



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0100716
(43) 공개일자 2015년09월02일

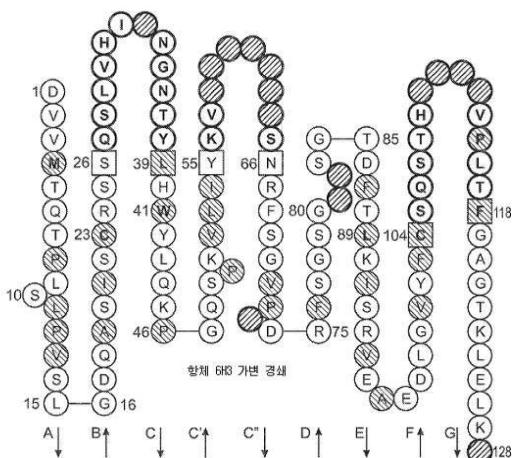
- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) **G01N 33/574** (2006.01)
- (52) CPC특허분류(Coo. Cl.)
C07K 16/2827 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7017826
- (22) 출원일자(국제) 2013년12월19일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2015년07월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/076701
- (87) 국제공개번호 WO 2014/100483
국제공개일자 2014년06월26일
- (30) 우선권주장
61/739,353 2012년12월19일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (71) 출원인
애플리뮨, 인크.
미합중국 메릴랜드주 20878 게터스버그 웨스트 왓
킨스 밀 로드 45
더 존스 홉킨스 유니버시티
미국 메릴랜드주 21218 볼티모어 찰스 스트리트
3400 엔.
- (72) 발명자
랭거만, 솔로몬
미국 메릴랜드 21215 볼티모어 크로스 컨트리 블
러바드 6606
리우, 린다
미국 메릴랜드 21029 클라크스빌 티퍼레이 코트
6512
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
박창남, 정대섭

전체 청구항 수 : 총 39 항

(54) 발명의 명칭 항 인간 B7-H4 항체 및 이의 용도

(57) 요약

B7-H4에 면역특이적으로 결합할 수 있는 항 인간 B7-H4 항체인 “6H3”, 이의 항원 결합 단편, 유도체, 및 인간화 변이체 및 이러한 분자들의 암 및 다른 질환의 치료 및 진단에서의 용도가 개시된다. 바람직한 구현예에서, 분자는 종양 생장을 예방하거나 늦추고/늦추거나, 종양 매개 억제를 저해하고/하거나, 종양을 제거하고/하거나, 종양 관련 대식세포(tumor-associated macrophage, “TAM”)의 활성을 차단하거나 고갈시키기 위해 사용되어, 그들의 활성을 변화시키고/시키거나 TAM 매개 면역 억제를 낮춘다.

대 표 도 - 도1a

(52) CPC특허분류(Coo. Cl.)

C07K 16/3069 (2013.01)

G01N 33/574 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/30 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C07K 2317/732 (2013.01)

C07K 2317/77 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

야오, 생

미국 메릴랜드 21004 콜롬비아 브라이스 오버룩 코트 11748

챈, 라이핑

미국 코네티컷 06514 햅던 캔터베리 로드 51

오버스트리트, 마이클, 글렌

미국 메릴랜드 21032 크라운스빌 브루스터 게이트 로드 1500

(30) 우선권주장

61/739,272 2012년12월19일 미국(US)

61/739,287 2012년12월19일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 항원 결합 단편을 포함하는 분자로서, 상기 분자는 인간 B7-H4에 면역특이적으로 결합하고, 상기 항원 결합 단편은,

- (1) 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 경쇄 가변 영역으로서, 상기 경쇄 가변 영역이 서열 번호 18 내지 23 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 것인, 경쇄 가변 영역; 및
- (2) 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역으로서, 상기 중쇄 가변 영역이 서열 번호 24 내지 29 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 것인, 중쇄 가변 영역을 포함하는, 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 분자는 인간 B7-H4에 면역특이적으로 결합하되,

- (I) 세포의 표면에 배열되거나;
- (II) 내인성 농도로 살아있는 세포의 표면에 배열되거나;
- (III) 살아있는 세포의 표면에 배열되고, B7-H4와 이의 세포 수용체 사이의 결합을 조절하거나;
- (IV) 살아있는 세포의 표면에 배열되고, 종양 관련 대식세포에 의한 면역 억제를 저해하거나;
- (V) 살아있는 세포의 표면에 배열되고, 종양 관련 대식세포의 활성을 조절하거나;
- (VI) 살아있는 종양 세포의 표면에 배열되고, 종양 매개 억제를 저해하거나;
- (VII) 살아있는 종양 세포의 표면에 배열되고 종양 특이적 세포 용해를 유발하는, 분자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 분자는,

- (1) 아미노산 서열 번호 19를 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 경쇄 가변 영역 및 아미노산 서열 번호 24를 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역;
- (2) 아미노산 서열 번호 19를 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 경쇄 가변 영역 및 아미노산 서열 번호 26을 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역;
- (3) 아미노산 서열 번호 19를 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 경쇄 가변 영역 및 아미노산 서열 번호 28을 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역;
- (4) 아미노산 서열 번호 19를 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 경쇄 가변 영역 및 아미노산 서열 번호 29를 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역;
- (5) 아미노산 서열 번호 20을 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 경쇄 가변 영역 및 아미노산 서열 번호 26을 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역;
- (6) 아미노산 서열 번호 20을 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 경쇄 가변 영역 및 아미노산 서열 번호 28을 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역;
- (7) 아미노산 서열 번호 20을 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 경쇄 가변 영역 및 아미노산 서열 번호 29를 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역;
- (8) 아미노산 서열 번호 22를 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 경쇄 가변 영역 및 아미노산 서열 번호 24를 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역;
- (9) 아미노산 서열 번호 22를 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 경쇄 가변 영역 및 아미노산 서열 번호 26을 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역;

- (10) 아미노산 서열 번호 22를 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 경쇄 가변 영역 및 아미노산 서열 번호 28을 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역;
- (11) 아미노산 서열 번호 22를 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 경쇄 가변 영역 및 아미노산 서열 번호 29를 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역;
- (12) 아미노산 서열 번호 23을 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 경쇄 가변 영역 및 아미노산 서열 번호 26을 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역;
- (13) 아미노산 서열 번호 23을 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 경쇄 가변 영역 및 아미노산 서열 번호 28을 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역; 또는
- (14) 아미노산 서열 번호 23을 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 경쇄 가변 영역 및 아미노산 서열 번호 29를 포함하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역을 포함하는, 분자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자가 검출가능하게 표지되거나, 접합된 독소, 약물, 수용체, 효소, 수용체 리간드를 포함하는, 분자.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자는 상기 세포 내에 내재될 수 있고 상기 세포의 사멸을 매개할 수 있는, 분자.

청구항 6

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 살아있는 세포가 종양 세포, 병원균이 감염된 세포 또는 대식세포인, 분자.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 분자는 항체이되, 상기 항체는,

- (I) 단일클론 항체, 인간 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체; 또는
- (II) 이중특이적, 삼중특이적, 또는 다중특이적 항체인, 분자.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자가 IgG1 또는 IgG4 항체인, 분자.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자는 ADCC 활성을 가지고, 직접적인 종양 또는 TAM 살상 활성을 가능하게 하고/하거나 TAM- 또는 종양 매개 억제를 저해할 수 있는, 분자.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자가 B7-H4 및 동일한 세포 상의 상이한 분자에 결합할 수 있는 이중특이적, 삼중특이적, 또는 다중특이적인 항체인, 분자.

청구항 11

치료적 유효량 또는 예방학적 유효량의 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 분자 및 생리학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 암 또는 감염성 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물로서, 상기 분자는 B7-H4 매개 억제에 대한 길항작용(antagonizing)으로 면역 반응을 상향 조절하는, 약학적 조성물.

청구항 12

암 또는 감염성 질환의 증상을 나타내는 대상체에서 상기 암 또는 감염성 질환을 치료하거나 상기 증상을 나타내기에 앞서 대상체에서 암 또는 감염성 질환을 예방하기 위한, 제11항의 약학적 조성물의 용도.

청구항 13

제11항에 있어서, 만성 바이러스 질환의 치료를 위한 상기 조성물 및 상기 용도는 상기 만성 바이러스 질환의 치료인, 약학적 조성물.

청구항 14

대상체에서 질환의 존재를 진단하기 위한 세포진 검정에서의 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 문자의 용도로서, 상기 세포진 검정은 상기 대상체의 세포를 상기 문자에 대한 결합능에 대하여 검정하는 단계를 포함하는, 용도.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 질환은 암 또는 T 세포 수 또는 건강에 영향을 미치는 질환인, 용도.

청구항 16

항암제로의 종양의 치료에 대한 대상체의 적합성을 결정하기 위한 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 문자의 용도로서, 상기 용도는 상기 종양의 미세환경 내에서 종양 관련 대식세포의 유효 또는 실제 농도를 결정하는 단계를 포함하는, 용도.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 항암제의 용량 또는 상기 항암제로의 상기 치료는 결정된 상기 종양 관련 대식세포의 유효 또는 실제 농도에 기반하여 설정되거나 조정되는, 용도.

청구항 18

B7-H4를 발현하는 종양 관련 대식세포의 유효 농도의 상승을 나타내는 것으로 확인된 환자에서 암을 치료하기 위한 치료적 유효량의 제11항의 약학적 조성물의, 용도.

청구항 19

제12항, 제16항 또는 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 또는 상기 암의 상기 치료는 화학요법, 호르몬 요법, 생물학적 요법, 면역요법, 방사 요법, 또는 수술을 추가적으로 포함하는, 용도.

청구항 20

항체 6H3의 항원 결합 단편을 포함하는 분자로서, 상기 분자는 면역특이적으로 인간 B7-H4에 결합하는, 분자.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 분자는 인간 B7-H4에 면역특이적으로 결합하고,

- (I) 세포의 표면에 배열되거나;
- (II) 내인성 농도로 살아있는 세포의 표면에 배열되거나;
- (III) 살아있는 세포의 표면에 배열되고, B7-H4와 이의 세포 수용체 사이의 결합을 조절하거나;
- (IV) 살아있는 세포의 표면에 배열되고, 종양 관련 대식세포에 의한 면역 억제를 저해하거나;
- (V) 살아있는 세포의 표면에 배열되고, 종양 관련 대식세포의 활성을 조절하거나;
- (VI) 살아있는 종양 세포의 표면에 배열되고, 종양 매개 억제를 저해하거나;
- (VII) 살아있는 종양 세포의 표면에 배열되고 종양 특이적 세포 용해를 유발하는, 분자.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 분자가 검출가능하게 표지되거나, 접합된 독소, 약물, 수용체, 효소, 수용체 리간드를 포함하는, 분자.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 분자는 상기 세포 내에 내재화될 수 있고 상기 세포의 사멸을 매개할 수 있는, 분자.

청구항 24

제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 살아있는 세포는 종양 세포, 병원균이 감염된 세포 또는 대식세포인, 분자.

청구항 25

제20항에 있어서, 상기 분자는 항체이되, 상기 항체는,

- (I) 단일클론 항체, 인간 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체; 또는
- (II) 이중특이적, 삼중특이적, 또는 다중특이적 항체인, 분자.

청구항 26

제20항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자가 IgG1 또는 IgG4 항체인, 분자.

청구항 27

제20항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자는 ADCC 활성을 가지고, 직접적인 종양 또는 TAM 살상 활성을 가능하게 하고/하거나 TAM- 또는 종양 매개 억제를 저해할 수 있는, 분자.

청구항 28

제20항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자가 B7-H4 및 동일한 세포 상의 상이한 분자에 결합할 수 있는 이중특이적, 삼중특이적, 또는 다중특이적인 항체인, 분자.

청구항 29

치료적 유효량 또는 예방학적 유효량의 제20항 내지 제28항 중 어느 한 항의 분자 및 생리학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 암 또는 감염성 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물로서, 상기 분자는 B7-H4 매개 억제에 대한 길항작용으로 면역 반응을 상향 조정하는, 약학적 조성물.

청구항 30

암 또는 감염성 질환의 증상을 나타내는 대상체에서 상기 암 또는 감염성 질환을 치료하거나 상기 증상을 나타내기에 앞서 대상체에서 암 또는 감염성 질환을 예방하기 위한, 제29항의 약학적 조성물의 용도.

청구항 31

제29항, 또는 제34항에 있어서, 만성 바이러스 질환의 치료를 위한 상기 조성물 및 상기 용도는 만성 바이러스 질환을 치료하는 것인, 조성물 또는 용도.

청구항 32

대상체에서 질환의 존재를 진단하기 위한 세포진 검정에서의 제20항 내지 제28항 중 어느 한 항의 분자의 용도로서, 상기 세포진 검정은 상기 대상체의 세포를 상기 분자에 대한 결합능에 대하여 검정하는 단계를 포함하는, 용도.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 질환은 암 또는 T 세포 수 또는 건강에 영향을 미치는 질환인, 용도.

청구항 34

항암제로의 종양의 치료에 대한 대상체의 적합성을 결정하기 위한 제21항 내지 제28항 중 어느 한 항의 분자의 용도로서, 상기 용도는 상기 종양 내 종양 관련 대식세포의 유효 또는 실제 농도를 결정하는 단계를 포함하는,

용도.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 항암제의 용량 또는 상기 항암제로의 상기 치료는 결정된 상기 종양 관련 대식세포의 유효 또는 실제 농도에 기반하여 설정되거나 조정되는, 용도.

청구항 36

B7-H4를 발현하는 종양 관련 대식세포의 유효 농도의 상승을 나타내는 것으로 확인된 환자에서 암을 치료하기 위한 치료적 유효량의 제29항의 약학적 조성물의, 용도.

청구항 37

제30항, 제34항 또는 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 또는 상기 암의 상기 치료는 화학요법, 호르몬요법, 생물학적 요법, 면역요법, 방사 요법, 또는 수술을 추가적으로 포함하는, 용도.

청구항 38

마우스 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 항원 결합 단편을 포함하는 분자로서, 상기 분자는 인간 B7-H4에 면역특이적으로 결합하고, 상기 항원 결합 단편은,

- (1) 마우스의 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 경쇄 가변 영역으로서, 상기 경쇄 가변 영역이 서열 번호 3의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변 영역; 및
- (2) 마우스의 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 중쇄 가변 영역으로서, 상기 중쇄 가변 영역이 서열 번호 5의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 분자.

청구항 39

항암제로의 종양 치료에 대한 대상체의 적합성을 결정하기 위한 제1항 내지 제10항 또는 제38항 중 어느 한 항의 분자의 용도로서, 상기 용도는 면역조직화학적으로 종양 세포의 표면 상 B7-H4의 수준을 결정하는 단계 및 종양 세포 상 B7-H4 수준이 동일한 조직으로부터의 비 종양 세포에 비해 상승된 경우 대상체가 치료에 적합한 것으로 결정하는 단계를 포함하는, 용도.

명세서

기술분야

[0001] 관련 문헌에 대한 상호 참조

본 출원은 각각 그 전체가 참조로서 포함된 2012년 12월 19일에 출원된 U.S.S.N. 61/739,272, 2012년 12월 19일에 출원된 U.S.S.N. 61/739,287, 및 2012년 12월 19일에 출원된 U.S.S.N. 61/739,353의 우선권 및 이점을 주장한다.

[0003] 서열 목록에 대한 참조

[0004] 본 출원은 문헌 및 컴퓨터 판독가능한 매체 내에 개시된 37 C.F.R. 1.821 이하 참조에 의한 하나 이상의 서열목록을 포함하고, 문헌 및 컴퓨터 판독가능한 개시는 그 전체가 참조로서 본원에 포함된다.

[0005] 본 발명은 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체인 “6H3” 및 이의 키메라 및 인간화 변이체, 및 이들의 항원 결합 단편을 포함하는 항 B7-H4 결합 분자 및 면역특이적으로 B7-H4에 결합할 수 있는 이의 유도체 및 암 및 다른 질환의 치료 및 진단에서 이러한 분자들의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 특히 종양 생장을 예방하거나 늦추고/늦추거나, 종양 매개 억제를 저해하고/하거나, 종양을 제거하고/하거나, 종양 관련 대식세포(tumor-associated macrophage, “TAM”)의 활성을 차단하거나 고갈시켜서, 그들의 활성을 변화시키고/시키거나 TAM 매개 면역 억제를 낮추기 위한 이러한 분자들의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0006] A. 세포 매개 면역 반응

[0007]

인간 및 다른 포유동물의 면역계는 감염 및 질환에 대한 보호를 제공하는 역할을 한다. 이러한 보호는 체액성 면역 반응 및 세포 매개 면역 반응에 의해 제공된다. 체액성 반응은 외부 표적(항원)을 인식하고 중화할 수 있는 항체 및 다른 생체 분자의 생성을 초래한다. 반대로, 세포 매개 면역 반응은 T 세포에 의한 대식세포, 자연 살상세포(NK), 및 항원 특이적 세포독성 T 림프구의 활성화, 및 항원의 인식에 응답하는 다양한 사이토카인의 분비와 관련된다(Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules," *Immunolog. Res.* 28(1):39-48).

[0008]

T 세포의 항원에 대한 면역 반응을 촉진으로 유도하는 능력은 2가지의 별개의 신호전달 상호작용을 필요로 한다 (Viglietta, V. et al. (2007) "Modulating Co-Stimulation," *Neurotherapeutics* 4:666-675; Korman, A.J. et al. (2007) "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy," *Adv. Immunol.* 90:297-339). 첫째로, 항원 제시 세포(antigen-presenting cell, APC)의 표면에 배열된 항원이 항원 특이적 미접촉(naive) CD4⁺ T 세포에 제시되어야 한다. 이러한 제시는 T 세포 수용체(TCR)를 통해 제시된 항원에 특이적일 면역 반응을 T 세포가 개시하도록 유도하는 신호를 전달한다. 두 번째로, APC와 별도의 T 세포 표면 분자 간의 상호작용에 의해 매개되는 일련의 공동 자극 신호가 T 세포의 제1 활성화 및 증식, 및 궁극으로 그들의 저해를 유발한다. 따라서, 제1 신호는 면역 반응에 특이성을 부여하고, 제2 신호는 반응의 성질, 규모 및 지속기간을 결정하는 역할을 한다.

[0009]

면역계는 공동 자극 리간드 및 수용체에 의해 엄격하게 조절된다. 이러한 분자들은 T 세포 활성화에 대한 제2 신호를 제공하고, 자신에 대한 면역을 제한하면서 감염에 대한 면역 반응은 최대화하기 위한 양성 및 음성 신호의 균형 잡힌 네트워크를 제공한다(Wang, L. et al. (March 7, 2011) "VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T Cell Responses," *J. Exp. Med.* 10.1084/jem.20100619:1-16; Lepenies, B. et al. (2008) "The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections," *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 8:279-288). APC의 B7.1(CD80) 및 B7.2(CD86) 리간드와 T 림프 구의 CD28 및 CTLA-4 수용체간의 결합이 특히 중요하다(Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules," *Immunolog. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation," *Immunol. Rev.* 229:307-321). B7.1 또는 B7.2의 CD28에 대한 결합은 T 세포 활성화를 자극하고; B7.1 또는 B7.2의 CTLA4에 대한 결합은 이러한 활성화를 저해한다 (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules," *Immunolog. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation," *Immunol. Rev.* 229:307-321; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited," *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548). CD28은 T 세포의 표면에서 구성적으로 발현되는 반면(Gross, J., et al. (1992) "Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse," *J. Immunol.* 149:380-388), CTLA4 발현은 T 세포 활성화 후 빠르게 상향조절된다(Linsley, P. et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement," *Immunity* 4:535-543). CTLA4가 친화도가 더 높은 수용체이기 때문에(Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126), 결합은 우선 (CD28을 통해) T 세포 증식을 개시한 다음, (CTLA4의 초기 발현을 통해) 이를 저해함으로써, 더 이상 증식이 요구되지 않을 때 효과를 약화시킨다.

[0010]

CD28 수용체의 리간드에 대한 추가적인 조사는 하나의 세트의 관련된 B7 분자들("B7 슈퍼페밀리")의 확인 및 특성분석을 이끌어낸다(Coyle, A.J. et al. (2001) "The Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T Cell Function," *Nature Immunol.* 2(3):203-209; Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited," *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548; Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands," *Genome Biol.* 6:223.1-223.7; Loke, P. et al. (2004) "Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T Cells," *Arthritis Res. Ther.* 6:208-214; Korman, A.J. et al. (2007) "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy," *Adv. Immunol.* 90:297-339; Flies, D.B. et al. (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity," *J. Immunother.* 30(3):251-260; Agarwal, A. et al. (2008) "The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance," *Curr. Opin. Organ Transplant.* 13:366-372; Lenschow, D.J. et al. (1996) "CD28/B7 System of T Cell Costimulation," *Ann. Rev. Immunol.* 14:233-258; Wang, S. et al. (2004) "Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses," *Microbes Infect.* 6:759-766). 적어도 8가지 패밀리 구성원이 존재한다: B7.1(CD80),

B7.2(CD86), 유도성 공동자극 리간트(ICOS-L; B7-H2), 프로그램화 세포 사멸-1 리간트 1(PD-L1; B7-H1), 프로그램화 세포 사멸-1 리간트 2(PD-L2; B7-DC), B7-H3(B7-RP2), B7-H4(또한, B7x 및 B7S1로도 지칭됨; Sica, G.L. et al. (2003) "B7-H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity," *Immunity* 18:849-861; Zang, X. et al. (2003) *B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,*" Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100:10388-10392; Prasad, D.V. et al. (2003) *B7S1, A Novel B7 Family Member That Negatively Regulates T Cell Activation,*" *Immunity* 18:863-873) 및 B7-H6(Brandt, C.S. et al. (2009) "The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans" , J Exp Med. 206(7):1495-503).

[0011] B7-CD28 패밀리 분자의 가용성 형태는 또한 류머티즘성 질환의 진행에 연루된다. 연구에서 가용성 PD-1이 류머티즘성 관절염(rheumatoid arthritis, RA) 환자에서 검출될 수 있고, 가용성 PD-1의 수치가 관절 낭액 내 TNF- α 농도와 관련된다는 것을 보여주었다. 가용성 B7-H4(sH4)는 난소 암 환자에서 잠재적인 생물마커로 검출되었고, 68명의 RA 환자 및 24명의 건강한 자원자의 연구로부터의 결과는 가용성 B7-H4이 건강한 사람 중 단지 13%에서만 존재하는 데 비해, RA 환자 중 65%의 혈액에 존재한다는 것을 보여준다(Simon, I. et al. (2006) "B7-H4 Is A Novel Membrane-Bound Protein And A Candidate Serum And Tissue Biomarker For Ovarian Cancer," *Cancer Res.* 66(3):1570-1575, Azuma, T. et al. (2009) "Potential Role Of Decoy B7-H4 In The Pathogenesis Of Rheumatoid Arthritis: A Mouse Model Informed By Clinical Data," *PLoS Med.*, 6(10):e1000166). 가용성 B7-H4의 수준은 건강한 사람(<5 ng/ml)에 비해 RA 환자(96.1 ng/ml)에서 유의하게 높았다.

[0012] 뮤라인 모델에서의 생체 내 연구에서는 sH4의 과발현 및 B7-H4의 결실이 염증을 유발하였다는 것을 보여준다 (Azuma, T. et al. (2009) "Potential Role Of Decoy B7-H4 In The Pathogenesis Of Rheumatoid Arthritis: A Mouse Model Informed By Clinical Data," *PLoS Med.* 6(10):e1000166). 마우스 내에서의 증상은 초기에 나타나고, 대조군보다 더 심각하며, 가용성 B7-H4의 염증성 효과는 중성구에 의존적인 것으로 나타났다. B7-H4에 의한 정상적인 신호전달을 모사하는 단백질을 사용하여, 마우스에서 질환 발달을 예방하였다.

B. B7-H4

[0014] 인간 B7-H4 단백질을 암호화하는 cDNA를 확인하였고, 태반 cDNA로부터 클로닝하였다(Sica, G.L. et al. (2003) "B7-H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity," *Immunity* 18:849-861; Zang, X. et al. (2003) *B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,*" Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100:10388-10392). B7-H4은 다음의 문헌들에서 논의된다: 미국 특허 제 7,931,896호; 제7,875,702호; 제7,847,081호; 제7,622,565호; 미국 특허 공개 제2011/0085970호; 제 2011/0020325호; 제2010/0256000호; 제2010/0240585호; 제2010/0227343호; 제2010/0227335호; 제2010/0158936호; 제2010/0092524호; 제2010/0028450호; 제2009/0275633호; 제2009/0215084호; 제2009/0176317호; 제 2009/0142342호; 제2009/0118175호; 제2009/0087416호; 제2009/0048122호; 제2009/0022747호; 제2009/0018315호; 제2008/0206235호; 제2008/0160036호; 제2008/0177039호; 제2008/0050370호; 제2007/0218032호; 제 2007/0184473호; 제2007/0172504호; 제2007/0160578호; 제2007/0122378호; 제2007/0036783호; 제2006/0003452호; 유럽 특허 공개 EP 제2124998호 및 EP 제2109455호; PCT 특허 공개 WO 2011/026132A2호; WO 2011/026122A2; WO 2011/005566A2; WO 2010/144295A1; WO 2010/102177A1; WO 2010/102167A1; WO 2009/111315A2; WO 2009/073533A2; WO 2008/092153A2; WO 2008/083239A2; WO 2008/083228A2; WO 2007/124361A2; WO 2007/122369A2; WO 2007/109254A2; WO 2007/087341A2; WO 2007/082154A2; WO 2007/067682A2; WO 2007/067681A2; WO 2007/041694A2; WO 2006/138670A2; WO 2006/133396A2; WO 2006/121991A2; WO 2006/066229A2; 및 WO 2006/007539A1.

[0015] 항 B7-H4 항체는 미국 특허 제7,888,477호; 제7,737,255호; 제7,619,068호; 제6,962,980호 및 미국 특허 공개 제20080199461호에 개시되어 있다. WO/2013/025779이 특허 관련 있다.

[0016] 인간 B7-H4 단백질은 282개의 아미노산 잔기를 가지며, 아미노산 잔기는 아미노 말단 세포외 도메인, 큰 소수성 막관통 도메인 및 매우 짧은 세포내 도메인(단지 2개의 아미노산 잔기로만 이루어짐)을 포함하는 것으로 분류된다. 다른 B7 패밀리 구성원처럼, B7-H4는 세포외 도메인 내에 한 쌍의 Ig-유사 영역을 가진다. B7-H4 단백질은 I형 막관통 단백질의 전체적인 구조를 가진다. 이러한 단백질은 다른 B7 패밀리 구성원들과 최소의 상동성(약 25%)을 가진다(Zang, X. et al. (2003) *B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,*" Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100:10388-10392).

[0017]

인간 B7-H4 cDNA 서열이 뮤라인 B7-H4 상동체를 확인하기 위해 사용된다. 뮤라인과 인간 오르토로그(ortholog) 사이의 동일성 수준(대략 87%)은 B7-H4가 진화적으로 매우 잘 보존되었음을 시사한다(Sica, G.L. et al. (2003) "B7-H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity," *Immunity* 18:849-861; Zang, X. et al. (2003) *B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,*" *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 100:10388-10392). 집중적인 상동성은 B7-H4 수용체 결합에 관여하는 것으로 여겨지는 단백질의 IgV 도메인에 대해서는 91%까지 증가한다(Stamper, C.C. et al. (2001) "Crystal Structure Of The B7-1/CTLA-4 Complex That Inhibits Human Immune Responses," *Nature* 410: 608-611; Schwartz, J.C. et al. (2001) "Structural Basis For Co-Stimulation By The Human CTLA-4/B7-2 Complex," *Nature* 410:604-608).

[0018]

다른 B7 구성원과는 대조적으로, B7-H4 mRNA는 널리 발현된다. 발현은 뇌, 심장, 신장, 간, 폐, 난소, 췌장, 태반, 전립선, 골격근, 피부, 소장, 비장, 위, 고환, 흉선, 및 자궁에서 발견된다(Sica, G.L. et al. (2003) "B7-H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity," *Immunity* 18:849-861; Zang, X. et al. (2003) *B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,*" *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 100:10388-10392; Prasad, D.V. et al. (2003) *B7S1, A Novel B7 Family Member That Negatively Regulates T Cell Activation,*" *Immunity* 18:863-873; Prasad, D.V. et al. (2003) *B7S1, A Novel B7 Family Member That Negatively Regulates T Cell Activation,*" *Immunity* 18:863-873).

[0019]

넓게 분포하는 B7-H4 mRNA의 발현에도 불구하고, 정상 세포 표면에서의 B7-H4 단백질의 존재는 제한되는 것으로 보인다(Sica, G.L. et al. (2003) "B7-H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity," *Immunity* 18:849-861; Choi, I.H. et al. (2003) "Genomic Organization And Expression Analysis Of B7-H4, An Immune Inhibitory Molecule Of The B7 Family," *J. Immunol.* 171:4650-4654). 새로 분리된 인간 T 세포, B 세포, 단핵구 및 수지상 세포는 (FACS 분석을 통해 결정된 바와 같이) 그들의 세포 표면에 B7-H4를 발현하지 않음에도 불구하고, 이러한 세포에서 B7-H4 발현이 시험관 내 리포풀리다당류(LPS), 식물성 혈구응집소(PHA), 감마 인터페론(IFN- γ), 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(PMA), 또는 이오노마이신 자극 후 유도될 수 있다(Sica, G.L. et al. (2003) "B7-H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity," *Immunity* 18:849-861). 이러한 광범위한 분포의 B7-H4 발현이, B7-H4의 기능이 다른 저해성 B7 분자들의 기능과는 상당히 다르다는 것을 발견했다(Zang, X. et al. (2003) *B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,*" *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 100:10388-10392 참조).

[0020]

B7-H4의 세포외 도메인이 다른 B7 패밀리 구성원과 단지 약 25%의 아미노산 상동성을 가진다는 이러한 발견 및 관찰과 일관되게, B7-H4는 공지된 B7 패밀리 수용체(즉, CTLA-4, ICOS, PD-1 또는 CD28)에 결합하지 않는다. B7-H4 특이적 수용체를 밝히기 위해 노력한 결과, 이러한 수용체가 활성화된 T 세포 상에 발현된다는 것을 밝혔다(Sica, G.L. et al. (2003) "B7-H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity," *Immunity* 18:849-861). B7-H4 융합 단백질의 T 세포 상의 추정 수용체에 대한 결합은 T 세포 증식 및 사이토카인(IL-2 및 IL-10) 생성을 유의하게 저해하는 것으로 밝혀졌고, 이러한 저해는 CD28 공동 자극에 대해 비가역적인 것으로 밝혀졌다(Zang, X. et al. (2003) *B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,*" *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 100:10388-10392; Prasad, D.V. et al. (2003) *B7S1, A Novel B7 Family Member That Negatively Regulates T Cell Activation,*" *Immunity* 18:863-873). B7-H4는 T 세포의 세포 주기 진행을 G₀/G₁기에서 중지시키는 것으로 밝혀졌는데(Sica, G.L. et al. (2003) "B7-H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity," *Immunity* 18:849-861), 이는 이러한 단백질이 아폽토시스를 유도하기보다는 세포 주기를 중지시킴으로써 저해 효과를 매개한다는 것을 나타낸다.

[0021]

항 B7-H4 항체는 시험관 내에서 비장 세포에 의한 IL-2 생성 수준을 현저하게 증가시키고, 생체 내에서 더 강한 면역 반응을 야기하는 것으로 밝혀졌다(Prasad, D.V. et al. (2003) *B7S1, A Novel B7 Family Member That Negatively Regulates T Cell Activation,*" *Immunity* 18:863-873; Zang, X. et al. (2003) *B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,*" *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 100:10388-10392; Prasad, D.V. et al. (2003) *B7S1, A Novel B7 Family Member That Negatively Regulates T Cell Activation,*" *Immunity* 18:863-873).

[0022]

B7-H4의 부재는 증성구 전구세포의 생장의 직접적인 조절을 통해 리스트리아 모노사이토제네스(*Listeria*

monocytogenes) 감염에 대한 저항성을 야기한다는 것이 입증되었다(Zhu, G. et al. (2009) “*B7-H4 Deficient Mice Display Augmented Neutrophil-Mediated Innate Immunity*,” *Blood* 113:1759–1769; Wei, J. et al. (2011) “*Tissue-Specific Expression Of B7x Protects From CD4 T Cell-Mediated Autoimmunity*,” *J. Exper. Med.* 208(8):1683–1694). 이처럼, B7-H4는 면역, 특히 자가면역 및 감염 저항성의 역할을 수행하는 것으로 제안된다. 따라서, 아고니스트 항 B7-H4 항체 및 B7-H4의 가용성 단백질 아고니스트가 염증성 장애의 치료를 위해 제안되고 있다(미국 특허 제931,896호; 미국 특허 공개 제2007/0122378호; 제2008/0160036호; 제2009/0142342호; 및 제2011/0020325호; 유럽 특허 공개 EP 제2124998호; PCT 특허 공개 WO 제2006/133396호; WO 제2007/041694호; WO 제2008/083228호; WO 제2009/111315호; WO 제2010/144295호; WO 제2011/005566호; WO 제2011/026122호; 및 WO 제2011/026132호).

[0023] B7-H4의 생체 내 유의성은 다수의 종양 조직에서 발견되는 높은 수준의 B7-H4 발현에 의해 추가적으로 입증되는 데, 예를 들면 인간 난소암(Choi, I.H. et al. (2003) “*Genomic Organization And Expression Analysis Of B7-H4, An Immune Inhibitory Molecule Of The B7 Family*,” *J. Immunol.* 171:4650–4654; Kryczek, I. et al. (2006) “*B7-H4 Expression Identifies A Novel Suppressive Macrophage Population In Human Ovarian Carcinoma*,” *J. Exp. Med.* 203(4):871–881; Bignotti, E. et al. (2006) “*Differential Gene Expression Profiles Between Tumor Biopsies And Short Term Primary Cultures Of Ovarian Serous Carcinomas: Identification Of Novel Molecular Biomarkers For Early Diagnosis And Therapy*,” *Gynecol. Oncol.* 103:405–416; Tringler, B. et al. (2006) “*B7-H4 Overexpression In Ovarian Tumors*,” *Gynecol. Oncol.* 100:44–52; Simon, I. et al. (2006) “*B7-h4 Is A Novel Membrane-Bound Protein And A Candidate Serum And Tissue Biomarker For Ovarian Cancer*,” *Cancer Res.* 66:1570–1575; Salceda, S. et al. (2005) “*The Immunomodulatory Protein B7-H4 Is Overexpressed In Breast And Ovarian Cancers And Promotes Epithelial Cell Transformation*,” *Exp. Cell Res.* 306:128–141), 비소세포폐암(Sun, Y. et al. (2006) “*B7-H3 And B7-H4 Expression In Non-Small-Cell Lung Cancer*,” *Lung Cancer* 53:143–151), 관 및 소엽성 유방암(Salceda, S. et al. (2005) “*The Immunomodulatory Protein B7-H4 Is Overexpressed In Breast And Ovarian Cancers And Promotes Epithelial Cell Transformation*,” *Exp. Cell Res.* 306:128–141; Tringler, B. et al. (2005) “*B7-H4 Is Highly Expressed In Ductal And Lobular Breast Cancer*,” *Clin. Cancer Res.* 11:1842–1848) 및 신세포 암종(Krambeck, A.E. et al. (2006) “*B7-H4 Expression In Renal Cell Carcinoma And Tumor Vasculature: Associations With Cancer Progression And Survival*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 103:10391–10396)이다. 종양 세포에서 B7-H4의 발현은 종양 공격성을 포함하는 부정적인 임상 및 병리학적 특징과 상관관계가 있다(Krambeck, A.E. et al. (2006) “*B7-H4 Expression In Renal Cell Carcinoma And Tumor Vasculature: Associations With Cancer Progression And Survival*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 103(2): 10391–10396).

C. 종양 관련 대식 세포(Tumor-Associated Macrophage, TAM)

[0024] 다수의 백혈구의 종양 자리로의 침윤에 주목한 염증과 암 사이의 연관이 관찰된 것은 한 세기 전보다 더 거슬러 올라간다(Balkwill, F. et al. (2001) “*Inflammation And Cancer: Back To Virchow?*,” *Lancet* 357:539–545; Coussens, L. M. et al. (2002) “*Inflammation and Cancer*,” *Nature* 420:860–867). 몇몇 연구에서는 현재 염증과 암을 연결시키는 두 개의 주요한 경로를 밝혔다: 내인성 및 외인성 경로(Allavena, P. et al. (2008) “*Pathways Connecting Inflammation and Cancer*,” *Curr. Opin. Genet. Devel.* 18:3–10; Colotta, F. (2009) “*Cancer-Related Inflammation, The Seventh Hallmark of Cancer: Links to Genetic Instability*,” *Carcinogenesis* 30(7): 1073–1081; Porta, C. et al. (2009) “*Cellular and Molecular Pathways Linking Inflammation and Cancer*,” *Immunobiology* 214:761–777). 내인성 경로는 염증 및 발암을 유발하는 유전적 변형을 포함하는 반면, 외인성 경로는 미생물/바이러스 감염 또는 암 발달과 연관되는 조직 내 만성 염증을 유발하는 자가면역 질환을 특징으로 한다. 두 경로는 염증성 매개인자의 중심적인 전사 인자(예컨대, NF-κB, STAT3, 및 HIF-1)를 활성화시켜서 염증에서 주요한 역할을 수행하는 백혈구를 동원하는 결과를 초래한다(Solinas, G. et al. (2009) “*Tumor-Associated Macrophages (TAM) As Major Players Of The Cancer-Related Inflammation*,” *J. Leukoc. Biol.* 86(5):1065–1073).

[0025] TAM은 염증과 암 사이의 연결을 제공한다. 대식세포는 활성화된 혈액 단핵구로부터 유래한 면역계 세포이다. 이들은 주로 병원균, 죽은 세포, 세포 찌꺼기 및 세포외 매트릭스(ECM)의 다양한 구성요소를 제거(즉, 식균작용)하기 위한 작용을 함으로써 병원균 또는 조직 손상에 의해 유발되는 염증 반응에 참여하는 것으로 인식되어 있다. 대식세포는 종양 미세환경에서 중요한 구성성분을 구성하고 종양 질량의 50%까지 나타날 수 있는 것으로 알

려져 있다.

[0027] 식균작용을 매개하는 것에 더하여, 대식세포는 전혈관신생(pro-angiogenic) 성장 인자 및 매트릭스 리모델링 프로테아제를 분비하고, 이에 따라 종양 발달 및 생장을 위해 필요한 혈관 기반의 발달(즉, 혈관신생)에서 중요한 역할을 수행한다(Pollard, J.W. (2009) “*Trophic Macrophages In Development And Disease*,” Nat. Rev. Immunol. 9:259-270). 이처럼, 종양 내 대식세포의 존재는 종양의 생장을 돋는 것으로 보인다. 다수의 연구들에서 종양 내 종양 관련 대식세포의 존재가 생존에 대한 부정적인 예후 인자라는 증거를 제공한다(Farinha, P. et al. (2005) “*Analysis Of Multiple Biomarkers Shows That Lymphoma-Associated Macrophage (LAM) Content Is An Independent Predictor Of Survival In Follicular Lymphoma (FL)*,” Blood 106:2169-2174; Dave, S.S. et al. (2004) “*Prediction Of Survival In Follicular Lymphoma Based On Molecular Features Of Tumor-Infiltrating Immune Cells*,” N. Engl. J. Med. 351:2159-2169; Solinas, G. et al. (2009) “*Tumor-Associated Macrophages (TAM) As Major Players Of The Cancer-Related Inflammation*,” J. Leukoc. Biol. 86(5):1065-1073).

[0028] 초기 종양은 중식하는 종양 세포로 산소 및 영양을 전달할 수 있는 종양 자신의 혈관을 생성하는 것을 필요로 한다. 따라서, 종양의 진행에는 종양 미세 환경 내에서 비악성 세포와 종양 세포간의 조화된 신호전달이 요구된다(Kaler, P. et al. (2010) “*Tumor Associated Macrophages Protect Colon Cancer Cells from TRAIL-Induced Apoptosis through IL-1 β -Dependent Stabilization of Snail in Tumor Cells*,” PLoS ONE 5(7):e11700 1-13). 현재에는 TAM이 종성구, 섭유아세포 및 종양 세포와 협력하는 다른 세포들과 마찬가지로 종양 내 혈관신생을 용이하게 하는 것이 잘 규명되어있다(Nucera, S. et al. (2011) “*The Interplay Between Macrophages And Angiogenesis In Development, Tissue Injury And Regeneration*,” Int. J. Dev. Biol. doi: 10.1387/ijdb.103227sn; Zamarron, B.F. et al. (2011) “*Dual Roles Of Immune Cells And Their Factors In Cancer Development And Progression*,” Int. J. Biol. Sci. 7(5):651-658; Liu, J. et al. (2011) “*Tumor-Associated Macrophages Recruit CCR6+ Regulatory T Cells And Promote The Development Of Colorectal Cancer Via Enhancing CCL20 Production In Mice*,” PLoS One. 6(4):e19495; Rigo, A. et al. (2010) “*Macrophages May Promote Cancer Growth Via A GM-CSF/HB-EGF Paracrine Loop That Is Enhanced By CXCL12*,” Molec. Cancer 9(273):1-13; Lin, J.Y. et al. (2011) “*Clinical Significance Of Tumor-Associated Macrophage Infiltration In Supraglottic Laryngeal Carcinoma*,” Chin. J. Cancer 30(4):280-286; Vergati, M. (2011) “*The Consequence Of Immune Suppressive Cells In The Use Of Therapeutic Cancer Vaccines And Their Importance In Immune Monitoring*,” J. Biomed. Biotechnol. 2011:182413).

[0029] B7-H4는 TAM(난소 종양에 존재하는 TAM을 포함)에서 과발현되는 것으로 나타난다(Kryczek, I. et al. (2006) “*B7-H4 Expression Identifies A Novel Suppressive Macrophage Population In Human Ovarian Carcinoma*,” J. Exp. Med. 203(4):871-881; Kryczek, I. et al. (2007) “*Relationship Between B7-H4, Regulatory T Cells, And Patient Outcome In Human Ovarian Carcinoma*,” Cancer Res. 67(18):8900-8905).

[0030] 염증 및 암의 치료에서의 이전의 모든 진전에도 불구하고, 암 치료를 위한 향상된 면역요법을 제공할 수 있는 개선된 조성물에 대한 요구가 여전히 존재한다. 따라서, 암 및 다른 질환 및 병태를 치료하기 위한 조성물 및 이들의 용도가 제공된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0031] 본 발명의 목적은 암 또는 박테리아 또는 바이러스 감염을 치료하기 위해 B7-H4 매개 면역 회피를 억제하기 위한 표면 B7-H4 내재화를 유도하기 위한 조성물 또는 방법을 제공하는 것이다.

[0032] 본 발명의 다른 목적은 암을 치료하기 위해 B7-H4 양성 종양을 표적화하는 B7-H4 mAb-적재 약물 접합체를 위한 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0033] 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체인 “6H3” 및 이의 키메라 및 인간화 변이체, 및 이들의 항원 결합 단편 및 이의 유도체를 포함하는 면역특이적으로 B7-H4에 결합할 수 있는 B7-H4 결합 분자 및 암 및 다른 질환의 치료 및 진단에서 이러한 분자들의 용도가 개시된다. 이러한 분자들의 용도는 종양 생장을 예방하거나 늦추고/늦추거나, 종양 매개 억제를 저해하고/하거나, 종양을 제거하고/하거나, 종양 관련 대식세포(tumor-associated macrophage,

TAM)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 B7-H4를 발현하는 세포의 활성을 차단하거나 고갈시키는 것이다. TAM 활성을 변화시킬 수 있고/있거나 TAM 매개 면역 억제를 낮출 수 있는 B7-H4의 활성의 차단 또는 감소가 또한 개시된다.

[0034] 예를 들어, 인간 B7-H4에 면역특이적으로 결합하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 항원 결합 단편을 포함하는 분자가 제공된다. 일부 구현예에서, B7-H4 결합 분자는 살아있는 세포의 표면 상에 배열된 B7-H4에 결합할 수 있고/있거나 B7-H4 결합 분자는 가용성 B7-H4 또는 내인성 농도로 발현된 B7-H4에 결합할 수 있다. 특정한 일 구현예에서, B7-H4 결합 분자는 가용성 B7-H4 또는 막 결합 B7-H4의 활성화를 실질적으로 차단할 수 있다.

[0035] 항체 6H3의 항원 결합 단편을 포함하는 분자가 개시되어, 분자는 인간 B7-H4에 면역특이적으로 결합한다. 예를 들어, 다음과 같은 인간 B7-H4에 면역특이적으로 결합할 수 있는 분자가 제공된다:

[0036] (I) 세포(특히, 살아있는 세포)의 표면에 배열되거나;

[0037] (II) 세포(특히, 살아 있는 세포)의 표면에 내인성 농도로 배열되거나;

[0038] (III) 살아있는 세포의 표면에 배열되고, B7-H4와 이의 세포 수용체 사이의 결합을 조절하거나;

[0039] (IV) 살아있는 세포의 표면에 배열되고, 종양 관련 대식세포에 의한 면역 억제를 저해하거나;

[0040] (V) 살아있는 세포의 표면에 배열되고, 종양 관련 대식세포의 활성을 조절하거나;

[0041] (VI) 살아있는 종양 세포의 표면에 배열되고, 종양 매개 억제를 저해하거나;

[0042] (VII) 살아있는 종양 세포의 표면에 배열되고, 종양 특이적 세포 용해를 유발하거나;

[0043] 이들 중 임의의 조합.

[0044] B7-H4에 면역특이적으로 결합할 수 있는 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 “6H3”의 인간화 변이체 및 그들의 항원 결합 단편 및 이의 유도체 및 암 및 다른 질환의 진단 및 치료에서의 이러한 분자들의 용도가 또한 제공된다. 종양 생장을 방지하거나 늦추고/늦추거나, 종양 매개 억제를 저해하고/하거나, 종양을 제거하고/하거나, 종양 관련 대식세포(tumor-associated macrophage, “TAM”)의 활성을 차단하거나 고갈시켜서 그들의 활성을 변화시키고/시키거나 TAM 매개 면역 억제를 낮추기 위한 이러한 분자들의 용도가 또한 개시된다.

[0045] 예를 들어, 인간 B7-H4에 면역특이적으로 결합하는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 항원 결합 단편을 포함하는 분자가 제공되어, 상기 항원 결합 단편은 다음을 포함한다:

[0046] (1) 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 경쇄 가변 영역으로서, 상기 경쇄 가변 영역이 서열 번호 18 내지 23 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 것인, 경쇄 가변 영역; 및

[0047] (2) 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역으로서, 상기 중쇄 가변 영역이 서열 번호 24 내지 29 중 어느 하나의 아미노산 서열을 가지는 것인, 중쇄 가변 영역.

[0048] 특정한 일 구현예에서, 인간 B7-H4 결합 분자는 살아있는 세포의 표면 상에 배열된 B7-H4에 결합할 수 있고/있거나 B7-H4 결합 분자가 가용성 B7-H4 또는 내인성 농도로 발현된 B7-H4에 결합할 수 있고, 특히 B7-H4 결합 분자가 가용성 B7-H4 또는 막 결합 B7-H4의 활성을 실질적으로 차단할 수 있다.

[0049] 따라서, 항체 6H3의 인간화 변이체의 항원 결합 단편을 포함하는 분자가 제공되어, 분자는 인간 B7-H4에 면역특이적으로 결합한다. 예를 들어, 인간 B7-H4에 면역특이적으로 결합할 수 있는 분자가 제공된다:

[0050] (I) 세포(특히, 살아 있는 세포)의 표면에 배열되거나;

[0051] (ii) 세포(특히, 살아 있는 세포)의 표면에 내인성 농도로 배열되거나;

[0052] (III) 살아있는 세포의 표면에 배열되고, B7-H4와 이의 세포 수용체 사이의 결합을 조절하거나;

[0053] (IV) 살아있는 세포의 표면에 배열되고, 종양 관련 대식세포에 의한 면역 억제를 저해하거나;

[0054] (V) 살아있는 세포의 표면에 배열되고, 종양 관련 대식세포의 활성을 조절하거나;

[0055] (VI) 살아있는 종양 세포의 표면에 배열되고 종양 매개 억제를 저해하거나;

[0056] (VII) 살아있는 종양 세포의 표면에 배열되고 종양 특이적 세포 용해를 유발하거나;

- [0057] 이를 중 임의의 조합.
- [0058] 또한 이러한 분자들의 구현예가 개시되되, 이러한 분자들은 검출가능하게 표지되거나, 접합된 독소, 약물, 수용체, 효소, 수용체 리간드를 포함한다. 일부 구현예에서, 개시된 분자들은 세포 내로 내재화될 수 있고 세포의 사멸을 매개할 수 있다.
- [0059] 살아있는 세포는 종양 세포, 병원균이 감염된 세포 또는 대식세포일 수 있다.
- [0060] 분자는 단일클론 항체, 인간 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.
- [0061] 분자는 IgG1 또는 IgG4 항체일 수 있다. 분자는 ADCC 활성을 가질 수 있고/있거나, 직접적인 종양 살상 활성을 가질 수 있고/있거나, ADC 활성을 가질 수 있고/있거나, TAM-매개 및/또는 종양 매개 억제를 저해할 수 있다.
- [0062] 분자는 이중특이적, 삼중특이적 또는 다중특이적 항체, 예를 들어 B7-H4 및 동일 세포 상의 다른 분자에 결합할 수 있는 항체일 수 있다.
- [0063] 개시된 B7-H4 결합 분자를 포함하는 약학적 조성물 및 암 또는 감염성 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물의 용도가 개시된다. 약학적 조성물은 치료적 유효량 또는 예방적 유효량의 하나 이상의 B7-H4 결합 분자 및 생리학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함할 수 있고, 분자는 B7-H4 매개 억제에 대한 길항작용(antagonizing)을 하여 면역 반응을 상향 조절한다.
- [0064] 약학적 조성물은 암 또는 감염성 질환의 증상을 나타내는 대상체의 암 또는 감염성 질환(특히, 만성 바이러스 감염)의 치료 또는 증상의 발현에 앞서 대상체에서 암 또는 감염성 질환을 예방하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 예방적 사용이 또한 제공된다.
- [0065] 치료적 유효량 또는 예방적 유효량의 하나 이상의 B7-H4 결합 분자 및 생리학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 염증의 치료를 위한 약학적 조성물이 개시되되, 분자가 B7-H4 매개 억제를 향상시켜 면역 반응을 하향조절한다.
- [0066] 약학적 조성물은 염증(특히, 자가면역 질환, 이식편 대 숙주 질환, 숙주 대 이식편 질환, 또는 이식 거부 반응이고, 이러한 용도는 자가면역 질환, 이식편 대 숙주 질환, 숙주 대 이식편 질환 또는 이식 거부 반응의 치료임)의 치료를 위해 사용될 수 있다.
- [0067] 개시된 분자는 대상체에서 질환(특히 암 또는 T 세포 수 또는 건강에 영향을 미치는 질환)의 존재를 진단하기 위한 세포진 검정에 사용될 수 있다. 특정한 일 구현예에서, 세포진 검정은 대상체의 세포를 분자에 결합하는 세포의 능력에 대해 검정하는 단계를 포함한다.
- [0068] 개시된 분자는 항암제로의 종양의 치료에 대한 대상체의 적합성을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 용도는 종양에서 종양 관련 대식세포의 유효 또는 실제 농도 및/또는 종양 세포 상의 B7-H4 발현 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 특정한 일 구현예에서, 항암제의 용량 또는 항암제로의 치료는 결정된 종양 관련 대식세포의 유효 또는 실제 농도에 기반하여 설정되거나 조정된다.
- [0069] 치료적 유효량의 개시된 약학적 조성물이 환자에서 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 환자가 종양 세포 상에서 높은 수준의 B7-H4 발현 및/또는 B7-H4를 발현하는 종양 관련 대식세포의 유효 농도의 상승을 나타내는 것으로 확인된다.
- [0070] 치료적으로 유효한 양의 개시된 약학적 조성물이 또한 대상체 내에서 면역 자극 반응을 자극하거나 향상시키거나 증가시키기 위해 사용될 수 있거나 면역 저해 반응을 감소시키거나 지연시키거나 예방하기 위해 사용될 수 있거나 이들의 조합을 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 암 또는 종양을 가지고 있거나 암 또는 종양이 발달될 수 있거나, 감염을 가지고 있거나 감염이 발달될 수 있다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 암 세포 또는 감염된 세포에 대한 면역 자극 반응을 자극하거나, 향상시키거나 증가시키는 데 효과적이다.
- [0071] 일부 구현예에서, 종양 또는 암의 치료는 화학요법, 호르몬 요법, 생물학적 요법, 면역요법, 방사 요법 또는 수술을 추가적으로 포함한다.
- [0072] 일부 구현예에서, 하나 이상의 개시된 B7-H4 결합 분자가 종양 세포, 병원균이 감염된 세포 또는 대식세포에 접촉한다.

[0073]

특정 구현예에서, B7-H4 결합 분자는 B7-H4와 이의 세포 수용체 사이의 결합을 조절한다.

도면의 간단한 설명

[0074]

도 1a 및 b는 뮤라인 항체 6H3의 경쇄(**도 1a**) 및 중쇄(**도 1b**)의 가변 도메인의 콜리에 펠스(Collier Perles) 2D 도면을 보여주는 다이어그램이다. 사슬의 3개의 CDR 루프들이 다이어그램의 상단에 나타나있다.

도 2a 및 b는 티미딘 삽입(**도 2a**) 및 IL-17 발현(**도 2b**)에 의해 측정된 B7-H4 Ig로 매개되는 T 세포 활성화의 억제를 차단하는 항체 6H3의 능력을 항체 농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)의 함수로서 보여주는 선 그래프이다

도 3a 내지 d는 항체 6H3이 난소암 환자의 T 세포 반응(IL-17 또는 INF γ)을 생성하는 기능적 CD4 및 CD8 세포)을 난소암 환자로부터의 TAM의 존재 하에 향상시킬 수 있다는 것을 보여주는 산점도이다(**도 3a**: CD4, 동형 대조군; **도 3b**: CD8, 동형 대조군; **도 3c**: CD4, 항-B7-H4 항체 6H3; **도 3d**: CD8, 항-B7-H4 항체 6H3).

도 4a 내지 I는 난소암 환자 종양 관련 대식세포(tumor-associated macrophages, TAM)에 의한 B7-H4(**도 4h**) 및 다른 항원(CD11b(**도 4a**), CD14(**도 4b**), CD123(**도 4c**), CD86(**도 4d**), CD80(**도 4e**), HLA-DR(**도 4f**), B7-H1(**도 4g**), 및 B7-DC(**도 4i**))의 발현 및 이러한 세포에 의한 B7-H4 발현을 검출하는 항체 6H3의 능력을 보여주는 산점도이다.

도 5는 B7-H4에 결합하는 항체 6H3의 결합 동역학을 항체 농도(nM)의 함수로서 보여주는 결합 곡선이다.

도 6은 다른 항 B7-H4 항체들(즉, 항체 H74, 2D1, 2H9, 2E11 및 8E11)에 비교하여 항체 6H3의 인간 H7-H4의 결합의 동역학을 항체 농도($\log[\text{mAb}]$, ng/mL)의 함수로서 보여주는 결합 곡선이다.

도 7은 B7-H4의 IgC 영역(**변이체 1**: 서열 번호 1의 IgV 잔기 29-149; **변이체 2**: 서열 번호 1의 IgV 잔기 29-154; **변이체 3**: 서열 번호 1의 IgV 잔기 29-158; **변이체 4**: ECD-hIgG4; **변이체 5**: 서열 번호 1의 IgC 잔기 154-259; **변이체 6**: ECD-hIgG1-서열 번호 7)에 결합하는 항체 6H3의 능력을 항체 농도(nM)의 함수로서 보여주는 결합 곡선이다.

도 8a 내지 c는 항 인간 B7-H4 항체 2H9(**도 8a**), 2D1(**도 8b**) 및 H74(**도 8c**)에 의해 인식되는 B7-H4의 영역(**변이체 1**: 서열 번호 1의 IgV 잔기 29-149; **변이체 2**: 서열 번호 1의 IgV 잔기 29-154; **변이체 3**: 서열 번호 1의 IgV 잔기 29-158; **변이체 4**: ECD-hIgG4; **변이체 5**: 서열 번호 1의 IgC 잔기 154-259; **변이체 6**: ECD-hIgG1-서열 번호 7)을 항체 농도(nM)의 함수로서 보여주는 결합 곡선이다.

도 9는 항 인간 B7-H4 항체 6H3, 2H9 및 2D1의 B7-H4 Ig로 매개되는 T 세포 활성화의 억제(3H-티미딘 삽입에 의해 측정된 증식(ΔCPM))를 차단하는 능력을 항체 농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)의 함수로서 비교한 선 그래프이다

도 10a 내지 f는 항체(단핵구가 없는 대조군, 팔리비주맙, 2H9, 2D1, 6H3, 항-B7-H1, 항-PD1)의 IFN γ 초회감작된 단핵구 매개 억제를 역전시키는 능력을 보여주는 막대 그래프이다. T 세포는 IL-2(CD4 $^+$ T 세포, **도 10a**; CD8 $^+$ T 세포, **도 10b**), TNF- α (CD4 $^+$ T 세포, **도 10c**; CD8 $^+$ T 세포, **도 10d**) 또는 IL-8(CD4 $^+$ T 세포, **도 10e**; CD8 $^+$ T 세포, **도 10f**)에 대하여 염색되었다.

도 11a 및 b는 항체 6H3이 B7-H4로 형질감염된 세포주 및 B7-H4 양성 유방암 세포주 SK-BR-3의 표면에 발현된 B7-H4의 강력한 내재화를 유도한다는 것을 보여준다. **도 11a**는 293T B7-H4 형질감염체의 Cypher5B 형광을 Cypher로 표지된 항체 6H3과 0, 1, 및 3 시간 항온배양한 후 유세포 측정한 결과를 보여주는 일련의 히스토그램이다. **도 11b**는 시간에 따른 B7-H4 표면 염색 및 Cypher 형광을 보여주는 선 그래프이다.

도 12a 및 b는 Cypher 표지된 6H3과의 항온배양 중 시간에 따라 B7-H4 양성 인간 유방암 세포주 SK-BR3 세포 상의 대조군에 대한 B7-H4 표면 염색 및 Cypher 형광을 보여주는 히스토그램이다.

도 13a 내지 c는 항체 6H3의 조직학 검체의 B7-H4 양성 종양 세포 검출능을 보여주는 현미경 사진이다. **도 13a 및 b**는 6H3으로 염색된 침샘 조직의 사진이고, **도 13c**는 두 가지의 상이하지만 연관된 난소의 장액성 낭종 병변을 보여준다.

도 14는 4°C에서 30분 간 처리 후 EG7(B7-H4 음성 세포), EG7.IG7(B7-H4 저발현 세포) 및 EG7.IVB3(B7-H4 고발현 세포) 내에서 키메라 2E11(-●-), 키메라 2H9(-■-), 키메라 2D1(-▲-), 및 키메라 6H3(-▼-)의 내재화를

보여주는 선 그래프이다.

도 15는 4℃에서 30분간 처리 후 EG7(B7-H4 음성 세포), EG7.IG7(B7-H4 저발현 세포) 및 EG7.IVB3(B7-H4 고발현 세포) 내에서 키메라 6H3(-●-), 인간화 변이체 2(-▲-), 인간화 변이체 6(-▲-), 인간화 변이체 7(-▲-), 인간화 변이체 9(-▲-), 인간화 변이체 12(-▲-), 및 인간화 변이체 14(-▲-)의 내재화를 보여주는 선 그래프이다.

도 16은 항 B7-H4 항체의 내재화를 내재화가 우세한 조건 하에 B7-H4의 세포 표면 발현의 함수로서 보여주는 선 그래프이다.

도 17은 항 B7-H4 항체의 내재화를 내재화가 우세하지 않은 조건 하에 B7-H4의 세포 표면 발현의 함수로서 보여주는 선 그래프이다.

도 18a 및 b는 E.G7ova/hB7-H4 세포(**도 18a**) 및 CT26/hB7-H4 세포(**도 18b**) 내 항 B7-H4 항체의 내재화를 보여주는 막대 그래프이다(X 축을 따라 왼쪽부터 오른쪽): 인간 키메라 6H3, 인간화 6H3 V2, 인간화 6H3 V6, 인간화 6H3 V7, 인간화 6H3 V9, 인간화 6H3 V12, 인간화 6H3 V14, 6H3.m1(마우스 IgG1), 6H3.m2a(마우스 IgG2a), 음성 대조군(항 PD-1 항체), 무처리.

도 19a 내지 c는 항체 의존성 세포 매개 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)을 측정하도록 설계된 검정에서 4종의 상이한 건강한 말초 혈액 단핵구 세포(peripheral blood mononucleated cell, PBMC) 공여자(117, 119, 121, 122)에 대하여 효과기 세포에 의한 EG7.B7H4 표적 세포의 특이적인 용해%를 3종의 상이한 효과기 세포:표적 세포 비(500,000:25,000(**도 19a**), 500,000:10,000(**도 19b**), 및 500,000:5,000(**도 19c**))에서의 키메라 6H3 항체의 농도((log (ng/ml))의 함수로서 보여주는 선 그래프이다.

도 20은 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)을 측정하도록 설계된 검정에서 3종의 상이한 공여자의 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)(114, 121, 122)로부터의 효과기 세포에 의한 EG7.B7H4 표적 세포의 특이적인 용해%를 14 종의 상이한 6H3의 인간화 변이체에 대하여 보여주는 막대 그래프이다(항체 농도 10 ng/ml, 1:20의 표적 세포:효과기 세포 비).

도 21a 내지 d는 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)을 측정하도록 설계된 검정에서 효과기 세포로서 4종의 상이한 공여자(공여자 118(**도 21a**), 공여자 117(**도 21b**), 공여자 121(**도 21c**) 또는 공여자 122(**도 21d**))로부터의 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)와 조합하여 증가하는 농도의 변이체 11 또는 변이체 14 인간화 6H3 항체 ($\log[\text{ng/mL}]$ 항체)를 이용하여 표적 세포의 특이적 용해%를 보여주는 막대 그래프이다.

도 22a 및 b는 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)을 측정하도록 설계된 검정에서 대조군 IgG1, 또는 6종의 상이한 농도(2000 ng/ml, 500 ng/ml, 125 ng/ml, 31.3 ng/ml, 7.81 ng/ml, 1.95 ng/ml)의 키메라 6H3 항체 중 하나의 존재 하에 3가지의 상이한 효과기 세포:표적 세포 비(20:1, 50:1, 100:1)에서 117(**도 22a**) 또는 120(**도 22b**) 공여자 세포에 의한 SK-BR-3 세포의 용해 %를 보여주는 막대 그래프이다.

도 23a 및 b는 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)을 측정하도록 설계된 검정에서 대조군 IgG1, 또는 6종의 상이한 농도(2000 ng/ml, 500 ng/ml, 125 ng/ml, 31.3 ng/ml, 7.81 ng/ml, 1.95 ng/ml)의 키메라 6H3 항체 중 하나의 존재 하에 3가지의 상이한 효과기 세포:표적 세포 비(20:1, 50:1, 100:1)에서 117(**도 23a**) 또는 120(**도 23b**) 공여자 세포에 의한 SK-BR-3 세포의 특이적 용해 %를 보여주는 막대 그래프이다.

도 24a 및 b는 대조군, 키메라 6H3 항체 및 HERCEPTIN® 항체를 활용한 보체 의존성 세포독성 검정의 결과를 보여주는 막대 그래프이다. **도 24a**는 다양한 항체 및 항체 농도에 대한 대조군, 1:2 보체, 및 1:5 보체 희석액에서의 RFU(상대 형광 단위-black로 보정됨)를 보여준다. 왼쪽부터 오른쪽으로, 각 보체 희석액인 막대들의 집합은 다음을 나타낸다: 제형 완충액, 50 μg/ml IgG1(음성 대조군), 5 μg/ml IgG1(음성 대조군), 0.5 μg/ml IgG1(음성 대조군), 50 μg/ml 키메라 6H3, 5 μg/ml 키메라 6H3, 0.5 μg/ml 키메라 6H3, 50 μg/ml HERCEPTIN® 5 μg/ml HERCEPTIN®, 0.5 μg/ml HERCEPTIN®. **도 24b**는 다양한 항체 및 항체 농도에 대한 대조군, 1:2 보체, 및 1:5 보체 희석액에서의 특이적 용해를 보여준다. 왼쪽부터 오른쪽으로, 각 보체 희석액인 막대들의 집합은 다음을 나타낸다: 50 μg/ml 키메라 6H3, 5 μg/ml 키메라 6H3, 0.5 μg/ml 키메라 6H3, 50 μg/ml HERCEPTIN® 5 μg/ml HERCEPTIN®, 0.5 μg/ml HERCEPTIN®.

도 25는 CTL-매개 용해 검정에서 상이한 효과기 세포:표적 세포 비에서의 Ag+ 표적 세포의 생존(CTL 부재 시 평균의 %)을 보여주는 막대 그래프이다.

도 26은 CTL-매개 용해 검정에서 대조군 IgG 또는 키메라 6H3 항체의 존재 하에 상이한 효과기 세포:표적 세포

비에서 EG7.B7H4+OVA 표적 세포의 특이적 용해%를 보여주는 막대 그래프이다. 왼쪽부터 오른쪽으로, 각 효과가 세포:표적 세포비인 막대들의 집합은 다음을 나타낸다: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 대조군 IgG, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 대조군 IgG, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 키메라 6H3, 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 키메라 6H3.

도 27a는 루이스 폐 암종(Lewis Lung Carcinoma, LCC) 종양 마우스 모델을 활용한 제1 실험에서 시간(종양 접종 후 날짜)에 따른 종양 부피(mm^3)를 보여주는 선 그래프로서, 종양을 가진 마우스는 제형 완충액 대조군(-◆-), 6H3.m1(-■-), 또는 6H3.m2a(-▲-)로 처리되었다. 도 27b는 루이스 폐 암종(Lewis Lung Carcinoma, LCC) 종양 마우스 모델에서 시간(종양 접종 후 날짜)에 따른 마우스의 생존%를 보여주는 카플란 마이어(Kaplan-Meier) 곡선으로서, 마우스는 제형 완충액 대조군(-◆-), 6H3.m1(-■-), 또는 6H3.m2a(-▲-)로 처리되었다.

도 28a는 루이스 폐 암종(LCC) 종양 마우스 모델을 활용한 제2 실험에서 시간(종양 접종 후 날짜)에 따른 종양 부피(mm^3)를 보여주는 선 그래프로서, 종양을 가진 마우스는 제형 완충액 대조군(-◆-), 6H3.m1(-■-), 또는 6H3.m2a(-▲-)로 처리되었다. 도 28b는 루이스 폐 암종(LCC) 종양 마우스 모델에서 시간(종양 접종 후 날짜)에 따른 마우스의 생존%를 보여주는 카플란 마이어 곡선으로서, 마우스는 제형 완충액 대조군(-◆-), 6H3.m1(-■-), 또는 6H3.m2a(-▲-)로 처리되었다.

도 29a는 CT26.B7H4 폐암 모델에서 종양 세포의 정맥 내 접종 후 치료의 부재 하에 시간(일)에 따른 종양의 성장 동역학(종양 수)을 보여주는 점도표이다. 도 29b는 CT26.B7H4 폐암 모델에서 종양 세포의 정맥 내 접종 및 제형 완충액(FB), 10일차부터 시작한 10 mg/kg 6H3.m2a(10 mg/kg -10); 10일차부터 시작한 1 mg/kg 6H3.m2a(1 mg/kg -10); 14일차부터 시작한 10 mg/kg 6H3.m2a(10 mg/kg -14); 또는 14일차부터 시작한 1 mg/kg 6H3.m2a(1 mg/kg -14)로의 치료 후 시간(일)에 따른 종양 수를 보여주는 점도표이다.

도 30은 제형 완충액 또는 100 mg/kg 의 6H3.m1 또는 6H3.m2의 주 1회 투여의 4회 후 24일차의 마우스 혈당 (mg/dL)을 보여주는 점도표이다.

도 31은 100 mg/kg 의 6H3.m1 또는 6H3.m2의 주 1회 투여의 4회 후 마우스 혈청에서 6H3.m1 또는 6H3.m2의 최고 점(C_{max}) 및 골(C_{min})에 대한 항체 수준(mg/mL)을 보여주는 점도표이다.

도 32a 내지 b는 혈청 항체 농도(log[항체], pg/ mL)의 함수로서 6H3.m1(32a) 또는 6H3.m2(32b)에 대한 상대 형광 단위(RFU)를 보여주는 선 그래프이다.

도 33은 B7-H4의 세포와 도메인에 결합하는 인간 키메라 6H3 및 14종의 인간화 변이체를 측정한 ELISA 검정(항체 농도(Log10(nM))의 함수로서 OD450)의 결과를 보여주는 결합 곡선이다.

도 34a 및 b는 B7-H4-Ig에 결합하는 키메라 6H3 및 인간화 변이체 V1~V7(도 34a) 및 V8~V14(도 34b)를 측정한 경쟁적 ELISA 검정(항체 농도(ng/mL)log)의 함수로서 450 nm에서의 흡광도)의 미가공 결과를 보여주는 결합 곡선이다.

도 35a 및 b는 B7-H4를 발현하는 세포에 결합하는 키메라 6H3, 인간화 변이체 V2, V6, V7, V9, V12, V14, 및 음성 대조군 항 PD-1 항체(도 34a 단독)를 측정한 경쟁적 ELISA 검정(항체 농도((ng/mL)log)의 함수로서 450 nm에서의 흡광도)의 미가공 결과(도 35a) 및 배경 감산 결과(도 35b)를 보여주는 결합 곡선이다.

도 36은 B7-H4를 발현하는 HEK293 형질감염체에 결합하는 6H3의 인간화 변이체의 항체 결합(항체 농도(nM)의 함수로서 평균 형광 강도(mean fluorescent intensity, MFI))을 보여주는 결합 곡선이다.

도 37은 마우스 B7-H4mIg 융합 단백질에 결합하는 항체 키메라 6H3 및 6H3의 인간화 변이체를 측정한 ELISA 검정(항체 농도(log10(nM))의 함수로서 OD450)의 결과를 보여주는 결합 곡선이다.

도 38a 내지 d는 다양한 농도(0, 1.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 또는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 키메라 6H3(“모”) 또는 6H3의 인간화 변이체와 조합하여 B7-H4-Ig 융합 단백질로 처리한 세포에 대한 IL-17(도 38a), IFN γ (도 38b), 증식([³H]-티미딘 삽입)(도 38c), 및 IL-10 분비의 분비(도 38d)를 보여주는 선 그래프이다.

* 대조군Ig 사용.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0075] 다수의 종양 조직, 예를 들어, 인간 난소암에서 발견되는 높은 수준의 B7-H4 발현은 면역 억제 매개에 있어서 B7-H4의 주요한 역할을 시사한다. 또한, B7-H4를 발현하는 TAM은 종양 관련 항원 특이적 T 세포 면역을 억제하

는 것으로 밝혀졌다(Kryczek, I. et al. (2006) “*B7-H4 Expression Identifies A Novel Suppressive Macrophage Population In Human Ovarian Carcinoma*,” J. Exp. Med. 203(4):871-881). TAM 내 B7-H4 발현 강도는 종양 내 Treg 세포 수와 유의하게 상호관련된다. 더욱이, TAM 상에 발현된 B7-H4는 불량한 환자 결과에 관련된다(Kryczek, I. et al. (2006) “*B7-H4 Expression Identifies A Novel Suppressive Macrophage Population In Human Ovarian Carcinoma*,” J. Exp. Med. 203(4):871-881). 이전에 발표된 데이터는, 또한, TAM이, 종양 내로의 Treg 세포 추적(trafficking) 및 TAM 자신을 포함하는 항원 제시 세포(APC) 상의 Treg 세포로 유도된 B7-H4 발현을 매개하는 케모카인 CCL22를 자발적으로 생성한다는 것을 보여준다(Kryczek, I. et al. (2006) “*Cutting Edge: Induction Of B7-H4 On APCs Through IL-10: Novel Suppressive Mode For Regulatory T Cells*,” J. Immunol. 177(1):40-44). 종합하면, 이러한 발견은 B7-H4를 발현하는 종양 세포 및 TAM이 종양 미세환경 내 면역 억제에서 매우 중요한 역할을 수행하여 종양이 면역계에 의해 검출되는 것을 피할 수 있도록 한다(“면역 회피”)는 것을 가리킨다. B7-H4를 차단하거나, B7-H4의 표면 발현을 조절하거나, B7-H4 매개 신호 전달을 조절하거나, TAM을 고갈시킴으로써, B7-H4에 면역특이적으로 결합할 수 있거나, B7-H4의 원래의 수용체와의 상호작용을 예방할 수 있는 개시된 분자는 암에 대한 효과적인 면역요법으로서 하나의 전략을 제시한다.

[0076] B7-H4에 면역특이적으로 결합할 수 있는 분자뿐 아니라 암 및 다른 질환들의 치료 및 진단에서의 이러한 분자들의 용도가 제공된다. 종양 생장을 예방하거나 늦추고/늦추거나, 종양 매개 억제를 저해하고/하거나, 종양을 제거하고/하거나, 종양 관련 대식세포(tumor-associated macrophage, “TAM”)의 활성을 차단하거나 고갈시켜서 그들의 활성을 변화시키고/시키거나 TAM 매개 면역 억제를 낮추기 위한 이러한 분자들의 용도가 또한 제공된다.

[0077] 특히, 이러한 분자들, 그리고 특히 hIgG1 또는 hIgG4 항체인 이러한 분자들이 B7-H4를 발현하는 세포, 종양 또는 TAM을 표적화하고, 다양한 기능적 활성(B7-H4와 이의 수용체(들)간의 상호작용의 조절, B7-H4 수준의 조절, 및 음성 신호전달의 약화 및/또는 B7-H4 양성 세포의 고갈을 포함함)을 스크리닝하기 위해 사용될 수 있다. 재조합 DNA 기술을 사용하여, 이러한 분자들은 Fc 수용체(FcR) 결합 활성이 거의 또는 전혀 없거나, 향상된 항체의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 또는 향상된 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성들을 가지는 Fc 도메인을 형성하기 위한 불변 영역을 포함하도록 조작될 수 있다. 이러한 재조합 분자들은 종양 또는 TAM 상의 B7-H4를 낮추거나, 종양 또는 TAM 상의 B7-H4가 종양 미세환경에서 T 세포 또는 다른 세포 상의 저해성 수용체(들)과 상호작용하는 것을 예방하는 조절 분자로서 사용될 수 있어서, T 세포 또는 다른 기능적 세포를 B7-H4 체크 포인트(“휴식(break)”) / 억제성 신호전달로부터 방출한다. 반대로, 이러한 분자들은 기능적 Fc 도메인을 형성하기 위한 불변 영역을 포함하도록 조작될 수 있고, 따라서, TAM의 고갈을 유발하는 ADCC 또는 CDC를 유도할 수 있고, 억제성 세포의 표면으로부터의 B7-H4 조절 또는 B7-H4를 발현하는 세포의 직접적인 살상과 같은 다른 활성에 부가하여 T 세포 또는 다른 기능적 세포를 체크 포인트 차단으로부터 해제할 수 있다. ADCC 활성을 가지는 항 B7-H4 항체가 B7-H4를 발현하는 종양 세포를 고갈시키는 동시에 TAM 매개 면역 억제를 저해하는 데에 특히 유용할 수 있다.

[0078] 특정한 일 양태에서, 본 개시는 Fc 변이체를 제공하되, Fc 영역은 적어도 하나의 변형(예컨대, 아미노산 치환, 아미노산 삽입, 아미노산 결실)을 카바트 등(1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.)에 의해 기재된 바와 같은 EU 인덱스에 의해 번호부여된 228, 234, 235 및 331번으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 위치에 포함한다.

[0079] 일 양태에서, 변형은 228P, 234F, 235E, 235F, 235Y, 및 331S(카바트에 기재된 바와 같은 EU 인덱스에 의해 번호부여됨)로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 치환이다.

[0080] 다른 특정한 양태에서, 본 개시는 Fc 변이체를 제공하되, Fc 영역은 IgG4 Fc 영역이고, 228 및 235번(카바트에 기재된 바와 같은 EU 인덱스에 의해 번호부여됨)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 위치에 적어도 하나의 변형을 포함한다. 또 다른 특정한 양태에서, Fc 영역은 IgG4 Fc 영역이고, 비자연적으로 발생하는 아미노산은 228P, 235E 및 235Y(카바트에 기재된 바와 같은 EU 인덱스에 의해 번호부여됨)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0081] 다른 특정한 양태에서, 본 개시는 Fc 변이체를 제공하되, Fc 영역은 239, 330 및 332번(카바트에 기재된 바와 같은 EU 인덱스에 의해 번호부여됨)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 위치에 적어도 하나의 비자연적으로 발생하는 아미노산을 포함한다. 일 양태에서, 변형은 239D, 330L, 330Y, 및 332E(카바트에 기재된 바와 같은 EU 인덱스에 의해 번호부여됨)로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 치환이다. 그 전체가 본원에 참조로서 포함된 미국 특허 제7,317,091호를 참조한다.

[0082] 다른 특정한 일 양태에서, 본 개시는 Fc 변이체를 제공하되, Fc 영역은 252, 254, 및 256번(카바트에 기재된 바와 같은 EU 인덱스에 의해 번호부여됨)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 위치에 적어도 하나의 비자연적으로 발생하는 아미노산을 포함한다. 일 양태에서, 변형은 252Y, 254T 및 256E(카바트에 기재된 바와 같은 EU 인덱스에 의해 번호부여됨)로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 치환이다. 그 전체가 본원에 참조로서 포함된 미국 특허 제7,083,784호를 참조한다.

[0083] 일정 양태에서, 본 개시는 Fc 변이체를 제공하되, Fc 영역은 428번(카바트에 기재된 바와 같은 EU 인덱스에 의해 번호부여됨) 위치에 비자연적으로 발생하는 아미노산을 포함한다. 일 양태에서, 428번 위치의 변형은 428T, 428L, 428F, 및 428S(카바트에 기재된 바와 같은 EU 인덱스에 의해 번호부여됨)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 그 전체가 본원에 참조로서 포함된 미국 특허 제7,670,600호를 참조한다. 다른 양태에서, Fc 변이체는 434번(카바트에 기재된 바와 같은 EU 인덱스에 의해 번호부여됨) 위치에 비자연적으로 발생하는 아미노산을 더 포함할 수 있다. 일 양태에서, 434번 위치의 변형은 434A, 434S, 및 434F(카바트에 기재된 바와 같은 EU 인덱스에 의해 번호부여됨)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 양태에서, 본 개시는 Fc 변이체를 제공하되, Fc 영역은 428번 및 434번(카바트에 기재된 바와 같은 EU 인덱스에 의해 번호부여됨) 위치에 비자연적으로 발생하는 아미노산을 포함한다. 특정한 일 양태에서, Fc 영역은 428L, 434S를 포함한다. 미국 특허 제8,088,376호를 참조한다.

[0084] 인간 B7-H4의 아미노산 서열은 (**서열 번호 1**)이다:

MASLGQILFW SIISIIILA GAIALIIGFG ISGKHSITVT TVASAGNIGE

DGILSCTFEP DIKLSDIVIQ WLKEGVGLV HEFKEGKDEL SEQDEMFRGR

TAVFADQVIV GNASRLKNV QLTDAGTYKC YIITSKGKGN ANLEYKTGAF

SMPEVNVDYN ASSETLRCEA PRWFPQPTVV WASQVDQGAN FSEVSNTSFE

LNSENVTMKV VSVLYNVTIN NTYSCMIEND IAKATGDIKV TESEIKRRSH

LQLLNNSKASL CVSSFFAISW ALLPLSPYLM LK

[0091] 뮤라인 B7-H4의 아미노산 서열은 (**서열 번호 2**)이다:

MASLGQIIFW SIINIIILA GAIALIIGFG ISGKHFITVT TFTSAGNIGE

DGTLSCTFEP DIKLNGIVIQ WLKEGIKGLV HEFKEGKDDL SQQHEMFRGR

TAVFADQVIV GNASRLKNV QLTDAGTYTC YIRTSKGKGN ANLEYKTGAF

SMPEINVNDYN ASSESLRCEA PRWFPQPTVA WASQVDQGAN FSEVSNTSFE

LNSENVTMKV VSVLYNVTIN NTYSCMIEND IAKATGDIKV TDSEVKRRSQ

LQLLNNSGPSP CVFSSAFVAG WALLSLSCL MLR

[0098] 본원에서 사용된 바와 같이, 결합이 동족(cognate) 항원에 대한 항체의 친화도 및 특이성을 나타내는 경우 분자가 제2 분자에 “면역특이적으로 결합” 할 수 있다고 진술된다. 결합이 면역글로불린 분자의 항원 인식 자리 관련된 경우 항체가 항원(특히, 항원 B7-H4)의 구조 또는 표적 영역(“에피토프”)에 “면역특이적으로 결합” 할 수 있다고 진술된다. 특정 항원에 면역특이적으로 결합하는 항체는, 다른 항원이 (예컨대, 면역검정법, 비아코어(BIACORE®) 검정법, 또는 당해 분야에 공지된 다른 검정법들에 의해 결정되는 바와 같이) 항원 인식 자리에 의해 인식되는 약간의 서열 또는 구조 유사성을 가지는 경우, 다른 항원에 낮은 친화도로 결합할 수 있지만, 전혀 관련없는 항원에는 결합하지 않을 것이다. 바람직하게는, 그러나, 바람직하게는, 항체(및 그들의 항원 결합 단편)은 다른 항원과 교차 반응하지 않을 것이다. 항체는 또한 면역특이적이지 않은 방식으로 다른 분자들, 예를 들면, Fc 영역과 같은 항원 인식 자리에 관련되지 않은 분자의 다른 영역/도메인 내 결합 도메인으로서 FcR 수용체에 결합할 수 있다. 결합이 동족 결합 리간드에 대한 수용체의 친화도 및 특이성을 나타낼 때 분자가 제2 분자에 “생리특이적으로 결합” 한다고 진술된다. 결합이 B7-H4-수용체 인식 자리에 관련된 경우 B7-H4 분자(예컨대, B7-H4 단백질 또는 융합 분자 등)가 수용체 또는 B7-H4의 표적 영역 또는 구조(“에피토프”)에 “생리특이적으로 결합” 할 수 있다고 진술된다. 분자는 하나를 초과하는 다른 분자에 생리특이적으로 결합할 수 있다.

[0099] 개시된 분자는, 이에 제한되지는 않으나 종양 내 존재하는 TAM을 포함하는, B7-H4를 발현하는 세포의 농도를 “

고갈” (즉, 부분적으로 또는 완전히 감소)시키거나 B7-H4를 발현하는 세포의 활성을 차단하는 능력을 가질 수 있다. 이러한 고갈은 종양 내에 존재하는 (또는 종양으로 동원된) 대식세포의 절대 수와 관련될 수 있거나, 활성 대식세포의 농도(즉, 전혈관신생 또는 전종양형성 효과를 매개하는 능력을 가지는 종양 내 또는 종양으로 동원된 대식세포의 농도)와 관련될 수 있다. 바람직하게, 이러한 고갈은 측정가능한 면역계 활성(예를 들어, 대식세포 수, 혈관신생능, 혈관형성, 대식세포 생존능 등)에서 적어도 10%의 변화, 더욱 바람직하게는, 이러한 활성에서 적어도 50%의 변화 또는 적어도 2배, 5배, 10배, 또는 더욱 더 바람직하게는 이러한 활성에서 적어도 100배의 변화를 제공할 것이다.

[0100] 본원에서 사용된 바와 같은, “조절”이라는 용어는 효과 또는 결과를 바꾸는 능력에 관한 것이다. 예를 들어, 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3, 또는 이의 키메라 또는 인간화 변이체, 또는 인간 B7-H4에 면역특이적으로 결합하는 이의 임의의 항원 결합 단편, 또는 B7-H4 또는 이의 동족 수용체에 생리특이적으로 결합하는 분자를 포함하는, B7-H4와 그의 동족 수용체간의 결합을 조절할 수 있고/있거나 B7-H4-동족 수용체 결합의 결과로 발생하는 신호 전달을 조절할 수 있는 폴리펩티드가 제공된다. 이러한 조절은 이러한 활성을 완전히 무효화(예컨대, B7-H4가 신호 전달을 매개하는 능력을 중화)시키거나, 일부 무효화(즉, B7-H4의 활성을 무효화시키지는 않으나 약화)시킬 수 있다. 조절은 항체의 결합 후 수용체의 내재화 또는 표적 세포 상의 수용체의 발현의 감소를 포함할 수 있다. 추가의 일 구현예에서, 이러한 조절은 B7-H4과 그의 동족 수용체간의 상호 작용을 향상시키거나, 그렇지 않으면 아고나이징(agonize)함으로써 B7-H4 동족 수용체 결합 또는 신호전달을 용이하게 할 수 있다. 추가의 일 구현예에서, 이러한 조절은 B7-H4과 그의 동족 수용체간의 상호 작용의 성질을 변경시켜서 유발되는 신호 전달의 성질을 변경시킬 수 있다. 예를 들어, 분자는, B7-H4에 결합함으로써 이러한 분자들의 다른 수용체에 대한 결합능을 변경시키고, 이에 따라, B7-H4의 전체적인 활성을 변경할 수 있다. 바람직하게, 이러한 조절은 측정가능한 면역계 활성에서 적어도 10%의 변화, 더욱 바람직하게는, 이러한 활성에서 적어도 50%의 변화 또는 적어도 2배, 5배, 10배, 또는 더욱 더 바람직하게는 이러한 활성에서 적어도 100배의 변화를 제공할 것이다. 이러한 조절은, 따라서, (예를 들어, 종양 세포 상의) B7-H4가 그의 동족 수용체에 결합하는 능력을 약화시키거나 완전히 무력화시키는 것을 초래할 수 있고, 따라서, B7-H4에 의해 매개되는 면역 반응의 저해를 감소(또는 예방)할 수 있다. 이처럼, 향상된 면역 반응이 바람직한, 암, 감염성 질환 및 다른 질환을 위한 치료가 또한 개시된다. 대안적으로, B7-H4 결합 분자는 종양의 생장, 발달, 생존능, 활성 등에 직접적으로 영향을 미칠 수 있는 종양 특이적 B7-H4에 대한 조절 활성을 발휘할 수 있다.

[0101] 결합 또는 나타난 효과라는 맥락에서 사용된, “실질적으로”라는 용어는 관찰된 효과가 생리학적으로 또는 치료적으로 관련된다는 것을 나타내기 위한 것이다. 따라서, 예를 들어, 분자는 가용성 B7-H4 또는 막결합 B7-H4의 활성을, 차단의 정도가 생리학적으로 또는 치료적으로 관련되는 경우(예를 들어, 이러한 정도가 전체의 60% 초과, 전체의 70% 초과, 전체의 75% 초과, 전체의 80% 초과, 전체의 85% 초과, 전체의 90% 초과, 전체의 95% 초과, 또는 전체의 97% 초과인 경우), 실질적으로 차단할 수 있다. 유사하게, 분자는, 면역특이성 및 특성이 60% 동일성 초과, 70% 동일성 초과, 75% 동일성 초과, 80% 동일성 초과, 85% 동일성 초과, 90% 동일성 초과, 95% 동일성 초과, 또는 97% 동일성 초과인 경우에, 다른 분자와 실질적으로 동일한 면역특이성 및/또는 특성을 가진다고 진술된다.

[0102] 본원에서 사용된 바와 같은, B7-H4에 의해 매개되는 “공동 자극” 신호는 양성 공동 자극 신호(예컨대, 활성의 증진을 초래하는 신호) 및 음성 공동 자극 신호(예컨대, 활성의 저해를 초래하는 신호)를 포함한다.

[0103] 본원에서 사용된 “항체”라는 용어는 항원 인식 자리인 “가변 영역”을 가지는 면역글로불린 분자를 나타내기 위한 것이다. “가변 영역”이라는 용어는 면역글로불린의 이러한 도메인을 항체가 광범위하게 공유하는 도메인(예를 들어, 항체 Fc 도메인)으로부터 구분하기 위한 것이다. 가변 영역은 그 잔기가 항원 결합을 담당하는 “과가변 영역”을 포함한다. 과가변 영역은 “상보성 결정 영역(complementarity determining region) 또는 “CDR”(즉, 통상적으로, 경쇄 가변 도메인 내 대략 24~34(L1), 50~56(L2) 및 89~97(L3) 잔기 및 중쇄 가변 도메인 내 대략 27~35(H1), 50~65(H2) 및 95~102(H3) 잔기(Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))로부터의 아미노산 잔기 및/또는 “과가변 루프”(즉, 경쇄 가변 도메인 내 26~32(L1), 50~52(L2) 및 91~96(L3) 잔기 및 중쇄 가변 도메인 내 26~32(H1), 53~55(H2) 및 96~101(H3)번 잔기(Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917))로부터의 잔기를 포함한다. “골격 영역(framework region)” 또는 “FR” 잔기는 본원에 정의된 과가변 영역 잔기가 아닌 가변 도메인 잔기이다. 항체라는 용어는 단일클론 항체, 다중 특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 합성 항체, 키메라 항체, 카멜화 항체(예컨대, Muyldermans *et al.*, 2001, *Trends Biochem. Sci.* 26:230; Nuttall *et al.*, 2000, *Cur. Pharm. Biotech.* 1:253; Reichmann and

Muyldermaens, 1999, *J. Immunol. Meth.* 231:25; 국제 공개 WO 94/04678 및 WO 94/25591; 미국 특허 제 6,005,079호 참조), 단쇄 Fv(scFv)(예컨대, Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) 참조), 단쇄 항체, 이황화 결합 Fv(sdFv), 인트라바디 및 항이디오타입(항-Id) 항체(예컨대, 항체에 대한 항-Id 및 항-항-Id 항체를 포함함)를 포함한다. 특히, 이러한 항체는 임의의 유형(예컨대, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스(예컨대, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂) 또는 서브클래스의 면역글로불린 분자를 포함한다.

[0104] 본원에서 사용된 항체의 “항원 결합 단편”이라는 용어는 항체의 하나 이상의 부분을 지칭하는 것으로, 항체의 상보성 결정 영역(CDR), 및 선택적으로 항체의 “가변 영역” 항원 인식 자리를 포함하는 골격 잔기를 함유하고, 항원에 면역특이적으로 결합하는 능력을 나타낸다. 이러한 단편은 Fab', F(ab')₂, Fv, 단쇄(ScFv), 및 이의 돌연변이체, 자연적으로 발생하는 변이체, 및 항체의 “가변 영역” 항원 인식 자리 및 이종 단백질(예컨대, 독소, 상이한 항원에 대한 항원 인식 자리, 효소, 수용체, 또는 수용체 리간드 등)을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 본원에 사용된, “단편”이라는 용어는 적어도 5개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 10개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 15개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 20개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 25개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 40개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 50개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 60개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 70개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 80개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 90개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 100개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 125개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 150개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 175개의 연속적인 아미노산 잔기, 적어도 200개의 연속적인 아미노산 잔기, 또는 적어도 250개의 연속적인 아미노산 잔기의 아미노산 서열을 포함하는 웹티드 또는 폴리웹티드를 지칭한다.

[0105] 임의의 개시된 항체 및 항원 결합 단편의 “유도체”의 생성 및 용도가 또한 개시된다. “유도체”라는 용어는 인간 B7-H4에 면역특이적으로 결합하지만, 항체 6H3에 대하여 1, 2, 3, 4, 또는 5개 이상의 아미노산 치환, 첨가, 결실 또는 변형을 포함함으로써, 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체인 6H3과는 아미노산 서열이 상이한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 지칭한다. 바람직하게, 이러한 유도체는 항체 6H3과 실질적으로 동일한 면역특이성 및/또는 특성을 또는 동일한 면역특이성 및 특성을 가질 것이다. 이러한 유도체의 아미노산 치환 또는 첨가는 자연적으로 발생(즉, DNA에 암호화됨)하거나 비자연적으로 발생하는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. “유도체”라는 용어는, 예를 들어, 변경된 CH1, 힌지, CH2, CH3 또는 CH4 영역을 가지는 변이체뿐만 아니라 항체 6H3의 키메라 또는 인간화 변이체를 포함함으로써, 예를 들어, 향상되거나 손상된 효과기 또는 결합 특성을 나타내는 다양한 Fc 영역을 가지는 항체 등을 형성한다. “유도체”라는 용어는 추가적으로 비아미노산 변형, 예를 들어, 글리코실화(예컨대, 변경된 만노스, 2-N-아세틸글루코사민, 갈락토스, 푸코스, 글루코스, 시알산, 5-N-아세틸뉴라민산, 5-글리코뉴라민 산 등의 내용물을 가짐), 아세틸화, 폐킬화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호/차단기에 의한 유도체화, 단백질가수분해, 세포 리간드 또는 다른 단백질에 결합될 수 있는 아미노산 등을 포함한다. 일부 구현예에서, 변경된 탄수화물 변형은 다음 중 하나 이상을 조절한다: 항체의 가용화, 항체의 세포내 수송 및 분비의 용이화, 항체 조립의 촉진, 구조적 온전성, 및 항체 매개 효과기 기능. 특정한 일 구현예에서, 변경된 탄수화물 변형은 탄수화물 변형이 결여된 항체에 비해 항체 매개 효과기 기능을 향상시킨다. 변경된 항체 매개 효과기 기능을 야기하는 탄수화물 변형은 당해 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, Shields, R.L. et al. (2002) “Lack Of Fucose On Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fcgamma RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity.”, *J. Biol. Chem.* 277(30): 26733-26740; Davies J. et al. (2001) “Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In ADCC Through Higher Affinity For FC Gamma RIII,” *Biotechnology & Bioengineering* 74(4): 288-294 참조). 탄수화물 내용물을 변경하는 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 예컨대 다음을 참조한다: Wallick, S.C. 등((1988) “Glycosylation Of A VH Residue Of A Monoclonal Antibody Against Alpha (1----6) Dextran Increases Its Affinity For Antigen,” *J. Exp. Med.* 168(3): 1099-1109); Tao, M.H. 등((1989) “Studies Of Aglycosylated Chimeric Mouse-Human IgG. Role Of Carbohydrate In The Structure And Effector Functions Mediated By The Human IgG Constant Region,” *J. Immunol.* 143(8): 2595-2601); Routledge, E.G. 등((1995) “The Effect Of Aglycosylation On The Immunogenicity Of A Humanized Therapeutic CD3 Monoclonal Antibody,” *Transplantation* 60(8):847-53); Elliott, S. 등((2003) “Enhancement Of Therapeutic Protein In Vivo Activities Through Glycoengineering,” *Nature Biotechnol.* 21:414-21); Shields, R.L. 등((2002) “Lack Of Fucose On Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fcgamma RIII And Antibody-Dependent Cellular

Toxicity.,” J. Biol. Chem. 277(30): 26733-26740).

[0106] “**키메라 항체**”는 항체의 상이한 부분들이 상이한 면역글로불린 분자로부터 유래한 항체, 예를 들면 비인간 항체로부터 유래된 가변 영역 및 인간 면역글로불린 불변 영역을 가지는 항체이다. 키메라 항체를 생성하기 위한 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예컨대, Morrison(1985, *Science* 229:1202); Oi 등(1986, *BioTechniques* 4:214); Gillies 등(1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202); 및 미국 특허 제6,311,415호, 제5,807,715호, 제4,816,567호, 및 제4,816,397호를 참조한다. 비 인간 종으로부터의 하나 이상의 CDR 및 인간 면역글로불린 분자로부터의 골격 영역을 포함하는 키메라 항체는, 예를 들어 CDR 이식(EP 239,400; 국제 공개 WO 91/09967; 및 미국 특허 제5,225,539호; 제5,530,101호; 및 제5,585,089호), 베니어링(veneering) 또는 표면치환(resurfacing)(EP 592,106; EP 519,596; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering* 7(805):805; 및 Roguska. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:969) 및 사슬 셔플링(미국 특허 제5,565,332호)을 포함하는 당해 분야에 공지된 다양한 기술들을 사용하여 생성될 수 있다.

[0107] 본원에 개시된 항체는 “**인간화 항체**”를 포함한다(예컨대, 유럽 특허 EP 239,400, EP 592,106, 및 EP 519,596; 국제 공개 WO 91/09967 및 WO 93/17105; 미국 특허 제5,225,539호, 제5,530,101호, 제5,565,332호, 제5,585,089호, 제5,766,886호, 및 제6,407,213호; 및 Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; Roguska et al., 1994, *PNAS* 91:969-973; Tan et al., 2002, *J. Immunol.* 169:1119-1125; Caldas et al., 2000, *Protein Eng.* 13:353-360; Morea et al., 2000, *Methods* 20:267-79; Baca et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684; Roguska et al., 1996, *Protein Eng.* 9:895-904; Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55 (23 Supp):5973s-5977s; Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55:1717-22; Sandhu, 1994, *Gene* 150:409-10; Pedersen et al., 1994, *J. Mol. Biol.* 235:959-973; Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-525; Reichmann et al., 1988, *Nature* 332:323-329; 및 Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 참조). 본원에 사용된 “**인간화 항체**”라는 용어는 인간 골격 영역 및 비인간(대개 마우스 또는 래트) 면역글로불린으로부터의 하나 이상의 CDR을 포함하는 면역글로불린을 지칭한다. CDR을 제공하는 비인간 면역글로불린은 “**공여자**”로 일컬어지며, 골격을 제공하는 인간 면역글로불린은 “**수여자**”로 일컬어진다. 불변 영역이 존재해야 할 필요는 없지만, 만일 존재한다면, 불변영역은 인간 면역글로불린 불변 영역에 실질적으로 동일해야 하는데, 즉, 적어도 약 85 내지 99%, 바람직하게는 약 95% 이상 동일해야 한다. 따라서, 아마 CDR을 제외한 인간화 면역글로불린의 모든 부분은 자연적인 인간 면역글로불린 서열의 상응하는 부위에 실질적으로 동일하다. 인간화 항체는 인간화 경쇄 및 인간화 중쇄 면역글로불린을 포함하는 항체이다. 예를 들어, 인간화 항체는 통상적인 키메라 항체를 포함하지 않는데, 예를 들어, 키메라 항체의 가변 영역 전체가 인간이 아니기 때문이다. “**인간화**” 과정에 의해 공여자 항체가 “**인간화**” 된 것으로 일컬어지기도 하는데, 이는 결과적인 인간화 항체가 CDR을 제공하는 공여자 항체와 동일한 항원에 결합하는 것으로 예상되기 때문이다. 대부분의 부위에서, 인간화 항체는 수여자의 과가변 영역 잔기가 비인간 종(예를 들어, 원하는 특이성, 친화도, 및 능력을 가지는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류)으로부터의 과가변 영역 잔기(공여자 항체)로 대체된 인간 면역글로불린(수여자 항체)이다. 일부 사례에서, 인간 면역글로불린의 골격 영역(FR) 잔기는 상응하는 비인간 잔기에 의해 대체된다. 더욱이, 인간화 항체는 수여자 항체 또는 공여자 항체 내에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 더욱 개선하기 위해 만들어진다. 일반적으로, 인간화 항체는, 적어도 하나, 그리고 통상적으로는 2개의 가변 영역 도메인의 모두를 실질적으로 포함할 수 있으며, 모든 또는 실질적으로 모든 과가변 영역은 비인간 면역글로불린 것에 대응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 또한, 인간화 항체는, 선택적으로, 통상적으로 Fc γRIIB 폴리펩티드에 면역 특이적으로 결합하는 인간 면역글로불린의 불변 영역이고, 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 첨가의 도입(즉, 돌연변이)으로 인해 변경된, 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부를 포함할 것이다.

[0108] 특히 바람직한 일 구현예에서, 항체 및 항원 결합 단편이 종양 또는 TAM에 대한 결합능에 대하여 선택됨으로써 이러한 세포들을 고갈시키거나 세포들의 활성을 조절한다.

[0109] 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간, 키메라, 또는 인간화 유도체가, 특히, 인간에서의 생체 내 사용에 바람직하지만, 뮤라인 항체 또는 다른 종의 항체들도 다양한 용도(예를 들어, 시험관 내 또는 원 위치(*in situ*) 검출 검정, 급성 생체 내 사용, 등)에 유리하게 채용될 수 있다. 이러한 인간 또는 인간화 항체는 아미노산 잔기 치환, 결실, 또는 첨가를 하나 이상의 비인간 CDR에 포함할 수 있다. 인간화 항체 유도체는 비유도 인간화 항체와 비교하여 실질적으로 동일하거나 더 강하거나 더 약한 결합을 가질 수 있다. 특정한 구현예에서, CDR의 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산 잔기가 치환되거나 결실되거나 첨가된다(즉, 돌연변이된다). 완전한 인간 항체는

특히 인간 대상체의 치료적 처지에 바람직하다.

[0110]

이러한 인간 항체는 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 사용하는 과자 디스플레이법을 포함하는 당해 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다(U.S. 특허 제4,444,887호 및 제4,716,111호; 및 국제 공개 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, 및 WO 91/10741 참조). 이러한 인간 항체는 기능적 내인성 면역글로불린은 발현할 수 없지만 인간 면역글로불린 유전자를 발현 할 수 있는 유전자이식 마우스를 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자 복합체가 무작위적으로 또는 상동 재조합에 의해 마우스 배아 줄기 세포에 도입될 수 있다. 대안적으로, 인간 가변 영역, 불변 영역, 및 다양성 영역이 인간 중쇄 및 경쇄 유전자에 더하여 마우스 배아 줄기 세포 내에 도입 될 수 있다. 마우스 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자는 상동재조합에 의한 인간 면역글로불린 유전자위의 도입과 동시에 또는 이와는 별개로 비 기능적이 될 수 있다. 특히, J_H 영역의 동형접합성 결실은 내인성 항체 생성 을 예방한다. 변형된 배아 줄기 세포를 증식시키고 배반포에 미세주입하여 키메라 마우스를 생성한다. 키메라 마우스를, 그런 다음, 교배하여 인간 항체를 발현하는 동형접합성 자손을 생성한다. 유전자이식 마우스는 선택 된 항원, 예컨대 폴리펩티드의 전부 또는 일부를 이용하여 통상적인 방법을 사용하여 면역화된다. 항원에 대해 유도된 단일클론 항체가 통상적인 하이브리도마 기술을 이용하여 면역화된 유전자 이식 마우스로부터 수득될 수 있다(예컨대, 미국 특허 제5,916,771호를 참조). 유전자이식 마우스가 품고 있는 인간 면역글로불린 이식유전자는 B 세포 분화 중에 재배열되고, 이어서 클래스 전환 및 체세포 돌연변이를 거친다. 따라서, 이러한 기술을 이용하면, 치료적으로 유용한 IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체를 생성할 수 있다. 이러한 인간 항체를 생성하기 위한 기술의 개관에 대해서는 론버그 및 헤스자(1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93, 그 전체가 참조로서 본원에 포함됨)를 참조한다. 인간 항체 및 인간 단일클론 항체를 생성하기 위한 기술 및 이러한 항체를 생성하기 위한 프로토콜의 자세한 논의에 대해서는, 예컨대, 그 전체가 본원에 참조로서 포함된, 국제 공개 WO 98/24893, WO 96/34096, 및 WO 96/33735호; 및 미국 특허 제5,413,923호, 제5,625,126호, 제5,633,425호, 제5,569,825호, 제5,661,016호, 제5,545,806호, 제5,814,318호, 및 제5,939,598호를 참조한다. 또한, 암제닉스 사(Abgenix, Inc., Freemont, CA) 및 메다렉스 사(Medarex, Princeton, NJ)와 같은 회사들이 전술된 바와 유사한 기술을 사용하여 선택된 항원에 대해 유도된 인간 항체를 제공하는 데에 관여할 수 있다.

[0111]

일부 구현예에서, 개시된 항체는 단일특이적이다. 이러한 항체의 이중특이적 유도체, 이러한 항체의 삼중특이적 유도체, 또는 더 큰 다중특이성의 유도 항체(인간 B7-H4에 대한 특이성에 추가하여 상이한 면역계 표적들에 특이성을 나타냄)가 특히 흥미롭다. 예를 들어, 이러한 항체는 인간 B7-H4 및 특정한 유형의 세포 또는 조직으로 항체를 표적화하는데 중요한 항원(예를 들어, 치료될 종양의 암 항원에 관련된 항원)에 결합할 수 있다. 다른 구현예에서, 이러한 다중특이적 항체는 대안적인 면역조절 경로, 예를 들면, B7-H1, PD-1, CTLA4, TIM3, TIM4, OX40, CD40, GITR, 4-1-BB, LIGHT 또는 LAG3에 관련된 분자(수용체 또는 리간드)에 결합하여, 하나의 분자에서 리간드 차단, 면역 세포 활성화 및 직접적인 종양 표적화와 같은 다수의 작용 매커니즘과 조합하고 면역조절 효과를 향상시킨다. 예를 들어, B7-H1이 또한 종양 및 TAM 상에서 발현되고, B7-H1 및 B7-H4 둘 다를 표적으로 하는 이중특이적 항체가 TAM 매개 면역 억제의 저해의 향상뿐 아니라 종양 매개 B7-H1+ 및 B7-H4+ 면역 억제의 저해의 향상을 제공할 수 있다. 나아가, PD-1 및 B7-H4 둘 다를 표적으로 하는 이중특이적 항체는 TAM 매개 면역 억제를 저해하고, (B7-H4 및 PD-1 경로 모두를 통해) 종양 매개 면역 억제를 저해하고, 괴로화된 T 세포를 활성화시켜서 효과기 CTL 인식을 증진시키고, 효과기 CTL을 PD-1:B7-H4 “다리”를 통해 종양으로 재유도/표적화 할 수 있다. 더욱이, 다중특이적 항체는, 특히 급성 및 만성 면역 반응을 조절하는 것에 관련된 사이토카인(예컨대, IL-7, IL-15, IL-12, IL-4 TGF-베타, IL-10, IL-17, IFNg, Flt3, BLys) 및 케모카인(예컨대, CCL21)과 같은 효과기 분자에 결합할 수 있다. 마찬가지로, B7-H4에 결합할 수 있는 내재화 또는 독소가 접합된 항체가 B7-H4를 발현하는 종양 세포의 유도 사멸 및 세포 내 흡수를 매개하기 위해 채용될 수 있다.

[0112]

대식세포는 HIV 감염의 초기 단계에 상당히 기여하는 것으로 보여진다(Carter, C. A. et al. (2008) “Cell Biology Of HIV-1 Infection Of Macrophages,” *Ann. Rev. Microbiol.* 62:425-443; Noursadeghi, M. et al. (2006) “HIV-1 Infection Of Mononuclear Phagocytic Cells: The Case For Bacterial Innate Immune Deficiency In AIDS,” *Lancet Infect. Dis.* 6:794-804). 따라서, B7-H4 및 대식세포 특이적 마커(예를 들어, CD14, CD68, CD163, TLR2, 등)에 결합하는 개시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 (특히, 독소에 접합된 경우) HIV 감염을 예방하기 위해 사용될 수 있다.

[0113]

바람직한 인간 수여자 골격 서열을 암호화하는 DNA 서열은, 이에 제한되지는 않으나, 인간 생식계열 VH 세그먼트 VH1-18 및 JH6 및 인간 생식계열 VL 세그먼트 VK-A26 및 JK4로부터의 FR 세그먼트들을 포함한다. 특정한 일 구현예에서, 하나 이상의 CDR이 일상적인 재조합 DNA 기술을 사용하여 골격 영역 내로 삽입된다. 골격 영역은

자연적으로 발생하거나 컨센서스 골격 영역일 수 있고, 바람직하게는 인간 골격 영역이다(예컨대, 인간 골격 영역의 목록에 관해서는, Chothia *et al.*, 1998, "Structural Determinants In The Sequences Of Immunoglobulin Variable Domain," *J. Mol. Biol.* 278: 457-479 을 참조).

[0114] 인간, 인간화 또는 키메라 항체 유도체는, 적어도 하나, 그리고 통상적으로는 2개의 가변 도메인의 모두를 실질적으로 포함할 수 있으며, 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비인간 면역글로불린(즉, 공여자 항체)의 CDR 영역에 대응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 골격 영역은 인간 면역글로불린 컨센서스 서열의 골격 영역이다. 바람직하게, 이러한 항체는, 또한, 통상적으로 인간 면역글로불린 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 항체의 불변 도메인은 항체의 제안된 기능, 특히 요구될 수 있는 효과기 기능에 대하여 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 항체의 불변 도메인은 인간 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM 도메인이거나 인간 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM 도메인을 포함할 수 있다. 특정한 일 구현예에서, 인간화 항체 유도체가 치료용도를 위한 것이고, 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 및 보체 의존성 세포독성(DCDC) 활성과 같은 항체 효과기 기능이 요구될 때, 인간 IgG 불변 도메인, 특히 IgG1 및 IgG3 이소형의 불변 도메인이 사용된다. 대안적 인 구현예에서, 항체가 치료목적을 위한 것이고 항체 효과기 기능이 요구되지 않을 때, IgG2 및 IgG4 이소형이 사용된다. 미국 특히 출원 공개 제2005/003700호 및 제2005/0064514호에 개시된 바와 같이 항체 효과기 기능을 변경하는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 Fc 불변 도메인.

[0115] 일부 구현예에서, 개시된 분자는 항체 중쇄의 적어도 가변 도메인뿐 아니라 항체 경쇄도 함유한다. 다른 구현예에서, 이러한 분자는 중쇄의 하나 이상의 CH1, 힌지, CH2, CH3, 및 CH4 영역(특히, CH1 및 힌지 영역, 또는 CH1, 힌지 및 CH2 영역, 또는 CH1, 힌지, CH2 및 CH3 영역)을 더 포함할 수 있다. 항체는 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 포함하는 임의의 클래스의 면역글로불린 및 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 및 IgG₄를 포함하는 임의의 이소형으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 불변 도메인은 항체가 세포독성 활성을 나타내는 것이 바람직한 보체 결합 불변 도메인이고, 통상적으로 IgG1 클래스이다. 이러한 세포독성 활성을 원하지 않는 다른 구현예에서, 불변 도메인은 IgG₂ 또는 IgG₄ 클래스의 도메인일 수 있다. 항체는 하나 이상의 클래스 또는 이소형으로부터의 서열을 포함할 수 있고, 원하는 효과기 기능을 최적화하기 위해 특정 불변 도메인을 선택하는 것은 당해 분야의 일반적인 기술 범주내이다.

[0116] 인간화 항체의 골격 및 CDR 영역이 모 서열에 정확하게 상응해야 할 필요는 없는데, 예컨대, 공여자 CDR 또는 컨센서스 골격이 적어도 하나의 잔기의 치환, 삽입 또는 결실에 의해 돌연변이되어서 그 자리의 CDR 또는 골격 잔기가 컨센서스 또는 공여자 항체와 상응하지 않을 수 있다. 이러한 돌연변이는, 그러나, 바람직하게는 집중적 이지 않다. 보통, 적어도 75%, 더욱 빈번하게는 90%, 그리고 가장 바람직하게는 95% 보다 큰 인간화 항체 잔기가 모 골격 영역(FR) 및 CDR 서열의 잔기에 상응할 것이다. 인간화 항체는, 이에 제한되지는 않으나, CDR 이식 (유럽 특히 EP239,400; 국제 공개 WO 91/09967호; 및 미국 특히 제5,225,539호, 제5,530,101호; 및 제5,585,089호), 베니어링 또는 표면치환(유럽 특히 EP592,106 및 EP 519,596; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7(6):805814 (1994); Roguska. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:969-973), 사슬 셔플링(미국 특히 제5,565,332호) 및, 예컨대, 미국 특히 제6,407,213호, 제5,766,886호, 제5,585,089호, 국제 공개 WO 9317105, Tan 등(2002, *J. Immunol.* 169:1119-25), Caldas 등(2000, *Protein Eng.* 13:353-60), Morea 등(2000, *Methods* 20:267-79), Baca 등(1997, *J. Biol. Chem.* 272:10678-84), Roguska 등(1996, *Protein Eng.* 9:895-904), Couto 등(1995, *Cancer Res.* 55 (23 Supp):5973s-5977s), Couto 등(1995, *Cancer Res.* 55:1717-22), Sandhu(1994, *Gene* 150:409-10), Pedersen 등(1994, *J. Mol. Biol.* 235:959-73), Jones 등(1986, *Nature* 321:522-525), Riechmann 등(1988, *Nature* 332:323), 및 Presta,(1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596)에 개시된 기술들을 포함하는 당해 분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 종종, 골격 영역의 골격 잔기는 항원 결합을 변경, 바람직하게는, 개선하기 위해 CDR 공여자 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환될 것이다. 이러한 골격 치환은 당해 분야에 잘 알려진 방법, 예컨대 항원 결합에 중요한 골격 잔기를 확인하기 위한 CDR과 골격 잔기의 상호작용의 모델링 및 특정 위치에서의 특이한 골격 잔기를 확인하기 위한 서열비교에 의해 확인된다(예컨대., Queen *et al.*, U.S. 특허 제5,585,089호; 미국 공개 제2004/0049014호 및 제2003/0229208호; U.S. 특허 제6,350,861호; 제6,180,370호; 제5,693,762호; 제5,693,761호; 제5,585,089호; 및 제5,530,101호 및 Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323를 참조한다).

[0117] B7-H4 결합 분자는 폴리펩티드의 생성에 유용한 당해 분야에 공지된 임의의 방법, 예컨대, 시험관 내 합성, 재조합 DNA 생성 등에 의해 제조될 수 있다. 바람직하게, 인간화 항체는 재조합 DNA 기술에 의해 제조된다. 항체는 재조합 면역글로불린 발현 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 인간화 항체를 포함하는 면역글로불린 분자의

재조합 생성은 미국 특허 제4,816,397호(Boss *et al.*), 미국 특허 제6,331,415호 및 제4,816,567호(둘 다 Cabilly *et al.*), 영국 특허 GB 2,188,638(Winter *et al.*), 및 영국 특허 GB 2,209,757에 기술되어 있다. 인간화 면역글로불린을 포함하는 면역글로불린의 재조합 발현을 위한 기술은 또한 Goeddel 등(Gene Expression Technology Methods in Enzymology Vol. 185 Academic Press (1991)), 및 Borreback(Antibody Engineering, W. H. Freeman (1992))에서도 찾을 수 있다. 재조합 항체의 생성, 설계 및 발현에 관한 추가적인 정보는 Mayforth(Designing Antibodies, Academic Press, San Diego (1993))에서 찾을 수 있다.

[0118]

재조합 키메라 항체를 생성하기 위한 예시적인 과정은 다음을 포함할 수 있다: a) 통상적인 분자생물학 방법에 의해 항 B7-H4 항체의 CDR 및 가변 영역이 인간 면역글로불린으로부터 유래된 Fc 영역에 융합된 항체 중쇄를 암호화하고 발현하는 발현 벡터를 제작함으로써, 키메라 항체 중쇄의 발현을 위한 벡터를 생성하는 단계; b) 통상적인 분자 생물학 방법에 의해 뮤라인 항 인간 B7-H4 단일클론 항체의 항체 경쇄를 암호화하고 발현하는 발현 벡터를 제작함으로써, 키메라 항체 경쇄의 발현을 위한 벡터를 생성하는 단계; c) 통상적인 분자 생물학 방법에 의해 발현 벡터를 숙주 세포에 전달하여 키메라 항체의 발현을 위한 형질감염된 숙주세포를 생성하는 단계; 및 d) 형질감염된 세포를 통상적인 세포 배양 기술에 의해 배양하여 키메라 항체를 생성하는 단계.

[0119]

재조합 인간화 항체를 생성하기 위한 예시적인 과정은 다음을 포함할 수 있다: a) 통상적인 분자 생물학 방법에 의해 공여자 항체 결합 특이성을 유지하기 위해 요구되는 가변 영역 골격의 최소 부위 및 CDR이 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체로부터 유래되고, 항체의 나머지 부분은 인간 면역글로불린으로부터 유래된 항 인간 B7-H4 중쇄를 암호화하고 발현하는 발현 벡터를 제작함으로써, 인간화 항체 중쇄의 발현을 위한 벡터를 생성하는 단계; b) 통상적인 분자 생물학 방법에 의해 공여자 항체 결합 특이성을 유지하기 위해 요구되는 가변 영역 골격의 최소 부위 및 CDR이 뮤라인 항 인간 B7-H4 단일클론 항체 6H3과 같은 비 인간 면역글로불린으로부터 유래되고, 항체의 나머지 부분은 인간 면역글로불린으로부터 유래된 항체 경쇄를 암호화하고 발현하는 발현 벡터를 제작함으로써, 인간화 항체 경쇄의 발현을 위한 벡터를 생성하는 단계; c) 통상적인 분자 생물학 방법에 의해 발현 벡터를 숙주 세포에 전달하여 인간화 항체의 발현을 위한 형질감염된 숙주세포를 생성하는 단계; 및 d) 형질감염된 세포를 통상적인 세포 배양 기술에 의해 배양하여 인간화 항체를 생산하는 단계.

[0120]

예시적인 방법에 대하여, 숙주 세포는 상이한 선택 마커를 포함할 수 있지만, 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 서열을 제외하고는 바람직하게는 동일한, 이러한 발현 벡터들로 공동형질감염될 수 있다. 이러한 절차는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 동일한 발현을 제공한다. 대안적으로, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 모두를 암호화하는 단일 벡터가 사용될 수 있다. 중쇄 및 경쇄에 대한 암호화 서열은 cDNA 또는 유전체 DNA 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 재조합 항체를 발현하기 위해 사용되는 숙주 세포는 에스체리키아 콜라이(*Escherichia coli*)와 같은 박테리아 세포, 또는 더욱 바람직하게는 진핵 세포(예컨대, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 HEK-293 세포)일 수 있다. 발현 벡터의 선택은 숙주 세포의 선택에 따라 좌우되며, 선택된 숙주 세포에서 원하는 발현 및 조절 특성이 나타나도록 선택될 수 있다. 사용될 수 있는 다른 세포주는, 이에 제한되지는 않으나, CHO-K1, NSO, 및 PER.C6(Crucell, Leiden, 네덜란드)를 포함한다.

[0121]

임의의 개시된 항체는 당업자에게 잘 알려진 기술을 사용하여 항 이디오타입 항체를 생성하는데 사용될 수 있다 (예컨대, Greenspan, N.S. *et al.* (1989) "Idiotypes: Structure And Immunogenicity," FASEB J. 7:437-444; and Nisinoff, A. (1991) "Idiotypes: Concepts And Applications," J. Immunol. 147(8):2429-2438를 참조).

[0122]

유도 항체 또는 항체 단편은, 특이적 화학적 절단, 아세틸화, 제형화, 튜니카마이신의 대사성 합성 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 당업자에게 공지된 기술을 사용한 화학적 변형에 의해 변형될 수 있다. 일구현예에서, 항체 유도체는 모 항체와 유사하거나 동일한 기능을 가질 것이다. 다른 구현예에서, 항체 유도체는 모 항체에 대해 변경된 활성을 나타낼 것이다. 예를 들어, 유도 항체(또는 이의 단편)는 그의 애피토프에 모 항체보다 더 단단하게 결합하거나 단백질 분해에 대해 더욱 저항성이 있게 될 수 있다.

[0123]

유도체화된 항체 내 치환, 첨가, 또는 결실은 항체의 Fc 영역 내에 존재할 수 있고, 따라서 하나 이상의 Fc γR에 대한 항체의 결합 친화도를 변형하는 역할을 수행할 수 있다. 하나 이상의 Fc γR에 대해 변형된 결합을 가지는 항체를 변형하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예컨대 PCT 공개 WO 04/029207, WO 04/029092, WO 04/028564, WO 99/58572, WO 99/51642, WO 98/23289, WO 89/07142, WO 88/07089, 및 미국 특허 제5,843,597호 및 제5,642,821호를 참조한다. 일부 구현예에서, Fc 영역이 결실(예를 들어, Fab 또는 F(ab)2 등)되거나 변형되어서, 분자가 감소되거나 Fc 수용체(FcR) 결합 활성을 전혀 나타내지 않거나, 향상된 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 항체는 활성화 Fc γR, 예컨

대, Fc γ RIIIA에 대해 변경된 친화도를 가진다. 바람직하게, 이러한 변형은 또한 변경된 Fc 매개 효과기 기능을 가진다. Fc 매개 효과기 기능에 영향을 미치는 변형들은 당해 분야에 잘 알려져 있다(예컨대, 미국 특허 제6,194,551호 및 WO 00/42072를 참조한다). 특정한 일 구현예에서, Fc 영역의 변형은 변경된 항체 매개 효과기 기능, 변경된 다른 Fc 수용체(예컨대, Fc 활성화 수용체)에 대한 결합, 변경된 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 활성, 변경된 C1q 결합 활성, 변경된 보체 의존성 세포독성 활성(CDC), 쇠세포 활성, 또는 이의 임의의 조합을 가지는 항체를 초래한다.

[0124] 유도체화된 항체는 포유동물, 바람직하게는 인간에서 모 항체의 반감기(예컨대, 혈청 반감기)를 변경시키기 위해 사용될 수 있다. 바람직하게, 이러한 변경은 15일보다 긴, 바람직하게는 20일보다 긴, 25일보다 긴, 30일보다 긴, 35일보다 긴, 40일보다 긴, 45일보다 긴, 2달보다 긴, 3달보다 긴, 4달보다 긴 또는 5달보다 긴 반감기를 초래할 것이다. 인간화 항체 또는 이의 단편의 증가된 반감기는 포유동물, 바람직하게는 인간에서, 상기 항체 또는 항체 단편의 포유동물 내 더 높은 혈청 역가를 초래하고, 이에 따라, 상기 항체 또는 항체 단편의 투여 빈도를 낮추고/낮추거나 상기 항체 또는 항체 단편이 투여되는 농도를 낮춘다. 증가된 생체 내 반감기를 가지는 항체 또는 이의 단편은 당업자에게 공지된 기술에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 증가된 생체 내 반감기를 가지는 항체 또는 이의 단편은 Fc 도메인과 FcRn 수용체 사이의 상호작용에 관여하는 것으로 확인된 아미노산 잔기를 변형(예컨대, 치환, 결실 또는 첨가)시킴으로써 생성될 수 있다. 인간화 항체는 생물학적 반감기를 증가시키도록 조작될 수 있다(예컨대, 미국 특허 제6,277,375호를 참조). 예를 들어, 인간화 항체는 Fc 헌지 도메인이 증가된 생체 내 또는 혈청 반감기를 가지도록 조작될 수 있다.

[0125] 증가된 생체 내 반감기를 가지는 항체 또는 이의 단편은 상기 항체 또는 항체 단편에 폴리머 분자, 예를 들어, 고분자량 폴리에틸렌글리콜(PEG)를 부착시킴으로써 생성할 수 있다. PEG는 다기능성 링커의 존재 또는 부재하에 상기 항체 또는 항체 단편의 N- 또는 C-말단에 대한 PEG의 자리 특이적 접합 또는 라이신 잔기에 존재하는 엘실론-아미노기를 통해서 상기 항체 또는 항체 단편에 부착될 수 있다. 생물학적 활성의 손실의 최소화를 야기하는 선형 또는 분지형 폴리머 유도체화가 사용될 것이다. 접합의 정도는 SDS-PAGE 및 질량 분광분석기로 엄중하게 모니터링되어 항체에 대한 PEG 분자의 적절한 접합을 보장할 것이다. 미반응 PEG는 항체-PEG 접합체로부터, 예컨대, 크기 배제 또는 이온 교환 크로마토그래피에 의해 분리될 수 있다.

[0126] 항체는 또한 포유동물 순환계에 실질적인 면역 반응 없이 주입될 수 있는 조성물을 제공하기 위해 Davis 등(미국 특허 제4,179,337호를 참조)에 기술된 커플링제 및 방법에 의해 변형될 수 있다.

[0127] 인간화 항체의 골격 잔기는 변형될 수 있다. 골격 영역 내 잔기는 항원 결합을 변경, 바람직하게는, 개선하기 위해 CDR 공여자 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환될 수 있다. 이러한 골격 치환은 당해분야에 잘 알려진 방법, 예컨대 항원 결합에 중요한 골격 잔기를 확인하기 위한 CDR과 골격 잔기의 상호작용의 모델링 및 특정 위치에서의 특이한 골격 잔기를 확인하기 위한 서열비교에 의해 확인된다(예컨대, 미국 특허 제5,585,089; 및 Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies For Therapy," Nature 332:323-327를 참조).

[0128] 개시된 B7-H4 결합 분자는 이종 분자(즉, 관련없는 분자)에 재조합적으로 융합되거나 화학적으로 접합(공유 및 비공유 접합을 포함함)될 수 있다. 융합이 필수적으로 직접적이어야 할 필요는 없으며, 링커 서열을 통해 일어날 수 있다.

[0129] 일 구현예에서, 이러한 이종 분자는 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90 또는 적어도 100개의 아미노산을 가지는 폴리펩티드이다. 이러한 이종 분자는 대안적으로 다음과 같은 효소, 호르몬, 세포 표면 수용체, 약물 모이어티 등일 수 있다: 대식세포 특이적 표적 시약(예를 들어, 세포 내 카복실에스터라제, hCE1(Needham, L.A. et al. (2011) "Drug Targeting To Monocytes And Macrophages Using Esterase-Sensitive Chemical Motif," J. Pharmacol. Exp. Ther. DOI:10.1124/jpet.111.183640), 키틴 및 키토산(Mazzarelli, R.A. (2010) "Chitins And Chitosans As Immunoadjuvants And Non-Allergenic Drug Carriers," Mar Drugs 8(2):292-312), 갈락토실화 저밀도 지단백질(Wu, F. et al. (009) "Galactosylated LDL Nanoparticles: A Novel Targeting Delivery System To Deliver Antigen To Macrophages And Enhance Antigen Specific T Cell Responses," Molec. Pharm. 6(5):1506-1517), N-포밀-Met-Leu-Phe(fMLF), 대식세포 특이적 케모-유인제(Wan, L. et al. (2008) "Optimizing Size And Copy Number For PEG-Fmlf (N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine) Nanocarrier Uptake By Macrophages," Bioconjug. Chem. 19(1):28-38), 말레일화 또는 만노실화 단백질, 예를 들어 말레일화 알부민(Anatelli, F. et al. (2006) "Macrophage-Targeted Photosensitizer Conjugate Delivered By Intratumoral Injection," Mol Pharm. 3(6):654-664; Bansal, P. et al. (1999) "MHC Class I-Restricted Presentation Of Maleylated

Protein Binding To Scavenger Receptors,” J. Immunol. 162(8):4430-4437); 또한 Mukhopadhyay, A. et al. (2003) “Intracellular Delivery Of Drugs To Macrophages,” Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 84:183-209 참조, 독소(예를 들어, 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소(즉, PE-40), 디프테리아 독소, 리신, 젤로닌, 또는 미국자리공 항바이러스 단백질), 단백질(예를 들어, 종양 괴사 인자, 인터페론(예컨대, α -인터페론, β -인터페론), 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성 인자, 또는 세포 사멸제(예컨대, 종양 괴사 인자- α , 종양 괴사 인자- β)), 생물학적 반응 조절제(예를 들어, 림포카인(예컨대, 인터류킨-1(“IL-1”)), 인터류킨-2(“IL-2”), 인터류킨-6(“IL-6”)), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(“GM-CSF”), 과립구 콜로니 자극 인자(“G-CSF”), 또는 대식세포 콜로니 자극 인자(“M-CSF”), 또는 성장 인자(예컨대, 성장 호르몬(“GH”))), 세포독소(예컨대, 세포분열억제 또는 세포파괴제, 예를 들어, 파클리타솔(paclitaxel), 사이토칼라신(cytochalasin) B, 그라미시딘(gramicidin) D, 에토פוס아이드(etoposide), 테노포사이드(tenoposide), 빙크리스틴(vincristine), 빙블라스틴(vinblastine), 콜키신(colchicine), 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 디하이드록시 안트라신 디온(dihydroxy anthracin dione), 미토산트론(mitoxantrone), 미트라마이신(mithramycin), 액티노마이신(actinomycin) D, 1-데하이드로테스토스테론(dehydrotestosterone), 글루코코르ти코이드, 프로카인(procaine), 테트라카인(tetracaine), 리도카인(lidocaine), 프로프라놀롤(propranolol), 및 퓨로마이신(puromycin) 및 이의 유사체 또는 상동체), 항대사제(예컨대, 메토트렉세이트(methotrexate), 6-미captופ리린, 6-티오구아닌, 시타라빈(cytarabine), 5-플루오로우라실 데카바진), 알킬화제(예컨대, 메클로레타민(mechlorethamine), 티오에파 클로람부실(thioepa chlorambucil), 멜팔란(melphalan), BiCNU™카무스틴(carmustine); BSNU) 및 로무스틴(lomustine(CCNU)), 사이클로토스파미드(cyclothosphamide), 부설판(busulfan), 디브로모만니톨(dibromomannitol), 스트렙토조토신(streptozotocin), 미토마이신(mitomycin) C, 및 시스디클로로디아민 플라티늄(cis dichlorodiamine platinum) (II)(DDP) 시스플라틴(cisplatin)), 안트라사이클린(anthracycline)(예컨대, 다우노루비신(daunorubicin(이전에는, 다우노마이신(daunomycin)) 및 독소루비신(doxorubicin)), 항생제(예컨대, 닉티노마이신(dactinomycin(이전에는, 액티노마이신(actinomycin)), 블레오마이신(bleomycin), 미트라마이신(mithramycin), 및 안트라마이신(anthramycin, AMC)), 또는 항체세포분열제(예컨대, 빙크리스틴(vincristine) 및 빙블라스틴(vinblastine)).

[0130] 다른 구현예에서, 분자는 제2 항체에 접합하여, Segal의 미국 특허 제4,676,980호에 기술된 바와 같은 항체 이종접합체를 형성한다. 이러한 이종접합 항체는 추가적으로 햅텐(예를 들어, 플루오레세인 등) 또는 세포 마커(예컨대, 4-1-BB, B7-H1, PD-1, CD4, CD8, CD14, CD25, CD27, CD40, CD68, CD163, CTLA4, GITR, LAG-3, OX40, TIM3, TIM4, TLR2, LIGHT, 등) 또는 사이토카인(예컨대, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, TGF-베타, IFNg, Flt3, BLys) 또는 케모카인(예컨대, CCL21) 등에 결합할 수 있다.

[0131] 융합 단백질의 Fc 부위는 이소형 또는 서브클래스에 따라 달라질 수 있고/있거나, 키메라 또는 혼성화일 수 있고/있거나, 예를 들어 효과기 기능을 개선하고, 반감기, 조직 접근성을 조절하고, 안정성과 같은 생물물리학적 특성을 증대시키고, 생성의 효율(및 적은 비용)을 개선하기 위해 변형될 수 있다. 개시된 융합 단백질의 제작에 유용한 많은 변형들 및 이를 제조하기 위한 방법들이 당해 분야에 공지되어 있는데, 예를 들어, Mueller, J.P. 등((1997) “Humanized Porcine VCAM-Specific Monoclonal Antibodies With Chimeric IgG2/G4 Constant Regions Block Human Leukocyte Binding To Porcine Endothelial Cells,” Mol. Immun. 34(6):441-452), Swann, P.G.((2008) “Considerations For The Development Of Therapeutic Monoclonal Antibodies,” Curr. Opin. Immun. 20:493-499 (2008)), 및 Presta, L.G.((2008) “Molecular Engineering And Design Of Therapeutic Antibodies,” Curr. Opin. Immun. 20:460-470)를 참조한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 원래의 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 Fc 영역이다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 혼성화, 예를 들어 IgG2/IgG4 Fc 불변 영역으로 이루어진 키메라이다. Fc 영역에 대한 변형은, 이에 제한되지는 않으나, Fc 감마 수용체 및 보체에 결합하는 것을 방지하도록 변형된 IgG4, 하나 이상의 Fc 감마 수용체에 결합하는 것을 개선하도록 변형된 IgG1, 효과기 기능을 최소화하도록 변형된 IgG1(아미노산 변화), (통상적으로 발현 숙주를 변화시킴으로써) 글리칸이 변경되거나 전혀 없는 IgG1 및 FcRn에 대하여 변경된 pH 의존성 결합을 가지는 IgG1를 포함한다. Fc 영역은 전체 힌지 영역, 또는 전체 힌지 영역보다 적은 영역을 포함할 수 있다.

[0132] 비호지킨 림프종 또는 밸덴스트롬 거대글로불린혈증에 대하여 리툭시맙(CD20에 대한 키메라 마우스/인간 IgG1 단일클론 항체)으로 치료받는 환자에서 치료 결과는 개체의 Fc γ 수용체(인간 IgG1의 Fc 도메인에 대하여 구분되는 고유 친화도를 가짐)의 대립형질 변이체의 발현과 상호관련된다. 특히, 저 친화도 활성 Fc 수용체 CD16A(Fc γ RIIIa)의 고 친화도 대립형질을 가지는 환자가 더 높은 반응률을 나타내었고, 비호지킨 림프종의 경우에는 무진행 생존을 개선하였다. 따라서, Fc 도메인은 개시된 항체 및 단편들이 저 친화도 저해성 Fc 수용체 CD32B(Fc

γ RIIB)에 대한 결합을 감소시키고, 저 친화도 활성 Fc 수용체 CD16A(Fc γ RIIIA)에 대한 결합을 향상시키거나 결합의 야생형의 수준을 유지하는 하나 이상의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 포함할 수 있도록 한다.

[0133] 다른 구현예는 그들의 반감기를 증가시키는 Fc γ R에 대하여 감소된 결합을 가지는 IgG2-4 혼성화 및 IgG4 돌연변이체를 포함한다. 대표적인 IgG2-4 혼성화 및 IgG4 돌연변이체는 다음에 기술되어 있다: Angal, S. 등((1993) "A Single Amino Acid Substitution Abolishes The Heterogeneity Of Chimeric Mouse/Human (Igg4) Antibody," Molec. Immunol. 30(1):105-108); Mueller, J.P. 등((1997) "Humanized Porcine VCAM-Specific Monoclonal Antibodies With Chimeric IgG2/G4 Constant Regions Block Human Leukocyte Binding To Porcine Endothelial Cells," Mol. Immun. 34(6):441-452); 및 미국 특허 제6,982,323호. 일부 구현예에서, IgG1 및/또는 IgG2 도메인이 변형되는데, 예를 들어, Angal, S. 등(1993)에는 세린 241이 프롤린으로 교체된 IgG1 및 IgG2 변이체가 기술되어 있다.

[0134] 바람직한 일 구현예에서, 이러한 분자들의 Fc 도메인은 CD16A에 대한 결합을 향상시키는 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 함유한다. CD16A에 대한 결합을 증가시키고 CD32B에 대한 결합을 감소시키는 인간 IgG1의 Fc 도메인의 다수의 치환들이 당해 분야에 공지되어 있고, Stavenhagen, J.B. 등((2007) "Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcgamma Receptors," Cancer Res. 57(18):8882-8890)에 기술되어 있다. CD32B에 대한 결합이 감소되고/되거나 CD16A에 대한 결합이 증가된 인간 IgG1 Fc 도메인의 예시적인 변이체들은 F243L, R929P, Y300L, V305I 또는 P296L 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 치환들은 인간 IgG1 Fc 도메인에 임의의 조합으로 존재할 수 있다. 일 구현예에서, 인간 IgG1 Fc 도메인 변이체는 F243L, R929P 및 Y300L 치환을 포함한다. 다른 구현예에서, 인간 IgG1 Fc 도메인 변이체는 F243L, R929P, Y300L, V305I 및 P296L 치환을 포함한다. 다른 구현예에서, 인간 IgG1 Fc 도메인 변이체는 N297Q 치환을 포함하는데, 이러한 돌연변이에서는 FcR 결합이 무효화된다.

[0135] 치료적 모이어티를 항체에 접합하기 위한 기술은 잘 알려져 있다(예컨대, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.; Hellstrom *et al.* "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc. ; Thorpe "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), 1985, pp. 475-506); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; and Thorpe *et al.* (1982) "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates," Immunol. Rev. 62:119-158을 참조).

[0136] 임의의 개시된 분자는 정제를 용이하게 하기 위해 마커 서열, 예를 들면, 웨პ티드에 융합될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 마커 아미노산 서열은 핸사-히스티딘 웨პ티드, 인플루엔자 해마글루티닌 단백질로부터 유래된 에피토프에 해당하는 해마글루티닌 "HA" 태그(Wilson, I.A. *et al.* (1984) "The Structure Of An Antigenic Determinant In A Protein," Cell, 37:767-778) 및 "플랙" 태그(Knappik, A. *et al.* (1994) "An Improved Affinity Tag Based On The FLAG Peptide For The Detection And Purification Of Recombinant Antibody Fragments," Biotechniques 17(4):754-761)이다.

[0137] 개시된 B7-H4 결합 분자는 진단 또는 치료제 또는 혈청 반감기가 증가되는 것이 바람직한 다른 분자와 접합될 수 있다. 항체는, 예를 들어, 임상 시험 절차의 일부분으로서 질환, 장애 또는 감염의 진행 또는 발달을 모니터링하여, 예컨대 주어진 치료 계획의 효능을 결정하거나 특정 치료법에 반응할 가능성이 가장 높은 환자(예를 들어, 높은 수준의 침윤성 TAM을 가지고, 특히 높은 수준의 B7-H4를 발현하는 환자)를 선택하기 위한 (생체 내, 원 위치, 또는 시험관 내) 진단용으로 사용될 수 있다.

[0138] 특히, 인간에서의 암의 대부분은 종양의 생존, 성장 및 진행에 필요한 구조의 지지 그룹(간질)과 서로 얹힌 암 세포로 구성된 고형 종양으로서 성장한다. 종양 간질 내 주요 구성요소는 섬유아세포, 신생 혈관 및 대식세포를 포함하는 면역 세포이다. 이러한 종양 관련 대식세포는 종양 간질의 가장 중요한 구성요소 중 하나일뿐만 아니라, 종양 관련 항원(TAA) 특이적 T 세포 면역을 개시하고 유지하는 데에 주요한 항원 제시 세포(APC)를 포함한다.

[0139] 종양 환경적 대식세포는 종양 내 존재하는 다른 APC, 예를 들어 수지상세포(DC)보다 현저하게 수적으로 우세하

고, 고형 종양 내 APC의 중요한 하위 군집을 대표한다(Kryczek, I. et al. (2006) "B7-H4 Expression Identifies A Novel Suppressive Macrophage Population In Human Ovarian Carcinoma," J. Exper. Med. 203(4):871-881). B7-H4⁺인 종양 환경적 대식세포는 T 세포 활성화를 유의하게 억제한다. B7-H4⁺ 대식세포는 IL-10 및 IL-6에 의해 시험관 내에서 B7-H4⁺ 대식세포로 전환될 수 있다(Kryczek, I. et al. (2006) "Cutting Edge: Induction Of B7-H4 On APCs Through IL-10: Novel Suppressive Mode For Regulatory T Cells," J. Immunol. 177(1):40-44). 난소 종양 환경에서 높은 수준의 IL-10 및 IL-6가 발견되기 때문에, 이러한 사이토카인의 B7-H4 발현 유도능이 공격적인 종양에서 보이는 증가된 T 세포 활성화의 억제와 관련있을 것으로 여겨진다. 중요하게는, 이러한 억제성 활성은 B7-H4 발현을 차단하는 작용을 하는 2종의 수지상 세포 분화 사이토카인인 GM-CSF 또는 IL-4에 의해 감소될 수 있다. 이러한 억제성 활성은 또한 개시된 조성물로 B7-H4 활성을 차단함으로써 감소될 수 있다.

[0140]

비록 종양 면역 내에서 수지상 세포에 의해 수행되는 역할과 표현형이 조사되었지만, 이러한 연구는 암 환자의 종양 미세환경에서 B7-H4⁺ 및 B7-H4⁻ 대식세포에 의해 수행되는 역할들을 밝혀내지는 못하였다. 개시된 B7-H4 결합 분자는 B7-H4⁺ 및 B7-H4⁻ 대식세포에 의해 수행되는 역할을 밝혀내는 데에 사용되고, 환자에서 종양의 임상적 예후(즉, 총 대식세포에 대한 B7-H4⁺ 대식세포의 정도는 종양 공격성 및 암의 중증도와 상호관련됨)를 평가하기 위한 수단으로서 사용된다. 이러한 평가는 총 대식세포에 대한 B7-H1⁺ 대식세포의 정도의 결정과 함께 특히 유용한데, 이는 종양 B7-H1 발현 및 양성 종양 B7-H4 발현이 독립적으로 암으로 인한 죽음에 관련되기 때문이다(Krambeck, A.E. et al. (2006) "B7-H4 Expression In Renal Cell Carcinoma And Tumor Vasculation: Associations With Cancer Progression And Survival," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 103(2): 10391-10396).

[0141]

검출은 분자, 예를 들어 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 검출가능한 물질에 결합시킴으로써 용이해질 수 있다. 검출가능한 물질의 예는 다양한 효소, 보결 원자단, 형광 물질, 빛광 물질, 생물발광 물질, 방사성 물질, 양전자 방출 금속, 및 비방사성 상자성 금속 이온들을 포함한다. 검출가능한 물질은 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여, 직접적으로, 또는 (예를 들어, 당해 분야에 공지된 텅커와 같은) 중간체를 통해 간접적으로 항체에 결합되거나 접합될 수 있다. 예를 들어, 진단제로서 사용하기 위한 항체에 접합될 수 있는 금속 이온에 대한 미국 특히 제4,741,900호를 참조한다. 이러한 진단 및 검출은 항체를, 다양한 효소, 호스래디쉬 페옥시다제, 알칼라인 포스파타제, 베타-갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스터라제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 효소; 이에 제한되지는 않으나 스트렙트아비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴과 같은 보결원자단 복합체; 이에 제한되지는 않으나, 웜밸리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 댠실 클로라이드 또는 피코에리트린과 같은 형광 물질; 이에 제한되지는 않으나, 류미놀과 같은 발광 물질; 이에 제한되지는 않으나, 루시퍼라제, 루시페린, 및 에퀴린과 같은 생물발광 물질; 이에 제한되지는 않으나, 비스무트(²¹³Bi), 탄소(¹⁴C), 크로뮴(⁵¹Cr), 코발트(⁵⁷Co), 플루오린(¹⁸F), 가돌리늄(¹⁵³Gd, ¹⁵⁹Gd), 갈륨(⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), 게르마늄(⁶⁸Ge), 홀뮴(¹⁶⁶Ho), 인듐(¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), 요오드(¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), 란타늄(¹⁴⁰La), 루테튬(¹⁷⁷Lu), 망간(⁵⁴Mn), 몰리브덴(⁹⁹Mo), 팔라듐(¹⁰³Pd), 인(³²P), 프라세오디뮴(¹⁴²Pr), 프로메튬(¹⁴⁹Pm), 레늄(¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re), 로듐(¹⁰⁵Rh), 류테븀(ruthenium)(⁹⁷Ru), 사마륨(¹⁵³Sm), 스칸듐(⁴⁷Sc), 셀레늄(⁷⁵Se), 스트론튬(⁸⁵Sr), 황(³⁵S), 테크네튬(⁹⁹Tc), 탈륨(²⁰¹Ti), 주석(¹¹³Sn, ¹¹⁷Sn), 삼중수소(³H), 크세논(¹³³Xe), 이테르븀(¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb), 이트륨(⁹⁰Y), 아연(⁶⁵Zn)과 같은 방사성 물질; 다양한 양전자 방출 단층 촬영을 이용하는 양전자 방출 금속 및 비방사성 상자성 금속 이온들을 포함하나 이에 제한되지는 않는 검출가능한 물질에 결합시킴으로써 달성될 수 있다.

[0142]

개시된 분자는 표적 항원 또는 항체 또는 다른 항원 결합 단편과의 결합을 통해 지지체에 고정화된 표적 항원에 결합할 수 있는 다른 분자들의 정제 또는 면역검정에 특히 유용한 고체 지지체에 부착될 수 있다. 이러한 고체 지지체는 이에 제한되지는 않으나, 유리, 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리프로필렌을 포함한다.

[0143]

임의의 이러한 항체, 융합 단백질 또는 단편뿐 아니라 이러한 핵산 분자를 전달하거나 복제할 수 있는 벡터 분자(예를 들어, 플라스미드)를 암호화하는 핵산 분자(DNA 또는 RNA)가 또한 개시된다. 이러한 핵산은 단일 가닥,

이중가닥일 수 있고, 단일 가닥 및 이중 가닥 부분 둘 다를 포함할 수 있다.

[0144] **A. 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 및 이의 CDR**

[0145] 개시된 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3은 인간 세포의 표면 상에 배열된 인간 B7-H4의 활성을 조절하는 능력을 (특히, 이러한 B7-H4가 내인성 농도로 발현된 경우) 가진다. “내인성 농도”라는 용어는 세포(세포는 정상 세포, 암세포 또는 감염된 세포일 수 있음)에 의해 문자가 원래 (즉, 발현 벡터 또는 재조합 프로모터의 부재 하에) 발현되는 수준을 지칭한다.

[0146] 일 구현예에서, 이러한 조절은 이러한 항체들의 B7-H4(바람직하게는 내인성으로 발현되고 배열됨)에 대한 결합에 의해 유발될 것이다. 하나의 대안적인 구현예에서, 이러한 조절은 내인성으로 발현되고 배열되는 B7-H4의 결합을 항상시키거나 아니면 용이하게 하는 것을 포함할 것이다.

[0147] 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3을 암호화하는 DNA를 서열분석하였다. 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 암호화 폴리뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은 아래에 기재된 바와 같다. CDR 서열은 밑줄 치고 진하게 나타낸다:

[0148] **항 인간 B7-H4 클론 6H3 경쇄 가변 영역:**

[0149] DVVMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HINGNTYLHW YLQKPGQSPK

[0150] VLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP

[0151] LTFGAGTKLE LK (서열 번호 3)

[0152] **경쇄 가변 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드:**

[0153] gatgttgtga tgacccaaac tcctctctcc ctgcctgtca

[0154] gtcttggaga

[0155] tcaaggctcc atctcttgca gatctagtca gagccttgta

[0156] cacattaatg

[0157] gaaacaccta ttacattgg tacctgcaga agccaggcca

[0158] gtctccaaag

[0159] gtcctgatct acaaagtttc caaccgattt tctgggtcc

[0160] cagacaggtt

[0161] cagtggcagt ggatcaggga cagattcac actcaagatc

[0162] agcagagtg

[0163] aggctgagga tctgggagtt tatttcgtct ctcaaagtac

[0164] acatgttccg

[0165] ctcacgttcg gtgctggac caagctggag ctgaaaac

[0166] (서열 번호 4)

[0167] **중쇄 가변 영역:**

[0168] EVQLQQSGPV LVKPGTSVKM SCKASGYTFT DYYMNWKQS HGKSLEWIGV

[0169] INPYNGDTTY NQKFKGKATL TVDKSSSTAY MEVNSLTFED SAVYYCARYP

[0170] ESTYWGGTTL VTVSA (서열 번호 5)

[0171] **경쇄 가변 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드:**

[0172] gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgta ctggtaagc

[0173] ctgggacttc

[0174] agtgaagatg tcctgttaagg ctctggata cacattcact
[0175] gactactata
[0176] tgaactgggt gaagcagac catggaaaga gtcttgagtg
[0177] gattggagtt
[0178] attaatcctt acaacggta cactacccat aaccagaagt
[0179] tcaagggcaa
[0180] ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagcctac
[0181] atggaggtca
[0182] acagcctgac atttgaggac tctgcagtct attactgtgc
[0183] aagatacccg
[0184] gagagtaactt actggggcca agggactctg gtcaactgtct
[0185] ctgca
[0186] (서열 번호 6)

[0187] Chothia 및 Lesk의 범주를 사용하면, 경쇄 CDR1은 클래스 4 표준 구조(canonical structure)를 가지는 것으로 결론지었고; 경쇄 CDR2 및 CDR3 중쇄 CDR1은 클래스 1 표준 구조를 가지는 것으로 결론지었고; 중쇄 CDR2는 클래스 2 표준 구조를 가지는 것으로 결론지었다(Chothia, C. et al. (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901-917). 콜리에 데 펠스(Collier de Perles)는 가변 도메인의 2D 도면으로 가변 도메인 내 베타 가닥 및 루프의 아미노산 위치에 관한 정보를 제공한다(Ruiz, M. et al. (2002) "IMGT Gene Identification And Colliers de Perles Of Human Immunoglobulins With Known 3D Structures," Immunogenetics 53(10-11):857-883). 뮤라인 6H3 항체 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 콜리에 데 펠스는 도 1a 및 b에 각각 나타나 있다. 사슬의 3개의 CDR 루프들이 다이어그램의 상단에 나타나 있다. 가변 경쇄 또는 중쇄 영역에 유리 Cys 잔기 또는 N-결합 글리코실화 자리는 존재하지 않는다.

B. 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체

[0189] 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 개시된 인간화 변이체 및 이들의 항원 결합 유도체는 통상적으로 면역특이적 또는 생리특이적 B7-H4 결합 분자를 포함하고, 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3와 실질적으로 동일하거나 동일한 결합 특성을 가질 수 있다. 예를 들어, 이들은 인간 세포의 표면 상에 배열된 인간 B7-H4의 활성을 조절하는 능력을 (특히, 이러한 B7-H4가 내인성 농도로 발현된 경우) 가진다.

[0190] 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 다수의 바람직한 경쇄 및 중쇄 인간화 유도체가 제조되었다. IGKV2-30*02 IGKJ4*01 수여자 골격으로부터 유래된, 바람직한 인간화 변이체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 아래에 보여진다 (CDR은 밑줄로 나타냄):

- [0191] 1. VL1A IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 1):
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HINGNTYLNW
- [0192] FQQRPQGSQSPR
- [0193] RLIYKVSNRD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV
- [0194] YYCSQSTHVP
- [0195] LTFGGGTKE IK (서열 번호 18)
- [0196] 2. VL1B IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 2):
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HINGNTYLNW
- [0197] YQQRPQGSQSPR

- [0200] VL1YKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV
- [0201] YFCSQSTHVP
- [0202] LTFGGGTKE IK (서열 번호 19)
- [0203] 3. VL1C IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 3):
- [0204] DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HINGNTYLHW
- [0205] YLQRPGQSPK
- [0206] VL1YKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV
- [0207] YFCSQSTHVP
- [0208] LTFGGGTKE IK (서열 번호 20)
- [0209] CAA85590 수여자 골격으로부터 유래된, 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 바람직한 인간화 변이체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열이 아래에 나타나 있다(CDR은 밑줄로 나타냄):
- [0210] 1. VL2A CAA85590 (인간화 1):
- [0211] DIVMTQTPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HINGNTYLNW
- [0212] FQQRPGQSPR
- [0213] RL1YKVSNRD SGVPDRFSGS GSGADFTLKI SRVEAEDVGV
- [0214] YYCSQSTHVP
- [0215] LTFGQGTKVE IK (서열 번호 21)
- [0216] 2. VL2B CAA85590 (인간화 2):
- [0217] DIVMTQTPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HINGNTYLHW
- [0218] YQQRPGQSPR
- [0219] VL1YKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV
- [0220] YFCSQSTHVP
- [0221] LTFGQGTKVE IK (서열 번호 22)
- [0222] 3. VL2C CAA85590 (인간화 3):
- [0223] DIVMTQTPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HINGNTYLHW
- [0224] YLQRPGQSPK
- [0225] VL1YKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV
- [0226] YFCSQSTHVP
- [0227] LTFGAGTKVE IK (서열 번호 23)
- [0228] IGHV1-46*03 IGHJ4*01 수여자 골격으로부터 유래된, 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 바람직한 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열이 아래에 나타나 있다(CDR은 밑줄로 나타냄):
- [0229] 1. VH1A IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 1):
- [0230] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYYMHWVRQA
- [0231] PGQGLEWMGI
- [0232] INPYNGDTSY AQKFQGRVTM TRDTSTSTVY MELSSLRSED
- [0233] TAVYYCARYP

- [0234] **ESTYWGQGTL** VTVSS (서열 번호 24)
- [0235] 2. VH1B IGHV1-46*03IGHJ4*01 (인간화 2):
- [0236] EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT **DYYMNWVRQA**
- [0237] PGQGLEWMGI
- [0238] **INPYNGDTSY** NQKFQGRVTL TVDKSTSTVY MELSSLRSED
- [0239] TAVYYCARYP
- [0240] **ESTYWGQGTL** VTVSS (서열 번호 25)
- [0241] 3. VH1C IGHV1-46*03IGHJ4*01 (인간화 3):
- [0242] EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT **DYYMNWVRQA**
- [0243] PGQGLEWIGI
- [0244] **INPYNGDTSY** NQKFQGRVTL TVDKSTSTAY MELSSLRSED
- [0245] TAVYYCARYP
- [0246] **ESTYWGQGTL** VTVSS (서열 번호 26)
- [0247] ABF83259 수여자 골격으로부터 유래된, 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 바람직한 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열이 아래에 나타나 있다(CDR은 밑줄로 나타냄):
- [0248] 1. VH2A ABF83259 (인간화 1):
- [0249] QVQLVQSGAE MKKPGASVKV SCKASGYTFT **DYYIHWRQA**
- [0250] PGQSLEWMGW
- [0251] **INPYNGDTKY** SQKFQGRVTV ARDTSATTAY MELSSLRSED
- [0252] TAVYYCARYP
- [0253] **ESTYWGQGTL** VTVSS (서열 번호 27)
- [0254] 2. VH2B ABF83259 (인간화 2):
- [0255] EVQLVQSGAE MKKPGASVKV SCKASGYTFT **DYYMNWVRQA**
- [0256] PGQSLEWMGV
- [0257] **INPYNGDTTY** NQKFQGRVTV AVDKSATTAY MELSSLRSED
- [0258] TAVYYCARYP
- [0259] **ESTYWGQGTL** VTVSS (서열 번호 28)
- [0260] 3. VH2C ABF83259 (인간화 3):
- [0261] EVQLVQSGAE MKKPGASVKV SCKASGYTFT **DYYMNWVRQA**
- [0262] PGQSLEWIGV
- [0263] **INPYNGDTTY** NQKFQGRVTV TVDKSATTAY MELSSLRSED
- [0264] TAVYYCARYP
- [0265] **ESTYWGQGTL** VTVSS (서열 번호 29)
- [0266] 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 개시된 인간화 변이체의 36개의 조합 중 임의의 것을 포함하는, 항체 및 이들의 항원 결합 단편이 제공된다. 구체적으로, 이러한 항체는 표 1에 나타낸 인간화 변이체 조합을 포함한다.

표 1

표 1				
항 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체				
인간화 변이체 번호	경쇄	서열 번호	증쇄	서열 번호
H1	VL1A IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 1)	18	VH1A IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 1)	24
H2	VL1A IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 1)	18	VH1B IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 2)	25
H3	VL1A IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 1)	18	VH1C IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 3)	26
H4	VL1A IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 1)	18	VH2A ABF83259 (인간화 1)	27
H5	VL1A IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 1)	18	VH2B ABF83259 (인간화 2)	28
H6	VL1A IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 1)	18	VH2C ABF83259 (인간화 3)	29
H7	VL1B IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 2)	19	VH1A IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 1)	24
H8	VL1B IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 2)	19	VH1B IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 2)	25
H9	VL1B IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 2)	19	VH1C IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 3)	26
H10	VL1B IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 2)	19	VH2A ABF83259 (인간화 1)	27
H11	VL1B IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 2)	19	VH2B ABF83259 (인간화 2)	28
H12	VL1B IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 2)	19	VH2C ABF83259 (인간화 3)	29
H13	VL1C IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 3)	20	VH1A IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 1)	24
H14	VL1C IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 3)	20	VH1B IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 2)	25
H15	VL1C IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 3)	20	VH1C IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 3)	26
H16	VL1C IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 3)	20	VH2A ABF83259 (인간화 1)	27
H17	VL1C IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 3)	20	VH2B ABF83259 (인간화 2)	28
H18	VL1C IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 3)	20	VH2C ABF83259 (인간화 3)	29
H19	VL2A CAA85590 (인간화 1)	21	VH1A IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 1)	24
H20	VL2A CAA85590 (인간화 1)	21	VH1B IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 2)	25
H21	VL2A CAA85590 (인간화 1)	21	VH1C IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 3)	26
H22	VL2A CAA85590 (인간화 1)	21	VH2A ABF83259 (인간화 1)	27
H23	VL2A CAA85590 (인간화 1)	21	VH2B ABF83259 (인간화 2)	28
H24	VL2A CAA85590 (인간화 1)	21	VH2C ABF83259 (인간화 3)	29
H25	VL2B CAA85590 (인간화 2)	22	VH1A IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 1)	24
H26	VL2B CAA85590 (인간화 2)	22	VH1B IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 2)	25
H27	VL2B CAA85590 (인간화 2)	22	VH1C IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 3)	26
H28	VL2B CAA85590 (인간화 2)	22	VH2A ABF83259 (인간화 1)	27
H29	VL2B CAA85590 (인간화 2)	22	VH2B ABF83259 (인간화 2)	28
H30	VL2B CAA85590 (인간화 2)	22	VH2C ABF83259 (인간화 3)	29

H31	VL2C CAA85590 (인간화 3)	23	VH1A IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 1)	24
H32	VL2C CAA85590 (인간화 3)	23	VH1B IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 2)	25
H33	VL2C CAA85590 (인간화 3)	23	VH1C IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 3)	26
H34	VL2C CAA85590 (인간화 3)	23	VH2A ABF83259 (인간화 1)	27
H35	VL2C CAA85590 (인간화 3)	23	VH2B ABF83259 (인간화 2)	28
H36	VL2C CAA85590 (인간화 3)	23	VH2C ABF83259 (인간화 3)	29

[0268] 항체 또는 이의 단편은 위의 클론 중 임의의 것에 의해 생성된 항체의 가변 중쇄 및/또는 경쇄의 아미노산 서열에 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 가변 중쇄 및/또는 가변 경쇄의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 인간 B7-H4에 대한 면역특이적 결합을 나타낸다. 항체 또는 이의 단편은 위에 나열된 클론의 CDR의 아미노산 서열과 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 CDR을 포함할 수 있고, B7-H4에 대한 면역특이적 결합을 나타낸다. 2종의 아미노산 서열 간의 동일성 백분율의 결정은 BLAST 단백질 비교에 의해 결정될 수 있다.

[0269] 분자는 1, 2, 또는 3개의 중쇄 CDR 및 1, 2, 또는 3개의 경쇄 CDR(가장 바람직하게는, 3개의 경쇄 CDR 및 3개의 중쇄 CDR)을 포함하는 면역글로불린 분자(예컨대, 항체, 디아바디, 융합 단백질 등)일 수 있으며, 경쇄 CDR은 다음을 포함한다:

[0270] (1) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 경쇄 CDR1;

[0271] (2) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 경쇄 CDR2;

[0272] (3) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 경쇄 CDR3;

[0273] (4) 마우스 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 경쇄 CDR1 및 경쇄 CDR2;

[0274] (5) 마우스 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 경쇄 CDR1 및 경쇄 CDR3;

[0275] (6) 마우스 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 경쇄 CDR2 및 경쇄 CDR3;

[0276] 또는

[0277] (7) 마우스 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 및 경쇄 CDR3.

[0278] 분자는 1, 2, 또는 3개의 중쇄 CDR 및 1, 2, 또는 3개의 경쇄 CDR(가장 바람직하게는, 3개의 경쇄 CDR 및 3개의 중쇄 CDR)을 포함하는 면역글로불린 분자일 수 있으며, 중쇄 CDR은 다음을 포함한다:

[0279] (1) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 중쇄 CDR1;

[0280] (2) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 중쇄 CDR2;

[0281] (3) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 중쇄 CDR3;

[0282] (4) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 중쇄 CDR1 및 중쇄 CDR2;

[0283] (5) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 중쇄 CDR1 및 중쇄 CDR3;

[0284] (6) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 중쇄 CDR2 및 중쇄 CDR3;

[0285] 또는

[0286] (7) 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2 및 중쇄 CDR3 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체.

[0287] 분자는 1, 2, 또는 3개의 중쇄 CDR 및 1, 2, 또는 3개의 경쇄 CDR(가장 바람직하게는, 3개의 경쇄 CDR 및 3개의 중쇄 CDR)을 포함하는 면역글로불린 분자일 수 있으며, 경쇄 CDR은 다음을 포함하고,

[0288] (1) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 경쇄 CDR1;

- [0289] (2) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 경쇄 CDR2;
- [0290] (3) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 경쇄 CDR3;
- [0291] (4) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 경쇄 CDR1 및 경쇄 CDR2;
- [0292] (5) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 경쇄 CDR1 및 경쇄 CDR3;
- [0293] (6) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 경쇄 CDR2 및 경쇄 CDR3;
- [0294] 또는
- [0295] (7) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2, 및 경쇄 CDR3,

[0296] 중쇄 CDR은 다음을 포함한다:

- [0297] (1) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 중쇄 CDR1;
- [0298] (2) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 중쇄 CDR2;
- [0299] (3) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 중쇄 CDR3;
- [0300] (4) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 중쇄 CDR1 및 중쇄 CDR2;
- [0301] (5) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 중쇄 CDR1 및 중쇄 CDR3;
- [0302] (6) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 중쇄 CDR2 및 중쇄 CDR3;
- [0303] 또는
- [0304] (7) 뮤라인 항 인간 B7-H4 항체 6H3 또는 이의 인간화 변이체의 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2 및 중쇄 CDR3.

[0305] 예를 들어, 항체는 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 CDR에 상응하는 CDR을 가지는 뮤라인 6H, 또는 이의 키메라 항체, 또는 인간화 변이체의 CDR을 가질 수 있다.

[0306] 특정한 일 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 1, 2, 3, 4, 5, 또는 가장 바람직하게는 6개의 CDR을 전부 포함하고, 항체 6H3과 동일한 인간 B7-H4에 대한 결합능을 나타낼 것이다.

C. 치료 및 예방적 용도

[0308] 통상적으로, 개시된 항체는 수여자 대상체 내 B7-H4에 면역특이적으로 결합한다. 본원에서 사용된, “**대상체**”는, 바람직하게는, 비영장류(예컨대, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 등) 또는 영장류(예컨대, 원숭이 및 인간)와 같은 포유동물이고, 가장 바람직하게는 인간이다. 바람직한 구현예에서, 항체는 인간 B7-H4에 면역특이적으로 결합하는 인간화 항체, 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0309] 일부 구현예에서, 이러한 분자는 B7-H4를 발현하는 종양 세포 또는 TAM을 수여자 인간 또는 인간 조직에서 (원 위치 또는 생체 외로) 고갈시킬 수 있거나 이러한 세포들의 활성을 조절할 수 있다. B7-H4 양성 종양 세포 또는 TAM의 고갈 또는 B7-H4 수준의 이로운 감소는 개시된 항 B7-H4 항체 또는 다른 종양 특이적 또는 TAM 특이적 마커를 사용한 종양 조직의 IHC에 의해, 또는 PCR, 원 위치 혼성화 또는 당업자에게 공지된 다른 방법에 의한 B7-H4 mRNA 수준에서의 감소에 의해 모니터링될 수 있다. 항 B7-H4 항체로의 치료로부터 혜택을 받을 수 있는 환자는 표적 B7-H4 단백질을 종양 또는 TAM에 발현시킬 것이고, 이는 종양 시료의 IHC, FACS, 원 위치 혼성화 또는 당업자에게 공지된 다른 방법에 의해 평가될 수 있다.

[0310] 본원에 사용된 “**치료(치료)하다(treat)**”, “**치료(치료)하는(treating)**”, “**치료(치료)(treatment)**”, “**치료 용도(therapeutic use)**”라는 용어는 B7-H4와 그의 수용체(들)의 상호작용에 의해, 또는 세포 표면 상에 배열되는 B7-H4의 발현 또는 제시에 의해 악화되는 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상의 완화, 감소, 제거를 지칭한다. 본원에서 사용된 “**치료적 유효량**”이라는 용어는 이러한 증상들의 임상적으로 의미 있는 완화, 감소, 또는 제거를 매개하기에 충분한 치료제의 양을 지칭한다. 효과의 범위가 수여 대상체의 예후 또는 건강에 영향을 미치기에 충분한 경우에, 효과가 임상적으로 의미가 있다. 치료적 유효량은 질환의 발병을 지연시키거나 최소화, 예컨대, 암의 전파를 지연시키거나 최소화시키기에 충분한 치료제의 양을 지칭할 수 있다. 치료적 유효량은 또한 질환의 관리 또는 치료에서 치료적 혜택을 제공하는 치료제의 양을 지칭할 수 있다. 또한, 치료제에 대한 치료적 유효량은 질환의 관리 또는 치료에 치료적 혜택을 제공하는 치료제 단독의 양 또는 다른 치료법과 조합된

양, 예컨대, 질환을 관리하거나 치료하기에 충분한 치료 항체의 치료 효능을 향상시키기에 충분한 양을 의미한다.

[0311] 본원에 사용된, “**예방제**”라는 용어는 장애 또는 질환의 임의의 증상을 발견하기 전에 이러한 장애 또는 질환을 예방하기 위해 사용할 수 있는 제제를 지칭한다. “**예방적 유효**” 량은 이러한 보호를 매개하기에 충분한 예방제의 양이다. 예방적 유효량은 또한 질환의 예방에서 예방적 혜택을 제공하는 예방제의 양을 지칭할 수 있다. 또한, 예방제에 대한 예방적 유효량은 또는 질환의 예방에서 예방적 혜택을 제공하는 예방제 단독의 양 또는 다른 제제와 조합된 양을 의미한다.

1. 면역계의 상향 조절제의 용도

[0313] 바람직한 일 구현예에서, B7-H4에 결합하는 개시된 분자들은 B7-H4에 결합하여 (예를 들어, B7-H4와 이의 수용체의 결합 자리에 근접하고, B7-H4와 이의 수용체의 결합 자리에 지장을 주는 하나 이상의 자리에 결합함으로써 또는 그 구조가 이러한 결합에 의해 방해 받음으로써 수용체에 결합하는 능력이 손상되는 영역에 결합함으로써) “실질적으로” B7-H4와 이의 수용체(들) 사이의 결합을 방해(즉, 손상, 방지, 또는 약화)한다. 위에서 논의한 바와 같이, B7-H4와 이의 수용체 사이의 상호작용은 T 세포의 증식을 저해하고 다중 사이토카인의 생성을 포함하는 염증을 감소시킨다(Zang, X. et al. (2003) *B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100:10388-10392; Prasad, D.V. et al. (2003) *B7S1, A Novel B7 Family Member That Negatively Regulates T Cell Activation*,” Immunity 18:863-873). 따라서, 바람직한 일 구현예에서, 대상체로의 이러한 분자의 투여는 정상적인 B7-H4의 수용체에 대한 결합에 대한 길항작용(antagonizing)을 함으로써 대상체의 면역 반응을 **상향 조절**한다.

[0314] 면역계의 상향 조절은 암 및 만성 감염의 치료에서 특히 바람직하며, 따라서, 본원에 개시된 조성물은 이러한 장애의 치료에 사용될 수 있다. B7-H4는 HIV 감염 시 과발현된다(Carter, C. A. et al. (2008) “*Cell Biology Of HIV-1 Infection Of Macrophages*,” Ann. Rev. Microbiol. 62:425-443; Noursadeghi, M. et al. (2006) “*HIV-1 Infection Of Mononuclear Phagocytic Cells: The Case For Bacterial Innate Immune Deficiency In AIDS*,” Lancet Infect. Dis. 6:794-804). 이에 따라, 개시된 항 B7-H4 항체는 HIV 감염 및 AIDS 치료의 치료제로서 특정한 용도를 가진다. 본원에 사용된 “**암**”이라는 용어는 세포의 조절되지 않는 비정상적인 성장으로부터 기인한 신생물 또는 종양을 지칭한다. 본원에 사용된, 암은 백혈병 및 림프종을 명백히 포함한다. 이러한 용어는 멀리 있는 자리로 전이될 잠재성을 가지고 있고 암이 아닌 세포와는 다른 표현형 형질, 예를 들어, 소프트 아가와 같은 3차원 기질 내 콜로니의 형성 또는 3차원 기저막 또는 세포 외 매트릭스 제제 내에 관 형상 망 또는 웹 형상 매트릭스의 형성을 나타내는 세포에 관련된 질환을 지칭한다. 암이 아닌 세포는 소프트 아가에 콜로니를 형성하지 않고, 3차원 기저막 또는 세포외 매트릭스 제제에 구와 유사한 구조를 형성한다.

[0315] B7-H의 발현은 항종양 면역, 특히, 효과기 세포 수준에서의 T 세포 반응의 하향 조절 기전을 나타내는 것으로 여겨진다. 따라서, B7-H4 매개 신호 전달, 특히 종양 미세환경에서, 특히 암 세포 또는 종양 관련 대식세포의 표면 상에 발현된 B7-H4를 차단하는 것이 항종양 면역 반응을 증가시키고 암의 하나 이상의 증상을 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 무세포 B7-H4의 증가된 발현을 특징으로 하는 암을 치료하는 방법은 통상적으로 필요로 하는 대상체에 막관통 B7-H4 또는 이의 수용체의 길항제, 또는 이의 조합을 B7-H4 매개 신호 전달, 종양 관련 대식세포 의존성 B7-H4 매개 신호 전달, 또는 종양 의존성 B7-H4 매개 신호 전달을 감소시키기에 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함한다.

[0316] 본원에 개시된 항체를 포함하는, 암의 치료에 사용하기 위한 B7-H4 매개 신호전달에 적합한 길항제는 위에 논의되어 있다. 암을 치료하기 위한 방법은 대상체에게 막관통 B7-H4에 결합하고, 막관통 B7-H4 매개 면역억제를 예방하고, 낮추고, 차단하고 저해하는 항체를 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 바람직한 일 구현예에서, 항체는 B7-H4의 IgG 도메인에 결합한다. 일부 구현예에서, 항체는 세포 표면 상의 막관통 B7-H4의 능력의 감소 및 낮아진 막관통 B7-H4 매개 면역억제를 야기하는 B7-H4 내재화를 유발한다. 내재화된 B7-H4는 산성 리소좀 구획으로 유도되어, 여기서 분해되고, 면역 억제 신호 전달을 매개하는 데에 더 이상 유효하지 않게 되는 것으로 알려져 있다. 이러한 방법은 또한 B7-H4 매개 면역 억제에 의해 감염에 대한 신체의 면역 반응을 회피하는 박테리아, 바이러스 및 다른 감염을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0317] 일부 구현예에서, 항체는 유효 성분에 접합된다. 유효 성분은, 예를 들어, 화학치료제 또는 방사성 동위원소와 같은 세포독성제일 수 있다. 막관통 B7-H4에 결합하면, 항체 및 이의 세포독성 적재물을 표적 세포에 내재화될 수 있다. 이러한 방식으로, 항체 약물 접합체는 표적 세포의 선택적인 파괴를 수행할 수 있다. 적합한 약물 접합체 및 면역 장애 및 암의 치료에서 항체 약물 접합체를 제조하고 사용하는 방법은 당해 분야에 공지되어

있다. 예를 들어, 항 CD70 약물 접합체를 기술한 본원에 그 전체가 참조로서 포함된 미국 공개 출원 제 2012/0288512호를 참조한다.

[0318] 표적 세포는, 이에 제한되지는 않으나, B7-H4를 발현하는 세포, 예를 들어, 형질전환되지 않았을 때는 통상적으로 B7-H4를 발현하지 않는 형질전환된 세포 또는 대조군 세포와 비교하여 증가된 발현을 특징으로 하는 세포를 포함한다. 바람직한 표적 세포는 암 세포 및 종양 관련 대식세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 종양 또는 종양 미세환경에 직접적으로 투여되어 종양 자리로의 조성물의 국소화를 향상시키고 B7-H4를 발현하는 비 표적 세포에 대한 독성을 감소시킨다.

[0319] 일부 구현예에서, IgC 도메인에 결합하는 항체는 IgV 도메인에 결합하는 항체와 조합하여 공동 투여된다.

[0320] B7-H4 특이적인 유효 성분은 단독으로 투여되거나, 통상적인 암 치료요법, 예를 들어, 화학요법, 방사성요법, 및 수술과 조합하여 투여될 수 있다.

[0321] 개시된 방법 및 조성물에 의해 예방되거나 치료될 수 있는 암 및 관련 장애는, 이에 제한되지는 않으나, 다음을 포함한다: 이에 제한되지는 않으나, 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 예를 들면 골수 야구성, 전골수구성, 골수단구성, 단구성, 적백혈병 백혈병 및 골수이형성증후군, 만성 백혈병, 예를 들면 이에 제한되지는 않으나 만성 골수성(과립구) 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 모양 세포성 백혈병을 포함하는 백혈병; 진성다혈구증; 림프종, 예를 들어, 이에 제한되지는 않으나, 호지킨 질환, 비호지킨 질환; 다발성 골수증, 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 무증상 다발성 골수종, 비분비 골수종, 골경화 골수종, 형질세포성백혈병, 고립성 형질세포종 및 골수외 형질세포종; 밸텐스트롬 거대글로불린혈증; 의미불명의 단클론 감마글로불린병증; 양성 단클론 감마글로불린병증; 중쇄 질환; 골 및 결합 조직 육종, 예를 들어, 이에 제한되지는 않으나, 뼈 육종, 골육종, 연골육종, 유잉 육종, 악성 거대세포종, 뼈의 섬유육종, 척색종, 골막육종, 연조직 육종, 맥관육종(혈관육종), 섬유육종, 카포시 육종, 평활근육종, 지방육종, 림프관 육종, 신경초종, 횡문근육종, 활액막육종; 이에 제한되지는 않으나, 신경교종, 성상 세포종, 뇌간 신경교종, 상의세포종, 회돌기 교종, 비교종계열 종양, 청신경종, 두개인두종, 수모세포종, 수막종, 송과체세포종, 송과체아세포종, 원발성 뇌 림프종을 포함하는 뇌종양; 이에 제한되지는 않으나, 선암, 소엽(소세포) 암종, 관 암종, 수질 유방암, 점액성 유방암, 관형 유방암, 유두상 유방암, 파제트병, 및 염증성 유방암을 포함하는 유방암; 이에 제한되지는 않으나, 크롬친화세포종 및 부신 피질 암종을 포함하는 부신 암종; 갑산성 암, 예를 들어 이에 제한되지는 않으나 유두상 또는 여포성 갑상선암, 갑상선 수질암 및 역형성 갑상선암; 이에 제한되지는 않으나, 인슐린종, 가스트리노마, 글루카곤종, 비포마, 소마토스티틴 분비성 종양, 및 유암종 또는 섬세포 종양을 포함하는 췌장암; 이에 제한되지는 않으나, 쿠싱병, 프로락틴 분비성 종양, 말단 비대증, 및 당뇨 요붕증을 포함하는 뇌하수체암; 이에 제한되지는 않으나, 안구흑색종, 예를 들어, 홍채 흑색종, 맥락막의 흑생종, 및 모양체 흑색종, 및 망막아종을 포함하는 안암; 이에 제한되지는 않으나, 편평세포 암종, 선암, 및 흑색종을 포함하는 질암; 이에 제한되지는 않으나, 편평세포 암종, 흑색종, 선암, 기저세포암종, 육종, 및 파제트병을 포함하는 외음부암; 이에 제한되지는 않으나, 편평세포 암종, 및 선암을 포함하는 자궁경부암; 이에 제한되지는 않으나, 자궁 내막 암종 및 자궁육종을 포함하는 자궁암; 이에 제한되지는 않으나, 난소 상피 암종, 경계성 종양, 생식세포종, 및 기질 종양을 포함하는 난소암; 이에 제한되지는 않으나, 편평세포 암, 선암, 선양낭성암종, 점액표피양암종, 선편평세포암종, 육종, 흑색종, 형질세포종, 우췌양 암종, 및 귀리 세포(소세포) 암종을 포함하는 식도암; 이에 제한되지는 않으나, 선암, 진균양(폴립성), 케양성, 표층 확산형, 미만 확산형, 악성 림프종, 지방 육종, 섬유 육종, 및 암육종을 포함하는 위암; 결장암; 직장암; 이에 제한되지는 않으나, 간세포 암종 및 간아세포종을 포함하는 간암, 이에 제한되지는 않으나, 선암을 포함하는 담낭암; 이에 제한되지는 않으나, 유두상, 결절성, 및 미만성을 포함하는 담관 암종; 이에 제한되지는 않으나, 비 소세포 폐암, 편평 세포 암종(표피 암종), 선암, 대세포 암종 및 소세포 폐암을 포함하는 폐암; 이에 제한되지는 않으나, 생식세포 종양, 정상피종, 역형성, 고전적(통상적), 정상피종, 비정상피종, 배아 암종, 기형 암종, 융모암종(난황낭 종양)을 포함하는 고환암, 이에 제한되지는 않으나, 선암, 평활근육종, 및 횡문근육종을 포함하는 전립선암; 음경 암; 이에 제한되지는 않으나, 편평 세포 암종을 포함하는 타액선 암; 이에 제한되지는 않으나, 편평 세포 암, 및 우상암을 포함하는 인두암; 이에 제한되지는 않으나, 기저형 암종, 편평 세포 암종 및 흑색종, 표층 확산형 흑생종, 결절형 흑색종, 악성 흑색점 흑색종, 선단 흑자성 흑색종을 포함하는 피부암; 이에 제한되지는 않으나, 신세포 암, 선암, 부신종, 섬유육종, 이행성 세포 암(신우 및/또는 요관)을 포함하는 신장암; 월름 종양(Wilms' tumor); 이에 제한되지는 않으나, 이행 세포 암종, 편평 세포 암종, 선암, 암육종을 포함하는 방광암. 또한, 암은 점액육종, 골육종, 내피육종, 림프관내피육종, 종피종, 활막종, 혈관모세포종, 상피 암종, 낭포선암, 기관지원성 암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두상

암종 및 유두상 선암종을 포함한다(이러한 장애의 검토를 위해서, Fishman *et al.*, 1985, *Medicine*, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia and Murphy *et al.*, 1997, *Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery*, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., 미국을 참조).

[0322]

따라서, 개시된 방법 및 조성물은 또한 다양한 암(특히, 난소, 유방, 전립선, 위장관, 신장, 갑상선 및 자궁암) 또는 (이에 제한되지는 않으나) 다음을 포함하는 다른 비정상적인 증식성 질환의 예방 또는 치료에 유용하다: 방광, 유방, 결장, 신장, 간, 폐, 난소, 혀장, 위, 자궁경부, 갑상선 및 피부의 암종을 포함하는 암종; 편평 세포 암종을 포함함; 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, B 세포 림프종, T 세포 림프종, 베키트 림프종(Berkett's lymphoma)을 포함하는 림프 계열의 조혈성 종양; 급성 및 만성 골수성 백혈병 및 전골수성 백혈병을 포함하는 골수 계열의 조혈성 종양; 섬유육종 및 횡문근종육종을 포함하는 간엽 조직 기원의 종양; 흑색종, 정상피종, 기형암종, 신경아세포종 및 신경교종을 포함하는 기타 종양; 성상세포종, 신경아세포종, 신경교종, 및 신경초종을 포함하는 중추 및 말초 신경계의 종양; 섬유육종, 횡문근종육종, 및 골육종을 포함하는 간엽 조직 기원의 종양; 흑색종, 색소성 건피증, 각질극세포종, 정상피종, 갑상선 소엽암 및 기형암종을 포함하는 기타 종양. 또한, 아폽토시스에서의 이상에 의해 유발된 암도 또한 본원에 개시된 방법 및 조성물에 의해 치료될 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 암은, 이에 제한되지는 않으나, 여포성 림프종, p53 돌연변이를 가지는 암종, 유방, 전립선 및 난소의 호르몬 의존성 종양, 및 가족성 선종성 용종증 및 골수이형성증후군과 같은 전암성 병변을 포함할 수 있다. 특정한 구현예에서, 난소, 방광, 유방, 결장, 폐, 피부, 혀장 또는 자궁 내 악성 또는 이상증식성 변화(예를 들어 화생 및 이형성), 또는 과증식성 장애는 개시된 방법 및 조성물에 의해 치료 또는 예방된다. 다른 특정한 구현예에서, 육종, 흑색종 또는 백혈병이 제공된 조성물 및 방법에 의해 예방되거나 치료된다.

[0323]

비록 다양한 기전을 통해서라도, 암 세포는 그들의 발달 중에 특징적인 세트의 기능적인 능력들을 획득한다. 이러한 능력들은 아폽토시스의 회피, 성장 신호에서의 자가 충족, 항 성장 신호에 대한 둔감화, 조직 침습/전이, 제한없는 설명적인 가능성 및 지속적인 혈관신생을 포함한다. “암 세포”라는 용어는 전 악성 및 악성 암 세포 모두를 포함하는 것을 의미한다. 일부 구현예에서, 암은 국소화된 채로 남아있는 양성 종양을 지칭한다. 다른 구현예에서, 암은 이웃하는 신체 구조에 침투하고 이를 파괴하고, 멀리 떨어진 자리로 확산되는 악성 종양을 지칭한다. 또 다른 구현예에서, 암은 특정한 암 항원(예컨대, 범 암종 항원(KS 1/4), 난소 암종 항원(CA125), 전립선 특이적 항원(PSA), 암배아 항원(CEA), CD19, CD20, HER2/neu, 등)에 관련된다.

[0324]

위에서 논의된 바와 같은 종양에 대한 적용과 유사하게, 항체 및 항원 결합 단편은 독소 또는 자가 항원 또는 병원균(예컨대, 바이러스, 예를 들어, HIV, HTLV, 간염 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 백시니아 바이러스, 광견병 바이러스; 박테리아, 예를 들어, 마이코박테리아(*Mycobacteria*), 스타필로코키(*Staphylococci*), 스트렙토코키(*Streptococci*), 뉴모노코키(*Pneumonococci*), 뇌척수막염균, 코노코키(*Conococci*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 세라티아(*Serratia*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 레지오넬라(*Legionella*), 코리네박테리아(*Corynebacteria*), 살모넬라(*Salmonella*), 비브리오(*Vibrio*), 클로스트리디아(*Clostridia*), 바실리(*Bacilli*), 파스테우렐라(*Pasteurella*), 렙토스피로시스(*Leptospirosis*), 보르데텔라(*Bordetella*)의 박테리아, 특히 콜레라, 파상풍, 보툴리누스증, 탄저병, 폐스트, 및 라임병에 관련된 병원균; 또는 진균류 또는 기생충성 병원균, 예를 들어, 칸디디아(*Candida*(알비칸스(*albicans*)), 크루세이(*krusei*), 글라브라타(*glabrata*), 트로피칼리스(*tropicalis*) 등), 크립토코커스(*Cryptococcus*), 아스페르길루스(*Aspergillus*(주미가투스(*jumigatus*), 니제르(*niger*) 등), 뮤코랄레스 속(무코(*mucor*), 앱시디아(*absidia*), 리조포스(*rhizophorus*)), 스포로트릭스 센키(*Sporothrix schenkii*), 블라스토마이세스 더마티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 파라콕시디오이데스 브라질리엔시스(*Paracoccidioides brasiliensis*), 콕시디오데스 임미티스(*Coccidioides immitis*) 및 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 엔타모에바 히스토리카(*Entamoeba histolytica*), 발란티듐 콜라이(*Balantidium coli*), 네글레리아 파울리리아(*Naegleria fowleri*), 아칸타모에바 속(*Acanthamoeba* sp.), 지아르디아 람비아(*Giardia lamblia*), 크립토스포리듐 속(*Cryptosporidium* sp.), 뉴모시스티스 카리니(*Pneumocystis carinii*), 플라스모디움 비박스(*Plasmodium vivax*), 바베시아 마이크로티(*Babesia microti*), 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*), 톡소플라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*), 등), 스포로트릭스(*Sporothrix*), 블라스토마이세스(*Blastomyces*), 파라콕시디오이데스(*Paracoccidioides*), 콕시디오이데스(*Coccidioides*), 히스토플라즈마(*Histoplasma*), 엔타모에바(*Entamoeba*), 히스토리티카(*Histolytica*), 발란티듐(*Balantidium*), 네글레리아(*Naegleria*), 아칸타모에바(*Acanthamoeba*), 지아르디아(*Giardia*), 크립토스포리듐(*Cryptosporidium*), 뉴모시스티스(*Pneumocystis*), 플라스모디움(*Plasmodium*), 바베시아(*Babesia*) 또는 트리파노소마(*Trypanosoma* 등)에 대한 면역 반응을 자극하기 위해 단독으로 또는 어쥬번트로서 백신 또는 항미생물제

와 조합하여 사용될 수 있다. 따라서, 항체 및 항원 결합 단편은 감염성 질환의 치료에 사용될 수 있다.

[0325] 위에 나타낸 바와 같이, 개시된 항체 및 항원 결합 단편의 특히 바람직한 용도는 종양 세포 또는 TAM에 결합하고 바람직하게는 종양 세포 또는 TAM을 실질적으로 차단하여 종양 세포 또는 TAM의 면역 억제 활성을 조절하는 것이다. 나아가, 이러한 항체는 B7-H4를 발현하는 종양 세포 또는 TAM을 종양 미세환경 내에서 고갈시키거나 말초 혈액에서 TAM의 농도를 고갈시키기 위해 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 이러한 조절 또는 고갈은 하나의 자리에 결합하여 정상적인 B7-H4 기능을 손상시키거나 방해하는 항 B7-H4 항체를 사용하여 달성된다. 이러한 방해의 결과로서, TAM 활성이 감소(조절)되고/되거나, 종양 내 실제 또는 유효(기능적) 농도의 대식세포가 고갈된다. 대안적으로, 이러한 조절 또는 고갈은 독소에 접합되어 종양 세포 또는 TAM에 대한 이들의 결합이 종양 세포 또는 대식세포의 사멸을 초래하는 항 B7-H4 항체를 사용하여 달성된다. 바람직하게, 각각의 구현예에서, 항체의 Fc 영역의 서열은 결실(예를 들어, Fab 또는 F(ab)₂, 등)되거나 변형되어, 분자는 Fc 수용체(FcR) 결합 활성이 감소되거나 전혀 없을 것이거나, 향상된 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 나타낼 것이다. 감소된 Fc 수용체 결합 활성이 전혀 없는 Fc 영역을 가지는 항체는 우선적으로 종양 또는 TAM 상의 B7-H4가 종양 미세환경 내 T 세포 상의 저해성 수용체(들)와 상호작용하는 것을 방지하는 차단제로서 작용할 것이다. 반면, 향상된 ADCC 또는 CDC 유도를 나타내는 Fc 영역을 가지는 항체의 용도는 우선적으로 종양 세포 또는 B7-H4를 발현하는 TAM의 고갈을 유발하기 위해 사용하는 것이다.

2. 면역계의 하향 조절제의 사용

[0326] 항 B7-H4 항체는 B7-H4의 항 이디오타입 펩티드 또는 항체(Wallmann, J. et al. (2010) "Anti-Ids in Allergy: Timeliness of a Classic Concept," World Allergy Organiz. J. 3(6):195-201; Nardi, M. et al. (2000) "Anti-idiotype Antibody Against Platelet Anti-GpIIIa Contributes To The Regulation Of Thrombocytopenia In HIV-1-ITP Patients," J. Exp. Med. 191(12):2093-2100), 또는 모사체(Zang, Y.C. et al. (2003) "Human Anti-Idiotypic T Cells Induced By TCR Peptides Corresponding To A Common CDR3 Sequence Motif In Myelin Basic Protein-Reactive T Cells," Int. Immunol. 15(9):1073-1080; Loiarro, M. et al. (Epub 2010 Apr 8) "Targeting TLR/IL-1R Signalling In Human Diseases," Mediators Inflamm. 2010:674363)를 생성하기 위해 채용될 수 있다. 이러한 분자는 B7-H4에 대한 대용체(surrogate)로 작용하고 B7-H4 수용체 활성을 아고나이징하거나 향상시켜서, 대상체에 이들을 투여하면, B7-H4 결합을 모사하거나 용이하게 되고 이러한 대상체의 면역계를 **하향 조절**한다. 이러한 분자들은, 따라서, 염증 및 자가면역 질환의 치료에 사용될 수 있다.

[0327] 면역계의 하향 조절은 염증 및 자가 면역 질환, 이식 거부에 대한 반응, 이식편 대 숙주 질환 또는 숙주 대 이식편 질환의 치료에 바람직하다. 개시된 항체를 투여함으로써 치료될 수 있는 자가면역 장애의 예는, 이에 제한되지는 않으나 다음을 포함한다: 원형 탈모, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역성 애디슨 병(Addison's disease), 부신의 자가면역 질환, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 간염, 자가면역성 난소염 및 고환염, 자가면역성 혈소판감소증, 베체트병(Behcet's disease), 수포성 유천포창, 심근증, 복장 스프루우-피부염(celiac sprue-dermatitis), 만성 피로 면역 장애 증후군(CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증, 척-스트라우스증후군(Churg-Strauss syndrome), 반흔성유천포창, CREST 증후군, 한랭 응집소 질환, 크론병(Crohn's disease), 원관성 루푸스, 원발성 혼합 한냉-글로불린증, 섬유근육통-섬유근육염, 사구체신염, 그레이브스 병(Graves' disease), 길랑-바레(Guillain-Barre), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 특발성 폐 섬유증, 특발성 혈소판감소성 자반증 (ITP), IgA 신경병증, 소아 관절염, 편평태선, 홍반성 루푸스, 메니에르병(Meniere's disease), 혼합결합조직병, 다발성 경화증, 시신경척수염(NMO), 제1형 또는 면역 매개 당뇨병, 중증 근육무력증, 보통천포창, 악성빈혈, 결절다발동맥염, 다발연골염, 다분비선증후군, 류마티스성 다발성 근육통, 다발근육염 및 피부근육염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담관간경화, 건선, 건선성 관절염, 레이노드 현상(Raynauld's phenomenon), 라이터 증후군(Reiter's syndrome), 류마티스성 관절염, 유육종증, 경피증, 쇼그렌 증후군(Sjoren's syndrome), 강직 인간 증후군, 전신성 홍반성 루푸스, 홍반성 루푸스, 타카야수 혈관염, 즉두 동맥염/거대 세포 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 혈관염, 예를 들어 포진상 피부염 혈관염, 백반, 및 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis).

[0329] 개시된 방법에 따라 예방되거나 치료되거나 관리될 수 있는 염증성 장애의 예는, 이에 제한되지는 않으나, 천식, 뇌염, 염증성 장 질환, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 알레르기성 장애, 폐혈 쇼크, 폐 섬유증, 무증상 척추관절증, 무증상 관절증, 관절염, 염증성 골용해, 및 만성 바이러스 또는 박테리아 감염에 기인한 만성 염증을

포함한다.

[0330] 따라서, 개시된 항체 및 항원 결합 단편은 염증성 및 자가 면역 질환, 이식 거부 반응, 이식편 대 숙주 및 숙주 대 이식편 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

D. 투여 방법

[0332] 다양한 전달 시스템이 공지되어 있고, 개시된 치료적 또는 예방적 조성물을 투여하기 위해 사용될 수 있는데, 예컨대, 리포솜 내 캡슐화, 미세입자, 미세캡슐, 항체 또는 융합 단백질을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체 매개 내포작용(endocytosis)(예를 들어, Wu *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432참조), 레트로바이러스 또는 다른 백터의 일부로서 핵산의 제작 등이 있다.

[0333] 면역글로불린 분자(예컨대, 항체, 디아바디, 융합 단백질 등)을 투여하는 방법은, 이에 제한되지는 않으나, 비경구 투여(예컨대, 경피, 근육내, 복강내, 정맥 내, 및 피하), 경막외, 및 점막(예컨대, 비강내 및 경구 경로)을 포함한다. 특정한 일 구현예에서, 항체는 근육내, 정맥내 또는 피하로 투여된다. 조성물은, 예를 들어, 표피 또는 점막성 선(예컨대, 경구 점막, 직장 및 장점막 등)을 통한 흡수에 의한 주입 또는 볼루스 주사에 의해 투여될 수 있고 다른 생물학적 활성 제제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신적이거나 국소적일 수 있다. 또한, 예컨대, 흡입기 또는 분무기(nebulizer) 및 에어로졸화제를 가지는 제형의 사용에 의한 폐 투여도 또한 채용될 수 있다. 예컨대, 미국 특허 제6,019,968호; 제5,985, 20호; 제5,985,309호; 제5,934,272호; 제5,874,064호; 제5,855,913호; 제5,290,540호; 및 제4,880,078호; 및 PCT 공개 WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; 및 WO 99/66903를 참조한다. 특정한 일 구현예에서, 약학적 조성물을 치료가 필요한 영역에 국소적으로 투여하는 것이 바람직할 수 있는데; 이는, 제한하고자 함이 아닌 예시로서, 주사에 의하거나 이식 수단에 의한 국소 주입에 의해 달성될 수 있고, 상기 이식물은 사이아라스틱 막과 같은 막 또는 섬유를 포함하는 다공성, 비다공성 또는 젤라틴성 물질이다. 바람직하게, 항체를 투여할 때, 항체 또는 융합 단백질이 흡수되지 않는 물질을 사용하도록 주의해야 한다.

[0334] 일부 구현예에서, 인간화 또는 키메라 항체는 항체의 표적화된 전달을 위해 리포솜 내에 제형화된다. 리포좀은 수상을 둘러싸는 동심으로 정돈된 인지질 이중층으로 구성된 소낭이다. 리포좀은 통상적으로 다양한 유형의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제를 포함한다. 리포좀의 구성요소는 생물학적 막의 지질 배열과 유사한 이중층 구조로 배열된다. 리포좀은, 부분적으로는 그들의 생체적합성, 낮은 면역원성 및 낮은 독성으로 인해 특히 바람직한 전달 비히클이다. 리포좀을 제조하기 위한 방법들은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예컨대, Epstein 등 (1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688); Hwang 등(1980 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030-4); U.S. 특허 제4,485,045호 및 제4,544,545호를 참조한다.

[0335] 미국 특허 제5,013,556호에 개시된 바와 같이 연장된 혈청 반감기, 즉 향상된 순환 시간을 가지는 리포좀을 제조하는 방법들이 또한 제공된다. 개시된 방법에 사용된 바람직한 리포좀은 순환계로부터 급격하게 제거되지 않는데, 즉, 단핵구 식세포계(MPS)로 흡수되지 않는다.

[0336] 개시된 분자는 또한 면역리포좀으로 제형화될 수 있다. 면역리포좀은 항체 또는 이의 단편이 리포좀 표면에 공유 결합 또는 비공유 결합된 리포좀 조성물을 지칭한다. 항체를 리포좀 표면에 결합시키기 위한 화학은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예컨대 미국 특허 제6,787,153호; Allen 등(1995, *Stealth Liposomes*, Boca Rotan: CRC Press, 233-44); Hansen 등(1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1239: 133-144)을 참조한다.

[0337] 개시된 분자는 항체의 양이 기재된 기밀하게 밀봉된 용기, 예를 들어 앰플 또는 샤ퟜ(sachette) 내에 포장될 수 있다. 일 구현예에서, 항체는 기밀하게 밀봉된 용기 내 건조 멸균 동결 분말 또는 무수 농축물로서 제공되고, 예컨대, 대상체에 투여하기에 적절한 농도의 물 또는 염수로 재구성될 수 있다. 바람직하게, 항체는 적어도 5 mg, 더욱 바람직하게는 적어도 10 mg, 적어도 15 mg, 적어도 25 mg, 적어도 35 mg, 적어도 45 mg, 적어도 50 mg, 또는 적어도 75 mg의 단위 용량으로 기밀하게 밀봉된 용기 내 건조 멸균 동결 분말로서 제공된다. 동결된 항체는 그들의 원래 용기 내에 2 내지 8°C로 저장되어야 하고, 항체는 재구성된 후 12 시간 내, 바람직하게는 6 시간 내, 5시간 내, 3시간 내, 또는 1시간 내에 투여되어야 한다. 대안적인 일 구현예에서, 항체는 항체의 농도 및 양이 기재된 기밀하게 밀봉된 용기 내에 액체 형태로 제공된다. 바람직하게, 액체 형태의 항체는 적어도 1 mg/ml, 더욱 바람직하게는, 적어도 2.5 mg/ml, 적어도 5 mg/ml, 적어도 8 mg/ml, 적어도 10 mg/ml, 적어도 15 mg/kg, 적어도 25 mg/ml, 적어도 50 mg/ml, 적어도 100 mg/ml, 적어도 150 mg/ml, 적어도 200 mg/ml의 항체로 기밀하게 밀봉된 용기 내에 제공된다.

[0338] 제형 내에 채용될 정확한 용량은 또한 투여의 경로, 및 병태의 심각도에 좌우될 것이고, 의사의 판단 및 각 환

자의 상황에 따라 결정되어야 한다. 유효 용량은 시험관 내 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 유래된 용량 반응 곡선으로부터 외삽될 수 있다. 항체에 대해서, 환자에게 투여되는 투여량은 통상적으로 환자 체중 kg 당 0.0001 mg 내지 100 mg이다. 바람직하게, 환자에게 투여되는 투여량은 환자의 체중의 kg 당 0.0001 mg/kg 및 20 mg/kg, 0.0001 mg/kg 및 10 mg/kg, 0.0001 mg/kg 및 5 mg/kg, 0.0001 및 2 mg/kg, 0.0001 및 1 mg/kg, 0.0001 mg/kg 및 0.75 mg/kg, 0.0001 mg/kg 및 0.5 mg/kg 사이, 0.0001 mg/kg 내지 0.25 mg/kg, 0.0001 내지 0.15 mg/kg, 0.0001 내지 0.10 mg/kg, 0.001 내지 0.5 mg/kg, 0.01 내지 0.25 mg/kg 또는 0.01 내지 0.10 mg/kg 사이이다. 일반적으로, 외부 폴리펩티드에 대한 면역 반응으로 인해, 인간 항체는 인체에서 다른 종으로부터 유래된 항체보다 더 긴 반감기를 가진다. 따라서, 더 낮은 투여량의 인간 항체 및 덜 빈번한 투여가 종종 가능하다. 또한, 항체 또는 이의 단편의 투여량 및 투여의 빈도는, 예를 들어, 지질화와 같은 변형에 의해 항체의 조직 투과 및 흡수를 향상시킴으로써 감소될 수 있다.

[0339]

또 다른 구현예에서, 조성물은 제어 방출 또는 서방출 시스템 내에서 전달될 수 있다. 당업자에게 공지된 임의의 기술이 하나 이상의 항체를 포함하는 서방형 제제를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 예컨대, 미국 특허 제4,526,938호; PCT 공개 WO 91/05548; PCT 공개 WO 96/20698; Ning 등(1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189), Song 등(1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397); Cleek 등(1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," *Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854); 및 Lam 등(1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760)을 참조한다. 일 구현예에서, 펌프가 제어 방출 시스템에서 사용될 수 있다(Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88:507; and Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574 참조). 다른 구현예에서, 폴리머 물질이 항체의 제어 방출을 달성하기 위해 사용될 수 있다(예컨대, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 참조; 또한, Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105); 미국 특허 제5,679,377호; 미국 특허 제5,916,597호; 미국 특허 제5,912,015호; 미국 특허 제5,989,463호; 미국 특허 제5,128,326호; PCT 공개 WO 99/15154; 및 PCT 공개 WO 99/20253 참조). 서방형 제제에 사용되는 폴리머의 예는, 이에 제한되지는 않으나, 폴리(2-하이드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴 산), 폴리(에틸렌-co-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴 산), 폴리글리콜라이드(PLG), 폴리무수몰, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알코올), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락타이드(PLA), 폴리(락타이드-co-글리콜라이드)(PLGA), 및 폴리오르토에스테르를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 제어 방출형 시스템은 치료 표적(예컨대, 폐)에 근접하게 위치하기 때문에, 전신적 용량의 일부만을 요구한다(예컨대, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984) 참조). 다른 구현예에서, 제어 방출형 이식물로서 유용한 폴리머 조성물이 Dunn 등(미국 제5,945,155호 참조)에 따라 사용된다. 이러한 특정 방법은 폴리머 시스템으로부터의 생물활성 물질의 원 위치 제어 방출의 치료 효과를 기반으로 한다. 이식은 일반적으로 치료적 처치가 필요한 환자의 신체 내 어디에서나 일어날 수 있다. 다른 구현예에서, 비 폴리머 서방형 전달 시스템이 사용되는데, 대상체의 신체 내 비 폴리머 이식물은 약물 전달 시스템으로 사용된다. 신체 내로 이식되면, 이식물의 유기 용매는 조성물로부터 둘러싼 조직액으로 소멸되거나 분산되거나 침출될 것이고, 비 폴리머 물질은 점차적으로 응집되거나 침전되어 고체, 미세 다공성 매트릭스를 형성할 것이다(예컨대, 미국 제5,888,533호를 참조). 제어 방출 시스템은 Langer에 의한 리뷰(1990, *Science* 249:1527-1533)에 논의되어 있다. 당업자에게 공지된 임의의 기술이 하나 이상의 치료제를 포함하는 서방형 제제의 생성을 위해 사용될 수 있다. 예컨대, 미국 특허 제4,526,938호; 국제 공개 WO 91/05548 및 WO 96/20698; Ning 등(1996, *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189); Song 등(1995, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397); Cleek 등(1997, *Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854); 및 Lam 등(1997, *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760)을 참조한다.

[0340]

치료적 또는 예방적 조성물이 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산을 포함하는 특정한 일 구현예에서, 핵산은, 암호화된 항체의 발현을 촉진하기 위해, 적절한 핵산 발현 벡터의 일부로서 제작되고, 예컨대, 레트로바이러스 벡터(미국 특허 제4,980,286호 참조)의 사용에 의해, 또는 직접적인 주사에 의해, 또는 미세입

자 포격(예컨대, 유전자 총; 바이오리스틱(Biolistic, Dupont)에 의해, 또는 지질 또는 세포 표면 수용체 또는 형질감염체로의 코팅에 의해, 또는 핵 안으로 들어가는 것으로 알려진 호메오박스 유사 웹티드(예컨대, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868 참조)와 결합하여 투여함으로써, 세포 내에 도달하도록 백터를 투여함으로써 생체 내로 투여될 수 있다. 대안적으로, 핵산은 세포 내로 도입될 수 있고, 상동 재조합에 의해 발현을 위한 숙주 세포 DNA 내로 삽입될 수 있다.

[0341] 치료적 또는 예방적 유효량의 항체를 이용한 대상체의 치료는 단회 치료, 또는 바람직하게는 일련의 치료들을 포함할 수 있다.

E. 조합 요법

[0343] 본원에 개시된 분자는, 또한, 암, 자가면역 질환, 감염성 질환 또는 중독의 예방 또는 치료를 위해, 이에 제한 되지는 않으나, 현행 표준 및 실험적 화학요법, 호르몬 요법, 생물학적 요법, 면역요법, 방사선 치료법 또는 수술을 포함하는 당업자에게 공지된 하나 이상의 다른 치료법과 조합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 분자는 암, 자가면역 질환, 감염성 질환 또는 중독의 치료 및/또는 예방을 위해 치료적 또는 예방적 유효량의 하나 이상의 제제, 치료용 항체, 또는 당업자에게 공지된 다른 제제와 조합하여 투여된다. 이러한 제제는, 예를 들어, 다음을 포함한다: 임의의 개시된 생물학적 반응 조절제, 세포독소, 항대사제, 알킬화제, 항생체 또는 항세포분열제 및 면역요법(예를 들어, ERBITUX™ (또한 IMC-C225으로도 알려짐)(ImClone Systems Inc.), EGFR에 대한 키메라화 단일클론 항체; 전이성 유방암을 가지는 환자의 치료를 위한 인간화 항 HER2 단일클론 항체인 HERCEPTIN®(Trastuzumab)(Genentech, CA); 응고 형성을 예방하기 위한 혈소판 상의 항 당단백질 IIb/IIIa 수용체인 REOPRO®(abciximab)(Centocor); 급성 신장 동종이식 거부를 예방하기 위한 면역억제성, 인간화 항 CD25 단일클론 항체인 ZENAPAX®(daclizumab)(Roche Pharmaceuticals, Switzerland)). 다른 예는 다음과 같다: 인간화 항 CD18 F(ab')₂ (Genentech); 인간화 항 CD18 F(ab')₂인 CDP860(Celltech, UK); CD4에 융합된 항 HIV gp120 항체인 PRO542(Progenics/Genzyme Transgenics); 항 CD14 항체인 C14(ICOS Pharm); 인간화 항 VEGF IgG1 항체(Genentech); 뮤라인 항 CA 125 항체인 OVAREX™(Altarex); 뮤라인 항 17-IA 세포 표면 항원 IgG2a 항체인 PANOREX™(Glaxo Wellcome/Centocor); 키메라 항 EGFR IgG 항체인 IMC-C225(ImClone System); 인간화 항 αVβ 3 인테그린 항체인 VITAXIN™(Applied Molecular Evolution/MedImmune); 인간화 항 CD52 IgG1 항체인 Campath 1H/LDP-03(Leukosite); 인간화 항 CD33 IgG 항체인 Smart M195(Protein Design Lab/Kanebo); 키메라 항 CD20 IgG1 항체인 RITUXANTM(IDEA Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); 인간화 항 CD22 IgG 항체인 LYMPHOCIDE™ (Immunomedics); 인간화 항 HLA 항체인 Smart ID10(Protein Design Lab); 방사성표지된 뮤라인 항 HLA DR 항체인 ONCOLYMTM(Lym-1)(Technicclone); 인간화 IgG1 항체인 항-CD11a (Genentech/Xoma); 인간화 항 ICAM3 항체인 ICM3™(ICOS Pharm); 영장류화 항 CD80 항체인 IDEC-114™(IDEA Pharm/Mitsubishi); 방사성표지된 뮤라인 항 CD20 항체인 ZEVALINTM(IDEA/Schering AG); 인간화 항 CD40L 항체인 IDEC-131™(IDEA/Eisai); 영장류화 항 CD4 항체인 IDEC-151™(IDEA); 영장류화 항 CD23항체인 IDEC-152™(IDEA/Seikagaku); 인간화 항 CD3 IgG인 SMART 항-CD3 (Protein Design Lab); 인간화 항 보체 인자 5(C5) 항체인 5G1.1™(Alexion Pharm); 영장화 항 CD4 IgG1 항체인 IDEC-151™(IDEA Pharm/SmithKline Beecham); 인간 항 CD4 IgG 항체인 MDX-CD4™ (Medarex/Eisai/Genmab); 인간화 항 TNF-α IgG4 항체인 CDP571™(Celltech); 인간화 항 α4β7 항체인 LDP-02™(LeukoSite/Genentech); 인간화 항 CD4 IgG 항체인 OrthoClone OKT4A™(Ortho Biotech); 인간화 항 CD40L IgG 항체인 ANTOVATM(Biogen); 인간화 항 VLA-4 IgG 항체인 ANTEGREN™(Elan); 인간 항 CD64 (FcγR) 항체인 MDX-33™(Medarex/Centeon); 인간화 항 IgE IgG1 항체인 rhuMab-E25™(Genentech/Novartis/Tanox Biosystems); 영장류화 항 CD23 항체인 IDEC-152™(IDEA Pharm); 뮤라인 항 CD-147 IgM 항체인 ABX-CBL™ (Abgenix); 래트 항 CD2 IgG 항체인 BTI-322™(Medimmune/Bio Transplant); 뮤라인 항 CD3 IgG2a 항체인 Orthoclone/OKT3™(ortho Biotech); 키메라 항 CD25 IgG1 항체인 SIMULECT™(Novartis Pharm); 인간화 항 β₂-인테그린 IgG 항체인 LDP-01™(LeukoSite); 뮤라인 항 CD18 F(ab')₂인 항-LFA-1™(Pasteur-Merieux/Immunotech); 인간 항 TGF-β₂ 항체인 CAT-152™(Cambridge Ab Tech); 및 키메라 항 인자 VII 항체인 Corsevin M™(Centocor), 등. 다른 구현예에서, 개시된 분자는 면역조절 효과를 향상시키기 위해 대안적인 면역 조절 경로(예를 들어, CTLA4, TIM3, TIM4, OX40, CD40, GITR, 4-1-BB, B7-H1, PD-1, LIGHT 또는 LAG3)를 향상 시키거나 방해하는 분자 또는 사이토카인(예컨대, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, GF-베타, IFNg, Flt3, Blys) 및 케모카인(예컨대, CCL21)과 같은 효과기 분자의 활성을 조절하는 분자와 조합하여 투여된다. 또 다른 구현예에서, 개시된 분자는 광범위한 면역 반응을 달성하기 위해 면역 반응의 상이한 단계 또는 양태를 활성화시키는 분자와 조합하여 투여된다. 예를 들어, 항 B7-H4 분자를 이용한 종양 매개 또는 TAM 매개 면역 억제

의 차단은 더욱 강한 면역 반응을 탈성하기 위해 T 세포 활성화 또는 초회감작(priming)을 향상시키는 분자와 조합될 수 있다.

[0344] 일정한 구현예에서, 하나 이상의 개시된 분자는 암의 치료에 유용한 하나 이상의 치료제와 동시에 포유동물, 바람직하게는 인간에게 투여될 수 있다. “동시”라는 용어는 예방제 또는 치료제를 정확하게 동시에 투여하는 것에 제한되기 보다는, 2개의 제제를 포유동물에게 연속적으로 일정한 시간 간격 이내에 투여하여, 2개의 제제가 함께 작용할 수 있어서, 이들이 다른 방식으로 투여되었던 경우보다 상승된 혜택을 제공하는 것을 의미한다. 예를 들어, 각각의 예방제 또는 치료제(예컨대, 화학요법, 방사선 요법, 호르몬 요법, 또는 생물학적 요법)은 동시에 또는 임의의 순서로 상이한 시점에 순차적으로 투여될 수 있지만; 동시에 투여되지 않은 경우, 이들은 원하는 치료 또는 예방 효과를 제공하도록 충분히 가까운 시간 또는 치료 혜택을 제공하는 충분히 가까운 계획으로 투여되어야 한다. 각각의 치료제는 임의의 적절한 형태로 임의의 적절한 경로에 의해 별도로 투여될 수 있다. 다양한 구현예에서, 예방제 또는 치료제는 1시간 미만 간격으로, 약 1시간 간격으로, 약 1시간 내지 약 2시간 간격으로, 약 2시간 내지 약 3시간 간격으로, 약 3시간 내지 약 4시간 간격으로, 약 4시간 내지 약 5시간 간격으로, 약 5시간 내지 약 6시간 간격으로, 약 6시간 내지 약 7시간 간격으로, 약 7시간 내지 약 8시간 간격으로, 약 8시간 내지 약 9시간 간격으로, 약 9시간 내지 약 10시간 간격으로, 약 10시간 내지 약 11시간 간격으로, 약 11시간 내지 약 12시간 간격으로, 24시간 이하 간격으로 또는 48시간 이하 간격으로 투여된다. 바람직한 구현예에서, 2종 이상의 구성요소가 동일한 환자 방문에서 투여된다.

[0345] 다른 구현예에서, 개시된 예방제 또는 치료제는 약 2내지 4일 간격, 약 4내지 6일 간격, 약 1주 간격, 약 1내지 2주 간격 또는 2주 보다 큰 간격으로 투여된다. 바람직한 구현예에서, 예방제 또는 치료제는 2종의 제제가 여전히 활성이 있거나 약동력학적 효과가 존재하는 기간 안에 투여된다. 당업자는 투여된 제제의 반감기를 결정함으로써 이러한 기간을 결정할 수 있을 것이다.

[0346] 일정 구현예에서, 개시된 예방제 또는 치료제는 주기적으로 대상체에 투여된다. 주기적 치료법은 일정 기간의 제1제제의 투여와 후속되는 일정 기간의 제2 및/또는 제3제제의 투여를 포함하고, 이러한 순차적인 투여는 반복된다. 주기적 치료법은 하나 이상의 치료요법에 대한 내성의 발달을 감소시키고/시키거나, 치료요법 중 하나의 부작용을 피하거나 감소시키고/시키거나, 치료의 효능을 개선할 수 있다.

[0347] 일정한 구현예에서, 개시된 예방제 또는 치료제는 약 3주 미만의 주기로, 약 2주마다 1번, 약 10일마다 1번, 또는 약 매주마다 1번 투여된다. 하나의 주기는, 매 주기마다 약 90분에 걸친 주입, 매 주기마다 약 1시간에 걸친 주입, 매 주기마다 약 45분에 걸친 주입에 의한 치료제 또는 예방제의 투여를 포함할 수 있다. 각 주기는 적어도 1주의 휴식, 적어도 2주의 휴식, 적어도 3주의 휴식을 포함할 수 있다. 투여되는 주기의 횟수는 약 1내지 약 12주기, 보다 통상적으로는 약 2내지 약 10주기, 보다 통상적으로는 약 2내지 약 8주기이다.

[0348] 또 다른 구현예에서, 치료제 및 예방제는 연속 주입 또는 연장된 휴식 기간을 가지지 않는 빈번한 투여에 의해 메트로놈 투여 요법으로 투여된다. 이러한 메트로놈 투여는 휴식 기간 없이 일정한 간격으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 통상적으로, 치료제, 특히 세포독성제는 낮은 용량으로 사용된다. 이러한 용량 요법은 연장된 기간 동안의 상대적으로 낮은 용량의 만성 일일 투여를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 낮은 용량의 사용은 독성 부작용을 최소화할 수 있고 휴식 기간을 없앨 수 있다. 일정한 구현예에서, 치료제 및 예방제는 약 24시간 내지 약 2일까지, 약 1주까지, 약 2주까지, 약 3주까지, 약 1개월까지, 약 2개월까지, 약 3개월까지, 약 4개월까지, 약 5개월까지, 약 6개월까지의 만성 저용량 또는 연속적인 주입에 의해 전달된다. 이러한 용량 요법의 일정 계획은 숙련된 의사에 의해 최적화될 수 있다.

[0349] 다른 구현예에서, 일련의 치료가 동시에 포유동물에게 투여되는데, 즉, 치료제의 개별 용량이 별도로 그렇지만 일정한 시간 간격 내에 투여되어 개시된 분자가 다른 제제 또는 제제들과 동시에 작용하도록 한다. 예를 들어, 하나의 구성요소는, 격주마다 1회 또는 3주마다 1회 투여될 수 있는 다른 구성요소와 조합하여 주 1회 투여될 수 있다. 다시 말해, 치료제에 대한 용량 계획은, 치료제가 동시에 또는 동일한 환자 방문 시에 투여되지 않는 경우에도 동시에 수행될 수 있다.

[0350] 다른 예방제 및/또는 치료제와 조합하여 사용될 때, 개시된 분자 및 예방제 및/또는 추가적인 치료제는 부가적으로 작용하거나 더욱 바람직하게는 상승적으로 작용할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 동일한 약학적 조성을 내에서 하나 이상의 추가적인 치료제와 동시에 투여된다. 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 별도의 약학적 조성을 내 하나 이상의 다른 치료제와 동시에 투여된다. 또 다른 구현예에서, 하나 이상의 개시된 분자는 다른 예방제 또는 치료제의 투여 이전에, 또는 이어서 투여된다. 조합 또는 동시 치료법의 2종 이상의 제제는 동일하거나 상이한 투여 경로, 예컨대, 경구 및 비경구로 투여

될 수 있다. 일정한 구현예에서, 개시된 분자가, 이에 제한되지는 않으나, 독성을 포함하는 잠재적으로 해로운 부작용을 생성할 수 있는 제2 예방제 또는 치료제와 동시에 투여될 때, 제2 예방제 또는 치료제는 유리하게는 해로운 부작용이 유발되는 임계값보다 낮은 용량으로 투여될 수 있다.

[0351] 본원에 제공된 투여의 빈도 및 투여량은 치료적 유효 및 예방적 유효라는 용어에 포함된다. 투여량 및 빈도는, 투여되는 구체적인 치료제 또는 예방제, 암의 중증도 및 유형, 투여의 경로, 및 환자의 연령, 체중, 반응 및 과거 병력에 따라 좌우되는 각 환자에 특이적인 인자들에 따라서 통상적으로 더 다양해질 수 있다. 적합한 계획은 이러한 인자들을 고려하고, 예를 들어, 문헌(*Physician's Desk Reference*, 56th ed., 2002)에서 권고한 투여량에 따라서 당업자에 의해 선택될 수 있다.

F. 약학적 조성물

[0353] 하나 이상의 개시된 분자를 포함하는 조성물이 제공된다. 조성물은 약학적 조성물의 제조에 유용한 대량의 약물 조성물(예컨대, 순수하지 않거나 멸균되지 않은 조성물) 및 단위 투여 형태의 제조에 사용할 수 있는 약학적 조성물(즉, 대상체 또는 환자에게 투여하기에 적합한 조성물)을 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 통상적으로 예방적 또는 치료적 유효량의 본원에 개시된 예방제 및/또는 치료제 또는 이러한 제제들의 조합 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 바람직하게, 조성물은 예방적 또는 치료적 유효량의 하나 이상의 개시된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다.

[0354] 특정한 일 구현예에서, “**약학적으로 허용가능한**”이라는 용어는 동물, 더욱 상세하게는 인간용으로 연방 규제 기관 또는 주 정부에 의해 승인되거나 미국 약전 또는 다른 일반적으로 알려진 약전 내에 목록화되어 있는 것을 의미한다. “**담체**”라는 용어는 이와 함께 치료제가 투여되는 희석제, 어쥬번트(예컨대, 완전 및 불완전 프로인드 어쥬번트(Freund's adjuvant)), 부형제 또는 비히클을 지칭한다. 이러한 약학적 담체는 물 및 오일(석유, 땅콩유, 대두유, 미네랄유, 호마유 등과 같은 동물, 식물 또는 합성 기원의 오일을 포함함)과 같은 멸균액일 수 있다. 약학적 조성물이 정맥 내 투여될 때 물이 바람직한 담체이다. 식염수 및 수용성 엑스트로스 및 글리세롤 용액이 또한 특히 주사용액을 위한 액체 담체로서 채용될 수 있다. 적합한 약학적 부형제는, 전분, 글루코스, 락토스, 자당, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카겔, 스테아르산 나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화 나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 원한다면, 조성물은 또한 적은 양의 습윤제 또는 에멀전화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 이러한 조성물은 용액, 혼탁액, 에멀젼, 정제, 알약, 캡슐, 분말, 서방성 제형 등의 형태를 취할 수 있다.

[0355] 일반적으로, 조성물의 성분들은 별도로 또는 단위 투여 형태, 예를 들어, 유효 성분의 양을 나타낸 앰플 또는 사세와 같은 기밀하게 밀봉된 용기 내 건조 동결 분말, 또는 무수 농축물로 함께 혼합되어 공급된다. 조성물이 주입에 의해 투여되는 경우, 멸균된 약학적 등급의 물 또는 염수를 함유하는 주입병으로 분배될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 주사용 멸균수 또는 염수의 앰플이 제공될 수 있어서, 성분들이 투여 전에 혼합될 수 있다.

[0356] 조성물은 중성 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 염은, 이에 제한되지는 않으나, 염화수소, 인산, 아세트, 옥살, 타르타르 산 등으로부터 유래된 음이온과 같은 음이온으로 형성된 염 및 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 철, 수산화물, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유래된 양이온과 같은 양이온으로 형성된 염을 포함한다.

G. 키트

[0358] 개시된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로 충진된 하나 이상의 용기를 포함하는 약학적 포장 및 키트가 또한 제공된다. 추가적으로, 질환의 치료에 유용한 하나 이상의 다른 예방제 또는 치료제가 또한 약학적 포장 또는 키트 내에 포함될 수 있다. 약학적 포장 또는 키트는 약학적 조성물의 하나 이상의 성분으로 충진된 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다. 선택적으로 이러한 용기(들)와 연관되는 것은 약학적 또는 생물학적 생성물의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 서식의 공고일 수 있으며, 이러한 공고는 인간 투여 용으로의 제조, 사용 또는 판매에 대한 기관의 승인을 반영한다.

[0359] 하나 이상의 개시된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 키트는 하나 이상의 개시된 방법으로 사용할 수 있다. 예를 들어, 암의 치료에 사용하기 위한 키트는 암의 치료에 유용한 하나 이상의 다른 예방제 또는 치료제를 하나 이상의 용기 내에 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 키트는 하나 이상의 추가적인 항체, 예를 들어 암과 관련된 하나 이상의 암 항원에 결합하는 세포독성 항체를 포함한다. 일정 구현예에서, 다른 예방제 또는 치료제는 화학요법이다. 다른 구현예에서, 예방제 또는 치료제는 생물학적 또는 호르몬 치료법이다.

H. 진단 방법

[0360] 개시된 항 B7-H4 결합 분자는 진단 목적, 예를 들어, B7-H4 발현과 관련된 질환, 장애 또는 감염을 모니터링하거나, 진단하거나, 검출하기 위해, 또는 적합한 환자 군집 또는 프로파일의 식별 또는 결정을 돋거나 결정하기 위해 사용될 수 있다. 질환, 장애 또는 감염, 특히 자가면역 질환의 진단 또는 검출은 다음을 포함한다: (a) B7-H4 또는 이의 유도체의 발현을 대상체의 세포, 혈청, 혈장, 혈액 또는 조직 시료에서 이러한 항원에 면역특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체(또는 이의 단편)를 사용하여 검정하는 단계; 및

[0362] (b) 항원의 수준을 대조군 수준, 예컨대, 정상 조직 시료 내 수준과 비교하는 단계로서, 여기서 항원의 대조군 수준과 비교하여 검정된 항원의 수준에서의 증가 또는 감소는 질환, 장애 또는 감염의 지표이다. 이러한 항체 및 단편은 바람직하게는 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 방사면역검정(RIA) 및 형광 활성화 세포 분류(FACS)와 같은 면역검정법에 채용된다.

[0363] 일부 구현예에서, 항체 또는 단편이 시험관 내 또는 원 위치 조직 시료 또는 생체 내 세포에서의 IHC 분석을 위해 사용된다. 예를 들어, B7-H4는 특히 암세포에서 발현되지만 정상 조직에서는 발현되지 않기 때문에(Sica, G.L. et al. (2003) "B7-H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity," *Immunity*18:849-861; Choi, I.H. et al. (2003) "Genomic Organization And Expression Analysis Of B7-H4, An Immune Inhibitory Molecule Of The B7 Family," *J. Immunol.* 171:4650-4654), 이러한 세포의 항체 또는 단편에 대한 결합에 의해 세포 상에서 B7-H4의 존재를 검출하는 것이 암 세포 진단이고 지표이다. 따라서, 대상체에서 암의 존재를 진단하기 위한 세포진 검정이 제공된다.

[0364] B7-H4는 HIV 감염 시 과발현되기 때문에(Carter, C. A. et al. (2008) "Cell Biology Of HIV-1 Infection Of Macrophages," *Ann. Rev. Microbiol.* 62:425-443; Noursadeghi, M. et al. (2006) "HIV-1 Infection Of Mononuclear Phagocytic Cells: The Case For Bacterial Innate Immune Deficiency In AIDS," *Lancet Infect. Dis.* 6:794-804), (개시된 항체 및 항원 결합 단편에 의해 검출된) 이러한 세포 상의 B7-H4의 발현은 인간에서 HIV를 진단하는데 사용될 수 있다.

[0365] 따라서, 항체 및 단편은 인간에서의 질환, 장애, 또는 감염의 검출 및 진단에 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 이러한 진단은 다음을 포함한다: a) 이러한 표지된 항체 또는 항원 결합 단편의 유효량을 대상체에 (예를 들어, 비경구, 피하, 또는 복강 내) 투여하는 단계; b) 투여 후 표지된 분자가 대상체 내에서 B7-H4가 발현된 자리에 우선적으로 농축될 수 있는 (그리고 결합되지 않은 표지된 분자가 배경 수준까지 제거될 수 있는) 시간 간격 동안 기다리는 단계; c) 배경 수준을 결정하는 단계; 및 d) 대상체 내에서 표지된 항체를 검출하는 단계로서, 배경 수준보다 높은 표지된 항체의 국소화된 검출은 대상체가 질환, 장애 또는 감염을 가지고 있음을 나타내는 것인 단계. 이러한 구현예에 따르면, 항체는 당업자에게 공지된 영상화 시스템을 사용하여 생체 내에서 검출할 수 있는 영상화 모이어티로 표지될 수 있다. 배경 수준은 검출된 표지된 분자의 양을 특정한 시스템에 대하여 사전에 결정된 표준값과 비교하는 단계를 포함하는 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0366] 대상체의 크기 및 사용되는 영상화 시스템이 진단 영상을 생성하기 위해 필요한 영상화 모이어티의 양을 결정할 것이라는 점이 당해 분야에서 이해될 것이다. 생체 내 종양 영상화는 S.W. Burchiel등의 문헌("Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments," (Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel and B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982))에 기술되어 있다.

[0367] 사용된 표지의 유형 및 투여의 방식을 포함하는 몇몇 변수들에 의해, 투여 후 표지된 분자가 대상체 내 자리에 우세하게 농축될 수 있고 결합하지 않은 표지된 분자가 배경 수준까지 제거될 수 있는 시간 간격은 6 내지 48 시간 또는 6 내지 24 시간 또는 6 내지 12시간이다. 다른 구현예에서, 투여 후 시간 간격은 5 내지 20일 또는 5 내지 10일이다.

[0368] 일 구현예에서, 질환, 장애 또는 감염의 모니터링은 질환, 장애 또는 감염을 진단하기 위한 방법을, 예를 들어, 초기 진단 후 1개월 후, 초기 진단 후 6개월 후, 초기 진단 후 1년 후 등에 반복함으로써 수행된다.

[0369] 표지된 분자의 존재는 당해 분야에 공지된 생체 내 스캐닝을 위한 방법을 사용하여 대상체 내에서 검출될 수 있다. 이러한 방법은 사용된 표지의 유형에 따라 좌우된다. 당업자는 특정한 표지를 검출하기에 적절한 방법을 결정할 수 있을 것이다. 진단 방법에 사용될 수 있는 방법 및 장치는, 이에 제한되지는 않으나, 컴퓨터 단층촬영(CT), 양전자 방출 단층 촬영(PET)와 같은 전신 스캔, 자기 공명 영상(MRI) 및 초음파를 포함한다.

[0370] 특정한 일 구현예에서, 분자는 방사성 동위원소로 표지되고, 방사선 반응성 수술 기기를 사용하여 환자 내에서 검출된다(Thurston *et al.*, U.S. 특허 제5,441,050호). 다른 구현예에서, 분자는 형광 화합물로 표지되고, 형광 반응성 스캔 기기를 사용하여 환자 내에서 검출된다. 다른 구현예에서, 분자는 양자 방출 금속으로 표지되고, 양자 방출 단층촬영을 사용하여 환자 내에서 검출된다. 또 다른 구현예에서, 분자는 상자성 표지로 표지되고, 자기 공명 영상(MRI)을 사용하여 환자 내에서 검출된다.

[0371] 당업자는 일상적인 실험 안에서 본원에 기술된 발명의 특정 구현예에 대한 많은 등가물들의 사용을 알아낼 수 있거나 인지할 것이다. 이러한 등가물들은 하기의 청구범위에 포함되는 것으로 의도된다.

실시예 1

항 인간 B7-H4 항체 6H3의 특성분석

재료 및 방법

[0375] 미접촉(naive) T(CD4⁺CD62L⁺) 세포를 우선 D011.10 마우스로부터 분리하였고, OVA 특이적 자극을 위해 OVA₃₂₃₋₃₃₉로 펠스된 APC(APC/OVA)에 더하여 재조합 TGF-β(10 ng/mL), IL-6(50 ng/mL), IL-23(4 ng/mL), 항 IL-4(1 μg/mL), 항 IFN-γ(1 μg/mL) 및 항 IL-2(1 μg/mL)의 존재 하에 Th17 세포로 극화시켰다. 다양한 용량의 뮤라인 B7-H4 Ig 또는 대조군 IgG를 5 μg/mL의 6H3 존재 하에 배양물에 직접적으로 첨가하고, 3일간 배양하였다. 증식 평가를 위해, 1 μci의 [³H]-티미딘을 수확 24시간 전에 첨가하였다. T 세포 증식을 티미딘 삽입에 의해 평가하였다(도 2a). 조건 배양 상충액을 IL-17 생성에 대하여 분석하였다(도 2b).

결과

[0377] 항체 6H3이 인간 B7-H4에 면역특이적으로 결합할 수 있다는 것을 정립하기 위해 다수의 독립적인 접근이 사용되었다. 이러한 접근 중 하나에서, 항체의 Th17(및 Th1) 분화의 B7-H4 Ig 매개 저해의 차단능을 평가하였다. 이에 따라, 8 내지 9 주령의 NOD 마우스로부터의 비장을 Th17 극화 조건 하에 대조군 Ig 또는 뮤라인 B7-H4.Ig 존재 하에서 항 CD3/CD28과 함께 3일간 배양하였다. 항체 6H3(10 mg/ml)의 B7-H4.Ig의 효과를 중화하는 능력을 배양물 내에서 평가하였다. 이러한 실험의 결과는 B7-H4 Ig의 투여가, 감소된 티미딘 삽입(도 2a) 및 감소된 IL-17의 발현(도 2b)으로 나타나는 바와 같이 증식을 억제한다는 것을 나타낸다. 이러한 저해는 항체 6H3의 투여(또는 공동 투여)에 의해 역전된다. IL-17의 생성은 유세포 분석을 사용하여 평가하였다.

[0378] 제2 접근에서, 난소 암 TAM 공동항온배양 후 세포에 의한 CTL 반응을 향상시키는 항체의 능력을 동종 T 세포 검정에서 평가하였다. 도 3a 내지 d는 항체 6H3이 이러한 향상된 CTL 반응을 매개할 수 있었다는 것을 보여준다(표 2).

표 2

표 2	이소형	항 B7-H4 항체 6H3
Th17	3%	5%
Th1	8%	10%
CD8+ /IFN-γ	7%	35%

[0380] 제3 접근에서, 항체 6H3을 난소 암 환자 종양 관련 대식세포(TAM)에 의한 B7-H4의 발현을 검출하는 능력에 대하여 시험하였다. 도 4a 내지 i에 나타낸 바와 같이, 항체 6H3은 이러한 세포상의 B7-H4를 검출하였다.

[0381] B7-H4에 결합하는 항체 6H3의 결합 동역학을 결정하기 위해, 전장 인간 B7-H4를 발현하였던 HEK293 세포를 다양한 농도의 항체(0, 0.01 ng, 0.03 ng, 0.1 ng, 0.3 ng, 1 ng, 10 ng, 30 ng, 100 ng, 300 ng, 1000 ng, 3000 ng, 10000 ng, 또는 30000 ng)의 존재 하에 RPMI 완전 배지(10% FBS)에서 배양(20분 간 4°C에서 200 μl 웰 내 1 x 10⁵으로 이용)하였다. 2차 항체(항 인간 Ig PE, 항 마우스 Ig APC, 항 햄스터 Ig PE 또는 항 래트 Ig PE)와의 항온배양 후 FACS 염색 플레이트를 사용하여 결합을 분석(FACS Canto II)하였다. 분석 결과는 표 3에서 보여진다.

표 3

채용된 항체 용액 및 부피				양(ng)	10% RPMI 첨가됨	총 부피	평균 형광 강 도(MFI)
0.01 ng/ μl	1 ng/ μl	100 ng/ μl	1000 ng/ μl				
3				0	200	200	191
				0.03	197	200	197
10				0.1	190	200	197
30				0.3	170	200	220
100				1	100	200	197
	3			3	197	200	273
	10			10	190	200	394
	30			30	170	200	505
	100			100	100	200	1072
		3		300	197	200	1980
		10		1000	190	200	2719
		30		3000	170	200	2843

[0383] 결과는 도 5에서 도표로 보여진다.

[0384] 도 6은 다른 항 B7-H4 항체(즉, 항체 H74, 2D1, 2H9, 2E11 및 8E11)에 대한 항체 6H3의 인간 H7-H4 결합의 동 역학을 나타낸 것이다. B7-H4 Ig는 미세역가 플레이트 상에 코팅되고, 세척되고, 차단되고, 다시 세척되었다. 다양한 농도의 항 B7-H4 항체가 결합할 수 있었다. 정제된 단백질이 클론 H74, 6H3, 및 8E11을 위하여 사용되었다. 하이브리도마 2D1, 2H9, 및 2E11로부터의 조건 배지가 사용되었다. 항온배양 후, 플레이트를 세척하였다. 결합된 항 B7-H4를 HRP-접합 엔소 항 마우스(Jackson ImmunoResearch)를 사용하여 검출하였다.

[0385] 실시예 2

[0386] 항 B7-H4 항체 6H3은 B7-H4 IgC 영역을 인식한다

[0387] 재료 및 방법

[0388] PBS에 희석된 B7-H4 세포의 도메인의 상이한 세그먼트로 이루어진 100 μl 12μg/ml 인간 IgG1 Fc 융합 단백질을 편평 바닥 96웰 플레이트(Costar 9017)에 4°C에서 밤새 고정하였다. B7-H4 융합 단백질은 **변이체 1: 서열 번호 1**의 IgV 잔기 29-149; **변이체 2: 서열 번호 1**의 IgV 잔기 29-154; **변이체 3: 서열 번호: 1**의 IgV 잔기 29-158; **변이체 4: ECD-hIgG4**; **변이체 5: 서열 번호 1**의 IgC 잔기 154-259; **변이체 6: ECD-hIgG1-서열 번호 7**을 포함한다. 플레이트를 PBS+0.1% PS-20으로 2회 세척하였고, 상온에서 1시간 동안 200 μl/웰 PBS 10% FBS로 차단하였다. PBS 10% FBS에 희석된 적정 마우스 항 인간 B7-H4 항체 2H9, 2D1, 2E11, 6H3, 8E11 또는 H74를 플레이트에 첨가하고, 상온에서 1시간동안 항온배양하였다. 플레이트를 3회 세척하고, 100 μl 1 μg/ml 항 마우스 Ig HRP(Sigma)를 각 웰에 첨가하고, 상온에서 1시간 동안 항온배양하였다. 플레이트를 6회 세척하고, 100 μl TMB 기질(SurModics)을 각 웰에 5 내지 15분 간 첨가하였다. 100 μl 정지 용액(0.1M 황산)을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 450 nm 흡광도에서 PerkinElmer EnVision 2104 Multilabel Reader로 판독하였다.

[0389] 결과

[0390] B7-H4의 세포의 도메인은 IgV-유사 도메인(**서열 번호 1**의 잔기 Ile 48 ~ Phe 150) IgC-유사 도메인(**서열 번호 1**의 잔기 Val 157 ~ Gly 236)을 포함한다(Sica, G.L. et al. (2003) “B7-H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity,” *Immunity*18:849-861). IgV-유사 도메인은 CD28에 대한 완전한 결합 자리를 포함하고; IgC-유사 도메인은 CTLA4에 대한 친화도의 증가에 관여하는 것으로 여겨진다(Inobe, M. et al. (1994) “Identification Of An Alternatively Spliced Form Of The Murine Homologue Of B7,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200(1):443-449 참조).

[0391] 항체 6H3에 의해 인식되는 B7-H4 도메인을 결정하기 위해, 항체를 정의된 결실을 가지는 B7-H4 변이체의 존재 하에 항온배양하였고, 결합의 정도를 측정하였다. 이러한 연구의 결과는 항체 6H3이 **서열 번호 1**의 잔기 29~149를 포함하는 B7-H4 변이체(**변이체 1**) 또는 **서열 번호 1**의 잔기 29~154를 포함하는 B7-H4 변이체(**변이체 2**), 또는 **서열 번호 1**의 잔기 29~158을 포함하는 B7-H4 변이체(**변이체 3**)에는 결합하지 않았지만, B7-H4 세포의 도메

인(ECD)-hIgG4를 포함하는 B7-H4 변이체(변이체 4), 및 서열 번호 1의 잔기 154~259를 포함하는 B7-H4 변이체(변이체 5), 및 B7-H4 ECD-hIgG1-KRRSKQQS을 포함하는 B7-H4 변이체(변이체 6; KRRSKQQS는 서열 번호 7)에 결합하였다는 것을 나타내었다(도 7). 따라서, 항 B7-H4 항체 6H3은 B7-H4 IgC 영역을 인식한다.

[0392] 분석은 또한 항 인간 B7-H4 항체 2H9, 2D1 및 H74를 사용하여 수행하였다. 항 B7-H4 mAb 2H9 및 2D1의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 다음과 같고(CDR은 밑줄로 나타냄); 항 H74는 상업적으로 입수 가능한 항 인간 B7-H4 항체(eBioscience, San Diego, CA)이다.

항 인간 B7-H4 클론 2H9

경쇄 가변 영역:

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESID NYGISFMHWY

QQKPGQPPKL

LIYRASNLES GIPARFSGSG SRTDFTLTIN PVETDDVATY

FCQQSDEGRT

FGGGTKLEIK (서열 번호 8)

중쇄 가변 영역:

EVQLVESGGN LVKPGGSLKL SCAASGFTFS NSAMSWVRQT

PEKRLEWVAT

ISDGGGRYTYYY PDNVKGRFTI SRDNAKNNLY LQMSHLKSED

TALYYCARDR

PHWYFDVWGT GATTVTVSS (서열 번호 9)

항 인간 B7-H4 클론 2D1

경쇄 가변 영역:

DVVMQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSHSLV HSNGNTYLHW

YLQKPGQSPN

LLIYIVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV

YFCSQSTHV

PTFGAGTKLE LK (서열 번호 10)

중쇄 가변 영역:

EVQLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFN SHGMSWVRQT

PEKRLDWVAT

ISDGGTYTYYY PVNVKGRFTI SRDNAKNNLY LQMSHLKSED

TAMYYCARDG

GGGAYWGQGT LVTVSA (서열 번호 11)

이러한 분석의 결과는 도 8a 내지 c에 나타나 있고, 표 4에 요약되어 있다.

표 4

표 4					
항체	인식된 B7-H4 도메인				
	ECD	IgV 단독			IgC 단독
2H9	+	+	+	+	

2D1	+				+
6H3	+				+
H74	+				+

[0421] 결과는 웨스턴 분석을 사용하여 확인하였다.

[0422] 실시예 3

항 인간 B7-H4 항체 6H3은 다른 항 인간 B7-H4 항체와 비교하여 예상치 못한 특성을 가진다

[0424] 재료 및 방법

[0425] 미접촉 CD4⁺ T 세포(CD4⁺CD62L⁺)를 D011.10 마우스로부터 분리하였고, OVA₃₂₃₋₃₃₉ 웨티드로 자극된 Balb/C 마우스로부터 수확한 방사선조사된 항원 제시 세포(APC)와 함께 증가되는 농도의 인간 B7-H4 Ig에 더하여 10 µg/mL의 항 B7-H4 Ab의 존재 하에 3일 간 배양하였다. 티미딘 삽입 분석 전 마지막 24시간에 [³H]-티미딘을 배양물에 첨가하였다.

[0426] 결과

[0427] 항 B7-H4 항체는 B7-H4 Ig 매개 T 세포 활성화의 억제를 차단한다. 항체 6H3의 특수성을 입증하기 위해, 미접촉 CD4+ T 세포(D011.10 마우스로부터 분리됨)를 방사선조사된 OVA-특이적 항원 제시 세포(APC)와 함께 증가하는 농도의 인간 B7-H4 Ig에 더하여 10 mg/mL의 항 B7-H4 mAb 2E11 및 2H9의 존재 하에 배양하였다. 항 B7-H4 항체 2H9의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열 번호 8 및 9이다. 항 B7-H4 항체 2E11의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 다음과 같다(CDR에는 밑줄을 침).

[0428] 항 인간 B7-H4 클론 2E11

[0429] 경쇄 가변 영역:

[0430] DIVMSQSPS LAVSVGEKVT VSCKSSQSL YSTNQRTYLA

[0431] WFQQKPGQSP

[0432] KLLIYWASTR ESGVPPDRFTG SGSGTDFLT ISSVKAEDLA

[0433] VYYCQQYYNY

[0434] PLTFGTGTKL ELK (서열 번호 12)

[0435] 중쇄 가변 영역:

[0436] EVKLVESEGG LVQPGSSMKL SCTASGFKFT DYYMAWVRQV

[0437] PEKGLEWVAN

[0438] INYDGSSSTYY LDSLKSRFII SRDNNAKNILY LQMNSLKSED

[0439] TATYYCARKG

[0440] YFDYWGQGTT LTVSS (서열 번호 13)

[0441] 도 9에 나타낸 바와 같이, 항체 6H3은 B7-H4 Ig 매개 T 세포 활성화의 억제를 가장 크게 차단하는 것으로 밝혀졌다.

[0442] 항 인간 B7-H4 항체들의 단핵구 매개 억제를 역전하는 능력을 비교하였고, T 세포에 의해 생성된 사이토카인을 측정하였다. 건강한 공여자로부터의 IFN-γ로 초회감작된 단핵구를 항 B7-H4 항체, 항-B7-H1 항체, 항-PD-1 항체, 또는 음성 대조군 항체와 항온배양하였다. 자가유래 T 세포를 항 CD3 항체로 활성화시키고, 전처리된 단핵구와 항체의 존재 하에 1개의 대식세포 당 10개의 T 세포의 비로 공동항온배양하였다. T 세포를 수확하고, CD4 및 CD8에 대하여 염색하고, IL-2, TNF-α 및 IL-8에 대하여 세포 내 염색을 하였다. 도 10a 내지 f는 이러한 실험의 결과를 보여준다. 항체 6H3은 IL-2, TNF-α 및 IL-8의 가장 높은 발현을 유발하는 것으로 밝혀졌다. 음성 대조군 항체의 존재 하에 초회감작된 단핵구의 항온배양은 유의한 단핵구 억제를 초래하였다. 단핵구의 부

재 시, T 세포 활성의 억제는 없었다.

[0443] 실시예 4

항 인간 B7-H4 항체 6H3은 B7-H4의 세포 표면 내재화를 유도한다

[0445] 재료 및 방법

항 인간 B7-H4 항체 6H3의 세포의 표면 상에 발현된 B7-H4(즉, 막결합 B7-H4) 내재화 유도능을 입증하기 위해, 항체 6H3 및 대조군 항체를 CypHer5E NHS 에스테르(내재화되면 산성 리소좀 구획에서 최대 형광을 방출하는 pH 민감성 시아닌 염료)로 표지하였다. CypHer5E로 표지된 6H3 항체를 인간 B7-H4를 발현하는 안정적인 HEK 293T 세포주(293T.hB7-H4) 또는 B7-H4 양성 유방암 종양 세포주인 SK-BR-3(ATCC)의 세포와 함께 다양한 시간으로 항온배양하였다. 항체 내재화는 BD FACS Canto II 기기를 사용한 유세포 분석에 의해 결정되는 CypHer5E 형광에서의 증가에 의해 결정하였다.

[0447] 결과

이러한 조사의 결과는 도 11a 및 b 및 도 12a 및 b에 나타나 있고, 항체 6H3이 B7-H4로 형질감염된 세포주 및 B7-H4 양성 유방암 세포주 SK-BR-3의 표면에 발현된 B7-H4의 강력한 내재화를 유도하였다는 것을 보여준다. 이러한 내재화는 두 세포주의 표면 B7-H4 수준을 감소시켰다. 이러한 결과에서 항체 6H3이 각각의 B7-H4 표면 수준을 감소시키고, 종양 또는 TAM B7-H4 매개 면역 억제를 저해하기 위해 B7-H4 양성 종양, 종양 세포 또는 종양 관련 대식세포(TAM)를 표적화하기 위해 사용될 수 있다는 것이 확인된다. 추가적으로, 이러한 결과로 항체 6H3의 접합체(예컨대, 약물, 독소 접합체 등)이 B7-H4 양성 종양, 종양 세포 및 종양 관련 대식세포(TAM)를 선택적으로 표적화하고 사멸시키기 위해 채용될 수 있다는 것이 확인된다. 도 12a 및 b는 CypHer로 표지된 6H3과의 항온배양 중 시간에 따른 B7-H4 양성 인간 유방암 세포주 SK-BR3 세포 상의 대조군에 대한 B7-H4 표면 염색 및 CypHer 형광을 보여주는 히스토그램이다.

[0449] 실시예 5

항 인간 B7-H4 항체 6H3은 IHC에 의해 B7-H4 양성 세포를 염색할 수 있다

[0451] 재료 및 방법

인간 조직 검체 내 B7-H4 발현을 클론 6H3을 사용한 IHC에 의해 평가하였고, 알칼라인 폐록시다제 및 DAB를 사용하여 검출하였다; 절편은 병리학자에 의해 판독되었다. 동일한 검체로부터의 절편을 또한 의학적 진단에서 가장 널리 사용되는 염색인 혜마톡실린 및 에오신 염색(H+E)을 사용하여 염색하였다.

[0453] 결과

항 인간 B7-H4 항체 6H3의 B7-H4 양성 세포를 검출하는 능력을 입증하기 위해, 항체를 표지하고 조직의 존재 하에 항온배양하였다. 도 13a 내지 c는 항체가 조직이 (H+E)으로 염색되었을 때 정상인 것으로 보였던 검체의 B7-H4 양성 종양 세포를 검출하는 능력을 보여준다. 도 13a 및 b는 H+E 염색 상에서는 정상으로 보였던, 6H3으로 염색한 침샘 조직의 이미지이다. B7-H4는 도관 상피 세포에서 가장 강하게 발현되는 것으로 보인다(양 이미지의 오른쪽 상단에 가장 잘 나타남). 선포세포에 의해서는 발현이 거의 되지 않는다(아래쪽 하단). 도 13c는 2개의 상이하지만 관련된 난소의 장액성 낭종 병변을 보여준다. 왼쪽 패널은 양성(장액성 낭포)이고, 오른쪽 패널은 악성 장액성 낭종암이다. 양 패널에서, 표피는 B7-H4를 발현하지만, 양성 종양보다 악성 쪽에서 더욱 집중적이며, 발현은 루멘(lumen) 표면 상에 강하게 나타나는 것으로 보이고; 이러한 증가된 강도는 B7-H4의 과발현을 반영하는 것으로 여겨진다.

[0455] 실시예 6

항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화

뮤라인 항 B7-H4 항체 6H3은 상동성 모델링된 항체 3D 구조를 생성하는 단계 및 구조 모델링에 기반하여 모 항체의 프로파일을 생성하는 단계를 포함하는 과정을 사용하여 인간화되었다. 한 세트의 인간화 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열이 생성되었는데, 각각에서는 모 항체 서열의 특이적인 영역과 인간 골격 서열의 주요부분을 조합하였다. 총 6개의 인간화 중쇄 서열 및 6개의 인간화 경쇄 서열을 생성하였다.

뮤라인 항체 6H3의 가변 도메인을 인간 생식계열에 비교한 서열 정렬 및 재배열된 골격 서열 데이터베이스가 Geneious를 사용하여 생성되었다. 바람직한 수여자 골격은, 골격 전체에 걸친 총 서열 동일성, 매칭 인터페이스

위치, 유사한 클래스로 분류된 CDR의 표준 위치, 및 제거되어야 할 N-글리코실화가 존재하는 자리에 기반하여 식별되었다.

[0459] 뮤라인 항체 6H3 가변 경쇄 및 중쇄의 구조적 모델을 Discovery Studio 내에 생성하였다. 주형 구조는 CDR을 가지는 그리고 CDR을 가지지 않는 6H3 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 서열을 가지는 PDB 데이터베이스를 검색함으로써 식별하였다. 주형에 대한 6H3 서열의 정렬 및 상동성에 기반한 구조의 모델링은 MODELLER을 사용하여 수행하였다(Sali, A. et al. (1993) "Comparative Protein Modelling By Satisfaction Of Spatial Restraints," J. Molec. Biol. 234(3):779-815).

[0460] 상이한 영역의 모 항체 서열과 인간 골격의 서열을 조합한 다수의 혼성화 서열을 3D 모델을 사용하여 조직적으로 분석하여 정의된 구조의 CDR에 가장 영향을 적게 미칠 것으로 예측되는 혼성화 서열을 식별하였다(Chothia, C. et al. (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901-917; Martin, A.C. et al. (1996) "Structural Families In Loops Of Homologous Proteins: Automatic Classification, Modelling And Application To Antibodies," J. Molec. Biol. 263(5):800-815). 베르니에(Vernier) 구역 내, VH/VL 사슬 간 인터페이스 내, 또는 CDR 표준 클래스 결정 위치 내, 5Å의 CDR 루프 이내의 인간 골격으로부터의 아미노산을 포함하는 혼성화 서열에 특히 주목하였는데, 이는 이러한 혼성화 서열이 얻어지는 인간화 항체의 기능에 대한 결정적인 효과를 가질 수 있는 것으로 판단되며 때문이다.

[0461] 모 항체의 프로파일을 CDR 분석 및 구조 모델링에 기반하여 생성하였다. 인간 수여자 골격을 서열 및 상동성 비교에 기반하여 식별하였다. 인간화 항체를 인간 골격 서열을 가지는 모 항체 서열의 일부와 융합되는 다수의 혼성화 서열을 생성함으로써 설계하였다. 3D 모델을 사용하여, 이러한 인간화 서열을 육안 및 컴퓨터 모델링으로 방법적으로 분석하여, 항원 결합을 보유할 가능성이 가장 높은 서열을 분리하였다. 원래의 항체 특이성을 보유하면서 최종 인간화 항체 내에 인간 서열의 양을 최대화하는 것이 목표였다.

[0462] 뮤라인 6H3 항체 가변 도메인을 인간 생식계열 데이터베이스와 비교한 서열 정렬을 생성하였다. 총 서열 동일성, 매칭 인터페이스 위치, 및 유사한 클래스로 분류된 CDR 표준 위치에 기반하여, 생식계열 패밀리 **IGKV2-30*02**를 경쇄에 대한 가능한 수여자 골격으로 식별하였다. J-세그먼트 유전자를 FR4 및 J-세그먼트 전체에 걸쳐 모 서열에 비교하였고, **IGKJ4*01**를 경쇄에 대하여 선택하였다. 모 가변 경쇄를 비중복 데이터베이스와 정렬한 후, 재배열된 인간 카파 경쇄 **CAA85590**를 제2 가능 수여자 골격으로 식별하였다. 이러한 수여자 골격에 대한 모 (6H3) 가변 경쇄의 정렬은 표 5에 나타나 있다(동일하지 않은 잔기는 밑줄로 나타냄).

표 5

표 5			
가변 경쇄	서열 번호	서열	
		10	20
뮤라인 6H3	3	DVVMQTPLS	LPVSLGDQAS
IGKV2-30*02 IGKJ4*01	14	DVVMTQSPLS	LPV T L GQ PAS
CAA85590	15	DIVMTQTPLS	LPV T L GQ PAS
		30	40
		50	60
뮤라인 6H3	3	YLQKPGQSPK	VLIYKVSNRF
IGKV2-30*02 IGKJ4*01	14	FQQRPGQSPR	R LIYKVSNRD
CAA85590	15	FQQRPGQSPR	R LIYKVSNRD
		70	80
		90	100
뮤라인 6H3	3	SRVEAEDLGV	YFCFSQSTHVP
IGKV2-30*02 IGKJ4*01	14	SRVEAED V GV	YYCM QGTHWP
CAA85590	15	SRVEAED V GV	YYCM QSIHWP
		110	112
		LK	
		IK	

[0464] 뮤라인 항체 6H3의 중쇄는 생식계열 **IGHV1-46*03**과 가장 유사한 것으로 밝혀졌다. J-세그먼트 유전자를 FR4 및 J-세그먼트 전체에 걸쳐 뮤라인 6H3 중쇄 서열에 비교하였고, **IGHJ4*01**를 중쇄에 대하여 선택하였다. 모 VL을 비중복 데이터베이스와 정렬한 후, 재배열된 인간 카파 경쇄 **ABF83259**를 제2 가능 수여자 골격으로 식별하였다.

뮤라인 가변 중쇄의 이러한 수여자 골격에 대한 정렬은 표6에 나타나 있다.

표 6

표 6					
가변 중쇄	서열 번호	서열			
		10	20	30	40
뮤라인 6H3	5	EVQLQQSGPV	LVKPGTSVKM	SCKASGYTFT	DYYMNWVKQS
IGHV1-46*03 IGHJ4*01	16	<u>QVQLVQSGAE</u>	<u>VKKPGASVKV</u>	SCKASGYTFT	<u>SYYMHWVRQA</u>
ABF83259	17	<u>QVQLVQSGAE</u>	<u>MKKPGASVKV</u>	SCKASGYTFT	<u>DYVIHWVRQA</u>
		50	60	70	80
뮤라인 6H3	5	HGKSLEWIGV	INPYNGDTTY	NQKFKGKATL	TVDKSSSTAY
IGHV1-46*03 IGHJ4*01	16	<u>PGQGLEWMGI</u>	<u>INPSGGSTSY</u>	<u>AQKFQGRVTIM</u>	<u>TRDTSTSTVY</u>
ABF83259	17	<u>PGQSLEWMGW</u>	<u>INPGDGDTKY</u>	<u>SQKFQGRVTY</u>	<u>ARDTSATTAY</u>
		90	100	110	115
뮤라인 6H3	5	MEVNLSLTfed	SAVYYCARYP	ES	TYWGQGTL
IGHV1-46*03 IGHJ4*01	16	<u>MELSSLRSED</u>	<u>TAVYYCARYF</u>	D	<u>YWGQGTL</u>
ABF83259	17	<u>MELSSLRSED</u>	<u>TAVYYCARAS</u>	<u>TGHVYWGQGTL</u>	<u>VTVSS</u>

[0466] 경쇄에서는, 3종의 인간화 사슬이 2종의 수여자 골격 IGKV2-30*02 IGKJ4*01 및 CAA85590 각각에 대하여 생성됨으로써, 6개의 인간화 6H3 경쇄를 형성하였다. 각각의 수여자 골격에 대한 제1 인간화 사슬(VL1A, VL2A)이 최대 인간 골격을 포함한다(**인간화 경쇄 1**). 각 수여자 골격(VL1B, VL2B)에 대한 제2 인간화 사슬은 인간 골격 서열에 융합된 약간의 양의 모 서열을 포함하고, 이는 원래의 CDR 구조를 유지하는 것을 도울 수 있을 것이다(**인간화 경쇄 2**). 각각의 수여자 골격(VL1C, VL2C)에 대한 제3 인간화 사슬은 인간 골격에 융합된 모 서열을 더욱 많이 포함하는데, 이는 원래의 항체 특이성 및 CDR 구조를 유지하는 것을 도울 것이다(**인간화 경쇄 3**). 이러한 사슬들의 아미노산 서열은 아래에 나타낸 바와 같다.

[0467] IGKV2-30*02 IGKJ4*01 수여자 골격으로부터 유래된 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 **경쇄 가변 영역**의 아미노산 서열(CDR은 밀줄로 나타냄).

[0468] 1. VL1A IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 1):

[0469] DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSSQLV HINGNTYLNW

[0470] FQQRPGQSPR

[0471] RLIYKVSNRD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV

[0472] YYCSQSTHVP

[0473] LTFGGGTKE IK (서열 번호 18)

[0474] 2. VL1B IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 2):

[0475] DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSSQLV HINGNTYLNW

[0476] YQQRPGQSPR

[0477] VLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV

[0478] YFCSQSTHVP

[0479] LTFGGGTKE IK (서열 번호 19)

[0480] 3. VL1C IGKV2-30*02 IGKJ4*01 (인간화 3):

[0481] DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSSQLV HINGNTYLNW

- [0482] YLQRPGQSPK
- [0483] VL1YKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV
- [0484] YFCSQSTHVP
- [0485] LTFGGGTKVE IK (서열 번호 20)
- [0486] CAA85590 수여자 골격으로부터 유래된 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 **중쇄 가변 영역**의 아미노산 서열(CDR은 밑줄로 나타냄):
1. VL2A CAA85590 (인간화 1):
- [0488] DIVMTQTPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HINGNTYLNW
- [0489] FQQRPGQSPR
- [0490] RL1YKVSNRD SGVPDRFSGS GSGADFTLKI SRVEAEDVGV
- [0491] YYCSQSTHVP
- [0492] LTFGQGTTKVE IK (서열 번호 21)
- [0493] 2. VL2B CAA85590 (인간화 2):
- [0494] DIVMTQTPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HINGNTYLHW
- [0495] YQQRPGQSPR
- [0496] VL1YKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV
- [0497] YFCSQSTHVP
- [0498] LTFGQGTTKVE IK (서열 번호 22)
- [0499] 3. VL2C CAA85590 (인간화 3):
- [0500] DIVMTQTPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HINGNTYLHW
- [0501] YLQRPGQSPK
- [0502] VL1YKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV
- [0503] YFCSQSTHVP
- [0504] LTFGAGTTKVE IK (서열 번호 23)
- [0505] 중쇄에 대하여, 3개의 인간화 사슬이 위에서 식별된 IGHV1-46*03IGHJ4*01 및 ABF83259 수여자 골격 각각에 대하여 생성되었다. 경쇄와 유사한 방식으로, 각각의 수여자 골격(VH1A, VH2A)에 대한 제1 인간화 사슬은 최대 인간 서열을 포함한다(인간화 1). 각각의 수여자 골격(VH1B, VH2B)에 대한 제2 인간화 사슬은 원래의 CDR 구조를 유지하는 것을 도울 것이다(인간화 2). 각각의 수여자 골격(VH1C, VH2C)에 대한 제3 사슬은 원래의 항체 특이성 및 CDR 구조를 유지하는 것을 도울 것이다(인간화 3). 이러한 사슬들의 아미노산 서열은 아래에 나타낸 바와 같다.
- [0506] IGHV1-46*03 IGHJ4*01 수여자 골격으로부터 유래된 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 **중쇄 가변 영역**의 아미노산 서열(CDR은 밑줄로 나타냄):
1. VH1A IGHV1-46*03 IGHJ4*01 (인간화 1):
- [0508] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGTYFT DYYMHWVRQA
- [0509] PGQGLEWMGI
- [0510] INPYNGDTSY AQKFQGRVTM TRDTSTSTVY MELSSLRSED
- [0511] TAVYYCARYP
- [0512] ESTYWGQGTLV VTVSS (서열 번호 24)

- [0513] 2. VH1B IGHV1-46*03IGHJ4*01 (인간화 2):
 EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYYMNWRQA
 PGQGLEWMGI
- [0515] INPYNGDTSY NQKFQGRVTL TVDKSTSTVY MELSSLRSED
- [0517] TAVYYCARYP
- [0518] ESTYWGQGTL VTVSS (서열 번호 25)
- [0519] 3. VH1C IGHV1-46*03IGHJ4*01 (인간화 3):
 EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYYMNWRQA
 PGQGLEWIGI
- [0521] INPYNGDTSY NQKFQGRVTL TVDKSTSTAY MELSSLRSED
- [0523] TAVYYCARYP
- [0524] ESTYWGQGTL VTVSS (서열 번호 26)
- [0525] ABF83259 수여자 골격으로부터 유래된 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(CDR은 밑줄로 나타냄):
 1. VH2A ABF83259 (인간화 1):
 QVQLVQSGAE MKKPGASVKV SCKASGYTFT DYYIHWVRQA
 PGQSLEWMGW
- [0528] INPYNGDTKY SQKFQGRVTV ARDTSATTAY MELSSLRSED
- [0530] TAVYYCARYP
- [0531] ESTYWGQGTL VTVSS (서열 번호 27)
- [0532] 2. VH2B ABF83259 (인간화 2):
 EVQLVQSGAE MKKPGASVKV SCKASGYTFT DYYMNWRQA
 PGQSLEWMGV
- [0535] INPYNGDTTY NQKFQGRVTV AVDKSATTAY MELSSLRSED
- [0536] TAVYYCARYP
- [0537] ESTYWGQGTL VTVSS (서열 번호 28)
- [0538] 3. VH2C ABF83259 (인간화 3):
 EVQLVQSGAE MKKPGASVKV SCKASGYTFT DYYMNWRQA
 PGQSLEWIGV
- [0541] INPYNGDTTY NQKFQGRVTV TVDKSATTAY MELSSLRSED
- [0542] TAVYYCARYP
- [0543] ESTYWGQGTL VTVSS (서열 번호 29)
- [0544] 본원에 개시된 항체 및 이들의 항원 결합 단편은 항 인간 B7-H4 항체 6H3의 개시된 인간화 변이체의 36개의 조합 중 임의의 것을 포함한다. 구체적으로, 이러한 항체는 표 1에 나타낸 조합을 포함한다.
- [0545] 제작된 36개의 인간화 변이체 중 20개가 인간 B7-H4에 대하여 결합 특이성을 보유한다. B7-H4에 결합하지만 기능성 검정에서는 더 이상 사용되지 않은 6개의 추가적인 중쇄 및 경쇄 조합은 다음과 같다: H1A L1C (서열 번호 24, 서열 번호 20), H1A L2C (서열 번호 24, 서열 번호 23), H1B L1B (서열 번호 25, 서열 번호 19), H1B L1C

(서열 번호 25, 서열 번호 20), H1B L2B (서열 번호 25, 서열 번호 22) 및 H1B L2C (서열 번호 25, 서열 번호 23)

[0546] **실시예 7**

[0547] 키메라 및 인간화 6H3 항체는 세포에 의해 내재화된다

[0548] **재료 및 방법**

[0549] 항 B7-H4 항체 6H3의 키메라 및 인간화 변이체

[0550] 하기 실시예에서 키메라 6H3(또한 인간 키메라 6H3, c6H3 및 hc6H3으로도 지칭됨)은 마우스 경쇄 및 중쇄 가변 영역(서열 번호 3 및 5) 및 인간 IgG1 중쇄 및 인간 κ 경쇄로부터의 불변 영역을 포함하는 키메라 6H3 항체를 지칭한다.

[0551] 표 7의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역 조합을 가지는 6H3의 인간화 변이체를 제조하였고, 하기 실시예에서 변이체 1~14(또한 V1~V14로도 지칭됨)로 지칭하였다.

표 7

변이체 번호	중쇄	경쇄
1	H1A	서열 번호 24 L1B 서열 번호 19
2	H1C	서열 번호 26 L1B 서열 번호 19
3	H2B	서열 번호 28 L1B 서열 번호 19
4	H2C	서열 번호 29 L1B 서열 번호 19
5	H1C	서열 번호 26 L1C 서열 번호 20
6	H2B	서열 번호 28 L1C 서열 번호 20
7	H2C	서열 번호 29 L1C 서열 번호 20
8	H1A	서열 번호 24 L2B 서열 번호 22
9	H1C	서열 번호 26 L2B 서열 번호 22
10	H2B	서열 번호 28 L2B 서열 번호 22
11	H2C	서열 번호 29 L2B 서열 번호 22
12	H1C	서열 번호 26 L2C 서열 번호 23
13	H2B	서열 번호 28 L2C 서열 번호 23
14	H2C	서열 번호 29 L2C 서열 번호 23

[0552]

[0553] 항 B7-H4 항체 6H3의 인간화 변이체

[0554] 내재화 검정

[0555] EG7 세포

[0556] pH 민감성 형광 Cypher-5로 표지된 키메라 6H3 및 인간화 6H3 변이체를 EG7(B7-H4 음성 세포), EG7.IG7(B7-H4 저발현 세포), 및 EG7.IVB3(B7-H4 고발현 세포) 내로의 내재화에 대하여 시험하였다.

[0557] 세포를 하기 조건에 따라 처리하였다: 4°C, 0.1% 아지드, 30 분(내재화 “없음” 우세); 4°C, 30 분; 또는 37°C; 4 시간(내재화 우세) 및 유세포 분석에 의해 분석함.

[0558] 624me1/hB7-H4 안정적 주

[0559] 키메라 항 B7-H4 항체(c2E11, c2H9, c2D1, c6H3) 및 인간 변이체 항 B7-H4 항체의 내재화를 또한 624me1/hB7-H4 안정적 세포주에서 검증하였다. 간략하게, 세포를 CypHer5-표지된 항 B7-H4 항체(10 퀄/m1)로 30분 간 펠스하고, 미결합 프로브를 제거하기 위해 한 차례 세척하고, 37°C에서 4시간 동안 항온배양하였다. 세포 표면 B7-H4 발현 및 항체 내재화를 유세포 분석으로 측정하였다.

[0560] CT26/hB7-H4 안정적 세포주-클론 E4F2

[0561] 항 B7-H4 항체 내재화를 또한 CT26/hB7-H4 안정적 세포주-클론 E4F2에서 검증하였다. 간략하게, 100,000 개의 세포를 37°C에서 4시간 동안 CypHer5-표지된 항 B7-H4 항체(2 퀄/m1)로 표지하였다. 세포를 0.1% 소듐 아지드로 30분 간 열음에서 전처리하였다. 그런 다음, 이들 세포를 4°C에서 4시간 동안 CypHer5로 표지된 항 B7-H4 항체(0.1% 아지드를 포함함)로 표지하였다. 항온배양 기간 후, 모든 세포를 펠렛화시키고, Fc 차단 배지에 재현탁하고, PE로 표지된 항 B7-H4 항체(H74)로 염색하여 세포 표면에서 B7-H4 수준을 측정하였다. 그런 다음 세포를 세척하고, Live/Dead nearIR viability 염료를 사용하여 염색하였다.

[0562] 마우스 6H3.m1(마우스 IgG1) 및 6H3.m2a(마우스 IgG2a) mAb

[0563] 마우스 6H3.m1(마우스 IgG1) 및 6H3.m2a(마우스 IgG2a) mAb 내재화를 포함하는 항 B7-H4 항체 내재화를 또한 CT26/hB7-H4 및 E.G7ova/hB7-H4 안정적 세포 주에서 검증하였다. 간략하게, 100K 세포를 37°C 배지 내에서 4시간 동안 CypHer5로 표지된 항 B7-H4 항체(2 퀄/m1)로 표지하였다. 표지 전에, 세포의 Fc 수용체를 10 퀄 마우스 IgG로 10분 간 차단하였다. 세포를, 그런 다음, 펠렛화하고, 세척하고, PE로 표지된 항 B7-H4 항체(H74)로 염색하여 세포 표면 상의 B7-H4 수준을 측정하였다. 마지막으로, 세포를 세척하고, Live/Dead™ nIR viability 염료로 염색하고 고정하였다.

[0564] 공초점 현미경을 사용한 내재화 연구

[0565] B7-H4 mAb 키메라 6H3, 키메라 2E11, 키메라 2H9, 키메라 2D1, 6H3 인간화 변이체 V2, V6, V7, V9, V12, 및 V14을 pH-민감성 시안 염료 CypHer5E NHS 에스테르(내재화되면 산성 리소좀 구획에서 최대 형광을 방출함)로 표지하였다. 1 µg/ml CypHer5E로 표지된 6H3, 2E11, 2H9, 2D1 또는 6H3 인간화 변이체 V2, V6, V7, V9, V12 및 V14를 293T.hB7-H4 또는 B7-H4 양성 유방 암 종양 세포주 SK-BR-3과 함께 다양한 시간으로 항온배양하였고, 공초점 형광 현미경(Perkin Elmer Operetta)으로 내재화에 대하여 모니터링하였다(데이터 미도시).

결과

[0567] 키메라 6H3은 내재화가 우세한 염색 프로토콜(37°C, 4시간) 중에서 EG7.IG7 (B7-H4 저발현 세포) 및 EG7.IVB3(B7-H4 고발현 세포) 모두에서 음성 대조군보다 높은 수준으로 내재화되었다.

[0568] 키메라 6H3은 심지어 내재화를 방지해야 할 조건 하에서도 세포에 의해 내재화되었다. 예를 들어, 키메라 6H3은 EG7.IVB3(B7-H4 고발현 세포)에서 내재화를 선호하지 않는 4°C, 30분 조건에서 음성 대조군 항체보다 높은 수준으로 내재화되었다.

[0569] 다른 키메라 항 B7-H4 항체(c2E11, c2H9, c2D1)도 또한 4°C에서 30분 간 처리 후, 일정한 정도의 내재화를 EG7.IG7(B7-H4 저발현 세포) 및/또는 EG7.IVB3(B7-H4 고발현 세포)에서 나타내었지만, 키메라 6H3이 더 높은 정도로 내재화되었다(도 14).

[0570] 6개의 인간화 변이체에 대해서도 세포 내재화 평가를 시험하였다. 6개의 변이체 모두는 내재화능을 보유하였다. 변이체 9는 키메라 6H3 및 시험된 다른 변이체에 비해 증가된 내재화를 나타냈다(도 15).

[0571] 항 B7-H4 항체 내재화를 또한 624me1/hB7-H4 안정적 세포주에서 검증하였다. B7-H4의 세포 표면 발현 수준을 유세포 분석으로 정립하였다. 624me1 세포는 B7-H4를 전혀 발현하지 않았고, 클론 B7은 소량을 발현하였고, 클론 B6이 가장 많은 양을 발현하였다. CypHer5로 표지된 키메라 항 B7-H4 mAb(c2H9, c2D1 c6H3)의 624Me1.B7H4 세포(클론 B6)으로의 내재화는 음성 대조군 항체(항 PD-1 항체)보다 더 컸다. 내재화의 정도는 세포 표면 hB7-H4 발현의 수준과 상호관련되었다. 키메라 항 B7-H4 mAb들 중에서, c6H3이 가장 큰 내재화를 보였다. CypHer5로 표지된 인간 변이체 항 B7-H4 mAb(V2, V6, V7, V9, V12 및 V14)의 624Me1.B7H4 세포(클론 B6)로의 내재화는 c6H3

와 유사하였다.

[0572] 항 B7-H4 항체 내재화를 또한 CT26/hB7-H4 안정적 세포주-클론 E4F2에서 검증하였다. 키메라 항 B7-H4 항체 (c2H9, c2D1, c6H3, 및 c2E11(일정 정도까지))가 내재화되었지만 음성 대조군 항체(항 PD-1 항체)는 내재화를 나타내지 않았다. 마찬가지로, 표지된 인간 변이체 항 B7-H4 mAb(V2, V6, V7, V9, V12 및 V14)는 내재화되었지만, 음성 대조군 항체는 내재화를 나타내지 않았다. 내재화의 정도는 세포 표면 hB7-H4 발현의 수준과 상호관련되었다(**도 16**). 항온배양 기간 후 세포 표면 상에 가능한 B7-H4의 양은 내재화된 항체의 양에 반비례하였다. 항 B7-H4 항체(c2H9, c2D1, c6H3, 및 변이체 V2, V6, V7, V9, V12 및 V14)는 또한 4°C + 아지드 조건 하에서, 약간 적은 정도까지이긴 하지만 내재화되었다(**도 16 및 17**). 이러한 조건이 상당한 정도까지 내재화를 저해하는 데에 실패하는 이유는 명확하지 않다. CT26 모 세포주는 이러한 조건 하에서 항 B7-H4 항체의 내재화를 나타내지 않았다.

[0573] 또한 마우스 6H3.m1(마우스 IgG1) 및 6H3.m2a(마우스 IgG2a) mAb를 키메라 6H3 및 6H3의 인간화 변이체와 CT26/hB7-H4 및 E.G7ova/hB7-H4 안정적 세포주에서 비교하기 위한 내재화 검정법도 수행하였다. 항 B7-H4 항체는 두 세포주 모두에서 내재화되는 반면, 음성 대조군(항 PD-1 항체)은 내재화를 나타내지 않았다(**도 18a 및 b**). 6H3.m1 및 6H3.m2a는 동일한 정도로 내재화한다. 인간 변이체 7은 가장 강하게 내재화되었던 반면, 변이체 2, 9, 및 12는 약간 더 낮은 정도까지 내재화한다. 위에서 관찰된 바와 같이, 항온배양 기간 후 세포 표면 상에 가능한 B7-H4의 양은 일반적으로 내재화된 항체의 양에 반비례하였다.

[0574] 공초점 현미경을 사용하여, 6H3의 내재화를 개별적인 세포 내 반점 모양의 형광에 의해 시각화하였다. 내재화 공정과 일치하는, 형광 신호는 5시간에서는 원형질 막에 인접하게 축적된 반면, 24시간에서는 형광 소낭의 축적을 큰 세포질 영역에서 볼 수 있었다.

[0575] 공초점 현미경을 사용하여, HEK293.hB7-H4 세포와의 5 시간 동안의 항온배양 후 CypHer5E로 표지된 6H3가 4종의 키메라 B7-H4 mAb(2E11, 2H9, 2D1, 6H3) 중에서 최대 내재화능을 나타내었다.

[0576] 공초점 현미경을 사용하면, HEK293.hB7-H4 세포와의 5시간의 항온배양 후 CypHer5E로 표지된 6H3 인간화 변이체 V2, V6 및 V7이 6개의 인간화 6H3 변이체 중에서 최대 내재화능을 나타내었다. 반면, SK-BR-3 세포와의 5시간의 항온배양 후 CypHer5E로 표지된 6H3 인간화 변이체 V6, V7 및 V14 이 6개의 인간화 6H3 변이체 중에서 최대 내재화능을 나타내었다. 인간화 6H3 V6 및 V7는 내재화를 유도하는 상위 2종의 변이체이다.

실시예 8

[0577] 6H3의 키메라 및 인간화 변이체는 항체 의존성 세포 매개 세포독성을 유도한다

재료 및 방법

ADCC 검정

[0578] 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 검정은 효과기 세포에 의한 표적 세포의 용해를 매개하는 키메라 6H3 및 6H3의 인간화 변이체의 능력을 시험하기 위해 설계되었다.

[0579] EG7.hB7-H4(클론 IVB3) 세포 및 SK-BR-3 세포를 표적 세포로서 시험하였다. 117, 119, 121, 및 122로 지칭된 4 종의 상이한 건강한 공여자로부터의 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)를 효과기 세포로서 시험하였다.

[0580] 4종의 상이한 효과기 대 표적 비(예컨대, 100:1, 50:1, 및 20:1의 E:T 비)를 검증하였다.

[0581] 시험(pilot) 실험에서 EL4-유래 세포가 PBMC에 의한 용해에 아주 민감한 것으로 밝혀졌고, 검정법을 이러한 배경을 최소화하도록 최적화하였다. EG7.hB7-H4를 활용한 검정에서 용해를 위한 항온배양 기간은 4시간이었다. SK-BR-3 세포를 활용한 검정에서 용해를 위한 항온배양 기간은 20시간이었다.

[0582] 총 용해를 생존률 염색으로 측정하였다. 특이적 용해 = $100 \times ([\% \text{ 사멸}] \text{항 B7-H4 항체 처리} - [\% \text{ 사멸}] \text{대조군 IgG 처리}) \div (100 - [\% \text{ 사멸}] \text{대조군 IgG 처리})$.

결과

[0583] 키메라 6H3 및 EG7.B7H4 표적 세포를 활용한 초기 검정에서, 표적 세포의 특이적 용해가 4종의 공여자 모두에서 모든 시험된 비에서 검출되었다. **도 19a** 내지 **c**는 3종의 상이한 효과기 세포:표적 세포 비에서의 결과를 나타낸 것이다. 20:1이 향후 검정을 위해 선택되었는데, 이는 20:1이 생체 내 ADCC 활성을 가장 잘 반영하기 때문이다.

[0584] 최적 검정 조건을 6H3의 14종의 인간화 변이체를 단일 농도(10 ng/mL)에서 비교하기 위해 채용하였다(**도 20**). 4

종의 효과기 세포 공여자 중 3종(114, 120, 122)이 특이적 용해를 나타내었다. 변이체 4, 5, 8 및 11은 가장 높은 ADCC 활성을 보였다. 시험한 14종의 변이체 중, 변이체 11이 가장 높은 ADCC 활성을 나타낸 반면, 변이체 14가 가장 낮은 ADCC 활성을 나타냈다. 변이체 11 및 14를 상이한 공여자/효과기 세포와 조합한 용량 적정 실험에서 항체 ADCC 활성에서의 상대적인 차이가 공여자 특이적이라는 것이 밝혀졌다(**도 21a 내지 d**).

[0589] 추가적인 ADCC 검정에서, SK-BR-3 세포를 표적 세포로 사용하였다. SK-BR-3 세포는 생체 내 표적 발현(막관통 B7-H4)을 전술된 검정에서 사용된 EG7.B7H4 세포보다 더 잘 모사하는 것으로 생각된다. 3가지의 상이한 효과기 세포:표적 세포 비(20:1, 50:1, 및 100:1)를 시험하였고, 2종의 상이한 효과기 세포 공여자(117 및 120)를 키메라 6H3 항체의 용량 적정으로 시험하였다.

[0590] PBMC 공여자(117 및 120)에 대하여 관찰된 총 용해(Live/Dead 염료 양성인 표적 세포의 %)는 높았다(**도 22a 및 b**). 검정은 20시간 동안 수행되었고, 높은 배경에도 불구하고, 2종의 공여자는 항체 용량 의존적 방식으로 특이적 용해를 나타내었다(**도 23a 및 b**). 50:1이 2종의 공여자에 대한 용량 의존적 활성을 관찰하는 데 바람직한 효과기:표적 비인 것으로 결정되었다.

실시예 9

6H3은 보체 의존성 세포독성을 유도하지 않는다

재료 및 방법

[0594] 6H3 항체의 보체 의존성 세포독성(CDC) 유도능을 시험하기 위한 검정을 설계하였다. SK-BR-3 세포(ATCC)를 표적으로 사용하였다. 표적 세포를 순수한 또는 희석된 정상 인간 혈청 보체(Quidel)와 6H3 또는 대조군 단백질 및 대사 표지 염료 AlamarBlue(Life Technologies)의 존재 하에 혼합하였다. HERCEPTIN™ 또한, 인간 IgG1 항체)을 양성 대조군으로 사용하였고, 인간 IgG1 이소형 대조군을 음성 대조군으로 사용하였다. AlamarBlue의 상대 형광 강도(생존 세포의 수에 비례함)를 EnVision 플레이트 판독기(PerkinElmer)를 사용하여 측정하였다.

결과

[0596] SK-BR-3 세포는 보체 내성 인자(예컨대, CD46, CD55, CD59)를 발현시키므로, 매우 많은 양의 보체를 사용하였다. HERCEPTIN™ 매개 사멸을 순수한 보체, 1:2 및 1:5-희석된 보체를 사용하여 관찰하였다. c6H3에 대하여 CDC 활성을 시험된 어떠한 조건에서도 관찰되지 않았다(**도 24a 및 b**).

실시예 10

6H3은 B7-H4를 발현하는 세포의 CTL 매개 용해를 향상시킨다

재료 및 방법

[0600] CTL 매개 용해 검정은 항원성 SIINFEKL(서열 번호 30) 웨티드로 펄스되고 IL-2가 보충된 APC의 존재 하에 시험관 내에서 초희감작된 OT-1 TCR 유전자이식 CD8 T 세포를 사용한다. CTL을, 그런 다음, 형광으로 표지된 표적 세포와 함께 다양한 효과기 대 표적(E:T) 비로 공동황은배양한다.

[0601] EG7 세포주에는 OVA-유래 웨티드가 존재하지 않기 때문에, EG7 또는 EG7.hB7-H4 세포를 웨티드로 펄스하고 숙신 이미드 에스테르 CFSE로 표지한다. 항원 음성(Ag-)인 EG7 세포를 DDAO 표지하고, 1:1의 비로 항원 양성(Ag+) 표적과 혼합하였다.

[0602] 4 시간의 항온배양 후, 세포를 Live/Dead 염색으로 염색하고, 생존 표적 세포를 정량하였다. CTL 매개 용해는 CFSE(Ag+) 및 DDAO(Ag-) 표적 사이의 비에서의 변화에 의해 결정된다.

결과

[0604] B7-H4를 발현하는 세포의 CTL 매개 용해에 대한 상이한 농도의 키메라 6H3 항체의 효과를 상이한 효과기:표적 세포 비에서 조사하였다. **도 25**에 나타낸 바와 같이, Ag-에 대한 Ag+ 표적의 빈도는 E:T 비의 증가에 따라 감소한다.

[0605] 특이적 용해는 Ag+ 대 Ag- 표적의 초기 비로 생존률을 조정하여 결정하였다. 인간 키메라 6H3 항체는 EG7.B7-H4 세포의 특이적 용해를 시험한 2가지 농도 모두에서 증가시켰다(**도 26**). 나아가, 키메라 6H3으로 유도된 B7-H4+ 세포의 용해를 CTL의 부재 하에 대조군 IgG와 비교하였다(**도 26**, 마지막 4개의 막대).

실시예 11

[0607] 6H3은 루이스 폐 암종 동계 종양 모델에서 종양 부피를 감소시키고 생존률을 증가시킨다

재료 및 방법

[0609] 루이스 폐 암종(LLC) 세포를 27 B16 마우스에 접종하였다. 종양($150\sim250 \text{ mm}^3$)을 지니는 마우스를 선택하고, 8일 차에 3개의 군(9 마우스/군)으로 나누었다. 마우스를 10 mg/kg 의 마우스 6H3.m1(마우스 IgG1) 또는 6H3.m2a(마우스 IgG2a) mAb 또는 제형 완충액으로 주당 2회(총 5회 용량) 처리하였다. 종양 크기를 주당 3회 모니터링하였다.

결과

[0611] 효과기 기능에 대한 잠재성이 있거나 없는 암 모델에서 항 B7-H4 mAb의 효능을 평가하기 위한 실험을 설계하였다. 루이스 폐 암종(LLC) 모델을 선택하였는데, 부분적으로 이러한 모델에서 생체 내 B7-H4 발현이 종양 및 종양 관련 대식세포에서 관찰되기 때문이다. 확립된 LLC 세포 종양을 가지는 마우스를 마우스 6H3.m1(마우스 IgG1) 또는 6H3.m2a(마우스 IgG2a)로 처리하였고, 시간에 따라 종양을 모니터링하였다.

[0612] 18일차에, 제형 완충액으로 처리된 마우스가 궤양이 생긴 LLC 종양을 가진 것이 관찰되었고, 상처가 거의 종양 만큼 커졌다. 6H3.m1으로 처리된 마우스는 제형 완충액 처리군과 유사한 것으로 보였다. 6H3.m2a으로 처리한 마우스는 아물기 시작한 작은 상처를 가졌다. 6H3.m2a에서는 느린 종양 성장과 증가된 생존 시간이 관찰되었다($p = 0.015$, 도 27a 및 b). 결과를 제2 검정에서 확인하였다(도 28a 및 b).

실시예 12

CT26.B7H4 동계 뮤라인 종양 모델

재료 및 물질

[0616] 꼬리 정맥 주사를 통해 0일차에 마우스에 CT26-B7H4(1E05)를 접종하고, 10일 또는 14일차부터 시작하여 10 mg/kg 또는 1 mg/kg 의 마우스 6H3.m1(마우스 IgG1) 또는 6H3.m2a(마우스 IgG2a)를 처리하였다. 마우스를 24일 차에 안락사시키고, 폐 안의 종양 결절의 숫자 및 크기를 기록하였다. 모든 실험군으로부터 폐를 제거하고, 고정 용액 내에 저장하였다. 실험 설계 및 계획은 아래에 나타낸 바와 같다. 군 당 마우스는 12~13 마리였고, 주당 2회의 용량이었다:

[0617] 군 1, 제형 완충액(12마리 마우스)

[0618] 군 2, 6H3.mIgG2a, 10 mg/kg 10일 차(12마리 마우스)

[0619] 군 3, 6H3.mIgG2a, 1 mg/kg 10일 차(12마리 마우스)

[0620] 군 4, 6H3.mIgG2a, 10 mg/kg 14일 차(13마리 마우스)

[0621] 군 5, 6H3.mIgG2a, 1 mg/kg 14일 차(13마리 마우스)

결과

[0623] CT26-B7H4 전이성 폐암 모델에서 6H3 항체의 효능을 시험하였다. 처리하지 않았을 때 시간에 따른 종양의 성장 동역학은 도 29a에 나타나 있다. 실험적 검정에서, 마우스에 CT26-B7H4(1E05)를 꼬리 정맥 주사를 통해 0일차에 접종하였고, 10일 또는 14일차부터 시작하여 10 mg/kg 또는 1 mg/kg 의 마우스 6H3.m1(마우스 IgG1) 또는 6H3.m2a(마우스 IgG2a)를 처리하였다. 일반적으로, 제형 완충액을 제공받은 한 마리의 마우스(6%의 체중이 줄어들고, 24일 차에 질병을 나타냄)를 제외하고는 체중에서의 유의한 변화는 없었다. 전이성 종양의 수는 6H3.mIgG2a 처리로 유의하게 감소하였다($p<0.001$)(도 29b)

실시예 13

독성의 평가

재료 및 물질

[0627] 군 당 8마리의 7 내지 9주령의 BALB/c 마우스를 100 mg/kg 투여량의 6H3.mIgG1, 6H3.mIgG2a, 또는 제형 완충액으로 한 달간 주 1회(총 5회 용량) 처리하였다. 혈당은 4번째 투여 후 시험하였다.

[0628] PK(4회 투여 후 최고점과 저점)의 초기 평가를 위해 혈청을 수집하였다. 항체를 B7-H4-Ig 융합 단백질로 혈청으

로부터 포획하고, 비오틴 항 마우스 IgG1(6H3.mIgG1) 또는 IgG2a(6H3.mIgG2a)로 검출하고, 유로퓸-스트렙트아비딘(Europium-Streptavidin)으로 검출하였다.

[0629] 조직병리를 위해 기관들을 수집하였다: 심장, 간, 비장, 폐, 신장(특히, 사구체), 장(회장, 십이지장, 공장, 맹장, 결장), 자궁, 침샘, 담낭 및 췌장(특히 도(islet)에 주의를 기울임).

결과

[0631] 잠재적 면역 효과가 기능을 가지거나 가지지 않는 항B7-H4 항체의 독성의 예비 평가를 제공하기 위한 독성 연구를 수행하였다. 모든 마우스가 회생이 계획된 때까지 생존하였다. 혈당 수준은 영향을 받지 않았다(도 30). 시험 물질 관련 독성 효과는 관찰되지 않았다. 최고점 및 저점 항체 농도를 4회 투여 후 평가하였다. 고혈청 농도를 확인하였고, C_{max}와 C_{min} 사이에서 약간의 차이가 관찰되었다(도 31 및 32a 및 b).

[0632] 시험 물질 관련한 현미경적 발견은 조직병리학 분석 중에 나타나지 않았다. 관찰된 현미경적 발견은 이러한 마우스의 균주 및 연령에서 공통적으로 관찰되는 성질에 따르기 마련인 것이고/것이거나 제형 완충액을 수여받은 동물 및 6H3.m1 및 6H3.m2a을 수여받은 동물에서도 유사한 빈도 및 심각도로 나타나는 것으로 간주하였고, 이에 따라, 6H3.m1 및 6H3.m2a의 투여와는 관련이 없는 것으로 간주되었다. 신장 사구체 또는 췌장 섬에서 군 간의 차이는 나타나지 않았다.

[0633] 폐의 일부 및 장 부분의 많은 부분은 자가용해의 증거를 보였다. 평가할 수 없는 소수의 자가용해성 조직 및 평가가 불가능한 소수의 조직은 6H3.m1 및 6H3.m2a 투여와 관련된 현미경적 변화의 평가에 영향을 미치지 않는 것으로 간주하였다.

실시예 14

6H3의 인간화 변이체의 결합 특성분석

재료 및 물질

[0637] PBS에 희석된 100 μl 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ B7-H4ECD his로 태그된 단백질(Sinobiologics)을 편평 바닥 96웰 플레이트(Costar 9017)에 4°C에서 밤새 고정하였다. 플레이트를 PBS+0.1% PS-20으로 2회 세척하고, 200 $\mu\text{l}/\text{웰}$ PBS 10% FBS로 상온에서 1시간 동안 차단하였다. PBS 10%FBS에 희석된 100 μl 키메라 6H3 및 14개의 선택된 6H3 인간화 변이체를 각 웰에 첨가하고 상온에서 1시간 동안 항온배양하였다. 플레이트를 3회 세척하고, 100 μl 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 항인간 Ig HRP(Sigma)를 각 웰에 첨가하고 상온에서 1시간 동안 항온배양하였다. 플레이트를 6회 세척하였고, 100 μl TMB 기질(SurModics)을 각 웰에 5 내지 15분 간 첨가하였다. 100 μl 정지 용액(0.1M 황산)을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 450 nm 흡광도에서 PerkinElmer EnVision 2104 Multilabel Reader로 판독하였다.

결과

[0639] 인간화 변이체 6H3 항체의 인간 키메라 6H3에 대한 B7-H4 세포와 도메인에 대한 결합 특성분석을 위한 ELISA 검정을 설계하였다.

[0640] 결과는 도 33 및 표 8에 나타나있고, 14개의 시험된 인간화 변이체가 인간 키메라 6H3과 비교하여 인간 B7-H4에 대해 2배 더하거나 덜한 친화도를 유지한다는 것을 보여준다.

표 8

mAB 6H3 항체의 B7-H4에 대한 EC₅₀

항체	EC ₅₀ (nM)
hc6H3	0.62
V1	8.67
V2	0.51
V3	1.19
V4	1.16
V5	0.95
V6	1.64
V7	1.07
V8	11.44
V9	0.75

V10	0.89
V11	0.97
V12	0.78
V13	0.92
V14	0.68

[0642] 실시예 15

[0643] 인간화 6H3의 경쟁적 결합 특성분석

[0644] 재료 및 물질

[0645] 14개의 인간화 6H3 항체 변이체의 12 지점의, 3배 계대 희석액을 100 퀄/ml 내지 0.5 ng/ml의 범위로 제조하였다. 5 ng/ml으로 비오틴화된 마우스 항 인간 B7-H4 6H3(각각, 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역에 대해 서열 번호 3 및 5)를 함유하는 검정 희석액 내에 희석액을 제조하였다. 항체를 B7-H4-Ig로 코팅된 검정 플레이트(200 ng/웰)에 상온에서 1시간 동안 결합하도록 하고, 스트렙트아비딘 HRP로 검출하였다.

[0646] B7-H4-Ig는 다음을 서열을 가지는 융합 단백질이다:

[0647] GFGISGRHSI TVTTVASAGN IGEDGIQSCT FEPDIKLSDI VIQWLKEGVL GLVHEFKEGK

[0648] DELSEQDEMFI RGRATAVFADQ VIVGNASLRL KNVQLTDAGT YKCYIITSKG KGNANLEYKT

[0649] GAFSMPEVN V DYNASSETLR CEAPRWFPQP TVVWASQVDQ GANFSEVSNT SFELNSENV

[0650] MKVVSVLYNV TINNTYSCMI ENDIAKATGD IKVTESEIKR RSEPKSCDKT HTCPCCPAPE

[0651] LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV DVDSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE

[0652] EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP

[0653] SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD

[0654] KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK

[0655] (서열 번호 31).

[0656] 결과

[0657] 경쟁적 ELISA 검정을 14개의 인간화 6H3 항체 변이체(V1~V14)에 대하여 수행하였다. 경쟁적 결합의 이점은 비교하는 mAb가 직접적으로 표지되거나 검출되지 않으므로, 2차 항체에 대한 표지 또는 결합에서의 차이가 상대적인 친화도에 영향을 미칠 수 없다는 것이다.

[0658] 표 9 및 도 34a 및 b에 나타낸 바와 같이, 변이체 V1 및 V8은 현저하게 감소된 B7-H4-Ig에 대한 결합 친화도를 가진다. 모든 다른 변이체는 항체 6H3의 인간 키메라 형태의 1.5배 내의 EC50 값을 가진다. 이러한 발견은 변이체 1 및 8이 또한 B7-H4-Ig에 대하여 불량한 결합 친화도를 나타낸다는 것을 보여주었던 비 경쟁적 결과와도 일치한다. 모든 다른 변이체는 키메라 6H3의 2배 이내이다.

표 9

인간화 변이체 항체 V1~V14의 결합 특성분석

플레이트 1			플레이트 2		
6H3 변이체	EC50		6H3 변이체	EC50	
	ng/mL	nM		ng/mL	nM
키메라	2437	16.2	키메라	2259	15.1
V1	23387	155.9	V8	54719	364.8
V2	2462	16.4	V9	2687	17.9
V3	3088	20.6	V10	2126	14.2
V4	2949	19.7	V11	2199	14.7
V5	3625	24.2	V12	3005	20.0

V6	2532	16.9	V13	2112	14.1
V7	2631	17.5	V14	2491	16.6

[0660] 실시예 16

[0661] 인간화 6H3의 포화 결합 특성분석

[0662] 재료 및 물질

[0663] 키메라 6H3 mAb 및 6H3의 인간화 변이체를 사용하여 624meli/B7-H4 세포에 대한 포화 결합 실험을 수행하였다. 간략하게, 50,000 세포를 0.1% 아지드로 엘음에서 30분 간 전처리하여 B7-H4 내재화를 차단하고, 그런 다음, 비오텐화된 항B7-H4 mAb로 30분 간 염색하였다. mAb를 200 킴/m1 부터 1 ng/ml로 낮아지는 12지점, 3배 계대 희석으로 희석하였다. 세포를 스트렙트아비딘 PE로 10분 간 염색하고, 세척하고, 고정하고, 유세포 분석으로 분석하였다.

[0664] 결과

[0665] 도 35a 및 b는 미가공(도 35a) 및 배경 감산 데이터(35b)에 대한 결합 곡선이다. 배경 감산 데이터는 항PD-1 항체(245 MFI)로부터의 평균 신호를 모든 다른 지점에서 감산하여 생성하였다. 감산된 값을 Kd 및 Bmax를 결정하기 위해 사용하였다. 항체는 Kd 값에 기반하여 2개의 군 이내에 나타난다(표 10).

표 10

mAb	Kd	표준 오차	Bmax	표준 오차
AMP-841	578	145	5811	256
6H3 V2	1320	543	4649	365
6H3 V6	787	152	6420	225
6H3 V7	803	151	6080	208
6H3 V9	3306	1352	4612	402
6H3 V12	2177	837	4584	356
6H3 V14	920	193	5575	215

[0666]

[0667] 항B7-H4 항체 결합 동역학

[0668] 실시예 17

[0669] 내재화는 결합 및 Kd 추산에 영향을 미친다

[0670] 재료 및 물질

[0671] 각각의 염색을 위해, 2십만 개의 HEK293.hB7-H4 형질감염체를 100 μ l 유세포 분석 완충액(PBS+2%FBS)에 재현탁하였다. 키메라 6H3 및 0, 0.1 ng, 0.3 ng, 1 ng, 3 ng, 10 ng, 30 ng, 100 ng, 300 ng, 1 μ g, 3 μ g 및 10 μ g의 14개의 인간화 변이체의 계대 희석액을 세포에 첨가하고, 4°C에서 30분 간 항온배양하였다. 그런 다음, 세포를 2 ml의 유세포 분석 완충액으로 2회 세척하고, 100 μ l의 유세포 분석 완충액에 재현탁하였다. 1 μ l 항 hIg PE 이차 항체(Biolegend)를 첨가하고, 세포와 함께 15분 간 항온배양하였다. 시료를, 그런 다음, 세척하고, 100 μ l의 유세포 분석 완충액 내에 재현탁하였다. 유세포 분석 데이터를 BD Canto(BD Biosciences)를 사용하여 플레이트 형식 상에서 획득하고, FlowJo 소프트웨어로 분석하였다. 염색 데이터(MFI)를, 그런 다음, Prism 5 소프트웨어 입력하여 결합 곡선을 생성시켰다. 한 자리 특이적 결합 알고리즘을 사용한 곡선 맞춤으로 각 변이체에 대한 개별적인 Kd를 계산하였다.

[0672] 결과

[0673] B7-H4를 발현하는 HEK293 형질감염 세포에 대한 6H3의 인간화 변이체의 결합의 동역학을 결정하기 위한 검정을

설계하였다. 결과는 아래의 표 11 및 도 36에 나타나 있다. 결과는 항체의 세포 내재화가 세포 결합 및 Kd 추산에 영향을 미친다는 것을 나타낸다.

표 11

B7-H4를 발현하는 HEK293 세포에 대한 6H3의 인간화 변이체들의 결합 동역학

항체	K _d (nM)	Bmax(MFI)
키메라 6H3	5.8	316
V1	18.8	204
V2	2.4	603
V3	6.0	583
V4	5.2	580
V5	4.2	646
V6	5.0	526
V7	6.5	513
V8	24.3	273
V9	1.8	553
V10	5.5	662
V11	6.9	648
V12	3.2	597
V13	7.0	648
V14	5.8	629

[0675] 실시예 18

[0676] 6H3은 마우스 B7-H4에 결합한다

[0677] 재료 및 물질

[0678] PBS에 희석된 100 μl 1 $\mu\text{g/ml}$ 마우스 B7-H4ECD mIgG2a Fc 융합 단백질을 편평 바닥 96웰 플레이트(Costar 9017)에 4°C에서 밤새 고정하였다. 플레이트를 PBS+0.1% PS-20로 2회 세척하고, 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ PBS 10% FBS로 상온에서 1시간 차단하였다. PBS 10%FBS에 희석된 100 μl 키메라 6H3 및 14개의 6H3 인간화 변이체를 각 웰에 첨가하고, 상온에서 1시간 동안 항온배양하였다. 플레이트를 3회 세척하고, 100 μl 1 $\mu\text{g/ml}$ 항 인간 Ig HRP(Sigma)를 각 웰에 첨가하고 상온에서 1시간 동안 항온배양하였다. 플레이트를 6회 세척하고, 100 μl 의 TMB 기질(SurModics)을 각 웰에 5 내지 15분 간 첨가하였다. 100 μl 의 중지 용액(0.1M 황산)을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 450 nm의 흡광도에서 PerkinElmer EnVision 2104 Multilabel Reader로 판독하였다.

[0679] 결과

[0680] 6H3의 인간화 변이체가 마우스 B7-H4-mIg 융합 단백질에 대한 결합능에 기반하여 마우스 B7-H4에 결합하는지를 결정하기 위한 ELISA 검정을 설계하였다. 결과는 아래의 표 12 및 도 37에 나타나 있다. 14개의 시험된 변이체 모두는 인간 키메라 6H3 결합과 비교할 때 2배 더해지거나 감해진 친화도를 유지하였다. 이러한 결과는 6H3의 인간화 변이체의 기능 분석이 세포 및/또는 동물이 마우스 B7-H4 단백질을 발현하는 뮤라인 모델 시스템을 사용하여 수행될 수 있다는 것을 나타낸다.

표 12

마우스 B7-H4-마우스-Ig 융합 단백질에 대한 6H3의 인간화 변이체의 결합 특성분석

항체	EC ₅₀ (nM)
키메라 6H3	0.09
V1	0.10
V2	0.08
V3	0.10
V4	0.08
V5	0.05
V6	0.13
V7	0.11

V8	0.06
V9	0.07
V10	0.13
V11	0.11
V12	0.09
V13	0.13
V14	0.11

[0682] 실시예 19

[0683] 6H3은 B7-H4-Ig의 효과를 역전시킨다

[0684] 재료 및 물질

[0685] 마우스 림프절(LN)을 PLP₁₃₉₋₁₅₁로 면역화된 SJL 마우스로 면역화 후 8일 차에 수확하였다. LN T 세포를 다양한 농도의 6H3의 인간화 변이체(10, 3.33, 1.11 & 0 μg/mL)에 더하여 10 μg/mL의 PLP₁₃₉₋₁₅₁ 및 10 μg/mL의 B7-H4 Ig(서열 번호 31) 또는 대조군 Ig로 자극하였다. T 세포 증식 평가를 위해 [³H]-티미딘을 배양의 마지막 48 시간 동안 배양물에 첨가하였다. 조건 배양 배지를 IL-17, IFNγ 및 IL-10 생성에 대하여 분석하였다.

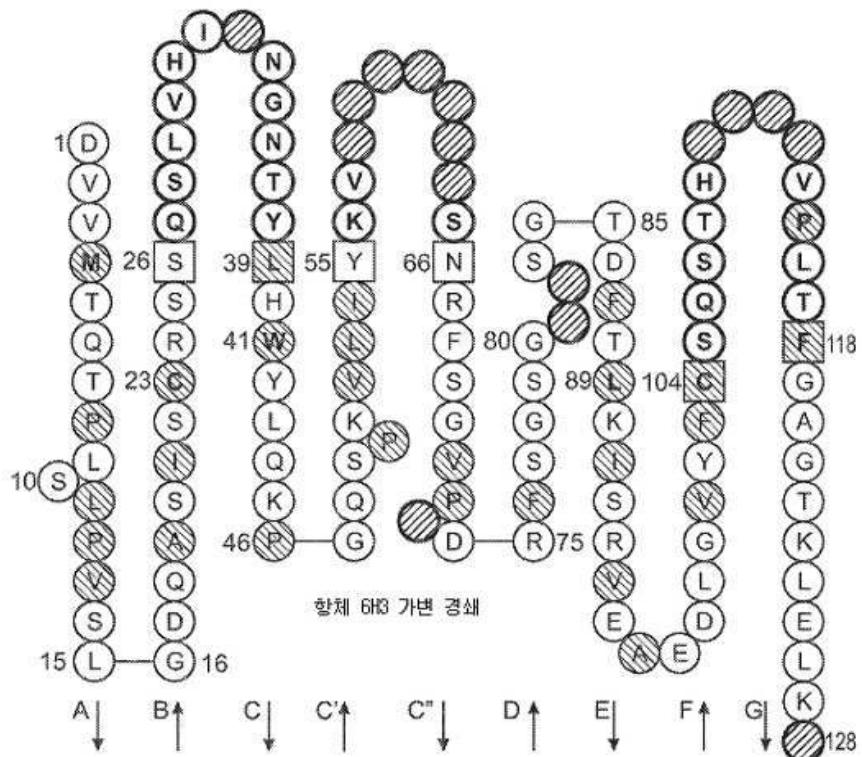
[0686] 결과

[0687] B7-H4- Ig를 가지는 세포의 치료에 대한 6H3의 인간화 변이체의 효과를 시험하기 위한 검정을 설계하였다. 도 38a 내지 d는 검정의 결과를 보여준다. B7-H4-Ig로 처리한 세포의 6H3, 또는 인간화 변이체 2, 6, 7, 11, 12, 또는 14와의 항온배양은 전염증성 사이토카인, 예를 들어, IL-17(도 38a) 및 IFNγ(도 38b)의 분비를 증가시키고, 세포 증식을 증가시키고([³H]-티미딘 삽입)(도 38c), 항 염증성 사이토카인, 예를 들어, IL-10의 분비를 감소시킨다(도 38d). 이러한 결과는 6H3 및 인간화 변이체가 B7-H4-Ig 매개 면역 저해성 반응을 역전시킨다는 것을 나타낸다.

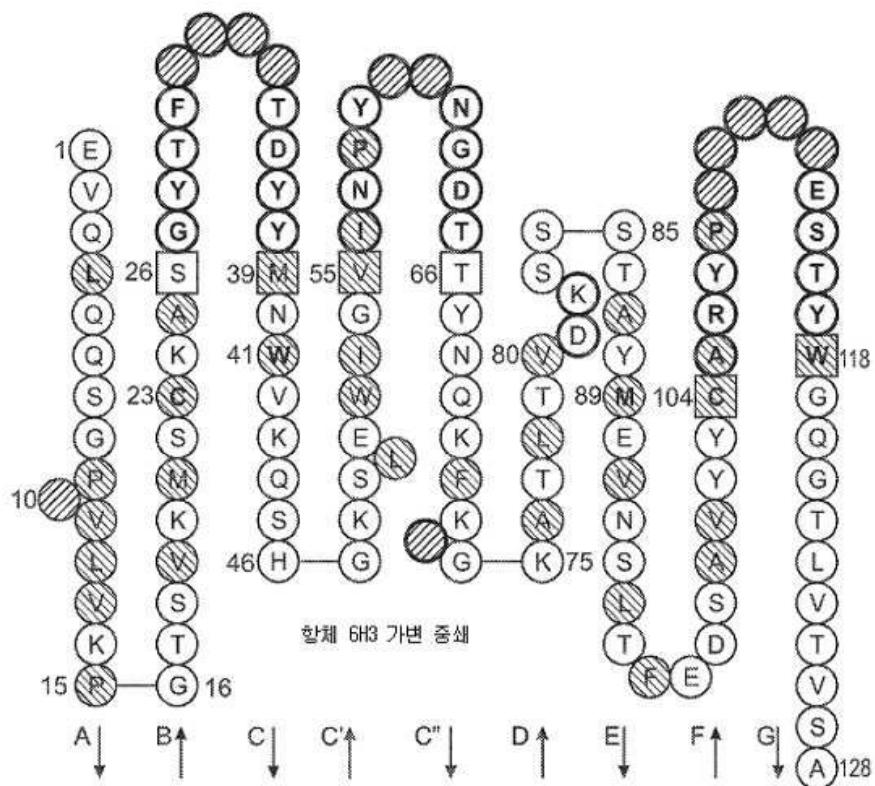
[0688] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물 및 특허는 각각의 개별적인 간행물 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 그 전체가 참조로서 본원에 포함된다고 나타낸 것과 동일하게 본원에 참조로서 포함된다. 본 발명은 본 발명의 구체적인 구현예와 관련하여 기술되었지만, 추가의 변형이 가능하고, 본 출원이 일반적으로 본 발명의 원리를 따르고, 본 발명이 속하는 당해 분야에 공지되거나 관습적인 실시의 범위 내에 속하는 바와 같이 그리고 전술된 필수적인 특성들에 적용될 수 있는 바와 같이, 본 개시 내용을 벗어난 사항들을 포함하는 본 발명의 어떠한 변형들, 용도들 또는 적응들도 망라하고자 하는 것으로 이해해야 할 것이다.

도면

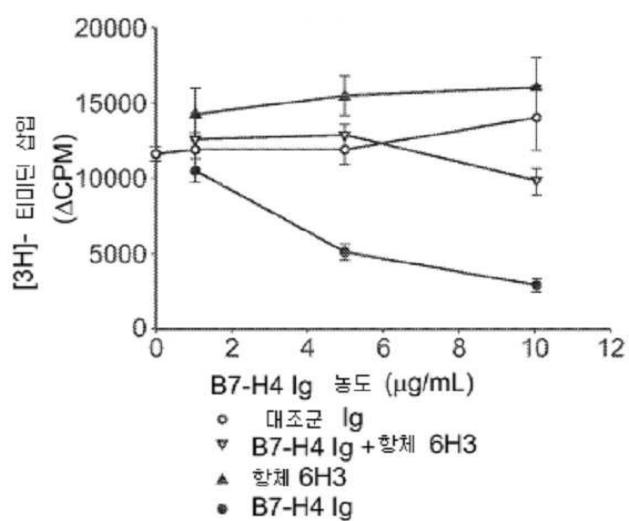
도면1a



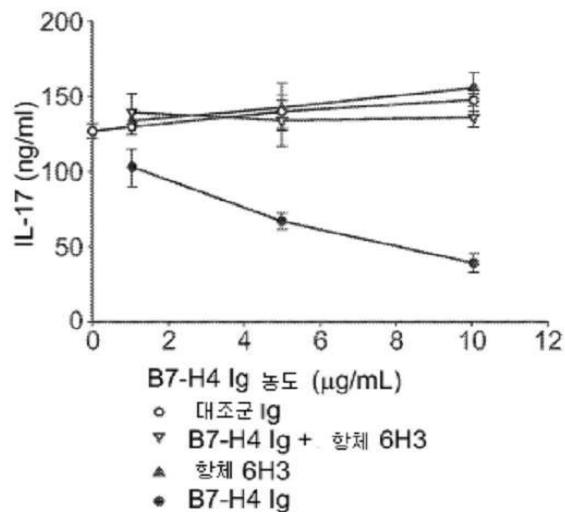
도면1b



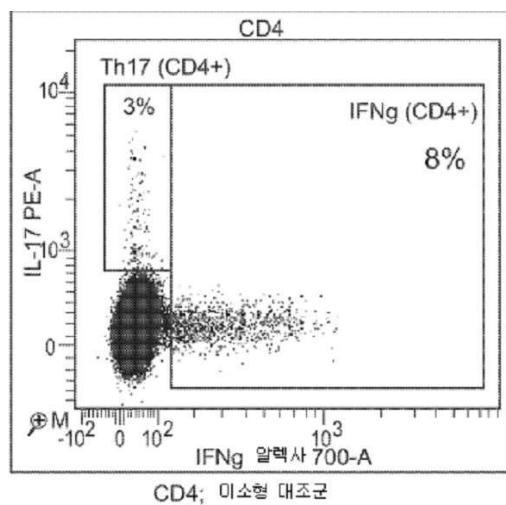
도면2a



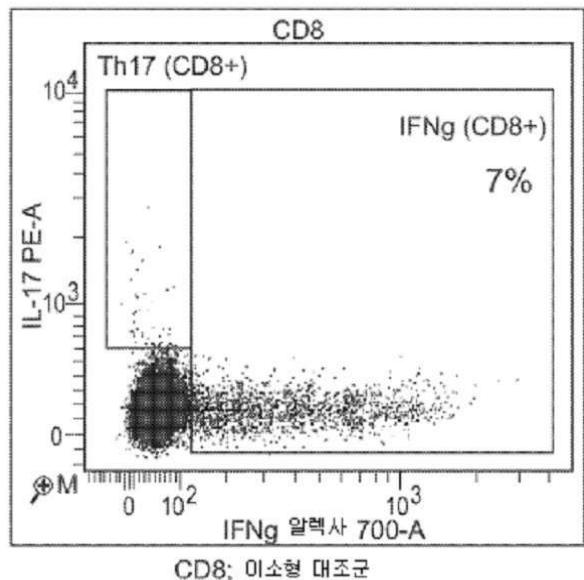
도면2b



도면3a

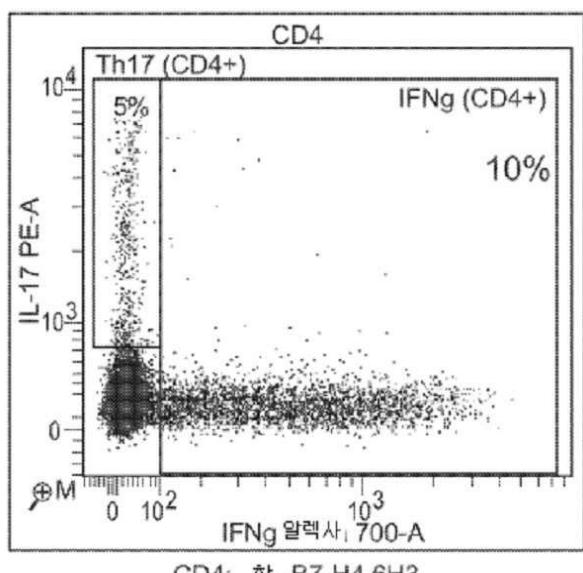


도면3b



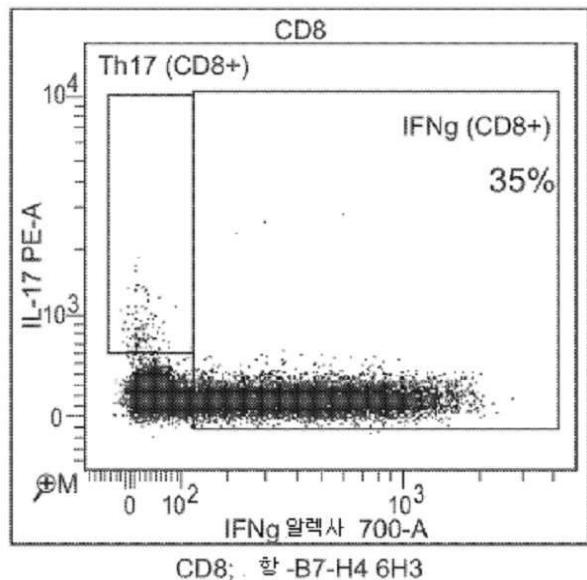
CD8; 미소혈 대조군

도면3c

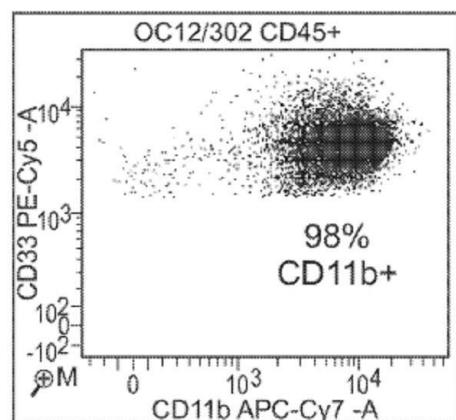


CD4; 할 -B7-H4 6H3

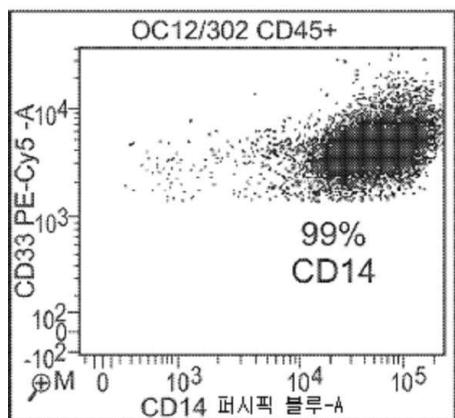
도면3d



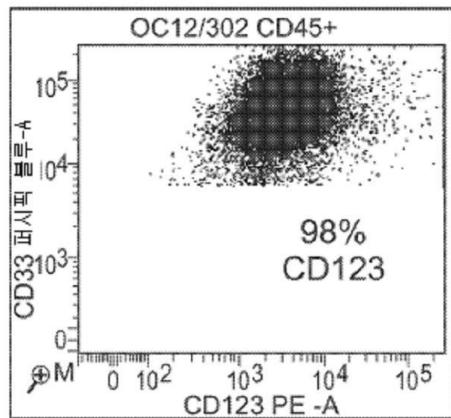
도면4a



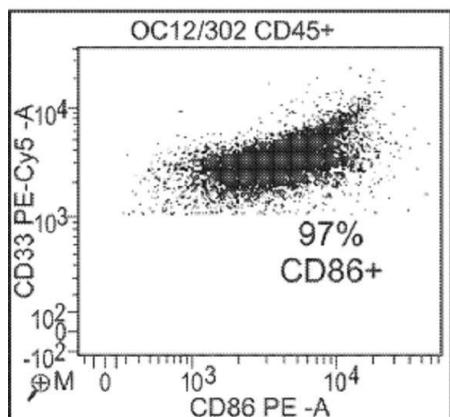
도면4b



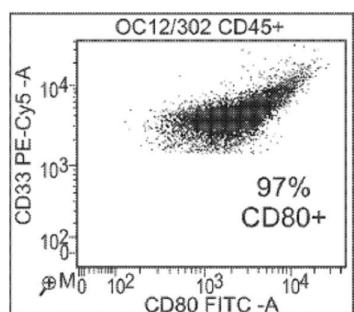
도면4c



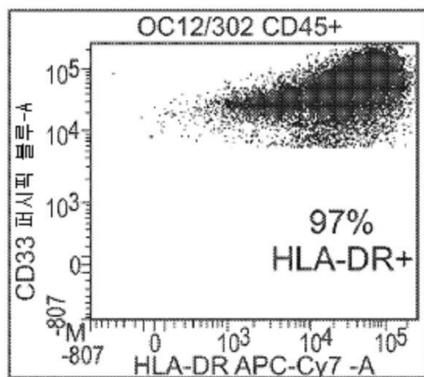
도면4d



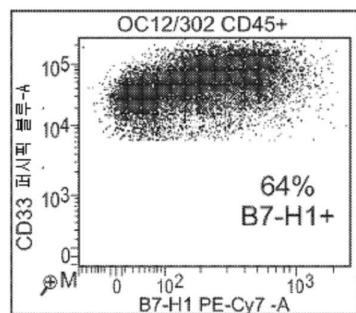
도면4e



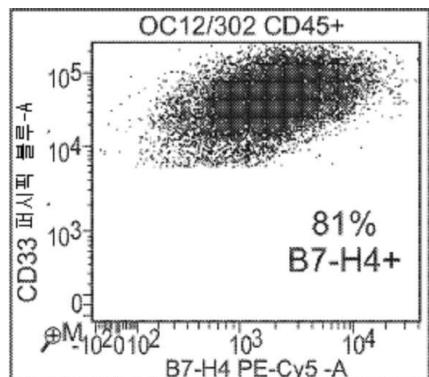
도면4f



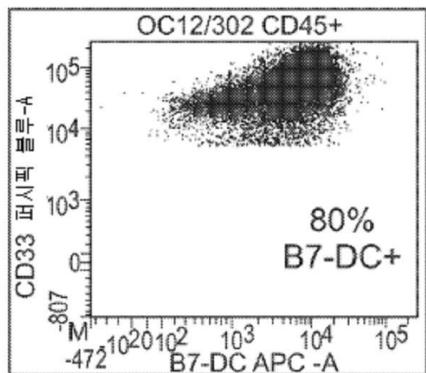
도면4g



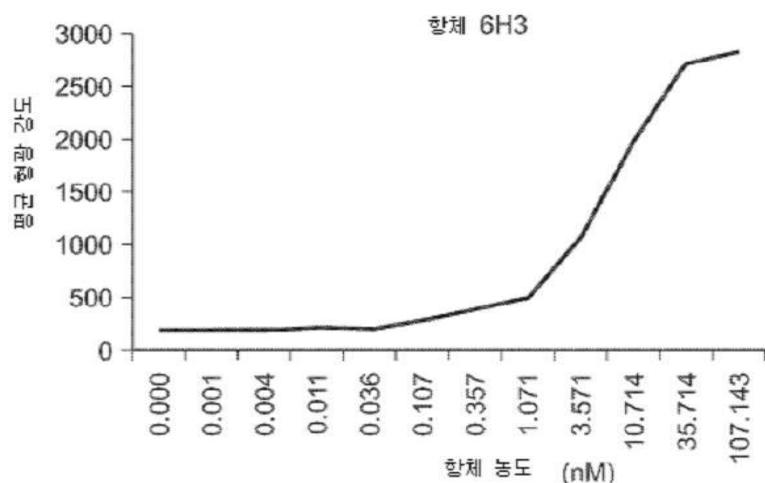
도면4h



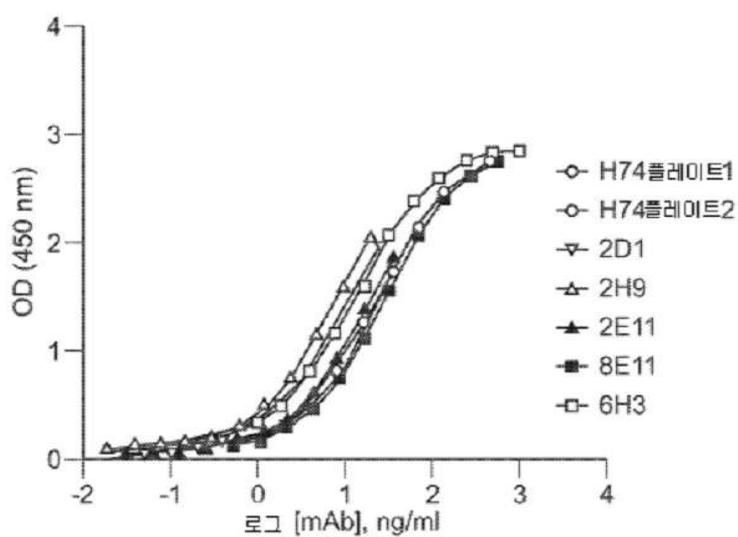
도면4*i*



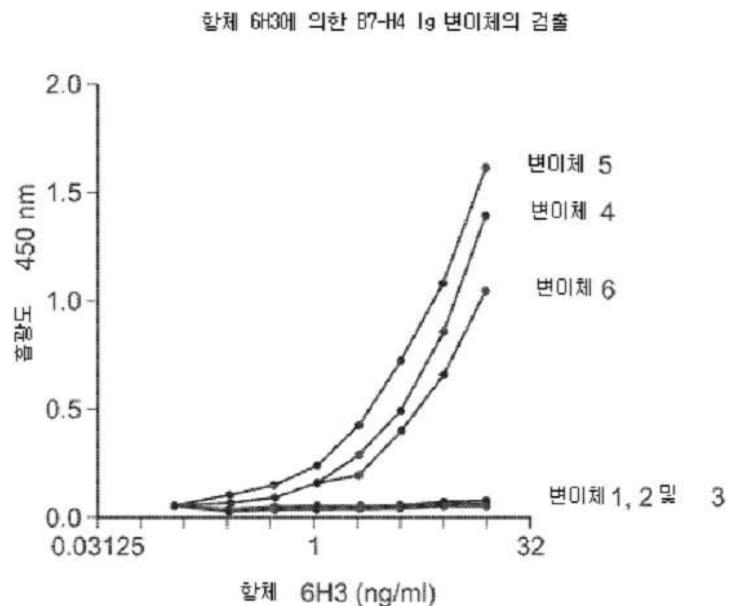
도면5



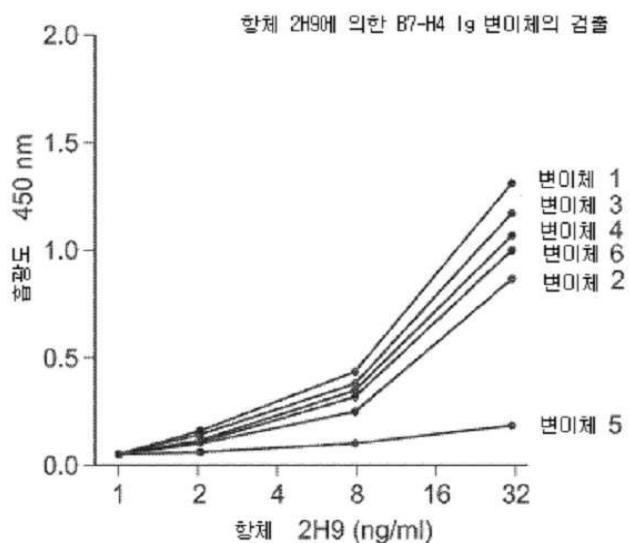
도면6



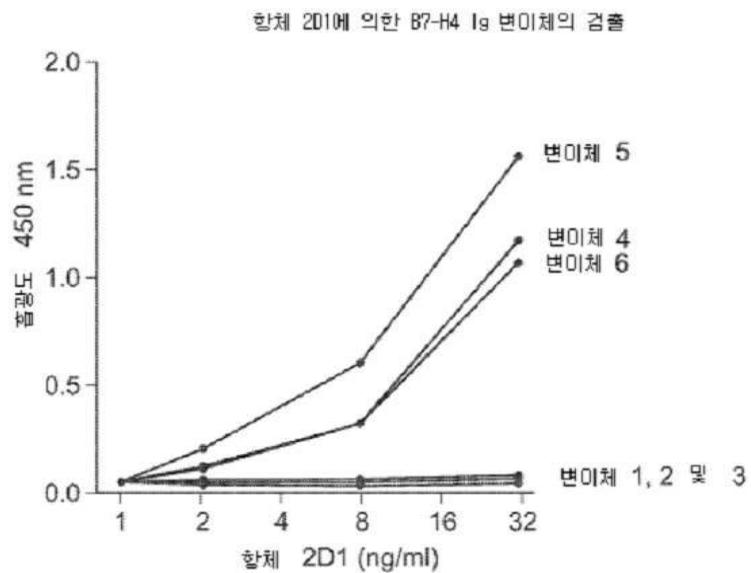
도면7



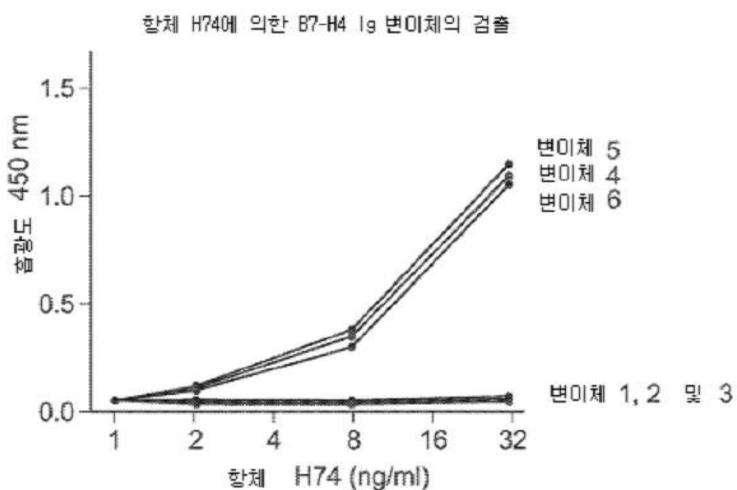
도면8a



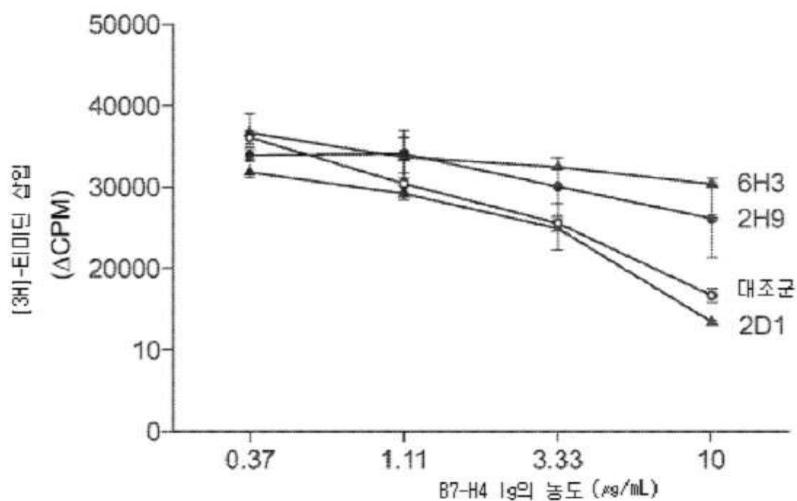
도면8b



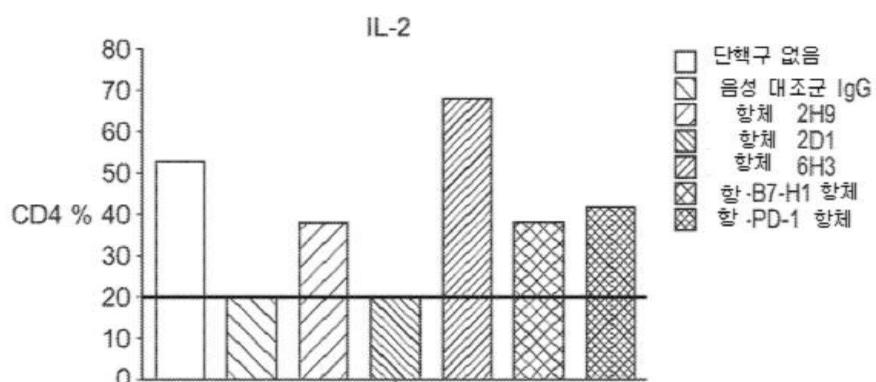
도면8c



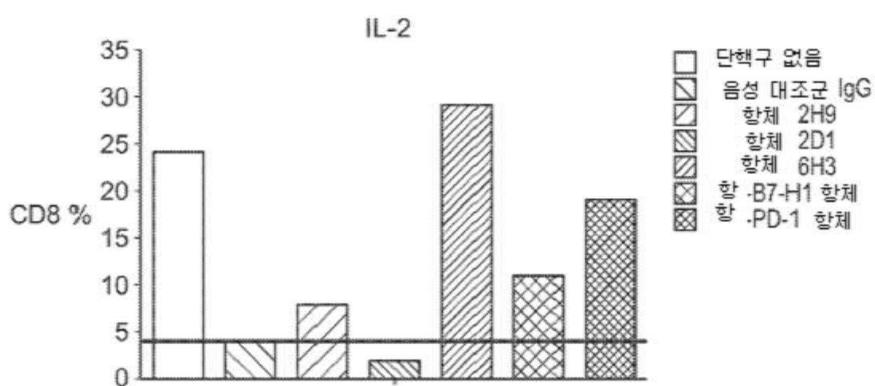
도면9



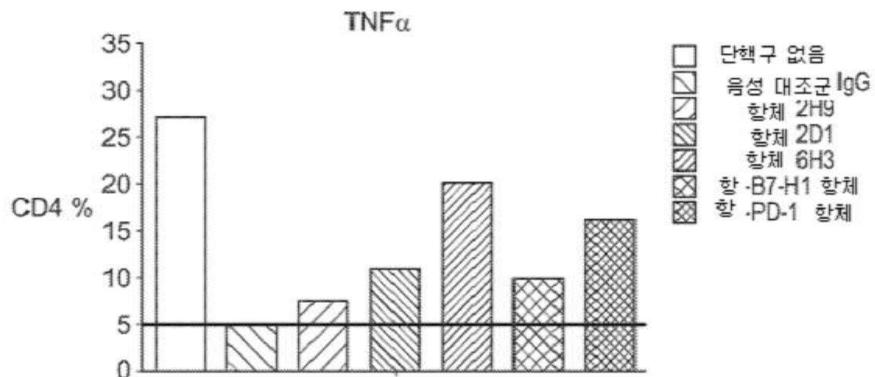
도면10a



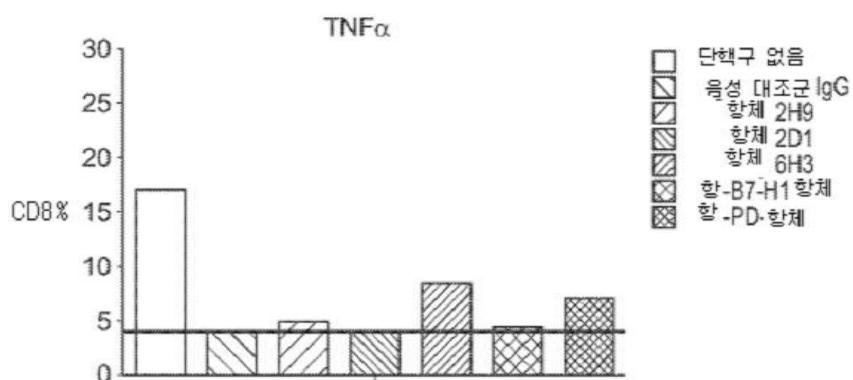
도면10b



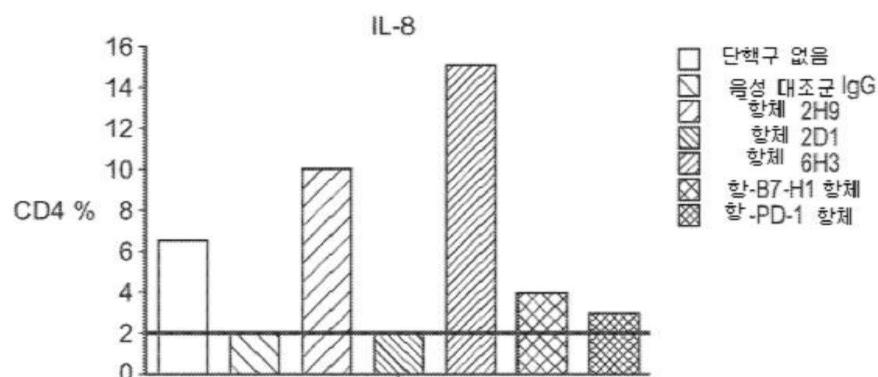
도면10c



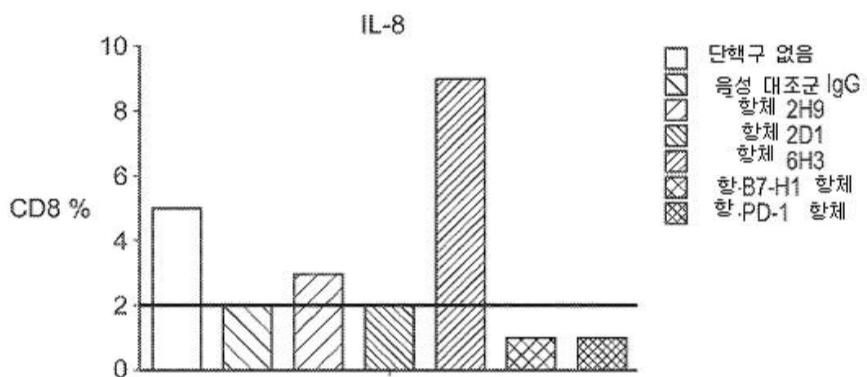
도면10d



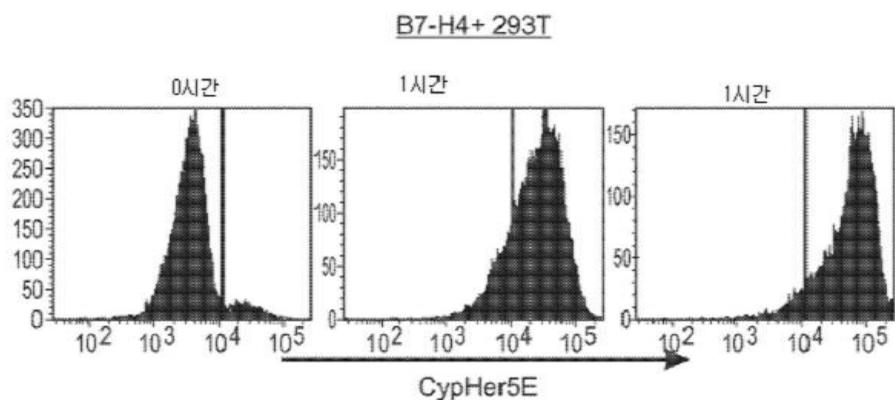
도면10e



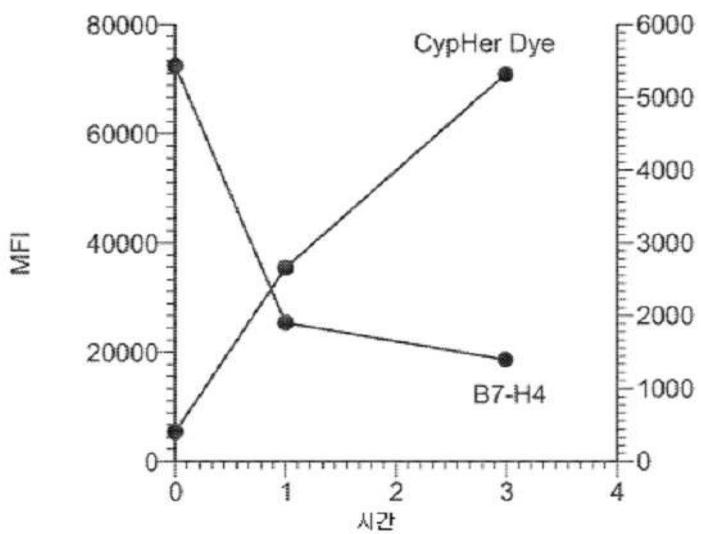
도면10f



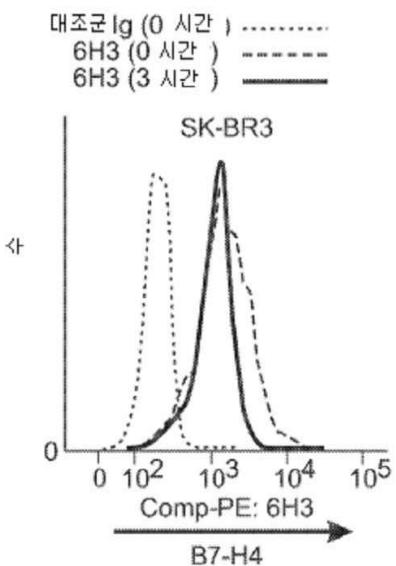
도면11a



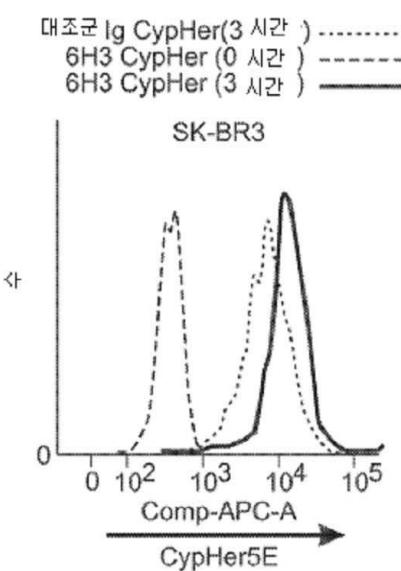
도면11b



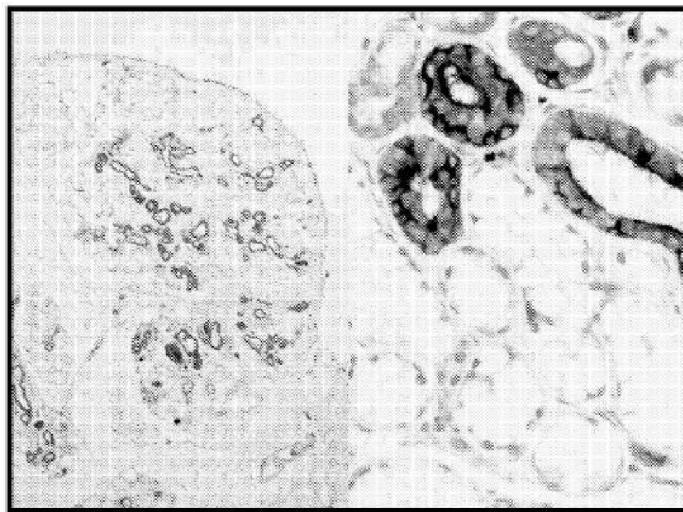
도면12a



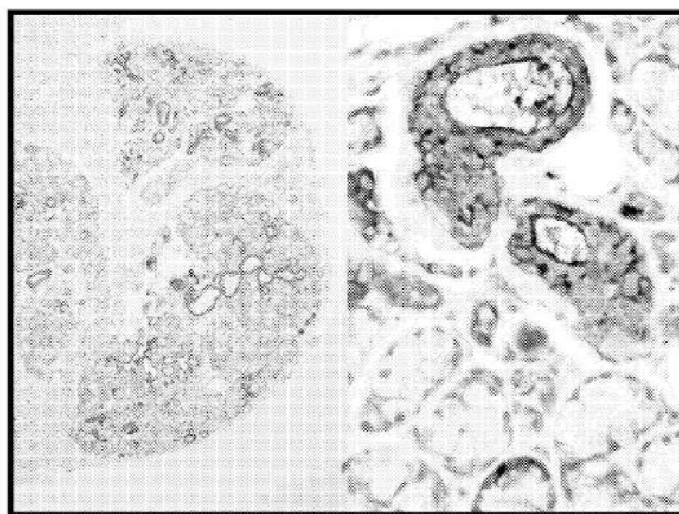
도면12b



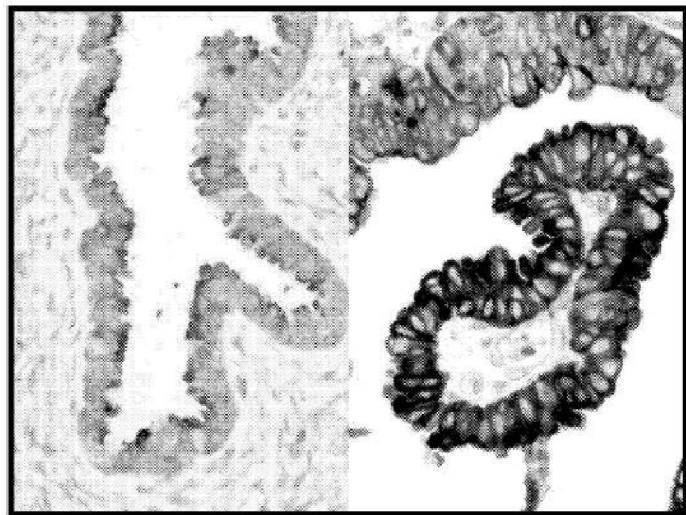
도면13a



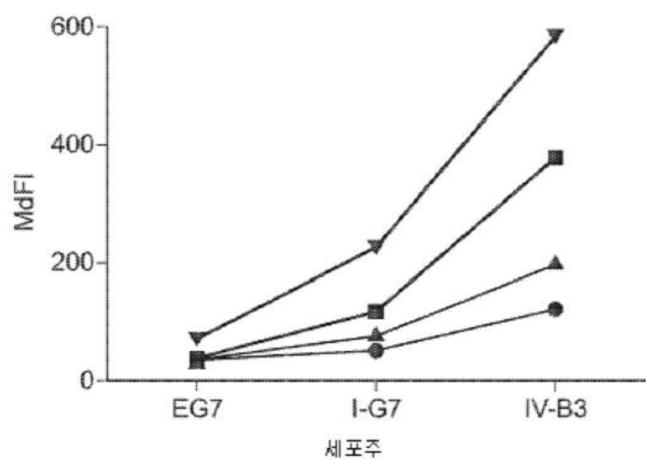
도면13b



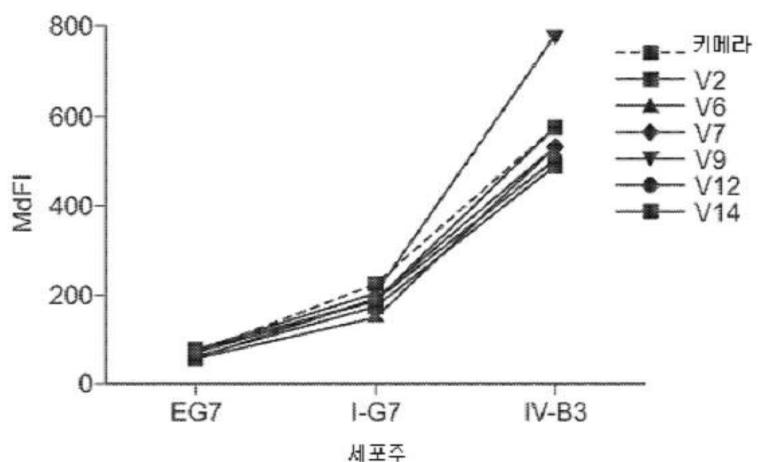
도면13c



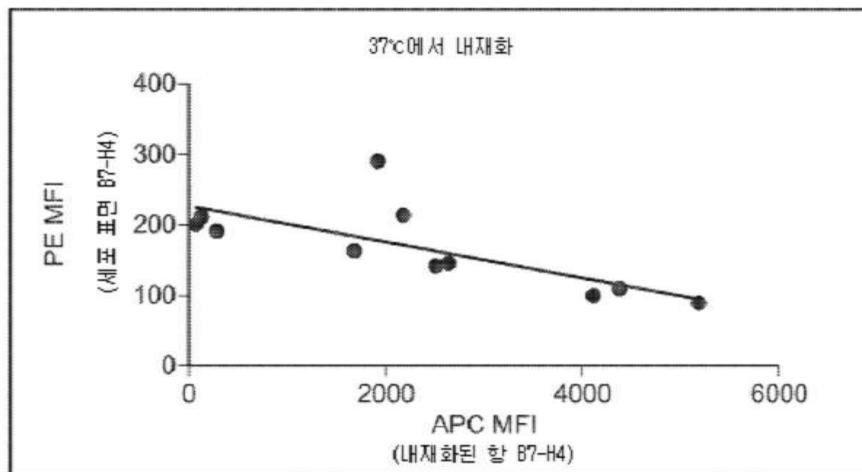
도면14



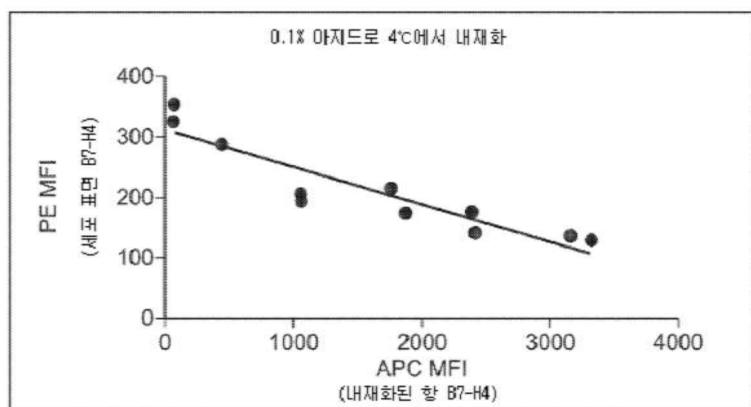
도면15



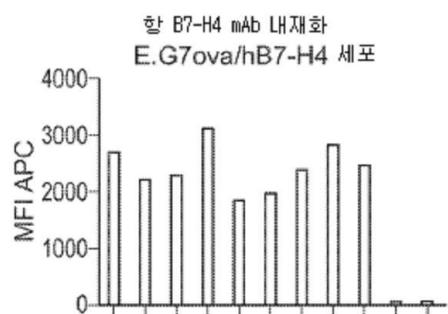
도면16



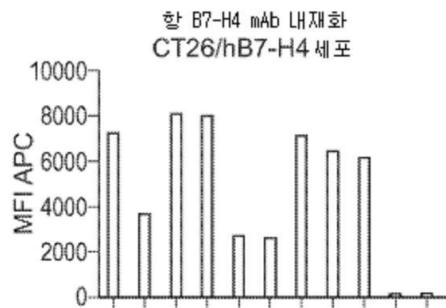
도면17



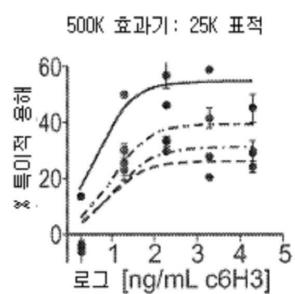
도면18a



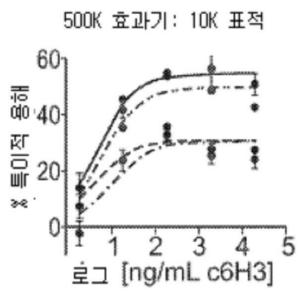
도면18b



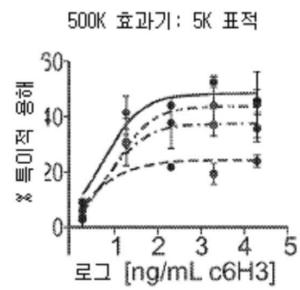
도면19a



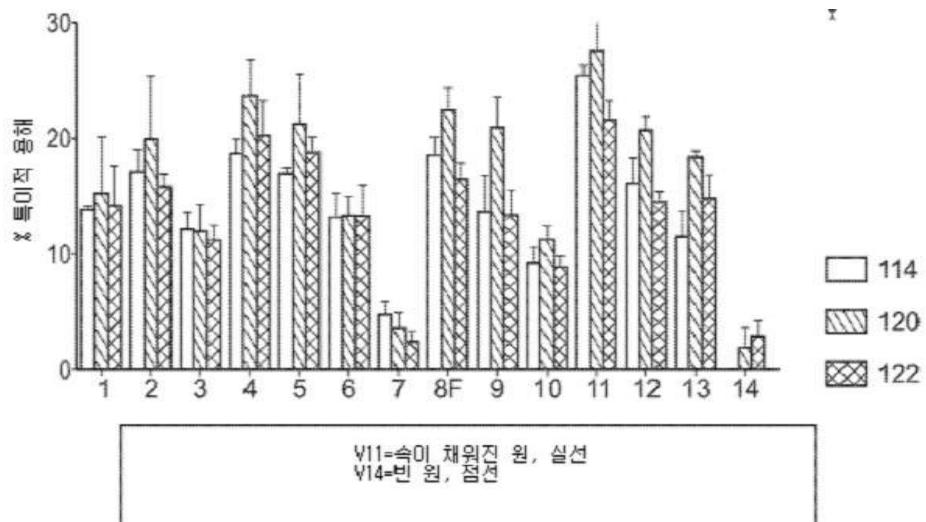
도면19b



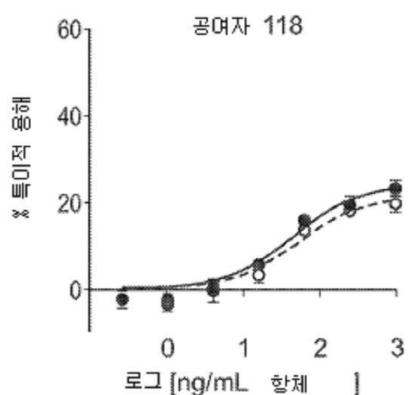
도면19c



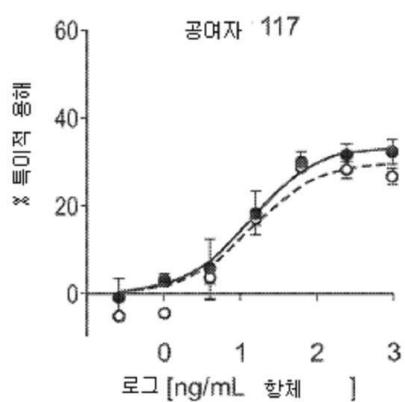
도면20



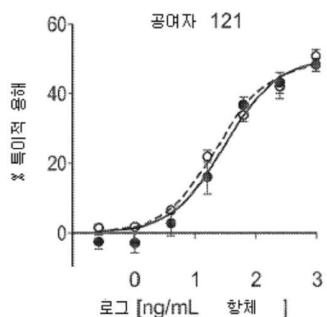
도면21a



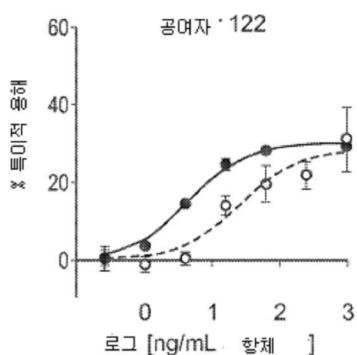
도면21b



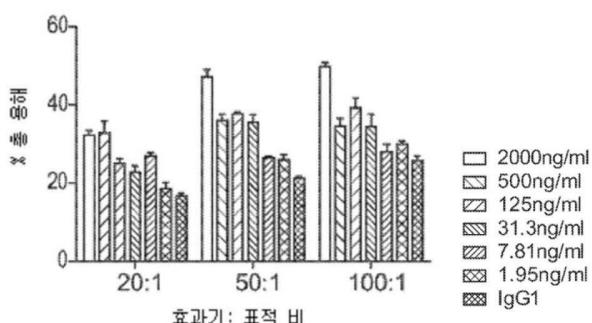
도면21c



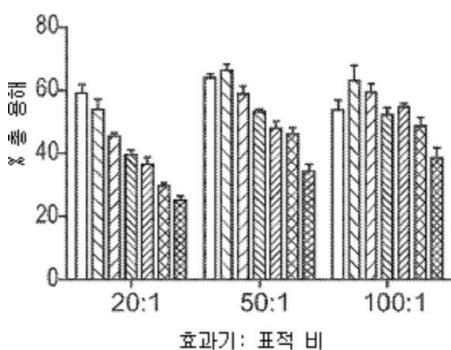
도면21d



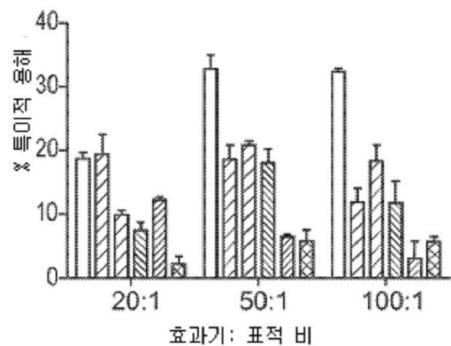
도면22a



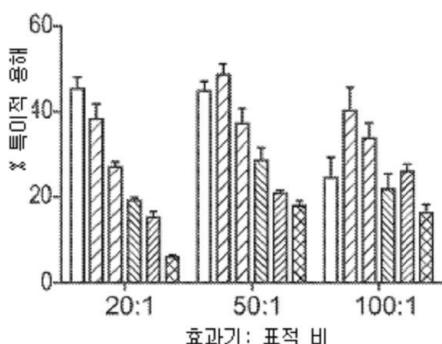
도면22b



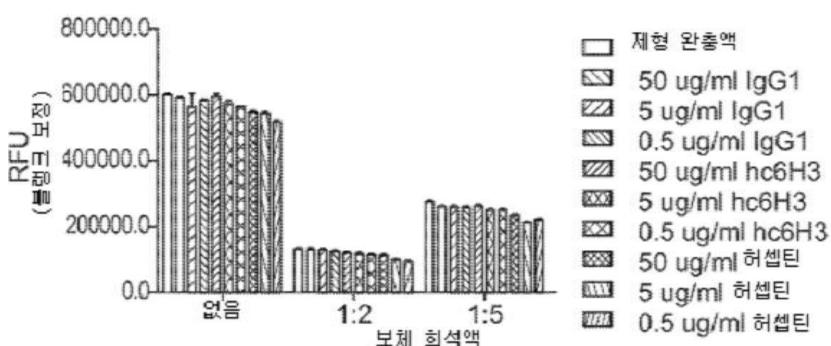
도면23a



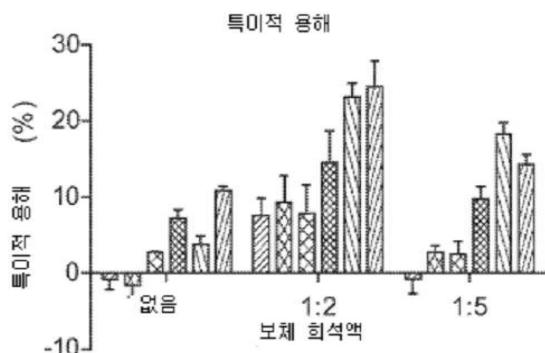
도면23b



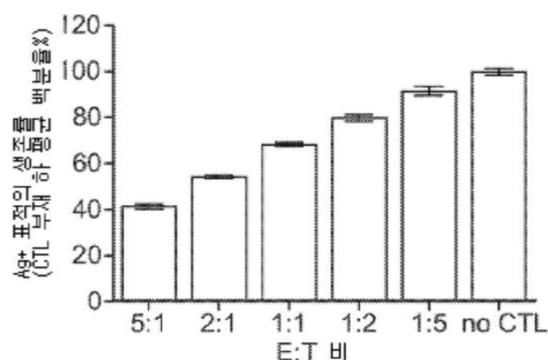
도면24a



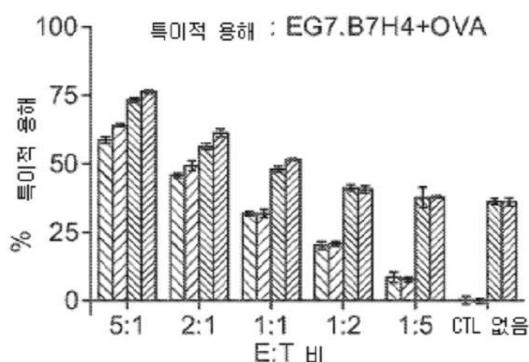
도면24b



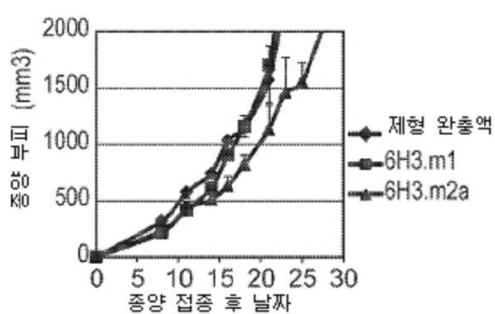
도면25



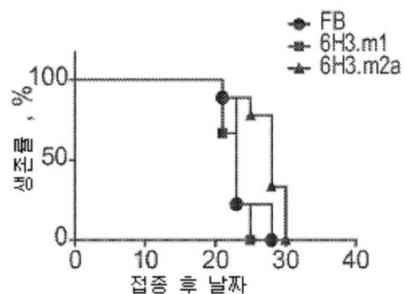
도면26



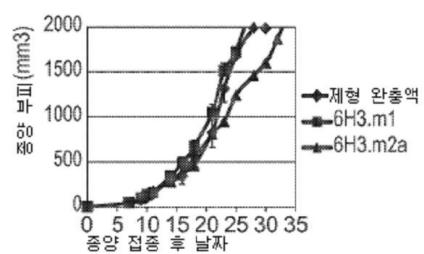
도면27a



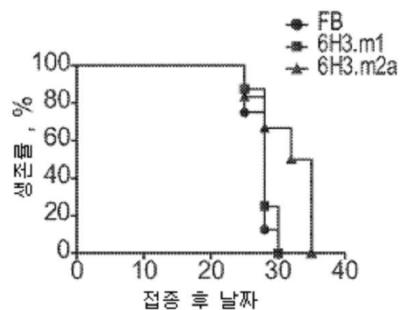
도면27b



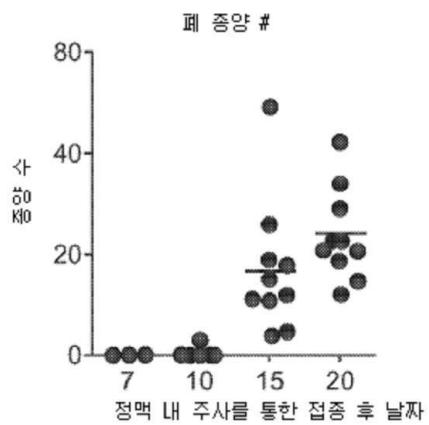
도면28a



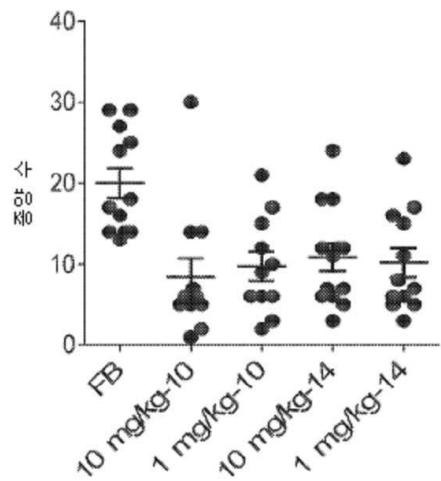
도면28b



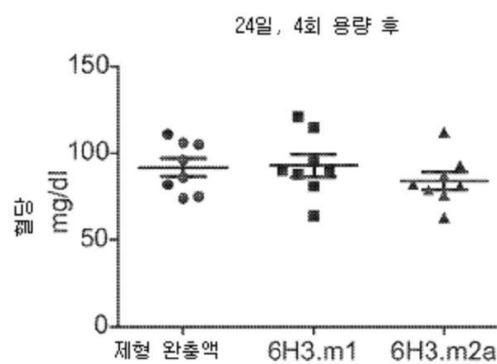
도면29a



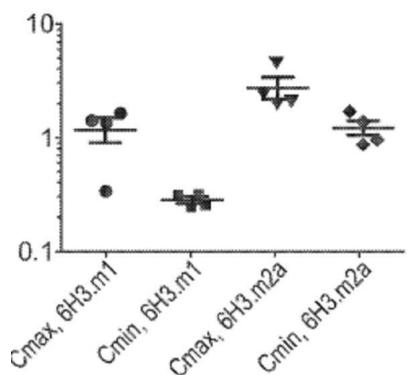
도면29b



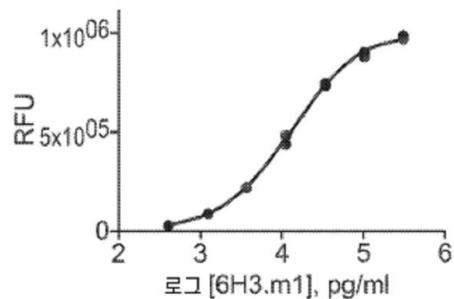
도면30



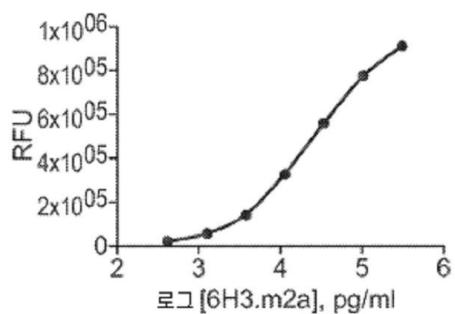
도면31



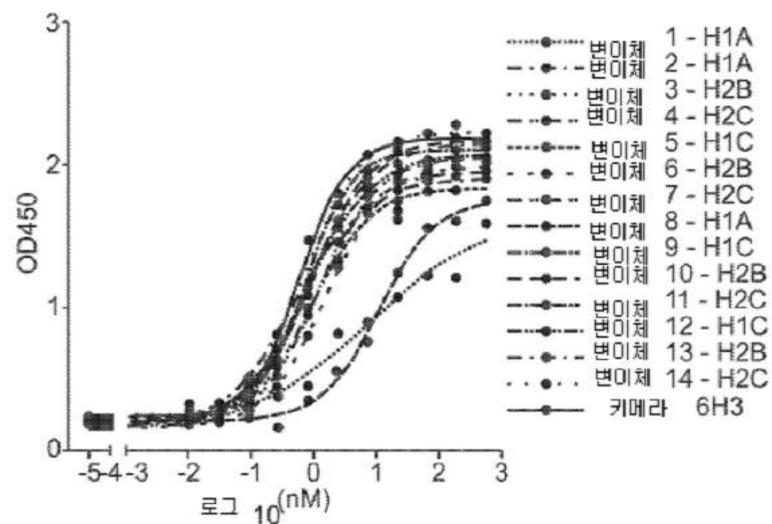
도면32a



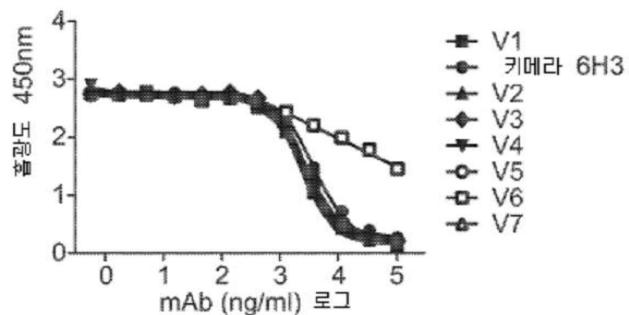
도면32b



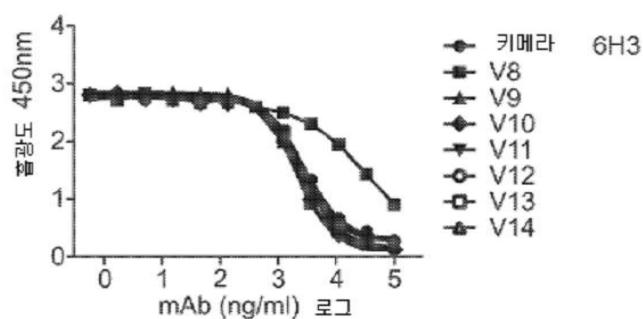
도면33



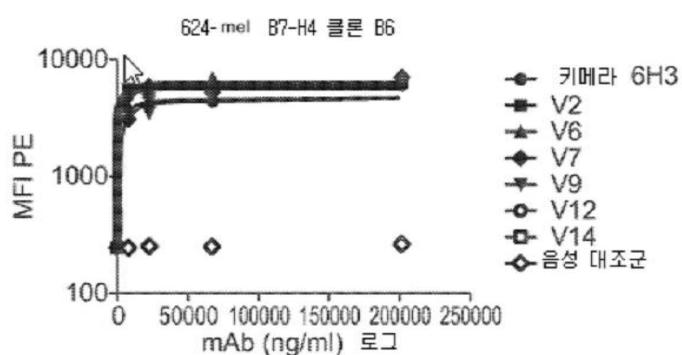
도면34a



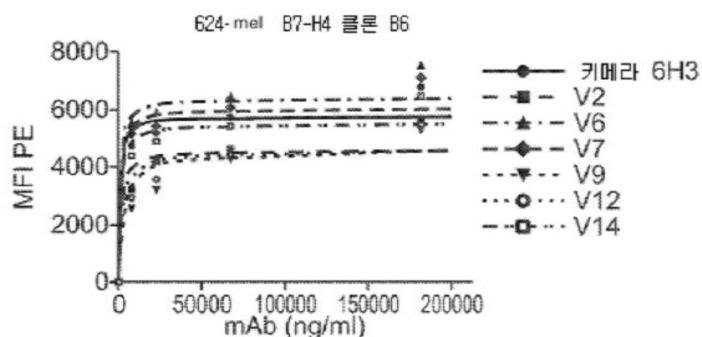
도면34b



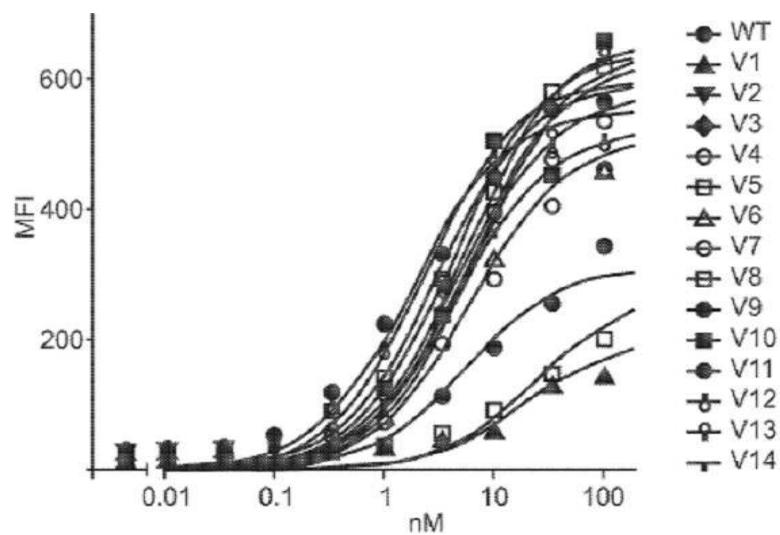
도면35a



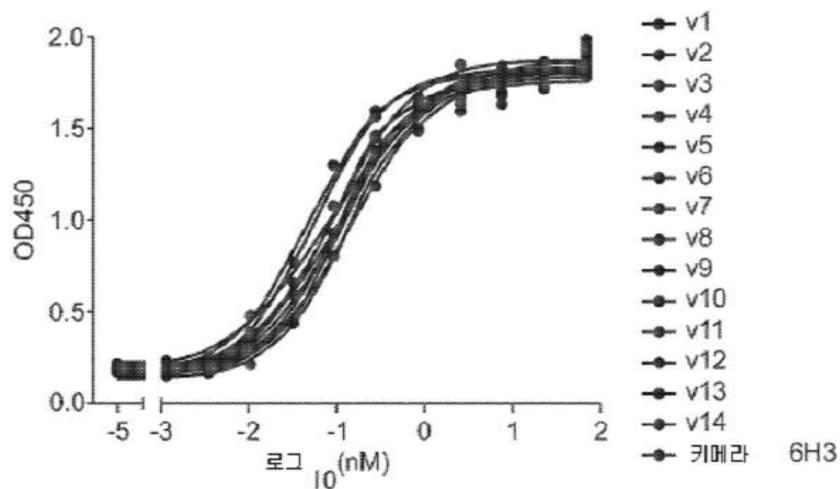
도면35b



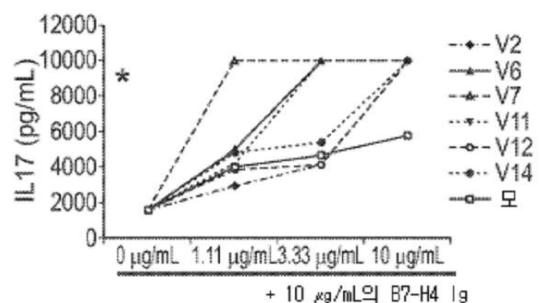
도면36



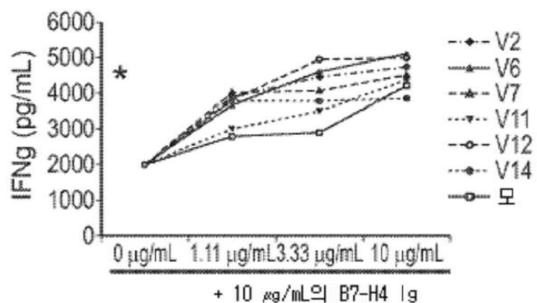
도면37



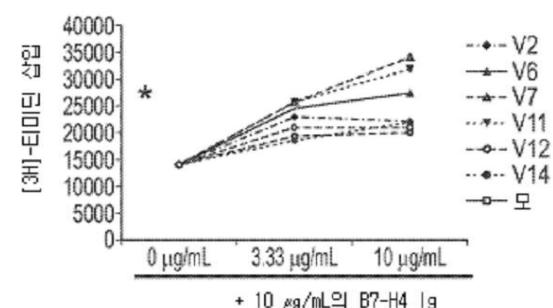
도면38a



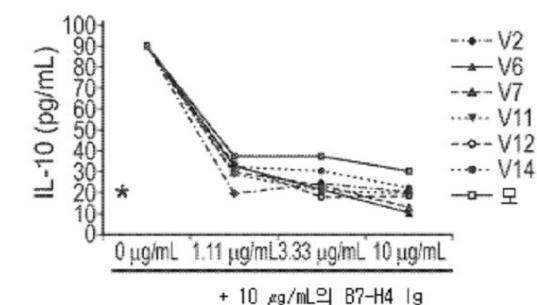
도면38b



도면38c



도면38d



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Amplimmune, Inc.

Johns Hopkins University

Langermann, Solomon

Yao, Sheng

Overstreet, Michael Glen

Liu, Linda

Chen, Lieping

<120> Anti-Human B7-H4 Antibodies and Their Uses

<130> AMP h841 PCT
 <150> US 61/739,272
 <151> 2012-12-19
 <150> US 61/739,287
 <151> 2012-12-19
 <150> US 61/739,353
 <151> 2012-12-19
 <160> 31
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 282
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile Ile

1	5	10	15
---	---	----	----

Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser

20	25	30
----	----	----

Gly Lys His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val

65	70	75	80
----	----	----	----

His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met

85	90	95
----	----	----

Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn

100	105	110
-----	-----	-----

Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr

115	120	125
-----	-----	-----

Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Asn Ala Asn Leu Glu

130	135	140
-----	-----	-----

Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn
 145 150 155 160
 Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln
 165 170 175

Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser
 180 185 190

Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met
 195 200 205

Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser
 210 215 220

Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val
 225 230 235 240

Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser
 245 250 255

Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu
 260 265 270

Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys
 275 280

<210> 2

<211> 283

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Ile Phe Trp Ser Ile Ile Asn Ile Ile
 1 5 10 15

Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser
 20 25 30

Gly Lys His Phe Ile Thr Val Thr Phe Thr Ser Ala Gly Asn Ile
 35 40 45

Gly Glu Asp Gly Thr Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu
 50 55 60

Asn Gly Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Ile Lys Gly Leu Val

65	70	75	80
His	Glu	Phe	Lys
Glu	Gly	Gly	Lys
	Asp	Asp	Leu
		Ser	Gln
			Gln
			His
			Glu
			Met

85	90	95	
Phe	Arg	Gly	Arg
Thr	Ala	Val	Phe
			Ala
			Asp
			Gln
			Val
			Val
			Gly
			Asn

100	105	110	
Ala	Ser	Leu	Arg
			Leu
			Lys
			Asn
			Val
			Gln
			Leu
			Thr
			Asp
			Ala
			Gly
			Thr
			Tyr

115	120	125	
Thr	Cys	Tyr	Ile
			Arg
			Thr
			Ser
			Lys
			Gly
			Lys
			Asn
			Ala
			Asn
			Leu
			Glu

130	135	140	
Tyr	Lys	Thr	Gly
			Ala
			Phe
			Ser
			Met
			Pro
			Glu
			Ile
			Asn
			Val
			Asp
			Tyr
			Asn

145	150	155	160
Ala	Ser	Ser	Glu
			Arg
			Cys
			Glu
			Ala
			Pro
			Arg
			Trp
			Phe
			Pro
			Gln

165	170	175	
Ala	Ser	Ser	Glu
			Arg
			Cys
			Glu
			Ala
			Pro
			Arg
			Trp
			Phe
			Pro
			Gln

180	185	190	
Pro	Thr	Val	Ala
			Trp
			Ala
			Ser
			Gln
			Val
			Asp
			Gln
			Gly
			Ala
			Asn
			Phe
			Ser

195	200	205	
Glu	Val	Ser	Asn
			Thr
			Ser
			Phe
			Glu
			Leu
			Asn
			Ser
			Glu
			Asn
			Val
			Thr
			Met

210	215	220	
Lys	Val	Val	Ser
			Val
			Leu
			Tyr
			Asn
			Val
			Thr
			Ile
			Asn
			Asn
			Thr
			Tyr
			Ser

225	230	235	240
Cys	Met	Ile	Glu
			Asn
			Asp
			Ile
			Ala
			Lys
			Ala
			Thr
			Gly
			Asp
			Ile
			Lys
			Val
			Gly
			Asn
			Val
			Thr
			Leu
			Asp
			Ile
			Asn
			Asn
			Leu
			Asn
			Asn
			Thr
			Tyr
			Ser

245	250	255	
Thr	Asp	Ser	Glu
			Val
			Lys
			Arg
			Arg
			Ser
			Gln
			Leu
			Gln
			Leu
			Leu
			Asn
			Ser
			Gly
			Pro
			Ser
			Cys
			Val
			Phe
			Ser
			Ala
			Phe
			Val
			Ala
			Gly
			Trp
			Ala

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 3

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ile

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 4

<211> 337

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gatgttgtga tgacccaaac tcctctctcc ctgcctgtca gtctggaga tcaaggctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagcctgtta cacattaatg gaaacaccta ttacattgg 120

tacctgcaga agccagggca gtctccaaag gtcctgtatc acaaagttt caaccgattt 180

tctgggttcc cagacagggtt cagtggcagt ggatcaggga cagattcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgtt ctcaaagtac acatgttccg 300

ctcacgttcg gtgctggac caagctggag ctgaaac 337

<210> 5

<211> 115

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 5

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Val Ser Ala
 115

<210> 6

<211> 345

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gagggtccagc tgcaacagtc tggacctgta ctggtaagc ctgggacttc agtgaagatg	60
tccctgttaagg cttctggata cacattcaact gactactata tgaactgggt gaagcagagc	120
catggaaaga gtcttgagtg gattggagtt attaatcctt acaacggta cactacctac	180
aaccagaagt tcaaggcca ggccacattg actgttgaca agtcccttag cacagcctac	240
atggagggtca acagccgtac atttgaggac tctgcgtct attactgtgc aagatacccg	300
gagagtactt actggggcca agggactctg gtcaactgtct ctgca	345

<210>

7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 7

Lys Arg Arg Ser Lys Gln Gln Ser

1 5

<210> 8

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 8

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Asp Asn Tyr

20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Glu Thr Asp Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp

85 90 95

Glu Gly Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser His Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 10

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser His Ser Leu Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ile Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 11

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 11

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser His

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Asp Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser His Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Gly Gly Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ala

115

<210> 12

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Asn Gln Arg Thr Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Tyr Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu

100 105 110

Lys

<210> 13

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Lys Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

100	105	110
-----	-----	-----

Val Ser Ser

115

<210> 14

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp

35	40
----	----

<210> 15

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Gly Leu Val His Ser

20	25	30
----	----	----

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp

35	40
----	----

<210> 16

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala

35 40

<210> 17

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Gly Asp Gly

1 5 10 15

Asp Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Val Ala Arg

20 25 30

Asp Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr

35 40

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp 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 Ser Gln Ser

85	90	95
Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	110
<210> 19		
<211> 112		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		

<220><223> Antibody		
<400> 19		
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly		
1	5	10
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ile		
20	25	30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser		
35	40	45
Pro Arg Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro		
50	55	60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
65	70	75
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser		
85	90	95
Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		

100	105	110
<210> 20		
<211> 112		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Antibody		
<400> 20		

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

20	25	30	
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser			
35	40	45	
Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
50	55	60	
Asp Arg Phe 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 Phe Cys Ser Gln Ser			
85	90	95	
Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105	110	
<210> 21			
<211> 112			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Antibody			
<400> 21			
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly			
1	5	10	15

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser			
85	90	95	
Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105	110	
<210> 22			

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Arg Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 23

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

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

Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100	105	110
-----	-----	-----

<210> 24

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody

<400> 24

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 Asp Tyr

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 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 Tyr Pro Glu Ser Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100	105	110
-----	-----	-----

Val Ser Ser

115

<210> 25

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody

<400> 25

Glu 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 Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 26

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody

<400> 26

Glu 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 Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

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

100	105	110
Val Ser Ser		
115		
<210> 27		
<211> 115		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Antibody		
<400> 27		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Met Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		
20	25	30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Met		

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

100	105	110
Val Ser Ser		
115		
<210> 28		

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Met 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

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Val Ala Val Asp Lys Ser Ala Thr 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 Tyr Pro Glu Ser Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 29

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Met 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

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

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

100	105	110
-----	-----	-----

Val Ser Ser

115

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide

<400> 30

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1	5	
---	---	--

<210> 31

<211> 454

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion Protein

<400> 31

Gly Phe Gly Ile Ser Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Ala Gly Asn Ile Gly Glu Asp Gly Ile Gln Ser Cys Thr Phe Glu

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Val Leu Gly Leu Val His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser

50	55	60
----	----	----

Glu Gln Asp Glu Met Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln
 65 70 75 80
 Val Ile Val Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr
 85 90 95
 Asp Ala Gly Thr Tyr Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly
 100 105 110
 Asn Ala Asn Leu Glu Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val
 115 120 125
 Asn Val Asp Tyr Asn Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro
 130 135 140
 Arg Trp Phe Pro Gln Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln
 145 150 155 160
 Gly Ala Asn Phe Ser Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser
 165 170 175
 Glu Asn Val Thr Met Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile
 180 185 190
 Asn Asn Thr Tyr Ser Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr
 195 200 205
 Gly Asp Ile Lys Val Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

305	310	315	320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro			
325	330	335	
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
340	345	350	
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn			
355	360	365	
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile			
370	375	380	
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr			
385	390	395	400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys			
405	410	415	
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys			
420	425	430	
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu			
435	440	445	
Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
450			