 백본을 갖는 포유동물 발현 벡터 또는 이전에 기술된 이중-특이적 벡터 (Merchant et al., 1998; Ridgway et al., 1996; Schaefer et al., 2011)에 삽입했다. 올바른 중쇄-경쇄 페어링을 위하여, 모 mAb들 중 하나를 CrossMab 포맷 (CH1-CL 교환)으로 발현시켰고, 나머지 mAb의 경우, 야생형 도메인 아키텍처(architecture)를 유지시켰다 (Schaefer et al., 2011). 중쇄 이중이량체화의 경우, 점 돌연변이를 CH3 도메인에 도입했다: 1st mAb (항 DC 마커 Ab들)의 경우 Y349C/T366S/L368A/Y407V; 2nd mAb (항-CD40)의 경우 S354C/T366W (Merchant et al., 1998; Ridgway et al., 1996). 인간 IgG1의 Fc-도메인 변이체들 (N297A, G237D/P238D/H268D/P271G/A330R(V11) N297 (수용체를 동원하지 않음)의 생성을 위해, 특이적 프라이머들을 사용한 부위-지정 돌연변이유발(site-directed mutagenesis)을 PCR (Agilent Technologies)에 의한 부위-지정 돌

연변이유발에 기초하여 제조업체의 지침에 따라 수행했다. 돌연변이된 플라스미드 서열들을 직접 염기서열분석(direct sequencing) (Life science core facility, Weizmann Institute of Science)으로 확인했다. 항체들을 제조하기 위해, 항체 중쇄 및 경쇄 발현 벡터를 Expi293 세포들 (ThermoFisher)에 일시적으로 형질감염시켰다. 상층액 중에 분비된 항체들을 단백질 G 세파로즈 4 패스트 플로우 (protein G Sepharose 4 Fast Flow) (GE Healthcare)에 의해 정제했다. 정제된 항체들을 PBS 중에 투석하고 멸균 여과하였다 (0.22 μ m). SDS-PAGE 및 Coomassie 염색으로 순도를 평가했고 순도가 >90%일 것으로 추정했다. 크기 배제 크로마토그래피(Size exclusion chromatography; SEC)를 Äkta Pure 25 FPLC 시스템 상에서 Superose 6 Increase 10/300GL 컬럼 (GE Healthcare)을 사용하여 수행했다.

[0244] **CD40, DEC-205 및 CD11c 결합 ELISA**

[0245] 제조합 인간 CD40 (SINO BIOLOGICAL), 인간 DEC-205 (Sino Biological) 및 마우스 CD11c (R&D Systems)을 사용하여 단일특이적 Ab 및 이중-특이적 Ab의 결합 특이도 및 친화도를 ELISA로 결정했다. 인간 CD40 또는 인간 DEC-205 (1 μ g/mL/웰) 또는 마우스 CD11c (5 μ g/mL/웰)의 제조합 세포외 도메인으로 ELISA 플레이트들 (Nunc)을 밤새 4°C에서 코팅했다. 모든 순차적 단계들을 실온에서 수행했다. 세척한 후에, 플레이트를 2% 소 혈청 알부민을 갖는 1xPBS로 1 hr 동안 차단한 다음에 연속 희석된 IgG들 (2% 소 혈청 알부민을 갖는 1xPBS로 1:5 연속 희석)로 1 hr 동안 인큐베이션했다. 이중 결합 ELISA 검정을 위해, 플레이트들을 비오티닌화된 인간 CD40 (Acrobiosystems)으로 1 hr 동안 인큐베이션했다. 세척 후에, 플레이트들을 홀스래디쉬 퍼옥시다제-접합 항-인간 IgG (Jackson ImmunoResearch) 또는 홀스래디쉬 퍼옥시다제-접합 스트렙타비딘 (Biolegend)으로 1 h 동안 인큐베이션했다. 일 성분 기질 용액 (one component substrate solution) (TMB)을 사용하여 검출을 수행하고 0.18 M 황산을 첨가하여 반응을 중단시켰다. SpectraMax Plus 분광계 (Molecular Devices)를 사용하여 450 nm에서의 흡광도를 즉시 기록하고, 음성 대조군 샘플들의 배경 흡광도를 뺐다.

[0246] **유세포 측정**

[0247] 단일 세포 현탁액들을 상기 기재한 바와 같이 제조했다. 표면 염색을 위해, 세포들을 U-모양의 96-웰 플레이트들 (ThermoFisher)에 100 μ l PBS 중 0.2-1x10⁶ 세포의 농도로 플레이팅했다. 세포들을 먼저 LIVE/DEAD™ Fixable blue dead cell stain (ThermoFisher)으로 염색한 후에 PBS로 2회 세척하였고, 이어서 인간 또는 마우스 TruStain Fc 차단제 (BioLegend)를 갖는 25 μ l FACS 완충액에 재현탁시키고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션했다. 표면 항원을 얼음 상에서 30분 동안 FAC 완충액에서 염색시켰다. 이어서, 세포들을 FACS 완충액으로 2회 세척하고, 150 μ l FACS 완충액에 재현탁시키고, 유세포 측정으로 분석했다. 세포내 IL-6 염색을 위해, True-Nuclear™ 전사 인자 완충액 세트 키트 (BioLegend) 및 항-IL-6 (MP5-20F3) (BioLegend)을 사용하여 제조업체의 지침에 따라 추가 염색 단계를 수행했다. 모든 샘플들을 CytoFLEX LX (Beckman Coulter) 상에서 분석했다. 달리 명시되지 않는 한, 세포 집단들은 하기 마커들 (BioLegend)로 정의된다: DC: CD45+ (30F11), CD11c+ (N418), MHC II+ (M5/11415.2), F4/80- (BM8). 대식세포: CD45+, CD11b+ (M1/70), MHC II+, F4/80+, Ly6C- (HK1.4), Ly6G- (1A8). 단핵구: CD45+, CD11b+, Ly6C+, F4/80-, CD11c-. B 세포: CD45+, CD19+ (1D3). cDC1s: CD45+, MHC II+, CD11c+, XCR1+ (ZET), CD19-, CD64- (10.1), F4/80-, SIRP α - (P84). cDC2: CD45+, MHC II+, CD11c+, SIRP α +, CD19-, CD64-, F4/80-, XCR1-. 간 cDC1, cDC2, Kupffer 세포 및 비-Kupffer 세포 대식세포는 하기 표면 마커들을 사용하여 이전에 기재된 바와 같이 (Sierro et al., 2017) 게이팅(gating)하였다: CD45, MHC II, CD11b, CD11c, CD64 (X54-5/7.1), F4/80, Ly6C, Tim4 (RMT4-54), CX3CR1 (SA011F11). CD40, CD86, CD80 및 DEC-205 발현의 경우, 하기 클론들을 사용하였다: CD40 (3/23), CD86 (GL-1), CD80 (16-10A1) 및 DEC-205 (NLDC-145).

[0248] **DC 우선 결합 검증**

[0249] 인간화된 CD40/Fc γ R 마우스로부터 비장을 수거하고, 단일 세포 현탁액을 상기 기재한 바와 같이 제조했다. 비장세포들을 표면 CD19 또는 CD11b 마커를 사용하여 염색했고, CD40 mAb 또는 CD40/CD11c bsAb를 첨가했다. FACS 완충액으로 세포들을 2회 세척하고 얼음 상의 FACS 완충액 중 PE-접합 항-인간 IgG (Jackson ImmunoResearch)로 염색하고, 유세포 측정으로 분석했다.

[0250] **인간 DC 활성화 검증**

[0251] 건강한 공여자의 신선한 전혈을 Ficoll 분리(GE Healthcare)시켜 PBMC들을 분리하였다. 인간 단핵구들 (CD14⁺)을 CD14-마이크로비드 양성 선택을 사용하여 제조업체의 지침 (Miltenyi Biotec)에 따라 분리했다. 단핵구들을

10% 열-불활성화 FBS, 1% Pen Strep, 100 ng/mL GM-CSF (Peprotech) 및 100 ng/mL IL-4 (Peprotech)을 갖는 RPMI 배지 중에 웰당 4×10^6 세포로 6-웰 플레이트에 배양하였다. 배지를 2일차 및 5일차에 보충했다. 단핵구-유래 미성숙 DC들을 7일차에 수거했다. CD45 및 CD86 상향조절을 위해, 단핵구-유래 미성숙 DC들을 U-모양의 96-웰 조직 배양 플레이트들 (ThermoFisher)에 1×10^5 세포/웰으로 플레이트팅했다. 도 3a 및 4b에 표시된 바와 같은 항체들을 웰들에 첨가하고, 37°C에서 밤새 인큐베이팅했다. 세포들을 수거하고 하기 마커들로 염색했다: CD86 (BU63), CD54 (HA58). 샘플들을 유세포 측정으로 분석했다.

[0252] **OVA-특이적 T 세포 반응**

[0253] 마우스 (도 8a+b에서 WT 또는 BATF3^{-/-}, 다른 모든 것에서 hCD40/Fc γ R)를 5 mg/kg의 랫트 항-마우스 CD40 mAb (FGK4.5) (BioXCell)의 존재 또는 부재 하에 또는 0.1-10 mg/kg의 항-인간 CD40 단일특이적 또는 이중-특이적 Ab와 함께 50 mg/kg의 오발부민 (Sigma)를 복강내 주사하여 면역화시켰다. 7일 후에, 말초 혈액을 수집하고, APC-접합 항-CD8 α (53-6.7) (BioLegend), 및 PE-접합 OVA 펩티드 SIINFEKL H-2b 사량체 (Tet-OVA, MBL International Corporation)로 염색하고, 유세포 측정으로 분석했다. OVA-발현 B16 종양 모델 (B16-OVA)에서 특이적 T 세포 반응을 위해, 마우스에 2×10^5 B16-OVA 세포들을 피하 이식했다. 종양이 확립될 때 (종양 길이 및 너비의 합이 대략 50 mm³에 도달함), 마우스에 5 mg/kg 랫트 항-마우스 CD40 mAb를 치료했고, 이 치료를 3일 후에 반복했다. 7일차에, 말초 혈액을 수집하고 상기 기재된 바와 같이 처리했다.

[0254] **혈청에서 트랜스아미나제 및 H&E 염색**

[0255] 마우스 (WT, BATF3^{-/-}, CD11c-DTR 또는 hCD40/Fc γ R)에 5 mg/kg의 랫트 항-마우스 CD40 mAb 또는 0.1-10 mg/kg의 항-인간 CD40 단일특이적 또는 이중특이적 Ab를 복강내 주사로 치료했다. 24시간 후에, 말초 혈액을 응고 활성화 혈청 튜브(clot activator serum tubes) (Becton Dickinson)에 수집했다. 혈액을 30분 동안 실온에서 응고시킨 후에, 10분 동안 3500 rpm으로 원심분리하고, 간 트랜스아미나제 (ALT/AST) 수준을 상업적 실험실 (American Medical Laboratories (AML), Israel)에 의해 혈청에서 결정했다. 치료받은 동물들의 간을 수거하고 밤새 4% 파라포름알데히드 (PFA)에 배치한 후에, 파라핀 처리하고, Weizmann Institute of Science의 조직학 & 병리학 부서의 헤마톡실린 및 에오신 (H&E)으로 염색했다. 슬라이드들을 Panoramic scan II 스캐너 (3DHISTECH)를 사용하여 스캐닝하고, CaseViewer 소프트웨어로 이미지를 얻었다.

[0256] **혈청 및 세포내 사이토카인 분석**

[0257] hCD40/Fc γ R 마우스에 항-인간 CD40 단일특이적 또는 이중-특이적 Ab 0.1 내지 10 mg/kg을 복강내 주사로 투여했고 3시간 후 채혈하여 혈청을 수집했다. IL-6 및 TNF- α 수준을 제조업체의 지침에 따라 ELISA MAXTM Deluxe Set 키트들 (BioLegend)을 사용하여 정량화했다. 세포내 IL-6 검출의 경우, 마우스에 항-인간 CD40 mAb 2.5 mg/kg 또는 0.5 mg/kg을 투여하고, 2.5시간 후에 채혈하여 세포내 IL-6 염색을 했다. 샘플들을 상기 기재된 바와 같이 유세포 측정에 의해 평가했다.

[0258] **종양 켈린지 및 치료**

[0259] 종양 세포주들을 37°C 및 5% CO2에서 습윤 인큐베이터에 유지시키고, 25 mM HEPES, 1% L-글루타민, 10% FBS, 1% Pen Strep, 1% 비필수 아미노산들, 및 1% 피루베이트를 함유한 완전 RPMI 배지에 배양하였다. MC38 (2X 106), B16-F10 (4x105), B16-OVA (2x105), 및 MCA-205 (5x105)을 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 이식하였고, 종양 부피를 전자 캘리퍼(caliper)로 2-3일마다 블라인드 측정(blindly measure)했다. 부피는 공식 (L2*L1)/2을 사용하여 보고되었고, 이때, L1은 가장 긴 직경이고 L2는 가장 짧은 직경이다. 종양 접종 7일 내지 10일 후에, 종양 길이 및 너비의 합이 대략 50 mm³에 도달할 때, 마우스를 종양 크기에 따라 무작위화하고 (0일차), 각 실험에 기재된 바와 같이 복강내 주사로 치료했다. WT 및 BATF3^{-/-}에 0일, 3일 및 6일차에 100 μ g 랫트 항-마우스 CD40 mAb 또는 대조군 PBS를 치료했다. hCD40/Fc γ R 마우스에 0일, 2일, 4일, 및 6일차에 CD40 mAb 또는 CD40/CD11c bsAb를 이들 각각의 MTD (각각 0.175 mg/kg 및 2.5 mg/kg)로 및/또는 0일, 3일 및 6일차에 PD-1 IgG1-N297A mAb (클론 RMP-1-14)을 10 mg/kg로 치료하거나, 대조군 PBS를 치료했다. 마우스를 치료 개시 후 8-20일 동안, 또는 종양 크기에 대한 Weizmann Institute of Science IACUC 제한으로 인해 미치료 대조군이 희생되어야 할 때까지 모니터링했다.

[0260] **혈소판 카운트**

[0261] K2E EDTA 튜브들 (Becton Dickinson)에 수집한 마우스 말초 혈액에서 혈소판 카운트 분석을 수행했다. Sysmex XP-300™ Automated Hematology Analyzer (Sysmex)를 사용하여 샘플들을 분석했다.

[0262] 세포-고갈 연구

[0263] CD40 치료를 하기 24시간 전에 대식세포 고갈(depletion)을 위한 클로드로네이트(Clodronate) 리포솜 (또는 대조군 PBS 리포솜) (Liposoma BV) 10 μ l/g 체중, 또는 혈소판 고갈 위한 항-CD42b Ab들 (R300) (EMFRET Analytics) 2 μ g/g 체중을 측면 꼬리 정맥을 통해 마우스에 주사했다. CD11c-DTR 마우스로부터 CD11c⁺ DC들을 제거하기 위해, CD40 치료하기 4일 및 2일 전에, 디프테리아 독소 (DT) (Sigma)를 4 μ g/kg의 용량으로 복강내 주사했다. 고갈 효능을 유세포 측정 또는 혈중 혈소판 카운트로 평가했다.

[0264] 실시예 2

[0265] 결과

[0266] cDC1(Conventional type 1 dendritic cell)들은 종양-특이적 CD8⁺ T 세포들을 프라이밍하는데 특화되어 있고, 종양에서 이들의 빈도 및 기능적 상태는 암 환자의 향상된 생존 및 체크포인트 차단 (checkpoint blockade)에 대한 반응과 관련이 있다. CD40 경로는 cDC1에 의한 T 세포 프라이밍에 중요한 역할을 하고, cDC1은 CD40 mAb들의 주요 표적으로 제안되기 때문에, 본 발명자들은 cDC1-결핍 Batf3^{-/-} 마우스를 사용하여 CD40 작용제 mAb들의 상이한 생체 내 활성에서 Cdc1의 역할을 평가했다. CD40 mAb와 함께 오발부민 (OVA)으로 야생형 마우스를 면역화한 결과 OVA 항원으로부터 유래한 펩티드에 특이적인 CD8⁺ T 세포의 강력한 활성화 및 전신 확장(systemic expansion)을 초래했다. Batf3^{-/-} 마우스에서 OVA-특이적 T 세포의 확장은 상당히 손상되었고, 이는 cDC1의 주요 역할은 CD40 작용제 mAb들의 생체 내 T-세포 프라이밍 활성화에서 아쥘반트임을 나타낸다 (도 8a). 종양-항원에 대한 반응을 모델링하기 위해, 마우스에 OVA를 발현하는 B16 흑색종 세포들을 접종했고, 이들에 CD40 mAb를 처리했다 (도 8b). 치료 시작 후 7일차에 테스트했을 때, 본 발명자들은 야생형 혈액에서 OVA-특이적인 CD8⁺ T 세포들을 관찰했고, Batf3^{-/-} 마우스에서는 관찰하지 못했으며, 이는 cDC1이 CD40 mAb 치료시 종양-특이적 CD8⁺ T 세포를 프라이밍하는데 필요함을 나타낸다. TME 내의 DC들은, 말초 조직에서 DC들 및 TME에서 다른 세포 유형들, 예컨대, 대식세포들 및 단핵구들에 비해 CD40 표면 발현을 상향조절하며 (도 8i), 이는 종양 cDC1이 CD40 mAb 치료의 주요 표적임을 추가로 암시한다. CD40 mAb 치료의 전반적인 항종양 효과에 대한 cDC1의 영향을 평가하기 위해, 항-CD40 단일요법에 잘 반응하는 2개의 종양 모델들을 사용했다. MC38 결장 선암 또는 MCA-205 섬유육종을 보유하는 마우스에 CD40 mAb를 치료하였고, 이어서 시간 경과에 따른 종양 성장을 추적했다. 종양 부피의 상당한 치료적 감소가 야생형 마우스에서 얻어졌지만, Batf3^{-/-} 동물에서는 얻어지지 않았다 (도 8c). 따라서, cDC1은 종양-특이적 CD8⁺ T 세포 프라이밍 및 CD40-표적 면역요법의 전반적인 항종양 효과를 매개하는데 필요한 필수적인 세포 집단으로 확인된다.

[0267] 이어서, 본 발명자들은 CD40 mAb 치료와 관련된 간 독성에서 DC들의 역할을 평가했다. CD40 mAb 주사 후 간 독성이 야생형, cDC1 결핍 Batf3^{-/-}, 및 심지어 CD40 mAb 주사 이전에 CD11c⁺ 세포가 고갈된 마우스 (pan-DC 결핍 CD11c-DTR 마우스)에서 간 트랜스아미나제의 혈중 농도의 상당한 상승으로 검출됐다 (도 8d). 따라서, DC들은 CD40 mAb 요법과 관련된 간 독성을 촉진하는 세포 집단이 아니다. 그러므로, 다른 CD40 발현 간-거주(liver-resident) 세포 집단들이 CD40 mAb-유도 간독성을 매개할 것이다. Kupffer 세포들 및 비-Kupffer 간 대식세포들은 CD11c를 발현하지 않고 (도 8j), CD11c-DTR에서 고갈되어 있지 않으며, Kupffer 세포들은 Batf3^{-/-} 마우스에 고갈되어 있지 않기 때문에 (도 81), 이들은 모든 이러한 마우스 모델들에 존재하며 관찰된 독성에 책임이 있을 수 있다. 그러므로 간 독성에서 이 대식세포들의 역할을 더 탐구하기로 결정했다.

[0268] CD40 면역요법과 관련이 있는 독성을 매개하는 CD40⁺ 세포 집단들을 확인하기 위해, CD40 및 모든 Fc γ 수용체들에 대해 완전히 인간화된 (hCD40/Fc γ Rs) 마우스 모델을 사용했고; 이 균주는 임상 환경에서 보고된 인간 CD40 mAb들의 용량-제한 독성 및 추가적인 생물학적 활성을 개괄한다. CD40-매개 간 독성을 평가하기 위해, hCD40/Fc γ R 마우스에, 완전한 인간 Fc-조작 CD40 작용제 (2141-V11) 및 인간 IgG1 Fc가 인간 억제성 Fc γ R 인 Fc γ RIIB에의 결합을 선택적으로 향상시키도록 돌연변이된 셀리크렐루맙(Selicrelumab)의 2세대 Fc-최적화 버전을 주사했고, 이로 인해 최적 CD40 작용에 필요한 가교결합을 제공했다. 이 모델은 현재 초기 임상 시험에서 평

가되고 있다 (ClinicalTrials.gov Identification: NCT04059588, NCT04547777). 단일 CD40 mAb 주사는 이전에 보고된 바와 같이 간 트랜스아미나제의 혈청 수준의 급격한 상승으로 이어졌고, 이는 간세포 응고 괴사, 및 굴혈관 혈정증(sinusoidal thrombosis)을 특징으로 하는 간 손상을 나타낸다 (도 8e). CD40 mAb 주사 이전에 클로드로네이트 리포솜들을 사용하여, DC들이 아닌, 간 대식세포들 및 Kupffer 세포들을 포함하는 대식세포들 및 식세포들의 전신 고갈이 유도된 경우에 (도 8m), 간 독성은 폐기되었다 (도 8e 및 도 8n). 본 발명자들은 간 독성을 매개하는 대식세포들의 이 중심적인 역할이, CD40 mAb의 국소 가교결합과 후속적으로 간 굴혈관에서 혈소판 활성화를 일으키는 Kupffer 세포에 의한 Fc γ RIIB 발현, 및/또는 간 대식세포들의 직접적인 CD40 경로 활성화에 의해 유발되는 것으로 가정했다.

[0269] 이 가능성들을 구별하기 위해, CD40 mAb 주사 이전에 순환하는 혈소판들을 제거하도록 항-CD42b mAb를 사용했다 (도 8o). 혈소판의 부재 하에서 간 독성의 상당한 감소가 관찰되었다 (도 8f). 이 설정에서 AST 및 ALT 수준이 어느정도 상승되었지만, 이 수준들은 혈소판 제거(platelet clearance) 없이 CD40 mAb 주사한 것보다 상당히 낮았다. 이 마우스들의 간들의 조직학적 분석은, 이들의 감소된 AST 및 ALT 수준과 상관관계가 있는, 혈소판-고갈 마우스에서 드물고 상대적으로 경미한 실질 괴사(parenchymal necrosis)만을 나타냈고, 아마도 항-CD42b 주사 후에 순환에 남아 있는 잔류 혈소판 (~2%)의 결과인 매우 적고 작은 피브린 혈전 병소(thrombus foci)를 나타냈다 (도 8o). 이 병소는 흔히 괴사성 실질(necrotic parenchyma) 근처 또는 주위의 소포에서 흔히 발견되며 (도 8p), 혈전 및 괴사 간의 인과관계를 암시한다. 따라서, 본 발명자들의 데이터는 CD40 mAb-유도 간 독성에서 혈소판의 중요한 역할을 뒷받침하고 혈소판 빈도와 간 손상의 강도의 상관관계를 보여준다. 이 결과들은 Kupffer 세포들 및 간 대식세포들이 이들의 Fc γ RIIB 발현을 통해 항-CD40 mAb에 의한 CD40의 혈소판 가교결합을 매개하는 모델을 뒷받침한다.

[0270] 다음으로, 본 발명자들은 항-CD40 매개 혈소판감소증(thrombocytopenia)에서 대식세포들의 역할을 평가하기를 원했다. CD40 mAb 주사 24시간 후에 혈소판 카운트의 대량 감소가 관찰되었고; 이 표현형은 CD40 mAb 주사 이전에 대식세포가 고갈되는 경우 폐기된다 (도 8g). 이 결과는 항-CD40 관련 혈소판감소증을 매개하는 대식세포들의 역할을 나타내며, 혈소판 및 대식세포들 둘 모두에 의해 유도되는 간 독성 및 혈소판감소증 사이의 인과관계를 암시한다.

[0271] 마지막으로, 본 발명자는 임상에서 관찰된 CD40 mAb-유도 독성의 제3 유형인 CRS에 기여하는 세포들의 아이덴티티(identity)를 평가했다. CD40 2141-V11 mAb의 단일 주사는 임상 시험에서 셀리크렐루맷 및 다른 CD40 mAb들에서 보고된 것과 유사하게, 다 혈청 인터류킨-6 (IL-6) 및 종양 괴사 인자 알파 (TNF- α)의 급격한 상승을 초래했다 (도 8q). 세포내 IL-6 염색은 CD40 mAb 주사 후에 세포들이 IL-6 발현을 빠르게 상향조절함에 따라, 혈액, 림프절 (LN) 및 비장에서 단핵구를 식별했고, 드문 LN 대식세포들의 집단 또한 식별했으며 (도 8h, 8r), 이는 CD40 mAb 유도 CRS를 매개하는 단핵구들의 주요 역할을 암시한다. 종합적으로, 이 실험들은 CD40 작용체와 관련된 용량-제한 독성에 기여하는 주요 세포 집단들을 식별했다. 본 데이터는 간 독성 및 혈소판감소증을 매개하는 대식세포들 및 혈소판들의 주요 역할, 및 IL-6-관련 CRS를 매개하는 단핵구들의 주요 역할을 암시한다.

[0272] 항-CD40 인간 Ab 2141을 DC 마커를 표적화 하는 Ab들과 커플링시켜 수지상 세포(DC) 상의 CD40을 선택적으로 표적화하는 이중특이적 항체들 (Abs)을 생성했다. 원하는 Abs를 클로닝하기 위해, Abs의 가변 영역들을 이들 하이브리도마 클론들로부터 얻은 RNA로부터 시퀀싱했다. Abs의 가변 도메인 서열들이 식별되면 (도 1a), 이들을 상기 기재된 바와 같이, 단일특이적 및 이중특이적 Ab 중쇄 및 경쇄 Ab에 대한 미리-생성된 벡터에서 원하는 IgG 불변 영역들에 인-프레임 클로닝한다. 항-CD40 (2141), -CD11c (N418), -DEC-205 (HD109) 단일특이적 Ab, -CD40/CD11c 및 -CD40/DEC-205 이중특이적 Ab를 함유하는 DNA 구조체들을 생성했다 (도 2a 및 2b). HEK293 세포들에 DNA 벡터 조합들을 형질감염시켜 단일특이적 및 이중특이적 Abs를 생성했다. 이 5개의 Ab들을 제조하고 정제했다. CD40/CD11c 및 CD40/DEC-205 bsAb을 형성하는데 필요한 올바른 이중이량체 조합의 형성은 SDS-PAGE 및 분석적 크기-배제 크로마토그램으로 입증되었다 (도 3a 및 3b). CD40 및 CD11c/DEC205 둘 모두에의 이 bsAb들의 동시적 결합과 함께 DEC-205/CD11c에 대해 음성인 다른 세포 유형들보다 DC에 대한 우선적인 결합이 입증되었다 (도 4a 내지 4d). 다음으로, 본 발명자들은 이 bsAb들의 작용 활성화, 시험관 내에서 인간 DC들의 활성화 (도 5) 및 생체 내에서 마우스 T-세포의 활성화 (도 7a 내지 7d)를 결정했다. bsAb 활성화에 대한 Fc γ RIIB-요구 사항들은, WT IgG1, IgG1-V11 (Fc γ RIIB에 대한 선택적으로 향상된 결합), 또는 IgG1-N297A (Fc γ R들에 결합하지 않는 탈글리코실화된 Fc)을 포함하는 여러 Fc 스캐폴드들의 맥락에서 발현시키면서, 각 bsAb의 활성을 비교함으로써 결정했다. 시험관 내 및 생체 내 실험은 이 bsAb들이 DC들 및 T-세포들을 효과적으로 활성화시키기 위해서는 Fc γ RIIB 결합을 필요로 함을 나타냈다 (도 6a 및 6b). 구체적으로는, 야생형 IgG1들은 IgG1-V11에 비해 상당히 감소된 강도로 DC들의 약한 활성화를 매개했다 (도 6a). 마찬가지로, hCD40/Fc γ R 마우스에서

CD40/CD11c-V11 및 CD40/DEC-205-V11에 의해 유도된 생체 내 T 세포 활성화는 각각 이 bsAb들의 IgG1 또는 N297A Fc-침묵 버전에 의해 상당히 감소되거나 완전히 폐기되었다 (도 6b). 종합하면, 본 결과는 CD40/DC bsAb들의 활성이 Fc-의존적인 것을 암시하고, 향상된 Fc γ RIIB 결합을 갖는 Fc-조작 bsAb들에 의해 증가된 활성이 달성됨을 입증했다. 그러므로, hIgG1-V11은, Fc 변이체를 사용하여 Fc-조작 CD40/DC bsAb들의 생체 내 특성들을 더 특성화하는데 사용된 CD40/DC bsAb들에 대해 최적인 IgG 스캐폴드로 선택됐다. 마지막으로, 이 bsAb들은 단일특이적 2141 CD40 Ab에 비해 개선된 독성 프로파일을 가져 최적 항종양 활성화에 필요한 높은 용량으로 사용할 수 있음을 나타낸다. 효능 실험들에 사용된 bsAb들의 상이한 용량들은 상기에 기재되어 있다. 이들의 안전 프로파일은 하기와 같이 특성화되었다: 활성을 나타내는 용량으로 투여된 bsAb들이 간 독성의 유도에 대해 평가되었다. 각 bsAb의 치료적 지표를 모 단량체 2141-V11 Ab와 비교했다. 최적의 CD40/DC bsAb의 최대 안전 용량을 결정했고 본 발명자들은 이 안전 용량의 치료 효능을 단일특이적 모 2141-V11의 미리결정된 MTD와 비교했다 (도 7a 내지 7d). 이 연구로부터, 2141의 DC-표적 bsAb 포맷은 적어도 간 독성의 문제에서 증가된 치료적 윈도우 (therapeutic window)를 달성할 수 있는 것으로 결론지을 수 있다.

[0273] 본 발명자들은 인간 Fc γ R들에 대한 구별되는 결합 특성들을 나타내는 하기 3개의 상이한 Fc 스캐폴드들을 기반으로 각 bsAb의 변이체들을 생성했다: 야생형 hIgG1, hIgG1-N297A (Fc γ R에 결합하지 않는 탈글리코실화된 Fc), 및 hIgG1-V11 (억제성 hFc γ RIIB에 대한 결합을 향상시키는 Fc 점 돌연변이) (도 9a 및 9b).

[0274] 비독성 용량으로 투여되는 경우 증가된 치료 효능이 CD40 mAb보다 CD40/CD11c bsAb에 의해 매개되는 지 결정하기 위해, 본 발명자들은 이들의 간 독성의 정도에 기초하여 이들의 MTD를 결정했다. 이들은 CD40 mAb 및 CD40/CD11c bsAb에 대해, 표준 항상성 값을 초과하는 혈청 ALT/AST의 상승을 유발하지 않고 (도 7b) 간 괴사 및 혈전의 징후가 없는 (도 10a) 최대 용량으로서 각각 0.175 mg/kg 및 2.5 mg/kg인 것으로 확인되었다. 다음으로 더 높은 테스트 용량에서, 두 시약 모두 ALT/AST 수준의 상승으로 나타난 바와 같이, 상당한 독성을 유도했고, 간 조직학은 치료받은 마우스에서 광범위한 간세포 괴사 및 피브린 혈전을 나타냈다. 본 발명자들은 이 MTD들에서 혈청 IL-6 및 TNF- α 수준을 평가했고, CD40 mAb과 비교하여 CD40/CD11c bsAb 주입 후에 CRS-관련 사이토카인들의 상당히 적은 상승을 확인했다 (도 10b). 이들의 MTD에서, CD40/CD11c bsAb는 모 CD4 mAb에 비해 상당히 향상된 T 세포 활성화를 유도했으며 (도 10c), 이는 이 bsAb 설계의 증가된 치료적 지표를 뒷받침한다.

[0275] 다음으로, 본 발명자들은 T 세포 프라이밍의 개선이 증가된 치료적 항-종양 활성으로 해석되는지 결정하는 것을 원했다. 이를 위해, 본 발명자들은 CD40/CD11c bsAb 및 CD40 mAb를 이들 각각의 MTD로 종양 보유 마우스에 치료했다 (도 10d). MC38 결장 및 B16-F10 흑색종 종양 모델 둘 모두에서 CD40/CD11c bsAb 치료는 CD40 mAb 치료와 비교해 상당히 개선된 종양 성장 조절을 초래했다. 치료 과정 마지막에서 간 독성의 징후는 치료받은 마우스에서 검출되지 않아, 이 치료 요법들의 안전한 프로파일을 입증했다. 이 결과들은 최대 안전 용량으로 투여되는 경우, CD40 mAb에 비해 CD40/CD11c bsAb의 개선된 항종양 역할을 암시한다.

[0276] CD40 작용제 mAb들은 여러 전임상 모델들에서 PD-1 차단과 상승작용을 하는 것으로 나타났고 [20][21]; 이 조합은 초기 단계 시험에서 전이성 췌관 선암 (PDAC) 환자들에 대한 임상적 활성을 입증했고 [22], 추가 임상 적응증(clinical indication)에 대해 평가 중이다. 그러므로 이들은 CD40/DC11c bsAb이 이러한 상승적 활성을 보유하는지 평가되었다. B16 흑색종 종양들을 보유한 hFc γ R/CD40 마우스에 PD-1 mAb, CD40/CD11c bsAb 또는 이들의 조합을 치료했다 (도 10e). 각 단일-요법에 비해 증가된 항종양 활성이 병용 요법에 의해 유도되었으며, 이는 향상된 요법을 위해 CD40/DC bsAb 및 항-PD1/L1을 조합하는 가능성을 뒷받침한다.

[0277] 본 발명은 본 발명의 특정 구현예들과 함께 설명되었지만, 많은 대안, 변형 및 변경들이 당업자에게 명백할 것임이 분명하다. 따라서, 첨부된 청구범위의 정신과 넓은 범위 내에 속하는 모든 이러한 대안, 변형, 및 변경들을 포함하는 것이 의도된다.

[0278] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 본 명세서 참조로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 표시한 것과 동일한 정도로, 이들의 전문이 본 명세서에 참조로 포함된다. 또한, 본 출원에서 임의의 참고문헌의 인용 또는 식별은 이러한 참고문헌이 본 발명에 대한 선행 기술로서 이용가능하다는 승인으로 해석되어서는 안 된다. 섹션 제목들이 사용되는 범위에서, 이들은 반드시 제한적인 것으로 해석되어서는 안 된다. 또한, 본 출원의 임의의 선행 문헌(들)은 이의/이들의 전문이 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0279] **참고문헌**

[0280] (다른 참고문헌들은 본 명세서 전체에 걸쳐 인용됨)

- [0281] [1] P. Sharma, "The future of immune checkpoint therapy," *Science* (80-.), vol. 348, no. 6230, pp. 56-61, 2014.
- [0282] [2] M. K. Callahan, M. A. Postow, and J. D. Wolchok, "Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy," *Immunity*, vol. 44, no. 5, pp. 1069-1078, 2016.
- [0283] [3] R. H. Vonderheide, "The Immune Revolution: A Case for Priming, Not Checkpoint," *Cancer Cell*, vol. 33, no. 4, pp. 563-569, 2018.
- [0284] [4] A. B. Alexandroff et al., "Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours," *Mol. Immunol.*, vol. 37, no. 9, pp. 515-526, 2000.
- [0285] [5] R. H. Vonderheide and M. J. Glennie, "Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy," *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 5, pp. 1035-1043, 2013.
- [0286] [6] L. P. Richman and R. H. Vonderheide, "Role of Crosslinking for Agonistic CD40 Monoclonal Antibodies as Immune Therapy of Cancer," *Cancer Immunol. Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 19-26, 2014.
- [0287] [7] A. L. White et al., "Interaction with Fc RIIB Is Critical for the Agonistic Activity of Anti-CD40 Monoclonal Antibody," *J. Immunol.*, vol. 187, no. 4, pp. 1754-1763, 2011.
- [0288] [8] R. H. Vonderheide et al., "Phase I study of the CD40 agonist antibody CP-870,893 combined with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced solid tumors," *Oncoimmunology*, vol. 2, no. 1, pp. 1-10, 2013.
- [0289] [9] R. H. Vonderheide et al., "Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870,893, a novel CD40 agonist monoclonal antibody," *J. Clin. Oncol.*, vol. 25, no. 7, pp. 876-883, 2007.
- [0290] [10] R. Dahan, B. C. Barnhart, F. Li, A. P. Yamniuk, A. J. Korman, and J. V. Ravetch, "Therapeutic Activity of Agonistic, Human Anti-CD40 Monoclonal Antibodies Requires Selective FcγR Engagement," *Cancer Cell*, vol. 29, no. 6, pp. 820-831, 2016.
- [0291] [11] D. A. Knorr, R. Dahan, and J. V. Ravetch, "Toxicity of an Fc-engineered anti-CD40 antibody is abrogated by intratumoral injection and results in durable antitumor immunity [Immunology and Inflammation]," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, pp. 2-7, 2018.
- [0292] [12] Y. Mazar et al., "Improving target cell specificity using a novel monovalent bispecific IgG design," *MAbs*, vol. 7, no. 2, pp. 377-389, 2015.
- [0293] [13] C. G. Park et al., "Generation of anti-human DEC205/CD205 monoclonal antibodies that recognize epitopes conserved in different mammals," *J. Immunol. Methods*, vol. 377, no. 1-2, pp. 15-22, 2012.
- [0294] [14] C. Demangel, J. Zhou, A. B. H. Choo, G. Shoebridge, G. M. Halliday, and W. J. Britton, "Single chain antibody fragments for the selective targeting of antigens to dendritic cells," *Mol. Immunol.*, vol. 42, no. 8, pp. 979-985, 2005.
- [0295] [15] I. Caminschi et al., "The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement," *Blood*, vol. 112, no. 8, pp. 3264-3273, 2008.
- [0296] [16] D. Sancho et al., "Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin," *J. Clin. Invest.*, vol. 118, no. 6, pp. 2098-2110, 2008.
- [0297] [17] A. Bachem et al., "Expression of XCR1 characterizes the Batf3-dependent lineage of dendritic cells capable of antigen cross-presentation," *Front. Immunol.*, vol. 3, no. JUL, pp. 1-12, 2012.
- [0298] [18] R. Dahan, B. C. Barnhart, F. Li, A. P. Yamniuk, A. J. Korman, and J. V. Ravetch, "Therapeutic Activity of Agonistic, Human Anti-CD40 Monoclonal Antibodies Requires Selective FcR Engagement," *Cancer Cell*, vol. 29, no. 6, pp. 820-831, 2016.
- [0299] [19] P. Smith, D. J. DiLillo, S. Bournazos, F. Li, and J. V. Ravetch, "Mouse model recapitulating

human Fcγ receptor structural and functional diversity,” Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 109, no. 16, pp. 6181-6186, 2012.

- [0300] [20] H. S. Ma et al., “A CD40 Agonist and PD-1 Antagonist Antibody Reprogram the Microenvironment of Nonimmunogenic Tumors to Allow T-cell-Mediated Anticancer Activity,” Cancer Immunol. Res., 2019.
- [0301] [21] S. F. Ngiew et al., “Agonistic CD40 mAb-driven IL12 reverses resistance to anti-PD1 in a T-cell-rich tumor,” Cancer Res., 2016.
- [0302] [22] M. H. O. Hara et al., “CD40 agonistic monoclonal antibody APX005M (sotigalimab) and chemotherapy , with or without nivolumab , for the treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: an open-label , multicentre , phase 1b study,” vol. 22, no. January, 2021.

도면

도면1aa

2141 (항-CD40) VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG
QGLEWMGWNPDSGGINYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELN
RLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLLTVSS

2141 (항-CD40) VL

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGIYSWLAWYQQKPGKA
PNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
QQANIFPLTFGGGTKEIK

N418 (항-CD11c) VH

EVQLVEKGGGLVQPGKSLKLSCAASGFTFSEYWMNWVRQAPG
KGLEWVGVIKYKYSNYATEYAESVKGRFTISRDDSKSSVYL
QMNNLRAEDTAIYYCARTWENWYFDFWGGGTQVTSS

N418 (항-CD11c) VL

DIQMTQSPSSLPASLGDRVITHCQASQDISNYLTWYQQKPGKA
PKLLIYEETNKLADGVPSRFSGSGSGRDYSFTISLSEEDVGSYY
CQHYDYPRTFGPGTKLEIK

HD-109 (항-DEC-205) VH

QVQLTESGPGLVAPSQSLSITCSVSGFSLTNYAINWVRQPPGKG
LEWLGIWTGGGTNYNSTLKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQT
DDTARYYCARVSHDYFYGSSPYYYGMDYWGQGTSTVSS

HD-109 (항-DEC-205) VL

DIQMNQSPSSLASLGDTITITCHASQNINVWLSWYQQKPGNIP
KLLIYKVSNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDATYYCQ
QQQSYPTTFGGGTKEIK

10B4 (항-Clec9a) VH

QIVESGGGLVQPKESLKISCTASGFTFSNAAIYWVRQTPGKGLE
WVGRIIRTRPSKYATDYADSVRGRFTISRDDSKSMVYLLQMDNLR
TEDTAMYYCTPRATEDVPFYWGQGVMTVSS

도면 1ab

10B4 (항-Clec9a) VL

DIVMTQTPSSQAVSAGEKVTMNCKSSQSVLYDENKKNYLAWY
 QQKSGQSPKLLIYWASTGESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQA
 EDLAVYYCQQYYDFPPTFGGGTKLELK

MARX10 (항-XCR1) VH

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWIHWMKQRPG
 QGLEWIGMIHPNSDNTKYNEKFKAKAILTVDKSSSTAYMQLSS
 LTSEDSAVYYCARFANDGAYWGQGTLVTVSS

MARX10 (항-XCR1) VL

DVVVTQTPLSLPVSLGDPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQ
 KPGQSPKLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDL
 GVFCSQNTHPYTFGGGTKLEIK

도면 1ba

항 CD40 모이어티:

2141 (항-CD40)- 중쇄 (서열 번호 5)

리더

가변

불변 (불변, CH1, CH2, CH3)

*V11 돌연변이 (G237D/P238D/H268D/P271G/A330R)

*“눅” 돌연변이 (S354C/T366W)

MGWSCIILFLVATATGVHS QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY
TFTGYMHMWVRQAPGGLEWMGWINPDSSGTNYAQKFQGRVTM
TRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYW
GQGTLVTVSS ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLG DD SVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVS DED GEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVHLQDNLGKEYCKKVSNAKALP RPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPP CREEMTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

2141 (항-CD40)- 경쇄 (서열 번호 6)

리더

가변

불변 (CL)

MGWSCIILFLVATATGVHS DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQ
GIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFLT
ISSLPEDFATYYCQANIFPLTFGGGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

DC 표적화 아암 (항-DEC-205,-CD11C,-Clec9a,-XCR1):

N418 중쇄 (항- CD11c)- CrossMAb (서열 번호 37)

리더

가변

불변 (CL)

불변 (힌지, CH2, CH3)

*V11 돌연변이 (G237D/P238D/H268D/P271G/A330R)

*“흙” 돌연변이 (Y349C/T366S/L368A/Y407V)

도면 1bb

MGWSCIIILFLVATATG EVQLVEKGGGLVQPGKSLKLSCAASGFTFSE
YWMNWVRQAPGKGLEWVGVIKYKYSNYATEYAESVKGRFTISRDD
SKSSVYLQMNNLRAEDTAIYYCARTWENWYFDWGGGTQVTVSSA
SVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGECDRSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGDDSVFLFPPPKPD
TLMISRTPEVTCVVDVSDDEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALNH
YTQKSLSLSPGKSAWSHPQFEK

N418 경쇄 (항- CD11c)- CrossMAb (서열 번호 38)

리더

가변

불변 (CH1)

MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLPASLGDRVTIHCQASQ
DISNYLTWYQQKPGKAPKLLIYETNKLADGVPSRFSGSGSGRQDYFST
ISSELEDVGSYYCQHYDYPRTFGPGTKLDLSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

HD-109 중쇄 (항-DEC-205)- CrossMAb (서열 번호 39)

리더

가변

불변 (CL)

불변 (힌지, CH2, CH3)

*V11 돌연변이(G237D/P238D/H268D/P271G/A330R)

*“홀” 돌연변이(Y349C/T366S/L368A/Y407V)

MGWSCIIILFLVATATGQVQLTESGPGLVAPSQSLTSITCSVSGFSLTNY
AINWVRQPPGKGLEWLGIIWTGGGTNYNSTLKSRLSISKDNSKSQV
FLKMNSLQTDATARYYCARVSHDYFYGSSPYYYGMDYWGQGTSTV
VSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGECDRSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGDDSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDDEDGEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGKSAWSHPQFEK

도면1bc

HD-109 경쇄 (항-DEC-205)- CrossMab (서열 번호 40)

리더

가변

불변 (CH1)

MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQININW
LSWYQQKPGNIPKLLIYKVSNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDIA
TYQCQQGQSYPTWTFGGGKLEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

10B4 중쇄 (항- Clec9a)- CrossMab (서열 번호 15)

리더

가변

불변 (CL)

불변 (힌지,CH2,CH3)

*V11 돌연변이(G237D/P238D/H268D/P271G/A330R)

*"홀" 돌연변이(Y349C/T366S/L368A/Y407V)

MGWSCIIILFLVATATGQIVESGGGLVQPKESLKISCTASGFTFSNAAI
YWVRQTPGKGLEWVGRIRTRPSKYATDYADSVRGRFTISRDDSKS
MVYQLMDNLRTEDTAMYYCTPRATEDVPFYWGQGVMTVSSASV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGECDSRSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGDDSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSDDEGEVKFNWYVDGGEVHNAAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGKSAWSHPQFEK

10B4 경쇄 (항- Clec9a)- CrossMab (서열 번호 16)

리더

가변

불변 (CH1)

MGWSCIIILFLVATATGVHSDIVMTQTPSSQAVSAGEKVTMNCKSSQ
SVLYDENKKNYLAWYQQKSGQSPKLLIYWASTGESGVPDRFIGSGS
GDTFTLTISVQAEDLAVYYCQYYDFPPTFGGGTKLELKSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSC

도면 1b

MARX10 중쇄 (항- XRC1)- CrossMab (서열 번호 17)

리더

가변

불변 (CL)

불변 (힌지, CH2, CH3)

*V11 돌연변이 (G237D/P238D/H268D/P271G/A330R)

*“홀” 돌연변이 (Y349C/T366S/L368A/Y407V)

MGWSCIILFLVATATG QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT
 NYWIHWMKQRPGQGLEWIGMIHPNSDKAILTVDKSSSTAYMQLSS
 LTSEDSAVYYCARFANDGAYWGQGTLVTVSS ASVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDS
 EPKSCDKTHTCPPCPAPELLG DD SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVS DED GEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALP RPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRE
 EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
 SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSA
 WSHPPQFEK

MARX10 경쇄 (항- XRC1)- CrossMab (서열 번호 18)

리더

가변

불변 (CH1)

MGWSCIILFLVATATGVHS DVVVTQTPLSLPVSLGDPASISCKSSQSL
 VHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKIFSGSGSGTDFTLKISRVEAE
 DLGVYFCSQNTHPVPTFGGGTKLEIK SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
 GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

카뱃 시스템에 따른 인간 IgG1 서열 (CH1, 힌지, CH2, CH3)-

야생형 (서열 번호 1)

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGPSVFPLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면 1be

본 발명의 관련 돌연변이를 갖는 카뱃 시스템에 따른 인간 IgG1 서열 (CH1, 힌지, CH2, CH3)

***V11 돌연변이(G237D/P238D/H268D/P271G/A330R) (서열 번호 2)**

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
G **D** **D**SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV **S** **D** **E** **D** **G** EVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLGKEYKCKVSNKALP **R**PIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

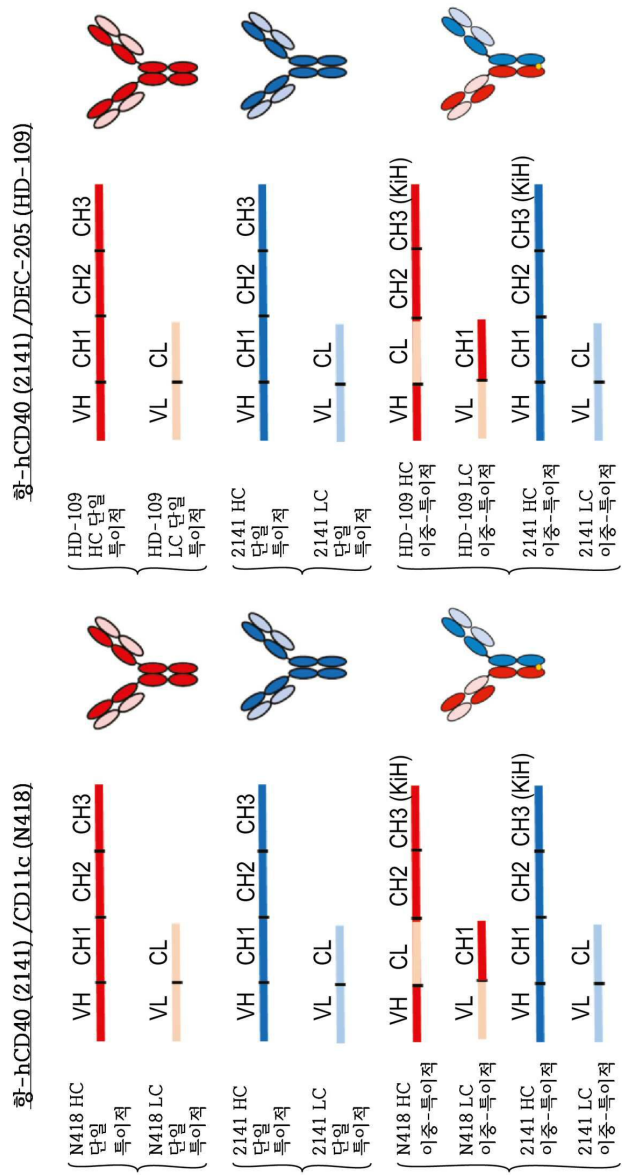
***“눅” 돌연변이(S354C/T366W) (서열 번호 3)**

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PP **C** RDELTKNQVSL **W** CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

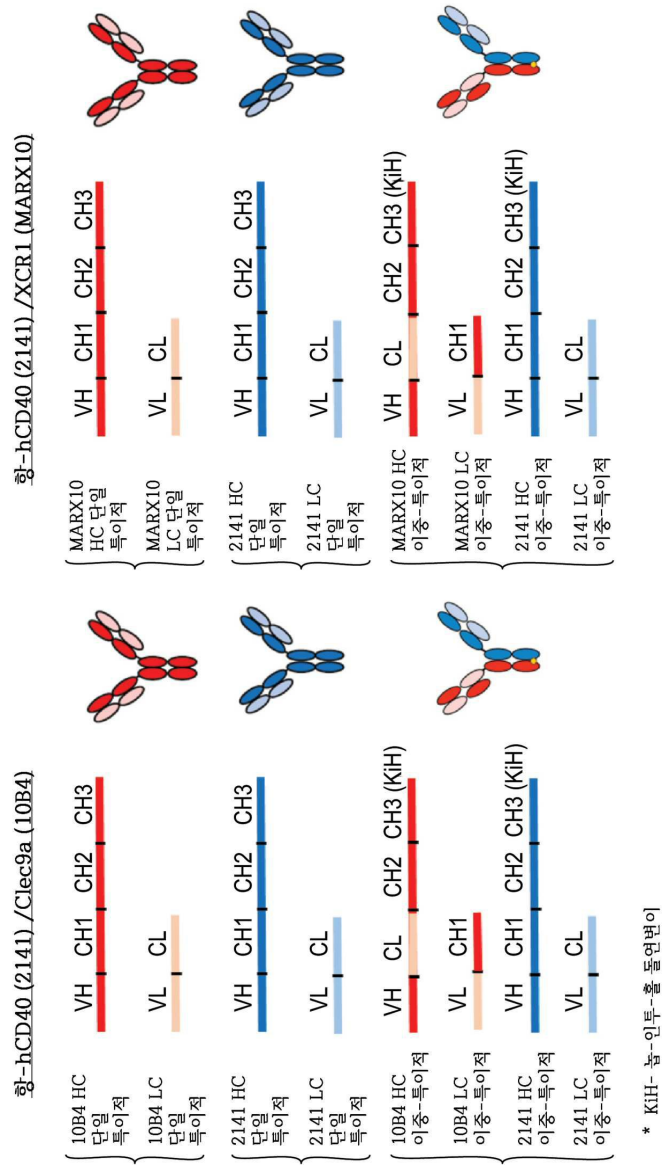
***“홀” 돌연변이(Y349C/T366S/L368A/Y407V) (서열 번호 4)**

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV **C** TL
PPSRDELTKNQVSL **S** **C** **A** VKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDS DGSFFL **V** SKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

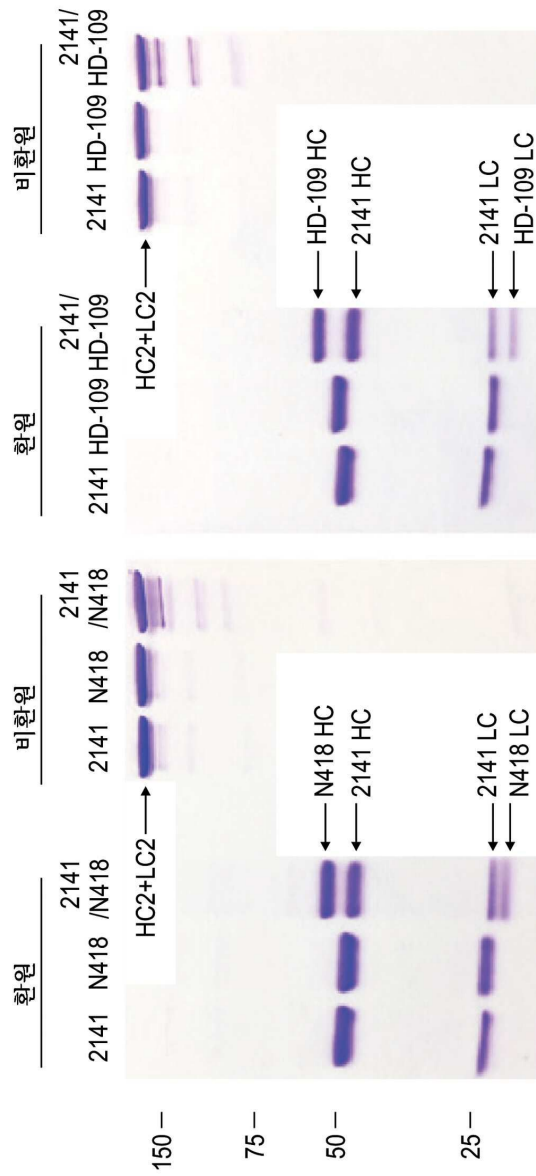
도면2a



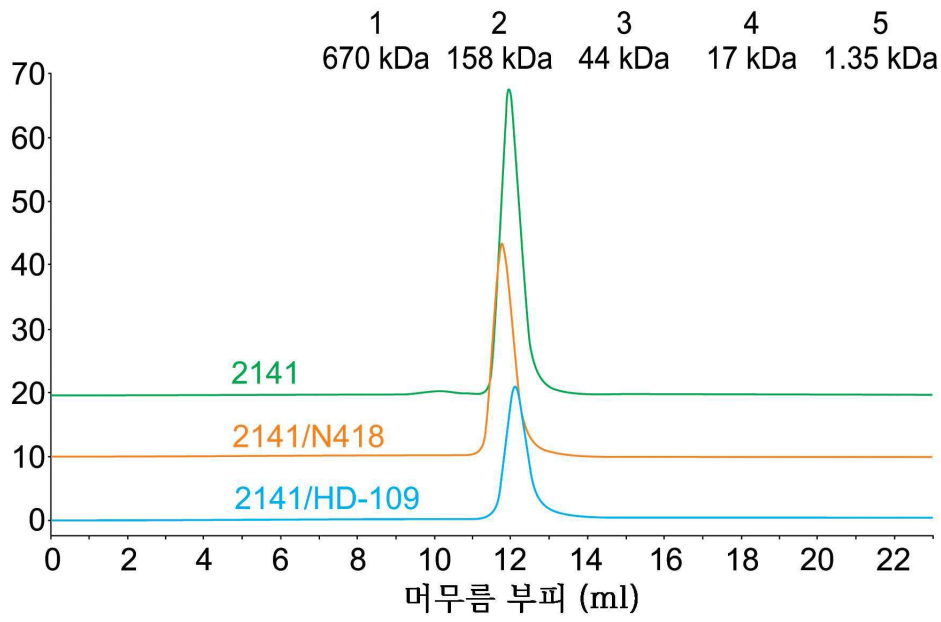
도면2b



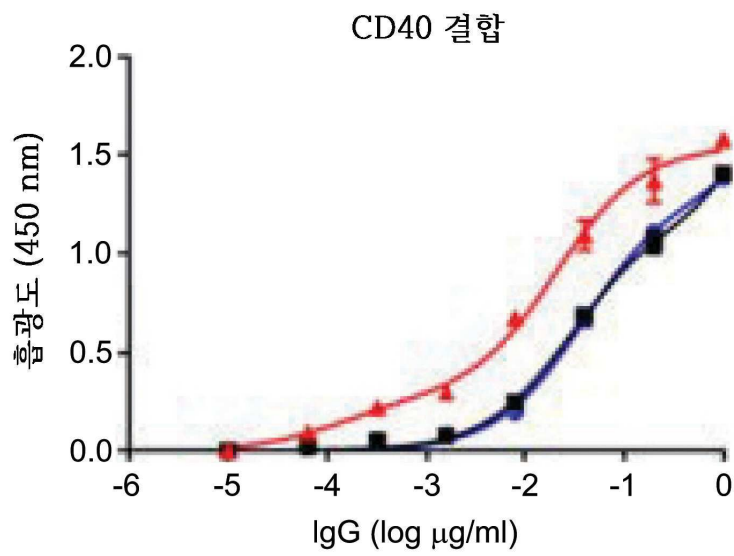
도면3a



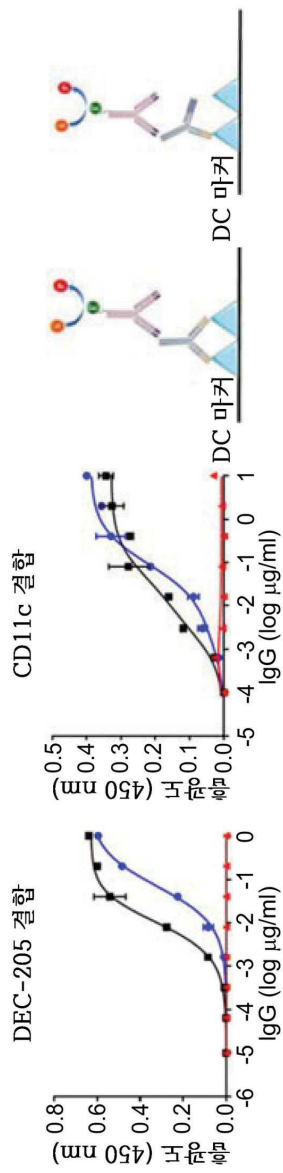
도면3b



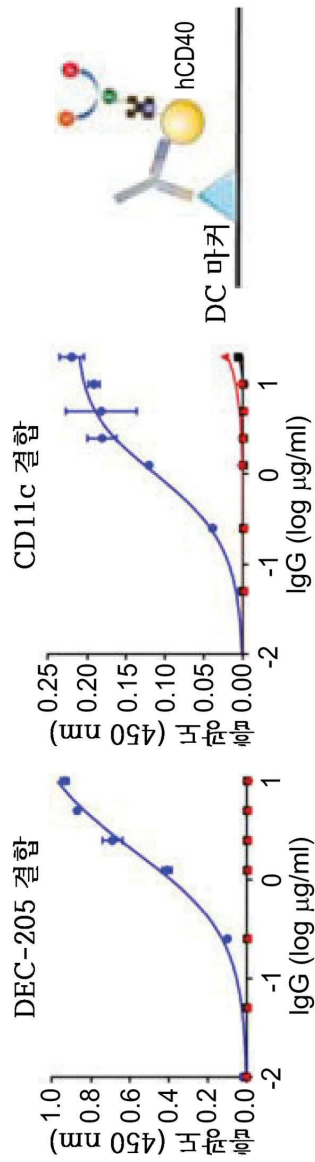
도면4a



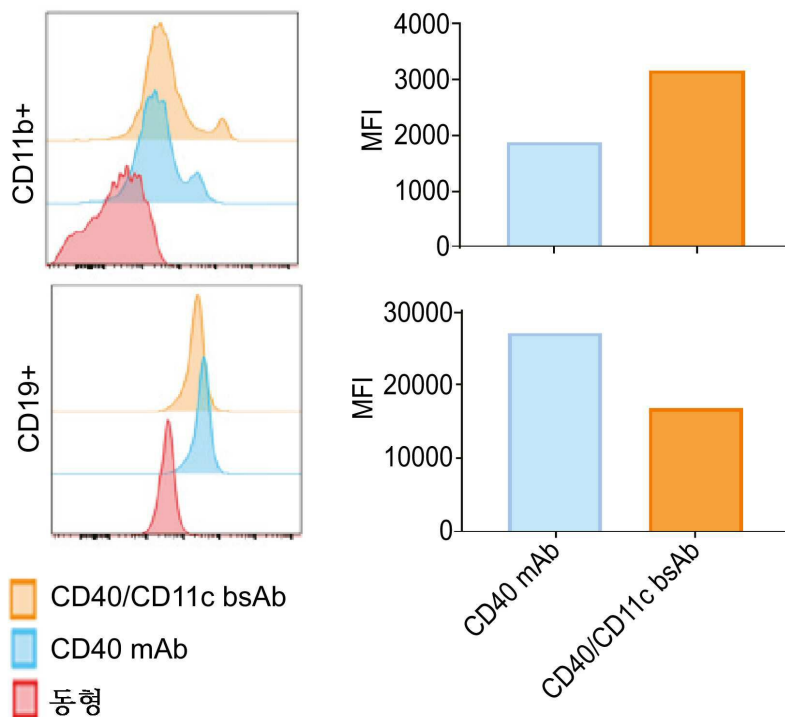
도면4b



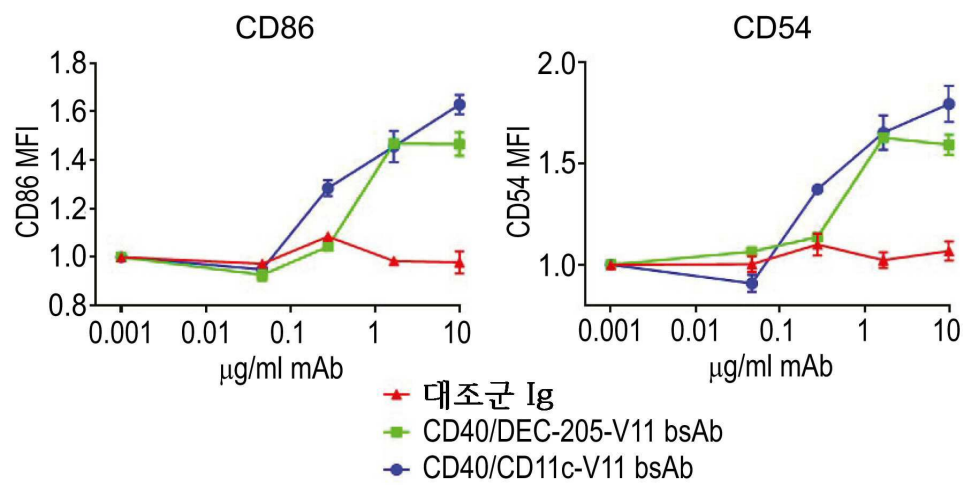
도면4c



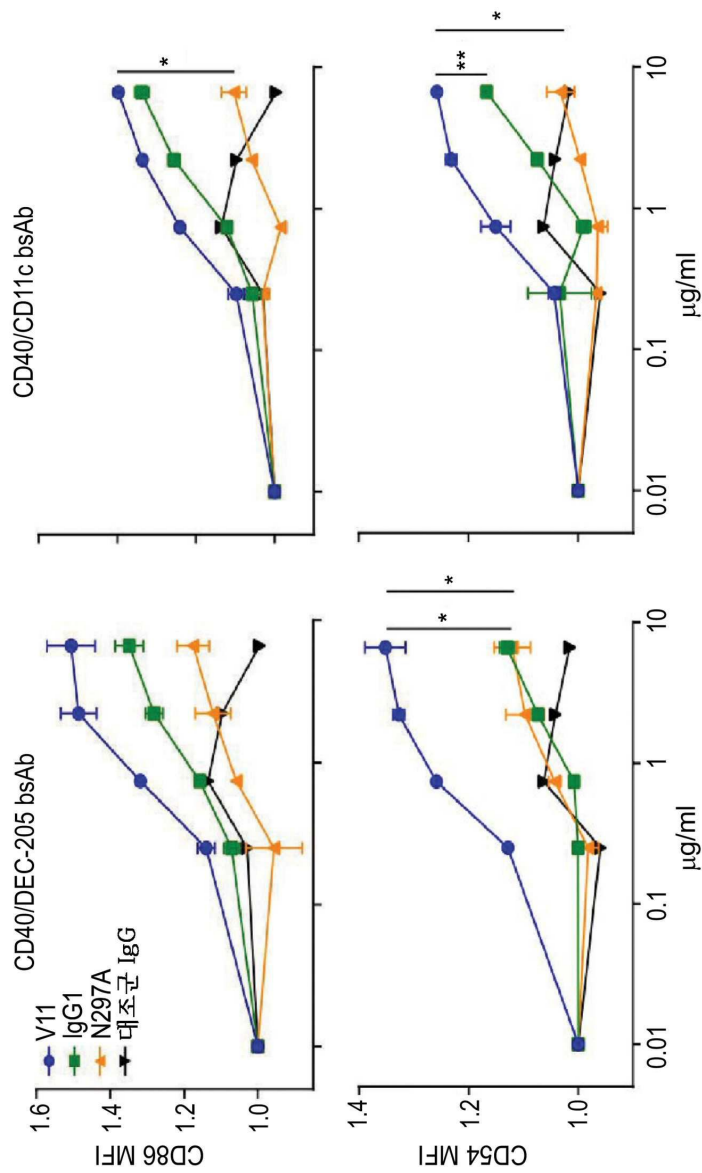
도면4d



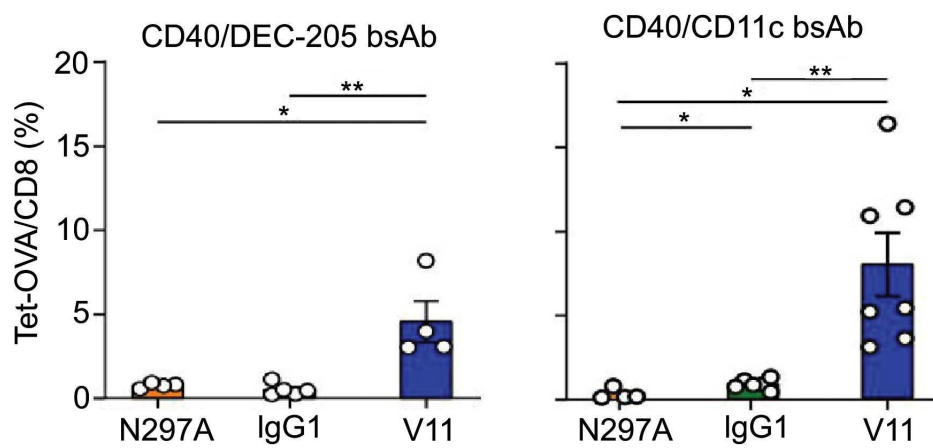
도면5



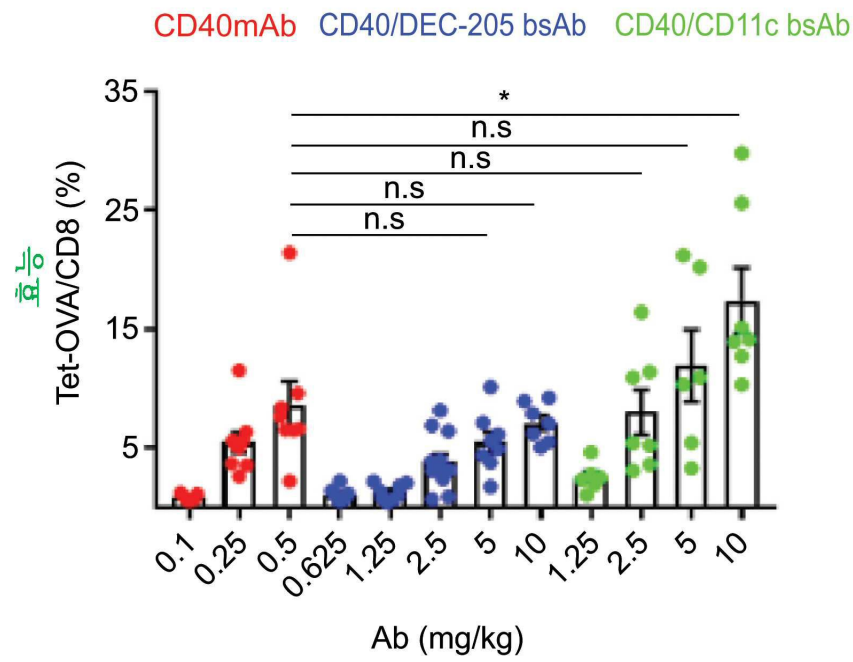
도면6a



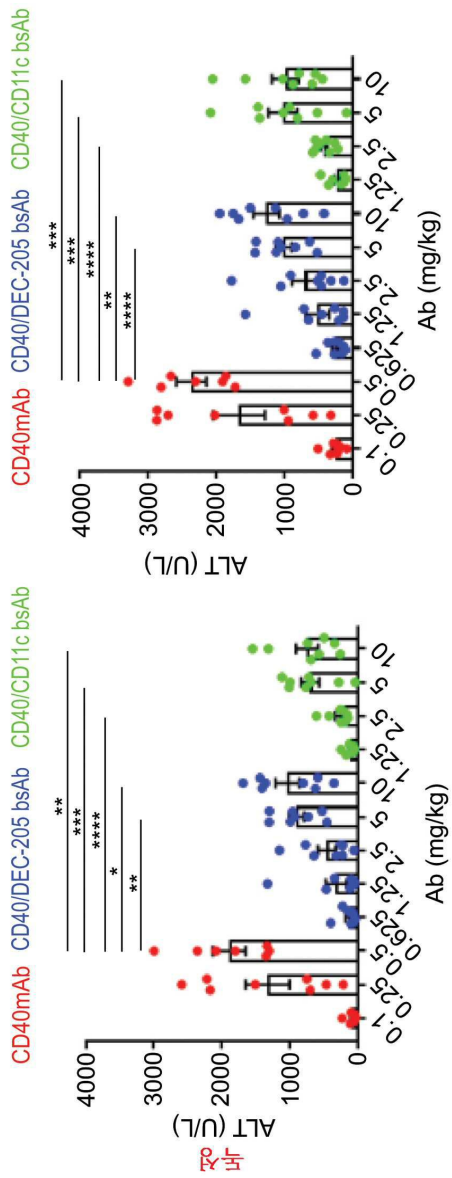
도면6b



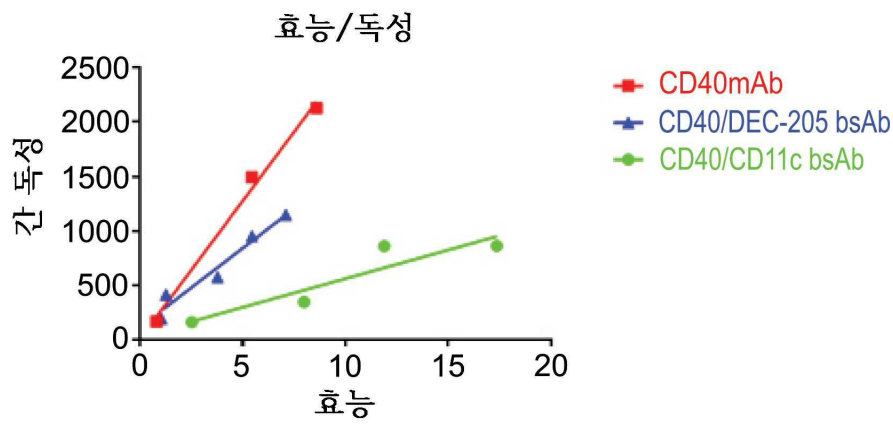
도면7a



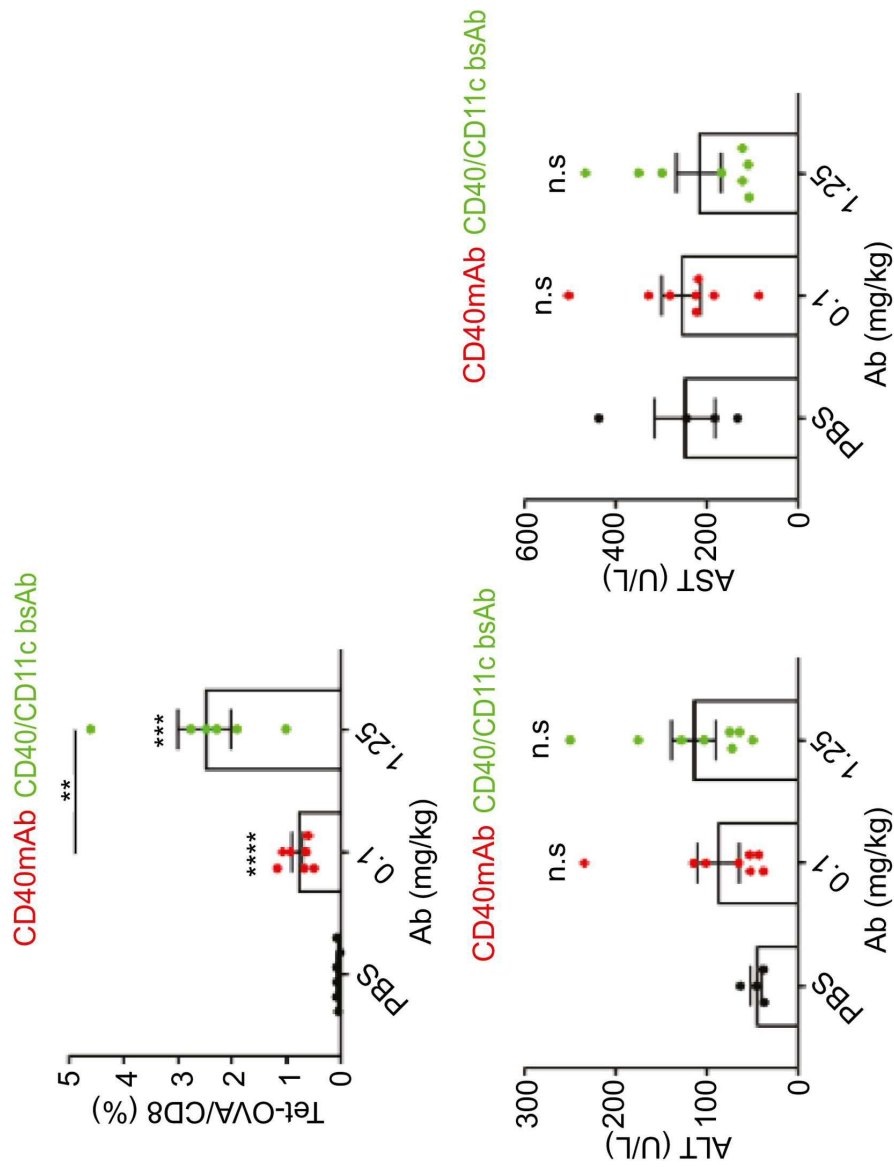
도면7b



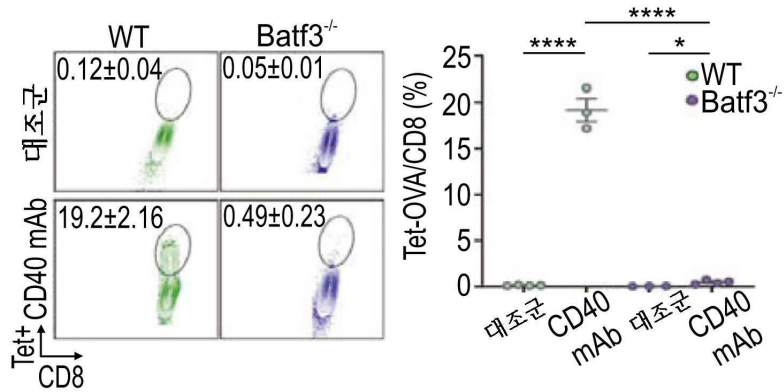
도면7c



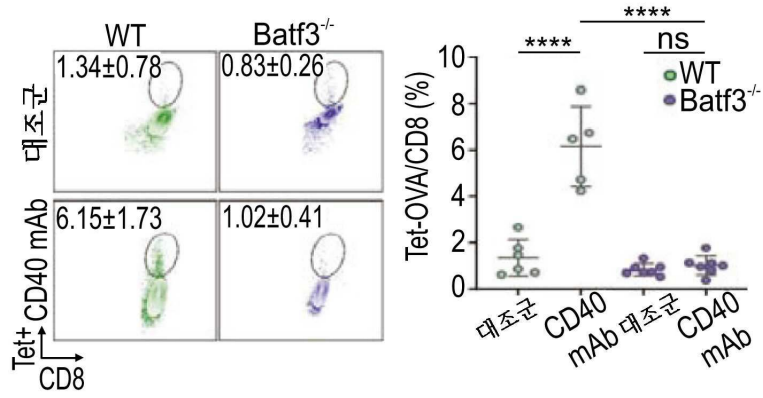
도면7d



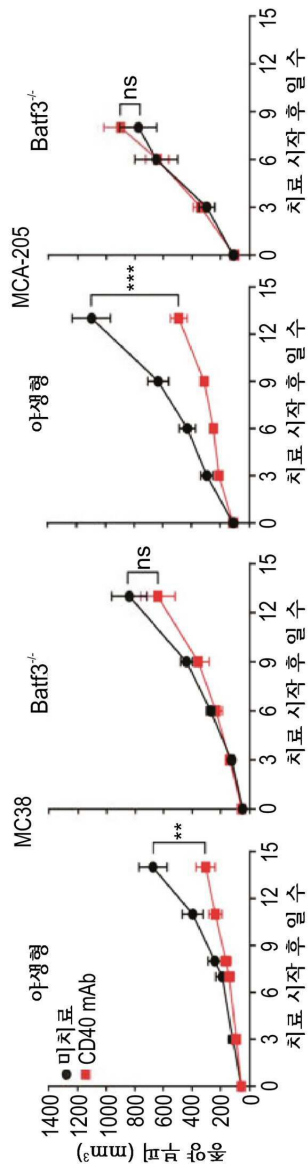
도면8a



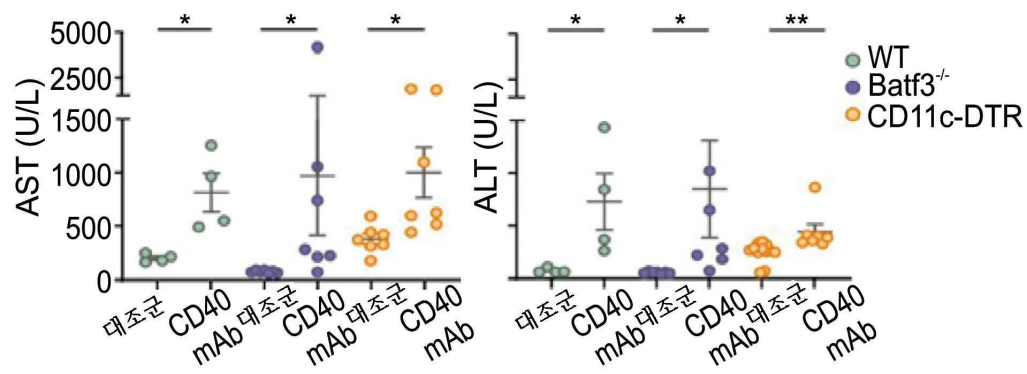
도면8b



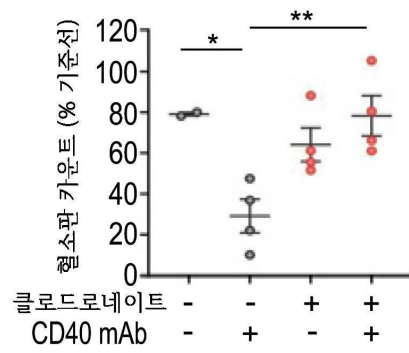
도면8c



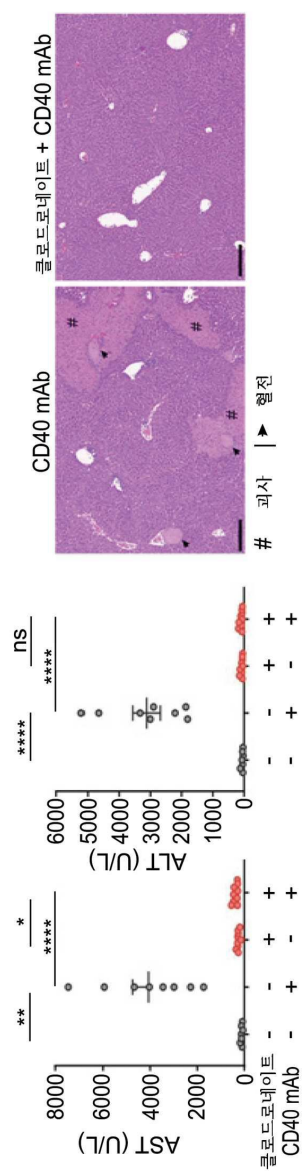
도면8d



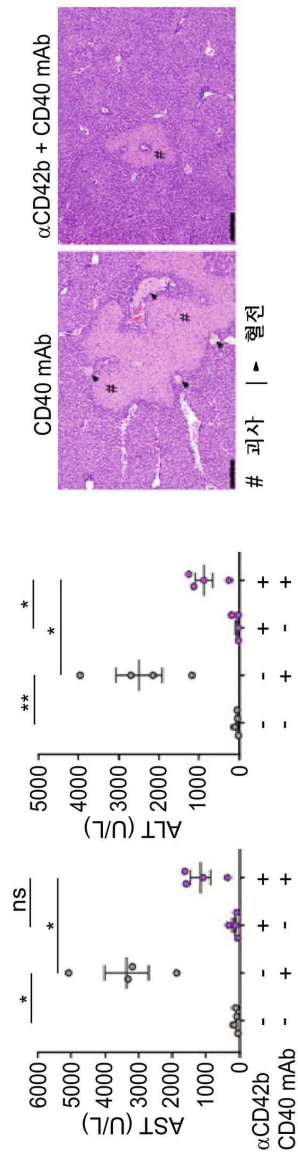
도면8g



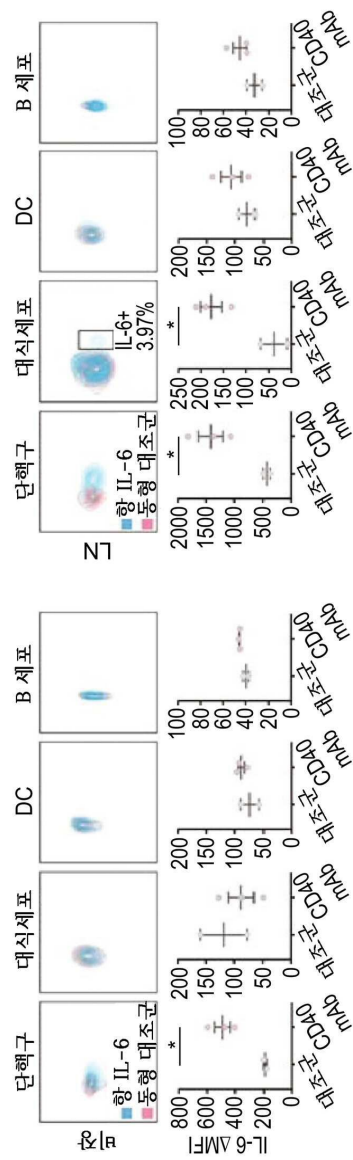
도면8e



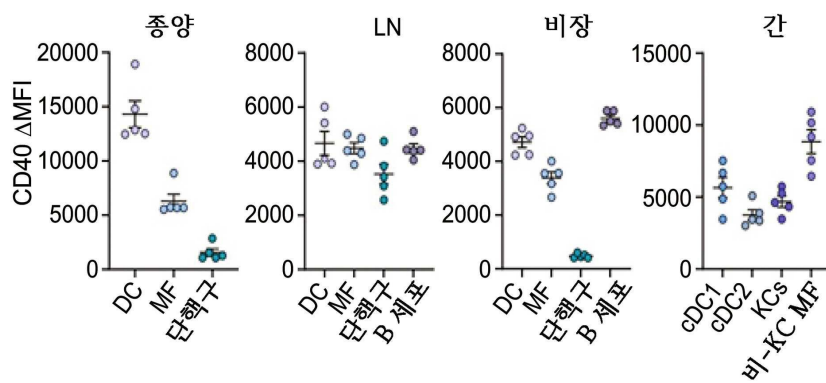
도면8f



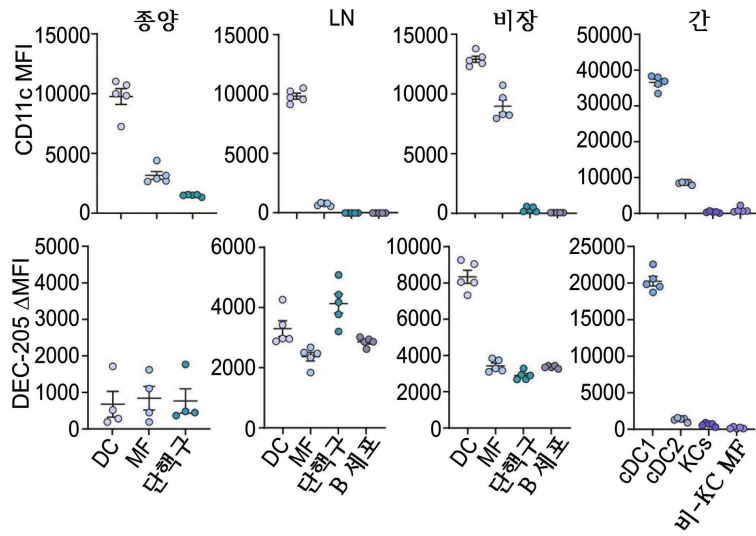
도면8h



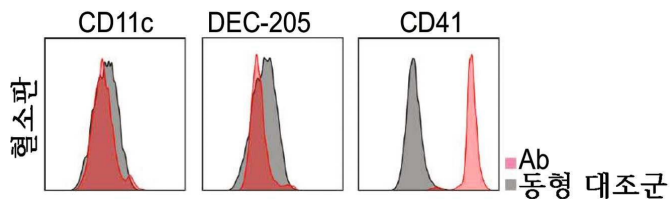
도면8i



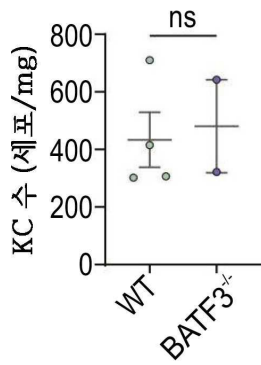
도면8j



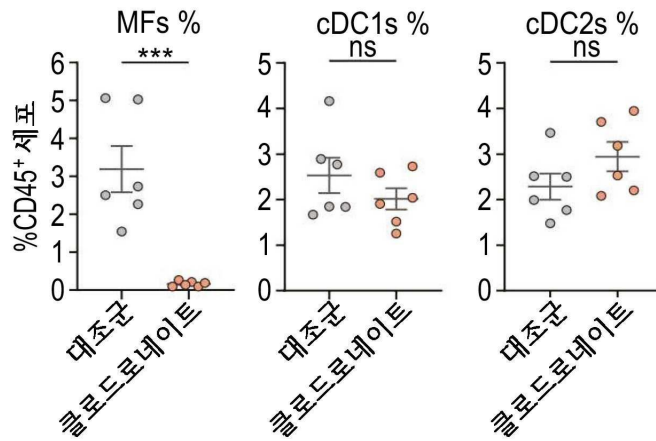
도면8k



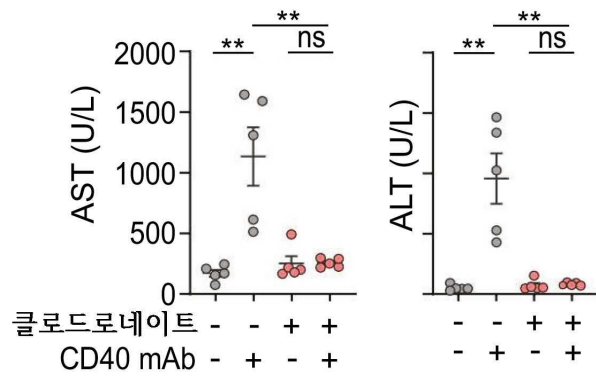
도면8l



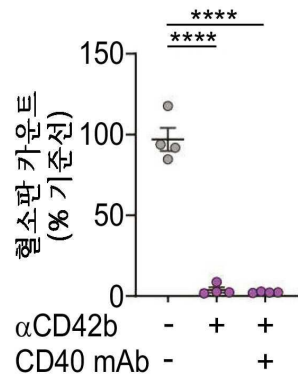
도면8m



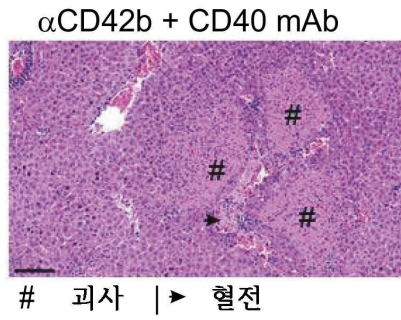
도면8n



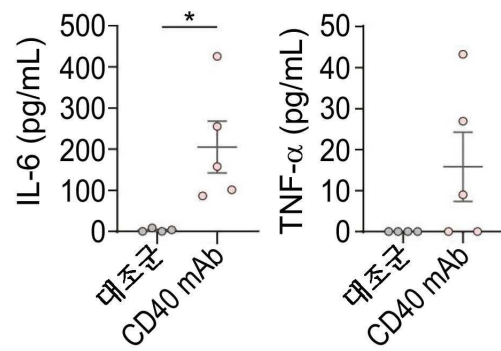
도면8o



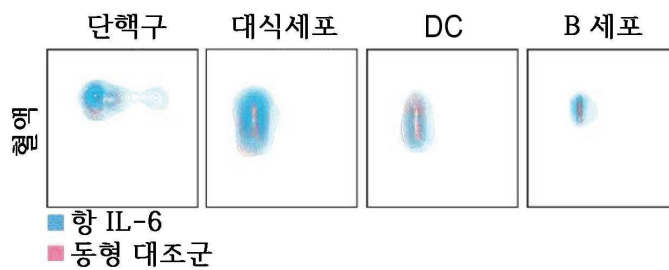
도면8p



도면8q



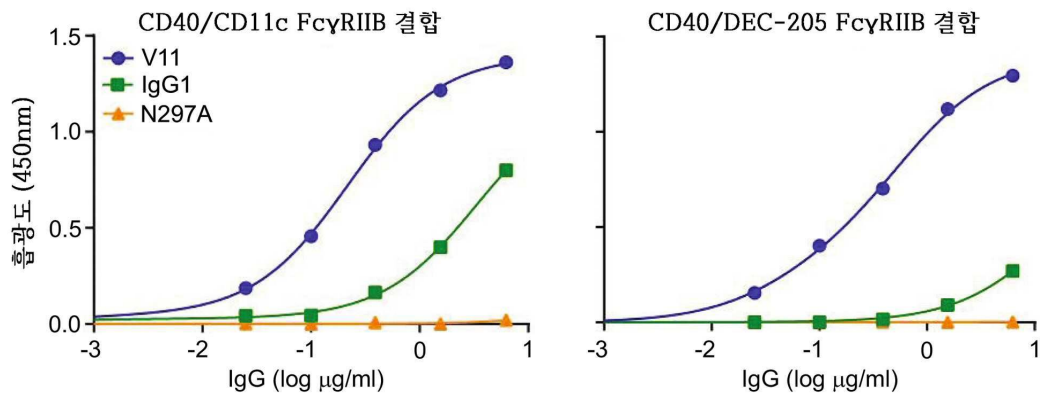
도면8r



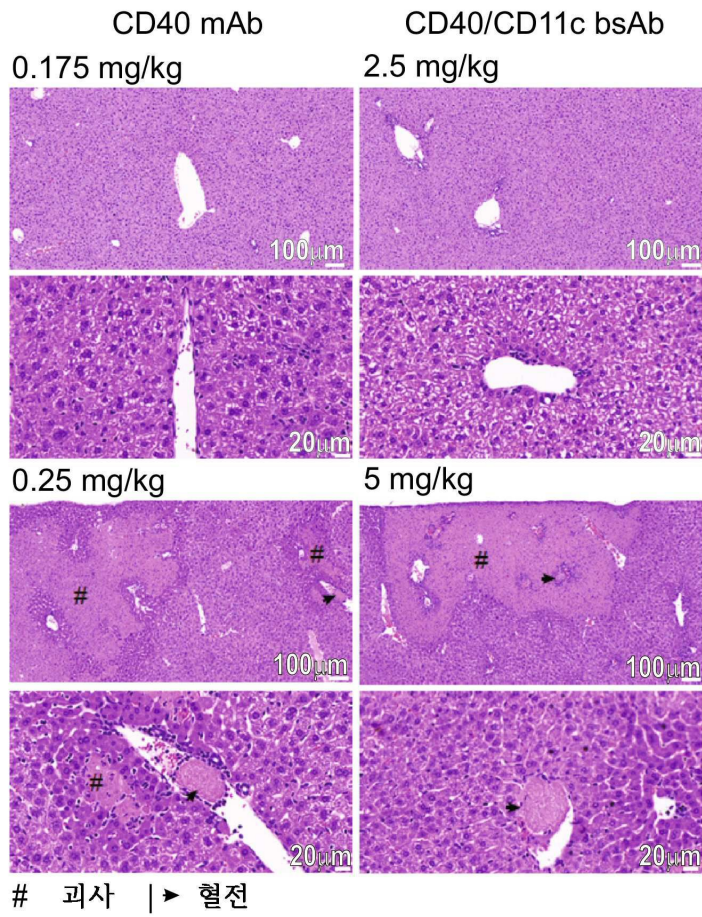
도면9a

변이체	Fc γ RIIB	Fc γ RIIA131R	Fc γ RIIIA158F
V11	++++	++	+
IgG1	++	++	+++
N297A	n.d.b	n.d.b	n.d.b

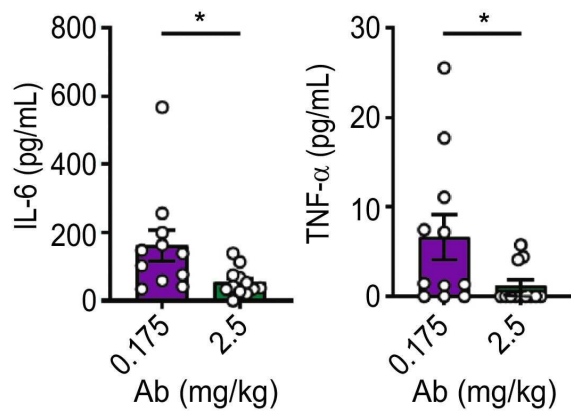
도면9b



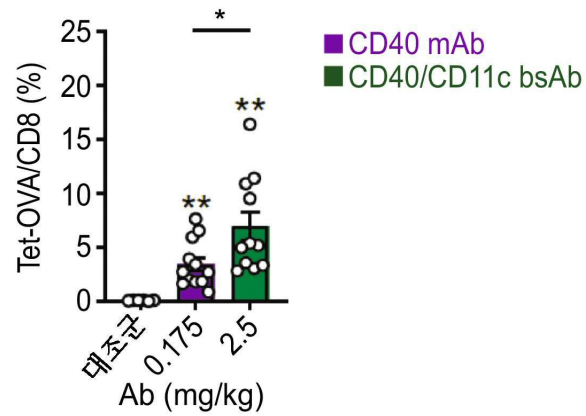
도면10a



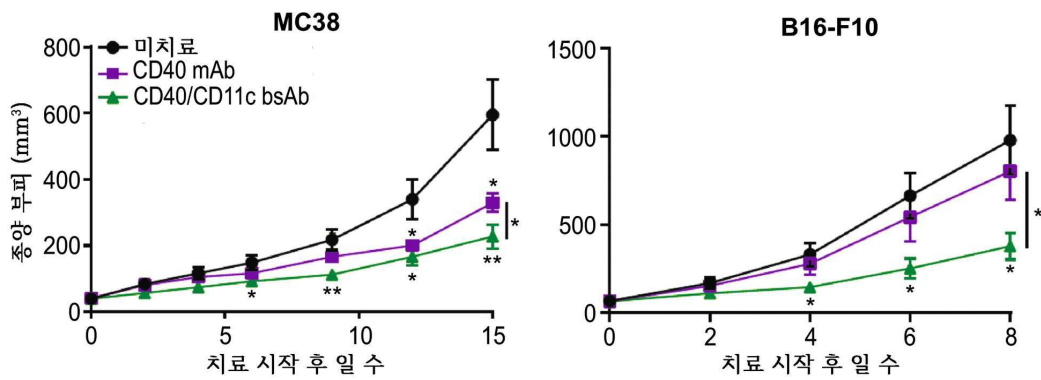
도면10b



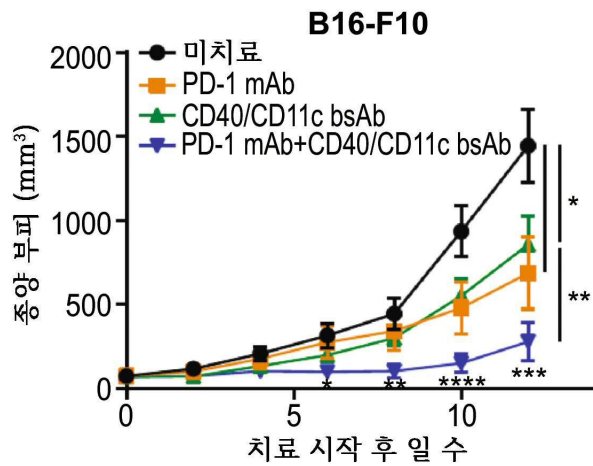
도면10c



도면10d



도면10e



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.

DAHAN, Rony

SALOMON, Ran

<120> MULTISPECIFIC ANTIBODIES FOR USE IN TREATING DISEASES

<130> 85611

<150> IL 272194

<151> 2020-01-22

<160> 63

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 329

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
50 55 60
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
65 70 75 80
Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95
Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
100 105 110
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
115 120 125
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145 150 155 160
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
165 170 175
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
180 185 190
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
210 215 220
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
225 230 235 240
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

290 295 300
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 2

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> human igg1 v11 amino acid sequence

<400> 2

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

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

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

165 170 175
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
180 185 190

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

Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 3

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Human IgG1 amino acid sequence with Knob mutations (S354C/T366W)

<400> 3

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
1 5 10 15
Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

195 200 205

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

210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu

225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

260 265 270

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

275 280 285
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

290 295 300
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 4

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Human IgG1 amino acid sequence with Hole mutations
(Y349C/T366S/L368A/Y407V)

<400> 4

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

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

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

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

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

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

325

<210> 5

<211> 475

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 2141 (Anti-CD40) Heavy chain amino acid sequence

<400> 5

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

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

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

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

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

 Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 245 250 255

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Asp Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro
 260 265 270
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 275 280 285
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Gly Glu Val Lys Phe Asn
 290 295 300

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

 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Glu
 370 375 380
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 385 390 395 400
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 405 410 415
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 420 425 430

 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 435 440 445
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 450 455 460
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475
 <210> 6
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220><223> 2141 (Anti-CD40) Light chain amino acid sequence

<400> 6

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

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

20 25 30
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile

35 40 45
Tyr Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn

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

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

85 90 95
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ile

100 105 110
Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

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

130 135 140
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro

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

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

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

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

210 215 220
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> n418 vh amino acid sequence

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Lys Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Lys

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Glu Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Lys Tyr Lys Tyr Ser Asn Tyr Ala Thr Glu Tyr Ala Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Thr Trp Glu Asn Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 8

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> n418 vl amino acid sequence

<400> 8

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

1 5 10 15

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

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

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

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

 195 200 205
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 210 215 220
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230
 <210> 9
 <211> 494
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> hd109 vh amino acid sequence

<400> 9

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Gln Val Gln Leu Thr Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
20 25 30

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
35 40 45

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
50 55 60

Gly Ile Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Thr Leu Lys
65 70 75 80

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
85 90 95

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
100 105 110

Arg Val Ser His Asp Tyr Phe Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Gly
115 120 125

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
145 150 155 160

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
165 170 175

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
180 185 190

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
195 200 205

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
210 215 220

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
225 230 235 240

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Arg Ser Glu Pro Lys Ser
245 250 255

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
260 265 270

Gly Asp Asp Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
275 280 285

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
290 295 300

Asp Glu Asp Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
305 310 315 320

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
325 330 335

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
340 345 350

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Arg Pro
355 360 365

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
370 375 380

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
385 390 395 400

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
405 410 415

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
420 425 430

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
435 440 445

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
450 455 460

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
465 470 475 480

Ser Pro Gly Lys Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

485 490

<210> 10

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hd109 vl amino acid sequence

<400> 10

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

1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala

20 25 30

Ser Leu Gly Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser

85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser

100 105 110

Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Ser

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

210 215 220
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

225 230

<210> 11

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> cp870 vh amino acid sequence

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr

100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> cp870 vl amino acid sequence

<400> 12

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Ser Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ile Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 19g3 vh amino acid sequence

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Glu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 19g3 vl amino acid sequence

<400> 14

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 10b4 vh amino acid sequence

<400> 15

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

Lys Ile Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Ala Ile

20 25 30

Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg

35 40 45

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

50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Met Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Pro Arg Ala Thr Glu Asp Val Pro Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Val

100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 16

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> 10b4 vh amino acid sequence

<400> 16

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asp

20 25 30

Glu Asn Lys Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Gly Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Asp Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 17

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> mrx10 vh amino acid sequence

<400> 17

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

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

Trp Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile His Pro Asn Ser Asp Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ala Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Phe Ala Asn Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> mrx10 vh amino acid sequence

<400> 18

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

1 5 10 15
 Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 19

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr

1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 20

Ile Asn Pro Asp Ser Gly Gly Thr

1 5

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 21

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr

1 5 10 15

Phe Asp Tyr

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 22

Gln Gly Ile Tyr Ser Trp

1 5

<210> 23

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 23

Thr Ala Ser

1

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 24

Gln Gln Ala Asn Ile Phe Pro Leu Thr Phe

1 5 10

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 25

Gly Phe Thr Phe Ser Glu Tyr Trp

1 5

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 26

Ile Lys Tyr Lys Tyr Ser Asn Tyr Ala Thr

1 5 10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 27

Ala Arg Thr Trp Glu Asn Trp Tyr Phe Asp Phe

1 5 10

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 28

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

1 5

<210> 29

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 29

Glu Thr Asn

1

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 30

Gln His Tyr Tyr Asp Tyr Pro Arg Thr

1

5

<210> 31

<211> 8

<212>

> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 31

Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Ala

1

5

<210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 32

Trp Thr Gly Gly Gly Thr

1

5

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 33

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

1 5 10 15

Gly Met Asp Tyr

20

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 34

Gln Asn Ile Asn Val Trp

1 5

<210> 35

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 35

Lys Val Ser

1

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 36

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 37

<211> 488

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> n418 vh amino acid sequence

<400> 37

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

1 5 10 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Lys Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Lys

20 25 30

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Glu Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Val Ile Lys Tyr Lys Tyr Ser Asn Tyr Ala Thr Glu Tyr Ala Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Thr Trp Glu Asn Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln

115 120 125

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

130 135 140

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser

145 150 155 160

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Gly Glu Cys Asp Arg Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 245 250 255
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Asp Asp Ser Val Phe
 260 265 270
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 275 280 285

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

 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 355 360 365
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
 370 375 380
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
 385 390 395 400
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 405 410 415

 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 420 425 430
 Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 435 440 445
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 450 455 460
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Ala
 465 470 475 480

 Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

485

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> n418 vl amino acid sequence

<400> 38

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile His Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Glu Thr Asn Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Tyr Asp Tyr Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 39

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hd109 vh amino acid sequence

<400> 39

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Val Ser His Asp Tyr Phe Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Gly

100 105 110

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hd109 vl amino acid sequence

<400> 40

Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 41

<211> 277

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 41

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile

195 200 205

Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn

210 215 220
Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
225 230 235 240
Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His

245 250 255
Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
260 265 270
Val Gln Glu Arg Gln

275
<210> 42
<211> 261
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 42

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

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

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

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

145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr

165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser

180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala

195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His

210 215 220

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

225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe

245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu

260

<210> 43

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 43

tcatttacca ggagagtgg

19

<210> 44

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 44

agaggtctctt ctcagtatgg tggttgtgc

29

<210> 45

<211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 45
 gctcacgtcc accaccacac atgt 24
 <210> 46
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 46
 gaaatagccc ttgaccaggc atcc 24
 <210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 47
 aacactcatt cctgttgaag 20
 <210> 48
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 48
 gctcttgaca atgggtgaag ttgatgtc 28
 <210> 49
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Single strand DNA oligonucleotide
 <400> 49
 ctaaacactca ttctgttca gggctcttg 28

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Single strand DNA oligonucleotide

<400> 50

gctgctcagg ctgtaggtgc tgtc

24

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> short synthetic peptide

<400> 51

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Ala

1 5

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 53

Ile Arg Thr Arg Pro Ser Lys Tyr Ala Thr

1 5 10

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 54

Thr Pro Arg Ala Thr Glu Asp Val Pro Phe Tyr

1 5 10

<210> 55

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 55

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

1 5 10

<210> 56

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 56

Trp Ala Ser

1

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 57

Gln Gln Tyr Tyr Asp Phe Pro Pro Thr

1 5

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 58

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp

1 5

<210> 59

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 59

Trp Ala Ser

1

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 60

Gln Gln Tyr Tyr Asp Phe Pro Pro Thr

1 5

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 61

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 62

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 62

Lys Ile Ser

1

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Complementarity-determining region (CDR)

<400> 63

Ser Gln Asn Thr His Val Pro Tyr Thr

1

5