(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0005109
(43) 공개일자 2025년01월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61K 47/6803 (2023.08)
(21) 출원번호 10-2024-7033695
(22) 출원일자(국제) 2023년04월14일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년10월10일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2023/088417
(87) 국제공개번호 WO 2023/198194
국제공개일자 2023년10월19일
(30) 우선권주장
PCT/CN2022/087003 2022년04월15일 중국(CN)

(71) 출원인
바이오사이토젠 파마슈티컬스 (베이징) 컴퍼니 리미티드
중국, 베이징 102629, 다싱 디스트릭트, 다싱 바이오-메디슨 인더스트리 파크, 바오션 사우스 스트리트, 넘버 12
(72) 발명자
리우 야쿠이
중국 베이징 102600 다싱 디스트릭트 다싱 바이오-메디슨 인더스트리 파크 바오션 사우스 스트리트 넘버 12
티안 마오펭
중국 베이징 102600 다싱 디스트릭트 다싱 바이오-메디슨 인더스트리 파크 바오션 사우스 스트리트 넘버 12
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

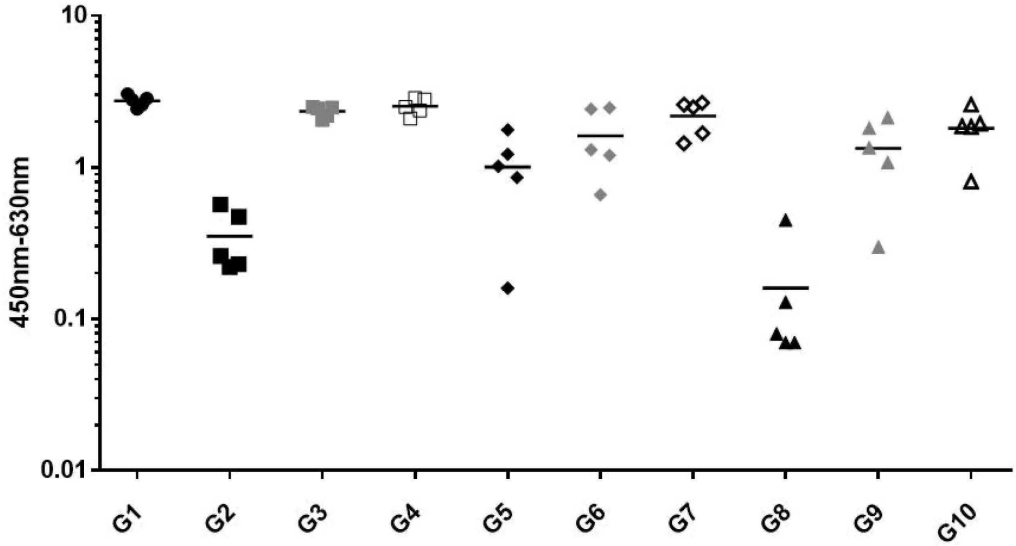
전체 청구항 수 : 총 61 항

(54) 발명의 명칭 **항-CD40 항체 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 개시는 항-CD40(TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 5) 항체, 이의 항원 결합 단편 및 이의 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 37/00 (2018.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/71 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자
양 팡
중국 베이징 102600 다싱 디스트릭트 다싱 바이오-메디슨 인더스트리 파크 바오션 사우스 스트리트 넘버 12
양 이
중국 베이징 102600 다싱 디스트릭트 다싱 바이오-메디슨 인더스트리 파크 바오션 사우스 스트리트 넘버 12

명 세 서

청구범위

청구항 1

CD40(TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 5)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서:

상보성 결정 영역(CDR) 1, 2, 및 3을 포함하고, 상기 VH CDR1 영역은 선택된 VH CDR1 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH CDR2 영역은 선택된 VH CDR2 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VH CDR3 영역은 선택된 VH CDR3 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 중쇄 가변 영역(VH); 및

CDR 1, 2 및 3을 포함하고, 상기 VL CDR1 영역은 선택된 VL CDR1 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL CDR2 영역은 선택된 VL CDR2 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 상기 VL CDR3 영역은 선택된 VL CDR3 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며,

상기 선택된 VH CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열 및 상기 선택된 VL CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열은 하기 중 하나 이상인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

(1) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 1, 2, 3에 제시되고, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 4, 5, 6에 제시됨;

(2) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 7, 8, 9에 제시되고, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 10, 11, 12에 제시됨;

(3) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 13, 14, 15에 제시되고, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 16, 17, 18에 제시됨;

(4) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 19, 20, 21에 제시되고, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 22, 23, 24에 제시됨;

(5) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 25, 26, 27에 제시되고, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 28, 29, 30에 제시됨; 및

(6) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 31, 32, 33에 제시되고, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 34, 35, 36에 제시됨.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 VH는 각각 서열 번호: 1, 2 및 3에 제시된 상기 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하며, 상기 VL은 각각 서열 번호: 4, 5 및 6에 제시된 상기 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 VH는 각각 서열 번호: 7, 8 및 9에 제시된 상기 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하며, 상기 VL은 각각 서열 번호: 10, 11 및 12에 제시된 상기 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 VH는 각각 서열 번호: 13, 14 및 15에 제시된 상기 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하며, 상기 VL은 각각 서열 번호: 16, 17 및 18에 제시된 상기 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 VH는 각각 서열 번호: 19, 20 및 21에 제시된 상기 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하며, 상기 VL은 각각 서열 번호: 22, 23 및 24에 제시된 상기 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 VH는 각각 서열 번호: 25, 26 및 27에 제시된 상기 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하며, 상기 VL은 각각 서열 번호: 28, 29 및 30에 제시된 상기 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 VH는 각각 서열 번호: 31, 32 및 33에 제시된 상기 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하며, 상기 VL은 각각 서열 번호: 34, 35 및 36에 제시된 상기 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간, 원숭이 또는 개 CD40에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 단쇄 가변 단편(scFv) 및/또는 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (선택적으로 YTE 및/또는 LALA 돌연변이를 갖는) 인간 IgG1 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 (선택적으로 YTE를 갖는) 인간 IgG4 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 11

폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산으로서:

(1) 각각 서열 번호: 1, 2 및 3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하며, 상기 VH는 서열 번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 이루는 경우 CD40에 결합하는, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편;

(2) 각각 서열 번호: 4, 5 및 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 VL을 포함하며, 상기 VL은 서열 번호: 65에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH와 쌍을 이루는 경우 CD40에 결합하는, 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편;

(3) 각각 서열 번호: 7, 8 및 9에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하며, 상기 VH는 서열 번호: 39에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 이루는 경우 CD40에 결합하는, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편;

(4) 각각 서열 번호: 10, 11 및 12에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 VL을 포함하며, 상기 VL은 서열 번호: 38에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH와 쌍을 이루는 경우 CD40에 결합하는, 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편;

(5) 각각 서열 번호: 13, 14 및 15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 VH를 포함하며, 상기 VH는 서열 번호: 41에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 이루는 경우 CD40에 결합하는, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편; 또는

(6) 각각 서열 번호: 16, 17 및 18에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL을 포함하며, 상기 VL은 서열 번호: 40에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH와 쌍을 이루는 경우 CD40에 결합하는,

면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편을 포함하는, 핵산.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 핵산은 각각 서열 번호: 1, 2 및 3에 제시된 상기 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH를 포함하는 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 핵산.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 핵산은 각각 서열 번호: 4, 5 및 6에 제시된 상기 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL을 포함하는 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 핵산.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 핵산은 각각 서열 번호: 7, 8 및 9에 제시된 상기 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH를 포함하는 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 핵산.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 핵산은 각각 서열 번호: 10, 11 및 12에 제시된 상기 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL을 포함하는 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 핵산.

청구항 16

제11항에 있어서, 상기 핵산은 각각 서열 번호: 13, 14 및 15에 제시된 상기 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH를 포함하는 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 핵산.

청구항 17

제11항에 있어서, 상기 핵산은 각각 서열 번호: 16, 17 및 18에 제시된 상기 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL을 포함하는 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 핵산.

청구항 18

제11항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 VH는 VL과 쌍을 이루는 경우 인간, 원숭이 또는 개 CD40에 특이적으로 결합하거나, 상기 VL은 VH와 쌍을 이루는 경우 인간, 원숭이 또는 CD40에 특이적으로 결합하는, 핵산.

청구항 19

제11항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린 중쇄 또는 상기 이의 단편은 인간 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편(예를 들어, 선택적으로 YTE 및/또는 LALA 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 중쇄 또는 이의 단편; 또는 선택적으로 YTE를 갖는 인간 IgG4 중쇄 또는 이의 단편)이며, 상기 면역글로불린 경쇄 또는 상기 이의 단편은 인간 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편인, 핵산.

청구항 20

제11항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산은 단쇄 가변 단편(scFv) 또는 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)를 코딩하는, 핵산.

청구항 21

제11항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산은 cDNA인, 핵산.

청구항 22

제11항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 핵산 중 하나 이상을 포함하는, 벡터.

청구항 23

제11항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 핵산 중 두 가지를 포함하는 벡터로서, 상기 벡터는 CD40에 함께 결합하는 상기 VL 영역 및 상기 VH 영역을 코딩하는, 벡터.

청구항 24

벡터 쌍으로서, 각 벡터는 제11항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 핵산 중 하나를 포함하며, 상기 벡터 쌍은 CD40에 함께 결합하는 상기 VL 영역 및 상기 VH 영역을 공통으로 코딩하는, 벡터 쌍.

청구항 25

제22항 또는 제23항에 따른 벡터 또는 제24항에 따른 벡터 쌍을 포함하는, 세포.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 세포는 CHO 세포인 것인, 세포.

청구항 27

제11항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 핵산 중 하나 이상을 포함하는, 세포.

청구항 28

제11항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 핵산 중 두 가지를 포함하는, 세포.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 두 가지 핵산은 CD40에 함께 결합하는 상기 VL 영역 및 상기 VH 영역을 공통으로 코딩하는, 세포.

청구항 30

항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생성하는 방법으로서, 상기 방법은

(a) 제25항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 세포가 상기 항체 또는 상기 항원 결합 단편을 생성하기에 충분한 조건 하에서 상기 세포를 배양하는 단계; 및

(b) 상기 세포에 의해 생성되는 상기 항체 또는 상기 항원 결합 단편을 수집하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 31

CD40에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서

선택된 VH 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 선택된 VL 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며, 상기 선택된 VH 서열 및 상기 선택된 VL 서열은:

(1) 상기 선택된 VH 서열이 서열 번호: 65이고, 상기 선택된 VL 서열이 서열 번호: 37이며;

(2) 상기 선택된 VH 서열이 서열 번호: 38이고, 상기 선택된 VL 서열이 서열 번호: 39이며; 또는

(3) 상기 선택된 VH 서열이 서열 번호: 40이고, 상기 선택된 VL 서열이 서열 번호: 41인 것 중 하나인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 VH는 상기 서열 번호: 65의 서열을 포함하며, 상기 VL은 상기 서열 번호: 37의 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 33

제31항에 있어서, 상기 VH는 상기 서열 번호: 38의 서열을 포함하며, 상기 VL은 상기 서열 번호: 39의 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 34

제31항에 있어서, 상기 VH는 상기 서열 번호: 40의 서열을 포함하며, 상기 VL은 상기 서열 번호: 41의 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 35

제31항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 인간, 원숭이 또는 개 CD40에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 36

제31항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 단쇄 가변 단편(scFv) 및/또는 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 37

제31항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 (선택적으로 YTE 및/또는 LALA 돌연변이를 갖는) 인간 IgG1 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 (선택적으로 YTE를 갖는) 인간 IgG4 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 38

제1항 내지 제10항 및 제31항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 상기 VH CDR 1, 2, 3 및 상기 VL CDR 1, 2, 3을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 39

제1항 내지 제10항 및 제31항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 교차 경쟁하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 40

치료제에 공유 결합된 제1항 내지 제10항 및 제31항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 항체-약물 접합체.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 치료제는 세포독성제 또는 세포증식억제제인 것인, 항체-약물 접합체.

청구항 42

암이 있는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 치료적 유효량의 제1항 내지 제10항 및 제31항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제40항 또는 제41항에 따른 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 대상체는 고형 종양이 있는, 방법.

청구항 44

제42항에 있어서, 상기 암은 흑색종, 췌장암, 중피종 또는 혈액학적 악성 종양인, 방법.

청구항 45

제42항에 있어서, 상기 암은 비호지킨 림프종, 림프종 또는 만성 림프구성 백혈병인, 방법.

청구항 46

종양 성장의 속도를 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은

종양 세포를 유효량의 제1항 내지 제10항 및 제31항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제40항 또는 제41항에 따른 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 47

종양 세포를 사멸시키는 방법으로서, 상기 방법은

종양 세포를 유효량의 제1항 내지 제10항 및 제31항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제40항 또는 제41항에 따른 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 48

대상체의 면역 반응을 억제하는 방법으로서, 상기 방법은

상기 대상체에게 유효량의 제1항 내지 제10항 및 제31항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제40항 또는 제41항에 따른 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 대상체는 자가면역 질환이 있는, 방법.

청구항 50

자가면역 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은

상기 대상체에게 유효량의 제1항 내지 제10항 및 제31항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 제40항 또는 제41항에 따른 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 전신성 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 알레르기성 피부염 또는 다발성 경화증인, 방법.

청구항 52

제1항 내지 제10항 및 제31항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 53

제40항 또는 제41항에 따른 항체-약물 접합체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 54

Fc 영역을 포함하는 CD40(TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 5)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 상기 Fc 영역은 야생형 Fc 영역과 비교하여 ADCC 효과가 부족하거나 감소된 ADCC 효과를 갖는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 FcRn(예를 들어, 인간 FcRn) 사이의 KD는 1×10^{-5}M 미

만, 5×10^{-6}M 미만, 1×10^{-6}M 미만, 5×10^{-7}M 미만, 1×10^{-7}M 미만 또는 5×10^{-8}M 미만인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 56

제54항 또는 제55항에 있어서, 상기 Fc영역은 IgG1 또는 IgG4 서브타입인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 57

제54항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 영역은 YTE 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 58

제54항, 제55항 및 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 영역은 LALA 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 59

제1항 내지 제10항, 제31항 내지 제37항 및 제54항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 반감기는 대상체에게 투여되는 경우 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 3일, 적어도 4일, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 7일, 적어도 8일, 적어도 9일, 적어도 10일, 적어도 11일, 적어도 12일, 적어도 13일, 적어도 14일, 적어도 15일, 적어도 16일, 적어도 17일 또는 적어도 18일인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 대상체는 마우스인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 61

제59항 또는 제60항에 있어서, 상기 대상체는 인간 또는 인간화 CD40을 발현하도록 유전자 변형된, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **우선권 주장**

[0002] 본 출원은 2022년 4월 15일 출원된 PCT 출원 제PCT/CN2022/087003호의 이익을 청구한다. 전술한 출원의 전체 내용이 인용 방식을 통해 본원에 포함된다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 개시는 항-CD40(TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 5) 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 자가면역 질환은 정상적인 신체 부분에 대한 비정상적 면역 반응으로 인해 발생하는 병태이다. 자가면역 질환은 적어도 80가지 유형이 있다. 자가면역 질환의 원인은 일반적으로 잘 이해되지 않는다. 루푸스와 같은 일부 자가면역 질환은 가족력으로 나타나며, 일부 다른 자가면역 질환은 감염이나 다른 환경 요인으로 인해 유발할 수 있다. 일부 자가면역 질환은 예를 들어, 셀리악병, 1형 당뇨병, 그레이브스병, 염증성 장 질환, 다발성 경화증, 건선, 류마티스 관절염, 전신성 홍반 루푸스를 포함한다.

[0006] 최근 치료용 항체의 임상적 및 상업적 성공으로 인해 항체를 사용하여 다양한 면역 관련 장애를 치료하는 수단에 대해 관심이 커지고 있다. 자가면역 질환을 치료하기 위한 다양한 항체 기반 치료제에 사용하기 위한 항체 개발이 필요하다.

발명의 내용

[0007] 본 개시는 항-CD40 항체, 이의 항원 결합 단편 및 이의 용도에 관한 것이다.

[0008] 일 양태에서, 본 개시는 CD40(TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 5)에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이며, 이는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)과 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하되, 일부 실시양태에서, VH CDR1 영역은 선택된 VH CDR1 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, VH CDR2 영역은 선택된 VH CDR2 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, VH CDR3 영역은 선택된 VH CDR3 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며; 일부 실시양태에서, VL CDR1 영역은 선택된 VL CDR1 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, VL CDR2 영역은 선택된 VL CDR2 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, VL CDR3 영역은 선택된 VL CDR3 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 일부 실시양태에서, 선택된 VH CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열과 선택된 VL CDR 1, 2 및 3 아미노산 서열은 하기 중 하나이다:

[0009] (1) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 1, 2, 3에 제시되고, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 4, 5, 6에 제시됨;

[0010] (2) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 7, 8, 9에 제시되고, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 10, 11, 12에 제시됨;

[0011] (3) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 13, 14, 15에 제시되고, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 16, 17, 18에 제시됨;

[0012] (4) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 19, 20, 21에 제시되고, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 22, 23, 24에 제시됨;

[0013] (5) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 25, 26, 27에 제시되고, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 28, 29, 30에 제시됨; 및

[0014] (6) 상기 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 31, 32, 33에 제시되고, 상기 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 34, 35, 36에 제시됨.

[0015] 일부 실시양태에서, VH는 각각 서열 번호: 1, 2 및 3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하며, VL은 각각 서열 번호: 4, 5 및 6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다. 일부 실시양태에서, VH는 각각 서열 번호: 7, 8 및 9에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하며, VL은 각각 서열 번호: 10, 11 및 12에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다. 일부 실시양태에서, VH는 각각 서열 번호: 13, 14 및 15에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하며, VL은 각각 서열 번호: 16, 17 및 18에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다. 일부 실시양태에서, VH는 각각 서열 번호: 19, 20 및 21에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하며, VL은 각각 서열 번호: 22, 23 및 24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다. 일부 실시양태에서, VH는 각각 서열 번호: 25, 26 및 27에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하며, VL은 각각 서열 번호: 28, 29 및 30에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다. 일부 실시양태에서, VH는 각각 서열 번호: 31, 32 및 33에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함하며, VL은 각각 서열 번호: 34, 35 및 36에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR 1, 2, 3을 포함한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간, 원숭이 또는 개 CD40에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단쇄 가변 단편(scFV) 또는 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 (선택적으로 YTE 및/또는 LALA 돌연변이를 갖는) 인간 IgG1 항체 또는 이의 항원 결합 단편이거나, 또는 (선택적으로 YTE를 갖는) 인간 IgG4 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0017] 일 양태에서, 본 개시는 다음을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산에 관한 것이다:

[0018] (1) 각각 서열 번호: 1, 2 및 3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하며, 일부 실시양태에서, 상기 VH는 서열 번호: 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 이루는 경우 CD40에 결합하는, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편;

[0019] (2) 각각 서열 번호: 4, 5 및 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 VL을 포함하며, 일부 실시양태에서, 상기 VL은 서열 번호: 65에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH와 쌍을 이루는 경우 CD40에 결합하는, 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편;

[0020] (3) 각각 서열 번호: 7, 8 및 9에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하며, 일부 실시양태에서, 상기 VH는 서열 번호: 39에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 이루는 경우 CD40에 결합하는, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편;

[0021] (4) 각각 서열 번호: 10, 11 및 12에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 VL을 포함하며, 일부 실시양태에서, 상기 VL은 서열 번호: 38에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH와 쌍을 이루는 경우 CD40에 결합하는, 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편;

[0022] (5) 각각 서열 번호: 13, 14 및 15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2 및 3을 포함하는 VH를 포함하며, 일부 실시양태에서, 상기 VH는 서열 번호: 41에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 이루는 경우 CD40에 결합하는, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편; 또는

[0023] (6) 각각 서열 번호: 16, 17 및 18에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL을 포함하며, 일부 실시양태에서, 상기 VL은 서열 번호: 40에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH와 쌍을 이루는 경우 CD40에 결합하는, 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편을 포함한다.

[0024] 일부 실시양태에서, 상기 핵산은 각각 서열 번호: 1, 2 및 3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH를 포함하는 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 핵산은 각각 서열 번호: 4, 5 및 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL을 포함하는 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 핵산은 각각 서열 번호: 7, 8 및 9에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH를 포함하는 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 핵산은 각각 서열 번호: 10, 11 및 12에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL을 포함하는 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 핵산은 각각 서열 번호: 13, 14 및 15에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VH를 포함하는 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 핵산은 각각 서열 번호: 16, 17 및 18에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 VL을 포함하는 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0025] 일부 실시양태에서, VH는 VL과 쌍을 이루는 경우 인간, 원숭이 또는 개 CD40에 특이적으로 결합하거나, VL은 VH와 쌍을 이루는 경우 인간, 원숭이 또는 CD40에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편은 인간 면역글로불린 중쇄 또는 이의 단편(예를 들어, 선택적으로 YTE 및/또는 LALA 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 중쇄 또는 이의 단편; 또는 선택적으로 YTE를 갖는 인간 IgG4 중쇄 또는 이의 단편)이며, 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편은 인간 면역글로불린 경쇄 또는 이의 단편이다. 일부 실시양태에서, 상기 핵산은 단쇄 가변 단편(scFv) 또는 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 상기 핵산은 cDNA이다.

[0026] 일 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 핵산 중 하나 이상을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 일 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 핵산 중 두 가지를 포함하는 벡터에 관한 것이며, 일부 실시양태에서, 상기 벡터는 CD40에 함께 결합하는 VL 영역 및 VH 영역을 코딩한다. 일 양태에서, 본 개시는 벡터 쌍에 관한 것이며, 일부 실시양태에서, 각 벡터는 본원에 기재된 바와 같은 핵산 중 하나를 포함하며, 일부 실시양태에서, 상기 벡터 쌍은 CD40에 함께 결합하는 VL 영역 및 VH 영역을 공통으로 코딩한다.

[0027] 일 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 벡터 또는 벡터 쌍을 포함하는 세포에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 상기 세포는 CHO 세포이다. 일 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 핵산 중 하나 이상을 포함하는 세포에 관한 것이다. 일 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 핵산 중 두 가지를 포함하는 세포에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 두 가지 핵산은 CD40에 함께 결합하는 VL 영역 및 VH 영역을 공통으로 코딩한다.

[0028] 일 양태에서, 본 개시는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생성하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 (a) 세포

가 항체 또는 항원 결합 단편을 생성하기에 충분한 조건 하에서 본원에 기재된 바와 같은 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 세포에 의해 생성되는 항체 또는 항원 결합 단편을 수집하는 단계를 포함한다.

[0029] 일 양태에서, 본 개시는 선택된 VH 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 선택된 VL 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 CD40에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이며, 일부 실시양태에서, 상기 선택된 VH 서열 및 상기 선택된 VL 서열은 (1) 선택된 서열은 서열 번호: 65이고, 선택된 VL 서열은 서열 번호: 37임; (2) 선택된 VH 서열은 서열 번호: 38이고, 선택된 VL 서열은 서열 번호: 39임; 및 (3) 선택된 VH 서열은 서열 번호: 40이고, 선택된 VL서열은 서열 번호: 41임 중 하나이다.

[0030] 일부 실시양태에서, 상기 VH는 서열 번호: 65의 서열을 포함하며, 상기 VL은 서열 번호: 37의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 VH는 서열 번호: 38의 서열을 포함하며, 상기 VL은 서열 번호: 39의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 VH는 서열 번호: 40의 서열을 포함하며, 상기 VL은 서열 번호: 41의 서열을 포함한다.

[0031] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간, 원숭이 또는 개 CD40에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 단쇄 가변 단편(scFV) 또는 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 (선택적으로 YTE 및/또는 LALA 돌연변이를 갖는) 인간 IgG1 항체 또는 이의 항원 결합 단편이거나, 또는 (선택적으로 YTE를 갖는) 인간 IgG4 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0032] 일 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 VH CDR 1, 2, 3 및 VL CDR 1, 2, 3을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

[0033] 일 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 교차 경쟁하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

[0034] 일 양태에서, 본 개시는 치료제에 공유 결합되는, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 상기 치료제는 세포독성제(cytotoxic agent) 또는 세포증식억제제(cytostatic agent)이다.

[0035] 일 양태에서, 본 개시는 암이 있는 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 치료적 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 본원에 기재된 바와 같은 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 대상체는 고형 종양이 있다. 일부 실시양태에서, 상기 암은 흑색종, 췌장암, 중피종 또는 혈액학적 악성 종양이다. 일부 실시양태에서, 상기 암은 비호지킨 림프종, 림프종 또는 만성 림프구성 백혈병이다.

[0036] 일 양태에서, 본 개시는 종양 성장의 속도를 늦추는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 종양 세포를 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일 양태에서, 본 개시는 종양 세포를 사멸시키는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 종양 세포를 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일 양태에서, 본 개시는 대상체의 면역 반응을 억제하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 대상체는 자가면역 질환이 있다.

[0037] 일 양태에서, 본 개시는 자가면역 질환을 치료하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 항체-약물 접합체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 전신성 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 알레르기성 피부염 또는 다발성 경화증이다.

[0038] 일 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 일 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 항체-약물 접합체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0039] 일 양태에서, 본 개시는 Fc 영역을 포함하는 CD40에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이며. 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 야생형 Fc 영역과 비교하여 ADCC 효과가 부족하거나 감소된 ADCC 효과를 갖

는다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 FcRn(예를 들어, 인간 FcRn) 사이의 KD는 1×10^{-5}M 미만, 5×10^{-6}M 미만, 1×10^{-6}M 미만, 5×10^{-7}M 미만, 1×10^{-7}M 미만 또는 5×10^{-8}M 미만이다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG1 또는 IgG4 서브타입이다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 YTE 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 LALA 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 반감기는 대상체에게 투여되는 경우 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 3일, 적어도 4일, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 7일, 적어도 8일, 적어도 9일, 적어도 10일, 적어도 11일, 적어도 12일, 적어도 13일, 적어도 14일, 적어도 15일, 적어도 16일, 적어도 17일 또는 적어도 18일이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 마우스이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간 또는 인간화 CD40을 발현하도록 유전자 변형된다.

[0040] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "암"은 자가 성장 능력을 갖는 세포를 지칭한다. 이러한 세포의 예는 빠르게 증식하는 세포 성장을 특징으로 하는 비정상적인 상태 또는 병태를 갖는 세포를 포함한다. 해당 용어는 조직병리학적 유형이나 침습 단계에 관계없이 암성 성장, 예를 들어, 종양, 발암 과정, 전이성 조직 및 악성 형질전환 세포, 조직 또는 기관을 포함하는 것을 의미한다. 또한, 다양한 기관계, 예컨대, 호흡기계, 심혈관계, 신장계, 생식계, 혈액계, 신경계, 간계, 위장계 및 내분비계의 악성 종양 뿐만 아니라 대부분의 결장암, 신세포암, 전립선암 및/또는 고환 종양, 비소세포폐암 및 소장암과 같은 악성 종양을 포함하는 선암이 포함된다. "자연적으로 발생하는" 암은 대상체로의 암세포의 이식에 의해 실험적으로 유도되지 않는 임의의 암을 포함하며, 예를 들어, 자발적으로 발생하는 암, 환자가 발암물질에 노출되어 야기되는 암, 변형 종양 유전자의 삽입 또는 종양 억제 유전자의 녹아웃에 의해 생성되는 암, 및 감염, 예를 들어, 바이러스 감염에 의해 발생하는 암을 포함한다. 용어 "암"은 당업계에 공지되어 있으며 상피 또는 내분비 조직의 악성 종양을 지칭한다. 해당 용어는 또한 암 조직 및 육종 조직으로 구성되는 악성 종양을 포함하는 암육종을 포함한다. "선암"은 선 조직으로부터 유래하거나 종양 세포가 인식 가능한 선 구조를 형성하는 암을 지칭한다. 용어 "육종"은 당업계에 공지되어 있으며 중간엽 유래의 악성 종양을 지칭한다. 용어 "조혈 신생물 장애"는 조혈 기원의 과형성/신생물 세포와 관련된 질환을 포함한다. 조혈 신생물 장애는 골수성, 림프성 또는 적혈구 계통 또는 이들의 전구 세포에서 발생할 수 있다.

[0041] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 적어도 1개(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개)의 상보성 결정 영역(CDR)(예를 들어, 면역글로불린 경쇄로부터 유래한 3개의 CDR 중 임의의 것 또는 면역글로불린 중쇄로부터 유래한 3개의 CDR 중 임의의 것)을 함유하고 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 항원 결합 분자를 지칭한다. 항체의 비제한적인 예는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체), 단쇄 항체, 키메라 항체, 인간 항체 및 인간화 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 항체의 Fc 영역을 함유할 수 있다. 용어 항체는 또한 유도체, 예를 들어 항체 단편으로부터 형성되는 이중특이적 항체, 단쇄 항체, 디아바디, 선형 항체 및 다중특이적 항체를 포함한다.

[0042] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항원 결합 단편"은 전장 항체(full-length antibody)의 일부를 지칭하며, 여기서 항체의 일부는 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항원 결합 단편은 적어도 하나의 가변 도메인(예를 들어, 중쇄의 가변 도메인 또는 경쇄의 가변 도메인)을 함유한다. 항체 단편의 비제한적인 예는 Fab, Fab', F(ab')$_2$, 및 Fv 단편을 포함한다.

[0043] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 인간에서 존재하는 내인성 핵산(예를 들어, 재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 유전자좌)에 의해 코딩되는 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 인간 항체는 인간으로부터 수집되거나 인간 세포 배양물(예를 들어, 인간 하이브리도마 세포)에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 인간 항체는 비인간 세포(예를 들어, 마우스 또는 햄스터 세포주)에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 인간 항체는 박테리아 또는 효모 세포에서 생성된다. 일부 실시양태에서, 인간 항체는 재배열되지 않은 또는 재배열된 인간 면역글로불린 유전자좌(예를 들어 중쇄 또는 경쇄 인간 면역글로불린 유전자좌)를 함유하는 유전자 변형 비인간 동물(예를 들어, 소)에서 생성된다.

[0044] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "키메라 항체"는 적어도 2개의 상이한 항체에 존재하는 서열을 함유하는 항체(예를 들어, 인간 및 마우스 항체와 같은 2개의 상이한 포유동물 종으로부터 유래한 항체)를 지칭한다. 키메라 항체의 비제한적인 예는 비인간(예를 들어, 마우스) 항체의 가변 도메인 서열(예를 들어, 경쇄 및/또는 중쇄 가변 도메인 서열의 전부 또는 일부) 및 인간 항체의 불변 도메인을 함유하는 항체이다. 키메라 항체의 추가 예는 본원에 기재되어 있고 당업계에 알려져 있다.

[0045] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "인간화 항체"는 비인간(예를 들어, 마우스) 면역글로불린으로부터 유래한 최소 서열을 함유하고 인간 면역글로불린으로부터 유래한 서열을 함유하는 비인간 항체를 지칭한다. 비제한적인

예에서, 인간화 항체는 수용자 항체의 초가변(예를 들어, CDR) 영역 잔기가 원하는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 비인간 항체(예를 들어, 공여자 항체), 예를 들어, 마우스, 래트 또는 토끼 항체로부터 유래한 초가변(예를 들어, CDR) 영역 잔기에 의해 대체되는 인간 항체(수용자 항체)이다. 일부 실시양태에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 상응하는 비인간(예를 들어, 마우스) 면역글로불린 잔기에 의해 대체된다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 함유할 수 있다. 이러한 변형을 통해 항체 성능을 추가로 개선할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인 중 실질적으로 전부의 가변 도메인을 함유하며, 여기서 초가변 루프(CDR)의 전부 또는 실질적으로 전부는 비인간(예를 들어, 마우스) 면역글로불린의 초가변 루프에 상응하고 프레임워크 영역의 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 면역글로불린의 프레임워크에 상응한다. 상기 인간화 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부를 함유할 수 있다. 인간화 항체는 당업계에 알려진 분자 생물학 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 인간화 항체를 생성하기 위한 방법의 비제한적인 예가 본원에 기재되어 있다.

[0046] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "단쇄 항체"는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 2개의 면역글로불린 가변 도메인(예를 들어, 포유동물 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄의 가변 도메인)을 함유하는 단일 폴리펩티드를 지칭한다. 단쇄 항체의 비제한적 예가 본원에 기재되어 있다.

[0047] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "다량체 항체"는 4개 이상(예를 들어, 6개, 8개 또는 10개)의 면역글로불린 가변 도메인을 함유하는 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 다량체 항체는 하나의 표적 분자(예를 들어, CD40)를 포유동물 세포(예를 들어, 인간 T 세포) 표면상에 있는 적어도 하나의 제2 표적 분자(예를 들어, CTLA-4)에 가교결합할 수 있다.

[0048] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체" 및 "환자"는 명세서 전반에 걸쳐 상호 교환적으로 사용 가능하며, 본 발명의 방법에 따른 치료가 제공되는 동물, 인간 또는 비인간을 설명한다. 수의학 및 비수의학 적용이 본 발명에 의해 고려된다. 인간 환자는 성인 또는 청소년(예를 들어, 18세 미만의 인간)일 수 있다. 환자는 인간 외에도 마우스, 래트, 햄스터, 기니피그, 토끼, 페럿, 고양이, 개 및 영장류를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 비인간 영장류(예를 들어, 원숭이, 침팬지, 고릴라 등), 설치류(예를 들어, 래트, 마우스, 게르빌루스쥐, 햄스터, 페럿, 토끼), 토끼목, 돼지(예를 들어, 돼지, 미니어처 피그), 말, 개, 고양이, 소 및 다른 가축, 농장 및 동물원 동물이 포함된다.

[0049] 본원에서 사용된 바와 같이, 항체를 언급하는 경우, 문구 "특이적으로 결합" 및 "특이적으로 결합하다"는 항체가 다른 분자에 비해, 이의 표적 분자(예를 들어, CD40)와의 상호작용에 더 선호하는 것을 의미하는데, 이는 상호작용이 표적 분자상에 있는 특정 구조(즉, 항원 결정기 또는 에피토프)의 존재에 의존하기 때문이며, 즉, 시약은 일반적으로 모든 분자가 아닌 특정 구조를 포함하는 분자를 인식하고 이에 결합한다. 표적 분자에 특이적으로 결합하는 항체를 표적 특이적 항체라고 지칭할 수 있다. 예를 들어, CD40 분자에 특이적으로 결합하는 항체는 CD40 특이적 항체 또는 항-CD40 항체라고 지칭할 수 있다.

[0050] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 상호 교환적으로 사용 가능하여, 임의의 길이의 적어도 2개 아미노산의 아미노산 중합체를 지칭한다.

[0051] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "폴리뉴클레오티드", "핵산 분자" 및 "핵산 서열"은 본원에서 상호 교환적으로 사용 가능하여, 임의의 길이의 적어도 2개의 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 중합체를 지칭하며, DNA, RNA, DNA/RNA 하이브리드 및 이의 변형을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0052] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 모두 본 발명이 속하는 당업계의 당업자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 발명에서 사용하기 위한 방법 및 물질이 본원에 기재되어 있으나; 당업계에 알려진 다른 적합한 방법 및 물질도 사용될 수 있다. 이러한 물질, 방법 및 예는 단지 예시적이며 제한하려는 의도가 아니다. 본원에서 언급되는 모든 공개, 특허 출원, 특허, 서열, 데이터베이스 항목 및 다른 참조문헌은 이들의 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다. 상충되는 경우 정의를 포함한 본 명세서가 적용된다.

[0053] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 하기의 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용과 도면 및 청구범위에 따라 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1은 hCD40 마우스에서 면역 반응에 대한 항-CD40 항체의 효과를 분석하기 위한 실험 방식을 나타낸다. 항-CD40 항체를 0일차 및 4일차에 투여하였다. OVA 및 CFA를 1일차에 투여하였다. 항-OVA 항체 수준을 10일차 및 17일차에 ELISA를 통해 결정하였다.

도 2는 ELISA를 통해 결정된 10일차의 항-OVA 항체 수준을 나타낸다. hCD40 마우스에 PBS(G1), 블레셀루맙(Bleselumab) 유사체(G2), 12B5-IgG4-FLAA(G3), 16D5-IgG4-FLAA(G4), 2F8-IgG4-FLAA(G5), 6A4-IgG4-FLAA(G6) 또는 15B4-IgG4-FLAA(G7)를 투여하였다.

도 3은 ELISA를 통해 결정된 17일차의 항-OVA 항체 수준을 나타낸다.

도 4는 시간 경과에 따른 hCD40 마우스의 혈청에 있는 블레셀루맙 유사체(G1), 12B5-IgG4-FLAA(G2), 6A4-IgG4-FLAA(G3) 및 2F8-IgG4-FLAA(G4)의 농도 및 시간 경과에 따른 C57BL/6 마우스의 혈청에 있는 블레셀루맙 유사체(G5), 12B5-IgG4-FLAA(G6), 6A4-IgG4-FLAA(G7) 및 2F8-IgG4-FLAA(G8)의 농도를 나타낸다.

도 5는 시간 경과에 따른 hFcRn 마우스의 혈청에 있는 12B5-IgG1-LALA-YTE(G1), 12B5-IgG1-N297A-YTE(G2), 12B5-IgG4-YTE(G3) 및 12B5-IgG4-FLAA(G4)의 농도를 나타낸다.

도 6은 ELISA를 통해 결정된 10일차의 항-OVA 항체 수준을 나타낸다. hCD40/hFcRn 마우스에 PBS(G1), 블레셀루맙 유사체(G2~G4), 12B5-IgG1-LALA-YTE(G5~G7) 또는 2F8-IgG1-LALA-YTE(G8~G10)를 투여하였다. 항-CD40 항체를 0일차에 투여하였다. OVA 및 CFA를 1일차에 투여하였다.

도 7은 ELISA를 통해 결정된 17일차의 항-OVA 항체 수준을 나타낸다.

도 8은 ELISA를 통해 결정된 21일차의 항-OVA 항체 수준을 나타낸다.

도 9는 Kabat 넘버링에 의해 정의된 바와 같은 항-CD40 항체(2F8, 6A4 및 12B5)의 CDR 서열 및 이의 관련된 항-CD40 항체의 CDR 서열을 열거한다.

도 10은 Chothia 넘버링에 의해 정의된 바와 같은 항-CD40 항체(2F8, 6A4 및 12B5)의 CDR 서열 및 이의 관련된 항-CD40 항체의 CDR 서열을 열거한다.

도 11은 항-CD40 항체(2F8, 6A4 및 12B5)의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 나열한다.

도 12는 12B5-IgG1-LALA-YTE, 12B5-IgG1, 리툭시맙 유사체 및 인간 IgG1에 대한 세포독성 데이터를 나타낸다.

도 13은 12B5-IgG1-LALA-YTE, 리툭시맙 유사체 및 인간 IgG1에 대한 세포독성 데이터를 나타낸다.

도 14는 12B5-IgG1-LALA-YTE 및 인간 IgG1의 PBMC 증식에 대한 억제 효과를 나타낸다.

도 15A는 12B5-IgG1-LALA-YTE의 B 세포 증식에 대한 억제 효과를 나타낸다.

도 15B는 hIgG1의 B 세포 증식에 대한 억제 효과를 나타낸다.

도 16은 MOG를 주사하여 EAE 모델을 유도한 후 hIgG1(G2) 또는 항-hCD40 항체 2F8-IgG1-LALA-YTE(G3)로 처리한 hCD40/hFcRn 마우스의 체중을 나타낸다. PBS를 주사한 hCD40/hFcRn 마우스를 대조(G1)로 사용하였다.

도 17은 MOG를 주사하여 EAE 모델을 유도한 후 hIgG1(G2) 또는 항-hCD40 항체 2F8-IgG1-LALA-YTE(G3)로 처리한 hCD40/hFcRn 마우스의 임상 점수를 나타낸다. PBS를 주사한 hCD40/hFcRn 마우스를 대조(G1)로 사용하였다.

도 18은 MOG를 주사하여 EAE 모델을 유도한 후 hIgG1(G2) 또는 항-hCD40 항체 2F8-IgG1-LALA-YTE(G3)로 처리한 hCD40/hFcRn 마우스로부터 유래한 척수의 H&E(헤마톡실린 및 에오신) 염색 이미지를 나타낸다. PBS를 주사한 hCD40/hFcRn 마우스를 대조(G1)로 사용하였다. 이미지를 염증 세포 침윤에 대해 조사하였다.

도 19는 MOG를 주사하여 EAE 모델을 유도한 후 hIgG1(G2) 또는 항-hCD40 항체 2F8-IgG1-LALA-YTE(G3)로 처리한 hCD40/hFcRn 마우스로부터 유래한 척수의 LFB(룩솔 패스트 블루) 염색 이미지를 나타낸다. PBS를 주사한 hCD40/hFcRn 마우스를 대조(G1)로 사용하였다. 이미지를 척수 탈수초화에 대해 조사하였다.

도 20은 CII 에멀젼을 주사하여 CIA 모델을 유도한 후 PBS(G2) 또는 항-hCD40 항체 12B5-IgG1-LALA-YTE(G3)로 처리한 hCD40 마우스의 체중을 나타낸다. PBS를 주사한 hCD40 마우스만을 대조(G1)로 사용하였다.

도 21은 CII 에멀젼을 주사하여 CIA 모델을 유도한 후 PBS(G2) 또는 항-hCD40 항체 12B5-IgG1-LALA-YTE(G3)로 처리한 hCD40 마우스의 임상 점수를 나타낸다. PBS를 주사한 hCD40 마우스만을 대조(G1)로 사용하였다.

도 22는 CII 에멀젼을 주사하여 CIA 모델을 유도한 후 PBS(G2) 또는 항-hCD40 항체 12B5-IgG1-LALA-YTE(G3)로 처리한 hCD40 마우스의 발생률을 나타낸다. PBS를 주사한 hCD40 마우스만을 대조(G1)로 사용하였다.

도 23은 CII 에멀젼을 주사하여 CIA 모델을 유도한 후 PBS(G2) 또는 항-hCD40 항체 12B5-IgG1-LALA-YTE(G3)로 처리한 hCD40 마우스의 사지로부터 수집한 관절 조직의 H&E 염색 이미지를 나타낸다. PBS를 주사한 hCD40 마우스만을 대조(G1)로 사용하였다. (a)는 염증 세포 침윤을 의미하고, (b)는 활막 과다형성을 의미하며, (c)는 판누스를 의미한다.

도 24는 본 개시에 논의된 아미노산 서열을 열거한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 본 개시는 CD40(TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 5)에 결합하는 항체, 이의 항원 결합 단편의 예를 제공한다.

[0056] **CD40 및 면역계**

[0057] 면역계는 신체의 정상 세포와 "이물질"로 간주하는 세포를 구별할 수 있으며, 이를 통해 면역계는 정상 세포를 그대로 두고 이물질 세포만 공격할 수 있다. 이러한 메커니즘에는 때때로 면역 관문이라고 지칭되는 단백질이 관여한다. 면역 관문은 면역계에서 신호를 켜거나(보조 자극 분자) 신호를 끄는 분자이다.

[0058] 관문 억제제는 면역계가 정상 조직을 공격하는 것을 방지하여 자가면역 질환을 방지할 수 있다. 많은 종양 세포 또한 관문 억제제를 발현한다. 이러한 종양 세포는 특히 종양 항원에 특이적인 T 세포에서 특정 면역 관문 경로를 공동 선택하여 면역 감시를 벗어난다(Creelan, Benjamin C. "Update on immune checkpoint inhibitors in lung cancer." Cancer Control 21.1 (2014): 80-89). 많은 면역 관문이 리간드-수용체 상호작용에 의해 개시되기 때문에, 리간드 및/또는 이들의 수용체에 대한 항체에 의해 용이하게 차단될 수 있다.

[0059] CD40(종양 괴사 인자 수용체 수퍼패밀리 구성원 5 또는 TNFRSF5로도 알려짐)은 항원 제시 세포(APC), 예컨대, 수지상 세포(DC), 대식세포, B 세포, 및 단핵구뿐만 아니라 많은 비면역 세포 및 광범위한 종양에서 발현되는 종양 괴사 인자 수용체 수퍼패밀리 구성원이다. 활성화된 T 보조 세포 상에 있는 삼량체 리간드 CD154(CD40 리간드 또는 CD40L로도 알려짐)와 상호작용하면 APC가 활성화되어 적응 면역이 유도된다.

[0060] 생리학적으로, CD40을 통해 APC에서 신호을 전달하는 것이 T 세포 보조의 주요 구성 요소를 나타내고 APC를 허가하는 보조 T 세포의 능력을 아주 큰 비중으로 매개하는 것으로 생각된다. 예를 들어, DC 상에 CD40의 결찰은 공동자극 및 MHC 분자의 증가된 표면 발현, 전염증성 사이토카인의 생성 및 향상된 T 세포 유발을 유도한다. 휴지 B 세포 상에 CD40의 결찰은 항원 제시 기능 및 증식을 증가시킨다.

[0061] 전임상 모델에서, 래트 항-마우스 CD40 mAb는 CD40+ B 세포 림프종 치료에서 놀라운 치료 활성을 나타내며(80~100%의 마우스가 치유되었고 CD8 T 세포 의존적 방식으로 재도전에 면역이 됨) 다양한 CD40 음성 종양에서도 효과가 있다. 이러한 mAb는 거의 말기의 질환이 있는 마우스에서 대부분의 종양을 제거할 수 있다. CD40 mAb는 이미 임상 시험에서 연구되었으며 흑색종, 췌장암, 중피종, 혈액학적 악성 종양, 특히 비호지킨 림프종, 림프종, 만성 림프구성 백혈병 및 진행성 고형 종양을 치료하는 데 사용된다.

[0062] 치료적 항-CD40 항체는 강력한 작용성부터 길항성까지 다양한 활성을 나타낸다. 현재, 이의 이질성에 대한 만족스러운 설명이 없다. 작용성 CD40 mAb의 주요 기전적 원리는 환자에게 임상적으로 의미 있는 항종양 T 세포 반응을 유도하기 위해 숙주 APC를 활성화하는 것이다. 이는 T 세포에 의존하지 않지만 대식세포에 의존적인 종양 퇴행의 유발을 포함한다. CD40 활성화 대식세포는 종양을 사멸하는 세포로 될 수 있으며, 적어도 췌장암에서, 체내 종양의 붕괴를 유도하는 종양 기질의 고갈을 촉진할 수도 있다. 중요하게도, 이러한 메커니즘은 종양에 의한 CD40의 발현을 필요로 하지 않으며, 이에 많은 임상 시험에서 광범위한 종양이 있는 환자의 포함을 정당화하였다. 이러한 전략이 DC, 대식세포 또는 둘 모두를 활성화하는 것을 목표로 하는 한, 목표는 반드시 CD40 mAb가 예를 들어 보체 매개 세포독성(CMC) 또는 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 통해 결합하는 세포를 사멸시키는 것은 아니다. 따라서, 설계상 강력한 작용성 항체는 CMC 또는 ADCC를 매개하지 않는다.

[0063] 대조적으로, 다른 인간 CD40 mAb는 CD40+ 종양, 예컨대, 거의 모든 B 세포 악성 종양, 흑색종의 일부 및 특정 암종에 대한 CMC 및 ADCC를 매개할 수 있다. 마지막으로, 종양 세포 상에 CD40의 결찰은 세포자멸사를 촉진하고 이것이 아무 면역 이펙터 경로에 관여하지 않고도 달성될 수 있다는 일부 증거가 있다. 이는 CD40+ B 세포 악성 종양 및 CD40+ 암종 및 흑색종과 같은 특정 고형 종양에서 나타났다.

[0064] 효과적인 면역 반응을 생성하는 CD40의 중심적인 역할 때문에 CD40은 또한 자가면역 질환의 발병기전에 중요한

역할을 한다. CD40은 여러 가지 방법으로 T 세포 의존성 자가면역 질환에 기여한다. 첫째, CD40 신호전달은 흉선에서 T 세포 선택의 수준에서 기능할 수 있다. 수질 흉선 상피 세포(mTEC)는 말초 조직 제한 항원을 발현하여 잠재적으로 자가반응성 T 세포의 음성 선택을 매개한다. TNFR 패밀리 구성원 RANK는 배아 mTEC 발달에 매우 중요한데, CD40은 출생 후 mTEC 발달을 촉진하여 자가 내성을 촉진하는 데 RANK와 협력한다. mTEC에서 CD40-CD154 상호작용의 중단이 중추 내성의 상실에 기여할 수 있다. 둘째, CD40 신호전달은 Th17 세포로의 T 세포 분화에 영향을 미칠 수 있는 IL-6과 같은 전염증성 사이토카인의 생성을 초래한다. CD40은 또한 항원 제시 세포(APC) 활성화 시 상향 조절된다. 구성적이든 유도적이든 CD40의 증가된 수준은 CD40-CD154 상호작용의 강도 증가에 기여할 수 있다. 또 다른 메커니즘은 정상적으로 감지될 수 없는 조직에서 CD40을 비정상적으로 발현하는 것이다. 내분비 조직 상에서 MHC 클래스 II 분자의 비정상적인 발현이 자가면역 질환의 발병에 기여할 수 있다는 가설이 제기된 바 있다. 이러한 조직 상에 비정상적인 CD40 발현은 또한 그레이브스병에서 자가면역 발작의 기여 요인, 및 췌장 섬세포 이식의 실패에 기여하는 염증성 사이토카인 생성의 기여 요인으로 제시된 바 있다. 마지막으로, CD40 보유 CD4+ T 세포는 인간 및 마우스의 1형 당뇨병에서 중요한 역할을 한다. 따라서 CD40은 B 세포와 T 세포 활성화가 병원에 중요한 역할을 하는 다양한 자가면역 과정에 기여하는 고려할 만한 후보 수용체이다.

[0065] CD40과 이의 기능에 대한 상세한 설명은 예를 들어, Vonderheide 등, "Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy." (2013): 1035-1043; Beatty, 등 "CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans." Science 331.6024 (2011): 1612-1616; Vonderheide 등 "Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870,893, a novel CD40 agonist monoclonal antibody." Journal of Clinical Oncology 25.7 (2007): 876-883; Peters 등, "CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator." Seminars in immunology. Vol. 21. No. 5. Academic Press, 2009에서 찾을 수 있으며 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0066] 본 개시는 여러 항-CD40 항체, 이의 항원 결합 단편 및 종양 성장을 억제하고 암을 치료하기 위해 이러한 항-CD40 항체 및 항원 결합 단편을 사용하는 방법을 제공한다.

[0067] **항체 및 항원 결합 단편**

[0068] 본 개시는 항-CD40 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일반적으로, 항체(면역글로불린이라고도 함)는 두 가지 종류의 폴리펩티드 사슬, 즉 경쇄와 중쇄로 구성된다. 본 개시의 비제한적인 항체는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 온전한 4개의 면역글로불린 사슬 항체일 수 있다. 항체의 중쇄는 IgM, IgG, IgE, IgA 또는 IgD를 포함하는 임의의 아이소타입이거나 IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgE1, IgE2 등을 포함하는 서브아이소타입일 수 있다. 경쇄는 카파 경쇄 또는 람다 경쇄일 수 있다. 항체는 2개의 동일한 경쇄 복사본과 2개의 동일한 중쇄 복사본을 포함할 수 있다. 각각 하나의 가변 도메인(또는 가변 영역, V_H) 및 다수의 불변 도메인(또는 불변 영역)을 함유하는 중쇄는 불변 도메인 내에서 이황화 결합을 통해 서로 결합하여 항체의 "줄기"를 형성한다. 각각 하나의 가변 도메인(또는 가변 영역, V_L) 및 하나의 불변 도메인(또는 불변 영역)을 함유하는 경쇄는 각각 이황화 결합을 통해 하나의 중쇄에 결합한다. 각 경쇄의 가변 영역은 결합되는 중쇄의 가변 영역과 정렬된다. 경쇄 및 중쇄 모두의 가변 영역은 보다 보존적인 프레임워크 영역(FR) 사이에 끼워진 초가변 영역 3개를 함유한다.

[0069] 상보성 결정 영역(CDR)으로 알려진 이러한 초가변 영역은 항체의 주요 항원 결합 표면을 포함하는 루프를 형성한다. 4개의 프레임워크 영역은 주로 베타-시트 구조를 채택하고 CDR은 연결되어 일부 경우 베타-시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각 사슬의 CDR은 프레임워크 영역에 의해 근접하게 유지되며 다른 사슬의 CDR과 함께 항원 결합 영역의 형성에 기여한다.

[0070] 항체의 아미노산 서열을 분석하여 항체의 CDR 영역을 식별하는 방법은 널리 알려져 있으며, CDR에 대한 여러 가지 정의가 일반적으로 사용된다. Kabat 정의는 서열 가변성을 기반으로 하며 Chothia 정의는 구조적 루프 영역의 위치를 기반으로 한다. 이러한 방법 및 정의는 예를 들어, Martin, "Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains," Antibody engineering, Springer Berlin Heidelberg, 2001. 422-439; Abhinandan 등 "Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains," Molecular immunology 45.14 (2008): 3832-3839; Wu, T.T. 및 Kabat, E.A. (1970) J. Exp. Med. 132: 211-250; Martin 등, Methods Enzymol. 203:121-53 (1991); Morea 등, Biophys Chem. 68(1-3):9-16 (Oct. 1997); Morea 등, J Mol Biol. 275(2):269-94 (Jan .1998); Chothia 등, Nature 342(6252):877-83 (Dec. 1989); Ponomarenko 및 Bourne, BMC Structural Biology 7:64 (2007)에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다. 본 개시에서 구체적으로 명시하지 않는 한, 본 개시에

서 기본적으로 Kabat 넘버링을 사용한다.

[0071] CDR은 항원의 에피토프를 인식하는 데 중요하다. 본원에서 사용된 바와 같이, "에피토프"는 항체의 항원 결합 도메인에 의해 특이적으로 결합될 수 있는 표적 분자의 가장 작은 부분이다. 에피토프의 최소 크기는 약 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개의 아미노산일 수 있으나, 에피토프가 항원의 2차 및 3차 구조에 기초한 항원의 3차원 배열에 의존할 수 있기 때문에 이러한 아미노산은 항원의 1차 구조의 연속적인 선형 서열에 있을 필요는 없다.

[0072] 일부 실시양태에서, 항체는 온전한 면역글로불린 분자(예를 들어, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgD, IgE, IgA)이다. IgG 하위 클래스(IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4)는 고도로 보존적이고 이들의 불변 영역, 특히 힌지 및 상위 CH2 도메인이 상이하다. IgG 하위 클래스의 서열 및 차이점은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어, Vidarsson 등, "IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions." Frontiers in immunology 5 (2014); Irani 등 "Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases." Molecular immunology 67.2 (2015): 171-182; Shakib, Farouk 편집. The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Elsevier, 2016에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0073] 항체는 임의의 종(예를 들어, 인간, 설치류, 마우스, 낙타류)으로부터 유래한 면역글로불린 분자일 수도 있다. 본원에 개시된 항체는 또한 폴리클로날, 모노클로날, 단일특이적, 다중특이적 항체 및 다른 폴리펩티드에 융합된 면역글로불린 결합 도메인을 포함하는 키메라 항체를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 용어 "항원 결합 도메인" 또는 "항원 결합 단편"은 온전한 항체의 특이적 결합 활성을 유지하는 항체의 일부, 즉 온전한 항체의 표적 분자 상에 있는 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 임의의 부분이다. 이는 예를 들어 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 이러한 단편의 변이체를 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 예를 들어 scFv, Fv, Fd, dAb, 이중특이적 항체, 이중특이적 scFv, 디아바디, 선형 항체, 단쇄 항체 분자, 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체 및 항체 결합 도메인이거나 이와의 상동성을 갖는 결합 도메인을 포함하는 임의의 폴리펩티드일 수 있다. 항원 결합 도메인의 비제한적인 예는, 예를 들어, 온전한 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR, 온전한 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역, 온전한 항체의 전장 중쇄 또는 경쇄, 또는 온전한 항체의 중쇄 또는 경쇄로부터의 개별 CDR을 포함한다.

[0074] 일부 실시양태에서, 상기 항원 결합 단편은 키메라 항원 수용체(CAR)의 일부를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 키메라 항원 수용체는 CD3 제타 막관통 및 엔도도메인에 융합되는, 본원에 기재된 바와 같은 단쇄 가변 단편(scFv)의 융합체이다. 일부 실시양태에서, 상기 키메라 항원 수용체는 또한 다양한 공동자극 단백질 수용체(예를 들어, CD28, 41BB, ICOS)로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 키메라 항원 수용체는 효능을 증가시키기 위해 다중 신호전달 도메인, 예를 들어, CD3z-CD28-41BB 또는 CD3z-CD28-OX40을 포함한다. 따라서, 일 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포(예를 들어, T 세포)를 추가로 제공한다.

[0075] 일부 실시양태에서, 상기 scFV는 1개의 중쇄 가변 도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 scFV는 2개의 중쇄 가변 도메인과 2개의 경쇄 가변 도메인을 갖는다.

[0076] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 서열(예를 들어, CDR 또는 VH/VL 서열)은 CD40 및 추가 항원(예를 들어, TNFRSF9(4-1BB), MSLN, FAP, ALB, CTLA4, HER2, GPC3, MYC, EPCAM, TNFRSF14(LIGHTR) 또는 ITGAX(CD11c))을 표적으로 하는 이중특이적 항체를 생성하는 데 사용될 수 있다.

[0077] **항-CD40 항체 및 항원 결합 단편**

[0078] 본 개시는 CD40(예를 들어, 인간 CD40)에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 본원에 기재된 항체 및 항원 결합 단편은 CD40에 결합할 수 있다. 이러한 항체는 작용제 또는 길항제일 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 CD40 신호전달 경로를 촉진하여 면역 반응을 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 CD40 신호전달 경로를 차단하여 면역 반응을 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 보체 의존성 세포독성(CMC) 또는 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 개시할 수 있다.

[0079] 본 개시는 예를 들어, 마우스 항-CD40 항체 2F8, 6A4, 12B5, 이들의 키메라 항체 및 이들의 인간 또는 인간화 항체를 제공한다.

[0080] 2F8 및 2F8 유래 항체(예를 들어, 인간 또는 인간화 항체)의 CDR 서열은 Kabat 넘버링에 의해 정의되는 바와 같

이 중쇄 가변 도메인의 CDR, 서열 번호: 1~3, 및 경쇄 가변 도메인의 CDR, 서열 번호: 4~6을 포함한다. CDR은 Chothia 시스템에 의해 정의될 수도 있다. Chothia 넘버링에 의해, 중쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 서열 번호: 19~21에 제시되고, 경쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 서열 번호: 22~24에 제시된다.

[0081] 유사하게, 6A4 및 6A4 유래 항체의 CDR 서열은 Kabat 넘버링에 의해 정의되는 바와 같이 중쇄 가변 도메인의 CDR, 서열 번호: 7~9 및 경쇄 가변 도메인의 CDR, 서열 번호: 10~12를 포함한다. Chothia 넘버링에 의해, 중쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 서열 번호: 25~27에 제시되고, 경쇄 가변 도메인의 CDR은 서열 번호: 28~30에 제시된다.

[0082] 12B5 및 12B5 유래 항체의 CDR 서열은 Kabat 넘버링에 의해 정의되는 바와 같이 중쇄 가변 도메인의 CDR, 서열 번호: 13~15 및 경쇄 가변 도메인의 CDR, 서열 번호: 16~18을 포함한다. Chothia 넘버링에 의해, 중쇄 가변 도메인의 CDR 서열은 서열 번호: 31~33에 제시되고, 경쇄 가변 도메인의 CDR은 서열 번호: 34~36에 제시된다.

[0083] 2F8 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열 번호: 65에 제시된다. 2F8 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열 번호: 37에 제시된다.

[0084] 6A4 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열 번호: 38에 제시된다. 6A4 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열 번호: 39에 제시된다.

[0085] 12B5 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열 번호: 40에 제시된다. 12B5 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열 번호: 41에 제시된다.

[0086] 변형된 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열이 또한 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 65, 38 또는 40과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 일부 실시양태에서, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호: 37, 39, 또는 41과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 중쇄 가변 영역 서열은 상응하는 경쇄 가변 영역 서열과 쌍을 이룰 수 있으며, 함께 CD40에 결합한다.

[0087] 인간화 백분율은 국제 면역유전학 정보 시스템(IMGT) 데이터베이스의 인간 항체 서열과 비교하여 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열의 동일성 백분율을 의미한다. 상위 히트는 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열이 다른 종보다 특정 종에 더 가깝다는 것을 의미한다. 예를 들어, 인간에 대한 상위 히트는 해당 서열이 다른 종보다 인간에 더 가깝다는 것을 의미한다. 인간 및 필리핀 원숭이(*Macaca fascicularis*)에 대한 상위 히트는 해당 서열이 인간 서열 및 필리핀 원숭이 서열과 동일한 동일성 백분율을 갖고, 이러한 백분율 동일성이 다른 종의 서열과 비교하여 가장 높다는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 인간화 백분율은 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 또는 95% 초과이다. 인간화 백분율을 결정하는 방법 및 상위 히트를 결정하는 방법에 관한 상세한 설명은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어, Jones 등 "The INNs and outs of antibody nonproprietary names." MAbs. Vol. 8. No. 1. Taylor & Francis, 2016에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다. 높은 인간화 백분율은 흔히 다양한 이점이 있는데, 예를 들어, 인간에서 더 안전하고 더 효과적이고, 인간 대상체에 대한 내약성이 우수할 가능성이 더 높고/높거나 부작용이 있을 가능성이 더 낮다. 일부 실시양태에서, 가변 영역은 예를 들어, 인간 중쇄 면역글로불린 유전자좌 서열(예를 들어, 인간 IGHV, 인간 IGHD 및 인간 IGHJ 유전자의 재조합) 및/또는 인간 카파 사슬 면역글로불린 유전자좌 서열(예를 들어, 인간 IGKV 및 인간 IGKJ 유전자의 재조합)로부터 유래되는 완전 인간이다.

[0088] 또한, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 또한 서열 번호: 1~3, 서열 번호: 7~9, 서열 번호: 13~15, 서열 번호: 19~21, 서열 번호: 25~27 및 서열 번호: 31~33으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 중쇄 가변 영역 CDR; 및/또는 서열 번호: 4~6, 서열 번호: 10~12, 서열 번호: 16~18, 서열 번호: 22~24, 서열 번호: 28~30 및 서열 번호: 34~36으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개, 2개 또는 3개의 경쇄 가변 영역 CDR을 함유할 수 있다.

[0089] 일부 실시양태에서, 상기 항체는 상보성 결정 영역(CDR) 1, 2, 3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 가질 수 있으며, 여기서 상기 CDR1 영역은 선택된 VH CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 상기 CDR2 영역은 선택된 VH CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 상기 CDR3 영역은 선택된 VH CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 CDR 1, 2, 3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 가질 수 있으며, 상기 CDR1 영역은 선택된 VL CDR1 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 상기 CDR2

영역은 선택된 VL CDR2 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되며, 상기 CDR3 영역은 선택된 VL CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 선택된 VH CDR 1, 2, 3 아미노산 서열 및 선택된 VL CDR 1, 2, 3 아미노산 서열은 **도 9**(Kabat CDR) 및 **도 10**(Chothia CDR)에 나타나 있다.

[0090] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 1; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 2; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 3의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 함유하는 중쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.

[0091] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 7; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 8; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 9의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 함유하는 중쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.

[0092] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 13; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 14; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 15의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 함유하는 중쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.

[0093] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 19; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 20; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 21의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 함유하는 중쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.

[0094] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 25; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 26; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 27의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 함유하는 중쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.

[0095] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 31; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 32; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 33의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 함유하는 중쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.

[0096] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 4; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 5; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 6의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.

[0097] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 10; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 11; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 12의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.

[0098] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 16; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 17; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 18의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.

[0099] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 22; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 23; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 24의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.

[0100] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 28; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 29; 0개,

1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 30의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.

[0101] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 34; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 35; 0개, 1개 또는 2개의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 갖는 서열 번호: 36의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 함유할 수 있다.

[0102] 삽입, 결실 및 치환은 CDR 서열 내에서 또는 CDR 서열의 종결 말단 중 하나 또는 둘 모두에서 발생할 수 있다. 일부 실시양태에서, CDR은 Kabat 넘버링 방식를 기준으로 결정된다. 일부 실시양태에서, CDR은 Chothia 넘버링 방식를 기준으로 결정된다. 일부 실시양태에서, CDR은 Kabat와 Chothia 넘버링 방식의 조합을 기준으로 결정된다.

[0103] 본 개시는 또한 CD40에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 선택된 VH 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 중쇄 가변 영역(VH) 및 선택된 VL 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 경쇄 가변 영역(VL)을 함유한다. 일부 실시양태에서, 선택된 VH 서열은 서열 번호: 65이고, 선택된 VL 서열은 서열 번호: 37이다. 일부 실시양태에서, 선택된 VH 서열은 서열 번호: 38이고, 선택된 VL 서열은 서열 번호: 39이다. 일부 실시양태에서, 선택된 VH 서열은 서열 번호: 40이고, 선택된 VL 서열은 서열 번호: 41이다.

[0104] 본 개시는 또한 본원에 기재된 항체와 경쟁할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 본원에 기재된 항체와 동일한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0105] 본 개시는 또한 본원에 기재된 바와 같은 임의의 항체 또는 항원 결합 단편과 교차 경쟁하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 교차 경쟁 검정은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어, Moore 등, "Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein." Journal of virology 70.3 (1996): 1863-1872에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다. 일 양태에서, 본 개시는 또한 본원에 기재된 바와 같은 임의의 항체 또는 항원 결합 단편과 동일한 에피토프 또는 영역에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 에피토프 비닝 검정은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어, Estep 등 "High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning." MAbs. Vol. 5. No. 2. Taylor & Francis, 2013에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0106] 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산 서열의 동일성 백분율을 결정하기 위해, 해당 서열을 최적의 비교를 목적으로 정렬한다(예를 들어, 갭을 최적의 정렬을 위해 제1 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열 중 하나 또는 둘 모두에 도입할 수 있고, 비상동성 서열을 비교 목적을 위해 무시할 수 있음). 이후, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에서의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 비교한다. 제1 서열 내의 위치가 제2 서열 내의 상응하는 위치와 마찬가지로 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드에 의해 점유되는 경우, 분자는 해당 위치에서 동일하다. 양 서열 사이의 동일성 백분율은 2개 서열의 최적 정렬을 위해 도입해야 하는 갭의 수와 각 갭의 길이를 고려하여 서열이 공유하는 동일 위치 수의 함수이다. 예를 들어, 서열 비교 및 2개의 서열 사이의 동일성 백분율 결정은 갭 페널티 12, 갭 확장 페널티 4 및 프레임시프트 갭 페널티 5를 갖는 Blossum 62 스코어링 매트릭스를 사용하여 달성될 수 있다.

[0107] 본 개시는 또한 면역글로불린 중쇄 또는 면역글로불린 경쇄를 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산을 제공한다. 면역글로불린 중쇄 또는 면역글로불린 경쇄는 **도 9** 또는 **도 10**에 나타난 바와 같은 CDR을 포함하거나, **도 11**에 나타난 바와 같은 서열을 갖는다. 폴리펩티드가 상응하는 폴리펩티드(예를 들어, 상응하는 중쇄 가변 영역 또는 상응하는 경쇄 가변 영역)와 쌍을 이루는 경우, 쌍을 이루는 폴리펩티드는 CD40(예를 들어, 인간 CD40)에 결합한다.

[0108] 항-CD40 항체 및 항원 결합 단편은 또한 항체 또는 항체 단편 및 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체 또는 항체 단편의 항체 변이체(유도체 및 접합체 포함)일 수 있다. 본원에서 제공되는 추가 항체는 폴리클로날, 모노클로날, 다중특이적(다량체, 예를 들어, 이중특이적), 인간 항체, 키메라 항체(예를 들어, 인간-마우스 키메라), 단쇄 항체, 세포 내 제조 항체(즉, 인트라바디) 및 이들의 항원 결합 단편이다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위 클래스일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG

항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0109] 항체 단편은 전장 항체의 원하는 친화성 및 특이성을 유지하는 한 제공되는 방법에서 사용하기에 적합하다. 따라서, CD40에 결합하는 항체 단편은 CD40에 결합하는 능력을 유지할 것이다. Fv 단편은 완전한 항원 인식 및 결합 부위를 함유하는 항체 단편이다. 이러한 영역은, 예를 들어, scFv에서 자연적으로 공유 결합일 수 있는, 밀착 결합된 하나의 중쇄 가변 도메인 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 구성된다. 이러한 구성에서, 각 가변 도메인의 3개 CDR이 상호작용하여 VH-VL 이량체 표면 상에 있는 항원 결합 부위를 정의한다. 종합적으로, 6개의 CDR 또는 이의 서브세트는 항체에 대한 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나 단일 가변 도메인(또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만 포함하는 Fv의 절반)조차도 일반적으로 전체 결합 부위보다 친화성이 낮음에도 불구하고 항원을 인식하고 결합하는 능력을 가질 수 있다.

[0110] 단쇄 Fv 또는 (scFv) 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인(또는 영역)을 포함하며, 이러한 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함하며, 이는 scFv가 항원 결합을 위해 원하는 구조를 형성할 수 있게 한다.

[0111] Fab 단편은 경쇄의 가변 도메인과 불변 도메인 및 중쇄의 가변 도메인과 제1 불변 도메인(CH1)을 함유한다. F(ab')2 항체 단편은 일반적으로 이들 사이의 힌지 시스테인에 의해 카복시 말단 근처에 공유 연결된 한 쌍의 Fab 단편을 포함한다. 항체 단편의 다른 화학적 결합도 당업계에 알려져 있다.

[0112] 디아바디는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편이며, 이 단편은 동일한 폴리펩티드 사슬(VH 및 VL)의 VL에 연결된 VH를 포함한다. 동일한 사슬에 있는 두 도메인 사이의 쌍을 이루기에는 너무 짧은 링커를 사용하여 도메인은 강제로 다른 사슬의 상보성 도메인과 쌍을 이루고 두 개의 항원 결합 부위를 생성한다.

[0113] 선형 항체는 상보성 경쇄 폴리펩티드와 함께 한 쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한 쌍의 직렬 Fd 세그먼트(VH-CH1-VH-CH1)를 포함한다. 선형 항체는 이중특이적이거나 단일특이적일 수 있다.

[0114] 본 개시의 항체 및 항체 단편은 원하는 이펙터 기능 또는 혈청 반감기를 제공하기 위해 Fc 영역에서 변형될 수 있다.

[0115] 항체의 다량체화는 항체의 자연적 응집을 통해 또는 당업계에 알려진 화학적 또는 재조합 연결 기법을 통해 달성될 수 있다. 예를 들어, 정제된 항체 제제(예를 들어, 정제된 IgG_1 분자)의 일부 백분율은 항체 동종이량체 및 다른 고차 항체 다량체를 함유하는 단백질 응집체를 자발적으로 형성한다.

[0116] 대안적으로, 항체 동종이량체는 당업계에 알려진 화학적 연결 기법을 통해 형성될 수 있다. 예를 들어, SMCC(석신이미딜 4-(말레이미도메틸)사이클로헥세인-1-카복실레이트) 및 SATA(N-석신이미딜 S-아세틸싸이오-아세테이트)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 이종이기능성 가교결합제를 사용하여 항체 다량체를 형성할 수 있다. 항체 동종이량체의 형성을 위한 예시적인 프로토콜은 Ghetie 등 (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 7509-7514, 1997)에 기재되어 있다. 항체 동종이량체는 펩신에 의한 소화를 통해 Fab'_2 동종이량체로 전환될 수 있다. 항체 동종이량체를 형성하는 또 다른 방법은 Zhao 등 (*J. Immunol.* 25:396-404, 2002)에 기재된 친자성(autophilic) T15 펩티드를 사용하는 것이다.

[0117] 일부 실시양태에서, 다중특이적 항체는 이중특이적 항체이다. 이중특이적 항체는 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이종이량체의 백분율을 최대화하기 위해 한 쌍의 항체 분자 사이의 경계면을 조작하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 경계면은 항체 불변 도메인의 CH3 도메인의 적어도 일부를 함유할 수 있다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 경계면으로부터 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 더 큰 측쇄(예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 아미노산 측쇄(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체하여 큰 측쇄(들)와 동일하거나 유사한 크기의 보상성 "공동"이 제2 항체 분자의 경계면에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 원치 않는 최종 생성물에 비해 이종이량체의 수율을 증가시키기 위한 메커니즘을 제공한다. 이러한 방법은, 예를 들어, WO 96/27011에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 포함된다.

[0118] 이중특이적 항체는 가교결합 또는 "이종접합체" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이종접합체의 항체 중 하나는 아비딘에 결합되고 다른 하나는 비오틴에 결합될 수 있다. 이종접합체 항체는 또한 임의의 편리한 가교결합 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 적합한 가교결합제 및 가교결합 기법은 당업계에 널리 알려져 있고, 미국 특허 제4,676,980호에 개시되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0119] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하는 방법이 또한 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 화학적 연결을 사용하여 제조될 수 있습니다. Brennan 등 (*Science* 229:81, 1985)은 온전한 항체가 단백질

분해로 절단되어 $F(ab')_2$ 단편을 생성하는 절차를 설명한다. 이러한 단편은 인접한 다이싸이올을 안정화하고 분자간 이황화물 형성을 방지하기 위해 다이싸이올 착화제인 소듐 아르세나이트의 존재 하에서 환원된다. 생성된 Fab' 단편은 싸이오나이트로벤조산(TNB) 유도체로 전환된다. Fab' TNB 유도체 중 하나는 머캅토에틸아민으로 환원되어 Fab' 싸이올로 재전환되고, 등몰량의 다른 Fab' TNB 유도체와 혼합되어 이중특이적 항체를 형성한다.

[0120] 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편 중 임의의 것은 안정화 분자(예를 들어, 대상체 또는 용액 내에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 반감기를 증가시키는 분자)에 접합될 수 있다. 안정화 분자의 비제한적인 예는 중합체(예를 들어, 폴리에틸렌 글라이콜) 또는 단백질(예를 들어, 인간 혈청 알부민과 같은 혈청 알부민)을 포함한다. 안정화 분자의 접합은 체외(예를 들어, 조직 배양물 내 또는 약학적 조성물로서 저장되는 경우) 또는 체내(예를 들어, 인간 내)에서 항체 또는 항원 결합 단편의 반감기를 증가시키거나 생물학적 활성을 연장시킬 수 있다.

[0121] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 치료제에 접합될 수 있다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 항체-약물 접합체는 치료제에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 치료제는 세포독성제(cytotoxic agent) 또는 세포증식억제제(cytostatic agent)(예를 들어, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티듐 브로마이드, 에메틴, 마이토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜치신, 독소루비신, 다우노루비신, 다이하이드록시 안트라신, 메이탄시노이드, 예컨대 DM-1 및 DM-4, 다이온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 푸로마이신, 에피루비신 및 사이클로포스파미드 및 유사체)이다.

[0122] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 내인성 CD40 또는 재조합 CD40을 인식한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 CD40을 인식한다.

[0123] 일부 실시양태에서, 야생형 마우스(예를 들어, C57BL/6 마우스)에서 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 반감기는 적어도 10일, 적어도 11일, 적어도 12일, 적어도 13일, 적어도 14일, 적어도 15일, 적어도 16일, 적어도 17일 또는 적어도 18일이다. 일부 실시양태에서, CD40 유전자 인간화 마우스(예를 들어, hCD40 마우스)에서 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 반감기는 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 3일, 적어도 4일 또는 적어도 5일이다.

[0124] 일부 실시양태에서, 야생형 마우스(예를 들어, C57BL/6 마우스)에서 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제거율(CL)은 7ml/일/kg 미만, 6ml/일/kg 미만, 5ml/일/kg 미만 또는 4ml/일/kg 미만이다. 일부 실시양태에서, CD40 유전자 인간화 마우스(예를 들어, hCD40 마우스)에서 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제거율(CL)은 15ml/일/kg 미만, 14ml/일/kg 미만, 13ml/일/kg 미만 또는 12ml/일/kg 미만이다.

[0125] 일부 실시양태에서, FcRn 유전자 인간화 마우스(예를 들어, hFcRn 마우스)에서 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 반감기는 적어도 6일, 적어도 7일, 적어도 8일, 적어도 9일, 적어도 10일, 적어도 11일, 적어도 12일, 적어도 13일 또는 적어도 14일이다. 일부 실시양태에서, FcRn 유전자 인간화 마우스(예를 들어, hFcRn 마우스)에서 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제거율(CL)은 16ml/일/kg 미만, 15ml/일/kg 미만, 14ml/일/kg 미만, 13ml/일/kg 미만, 12ml/일/kg 미만, 11ml/일/kg 미만, 10ml/일/kg 미만, 9ml/일/kg 미만, 8ml/일/kg 미만 또는 7ml/일/kg 미만이다.

[0126] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 내인성, 재조합 또는 인간 CD40을 발현하는 세포로 진입할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 세포내이입을 통해 세포로 진입할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 세포내이입을 통해 세포(예를 들어, CD40 발현 세포)의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 100%에 진입한다.

[0127] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 면역 자극 효과를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 면역 억제 효과를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 면역 기능(예를 들어, 항원 유도 항체 생성)을 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 투여되지 않은 경우 동일한 면역 기능과 비교하여 95% 미만, 90% 미만, 85% 미만, 80% 미만, 75% 미만, 70% 미만, 65% 미만, 60% 미만, 55% 미만, 50% 미만, 45% 미만, 40% 미만, 35% 미만, 30% 미만, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만으로 억제한다.

[0128] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 면역 억제 효과는 가역적이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 면역 억제 효과는 불가역적이다. 일부 실시양태에서, 대상체(예를 들어, 마우스)의 면역 기능(예를 들어, T 세포 의존성 체액 면역 기능)은 대상체에게 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 투여한 후 적어도 10일, 적어도 15일, 적어도 20일, 적어도 25일, 적어도 30일, 적어도 32일, 적어도 35일, 적어도 40일, 적어도 45일 또는 적어도 60일 후 회복된다. 일부 실시양태에서, 대상체(예를 들어, 마우스)의 면역 기능(예를 들어, T 세포 의존성 체액 면역 기능)은 대상체에게 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하기 전 동일한 면역 기능과 비교하여 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 그 이상으로 회복된다.

[0129] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 면역 억제 효과는 대상체(예를 들어, 마우스)의 면역계의 기관(예를 들어, 비장)에서 $CD20^{+}/CD19^{+}$ 세포의 백분율을 감소시키지 않는다.

[0130] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 약 0.1μg/ml, 약 0.2μg/mL, 약 0.3μg/mL, 0.4μg/mL, 0.5μg/mL, 1μg/mL, 2μg/mL, 5μg/mL, 10μg/mL 이하의 농도로 CD40 수용체를 포화시킨다.

[0131] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD40에 대한 CD154의 결합을 95% 미만, 90% 미만, 85% 미만, 80% 미만, 75% 미만, 70% 미만, 65% 미만, 60% 미만, 55% 미만, 50% 미만, 45% 미만, 40% 미만, 35% 미만, 30% 미만, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만으로 감소시킨다.

[0132] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 CD40 수용체 점유율(RO%)은 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 100%이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 활성화된 B 세포의 백분율을 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 투여되지 않은 경우 활성화된 B 세포의 백분율과 비교하여 95% 미만, 90% 미만, 85% 미만, 80% 미만, 75% 미만, 70% 미만, 65% 미만, 60% 미만, 55% 미만, 50% 미만, 45% 미만, 40% 미만, 35% 미만, 30% 미만, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만으로 감소시킨다.

[0133] **항체 특징**

[0134] 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD40과 CD40 리간드(예를 들어, CD154) 사이의 결합을 차단할 수 있다.

[0135] 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD40 작용제 또는 길항제일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 CD40에 결합하여 CD40 신호전달 경로를 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 면역 반응을 상향 조절할 수 있거나 면역 반응을 하향 조절할 수 있다.

[0136] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 면역 반응, 활성 또는 면역 세포(예를 들어, T 세포, CD8+ T 세포, CD4+ T 세포, 대식세포, 항원 제시 세포)의 수를 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 2배, 3배, 5배, 10배 또는 20배 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 활성 또는 면역 세포(예를 들어, T 세포, CD8+ T 세포, CD4+ T 세포, 대식세포, 항원 제시 세포)의 수를 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 2배, 3배, 5배, 10배 또는 20배 감소시킬 수 있다.

[0137] 일부 구현에서, 항체(또는 이의 항원 결합 단편)는 $0.1s^{-1}$ 미만, $0.01s^{-1}$ 미만, $0.001s^{-1}$ 미만, $0.0001s^{-1}$ 미만 또는 $0.00001s^{-1}$ 미만의 해리 속도(koff)로 CD40(인간 CD40, 원숭이 CD40(예를 들어, 붉은털 원숭이, 필리핀 원숭이), 개 CD40, 마우스 CD40 및/또는 키메라 CD40)에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 해리 속도(koff)는 $0.01s^{-1}$ 초과, $0.001s^{-1}$ 초과, $0.0001s^{-1}$ 초과, $0.00001s^{-1}$ 초과 또는 $0.000001s^{-1}$ 초과이다.

[0138] 일부 실시양태에서, 동역학적 결합 속도(kon)는 1×10^{2}/Ms 초과, 1×10^{3}/Ms 초과, 1×10^{4}/Ms 초과, 1×10^{5}/Ms 초과 또는 1×10^{6}/Ms 초과이다. 일부 실시양태에서, 동역학적 결합 속도(kon)는 1×10^{5}/Ms 미만, 1×10^{6}/Ms 미만, 또는 1×10^{7}/Ms 미만이다.

[0139] 동역학적 속도 상수(KD=koff/kon)의 몫으로부터 친화성을 추론할 수 있다. 일부 실시양태에서, KD는 1×10^{-6}M 미만, 1×10^{-7}M 미만, 1×10^{-8}M 미만, 1×10^{-9}M 미만 또는 1×10^{-10}M 미만이다. 일부 실시양태에서, KD는 50nm,

30nM, 20nM, 15nM, 10nM, 9nM, 8nM, 7nM, 6nM, 5nM, 4nM, 3nM, 2nM 또는 1nM 미만이다. 일부 실시양태에서, KD는 1×10^{-7}M 초과, 1×10^{-8}M 초과, 1×10^{-9}M 초과, 1×10^{-10}M 초과, 1×10^{-11}M 초과 또는 1×10^{-12}M 초과이다.

[0140] 항원에 대한 항체의 친화성을 측정하기 위한 일반적인 기법은 예를 들어, ELISA, RIA 및 표면 플라스몬 공명(SPR)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 CD40(서열 번호: 42), 마우스 CD40(서열 번호: 50) 및/또는 키메라 CD40(서열 번호: 49)에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 CD40(서열 번호: 42), 마우스 CD40(서열 번호: 50) 및/또는 키메라 CD40(서열 번호: 49)에 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체는 FcRn(서열 번호: 51)에 결합한다.

[0141] 일부 실시양태에서, 열 안정성이 결정된다. 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편은 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 또는 95℃ 초과의 Tm을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, Tm은 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 또는 95℃ 미만이다.

[0142] 일부 실시양태에서, 항체는 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190% 또는 200% 초과의 종양 성장 억제 백분율(TGI%)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체는 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 또는 200% 미만의 종양 성장 억제 백분율을 갖는다. TGI%는, 예를 들어, 처리 시작 후 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30일에, 또는 처리 시작 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개월에 결정될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 종양 성장 억제 백분율(TGI%)은 하기 공식을 사용하여 계산된다:

[0143] TGI (%) = [1-(Ti-T0)/(Vi-V0)]×100%

[0144] Ti는 i일차에 처리군의 평균 종양 부피이다. T0은 0일차에 처리군의 평균 종양 부피이다. Vi는 i일차에 대조군의 평균 종양 부피이다. V0은 0일차에 대조군의 평균 종양 부피이다.

[0145] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD40 길항제이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 CD40를 발현하는 표적 세포에서의 CD40 신호 전달을 감소시킨다.

[0146] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 APC(예를 들어, DC 세포) 기능을 향상시킬 수 있고, 예를 들어, 공동자극 및 MHC 분자의 표면 발현을 유도하고, 전염증성 사이토카인의 생성을 유도하고/하거나 T 세포 유발 기능을 향상시킬 수 있다.

[0147] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 CD40을 발현하는 종양 세포에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 보체 매개 세포독성(CMC) 및/또는 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 유도하며, 종양 세포를 사멸시킬 수 있다.

[0148] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 기능적 Fc 영역을 갖는다. 일부 실시양태에서, 기능성 Fc 영역의 이펙터 기능은 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)이다. 일부 실시양태에서, 기능성 Fc 영역의 이펙터 기능은 식세포작용이다. 일부 실시양태에서, 기능성 Fc 영역의 이펙터 기능은 ADCC 및 식세포작용이다.

[0149] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 유도할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 유도할 수 없다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 보체 매개 세포독성(CMC)을 유도할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 보체 매개 세포독성(CMC)을 유도할 수 없다.

[0150] 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG1, 인간 IgG2, 인간 IgG3, 또는 인간 IgG4이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 IgG1 항체이며, 선택적으로 SI 돌연변이, LALA 돌연변이, N297A 돌연변이, YTE 돌연변이 및/또는 FLAA 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 IgG4 항체이며, 선택적으로 SI 돌연변이, LALA 돌연변이, N297A 돌연변이, YTE 돌연변이 및/또는 FLAA 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 항체이다.

[0151] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 기능적 Fc 영역을 갖지 않는다. 예를 들어, 항체 또는 항원 결합 단편은 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv 단편이다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 LALA 돌연변이(EU 넘버링에 따라 L234A 및 L235A 돌연변이) 또는 LALA-PG 돌연변이(EU 넘버링에 따라 L234A, L235A, P329G 돌연변이)를 갖는다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 FLAA 돌연변이(EU 넘버링에 따라 F234A 및 L235A)를 갖는다. 일부 실시양태

에서, Fc는 SI 돌연변이(EU 넘버링에 따라 S239D 및 I332E 돌연변이)를 갖는다. 일부 실시양태에서, Fc는 EU 넘버링에 따라 N297A 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, Fc는 YTE 돌연변이(EU 넘버링에 따라 M252Y, S254T 및 T256E)를 갖는다.

[0152] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호: 52~59 중 어느 하나와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0153] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 PMBC 증식을, 아이소타입 대조 항체(예를 들어, hIgG1)와 비교하여, 예를 들어, 90% 미만, 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만 또는 30% 미만으로 억제할 수 있다.

[0154] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 B 세포 증식 및/또는 B 세포 활성화를 억제할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편을 처리 시 PMBC 세포에 있는 활성화된 B 세포 서브세트의 백분율은 아이소타입 대조 항체(예를 들어, hIgG1)를 처리 시의 백분율과 비교하여 90% 미만, 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만 또는 5% 미만으로 감소시킬 수 있다.

[0155] **항-CD40 항체의 제조 방법**

[0156] 폴리클로날 및 모노클로날 항체 제조를 위한 표준 기법을 사용하여 항체를 생성하기 위해 인간 CD40의 단리된 단편은 면역원으로 사용될 수 있다. 폴리클로날 항체는 항원성 펩티드 또는 단백질을 여러 회 주사(예를 들어, 피하 또는 복강 내 주사)하여 동물에서 생성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원성 펩티드 또는 단백질은 적어도 하나의 보조제와 함께 주사된다. 일부 실시양태에서, 항원성 펩티드 또는 단백질은 면역화될 종에서 면역원성인 작용제에 접합될 수 있다. 동물에게 항원성 펩티드 또는 단백질을 1회 이상(예를 들어, 2회, 3회 또는 4회) 주사할 수 있다.

[0157] 전장 폴리펩티드 또는 단백질이 사용될 수 있거나, 대안적으로, 이의 항원성 펩티드 단편이 면역원으로 사용될 수 있다. 단백질의 항원성 펩티드는 CD40의 아미노산 서열의 적어도 8개(예를 들어, 적어도 10개, 15개, 20개, 또는 30개)의 아미노산 잔기를 포함하고 단백질의 에피토프를 망라하여 펩티드에 대해 생성된 항체가 단백질과 함께 특정 면역 착물을 형성하도록 한다. 위에 기재된 바와 같이, 인간 CD40의 전장 서열(서열 번호: 42)은 당업계에 알려져 있다. 일부 실시양태에서, Fc-표기 또는 His-표기 인간 CD40 단백질이 면역원으로 사용된다.

[0158] 면역원은 전형적으로 적합한 대상체(예를 들어, 적어도 하나의 인간 면역글로불린 유전자좌를 발현하는 인간 또는 유전자 변형 동물)를 면역화하여 항체를 제조하는 데 사용된다. 적절한 면역원성 제제는 예를 들어 재조합적으로 발현되거나 화학적으로 합성된 폴리펩티드(예를 들어, 인간 CD40의 단편)를 함유할 수 있다. 상기 제제는 프로인트 완전 또는 불완전 보조제 또는 유사한 면역자극제와 같은 보조제를 추가로 포함할 수 있다.

[0159] 폴리클로날 항체는 면역원으로서 CD40 폴리펩티드 또는 이의 항원성 펩티드(예를 들어, CD40의 일부)로 적합한 대상체를 면역화하여 위에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 면역화된 대상체의 항체 역가는 고정된 CD40 폴리펩티드 또는 펩티드를 사용하는 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA)과 같은 표준 기법에 의해 시간 경과에 따라 모니터링될 수 있다. 원하는 경우, 해당 항체 분자는 포유동물로부터(예를 들어 혈액으로부터) 단리될 수 있으며, 단백질 A 또는 단백질 G 크로마토그래피와 같은 잘 알려진 기법에 의해 추가로 정제되어 IgG 분획을 수득할 수 있다. 면역화 후 적절한 시점에, 예를 들어 특정 항체 역가가 가장 높을 때, 항체 생성 세포를 대상체로부터 수득할 수 있으며 표준 기법, 예컨대, Kohler 등 (*Nature* 256:495-497, 1975)에서 최초로 기재된 하이브리도마 기법, 인간 B 세포 하이브리도마 기법(Kozbor 등, *Immunol. Today* 4:72, 1983), EBV 하이브리도마 기법(Cole 등, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985) 또는 트라이오마 기법에 의해 모노클로날 항체를 제조하는 데 사용될 수 있다. 하이브리도마를 생성하는 기술은 널리 알려져 있다(일반적으로 Current Protocols in Immunology, 1994, Coligan 등 (편집), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY 참조). 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마 세포는 관심 폴리펩티드 또는 에피토프에 결합하는 항체에 대한 하이브리도마 배양 상청액을 스크리닝하여, 예를 들어, 표준 ELISA 검정을 사용하여 검출된다.

[0160] 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편의 변이체는 적절한 뉴클레오티드 변화를 본원에 기재된 인간, 인간화 또는 키메라 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 DNA에 도입하거나 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 변이체는, 예를 들어 항체의 항원 결합 부위 또는 항원 결합 도메인을 구성하는 아미노산 서열 내 잔기의 결실, 삽입 또는 치환을 포함한다. 이와 같은 변이체 집단에서, 일부 항체 또는 항원 결합 단편은 표적 단백질, 예를 들어, CD40에 대한 증가된 친화성을 가질 것이다. 결합 친화성이 증가된 항체 또는 이의 항원 결합 단

편에 도달하기 위해 결실, 삽입 및/또는 조합의 임의의 조합이 이루어질 수 있다. 항체 또는 항원 결합 단편에 도입된 아미노산 변화는 또한 글리코실화 부위의 수를 변경하는 것(예를 들어, 증가 또는 감소), 글리코실화 부위의 유형을 변경하하는 것(예를 들어, 상이한 당이 세포에 존재하는 효소에 의해 부착되도록 아미노산 서열을 변경) 또는 새로운 글리코실화 부위를 도입하는 것과 같이 항체 또는 항원 결합 단편에 새로운 번역 후 변형을 변경하거나 도입할 수 있다.

[0161] 본원에 개시된 항체는 포유동물을 포함하는 임의의 종의 동물로부터 유래될 수 있다. 천연 항체의 비제한적인 예는, 인간, 영장류, 예를 들어 원숭이 및 유인원, 소, 돼지, 말, 양, 낙타류(예를 들어, 낙타 및 라마), 닭, 염소 및 설치류(예를 들어, 래트, 마우스, 햄스터 및 토끼)로부터 유래한 항체를 포함하며, 이는 인간 항체를 생성하도록 유전자적으로 조작된 유전자 변형 설치류를 포함한다.

[0162] 인간 및 인간화 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래한(또는 이로부터 유래한 것과 동일한 아미노산 서열을 갖는) 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함한다. 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않은 아미노산 잔기(예를 들어, 체외에서 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이생성에 의해 또는 체내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를, 예를 들어, CDR에 포함할 수 있다.

[0163] 인간화 항체는 전형적으로 비인간 CDR이 이식된 인간 프레임워크(FR)를 갖는다. 따라서, 인간화 항체는 비인간 공급원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 서열을 갖는다. 이러한 비인간 아미노산 잔기는 흔히 "유입"(import) 잔기라고 하며, 이는 전형적으로 "유입" 가변 도메인으로부터 유래한다. 인간화는 기본적으로 예를 들어 설치류 CDR 또는 CDR 서열을 인간 항체의 상응하는 서열로 대체함으로써 수행된다. 이러한 방법은 예를 들어, Jones 등, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann 등, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen 등, Science, 239:1534-1536 (1988)에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다. 따라서, "인간화" 항체는 온전한 인간 V 도메인보다 실질적으로 더 적은 부분이 비인간 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 치환된 키메라 항체이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기와 일부 FR 잔기가 인간 항체의 유사성 부위의 잔기에 의해 대체되는 마우스 항체이다.

[0164] 인간화 항체 제조에 사용되는 인간 VH 및 VL 도메인의 선택은 면역원성을 감소시키는 데 매우 중요하다. 소위 "최적 적합"(best-fit) 방법에 따르면, 마우스 항체의 V 도메인의 서열은 알려진 인간 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝된다. 이후, 마우스의 서열과 가장 가까운 인간 서열이 인간화 항체에 대한 인간 FR로 받아들여진다(Sims 등, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia 등, J. Mol. Biol., 196:901 (1987)).

[0165] 항원에 대한 높은 특이성과 친화성 및 다른 유리한 생물학적 특성을 유지하면서 항체를 인간화하는 것이 더욱 중요하다. 이러한 목표를 달성하기 위해, 인간화 항체는 모 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 사용하여 모 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물을 분석하는 과정을 통해 제조될 수 있다. 3차원 면역글로불린 모델은 일반적으로 이용 가능하며 당업자에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 형태 구조를 예시하고 표시하는 컴퓨터 프로그램이 이용 가능하다. 이러한 표시를 검사하면 후보 면역글로불린 서열의 기능에서 잔기의 역할 가능성을 분석할 수 있는데, 즉, 후보 면역글로불린이 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석이 가능하다. 이러한 방식으로, 표적 항원에 대한 증가된 친화성과 같은 원하는 항체 특징이 달성되도록 수용자 및 유입 서열로부터 FR 잔기를 선택하고 조합할 수 있다.

[0166] 통상적으로, 인간, 인간화 또는 키메라 항-CD40 항체의 아미노산 서열 변이체는 원래 항체의 경쇄 또는 중쇄에 존재하는 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 함유할 것이다.

[0167] 일부 실시양태에서, 인간화 중쇄 면역글로불린 유전자좌 및 인간화 카파 사슬 면역글로불린 유전자좌를 갖는 마우스(예를 들어, RenMab™ 마우스)를 사용하여 항체를 생성한다. 중쇄 면역글로불린 유전자좌는 항체 중쇄의 유전자를 함유하는 염색체에 있는 영역이다. 유전자좌는 예를 들어, 인간 IGHV(가변) 유전자, 인간 IGHD(다양성) 유전자, 인간 IGHJ(결합) 유전자 및 마우스 중쇄 불변 도메인 유전자를 포함할 수 있다. 카파 사슬 면역글로불린 유전자좌는 항체 경쇄(카파 사슬)를 코딩하는 유전자를 함유하는 염색체에 있는 영역이다. 카파 사슬 면역글로불린 유전자좌는 예를 들어, 인간 IGKV (가변) 유전자, 인간 IGKJ (결합) 유전자 및 마우스 경쇄 불변 도메인 유전자를 포함할 수 있다. RenMab™ 마우스에 관한 상세한 설명은 PCT/CN2020/075698에서 찾을 수 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0168] 일부 실시양태에서, 인간화 중쇄 면역글로불린 유전자좌 및 인간화 카파 사슬 면역글로불린 유전자좌를 갖는 마

우스(예를 들어, RenLite™ 마우스)를 사용하여 항체를 생성한다. 중쇄 면역글로불린 유전자좌는 항체 중쇄의 유전자를 함유하는 염색체에 있는 영역이다. 유전자좌는 예를 들어, 인간 IGHV(가변) 유전자, 인간 IGHD(다양성) 유전자, 인간 IGHJ(결합) 유전자 및 마우스 중쇄 불변 도메인 유전자를 포함할 수 있다. 카파 사슬 면역글로불린 유전자좌는 일반적인 경쇄를 코딩하는 유전자를 함유하는 염색체에 있는 영역이다. 카파 사슬 면역글로불린 유전자좌는 예를 들어, 인간 IGKV(가변) 유전자, 인간 IGKJ(결합) 유전자 및 마우스 경쇄 불변 도메인 유전자를 포함할 수 있다. RenLite™ 마우스에 관한 상세한 설명은 PCT/CN2021/097652에서 찾을 수 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0169] 마우스에 의해 생성된 항체는 완전한 인간 VH, 완전한 인간 VL 및 마우스 불변 영역을 갖는다. 일부 실시양태에서, 인간 VH 및 인간 VL은 인간 IgG 불변 영역(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4)에 연결된다. 일부 실시양태에서, 불변 영역은 서열 번호: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 또는 59와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 갖는다.

[0170] 원래 서열에 대한 동일성 또는 상동성은 일반적으로 서열을 정렬하고, 필요한 경우 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 갭을 도입한 후, 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 치환을 고려하지 않고, 인간, 인간화 또는 키메라 항-CD40 항체 또는 단편 내에 존재하는 서열과 동일한 후보 서열 내에 존재하는 아미노산 잔기의 백분율이다.

[0171] 항-CD40 항체 또는 항원 결합 단편에 대한 추가 변형이 이루어질 수 있다. 예를 들어, 시스테인 잔기가 Fc 영역에 도입되어 이러한 영역에서 쇄간 이황화 결합이 형성될 수 있다. 이와 같이 생성된 동종이량체 항체는 체외 및/또는 체내에서 임의의 증가된 반감기를 가질 수 있다. 체외 및/또는 체내에서 증가된 반감기를 갖는 동종이량체 항체는 또한 예를 들어, (*Cancer Res.* 53:2560-2565, 1993)에 기재된 바와 같이 이종이기능성 가교연결자를 사용하여 제조될 수 있다. 대안적으로, 이중 Fc 영역을 갖는 항체를 조작할 수 있다(예를 들어, Stevenson 등, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230, 1989 참조).

[0172] 일부 실시양태에서, 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 공유 결합 변형이 이루어질 수 있다. 이러한 공유 결합 변형은 화학적 또는 효소적 합성이나 효소적 또는 화학적 절단을 통해 이루어질 수 있다. 해당 항체 또는 항체 단편의 다른 유형의 공유 변형은 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제를 항체 또는 단편의 표적화된 아미노산 잔기와 반응시켜 분자 내로 도입된다.

[0173] 일부 실시양태에서, Fc 영역에 (직접적으로 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 결여된 탄수화물 구조를 갖는 항체 변이체가 제공된다. 예를 들어, 이러한 항체 중 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은, 예를 들어, WO 2008/077546에 기재된 바와 같이, MALDI-TOF 질량 분석법에 의해 측정된 바와 같이 Asn 297에 부착된 모든 당구조(예를 들어, 복합, 하이브리드 및 고-만노스 구조)의 합에 대해, Asn297에서 당 사슬 내의 푸코스의 평균 양을 계산하여 결정된다. Asn297은 Fc 영역의 약 위치 297(Fc 영역 잔기의 Eu 넘버링; 또는 Kabat 넘버링의 경우 위치 314)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하나; Asn297은 또한 항체의 사소한 서열 변이로 인해 위치 297의 업스트림 또는 다운스트림, 즉, 위치 294와 300 사이에 약 ±3개 아미노산에 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 글리칸 이질성을 감소시키기 위해, 항체의 Fc 영역은 위치 297의 아스파라긴을 알라닌(N297A)으로 대체하도록 추가로 조작될 수 있다.

[0174] 일부 실시양태에서, Fab-arm 교환을 회피하여 생성 효율을 용이하게 하기 위해, 항체의 Fc 영역을 추가로 조작하여 IgG4의 위치 228(EU 넘버링)의 세린을 프롤린(S228P)으로 대체한다. S228 돌연변이에 관한 상세한 설명은, 예를 들어, Silva 등 "The S228P mutation prevents in vivo and in vitro IgG4 Fab-arm exchange as demonstrated using a combination of novel quantitative immunoassays and physiological matrix preparation." Journal of Biological Chemistry 290.9 (2015): 5462-5469에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0175] **재조합 벡터**

[0176] 본 개시는 또한 본원에 개시된 단리된 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 본원에 개시된 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드)를 포함하는 재조합 벡터(예를 들어, 발현 벡터), (즉, 숙주 세포가 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 함유하도록) 재조합 벡터가 도입되는 숙주 세포 및 재조합 기법에 의한 재조합 항체 폴리펩티드 또는 이의 단편의 생성을 제공한다.

[0177] 본원에서 사용된 바와 같이, "벡터"는 벡터가 숙주 세포에 도입되는 경우 하나 이상의 관심 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 전달할 수 있는 임의의 작제물이다. "발현 벡터"는 발현 벡터가 도입된 숙주 세포에서 코딩된 폴리펩티드로서 하나 이상의 관심 폴리뉴클레오티드를 전달하고 발현할 수 있다. 따라서, 발현 벡터에서, 관심 폴리뉴클레오티드는 벡터 내에서 또는 관심 폴리뉴클레오티드의 통합 부위 근처에 있는 또는 이에 측접하는 숙주 세포의 게놈에서 프로모터, 인핸서 및/또는 폴리-A 테일과 같은 조절 요소와 작동 가능하게 연결되어 벡터 내에서 발현하도록 배치되어, 관심 폴리뉴클레오티드가 발현 벡터와 함께 도입된 숙주 세포에서 번역될 것이다.

[0178] 벡터는 당업계에 알려진 방법, 예를 들어 전기천공, 화학적 형질감염(예를 들어, DEAE-덱스트란), 형질전환, 형질감염, 및 감염 및/또는 형질도입(예를 들어, 재조합 바이러스를 사용)에 의해 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 따라서, 벡터의 비제한적인 예는 바이러스 벡터(재조합 바이러스를 생성하는 데 사용될 수 있음), 네이키드 DNA 또는 RNA, 플라스미드, 코스미드, 파지 벡터 및 양이온성 축합제와 관련된 DNA 또는 RNA 발현 벡터를 포함한다.

[0179] 일부 구현에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 본원에 개시된 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드)는 바이러스 발현 시스템(예를 들어, 백시니아 또는 다른 폭스 바이러스, 레트로바이러스, 또는 아데노바이러스)을 사용하여 도입되며, 이는 비병원성(결함), 복제 적격 바이러스의 사용을 수반할 수 있거나, 복제 결함 바이러스를 사용할 수 있다. 후자의 경우, 바이러스 증식은 일반적으로 바이러스 패키징 세포를 보완하는 경우에만 발생한다. 적합한 시스템은, 예를 들어, Fisher-Hoch 등, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:317-321; Flexner 등, 1989, Ann. N.Y. Acad Sci. 569:86-103; Flexner 등, 1990, Vaccine, 8:17-21; 미국 특허 제4,603,112호, 제4,769,330호 및 제5,017,487호; WO 89/01973; 미국 특허 제4,777,127호; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO 91/02805; Berkner-Biotechniques, 6:616-627, 1988; Rosenfeld 등, 1991, Science, 252:431-434; Kolls 등, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:215-219; Kass-Eisler 등, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11498-11502; Guzman 등, 1993, Circulation, 88:2838-2848; 및 Guzman 등, 1993, Cir. Res., 73:1202-1207에 개시되어 있다. 이러한 발현 시스템에 DNA를 포함시키는 기법은 당업자에게 널리 알려져 있다. DNA는, 또한 예를 들어 Ulmer 등, 1993, Science, 259:1745-1749, 및 Cohen, 1993, Science, 259:1691-1692에 기재된 바와 같이 "네이키드" DNA일 수 있다. 네이키드 DNA의 흡수는 세포 내로 효율적으로 운반되는 생분해성 비드에 DNA를 코팅하여 증가될 수 있다.

[0180] 발현을 위해, 본원에 개시된 항체 코딩 또는 폴리펩티드 코딩 폴리뉴클레오티드를 포함하는 DNA 삽입물은 적절한 프로모터(예를 들어, 이종성 프로모터), 예컨대, 파지 람다 PL 프로모터, 대장균(*E. Coli*) lac, trp 및 tac 프로모터, SV40 초기 및 후기 프로모터 및 레트로바이러스 LTR의 프로모터 등에 작동적으로 연결될 수 있다. 다른 적합한 프로모터는 당업자에게 알려져 있다. 발현 작제물은 전사 개시, 종결 및 전사된 영역에서 번역을 위한 리보솜 결합 부위를 추가로 함유할 수 있다. 작제물에 의해 발현된 성숙 전사체의 코딩 부분은 초기에 개시되는 번역 및 번역될 폴리펩티드의 말단에 적절하게 위치하는 종결 코돈(UAA, UGA 또는 UAG)을 포함할 수 있다.

[0181] 밝혀진 바와 같이, 발현 벡터는 적어도 하나의 선택 가능한 마커를 포함할 수 있다. 이러한 마커는 진핵 세포 배양을 위한 다이하이드로폴레이트 환원효소 또는 네오마이신 저항성 및 대장균(*E. coli*) 및 다른 박테리아에서 배양하기 위한 테트라사이클린 또는 암피실린 저항성 유전자를 포함한다. 적절한 숙주의 대표적인 예는 박테리아 세포, 예컨대, 대장균(*E. coli*), 스트렙토미세스(*Streptomyces*), 및 쥐장티푸스균(*Salmonella typhimurium*) 세포; 진균 세포, 예컨대, 효모 세포; 곤충 세포, 예컨대 초파리 S2 및 담배거세미나방 Sf9 세포; 동물 세포, 예컨대, CHO, COS, 보우 흑색종 및 HK 293 세포; 및 식물 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본원에 기재된 숙주 세포에 대한 적절한 배양 배지 및 조건은 당업계에 알려져 있다.

[0182] 박테리아에 사용하기 위한 비제한적인 벡터는 Qiagen으로부터 이용 가능한 pQE70, pQE60 및 pQE-9; Stratagene으로부터 이용 가능한 pBS 벡터, Phagescript 벡터, Bluescript 벡터, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A; 및 Pharmacia로부터 이용 가능한 ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5를 포함한다. 비제한적인 진핵 벡터는 Stratagene으로부터 이용 가능한 pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 및 pSG; 및 Pharmacia로부터 이용 가능한 pSVK3, pBPV, pMSG 및 pSVL을 포함한다. 다른 적합한 벡터는 당업자에게 용이하게 명백할 것이다.

[0183] 사용하기에 적합한 비제한적인 박테리아 프로모터는 대장균(*E. coli*) lacI 및 lacZ 프로모터, T3 및 T7 프로모터, gpt 프로모터, 람다 PR 및 PL 프로모터 및 trp 프로모터를 포함한다. 적합한 진핵생물 프로모터는 CMV 즉시 초기 프로모터, HSV 티미딘 인산화효소 프로모터, 초기 및 후기 SV40 프로모터, 레트로바이러스 LTR의 프로모터, 예컨대, 라우스 육종 바이러스(RSV)의 프로모터 및 메탈로싸이오네인 프로모터, 예컨대, 마우스 메탈로싸이오네인-I 프로모터를 포함한다.

[0184] 효모 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)에서, 알파 인자, 알코올 산화효소 및 PGH와 같은 구성적 또는 유도성 프로모터를 함유하는 다수의 벡터가 사용될 수 있다. 검토를 위해, Ausubel 등 (1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 및 Grant 등, *Methods Enzymol., 153:* 516-544 (1997)를 참조한다.

[0185] 숙주 세포로의 작제물의 도입은 칼슘 포스페이트 형질감염, DEAE-덱스트란 매개 형질감염, 양이온성 지질 매개 형질감염, 전기천공, 형질도입, 감염 또는 다른 방법에 의해 영향을 받을 수 있다. 이러한 방법은 Davis 등, Basic Methods In Molecular Biology (1986)과 같은 많은 표준 실험실 매뉴얼에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0186] 벡터에 인핸서 서열을 삽입하여 고등 진핵생물에 의한 본 개시의 항체를 코딩하는 DNA의 전사를 증가시킬 수 있다. 인핸서는 제공되는 숙주 세포 유형에서 프로모터의 전사 활성을 증가시키는 작용을 하는 DNA의 시스 작용 요소이며, 일반적으로 약 10 내지 300bp이다. 인핸서의 예는 염기쌍 100 내지 270의 복제 원점 후반부에 위치한 SV40 인핸서, 거대세포바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 원점 후반부에 있는 폴리오마 인핸서, 아데노바이러스 인핸서를 포함한다.

[0187] 번역된 단백질을 소포체의 내강, 주변세포질 공간 또는 세포외 환경으로 분비하기 위해 적절한 분비 신호가 발현된 폴리펩티드에 통합될 수 있다. 이 신호는 폴리펩티드에 내인성일 수 있거나 이종성 신호일 수 있다.

[0188] 해당 폴리펩티드(예를 들어, 항체)는 융합 단백질(예를 들어, GST 융합) 또는 히스티딘-태그와 같은 변형된 형태로 발현될 수 있으며, 분비 신호뿐만 아니라 추가의 이종성 기능 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 추가의 아미노산, 특히 하전된 아미노산의 영역이 폴리펩티드의 N-말단에 첨가되어, 숙주 세포에서의 안정성 및 지속성을 개선시킬 수 있고, 정제 동안, 또는 후속 취급 및 보관 동안 지속될 수 있다. 또한, 정제를 용이하게 하기 위해 폴리펩티드에 펩티드 모이어티를 첨가할 수 있다. 이러한 영역은 폴리펩티드의 최종 제조 전 제거될 수 있다. 특히, 분비 또는 배설을 유발하고, 안정성을 개선하며, 정제를 용이하게 하기 위해 폴리펩티드에 펩티드 모이어티를 첨가하는 것은 당업계에서 친숙하고 일상적인 기법이다.

[0189] **치료 방법**

[0190] 본 개시의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다양한 치료 목적을 위해 사용될 수 있다.

[0191] 일 양태에서, 본 개시는 대상체에서 암을 치료하는 방법, 대상체에서 시간에 따른 종양 부피의 증가 속도를 감소시키는 방법, 전이 발생의 위험을 감소시키는 방법 또는 대상체에서 추가 전이 발생의 위험을 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 치료는 암의 진행을 정지시키거나, 둔화시키거나, 지연시키거나, 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 치료를 통해 대상체에서 암의 하나 이상의 증상의 수, 중증도 및/또는 기간의 감소로 이어질 수 있다.

[0192] 일 양태에서, 본 개시는 치료적 유효량의 본원에 개시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 암이 있거나 암이 있는 것으로 식별되거나 또는 암이 있는 것으로 진단된 대상체), 예를 들어, 유방암(예를 들어, 삼중 음성 유방암), 카르시노이드암, 자궁경부암, 자궁내막암, 신경암, 신경교종, 두경부암, 간암, 폐암, 소세포폐암, 림프종, 흑색종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신장암, 대장암, 위암, 고환암, 갑상선암, 방광암, 요도암 또는 혈액학적 악성 종양이 있는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 상기 암은 절제 불가능한 흑색종 또는 전이성 흑색종, 비소세포폐암(NSCLC), 소세포폐암(SCLC), 방광암 또는 전이성 호르몬 불응성 전립선암이다. 일부 실시양태에서, 상기 대상체는 고형 종양이 있다. 일부 실시양태에서, 상기 암은 두경부 편평세포암(SCCHN), 신세포 암(RCC), 삼중 음성 유방암(TNBC) 또는 결장직장암이다. 일부 실시양태에서, 상기 대상체는 호지킨 림프종이 있다. 일부 실시양태에서, 상기 대상체는 삼중 음성 유방암(TNBC), 위암, 요로상피암, 메르켈 세포암 또는 두경부암이 있다. 일부 실시양태에서, 상기 암은 흑색종, 췌장암, 중피종, 혈액학적 악성 종양, 특히, 비호지킨 림프종, 림프종, 만성 림프구성 백혈병 또는 진행성 고형 종양이다.

[0193] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물 및 방법은 암 위험이 있는 환자의 치료에 사용될 수 있다. 암 환자는 당업계에 알려진 다양한 방법으로 식별될 수 있다.

[0194] 일 양태에서, 본 개시는, 예를 들어, APC 세포의 기능 특성에 영향을 미침(예를 들어, CD40과 CD40L 사이의 상호작용을 차단함)으로써, 이상 또는 원치 않는 면역 반응과 관련되는 장애, 예를 들어, 자가면역 장애를 치료하거나, 예방하거나, 이의 진행 위험을 감소시키기 위한 방법을 제공한다. 이러한 자가면역 장애는 원형 탈모증,

루푸스, 강직성 척추염, 메니에르병, 항인지질 증후군, 혼합 결합 조직 질환, 자가면역 애디슨병, 다발성 경화증, 자가면역 용혈성 빈혈, 중증 근육무력증, 자가면역 간염, 심상성 천포창, 베체트병, 악성 빈혈, 수포성 유천포창, 다발성관절염 결절증, 심근병증, 다발연골염, 복강 스프루-피부염, 다선성 증후군, 만성 피로 증후군(CFIDS), 류마티스성 다발근통, 만성 염증성 탈수초증, 다발근염 및 피부근염, 만성 염증성 다발신경병증, 원발성 무감마글로불린혈증, 처그-스트라우스 증후군, 원발성 담즙성 간경화증, 반흔성 유천포창, 건선, CREST, 레이노 현상, 한랭 응집소 질환, 라이터 증후군, 크론병, 류마티스열, 원반상 루푸스, 류마티스 관절염, 한랭글로불린혈증 유육종증, 섬유근통, 경피증, 그레이브병, 쇼그렌 증후군, 길랭-바레, 경직 증후군, 하시모토 갑상선염, 타카야수 동맥염, 특발성 폐섬유증, 측두동맥염/거대 세포 동맥염, 특발성 혈소판감소증(ITP), 궤양성 대장염, IgA 신병증, 포도막염, 당뇨병(예를 들어, 1형), 혈관염, 편평 태선 및 백반증을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 또한 세포, 조직 또는 장기 이식, 예를 들어, 신장, 간 및 심장 이식, 예를 들어, 이식편 대 숙주 질환(GVHD)과 관련된 비정상적이거나 원치 않는 면역 반응과 연관되는 장애를 치료하거나, 방지하거나, 이의 진행 위험을 감소시키거나, 동종이식 거부를 방지하기 위해 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 피부과 장애, 간 질환(예를 들어, 간경변), 히드라데니스, 실험적 자가면역 뇌척수염이 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 신장 질환, 루푸스, 쇼그렌 증후군, 궤양성 대장염, 건선, 알레르기성 피부염, 아토피성 피부염, 농가진, 면역성 혈소판 감소증(ITP) 또는 다른 염증성 관절염이 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 다발성 경화증 또는 중증 근무력증이 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 크론병, 궤양성 결장염 또는 1형 당뇨병이 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 자가면역 갑상선 질환, 그레이브스병, 다발성 경화증, 건선, 염증성 장 질환(예를 들어, 크론병(CD) 및 궤양성 대장염), 류마티스 관절염, 쇼그렌 증후군, 자가면역성 신염 또는 전신성 홍반성 루푸스가 있다. CD40과 다양한 자가면역 질환의 관계는 예를 들어, Peters 등, "CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator" Seminars in immunology. Vol. 21. No. 5. Academic Press, 2009 및 Karnell, Jodi L. 등 "Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond." Advanced drug delivery reviews (2018); Albach 등 "Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of single rising doses of BI 655064, an antagonistic anti-CD40 antibody in healthy subjects: a potential novel treatment for autoimmune diseases." European journal of clinical pharmacology 74.2 (2018): 161-169;에 개시되어 있으며, 각각의 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0195] 본원에서 사용된 바와 같이, "유효량"은 질환, 예를 들어, 자가면역 질환 또는 암의 진행을 정지시키거나, 둔화시키거나, 지연시키거나 억제하는 것을 포함하는 유익하거나 원하는 결과를 달성하기에 충분한 양 또는 용량을 의미한다. 유효량은, 예를 들어, 항체, 항원 결합 단편, 항체 코딩 폴리뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 및/또는 이의 조성물이 투여될 대상의 연령 및 체중, 증상의 중증도 및 투여 경로에 따라 달라질 것이며, 따라서 투여는 개별적 기준으로 결정될 수 있다.

[0196] 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 항원 결합 단편의 유효량은 환자의 자가면역 질환 또는 암의 진행을 개선, 정지, 안정화, 역촉진, 억제, 둔화 및/또는 지연시키기에 충분한 양이거나, 체외에서 세포(예를 들어, 생검된 세포, 본원에 기재된 임의의 암 세포, 또는 세포주(예를 들어, 암 세포주))의 증식을 개선, 정지, 안정화, 역촉진, 둔화 및/또는 지연시키기에 충분한 양이다. 당업계에서 이해되는 바와 같이, 항체 또는 항원 결합 단편의 유효량은, 특히, 환자 이력뿐만 아니라 사용된 항체의 유형(및/또는 용량)과 같은 다른 요소에 따라 달라질 수 있다.

[0197] 본원에 개시된 항체, 항체 코딩 폴리뉴클레오티드 및/또는 조성물을 투여하기 위한 유효량 및 일정은 경험적으로 결정될 수 있으며, 이와 같은 결정은 당업자의 능력 범위 내에 있다. 당업자는 투여되어야 하는 용량이, 예를 들어, 본원에 개시된 항체, 항체 코딩 폴리뉴클레오티드 및/또는 조성물이 투여되는 포유동물, 투여의 경로, 특정 유형의 항체, 항체 코딩 폴리뉴클레오티드, 항원 결합 단편 및/또는 본원에 개시된 조성물 및 포유동물에게 투여되는 다른 약물에 따라 달라질 것임을 이해할 것이다. 항체 또는 항원 결합 단편에 대한 적절한 용량을 선택하는 지침은 항체 및 항원 결합 단편의 치료적 용도에 대한 문헌, 예를 들어, Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone 등 편집, Noges Publications, Park Ridge, N.J., 1985, ch. 22 및 pp. 303-357; Smith 등, Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber 등 편집, Raven Press, New York, 1977, pp. 365-389에서 찾을 수 있다.

[0198] 항체의 유효량의 전형적인 일일 용량은 0.01mg/kg 내지 100mg/kg이다. 일부 실시양태에서, 용량은 100mg/kg, 10mg/kg, 9mg/kg, 8mg/kg, 7mg/kg, 6mg/kg, 5mg/kg, 4mg/kg, 3mg/kg, 2mg/kg, 1mg/kg, 0.5mg/kg, 또는 0.1mg/kg 미만일 수 있다. 일부 실시양태에서, 용량은 10mg/kg, 9mg/kg, 8mg/kg, 7mg/kg, 6mg/kg, 5mg/kg,

4mg/kg, 3mg/kg, 2mg/kg, 1mg/kg, 0.5mg/kg, 0.1mg/kg, 0.05mg/kg 또는 0.01mg/kg 초과일 수 있다. 일부 실시양태에서, 용량은 약 10mg/kg, 9mg/kg, 8mg/kg, 7mg/kg, 6mg/kg, 5mg/kg, 4mg/kg, 3mg/kg, 2mg/kg, 1mg/kg, 0.9mg/kg, 0.8mg/kg, 0.7mg/kg, 0.6mg/kg, 0.5mg/kg, 0.4mg/kg, 0.3mg/kg, 0.2mg/kg 또는 0.1mg/kg이다.

[0199] 본원에 기재된 임의의 방법에서, 하나 이상의 항체, 이의 항원 결합 단편 또는 약학적 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 항체, 항원 결합 단편 또는 약학적 조성물) 및 선택적으로 하나 이상의 추가 치료제가 대상체에게 적어도 주 1회(예를 들어, 주 1회, 주 2회, 주 3회, 주 4회, 일 1회, 일 2회 또는 일 3회) 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 두 가지 상이한 항체 및/또는 항원 결합 단편이 동일한 조성물(예를 들어, 액체 조성물)로 투여된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 항체 또는 항원 결합 단편 및 적어도 하나의 추가 치료제가 동일한 조성물(예를 들어, 액체 조성물)로 투여된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 항체 또는 항원 결합 단편 및 하나 이상의 추가 치료제는 두 가지 상이한 조성물(예를 들어, 하나 이상의 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는 액체 조성물 및 하나 이상의 추가 치료제를 함유하는 고체 경구 조성물)로 투여된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 추가 치료제는 알약, 정제 또는 캡슐로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 추가 치료제는 서방성 경구 제형으로 투여된다.

[0200] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 추가 치료제는 적어도 하나의 항체, 항원 결합 항체 단편 또는 약학적 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 항체, 항원 결합 항체 단편 또는 약학적 조성물)을 투여하기 전 또는 후에 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 추가 치료제 및 적어도 하나의 항체, 항원 결합 항체 단편 또는 약학적 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 항체, 항원 결합 항체 단편 또는 약학적 조성물)은 대상체에서 하나 이상의 추가 치료제 및 적어도 하나의 항체 또는 항원 결합 단편(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편)의 생활성 기간에 중첩이 존재하도록 대상체에게 투여된다.

[0201] 일부 실시양태에서, 대상체는 연장된 기간에 걸쳐(예를 들어, 적어도 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 1년, 2년, 3년, 4년 또는 5년의 기간에 걸침) 적어도 하나의 항체, 항원 결합 항체 단편 또는 약학적 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 항체, 항원 결합 항체 단편 또는 약학적 조성물)을 투여할 수 있다. 숙련된 의료 전문가는 치료의 효과를 진단하거나 추적하기 위해 본원에 기재된 방법 중 임의의 방법(예를 들어, 암의 적어도 하나의 증상에 대한 관찰)을 사용하여 치료 기간을 결정할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 숙련된 의료 전문가는 또한 대상체에게 투여되는 항체 또는 항원 결합 항체 단편(및/또는 하나 이상의 추가 치료제)의 정체 및 수를 변경(예를 들어, 증가 또는 감소)할 수 있고, 또한 (예를 들어, 본원에 기재되고 당업계에 알려진 임의의 방법을 사용하여) 치료 효과의 평가에 기초하여 대상체에 대한 적어도 하나의 항체 또는 항원 결합 항체 단편(및/또는 하나 이상의 추가 치료제)의 투여의 용량 또는 빈도를 조정(예를 들어, 증가 또는 감소)할 수 있다.

[0202] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 추가 치료제가 대상체에게 투여될 수 있다. 상기 추가 치료제는 B-Raf의 억제제, EGFR 억제제, MEK의 억제제, ERK의 억제제, K-Ras의 억제제, c-Met의 억제제, 역형성 림프종 인산화효소(ALK)의 억제제, 포스파티딜이노시톨 3-인산화효소(PI3K)의 억제제, Akt의 억제제, mTOR의 억제제, 이중 PI3K/mTOR 억제제, 브루톤의 티로신 인산화효소(BTK)의 억제제 및 아이소시트레이트 탈수소효소 1(IDH1) 및/또는 아이소시트레이트 탈수소효소 2(IDH2)의 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 억제제를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가 치료제는 인돌아민 2,3-이산소화효소-1(IDO1)의 억제제(예를 들어, 에파카도스타트)이다.

[0203] 일부 실시양태에서, 추가 치료제는 HER3의 억제제, LSD1의 억제제, MDM2의 억제제, BCL2의 억제제, CHK1의 억제제, 활성화된 고슴도치 신호전달 경로의 억제제 및 에스트로겐 수용체를 선택적으로 분해하는 작용제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 억제제를 포함할 수 있다.

[0204] 일부 실시양태에서, 추가 치료제는 트라벡테딘, nab-파클리탁셀, 트레바나닙, 파조파닙, 세디라닙, 팔보시클립, 에베롤리무스, 플루오로피리미딘, IFL, 레고라페닙, 레오리신, 알림타, 지카디아, 서텐트, 템시롤리무스, 악시티닙, 에베롤리무스, 소라페닙, 보트리엔트, 파조파닙, IMA-901, AGS-003, 카보잔티닙, 빈플루닌, Hsp90 억제제, Ad-GM-CSF, 테마졸로미드, IL-2, IFNa, 빈블라스틴, 탈로미드, 다카바진, 사이클로포스파마이드, 레날리도마이드, 아자시티딘, 레날리도마이드, 보르테조미드, 암루비신, 카르필조밉, 프랄라트렉세이트 및 엔자스타우린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치료제를 포함할 수 있다.

[0205] 일부 실시양태에서, 추가 치료제는 보조제, TLR 작용제, 종양 괴사 인자(TNF) 알파, IL-1, HMGB1, IL-10 길항제, IL-4 길항제, IL-13 길항제, IL-17 길항제, HVEM 길항제, ICOS 작용제, CX3CL1을 표적화하는 치료, CXCL9를 표적화하는 치료, CXCL10을 표적화하는 치료, CCL5를 표적화하는 치료, LFA-1 작용제, ICAM1 작용제 및

셀렉틴 작용제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치료제를 포함할 수 있다.

[0206] 일부 실시양태에서, 카보플라틴, nab-파클리탁셀, 파클리탁셀, 시스플라틴, 페메트렉스드, 젬시타빈, FOLFOX, 또는 FOLFIRI가 대상체에게 투여된다.

[0207] 일부 실시양태에서, 추가 치료제는 항-OX40 항체, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-PD-L2 항체, 항-LAG-3 항체, 항-TIGIT 항체, 항-BTLA 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-ICOS 항체, 항-CD27 항체, 항-OX40 항체, 항-4-1BB 항체 및/또는 항-GITR 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-CD40 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항-PD-1 항체 및 항-TIGIT 항체와 함께 투여될 수 있다.

[0208] **약학적 조성물 및 투여 경로**

[0209] 본원에서는 또한 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편 중 적어도 하나(예를 들어, 1종, 2종, 3종 또는 4종)를 함유하는 약학적 조성물이 제공된다. 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편 중 두 가지 이상(예를 들어, 2종, 3종 또는 4종)은 임의의 조합으로 약학적 조성물에 존재할 수 있다. 약학적 조성물은 당업계에 알려진 임의의 방식으로 제형화될 수 있다.

[0210] 약학적 조성물은 의도된 투여 경로(예를 들어, 정맥 내, 동맥 내, 근육 내, 피내, 피하 또는 복강 내)에 적합하도록 제형화된다. 상기 조성물은 멸균 희석제(예를 들어, 멸균수 또는 식염수), 고정 오일, 폴리에틸렌 글라이콜, 글리세린, 프로필렌 글라이콜 또는 다른 합성 용매, 항균 또는 항진균제, 예컨대, 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤, 클로로뷰탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등, 항산화제, 예컨대, 아스코르브산 또는 소듐 바이설파이트, 킬레이트제, 예컨대, 에틸렌디아민테트라아세트산, 완충액, 예컨대, 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 등장제, 예컨대 당(예를 들어, 덱스트로스), 폴리알코올(예를 들어, 만니톨 또는 소르비톨), 또는 염(예를 들어, 소듐 클로라이드) 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 리포솜 현탁액도 약학적으로 허용 가능한 담체로 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 제4,522,811호 참조). 조성물의 제제는 앰플, 일회용 주사기, 또는 다회 용량 바이알로 제형화되고 봉입될 수 있다. 필요한 경우(예를 들어, 주사 가능한 제형에서와 같이), 적절한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅 또는 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제(예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴)를 포함시켜 연장될 수 있다. 대안적으로, 제어 방출은 생분해성, 생체적합성 중합체(예를 들어, 에틸렌 바이닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글라이콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산; Alza Corporation 및 Nova Pharmaceutical, Inc.)를 포함할 수 있는 임플란트 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템에 의해 달성될 수 있다.

[0211] 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편 중 하나 이상을 포함하는 조성물은 비경구(예를 들어, 정맥 내, 동맥 내, 근육 내, 피내, 피하 또는 복강 내) 투여를 위해 용량 단위 형태(즉, 투여의 용이성 및 용량의 균일성을 위해 기결정된 양의 활성 화합물을 함유하는 물리적으로 분리된 단위)로 제형화될 수 있다.

[0212] 비경구 투여를 위한 약학적 조성물은 바람직하게는 무균 및 실질적으로 등장성이며, 우수제조기준(Good Manufacturing Practice, GMP) 조건 하에 제조된다. 약학적 조성물은 단위 용량 형태(즉, 단일 투여를 위한 용량)로 제공될 수 있다. 약학적 조성물은 하나 이상의 생리학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 사용하여 제형화될 수 있다. 상기 제형은 선택된 투여 경로에 따라 달라진다. 주사의 경우, 항체는 주사 부위의 불편함을 감소시키기 위해 수용액, 바람직하게는 생리학적으로 호환 가능한 완충액으로 제형화될 수 있다. 상기 용액은 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 항체는 사용 전에 적합한 운반체, 예를 들어 멸균 발열원이 없는 물로 구성하기 위해 동결건조된 형태일 수 있다.

[0213] 조성물의 독성 및 치료 효능은 세포 배양물 또는 실험 동물(예를 들어, 원숭이)에서 표준 약학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, LD50(집단의 50%에 대한 치사 용량) 및 ED50(집단의 50%에서 치료적으로 효과적인 용량)을 결정할 수 있다: 해당 치료 지수의 비율은 LD50:ED50이다. 높은 치료 지수를 나타내는 작용제가 바람직하다. 작용제가 바람직하지 않은 부작용을 나타내는 경우, 잠재적인 손상을 최소화하기 위해(즉, 원치 않는 부작용을 감소시키기 위해) 주의를 기울여야 한다. 독성 및 치료 효능은 다른 표준 약학적 절차에 의해 결정될 수 있다.

[0214] 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 수득된 데이터는 대상체(예를 들어, 인간)에서 사용하기 위한 임의의 제공되는 작용제의 적절한 용량을 제형화하는 데 사용될 수 있다. 하나 이상(예를 들어, 1종, 2종, 3종, 또는 4종)의 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항체 단편)의 치료적 유효량은 대상체(예를 들어, 암이 있는 것으로 식별된 인간 대상체), 또는 질환의 발병 위험이 있는 것으로 식별된 대상

체(예를 들어, 이전에 암이 발병했으나 현재 치유된 대상체)에서 질환을 치료(예를 들어, 암 세포를 사멸)하는 양일 것이고, 대상체(예를 들어, 인간)에서 질환의 하나 이상의 증상의 중증도, 빈도, 및/또는 기간을 감소시킬 것이다. 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편의 효과 및 용량은 당업계에 알려진 방법을 사용하는 보건 전문가 또는 수의학 전문가에 의해서 뿐만 아니라 대상체(예를 들어, 인간)에서의 하나 이상의 질환 증상에 대한 관찰에 의해 결정될 수 있다. 특정 요소는 대상체를 효과적으로 치료하는 데 필요한 용량 및 시기에 영향을 미칠 수 있다(예를 들어, 질환 또는 장애의 중증도, 이전 치료, 대상체의 일반적인 건강 및/또는 연령, 및 다른 질환의 존재).

[0215] 예시적인 용량은 대상체의 체중의 킬로그램당 본원에 기재된 임의의 항체 또는 항원 결합 단편의 밀리그램 또는 마이크로그램(예를 들어, 약 1μg/kg 내지 약 500mg/kg; 약 100μg/kg 내지 약 500mg/kg; 약 100μg/kg 내지 약 50mg/kg; 약 10μg/kg 내지 약 5mg/kg; 약 10μg/kg 내지 약 0.5mg/kg; 또는 약 1μg/kg 내지 약 50μg/kg)의 양을 포함한다. 이러한 용량은 광범위한 범위를 포괄하나, 당업자중 한 명은 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함하는 치료제가 효능이 다양하며, 유효량이 당업계에 알려진 방법에 의해 결정될 수 있음을 이해할 것이다. 전형적으로, 처음에 비교적 낮은 용량이 투여되고, 담당 의료 전문가 또는 수의학 전문가(치료 적용의 경우) 또는 연구원(여전히 개발 단계에서 작업하는 경우)은 후속적으로 그리고 적절한 반응이 수득될 때까지 용량을 점진적으로 증가시킬 수 있다. 또한, 임의의 특정 대상체에 대한 특정 용량 수준은 사용된 특정 화합물의 활성, 대상체의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도, 및 체내 항체 또는 항체 단편의 반감기를 포함하는 다양한 요소에 따라 달라질 것으로 이해된다.

[0216] 약학적 조성물은 투여를 위한 지침과 함께 용기, 팩 또는 디스펜서에 포함될 수 있다. 본 개시는 또한 본원에 기재된 바와 같은 다양한 용도를 위한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법을 제공한다.

[0217] **실시예**

[0218] 본 발명은 하기 실시예에서 추가로 설명되며, 이는 청구범위에서 기재된 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0219] **실시예 1. 인간 항-CD40 항체 생성**

[0220] 인간 CD40에 대한 항체를 생성하기 위해, RenMab™ 마우스 또는 RenLite™ 마우스를 인간 CD40으로 면역화하였다. 항-CD40 항체는 아래 기재된 방법으로 제조되었다.

[0221] RenMab™ 마우스는 인간화 중쇄 면역글로불린 유전자좌와 인간화 카파 사슬 면역글로불린 유전자좌를 모두 가지고 있다. 중쇄 면역글로불린 유전자좌는 항체 중쇄의 유전자를 함유하는 염색체에 있는 영역이다. 유전자좌는 IGHV(가변), IGHD(다양성), IGHJ(결합) 및 중쇄 불변 도메인 유전자를 포함한다. 카파 사슬 면역글로불린 유전자좌는 항체 경쇄(카파 사슬)를 코딩하는 유전자를 함유하는 염색체에 있는 영역이다. 카파 사슬 면역글로불린 유전자좌는 IGKV(가변), IGKJ(결합) 및 경쇄 불변 도메인 유전자를 포함한다. RenMab™ 마우스에 관한 상세한 설명은 PCT/CN2020/075698에서 찾을 수 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0222] RenLite™ 마우스는 항체 유전자에 전략적으로 조작된 완전 인간화 공통 경쇄를 유지하면서도 중쇄의 가변 영역에서 완전한 인간화를 갖는 유전자 조작 모델로서 사용될 수 있다. RenLite™ 마우스에 관한 상세사항은 PCT/CN2021/097652에서 찾을 수 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0223] ***마우스의 면역화***

[0224] RenMab™ 마우스 또는 RenLite™ 마우스를 Fc 표기 인간 CD40 단백질(hCD40-Fc, Beijing ACROBiosystems Co. Ltd., Cat#: CDO-H5253) 또는 개 CD40(dCD40-Fc, Sino Biological Inc., Cat#: 70105-D02H)으로 면역화하였다. 구체적으로, hCD40-Fc 또는 dCD40-Fc를 보조제와 함께 유화하였고 마우스의 발꿈치, 목 또는 꼬리 부분에 주사하였다. 마우스를 총 3회 면역화하였다: 완전 프로인트 보조제(CFA)를 제1 면역화에 사용하였으며, 불완전 프로인트 보조제(IFA)를 제2 면역화 및 제3 면역화에 사용하였다. 제1 면역화와 제2 면역화 사이의 간격은 2주였으며, 제2 면역화와 제3 면역화 사이의 간격은 2주였다. 안와 혈액을 제3 면역화 후 1주에 수집하여 ELISA를 사용하여 항체 역가를 분석하였다. 2주 후, 높은 역가를 갖는 마우스를 선택하여 hCD40-His(His-Tag가 있는 인간 CD40 단백질, Beijing ACROBiosystems Co. Ltd., Cat#: CDO-H5228) 또는 dCD40-His(CD40 단백질, 개, 재조합(His Tag), Sino Biological Inc., Cat#: 70105-D08H)를 꼬리 정맥을 통해 주사하였다.

[0225] 다른 실험에서, RenMab™ 마우스 또는 RenLite™ 마우스를 인간 CD40 및/또는 개 CD40을 코딩하는 발현 플라스미

드를 (근육 내(i.m.) 주사에 의해) 마우스의 전전경골근에 주사하여 면역화하였다. 마우스에게 각각의 주사 사이에 적어도 14일의 간격으로 적어도 4회 주사하였다. 혈액을 최종 면역화 후 7일에 수집하였고 ELISA를 통해 혈청의 항체 역가를 시험하였다.

[0226] 면역화를 강화하기 위한 절차도 면역화 후 적어도 7일 후 (발현 플라스미드 주사 또는 단백질 주사를 통해) 수행되었다. 마우스에게 펄스 면역화를 위해 CHO-S-hCD40(인간 CD40 단백질을 발현하는 형질감염 CHO-S 세포) 또는 CHO-S-dCD40(개 CD40 단백질을 발현하는 형질감염 CHO-S 세포)을 (복강 내 투여에 의해) 또한 주사하였다. 면역계 기관(예를 들어, 골수, 림프절 및 비장)은 주사 후 5일차에 수집되었다.

[0227] 또한 항원 특이적 B 세포를 골수종 세포와의 융합 없이 면역화된 마우스로부터 직접 단리하였다. 항체 경쇄 및 중쇄 가변 영역 서열을 항원 특이적 B 세포로부터 직접 수득하였다. 예를 들어, 단일 세포 기술(예를 들어, Beacon® Optofluidic System, Berkeley Lights Inc.)을 사용하여 항원 특이적 모노클로날 항체를 분비하는 형질 세포를 스크리닝하였다. 항체 가변 영역 서열을 역전사 및 PCR 기반 시퀀싱을 사용하여 수득하였다. 항체는 항체 가변 영역 서열을 포함하는 벡터로 세포를 형질감염하여 발현되었다. FACS를 사용하여 항체와 CD40 사이의 결합을 검증하였다. 이러한 방법으로 수득한 예시적인 항-CD40 항체는 2F8, 6A4, 15B4, 16D5 및 12B5을 포함한다.

[0228] 상기 항체를 아래 규칙에 따라 명명하였다. 예를 들어, 2F8 항체의 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)이 인간 IgG1의 불변 영역에 연결되는 경우, 항체를 2F8-IgG1로 명명하였다. 유사하게도, 2F8의 동일한 VH 및 VL 서열을 포함하는 2F8-IgG2 및 2F8-IgG4가 생성되었으나, 불변 영역은 각각 인간 IgG2 및 IgG4 서브타입으로부터 유래되었다.

[0229] 불변 영역은 또한 돌연변이를 포함할 수 있다. 예를 들어, LALA 돌연변이(EU 넘버링에 따라 L234A 및 L235A), N297A, YTE 돌연변이(EU 넘버링에 따라 M252Y, S254T 및 T256E), FLAA 돌연변이(EU 넘버링에 따라 F234A 및 L235A) 또는 SI 돌연변이(EU 돌연변이에 따라 S239D 및 I332E)가 2F8-IgG1의 Fc 영역에 도입되어 각각 2F8-IgG1-LALA, 2F8-IgG1-N297A, 2F8-IgG1-YTE, 2F8-IgG1-FLAA 및 2F8-IgG1-SI를 생성하였다. YTE 돌연변이는 또한 2F8-IgG1-LALA 또는 2F8-IgG1-N297A의 Fc 영역에 도입되어 각각 2F8-IgG1-LALA-YTE 또는 2F8-IgG1-N297A-YTE를 생성하였다. 상이한 불변 영역 서열을 갖는 항체가 또한 6A4, 15B4, 16D5 및 12B5를 생성하였다.

[0230] 2F8의 중쇄 CDR 1, 2, 3 및 경쇄 CDR 1, 2, 3의 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 1~6(Kabat 넘버링) 또는 서열 번호: 19~24(Chothia 넘버링)에 나타나 있다. 2F8의 인간 중쇄 가변 영역 및 인간 경쇄 가변 영역은 각각 서열 번호: 65 및 서열 번호: 37에 나타나 있다.

[0231] 6A4의 중쇄 CDR 1, 2, 3 및 경쇄 CDR 1, 2, 3의 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 7~12(Kabat 넘버링) 또는 서열 번호: 25~30(Chothia 넘버링)에 나타나 있다. 6A4의 인간 중쇄 가변 영역 및 인간 경쇄 가변 영역은 각각 서열 번호: 38 및 서열 번호: 39에 나타나 있다.

[0232] 12B5의 중쇄 CDR 1, 2, 3 및 경쇄 CDR 1, 2, 3의 아미노산 서열은 각각 서열 번호: 13~18(Kabat 넘버링) 또는 서열 번호: 31~36(Chothia 넘버링)에 나타나 있다. 12B5의 인간 중쇄 가변 영역 및 인간 경쇄 가변 영역은 각각 서열 번호: 40 및 서열 번호: 41에 나타나 있다.

[0233] ***항체 제조***

[0234] 서열 검증 단계에서 양성 항체 서열이 플라스미드 추출 및 100ml 시스템으로의 형질감염을 수행하였다. 세포 배양 10~13일 후 발현 상청액을 수집하였고 친화성 크로마토그래피를 수행하였다. 수득된 항체 샘플은 하기의 체외 시험 및 스크리닝에 사용되었다.

[0235] **실시예 2. 항-CD40 항체의 결합 친화성**

[0236] 블레셀루맙(VH 서열 번호: 43, VL 서열 번호: 44; HC 서열 번호: 66, LC 서열 번호: 60)은 CD40을 표적으로 하는 완전 인간 IgG4 모노클로날 항체로서, 루푸스 치료에 승인되었다.

[0237] 인간 CD40(hCD40), 원숭이(필리핀 원숭이) CD40(fasCD40) 또는 개 CD40(dCD40)에 대한 항-CD40 항체인 2F8-IgG4-FLAA, 6A4-IgG4-FLAA, 12B5-IgG4-FLAA 및 블레셀루맙 유사체의 결합 친화성을 미리 고정된 단백질 A 센서 칩이 장착된 Biacore™ (Biacore, Inc., Piscataway N.J.) 8K 바이오센서를 사용하여 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 측정하였다.

[0238] 구체적으로, hCD40-His, fasCD40-His(Cynomolgus CD40/TNFRSF5 단백질, His Tag, Beijing ACRO Biosystems

Co. Ltd., Cat#: CDO-C52H6) 또는 dCD40-His를 200nM, 100nM, 50nM, 25nM, 6.25nM, 3.125nM 또는 0nM로 1× HBS-EP+ 완충액(PH 7.4)으로 희석한 후 Biacore™ 8K 바이오센서에 약 10μl/분으로 약 50초 동안 주사하여 필요한 포획 수준(예를 들어, 약 100반응 단위(RU))을 충족시켰다. 이후, 1× HBS-EP+ 완충액(PH 7.4)과 함께 1μg/ml 농도의 정제된 항-CD40 항체를 1μl/분으로 50초 동안 주사하였다. 해리를 400초 동안 모니터링하였다. 매번 적가의 방식으로 마지막 주사를 완료한 후, 글라이신 용액(pH 2.0)을 사용하여 30μL/분으로 30초 동안 칩을 재생시켰다.

[0239] 동역학적 결합 속도(kon)와 해리 속도(koff)는 Biacore 8K Evaluation Software 3.0을 사용하여 데이터를 전체적으로 1:1 Langmuir 결합 모델에 피팅하여 동시에 수득하였다(Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B., 1994. *Methods Enzymology* 6. 99-110). 동역학적 속도 상수(KD=koff/kon)의 몫으로부터 친화성을 추론하였다.

[0240] 당업자가 이해하는 바와 같이, 매개변수(예를 들어, 항체 농도)를 적절하게 조정한 동일한 방법을 각 시험 대상 항체에 대해 수행하였다. 시험 대상 항체에 대한 결과는 아래 표에 요약되어 있다.

[0241] 시험 대상 항체에 대한 결과는 아래 표에 요약되어 있다. 결과는 항-CD40 항체 2F8-IgG4-FLAA 및 12B5-IgG4-FLAA가 인간, 원숭이 및 개 CD40에 특이적으로 결합함을 나타내었다. 6A4-IgG4-FLAA는 인간 및 원숭이 CD40에 특이적으로 결합한다.

표 1

항-CD40 항체	분석물 1 용액	K_{on}(1/Ms)	K_{off}(1/s)	KD(M)
2F8-IgG4-FLAA	hCD40-His	6.54E+05	2.29E-04	3.51E-10
2F8-IgG4-FLAA	fasCD40-His	9.89E+05	2.97E-04	3.01E-10
2F8-IgG4-FLAA	dCD40-His	5.13E+05	2.66E-03	5.18E-09
6A4-IgG4-FLAA	hCD40-His	3.09E+05	5.11E-04	1.66E-09
6A4-IgG4-FLAA	fasCD40-His	2.88E+05	1.49E-02	5.17E-08
6A4-IgG4-FLAA	dCD40-His	—	—	—
12B5-IgG4-FLAA	hCD40-His	5.29E+05	3.89E-04	7.35E-10
12B5-IgG4-FLAA	fasCD40-His	5.35E+05	2.65E-04	4.95E-10
12B5-IgG4-FLAA	dCD40-His	4.01E+05	1.29E-02	3.21E-08
블레셀루맙 유사체	hCD40-His	4.29E+05	6.82E-04	1.59E-09
블레셀루맙 유사체	fasCD40-His	2.70E+05	9.07E-04	3.35E-09
블레셀루맙 유사체	dCD40-His	—	—	—

[0242]

[0243] **실시예 3. 저캇-luc-hCD40 리포터 세포 활성화 검정**

[0244] 이스칼리맙(VH 서열 번호: 45, VL 서열 번호: 46; HC 서열 번호: 61, LC 서열 번호: 62)은 Novartis 및 XOMA가 쇼그렌 증후군의 치료를 위해 개발한 CD40 신호전달 경로를 차단하는 완전 인간 IgG1 항체이다.

[0245] BI655064(VH 서열 번호: 47, VL 서열 번호: 48; HC 서열 번호: 63, LC 서열 번호: 64)는 Boehringer Ingelheim이 류마티스 관절염(RA) 및 루푸스 신염 등의 치료를 위해 개발한 인간화 순수 길항성 항-CD40 IgG1 모노클로날 항체이다.

[0246] 실험은 항-CD40 항체 2F8-IgG4-FLAA, 6A4-IgG4-FLAA, 15B4-IgG4-FLAA, 12B5-IgG4-FLAA, BI655064 유사체, 이스칼리맙 유사체 및 블레셀루맙 유사체가 CD40 신호전달 경로를 차단할 수 있는지 시험하기 위해 수행되었다.

[0247] CHO-K1-Fcγ RIIB 세포(Promega, Cat#: CS1979A09)를 96웰 플레이트(세포 밀도 4×10^4개 세포/웰)에 접종하였고 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 시험 대상 항체를 최고 농도 6μg/mL로 연속 희석(3배)하였다. 인간 CD40 리

간드 CD40L-His(인간 CD40 리간드/TNFSF5 단백질, His, Flag Tag(활성 삼량체)(MALS 인증됨), Beijing ACROBiosystems Co. Ltd., Cat#: CDL-H52Db)를 최고 농도로 3μg/ml로 연속 희석하였다. 저캇-Luc-hCD40 세포(인간 CD40 단백질을 발현하는 형질감염 저캇-Luc 세포)를 96웰 플레이트(세포 밀도 5×10^5개 세포/웰)에 접종한 후, 25μl의 연속 희석된 항체 용액 및/또는 인간 CD40 리간드를 각 웰에 첨가하였다. 항체의 작동 농도는 0.5μg/ml, 1μg/ml 및 2μg/ml이었다. 위의 96웰 플레이트를 37℃ 인큐베이터에서 6시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 꺼내었고, 75μl의 Bio-lite™ 루시퍼레이즈 검정 시약(Vazyme Biotech Co., Ltd., Cat#: DD1201-02-AB)을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 5~10분 동안 인큐베이션한 후, 발광 검출기에 방치하여 형광 신호를 검출하였다.

[0248] 모든 항-CD40 항체의 농도가 감소하면, 형광 신호(CD40 리간드에 결합하는 세포를 밝힘)가 증가하여, 이는 인간 CD40과 인간 CD40 리간드 사이의 결합이 항-CD40 항체에 의해 차단되었음을 시사한다.

[0249] **실시예 4: 체내 항-CD40 항체의 면역억제 효과**

[0250] ***hCD40 마우스에서 항-CD40 항체의 면역억제 효과***

[0251] CD40 유전자 인간화 마우스 모델은 키메라 CD40 단백질(서열 번호: 49)을 발현하도록 생성되었으며, 여기서 마우스 CD40 단백질의 세포외 영역의 일부는 상응하는 인간 CD40 세포외 영역으로 대체되었다. 구체적으로, 마우스 CD40(서열 번호: 50)의 아미노산 20~192를 인간 CD40(서열 번호: 42)의 아미노산 20~192로 대체하였다. 인간화 마우스 모델(예를 들어, hCD40 마우스)은 인간과 마우스 CD40을 발현하는 실험실 마우스의 임상 결과 사이의 차이를 유의하게 감소시켜 임상 환경에서 새로운 치료법을 시험하기 위한 도구를 제공한다. CD40 유전자 인간화 마우스 모델에 관한 상세한 설명은 PCT/CN2018/091845에서 찾을 수 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0252] 인간 항-CD40 항체가 면역 반응에 미치는 영향을 분석하기 위해 실험을 수행하였다. 오브알부민(OVA)을 hCD40 마우스에서 면역 반응을 자극하는 항원으로 사용하였다. 간략하게 설명하면, hCD40 마우스(6~8주령)를 1개의 대조군과 6개의 처리군(군당 마우스 5마리)으로 배치하였다. 처리군 마우스를 무작위로 선택하여 각각 항-CD40 항체 블레셀루맙 유사체(G2), 12B5-IgG4-FLAA(G3), 16D5-IgG4-FLAA(G4), 2F8-IgG4-FLAA(G5), 6A4-IgG4-FLAA(G6) 및 15B4-IgG4-FLAA(G7)를 각각 2mg/kg의 용량 수준으로 복강 내(i.p.) 투여하였다. 대조군 마우스(G1)에 동일한 부피의 인산 완충 식염수(PBS)를 주사하였다. 총 2회의 투여를 각각 0일차(군 배정 당일) 및 4일차(군 배정 4일 후)에 수행하였다. 오브알부민(OVA)을 PBS로 1mg/ml로 희석하였고, CFA와 1:1의 부피비로 혼합하였으며, 면역화 부피는 마우스당 200μl였다. 마우스에게 1일차(군 배정 1일 후)에 OVA/CFA 혼합물을 복강 내로 투여하였다. 혈청을 10일차 및 17일차에 각 동물로부터 수집하여 ELISA 분석을 수행하였다. **도 1**은 시험 방식을 나타낸다. OVA는 ELISA 플레이트상에 미리 코팅되어 있었다. 염소 항-마우스 IgG H&L(HRP)(Abcam, Cat#: ab97265)를 ELISA 분석에 사용하였다. 자세한 투여 방식은 아래 표에 나타나 있다.

표 2

[0253]

군	마우스의 수	항체	용량 (mg/kg)	경로	빈도	총 투여 횟수
G1	5	PBS	-	i.p.	BIW	2
G2	5	블레셀루맙 유사체	2	i.p.	BIW	2
G3	5	12B5-IgG4-FLAA	2	i.p.	BIW	2
G4	5	16D5-IgG4-FLAA	2	i.p.	BIW	2
G5	5	2F8-IgG4-FLAA	2	i.p.	BIW	2
G6	5	6A4-IgG4-FLAA	2	i.p.	BIW	2
G7	5	15B4-IgG4-FLAA	2	i.p.	BIW	2

[0254] **도 2**에 나타난 바와 같이, 10일차에 수집한 혈청에 대한 ELISA 결과는 항-CD40 항체 블레셀루맙 유사체(G2), 12B5-IgG4-FLAA(G3), 16D5-IgG4-FLAA(G4), 2F8-IgG4-FLAA(G5), 6A4-IgG4-FLAA(G6) 및 15B4-IgG4-FLAA(G7)가 PBS(G1)와 비교하여 hCD40 마우스에서 면역 반응을 감소시켰음을 나타내었다. **도 3**은 17일차에 수집한 혈청에 대한 ELISA 결과를 나타낸다. 17일차의 결과는 10일차에 수득한 결과와 유사하였다. 구체적으로, 블레셀루맙 유

사체(G2), 12B5-IgG4-FLAA(G3), 2F8-IgG4-FLAA(G5) 및 6A4-IgG4-FLAA(G6)는 16D5-IgG4-FLAA(G4) 및 15B4-IgG4-FLAA(G7)보다 낮은 OD로 면역 반응을 감소시켰다. 17일차에 증가된 항체 분해 때문에 더 많은 항체가 10일차에 감소된 면역 반응을 나타내는 것으로 고려된다.

[0255] ***hCD40/hFcRn 마우스에서 항-CD40 항체의 면역억제 효과***

[0256] 또한 CD40/FcRn 이중 유전자 인간화 마우스 모델을 hCD40 마우스와 FcRn 유전자 인간화 마우스(hFcRn 마우스)를 교배하여 생성하였다. FcRn 유전자 인간화 마우스는 인간 FcRn 단백질(서열 번호: 51)을 발현하도록 조작되었다. FcRn 유전자 인간화 마우스 및 CD40/FcRn 이중 유전자 인간화 마우스(hCD40/hFcRn 마우스)에 관한 상세한 설명은 PCT/CN2022/075057에서 찾을 수 있으며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 포함된다.

[0257] 위의 실험과 유사하게, 항-CD40 항체 블레셀루맙 유사체, 12B5-IgG1-LALA-YTE 및 2F8-IgG1-LALA-YTE의 약동학(PK) 및 체내 효능을 hCD40/hFcRn 마우스에서 시험하였다. 처리군(G2~G10)에서, hCD40/hFcRn 마우스에 각각 항-CD40 항체 블레셀루맙 유사체, 12B5-IgG1-LALA-YTE 및 2F8-IgG1-LALA-YTE를 1~4mg/kg(즉, 1mg/kg, 2mg/kg 또는 4mg/kg)씩 복강 내(ip) 투여로 0일차(군 배정 일)에 주사하였다. 대조군 마우스(G1)에 동일한 부피의 PBS를 주사하였다. 마우스에게 1일차(군 배정 1일 후)에 OVA/CFA 혼합물을 복강 내로 투여하였다. 혈청을 항체 투여 4시간 후 및 1일차, 5일차, 10일차, 17일차 및 21일차에 각 동물로부터 수집하였다. 이후, 수집된 혈청은 PK 분석을 수행하였다. 또한, 10일차, 17일차 및 21일차에 각 동물로부터 수집한 혈청도 ELISA 분석을 수행하였다. 자세한 투여 방식은 아래 표에 나타나 있다.

표 3

[0258]

군	마우스의 수	항체	용량 (mg/kg)	경로	빈도	총 투여 횟수
G1	5	PBS	-	i.p.	0일차	1
G2	5	블레셀루맙 유사체	4	i.p.	0일차	1
G3	5	블레셀루맙 유사체	2	i.p.	0일차	1
G4	5	블레셀루맙 유사체	1	i.p.	0일차	1
G5	5	12B5-IgG1-LALA-YTE	4	i.p.	0일차	1
G6	5	12B5-IgG1-LALA-YTE	2	i.p.	0일차	1
G7	5	12B5-IgG1-LALA-YTE	1	i.p.	0일차	1
G8	5	2F8-IgG1-LALA-YTE	4	i.p.	0일차	1
G9	5	2F8-IgG1-LALA-YTE	2	i.p.	0일차	1
G10	5	2F8-IgG1-LALA-YTE	1	i.p.	0일차	1

[0259] 약동학 결과는 상이한 항체를 주사한 후 hCD40/hFcRn 마우스의 혈청 내 항체 농도가 시간이 지남에 따라 감소함을 나타내었으며, 이는 약동학적 특징과 일치한다. 10일차, 17일차 및 21일차에 수집한 혈청에 대한 ELISA 결과는 아래 표 및 **도 6~도 8**에 각각 나타나 있다. 전반적으로, 대조군과 처리군의 모든 마우스의 항-OVA 항체는 실험 내내 지속적으로 증가하는 추세를 나타내었다. 또한, 처리군 마우스는 대조군 마우스보다 적은 항-OVA 항체를 생성하였다. 결과는 또한 용량 상관관계를 나타내었는데, 즉, 항체를 더 높은 용량으로 투여할수록 항-OVA 항체가 적게 생성되었고, 면역억제 효과가 더 양호하게 달성되었다. 일반적으로, 2F8-IgG1-LALA-YTE의 면역억제 효과는 12B5-IgG1-LALA-YTE보다 양호하였으며, 12B5-IgG1-LALA-YTE의 면역억제 효과는 블레셀루맙 유사체보다 양호하였다.

표 4

군		10일차 (OD 값)	17일차 (OD 값)	21일차 (OD 값)
G1	평균	0.28	2.31	2.74
	CV	0.63	0.19	0.09
G2	평균	0.03	0.08	0.35
	CV	0.06	0.31	0.45
G3	평균	0.03	1.22	2.34
	CV	0.05	0.17	0.09
G4	평균	0.05	1.72	2.53
	CV	0.33	0.11	0.12
G5	평균	0.03	0.16	1.01
	CV	0.04	0.70	0.58
G6	평균	0.03	0.64	1.61
	CV	0.08	0.62	0.50
G7	평균	0.04	1.38	2.17
	CV	0.22	0.64	0.26
G8	평균	0.03	0.03	0.16
	CV	0.02	0.03	1.02
G9	평균	0.03	0.37	1.34
	CV	0.06	0.77	0.53
G10	평균	0.03	0.79	1.81
	CV	0.05	0.49	0.35

CV: 변동 계수

[0260]

[0261] **실시예 5. 약동학적 분석**

[0262] ***hCD40 마우스 및 C57BL/6 마우스에서의 PK 분석***

[0263] 항-CD40 항체의 약동학적 제거율을 hCD40 마우스에서 결정하였다. 구체적으로, 마우스를 4개 군(군당 3마리)으로 배치하였고 블레셀루맙 유사체(G1), 12B5-IgG4-FLAA(G2), 6A4-IgG4-FLAA(G3) 및 2F8-IgG4-FLAA(G4)를 각각 3mg/kg씩 정맥 내 주사로 투여하였다. 혈액 샘플을 투여 후 15분, 1일, 3일, 7일, 10일, 14일 및 투여 전 4일에 수집하였다.

[0264] 인간 항체의 혈청 수준은 샌드위치 ELISA에 의해 결정되었다. 간략하게 설명하면, 염소 항-인간 IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch Inc., Cat#: 109-005-088)를 최종 농도 2000ng/mL로 희석하였고, 96웰 플레이트(ELISA 플레이트)에 100㎕/웰로 첨가한 후, 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 PBS-T 완충액(Tween™ 20이 보충된 PBS)로 4번 세척하였다. 항체 미결합 영역은 2% BSA(소 혈청 알부민)로 2시간 동안 37℃에서 차단하였다. 이후, 플레이트를 PBS-T 완충액으로 4회 세척하였다. 세척 후, 혈청 100㎕L(1% BSA에 1/20 희석(MRD))를 각 웰에 첨가하였다. 웰을 밀봉하였고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트 세척기를 사용하여 플레이트를 세척한 후, 과산화효소 AffiniPure F(ab')$_2$ 단편 염소 항-인간 IgG, Fcɣ 단편 특이적(Jackson ImmunoResearch Inc., Cat#: 109-036-098)을 플레이트의 각 웰에 100㎕/웰로 첨가하였고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척한 후 기질로서 테트라메틸벤지딘(TMB) 용

액을 100μL/웰로 96웰 플레이트에 첨가하였다. 암실에서 실온에서 인큐베이션한 후, 100μL 종지 용액(Beyotime, Cat#: P0215)을 각 웰에 첨가하였다. 마이크로플레이트 리더를 사용하여 450nm 및 630nm의 파장에서 각 웰의 흡광도 값을 판독하였다. 데이터 분석 소프트웨어 Gen5™를 사용하여 데이터를 분석하였다. 각 시험 제품에 의해 제조된 교정 샘플의 흡광도 값과 상응하는 농도를 사용하여 4가지 매개변수(즉, $T_{1/2}$, C_{max}, $AUC_{0-14일차}$ 및 CL)로 구성된 표준 곡선을 생성하였다. 표준 곡선을 사용하여 각 혈청 샘플의 항체 농도를 계산하였다. 각 시점에서 계산된 샘플 농도를 사용하여 약물 농도-시간 곡선을 생성하였다. Phoenix™ WinNolin 8.3을 사용하여 약동학적 매개변수를 계산하였다. 결과는 아래 표에 나타나 있다.

[0265] 위 실험과 유사하게, 항-CD40 항체 블레셀루맙 유사체, 12B5-IgG4-FLAA, 6A4-IgG4-FLAA 및 2F8-IgG4-FLAA의 약동학적 제거율 또한 C57BL/6 마우스에서 결정되었다. 자세한 투여 방식은 아래 표에 나타나 있다.

표 5

[0266]

군	항체	용량 (mg/kg)	경로	마우스	마우스의 수	총 투여 횟수
G1	블레셀루맙 유사체	3	i.v.	hCD40	3	1
G2	12B5-IgG4-FLAA	3	i.v.	hCD40	3	1
G3	6A4-IgG4-FLAA	3	i.v.	hCD40	3	1
G4	2F8-IgG4-FLAA	3	i.v.	hCD40	3	1
G5	블레셀루맙 유사체	3	i.v.	C57BL/6	3	1
G6	12B5-IgG4-FLAA	3	i.v.	C57BL/6	3	1
G7	6A4-IgG4-FLAA	3	i.v.	C57BL/6	3	1
G8	2F8-IgG4-FLAA	3	i.v.	C57BL/6	3	1

[0267] 항체 투여 전 4일에, 항체 농도는 0μg/ml로 검출되었다(결과는 나타내지 않음). **도 4** 및 아래 표에 나타난 바와 같이, 결과는 전형적인 약동학적 특징과 일치하였으며, 상이한 항체를 주사한 후, hCD40 마우스와 C57BL/6 마우스의 혈청에 있는 항체 농도는 시간 경과에 따라 감소하였음을 나타낸다. C57BL/6(B6) 마우스에서 항-CD40 항체의 반감기는 12.37~17.70일 범위 내에 있는 반면에, hCD40 마우스에서 항-CD40 항체의 반감기는 1.87~4.84일 범위 내에 있었다. C57BL/6 마우스에서 항-CD40 항체의 제거율(CL)은 4.65~6.35ml/일/kg 범위인 반면에, hCD40 마우스에서 항-CD40 항체의 CL은 12.92~14.69ml/일/kg 범위였다. 결과는 야생형 C57BL/6 마우스의 모든 항체 농도가 유사함을 나타내었다. 이와 대조적으로, hCD40 마우스에서, 모든 항체 농도가 더 신속하게 감소하였는데, 이는 TMDD(표적 매개 약물 분포)로 설명될 수 있다.

표 6

[0268]

군		$T_{1/2}$ (일차)	C_{max} (μg/ml)	$AUC_{0-14일차}$ (일*μg/ml)	CL (ml/일/kg)
G1	평균	4.84	60.64	200.76	12.92
	CV	0.11	0.06	0.08	0.07
G2	평균	1.87	61.10	201.68	14.69
	CV	0.26	0.09	0.06	0.06
G3	평균	4.77	53.65	184.74	14.11
	CV	0.12	0.04	0.06	0.09
G4	평균	4.44	53.85	187.48	14.18
	CV	0.29	0.07	0.07	0.11
G5	평균	12.37	65.38	292.19	5.75
	CV	0.13	0.07	0.06	0.04
G6	평균	13.49	71.48	341.94	4.65
	CV	0.19	0.04	0.04	0.11
G7	평균	12.89	52.84	253.70	6.35
	CV	0.08	0.07	0.09	0.09
G8	평균	17.70	56.70	262.04	5.18
	CV	0.34	0.08	0.05	0.17

[0269] $T_{1/2}$: 종결 반감기

[0270] C_{max}: 최대 농도

[0271] $AUC_{0-14일차}$: 0~14일차에 혈액 농도-시간 곡선하 면적

[0272] CL: 제거율

[0273] ***hFcRn 마우스에서 PK 분석***

[0274] 위의 실험과 유사하게, 항-CD40 항체 12B5의 약동학적 제거율을 hFcRn 마우스에서 결정하였고, 마우스를 4개 군(군당 5마리 마우스)으로 배치하였다. 2mg/kg의 12B5-IgG1-LALA-YTE(G1), 12B5-IgG1-N297A-YTE(G2), 12B5-IgG4-YTE(G3) 또는 12B5-IgG4-FLAA(G4)를 정맥 내 주사로 투여하였다. 투여 후 2시간, 1일, 3일, 7일, 10일, 14일, 21일, 28일, 35일에 및 투여 전 4일에 혈액 샘플을 수집하였다. 자세한 투여 방식은 아래 표에 나타나 있다.

표 7

[0275]

군	항체	용량 (mg/kg)	경로	마우스의 수	총 투여 횟수
G1	12B5-IgG1-LALA-YTE	2	i.v.	5	1
G2	12B5-IgG1-N297A-YTE	2	i.v.	5	1
G3	12B5-IgG4-YTE	2	i.v.	5	1
G4	12B5-IgG4-FLAA	2	i.v.	5	1

[0276] 항체 투여 전 4일에, 항체 농도는 0μg/ml로 검출되었다(결과는 나타내지 않음). **도 5** 및 아래 표에 나타난 바와 같이, 결과는 전형적인 약동학적 특징과 일치하였으며, 상이한 항체를 주사한 후, hFcRn 마우스의 혈청에 있는 항체 농도는 시간 경과에 따라 감소하였음을 나타낸다. 마우스에서 12B5-IgG1-LALA-YTE(G1) 및 12B5-IgG4-

YTE(G3)의 반감기($T_{1/2}$)는 각각 11.99일 및 13.72일이었다. 12B5-IgG1-N297A-YTE(G2)는 6.58일의 가장 짧은 반감기를 나타내었다. 결과는 12B5-IgG1-N297A-YTE(G2)가 가장 짧은 반감기를 가짐을 나타내었다. 12B5-IgG1-LALA-YTE(G1) 및 12B5-IgG4-YTE(G3)의 반감기는 12B5-IgG4-FLAA(G4)보다 길었다.

표 8

[0277]

군		$T_{1/2}$ (일차)	C_{max} (ug/ml)	$AUC_{0-35일차}$ (일*ug/ml)	CL (ml/일/kg)
G1	평균	11.99	26.83	260.73	6.59
	CV	0.10	0.07	0.06	0.05
G2	평균	6.58	23.76	129.08	15.09
	CV	0.04	0.09	0.03	0.03
G3	평균	13.72	26.47	249.21	6.62
	CV	0.04	0.10	0.05	0.05
G4	평균	10.53	26.74	193.54	9.29
	CV	0.07	0.10	0.08	0.07

[0278] $T_{1/2}$: 종결 반감기;

[0279] C_{max}: 최대 농도;

[0280] $AUC_{0-35일차}$: 0~35일차에 혈액 농도-시간 곡선하 면적

[0281] CL: 제거율

[0282] **실시예 6. 인간 FcRn에 대한 항-CD40 항체의 결합 친화성**

[0283] 항-CD40 항체 12B5-IgG1-LALA-YTE, 12B5-IgG1-N297A-YTE, 12B5-IgG4-YTE 및 12B5-IgG4의 인간 FcRn에 대한 결합 친화성을 미리 고정화된 Protein A 센서 칩이 장착된 Biacore™(Biacore, Inc., Piscataway N.J.) 8K 또는 T200 바이오센서를 사용하여 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 측정하였다.

[0284] hFcRn-His(FCGRT&B2M 이종이량체 단백질, His Tag&Strep II Tag(SPR & BLI & MALS 인증, Beijing ACROBiosystems Co. Ltd., Cat#: FCM-H5286))를 1×HBS-EP+ 완충액(PH 7.4)로 1μg/ml로 희석한 후, Biacore™ 8K 또는 T200 바이오센서에 약 50초 동안 10μl/분으로 주사하여 요구되는 포획 수준(예를 들어, 약 200반응 단위(RU))을 충족시켰다. 이후, 1250nM, 625nM, 312.5nM, 156.25nM, 78.125nM 또는 0nM 농도의 정제된 항-CD40 항체(1× HBS-EP+ 완충액(PH 7.4) 사용)를 50초 동안 30μl/분의 속도로 주사하였다. 해리를 200초 동안 모니터링하였다. 매번 적가의 방식으로 마지막 주사를 완료한 후, 글라이신 용액(pH 1.7)을 사용하여 30μL/분으로 30초 동안 칩을 재생시켰다. 결합 곡선을 수득하였다. 데이터 분석은 분석 소프트웨어를 통해 수행하였으며, 결합 및 해리 곡선은 정상 상태 친화성 결합 모델을 사용하여 피팅되어 친화성 동역학적 데이터를 수득하였다.

[0285] 1×HBS-EP+ 완충액(pH 7.4)을 1×HBS-EP+ 완충액(pH 6.0)로 대체한 것을 제외하고는 위의 실험을 반복하였다.

[0286] 당업자가 이해하는 바와 같이, 매개변수(예를 들어, 항체 농도)를 적절하게 조정한 동일한 방법을 각 시험 대상 항체에 대해 수행하였다. 시험 대상 항체에 대한 결과는 아래 표에 요약되어 있다.

[0287] 결과는 아래 표에 나타나 있다. pH 값이 7.4인 경우, 12B5-IgG4-FLAA는 hFcRn에 결합하지 않았으나, 다른 항체는 hFcRn에 결합하였다. pH 6.0에서, 모든 항체는 hFcRn에 대해 높은 결합 친화성을 나타내었다. 결과는, 산성 조건 하에서, 모든 항체가 hFcRn에 대한 증가된 친화성을 갖고 있음을 밝힌다. 또한, 12B5-IgG1-LALA-YTE 및 12B5-IgG4-YTE는 12B5-IgG1-N297A-YTE보다 hFcRn에 대한 더 높은 결합 친화성을 나타내었다.

표 9

포획 1 용액	분석물 1 용액	KD(M)
12B5-IgG1-LALA-YTE	hFcRn-His (PH 6.0)	3.78E-08
12B5-IgG1-N297A-YTE	hFcRn-His (PH 6.0)	1.12E-07
12B5-IgG4-YTE	hFcRn-His (PH 6.0)	9.10E-08
12B5-IgG4-FLAA	hFcRn-His (PH 6.0)	4.97E-07
12B5-IgG1-LALA-YTE	hFcRn-His (PH 7.4)	1.18E-06
12B5-IgG1-N297A-YTE	hFcRn-His (PH 7.4)	2.68E-06
12B5-IgG4-YTE	hFcRn-His (PH 7.4)	2.06E-06
12B5-IgG4-FLAA	hFcRn-His (PH 7.4)	—

[0288]

[0289] **실시예 7. 항체 의존성 세포독성(ADCC)의 결정**

[0290] 리툭시맙(VH 서열 번호: 67, VL 서열 번호: 68)은 CD20을 표적으로 하는 키메라 모노클로날 항체이며, 1997년 재발 또는 불응성 저등급 또는 소포성, CD20 양성 B 세포 비호지킨 림프종(NHL)에 대한 정맥 내 치료제로서 처음 출시되었다.

[0291] 본 실험에서, FcR-TANK 세포(ImmuneOnco Biopharmaceuticals(Shanghai) Inc.)를 이펙터 세포로, Raji 세포(ATCC, Cat#: CCL-86)를 표적 세포로 사용하였다. 세포를 각 항체(최종 농도 50μg/mL)와 함께 3:1의 E:T(이펙터:표적) 비율로 2시간 또는 4시간 동안 인큐베이션하여 ADCC 활성을 결정하였다.

[0292] 결과는 **도 12**에 나타나 있다. 2F8-IgG1 및 리툭시맙 유사체는 ADCC 활성을 갖지만 2F8-IgG1-LALA-YTE는 ADCC 효과를 나타내지 않았다.

[0293] **실시예 8. 보체 의존성 세포독성(CDC)의 결정**

[0294] 항-CD40 항체의 CDC 효과를 평가하기 위해 실험을 수행하였다. 실험에서, Raji 세포(세포 밀도 5×10^4개 세포/웰)를 96웰 플레이트에 접종한 후, 항체 2F8-IgG1-LALA-YTE, 리툭시맙 유사체, 또는 인간 IgG1을 50μg/mL의 최종 농도로 첨가하였다. 세포를 각 항체와 함께 37℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 희석된 정상 인간 혈청 보체(QIDEL, Cat#: A113)를 첨가하였다. 37℃, 5% CO_2 에서 1.5시간 동안 인큐베이션한 후, PrestoBlue™ 세포 생존율 시약(Invitrogen, Cat#: 2413466)을 각 웰에 첨가하였고, 플레이트를 37℃에서 2시간 동안 5% CO_2.와 함께 인큐베이션하였다.

[0295] 결과는 **도 13**에 나타나 있다. 2F8-IgG1-LALA-YTE는 CDC 효과를 나타내지 않은 반면, 양성 대조군 리툭시맙 유사체는 강한 CDC 효과를 나타내었다.

[0296] **실시예 9. 항-CD40 항체의 PBMC 증식에 대한 억제 효과**

[0297] 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 세포를 96웰 플레이트(5×10^4개 세포/웰)에 접종하였다. 연속 희석된 항체 2F8-IgG1-LALA-YTE 또는 hIgG1(100ng/mL, 10ng/mL, 8ng/mL, 5ng/mL, 4ng/mL, 2ng/mL, 1ng/mL, 0.5ng/mL 또는 0.25ng/mL)을 각 웰에 첨가하였고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이후, 10μl ANTI-FLAG 항체(Sigma, Cat#: F1804)가 접합된 shCD154(인간 CD40 리간드/TNFSF5 단백질, His, Flag Tag(활성 삼량체 MALS 인증됨), ACRO, Cat#: CDL-H52Db)를 각 웰에 첨가하였고, 플레이트를 37℃에서 64시간 동안 인큐베이션하였다. 형광 신호는 마이크로플레이트 리더를 통해 Vazyme Biotech CellCounting-Lite® 2.0 발광 세포 생존율 검정(Vazyme, Cat#: DD1101-02)를 사용하여 측정되었다.

[0298] 결과는 **도 14**에 나타나 있으며, 이는 2F8-IgG1-LALA-YTE가 PBMC 증식을 효과적으로 억제하였음을 밝힌다.

[0299] **실시예 10. 항-CD40 항체의 B 세포 증식에 대한 억제 효과**

[0300] 말초 혈액에서 B 세포 서브세트는 분화, 성숙 및 활성화의 상이한 단계에 따라 구별될 수 있고, 이는 CD19, CD20, CD27, CD23, CD69, CD80 및 CD86과 같은 상이한 표면 마커의 발현을 특징으로 하며, 여기서 CD23, CD69, CD80 및 CD86은 활성 B 세포에 대한 특수한 표면 마커이다.

[0301] 이 실험에서, 인간 PBMC 세포는 1×10^5개 세포/웰의 밀도로 96웰 플레이트에 플레이팅되었다. 항-CD40 항체 2F8-IgG1-LALA-YTE 및 hIgG1은 최고 농도 1000ng/mL로 연속 희석(3배)되었다. 항체 10μL를 96웰 플레이트에 첨가하였다. 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 10μL의 항-FLAG® M2 항체(Sigma, Cat#: F1804)가 접합된 shCD154를 첨가하였고, 37℃에서 18시간 동안 인큐베이션하였다. 이후, 세포를 PE 항-인간 CD20(BioLegend, Cat#: 302306), PerCP/Cyanine5.5 항-인간 CD69 항체(BioLegend, Cat#: 310926), Brilliant Violet 421™ 항-인간 CD86 항체(BioLegend, Cat#: 305426), FITC 항-인간 CD80 항체(BioLegend, Cat#: 375406), APC/Cy7 항-인간 CD23(BioLegend, Cat#: 338502), 인간 CD40 리간드/TNFSF5 단백질, His, Flag Tag(활성 삼량체)(MALS 인증)(ACRO, Cat#: CDL-H52Db-100ug) 및 모노클로날 항-FLAG® M2 항체(Sigma, Cat#: F1804-1MG)와 함께 4℃ 암실에서 30분 동안 인큐베이션한 후 유세포 분석을 수행하였다. 결과는 **도 15A~도 15B**에 나타나 있다.

[0302] 2F8-IgG1-LALA-YTE의 농도가 증가함에 따라 활성화된 B 세포 서브세트의 백분율은 모두 감소하였는데, 이는 2F8-IgG1-LALA-YTE가 B 세포의 증식과 활성화를 효과적으로 억제하였음을 밝힌다.

[0303] **실시예 11. hCD40/hFcRn 마우스의 EAE 모델을 사용한 항-CD40 항체의 효과 평가**

[0304] 실험적 자가면역성 뇌척수염(EAE)은 인간의 염증성 탈수초 질환인 다발성 경화증(MS)을 위해 가장 흔히 사용되는 실험 모델이다. 이 실험에서, EAE 모델을 hCD40/hFcRn 마우스를 통해 확립하여 인간 항-CD40 항체의 효과를 분석하였다. 구체적으로, hCD40/hFcRn 마우스는 대조군(G1) 및 두 개의 처리군(G2 및 G3)으로 배치되었다. 이후, hCD40/hFcRn 마우스를 1일차(군 배정 1일 후)에 두 개 지점에 후늑골에 100uL의 MOG(Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein(35-55))(마우스당 300μg의 용량 수준)를 주사하여 면역화하였고, 면역화 후 2시간 및 48시간에 250μL PTX(Pertussis Toxin)를 복강내 주사하여 EAE 모델을 수득하였다. 대조군(G1) 마우스에 동일한 부피의 PBS를 주사하였다.

[0305] G2 및 G3 군 마우스에게 10mg/kg의 hIgG1 또는 2F8-IgG1-LALA-YTE를 복강 내 주사로 각각 0일차(군 배정 당일), 4일차(군 배정 4일 후) 및 8일차(군 배정 8일 후)에 투여하였다. 대조군 마우스(G1)에는 주사하지 않았다. 마우스 체중을 측정하였고 매일 EAE의 신경학적 증상을 검사하였으며, 다음 척도에 따라 점수를 부여하였다: 0 = 증상 없음; 1 = 늘어진 꼬리; 2 = 뒷다리 무력; 3 = 뒷다리 마비; 4 = 앞다리 마비; 5 = 마우스가 죽어가거나 사망; 0.5등급은 중간 점수를 나타낸다. 실험이 끝난 후(군 배정 30일 후), 조직병리학적 분석을 위해 척수를 수집하였다. 자세한 투여 방식은 아래 표에 나타나 있다.

표 10

[0306]

군	항체	용량 (mg/kg)	경로	마우스의 수	총 투여 횟수
G1	-	-	-	8	-
G2	hIgG1	10	i.p.	8	3
G3	2F8-IgG1-LALA-YTE	10	i.p.	8	3

[0307] **도 16~도 19**에 나타난 바와 같이, 2F8-IgG1-LALA-YTE(G3)는 동물 모델링에 의해 야기되는 체중 감소를 방지할 수 있었고(**도 16**), 임상 점수를 감소시킬 수 있었다(**도 17**). 또한, 2F8-IgG1-LALA-YTE를 투여한 EAE 마우스에서 척수염 세포의 침윤(**도 18**) 및 척수 탈수초화(**도 19**)에 대한 특정 개선 효과가 있었다.

[0308] **실시예 12. hCD40 마우스의 CIA 모델을 사용한 항-CD40 항체의 효과 평가**

[0309] 콜라겐 유도 관절염(CIA) 모델은 인간의 류마티스 관절염(RA)과 면역학적 및 병리학적 유사성을 공유하고 있기 때문에 일반적으로 사용되는 모델이다. CIA 모델을 hCD40 마우스를 통해 확립하여 인간 항-CD40 항체의 효과를 분석하였다.

[0310] 구체적으로, hCD40 마우스는 대조군(G1) 및 두 개의 모델군(G2 및 G3)으로 배치되었다. 그 후, hCD40 마우스를 0일차(면역화의 첫째 날)에 두 개의 지점에서 꼬리 뿌리 내로 50μL의 II형 콜라겐(CII) 에멀젼(동일한 부피의 닭 흉골 연골로부터 유래한 CFA 및 콜라겐(SIGMA Cat#: C9301)으로 구성됨)을 주사하여 면역화하였다. 제2 면역화는 CIA 모델을 수득하기 위해 동일한 용량으로 21일차(첫번째 면역화 후 21일)에 수행하였다. 대조군(G1)에 동일한 부피의 PBS를 주사하였다.

[0311] G3 마우스에게 0일차, 4일차, 7일차, 20일차, 24일차 및 27일차에 복강 내 주사로 3mg/kg의 12B5-IgG1-LALA-YTE를 투여하였다. G2 마우스에 동일한 부피의 PBS를 투여하였다. G1 마우스에게는 주사하지 않았다. 모든 마우스의 체중을 측정하고 (A) 손가락의 지간 관절, (B) 앞발의 중족골 관절 및 (C) 손목, 그리고 뒷발의 중족골 관절 및 발목 관절의 홍반 및 부기의 징후에 대해 매일 모니터링하였다. 각 발의 임상적 관절염의 중증도를 다음과 같이 0~4의 척도로 평가하였다:

[0312] 0 = 정상. 건강한 마우스와 비교할 때 외관상 명백한 차이 없음;

[0313] 1 = 한 종류의 관절(A, B 또는 C) 홍반 및 부기;

[0314] 2 = 두 종류의 관절(A, B 또는 C) 홍반 및 부기;

[0315] 3 = 세 종류의 관절(A, B 또는 C) 홍반 및 부기; 및

[0316] 4 = 발 전체 홍반 및 부기.

[0317] 동물의 점수는 0~16의 척도로 4개 사지 점수의 합계이다. 실험이 끝난 후(제1 면역화 후 56일), 조직병리학적 분석을 위해 사지를 수집하였다. 자세한 투여 방식은 아래 표에 나타나 있다.

표 11

[0318]

군	항체	용량 (mg/kg)	경로	마우스의 수	총 투여 횟수
G1	-	-	-	10	-
G2	PBS	-	i.p.	10	6
G3	12B5-IgG1-LALA-YTE	3	i.p.	10	6

[0319] **도 20~도 23**에 나타난 바와 같이, 12B5-IgG1-LALA-YTE(G3)는 동물 모델링에 의해 야기된 체중 감소를 방지할 수 있었고(**도 20**), 대조군 G2(**도 21 내지 도 22**)과 비교하여 더 낮은 임상 점수 및 발병률에 의해 밝혀진 바와 같이 임상 중증도를 유의하게 감소시킬 수 있다. **도 23**에 나타난 바와 같이, 관절 조직의 조직병리학적 분석 결과는 염증 세포 유입(a), 활막 과다형성(b), 판누스 형성(c) 및 척수 탈수초화 또한 대조에 비해 12B5-IgG1-LALA-YTE 처리군에서 개선되었음을 입증하였다.

[0320] **실시예 13. 항-CD40 항체의 체내 효능**

[0321] 알레르기성 피부염(AD)은 홍반, 소양증, 인설, 태선화 및 구진소포를 특징으로 하는 피부의 염증성 병태이다.

[0322] 이 실험에서, AD 진단을 받은 개에서 항-CD40 항체 2F8-IgG1-LALA-YTE의 체내 효능을 평가하였다. 실험 전, 개는 1년 초과의 AD 증상이 재발하여 반복적으로 글루코코르티코이드 치료를 받았다. 구체적으로, 항체를 정맥 내 주사(iv)로 투여하였다. 주사 부피는 개의 체중을 기준으로 계산되었다. 투여 빈도는 2주 1회(총 6회 투여)로 하였다. 2회 주사 후, 개 피부의 홍반이 유의하게 감소한 것이 관찰되었다. 말초 혈액을 또한 수집하여 혈액 생화학 및 완전 혈구 수치(CBC)를 시험하였다. 결과는 시험 대상 항체 2F8-IgG1-LALA-YTE가 개에 대해 내약성이 우수하고 독성이 없음을 나타내었다. 부작용은 관찰되지 않았다.

[0323] **기타 실시양태**

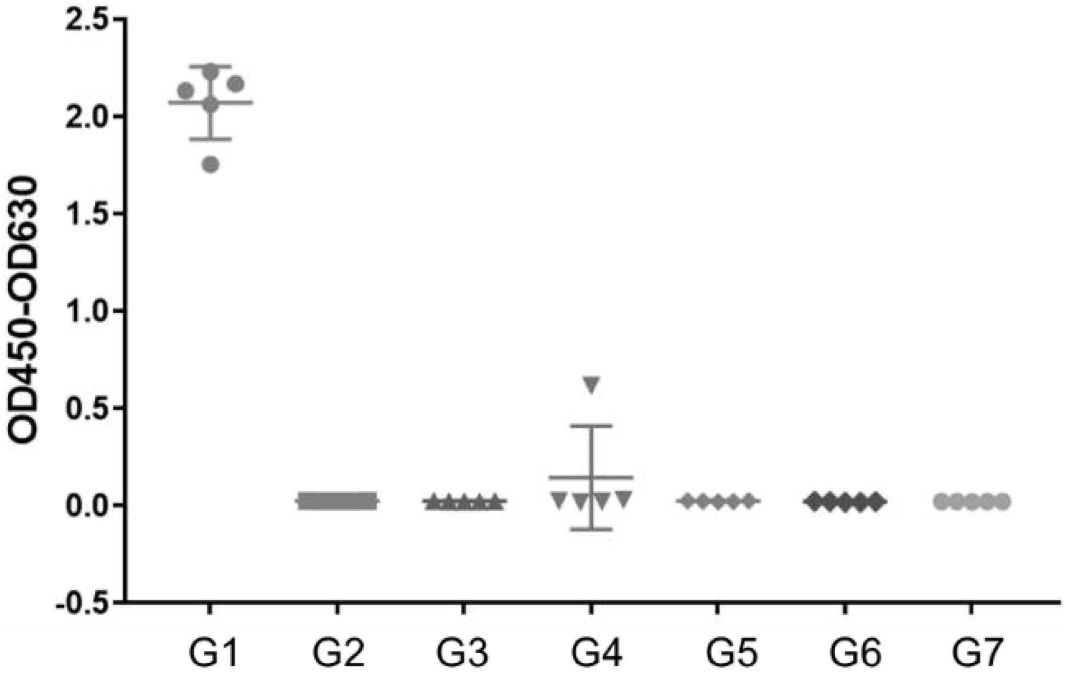
[0324] 본 발명이 이의 상세한 설명과 함께 설명되었으나, 전술한 설명은 첨부되는 청구범위의 범위에 의해 정의되는 본 발명의 범위를 예시하기 위한 것이지 제한하려는 것이 아니라는 점을 이해하여야 한다. 다른 양태, 이점 및 변형은 다음 청구범위의 범위 내에 있다.

도면

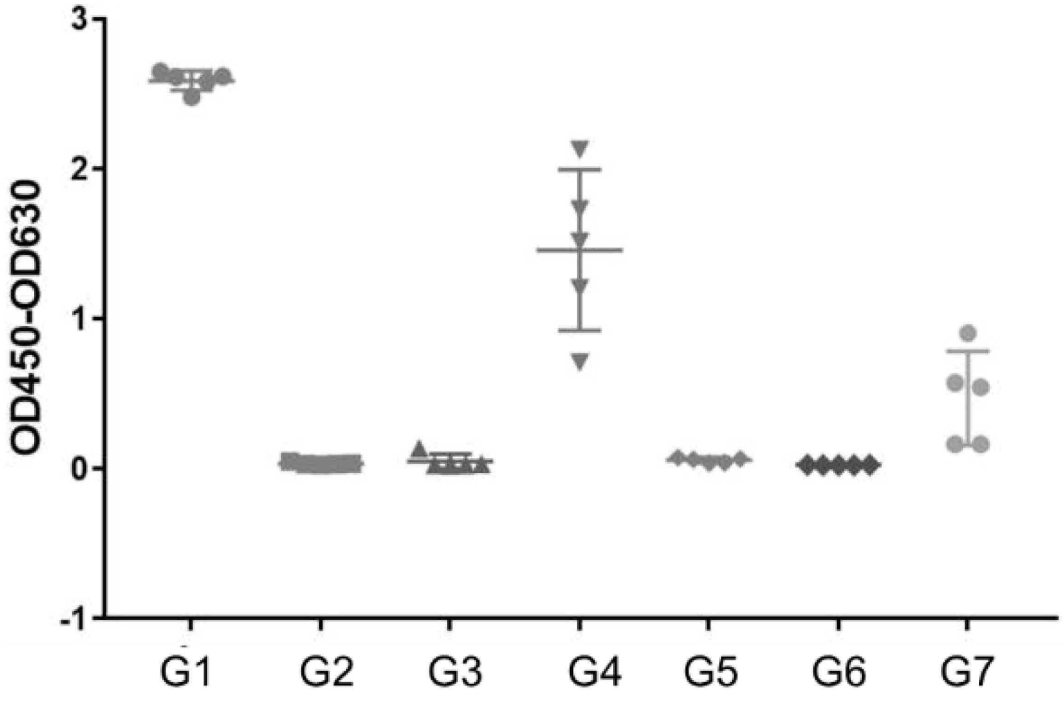
도면1


OVA/CFA
면역화
1st Ab
2mg/kg
2nd Ab
2mg/kg
0일차
1
4
10
17
ELISA 확인
혈청 항-OVA
ELISA 확인
혈청 항-OVA

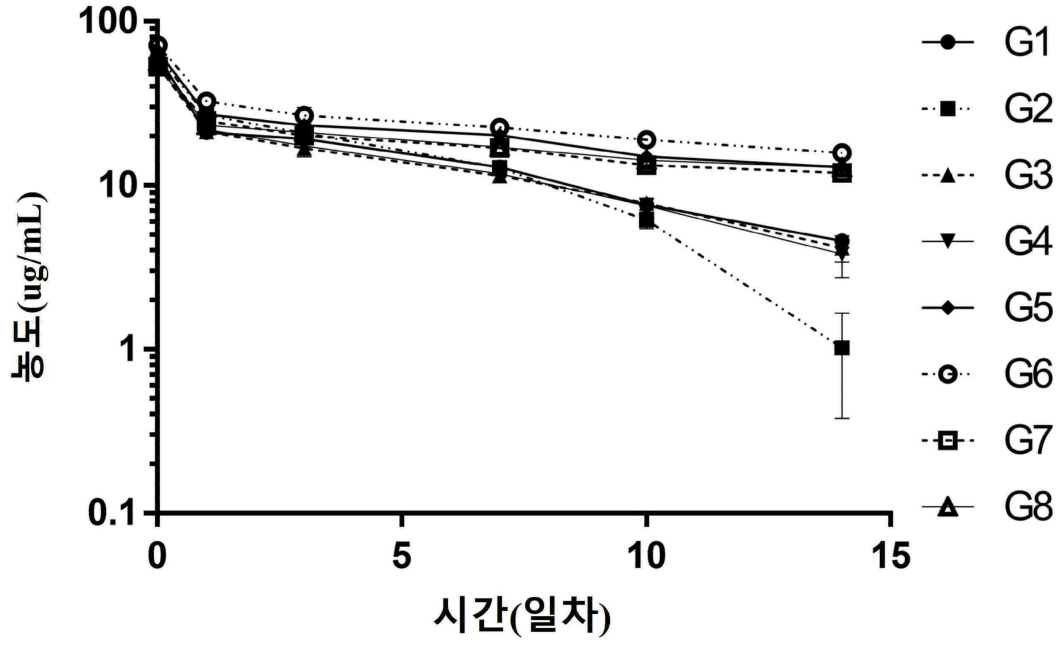
도면2


OD450-OD630
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7

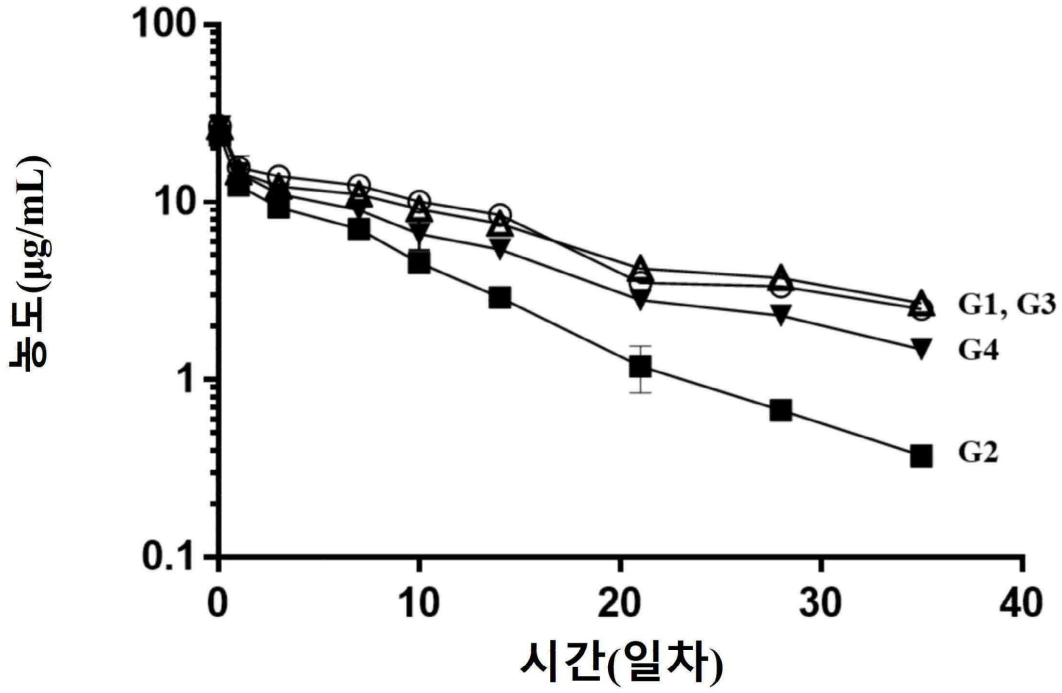
도면3


OD450-OD630
3
2
1
0
-1
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7

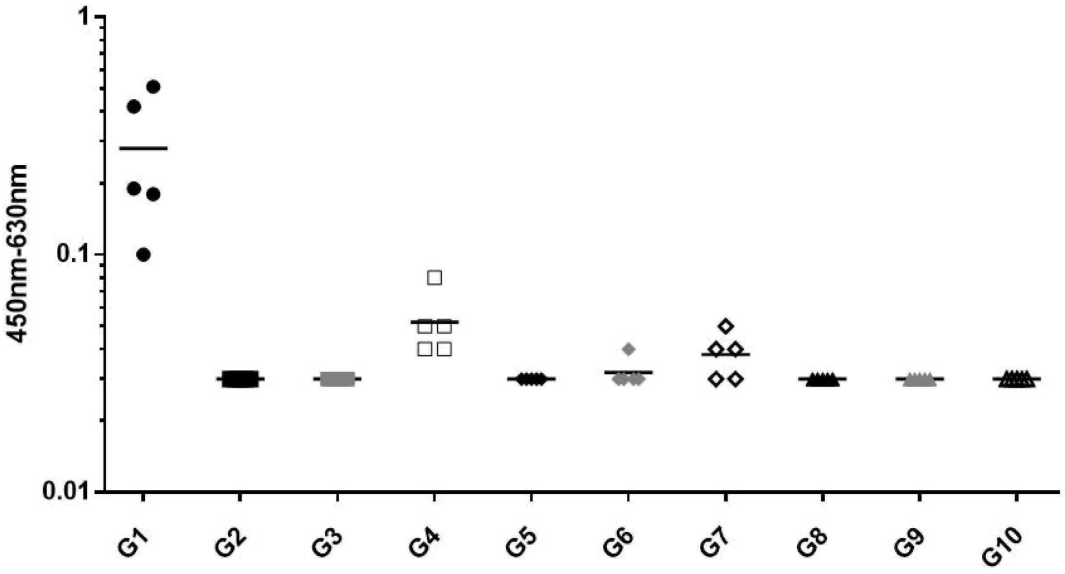
도면4


농도(ug/mL)
100
10
1
0.1
0
5
10
15
시간(일차)
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
G8

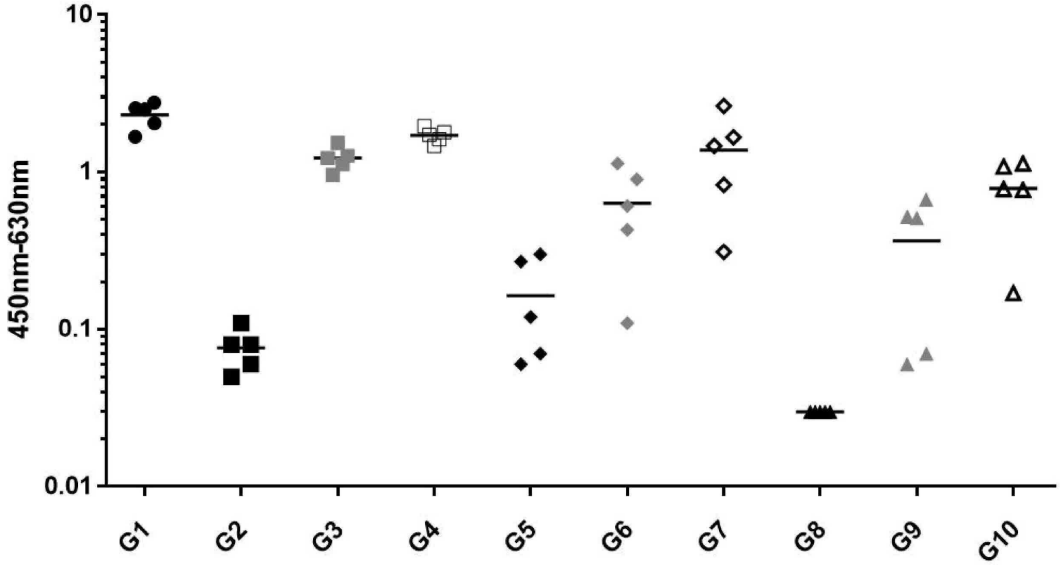
도면5


100
10
1
0.1
농도(μg/mL)
0
10
20
30
40
시간(일차)
G1, G3
G4
G2

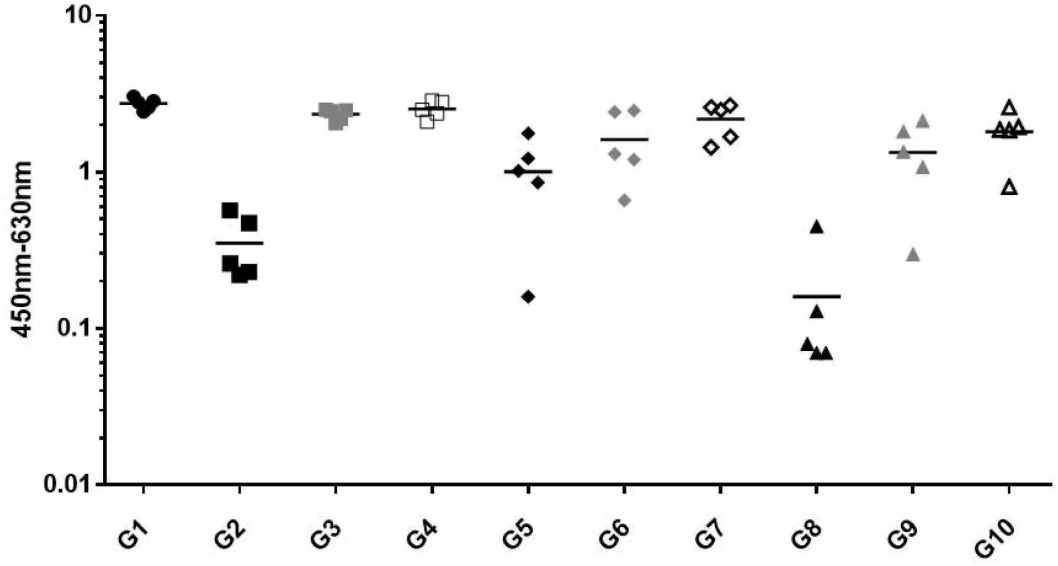
도면6


1
0.1
0.01
450nm-630nm
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
G8
G9
G10

도면7



도면8



도면9

항-CD40 항체에 대한 Kabat CDR

Ab	VH CDR1	서열 번호:	VH CDR2	서열 번호:	VH CDR3	서열 번호:	VL CDR1	서열 번호:	VL CDR2	서열 번호:	VL CDR3	서열 번호:
2F8	SYAMH	1	VISYDGDNKYHAESVKG	2	RGTVTNYYSYSGLDV	3	RSSQSLLYSNGKNYLD	4	LASNRAS	5	MQALQTPRT	6
6A4	NYVMS	7	TIRGSGISTYYTDSVKG	8	GIVGATTPFDY	9	RASQSVRSFLA	10	ETSNRAT	11	QQRSDWPPT	12
12B5	YYYWS	13	HISYSGSTYNPSLKS	14	GIVGARRGFDF	15	RASQSVSNNLA	16	DASNRAA	17	QQRNNWPPT	18

도면10

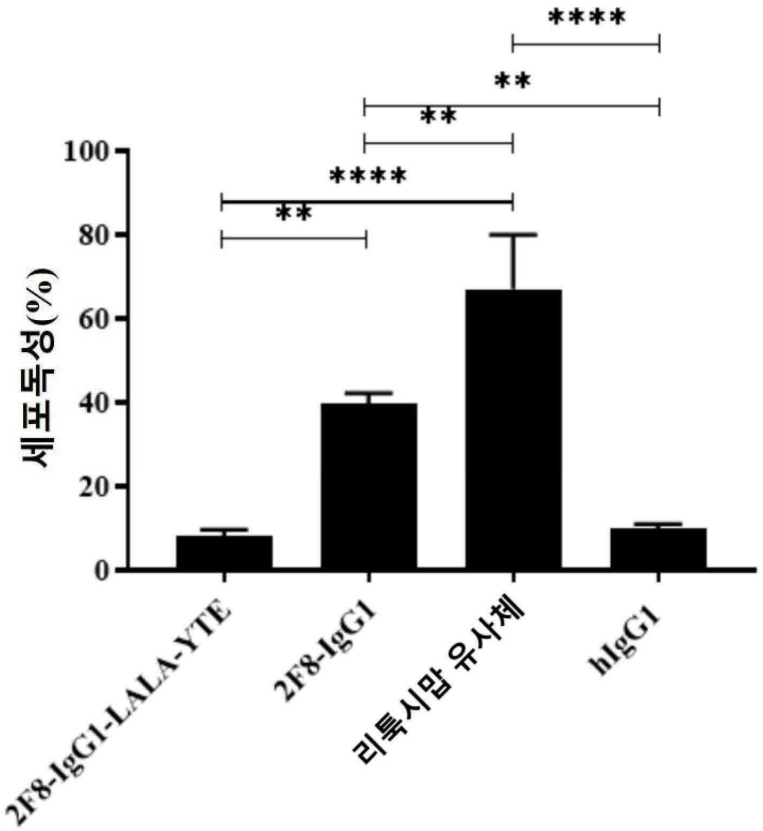
항-CD40 항체에 대한 Chothia CDR

Ab	VH CDR1	서열 번호:	VH CDR2	서열 번호:	VH CDR3	서열 번호:	VL CDR1	서열 번호:	VL CDR2	서열 번호:	VL CDR3	서열 번호:
2F8	GFSFSSY	19	SYDGDN	20	RGTVTNYY SYSGLDV	21	RSSQSLLY SNGKNYL D	22	LASNRAS	23	MQALQT PRT	24
6A4	GFTFSNY	25	RGSGIS	26	GIVGATTPF DY	27	RASQSVR SFLA	28	ETSNRAT	29	QQRSD WPPT	30
12B5	GGSISYY	31	SYSGS	32	GIVGARRGF DF	33	RASQSVS NNLA	34	DASNRAA	35	QQRNN WPPT	36

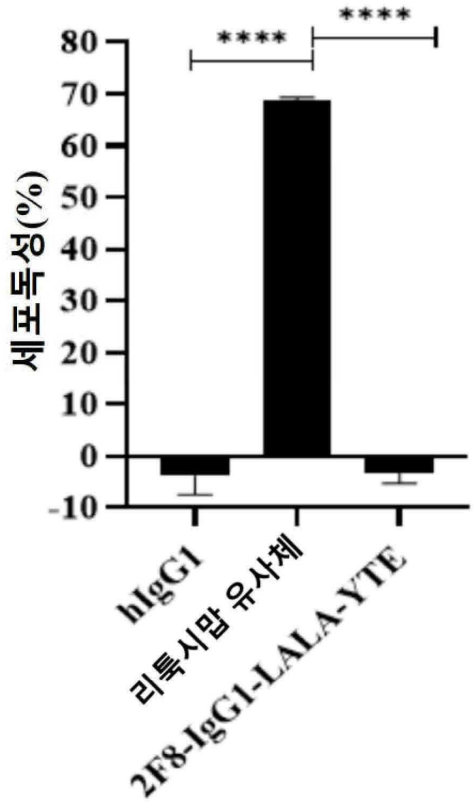
도면11

항체 가변 도메인	아미노산 서열	서열 번호
2F8 인간 중쇄 가변 영역	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYAMHWVRQVPGKGLEWVSVISYDGDNKYHAESVKGRFTISRDNSK NILYLQMNSLRPEDTAVYYCARRGTVTNYYSYSGLDVWGQGTTVTVSS	65
2F8 인간 경쇄 가변 영역	DIQLTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGKNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLASNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYFCMQALQTPRTFGQGTKVEIKR	37
6A4 인간 중쇄 가변 영역	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYVMSWVRQAPGKGLEWVSTIRGSGISTYYTDSVKGRFTTSRDNPKN TLFLQMSSLRAEDTAVYYCAKGIVGATTPFDYWGQGTLVTVSS	38
6A4 인간 경쇄 가변 영역	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSFLAWYQQKPGQAPRLLIYETSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPE DFAVYYCQQRSDWPPTFGQGTKVEIKR	39
12B5 인간 중쇄 가변 영역	QVQLVQSGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISYYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGSTNYNPSLKSRVTISEDTSKKQFSL KLDSVTAADTAVYYCAGGIVGARRGFDFWGQGTLVTVSS	40
12B5 인간 경쇄 가변 영역	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSNNLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAADIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQRNNWPPTFGQGTKVEIKR	41

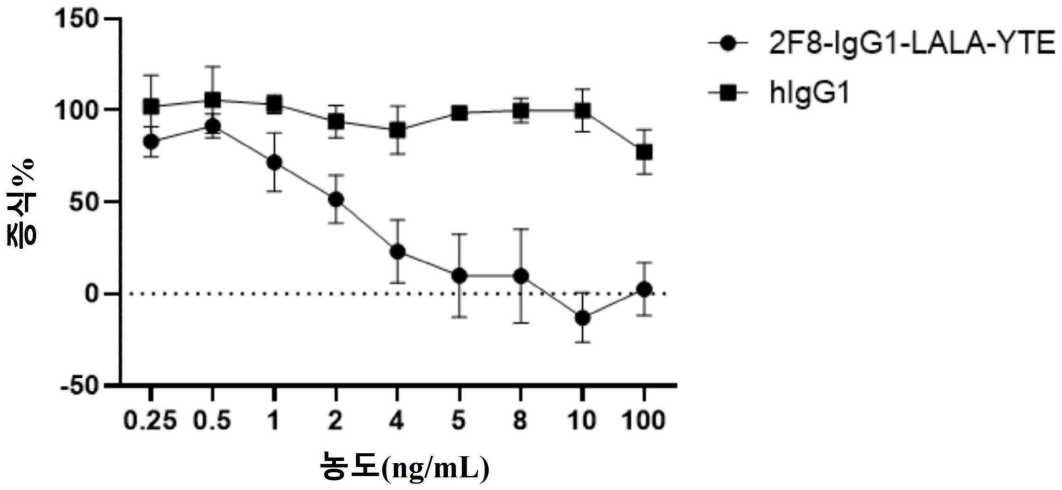
도면12



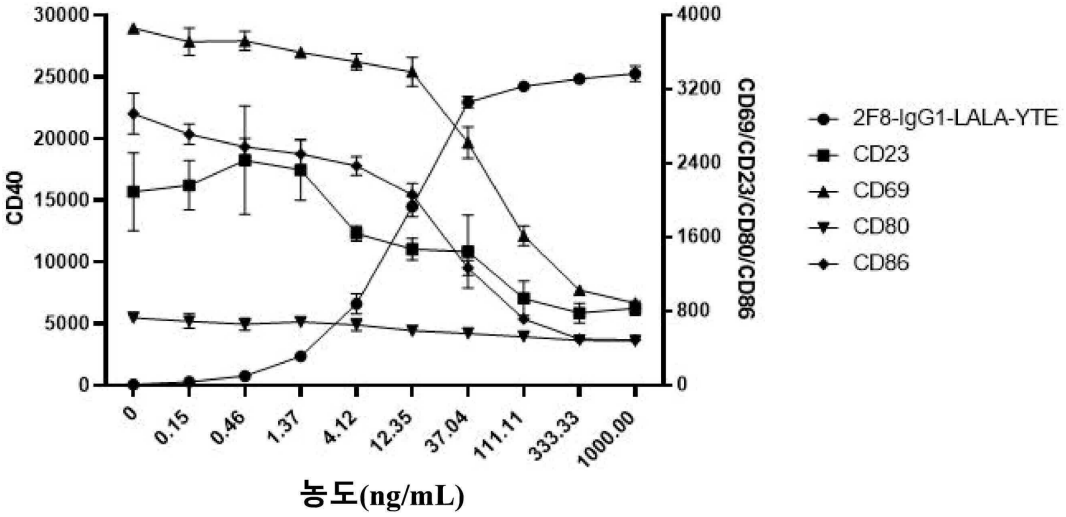
도면13


****
****
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
세포독성(%)
hIgG1
리툭시맙 유사체
2F8-IgG1-LALA-YTE

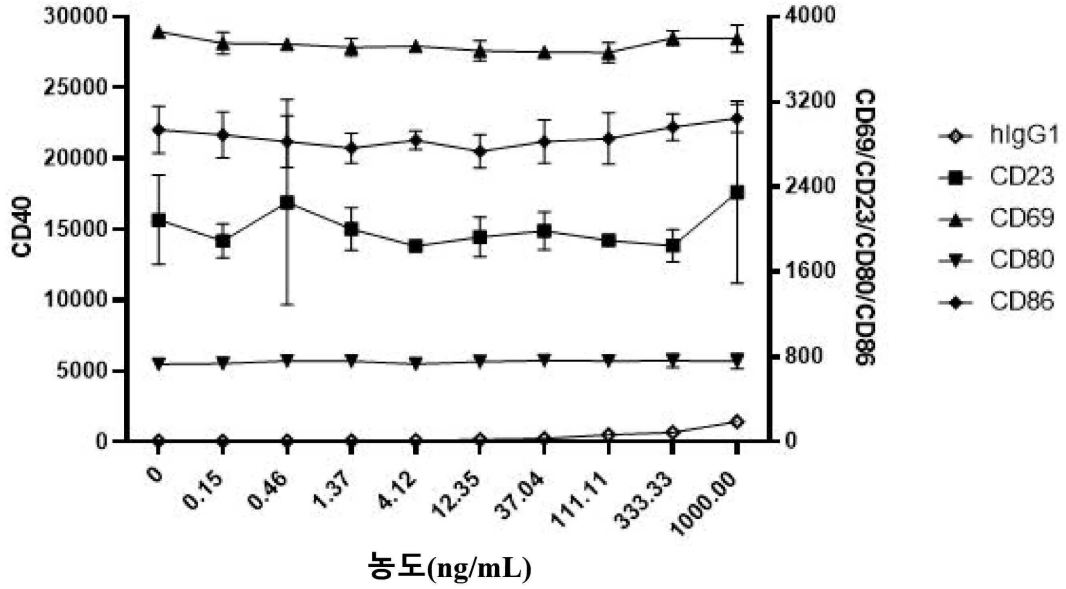
도면14


150
100
50
0
-50
증식%
0.25
0.5
1
2
4
5
8
10
100
농도(ng/mL)
2F8-IgG1-LALA-YTE
hIgG1

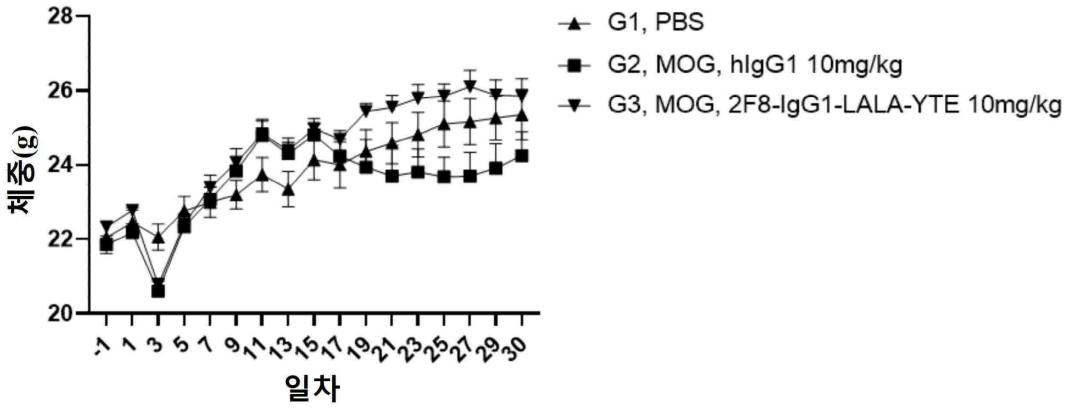
도면15a



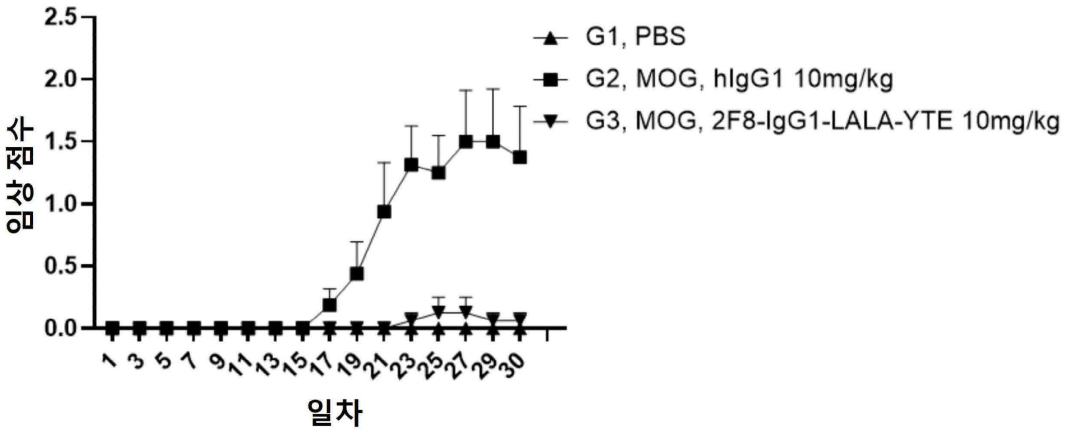
도면15b



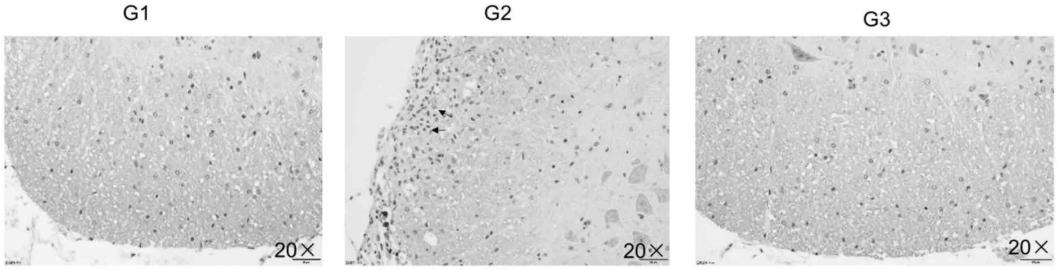
도면16



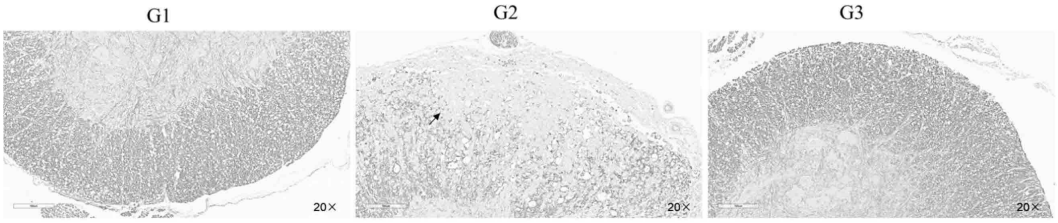
도면17



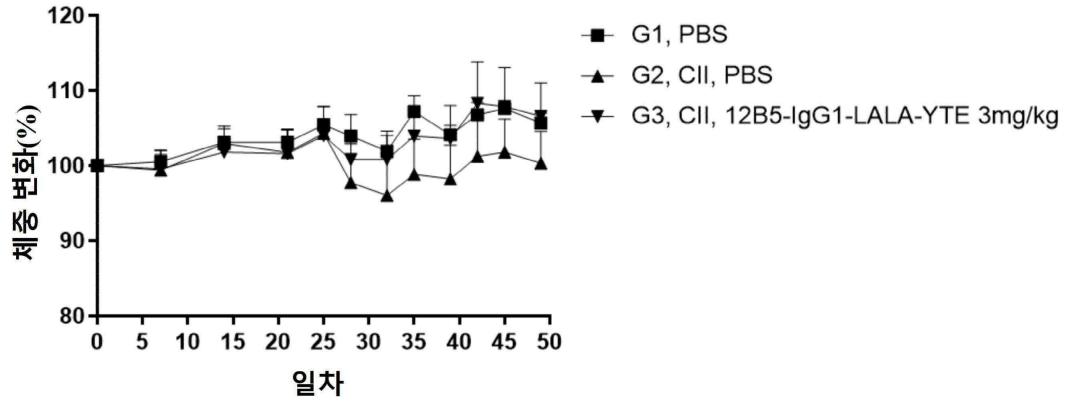
도면18



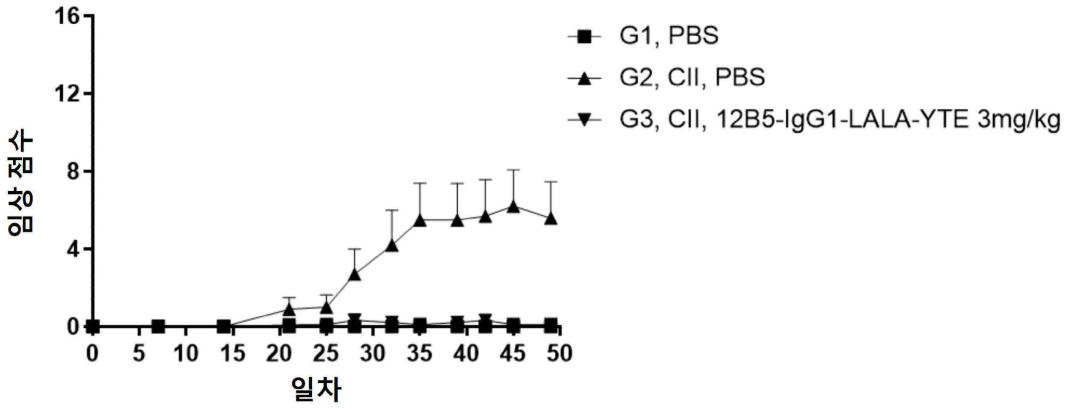
도면19



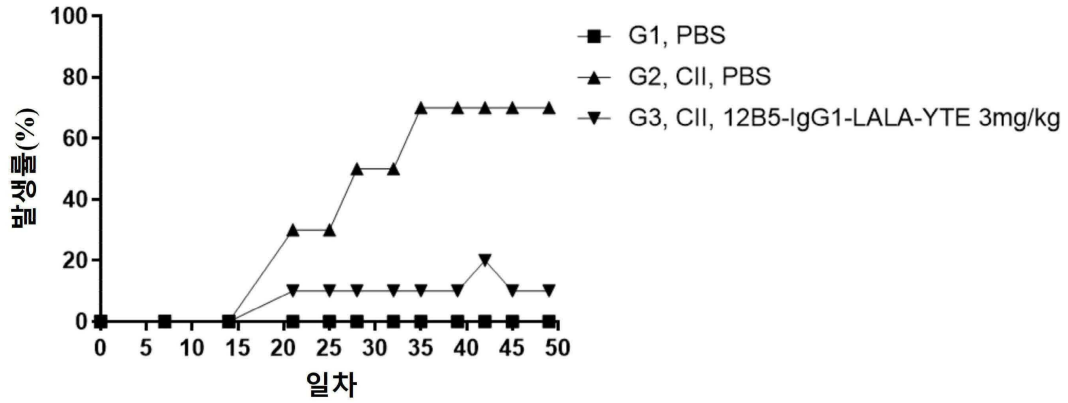
도면20



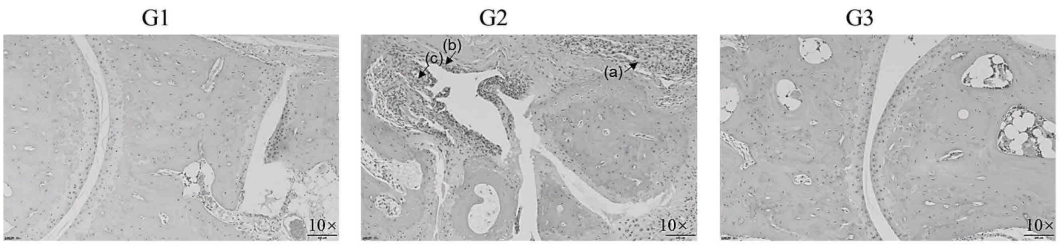
도면21



도면22



도면23



도면24a

인간 CD40 단백질(서열 번호: 42)

MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGW
HCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKK
PTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

블레셀루맙 VH(서열 번호: 43)

QLQLQESGPGLLKPSETLSLTCTVSGGSISSPGYYGGWIRQPPGKGLEWIGSIYKSGSTYHNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCTRPVVRYFGWFDPW
GQGTLVTVSS

블레셀루맙 VL(서열 번호: 44)

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPTFGQGTKVEIKR

이스칼리맙 VH(서열 번호: 45)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEESNRYHADSVKGRFTISRDNSKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPD
YWGQGTLVTVSS

이스칼리맙 VL(서열 번호: 46)

DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPFTFGPGTKVDI
RR

BI655064 VH(서열 번호: 47)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRGNIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDVWG
QGTTVTVSS

BI655064 VL(서열 번호: 48)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNRGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGQGTKL
EIKR

도면24b

키메라 CD40 단백질(서열 번호: 49)

MVSLPRLCALWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGW
HCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRLRALLVIPVVMGILITIFGVFLYIKKVVK
KPKDNEILPPAARRQDPQEMEDYPGHNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQVTDSIALRPLV

마우스 CD40 단백질(서열 번호: 50)

MVSLPRLCALWGCLLTAVHLGQCVTCSDKQYLHDGQCCDLCQPGSRLTSHCTALEKTQCHPCDSGEFSAQWNREIRCHQHRHCEPNQGLRVKKEGTAESDTVCTCKE
GQHCTSKDCEACAQHTPCIPGFGVMEMATETTDTVCHPCPVGFFSNQSSLFEKCYPWTSCEDKNLEVLQKGTSQTNVICGLKSRMRALLVIPVVMGILITIFGVFLYIKKV
VKKPKDNEILPPAARRQDPQEMEDYPGHNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQVTDSIALRPLV

인간 FcRn 단백질(서열 번호: 51)

MGVPRPQPWALGLLLFLLPGSLGAESHLSLLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLGPQQYLSYNSLRGEAEPCGAWVWENQVSWYWEKETTDLRIKEKLFLEAFKALGG
KGPYTLQGLLGCELGPDNTSVPTAKFALNGEEFMNFDLKQGTWGGDWPEALAISQRWQQQDKAANKELTFLLFSCPHRLREHLERGRGNLEWKEPPSMRLKARPSSPG
FSVLTCSAFSFYPPELQLRFLRNGLAAGTGQGDFGPNSDGSFHASSSLTVKSGDEHHYCCIVQHAGLAQPLRVELESPAKSSVLVVGIVIGVLLLTAAAVGGALLWRRMR
SGLPAPWISLRGDDTGVLLPTPGEAQDADLKDVNVIPATA

IgG1 중쇄 불변 영역(서열 번호: 52)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

SI 돌연변이를 갖는 IgG1 중쇄 불변 영역(서열 번호: 53)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

LALA 돌연변이를 갖는 IgG1 중쇄 불변 영역(서열 번호: 54)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS

도면24c

KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

LALA 돌연변이 및 YTE 돌연변이를 갖는 IgG1 중쇄 불변 영역(서열 번호: 55)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

N297A 돌연변이 YTE 돌연변이를 갖는 IgG1 중쇄 불변 영역(서열 번호: 56)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

IgG4 중쇄 불변 영역(서열 번호: 57)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA
PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

FLAA 돌연변이를 갖는 IgG4 중쇄 불변 영역(서열 번호: 58)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA
PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

YTE 돌연변이를 갖는 IgG4 중쇄 불변 영역(서열 번호: 59)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA
PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

도면24d

블레셀루맙 중쇄 불변 영역 서열 번호: 66중쇄 불변 영역

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA
PEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

블레셀루맙 경쇄 불변 영역 서열 번호: 60

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

이스칼리맙 중쇄 불변 영역 서열 번호: 61

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

이스칼리맙 경쇄 불변 영역 서열 번호: 62

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

BI655064 중쇄 불변 영역 서열 번호: 63

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

BI655064 경쇄 불변 영역 서열 번호: 64

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

리툭시맙 VH(서열 번호: 67)

도면24e

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSA
VYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSA

리툭시맙 VL(서열 번호: 68)

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPT
FGGGTKLEIKR

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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