



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0057113  
 (43) 공개일자 2019년05월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 16/24* (2006.01) *A61K 38/20* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 11/06* (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C07K 16/246* (2013.01)  
*A61K 38/2013* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7012253  
 (22) 출원일자(국제) 2017년09월28일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2019년04월26일  
 (86) 국제출원번호 PCT/US2017/053880  
 (87) 국제공개번호 WO 2018/064255  
 국제공개일자 2018년04월05일
- (30) 우선권주장  
 62/401,158 2016년09월28일 미국(US)  
 62/421,038 2016년11월11일 미국(US)

- (71) 출원인  
 조마 (유에스) 엘엘씨  
 미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 스위트 310 파  
 월 스트리트 2200  
 무스크 파운데이션 포 리서치 디벨롭먼트  
 미국 사우스캐롤라이나주 29425 찰스턴 수트 909  
 하굿 애비뉴 19
- (72) 발명자  
 로엘 마리나  
 미국 94710 캘리포니아주 베클리 세븐쓰 스트리트  
 2910 조마 (유에스) 엘엘씨 내  
 루빈스타인 마크  
 미국 29425 사우스캐롤라이나주 찰스턴 애슐리 애  
 비뉴 171 메디컬 유니버시티 오브 사우스 캐롤라  
 이나 씨/오  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
 유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 76 항

(54) 발명의 명칭 인터루킨-2에 결합하는 항체 및 그 용도

### (57) 요 약

본 개시는 일반적으로 인간 인터루킨 2(IL-2)에 대한 인간 항체, 및 이러한 항체의 IL-2 활성을 조절하는데 있어서의 사용 및 암, 자가 면역 질환, 또는 감염과 같은 질환의 치료에서의 사용의 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

**A61K 39/395** (2013.01)

**A61K 39/3955** (2013.01)

**A61P 11/06** (2018.01)

**A61P 31/04** (2018.01)

**A61P 35/00** (2018.01)

**A61P 37/06** (2018.01)

**C07K 16/18** (2013.01)

**C07K 16/28** (2013.01)

**C07K 2317/24** (2013.01)

(72) 발명자

**이사프라스 하산**

미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트  
2910 조마 (유에스) 엘엘씨 내

**라오 루엘린**

미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트  
2910 조마 (유에스) 엘엘씨 내

**리 오우**

미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트  
2910 조마 (유에스) 엘엘씨 내

**베딩거 다니엘 에이치.**

미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트  
2910 조마 (유에스) 엘엘씨 내

**린드 크리스틴 캠필드**

미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트  
2910 조마 (유에스) 엘엘씨 내

**홈즈 아그네스 초핀**

미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트  
2910 조마 (유에스) 엘엘씨 내

**타케우치 토시히코**

미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트  
2910 조마 (유에스) 엘엘씨 내

**슈위며 로렌**

미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트  
2910 조마 (유에스) 엘엘씨 내

**지양 호아**

미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트  
2910 조마 (유에스) 엘엘씨 내

**미르자 아메르 엠.**

미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트  
2910 조마 (유에스) 엘엘씨 내

**존슨 커크 더블유.**

미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트  
2910 조마 (유에스) 엘엘씨 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

$1 \times 10^{-10}$  M 이하의 친화도  $K_D$ 로 인간 인터루킨-2(IL-2)와 결합하고, IL-2 수용체 알파(IL-2 R $\alpha$ ) 서브 유닛과 IL-2의 결합을 억제하는 인간 또는 인간화 항체로서,  
상기 항체는 IL-2 R $\alpha\beta\gamma$  및 IL-2 R $\beta\gamma$ 를 통한 IL-2 신호 전달을 억제하고,  
상기 항체는 IL-2 R $\alpha\beta\gamma$ 를 통한 IL-2 신호 전달을 IL-2 R $\beta\gamma$ 를 통한 것보다 더 많이 억제하는, 항체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는 인간 또는 마우스 IL-2 R $\beta$  또는 IL-2 R $\beta\gamma$  복합체를 발현하는 세포에 대한 인간 IL-2의 결합을 완전히 차단하지는 않는, 항체.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체는 IL-2 R $\alpha$ , IL-2 R $\beta\gamma$  또는 IL-2 R $\alpha\beta\gamma$ 에 대한 IL-2의 결합에 대해 알로스테릭(allosteric)한 부위에서 결합하는, 항체.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 음성 조절제 항체이고, 선택적으로 상기 항체는 IL-2와 IL-2 수용체  $\alpha$ (IL-2 R $\alpha$ ) 사이의 결합 친화도를 약 2배 이상, 선택적으로는 1000배 이하까지 약화시킬 수 있는, 항체.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체와 복합체화된 IL-2가 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma_c$ 를 발현하는 CHO 세포에 5 nM 이하의 EC50으로 결합하거나 또는 상기 항체와 복합체화된 IL-2가 IL-2 R $\beta$ 를 발현하는 (그러나  $\gamma_c$ 는 발현하지 않는) CHO 세포에 100 nM 이하의 EC50으로 결합하는, 항체.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 마우스, 래트 또는 토끼 IL-2 중 하나 이상 및 인간 IL-2에 결합하는, 항체.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 IL-2 R $\alpha$ , IL-2 R $\beta$  및  $\gamma_c$ 를 발현하는 세포에서 STAT5 활성화의 IL-2 자극을 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma_c$ 를 발현하지만 IL-2 R $\alpha$ 를 발현하지 않는 세포에서보다 더 많이 억제하는, 항체.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 IL-2 R $\alpha$ , IL-2 R $\beta$  및  $\gamma_c$ 를 발현하는 세포에서 STAT5 활성화의 IL-2 자극을 200배 이상 억제하는, 항체.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma_c$ 를 발현하지만 IL-2 R $\alpha$ 를 발현하지 않는 세포에서 STAT5 활성화의 IL-2 자극을 10배 이하로 억제하는, 항체.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 IL-2 R $\alpha$ , IL-2 R $\beta$  및  $\gamma_c$ 를 발현하는 세포에서의 증식의 IL-2 자극을 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma_c$ 를 발현하지만 IL-2 R $\alpha$ 를 발현하지 않는 세포에서보다 더 많이 억제하는, 항

체.

### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 IL-2 R $\alpha$ , IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하는 NK 세포의 증식의 IL-2 자극을 15배 초과로 억제하는, 항체.

### 청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하지만 IL-2 R $\alpha$ 를 발현하지 않는 BaF3 세포의 증식의 IL-2 자극을 10배 미만으로 억제하는, 항체.

### 청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 XPA.92.019, XPA.92.041, XPA.92.042 또는 XPA.92.099로 이루어진 군에서 선택되는, 항체.

### 청구항 14

인간 인터루킨-2(IL-2)와 결합하는 항체로서,

- (a) 서열 번호 17, 20, 23 또는 26에 기재된 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 또는 하나 또는 두 개의 아미노산이 변경된 그의 변이체;
- (b) (a)와 동일한 중쇄 가변 영역에서 유래된 서열 번호 18, 21, 24 또는 27에 기재된 중쇄 CDR2 아미노산 서열, 또는 하나 또는 두 개의 아미노산이 변경된 그의 변이체; 및
- (c) (a)와 동일한 중쇄 가변 영역에서 유래된 서열 번호 19, 22, 25 또는 28에 기재된 중쇄 CDR3 아미노산 서열, 또는 하나 또는 두 개의 아미노산이 변경된 그의 변이체를 포함하는, 항체.

### 청구항 15

인간 인터루킨-2(IL-2)와 결합하는 항체로서,

- (a) 서열 번호 17, 20, 23 또는 26에 기재된 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 또는 이와 70% 이상의 동일성을 갖는 그의 변이체;
- (b) (a)와 동일한 중쇄 가변 영역에서 유래된 서열 번호 18, 21, 24 또는 27에 기재된 중쇄 CDR2 아미노산 서열, 또는 이와 70% 이상의 동일성을 갖는 그의 변이체; 및
- (c) (a)와 동일한 중쇄 가변 영역에서 유래된 서열 번호 19, 22, 25 또는 28에 기재된 중쇄 CDR3 아미노산 서열, 또는 이와 70% 이상의 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함하는, 항체.

### 청구항 16

인간 인터루킨-2(IL-2)와 결합하는 항체로서,

- (a) 서열 번호 17, 20, 23 또는 26에 기재된 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 또는 이와 70% 이상의 동일성을 갖는 그의 변이체;
- (b) 서열 번호 18, 21, 24 또는 27에 기재된 독립적으로 선택된 중쇄 CDR2 아미노산 서열, 또는 이와 70% 이상의 동일성을 갖는 그의 변이체; 및
- (c) 서열 번호 19, 22, 25 또는 28에 기재된 독립적으로 선택된 중쇄 CDR3 아미노산 서열, 또는 이와 70% 이상의 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함하는, 항체.

### 청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중쇄 CDR1, CDR2 또는 CDR3 아미노산 서열 중 두 개 이상이 서열 번호 17 내지 28 중 어느 하나에 기재되어 있는, 항체.

### 청구항 18

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 중 세 개가 서열 번호 17 내지 28 중 어느 하나에 기재되어 있는, 항체.

#### 청구항 19

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 1, 3, 5, 또는 7에 기재된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열과 85% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

#### 청구항 20

제14항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 1, 3, 5, 또는 7에 기재된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열과 95% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

#### 청구항 21

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 가변 영역에서 세 개의 HCDR 모두에 대해 70% 이상 동일한 아미노산 서열 또는 서열 번호 17 내지 28 중 어느 하나에 기재된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함하는, 항체.

#### 청구항 22

제14항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 중쇄 골격 아미노산이 다른 인간 항체 아미노산 서열로부터의 상응하는 아미노산(들)으로 치환되어 있는, 항체.

#### 청구항 23

제14항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 29 내지 40 중 어느 하나에 기재된 경쇄 CDR 아미노산 서열 중 어느 하나를 더 포함하는, 항체.

#### 청구항 24

제14항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 29 내지 40 중 어느 하나에 기재된 경쇄 CDR 아미노산 서열 중 두 개 이상을 포함하는, 항체.

#### 청구항 25

제14항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 29 내지 40 중 어느 하나에 기재된 경쇄 CDR 아미노산 서열 중 세 개 이상을 포함하는, 항체.

#### 청구항 26

제14항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

- (a) 서열 번호 29, 32, 35 또는 38에 기재된 경쇄 CDR1 아미노산 서열, 또는 하나 또는 두 개의 아미노산이 변경된 그의 변이체;
- (b) (a)와 동일한 경쇄 가변 영역에서 유래된 서열 번호 30, 33, 36 또는 39에 기재된 경쇄 CDR2 아미노산 서열, 또는 하나 또는 두 개의 아미노산이 변경된 그의 변이체; 및
- (c) (a)와 동일한 경쇄 가변 영역에서 유래된 서열 번호 31, 34, 37 또는 40에 기재된 경쇄 CDR3 아미노산 서열, 또는 하나 또는 두 개의 아미노산이 변경된 그의 변이체를 포함하는, 항체.

#### 청구항 27

인간 인터루킨-2(IL-2)와 결합하는 항체로서,

- (a) 서열 번호 29, 32, 35 또는 38에 기재된 경쇄 CDR1 아미노산 서열 또는 이와 70% 이상의 동일성을 갖는 그의 변이체;
- (b) (a)와 동일한 경쇄 가변 영역에서 유래된 서열 번호 30, 33, 36 또는 39에 기재된 경쇄 CDR2 아미노산 서열, 또는 이와 70% 이상의 동일성을 갖는 그의 변이체; 및

(c) (a)와 동일한 경쇄 가변 영역에서 유래된 서열 번호 31, 34, 37 또는 40에 기재된 경쇄 CDR3 아미노산 서열 또는 이와 70% 이상의 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함하는, 항체.

### 청구항 28

제14항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 서열 번호 29, 32, 35 또는 38에 기재된 경쇄 CDR1 아미노산 서열, 또는 하나 또는 두 개의 아미노산이 변경된 그의 변이체;

(b) 서열 번호 30, 33, 36 또는 39에 기재된 독립적으로 선택된 경쇄 CDR2 아미노산 서열 또는 하나 또는 두 개의 아미노산이 변경된 그의 변이체; 및

(c) 서열 번호 31, 34, 37 또는 40에 기재된 독립적으로 선택된 경쇄 CDR3 아미노산 서열, 또는 하나 또는 두 개의 아미노산이 변경된 그의 변이체를 포함하는, 항체.

### 청구항 29

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 경쇄 CDR1, CDR2 또는 CDR3 아미노산 서열의 둘 이상은 서열 번호 29 내지 40 중 어느 하나에 기재되어 있는, 항체.

### 청구항 30

제23항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 9, 11, 13, 또는 15 중 어느 하나에 기재된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열과 70% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

### 청구항 31

제30항에 있어서, 서열 번호 9, 11, 13, 또는 15 중 어느 하나에 기재된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열과 85% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

### 청구항 32

제30항에 있어서, 서열 번호 9, 11, 13, 또는 15 중 어느 하나에 기재된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열과 95% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

### 청구항 33

제32항에 있어서, 서열 번호 9, 11, 13, 또는 15 중 어느 하나에 기재된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

### 청구항 34

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 경쇄 가변 영역의 세 개의 LCDR 모두에 대해 70% 이상 동일한 아미노산 서열(서열 번호 29 내지 40에 기재된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 아미노산 서열)을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함하는, 항체.

### 청구항 35

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, (i) 경쇄 가변 영역의 세 개의 LCDR 모두에 대해 70% 이상 동일한 아미노산 서열(서열 번호 29 내지 40 중 어느 하나에 기재된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 아미노산 서열) 및 (ii) 중쇄 가변 영역의 세 개의 HCDR 모두에 대해 70% 이상 동일한 아미노산 서열(서열 번호 17 내지 28 중 어느 하나에 기재된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 아미노산 서열)을 포함하는, 항체.

### 청구항 36

경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역을 포함하는 인간 인터루킨-2(IL-2)와 결합하는 항체로서,

(a) 상기 경쇄 가변 영역은 적어도, 서열 번호 29, 32, 35, 또는 38, 또는 이와 80% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR1, 서열 번호 30, 33, 36, 또는 39, 또는 이와 80% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR2, 및/또는 서열 번호 31, 34, 37 또는 40, 또는 이와 80% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR3을 포함하고/하거나,

(b) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 17, 20, 23, 또는 26, 또는 이와 80% 이상 동일한 서열에서 선택된 적어도 CDR1, 서열 번호 18, 21, 24, 또는 27, 또는 이와 80% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR2, 및/또는 서열 번호 19, 22, 25 또는 28, 또는 이와 80% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR3을 포함하는, 항체.

#### 청구항 37

제31항에 있어서,

(a) 상기 경쇄 가변 영역은 적어도, 서열 번호 29, 32, 35, 또는 38, 또는 이와 90% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR1, 서열 번호 30, 33, 36, 또는 39, 또는 이와 90% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR2, 및 서열 번호 31, 34, 37 또는 40, 또는 이와 90% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR3을 포함하고/하거나,

(b) 상기 중쇄 가변 영역은 적어도, 서열 번호 17, 20, 23 또는 26, 또는 이와 90% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR1, 서열 번호 18, 21, 24, 또는 27, 또는 이와 90% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR2, 및 서열 번호 19, 22, 25, 또는 28, 또는 이와 90% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR3을 포함하는, 항체.

#### 청구항 38

제14항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, IL-2 수용체 알파(IL-2 R- $\alpha$ ) 서브 유닛에 대한 IL-2의 결합을 억제하는, 항체.

#### 청구항 39

제14항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 IL-2 R $\beta$   $\gamma$  복합체에 대한 IL-2의 결합을 부분적으로 억제하는, 항체.

#### 청구항 40

제14항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 IL-2 R $\alpha$ , IL-2 R $\beta$   $\gamma$  또는 IL-2 R $\alpha$  R $\beta$   $\gamma$ 에 대한 IL-2의 결합에 대해 알로스태릭한 부위에서 결합하는, 항체.

#### 청구항 41

제14항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 음성 조절제 항체이고, 선택적으로 상기 항체는 IL-2 와 IL-2 수용체  $\alpha$  (IL-2 R $\alpha$ ) 사이의 결합 친화도를 약 2배 이상, 선택적으로는 1000배 이하까지 약화시킬 수 있는, 항체.

#### 청구항 42

제14항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 IL-2 R $\beta$   $\gamma$  복합체에 대한 IL-2의 결합의 EC50을 3배 초과로 바꾸지 않는, 항체.

#### 청구항 43

제14항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 마우스, 래트 또는 토끼 IL-2 중 하나 이상 및 인간 IL-2에 결합하는, 항체.

#### 청구항 44

제14항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 IL-2로 상기 IL-2 R을 자극한 것에 반응하여 세포에서의 STAT5 활성화를 억제하는, 항체.

#### 청구항 45

제14항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 인간 항체 또는 인간화 항체인, 항체.

#### 청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 불변 영역을 더 포함하되, 상기 중쇄 불변 영역은 변형 또는 비변형된 IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, 이의 단편 또는 이들의 조합인, 항체.

**청구항 47**

제26항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 경쇄 골격 아미노산이 다른 인간 항체 아미노산 서열로부터의 상응하는 아미노산(들)으로 치환되어 있는, 항체.

**청구항 48**

제14항 내지 제16항, 제26항 내지 제28항 또는 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 XPA.92.019, XPA.92.041, XPA.92.042 또는 XPA.92.099로 이루어진 군에서 선택되는, 항체.

**청구항 49**

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역에 부착된 인간 경쇄 불변 영역을 더 포함하는, 항체.

**청구항 50**

제50항에 있어서, 상기 경쇄 불변 영역은 변형 또는 비변형된 람다 경쇄 불변 영역, 카파 경쇄 불변 영역, 이의 단편, 또는 이들의 조합인, 항체.

**청구항 51**

제14항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 인터루킨-2(IL-2)와  $10^{-10}$  M 이하의 친화도  $K_D$ 로 결합하는, 항체.

**청구항 52**

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 중쇄 또는 경쇄를 인코딩하는 뉴클레오파이드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자.

**청구항 53**

발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 제52항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

**청구항 54**

제53항의 벡터 또는 제49항의 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포.

**청구항 55**

제54항에 있어서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하되, 상기 중쇄 및 경쇄 핵산은 다른 핵산 또는 동일한 핵산에 의해 발현되는, 숙주 세포.

**청구항 56**

제54항 또는 제55항의 숙주 세포를 적합한 조건하에 배양하는 단계 및 상기 항체를 회수하는 단계를 포함하는, 제54항 또는 제55항의 숙주 세포를 사용하여 항체를 생성하는 방법.

**청구항 57**

제56항의 방법으로 생성된 항체.

**청구항 58**

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항의 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 멸균 약학 조성물.

**청구항 59**

IL-2 활성 억제를 필요로 하는 환자에서 IL-2 활성을 억제하는 방법으로서, IL-2 활성 억제를 필요로 하는 대상에게 제1항 내지 제52항 중 어느 한 항의 항체 또는 제58항의 약학 조성물의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 60**

증가된 인터루킨-2(IL-2) 또는 인터루킨-2 수용체(IL-2 R) 수준 또는 활성과 관련된 질병, 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 이러한 치료를 필요로 하는 대상에게 제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 항체 또는 제58항의 약학 조성물의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 61**

제60항에 있어서, 상기 질병, 질환 또는 장애는 암, 미생물 감염, 천식 및 자가 면역 질환으로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

**청구항 62**

제61항에 있어서, 상기 암은 흑색종, 신장 세포 암종, 럼프종, 육종, 유방암, 폐암, 방광암, 대장암, 위암, 비소세포성 폐암(NSCLC), 두경부암, 피부암 및 편평 상피암(SCC)으로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

**청구항 63**

제62항에 있어서, 상기 투여는 상기 대상의 종양 부피를 감소시키는 방법.

**청구항 64**

제60항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여가 상기 대상의 CD8+ T 세포 대 CD4+ T 세포의 비를 증가시키는 방법.

**청구항 65**

제60항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 정맥 내, 종양 내, 동맥 내, 복강 내, 근육 내, 피내 또는 피하 투여되는 방법.

**청구항 66**

제60항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 제2 제제와 함께 투여되는 방법.

**청구항 67**

제66항에 있어서, 상기 제2 제제는 IL-2, IL-2 변이체, 체크포인트 억제제, CART/TIL 제제, 종양 항원에 대한 항체 또는 백신인 방법.

**청구항 68**

제67항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제는 항-PD-1 항체, 항-PDL-1 항체, 항-CTLA-4 항체, PD-1 억제제, PDL-1 억제제, 또는 CTLA-4 억제제로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

**청구항 69**

제67항에 있어서, 상기 제2 제제가 IL-2 또는 IL-2 변이체인 경우; 상기 항체는 투여하기 전에 IL-2 또는 IL-2 변이체와 복합체화되거나 별도로 투여될 수 있는 방법.

**청구항 70**

제69항에 있어서, 상기 IL-2 또는 IL-2 변이체 및 IL-2 항체는 1:1의 몰비로 투여되는 방법.

**청구항 71**

제69항 또는 제70항에 있어서, IL-2 항체를 IL-2 또는 IL-2 변이체와 함께 투여하는 것은 IL-2의 치료 지수(TI)를 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배 이상 증가시키는 방법.

**청구항 72**

제69항에 있어서, 체크포인트 억제제, CART/TIL 제제, 종양 항원에 대한 항체 또는 백신의 투여를 더 포함하는

방법.

### 청구항 73

제60항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 매주 1회, 2주마다 1회, 매달 2회, 매달 1회, 2개월마다 1회, 또는 3개월마다 1회 투여되는 방법.

### 청구항 74

증가된 인터루킨-2(IL-2) 또는 인터루킨-2 수용체(IL-2 R)와 관련된 질환 또는 장애를 치료하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 항체 또는 제58항의 약학 조성물을 포함하는 조성물.

### 청구항 75

증가된 IL-2 또는 IL-2 R 발현 또는 활성과 관련된 질환 또는 장애를 치료하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 항체 또는 제58항의 약학 조성물을 포함하는 조성물.

### 청구항 76

세포에서 IL-2 활성을 조절하는 방법으로서, 상기 세포를 상기 세포에서 IL-2 활성을 조절하는 데 유효한 양의 제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 항체 또는 제58항의 약학 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

#### [0001] 관련 출원의 상호 참조

본 출원은 2016년 9월 28일자로 출원된 미국 가출원 제62/401,158호 및 2016년 11월 11일자로 출원된 미국 가출원 제62/421,038호의 우선권의 이익을 주장하며, 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

#### [0003] 전자 제출된 자료의 참조에 의한 통합

본원에 참고로 병합된 컴퓨터-판독 가능한 뉴클레오파이드/아미노산 서열 목록은 다음과 같이 동일시되고 제출된다: 파일명: 51134\_Seqlisting.txt; 크기: 20,399 바이트; 만든 날짜: 2017년 9월 28일.

#### [0005] 기술 분야

본 개시는 일반적으로 IL-2 신호 전달과 관련된 질환을 치료하기 위한 인터루킨-2(IL-2) 항체 및 치료법에 관한 것으로, 이를 필요로하는 대상에게 IL-2 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.

## 배경 기술

[0007] 인터루킨-2 (IL-2)는 사이토카인의 4- $\alpha$  헬릭스 번들 계열의 구성원인 15 kDa 웹타이드이다 (문헌 [Wang et al., *Annual review of immunology* 27, 29-60 (2009)]). T 세포 성장 인자로서 1976년에 처음 발견되었지만 T 세포 성장 인자(TCGF), 림프구 조절매개(LCM) 인자, T 세포 분열 인자(TM), 살해 보조 인자(KHF), T 세포 대체 인자(TRF)의 여러 가지 이름으로 기술된다(문헌 [Lotze MT, *Interleukin-2, In Human Cytokines: Handbook for basic and clinical research*, pp 81-96(1992); Smith et al., *Cytokine Reference*, pp 113-125 (2001)]). IL-2는 CD4 T 세포, CD8 T 세포, 수지상 세포(DC), 자연 살해(NK) 세포 및 자연 살해 T(NKT) 세포를 포함한 많은 세포에서 생성된다. IL-2는 T 세포 수용체(TCR)의 결합을 포함하여 광범위한 신호 후에 생성되며, TCR 및 미접촉(naive) T 세포상의 CD28과 같은 공동자극 분자를 결합 시 신속하고 일시적으로 생성된다. IL-2 분비의 일시적인 특성은 TCR 신호에 의한 전사 유도 및 공동자극 신호에 의한 IL-2 mRNA의 안정화, 이어서 IL-2 유전자의 전사 침묵화 및 IL-2 mRNA의 급속 분해에 의존한다. IL-2가 자체 생성을 억제하는 고전적 자동 조절 피드백 루프가 최근에 기술되었다(문헌 [Malek TR, *Annual review of immunology* 26, 453-479 (2008)]).

[0008] IL-2에 대한 수용체(IL-2 R)는 IL-2 R $\alpha$  (CD25로도 알려짐), IL-2 R $\beta$  (CD122로도 알려짐) 및 공통 감마 사슬 $\gamma$ c(CD132로도 알려짐)의 세 개의 사슬로 구성된다. 세 개의 수용체 사슬은 다양한 세포 유형에 따라 별개로 다르게 표현된다. IL-2는 Jak/Stat, PI3K-AKT 및 MAPK 경로와 같은 세포 경로를 활성화시키는 IL-2 R $\beta$  와 $\gamma$ c 사이의 상호 작용을 통해 신호 전달한다.

## 발명의 내용

[0009]

본원은 IL-2 신호 전달과 관련된 질병 또는 장애의 치료를 위한 방법 및 조성물을 제공하거나 IL-2 신호 전달의 조절이 향상된 임상(또는 면역) 반응을 유도할 수 있는 방법 및 조성물을 제공한다. 본원은 인간 IL-2와 결합하는 항체를 제공한다. 본원에 기재된 항체는 임의의 또는 모든 IL-2 R 사슬(IL-2 R $\alpha$ , IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c)에 대한 IL-2 결합에 상이한 효과를 가질 수 있다. 특히, 본 출원은 암의 치료에서의 상기 항체의 사용 방법을 제공한다.

[0010]

다양한 구현예에서, 본 개시는  $2 \times 10^{-9}$  M 이하의 친화도  $K_D$ 를 갖는 IL-2 특이적 항체를 제공한다. 다양한 구현예에서, 본 개시는  $1 \times 10^{-10}$  M 이하의 친화도  $K_D$ 를 갖는 IL-2 특이적 항체를 제공한다. 예시적인 구현예에서, 본원에 기재된 항-IL-2 항체는 적어도  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M,  $10^{-12}$  M,  $10^{-13}$  M 이하의 친화도로 결합한다. 특정 구현예에서, 친화도는 표면 플라스몬 공명 또는 KinExA 분석에 의해 측정된다.

[0011]

다양한 구현예에서, 항체는 IL-2 R $\alpha$  $\beta$  $\gamma$  및 IL-2 R $\beta$  $\gamma$ 를 통한 IL-2 신호 전달을 억제하고, 항체는 IL-2 R $\alpha$  $\beta$  $\gamma$ 를 통한 IL-2 신호 전달을 IL-2 R $\beta$  $\gamma$ 를 통한 것보다 더 많이 억제한다.

[0012]

관련된 구현예에서, 항체는 IL-2와 결합하고 IL-2 수용체 알파(IL-2 R $\alpha$ ) 서브유닛과 IL-2의 결합을 억제한다. 다양한 구현예에서, 항체는 IL-2 R $\alpha$  $\beta$  $\gamma$ 를 통한 IL-2 신호 전달을 IL-2 R $\beta$  $\gamma$ 를 통한 것보다 더 많이 억제한다.

[0013]

관련된 구현예에서, 항체는 인간 또는 마우스 IL-2 R $\beta$  또는 IL-2 R $\gamma$  복합체를 발현하는 세포에 대한 인간 IL-2의 결합을 완전히 차단하지는 않는다. 관련된 양태에서, 항체는 IL-2의 IL-2 R $\alpha$  또는 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c 사슬에 대한 결합에 대해 알로스테릭(allosteric)한 부위에서 결합한다.

[0014]

다양한 구현예에서, 항체는 음성 조절제 항체이고, 선택적으로 항체는 IL-2와 IL-2 수용체  $\alpha$ (IL-2 R $\alpha$ ) 사이의 결합 친화도를 약 2배 이상 선택적으로 1000배 이하까지 약화시킬 수 있다. 다른 구현예에서, 본원에 기재된 항체는 IL-2 및 IL-2 R $\alpha$  사이의 결합 친화도를 적어도 2~1000배, 10~100배, 2배, 5배, 10배, 25배, 50배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 600배, 700배, 800배, 900배 또는 1000배로 약화시킬 수 있다. 다양한 구현예에서, IL-2와 복합체화된 항체는 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하는 세포에 약 5 nM 이하의 EC50으로 결합한다. 다양한 구현예에서, 항체는 IL-2 R $\beta$ 를 발현하는(그러나  $\gamma$ c는 발현하지 않는) 세포에 약 200 nM 이하의 EC50으로 결합한다. 일부 구현예에서, IL-2와 복합체화된 항체는 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하는 세포에 0.1~100nM, 0.1~10nM, 1~5nM의 범위의 EC50으로 결합한다. 다양한 구현예에서, IL-2와 복합체화된 항체는 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하는 세포에 1, 2, 3, 4 또는 5 nM의 EC50으로 결합한다. 일부 구현예에서, IL-2와 복합체화된 항체는 IL-2 R $\beta$ 를 발현하는(그러나  $\gamma$ c는 발현하지 않는) 세포에 10~500 nM, 10~300 nM, 10~200 nM의 범위의 EC50으로 결합한다. 다양한 구현예에서, IL-2와 복합체화된 항체는 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하는 세포에 10, 50, 100, 150 또는 200 nM의 EC50으로 결합한다. 관련된 구현예에서, IL-2와 복합체화된 항체는 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하는 세포에 IL-2 R $\beta$ 를 발현하는(그러나  $\gamma$ c는 발현하지 않는) 세포보다 9배 내지 40배 더 많이 결합한다.

[0015]

다양한 구현예에서, 항체는 인간 IL-2에 결합하고, 마우스, 래트, 또는 토끼 IL-2 중 하나 이상에 결합한다.

[0016]

다양한 구현예에서, 항체는 IL-2 R $\alpha$ , IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하는 세포에서 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하지만 IL-2 R $\alpha$ 는 발현하지 않는 세포보다 STAT5 활성화의 IL-2 자극을 더 많이 억제한다. 예를 들어, 마우스 IL-2 R $\alpha$ , R $\beta$  및  $\gamma$ c(예컨대, CTL2-2)를 발현하는 세포에서, EC50 변화는 293배 내지 793배의 범위일 수 있으며, 마우스 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하는 세포(예컨대, 마우스 1차 NK 세포)의 경우 13배 내지 16배인 것과 비교된다. 인간 IL-2 R $\alpha$ , R $\beta$  및  $\gamma$ c(예컨대, NK92 세포주)를 발현하는 세포의 경우, EC50 변화는 495배 내지 1855배의 범위일 수 있으며, 인간 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하는 세포(인간 CD25+ 결핍 1차 NK 세포)의 경우 45배 내지 104배, 또는 인간 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하도록 조작된 CHO-K1 세포의 경우 5배 내지 9배인 것과 비교된다. EC50 변화 비율은 마우스 R $\beta$  및  $\gamma$ c에 비해 마우스 R $\alpha$ , R $\beta$  및  $\gamma$ c의 경우 18배 내지 60배 더 커지고(클론 5355로도 알려진 대조군 항체 MAB602의 경우 76배), 인간 R $\beta$  및  $\gamma$ c와 비교하여 인간 R $\alpha$ , R $\beta$  및  $\gamma$ c의 경우 9배 내지 19배 더 커진다(MAB602의 경우 50배). 관련된 구현예에서, 항체는 인간 IL-2 R $\alpha$ , IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하는 세포의 경우 400배 이상, 마우스 IL-2 R $\alpha$ , IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하는 세포에서 200배 이상 STAT5 활성화의 IL-2 자극을 억제한다. 관련된 구현예에서, 항체는 인간 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하지만 IL-2 R $\alpha$ 를 발현하지 않는 세포에서 10배(CHO-R $\beta$  $\gamma$ ) 또는 150배 미만(예컨대, 인간 CD25+ 결핍 1차 NK 세포에서)으로, 또는 마우스 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c

c(예컨대, 마우스 NK 세포)를 발현하는 세포에서 20배 미만으로 STAT5 활성화의 IL-2 자극을 억제한다.

[0017] 다양한 구현예에서, 항체는 IL-2 R $\alpha$ , IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하는 세포에서 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하지만 IL-2 R $\alpha$ 는 발현하지 않는 세포보다 증식의 IL-2 자극을 더 많이 억제한다. 다양한 구현예에서, 항체는 IL-2 R $\alpha$ , IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하는 NK 세포의 증식의 IL-2 자극을 20배 초과하여 억제한다. 다양한 구현예에서, 항체는 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 발현하지만 IL-2 R $\alpha$ 를 발현하지 않는 BaF3 세포의 증식의 IL-2 자극을 12배 미만으로 억제한다.

[0018] 하나의 구현예에서, IL-2 항체는 단일 클론 항체이다.

[0019] 다양한 구현예에서, IL-2 항체는 인간 또는 인간화 항체이다.

[0020] 다양한 구현예에서, 항체는 XPA.92.019, XPA.92.041, XPA.92.042 또는 XPA.92.099로 이루어진 군에서 선택된다.

[0021] 하나의 양태에서, 본 개시는 (a) 서열 번호 17, 20, 23 또는 26에 기재된 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 또는 하나 또는 두 개의 아미노산이 변경된 그의 변이체; (b) (a)와 동일한 중쇄 가변 영역에서 유래된 서열 번호 18, 21, 24 또는 27에 기재된 중쇄 CDR2 아미노산 서열, 또는 하나 또는 두 개의 아미노산이 변경된 그의 변이체; 및 (c) (a)와 동일한 중쇄 가변 영역에서 유래된 서열 번호 19, 22, 25 또는 28에 기재된 중쇄 CDR3 아미노산 서열, 또는 하나 또는 두 개의 아미노산이 변경된 그의 변이체를 포함하는 인간 인터루킨-2(IL-2)와 결합하는 항체를 제공한다.

[0022] 관련된 양태에서, 본 개시는 (a) 서열 번호 17, 20, 23 또는 26에 기재된 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 또는 이와 70% 이상의 동일성을 가지는 그의 변이체; (b) (a)와 동일한 중쇄 가변 영역에서 유래된 서열 번호 18, 21, 24 또는 27에 기재된 중쇄 CDR2 아미노산 서열, 또는 이와 70% 이상의 동일성을 갖는 그의 변이체; 및 (c) (a)와 동일한 중쇄 가변 영역에서 유래된 서열 번호 19, 22, 25 또는 28에 기재된 중쇄 CDR3 아미노산 서열, 또는 이와 70% 이상의 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함하는 인간 인터루킨-2(IL-2)와 결합하는 항체를 제공한다.

[0023] 또 다른 양태에서, 본 개시는 (a) 서열 번호 17, 20, 23 또는 26에 기재된 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 또는 이와 70% 이상의 동일성을 갖는 그의 변이체; (b) 서열 번호 18, 21, 24 또는 27에 기재된 독립적으로 선택된 중쇄 CDR2 아미노산 서열, 또는 이와 70% 이상의 동일성을 갖는 그의 변이체; 및 (c) 서열 번호 19, 22, 25 또는 28에 기재된 독립적으로 선택된 중쇄 CDR3 아미노산 서열, 또는 이와 70% 이상의 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함하는 인간 인터루킨-2(IL-2)와 결합하는 항체를 제공한다.

[0024] 특정 구현예에서, 중쇄 CDR1, CDR2 또는 CDR3 아미노산 서열 중 둘 이상은 서열 번호 17~28 중 어느 하나에 기재되어 있다. 관련된 구현예에서, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 중 세 개는 서열 번호 17~28 중 어느 하나에 기재되어 있다.

[0025] 일부 구현예에서, 본원에서 고려되는 항체는 서열 번호 1, 3, 5 또는 7에 기재된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열과 85% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 서열 번호 1, 3, 5 또는 7에 기재된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열과 95% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 항체가 본원에서 제공된다.

[0026] 또한 본원에 기재된 항체는 중쇄 가변 영역에서 세 개의 HCDR 모두와 70% 이상 동일한 아미노산 서열(서열 번호 17~28 중 어느 하나에 기재된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 아미노산 서열)을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 것으로 여겨진다.

[0027] 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 항체는 하나 이상의 중쇄 골격 아미노산이 또 다른 인간 항체 아미노산 서열로부터의 상응하는 아미노산(들)으로 치환된 것을 포함한다.

[0028] 하나의 구현예에서, 본원에서 고려되는 항체는 서열 번호 29~40 중 어느 하나에 기재된 경쇄 CDR 아미노산 서열 중 어느 하나를 더 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에서 고려되는 항체는 서열 번호 29~40 중 어느 하나에 기재된 경쇄 CDR 아미노산 서열 중 둘 이상을 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에서 고려되는 항체는 서열 번호 29~40 중 어느 하나에 기재된 경쇄 CDR 아미노산 서열 중 세 개 이상을 포함한다.

[0029] 또 다른 양태에서, 본원에 기술된 항체는 (a) 서열 번호 29, 32, 35 또는 38에 기재된 경쇄 CDR1 아미노산 서열, 또는 하나 또는 두 개의 아미노산이 변경된 그의 변이체; (b) (a)와 동일한 경쇄 가변 영역에서 유래된 서열 번호 30, 33, 36 또는 39에 기재된 경쇄 CDR2 아미노산 서열, 또는 하나 또는 두 개의 아미노산이 변경된 그의 변이체; 및 (c) (a)와 동일한 경쇄 가변 영역에서 유래된 서열 번호 31, 34, 37 또는 40에 기재된 경쇄

CDR3 아미노산 서열, 또는 하나 또는 두 개의 아미노산이 변경된 그의 변이체를 포함한다.

[0030] 대체 구현예에서, 본원에서 고려되는 항체는 (a) 서열 번호 29, 32, 35 또는 38에 기재된 경쇄 CDR1 아미노산 서열, 또는 하나 또는 두 개의 아미노산이 변경된 그의 변이체; (b) 서열 번호 30, 33, 36 또는 39에 기재된 독립적으로 선택된 경쇄 CDR2 아미노산 서열 또는 하나 또는 두 개의 아미노산이 변경된 그의 변이체; 및 (c) 서열 번호 31, 34, 37 또는 40에 기재된 독립적으로 선택된 경쇄 CDR3 아미노산 서열, 또는 하나 또는 두 개의 아미노산이 변경된 그의 변이체를 포함한다.

[0031] 특정 구현예에서, 경쇄 CDR1, CDR2 또는 CDR3 아미노산 서열 중 둘 이상은 서열 번호 29~40 중 어느 하나에 기재되어 있다.

[0032] 또한 본원에 기재된 항체는 서열 번호 9, 11, 13, 또는 15 중 어느 하나에 기재된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열과 70% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것으로 생각된다. 관련된 구현예에서, 항체는 서열 번호 9, 11, 13, 또는 15 중 어느 하나에 기재된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열과 85% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 추가 구현예에서, 항체는 서열 번호 9, 11, 13, 또는 15 중 어느 하나에 기재된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열과 95% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 서열 번호 9, 11, 13, 또는 15 중 어느 하나에 기재된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다.

[0033] 추가 구현예에서, 본원에 기재된 항체는 경쇄 가변 영역의 세 개의 LCDR 모두에 대해 70% 이상 동일한 아미노산 서열(서열 번호 29~40 중 어느 하나에 기재된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 아미노산 서열)을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

[0034] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 항체는 (i) 경쇄 가변 영역의 세 개의 LCDR 모두에 대해 70% 이상 동일한 아미노산 서열(서열 번호 29~40 중 어느 하나에 기재된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 아미노산 서열) 및 (ii) 중쇄 가변 영역의 세 개의 HCDR 모두에 대해 70% 이상 동일한 아미노산 서열(서열 번호 17~28 중 어느 하나에 기재된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 아미노산 서열)을 포함한다.

[0035] 다양한 구현예에서, 본 개시는 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역을 포함하는 인터루킨-2(IL-2)와 결합하는 항체를 제공하되, (a) 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 29, 32, 35, 또는 38, 또는 이와 80% 이상 동일한 서열에서 선택된 적어도 CDR1, 서열 번호 30, 33, 36, 또는 39, 또는 이와 80% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR2, 및/또는 서열 번호 31, 34, 37 또는 40, 또는 이와 80% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR3을 포함하고/하거나, (b) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 17, 20, 23, 또는 26, 또는 이와 80% 이상 동일한 서열에서 선택된 적어도 CDR1, 서열 번호 18, 21, 24, 또는 27, 또는 이와 80% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR2, 및/또는 서열 번호 19, 22, 25 또는 28, 또는 이와 80% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR3을 포함한다.

[0036] 다양한 구현예에서, 본 개시는 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역을 포함하는 IL-2와 결합하는 항체를 제공하되, (a) 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 29, 32, 35, 또는 38, 또는 이와 90% 이상 동일한 서열에서 선택된 적어도 CDR1, 서열 번호 30, 33, 36, 또는 39, 또는 이와 90% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR2, 및 서열 번호 31, 34, 37 또는 40, 또는 이와 90% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR3을 포함하고/하거나, (b) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 17, 20, 23 또는 26, 또는 이와 90% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR1, 서열 번호 18, 21, 24, 또는 27, 또는 이와 90% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR2, 및/또는 서열 번호 19, 22, 25, 또는 28, 또는 이와 90% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR3을 포함한다.

[0037] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 항체는 IL-2와 IL-2 수용체 알파(IL-2 R $\alpha$ ) 서브유닛과의 결합을 억제한다. 관련된 구현예에서, 본원에 기재된 항체는 IL-2 R $\beta$   $\gamma$  복합체에 대한 IL-2의 결합을 완전히 차단하지는 않는다.

[0038] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 항체는 IL-2 R $\alpha$ , IL-2 R $\beta$ , IL-2R $\gamma$  및/또는 IL-2 R $\beta$   $\gamma$ 에 대한 IL-2의 결합에 대해 알로스테릭 부위에서 결합한다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 항체는 IL-2에 결합하고 IL-2 R $\alpha$ , IL-2 R $\beta$  및/또는  $\gamma$ c에 대한 결합 선호도에 영향을 주는 구조 변화를 유도한다.

[0039] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 항체는 IL-2 R $\beta$   $\gamma$  복합체에 대한 IL-2의 결합의 EC50을 3배 초과로 바꾸지 않는다.

[0040] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 항체는 IL-2로 IL-2 R을 자극한 것에 반응하여 세포에서 STAT5 활성화를 억제한다.

[0041] 일부 구현예에서, 본 개시의 항체는 중쇄 불변 영역을 더 포함하되, 상기 중쇄 불변 영역은 변형 또는 비변형된

IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, 이의 단편 또는 이들의 조합이다.

[0042] 특정 구현예에서, 하나 이상의 경쇄 골격 아미노산이 다른 인간 항체 아미노산 서열로부터의 상응하는 아미노산(들)으로 치환되어 있고, 선택적으로 상기 골격은 도 12a~e에 기재된 변경 중 하나 이상을 포함하는 항체가 제공된다.

[0043] 하나의 양태에서, 본 개시의 항체는 XPA.92.019, XPA.92.041, XPA.92.042 또는 XPA.92.099로 이루어진 군에서 선택된다.

[0044] 하나의 구현예에서, 본원에 기재된 항체는 상기 경쇄 가변 영역에 부착된 인간 경쇄 불변 영역을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 경쇄 불변 영역은 변형 또는 비변형된 람다 경쇄 불변 영역, 카파 경쇄 불변 영역, 이의 단편, 또는 이들의 조합이다.

[0045] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 기재된 중쇄 또는 경쇄를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공한다. 다양한 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 또는 16에 기재되어 있다.

[0046] 추가 양태에서, 본 개시는 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 본원에서 고려되는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 또한, 본 개시의 발현 벡터 또는 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포도 고려된다. 특정 구현예에서, 본 개시는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 제공하되, 상기 중쇄 및 경쇄 핵산은 상이한 핵산 또는 동일한 핵산에 의해 발현된다.

[0047] 관련된 양태에서, 본 개시는 항체를 생산하기 위해 본원에 기재된 바와 같은 숙주 세포를 사용하는 방법으로서, 적합한 조건하에 숙주 세포를 배양하고 상기 항체를 회수하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 또한, 본원에 개시된 방법에 의해 제조된 항체가 제공된다.

[0048] 본 개시는 또한 본원에 개시된 바와 같은 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 멸균 약학 조성물을 고려한다.

[0049] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에서 고려되는 항체 또는 약학 조성물의 치료 유효량을 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 환자에서 IL-2 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 여러 가지 구현예에서, 본 방법은 조절 T 세포/CD25 hi, T 효과기/CD 25 lo, 및/또는 고친화성 삼량체 IL-2 수용체(IL-2 R $\alpha\beta\gamma$ ) 또는 IL-2R $\alpha$ 와 같은 세포 집단에서 IL-2 활성을 억제하는 것으로 간주된다.

[0050] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에서 고려되는 항체 또는 약학 조성물의 치료 유효량을 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 증가된 인터루킨-2(IL-2) 또는 인터루킨-2 수용체(IL-2 R) 발현 또는 활성과 관련된 질병, 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[0051] 다양한 구현예에서, 본 개시는 본원에서 고려되는 항체 또는 약학 조성물의 치료 유효량을 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 인터루킨-2(IL-2) 신호 전달의 조절이 대상의 면역 반응을 개선 시키는데 유익한 질병, 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법을 제공한다.

[0052] 또 다른 양태에서, 본 개시는 암, 미생물 감염, 천식 및 자가 면역 질환으로 이루어진 군에서 선택된 질병, 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[0053] 다양한 구현예에서, 암은 흑색종, 신장 세포 암종, 림프종, 육종, 유방암, 폐암, 방광암, 대장암, 위암, 비소세포성 폐암(NSCLC), 두경부암, 피부암 및 편평 상피암(SCC)으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0054] 다양한 구현예에서, 미생물 감염은 바이러스성, 세균성 또는 곰팡이 감염이다.

[0055] 다양한 구현예에서, 본원에서 고려되는 항체 또는 약학 조성물의 치료 유효량을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계는 대상의 종양 부피를 감소시킨다.

[0056] 다양한 구현예에서, 본원에서 고려되는 항체 또는 약학 조성물의 치료 유효량을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계는 대상의 CD8+ T 세포 대 CD4+ T 세포의 비를 증가시킨다. 다양한 구현예에서, 항체는 CD8+ 대 CD4+ T 세포의 비를 적어도 약 1배, 선택적으로 최대 100배까지 증가시킨다. 다른 구현예에서, 본원에 기재된 항체는 CD8+ 대 CD4+ T 세포의 비를 적어도 1~100배, 10~100배, 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 25배, 50배 또는 100배 증가시킬 수 있다.

[0057] 다양한 구현예에서, 본원에 개시된 항체는 정맥 내, 동맥 내, 복강 내, 종양 내, 근육 내, 피내 또는 피하로 투

여된다.

- [0058] 다양한 구현예에서, 본원에 개시된 항체는 제2 제제와 함께 투여된다. 관련된 구현예에서, 제2 제제는 IL-2, IL-2 변이체, 또는 IL-2 수준을 증가시킬 수 있는 제제, 체크포인트 억제제, CART/TIL 제제, 종양 항원에 대한 항체 또는 백신이다. 관련된 구현예에서, 체크포인트 억제제는 항-PD-1 항체, 항-PDL-1 항체, 항-CTLA-4 항체, PD-1 억제제, PDL-1 억제제, 또는 CTLA-4 억제제로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0059] 다양한 구현예에서, 항체가 IL-2와 함께 투여되는 경우, IL-2 또는 IL-2 변이체 및 IL-2 항체는 1:1 몰비로 투여된다. 다양한 구현예에서, IL-2 또는 IL-2 변이체와 함께 IL-2 항체를 투여하는 것은 IL-2의 치료 지수(TI)를 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배 이상으로 증가시킨다.
- [0060] 다양한 구현예에서, 항체는 IL-2 및 체크포인트 억제제, CART/TIL 제제, 종양 항원에 대한 항체 또는 백신과 같은 제2 제제와 함께 투여될 수 있다.
- [0061] 다양한 구현예에서, 비-IL-2 반응성 종양 유형에 대한 효험이 이제 성장 및/또는 전이 억제에 민감하게 되는, IL-2와 함께 IL-2 항체, 선택적으로 체크포인트 억제제 또는 기타 부속 종양학 요법과 함께 투여하는 단계를 포함하는 질병, 예컨대 암을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0062] 다양한 구현예에서, IL-2는 본원에 기재된 또 다른 제2 제제를 투여하기 전에, 투여 여부에 관계없이 항체와 복합체화될 수 있다.
- [0063] 다양한 구현예에서, 본원에 개시된 항체는 매주 1회, 2주마다 1회, 매달 2회, 매달 1회, 2개월마다 1회, 또는 3개월마다 1회 투여된다.
- [0064] 다양한 구현예에서, IL-2 및 IL-2 항체가 미리 혼합되는 경우, 제제는 매주 2회 함께 투여될 수 있다. 다양한 구현예에서, IL-2는 0.1 내지 10 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 다양한 구현예에서, IL-2 항체는 정맥 내 투여된다.
- [0065] IL-2 항체에 적절한 IL-2 투약을 첨가하는 경우, IL-2가 순차적으로, 예를 들어 동일한 날에 투여되고, 특정 구현예에서 IL-2 항체가 IL-2의 투여 전에 투여되는 것으로 계획된다. 다양한 구현예에서, IL-2 항체는 항체 투여 후에 IL-2의 매주 또는 주당 수회 투여로 매주 투여된다.
- [0066] 다양한 구현예에서, IL-2 항체는 주당 1회 투여되고, IL-2 요법(예컨대, 프로루킨(Proleukin))은 공지된 처방스케줄에 따라 투여되지만, IL-2보다 낮은 투여량으로 투여된다.
- [0067] 다양한 구현예에서, 본 개시는 증가 또는 감소된 IL-2, IL-2R 발현 또는 활성과 관련된 질환 또는 장애를 치료하는 데 본원에 개시된 항체 또는 약학 조성물을 포함하는 조성물을 투여하는 방법을 제공한다.
- [0068] 하나의 양태에서, 본 개시는 세포에서 IL-2 활성을 조절하는 데 유효한 양의 본원에 개시된 항체 또는 약학 조성물을 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 세포에서 IL-2 활성을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0069] 또한 IL-2 또는 IL-2R 발현 또는 활성과 관련된 본원에 기재된 임의의 장애의 치료를 위한 IL-2와 결합하는 본 개시의 상기 항체 또는 조성물 중 임의의 것을 포함하는 조성물, 또는 약의 제조에서의 그의 용도도 고려된다. 주사기, 예컨대 일회용 또는 미리 충진된 주사기, 멸균 밀폐 용기, 예컨대 바이알, 병, 용기 및/또는 선택적으로 사용을 위한 적합한 지침을 갖는 상기 항체 또는 조성물 중 임의의 것을 포함하는 키트 또는 패키지가 또한 고려된다.
- [0070] 본원에 기재된 각각의 특징 또는 구현예 또는 조합은 본 발명의 임의의 양태의 비한정적이고 예시적인 예이며, 본원에 기재된 임의의 다른 특징 또는 구현예 또는 조합과 결합될 수 있다는 것을 의미한다. 예를 들어, "하나의 구현예", "일부 구현예", "특정 구현예", "추가 구현예", "특정 예시적인 구현예" 및/또는 "다른 구현예"와 같은 언어로 특징이 기재되는 경우, 이들 유형의 구현예들 각각은 모든 가능한 조합을 나열할 필요 없이 본원에 기재된 임의의 다른 특징 또는 특징들의 조합과 결합되도록 의도된 특징의 비제한적인 예이다. 이러한 특징 또는 특징들의 조합은 본 발명의 임의의 양태에 적용된다. 범위 내에 속하는 값의 예가 개시된 경우, 이들 예 중 하나는 범위의 가능한 종료점으로 간주되며, 이러한 종료점 사이의 임의의 그리고 모든 숫자 값이 고려되며 종료점의 상한 및 하한의 모든 조합이 구상된다.
- [0071] 본원에서의 소제목은 독자의 편의를 위한 것이며 제한하려는 것은 아니다. 본 발명의 추가적인 양태, 구현예 및 변형은 상세한 설명 및/또는 도면 및/또는 청구 범위로부터 명백할 것이다.

## 도면의 간단한 설명

[0072]

**도 1a 및 도 1b**는 XPA.92.099의 서열에 대한 선택된 클론의 중쇄 및 경쇄의 다중 서열 정렬을 나타낸다.

**도 2a 내지 도 2d**는 가변적인 IL-2 농도의 존재하에 IL-2 R $\beta$  또는 IL-2 R $\beta$ γ를 발현하는 세포에 대한 XPA.92.019(도 2a), XPA.92.041(도 2b), XPA.92.042(도 2c), XPA.92.099(도 2d)의 결합의 측정값을 나타낸다.

**도 3a 내지 도 3c**는 고정 농도의 IL-2 (100nM)의 존재 및 부재하에 IL-2 R $\beta$  또는 IL-2 R $\beta$ γ를 발현하는 세포에 대한 XPA.92.019(도 3a), XPA.92.041(도 3b) 및 XPA.92.042(도 3c) 항체 적정 및 결합의 측정값을 나타낸다.

**도 4a 내지 도 4c**는 0.001~100 ng/mL 항-IL-2 항체 또는 대조군의 존재하에 IL-2에 대한 BaF3-IL-2 R $\beta$ γ(도 4a), NK-92(도 4b) 및 CTL-2(도 4c) 세포의 IL-2에 대한 증식 반응을 나타낸다.

**도 5a 내지 도 5c**는 NK92(도 5a), BaF3-IL-2 R $\beta$ γ(도 5b) 및 CTL-2 세포(도 5c)의 IL-2-유도 증식에 대한 EC50 변화로서 IL-2 항체의 효과를 나타낸다.

**도 6**은 상이한 종에 대한 IL-2 서열의 정렬 및 IL-2 단백질상의 IL-2 R 알파 사슬 결합 부위를 나타낸다.

**도 7a 내지 도 7c**는 항-IL-2 항체 복합체 또는 대조군의 존재하에 인간 NK-92(도 7a), 인간 1차 NK 세포(Rα 결핍)(도 7b) 또는 마우스 1차 NK 세포(도 7c)에서 STAT5의 IL-2 유도 인산화를 나타낸다.

**도 8a 내지 도 8g**는 비장에서의 T 세포 및 NK 세포 서브 세트의 빈도의 그래프를 나타낸다: CD8+의 백분율(도 8a); CD4+(도 8b); CD8+ CD44hi(도 8c); CD4+ CD44+ CD25hi(도 8d); CD8+ 대 CD4+ 세포의 비(도 8e); 생체 내 IL-2/항체 복합체 투여 후 NK 세포의 백분율(도 8f) 및 C57BL/6 마우스의 NK 세포(도 8g)에 의한 평균 그랜자임 B(GRZB) 생성.

**도 9a 내지 도 9f**는 비히를 대조군(도 9a), IL-2/항-IL-2 항체 복합체(도 9b), 항-PD-1 항체 단독(도 9c), IL-2/mAb, XPA.92.099 + 항-PD-1 항체(도 9d), 항-CTLA-4 항체 단독(도 9e) 및 IL-2/mAb, XPA.92.099 + 항-CTLA-4 항체(도 9f)로 처리한 피하 LLC 이종 이식 마우스 모델에서 개별 종양의 반응을 나타낸다. 각각의 그래프에서, 29일째의 선은 치료 마지막 날을 나타낸다.

**도 10a 내지 도 10b**는 IL-2/항-IL-2 항체 복합체(IL-2cx) 및 항-PD-1 항체 단일 및 병용 요법으로 처리된 피하 LLC 이종 이식 마우스의 평균 종양 크기(도 10a) 및 후기 생존율(도 10b)을 나타낸다. 오차 막대는 +/- 표준 오차(SEM)를 나타내며, n = 15 마우스/팔이다.

**도 11a 내지 도 11f**는 IL-2/항-IL-2 항체 복합체(XPA.92.019 또는 XPA.92.099 IL-2 항체를 사용하여) 단독 또는 항-PD-1 항체와 조합하여 처리된 피하 LLC 이종 이식 마우스 모델로부터 T 세포 서브 세트의 백분율(도 11a의 CD8+, 도 11b의 CD8+ 중 CD44+, 도 11c의 CD4+, 도 11d의 CD4+ 중 CD25+, 도 11e의 CD8+ 중 IFNγ+의 백분율; 도 11f의 CD8+/CD4+의 비율)의 그래프를 나타낸다.

**도 12a~e**는 IL-2 항체, XPA.92.019, XPA.92.041, XPA.92.042, 및 XPA.92.099에 대해 IMGT 시스템에 의해 지정된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 및 상보성 결정 영역(CDR)의 서열 및 상응하는 서열 식별(ID) 번호(NO)를 나타낸다.

**도 13a 내지 도 13c**는 24시간 동안 표시된 항체의 고정된 200 nM 농도로 미리 복합체화된 IL-2의 다양한 투여량으로 처리된 인간 PBMC의 분석을 나타낸다. 샘플을 NK 세포 마커 및 CD69 발현에 대해 염색하고, 림프구/CD3-/CD56bright에 게이팅된 유동 세포 분석법(flow cytometry)으로 분석하였다. CD69의 평균 형광 강도(MFI)를 공여자 603(도 13a) 및 공여자 625(도 13b)에 대한 IL-2 농도에 대해 도시하였다. IL-2 단독에 대한 항체 처리 곡선으로부터의 EC50 값의 배수 변화(fold-shift)를 결정하였다(도 13c).

**도 14a 내지 도 14c**는 24시간 동안 표시된 항체의 고정된 200 nM 농도로 미리 복합체화된 IL-2의 다양한 투여량으로 처리된 인간 PBMC를 나타낸다. 샘플을 T<sub>reg</sub> 마커 및 CD69 발현에 대해 염색하고 림프구/CD3+CD4+/CD25+CD127-에 게이팅된 유동 세포 분석법으로 분석하였다. CD69의 MFI는 공여자 603(도 14a) 및 공여자 625(도 14b)에 대한 IL-2 농도에 대해 도시하였다. IL-2 단독에 대한 항체 처리 곡선으로부터의 EC50 값의 배수 변화를 결정하였다(도 14c).

**도 15a 및 도 15b**는 24시간 동안 표시된 항체의 고정된 200 nM 농도로 미리 복합체화된 IL-2의 다양한 양으로 처리된 인간 PBMC에 대한 T<sub>reg</sub> 항상성을 나타낸다. 샘플을 T<sub>reg</sub> 마커에 대해 염색하고 림프구

/CD3+/CD4+/CD25+CD127-에 게이팅된 유동 세포 분석법으로 분석하였다. 공여자 603(도 15a) 및 공여자 625(도 15b)에 대한 총 CD4+ 집단의 T<sub>regs</sub>의 빈도가 표시된다.

도 16은 CT26 결장암 세포를 투여 받고 IL-2 단독으로 처리된 동물에서 종양 성장 결과를 분석한 결과를 도시한다.

도 17은 CT26 결장암 및 IL2:mAb IL2를 상이한 몰비로 투여 받은 동물에서의 종양 성장 결과를 나타내며, IL-2에 대한 항체의 비를 1:1로 투여 받은 동물은 IL-2/항체 조합 치료를 다른 비율로 투여 받은 동물에 비해 종양 성장에 대한 효능이 개선되었다.

도 18은 mAb:IL2 복합체의 1:1 또는 2:1 몰비로 처리된 동물에서 대장 세포주의 종양 성장이 보다 느린 것을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0073]

본 발명은 인터루킨-2(IL-2)에 대한 인간 항체와 관련된 물질, 방법 및 용도를 제공한다. 특히, 본 출원은 암의 치료에서의 상기 항체의 사용 방법을 제공한다.

[0074]

본 개시는 IL-2와 상호 작용하고 예를 들어 결합 파트너, IL-2 R $\alpha$ , IL-2 R $\alpha\beta\gamma$  및 IL-2 R $\beta\gamma$ 를 통한 신호 전달과 같은 IL-2 활성을 조절하는 분자 또는 제제를 제공한다. 본 개시는 암, 미생물 감염, 천식 및 자가 면역 질환을 치료하기 위한 치료제를 제공한다. 본원에 개시된 조성물은 유리하게는 종양에서 면역 세포 활성을 조절하는 능력을 가지므로, 하나의 양태에서 종양의 성장에 직접 또는 간접적으로 영향을 미치는 세포 집단에 영향을 줌으로써 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0075]

### 정의

[0076]

본원에 사용된 용어는 특정 구현예를 단지 설명하기 위한 것이며 제한하려는 것은 아니다.

[0077]

본원에 사용된 "CHO"는 중국 햄스터 난소 세포를 의미한다.

[0078]

본원에 사용된 "CHO-K1"은 성체 중국 햄스터의 난소에서 유래된 모 CHO 세포주의 서브클론(subclone)을 의미한다.

[0079]

본원에 사용된 "IL-2"는 인터루킨-2를 지칭한다.

[0080]

본원에 사용된 "IL-2 R"은 인터루킨-2 수용체를 지칭한다. IL-2 R은 세 개의 사슬 또는 서브유닛, IL-2 R $\alpha$  (CD25로도 알려짐), IL-2 R $\beta$  (CD122로도 알려짐) 및 공통 감마 사슬  $\gamma c$  (CD132로도 알려짐)로 구성된다. 용어 "IL-2R $\beta$  및  $\gamma c$ "는 용어 "IL-2R $\beta\gamma c$ "와 상호 교환적으로 사용되어  $\alpha$  서브유닛이 없고  $\beta$  및  $\gamma$  서브유닛을 포함하는 IL-2R을 지칭한다.

[0081]

본원에서 "T<sub>reg</sub>" 또는 "T<sub>regs</sub>"는 조절 T 세포를 의미한다.

[0082]

용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며 완전히 조립된 항체, 사량체 항체, 단일클론 항체, 다클론 항체, 다중 특이성 항체(예컨대, 이중 특이성 항체), 항원에 결합할 수 있는 항체 단편(예컨대, Fab', F'(ab)2, Fv, 단일 사슬 항체, 디아바디(diabody), Fcаб) 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 전술한 것을 포함하는 재조합 웨პ타이드를 포함한다. "면역글로불린" 또는 "사량체 항체"는 각각 가변 영역 및 불변 영역을 포함하는 두 개의 중쇄 및 두 개의 경쇄로 구성되는 사량체 당단백질이다. 항원-결합 부분은 재조합 DNA 기술에 의해 또는 손상되지 않은 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생성될 수 있다. 항체 단편 또는 항원-결합 부분은 특히 Fab, Fab', F(ab')2, Fv, 도메인 항체(dAb), 상보성 결정 영역(CDR) 단편, CDR 이식 항체, 단쇄 항체(scFv), 단쇄 항체 단편, 키메라 항체, 디아바디, 트리아바디(triabody), 테트라바디(tetraabody), 미니 바디(minibody), 선형 항체; 퀄레이트 재조합 항체, 트리바디(tribody) 또는 바이바디(bibody), 인트라바디(intrabody), 나노바디(nanobody), 소형 모듈용 면역 약제(small modular immunopharmaceutical, SMIP), 항원-결합 도메인 면역글로불린 융합 단백질, 카멜화 항체, VHH 함유 항체, 또는 그의 변이체 또는 유도체, 및 항체가 원하는 생물학적 활성을 보유하는 한, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 CDR 서열과 같은 폴리펩타이드에 특이적 항원 결합을 부여하기에 충분한 면역글로불린의 적어도 일부를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0083]

"면역글로불린" 또는 "천연 항체"는 사량체 당단백질이다. 자연적으로 발생하는 면역글로불린에서 각각의 사량체는 두 개의 동일한 폴리펩타이드 사슬 쌍으로 구성되며, 각각의 쌍은 하나의 "경쇄"(약 25 kDa)와 하나의 "중쇄"(약 50~70 kDa)를 갖는다. 각 사슬의 아미노 말단 부분은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100 내지 110개 또

는 그 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 각 사슬의 카복시-말단 부분은 주로 효과기 기능을 담당하는 불변 영역을 한정한다. 인간 경쇄는 카파( $\kappa$ ) 및 람다( $\lambda$ ) 경쇄로 분류된다. 중쇄는 뮤( $\mu$ ), 엘타( $\Delta$ ), 감마( $\gamma$ ), 알파( $\alpha$ ) 및 엡실론( $\epsilon$ )으로 분류되며 각각 항체의 아이소타입을 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 정의한다. 경쇄 및 중쇄 내에서, 가변 및 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산의 "J"영역에 의해 결합되고, 중쇄는 또한 약 10개 이상의 아미노산의 "D"영역을 포함한다. 일반적으로 문헌 [Fundamental Immunology, Ch. 7, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)]을 참조한다(모든 목적을 위해 그 전체가 참조로서 포함됨). 각각의 경쇄/중쇄 쌍의 가변 영역은 항체 결합 부위를 형성하여 손상되지 않은 면역글로불린은 2개의 결합 부위를 갖는다.

[0084] 본원에서 사용된 "중쇄 가변 영역"은 상기 항체 중쇄 가변 도메인의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항체 분자의 영역을 의미한다. 중쇄 가변 영역은 상기 항체 중쇄의 하나, 둘 또는 세 개의 CDR을 포함할 수 있다.

[0085] 본원에서 사용된 "경쇄 가변 영역"은 상기 항체 경쇄 가변 도메인의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항체 분자의 영역을 의미한다. 경쇄 가변 영역은 항체에 따라 카파 또는 람다 경쇄 중 하나일 수 있는 상기 항체 경쇄의 하나, 둘 또는 세 개의 CDR을 포함할 수 있다.

[0086] "단일클론 항체"는 실질적으로 균질한 항체의 집단에서 수득된 항체를 의미한다. 즉, 집단을 구성하는 개개의 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고 동일하다.

[0087] 본원에서 사용된 "항체 변이체"는 기준 항체 가변 영역 도메인의 가변 영역에서 적어도 하나의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 포함하는 항체 폴리펩타이드 서열을 의미한다. 변이체는 비변형 항체와 실질적으로 동종이거나 실질적으로 동일할 수 있다.

[0088] 본원에서 사용된 "키메라 항체"는 전형적으로 상이한 종에서 유래된 두 개의 상이한 항체(예컨대, 미국 특허 제4,816,567호 참조)에서 유도된 서열을 함유하는 항체를 의미한다. 가장 전형적으로, 키메라 항체는 인간 및 설치류 항체 단편, 일반적으로 인간 불변 및 마우스 가변 영역을 포함한다.

[0089] "중화 항체"는 그것이 결합하는 표적항원의 생물학적 기능을 제거하거나 현저하게 감소시킬 수 있는 항체 분자이다. 따라서, "중화" 항-표적 항체는 효소 활성, 리간드 결합 또는 세포 내 신호 전달과 같은 생물학적 기능을 제거하거나 현저하게 감소시킬 수 있다.

[0090] "단리된" 항체는 확인되고 분리되어 자연 환경의 구성 요소로부터 회수된 항체이다. 자연 환경의 오염 성분은 항체의 진단적 또는 치료적 용도를 방해하는 물질이며, 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 다양한 구현예에서, 항체는 (1) 로리(Lowry) 방법에 의해 측정된 항체의 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과로 (2) 스피닝 컵 서열분석기(spinning cup sequenator)를 사용하여 N-말단 뜯느 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 수준까지, 또는 (3) 쿠마시 블루(Coomassie blue) 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의해 균질화될 때까지 정제될 것이다. 단리된 항체는 항체 자연 환경의 적어도 한 성분도 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 내에서 제자리에 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 적어도 하나의 정제단계에 의해 제조될 것이다.

[0091] 본원에서 사용된 바와 같이, "특이적으로 결합하는", "표적 특이적", 표적에 "특이적"이거나 또는 표적 항원과 "면역 반응성"인 항체는 유사한 항체보다 더 큰 친화성으로 표적 항원에 결합하는 항체 또는 항체 물질을 의미한다. 본 개시의 하나의 양태에서, 표적 결합 폴리펩타이드, 또는 이의 단편, 변이체 또는 유도체는 다른(즉, 비인간) 종의 표적에 대한 그의 결합 친화도와 비교하여, 인간 표적에 더 큰 친화도로 결합하지만, 표적의 보체를 인식하고 결합하는 결합 폴리펩타이드는 제공된 범위 내에 있다.

[0092] 예를 들어, 그의 동족 항원에 대해 "특이적인" 항체 또는 그의 단편인 폴리펩타이드는 항체의 가변 영역이 검출 가능한 선호도로 목적 폴리펩타이드를 인식하고 결합하는 것을 나타낸다(즉, 계열 구성원간의 국부적인 서열 동일성, 동질성 또는 유사성의 존재 가능성에도 불구하고, 결합 친화도의 측정 가능한 차이로 인하여 목적 폴리펩타이드를 동일한 계열의 다른 폴리펩타이드와 구별할 수 있음). 특정 항체는 또한 항체의 가변 영역 외부, 및 특히 분자의 불변 영역에서의 서열과의 상호 작용을 통해 다른 단백질(예를 들어, *S. aureus* 단백질 A 또는 ELISA 기술에서의 다른 항체)과 상호 작용할 수 있다. 본 개시의 방법에서 사용하기 위한 항체의 결합 특이성을 결정하기 위한 스크리닝 검정은 당업계에 잘 알려져 있고 일상적으로 실시되고 있다. 이러한 검정에 대한 포괄적인 논의는 문헌 [Harlow et al., (Eds), Antibodies A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Chapter 6]을 참조한다. 상기 방법에서 사용하기 위한 항체는 당업계에 공지

된 임의의 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0093] 용어 "에피토프"는 하나 이상의 항원 결합 영역에서 항체와 같은 선택적인 결합체에 의해 인식되고 결합될 수 있는 임의의 분자의 부분을 의미한다. 에피토프는 대개 아미노산 또는 탄수화물 측쇄와 같은 분자의 화학적 활성 표면기로 구성되며 특이적인 전하 특성뿐만 아니라 특이적 3차원 구조 특성을 갖는다. 본원에서 사용된 에피토프는 인접하거나 인접하지 않을 수 있다. 더욱이, 에피토프는 항체를 생성시키는 데 사용된 에피토프와 동일한 3차원 구조를 포함하지만, 항체 면역 반응을 자극하는 데 사용된 표적에서 발견되는 아미노산 잔기 중 어느 것도 포함하지 않거나 단지 일부만을 포함하는 점에서 모방성(미모토프(mimotope))일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 미모토프는 선택적 결합체에 의해 결합된 에피토프와 상이한 항원으로 간주되지 않으며, 선택적 결합체는 에피토프와 미모토프의 동일한 3차원 구조를 인식한다.

[0094] 본 개시의 항체 물질 및 폴리펩타이드와 관련하여 사용될 때 "유도체"라는 용어는 유비퀴틴화, 치료제 또는 진단 체제에 접합, (예컨대, 방사성 핵종 또는 다양한 효소로) 표지, 폐길화(PEGylation)(폴리에틸렌 글리콜과의 유도체화)와 같은 공유 결합 중합체 부착 및 오르니틴(ornithine)과 같은 아미노산의 화학적 합성에 의한 삽입 또는 치환(인간 단백질에서는 일반적으로 발생하지 않음) 등의 기술에 의해 화학적으로 변형된 폴리펩타이드를 의미한다. 유도체는 본 개시의 유도체화되지 않은 분자의 결합 특성을 보유한다.

[0095] 용어 "치료 유효량"은 치료하고자 하는 질병의 증상 또는 징후를 경감시키거나 완화시키는 데 효과적인 본 개시의 표적 특이적 조성물의 양을 나타내기 위해 본원에서 사용된다.

[0096] 본원에서 방법과 관련하여 사용되는 용어 "치료한다", "치료된", "치료하는" 및 "치료"는 일시적으로 또는 영구적으로, 부분적으로 또는 완전히, 병, 질병 또는 질환의 임상적인 증상, 징후 또는 진행을 제거, 감소, 억제 또는 개선하는 것을 의미한다. 그러한 치료는 절대적으로 유용할 필요는 없다.

[0097] 본 발명의 방법은 본원에 기재된 예시적인 서열, 그의 단편, 변이체 및 유도체, 본원에 인용된 표적 특이적 항체를 포함하는 약학 제제를 포함할 수 있는 표적 특이적 항체의 용도를 제공한다. 이들의 종류의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 하위부류 또는 아이소타입, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가로 나뉘질 수 있는 상이한 부류들, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 할당될 수 있다. 상이한 부류의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 배치는 잘 알려져 있다. 상이한 아이소타입은 상이한 효과기 기능을 갖는다. 예를 들어, IgG1 및 IgG3 아이소타입은 ADCC 활성을 갖는다. 본원에 개시된 항체는, 그것이 불변 도메인을 포함하는 경우, 임의의 이들 하위부류 또는 아이소타입일 수 있다.

[0098] 본 개시는 도 12a~e에 기재된 예시적인 서열, 그의 단편, 변이체 및 유도체, 상기에 인용된 표적 특이적 항체를 포함하는 약학적 제제를 포함할 수 있는 표적-특이적 항체, 상기 약학적 제제의 제조 방법 및 상기 약학적 제제 및 화합물로 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법에 사용되고 본원에 기재된 항체는 하나 이상의 IL-2 항원에 약  $2 \times 10^{-9}$  M 이하, 또는 약  $1 \times 10^{-10}$  M, 또는 수도 약  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M,  $10^{-12}$  M 또는  $10^{-13}$  M 이하, 또는  $10^{-10}$  내지  $10^{-13}$  M의  $K_D$ 의 결합 친화도를 나타낼 수 있다. 이러한 친화도는 평형 투석과 같은 통상적인 기술을 사용하거나; 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 기술(예컨대, BIACore 2000 기기, 제조업체가 제시한 일반적인 절차 사용)을 사용하거나;  $^{125}\text{I}$  표지된 표적 항원을 사용하는 방사면역측정법에 의해; 또는 하기의 실시예에 기재된 또는 당업자에게 공지된 다른 방법에 의해 판정될 수 있다. 친화도 데이터는 예를 들어 문헌 [Scatchard *et al.*, Ann NY Acad. Sci., 51:660, 1949]의 방법에 의해 분석될 수 있다.

[0099] KinExA 동역학 배제 분석은 또한 항원에 대한 항체의 친화도를 측정하는 데 유용하다. KinExA 기술은 용액상과 고체상 사이의 결합 사건보다 용액상에서의 결합 사건을 측정한다. 또한, 결합 사건을 측정하는 많은 방법은 적어도 하나의 반응물을 고정화 또는 표지를 통해 변형해야 하지만, KinExA 방법은 연구 중인 분자를 변형할 필요가 없다. KinExA 방법은 현재 이용 가능한 다른 방법보다 넓은 범위의 결합 상수를 측정하게 할 수 있다고 여겨진다. 항체 특성화를 위한 KinExA 장치 및 작동에 대한 추가적인 설명은 제조사(Sapidyne Instruments, Inc., Boise, ID)로부터 이용 가능하며, 공개된 문헌, 예를 들어 미국 특허 번호 제6,664,114호 및 문헌 [Darling *et al.*, "Kinetic Exclusion Assay Technology: Characterization of Molecular Interactions" Assay and Drug Development Technologies, 2:647-657 (2004)]에서 찾을 수 있다.

## [0100] 인터루킨 2(IL-2)

[0101] 인터루킨-2 (IL-2)는 사이토카인의 4- $\alpha$  헬릭스 번들 계열의 구성원인 15 kDa 펩타이드이다 (문헌 [Wang *et al.*, Annual review of immunology 27, 29-60 (2009)]). T 세포 성장 인자로서 1976년에 처음 발견되었지만 T

세포 성장 인자(TCGF), 림프구 조절배지(LCM) 인자, T 세포 분열 인자(TMIF), 살해 보조 인자(KHF), T 세포 대체 인자(TRF)의 여러 가지 이름으로 기술된다(문헌 [Lotze MT, Interleukin-2, In Human Cytokines: Handbook for basic and clinical research, pp 81-96(1992); Smith et al., Cytokine Reference, pp 113-125 (2001)]). IL-2는 활성화된 CD4+ T 세포에 의해 1차적으로 생성되고, 활성화된 CD8+ T 세포에 의해 2차적으로 생성되며, 활성화된 수지상 세포(DC), 자연 살해 세포(NK) 및 자연 살해 T(NKT) 세포에 의해 적은 정도로 생성된다. IL-2는 TCR 및 미접촉 T 세포상의 CD28과 같은 공동자극 분자를 결합시 신속하고 일시적으로 생성된다. IL-2 분비의 일시적인 특성은 TCR 신호에 의한 전사 유도 및 공동자극 신호에 의한 IL-2 mRNA의 안정화, 이어서 IL-2 유전자의 전사 침묵화 및 IL-2 mRNA의 급속 분해에 의존한다. IL-2가 자체 생성을 억제하는 고전적 자동 조절 피드백 루프가 최근에 기술되었다(문헌 [Malek TR, Annual review of immunology 26, 453-479 (2008)]).

[0102] 처음에는 주로 면역 자극 인자로 간주되어 이후의 연구에서도 면역 내성에 대한 역할이 밝혀졌다(문헌 [Malek TR, Annual review of immunology 26, 453-479 (2008)]). 현재 IL-2는 면역 활성화, 특이적 기억과 면역 내성의 유지에 기여하는 복잡한 역할을 하고 있다(문헌 [Waldmann T, Arthritis research 4 (3) S161-167 (2002); Bachmann 및 Oxenius, EMBO reports 8, 1142-1148 (2007)]). IL-2 자극의 특정 효과는 예를 들어 보조 T 세포의 존재, CD28 신호 전달을 통한 공동-자극 및 조절 T 세포에 의한 억제와 같은 인자를 비롯한 생물학적 상황에 따라 달라진다. 이 생물학적 상황의 일부는 급성 항원 자극이나 만성 감염과 같은 상이한 조건하에서 상이한 세포 유형에서 3개의 IL-2 수용체 사슬의 차별적인 발현을 통해 매개된다. 또한, IL-2 및 그 수용체는 양성 및 음성 피드백 메카니즘 모두에 의해 조절된다(문헌 [Boyman 및 Sprent, Nat Rev Immunol 12, 180-190 (2012)]).

### [0103] IL-2 뮤테인

[0104] IL-2 변이체(뮤테인)는 야생형 IL-2에 비해 개선된 치료 효과를 가질 수 있다. (IL-2의 N88R 돌연변이를 포함하는) BAY 50-4798 및 (IL-2의 D20T 돌연변이를 포함하는) Selectikine과 같은 IL-2 R $\beta$ 에 대한 결합 친화도가 감소된 IL-2 뮤테인이 생성되었다(문헌 [Shanafelt et al, Nat. Biotechnol. 19: 1197-1202 (2000); Laurent et al, J. Transl. Med. 11, 5 (2013)]). 그러나, 임상 시험에서 시험했을 때, 이들 IL-2 뮤테인은 환자에서 감소된 독성을 나타내지 않았다. IL-2 R $\alpha$ 에 대한 친화도가 감소된 IL-2 뮤테인, 예를 들어 ' $\alpha$  뮤테인이 없는' GA501 및 GA504가 생성되었다(문헌 [Carmenate et al, J. Immunol. 190: 6230-38 (2013); Klein et al, Cancer Res. 73, 486 (2013)]). 작용성 IL-2 뮤테인 H9와 D10(IL-2 superkines으로도 알려짐)은 IL-2 R $\beta$ 와 200배 증가된 친화도로 결합하고 IL-2 R $\alpha$ 를 필요로하지 않고 이량체 IL-2R에 효율적으로 결합하였으며, 이러한 결합은 시험관 내 및 생체 내에서 증가된 STAT5 인산화 및 세포 증식을 일으켰다(문헌 [Levin et al, Nature 484: 529-33 (2012)]). H9 돌연변이인 H9-RETR은 H9(L18R, Q22E, Q126T 및 S130R)에 네 개의 돌연변이를 도입함으로써 조작되었으며 IL-2 R $\beta$  결합을 유지하지만  $\gamma$ c에 대한 현저히 감소된 친화도를 보였다(문헌 [Mitra et al, Immunity 42: 815-25]). IL-2 뮤테인은 또한 WO2014/100014호, WO2015164815호, WO205/118016호, WO2016/030350호, US 8,759,486호 및 US 9,266,938호에 기재되어 있다.

### [0105] 인터루킨 2 수용체(IL-2 R)

[0106] IL-2에 대한 수용체는 IL-2 R $\alpha$ (CD25로도 알려짐), IL-2 R $\beta$ (CD122로도 알려짐) 및 공통 감마 사슬  $\gamma$ c(CD132로도 알려짐)의 세 개의 사슬로 구성된다. 세 개의 수용체 사슬은 다양한 세포 유형에 따라 별개로 다르게 표현된다. IL-2는 Jak/Stat, PI3K-AKT 및 MAPK 경로와 같은 세포 경로를 활성화시키는 IL-2 R $\beta$ 와  $\gamma$ c 사이의 상호 작용을 통해 신호 전달한다. IL-2에 대한 보다 높은 민감도는 IL-2와 독립적으로 결합하고 다른 두 사슬과의 결합을 촉진하여 고친화성 삼량체 수용체 복합체를 형성할 수 있는 IL-2 R $\alpha$ 와의 상호 작용을 통해 부여된다(문헌 [Malek TR, Annual review of immunology 26, 453-479 (2008)]). Tac항원으로도 불리는 IL-2 R $\alpha$ 는 IL-2에 특이적인 반면, IL-2 R $\beta$ 는 IL-2 및 IL-15 모두에 의해 이용되며 때로는 공통  $\beta$  사슬이라고도 불린다. 공통  $\gamma$  사슬로도 알려진 IL-2 R $\gamma$ 는 IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 및 IL-21을 포함한 여러 가지 사이토카인에 의해 공유된다(문헌 [Malek TR, Annual review of immunology 26, 453-479 (2008); Smith KA, Cytokine Reference, pp 1459-1469 (2001); Boyman 및 Sprent Nat Rev Immunol 12, 180-190 (2012)]).

### [0107] 치료제로서의 IL-2

[0108] 1992년 전이성 신세포 암종(RCC) 및 1998년 전이성 흑색종(MM)의 치료를 위해 미국 FDA에서 IL-2(알데스루킨(aldesleukin))의 재조합 변형 버전을 승인했다. 이는 일부 환자에서 생존율을 향상시키는 데 효과적이며, 적은 비율의 환자에서 내구성이 있고 완전하면서 분명한 치료 효과가 있는 퇴행을 일으키는 것으로 나타났다(문헌 [Dutcher et al., Journal for Immunotherapy of Cancer 2(26) (2014); Rosenberg SA, J Immunol 192, 5451-5458 (2014)]). 동시에 대부분의 환자는 혈관 누출 증후군(VLS), 폐부종, 저혈압, 신장 손상, CNS 손상 및 심장

영향을 비롯한 심각한 부작용을 경험한다. 대부분의 부작용은 되돌릴 수 있지만, 치료 관리의 필요성에는 전문적인 면역 요법 센터에 입원이 필요하다. 이는 치료에 대한 수용에 대한 엄격한 자격 요건과 함께 알데스루킨의 사용을 제한한다(문헌 [Dutcher et al., *Journal of Immunotherapy of Cancer* 2 (26) (2014)]). 알데스루킨 치료의 또 다른 단점은 빠른 신장 청정이 투여된 IL-2의 반감기를 짧게 하여 수 주 동안 5일에 걸쳐 다수의 정맥 투여가 필요하다는 것이다.

[0109] 최근 IL-2의 역할과 그 근본적인 메커니즘 및 상호 작용에 대한 이해의 진보는 IL-2 활성의 외견상 역설적인 효과를 설명하는 데 도움이 되었다. 예를 들어 조절 T 세포는 높은 수준의 IL-2 R $\alpha$ (CD25)를 발현하여 낮은 수준의 IL-2에 민감하게 만든다. 따라서 저농도 IL-2의 처리가 활성화 전에 IL-2 R $\alpha$ 를 거의 발현하지 않는 효과기 T 세포보다는 억제 경로를 자극하는 경향이 더 있다. 면역 억제를 제공하는 것 외에도, 조절 T 세포는 또한 IL-2에 대한 싱크(sink)를 제공하여, 효과기 T 세포가 활성화될 가능성을 더욱 감소시킬 수 있다. 동시에, 이를 효과는 응답 속도 감소에 기여할 수 있으며, 항-종양 반응을 달성하기 위해 고용량의 IL-2 처리에 대한 요구에 대해 설명할 수 있다(문헌 [Boyman 및 Sprent, *Nature review. Immunology* 12, 180-190 (2012)]). 마지막으로, 연구자들은 폐 내피 세포에서 IL-2 수용체의 발현을 보고했는데, 이는 이들 세포 유형에 IL-2의 직접적인 영향을 미칠 수 있다. 치료 효과에 필요한 고용량의 IL-2가 내피 세포에서 IL-2 수용체의 낮은 수준을 활성화시켜 VLS, 폐부종 및 저혈압을 유발하는 손상에 기여할 수 있다고 제안되었다(문헌 [Boyman 및 Sprent, *Nature review: Immunology* 12, 180-190 (2012); Rafi-Janajreh et al., *J Immunol* 163, 1619-1627 (1999); Krieg et al., *PNAS* 107, 11906-11911 (2010); Downie et al., *American journal of respiratory cell and molecular biology* 7, 58-65 (1992)]).

[0110] 종양학에서 IL-2에 근거한 면역 요법의 잠재적인 개선을 위해 여러 가지 접근법이 제안되고 시험되었는데, 1) IL-2 R $\beta$ γ와의 상호 작용을 감소시키거나(문헌 [Shanafelt et al., *Nature biotechnology* 18, 1197-1202 (2000)]) 증가시키거나(문헌 [Levin et al., *Nature* 484, 529-533 (2012)]) 또는 IL-2 R $\alpha$ 와의 상호 작용을 감소시키기 위해(문헌 [Charych et al., *Clin Cancer Res* 22, 680-690 (2016)], 미국 특허 번호 제9,266,938호) IL-2를 조작; 2) IL-2 융합 또는 접합에 의한 반감기 증가(WO 2012/065086호; WO 2013/177187호; WO 2015/118016호); 3) 항-수용체 항체를 이용한 IL-2 처리 강화(WO 2008/003473호); 4) 암항원을 표적으로 하는 항체에 IL-2를 접합시키는 것(WO 2016/030350호; 문헌 [Sujimoto et al., *Anticancer Res.* 34(1), 89-97 (2014)]); 5) IL-2를 IL-2 R $\alpha$ 와 융합시킴(WO 2016/022671호); 및 6) IL-2 활성을 조절하는 항-IL-2 항체의 사용(문헌 [Boyman et al., *Science* 311, 1924-1927 (2006); Létourneau et al., *PNAS* 107, 2171-2176 (2010); Spangler et al., *Immunity* 42, 815-825 (2015); Tomala 및 Kovar, *Oncobiology* 5 (2016)]) (미국 특허 공개 번호 제20100310501호 및 제20130142755호; WO 2007/095643호; WO 2014/108748호; WO 2015/109212호; WO 2016005950호). IL-2 수용체와의 IL-2 상호 작용을 조절하는 항-IL-2 항체에 대한 여러 보고서가 공개되었지만, 이들은 이 유망한 접근법의 개념의 증거를 나타내기 위해 마우스 항-인간 IL-2 또는 항-쥐 IL-2에 대해 기술하였다(문헌 [Krieg et al., *PNAS* 107, 11906-11911 (2010), Boyman et al., *Science* 311, 1924-1927 (2006), Létourneau et al., *PNAS* 107, 2171-2176 (2010)])(미국 특허 공개 번호 제20130142755호). 이상적으로 치료용 항체는 인간 기원인 반면, 쥐 또는 다른 종으로부터 인간화된 항체가 또한 수용 가능할 수 있다. 대리 항체의 사용은 궁극적인 치료 후보 물질의 활성을 완전히 재현하지 않을 수 있는 결합 특성의 미묘한 차이의 위험을 초래한다. 다수의 연구에서 이를 항체의 에피토프 차이의 기능적 결과를 강조했다(문헌 [Su et al., *Science translational medicine* 7, 311 (2015); Rojas et al., *Immunobiology* 218, 105-113 (2013); Garcia-Martinez et al., *International immunology* 24, 427-446 (2012)]).

## 항체

[0112] 위에서 언급했듯이 "면역글로불린" 또는 "천연 항체"는 사량체 당단백질이다. 자연적으로 발생하는 면역글로불린에서 각각의 사량체는 두 개의 동일한 폴리펩타이드 사슬 쌍으로 구성되며, 각각의 쌍은 하나의 "경쇄"(약 25 kDa)와 하나의 "중쇄"(약 50~70 kDa)를 갖는다. 각각의 중쇄는 한 쪽 말단에 가변 도메인(VH)과 그 뒤에 다수의 불변 도메인을 갖는다. 각각의 경쇄는 한 쪽 말단에 가변 도메인(VL)을, 다른 쪽 말단에 불변 도메인을 가지며, 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성한다고 여겨진다(문헌 [Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987]).

[0113] 면역글로불린 가변 도메인은 세 개의 초가변 영역 또는 CDR에 의해 결합된 상태적으로 보존된 골격 영역(FR)의 동일한 일반 구조를 나타낸다. N 말단에서 C 말단까지 경쇄 및 중쇄는 모두 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3,

CDR3 및 FR4를 포함한다. 각각의 도메인에 아미노산을 배치하는 것은 문헌 [Kabat Sequences of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 및 1991)], 또는 문헌 [Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987; Chothia et al., *Nature* 342:878-883, 1989]의 정의를 따른다.

[0114] 항체의 초가변 영역은 항원-결합을 담당하는 항체의 CDR 아미노산 잔기를 의미한다. 초가변 영역은 CDR에서의 아미노산 잔기(예컨대, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]에 기재된 바와 같은 경쇄 가변 도메인의 잔기 24~34(L1), 50~56(L2) 및 89~97(L3) 및 중쇄 가변 도메인의 31~35(H1), 50~65(H2) 및 95~102(H3)) 및/또는 고가변 루프에서의 이들 잔기(예컨대, 문헌 [Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)]에 기재된 바와 같은 경쇄 가변 도메인의 잔기 26~32(L1), 50~52(L2) 및 91~96(L3) 및 중쇄 가변 도메인의 26~32(H1), 53~55(H2) 및 96~101(H3))를 포함한다. CDR은 또한 IMGT(ImMunoGenTics) 번호 매김(경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 CDR 위치를 CDR1, 약 27 내지 38 잔기; CDR2, 대략 56 내지 65 잔기; CDR3, 대략 105 내지 116 잔기(생식 계열) 또는 105 내지 117 잔기(재배치)로 기술하는 문헌[Lefranc, M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003)])에 따라 식별되고 번호가 부여되었다. 하나의 구현예에서, CDR은 본원에 개시된 대략 유사한 길이의 항체의 중쇄 또는 경쇄 중 경쇄 가변 도메인에서 대략 잔기 26~31(L1), 49~51(L2) 및 88~98(L3)에 위치하고, 중쇄 가변 도메인에서 대략 잔기 26~33(H1), 51~58(H2) 및 97~110(H3)에 위치하는 것으로 여겨진다. 그러나, 당업자는 CDR 잔기의 실제 위치가 특정 항체의 서열이 식별될 때 전술한 돌출된 잔기와 다를 수 있음을 이해하고 있다.

[0115] 골격 또는 FR 잔기는 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0116] 단일클론 항체는 혼합물 내의 모든 항체가 단일 클론에서 유래된 단일 아미노산 서열을 갖는 실질적으로 균질한 항체의 집단에서 수득된 항체를 의미한다. 단일클론 항체는 일반적으로 매우 특이적이며, 단일 항원 부위 또는 에피토프에 대해 유도된다. 대조적으로, 다클론 항체 제제는 전형적으로 동일 또는 상이한 결정기(에피토프)에 대해 유도된, 다양한 아미노산 서열을 갖는 항체의 혼합물을 포함한다. 그들의 특이성 외에도, 단일클론 항체는 상이한 특이성 및 특성을 갖는 기타 면역글로불린에 의해 오염되지 않은 균질 배양에서 합성된다는 점에서 유리하다.

[0117] 하기와 기재된 바와 같이, 본원에 기재되고 본원에서 고려되는 단일클론, 인간, 인간화 및 기타 항체를 포함하는 항체는 전형적으로 재조합적으로 또는 시험관 내 또는 생체 내에서 유전 암호를 조작하는 기타 방법을 통해 생성되므로 반드시 자연에서 발견되는 특정 항체를 반영할 필요는 없다.

[0118] 단일클론 항체는 문헌 [Kohler et al. *Nature*, 256:495-7, 1975]이 처음에 기술한 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나(문헌 [Harlow & Lane; Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1988); Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]) 또는 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다(예컨대, 미국 특허 번호 제 4,816,567호 참조). 단일클론 항체는 또한 예를 들어, 문헌 [Clackson et al. *Nature* 352:624-628, 1991 및 Marks et al. *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991]에 기술된 기술을 사용하여 과거 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 단일클론 항체를 생산하기 위한 추가 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0119] 상기 방법에 의해 생성된 것들과 같은 단일클론 항체는 통상적인 면역글로불린 정제과정, 예를 들어 단백질 A-세파로스, 소수성 상호 작용 크로마토그래피(HIC), 이온 교환 크로마토그래피, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기 영동, 투석 및/또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수액(ascites fluid), 또는 혈청에서 적합하게 분리된다.

## IL-2 항체

[0121] 본 개시는 표적 특이적 항체를 인코딩하는 아미노산 분자의 용도를 포함한다. 완전 인간 항-인간 IL-2 항체를 과거 디스플레이 라이브러리로부터 생성하였다. 본원에 기재된 IL-2 항체는 상이한 IL-2 수용체 사슬과의 인간 IL-2의 상호 작용을 차등적으로 조절한다. 구체적으로는, IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c 결합 및 신호 전달을 허용하게 두면서 IL-2와 IL-2 R $\alpha$ 의 상호 작용을 예방 또는 감소시킬 수 있는 항체를 확인하는 것이 목표였다. 이를 달성하기 위해, 차별적인 IL-2 조절 특성을 보유할 것으로 예상되는 항-리간드 항체를 동정하기 위해 인간 IL-2 수용체 사슬의 상이한 조합을 발현하도록 조작된 세포를 사용하여 신규 스크리닝 접근법을 고안하였다. 유동 세포 분석 법에 기초한 스크린을 사용하여, 항체를 IL-2 제한에 대한 영향 또는 조작된 세포주에 결합하는 것에 대한 허용성에 기초하여 계층화하였다. 목적 항체는 또한 IL-2와 복합체화되고 세 개의 수용체 사슬 모두를 발현하거나

IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c만 발현하는 IL-2 의존성 세포주를 사용하여 기능 분석에서 시험하였다. 생체 내 시험은 이들 세포주에서 상이한 활성 패턴을 가진 항체가 마우스의 T 세포 서브 세트에 대한 차별적 효과를 매개한다는 것을 입증했다. 놀랍게도, 생체 내에서 CD4+ T 세포보다 CD8+를 우선적으로 자극하는 가장 강력한 차이를 일으키는 항체는 수용체 결합 허용성의 하이브리드 패턴을 가지고 있었으며, 예를 들어 IL-2 R $\alpha$  결합을 완전히 차단하지 않는 항체는 IL-2 R $\alpha$  결합을 완전히 차단한 항체보다 생체 내 처리 후 T 세포의 CD8+/CD4+ 비율을 보다 크게 했다. 또한 예기치 않게 CD8+/CD4+ T 세포에서 가장 큰 변화를 주었던 항체가 IL-2 R $\beta$  세포에서 신호 전달을 억제하는 정도가 작은 것으로 밝혀졌다. 종양학 모델에서 이를 항체와 hIL-2의 복합체를 단독으로 및 다른 면역 조절 항체와 함께 시험하여 면역 요법제로서의 잠재력을 추가로 입증했다.

[0122] 일부 구현예에서, 인간 항-표적 항체의 아미노산 서열은 본원에 기재된 인간화 항체 또는 임의의 기타 변이체를 포함하여, 도 12a~e 또는 서열번호 9, 11, 13, 또는 15에 기재된 항체 XPA.92.019, XPA.92.041, XPA.92.042 또는 XPA.92.099, 또는 그의 변이체의 성숙한(즉, 신호 전달 서열을 결실시키는) 경쇄 가변 영역(VL)의 아미노산 서열의 하나 이상의 CDR을 포함한다. 일부 구현예에서, VL은 상기 항체 중 어느 하나의 경쇄의 CDR1의 처음부터 CDR3의 말단까지의 아미노산 서열을 포함한다.

[0123] 하나의 구현예에서, 표적 특이적 항체는 서열 번호 9, 11, 13 또는 15에 기재된 VL 영역의 아미노산 서열, 서열 번호 9, 11, 13 또는 15에 기재된 VL 영역을 인코딩하는 핵산, 또는 서열 번호 10, 12, 14 또는 16에 기재된 VL 영역을 인코딩하는 핵산 분자에 의해 인코딩된 것을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역으로부터 각각 독립적으로 선택된 CDR1, CDR2 또는 CDR3(LCDR1, LCDR2, LCDR3)을 포함한다.

[0124] 일부 구현예에서, 인간 항-표적 항체의 아미노산 서열은 본원에 기재된 인간화 항체 또는 임의의 기타 변이체를 포함하여, 도 12a~e 또는 서열번호 1, 3, 5, 또는 7에 기재된 항체 XPA.92.019, XPA.92.041, XPA.92.042 또는 XPA.92.099, 또는 그의 변이체의 성숙한(즉, 신호 전달 서열을 결실시키는) 중쇄 가변 영역(VH)의 아미노산 서열의 하나 이상의 CDR을 포함한다. 일부 구현예에서, VH는 상기 항체 중 어느 하나의 중쇄의 CDR1의 처음부터 CDR3의 말단까지의 아미노산 서열을 포함한다.

[0125] 하나의 구현예에서, 표적 특이적 항체는 서열 번호 1, 3, 5 또는 7에 기재된 VH 영역의 아미노산 서열, 서열 번호 1, 3, 5 또는 7에 기재된 VH 영역을 인코딩하는 핵산, 또는 서열 번호 2, 4, 6 또는 8에 기재된 VL 영역을 인코딩하는 핵산 분자에 의해 인코딩된 것을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역으로부터 각각 독립적으로 선택된 CDR1, CDR2 또는 CDR3(HCDR1, HCDR2, HCDR3)을 포함한다.

[0126] 표적 특이적 항체의 폴리펩타이드는 XPA.92.019, XPA.92.041, XPA.92.042 또는 XPA.92.099로 이루어진 군에서 선택된 VH 영역의 아미노산 서열을 포함하는 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함할 수 있다.

[0127] 또 다른 구현예에서, 항체는 상기 개시된 성숙한 경쇄 가변 영역 및 상기 개시된 성숙한 중쇄 가변 영역을 포함하며, 선택적으로 도 12a~e에 기재된 바와 같이 쌍을 이룬다.

[0128] 예시적인 구현예에서, 본 개시는 하기 CDR(들) 중 임의의 것에 예컨대 보존적 또는 비보존적 치환과 같은 하나 또는 두 개의 돌연변이를 선택적으로 포함하며, 선택적으로 도 12a~e에 개시된 바와 같이 쌍을 이루는, 서열 번호 17~40 중 어느 하나의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 또는 LCDR3 중 어느 하나, 둘, 셋, 네, 다섯 또는 여섯 개를 각각 보유하는 단일클론 항체; 선택적으로 하기 CDR(들) 중 임의의 것에 하나 또는 두 개의 변이를 포함하고, 선택적으로 임의의 적합한 중쇄 불변 영역, 예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2 또는 IgE, 이의 인간 서열 또는 이의 혼성체를 더 포함하는, HCDR1, HCDR2, HCDR3 모두 또는 서열 번호 17~28 중 어느 하나의 중쇄 가변 영역을 보유하는 단일클론 항체; 선택적으로 하기 CDR(들) 중 임의의 것에 하나 또는 두 개의 돌연변이를 포함하고, 임의의 적합한 경쇄 불변 영역, 예를 들어 카파 또는 람다 경쇄 불변 영역, 이의 인간 서열 또는 이의 혼성체를 더 포함하는, LCDR1, LCDR2, LCDR3 모두 또는 서열 번호 29~40 중 어느 하나의 경쇄 가변 영역을 보유하는 단일클론 항체를 고려한다.

[0129] 일부 구현예에서, 항체는 도 12a~e에 개시된 바와 같이, 세 개의 경쇄 CDR 모두, 세 개의 중쇄 CDR 모두, 또는 경쇄 및 중쇄의 6개의 CDR 모두를 포함한다. 일부 예시적인 구현예에서, 항체의 두 개의 경쇄 CDR은 상이한 항체의 제3 경쇄 CDR과 결합될 수 있다. 대안으로, 한 항체의 LCDR1은 상이한 항체의 LCDR2와 결합될 수 있으며, 특히 CDR이 상동성이 높은 경우에 또 다른 항체의 LCDR3과 결합될 수 있다. 유사하게, 항체의 두 개의 중쇄 CDR은 상이한 항체의 제3 중쇄 CDR과 결합될 수 있거나, 한 항체의 HCDR1은 상이한 항체의 HCDR2와 결합될 수 있으며, 특히 CDR이 상동성이 높은 경우에 또 다른 항체의 HCDR3과 결합될 수 있다.

[0130] 일부 구현예에서, 서열 번호 1, 3, 5 또는 7에 기재된 중쇄 가변 영역과 동일성이 적어도 약 65%, 70%, 75%,

80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상인 아미노산 서열 및/또는 서열번호 9, 11, 13, 또는 15에 기재된 경쇄 가변 영역과 동일성이 적어도 약 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상인 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함하고, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 또는 LCDR3 중 적어도 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯 또는 모두를 추가로 포함하는 항체가 제공된다. 일부 구현 예에서, 경쇄 가변 영역과의 퍼센트 동일성을 갖는 아미노산 서열은 경쇄 CDR 중 하나, 둘 또는 세 개를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 중쇄 가변 영역과의 퍼센트 동일성을 갖는 아미노산 서열은 중쇄 CDR 중 하나, 둘 또는 세 개를 포함할 수 있다.

[0131] 또 다른 구현 예에서, 도 12a~e의 항체 서열의 중쇄 가변 영역의 세 개의 HCDR 모두 또는 서열 번호 17~28에 기재된 CDR과 동일성이 적어도 약 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상인 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 항체가 제공된다.

[0132] 관련된 구현예에서, 도 12a~e의 항체 서열의 경쇄 가변 영역의 세 개의 LCDR 모두 또는 서열 번호 29~40에 기재된 CDR과 동일성이 적어도 약 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상인 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 항체가 제공된다.

[0133] 추가 구현예에서, 도 12a~e의 항체 서열의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 여섯 개의 CDR 모두 또는 서열 번호 17~40에 기재된 CDR과 동일성이 적어도 약 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상인 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 항체가 제공된다.

[0134] 본 개시의 항체는 항체의 CDR 영역에서 하나 또는 두 개 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 비-보존적 또는 보존적 치환을 가질 수 있다.

[0135] 관련된 구현예에서, 골격의 잔기가 변경된다. 변경될 수 있는 중쇄 골격 영역은 중쇄 CDR 잔기를 둘러싸는 H-FR1, H-FR2, H-FR3 및 H-FR4로 지정된 영역 내에 놓이고, 변경될 수 있는 경쇄 골격 영역은 경쇄 CDR 잔기를 둘러싸는 L-FR1, L-FR2, L-FR3 및 L-FR4로 지정된 영역 내에 놓인다. 골격 영역 내의 아미노산은, 예를 들어, 인간 골격 또는 인간 공통 골격에서 확인된 임의의 적합한 아미노산으로 대체될 수 있다.

[0136] XPA.92.019의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은 각각 서열 번호 1 및 9에 기재되어 있다. XPA.92.041의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은 각각 서열 번호 3 및 11에 기재되어 있다. XPA.92.042의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은 각각 서열 번호 5 및 13에 기재되어 있고, XPA.92.099의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은 각각 서열 번호 7 및 15에 기재되어 있다.

[0137] 다양한 구현예에서, 항체가 IL-2와 복합체화되고 포유 동물 숙주 내로 주입될 때, 복합체는 CD8+ T 세포, NK 세포, NK T 세포, CD4+ T 세포, 종양 반응성 CD8+ T 세포 또는 종양-반응성 CD4+ T 세포 중 하나 이상으로 확대된다.

[0138] 다양한 구현예에서, 본원에 기재된 항체는 수용체 서브 유닛 용도 또는 생물학적 활성에 영향을 주는 IL-2의 구조 변화를 유도한다.

[0139] 본 개시의 항체는 당업계에 널리 알려져 있고 본원에 기재된 항체의 보다 작은 항원 결합 단편으로서 사용될 수 있다는 것이 추가로 고려된다.

#### 항체 단편

[0141] 항체 단편은 손상되지 않은 전장 항체의 일부, 바람직하게는 손상되지 않은 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')2, Fcab 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단쇄 항체 분자(예컨대, scFv); 이중특이적(bispecific), 삼중특이적(trispecific) 등의 항체(예컨대, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디)와 같은 다중 특이적 항체 단편; 미니바디; 퀼레이트 재조합 항체; 트리바디 또는 바이바디; 인트라바디; 나노바디; 소형 모듈 면역제제(SMIP), 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질; 카멜화 항체; VH 함유 항체; 및 항체 단편으로부터 형성된 기타 폴리펩타이드를 포함한다. 예를 들어 문헌[Holliger & Hudson, 2005 *Nat. Biotech.* 23:1126-36; Eyer & Hruska, *Veterinarni Medicina* 57:439-513, 2012]을 참조한다.

[0142] 항체의 파파인 소화는 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는 VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인

"Fab" 단편이라고 불리는 두 개의 동일한 항원-결합 단편 및 그 이름이 쉽게 결정화하는 능력을 반영하는 잔여 "Fc" 단편을 생성한다. 웨신 처리는 헌지 영역에서 이황화 브릿지에 의해 연결된 두 개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')2 단편을 생성한다. "단쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 링커 웨პ타이드에 의해 접합된 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하며, 이를 도메인은 단일 폴리웨პ타이드 사슬 내에 존재한다. 바람직하게는, Fv 폴리웨პ타이드는 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있게 하는 VH 및 VL 도메인 사이의 폴리웨პ타이드 링커를 추가로 포함하여, VL 및 VH 영역이 쌍을 이루어 단일 단백질 사슬로 될 수 있게 하는 합성 링커를 통해 1가 분자를 형성한다(문헌 [Bird *et al.*, *Science* 242:423-426, 1988, 및 Huston *et al.*, *PNAS* 85:5879-5883, 1988]). scFv에 대한 검토를 위해 문헌 [Pluckthun, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 1 13, Rosenburg 및 Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다. Fd 단편은 VH 및 CH1 도메인으로 구성된다.

[0143] 추가적인 항체 단편은 VH 도메인으로 구성되는 도메인 항체(dAb) 단편(문헌 [Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546, 1989])을 포함한다. 디아바디는 VH 및 VL 도메인이 단일 폴리웨პ타이드 사슬상에 발현되지만, 동일한 사슬상의 두 도메인 사이의 쌍을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용하여, 상기 도메인들이 또 다른 사슬의 상보적인 도메인과 짹을 지울 수 있게 하고 두 개의 항원 결합 부위를 생성하는 이가 항체이다(예컨대, EP 404,097호; WO 93/11161호; 문헌 [Holliger *et al.*, *PNAS* 90:6444-6448, 1993], 및 문헌 [Poljak *et al.*, *Structure* 2:1121-1123, 1994]을 참조). 디아바디는 이중 특이적 또는 단일 특이적일 수 있다.

[0144] 경쇄가 없는 기능성 중쇄 항체는 너스 상어(nurse shark)(문헌 [Greenberg *et al.*, *Nature* 374:168-73, 1995]), 수염 상어(wobbegong shark)(문헌 [Nuttall *et al.*, *Mol Immunol.* 38:313-26, 2001]) 및 낙타와 단봉낙타, 알파카, 라마와 같은 낙타과(문헌 [Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-8, 1993; Nguyen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 275:413, 1998])에서 자연적으로 발생한다. 항원 결합 부위는 이를 동물에서 단일 도메인, 즉 VH-H2L2 구조만을 갖는 중쇄의 동종이량체("중쇄 항체" 또는 "HCAb"로 지칭됨)이다. 낙타 VH-H2L2는 헌지, CH2 및 CH3 도메인을 포함하고 CH1 도메인이 없는 IgG2 및 IgG3 불변 영역과 재조합된다고 보고되었다(문헌 [Hamers-Casterman *et al.*, *supra*]). 예를 들어, 라마 IgG1은 VH가 헌지, CH1, CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 불변 영역과 재조합하는 통상적인(H2L2) 항체 아이소타입인 반면, 라마 IgG2 및 IgG3은 CH1 도메인이 없는 중쇄-유일 아이소타입이며, 경쇄는 포함하지 않는다. 낙타 VH-H2L2는 고전화도로 결합하는 것으로 밝혀졌으며(문헌 [Desmyter *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276:26285-90, 2001]), 용액에서 높은 안정성을 갖는다(문헌 [Ewert *et al.*, *Biochemistry* 41:3628-36, 2002]). 고전적인 VH-유일 단편은 가용성 형태로 생성하기가 어렵지만, 골격 잔기가 유사-VHH로 더 많이 변형될 때 용해도 및 특이적 결합의 향상을 얻을 수 있다. (예컨대, 문헌 [Reichman, *et al.*, *J. Immunol. Methods* 1999, 231:25-38] 참조). 낙타 중쇄를 갖는 항체를 생성시키는 방법은 예를 들어 미국 특허 공개 번호 제20050136049호 및 제20050037421호에 기재되어 있다.

[0145] 분자 질량이 단지 15 kDa인 완전히 기능하는 항원-결합 단편인 항체 중쇄의 가변 도메인은 나노바디로 지칭된다(문헌 [Cortez-Retamozo *et al.*, *Cancer Research* 64:2853-57, 2004]). 나노바디 라이브러리는 문헌 [Conrath *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* 45:2807-12, 2001]에 기재된 바와 같이 면역된 단봉 낙타에서 또는 문헌 [Revets *et al.*, *Expert Opin. Biol. Ther.* 5(1):111-24 (2005)]에 기재된 바와 같은 재조합 방법을 사용하여 생성될 수 있다.

[0146] 이중특이적 Fab-scFv("바이바디") 및 삼중특이적 Fab-(scFv)(2)("트라이바디")의 제조는 문헌 [Schoonjans *et al.*, *J. Immunol.* 165:7050-57, 2000 및 Willemse *et al.*, *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 786:161-76, 2003]에 기재되어 있다. 바이바디 또는 트라이바디의 경우, scFv 분자는 예컨대, 트라이바디를 생성하기 위해 VL-CL(L) 및 VH-CH1(Fd) 사슬 중 하나 또는 둘 모두에 융합되며, 두 개의 scFv는 Fab의 C-말단에 융합되며, 바이바디에서 하나의 scFv는 Fab의 C-말단에 융합된다. 추가적인 Fab-기재 이중 특이적 포맷은 문헌 [Wu *et al.*, *mAbs* 7: 470-482, 2015]에 기재되어 있다.

[0147] (헌지 없는) 웨პ타이드 링커 또는 IgG 헌지를 통해 CH3에 융합된 scFv로 구성된 "미니바디"는 문헌 [Olafsen, *et al.*, *Protein Eng Des Sel.* 17(4):315-23, 2004]에 기재되어 있다.

[0148] 인트라바디는 세포 내 발현을 입증하고 세포 내 단백질 기능을 조작할 수 있는 단일 사슬 항체이다(문헌 [Biocca, *et al.*, *EMBO J.* 9:101-108, 1990; Colby *et al.*, *PNAS* 101:17616-21, 2004]). 세포 내 영역에서 항체 구조물을 보유하는 세포 신호 서열을 포함하는 인트라바디는 문헌 [Mhashilkar *et al.*, *(EMBO J.* 14:1542-51, 1995) 및 Wheeler *et al.*, *(FASEB J.* 17:1733-5, 2003)]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 트랜스바디

는 단백질 전달 도메인(PTD)이 단쇄 가변 단편(scFv) 항체와 융합된 세포 투과성 항체이다(문헌 [Heng *et al.*, *Med Hypotheses*. 64:1105-8, 2005]).

[0149] 또한, 표적 단백질에 특이적인 SMIP 또는 결합 도메인 면역글로불린 융합 단백질인 항체가 고려된다. 이러한 작제물은 항체 효과기 기능을 수행하는 데 필요한 면역글로불린 도메인에 융합된 항원 결합 도메인을 포함하는 단쇄 폴리펩타이드이다. 예를 들어, WO 03/041600호, 미국 특허 공개 번호 제20030133939호 및 미국 특허 공개 번호 제20030118592호를 참조한다.

[0150] 하나 이상의 CDR은 공유 결합 또는 비공유 결합으로 분자에 혼입되어 면역접합체(immunoadhesin)가 될 수 있다. 면역접합체는 더 큰 폴리펩타이드 사슬의 일부로서 CDR(들)을 혼입시킬 수 있거나, CDR(들)을 또 다른 폴리펩타이드 사슬에 공유 결합시킬 수 있거나, CDR(들)을 비공유 결합으로 혼입시킬 수 있다. CDR은 면역접합체를 특정한 목적 항원에 특이적으로 결합시키는 것을 허용한다.

[0151] 따라서, 항체의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역의 (예컨대, 단일 CDR 단독으로 또는 일렬로, CDR의 2개, 3개 또는 기타 다수 반복, 또는 2개 또는 3개의 CDR의 조합을 단독으로 또는 일렬로 반복; 선택적으로 CDR들 또는 반복들 사이에 스페이서 아미노산 서열이 있는) 1개, 2개 및/또는 3개의 CDR을 포함하는 다양한 조성물은 당업계에 공지된 기술에 의해 생성될 수 있다.

#### 키메라 항체 및 인간화 항체

[0153] 키메라 또는 인간화 항체는 모체 비인간(예컨대, 마우스) 단일클론 항체보다 인간에서 면역원성이 작기 때문에 아나필락시스(anaphylaxis) 위험이 훨씬 적은 사람의 치료에 사용될 수 있다.

[0154] 비인간(예컨대, 마우스) 단일클론 항체의 가변 Ig 도메인이 인간 불변 Ig 도메인에 융합된 키메라 단일클론 항체는 당업계에 공지된 표준 절차를 사용하여 생성될 수 있다(문헌 [Morrison *et al.*, *PNAS* 81, 6841-6855 (1984); 및, Boulian *et al.*, *Nature* 312, 643-646, (1984)] 참조).

[0155] 인간화 항체는, 예를 들어, (1) 인간 골격 및 불변 영역상에 비인간 상보성 결정 영역(CDR)을 이식하거나(당업계에서 "CDR 이식"을 통한 인간화로 지칭되는 과정), (2) 전체 비인간 가변 도메인을 이식하지만, 표면 잔기의 치환에 의해 인간 유사 표면으로 이들을 "클로킹(cloaking)"시키거나(당업계에서 "베니어링(veneering)"으로 지칭되는 과정), 또는 대안으로 (3) 항원 결합 또는 단백질 접힘에 악영향을 미치지 않지만, 인간 환경에서 면역원성을 감소시킬 가능성이 있을 것으로 판단되는 위치에서 인간 아미노산을 치환하는 것(예컨대, HUMAN ENGINEERING™ 등을 포함하는 여러 가지 방법에 의해 달성될 수 있다. 본원에서, 인간화 항체는 "CDR 이식된", "인간화된", "베니어링된" 및 "HUMAN ENGINEERED™" 항체를 포함할 것이다. 이들 방법은 예를 들어 문헌 [Jones *et al.*, *Nature* 321:522 525 (1986); Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 81:6851-6855 (1984); Morrison 및 Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoefer *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.* 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immunol.* 31:169-217 (1994); Studnicka *et al.* U.S. Patent No. 5,766,886; Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7:805-814, 1994; Co *et al.*, *J. Immunol.* 152, 2968-2976 (1994); Riechmann, *et al.*, *Nature* 332:323-27 (1988); 및 Kettleborough *et al.*, *Protein Eng.* 4:773-783 (1991)]에 기재되어 있다. CDR 이식 기술은 이 분야에서 공지되어 있으며, 예를 들면, 문헌 [Riechmann, *et al.*, *Nature* 332:323-27 (1988)]에 기재되어 있다. 추가적인 항체 인간화 방법은 문헌 [Safdar *et al.*, *Biotech. Gen. Eng. Rev.* 29:175-86, 2013]에서 고찰되었다.

#### 유전자 이식 동물로부터의 인간 항체

[0157] 또한, 내인성 면역글로불린 생산이 없으며 인간 면역글로불린 유전자좌를 포함하도록 조작된 유전자 이식 동물을 사용하여 표적 단백질에 대한 인간 항체를 생산할 수 있다. 예를 들어, WO 98/24893호는 인간 Ig 유전자좌를 갖는 유전자 이식 동물을 개시하고, 상기 동물은 내인성 중쇄 및 경쇄 유전자좌의 불활성화로 인해 기능적 내인성 면역글로불린을 생성하지 않는다. WO 91/00906호는 또한 면역원성에 면역 반응을 부여할 수 있는 유전자 이식 비영장류 포유 동물 숙주를 개시하고, 항체는 영장류 불변 및/또는 가변 영역을 가지며, 내인성 면역글로불린-인코딩 유전자좌는 치환되거나 불활성화된다. WO 96/30498호 및 미국 특허 번호 제6,091,001호는 수정된 항체 분자를 형성하기 위해 불변 또는 가변 영역의 전부 또는 일부를 대체하기 위해, 포유류에서 면역글로불린 유전자좌를 변형시키는 Cre/Lox 시스템의 용도를 개시한다. WO 94/02602호는 불활성화된 내인성 Ig 유전자좌 및 기능적 인간 Ig 유전자좌를 갖는 비인간 포유 동물 숙주를 개시한다. 미국 특허 번호 제5,939,598호는 마우스가 내인성 중쇄가 없고, 하나 이상의 이종성(xenogenic) 불변 영역을 포함하는 외인성 면역글로불린 유전자좌를 발현하는 유전자 이식 마우스를 제조하는 방법을 개시한다. 또한, 미국 특허 번호 제6,114,598호, 제6,657,103호

및 제6,833,268호; 문헌 [Green LL, *Curr Drug Discovery Technol.*, 11(1), 74-84, 2014; Lee et al., *Nature Biotechnology*, 32:356-363, 2014; Lee 및 Owen, *Methods Mol Biol.*, 901:137-48, (2012)]을 참조한다.

[0158] 전술한 유전자 이식 동물을 사용하여, 선택된 항원 분자에 면역 반응을 생성시킬 수 있고, 항체 생산 세포는 동물에서 제거되어 인간 단일 클론 항체를 분비하는 하이브리도마를 생산하는 데 사용될 수 있다. 면역 프로토콜, 보강제 등은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 WO 96/33735호에 기재된 바와 같은 유전자 이식 마우스의 면역화에 사용된다. 이 공보는 IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , 인간 CD4, L 셀렉틴, gp39 및 파상풍 독소를 비롯한 다양한 항원 분자에 대한 단일클론 항체를 개시한다. 단일클론 항체는 상응하는 단백질의 생물학적 활성 또는 생리적 효과를 억제 또는 중화하는 능력에 대해 시험될 수 있다. WO 96/33735호는 IL-8로 면역화된 유전자 이식 마우스의 면역 세포에서 유래된 IL-8에 대한 단일클론 항체가 호중구의 IL-8 유도 기능을 차단하는 것을 개시한다. 유전자 이식 동물을 면역화시키는 데 사용되는 항원에 대한 특이성을 갖는 인간 단일클론 항체는 또한 WO 96/34096호 및 미국 특허 공개 번호 제20030194404호; 및 미국 특허 공개 번호 제20030031667호에 개시되어 있다.

[0159] 단일클론 항체를 만드는 데 유용한 추가 유전자 이식 동물은 미국 특허 번호 제5,770,429호 및 문헌 [Fishwild, et al., *Nat. Biotechnol.*, 14:845-851 (1996)]에 기재된 Medarex HuMAB-MOUSE®를 포함하고, 이는 인간 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 재배열되지 않은 인간 항체 유전자로부터의 유전자 서열을 포함한다. HuMAB-MOUSE®를 예방 접종하면 표적 단백질에 대한 완전 인간 단일클론 항체의 생산이 가능하다.

[0160] 또한, 문헌 [Ishida et al., *Cloning Stem Cells*, 4:91-102 (2002)]은 인간 DNA의 메가베이스 크기 절편을 포함하고 전체 인간 면역글로불린(hIg) 유전자좌를 흔입시키는 트랜스크로모 마우스(TransChromo Mouse, TCMOUSE™)를 기재하고 있다. TCMOUSE™는 IgG(IgG1-G4)의 모든 하위 클래스를 포함하여 완전히 다양한 hIg 레퍼토리를 가지고 있다. 다양한 인간 항원과 함께 TCMOUSE™를 예방 접종하면 인간 항체를 포함하는 항체 반응이 생성된다.

[0161] 또한 문헌 [Jakobovits et al., *PNAS*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993)]; 및 미국 특허 번호 제5,591,669 호, 미국 특허 번호 제 5,589,369호, 미국 특허 번호 제5,545,807호; 및 미국 특허 공개 번호 제20020199213호를 참조한다. 미국 특허 공개 번호 제20030092125호는 동물의 면역 반응을 원하는 에피토프에 바이어싱하는 방법을 기술한다. 인체 항체는 또한 시험 관내 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다(미국 특허 번호 제5,567,610호 및 제5,229,275호 참조).

#### 디스플레이 기술에서의 인간 항체

[0163] 재조합 인간 항체 유전자의 레퍼토리를 제조하는 기술의 개발 및 필라멘트형 박테리오파지의 표면상에 인코딩된 항체 단편의 디스플레이이는 인간 항체를 직접 제조하는 수단을 제공한다. 파지 기술로 생성된 항체는 박테리아에서 항원 결합 단편(일반적으로 scFv 또는 Fab 단편)으로 생성되므로 효과기 기능이 결핍된다. 효과기 기능은 두 가지 전략 중 하나에 의해 도입될 수 있다: 예를 들어, 포유 동물 세포에서의 발현을 위해 완전한 항체 내로 단편을 조작하거나 또는 효과기 기능을 유발할 수 있는 제2 결합 부위를 갖는 이중 특이적 항체 단편 내로 단편을 조작할 수 있다.

[0164] 예로서, 파지 디스플레이 기술에서 사용하기 위한 항체 라이브러리를 제조하는 한 방법은 표적 항원 또는 이의 항원성 부분으로 인간 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 비인간 동물을 면역화시켜 면역 반응을 생성시켜, 면역화된 동물에서 항체 생성 세포를 추출하는 단계; 추출된 세포로부터 RNA를 분리하고, RNA를 역전사시켜 cDNA를 생성하고, 프라이머를 사용하여 cDNA를 증폭시키고, cDNA를 파지 디스플레이 벡터에 삽입하여 항체를 파지상에 발현시키는 단계를 포함한다. 본 개시의 재조합 표적 특이적 항체는 이러한 방식으로 수득될 수 있다.

[0165] 또 다른 예에서, 항체 생성 세포는 비면역화된 동물에서 추출될 수 있고, RNA는 추출된 세포에서 분리되고 역전사되어 cDNA를 생성하며, 이는 프라이머를 사용하여 증폭되고 항체가 파지상에 발현되도록 파지 디스플레이 벡터에 삽입된다. 파지 디스플레이 과정은 필라멘트형 박테리오파지의 표면에서의 항체 레퍼토리 디스플레이 및 선택된 항원과의 결합에 의한 파지의 후속 선택을 통해 면역 선택을 모방한다. 하나의 이러한 기술은 WO 99/10494호에 기술되어 있으며, 이는 이러한 접근법을 사용하여 MPL 및 msk 수용체에 대한 고친화성 및 기능성 작동 항체의 분리를 기술한다. 본 개시의 항체는 인간 림프구 유래 mRNA로부터 제조된 인간 VL 및 VH cDNA를 사용하여 제조된 재조합 조합성 항체 라이브러리, 예를 들어 scFv 또는 Fab 파지 디스플레이 라이브러리의 스크리닝에 의해 단리될 수 있다. 이러한 라이브러리를 제조하고 스크리닝하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 제5,969,108호를 참조한다. 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하기 위한 시판용 키트가

있다(예컨대, Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, 카탈로그 번호 27-9400-01 및 Stratagene SurfZAP™ 파지 디스플레이 키트, 카탈로그 번호 240612). 항체 디스플레이 라이브러리의 생성 및 스크리닝에 사용될 수 있는 기타 방법 및 시약이 있다(예컨대, Ladner 등의 미국 특허 번호 제5,223,409호; Kang 등의 PCT 공개 번호 WO 92/18619호; Dower 등의 PCT 공개 번호 WO 91/17271호; Winter 등의 PCT 공개 번호 WO 92/20791호; Markland 등의 PCT 공개 번호 WO 92/15679호; Breitling 등의 PCT 공개 번호 WO 93/01288호; McCafferty 등의 PCT 공개 번호 WO 92/01047호; Garrard 등의 WO 92/09690호; 문헌 [Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.*, (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; 및 Barbas *et al.*, (1991) *PNAS* 88:7978-7982, 및 Omidfar & Daneshpour, *Exp. Op. Drug Disc.* 10:651-669, 2015] 참조).

[0166]

하나의 구현예에서, 원하는 특성을 갖는 표적 항원에 특이적인 인간 항체를 단리하기 위해, 원하는 특이성을 갖는 항체 단편을 선별하기 위해 인간 VH 및 VL 라이브러리를 스크리닝한다. 이 방법에 사용된 항체 라이브러리는 본원 및 당업계에 기재된 바와 같이 제조 및 스크리닝된 scFv 라이브러리일 수 있다(McCafferty 등의 PCT 공개 번호 WO 92/01047호, 문헌 [McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990)]; 및 문헌 [Griffiths *et al.*, *EMBO J* 12:725-734 (1993)]). 항체 라이브러리는 항원으로서 표적 단백질을 사용하여 스크리닝되는 것이 바람직하다.

[0167]

또는, 항체의 Fd 단편(VH-CH1) 및 경쇄(VL-CL)를 PCR에 의해 개별적으로 클로닝하고 조합성 파지 디스플레이 라이브러리에서 무작위로 재조합시킨 다음 특정 항원에 결합하도록 선택될 수 있다. Fab 단편은 파지 표면에서 발현된다, 즉 그들을 인코딩하는 유전자와 물리적으로 연관되어 있다. 따라서, 항원 결합에 의한 Fab의 선택은 이후에 증폭될 수 있는 Fab 인코딩 서열을 공동 선택한다. 몇 차례의 항원 결합 및 재증폭을 통해, 패닝(panning)으로 불리는 절차, 항원에 특이적인 Fab를 풍부하게 하고 최종적으로 분리한다.

[0168]

1994년에는 "가이드 선택(guided selection)"이라고 불리는 항체의 인간화 접근법이 설명되었다. 가이드 선택은 마우스 단일클론 항체의 인간화를 위한 파지 디스플레이 기술의 힘을 이용한다(문헌 [Jespers, L. S., *et al.*, *Bio/Technology* 12, 899-903 (1994)] 참조). 이를 위해, 마우스 단일클론 항체의 Fd 단편이 인간 경쇄 라이브러리와 함께 표시될 수 있으며, 생성된 하이브리드 Fab 라이브러리가 항원으로 선택될 수 있다. 마우스 Fd 단편은 이에 의해 선택을 안내하는 템플릿을 제공한다. 이어서, 선택된 인간 경쇄는 인간 Fd 단편 라이브러리와 결합된다. 생성된 라이브러리를 선택하면 전적으로 인간 Fab가 생성된다.

[0169]

파지-디스플레이 라이브러리로부터 인간 항체를 유도하기 위한 다양한 과정이 기술되어 있다(예를 들어, 문헌 [Hoogenboom *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]; 미국 특허 번호 제5,565,332호 및 제5,573,905호; 문헌 [Clackson, T., 및 Wells, J. A., TIBTECH 12, 173-184 (1994)]을 참조). 특히, 파지 디스플레이 라이브러리로부터 유래된 항체의 시험판내 선별 및 진화는 강력한 도구가 되었다(문헌 [Burton, DR 및 Barbas III, CF, *Adv. Immunol.* 57, 191-280 (1994); Winter, G., *et al.*, *Annu. Immunol.* 12, 433-455 (1994)]; 미국 특허 공개 번호 제20020004215호 및 WO 92/01047호; 미국 특허 공개 번호 제20030190317호; 및 미국 특허 번호 제6,054,287호 및 제5,877,293호를 참조).

[0170]

Fv 단편은 파지 단백질 융합(예컨대, M13 유전자 III)으로 표현된 한 사슬과 가용성 단편으로 표현된 상보성 사슬의 결합에 의해 파지의 표면상에 표시된다. 파지는 클래스 I 파지: fd, M13, f1, If1, Ike, ZJ/Z, Ff 중 하나 및 클래스 II 파지 Xf, Pf1 및 Pf3 중 하나와 같은 섬유상 파지일 수 있음이 고려된다. 파지는 M13 또는 fd 또는 이의 유도체일 수 있다.

[0171]

일단 초기 인간 VL 및 VH 절편이 선택되면, 바람직한 VL/VH 쌍의 조합을 선택하기 위해, 선택된 VL 및 VH 절편의 상이한 쌍이 표적 결합을 위해 스크리닝되는 "흔합 및 일치"실험이 수행된다(예를 들어, 문헌 [Kang *et al.*, *PNAS* 88: 11120-11123, (1991)] 참조). 또한, 항체의 품질을 더욱 향상시키기 위해, 바람직하게는 VH 및/또는 VL의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 영역 중 임의의 영역 내에서, 자연 면역 반응 중에 항체의 친화도 성숙을 담당하는 생체내 체세포 돌연변이 과정과 유사한 과정으로, 바람직한 VL/VH 쌍(들)의 VL 및 VH 절편을 무작위로 돌연변이 시킬 수 있다. 이 시험판내 친화도 성숙은 VH CDR1, CDR2 및 CDR3, 또는 VL CDR1, CDR2 및 CDR3에 각각 상보적인 PCR 프라이머를 사용하여 VL 및 VH 영역을 증폭시킴으로써 달성될 수 있으며, 프라이머는 생성된 PCR 산물이 무작위 돌연변이가 VH 및/또는 VL CDR3 영역으로 도입된 VL 및 VH 절편을 인코딩하도록 특정 위치에서 4개의 뉴

클레오타이드 염기의 무작위 혼합물로 스파이킹(spike)되었다. 이러한 무작위로 변이된 VL 및 VH 절편은 표적 항원에 대한 결합을 위해 재스크리닝될 수 있다.

[0172] 재조합 면역글로불린 디스플레이 라이브러리로부터 표적 특이적 항체를 스크리닝 및 단리한 후, 선택된 항체를 인코딩하는 핵산을 표준 재조합 DNA 기술에 의해 디스플레이 폐키지(예컨대, 파지 게놈)로부터 회수하고 기타 발현 벡터 내로 서브클로닝할 수 있다. 원한다면, 핵산은 추가로 조작되어 하기 기재된 바와 같이 본 개시의 기타 항체 형태를 생성할 수 있다. 조합 라이브러리의 스크리닝에 의해 단리된 재조합 인간 항체를 발현시키기 위해, 항체를 인코딩하는 DNA는 재조합 발현 벡터에 클로닝되고 본원에 기재된 포유 동물 숙주 세포에 도입된다.

[0173] 파지 디스플레이 방법은 박테리아 또는 숙주 세포의 돌연변이 균주에서 수행될 수 있는 것으로 고려된다. 돌연변이 균주는 그 내에 복제된 DNA가 모 DNA와 관련하여 돌연변이되게 하는 유전적 결함을 갖는 숙주 세포이다. 돌연변이 균주의 예는 NR9046mutD5 및 NR9046 mut T1이 있다.

[0174] 또한, 파지 디스플레이 방법은 보조 파지를 사용하여 수행될 수 있는 것으로 고려된다. 이는 결함이 있는 파지 게놈을 함유하는 세포를 감염시키는 데 사용되고 결함을 보완하는 기능을 하는 파지이다. 결함이 있는 파지 게놈은 유전자 서열을 인코딩하는 일부 기능이 제거된 파지미드 또는 파지일 수 있다. 보조 파지의 예로는 M13K07, M13K07 유전자 III 번호 3이 있고, 캡시드 단백질에 융합된 결합 분자를 디스플레이하거나 인코딩하는 파지가 있다.

[0175] 항체는 또한 H 또는 L 사슬 클론을 함유하는 개별 콜로니가 기타 사슬(L 또는 H)을 인코딩하는 클론의 완전한 라이브러리를 감염시키는 데 사용되는, WO 92/01047호에 개시된 바와 같은 계층적 이중 조합 접근법을 사용하는 파지 디스플레이 스크리닝 방법을 통해 생성되고, 생성된 2체의 특이적 결합 요소는 여기에 기재된 바와 같은 파지 디스플레이 기술에 따라 선택된다. 이 기술은 또한 문헌 [Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)]에 개시되어 있다.

[0176] 효모, 미생물 및 포유 동물 세포의 표면상에 펩타이드를 표시하는 방법은 또한 항원 특이적 항체를 확인하는 데 사용되었다. 예를 들어, 미국 특허 번호 제5,348,867호; 제5,723,287호; 제6,699,658호; 문헌 [Wittrup, *Curr Op. Biotech.* 12:395-99 (2001); Lee *et al.*, *Trends in Biotech.* 21(1) 45-52 (2003); Surgeeva *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58: 1622-54 (2006)]을 참조한다. 항체 라이브러리는 면역계에서 B 세포에 의한 항체의 세포 표면 디스플레이를 효과적으로 모방하는, 응집체(agglutinin)와 같은 효모 단백질에 부착될 수 있다.

[0177] 파지 디스플레이 방법 이외에, 항체는 시험관내 디스플레이 방법, 및 리보솜 디스플레이와 mRNA 디스플레이를 포함한 미생물 세포 디스플레이를 사용하여 단리될 수 있다(문헌 [Amstutz *et al.*, *Curr. Op. Biotech.* 12:400-05 (2001)]). 리보솜 디스플레이를 사용한 폴리펩타이드의 선별은 문헌 [Hanes *et al.*, *PNAS*, 94:4937-4942 (1997)] 및 Kawasaki에게 허여된 미국 특허 번호 제5,643,768호 및 제5,658,754호에 기재되어 있다. 리보솜 디스플레이에는 또한 항체의 신속한 대량 돌연변이 분석에도 유용하다. 선택적 돌연변이 유발 접근법은 또한 리보솜 디스플레이 기술을 사용하여 선택될 수 있는 개선된 활성을 갖는 항체를 생산하는 방법을 제공한다.

#### 아미노산 서열 변이체

[0179] 항체의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 및/또는 6개의 CDR을 포함하는 변형된 폴리펩타이드 조성물이 생성될 수 있으며, CDR은 표적 분자에 대한 증가된 특이성 또는 친화도를 제공하도록 변경된다. 항체 CDR 내의 부위는 전형적으로 예컨대, 우선 보존적 선택(예컨대, 동일하지 않은 소수성 아미노산 대신 치환된 소수성 아미노산)으로 치환된다. 보다 상이한 선택(예컨대, 충전된 아미노산 대신 치환된 소수성 아미노산)으로 치환되어 연속으로 변형된 후, 표적 부위에 결실 또는 삽입을 행할 수 있다. 예를 들어, CDR을 둘러싼 보존된 골격 서열을 사용하여, 이들 컨센서스 서열에 상보적인 PCR 프라이머가 생성되어 프라이머 영역 사이에 위치한 항원-특이적 CDR 서열을 증폭시킨다. 뉴클레오타이드와 폴리펩타이드 서열을 클로닝하고 발현하는 기술은 당업계에서 정착된 것이다[예컨대, 문헌 [Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, New York (1989)] 참고] 증폭된 CDR 서열이 적절한 플라스미드에 라이게이팅된다. 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 및/또는 6개의 클로닝된 CDR을 포함하는 플라스미드는 선택적으로 CDR에 연결된 추가 폴리펩타이드 인코딩 영역을 함유한다.

[0180] 변형은 하기에 보다 상세히 기재된 보존적 또는 비보존적 아미노산 치환에 의해 이루어질 수 있다. "삽입" 또는 "결실"은 바람직하게는 약 1 내지 20개의 아미노산, 보다 바람직하게는 1 내지 10개의 아미노산 범위이다. 변형은 재조합 DNA 기술을 사용하여 항체 폴리펩타이드 분자에서 아미노산의 치환을 체계적으로 만들고, 생성된 재조합 변이체를 활성에 대해 분석함으로써 도입될 수 있다. 핵산 변경은 상이한 종(가변 위치)으로부터 또는 고

도로 보존된 영역(불변 영역)의 핵산 중 다른 부위에서 이루어질 수 있다. 항체 서열을 변경하고 본 개시에 유용한 항체 폴리펩타이드 조성물을 발현시키는 방법은 당업계에 기재되어 있다. 예컨대, 미국 특허 번호 제 8,569,462호를 참조한다. 또 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이들 변이체는 제거된 항체 분자에서 적어도 하나의 아미노산 잔기 및 그 자리에 삽입된 상이한 잔기를 갖는다. 초가변 영역 또는 CDR 영역 또는 골격 영역 중 임의의 것 내에서의 치환 돌연변이 유발이 고려된다. 보존적 치환은 아미노산을 그 부류의 또 다른 구성원으로 대체하는 것을 포함한다. 비보존적 치환은 이들 부류 중 하나의 구성원을 다른 부류의 구성원으로 대체하는 것을 포함한다.

[0181] 보존적 아미노산 치환은 관련된 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성 성질의 유사성에 기초하여 이루어진다. 예를 들어, 비극성(소수성) 아미노산은 알라닌(Ala, A), 류신(Leu, L), 아이소류신(Ile, I), 발린(Val, V), 프롤린(Pro, P), 페닐알라닌(Phe, F), 트립토판(Trp, W) 및 메티오닌(Met, M)을 포함하고, 극성 중성 아미노산은 글라이신(Gly, G), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 시스테인(Cys, C), 티로신(Tyr, Y), 아스파라긴(Asn, N) 및 글루타민(Gln, Q)을 포함하며, 양으로 하전된(염기성) 아미노산은 아르기닌(Arg, R), 리신(Lys, K) 및 히스티딘(His, H)을 포함하고, 음으로 하전된(산성) 아미노산은 아스파르트 산(Asp, D) 및 글루탐산(Glu, E)을 포함한다.

[0182] 항체의 적절한 형태를 유지하는 데 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기는 또한 분자의 산화 안정성을 개선시키고 비정상적인 가교 결합을 방지하기 위해 일반적으로 세린으로 치환될 수 있다. 반대로, 시스테인 결합(들)은 안정성을 향상시키기 위해(특히, 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우) 항체에 첨가될 수 있다.

### 변형된 글리코실화

[0184] 예를 들어, 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 잔기를 결실시키고/시키거나 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 첨가하는 것과 같이, 모 항체에 비해 변형된 글리코실화 패턴을 갖는 항체 변이체가 또한 생산될 수 있다.

[0185] 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-결합 또는 O-결합이다. N-결합은 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 결합하는 것을 의미한다. 트라이펩타이드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌(여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 탄수화물 모이어티를 아스파라긴 측쇄에 효소적으로 부착시키는 인식 서열이다. 폴리펩타이드에서 이들 트라이펩타이드 서열 중 하나가 존재하면 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. 따라서, N-결합 글리코실화 부위는 하나 이상의 이들 트라이펩타이드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경함으로써 항체에 첨가될 수 있다. O-결합 글리코실화는 하이드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌에 당(sugar) N-아세틸갈락토사민아미노산, 갈락토스, 또는 자일로스를 부착시키는 것을 의미하지만, 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시리신이 또한 사용될 수 있다. O-결합 글리코실화 부위는 원래 항체의 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 삽입하거나 치환함으로써 항체에 첨가될 수 있다.

[0186] Fc 글리칸은 Fc 수용체 및 C1q에 대한 IgG의 결합에 영향을 미치므로 IgG 효과기 기능에 중요하다. 변형된 Fc 글리칸 및 변형된 효과기 기능을 갖는 항체 변이체가 생산될 수 있다. 예를 들어, 시알산, 코어 푸코스, 이분화 N-아세틸글루코사민 및 만노스 잔기와 같은 변형된 말단 당을 갖는 항체는 Fc γRIIIa 수용체에 대한 변화된 결합 및 변화된 ADCC 활성을 가질 수 있다. 추가 예에서, 변형된 말단 갈락토오스 잔기를 갖는 항체는 C1q에 대한 변화된 결합 및 변화된 CDC 활성을 가질 수 있다(문헌 [Raju, *Curr. Opin. Immunol.* 20:471-78, 2008]).

[0187] 또한, 본 방법에 사용하기 위해 고려되는 것은 개선된 ADCC 활성을 나타내는, 결핍되거나 감소된 푸코실화를 갖는 항체 분자이다. 이를 달성하기 위한 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Yamane-Ohnuki *et al.*, *Biotechnol Bioeng.* 87:614-22 (2004); Rothman *et al.*, *Mol Immunol.* 26:1113-23 (1989); Shields *et al.*, *J Biol Chem.* 277:26733-40 (2002); Shinkawa *et al.*, *J Biol Chem.* 278:3466-73 (2003); Umana *et al.*, *Nat Biotechnol.* 17:176-80 (1999); Ferrara *et al.*, *Biotechnol Bioeng.* 93:851-61 (2006)]을 참조한다. 항체의 글리코실화 및 방법은 문헌 [Niewa 및 Satoh, *J. Pharmaceutical Sciences* 104:930-41, (2015)]에서 검토된다.

### 변형된 효과기 기능을 갖는 변이체

[0189] 본 방법에서 사용하기 위한 항체의 기타 변형이 고려된다. 하나의 양태에서, 예를 들어, 암 치료에서 항체의 유효성을 향상시키기 위해, 효과기 기능과 관련하여 본원에서 사용된 항체를 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 효과기 기능을 변형시키는 한 방법은 시스테인 잔기(들)가 Fc 영역에 도입되어, 이 영역에서 사슬간 이황화 결합 형성을 허용할 수 있음을 교시한다. 따라서 생성된 동종이량체 항체는 개선된 내재화 능력 및/또는 증가된

보체-매개 세포 사멸 및 항체-의존성 세포 독성(ADCC)을 가질 수 있다. 문헌 [Caron et al., *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992)] 및 문헌 [Shopes, B, *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992)]을 참조한다. 향상된 항-종양 활성을 갖는 동종이량체 항체는 또한 문헌 [Wolff et al., *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993)]에 기재된 바와 같은 헤테로 이작용성 가교체를 사용하여 제조될 수 있다. 대안으로, 이중 Fc 영역을 가지며 이에 의해 강화된 보체 용해 및 ADCC 능력을 가질 수 있는 항체가 조작될 수 있다. 문헌 [Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)]을 참조한다.

[0190] 본 개시의 특정 구현예에서, 예를 들어, 치료 효능을 증가시키기 위해 손상되지 않은 항체보다는 항체 단편을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이 경우, 예를 들어 다당류 중합체를 포함하는 PEG 또는 다른 수용성 중합체와 같은 분자를 항체 단편에 첨가하여 반감기를 증가시키기 위해 항체 단편을 변형시켜 혈청 반감기를 증가시키는 것이 바람직할 수 있다.

[0191] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "구제 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자(예컨대, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)의 Fc 영역의 에피토프를 지칭하고, 이는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기를 증가시키는 역할을 한다. 구제 수용체 결합 에피토프는 바람직하게는 Fc 도메인의 1개 또는 2개의 루프로부터 임의의 하나 이상의 아미노산 잔기가 항체 단편의 유사한 위치로 전달되는 영역을 구성한다. 하나의 구현예에서, Fc 도메인의 1개 또는 2개의 루프로부터 3개 이상의 잔기가 전사된다. 또 다른 구현예에서, 에피토프는 Fc 영역(예컨대, IgG)의 CH2 도메인으로부터 취해지고 항체의 CH1, CH3 또는 VH 영역, 또는 하나 초과의 그러한 영역으로 전달된다. 대안으로, 에피토프는 Fc 영역의 CH2 도메인으로부터 취해지고, 항체 단편의 CL 영역 또는 VL 영역, 또는 둘 모두로 전달된다.

[0192] 본 개시의 항체는 인간 Fc 부분, 인간 컨센서스 Fc 부분, 또는 Fc 구제 수용체와 상호 작용하는 능력을 보유하는 그의 변이체를 포함할 수 있다[예컨대, 문헌 [Sarmay et al., *Molec. Immunol.* 29:633-9 (1992)] 참조].

[0193] Shields 등은 모든 인간 Fc 수용체에 대한 결합에 관여하는 IgG1 잔기가 경첩에 인접한 CH2 도메인에 위치하고, 다음과 같은 두 가지 범주로 분류된다: 1) 모든 FcR과 직접 상호 작용할 수 있는 위치는 Leu234-Pro238, Ala327 및 Pro329(및 가능한 한 Asp265)를 포함한다; 2) 탄수화물의 성질 또는 위치에 영향을 미치는 위치는 Asp265 및 Asn297을 포함한다. Fc 수용체 II에 대한 결합에 영향을 미치는 추가 IgG1 잔기는 다음과 같다: (최대 효과) Arg255, Thr256, Glu258, Ser267, Asp270, Glu272, Asp280, Arg292, Ser298 및 (보다 적은 효과) His268, Asn276, His285, Asn286, Lys290, Gln295, Arg301, Thr307, Leu309, Asn315, Lys322, Lys326, Pro331, Ser337, Ala339, Ala378 및 Lys414. A327Q, A327S, P329A, D265A 및 D270A는 결합을 감소시켰다. Fc 수용체 IIIA와의 결합을 감소시키는 추가 IgG1 잔기는 당업계에 공지되어 있다. 또한 문헌 [Presta et al., *Biochem. Soc. Trans.* 30:487-490, 2001] 및 미국 특허 번호 제6,194,551호, 제6,737,056호, 제5,624,821호, 및 미국 특허 공개 번호 제20040132101호를 참조하고, 이들은 그 전체가 본원에 참조로써 포함된다.

#### 공유 결합 변형

[0194] 공유 결합 변형을 포함하는 항체 또한 상기 방법에서의 사용을 고려한다. 해당되는 경우, 화학 합성 또는 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 만들어질 수 있다. 항체의 공유 결합 변형의 다른 유형은 선택된 측쇄 또는 N-말단 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 항체의 표적화된 아미노산 잔기를 반응시킴으로써 분자 내로 도입된다.

[0195] 시스테인 잔기는 가장 일반적으로 클로로아세트산 또는 클로로아세트아미드와 같은 α-할로아세테이트(및 상응하는 아민)와 반응하여 카복시메틸 또는 카복시아미도메틸 유도체를 제공한다. 시스테인 잔기는 또한 브로모트리플루오로아세톤, α-브로모-β-(5-이미도조일)프로페온산, 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬말레이미드, 3-나이트로-2-파리딜 디이설파이드, 메틸 2-파리딜 디이설파이드, p-클로로머큐리벤조에이트, 2-클로로머큐리-4-나이트로페놀, 또는 클로로-7-나이트로벤조-2-옥사-1,3-다이아졸과 반응하여 유도된다.

[0196] 다른 변형은 히스티딜, 리시닐 아르기닌, 티로실, 글루타미닐 및 프롤린 및 리신의 아스파라긴 하이드록실화를 포함한다. 이러한 변형의 제조 방법은 본원에 참조로 인용된 미국 특허 번호 제8,926,976호 및 당업계에 개시되어 있다.

[0197] 카복실 측기(아스파딜 또는 글루타밀)는 카보디이미드(R-N.dbd.C.dbd.N-R')(식 중, R 및 R'는 상이한 알킬기임) 예를 들어, 1-사이클로헥실-3-(2-모폴리닐-4-에틸)카보디이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-다이메틸펜틸) 카보디이미드와의 반응에 의해 선택적으로 변형된다. 또한, 아스파딜 및 글루타밀 잔기들은 암모니아 이온과의 반응에 의해서 아스파라기닐 및 글루타미닐 잔기로 전환된다.

- [0199] 기타 변형으로서는, 프롤린과 리신의 하이드록실화, 세릴 또는 트레오닐 잔기들의 하이드록실기의 인산화, 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 알파-아미노기의 메틸화(문헌 [T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)]), N-말단 아민의 아세틸화, 및 임의의 C-말단 카복실기의 아미드화를 포함한다.
- [0200] 공유 결합 변형의 또 다른 유형은 화학적 또는 효소적으로 글리코시드를 항체에 커플링시키는 것을 포함한다. 이들 과정은 N-결합 또는 O-결합 글리코실화를 위한 글리코실화 능력을 갖는 숙주 세포에서 항체의 생산을 요구하지 않는다는 점에서 유리하다. 사용된 커플링 방식에 따라서, 당(들)은 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 유리 카복실기, (c) 유리 설프하이드릴기 예를 들어, 시스테인의 유리 설프하이드릴기, (d) 유리 하이드록실기 예를 들어, 세린, 트레오닌 또는 하이드록시프롤린의 유리 하이드록실기, (e) 방향성 잔기 예를 들어, 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판의 방향성 잔기, 또는 (f) 글루타민의 아미드기에 부착될 수 있다. 이들 방법은 WO 87/05330호 및 문헌 [Aplin 및 Wriston, (*CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981))]에 기재되어 있다.
- [0201] 항체상에 존재하는 임의의 탄수화물 모이어티는 화학적으로 또는 효소적으로 제거될 수 있다. 화학적 탈 글리코실화는 화합물 트라이플루오로메탄설폰산 또는 이와 동등한 화합물에 대한 항체의 노출을 필요로 한다. 이 처리는 항체를 손상시키지 않으면서 결합 당(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈اكت오사민)을 제외한 대부분 또는 모든 당의 절단을 초래한다. 화학적 탈 글리코실화는 문헌 [Hakimuddin, *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 52 (1987)] 및 문헌 [Edge *et al.*, *Anal. Biochem.* 118: 131 (1981)]에 기재되어 있다. 문헌 [Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.* 138:350 (1987)]에 기재된 바와 같이 다양한 엔도-글리코시다제 및 엑소-글리코시다제를 사용하여 항체에 대한 탄수화물 모이어티를 효소적으로 절단할 수 있다.
- [0202] 항체의 공유 결합 변형의 다른 유형은 항체를 다양한 비단백질성 중합체 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸화된 폴리올, 폴리옥시에틸화된 솔비톨, 폴리옥시에틸화된 글루코스, 폴리옥시에틸화된 글리세롤, 폴리옥시알킬렌 또는 텍스트란과 같은 다당류 중 하나와 결합시키는 것을 포함한다. 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있다.
- [0203] **유도체**
- [0204] 전술한 바와 같이, 유도체는 항체 물질 및 폴리펩타이드와 관련하여 사용될 때, 유비퀴틴화, 치료제 또는 진단 제제에 접합, 표지(예컨대, 방사성 핵종 또는 다양한 효소), 폐길화(폴리에틸렌 글리콜에 의한 유도체화)와 같은 공유 결합 중합체 부착 및 오르니틴과 같은 아미노산의 화학적 합성에 의한 삽입 또는 치환과 같은 기술에 의해 화학적으로 변형된 폴리펩타이드를 의미한다. 본원에 개시된 항체의 유도체는 또한 치료제로서 유용하며, 본원의 방법에서 사용될 수 있다.
- [0205] 접합 모이어티는 항체 물질에 공유 결합으로 또는 이온성, 반 데르 발스 또는 수소 결합(예컨대 방사성 뉴클레오타이드 또는 스트렙타비딘에 의해 인식되는 바이오틴이 부착된 뉴클레오타이드의 혼입)을 통해 항체 물질에 혼입되거나 부착될 수 있다.
- [0206] 항체는 가요성 링커, 예컨대,  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 에 의해 IL-2 또는 그의 변이체에 공유 결합으로 부착될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Tomala *et al.*, *ACS Chemical Biology* 8, 871-876 (2013)]을 참조한다.
- [0207] 생체 내에서 더 긴 반감기를 제공하기 위해 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 항체 물질에 부착될 수 있다. PEG 기는 임의의 편리한 분자량일 수 있고 선형 또는 분지형일 수 있다. PEG의 평균 분자량은 바람직하게는 약 2 킬로돌턴("kDa") 내지 약 100 kDa, 보다 바람직하게는 약 5 kDa 내지 약 50 kDa, 가장 바람직하게는 약 5 kDa 내지 약 10 kDa의 범위일 것이다. PEG 기는 일반적으로 항체 물질(예컨대, 알데하이드, 아미노 또는 에스터기)상의 반응기에 대해 PEG 모이어티(예컨대, 알데하이드, 아미노, 싸이올 또는 에스터기)상의 천연 또는 조작된 반응기를 통한 아실화 또는 환원성 알킬화를 통해 본 개시의 항체 물질에 결합될 것이다. PEG 모이어티를 항체 물질에 첨가하는 것은 당업계에 공지된 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 국제 공개 번호 제WO 96/11953호 및 미국 특허 번호 제4,179,337호를 참조한다.
- [0208] 항체 물질과 PEG의 라이제이션은 일반적으로 수성 상에서 일어나며 역상 분석 HPLC로 쉽게 모니터링할 수 있다. 폐길화된 물질을 예비 HPLC로 정제하고 분석용 HPLC, 아미노산 분석 및 레이저 탈착 질량 분광 분석으로 특성화한다.
- [0209] **항체 접합체(Antibody Conjugates)**
- [0210] 항체는 "네이키드(naked)" 또는 비접합 형태로 투여될 수 있거나, 또는 기타 치료제 또는 진단 제제에 직접 접

합될 수 있거나, 또는 그러한 기타 치료제 또는 진단 제제를 포함하는 담체 중합체에 간접적으로 접합될 수 있다.

[0211] 항체는 방사성 동위 원소, (바이오틴, 아비딘 등과 같은) 친화도 표지, (서양고추냉이 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제 등과 같은) 효소 표지, (FITC 또는 로다민 등과 같은) 형광 또는 발광 또는 생물발광 표지, 상자성(paramagnetic) 원자 등의 사용을 통해 탐지가능하게 표지될 수 있다. 이러한 표지를 수행하는 절차는 당업계에 잘 알려져 있다; 예를 들어 문헌 [Sternberger, L.A. et al., *J. Histochem. Cytochem.* 18:315 (1970); Bayer, E.A. et al., *Meth. Enzym.* 62:308 (1979); Engval, E. et al., *Immunol.* 109:129 (1972); Goding, J.W. *J. Immunol. Meth.* 13:215 (1976)]을 참조한다.

[0212] 항체 모이어티의 접합은 미국 특허 번호 제6,306,393호에 기재되어 있다. 일반적인 기술은 또한 문헌 [Shih et al., *Int. J. Cancer* 41:832-839 (1988); Shih et al., *Int. J. Cancer* 46:1101-1106 (1990)]; 및 Shih 등의 미국 특허 번호 제5,057,313호에 개시되어 있다. 이러한 일반적인 방법은 산화된 탄수화물 부분을 갖는 항체 성분을 적어도 하나의 유리 아민 작용기를 가지며 복수의 약물, 독소, 킬레이트화제, 봉소 첨가제, 또는 기타 치료제가 담지된 담체 중합체와 반응시키는 것을 포함한다. 이 반응은 최초 Schiff 염기(이민) 결합을 초래하며, 이는 최종 접합체를 형성하기 위해 2급 아민으로 환원함으로써 안정화될 수 있다.

[0213] 담체 중합체는 예를 들어 적어도 50개의 아미노산 잔기의 아미노렉스트란 또는 폴리펩타이드일 수 있다. 담체 중합체에 약물 또는 기타 제제를 접합시키는 다양한 기술이 당업계에 공지되어 있다. 폴리펩타이드 담체는 아미노렉스트란 대신에 사용될 수 있지만, 폴리펩타이드 담체는 사슬에서 적어도 50개의 아미노산 잔기, 바람직하게는 100~5000개의 아미노산 잔기를 가져야 한다. 아미노산의 적어도 일부는 라이신 잔기 또는 글루탐산 또는 아스파르트산 잔기이어야 한다. 리신 잔기의 펜던트 아민 및 글루타민 및 아스파르트산의 펜던트 카복실레이트는 약물, 면역 조절제, 킬레이트화제, 봉소 첨가제 또는 다른 치료제를 부착하기에 편리하다. 적합한 폴리펩타이드 담체의 예로는 폴리리신, 폴리글루타민산, 폴리아스파르트산, 이들의 공중합체, 및 이들 아미노산과 다른 것, 예컨대 세린의 혼합된 중합체를 포함하여 그 결과 담지된 담체 및 접합체상에 바람직한 용해성을 부여한다. 항체가 접합될 수 있는 제제의 예로는 본원에 기재된 임의의 세포 독성제 또는 화학적 치료제가 포함된다.

[0214] 대안으로, 접합된 항체는 항체 성분을 치료제와 직접 접합시킴으로써 제조될 수 있다. 일반적인 절차는 치료제가 산화된 항체 성분에 직접 부착된다는 것을 제외하고는 접합의 간접 방법과 유사하다. 예를 들어 항체의 탄수화물 모이어티가 폴리에틸렌글리콜에 부착되어 반감기를 연장시킬 수 있다.

[0215] 대안으로, 치료제는 이황화 결합 형성을 통해 또는 N-숙시닐 3-(2-페리딜다이싸이오)프로피오네이트(SPDP)와 같은 혜테로이작용성 가교제를 사용하여 환원된 항체 성분의 헌지 영역에 부착될 수 있다. 문헌 [Yu et al., *Int. J. Cancer* 56:244 (1994)]. 이러한 접합에 대한 일반적인 기술은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어 문헌 [Wong, *Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking* (CRC Press 1991); Upeslasis et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995)]을 참조한다. N-숙신이미딜-3-(2-페리딜다이싸이올)프로피오네이트(SPDP), 이미노티울레인(IT), 이미도에스터의 이작용성 유도체(예컨대, 다이메틸 아디페미테이트 HCL), 활성 에스터(예컨대, 다이숙신이미딜 수베르산), 알데하이드(예컨대, 글루타르알데하이드), 비스-아지도 화합물(예컨대, 비스(p-아지도벤조일)헥세인다이아민), 비스-디아조늄 유도체(예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌다이아민), 다이아이소시아네이트(예컨대, 툴릴렌 2,6-다이아이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오린 화합물(예컨대, 1,5-다이플루오로-2,4-다이나이트로벤젠)과 같이 다양한 이작용성 단백질 커플링제가 당업계에 공지되어 있다.

## 항체의 재조합 생산

[0217] 본원에 기재된 항체를 인코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여(예컨대, 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 단리 및 시퀀싱될 수 있다. 보통 이것은 항체를 인코딩하는 DNA 또는 바람직하게는 mRNA(즉, cDNA)를 클로닝할 것을 요구한다. 클로닝 및 시퀀싱은, 예를 들어 중합효소 연쇄 반응(PCR) (문헌 [Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press; Ausubel, et al. (Eds.), *Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1994)]을 참조하고, 이들은 본원에 참조로서 포함됨)과 같은 표준 기술을 사용하여 수행될 수 있다.

- [0218] 시퀀싱은 표준 기술을 사용하여 수행된다(예컨대, 문헌 [Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, 및 Sanger, F. *et al.* (1977) PNAS 74:5463-5467]을 참조하고, 이는 본원에 참조로서 포함된다). 클로닝된 핵산의 서열을 인간 면역글로불린 유전자 및 cDNA의 공개된 서열과 비교함으로써, 당업자는 시퀀싱된 영역에 따라 (i) 면역글로불린 폴리펩타이드의 생식 세포 절편 사용(중쇄의 아이소타입을 포함함) 및 (ii) N 영역 부가 및 체세포 돌연변이 과정으로부터 기인된 서열을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 서열을 용이하게 결정할 수 있다. 면역글로불린 유전자 서열 정보의 한 가지 출처는 미국 국립 생물공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information), 국립 의학 도서관(National Library of Medicine), 베데스다, 메릴랜드주 국립 보건원(National Institutes of Health)이다.
- [0219] 일단 단리되면, DNA는 발현 벡터에 위치된 후 대장균, 원숭이(simian) COS 세포, 인간 배아 신장 293 세포(예컨대, 293E 세포), 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 달리 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내에 형질감염되어 재조합 숙주 세포에서 단일클론 항체를 합성할 수 있다. 항체의 재조합 생산은 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0220] 항체의 재조합 생산을 위해, 이를 인코딩하는 핵산을 단리하고 추가 클로닝(DNA 증폭) 또는 발현을 위해 복제 가능한 벡터에 삽입한다. 단일클론 항체를 인코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여(예컨대, 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써)를 용이하게 단리 및 시퀀싱된다. 많은 벡터를 사용할 수 있다. 벡터 성분은 일반적으로 이에 제한되지 않지만, 다음 중 하나 이상을 포함한다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 선택 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열, 이들은 당업계에 공지되고 기술되어 있다.
- [0221] 다양한 구현예에서, 서열 번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 또는 16에 기재된 뉴클레오타이드 서열은 본원의 항체 또는 그의 단편을 발현하는 데 유용하다.
- [0222] 일부 구현예에서, 상이한 핵산 분자는 표적 특이적 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 인코딩한다. 다른 구현예에서, 동일한 핵산 분자는 표적 특이적 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 인코딩한다. 하나의 구현예에서, 핵산은 본원에 기재된 핵산에 의해 인코딩된 임의의 폴리펩타이드뿐만 아니라 본 개시의 표적 특이적 항체를 인코딩한다.
- [0223] 하나의 양태에서, 본 개시의 핵산 분자는 서열 번호 9, 11, 13, 또는 15에 기재된 항체 XPA.92.019, XPA.92.041, XPA.92.042 및 XPA.92.099의 VL 아미노산 서열 또는 그 일부를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 관련된 양태에서, VL 아미노산 서열은 컨센서스 서열이다. 일부 구현예에서, 핵산은 상기 항체의 경쇄 CDR의 아미노산 서열을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 상기 부분은 CDR1~CDR3을 포함하는 인접하는 부분이다. 하나의 구현예에서, 상기 부분은 선택적으로 상이한 인간 또는 인간 컨센서스 골격을 가지며, 선택적으로 집합적인 3개의 CDR에서 1개 또는 2개 이하 또는 3개 이하의 돌연변이를 갖는 적어도 하나, 둘 또는 세 개의 영역의 경쇄 CDR1, CDR2 또는 CDR3 영역을 포함한다.
- [0224] 하나의 구현예에서, 본 개시는 서열 번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 또는 15 중 임의의 하나에 기재된 가변 영역 아미노산 서열을 갖는 기능성 단편을 포함하는 항원-결합 화합물을 제공한다. 관련된 구현예에서, 전술한 항원 결합 화합물은 완전히 조립된 사량체 항체, 단일클론 항체 및 인간화 항체; 인간 항체; 키메라 항체; 다중특이적 항체, 항체 단편, Fab, F(ab')2; Fv; scFv 또는 단쇄 항체 단편; 디아바디; 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, 선형 항체; 퀄레이트 재조합 항체, 트리바디 또는 바이바디, 소형 모듈용 면역 약제(SMIP), 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질, 카멜화 항체, VH<sub>H</sub> 함유 항체, 또는 본 개시의 하나 이상의 CDR 서열을 포함하고 원하는 생물학적 활성을 나타내는 이들 항체 중 어느 하나의 변이체 또는 유도체, 또는 둘 이상의 항체의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된다. 본 개시의 항원 결합 화합물은 바람직하게는 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 IL-2에 대해  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-13}$  M 이하의 결합 친화도를 보유한다.
- [0225] 하나의 양태에서, 본 개시의 항체는 도 12a~e에서 짹을 이룬 바와 같이, 각각 서열 번호 1, 3, 5 또는 7의 아미노산 서열 및 서열 번호 9, 11, 13, 또는 15에 기재된 바와 같은 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 항체는 상기 아미노산 서열에서 기재된 항체의 전부 또는 일부를 포함할 수 있음이 또한 고려된다. 하나의 구현예에서, 항체는 도 12a~e에서 짹을 이룬 바와 같이, 서열 번호 17~28의 중쇄의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 중 적어도 하나, 또는 서열 번호 29~40의 경쇄의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0226] 하나의 구현예에서, 중쇄는 중쇄 CDR3 서열로 확인된 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 "중쇄 CDR3 서열"(HCDR3)은 도 12a~e 및 서열 번호 19, 22, 25 또는 28에 개시된 중쇄 CDR3 서열로서 확인된 아미노산 서열을

포함한다. 대안으로, HCDR3 서열은 도 12a~e에서 확인된 임의의 HCDR3 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산 변화(예컨대, 치환, 삽입 또는 결실)를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 치환은 도 12a~e의 또 다른 HCDR3 내의 상응하는 위치에서 아미노산으로의 치환을 포함한다. 대안으로, HCDR3 서열은 본원에 기재된 서열로부터 결정된 바와 같이 HCDR3의 컨센서스 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0227] 전술한 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄는 서열 번호 17, 20, 23 또는 26, 또는 도 12a~e에서 HCDR1로 확인된 임의의 아미노산 서열을 포함하는 "중쇄 CDR1 서열"(HCDR1), 서열 번호 17, 20, 23 또는 26, 또는 도 12a~e에서 확인된 임의의 HCDR1과 비교하여 하나 이상의 아미노산 변화를 함유하는 아미노산 서열, 바람직하게는 도 12a~e의 또 다른 HCDR1 내에서 대응하는 위치의 아미노산으로의 치환, 또는 본원에 기재된 HCDR1의 컨센서스 서열을 더 포함할 수 있다.

[0228] 대안으로, 전술한 HCDR3 서열을 포함하는 중쇄는 서열 번호 18, 21, 24 또는 27 또는 도 12a~e에서 HCDR2로 확인된 임의의 아미노산 서열을 포함하는 "중쇄 CDR2 서열"(HCDR2), 서열 번호 18, 21, 24 또는 27, 또는 도 12a~e에서 확인된 임의의 HCDR2와 비교하여 하나 이상의 아미노산 변화를 함유하는 아미노산 서열, 바람직하게는 도 12a~e의 또 다른 HCDR2 내에서 대응하는 위치의 아미노산으로의 치환, 또는 본원에 기재된 HCDR2의 컨센서스 서열을 더 포함할 수 있다.

[0229] 전술한 중쇄 CDR3 서열을 포함하는 중쇄는 또한 (a) 전술한 중쇄 CDR1 서열 및 (b) 전술한 본 발명의 중쇄 CDR2 서열 모두를 포함할 수 있다.

[0230] 본 개시의 한 양태는 하기 기재된 중쇄 CDR 서열 중 어느 하나, 둘 및/또는 세 개를 포함하는 중쇄를 포함하는 표적 항원에 결합하는 항체를 제공한다.

[0231] 전술한 임의의 중쇄 CDR 서열은 CDR의 어느 한 말단에 부가된 아미노산을 또한 포함할 수 있다. 아미노산 유사체를 함유하는 변이체 또는 유도체의 제조 또는 친화도 성숙을 포함하는, 본 발명의 항체 및 항원-결합 화합물의 변이체 및 유도체의 제조는 본원에 더욱 상세히 기재되어 있다. 예시적인 변이체는 아미노산 서열 내의 상응하는 아미노산의 보존적 또는 비보존적 치환을 함유하는 변이체, 또는 상이한 인간 항체 서열의 대응하는 아미노산으로의 아미노산의 치환을 포함한다.

[0232] 전술한 중쇄 중 어느 하나를 포함하는 항체는 경쇄, 바람직하게는 표적 항원에 결합하는 경쇄, 및 가장 바람직하게는 후술하는 경쇄 CDR 서열을 포함하는 경쇄를 추가로 포함할 수 있다.

[0233] 본 개시의 또 다른 양태는 후술하는 임의의 1개, 2개 및/또는 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 표적 항원에 결합하는 항체를 제공한다.

[0234] 바람직하게는 경쇄는 경쇄 CDR3 서열로 확인된 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 "경쇄 CDR3 서열"(LCDR3)은 도 12a~e 및 서열 번호 31, 34, 37 또는 40 내에서 경쇄 CDR3 서열로서 확인된 아미노산 서열을 포함한다. 대안으로, 경쇄 CDR3 서열은 도 12a~e에서 확인된 임의의 경쇄 CDR3 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산 변화(예컨대, 치환, 삽입 또는 결실)를 함유하는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 치환은 도 12a~e의 또 다른 경쇄 CDR3 내의 상응하는 위치에서 아미노산으로의 치환을 포함한다.

[0235] 전술한 경쇄 CDR3 서열을 포함하는 경쇄는 서열 번호 29, 32, 35 또는 38 또는 도 12a~e에서 경쇄 CDR1로 확인된 임의의 아미노산 서열을 포함하는 "경쇄 CDR1 서열", 서열 번호 29, 32, 35 또는 38, 또는 도 12a~e에서 확인된 임의의 경쇄 CDR1과 비교하여 하나 이상의 아미노산 변화를 함유하는 아미노산 서열, 바람직하게는 도 12a~e의 또 다른 CDR1 내에서 대응하는 위치의 아미노산으로의 치환을 더 포함할 수 있다.

[0236] 대안으로, 전술한 경쇄 CDR3 서열을 포함하는 경쇄는 서열 번호 30, 33, 36 또는 39 또는 도 12a~e에서 경쇄 CDR2로서 확인된 임의의 아미노산 서열을 포함하는 "경쇄 CDR2 서열", 도 12a~e에서 확인된 임의의 경쇄 CDR2와 비교하여 하나 이상의 아미노산 변화를 함유하는 아미노산 서열, 바람직하게는 서열 번호 30, 33, 36 또는 39, 또는 도 12a~e의 또 다른 경쇄 CDR2 내에서 대응하는 위치에서 아미노산으로의 치환을 더 포함할 수 있다.

[0237] 관련된 양태에서, 본 개시는 인간 항체로부터 중쇄 가변 영역의 골격 영역 및 경쇄 가변 영역의 골격 영역을 포함하는 서열 번호 17~28의 HCDR, 또는 서열 번호 29~40의 LCDR 중 적어도 하나를 포함하는 정제된 폴리펩타이드를 고려한다. 또 다른 구현예에서, 중쇄 가변 영역의 골격 영역 및 경쇄 가변 영역의 골격 영역은 상이한 인간 항체 서열에 대해 보다 상동성이 있도록 아미노산 치환에 의해 화학적으로 변형된다. 예를 들어, 각각의 중쇄 골격 영역(H-FR1-4) 내에서, 중쇄 가변 영역 중 적어도 하나, 적어도 두 개, 적어도 세 개, 적어도 네 개, 적어도 다섯 개, 또는 적어도 여섯 개의 천연 골격 영역 잔기는 아미노산 치환에 의해 변형되고, 각 경쇄 골격 영역

(L-FR1-4) 내에서, 경쇄 가변 영역 중 적어도 하나, 적어도 두 개, 적어도 세 개, 적어도 네 개, 적어도 다섯 개 또는 적어도 여섯 개의 친연 골격 잔기는 아미노산 치환에 의해 변형되었다.

[0238] 전술한 경쇄 CDR3 서열을 포함하는 경쇄는 또한 (a) 전술한 경쇄 CDR1 서열 및 (b) 전술한 경쇄 CDR2 서열 모두를 포함할 수 있다.

[0239] 전술한 경쇄 가변 영역 중 임의의 하나를 포함하는 항체는 도 12a~e에 기재된 바와 같이 선택적으로 쌍으로 된 중쇄 가변 영역, 바람직하게는 표적 항원에 결합하는 중쇄 가변 영역, 및 가장 바람직하게는 전술한 중쇄 CDR 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 더 포함할 수 있다.

[0240] 또 다른 구현예에서, 항체는 서열 번호 1, 3, 5 및 7로 이루어진 군에서 선택된 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 9, 11, 13 및 15로 이루어진 군에서 선택된 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0241] 관련 양태에서, 핵산 분자는 서열 번호 9, 11, 13 또는 15 중 어느 하나의 경쇄 아미노산 서열 또는 그의 일부를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 핵산 분자는 서열 번호 10, 12, 14 또는 16 중 어느 하나의 경쇄 뉴클레오타이드 서열, 또는 그의 일부를 포함한다. 본 개시의 핵산 분자는 서열 번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 또는 16의 서열을 포함하는 모든 핵산 서열을 추가로 포함하고, 핵산 서열은 본원에 기재된 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열 또는 본원에 기재된 임의의 HCDR 또는 LCDR을 인코딩하고, 서열 번호 17~28 및 29~40에 기재된 바와 같은 유전자 암호의 다양성에 기반하여 동의 코돈뿐만 아니라 본원에 기재된 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열 또는 본원에 기재된 임의의 HCDR 또는 LCDR을 인코딩하고, 서열 번호 17~28 및 29~40에 기재된 바와 같은 핵산 서열에 본원에 기재된 바와 같은 고도로 염격한 조건하에서 혼성화하는 핵산을 포함한다.

[0242] 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열 번호 9, 11, 13 또는 15에 기재된 VL 아미노산 서열에 적어도 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 97, 98 또는 99% 동일한 VL 아미노산 서열을 인코딩한다. 본 개시의 핵산 분자는 서열 번호 9, 11, 13 또는 15의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열에 본원에 기재된 바와 같은 고도로 염격한 조건하에서 혼성화하거나, 또는 서열 번호 10, 12, 14 또는 16의 경쇄 가변 영역 핵산 서열을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0243] 본 개시의 핵산 분자는 항체 XPA.92.019, XPA.92.041, XPA.92.042 및 XPA.92.099 중 어느 하나 또는 그 일부의 VH 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것으로 또한 고려된다. 일부 구현예에서, 핵산은 상기 항체의 중쇄 CDR의 아미노산 서열을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 상기 부분은 중쇄 CDR1~CDR3을 포함하는 인접한 부분이다. 하나의 구현예에서, 상기 부분은 선택적으로 상이한 인간 또는 인간 컨센서스 골격을 가지며, 집합적인 3개의 CDR에서 1개 또는 2개 이하 또는 3개 이하의 돌연변이를 갖는 적어도 하나, 둘 또는 세 개의 영역의 중쇄 CDR1, CDR2 또는 CDR3 영역을 포함한다.

[0244] 관련된 양태에서, 핵산 분자는 서열 번호 1, 3, 5 또는 7의 중쇄 중 하나의 중쇄 아미노산 서열 또는 그의 일부를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 핵산 분자는 서열 번호 2, 4, 6 또는 8의 중쇄 뉴클레오타이드 서열 또는 그의 일부를 포함한다.

[0245] 일부 구현예에서, 핵산 분자는 서열 번호 1, 3, 5 또는 7에 기재된 VH 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 VH 아미노산 서열을 인코딩한다. 관련된 양태에서, VH 아미노산 서열은 컨센서스 서열이다. 본 개시의 핵산 분자는 서열 번호 1, 3, 5 또는 7의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열에 본원에 기재된 바와 같은 고도로 염격한 조건하에서 혼성화하거나 또는 서열 번호 2, 4, 6 또는 8 중 어느 하나의 중쇄 가변 영역 핵산 서열을 더 포함한다.

[0246] 본 개시의 핵산은 XPA.92.019, XPA.92.041, XPA.92.042 및 XPA.92.099로부터 선택되는 항체의 전장 경쇄 또는 중쇄를 인코딩할 수 있으며, 전장 경쇄 또는 전장 중쇄는 경쇄 불변 영역 또는 중쇄 불변 영역을 각각 포함하고, 경쇄 불변 영역은 선택적으로 비변형 또는 변형된 카파 또는 람다 영역을 포함하고, 중쇄 불변 영역은 임의의 부류의 비변형 또는 변형 불변 영역, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD 또는 IgE를 포함한다.

[0247] 하나의 양태에서, 전장 가변 경쇄 항체는 서열 번호 9, 11, 13 또는 15에 기재된 서열을 포함한다. 전장 경쇄를 인코딩하는 뉴클레오타이드는 서열 번호 9, 11, 13 또는 15에 기재된 서열을 인코딩하고 서열 번호 10, 12, 14 또는 16에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것으로 고려된다.

[0248] 하나의 양태에서, 전장 가변 중쇄 항체는 서열 번호 1, 3, 5 또는 7 중 어느 하나의 서열을 포함한다. 전장 중쇄를 인코딩하는 뉴클레오타이드는 서열 번호 1, 3, 5 또는 7의 서열 중쇄를 인코딩하고, 서열 번호 2, 4, 6 또

는 8 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오파이드 서열을 포함하는 것으로 고려된다.

- [0249] 추가 구현예에서, 본 개시는 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역을 포함하는 IL-2에 결합하는 항체를 제공하되, (a) 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호 29, 32, 35, 또는 38, 또는 이와 80% 이상 동일한 서열에서 선택된 적어도 CDR1, 서열 번호 30, 33, 36, 또는 39, 또는 이와 80% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR2, 및/또는 서열 번호 31, 34, 37 또는 40, 또는 이와 80% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR3을 포함하고/하거나, (b) 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 17, 20, 23 또는 26, 또는 이와 80% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR1, 서열 번호 18, 21, 24, 또는 27, 또는 이와 80% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR2, 및/또는 서열 번호 19, 22, 25, 또는 28, 또는 이와 80% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR3을 포함한다.
- [0250] 관련 구현예에서, 경쇄 가변 영역은 서열 번호 29, 32, 35, 또는 38, 또는 이와 90% 이상 동일한 서열에서 선택된 적어도 CDR1, 서열 번호 30, 33, 36, 또는 39, 또는 이와 90% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR2, 및 서열 번호 31, 34, 37 또는 40, 또는 이와 90% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR3을 포함하고/하거나, 중쇄 가변 영역은 서열 번호 17, 20, 23 또는 26, 또는 이와 90% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR1, 서열 번호 18, 21, 24, 또는 27, 또는 이와 90% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR2, 및 서열 번호 19, 22, 25, 또는 28, 또는 이와 90% 이상 동일한 서열에서 선택된 CDR3을 포함한다.
- [0251] 예시적인 구현예에서, 본 개시의 항체는 인간 카파( $\kappa$ ) 또는 인간 람다( $\lambda$ ) 경쇄 또는 이로부터 유래된 아미노산 서열, 또는 인간 중쇄 또는 그로부터 유래된 서열, 또는 단일 사슬, 이량체, 사량체 또는 다른 형태로 중쇄 및 경쇄 모두 함께 포함한다.
- [0252] 본원에서 벡터에서 DNA를 클로닝 또는 발현시키기 위한 적합한 숙주 세포는 전술한 원핵 생물, 효모 또는 고등 진핵 생물이다. 이 목적으로 적합한 원핵 생물은 그램 음성 또는 그램 양성 생물체와 같은 진정 세균을, 예를 들어, 대장균속(예컨대, *E. coli*), 엔테로박터속, 에르비니아균속(*Erwinia*), 클렙시엘라속(*Klebsiella*), 프로테우스속(*Proteus*), 살모넬라속(*Salmonella*)(예컨대, 살모넬라 타이피류리움(*Salmonella typhimurium*)), 세라티아(*Serratia*)(예컨대, 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescans*)) 및 시겔라(*Shigella*)와 같은 장내 세균뿐만 아니라 고초균 및 *B. 리체니포르미스*(*licheniformis*)와 같은 바실러스(예컨대, 1989년 4월 12일 출간된 DD 266,710에 개시된 *B. 리체니포르미스* 41 P), 녹농균과 같은 슈도모나스(*Pseudomonas*) 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)를 포함한다. 하나의 *E. coli* 클로닝 숙주는 *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537) 및 *E. coli* W3110(ATCC 27,325)과 같은 다른 균주가 적합하지만, *E. coli* 294(ATCC 31,446)이다. 이들 예는 제한적인 것이라기 보다는 예시적인 것이다.
- [0253] 원핵 생물 이외에, 사상 균류 또는 효모와 같은 진핵 미생물은 항체-인코딩 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세례비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 일반적인 베이커 효모는 하부의 진핵 생물 숙주 미생물 중에서 가장 일반적으로 사용된다. 그러나, 예를 들어 스키조사카로마이세스 품베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로마이세스 숙주 예컨대, *K. 락티스*(*K. lactis*), *K. 프라질리스*(*K. fragilis*)(ATCC 12,424), *K. 불가리쿠스*(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045), *K. 위커하미*(*K. wickerhamii*)(ATCC 24,178), *K. 왈티*(*K. waltii*) (ATCC 56,500), *K. 드로소필라룸*(*K. drosophilae*) (ATCC 36,906), *K. 써모톨레란스*(*K. thermotolerans*), 및 *K. 마르시아누스*(*K. marxianus*); 야로위아(yarrowia) (EP 402,226); 페치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) (EP 183,070); 칸디다(*Candida*); 트리코데르마 리제이(*Trichoderma reesiae*) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 슈완니오마이세스(*Schwanniomyces*), 예컨대, 슈완니오마이세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 사상 진균, 예컨대, 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*), 및 아스페질러스(*Aspergillus*) 숙주, 예컨대, *A. 니둘란스*(*A. nidulans*) 및 *A. 니거*(*A. niger*)와 같은 다수의 다른 속, 종, 및 균주가 일반적으로 이용가능하며, 본원에서 유용하다.
- [0254] 글리코실화 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 생물 유래이다. 무척추 동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 다수의 배클로바이러스 균주 및 변이체, 및 숙주, 예컨대, 스포돕프테라 푸르기페다(*Spodoptera frugiperda*) (애벌레), 아에데스 아에기프티(*Aedes aegypti*) (모기), 아에데스 알보피크투스(*Aedes albopictus*) (모기), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*) (초파리), 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*)로부터의 상응하는 허용 곤충 숙주 세포가 확인되어 있다. 형질감염용으로서 다양한 바이러스 균주가 공개적으로 이용가능하며, 그 예로는 오토그래파 캘리포니카(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체, 및 봄빅스 모리 NPV의 *Bm-5* 균주가 있으며, 상기 바이러스는 본원에서 본 출원에 따른 바이러스로서, 특히, 스포돕프테라 푸르기페다 세포의 형질감염을 위한 것으로서 사용될 수 있다.

- [0255] 목화, 옥수수, 감자, 대두, 페루니아, 토마토, 및 담배, 템나(lemna) 및 다른 식물 세포의 식물 세포 배양물 또한 숙주로서 사용될 수 있다.
- [0256] 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 CHOK1 세포(ATCC CCL61), DXB-11, DG-44, 및 차이니즈 햄스터 난소 세포 /-DHF을 포함하는 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO, 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]) ; SV40에 의해 형질 전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주(현탁 배양물 중에서의 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59, 1977]); 새끼 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 마우스 세르톨리 세포(TM4, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251, 1980]); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 베팔로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포(문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 세포주(Hep G2)가 있다.
- [0257] 숙주 세포는 항체 생산을 위한 전술한 발현 또는 클로닝 벡터로 형질 전환 또는 형질 감염되고, 프로모터를 유도하고, 형질 전환체를 선별하거나, 또는 원하는 서열을 인코딩하는 유전자를 증폭시키는 데 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양된다. 또한, 선별 마커에 의해 분리된 전사 단위의 다중 카페를 갖는 신규한 벡터 및 형질 감염된 세포주는 표적에 결합하는 항체의 발현에 특히 유용하고 바람직하다.
- [0258] 재조합 기술을 사용할 때, 항체는 세포 내, 세포질 주위 공간에서 생성되거나 미생물배양을 포함하여 배지로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생성되면, 제1 단계로서, 예를 들어 원심 분리 또는 한외 여과에 의해 숙주 세포 또는 용해된 단편의 미립자 잔해가 제거된다. 문헌 [Better et al. Science 240 : 1041-43, 1988, ICSU Short Reports 10 : 105 (1990) 및 PNAS 90 : 457-461 (1993)]에는 E. 콜라이의 세포질 주위 공간으로 분비되는 항체를 단리하는 절차가 기술되어 있다. 또한, 문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]을 참조한다.
- [0259] 대안으로, 항체는 원핵 생물 또는 진핵 생물의 시험관 내 번역을 사용하여 무세포계에서 합성될 수 있다(문헌 [Stech 및 Kubick, Antibodies 4:12-33, 2015]을 참조한다).
- [0260] 항체 조성물은 예를 들어 하이드록실아파타이트 크로마토그래피 양이온 또는 조류 교환 크로마토그래피 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있으며, 친화성 크로마토그래피는 잘 알려진 정제기술이다. 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 종 및 아이소타입에 달려있다. 단백질 A는 인간  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2 또는  $\gamma$ 4 중쇄를 기반으로 하는 항체를 정제하는 데 사용될 수 있다(문헌 [Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13, 1983]). 단백질 G는 모든 마우스 아이소타입 및 인간  $\gamma$ 3에 대해 권장된다(문헌 [Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)]). 친화성 리간드가 부착된 매트릭스는 가장 흔히 아가로오스지만, 기타 매트릭스도 이용 가능하다. 제어된 공극 유리 또는 폴리(스타이렌다이바이닐)벤젠과 같은 기계적으로 안정한 매트릭스는 아가로오스로 달성될 수 있는 것보다 빠른 유속 및 짧은 처리 시간을 가능하게 한다. 항체가 CH 3 도메인을 포함하는 경우, Bakerbond ABX™ 수지(문헌 [J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.])는 정제에 유용하다. 이온 교환 칼럼에서의 분별, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지(예컨대, 폴리아스파르트산 칼럼)에서의 헤파린 SEPHAROSE® 크로마토그래피에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱(chromatofocusing) SDS-PAGE 및 황산 암모늄 침전은 또한 회수될 항체에 따라 이용 가능하다.
- [0261] 하나의 구현예에서, IL-2 항체는 전체가 참조로서 포함된, 문헌 [Bergamaschi et al., JBC 283(7), 4189-4199 (2007) 및 Gaston et al., PLoS One. 27;8(11):e81768 (2013)]에 IL-15/IL-15R 복합체에 대해 기재된 방법을 사용하여 IL-2 단독으로 또는 동시에 발현될 수 있다. 예를 들어, IL-2 및 IL-2 항체는 단일 플라스미드 또는 다중 플라스미드상의 동일한 세포 유형의 플라스미드상에 동시 발현될 수 있고, 생산 중 재조합 발현 단계 동안 복합체화될 수 있다. 또는 IL-2 및 IL-2 항체는 상이한 세포에서 발현된 후, 별도의 단계로 함께 복합체화된다.
- [0262] **스크리닝 방법**
- [0263] 효과적인 치료제는 중대한 독성이 없는 효과적인 제제를 확인하는 것에 달려있다. 항체는 당업계에 공지된 방법에 의해 결합 친화도에 대해 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, 젤 이동 분석, 웨스턴 븍릿, 방사성 표지 경쟁 분석, 크로마토그래피에 의한 공분획화, 공동 침전, 가교 결합, ELISA, 표면 플라스몬 공명, KinExA 등이 사용될 수 있으며, 예를 들어 그 전체가 본원에 참조로서 포함된, 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology

(1999) John Wiley & Sons, NY]에 기재되어 있다.

- [0264] (예컨대, IL-2 항체에 의한) IL-2 활성의 생물학적 활성 및 조절을 평가하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 중화는 중화 분석에 의해 측정될 수 있고 억제 농도로서 표현되어 50% 최대(IC50) 값을 유도할 수 있다. IC50 값은 제2 분자 또는 세포 활성의 최대 생물학적 반응의 반 억제를 유도하는 데 필요한 분자의 농도를 측정함으로써 주어진 분자에 대해 산출될 수 있다. IC50이 낮을수록 원하는 단백질 활성을 저해하는 분자의 효능이 커진다.
- [0265] 유동 세포 분석법에 의한 IL-2 항체 스크리닝
- [0266] 인간 IL-2 수용체 R $\alpha$  또는 R $\beta$  및  $\gamma$ c에 결합하는 IL-2 항체는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 인간 IL-2 수용체 IL-2 R $\alpha$ , IL-2 R $\beta$  또는 R $\beta$  및  $\gamma$ c를 자연적으로 포함하거나 발현하도록 조작된 세포의 유동 세포 분석법 스크리닝에 의해 평가될 수 있다.
- [0267] IL-2 유도 증식의 IL-2 항체 조절
- [0268] 발광 세포 생존능 분석을 사용하여 IL-2 R $\alpha$  상호작용을 주로 차단하는 항체의 세포 증식에 대한 영향을 포함하는, 상이한 IL-2 수용체 복합체(IL-2 R $\alpha\beta\gamma$  또는 IL-2 R $\beta\gamma$ )를 발현하는 세포의 IL-2 유도 증식의 IL-2 항체 조절을 평가. 예를 들어, 활성은 증식 분석에 의해 측정될 수 있으며 EC50(최대 50%로 유도하는 유효 농도) 값으로 표시된다. EC50 값은 최대 생물학적 반응의 반을 이끌어내기 위해 필요한 분자의 농도를 결정함으로써 주어진 분자에 대해 산출될 수 있다. EC50이 낮을수록 원하는 활성을 이끌어낼 수 있는 분자의 효능이 커진다.
- [0269] IL-2 유도 STAT5 인산화
- [0270] IL-2 항체에 의한 IL-2 활성의 조절은 상이한 IL-2 수용체 복합체(IL-2 R $\alpha\beta\gamma$  또는 IL-2 R $\beta\gamma$ )를 발현하는 세포에서 하류 전사 인자 STAT5(Signal Transducer and Activator of Transcription 5)의 IL-2 유도 활성의 측정함으로써 평가될 수 있다. 다양한 투여량의 IL-2 및 항-IL-2 항체는 상이한 IL-2 수용체 복합체를 발현하는 세포에 첨가하기 전에 미리 복합체화될 수 있다. 인산화된(활성화된, pSTAT5) 및 총 레벨의 STAT5는 면역 분석법에 의해 측정되고, 인산화된 STAT5의 백분율이 산출된다. 전술한 바와 같이 EC50 및 IC50 값이 산출될 수 있다.
- [0271] 당업계에 공지된 IL-2 활성을 평가하는 다른 방법을 사용하여 본원에서 항체의 생물학적 효과를 분석할 수 있다. IL-2는 마우스 또는 기타 포유 동물에 투여될 수 있으며, 효과기, 보조, 조절 T 세포, NK 세포 또는 수지상 세포와 같은 면역 세포의 빈도 또는 활성을 측정함으로써 그 활성이 분석될 수 있다.
- [0272] IL-2의 활성은 또한 그랜자임 B의 상향 조절 또는 IL-2 반응성 세포에서 인터페론 감마를 분비하는 증가된 능력을 모니터링함으로써 측정될 수 있다. IL-2 활성은 또한 IL-2 반응 세포에서의 KI67 검출에 의해 측정될 수 있다. 마우스에서 BRDU는 동물에게 주사될 수 있으며, IL-2 반응 세포에 BRDU의 혼입이 측정된다. 마우스에서 CD44hi 또는 CD25hi가 되는 CD8+ 또는 CD4+ T 세포의 빈도는 IL-2 활성의 척도이다. 이를 분석을 수행하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.
- [0273] 병용 요법
- [0274] 본 개시의 IL-2 항체는 제2 제제와 함께 투여될 수 있으며, 상기 조합물은 본원에 기재된 질환 또는 장애를 치료하는 데 유용할 수 있다. IL-2에 대한 항체의 사용의 경우, 하나 초과의 IL-2 항체가 각각의 표적 항원에 결합하는 데 효과적인 경우, 항체의 조합은 치료 받을 질환 또는 장애에 대해 여전히 더 개선된 효능을 제공하도록 표적 항원의 상이한 에피토프에 대한 2개 이상의 항체가 혼합될 수 있음이 고려된다. 본 발명의 하나 이상의 항체를 포함하는 조성물은 IL-2 또는 IL-2 R과 관련된 질환 또는 장애를 앓고 있거나 고통을 받기 쉬운 사람 또는 포유 동물에게 투여될 수 있다.
- [0275] 두 개 치료제의 동시 투여는 제제가 치료 효과를 발휘하는 기간에 중첩이 존재하는 한, 제제를 동시에 또는 동일한 경로로 투여할 것을 요구하지 않는다. 동시 또는 순차 투여가 고려되며, 다른 날 또는 주간의 투여가 고려된다.
- [0276] 대안으로, 제2 제제는 기타 치료제, 예컨대 사이토카인, 성장 인자, 억제제 및 기타 표적 항원에 대한 항체일 수 있다.
- [0277] 본 개시의 치료제는 동일한 제형으로 동시에 투여될 수 있음이 고려된다. 서로 30분 이내에 투여된 제제를 동시에 지칭하는, 제제는 별도의 제형으로 투여되고 동시에 투여되는 것이 또한 고려된다. 제2 제제가 동시에 투여

될 수 있음이 또한 고려된다.

[0278] 또 다른 양태에서, IL-2에 대한 항체는 기타 조성물의 투여 전에 투여된다. 사전 투여는 기타 제제 투여 30분 전까지 기타 제제로 치료하기 1주 전 범위 내의 항체 투여를 의미한다. 제제가 또 다른 조성물 또는 제제의 투여 후에 투여되는 것이 또한 고려된다. 후속 투여는 항체 치료 30분 후부터 항체 투여 후 1주일까지, 예컨대 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 1일, 2일 등의 투여를 기술한 것을 의미한다. 제2 제제는 이러한 방식으로 IL-2 항체의 투여 전 또는 투여 후에 투여될 수 있다.

[0279] 적절한 경우, 다른 보조 요법이 투여될 수 있음이 또한 고려된다. 예를 들어, 환자에게 또한 외과적 치료법, 화학 치료법, 세포 독성 제제, 광역학 요법, 면역 조절 또는 방사선 요법이 적절하게 집행될 수 있다.

[0280] 본원에서 항체가 예를 들어 제2 제제가 사이토카인 또는 성장 인자 또는 화학 치료제인 제2 제제와 함께 투여될 때, 투여는 또한 방사선 요법제 또는 방사선 요법의 사용을 포함하는 것이 고려된다. 항체 조성물과 조합하여 투여되는 방사선 요법은 치료 의사가 결정한 바와 같이, 그리고 암 치료를 받는 환자에게 전형적으로 주어진 투여량으로 투여된다.

[0281] 세포 독성제는 세포의 기능을 억제하거나 예방하고/하거나 세포의 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 이 용어는 방사성 동위 원소(예컨대, I131, I125, Y90 및 Re186), 화학 치료제 및 박테리아, 진균류, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소 또는 합성 독소 또는 그 단편과 같은 독소를 포함하려는 것이다. 비세포 독성제는 세포의 기능을 억제하지 않거나 예방하지 않고/않거나 세포 파괴를 일으키지 않는 물질을 지칭한다. 비세포 독성제는 세포 독성으로 활성화될 수 있는 제제를 포함할 수 있다. 비세포 독성제는 비드, 리포솜, 매트릭스 또는 입자를 포함할 수 있다(예컨대, 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 공개 제2003/0028071호 및 제2003/0032995호 참조). 이러한 제제는 본 개시에 따른 항체와 접합, 커플링, 연결 또는 결합될 수 있다.

[0282] 하나의 구현예에서, 제2 제제는 체크포인트 억제제(예컨대, 항-PDL-1 항체, 항-CTLA-4 항체, PD-1 억제제 또는 PDL-1 억제제 PD-1)이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 IL-2 항체는 키메라 항원 수용체 T 세포/종양-침윤 램프구(CART/TIL) 요법 또는 제제와 조합될 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 IL-2 항체는 백신 요법과 조합될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 개시의 IL-2 항체는 종양 특이적 항원을 표적으로 하는 다른 항체 또는 제제와 조합될 수 있다.

[0283] 키메라 항원 수용체(CAR)는 종양 특이적 항체의 (scFv) 세포외 도메인으로 이루어진 수용체 복합체로 형질 변환된 CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 팽창에 의해 생성되며, CD4+ 또는 CD8+의 힌지 및 막 관통성 도메인을 통해 세포질 신호 전달 영역에 연결된다(문헌 [Haji-Fatahaliha *et al.*, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 44:1339-1349(2016)]). 일부 CAR은 이들 세포에 큰 세포 독성 활성을 부여할 수 있는 상호 자극적 신호 전달 도메인(예컨대, CD28, OX40, 또는 41BB)을 발현하도록 조작되었다.

[0284] 종양 침윤성 램프구(TIL)는 전형적으로 새로운 종양 샘플 또는 혈액으로부터 분리된 CD4+ 또는 CD8+ T 세포이며, IL-2로 확장된 후 샘플을 제공한 환자에게 정맥 내로 주입된다. 선택적으로, 종양항원 특이적 CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 확장은 하나 이상의 종양 항원이 로딩된 APC를 사용하여 수행된다. 세포 주입 후, TIL의 활성을 유지하기 위해 환자에게 종종 IL-2(고농도 또는 저용량)를 투여한다(문헌 [Nayar *et al.*, *Oncology Immunology* 4(4), e1002720 (2015)]). 또 다른 방법으로, T 세포는 선택된 종양 항원에 특이적인 수용체로 형질 도입된다. 이 방법은 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 복용한 후, 선택된 종양 항원에 특이적인 TCR로 T 세포를 변환시키고 이들 세포를 확장시키는 것을 포함한다.

[0285] 일부 구현예에서, IL-2 항체는 IL-2 또는 IL-2 변이체와 함께 투여된다. 다양한 구현예에서, 항체는 투여하기 전에 IL-2와 복합체화될 수 있거나, IL-2 및 IL-2 항체를 본원에 기재된 바와 같이 조합하여 투여될 수 있다(문헌 [Garcia-Martinez 및 Leon, *Int'l. Immunol.* 24: 427-446 (2012); Spangler *et al.*, *Immunity*, 42: 815-825; Arenas-Ramirez *et al.*, *Trends in Immunol.* 36: 763-777]). 항체가 IL-2와 조합하여 투여될 때, IL-2의 양은 사용된 치료 용량, 예컨대 700,000 국제단위(I.U.)/kg (0.04 mg/kg) 미만인 것으로 고려된다. 일부 구현예에서, IL-2는 약 300,000 내지 6,000,000 I.U./kg, 약 250,000 내지 500,000 I.U./kg, 약 100,000 내지 250,000 I.U./kg, 약 10,000 내지 100,000 I.U./kg, 또는 약 1,000 내지 10,000 I.U./kg 또는 약 500 내지 5,000 I.U./kg의 용량으로 투여된다. 다양한 구현예에서, 복합체 중의 IL-2 대 IL-2 항체의 비는 몰비를 기준으로 1:1이다. 다양한 구현예에서, 복합체 중의 IL-2 대 IL-2 항체의 비는 1:1이 아니며, 예를 들어 비는 몰비를 기준으로 약 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10 이상이다. 다양한 구현예에서, IL-2-특이적 항체는 본원에 기재된 XPA.92.019이다.

- [0286] 다양한 구현예에서, IL-2 및 IL-2 항체가 투여 전에 미리 혼합되는 경우, 상기 제제는 매주 2회 함께 투여될 수 있다. 다양한 구현예에서, IL-2는 본원에 기재된 항체의 투여량으로 0.1 내지 10 mg/kg의 투여량으로 투여된다. 다양한 구현예에서, IL-2 항체는 정맥 내 투여된다.
- [0287] IL-2 투약을 IL-2 항체와 관련하여 첨가하는 경우, 예를 들어 동일한 날에 IL-2가 순차적으로 투여되고, 특정 구현예에서, IL-2 항체가 IL-2의 투여 전에 투여되는 것으로 고려된다. 다양한 구현예에서, IL-2 항체는 항체 투여 후에 IL-2의 매주 또는 주당 수회 투여로 매주 투여된다.
- [0288] 다양한 구현예에서, IL-2 항체는 주당 1회 투여되고, IL-2 요법(예컨대, 프로루킨(Proleukin))은 공지된 처방 스케줄에 따라 투여되지만, IL-2보다 낮은 투여량으로 투여된다.
- [0289] 본원의 항체와 IL-2의 조합은 항-종양 약물로서 IL-2의 치료 지수(Therapeutic Index, TI)를 증가시키는 것이 또한 고려된다. 다양한 구현예에서, IL-2의 TI는 본 개시의 항-IL-2 항체와 조합하여 투여될 때, 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배 이상으로 증가된다.
- [0290] IL-2는 항체 투여와 동일한 스케줄로 투여될 수 있거나 또는 IL-2가 항체와 별도로 투여되는 경우, PROLEUKIN®과 같은 기타 IL-2 치료제에 대해 기재된 바와 같이 또는 이전에 사용된 치료 용량과 비교하여 감소된 투여량으로 투여될 수 있다. 현재 권장되는 PROLEUKIN®(알데스루킨) 치료 요법은 매 8시간마다 15분 정맥 내 주입으로 투여된다. 다음 일정은 전이성 신세포 암종(전이성 RCC) 또는 전이성 흑색종을 가진 성인 환자를 치료하는 데 사용되었다. 치료의 각 과정은 휴식 기간에 의해 분리된 두 번의 5일 치료주기로 구성된다. 최대 14회 용량의 15분간 정맥 내 주입으로 8시간마다 600,000 국제단위/kg (0.037 mg/kg)의 용량으로 투여된다. 9일간 휴식을 취한 후, 또 다른 14회 투여를 반복하고, 허용된 대로 주기당 최대 28회 투여를 반복한다. 이 일정은 치료 의사가 필요에 따라 수정될 수 있다. IL-2의 표준 용량과 비교하여 투약이 감소되는 항체와 함께 IL-2가 투여되는 경우에 고려된다. 추가 투약 요법은 또한 상세한 설명에서 하기에 기재된다.
- [0291] 본 개시의 항체와 함께 사용하기 위한 것으로 간주되지만 이에 제한되지 않는 화학 치료제 및 기타 제제는 표 1에 열거된 것들을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0292]

표 1: 화학 치료제 및 기타 제제

<u>알킬화제</u>	<u>천연물</u>
<u>질소 머스타드</u>	<u>유사분열 억제제</u>
메클로레타민	탈산
사이클로포스파마이드	파클리 탁셀
아이포스파마이드	빈 카 알칼로이드
멜팔란	빈 블라스틴 (VLB)
클로람부실	빈 크리스틴
<u>나이트로소우레아</u>	비노렐빈
카무스틴 (BCNU)	탁소텔® (도세탁셀)
로무스틴 (CCNU)	에스트라무스틴
세무스틴 (메틸-CCNU)	에스트라무스틴 인 산염
<u>에틸렌이민/메틸-멜라민</u>	<u>에피포도필로톡신</u>
트라이에틸렌멜라민 (TEM)	에토포시드
트라이에틸렌 싸이오포스포라마이드 (싸이오텐파)	테니포시드
헥사메틸멜라민 (HMM, 알트레타민)	<u>항생제</u>
<u>알킬 설폰산염</u>	액티모마이신 D
부설판	다우노마이신 (루비도-마이신)
<u>트라이아진</u>	독소루비신 (아드리아-마이신)
다카바진 (DTIC)	마이토잔트론이 다루비신
<u>항대사성 물질</u>	블레오마이신
<u>엽산 유사체</u>	스플리카마이신 (미트라마이신)
메토트렉세이트	미토마이신 C
트라이 메트렉세이트	닥티노마이신
페메트렉시드 (다중 표적 항암제)	아파디콜린
<u>파리미딘 유사체</u>	<u>효소</u>
5-플루오로우라실	L-아스파라기나이제
플루오로데옥시우리딘	L-아르기나이제
펩시타빈	
사이토신 아라비노사이드 (AraC, 사이타라빈)	<u>방사선 증감제</u>
5-아자시티딘	메트로니다졸
2,2'-다이플루오로데옥시-시티딘	미소니다졸
<u>퓨린 유사체</u>	데스메틸미소니다졸
6-페르캅토퓨린	피모니다졸
6-싸이오구아닌	에타니다졸
	니모라졸
	RSU 1069
	E09
	RB 6145
	SR4233
	니코틴아마이드
	5-브로모데오지우리딘

[0293]

아자싸이 오프린 2'-데옥시 코포마이신 (펜토스타틴) 에리스로하이드록시 노닐-아데닌 (EHNA) 플루다라빈 인산염 2-클로로데옥시 아데노신 (클라드리빈, 2-CdA)	5-아이 오도데옥시우리딘 브로모데옥시 시티딘
<b>I형 토포아이소머라아제 억제제</b> 캄프토테신 토포테칸 이리노테칸	<b>기타 제제</b> 백금 배위 복합체 시스플라틴 카보플라틴 옥살리플라틴 안트라센디온 미톡산트론  치환된 우레아 하이드록시우레아
<b>생물학적 반응 조절 물질</b> G-CSF GM-CSF	메틸하이드라진 유도체 N-메틸 하이드라진 (MIH) 프로카바진
<b>분화제</b> 레티노산 유도체	<b>부신피질 억제제</b> 마이토테인 ( <i>o, p'</i> -DDD) 아미노글루테티미드
<b>호르몬제 및 길항제</b> 부신 피질 스테로이드제/길항제 프레드니손 및 균등물 덱사메타손 아미노글루테티미드	<b>사이토카인</b> 인터페론(α, β, γ) 인터루킨-2
<b>프로게스틴제</b> 하이드록시프로게스테론 카프로에이트 메드록시 프로게스테론 아세테이트 메게스트롤 아세테이트	<b>감광제</b> 히마토포르피린 유도체 포토프린 ® 벤조포르피린 유도체 Npe6 주석 에티오프로피린 (SnET2) 페오보라이드-a 박테리오클로로필-a 나프탈로시아닌 프탈로시아닌 아연 프탈로시아닌
<b>에스트로겐제</b> 다이에틸 스틸 베스트롤 에티닐 에스트라디올/당량	<b>방사선</b> X-레이 자외선 감마선 가시 광선 적외선 마이크로파 방사선
<b>항에스트로겐제</b> 타목시펜	
<b>안드로겐제</b> 테스토스테론 프로피오네이트 플루옥시메테론/당량	
<b>항안드로겐제</b>	

[0294]

플루타마이드 성선 자극 호르몬 방출 호르몬 유사체 류프롤라이드  <b>비스테로이드성 항안드로겐제</b> 플루타마이드	
--	--

[0295]

## 장애 치료

[0297]

또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 임의 유형의 항체가 상기 방법에서 사용될 수 있다. 예시적인 구현예에서, 표적 특이적 항체는 인간, 키메라 또는 인간화 항체이다. 또 다른 예시적인 구현예에서, 표적은 인간이고 환자는 인간 환자이다. 대안으로, 환자는 표적 특이적 항체가 교차 반응하는 표적 단백질을 발현하는 포유 동물일 수 있다. 항체는 수의학 목적을 위해 또는 인간 질병의 동물 모델로서 항체가 교차 반응하는(예컨대, 영장류) 표적 단백질을 발현하는 비인간 포유 동물에 투여될 수 있다.

- [0298] 하나의 구현예에서, 본 개시는 치료 유효량의 IL-2 항체 또는 본원에서 고려되는 약학 조성물을 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 본원에 기재된 질병, 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0299] 또 다른 구현예에서, 본 개시는 치료 유효량의 항체 또는 본원에서 고려되는 약학 조성물을 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 증가된 IL-2 또는 IL-2 R 발현과 관련된 질병, 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법을 제공한다.
- [0300] 또 다른 구현예에서, 본 개시는 암, 미생물 감염, 천식 및 자가 면역 질환으로 이루어진 군에서 선택된 질병, 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0301] 하나의 구현예에서, 본 개시는 치료 유효량의 IL-2 항체 또는 본원에서 고려되는 약학 조성물을 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하거나 암의 재발을 예방하는 방법을 제공한다.
- [0302] 다양한 구현예에서, 본 개시는 치료 유효량의 항체 또는 본원에서 고려되는 약학 조성물을 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 IL-2-기초 치료법의 하나 이상의 부작용을 완화시키는 방법을 제공한다. 이러한 부작용의 예는 혈관 누출 증후군 및 폐부종, 신장 손상, CNS 손상 및 심장 효과(및 저혈압, 설사, 요량 감소증, 오한, 구토, 호흡 곤란, 발진, 빌리루빈 혈증, 혈소판 감소증, 메스꺼움, 정신 착란, 크레아티닌 증가, 호흡 곤란, 발열, 심장 마비, 심근 경색, 정신병, 폐혈증, SGOT 증가, 혼미, 심실상번맥 및 사망과 같은 증상)를 포함한다.
- [0303] 또한, 치료 유효량의 항체 또는 본원에서 고려되는 약학 조성물을 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 IL-2 요법을 받는 대상에서 유효 IL-2 투여량을 감소시키는 방법이 제공된다. 본원에 기재된 IL-2 항체의 투여는 치료되는 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상을 개선시키는 데 필요한 대상에서의 IL-2의 투여량을 (IL-2 항체 치료가 없을 때 필요한 투여량과 비교하여) 감소시키고, IL-2 치료의 치료 창을 효과적으로 증가시킬 수 있음이 고려된다.
- [0304] 본 개시의 항체(또는 본원에 기재된 제제)로 치료될 수 있는 예시적인 질환 또는 장애는 암들, 예를 들어 식도암, 췌장암, 전이성 췌장암, 췌장의 전이성 선암, 방광암, 위암, 섬유성암, 뇌교종, 악성 뇌교종, 확산 내재성 뇌교종, 재발성 소아 뇌종양, 신세포암종, 투명세포 전이성 신세포 암종, 신장암, 전립선암, 전이성 거세 저항성 전립선 암, 4기 전립선 암, 전이성 흑색종, 흑색종, 악성 흑색종, 피부의 재발성 흑색종, 흑색종 두뇌 전이, IIIA기 피부 흑색종; IIIB기 피부 흑색종, IIIC기 피부 흑색종; IV 기 피부 흑색종, 두경부 악성 흑색종, 폐암, 비소세포 폐암(NSCLC), 편평 세포 비소세포 폐암, 유방암, 재발성 전이성 유방암, 간세포 암종, 호지킨 림프종, 여포성 림프종, 비호지킨 림프종, 진행성 B 세포 NHL, 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL)을 포함한 HL, 다발성 골수종, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 리히터 증후군; 발렌스트롬 마크로글로불린혈증, 성인 교모세포종; 성인 신경아교육종, 재발성 교모세포종, 재발성 소아 횡문근육종, 재발성 유잉 육종(ewing sarcoma)/말초 원시 신경 외배엽 종양, 재발성 신경아세포종; 재발성 골육종, 결장암, 비인두 비각화 암종; 재발성 비인두 미분화 암종, 자궁 경부 선암; 자궁 경부 선편평상피암; 자궁 경부 편평 세포 암종; 재발성 자궁 경부 암종; IVA기 자궁 경부암; IVB기 자궁 경부암, 항문관 편평 세포 암종; 전이성 항문관 암종; 재발성 항문관 암종, 재발성 두경부 암; 두경부 편평 세포 암종(HNSCC), 난소 암종, 대장암, 위암(gastric cancer), 진행성 위장암, 위선암; 위식도 접합부 선암종, 뼈 종양, 연조직 육종; 뼈 육종, 흉선암, 요로 상피세포 암종, 재발성 메르켈 세포 암종; III기 메르켈 세포 암종; IV기 메르켈 세포 암종, 골수이형성 증후군 및 재발성 균상 식육종 및 시자리(Sezary) 증후군으로 이루어진 군에서 선택되는 암을 포함한다. 관련된 양태에서, 본 개시는 치료 유효량의 항체 또는 본원에서 고려되는 약학 조성물을 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법을 제공한다.
- [0305] 특정 구현예에서, 암은 흑색종, 신세포 암종, 림프종, 백혈병, 육종, 유방암, 폐암, 방광암, 대장암, 위암, 비소세포 폐암종(NSCLC), 방광암, 두경부암, 피부암 및 편평 상피 세포 암종(SCC)으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0306] 다양한 구현예에서, 비-IL-2 반응성 종양 유형에 대한 효험이 이제 성장 및/또는 전이 억제에 민감하게 되는, IL-2와 함께 IL-2 항체, 선택적으로 체크포인트 억제제 또는 기타 부속 종양학 요법과 함께 투여하는 단계를 포함하는 질병, 예컨대 암을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0307] 관련된 양태에서 암은 전이성이다. 관련된 양태에서, 전이는 뼈 또는 골격 조직, 간, 폐, 신장 또는 췌장으로의 전이를 포함한다. 본원의 방법은 대상의 종양 크기 또는 종양 부담을 감소시키고/시키거나 대상에서 전이를 감소시키는 것으로 고려된다.

- [0308] 다양한 구현예에서, 상기 방법은 종양 크기를 10%, 20%, 30% 이상 감소시킨다. 다양한 구현예에서, 상기 방법은 종양 크기를 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%까지 감소시킨다.
- [0309] 다양한 구현예에서, 상기 방법은 RECIST(고형 종양에서의 반응 평가 기준) 및 irRC(면역 반응 기준)를 포함하는 분야의 표준 방법론에 의해 정의된 바와 같이, 종양이 성장하고 안정 질환을 유발하는 능력을 감소시킨다.
- [0310] 하나의 구현예에서, 상기 치료를 필요로 하는 동물에서 암의 치료는 IL-2에 대해 특이적인 항체 또는 본원에 기재된 항체를 포함하는 조성물의 유효량을 선택적으로 IL-2와 조합하여 투여하는 것을 포함한다.
- [0311] 본 개시의 방법에 의해 치료 가능한 질환은 포유 동물에서 바람직하게 발생한다. 포유 동물에는 예를 들어 인간 및 다른 영장류뿐만 아니라, 개와 고양이와 같은 애완 동물 또는 동반자 동물, 래트, 마우스 및 토끼와 같은 실험 동물, 그리고 말, 돼지, 양 및 소와 같은 농장 동물이 포함된다.
- [0312] **약학 조성물의 제형**
- [0313] 본 개시의 항체를 인간 또는 시험 동물에 투여하기 위해, 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물로 항체를 제형화하는 것이 바람직하다. "약학적으로 또는 약리학적으로 허용 가능한"이라는 문구는 하기 기재된 바와 같이 당업계에 잘 알려진 경로를 사용하여 투여될 때 알레르기 반응 또는 다른 이상 반응을 일으키지 않는 문자 엔티티 및 조성물을 지칭한다. "약학적으로 허용 가능한 담체"는 임의의 및 모든 임상적으로 유용한 용매, 분산매, 코팅, 항균성 및 항진균성 제제, 등장성 및 흡수 지연성 제제 등을 포함한다.
- [0314] 또한, 화합물은 물 또는 일반적인 유기 용매와 용매화물을 형성할 수 있다. 이러한 용매화물도 또한 고려된다.
- [0315] 항체는 비경구, 피하, 복강 내, 종양 내, 폐 내 및 비강 내를 포함하는 임의의 적합한 수단에 의해 투여되고, 국소 치료를 위해 필요하다면 병소 내 투여로 투여된다. 비경구 주입에는 정맥 내, 동맥 내, 복강 내, 근육 내, 피내 또는 피하 투여가 포함된다. 또한, 항체는 펠스 주입에 의해, 특히 항체의 감소된 투여량으로 적절하게 투여될 수 있다. 투여가 일시적인지 또는 만성적인지에 부분적으로 의존하여 투여가 바람직하게는 주사, 가장 바람직하게는 정맥 내, 근육 내 또는 피하 주사에 의해 제공된다. 국소 투여, 특히 경피 투여, 점막 경유 투여, 직장 투여, 구강 투여 또는 국소 투여, 예컨대, 원하는 부위에 가까이 위치한 카테터를 통한 투여를 포함하는 다른 투여 방법이 고려된다.
- [0316] 본원에 기재된 항체를 유효 성분으로 함유하는 본 개시의 약학 조성물은 투여 경로에 따라 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제를 함유할 수 있다. 이러한 담체 또는 첨가제의 예로는 물, 약학적으로 허용 가능한 유기 용매, 콜라겐, 폴리바이닐 알코올, 폴리바이닐 피롤리돈, 카복시 바이닐 중합체, 카복시메틸셀룰로오스 나트륨, 폴리아크릴 나트륨, 알긴산 나트륨, 수용성 텍스트란, 카복시메틸 전분 나트륨, 펙틴, 메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 잔탄 겸, 아라비아 겸, 카제인, 젤라틴, 한천, 다이글리세린, 글리세린, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 바셀린, 파라핀, 스테아릴 알코올, 스테아르산, 인간 혈청 알부민(HSA), 만니톨, 솔비톨, 락토오스, 약학적으로 허용 가능한 계면 활성제 등이 포함된다. 사용되는 첨가제는 본 개시의 투여 형태에 따라 적절하게는 상기 또는 이들의 조합으로부터 선택되나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0317] 약학 조성물의 제형은 선택된 투여 경로에 따라 달라질 것이다(예컨대, 용액, 에멀젼). 투여될 항체를 포함하는 적절한 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 비히클 또는 담체 내에 제조될 수 있다. 용액 또는 에멀젼의 경우, 적합한 담체는 예를 들어 염수 및 완충된 매질을 포함하는 수성 또는 알코올성/수용액, 에멀젼 또는 혼탁액을 포함한다. 비경구용 비히클은 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 링거 젖산 용액 또는 고정 오일을 포함할 수 있다. 정맥 내 비히클은 다양한 첨가제, 보존제 또는 유체, 영양제 또는 전해질 보충제를 포함할 수 있다.
- [0318] 다양한 수성 담체, 예컨대, 멸균 인산 완충 식염수, 정균수, 물, 완충수, 0.4% 식염수, 0.3% 글라이신 등을 경미한 화학 개질 등을 실시한 알부민, 리포단백질, 글로불린 등과 같은 항상된 안정성의 기타 단백질을 포함할 수 있다.
- [0319] 항체의 치료용 제형은 원하는 순도를 갖는 항체를 임의의 생리학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 저장을 위해 동결 건조 제형 또는 수용액의 형태로 제조된다(문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]). 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수혜자에게 비독성이며, 인산염, 시트르산 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 산화 방지제; (옥타데실다이메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드;

벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 뷰틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀, 사이클로헥산올, 3-펜탄올; 및 m-크레졸과 같은) 방부제; (약 10 잔기 미만의) 저분자량 폴리펩타이드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리바이닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 단당류, 이당류 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 기타 탄수화물; EDTA와 같은 칼레이트제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염-형성 반대 이온; 금속 복합체(예컨대, Zn-단백질 복합체); 및/또는 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온성 계면 활성제를 포함한다.

[0320] 본원의 제형은 또한 치료되는 특정 질후에 필요한 하나 초과의 활성 화합물, 바람직하게는 서로에게 악영향을 미치지 않는 보완 활성을 갖는 활성 화합물을 함유할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 효과적인 양으로 적절하게 조합하여 존재한다.

[0321] 활성 성분은 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀젼, 나노-입자 및 나노캡슐)에서 또는 매크로에멀젼(macroemulsions)에서 예를 들어 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트)마이크로캡슐에 각각 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기재되어 있다.

[0322] 생체 내 투여에 사용되는 제형은 멸균 상태여야 한다. 이는 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.

[0323] 수성 혼탁액은 수성 혼탁액의 제조에 적합한 부형제와 혼합하여 활성 화합물을 함유할 수 있다. 이러한 부형제는 혼탁제, 예를 들어 카복시메틸셀룰로오스 나트륨, 메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 알긴산 나트륨, 폴리바이닐피롤리돈, 트라가칸트 겹 및 아카시아 겹; 분산제 또는 습윤제는 천연 발생 포스파티아이드, 예를 들어 레시틴 또는 알킬렌 옥사이드와 지방산의 축합 생성물, 예를 들어 폴리옥시에틸렌 스테아레이트, 또는 에틸렌 옥사이드와 장쇄 지방족 알코올의 축합 생성물, 예를 들어 헵타데카에틸렌-엔옥시세탄올, 또는 에틸렌 옥사이드와 지방산 및 폴리옥시에틸렌 솔비톨 모노올레아이트와 같은 헥시톨로부터 유도된 부분 에스터와의 축합 생성물, 또는 에틸렌 옥사이드와 지방산 및 헥시톨 무수물, 예를 들어 폴리에틸렌 솔비탄 모노올레아이트로부터 유도된 부분 에스터와의 축합 생성물이 있다. 수성 혼탁액은 또한 하나 이상의 보존제, 예를 들어 에틸 또는 n-프로필, p-하이드록시벤조아이트를 함유할 수 있다.

[0324] 본원에 기재된 항체는 저장을 위해 동결 건조될 수 있고, 사용하기 전에 적당한 담체에서 재구성될 수 있다. 이 기술은 기존의 면역글로불린에서 효과가 있는 것으로 나타났다. 임의의 적합한 동결 건조 및 재구성 기술이 사용될 수 있다. 당업자는 동결 건조 및 재구성이 항체 활성 손실의 정도를 변화시킬 수 있으며, 이를 보완하기 위해 사용 수준을 조정할 필요가 있음을 이해할 것이다.

[0325] 본원에 기재된 IL-2 항체는 하나 이상의 추가 항체와 함께 공제형물로서 제조 및 투여될 수 있다. 하나의 양태에서, 항체 중 적어도 두 개는 상이한 항원을 인식하고 결합한다. 또 다른 양태에서, 복수의 항체 중 적어도 두 개는 동일한 항원의 상이한 에피토프를 특이적으로 인식하고 결합할 수 있다.

[0326] 물을 첨가하여 수성 혼탁액을 제조하기에 적합한 분산 가능한 분말 및 과립은 분산제 또는 습윤제, 혼탁제 및 하나 이상의 보존제와의 혼합물로 활성 화합물을 제공한다. 적합한 분산제 또는 습윤제 및 혼탁제는 이미 전술한 것들로 예시된다.

[0327] 이들 제형 중의 항체 농도는 예를 들어 약 0.5 중량% 미만, 통상적으로 약 1 중량% 또는 약 1 중량% 이상 내지 15 중량% 또는 20 중량%까지 광범위하게 다양할 수 있으며, 주로 체액량, 점도 등에 기초하여 선택된 특정 투여 방식에 따라 선택될 수 있다. 따라서, 비경구 주사를 위한 전형적인 약학 조성물은 1ml의 멸균 완충수 및 50mg의 항체를 함유하도록 제조될 수 있다. 정맥 내 주입을 위한 전형적인 조성물은 250ml의 멸균 렇거액 및 150mg의 항체를 함유하도록 제조될 수 있다. 비경구적으로 투여 가능한 조성물을 제조하기 위한 실제 방법은 당업자에게 공지되거나 명백할 것이며, 예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980)]에 보다 상세히 기재되어 있다. 항체의 유효 투여량은 투여 당 체중 1 kg 당 0.01 mg 내지 1000 mg의 범위이다.

[0328] 약학 조성물은 멸균 주사 가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조용 멸균 주사 가능한 수성, 유성 혼탁액, 분산액 또는 멸균 분말의 형태일 수 있다. 혼탁액은 전술한 적합한 분산제 또는 습윤제 및 혼탁제를 사용하여 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다. 멸균 주사 가능한 제제는 또한 비독성 경구-허용 희석제 또는 용매 중 멸균 주

사 용액 또는 혼탁액, 예를 들어 1,3-부탄 디올의 용액일 수 있다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물 및 식물성 오일, 링거액, 등장성 염화 나트륨 용액을 함유하는 용매 또는 분산매일 수 있다. 또한, 멸균의 고정유가 용매 또는 혼탁 매질로서 통상적으로 사용된다. 이 목적을 위해 합성 모노 또는 다이 글리세라이드를 포함하여 임의의 완하성 지방유가 사용될 수 있다. 또한 올레산과 같은 지방산은 주사제의 제조에 사용된다.

[0329] 모든 경우에 형태는 멸균되어야 하며 용이하게 주사할 수 있는 정도까지 유동적이어야 한다. 적절한 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지 및 계면 활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 그것은 제조 및 저장 조건하에서 무변성이어야 하며, 박테리아 및 진균류와 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 미생물 작용의 예방은 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등과 같은 다양한 항박테리아제 및 항진균제에 의해 야기될 수 있다. 많은 경우에, 당 또는 염화나트륨과 같은 등장 화제를 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사 가능한 조성물의 장시간 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 사용에 의해 야기될 수 있다.

[0330] 투여에 유용한 조성물은 그 효능을 증가시키기 위해 흡수 또는 흡수 증강제와 함께 제형화될 수 있다. 그러한 증강제는 예를 들어, 살리실레이트, 글리코콜레이트/리놀레이트, 글리콜레이트, 아프로티닌, 바시트라신, SDS, 카프레이트 등을 포함한다. 예컨대, 문헌 [Fix, *J. Pharm. Sci.*, 85:1282-1285 (1996)] 및 문헌 [Olaiyai 및 Stella, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32:521-544 (1993)]을 참조한다.

[0331] 항체 조성물은 그의 동족 수용체 또는 리간드에 대한 표적의 결합, 표적 매개 신호전달 등을 포함하는 표적 활성을 조절하는 용도로 고려된다. 특히, 조성물은 실질적으로 부작용이 없는 농도에서 억제 성질을 나타내므로 확장된 치료 프로토콜에 유용하다. 예를 들어, 하나 이상의 기타 제제, 예컨대 IL-2, PD-1 억제제, PD-L1 억제제, CTLA-4 억제제와 항체 조성물의 동시 투여는 치료받는 질환 또는 장애를 유익하게 억제할 수 있으며, 효과적으로 환자의 독성 부작용을 감소시킨다.

[0332] 또한, 본 개시에서 사용하기 위해 고려되는 조성물의 친수성 및 소수성의 특성은 균형이 잘 잡혀있어 시험관 내 및 특히 생체 내 사용 모두에 대한 유용성을 향상시키지만, 이러한 균형이 없는 다른 조성물은 실질적으로 덜 유용하다. 구체적으로, 본 개시에서 사용하기 위해 고려되는 조성물은 수성 매질에서 적절한 용해도를 가지며, 신체에서의 흡수 및 생체 이용률을 허용하면서 화합물이 세포막을 횡단하여 추정 작용 부위로 가도록 허용하는 지질의 용해도를 가진다. 따라서, 고려되는 항체 조성물은 표적 항원 활성 부위로 전달될 수 있을 때 최대로 효과적이다.

### 투여 및 투약

[0334] 하나의 양태에서, 본 개시의 방법은 본원에 기재된 항체를 포함하는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 약학 조성물은 멸균 조성물이다.

[0335] 본 개시의 방법은 주사, 경구 섭취, 비강 내, 국소, 경피, 비경구, 흡입 분무, 질 또는 직장 투여를 포함하지만 이에 한정되지 않는 포유 동물 대상에 직접 또는 간접적으로 치료제를 도입하기 위한 의학적으로 허용되는 임의의 수단을 사용하여 수행된다. 본원에서 사용되는 용어 비경구는 피하, 정맥 내, 근육 내 및 대장 내 주사뿐만 아니라 카테터 또는 주입 기술을 포함한다. 특정 부위에서 피내, 종양 내, 유방 내, 복강 내, 척수강 내, 안구 후, 폐내 주사 및/또는 외과적 이식에 의한 투여가 또한 고려된다.

[0336] 하나의 구현예에서, 투여는 부위 내로의 직접 주사에 의해 또는 제형을 내부적으로 전달할 수 있는 지속 전달 또는 지속 방출 메카니즘을 통해 치료를 필요로 하는 암 또는 발병 조직의 부위에서 수행된다. 예를 들어, 조성물의 지속 전달이 가능한 생분해성 마이크로스피어 또는 캡슐 또는 기타 생분해성 중합체 구성(예컨대, 가용성 폴리펩타이드, 항체 또는 소형 분자)은 암의 주변 또는 암의 부위에 이식된 본 개시의 제형에 포함될 수 있다.

[0337] 치료 조성물은 또한 다수의 부위에서 환자에게 전달될 수 있다. 동시에 다수의 투여가 투여되거나 일정 기간에 걸쳐 투여될 수 있다. 특정 경우에, 치료 조성물의 연속적인 유동을 제공하는 것이 유익하다. 추가 치료법은 일정 기간, 예를 들어, 1주일에 1회, 2주에 1회, 1개월에 2회, 1개월에 1회, 2개월에 1회, 또는 3개월에 1회 또는 더 긴 간격으로 시행될 수 있다.

[0338] 주어진 투여량에서의 항체 조성물의 양은 치료받을 장애의 특성뿐만 아니라 치료법이 시행되는 개체의 크기에 따라 달라질 수 있다. 전형적인 치료에서, 약 1 mg/일, 5 mg/일, 10 mg/일, 20 mg/일, 50 mg/일, 75 mg/일, 100 mg/일, 150 mg/일, 200 mg/일, 250 mg/일, 500 mg/일 또는 1000 mg/일로 투여될 필요성이 있을 수 있다. 이를 농도는 단일 투여 형태 또는 다중 투여량으로 투여될 수 있다. 표준 용량-반응 연구는 먼저 동물

모델에서, 그리고나서 임상 시험에서 특정 질병 상태와 환자 집단에 대한 최적 용량을 밝혀준다.

[0339] 본 개시에서 또한 고려되는 바와 같이, 주어진 투여량에서의 IL-2 항체의 양은 치료받을 장애의 특성뿐만 아니라 치료법이 시행되는 개체의 크기에 따라 달라질 수 있다. 항체 조성물은 질병 진행 또는 허용할 수 없는 독성 까지 1주, 2주 또는 4주마다 30~60분에 걸쳐 정맥 내 주입으로서 매주 2회 0.1 내지 15 mg의 투여량 범위로 투여될 수 있다. 다양한 구현예에서, 항체 조성물은 매주 2회 또는 1주, 2주 또는 4주마다 0.3~30 mg/kg의 투여량 범위로 피하 또는 근육 내 투여될 수 있다. 다양한 구현예에서, 투여량은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 30 mg/kg일 수 있다. 다양한 구현예에서, 항체 조성물은 매주 2회 또는 1주, 2주 또는 4주마다 0.3 내지 3 mg/kg의 투여량 범위로 정맥 내 투여될 수 있다. 대안으로, 항체 조성물은 매주 2회 또는 1주, 2주 또는 4주마다 0.5~5 mg/kg의 투여량 범위로 피하 또는 근육 내 투여될 수 있다.

[0340] 다양한 구현예에서, IL-2가 IL-2 항체와 조합하여 투여될 때, 투여되는 IL-2의 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 1 mg/kg, 또는 약 0.05 내지 0.5 mg/kg의 범위이다. 다양한 구현예에서, IL-2 항체와 조합하여 투여될 때의 IL-2는 약 0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.15 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.75 mg/kg 또는 1.0 mg/kg의 투여량이거나, 또는 투여되는 중량으로 주어질 때는 약 1.0 µg~50 µg, 또는 약 1.0 µg, 3.0 µg, 5.0 µg, 7.5 µg, 10 µg, 12.5 µg, 15 µg, 20 µg, 25 µg, 30 µg, 35 µg, 40 µg 또는 50 µg의 투여량이다. 항-IL2 mAb 투여 범위는 0.05 내지 5 mg/kg일 수 있다. 다양한 구현예에서, IL-2 항체는 약 0.05 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1.0 mg/kg, 1.25 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 2.5 mg/kg, 3.0 mg/kg, 3.5 mg/kg, 4.0 mg/kg, 4.5 mg/kg 또는 5 mg/kg의 용량으로 투여되거나, 또는 투여되는 중량으로 주어질 때는 약 50 mg 내지 1000 mg, 또는 약 30 mg, 50 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 950 mg 또는 1000 mg일 수 있다. 예를 들어, 마우스에 투여된 mAb:IL2의 1:1 몰비는 15ug:1.5ug(즉, 0.75mg/kg:0.075mg/kg)으로 투여될 수 있다. 인간에서의 예시적인 투여 요법은, 미리 혼합된 경우 약 0.1 mg/kg mAb + 0.01 mg/kg IL-2일 수 있거나, 또는 별도로 투여되는 경우 1~5 mg/kg mAb + 0.005 내지 0.05 mg/kg IL-2일 수 있다.

[0341] 추가 치료제가 본 개시의 치료제와 함께 투여되는 경우 투약이 변형될 수 있음이 또한 명백 할 것이다.

#### 키트

[0343] 추가 양태로서, 본 개시물은 본 개시의 방법을 수행하기 위한 그의 사용을 용이하게 하는 방식으로 포장된 하나 이상의 화합물 또는 조성물을 포함하는 키트를 포함한다. 하나의 구현예에서, 이러한 키트는 밀봉된 병이나 용기와 같은 용기에 포장된, 용기에 라벨이 부착되어 있거나 또는 상기 방법을 수행하는 화합물 또는 조성물의 용도를 기술하는 패키지에 포함되어 있는, 본원에 기재된 화합물 또는 조성물을 포함한다. 바람직하게는, 화합물 또는 조성물은 단위 투약 형태로 포장된다. 키트는 특정 투여 경로에 따라 또는 스크리닝 분석을 실시하기 위해 조성물을 투여하기에 적합한 장치를 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는, 키트는 항체 조성물의 용도를 기술하는 라벨을 포함한다.

[0344] 본 개시의 추가 양태 및 세부 사항은 하기 실시예로부터 명백할 것이며, 이는 제한하기보다는 예시하려는 것이다.

#### 실시예

##### 실시예 1: IL-2에 대한 고친화성 항체 패닝

[0347] 바이오틴 시약에 대한 IL-2의 1:10 비율을 사용하는 제조업자의 프로토콜에 따라 EZ-링크 마이크로 NHS-PEG4-바이오틴일화 키트(Pierce, Rockford, IL)를 사용하여 재조합 인간 IL-2(C125A 돌연변이, Reprokine, Rehovot, Israel)를 바이오틴일화하였다.

[0348] 용해성 패닝 방법을 사용하여 단체 Fv(scFv) 파지 디스플레이 라이브러리(XOMA, Berkeley, CA)를 바이오틴일화 IL-2로 패닝하였다. 카파와 람다 서브라이브러리는 별도로 패닝되었다. 파지 패닝의 첫번째 라운드의 경우, 라이브러리의 50X 라이브러리 당량(카파는 약  $7 \times 10^{12}$  cfu이고 람다는 약  $1 \times 10^{13}$ )은 10% 우유/PBS로 1:1 혼합하여 회전하며 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 차단된 파지를 스트렙타비딘-코팅 자성 DYNABEADS® M-280(ThermoFisher)에 첨가하고 45분 동안 회전 배양함으로써 스트렙타비딘에 대한 결합제를 차단된 파지로부터 선택 취소하였다. 선택 취소 단계를 한 번 더 반복하였다. 자석을 사용하여 파지와 비드(bead)를 분리하였다. 선택 취소 단계와 동시에, 200 pmole의 바이오틴일화 IL-2를 실온에서 45분 동안 회전 배양하여 스트렙타비딘-

코팅 자성 DYNABEADS® M-280에 결합되게 하였다. 선택은 자성 스트렙타비딘 비드(서브라이브러리 당 100 pmol)에 결합된 바이오틴일화 IL-2에 선택 취소된 파지를 첨가하고 1.5시간 동안 회전 배양하여 수행하였다. 선택 후, 비결합된 파지를 0.5% 우유/PBS-0.1% TWEEN으로 5분간 비드로부터 3회 세척한 후, 각각 이어서 0.5% 우유/PBS로 추가로 5분 3회 세척하였다. 결합된 파지는 100 mM 트라이에틸아민을 첨가하고 30분 동안 실온에서 회전 배양함으로써 세척 단계 후에 비드로부터 용출되었다. 용출된 파지를 동량의 1M 트리스-HCl(pH 7.4)을 첨가하여 중화시켰다. 이어서, 용출되고 중화된 파지를 50 mL Falcon 튜브(Falcon No 352070)에 수집하여 로그기(log-phase) 성장 TG1+cytFkpA 박테리아 세포(OD600 약 0.5)를 감염시키는 데 사용하였다. 감염은 37°C에서 30분 동안 진탕하지 않고 있었고, 이어서 37°C에서 100 rpm으로 진탕하며 추가로 30분간 배양하였다. 세포를 100 µg/mL 카르베니실린(Carbenicillin), 34 µg/mL 클로람페니콜(Chloramphenicol) 및 2% 글루코스(2YTCCmG) 한천 생물 검정 플레이트가 보충된 2xYT 배지에 도말하고 밤새 30°C에서 배양하여 밤새 잔디 성장을 허용하였다.

[0349]

다음 라운드의 투입물으로 사용하기 위한 제조에서, M13K07 보조 파지를 사용하여 과다 감염에 의해 이전 라운드 배출물의 100배가 구조(rescue)되었다. 이것은 이전 패닝 라운드 배출물에서 금한 세포가 2xYTCCm 배지에 접종하여 수행되었다. OD600nm를 배양 개시에 대해 측정하고 약 0.05의 개시 OD600nm를 반영하도록 조정하였다. 세포가 OD600nm 약 0.5의 로그-성장기에 이를 때까지 진탕하며 37°C에서 성장시켰다. 세포를 37°C에서 30분 동안 진탕하지 않고 감염 다중도(MOI) = 약 20에서 M13K07(New England Biolabs, MA)로 감염시킨 다음, 150 rpm으로 진탕하면서 37°C에서 추가로 30분간 배양하였다. 37°C에서 감염시킨 후, 세포를 펠렛화하고 25 µg/mL 카나마이신(Kanamycin), 100 µg/mL 카르베니실린 및 2% 아라비노스(Arabinose)(2YTCKAra)를 보충한 새로운 2xYT 배지로 옮겼다. 배양은 25°C에서 밤새 성장시켰다. 파지를 원심 분리에 의해 세포 및 잔해로부터 분리하고, 생성된 상등액을 회수하고 다음 패닝 라운드의 투입물로 사용하였다. 선택 농축은 각 패닝 라운드에 사용된 투입량 및 생성된 파지 배출 역가에 의해 모니터링되었다.

[0350]

두 번째 및 세 번째 패닝 라운드에서는 라운드 1에서 따른 동일한 용액상 프로토콜을 다음의 예외를 제외하고 사용하였다. 패닝 라운드 2와 3에서 사용된 파지 투입량은 약  $1.0 \times 10^{10}$  cfu였다. 라운드 2의 경우, 25 및 10 pmole의 바이오틴일화 항원을 선택에 사용하고, 라운드 3의 경우, 10 pmole의 바이오틴일화 항원을 사용하였다. 라운드 2에서, 결합되지 않은 파지를 0.5% 우유/PBS-0.1% TWEEN으로 5분간 비드로부터 5회 세척한 후, 각각 이어서 0.5% 우유/PBS로 추가로 5분 5회 세척하였다. 라운드 3 패닝에서, 비드를 0.5% 우유/PBS-0.1% TWEEN으로 5분간 5회 세척한 다음 0.5% 우유/PBS-0.1% TWEEN으로 3회 빠르게 세척한 다음, 0.5% 우유/PBS로 5분 5회 세척하고 3회 빠르게 세척하였다.

[0351]

### 실시예 2: 세포질 주위 추출물에서의 항체 스크리닝

[0352]

IL-2 결합제를 스크리닝하는 데 사용하기 위해 분비된 항체 단편을 함유하는 박테리아 세포질 주위 추출물(PP-E)을 표준 방법으로 제조하였다. 개별 콜로니를 100 µg/mL 카르베니실린과 0.1% 글루코스 배지가 보충된 2YTC로 채워진 96-웰 플레이트에 집어넣었다. 로그 성장기에 도달할 때까지 배양물을 37°C에서 진탕하며 성장시켰다(OD 600nm=0.5). 이어서, 1 mM IPTG 최종물을 첨가하여 콜로니를 유도하여 가용성 단편 항체를 생성시키고, 25°C에서 밤새 진탕하며 배양하였다. 가용성 단편 항체를 포함하는 PPE는 완전한 EDTA가 없는 프로테아제 저해제 칵테일 정제(Roche, IN)와 함께 1:3 부피비의 얼음 냉각 PPB 용액(Teknova, Hollister, CA)과 이중 증류수(ddH<sub>2</sub>O)를 첨가하는 표준 방법을 사용하여 유도된 세포로부터 제조되었다.

[0353]

### ELISA

[0354]

PPE는 다음과 같이 ELISA에 의해 분석하였다. 384-웰 스트렙타비딘 코팅 플레이트(Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) 또는 384-웰 MaxiSorp(Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY)를 4°C에서 밤새 스트렙타비딘-코팅 플레이트에 대해서는 바이오틴일화 IL-2 (PBS 중 1 µg/mL)로 코팅하였고, MaxiSorp 플레이트 또는 PBS(대조군)에 대해서는 IL-2(PBS 중 1 µg/mL)로 코팅하였다. PPE를 5% BSA/PBS로 1시간 동안 차단한 다음 코팅된 ELISA 플레이트(20 µl/웰)에 첨가하고 실온(RT)에서 1시간 동안 배양하였다. 결합된 scFv 단편을 쥐 항-V5 mAb(Sigma)로 실온에서 1시간 동안 검출한 후에 염소 항-마우스 HRP-접합 항혈청(Thermo Scientific, Rockford, IL)으로 검출하였다. PBS-0.1% TWEEN-20(Teknova, Hollister, CA)로 3번 세척하여 ELISA 스크린의 모든 단계에 따라 수행하였다. 색상은 가용성 3.3', 5.5'-테트라메틸벤지딘(TMB) 기질(KPL) 20 µl/웰로 450 nm 흡광도에서 발색시키고 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20 µl/웰)로 중단시켰다.

[0355]

스트렙타비딘에 의해 포획된 바이오틴일화된 rhIL-2와의 결합에서 백그라운드(background)보다 3배 초과로 측정하였고, 1차 스크리닝에서 스트렙타비딘 단독으로 결합된 백그라운드보다 3배 미만으로 측정한 샘플을 1차 히트

로 지정했다. 1차 적중을 골라서 새로운 플레이트에 재배열하였고, PPE를 제조하고 위와 같은 방법으로 재스크리닝하였다. IL-2의 결합에서 백그라운드보다 3배 초과로 다시 측정하였고 대조 플레이트상의 결합에서 3배 미만으로 측정한 샘플을 2차 히트로 지정했다. 2차 히트를 다시 재배열한 후, 3차 스크린용 플레이트상에 직접 코팅된 rhIL-2상에 ELISA로 PPE를 스크리닝하였다.

[0356] 재구성(*Reformatting*)

[0357] 2차 히트의 DNA 서열을 결정하였고, 3차 스크린에서 결합한 13개의 독특한 클론을 IgG2 포맷으로 재구성하였다. 선택된 히트의 가변 중쇄(VH) 및 경쇄(VL)를 PCR 증폭하고, 항체 불변 영역 서열을 함유하는 플라스미드 벡터에 클로닝하고, 표준 방법을 사용하여 293E 세포에 일시적으로 형질 감염시켜 추가 특성화를 위한 물질을 생성시켰다.

[0358] SPR에 의한 결합

[0359] 예비 운동 결합 분석을 위해, 배양 상등액의 IgG를 ProteOn X100 (Biorad)의 고정화된 항-인간 Fc 표면에 주입하고 rhIL-2 5농도를 주입하거나 전개 완충액(running buffer)(1% BSA를 갖는 HBS-EP+)에 의해 운동 결합 분석을 위한 표준 방법을 사용한다. ProteOn 분석 소프트웨어를 사용하여 친화도는 한 자릿수 내지 두 자릿수의 nM 범위로 추정된다(표 2). 이들 항체가 IL-2 수용체 결합과 경쟁하는지를 결정하기 위해, 두 번째 실험은 가용성 IL-2 R $\beta$  (R&D Systems)가 유사하게 포획된 IgG에 결합된 IL-2에 결합할 수 있는지 여부를 시험하였다. 항체들 중 세 개인 XPA.92.011, XPA.92.012 및 XPA.92.013은 IL-2 R $\beta$ 의 결합을 명백히 허용하는 반면, 다른 10개의 항체에 의해 포획된 IL-2에 대해서는 이러한 결합은 검출되지 않았다.

표 2: 재조합 인간 IL-2(rhIL-2)에 결합한 IL-2 항체 및 SPR에 의해 측정된 IL-2 R $\beta$ .

항체	rhIL-2 친화도 (nM)	R $\beta$ -결합 허용
XPA.92.001	4.9	아니오
XPA.92.002	20.2	아니오
XPA.92.003	3.9	아니오
XPA.92.004	98	아니오
XPA.92.005	5.5	아니오
XPA.92.006	3.5	아니오
XPA.92.007	2.1	아니오
XPA.92.008	3.0	아니오
XPA.92.009	3.3	아니오
XPA.92.010	17	아니오
XPA.92.011	2.3	예
XPA.92.012	27	예
XPA.92.013	41	예

[0361]

[0362] 친화도 성숙

[0363] 3개의 IL-2 R $\beta$  허용 항체의 친화도가 낮고, 빠른 반응 속도로 인해, 이들은 경쇄 셀플링을 사용하여 친화도 성숙을 겪었다. 3개의 항체 각각으로부터의 VH 영역을 VL 라이브러리 내로 클로닝하였다. 이 새로운 Fab 라이브러리는 용액 상 프로토콜을 사용하여 바이오틴일화된 IL-2에 대해 폐닝시켰다.

[0364] 폐닝 경쇄 셀플링 라이브러리

[0365] 폐지 폐닝의 첫 번째 라운드를 위해, 친화도 성숙 라이브러리로부터 약  $1 \times 10^{11}$  파지를 SuperBlock(ThermoFisher)과 1:1로 혼합하여 실온에서 1시간 동안 회전시키며 차단시켰다. 스트렙타비딘-코팅 자성 DYNABEADS® M-280에 차단된 파지를 첨가하고 30분 동안 회전시키면서 배양함으로써, 스트렙타비딘에 대한 결합제를 차단된 파지로부터 선택 취소하였다. 선택 취소 단계를 한 번 더 반복하였다. 자석을 사용하여 파지와 비드(bead)를 분리하였다. 선택 취소 단계와 동시에, 10 pmole의 바이오틴일화 IL-2를 실온에서 1시간 동안 회전 배양하여 스트렙타비딘-코팅 자성 DYNABEADS® M-280에 결합되게 하였다. 선택은 자성 스트렙타비딘 비드에 결합된 바이오틴일화 IL-2에 선택 취소된 파지를 첨가하고 1.5 시간 동안 회전 배양하여 수행하였다. 선택 후, 비결합된 파지를 5분 동안 0.5% 수퍼블록 PBS-0.1% TWEEN으로 비드로부터 5회 세척한 후, 각각 이어서 0.5% 수퍼블록 PBS로 추가로 5분 3회 세척하였다. 결합된 파지는 100 mM 트라이에틸아민을 첨가하고 30분 동안 실온에서 회전 배양함으로써 세척 단계 후에 비드로부터 용출되었다. 용출된 파지를 동량의 1M 트리스-HCl(pH 7.4)을

첨가하여 중화시켰다. 이어서, 용출된 중화 파지를 50 mL Falcon 투브 (Falcon No 352070)에 수집하여 로그기 성장 TG1+cytFkpA 박테리아 세포(OD600 약 0.5)에 감염시키는 데 사용하였다. 감염은 37°C에서 30분 동안 진탕하지 않고 있었고, 이어서 37°C에서 100 rpm으로 진탕하며 추가로 30분간 배양하였다. 세포를 100 ug/mL 카르베니실린(Carbenicillin), 34  $\mu$ g/mL 클로람페니콜(Chloramphenicol) 및 2% 글루코스(2YTCCmG) 한천 생물 검정 플레이트가 보충된 2xYT 배지에 도말하고 밤새 30°C에서 배양하여 밤새 잔디 성장을 허용하였다.

[0366] 오염된 모 scFv 클론을 제거하기 위해, 라운드 1 배출물의 DNA를 NheI-HF(NEB) 및 BsmI로 절단하여 scFv 파지미드를 모두 절단하나 Fab 파지미드는 절단하지 않았다. 생성된 DNA를 TG1+cytFkpA 세포로 형질 전환시키고 전술한 바와 같이 파지를 생산하였다.

[0367] 라운드 1과 유사한 프로토콜을 사용하여 다음과 같이 변경하여 패닝의 추가 라운드를 완료했다. KingFisher 기기를 사용하여 스트렙타비딘-코팅 자성 DYNABEADS® M-280에 대해 약 5x10<sup>10</sup> 파지의 30분간 3회 선택 취소를 수행하였다. 1 pmole의 바이오틴일화 IL-2를 스트렙타비딘-코팅 자성 DYNABEADS® M-280상에 코팅하고, 선택 취소된 파지를 첨가하고 혼합을 위해 KingFisher를 사용하여 1시간 동안 배양하였다. 최종적으로, 결합되지 않은 파지를 5분 동안 0.5% 수퍼블록/PBS-0.1% TWEEN으로 5회 비드로부터 세척하였고, 각각 이어서 0.5% 수퍼블록/PBS로 5분 5회 세척하였다.

[0368] SPR에 의한 반응속도 등급매김(*Kinetic ranking*)

[0369] 친화도 성숙 클론의 1차 스크리닝을 오프-속도 등급매김(off-rate ranking)을 위해 Biacore 4000을 사용하여 SPR에 의해 수행하였다. Biacore CM5 칩을 4개의 모든 유동 세포의 1, 2, 4 및 5 지점에 고정화된 항-Fab 포획 시약과 함께 제조자의 지시 및 시약(Biacore)에 따라 아민 커플링에 의해 제조하였다. PPE 중 4개의 96-웰 플레이트를 상기한 바와 같이 준비한 다음, Biacore 전개 완충액(1% BSA를 갖는 HBS-EP+)으로 1:1로 희석하고 0.2  $\mu$ m Multiscreen 플레이트(Millipore)를 통해 원심 분리로 여과했다. 희석되고 여과된 PPE를 1 또는 5 지점에 3분간 주입한 다음, 30  $\mu$ L/분의 고성능 모드에서 완충액 또는 50 nM IL-2를 3분간 주입하였다. 5분 동안 해리를 모니터링하였다. IL-2 주사는 2 또는 4 지점 및 IL-2 완충액 주입을 사용하지 않고 이중 참조하였다. 데이터는 Biacore 4000 Evaluation 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 45 초과 RU의 Fab를 포획하고 0.01초-1 미만의 오프-속도인 37 개의 시료를 히트로 지정하고 추가 스크리닝으로 옮겼다.

[0370] PPE를 2분간 주사하고, IL-2를 30, 10, 3 및 0 nM로 주사한 것을 제외하고는, 히트로 지정된 샘플을 상기한 바와 같이 SPR에 의해 시퀀싱하고 재스크리닝하였다. 온-속도(on-rate)와 오프 속도를 모두 맞추어서 데이터를 분석하였으며, 이 값으로부터 친화도 추정치를 10nM 내지 0.06nM 범위로 계산하였다.

### 실시예 3: IL-2 조절 항체에 대한 추가 스크리닝

[0372] CHO-K1 세포를 항-IL-2 항체의 신규한 스크리닝 및 기능 분석에 사용하기 위해 인간 IL-2 수용체를 발현하도록 조작하였다. IL-2 R $\alpha$  (CHO/R $\alpha$ ), IL-2 R $\beta$  (CHO/R $\beta$ ), 또는 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c (CHO/R $\beta$  $\gamma$ c)를 고, 중 또는 저 수준으로 발현하는 CHO-K1 세포의 안정한 클론을 당업계에 공지된 형광 활성화 세포 분류(FACS) 방법을 사용하여 선택하였다. 쥐 유래 BaF3 세포주를 인간 IL-2 수용체로 형질 감염시켜 IL-2 반응성을 부여하였고, 생성된 세포주를 IL-2에 노출시켜 증식 분석에서 항체 활성의 특성 분석을 위해 사용하였다. 발현 수준(수용체/세포의 수)을 평가하고, 결합, 신호 전달 또는 증식 분석에서 최적의 수행을 위해 다수의 라인을 시험했다. 다음 세포주 클론을 다양한 분석에서 사용하기 위해 선택했다(표 3).

[0373] 표 3: 인간 IL-2 수용체 발현 수준(수용체/세포).

세포주(클론#)	R $\alpha$	R $\beta$	R $\gamma$
CHO/IL-2 R $\alpha$ (#6)	2e5	--	--
CHO/IL-2 R $\beta$ (#4~29)	--	6e5	--
CHO/IL-2 R $\beta\gamma$ (#20~21)	--	2e5	2.5e5
CHO/IL-2 R $\beta\gamma$ (#17)	--	8e3	1e4
BaF3/IL-2 R $\beta\gamma$ (#66)	--	2e4	7e3
NK92	4e3	5e3	6e3

[0374] 인간 IL-2 수용체 유전자로 형질 감염되지 않음

[0375] 세포질 주위 추출물(PPE)의 유세포 분석 스크리닝

[0376] 원하는 특성을 갖는 항체를 확인하기 위해, 가용성 항체 단편을 함유하는 PPE를 포함하거나 포함하지 않는 CHO/R $\alpha$ , CHO/R $\beta$ , CHO/R $\beta\gamma$  및 모 CHO-K1 세포상에서 스크리닝하였다. 스크리닝을 하여 1) CHO/R $\alpha$  또는 모세포에 결합하지 않는 클론, 및 2) IL-2가 존재하지만 부재하지 않는 CHO/R $\beta$  또는 CHO/R $\beta\gamma$  세포에 결합하는 클론을 확인하였다. 세포를 Exce1302 및 2 mM L-글루타민(Sigma# 14324C-500 mL)에서 성장시켰다. 시험 당일, 세포를 세척하고 염색하고 FAC 완충액(PBS 및 5% BSA 및 0.1% 아자이드화 나트륨)에서 재현탁시켰다. CHO-K1 및 CHO/R $\beta$  세포를 CFSE(Invitrogen# C34554) 또는 Cell Trace Brilliant Violet(Invitrogen # 34557)으로 염색하였다. 염색된 CHO-K1 및 CHO/R $\beta$ 를 염색되지 않은 CHO/R $\beta\gamma$  세포와 혼합하였다. 가용성 항체 단편(PPE)을 함유하는 96-웰 V-바닥 플레이트(Costar)의 각 웰에 CHO-K1, CHO-K1-IL-2R $\beta$  및 CHO/R $\beta\gamma$  세포 및 IL-2를 첨가하여 100nM의 최종 농도에서 각 웰이 각 세포 유형에 IL-2(Reprokine # RK60568)를 더하여 50,000 개를 함유하게 되었다. 동일한 배치(batch)에서 제조된 PPE를 함유하는 웰을 갖는 또 다른 분리된 96-웰 V-바닥 플레이트에서, CFSE로 염색된 CHO-K1 세포를 100 nM의 최종 농도에서 염색되지 않은 CHO/R $\alpha$ (웰당 각 세포 유형 50,000개) 및 IL-2와 혼합하였다. 모든 시료는 4°C에서 1~2시간 동안 배양한 후 FACs Buffer로 세척하였다. 다음으로, 1  $\mu$ g/mL 마우스 항-c-myc(Roche# 11667149001)를 세포에 첨가하고 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 다시 세척하고 항-마우스 중쇄 및 경쇄 항체(Jackson Immunoresearch #115-136-146)를 1:1000으로 희석하여 세포에 첨가하고 4°C에서 30분 내지 1시간 동안 배양하였다. 시료를 FACScan 유동 세포분석기를 사용하여 분석하였다. 모 CHO-K1 세포와 비교하여 CHO/R $\beta$  또는 CHO/R $\beta\gamma$  세포상에서 2배 이상의 결합 및 CHO/R $\alpha$  세포에서 2배 미만의 결합을 나타내는 시료를 추가 특성 분석을 위해 선택하였다.

[0377] 정제된 IgG의 유동 세포 분석법 스크리닝

[0378] 과거-유래 항체 단편을 전장 인간 IgG로 재구성한 후, 정제된 항체를 전술한 바와 같이 성장되고 염색된 CHO/R $\alpha$ , CHO/R $\beta$ , CHO/R $\beta\gamma$  및 모 CHO-K1 세포상에서 스크리닝하였다. 항-IL-2 항체의 결합 효능을 특성화하기 위해, IgG를 연속적으로 적정하고 세포 및 고정된 최종 농도의 IL-2(Reprokine # RK60568)를 함유하는 웰에 첨가하였다. 또 다른 시험에서, IL-2를 연속적으로 적정하여 세포 및 고정된 양의 항-IL-2 항체를 함유하는 웰에 첨가하여 항체의 결합 효능을 측정하였다. 이를 1 내지 1.5시간 동안 4°C에서 배양하였다. 결합 항체는 항-인간 중쇄 및 경쇄(Jackson Immuno Research # 109-136-088)를 1:1000으로 첨가하고 4°C에서 30분 내지 1시간 동안 배양하여 검출하였다. BD FACs Canto 유동 세포 분석기를 사용하여 시료를 분석했다. 상이한 IL-2 R 사슬을 발현하는 CHO 세포에 대한 IL-2 농도의 증가하에 정제된 항체의 결합을 도 2a~2d에 나타내었다. 일정한 [IL-2]의 존재하에 선택된 정제 항체의 적정을 도 3a~3d에 나타내었다. 유동 세포 분석법에 의해 측정된 세포에 결합하는 항체의 EC50을 표 4에 나타내었다.

[0379] 표 4: 인간 IL-2 수용체를 발현하는 세포에 결합하는 IL-2/mAb 복합체의 EC<sub>50</sub>(최대 결합의 절반이 관찰되는 항체의 농도).

항체	CHO/IL-2 R $\beta$ (#4-29) (nM)	CHO/IL-2 R $\beta$ γ (#20- 21) (nM)	R $\beta$ /R $\beta$ + γc 비율
XPA.92.019	23	1.3	18
XPA.92.041	22	2.5	9
XPA.92.042	25	2.6	10
XPA.92.099	76	2.0	38

## [0380] [0381] 실시예 4: IL-2 유도 세포 증식

## [0382] 배경 및 접근 방식

고친화성 삼량체 또는 저친화성 이량체 IL-2 R 복합체를 발현하는 세포에 대한 항체의 상대적 효과를 평가하기 위해, 2개의 세포주를 사용한 세포 증식 분석을 사용하였다. NK 혈통의 인간 세포주인 NK-92와 인간 IL-2 수용체  $\beta$  및  $\gamma$  사슬로 형질 감염된 마우스 림프구 세포주 BaF3은 모두 IL-2에 반응하여 증식 활성을 나타낸다. NK-92 세포주는 삼량체성 고친화성 IL-2 수용체 복합체인 Ra, R $\beta$  및  $\gamma$ c를 형성하는 데 필요한 3개의 모든 사슬을 발현하고, NK-92 세포주는 성장을 위해 IL-2에 의존한다. BaF3 세포는 정상적으로 성장을 위해 IL-3에 의존하지만, 일단 IL-2 수용체로 형질 감염시키면 세포는 IL-3에서 이유되고 성장 의존성을 위해 IL-2로 전이되었다. 이들 실험에 사용된 BaF3 클론은 IL-2 R $\beta$  및  $\gamma$ c 사슬만으로 형질 감염되었고 따라서 인간 IL-2 수용체의 더 낮은 친화성 이량체 복합체를 통해 신호 전달한다. 고친화성 삼량체 IL-2 수용체 복합체(NK-92 세포, IL-2 R a  $\beta$   $\gamma$ ) 또는 더 낮은 친화성 이량체 복합체(BaF3 세포, IL-2 Ra  $\beta$   $\gamma$ )를 발현하는 세포에서 IL-2 유도 증식의 항체 조절 효과를 평가하였다. 이는 IL-2 Ra 상호 작용을 주로 차단하는 항체의 세포 증식에 대한 효과의 증명을 포함하여, 상이한 수용체 복합체에 의해 매개되는 IL-2-유도 증식의 억제범위를 비교할 수 있게 한다.

## [0384] 방법

NK-92 세포는 12.5% FBS, 12.5% 말 혈청(Hyclone), 0.2 mM 이노시톨, 0.02 mM 엽산(Sigma Aldrich)을 갖는 a MEM(Life Technologies); 15 ng/mL 인간 IL-2 (Reprokine, Valley Cottage NY)를 갖는 0.1 mM 2-미캡토에탄올(Life Technologies)에서 유지시켰다. BaF3 IL-2 R $\beta$   $\gamma$  세포를 10% FBS, 0.4 mg/mL 제네티신(Geneticin; Life Technologies) 및 100 ng/mL hIL-2로 RPM에서 유지시켰다. 세포를 원심 분리하여 펠렛화하고, DPBS로 세척하고, IL-2없이 완전한 성장 배지에서 밤새 재현탁하였다. 밤새 IL-2를 회수한 후, 세포를 다시 세척하고, IL-2가 없는 각각의 세포 성장 배지에서 불투명한 평평 바닥 96 웰 플레이트에 25,000 세포/웰로 접종하였다.

[0385] [0386] IL-2 적정 및 항체 희석물을 혼합하고 세포에 첨가하기 전에 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후, 이들 샘플을 웰 당 100  $\mu$ L의 최종 농도를 달성하기 위해 세포와 함께 배양 플레이트에 첨가하고, 플레이트를 37°C의 배양기에 48시간 동안 두었다. IL-2 적정 분석에서 최종 항체 농도는 30  $\mu$ g/mL였다.

[0387] 배양기에서 48시간 후, 플레이트를 제거하고 실온과 같은 온도가 되게 하였다. CellTiterGlo 용액, 100  $\mu$ L/웰(Promega, Madison WI)을 각각의 웰에 첨가하였다. 이어서, 플레이트를 2분간 진탕기에 놓아 세포 용해를 유도하였고, 실온에서 8분간 더 배양한 다음, 500 mS 통합 시간으로 FlexStation 3 륨미노미터(Molecular Devices, Sunnyvale CA)에서 판독했다. 발광 값은 도 4a, 4b 및 4c에 기재된 바와 같이 EC<sub>50</sub> 값을 결정하는 데 S자형 용량 반응 4 매개변수 적합을 사용하여 Prism (GraphPad Software, La Jolla CA)에서 분석하였다. 이들 결과는 IL-2 항체인 XPA.92.019, XPA.92.041, XPA.92.042 및 XPA.92.099가 단지 R $\beta$   $\gamma$  복합체(R $\beta$   $\gamma$ )를 발현하는 세포 보다 세 가지 수용체(R a  $\beta$   $\gamma$ )를 모두 발현하는 세포의 증식에 더 큰 영향을 미친다는 것을 보여준다. IL-2 항체인 XPA.92.019, XPA.92.041, XPA.92.042 및 XPA.92.099는 또한 IL-2 R a  $\beta$   $\gamma$  (NK92 및 CTL-L2 세포)를 발현하는 세포 및 IL-2 R a  $\beta$   $\gamma$  (BaF3 세포)를 발현하는 세포에서 IL-2 유도 증식을 MAB602 대조군 항체보다 더 많이 억제함을 밝혔다(도 5a-5c).

[0388] 표 5: 증식 분석법: 인간 수용체를 발현하는 세포에서 비결합 IL-2의 EC<sub>50</sub> (EC<sub>50</sub> 배수 변화)과 비교한 mAb/IL-2 복합체의 EC<sub>50</sub>

항체	NK92(huR $\alpha$ βγ) (EC <sub>50</sub> 배수 변화)	BaF3/IL-2 HuR $\beta$ γ (EC <sub>50</sub> 배수 변화)	비율 (huR $\alpha$ βγ / R $\beta$ γ)
XPA.92.019	83	5.2	6
XPA.92.041	35	3.9	9
XPA.92.042	52	5.0	10
XPA.92.099	22	2.4	9
비교를 위해: MAB602	15	1.2	13

[0389]

표 6: 중식 분석법: 마우스 수용체를 발현하는 세포에서 비결합 IL-2의 EC<sub>50</sub> (EC<sub>50</sub> 배수 변화)과 비교한 mAb/IL-2 복합체의 EC<sub>50</sub>

항체	CTL-L- 2(huR $\alpha$ βγ) (EC <sub>50</sub> 배수 변화)
XPA.92.019	130
XPA.92.041	58
XPA.92.042	156
XPA.92.099	54
비교를 위해: MAB602	18

[0391]

#### 실시예 5: SPR 연구

[0393]

항체 친화도를 표준 포획 방법론으로 Biacore 4000을 사용하여 SPR로 측정하였다. 간단히 말하면, 항-인간 항체 포획 키트(Biacore)로부터의 (Fc 특이적) 항-인간 IgG를 제조업체의 지시 사항에 따라 CM-5 센서 칩의 4개의 모든 유동 세포의 1, 2, 4 및 5 지점상에 아민 커플링에 의해 고정시켰다. 전개 완충액은 1% BSA를 갖는 HBS-EP+였다. 2 μg/mL의 항체를 10 μL/분의 유속으로 2분간 주입했다. rhIL-2를 0.11nM~10nM의 5가지 농도로 3배 연속 희석하여 3분 동안 3회 주입하고, 해리를 10분 동안 모니터링하였다. 데이터는 Biacore 4000 Evaluation 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 친화도를 표 7에 나타내었다.

[0394]

표 7: 인간 IL-2에 대한 선택된 항체의 반응 속도 및 친화도.

항체	k <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (M)
XPA.92.019	3.7e6	3.4e-5	9.5e-12
XPA.92.041	5.6e6	3.2e-4	5.8e-11
XPA.92.042	8.9e6	2.5e-4	2.8e-11
XPA.92.099	5.5e6	2.4e-4	4.4e-11
비교를 위해: MAB602			1.2e-10

[0395]

인간, 토끼 및 마우스 IL-2와 IL-2 항체의 종 교차 반응성을 30 nM 내지 1 nM의 3배 단계 희석에서 4가지 농도로 2회 주사한 것을 제외하고는 상기한 바와 같이 SPR에 의해 결정하였다. 인간 서열과 비교하여 다른 종의 IL-2의 아미노산 서열을 도 6에 나타내었다. PubMed 구조 데이터베이스(돼지: caa40071, 래트: aaa41427, 토끼: np\_001156652, 인간: np\_000577, 마우스: aab39206)로부터 여러 종의 IL-2 서열을 검색하였다. 이들 서열을 벡터 NTI®(Lifetech)로 옮겨 정렬 도구를 사용하여 정렬하였다. 친화도 추정치는 표 8에 요약되어 있다.

[0397] 표 8: 종 교차 반응성: 마우스, 래트 또는 토끼의 IL-2에 대한 IL-2 항체의 친화도.

항체	마우스 (I)	래트 (II)	토끼 (III)
XPA.92.019	1e-7	>1e-6	2e-10
XPA.92.041	4e-8	1e-9	5 e-10
XPA.92.042	1e-8	6e-9	6e-10
XPA.92.099	바인딩 없음	바인딩 없음	9e-11
비교를 위해: MAB602	1e-8	검사되지 않음	검사되지 않음

## [0398] [0399] 실시예 6: 내인성으로 발현하는 세포주를 이용한 기능적 신호 전달 분석

[0400] IL-2 R $\alpha$  (CD25)의 존재는 IL-2 사이토카인에 대한 이량체 IL-2 수용체(IL-2 R $\beta$ γ)의 친화도를 증가시킨다. 인간에서 많은 면역 세포는 미접촉(naive) 및 기억 T 세포 및 CD56dim NK 세포를 포함하여 이량체 수용체만을 발현한다. 대조적으로, 삼량체성 IL-2 R(IL-2 R $\alpha\beta\gamma$ )은 조절 T 세포, CD56bright NK 세포에서 발견되며 효과기 T 세포에 의해 일시적으로 발현된다. 내인성 수준의 IL-2 R 발현을 갖는 세포주는 수용체 및 신호 전달 성분을 천연 비율로 유지하고 순상되지 않은 신호 전달 경로를 포함한다. 전사 인자 STAT5(Signal Transducer and Activator of Transcription 5)의 활성은 IL-2 수용체를 통해 IL-2에 의해 매개되는 중요한 초기 신호 전달 사건이다. STAT5 인산화의 결과는 증식, 생존 및 세포 사멸과 같은 세포 과정에 관여하는 다양한 유전자의 증가된 발현이다. 항-IL-2 항체 후보 물질이 인간 IL-2 R $\alpha\beta\gamma$  또는 IL-2 R $\beta\gamma$  성분의 내인성 발현을 갖는 세포주에서 IL-2 신호 전달에 영향을 주는 능력을 평가하기 위해, 하기에 기재된 바와 같이 STAT5a 및 b의 인산화를 측정하였다.

## [0401] 인간 NK-92 세포주에서 STAT5a, b의 인산화

[0402] 삼량체 수용체(IL-2 R $\alpha\beta\gamma$ )를 발현한 세포에서 STAT5의 인산화를 유도하는 항체/IL-2 복합체의 능력을 비교하기 위해, NK-92 세포주(ATCC)를 이용하였다. 이는 성장을 위해 IL-2에 의존하고 세포 독성 능력 및 특징적인 NK 세포 표면 마커를 유지하는 NK 세포주이다. 그것은 CD25(IL-2 R $\alpha$ )의 발현에 대해 균일하게 높다. 세포를 2회 세척 한 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 10% FBS(Hyclone)를 갖지만 IL-2는 없는 RPMI-1640 배지(Life Technologies)에서 밤새 기아가 이어졌다. 다음날, PBS 및 0.5% BSA에 웰 당 100,000 세포의 농도로 세포를 접종하였다. NK-92 세포를 함유하는 플레이트에 웰 당 50 μl를 첨가하기 전에, 다양한 투여량의 IL-2 및 표시된 100 nM의 항-IL-2 항체를 37°C에서 15~30분간 미리 복합체화하였다. 세포를 37°C에서 30분간 자극한 다음 반응을 멈추기 위해 차가운 PBS 100 μl를 첨가하였다. 플레이트를 4°C에서 1500 rpm으로 3분간 원심 분리하였다. 이어서, 상등액을 제거하고, 80 μl 차가운 MSD 용해 완충액을 각 웰에 첨가하였다. 세포를 4°C에서 1시간 동안 진탕 플랫폼에서 배양하여 완전히 용해시켰다. MSD Phospho(Tyr694)/Total STAT5a,b Whole Cell Lysate 키트 (MesoScale Discovery; K15163D-2)를 제조업체의 지침에 따라 사용하여 전체 및 인산화된 STAT5a,b를 측정하였다. 플레이트를 Sector Imager 6000(MesoScale Discovery)에서 판독하였다. 곡선은 Prism version 6.05(GraphPad)에서 S형 용량-반응 방정식을 사용하여 비선형 회귀에 적합했다.

[0403] 예상대로 아이소타입 대조군(항-KLH)과 무항체 대조군은 각각 0.9 및 0.6 pM의 EC50 값으로 IL-2 신호 전달에 매우 민감했다(도 7a). 아이소타입 대조군과 비교하여, 시험된 모든 화합물은 STAT5a,b의 IL-2-유도 인산화의 EC50 증가를 보였다. 기준 항체 MAB602는 아이소타입 대조군(0.9 pM 내지 900 pM)에 비해 EC50 값에서 1,000배의 변화를 유도했다. XPA.92.019, XPA.92.041, XPA.92.042 사이의 배수 변화는 각각 900 pM, 1150 pM 및 1700 pM의 증가된 EC50 값과 유사했다. XPA.92.099는 이 분석에서 EC50 값을 0.9 pM 내지 463 pM으로 약간 낮추었다.

## [0404] 인간 1차 NK 세포에서 STAT5a, b의 인산화

[0405] 이량체 수용체(IL-2 R $\beta\gamma$ )를 갖는 세포에서 항체/IL-2 복합체가 STAT5 경로를 조절하는 능력을 조사하기 위해 정제된 1차 NK 세포를 이용하였다. 추가적인 CD25+ 결실은 이량체 IL-2 R $\beta\gamma$  있는 세포만이 존재함을 확인하였다. 다양한 기증자로부터 받은 말초 혈액 단핵 세포(PBMCs)를 밀도 구배 원심 분리를 사용하여 단리하였다. 간단히 말하면, 회색된 전혈을 50 ml 원뿔형의 Ficoll(Sigma) 용액 위에 적층하였다. 층을 브레이크 없이 400 xg에서 30분 동안 실온에서 원심 분리하였다. 세포 밴드를 수집하고, 세척하고, 분액으로 동결시켰다. PhosphoSTAT5 분석을 위한 NK 세포를 단리하기 위해, 제조사의 지침에 따라, PBMC의 바이알을 해동시키고 NK 세

포를 MACS NK 세포 단리 키트, 인간(Miltenyi Biotech; cat: 130-092-657)을 사용하여 단리하였다. 정제된 NK 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 10% FBS(Hyclone)를 갖지만, IL-2는 없는 RPMI-1640 배지(Life Technologies)에 밤새 그대로 두었다. 다음날, 자성 비드 분리를 사용하여 NK 세포 집단으로부터 CD25+ NK 세포를 제거하였다. 간단히 말하면, 세포를 MACS 완충액(PBS (Life Technologies) 및 1% 소 혈청 알부민(Sigma)에 재현탁하고 바이오틴 항-인간 CD25(ebioscience) 항체(50 μl 세포 용액마다 1 μl 항체)와 함께 배양하였다. 실온에서 10분 배양한 후, 세포를 세척하고 40 μl MagniSort 스트렙타비딘 양성 선별 비드(ebioscience)에 재현탁시켰다. 실온에서 10분간 추가 배양한 후, 부피를 2.5 mL로 하고 실온에서 5분간 배양하여 EasySep Magnet(STEMCELL Technologies)로 분리하였다. 결합되지 않은 세포를 깨끗한 투브로 옮기고 실온에서 추가 5분간 배양하여 모든 CD25+ 세포를 완전히 고갈시켰다.

[0406]

PhosphoSTAT5a,b 분석을 완료하기 위해, NK 세포를 PBS 및 0.5% BSA에 웰 당 100,000 세포의 농도로 접종하였다. NK 세포를 함유하는 플레이트에 웰 당 50 μl를 첨가하기 전에, 다양한 투여량의 IL-2 및 표시된 100 nM의 항-IL-2 항체를 37°C에서 15~30분간 미리 복합체화하였다. 세포를 37°C에서 30분간 자극한 다음 반응을 멈추기 위해 차가운 PBS 100 μL를 첨가하였다. 플레이트를 4°C에서 1500 rpm으로 3분간 원심 분리하였다. 이어서, 상등액을 제거하고, 80 μl 차가운 MSD 용해 완충액을 각 웰에 첨가하였다. 세포를 4°C에서 1시간 동안 진탕 플랫폼에서 배양하여 완전히 용해시켰다. MSD Phospho(Tyr694)/Total STAT5a,b Whole Cell Lysate 키트(MesoScale Discovery; K15163D-2)를 제조업체의 지침에 따라 사용하여 전체 및 인산화된 STAT5a,b를 측정하였다. 플레이트를 Sector Imager 6000(MesoScale Discovery)에서 판독하였다. 곡선은 Prism version 6.05(GraphPad)에서 S형 용량-반응 방정식을 사용하여 비선형 회귀에 적합했다.

[0407]

기존의 문헌과 일치하게, 이량체 수용체는 NK-92 세포와 비교하여 무항체 및 아이소타입 대조군(항-KLH) 시료(각각 133 및 127 pM)에서 보다 높은 EC<sub>50</sub> 값으로 알 수 있듯이 IL-2 사이토카인에 덜 민감했다(도 7b). 아이소타입 대조군과 비교하여, 시험된 모든 화합물은 STAT5a,b의 IL-2-유도 인산화의 증가된 EC<sub>50</sub> 값을 나타내었다. 기준 항체 MAB602는 아이소타입 대조군(128 pM 내지 1302 pM)에 비해 EC<sub>50</sub> 값에서 10배의 변화를 유도했다. XPA.92.019, XPA.92.041, XPA.92.042의 배수 변화는 각각 5041 pM, 4520 pM 및 5124 pM의 EC<sub>50</sub> 값과 유사했다. XPA.92.099는 이 분석에서 다른 XPA.92 항체보다 EC<sub>50</sub> 값을 약간 낮게 변화시켰으며, EC<sub>50</sub> 값은 3054pM이었다. 인간 IL-2 수용체를 발현하는 세포에 대한 EC<sub>50</sub>의 배수 변화를 표 9에 요약하였다.

[0408]

**표 9: pSTAT5a,b를 분석: 인간 수용체를 내인성으로 발현하는 세포에서의 비결합 IL-2(배수 변화)의 EC<sub>50</sub>과 비교한 mAb/IL-2 복합체의 EC<sub>50</sub>.**

항체	NK92 (huR $\alpha$ βγ) (EC <sub>50</sub> 배수 변화)	인간 1차 NK 세포(huR $\beta$ γ) (EC <sub>50</sub> 배수 변화)	EC <sub>50</sub> 의 비율 (R $\alpha$ βγ/R $\beta$ γ)
XPA.92.019	966	40	24
XPA.92.041	1233	35	35
XPA.92.042	1855	41	45
XPA.92.099	495	24	21
비교를 위해: MAB602	959	10	96

[0409]

마우스의 1차 NK 세포에서 STAT5a,b의 인산화

[0410]

마우스의 NK 세포는 이량체 IL-2 수용체를 독점적으로 발현한다는 점에서 그의 인간 대응물과 다르다. 마우스에서 신호 전달에 영향을 미치는 IL-2/항체 복합체의 능력을 측정하기 위해, 3개의 암컷 BALB/C 마우스로부터의 비장을 수득하였고, 1 mL 주사기(백톤 디킨슨)의 뒷 부분을 이용하여 40 μM 세포 여과기(Falcon)를 통해 장기를 밀어 넣어 단일 세포 혼탁액을 생성시켰다. 비장 세포를 세척한 후 RBC 용해 완충액(시그마)에 재현탁시키고 실온에서 5분 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 RPMI-1640(Life technologies) 및 10% FBS(Hyclone)로 세척하였다. NK 세포는 MACS 마우스 NK 단리 키트 II(Miltenyi)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분류하였다. 세포를 세척하고 계수하고 100,000 세포를 PBS 및 0.5% BSA 완충액에서 각 웰에 접종하였다. NK 세포를 함유하는 플레이트에 웰 당 50 μl를 첨가하기 전에, 다양한 투여량의 IL-2 및 표시된 100 nM의 항-IL-2 항체를 37°C에서 15~30분간 미리 복합체화하였다. 세포를 37°C에서 30분간 자극한 다음 반응을 멈추기 위해 차가운 PBS 100 μl를 첨가하였다. 플레이트를 4°C에서 1500 rpm으로 3분간 원심 분리하였다. 그 후, 상등액을 제거하고 80 μl 차가운 MSD 용해 완충액을 각 웰에 첨가 하였다. 세포를 4°C에서 1시간 동안 진탕 플랫폼에서 배양하여 완전히 용

해시켰다. MSD Phospho(Tyr694)/Total STAT5a,b Whole Cell Lysate 키트(MesoScale Discovery; K15163D-2)를 제조업체의 지침에 따라 사용하여 전체 및 인산화된 STAT5a,b를 측정하였다. 플레이트를 Sector Imager 6000(MesoScale Discovery)에서 판독하였다. 곡선은 Prism version 6.05(GraphPad)에서 S형 용량-반응 방정식을 사용하여 비선형 회귀에 적합했다.

[0412] 무항체 및 아이소타입 대조군에 대한 EC<sub>50</sub> 값은 인간 1차 NK 세포(도 7c)(각각 139 pM 및 116 pM)에서 볼 수 있는 EC<sub>50</sub> 값과 매우 유사했다. 아이소타입 대조군과 비교하여, 시험된 모든 화합물은 STAT5a,b의 IL-2-유도 인산화의 증가된 EC<sub>50</sub> 값을 나타내었다. 기준 항체 MAB602는 아이소타입 대조군(116 pM 내지 361 pM)에 비해 EC<sub>50</sub> 값에서 3배의 변화를 유도했다. XPA.92.019, XPA.92.041, XPA.92.042 및 XPA.92.099의 배수 변화는 각각 1723 pM, 1352 pM, 1663 pM 및 1912 pM의 EC<sub>50</sub> 값으로 각각 약 10~15배였다. 마우스 IL-2 수용체를 발현하는 세포에 대한 EC<sub>50</sub>의 배수 변화를 표 10에 요약하였다.

[0413] 표 10: pSTAT5a, b 분석: 쥐 수용체를 내인성으로 발현하는 세포에서의 비결합 IL-2(배수 변화)의 EC<sub>50</sub>과 비교한 mAb/IL-2 복합체의 EC<sub>50</sub>.

항체	CTL-2 (μRαβγ) (EC <sub>50</sub> 배수 변화)	마우스 1차 NK 세포 (μβγ) (EC <sub>50</sub> 배수 변화)	EC <sub>50</sub> 의 비율 (Rαβγ/Rβγ)
XPA.92.019	523	15	35
XPA.92.041	404	12	34
XPA.92.042	793	14	57
XPA.92.099	293	17	17
비교를 위해: MAB602	227	3	76

[0414]

#### 실시예 7: IL-2/항체 복합체의 생체 내 투여 후 림프구 서브 세트 분석

[0415] [0416] 정상 C57BL/6 마우스에 비히를 대조군을 복강 내 주사하거나, 또는 0일, 2일 및 4일째에 표시된 바와 같이 아이소타입 대조군 항체 또는 항-IL-2 mAb를 5배 과량으로 미리 배양한 1 μg hIL-2(도 8a~d) 또는 1.5 μg hIL-2(도 8f 및 8g)를 복강 내 주사하였다. 6일 째에, 표준 기술을 사용하여 비장을 수확하고 다음과 같이 유동 세포분석기 서브 세트에 대해 염색하였다. 비장을 분리하고 해리시켜 단일 세포 혼탁액을 생성시켰다. RBC 용해 완충액(Gibco, ThermoFisher)을 사용하여 적혈구를 용해시켰다. 세포를 FACS 완충액(PBS) 및 2% FBS와 아지드화 나트륨(0.1%)으로 두 번 세척하고 96-웰 V 바닥 플레이트(1 X 10<sup>6</sup> 세포/웰)에 도말하였다. 세포를 FACS 완충액에서 다음의 형광 표지된 항체(Biolegend, Ebioscience, BD Biosciences 또는 Life Technologies에서 구입한 CD4(GK1.5), CD8(53-6.7), CD25(PC61.5), CD44(IM7), CD122(TM-β1), IFNγ(XMG1.2) 및 NK1.1(PK136), 그랜자임 B(GB12))의 각테일로 염색하였다. 시료를 얼음 위에서 20~60분 동안 염색 각테일에서 배양하고, 2회 세척하고, BD LSRII 또는 BD Accuri 상에서 판독하였다. 그랜자임 B 염색의 분석을 위해, 표면 마커로 염색하고 세척한 시료를 제조사의 지침에 따라 cytofix/cytoperm 완충액(BD Biosciences)으로 고정시키고 투과시킨 다음 이어서 항-그랜자임 B 항체로 얼음에서 20~60분 동안 염색하였다. 시료를 두 번 세척하고 BD LSRII 또는 BD Accuri에서 판독하였다. FlowJo 소프트웨어(TreeStar) 또는 CFflow(BD Biosciences)를 사용하여 데이터를 분석하였다. 림프구 서브세트의 분석을 위해, 선별은 다음과 같이 림프구에서 게이팅하였고, 계통 마커는 다음과 같다: CD8+ 대 CD4 발현/CD8+ 세포의 % CD44hi; CD4+ 세포의 %CD25hi 및 CD44hi; 및 CD8, CD4 또는 NK1.1 양성 세포의 비율. 도 8a~8d는 관련 T 세포 서브세트의 요약을 나타내고, 도 8e는 도 8a 및 8b의 데이터로부터 계산된 CD8+/CD4+ T 세포의 비율을 나타낸다. 도 8f는 총 림프구의 NK1.1+ 세포의 빈도를 나타낸다. 도 8g는 IL-2/항-IL-2 항체와 접촉시킨 후 마우스에서의 NK 세포에 의한 그랜자임 B의 생산을 나타낸다.

[0417]

이들 결과는 항-IL-2 항체가 NK 세포 수준 및 활성뿐만 아니라 생체 내 CD8/CD4 비율에 영향을 미친다는 것을 보여준다.

[0418]

#### 실시예 8: 폐암 마우스 모델에서 항체/IL-2 복합체 단독으로 및 체크포인트 억제제와 함께 처리

[0419]

종양 이종이식 동물 모델에서 항-IL-2 항체의 효과를 입증하기 위해, C57BL/6 마우스를 루이스 폐암 LLC-A9F1(LLC) 세포(2.5 × 10<sup>5</sup> 세포)로 폐암 접종하였고 종양을 치료 없이 10일 동안 성장하게 두어 확립하였다(치료는 11일째에 시작하였다). 분리들은 치료를 위해 무작위 추출 전에 제거되었다. LLC 종양을 지닌 여섯 그룹의 마우스의 치료를 위해 각각 다음과 같이 처리하였다: (1) 비히를 단독 대조군, n=10 마우스; (2) 항-IL-2

XPA.92.099 단일클론 항체(IL-2/mAb)와 복합체화한 IL-2(IL-2/mAb)(IP 주사를 통해 IL-2 1  $\mu\text{g}$  및 mAb 5  $\mu\text{g}$ 을 48시간마다 투여), n=5 마우스; (3) 항-PD-1 mAb 단독(Bioxcel의 RMP1-14 클론, 200  $\mu\text{g}$  주당 2회 투여), n=10 마우스; (4) IL-2/mAb(XPA.92.099) 및 항-PD-1 mAb 조합, n=5 마우스; (5) 항-CTLA-4 mAb 단독(Bioxcel의 UC10-4F10-11, 200  $\mu\text{g}$  주당 2회 투여), n=10 마우스; 또는 (6) IL-2/mAb(XPA.92.099) 및 항-CTLA-4 mAb 조합 n=5 마우스. 종양 측정(길이 및 폭)은 블라인드로 수행하였고 면적은  $\text{mm}^2$ 로 기술하였다. 도 9는 상기한 바와 같이 처리된 개별 마우스에 대한 시간 경과에 따른 종양 면적의 그래프를 나타낸다. 치료된 마우스의 수는 의미를 얻기에는 너무 낮지만, 항 PD-1 또는 항-CTLA-4와 IL-2/항-IL-2 복합체의 병용 효과는 종양 성장을 감소시킬 가능성이 있고, 대조군이나 단일 제제 치료보다 더 큰 완전한 반응을 보였다(도 9).

[0420] 항-IL-2 항체의 항 종양 효과를 추가로 평가하기 위해, 많은 수의 마우스(n=15/그룹)에 대한 실험을 수행하였다. 상기한 바와 같이 LLC 종양 세포를 마우스에 접종하였다. 일단 종양이 확립되고 마우스가 무작위로 선택되면, 각각 15 마리의 마우스 네 그룹을 다음과 같이 처리하였다: (1) 비히를 단독 대조군(PBS); (2) 주당 2 회 투여된 항-PD-1 mAb(RMP1-14 클론), 200  $\mu\text{g}$  피하 주사(sc); (3) IL-2/mAb 복합체(클론 99, 48 시간마다, IP 주사, 2  $\mu\text{g}$  IL-2 + 10  $\mu\text{g}$  mAb); (4) 그룹 (2) 및 (3)에 기재된 바와 같은 IL-2/mAb99 + 항-PD-1 mAb의 조합. 종양 측정(길이 및 폭)은 블라인드로 수행하였고, 면적은  $\text{mm}^2$ 로 기술하였다. 도 10a는 전술한 바와 같이 각각의 처리 그룹에 대한 시간 경과에 따른 평균 종양 부피의 그래프를 나타낸다. 오차 막대는 평균의 표준 오차 (SEM)를 나타낸다. IL-2/항-IL-2 복합체 및 항-PD-1 모노-치료법은 대조군-처리 마우스와 비교하여 종양 성장을 유의하게 감소시키지만, 항-PD-1과 IL-2/항-IL-2 복합체의 병용 효과는 어느 하나의 시약 단독보다 유의하게 더 컸다. 그림 10b는 동일 실험에서 생존 플롯을 나타낸다. IL-2/mAb99 단독 투여 그룹에서 마우스 1 마리, 항-PD-1 단독 투여 그룹에서 2 마리, 병용 치료 그룹에서 6 마리의 마우스가 완전한 반응을 나타내지만 대조군에서 마우스는 (종양을 검출 할 수 없는) 완전한 반응이 없었다.

#### 실시예 9: 피하 LLC 종양을 지닌 C57BL/6마우스에서의 면역 세포에 대한 IL-2/항체 복합체의 효과

[0422] 전술한 바와 같이 종양 공격시 생체 내에서 면역 세포에 대한 항체/IL-2 복합체의 효과를 평가하기 위해서, 마우스에  $1 \times 10^6$  LLC 종양을 주입했다. 종양 주입 21일 후, 종양이 확립된 마우스를 무작위로 5 그룹으로 나누어 다음과 같이 처리 하였다: (1) 대조군(Ab 또는 IL-2 없음); (2) 항-PD-1 mAb(RMP1-14 클론), 주당 2회 피하 200  $\mu\text{g}$  투여; (3) 2일마다 IP 주사에 의한 IL-2/mAb99 복합체(2  $\mu\text{g}$  IL-2 + 10  $\mu\text{g}$  mAb); (4) 그룹 (2) 및 그룹 (3)에 기재된 바와 같은 IL-2/mAb99 + 항-PD-1 mAb의 조합; (5) (1, 3, 5, 9, 13 및 17일째에 IP 주사에 의한 2  $\mu\text{g}$  IL-2 + 10  $\mu\text{g}$  mAb) IL-2/mAb19 복합체; (6) 그룹 (2) 및 (5)에 기재된 바와 같은 IL-2/mAb19 + 항-PD-1 mAb의 조합. 치료 개시 후 19일째에 마우스를 희생시키고 면역 세포를 다음과 같이 분석하였다. 세포 표면 마커의 발현에 대해 상기한 바와 같이 비장 세포를 분리하고 분석하였다. 인터페론 감마(IFN  $\gamma$ )를 생산하는 CD8+ T 세포의 능력을 분석하기 위해, PMA(Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, 50 ng/mL)와 아이오노마이신 (ionomycin)(1  $\mu\text{M}$ )으로 10~12시간 동안 (RPMI 및 10% FBS) 및 brefeldin A(Golgistop, BD Biosciences)에서 자극하였다. 세포를 세포 외 CD8에 대해 염색하였고 고정시키고 투과시킨 후(Cytofix/Cytoperm, BD Biosciences), IFN  $\gamma$ 에 대해 세포 내로 염색하였다. FlowJo 소프트웨어(Treestar) 또는 CFflow(BD Biosciences)를 사용하여 분석된 BD LSRII 또는 BD Accuri에서 시료를 판독하였다. CD8+ T 세포 반응의 분석을 위해, 세포를 립프구 및 CD8+ T 세포에 게이팅하고, IFN  $\gamma$ 에 양성인 세포의 백분율을 평가하였다. 도 11의 그래프는 IL-2/mAb 복합체로 처리한 것이 CD8+ T 세포(도 11a)의 빈도 및 활성화된 CD8+ T 세포(% CD44hi, 도 11b)의 비율을 증가시킴을 나타내며, CD4+ T 세포(도 11c)의 빈도 또는 CD25hi( $T_{\text{reg}}$ )인 CD4+ 세포의 퍼센트(% CD25hi, 도 11d)는 증가시키지 않았음을 나타낸다. 도 11은 IL-2/mAb로 처리한 것이 PMA/I로 자극시 IFN  $\gamma$ 를 생성할 수 있는 CD8+ T 세포의 빈도를 증가시킬(도 11e)뿐만 아니라 CD8+/CD4+ T 세포의 비율도 증가시킴을(도 11f) 나타낸다.

#### 실시예 10: 인간 면역 세포에 대한 IL-2/항체 복합체의 효과

[0424] T 세포 및 NK 세포 외에도, 다른 면역 및 비면역 세포 유형은 기능적 IL-2 수용체를 발현한다. 여기에는 B 세포, 단핵구, 과립구 및 일부 보고에서는 내피 세포가 포함된다. 이들 세포 유형 중 많은 것은 IL-2R $\alpha$ 를 구성적으로 발현시키거나 특정 사이토카인 또는 자극 인자에 반응하여 이를 발현할 수 있다. IL-2/mAb 복합체로 처리하는 것이 삼량체 IL-2 수용체(IL-2R $\alpha$   $\beta$   $\gamma$ )를 발현하는 세포에서 어떻게 활성화에 영향을 끼치는지 조사하기 위해 실험을 수행하였다. PBMC는 다양한 면역 세포 서브세트의 상당한 백분율을 함유하므로 핵심 세포 집단에 대한 항-IL-2 항체의 영향을 평가하는 유용한 도구를 제공한다. 기능성 삼량체 IL-2R $\alpha$   $\beta$   $\gamma$  발현하는 것으로 보

고되는 세포는 다음을 포함한다: CD56<sup>bright</sup> NK 세포, 활성화 CD8 T 세포, T<sub>regs</sub>, 단핵구 및 B 세포. 활성화의 판독으로서, T 세포 및 NK 세포에서 IL-2 신호 전달에 의해 유도된 CD69 마커의 발현 수준을 분석하였다. 또한, IL-2/mAb 복합체 처리 후의 CD4 T 세포 집단에서 T<sub>regs</sub>의 빈도를 측정하였다.

[0425] 다양한 공여체로부터의 PBMC를 밀도 구배 원심 분리를 사용하여 단리하였다. 희석된 전혈을 50 mL 원뿔형 투브에서 Ficoll(Sigma) 용액 위에 적층하였다. 층을 브레이크 없이 400 xg에서 30분 동안 실온에서 원심 분리하였다. 세포 밴드를 수집하고, 세척하고, 분액으로 동결시켰다. 분액을 완전한 RPMI 배지(RPMI 1640(Life Technologies) + 10% FBS(Hyclone) + 2 mM L-글루타민)로 해동시켰다. 두 번 세척 후, 세포를 계수하고, 50 μL 부피의 96-웰 둥근 바닥 플레이트에 1 X 10<sup>6</sup> PBMC/웰로 도말하였다. 세포를 함유하는 플레이트에 웰당 50 μl를 첨가하기 전에, 다양한 투여량의 재조합 인간 IL-2(Reprokine, Israel)와 표시된 항-IL-2 항체 200 nM을 37 °C에서 30분간 미리 복합체화하였다. 이어서 플레이트를 37 °C에서 20~24 시간 동안 배양했다. 일단 배양이 완료되면, 상등액을 제거하고 세포를 FACS 완충액(PBS (Life Technologies), 0.5% BSA(Sigma) 및 0.1% 아자이드화 나트륨(Teknova))에서 2회 세척하였다. 시료를 실온에서 10분 동안 인간 TruStain FcX로 Fc 차단시키고(BioLegend), 각각 2개의 웰로 나누었다. 한 세트를 형광 표지된 항체의 다음의 카테일(Biolegend)로 염색하였다: CD69(FN50), CD4(OKT4), CD8a(SK1), CD127(A019D5), CD25(M-A251), CD3(HIT3a). 두 번째 세트를 형광 표지된 항체의 다음의 카테일(Biolegend)로 염색하였다: CD3(HIT3a), CD56(HCD56), CD19(HIB19), CD69(FN50), CD14(M5E2). 시료를 4 °C에서 60분간 어둠 속에서 배양하였다. 이를 FACS 완충액으로 2회 세척하고 어둠 속에서 4 °C에서 20분 동안 50 μl BD Cytofix (Becton Dickenson)로 고정시켰다. 시료를 FACS 완충액으로 2회 세척하고 BD FACSCanto II에서 관찰하였다. 데이터를 FlowJo 소프트웨어(TreeStar) 및 GraphPad Prism(버전 7)을 사용하여 3-매개 변수 적합을 사용하여 분석하였다.

[0426] CD3- 및 CD56+ 집단이 뒤따르는 램프구에 게이팅하여 NK 세포를 식별하였다. 이 CD56+ 집단 중 가장 밝은 약 10%는 CD56<sup>bright</sup> NK 세포를 나타낸다. CD56<sup>bright</sup> NK 세포에서, CD69 발현에 대한 IL-2 처리의 투여량 의존적 효과를 각각 공여자 603 또는 625에 대해 7.6 nM(도 13a) 또는 9.5 nM(도 13b)의 EC50 값으로 관찰하였다. 기준 항체 MAB602는 EC50 값에서 5~10배 우향-변화를 유도하였다(도 13c). XPA.92.019, XPA.92.042 또는 XPA.92.099로 처리한 경우에도 MAB602에서 볼 수 있는 것과 유사한 EC50 값의 증가를 보였다(도 13c). 이는 이들 항-IL-2 항체가 IL-2R α β γ를 발현하는 CD56<sup>bright</sup> NK 세포에서 IL-2-유도 활성화에 대한 감수성을 감소시킨다는 것을 시사한다.

[0427] T<sub>reg</sub> 집단에서 CD69의 유도를 분석하기 위해, 다음의 프로파일을 발현하는 램프구를 분석하였다: CD3+CD4+CD25+CD127-. CD56<sup>bright</sup> NK 세포와 마찬가지로, IL-2 처리의 투여량 의존적 효과를 각각 공여자 603 또는 625에 대해 28 nM(도 14A) 또는 22 nM(도 14B)의 EC50 값으로 관찰하였다. 기준 항체 MAB602는 EC50 값에서 5~10배 우향-변화를 유도하였다(도 14c). XPA.92.042 또는 XPA.92.099로 처리한 경우에도 MAB602와 비슷한 EC50 값의 증가를 보인 반면, XPA.92.019는 10~15배 더 높은 변화를 유도했다(도 14c).

[0428] IL-2에 의해 제공된 신호 전달은 Treg 성장 및 항상성에 중요하다. 이 분석에 사용된 IL-2의 농도에 대해, 도 15a 및 도 15b에 도시된 바와 같이, T<sub>regs</sub>의 백분율은 무항체 대조군에 대해 상대적으로 변화가 없었다. 그러나, 미리 복합체화된 IL-2/항-IL-2 항체의 첨가는 공여자 603(도 15a) 및 625(도 15b)에 대해 용량 의존적으로 T<sub>regs</sub>의 빈도를 감소시켰다. IL-2의 고농도에서, Treg 세포의 빈도는 항체 처리하지 않은 시료와 비슷하거나 약간 높았다. 그러나 10 ng/mL 이하의 IL-2 농도에서 시험된 모든 항체로 24시간 자극한 후에 훨씬 더 적은 T<sub>regs</sub>를 확인하였다. 이는 XPA.92.019, XPA.92.042 및 XPA.92.099 항체가 T<sub>reg</sub> 항상성에 필요한 IL-2 신호를 억제함을 시사한다.

#### 실시예 11: 쥐 결장 암종 모델에서 면역 세포에 대한 IL-2/항체 복합체의 효과

항-IL-2 항체/IL-2 복합체가 결장암 치료에 효과적인지를 결정하기 위해, 마우스에게 CT26 세포를 피하 이식하고 이어서 항체/IL-2 처리를 실시했다.

[0431] **종양 세포.** CT26 쥐 결장 종양 세포는 원래 ATCC로부터 구입하였다. 종양 세포를 냉동된 한 개의 바이알에서 해동시키고 10% 열-불활성화된 FBS를 함유하는 적절한 완전 RPMI 배양 배지를 사용하여 시험관내 배양물에 넣었다.

[0432] 동물. Jackson Laboratories로부터 구입한 7~8 주령의 암컷 Balb/c 마우스를 사용하였다. 마우스를 4일 동안 순응시키고 동물용으로 18개의 케이지 각각에 네 마리의 마우스로 식량과 물을 무제한 제공하고 연구 시작 4일 전에 순응시켰다. 마우스에 종양 세포를 이식하기 전에(0일째), 종양이 캘리퍼스(calipers)로 측정될 때까지 일주일에 한 번 마우스 무게를 측정하였고, 치료 개시 전날, 종양 성장 및 치료 중에 일주일에 두 번 무게를 측정하였다.

[0433] 처리. IL-2는 Reprokine(이스라엘)으로부터 얻었고 항-IL-2 항체를 XOMA에서 제조하였다. 멸균수로 제조된 IL-2의 저장 용액을 적절하게 투여액에 희석시켜 200  $\mu$ l의 부피에서 50  $\mu$ g, 100  $\mu$ g, 150  $\mu$ g 및 1.5  $\mu$ g을 해당 그룹의 각 마우스에 전달하였다. IL-2 및 항체 조합물을 투여 일에 투여액 중에 함께 혼합되었다.

[0434] 생체 내 효능 연구: 충분한 수의 세포가 마우스에 이식될 준비가 될 때까지 CT26 세포 배양물을 약 1주 동안 팽창시켰다. 이식 당일, 세포를 따뜻한 트립신/EDTA 용액으로 간략히 처리한 후 혈청 함유 배지를 첨가하고 멸균 1X PBS에서 2회 세척한 후 지수 성장기에서 배양물로부터 세포를 수확하였다. 세포 혼탁액을 세포 생존력 및 부착 능력을 보존하기 위해 이식 시까지 및 이식하는 동안 얼음에서 유지하였다. 마지막 원심분리 후, 세포를 계수하고 멸균 1X PBS 중의  $7.5 \times 10^6 / ml$ 의 최종 농도로 적절하게 재현탁시켰다. 생존력은 0.4% 트리판 블루 용액을 사용하여 측정하였으며 94.5%인 것으로 나타났다. 종양 세포( $0.75 \times 10^6$ )를 마취된 마우스의 좌측에 100  $\mu$ l의 부피로 피하 이식하였다. 마우스를 주의 깊게 모니터링하고 임상 관찰을 매일 기록했다. 치료 시행 후 매일 마우스 체중을 측정하였고 종양 성장을 길이(L) 및 폭(W)의 캘리퍼스 측정에 의해 주 2회 결정하였다; 종양 크기는 공식 ( $L \times W^2 / 2$ )로 계산한다. 그룹간에 유사한 종양 평균 및 표준 편차를 보장하는 컴퓨터 생성 무작위 템플릿을 사용하여 치료 그룹으로 무작위로 추출한 경우, 종양은 세포 이식 후 6일째에 캘리퍼로 측정할 수 있게 되었고 크기가 약 100  $mm^3$ 에 도달하였다. 무작위 추출 후, 마우스는 복강 내 경로로 시험 물품을 받았다.

[0435] 결과: 단지 IL-2로만 처리된 동물에서 종양 성장 결과의 분석은 비히를 대조군(20일째에 대략 2600  $mm^3$ )과 비교하여 IL-2 50  $\mu$ g 및 100  $\mu$ g 처리된 그룹(20일째에 각각 대략 1300  $mm^3$  및 400  $mm^3$ )에서 10~20일의 종양 성장 감소가 있었고, 이들 마우스는 기면성이었고 동물 중 일부 사망(3)이 있었다(도 16). 이는 문헌의 전임상 보고 및 임상에서 효과적인 IL-2 치료법의 도전적인 성격과 일치한다. 2.5 mg/kg 이하의 IL-2 단독 투여량은 최소의 항-종양 효능을 갖는다.

[0436] 대조적으로, 1:1의 비율로 항-IL-2 항체와 조합된 IL-2의 투여는 비히를 대조군과 비교하여 IL-2:mAb 조합의 개선된 치료 지수(Therapeutic Index, TI), 그리고 1:1 몰비(1:10 질량비) 및 IL-2 mAb 존재하에 매우 저용량인 IL-2의 항-종양 효능의 중요성을 보여주었다. 마우스에 표 11에 기재된 바와 같이 다양한 투여량의 IL-2 및 항체를 투여하였다.

[0437] 표 11

설계	마우스 번호	처리/ IP 경로	투여량 (ug/마우스)/체적	투약 일정
종양의 무작위 추출 후 치료 시작 (약 100 $mm^3$ )	6	대조 비히 클	NA/200 $\mu$ l	Q 3일 1.5 주
	6	mAb19 + IL-2 (1:1 몰비)	15 ug/마우스 + 1.5 ug/마우스	Q 3일 1.5 주
	6	mAb19 + IL-2 (1:2 몰비)	15 ug/마우스 + 3.0 ug/마우스	Q 3일 1.5 주
	6	mAb19 + IL-2 (3:1 몰비)	15 ug/마우스 + 0.5 ug/마우스	Q 3일 1.5 주
	6	mAb19 + IL-2 (1:2 몰비; ½ 총 복용량 대상기 그룹 3)	7.5 ug/마우스 + 1.5 ug/마우스	Q 3일 1.5 주

[0438]

[0439] 도 17은 IL-2에 대한 항체의 1:1 비율을 받는 동물이 다른 비율의 IL-2/항체 조합 처리를 받는 동물에 비해 종

양 성장에 대한 효능이 개선되었음을 입증한다. 또한, 이 동물들에서 치사율도 없고 명백한 부정적인 체중 감소나 부정적인 행동 징후도 없었다.

[0440] 이들 결과는 항-IL2 mAb와 조합한 IL-2의 매우 낮은 용량이 중등도에서 양호한 항-종양 효능임을 입증하고, 15 ug:1.5 ug(즉, 0.75 mg/kg:0.075 mg/kg)으로 투여된 mAb19:IL2의 1:1 몰비가 가장 효과적인 비율이다. 9일째에 mAb:IL2 15ug:1.5ug 그룹은 다른 모든 그룹과 통계적으로 유의하게 다름을 주목한다.

[0441] IL-2/항-IL-2 항체 치료의 몰비 측면을 추가로 분석하기 위한 추가 연구가 수행되었다. 치료 요법을 하기 표 12에 나타낸다.

[0442] 표 12

설계	마우스 번호	처리 / IP 경로	투여량 (ug/마우스)/체적	투약 일정
종양의 무작위 추출 후 치료 시작 (약 100 mm <sup>3</sup> )	11~12	대조 비히클	NA/200 uL	Q 3일 1.5주 (즉, 1, 4, 7, 10일)
	11~12	mAb19 + IL-2 (1:1 몰비)	15 ug/마우스 + 1.5 ug/마우스	Q 3일 1.5주
	11~12	mAb19 + IL-2 (2:1 몰비)	30 ug/마우스 + 1.5 ug/마우스	Q 3일 1.5주

[0443]

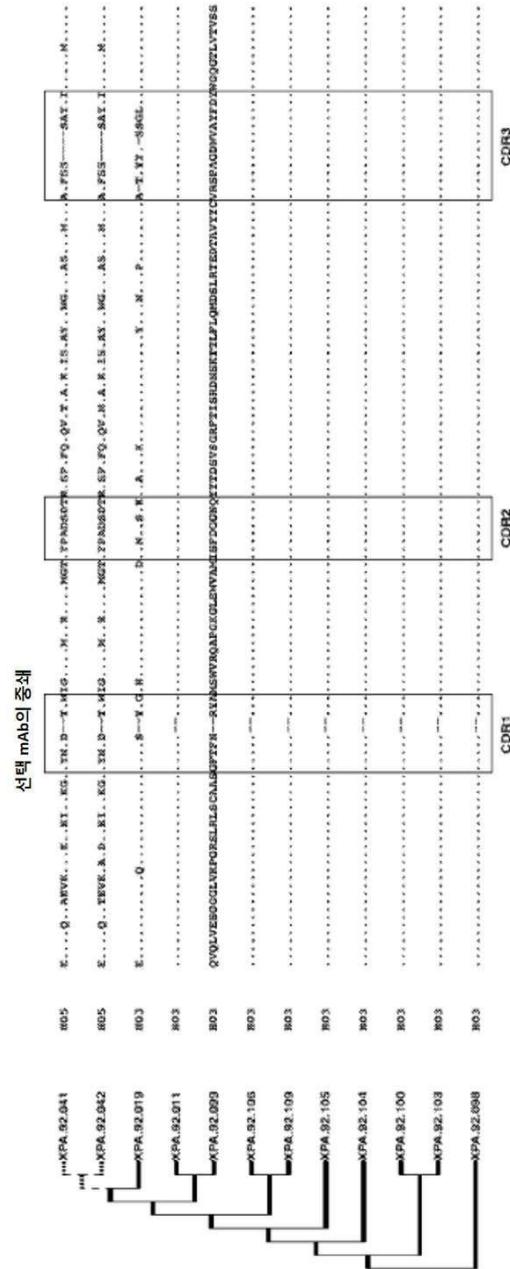
[0444] 결과를 도 18에 나타내었고, 이는 7일 및 10일째에 mAb:IL2 15 μg:1.5 μg 그룹에서 더 느린 종양 성장이 비히클 대조군과 통계적으로 유의하게 다르고 mAb:IL2 30 μg:1.5 μg 그룹에서도 성장이 대조군에 비해 낮음을 예시한다. 실험은 항-IL2 mAb와 조합하여 IL-2의 매우 낮은 투여량이 항-종양 효능을 입증하고, 15 ug:1.5 ug(즉, 0.75 mg/kg: 0.075 mg/kg)으로 투여된 mAb:IL2의 1:1 몰비가 적어도 2:1 비율만큼 효과적임을 입증한다. 이 투여량 그룹 중 어떤 것에도 치사율이나 유의한 부작용이 없었다. 따라서, IL-2 단독으로 유사한 효능이 어느 정도의 사망률을 동반하는 반면, 이들 연구에서는 적어도 6배(15:0.5 내지 15:3.0)의 치료 지수가 나타났다.

[0445]

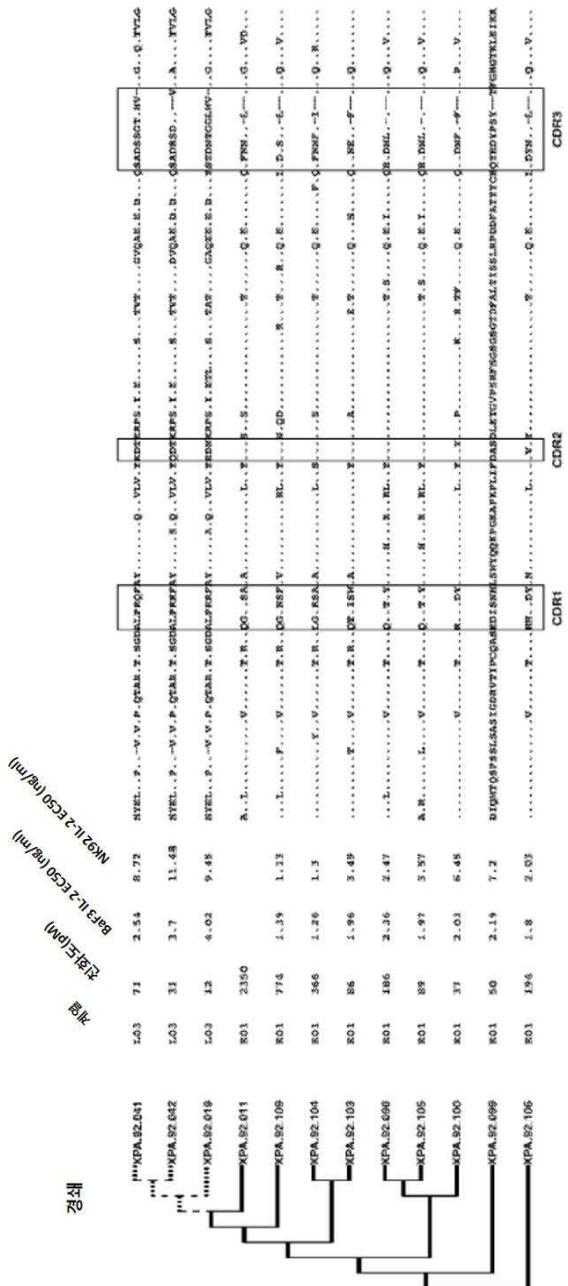
상기 예시적인 실시예에 기재된 발명의 다양한 수정 및 변형을 당업자가 생각할 수 있을 것으로 예상된다. 따라서, 첨부된 청구 범위에 나타난 바와 같은 단지 이러한 제한은 본 발명에 포함되어야 한다.

도면

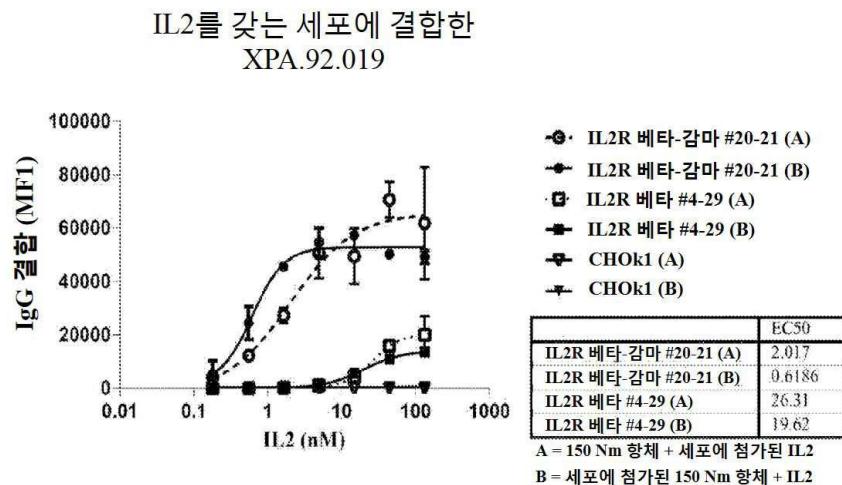
## 도면1a



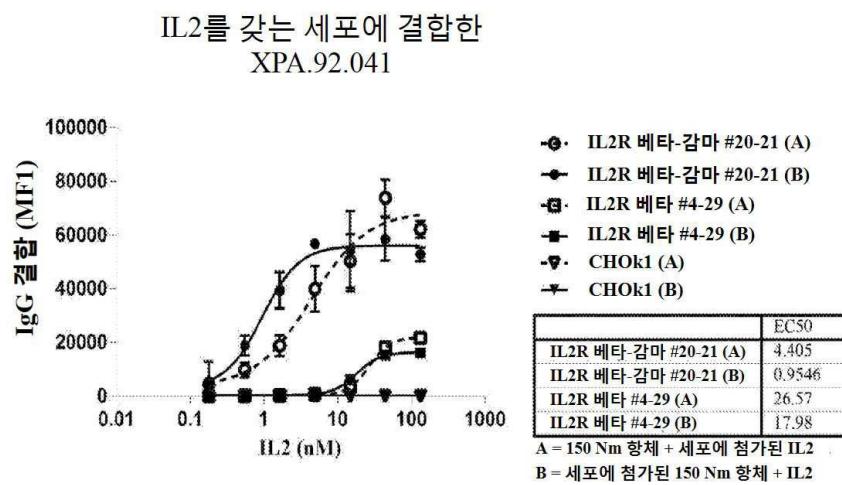
## 도면1b



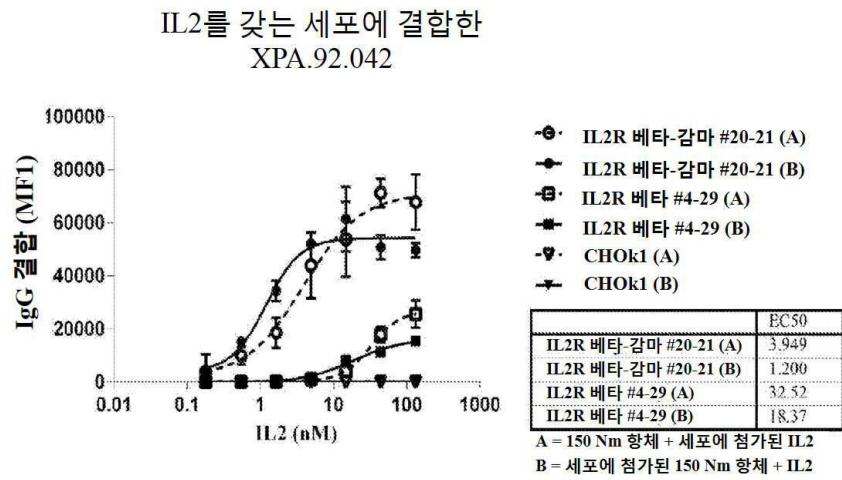
## 도면2a



## 도면2b

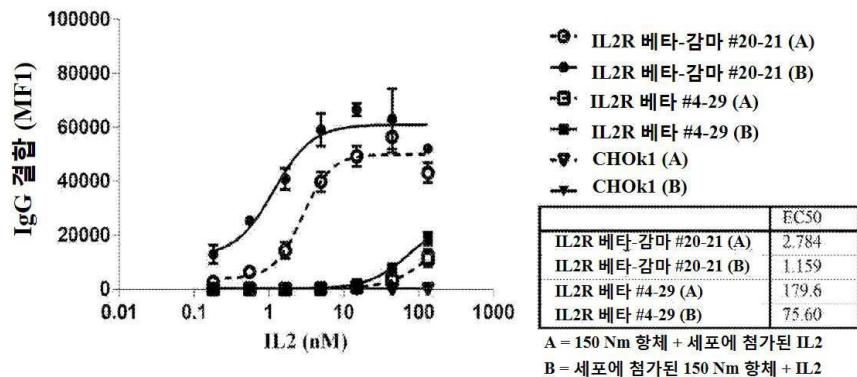


## 도면2c



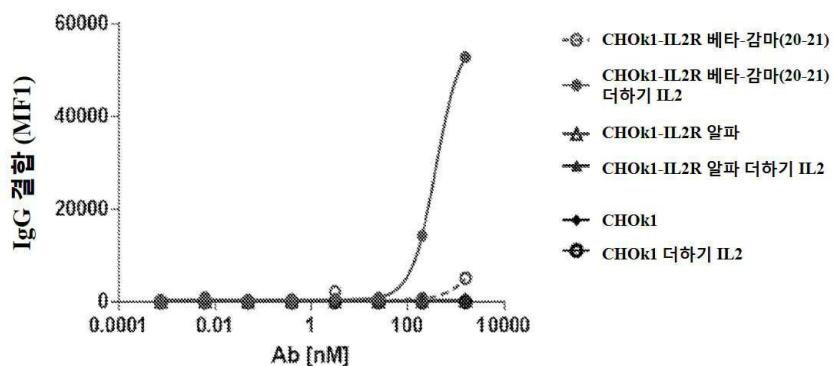
## 도면2d

IL2를 갖는 세포에 결합한  
XPA.92.099



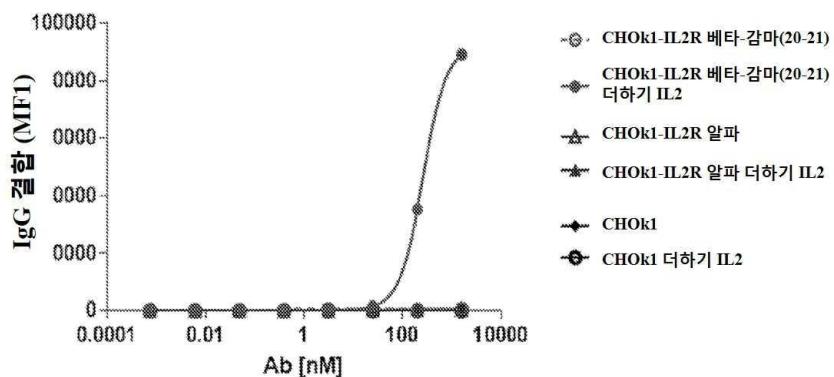
## 도면3a

세포 +/- 100 nM IL2에 결합한  
XPA.92.019



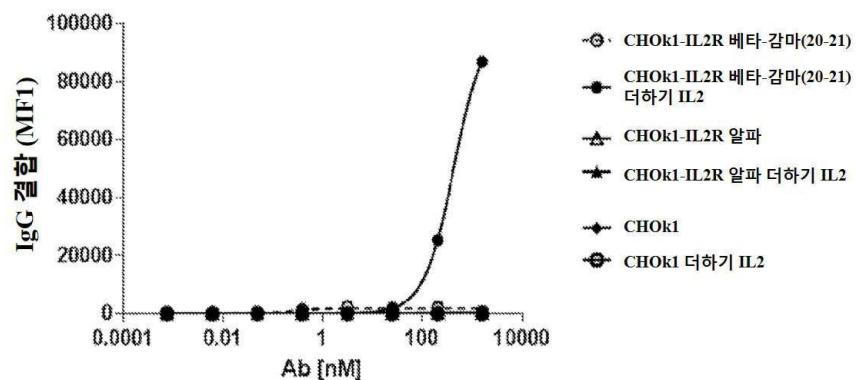
## 도면3b

세포 +/- 100 nM IL2에 결합한  
XPA.92.041

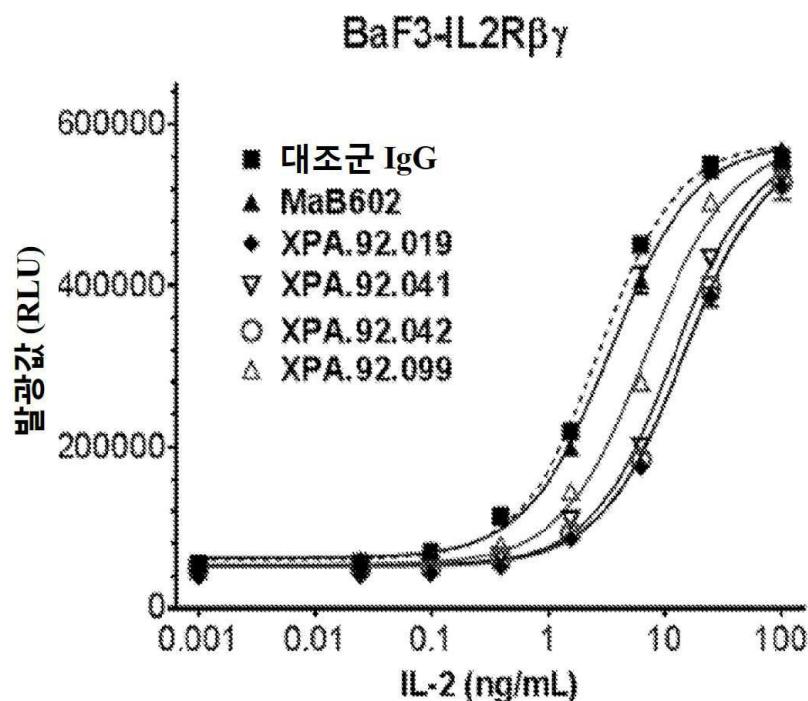


## 도면3c

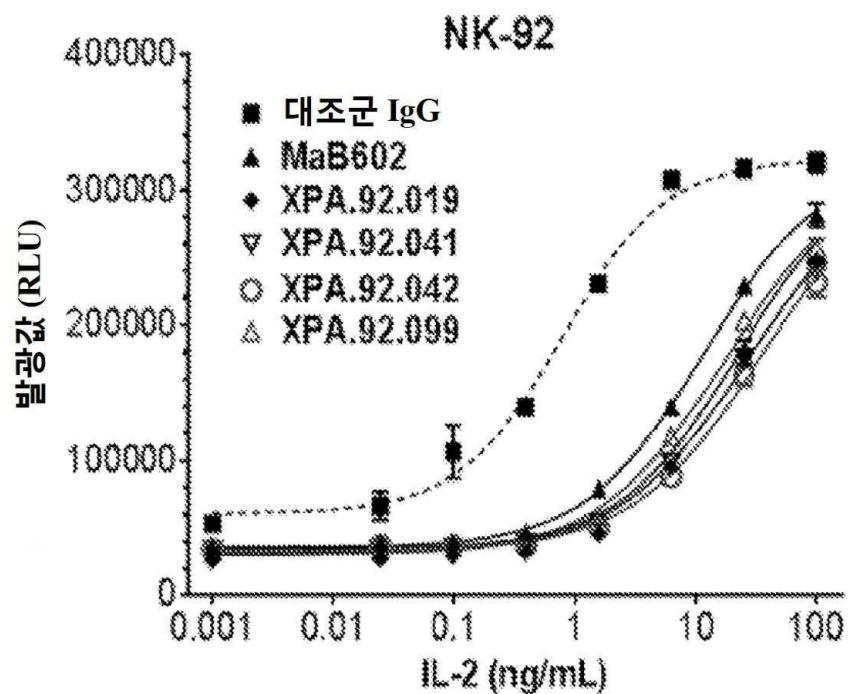
세포 +/- 100 nM IL2 에 결합한  
XPA.92.042



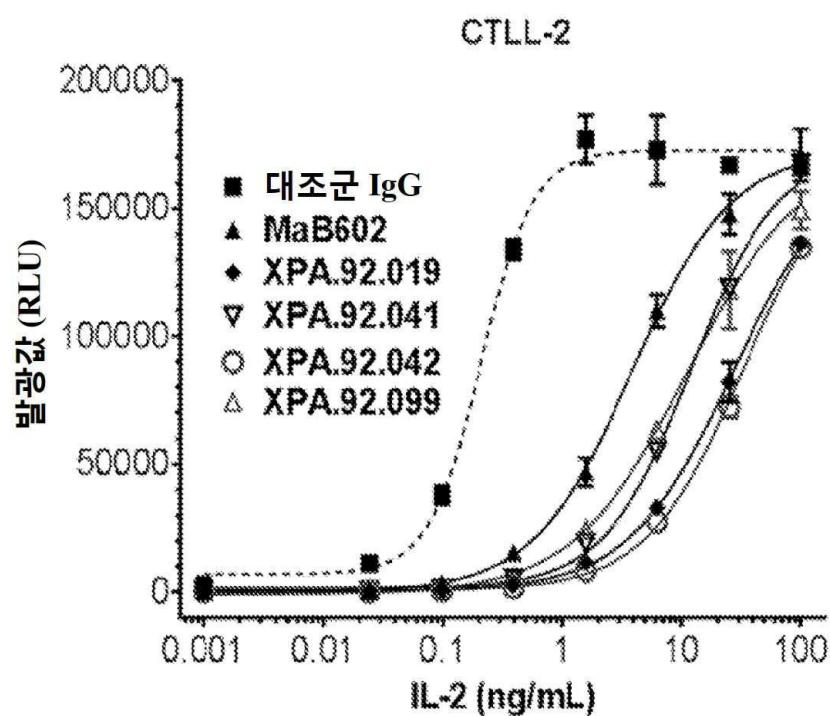
## 도면4a



도면4b

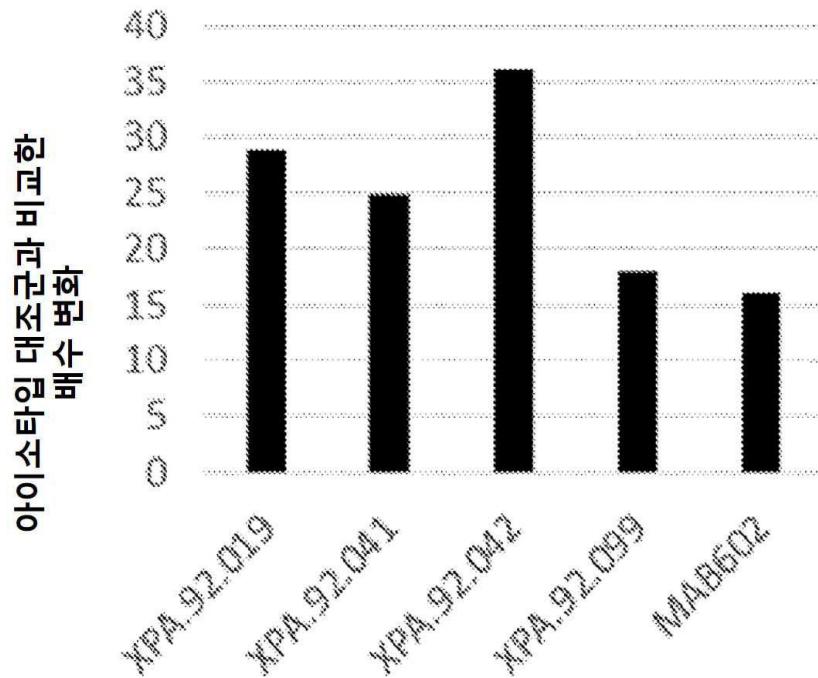


도면4c



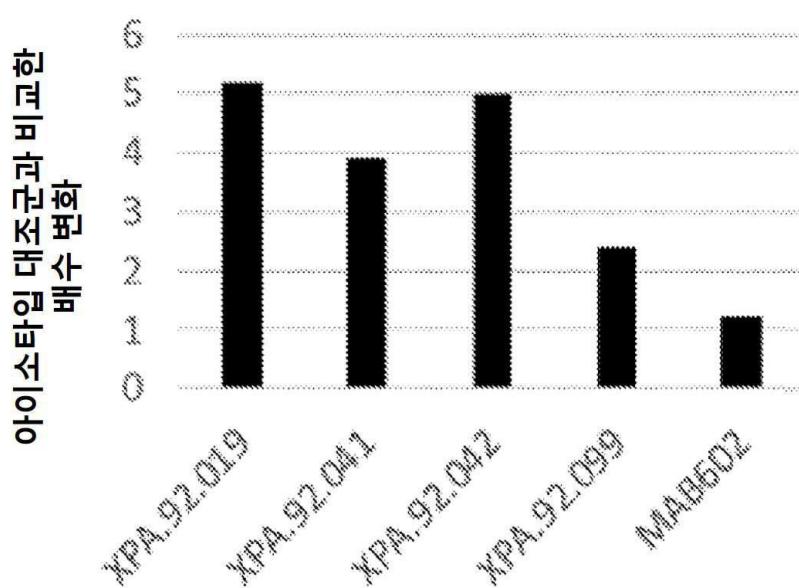
도면5a

## NK92 증식 - EC50



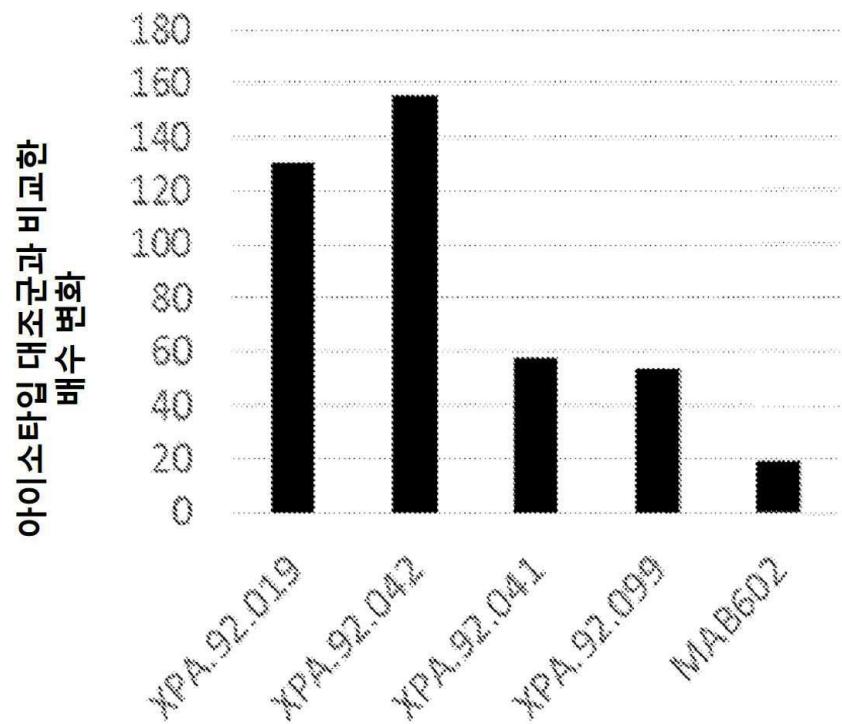
도면5b

## BaF3-Rbg 증식 EC50



도면5c

## CTL-L-2 증식 EC50



## 도면6

인터루컨-2 사열 배치

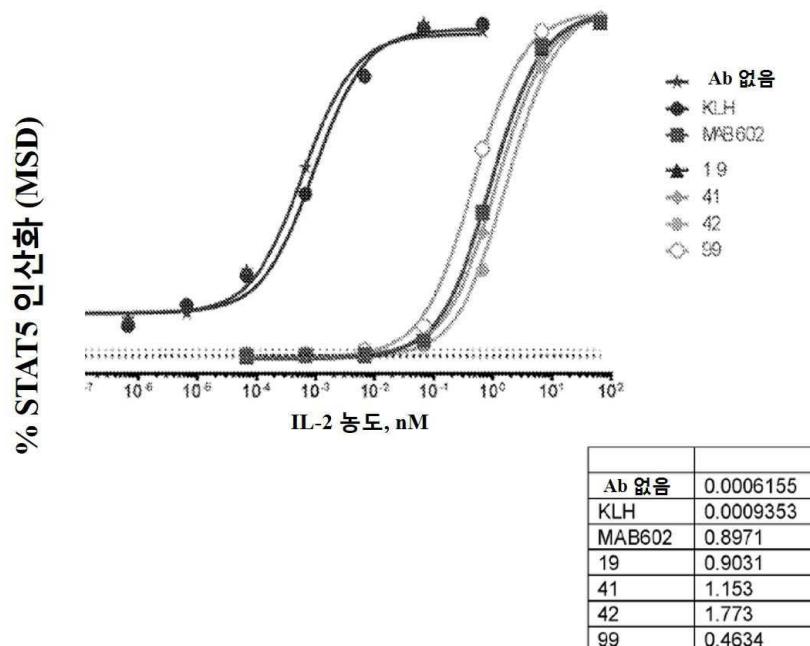
마우스 서열에서만 삽입

마우스 래트 인간 토끼 돼지

IL-2 Ra 결합 영역

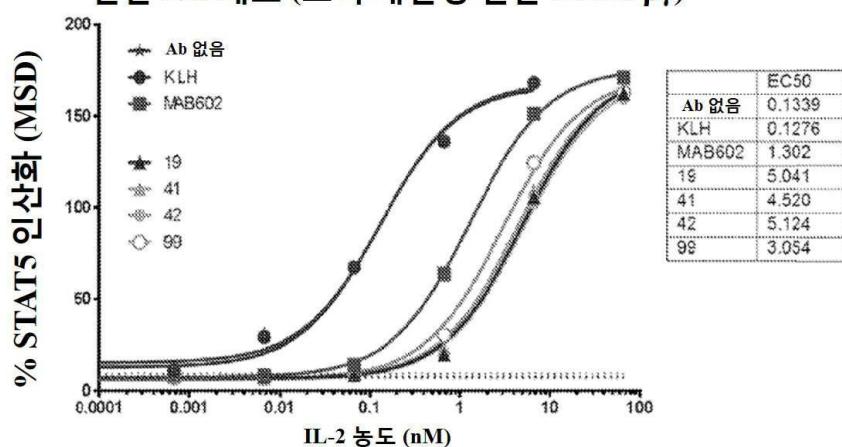
- 70 -

## 도면7a

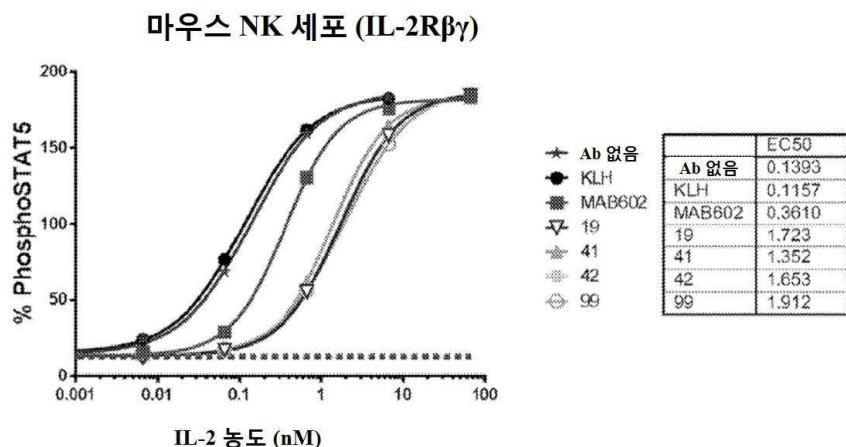
NK-92 세포 (내인성 인간 IL-2Ra $\beta\gamma$ )

## 도면7b

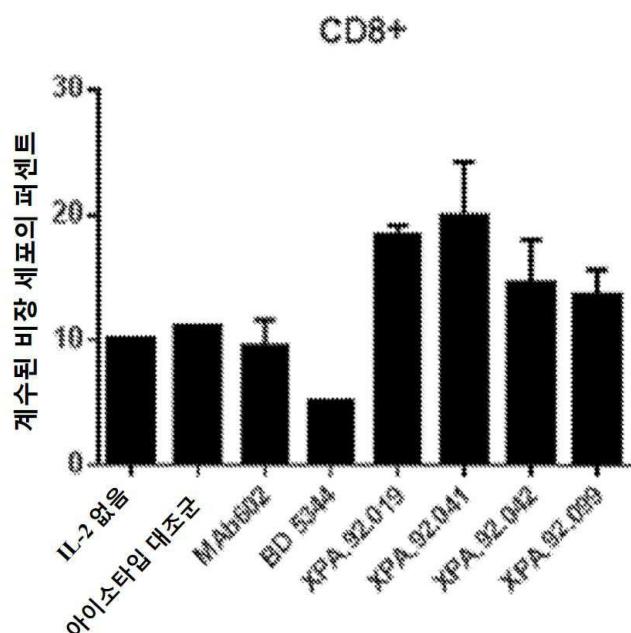
## 인간 NK 세포 (오직 내인성 인간 IL-2R βγ)



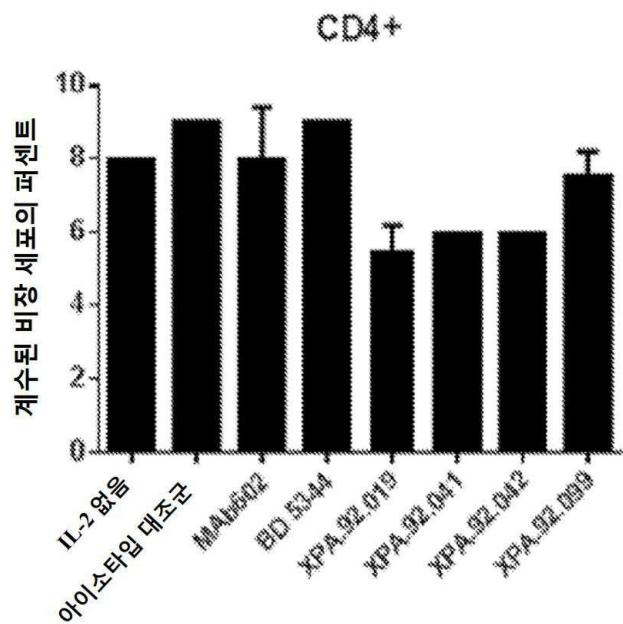
도면7c



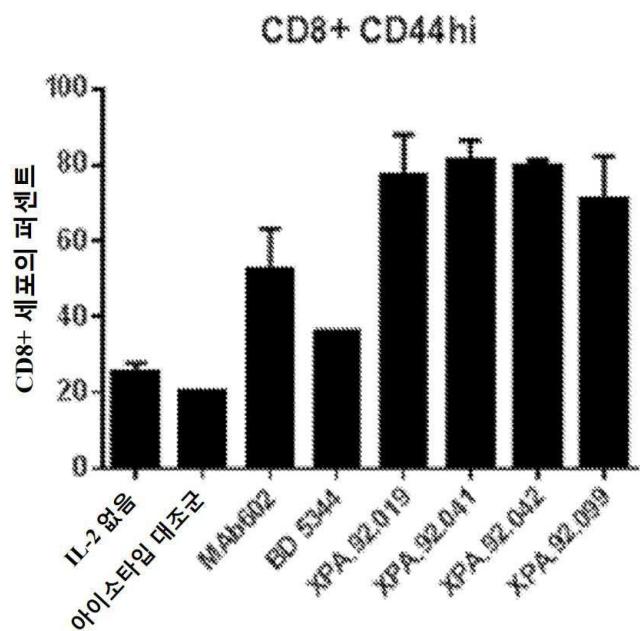
도면8a



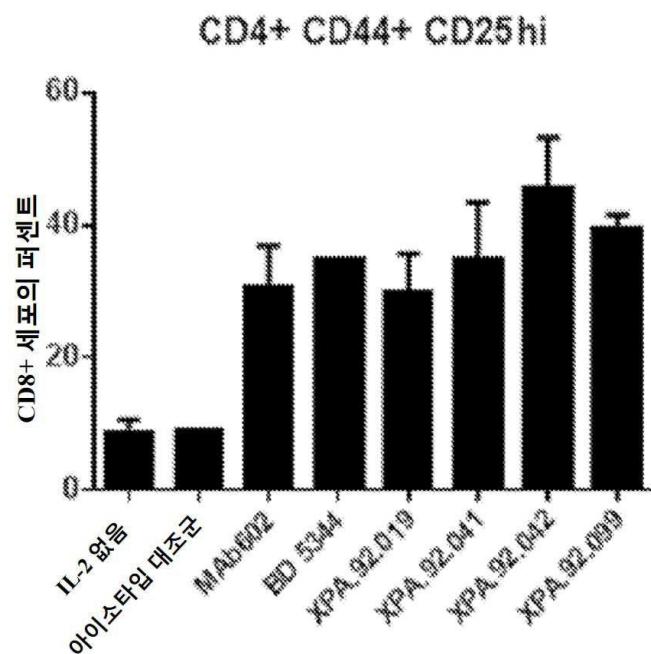
도면8b



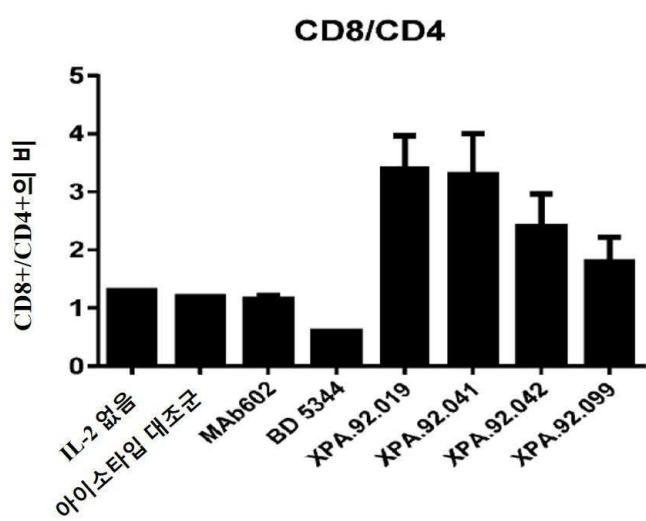
도면8c



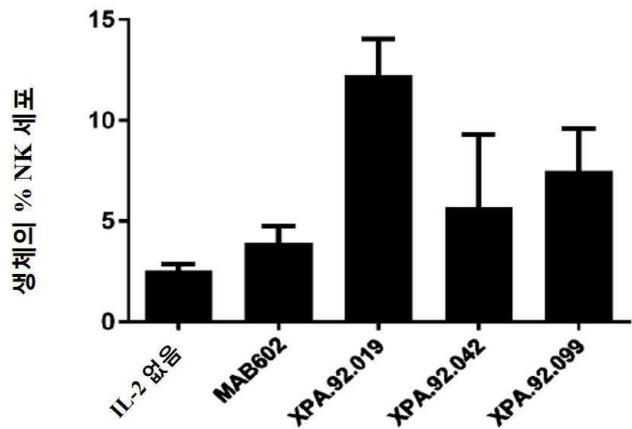
도면8d



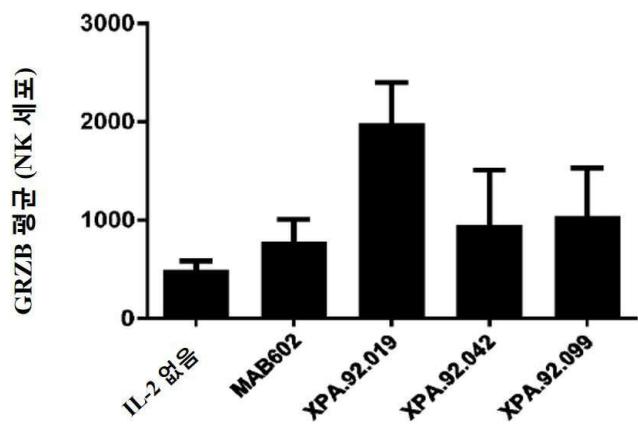
도면8e



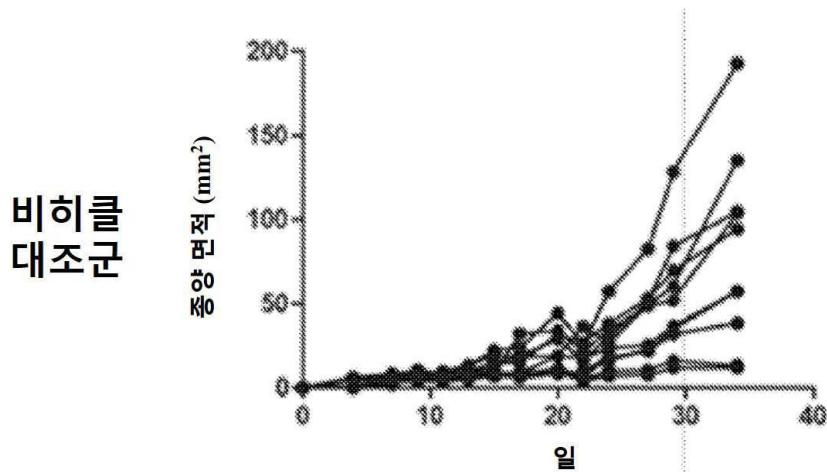
도면8f



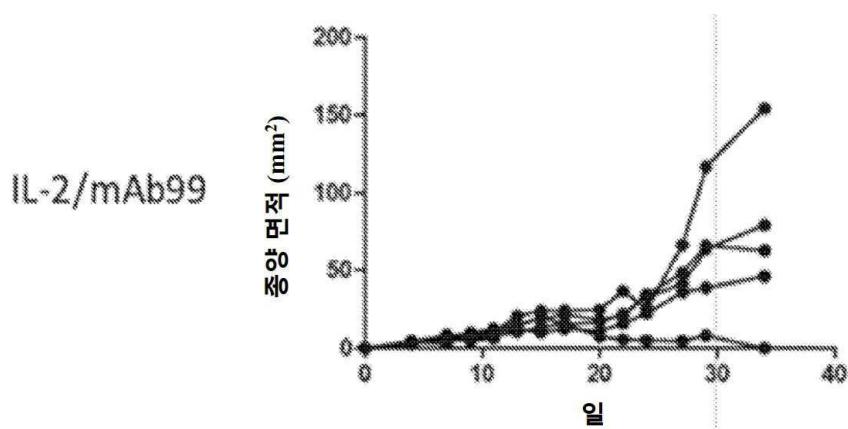
도면8g



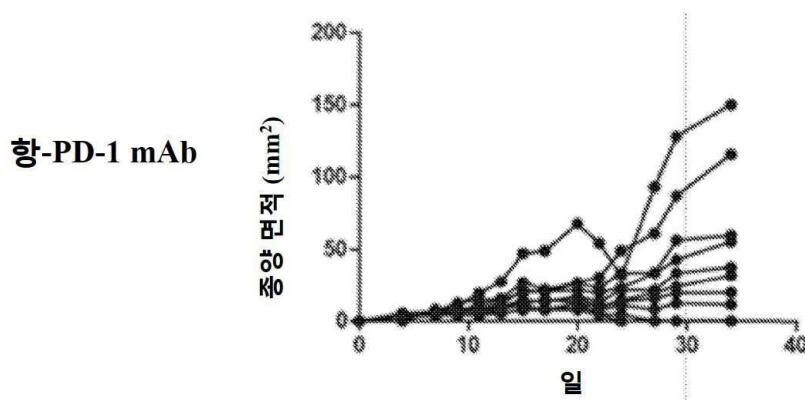
도면9a



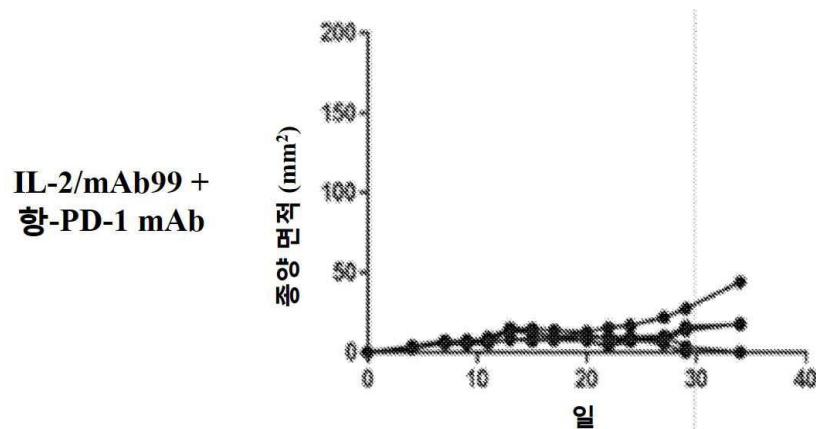
도면9b



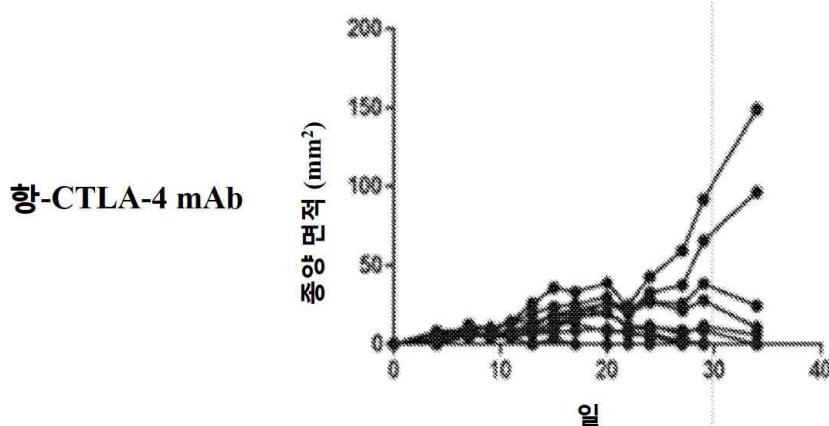
도면9c



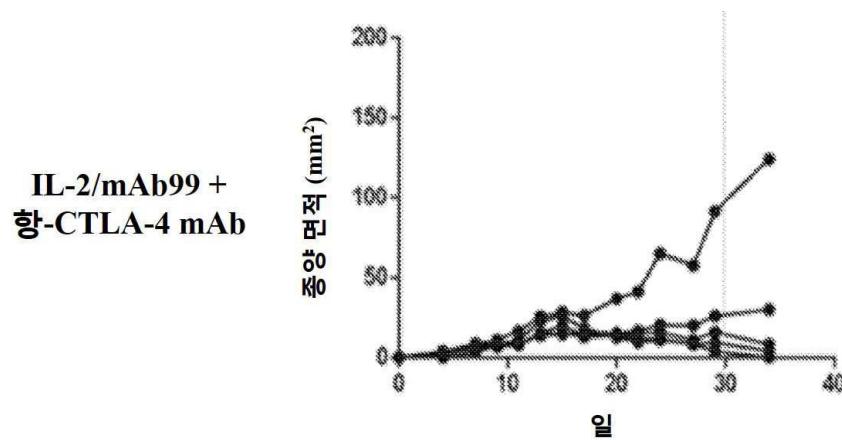
도면9d



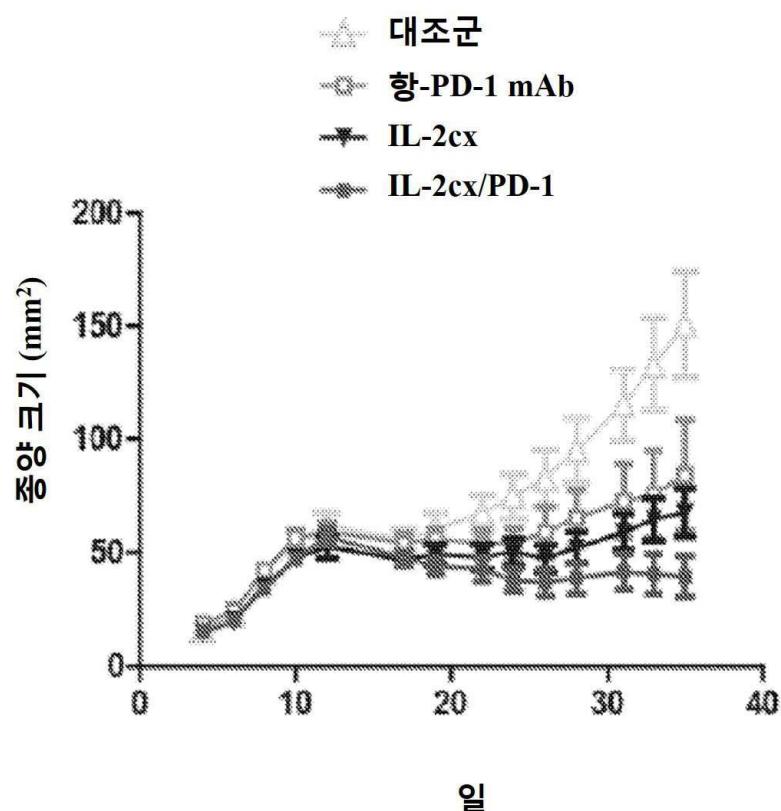
도면9e



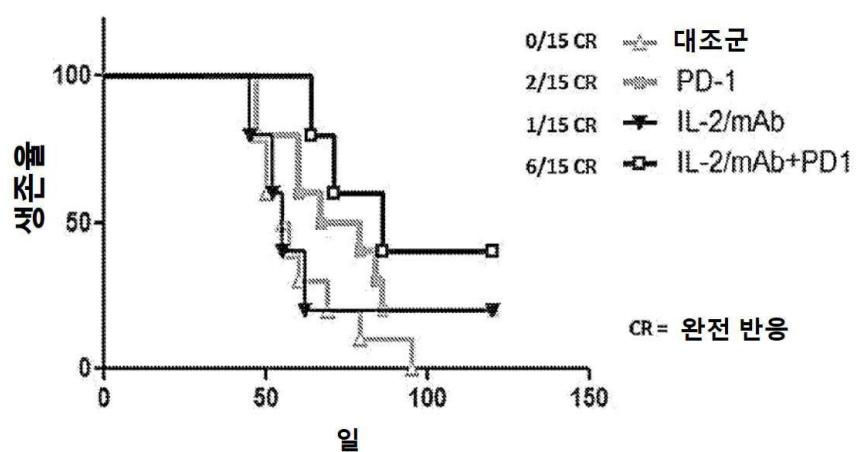
도면9f



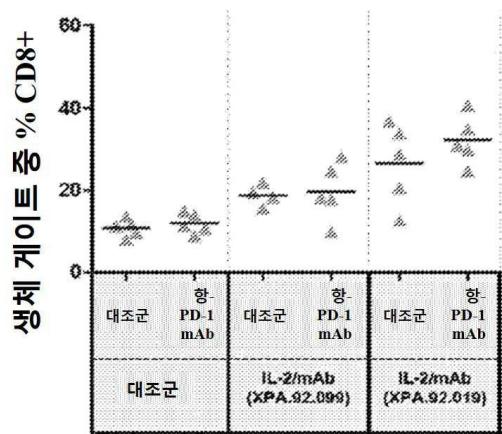
도면10a



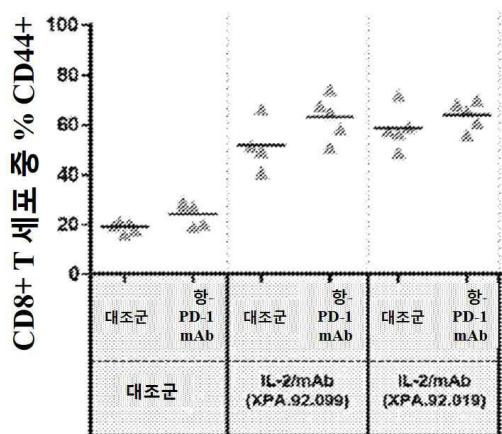
도면10b



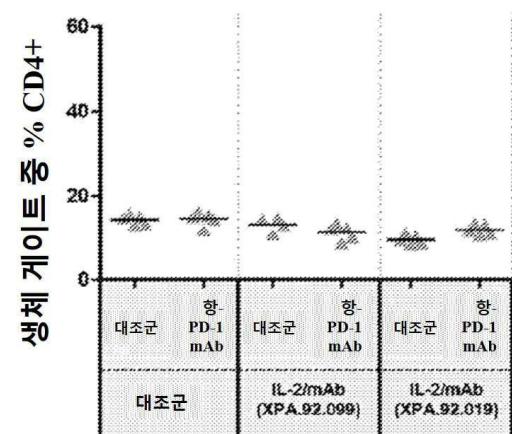
도면11a



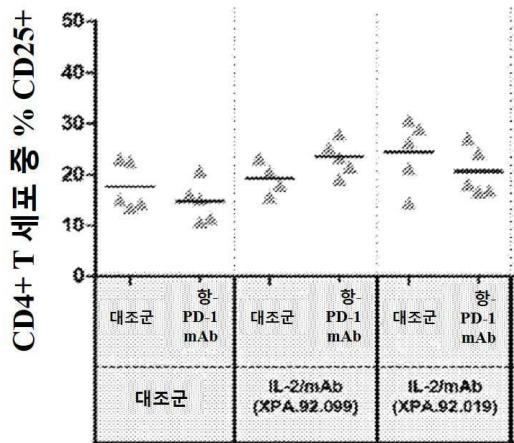
도면11b



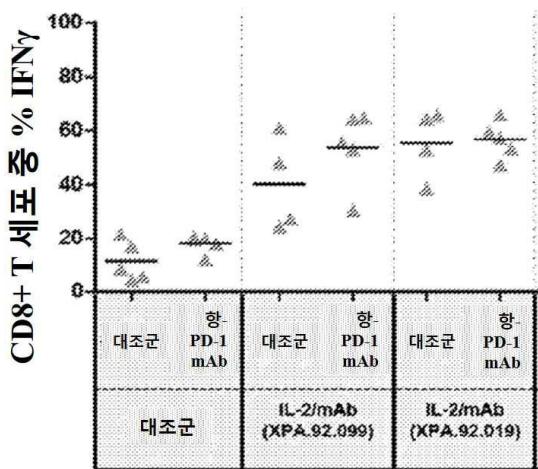
도면11c



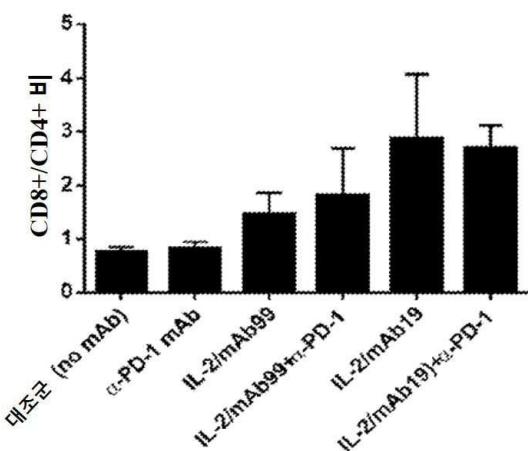
도면11d



도면11e



도면11f



## 도면12a

서열 번호	이름	시열
1	XPA.92.019 HV H-CDR1 26-33 H-CDR2 51-58 H-CDR3 97-108	EVQLVSEGGG LVKPGRSIIRL SCAASGFTFS YGMHNVROA PGKLEWVAD ISNGDSNKKY ADSVRGFTI SRDNSTKLY LQNSLRLTD TAVYCAYTPY YDSSGLDTWG QGTIVTVSS
2	XPA.92.019 HV	gaagtgcagg tggtagggc tggggggggc tggggggggc tggggggggc tggggggggc tcctgtcaag cttctggatt caacttcaatg tactatggaa tgactatggaa ccggccaggat ccaggaaagg ggcttagggtg ggtggcgat atatcaatgg atggaaagg taaaatatac gcagacctgt tgaaaggggc attcacatc tcacagaaatc atccaaaggc aatcgatgtac ctgcaatgtg acagccgtgg acctggatgg aatcgatgtatc aatcgatgtatc gacccatcac tatgtatgtg aatcgatgtatc aatcgatgtatc aatcgatgtatc aatcgatgtatc aatcgatgtatc EVQLVSEGGAE VKKPGESEKTI SRKGSGTNFD TWIGWVROM PGKLEWVAD ISNGDSNKKY SPSFQGVTT SADKSISTAY LOWGSLRASD TAMYYCARES SSAYDIWGGG TMVTVSS
3	XPA.92.041 HV H-CDR1 26-33 H-CDR2 51-58 H-CDR3 97-106	gagggtcaagc tggtagggc tggggggggc tggggggggc tggggggggc tggggggggc tcctgtcaagg gttctgtata caacttcaatg tactatggaa acgtacttggat tggctggat cccgggggag ggtggggatg gatggggacc atatccggc ctacttccgg caccatgtatc agccctgtct tocaaggcca gttcacacc tcacccggcaca aytccatggc caccggatc atgtcaatggg qdggccgtggq gqdgccgtggq acggccgtggq acggccgtggq aatcgatgtatc agccctgtct atgtcaatggg qdggccgtggq acgtatggca cctcttcgtc a EVQLVSEGGTE VRKAGDSKTI SRKGSGTNFD TWIGWVROM PGKLEWVAD ISNGDSNKKY SPSFQGVTT SADKSISTAY LOWGSLRASD TAMYYCARES SSAYDIWGGG TMVTVSS
4	XPA.92.041 HV	gagggtcaagc tggtagggc tggggggggc tggggggggc tggggggggc tggggggggc tcctgtcaagg gttctgtata caacttcaatg tactatggaa acgtacttggat tggctggat cccgggggag ggtggggatg gatggggacc atatccggc ctacttccgg caccatgtatc agccctgtct tocaaggcca gttcacacc tcacccggcaca aytccatggc caccggatc atgtcaatggg qdggccgtggq gqdgccgtggq acggccgtggq acggccgtggq aatcgatgtatc agccctgtct atgtcaatggg qdggccgtggq acgtatggca cctcttcgtc a
5	XPA.92.042 HV H-CDR1 26-33 H-CDR2 51-58 H-CDR3 97-106	gagggtcaagc tggtagggc tggggggggc tggggggggc tggggggggc tggggggggc tcctgtcaagg gttctgtata caacttcaatg tactatggaa acgtacttggat tggctggat cccgggggag ggtggggatg gatggggacc atatccggc ctacttccgg caccatgtatc agccctgtct tocaaggcca gttcacacc tcacccggcaca aytccatggc caccggatc atgtcaatggg qdggccgtggq gqdgccgtggq acggccgtggq acggccgtggq aatcgatgtatc agccctgtct atgtcaatggg qdggccgtggq acgtatggca cctcttcgtc a
6	XPA.92.042 HV	gagggtcaagc tggtagggc tggggggggc tggggggggc tggggggggc tggggggggc tcctgtcaagg gttctgtata caacttcaatg tactatggaa acgtacttggat tggctggat cccgggggag ggtggggatg gatggggacc atatccggc ctacttccgg caccatgtatc agccctgtct tocaaggcca gttcacacc tcacccggcaca aytccatggc caccggatc atgtcaatggg qdggccgtggq gqdgccgtggq acggccgtggq acggccgtggq aatcgatgtatc agccctgtct atgtcaatggg qdggccgtggq acgtatggca cctcttcgtc a
7	XPA.92.099 HV H-CDR1 26-33 H-CDR2 51-58 H-CDR3 97-110	EVQLVSEGGG LVKPGRSIIRL SCAASGFTFS YAMMSWVROA PGKLEWVAM ISFQGQNY TDSVSGFTI SRDNSTKLY LQNSLRLTD TAVYCAYTPY AGDWAYTFY WGQSTLVTVSS

## 도면12b

서열번호	이름	서열
8	XPA.92.099 HV	caggcagc tggtaggc tggtcaagg cttggggatc cttggggatc tccttgtcag ccctcgatt cacttcaat aqataatcca tggatgggtt ccggccatgt ccggcaagg ggctggatg gttggatg atatcatgt atgggttaa tcaataatc acgactcc tgatggccg attaccata tcaggatca atccaaaga acatgttt ctggaaatgg aacatggac aacggctgtt atatgttg gggatccc ggggggact gggtgcta ctggactac tggggcagg gaaaccctgtt caccctcc tca
9	XPA.92.019 LV (람다) H-CDR1 26-31 H-CDR2 49-51 H-CDR3 88-98	SYELIQPPSV SVSPQTARI TCGSDALPKR FAYWYQQKAG DEADYVCYST DNTGGLAVFG GGTKLTVLG FSGSSSGTVA TLITSGAQEE DEADYVCQSA DSQTYHVEG GGQLTVLG
10	XPA.92.019 LV (람다)	tcctatggc tgacacagcc accctggtg tcagtatccc caggacaadcc ggccaggatc acctgtctg gagatgcatt gccaaaaaaa ttgtcttatt ggaccacgaa gaaggcagnc ctggccctg taatgtcat ctatggat acaaaggat cccggatc cccggatc ctgttgtgtt ccgtgtcagg gacaaacggcc accttgacca ttagtggggc ccggaggag gtatggatc actatatacg ttactccaca gacaacactg gtgtgttctgtt ggtgttcggc ggggggatca agcttacatgtt octaggat
11	XPA.92.041 LV (람다) H-CDR1 26-31 H-CDR2 49-51 H-CDR3 88-98	SYELIQPPSV SVSPQTARI TCGSDALPRO FAYWYQQKPG QAPVLYIYD TERPSGIPER FSGSSSGTIV TLITSGQAE DEADYVCQSA DSQTYHVEG GGQLTVLG
12	XPA.92.041 LV (람다)	tcctatggc tgacacagcc accctggtg tcagtgtcccc casggacagac ggccaggatc accgtctg gagatgtt ttgtcttatt ggccaggaa gaaggcagnc caggccctg tgctgtgtt atataaaagac actggatggc cccggatc cccggatc tttgttgtt ccgtgtcagg gacaaacggcc acgttgacca ttagtggatc ccggaggaa gatggatc actatatacg tcataatggca gacggatgtt gtacttataa cgtgtttggaa ggggggatca agcttacatgtt octaggat
13	XPA.92.042 LV (람다) H-CDR1 26-31 H-CDR2 49-51 H-CDR3 88-97	SYELIQPPSV SVSPQTARI TCGSDALPKR FAYWYQQKSG QAPVLYIYD TERPSGIPER FSGSSSGTIV TLITSGQAE DDADYVCQSA DRDSYVFGA GITLTVLG

도면 12c

## 도면12d

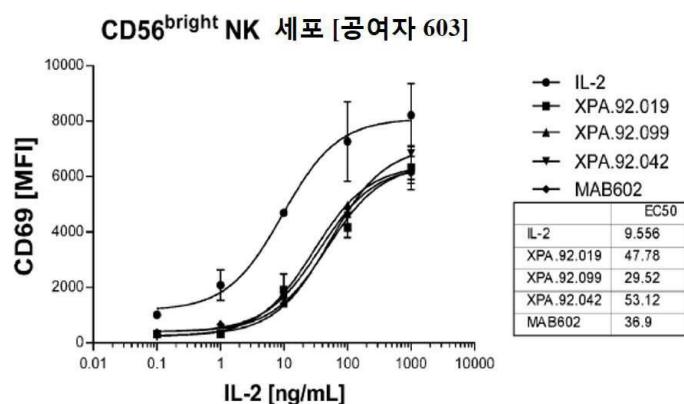
서열 번호	이름	서열
25	XPA.92.042 HV H-CDR3	SSAYDIAFRS
26	XPA.92.099 HV H-CDR1	GFTFRRYA
27	XPA.92.099 HV H-CDR2	TSFDGGNQ
28	XPA.92.099 HV H-CDR3	VRSPPAGDWVAYFDY
29	XPA.92.019 LV (람[E]) L-CDR1	ALPFKRF
30	XPA.92.019 LV (람[E]) L-CDR2	ZDN
31	XPA.92.019 LV (람[E]) L-CDR3	YSTDWTGGIWW
32	XPA.92.041 LV (람[E]) L-CDR1	ALPFRKF
33	XPA.92.041 LV (람[E]) L-CDR2	KDT
34	XPA.92.041 LV (람[E]) L-CDR3	DSSGTYHQSA
35	XPA.92.042 LV (람[E]) L-CDR1	ALPFKRF
36	XPA.92.042 LV (람[E])	QDT

## 도면12e

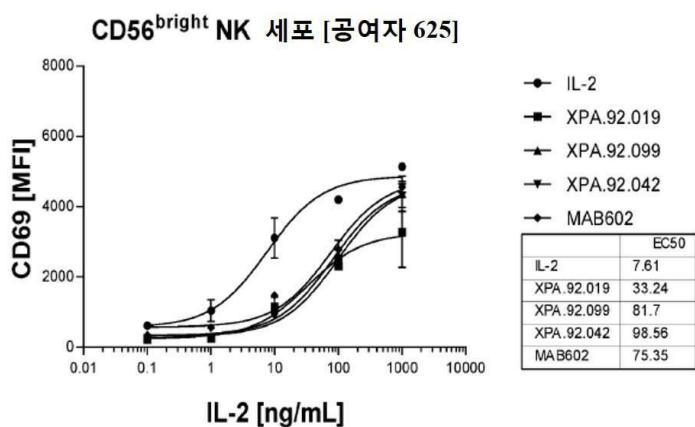
서열 번호	이름	서열
	L-CDR2	
37	XPA.92.042 LV (람다) L-CDR3	QSADRSDSYY
38	XPA.92.099 LV (파이) L-CDR1	EDISNH
39	XPA.92.099 LV (파이) L-CDR2	DAS
40	XPA.92.099 LV (파이) L-CDR3	HQYHDPST

HV = 중쇄 가변 영역  
 LV = 경쇄 가변 영역

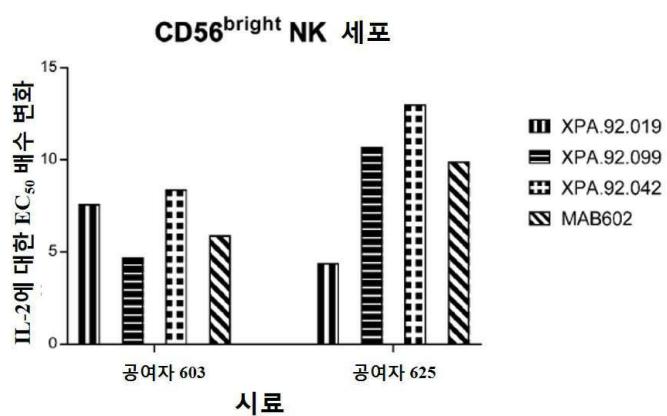
도면13a



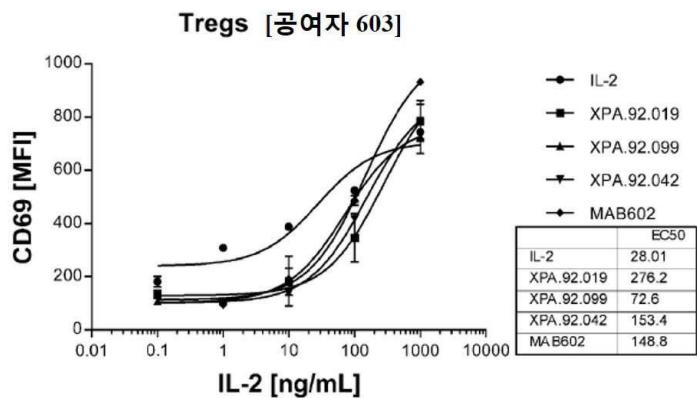
도면13b



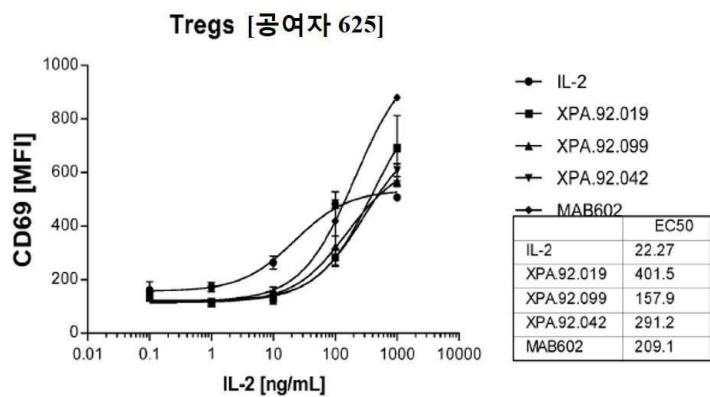
도면13c



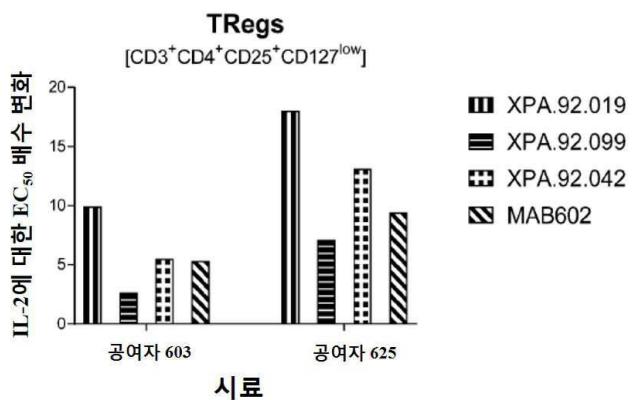
## 도면14a



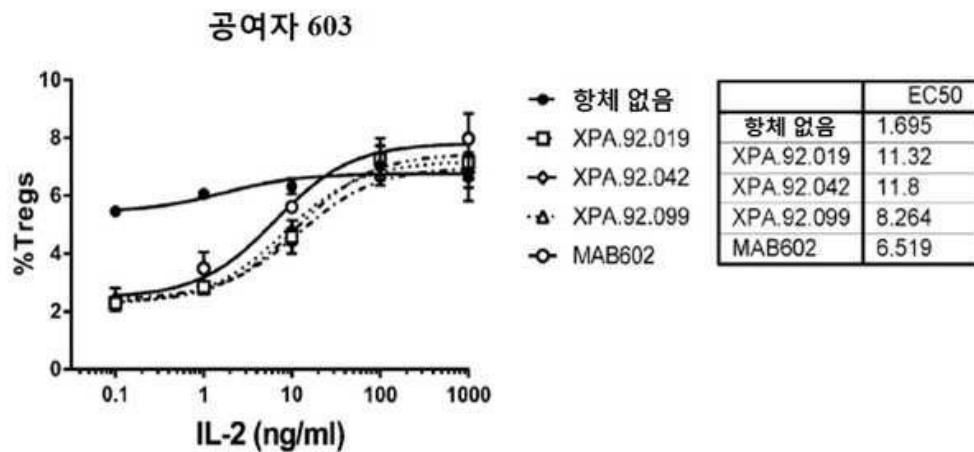
## 도면14b



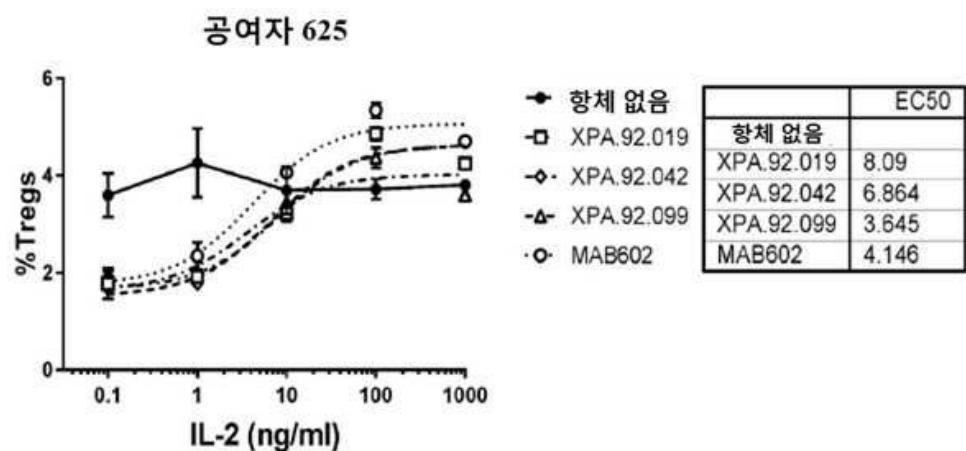
## 도면14c



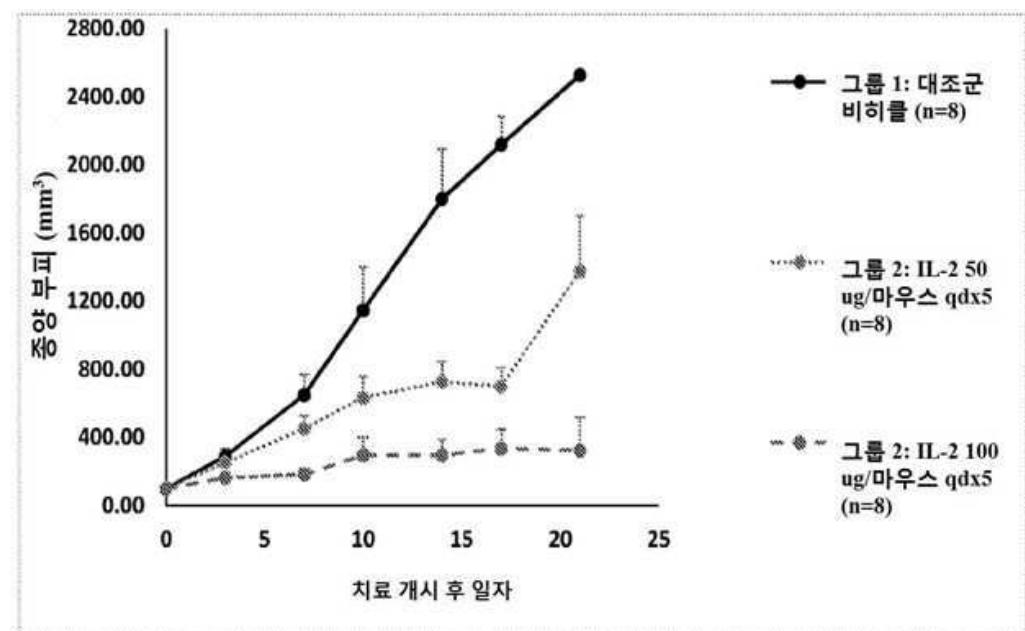
도면15a



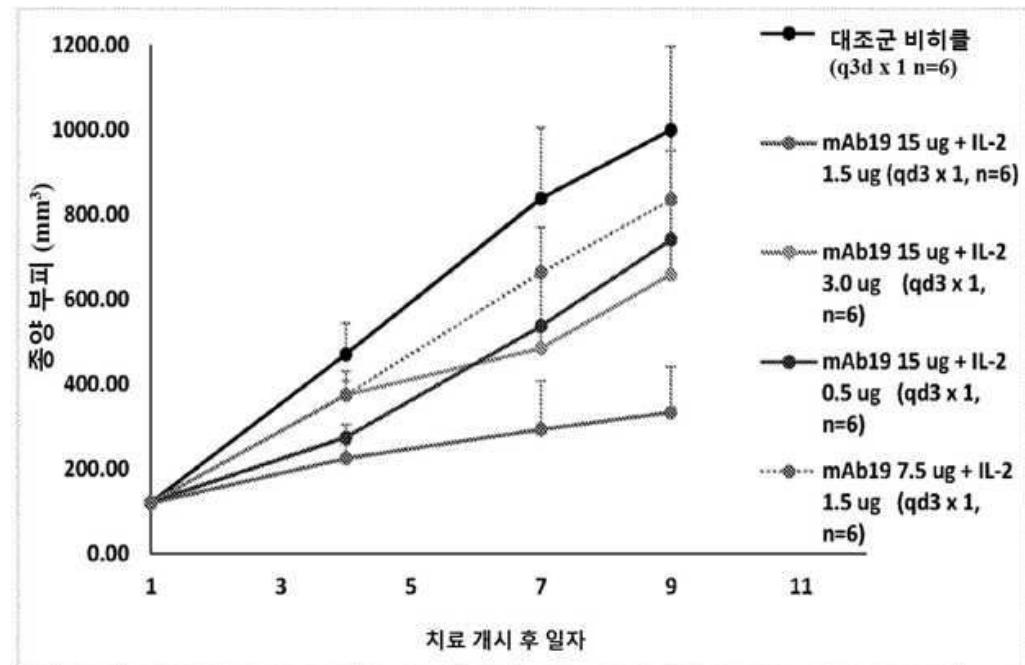
도면15b



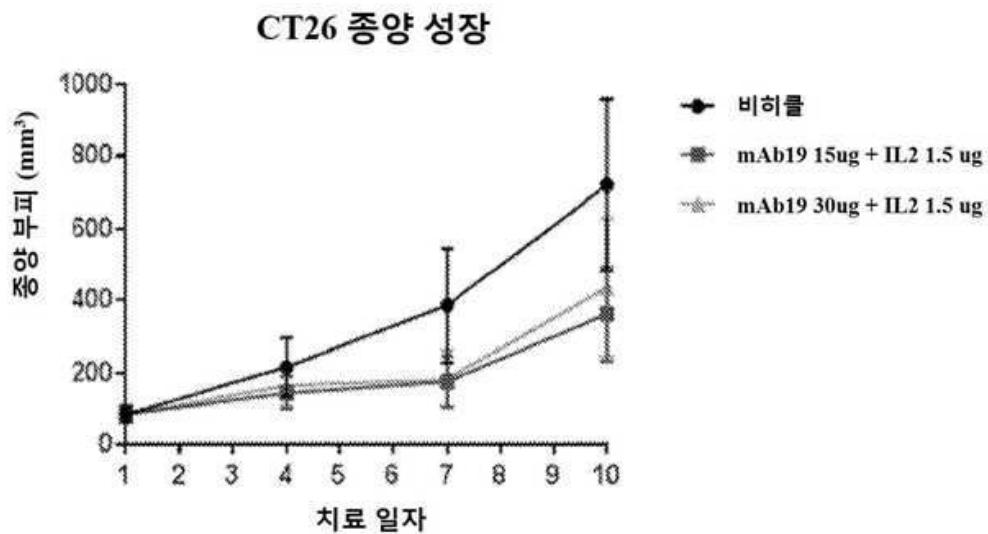
도면16



도면17



## 도면18



## 서열 목록

## SEQUENCE LISTING

<110> Xoma (US) LLC  
 Batterton, Matt

<120> Antibodies That Bind Interleukin-2 and Uses Thereof  
 <130> 27129/51134  
 <150> US 62/421,038  
 <151> 2016-11-11  
 <150> US 62/401,158  
 <151> 2016-09-28  
 <160> 40  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <223> XPA.92.019 HV  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (26)..(33)  
 <223> H-CDR1

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt;

&gt; (51)..(58)

&lt;223&gt; H-CDR2

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (97)..(108)

&lt;223&gt; H-CDR3

&lt;400&gt; 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Asp Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Thr Pro Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; XPA.92.019 HV

&lt;400&gt; 2

gaagtgcagc tggtgagtc tggggaggc ttggccagc ctgggaggc cctgagactc 60

tcctgtcagc cctctggatt caccttcagt tactatggca tgcaactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctagagtg ggtggcagat atatcaaatg atggaagtaa taaatattac	180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagac cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag acctgaggac acggctgtat attactgtgc gacccttac	300
tatgatagta gtgggttgga ctactggggc cagggAACCC tggtcacCGT ctcctca	357

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; XPA.92.041 HV

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (26)..(33)

&lt;223&gt; H-CDR1

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (51)..(58)

&lt;223&gt; H-CDR2

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (97)..(106)

&lt;223&gt; H-CDR3

&lt;400&gt; 3

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Asn Phe Asp Thr Tyr

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Thr Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Phe Ser Ser Ser Ala Tyr Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 4

<211> 351

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> XPA.92.041 HV

<400> 4

gaggtccagc tggtagtc tggaggcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatt 60

tcctgttaagg gttctggata caacttgac acgtactgga tcggctgggt ggcgcagatg 120

cccgaggagag gcctggagtg gatgggcacc atctatcctg ctgactctga caccagatat 180

agcccgctt tccaaggcca ggtcaccacc tcagccgaca agtccatcg caccgcctac 240

ctgcagtggg gcagcctgag ggcctcggac accgcccgtt attactgtgc gaggtttagc 300

agttctgcct atgacatttg gggcaaggaa acaatggtca ccgtctcttc a 351

<210> 5

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.042 HV

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (26)..(33)

<223> H-CDR1

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (51)..(58)

<223> H-CDR2

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (97)..(106)

<223> H-CDR3

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr Glu Val Lys Lys Ala Gly Asp

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Asn Phe Asp Thr Tyr

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Trp Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Phe Ser Ser Ala Tyr Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 6

<211> 351

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221>

misc\_feature

<223> XPA.92.042 HV

<400> 6

gagggtccagc tggtacagtc tggaacagag gtgaaaaagg ccggggactc tctgaagatt	60
tcctgttaagg gttctggata caactttgac acgtactgga tcggctgggt ggcggcagatg	120
cccgggagag gcctggagtg gatgggcacc atctatcctg ctgactctga caccagatat	180
agtccgtctt tccaaggcca ggtcaccatg tcagccgaca agtccatcag caccgcctac	240
ctgcagtggg gcagcctgag ggcctcgac accgccatgt attactgtgc gaggttcagc	300
agctctgcct atgacatttg gggccaaggaa acaatggtca ccgtctttca a	351

<210> 7

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.099 HV

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (26)..(33)

<223> H-CDR1

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (51)..(58)

<223> H-CDR2

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (97)..(110)

<223> H-CDR3

<400> 7

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

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Arg Tyr

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

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

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

Ala Met Ile Ser Phe Asp Gly Gly Asn Gln Tyr Tyr Thr Asp Ser Val

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115	120
-----	-----

<210> 8

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

&lt;220&gt;&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; XPA.92.099 HV

&lt;400&gt; 8

cagggtgcagc tggtgaggc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggaggc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcaat agatatgcc a tagctgggt ccgcaggct	120
ccagggcaagg gcttagatgt ggtggcgatg atatcattt atggaggtaa tcaatattac	180

acagactccg tgagtggccg attcaccatc tccagagaca attccaagac cacgctgttt	240
ctgcaaatgg acagcctgag aactgaggac acggctgtgt attattgtgt gagatccccg	300
gcggggact gggttgccta ctttactac tggggcagg gaaccctggt caccgtctcc	360
tca	363

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 109

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; XPA.92.019 LV (lambda)

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (26)..(31)

&lt;223&gt; L-CDR1

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (49)..(51)

&lt;223&gt; L-CDR2

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (88)..(98)

&lt;223&gt; L-CDR3

&lt;400&gt; 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Thr Leu Ser Gly Ser

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

<210> 10

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> XPA.92.019 LV (lambda)

<400> 10

tcctatgagc tgacacagcc accctcggtg tcagtatccc caggacaaac ggccaggatc acctgctctg gagatgcatt gccaaaaga tttgcttatt ggtaccagca gaaggcaggc caggccccctg tactggtcat ctatgaggac aacaaacgac cctccggat ccctgagaca ctgtctggct ccagttcagg gacaacggcc accttgacca tcagtgggc ccaggaggag gatgaagctg actactattg ttactccaca gacaacactg gtggtctctg ggtgttcggc ggagggacca agctgaccgt cctaggt	60 120 180 240 300 327
--	---------------------------------------

<210> 11

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.041 LV (lambda)

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (26)..(31)

<223> L-CDR1

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (49)..(51)

&lt;223&gt; L-CDR2

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (88)..(98)

&lt;223&gt; L-CDR3

&lt;400&gt; 11

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

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Arg Gln Phe Ala

20 25 30

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

35 40 45

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr

85 90 95

His Val Phe Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly

100 105

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 327

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; XPA.92.041 LV (lambda)

&lt;400&gt; 12

tcctatgagc tgacacagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacagac ggccaggatc	60
acctgctctg gagatgcgtt gccaaggcaa tttgcttatt ggtaccagca gaagccaggc	120
caggccccctg tgctgggtat atataaagac actgagaggc cctcagggat ccctgagcga	180
ttctctggct ccagctcagg gacaacagtc acgttgacca tcagtggagt ccaggcagaa	240

gacgaggctg actattactg tcaatcagca gacagcagt gtacttatca cgtgtttgga	300
ggaggcaccc agctgaccgt ccttaggt	327

<210> 13  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.042 LV (lambda)

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (26)..(31)

<223> L-CDR1

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (49)..(51)

<223> L-CDR2

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (88)..(97)

<223> L-CDR3

<400> 13

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

1 5 10 15  
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Arg Lys Phe Ala

20 25 30

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

35 40 45  
Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Asp Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Arg Ser Asp Ser Tyr

85 90 95

Val Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100 105

<210> 14

<211> 324

<212> DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; XPA.92.042 LV (lambda)

&lt;400&gt; 14

tcctatgagc tgacacagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc 60

acctgctctg gagatgcatt gccaagaaaa ttgttact ggtaccagca gaagttaggc 120

caggccccctg tcctgggtat atatcaagac actaagaggc cctcaggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccagctcagg gacaacagtc acgttgacca tcagtgacgt ccaggcagag 240

gacgacgctg acitattattg tcagtcagcc gacagaagtg attcttatgt ctggagct 300

gggaccaagc tcaccgtctt aggt 324

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 109

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; XPA.92.099 LV (kappa)

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (27)..(32)

&lt;223&gt; K-CDR1

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (50)..(52)

&lt;223&gt; K-CDR2

&lt;220&gt;&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (89)..(98)

&lt;223&gt; K-CDR3

&lt;400&gt; 15

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Pro Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Asn His

20 25 30

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

35 40 45

Phe Asp Ala Ser Asp Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

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

100	105
-----	-----

<210> 16

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> XPA.92.099 LV (kappa)

<400> 16

gacatccaga	tgaccaggc	tccttcctcc	ctgtctgctt	ctattggaga	cagagtacc	60
atccccgtcc	aggcgagtga	ggacatttagt	aatcatttaa	gttgttatca	gcagaaaccca	120
gggaaagccc	ctaaacccct	gatcttcgtat	gcattcgatt	tggaaacagg	ggtcccatca	180
aggttcagtg	gaagtggatc	tggcacat	tttgtctca	ccatcagcag	cctgcggcct	240
gatgattttgc	caacttatta	ctgccaccag	tatcatgatt	atccctcgta	cactttggc	300
cacgggacca	agctggagat	caaacgt				327

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.019 HV H-CDR1

<400> 17

Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Tyr Gly

1	5	9
---	---	---

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.019 HV H-CDR2

<400> 18

Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asn Lys

1 5

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.019 HV H-CDR3

<400> 19

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr

1 5 10

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.041 HV H-CDR1

<400> 20

Gly Tyr Asn Phe Asp Thr Tyr Trp

1 5

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.041 HV H-CDR2

<400> 21

Ile Tyr Pro Ala Asp Ser Asp Thr

1 5

<210> 22  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.041 HV H-CDR3

<400> 22  
Ala Arg Phe Ser Ser Ser Ala Tyr Asp Ile  
1 5 10

<210> 23  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.042 HV H-CDR1  
<400> 23  
Gly Tyr Asn Phe Asp Thr Tyr Trp

1 5  
<210> 24  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.042 HV H-CDR2  
<400> 24

Ile Tyr Pro Ala Asp Ser Asp Thr  
1 5

<210> 25  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<223> XPA.92.042 HV H-CDR3

<400> 25

Ser Ser Ala Tyr Asp Ile Ala Arg Phe Ser

1 5 10

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.099 HV H-CDR1

<400> 26

Gly Phe Thr Phe Asn Arg Tyr Ala

1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.099 HV H-CDR2

<400> 27

Ile Ser Phe Asp Gly Gly Asn Gln

1 5

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.099 HV H-CDR3

<400> 28

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

1 5 10

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.019 LV (lambda) L-CDR1

<400> 29

Ala Leu Pro Lys Arg Phe

1 5

<210> 30

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.019 LV (lambda) L-CDR2

<400> 30

Glu Asp Asn

1

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.019 LV (lambda) L-CDR3

<400> 31

Tyr Ser Thr Asp Asn Thr Gly Gly Leu Trp Val

1 5 10

<210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.041 LV (lambda) L-CDR1

<400> 32

Ala Leu Pro Arg Gln Phe

1 5

<210> 33

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.041 LV (lambda) L-CDR2

<400> 33

Lys Asp Thr

1

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.041 LV (lambda) L-CDR3

<400> 34

Asp Ser Ser Gly Thr Tyr His Gln Ser Ala

1 5 10

<210> 35

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220

><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.042 LV (lambda) L-CDR1

<400> 35

Ala Leu Pro Arg Lys Phe

1 5

<210> 36

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.042 LV (lambda) L-CDR2

<400> 36

Gln Asp Thr

1

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.042 LV (lambda) L-CDR3

<400> 37

Gln Ser Ala Asp Arg Ser Asp Ser Tyr Val

1

5

10

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.099 LV (kappa) K-CDR1

<400> 38

Glu Asp Ile Ser Asn His

1

5

<210> 39

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.099 LV (kappa) K-CDR2

<400> 39

Asp Ala Ser

1

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> XPA.92.099 LV (kappa) K-CDR3

<400> 40

His Gln Tyr His Asp Tyr Pro Ser Tyr Thr

1

5

10