(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0167025
(43) 공개일자 2023년12월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01) *A61K 47/20* (2017.01)
A61K 47/26 (2017.01) *A61K 9/08* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/39591 (2013.01)
A61K 47/183 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7031740
(22) 출원일자(국제) 2022년02월17일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년09월15일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/016776
(87) 국제공개번호 WO 2022/178114
국제공개일자 2022년08월25일
(30) 우선권주장
63/150,475 2021년02월17일 미국(US)

(71) 출원인
압테보 리서치 앤드 디벨롭먼트 엘엘씨
미국 워싱턴주 98121 시애틀 스위트 1050 포스 애비뉴 2401
(72) 발명자
비엔베뉴 데이비드 레너드
미국 워싱턴주 98121 시애틀 스위트 1050 포스 애비뉴 2401 압테보 리서치 앤드 디벨롭먼트 엘엘씨 내
(74) 대리인
특허법인아주

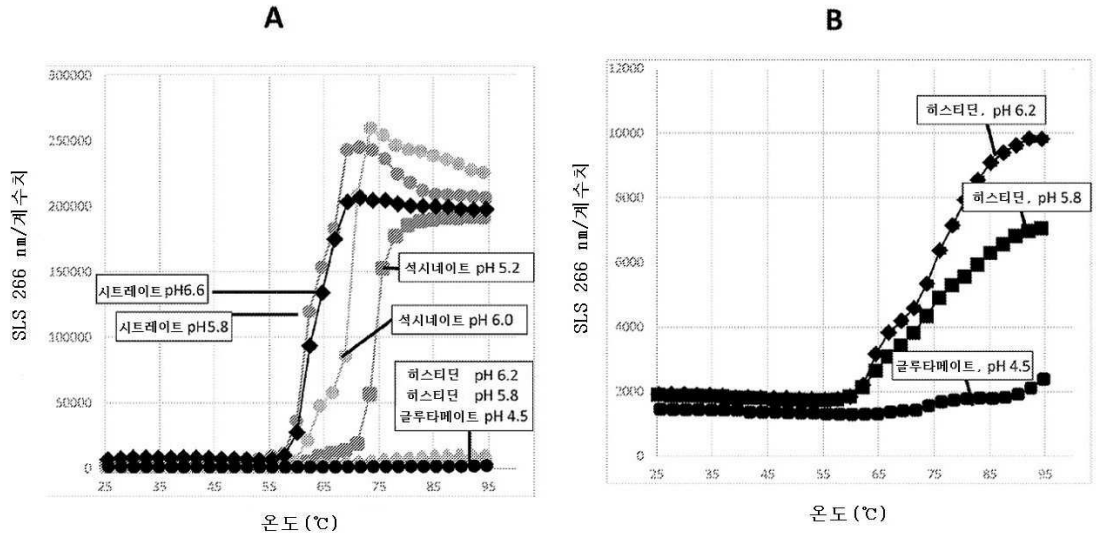
전체 청구항 수 : 총 65 항

(54) 발명의 명칭 **4-1BB 및 OX40 결합 단백질을 포함하는 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 개시내용은 4-1BB 및 OX40에 결합하는 이중특이적 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 또한, 이러한 조성물을 사용하여 암과 같은 장애를 치료하는 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/20 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
A61K 9/08 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/522 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

약제학적 조성물로서,

(a) 4-1BB 및 OX40에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편;

(b) 약 5mM 내지 약 15mM의 안정성 촉진 완충제;

(c) 약 25mM 내지 약 50mM의 안정화 아미노산;

(d) 약 2% 내지 약 8% w/v의 당; 및

(e) 약 0.01% 내지 약 0.03%의 계면활성제

를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 안정성 촉진 완충제는 석시네이트, 히스티딘, 시트레이트 및 글루타메이트로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 안정성 촉진 완충제는 상기 조성물에 약 5mM, 약 6mM, 약 7mM, 약 8mM, 약 9mM, 약 10mM, 약 11mM, 약 12mM, 약 13mM, 약 14mM 또는 약 15mM의 농도로 존재하는, 약제학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 안정성 촉진 완충제는 글루타메이트인, 약제학적 조성물.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 글루타메이트는 상기 조성물에 약 5mM의 농도로 존재하는, 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안정화 아미노산은 아르기닌, 메티오닌, 류신 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 안정화 아미노산은 상기 조성물에 약 25mM, 약 26mM, 약 27mM, 약 28mM, 약 29mM, 약 30mM, 약 31mM, 약 32mM, 약 33mM, 약 34mM, 약 35mM, 약 36mM, 약 37mM, 약 38mM, 약 39mM, 약 40mM, 약 41mM, 약 42mM, 약 43mM, 약 44mM, 약 45mM, 약 46mM, 약 47mM, 약 48mM, 약 49mM 또는 약 50mM의 농도로 존재하는, 약제학적 조성물.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 안정화 아미노산은 류신인, 약제학적 조성물.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 류신은 상기 조성물에 약 40mM의 농도로 존재하는, 약제학적 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 당은 수크로스, 트레할로스, 및 소르비톨로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 당은 상기 조성물에 약 2% w/v 내지 약 8% w/v의 농도로 존재하는, 약제학적 조성물.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 당은 상기 조성물에 약 2% w/v, 약 3% w/v, 약 4% w/v, 약 5% w/v, 약 6% w/v, 약 7% w/v 또는 약 8% w/v의 농도로 존재하는, 약제학적 조성물.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 당은 수크로스인, 약제학적 조성물.

청구항 14

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수크로스는 상기 조성물에 약 3% w/v의 농도로 존재하는, 약제학적 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 계면활성제를 더 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트-80(Polysorbate-80)인, 약제학적 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 폴리소르베이트-80은 상기 조성물에 약 0.01% w/v 내지 약 0.03% w/v의 농도로 존재하는, 약제학적 조성물.

청구항 18

제6항 또는 제17항에 있어서, 상기 폴리소르베이트-80은 상기 조성물에 약 3% w/v의 농도로 존재하는, 약제학적 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물의 pH가 약 4.3 내지 약 4.7의 범위인, 약제학적 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물의 pH가 약 4.5인, 약제학적 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 상기 조성물에 약 10 mg/mL 내지 약 50 mg/mL의 농도로 존재하는, 약제학적 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 염화나트륨(NaCl)을 포함하지 않는, 약제학적 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 약 90% 초과의 순도를 갖는, 약제학적 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 약 10 mg/mL의 농도의 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편;

(b) 약 10mM의 글루타메이트;

(c) 약 40mM 류신;

(d) 약 3% w/v 수크로스; 및

(e) 약 0.02%의 폴리소르베이트-80

을 포함하되, 상기 조성물의 pH는 약 4.3 내지 약 4.7인, 약제학적 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 10 mg/mL의 농도의 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편;

(b) 10mM 글루타메이트;

(c) 40mM 류신;

(d) 3% w/v 수크로스; 및

(e) 0.02% 폴리소르베이트-80

을 포함하되, 상기 조성물의 pH는 4.5인, 약제학적 조성물.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 단일 사슬 Fv(scFv)를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')2, scFv, 다이설파이드 연결된 Fv, 또는 scFv-Fc를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 4-1BB 항원-결합 도메인 및 인간 OX40 항원-결합 도메인을 포함하며,

(a) 상기 4-1BB 항원-결합 도메인은 (i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1; (ii) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2; (iii) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3; (iv) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)-CDR1; (v) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 (vi) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하며;

(b) 상기 OX40 항원-결합 도메인은 (i) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1; (ii) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2; (iii) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3; (iv) 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1; (v) 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 (vi) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 4-1BB 항원-결합 도메인 및 인간 OX40 항원-결합 도메인을 포함하며,

(a) 상기 4-1BB 항원-결합 도메인은 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며;

(b) 상기 OX40 항원-결합 도메인은 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 4-1BB 항원-결합 도메인 및 인간 OX40 항원-결합 도메인을 포함하며,

(a) 상기 4-1BB 항원-결합 도메인은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함하며;

(b) 상기 OX40 항원-결합 도메인은 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 32

약제학적 조성물로서,

(a) 10 mg/mL의 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

(i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1; 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2; 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3; 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)-CDR1; 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하는 4-1BB 항원-결합 도메인; 및

서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1; 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2; 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3; 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1; 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하는 OX40 항원-결합 도메인;

(ii) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 4-1BB 항원-결합 도메인; 및

서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 OX40 항원-결합 도메인;

(iii) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함하는 4-1BB 항원-결합 도메인; 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함하는 OX40 항원-결합 도메인; 또는

(iv) 서열번호 13의 아미노산 서열

을 포함하는, 상기 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편;

(b) 약 5mM 내지 약 15mM의 글루타메이트;

(c) 약 25mM 내지 약 50mM의 류신;

(d) 약 2% 내지 약 8% w/v 수크로스; 및

(e) 약 0.01% 내지 약 0.03%의 폴리소르베이트-80

을 포함하되, 상기 조성물의 pH는 약 4.3 내지 약 4.7인, 약제학적 조성물.

청구항 33

약제학적 조성물로서,

(a) 10 mg/mL의 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

(i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1; 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2; 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3; 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)-CDR1; 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하는 4-1BB 항원-결합 도메인; 및

(ii) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1; 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2; 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3; 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1; 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하는 OX40 항원-결합 도메인

을 포함하는, 상기 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편;

(b) 10mM 글루타메이트;

(c) 40mM 류신;

(d) 3% w/v 수크로스; 및

(e) 0.02% 폴리소르베이트-80

을 포함하되; 상기 조성물의 pH는 4.5인, 약제학적 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서,

(a) 상기 4-1BB 항원-결합 도메인은 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며;

(b) 상기 OX40 항원-결합 도메인은 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적 제형은 액체인, 약제학적 조성물.

청구항 36

제28항 내지 제30항 및 제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 4-1BB 결합 도메인 및 상기 인간 OX40 결합 도메인은 동일한 폴리펩타이드 상에 있는, 약제학적 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 인간 4-1BB 결합 도메인은 상기 인간 OX40 결합 도메인에 대해 N-말단인, 약제학적 조성물.

청구항 38

제36항에 있어서, 상기 인간 4-1BB 결합 도메인은 상기 인간 OX40 결합 도메인에 대해 C-말단인, 약제학적 조성물.

청구항 39

제1항 내지 제30항 및 제32항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 면역글로불린 불변 영역을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 면역글로불린 불변 영역은 IgG1의 면역글로불린 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 CH1 도메인을 함유하지 않는, 약제학적 조성물.

청구항 42

제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역글로불린 불변 영역은 EU 넘버링 시스템에 따른 E233P, L234A, L235A, G237A 및 K322A의 치환, 및 G236의 결실을 포함하는 인간 IgG1 CH2 도메인을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 43

제28항 내지 제30항 및 제32항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 면역글로불린 불변 영역과 상기 인간 4-1BB 결합 도메인 사이에 그리고/또는 면역글로불린 불변 영역과 상기 인간 OX40 결합 도메인 사이에 링커를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 면역글로불린 불변 영역과 상기 인간 4-1BB 결합 도메인 사이 그리고/또는 상기 면역글로불린 불변 영역과 상기 인간 OX40 결합 도메인 사이의 링커가 10 내지 30개의 아미노산, 15 내지 30개의 아미노산, 또는 20 내지 30개의 아미노산을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 면역글로불린 불변 영역과 상기 인간 4-1BB 결합 도메인 사이 또는 상기 면역글로불린 불변 영역과 상기 인간 OX40 결합 도메인 사이의 링커가 아미노산 서열 (Gly4Ser)n(여기서 n은 1 내지 5임)(서열번호 21)을 포함하며, 선택적으로 n은 1인, 약제학적 조성물.

청구항 46

제28항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 2개의 폴리펩타이드의 이량체를 포함하며, 각각의 폴리펩타이드는, 아미노-말단으로부터 카복실-말단으로 순서대로, 제1 scFv, 힌지 영역, 면역글로불린 불변 영역, 및 제2 scFv를 포함하되, (a) 상기 제1 scFv는 인간 4-1BB 항원-결합 도메인을 포함하며, 상기 제2 scFv는 인간 OX40 항원-결합 도메인을 포함하거나, (b) 상기 제1 scFv는 인간 OX40 항원-결합 도메인을 포함하며, 상기 제2 scFv는 인간 4-1BB 항원-결합 도메인을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 이량체는 동종이량체인, 약제학적 조성물.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적 제형은 -20℃에서 저장될 수 있는, 약제학적 조성물.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, -20℃에서 저장 후, 약 3주, 약 6주, 약 3개월, 약 6개월 및 약 7개월 후에 pH의 유의한 변화가 없는, 약제학적 조성물.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, -20℃에서 저장 후, 약 3주, 약 6주, 약 3개월, 약 6개월 또는 약 7개월 후에 고분자량 함량 백분율(HMW%)의 유의한 변화가 없는, 약제학적 조성물.

청구항 51

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, -20℃에서 저장 후, 약 3주, 약 6주, 약 3개월, 약 6개월 또는 약 7개월 후에 상기 HMW%의 변화가 5% 미만인, 약제학적 조성물.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 1, 2 또는 3회의 동결/해동 사이클 후에 상기 HMW%의 유의한 변화가 없는, 약제학적 조성물.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 1, 2 또는 3회의 동결/해동 사이클 후 상기 HMW%의 변화가 5% 미만인, 약제학적 조성물.

청구항 54

제50항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HMW%는 크기 배제 초압 액체 크로마토그래피(SE-UPLC)에 의해 측정되는, 약제학적 조성물.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 크기 배제 초압 액체 크로마토그래피(SE-UPLC)에 의해 측정한 경우, -20℃에서, 약 3주, 약 6주, 약 3개월, 약 6개월 또는 약 7개월 후 저장 후에 응집체 형성의 유의한 변화가 없는, 약제학적 조성물.

청구항 56

대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에게 유효량의 제1항 내지 제55항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 암은 고형 종양 암인, 방법.

청구항 58

제56항 또는 제57항에 있어서, 상기 암이 육종, 암종 또는 림프종인, 방법.

청구항 59

제56항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 흑색종, 신장암, 췌장암, 폐암, 위암, 결장/장암, 전립선암, 난소암, 유방암, 간암, 뇌암 또는 혈액암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 60

제56항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 인간인, 방법.

청구항 61

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 종양 침윤 림프구에서 4-1BB 및 OX40을 발현하는, 방법.

청구항 62

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 암의 치료에 사용하기 위한, 약제학적 조성물.

청구항 63

제1항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 고형 종양 암의 치료에 사용하기 위한, 약제학적 조성물.

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 고형 종양 암은 육종, 암종 또는 림프종인, 항체 약제학적 조성물.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 암은 흑색종, 신장암, 췌장암, 폐암, 결장암/장암, 위암, 전립선암, 난소암, 유방암, 간암, 뇌암 또는 혈액암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2021년 2월 17일에 출원된 미국 가출원 제63/150,475호의 우선권 이익을 주장하며, 이는 그 전문이 본 명세서에 참조에 의해 원용된다.

[0003] 전자적으로 제출된 서열 목록에 대한 참조

[0004] 전자적으로 제출된 서열 목록(명칭: 4897_0060000_Seqlisting_ST25.txt; 크기: 18,030 바이트; 및 생성 날짜: 2022년 2월 16일)의 내용은 그 전체가 본 명세서에 참조에 의해 원용된다.

[0005] 본 개시내용의 분야

[0006] 본 개시내용은 4-1BB 및 OX40에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 조성물은 고형 종양암을 포함하는 장애의 치료에 유용하다. 또한, 이러한 조성물을 사용하여 암과 같은 장애를 치료하는 방법이 제공된다.

배 경 기 술

[0007] 4-1BB(CD137) 및 OX40은 TNF-수용체(TNFR) 패밀리의 구성원이다(Bremer, *ISRN Oncol.*: 371854 (2013)). 이러한 수용체는 미경험 T 또는 NK 세포에 구성적으로 존재하지 않는다. 이들의 발현은 T-세포 수용체(TCR)를 통한 T 세포의 자극, 또는 NK 세포의 다른 자극에 의해 촉발된다. 4-1BB는 주로 CD8 T 세포 및 NK 세포에서 상향조절되는 반면, OX40은 주로 CD4 T 세포에서 상향조절된다. 이러한 수용체의 기능은 T 및 NK 세포에 공동-자극 신호를 제공하는 것이다. 이러한 수용체의 활성화는 4-1BB 리간드(4-1BBL) 또는 OX40 리간드(OX40L) 삼량체와의 상호작용을 통한 삼량체화에 의해 자연적으로 촉발되어, 신호 전달 및 특정 세포 기능의 개시를 초래한다. 4-1BB는 IFN-γ, 그랜자임, 및 항-아폽토시스 유전자의 증가된 발현을 통해 CD8 T 세포 및 NK 세포의 효과기 기능을 향상시켜, 더 많은 및 더 우수한 효과기 CD8 T 및 NK 세포의 생성을 유도한다. OX40은 IL-2를 생산하는 능력 및 기억 CD4 T 세포의 클론 확장을 향상시킴으로써 CD4 T 세포의 효과기 기능을 향상시킨다.

[0008] 4-1BB 및 OX40은 종종 종양 침윤 림프구에서 발현되며, 이들의 발현은 종양-특이적 T 세포를 확인하는 데 사용되었다. 인간 고형 종양은 종종 림프구, 주로 CD8+ 및 CD4+ T 세포에 의해 침윤된다. 종양 침윤 림프구의 축적은 종종 다양한 악성 종양에 의해 영향을 받는 환자에서 개선된 생존과 관련이 있다(Ye et al., OncoImmunology 2: e27184 (2013); Montler et al., Clin Transl Immunology 5:e70 (2016)).

[0009] 다양한 유도 및 자발적 종양 모델에서의 전임상 결과는 작용제 항체로 4-1BB를 표적화하는 것이 종양 제거 및 지속적인 항종양 면역을 유발할 수 있음을 시사한다. 우렐루맙 및 우토밀루맙은 고형 종양의 치료를 포함하는 적응증에 대한 임상 시험이 진행중인 작용제 항-4-1BB 단클론성 항체이다. 효능의 초기 징후에도 불구하고, 우렐루맙의 임상 개발은 1 mg/kg 초과의 용량에서 염증성 간 독성에 의해 방해를 받았다. 우토밀루맙은 우렐루맙보다 덜 강력하지만, 우렐루맙에 비해 개선된 안전성 프로파일을 갖는다(Chester et al., Blood 131: 39-57 (2018)). 우렐루맙으로 관찰되는 바와 같은 간 독성, 또는 다른 전신 손상을 일으키지 않는 4-1BB를 표적으로 하는 효과적인 치료제에 대한 요구가 존재한다.

[0010] OX40 작용제는 종양으로의 T-세포 침윤을 증가시키는 것으로 보고되었다. 그리고 OX40 신호전달은 항종양 면역 반응의 Treg-매개 억제를 예방할 수 있다. 4T-1 유방암, B16 흑색종, 루이스 폐 암종 및 여러 화학적으로 유도된 육종을 포함하는 여러 전임상 마우스 암 모델에서, OX40 작용제의 주사는 치료 반응을 야기하였다(Ohsima et al., *J. Immunology* 159:3838-3848 (1997); Imura et al., *J. Exp. Med.* 183:2185-2195 (1996); Maxwell et al., *J. Immunology* 164:107-112 (2000); Gough et al., *J. Immunotherapy* 33(8):798-809 (2010)).

[0011] 일부 경우에, 연구자는 4-1BB 또는 OX40에 대한 다중 결합 도메인(2 초과), 또는 작용(agonism)을 유도하기 위한 다중 OX40L 및 4-1BBL 세포외 도메인의 융합체를 함유하는 단백질 작제물을 생성하였다. 다른 예에서, 4-1BB 또는 OX40에 대한 결합 도메인(들) 및 종양-특이적 항원에 대한 결합 도메인(들)을 함유하는 이중특이적 단백질이 존재한다. 종양 항원 결합을 통한 결합 및 클러스터링은 4-1BB 및 OX40의 클러스터링 및 신호전달을 유도한

다. 그러나, 이들 작제물 중 어느 것도 종양 침윤 림프구, 즉, CD8+ T 세포 CD4 T+ 세포, 및 NK 세포의 기능을 자극하지 않고 이는 그렇게 하기 위해 효과기 세포의 표적외 활성화(즉, FcɣR1, FcɣRIIa, FcɣRIIb, FcɣRIIa 및 FcɣRIIIb에 대한 결합을 통한 활성화)가 최소이거나 없을 것으로 예상된다. 따라서, 종양 침윤 림프구의 활성을 선택적으로 강화하는 치료 옵션(순환 림프구에 최소 또는 전혀 영향을 미치지 않음), 예를 들어, 4-1BB 및 OX40 둘 다에 결합하고 이를 자극하는 이중특이적 항체를 포함하는 약제학적 조성물이 필요하다.

발명의 내용

[0012] 본 개시내용의 일부 양상은 (a) 4-1BB 및 OX40에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편; (b) 약 5mM 내지 약 15mM의 안정성 촉진 완충제; (c) 약 25mM 내지 약 50mM의 안정화 아미노산; (d) 약 2% 내지 약 8% w/v의 당; 및 (e) 약 0.01% 내지 약 0.03%의 계면활성제를 포함하는, 약제학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 개시내용의 일부 양상에서, 안정성 촉진 완충제는 석시네이트, 히스티딘, 시트레이트 및 글루타메이트로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 양상에서, 안정성 촉진 완충제는 조성물에 약 5mM, 약 6mM, 약 7mM, 약 8mM, 약 9mM, 약 10mM, 약 11mM, 약 12mM, 약 13mM, 약 14mM 또는 약 15mM의 양으로 존재한다. 일부 양상에서, 안정성 촉진 완충제는 글루타메이트이다. 일부 양상에서, 글루타메이트는 조성물에 약 5mM의 농도로 존재한다.

[0014] 본 개시내용의 일부 양상에서, 안정화 아미노산은 아르기닌, 메티오닌, 류신 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 양상에서, 안정화 아미노산은 조성물에 약 25mM, 약 26mM, 약 27mM, 약 28mM, 약 29mM, 약 30mM, 약 31mM, 약 32mM, 약 33mM, 약 34mM, 약 35mM, 약 36mM, 약 37mM, 약 38mM, 약 39mM, 약 40mM, 약 41mM, 약 42mM, 약 43mM, 약 44mM, 약 45mM, 약 46mM, 약 47mM, 약 48mM, 약 49mM 또는 약 50mM의 농도로 존재한다. 일부 양상에서, 안정화 아미노산은 류신이다. 일부 양상에서, 류신은 조성물에 약 40mM의 농도로 존재한다.

[0015] 본 개시내용의 일부 양상에서, 당은 수크로스, 트레할로스, 및 소르비톨로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 양상에서, 당은 조성물에 약 2% w/v 내지 약 8% w/v의 농도로 존재한다. 일부 양상에서, 당은 조성물에 약 2% w/v, 약 3% w/v, 약 4% w/v, 약 5% w/v, 약 6% w/v, 약 7% w/v 또는 약 8% w/v의 농도로 존재한다. 일부 양상에서, 당은 수크로스이다. 일부 양상에서, 수크로스는 조성물에 약 3% w/v의 농도로 존재한다.

[0016] 본 개시내용의 일부 양상에서, 약제학적 조성물은 계면활성제를 추가로 포함한다. 일부 양상에서, 계면활성제는 조성물에 약 0.01% w/v 내지 약 0.03% w/v의 농도로 존재한다. 일부 양상에서, 계면활성제는 폴리소르베이트-80(Polysorbate-80)이다. 일부 양상에서, 폴리소르베이트-80은 조성물에 약 3% w/v의 농도로 존재한다.

[0017] 본 개시내용의 일부 양상에서, 조성물의 pH는 약 4.3 내지 약 4.7의 범위이다. 일부 양상에서, 조성물의 pH는 약 4.5이다.

[0018] 본 개시내용의 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 조성물에 약 10 mg/mL 내지 50 mg/mL의 농도로 존재한다.

[0019] 본 개시내용의 일부 양상에서, 약제학적 조성물은 염화나트륨(NaCl)을 포함하지 않는다.

[0020] 본 개시내용의 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 약 90% 초과의 순도를 갖는다.

[0021] 본 개시내용의 일부 양상에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 (a) 약 10 mg/mL의 농도의 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편; (b) 약 10mM의 글루타메이트; (c) 약 40mM의 류신; (d) 약 3% w/v 수크로스; 및 (e) 약 0.02%의 폴리소르베이트-80을 포함하며; 조성물의 pH는 약 4.3 내지 약 4.7이다.

[0022] 본 개시내용의 일부 양상에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 (a) 10 mg/mL 농도의 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편; (b) 10mM 글루타메이트; (c) 40mM 류신; (d) 3% w/v 수크로스; 및 (e) 0.02%의 폴리소르베이트-80을 포함하며; 조성물의 pH는 4.5이다.

[0023] 본 개시내용의 일부 양상에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 단일 사슬 Fv(scFv)를 포함하는 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0024] 본 개시내용의 일부 양상에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 Fab, Fab', F(ab')2, scFv, 다이설파이드 연결된 Fv, 또는 scFv-Fc를 포함하는 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0025] 본 개시내용의 일부 양상에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 인간 4-1BB 항원-결합 도메인 및 인간

OX40 항원-결합 도메인을 포함하는 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하며, 여기서, (a) 4-1BB 항원-결합 도메인은 (i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1; (ii) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2; (iii) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3; (iv) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)-CDR1; (v) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 (vi) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하며; (b) OX40 항원-결합 도메인은 (i) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1; (ii) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2; (iii) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3; (iv) 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1; (v) 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 (vi) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함한다.

[0026] 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 4-1BB 항원-결합 도메인 및 인간 OX40 항원-결합 도메인을 포함하며, 여기서, (a) 4-1BB 항원-결합 도메인은 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며; (b) OX40 항원-결합 도메인은 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0027] 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 4-1BB 항원-결합 도메인 및 인간 OX40 항원-결합 도메인을 포함하며, 여기서, (a) 4-1BB 항원-결합 도메인은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함하며; (b) OX40 항원-결합 도메인은 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함한다.

[0028] 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함한다.

[0029] 본 개시내용의 일부 양상에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 (a) 10 mg/mL의 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 (i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1; 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2; 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3; 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)-CDR1; 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하는 4-1BB 항원-결합 도메인; 그리고 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1; 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2; 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3; 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1; 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하는 OX40 항원-결합 도메인; (ii) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 4-1BB 항원-결합 도메인; 및 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 OX40 항원-결합 도메인; (iii) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함하는 4-1BB 항원-결합 도메인; 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함하는 OX40 항원-결합 도메인; 또는 (iv) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편; (b) 약 5mM 내지 약 15mM의 글루타메이트; (c) 약 25mM 내지 약 50mM의 류신; (d) 약 2% 내지 약 8% w/v 수크로스; 및 (e) 약 0.01% 내지 약 0.03%의 폴리소르베이트-80을 포함하며; 여기서, 조성물의 pH는 약 4.3 내지 약 4.7이다.

[0030] 본 개시내용의 일부 양상에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 (a) 10 mg/mL의 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 (i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1; 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2; 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3; 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)-CDR1; 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하는 4-1BB 항원-결합 도메인; 및 (ii) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1; 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2; 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3; 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1; 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하는 OX40 항원-결합 도메인을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편; (b) 10mM 글루타메이트; (c) 40mM 류신; (d) 3% w/v 수크로스; 및 (e) 0.02%의 폴리소르베이트-80을 포함하며; 조성물의 pH는 4.5이다.

[0031] 일부 양상에서, 약제학적 조성물은 (a) 4-1BB 항원-결합 도메인이 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며; (b) OX40 항원-결합 도

메인은 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 포함한다.

[0032] 본 개시내용의 일부 양상에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 액체이다.

[0033] 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물의 일부 양상에서, 인간 4-1BB 결합 도메인 및 인간 OX40 결합 도메인은 동일한 폴리펩타이드 상에 있다. 일부 양상에서, 인간 4-1BB 결합 도메인은 인간 OX40 결합 도메인에 대한 N-말단이다. 일부 양상에서, 인간 4-1BB 결합 도메인은 인간 OX40 결합 도메인에 대한 C-말단이다.

[0034] 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물의 일부 양상에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 면역글로불린 불변 영역을 포함한다. 양상에서, 면역글로불린 불변 영역은 IgG1의 면역글로불린 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다. 일부 양상에서, 항체는 CH1 도메인을 함유하지 않는다. 일부 양상에서, 면역글로불린 불변 영역은 EU 넘버링 시스템에 따른 E233P, L234A, L235A, G237A 및 K322A의 치환, 및 G236의 결실을 포함하는 인간 IgG1 CH2 도메인을 포함한다.

[0035] 일부 양상에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 면역글로불린 불변 영역과 인간 4-1BB 결합 도메인 사이 그리고/또는 면역글로불린 불변 영역과 인간 OX40 결합 도메인 사이에 링커를 포함한다. 일부 양상에서, 면역글로불린 불변 영역과 인간 4-1BB 결합 도메인 사이 그리고/또는 면역글로불린 불변 영역과 인간 OX40 결합 도메인 사이의 링커는 10 내지 30개의 아미노산, 15 내지 30개의 아미노산, 또는 20 내지 30개의 아미노산을 포함한다. 일부 양상에서, 면역글로불린 불변 영역과 인간 4-1BB 결합 도메인 사이 또는 면역글로불린 불변 영역과 인간 OX40 결합 도메인 사이의 링커는 아미노산 서열 (Gly4Ser)n을 포함하며, 여기서 n은 1 내지 5이며(서열번호 21), 선택적으로, n은 1이다. 일부 양상에서, 항체는 2개의 폴리펩타이드의 이량체를 포함하며, 각각의 폴리펩타이드는 아미노-말단으로부터 카복실-말단으로 순서대로 제1 scFv, 힌지 영역, 면역글로불린 불변 영역, 및 제2 scFv를 포함하며, 여기서, (a) 제1 scFv는 인간 4-1BB 항원-결합 도메인을 포함하며, 제2 scFv는 인간 OX40 항원-결합 도메인을 포함하거나, 또는 (b) 제1 scFv는 인간 OX40 항원-결합 도메인을 포함하며, 제2 scFv는 인간 4-1BB 항원-결합 도메인를 포함한다. 일부 양상에서, 이량체는 동종이량체이다.

[0036] 본 개시내용의 일부 양상에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 -20℃에서 저장될 수 있다. 일부 양상에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 -20℃에서 저장 후, 약 3주, 약 6주, 약 3개월, 약 6개월 및 약 7개월 후에 pH의 유의한 변화가 없다. 일부 양상에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 -20℃에서 저장 후, 약 3주, 약 6주, 약 3개월, 약 6개월 또는 약 7개월 후에 고분자량 함량 백분율(HMW%)의 유의한 변화가 없다. 일부 양상에서, -20℃에서 저장 후, 약 3주, 약 6주, 약 3개월, 약 6개월 또는 약 7개월 후에 HMW%의 변화는 5% 미만이다.

[0037] 본 개시내용의 일부 양상에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 1, 2 또는 3회의 동결/해동 사이클 후 HMW%의 유의한 변화가 없다. 일부 양상에서, 1, 2 또는 3회의 동결/해동 사이클 후 HMW%의 변화는 5% 미만이다. 일부 양상에서, HMW%는 크기 배제 초압 액체 크로마토그래피(SE-UPLC)에 의해 측정된다.

[0038] 본 개시내용의 일부 양상에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 크기 배제 초압 액체 크로마토그래피(SE-UPLC)에 의해 측정한 경우 -20℃에서 저장 후, 약 3주, 약 6주, 약 3개월, 약 6개월 또는 약 7개월 후에 응집체 형성의 유의한 변화가 없다.

[0039] 또한, 대상체에게 유효량의 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 양상에서, 암은 고형 종양 암이다. 일부 양상에서, 암은 육종, 암종 또는 림프종이다. 일부 양상에서, 암은 흑색종, 신장암, 췌장암, 폐암, 위암, 결장/장암, 전립선암, 난소암, 유방암, 간암, 뇌암 또는 혈액암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 양상에서, 대상체는 인간이다. 일부 양상에서, 대상체는 종양 침윤 림프구에서 4-1BB 및 OX40을 발현한다.

[0040] 본 개시내용의 일부 양상에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 암의 치료에 사용하기 위한 것이다. 일부 양상에서, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 고형 종양 암의 치료에 사용하기 위한 것이다. 일부 양상에서, 고형 종양 암은 육종, 암종 또는 림프종이다. 일부 양상에서, 암은 흑색종, 신장암, 췌장암, 폐암, 결장/장암, 위암, 전립선암, 난소암, 유방암, 간암, 뇌암 또는 혈액암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

도면의 간단한 설명

[0041] **도 1A** 및 **도 1B**는 상이한 단백질 제형에서 FXX01102의 T_{agg} 분석을 도시한다(실시예 2 참조).

도 2는 100mM 염화나트륨의 존재 또는 부재 하에 10mM 글루타메이트, 8% w/v 수크로스, 0.02% w/v 폴리소르베이트-80에서 10 mg/mL로 제형화된 FXX01102에 대해 수행된 B_{22} 분석의 결과를 도시한다(실시예 3 참조).

도 3은 10mM 글루타메이트, 4% w/v 수크로스, pH 4.5에서 제형화된 10 mg/mL FXX01102에 대한 아르기닌, 메티오닌 및 글리신의 영향을 비교하는 B_{22} 분석의 결과를 도시한다(실시예 4 참조).

도 4는 10mM 글루타메이트, 4% w/v 수크로스, pH 4.5에서 제형화된 FXX01102에 대한 류신의 영향을 결정하기 위한 B_{22} 실험의 결과를 도시한다(실시예 4 참조).

도 5는 25mM $MgSO_4$, 라이신 또는 류신이 첨가되거나 첨가되지 않은 10mM 글루타메이트, 4% w/v 수크로스, pH 4.5에서 제형화된 10 mg/mL FXX01102의 T_{agg} 플롯의 비교를 도시한다(실시예 5 참조).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 본 개시내용의 이해를 용이하게 하기 위해, 다수의 용어 및 어구가 하기에 정의된다.

[0043] **I. 용어**

[0044] 본 명세서에서 사용되는 용어 "4-1BB"는 천연 4-1BB 폴리펩타이드 및 4-1BB 폴리펩타이드의 아이소형을 포함하나 이에 제한되지 않는 포유동물 4-1BB 폴리펩타이드를 지칭한다. "4-1BB"는 전장의 프로세싱되지 않은 4-1BB 폴리펩타이드뿐만 아니라 세포 내에서의 프로세싱으로부터 생성된 4-1BB 폴리펩타이드의 형태를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "CD137"은 용어 "4-1BB"와 호환 가능한 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "인간 4-1BB"는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "시노몰구스 4-1BB"는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다. "4-1BB 폴리뉴클레오타이드", "4-1BB 뉴클레오타이드" 또는 "4-1BB 핵산"은 4-1BB를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0045] 본 명세서에서 사용되는 용어 "OX40"은 천연 OX40 폴리펩타이드 및 OX40 폴리펩타이드의 아이소형을 포함하나 이에 제한되지 않는 포유동물 OX40 폴리펩타이드를 지칭한다. "OX40"은 전장의 프로세싱되지 않은 OX40 폴리펩타이드뿐만 아니라 세포 내에서의 프로세싱으로부터 생성된 OX40 폴리펩타이드의 형태를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "인간 OX40"은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "시노몰구스 OX40"은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다. "OX40 폴리뉴클레오타이드", "OX40 뉴클레오타이드" 또는 "OX40 핵산"은 OX40을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0046] 본 명세서에서 사용되는 용어 "종양 침윤 림프구" 또는 "TIL"은 종양 세포와 직접적으로 겨루고/겨루거나 이를 둘러싸는 림프구를 지칭한다. 종양 침윤 림프구는 통상적으로 비-순환 림프구이고, CD8+ T 세포, CD4+ T 세포 및 NK 세포를 포함한다. 종양 침윤 림프구는 OX40 및 4-1BB를 발현할 수 있다.

[0047] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체" 및 "항체들"은 당 분야의 용어이고 본 명세서에서 호환적으로 사용될 수 있고, 항원에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-결합 부위를 갖는 분자 또는 분자들의 복합체를 지칭한다.

[0048] 항체는 예를 들어, 단클론성 항체, 재조합적으로 생산된 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 재표면화된 항체, 키메라 항체, 면역글로불린, 합성 항체, 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄 분자를 포함하는 사량체 항체, 항체 경쇄 단량체, 항체 중쇄 단량체, 항체 경쇄 이량체, 항체 중쇄 이량체, 항체 경쇄-항체 중쇄 쌍, 인트라바디, 이종접합체 항체, 단일 도메인 항체, 1가 항체, 단일 사슬 항체 또는 단일-사슬 Fv(scFv), 카멜화된 항체, 아피바디, Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, 다이설파이드-연결된 Fv(sdFv), 항-이디오타입(항-Id) 항체(예를 들어, 항-항-Id 항체 포함), 이중특이적 항체, 및 다중-특이적 항체를 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 항체는 다클론성 항체 집단을 지칭한다. 항체는 면역글로불린 분자의 임의의 타입(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY), 임의의 부류(예를 들어, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 또는 IgA_2), 또는 임의의 하위부류(예를 들어, IgG_{2a} 또는 IgG_{2b})일 수 있다. 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 항체는 IgG 항체, 또는 이의 부류(예를 들어, 인간 IgG_1, IgG_2 또는 IgG_4) 또는 하위부류이다. 특정 양상에서, 항체는 인간화 단클론성 항체이다. 또 다른 특정 양상에서, 항체는 인간 단클론성 항체, 예를 들어, 면역글로불린이다. 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된

항체는 IgG_1, IgG_2 또는 IgG_4 항체이다.

[0049] "이중특이적" 항체는 2개의 상이한 항원에 결합하는 2개의 상이한 항원-결합 부위(Fc 영역 제외)를 갖는 항체이다. 이중특이적 항체는 예를 들어, 재조합적으로 생산된 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 재표면화된 항체, 키메라 항체, 면역글로불린, 합성 항체, 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄 분자를 포함하는 사량체 항체, 항체 경쇄 단량체, 이종접합체 항체, 연결된 단일 사슬 항체 또는 연결된-단일-사슬 Fv(scFv), 카멜화된 항체, 아피바디, 연결된 Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, 화학적으로 연결된 Fv, 및 다이설파이드-연결된 Fv(sdFv)를 포함할 수 있다. 이중특이적 항체는 면역글로불린 분자의 임의의 타입(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 또는 IgY), 임의의 부류(예를 들어, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, 또는 IgA_2), 또는 임의의 하위부류(예를 들어, IgG_{2a} 또는 IgG_{2b})일 수 있다. 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 이중특이적 항체는 IgG 항체, 또는 이의 부류(예를 들어, 인간 IgG_1, IgG_2 또는 IgG_4) 또는 하위부류이다. 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 이중특이적 항체는 2개의 폴리펩타이드, 선택적으로 동일한 폴리펩타이드를 포함하며, 각각의 폴리펩타이드는 아미노-말단에서 카복실-말단으로 순서대로, 제1 scFv 항원-결합 도메인, 링커(선택적으로 링커는 힌지 영역임), 면역글로불린 불변 영역, 및 제2 scFv 항원-결합 도메인을 포함한다. 이러한 특정 타입의 항체는 ADAPTIR™ 기술에 의해 예시된다. 예시적인 분자는 본 개시 전반에 걸쳐 FXX01102로 지칭된다. 이중특이적 항체는 예를 들어, 각각의 표적에 대해 1가(예를 들어, 하나의 항원을 표적화하는 하나의 아암 및 제2 항원을 표적화하는 다른 아암을 갖는 IgG 분자) 또는 각각의 표적에 대해 2가(예를 들어, 이중 가변 도메인 항체, IgG-scFv, scFv-Fc-scFv, 또는 이량체를 함유하는 ADAPTIR™ 항체, 여기서 이량체의 각각의 폴리펩타이드는 2개의 상이한 항원-결합 도메인을 함유함)일 수 있다.

[0050] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항원-결합 도메인", "항원-결합 영역", "항원-결합 부위" 및 유사한 용어는 항체 분자에 항원(예를 들어, 상보성 결정 영역(CDR))에 대한 이의 특이성을 부여하는 아미노산 잔기를 포함하는 항체 분자의 부분을 지칭한다. 항원-결합 영역은 설치류(예를 들어, 마우스, 래트, 또는 햄스터) 및 인간과 같은 임의의 동물 종으로부터 유래될 수 있다. 4-1BB에 결합하는 항원-결합 도메인은 본 명세서에서, 예를 들어, "4-1BB 결합 도메인"으로 지칭될 수 있다. OX40에 결합하는 항원-결합 도메인은 본 명세서에서, 예를 들어, "OX40 결합 도메인"으로 지칭될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "인간 4-1BB 결합 도메인" 또는 "인간 4-1BB 항원-결합 도메인"은 비인간 4-1BB(예를 들어, 뮤린, 설치류, 또는 비인간 영장류 4-1BB)에도 결합할 수 있지만, 인간 4-1BB에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인을 지칭한다. 마찬가지로, "인간 OX40 결합 도메인" 또는 "인간 OX40 항원-결합 도메인"은 인간 OX40에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인을 지칭한다.

[0051] 본 명세서에서 사용되는 용어 "4-1BB/OX40 항체", "항-4-1BB/OX40 항체" 또는 "4-1BB x OX40 항체"는 4-1BB(예를 들어, 인간 4-1BB)에 결합하는 항원-결합 도메인 및 OX40(예를 들어, 인간 OX40)에 결합하는 항원-결합 도메인을 함유하는 이중특이적 항체를 지칭한다.

[0052] "단클론성" 항체는 단일 항원 결정인자 또는 에피토프의 고도로 특이적 인식 및 결합에 관여하는 균질한 항체 집단을 지칭한다. 이는 통상적으로 상이한 항원 결정인자에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 다클론성 항체와 대조적이다. 용어 "단클론성" 항체는 무손상 및 전장 면역글로불린 분자 둘 다뿐만 아니라 Fab, Fab', F(ab')2, Fv), 단일 사슬(scFv), 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 및 항원 인식 부위를 포함하는 임의의 다른 변형된 면역글로불린 분자를 포함한다. 또한, "단클론성" 항체는 하이브리도마, 파지 선택, 재조합 발현, 및 트랜스제닉 동물을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 수의 방식으로 제조된 이러한 항체를 지칭한다.

[0053] 용어 "키메라" 항체는 아미노산 서열이 2개 이상의 종으로부터 유래된 항체를 지칭한다. 통상적으로, 경쇄 및 중쇄 둘 다의 가변 영역은 요망되는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 포유동물의 한 종(예를 들어, 마우스, 래트, 토끼 등)으로부터 유래된 항체의 가변 영역에 상응하는 반면, 불변 영역은 그러한 종에서 면역 반응을 유발하는 것을 피하기 위해 또 다른 것(대개 인간)으로부터 유래된 항체의 서열에 상동성이다.

[0054] 용어 "인간화된" 항체는 최소 비인간(예를 들어, 뮤린) 서열을 함유하는 비인간(예를 들어, 뮤린) 항체의 형태를 지칭한다. 통상적으로, 인간화된 항체는 상보적 결정 영역(CDR)으로부터의 잔기가 요망되는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 비인간 종(예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 햄스터)의 CDR로부터의 잔기에 의해 대체된다("CDR 그라프팅됨")(Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536(1988)). 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기는 요망되는 특이성, 친화성, 및 능력을 갖는 비인간 종으로부터의 항체에서 상응하는 잔기로 대체된다. 이의 인간화 항체는 항체 특이성, 친화성, 및/또는 능력을 정제 및 최적화하기 위해 Fv 프레임워크 영역 및/또는

대체된 비인간 잔기 내의 추가 잔기의 치환에 의해 추가로 변형될 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비인간 면역글로불린에 상응하는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역을 함유하는 적어도 하나, 및 통상적으로 2 또는 3개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 반면 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 공통 서열의 것이다. 인간화 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역 또는 도메인(Fc)의 적어도 일부, 통상적으로 인간 면역글로불린의 것을 포함할 수 있다. 인간화 항체를 생성하기 위해 사용되는 방법의 예는 미국 특허 제5,225,539호; 문헌[Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3):969-973 (1994), 및 Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895-904 (1996)]에 기재되어 있다.

[0055] 용어 "인간" 항체는 인간 면역글로불린 유전자 좌로부터 유래된 아미노산 서열을 갖는 항체를 의미하며, 여기서 이러한 항체는 당 분야에 공지된 임의의 기술을 사용하여 제조된다.

[0056] 가변 영역은 통상적으로 항체의 일부, 일반적으로, 경쇄 또는 중쇄의 일부, 통상적으로 성숙 중쇄에서 약 아미노-말단 110 내지 125개의 아미노산 및 성숙 경쇄에서 약 90 내지 115개의 아미노산을 지칭하며, 이는 항체들 사이에서 서열이 광범위하게 상이하고 이의 특정 항원에 대한 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다. 서열의 가변성은 상보성 결정 영역(CDR)으로 지칭되는 영역에 집중되는 반면, 가변 도메인에서 보다 고도로 보존된 영역은 프레임워크 영역(FR)으로 지칭된다. 임의의 특정 기전 또는 이론에 의해 제한하고자 하는 것은 아니지만, 경쇄 및 중쇄의 CDR은 주로 항체와 항원의 상호작용 및 특이성을 담당할 수 있는 것으로 여겨진다. 일부 양상에서, 가변 영역은 인간 가변 영역이다. 일부 양상에서, 가변 영역은 설치류 또는 뮤린 CDR 및 인간 프레임워크 영역(FR)을 포함한다. 특정 양상에서, 가변 영역은 영장류(예를 들어, 비인간 영장류) 가변 영역이다. 일부 양상에서, 가변 영역은 설치류 또는 뮤린 CDR 및 영장류(예를 들어, 비인간 영장류) 프레임워크 영역(FR)을 포함한다.

[0057] 용어 "VH" 및 "VH 도메인"은 항체의 중쇄 가변 영역을 지칭하기 위해 호환적으로 사용된다.

[0058] 용어 "VL" 및 "VL 도메인"은 항체의 경쇄 가변 영역을 지칭하기 위해 호환적으로 사용된다.

[0059] 용어 "Kabat 넘버링" 및 유사 용어는 당 분야에서 인지되고, 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역, 또는 이의 항원-결합 부분에서 아미노산 잔기를 넘버링하는 시스템을 지칭한다. 일부 양상에서, 항체의 CDR은 Kabat 넘버링 시스템에 따라 결정될 수 있다(예를 들어, 문헌[Kabat EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190: 382-391 and Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242] 참조). Kabat 넘버링 시스템을 사용하여, 항체 중쇄 분자 내의 CDR은 통상적으로 선택적으로 35 다음에 1 또는 2개의 추가 아미노산을 포함할 수 있는(Kabat 넘버링 방식에서 35A 및 35B로 지칭됨) 아미노산 위치 31 내지 35(CDR1), 아미노산 위치 50 내지 65(CDR2), 및 아미노산 위치 95 내지 102(CDR3)에 존재한다. Kabat 넘버링 시스템을 사용하여, 항체 경쇄 분자 내의 CDR은 통상적으로 아미노산 위치 24 내지 34(CDR1), 아미노산 위치 50 내지 56(CDR2), 및 아미노산 위치 89 내지 97(CDR3)에 존재한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체의 CDR은 Kabat 넘버링 방식에 따라 결정되었다.

[0060] Chothia는 대신에 구조적 루프의 위치를 지칭한다(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Kabat 넘버링 규칙을 사용하여 넘버링될 때 Chothia CDR-H1 루프의 말단은 루프의 길이에 따라 H32와 H34 사이에서 다양하다(이는 Kabat 넘버링 방식이 H35A 및 H35B에 삽입을 위치시키기 때문이고; 35A 및 35B가 존재하지 않는 경우, 루프는 32에서 종료되며; 35A만이 존재하는 경우, 루프는 33에서 종료되며; 35A 및 35B 둘 다가 존재하는 경우, 루프는 34에서 종료됨). 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체의 CDR은 Chothia 넘버링 방식에 따라 결정되었다.

[0061] AbM 초가변 영역은 Kabat CDR과 Chothia 구조적 루프 사이의 절충을 나타내고, Oxford Molecular의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체의 CDR은 AbM 넘버링 방식에 따라 결정되었다.

루프	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B (Kabat 넘버링)	H26-H32..34
H1	H31-H35	H26-H35 (Chothia 넘버링)	H26-H32
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0062]

[0063] IMGT 넘버링 규칙은 문헌[Brochet, X, et al, *Nucl. Acids Res. 36*: W503-508 (2008)]에 기재되어 있다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체의 CDR은 IMGT 넘버링 규칙에 따라 결정되었다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 달리 제공되지 않는 한, 면역글로불린 분자의 가변 영역에서 아미노산 잔기의 위치는 IMGT 넘버링 규칙에 따라 넘버링된다.

[0064] 본 명세서에서 사용되는 용어 "불변 영역" 또는 "불변 도메인"은 호환 가능하고 당 분야에서 통상적인 의미를 갖는다. 불변 영역은 항체 부분, 예를 들어, 항원에 대한 항체의 결합에 직접 관여하지 않지만 다양한 효과기 기능, 예컨대, Fc 수용체와의 상호작용을 나타낼 수 있는 경쇄 및/또는 중쇄의 카복실 말단 부분이다. 면역글로불린 분자의 불변 영역은 일반적으로 면역글로불린 가변 도메인에 비해 더 보존된 아미노산 서열을 갖는다. 면역글로불린 "불변 영역" 또는 "불변 도메인"은 CH1 도메인, 힌지, CH2 도메인, 및 CH3 도메인 또는 이러한 도메인, 예를 들어, CH2 도메인 및 CH3 도메인의 서브세트를 함유할 수 있다. 본 명세서에 제공된 일부 양상에서, 면역글로불린 불변 영역은 CH1 도메인을 함유하지 않는다. 본 명세서에 제공된 일부 양상에서, 면역글로불린 불변 영역은 힌지를 함유하지 않는다. 본 명세서에 제공된 일부 양상에서, 면역글로불린 불변 영역은 CH2 도메인 및 CH3 도메인을 함유한다.

[0065] "Fc 영역" 또는 "Fc 도메인"은 세포 상의 항체 수용체 및 보체의 C1q 성분에 대한 결합을 담당하는 공급원 항체의 부분에 상응하거나 이로부터 유래된 폴리펩타이드 서열을 지칭한다. Fc는 "단편 결정질"을 나타내고, 단백질 결정을 용이하게 형성할 항체의 단편을 지칭한다. 원래 단백질분해 소화에 의해 기술된 독특한 단백질 단편은 면역글로불린 단백질의 전반적인 일반 구조를 정의할 수 있다. "Fc 영역" 또는 "Fc 도메인"은 CH2 도메인, CH3 도메인, 및 선택적으로 힌지의 전부 또는 일부를 함유한다. "Fc 영역" 또는 "Fc 도메인"은 단일 폴리펩타이드 또는 2개의 다이설파이드-연결된 폴리펩타이드를 지칭할 수 있다. 면역글로불린 구조 및 기능의 검토를 위해, 문헌[Putnam, The Plasma Proteins, Vol. V (Academic Press, Inc., 1987), pp. 49-140; 및 Padlan, Mol. Immunol.31:169-217, 1994]이 참조된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 Fc는 자연 발생 서열의 변이체를 포함한다.

[0066] 본 명세서에서 사용되는 "면역글로불린 이량체화 도메인" 또는 "면역글로불린 이종이량체화 도메인"은 제2 폴리펩타이드 사슬의 상이한 면역글로불린 도메인과 우선적으로 상호작용하거나 회합하는 폴리펩타이드 사슬의 면역글로불린 도메인을 지칭하며, 여기서 상이한 면역글로불린 이종이량체화의 상호작용은 제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬의 이종이량체화("이종이량체"로도 지칭되는 2개의 상이한 폴리펩타이드 사슬 사이에 이량체의 형성)에 실질적으로 기여하거나 이를 효율적으로 촉진시킨다. 면역글로불린 이종이량체화 도메인 사이의 상호작용은, 제1 폴리펩타이드 사슬의 면역글로불린 이종이량체화 도메인 및/또는 제2 폴리펩타이드 사슬의 면역글로불린 이종이량체화 도메인의 부재 하에서 제1 폴리펩타이드와 제2 폴리펩타이드 사이의 이량체화의 통계적으로 유의한 감소가 존재하는 경우 제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬의 이종이량체화"에 실질적으로 기여하거나 이를 효율적으로 촉진시킨다". 일부 양상에서, 제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬이 공동-발현될 때, 제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬의 적어도 60%, 적어도 약 60% 내지 약 70%, 적어도 약 70% 내지 약 80%, 적어도 80% 내지 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%는 서로 이종이량체를 형성한다. 대표적인 면역글로불린 이종이량체화 도메인은 본 명세서에 제공된 바와 같은 야생형 면역글로불린 CH1 및 CL 도메인 및 변경된(또는 돌연변이된) 면역글로불린 CH1 및 CL 도메인을 포함하는, 면역글로불린 CH1 도메인, 면역글로불린 CL 도메인(예를 들어, Cκ 또는 Cλ 아이소형), 또는 이들의

유도체를 포함한다.

[0067] "야생형 면역글로불린 힌지 영역"은 자연 발생 항체의 중쇄에서 발견된 CH1과 CH2 도메인(IgG, IgA, 및 IgD의 경우) 사이에 개재되어 이를 연결하거나 CH3와 CH1 도메인(IgE 및 IgM의 경우) 사이에 개재되어 이를 연결하는 자연 발생 상부 및 중간 힌지 아미노산 서열을 지칭한다. 일부 양상에서, 야생형 면역글로불린 힌지 영역 서열은 인간이고, 인간 IgG 힌지 영역을 포함할 수 있다. "변경된 야생형 면역글로불린 힌지 영역" 또는 "변경된 면역글로불린 힌지 영역"은 (a) 최대 30%의 아미노산 변화(예를 들어, 최대 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5% 아미노산 치환 또는 결실)를 갖는 야생형 면역글로불린 힌지 영역, 또는 (b) 약 5개의 아미노산(예를 들어, 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 아미노산) 내지 최대 약 120개의 아미노산의 길이를 가지고(예를 들어, 약 10 내지 약 40개의 아미노산 또는 약 15 내지 약 30개의 아미노산 또는 약 15 내지 약 20개의 아미노산 또는 약 20 내지 약 25개의 아미노산의 길이를 가지고), 최대 약 30%의 아미노산 변화(예를 들어, 최대 약 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1%의 아미노산 치환 또는 결실 또는 이들의 조합)를 가지고, US 2013/0129723 및 US 2013/0095097에 개시된 바와 같은 IgG 코어 힌지 영역을 갖는 야생형 면역글로불린 힌지 영역의 일부를 지칭한다. 본 명세서에 제공된 바와 같이, "힌지 영역" 또는 "힌지"는 항원-결합 도메인(예를 들어, 4-1BB 또는 OX40-결합 도메인)과 면역글로불린 불변 영역 사이에 위치할 수 있다.

[0068] 본 명세서에서 사용되는 "링커"는 2개의 화합물, 예를 들어, 2개의 폴리펩타이드를 연결할 수 있는 모이어티, 예를 들어, 폴리펩타이드를 지칭한다. 링커의 비제한적인 예는 글리신-세린(예를 들어, (Gly4Ser)) 반복부를 포함하는 가요성 링커, 및 (a) 막횡단 단백질(예를 들어, 타입 I 막횡단 단백질)의 도메인간 영역; (b) 타입 II C-렉틴의 줄기 영역; 또는 (c) 면역글로불린 힌지로부터 유래된 링커를 포함한다. 본 명세서에 제공된 바와 같이, 링커는 예를 들어, (1) 단일-사슬 Fv(scFv)에서 VH와 VL 영역 사이의 폴리펩타이드 영역 또는 (2) 면역글로불린 불변 영역과 항원-결합 도메인 사이의 폴리펩타이드 영역을 지칭할 수 있다. 일부 양상에서, 링커는 5 내지 약 35개의 아미노산, 예를 들어, 약 15 내지 약 25개의 아미노산으로 구성된다. 일부 양상에서, 링커는 적어도 5개의 아미노산, 적어도 7개의 아미노산 또는 적어도 9개의 아미노산으로 구성된다.

[0069] 본 명세서에서 사용되는 용어 "중쇄"는 항체와 관련하여 사용될 때 임의의 별개의 타입, 예를 들어, 불변 영역의 아미노산 서열을 기반으로 하여 알파(α), 델타(δ), 입실론(ε), 감마(γ), 및 뮤(μ)를 지칭할 수 있으며, 이는 각각 IgG의 하위부류, 예를 들어, IgG_1, IgG_2, IgG_3, 및 IgG_4를 포함하는, 항체의 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM 부류를 발생시킨다.

[0070] 본 명세서에서 사용되는 용어 "경쇄"는 항체와 관련하여 사용될 때 임의의 별개의 타입, 예를 들어, 불변 영역의 아미노산 서열을 기반으로 하여 카파(κ) 또는 람다(λ)를 지칭할 수 있다. 경쇄 아미노산 서열은 당 분야에 잘 알려져 있다. 특정 양상에서, 경쇄는 인간 경쇄이다.

[0071] 본 명세서에서 사용되는 용어 "EU 넘버링 시스템"은 문헌[Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) 및 Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991]에 기재된 바와 같이, 항체의 불변 영역에 대한 EU 넘버링 규칙을 지칭하며, 이러한 문헌 각각은 전문이 본 명세서에 참조에 의해 원용된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 달리 제공되지 않는 한, 면역글로불린 분자의 불변 영역에서 아미노산 잔기의 위치는 EU 명명법에 따라 넘버링된다(Ward et al., 1995 Therap. Immunol.2:77-94).

[0072] 본 명세서에서 사용되는 용어 "이량체"는 공유 결합(예를 들어, 다이설파이드 결합) 및 다른 상호작용(예를 들어, 정전기적 상호작용, 염 브릿지, 수소 결합, 및 소수성 상호작용)을 포함하는, 분자간 힘의 하나 이상의 형태를 통해 서로 회합되는 2개의 하위단위로 구성되는 생물학적 독립체를 지칭하고, 적절한 조건 하에서(예를 들어, 생리학적 조건 하에서, 재조합 단백질을 발현, 정제, 및/또는 저장하기에 적합한 수용액에서, 또는 비-변성 및/또는 또는 비-환원 전기영동을 위한 조건 하에서) 안정하다. 본 명세서에서 사용되는 "이종이량체" 또는 "이종이량체 단백질"은 2개의 상이한 폴리펩타이드로부터 형성된 이량체를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 "동종이량체" 또는 "동종이량체 단백질"은 2개의 동일한 폴리펩타이드로부터 형성된 이량체를 지칭한다.

[0073] "결합 친화성"은 일반적으로 분자(예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 이의 결합 파트너(예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총합의 강도를 지칭한다. 달리 명시하지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 "결합 친화성"은 결합 쌍의 구성원(예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화성을 지칭한다. 이의 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화성은 일반적으로 해리 상수(K_D)로 표시될 수 있다. 친화성은 평형 해리 상수(K_D), 및 평형 회합 상수(K_A)를 포함하나 이에 제한되지 않는 당 분야에 공지된 다수의 방식으로 측정 및/또

는 표현될 수 있다. K_D는 k_{off}/k_{on}의 몫으로부터 계산되는 반면, K_A는 k_{on}/k_{off}의 몫으로부터 계산된다. k_{on}은 예를 들어, 항원에 대한 항체의 회합 속도 상수를 지칭하며, k_{off}는 예를 들어, 항원으로부터 항체의 해리를 지칭한다. k_{on} 및 k_{off}는 BIAcore® 또는 KinExA와 같은 당업자에게 공지된 기술에 의해 결정될 수 있다.

[0074] 본 명세서에서 사용되는 용어 "면역특이적으로 결합한다", "면역특이적으로 인식한다", "특이적으로 결합한다" 및 "특이적으로 인식한다"는 항체의 맥락에서 유사한 용어이다. 이러한 용어는 항체가 이의 항원-결합 도메인을 통해 에피토프에 결합하고 결합이 항원-결합 도메인과 에피토프 사이에 일부 상보성을 수반함을 나타낸다. 따라서, 인간 4-1BB 및/또는 OX40에 "특이적으로 결합하는" 항체는 또한, 비-관련된 비-4-1BB 및/또는 OX40 단백질에 대한 결합 정도가 예를 들어, 방사선면역검정(RIA)에 의해 측정한 경우 4-1BB 및/또는 OX40에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만일 수 있다.

[0075] 결합 도메인은 "고 친화성" 결합 도메인 및 "저 친화성" 결합 도메인으로 분류될 수 있다. "고친화성" 결합 도메인은 10^{-7} M 미만, 10^{-8} M 미만, 10^{-9} M 미만, 10^{-10} M 미만의 KD 값을 갖는 결합 도메인을 지칭한다. "저 친화성" 결합 도메인은 10^{-7} M 초과, 10^{-6} M 초과, 또는 10^{-5} M 초과의 K_D를 갖는 결합 도메인을 지칭한다. "고 친화성" 및 "저 친화성" 결합 도메인은 이들의 표적에 결합하지만, 시험 샘플에 존재하는 다른 성분에는 유의하게 결합하지 않는다.

[0076] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 항체는 표적에 매우 근접하게 있을 때 및 당업자가 결합을 위해 필요한 것으로 고려될 조건 하에서 이의 표적(즉, 인간 4-1BB 또는 인간 OX40)에 특이적으로 결합할 경우 "결합 가능"하다. "인간 4-1BB 항원-결합 도메인"은 인간 4-1BB에 특이적으로 결합하는 결합 도메인을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. "인간 OX40 항원-결합 도메인"은 OX40에 특이적으로 결합하는 결합 도메인을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0077] 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드", 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 지칭하기 위해 본 명세서에서 호환적으로 사용된다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 변형된 아미노산을 포함할 수 있고, 비-아미노산에 의해 중단될 수 있다. 용어는 또한 자연적으로 또는 개입, 예를 들어, 다이설파이드 결합 형성, 글리코실화(개입), 지질화, 아세틸화, 포스포릴화, 또는 임의의 다른 조작 또는 변형, 예컨대, 라벨링 성분과의 컨쥬게이션에 의해 변형된 아미노산 중합체를 포함한다. 또한, 정의 내에, 예를 들어, 아미노산의 하나 이상의 유사체(예를 들어, 비천연 아미노산 등을 포함함)뿐만 아니라 당 분야에 공지된 다른 변형을 함유하는 폴리펩타이드가 포함된다. 본 발명의 폴리펩타이드는 항체에 기반하기 때문에, 일부 양상에서, 폴리펩타이드는 단일 사슬 또는 관련 사슬로 발생할 수 있는 것으로 이해된다.

[0078] 용어 "약제학적 제형" 및 "약제학적 조성물"은 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이게 하는 형태이고, 제형이 투여되는 대상체에 대해 허용 가능하지 않게 독성인 추가적인 성분을 함유하지 않는 제제(preparation)를 지칭한다. 제형은 멸균될 수 있다.

[0079] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약제학적으로 허용 가능한"은 당 분야에 잘 알려진 경로를 사용하여 투여될 때 일반적으로 알레르기 또는 다른 심각한 부작용을 일으키지 않는 분자 실체 및 조성물을 지칭한다. 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 동물, 보다 특히 인간에서 사용하기 위해 미국 약전 또는 다른 일반적으로 인정되는 약전에 열거된 분자 실체 및 조성물은 "약제학적으로 허용 가능한" 것으로 간주된다.

[0080] 본 명세서에서 사용되는 용어 "투여하다", "투여하는", "투여" 등은 약물, 예를 들어, 4-1BB/OX40 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생물학적 작용의 요망되는 부위(예를 들어, 정맥내 투여)에 전달하기 위해 사용될 수 있는 방법을 지칭한다. 본 명세서에 기재된 제제 및 방법과 함께 사용될 수 있는 투여 기술은 예를 들어, 문헌 [Goodman and Gilman, The Pharmacological Basis of the Therapeutics, current edition, Pergamon; and Remington's, Pharmaceutical Sciences, current edition, Mack Publishing Co., Easton, Pa]에서 발견된다.

[0081] 본 명세서에서 사용되는 용어 "대상체" 및 "환자"는 호환적으로 사용된다. 대상체는 동물일 수 있다. 일부 양상에서, 대상체는 포유동물, 예를 들어, 비인간 동물(예를 들어, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트, 마우스, 원숭이 또는 다른 영장류 등)이다. 일부 양상에서, 대상체는 인간이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "필요로 하는 환자" 또는 "필요로 하는 대상체"는 예를 들어, 본 명세서에 제공된 4-1BB/OX40 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로 치료 또는 개선될 수 있는 질환, 장애 또는 병태의 위험이 있거나 이를 앓고 있는 환자를 지칭한다. 필요한 환자는 예를 들어, 암으로 진단된 환자일 수 있다.

[0082] 용어 "치료적 유효량"은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는데 효과적인 약물, 예를 들어, 항-4-1BB/OX40 항체의 양을 지칭한다. 암의 경우, 치료적 유효량의 약물은 암 세포의 수를 감소시키고; 종양 크기 또는 부담을 감소시키고; 말초 장기로의 암 세포 침윤을 저해하고(즉, 어느 정도 늦추고 특정 양상에서 중지시키고); 종양 전이를 저해하고(즉, 어느 정도 늦추고 특정 양상에서 중지시키고); 종양 성장을 어느 정도 저해하고; 암과 관련된 증상들 중 하나 이상을 어느 정도 완화시키고; 그리고/또는 바람직한 반응, 예컨대, 증가된 무진행 생존(PFS), 무질환 생존(DFS), 또는 전체 생존(OS), 완전 반응(CR), 부분 반응(PR), 또는 일부 경우에, 안정한 질환(SD), 진행성 질환(PD)의 감소, 진행까지의 시간(TTP) 감소, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다.

[0083] "치료하는" 또는 "치료" 또는 "치료하기 위해" 또는 "경감시키다" 또는 "경감시키기 위해"와 같은 용어는 진단된 병리학적 병태 또는 장애를 치료, 감속, 증상 경감 및/또는 진행을 중단시키는 치료적 조치를 지칭한다. 따라서, 치료가 필요한 사람들은 이미 장애를 갖는 것으로 진단되거나 의심되는 사람들을 포함한다. 일부 양상에서, 환자가 하기 중 하나 이상을 나타내는 경우, 대상체는 본 발명의 방법에 따라 암에 대해 성공적으로 "치료"된다: 암 세포의 수의 감소 또는 완전한 부재; 종양 크기의 감소; 예를 들어, 연조직 및 골로의 암의 확산을 포함하는 말초 장기로의 암 세포 침윤의 저해 또는 부재; 종양 전이의 저해 또는 부재; 종양 성장의 저해 또는 부재; 특정 암과 관련된 하나 이상의 증상의 완화; 감소된 이환율 및 사망률; 삶의 질 향상; 종양의 종양원성, 종양원성 빈도, 또는 종양원성 능력의 감소; 종양에서 암 줄기 세포의 수 또는 빈도의 감소; 종양원성 세포의 비종양원성 상태로의 분화; 증가된 무진행 생존(PFS), 무질환 생존(DFS), 또는 전체 생존(OS), 완전 반응(CR), 부분 반응(PR), 안정 질환(SD), 진행성 질환(PD)의 감소, 감소된 진행 시간(TTP), 또는 이들의 임의의 조합.

[0084] 용어 "암" 및 "암성"은 세포 집단이 조절되지 않은 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 지칭하거나 기재한다. 암의 예는 흑색종, 신장암, 췌장암, 폐암, 장암, 전립선암, 유방암, 간암, 뇌암 및 혈액암을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 암은 원발성 종양일 수 있거나 진행성 또는 전이성 암일 수 있다.

[0085] 암은 고형 종양 암일 수 있다. 용어 "고형 종양"은 일반적으로 낭종 또는 액체 영역을 함유하지 않는 비정상적인 조직 덩어리를 지칭한다. 고형 종양의 예는 육종, 암종, 및 림프종이다. 백혈병(혈액암)은 일반적으로 고형 종양을 형성하지 않는다. 고형 종양은 OX40 및 4-1BB를 발현하는 종양 침윤 림프구를 함유할 수 있다.

[0086] 본 명세서에서 사용되는 용어 "하나"는 달리 명시하지 않는 한 열거된 성분 중 "하나 이상"을 지칭하는 것으로 이해되어야 한다.

[0087] 구체적으로 언급되거나 문맥상 명백하지 않은 한, 본 명세서에서 사용되는 용어 "또는"은 포괄적인 것으로 이해된다. 본 명세서에서 "A 및/또는 B"와 같은 어구에서 사용되는 용어 "및/또는"은 "A 및 B", "A 또는 B", "A" 및 "B" 둘 다를 포함하는 것으로 의도된다. 마찬가지로, "A, B 및/또는 C"와 같은 어구에서 사용되는 용어 "및/또는"은 하기 양상들 각각을 포함하는 것으로 의도된다: A, B, 및 C; A, B, 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독).

[0088] 양상이 본 명세서에서 "포함하는"이라는 언어로 기재될 때마다, "로 이루어진" 및/또는 "본질적으로 이루어진"과 관련하여 기재된 달리 유사한 양상이 또한 제공되고 본 출원 개시내용의 일부인 것으로 이해된다. 본 개시내용에서, "포함하다", "포함하는", "함유하는" 및 "갖는" 등은 미국 및 유럽 특허법에서 그들에게 부여된 의미를 가질 수 있고, "포함하다", "포함하는" 등을 의미할 수 있으며; "로 본질적으로 이루어진" 또는 "본질적으로 이루어진"은 마찬가지로 미국 및 유럽 특허법에 귀속되는 의미를 갖는다. 미국 특허법에 관한 한, 상기 용어는 개방형으로서, 언급되는 것의 기본적인 또는 신규한 특징이 언급되는 것보다 많은 존재에 의해 변경되지 않고 종래 기술 양상을 배제하는 한 언급되는 것보다 많은 존재를 허용하는 것으로 인식되어야 한다. 또한, 유럽 특허법에 관한 한 "로 본질적으로 이루어진" 또는 본질적으로 포함하는"의 사용은 특정 추가 성분, 즉, 화합물 또는 조성물의 필수 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 성분이 존재할 수 있음을 의미하는 것으로 인식되어야 한다.

[0089] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약" 및 "대략"은 수치 값 또는 수치 범위를 수식하는 데 사용될 때, 값 또는 범위의 최대 5% 초과 또는 5% 미만의 편차가 인용된 값 또는 범위의 의도된 의미 내에 유지됨을 나타낸다.

[0090] 본 명세서에 제공된 임의의 도메인, 성분, 조성물, 및/또는 방법은 본 명세서에 제공된 임의의 다른 도메인, 성분, 조성물, 및/또는 방법 중 하나 이상과 조합될 수 있다.

[0091] **II. 약제학적 조성물**

[0092] 본 개시내용은 공지된 제형에 비해 향상된 안정성을 갖는 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합

단편을 포함하는 신규한 약제학적 조성물을 제공한다. 본 명세서에서 제공되는 신규한 약제학적 조성물은 -20℃에서의 저장 동안뿐만 아니라 다중 동결 해동 주기 후에 시간 경과에 따른 응집체 형성을 저해한다. 본 개시내용의 신규한 약제학적 조성물은 개선된 안정성을 위해 특정 부형제(즉, 안정성 촉진 완충제, 안정화 아미노산, 당 성분, 및 계면활성제)와 함께 제형화된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 유리하게는, 신규한 약제학적 조성물은 pH 값의 범위에 걸쳐 향상된 안정성을 제공한다.

[0093] 응집체 또는 분해 생성물의 형성을 최소화하기 위해 단백질의 이차 및 삼차 구조를 안정화시키는 용액 조건은 치료용 제형에 바람직하다. 질환을 치료하는 데 사용되는 치료용 단백질, 예를 들어, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 경우, 생성물-관련 오염물은 역가의 손실, 예상치 못한 역가의 증가, 면역원성 및 다른 원치 않는 부작용을 포함하는 바람직하지 않은 결과를 가질 수 있다. 제형은 여러 성분으로 구성될 수 있고, 통상적으로 수용액으로 제공된다. 이러한 성분은 특정 pH를 유지하고 저장 동안 pH의 변화에 저항하는 완충제, 염, 아미노산, 세제, 중합체, 당 및 약물의 안정성 또는 용해도를 유지하거나 용액에 다른 바람직한 특성을 도입하는 역할을 하는, 계면활성제와 같은 다른 화학적 부형제를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 성분은 양전하 또는 음전하를 가질 수 있거나, 쯔비터이온일 수 있거나, 양친매성, 소수성 또는 친수성일 수 있다. 상이한 성분은 이들의 화학적 특성에 기반하여 단백질의 상이한 영역에 결합, 이를 상호작용 및/또는 안정화될 수 있다. 인간 환자에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물은 통상적으로, 예를 들어, 액체 담체에서 비경구 투여를 위해 제형화되거나, 정맥내 또는 피하 투여를 위해 액체 용액 또는 현탁액으로 재구성하기에 적합하다. 비경구 투여용 액체 조성물은 주사 또는 연속 주입에 의한 투여를 위해 제형화될 수 있다. 주사 또는 주입에 의한 투여 경로는 정맥내, 복강내, 근육내, 척추강내 및 피하를 포함한다. 일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 제형은 투여 전에 동결건조된다. 일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 제형은 투여 전에 동결건조되지 않는다.

[0094] 본 개시내용은 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 신규한 약제학적 조성물을 제공한다. 일부 양상에서, 본 개시내용은 (a) 4-1BB 및 OX40에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편; (b) 약 5mM 내지 약 15mM의 안정성 촉진 완충제; (c) 약 25mM 내지 약 50mM의 안정화 아미노산; (d) 약 2% 내지 약 8% w/v의 당; 및 (e) 약 0.01% 내지 약 0.03%의 계면활성제를 제공한다.

[0095] 일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물은 석시네이트, 히스티딘, 시트레이트 및 글루타메이트로 이루어진 군으로부터 선택된 안정성 촉진 완충제를 포함한다. 일부 양상에서, 안정성 촉진 완충제는 조성물에 약 5mM, 약 6mM, 약 7mM, 약 8mM, 약 9mM, 약 10mM, 약 11mM, 약 12mM, 약 13mM, 약 14mM 또는 약 15mM의 농도로 존재한다. 일부 양상에서, 안정성 촉진 완충제는 글루타메이트이다. 일부 양상에서, 글루타메이트는 조성물에 약 5mM의 농도로 존재한다.

[0096] 일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물은 아르기닌, 메티오닌, 류신 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된 안정화 아미노산을 포함한다. 일부 양상에서, 안정화 아미노산은 조성물에 약 25mM, 약 26mM, 약 27mM, 약 28mM, 약 29mM, 약 30mM, 약 31mM, 약 32mM, 약 33mM, 약 34mM, 약 35mM, 약 36mM, 약 37mM, 약 38mM, 약 39mM, 약 40mM, 약 41mM, 약 42mM, 약 43mM, 약 44mM, 약 45mM, 약 46mM, 약 47mM, 약 48mM, 약 49mM 또는 약 50mM의 농도로 존재한다. 일부 양상에서, 안정화 아미노산은 류신이다. 일부 양상에서, 류신은 조성물에 약 40mM의 농도로 존재한다.

[0097] 일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물은 수크로스, 트레할로스, 및 소르비톨로 이루어진 군으로부터 선택된 당을 포함한다. 일부 양상에서, 당은 조성물에 약 2% w/v 내지 약 8% w/v의 농도로 존재한다. 일부 양상에서, 당은 조성물에 약 2% w/v, 약 3% w/v, 약 4% w/v, 약 5% w/v, 약 6% w/v, 약 7% w/v 또는 약 8% w/v의 농도로 존재한다. 일부 양상에서, 당은 수크로스이다. 일부 양상에서, 수크로스는 조성물에 약 3% w/v의 농도로 존재한다.

[0098] 일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물은 계면활성제를 포함한다. 일부 양상에서, 계면활성제는 조성물에 약 0.01% w/v 내지 약 0.03% w/v의 농도로 존재한다. 일부 양상에서, 계면활성제는 폴리소르베이트-80이다. 일부 양상에서, 폴리소르베이트-80은 조성물에 약 3% w/v의 농도로 존재한다.

[0099] 일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물은 특정 pH 범위 내에서 향상된 안정성을 제공한다. 일부 양상에서, 조성물의 pH는 약 4.3 내지 약 4.7의 범위이다. 일부 양상에서, 조성물의 pH는 약 4.5이다. 일부 양상에서, 조성물의 pH는 4.5이다.

[0100] 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물의 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 조성물에 약 10 내지 50 mg/mL의 농도로 존재한다. 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 조성물에 약 10 mg/mL의 농도로 존재한다. 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 조성물에 약 20 mg/mL의 농도로 존재한다. 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 조성물에 약 30 mg/mL의 농도로 존재한다. 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 조성물에 약 40 mg/mL의 농도로 존재한다. 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 조성물에 약 50 mg/mL의 농도로 존재한다.

[0101] 글루타메이트, 수크로스, 및 폴리소르베이트-80과 함께 제형화된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물에 염화나트륨(NaCl)의 첨가는 조성물에 불안정화 효과를 가질 수 있고, 단백질 응집을 유발할 수 있는 단백질-단백질 상호작용을 촉진할 수 있다. 따라서, 일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 염화나트륨(NaCl)을 포함하지 않는다.

[0102] 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물의 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 약 90% 초과의 순도를 갖는다. 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 약 91% 초과의 순도를 갖는다. 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 약 92% 초과의 순도를 갖는다. 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 약 93% 초과의 순도를 갖는다. 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 약 94% 초과의 순도를 갖는다. 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 약 95% 초과의 순도를 갖는다.

[0103] 일부 양상에서, 본 명세서에는 (a) 약 10 mg/mL의 농도의 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편; (b) 약 10mM의 글루타메이트; (c) 약 40mM의 류신; (d) 약 3% w/v 수크로스; 및 (e) 약 0.02%의 폴리소르베이트-80을 포함하는 약제학적 조성물이 제공되며, 여기서, 조성물의 pH는 약 4.3 내지 약 4.7이다.

[0104] 일부 양상에서, 본 명세서에는 (a) 10 mg/mL 농도의 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편; (b) 10mM 글루타메이트; (c) 40mM 류신; (d) 3% w/v 수크로스; 및 (e) 0.02%의 폴리소르베이트-80을 포함하는 약제학적 조성물이 제공되며, 여기서, 조성물의 pH는 4.5이다.

[0105] 일반적으로, 이러한 조성물은 통상적으로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "약제학적으로 허용 가능한"은 동물, 특히 인간에서 사용하기 위해 정부 규제 기관에 의해 승인되거나 미국 약전 또는 다른 일반적으로 인정되는 약전에 열거된 것을 의미한다. 이러한 약제학적 담체는 멸균 액체, 예컨대, 물, 및 석유, 동물, 식물성 또는 합성 기원의 것들을 포함하는 오일, 예컨대, 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름, 글리세롤 폴리에틸렌 글리콜 리시놀레에이트, 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 물 또는 수용액 염수 및 수성 덱스트로스 및 글리세롤 용액은 특히 주사용 용액을 위한 담체로서 사용될 수 있다.

[0106] **III. 4-1BB x OX40 이중특이적 항체**

[0107] 본 명세서에는 인간 4-1BB에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인(즉, 인간 4-1BB 항원-결합 도메인) 및 인간 OX40에 결합하는 항원-결합 도메인(즉, 인간 OX40 항원-결합 도메인)을 포함하는 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 신규한 약제학적 조성물이 제공된다. 본 명세서에 기재된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 둘 다의 표적 단백질에 대해 2가이며, 즉, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 2개의 4-1BB 결합 도메인 및 2개의 OX40 결합 도메인을 함유한다. 이러한 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 ADAPTIR™ 기술에 의해 예시된다. 예시적인 분자는 본 개시 전반에 걸쳐 FXX01102로 지칭된다. 각각의 표적에 대해 2가인 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 이량체를 함유하는 이중 가변 도메인 항체, IgG-scFv, scFv-Fc-scFv, 또는 ADAPTIR™ 항체를 포함하나, 이에 제한되지 않으며, 여기서 이량체의 각각의 폴리펩타이드는 2개의 상이한 항원-결합 도메인을 함유한다. 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 단일 사슬 Fv(scFv)를 포함한다. 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')2, scFv, 다이설파이드 연결된 Fv, 또는 scFv-Fc를 포함한다.

[0108] **A. 4-1BB 결합 도메인**

[0109] 본 명세서에는 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 조립하는 데 사용될 수 있는 인간 4-1BB(즉, 4-1BB 결합 도메인)에 결합하는 항원-결합 도메인이 제공된다. 4-1BB 결합 도메인은 인간 4-1BB에 대한 결합에 추가하여, 다른 종으로부터의 4-1BB, 예를 들어, 시노몰구스 원숭이 및/또는 마우스 4-1BB에 결합할 수

있다. 일부 양상에서, 4-1BB 결합 도메인은 인간 4-1BB 및 시노몰구스 원숭이 4-1BB에 결합한다.

[0110] 4-1BB 결합 도메인은 6개의 상보성 결정 영역(CDR), 즉, 가변 중쇄(VH) CDR1, VH CDR2, VH CDR3, 가변 경쇄(VL) CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함한다. 4-1BB 결합 도메인은 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)를 포함할 수 있다. VH 및 VL은 별도의 폴리펩타이드일 수 있거나 동일한 폴리펩타이드 상에(예를 들어, scFv에) 있을 수 있다.

[0111] 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 4-1BB 결합 도메인은 표 A에 제공된 6개의 CDR(예를 들어, 서열번호 1 내지 6)의 조합을 포함한다.

[0112] **표 A. 4-1BB VH CDR 아미노산 서열**[1]

VH CDR1 (서열번호)	VH CDR2 (서열번호)	VH CDR3 (서열번호)
GYTFTSYW (서열번호 1)	IYPSGGST (서열번호 2)	ASFSDGYYAYAMDY (서열번호 3)

[1]CDR은 IMGT에 따라 결정된다.

[0113]

[0114] **표 B. 4-1BB VL CDR 아미노산 서열**[4]

VL CDR1 (서열번호)	VL CDR2 (서열번호)	VL CDR3 (서열번호)
QDISNY (서열번호 4)	YTS (서열번호 5)	QQGYTLPYT (서열번호 6)

[4]CDR은 IMGT에 따라 결정된다.

[0115]

[0116] 4-1BB에 대해 2가인 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 2개의 4-1BB 결합 도메인을 포함할 수 있으며, 각각은 상기 표 A 및 표 B에 열거된 6개의 CDR을 포함한다.

[0117] 본 명세서에 기재된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 일부 양상에서, 4-1BB 결합 도메인은 표 C에 제공된 VH 서열을 포함한다.

[0118] **표 C: 4-1BB 가변 중쇄(VH) 아미노산 서열**

서열번호	VH 아미노산 서열
14	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGL EWMGNIYPSGGSTNYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCASFSDGYYAYAMDYWGQGTLVTVSS

[0119]

[0120] 본 명세서에 기재된 4-1BB 결합 도메인은 표 C의 VH 서열의 CDR, 예를 들어, IMGT-정의된 CDR, Kabat-정의된 CDR, Chothia-정의된 CDR, 또는 AbM-정의된 CDR을 포함하는 VH를 포함할 수 있다.

[0121] 본 명세서에 기재된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 일부 양상에서, 4-1BB 결합 도메인은 표 D에 제공된 VL 서열을 포함한다.

[0122] **표 D: 4-1BB 가변 경쇄(VL) 아미노산 서열**

서열번호	VL 아미노산 서열
15	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNWYQQKPGQAPRLLI YYASRRHTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQGYNLPY TFGQGTKVEIK

[0123]

[0124] 본 명세서에 기재된 4-1BB 결합 도메인은 표 D의 VL 서열의 CDR, 예를 들어, IMGT-정의된 CDR, Kabat-정의된 CDR, Chothia-정의된 CDR, 또는 AbM-정의된 CDR을 포함하는 VL을 포함할 수 있다.

[0125] 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 2개의 4-1BB 결합 도메인을 포함할 수 있으며, 각각은 표 C에 제공된 VH 및 표 D에 제공된 VL을 포함한다. 표 C에 제공된 VH 및 표 D에 제공된 VL은 상이한 폴리펩타이드 상에 있을 수 있거나 동일한 폴리펩타이드 상에 있을 수 있다. VH 및 VL이 동일한 폴리펩타이드 상에 있을 때, 이들은 어느 한 배향(즉, VH-VL 또는 VL-VH)일 수 있으며, 이들은 링커(예를 들어, 글리신-세린 링커)에 의해 연결될 수 있다. 일부 양상에서, VH 및 VL은 적어도 15개의 아미노

산 길이(예를 들어, 15 내지 50개의 아미노산, 15 내지 40개의 아미노산, 15 내지 30개의 아미노산, 15 내지 25개의 아미노산 또는 15 내지 20개의 아미노산)인 글리신-세린 링커를 통해 연결된다. 일부 양상에서, VH 및 VL은 적어도 20개의 아미노산 길이(예를 들어, 20 내지 50개의 아미노산, 20 내지 40개의 아미노산, 20 내지 30개의 아미노산, 또는 20 내지 25개의 아미노산)인 글리신-세린 링커를 통해 연결된다.

[0126] 본 명세서에 기재된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 항원 결합 단편의 일부 양상에서, 4-1BB 결합 도메인은 표 C의 VH 서열의 CDR, 예를 들어, IMGT-정의된 CDR, Kabat-정의된 CDR, Chothia-정의된 CDR, 또는 AbM-정의된 CDR을 포함하는 VH, 및 표 D의 VL 서열의 CDR, 예를 들어, IMGT-정의된 CDR, Kabat-정의된 CDR, Chothia-정의된 CDR, 또는 AbM-정의된 CDR을 포함하는 VL을 포함할 수 있다.

[0127] **B. OX40 결합 도메인**

[0128] 본 명세서에는 4-1BB x OX40 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 조립하는 데 사용될 수 있는 인간 OX40에 결합하는 항원-결합 도메인(즉, OX40 결합 도메인)이 제공된다. OX40 결합 도메인은 인간 OX40에 대한 결합에 추가하여, 다른 종으로부터의 OX40, 예를 들어, 시노몰구스 원숭이 및/또는 마우스 OX40에 결합할 수 있다. 일부 양상에서, OX40 결합 도메인은 인간 OX40 및 시노몰구스 원숭이 OX40에 결합한다.

[0129] OX40 결합 도메인은 6개의 상보성 결정 영역(CDR), 즉, 가변 중쇄(VH) CDR1, VH CDR2, VH CDR3, 가변 경쇄(VL) CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함할 수 있다. OX40 결합 도메인은 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)를 포함할 수 있다. VH 및 VL은 별도의 폴리펩타이드일 수 있거나 동일한 폴리펩타이드 상에(예를 들어, scFv에) 있을 수 있다.

[0130] 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 OX40 결합 도메인은 표 E 및 표 F에 열거된 6개의 CDR을 포함한다.

[0131] **표 E. OX40 VH CDR 아미노산 서열**[3]

VH CDR1 (서열번호)	VH CDR2 (서열번호)	VH CDR3 (서열번호)
GFTLSYYG (서열번호 7)	ISHDGSDK (서열번호 8)	SNDQFDP (서열번호 9)

[3]CDR은 IMGT에 따라 결정된다.

[0132]

[0133] **표 F. OX40 VL CDR 아미노산 서열**[4]

VL CDR1 (서열번호)	VL CDR2 (서열번호)	VL CDR3 (서열번호)
NIGSKS (서열번호 10)	DDS (서열번호 11)	QVWDSSSDHVV (서열번호 12)

[4]CDR은 IMGT에 따라 결정된다.

[0134]

[0135] OX40에 대해 2가인 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 2개의 OX40 결합 도메인을 포함할 수 있으며, 각각은 상기 표 E 및 표 F에 열거된 6개의 CDR을 포함한다.

[0136] 본 명세서에 기재된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 일부 양상에서, OX40 결합 도메인은 표 G에 제공된 VH 서열을 포함한다

[0137] **표 G: OX40 가변 중쇄(VH) 아미노산 서열**

서열번호	VH 아미노산 서열
17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLE WVAAISHDGSDKYYADSVKGRFTISRDNSKNRLYLQMNSLRAEDTA VYYCSNDQFDPWGQGTLVTVSS

[0138]

[0139] 본 명세서에 기재된 OX40 결합 도메인은 표 G의 VH 서열의 CDR, 예를 들어, IMGT-정의된 CDR, Kabat-정의된 CDR, Chothia-정의된 CDR을 포함하는 VH를 포함할 수 있다.

[0140] 본 명세서에 기재된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 일부 양상에서, OX40 결합 도메인은 표 H에 제공된 VL 서열을 포함한다.

[0141] **표 H: OX40 가변 경쇄(VL) 아미노산 서열**

서열번호	VL 아미노산 서열
18	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVV YDDSGRPSGIPERFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSD HVVFGGGTKLTVL

[0142]

[0143] 본 명세서에 기재된 OX40 결합 도메인은 표 I의 VL 서열의 CDR, 예를 들어, IMGT-정의된 CDR, Kabat-정의된 CDR, Chothia-정의된 CDR, 또는 AbM-정의된 CDR을 포함하는 VL을 포함할 수 있다.

[0144] 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 2개의 OX40 결합 도메인을 포함할 수 있으며, 각각은 표 G에 제공된 VH 및 표 H에 제공된 VL을 포함한다. 표 G에 제공된 VH 및 표 H에 제공된 VL은 상이한 폴리펩타이드 상에 있을 수 있거나 동일한 폴리펩타이드 상에 있을 수 있다. VH 및 VL이 동일한 폴리펩타이드 상에 있을 때, 이들은 어느 한 배향(즉, VH-VL 또는 VL-VH)일 수 있으며, 이들은 링커(예를 들어, 글리신-세린 링커)에 의해 연결될 수 있다. 일부 양상에서, VH 및 VL은 적어도 15개의 아미노산 길이(예를 들어, 15 내지 50개의 아미노산, 15 내지 40개의 아미노산, 15 내지 30개의 아미노산, 15 내지 25개의 아미노산 또는 15 내지 20개의 아미노산)인 글리신-세린 링커를 통해 연결될 수 있다. 일부 양상에서, VH 및 VL은 적어도 20개의 아미노산 길이(예를 들어, 20 내지 50개의 아미노산, 20 내지 40개의 아미노산, 20 내지 30개의 아미노산, 또는 20 내지 25개의 아미노산)인 글리신-세린 링커를 통해 연결된다.

[0145] 본 명세서에 기재된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 항원 결합 단편의 일부 양상에서, OX40 결합 도메인은 표 G의 VH 서열의 CDR, 예를 들어, IMGT-정의된 CDR, Kabat-정의된 CDR, Chothia-정의된 CDR, 또는 AbM-정의된 CDR을 포함하는 VH, 및 표 H의 VL 서열의 CDR, 예를 들어, IMGT-정의된 CDR, Kabat-정의된 CDR, Chothia-정의된 CDR, 또는 AbM-정의된 CDR을 포함하는 VL을 포함할 수 있다.

[0146] **C. 4-1BB 및/또는 OX40 결합 도메인**

[0147] 4-1BB 또는 OX40 결합 도메인에서, VH CDR 또는 VH 및 VL CDR 또는 VL은 별도의 폴리펩타이드일 수 있거나 동일한 폴리펩타이드 상에 있을 수 있다. VH CDR 또는 VH 및 VL CDR 또는 VL이 동일한 폴리펩타이드 상에 있을 때, 이들은 어느 한 배향(즉, VH-VL 또는 VL-VH)일 수 있다.

[0148] VH CDR 또는 VH 및 VL CDR 또는 VL이 동일한 폴리펩타이드 상에 있을 때, 이들은 링커(예를 들어, 글리신-세린 링커)에 의해 연결될 수 있다. VH는 링커 서열에 대해 N-말단에 위치할 수 있으며, VL은 링커 서열에 대해 C-말단에 위치할 수 있다. 대안적으로, VL은 링커 서열에 대해 N-말단에 위치할 수 있으며, VH는 링커 서열에 대해 C-말단에 위치할 수 있다.

[0149] VH 및 VL 영역을 연결하기 위한 펩타이드 링커의 사용은 당 분야에 잘 알려져 있으며, 이러한 특정 분야에 다수의 간행물이 존재한다. 일부 양상에서, 펩타이드 링커는 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser 아미노산 서열($(Gly_4Ser)_3$)(서열번호 20)의 3개의 반복부로 구성된 15mer이다. 일부 양상에서, 적합한 링커는 무작위 돌연변이유발을 통해 단순 링커(예를 들어, (Gly4Ser)n)(여기서, n은 1 내지 5임)(서열번호 21)를 최적화함으로써 수득될 수 있다.

[0150] 4-1BB 및/또는 OX40 결합 도메인은 인간화된 결합 도메인일 수 있다. 4-1BB 및/또는 OX40 결합 도메인은 래트 결합 도메인일 수 있다. 4-1BB 및/또는 OX40 결합 도메인은 뮤린 결합 도메인일 수 있다. 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체는 인간화 4-1BB 결합 도메인 및 래트 OX40 결합 도메인을 포함한다. 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체는 인간화 4-1BB 결합 도메인 및 뮤린 OX40 결합 도메인을 포함한다. 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체는 인간화 4-1BB 결합 도메인 및 인간화 OX40 결합 도메인을 포함한다.

[0151] 본 명세서에 기재된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 일부 양상에서, 4-1BB 및/또는 OX40 결합 도메인은 scFv일 수 있다. 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서 모든 4-1BB 및 OX40 결합 도메인은 scFv이다. 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서 적어도 하나의 4-1BB 또는 OX40 결합 도메인은 scFv이다. 본 명세서에 기재된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 일부 양상에서, 폴리펩타이드는 4-1BB 결합 도메인(예를 들어, scFv) 및 OX40 결합 도메인(예를 들어, scFv)을 포함한다.

[0152] 본 명세서에 기재된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 항원 결합 단편의 일부 양상에서, 4-1BB scFv는 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함한다. 본 명세서에 기재된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 항원 결합 단편의 일부 양상에서, OX40 scFv는 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함한다.

[0153] 일부 양상에서, 4-1BB 및/또는 OX40 결합 도메인은 별도의 폴리펩타이드 사슬 상에 VH 및 VL을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서 모든 4-1BB 및 OX40 결합 도메인은 별도의 폴리펩타이드 사슬 상에 VH 및 VL을 포함한다. 일부 양상에서, 4-1BB 및/또는 OX40 결합 도메인은 동일한 폴리펩타이드 사슬 상에 VH 및 VL을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서 모든 4-1BB 또는 OX40 결합 도메인은 동일한 폴리펩타이드 사슬 상에 VH 및 VL을 포함한다.

[0154] 본 명세서에 기재된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 일부 양상에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 2개의 폴리펩타이드를 포함하며, 각각의 폴리펩타이드는 아미노-말단에서 카복실-말단으로 순서대로, 제1 항원-결합 도메인, 링커(예를 들어, 여기서 링커는 힌지 영역임), 면역글로불린 불변 영역, 및 제2 항원-결합 도메인을 포함한다. 이러한 구성은 또한 본 명세서에서 ADAPTIR™ 포맷으로 지칭된다. 예시적인 분자는 본 개시 전반에 걸쳐 FXX01102로 지칭된다.

[0155] 이러한 포맷에서, 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 2개의 폴리펩타이드의 이량체를 포함하며, 각각의 폴리펩타이드는 아미노-말단에서 카복실-말단으로 순서대로, 제1 scFv, 힌지 영역, 면역글로불린 불변 영역, 및 제2 scFv를 포함하며, 여기서 (a) 제1 scFv는 인간 4-1BB 항원-결합 도메인을 포함하고, 제2 scFv는 인간 OX40 항원-결합 도메인을 포함하거나, (b) 제1 scFv는 인간 OX40 항원-결합 도메인을 포함하고, 제2 scFv가 인간 4-1BB 항원-결합 도메인을 포함한다.

[0156] 본 명세서에 제공된 바와 같이, 본 명세서에 제공된 임의의 CDR, VH, VL, scFv, 및/또는 힌지를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 폴리펩타이드는 면역글로불린 불변 영역을 추가로 포함할 수 있다. 불변 영역의 존재는 불변 영역이 없는 유사한 이중특이적 항체와 비교하여 이중특이적 항체의 반감기를 연장시킨다. 면역글로불린 불변 영역은 예를 들어, 힌지와 4-1BB 결합 도메인(예를 들어, 4-1BB 결합 scFv) 사이에 위치할 수 있다. 면역글로불린 불변 영역은 또한 힌지와 OX40-결합 도메인(예를 들어, OX-40 결합 scFv) 사이에 위치할 수 있다. 일부 양상에서, 폴리펩타이드는 아미노-말단에서 카복실-말단으로의 순서로, 힌지 영역, 면역글로불린 불변 영역, 및 항원-결합 도메인(예를 들어, scFv)을 포함한다.

[0157] 일부 양상에서, 면역글로불린 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 또는 IgD의 면역글로불린 CH2 및 CH3 도메인을 포함하며, 선택적으로 여기서 IgG는 인간이다. 일부 경우에, 면역글로불린 불변 영역은 IgG1(예를 들어, 인간 IgG1)의 면역글로불린 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다. 일부 양상에서, 폴리펩타이드는 CH1 도메인을 함유하지 않는다.

[0158] 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 각각 서열번호 1 내지 3의 4-1BB VH CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 각각 서열번호 4 내지 6의 4-1BB VL CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 각각 서열번호 7 내지 9의 OX40 VH CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 각각 서열번호 10 내지 12의 OX40 VL CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함한다.

[0159] 일부 양상에서, 인간 4-1BB 결합 도메인 및 인간 OX40 결합 도메인은 동일한 폴리펩타이드 상에 있다. 일부 양상에서, 인간 4-1BB 결합 도메인은 인간 OX40 결합 도메인에 대해 N-말단이다. 일부 양상에서, 인간 4-1BB 결합 도메인은 인간 OX40 결합 도메인에 대해 C-말단이다. 일부 양상에서, 면역글로불린 불변 영역은 IgG1의 면역글로불린 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0160] 일부 양상에서, 항체는 CH1 도메인을 함유하지 않는다.

[0161] 일부 양상에서, 면역글로불린 불변 영역은 EU 넘버링 시스템에 따른 E233P, L234A, L235A, G237A 및 K322A의 치환, 및 G236의 결실을 포함하는 인간 IgG1 CH2 도메인을 포함한다. 일부 양상에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 면역글로불린 불변 영역과 인간 4-1BB 결합 도메인 사이 그리고/또는 면역글로불린 불변 영역과 인간 OX40 결합 도메인 사이에 링커를 포함한다. 일부 양상에서, 면역글로불린 불변 영역과 인간 4-1BB 결합 도메인 사이 그리고/또는 면역글로불린 불변 영역과 인간 OX40 결합 도메인 사이의 링커는 10 내지 30개의 아미노산, 15 내지 30개의 아미노산, 또는 20 내지 30개의 아미노산을 포함한다. 일부 양상에서, 면역글로불린 불변 영역과 인간 4-1BB 결합 도메인 사이 또는 면역글로불린 불변 영역과 인간 OX40 결합 도메인 사이의 링커는 아미노산 서열 (Gly4Ser)n을 포함하며, 여기서 n은 1 내지 5이며(서열번호 21), 선택적으로 n은 1이다.

[0162] **D. 4-1BB 및 OX40 결합 도메인을 포함하는 조성물**

[0163] 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 2개의 폴리펩타이드의 이량체를 포함하는 4-1BB x OX40

이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 각각의 폴리펩타이드는 아미노-말단에서 카복실-말단으로 순서대로, 제1 scFv, 힌지 영역, 면역글로불린 불변 영역, 및 제2 scFv를 포함하며, 여기서 (a) 제1 scFv가 인간 4-1BB 항원-결합 도메인을 포함하고, 제2 scFv가 인간 OX40 항원-결합 도메인을 포함하거나, (b) 제1 scFv가 인간 OX40 항원-결합 도메인을 포함하고, 제2 scFv는 인간 4-1BB 항원-결합 도메인을 포함한다. 일부 양상에서, 이량체는 동종이량체이다.

[0164] 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함한다.

[0165] 본 개시내용의 일부 양상은 인간 4-1BB 항원-결합 도메인 및 인간 OX40 항원-결합 도메인을 포함하는 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 제공하며, 여기서 (a) 4-1BB 항원-결합 도메인은 (i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1; (ii) 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2; (iii) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3; (iv) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)-CDR1; (v) 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 (vi) 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하며; (b) OX40 항원-결합 도메인은 (i) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1; (ii) 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2; (iii) 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3; (iv) 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1; (v) 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 (vi) 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함한다.

[0166] 본 개시내용의 일부 양상은 인간 4-1BB 항원-결합 도메인 및 인간 OX40 항원-결합 도메인을 포함하는 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 제공하며, 여기서 (a) 4-1BB 항원-결합 도메인은 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며; (b) OX40 항원-결합 도메인은 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0167] 본 개시내용의 일부 양상은 인간 4-1BB 항원-결합 도메인 및 인간 OX40 항원-결합 도메인을 포함하는 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 제공하며, 여기서 (a) 4-1BB 항원-결합 도메인은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함하며; (b) OX40 항원-결합 도메인은 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함한다.

[0168] 본 개시내용의 일부 양상은 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 인간 OX40 항원-결합 도메인 및 인간 4-1BB 항원-결합 도메인을 포함하는 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0169] 본 개시내용의 일부 양상은 (a) 10 내지 50 mg/mL의 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 (i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1; 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2; 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3; 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)-CDR1; 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하는 4-1BB 항원-결합 도메인; 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1; 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2; 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3; 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1; 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하는 OX40 항원-결합 도메인; (ii) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 4-1BB 항원-결합 도메인; 및 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 OX40 항원-결합 도메인; (iii) 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함하는 4-1BB 항원-결합 도메인; 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 scFv를 포함하는 OX40 항원-결합 도메인; 또는 (iv) 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편; (b) 약 5mM 내지 약 15mM의 글루타메이트; (c) 약 25mM 내지 약 50mM의 류신; (d) 약 2% 내지 약 8% w/v 수크로스; 및 (e) 약 0.01% 내지 약 0.03%의 폴리소르베이트-80을 포함하는 약제학적 조성물을 제공하며; 조성물의 pH는 약 4.3 내지 약 4.7이다.

[0170] 본 개시내용의 일부 양상은 (a) 10 mg/mL의 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 (i) 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1; 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2; 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3; 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL)-CDR1; 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 서열번호 7의 아미노

산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하는 4-1BB 항원-결합 도메인; 및 (ii) 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR1; 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR2; 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH-CDR3; 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR1; 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함하는 OX40 항원-결합 도메인을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편; (b) 10mM 글루타메이트; (c) 40mM 류신; (d) 3% w/v 수크로스; 및 (e) 0.02%의 폴리소르베이트-80을 포함하는 약제학적 조성물을 제공하며, 여기서, 조성물의 pH는 4.5이다.

[0171] 일부 양상에서, 약제학적 조성물은 (a) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 4-1BB 항원-결합 도메인; 및 (b) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 OX40 항원-결합 도메인을 포함한다.

[0172] **IV. 방법 및 용도**

[0173] 본 개시내용은 4-1BB 및/또는 OX40에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 제공하며, 이러한 조성물은 암의 치료와 같은 치료적 치료 방법을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 적용에 유용하다. 일부 양상에서, 약제학적 조성물은 종양 성장을 저해하고/하거나 종양 부피를 감소시키는데 유용하다. 사용 방법은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다. 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 요법에 사용하기 위한 임의의 개시된 항체 또는 항원 결합 단편의 용도를 포함할 수 있다.

[0174] 본 개시내용은 (a) 4-1BB 및 OX40에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편; (b) 약 5mM 내지 약 15mM의 안정성 촉진 완충제; (c) 약 25mM 내지 약 50mM의 안정화 아미노산; (d) 약 2% 내지 약 8% w/v의 당; 및 (e) 약 0.01% 내지 약 0.03%의 계면활성제를 포함하는, 유효량의 약제학적 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0175] 일부 양상에서, 암은 흑색종, 신장암, 췌장암, 폐암, 결장암/장암, 위암, 전립선암, 난소암, 유방암, 간암, 뇌암 및 혈액암을 포함하나 이에 제한되지 않는 암이다. 암은 원발성 종양일 수 있거나 진행성 또는 전이성 암일 수 있다. 일부 양상에서, 암은 고형 종양이다. 예를 들어, 본 개시내용은 육종, 암종, 및 림프종의 치료를 위한 이중특이적 항체의 용도를 포함한다. 본 개시내용은 치료적 유효량의 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물을 대상체에게 투여함으로써 육종, 암종 또는 림프종을 갖는 인간 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0176] 일부 양상에서, 본 개시내용은 인간 대상체를 종양 침윤 림프구를 함유하는 종양 또는 암성 조직으로 치료하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 4-1BB 및 OX40을 발현하는 림프구를 함유하는 종양으로 인간 대상체를 치료하는 단계를 제공한다. 일부 양상에서, 본 개시내용은 (a) 4-1BB 및 OX40에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편; (b) 약 5mM 내지 약 15mM의 안정성 촉진 완충제; (c) 약 25mM 내지 약 50mM의 안정화 아미노산; (d) 약 2% 내지 약 8% w/v의 당; 및 (e) 약 0.01% 내지 약 0.03%의 계면활성제를 포함하는, 치료학적 유효량의 약제학적 조성물을 고형 종양을 갖는 인간 대상체에게 투여하는 단계를 제공한다.

[0177] 본 개시내용의 일부 양상은 본 명세서에 개시된 바와 같은 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 치료적 유효량의 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 면역 반응을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0178] 본 개시내용의 일부 양상은 본 명세서에 개시된 바와 같은 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 T 세포 공동자극 경로를 작용시키는 방법을 제공한다.

[0179] 본 개시내용의 일부 양상은 본 명세서에 개시된 바와 같은 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 치료학적 유효량의 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 NK 세포 및/또는 T 세포(예를 들어, CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포)의 증식을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0180] 본 개시내용의 일부 양상은 본 명세서에 개시된 바와 같은 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 치료학적 유효량의 약제학적 조성물을 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 종양 침윤 림프구의 수를 증가시키는 방법을 제공한다.

[0181] 본 개시내용의 일부 양상은 본 명세서에 기재된 바와 같은 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 치료학적 유효량의 약제학적 조성물을 대상체에 투여함으로써 대상체에서 종양 침윤 림프구에 의한 그랜자임의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0182] 일부 양상에서, 대상체는 인간이다.

[0183] 일부 양상에서, 본 명세서에는 의약으로서 사용하기 위한 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 일부 양상에서, 본 명세서에는 암의 치료 방법에 사용하기 위한 4-1BB x OX40 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0184] **V. 키트 및 용기**

[0185] 본 개시내용은 또한 본 명세서에 기재되고 예시된 임의의 약제학적 제형을 포함하는 용기를 제공한다.

[0186] 일부 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재되고 예시된 임의의 약제학적 제형 및/또는 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 특히 진단, 기초 연구, 또는 치료 방법에 사용하기 위한 약제학적 제형, 항체, 이의 항원-결합 단편, 및 다른 제제를 공급하는 데 사용될 수 있다. 일부 양상에서, 키트는 대상체에서 암을 치료하는 방법에서, 본 명세서에 기재되고 예시된 임의의 하나 이상의 약제학적 제형, 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 및/또는 이중특이적 항체, 및 하나 이상의 약제학적 제형, 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하기 위한 설명서를 포함한다. 일부 양상에서, 키트는 고형 종양 암의 치료에서 사용하기 위한, 본 명세서에 기재되고 예시된 임의의 하나 이상의 약제학적 제형, 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 및/또는 이중특이적 항체, 및 하나 이상의 약제학적 제형, 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하기 위한 설명서를 포함한다.

[0187] **실시예**

[0188] 본 명세서에 기재된 실시예는 단지 예시적인 목적을 위한 것이며, 이에 비추어 다양한 수정 또는 변경이 당업자에게 제안될 것이고 본 출원의 사상 및 범위 내에 포함되는 것으로 이해된다.

[0189] 실시예 1. 응집 및/또는 분해를 최소화하기 위한 단백질을 안정화시키는 상이한 부형제의 사용.

[0190] 상이한 성분 및 부형제는 이들의 화학적 특성에 기초하여 단백질의 상이한 영역에 결합, 상호작용 및/또는 안정화시킬 수 있다. 따라서, 하기 표 1에 열거된 서브세트와 같은, 단백질 제형에 대한 이들의 영향을 결정하기 위해 다양한 상이한 타입의 부형제를 스크리닝하는 것이 유용하다.

[0191] 상이한 제형의 영향은 다양한 수단으로 측정될 수 있다. 한 가지 접근법은 제조된 후 약물에 대한 잠재적인 저장 조건("의도된 저장 조건")뿐만 아니라 가속화된 저장 조건(의도된 저장 조건보다 더 높은 온도) 둘 다를 포함하는, 상이한 온도에서 제형화된 단백질을 저장하는 것이다. 저장 안정성 실험을 수행할 때, 샘플을 상이한 시점에 제거하고, 분석용 크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피(SE-HPLC)와 같은 상이한 기술에 의해 분석하였다. SE-HPLC를 사용하여 시간 경과에 따른 순도의 변화를 측정하는 것은 상이한 제형이 응집 또는 분해를 저해하거나 촉진하는지 여부를 평가하는 데 유용할 수 있다. 분석용 양이온 교환 크로마토그래피(CEX-HPLC) 및/또는 모세관 등전위 포커싱(cIEF)은 상이한 제형 조건이 단백질 구조에서 전하-관련 변화를 저해하거나 촉진하는지 여부를 결정하기 위해 단백질의 전하 변이체 프로파일의 변화를 모니터링하는 데 사용될 수 있다.

[0192] 저장 안정성 실험을 사용하여 상이한 제형을 평가하는 것 외에도, 단백질 안정성에 대한 생물물리학적 영향을 특성규명하기 위해 다른 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 시차 주사 형광측정법(DSF) 또는 시차 주사 열량측정법(DSC)을 사용하여 용융점(T_M, 열 용융 전이의 중간점)을 결정하는 것은 상이한 제형이 단백질의 열 안정성을 안정화(T_M 증가) 또는 불안정화(T_M 감소)하는지를 평가하는데 도움이 될 수 있다. 제형의 안정화 효과를 평가하는 데 사용될 수 있는 또 다른 생물물리학적 방법은 B_{22}, 입자 상호작용 파라미터 또는 제2 비리얼 계수(virial coefficient)의 결정이다. 주어진 제형에서 상이한 단백질 농도에서의 광산란 측정을 이용하여, 선의 기울기는 용액이 유리한지(증가, 양의 기울기) 또는 불리한지(감소, 음의 기울기)를 결정하는 데 사용될 수 있다. 266 nm에서의 동적 광 산란(DLS) 모니터링은 또한 응집 온도(T_{agg})를 결정하는 데 사용될 수 있으며, 이는 상이한 제형을 비교하는 데 또한 유용하다.

표 1

단백질 제형에 포함될 수 있는 성분의 예

성분	분류
류신	아미노산-소수성
글루탐산	아미노산-음으로 하전됨
글리신	아미노산 중성
아르기닌	아미노산-양으로 하전됨
히스티딘	아미노산-양으로 하전됨
라이신	아미노산-양으로 하전됨
메티오닌	아미노산-항산화제
아스코르브산	항산화제
글리세롤	벌크화제
EDTA	킬레이트제
염화나트륨	염
염화칼슘	염
염화마그네슘	염
염화칼륨	염
만니톨	당
소르비톨	당
수크로스	당
폴리소르베이트-80	세제

[0193]

[0194] 실시예 2. 상이한 완충제, pH, 및 수크로스 농도의 평가

[0195] FXX01102 이중특이적 단백질을 생물반응기에서 CHO 세포에 의해 발현시키고, 칼럼 크로마토그래피를 사용하여 거의-균질성(near-homogeneity)(SE-HPLC에 의해 95% 초과의 순도)까지 정제하였다. 이를 농축시키고, 완충제-교환하고, 하기 **표 2**에 제시된 일련의 상이한 조성물로 제형화하였다. 모든 완충제를 10mM로 사용하였고, FXX01102 단백질 농도는 각 용액에서 10 mg/mL이었다. 이러한 연구의 목적은 FXX01102 이중특이적 항체의 안정성에 대한 상이한 완충제, pH, 및 수크로스 농도의 효과를 결정하는 것이었다. 온도(T_{agg}) 및 T_m(용융 곡선의 중간점)의 함수로서 응집의 개시를 Uncle 기기(Unchained Labs)를 사용하여 결정하였다. T_{agg}를 증가하는 온도의 함수로서 266 nm에서 광산란 측정을 통해 측정하였다.

[0196] 샘플 세트에 걸친 T_m 값의 비교는 pH, 완충제, 및 수크로스 농도가 제1 도메인(T_{m1})의 언폴딩(unfolding)에 큰 영향을 미치지 않았음을 시사하였는데, 이는 값 모두가 약 61 내지 62℃ 내에 있기 때문이다(데이터는 미도시됨). 그러나, 266 nm에서의 동적 광 산란(DLS) 데이터의 비교는 샘플에서 불용성 미립자의 형성에 차이를 나타내었다(**도 1A 및 도 1B**). 수크로스 농도는 완충제 및 pH의 영향에 비해 약간의 변화를 일으켰으므로, 석시네이트, 히스티딘, 및 시트레이트, 및 8% w/v 글루타메이트 완충제에 대해 2% w/v 수크로스 데이터만이 플롯팅되었다. **도 1A**에 도시된 바와 같이, pH 5.8 및 6.6의 2개의 시트레이트 완충제는 매우 유사한 T_{agg} 곡선을 가졌으며, pH 6.6 트레이스(trace)는 약간 더 높은 온도로 이동하였으며, 이는 FXX01102에 대한 보다 안정한 용액 조건을 반영하는 것이다. 시트레이트에 대한 T_{agg} 데이터는 시험된 것들 중에서 안정성-촉진 완충제가 가장 적었고, 석시네이트가 그 뒤를 이었음을 시사하였다. pH 5.2의 낮은 pH 석시네이트 제형은 pH 6.0 용액보다 더 높은 T_{agg} 값을 제공하였다. 히스티딘 및 글루타메이트 완충제는 모두 광산란의 최소 증가를 나타내었고, 세트에서 바람직한 제형으로 확인되었다. His 및 Glu 완충제의 플롯(**도 1B**)은 글루타메이트가 평가된 것들 중에서 가장 낮은 광산란 신호를 가짐을 보여주었다. 히스티딘 제형은 석시네이트 제형과 동일한 경향을 나타내었고, 더 낮은 pH 5.8 제형이 더 높은 pH 6.2 용액보다 더 잘 수행되었다. 유사한 pH 값이 상이한 완충제와 함께 사용되었기 때문에, T_{agg}의 차이는 pH 단독의 결과가 아니라 완충제의 pH와 전하 특성의 조합일 가능성이 있다. 이러한 결과에 부분적으로 기초하여, 글루타메이트는 후속 실험에서 1차 완충제가 되었다.

표 2

T_m 및 T_{agg}에 대한 영향을 위해 평가된 완충제

완충제 (10 mM)	수크로스 (w/v)	폴리소르베이트-80 (w/v)	pH
석시네이트	2%	0.02	5.2
석시네이트	6%	0.02	5.2
석시네이트	2%	0.02	6.0
석시네이트	6%	0.02	6.0
히스티딘	2%	0.02	5.8
히스티딘	6%	0.02	5.8
히스티딘	2%	0.02	6.2
히스티딘	6%	0.02	6.2
시트레이트	2%	0.02	5.8
시트레이트	6%	0.02	5.8
시트레이트	2%	0.02	6.6
시트레이트	6%	0.02	6.6
글루타메이트	8%	0.02	4.5

[0197]

[0198] 실시예 3. 낮은 pH 제형에 대한 NaCl의 영향 평가

[0199] FXX01102 이중특이적 단백질을 농축시키고, pH 4.5에서 10mM 글루타메이트, 8% 중량/부피 수크로스, 및 0.02% 중량/부피 폴리소르베이트-80의 용액으로 교환하였으며, 이는 100mM 염화나트륨(NaCl)을 포함하거나 포함하지 않고, 8 mg/mL의 최종 단백질 농도를 갖는다. 희석 시리즈를 0, 2, 4, 6, 및 8 mg/mL의 단백질 농도로 생성하였다. 이러한 용액을 Unchained Laboratories에 의해 제작된 "Uncle" 기기에서 분석하였다. 목표는 염화나트륨의 포함이 글루타메이트/수크로스/폴리소르베이트-80 제형의 안정화 특성을 개선시켰는지 여부를 결정하는 것이었다. B_{22}를 이들 2개의 용액에 대해 조사하였고, 제형에 NaCl의 첨가가 기울기의 유의한 감소를 야기하였고, 이는 불안정화 효과와 동일하고 응집을 유발할 수 있는 단백질-단백질 상호작용을 촉진시키는 것이 명백하였다(**도 2**). 따라서, 이러한 연구에서 염화나트륨은 추가로 평가되지 않았다.

[0200] 실시예 4. FXX01102 제형의 B22 값에 대한 아르기닌, 메티오닌, 류신 및 글리신의 영향 평가

[0201] 아미노산인 메티오닌, 아르기닌 및 글리신을 또한 이들이 FXX01102에 발휘할 수 있는 안정화 특성에 대해 조사하였다. FXX01102의 10 mg/mL 용액을 100mM 아르기닌, 50mM 메티오닌 또는 50mM 글리신과 함께 추가 부형제 없이 pH 4.5에서 10mM 글루타메이트, 4% w/v 수크로스에서 제조하였다. B_{22}에 대한 영향을 조사하기 위해 Uncle에서 0, 2, 4, 6, 8, 및 10 mg/mL의 희석 시리즈를 분석하였다. B_{22} 기울기의 비교(**도 3**)는 글리신 및 메티오닌 둘 다가 아르기닌과 비교하여 B_{22} 기울기 값을 증가시키는 것으로 보이며, 이는 추가의 아미노산이 첨가되지 않은 제형과 비교하여 기울기를 감소시킨다는 것을 보여준다. 이는 비-하전되거나 더 많은 소수성 아미노산이 염 또는 다른 하전된 아미노산을 첨가하는 것과 비교하여 FXX01102 안정성에 더 유리한 효과를 가질 수 있음을 시사하였다.

[0202] FXX01102 안정성에 대한 소수성 아미노산의 영향을 추가로 조사하기 위해, 25mM 류신이 있거나 없는 제형의 B_{22} 기울기를 비교하였다. 류신의 존재 또는 부재 하에 pH 4.5의 10mM 글루타메이트, 4% w/v 수크로스 중 FXX01102의 희석 시리즈를 조사하였다. 류신-함유 제형의 기울기는 류신이 없는 단백질 용액의 기울기보다 약간 더 높았는데, 이는 류신이 단백질에 대한 안정화 효과를 발휘하고 자가-상호작용 특성을 감소시킬 수 있음을 시사한다(**도 4**).

[0203] 실시예 5. FXX01102 제형의 응집 온도(T_{agg})에 대한 마그네슘 설페이트, 라이신 및 류신의 영향 평가

[0204] 제형의 서브세트에 대해, 온도(T_{agg})의 함수로서 응집의 개시를 Uncle 기기(Unchained Labs)를 사용하여 결정하였다. T_{agg}를 증가하는 온도의 함수로서 266 nm에서 광산란 측정을 통해 측정하였다. 25mM 류신, $MgSO_4$ 및 라이신과 함께, pH 4.5의 10mM 글루타메이트, 4% w/v 수크로스 중의 FXX01102. 온도 대 266 nm에서의 산란 플롯의 비교는 $MgSO_4$ 및 라이신 둘 다가 추가 부형제가 없는 제형과 비교하여 훨씬 더 낮은 온도에서 산란의 증가를 야기하였음을 보여주었다(**도 5**). 류신을 함유하는 샘플은 평가된 전체 온도 범위에 걸쳐 임의의 산란 증가를 나타내지 않았다. 이는 류신으로 수득된 B_{22}의 개선(이전 실시예에 기재됨)이 FXX01102가 제형화될 때 응집에 대한 증가된 내성으로 해석될 수 있음을 나타내었다.

[0205] 실시예 6. -20℃에서 FXX01102 제형의 안정성 평가

[0206] -20℃에서 저장될 때 FXX01102의 안정성을 평가하기 위해 실험을 수행하였다. 하기 **표 3**에 제시되는 모든 제형은 완충제로서 10mM 글루타메이트 및 0.02% 폴리소르베이트를 함유하였다. 또한, 모든 제형은 3 또는 8% w/v 수크로스, 3% 트레할로스, 또는 3% 소르비톨인 당 성분을 함유하였다. 이전 데이터에 기초하여, Leu, Met 또는 Gly 아미노산의 첨가가 FXX01102의 안정성을 개선시켰는지 여부를 조사하였다. 개선된 안정성을 갖는 제형은 크기 배제 초압 액체 크로마토그래피(SE-UPLC)에 의해 측정한 경우 더 적은 응집체 형성을 나타내야 한다.

[0207] FXX01102를 2개의 크로마토그래피 칼럼을 사용하여 정화된 생물반응기 상청액으로부터 정제하여 95% 초과의 출발 순도를 달성하였다. 이러한 물질을 UF/DF 시스템 및 적어도 10 투석부피의 완충제를 사용하여 글루타메이트로 완충제-교환하고, 10 mg/mL까지 농축시켰다. 상이한 제형을 제조한 후, 0.5mL Sarstedt 바이알에 200㎕L 분취량을 제조하였다. 연구 시작시 pH를 결정하였다. 대부분의 샘플은 약 4.6의 pH를 가졌다. SE-UPLC를 사용하여 초기 고분자량 함량%(HMW%)를 결정하였다. 이어서, 바이알을 -20℃에 놓고, 저장 후 3주, 6주, 3, 6 및 7개월에 (제형의 서브세트에 대해) 측정하였다. 적절한 기간에, 바이알을 냉동고에서 꺼내고, 분석하였다. 더 큰 3.75mL 분취물을 제조하고, 3회 동결/해동(3x F/T) 사이클을 통해 취하였다. 이는 상이한 제형을 비교하기 위한 추가적인 스트레스-시험으로 작용하였다. 이러한 데이터는 하기 **표 3**에 요약되어 있다. 3개월 데이터의 평가 후, 샘플의 서브세트만을 6개월 및 7개월에 분석하여 특정 관심 제형에 초점을 맞추었다.

[0208] 세트의 다른 제형에 대한 소르비톨 및 트레할로스-함유 제형(ID #5, 6)의 비교는 이들이 응집체 형성에 기여함을 나타내었다. 이러한 2개의 제형은 3x F/T 샘플의 HMW%을 기초로 하여, 3개월 및 6개월 시점에 분석된 최악의 성능 조건이었다. 따라서, 수크로스를 바람직한 당 성분으로 확인하였다. 3% 및 8% 수크로스에 대한 응집체 데이터(각각 ID #2 및 #3)는 더 높은 농도의 수크로스가 장기 저장에 대해 유의한 이점을 갖지 않았음을 나타내었으며, 이는 이러한 제형에 대한 3 및 6개월의 HMW%가 꽤 유사하였기 때문이다. 그러나, 더 높은 수크로스 농도(6.3 대 8.8%)와 함께 3x F/T 후에 더 적은 응집체가 존재하는 것으로 관찰되었다.

[0209] 상기 수행된 B_{22} 분석에 기초하여, Met, Gly 및 Leu는 FXX01102의 저장 안정성에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 예측되었다. -20℃ 안정성에 대한 이들의 영향에 대해 3가지 농도의 각 아미노산을 분석하였다. 각각에 대해, 농도 증가는 시간이 지남에 따라 응집체 형성을 감소시켰다. Met(ID#10, 11, 12), Gly(ID# 13, 14, 15), 및 Leu(ID#7, 8, 9)의 경우, 첨가된 아미노산 부형제 농도의 함수로서 시간에 따라 더 낮은 HMW%의 경향이 명백하였다. 제형 ID #9가 3x F/T 분석에서 및 시간 경과에 따라 가장 낮은 응집체 형성을 갖기 때문에, 류신은 가장 큰 안정화 영향을 갖는 것으로 나타났다. 아미노산의 조합을 포함하는 제형이 또한 조사되었고(ID#16, 17, 18), 이러한 접근법에 약간의 이점이 있음을 나타내었다. 그러나, 등가 농도의 Leu를 함유한 제형에 대한 조합물의 HMW%의 비교(즉, #16 대 #8, 또는 #18 대 #8)는 Leu가 이러한 효과의 주요 드라이버(driver)임을 시사하였다. ID #7, 8 및 9에 대한 T_m 및 T_{agg} 값을, 10mM에서 40mM까지의 류신 농도 증가가 이러한 두 파라미터 중 어느 하나에 큰 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위해 결정하였다. 3가지의 완충제 모두에 대해 61℃의 T_m으로 차이는 비교적 작았고, 266 nm에서 결정된 광 산란의 유의한 변화는 없었다.

표 3

-20℃에서 저장 후 HMW%에 대한 영향에 대해 평가된 완충제.
NT = "시험되지 않음"

샘플			검정							
			pH	SE-UPLC, HMW %						
ID	당	부형제	초기 pH	초기	3x F/T	3주	6주	3 개월	6 개월	7 개월
1	8% 수크로스	N/A	4.67	4.9	6.3	5.3	5.7	7.9	11.9	NT
2	3% 수크로스	N/A	4.63	4.9	8.8	5.3	5.7	8	11.7	11.9
3	3% 수크로스	N/A	4.47	3.1	7.3	3.8	3.9	6.5	10.7	NT
4	3% 수크로스	N/A	4.75	6.5	9.7	6.8	7.3	9.1	12	NT
5	3% 트레할로스	N/A	4.64	5	13.7	7.1	9.1	17.3	NT	NT
6	3% 소르비톨	N/A	4.62	5	15.3	10.1	13.8	30.1	NT	NT
7	3% 수크로스	10 mM Leu	4.63	4.8	7.2	4.9	5	5.7	7.5	NT
8	3% 수크로스	25 mM Leu	4.62	4.6	6.2	4.6	4.7	5	5.2	5.1
9	3% 수크로스	40 mM Leu	4.62	4.3	5.2	4	4.2	4.4	4.3	4.3
10	3% 수크로스	10 mM Met	4.61	4.9	8.1	6	6.3	8.3	NT	NT
11	3% 수크로스	25 mM Met	4.62	4.7	6.8	5.2	5.1	6.5	NT	11.3
12	3% 수크로스	40 mM Met	4.61	4.5	6.8	4.6	4.8	5.7	NT	NT
13	3% 수크로스	25 mM Gly	4.62	5.2	8.4	5.5	5.8	7.3	NT	NT
14	3% 수크로스	50 mM Gly	4.62	5.5	8.3	5.6	5.8	7.1	NT	9.2
15	3% 수크로스	75 mM Gly	4.64	5.6	7.8	5.8	5.9	6.6	NT	NT
16	3% 수크로스	25 mM Leu, 25 mM Met	4.62	4.2	5.7	4.1	4.3	4.8	NT	5.3
17	3% 수크로스	25 mM Met, 50 mM Gly	4.68	4.6	5.8	5.1	5	6.1	NT	NT
18	3% 수크로스	25 mM Leu, 50 mM Gly	4.63	4.8	6	4.7	4.8	5.1	NT	5.6

[0210]

[0211] 실시예 7. -20℃에서 FXX01102의 추가 글루타메이트 제형의 평가

[0212] -20℃에서 저장될 때 FXX01102의 안정성을 평가하기 위해 실험을 수행하였다. 하기 **표 4**에 제시된 모든 제형은 완충제로서 5mM 글루타메이트를 함유하였다. 또한, 모든 제형은 0, 2, 3, 또는 8% w/v 수크로스인 당 성분을 함유하였다. 이전 데이터에 기초하여, 본 발명자들은 FXX01102의 안정성에 대한 pH뿐만 아니라 Leu 농도의 변동을 추가로 조사하였다. 이를 실시예 6에 기재된 것과 동일한 방식으로 수행하였다. 개선된 안정성을 갖는 제형은 크기 배제 초압 액체 크로마토그래피(SE-UPLC)에 의해 측정한 경우 더 적은 응집체 형성을 나타내어야 한다. 초기 및 6주 시점 사이의 HMW%의 차이뿐만 아니라 3x F/T 스트레스 시험에 대해 데이터를 분석하였다. 데이터는 더 낮은 pH 값 및 더 높은 농도의 류신이 시간 경과에 따라 뿐만 아니라 다중 냉동 해동 주기 동안 응집체 형성을 저해함을 보여주었다. 제형에 수크로스를 포함시키는 것은 완충제로서 10mM 글루타메이트 및 0.02% 폴리소르베이트에 대해 긍정적인 효과를 가졌다. 또한, 모든 제형은 3 또는 8% w/v 수크로스, 3% 트레할로스 또는 3% 소르비톨인 당 성분을 함유하였다. 이전 데이터에 기초하여, 본 발명자들은 또한 Leu, Met 또는 Gly 아미노산의 첨가를 조사한 반면, 수크로스의 부재는 다른 제형보다 더 높은 HMW%를 초래하였다(제형 #6, **표 4**). 이전 실험

과 유사하게, 더 높은 수준의 수크로스는 6주에 저장 안정성 데이터에 대한 명목상 영향을 주었지만, 3X F/T 동안 응집체 형성을 저해하는 데 더 큰 영향을 미쳤다.

표 4

-20℃에서 저장 후 HMW%에 대한 영향에 대해 평가된 완충제

제형		[단백질] (mg/ml)	SE-UPLC			
			HMW%			
시점		초기	초기	3주	3X FT	6주
1	3% Suc, 0.02% PS80, pH = 4.65	8.65	0.87	1.83	2.84	2.72
2	3% Suc, 0.02% PS80, pH = 4.66	8.62	1.05	1.91	3.07	2.53
3	3% Suc, 0.02% PS80, pH = 4.86	8.67	2.08	2.95	5.13	3.55
4	3% Suc, 25 mM Leu, 0.02% PS80, pH = 4.69	8.56	1.2	1.33	2.05	1.38
5	3% Suc, 37.5 mM Leu, 0.02% PS80, pH = 4.74	8.32	1.19	1.31	1.87	1.38
6	0% Suc, 0.02% PS80, pH = 4.62	8.57	1.05	2.75	8.18	2.83
7	3% Suc, 0.05% PS80, pH = 4.66	8.8	1.07	2.34	3.44	3.09
8	8% Suc, 0.02% PS80, pH = 4.63	8.61	1.05	1.65	2.08	1.98
9	3% Suc, 25 mM Leu, 0.02% PS80, pH = 4.48	9.61	0.71	0.78	0.91	0.82
10	3% Suc, 25 mM Leu, 0.02% PS80, pH = 4.73	9.6	1.21	1.36	1.63	1.34
11	3% Suc, 25 mM Leu, 0.02% PS80, pH = 4.81	9.72	2.33	2.48	3.62	2.68
12	3% Suc, 25 mM Leu, 0.02% PS80, pH = 4.70	9.63	1.03	1.14	1.41	1.15
13	3% Suc, 25 mM Leu, 0.02% PS80, pH = 4.57	9.69	1.61	1.71	2.28	1.72
14	3% Suc, 37.5 mM Leu, 0.02% PS80, pH = 4.57	9.62	1.36	1.37	1.85	1.51
15	3% Suc, 50 mM Leu, 0.02% PS80, pH = 4.58	9.48	1.42	1.44	2.02	1.47
16	3% Suc, 25 mM Leu, 0.05% PS80, pH = 4.61	9.65	1.21	1.28	1.66	1.39
17	2% Suc, 25 mM Leu, 0.02% PS80, pH = 4.55	9.71	1.22	1.29	1.79	1.29
18	5% Suc, 25 mM Leu, 0.02% PS80, pH = 4.55	9.63	1.18	1.28	1.48	1.45
19	3% Suc, 10 mM Leu, 0.02% PS80, pH = 4.58	8.51	1.06	1.1	1.37	1.18
20	3% Suc, 37.5 mM Leu, 0.02% PS80, pH = 4.53	9.74	1.68	1.09	1.05	1.09
21	3% Suc, 37.5 mM Leu, 0.02% PS80, pH = 4.61	9.87	2.11	1.6	1.95	1.61
22	3% Suc, 37.5 mM Leu, 0.02% PS80, pH = 4.85	10.03	2.63	2.53	3.39	2.67
23	3% Suc, 50 mM Leu, 0.02% PS80, pH = 4.57	9.84	1.75	1.19	1.38	1.19
24	3% Suc, 50 mM Leu, 0.02% PS80, pH = 4.48	9.79	2.16	1.7	2.02	1.72

[0213]

[0214] * * *

[0215] 본 발명은 본 명세서에 기재된 특정 양상에 의해 범위를 제한하지 않는다. 실제로, 기재된 것 이외에 본 발명의 다양한 변형은 전술한 설명 및 첨부 도면으로부터 당업자에게 명백해질 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구항의 범위에 속하는 것으로 의도된다.

[0216] 본 명세서에 인용된 모든 참고문헌(예를 들어, 간행물 또는 특허 또는 특허 출원)은 각각의 개별 참고문헌(예를 들어, 간행물 또는 특허 또는 특허 출원)이 모든 목적을 위해 그 전체가 참조에 의해 원용되도록 구체적으로 그리고 개별적으로 표시된 것처럼 모든 목적을 위해 동일한 정도로 그리고 전체적으로 참고로 본 명세서에 포함된다.

[0217] 기타 양상은 하기 청구범위 내이다.

[0218] 서열

서열번호 1
GYTFTSYW

서열번호 2
IYPGSSTT

서열번호 3
ASFSDGYYAYAMDY

서열번호 4
QDISNY

서열번호 5
YTS

서열번호 6
QQGYTLPYT

서열번호 7
GFTLSYYG

서열번호 8
ISHDGSDK

서열번호 9
SNDQFDP

서열번호 10
NIGSKS

서열번호 11
DDS

서열번호 12
QVWDSSSDHVV

서열번호 13
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGNIYPSGGS
TNYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASFSDGYYAYAMDYWGQG
TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL
NWYQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQGYN
LPYTFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLV
VYDDSGRPSGIPERFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKL
TVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGM

[0219]

HWVRQAPGKGLEWVAAISHDGSDKYYADSVKGRFTISRDNSKNRLYLQMNSLRAEDT
AVYYCSNDQFDPWGQGTLVTVSSR

서열번호 14

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGNIYPSGGS
TNYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASFSDGYYAYAMDYWGQG
TLVTVSS

서열번호 15

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNWYQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQGYNLPYTFGQGTKVEIK

서열번호 16

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGNIYPSGGS
TNYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASFSDGYYAYAMDYWGQG
TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL
NWYQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQGYN
LPYTFGQGTKVEIK

서열번호 17

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAAISHDGSD
KYYADSVKGRFTISRDNSKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGTLVTVSS

서열번호 18

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPSGIPER
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL

서열번호 19

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPSGIPER
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEW
VAAISHDGSDKYYADSVKGRFTISRDNSKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWG
QGTLVTVSSR

서열번호 20

GGGGSGGGGSGGGGS

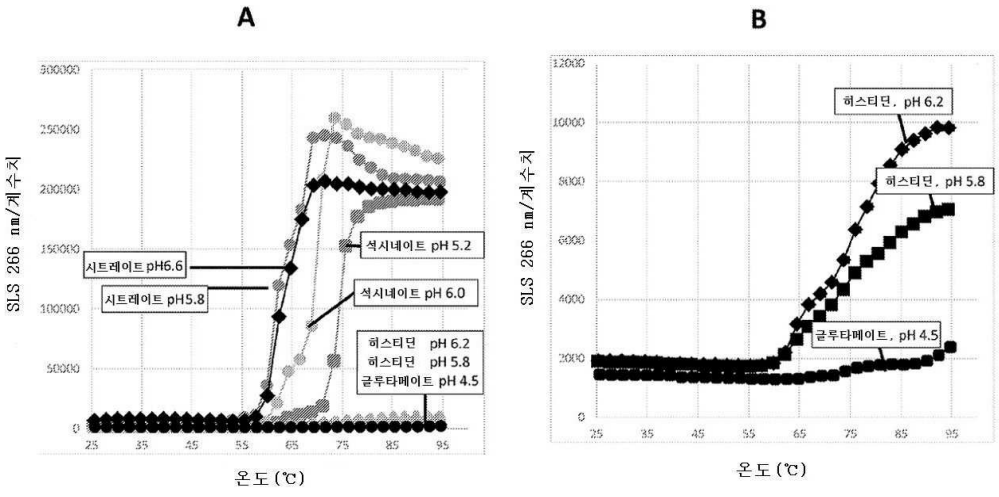
서열번호 21

GGGGS

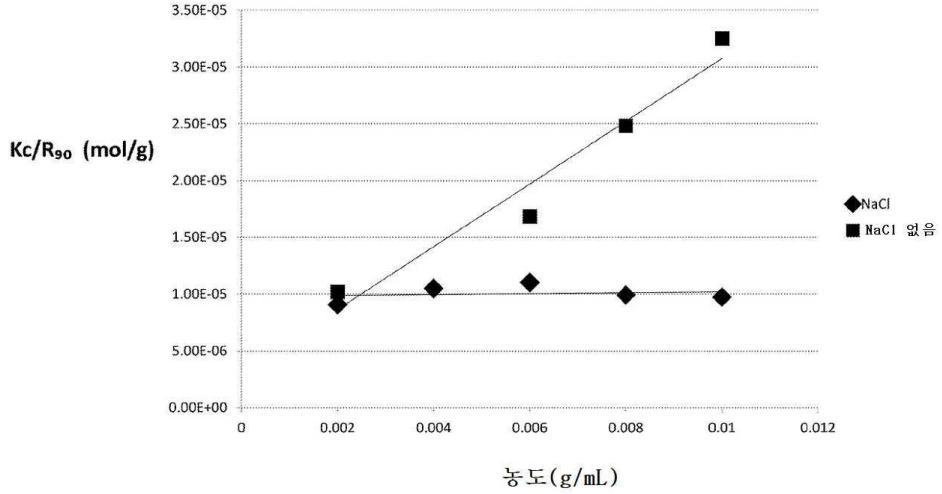
[0220]

도면

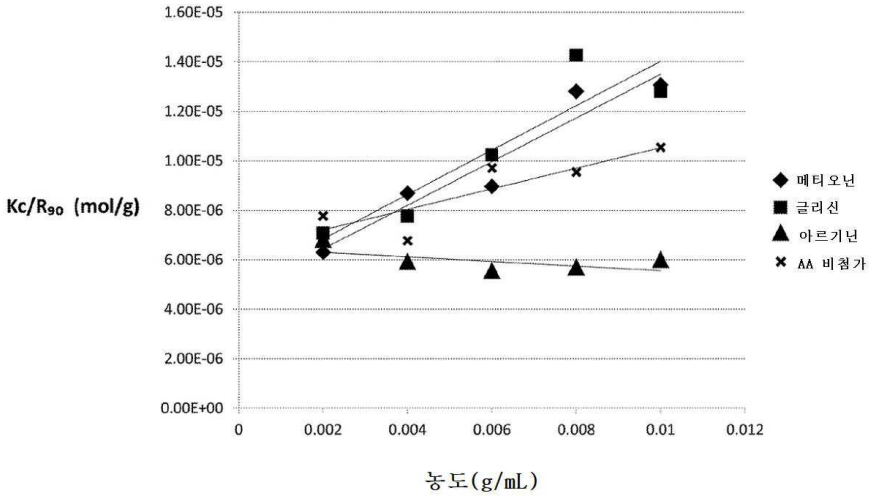
도면1



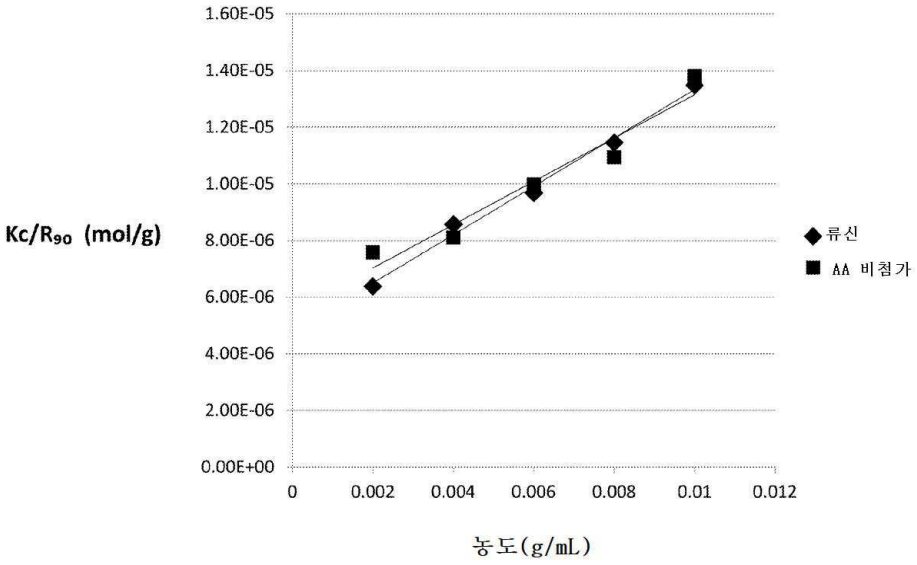
도면2


Kc/R90 (mol/g)
3.50E-05
3.00E-05
2.50E-05
2.00E-05
1.50E-05
1.00E-05
5.00E-06
0.00E+00
0
0.002
0.004
0.006
0.008
0.01
0.012
농도(g/mL)
NaCl
NaCl 없음

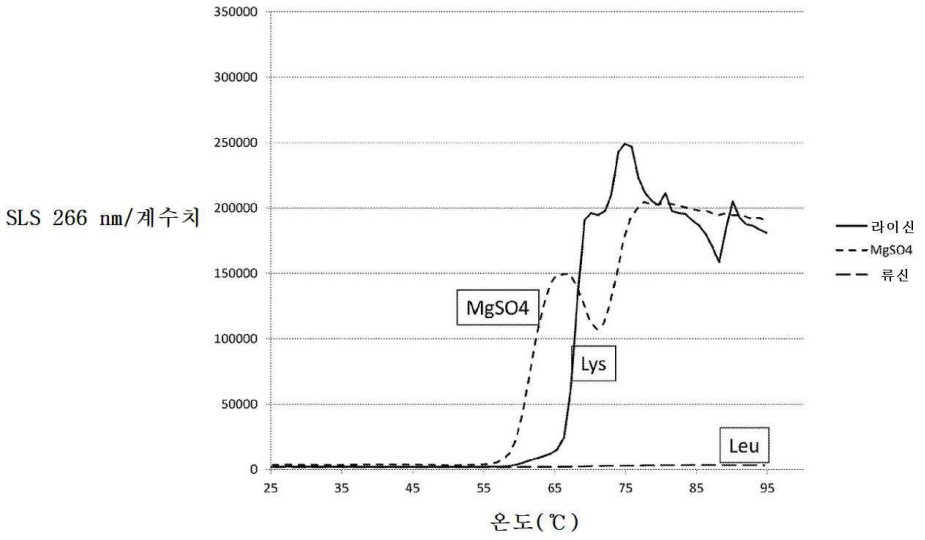
도면3


Kc/R90 (mol/g)
1.60E-05
1.40E-05
1.20E-05
1.00E-05
8.00E-06
6.00E-06
4.00E-06
2.00E-06
0.00E+00
0
0.002
0.004
0.006
0.008
0.01
0.012
농도(g/mL)
메티오닌
글리신
아르기닌
AA 비첨가

도면4



도면5



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Aptevo Research and Development LLC

<120> COMPOSITIONS COMPRISING 4-1BB AND OX40 BINDING PROTEINS AND METHODS OF USE

<130> 4897.006PC01

<140> PCT/ US2022/016776

<141> 2022-02-17

<150> US 63/150,475

<151> 2021-02-17

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> 4-1BB Heavy Chain CDR 1

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 2

<

211> 8

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> 4-1BB Heavy Chain CDR 2

<400> 2

Ile Tyr Pro Gly Ser Ser Thr Thr

1 5

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> 4-1BB Heavy Chain CDR 3

<400> 3

Ala Ser Phe Ser Asp Gly Tyr Tyr Ala Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> 4-1BB Light Chain CDR 1

<400> 4

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

1 5

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> 4-1BB Light Chain CDR 2

<400> 5

Tyr Thr Ser

1

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> 4-1BB Light Chain CDR 3

<400> 6

Gln Gln Gly Tyr Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> OX40 Heavy Chain CDR1

<400> 7

Gly Phe Thr Leu Ser Tyr Tyr Gly

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> OX40 Heavy Chain CDR2

<400> 8

Ile Ser His Asp Gly Ser Asp Lys

1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> OX40 Heavy Chain CDR3

<400> 9

Ser Asn Asp Gln Phe Asp Pro

1 5

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> OX40 Light Chain CDR1

<400> 10

Asn Ile Gly Ser Lys Ser

1 5

<210> 11

<211> 3

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> OX40 Light Chain CDR2

<400> 11

Asp Asp Ser

1

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> OX40 Light Chain CDR3

<400> 12

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val

1 5 10

<210> 13

<211> 727

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> 4-1BB x OX40 bispecific antibody

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ser Phe Ser Asp Gly Tyr Tyr Ala Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val

130 135 140

Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala

145 150 155 160

Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Asn Trp

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Asn Leu Pro Tyr Thr Phe Gly

225 230 235 240

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr

245 250 255

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Pro Ser Val

260 265 270

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

275 280 285

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

290 295 300

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

305 310 315 320

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

325 330 335

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

340 345 350

Cys Ala Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

355 360 365

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

370 375 380

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly
465 470 475 480
Gly Ser Pro Ser Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val
485 490 495
Ala Pro Gly Lys Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly
500 505 510
Ser Lys Ser Val Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val

515 520 525
Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Gly Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg
530 535 540
Phe Ser Gly Ser Thr Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg
545 550 555 560
Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser
565 570 575
Ser Ser Asp His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

580 585 590
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
595 600 605
Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val
610 615 620
Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
625 630 635 640
Leu Ser Tyr Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

645 650 655
Leu Glu Trp Val Ala Ala Ile Ser His Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr
660 665 670
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
675 680 685
Asn Arg Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
690 695 700
Val Tyr Tyr Cys Ser Asn Asp Gln Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr

705 710 715 720

Leu Val Thr Val Ser Ser Arg

725

<210> 14

<211> 121

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> 4-1BB Variable Heavy Chain Amino Acid Sequence

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ser Phe Ser Asp Gly Tyr Tyr Ala Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> 4-1BB Variable Light Chain

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Asn Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 16

<211> 248

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> scFv

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ser Phe Ser Asp Gly Tyr Tyr Ala Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val

130 135 140

Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala

145 150 155 160

Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Asn Trp

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Asn Leu Pro Tyr Thr Phe Gly

225 230 235 240

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

245

<210> 17

<211> 114

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> OX40 Variable Heavy Chain

<400> 17

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu 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 Ala Ile Ser His Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

85 90 95

Ser Asn Asp Gln Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser

<210> 18
<211> 108
<212> PRT
<213> artificial sequence
<220><223> Variable Light Chain
<400> 18
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys
1 5 10 15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val

20 25 30

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

85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105
<210> 19
<211> 243
<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> OX40 scFv

<400> 19

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
20 25 30

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

Asp Asp Ser Gly Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Thr Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
130 135 140

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Tyr Tyr
145 150 155 160

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
165 170 175

Ala Ala Ile Ser His Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
180 185 190

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Arg Leu Tyr
195 200 205

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
210 215 220

Ser Asn Asp Gln Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

225 230 235 240

Ser Ser Arg

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 20

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Linker

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(5)

<223> Wherein the sequence can be repeated between 1 to 5 times

<400> 21

Gly Gly Gly Gly Ser

1