

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2016-0099092

(43) 공개일자

2016년08월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/39558 (2013.01)

A61K 38/16 (2013.01)

(21) 출원번호

10-2016-7018833

(22) 출원일자(국제)

2014년12월17일

심사청구일자

없음

(85) 번역문제출일자

2016년07월13일

(86) 국제출원번호

PCT/US2014/070998

(87) 국제공개번호

WO 2015/095423

국제공개일자

2015년06월25일

(30) 우선권주장

61/917,264 2013년12월17일 미국(US)

62/080,991 2014년11월17일 미국(US)

(71) 출원인

제넨테크, 인크.

미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 발명자

청, 지앤

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

킴, 정

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

(74) 대리인

양영준, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 91 항

(54) 발명의 명칭 OX40 결합 효능제 및 PD-1 축 결합 길항제를 포함하는 조합 요법

(57) 요약

본 발명은 암을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 방법은 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제를 투여하는 것을 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

C07K 16/2827 (2013.01)

C07K 16/2878 (2013.01)

A61K 2039/507 (2013.01)

A61K 2039/55 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

C07K 2317/75 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

개체에게 유효량의 인간 PD-1 측 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제를 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, PD-1 측 결합 길항제가 PD-1 결합 길항제, PDL1 결합 길항제 및 PDL2 결합 길항제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, PD-1 측 결합 길항제가 PD-1 결합 길항제인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 PD-1의 그의 리간드 결합 파트너에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 PD-1의 PDL1에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 PD-1의 PDL2에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 7

제3항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 PD-1의 PDL1 및 PDL2 둘 다에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 8

제3항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 항체인 방법.

청구항 9

제3항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 니볼루맙인 방법.

청구항 10

제3항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 펌브롤리주맙인 방법.

청구항 11

제3항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 CT-011인 방법.

청구항 12

제3항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 AMP-224인 방법.

청구항 13

제2항에 있어서, PD-1 측 결합 길항제가 PDL1 결합 길항제인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, PDL1 결합 길항제가 PDL1의 PD-1에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, PDL1 결합 길항제가 PDL1의 B7-1에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, PDL1 결합 길항제가 PDL1의 PD-1 및 B7-1 둘 다에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 17

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, PDL1 결합 길항제가 항-PDL1 항체인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 항-PDL1 항체가 모노클로날 항체인 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 항-PDL1 항체가 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 단편인 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 항-PDL1 항체가 인간화 항체 또는 인간 항체인 방법.

청구항 21

제13항에 있어서, PDL1 결합 길항제가 YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 및 MEDI4736으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법

청구항 22

제17항에 있어서, 항체가 GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 1)의 HVR-H1 서열, AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2)의 HVR-H2 서열 및 RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 3)의 HVR-H3 서열을 포함하는 중쇄; 및 RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 4)의 HVR-L1 서열, SASFLYS (SEQ ID NO: 5)의 HVR-L2 서열 및 QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 6)의 HVR-L3 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제17항에 있어서, 항체가

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAVISPYGGSTYYA
DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS (SEQ
ID NO:7) 또는 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWI
SPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG
TLVTVSSASTK (SEQ ID NO:8)

의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASF
LYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID
NO:9)

의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제2항에 있어서, PD-1 측 결합 길항제가 PDL2 결합 길항제인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, PDL2 결합 길항제가 항체인 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, PDL2 결합 길항제가 이뮤노어드레신인 방법.

청구항 27

제8항, 제17항 내지 제23항 및 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 EU 넘버링에 따른 위치 297에 Asn에서 Ala로의 치환을 갖는 인간 IgG1인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, OX40 결합 효능제가 OX40 효능제 항체, OX40L 효능제 단편, OX40 올리고머 수용체 및 OX40 이뮤노어드레신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, OX40 결합 효능제가 인간 OX40에 결합하는 OX40 효능제 항체인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, OX40 효능제 항체가 MEDI6469, MEDI0562 또는 MEDI6383인 방법.

청구항 31

제29항에 있어서, OX40 효능제 항체가 전장 인간 IgG1 항체인 방법.

청구항 32

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, OX40 결합 효능제가 삼량체 OX40L-Fc 단백질인 방법.

청구항 33

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, OX40 결합 효능제가 OX40L의 1개 이상의 세포의 도메인을 포함하는 OX40L 효능제 단편인 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 방광암, 췌장암, 자궁내막암, 결장암, 신장암, 식도암, 전립선암, 결장직장암, 교모세포종, 신경모세포종 또는 간세포성 암종인 방법.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 암을 가지고 있거나 암으로 진단된 것인 방법.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 치료가 치료 중지 후에 개체에서 지속된 반응을 유발하는 것인 방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, OX40 결합 효능제가 PD-1 축 결합 길항제 전에, PD-1 축 결합 길항제와 동시에 또는 PD-1 축 결합 길항제 후에 투여되는 것인 방법.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 인간인 방법.

청구항 39

유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제를 투여하는 것을 포함하는, 암을 갖는 개체에서 면역 기능

을 증진시키는 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 개체에서의 CD8 T 세포가 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제의 투여 전에 비해 증진된 프라이밍, 활성화, 증식 및/또는 세포용해 활성을 갖는 것인 방법.

청구항 41

제39항에 있어서, CD8 T 세포의 수가 조합물의 투여 전에 비해 상승되는 것인 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, CD8 T 세포가 항원-특이적 CD8 T 세포인 방법.

청구항 43

제39항에 있어서, Treg 기능이 조합물의 투여 전에 비해 저해되는 것인 방법.

청구항 44

제39항에 있어서, T 세포 소진이 조합물의 투여 전에 비해 감소되는 것인 방법.

청구항 45

제39항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1 축 결합 길항제가 PD-1 결합 길항제, PDL1 결합 길항제 및 PDL2 결합 길항제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, PD-1 축 결합 길항제가 PD-1 결합 길항제인 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 PD-1의 그의 리간드 결합 파트너에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 48

제46항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 PD-1의 PDL1에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 49

제46항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 PD-1의 PDL2에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 50

제46항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 PD-1의 PDL1 및 PDL2 둘 다에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 51

제46항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 항체인 방법.

청구항 52

제46항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 니볼루맙인 방법.

청구항 53

제46항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 펙트롤리주맙인 방법.

청구항 54

제46항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 CT-011인 방법.

청구항 55

제46항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 AMP-224인 방법.

청구항 56

제45항에 있어서, PD-1 축 결합 길항제가 PDL1 결합 길항제인 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, PDL1 결합 길항제가 PDL1의 PD-1에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 58

제56항에 있어서, PDL1 결합 길항제가 PDL1의 B7-1에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 59

제56항에 있어서, PDL1 결합 길항제가 PDL1의 PD-1 및 B7-1 둘 다에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 60

제56항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, PDL1 결합 길항제가 항-PDL1 항체인 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 항-PDL1 항체가 모노클로날 항체인 방법.

청구항 62

제60항에 있어서, 항-PDL1 항체가 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 단편인 방법.

청구항 63

제60항에 있어서, 항-PDL1 항체가 인간화 항체 또는 인간 항체인 방법.

청구항 64

제56항에 있어서, PDL1 결합 길항제가 YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 및 MEDI4736으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 65

제60항에 있어서, 항-PDL1 항체가 GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 1)의 HVR-H1 서열, AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2)의 HVR-H2 서열 및 RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 3)의 HVR-H3 서열을 포함하는 중쇄; 및 RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 4)의 HVR-L1 서열, SASFLYS (SEQ ID NO: 5)의 HVR-L2 서열 및 QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 6)의 HVR-L3 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것인 방법.

청구항 66

제60항에 있어서, 항-PDL1 항체가

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYA
DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS (SEQ
ID NO:7) 또는 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWI
SPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG
TLVTVSSASTK (SEQ ID NO:8)

의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASF
LYSGVPSRFRSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID
NO:9)

의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 67

제51항, 제60항 내지 제63항, 제65항 및 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 EU 넘버링에 따른 위치 297에 Asn에서 Ala로의 치환을 갖는 인간 IgG1인 방법.

청구항 68

제45항에 있어서, PD-1 측 결합 길항제가 PDL2 결합 길항제인 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, PDL2 결합 길항제가 항체인 방법.

청구항 70

제68항에 있어서, PDL2 결합 길항제가 이뮤노어드레신인 방법.

청구항 71

제39항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, OX40 결합 효능제가 OX40 효능제 항체, OX40L 효능제 단편, OX40 올리고머 수용체 및 OX40 이뮤노어드레신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, OX40 결합 효능제가 인간 OX40에 결합하는 OX40 효능제 항체인 방법.

청구항 73

제72항에 있어서, OX40 효능제 항체가 MEDI6469, MEDI0562 또는 MEDI6383인 방법.

청구항 74

제72항에 있어서, OX40 효능제 항체가 전장 IgG1 항체인 방법.

청구항 75

제39항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, OX40 결합 효능제가 삼량체 OX40L-Fc 단백질인 방법.

청구항 76

제39항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, OX40 결합 효능제가 OX40L의 1개 이상의 세포외 도메인을 포함하는 OX40L 효능제 단편인 방법.

청구항 77

제39항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 방광암, 췌장암, 자궁내막암, 결장암, 신장암, 식도암, 전립선암, 결장직장암, 교모세포종, 신경모세포종 또는 간세포성 암종인 방법.

청구항 78

제39항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 암으로 진단된 것인 방법.

청구항 79

제39항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 치료가 치료 중지 후에 개체에서 지속된 반응을 유발하는 것인 방

법.

청구항 80

제39항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, OX40 결합 효능제가 PD-1 축 결합 길항제 전에, PD-1 축 결합 길항제와 동시에 또는 PD-1 축 결합 길항제 후에 투여되는 것인 방법.

청구항 81

제39항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 인간인 방법.

청구항 82

제1항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1 축 결합 길항제 및/또는 OX40 결합 효능제가 정맥내로, 근육내로, 피하로, 국소로, 경구로, 경피로, 복강내로, 안와내로, 이식에 의해, 흡입에 의해, 척수강내로, 뇌실내로 또는 비강내로 투여되는 것인 방법.

청구항 83

제1항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위한 화학요법제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 84

개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위한 의약의 제조에서의 인간 PD-1 축 결합 길항제의 용도이며, 여기서 의약은 인간 PD-1 축 결합 길항제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하고, 여기서 치료는 의약을 OX40 결합 효능제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물과 조합하여 투여하는 것을 포함하는 것인 용도.

청구항 85

개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위한 의약의 제조에서의 OX40 결합 효능제의 용도이며, 여기서 의약은 OX40 결합 효능제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하고, 여기서 치료는 의약을 인간 PD-1 축 결합 길항제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물과 조합하여 투여하는 것을 포함하는 것인 용도.

청구항 86

개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키는데 사용하기 위한 인간 PD-1 축 결합 길항제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물이며, 여기서 치료는 상기 조성물을 제2 조성물과 조합하여 투여하는 것을 포함하고, 여기서 제2 조성물은 OX40 결합 효능제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 87

개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키는데 사용하기 위한 OX40 결합 효능제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물이며, 여기서 치료는 상기 조성물을 제2 조성물과 조합하여 투여하는 것을 포함하고, 여기서 제2 조성물은 인간 PD-1 축 결합 길항제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 88

PD-1 축 결합 길항제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 의약, 및 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위해 의약을 OX40 결합 효능제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물과 조합하여 투여하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 포함하는 키트.

청구항 89

PD-1 축 결합 길항제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제1 의약 및 OX40 결합 효능제 및 임의적인

제약상 허용되는 담체를 포함하는 제2 의약을 포함하는 키트.

청구항 90

제89항에 있어서, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위해 제1 의약 및 제2 의약을 투여하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 추가로 포함하는 키트.

청구항 91

OX40 결합 효능제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 의약, 및 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위해 의약을 PD-1 축 결합 길항제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물과 조합하여 투여하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본 출원은 2013년 12월 17일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 61/917,264 및 2014년 11월 17일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 62/080,991의 우선권 이익을 주장하며, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] ASCII 텍스트 파일의 서열 목록 제출
- [0004] ASCII 텍스트 파일의 하기 제출 내용: 서열 목록의 컴퓨터 판독가능 형태 (CRF) (파일명: 146392030640SeqList.txt, 기록 일자: 2014년 12월 16일, 크기: 72 KB)는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0005] 발명의 분야
- [0006] 본 발명은 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제를 투여함으로써 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] T-세포에 2가지 별개의 신호를 제공하는 것은 항원-제시 세포 (APC)에 의한 휴지 T 림프구의 림프구 활성화에 널리 허용되는 모델이다. 문헌 [Lafferty et al., Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 53: 27-42 (1975)]. 이러한 모델은 추가로 비-자기 면역 관용으로부터 자기 면역 관용의 구별을 제공한다. 문헌 [Bretscher et al., Science 169: 1042-1049 (1970); Bretscher, P.A., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96: 185-190 (1999); Jenkins et al., J. Exp. Med. 165: 302-319 (1987)]. 1차 신호 또는 항원 특이적 신호는 주요 조직적합성-복합체 (MHC)와 관련하여 제시된 외래 항원 펩티드의 인식 후에 T-세포 수용체 (TCR)를 통해 전달된다. 2차 또는 공동-자극 신호는 항원-제시 세포 (APC) 상에서 발현된 공동-자극 분자에 의해 T-세포로 전달되어, T-세포가 클론 확장, 시토카인 분비 및 이펙터 기능을 촉진하도록 유도한다. 문헌 [Lenschow et al., Ann. Rev. Immunol. 14:233 (1996)]. 공동-자극의 부재 하에, T-세포는 항원 자극에 대해 불응성이 될 수 있고, 효과적인 면역 반응을 탑재하지 않을 수 있으며, 추가로 외래 항원에 대해 소진되거나 관용이 생길 수 있다.
- [0008] 2-신호 모델에서 T-세포는 양성 및 음성 2차 공동-자극 신호를 둘 다 받는다. 이러한 양성 및 음성 신호의 조절은 면역 관용을 유지하고 자가면역을 방지하면서 숙주의 보호성 면역 반응을 최대화하는데 중요하다. 음성 2차 신호는 T-세포 관용을 유도하는데 필요한 것으로 보이는 반면에, 양성 신호는 T-세포 활성화를 촉진한다. 간단한 2-신호 모델이 나이브 림프구에 대해서는 여전히 유효한 설명을 제공하지만, 숙주의 면역 반응은 동적 과정이고, 공동-자극 신호는 또한 항원-노출된 T-세포에도 제공될 수 있다. 공동-자극 신호의 조작이 세포-기반 면역 반응을 증진시키거나 종결시키는 수단을 제공하는 것으로 나타났기 때문에, 공동-자극의 메커니즘이 치료 관심사이다. 최근에, T 세포 기능이상 또는 무반응은 억제 수용체인 프로그램화된 사멸 1 폴리펩티드 (PD-1)의 유도된 발현 및 지속된 발현과 공동으로 일어나는 것으로 밝혀졌다. 그 결과, PD-1 및 PD-1과의 상호작용을 통해 신호를 전달하는 다른 분자, 예컨대 프로그램화된 사멸 리간드 1 (PD-L1) 및 프로그램화된 사멸 리간드 2 (PD-L2)를 표적화하는 요법이 관심이 집중되는 영역이다.
- [0009] PD-L1은 많은 암에서 과다발현되며, 종종 불량한 예후와 연관된다 (Okazaki T et al., Intern. Immun. 2007 19(7):813) (Thompson RH et al., Cancer Res 2006, 66(7):3381). 흥미롭게도, 대다수의 중앙 침윤 T 림프구는 정상 조직 내의 T 림프구 및 말초 혈액 T 림프구와 달리 PD-1을 우세하게 발현하며, 이는 중앙-반응성 T 세

포 상에서의 PD-1의 상향-조절이 손상된 항종양 면역 반응에 대한 원인이 될 수 있다는 것을 나타낸다 (Blood 2009 114(8):1537). 이것은 T 세포 활성화의 감소 및 면역 감시의 회피를 유발하도록 PD-1 발현 T 세포와 상호 작용하는 PD-L1 발현 종양 세포에 의해 매개되는 PD-L1 신호전달의 이용으로 인한 것일 수 있다 (Sharpe et al., Nat Rev 2002) (Keir ME et al., 2008 Annu. Rev. Immunol. 26:677). 따라서, PD-L1/PD-1 상호작용의 억제제는 종양의 CD8+ T 세포-매개 사멸을 증진시킬 수 있다.

[0010] PD-1의 치료 표적화 및 PD-1과의 상호작용을 통해 신호를 전달하는 다른 분자, 예컨대 프로그램화된 사멸 리간드 1 (PD-L1) 및 프로그램화된 사멸 리간드 2 (PD-L2)는 강력한 관심 영역이다. PD-L1 신호전달의 억제는 암 (예를 들어, 종양 면역), 및 급성 및 만성 (예를 들어, 지속성) 감염 둘 다를 포함한 감염의 치료를 위해 T 세포 면역을 증진시키기 위한 수단으로서 제안되었다. 최적 치유적 치료는 PD-1 수용체/리간드 상호작용의 차단 을, 종양 성장을 직접적으로 억제하는 작용제와 조합할 수 있다. 다양한 암의 치료, 안정화, 예방 및/또는 발생 지연을 위한 최적 요법에 대한 필요성이 계속 존재한다.

[0011] 공동-자극 신호의 조작이 세포-기반 면역 반응을 증진시키거나 종결시키는 수단을 제공하는 것으로 나타났기 때문에, 공동-자극의 메커니즘이 치료 관심사이다. 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리의 구성원인 OX40 (또한 CD34, TNFRSF4 또는 ACT35 항원으로 공지됨)은 CD4+ 및 CD8+ T 세포에게 공동-자극 신호를 제공하여 증진된 세포 증식, 생존, 이펙터 기능 및 이동을 유발할 수 있다. OX40 신호전달은 또한 기억 T 세포 발생 및 기능을 증진시킨다. OX40은 나이브 T 세포 상에서 구성적으로 발현되지 않지만, T 세포 수용체 (TCR)의 연관 후에 유도 된다. OX40에 대한 리간드인 OX40L은 항원 제시 세포 상에서 우세하게 발현된다. OX40은 활성화된 CD4+ T 세포, 활성화된 CD8+ T 세포, 기억 T 세포 및 조절 T (Treg) 세포에 의해 고도로 발현된다.

[0012] OX40 신호전달을 종양 세포에서 탈조절되는 다른 신호전달 경로와 조합하는 것은 치료 효능을 추가로 증진시킬 수 있다. 따라서, 다양한 암, 면역 관련 질환 및 T 세포 기능이상 장애를 치료하거나 그의 발달을 지연시키는 이러한 최적 요법에 대한 필요성이 남아있다.

[0013] 본원에 인용된, 특허 출원, 특허 공개 및 유니프록케이비(UniProtKB)/스위스-프로트(Swiss-Prot) 등록 번호를 포함한 모든 참고문헌은, 각각의 개별 참고문헌이 구체적으로 및 개별적으로 참조로 포함되는 것으로 나타내어지는 것처럼 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

발명의 내용

[0014] 한 측면에서, 개체에게 유효량의 인간 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)를 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키는 방법이 본원에 제공 된다.

[0015] 또 다른 측면에서, 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)를 투여하는 것을 포함하는, 암을 갖는 개체에서 면역 기능을 증진시키는 방법이 본원에 제공된다.

[0016] 추가 측면에서, 감염 (예를 들어, 박테리아 또는 바이러스 또는 다른 병원체에 의한 것)을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 감염은 바이러스 및/또는 박테리아에 의한 것이다. 일부 실시양태에서, 감염은 병원체에 의한 것이다. 일부 실시양태에서, 감염은 급성 감염이다. 일부 실시양태에서, 감염은 만성 감염이다.

[0017] 또 다른 측면에서, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위한 (또는 일부 실시양태에서, 감염을 치료하기 위한) 의약의 제조에서의 인간 PD-1 축 결합 길항제의 용도가 본원에 제공되며, 여기서 의약은 인간 PD-1 축 결합 길항제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하고, 여기서 치료는 의약을 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체) 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물과 조합하여 투여 하는 것을 포함한다.

[0018] 또 다른 측면에서, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위한 (또는 일부 실시양태에서, 감염을 치료하기 위한) 의약의 제조에서의 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)의 용도가 본원에 제공되며, 여기서 의약은 OX40 결합 효능제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하고, 여기서 치료는 의약을 인간 PD-1 축 결합 길항제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물과 조합하여 투여하는 것을 포함한다.

[0019] 또 다른 측면에서, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키는데 (또는 일부 실시양태에서, 감염을 치료 하는데) 사용하기 위한 인간 PD-1 축 결합 길항제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물이 본원

에 제공되며, 여기서 치료는 상기 조성물을 제2 조성물과 조합하여 투여하는 것을 포함하고, 여기서 제2 조성물은 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체) 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함한다.

[0020] 또 다른 측면에서, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키는데 (또는 일부 실시양태에서, 감염을 치료하는데) 사용하기 위한 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체) 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 치료는 상기 조성물을 제2 조성물과 조합하여 투여하는 것을 포함하고, 여기서 제2 조성물은 인간 PD-1 축 결합 길항제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함한다.

[0021] 또 다른 측면에서, PD-1 축 결합 길항제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 의약, 및 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위해 (또는 일부 실시양태에서, 감염을 치료하기 위해) 의약을 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체) 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물과 조합하여 투여하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 포함하는 키트가 본원에 제공된다.

[0022] 또 다른 측면에서, PD-1 축 결합 길항제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제1 의약 및 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체) 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제2 의약을 포함하는 키트가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 키트는 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위해 (또는 일부 실시양태에서, 감염을 치료하기 위해) 제1 의약 및 제2 의약을 투여하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 추가로 포함한다.

[0023] 또 다른 측면에서, OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체) 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 의약, 및 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위해 (또는 일부 실시양태에서, 감염을 치료하기 위해) 의약을 PD-1 축 결합 길항제 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물과 조합하여 투여하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 포함하는 키트가 본원에 제공된다.

[0024] 일부 실시양태에서, 암은 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 방광암, 췌장암, 자궁내막암, 결장암, 신장암, 식도암, 전립선암, 결장직장암, 교모세포종, 신경모세포종 또는 간세포성 암종이다.

[0025] 일부 실시양태에서, 개체는 암을 가지고 있거나 암으로 진단되었다.

[0026] 일부 실시양태에서, 암 세포 (개체로부터의 암의 샘플 중)는 PD-L1을 발현하지 않는다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 샘플 중 0%로 포함되는 경우에 샘플에 부재한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커 발현은 단백질 발현에 의해 (예를 들어, 면역조직화학 (IHC) 방법에 의해) 결정된다.

[0027] 일부 실시양태에서, 암 세포 (개체로부터의 암 샘플로부터)는 PD-L1을 발현한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 샘플 중 0% 초과로 포함되는 경우에 샘플에 존재한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 단백질 발현에 의해 샘플에서 검출된다. 일부 실시양태에서, 단백질 발현은 면역조직화학 (IHC)에 의해 결정된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 항-PD-L1 항체를 사용하여 검출된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 IHC에 의해 약한 염색 강도로, IHC에 의해 중간 정도의 염색 강도로 또는 IHC에 의해 강한 염색 강도로 검출된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 항-PD-L1 항체를 사용하여 검출되고, 여기서 PD-L1 바이오마커는 IHC에 의해 중간 정도의 염색 강도로 또는 IHC에 의해 강한 염색 강도로 검출된다.

[0028] 일부 실시양태에서, 개체는 PD-1 축 결합 길항제에 대해 내성이 있는 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 개체는 PD-1 축 결합 길항제에 불응성이다. 일부 실시양태에서, 환자는 PD-1 축 결합 길항제에 대한 효과적인 반응을 갖지 않았다.

[0029] 일부 실시양태에서, 개체는 (예를 들어, 진단 시험을 사용하여 결정 시) 높은 T 세포 침윤이 수반된 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 개체는 (예를 들어, 진단 시험을 사용하여 결정 시) 낮거나 본질적으로 검출불가능한 T 세포 침윤이 수반된 암을 갖는다.

[0030] 상기 및 본원에 기재된 방법, 용도, 조성물 및 키트의 일부 실시양태에서, 인간 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)의 치료 또는 투여는 치료 중지 후에 개체에서 지속된 반응을 유발한다.

[0031] 일부 실시양태에서, OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체) 및 PD-1 축 결합 길항제 (예를 들어, 항-PD-1 또는 항-PDL1 항체)를 사용한 조합 치료는 상승작용적이고, 이에 의해 조합에서의 OX40 결합제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)의 효과적인 용량은 단일 작용제로서의 OX40 결합제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)의 효과적인 용량에 비해 감소된다.

- [0032] 일부 실시양태에서, OX40 결합 효능제는 PD-1 축 결합 길항제 전에, PD-1 축 결합 길항제와 동시에 또는 PD-1 축 결합 길항제 후에 투여된다. 일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제는 동일한 조성물 중에 존재한다.
- [0033] 일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제는 개별 조성물 중에 존재한다. 일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항제는 PD-1 결합 길항제, PDL1 결합 길항제 및 PDL2 결합 길항제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항제는 PD-1 결합 길항제이다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항제는 PD-1의 그의 리간드 결합 파트너에 대한 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항제는 PD-1의 PDL1에 대한 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항제는 PD-1의 PDL2에 대한 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항제는 PD-1의 PDL1 및 PDL2 둘 다에 대한 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항제는 항체이다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항제는 니볼루맙이다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항제는 펌브롤리주맙이다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항제는 CT-011이다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항제는 AMP-224이다. 일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항제는 PDL1 결합 길항제이다. 일부 실시양태에서, PDL1 결합 길항제는 PDL1의 PD-1에 대한 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, PDL1 결합 길항제는 PDL1의 B7-1에 대한 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, PDL1 결합 길항제는 PDL1의 PD-1 및 B7-1 둘 다에 대한 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, PDL1 결합 길항제는 항-PDL1 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-PDL1 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-PDL1 항체는 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 항-PDL1 항체는 인간화 항체 또는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, PDL1 결합 길항제는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 및 MEDI4736. 일부 실시양태에서, 항체는 GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 1)의 HVR-H1 서열, AWISPYGGSTYYADSVK (SEQ ID NO: 2)의 HVR-H2 서열 및 RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 3)의 HVR-H3 서열을 포함하는 중쇄; 및 RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 4)의 HVR-L1 서열, SASFLYS (SEQ ID NO: 5)의 HVR-L2 서열 및 QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 6)의 HVR-L3 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 다음 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역:
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYA
DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS (SEQ
ID NO:7) 또는 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWI
SPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG
TLTVTVSSASTK (SEQ ID NO:8)
- [0034]
- [0035] 및 다음 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다:
- DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAWYQQKPGKAPKLLIY SASF
LYSGVPSRFSGSGSGTDFITLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID
NO:9)
- [0036]
- [0037] 일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항제는 PDL2 결합 길항제이다. 일부 실시양태에서, PDL2 결합 길항제는 항체이다. 일부 실시양태에서, PDL2 결합 길항제는 이뮤노어드헤신이다. 일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항제는 1개 이상의 비-글리코실화 부위 돌연변이 (예를 들어, 치환)를 포함하는 항체 (예를 들어, 항-PD1 항체, 항-PDL1 항체 또는 항-PDL2 항체)이다. 일부 실시양태에서, 치환 돌연변이는 아미노산 위치 N297, L234, L235 및 D265 (EU 넘버링)에서의 1개 이상의 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치환 돌연변이는 N297G, N297A, L234A, L235A 및 D265A (EU 넘버링)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 IgG1이다.
- [0038] 일부 실시양태에서, OX40 결합 효능제는 OX40 효능제 항체, OX40L 효능제 단편, OX40 올리고머릭 수용체 및 OX40 이뮤노어드헤신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 인간 OX40에 결합한다. 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 본원 (예를 들어, 공보 단락 198-226)에 개시된 항-인간 OX40 효능제 항체 중 어느 하나이다. 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 MEDI6469, MEDI0562 또는 MEDI6383이다. 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 전장 IgG1 항체이다. 일부 실시양태에서, OX40 결합 효능제는 삼량체 OX40L-Fc 단백질이다. 일부 실시양태에서, OX40 결합 효능제는 미국 특허 번호 7,959,925에 기재된 삼량체 OX40L 융합 단백질이다. 일부 실시양태에서, OX40 결합 효능제는 OX40L의 1개 이상의 세포외 도메인을 포함한다. 임의의 다른 실시양태와 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, OX40 결합 효능제 (예를 들어,

OX40 효능제 항체)는 MEDI6383이 아니다. 임의의 다른 실시양태와 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, OX40 결합 효능제 (예를 들어, OX40 효능제 항체)는 MEDI0562가 아니다. 일부 실시양태에서, OX40 결합 효능제 (예를 들어, OX40 효능제 항체)는 인간 및/또는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, OX40 결합 효능제 (예를 들어, OX40 효능제 항체)는 고갈성 항-인간 OX40 항체 (인간 OX40을 발현하는 세포를 고갈시키는 것)이다. 일부 실시양태에서, 인간 OX40 발현 세포는 CD4+ 이펙터 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 인간 OX40 발현 세포는 Treg 세포이다. 일부 실시양태에서, 고갈은 ADCC 및/또는 식세포작용에 의한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 이펙터 세포에 의해 발현된 Fc γ R에 결합하여 인간 이펙터 세포 기능을 활성화시킴으로써 ADCC를 매개한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 이펙터 세포에 의해 발현된 Fc γ R에 결합하여 인간 이펙터 세포 기능을 활성화시킴으로써 식세포작용을 매개한다. 일부 실시양태에서, 인간 이펙터 세포는 대식세포, 자연 킬러 (NK) 세포, 단핵구 및 호중구로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 인간 이펙터 세포는 대식세포이다. 일부 실시양태에서, OX40 결합 효능제 (예를 들어, OX40 효능제 항체)는 기능적 Fc 영역을 갖는다. 일부 실시양태에서, 기능적 Fc 영역의 이펙터 기능은 ADCC이다. 일부 실시양태에서, 기능적 Fc 영역의 이펙터 기능은 식세포작용이다. 일부 실시양태에서, 기능적 Fc 영역의 이펙터 기능은 ADCC 및 식세포작용이다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG1이다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG4이다.

[0039] 상기 및 본원에 기재된 방법, 용도, 조성물 및 키트의 일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항제 및/또는 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)는 정맥내로, 근육내로, 피하로, 국소로, 경구로, 경피로, 복강내로, 안와내로, 이식에 의해, 흡입에 의해, 척수강내로, 뇌실내로 또는 비강내로 투여된다. 상기 및 본원에 기재된 방법, 용도, 조성물 및 키트의 일부 실시양태에서, 치료는 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위한 화학요법제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 개체는 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제를 사용한 조합 치료 전에 화학요법제로 치료되었다. 일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항제 및/또는 OX40 결합 효능제의 조합으로 치료된 개체는 화학요법제 치료에 대해 불응성이다. 본 출원 전반에 걸쳐 기재된 방법, 용도, 조성물 및 키트의 일부 실시양태는 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위한 화학요법제를 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0040] 상기 및 본원에 기재된 방법, 용도, 조성물 및 키트의 일부 실시양태에서, 개체에서의 CD8 T 세포는 조합물의 투여 전에 비해 증진된 프라이밍, 활성화, 증식 및/또는 세포용해 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포의 수는 조합물의 투여 전에 비해 상승된다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포는 항원-특이적 CD8 T 세포이다. 일부 실시양태에서, Treg 기능은 조합물의 투여 전에 비해 저해된다. 일부 실시양태에서, T 세포 소진은 조합물의 투여 전에 비해 감소된다. 일부 실시양태에서, Treg 세포의 수는 조합물의 투여 전에 비해 감소된다. 일부 실시양태에서, 혈장 인터페론 감마는 조합물의 투여 전에 비해 증가된다. 일부 실시양태에서, 기억 T 이펙터 세포의 수는 조합물의 투여 전에 비해 증가된다. 일부 실시양태에서, 기억 T 이펙터 세포 활성화 및/또는 증식은 조합물의 투여 전에 비해 증가된다. 일부 실시양태에서, 기억 T 이펙터 세포는 말초 혈액에서 검출된다. 일부 실시양태에서, 기억 T 이펙터 세포의 검출은 CXCR3의 검출에 의한다.

[0041] 대상체로부터 수득된 백혈구를 포함하는 샘플 (예를 들어, 말초 혈액) 중 1종 이상의 마커 유전자, 단백질(들) (예를 들어, 시토카인, 예를 들어, 감마 인터페론) 및/또는 세포 조성물 (예를 들어, Treg의 백분율 및/또는 Treg의 절대 수; 예를 들어, CD8+ 이펙터 T 세포의 수)의 발현 수준을 측정하는 단계 - 여기서 대상체는 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)로 치료되었고, 여기서 1종 이상의 마커 유전자는 T 세포 마커 유전자 또는 기억 T 세포 마커 유전자 (예를 들어, T 이펙터 기억 세포의 마커)로부터 선택됨 -; 및 참조와 비교하여 대상체로부터 수득된 샘플 중 1종 이상의 마커 유전자, 단백질(들) 및/또는 세포 조성물의 발현 수준을 기반으로 약역학적 활성을 입증하는 것으로서 치료를 결정하는 단계 - 여기서 참조와 비교하여 1종 이상의 마커 유전자의 증가된 발현은 OX40 효능제 치료에 대한 약역학적 활성을 나타냄 - 에 의해 OX40 효능제 치료의 약역학적 활성을 모니터링하는 방법이 본원에 제공된다. 마커 유전자, 단백질 및/또는 세포 조성물의 발현 수준은 본원에 기재된 바와 같은 1종 이상의 방법에 의해 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 개체로부터의 샘플 (예를 들어, 말초 혈액 샘플) 중 증식 CD8+ T 세포의 수준 (예를 들어, Ki67+/총 CD8+ T 세포의 백분율)을 측정하는 것을 포함하는, OX40 효능제 치료 및 PD-1 축 결합 길항제 조합 치료의 약역학적 활성을 모니터링하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 참조 (예를 들어, 조합 치료 전의 수준)와 비교하여 샘플 중 증식 CD8+ T 세포의 증가된 수준은 조합 치료에 대한 약역학적 활성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 개체로부터의 샘플 (예를 들어, 말초 혈액 샘플) 중 활성화된 CD8+ T 세포의 수준 (예를 들어, CXCR3 +/총 CD8+ T 세포의 백분율)을 측정하는 것을 포함하는, OX40 효능제 치료 및 PD-1 축 결합 길항제 조합 치료의 약역학적 활성을 모니터링하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 참조 (예를 들어, 조합 치료 전의 수준)와 비교하여 샘플

중 활성화된 CD8+ T 세포의 증가된 수준은 조합 치료에 대한 약역학적 활성을 나타낸다.

[0042] 대상체로부터 수득된 백혈구를 포함하는 샘플 (예를 들어, 말초 혈액) 중 말초 혈액 샘플 중 1종 이상의 마커 유전자, 단백질(들) (예를 들어, 시토카인, 예를 들어, 감마 인터페론) 및/또는 세포 조성물 (예를 들어, Treg의 백분율 및/또는 Treg의 절대 수; 예를 들어, CD8+ 이펙터 T 세포의 수)의 발현 수준을 측정하는 단계 - 여기서 대상체는 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)로 치료되었고, 여기서 1종 이상의 마커 유전자는 T 세포 마커 유전자 또는 기억 T 세포 마커 유전자 (예를 들어, T 이펙터 기억 세포의 마커)로부터 선택됨 -; 및 참조와 비교하여 대상체로부터 수득된 샘플 중 1종 이상의 마커 유전자, 단백질(들) 및/또는 세포 조성물의 발현 수준을 기반으로 하여 대상체를 치료에 대한 반응성 또는 비-반응성으로 분류하는 단계 - 여기서 참조와 비교하여 1종 이상의 마커 유전자의 증가된 발현은 OX40 효능제 치료에 대한 반응성 또는 반응성의 결여를 나타냄 - 에 의해 OX40 효능제 치료에 대한 대상체의 반응성을 모니터링하는 방법이 본원에 제공된다. 마커 유전자, 단백질 및/또는 세포 조성물의 발현 수준은 본원에 기재된 바와 같은 1종 이상의 방법에 의해 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 개체로부터의 샘플 (예를 들어, 말초 혈액 샘플) 중 증식 CD8+ T 세포의 수준 (예를 들어, Ki67+/총 CD8+ T 세포의 백분율)을 측정하는 것을 포함하는, OX40 효능제 치료 및 PD-1 축 결합 길항제 조합 치료의 반응성을 모니터링하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 참조 (예를 들어, 조합 치료 전의 수준)와 비교하여 샘플 중 증식 CD8+ T 세포의 증가된 수준은 조합 치료에 대한 반응성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 개체로부터의 샘플 (예를 들어, 말초 혈액 샘플) 중 활성화된 CD8+ T 세포의 수준 (예를 들어, CXCR3 +/총 CD8+ T 세포의 백분율)을 측정하는 것을 포함하는, OX40 효능제 치료 및 PD-1 축 결합 길항제 조합 치료의 반응성을 모니터링하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 참조 (예를 들어, 조합 치료 전의 수준)와 비교하여 샘플 중 활성화된 CD8+ T 세포의 증가된 수준은 조합 치료에 대한 반응성을 나타낸다.

[0043] 본원에 기재된 다양한 실시양태의 특성 중 하나, 일부 또는 전부가 조합되어 본 발명의 다른 실시양태를 형성할 수 있는 것으로 이해된다. 본 발명의 이들 및 다른 측면은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백하게 될 것이다. 본 발명의 이들 및 다른 실시양태는 하기 상세한 설명에 추가로 기재된다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1: 종양 침윤 CD8+T 세포는 CT26 결장직장 동계 종양 모델에서 높은 수준의 PD-1 억제 수용체를 발현한다 (대조군 치료 마우스). PD-1 발현 CD8+ TIL의 대략 절반은 또한 OX40을 발현한다. 대조군 항체를 사용한 치료 시작 2일 후, 5마리의 마우스 중 1 마리로부터의 대표적인 유동 세포측정법 도트 플롯.

도 2A 및 B: (도 2A) 항-OX40 효능제 항체 단독을 사용한 치료 및 항-PDL1 길항제 항체와 조합한 항-OX40 효능제 항체를 사용한 치료는 종양내 Foxp3+ T조절 세포의 비율 (CD45+ 세포의 총수에 비해)을 유의하게 감소시켰다. (도 2B) 항-OX40 효능제 항체 단독을 사용한 치료 및 항-PDL1 길항제 항체와 조합한 항-OX40 효능제 항체를 사용한 치료는 CT26 결장직장 종양 모델에서 종양내 Foxp3+ T 조절 세포의 절대 수를 유의하게 감소시켰다. (도 2A) 및 (도 2B) 둘 다에 대해: 데이터는 치료 시작 후 제9일로부터의 것이고, 각각의 기호는 개별 마우스를 나타낸다. 마우스에게 제1일에 제1 용량으로 10mg/kg의 대조군 항체 또는 항-PDL1 항체를 IV 투여하고, 이어서 5mg/kg IP BIW (1주 2회) 투여하였다. 항-OX40 효능제 항체는 제1일에 제1 용량으로 0.1mg/kg IV 투여하고, 이어서 0.1mg/kg IP TIW (1주 3회) 투여하였다.

도 3A 및 B: 항-OX40 효능제 항체를 사용한 치료는 (도 3A) 종양내 골수성 (CD11b+ Gr-1low/중간) 세포 상에서 및 (도 3B) CT26 결장직장 동계 종양 모델에서의 종양 세포 상에서 PDL1 발현을 증대시켰다. 데이터는 치료 시작 후 제9일로부터의 것이다. 각각의 도트/사각형은 개별 마우스를 나타낸다. PDL1 발현은 유동 세포측정법에 의해 기하 평균 형광 강도 (기하 MFI)로 측정되었다. **p<0.01, *p<0.05, 독립표본 t-검정에 의해 계산됨. 이러한 실험에서의 투여는 대조군 항체의 경우에 제1일에 제1 용량 10mg/kg IV, 이어서 5mg/kg IP BIW였다. 항-OX40 효능제 항체는 제1일에 제1 용량으로 0.1mg/kg IV 투여하고, 이어서 0.1mg/kg IP TIW 투여하였다.

도 4A, 4B: 항-OX40 효능제 항체 및 항-PDL1 길항제 항체를 사용한 치료는 C57BL/6 마우스에서의 MC38 결장직장 암 동계 종양 모델에서 상승작용적 조합 효능을 입증하였다. (도 4A) 치료군, n=10/군에서 시간 경과 (일)에 따른 평균 종양 부피 (mm³) 측정. (도 4B) 치료군에서 시간 경과에 따른 개별 종양 부피 측정. 흑색 선은 군의 평균을 나타낸다. 청색 파선은 대조군의 평균을 나타낸다. 회색 선은 개별 동물이다. 적색 선은 케양이 생긴 종양 또는 과도한 종양 크기로 인해 연구로부터 드롭시킨 개별 동물을 나타낸다. 대조군 항체, 항-PDL1 항체 또는 항-OX40 효능제 항체는 제1일에 제1 용량으로 10mg/kg IV 투여하고, 이어서 3주 동안 10mg/kg IP TIW 투여하였다.

도 5A, 5B: 항-OX40 효능제 항체 및 항-PDL1 길항제 항체를 사용한 치료는 Balb/c 마우스에서의 CT26 결장직장암 동계 종양 모델에서 상승작용적 조합 효능을 입증하였다. (도 5A) 치료군, n=10/군에서 시간 경과 (일)에 따른 평균 종양 부피 (mm³) 측정. (도 5B) 치료군에서 시간 경과에 따른 개별 종양 부피 측정. 대조군 항체 또는 항-PDL1은 제1일에 제1 용량으로 10mg/kg IV 투여하고, 이어서 3주 동안 5mg/kg IP TIW 투여하였다. 항-OX40 효능제 항체는 제1일에 단일 용량으로 1mg/kg IV 투여하였다. 흑색 선은 군의 평균을 나타낸다. 청색 파선은 대조군의 평균을 나타낸다. 회색 선은 개별 동물이다. 적색 선은 궤양이 생긴 종양 또는 과도한 종양 크기로 인해 연구로부터 드롭시킨 개별 동물을 나타낸다.

도 6A, 6B: 항-OX40 효능제 항체 단일 작용제 치료는 Balb/c 마우스에서의 CT26 결장직장암 동계 종양 모델에서 투여 반응성을 나타낸다. (도 6A) 치료군, n=10/군에서 시간 경과 (일)에 따른 평균 종양 부피 (mm³) 측정. (도 6B) 치료군에서 시간 경과에 따른 개별 종양 부피 측정. 흑색 선은 군의 평균을 나타낸다. 청색 파선은 대조군의 평균을 나타낸다. 회색 선은 개별 동물이다. 적색 선은 궤양이 생긴 종양 또는 과도한 종양 크기로 인해 연구로부터 드롭시킨 개별 동물을 나타낸다. 대조군 항체는 제1일에 제1 용량으로 1mg/kg IV 투여하고, 이어서 3주 동안 1mg/kg IP TIW 투여하였다. 항-OX40 효능제 항체는 제1일에 제1 용량으로 0.01mg/kg, 0.1mg/kg 또는 1mg/kg IV 투여하고, 이어서 3주 동안 TIW IP 투여하였다.

도 7A, 7B: 최대 미만 용량의 항-OX40 효능제 항체 플러스 항-PDL1 길항제 항체를 사용한 조합 치료는 Balb/c 마우스에서의 CT26 결장직장암 동계 종양 모델에서 상승작용적 조합 효능을 입증하였다. (도 7A) 치료군, n=10/군에서 시간 경과 (일)에 따른 평균 종양 부피 (mm³) 측정. (도 7B) 치료군에서 시간 경과에 따른 개별 종양 부피 측정. 흑색 선은 군의 평균을 나타낸다. 청색 파선은 대조군의 평균을 나타낸다. 회색 선은 개별 동물이다. 적색 선은 궤양이 생긴 종양 또는 과도한 종양 크기로 인해 연구로부터 드롭시킨 개별 동물을 나타낸다. 대조군 항체 또는 항-PDL1은 제1일에 제1 용량으로 10mg/kg IV 투여하고, 이어서 3주 동안 10mg/kg IP TIW 투여하였다. 항-OX40 효능제 항체는 제1일에 제1 용량으로 0.1mg/kg IV 제공하고, 이후 3주 동안 0.1mg/kg IP TIW 투여하였다.

도 8A, 8B: 별개의 실험에서, 최대 미만의 효과적인 용량의 단일 0.1mg/kg IV 주사로 투여된 항-OX40 효능제 항체 플러스 항-PDL1은 Balb/c 마우스에서의 CT26 결장직장암 동계 종양 모델의 상승작용적 조합 효능을 입증하였다. (도 8A) 치료군, n=10/군에서 시간 경과 (일)에 따른 평균 종양 부피 (mm³) 측정. (도 8B) 치료군에서 시간 경과에 따른 개별 종양 부피 측정. 흑색 선은 군의 평균을 나타낸다. 청색 파선은 대조군의 평균을 나타낸다. 회색 선은 개별 동물이다. 적색 선은 궤양이 생긴 종양 또는 과도한 종양 크기로 인해 연구로부터 드롭시킨 개별 동물을 나타낸다. 대조군 항체 또는 항-PDL1은 제1일에 제1 용량으로 10mg/kg IV 투여하고, 이어서 3주 동안 5mg/kg IP TIW 투여하였다. 항-OX40 항체는 제1일에 제1 또는 단일 용량으로 0.1mg/kg IV 제공하였고, 이후 3주 동안 0.1mg/kg IP TIW 투여하였다.

도 9A, B, C & D: 말초 혈액 중 증식성 T 세포, Treg 세포, 혈장 인터페론-감마 및 활성화 T 세포의 수준에 대한 OX40 효능제 항체 및 PDL1 길항제 (항-PDL1 길항제 항체)를 사용한 조합 치료의 효과. 조합 치료된 CT26 마우스로부터 취한 말초 혈액의 분석은 이펙터 세포 증식 및 염증성 T 세포 마커의 증가를 밝혀냈다. CD8+의 T 세포의 증식 수준 (도 9A), Treg 세포 (도 9B), 혈장 인터페론 감마 수준 (도 9C) 및 활성화된 T 세포 (도 9D)를 검사하였다. (도 9A) 증식성 CD8+ T 세포의 수준 (ki67+/총 CD8+ T 세포의 백분율로 표현됨)은 OX40 효능제 항체 또는 PDL1 길항제 항체를 단독으로 사용한 치료에 비해 OX40 효능제 항체 및 PD-L1 길항제의 조합으로 치료된 동물에서 유의하게 증가하였다. (도 9B) OX40 효능제 항체 단일 작용제를 사용한 치료 및 OX40 효능제 항체 및 PDL1 길항제의 조합을 사용한 치료로 감소된 말초 혈액 Treg를 관찰하였다. (도 9C) OX40 효능제 및 PDL1 길항제의 조합을 사용한 치료로 증가된 혈장 감마 인터페론 (IFN γ)을 관찰하였다. (도 9D) 활성화된 T 세포 (특히, 활성화된 기억 Teff 세포)의 수준은 OX40 효능제 또는 PDL1 길항제를 단독으로 사용한 치료에 비해 OX40 효능제 항체 및 PD-L1 길항제의 조합으로 치료된 동물에서 유의하게 증가하였다.

도 10은 요로상피 방광암 (UBC) 및 비소세포 폐암 (NSCLC)을 가진 인간 환자로부터의 암 샘플에서 OX40 발현과 PDL1 진단 상태와의 연관성을 보여준다. 조직 샘플은 항-PD-L1 항체, MPDL3280A를 사용하는 1상 임상 시험에 참가한 환자로부터의 것이었다. 종양 침윤 면역 세포 (IC)의 PD-L1 바이오마커 상태는 본원에 개시된 바와 같은 IHC를 사용하여 결정하였다. OX40 발현 수준은 rtPCR 분석 (플루이디움(Fluidigm))을 사용하여 결정하였다. 삼각형은 환자가 부분 또는 완전 임상 반응을 가졌다는 것을 의미하고; 원형은 환자가 안정 질환을 보여주었다는 것을 의미하고, 사각형은 환자가 진행성 질환을 가졌다는 것을 의미한다.

도 11A, B, C, D, E & F: 대조군 세포 샘플의 예시적인 IHC 분석을 보여준다. (도 11A) 모 HEK-293 세포의 음

성 대조군 IHC 염색; (도 11B) 약한 염색 강도를 갖는, 재조합 인간 PD-L1로 형질감염된 HEK-293 세포의 IHC 염색; (도 11C) 중간 정도의 염색 강도를 갖는, 재조합 인간 PD-L1로 형질감염된 HEK-293 세포의 IHC 염색; (도 11D) 강한 염색 강도를 갖는, 재조합 인간 PD-L1로 형질감염된 HEK-293 세포의 IHC 염색; (도 11E) 태반 조직 샘플의 양성 조직 대조군 IHC 염색; (도 11F) 편도 조직 샘플의 양성 조직 대조군 IHC 염색. 모든 IHC 염색은 독점적 항-PD-L1 항체를 사용하여 수행하였다.

도 12A, B & C: (도 12A) 삼중-음성 유방암; (도 12B) 악성 흑색종; (도 12C) NSCLC, 선암종으로부터의 종양 샘플의 예시적인 PD-L1 양성 IHC 염색을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] 본 출원의 본 발명자들은 항-인간 OX40 효능제 항체와 항-PD-L1 면역 요법과의 조합이 종양 성장의 상승작용적 억제 및 증가된 반응을 유발하였다는 것을 입증하였다.
- [0046] 한 측면에서, 개체에게 유효량의 인간 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제를 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위한 방법, 조성물 및 용도가 본원에 제공된다.
- [0047] 또 다른 측면에서, 유효량의 인간 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제를 투여하는 것을 포함하는, 암을 갖는 개체에서 면역 기능을 증진시키기 위한 방법, 조성물 및 용도가 본원에 제공된다.
- [0048] 또 다른 측면에서, 유효량의 인간 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제를 투여하는 것을 포함하는, 암을 갖는 개체에서 감염 (예를 들어, 박테리아 또는 바이러스 또는 다른 병원체에 의한 감염)을 치료하기 위한 방법, 조성물 및 용도가 본원에 제공된다.
- [0049] I. 정의
- [0050] 본 발명을 상세히 기재하기 앞서, 본 발명이 특정한 조성물 또는 생물학적 시스템에 제한되는 것이 아니며, 물론 달라질 수 있다는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어가 단지 특정한 실시양태를 기재하려는 목적을 위한 것이며, 제한하려는 의도를 갖지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0051] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 내용상 달리 명백히 지시되지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "분자"에 대한 언급은 임의로 2개 이상의 이러한 분자의 조합 등을 포함한다.
- [0052] 본원에 사용된 용어 "약"은 이러한 기술 분야의 통상의 기술자에게 용이하게 공지된 각각의 값에 대한 통상의 오차 범위를 지칭한다. 본원에서 "약" 값 또는 파라미터에 대한 언급은 값 또는 파라미터 그 자체에 대한 실시양태를 포함 (및 기재)한다.
- [0053] 본원에 기재된 본 발명의 측면 및 실시양태는 측면 및 실시양태를 "포함하는 것", 이들로 "이루어진 것", 및 이들로 "본질적으로 이루어진 것"을 포함하는 것으로 이해된다.
- [0054] 본원에 사용된 용어 "OX40"은 달리 나타내지 않는 한 포유동물, 예컨대 영장류 (예를 들어, 인간) 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함한 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 OX40을 지칭한다. 용어는 "전장", 프로세싱되지 않은 OX40, 뿐만 아니라 세포에서의 프로세싱으로부터 생성된 임의의 형태의 OX40를 포괄한다. 용어는 또한 OX40의 자연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포괄한다. 신호 펩티드가 결합된 예시적인 인간 OX40의 아미노산 서열은 서열식별번호: 60
- (LHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCN
LRSGSERKQLCTATQDQTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTL
AGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTAWPRTSQGPSTRPVEVPPG
RAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLA
KI)
- [0055] 로 제시된다.
- [0056] "OX40 활성화"는 OX40 수용체의 활성화를 지칭한다. 일반적으로, OX40 활성화는 신호 전달을 유발한다.
- [0057] 용어 "항-OX40 항체" 및 "OX40에 결합하는 항체"는 항체가 OX40을 표적화하는데 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 OX40에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 한 실시양태에서, 항-OX40 항체의 비관련 비-OX40 단백질에 대한 결합 정도는, 예를 들어 방사선면역검정 (RIA)에 의한 측정 시, 항체의 OX40에 대한 결

합의 약 10% 미만이다. 특정 실시양태에서, OX40에 결합하는 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$ 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예를 들어, 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (Kd)를 갖는다. 특정 실시양태에서, 항-OX40 항체는 상이한 종으로부터의 OX40 사이에 보존된 OX40의 에피토프에 결합한다.

[0058] 용어 "PD-1 축 결합 길항제"는 PD-1 신호전달 축 상의 신호전달로부터 발생한 T-세포 기능이상이 제거되어 T-세포 기능 (예를 들어, 증식, 시토카인 생산, 표적 세포 사멸)을 회복 또는 증진시키는 결과를 나타내도록, PD-1 축 결합 파트너와 그의 결합 파트너 중 1종 이상의 상호작용을 억제하는 분자를 지칭한다. 본원에 사용된 PD-1 축 결합 길항제는 PD-1 결합 길항제, PD-L1 결합 길항제 및 PD-L2 결합 길항제를 포함한다.

[0059] 용어 "PD-1 결합 길항제"는 PD-1과 그의 결합 파트너, 예컨대 PD-L1, PD-L2 중 1종 이상과의 상호작용으로부터 발생한 신호 전달을 감소, 차단, 억제, 제거 또는 방해하는 분자를 지칭한다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항제는 PD-1의 그의 결합 파트너 중 1종 이상에 대한 결합을 억제하는 분자이다. 구체적인 측면에서, PD-1 결합 길항제는 PD-1의 PD-L1 및/또는 PD-L2에 대한 결합을 억제한다. 예를 들어, PD-1 결합 길항제는 항-PD-1 항체, 그의 항원 결합 단편, 이뮤노어드헤신, 융합 단백질, 올리고펩티드, 및 PD-1과 PD-L1 및/또는 PD-L2와의 상호작용으로부터 발생한 신호 전달을 감소, 차단, 억제, 제거 또는 방해하는 다른 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, PD-1 결합 길항제는 기능이상적 T-세포가 보다 덜 기능이상적이 되도록 (예를 들어, 항원 인식에 대한 이펙터 반응을 증진시킴) PD-1을 통한 T 림프구 매개된 신호전달시에 발현된 세포 표면 단백질에 의해 또는 이를 통해 매개되는 음성 공동-자극 신호를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항제는 항-PD-1 항체이다. 구체적인 측면에서, PD-1 결합 길항제는 본원에 기재된 MDX-1106 (니볼루맵)이다. 또 다른 구체적인 측면에서, PD-1 결합 길항제는 본원에 기재된 MK-3475 (렘브롤리주맵)이다. 또 다른 구체적인 측면에서, PD-1 결합 길항제는 본원에 기재된 CT-011 (피딜리주맵)이다. 또 다른 구체적인 측면에서, PD-1 결합 길항제는 본원에 기재된 AMP-224이다.

[0060] 용어 "PD-L1 결합 길항제"는 PD-L1과 그의 결합 파트너, 예컨대 PD-1, B7-1 중 1종 이상과의 상호작용으로부터 발생한 신호 전달을 감소, 차단, 억제, 제거 또는 방해하는 분자를 지칭한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 길항제는 PD-L1의 그의 결합 파트너에 대한 결합을 억제하는 분자이다. 구체적인 측면에서, PD-L1 결합 길항제는 PD-L1의 PD-1 및/또는 B7-1에 대한 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 길항제는 항-PD-L1 항체, 그의 항원 결합 단편, 이뮤노어드헤신, 융합 단백질, 올리고펩티드, 및 PD-L1과 그의 결합 파트너, 예컨대 PD-1, B7-1 중 1종 이상과의 상호작용으로부터 발생한 신호 전달을 감소, 차단, 억제, 제거 또는 방해하는 다른 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, PD-L1 결합 길항제는 기능이상적 T-세포가 보다 덜 기능이상적이 되도록 (예를 들어, 항원 인식에 대한 이펙터 반응을 증진시킴) PD-L1을 통한 T 림프구 매개된 신호전달시에 발현된 세포 표면 단백질에 의해 또는 이를 통해 매개되는 음성 공동-자극 신호를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 길항제는 항-PD-L1 항체이다. 구체적인 측면에서, 항-PD-L1 항체는 본원에 기재된 YW243.55.S70이다. 또 다른 구체적인 측면에서, 항-PD-L1 항체는 본원에 기재된 MDX-1105이다. 또 다른 구체적인 측면에서, 항-PD-L1 항체는 본원에 기재된 MPDL3280A이다. 또 다른 구체적인 측면에서, 항-PD-L1 항체는 본원에 기재된 MEDI4736이다.

[0061] 용어 "PD-L2 결합 길항제"는 PD-L2 및 그의 결합 파트너 중 1종 이상, 예컨대 PD-1과의 상호작용으로부터 발생한 신호 전달을 감소, 차단, 억제, 폐지 또는 방해하는 분자를 지칭한다. 일부 실시양태에서, PD-L2 결합 길항제는 PD-L2의 그의 결합 파트너 중 1종 이상에 대한 결합을 억제하는 분자이다. 구체적인 측면에서, PD-L2 결합 길항제는 PD-L2의 PD-1에 대한 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, PD-L2 길항제는 항-PD-L2 항체, 그의 항원 결합 단편, 이뮤노어드헤신, 융합 단백질, 올리고펩티드, 및 PD-L2 및 그의 결합 파트너 중 1종 이상, 예컨대 PD-1과의 상호작용으로부터 발생한 신호 전달을 감소, 차단, 억제, 폐지 또는 방해하는 다른 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, PD-L2 결합 길항제는 기능이상적 T-세포가 보다 덜 기능이상적이 되도록 (예를 들어, 항원 인식에 대한 이펙터 반응을 증진시킴) PD-L2를 통한 T 림프구 매개된 신호전달시에 발현된 세포 표면 단백질에 의해 또는 이를 통해 매개되는 음성 공동-자극 신호를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, PD-L2 결합 길항제는 이뮤노어드헤신이다.

[0062] 면역 기능이상과 관련된 용어 "기능이상"은 항원 자극에 대한 감소된 면역 반응성의 상태를 지칭한다. 이러한 용어는 항원 인식이 일어날 수 있지만 그로 인한 면역 반응이 감염 또는 종양 성장을 제어하는데 효과적이지 않은 소진 및/또는 무반응 둘 다의 공통 요소를 포함한다.

[0063] 본원에 사용된 용어 "기능이상적"은 또한 항원 인식에 대한 불응성 또는 비반응성, 구체적으로 항원 인식을 하류 T-세포 이펙터 기능, 예컨대 증식, 시토카인 생산 (예를 들어, IL-2) 및/또는 표적 세포 사멸로 번역하는 능

력의 손상을 포함한다.

- [0064] 용어 "무반응"은 T-세포 수용체를 통해 전달된 불완전한 또는 불충분한 신호로부터 발생한 항원 자극에 대한 비 반응성의 상태 (예를 들어, ras-활성화의 부재 하에 세포내 Ca^{+2} 를 증가시킴)를 지칭한다. T 세포 무반응은 또한 공동-자극의 부재 하에 항원으로의 자극시에 발생할 수 있으며, 이는 세포가 심지어 공동자극과 관련하여 항원에 의한 후속 활성화에 불응성이 되도록 한다. 비반응성 상태는 종종 인터류킨-2의 존재에 의해 무효화될 수 있다. 무반응성 T-세포는 클론 확장을 겪고/거나 이펙터 기능을 획득하지 않는다.
- [0065] 용어 "소진"은 다수의 만성 감염 및 암 동안 일어나는 지속된 TCR 신호전달로부터 발생한 T 세포 기능 이상의 상태로서 T 세포 소진을 지칭한다. 이는 불완전한 또는 결함이 있는 신호전달을 통해서가 아니라 지속된 신호전달로부터 발생한다는 점에서 무반응과 구별된다. 이는 불량한 이펙터 기능, 억제 수용체의 지속된 발현 및 기능적 이펙터 또는 기억 T 세포의 것과 구별되는 전사 상태에 의해 정의된다. 소진은 감염 및 종양의 최적의 제어를 방해한다. 소진은 외인성 음성 조절 경로 (예를 들어, 면역조절 시토카인), 뿐만 아니라 세포 내인성 음성 조절 (공동자극) 경로 (PD-1, B7-H3, B7-H4 등) 둘 다로부터 발생할 수 있다.
- [0066] "T-세포 기능을 증진시키는 것"은 T-세포가 지속된 또는 증폭된 생물학적 기능을 갖도록 유도, 유발 또는 자극하는 것, 또는 소진된 또는 불활성 T-세포를 재생 또는 재활성화시키는 것을 의미한다. T-세포 기능을 증진시키는 것의 예는 개입 전의 수준에 비해 CD8+ T-세포로부터의 감마-인터페론의 증가된 분비, 증가된 증식, 증가된 항원 반응성 (예를 들어, 바이러스, 병원체 또는 종양 클리어런스)을 포함한다. 한 실시양태에서, 증진 수준은 적어도 50%, 대안적으로 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150%, 200%이다. 이러한 증진을 측정하는 방식은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다.
- [0067] "T 세포 기능이상 장애"는 항원 자극에 대한 감소된 반응성을 특징으로 하는 T-세포의 장애 또는 상태이다. 특정한 실시양태에서, T-세포 기능이상 장애는 PD-1을 통한 부적절한 증가된 신호전달과 특이적으로 연관된 장애이다. 또 다른 실시양태에서, T-세포 기능이상 장애는 T-세포가 무반응이거나 또는 시토카인 분비, 증식 또는 세포용해 활성을 수행하는 능력이 감소된 것이다. 구체적 측면에서, 감소된 반응성은 면역원을 발현하는 병원체 또는 종양을 비효과적으로 제어한다. T-세포 기능이상을 특징으로 하는 T 세포 기능이상 장애의 예는 미해결 급성 감염, 만성 감염 및 종양 면역을 포함한다.
- [0068] "종양 면역"은 종양이 면역 인식 및 클리어런스를 회피하는 과정을 지칭한다. 이에 따라, 치료 개념으로서 종양 면역은 이러한 회피가 감쇠되는 경우에 "치료"되고, 종양은 면역계에 의해 인식되어 공격받는다. 종양 인식의 예는 종양 결합, 종양 수축 및 종양 클리어런스를 포함한다.
- [0069] "면역원성"은 면역 반응을 일으키기 위한 특정한 물질의 능력을 지칭한다. 종양은 면역원성이고, 면역 반응에 의한 종양 세포의 클리어런스에서 종양 면역원성 도움을 증진시킨다. 종양 면역원성을 증진시키는 것의 예는 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제를 사용한 치료를 포함한다.
- [0070] "지속된 반응"은 치료 중지 후에 종양 성장 감소에 대한 지속된 효과를 지칭한다. 예를 들어, 종양 크기는 투여 단계 초기의 크기와 비교하여 동일하거나 보다 작게 남아 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, 지속된 반응은 적어도 치료 지속기간과 동일한 지속기간, 치료 지속기간의 적어도 1.5X, 2.0X, 2.5X 또는 3.0X 길이의 지속기간을 갖는다.
- [0071] 용어 "제약 제제"는 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적일도록 하는 형태로 존재하며 제제를 투여할 대상체에 허용되는 않는 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다. 이러한 제제는 멸균된다. "제약상 허용되는" 부형제 (비히클, 첨가제)는 사용된 활성 성분의 유효 용량을 제공하기 위해 대상 포유동물에 합리적으로 투여될 수 있는 것이다.
- [0072] 본원에 사용된 용어 "치료"는 임상 병리상태의 과정 동안 치료될 개체 또는 세포의 자연 과정을 변경하도록 설계된 임상 개입을 지칭한다. 치료의 바람직한 효과는 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 호전 또는 완화, 및 경감 또는 개선된 예후를 포함한다. 예를 들어, 개체는 암성 세포의 증식의 감소 (또는 파괴), 질환으로부터 발생하는 증상의 감소, 질환을 앓고 있는 개체의 삶의 질의 증가, 질환을 치료하는데 요구되는 다른 의약의 용량의 감소, 및/또는 개체의 생존 연장을 포함하나 이에 제한되지는 않는 암과 연관된 1종 이상의 증상이 완화되거나 제거되는 경우에 성공적으로 "치료된다".
- [0073] 본원에 사용된 "질환의 진행을 지연시키는"은 질환 (예컨대 암)의 발생이 연기, 저지, 지연, 지체, 안정화 및/또는 연장되는 것을 의미한다. 이러한 지연은 치료할 질환 및/또는 개체의 병력에 따라 다양한 기간일 수

있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이, 충분한 또는 유의한 지연은 사실상 개체에서 질환이 발생하지 않는 방지를 포괄할 수 있다. 예를 들어, 후기 단계 암, 예컨대 전이의 발생이 지연될 수 있다.

[0074] "유효량"은 특정한 장애의 측정가능한 개선 또는 예방을 야기하는데 요구되는 적어도 최소한의 양이다. 본원에서 유효량은 환자의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 도출하는 항체의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 유효량은 또한 치료상 유의한 효과가 치료의 임의의 독성 또는 유해한 효과를 증가하는 것이다. 예방적 용도의 경우에, 유의한 또는 목적하는 결과는 질환의 생화학적, 조직학적 및/또는 거동적 증상, 그의 합병증 및 질환의 발생 동안 제시되는 중간 병리학적 표현형을 포함한 질환의 위험을 제거 또는 감소시키거나, 상기 질환의 중증도를 경감시키거나, 또는 상기 질환의 발병을 지연시키는 것과 같은 결과를 포함한다. 치료적 용도의 경우에, 유의한 또는 목적하는 결과는 질환으로부터 발생하는 1종 이상의 증상을 감소시키고/거나, 질환을 앓고 있는 개체의 삶의 질을 증가시키고/거나, 질환을 치료하는데 요구되는 다른 의약의 용량을 감소시키고/거나, 표적화를 통해서와 같이 또 다른 의약의 효과를 증진시키고/거나, 질환의 진행을 지연시키고/거나, 생존을 연장시키는 것과 같은 임상 결과를 포함한다. 암 또는 종양의 경우에, 유효량의 약물은 암 세포의 수를 감소시키고/거나; 종양 크기를 감소시키고/거나; 말초 기관으로의 암 세포 침윤을 억제하고/거나 (즉, 어느 정도 늦추거나 바람직하게는 정지시키는 것); 종양 전이를 억제하고/거나 (즉, 어느 정도 늦추거나 바람직하게는 정지시키는 것); 종양 성장을 어느 정도 억제하고/거나; 장애와 연관된 증상 중 1종 이상을 어느 정도 경감시킬 수 있다. 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 본 발명의 목적상, 약물, 화합물 또는 제약 조성물의 유효량은 직접 또는 간접적으로 예방적 또는 치유적 치료를 달성하는데 충분한 양이다. 임상 환경에서 이해되는 바와 같이, 약물, 화합물 또는 제약 조성물의 유효량은 또 다른 약물, 화합물 또는 제약 조성물과 함께 달성될 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 따라서, 1종 이상의 치료제를 투여하는 맥락에서 "유효량"이 고려될 수 있고, 1종 이상의 기타 작용제와 함께 목적하는 결과가 달성될 수 있거나 달성되는 경우에 단일 작용제가 유효량으로 제공된 것으로 간주될 수 있다.

[0075] 본원에 사용된 "와 함께"는 한 치료 양식, 뿐만 아니라 또 다른 치료 양식의 투여를 지칭한다. 따라서, "와 함께"는 한 치료 양식을 개체에게 다른 치료 양식을 투여하기 전에, 그 동안 또는 그 후에 투여하는 것을 지칭한다.

[0076] "장애"는 포유동물이 해당 장애에 걸리기 용이하게 하는 병리학적 상태를 포함한 만성 및 급성 장애 또는 질환을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 치료로부터 이익을 얻게 될 임의의 상태이다.

[0077] 용어 "세포 증식성 장애" 및 "증식성 장애"는 어느 정도의 비정상 세포 증식과 연관된 장애를 지칭한다. 한 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 암이다. 한 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 종양이다.

[0078] 본원에 사용된 "종양"은 모든 신생물성 세포 성장 및 증식 (악성이든 양성이든) 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 지칭한다. 용어 "암", "암성", "세포 증식성 장애", "증식성 장애" 및 "종양"은 본원에 지칭될 때 상호 배타적이지 않다.

[0079] 본원에 사용된 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 비조절된 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물에서의 생리학적 상태를 지칭하거나 기재한다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병 또는 림프성 악성종양을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예는, 편평세포암 (예를 들어, 상피 편평세포암), 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평세포 암종을 포함한 폐암, 복막암, 간세포성암, 위장암 및 위장 기질 암을 포함한 위암 또는 복부암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 요로암, 간세포암, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암 또는 신암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 흑색종, 표재 확산성 흑색종, 악성 흑자 흑색종, 말단 흑자 흑색종, 결절성 흑색종, 다발성 골수종 및 B-세포 림프종 (저등급/여포성 비-호지킨 림프종 (NHL); 소림프구성 (SL) NHL; 중등급/여포성 NHL; 중등급 미만성 NHL; 고등급 면역모세포성 NHL; 고등급 림프모구성 NHL; 고등급 비-분할 소세포 NHL; 거대 종양 NHL; 외투 세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 포함); 만성 림프구성 백혈병 (CLL); 급성 림프모구성 백혈병 (ALL); 모발상 세포 백혈병; 만성 골수모구성 백혈병; 및 이식 후 림프증식성 장애 (PTLD), 뿐만 아니라 모반증에 연관된 비정상적 혈관 증식, 부종 (예컨대 뇌 종양에 연관된 부종), 메이그스 증후군, 뇌암과 두경부암, 및 연관된 전이를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체에 의한 치료가 잘 듣는 암은 유방암, 결장직장암, 직장암, 비소세포 폐암, 교모세포종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 신세포암, 전립선암, 간암, 췌장암, 연조직 육종, 카포시 육종, 카르시노이드 암종, 두경부암, 난소암, 중피종 및 다발성 골수종을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 다음으로부터 선택된다: 소세포 폐암, 교모세포종, 신경모세포종, 흑색종, 유방 암종,

위암, 결장직장암(CRC) 및 간세포성 암종. 또한, 일부 실시양태에서, 암은 다음으로부터 선택된다: 비소세포 폐암, 결장직장암, 교모세포종 및 유방 암종, 및 이들 암의 전이성 형태.

[0080]

본원에 사용된 용어 "세포독성제"는 세포에 해로운 (예를 들어, 세포 사멸을 야기하거나, 증식을 억제하거나 또는 달리 세포 기능을 방해하는) 임의의 작용제를 지칭한다. 세포독성제는 방사성 동위원소 (예를 들어, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb 및 Lu의 방사성 동위원소들); 화학요법제; 성장 억제제; 핵 산분해 효소와 같은 효소 및 그의 단편; 및 독소, 예컨대 소분자 독소 또는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소 (그의 단편 및/또는 변이체 포함)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 세포독성제는 항미세관제, 백금 배위 착물, 알킬화제, 항생제, 토포이소머라제 II 억제제, 항대사물, 토포이소머라제 I 억제제, 호르몬 및 호르몬 유사체, 신호 전달 경로 억제제, 비-수용체 티로신 키나제 혈관신생 억제제, 면역억제제, 아폽토시스촉진제, LDH-A의 억제제, 지방산 생합성의 억제제, 세포 주기 신호전달 억제제, HDAC 억제제, 프로테아솜 억제제 및 암 대사의 억제제로부터 선택될 수 있다. 한 실시양태에서 세포독성제는 타산이다. 한 실시양태에서 타산은 과클리탁셀 또는 도세탁셀이다. 한 실시양태에서 세포독성제는 백금 작용제이다. 한 실시양태에서 세포독성제는 EGFR의 길항제이다. 한 실시양태에서 EGFR의 길항제는 N-(3-에티닐페닐)-6,7-비스(2-메톡시에톡시)퀴나졸린-4-아민 (예를 들어, 에를로티닙)이다. 한 실시양태에서 세포독성제는 RAF 억제제이다. 한 실시양태에서, RAF 억제제는 BRAF 및/또는 CRAF 억제제이다. 한 실시양태에서 RAF 억제제는 베무라페닙이다. 한 실시양태에서 세포독성제는 PI3K 억제제이다.

[0081]

"화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화합물을 포함한다. 화학요법제의 예는 에를로티닙 (타르세바(TARCEVA)®, 제넨테크/OSI 팜.(OSI Pharm.)), 보르테조미 (벨케이드(VELCADE)®, 밀레니엄 팜.(Millennium Pharm.)), 디술 피람, 에피갈로카테킨 갈레이트, 살리노스포라미드 A, 카르필조미, 17-AAG (겔다나마이신), 라디시콜, 락테이트 데히드로게나제 A (LDH-A), 폴베스트란트 (파슬로렉스(FASLODEX)®, 아스트라제네카(AstraZeneca)), 수네티닙 (수네티(SUTENT)®, 화이자(Pfizer)/수젠(Sugen)), 레트로졸 (페마라(FEMARA)®, 노파르티스(Novartis)), 이마 티닙 메실레이트 (글리벡(GLEEVEC)®, 노파르티스), 피나수네이트 (바탈라닙(VATALANIB)®, 노파르티스), 옥살 리플라틴 (엘록사틴(ELOXATIN)®, 사노피(Sanofi)), 5-FU (5-플루오로우라실), 류코보린, 라파마이신 (시롤리무 스, 라파문(RAPAMUNE)®, 와이어쓰(Wyeth)), 라파티닙 (타이커브(TYKERB)®, GSK572016, 글락소 스미스 클라인 (Glaxo Smith Kline)), 로나파미 (SCH 66336), 소라페닙 (넥사바르(NEXAVAR)®, 바이엘 랩스(Bayer Labs)), 게 피티닙 (이레사(IRESSA)®, 아스트라제네카), AG1478, 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 시톡산(CYTOXAN)® 시클로 포스파미드; 알킬 술포네이트, 예컨대 부술폰, 임프로술폰 및 피포술폰; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠 온, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민, 및 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리 에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸로멜라민을 포함한 메틸라멜라민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타 시논); 캄프토테신 (토포테칸 및 이리노테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카 르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토포신 (특히 크립토포신 1 및 크립토포신 8); 아드레노코르티코 스테로이드 (프레드니손 및 프레드니솔론 포함); 시프로테론 아세테이트; 5 α -리덕타제 (피나스테리드 및 두타 스테리드 포함); 보리노스타트, 로미렙신, 파노비노스타트, 발프로산, 모세티노스타트 돌라스타틴; 알데스류킨, 활석 두오카르마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코닥티닌; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로마파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미 드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트 로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니 무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대 에네딘 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 γ 1I 및 칼리케아미신 ω 1I (Angew Chem. Int'l. Ed. Engl. 1994 33:183-186); 디네미신 A를 포함한 디네미신; 비스포스 포네이트, 예컨대 클로드로네이트; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련된 색소단백 질 에네딘 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티 노마이신, 카라비신, 카미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6- 디아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신(ADRIAMYCIN)® (독소루비신), 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴 리노-독소루비신, 2-피콜리노-독소루비신 및 테옥시독소루비신), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀 로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피 로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니맥스, 지 노스타틴, 조루비신; 항-대사물, 예컨대 메토타렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴산 유사체, 예컨대 테 노프테린, 메토타렉세이트, 프테로프테린, 트리메타렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토피리딘, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르

모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토라톤; 항부신제, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 테포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피담놀; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 폴리사카라이드 복합체 (JHS 내추럴 프로덕츠(JHS Natural Products), 오레곤주 유진); 라죽산; 리죽신; 시조푸란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라큐린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈테신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 탁솔(TAXOL) (파클리탁셀; 브리스톨-마이어스 스킵 온콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology), 뉴저지주 프린스턴), 아브락산(ABRAXANE)® (크레모포르-무함유), 파클리탁셀의 알부민-조작된 나노입자 제제 (아메리칸 파마슈티칼 파트너스(American Pharmaceutical Partners), 일리노이주 샤움버그) 및 탁소테레(TAXOTERE)® (도세탁셀, 도세탁셀; 사노피-아벤티스(Sanofi-Aventis)); 클로람부실; 겐자르(GEMZAR)® (겐시타빈); 6-티오구아닌; 메르캅토피린; 메토크세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; 나벨빈(NAVELBINE)® (비노렐빈); 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 카페시타빈 (젤로다(XELODA)®); 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000년; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산; 및 상기 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 및 유도체를 포함한다.

[0082] 화학요법제는 또한 (i) 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항-호르몬제, 예컨대 항-에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (놀바덱스(NOLVADEX)®; 타목시펜 시트레이트 포함), 탈록시펜, 드롤록시펜, 아이오독시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 파레스톤(FARESTON)® (토레미핀 시트레이트); (ii) 부신에서 에스트로겐 생산을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예컨대, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메가세(MEGASE)® (메게스트롤 아세테이트), 아로마신(AROMASIN)® (엑스메스탄; 화이자), 포르메스타니, 파드로졸, 리비소르(RIVISOR)® (보로졸), 페마라(FEMARA)® (레트로졸; 노바티스) 및 아리미덱스(ARIMIDEX)® (아나스트로졸; 아스트라제네카); (iii) 항-안드로겐, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 부세렐린, 트립테렐린, 메드록시프로게스테론 아세테이트, 디에틸stil베스트롤, 프레마린, 플루옥시메스테론, 모든 트랜스레티온산, 펜레티니드, 뿐만 아니라 트룩사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); (iv) 단백질 키나제 억제제; (v) 지질 키나제 억제제; (vi) 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식에 관여하는 신호전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것, 예컨대, 예를 들어 PKC-알파, Ralf 및 H-Ras; (vii) 리보자임, 예컨대 VEGF 발현 억제제 (예를 들어, 안지오자임(ANGIOZYME)®) 및 HER2 발현 억제제; (viii) 백신, 예컨대 유전자 요법 백신, 예를 들어, 알로벡틴(ALLOVECTIN)®, 류벡틴(LEUVECTIN)® 및 박시드(VAXID)®; 프로류킨(PROLEUKIN)®, rIL-2; 토포이소머라제 1 억제제, 예컨대 루르토테칸(LURTOTECAN)®; 아바렐릭스(ABARELIX)® rmRH; 및 (ix) 상기 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 및 유도체를 포함한다.

[0083] 화학요법제는 또한 항체, 예컨대 알렘투주맙 (캄파트(Campath)), 베바시주맙 (아바스틴(AVASTIN)®, 제넨테크); 세툽시주맙 (에르비투스(ERBITUX)®, 임클론(Imclone)); 파니투무맙 (벡티빅스(VECTIBIX)®, 얌젠(Amgen)), 리툽시주맙 (리툽산(RITUXAN)®, 제넨테크/바이오젠 아이덱(Biogen Idec)), 페르투주맙 (옵니타르그(OMNITARG)®, 2C4, 제넨테크), 트라스투주맙 (헤르셉틴®, 제넨테크), 토시투모맙 (백사르(Bexxar), 코릭시아(Corixa)), 및 항체 약물 접합체, 겐투주맙 오조가미신 (밀로타르그(MYLOTARG)®, 와이어쓰)을 포함한다. 본 발명의 화합물과 조합되어 작용제로서의 치료 잠재력을 갖는 추가의 인간화 모노클로날 항체는 다음을 포함한다: 아폴리주맙, 아셀리주맙, 아틀리주맙, 바피뉴주맙, 비바투주맙 메르탄신, 칸투주맙 메르탄신, 세텔리주맙, 세르톨리주맙 페골, 시드푸시투주맙, 시드투주맙, 다클리주맙, 에쿨리주맙, 에팔리주맙, 에프라투주맙, 예를리주맙, 펠비주맙, 폰톨리주맙, 겐투주맙 오조가미신, 이노투주맙 오조가미신, 이필리무맙, 라베투주맙, 린투주맙, 마투주맙, 메폴리주맙, 모타비주맙, 모토비주맙, 나탈리주맙, 니모투주맙, 놀로비주맙, 누마비주맙, 오크렐리주맙, 오말리주맙, 팔리비주맙, 파스쿨리주맙, 펙푸시투주맙, 펙투주맙, 펙셀리주맙, 팔리비주맙, 라니비주맙, 레슬리비주맙, 레슬리주맙, 레시비주맙, 로벨리주맙, 루폴리주맙, 시브로투주맙, 시폴리주맙, 손투주맙, 타카투주맙 테트락세탄, 타도시주맙, 탈리주맙, 테피마주맙, 토실리주맙, 토랄리주맙, 투코투주맙 셀모류킨, 투쿠시투주맙, 우마비주맙,

우르톡사주맵, 우스테키누맵, 비실리주맵, 및 항-인터류킨-12 (ABT-874/J695, 와이어쓰 리서치 앤 애보트 래보러토리즈(Wyeth Research and Abbott Laboratories)) (이는 인터류킨-12 p40 단백질을 인식하도록 유전자 변형된, 오직 인간 서열의 재조합 전장 IgG₁ λ 항체임).

[0084]

화학요법제는 또한 EGFR에 직접적으로 결합하거나 달리 상호작용하여 그의 신호전달 활성을 방지하거나 감소시키며 대안적으로는 "EGFR 길항제"로 지칭되는 화합물을 지칭하는 "EGFR 억제제"를 포함한다. 이러한 작용제의 예는 EGFR에 결합하는 항체 및 소분자를 포함한다. EGFR에 결합하는 항체의 예는 MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (미국 특허 번호 4,943,533 (Mendelsohn et al.) 참조) 및 그의 변이체, 예컨대 키메라화 225 (C225 또는 세특시맵(Cetuximab); 에르비투스(ERBITUX)®) 및 재형성된 인간 225 (H225) (W096/40210, (임클론 시스템 인크.(Imclone Systems Inc.) 참조); IMC-11F8, 완전 인간, EGFR-표적화된 항체 (임클론); 유형 II 돌연변이체 EGFR에 결합하는 항체 (미국 특허 번호 5,212,290); 미국 특허 번호 5,891,996에 기재된 바와 같은 EGFR에 결합하는 인간화 및 키메라 항체; 및 EGFR에 결합하는 인간 항체, 예컨대 ABX-EGF 또는 파니투무맵 (W098/50433 (아브게닉스(Abgenix)/암젠(Amgen)) 참조); EMD 55900 (Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); EGFR 결합에 대해 EGF 및 TGF-알파 둘 다와 경쟁하는, EGFR에 대해 지시된 인간화 EGFR 항체인 EMD7200 (마투주맵) (EMD/머크); 인간 EGFR 항체, HuMax-EGFR (젠맵(GenMab)); E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 및 E7.6.3으로 공지되어 있으며 US 6,235,883에 기재된 완전 인간 항체; MDX-447 (메다렉스 인크.(Medarex Inc.)); 및 mAb 806 또는 인간화 mAb 806 (Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)). 항-EGFR 항체는 세포독성제와 접합될 수 있으며, 이에 따라 면역접합체를 생성한다 (예를 들어, EP659,439A2 (머크 패이턴트 게엠베하(Merck Patent GmbH)) 참조). EGFR 길항제는 미국 특허 번호 5,616,582, 5,457,105, 5,475,001, 5,654,307, 5,679,683, 6,084,095, 6,265,410, 6,455,534, 6,521,620, 6,596,726, 6,713,484, 5,770,599, 6,140,332, 5,866,572, 6,399,602, 6,344,459, 6,602,863, 6,391,874, 6,344,455, 5,760,041, 6,002,008 및 5,747,498, 뿐만 아니라 하기 PCT 공개: W098/14451, W098/50038, W099/09016 및 W099/24037에 기재된 화합물과 같은 소분자를 포함한다. 특정한 소분자 EGFR 길항제는 OSI-774 (CP-358774, 예를로티닙, 타르세마®, 제넨테크/OSI 파마슈티칼스(OSI Pharmaceuticals)); PD 183805 (CI 1033, 2-프로펜아미드, N-[4-[(3-클로로-4-플루오로페닐)아미노]-7-[3-(4-모르폴리닐)프로폭시]-6-퀴나졸리닐]-, 디히드로클로라이드, 화이자 인크.(Pfizer Inc.)); ZD1839, 게피티닙 (이레사®), 4-(3'-클로로-4'-플루오로아닐리노)-7-메톡시-6-(3-모르폴리노프로폭시)퀴나졸린, 아스트라제네카; ZM 105180 ((6-아미노-4-(3-메틸페닐-아미노)-퀴나졸린, 제네카(Zeneca)); BIBX-1382 (N8-(3-클로로-4-플루오로-페닐)-N2-(1-메틸-피페리딘-4-일)-피리미도[5,4-d]피리미딘-2,8-디아민, 베링거 잉겔하임(Boehringer Ingelheim)); PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-페닐에틸)아미노]-1H-피롤로[2,3-d]피리미딘-6-일]-페놀); (R)-6-(4-히드록시페닐)-4-[(1-페닐에틸)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘; CL-387785 (N-[4-[(3-브로모페닐)아미노]-6-퀴나졸리닐]-2-부탄아미드); EKB-569 (N-[4-[(3-클로로-4-플루오로페닐)아미노]-3-시아노-7-에톡시-6-퀴놀리닐]-4-(디메틸아미노)-2-부탄아미드) (와이어쓰); AG1478 (화이자); AG1571 (SU 5271; 화이자); 이중 EGFR/HER2 티로신 키나제 억제제, 예컨대 라파티닙 (타이커브(TYKERB)®, GSK572016 또는 N-[3-클로로-4-[(3-플루오로페닐)메톡시]페닐]6[[[2메틸술포닐)에틸]아미노]메틸]-2-푸라닐]-4-퀴나졸린아민)을 포함한다.

[0085]

화학요법제는 또한 상기 단락에 언급된 EGFR-표적화된 약물; 소분자 HER2 티로신 키나제 억제제, 예컨대 TAK165 (다케다(Takeda)로부터 입수가능); ErbB2 수용체 티로신 키나제의 경구 선택적 억제제인 CP-724,714 (화이자 및 OSI); EGFR에 우선적으로 결합하지만, HER2 및 EGFR-과다발현 세포 둘 다를 억제하는 이중-HER 억제제, 예컨대 EKB-569 (와이어쓰로부터 입수가능); 경구 HER2 및 EGFR 티로신 키나제 억제제인 라파티닙 (GSK572016; 글락소-스미스클라인으로부터 입수가능); PKI-166 (노파르티스로부터 입수가능); 범-HER 억제제, 예컨대 카네르티닙 (CI-1033; 파마시아(Pharmacia)); Raf-1 신호전달을 억제하는 Raf-1 억제제, 예컨대 안티센스 작용제 ISIS-5132 (ISIS 파마슈티칼스(ISIS Pharmaceuticals)로부터 입수가능); 비-HER 표적화된 TK 억제제, 예컨대 이마티닙 메실레이트 (글리벡®, 글락소-스미스클라인으로부터 입수가능); 다중-표적화된 티로신 키나제 억제제, 예컨대 수니티닙 (수텐트®, 화이자로부터 입수가능); VEGF 수용체 티로신 키나제 억제제, 예컨대 바타라닙 (PTK787/ZK222584, 노파르티스/쉐링 아게(Schering AG)로부터 입수가능); MAPK 세포외 조절 키나제 I 억제제 CI-1040 (파마시아로부터 입수가능); 퀴나졸린, 예컨대 PD 153035, 4-(3-클로로아닐리노) 퀴나졸린; 피리도피리미딘; 피리미도피리미딘; 피롤로피리미딘, 예컨대 CGP 59326, CGP 60261 및 CGP 62706; 피라졸로피리미딘, 4-(페닐아미노)-7H-피롤로[2,3-d] 피리미딘; 쿠르쿠민 (디페롤로일 메탄, 4,5-비스(4-플루오로아닐리노)프탈이미드); 니트로티오펜 모이어티를 함유하는 티르포스틴; PD-0183805 (워너-램버트(Warner-Lambert)); 안티센스 분자 (예컨대, HER 코딩 핵산에 결합하는 것); 퀴녹살린 (미국 특허 번호 5,804,396); 트리포스틴 (미국 특허 번

호 5,804,396); ZD6474 (아스트라제네카); PTK-787 (노파르티스/쉐링 아게); 범-HER 억제제, 예컨대 CI-1033 (화이자); 아피니택(Affinitac) (ISIS 3521; 이시스/릴리(isis/Lilly)); 이마티닙 메실레이트 (글리벡®); PKI 166 (노파르티스); GW2016 (글락소 스미스클라인); CI-1033 (화이자); EKB-569 (와이어쓰); 세막시닙 (Semaxinib) (화이자); ZD6474 (아스트라제네카); PTK-787 (노파르티스/쉐링 아게); INC-1C11 (임클론), 라파마이신 (시클리무스, 라파문(RAPAMUNE)®); 또는 하기 특허 공개: 미국 특허 번호 5,804,396; WO 1999/09016 (아메리칸 시아나미드(American Cyanamid)); WO 1998/43960 (아메리칸 시아나미드); WO 1997/38983 (위너-램버트); WO 1999/06378 (위너-램버트); WO 1999/06396 (위너-램버트); WO 1996/30347 (화이자 인크.); WO 1996/33978 (제네카); WO 1996/3397 (제네카); 및 WO 1996/33980 (제네카) 중 임의의 것에 기재되어 있는 것을 포함한다.

[0086]

화학요법제는 또한 텍사메타손, 인터페론, 콜키신, 메토프린, 시클로스포린, 암포테리신, 메트로니다졸, 알렘투주맙, 알리트레티노인, 알로푸리놀, 아미포스틴, 삼산화비소, 아스파라기나제, BCG 리브, 베바시주맙, 벡사로텐, 클라드리빈, 클로파라빈, 다르베포에틴 알파, 데니류킨, 텍스라족산, 에포에틴 알파, 에블로티닙, 필그라스티م, 히스트렐린 아세테이트, 이브리투모맙, 인터페론 알파-2a, 인터페론 알파-2b, 레날리도미드, 레바미솔, 메스나, 메톡살렌, 난드롤론, 넬라라빈, 노페투모맙, 오프렐베킨, 팔리페르민, 파미드로네이트, 페가데마제, 페가스파르가제, 페그필그라스티م, 페메트렉세드 이나트륨, 폴리카마이신, 포르피머 소듐, 퀴나크린, 라스부리카제, 사르그라모스틴, 테모졸로미드, VM-26, 6-TG, 토레미펜, 트레티노인, ATRA, 발루비신, 졸레드로네이트 및 졸레드론산, 및 그의 제약상 허용되는 염을 포함한다.

[0087]

화학요법제는 또한 히드로코르티손, 히드로코르티손 아세테이트, 코르티손 아세테이트, 텍소코르톨 피발레이트, 트리암시놀론 아세토니드, 트리암시놀론 알콜, 모메타손, 암시노니드, 부데소니드, 데소니드, 플루오시노니드, 플루오시놀론 아세토니드, 베타메타손, 베타메타손 인산나트륨, 텍사메타손, 텍사메타손 인산나트륨, 플루오코르톨론, 히드로코르티손-17-부티레이트, 히드로코르티손-17-발레레이트, 알클로메타손 디프로피오네이트, 베타메타손 발레레이트, 베타메타손 디프로피오네이트, 프레드니카르베이트, 클로베타손-17-부티레이트, 클로베타솔-17-프로피오네이트, 플루오코르톨론 카프로에이트, 플루오코르톨론 피발레이트 및 플루프레드니넨 아세테이트; 면역 선택적 항염증 펩티드 (ImSAID), 예컨대 페닐알라닌-글루타민-글리신 (FEG) 및 그의 D-이성질체 형태 (feG) (이물란 바이오테라퓨틱스, 엘엘씨(IMULAN BioTherapeutics, LLC)); 항류마티스 약물, 예컨대 아자티오프린, 시클로스포린 (시클로스포린 A), D-페니실라민, 금 염, 히드록시클로로퀸, 레플루노미드미노시클린, 술파살라진, 중앙 괴사 인자 알파 (TNF α) 차단제, 예컨대 에타네르셉트 (엔브렐), 인플릭시맙 (레미케이드), 아달리무맙 (휴미라), 세르톨리주맙 페골 (심지아), 골리무맙 (심포니), 인터류킨 1 (IL-1) 차단제, 예컨대 아나킨라 (키네트), T 세포 공동자극 차단제, 예컨대 아바타셉트 (오렌시아), 인터류킨 6 (IL-6) 차단제, 예컨대 토실리주맙 (악테메라(ACTEMERA)®); 인터류킨 13 (IL-13) 차단제, 예컨대 레브리키주맙; 인터페론 알파 (IFN) 차단제, 예컨대 론탈리주맙; 베타 7 인테그린 차단제, 예컨대 rhuMab 베타7; IgE 경로 차단제, 예컨대 항-M1 프라임; 분비된 동중삼량체성 LTa3 및 막 결합 이중삼량체 LTa1/ β 2 차단제, 예컨대 항-림포독소 알파 (LTa); 방사성 동위원소 (예를 들어, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² 및 Lu의 방사성 동위원소); 기타 조상중인 작용제, 예컨대 티오플라틴, PS-341, 페닐부티레이트, ET-18-OCH₃, 또는 파르네실 트랜스퍼라제 억제제 (L-739749, L-744832); 폴리페놀, 예컨대 퀘르세틴, 레스베라트롤, 피세아타놀, 에피갈로카테킨 갈레이트, 테아플라빈, 플라바놀, 프로시아니딘, 베틀린산 및 그의 유도체; 자가포식 억제제, 예컨대 클로로퀸; 델타-9-테트라하이드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)®); 베타-라파콘; 라파콜; 콜키신; 베틀린산; 아세틸캄프로테신, 스코폴렉틴 및 9-아미노캄프로테신; 포도필로톡신; 테가푸르 (유프토랄(UFTORAL)®); 벡사로텐 (탈그레틴(TARGRETIN)®); 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스(BONEFOS)® 또는 오스타크(OSTAC)®), 에티드로네이트 (디드로칼(DIDROCAL)®), NE-58095, 졸레드론산/졸레드로네이트 (조메타(ZOMETA)®), 알렌드로네이트 (포사맥스(FOSAMAX)®), 파미드로네이트 (아레디아(AREDIA)®), 틸루드로네이트 (스켈리드(SKELID)®) 또는 리세드로네이트 (악토넬(ACTONEL)®); 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신, 예컨대 테라토프(THERATOPE)® 백신; 페리포신, COX-2 억제제 (예를 들어, 셀레콕시브 또는 에토리콕시브), 프로테오솜 억제제 (예를 들어, PS341); CCI-779; 티피파르닙 (R11577); 오라페닙, ABT510; Bcl-2 억제제, 예컨대 오블리메르센 소듐 (게나센스(GENASENSE)®); 픽산트론; 파르네실트랜스퍼라제 억제제, 예컨대 로나파르닙 (SCH 6636, 사라사르(SARASAR)™); 및 상기 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기 중 2종 이상의 조합, 예컨대 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법에 대한 약어인 CHOP; 및 5-FU 및 류코보린과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴(ELOXATIN)™)을 사용한 치료 요법에 대한 약어인 FOLFOX를 포함한다.

- [0088] 화학요법제는 또한 진통, 해열 및 항-염증 효과를 갖는 비-스테로이드성 항-염증 약물을 포함한다. NSAID는 효소 시클로옥시게나제의 비-선택적 억제제를 포함한다. NSAID의 구체적 예는 아스피린, 프로피온산 유도체, 예컨대 이부프로펜, 페노프로펜, 케토프로펜, 플루르비프로펜, 옥사프로진 및 나프록센, 아세트산 유도체, 예컨대 인도메타신, 숀린, 에토돌락, 디클로페낙, 에놀산 유도체, 예컨대 피록시캄, 펠록시캄, 테녹시캄, 드록시캄, 로르녹시캄 및 이속시캄, 페남산 유도체, 예컨대 메페남산, 메클로페남산, 플루페남산, 톨페남산 및 COX-2 억제제, 예컨대 셀레코시브, 에토리코시브, 루미라코시브, 파레코시브, 로페코시브, 로페코시브 및 발데코시브를 포함한다. NSAID는 상태, 예컨대 류마티스 관절염, 골관절염, 염증성 관절병증, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 라이터 증후군, 급성 통풍, 월경근관증, 전이성 골통, 두통 및 편두통, 수술후 통증, 염증 및 조직 손상으로 인한 정도 내지 중등도 통증, 발열, 장폐쇄증 및 신산통의 증상 완화용으로 지시될 수 있다.
- [0089] "성장 억제제"가 본원에 사용되는 경우에, 이것은 세포의 성장을 시험관내 또는 생체내 억제하는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 한 실시양태에서, 성장 억제제는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포의 증식을 방지 또는 감소시키는 성장 억제 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 성장 억제제는 S 기에서 세포의 백분율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 (S 기 이외의 다른 곳에서) 세포 주기 진행을 차단하는 작용제, 예컨대 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 작용제를 포함한다. 전통적인 M-기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산, 및 토포이소머라제 II 억제제, 예컨대 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 상기 작용제, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토타렉세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C는 또한 S기 정지에도 작용한다. 추가의 정보는 문헌 [Mendelsohn and Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995)], 예를 들어 p. 13에서 찾아볼 수 있다. 탁산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 둘 다 주목으로부터 유래된 항암 약물이다. 유럽 주목으로부터 유래된 도세탁셀 (탁소테데®, 롱-프랑 로러 (Rhone-Poulenc Rorer))은 파클리탁셀 (탁솔®, 브리스톨-마이어스 스킵(Bristol-Myers Squibb))의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜블린 이량체로부터 미세관 조립을 촉진하고, 탈중합을 방지함으로써 미세관을 안정화시켜, 세포에서의 유사분열 억제를 유발한다.
- [0090] "방사선 요법"은 정상적으로 기능하거나 세포를 파괴하는 능력이 완전히 제한되도록 세포에 대한 충분한 손상을 유도하기 위해 지정된 감마선 또는 베타선을 사용하는 것을 의미한다. 투여량 및 치료의 지속기간을 결정하기 위한 관련 기술분야에 공지된 수많은 방법이 있음을 이해할 것이다. 전형적인 치료는 1회 투여로 제공되며, 전형적인 투여량은 1일에 10 내지 200 유닛 (Gray) 범위이다.
- [0091] 치료 목적의 "대상체" 또는 "개체"는 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 고양이, 소 등을 포함한, 포유동물로 분류되는 임의의 동물을 지칭한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.
- [0092] 용어 "항체"는 본원에서 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 모노클로날 항체 (예를 들어, 전장 모노클로날 항체), 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함한다.
- [0093] "단리된" 항체는 그의 자연 환경의 성분으로부터 확인되고 분리 및/또는 회수된 것이다. 그의 자연 환경의 오염 성분은 항체의 연구, 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 (1) 예를 들어 로우리(Lowry) 방법으로 측정시에 95 중량% 초과인 항체로, 및 일부 실시양태에서는 99 중량% 초과인 항체로; (2) 예를 들어 스핀닝 컵 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 예를 들어 쿠마시(Coomassie) 블루 또는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질한 것으로 나타날 정도로 정제된다. 단리된 항체는 재조합 세포 내의 계내 항체를 포함하며, 이는 항체의 자연 환경의 적어도 1종의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 적어도 1회의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.
- [0094] "천연 항체"는 통상적으로 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된 약 150,000 달톤의 이중사량체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 1개의 공유 디설피드 결합에 의해 중쇄에 연결되지만, 디설피드 연결의 수는 상이한 이뮤노글로불린 이소형의 중쇄마다 달라진다. 또한, 각각의 중쇄 및 경쇄는 규칙적으로 이격된쇄 내 디설피드 가교를 갖는다. 각각의 중쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 (VH)을 갖고, 이어서 다수의 불변 도메인을 갖는다. 각각의 경쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 (VL)을 다른쪽 말단에 불변 도메인을 갖고; 경쇄의 불변

도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되며, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정한 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이에 계면을 형성한다고 여겨진다.

- [0095] 용어 "불변 도메인"은 항원 결합 부위를 함유하는 이뮤노글로불린의 다른 부분인 가변 도메인에 비해 보다 보존된 아미노산 서열을 갖는 이뮤노글로불린 분자의 일부를 지칭한다. 불변 도메인은 중쇄의 C_H1, C_H2 및 C_H3 도메인 (집합적으로, CH) 및 경쇄의 CHL (또는 CL) 도메인을 함유한다.
- [0096] 항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 지칭한다. 중쇄의 가변 도메인은 "V_H"로 지칭될 수 있다. 경쇄의 가변 도메인은 "V_L"로 지칭될 수 있다. 이들 도메인은 일반적으로 항체의 가장 가변적인 부분이고, 항원-결합 부위를 함유한다.
- [0097] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체마다 서열에서 광범위하게 상이하며, 각각의 특정한 항체의 그의 특정한 항원에 대한 결합 및 특이성에 이용된다는 사실을 지칭한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전반에 걸쳐 균등하게 분포되지 않는다. 이것은 경쇄 가변 도메인 및 중쇄 가변 도메인 둘 다에서 초가변 영역 (HVR)이라 불리는 3개의 절편에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)으로 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은, 주로 베타-시트 형상을 채택하여 3개의 HVR에 의해 연결되어 있는 4개의 FR 영역을 포함하며, 이는 베타-시트 구조를 연결하고 일부 경우에는 그의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각각의쇄에서의 HVR은 FR 영역에 의해 함께 근접하게 위치되어 있고, 다른 쇠로부터의 HVR과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항원에 대한 항체의 결합에 직접적으로 수반되지는 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체-의존성 세포 독성에의 항체의 참여를 나타낸다.
- [0098] 임의의 포유동물 종으로부터의 항체 (이뮤노글로불린)의 "경쇄"는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기반하여, 카파 ("κ") 및 람다 ("λ")로 불리는 2종의 명백하게 별개의 유형 중 1종으로 지정될 수 있다.
- [0099] 본원에 사용된 용어 IgG "이소형" 또는 "하위부류"는 그의 불변 영역의 화학적 특징 및 항원 특징에 의해 정의된 이뮤노글로불린의 임의의 하위부류를 의미한다.
- [0100] 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체 (이뮤노글로불린)는 상이한 부류로 배정될 수 있다. 이뮤노글로불린의 5종의 주요 부류: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있으며, 이들 중 몇몇은 하위부류 (이소형), 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂로 추가로 분류될 수 있다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α, γ, ε, γ 및 μ로 지칭된다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형상은 널리 공지되어 있고, 일반적으로 예를 들어 문헌 [Abbas et al. Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000)]에 기재되어 있다. 항체는 항체와 1종 이상의 다른 단백질 또는 펩티드의 공유 또는 비-공유 회합에 의해 형성되는, 보다 큰 융합 분자의 일부일 수 있다.
- [0101] 용어 "전장 항체", "무손상 항체" 및 "전체 항체"는 본원에서 교환가능하게 사용되고, 하기 정의된 항체 단편이 아닌, 그의 실질적으로 무손상 형태의 항체를 지칭한다. 용어는 특히 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.
- [0102] 본원의 목적상 "네이키드 항체"는 세포독성 모이어티 또는 방사성표지에 접합되지 않은 항체이다.
- [0103] "항체 단편"은 바람직하게는 항원 결합 영역을 포함하는 무손상 항체의 일부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 단편은 항원-결합 단편이다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.
- [0104] 항체를 파파인으로 소화시키면, "Fab" 단편으로 불리는, 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는 2개의 동일한 항원-결합 단편 및 나머지 "Fc" 단편이 생성되며, 이러한 명칭은 그의 용이하게 결정화되는 능력을 반영한 것이다. 펩신 처리에 의해, 2개의 항원-결합 부위를 갖고 여전히 항원에 가교-연결될 수 있는 F(ab')₂ 단편이 생성된다.
- [0105] "Fv"는 완전한 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 한 실시양태에서, 2-쇄 Fv 종은 단단히 비-공유 회합된 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 이루어진다. 단일-쇄 Fv (scFv) 종에서는, 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인이 유연한 펩티드 링커에 의해 공유 연결되어 경쇄 및 중쇄가 2-쇄 Fv 종에서의 구조와 유사한 "이량체" 구조로 회합할 수 있다. 이러한 형상에서, 각 가변 도메인의 3개의 HVR은 상호작용하여 VH-VL 이량체의 표면 상의 항원-결합 부위를 한정한다. 집합적으로, 6개의 HVR이 항체에 항원-결합 특이성

을 부여한다. 그러나, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 HVR만을 포함하는 Fv의 절반)은 전체 결합 부위보다 친화도가 낮은 하지만 항원을 인식하고 그에 결합하는 능력을 갖는다.

[0106] Fab 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 함유하고, 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 1개 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 수개의 잔기가 부가되었다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 기를 보유하는 Fab'에 대한 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 본래 이들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생산되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

[0107] "단일-쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하며, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇠에 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 목적하는 구조를 형성할 수 있게 하는, VH 및 VL 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Pluckthuen, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315]을 참조한다.

[0108] 용어 "디아바디"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편을 지칭하는데, 상기 단편은 동일한 폴리펩티드 쇠 (VH-VL) 내에서 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 동일한 쇠 상의 2개의 도메인 사이의 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 또 다른 쇠의 상보적 도메인과 쌍형성하도록 강제되어 2개의 항원-결합 부위가 생성된다. 디아바디는 2가 또는 이중특이적일 수 있다. 디아바디는, 예를 들어 EP 404,097; WO 1993/01161; 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); 및 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]에 보다 완전히 기재되어 있다. 트리아바디 및 테트라바디는 또한 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)]에 기재되어 있다.

[0109] 본원에서 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 예를 들어 상기 집단을 구성하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 돌연변이, 예를 들어 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 수식이 "모노클로날"은 별개 항체의 혼합물이 아닌 것으로서의 항체의 특징을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 이러한 모노클로날 항체는 전형적으로 표적에 결합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체를 포함하고, 여기서 표적-결합 폴리펩티드 서열은 복수의 폴리펩티드 서열로부터 단일 표적 결합 폴리펩티드 서열을 선택하는 것을 포함하는 과정에 의해 수득되었다. 예를 들어, 선택 과정은 복수의 클론, 예컨대 하이브리도마 클론, 파지 클론 또는 재조합 DNA 클론의 풀로부터 고유한 클론의 선택일 수 있다. 선택된 표적 결합 서열은, 예를 들어 표적에 대한 친화도 개선, 표적 결합 서열의 인간화, 세포 배양물 중 그의 생산 개선, 생체내에서의 그의 면역원성 감소, 다중특이적 항체의 생성 등을 위해 추가로 변경될 수 있고, 변경된 표적 결합 서열을 포함하는 항체는 또한 본 발명의 모노클로날 항체인 것으로 이해되어야 한다. 전형적으로 상이한 결정기 (에피토프)에 대해 지시되는 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 대조적으로, 모노클로날 항체 제제의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해 지시된다. 모노클로날 항체 제제는, 그의 특이성에 더하여, 전형적으로 다른 이뮤노글로불린에 의해 오염되지 않은 점에서 유리하다.

[0110] 수식이 "모노클로날"은 항체의 특징이 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 것임을 나타내며, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 생산을 요구한다는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용하고자 하는 모노클로날 항체는, 예를 들어 하이브리도마 방법 (예를 들어, 문헌 [Kohler and Milstein, Nature, 256:495-97 (1975); Hongo et al., Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)]), 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조), 파지-디스플레이 기술 (예를 들어, 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004)] 참조), 및 인간 이뮤노글로불린 유전자좌 또는 인간 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 유전자의 일부 또는 전부를 갖는 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체를 생산하는 기술 (예를 들어, WO1998/24893; WO1996/34096; WO1996/33735; WO1991/10741; 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993)]; 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016; 문헌 [Marks et al.,

Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996); 및 Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)] 참조)를 포함한 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0111] 본원의 모노클로날 항체는 구체적으로 중쇄 및/또는 경쇄의 일부만이 특정한 종으로부터 유래되거나 특정한 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체에서의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고,쇄(들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체에서의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체, 뿐만 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체의 단편을 포함한다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)] 참조). 키메라 항체는, 항체의 항원-결합 영역이, 예를 들어 마카크 원숭이를 관심 항원으로 면역화시켜 생산된 항체로부터 유래된 것인 프리마티즈드(PRIMATIZED)® 항체를 포함한다.

[0112] 비-인간 (예를 들어, 무린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 한 실시양태에서, 인간화 항체는 수용자의 HVR로부터의 잔기가 목적하는 특이성, 친화도 및/또는 능력을 갖는 비-인간 중 (공여자 항체), 예컨대 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류의 HVR로부터의 잔기에 의해 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 FR 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 추가로, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능이 추가로 개선되도록 이루어질 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 이뮤노글로불린의 것에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체는 임의로 또한 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc) 중 적어도 일부분, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 적어도 일부분을 포함할 것이다. 추가의 상세한 내용에 대해서는, 예를 들어 문헌 [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)]을 참조한다. 또한, 예를 들어 문헌 [Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)]; 및 미국 특허 번호 6,982,321 및 7,087,409를 참조한다.

[0113] "인간 항체"는 인간에 의해 생산되고/되거나 본원에 개시된 임의의 인간 항체 제조 기술을 사용하여 제조된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유하는 항체이다. 인간 항체의 이러한 정의는 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 분명히 배제한다. 인간 항체는 파지-디스플레이 라이브러리를 포함한 관련 기술분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]. 또한, 문헌 [Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]에 기재된 방법도 인간 모노클로날 항체의 제조에 이용가능하다. 또한 문헌 [van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001)]을 참조한다. 인간 항체는, 항원 펩티드에 반응하여 이러한 항체를 생산하도록 변형되었으나 내인성 유전자좌는 무력화시킨 트랜스제닉 동물, 예를 들어 면역화된 제노마우스에게 항원을 투여함으로써 제조될 수 있다 (예를 들어, 제노마우스(XENOMOUSE)™ 기술에 관한 미국 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584 참조). 또한, 예를 들어 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체에 관한 문헌 [Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)]을 참조한다.

[0114] "중-의존성 항체"는 제2 포유동물 종으로부터의 항원의 동족체에 대한 것보다, 제1 포유동물 종으로부터의 항원에 대한 결합 친화도가 더 강한 항체이다. 통상적으로, 중-의존성 항체는 인간 항원에 "특이적으로 결합하나" (예를 들어, 약 1×10^{-7} M 이하, 바람직하게는 약 1×10^{-8} M 이하, 바람직하게는 약 1×10^{-9} M 이하의 결합 친화도 (Kd) 값을 가짐), 인간 항원에 대한 그의 결합 친화도보다 적어도 약 50배 또는 적어도 약 500배 또는 적어도 약 1000배 더 약한, 제2 비인간 포유동물 종으로부터의 항원의 상동체에 대한 결합 친화도를 갖는다. 중-의존성 항체는 상기 정의된 바와 같은 임의의 다양한 유형의 항체일 수 있으나, 바람직하게는 인간화 또는 인간 항체이다.

[0115] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역", "HVR" 또는 "HV"는 서열 내에서 초가변적이고/거나 구조적으로 한정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR; VH 내에 3개 (H1, H2, H3), 및 VL 내에 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. 천연 항체에서, H3 및 L3은 6개의 HVR 중 가장 높은 다양성을 나타

내고, H3은 특히 항체에 대한 정밀한 특이성을 부여하는데 고유한 역할을 수행하는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 문헌 [Xu et al., Immunity 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, in Methods in Molecular Biology 248: 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003)]을 참조한다. 실제로, 중쇄만으로 이루어진 자연 발생 낙타류 항체는 경쇄의 부재 하에 기능적이고 안정하다. 예를 들어, 문헌 [Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993); Sheriff et al., Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996)]을 참조한다.

[0116] 다수의 HVR 설명이 사용되고 있으며 본원에 포괄된다. 카바트(Kabat) 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 가변성을 기반으로 하며, 가장 통상적으로 사용된다 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). 코티아(Chothia)는 그 대신 구조 루프의 위치를 지칭한다 (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). AbM HVR은 카바트 HVR과 코티아 구조적 루프 사이의 절충안을 나타내고, 옥스포드 몰레큘라(Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다. "접촉" HVR은 이용가능한 복합체 결정 구조의 분석을 기반으로 한다. 각각의 이들 HVR로부터의 잔기를 하기에 나타낸다.

루프	카바트	AbM	코티아	접촉
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (카바트 넘버링)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (코티아 넘버링)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0117]

[0118] HVR은 하기와 같이 "연장된 HVR"을 포함할 수 있다: VL에서의 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 또는 89-96 (L3), 및 VH에서의 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기는 각각의 이들 정의에 대해 카바트 등의 상기 문헌에 따라 넘버링된다.

[0119] "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 HVR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0120] 용어 "카바트에서와 같은 가변-도메인 잔기-넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산-위치 넘버링" 및 그의 변형은 카바트 등의 상기 문헌에서의 항체의 편집의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대해 사용된 넘버링 시스템을 지칭한다. 이러한 넘버링 시스템을 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축, 또는 그 내로의 삽입에 상응하게 보다 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 다음에 단일 아미노산 삽입 (카바트에 따라 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 다음에 삽입된 잔기 (예를 들어, 카바트에 따라 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 항체 서열을 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 상동성 영역에서 정렬함으로써 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다.

[0121] 카바트 넘버링 시스템은 일반적으로 가변 도메인 내의 잔기 (대략 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)을 언급하기 위해 사용된다 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]). "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 인덱스"는 일반적으로 이뮤노글로불린 중쇄 불변 영역의 잔기를 지칭하는 경우에 사용된다 (예를 들어, 카바트 등의 상기 문헌에 보고된 EU 인덱스). "카바트에서와 같은 EU 인덱스"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다.

[0122] 표현 "선형 항체"는 문헌 [Zapata et al. (1995 Protein Eng, 8(10):1057-1062)]에 기재된 항체를 지칭한다. 간략하게, 이들 항체는 상보적 경쇄 폴리펩티드와 함께 한 쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한 쌍의 탠덤 Fd 절편 (VH-CH1-VH-CH1)을 포함한다. 선형 항체는 이중특이적 또는 단일특이적일 수 있다.

[0123] 본원에 사용된 용어 "결합한다", "에 특이적으로 결합한다" 또는 "에 특이적인"은 생물학적 분자를 포함하는 이

중 분자 집단의 존재 하에 표적의 존재를 결정할 수 있는 것으로, 측정가능하고 재생가능한 상호작용, 예컨대 표적 및 항체 사이의 결합을 지칭한다. 예를 들어, 표적 (에피토프일 수 있음)에 결합하거나 특이적으로 결합하는 항체는 다른 표적에 결합하는 경우보다 더 큰 친화도, 결합력으로, 더 용이하게 및/또는 더 긴 기간 동안 상기 표적에 결합하는 항체이다. 한 실시양태에서, 비관련 표적에 항체가 결합하는 정도는, 예를 들어 방사성 면역검정 (RIA)에 의한 측정 시에 표적에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시양태에서, 표적에 특이적으로 결합하는 항체의 해리 상수 (K_d)는 $\leq 1 \mu M$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ 또는 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 이다. 특정 실시양태에서, 항체는 상이한 종으로부터의 단백질 사이에 보존되는, 단백질 상의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 특이적 결합은 배타적 결합을 포함할 수 있지만, 이를 필요로 하지는 않는다.

[0124] 용어 "검출"은 직접 및 간접 검출을 포함한 임의의 검출 수단을 포함한다.

[0125] 본원에 사용된 용어 "바이오마커"는 샘플에서 검출될 수 있는 표지자, 예를 들어 예측, 진단 및/또는 예후를 지칭한다. 바이오마커는 특정의, 분자적, 병리학적, 조직학적 및/또는 임상적 특색을 특징으로 하는 질환 또는 장애 (예를 들어, 암)의 특정한 하위유형의 표지자로서 역할을 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이오마커는 유전자이다. 바이오마커는 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, DNA 및/또는 RNA), 폴리뉴클레오티드 카피수 변경 (예를 들어, DNA 카피수), 폴리펩티드, 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 변형 (예를 들어, 번역후 변형), 탄수화물 및/또는 당지질-기체 분자 마커를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0126] 용어 "바이오마커 서명", "서명", "바이오마커 발현 서명" 또는 "발현 서명"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 그의 발현이 표지자, 예를 들어 예측, 진단 및/또는 예후인 바이오마커 중 하나 또는 그의 조합을 지칭한다. 바이오마커 서명은 특정의 분자, 병리학적, 조직학적 및/또는 임상적 특징에 의해 특징화된 특정한 하위유형의 질환 또는 장애 (예를 들어, 암)의 표지자로서 역할을 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이오마커 서명은 "유전자 서명"이다. 용어 "유전자 서명"은 "유전자 발현 서명"과 상호교환가능하게 사용되고, 그의 발현이 표지자, 예를 들어 예측, 진단 및/또는 예후인 폴리뉴클레오티드 중 하나 또는 그의 조합을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 바이오마커 서명은 "단백질 서명"이다. 용어 "단백질 서명"은 "단백질 발현 서명"과 상호교환가능하게 사용되고, 그의 발현이 표지자, 예를 들어 예측, 진단 및/또는 예후인 폴리펩티드 중 하나 또는 그의 조합을 지칭한다.

[0127] 개체에 대한 증가된 임상 이익과 연관된 바이오마커의 "양" 또는 "수준"은 생물학적 샘플 중 검출가능한 수준이다. 이들은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되고 또한 본 발명에 개시된 방법에 의해 측정될 수 있다. 평가되는 바이오마커의 발현 수준 또는 양은 치료에 대한 반응을 결정하기 위해 사용될 수 있다.

[0128] 용어 "발현의 수준" 또는 "발현 수준"은 일반적으로 상호교환가능하게 사용되고, 일반적으로 생물학적 샘플 중 바이오마커의 양을 지칭한다. "발현"은 일반적으로 정보 (예를 들어, 유전자-코딩 및/또는 후성학)가 세포 내에 존재하고 작동하는 구조로 전환되는 과정을 지칭한다. 따라서, 본원에 사용된 "발현"은 폴리뉴클레오티드로의 전사, 폴리펩티드로의 번역 또는 심지어 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드 변형 (예를 들어, 폴리펩티드의 번역후 변형)을 지칭할 수 있다. 전사된 폴리뉴클레오티드, 번역된 폴리펩티드, 또는 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드 변형 (예를 들어, 폴리펩티드의 번역후 변형)의 단편도 또한, 이들이 대안적 스플라이싱에 의해 생성된 전사체 또는 분해된 전사체로부터 유래하든지 또는 예를 들어 단백질분해에 의한 폴리펩티드의 번역후 프로세싱으로부터 유래하든지 관계없이, 발현된 것으로 간주될 것이다. "발현된 유전자"는 mRNA로서 폴리뉴클레오티드로 전사되고, 이어서 폴리펩티드로 번역되는 것, 또한 RNA로 전사되지만 폴리펩티드로 번역되지 않는 것 (예를 들어, 운반 및 리보솜 RNA)을 포함한다.

[0129] "상승된 발현", "상승된 발현 수준" 또는 "상승된 수준"은 대조군, 예컨대 질환 또는 장애 (예를 들어, 암)를 앓고 있지 않는 개체 또는 개체들 또는 내부 대조군 (예를 들어, 하우스키팅 바이오마커)에 비해 개체에서의 바이오마커의 증가된 발현 또는 증가된 수준을 지칭한다.

[0130] "감소된 발현", "감소된 발현 수준" 또는 "감소된 수준"은 대조군, 예컨대 질환 또는 장애 (예를 들어, 암)를 앓고 있지 않는 개체 또는 개체들 또는 내부 대조군 (예를 들어, 하우스키팅 바이오마커)에 비해 개체에서의 바이오마커의 감소된 발현 또는 감소된 수준을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 감소된 발현은 거의 없거나 또는 전혀 없는 발현이다.

[0131] 용어 "하우스키팅 바이오마커"는 전형적으로 모든 세포 유형에서 유사하게 존재한 바이오마커 또는 바이오마커의 군 (예를 들어, 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드)을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 하우스키팅 바이오마커는 (하우스키팅 유전자)이다. "하우스키팅 유전자"는 본원에서 그의 활성이 세포 기능의 유지에 필수적이

고 전형적으로 모든 세포 유형에서 유사하게 존재하는 단백질을 코딩하는 유전자 또는 유전자의 군을 지칭한다.

- [0132] 본원에 사용된 "증폭"은 일반적으로 원하는 서열의 다중 카피를 생산하는 과정을 지칭한다. "다중 카피"는 적어도 2개의 카피를 의미한다. "카피"가 반드시 주형 서열에 대한 완전한 서열 상보성 또는 동일성을 의미하는 것이 아니다. 예를 들어, 카피는 뉴클레오타이드 유사체, 예컨대 데옥시이노신, 의도적 서열 변경 (예컨대, 주형에 혼성화가능하지만 상보성이 아닌 서열을 포함하는 프라이머를 통해 도입되는 서열 변경), 및/또는 증폭 동안 발생하는 서열 오류를 포함할 수 있다.
- [0133] 용어 "멀티플렉스-PCR"은 단일 반응에서 2개 이상의 DNA 서열을 증폭시키는 목적을 위해 1개 초과인 프라이머 세트를 사용하여 단일 공급원 (예를 들어, 개체)으로부터 수득한 핵산에 대해 수행되는 단일 PCR 반응을 지칭한다.
- [0134] 혼성화 반응의 "엄격도"는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있고, 일반적으로 프로브 길이, 세척 온도 및 염 농도에 따라 실험적으로 계산된다. 일반적으로, 프로브가 길수록 적절한 어닐링을 위해 보다 높은 온도가 필요하고, 프로브가 짧으면 보다 낮은 온도가 필요하다. 혼성화는 일반적으로 상보성 가닥이 그의 용융 온도 미만의 환경에 존재할 때 변성 DNA가 재어닐링되는 능력에 의존한다. 프로브와 혼성화가능한 서열 사이의 바람직한 상동성 정도가 클수록 사용될 수 있는 상대 온도가 보다 높다. 그 결과, 보다 높은 상대 온도는 반응 조건을 보다 엄격하게 만들고, 보다 낮은 온도는 덜 엄격하게 만드는 경향이 있다. 혼성화 반응의 엄격도에 대한 추가의 세부사항 및 설명에 대해 문헌 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)]을 참조한다.
- [0135] 본원에 정의된 바와 같은 "엄격한 조건" 또는 "고 엄격도 조건"은 다음과 같은 것에 의해 확인될 수 있다: (1) 세척을 위해 낮은 이온 강도 및 고온, 예를 들어 0.015 M 염화나트륨/0.0015 M 시트르산나트륨/0.1% 소듐 도데실 술페이트를 50°C에서 사용하는 것; (2) 혼성화 동안 변성제, 예컨대 포름아미드, 예를 들어 50% (v/v) 포름아미드 + 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% 피콜(Ficoll)/0.1% 폴리비닐피롤리돈/50 mM 인산나트륨 완충제 (pH 6.5) + 750 mM 염화나트륨, 75 mM 시트르산나트륨을 42°C에서 사용하는 것; 또는 (3) 42°C에서 0.2 x SSC (염화나트륨/시트르산나트륨)로의 10분 세척에 이어서 55°C에서 EDTA 함유 0.1 x SSC로 이루어진 10분의 고-엄격도 세척과 함께, 42°C에서 50% 포름아미드, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M 시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 5 x 덴하르트(Denhardt) 용액, 초음파 처리된 연어 정자 DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS 및 10% 텍스트란 술페이트를 사용한 용액 중에서 밤새 혼성화하는 것.
- [0136] "중간 정도의 엄격한 조건"은 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989]에 기재된 바와 같이 확인될 수 있고, 상기 기재된 것보다 덜 엄격한 세척 용액 및 혼성화 조건 (예를 들어, 온도, 이온 강도 및 %SDS)을 포함한다. 중간 정도의 엄격한 조건의 예는 20% 포름아미드, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM 시트르산삼나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 7.6), 5 x 덴하르트 용액, 10% 텍스트란 술페이트 및 20 mg/ml의 변성되고 전단된 연어 정자 DNA를 포함하는 용액 중 37°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 필터를 약 37-50°C에서 1 x SSC로 세척하는 것이다. 통상의 기술자는 프로브 길이 등과 같은 인자를 조절하기 위해 필요한 온도, 이온 강도 등의 조정 방법을 인식할 것이다.
- [0137] 본원에 사용된 "폴리머라제 연쇄 반응" 또는 "PCR"의 기술은 일반적으로 미량의 핵산, RNA 및/또는 DNA의 특정 조각이 1987년 7월 28일에 허여된 미국 특허 번호 4,683,195에 기재된 바와 같이 증폭되는 절차를 지칭한다. 일반적으로, 올리고뉴클레오타이드 프라이머가 설계될 수 있도록, 관심 영역 말단 또는 그 너머로부터의 서열 정보는 활용될 필요가 있으며; 이러한 프라이머는 증폭시키려는 주형의 대향하는 가닥에 대한 서열과 동일하거나 유사할 것이다. 2개 프라이머의 5' 말단 뉴클레오타이드는 증폭되는 물질의 말단과 일치할 수 있다. PCR은 특정한 RNA 서열, 전체 게놈 DNA로부터의 특정한 DNA 서열, 및 전체 세포 RNA로부터 전사되는 cDNA, 박테리오파지 또는 플라스미드 서열 등을 증폭하는데 사용될 수 있다. 일반적으로 문헌 [Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263 (1987); Erlich, ed., PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989)]을 참조한다. 본원에 사용된 PCR은 프라이머로서 공지의 핵산 (DNA 또는 RNA)을 사용하는 것을 포함하는 핵산 시험 샘플을 증폭시키는 핵산 폴리머라제 반응 방법의 하나의 예이지만 유일한 예는 아닌 것으로 간주되고, 핵산 폴리머라제를 활용하여 특정 조각의 핵산을 증폭 또는 생성시키거나 또는 특정한 핵산에 상보적인 특정 조각의 핵산을 증폭 또는 생성시킨다.
- [0138] "정량적 실시간 폴리머라제 연쇄 반응" 또는 "qRT-PCR"은 PCR 생성물의 양이 PCR 반응의 각각의 단계에서 측정되는 PCR의 형태를 지칭한다. 이러한 기술은 문헌 [Cronin et al., Am. J. Pathol. 164(1):35-42 (2004); 및 Ma et al., Cancer Cell 5:607-616 (2004)]을 포함한 다양한 공개물에 기재된 바 있다.

- [0139] 용어 "마이크로어레이"는 기관 상의 혼성화가능한 어레이 요소, 바람직하게는 폴리뉴클레오타이드 프로브의 정렬된 배열을 지칭한다.
- [0140] 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 단수 또는 복수로 사용될 때 일반적으로 비변형된 RNA 또는 DNA 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있는 임의의 폴리리보뉴클레오타이드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오타이드를 지칭한다. 따라서, 예를 들어 본원에 정의된 바와 같은 폴리뉴클레오타이드는 비제한적으로 단일- 및 이중-가닥 DNA, 단일- 및 이중-가닥 영역을 포함하는 DNA, 단일- 및 이중-가닥 RNA, 및 단일- 및 이중-가닥 영역을 포함하는 RNA, 단일-가닥 또는 보다 전형적으로는 이중-가닥일 수도 있거나 또는 단일- 및 이중-가닥 영역을 포함할 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 하이브리드 분자를 포함한다. 또한, 본원에 사용된 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 RNA 또는 DNA, 또는 RNA와 DNA 둘 다를 포함하는 삼중-가닥 영역을 지칭한다. 이러한 영역 내 가닥들은 동일한 분자 또는 상이한 분자로부터의 것일 수 있다. 상기 영역은 모두 1개 이상의 분자를 포함할 수 있지만, 보다 전형적으로는 오직 일부 분자의 영역을 포함한다. 삼중-나선 영역의 분자 중 1개는 종종 올리고뉴클레오타이드이다. 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 구체적으로 cDNA를 포함한다. 용어는 1개 이상의 변형된 염기를 함유하는 DNA (cDNA 포함) 및 RNA를 포함한다. 따라서, 안정성 또는 다른 이유로 인해 변형된 백본을 갖는 DNA 또는 RNA는 본원에서 의도된 용어와 같은 "폴리뉴클레오타이드"이다. 또한, 이노신과 같은 비통상적 염기 또는 삼중수소화 염기와 같은 변형된 염기를 포함하는 DNA 또는 RNA가 본원에 정의된 바와 같은 용어 "폴리뉴클레오타이드" 내에 포함된다. 일반적으로, 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 비변형된 폴리뉴클레오타이드의 모든 화학적으로, 효소적으로 및/또는 대사적으로 변형된 형태, 뿐만 아니라 바이러스 및 세포 (단순 및 복합 세포 포함)의 특징적인 DNA 및 RNA의 화학적 형태를 포함한다.
- [0141] 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 단일-가닥 데옥시리보뉴클레오타이드, 단일-가닥 또는 이중-가닥 리보뉴클레오타이드, RNA:DNA 하이브리드 및 이중-가닥 DNA를 포함하나 이에 제한되지 않는 비교적 짧은 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 올리고뉴클레오타이드, 예컨대 단일-가닥 DNA 프로브 올리고뉴클레오타이드는 종종 예를 들어 상업적으로 입수 가능한 자동화 올리고뉴클레오타이드 합성기를 사용하여 화학적 방법에 의해 합성된다. 그러나, 올리고뉴클레오타이드는 시험관내 재조합 DNA-매개 기술을 포함한 다양한 다른 방법에 의해 및 세포 및 유기체에서 DNA의 발현에 의해 제조될 수 있다.
- [0142] 용어 "진단"은 분자 또는 병리학적 상태, 질환 또는 상태 (예를 들어, 암)의 확인 또는 분류를 지칭하기 위해 본원에 사용된다. 예를 들어, "진단"은 특정한 유형의 암의 확인을 지칭할 수 있다. "진단"은 또한 예를 들어 조직병리학적 기준, 또는 분자 특징 (예를 들어, 바이오마커 (예를 들어, 특정한 유전자 또는 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질) 중 1종 또는 그의 조합의 발현에 의해 특징화된 하위유형)에 의한 특정한 하위유형의 암의 분류를 지칭할 수 있다.
- [0143] 용어 "진단을 돕는 것"은 질환 또는 장애 (예를 들어, 암)의 특정한 유형의 증상 또는 상태의 존재 또는 특성에 대한 임상 결정을 돕는 방법을 지칭하기 위해 본원에 사용된다. 예를 들어, 질환 또는 상태 (예를 들어, 암)의 진단을 돕는 방법은 개체로부터 생물학적 샘플에서 특정 바이오마커를 측정하는 것을 포함할 수 있다.
- [0144] 본원에 사용된 용어 "샘플"은 예를 들어 물리적, 생화학적, 화학적 및/또는 생리학적 특징에 기초하여 특징화 및/또는 확인되는 세포성 및/또는 다른 분자 엔티티를 함유하는 관심 대상체 및/또는 개체로부터 얻거나 이들체로부터 유래된 조성물을 지칭한다. 예를 들어, 어구 "질환 샘플" 및 그의 변형 표현은 특징화되는 세포성 및/또는 분자 엔티티를 함유하는 것으로 예상되거나 공지된 관심 대상으로부터 얻은 임의의 샘플을 지칭한다. 샘플은 1차 또는 배양된 세포 또는 세포주, 세포 상청액, 세포 용해물, 혈소판, 혈청, 혈장, 유리체액, 림프액, 활액, 여포액, 정액, 양수, 유액, 전혈, 혈액-유래 세포, 소변, 뇌척수액, 타액, 객담, 누액, 땀, 점액, 종양 용해물, 및 조직 배양 배지, 조직 추출물, 예컨대 균질화된 조직, 종양 조직 및 세포 추출물, 및 그의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0145] "조직 샘플" 또는 "세포 샘플"은 대상체 또는 개체의 조직으로부터 얻은 유사한 세포의 집합을 의미한다. 조직 또는 세포 샘플의 공급원은 신선하고/거나 냉동되고/거나 보존된 기관, 조직 샘플, 생검 및/또는 흡인물로부터의 고체 조직, 혈액 또는 임의의 혈액 구성성분, 예를 들어 뇌 척수액, 양수, 복수액 또는 간질액과 같은 체액 및 대상체의 임신 또는 발생 중 임의의 시점으로부터의 세포 또는 혈장일 수 있다. 또한, 조직 샘플은 1차 또는 배양된 세포 또는 세포주일 수 있다. 임의로, 조직 또는 세포 샘플은 질환 조직/기관으로부터 수득한다. 조직 샘플은 자연에서 조직과 자연적으로 서로 혼합되지 않는 화합물, 예컨대 보존제, 항응고제, 완충제, 고정제, 영양소, 항생제 등을 함유할 수 있다.
- [0146] 본원에 사용된 "참조 샘플", "참조 세포", "참조 조직", "대조군 샘플", "대조군 세포" 또는 "대조군 조직"은

비교 목적을 위해 사용되는 샘플, 세포, 조직, 표준 또는 수준을 지칭한다. 한 실시양태에서, 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조군 샘플, 대조군 세포 또는 대조군 조직은 동일한 대상체 또는 개체의 건강한 및/또는 비-이환된 신체 일부 (예를 들어, 조직 또는 세포)로부터 취득된다. 예를 들어, 건강한 및/또는 비-이환된 세포 또는 조직은 이환된 세포 또는 조직 (예를 들어, 종양에 인접한 세포 또는 조직)에 인접하여 있다. 또 다른 실시양태에서, 참조 샘플은 동일한 대상체 또는 개체의 신체의 비처리 조직 및/또는 세포로부터 취득된다. 또 다른 실시양태에서, 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조군 샘플, 대조군 세포 또는 대조군 조직은 대상체 또는 개체가 아닌 개체의 건강한 및/또는 비-이환된 신체의 일부 (예를 들어, 조직 또는 세포)로부터 취득된다. 또 다른 실시양태에서, 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조군 샘플, 대조군 세포 또는 대조군 조직은 대상체 또는 개체가 아닌 개체의 신체의 비처리 조직 및/또는 세포로부터 취득된다.

[0147] 본원에서의 목적을 위해, 조직 샘플의 "절편"은 조직 샘플의 단일 부분 또는 조각, 예를 들어 조직 샘플로부터 절단한 조직의 박편 또는 세포를 의미한다. 조직 샘플의 동일한 절편이 형태 및 분자 수준 둘 다에서 분석되거나, 또는 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 둘 다에 대해 분석될 수 있음을 이해한다면, 조직 샘플의 다수의 절편을 채취하여 분석에 적용할 수 있음이 이해된다.

[0148] "상관시키다" 또는 "상관시키는"은 임의의 방식으로든 제1 분석 또는 프로토콜의 성과 및/또는 결과를 제2 분석 또는 프로토콜의 성과 및/또는 결과와 비교하는 것을 의미한다. 예를 들어, 제2 프로토콜의 수행시에 제1 분석 또는 프로토콜의 결과를 이용할 수 있고/있거나 제1 분석 또는 프로토콜의 결과를 이용하여 제2 분석 또는 프로토콜을 수행해야 하는지의 여부를 결정할 수 있다. 폴리뉴클레오티드 분석 또는 프로토콜의 실시양태와 관련하여, 폴리뉴클레오티드 발현 분석 또는 프로토콜의 결과를 이용하여 특정 치료 요법을 수행해야 하는지의 여부를 결정할 수 있다. 폴리뉴클레오티드 분석 또는 프로토콜의 실시양태와 관련하여, 폴리뉴클레오티드 발현 분석 또는 프로토콜의 결과를 이용하여 특정 치료 요법을 수행해야 하는지의 여부를 결정할 수 있다.

[0149] 단어 "표지"는 본원에 사용된 경우에 검출가능한 화합물 또는 구성물을 지칭한다. 표지는 전형적으로 시약, 예컨대 폴리뉴클레오티드 프로브 또는 항체에 직접 또는 간접적으로 접합되거나 융합되고, 그와 접합되거나 융합된 시약의 검출을 용이하게 한다. 표지는 그 자체로 검출가능할 수도 있고 (예를 들어, 방사선동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소 표지의 경우에는 검출가능한 생성물을 생성하는 기질 화합물 또는 구성물의 화학적 변형을 촉매할 수도 있다.

[0150] 의약을 사용한 치료에 대한 환자의 "유효 반응" 또는 환자의 "반응성" 및 유사한 용어는 질환 또는 장애, 예컨대 암에 걸릴 위험이 있거나 또는 이를 앓고 있는 환자에게 부여되는 임상 또는 치료 이익을 지칭한다. 한 실시양태에서, 이러한 이익은 생존 (전체 생존 및 무진행 생존 포함) 연장; 객관적 반응 (완전 반응 또는 부분 반응 포함)의 발생; 또는 암의 증상 또는 징후의 개선 중 어느 1종 이상을 포함한다.

[0151] 치료에 대한 "유효 반응을 갖지 않는" 환자는 생존 (전체 생존 및 무진행 생존 포함)의 연장; 객관적 반응 (완전 반응 또는 부분 반응 포함)의 발생; 또는 암의 증상 또는 징후의 개선 중 어느 1종을 갖지 않는 환자를 지칭한다.

[0152] "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성 세포 (예를 들어, NK 세포, 호중구 및 대식세포) 상에 존재하는 Fc 수용체 (FcR) 상에 결합된 분비된 이뮤노글로불린이 이들 세포독성 이펙터 세포로 하여금 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후 세포독소로 표적 세포를 사멸시킬 수 있도록 하는 세포독성의 한 형태를 지칭한다. ADCC를 매개하 위한 1차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII를 발현하는 반면에, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)]의 페이지 464의 표 3에 요약된다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337 또는 미국 특허 번호 6,737,056 (Presta)에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 PBMC 및 NK 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다. ADCC 활성을 평가하기 위한 예시적인 검정은 본원 실시예에 제공된다.

[0153] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체 존재 하에의 표적 세포의 용해를 지칭한다. 전형적 보체 경로의 활성화는 보체계의 제1 성분 (C1q)이 그의 동족 항원에 결합되어 있는 (적절한 하위부류의) 항체에 결합함으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다. 변형된 Fc 영역 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 변이체 (변이체 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드) 및 증가되거나 감소된 C1q 결합 능력을 갖는 폴리펩티드 변

이체는, 예를 들어 미국 특허 번호 6,194,551 B1 및 WO 1999/51642에 기재되어 있다. 또한, 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]을 참조한다.

- [0154] "고갈성 항-OX40 항체"는 OX40-발현 세포를 사멸시키거나 고갈시키는 항-OX40 항체이다. OX40 발현 세포의 고갈은 다양한 메카니즘, 예컨대 항체-의존성 세포-매개 세포독성 및/또는 식세포작용에 의해 달성될 수 있다. OX40-발현 세포의 고갈은 시험관내에서 검정될 수 있고, 시험관내 ADCC 및 식세포작용 검정에 대한 예시적인 방법은 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, OX40-발현 세포는 인간 CD4+ 이펙터 T 세포이다. 일부 실시양태에서, OX40-발현 세포는 인간 OX40을 발현하는 트랜스제닉 BT474 세포이다.
- [0155] "이펙터 기능"은 항체 이소형에 따라 달라지는, 항체의 Fc 영역에서 기인하는 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B-세포 수용체)의 하향 조절; 및 B-세포 활성화를 포함한다.
- [0156] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 일부 실시양태에서, FcR은 천연 인간 FcR이다. 일부 실시양태에서, FcR은 IgG 항체에 결합하는 수용체 (감마 수용체)이고, Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII 하위부류의 수용체를 포함하며, 이들은 이들 수용체의 대립유전자 변이체 및 대안적으로 스플라이싱된 형태를 포함한다. Fc γ RII 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 포함하는데, 이들은 그의 세포질 도메인에서 주로 차이가 나는 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재의 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다. (예를 들어, 문헌 [Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은, 예를 들어 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); 및 de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)]에서 검토된다. 추후로 확인될 것들을 포함하여 다른 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포괄된다. 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 또한 모체 IgG의 태아로의 전달 (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 및 Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)) 및 이뮤노글로불린의 항상성 조절을 담당하는 신생아 수용체 FcRn을 포함한다. FcRn에의 결합의 측정 방법은 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Ghetie and Ward., Immunol. Today 18(12):592-598 (1997); Ghetie et al., Nature Biotechnology, 15(7):637-640 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216 (2004)]; WO 2004/92219 (Hinton et al.) 참조). 인간 FcRn 고친화도 결합 폴리펩티드의 인간 FcRn에 대한 생체내 결합 및 혈청 반감기는, 예를 들어 인간 FcRn을 발현하는 트랜스제닉 마우스 또는 형질감염된 인간 세포주에서, 또는 변이체 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드를 투여한 영장류에서 검정할 수 있다. WO 2000/42072 (Presta)는 FcR에 대한 결합이 개선되거나 감소된 항체 변이체를 기재하고 있다. 또한, 예를 들어 문헌 [Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)]을 참조한다.
- [0157] "기능적 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 "이펙터 기능"을 갖는다. 예시적인 "이펙터 기능"은 C1q 결합; CDC; Fc 수용체 결합; ADCC; 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향조절 등을 포함한다. 상기 이펙터 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인 (예를 들어, 항체 가변 도메인)과 결합할 것을 필요로 하고, 예를 들어 본원의 정의에서 개시된 바와 같은 다양한 검정을 사용하여 평가할 수 있다.
- [0158] "인간 이펙터 세포"는 1종 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 세포는 적어도 Fc γ RIII를 발현하고 ADCC 이펙터 기능(들)을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 천연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함한다. 이펙터 세포는 천연 공급원, 예를 들어 혈액으로부터 분리될 수 있다.
- [0159] "인간 이펙터 세포를 갖는" 암 또는 생물학적 샘플은, 진단 시험에서 샘플에 인간 이펙터 세포가 존재하도록 한 (예를 들어, 인간 이펙터 세포를 침윤시킨) 것이다.
- [0160] "FcR-발현 세포를 갖는" 암 또는 생물학적 샘플은, 진단 시험에서 샘플에 FcR-발현이 존재하도록 한 (예를 들어, FcR-발현 세포를 침윤시킨) 것이다. 일부 실시양태에서, FcR은 Fc γ R이다. 일부 실시양태에서, FcR은 활성화 Fc γ R이다.
- [0161] II. PD-1 축 결합 길항제
- [0162] 개체에게 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제를 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키는 방법이 본원에 제공된다. 또한, 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제를 투여하는 것을 포함하는, 암을 갖는 개체에서 면역 기능을 증진시키는 방법이 본원에 제공된다.

- [0163] 예를 들어, PD-1 축 결합 길항제는 PD-1 결합 길항제, PDL1 결합 길항제 및 PDL2 결합 길항제를 포함한다. "PD-1"에 대한 대체 명칭은 CD279 및 SLEB2를 포함한다. "PDL1"에 대한 대체 명칭은 B7-H1, B7-4, CD274 및 B7-H를 포함한다. "PDL2"에 대한 대체 명칭은 B7-DC, Bt dc 및 CD273을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-1, PDL1 및 PDL2는 인간 PD-1, PDL1 및 PDL2이다.
- [0164] 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항제는 PD-1의 그의 리간드 결합 파트너에 대한 결합을 억제하는 분자이다. 구체적 측면에서 PD-1 리간드 결합 파트너는 PDL1 및/또는 PDL2이다. 또 다른 실시양태에서, PDL1 결합 길항제는 PDL1의 그의 결합 파트너에 대한 결합을 억제하는 분자이다. 구체적 측면에서, PDL1 결합 파트너는 PD-1 및/또는 B7-1이다. 또 다른 실시양태에서, PDL2 결합 길항제는 PDL2의 그의 결합 파트너에 대한 결합을 억제하는 분자이다. 구체적 측면에서, PDL2 결합 파트너는 PD-1이다. 길항제는 항체, 항원 결합 그의 단편, 이뮤노어드헤신, 융합 단백질 또는 올리고펩티드일 수 있다.
- [0165] 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항제는 항-PD-1 항체 (예를 들어, 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체)이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 니볼루맵, 펌브롤리주맵 및 CT-011로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항제는 이뮤노어드헤신 (예를 들어, 불변 영역 (예를 들어, 이뮤노글로불린 서열의 Fc 영역)에 융합된 PDL1 또는 PDL2의 세포외 또는 PD-1 결합 부분을 포함하는 이뮤노어드헤신)이다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항제는 AMP-224이다. MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558 및 오피디보(OPDIVO)®로도 공지된 니볼루맵은 W02006/121168에 기재된 항-PD-1 항체이다. MK-3475, 머크 3475, 램브롤리주맵, 키트루다(KEYTRUDA)® 및 SCH-900475로도 공지된 펌브롤리주맵은 W02009/114335에 기재된 항-PD-1 항체이다. hBAT 또는 hBAT-1로도 공지된 CT-011은 W02009/101611에 기재된 항-PD-1 항체이다. B7-DCIg로도 공지된 AMP-224는 W02010/027827 및 W02011/066342에 기재된 PDL2-Fc 융합 가용성 수용체이다.
- [0166] 일부 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 니볼루맵 (CAS 등록 번호: 946414-94-4)이다. 추가 실시양태에서, 서열식별번호: 10으로부터의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 11로부터의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-PD-1 항체가 제공된다. 추가 실시양태에서, 중쇄 및/또는 경쇄 서열을 포함하는 단리된 항-PD-1 항체가 제공되며, 여기서:
- [0167] (a) 중쇄 서열은 다음 중쇄 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖거나:
- QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIYW
DGSKRYAYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:10)
- [0168]
- [0169] (b) 경쇄 서열은 다음 경쇄 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는다:
- EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFLTISSELPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:11)
- [0170]
- [0171] 일부 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 펌브롤리주맵 (CAS 등록 번호: 1374853-91-4)이다. 추가 실시양태에서, 서열식별번호: 12로부터의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 13으로부터의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-PD-1 항체가 제공된다. 추가 실시양태에서, 중쇄 및/또는 경쇄 서열을 포함하는 단리된 항-PD-1 항체가 제공되며, 여기서:
- [0172] (a) 중쇄 서열은 다음 중쇄 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖거나:

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG
INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TDSSTTTAY MELKSLQFDD
TAVYYCARRDYRFDMGFDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE
STAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT
VPSSSLGKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK
(SEQ ID NO:12)

[0173]

[0174]

(b) 경쇄 서열은 다음 경쇄 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는다:

EIVLTQSPAT LSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRL LIYLAASYLES
GVPARFSGSG SGTDFILTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEI KRTVAAPSVF
IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSLTSLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:13)

[0175]

[0176]

일부 실시양태에서, PDL1 결합 길항제는 항-PDL1 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-PDL1 결합 길항제는 YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 및 MEDI4736로 이루어진 군으로부터 선택된다. BMS-936559로도 공지된 MDX-1105는 WO2007/005874에 기재된 항-PDL1 항체이다. 항체 YW243.55.S70 (각각 서열식별번호: 20 및 21에 제시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열)는 WO 2010/077634 A1에 기재된 항-PDL1이다. MEDI4736은 WO2011/066389 및 US2013/034559에 기재된 항-PDL1 항체이다.

[0177]

본 발명의 방법에 유용한 항-PDL1 항체, 및 그의 제조 방법의 예는 PCT 특허 출원 WO 2010/077634 A1 및 미국 특허 번호 8,217,149에 기재되어 있으며, 이들은 본원에 참조로 포함된다.

[0178]

일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항제는 항-PDL1 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-PDL1 항체는 PDL1과 PD-1 사이 및/또는 PDL1과 B7-1 사이의 결합을 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-PDL1 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-PDL1 항체는 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 항-PDL1 항체는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-PDL1 항체는 인간 항체이다.

[0179]

WO 2010/077634 A1에 기재된 것과 같은, 본 발명에 유용한 항-PDL1 항체를 함유하는 조성물을 포함한 상기 항체는 암을 치료하기 위해 OX40 결합 효능제와 조합하여 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-PDL1 항체는 서열식별번호: 7 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0180]

한 실시양태에서, 항-PDL1 항체는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 폴리펩티드를 함유하며, 여기서

[0181]

(a) HVR-H1 서열은 GFTFSX₁SWIH (SEQ ID NO: 14)이고;

[0182]

(b) HVR-H2 서열은 AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO: 15)이고;

[0183]

(c) HVR-H3 서열은 RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 3)이고;

[0184]

추가로 여기서 X₁은 D 또는 G이고; X₂는 S 또는 L이고; X₃은 T 또는 S이다.

[0185]

한 구체적 측면에서, X₁은 D이고; X₂는 S이고; X₃은 T이다. 또 다른 측면에서, 폴리펩티드는 다음 화학식에 따라 HVR 사이에 병렬배치된 가변 영역 중쇄 프레임워크 서열을 추가로 포함한다: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4). 또 다른 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 프레임워크 서열은 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크이다. 추가

측면에서, 프레임워크 서열 중 적어도 1개는 하기와 같다:

[0186] HC-FR1은 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 16)이다.

[0187] HC-FR2는 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 17)이다.

[0188] HC-FR3은 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 18)이다.

[0189] HC-FR4는 WGQGTTLVTVSA (SEQ ID NO: 19)이다.

[0190] 추가 측면에서, 중쇄 폴리펩티드는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3을 포함하는 가변 영역 경쇄와 추가로 조합되며, 여기서

[0191] (a) HVR-L1 서열은 RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO: 20)이고;

[0192] (b) HVR-L2 서열은 SASX₉LX₁₀S, (SEQ ID NO: 21)이고;

[0193] (c) HVR-L3 서열은 QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NO: 22)이고;

[0194] 추가로 여기서 X₄는 D 또는 V이고; X₅는 V 또는 I이고; X₆는 S 또는 N이고; X₇은 A 또는 F이고; X₈은 V 또는 L이고; X₉는 F 또는 T이고; X₁₀은 Y 또는 A이고; X₁₁은 Y, G, F 또는 S이고; X₁₂는 L, Y, F 또는 W이고; X₁₃은 Y, N, A, T, G, F 또는 I이고; X₁₄는 H, V, P, T 또는 I이고; X₁₅는 A, W, R, P 또는 T이다.

[0195] 추가 측면에서, X₄는 D이고; X₅는 V이고; X₆는 S이고; X₇은 A이고; X₈은 V이고; X₉는 F이고; X₁₀은 Y이고; X₁₁은 Y이고; X₁₂는 L이고; X₁₃은 Y이고; X₁₄는 H이고; X₁₅는 A이다. 추가 측면에서, 경쇄는 다음 화학식에 따라 HVR 사이에 병렬배치된 가변 영역 경쇄 프레임워크 서열을 추가로 포함한다: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). 추가 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 프레임워크 서열은 VL 카파 I 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 프레임워크 서열 중 적어도 1개는 하기와 같다:

[0196] LC-FR1은 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (SEQ ID NO: 23)이다.

[0197] LC-FR2는 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 24)이다.

[0198] LC-FR3은 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 25)이다.

[0199] LC-FR4는 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 26)이다.

[0200] 또 다른 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 단리된 항-PDL1 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되며, 여기서

[0201] (a) 중쇄는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3을 포함하고, 여기서 추가로

[0202] (i) HVR-H1 서열은 GFTFSX1SWIH (SEQ ID NO: 14)이고;

[0203] (ii) HVR-H2 서열은 AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO: 15)이고;

[0204] (iii) HVR-H3 서열은 RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 3)이고;

[0205] (b) 경쇄는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3을 포함하고, 여기서 추가로

[0206] (i) HVR-L1 서열은 RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO: 20)이고;

[0207] (ii) HVR-L2 서열은 SASX₉LX₁₀S (SEQ ID NO: 21)이고;

[0208] (iii) HVR-L3 서열은 QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NO: 22)이고;

[0209] 추가로 여기서 X₁는 D 또는 G이고; X₂는 S 또는 L이고; X₃은 T 또는 S이고; X₄는 D 또는 V이고; X₅는 V 또는 I이고; X₆는 S 또는 N이고; X₇은 A 또는 F이고; X₈은 V 또는 L이고; X₉는 F 또는 T이고; X₁₀은 Y 또는 A이고; X₁₁은 Y, G, F 또는 S이고; X₁₂는 L, Y, F 또는 W이고; X₁₃은 Y, N, A, T, G, F 또는 I이고; X₁₄는 H, V, P, T 또는 I

이고; X_{15} 는 A, W, R, P 또는 T이다.

[0210] 구체적 측면에서, X_1 은 D이고; X_2 는 S이고; X_3 은 T이다. 또 다른 측면에서, X_4 는 D이고; X_5 는 V이고; X_6 은 S이고; X_7 은 A이고; X_8 은 V이고; X_9 는 F이고; X_{10} 은 Y이고; X_{11} 은 Y이고; X_{12} 는 L이고; X_{13} 은 Y이고; X_{14} 는 H이고; X_{15} 는 A이다. 또 다른 측면에서, X_1 은 D이고; X_2 는 S이고; X_3 은 T이고; X_4 는 D이고; X_5 는 V이고; X_6 은 S이고; X_7 은 A이고; X_8 은 V이고; X_9 는 F이고; X_{10} 은 Y이고; X_{11} 은 Y이고; X_{12} 는 L이고; X_{13} 은 Y이고; X_{14} 는 H이고; X_{15} 는 A이다.

[0211] 추가 측면에서, 중쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함하고: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), 경쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). 추가 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카바트 하위군 I, II 또는 III 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:16)

HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:17)

HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:18)

[0212] HC-FR4 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:19)

[0213] 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카바트 카파 I, II, II 또는 IV 하위군 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카파 I 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC (SEQ ID NO:23)

LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:24)

LC-FR3 GVPSTRFSGSGGTDFLTITSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:25)

[0214] LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:26)

[0215] 추가의 구체적 측면에서, 항체는 인간 또는 무린 불변 영역을 추가로 포함한다. 추가 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 구체적 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 추가 측면에서, 무린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 측면에서, 무린 불변 영역은 IgG2A이다. 추가의 구체적 측면에서, 항체는 감소된 또는 최소 이펙터 기능을 갖는다. 추가의 구체적 측면에서 최소 이펙터 기능은 "이펙터-무함유 Fc 돌연변이" 또는 비-글리코실화로부터 발생한다. 추가 측면에서, 이펙터-무함유 Fc 돌연변이는 불변 영역에서의 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.

[0216] 또 다른 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-PDL1 항체가 제공되며, 여기서

[0217] (a) 중쇄는 각각 GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 1), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) 및 RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 3)에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 서열을 추가로 포함하거나,

[0218] (b) 경쇄는 각각 RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 4), SASFLYS (SEQ ID NO: 5) 및 QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 6)에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 서열을 추가로 포함한다.

[0219] 구체적 측면에서, 서열 동일성은 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다. 또 다른 측면에서, 중쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함하고: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), 경쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). 또 다른 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카바트 하위군 I, II 또는 III 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:16)
 HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 17)
 HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:18)
 HC-FR4 WGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:19)

[0220]

[0221]

추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카바트 카파 I, II, II 또는 IV 하위군 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카파 I 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC (SEQ ID NO:23)
 LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:24)
 LC-FR3 GVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:25)
 LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:26)

[0222]

[0223]

추가구체적 측면에서, 항체는 인간 또는 무린 불변 영역을 추가로 포함한다. 추가 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가구체적 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 추가 측면에서, 무린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 측면에서, 무린 불변 영역은 IgG2A이다. 추가구체적 측면에서, 항체는 감소된 또는 최소 이펙터 기능을 갖는다. 추가구체적 측면에서 최소 이펙터 기능은 "이펙터-무함유 Fc 돌연변이" 또는 비-글리코실화로부터 발생한다. 추가 실시양태에서, 이펙터-무함유 Fc 돌연변이는 불변 영역에서의 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.

[0224]

추가 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 단리된 항-PDL1 항체가 제공되며, 여기서

[0225]

(a) 중쇄 서열은 다음 중쇄 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖거나:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAVIS
 PYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGT
 LVTVSA (SEQ ID NO:28)

[0226]

[0227]

(b) 경쇄 서열은 다음 경쇄 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖는다:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASF
 LYSQVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:

[0228]

9)

[0229]

구체적 측면에서, 서열 동일성은 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다. 또 다른 측면에서, 중쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함하고: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), 경쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). 또 다른 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카바트 하위군 I, II 또는 III 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:16)
 HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:17)
 HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:18)
 HC-FR4 WGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:19)

[0230]

[0231]

추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카바트 카파 I, II, II 또는 IV 하위군 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카파 I 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC (SEQ ID NO:23)
 LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:24)
 LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:25)
 LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:26)

[0232]

[0233]

추가구체적 측면에서, 항체는 인간 또는 무린 불변 영역을 추가로 포함한다. 추가 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가구체적 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 추가 측면에서, 무린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 측면에서, 무린 불변 영역은 IgG2A이다. 추가구체적 측면에서, 항체는 감소된 또는 최소 이펙터 기능을 갖는다. 추가구체적 측면에서, 최소 이펙터 기능은 원핵 세포에서의 생산으로부터 발생한다. 추가구체적 측면에서 최소 이펙터 기능은 "이펙터-무함유 Fc 돌연변이" 또는 비-글리코실화로부터 발생한다. 추가 실시양태에서, 이펙터-무함유 Fc 돌연변이는 불변 영역에서의 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.

[0234]

또 다른 추가 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 단리된 항-PDL1 항체가 제공되며, 여기서

[0235]

(a) 중쇄 서열은 다음 중쇄 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖거나:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYG
 GSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTILVT
 VSS (SEQ ID NO:7)

[0236]

(b) 경쇄 서열은 다음 경쇄 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖는다:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASF
 LYSQVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:

[0238]

9)

[0239]

추가 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 단리된 항-PDL1 항체가 제공되며, 여기서

[0240]

(a) 중쇄 서열은 다음 중쇄 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖거나:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWI
 SPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG
 TLVTVSSASTK (SEQ ID NO:8)

[0241]

(b) 경쇄 서열은 다음 경쇄 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖는다:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF
 LYSQVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:

[0243]

9)

[0244]

구체적 측면에서, 서열 동일성은 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다. 또 다른 측면에서, 중쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함하고: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), 경쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). 또 다른 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카바트 하위군 I, II 또는 III 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:16)
 HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:17)
 HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:18)
 HC-FR4 WGQGTILVTVSS (SEQ ID NO:27)

[0245]

[0246]

추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카바트 카파 I, II, II 또는 IV 하위군 서열로부터 유래된다. 추가 측

면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카파 I 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC (SEQ ID NO:23)
 LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:24)
 LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:25)
 LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:26)

[0247]

[0248]

추가구체적 측면에서, 항체는 인간 또는 무린 불변 영역을 추가로 포함한다. 추가 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가구체적 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 추가 측면에서, 무린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 측면에서, 무린 불변 영역은 IgG2A이다. 추가구체적 측면에서, 항체는 감소된 또는 최소 이펙터 기능을 갖는다. 추가구체적 측면에서, 최소 이펙터 기능은 원핵 세포에서의 생산으로부터 발생한다. 추가구체적 측면에서 최소 이펙터 기능은 "이펙터-무함유 Fc 돌연변이" 또는 비-글리코실화로부터 발생한다. 추가 실시양태에서, 이펙터-무함유 Fc 돌연변이는 불변 영역에서의 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.

[0249]

또 다른 실시양태에서, 항-PDL1 항체는 MPDL3280A (CAS 등록 번호: 1422185-06-5)이다. 추가 실시양태에서,

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAVISPYGGSTYYA
 DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVTVSS (SEQ
 ID NO:7) 또는 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAVI
 SPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG
 TLTVTVSSASTK (SEQ ID NO:8)

[0250]

[0251]

로부터의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASF
 LYSQVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID
 NO:9)

[0252]

[0253]

의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-PDL1 항체가 제공된다. 추가 실시양태에서, 중쇄 및/또는 경쇄 서열을 포함하는 단리된 항-PDL1 항체가 제공되며, 여기서

[0254]

(a) 중쇄 서열은 다음 중쇄 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖고/거나:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAVISPYGGSTYYA
 DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVTVSSAST
 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:29)

[0255]

[0256]

(b) 경쇄 서열은 다음 경쇄 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는다:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYASFLYSGVPSRFS
 GSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
 GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEK
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:30)

[0257]

[0258]

추가 실시양태에서, 본 발명은 임의의 상기 기재된 항-PDL1 항체를 적어도 1종의 제약상 허용되는 담체와 조합

하여 포함하는 조성물을 제공한다.

[0259] 추가 실시양태에서, 항-PDL1 항체의 경쇄 또는 중쇄 가변 영역 서열을 코딩하는 단리된 핵산이 제공되며, 여기서

[0260] (a) 중쇄는 각각 GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:1), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2) 및 RHWPGGFDY (SEQ ID NO:3)에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 서열을 추가로 포함하고,

[0261] (b) 경쇄는 각각 RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:4), SASFLYS (SEQ ID NO:5) 및 QQYLYHPAT (SEQ ID NO:6)에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 서열을 추가로 포함한다.

[0262] 구체적 측면에서, 서열 동일성은 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다. 또 다른 측면에서, 중쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함하고: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), 경쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). 또 다른 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카바트 하위군 I, II 또는 III 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:16)

HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:17)

HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:18)

[0263] HC-FR4 WGQGTILVTVSA (SEQ ID NO:19)

[0264] 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카바트 카과 I, II, II 또는 IV 하위군 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카과 I 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:23)

LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:24)

LC-FR3 GVPSTRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:25)

[0265] LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:26)

[0266] 추가의 구체적 측면에서, 본원에 기재된 항체 (예컨대 항-PD-1 항체, 항-PDL1 항체 또는 항-PDL2 항체)는 인간 또는 뮤린 불변 영역을 추가로 포함한다. 추가 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 구체적 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 추가 측면에서, 뮤린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 측면에서, 뮤린 불변 영역은 IgG2A이다. 추가의 구체적 측면에서, 항체는 감소된 또는 최소 이펙터 기능을 갖는다. 추가의 구체적 측면에서, 최소 이펙터 기능은 원핵 세포에서의 생산으로부터 발생한다. 추가의 구체적 측면에서 최소 이펙터 기능은 "이펙터-무함유 Fc 돌연변이" 또는 비-글리코실화로부터 발생한다. 추가 측면에서, 이펙터-무함유 Fc 돌연변이는 불변 영역에서의 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.

[0267] 추가 측면에서, 본원에 기재된 임의의 항체를 코딩하는 핵산이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 임의의 이전에 기재된 항-PDL1, 항-PD-1 또는 항-PDL2 항체를 코딩하는 핵산의 발현에 적합한 벡터를 추가로 포함한다. 추가의 구체적 측면에서, 벡터는 핵산의 발현에 적합한 숙주 세포를 추가로 포함한다. 추가의 구체적 측면에서, 숙주 세포는 진핵 세포 또는 원핵 세포이다. 추가의 구체적 측면에서, 진핵 세포는 포유동물 세포, 예컨대 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO)이다.

[0268] 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여, 예를 들어 이전에 기재된 임의의 항-PDL1, 항-PD-1 또는 항-PDL2 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산을, 상기 항체 또는 단편을 생산하는데 적합한 조건 하에서, 발현에 적합한 형태로 함유하는 숙주 세포를 배양하고, 항체 또는 단편을 회수하는 것을 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0269] 일부 실시양태에서, 단리된 항-PDL1 항체는 비-글리코실화된다. 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 모이어티의 아스파라긴 잔기의 측쇄에의 부착을 지칭한다. 트리펩티드 서열

아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 탄수화물 모이어티의 아스파라긴 측쇄에의 효소적 부착을 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩티드에서 이들 트리펩티드 서열 중 어느 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. O-연결 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중 하나가 히드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착된 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신이 또한 사용될 수 있다. 항체로부터 글리코실화 부위를 제거하는 것은 상기 기재된 트리펩티드 서열 중 1개 (N-연결 글리코실화 부위의 경우)가 제거되도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 달성된다. 변경은 글리코실화 부위 내에 아스파라긴, 세린 또는 트레오닌 잔기를 또 다른 아미노산 잔기 (예를 들어, 글리신, 알라닌 또는 보존적 치환)로 치환하는 것에 의해 만들어질 수 있다.

[0270] 본원의 임의의 실시양태에서, 단리된 항-PDL1 항체는 인간 PDL1, 예를 들어 유니프루트케이비/스위스-프루트 등록 번호 Q9NZQ7.1로 제시된 바와 같은 인간 PDL1 또는 그의 변이체에 결합할 수 있다.

[0271] 추가 실시양태에서, 본 발명은 본원에 제공된 바와 같은 항-PDL1, 항-PD-1 또는 항-PDL2 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 적어도 1종의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 개체에게 투여되는 항-PDL1, 항-PD-1 또는 항-PDL2 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물이다. 본원에 기재되거나 관련 기술분야에 공지된 임의의 제약상 허용되는 담체가 사용될 수 있다.

[0272] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-PDL1 항체는 약 60 mg/mL의 양의 항체, 약 20 mM의 농도의 히스티딘 아세테이트, 약 120 mM의 농도의 수크로스 및 0.04% (w/v)의 농도의 폴리소르베이트 (예를 들어, 폴리소르베이트 20)를 포함하는 제제 중에 존재하고, 제제는 약 5.8의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-PDL1 항체는 약 125 mg/mL의 양의 항체, 약 20 mM의 농도의 히스티딘 아세테이트, 약 240 mM의 농도의 수크로스 및 0.02% (w/v)의 농도의 폴리소르베이트 (예를 들어, 폴리소르베이트 20)를 포함하는 제제 중에 존재하고, 제제는 약 5.5의 pH를 갖는다.

[0273] III. OX40 결합 효능제

[0274] 개체에게 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제를 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키는 방법이 본원에 제공된다. 또한, 암을 갖는 개체에게 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제를 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체에서 면역 기능을 증진시키는 방법이 본원에 제공된다.

[0275] OX40 결합 효능제는, 예를 들어 OX40 효능제 항체 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체), OX40L 효능제 단편, OX40 올리고머 수용체 및 OX40 이뮤노어드헤신을 포함한다.

[0276] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 CD4+ 이펙터 T 세포 증식 및/또는 CD4+ 이펙터 T 세포에 의한 시토카인 생산을, OX40 효능제 항체를 사용한 치료 전 증식 및/또는 시토카인 생산과 비교하여 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 시토카인은 IFN- γ 이다.

[0277] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 기억 T 세포 증식을 증가시키고/거나 기억 세포에 의한 시토카인 생산을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 시토카인은 IFN- γ 이다.

[0278] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 이펙터 T 세포 기능의 Treg 저해를 억제한다. 일부 실시양태에서, 이펙터 T 세포 기능은 이펙터 T 세포 증식 및/또는 시토카인 생산이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 T 세포는 CD4+ 이펙터 T 세포이다.

[0279] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 OX40을 발현하는 표적 세포에서 OX40 신호 전달을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, OX40 신호 전달은 NF κ B 하류 신호전달을 모니터링함으로써 검출된다.

[0280] 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는 고갈성 항-인간 OX40 항체이다 (예를 들어, 인간 OX40을 발현하는 세포를 고갈시킨다). 일부 실시양태에서, 인간 OX40 발현 세포는 CD4+ 이펙터 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 인간 OX40 발현 세포는 Treg 세포이다. 일부 실시양태에서, 고갈은 ADCC 및/또는 식세포작용에 의한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 이펙터 세포에 의해 발현된 Fc γ R에 결합하여 인간 이펙터 세포 기능을 활성화함으로써 ADCC를 매개한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 이펙터 세포에 의해 발현된 Fc γ R에 결합하여 인간 이펙터 세포 기능을 활성화함으로써 식세포작용을 매개한다. 예시적인 인간 이펙터 세포는, 예를 들어 대식세포, 자연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 호중구를 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 이펙터 세포는 대

식세포이다.

[0281] 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는 기능적 Fc 영역을 갖는다. 일부 실시양태에서, 기능적 Fc 영역의 이펙터 기능은 ADCC이다. 일부 실시양태에서, 기능적 Fc 영역의 이펙터 기능은 식세포작용이다. 일부 실시양태에서, 기능적 Fc 영역의 이펙터 기능은 ADCC 및 식세포작용이다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG1이다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG4이다.

[0282] 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는 인간 또는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, OX40 결합 효능제 (예를 들어, OX40 효능제 항체)는 MEDI6383이 아니다. 일부 실시양태에서, OX40 결합 효능제 (예를 들어, OX40 효능제 항체)는 MEDI0562가 아니다.

[0283] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 미국 특허 번호 7,550,140 (그 전문이 참조로 포함됨)에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYTMNWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRYSQVHYALDYWGQGTLLTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTFSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHITCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:31)

[0284]

[0285] 의 서열을 포함하는 중쇄 및/또는

DIVMTQSPDSLPTPGEPASISCRSSQSLHSGNYLDWYLQKAGQSPQLLIYLGSNRASGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQYYNHPTTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:32)

[0286]

[0287] 의 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 미국 특허 번호 7,550,140에 기재된 바와 같은 항체 008의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 미국 특허 번호 7,550,140에 기재된 바와 같은 항체 008의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0288] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 미국 특허 번호 7,550,140에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는

DIQMTQSPDSLPTPGEPASISCRSSQSLHSGNYLDWYLQKAGQSPQLLIYLGSNRASGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQYYNHPTTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:33)

[0289]

[0290] 의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 미국 특허 번호 7,550,140에 기재된 바와 같은 항체 SC02008의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 미국 특허 번호 7,550,140에 기재된 바와 같은 항체 SC02008의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0291] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 미국 특허 번호 7,550,140에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는

EVQLVESGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAIGTGGGTYYA
DSVMGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARYDNVMGLYWFDYWGQGT LTVTS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:34)

[0292]

의 서열을 포함하는 중쇄 및/또는

[0293]

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG
SGSGTDFLTITSLLEPEDFAVYYCQQRSNWPPAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:35)

[0294]

의 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 미국 특허 번호 7,550,140에 기재된 바와 같은 항체 023의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 미국 특허 번호 7,550,140에 기재된 바와 같은 항체 023의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0295]

일부 실시양태에서, 0X40 효능제 항체는 미국 특허 번호 7,960,515 (그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 항-인간 0X40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 0X40 효능제 항체는

[0296]

EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSTIDYAD
SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARESGWYLFDYWGQGT LTVTVSS (SEQ
ID NO:36)

[0297]

의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는

[0298]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:37)

[0299]

의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 미국 특허 번호 7,960,515에 기재된 바와 같은 항체 11D4의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 미국 특허 번호 7,960,515에 기재된 바와 같은 항체 11D4의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0300]

일부 실시양태에서, 0X40 효능제 항체는 미국 특허 번호 7,960,515에 기재된 항-인간 0X40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 0X40 효능제 항체는

[0301]

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYA
DSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCAKDQSTADYYFYGM DVWGQGT TTVT
VSS (SEQ ID NO:38)

[0302]

의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는

[0303]

EIVVTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG
SGSGTDFLTITSLLEPEDFAVYYCQQRSNWPTFGGQGTKVEIK (SEQ ID NO:39)

[0304]

의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 미국 특허 번호 7,960,515에 기재된 바와 같은 항체 18D8의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 미국 특허 번호 7,960,515에 기재된 바와 같은 항체 18D8의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0305]

일부 실시양태에서, 0X40 효능제 항체는 WO 2012/027328 (그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 항-인간

[0306]

OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTDYSMHVVRQAPGQGLKWMGWINTETGEPTY
ADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCANPYDYVSYAMDYWGQGTITVTVS
S (SEQ ID NO:40)

의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYLYTGVPSRFS
GSGSGTDFITFTISSLPEDIATYYCQHYSTPRTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:41)

의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2012/027328에 기재된 바와 같은 항체 hu106-222의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2012/027328에 기재된 바와 같은 항체 hu106-222의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 WO 2012/027328에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYEFPSHMSWVRQAPGKGLVLAASNDGGSTYYP
DTMERRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYDDYYAWFAYWGQGTMTVTVSS
(SEQ ID NO:42)

의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSVSTSGYSYMHVYQQKPGQAPRLLIYLASNLESGVP
ARFSGSGGTDFITLTISSLEPEDFAVYYCQHSRELPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:43)

의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2012/027328에 기재된 바와 같은 항체 Hu119-122의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2012/027328에 기재된 바와 같은 항체 Hu119-122의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 WO 2013/028231 (그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는

MYLGLNYVFIVFLNGVQSEVKLEESGGGLVQPGGSMKLSAASGFTFSDAWMDWVRQSPE
KGLEWVAEIRSKANNHATYYAESVNGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTGIYYCTWGEV
FYFDYWGQGTITLVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYITCNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:44)

의 서열을 포함하는 중쇄 및/또는

MRPSIQFLGLLLFWLHGAQCIDIQMTQSPSSLSASLGGKVITITCKSSQDINKYIAWYQHKPGKG
PRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFISNLEPEDIATYYCLQYDNLLTFGAGTKLELKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:45)

- [0320] 의 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는
MYLGLNYVFIVFLNGVQSEVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPE
KGLEWVAEIRSKANNHATYYAESVNGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTGIYYCTWGEV
FYFDYWGGQTTTLTVSS (SEQ ID NO:61)
- [0321]
- [0322] 의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는
MRPSIQFLGLLFLWLHGAQCIDIQMTQSPSSLSASLGGKVTITCKSSQDINKYIAWYQHKPGKG
PRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYFSISNLEPEDIATYYCLQYDNLFTFGAGTKLELK
(SEQ ID NO:62)
- [0323]
- [0324] 의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2013/028231에 기재된 바와 같은 항체 Mab CH 119-43-1의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2013/028231에 기재된 바와 같은 항체 Mab CH 119-43-1의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.
- [0325] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 WO 2013/038191 (그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는
EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTTY
NEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCANYYGSSLSMDYWGQGTSTVTVSS
(SEQ ID NO:46)
- [0326]
- [0327] 의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는
DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFS
GSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGTKEIKR (SEQ ID NO:47)
- [0328]
- [0329] 의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2013/038191에 기재된 바와 같은 항체 클론 20E5의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2013/038191에 기재된 바와 같은 항체 클론 20E5의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.
- [0330] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 WO 2013/038191에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는
EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFKDYTMHWVKQSHGKSLEWIGGIYPNNGGSTYN
QNFKDKATLTVDKSSSTAYMEFRSLTSEDSAVYYCARMGYHGPLHDFDVWGAGTTVTVPSP
(SEQ ID NO:48)
- [0331]
- [0332] 의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는
DIVMTQSHKFMSTSLGDRVSITCKASQDVGA AVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDR
FTGGSGTDFTLTISNVQSEDLTDYFCQQYINYPLTFGGGTKEIKR (SEQ ID NO:49)
- [0333]
- [0334] 의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2013/038191에 기재된 바와 같은 항체 클론 12H3의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2013/038191에 기재된 바와 같은 항체 클론 12H3의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다
- [0335] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 WO 2014/148895A1 (그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWMGYINPYNDGTK
YNEKFKGRVTITSDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCANYYGSSLSMDYWGQGTSLTVTVSS
(SEQ ID NO:50)
- [0336]

- [0337] 의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFS
- [0338] GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:51)
- [0339] 의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 20E5의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 20E5의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.
- [0340] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWMGYINPYNDGTK
YNEKFKGRVTITSDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCANYYGSSLSMDYWGQGTILVTVSS
(SEQ ID NO:50)
- [0341]
- [0342] 의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSRLHSGVPSRFS
- [0343] GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:52)
- [0344] 의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 20E5의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 20E5의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.
- [0345] 일부 실시양태에서 OX40 효능제 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYINPYNDGTKY
NEKFKGRATITSDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCANYYGSSLSMDYWGQGTILVTVSS
(SEQ ID NO:53)
- [0346]
- [0347] 의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFS
- [0348] GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:51)
- [0349] 의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 20E5의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 20E5의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.
- [0350] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYINPYNDGTKY
NEKFKGRATITSDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCANYYGSSLSMDYWGQGTILVTVSS
(SEQ ID NO:53)
- [0351]
- [0352] 의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSRLHSGVPSRFS
- [0353] GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:52)
- [0354] 의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 20E5의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태

에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 20E5의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0355] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYINPYNDGTTY
NEKFKGRATLTSDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCANYYGSSLSMDYWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:54)

[0356]

의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFS
GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:51)

[0358]

의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 20E5의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 20E5의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0360] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYINPYNDGTTY
NEKFKGRATLTSDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCANYYGSSLSMDYWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:54)

[0361]

의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSRLHSGVPSRFS
GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:52)

[0363]

의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 20E5의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 20E5의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0365] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFKDYTMHWVRQAPGQGLEWMGGIYPNNGGST
YNQNFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARMGYHGPHLDFDVWGQGTTVTV
SS (SEQ ID NO:55)

[0366]

의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGA AVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYINYLPTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:56)

[0368]

의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 12H3의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 12H3의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0370] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFKDYTMHWVRQAPGQGLEWMGGIYPNNGGST
YNQNFKDRVITITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARMGYHGPLHDFDVWGQGTTVTV
SS (SEQ ID NO:55)

[0371]

의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는

[0372]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVGA AVAWYQQKPGKAPKLLIWASTRHTGVDPDR
FSGGGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYINYPITFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:57)

[0373]

의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 12H3의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 12H3의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0374]

일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는

[0375]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFKDYTMHWVRQAPGQGLEWIGGIYPNNGGSTY
NQNFKDRVITLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARMGYHGPLHDFDVWGQGTTVTVS
S (SEQ ID NO:58)

[0376]

의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는

[0377]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVGA AVAWYQQKPGKAPKLLIWASTRHTGVPSRF
SGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYINYPITFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:56)

[0378]

의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 12H3의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 12H3의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0379]

일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는

[0380]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFKDYTMHWVRQAPGQGLEWIGGIYPNNGGSTY
NQNFKDRVITLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARMGYHGPLHDFDVWGQGTTVTVS
S (SEQ ID NO:58)

[0381]

의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는

[0382]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVGA AVAWYQQKPGKAPKLLIWASTRHTGVDPDR
FSGGGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYINYPITFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:57)

[0383]

의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 12H3의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 12H3의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0384]

일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는

[0385]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFKDYTMHWVRQAPGQGLEWIGGIYPNNGGSTY
NQNFKDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARMGYHGPLHDFDVWGQGTTVTVS
S (SEQ ID NO:59)

[0386]

- [0387] 의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGAAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRF
- [0388] SGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYINYPITFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:56)
- [0389] 의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 12H3의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 12H3의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.
- [0390] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 항-인간 OX40 효능제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는
QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGYTFKDYTMHWVRQAPGQGLEWIGGIYPNNGGSTY
NQNFKDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARMGYHGPLDFDVWGQGTITVTVS
S (SEQ ID NO:59)
- [0391] S (SEQ ID NO:59)
- [0392] 의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGAAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVDPDR
- [0393] FSGGGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYINYPITFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:57)
- [0394] 의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 12H3의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 WO 2014/148895A1에 기재된 바와 같은 항체 클론 12H3의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.
- [0395] 일부 실시양태에서, 효능제 항-인간 OX40 항체는 L106 BD (파밍겐 프로덕트(Pharmingen Product) # 340420)이다. 일부 실시양태에서, 항체는 항체 L106 (BD 파밍겐 프로덕트 # 340420)의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 항체 L106 (BD 파밍겐 프로덕트 # 340420)의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.
- [0396] 일부 실시양태에서, 효능제 항-인간 OX40 항체는 ACT35 (산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology), 카탈로그 # 20073)이다. 일부 실시양태에서, 항체는 항체 ACT35 (산타 크루즈 바이오테크놀로지, 카탈로그 # 20073)의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 항체 ACT35 (산타 크루즈 바이오테크놀로지, 카탈로그 # 20073)의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.
- [0397] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 MEDI6469이다. 일부 실시양태에서, 항체는 항체 MEDI6469의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 항체 MEDI6469의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.
- [0398] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 MEDI0562이다. 일부 실시양태에서, 항체는 항체 MEDI0562의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 항체 MEDI0562의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.
- [0399] 일부 실시양태에서, OX40 효능제 항체는 상기 제시된 OX40 효능제 항체 중 어느 1종과 동일한 에피토프에 결합하는 효능제 항체이다.
- [0400] 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는 기능적 Fc 영역을 갖는다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG1이다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG4이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 OX40 효능제 항체는 이펙터 기능을 (예를 들어, 야생형 IgG1에서의 이펙터 기능과 비교하여) 증가시키도록 조작된다. 일부 실시양태에서, 항체는 Fc γ 수용체에 대한 증가된 결합을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체는 Fc 영역에 (직접적으로 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 결여되어 있다. 예를 들어, 이러한 항체에서 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 이등분된 올리고사카라이드를 포함하며, 예를 들어 여기서 항체의 Fc 영역에 부착된 이중안테나 올리고사카라이드는 GlcNAc에 의해 이등분된다. 일부 실시양태에서, 항체 변이체는 ADCC를 개선하는 1개 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영

역의 위치 298, 333 및/또는 334 (잔기의 EU 넘버링)에서의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다.

- [0401] 본원에 기재된 방법에 유용한 OX40 효능제는 항체로 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 비-항체 OX40 효능제가 고려되고 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다.
- [0402] 상기 기재된 바와 같이, OX40L (CD134L로도 공지됨)는 OX40에 대한 리간드로서의 역할을 한다. 이에 따라 OX40L의 일부 또는 전부를 제시하는 효능제는 OX40 효능제로서의 역할을 할 수 있다. 일부 실시양태에서, OX40 효능제는 OX40L의 1개 이상의 세포외 도메인을 포함할 수 있다. OX40L의 세포외 도메인의 예는 OX40-결합 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, OX40 효능제는 OX40L의 1개 이상의 세포외 도메인을 포함하지만 그 단백질의 다른 불용성 도메인, 예를 들어 막횡단 도메인은 결여되어 있는 OX40L의 가용성 형태일 수 있다. 일부 실시양태에서, OX40 효능제는 OX40L에 결합할 수 있는 OX40L의 1개 이상의 세포외 도메인을 포함하는 가용성 단백질이다. 일부 실시양태에서, OX40 효능제는, 예를 들어 그의 유효성, 반감기 또는 다른 바람직한 특징을 증가시키기 위해 또 다른 단백질 도메인에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, OX40 효능제는 이뮤노글로불린 Fc 도메인에 연결된 OX40L의 1개 이상의 세포외 도메인을 포함할 수 있다.
- [0403] 일부 실시양태에서, OX40 효능제는 미국 특허 번호 7,696,175에 기재된 OX40 효능제 중 어느 1종일 수 있다.
- [0404] 일부 실시양태에서, OX40 효능제는 올리고머 또는 다량체 분자일 수 있다. 예를 들어, OX40 효능제는 단백질이 올리고머화되도록 1개 이상의 도메인 (예를 들어, 류신 지퍼 도메인)을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, OX40 효능제는 1개 이상의 류신 지퍼 도메인에 연결된 OX40L의 1개 이상의 세포외 도메인을 포함할 수 있다.
- [0405] 일부 실시양태에서, OX40 효능제는 유럽 특허 번호 EP0672141 B1에 기재된 OX40 효능제 중 어느 1 종일 수 있다.
- [0406] 일부 실시양태에서, OX40 효능제는 삼량체 OX40L 융합 단백질일 수 있다. 예를 들어, OX40 효능제는 이뮤노글로불린 Fc 도메인 및 삼량체화 도메인 (비제한적으로 이소류신 지퍼 도메인 포함)에 연결된 OX40L의 1개 이상의 세포외 도메인을 포함할 수 있다.
- [0407] 일부 실시양태에서, OX40 효능제는 국제 공개 번호 W02006/121810에 기재된 OX40 효능제 중 어느 1종, 예컨대 OX40 이뮤노어드헤신일 수 있다. 일부 실시양태에서, OX40 이뮤노어드헤신은 삼량체 OX40-Fc 단백질일 수 있다. 일부 실시양태에서, OX40 효능제는 MEDI6383이다.
- [0408] IV. 항체 제조
- [0409] 본원에 기재된 항체는 항체의 생성을 위해 관련 기술분야에서 이용가능한 기술, 하기 섹션에 보다 상세히 기재되어 있는 예시적인 방법을 사용하여 제조된다.
- [0410] 항체는 관심 항원 (즉, PD-L1 (예컨대 인간 PD-L1), OX40 (예컨대 인간 OX40))에 대해 지시된다. 바람직하게는, 항원은 생물학적으로 중요한 폴리펩이드이고, 장애를 앓고 있는 포유동물에게 항체를 투여하는 것은 그 포유동물에서 치료 이익을 가져올 수 있다.
- [0411] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 150 \text{ nM}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 50 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$ 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예를 들어, 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (Kd)를 갖는다.
- [0412] 한 실시양태에서, Kd는 하기 검정에 의해 기재된 바와 같이 관심 항체의 Fab 버전 및 그의 항원을 사용하여 수행된 방사성표지된 항원 결합 검정 (RIA)에 의해 측정된다. 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도는 비표지된 항원의 적정 시리즈의 존재 하에 최소 농도의 (^{125}I)-표지된 항원으로 Fab를 평형화시킨 후, 항-Fab 항체-코팅된 플레이트를 사용하여 결합된 항원을 포획함으로써 측정한다 (예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)] 참조). 검정 조건을 확립하기 위해, 마이크로타이터(MICROTITER)® 멀티-웰 플레이트 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중 5 $\mu\text{g/ml}$ 포획 항-Fab 항체 (카펠 랩스 (Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후, PBS 중 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 2 내지 5시간 동안 실온 (대략 23°C)에서 차단한다. 비-흡착 플레이트 (눈크(Nunc) #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [^{125}I]-항원을 관심 Fab의 연속 희석물과 혼합한다. 이어서, 관심 Fab를 밤새 인큐베이션하지만; 평형에 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 기간 (예를 들어, 약 65시간) 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 이후에, 혼합물을 포획 플레이트로 옮겨 실온에서 (예를 들어, 1시간 동안) 인큐베이션한다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1%

폴리소르베이트 20 (트윈(TWEEN)-20®)으로 8회 세척한다. 플레이트가 건조된 경우에, 150 μ l/웰의 섬광제 (마이크로신트(MICROSCINT)-20™; 팩커드(Packard))를 첨가하고, 플레이트를 탑카운트(TOPCOUNT)™ 감마 계수기 (팩커드) 상에서 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의 농도를 선택하여 경쟁적 결합 검정에 사용한다.

[0413] 또 다른 실시양태에 따르면, Kd는 예를 들어 ~10 반응 단위 (RU)로 고정화된 항원 CM5 칩을 사용하여 25℃에서 비아코어(BIACORE)®-2000 또는 비아코어®-3000 (비아코어, 인크.(BIAcore, Inc.), 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하는 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용하여 측정된다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어, 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨, pH 4.8을 사용하여 5 μ g/ml (~0.2 μ M)로 희석한 후에 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)가 달성되도록 5 μ l/분의 유량으로 주입한다. 항원의 주사 후, 1 M 에탄올아민을 주입하여 미반응기를 차단한다. 동역학적 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석물 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 μ l/분의 유량으로 25℃에서 0.05% 폴리소르베이트 20 (트윈-20™) 계면활성제를 갖는 PBS (PBST) 내에 주입한다. 간단한 일-대-일 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델 (비아코어® 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 이용하여 회합 및 해리 센서그램을 동시에 피팅시켜 회합률 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})을 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는 k_{off}/k_{on} 의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)]을 참조한다. 회합률이 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 을 초과하는 경우에, 회합률은 분광계, 예컨대 정지-유동 설비 분광광도계 (아비브 인스트루먼트(Aviv Instruments)) 또는 교반 큐벳이 장착된 8000-시리즈 SLM-아민코(AMINCO)™ 분광광도계 (써모스펙트로닉(ThermoSpectronic))에서 측정되는 바와 같은, 증가하는 농도의 항원의 존재 하에 PBS, pH 7.2 중 20 nM의 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25℃에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 대역-통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용하는 것에 의해 결정될 수 있다.

[0414] (i) 항원 제조

[0415] 임의로 다른 분자에 접합된 가용성 항원 또는 그의 단편은 항체를 생성하기 위한 면역원으로서 사용될 수 있다. 막형단 분자, 예컨대 수용체에 대해, 이들의 단편 (예를 들어 수용체의 세포외 도메인)이 면역원으로서 사용될 수 있다. 대안적으로, 막형단 분자를 발현하는 세포가 면역원으로서 사용될 수 있다. 이러한 세포는 천연 공급원 (예를 들어 암 세포주)으로부터 유래될 수 있거나, 또는 막형단 분자를 발현하도록 재조합 기술에 의해 형질전환된 세포일 수 있다. 항체의 제조에 유용한 다른 항원 및 그의 형태는 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0416] (ii) 특정 항체-기반 방법

[0417] 폴리클로날 항체는 관련 항원 및 아주반트의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 바람직하게 생성된다. 이관능성 작용제 또는 유도체화제, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통한), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, $SOCl_2$ 또는 $R^1N=C=NR$ (여기서 R 및 R^1 은 상이한 알킬 기임)을 사용하여, 면역화될 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들어 키텔 림프 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제제에 관련 항원을 접합시키는 것이 유용할 수 있다.

[0418] 예를 들어 단백질 또는 접합체 100 μ g 또는 5 μ g (각각, 토끼 또는 마우스의 경우)을 3 부피의 프로인트 완전 아주반트와 합하고, 상기 용액을 다중 부위에 피내로 주사함으로써, 동물을 항원, 면역원성 접합체 또는 유도체에 대해 면역화한다. 1개월 후에 프로인트 완전 아주반트 중 펩티드 또는 접합체를 원래 양의 1/5 내지 1/10으로 다중 부위에 피하 주사하여 동물을 부스팅한다. 7 내지 14일 후에 동물에서 채혈하여, 혈청을 항체 역가에 대해 검정한다. 역가가 정제기에 도달할 때까지 동물을 부스팅한다. 바람직하게는, 상이한 단백질에 접합되었고/거나 상이한 가교 시약을 통해 접합되었으나 동일한 항원의 접합체로 동물을 부스팅한다. 접합체는 또한 재조합 세포 배양에서 단백질 융합체로서 제조될 수 있다. 또한, 응집제, 예컨대 명반이 면역 반응을 증진시키는 데 적합하게 사용된다.

[0419] 본 발명의 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 최초로 기재되고, 예를 들어 인간-인간 하이브리도마에 관하여 문헌 [Hongo et al., Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), 및 Ni, Xiandai

Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)]에 추가로 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 추가의 방법은, 예를 들어 하이브리도마 세포주로부터의 모노클로날 인간 천연 IgM 항체의 생산에 관하여 미국 특허 번호 7,189,826에 기재된 것을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술 (트리오마 기술)은 문헌 [Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)]에 기재되어 있다.

[0420] 다양한 다른 하이브리도마 기술에 대해서는, 예를 들어 US 2006/258841; US 2006/183887 (완전 인간 항체), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; 및 미국 특허 번호 7,078,492 및 7,153,507 을 참조한다. 하이브리도마 방법을 사용하여 모노클로날 항체를 생산하는 예시적인 프로토콜은 하기와 같이 기재된다. 한 실시양태에서, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터를, 면역화에 사용되는 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 도출하도록 면역화시킨다. 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 단편, 및 보조제, 예컨대 모노포스포릴 지질 A (MPL)/트레할로스 디크리노미콜레이트 (TDM) (리비 이뮤노켄. 리서치, 인크.(Ribi Immunochem. Research, Inc.), 몬타나주 해밀턴)의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 항체를 유도한다. 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 항원) 또는 그의 단편은 관련 기술분야에 널리 공지된 방법, 예컨대 재조합 방법 (이의 일부는 본원에 추가로 기재되어 있음)을 사용하여 제조할 수 있다. 면역화된 동물로부터의 혈청을 항-항원 항체에 대해 검정하고, 부스터 면역화를 임의로 투여한다. 항-항원 항체를 생산하는 동물로부터 림프구를 단리한다. 대안적으로, 림프구를 시험관내 면역화시킬 수 있다.

[0421] 이어서, 림프구를 적합한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성한다. 예를 들어, 문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]을 참조한다. 효율적으로 융합되고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 안정한 고 수준 생산을 지지하며, 배지, 예컨대 HAT 배지에 감수성인 골수종 세포를 사용할 수 있다. 예시적인 골수종 세포는 뮌헨 골수종 세포주, 예컨대 스크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center) (미국 캘리포니아주 샌디에고)로부터 입수가 가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터 유래된 것, 및 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection) (미국 메릴랜드주 록빌)으로부터 입수가 가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 또한 인간 모노클로날 항체의 생산에 대해 기재되었다 (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[0422] 이와 같이 제조한 하이브리도마 세포는 적합한 배양 배지, 예를 들어 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 1종 이상의 물질을 함유하는 배지에 접종하여 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결여된 경우에, 하이브리도마를 위한 배양 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이며 (HAT 배지), 이러한 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다. 바람직하게는, 예를 들어 문헌 [Even et al., Trends in Biotechnology, 24(3), 105-108 (2006)]에 기재된 바와 같이, 소 태아 혈청과 같은 동물-유래 혈청의 사용을 감소시키기 위해 혈청-무함유 하이브리도마 세포 배양 방법을 사용한다.

[0423] 문헌 [Franek, Trends in Monoclonal Antibody Research, 111-122 (2005)]에는 하이브리도마 세포 배양의 생산성을 개선하기 위한 도구로서의 올리고펩티드가 기재되어 있다. 구체적으로, 표준 배양 배지를 특정 아미노산 (알라닌, 세린, 아스파라긴, 프롤린) 또는 단백질 가수분해물 분획으로 풍부화시키면, 3 내지 6개의 아미노산 잔기로 구성된 합성 올리고펩티드에 의해 아포토시스가 유의하게 저해될 수 있다. 펩티드는 밀리몰 또는 더 높은 농도로 존재한다.

[0424] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 본 발명의 항체에 결합하는 모노클로날 항체의 생산에 대해 검정할 수 있다. 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전에 의해 또는 시험관내 결합 검정, 예컨대 방사선면역검정 (RIA) 또는 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 결정할 수 있다. 모노클로날 항체의 결합 친화도는, 예를 들어 스캐차드(Scatchard) 분석에 의해 결정할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)]을 참조한다.

[0425] 목적하는 특이성, 친화도 및/또는 활성을 갖는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후에, 클론을 한계 희석 절차에 의해 서브클로닝하고, 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 문헌 [Goding]을 참조한다. 이러한 목적에 적합한 배양 배지는, 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 추가로, 하이

브리도마 세포는 동물에서 복수 종양으로서 생체내 성장시킬 수 있다. 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 통상의 이뮤노글로불린 정제 절차, 예컨대 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적합하게 분리한다. 하이브리도마 세포로부터 단백질을 분리하는 하나의 절차가 US 2005/176122 및 미국 특허 번호 6,919,436에 기재되어 있다. 방법은 결합 과정에서 최소 염, 예컨대 액방성 염을 사용하고, 바람직하게는 또한 용리 과정에서 소량의 유기 용매를 사용하는 것을 포함한다.

[0426] (iii) 라이브러리-유래 항체

[0427] 본 발명의 항체는 목적 활성 또는 활성들을 갖는 항체에 대해 조합 라이브러리를 스크리닝하는 것에 의해 단리될 수 있다. 예를 들어, 실시예 3에 기재된 방법과 같은, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고, 목적하는 결합 특성을 보유하는 항체에 대해 이러한 라이브러리를 스크리닝하는 다양한 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 추가의 방법은 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)]에 검토되어 있고, 예를 들어 문헌 [McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004)]에 추가로 기재되어 있다.

[0428] 특정 파지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 개별적으로 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 클로닝되고, 파지 라이브러리에 무작위 재조합되며, 이는 이어서 문헌 [Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 항원-결합 파지에 대해 스크리닝될 수 있다. 파지는 전형적으로 항체 단편을 단일-쇄 Fv (scFv) 단편 또는 Fab 단편으로 디스플레이한다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요없이 면역원에 대한 고-친화도 항체를 제공한다. 대안적으로, 나이브 레퍼토리를 클로닝 (예를 들어, 인간으로부터)하여, 문헌 [Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993)]에 기재된 바와 같이 어떠한 면역화도 없이 광범위한 비-자기 및 또한 자기 항원에 대한 항체의 단일 공급원을 제공할 수 있다. 최종적으로, 문헌 [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터의 재배열되지 않은 V-유전자 절편을 클로닝하고, 고도로 가변성인 CDR3 영역을 코딩하고 시험관내 재배열이 달성되도록 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써, 나이브 라이브러리를 또한 합성적으로 제조할 수 있다. 인간 항체 파지 라이브러리를 기재하는 특허 공개는, 예를 들어 다음을 포함한다: 미국 특허 번호 5,750,373 및 미국 특허 공개 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 및 2009/0002360.

[0429] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 단편은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편으로 간주된다.

[0430] (iv) 키메라, 인간화 및 인간 항체

[0431] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 키메라 항체이다. 특정 키메라 항체는, 예를 들어 미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)]에 기재되어 있다. 한 예에서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역 (예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 또는 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 추가의 예에서, 키메라 항체는 부류 또는 하위부류가 모 항체의 것으로부터 변화된 "부류 교체된" 항체이다. 키메라 항체는 그의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0432] 특정 실시양태에서, 키메라 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 모 비-인간 항체의 특이성 및 친화도를 보유하면서 인간에 대한 면역원성이 감소되도록 인간화된다. 일반적으로, 인간화 항체는 HVR, 예를 들어 CDR (또는 그의 일부)이 비-인간 항체로부터 유래되고, FR (또는 그의 일부)이 인간 항체 서열로부터 유래된 1개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 또한 임의로 인간 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체 내의 일부 FR 잔기는, 예를 들어 항체 특이성 또는 친화도를 복원하거나 또는 개선시키기 위해, 비-인간 항체 (예를 들어, HVR 잔기가 유래된 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.

[0433] 인간화 항체 및 그의 제조 방법은 예를 들어 문헌 [Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633

(2008))에 검토되어 있고, 추가로 예를 들어 문헌 [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)]; 미국 특허 번호 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321, 및 7,087,409; [Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005)] (SDR (a-CDR) 이식을 기재함); [Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991)] ("재표면화"를 기재함); [Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005)] ("FR 서플링"을 기재함); 및 [Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) 및 Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000)] (FR 서플링에 대한 "가이드 선택" 접근법을 기재함)에 기재되어 있다.

[0434] 인간화에 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 "최적-적합" 방법을 사용하여 선택된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993)] 참조); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정한 하위군의 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); 및 Presta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993)] 참조); 인간 성숙 (체세포 성숙) 프레임워크 영역 또는 인간 배선 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)] 참조); 및 FR 라이브러리 스크리닝으로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) 및 Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)] 참조)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0435] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 관련 기술분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 문헌 [van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) 및 Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008)]에 기재되어 있다.

[0436] 인간 항체는 항원 펩티드에 반응하여 인간 가변 영역을 갖는 무손상 인간 항체 또는 무손상 항체를 생산하도록 변형된 트랜스제닉 동물에게 면역원을 투여하는 것에 의해 제조할 수 있다. 이러한 동물은 전형적으로 내인성 이뮤노글로불린 유전자좌를 대체하거나 또는 염색체외에 존재하거나 동물의 염색체로 무작위적으로 통합된 인간 이뮤노글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 함유한다. 이러한 트랜스제닉 마우스에서, 내인성 이뮤노글로불린 유전자좌는 일반적으로 불활성화된다. 트랜스제닉 동물로부터 인간 항체를 수득하는 방법의 검토를 위해, 문헌 [Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005)]을 참조한다. 또한, 예를 들어 제노마우스(XENOMOUSE)TM 기술을 기재하는 미국 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584; HuMab® 기술을 기재하는 미국 특허 번호 5,770,429; K-M 마우스(K-M MOUSE)® 기술을 기재하는 미국 특허 번호 7,041,870, 및 벨로시마우스(VelociMouse)® 기술을 기재하는 미국 특허 출원 공개 번호 US 2007/0061900을 참조한다. 이러한 동물에 의해 생성된 무손상 항체로부터의 인간 가변 영역은 예를 들어 상이한 인간 불변 영역과 조합시키는 것에 의해 추가로 변형될 수 있다.

[0437] 인간 항체는 또한 하이브리도마-기반 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 기재되어 있다. (예를 들어, 문헌 [Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 및 Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)] 참조.) 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체는 또한 문헌 [Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)]에 기재되어 있다. 추가의 방법은, 예를 들어 미국 특허 번호 7,189,826 (하이브리도마 세포주로부터의 모노클로날 인간 IgM 항체의 생산 기재) 및 문헌 [Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)] (인간-인간 하이브리도마 기재)에 기재된 것을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술 (트리오마(Trioma) 기술)은 또한 문헌 [Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)]에 기재되어 있다.

[0438] 인간 항체는 또한 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리하는 것에 의해 생성될 수 있다. 이어서, 이러한 가변 도메인 서열은 목적하는 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선택하는 기술은 하기 기재된다.

[0439] (v) 항체 단편

[0440] 항체 단편은 전통적인 수단, 예컨대 효소적 소화에 의해 또는 재조합 기술에 의해 생성될 수 있다. 특정 상황에서는, 전체 항체가 아닌 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 단편의 크기가 작을수록 클리어런스가 신속하고, 고품 종양에 대한 접근을 개선시킬 수 있다. 특정 항체 단편의 검토를 위해, 문헌 [Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134]을 참조한다.

[0441] 항체 단편의 생산을 위한 다양한 기술이 개발되어 왔다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백질분해적 소화를 통해 유래되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); 및 Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 이들 단편은 현재 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생산될 수 있다. Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편은 모두 이. 콜라이(*E. coli*)에서 발현되어 그로부터 분리될 수 있어서 다량의 이들 단편의 용이한 생산을 가능하게 한다. 항체 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 분리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다 (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). 또 다른 접근법에 따르면, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 분리될 수 있다. 셀 비지 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하는, 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 F(ab')₂ 단편이 미국 특허 번호 5,869,046에 기재되어 있다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술들이 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 특정 실시양태에서, 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 번호 5,571,894; 및 5,587,458을 참조한다. Fv 및 scFv는 불변 영역이 결여된 무손상 결합 부위를 갖는 유일한 종이고; 따라서 생체내 사용 동안 비특이적 결합의 감소에 적합할 수 있다. scFv 융합 단백질은 scFv의 아미노 또는 카르복시 말단에 이펙터 단백질의 융합체를 생성시키도록 구축될 수 있다. 상기 문헌 [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck]을 참조한다. 또한, 항체 단편은, 예를 들어 미국 특허 번호 5,641,870에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체는 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0442] (vi) 다중특이적 항체

[0443] 다중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖고, 여기서 에피토프는 통상적으로 상이한 항원으로부터의 것이다. 이러한 분자는 정상적으로 단지 2개의 상이한 에피토프에 결합할 것이지만 (즉, 이중특이적 항체, BsAb), 추가의 특이성을 갖는 항체, 예컨대 삼중특이적 항체가 본원에 사용될 때 이러한 표현에 포괄된다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, F(ab')₂ 이중특이적 항체)으로 제조될 수 있다. 한 측면에서, OX40 및 PD-1에 결합하는 이중특이적 항체가 제공된다. 한 측면에서, OX40 및 PD-L1에 결합하는 이중특이적 항체가 제공된다.

[0444] 이중특이적 항체의 제조 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 전통적인 생산은 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동발현을 기반으로 하며, 여기서 2개의쇄는 상이한 특이성을 갖는다 (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 편성으로 인해, 이들 하이브리도마 (퀴드로마)는 10종의 상이한 항체 분자의 잠재적 혼합물을 생산하며, 이 중 1종만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 통상적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 정확한 분자의 정제는 다소 번거롭고, 산물 수율이 낮다. 유사한 절차가 WO 93/08829 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0445] 이중특이적 항체를 제조하기 위한 관련 기술분야에 공지된 하나의 접근법은 "노브-인트루-홀" 또는 "돌출부-대-함몰부" 접근법이다 (예를 들어 미국 특허 번호 5,731,168 참조). 이러한 접근법에서, 두 이뮤노글로불린 폴리펩티드 (예를 들어, 중쇄 폴리펩티드)는 각각 계면을 포함한다. 하나의 이뮤노글로불린 폴리펩티드의 계면은 다른 이뮤노글로불린 폴리펩티드 상의 상응하는 계면과 상호작용하며, 이에 의해 두 이뮤노글로불린 폴리펩티드가 회합하게 된다. 이들 계면은 하나의 이뮤노글로불린 폴리펩티드의 계면에 위치한 "노브" 또는 "돌출부" (이들 용어는 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있음)는 다른 이뮤노글로불린 폴리펩티드의 계면에 위치한 "홀" 또는 "함몰부" (이들 용어는 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있음)와 상응하도록 조작될 수 있다. 일부 실시양태에서, 홀은 노브와 동일하거나 유사한 크기를 갖고 두 계면이 상호작용할 때, 하나의 계면의 노브가 다른 계면의 상응하는 홀에 위치가능하도록 적합하게 위치한다. 이론에 얽매이지는 않지만, 이것은 이중다량체를 안정화시키고 다른 종, 예를 들어 동종다량체에 비해 이중다량체의 형성을 선호하는 것으로 생각된다. 일부 실시양태에서, 이러한 접근법을 사용하여 두 상이한 이뮤노글로불린 폴리펩티드의 이중다량체화를 촉진할 수 있으며, 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 두 이뮤노글로불린 폴리펩티드를 포함하는 이중특이적 항체를 생성할 수 있다.

[0446] 일부 실시양태에서, 노브는 소형 아미노산 측쇄를 보다 대형의 측쇄로 대체함으로써 구축될 수 있다. 일부 실시양태에서, 홀은 대형 아미노산 측쇄를 보다 소형의 측쇄로 대체함으로써 구축될 수 있다. 노브 또는 홀은 원래 계면에 존재할 수 있거나 또는 합성적으로 도입될 수 있다. 예를 들어, 노브 또는 홀은 적어도 1개의 "원래" 아미노산 잔기를 적어도 1개의 "유입" 아미노산 잔기로 대체하도록 계면을 코딩하는 핵산 서열을 변경시

킴으로써 합성적으로 도입될 수 있다. 핵산 서열을 변경하기 위한 방법은 관련 기술분야에 널리 공지된 표준 분자 생물학 기술을 포함할 수 있다. 다양한 아미노산 잔기의 측쇄 부피는 하기 표에 제시되어 있다. 일부 실시양태에서, 원래 잔기는 작은 측쇄 부피 (예를 들어, 알라닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 글리신, 세린, 트레오닌 또는 발린)를 갖고, 노브를 형성하기 위한 유입 잔기는 자연 발생 아미노산이며 아르기닌, 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 원래 잔기는 큰 측쇄 부피 (예를 들어, 아르기닌, 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판)를 갖고, 홀을 형성하기 위한 유입 잔기는 자연 발생 아미노산이며 알라닌, 세린, 트레오닌 및 발린을 포함할 수 있다.

[0447]

<표 1> 아미노산 잔기의 특성

아미노산	I-문자 약어	질량 ^a (달톤)	부피 ^b (Å ³)	접근가능한 표면적 ^c (Å ²)
알라닌 (Ala)	A	71.08	88.6	115
아르기닌 (Arg)	R	156.20	173.4	225
아스파라긴 (Asn)	N	114.11	117.7	160
아스파르트산 (Asp)	D	115.09	111.1	150
시스테인 (Cys)	C	103.14	108.5	135
글루타민 (Gln)	Q	128.14	143.9	180
글루탐산 (Glu)	E	129.12	138.4	190
글리신 (Gly)	G	57.06	60.1	75
히스티딘 (His)	H	137.15	153.2	195
이소류신 (Ile)	I	113.17	166.7	175
류신 (Leu)	L	113.17	166.7	170
리신 (Lys)	K	128.18	168.6	200
메티오닌 (Met)	M	131.21	162.9	185
페닐알라닌 (Phe)	F	147.18	189.9	210
프롤린 (Pro)	P	97.12	122.7	145
세린 (Ser)	S	87.08	89.0	115
트레오닌 (Thr)	T	101.11	116.1	140
트립토판 (Trp)	W	186.21	227.8	255
티로신 (Tyr)	Y	163.18	193.6	230
발린 (Val)	V	99.14	140.0	155

[0448]

^a 아미노산의 분자량 마이너스 물의 분자량. 문헌 [Handbook of Chemistry and Physics, 43rd ed. Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961]으로부터의 값.

[0449]

^b 문헌 [A.A. Zamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24:107-123, 1972]으로부터의 값.

[0450]

^c 문헌 [C. Chothia, J. Mol. Biol. 105:1-14, 1975]으로부터의 값. 접근가능한 표면적은 이러한 참고문헌의 도 6-20에 정의되어 있다.

[0451]

일부 실시양태에서, 노브 또는 홀을 형성하기 위한 원래 잔기는 이중다량체의 3차원 구조를 기초로 하여 확인된다. 3차원 구조를 획득하기 위한 관련 기술분야에 공지된 기술은 X선 결정학 및 NMR을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 계면은 이뮤노글로불린 불변 도메인의 CH3 도메인이다. 이들 실시양태에서, 인간 IgG₁의

[0452]

CH3/CH3 계면은 4개의 역평행 β -가닥에 위치한 각 도메인 상의 16개 잔기를 수반한다. 이론에 얽매는 것을 바라지는 않지만, 돌연변이된 잔기는 바람직하게는 노브가 파트너 CH3 도메인의 보상성 홀 보다는 주위 용매에 의해 수용될 수 있는 위험을 최소화하기 위해 2개의 중심 역평행 β -가닥 상에 위치한다. 일부 실시양태에서, 두 이뮤노글로불린 폴리펩티드 내 상응하는 노브 및 홀을 형성하는 돌연변이는 하기 표에 제공된 1개 이상의 쌍에 상응한다.

[0453] <표 2> 상응하는 노브- 및 홀-형성 돌연변이의 예시적인 세트

제 1 이뮤노글로불린의 CH3	제 2 이뮤노글로불린의 CH3
T366Y	Y407T
T366W	Y407A
F405A	T394W
Y407T	T366Y
T366Y:F405A	T394W:Y407T
T366W:F405W	T394S:Y407A
F405W:Y407A	T366W:T394S
F405W	T394S

[0454]

[0455] 돌연변이는 원래 잔기, 이어서 카바트 넘버링 시스템을 사용한 위치, 및 그 다음 유입 잔기로 표시된다 (모든 잔기는 단일-문자 아미노산 코드로 주어진다). 다중 돌연변이는 콜론에 의해 분리된다.

[0456] 일부 실시양태에서, 이뮤노글로불린 폴리펩티드는 상기 표 2에 열거된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 CH3 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이중특이적 항체는 표 2의 좌측 칼럼에 열거된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 CH3 도메인을 포함하는 제1 이뮤노글로불린 폴리펩티드 및 표 2의 우측 칼럼에 열거된 1개 이상의 상응하는 아미노산 치환을 포함하는 CH3 도메인을 포함하는 제2 이뮤노글로불린 폴리펩티드를 포함한다.

[0457] 상기 논의된 바와 같은 DNA의 돌연변이에 따라, 1개 이상의 상응하는 노브- 또는 홀-형성 돌연변이를 갖는 변형된 이뮤노글로불린 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 관련 기술분야에 공지된 표준 재조합 기술 및 세포 시스템을 사용하여 발현 및 정제할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,731,168; 5,807,706; 5,821,333; 7,642,228; 7,695,936; 8,216,805; 미국 공개 번호 2013/0089553; 및 문헌 [Spiess et al., Nature Biotechnology 31: 753-758, 2013]을 참조한다. 변형된 이뮤노글로불린 폴리펩티드는 원핵 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이 또는 진핵 숙주 세포, 예컨대 CHO 세포를 사용하여 생산할 수 있다. 상응하는 노브- 및 홀-보유 이뮤노글로불린 폴리펩티드를 공동-배양으로 숙주 세포에서 발현시키고 이중다량체로서 함께 정제할 수 있거나, 또는 단일 배양으로 발현시키고 개별적으로 정제하고 시험관내에서 조립할 수 있다. 일부 실시양태에서, 박테리아 숙주 세포의 두 균주 (하나는 노브를 갖는 이뮤노글로불린 폴리펩티드를 발현하는 것이고, 다른 것은 홀을 갖는 이뮤노글로불린 폴리펩티드를 발현하는 것임)는 관련 기술분야에 공지된 표준 박테리아 배양 기술을 사용하여 공동-배양한다. 일부 실시양태에서, 두 균주를, 예를 들어 배양 중 동일한 발현 수준을 달성하기 위해 특정 비로 혼합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 두 균주를 50:50, 60:40 또는 70:30 비로 혼합할 수 있다. 폴리펩티드 발현 후에, 세포를 함께 용해시킬 수 있고, 단백질을 추출할 수 있다. 동중다량체 vs. 이중다량체 종의 존재비를 측정할 수 있도록 하는 관련 기술분야에 공지된 표준 기술은 크기 배제 크로마토그래피를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 변형된 이뮤노글로불린 폴리펩티드는 표준 재조합 기술을 사용하여 개별적으로 발현시키고 시험관내에서 함께 조립할 수 있다. 조립은, 예를 들어 각각의 변형된 이뮤노글로불린 폴리펩티드를 정제하고 그를 동일한 질량으로 함께 인큐베이션하고, 디설피드를 환원시키고 (예를 들어, 디티오프라이톨로 처리함으로써), 농축시키고, 폴리펩티드를 재산화시킴으로써 달성할 수 있다. 형성된 이중특이적 항체는 양이온-교환 크로마토그래피를 포함한 표준 기술을 사용하여 정제하고 크기 배제 크로마토그래피를 포함한 표준 기법을 사용하여 측정할 수 있다. 이들 방법의 보다 상세한 설명에 대해서는, 문헌 [Speiss et al., Nat Biotechnol 31:753-8, 2013]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 변형된 이뮤노글로불린 폴리펩티드를 CHO 세포에서 개별적으로 발현시키고, 상기 기재된 방법 사용하여 시험관내에서 조립할 수 있다.

- [0458] 다른 접근법에 따르면, 목적하는 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)을 갖는 항체 가변 도메인이 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 바람직하게는, 융합체는 힌지, CH2 및 CH3 영역 중 적어도 일부를 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인을 갖는다. 융합체 중 적어도 1개에 존재하는, 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)을 갖는 것이 전형적이다. 이뮤노글로불린 중쇄 융합체 및 목적하는 경우에 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 개별 발현 벡터 내로 삽입하고, 적합한 숙주 유기체 내로 공동-형질감염시킨다. 이는, 구축에 사용된 3종의 폴리펩티드 쇠의 동등하지 않은 비가 최적의 수율을 제공하는 경우의 실시양태에서 상기 3종의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조정하는데 있어서 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 적어도 2종의 폴리펩티드 쇠의 동등한 비의 발현이 고수율을 발생시키거나 또는 비가 특정한 유의성을 갖지 않는 경우에, 2중 또는 모든 3종의 폴리펩티드 쇠에 대한 코딩 서열을 1개의 발현 벡터에 삽입하는 것이 가능하다.
- [0459] 이 접근법의 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한쪽 아암 내에 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄, 및 다른쪽 아암 내의 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공함)으로 구성된다. 이중특이적 분자의 한쪽 절반에만 이뮤노글로불린 경쇄가 존재하는 것이 용이한 분리 방식을 제공하기 때문에, 이러한 비대칭 구조는 원치않는 이뮤노글로불린 쇠 조합물로부터 목적하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 접근법이 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체의 생성에 대한 추가의 상세내용에 대해서는 예를 들어 문헌 [Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)]을 참조한다.
- [0460] WO96/27011에 기재된 또 다른 접근법에 따르면, 한 쌍의 항체 분자 사이의 계면을 조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이중이량체의 백분율을 최대화할 수 있다. 하나의 계면은 항체 불변 도메인의 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터 1개 이상의 소형 아미노산 측쇄가 보다 대형의 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 대형 아미노산 측쇄를 보다 소형의 것 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써 대형 측쇄(들)에 대해 동일하거나 유사한 크기의 보상성 "함몰부"가 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이것은 다른 원치않는 최종-산물, 예컨대 동종이량체에 비해 이중이량체의 수율을 증가시키기 위한 메커니즘을 제공한다.
- [0461] 이중특이적 항체는 가교된 또는 "이중접합체" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이중접합체 내의 항체들 중 1개는 아비딘에 커플링되고, 다른 것은 비오틴에 커플링될 수 있다. 이러한 항체는, 예를 들어 면역계 세포의 원치않는 세포로의 표적화 (미국 특허 번호 4,676,980) 및 HIV 감염의 치료 (WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP 03089)를 위해 제안된 바 있다. 임의의 편리한 가교 방법을 사용하여 이중접합체 항체를 제조할 수 있다. 적합한 가교제가 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 다수의 가교 기술과 함께 미국 특허 번호 4,676,980에 개시되어 있다.
- [0462] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하는 기술이 또한 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 화학적 연결을 사용하여 이중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)]은 무손상 항체를 단백질분해적으로 절단하여 F(ab')₂ 단편을 생성하는 절차를 기재한다. 이들 단편을 디티올 착화제 아비산 나트륨의 존재 하에서 환원시켜, 이웃자리 디티올을 안정화시키고 분자간 디설피드 형성을 방지한다. 이어서 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 이어서 Fab'-TNB 유도체 중 1종을 메르캅토에틸아민에 의한 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환시키고, 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이중특이적 항체를 형성한다. 생산된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 작용제로서 사용될 수 있다.
- [0463] 최근 진전은 이중특이적 항체를 형성하기 위해 화학적으로 커플링될 수 있는 이. 콜라이로부터의 Fab'-SH 단편의 직접 회수를 용이하게 하였다. 문헌 [Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)]은 완전히 인간화된 이중특이적 항체 F(ab')₂ 분자의 생산을 기재한다. 각각의 Fab' 단편은 이. 콜라이로부터 개별적으로 분리되었고, 이중특이적 항체를 형성하기 위해 시험관내에서 유도 화학적 커플링에 적용되었다.
- [0464] 재조합 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조 및 분리하기 위한 다양한 기술이 또한 기재되어 있다. 예를 들어, 류신 지퍼를 사용하여 이중특이적 항체가 생산되었다. 문헌 [Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드가 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 유전자 융합에 의해 연결되었다. 항체 동종이량체가 힌지 영역에서 환원되어 단량체가 형성된 후, 재-산화되어 항체 이중이량체가 형성되었다. 이러한 방법은 항체 동종이량체의 생산에 또한 사용될 수 있다. 문헌 [Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편의 제조를 위한 대안적인 메커니즘을 제공한다. 상기 단편은 동일한 쇠 상의 2개의 도메인

사이의 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함한다. 따라서, 한 단편의 V_H 및 V_L 도메인이 또 다른 단편의 상보적인 V_L 및 V_H 도메인과 쌍형성하도록 강제되어 그에 의해 2개의 항원-결합 부위가 형성된다. 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 또 다른 전략이 또한 보고되어 있다. 문헌 [Gruber et al., J. Immunol, 152:5368 (1994)]을 참조한다.

[0465] 2가 초과와 원자가를 갖는 항체가 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체가 제조될 수 있다. (문헌 [Tuft et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)]).

[0466] (vii) 단일-도메인 항체

[0467] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 단일-도메인 항체이다. 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 단일 폴리펩티드 쇄이다. 특정 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다 (도만티스, 인크.(Domantis, Inc.), 매사추세츠주 월섬; 예를 들어 미국 특허 번호 6,248,516 B1 참조). 한 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부로 이루어진다.

[0468] (viii) 항체 변이체

[0469] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 적절한 변화를 도입하거나 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구축물에 도달하기 위해 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어질 수 있으며, 단 최종 구축물은 목적하는 특징을 보유해야 한다. 아미노산 변경은 서열이 제조되는 시점에 대상 항체 아미노산 서열에 도입될 수 있다.

[0470] (ix) 치환, 삽입과 결실 변이체

[0471] 특정 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체가 제공된다. 치환 돌연변이유발을 위한 관심 부위는 HVR 및 FR을 포함한다. 보존적 치환은 표 1에서 "보존적 치환"의 표제 하에 제시된다. 보다 실질적인 변화는 표 1에서 "예시적인 치환"의 표제 하에 제공되고, 아미노산 측쇄 부류에 관하여 하기에 추가로 기재된다. 아미노산 치환은 관심 항체에 도입될 수 있고, 산물은 목적 달성, 예를 들어 보유/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0472] <표 3> 예시적인 치환

원래 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0473]

[0474] 아미노산은 공통적인 측쇄 특성에 따라 그룹화될 수 있다:

[0475] a. 소수성 : 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0476] b. 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0477] c. 산성 : Asp, Glu;

[0478] d. 염기성: His, Lys, Arg;

[0479] e. 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0480] f. 방향족 : Trp, Tyr, Phe.

[0481] 비-보존적 치환은 이들 부류 중 1종의 구성원을 또 다른 부류로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0482] 치환 변이체의 한 유형은 모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 1개 이상의 초가변 영역 잔기를 치환하는 것을 수반한다. 일반적으로, 추가의 연구를 위해 선택된 생성된 변이체(들)는 모 항체에 비해 특정 생물학적 특성 (예를 들어, 증가된 친화도, 감소된 면역원성)에서 변형 (예를 들어, 개선)을 가질 것이고/거나 모 항체의 특정 생물학적 특성을 실질적으로 보유할 것이다. 예시적인 치환 변이체는, 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 파지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기술을 사용하여 편리하게 생성될 수 있는 친화도 성숙 항체이다. 간략하게, 1개 이상의 HVR 잔기가 돌연변이되고, 변이체 항체가 파지 상에 디스플레이되고, 특정한 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다.

[0483] 변경 (예를 들어, 치환)은 예를 들어 항체 친화도를 개선시키기 위해 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟"에서, 즉, 체세포 성숙 과정 동안 고 빈도로 돌연변이를 겪는 코돈에 의해 코딩된 잔기 (예를 들어, 문헌 [Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)] 참조), 및/또는 SDR (a-CDR)에서 이루어질 수 있고, 여기서 생성 변이체 VH 또는 VL은 결합 친화도에 대해 검사된다. 2차 라이브러리로부터 구축 및 재선택하는 것에 의한 친화도 성숙은, 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))]에 기재되어 있다. 친화도 성숙의 일부 실시양태에서, 다양성은 임의의 다양한 방법 (예를 들어, 오류-유발 PCR, 쇠 서플링 또는 올리고뉴클레오타이드-지시된 돌연변이유발)에 의한 성숙을 위해 선택된 가변 유전자로 도입된다. 이어서, 2차 라이브러리가 생성된다. 이어서, 라이브러리를 스크리닝하여 목적 친화도를 갖는 임의의 항체 변이체를 확인한다. 다양성을 도입

하는 또 다른 방법은 HVR-지시된 접근법을 수반하며, 여기서 여러 HVR 잔기 (예를 들어, 한 번에 4-6개 잔기)가 무작위화된다. 항원 결합에 수반되는 HVR 잔기는 예를 들어 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 사용하여 구체적으로 확인될 수 있다. 특히, CDR-H3 및 CDR-L3이 종종 표적화된다.

[0484] 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 이러한 변경이 항체가 항원에 결합하는 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 1개 이상의 HVR 내에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경 (예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환)이 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟" 또는 SDR의 외부일 수 있다. 상기 제공된 변이체 VH 및 VL 서열의 특정 실시양태에서, 각각의 HVR은 변경되지 않거나, 또는 1, 2 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 함유한다.

[0485] 문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085]에 기재된 바와 같이, 돌연변이유발을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역의 확인에 유용한 방법은 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"로 불린다. 이러한 방법에서, 잔기 또는 표적 잔기의 군 (예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys 및 glu)이 확인되고, 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)에 의해 대체되어 항체와 항원의 상호작용에 영향을 미치는지 여부를 결정한다. 추가의 치환은 초기 치환에 대한 기능적 감수성이 입증된 아미노산 위치에 도입될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조가 사용된다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃 잔기는 치환을 위한 후보로 표적화되거나 또는 제거될 수 있다. 변이체는 그들이 목적하는 특성을 함유하는지 여부를 결정하기 위해 스크리닝될 수 있다.

[0486] 아미노산 서열 삽입은 길이 범위가 1개의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 N- 또는 C-말단에 대한 효소 (예를 들어, ADEPT의 경우) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드의 융합을 포함한다.

[0487] (x) 글리코실화 변이체

[0488] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키도록 변경된다. 항체에 대한 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 1개 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성될 수 있다.

[0489] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우에, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생산된 천연 항체는 전형적으로 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에의 N-연결에 의해 일반적으로 부착되는 분지형, 이중안테나 올리고사카라이드를 포함한다. 예를 들어 문헌 [Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997)]을 참조한다. 올리고사카라이드는 다양한 탄수화물, 예를 들어 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스 및 시알산, 뿐만 아니라 이중안테나 올리고사카라이드 구조의 "줄기" 내 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 내 올리고사카라이드의 변형은 특정 개선된 특성을 갖는 항체 변이체를 생성하기 위해 이루어질 수 있다.

[0490] 한 실시양태에서, Fc 영역에 부착된 탄수화물 구조에서 푸코스가 감소되거나 푸코스가 결여되어 있는 Fc 영역을 포함하는 항체 변이체가 제공되며, 이는 ADCC 기능을 개선시킬 수 있다. 구체적으로, 야생형 CHO 세포에서 생산된 동일한 항체 상의 푸코스의 양에 비해 푸코스가 감소된 항체가 본원에서 고려된다. 즉, 이들은 천연 CHO 세포 (예를 들어, 천연 글리코실화 패턴을 생산하는 CHO 세포, 예컨대 천연 FUT8 유전자를 함유하는 CHO 세포)에 의해 생산된 경우에 이들이 달리 갖게 될 것보다 더 적은 양의 푸코스를 갖는 것을 특징으로 한다. 특정 실시양태에서, 항체는 그 상의 N-연결 글리칸의 약 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% 미만이 푸코스를 포함하는 것이다. 예를 들어, 이러한 항체에서 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체는 그 상의 N-연결 글리칸 중 어느 것도 푸코스를 포함하지 않는 항체이며, 즉 항체는 푸코스가 완전히 없거나, 또는 푸코스를 전혀 갖지 않거나, 또는 비-푸코실화된다. 푸코스의 양은 예를 들어 WO 2008/077546에 기재된 바와 같이 MALDI-TOF 질량 분광측정법에 의한 측정 시, Asn 297에 부착된 모든 당구조물 (예를 들어, 복합체, 하이브리드 및 높은 만노스 구조물)의 합계에 관하여 Asn297에서 당쇄 내의 푸코스의 평균 양을 계산하는 것에 의해 결정된다. Asn297은 Fc 영역 내의 약 위치 297 (Fc 영역 잔기의 Eu 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하지만; Asn297은 또한 항체에서의 부차적 서열 변이로 인해 위치 297의 약 ± 3 아미노산 상류 또는 하류, 즉 위치 294 내지 300에 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공보 번호 US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (교와 핫코 고교 캄파니 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))을 참조한다. "탈푸코실화" 또

는 "푸코스-결핍" 항체 변이체에 대한 문헌의 예는 하기를 포함한다: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; 문헌 [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]. 탈푸코실화 항체를 생산할 수 있는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (문헌 [Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]; 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1 (Presta, L); 및 WO 2004/056312 A1 (Adams et al., 특히 실시예 11)), 및 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포 (예를 들어, 문헌 [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)]; 및 WO2003/085107 참조)가 포함된다.

[0491] 이등분된 올리고사카라이드를 갖는 항체 변이체가 추가로 제공되며, 예를 들어 여기서 항체의 Fc 영역에 부착된 이중안테나 올리고사카라이드는 GlcNAc에 의해 이등분된다. 이러한 항체 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체의 예는, 예를 들어 WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); 미국 특허 번호 6,602,684 (Umana et al.); US 2005/0123546 (Umana et al.), 및 문헌 [Ferrara et al., Biotechnology and Bioengineering, 93(5): 851-861 (2006)]에 기재되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고사카라이드 내에 적어도 1개의 갈락토스 잔기를 갖는 항체 변이체가 또한 제공된다. 이러한 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는, 예를 들어 WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); 및 WO 1999/22764 (Raju, S.)에 기재되어 있다.

[0492] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 Fc 영역을 포함하는 항체 변이체는 Fc γ RIII에 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 Fc 영역을 포함하는 항체 변이체는 인간 이펙터 세포의 존재 하에 ADCC 활성을 갖거나, 또는 인간 야생형 IgG1Fc 영역을 포함하는 달리 동일한 항체와 비교하여 인간 이펙터 세포의 존재 하에 증가된 ADCC 활성을 갖는다.

[0493] (xi) Fc 영역 변이체

[0494] 특정 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 변형이 본원에 제공된 항체의 Fc 영역에 도입되어 Fc 영역 변이체가 생성될 수 있다. Fc 영역 변이체는 1개 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0495] 특정 실시양태에서, 본 발명은 모든 이펙터 기능은 아니지만, 일부 이펙터 기능을 보유하고 있으므로, 생체내에서의 항체의 반감기가 중요하긴 하지만 특정의 이펙터 기능 (예컨대 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 해로운 많은 적용 분야에 대한 바람직한 후보가 되는 항체 변이체를 고려한다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정이 수행될 수 있다. 예를 들어, 항체에 Fc γ R 결합이 결여되어 있지만 (따라서 ADCC 활성 결여 가능성이 있음) FcRn 결합 능력은 보유하는 것을 보장하기 위해 Fc 수용체 (FcR) 결합 검정이 수행될 수 있다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 단지 Fc(RIII)만을 발현하고, 반면에 단핵구는 Fc(RI, Fc(RII 및 Fc(RIII)를 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 비제한적 예가 미국 특허 번호 5,500,362 (예를 들어, 문헌 [Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)] 및 Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985)] 참조); 5,821,337 (문헌 [Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)] 참조)에 기재되어 있다. 대안적으로, 비-방사성 검정 방법을 사용할 수 있다 (예를 들어, 유동 세포측정법을 위한 악티(ACTI)TM 비-방사성 세포독성 검정 (캘리포니아주 마운틴 뷰 소재의 셀테크놀로지, 인크.(CellTechnology, Inc.)); 및 사이토독스(CytoTox) 96 \oplus 비-방사성 세포독성 검정 (위스콘신주 매디슨 소재의 프로메가(Promega)) 참조). 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다. 또한, C1q 결합 검정을 수행하여, 항체가 C1q에 결합할 수 없고 따라서 CDC 활성이 결여되어 있음을 확인할 수 있다. 예를 들어, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402에서 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위해 CDC 검정을 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); 및 Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)] 참조). FcRn 결합 및 생체내 클리어런스/반감기 결정은 또한 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol.

18(12):1759-1769 (2006)] 참조).

- [0496] 감소된 이펙터 기능을 갖는 항체는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 1개 이상의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 6,737,056). 이러한 Fc 돌연변이체는 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2개 이상에서 치환을 갖는 Fc 돌연변이체 (잔기 265 및 297의 알라닌으로의 치환을 갖는, 소위 "DANA" Fc 돌연변이체 포함)를 포함한다 (미국 특허 번호 7,332,581).
- [0497] FcR에 대해 개선되거나 감소된 결합을 갖는 특정 항체 변이체가 기재되어 있다. (예를 들어, 미국 특허 번호 6,737,056; WO 2004/056312 및 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)] 참조.)
- [0498] 특정 실시양태에서, 항체 변이체는 ADCC를 개선시키는 1개 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334 (잔기의 EU 넘버링)에서 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 예시적인 실시양태에서, 항체는 그의 Fc 영역에 하기 아미노산 치환을 포함한다: S298A, E333A 및 K334A.
- [0499] 일부 실시양태에서, 예를 들어 미국 특허 번호 6,194,551, WO 99/51642 및 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]에 기재된 바와 같이, 변경된 (즉, 개선된 또는 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 나타내는 변경들이 Fc 영역에서 만들어진다.
- [0500] 증가된 반감기, 및 모체 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 개선된 결합을 갖는 항체 (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 및 Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994))가 US2005/0014934A1 (Hinton et al.)에 기재되어 있다. 이들 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 개선시키는 1개 이상의 치환을 그 내부에 갖는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434 중 1개 이상에서 치환, 예를 들어 Fc 영역 잔기 434의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 7,371,826). Fc 영역 변이체의 다른 예에 관하여 또한 문헌 [Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 WO 94/29351을 참조한다.
- [0501] (xii) 항체 유도체
- [0502] 본 발명의 항체는 관련 기술분야에 공지되고 용이하게 입수가 가능한 추가의 비단백질성 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체이다. 수용성 중합체의 비제한적 예는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 그의 혼합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드가 물에서의 안정성으로 인해 제조에 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착되는 중합체의 수는 달라질 수 있고, 1개 초과 중합체가 부착되는 경우에 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선시킬 항체의 특정한 특성 또는 기능, 항체 유도체가 요법에서 규정된 조건 하에 사용될 것인지 여부 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 고려사항을 기초로 하여 결정될 수 있다.
- [0503] (xiii) 벡터, 숙주 세포 및 재조합 방법
- [0504] 항체는 또한 재조합 방법을 사용하여 생산할 수 있다. 항-항원 항체의 재조합 생산을 위해, 항체를 코딩하는 핵산을 분리하고, 추가의 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위한 복제가능한 벡터 내로 삽입한다. 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 분리하고 서열분석할 수 있다. 다수의 벡터가 이용가능하다. 벡터 성분은 일반적으로 하기 중 1종 이상을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 1종 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열.
- [0505] (a) 신호 서열 성분
- [0506] 본 발명의 항체는 직접적으로뿐만 아니라 이중 폴리펩티드, 바람직하게는 신호 서열, 또는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드와의 융합 폴리펩티드로서 재조합적으로 생산될 수 있다. 바람직하게는, 선택된 이중 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식 및 프로세싱 (예를 들어, 신호 펩티다제에 의해 절단)되는 것이다. 천연 항체 신호 서열을 인식 및 프로세싱하지 못하는 원핵 숙주 세포의 경우에

는, 신호 서열을 예를 들어 알칼리성 포스포타제, 페니실리나제, lpp 또는 열-안정성 엔테로톡신 II 리더의 군 으로부터 선택된 원핵 신호 서열로 치환한다. 효모 분비의 경우에, 천연 신호 서열은 예를 들어 효모 인버타제 리더, 인자 리더 (사카로미세스(*Saccharomyces*) 및 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*) α -인자 리더 포함), 또는 산 포스포타제 리더, 씨. 알비칸스(*C. albicans*) 글루코아밀라제 리더, 또는 WO 90/13646에 기재된 신호에 의해 치환될 수 있다. 포유동물 세포 발현 시에는, 포유동물 신호 서열뿐만 아니라 바이러스 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호가 이용가능하다.

[0507] (b) 복제 기점

[0508] 발현 벡터 및 클로닝 벡터 둘 다는 벡터가 1종 이상의 선택된 숙주 세포 내에서 복제될 수 있게 하는 핵산 서열 을 함유한다. 일반적으로, 클로닝 벡터에서 상기 서열은 벡터가 숙주 염색체 DNA와 독립적으로 복제될 수 있게 하는 것이고, 복제 기점 또는 자율 복제 서열을 포함한다. 이러한 서열은 다양한 박테리아, 효모 및 바이러스 에 대해 널리 공지되어 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기점은 대부분의 그람-음성 박테리아에 적합하 고, 2 μ 플라스미드 기점은 효모에 적합하고, 다양한 바이러스 기점 (SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또 는 BPV)은 포유동물 세포에서의 클로닝 벡터에 유용하다. 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에 서는 필요하지 않다 (단지 SV40 기점이 초기 프로모터를 함유하기 때문에, 전형적으로 이것이 사용될 수 있음).

[0509] (c) 선택 유전자 성분

[0510] 발현 및 클로닝 벡터는 선택 마커라고도 불리는 선택 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토틱렉세이트 또는 테트라시클린에 대한 내성을 부 여하거나, (b) 영양요구성 결핍을 보완하거나, 또는 (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요 영양분을 공 급하는 단백질을 코딩하며, 예를 들어 바실루스의 경우에는 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자이다.

[0511] 선택 계획의 한 예는 숙주 세포의 성장을 정지시키는 약물을 이용한다. 이중 유전자로 성공적으로 형질전환된 이들 세포는 약물 내성을 부여하는 단백질을 생산하고, 따라서 선택 요법에서 생존한다. 이러한 우성 선택의 예는 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 히드로마이신을 사용한다.

[0512] 포유동물 세포를 위한 적합한 선택 마커의 또 다른 예는 항체-코딩 핵산을 취하는데 적절한 세포의 확인을 가능 하게 하는 마커, 예컨대 DHFR, 글루타민 신테타제 (GS), 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게 는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카르복실라제 등이다.

[0513] 예를 들어, DHFR 유전자로 형질전환시킨 세포는 형질전환체를 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토틱렉세이트 (Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 배양함으로써 확인한다. 이들 조건 하에서, DHFR 유전자를 임의의 다른 공동-형질전환 된 핵산과 함께 증폭시킨다. 내인성 DHFR 활성이 결핍된 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포주 (예를 들어, ATCC CRL-9096)를 사용할 수 있다.

[0514] 대안적으로, GS 유전자로 형질전환시킨 세포는 형질전환체를 GS의 억제제인 L-메티오닌 술폭시민 (Msx)을 함유 하는 배양 배지에서 배양함으로써 확인한다. 이들 조건 하에서, GS 유전자를 임의의 다른 공동-형질전환시킨 핵산과 함께 증폭시킨다. GS 선택/증폭 시스템을 상기 기재된 DHFR 선택/증폭 시스템과 조합하여 사용할 수 있 다.

[0515] 대안적으로, 관심 항체를 코딩하는 DNA 서열, 야생형 DHFR 유전자 및 또 다른 선택 마커, 예컨대 아미노글리코 시드 3'-포스포트랜스퍼라제 (APH)로 형질전환시키거나 공동-형질전환시킨 숙주 세포 (특히 내인성 DHFR을 함유 하는 야생형 숙주)는 선택 마커, 예컨대 아미노글리코시드계 항생제, 예를 들어 카나마이신, 네오마이신 또는 G418에 대한 선택제를 함유하는 배지에서의 세포 성장에 의해 선택될 수 있다. 미국 특허 번호 4,965,199를 참 조한다.

[0516] 효모에 사용하기 적합한 선택 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 trp1 유전자이다 (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979)). trp1 유전자는 트립토판에서 성장하는 능력이 결여된 효모의 돌연변이체 균주, 예를 들어 ATCC 번호 44076 또는 PEP4-1에 대한 선택 마커를 제공한다. 문헌 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)]. 이 어서, 효모 숙주 세포 계능 내의 trp1 병변의 존재는 트립토판의 부재 하의 성장에 의해 형질전환을 검출하는데 효과적인 환경을 제공한다. 유사하게, Leu2-결핍 효모 균주 (ATCC 20,622 또는 38,626)는 Leu2 유전자를 보유 하는 공지된 플라스미드에 의해 보완된다.

[0517] 추가로, 1.6 μ m 원형 플라스미드 pKD1로부터 유래된 벡터는 클루이베로미세스 효모의 형질전환에 사용될 수 있 다. 대안적으로, 재조합 소 키모신의 대규모 생산을 위한 발현 시스템으로 케이. 락티스(*K. lactis*)가 보고되

었다. 문헌 [Van den Berg, Bio/Technology, 8: 135 (1990)]. 클루이베로미세스의 산업적 균주에 의한 성숙 재조합 인간 혈청 알부민의 분비를 위한 안정한 다중-카피 발현 벡터가 또한 개시되었다. 문헌 [Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)].

(d) 프로모터 성분

발현 및 클로닝 벡터는 일반적으로, 숙주 유기체에 의해 인식되고 항체를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결되는 프로모터를 함유한다. 원핵 숙주에 사용하기 적합한 프로모터는 phoA 프로모터, β -락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 알칼리성 포스파타제 프로모터, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템 및 하이브리드 프로모터, 예컨대 tac 프로모터를 포함한다. 그러나, 다른 공지된 박테리아 프로모터도 적합하다. 박테리아 시스템에 사용하기 위한 프로모터는 또한, 항체를 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 샤인-달가노 (S.D.) 서열을 함유할 것이다.

진핵생물에 대한 프로모터 서열이 공지되어 있다. 실질적으로 모든 진핵 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30개 염기 상류에 위치하는 AT-풍부 영역을 갖는다. 다수의 유전자의 전사 출발점으로부터 70 내지 80개 염기 상류에서 발견되는 또 다른 서열은 CNCAAT 영역 (여기서 N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있음)이다. 코딩 서열의 3' 말단에 폴리 A 꼬리를 부가하기 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 대부분의 진핵 유전자의 3' 말단에 존재한다. 이들 모든 서열들이 진핵 발현 벡터 내로 적합하게 삽입된다.

효모 숙주에 사용하기 적합한 프로모터 서열의 예는 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 당분해 효소, 예컨대 엔올라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 헥소키나제, 피루베이트 데카르복실라제, 포스포프룩토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오스 포스페이트 이소머라제, 포스포글루코스 이소머라제 및 글루코키나제에 대한 프로모터를 포함한다.

성장 조건에 의해 제어되는 전사의 추가의 이점을 갖는 유도성 프로모터인 다른 효모 프로모터는 알콜 데히드로게나제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사과 연관된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 및 말토스 및 갈락토스 이용을 담당하는 효소에 대한 프로모터 영역이다. 효모 발현에 사용하기에 적합한 벡터 및 프로모터는 EP 73,657에 추가로 기재되어 있다. 또한, 효모 인헨서는 효모 프로모터와 함께 유리하게 사용된다.

포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터의 항체 전사는, 예를 들어 바이러스, 예컨대 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스 (예컨대 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 시토메갈로바이러스, 레트로바이러스, 간염-B 바이러스, 원숭이 바이러스 40 (SV40)의 게놈으로부터 수득한 프로모터에 의해, 또는 이중 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터, 열 쇼크 프로모터에 의해, 이러한 프로모터가 숙주 세포 시스템과 상용성인 한 제어될 수 있다.

SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스 복제 기점을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득된다. 인간 시토메갈로바이러스의 극초기 프로모터가 HindIII E 제한 단편으로 편리하게 수득된다. 소 유두종 바이러스를 벡터로 사용하여 포유동물 숙주에서 DNA를 발현시키기 위한 시스템이 미국 특허 번호 4,419,446에 개시되어 있다. 이러한 시스템의 변형이 미국 특허 번호 4,601,978에 기재되어 있다. 또한, 단순 헤르페스 바이러스로부터의 티미딘 키나제 프로모터의 제어 하에 마우스 세포에서 인간 β -인터페론 cDNA를 발현시키는 것에 대해서는 문헌 [Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982)]을 참조한다. 대안적으로, 라우스 육종 바이러스의 긴 말단 반복부를 프로모터로 사용할 수 있다.

(e) 인헨서 요소 성분

고등 진핵생물에 의해 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA를 전사하는 것은 종종, 인헨서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가된다. 다수의 인헨서 서열이 현재 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α -태아단백질 및 인슐린)로부터 공지되어 있다. 그러나, 전형적으로는 진핵 세포 바이러스로부터의 인헨서를 사용할 것이다. 예는 복제 기점의 하류 쪽 (bp 100-270)의 SV40 인헨서, 시토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 복제 기점의 하류 쪽의 폴리오마 인헨서 및 아데노바이러스 인헨서를 포함한다. 또한, 진핵 프로모터의 활성화를 위한 인헨서 요소에 대해 문헌 [Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)]을 참조한다. 인헨서는 항체-코딩 서열에 대해 위치 5' 또는 3'에서 벡터 내로 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 부위 5'에 위치한다.

(f) 전사 종결 성분

진핵 숙주 세포 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다세포 유기체로부터의 유핵 세포)에 사용되

는 발현 벡터는 또한 전사의 종결 및 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 함유할 것이다. 이러한 서열은 통상적으로 진행 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 영역으로부터 이용가능하다. 이들 영역은 항체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사된 뉴클레오타이드 절편을 함유한다. 유용한 전사 종결 성분 중 1종은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다. W094/11026 및 그에 개시된 발현 벡터를 참조한다.

[0529] (g) 숙주 세포의 선택 및 형질전환

[0530] 본원에서 벡터에 DNA를 클로닝하거나 발현시키기에 적합한 숙주 세포는 상기 기재된 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포이다. 이러한 목적에 적합한 원핵생물은 유박테리아, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어 엔테로박테리아세아에, 예컨대 에스케리키아(*Escherichia*), 예를 들어 이. 콜라이, 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예를 들어 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*), 예를 들어 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*) 및 시겔라(*Shigella*), 뿐만 아니라 바실루스, 예컨대 비. 서브틸리스(*B. subtilis*) 및 비. 리케니포르미스(*B. licheniformis*) (예를 들어, 1989년 4월 12일에 공개된 DD 266,710에 개시된 비. 리케니포르미스 41P), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 예컨대 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*) 및 스트렙토미세스(*Streptomyces*)를 포함한다. 한 바람직한 이. 콜라이 클로닝 숙주는 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446)이지만, 다른 균주, 예컨대 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 X1776 (ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 W3110 (ATCC 27,325)도 적합하다. 이들 예는 제한적이기보다는 예시적이다.

[0531] 전장 항체, 항체 융합 단백질 및 항체 단편은 박테리아에서, 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않을 때, 예컨대 치료 항체가 중앙 세포 파괴에 있어서 그 차제로 유효성을 나타내는 세포독성제 (예를 들어, 독소)에 접합될 때 생산될 수 있다. 전장 항체는 순환 반감기가 보다 길다. 이. 콜라이에서의 생산은 보다 신속하고 보다 비용 효율적이다. 박테리아에서의 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 대해서는, 예를 들어 발현 및 분비 최적화를 위한 번역 개시 영역 (TIR) 및 신호 서열이 기재되어 있는 미국 특허 번호 5,648,237 (Carter et al.), 미국 특허 번호 5,789,199 (Joly et al.), 미국 특허 번호 5,840,523 (Simmons et al.)을 참조한다. 또한, 이. 콜라이에서의 항체 단편의 발현을 기재하고 있는 문헌 [Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254]을 참조한다. 발현 후에, 항체는 이. 콜라이 세포 페이스트로부터 가용성 분획으로 단리될 수 있고, 예를 들어 이소형에 따라 단백질 A 또는 G 칼럼을 통해 정제될 수 있다. 최종 정제는, 예를 들어 CHO 세포에서 발현된 항체를 정제하는 방법과 유사하게 수행될 수 있다.

[0532] 원핵생물에 추가로, 진핵 미생물, 예컨대 사상 진균 또는 효모가 항체-코딩 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로미세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 통상적인 제빵 효모는 하등 진핵 숙주 미생물 중에서 가장 통상적으로 사용된다. 그러나, 다수의 다른 속, 종 및 균주가 본원에서 통상적으로 이용가능하고 유용하며, 예컨대 쉬조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로미세스 숙주, 예컨대 케이. 락티스, 케이. 프라길리스(*K. fragilis*) (ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045), 케이. 위케라미이(*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178), 케이. 왈티이(*K. waltii*) (ATCC 56,500), 케이. 드로소필라룸(*K. drosophilum*) (ATCC 36,906), 케이. 써모톨레란스(*K. thermotolerans*) 및 케이. 마르시아누스(*K. marxianus*); 야로위아(*Yarrowia*) (EP 402,226); 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) (EP 183,070); 칸디다(*Candida*); 트리코더마 레시아(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 슈완니오미세스(*Schwanniomyces*), 예컨대 슈완니오미세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 사상 진균, 예컨대 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*) 및 아스페르길루스(*Aspergillus*) 숙주, 예컨대 에이. 니들란스(*A. nidulans*) 및 에이. 니거(*A. niger*)가 있다. 치료 단백질을 생산하기 위한 효모 및 사상 진균의 사용에 관한 논의를 검토하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004)]을 참조한다.

[0533] 글리코실화 경로가 "인간화"됨으로써 부분 또는 완전 인간 글리코실화 패턴을 갖는 항체를 생산하는 특정 진균 및 효모 균주가 선택될 수 있다. 예를 들어 문헌 [Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)] (피키아 파스토리스에서의 글리코실화 경로의 인간화 기재); 및 상기 문헌 [Gerngross et al.]을 참조한다.

[0534] 글리코실화 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 수많은 바칼로바이러스 균주 및 변이체 및 숙주, 예컨대 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) (모충), 아에데스 아에집티(*Aedes aegypti*) (모기), 아

에데스 알보픽투스(*Aedes albopictus*) (모기), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*) (과실파리) 및 bombyx 모리(*Bombyx mori*)로부터의 상응하는 허용 곤충 숙주 세포가 확인되었다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주, 예를 들어 아우토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체, 및 bombyx 모리 NPV의 Bm-5 균주가 공중 이용가능하고, 이러한 바이러스는 특히 스포도프테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해 본 발명에 따라 본원의 바이러스로서 사용될 수 있다.

[0535] 목화, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토, 좀개구리밥 (렘나세아에(*Leninaceae*)), 알팔파 (엠. 트룬카툴라(*M. truncatula*)) 및 담배의 식물 세포 배양물을 또한 숙주로서 이용할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 및 6,417,429 (트랜스제닉 식물에서 항체를 생산하기 위한 플랜티바디스(PLANTIBODIES)TM 기술을 기재함)를 참조한다.

[0536] 척추동물 세포를 숙주로서 사용할 수 있고, 척추동물 세포를 배양하여 증식시키는 것 (조직 배양)이 상용 절차가 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (현탁 배양의 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간세포암 세포주 (Hep G2)이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포, 예를 들어 DHFR- CHO 세포 (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); 및 골수종 세포주, 예컨대 NS0 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해서는, 예를 들어 문헌 [Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 255-268]을 참조한다.

[0537] 숙주 세포는 항체 생산을 위해 상기 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환되고, 프로모터를 유도하거나 형질전환체를 선택하거나 또는 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형된 통상의 영양 배지에서 배양된다.

[0538] (h) 숙주 세포의 배양

[0539] 본 발명의 항체를 생산하는데 사용된 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 입수가 가능한 배지, 예컨대 햄(Ham)의 F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM, 시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 돌베코의 변형 이글 배지 (DMEM, 시그마)는 숙주 세포를 배양하는데 적합하다. 또한, [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985에 기재된 배지들 중 임의의 것을 숙주 세포에 대한 배양 배지로 사용할 수 있다. 임의의 이들 배지는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린, 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘, 및 포스페이트), 완충제 (예컨대 HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대 겐타마이신 (GENTAMYCIN)TM 약물), 미량 원소 (통상적으로 마이크로몰 범위로 최종 농축물에 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 및 글루코스 또는 등가의 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필요한 보충제가 또한 통상의 기술자에게 공지된 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 이전에 발현을 위해 선택된 숙주 세포에 사용된 것들이고, 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0540] (xiv) 항체의 정제

[0541] 재조합 기술을 사용하는 경우에, 항체는 세포내에서 생산되거나, 주변세포질 공간에서 생산되거나, 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포내에서 생산되는 경우에, 제1 단계로서 미립자 파편인 숙주 세포 또는 용해된 단편을, 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거한다. 문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]은 이. 콜라이의 주변세포질 공간으로 분비된 항체를 분리하는 절차를 기재한다. 간략하게, 세포 페이스트를 아세트산나트륨 (pH 3.5), EDTA 및 페닐메틸설포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재 하에 약 30분에 걸쳐 해동시킨다. 세포 파편을 원심분리에 의해 제거할 수 있다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우에, 일반적으로 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 상업적으로 입수가 가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘 (Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 유닛을 사용하여 먼저 농축시킨다. 프로테아제

억제제, 예컨대 PMSF는 단백질을 분해를 억제하기 위해 상기 단계 중 임의의 단계에 포함될 수 있고, 항생제는 우연한 오염물의 성장을 방지하기 위해 포함될 수 있다.

[0542] 세포로부터 제조된 항체 조성물은, 예를 들어 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있으며, 여기서 친화성 크로마토그래피가 전형적으로 바람직한 정제 단계 중 한 단계이다. 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소형에 따라 달라진다. 단백질 A는 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$ 또는 $\gamma 4$ 중쇄를 기반으로 하는 항체를 정제하는데 사용될 수 있다 (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 $\gamma 3$ 에 대해 권장된다 (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 제어형 세공 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스에 의해 달성될 수 있는 것보다 더 신속한 유량 및 더 짧은 가공 시간을 가능하게 한다. 항체가 $C_{\alpha 3}$ 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABXTM 수지 (제이. 티. 베이커(J. T. Baker), 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 회수될 항체에 따라 다른 단백질 정제 기술, 예컨대 이온-교환 칼럼 상에서의 분별증류, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스(SEPHAROSE)TM 상에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예컨대 폴리아스파르트산 칼럼) 상에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전이 또한 이용가능하다.

[0543] 일반적으로, 조사, 시험 및 임상에 사용하기 위한 항체를 제조하는 다양한 방법론이 관련 기술분야에 널리 확립되고 있고, 이는 상기 기재된 방법론과 일치하고/거나 특정한 관심 항체에 대해 통상의 기술자에게 인지되는 바와 같다.

[0544] C. 생물학적 활성 항체의 선택

[0545] 상기 기재된 바와 같이 생산된 항체는 치료 관점 또는 항체의 생물학적 활성을 보유하는 제제 또는 조건 선택에 있어서 유의한 특성을 갖는 항체를 선택하기 위해 1종 이상의 "생물학적 활성" 검정에 적용될 수 있다. 항체는 그를 생성하는 항원에 결합하는 능력에 대해 시험될 수 있다. 예를 들어, 관련 기술분야에 공지된 방법 (예컨대 ELISA, 웨스턴 블롯 등)이 사용될 수 있다.

[0546] 예를 들어, 항-PDL1 항체의 경우, 항체의 항원 결합 특성은 PDL1에 결합하는 능력을 검출하는 검정에서 평가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체의 결합은, 예를 들어 포화 결합; ELISA; 및/또는 경쟁 검정 (예를 들어 RIA)에 의해 결정될 수 있다. 또한, 항체는, 예를 들어 치료제로서의 그의 유효성을 평가하기 위해 다른 생물학적 활성 검정에 적용될 수 있다. 이러한 검정은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 항체에 대한 표적 항원 및 의도된 용도에 따라 달라진다. 예를 들어, 항체에 의한 PD-L1 차단 of 생물학적 효과는, 예를 들어 미국 특허 8,217,149에 기재된 바와 같이, CD8+ T 세포, 림프구성 맥락수막염 바이러스 (LCMV) 마우스 모델 및/또는 동계종양 모델에서 평가될 수 있다.

[0547] 관심 항원 상의 특정한 에피토프에 결합하는 항체 (예를 들어, 실시예의 항-PDL1 항체가 PD-L1에 결합하는 것을 차단하는 항체)를 스크리닝하기 위해, 문헌 [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 바와 같은 상용 교차-차단 검정을 수행할 수 있다. 대안적으로, 예를 들어 문헌 [Champe et al., J. Biol. Chem. 270:1388-1394 (1995)]에 기재된 바와 같은 에피토프 맵핑을 수행하여, 항체가 관심 에피토프에 결합하는지 여부를 결정할 수 있다.

[0548] 한 측면에서, 생물학적 활성을 갖는 항-OX40 항체를 확인하기 위한 검정이 제공된다. 생물학적 활성은, 예를 들어 OX40에 결합하는 것 (예를 들어, 인간 및/또는 시노물구스 OX40에 결합하는 것); OX40-매개 신호 전달을 증가시키는 것 (예를 들어, NFkB-매개 전사를 증가시키는 것); 인간 OX40을 발현하는 세포 (예를 들어, T 세포)를 고갈시키는 것; 예를 들어 이펙터 T 세포 증식을 증가시키고/거나 이펙터 T 세포에 의한 시토카인 생산 (예를 들어, 감마 인터페론)을 증가시킴으로써 T 이펙터 세포 기능 (예를 들어, CD4+ 이펙터 T 세포, CD8+ 이펙터 T 세포)을 증진시키는 것; 예를 들어 기억 T 세포 증식을 증가시키고/거나 기억 T 세포에 의한 시토카인 생산 (예를 들어, 감마 인터페론)을 증가시킴으로써 기억 T 세포 기능 (예를 들어, CD4+ 기억 T 세포)을 증진시키는 것; 조절 T 세포 기능을 억제하는 것 (예를 들어, 이펙터 T 세포 기능 (예를 들어, CD4+ 이펙터 T 세포 기능, CD8+ 이펙터 T 세포 기능)의 Treg 저해를 감소시킴으로써)을 포함할 수 있다. 생체내 및/또는 시험관내에서 이러한 생물학적 활성을 갖는 항체가 또한 제공된다.

[0549] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 이러한 생물학적 활성에 대해 시험된다.

- [0550] T 세포 공동자극은 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 검정될 수 있고, 예시적인 방법은 본원에 개시된다. 예를 들어, T 세포 (예를 들어, 기억 또는 이펙터 T 세포)를 말초 혈액구 (예를 들어, 피골 구배 원심분리를 사용하여 인간 전혈로부터 분리됨)로부터 수득할 수 있다. 기억 T 세포 (예를 들어, CD4+ 기억 T 세포) 또는 이펙터 T 세포 (예를 들어 CD4+ Teff 세포)는 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 PBMC로부터 분리할 수 있다. 예를 들어, 밀테니(Miltenyi) CD4+ 기억 T 세포 분리 키트 또는 밀테니 나이트 CD4+ T 세포 분리 키트를 사용할 수 있다. 분리된 T 세포를 항원 제시 세포 (CD32 및 CD80을 발현하는 조사된 L 세포)의 존재 하에 배양하고, OX40 효능제 항체의 존재 또는 부재 하에 항-CD3 항체의 첨가에 의해 활성화시킨다. T 세포 증식의 효능제 OX40 항체의 효과는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 측정할 수 있다. 예를 들어, 셀타이터 글로(CellTiter Glo) 키트 (프로메가)를 사용할 수 있고, 결과는 다중표지 판독기 (퍼킨 엘머(Perkin Elmer)) 상에서 판독한다. T 세포 기능에 대한 효능제 OX40 항체의 효과는 또한 T 세포에 의해 생산된 시토키인의 분석에 의해 결정할 수 있다. 한 실시양태에서, CD4+ T 세포에 의한 인터페론 감마의 생산은, 예를 들어 세포 배양 상청액 중 인터페론 감마의 측정에 의해 결정한다. 인터페론 감마를 측정하기 위한 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다.
- [0551] Treg 세포 기능은 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 검정될 수 있고, 예시적인 방법은 본원에 개시된다. 한 예에서, 이펙터 T 세포 증식을 저해하는 Treg의 능력을 검정한다. T 세포는 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 인간 전혈로부터 분리한다 (예를 들어, 기억 T 세포 또는 나이트 T 세포를 분리함으로써). 정제된 CD4+ 나이트 T 세포를 (예를 들어, CFSE로) 표지하고, 정제된 Treg 세포를 상이한 시약으로 표지한다. 조사된 항원 제시 세포 (예를 들어, CD32 및 CD80을 발현하는 L 세포)는 표지된 정제된 나이트 CD4+ T 세포 및 정제된 Treg와 함께 공동-배양한다. 공동-배양물은 항-CD3 항체를 사용하여 활성화시키고, 효능제 OX40 항체의 존재 또는 부재 하에 시험한다. 적합한 시간 (예를 들어, 6일의 공동배양) 후에, CD4+ 나이트 T 세포 증식의 수준을 FACS 분석을 사용하여 환원된 표지 염색 (예를 들어, 환원된 CFSE 표지 염색) 중 염료 희석에 의해 추적한다.
- [0552] OX40 신호전달은 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 검정될 수 있고, 예시적인 방법은 본원에 개시된다. 한 실시양태에서, 인간 OX40 및 리포터 유전자 (예를 들어, 베타 루시페라제)에 융합된 NFkB 프로모터를 포함하는 리포터 유전자를 발현하는 트랜스제닉 세포를 생성시킨다. 세포에의 OX40 효능제 항체의 첨가는 증가된 NFkB 전사를 유발하며, 이는 리포터 유전자에 대한 검정을 사용하여 검출한다.
- [0553] 식세포작용은, 예를 들어 단핵구-유래 대식세포 또는 U937 세포 (성숙 대식세포의 형태 및 특징을 갖는 인간 조직구성 림프종 세포주)를 사용하여 검정할 수 있다. OX40 발현 세포를 항-OX40 효능제 항체의 존재 또는 부재 하에 단핵구-유래 대식세포 또는 U937 세포에 첨가한다. 적합한 기간 동안 세포를 배양한 후에, 식세포작용의 백분율은, 1) 대식세포 또는 U937 세포 및 2) OX40 발현 세포의 마커에 대해 이중 염색된 세포의 백분율을 검사하고, 이것을 OX40 발현 세포의 마커 (예를 들어, GFP)를 나타내는 세포의 총수로 나눔으로써 결정한다. 분석은 유동 세포측정법에 의해 수행할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 분석은 형광 현미경검사 분석에 의해 수행할 수 있다.
- [0554] ADCC는, 예를 들어 관련 기술분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 검정될 수 있다. 예시적인 방법은 정의 섹션에서 기재되어 있고, 예시적인 검정은 실시예에 개시된다. 일부 실시양태에서, OX40의 수준은 ADCC 검정에서 시험하는데 사용된 OX40 발현 세포에 대해 특징화된다. 세포는 검출가능하게 표지된 항-OX40 항체 (예를 들어, PE 표지됨)로 염색할 수 있고, 이어서 형광의 수준을 유동 세포측정법을 사용하여 결정하고 결과를 중앙 형광강도 (MFI)로 제공한다. 또 다른 실시양태에서, ADCC를 셀타이터 글로 검정 키트에 의해 분석할 수 있고, 세포 생존율/세포독성을 화학발광에 의해 결정할 수 있다.
- [0555] FcγRIA, FcγRIIA, FcγRIIB, 및 FcγRIIIA의 2종의 동종이형 (F158 및 V158)에 대한 다양한 항체의 결합 친화도는 각각의 재조합체 Fcγ 수용체를 사용하여 ELISA-기반 리간드-결합 검정으로 측정할 수 있다. 정제된 인간 Fcγ 수용체는 C-말단에서 Gly/6xHis/글루타티온 S-트랜스퍼라제 (GST) 폴리펩티드 태그에 연결된 수용체 γ쇄의 세포의 도메인을 함유하는 융합 단백질로서 발현된다. 그러한 인간 Fcγ 수용체에 대한 항체의 결합 친화도는 하기와 같이 검정한다. 저-친화도 수용체, 즉 FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B) 및 FcγRIIIA (CD16)의 2종의 동종이형 F-158 및 V-158에 대해, 항체를 염소 항-인간 카파쇄의 F(ab')₂ 단편 (ICN 바이오메디칼 (Biomedical); 캘리포니아주 어바인)과 대략 1:3 몰비의 항체:가교 F(ab')₂로 가교시켜 다량체로서 시험할 수 있다. 플레이트를 항-GST 항체 (제넨테크)로 코팅하고 소 혈청 알부민 (BSA)으로 차단한다. ELx405™ 플레이트 세척기 (바이오텍 인스트루먼트(Biotek Instruments); 버몬트주 위누스키)를 사용하여 0.05% 트윈-20을 함유하는 포스페이트-완충 염수 (PBS)로 세척한 후에, Fcγ 수용체를 25 ng/웰로 플레이트에 첨가하고, 1시간 동안

실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척한 후에, 시험 항체의 연속 회석물을 다량체 복합체로서 첨가하고, 플레이트를 2시간 동안 실온에 인큐베이션하였다. 플레이트 세척으로 비결합 항체를 제거한 후에, Fc γ 수용체에 결합된 항체를 염소 항-인간 F(ab')₂의 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)-접합된 F(ab')₂ 단편 (잭슨 이뮤노리서치 래보러토리즈(Jackson ImmunoResearch Laboratories); 펜실베이니아주 웨스트 그로브)으로 검출하고, 이어서 기질 테트라메틸벤지딘 (TMB) (키르케가드 & 페리 래보러토리즈(Kirkegaard & Perry Laboratories); 메릴랜드주 게이더스버그)을 첨가하였다. 플레이트를 시험된 Fc γ 수용체에 따라 5-20분 동안 실온에서 인큐베이션하여 색이 발현되도록 하였다. 반응을 1 M H₃PO₄로 종결시키고, 450 nm에서의 흡광도를 마이크로플레이트 판독기 (스펙트라마кс(SpectraMax)®190, 몰레큘라 디바이시스(Molecular Devices); 캘리포니아주 서니베일)로 측정하였다. 용량-반응 결합 곡선은 항체의 농도에 대하여 이중 항체 회석물로부터의 평균 흡광도 값을 플롯팅함으로써 생성시킨다. Fc γ 수용체에 대한 결합으로부터의 최대 반응의 50%가 검출되는 항체의 유효 농도에 대한 값 (EC₅₀)은 소프트맥스 프로(SoftMax Pro) (몰레큘라 디바이시스)를 사용하여 4-파라미터 방정식에 의해 결합 곡선을 피팅한 후에 결정하였다.

[0556] 임의의 상기 시험관내 검정에 사용하기 위한 세포는 OX40을 자연적으로 발현하거나 또는 OX40을 발현하도록 조작된 세포 또는 세포주를 포함한다. 이러한 세포는 OX40을 자연적으로 발현하는 활성화된 T 세포, Treg 세포 및 활성화된 기억 T 세포를 포함한다. 이러한 세포는 또한 OX40을 발현하는 세포주 및 OX40을 정상적으로 발현하지는 않지만 OX40을 코딩하는 핵산으로 형질감염된 세포주를 포함한다. 임의의 상기 시험관내 검정에 사용하기 위한 본원에 제공된 예시적인 세포주는 인간 OX40을 발현하는 트랜스제닉 BT474 세포 (인간 유방암 세포주)를 포함한다.

[0557] 임의의 상기 검정이 항-OX40 항체 대신 또는 이것에 더하여 본 발명의 면역접합체를 사용하여 수행될 수 있는 것으로 이해된다.

[0558] 임의의 상기 검정이 항-OX40 항체 및 추가의 치료제 (예를 들어, PD-1 축 결합제 (예를 들어, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체))를 사용하여 수행될 수 있는 것으로 이해된다.

[0559] D. 제약 조성물 및 제제

[0560] PD-1 축 결합 길항제 및/또는 본원에 기재된 항체 (예컨대 항-PD-L1 항체 또는 항-인간 OX40 효능제 항체) 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물 및 제제가 또한 본원에 제공된다.

[0561] 본원에 기재된 바와 같은 제약 조성물 및 제제는 목적하는 정도의 순도를 갖는 활성 성분 (예컨대 항체 또는 폴리펩티드)을 1종 이상의 임의적인 제약상 허용되는 담체와 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 혼합하는 것에 의해 제조될 수 있다 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)). 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 일반적으로 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기 산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 핵사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카데콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함한 다른 탄수화물; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대-이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에서 예시적인 제약상 허용되는 담체는 간질성 약물 분산액 작용제, 예컨대 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질 (sHASEGP), 예를 들어 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예컨대 rHuPH20 (힐레넥스(HYLENEX)®, 백스터 인터내셔널, 인크.(Baxter International, Inc.))을 추가로 포함한다. rHuPH20을 포함한, 특성의 예시적인 sHASEGP 및 사용 방법은 미국 특허 공개 번호 2005/0260186 및 2006/0104968에 기재되어 있다. 한 측면에서, sHASEGP는 1개 이상의 추가의 글리코사미노글리카나제, 예컨대 콘드로이티나제와 조합된다.

[0562] 예시적인 동결건조 항체 제제는 미국 특허 번호 6,267,958에 기재되어 있다. 수성 항체 제제는 미국 특허 번호 6,171,586 및 W02006/044908에 기재된 것을 포함하고, 후자의 제제는 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다.

[0563] 본원의 조성물 및 제제는 또한 치료되는 특정한 적응증에의 필요에 따라 1종 초과 활성 성분, 바람직하게는 서로 유해한 영향을 미치지 않는 보완적 활성을 갖는 것을 함유할 수 있다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적에

유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.

- [0564] 활성 성분은 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로구체, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 내에, 또는 마크로에멀전 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.
- [0565] 지속-방출 제제가 제조될 수 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이러한 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 생체내 투여에 사용되는 제제는 일반적으로 멸균성이다. 멸균은 예를 들어 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다.
- [0566] IV. 치료 방법
- [0567] 개체에게 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)를 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 치료는 치료 중지 후에 개체에서 지속된 반응을 유발한다. 본원에 기재된 방법은 암의 치료를 위해 종양 면역원성을 증가시키는 것과 같이 증진된 면역원성이 요구되는 상태를 치료하는데 있어서 용도를 발견할 수 있다. 또한, 암을 갖는 개체에게 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)를 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체에서 면역 기능을 증진시키는 방법이 본원에 제공된다. 추가 측면에서, 감염 (예를 들어, 박테리아 또는 바이러스 또는 다른 병원체에 의한 것)을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 감염은 바이러스 및/또는 박테리아에 의한 것이다. 일부 실시양태에서, 감염은 병원체에 의한 것이다. 일부 실시양태에서, 감염은 급성 감염이다. 일부 실시양태에서, 감염은 만성 감염이다.
- [0568] 관련 기술분야에 공지되거나 하기 기재된 임의의 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제가 방법에 사용될 수 있다.
- [0569] 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.
- [0570] 일부 실시양태에서, 개체는 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)를 사용한 조합 치료 전에 OX40 결합 효능제 표적화 요법으로 치료되었다.
- [0571] 일부 실시양태에서, 개체는 1종 이상의 PD-1 축 길항제에 내성이 있는 (내성이 있는 것으로 입증된) 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, PD-1 축 길항제에 대한 내성은 암의 재발 또는 불응성 암을 포함한다. 재발은 치료 후에 원래 부위 또는 새로운 부위에서 암의 재출현을 지칭할 수 있다. 일부 실시양태에서, PD-1 축 길항제에 대한 내성은 PD-1 축 길항제를 사용한 치료 동안 암의 진행을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-1 축 길항제에 대한 내성은 치료에 반응하지 않는 암을 포함한다. 암은 치료 초기에 내성이 있을 수 있거나 또는 치료 동안 내성이 있게 될 수 있다. 일부 실시양태에서, 암은 초기 단계 또는 후기 단계이다.
- [0572] 또 다른 측면에서, 개체는 PD-L1 바이오마커를 발현하는 (예를 들어 진단 시험에서 발현하는 것으로 나타난) 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 환자의 암은 낮은 PD-L1 바이오마커를 발현한다. 일부 실시양태에서, 환자의 암은 높은 PD-L1 바이오마커를 발현한다. 임의의 방법, 검정 및/또는 키트의 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 샘플 중 0%로 포함되는 경우에 샘플에 부재한다.
- [0573] 임의의 방법, 검정 및/또는 키트의 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 샘플 중 0% 초과로 포함되는 경우에 샘플에 존재한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 샘플 중 적어도 1%에 존재한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 샘플 중 적어도 5%에 존재한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 샘플 중 적어도 10%에 존재한다.
- [0574] 임의의 방법, 검정 및/또는 키트의 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 FACS, 웨스턴 블롯, ELISA, 면역침전, 면역조직화학, 면역형광, 방사선면역검정, 도트 블롯팅, 면역검출 방법, HPLC, 표면 플라즈몬 공명, 광학 광분석법, 질량 분광측정법, HPLC, qPCR, RT-qPCR, 멀티플렉스 qPCR 또는 RT-qPCR, RNA-seq, 마이크로어레이 분석, SAGE, 매스어레이(MassARRAY) 기술 및 FISH, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법을 사용하여 샘플에서 검출된다.
- [0575] 임의의 방법, 검정 및/또는 키트의 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 단백질 발현에 의해 샘플에서 검출

된다. 일부 실시양태에서, 단백질 발현은 면역조직화학 (IHC)에 의해 결정된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 항-PD-L1 항체를 사용하여 검출된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 IHC에 의해 약한 염색 강도로 검출된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 IHC에 의해 중간 정도의 염색 강도로 검출된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 IHC에 의해 강한 염색 강도로 검출된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 중앙 세포, 중앙 침윤 면역 세포, 기질 세포 및 그의 임의의 조합 상에서 검출된다. 일부 실시양태에서, 염색은 막 염색, 세포질 염색 또는 그의 조합이다.

[0576] 임의의 방법, 검정 및/또는 키트의 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커의 부재는 샘플에 부재하거나 또는 염색되지 않는 것으로 검출된다. 임의의 방법, 검정 및/또는 키트의 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커의 존재는 샘플에서의 임의의 염색으로 검출된다.

[0577] 일부 실시양태에서, 본 발명의 조합 요법은 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)의 투여를 포함한다. PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법으로 투여될 수 있다. 예를 들어, PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제는 순차적으로 (상이한 시간에) 또는 공동으로 (동시에) 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항제는 OX40 결합 효능제와 별개의 조성물 중에 존재한다. 일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항제는 OX40 결합 효능제와 동일한 조성물 중에 존재한다.

[0578] PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)는 동일한 투여 경로에 의해 또는 상이한 투여 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항제는 정맥내로, 근육내로, 피하로, 국소로, 경구로, 경피로, 복강내로, 안와내로, 이식에 의해, 흡입에 의해, 척수강내로, 뇌실내로 또는 비강내로 투여된다. 일부 실시양태에서, OX40 결합 효능제는 정맥내로, 근육내로, 피하로, 국소로, 경구로, 경피로, 복강내로, 안와내로, 이식에 의해, 흡입에 의해, 척수강내로, 뇌실내로 또는 비강내로 투여된다. 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제는 질환의 예방 또는 치료를 위해 투여될 수 있다. PD-1 축 결합 길항제 및/또는 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)의 적절한 투여량은 치료될 질환의 유형, PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 개체의 임상 상태, 개체의 임상 병력 및 치료에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 기초하여 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체) 및 PD-1 축 결합 길항제 (예를 들어, 항-PD-1 또는 항-PDL1 항체)를 사용한 조합 치료는 상승작용적이고, 이에 의해 조합 중 OX40 결합제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)의 효과적인 용량은 단일 작용제로서의 OX40 결합제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)의 효과적인 용량에 비해 감소된다.

[0579] 일반적인 제한으로서, 인간에게 투여되는 항체의 치료 유효량은 1회 투여 또는 그 초과 투여이든지 환자 체중 kg당 약 0.01 내지 약 50 mg 범위일 것이다. 일부 실시양태에서, 사용된 항체는, 예를 들어 약 0.01 내지 약 45 mg/kg, 약 0.01 내지 약 40 mg/kg, 약 0.01 내지 약 35 mg/kg, 약 0.01 내지 약 30 mg/kg, 약 0.01 내지 약 25 mg/kg, 약 0.01 내지 약 20 mg/kg, 약 0.01 내지 약 15 mg/kg, 약 0.01 내지 약 10 mg/kg, 약 0.01 내지 약 5 mg/kg, 또는 약 0.01 내지 약 1 mg/kg 매일 투여된다. 일부 실시양태에서, 항체는 15 mg/kg로 투여된다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 항-PDL1 항체는 인간에게 21일 주기의 제1일에 약 100 mg, 약 200 mg, 약 300 mg, 약 400 mg, 약 500 mg, 약 600 mg, 약 700 mg, 약 800 mg, 약 900 mg, 약 1000 mg, 약 1100 mg, 약 1200 mg, 약 1300 mg 또는 약 1400 mg의 용량으로 투여된다. 용량은 단일 용량으로서 또는 다중 용량 (예를 들어, 2 또는 3회 용량)으로서 투여, 예컨대 주입될 수 있다. 조합 치료로 투여된 항체의 용량은 단일 치료와 비교하여 감소될 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0580] 일부 실시양태에서, 방법은 추가의 요법을 추가로 포함할 수 있다. 추가의 요법은 방사선 요법, 수술 (예를 들어, 종괴절제술 및 유방절제술), 화학요법, 유전자 요법, DNA 요법, 바이러스 요법, RNA 요법, 면역요법, 골수 이식, 나노요법, 모노클로날 항체 요법, 또는 상기의 조합일 수 있다. 추가의 요법은 아주반트 또는 네오아주반트 요법의 형태일 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 소분자 효소 억제제 또는 항전이제의 투여이다. 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 부작용 제한 작용제 (예를 들어, 치료의 부작용의 발생 및/또는 중증도를 경감시키고자 하는 작용제, 예컨대 항구토제 등)의 투여이다. 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 방사선 요법이다. 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 수술이다. 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 방사선 요법 및 수술의 조합이다. 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 감마선 조사이다. 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 PI3K/AKT/mTOR 경로를 표적화하는 요법, HSP90 억제제, 튜블린 억제제, 아포토시스 억제제 및/또는 화학예방제이다. 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 CTLA-4 (CD152로도 공지됨), 예를 들어 차단 항체, 이필리무맙 (MDX-

010, MDX-101 또는 예르보이(Yervoy)®로도 공지됨), 트레멜리무맵 (티실리무맵 또는 CP-675,206로도 공지됨), B7-H3 (CD276로도 공지됨)에 대해 지시된 길항제, 예를 들어 차단 항체, MGA271, TGF 베타에 대해 지시된 길항제, 예를 들어 메텔리무맵 (CAT-192로도 공지됨), 프레솔리무맵 (GC1008로도 공지됨) 또는 LY2157299, 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 T 세포 (예를 들어, 세포독성 T 세포 또는 CTL)의 입양 전달을 포함하는 치료, 양성-음성 TGF 베타 수용체, 예를 들어 양성-음성 TGF 베타 유형 II 수용체를 포함하는 T 세포의 입양 전달을 포함하는 치료, HERCREEM 프로토콜을 포함하는 치료 (예를 들어, [ClinicalTrials.gov Identifier NCT00889954] 참조), CD137 (TNFRSF9, 4-1BB 또는 ILA로도 공지됨)에 대해 지시된 효능제, 예를 들어 활성화 항체, 우렐루맵 (BMS-663513로도 공지됨), CD40에 대해 지시된 효능제, 예를 들어 활성화 항체, CP-870893, OX40 (CD134로도 공지됨)에 대해 지시된 효능제, 예를 들어 상이한 항-OX40 항체 (예를 들어, AgonOX)와 함께 투여되는 활성화 항체, CD27에 대해 지시된 효능제, 예를 들어 활성화 항체, CDX-1127, 인돌아민-2,3-디옥시게나제 (IDO), 1-메틸-D-트립토판 (1-D-MT로도 공지됨), 항체-약물 접합체 (일부 실시양태에서, 메르탄신 또는 모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE)를 포함함), 항-NaPi2b 항체-MMAE 접합체 (DNIB0600A 또는 RG7599로도 공지됨), 트라스투주맵 엠탄신 (T-DM1, 아도-트라스투주맵 엠탄신 또는 카르실라(KADCYLA)® (제넨테크)로도 공지됨), DMUC5754A, 엔도텔린 B 수용체 (EDNBR)를 표적화하는 항체-약물 접합체, 예를 들어 MMAE와 접합된 EDNBR에 대해 지시된 항체, 혈관신생 억제제, VEGF, 예를 들어 VEGF-A에 대해 지시된 항체, 베바시주맵 (아바스틴(AVASTIN)® (제넨테크)으로도 공지됨), 안지오펜이딘 2 (Ang2로도 공지됨)에 대해 지시된 항체, MEDI3617, 항신생물제, CSF-1R (M-CSFR 또는 CD115로도 공지됨)을 표적화하는 작용제, 항-CSF-1R (IMC-CS4로도 공지됨), 인터페론, 예를 들어 인터페론 알파 또는 인터페론 감마, 로페론-A, GM-CSF (재조합 인간 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자, rhu GM-CSF, 사르그라모스틴 또는 류킨(Leukine)®으로도 공지됨), IL-2 (알데스류킨 또는 프로류킨 (Proleukin)®으로도 공지됨), IL-12, CD20을 표적화하는 항체 (일부 실시양태에서, CD20을 표적화하는 항체는 오비누투주맵 (GA101 또는 가지바(Gazyva)®로도 공지됨) 또는 리톡시맵임), GTR을 표적화하는 항체 (일부 실시양태에서, GTR을 표적화하는 항체는 TRX518임), 이와 함께 암 백신 (일부 실시양태에서, 암 백신은 펩티드 암 백신이고, 이는 일부 실시양태에서 개별맞춤 펩티드 백신이고; 일부 실시양태에서 펩티드 암 백신은 다가 긴 펩티드, 다중-펩티드, 펩티드 콕테일, 하이브리드 펩티드 또는 펩티드-펄스 수지상 세포 백신임 (예를 들어, 문헌 [Yamada et al., Cancer Sci, 104:14-21, 2013] 참조), 이와 함께 아주반트, TLR 효능제, 예를 들어 폴리-ICLC (힐토놀(Hiltonol)®로도 공지됨), LPS, MPL, 또는 CpG ODN, 종양 괴사 인자 (TNF) 알파, IL-1, HMGB1, IL-10 길항제, IL-4 길항제, IL-13 길항제, HVEM 길항제, ICOS 효능제, 예를 들어 ICOS-L에 의한 투여 또는 ICOS에 대해 지시된 효능작용 항체, CX3CL1을 표적화하는 치료, CXCL10을 표적화하는 치료, CCL5를 표적화하는 치료, LFA-1 또는 ICAM1 효능제, 셀렉틴 효능제, 표적화 요법, B-Raf의 억제제, 베무라페닙 (젤보라프 (Zelboraf)®로도 공지됨), 다브라페닙 (타핀라(Tafinlar)®로도 공지됨), 에를로티닙 (타르세바(Tarceva)®로도 공지됨), MEK, 예컨대 MEK1 (MAP2K1로도 공지됨) 또는 MEK2 (MAP2K2로도 공지됨)의 억제제, 코비메티닙 (GDC-0973 또는 XL-518로도 공지됨), 트라메티닙 (메키니스트(Mekinist)®로도 공지됨), K-Ras의 억제제, c-Met의 억제제, 오나르투주맵 (MetMAB로도 공지됨), Alk의 억제제, AF802 (CH5424802 또는 알렉티닙으로도 공지됨), 포스포타티딘이노시톨 3-키나제 (PI3K)의 억제제, BKM120, 이텔라리십 (GS-1101 또는 CAL-101로도 공지됨), 페리포신 (KRX-0401로도 공지됨), Akt, MK2206, GSK690693, GDC-0941, mTOR의 억제제, 시롤리무스 (라파마이신으로도 공지됨), 템시롤리무스 (CCI-779 또는 토리셀(Torisel)®로도 공지됨), 에베롤리무스 (RAD001로도 공지됨), 리다포롤리무스 (AP-23573, MK-8669 또는 데포롤리무스로도 공지됨), OSI-027, AZD8055, INK128, 이중 PI3K/mTOR 억제제, XL765, GDC-0980, BEZ235 (NVP-BEZ235로도 공지됨), BGT226, GSK126458, PF-04691502, PF-05212384 (PKI-587로도 공지됨)이다. 추가의 요법은 본원에 기재된 화학요법제 중 1종 이상일 수 있다.

[0581] 본원에 기재된 임의의 방법 (예를 들어, 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제의 조합물을 투여하는 것을 포함하는 조합 치료)의 효능은 관련 기술분야에 공지된 다양한 모델, 예컨대 임상 또는 전임상 모델에서 시험될 수 있다. 적합한 전임상 모델은 본원에 예시되어 있으며, 추가로 비제한적으로 ID8 난소암, GEM 모델, B16 흑색종, RENCA 신세포암, CT26 결장직장암, MC38 결장직장암 및 암의 클라우드만(Cloudman) 흑색종 모델을 포함할 수 있다.

[0582] 본원에 기재된 임의의 방법 (예를 들어, 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제의 조합물을 투여하는 것을 포함하는 조합 치료)의 효능은 비제한적으로 비소세포 폐암, 췌장관 선암종 또는 흑색종의 GEM 모델을 포함한다, 종양을 발생시키는 GEM 모델에서 시험될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Jackson, E.L., et al. (2001) Genes Dev. 15(24):3243-8 (Kras^{G12D}의 설명) 및 Lee, C.L., et al. (2012) Dis. Model Mech. 5(3):397-402 (FRT-매개 p53^{null} 대립유전자)]에 기재된 바와 같이, 아데노바이러스 레콤비나제 치료 후에 p53^{null} 배경에서

Kras^{G12D}를 발현하는 마우스는 비소세포 폐암에 대한 전임상 모델로서 사용될 수 있다. 또 다른 예로서, 문헌 [Jackson, E.L., et al. (2001) Genes Dev. 15(24):3243-8 (Kras^{G12D}의 설명) 및 Aguirre, A.J., et al. (2003) Genes Dev. 17(24):3112-26 (p16/p19^{null} 대립유전자)]에 기재된 바와 같이, p16/p19^{null} 배경에서 Kras^{G12D}를 발현하는 마우스는 췌장관 선암종 (PDAC)에 대한 전임상 모델로서 사용될 수 있다. 추가의 예로서, 문헌 [Dankort, D., et al. (2007) Genes Dev. 21(4):379-84 (Braf^{V600E}의 설명) 및 Trotman, L.C., et al. (2003) PLoS Biol. 1(3):E59 (PTEN^{null} 대립유전자)]에 기재된 바와 같이, 유도성 (예를 들어, 4-OHT 처리) 레콤비나제 치료 후에 멜라닌세포-특이적 PTEN^{null} 배경에서 Braf^{V600E}를 발현하는 멜라닌세포를 갖는 마우스는 흑색종에 대한 전임상 모델로서 사용될 수 있다. 임의의 이들 예시적인 모델의 경우에, 종양을 발생시킨 후, 마우스는 조합 항-PDL1 및 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체) 치료 또는 대조군 치료를 받은 치료군 내로 무작위로 동원된다. 종양 크기 (예를 들어, 종양 부피)는 치료 과정 동안에 측정되고, 전체 생존율은 또한 모니터링된다.

[0583] 또 다른 측면에서, 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제의 조합물을 투여하는 것을 포함하는, 암을 갖는 개체에서 면역 기능을 증진시키는 방법이 본원에 제공된다.

[0584] 본 개시내용의 방법의 일부 실시양태에서, 암 (일부 실시양태에서, 진단 시험을 사용하여 검사된 바와 같은 환자의 암 샘플)은 T 세포 침윤의 상승된 수준을 갖는다. 본원에 사용된, 암의 T 세포 침윤은 암 조직 내의 또는 달리 암 조직과 연관된 T 세포, 예컨대 종양-침윤 림프구 (TIL)의 존재를 지칭할 수 있다. T 세포 침윤은 특정 암에서 개선된 임상 결과와 연관될 수 있는 것으로 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Zhang et al., N. Engl. J. Med. 348(3):203-213 (2003)] 참조).

[0585] 그러나, T 세포 소진은 또한 높은 수준의 억제 보조-수용체를 발현하고 이펙터 시토카인을 생산하는 능력은 결여되어 있는 많은 종양-침윤 림프구 (TIL)를 갖는 암의 주요 면역학적 특색이다, (Wherry, E.J. Nature immunology 12: 492-499 (2011); Rabinovich, G.A., et al., Annual review of immunology 25:267-296 (2007)). 본 개시내용의 방법의 일부 실시양태에서, 개체는 T 세포 기능이상적 장애를 갖는다. 본 개시내용의 방법의 일부 실시양태에서, T 세포 기능이상적 장애는 T 세포 무반응 또는 시토카인을 분비하거나 증식하거나 세포용해 활성을 실행하는 능력의 감소를 특징으로 한다. 본 개시내용의 방법의 일부 실시양태에서, T 세포 기능이상적 장애는 T 세포 소진을 특징으로 한다. 본 개시내용의 방법의 일부 실시양태에서, T 세포는 CD4+ 및 CD8+ T 세포이다. 이론에 얽매이는 것을 바라지는 않지만, OX40 결합 효능제 치료는 조합물의 투여 전에 비해 T 세포 (예를 들어, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 기억 T 세포) 프라이밍, 활성화 및/또는 증식을 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, T 세포는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포이다.

[0586] 본 개시내용의 방법의 일부 실시양태에서, 암 (일부 실시양태에서, 환자의 암 샘플은 진단 시험을 사용하여 검사됨)은 낮은 수준의 T 세포 침윤을 갖는다. 일부 실시양태에서, 암 (일부 실시양태에서, 환자의 암 샘플은 진단 시험을 사용하여 검사됨)은 검출가능한 T 세포 침윤을 갖지 않는다. 일부 실시양태에서, 암은 비-면역원성 암 (예를 들어, 비-면역원성 결합직장암 및/또는 난소암)이다. 이론에 얽매이는 것을 바라지는 않지만, OX40 결합 효능제 치료는 조합물의 투여 전에 비해 T 세포 (예를 들어, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 기억 T 세포) 프라이밍, 활성화 및/또는 증식을 증가시킬 수 있다.

[0587] 본 개시내용의 방법의 일부 실시양태에서, 개체에서의 활성화된 CD4 및/또는 CD8 T 세포는 조합물의 투여 전에 비해 γ -IFN⁺ 생산 CD4 및/또는 CD8 T 세포 및/또는 증진된 세포용해 활성을 특징으로 한다. γ -IFN⁺는, 예를 들어 세포 고정, 투과화 및 γ -IFN에 대한 항체를 사용한 염색을 수반하는 세포내 시토카인 염색 (ICS)을 포함한 관련 기술분야에 공지된 임의의 수단에 의해 측정될 수 있다. 세포용해 활성은 관련 기술분야에 공지된 임의의 수단에 의해, 예를 들어 혼합 이펙터 및 표적 세포를 사용한 세포 사멸 검정을 사용하여 측정될 수 있다.

[0588] 일부 실시양태에서, CD8+ T 세포는, 예를 들어 CD8b 발현의 존재를 특징으로 한다 (예를 들어, 예컨대 플루이다임을 사용하여 rtPCR에 의함) (Cd8b는 T-세포 표면 당단백질 CD8 베타 채; CD8 항원, 알파 폴리펩티드 p37로도 공지됨; 수탁 번호는 NM_172213임). 일부 실시양태에서, CD8+ T 세포는 말초 혈액으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, CD8+ T 세포는 종양으로부터의 것이다.

[0589] 일부 실시양태에서, Treg 세포는, 예를 들어 Foxp3 발현의 존재를 특징으로 한다 (예를 들어, 예컨대 플루이다임을 사용하여 rtPCR에 의함) (Foxp3은 포크헤드 박스 단백질 P3; 스쿠르핀; FOXP3delta7로도 공지됨;

면역결핍, 다발내분비병증, 장병증, X-연관; 수탁 번호는 NM_014009임). 일부 실시양태에서, Treg는 말초 혈액으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, Treg 세포는 종양으로부터의 것이다.

[0590] 일부 실시양태에서, 염증성 T 세포는, 예를 들어 Tbet 및/또는 CXCR3 발현의 존재를 특징으로 한다 (예를 들어, 예컨대 플루이다임을 사용하여 rtPCR에 의함). 일부 실시양태에서, 염증성 T 세포는 말초 혈액으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 염증성 T 세포는 종양으로부터의 것이다.

[0591] 본 개시내용의 방법의 일부 실시양태에서, CD4 및/또는 CD8 T 세포는 IFN- γ , TNF- α 및 인터류킨으로 이루어진 군으로부터 선택된 시토카인의 증가된 방출을 나타낸다. 시토카인 방출은 CD4 및/또는 CD8 T 세포를 함유하는 샘플에서 방출된 시토카인의 존재를 검출하기 위해 관련 기술분야에 공지된 임의의 수단에 의해, 예를 들어 웨스턴 블롯, ELISA 또는 면역조직화학 검정을 사용하여 측정될 수 있다.

[0592] 본 개시내용의 방법의 일부 실시양태에서, CD4 및/또는 CD8 T 세포는 이펙터 기억 T 세포이다. 본 개시내용의 방법의 일부 실시양태에서, CD4 및/또는 CD8 이펙터 기억 T 세포는 CD44^고 CD62L^저의 발현을 갖는 것을 특징으로 한다. CD44^고 CD62L^저의 발현은 관련 기술분야에 공지된 임의의 수단에 의해, 예를 들어 조직 (예를 들어, 암 조직)의 단세포 현탁액을 제조하고 CD44 및 CD62L에 대한 상업용 항체를 사용하여 표면 염색 및 유동 세포측정법을 수행함으로써 검출될 수 있다. 본 개시내용의 방법의 일부 실시양태에서, CD4 및/또는 CD8 이펙터 기억 T 세포는 CXCR3의 발현을 갖는 것을 특징으로 한다 (C-X-C 케모카인 수용체 유형 3; Mig 수용체; IP10 수용체; G 단백질-커플링된 수용체 9; 인터페론-유도성 단백질 10 수용체로도 공지됨; 수탁 번호 NM_001504). 일부 실시양태에서, CD4 및/또는 CD8 이펙터 기억 T 세포는 말초 혈액으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, CD4 및/또는 CD8 이펙터 기억 T 세포는 종양으로부터의 것이다.

[0593] 본 개시내용의 방법의 일부 실시양태에서, 개체에게 유효량의 인간 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제의 투여는 인간 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제의 투여 전에 비해 CD8 T 세포 상의 증가된 염증 마커 (예를 들어, CXCR3)를 특징으로 한다. CXCR3/CD8 T 세포는 관련 기술분야에 공지된 임의의 수단 및 실시예에 기재된 방법에 의해 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, CXCR3/CD8 T 세포는 말초 혈액으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, CXCR3/CD8 T 세포는 종양으로부터의 것이다.

[0594] 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, Treg 기능은 조합물의 투여 전에 비해 저해된다. 일부 실시양태에서, T 세포 소진은 조합물의 투여 전에 비해 감소된다.

[0595] 일부 실시양태에서, Treg의 수는 조합물의 투여 전에 비해 감소된다. 일부 실시양태에서, 혈장 인터페론 감마는 조합물의 투여 전에 비해 증가된다. Treg 수는, 예를 들어 CD4+Foxp3+ CD45+ 세포의 백분율을 결정함으로써 (예를 들어, FACS 분석에 의함) 평가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플 중 Treg의 절대 수가 결정된다. 일부 실시양태에서, Treg는 말초 혈액으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, Treg는 종양으로부터의 것이다.

[0596] 일부 실시양태에서, T 세포 프라이밍, 활성화 및/또는 증식은 조합물의 투여 전에 비해 증가된다. 일부 실시양태에서, T 세포는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, T 세포 증식은 Ki67+ CD8+ T 세포의 백분율을 결정함으로써 (예를 들어, FACS 분석에 의함) 검출된다. 일부 실시양태에서, T 세포 증식은 Ki67+ CD4+ T 세포의 백분율을 결정함으로써 (예를 들어, FACS 분석에 의함) 검출된다. 일부 실시양태에서, T 세포는 말초 혈액으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 종양으로부터의 것이다.

[0597] 관련 기술분야에 공지되거나 하기 기재된 임의의 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제가 본 개시내용의 방법에 사용될 수 있다.

[0598] VI. 검출 및 진단 방법

[0599] 일부 실시양태에서, 샘플은 PD-1 축 결합 길항제를 사용한 치료 전에 (일부 실시양태에서, 예를 들어 PD-1 축 결합 길항제와 조합하여 OX40 결합 효능제, 예를 들어 항-인간 OX40 효능제 항체를 사용한 치료 전에) 수득된다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 포르말린 고정 및 파라핀 포매된 것이거나, 보존된 것이거나, 신선한 것이거나 또는 동결된 것이다.

[0600] 일부 실시양태에서, 샘플은 전혈이다. 일부 실시양태에서, 전혈은 면역 세포, 순환 종양 세포 및 그의 임의의 조합을 포함한다.

[0601] 바이오마커 (예를 들어, PD-L1)의 존재 및/또는 발현 수준/양은 대사물, DNA, mRNA, cDNA, 단백질, 단백질 단편 및/또는 유전자 카피수를 포함하나 이에 제한되지는 않는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 기준에 기초하

여 정성적으로 및/또는 정량적으로 결정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제1 샘플에서 바이오마커의 존재 및/또는 발현 수준/양은 제2 샘플에서의 존재/부재 및/또는 발현 수준/양에 비해 증가 또는 상승된다. 특정 실시양태에서, 제1 샘플에서 바이오마커의 존재/부재 및/또는 발현 수준/양은 제2 샘플에서의 존재 및/또는 발현 수준/양에 비해 감소 또는 저하된다. 특정 실시양태에서, 제2 샘플은 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조군 샘플, 대조군 세포 또는 대조군 조직이다. 유전자의 존재/부재 및/또는 발현 수준/양을 결정하기 위한 추가의 개시내용이 본원에 기재된다.

[0602] 임의의 방법의 일부 실시양태에서, 상승된 발현은 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조군 샘플, 대조군 세포 또는 대조군 조직과 비교하여 표준 관련 기술분야 공지 방법, 예컨대 본원에 기재된 것에 의해 검출된 바이오마커 (예를 들어, 단백질 또는 핵산 (예를 들어, 유전자 또는 mRNA))의 수준에서의 약 임의의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과와 전반적 증가를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 상승된 발현은 샘플에서 바이오마커의 발현 수준/양의 증가를 지칭하며, 여기서 증가는 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조군 샘플, 대조군 세포 또는 대조군 조직에서의 각각의 바이오마커의 발현 수준/양의 적어도 약 임의의 1.5X, 1.75X, 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 25X, 50X, 75X 또는 100X이다. 일부 실시양태에서, 상승된 발현은 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조군 샘플, 대조군 세포, 대조군 조직 또는 내부 대조군 (예를 들어, 하우스키퍼 유전자)과 비교하여 약 1.5배, 약 1.75배, 약 2배, 약 2.25배, 약 2.5배, 약 2.75배, 약 3.0배 또는 약 3.25배 초과와 전반적 증가를 지칭한다.

[0603] 임의의 방법의 일부 실시양태에서, 감소된 발현은 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조군 샘플, 대조군 세포, 또는 대조군 조직과 비교하여 표준 관련 기술분야 공지 방법, 예컨대 본원에 기재된 것에 의해 검출된 바이오마커 (예를 들어, 단백질 또는 핵산 (예를 들어, 유전자 또는 mRNA))의 수준에서의 약 임의의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과와 전반적 감소를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 감소된 발현은 샘플에서 바이오마커의 발현 수준/양의 감소를 지칭하며, 여기서 감소는 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조군 샘플, 대조군 세포, 또는 대조군 조직에서의 각각의 바이오마커의 발현 수준/양의 적어도 약 임의의 0.9X, 0.8X, 0.7X, 0.6X, 0.5X, 0.4X, 0.3X, 0.2X, 0.1X, 0.05X 또는 0.01X이다.

[0604] 샘플 중 다양한 바이오마커의 존재 및/또는 발현 수준/양은 면역조직화학 ("IHC"), 웨스턴 블롯 분석, 면역침전, 분자 결합 검정, ELISA, ELIFA, 형광 활성화 세포 분류 ("FACS"), 매스어레이, 단백질체학, 정량적 혈액 기반 검정 (예를 들어, 혈청 ELISA), 생화학적 효소적 활성 검정, 계내 혼성화, 서던 분석, 노던 분석, 전체 게놈 서열분석, 폴리머라제 연쇄 반응 ("PCR") (정량적 실시간 PCR ("qRT-PCR") 포함) 및 다른 증폭 유형 검출 방법, 예를 들어 분지형 DNA, SISBA, TMA 등), RNA-Seq, FISH, 마이크로어레이 분석, 유전자 발현 프로파일링 및/또는 유전자 발현의 일련의 분석 ("SAGE") 뿐만 아니라 단백질, 유전자 및/또는 조직 어레이 분석에 의해 수행될 수 있는 매우 다양한 검정 중 어느 하나를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다수의 방법론에 의해 분석될 수 있으며, 이들 중 다수는 관련 기술분야에 공지되어 있고 통상의 기술자에 의해 이해된다. 유전자 및 유전자 산물의 상태를 평가하기 위한 전형적인 프로토콜은, 예를 들어 문헌 [Ausubel et al., eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, Units 2 (노던 블롯팅), 4 (서던 블롯팅), 15 (이뮤노블롯팅) 및 18 (PCR 분석)]에서 발견된다. 또한, 멀티플렉스화 면역검정, 예컨대 룰스 베이스드 메디슨(Rules Based Medicine) 또는 메조 스케일 디스커버리(Meso Scale Discovery) ("MSD")로부터 입수가 가능한 것이 사용될 수 있다.

[0605] 일부 실시양태에서, 바이오마커의 존재 및/또는 발현 수준/양은 (a) 샘플 (예컨대, 대상체 암 샘플)에 대해 유전자 발현 프로파일링, PCR (예컨대, rtPCR 또는 qRT-PCR), RNA-seq, 마이크로어레이 분석, SAGE, 매스어레이 기술 또는 FISH를 수행하는 것; 및 b) 샘플에서 바이오마커의 존재 및/또는 발현 수준/양을 결정하는 것을 포함하는 방법을 사용하여 결정된다. 일부 실시양태에서, 마이크로어레이 방법은 엄격한 조건 하에 상기 언급된 유전자를 코딩하는 핵산 분자에 혼성화할 수 있는 1종 이상의 핵산 분자를 갖거나 또는 상기 언급된 유전자에 의해 코딩되는 단백질 중 1종 이상에 결합할 수 있는 1종 이상의 폴리펩티드 (예컨대, 펩티드 또는 항체)를 갖는 마이크로어레이 칩의 사용을 포함한다. 한 실시양태에서, PCR 방법은 qRT-PCR이다. 한 실시양태에서, PCR 방법은 멀티플렉스-PCR이다. 일부 실시양태에서, 유전자 발현은 마이크로어레이에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 유전자 발현은 qRT-PCR에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 발현은 멀티플렉스-PCR에 의해 측정된다.

[0606] 세포에서 mRNA의 평가 방법은 널리 공지되어 있고, 예를 들어 상보적 DNA 프로브를 사용하는 혼성화 검정 (예컨대, 1종 이상의 유전자에 특이적인 표지된 리보프로브를 사용하는 계내 혼성화, 노던 블롯 및 관련 기술) 및 다양한 핵산 증폭 검정 (예컨대, 1종 이상의 유전자에 특이적인 상보적 프라이머를 사용하는 RT-PCR, 및 다른 증

폭 유형의 검출 방법, 예를 들어 분지형 DNA, SISBA, TMA 등)을 포함한다.

- [0607] 포유동물로부터의 샘플은 노던, 도트 블롯 또는 PCR 분석을 이용하여 mRNA에 대해 편리하게 검정될 수 있다. 또한, 이러한 방법은 생물학적 샘플에서 mRNA 수준의 결정 (예를 들어, "하우스키핑" 유전자, 예컨대 액틴 패밀 리 구성원의 비교 대조군 mRNA 서열의 수준을 동시에 검사함으로써 결정됨)을 허용하는 1개 이상의 단계를 포함 할 수 있다. 임의로, 증폭된 표적 cDNA의 서열을 결정할 수 있다.
- [0608] 임의적인 방법은 마이크로어레이 기술에 의해 조직 또는 세포 샘플 중 mRNA, 예컨대 표적 mRNA를 검사 또는 검 출하는 프로토콜을 포함한다. 핵산 마이크로어레이를 사용하여, 시험 및 대조군 조직 샘플로부터의 시험 및 대 조 mRNA 샘플을 역전사시키고, 표지하여 cDNA 프로브를 생성한다. 이어서, 프로브를 고체 지지체 상에 고정된 핵산 어레이에 혼성화시킨다. 어레이는 어레이의 각각의 구성원의 서열 및 위치를 알 수 있도록 구성된다. 예 를 들어, 그의 발현이 항혈관신생 요법의 증가된 또는 감소된 임상 이익과 상관되는 유전자의 선택물을 고체 지 지지체 상에 배열할 수 있다. 특정한 어레이 구성원과 표지된 표지의 혼성화는 프로브가 유래된 샘플이 그러한 유전자를 발현한다는 것을 나타낸다.
- [0609] 일부 실시양태에 따르면, 존재 및/또는 발현 수준/양은 상기 언급된 유전자의 단백질 발현 수준을 관찰함으로써 측정된다. 특정 실시양태에서, 방법은 본원에 기재된 바이오마커 (예를 들어, 항-PD-L1 항체)의 결합을 허용하 는 조건 하에 상기 바이오마커에 대한 항체와 생물학적 샘플을 접촉시키는 것, 및 항체와 바이오마커 사이에 복 합체가 형성되는지 여부를 검출하는 것을 포함한다. 이러한 방법은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다. 한 실시양태에서, 항체는 PD-L1 측 결합 길항제, 예를 들어 개체의 선택을 위한 바이오마커를 사용하는 요법에 적 격인 대상체를 선택하는데 사용된다.
- [0610] 특정 실시양태에서, 샘플 내의 바이오마커 단백질의 존재 및/또는 발현 수준/양은 IHC 및 염색 프로토콜을 이용 하여 조사된다. 조직 절편의 IHC 염색은 샘플 내의 단백질의 존재를 결정 또는 검출하는 신뢰할만한 방법인 것 으로 밝혀졌다. 임의의 방법, 검정 및/또는 키트의 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 PD-L1이다. 일부 실시양태에서, PD-L1은 면역조직화학에 의해 검출된다. 일부 실시양태에서, 개체로부터의 샘플에서의 PD-L1 바 이오마커의 상승된 발현은 상승된 단백질 발현이고, 추가 실시양태에서 IHC를 사용하여 결정된다. 한 실시양태 에서, 바이오마커의 발현 수준은 (a) 항체를 사용하여 샘플 (예컨대, 대상체 암 샘플)의 IHC 분석을 수행하는 것; 및 (b) 샘플에서 바이오마커의 발현 수준을 결정하는 것을 포함하는 방법을 사용하여 결정된다. 일부 실 시양태에서, IHC 염색 강도는 참조물과 비교하여 결정된다. 일부 실시양태에서, 참조물은 참조 값이다. 일부 실 시양태에서, 참조물은 참조 샘플 (예를 들어, 대조군 세포주 염색 샘플 또는 비-암성 환자로부터의 조직 샘플) 이다.
- [0611] IHC는 형태 염색 및/또는 형광 계내 혼성화와 같은 추가의 기술과 조합하여 수행할 수 있다. 2개의 일반적 IHC 방법; 즉 직접 및 간접 검정이 이용가능하다. 제1 검정에 따르면, 표적 항원에 대한 항체의 결합은 직접 결정 된다. 이러한 직접 검정은 추가의 항체 상호작용 없이도 가시화될 수 있는 표지된 시약, 예컨대 형광 태그 또 는 효소-표지된 1차 항체를 사용한다. 전형적인 간접 검정에서, 미접합 1차 항체가 항원에 결합한 후에, 표지 된 2차 항체가 1차 항체에 결합한다. 2차 항체가 효소적 표지에 접합된 경우에, 발색 또는 형광 기질을 첨가하 여 항원의 가시화를 제공한다. 여러 2차 항체가 1차 항체 상의 상이한 에피토프와 반응할 수 있기 때문에, 신 호 증폭이 발생한다.
- [0612] IHC에 사용되는 1차 및/또는 2차 항체는 전형적으로 검출가능한 모이어티로 표지될 것이다. 다수의 표지가 이 용가능하고, 이는 일반적으로 하기 카테고리 그룹화될 수 있다: (a) 방사성동위원소, 예컨대 ³⁵S, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H 및 ¹³¹I; (b) 콜로이드성 금 입자; (c) 희토류 킬레이트 (유로퓸 킬레이트), 텍사스 레드, 로다민, 플루오레세인, 단실, 리사민, 움벨리페론, 피코크리테린, 피코시아닌, 또는 상업적으로 입수가 가능한 형광단, 예 컨대 스펙트럼 오렌지7(SPECTRUM ORANGE7) 및 스펙트럼 그린7(SPECTRUM GREEN7) 및/또는 상기 중 어느 1종 이 상의 유도체를 포함하나 이에 제한되지는 않는 형광 표지; (d) 다양한 효소-기질 표지가 이용가능하고, 미국 특허 번호 4,275,149는 이들 중 일부의 개관을 제공한다. 효소 표지의 예는 루시페라제 (예를 들어, 반딧불이 루 시페라제 및 박테리아 루시페라제; 미국 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 말레이트 데히드로게나제, 우레아제, 퍼옥시다제, 예컨대 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRPO), 알칼리성 포스파타제, β-갈락 토시다제, 글루코야밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제 (예를 들어, 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제), 헤테로시클릭 옥시다제 (예컨대, 우리카제 및 크산틴 옥시다제), 락토퍼옥시다제, 마이크로퍼옥시다제 등을 포함한다.

- [0613] 효소-기질 조합물의 예는 예를 들어 기질로서 수소 퍼옥시다제와의 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRPO); 발색 기질로서 파라-니트로페닐 포스페이트와의 알칼리성 포스파타제 (AP); 및 발색 기질 (예를 들어, p-니트로페닐-β-D-갈락토시다제) 또는 형광 기질 (예를 들어, 4-메틸움벨리페릴-β-D-갈락토시다제)과의 β-D-갈락토시다제 (β-D-Gal)를 포함한다. 이들의 일반적 검토를 위해, 미국 특허 번호 4,275,149 및 4,318,980을 참조한다.
- [0614] 임의의 방법의 일부 실시양태에서, PD-L1은 항-PD-L1 진단 항체 (즉, 1차 항체)를 사용 하는 면역조직화학에 의해 검출된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 진단 항체는 인간 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 진단 항체는 비인간 항체이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 진단 항체는 래트, 마우스 또는 토끼 항체이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 진단 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 진단 항체는 직접 표지된다.
- [0615] 이에 따라 제조된 시료를 탑재하고 이에 커버슬립을 덮을 수 있다. 이어서, 예를 들어 현미경을 사용하여 슬라이드 평가를 수행하고, 관련 기술분야에 통상적으로 사용되는 염색 강도 기준을 이용할 수 있다. 한 실시양태에서, 종양으로부터의 세포 및/또는 조직을 IHC를 사용하여 검사하는 경우, 염색은 일반적으로 (샘플에 존재할 수 있는 기질 또는 주위 조직에 반대되는 것으로서) 종양 세포 및/또는 조직에서 결정 또는 평가되는 것으로 이해된다. 일부 실시양태에서, 종양으로부터의 세포 및/또는 조직을 IHC를 이용하여 조사하는 경우, 염색은 종양 침윤 면역 세포 (종양내 또는 종양주위 면역 세포 포함)에서의 결정 또는 평가를 포함하는 것으로 이해된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커의 존재는 하기 표 4에 기재된 바와 같이, IHC에 의해 >0%의 샘플, 적어도 1%의 샘플, 적어도 5%의 샘플 또는 적어도 10%의 샘플에서 검출된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커의 존재는 IHC에 의해 <5%의 세포에서 검출된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커의 존재는 IHC에 의해 <1%의 세포에서 검출된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커의 존재는 IHC에 의해 0%의 세포에서 검출된다.
- [0616] 임의의 방법, 검정 및/또는 키트의 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커의 존재는 IHC에 의해 임의의 강도의 PD-L1 염색으로 검출된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 IHC에 의해 약한 염색 강도로 검출된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 IHC에 의해 중간 정도의 염색 강도로 검출된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 IHC에 의해 강한 염색 강도로 검출된다.
- [0617] 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 종양 세포, 종양 침윤 면역 세포 및 그의 조합에서 IHC에 의해 검출된다.
- [0618] IHC에 사용하기에 적합한 항-PD-L1 항체는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 통상의 기술자는 추가의 적합한 항-PD-L1 항체가 예를 들어 본원에 개시된 IHC 프로토콜을 이용하여 항-PD-L1 항체와 비교함으로써 확인 및 특정화될 수 있음을 이해한다.
- [0619] 양성 조직 대조군은 태반 및 편도 조직 (강한 PD-L1 염색 강도); 재조합 인간 PD-L1로 형질감염된 HEK-293 세포 (약한, 중간 및 강한 강도의 다양한 정도의 PD-L1 염색 강도)를 사용하여 예시한다. 다음이 예시적인 PD-L1 IHC 기준을 위해 언급될 수 있다.

[0620] <표 4>

PD-L1 상태	염색 기준
음성	ANY 염색 강도에서의 0% 막 염색 또는 세포질 염색 또는 둘 다의 조합
양성	ANY 염색 강도에서의 >0% 막 염색 또는 세포질 염색 또는 둘 다의 조합
	ANY 염색 강도에서의 ≥1% 막 염색 또는 세포질 염색 또는 둘 다의 조합
	ANY 염색 강도에서의 ≥5% 막 염색 또는 세포질 염색 또는 둘 다의 조합
	ANY 염색 강도에서의 ≥10% 막 염색 또는 세포질 염색 또는 둘 다의 조합

- [0621]
- [0622] 일부 실시양태에서, PDL1 상태는 상기 표 4에 제공된 가이드라인에 따라 진단된다.
- [0623] 일부 실시양태에서, PD-L1 IHC 진단 평가를 위한 기준은 다음과 같이 제공된다:

[0624] <표 5>

PD-L1 진단 평가	IHC 점수
임의의 식별가능한 PD-L1 염색의 부재 또는 종양 연관 종양내 세포 및 인접 종양-주위 결합조직형성 기질에 의해 점유된 종양 면적의 <1%를 커버하는 종양 침윤 면역 세포에서 임의의 강도의 식별가능한 PD-L1 염색의 존재	IHC 0
종양 연관 종양내 세포 및 인접 종양-주위 결합조직형성 기질에 의해 점유된 종양 면적의 ≥1% 내지 <5%를 커버하는 종양 침윤 면역 세포에서 임의의 강도의 식별가능한 PD-L1 염색의 존재	IHC 1
종양 연관 종양내 세포 및 인접 종양-주위 결합조직형성 기질에 의해 점유된 종양 면적의 ≥5% 내지 <10%를 커버하는 종양 침윤 면역 세포에서 임의의 강도의 식별가능한 PD-L1 염색의 존재	IHC 2
종양 연관 종양내 세포 및 인접 종양-주위 결합조직형성 기질에 의해 점유된 종양 면적의 ≥10%를 커버하는 종양 침윤 면역 세포에서 임의의 강도의 식별가능한 PD-L1 염색의 존재	IHC 3

[0625]

[0626]

일부 실시양태에서, PDL1 상태는 상기 표 5에 제공된 가이드라인에 따라 진단된다. 일부 실시양태에서, IHC 0 및/또는 IHC 1의 점수를 갖는 샘플은 PDL1 바이오마커 음성으로 간주될 수 있다. 일부 실시양태에서, IHC 2 및/또는 IHC 3의 점수를 갖는 샘플은 PDL1 바이오마커 양성으로 간주될 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플은 IHC 0, IHC 0 및/또는 1, IHC 1, IHC 1 및/또는 2, IHC 2, IHC 2 및/또는 3, 또는 IHC 3으로 진단된다.

[0627]

일부 실시양태에서, PDL1 발현은 종양 또는 종양 샘플에서 평가된다. 본원에 사용된 종양 또는 종양 샘플은 종양 세포에 의해 점유된 종양 영역의 일부 또는 전부를 포괄할 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 또는 종양 샘플은 종양 연관된 종양내 세포 및/또는 종양 연관된 기질 (예를 들어, 인접 종양-주위 결합조직형성 기질)에 의해 점유된 종양 영역을 추가로 포괄할 수 있다. 종양 연관된 종양내 세포 및/또는 종양 연관된 기질은 주요 종양 덩이에 바로 근접하고/거나 이와 인접하는 면역 침윤물 영역 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 종양 침윤 면역 세포)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, PDL1 발현은 종양 세포에서 평가된다. 일부 실시양태에서, PDL1 발현은 상기 기재된 바와 같은 종양 영역 내의 면역 세포, 예컨대 종양 침윤 면역 세포에 대해 평가된다.

[0628]

대안적 방법에서, 샘플을 항체-바이오마커 복합체 형성에 충분한 조건 하에서 상기 바이오마커에 특이적인 항체와 접촉시킨 후에 상기 복합체를 검출할 수 있다. 바이오마커의 존재는 다수의 방법, 예컨대 혈장 및 혈청을 포함한 매우 다양한 조직 및 샘플을 검정하기 위한 웨스턴 블롯팅 및 ELISA 절차에 의해 검출할 수 있다. 이러한 검정 포맷을 사용한 광범위한 면역검정 기술이 이용가능하고, 예를 들어 미국 특허 번호 4,016,043, 4,424,279 및 4,018,653을 참조한다. 이들은 비-경쟁적 유형의 단일-부위 및 2-부위 또는 "샌드위치" 검정, 뿐만 아니라, 통상적인 경쟁적 결합 검정을 둘 다 포함한다. 또한, 이들 검정은 표적 바이오마커에 대한 표지된 항체의 직접 결합을 포함한다.

[0629]

조직 또는 세포 샘플에서 선택된 바이오마커의 존재 및/또는 발현 수준/양은 또한 기능 또는 활성-기반 검정에 의해 조사될 수 있다. 예를 들어, 바이오마커가 효소인 경우에, 관련 기술분야에 공지된 검정을 수행하여 조직 또는 세포 샘플에서 주어진 효소적 활성의 존재를 결정 또는 검출할 수 있다.

[0630]

특정 실시양태에서, 샘플은 검정된 바이오마커의 양의 차이 및 사용된 샘플의 품질의 가변성 둘 다, 및 검정 수행 사이의 가변성에 대해 정규화된다. 널리 공지되어 있는 하우스키핑 유전자를 포함한, 특정의 표준화 바이오마커의 발현을 검출하고 그를 도입함으로써 상기과 같은 정규화를 달성할 수 있다. 대안적으로, 정규화는 검정된 유전자 또는 그의 큰 하위세트 모두의 평균 또는 중앙 신호를 기반으로 할 수 있다 (전반적 정규화 접근법). 유전자마다, 대상체 종양 mRNA 또는 단백질의 측정된 정규화 양을 참조 세트에서 확인된 양과 비교한다. 각 대상체마다 시험된 종양당 각 mRNA 또는 단백질에 대해 정규화된 발현 수준은 참조 세트에서 측정된 발현 수준의 백분율로서 표현될 수 있다. 분석할 특정한 대상체 샘플에서 측정된 존재 및/또는 발현 수준/양은 이러한 범위 내의 일부 백분율수에 포함될 것이며, 이는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0631]

한 실시양태에서, 샘플은 임상 샘플이다. 또 다른 실시양태에서, 샘플은 진단 검정에 사용된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 원발성 또는 전이성 종양으로부터 획득된다. 조직 생검은 종양 조직의 대표적인 조각을 얻기

위해 종종 사용된다. 대안적으로, 종양 세포는 관심 종양 세포를 함유하는 것으로 공지되어 있거나 그렇게 여겨지는 조직 또는 유체의 형태로 간접적으로 수득될 수 있다. 예를 들어, 폐암 병변의 샘플은 절제, 기관지경 검사, 미세 바늘 흡인, 기관지 찰과술에 의해, 또는 객담, 흉막액 또는 혈액으로부터 수득될 수 있다. 유전자 또는 유전자 산물은 암 또는 종양 조직으로부터, 또는 다른 신체 샘플, 예컨대 소변, 객담, 혈청 또는 혈장으로부터 검출될 수 있다. 암성 샘플에서 표적 유전자 또는 유전자 산물의 검출에 대해 상기 논의된 것과 동일한 기술이 다른 신체 샘플에도 적용될 수 있다. 암 세포는 암 병변으로부터 벗겨져서 이러한 신체 샘플 중에 나타날 수 있다. 이러한 신체 샘플을 스크리닝함으로써 이들 암에 관한 간단한 조기 진단을 달성할 수 있다. 또한, 요법의 진행은 이러한 신체 샘플을 표적 유전자 또는 유전자 산물에 대해 시험함으로써 보다 용이하게 모니터링될 수 있다.

[0632] 특정 실시양태에서, 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조군 샘플, 대조군 세포 또는 대조군 조직은 단일 샘플 또는 시험 샘플이 수득되는 때보다 하나 이상의 다른 시점에 수득된 동일한 대상체 또는 개체로부터의 조합된 다중 샘플이다. 예를 들어, 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조군 샘플, 대조군 세포 또는 대조군 조직은 시험 샘플이 수득된 때보다 이른 시점에 동일한 대상체 또는 개체로부터 수득된다. 이러한 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조군 샘플, 대조군 세포 또는 대조군 조직은 참조 샘플이 암의 초기 진단 동안 수득되고 시험 샘플이 암이 전이성이 되었을 때 이후에 수득되는 경우에 유용해질 수 있다.

[0633] 특정 실시양태에서, 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조군 샘플, 대조군 세포 또는 대조군 조직은 대상체 또는 개체가 아닌 하나 이상의 건강한 개체로부터의 조합된 다중 샘플이다. 특정 실시양태에서, 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조군 샘플, 대조군 세포 또는 대조군 조직은 대상체 또는 개체가 아닌 질환 또는 장애 (예를 들어, 암)를 갖는 하나 이상의 개체로부터의 조합된 다중 샘플이다. 특정 실시양태에서, 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조군 샘플, 대조군 세포 또는 대조군 조직은 정상 조직으로부터 모은 RNA 샘플 또는 대상체 또는 개체가 아닌 하나 이상의 개체로부터 모은 혈장 또는 혈청 샘플이다. 특정 실시양태에서, 참조 샘플, 참조 세포, 참조 조직, 대조군 샘플, 대조군 세포 또는 대조군 조직은 종양 조직으로부터 모은 RNA 샘플 또는 대상체 또는 개체가 아닌 질환 또는 장애 (예를 들어, 암)를 갖는 하나 이상의 개체로부터 모은 혈장 또는 혈청 샘플이다.

[0634] 일부 실시양태에서, 샘플은 개체로부터 조직 샘플이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 종양 조직 샘플 (예를 들어, 생검 조직)이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 폐 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 신장 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 피부 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 췌장 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 위 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 방광 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 식도 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 중피 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 유방 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 갑상선 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 결장직장 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 두경부 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 골육종 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 전립선 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 난소 조직, HCC (간), 혈액 세포, 림프절 및/또는 골/골 골수 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 결장 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 자궁내막 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 뇌 조직 (예를 들어, 교모세포종, 신경모세포종 등)이다.

[0635] 일부 실시양태에서, 종양 조직 샘플 (용어 "종양 샘플"이 본원에서 상호교환가능하게 사용됨)은 종양 세포에 의해 점유된 종양 영역의 일부 또는 전부를 포괄할 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 또는 종양 샘플은 종양 연관된 종양내 세포 및/또는 종양 연관된 기질 (예를 들어, 인접 종양-주위 결합조직형성 기질)에 의해 점유된 종양 영역을 추가로 포괄할 수 있다. 종양 연관된 종양내 세포 및/또는 종양 연관된 기질은 주요 종양 덩이에 바로 근접하고/거나 이와 인접하는 면역 침윤물 영역 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 종양 침윤 면역 세포)을 포함할 수 있다.

[0636] 임의의 방법의 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 악성 암성 종양 (즉, 암)이다. 일부 실시양태에서, 종양 및/또는 암은 고형 종양 또는 비-고형 또는 연부 조직 종양이다. 연부 조직 종양의 예는 백혈병 (예를 들어, 만성 골수 백혈병, 급성 골수 백혈병, 성인 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수 백혈병, 성숙 B-세포 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 전림프구성 백혈병 또는 모발 상 세포 백혈병) 또는 림프종 (예를 들어, 비-호지킨 림프종, 피부 T-세포 림프종 또는 호지킨병)을 포함한다. 고형 종양은 혈액, 골수 또는 림프계 이외의 신체 조직의 임의의 암을 포함한다. 고형 종양은 상피 세포 기원의 종양 및 비-상피 세포 기원의 종양으로 추가로 나누어질 수 있다. 상피 세포 고형 종양의 예는 위장관, 결장, 결장직장 (예를 들어, 기저양 결장직장 암종), 유방, 전립선, 폐, 신장, 간, 췌장, 난소 (예를 들어, 자궁

내막양 난소 암종), 두경부, 구강, 위, 십이지장, 소장, 대장, 항문, 담낭, 음순, 비인두, 피부, 자궁, 남성 생식 기관, 비뇨 기관 (예를 들어, 요로상피 암종, 이행성 요로상피 암종, 이행 세포 암종), 방광 및 피부의 종양을 포함한다. 비-상피 기원의 고형 종양은 육종, 뇌 종양 및 골 종양을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폐암은 비-소세포 폐암 (NSCLC)이다. 일부 실시양태에서, 암은 2차 또는 3차 국부 진행성 또는 전이성 비소세포 폐암이다. 일부 실시양태에서, 암은 선암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 편평 세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 비소세포 폐암 (NSCLC), 교모세포종, 신경모세포종, 흑색종, 유방 암종 (예를 들어 삼중-음성 유방암), 위암, 결장직장암 (CRC) 또는 간세포성 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 원발성 종양이다. 일부 실시양태에서, 암은 임의의 상기 유형의 암으로부터 유래된 제2 부위에서의 전이성 종양이다.

[0637] 임의의 방법의 일부 실시양태에서, 암은 인간 이펙터 세포를 디스플레이한다 (예를 들어, 인간 이펙터 세포에 의해 침윤된다). 인간 이펙터 세포를 검출하기 위한 방법은, 예를 들어 IHC 사용을 포함하여, 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 암은 높은 수준의 인간 이펙터 세포를 발현한다. 일부 실시양태에서, 인간 이펙터 세포는 NK 세포, 대식세포, 단핵구 중 1종 이상이다. 일부 실시양태에서, 암은 본원에 기재된 임의의 암이다. 일부 실시양태에서, 암은 비소세포 폐암 (NSCLC), 교모세포종, 신경모세포종, 흑색종, 유방 암종 (예를 들어 삼중-음성 유방암), 위암, 결장직장암 (CRC) 또는 간세포성 암종이다.

[0638] 임의의 방법의 일부 실시양태에서, 암은 FcR을 발현하는 세포를 디스플레이한다 (예를 들어, FcR을 발현하는 세포에 의해 침윤된다). FcR을 검출하기 위한 방법은, 예를 들어 IHC 사용을 포함하여, 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 암은 FcR을 발현하는 세포를 높은 수준으로 발현한다. 일부 실시양태에서, FcR은 Fc γ R이다. 일부 실시양태에서, FcR은 활성화 Fc γ R이다. 일부 실시양태에서, 암은 비소세포 폐암 (NSCLC), 교모세포종, 신경모세포종, 흑색종, 유방 암종 (예를 들어 삼중-음성 유방암), 위암, 결장직장암 (CRC) 또는 간세포성 암종이다.

[0639] 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 FACS, 웨스턴 블롯, ELISA, 면역침전, 면역조직화학, 면역형광, 방사선 면역검정, 도트 블롯팅, 면역검출 방법, HPLC, 표면 플라즈몬 공명, 광학 광분석법, 질량 분광측정법, HPLC, qPCR, RT-qPCR, 멀티플렉스 qPCR 또는 RT-qPCR, RNA-seq, 마이크로어레이 분석, SAGE, 매스어레이 기술 및 FISH, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법을 사용하여 샘플에서 검출된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 FACS 분석을 사용하여 검출된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 바이오마커는 PD-L1이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 발현은 혈액 샘플에서 검출된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 발현은 혈액 샘플에서 순환 면역 세포 상에서 검출된다. 일부 실시양태에서, 순환 면역 세포는 CD3+/CD8+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 분석 전에, 면역 세포는 혈액 샘플로부터 단리된다. 세포 분류를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 이러한 세포 집단을 단리/풍부화하는데 적합한 임의의 방법이 이용될 수 있다. 일부 실시양태에서, PD-L1 발현은 PD-L1/PD-1 축 경로의 억제제, 예컨대 항-PD-L1 항체를 사용한 치료에 반응하는 개체로부터의 샘플에서 상승된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 발현은 혈액 샘플에서 순환 면역 세포, 예컨대 CD3+/CD8+ T 세포 상에서 상승된다.

[0640] 대상체로부터 수득된 백혈구를 포함하는 샘플 중 1종 이상의 마커 유전자, 단백질(들) (예를 들어, 시토카인, 예를 들어, 감마 인터페론) 및/또는 세포 조성물 (예를 들어, Treg의 백분율 및/또는 Treg의 절대 수; 예를 들어, CD8+ 이펙터 T 세포의 수)의 발현 수준을 측정하는 단계 - 여기서 대상체는 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)로 치료되었고, 여기서 1종 이상의 마커 유전자는 T 세포 마커 유전자 또는 기억 T 세포 마커 유전자 (예를 들어, T 이펙터 기억 세포의 마커)로부터 선택됨 -; 및 참조와 비교하여 대상체로부터 수득된 샘플 중 1종 이상의 마커 유전자, 단백질(들) 및/또는 세포 조성물의 발현 수준을 기반으로 약역학적 활성을 입증하는 것으로서 치료를 결정하는 단계 - 여기서 참조와 비교하여 1종 이상의 마커 유전자의 증가된 발현은 OX40 효능제 치료에 대한 약역학적 활성을 나타냄 - 에 의해 OX40 효능제 치료의 약역학적 활성을 모니터링하는 방법이 본원에 제공된다. 마커 유전자, 단백질 및/또는 세포 조성물의 발현 수준은 본원에 기재된 바와 같은 1종 이상의 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0641] 본원에 사용된 "약역학적 (PD) 활성"은 대상체에 대한 치료 (예를 들어, PD-1 축 길항제 치료와 조합된 OX40 효능제)의 효과를 지칭할 수 있다. PD 활성의 예는 1종 이상의 유전자의 발현 수준의 조정을 포함할 수 있다. 이론에 얽매이는 것을 바라지는 않지만, 예컨대 유전자 마커의 발현을 측정함으로써 PD 활성을 모니터링하는 것은 OX40 효능제 및 PD-1 축 길항제를 검사하는 임상 시험 동안 유리할 수 있다고 생각된다. PD 활성을 모니터링하는 것은, 예를 들어 치료에 대한 반응, 독성 등을 모니터링하는데 사용될 수 있다.

[0642] 일부 실시양태에서, 1종 이상의 마커 유전자, 단백질 및/또는 세포 조성물의 발현 수준은 치료 (예를 들어, PD-

1 축 결합 길항제와 조합된 OX40 효능제 치료)를 받지 않은 대상체로부터의 샘플을 포함할 수 있는 참조와 비교될 수 있다. 일부 실시양태에서, 참조는 치료 (예를 들어, PD-1 축 결합 길항제와 조합된 OX40 효능제 치료)를 받기 전 동일한 대상체로부터의 샘플을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 참조는 치료 (예를 들어, PD-1 축 길항제와 조합된 OX40 효능제 치료)를 받은 다른 대상체의 1종 이상의 샘플로부터의 참조 값을 포함할 수 있다. 예를 들어, 환자 집단은 치료될 수 있고, 1종 이상의 유전자의 발현 수준에 대한 평균, 평균값 또는 중앙값은 전체로서의 집단으로부터 생성될 수 있다. 공유되는 특징 (예를 들어, 동일한 암 유형 및/또는 병기, 또는 통상의 치료, 예컨대 PD-1 축 결합 길항제와 조합된 OX40 효능제에 대한 노출)을 갖는 암으로부터 수득된 샘플의 세트가 집단으로부터, 예컨대 임상 결과 연구와 함께 연구될 수 있다. 이러한 세트는 참조, 예를 들어 참조 번호를 유도하는데 사용될 수 있으며, 여기에 대상체의 샘플이 비교될 수 있다. 본원에 기재된 임의의 참조는 PD 활성을 모니터링하기 위한 참조로서 사용될 수 있다.

[0643] 대상체로부터 수득된 백혈구를 포함하는 샘플 중 말초 혈액 샘플 중 1종 이상의 마커 유전자, 단백질(들) (예를 들어, 시토카인, 예를 들어, 감마 인터페론) 및/또는 세포 조성물 (예를 들어, Treg의 백분율 및/또는 Treg의 절대 수; 예를 들어, CD8+ 이펙터 T 세포의 수)의 발현 수준을 측정하는 단계 - 여기서 대상체는 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)로 치료되었고, 여기서 1종 이상의 마커 유전자는 T 세포 마커 유전자 또는 기억 T 세포 마커 유전자 (예를 들어, T 이펙터 기억 세포의 마커)로부터 선택됨 -; 및 참조와 비교하여 대상체로부터 수득된 샘플 중 1종 이상의 마커 유전자, 단백질(들) 및/또는 세포 조성물의 발현 수준을 기반으로 하여 대상체를 치료에 대한 반응성 또는 비-반응성으로 분류하는 단계 - 여기서 참조와 비교하여 1종 이상의 마커 유전자의 증가된 발현은 OX40 효능제 치료에 대한 반응성 또는 반응성의 결여를 나타냄 - 에 의해 OX40 효능제 치료에 대한 대상체의 반응성을 모니터링하는 방법이 본원에 제공된다. 마커 유전자, 단백질 및/또는 세포 조성물의 발현 수준은 본원에 기재된 바와 같은 1종 이상의 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0644] 일부 실시양태에서, 반응성을 모니터링하기 위한 참조는 치료 (예를 들어, PD-1 축 결합 길항제와 조합된 OX40 효능제 치료)를 받지 않은 대상체로부터의 샘플을 포함할 수 있는 참조와 비교될 수 있다. 일부 실시양태에서, 반응성을 모니터링하기 위한 참조는 치료 (예를 들어, PD-1 축 결합 길항제와 조합된 OX40 효능제 치료)를 받기 전 동일한 대상체로부터의 샘플을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 반응성을 모니터링하기 위한 참조는 치료 (예를 들어, PD-1 축 결합 길항제와 조합된 OX40 효능제 치료)를 받은 다른 환자의 1종 이상의 샘플로부터의 참조 값을 포함할 수 있다. 예를 들어, 환자 집단은 치료될 수 있고, 1종 이상의 유전자의 발현 수준에 대한 평균, 평균값 또는 중앙값은 전체로서의 집단으로부터 생성될 수 있다. 공유되는 특징 (예를 들어, 동일한 암 유형 및/또는 병기, 또는 통상의 치료, 예컨대 OX40 효능제에 대한 노출)을 갖는 암으로부터 수득된 샘플의 세트가 집단으로부터, 예컨대 임상 결과 연구와 함께 연구될 수 있다. 이러한 세트는 참조, 예를 들어 참조 번호를 유도하는데 사용될 수 있으며, 여기에 대상체의 샘플이 비교될 수 있다. 본원에 기재된 임의의 참조는 PD 활성을 모니터링하기 위한 참조로서 사용될 수 있다.

[0645] 본 개시내용의 특정 측면은 샘플에서 1종 이상의 유전자 또는 1종 이상의 단백질의 발현 수준의 측정에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 백혈구를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플은 말초 혈액 샘플 (예를 들어, 종양을 갖는 환자로부터의 것)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플은 종양 샘플이다. 종양 샘플은 암 세포, 림프구, 백혈구, 기질, 혈관, 결합 조직, 기저판 및 종양과 연관된 임의의 다른 세포 유형을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플은 종양-침윤 백혈구를 함유하는 종양 조직 샘플이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 1종 이상의 세포 유형 (예를 들어, 백혈구)을 분리하거나 단리하도록 처리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플은 세포 유형을 분리하거나 단리하는 것 없이 사용될 수 있다.

[0646] 종양 샘플은 비제한적으로 생검, 내시경검사 또는 외과적 절차를 포함한 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 대상체로부터 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 샘플은 방법, 예컨대 동결, 고정 (예를 들어, 포르말린 또는 유사한 고정제를 사용함으로써) 및/또는 파라인 왁스에의 포매에 의해 제조될 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 샘플은 절편화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 신선한 종양 샘플 (즉, 상기 기재된 방법에 의해 제조되지 않은 것)이 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 샘플은 mRNA 및/또는 단백질 완전성을 보존하기 위해 용액 중에서의 인큐베이션에 의해 제조될 수 있다.

[0647] 일부 실시양태에서, 샘플은 말초 혈액 샘플일 수 있다. 말초 혈액 샘플은 백혈구, PBMC 등을 포함할 수 있다. 말초 혈액 샘플로부터 백혈구를 단리하기 위해 관련 기술분야에 공지된 임의의 기술이 사용될 수 있다. 예를 들어, 혈액 샘플을 뽑아낼 수 있고, 적혈구를 용해시킬 수 있고, 백혈구 펠릿을 단리하여 샘플에 사용할 수 있다. 또 다른 예에서, 밀도 구배 분리가 적혈구로부터 백혈구 (예를 들어, PBMC)를 분리하는데 사용될 수 있다.

일부 실시양태에서, 신선한 말초 혈액 샘플 (즉, 상기 기재된 방법에 의해 제조되지 않은 것)이 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 말초 혈액 샘플은 mRNA 및/또는 단백질 완전성을 보존하기 위해 용액 중에서의 인큐베이션에 의해 제조될 수 있다.

[0648] 일부 실시양태에서, 반응성은 다음 중 어느 1종 이상을 지칭할 수 있다: 생존 (전체 생존 및 무진행 생존 포함) 연장; 객관적 반응 (완전 반응 또는 부분 반응 포함) 생성; 또는 암의 징후 또는 증상의 개선. 일부 실시양태에서, 반응성은 암 환자에서 종양의 상태, 즉 반응하는지, 안정화되는지 또는 진행하는지를 결정하기 위한 공개된 RECIST 가이드라인 세트에 따른 1종 이상의 인자의 개선을 지칭할 수 있다. 이들 가이드라인의 보다 상세한 논의에 대해서는, 문헌 [Eisenhauer et al., Eur J Cancer 2009;45: 228-47; Topalian et al., N Engl J Med 2012;366:2443-54; Wolchok et al., Clin Can Res 2009;15:7412-20; 및 Therasse, P., et al. J. Natl. Cancer Inst. 92:205-16 (2000)]을 참조한다. 반응성 대상체는 그의 암(들)이, 예를 들어 RECIST 기준을 기반으로 한 1종 이상의 인자에 따른 개선을 보이는 대상체를 지칭할 수 있다. 비-반응성 대상체는 그의 암(들)이, 예를 들어, RECIST 기준을 기반으로 한 1종 이상의 인자에 따른 개선을 보이지 않는 대상체를 지칭할 수 있다.

[0649] 통상적인 반응 기준은 새로운 병변의 출현을 포함한 초기 분명한 방사선학적 진행이 선행될 수 있는 지연된 반응을 생성할 수 있는 면역요법제의 항종양 활성을 특징화하는데 적합하지 않을 수 있다. 따라서, 새로운 병변의 가능한 출현을 설명하고 방사선학적 진행이 후속 평가에서 확증되도록 하는 변형된 반응 기준이 개발되었다. 따라서, 일부 실시양태에서, 반응성은 면역-관련 반응 기준 2 (irRC)에 따른 1종 이상의 인자의 개선을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Wolchok et al., Clin Can Res 2009;15:7412 - 20]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 새로운 병변은 정의된 종양 부담에 추가되고, 예를 들어 후속 평가에서의 방사선학적 진행이 이어진다. 일부 실시양태에서, 비-표적 병변의 존재는 완전 반응의 평가에 포함되고 방사선학적 진행의 평가에는 포함되지 않는다. 일부 실시양태에서, 방사선학적 진행은 단지 측정가능한 질환을 기초로 하여 결정될 수 있고/거나 처음 문서화된 날로부터 ≥ 4 주 연속적 평가에 의해 확증될 수 있다.

[0650] 일부 실시양태에서, 반응성은 면역 활성화를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 반응성은 치료 효능을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 반응성은 면역 활성화 및 치료 효능을 포함할 수 있다.

[0651] V. 제조 물품 또는 키트

[0652] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항제 및/또는 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)를 포함하는 제조 물품 또는 키트가 제공된다. 일부 실시양태에서, 제조 물품 또는 키트는 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위해 또는 암을 갖는 개체의 면역 기능을 증진시키기 위해 OX40 결합 효능제와 함께 PD-1 축 결합 길항제 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 임의의 PD-1 축 결합 길항제 및/또는 OX40 결합 효능제가 제조 물품 또는 키트에 포함될 수 있다.

[0653] 일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)는 동일한 용기 또는 별개의 용기 내에 존재한다. 적합한 용기는, 예를 들어 병, 바이알, 팩 및 시린지를 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리, 플라스틱 (예컨대 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리에틸렌) 또는 금속 합금 (예컨대 스테인레스 스틸 또는 하스텔로이)으로부터 형성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 용기는 제제를 수용하고, 용기 상의 또는 용기에 회합된 라벨은 사용 지침을 나타낼 수 있다. 제조 물품은 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질, 예컨대 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 시린지, 및 사용 지침서가 있는 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제조 물품은 1종 이상의 또 다른 작용제 (예를 들어, 화학요법제 및 항신생물제)를 추가로 포함한다. 1종 이상의 작용제를 위한 적합한 용기는, 예를 들어 병, 바이알, 팩 및 시린지를 포함한다.

[0654] 본 명세서는 통상의 기술자가 본 발명을 실시할 수 있도록 하기에 충분한 것으로 간주된다. 본원에 제시되고 기재된 것들 이외에도 본 발명의 다양한 변형이 상기 기재내용으로부터 통상의 기술자에게 명백해질 것이고, 이는 첨부된 청구범위의 범주 내에 속할 것이다. 본원에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0655] 실시예

[0656] 본 발명은 하기 실시예를 참조하여 충분히 이해될 것이다. 그러나, 이들 실시예가 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 본원에 기재된 실시예 및 실시양태는 단지 예시적 목적을 위한 것이며, 이에 비추어 다양한 변형 또는 변화가 통상의 기술자에게 제안될 것이고, 본원의 취지 및 범위, 및 첨부된 청구범위의

범주 내에 포함되어야 하는 것으로 이해된다.

[0657]

물질 및 방법

[0658]

생체내 종양 모델: CT26 및 MC38 결장직장 세포주는 제넨테크에서 유지되었다. CT26 연구를 위해, 8-10주령 암컷 Balb/c 마우스 (찰스 리버 래보러토리즈(Charles River Laboratories); 캘리포니아주 홀리스트어)에 0.1백만 개의 CT26 세포를 우편측 옆구리에 피하로 접종하였다. MC38 연구를 위해, 8-10주령 암컷 C57BL/6 마우스 (찰스 리버 래보러토리즈)에 0.1백만개의 MC38 세포를 우편측 옆구리에 피하로 접종하였다. 종양이 대략 150mm³의 평균 종양 부피에 이르렀을 때, 마우스를 동원하여 치료군 내로 무작위화하고, 항체 치료를 제1일 다음 날 시작하였다. 모든 동물 연구는 동물 복지법 및 실험 동물의 관리 및 사용에 대한 가이드 및 IACUC 가이드라인에 기재된 가이드라인 및 규제에 따라 수행하였다. 치료군은 하기와 같았다: 1) 대조군 항체, 10 mg/kg IV 제1 용량, 이어서 5mg/kg IP, BIWx2, n=5; 2) 무린 항-마우스 OX40 효능제 모노클로날 항체 (OX86 항체로부터 유래된 래트 항-마우스 OX40 가변 영역 및 마우스 IgG2a Fc를 갖는 키메라 항체. 이에 따라 이러한 무린 항체는 비제한적으로 ADCC를 포함한 이펙터 기능이 가능함), 0.1 mg/kg IV 제1 용량, 이어서 IP, TIWx2, n=5; 3) 무린 항-PD-L1, 10 mg/kg IV 제1 용량, 이어서 5 mg/kg IP, TIWx2, n=5; 및 4) 무린 항-마우스 OX40 효능제 모노클로날 항체, 0.1 mg/kg IV 제1 용량, 이어서 IP, TIWx2 및 무린 항-PD-L1, 10 mg/kg IV 제1 용량, 이어서 5 mg/kg IP TIWx2, n=5. 마우스를 희생시키고, 말초 혈액을 제1 용량 후 제9일에 수거하였다.

[0659]

항체: 모든 치료 항체는 제넨테크에서 생성되었다. 대조군 항체는 항-gp120 마우스 IgG1, 클론 10E7.1D2였다. 항-OX40 항체는 클론 OX-86 마우스-IgG2a (무린 IgG2a 백본 상에 래트 항-마우스 OX40 효능제 항체 OX-86을 클로닝함으로써 생성됨)였고, 항-PDL1은 클론 6E11.1.9 마우스 IgG1였다. 투여 스케줄은 도면 범례 상에 나타나 있으며, 제1또는 단일 용량은 정맥내로 (IV) 투여되고 후속 용량은 복강내로 (IP) 제공된다. 항체를 PBS 또는 20mM 히스티딘 아세테이트, 240 mM 수크로스, 0.02 % 폴리소르베이트 20 (pH 5.5) 중에 희석하였다. TIW는 1주 3회 투여를 나타내고, BIW는 1주 2회 투여를 나타낸다.

[0660]

종양 프로세싱 및 유동 세포측정법: 종양을 수거하고, C-튜브 (밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec); 캘리포니아주 샌디에고)에서 요동 플랫폼 상에서 37℃에서 15분 동안 5% 소 태아 혈청 + 0.25mg/ml의 콜라게나제 D (로슈(Roche); 인디애나주 인디애나폴리스) 및 0.1 mg/ml의 DNase I (로슈)을 갖는 RPMI-1640 배지에서 소화시키기 전에 면도날로 분쇄하였다. 인큐베이션 후에, 종양을 찬틀MACS (밀테니 바이오텍) 상에서 프로세싱하고, 여과하고, 세척하여 단세포 현탁액을 생성시켰다. 세포를 Vi-세포 계수기 (벤크만 쿨터(Beckman Coulter); 캘리포니아주 브레아)에서 계수하였다.

[0661]

말초 혈액을 유동 세포측정법에 의해 T 세포의 활성화 및 증식에 대해 평가하였다. 50 uL 혈액을 CD45, CD3, CD4, CD8, CXCR3에 대한 상업용 항체 (모두 BD 바이오사이언시스(BD Biosciences)) 및 Ki67에 대한 상업용 항체 (이바이오사이언시스(eBiosciences))를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 염색하였다. 세포를 먼저 얼음 상에서 30분 동안 PBS 중 라이브/데드 근적외선 생존 염료 (라이프 테크놀로지스(Life Technologies); 뉴욕주 그랜드 아일랜드)로 염색한 다음, 세척하였다. 이어서, 세포를 PBS + 0.5% BSA + 2mM EDTA 완충제 중 얼음 상에서 30분 동안 후속 표면 염색 전에 정제된 항-CD16/-CD32 (BD 바이오사이언시스; 캘리포니아주 산호세)로 Fc 수용체 차단시켰다. PD-1 및 T 세포의 OX40 발현을 평가하기 위해, 세포를 다음과 같이 염색하였다: PD1-FITC, CD3-PerCp.Cy5.5, CD4-PE-Cy7, CD8 퍼시픽 블루(Pacific Blue), CD45 v500, (BD 바이오사이언시스); OX40 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 647 (제넨테크, 클론 1H1). 다양한 세포 유형의 PDL1 발현을 평가하기 위해, 염색은 하기와 같았다: CD11b-FITC, Gr-1 PE-Cy7, CD8 알렉사 700, CD45 v500, CD4-PerCp.Cy5.5 (BD 바이오사이언시스); PDL1-비오틴 (제넨테크, 클론 6F8.2.5), 이어서 스트렙타비딘-PE (BD 바이오사이언스). Foxp3+ T 조절 세포 집단을 평가하기 위해, 세포를 먼저 CD45-PE-Cy7, CD4 PerCp-Cy5.5 (BD 바이오사이언시스)로 표면 염색한 다음, 1x foxp3 고정/투과화 완충제 (이바이오사이언스; 캘리포니아주 샌디에고) 중 4℃에서 밤새 고정시켰다. 이어서, 세포를 1x foxp3 투과화 완충제 (이바이오사이언스) 중에 투과시키고, Foxp3-FITC (이바이오사이언스)로 염색하였다. 염색된 세포는 포르테사(Fortessa) 또는 FACS 칸토 II (BD 바이오사이언시스) 상에서 FACS 디바 소프트웨어, 이어서 플로우조(FlowJo) 소프트웨어 상의 분석을 사용하여 획득하였다.

[0662]

종양 절개 및 플루이다임 발현 분석: RNA를 문헌 [Powles, T., et al. (2014) Nature 515:558-62; Herbst, R.S., et al. (2014) Nature 515:563-7]에 기재된 바와 같이 UBC 또는 NSCLC에 대해 FFPE 유래된 보존 종양으로부터 추출하였다. 간략하게, 종양 FFPE 절편을 크게 절개하여 신생물성 조직을 풍부화하고, 조직을 종양 용해 완충제 및 프로테아제 K를 사용하여 용해시켜 완전한 소화 및 핵산 방출되도록 하였다. RNA는 제조업체의 프로토콜에 따라 하이 퓨어 FFPE RNA 마이크로 키트(High Pure FFPE RNA Micro Kit) (로슈 어플라이드 사이언

스(Roche Applied Sciences), 인디애나주 인디애나폴리스)를 사용하여 단리하였다.

[0663] 유전자-발현 분석을 이전에 문헌 [Shames, D.S., et al. (2013) PLoS ONE 8:e56765]에 기재된 바와 같이 바이오마크 HD 실시간 PCR 플랫폼 (플루이다임)을 사용하여 수행하였다. 발현 패널에서의 모든 택텐 검정은 FAM-MGB였고, 4종의 참조 유전자: SP2, GUSB, TMEM55B 및 VPS33B를 포함하여 라이프 테크놀로지스를 통해 주문 제작 또는 맞춤 설계로 주문하였다. 4종의 참조 유전자 (SP2, GUSB, TMEM55B 및 VPS33B)에 대한 C_t 값의 기하 중앙값을 각 샘플에 대해 계산하고, 발현 수준은 델타 C_t (DC_t) 방법을 사용하여 하기와 같이 결정하였다: C_t (표적 유전자) 2 기하중앙값 C_t (참조 유전자). 연구에서의 환자에 걸친 중앙값 mRNA 발현 수준 (이뮤노칩 (iChip)에 의해 측정됨)을 컷오프로 사용하여 고 vs 저 발현 카테고리화를 도출하였다. P 값은 t 검정에 의해 결정하였다.

[0664] PD-L1 면역조직화학 (IHC): 종양 샘플 또는 암 세포주의 포르말린-고정된 파라핀-포매 (FFPE) 절편을 분석하였다.

[0665] 포르말린-고정된 파라핀-포매 조직 절편을 탈파라핀화시킨 후에 항원 검색, 차단, 및 1차 항-PD-L1 항체와의 인큐베이션을 수행하였다. 2차 항체와 인큐베이션하고, 효소 색을 발현시킨 후에, 절편을 대조염색시키고 일련의 알콜 및 크실렌에서 탈수시킨 다음 커버슬립을 덮었다.

[0666] 하기 프로토콜을 IHC에 사용하였다. 4-mm 두께의 포르말린-고정된 파라핀-포매 (FFPE) 조직 절편을 자동화 염색 플랫폼 상에서 항-인간 PD-L1 토끼 모노클로날 항체를 4.3 mg/ml의 농도로 사용하여 PD-L1에 대해 염색하고, 디아미노벤지딘에 의해 신호를 시각화하였으며; 절편을 헤마톡실린으로 대조염색하였다. PD-L1 발현은 하기 점수화 계획을 사용하여 종양-침윤 면역 세포에 대해 평가하였다:

PD-L1 진단 평가	IHC 점수
임의의 식별가능한 PD-L1 염색의 부재 또는 종양 연관 종양내 세포 및 인접 종양-주위 결합조직형성 기질에 의해 점유된 종양 면적의 <1%를 커버하는 종양 침윤 면역 세포에서 임의의 강도의 식별가능한 PD-L1 염색의 존재	IHC 0
종양 연관 종양내 세포 및 인접 종양-주위 결합조직형성 기질에 의해 점유된 종양 면적의 $\geq 1\%$ 내지 <5%를 커버하는 종양 침윤 면역 세포에서 임의의 강도의 식별가능한 PD-L1 염색의 존재	IHC 1
종양 연관 종양내 세포 및 인접 종양-주위 결합조직형성 기질에 의해 점유된 종양 면적의 $\geq 5\%$ 내지 <10%를 커버하는 종양 침윤 면역 세포에서 임의의 강도의 식별가능한 PD-L1 염색의 존재	IHC 2
종양 연관 종양내 세포 및 인접 종양-주위 결합조직형성 기질에 의해 점유된 종양 면적의 $\geq 10\%$ 를 커버하는 종양 침윤 면역 세포에서 임의의 강도의 식별가능한 PD-L1 염색의 존재	IHC 3

[0667]

[0668] 벤타나 벤치마크(Ventana Benchmark) XT 또는 벤치마크 울트라(Benchmark Ultra) 시스템을 사용하여 하기 시약 및 물질을 사용하는 PD-L1 IHC 염색을 수행하였다:

[0669] 1차 항체: 항-PD-L1 토끼 모노클로날 1차 항체

[0670] 시편 유형: 조직 샘플의 포르말린-고정된 파라핀 포매 (FFPE) 절편 및 변화하는 염색 강도의 대조군 세포 펠릿

[0671] 절차 중: 인간 기기: 벤치마크 XT 또는 벤치마크 울트라

[0672] 에피토프 회수 조건: 세포 컨디셔닝, 표준 1 (CC1, 벤타나, cat # 950-124)

[0673] 1차 항체 조건: 1/100, 36°C에서 6.5 μ g/ml/16분

[0674] 회색제: 항체 회색 완충제 (운반체 단백질 및 Brig-35를 함유하는 트리스-완충 염수)

[0675] 음성 대조군: (세포 신호전달): 6.5 μ g/ml의 나이브 토끼 IgG (셀 시그널링(Cell Signaling)) 또는 회색제 단독

[0676] 검출: 옵티뷰(Optiview) 또는 울트라뷰(Ultraview) 유니버설 DAB 검출 키트 (벤타나), 및 증폭 키트 (적용 가능한 경우)를 제조업체의 지침 (벤타나)에 따라 사용하였다.

- [0677] 대조염색: 벤틀라나 헤마톡실린 II (카탈로그 # 790-2208)/청색화 시약 (카탈로그 # 760-2037) 포함 (각각 4분 및 4분)
- [0678] 벤치마크 프로토콜은 하기와 같았다:
- [0679] 1. 파라핀 (선택됨)
- [0680] 2. 탈파라핀화 (선택됨)
- [0681] 3. 세포 컨디셔닝 (선택됨)
- [0682] 4. 컨디셔너 #1 (선택됨)
- [0683] 5. 표준 CC1 (선택됨)
- [0684] 6. Ab 인큐베이션 온도 (선택됨)
- [0685] 7. 36C Ab Inc. (선택됨)
- [0686] 8. 적정 (선택됨)
- [0687] 9. 자동-분배 (1차 항체), 및 (16분) 동안 인큐베이션
- [0688] 10. 대조염색 (선택됨)
- [0689] 11. (헤마톡실린 II) 한 방울 적용 (대조염색), 커버슬립 적용, 및 (4분) 동안 인큐베이션
- [0690] 12. 포스트 대조염색 (선택됨)
- [0691] 13. (청색화 시약) 한 방울 적용 (포스트 대조염색), 커버슬립 적용, 및 (4분) 동안 인큐베이션
- [0692] 14. 슬라이드를 비누 물에서 세척하여 오일 제거
- [0693] 15. 슬라이드를 물로 세정
- [0694] 16. 95% 에탄올, 100% 에탄올에서 크실렌 (라이카(Leica) 자동염색기 프로그램 #9)을 통한 슬라이드의 탈수
- [0695] 17. 커버슬립 덮기.
- [0696] 결과:
- [0697] OX40은 활성화된 CD4 T 세포 (Teff) 및 T 조절 (Treg) 세포 상에 발현되는 공동-자극 분자인 것으로 공지되어 있다. OX40은 나이브 T 세포 상에서 구성적으로 발현되지 않지만, T 세포 수용체 (TCR)의 연관 후에 유도된다. TCR 자극의 존재 하에 OX40의 라이게이션은 Teff 세포의 활성화를 강화시키고 Treg 세포를 억제하는 이중 메커니즘을 통해 T 이펙터 세포 기능을 증진시키는 것으로 공지되어 있다. 항-OX40 치료는 시험관내 Treg 억제 검정에서 Treg 활성을 감소시키는 것으로 발견되었다. 이들 결과는 OX40 효능제 치료가 여러 결정적인 T 세포 기능을 조절할 수 있다는 것을 입증한다.
- [0698] PD-L1 신호전달의 억제는 암 (예를 들어, 종양 면역), 및 급성 및 만성 (예를 들어 지속성) 감염 둘 다를 포함한 감염을 치료하기 위해 T 세포 면역을 증진시키기 위한 수단으로서 제안되었다.
- [0699] 본 발명자들은 종양내 T 세포가 PD-1 및 OX40을 발현하였는지 여부를 검사하였다. 도 1에 나타난 바와 같이, 종양내 CD8+ T 세포는 억제 수용체, 예컨대 PD-1을 발현하였지만, 이들 세포 중 많은 비율은 또한 OX40을 발현하였다. 이러한 결과는 T 이펙터 세포의 OX40 자극이 T 세포 상에 발현된 PD-1 및 다른 억제 수용체의 효과를 상쇄시킬 수 있다는 것을 시사한다.
- [0700] 항-OX40 효능제 항체 (단일 작용제)를 사용한 치료는 CD45+ 세포의 총수에 비해 종양내 Foxp3+ 조절 T 세포의 비율을 유의하게 감소시켰고 (CD45는 모든 조혈 세포, 예컨대 백혈구를 정의함; 도 2A), 뿐만 아니라 종양내 Foxp3+ Treg의 절대 수를 유의하게 감소시켰다 (도 2B). 게다가, 항-OX40 효능제 항체 및 항-PDL1 길항제 항체의 조합을 사용한 치료는 CD45+ 세포의 총수에 비해 종양내 Foxp3+ 조절 T 세포의 비율을 유의하게 감소시켰고 (도 2A), 뿐만 아니라 종양내 Foxp3+ Treg의 절대 수를 유의하게 감소시켰다 (도 2B). 이들 결과는 OX40 효능제가 항-PDL1 길항제와 조합하여 투여될 때 종양내 Foxp3+ Treg의 OX40 효능제-매개 감소가 유지된다는 것을 입증하였다.
- [0701] 본 발명자들은 PD-L1 발현에 대한 OX40 효능제 치료의 효과를 검사하였다. 항-OX40 효능제를 사용한 치료는 종

양 세포 및 종양내 골수 세포에서 PD-L1 발현을 유의하게 증가시켰으며, 이는 PD-L1이 음성 피드백 방식으로 항-OX40 효능을 제한할 수 있다는 것을 시사한다 (도 3A&B). 이론에 얽매는 것을 바라지는 않지만, 이들 결과는 OX40 효능제를 사용한 치료가 PD-L1 발현을 증가시켰기 때문에, OX40 효능제를 사용한 치료가 PD-1 축 억제제를 사용한 치료를 증진시킬 수 있다는 것을 시사한다. 임상 데이터는 증가된 PDL1 발현을, PD1 축 길항제 (예를 들어, 항-PD-L1 길항제 항체)에 대한 반응의 풍부화로서 연관시킨다.

[0702] 항-OX40 효능제 항체 및 항-PDL1 길항제 항체를 사용한 치료는 CT26 및 MC38 결장직장암 동계 종양 모델에서 상승작용적 조합 효능을 입증하였다 (도 4A&B, 5A&B). 개별 종양 부피 측정의 분석 (각 실험에서 개별 마우스로부터; 도 4B, 5B)은 조합 치료된 동물이 어느 하나의 작용제 (OX40 효능제, PDL1 길항제) 단독으로 치료된 동물과 비교하여 보다 높은 빈도로 유의한 종양-크기 감소를 나타냈다는 것을 밝혀냈다. 또 다른 방식으로 말하자면, 부분 및 완전 반응을 갖는 동물의 빈도는 어느 하나의 작용제 단독으로 치료된 동물과 비교하여 조합 치료된 동물에서 훨씬 더 높다.

[0703] 조합 치료된 CT26 마우스로부터 취한 말초 혈액의 분석은 이펙터 세포 증식 및 염증성 T 세포 마커의 증가를 밝혀냈다 (도 9A, B, C & D). CD8+ T 세포의 증식 수준 (도 9A), Treg 세포 (도 9B), 혈장 인터페론 감마 수준 (도 9C) 및 활성화된 T 세포 (도 9D)를 검사하였다. (어느 하나의 단일 작용제 부문에 비해) 조합 부문에서의 증식 (Ki67), 혈장 인터페론 감마 및 염증 마커 (Tbet, CXCR3)의 증가는 aPDL1 (체크포인트 차단) 및 aOX40 (공동-자극) 활성화의 상승작용을 밝혀냈다.

[0704] 구체적으로, 증식성 CD8+ T 세포의 수준 (ki67+/총 CD8+ T 세포의 퍼센트로 표현됨)은 OX40 효능제 또는 PDL1 길항제 단독을 사용한 치료에 비해 OX40 효능제 및 PD-L1 길항제의 조합으로 치료된 동물에서 유의하게 증가하였다 (도 9A). 조합-치료된 동물에서의 증식성 CD8+ T 세포의 수준은 단일-작용제 치료된 집단의 상가적 효과보다 더 컸으며, 이는 PD-1 축 억제제와 조합된 OX40 효능제 치료의 상승작용적 효과가 말초 혈액 마커 및 세포의 분석에 의해서 검출될 수 있었다는 것을 입증한다.

[0705] 추가로, 감소된 말초 혈액 Treg이 OX40 효능제 단일 작용제를 사용한 치료에서 관찰되었고, 말초 혈액 Treg의 감소는 조합 (OX40 효능제 및 PDL1 길항제의 조합) 요법 부문에서 유지되었다 (도 9B). 증가된 혈장 감마 인터페론이 OX40 효능제 및 PDL1 길항제의 조합에서 관찰되었다 (도 9C).

[0706] 케모카인 수용체 CXCR3은 CXC 케모카인 수용체 패밀리의 Gai 단백질-커플링된 수용체이다. 다음과 같은 CXCR3의 2종의 변이체가 존재한다: CXCR3-A는 CXC 케모카인 CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) 및 CXCL11 (I-TAC)에 결합하고, 반면에 CXCR3-B는 CXCL9, CXCL10 및 CXCL11에 추가로 CXCL4에 결합할 수 있다 (Clark-Lewis, I., et al. (2003) J. Biol. Chem. 278(1):289-95). CXCR3은 주로 활성화된 T 림프구 및 NK 세포 및 일부 상피 세포 상에서 발현된다. CXCR3 및 CCR5는 Th1 세포 상에서 우선적으로 발현되고 이펙터 기억 CD8 T 세포 상에서 상향조절된다 (Groom, J.R. and Luster, A.D. (2011) Exp. Cell Res.317(5):620-31). CXCR3은 백혈구 트래킹을 조절할 수 있다. CXCR3에 대한 케모카인의 결합은 다양한 세포성 반응, 가장 주목할만하게는 인테그린 활성화, 세포골격 변화 및 염증 세포의 화학주성 이동을 유도한다 (Groom, J.R. and Luster, A.D. (2011) Exp. Cell Res.317(5):620-31).

[0707] 활성화된 T 세포 (특히, CXCR3 마커를 사용하여 결정되는 활성화된 기억 Teff 세포)의 수준은 OX40 효능제 또는 PDL1 길항제 단독을 사용한 치료에 비해 OX40 효능제 및 PD-L1 길항제의 조합으로 치료된 동물에서 유의하게 증가하였다 (도 9D). 조합-치료된 동물에서의 T 기억 이펙터 세포 (CXCR3+)의 수준은 단일-작용제 치료된 집단의 상가적 효과보다 더 컸으며, 이는 PD-1 축 억제제와 조합된 OX40 효능제 치료의 상승작용적 효과가 말초 혈액 마커 및 세포의 분석에 의해서 검출될 수 있었다는 것을 입증한다. 조합 치료 부문에서 CD8 T 세포 상의 증식 (Ki67) 및 염증 마커 (CXCR3)의 증가는 항-PDL1 (체크포인트 차단) 및 항-OX40 (공동-자극) 활성화의 상승작용을 통한 세포독성의 증진을 시사할 수 있다.

[0708] 추가로, 조합 치료 효과는 이펙터 및 염증성 T 세포 마커의 증가에 의해 검출하였다 (예를 들어, rtPCR (플루이다임)에 의해, 조합 치료된 종양 샘플 대 어느 하나의 작용제 단독으로 치료된 샘플에서 분석함). 예를 들어, Treg에 대한 마커 (Fox3p), CD8+ Teff에 대한 마커 (CD8b) 및 활성화된 T 세포에 대한 마커 (예를 들어, Tbet, CXCR3, 예를 들어 인터페론 감마 반응-연관 유전자)를 분석할 수 있다.

[0709] CT26 결장직장암 동계 종양 모델에서 OX40 효능제 항체 치료의 용량-반응 효과를 검사하기 위해 실험을 수행하였다. 항-OX40 효능제 항체 단일 작용제 치료는 용량 반응성을 보여준다 (도 6A, B). 0.1 mg/ml 용량은 최대 미만의 효능을 보여주었고, 추가의 조합 치료 실험을 위해 선택하였다.

- [0710] 도 7A 및 B는 어느 하나의 작용제 단독을 사용한 치료와 비교하여 항-PDL1 길항제 항체와 조합한 항-OX40 효능제 항체의 준치료 용량을 사용한 치료의 결과를 보여준다. 상승작용적 조합 효능이 관찰되었으며, 이는 OX40 효능제 항체의 최대 효과적인 용량이 PD-1 축 길항제와 조합하여 치료될 때 보다 낮아질 수 있다는 것을 시사한다.
- [0711] 도 8A 및 B는 어느 하나의 작용제 단독을 사용한 치료와 비교하여 항-PDL1 길항제 항체와 조합한 항-OX40 효능제 항체의 준치료 수준의 단일 용량을 사용한 치료의 결과를 보여준다. 상승작용적 조합 효능이 관찰되었으며, 이는 OX40 효능제 항체의 최대 효과적인 용량이 PD-1 축 길항제와 조합하여 OX40 효능제 항체가 제공될 때 보다 낮아질 수 있다는 것을 시사한다.
- [0712] 도 10은 요로상피 방광암 (UBC) 및 비소세포 폐암 (NSCLC)을 가진 인간 환자로부터의 암 샘플에서 OX40 발현과 PDL1 진단 상태와의 연관성을 보여준다. 조직 샘플은 항-PD-L1 항체, MPDL3280A를 사용하는 1상 임상 시험에 참가한 환자로부터의 것이었다. 종양 침윤 면역 세포 (IC)의 PD-L1 바이오마커 상태는 본원에 개시된 바와 같은 IHC를 사용하여 결정하였다. OX40 발현 수준은 rtPCR 분석 (플루이다임)을 사용하여 결정하였다. UBC에서, OX40 발현은 0 또는 1의 PDL1 IHC 상태를 갖는 환자에서 관찰되었다. OX40 발현의 수준은 PDL1 IHC 상태와 상관관계가 있었으며, 이때 증가된 증가된 PDL1 발현은 증가된 OX40 발현과 상관관계가 있었다. NSCLC에서, OX40의 발현은 IHC에 의해 PDL1 발현이 낮거나 없는 환자에서 관찰되었다 (2 및 3의 PDL1 IHC 상태를 갖는 샘플에서 뿐만 아니라). 이들 결과는 (a) PDL1 IHC 0 및/또는 1 상태를 갖는 환자에서 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)를 사용한 조합 치료에 있어 개선된 반응에 대한 잠재력; (b) 선행 PD-1 축 결합 길항제 치료에 반응하지 않은 환자에서 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)를 사용한 조합 치료에 있어 개선된 반응에 대한 잠재력; 및 (c) PDL1 IHC 2 및/또는 3 상태를 갖는 환자에서 PD-1 축 결합 길항제 및 OX40 결합 효능제 (예를 들어, 항-인간 OX40 효능제 항체)를 사용한 조합 치료에 있어 개선된 반응에 대한 잠재력을 시사한다.
- [0713] 암의 치료에 사용하기 위해 항-PD-L1 항체 MPDL3280A를 평가한 임상 연구의 결과는 PD-L1 발현이 MPDL3280A에 대한 임상 반응과 연관성이 있음을 시사하였다. 종양 침윤 면역 세포 PDL1 발현과 치료 반응과의 연관성은 종양 세포 PDL1 발현보다 더 강한 것으로 보인다고 밝혀졌다. 종양 침윤 면역 세포는 IFN γ 발현에 대해 보다 감수성일 수 있고, 요법 전 기존의 T 세포 반응을 우선적으로 저해하는 작용을 할 수 있다 (Herbst, R.S., et al. (2014) Nature 515:563-7). 이론에 얽매는 것을 바라지는 않지만, OX40 효능제 치료는 IFN γ 발현을 증가시켜, 종양 침윤 면역 세포에서 증진된 PDL1 발현을 유발할 수 있고, 이에 수반하여 PD-1 축 결합 길항제 치료에 대한 증가된 반응성을 유발할 수 있는 것으로 생각된다. 따라서, OX40 결합 효능제 및 PD-1 축 결합 길항제를 포함한 조합 치료는 보다 낮은 PDL1 바이오마커 상태를 갖는 환자의 치료에 유용하다.
- [0714] IHC에 의한 PD-L1 발현 점수화: 종양 시편에서의 PD-L1 발현의 존재 또는 부재를 IHC에 의해 인간 포르말린-고정된, 파라핀-포매 (FFPE) 조직에서 PD-L1을 검출할 수 있는 항-PD-L1-특이적 항체를 사용하여 평가하였다. 종양 샘플에서 PD-L1의 상대 발현을 측정 및 정량화하기 위해, PD-L1 IHC 점수화 시스템을 개발하여 종양 세포 및 종양 침윤 면역 세포에서 PD-L1 특이적 신호를 측정하였다. 면역 세포는 림프구 및/또는 대식세포/조직구 형태를 갖는 세포로 정의된다.
- [0715] 종양 세포 염색은 임의의 강도의 막 염색을 보여주는 모든 종양 세포의 퍼센트로 표현된다. 침윤 면역 세포 염색은 임의의 강도의 염색을 보여주는 면역 세포가 차지하는 전체 종양 영역의 퍼센트로 규정된다. 전체 종양 영역은 주요 종양 덩어리에 바로 인접한 및 이와 근접한 면역 침윤물의 영역을 포함하여, 악성 세포뿐만 아니라 종양-연관 기질을 포괄한다. 또한, 침윤 면역 세포 염색은 모든 종양 침윤 면역 세포의 퍼센트로 규정된다.
- [0716] 종양 조직에 매우 광범위한 PD-L1 염색 강도가 존재하였다. 준세포 국제화에 관계없이, 신호는 또한 강한, 중간 정도, 약한 또는 음성 염색으로 분류되었다.
- [0717] 도 11에 도시된 바와 같이, 음성 신호 강도는 HEK-293 세포를 사용하여 예시된 바와 같이 임의의 검출가능한 신호의 부재를 특징으로 하였다 (도 11A). 대조적으로, 양성 신호 강도는 재조합 인간 PD-L1로 형질감염된 HEK-293 세포를 사용하여 예시된 바와 같이, 금색 내지 암갈색의 막 염색을 특징으로 하였다 (도 11B-D 참조). 최종적으로, 양성 신호 강도는 또한 태반 영양막의 염색 (도 11E) 및 편도 음와 영역의 강한 염색 (도 11F) 및 중등 금색 내지 암갈색 염색을 특징으로 하는 막 패턴에 의해 설명되었다. 종양 조직에서, PD-L1 음성 샘플은 20x 배율을 사용하여 평가 시에 검출가능한 신호가 없거나 또는 단지 약한 세포질 배경 염색을 나타내는 것으로 정성화되었다. 대조적으로, PD-L1 양성 샘플은 주로 종양 세포 및/또는 침윤 면역 세포에서의 막 염색을 입증하였다. PD-L1 염색은 흐린, 밝은-갈색 막으로 나타나는 약한 강도에서부터 낮은 배율에서도 용이하게 인식되

는 진한 암갈색 막으로 나타나는 강한 강도까지 가변 강도로 관찰되었다.

[0718] 3종의 대표적인 PD-L1 양성 종양 샘플이 도 12에 도시된다. 삼중-음성 유방암의 경우에, 대부분의 종양 세포는 막 및 세포질 염색의 조합을 보이면서 PD-L1에 대해 강하게 양성인 것으로 관찰되었다 (100x 배율) (도 12A). 악성 흑색종의 경우에, 일부가 PD-L1에 대해 막 염색된 면역 세포의 클러스터 및 PD-L1에 대해 막 염색된 희귀 종양 세포 (화살표)가 관찰되었다 (400x 배율) (도 12B). NSCLC, 선암종의 경우에, PD-L1에 대해 강한 염색을 갖는 면역 세포의 클러스터와, PD-L1에 대해 막 및/또는 세포질 염색된 여러 종양 세포 (화살표)가 관찰되었다 (400x 배율) (도 12C).

[0719] 양성 경우에서의 염색은 공간 분포 및 강도와 관련하여 집중되는 경향이 있다. 임의의 강도의 염색을 나타내는 종양 또는 면역 세포의 백분율을 시각적으로 추정하고, 이를 사용하여 PD-L1 상태를 결정하였다. 이소형 음성 대조군을 사용하여 시험 샘플에서의 배경의 존재를 평가하였다.

[0720] 염색은 H&E의 경우에 하나의 연속 조직 절편, 항-PD-L1의 경우에 제2의 연속 조직 절편, 및 이소형 음성 대조군 항체의 경우에 제3의 연속 조직 절편을 필요로 하였다. PD-L1-형질감염된 HEK-293 세포주 대조군 또는 편도 슬라이드를 실행 대조군 및 검정 특이성에 대한 참조로 사용하였다.

[0721] PDL-1 상태 기준

PD-L1 상태	염색 기준
음성	ANY 염색 강도에서의 0% 막 염색 또는 세포질 염색 또는 둘 다의 조합
양성	ANY 염색 강도에서의 >0% 막 염색 또는 세포질 염색 또는 둘 다의 조합
	ANY 염색 강도에서의 $\geq 1\%$ 막 염색 또는 세포질 염색 또는 둘 다의 조합
	ANY 염색 강도에서의 $\geq 5\%$ 막 염색 또는 세포질 염색 또는 둘 다의 조합
	ANY 염색 강도에서의 $\geq 10\%$ 막 염색 또는 세포질 염색 또는 둘 다의 조합

[0722]

[0723] 상기 제시된 표는 PDL1 상태를 결정하기 위해 PDL1 염색 기준을 사용하는 한 실시양태를 기재한다. 또 다른 실시양태에서, IHC 0 및/또는 1의 IHC 점수를 갖는 샘플은 PDL1 음성으로 간주될 수 있으며, 반면에 IHC 2 및/또는 3의 IHC 점수를 갖는 샘플은 PDL1 양성으로 간주될 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 그 자체 상에서의 PDL1 발현 (예를 들어, PDL1 염색)을 평가하였다.

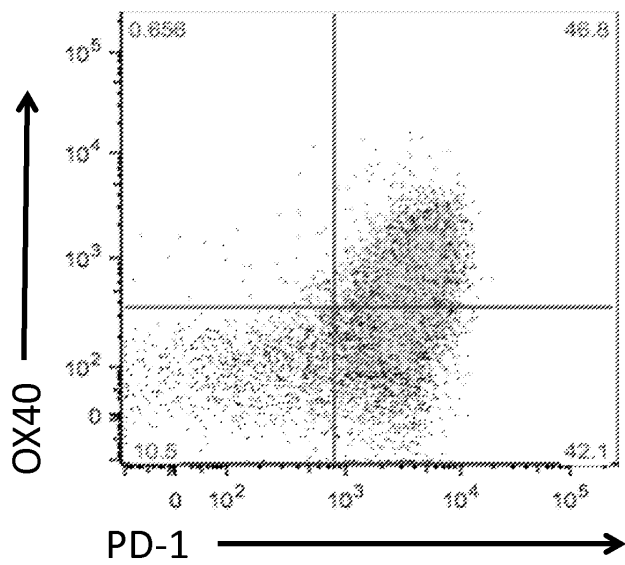
[0724] 일부 경우에, PD-L1 양성 상태는 종양 연관된 종양내 세포 및 인접 종양주위 결합조직형성 기질에 의해 점유되는 종양 영역의 최대 50%에서의 종양 세포 또는 종양 침윤 면역 세포에서 임의의 강도의 식별가능한 PD-L1 염색의 존재를 포함할 수 있다. 따라서, PD-L1 양성 염색은 임의의 강도의 염색을 나타내는 종양 세포 또는 종양 침윤 면역 세포를 50%만큼 많이 포함한다.

[0725] 항-PD-L1로 염색된 평가가능한 슬라이드를 상기 기재된 바와 같이 평가하였다. 음성 염색 강도는 임의의 검출 가능한 신호의 부재 또는 (갈색 또는 암갈색보다는 오히려) 연회색 내지 청색을 특징으로 하는 신호의 부재 및 막 증진의 부재를 특징으로 하였다. 막 염색이 없는 (예를 들어, 부재하는) 경우가 음성이었다.

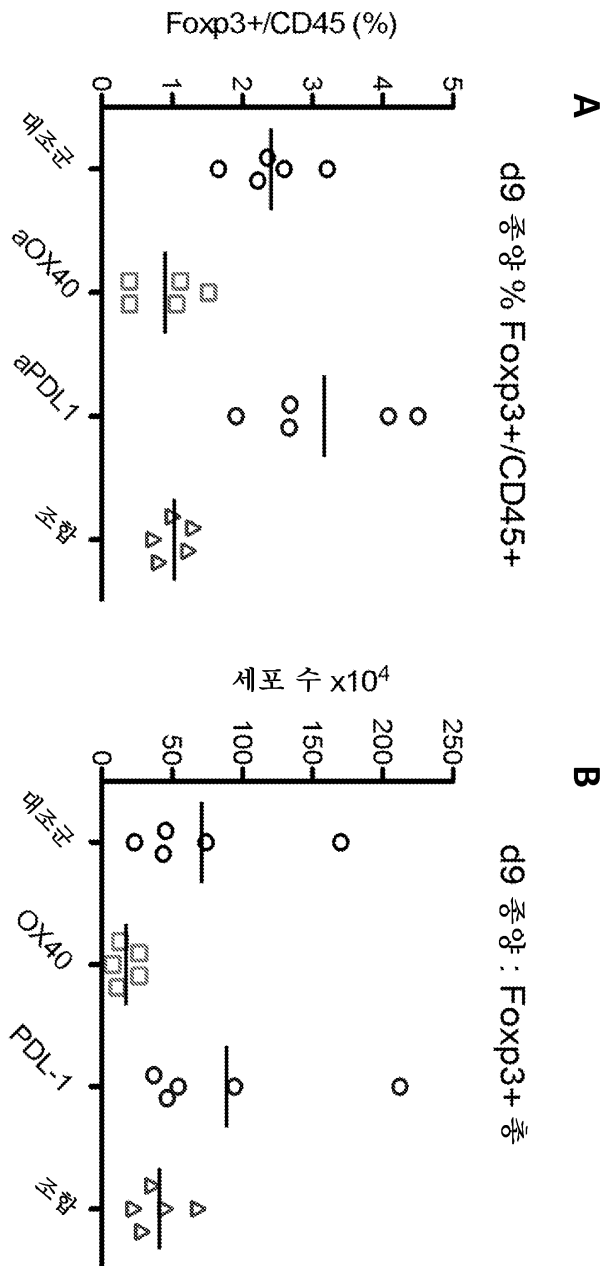
[0726] 상기 본 발명은 이해의 명확성의 목적을 위해 예시 및 예의 방식으로 어느 정도 상세하게 기재되었지만, 상기 설명 및 예는 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본원에 인용된 모든 특허 및 과학 문헌의 개시내용은 그 전문이 명백하게 참조로 포함된다.

도면

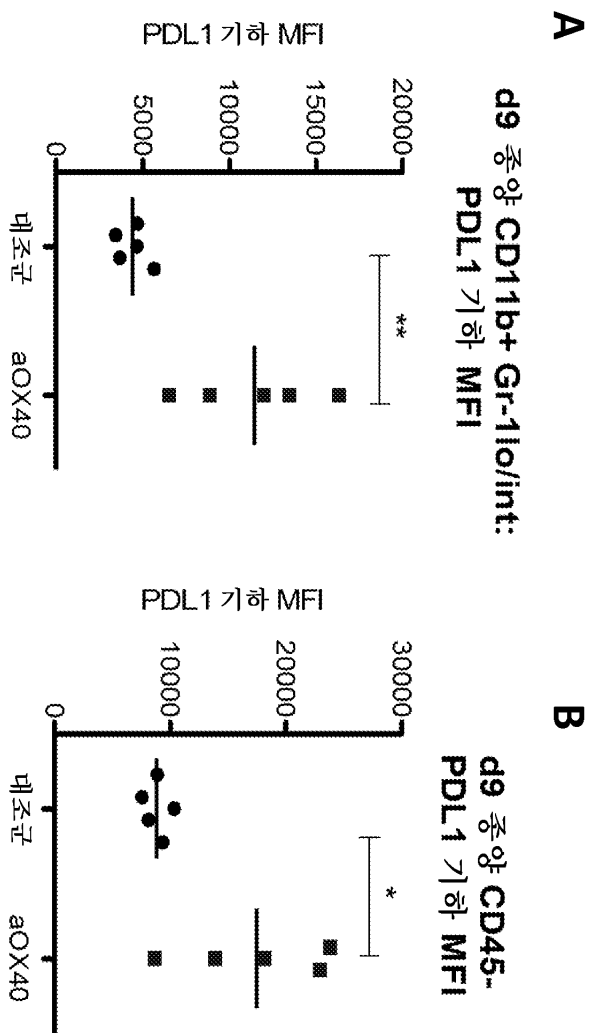
도면1



도면2

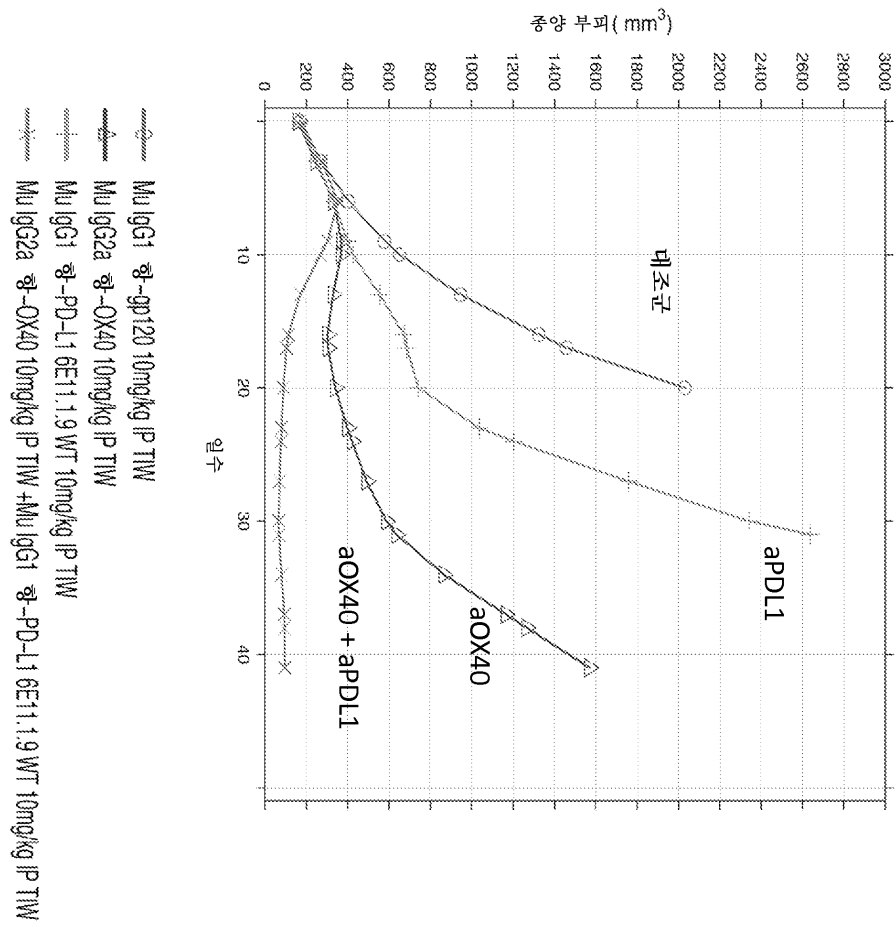


도면3

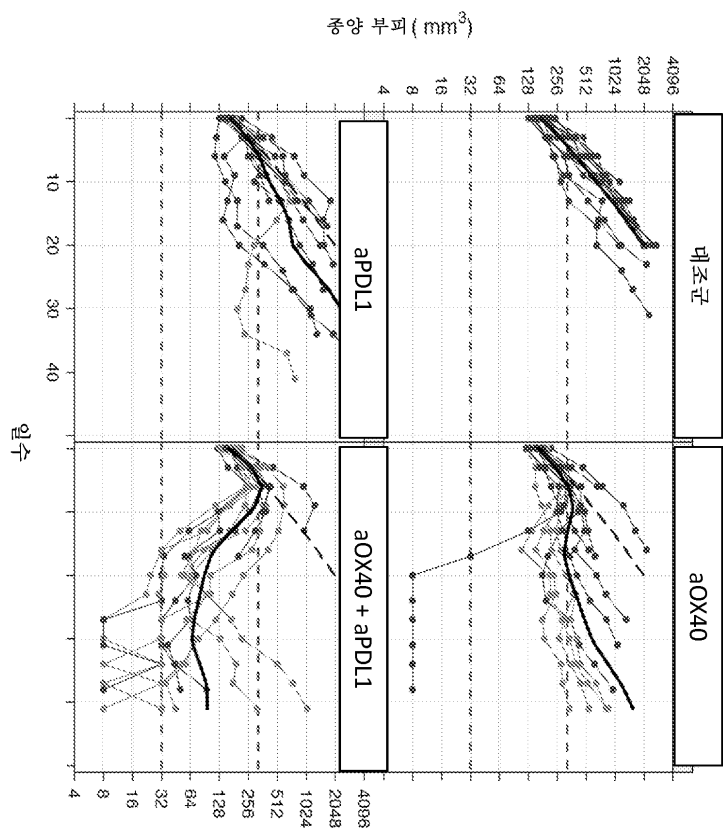


도 4A

도면4i

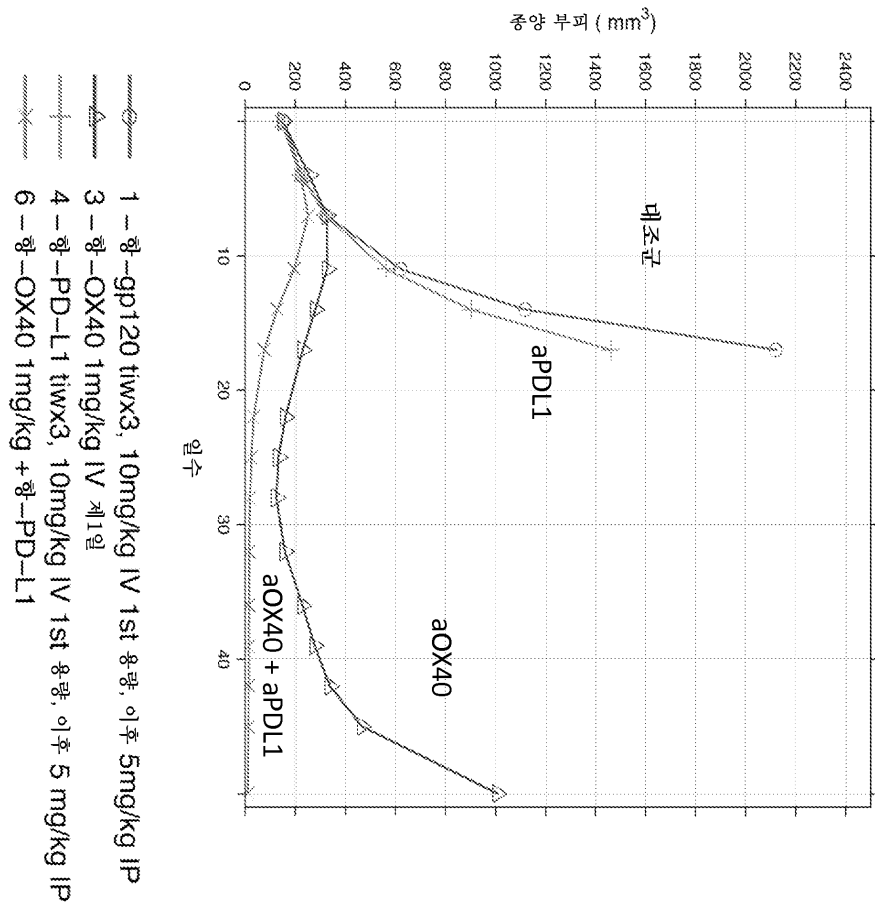


도 4B



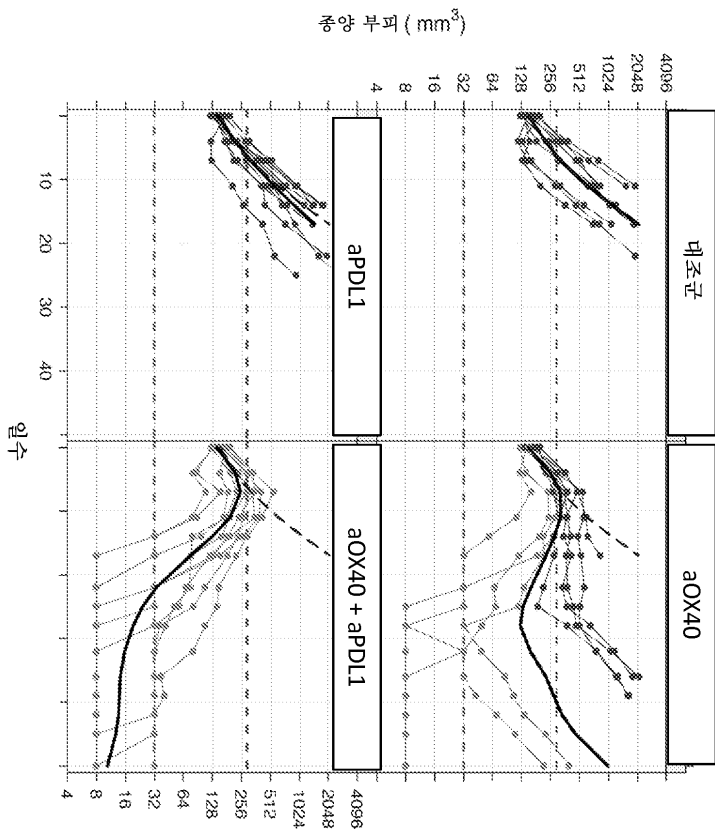
도면4ii

도 5A



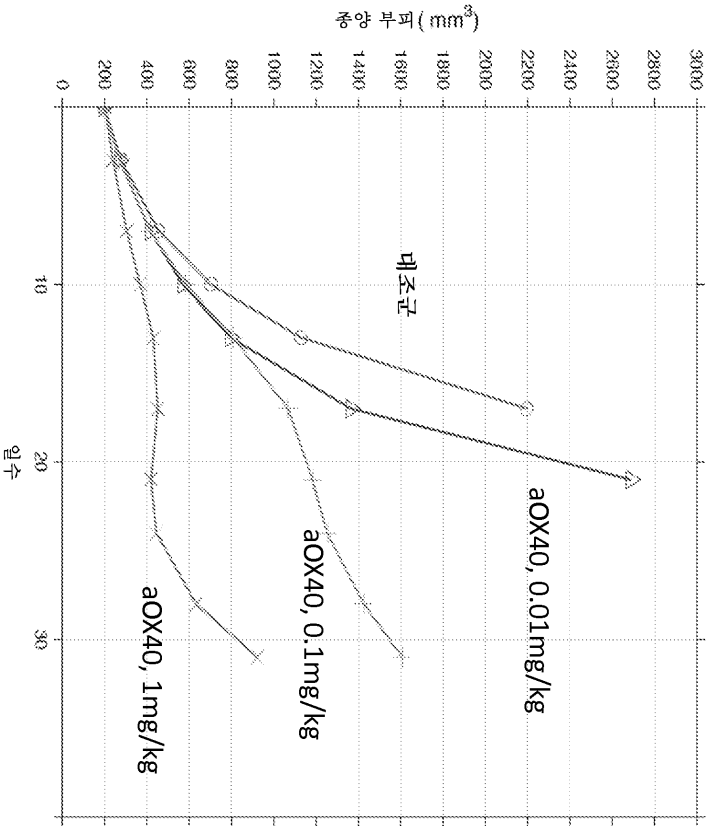
도면5i

도 5B



도면5ii

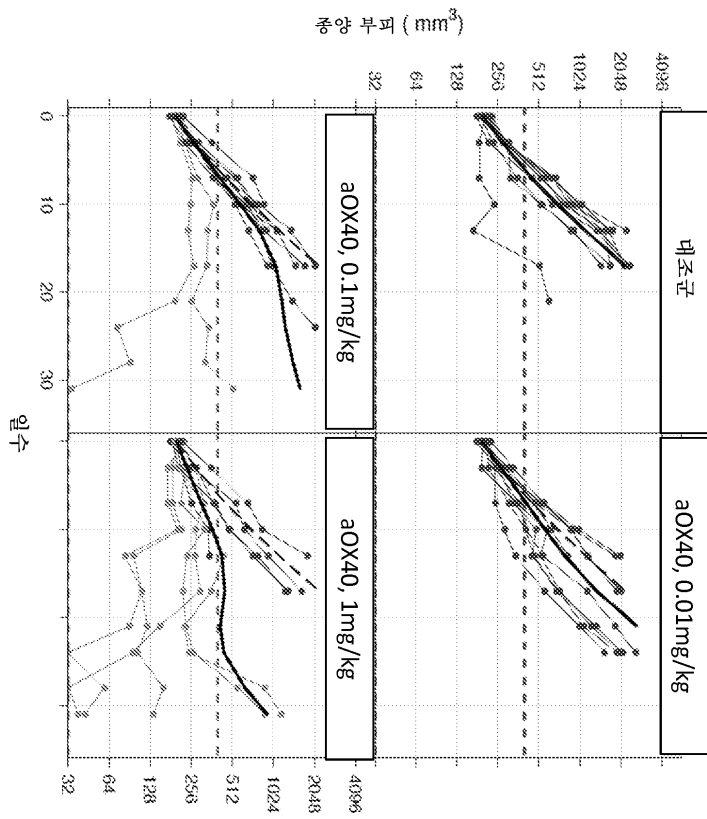
도 6A



도면6i

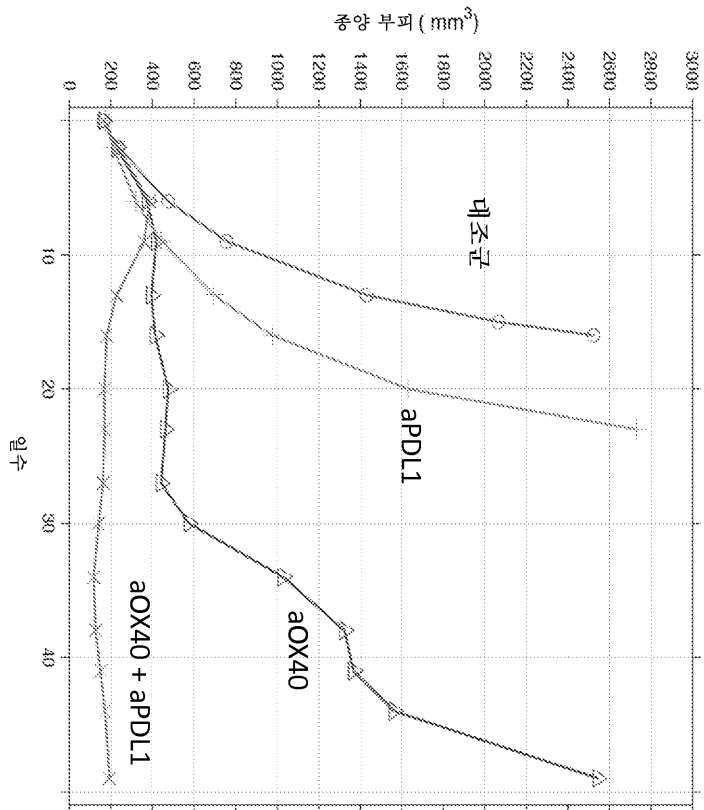
- 01 - Mu IgG1 항-gp120 1306, 1 mg/kg
- 05 - Mu IgG2a 항-mOX40, 0.01 mg/kg, TIWx3
- 06 - Mu IgG2a 항-mOX40, 0.1 mg/kg, TIWx3
- 07 - Mu IgG2a 항-mOX40, 1 mg/kg, TIWx3

도 6B



도면6ii

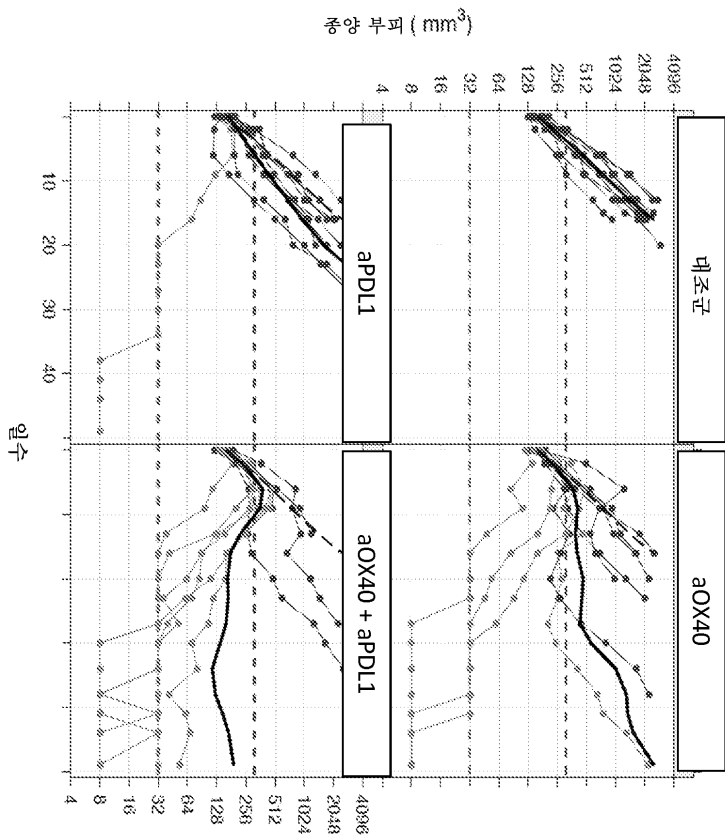
도 7A



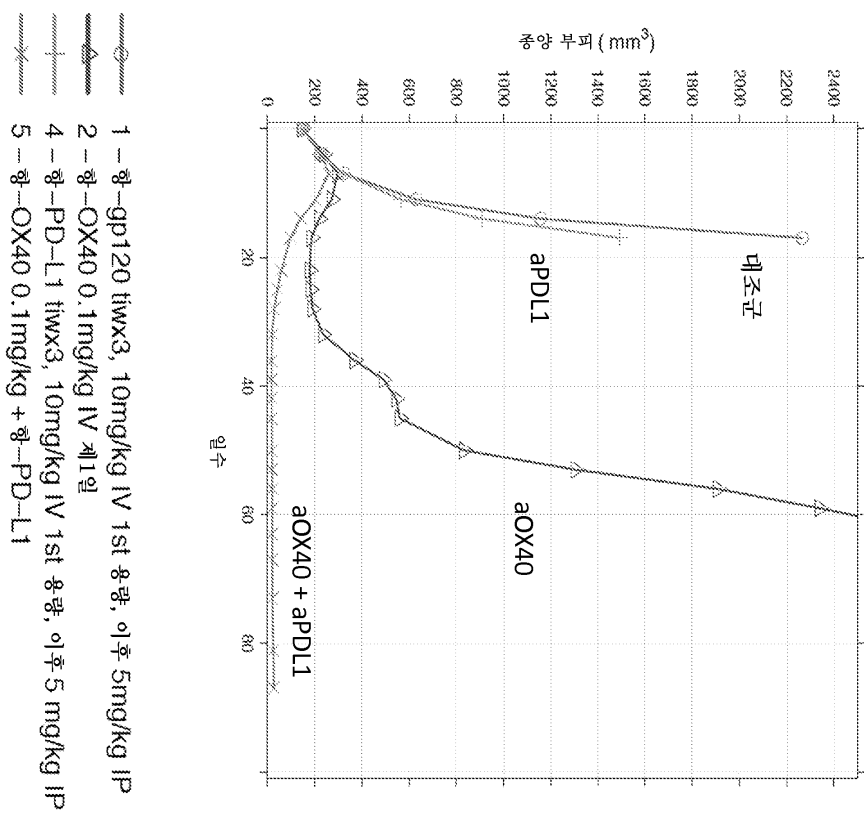
도면 7i

- Mu IgG1 항-gp120 10mg/kg IP TIW
- △ Mu IgG2a 항-OX40 0.1mg/kg IP TIW
- ▽ Mu IgG1 항-PD-L1 6E11.1.9 WT 10mg/kg IP TIW
- × Mu IgG2a 항-OX40 0.1mg/kg IP TIW + Mu IgG1 항-PD-L1 6E11.1.9 WT 10mg/kg IP TIW

도 7B

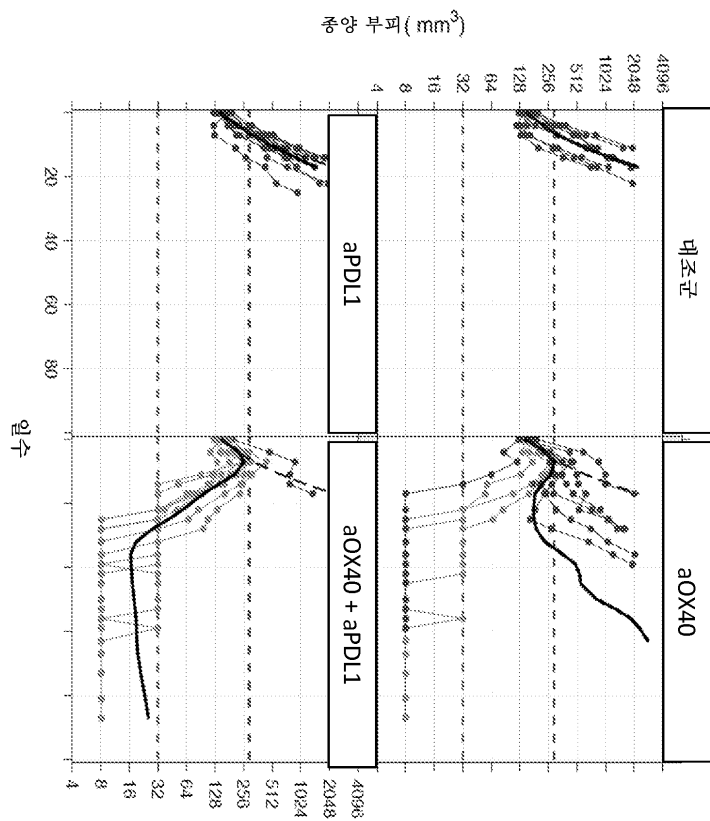


도면8i

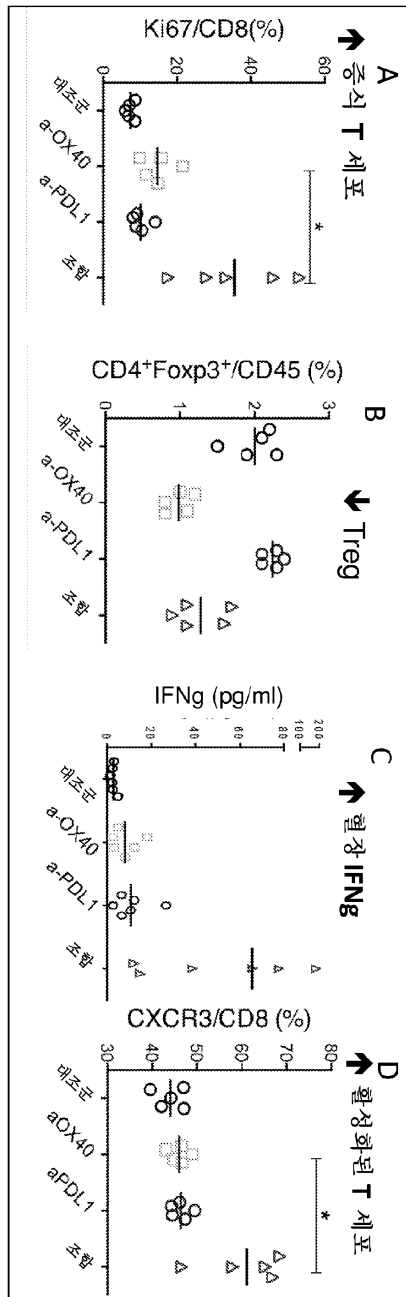


도 8B

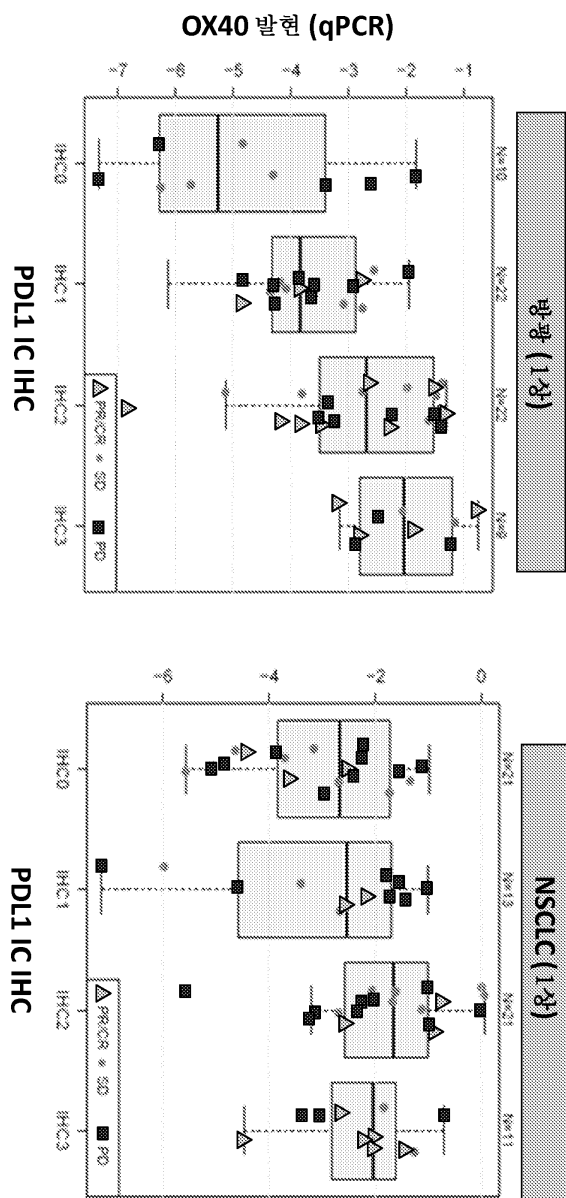
도면8ii



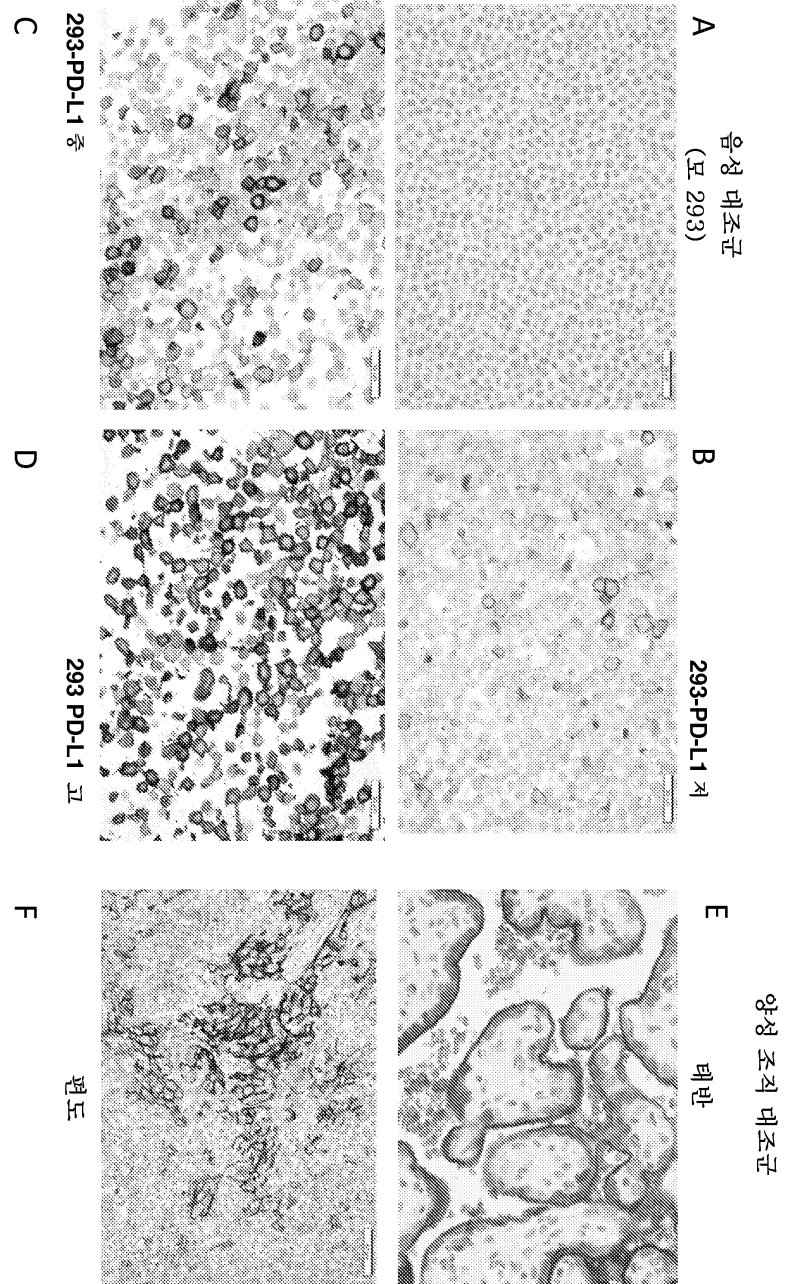
도면9



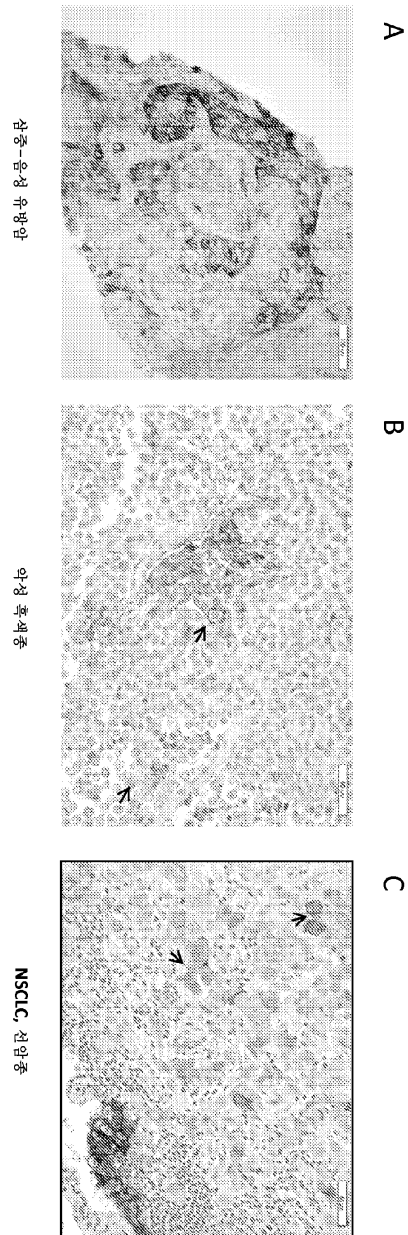
도면10



도면11



도면12



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC.

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

Jeanne CHEUNG

Jeong KIM

<120> COMBINATION THERAPY COMPRISING OX40

BINDING AGONISTS AND PD-1 AXIS BINDING ANTAGONISTS

<130> 146392030640

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/080,991

<151> 2014-11-17

<150> US 61/917,264

<151> 2013-12-17

<160> 62

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

>

<223> Synthetic Construct

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His

1 5 10

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 2

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 3

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 5

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 6

Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr

1 5

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

115 120

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 9

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

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

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

<210> 10

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe

405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440

<210> 11

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 12

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 12

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

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

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

180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

210 215 220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val

225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

260 265 270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340 345 350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435

440

445

<210> 13

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 13

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

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser

20

25

30

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

35

40

45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50

55

60

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

65

70

75

80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85

90

95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = Asp or Gly

<400> 14

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Ser Trp Ile His

1 5 10

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = Ser or Leu

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

<223> Xaa = Thr or Ser

<400> 15

Ala Trp Ile Xaa Pro Tyr Gly Gly Ser Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 16

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 16

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 17

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

1 5 10

<210> 18

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 18

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

1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 19

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

1 5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221

> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa = Asp or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = Val or Ile

<220>

<221> VARIANT

<222> 7

<223> Xaa = Ser or Asn

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa = Ala or Phe

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

<223> Xaa = Val or Leu

<400> 20

Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Ala

1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = Phe or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = Tyr or Ala

<400> 21

Ser Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = Tyr, Gly, Phe or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = Leu, Tyr, Phe or Trp

<220>

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa = Tyr, Asn, Ala, Thr, Gly, Phe or Ile

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = His, Val, Pro, Thr or Ile

<220>

<221> VARIANT

<222> 8

<223> Xaa = Ala, Trp, Arg, Pro or Thr

<400> 22

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr

1 5

<210> 23

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 23

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 24

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

1 5 10 15

<210> 25

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 25

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 26

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 27

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 28

<211> 118

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 29

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 29

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

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

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

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

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

 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

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

305 310 315 320

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

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

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

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

370 375 380

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

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

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

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445

<210> 30

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 30

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

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

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

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

 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 31
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Synthetic Construct

<400> 31

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Arg Tyr Ser Gln Val His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

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

 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450
 <210> 32
 <211> 219
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Asn His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 33

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 33

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Asn His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 34

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 34

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

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

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

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

50 55 60

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

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

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

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

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

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

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

165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

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

 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

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

 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 35
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 35

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

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

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

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

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

145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

 165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

 180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

 195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 36

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 36

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

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

 20 25 30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

 35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val

 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95
Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

 100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 37

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

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

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

<210> 38

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 38

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

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

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

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

<210> 39

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 39

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

1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 40

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 41

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

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

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

<210> 42

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 42

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

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

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

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 43

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

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

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

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

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

<210> 44

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 44

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly

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

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

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

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

 210 215 220
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

405 410 415

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

420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

435 440 445

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

450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys

465

<210

> 45

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 45

Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Asp

35 40 45

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

50 55 60

Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser

85 90 95

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

100 105 110

Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu 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> 46

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400

> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 47

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 47

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 48

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 48

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

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Phe Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Pro

115 120

<210> 49

<211> 108

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 49

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 50

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 50

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

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

<210> 51

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 51

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

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

<210> 52

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 52

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

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

<210> 53

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 53

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 Ser Tyr			
20	25	30	
Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe			
50	55	60	
Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			

<210> 54

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 54

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

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

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

<210> 55

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 55

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

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

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

<210> 56

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400

> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 57

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 57

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

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

<210> 58

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 58

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

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

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

Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 59

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 59

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

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

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

<210> 60

<211> 249

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His

1	5	10	15
Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln			
20	25	30	

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

<210> 61

<211> 138

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400

> 61

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

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

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 62

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 62

Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
 1 5 10 15
 Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Asp

35

40

45

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

50

55

60

Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser

65

70

75

80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser

85

90

95

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

100

105

110

Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

115

120

125