(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년07월29일
(11) 등록번호 10-2427192
(24) 등록일자 2022년07월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7006944(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년01월05일
심사청구일자 2021년01월05일
(85) 번역문제출일자 2020년03월09일
(65) 공개번호 10-2020-0029618
(43) 공개일자 2020년03월18일
(62) 원출원 특허 10-2019-7015730
원출원일자(국제) 2018년01월05일
심사청구일자 2019년05월31일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2018/000043
(87) 국제공개번호 WO 2018/127787
국제공개일자 2018년07월12일
(30) 우선권주장
62/443,281 2017년01월06일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR102089072 B1
US7932045 B2

(73) 특허권자
주식회사 유틸렉스
서울특별시 금천구 가산디지털1로 58, 408호(가산동, 에이스 한솔타워 지식산업센터)
(72) 발명자
권, 병 에스.
서울특별시 금천구 가산디지털1로 25 대륭테크노타운17차 스위트 1401호 주식회사 유틸렉스 내
이, 승-주
서울특별시 금천구 가산디지털1로 25 대륭테크노타운17차 스위트 1401호 주식회사 유틸렉스 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 37 항 심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 **항-인간 4-1BB 항체 및 그의 용도**

(57) 요 약

참조 항-인간 4-1BB 항체에서 발견되지 않는 하나 이상의 구조적 특색을 갖는 항-인간 4-1BB 항체 및 그의 단편이 제공되며, 여기서 상기 특색은 참조 항체에 비해 항체의 특정 특징을 개선시킬 수 있다. 본원에 기재된 항-인간 4-1BB 항체와 관련된 다양한 시험관내 및 생체내 방법 및 시약이 또한 제공된다. 방법은, 예를 들어, 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편을 사용하여 T-세포 증식을 유도하는 것, IFNγ의 T 세포 분비를 유도하는 것, 뿐만 아니라 암을 검출, 예방 및/또는 치유적 치료하는 것을 포함한다.

(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 37/04 (2018.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/51 (2013.01)
C07K 2317/515 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
(72) 발명자
김, 영 호
서울특별시 금천구 가산디지털1로 25 대륭테크노타운17차 스위트 1401호 주식회사 유틸렉스 내
오, 호-식
서울특별시 금천구 가산디지털1로 25 대륭테크노타운17차 스위트 1401호 주식회사 유틸렉스 내
이, 중 원
서울특별시 금천구 가산디지털1로 25 대륭테크노타운17차 스위트 1401호 주식회사 유틸렉스 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 서열식별번호: 5의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 6의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열식별번호: 7 또는 8의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3; 및

(b) 서열식별번호: 1의 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열식별번호: 2의 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열식별번호: 4의 서열을 포함하는 경쇄 CDR3

을 포함하는 항-4-1BB 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산 분자.

청구항 2

제1항의 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 3

제1항의 핵산 분자를 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 4

제3항에 있어서, 숙주 세포가 박테리아, 효모, 곤충 또는 포유동물 세포로부터 선택되는 것인 단리된 숙주 세포.

청구항 5

제4항에 있어서, 숙주 세포가 이.콜라이(*E.coli*), 피.파스토리스(*P.pastoris*), Sf9, COS, HEK293, CHO 및 포유동물 림프구로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단리된 숙주 세포.

청구항 6

(a) 서열식별번호: 5의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 6의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열식별번호: 7 또는 8의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3; 및

(b) 서열식별번호: 1의 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열식별번호: 2의 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열식별번호: 4의 서열을 포함하는 경쇄 CDR3

을 포함하는 항-4-1BB 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 7

(a) 서열식별번호: 5의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 6의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열식별번호: 7 또는 8의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3; 및

(b) 서열식별번호: 1의 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열식별번호: 2의 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열식별번호: 4의 서열을 포함하는 경쇄 CDR3

을 포함하는 항-4-1BB 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 8

제2항의 재조합 벡터를 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 9

제3항의 숙주 세포를 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 10

(a) 서열식별번호: 5의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 6의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열식별번호: 7 또는 8의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3; 및

(b) 서열식별번호: 1의 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열식별번호: 2의 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열식별번호: 4의 서열을 포함하는 경쇄 CDR3

을 포함하는 항-4-1BB 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하기 위한 제약 조성물이며,

상기 암이 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 난관암, 담낭암, 위장암, 두경부암, 혈액암, 후두암, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 중피종, 난소암, 원발성 복막암, 타액선암, 육종, 위암, 갑상선암, 췌장암 및 전립선암으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 11

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 이온화 방사선, 화학요법제, 항체 작용제 및 세포-기반 요법으로부터 선택된 1종 이상의 추가의 항암 요법을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 것인 제약 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 1종 이상의 추가의 항암 요법이 면역 체크포인트 억제제, IL-12, GM-CSF, 항-CD4 작용제, 시스플라틴, 플루오로우라실, 독소루비신, 이리노테칸, 파클리탁셀 또는 시클로포스파미드를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 13

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 면역 체크포인트 억제제를 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 것이어서, 대상체가 둘 다를 사용한 치료를 받는 것인 제약 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 면역 체크포인트 억제제가 PD-1 신호전달을 억제하는 작용제인 제약 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, PD-1 신호전달을 억제하는 작용제가 PD-1 항체인 제약 조성물.

청구항 16

(a) 대상체로부터의 생물학적 샘플 내 분비된 IFN-감마의 측정치를 제공하거나 또는 얻는 단계이며, 여기서 대상체는 제1항의 핵산 분자에 의하여 코딩되는 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편의 소정의 양을 포함하거나 또는 그를 전달하는 제약 조성물을 투여받은 적이 있는 것인 단계; 및

(b) 분비된 IFN-감마의 측정치를 참조 값과 비교하는 단계

를 포함하는, 치유적 치료를 필요로 하는 대상체의 치유적 치료를 위한 항-4-1BB 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 용량을 결정하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 생물학적 샘플이 전혈, 혈장 또는 혈청의 샘플인 방법.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 대상체가 암을 갖는 것인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 암이 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 난관암, 담낭암, 위장암, 두경부암, 혈액암, 후두암, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 중피종, 난소암, 원발성 복막암, 타액선암, 육종, 위암,

갑상선암, 췌장암 및 전립선암으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 20

세포를 제6항에 기재된 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편과 접촉시키는 것을 포함하는, 시험관내에서 세포에 의한 IFN-감마의 분비를 증가시키는 방법.

청구항 21

T 세포의 집단을 제6항에 기재된 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편과 접촉시킴으로써, 활성화된 T 세포의 증식을 증가시키는 것을 포함하는, 활성화된 T 세포의 생체외 증식 또는 단리 방법.

청구항 22

(a) 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 관심 에피토프의 펩티드 및 IL-2와 함께 배지에서 배양하는 단계;

(b) 관심 에피토프의 펩티드를 첨가함으로써, 배양된 세포에서의 4-1BB 발현을 유도하는 단계;

(c) 배양된 세포를 제6항 또는 제10항에 기재된 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편; 제7항에 기재된 핵산 분자에 의하여 코딩되는 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편; 제8항에 기재된 재조합 벡터로부터 수득되는 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편; 또는 제9항에 기재된 숙주 세포로부터 수득되는 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편으로 코팅된 표면과 접촉시키며, 여기서 4-1BB를 발현하는 배양된 세포가 코팅된 표면에 달라붙는 것인 단계; 및

(d) 비부착된 세포를 제거함으로써, 항원-특이적 활성화된 T 세포를 단리하는 단계

를 포함하는, 항원-특이적 활성화된 T 세포를 단리하는 방법.

청구항 23

제21항에 있어서, 활성화된 T 세포가 $CD8^+$ T 세포인 방법.

청구항 24

(a) 서열식별번호: 5의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 6의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열식별번호: 7 또는 8의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3; 및

(b) 서열식별번호: 1의 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열식별번호: 2의 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열식별번호: 4의 서열을 포함하는 경쇄 CDR3

을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 25

제24항에 있어서,

(a) 서열식별번호: 16 또는 17의 서열을 포함하는 중쇄 프레임워크 1 (FR1) 영역; 및

(b) 서열식별번호: 18-20 중 어느 하나의 서열을 포함하는 중쇄 프레임워크 3 (FR3) 영역

중 하나 이상을 추가로 포함하는 폴리펩티드.

청구항 26

제24항에 있어서,

(a) 서열식별번호: 11-14로부터 선택된 서열과 적어도 98% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인;

(b) 서열식별번호: 10의 서열과 적어도 98% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인; 또는

(c) 서열식별번호: 11-14로부터 선택된 서열과 적어도 98% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 10의 서열과 적어도 98% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인

중 어느 하나를 포함하는 폴리펩티드.

청구항 27

제24항에 있어서,

(a) 서열식별번호: 11-14로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인;

(b) 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인; 또는

(c) 서열식별번호: 11-14로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인

을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 28

제24항에 있어서, 폴리펩티드가 $1x10^{-7}$ 내지 $1x10^{-12}$ M의 인간 4-1BB 분자에 대한 결합 친화도 (K_D)를 갖는 것인 폴리펩티드.

청구항 29

제24항에 있어서, 폴리펩티드가 개 4-1BB 폴리펩티드에 결합하지 못하거나 또는 약하게 결합하는 것인 폴리펩티드.

청구항 30

제24항에 있어서, 폴리펩티드가 이뮤노글로불린 불변 도메인을 포함하며, 여기서 불변 도메인은 IgG1 또는 그의 변이체, IgG2 또는 그의 변이체, IgG4 또는 그의 변이체, IgA 또는 그의 변이체, IgE 또는 그의 변이체, IgM 또는 그의 변이체, 및 IgD 또는 그의 변이체로부터 선택되는 것인 폴리펩티드.

청구항 31

(a) 제24항의 폴리펩티드; 및

(b) 제약상 허용되는 담체

를 포함하는 암을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 32

제24항에 있어서, 폴리펩티드가 단일 쇄 폴리펩티드인 폴리펩티드.

청구항 33

제24항에 있어서, 폴리펩티드가 2개의 단일 쇄 폴리펩티드를 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 34

제24항의 폴리펩티드를 포함하는, 암의 치료를 위한 약제.

청구항 35

세포를 제24항의 폴리펩티드와 접촉시키는 것을 포함하는, 시험관내에서 세포에 의한 IFN-감마의 분비를 증가시키는 방법.

청구항 36

T 세포의 집단을 제24항의 폴리펩티드와 접촉시킴으로써, 활성화된 T 세포의 증식을 증가시키는 것을 포함하는, 활성화된 T 세포의 생체외 증식 또는 단리 방법.

청구항 37

(a) 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 관심 에피토프의 펩티드 및 IL-2와 함께 배지에서 배양하는 단계;

(b) 관심 에피토프의 펩티드를 첨가함으로써, 배양된 세포에서의 4-1BB 발현을 유도하는 단계;

(c) 배양된 세포를 제24항의 폴리펩티드로 코팅된 표면과 접촉시키며, 여기서 4-1BB를 발현하는 배양된 세포가 코팅된 표면에 달라붙는 것인 단계; 및

(d) 비부착된 세포를 제거함으로써, 항원-특이적 활성화된 T 세포를 단리하는 단계

를 포함하는, 항원-특이적 활성화된 T 세포를 단리하는 방법.

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호-참조

[0002] 본 출원은 2017년 1월 6일에 출원된 미국 특허 출원 번호 62/443,281에 대한 우선권 및 이익을 주장하며, 이 출원의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 암은 세계에서 주요 사망 원인 중 하나로 남아있다. 최근 통계는 세계 인구의 13%가 암으로 사망하는 것으로 보고한다. 국제 암 연구 기관 (IARC)으로부터의 추정에 따르면, 2012년에 전 세계적으로 1,410만건의 새로운 암 사례 및 820만건의 암 사망이 발생하였다. 2030년 경에는, 인구 증가 및 노령화 및 흡연, 건강하지 못한 식습관 및 신체 활동 부족과 같은 위험 인자에 대한 노출로 인해 세계 부담이 2,170만건의 새로운 암 사례 및 1,300만건의 암 사망으로 증가할 것으로 예상된다. 추가로, 통증 및 암 치료를 위한 의료비가 암 환자와 그 가족 모두의 삶의 질 저하를 유발한다. 무엇보다도, 암은 개선된 치료 방법을 시급히 찾을 필요가 있는 질환이라는 것이 명백하다.

발명의 내용

[0004] 본 개시내용은, 특히, 인간 4-1BB 폴리펩티드에 결합하는 항체 및 그의 단편을 제공한다. 일부 측면에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 및 그의 단편은, 이들이 참조 항-인간 4-1BB 항체에서 발견되지 않는 하나 이상의 특정한 구조적 특색을 함유한다는 점에서 참조 항-인간 4-1BB 항체의 변이체이다. 본 개시내용은 제공된 변이체 항-인간 4-1BB 항체가 본원에 기재된 하나 이상의 구조적 특색이 결여된 참조 항-인간 4-1BB 항체에 비해 개선된 특성을 갖는다는 인식을 포괄한다. 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 및 그의 단편은 하나 이상의 개선된 특성, 예컨대, 예를 들어, 개선된 결합 친화도, T 세포 증식 (예를 들어, $CD8^+$ T 세포의 증식)의 개선된 유도, T 세포 (예를 들어, $CD8^+$ T 세포의 증식)에 의한 IFNγ 생산을 유도하는 증가된 능력, 생체내 암 증식을 감소시키고/거나 제거하는 개선된 능력 (예를 들어, 보다 낮은 용량에서)을 갖는다.

[0005] 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 5 내지 8의 서열이거나 또는 그를 포함하는 1, 2 또는 3개의 중쇄 CDR 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 하기 중 하나 이상을 포함한다: 서열식별번호: 5의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 6의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열식별번호: 7 또는 8의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR3. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 하기를 각각 포함한다: 서열식별번호: 5의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 6의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열식별번호: 7 또는 8의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR3.

[0006] 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 1-4의 서열이거나 또는 그를 포

함하는 1, 2 또는 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 하기 중 하나 이상을 포함한다: 서열식별번호: 1의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR1, 서열식별번호: 2의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열식별번호: 3 또는 4의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR3. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 하기를 각각 포함한다: 서열식별번호: 1의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR1, 서열식별번호: 2의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열식별번호: 3 또는 4의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR3.

[0007] 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 5의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 6의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열식별번호: 7 또는 8의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열식별번호: 1의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR1, 서열식별번호: 2의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열식별번호: 4의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0008] 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 16 또는 17의 서열을 포함하는 중쇄 프레임워크 1 (FR1) 영역을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 18-20 중 어느 하나의 서열을 포함하는 중쇄 프레임워크 3 (FR3) 영역을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 16 또는 17의 서열을 포함하는 중쇄 프레임워크 1 (FR1) 영역 및 서열식별번호: 18-20 중 어느 하나의 서열을 포함하는 중쇄 프레임워크 3 (FR3) 영역을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0009] 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 11-14로부터 선택된 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편에 대한 실질적 상동성을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 11-14로부터 선택된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4% 또는 99.5% 동일한 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 11-14로부터 선택된 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0010] 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 9 또는 10의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편에 대한 실질적 상동성을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 9 또는 10의 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4% 또는 99.5% 동일한 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 9 또는 10의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0011] 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 11-14로부터 선택된 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 10의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편에 대한 실질적 상동성을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 11-14로부터 선택된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4% 또는 99.5% 동일한 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 10의 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4% 또는 99.5% 동일한 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 11-14로부터 선택된 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 10의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0012] 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편은 효능작용 항체이다. 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편은 인간화 항-인간 4-1BB 항체 94G1 (즉, 각각 서열식별번호: 9 및 11의 경쇄 및 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체)보다 우월한 효능작용 활성을 갖는 것을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편은 인간화 항-인간 4-1BB 항체 94G1 (즉, 각각 서열식별번호: 9 및 11의 경쇄 및 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체)보다 개선된 결합 친화도를 갖는 것을 특징으로 한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편은 인간화 항체이거나 또는 그를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편은 인간 이뮤노글로불린 불변 도메인을 포함하며, 여기서 불변 도메인은 IgG1 또는 그의 변이체, IgG2 또는 그의 변이체, IgG4 또는 그의 변이체, IgA 또는 그의

변이체, IgE 또는 그의 변이체, IgM 또는 그의 변이체, 및 IgD 또는 그의 변이체로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편은 인간 IgG1이거나 또는 그를 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG1은 서열식별번호: 22 또는 23과 적어도 95% 동일한 서열이거나 또는 그를 포함한다.

[0014] 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편은 모노클로날 항체이다.

[0015] 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편은 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')2 단편, Fv 단편, 디술피드-결합된 Fv 단편, scFv 단편, 단일 도메인 항체, 휴마바디, 나노바디 또는 디아바디이다.

[0016] 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편은 $1x10^{-7}$ 내지 $1x10^{-12}$ M의 인간 4-1BB 분자에 대한 결합 친화도 (K_D)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편은 $1x10^{-8}$ 내지 $1x10^{-12}$ M의 인간 4-1BB 분자에 대한 결합 친화도 (K_D)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편은 $1x10^{-9}$ 내지 $1x10^{-12}$ M의 인간 4-1BB 분자에 대한 결합 친화도 (K_D)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편은 $1x10^{-10}$ 내지 $1x10^{-12}$ M의 인간 4-1BB 분자에 대한 결합 친화도 (K_D)를 갖는다.

[0017] 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편은 인간 4-1BB 폴리펩티드의 세포외 도메인 내의 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편은 인간 4-1BB의 세포외 도메인 내의 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편의 결합은 서열식별번호: 44의 위치 N30, D38, N39 및 R41에서의 1종 이상의 돌연변이에 의해 제거된다.

[0018] 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편은 비-영장류 4-1BB 폴리펩티드에 결합하지 못하거나 또는 약하게 결합한다. 일부 실시양태에서, 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편은 개 4-1BB 폴리펩티드에 결합하지 못하거나 또는 약하게 결합한다.

[0019] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 벡터 및/또는 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 박테리아, 효모, 곤충 또는 포유동물 세포로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 이.콜라이(*E.coli*), 피.파스토리스(*P.pastoris*), Sf9, COS, HEK293, CHO 및 포유동물 림프구로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0020] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산 및/또는 벡터 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0021] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법으로서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하거나 또는 그를 전달하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법으로서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산 및/또는 벡터를 포함하거나 또는 그를 전달하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖거나 또는 그의 발생 위험이 있다.

[0022] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 면역 반응의 유도를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하거나 또는 그를 전달하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 면역 반응의 유도를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산 및/또는 벡터를 포함하거나 또는 그를 전달하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖거나 또는 그의 발생 위험이 있다.

[0023] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 면역 반응의 증강을 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 증강시키는 방법으로서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하거나 또는 그를 전달하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 면역 반응의 증강을 필요로 하는 대상

체에서 면역 반응을 증강시키는 방법으로서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산 및/또는 벡터를 포함하거나 또는 그를 전달하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖거나 또는 그의 발생 위험이 있다.

[0024] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법에 의해 치료될 대상체에서의 암은 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 난관암, 담낭암, 위장암, 두경부암, 혈액암, 후두암, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 중피종, 난소암, 원발성 복막암, 타액선암, 육종, 위암, 갑상선암, 췌장암 및 전립선암으로부터 선택된다.

[0025] 일부 실시양태에서, 조성물은 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 0.01 mg/kg 내지 100 mg/kg의 용량으로 포함하거나 또는 그를 전달한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 약 0.01 mg/kg, 0.025 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.075 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 8 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 50 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg 또는 100 mg/kg의 용량으로 포함하거나 또는 그를 전달한다.

[0026] 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 및/또는 그의 단편 및/또는 그를 포함하는 조성물은 대상체에서 증가된 T 세포 증식 (예를 들어, $CD8^+$ T 세포 증식) 및/또는 T 세포 (예를 들어, $CD8^+$ T 세포)에 의한 증가된 IFNɣ 분비를 유도하는 것을 특징으로 한다.

[0027] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 1종 이상의 추가의 항암 요법을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하거나 또는 그를 전달하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 이온화 방사선, 화학요법제, 항체 작용제 및 세포-기반 요법 중 1종 이상을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하거나 또는 그를 전달하는 조성물을 투여하여, 대상체가 둘 다를 사용한 치료를 받도록 하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0028] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 면역 체크포인트 억제제, IL-12, GM-CSF, 항-CD4 작용제, 플루오로우라실, 독소루비신, 이리노테칸, 파클리탁셀, 시스플라틴 또는 시클로포스파미드 중 1종 이상을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하거나 또는 그를 전달하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0029] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 면역 체크포인트 억제제를 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하거나 또는 그를 전달하는 조성물을 투여하여, 대상체가 둘 다를 사용한 치료를 받도록 하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 억제제는 PD-1 신호전달을 억제하는 작용제이다. 일부 실시양태에서, PD-1 신호전달을 억제하는 작용제는 항-PD-1 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 니볼루맙, 펨브롤리주맙, 아테졸리주맙, 두르발루맙 또는 아벨루맙이다.

[0030] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 치유적 치료를 필요로 하는 대상체의 치유적 치료를 위한 항-4-1BB 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 용량을 결정하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (i) 대상체로부터의 생물학적 샘플 내 분비된 IFN-감마의 측정치를 제공하거나 또는 얻으며, 여기서 대상체는 본원에 기재된 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편의 소정의 양을 포함하거나 또는 그를 전달하는 조성물을 투여받은 적이 있는 것인 단계; 및 (ii) 분비된 IFN-감마의 측정치를 참조 값과 비교하며, 여기서 분비된 IFN-감마의 측정치가 참조 값보다 더 높거나 또는 더 낮으면, 투여될 항-4-1BB 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 양을 조정함으로써, 대상체의 치유적 치료를 위한 용량을 결정하는 단계. 일부 실시양태에서, 참조 값은 1명 이상의 건강한 대상체로부터 유래된 값, 1명 이상의 암 진단된 대상체로부터 유래된 값 또는 암 위험 예측 알고리즘으로부터 유래된 값을 포함하는 인덱스 값을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 전혈, 혈장 또는 혈청의 샘플이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖거나 또는 그의 발생 위험이 있다. 일부 실시양태에서, 암은 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 난관암, 담낭암, 위장암, 두경부암, 혈액암, 후두암, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 중피종, 난소암, 원발성 복막암, 타액선암, 육종, 위암, 갑상선암, 췌장암 및 전립선암으로부터 선택된다.

[0031] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 세포를 본원에 기재된 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편과 접촉시키는 것을 포함하는, 생체내 또는 시험관내에서 세포에 의한 IFN-ɣ의 분비를 증가시키는 방법을 제공한다.

[0032] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 T 세포의 집단을 본원에 기재된 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편과 접촉시킴으로써, 활성화된 T 세포의 증식을 증가시키는 것을 포함하는, 활성화된 T 세포의 생체외 증식 또는 단리 방법을 제공한다.

[0033] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하나 이상의 하기 단계를 포함하는, 항원-특이적 활성화된 T 세포를 단리하는 방법을 제공한다: (a) 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 관심 에피토프의 펩티드 및 IL-2와 함께 배지에서 배양하는 단계; (b) 관심 에피토프의 펩티드를 첨가함으로써, 배양된 세포에서의 4-1BB 발현을 유도하는 단계; (c) 배양된 세포를 본원에 기재된 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편으로 코팅된 표면과 접촉시키며, 여기서 4-1BB를 발현하는 배양된 세포는 코팅된 표면에 달라붙는 것인 단계; 및 (d) 비부착된 세포를 제거함으로써, 항원-특이적 활성화된 T 세포를 단리하는 단계. 일부 실시양태에서, 활성화된 T 세포는 $CD8^+$ T 세포이다.

[0034] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생산되는 활성화된 T 세포의 치료 유효량을 포함하는 조성물을 암의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 암을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 암은 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 난관암, 담낭암, 위장암, 두경부암, 혈액암, 후두암, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 중피종, 난소암, 원발성 복막암, 타액선암, 육종, 위암, 갑상선암, 췌장암 및 전립선암으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 10^9개, 적어도 10^{10}개 세포, 또는 10^{10}개 초과의 활성화된 T 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화된 T 세포는 $CD8^+$ T 세포이다.

[0035] 특히, 본원에 기재된 바와 같은 항-인간 4-1BB 항체 및/또는 그의 단편 및/또는 그를 포함하는 조성물을 특징화하는 기술이 또한 제공된다. 일부 실시양태에서, AML 세포 (예를 들어, HL60)에 결합하는 항-인간 4-1BB 항체 및/또는 그의 단편 및/또는 그를 포함하는 조성물을 특징화하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, ELISA, 면역조직화학, 비아코어 결합 검정, 질량 분광측정법, 등전 포커싱 (IEF) 크로마토그래피 및/또는 웨스턴 블롯에 의해 항-인간 4-1BB 항체 및/또는 그의 단편 및/또는 그를 포함하는 조성물을 특징화하는 방법이 제공된다.

[0036] 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 항-인간 4-1BB 항체 및/또는 그의 단편 및/또는 상기 항체 또는 그의 단편을 함유하는 조성물을 만들거나 또는 제조하는데 관련된 다양한 기술을 제공한다.

[0037] 본 출원에 사용된 용어 "약" 및 "대략"은 동의어로 사용된다. 본원에서 공개, 특허 또는 특허 출원에 대한 임의의 인용은 그 전문이 참조로 포함되는 것이다. 약/대략의 존재 또는 부재 하에 본 출원에 사용된 임의의 수치는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 인지되는 임의의 정상적인 변동을 포함하는 것으로 의도된다.

[0038] 본 발명의 다른 특색, 목적 및 이점은 하기 상세한 설명에서 명백하다. 그러나, 본 발명의 실시양태를 나타내는 상세한 설명은 제한이 아니라 단지 예시로서 주어지는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명의 범주 내에 있는 다양한 변화 및 변형은 상세한 설명으로부터 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0039] 하기 도면으로 구성된, 본원에 포함된 도면은 제한하려는 것이 아니라, 단지 예시 목적을 위한 것이다. 본 개시내용의 상기 및 다른 목적, 측면, 특색 및 이점은 첨부 도면과 함께 하기 설명을 참조함으로써 보다 명백해질 것이며 보다 잘 이해될 것이고, 여기서:

도 1a는 인간 4-1BB 세포외 도메인 (ECD) 구축물을 도시한다. 상단에 전장 4-1BB ECD (167개 아미노산)의 개략도가 있고, 그 아래에는 4-1BB ECD의 다양한 단편: R1 (1-55 aa), R2 (56-110 aa), R3 (110-167 aa), R1.1 (1-45 aa), R1.2 (1-35 aa), R1.3 (11-55 aa), R1.4 (21-55 aa), R1.5 (1-25 aa) 및 R1.6 (1-30 aa)이 제시되어 있다. 각각의 이들 4-1BB ECD 구축물은 GST와 융합되었다. 도 1b는 도 1a에 기재된 바와 같은 4-1BB ECD 융합 구축물에 대한 예시적인 인간화 항-4-1BB 항체의 결합을 제시하는 웨스턴 블롯을 도시한다. 제시된 바와 같이, 예시적인 인간화 항-4-1BB 항체는 전장 4-1BB ECD 융합 폴리펩티드 및 R1 융합 폴리펩티드에는 결합하지만, R2 또는 R3 융합 폴리펩티드에는 결합하지 않는다. 분자 크기 표시는 좌측에 kDa로 나타나 있다.

도 2a는 4-1BB ECD 융합 구축물을 발현하는 세포로부터의 전체 세포 추출물의 SDS-PAGE 겔을 도시한다. 상기 기재된 바와 같은 융합 구축물을 도 2a에서 1 mM IPTG로 유도하여 이. 콜라이 BL21 세포에서 발현시키고, 전체 세포 추출물을 12% SDS-PAGE에 의해 분해하였다. 제시된 바와 같이, 모든 융합 구축물 (ECD, R1, R1.1, R1.2, R1.3, R1.4, R1.5, 및 R1.6)은 강건한 단백질 발현을 갖는다. 도 2b는 전장 4-1BB ECD 융합 폴리펩티드, 및 R1.1, R1.2, R1.3 및 R1.6 융합 폴리펩티드에는 결합하지만, R1.4 또는 R1.5 융합 폴리펩티드에는 결합하지 않

는 예시적인 인간화 항-4-1BB 항체를 제시하는 웨스턴 블롯을 도시한다. 이뮤노블롯을 예시적인 항-인간 4-1BB 항체를 사용하여 수행하였다. 분자 크기 표시는 좌측에 kDa로 나타나 있다.

도 3은 ELISA에 의해 측정된 바와 같은, 재조합 인간 4-1BB 항원에 대한 항-4-1BB 모노클로날 항체의 결합 친화도를 도시한다. OD_{450nm} 값을 y-축에 나타내고, 항-4-1BB 항체의 증가하는 농도 (μg/ml)를 x-축을 따라 나타낸다. BBK-4 (동그라미)는 뮤린 항-인간 4-1BB 항체이고, 94G1 (정사각형), 94K (위쪽으로 향해 있는 삼각형), 94KV (다이아몬드), 94KVT (별 모양) 및 EU101 (아래쪽으로 향해 있는 삼각형)은 예시적인 인간화 변이체 항-4-1BB 항체이다.

도 4는 4-1BB 발현 Jurkat T 세포 (Jurkat 8-1)에 대한 항-4-1BB 모노클로날 항체의 결합을 도시한다. 평균 형광 강도 (MFI) 값을 y-축에 나타내고, 항체의 Log10 농도 (μg/ml)를 x-축을 따라 나타낸다. BBK-4 (동그라미)는 뮤린 항-인간 4-1BB 항체이고, 94G1 (정사각형), 94K (위쪽으로 향해 있는 삼각형), 94KV (다이아몬드), 94KVT (별 모양) 및 EU101 (아래쪽으로 향해 있는 삼각형)은 예시적인 인간화 변이체 항-4-1BB 항체이다.

도 5는 4-1BB에 대한 변이체 항-4-1BB 항체의 시험관내 결합 친화도를 열거하는 표를 제공한다. 결합 친화도는 표면 플라즈몬 공명 (SPR, 비아코어 3000)을 사용하여 측정하였다. 94G1 및 EU101은 예시적인 인간화 변이체 항-4-1BB 항체이다.

도 6은 4-1BB 발현 $CD8^+$ T 세포에 대한 항-4-1BB 모노클로날 항체의 결합을 도시한다. $CD8^+$ T 세포를 인간 PBMC로부터 단리하고, 항-CD3 항체에 의해 2일 동안 활성화시켰다. 4-1BB-PE는 예시적인 상업적으로 입수가능한 항-4-1BB 항체이고, BBK-4는 뮤린 항-인간 4-1BB 항체이며, 94G1, 94K, 94KV, 94KVT 및 EU101은 예시적인 인간화 변이체 항-4-1BB 항체이다. 하단 패널의 그래프는 상단 패널의 FACS 데이터에서 각 항체에 대해 제시된 값을 반영한다.

도 7은 항-4-1BB 항체로 처리된 $CD8^+$ T 세포의 시험관내 증식을 정량화한 그래프를 도시한다. 증식하는 $CD8^+$ T 세포를 항체로 처리하지 않거나, 인간 IgG 단독, BBK-4 또는 예시적인 인간화 변이체 항-4-1BB 항체: 94G1, 94K, 94KV, 94KVT 및 EU101로 처리하고, 증식하는 (즉, 대사적 활성) 세포를 염색하기 위해 WST-1 (수용성 테트라졸륨 염)로 처리하였다.

도 8은 항-4-1BB 항체로 처리된 $CD8^+$ T 세포에 의한 시험관내 IFNγ 분비를 정량화한 그래프를 도시한다. $CD8^+$ T 세포를 인간 PBMC로부터 단리하고, 항체로 처리하지 않거나, 인간 IgG 단독 또는 1 μg/ml의 항-4-1BB 항체: BBK-4, 94G1, 94K, 94KV, 94KVT 및 EU101로 처리하였다. IFNγ 분비를 제1일, 제3일 및 제5일에 평가하였다.

도 9는 (A) $CD4^+$ 및 (B) $CD8^+$에서의 IFN-γ 분비를 도시하는 그래프를 제시한다. 건강한 공여자의 PBMC로부터 단리한 후, PBMC에 존재하는 활성화된 T 세포를 RPMI-1640+2%FBS 배지에 24시간 동안 정치해 두고, 정치해 둔 PBMC를 철 비드-부착된 항-CD4 항체 또는 항-CD8 항체로 처리하고, $CD4^+$ 세포 또는 $CD8^+$ 세포를 MACS 자기 분리기를 사용하여 단리하였다. 단리된 $CD4^+$ T 세포 또는 $CD8^+$ T 세포를 T 세포 활성화제인 항-CD3으로 처리하여 4-1BB 발현을 유도하고, 상이한 농도 (0.5, 1.0, 2.5 및 5.0 μg/ml)의 EU101 또는 대조군 인간 IgG (5.0 μg/ml)로 3일 동안 처리하였다. 3일 후, 세포를 배제한 배양 배지를 수득하고, 배양 배지에서의 인간 IFN-γ의 형광을 ELISA (이바이오사이언스(ebioscience))에 의해 사정하였다. 결과를 IFN-γ ELISA 키트에 제공된 바와 같은 표준 곡선과 비교하였다.

도 10a는 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 BBK4, 94G1, 94KVT 및 EU101의 항체-의존성 세포독성 (ADCC)을 도시하는 그래프를 제시한다. 도 10b는 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 BBK4, 94G1 및 EU101의 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 도시하는 그래프를 제시한다.

도 11은 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101)의 농도에 따른 생체내 항암 효과를 제시하며, 이는 결장암 종양 세포 (HT29)를 인간화 마우스에 피하로 주사하고, 종양 크기가 100 내지 200 mm^3에 도달하면, 마우스에 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101)를 체중 1 kg당 1.0 mg, 5.0 mg 및 10.0 mg의 용량으로 5일마다 1회, 3차례 정맥내로 투여한 후의 종양 크기로서 측정된다 (대표 데이터).

도 12는 항체로서의 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101) 및 예시적인 항-PD-1 항체 (키트루다, "KD")의 농도에 따른 항암 효과를 제시한다. 항암 효과는 인간화 마우스로의 결장암 종양 세포 (HT29)의 피하 주사 및 항체

치료 후의 종양 크기로서 측정되었다. 종양 크기가 100 내지 150 mm^3에 도달하면, 마우스를 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101) 또는 예시적인 항-PD-1 항체 (키트루다)로 복강내 주사에 의해 체중 1 kg당 5.0 mg 및 10.0 mg의 용량으로 5일마다 1회, 3차례 치료하였다.

도 13은 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101) 및 예시적인 항-PD-1 항체 (키트루다)의 개별 치료 및 조합 요법의 비교 항암 효과를 제시한다. 항암 효과는 결장암 종양 세포 (HT29)를 인간화 마우스에 피하로 주사하고 항체 치료한 후의 종양 크기로서 측정되었다. 종양 크기가 300 내지 450 mm^3에 도달하면, 개별 치료를 위한 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101)를 2.5 mpk로 투여하고, 개별 치료를 위한 예시적인 항-PD-1 항체 (키트루다)를 2.5 mpk로 투여하고, 조합 요법을 위한 EU101, 2.5 mpk + 키트루다, 2.5 mpk를 투여하였다. 투여는 마우스에 대한 복강내 주사에 의해, 총 3차례 동안 3일마다 1회였다.

도 14a는 도 13에 기재된 바와 같은, 종양-이식된 인간화 마우스에 대한 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101) 및 예시적인 항-PD-1 항체 (키트루다)를 사용한 개별 및 조합 치료로부터 34일 후에 마우스 혈액 또는 1 그램의 종양 조직에 순환되는 인간 $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포의 수를 제시한다. 종양 내 T 세포 침윤 림프구 (TIL)의 수는 유동 세포측정기를 사용하여 $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포의 비 (%)를 측정하여 총 세포 수에 대한 부분 비를 계산함으로써 측정하였다. 유동 세포측정법을 수행하여, 세포를 FITC-표지된 CD4 항체, 형광 BV510-표지된 CD8 항체 및 형광 APC-cy7-표지된 CD45 항체로 염색하고, 인간 혈액 세포 마커로서, CD45-양성 세포를 유동 세포측정법 프로그램으로부터 분리 (게이팅)한 후 $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포의 비 (%)를 측정하였다. 도 14b는, 세포를 형광 APC-cy7-표지된 CD45, 형광 BV510-표지된 CD8 항체, 형광 FITC-표지된 CD4 항체, 형광 PE-표지된 INFγ 및 형광 APC-표지된 Foxp3 항체로 염색한 후 유동 세포측정기를 사용하여 $CD8^+IFN\text{-}\gamma^+$ T 세포의 비와 Treg ($CD4^+Foxp3^{high}$ T 세포)의 비 사이의 부분 비를 계산함으로써 측정된 $CD8^+IFN\text{-}\gamma+$ T 세포의 비에 대한 Treg ($CD4^+Foxp3^{high}$ T 세포)의 비를 제시한다.

도 15a 및 도 15b는 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101) 및 예시적인 항-PD-1 항체 (키트루다)의 개별 및 조합 치료 후의 혈청 및 종양액을 통한 IFN-γ 분석 결과를 제시한다. 도 15a 및 15b에 제시된 모든 치료 그룹에 대해 수행된 해부 후, 10 μl의 혈청 및 100 μl의 종양액을 인간 IFN-γ 및 인간 TGF-β ELISA 키트로 분석하였다.

도 16a는 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101)로의 패닝 전에 측정된 항원-특이적 $CD8^+$ T 세포 비 ($4\text{-}1BB^+CD8^+$ T 세포의 비: 43.2%, $CD8^+$ T 세포의 비: 58.6%)를 제시한다. 도 16b는 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101)로의 패닝 후에 측정된 항원-특이적 $CD8^+$ T 세포 비 ($pCMV^+CD8^+$ T 세포의 비: 60.0%, $CD8^+$ T 세포의 비: 79.3%)를 제시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 특정 정의

[0041] 하기 설명에서는, 재조합 DNA 및 면역학에서 사용되는 다수의 용어가 광범위하게 이용된다. 이러한 용어에 의해 주어질 범주를 포함한, 본 명세서 및 청구범위의 보다 명확하고 일관된 이해를 제공하기 위해, 하기 정의가 제공된다.

[0042] 약: 용어 "약"은, 값과 관련하여 본원에 사용되는 경우에, 언급된 값과 문맥상 유사한 값을 지칭한다. 일반적으로, 상기 문맥에 익숙한 관련 기술분야의 통상의 기술자는 그 문맥에서 "약"에 의해 포괄되는 적절한 분산도를 인지할 것이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 용어 "약"은 언급된 값의 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 그 미만 이내에 있는 값의 범위를 포괄할 수 있다.

[0043] 투여: 본원에 사용된 용어 "투여"는 전형적으로 조성물이거나 또는 조성물에 포함된 작용제의 전달을 달성하기 위한 대상체 또는 시스템에 대한 조성물의 투여를 지칭한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는, 적절한 상황에서, 대상체, 예를 들어 인간에 대한 투여에 이용될 수 있는 다양한 경로를 알 것이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 투여는 안구, 경구, 비경구, 국소 투여 등일 수 있다. 일부 특정한 실시양태에서, 투여는 기관지 (예를 들어, 기관지 점적주입에 의한 것), 협측, 피부 (예를 들어, 진피, 피내, 피간, 경피 등으로의 국소 중 하나

이상일 수 있거나 또는 그를 포함할 수 있음), 경장, 동맥내, 피내, 위내, 수질내, 근육내, 비강내, 복강내, 척수강내, 정맥내, 뇌실내, 특정한 기관 내 (예를 들어 간내), 점막, 비강, 경구, 직장, 피하, 설하, 국소, 기관 (예를 들어, 기관내 점적주입에 의한 것), 질, 유리체 투여 등일 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여는 단지 단일 용량을 수반할 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여는 고정된 횟수의 용량의 적용을 수반할 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여는 간헐적 (예를 들어, 시간상 간격이 있는 복수의 용량) 및/또는 주기적 (예를 들어, 공통의 시간 기간만큼 간격이 있는 개별 용량) 투약인 투약을 수반할 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여는 적어도 선택된 시간 기간 동안의 연속 투약 (예를 들어, 관류)을 수반할 수 있다.

[0044] 친화도: 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, "친화도"는 특정한 리간드가 그의 파트너에 결합하는 견고성의 척도이다. 친화도는 다양한 방식으로 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 친화도는 정량적 검정에 의해 측정된다. 일부 이러한 실시양태에서, 결합 파트너 농도는 생리학적 조건을 모방하기 위해 리간드 농도를 초과하도록 고정될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시양태에서, 결합 파트너 농도 및/또는 리간드 농도는 달라질 수 있다. 일부 이러한 실시양태에서, 친화도는 비슷한 조건 (예를 들어, 농도) 하의 참조와 비교될 수 있다.

[0045] 효능제: 관련 기술분야의 통상의 기술자는 용어 "효능제"가, 그의 존재, 수준, 정도, 유형 또는 형태가 또 다른 작용제 (즉, 효능작용이 적용되는 작용제)의 증가된 수준 또는 활성과 상관관계가 있는 작용제 상태 또는 사건을 지칭하는 것으로 사용될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 일반적으로, 효능제는, 예를 들어, 소분자, 폴리펩티드, 핵산, 탄수화물, 지질, 금속 및/또는 관련 활성화 활성을 제시하는 임의의 다른 개체를 포함한 임의의 화학적 부류의 작용제일 수 있거나 또는 그를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 효능제는 직접적일 수 있고 (이 경우에는 그의 표적에 대해 직접적으로 그의 영향을 발휘함); 일부 실시양태에서, 효능제는 간접적일 수 있다 (이 경우에는 그의 표적에 대한 결합 이외의 다른 방식으로; 예를 들어, 표적의 수준 또는 활성이 변경되도록 표적의 조절제와 상호작용함으로써 그의 영향을 발휘함).

[0046] 동물: 본원에 사용된 바와 같이 동물계의 임의의 구성원을 지칭한다. 일부 실시양태에서, "동물"은 어느 성별이든지, 임의의 발달 단계에 있는 인간을 지칭한다. 일부 실시양태에서, "동물"은 임의의 발달 단계에 있는 비-인간 동물을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 비-인간 동물은 포유동물 (예를 들어, 설치류, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 양, 소, 영장류 및/또는 돼지)이다. 일부 실시양태에서, 동물은 포유동물, 조류, 파충류, 양서류, 어류, 곤충류 및/또는 충류를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 동물은 트랜스제닉 동물, 유전자 조작된 동물 및/또는 클론일 수 있다.

[0047] 길항제: 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 사용된 용어 "길항제"가, 그의 존재, 수준, 정도, 유형 또는 형태가 또 다른 작용제 (즉, 억제되는 작용제 또는 표적)의 저하된 수준 또는 활성과 상관관계가 있는 작용제 상태 또는 사건을 지칭하는 것으로 사용될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 일반적으로, 길항제는, 예를 들어, 소분자, 폴리펩티드, 핵산, 탄수화물, 지질, 금속 및/또는 관련 억제 활성을 제시하는 임의의 다른 개체를 포함한 임의의 화학적 부류의 작용제일 수 있거나 또는 그를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 길항제는 직접적일 수 있고 (이 경우에는 그의 표적에 대해 직접적으로 그의 영향을 발휘함); 일부 실시양태에서, 길항제는 간접적일 수 있다 (이 경우에는 그의 표적에 대한 결합 이외의 다른 방식으로; 예를 들어, 표적의 수준 또는 활성이 변경되도록 표적의 조절제와 상호작용함으로써 그의 영향을 발휘함).

[0048] 항체: 본원에 사용된 용어 "항체"는 특정한 표적 항원에 대한 특이적 결합을 부여하기에 충분한 정규 이뮤노글로불린 서열 요소를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 자연 생산된 그대로의 무손상 항체는, 통상적으로 소위 "Y-형상" 구조로 서로와 회합되는 2개의 동일한 중쇄 폴리펩티드 (각각 약 50 kD) 및 2개의 동일한 경쇄 폴리펩티드 (각각 약 25 kD)로 구성된 대략 150 kD의 사량체 작용제이다. 각각의 중쇄는 적어도 4개의 도메인 (각각 약 110개 아미노산 길이) - 아미노-말단 가변 (VH) 도메인 (Y 구조의 선단에 배치됨), 이어서 3개의 불변 도메인: CH1, CH2, 및 카르복시-말단 CH3 (Y의 줄기의 기부에 배치됨)으로 구성된다. "스위치"로서 공지된, 짧은 영역이 중쇄 가변 및 불변 영역을 연결한다. "힌지"는 CH2 및 CH3 도메인을 항체의 나머지에 연결한다. 이러한 힌지 영역 내의 2개의 디술피드 결합이 무손상 항체에서 2개의 중쇄 폴리펩티드를 서로에 연결한다. 각각의 경쇄는 또 다른 "스위치"에 의해 서로 분리된 2개의 도메인 - 아미노-말단 가변 (VL) 도메인, 이어서 카르복시-말단 불변 (CL) 도메인으로 구성된다. 무손상 항체 사량체는, 중쇄 및 경쇄가 단일 디술피드 결합에 의해 서로에 연결된 2개의 중쇄-경쇄 이량체로 구성되고; 2개의 다른 디술피드 결합이 중쇄 힌지 영역을 서로에 연결하여, 이량체가 서로에 연결되고 사량체가 형성된다. 자연-생산된 항체는 또한, 전형적으로 CH2 도메인 상에서 글리코실화된다. 천연 항체 내 각각의 도메인은 압축된 역평행 베타 배럴로 서로에 대해 패킹된 2개의 베타 시트 (예를 들어, 3-, 4- 또는 5-가닥 시트)로부터 형성된 "이뮤노글로불린 폴

딩"을 특징으로 하는 구조를 갖는다. 각각의 가변 도메인은 "상보성 결정 영역"으로서 공지된 3개의 초가변 루프 (CDR1, CDR2 및 CDR3) 및 4개의 다소 불변인 "프레임워크" 영역 (FR1, FR2, FR3 및 FR4)을 함유한다. 천연 항체가 폴딩되는 경우에, FR 영역은 도메인을 위한 구조적 프레임워크를 제공하는 베타 시트를 형성하고, 중쇄 및 경쇄 둘 다로부터의 CDR 루프 영역은 3-차원 공간으로 함께 합쳐져, 이들이 Y 구조의 선단에 배치되는 단일 초가변 항원 결합 부위를 생성한다. 자연-발생 항체의 Fc 영역은 보체계의 요소, 및 또한 예를 들어 세포독성을 매개하는 이펙터 세포를 포함한 이펙터 세포 상의 수용체에 결합한다. 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, Fc 수용체에 대한 Fc 영역의 친화도 및/또는 다른 결합 속성은 글리코실화 또는 다른 변형을 통해 조정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따라 생산 및/또는 이용되는 항체는 글리코실화된 Fc 도메인, 예컨대 변형 또는 조작된 이러한 글리코실화를 갖는 Fc 도메인을 포함한다. 본 발명의 목적상, 특정 실시양태에서, 천연 항체에서 발견되는 바와 같은 충분한 이뮤노글로불린 도메인 서열을 포함하는 임의의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 복합체는, 이러한 폴리펩티드가 자연 생산되든 (예를 들어, 항원에 반응하는 유기체에 의해 생성됨) 또는 재조합 조작, 화학적 합성, 또는 다른 인공 시스템 또는 방법론에 의해 생산되든, "항체"로 지칭되고/거나 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 폴리클로날이고; 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날이다. 일부 실시양태에서, 항체는 마우스, 토끼, 영장류 또는 인간 항체에 대해 특징적인 불변 영역 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체 서열 요소는 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 인간화, 영장류화, 키메라 요소 등이다. 더욱이, 본원에 사용된 용어 "항체"는 적절한 실시양태에서 (달리 언급되지 않거나 또는 문맥상 명확하지 않는 한) 대안적 제시로 항체의 구조적 및 기능적 특색을 이용하기 위한 임의의 관련 기술분야에 공지되어 있거나 또는 개발된 구축물 또는 포맷을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 실시양태에서, 본 발명에 따라 이용되는 항체는, 비제한적으로, 무손상 IgA, IgG, IgE 또는 IgM 항체; 이중- 또는 다중-특이적 항체 (예를 들어, 지바디(Zybody)® 등); 항체 단편 예컨대 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')2 단편, Fd' 단편, Fd 단편, 및 단리된 CDR 또는 그의 세트; 단일 쇄 Fv; 폴리펩티드-Fc 융합체; 단일 도메인 항체 (예를 들어, 상어 단일 도메인 항체 예컨대 IgNAR 또는 그의 단편); 낙타류 항체; 차폐된 항체 (예를 들어, 프로바디(Probody)®); 소형 모듈 면역제약 ("SMIP™"); 단일 쇄 또는 탠덤 디아바디 (TandAb®); 휴마바디, VHH; 안티칼린(Anticalin)®; 나노바디(Nanobody)® 미니바디; BiTE®; 안키린 반복 단백질 또는 DARPIN®; 아비머(Avimer)®; DART; TCR-유사 항체; 애드넥틴(Adnectin)®; 아필린(Affilin)®; 트랜스-바디(Trans-body)®; 아피바디(Affibody)®; 트리머(Trimer)X®; 마이크로프로틴; 피노머(Fynomer)®; 센티린(Centyrin)®; 및 칼비토르(KALBITOR)®로부터 선택된 포맷이다. 일부 실시양태에서, 항체는 공유 변형 (예를 들어, 글리칸의 부착)이 결여될 수 있으며, 이는 자연 생산된 경우에는 존재할 것이다. 일부 실시양태에서, 항체는 공유 변형 (예를 들어, 글리칸, 페이로드 [예를 들어, 검출가능한 모이어티, 치료 모이어티, 촉매 모이어티 등], 또는 다른 펜던트 기 [예를 들어, 폴리-에틸렌 글리콜 등]의 부착)을 함유할 수 있다.

[0049] 항체 단편: 본원에 사용된 "항체 단편"은 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 항체 작용제의 부분을 지칭하고, 전형적으로 그의 항원-결합 부분 또는 가변 영역을 포함하는 부분을 지칭한다. 항체 단편은 임의의 수단에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 항체 단편은 무손상 항체 또는 항체 작용제의 단편화에 의해 효소적으로 또는 화학적으로 생산될 수 있다. 대안적으로, 일부 실시양태에서, 항체 단편은 재조합적으로 생산될 수 있다 (즉, 조작된 핵산 서열의 발현에 의한 것). 일부 실시양태에서, 항체 단편은 전체적으로 또는 부분적으로 합성 생산될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 단편 (특히 항원-결합 항체 단편)은 적어도 약 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190개 또는 그 초과의 아미노산, 일부 실시양태에서는 적어도 약 200개 아미노산의 길이를 가질 수 있다.

[0050] 결합: 본원에 사용된 용어 "결합"은 전형적으로 2종 이상의 개체 사이의 또는 그 중에서의 비-공유 회합을 지칭하는 것으로 이해될 것이다. "직접" 결합은 개체 또는 모이어티 사이의 물리적 접촉을 수반하고; 간접 결합은 1종 이상의 중간 개체와의 물리적 접촉에 의한 물리적 상호작용을 수반한다. 2종 이상의 개체 사이의 결합은 전형적으로 임의의 다양한 상황에서 - 예컨대 상호작용하는 개체 또는 모이어티가 단리되어 또는 보다 복잡한 시스템의 상황에서 (예를 들어, 담체 개체와 공유적으로 또는 달리 회합된 동안 및/또는 생물학적 시스템 또는 세포에서) 연구되는 경우에 사정될 수 있다.

[0051] 암: 용어 "암", "악성종양", "신생물", "종양" 및 "암종"은 상대적으로 비정상적, 비제어적 및/또는 자율적 성장을 나타내어, 이들이 세포 증식 제어의 상당한 상실을 특징으로 하는 이상 성장 표현형을 나타내는 세포를 지칭하는 것으로 본원에 사용된다. 일부 실시양태에서, 종양은 전암성 (예를 들어, 양성), 악성, 전-전이성, 전이성, 및/또는 비-전이성인 세포일 수 있거나 또는 그를 포함할 수 있다. 본 개시내용은 그의 교시가 특히 관련될 수 있는 특정 암을 구체적으로 확인한다. 일부 실시양태에서, 관련 암은 고형 종양을 특징으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 관련 암은 혈액 종양을 특징으로 할 수 있다. 일반적으로, 관련 기술분야에 공지된

다양한 유형의 암의 예는, 예를 들어, 백혈병, 림프종 (호지킨 및 비-호지킨), 골수종 및 골수증식성 장애를 포함한 조혈암; 육종, 흑색종, 선종, 고형 조직의 암종, 구강, 인후, 후두 및 폐의 편평 세포 암종, 간암, 비뇨생식기암 예컨대 전립선암, 자궁경부암, 방광암, 자궁암 및 자궁내막암 및 신세포 암종, 골암, 췌장암, 피부암, 피부 또는 안내 흑색종, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 두경부암, 유방암, 위장암 및 신경계암, 양성 병변 예컨대 유두종 등을 포함한다.

[0052] CDR: 본원에 사용된 바와 같이, 항체 가변 영역 내의 상보성 결정 영역을 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 각각의 가변 영역에 3개의 CDR이 존재하며, 이들은 각각의 가변 영역에 대해 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 지정된다. "CDR의 세트" 또는 "CDR 세트"는 항원에 결합할 수 있는 단일 가변 영역에서 발생하는 3개 또는 6개의 CDR, 또는 항원에 결합할 수 있는 동족 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 CDR의 그룹을 지칭한다. CDR 경계를 정의하기 위한 특정 시스템 (예를 들어, 카바트, 코티아 등)이 관련 기술분야에서 확립된 바 있으며; 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이들 시스템 사이의 및 그 중에서의 차이를 인지하고, 청구된 발명을 이해하고 실시하는데 요구되는 정도까지 CDR 경계를 이해할 수 있다.

[0053] 화학요법제: 본원에 사용된 용어 "화학요법제"는 1종 이상의 아폽토시스촉진제, 세포증식억제제 및/또는 세포독성제, 예를 들어 구체적으로 예컨대 바람직하지 않은 세포 증식과 연관된 1종 이상의 질환, 장애 또는 상태를 치료하는데 사용하기 위해 이용 및/또는 권장되는 작용제를 지칭하는 관련 기술분야에서 이해되는 의미를 갖는다. 많은 실시양태에서, 화학요법제는 암의 치료에 유용하다. 일부 실시양태에서, 화학요법제는 1종 이상의 알킬화제, 1종 이상의 안트라시클린, 1종 이상의 세포골격 파괴제 (예를 들어 미세관 표적화제 예컨대 탁산, 메이탄신 및 그의 유사체), 1종 이상의 에포틸론, 1종 이상의 히스톤 데아세틸라제 억제제 (HDAC), 1종 이상의 토포이소머라제 억제제 (예를 들어, 토포이소머라제 I 및/또는 토포이소머라제 II의 억제제), 1종 이상의 키나제 억제제, 1종 이상의 뉴클레오티드 유사체 또는 뉴클레오티드 전구체 유사체, 1종 이상의 펩티드 항생제, 1종 이상의 백금-기반 작용제, 1종 이상의 레티노이드, 1종 이상의 빈카 알칼로이드, 및/또는 1종 이상의 상기 작용제의 1종 이상의 유사체 (즉, 관련 항증식 활성을 공유함)일 수 있거나 또는 그를 포함할 수 있다. 일부 특정한 실시양태에서, 화학요법제는 악티노마이신, 올-트랜스 레티노산, 아우리스타틴, 아자시티딘, 아자티오프린, 블레오마이신, 보르테조밉, 카르보플라틴, 카페시타빈, 시스플라틴, 클로람부실, 시클로포스파미드, 쿠르쿠민, 시타라빈, 다우노루비신, 도세탁셀, 독시플루리딘, 독소루비신, 에피루비신, 에포틸론, 에토포시드, 플루오로우라실, 겜시타빈, 히드록시우레아, 이다루비신, 이마티닙, 이리노테칸, 메이탄신 및/또는 그의 유사체 (예를 들어 DM1), 메클로레타민, 메르캅토퓨린, 메토트렉세이트, 미톡산트론, 메이탄시노이드, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 페메트렉세드, 테니포시드, 티오구아닌, 토포테칸, 발루비신, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 비노렐빈, 및 그의 조합 중 1종 이상일 수 있거나 또는 그를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 화학요법제는 항체-약물 접합체와 관련하여 이용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화학요법제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 항체-약물 접합체에서 발견되는 것이다: hLL1-독소루비신, hRS7-SN-38, hMN-14-SN-38, hLL2-SN-38, hA20-SN-38, hPAM4-SN-38, hLL1-SN-38, hRS7-Pro-2-P-Dox, hMN-14-Pro-2-P-Dox, hLL2-Pro-2-P-Dox, hA20-Pro-2-P-Dox, hPAM4-Pro-2-P-Dox, hLL1-Pro-2-P-Dox, P4/D10-독소루비신, 겜투주맙 오조가미신, 브렌툭시맙 베도틴, 트라스투주맙 엠탄신, 이노투주맙 오조가미신, 글렘바투무맙 베도틴, SAR3419, SAR566658, BIIB015, BT062, SGN-75, SGN-CD19A, AMG-172, AMG-595, BAY-94-9343, ASG-5ME, ASG-22ME, ASG-16M8F, MDX-1203, MLN-0264, 항-PSMA ADC, RG-7450, RG-7458, RG-7593, RG-7596, RG-7598, RG-7599, RG-7600, RG-7636, ABT-414, IMGN-853, IMGN-529, 보르세투주맙 마포도틴, 및 로르보투주맙 메르탄신.

[0054] 조합 요법: 본원에 사용된 용어 "조합 요법"은 대상체가 동시에 2종 이상의 치료 레지멘 (예를 들어, 2종 이상의 치료제)에 노출되는 상황을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 2종 이상의 치료 레지멘은 동시에 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 2종 이상의 치료 레지멘은 순차적으로 투여될 수 있다 (예를 들어, 제1 레지멘이 제2 레지멘의 임의의 용량의 투여 전에 투여됨). 일부 실시양태에서, 2종 이상의 치료 레지멘은 중첩되는 투약 레지멘으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조합 요법의 투여는 다른 작용제(들) 또는 양식을 받고 있는 대상체에 대한 1종 이상의 치료 작용제 또는 양식의 투여를 수반할 수 있다.

[0055] 상응하는: 본원에 사용된 용어 "상응하는"은 적절한 참조 화합물 또는 조성물과의 비교를 통해 화합물 또는 조성물 내 구조적 요소의 위치/정체를 지정하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 중합체 내 단량체 잔기 (예를 들어, 폴리펩티드 내 아미노산 잔기 또는 폴리뉴클레오티드 내 핵산 잔기)는 적절한 참조 중합체 내 잔기에 "상응하는" 것으로서 확인될 수 있다. 예를 들어, 통상의 기술자는, 단순성의 목적으로, 폴리펩티드 내 잔기가 참조 관련 폴리펩티드에 기반하여 정규 넘버링 시스템을 사용하여 종종 지정된다는 것을 인지할 것이므로, 예를 들어 위치 190에서의 잔기에 "상응하는" 아미노산은 실제로 특정한 아미노산 쇄 내 190번째 아

미노산일 필요는 없으며, 오히려 참조 폴리펩티드 내 190에서 발견되는 잔기에 상응하고; 관련 기술분야의 통상의 기술자는 "상응하는" 아미노산을 확인하는 방법을 용이하게 인지한다. 예를 들어, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 개시내용에 따른 폴리펩티드 및/또는 핵산 내 "상응하는" 잔기를, 예를 들어, 확인하는데 이용될 수 있는 다양한 서열 정렬 전략, 예컨대, 예를 들어, BLAST, CS-BLAST, CUSASW++, DIAMOND, FASTA, GGSEARCH/GLSEARCH, Genoogle, HMMER, HHpred/HHsearch, IDF, Infernal, KLAST, USEARCH, parasail, PSI-BLAST, PSI-Search, ScalaBLAST, Sequilab, SAM, SSEARCH, SWAPHI, SWAPHI-LS, SWIMM, 또는 SWIPE와 같은 소프트웨어 프로그램을 알 것이다.

[0056] 조작된: 일반적으로, 용어 "조작된"은 인간의 손에 의해 가공되어 있는 측면을 지칭한다. 예를 들어, 폴리펩티드는, 폴리펩티드 서열이 인간의 손에 의해 가공되었을 때, "조작된" 것으로 간주된다. 예를 들어, 본 발명의 일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드는 인간의 손에 의해 참조 폴리펩티드 서열 내로 도입되어 있는 1종 이상의 아미노산 돌연변이, 결실 및/또는 삽입을 포함하는 서열을 포함한다. 비슷하게, 세포 또는 유기체는, 그것이 가공되어 그의 유전자 정보가 변경되어 있다면 (예를 들어, 이전에는 존재하지 않은 새로운 유전 물질이, 예를 들어 형질전환, 교잡, 체세포 혼성화, 형질감염, 형질도입, 또는 다른 메카니즘에 의해 도입되어 있거나, 또는 이전에 존재한 유전 물질이, 예를 들어 치환 또는 결실 돌연변이에 의해 또는 교잡 프로토콜에 의해 변경 또는 제거됨), "조작된" 것으로 간주된다. 관례로, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 조작된 폴리펩티드 또는 세포의 유도체 및/또는 자손은, 실제 가공이 이전 개체에 대해 수행되었더라도, 전형적으로 여전히 "조작된" 것이라 지칭된다.

[0057] 에피토프: 본원에 사용된 바와 같이, 이뮤노글로불린 (예를 들어, 항체 또는 수용체) 결합 구성요소에 의해 특이적으로 인식되는 임의의 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 항원 상의 복수의 화학적 원자 또는 기로 구성된다. 일부 실시양태에서, 항원이 적절한 3-차원 입체형태를 채택할 때, 이러한 화학적 원자 또는 기는 표면-노출된다. 일부 실시양태에서, 항원이 이러한 입체형태를 채택할 때, 이러한 화학적 원자 또는 기는 공간상 물리적으로 서로 가까이 있다. 일부 실시양태에서, 항원이 대안적 입체형태를 채택할 때 (예를 들어, 선형화됨), 적어도 일부의 이러한 화학적 원자 또는 기는 물리적으로 서로 분리되어 있다.

[0058] 생체외: 본원에 사용된 바와 같이, 다세포 유기체의 상황 밖에서 발생하는 생물학적 사건을 지칭한다. 예를 들어, 세포-기반 시스템과 관련하여, 상기 용어는 인공 환경에서 세포의 집단 중에서 발생하는 사건 (예를 들어, 세포 증식, 시토카인 분비 등)을 지칭하는 것으로 사용될 수 있다.

[0059] 프레임워크 또는 프레임워크 영역: 본원에 사용된 바와 같이, CDR을 제외한 가변 영역의 서열을 지칭한다. CDR 서열이 다양한 시스템에 의해 결정될 수 있기 때문에, 마찬가지로 프레임워크 서열도 상응하게 다양한 해석에 적용된다. 6개의 CDR은 중쇄 및 경쇄 상의 프레임워크 영역을 각각의 쇄 상에서 4개의 하위-영역 (FR1, FR2, FR3 및 FR4)으로 분할하며, 여기서 CDR1은 FR1과 FR2 사이에, CDR2는 FR2와 FR3 사이에, CDR3은 FR3과 FR4 사이에 위치된다. 특정한 하위-영역을 FR1, FR2, FR3 또는 FR4로서 명시하지 않으면서, 다른 것으로 지칭되는 프레임워크 영역은 단일 자연 발생 이뮤노글로불린 쇄의 가변 영역 내의 조합된 FR을 나타낸다. 본원에 사용된 바와 같이, FR은 4개의 하위-영역 중 하나를 나타내며, 예를 들어 FR1은 가변 영역의 아미노 말단 단부 및 CDR1과 관련하여 5'에 가장 가까운 첫번째 프레임워크 영역을 나타내고, FR들은 프레임워크 영역을 구성하는 하위-영역 중 2개 이상을 나타낸다.

[0060] 인간화: 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 용어 "인간화"는, 항체의 아미노산 서열이 비-인간 종 (예를 들어, 마우스)에서 생성된 참조 항체로부터의 V_H 및 V_L 영역 서열을 포함하지만, 또한 이들을 보다 "인간-유사"로 만들기 위해, 즉 인간 배선 가변 서열에 보다 유사해지도록 하기 위해 의도된 이들 서열에서의 참조 항체에 비교되는 변형을 포함하는 항체 (또는 항체 구성요소)를 지칭하는 것으로 통상적으로 사용된다. 일부 실시양태에서, "인간화" 항체 (또는 항체 구성요소)는 관심 항원에 면역특이적으로 결합하며, 실질적으로 인간 항체의 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 프레임워크 (FR) 영역 및 실질적으로 비-인간 항체의 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 상보성 결정 영역 (CDR)을 갖는 것이다. 인간화 항체는, 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역이 비-인간 이뮤노글로불린 (즉, 공여자 항체)의 것에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 프레임워크 영역이 인간 이뮤노글로불린 컨센서스 서열의 것인 적어도 1개, 전형적으로는 2개의 가변 도메인 (Fab, Fab', $F(ab')_2$, FabC, Fv)을 실질적으로 모두 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 또한 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 부분, 전형적으로는 인간 이뮤노글로불린 불변 영역의 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 경쇄 뿐만 아니라 중쇄의 적어도 가변 도메인을 둘 다 함유한다. 항체는 또한 중쇄 불변 영역의 C_H1, 힌지, C_H2,

C_H3, 및 임의로 C_H4 영역을 포함할 수 있다.

[0061] 시험관내: 본원에 사용된 용어 "시험관내"는 다세포 유기체 내에서보다는, 인공 환경에서, 예를 들어 시험관 또는 반응 용기에서, 세포 배양물 등에서 발생하는 사건을 지칭한다.

[0062] 생체내: 본원에 사용된 바와 같이, 다세포 유기체, 예컨대 인간 및 비-인간 동물 내에서 발생하는 사건을 지칭한다. 세포-기반 시스템과 관련하여, 상기 용어는 살아있는 세포 내에서 (예를 들어, 시험관내 시스템과 대조적으로) 발생하는 사건을 지칭하는 것으로 사용될 수 있다.

[0063] 단리된: 본원에 사용된 바와 같이, (1) 초기에 생산될 때 (자연적이든지 및/또는 실험 환경이든지) 그것이 회합되었던 구성요소의 적어도 일부로부터 분리되어 있고/거나, (2) 인간의 손에 의해 설계, 생산, 제조 및/또는 제작되어 있는 물질 및/또는 개체를 지칭한다. 단리된 물질 및/또는 개체는, 이들이 초기에 회합되었던 다른 구성요소의 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99% 초과로부터 분리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단리된 작용제는 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 99% 초과로 순수하다. 본원에 사용된 바와 같이, 물질은 다른 구성요소를 실질적으로 함유하지 않는 경우에 "순수"하다. 일부 실시양태에서, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 것처럼, 물질은 특정의 다른 구성요소 예컨대, 예를 들어, 1종 이상의 담체 또는 부형제 (예를 들어, 완충제, 용매, 물 등)와 조합된 후에도 여전히 "단리된" 것 또는 심지어 "순수한" 것으로 간주될 수 있으며; 이러한 실시양태에서, 물질의 퍼센트 단리 또는 순도는 이러한 담체 또는 부형제를 포함시키지 않으면서 계산된다. 단지 하나의 예를 들자면, 일부 실시양태에서, 자연 발생하는 생물학적 중합체 예컨대 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드는 a) 그의 유래 기원 또는 공급원에 따라, 자연에서 그의 천연 상태에서 그와 동반된 구성요소의 일부 또는 모두와 회합되지 않는 경우; b) 자연에서 그를 생산하는 종과 동일한 종의 다른 폴리펩티드 또는 핵산을 실질적으로 함유하지 않는 경우; c) 자연에서 그를 생산하는 종의 것이 아닌 세포 또는 다른 발현 시스템에 의해 발현되거나 또는 그렇지 않으면 그로부터의 구성요소와 회합된 상태인 경우에 "단리된" 것으로 간주된다. 따라서, 예를 들어, 일부 실시양태에서, 화학적으로 합성되거나 또는 자연에서 그를 생산하는 것과는 상이한 세포 시스템에서 합성되는 폴리펩티드는 "단리된" 폴리펩티드인 것으로 간주된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시양태에서, 1종 이상의 정제 기술에 적용된 바 있는 폴리펩티드는 a) 자연에서 그것이 회합되고/거나; b) 초기에 생산될 때 그것이 회합되었던 다른 구성요소로부터 분리되어 있는 한, "단리된" 폴리펩티드인 것으로 간주될 수 있다.

[0064] K_D: 본원에 사용된 바와 같이, 결합 작용제 (예를 들어, 항체 또는 그의 결합 구성요소)의 그의 파트너 (예를 들어, 항체 또는 그의 결합 구성요소가 결합하는 에피토프)와의 복합체로부터의 해리 상수를 지칭한다.

[0065] 작동가능하게 연결된: 본원에 사용된 바와 같이, 기재된 구성요소가 이들의 의도된 방식으로의 기능을 가능하게 하는 관계에 있는 병렬배치를 의미한다. 기능적 요소에 "작동가능하게 연결된" 제어 요소는, 기능적 요소의 발현 및/또는 활성이 제어 요소와 상용성인 조건 하에 달성되는 방식으로 회합된다. 일부 실시양태에서, "작동가능하게 연결된" 제어 요소는 관심 코딩 요소와 인접해 있으며 (예를 들어, 공유 연결됨); 일부 실시양태에서, 제어 요소는 관심 기능적 요소에 대해 트랜스로 또는 그렇지 않으면 거리를 두고 작용한다.

[0066] 제약 조성물: 본원에 사용된 용어 "제약 조성물"은, 활성제가 1종 이상의 제약상 허용되는 담체와 함께 제제화된 조성물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 인간 또는 동물 대상체에 대한 투여에 적합하다. 일부 실시양태에서, 활성제는 관련 집단에 투여될 때 미리 결정된 치료 효과를 달성할 통계적으로 유의한 확률을 제시하는, 치료 레지멘에서의 투여에 적절한 단위 투약 양으로 존재한다.

[0067] 폴리펩티드: 본원에 사용된 용어 "폴리펩티드"는 일반적으로 적어도 3개의 아미노산의 중합체인, 관련 기술분야에서 인식된 의미를 갖는다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 용어 "폴리펩티드"가 본원에 언급된 완전한 서열을 갖는 폴리펩티드를 포괄할 뿐만 아니라, 이러한 완전한 폴리펩티드의 기능적 단편 (즉, 적어도 1종의 활성을 유지하는 단편)을 나타내는 폴리펩티드도 포괄하도록 충분히 일반적으로 의도된다는 것을 인지할 것이다. 더욱이, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 단백질 서열이 활성을 파괴하지 않으면서 일부 치환을 일반적으로 허용한다는 것을 이해한다. 따라서, 활성을 유지하며, 동일한 부류의 또 다른 폴리펩티드와 적어도 약 30-40%, 종종 약 50%, 60%, 70%, 또는 80% 초과의 전체 서열 동일성을 공유하며, 통상적으로 적어도 3-4개 및 종종 최대 20개 또는 그 초과의 아미노산을 포괄하는 1개 이상의 고도로 보존된 영역에서의 종종 90% 또는 심지어 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 초과의 훨씬 더 높은 동일성의 적어도 1개의 영역을 추가로 통상적으로 포함하는 임의

의 폴리펩티드는 본원에 사용된 바와 같은 관련 용어 "폴리펩티드" 내에 포괄된다. 폴리펩티드는 L-아미노산, D-아미노산, 또는 이들 둘 다를 함유할 수 있으며, 관련 기술분야에 공지된 임의의 다양한 아미노산 변형 또는 유사체를 함유할 수 있다. 유용한 변형은, 예를 들어, 말단 아세틸화, 아미드화, 메틸화 등을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단백질은 천연 아미노산, 비-천연 아미노산, 합성 아미노산, 및 그의 조합을 포함할 수 있다. 용어 "펩티드"는 일반적으로 약 100개 미만의 아미노산, 약 50개 미만의 아미노산, 20개 미만의 아미노산, 또는 10개 미만의 아미노산의 길이를 갖는 폴리펩티드를 지칭하는 것으로 사용된다. 일부 실시양태에서, 단백질은 항체, 항체 단편, 그의 생물학적 활성 부분 및/또는 그의 특징적인 부분이다.

[0068] 예방하다 또는 예방: 본원에 사용된 바와 같이, 질환, 장애 및/또는 상태의 발생과 관련하여 사용될 때, 질환, 장애 및/또는 상태의 발생 위험을 감소시키는 것 및/또는 질환, 장애 또는 상태의 1종 이상의 특징 또는 증상의 발병 및/또는 중증화를 지연시키는 것을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 예방은 집단에 기반하여 사정되어, 특정한 질환, 장애 또는 상태에 걸리기 쉬운 집단에서 그 질환, 장애 또는 상태의 1종 이상의 증상의 발생, 빈도 및/또는 강도에서의 통계적으로 유의한 저하가 관찰된다면, 작용제가 그 질환, 장애 또는 상태를 "예방"하는 것으로 간주된다.

[0069] 재조합: 본원에 사용된 바와 같이, 재조합 수단에 의해 설계, 조작, 제조, 발현, 생성, 제작 및/또는 단리된 폴리펩티드, 예컨대 숙주 세포 내로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 폴리펩티드; 재조합 조합론의 인간 폴리펩티드 라이브러리로부터 단리된 폴리펩티드; 폴리펩티드 또는 그의 1종 이상의 구성요소(들), 부분(들), 요소(들) 또는 도메인(들)을 코딩하고/거나 그의 발현을 지시하는 유전자 또는 유전자들 또는 유전자 구성요소에 대한 트랜스제닉이거나 또는 그를 발현하도록 달리 가공된 바 있는 동물 (예를 들어, 마우스, 토끼, 양, 어류 등)로부터 단리된 폴리펩티드; 및/또는 선택된 핵산 서열 요소의 스플라이싱 또는 서로에 대한 라이게이션, 선택된 서열 요소의 화학적 합성 및/또는 그렇지 않으면 폴리펩티드 또는 그의 1종 이상의 구성요소(들), 부분(들), 요소(들) 또는 도메인(들)을 코딩하고/거나 그의 발현을 지시하는 핵산의 생성을 수반하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 폴리펩티드를 지칭하는 것으로 의도된다. 일부 실시양태에서, 이러한 선택된 서열 요소 중 1종 이상은 자연에서 발견된다. 일부 실시양태에서, 이러한 선택된 서열 요소 중 1종 이상은 인 실리코 설계된다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 이러한 선택된 서열 요소는, 예를 들어, 천연 또는 합성 공급원 예컨대, 예를 들어, 관심 공급원 유기체 (예를 들어, 인간, 마우스 등)의 배선으로부터의 공지된 서열 요소의 돌연변이유발 (예를 들어, 생체내 또는 시험관내)로부터 생성된다.

[0070] 특이적 결합: 본원에 사용된 용어 "특이적 결합"은 결합이 발생할 환경에서 가능한 결합 파트너들 사이를 구별하는 능력을 지칭한다. 다른 잠재적 표적이 존재하는 경우에 하나의 특정한 표적과 상호작용하는 결합 작용제는 그것이 상호작용하는 표적에 "특이적으로 결합"한다고 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 특이적 결합은 결합 작용제와 그의 파트너 사이의 회합 정도를 검출 또는 결정함으로써 사정되고; 일부 실시양태에서, 특이적 결합은 결합 작용제-파트너 복합체의 해리 정도를 검출 또는 결정함으로써 사정되고; 일부 실시양태에서, 특이적 결합은 결합 작용제가 그의 파트너 및 또 다른 개체 사이에서 대안적 상호작용을 경쟁하는 능력을 검출 또는 결정함으로써 사정된다. 일부 실시양태에서, 특이적 결합은 소정의 농도 범위에 걸쳐 이러한 검출 또는 결정을 수행함으로써 사정된다.

[0071] 대상체: 본원에 사용된 용어 "대상체"는 유기체, 전형적으로는 포유동물 (예를 들어, 인간, 일부 실시양태에서는 출생전 인간 형태를 포함함)을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 관련 질환, 장애 또는 상태를 앓고 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 질환, 장애 또는 상태에 걸리기 쉽다. 일부 실시양태에서, 대상체는 질환, 장애 또는 상태의 1종 이상의 증상 또는 특징을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 대상체는 질환, 장애 또는 상태의 임의의 증상 또는 특징을 나타내지 않는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 질환, 장애 또는 상태에 대한 감수성 또는 그의 위험에 대해 특징적인 1종 이상의 특색을 갖는 자이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 환자이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 진단 및/또는 요법이 투여되고/거나 투여된 적이 있는 개체이다.

[0072] 치료제: 본원에 사용된 어구 "치료제"는 일반적으로 유기체에게 투여되는 경우에 목적하는 약리학적 효과를 도출하는 임의의 작용제를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 작용제는 적절한 집단 전체에 걸쳐 통계적으로 유의한 효과를 나타내는 경우에 치료제인 것으로 간주된다. 일부 실시양태에서, 적절한 집단은 모델 유기체의 집단일 수 있다. 일부 실시양태에서, 적절한 집단은 다양한 기준, 예컨대 특정 연령 그룹, 성별, 유전적 배경, 기존의 임상 상태 등에 의해 정의될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료제는 질환, 장애 및/또는 상태의 1종 이상의 증상 또는 특색을 완화시키고/거나, 호전시키고/거나, 경감시키고/거나, 억제하고/거나, 예방하고/거나, 그의 발병을 지연시키고/거나, 그의 중증도를 감소시키고/거나, 그의 발생률을 감소시키기 위해 사용될 수 있는 물질이다. 일부 실시양태에서, "치료제"는 인간에 대한 투여용으로 시판될 수 있기 전에 정부 기관에 의해 승인되어

있거나 또는 승인되도록 요구되는 작용제이다. 일부 실시양태에서, "치료제"는 인간에 대한 투여를 위해 의료 처방이 요구되는 작용제이다.

[0073] 치료 유효량: 본원에 사용된 용어 "치료 유효량"은, 질환, 장애 및/또는 상태를 앓고 있거나 또는 그에 걸리기 쉬운 집단에 치료 투약 레지멘에 따라 투여될 때, 질환, 장애 및/또는 상태를 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 일부 실시양태에서, 치료 유효량은 질환, 장애 및/또는 상태의 1종 이상의 증상의 발생률 및/또는 중증도를 감소시키고/거나, 그의 1종 이상의 특징을 안정화시키고/거나, 그의 발병을 지연시키는 양이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 용어 "치료 유효량"이 실제로 특정한 개체에서 성공적인 치료를 달성할 것을 요구하지는 않는다는 것을 인지할 것이다. 오히려, 치료 유효량은 이러한 치료를 필요로 하는 환자에게 투여될 때 유의한 수의 대상체에서 특정한 목적하는 약리학적 반응을 제공하는 양일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 용어 "치료 유효량"은, 본 발명의 요법과 관련하여 그를 필요로 하는 개체에게 투여될 때, 상기 개체에서 발생하는 암-보조 과정을 차단, 안정화, 약화 또는 반전시키거나, 또는 상기 개체에서 암-억제 과정을 증강 또는 증가시킬 양을 지칭한다. 암 치료와 관련하여, "치료 유효량"은, 암으로 진단된 개체에게 투여될 때, 개체에서 암의 추가의 발생을 예방, 안정화, 억제 또는 감소시킬 양이다. 본원에 기재된 조성물의 특히 바람직한 "치료 유효량"은 악성종양 예컨대 췌장 암종의 발생을 반전시키거나 (치유적 치료에서) 또는 악성종양의 관해의 달성 또는 연장을 돕는다. 개체에서 암을 치료하기 위해 상기 개체에게 투여되는 치료 유효량은 관해를 촉진하거나 또는 전이를 억제하기 위해 투여되는 치료 유효량과 동일하거나 상이할 수 있다. 대부분의 암 요법와 마찬가지로, 본원에 기재된 치료 방법은 암에 대한 "치유"로서 해석되지 않거나, 그로 한정되지 않거나, 또는 달리 제한되지 않아야 하며; 오히려 치료 방법은 암을 "치료"하기 위한, 즉 암을 갖는 개체의 건강에 바람직하거나 또는 유익한 변화를 가져오기 위한 기재된 조성물의 사용을 나타낸다. 이러한 이익은 종양학 분야의 숙련된 건강관리 제공자에 의해 인식되고, 환자 상태의 안정화, 종양 크기의 저하 (종양 퇴행), 생명 기능의 개선 (예를 들어, 암성 조직 또는 기관의 개선된 기능), 추가의 전이의 저하 또는 억제, 기회 감염의 저하, 증가된 생존성, 통증의 저하, 개선된 운동 기능, 개선된 인지 기능, 개선된 에너지감 (활력, 저하된 권태감), 개선된 행복감, 정상 식욕의 회복, 건강한 체중 증가의 회복, 및 그의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 추가로, 개체에서의 특정한 종양의 퇴행 (예를 들어, 본원에 기재된 치료의 결과로서)은 또한 종양 예컨대 췌장 선암종의 부위로부터 암 세포의 샘플을 채취하고 (예를 들어, 치료 동안), 암 세포의 상태를 모니터링하여 분자 수준에서 암 세포의 보다 덜 악성인 표현형으로의 퇴행을 검증하기 위해 암 세포를 대사 및 신호전달 마커의 수준에 대해 시험함으로써 사정될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법을 이용함으로써 유도된 종양 퇴행은 상기 논의된 임의의 혈관신생촉진 마커의 저하, 본원에 기재된 항혈관신생 마커의 증가, 암으로 진단된 개체에서 비정상적 활성을 나타내는 대사 경로, 세포간 신호전달 경로 또는 세포내 신호전달 경로의 정상화 (즉, 암을 앓고 있지 않는 정상 개체에서 발견되는 상태로의 변경)를 발견함으로써 나타내어질 것이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는, 일부 실시양태에서, 치료 유효량이 단일 용량으로 제제화 및/또는 투여될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 일부 실시양태에서, 치료 유효량은, 예를 들어, 투약 레지멘의 일부로서 복수의 용량으로 제제화 및/또는 투여될 수 있다.

[0074] 변이체: 분자, 예를 들어, 핵산, 단백질 또는 소분자와 관련하여 본원에 사용된 용어 "변이체"는 참조 분자와 유의한 구조적 동일성을 제시하지만, 참조 분자와 구조적으로, 예를 들어, 참조 개체와 비교 시 1종 이상의 화학적 모이어티의 존재 또는 부재 또는 그의 수준에 있어서 상이한 분자를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 변이체는 또한 그의 참조 분자와 기능적으로 상이하다. 일반적으로, 특정한 분자가 참조 분자의 "변이체"인 것으로 적절하게 간주되는지의 여부는 그의 참조 분자와의 구조적 동일성 정도에 기반한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 인지될 것처럼, 임의의 생물학적 또는 화학적 참조 분자는 특정의 특징적인 구조적 요소를 갖는다. 변이체는, 정의에 의하면, 1종 이상의 이러한 특징적인 구조적 요소를 공유하지만, 적어도 하나의 측면에서 참조 분자와 상이한 별개의 분자이다. 단지 몇몇 예를 들자면, 폴리펩티드는 선형 또는 3-차원 공간에서 서로에 대해 지정된 위치를 갖고/거나 특정한 구조적 모티프 및/또는 생물학적 기능에 기여하는 복수의 아미노산으로 구성된 특징적인 서열 요소를 가질 수 있고; 핵산은 선형 또는 3-차원 공간에서 서로에 대해 지정된 위치를 갖는 복수의 뉴클레오티드 잔기로 구성된 특징적인 서열 요소를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 변이체 폴리펩티드 또는 핵산은 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열에서의 1종 이상의 차이의 결과로서 참조 폴리펩티드 또는 핵산과 상이할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변이체 폴리펩티드 또는 핵산은 참조 폴리펩티드 또는 핵산과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 99%의 전체 서열 동일성을 제시한다. 일부 실시양태에서, 변이체 폴리펩티드 또는 핵산은 참조 폴리펩티드 또는 핵산과 적어도 1종의 특징적인 서열 요소를 공유하지 않는다. 일부 실시양태에서, 참조 폴리펩티드 또는 핵산은 1종 이상의 생물학적 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 변이체 폴리펩티드 또는 핵산은 참조 폴리펩티드 또는 핵산의 생물학적

활성 중 1종 이상을 공유한다.

[0075] 벡터: 본원에 사용된 바와 같이, 그것이 연결되어 있는 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터의 하나의 유형은 "플라스미드"이며, 이는 추가의 DNA 절편이 라이게이션될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭한다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이며, 여기서 추가의 DNA 절편은 바이러스 게놈 내로 라이게이션될 수 있다. 특정 벡터는, 이들이 도입된 숙주 세포에서 자율 복제할 수 있다 (예를 들어, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로의 도입 시 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있으며, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 더욱이, 특정 벡터는, 이들이 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"라 지칭된다. 표준 기술이 재조합 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성, 및 조직 배양 및 형질전환을 위해 사용될 수 있다 (예를 들어, 전기천공, 리포펙션). 효소적 반응 및 정제 기술은 제조업체의 설명서에 따라 또는 관련 기술분야에서 통상적으로 달성되는 바와 같이 또는 본원에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 상기 기술 및 절차는 일반적으로 관련 기술분야에 널리 공지된 통상적인 방법에 따라 및 본 명세서 전반에 걸쳐 인용되고 논의된 다양한 일반 참고문헌 및 보다 구체적인 참고문헌에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2^{nd} ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))]을 참조하며, 이 문헌은 임의의 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0076] 예시적 실시양태의 상세한 설명

[0077] 본 개시내용은, 특히, 유도성 공동-자극 분자인 4-1BB, 및 그에 결합하는 치료 항체로서, 참조 항-4-1BB 항체보다 개선된 특징을 갖도록 조작되어 있는 치료 항체에 관한 것이다. 예를 들어, 본원에 제공되는 조작된 항체는 인간 4-1BB (한국 특허 번호 10-0500286, 수탁 번호: KCTC 0952BP)의 세포외 도메인 내의 에피토프를 특이적으로 인식하는 참조 효능제 항체에 비해 항원 친화도를 증강시키도록 변형되어 있다. 구체적으로, 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명자들은 참조 인간화 항-인간 4-1BB 항체, 즉 94G1 (미국 특허 번호 7,932,045)을 조작하였다. 본원의 실시예에 기재된 바와 같이, 참조 항체 94G1의 경쇄 및 중쇄 CDR 서열을 각각의 쇄의 친화도를 개선시키도록 별개로 조작하였다. 더욱이, 본원에 기재된 바와 같이, 예시적인 조작된 항-4-1BB 항체는 활성화된 T 세포의 증식을 효과적으로 유도할 수 있다. 특히, 예시적인 조작된 항-4-1BB 항체는, 4-1BB 분자에 결합하며 활성화-유도된 세포 사멸 (AICD)을 억제하는 4-1BB 인간화 항체에 의해 유발된 자극으로 인해 $CD8^+$ T 세포의 놀랍게도 개선된 활성을 유도할 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 참조 항체에 비해 개선된 특성을 갖는 조작된 항-인간 4-1BB 항체를 제공하며, 더욱이 이들 항체가 시험관내 및 생체내에서 놀랍게도 유익한 활성을 갖는다는 것을 입증한다.

[0078] 4-1BB

[0079] 4-1BB (또한 CD137, TNFRSF9 등으로 지칭됨)는 종양 괴사 인자 수용체 (TNFR) 슈퍼패밀리에 속하는 수용체이다. 4-1BB는 활성화된 T 림프구에서 일반적으로 발현되는 공동-자극 분자이며, 면역 및 자가면역 질환에 수반된다 (문헌 [Kwon et al. PNAS 84:2896,1987]; [Kwon et al. PNAS (1989) 86:1963]; [Son et al. Journal of Immunological Methods (2004) 286(1-2):187-201], 이들 문헌은 각각 그 전문이 본원에 참조로 포함됨). 인간 4-1BB는 255개 아미노산의 단백질 (수탁 번호 NM_001561; NP_001552)이다. 완전한 인간 4-1BB 아미노산 서열은 서열식별번호: 44로 제공된다. 4-1BB는 단량체 (30 kDa) 및 이량체 (55 kDa) 형태로 세포 표면 상에서 발현되며, 아마도 신호전달을 위해서는 4-1BB 리간드와 삼량체화된다.

[0080] 현 시점에서의 4-1BB에 관한 이해는, 이것이 $Foxp3^+$ Treg 및 수지상 세포 (DC)를 포함한 다수의 세포 상에서, 비록 낮은 수준이기는 하나, 구성적으로 발현된다는 것을 시사한다 (문헌 [Vinay and Kwon (2014) BMB Rep. 47(3): 122-129] 참조, 이 문헌은 본원에 참조로 포함됨). 다수의 효능제, 예컨대 시토카인 (예를 들어, IL-2, IL-4), 폴리클로날 활성화제 (예를 들어, Con A 및 PHA), 세포 표면 분자 (예를 들어, 항-CD3 및 항-CD28) 및 Ca^{2+} 유도 및 PKC 활성의 프로모터 (예를 들어, 이오노마이신 및 포르볼 미리스테이트 아세테이트)를 사용한 활성화는 4-1BB의 발현을 추가로 증강시킨다. Id.

[0081] 뮤린 및 인간 T 세포에 관한 수많은 연구는, 4-1BB가 증강된 세포 증식, 생존, 및 시토카인 생산을 촉진한다는 것을 나타낸다 (Croft, 2009, Nat. Rev. Immunol. 9:271-285). 연구를 통해, 일부 4-1BB 효능제 모노클로날 항체가 공동자극 분자 발현을 증가시키며 세포용해성 T 림프구 반응을 현저히 증강시켜, 다양한 모델에서 항종

양 효능을 초래할 수 있다는 것이 나타난 바 있다. 4-1BB 효능제 모노클로날 항체는 예방적 및 치료적 환경에서의 효능을 입증한 바 있다. 추가로, 4-1BB 단독요법 및 조합 요법 종양 모델은 지속적인 항종양 보호성 T 세포 기억 반응을 확립한 바 있다 (Lynch (2008) Immunol. Rev. 22: 277-286). 4-1BB 효능제는 또한 다양한 관련 기술분야에서 인식된 자가면역 모델에서 자가면역 반응을 억제하는 것으로 제시된 바 있다 (Vinay (2006) J. Mol. Med. 84:726-736). 4-1BB의 이러한 이중 활성은 면역요법 접근법과 연관될 수 있는 자가면역 부작용을 약화시키면서, 항종양 활성을 제공할 가능성을 제안한다.

[0082] 4-1BB 항체 및 그의 단편

[0083] 본 개시내용은, 적어도 부분적으로, 시험관내 및/또는 생체내에서 현저히 및 예상외로 우월한 특징을 나타내는 조작된 항-인간 4-1BB 항체 및 그의 단편을 제공한다. 예를 들어, 특정의 제공된 항체는 참조 인간화 항-인간 4-1BB 항체에 비해 증가된 친화도를 갖는다.

[0084] 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 5 내지 8의 서열이거나 또는 그를 포함하는 1, 2 또는 3개의 중쇄 CDR 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 하기 중 하나 이상을 포함한다: 서열식별번호: 5의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 6의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열식별번호: 7 또는 8의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR3. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 하기를 각각 포함한다: 서열식별번호: 5의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 6의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열식별번호: 7 또는 8의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR3.

[0085] 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 1-4의 서열이거나 또는 그를 포함하는 1, 2 또는 3개의 경쇄 CDR 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 하기 중 하나 이상을 포함한다: 서열식별번호: 1의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR1, 서열식별번호: 2의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열식별번호: 3 또는 4의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR3. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 하기를 각각 포함한다: 서열식별번호: 1의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR1, 서열식별번호: 2의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열식별번호: 3 또는 4의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR3.

[0086] 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 5의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 6의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR2 및 서열식별번호: 7 또는 8의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열식별번호: 1의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR1, 서열식별번호: 2의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR2 및 서열식별번호: 4의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0087] 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 6의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR2를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하며, 여기서 5번째 아미노산, 즉 아스파라긴 (N)은 글루타민 (Q), 글루탐산 (E) 또는 세린 (S)으로 치환되었다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 6의 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 CDR2를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하며, 여기서 5번째 아미노산, 즉 아스파라긴 (N)은 발린 (V), 글리신 (G) 또는 프롤린 (P)으로 치환되었다.

[0088] 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 3 또는 4의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하며, 여기서 LCDR3의 6번째 아미노산 위치는 돌연변이된다.

[0089] 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 16 또는 17의 서열을 포함하는 중쇄 프레임워크 1 (FR1) 영역을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 18-20 중 어느 하나의 서열을 포함하는 중쇄 프레임워크 3 (FR3) 영역을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 16 또는 17의 서열을 포함하는 중쇄 프레임워크 1 (FR1) 영역 및 서열식별번호: 18-20 중 어느 하나의 서열을 포함하는 중쇄 프레임워크 3 (FR3) 영역을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0090] 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 11-14로부터 선택된 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편에 대한 실질적 상동성을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 11-14로부터 선택된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4% 또는 99.5% 동일한 서열이

거나 또는 그를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 11-14로부터 선택된 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0091] 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 9 또는 10의 서열을 갖거나 또는 그를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편에 대한 실질적 상동성을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 9 또는 10의 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4% 또는 99.5% 동일한 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 9 또는 10의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0092] 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 11-14로부터 선택된 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 10의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편에 대한 실질적 상동성을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 11-14로부터 선택된 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4% 또는 99.5% 동일한 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 10의 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4% 또는 99.5% 동일한 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 항체 단편은 서열식별번호: 11-14로부터 선택된 서열이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 10의 서열이거나 또는 그를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0093] 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편의 아미노산 서열은 보존적 치환을 통해 치환될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "보존적 치환"은, 폴리펩티드 내 1개 이상의 아미노산이 상응하는 폴리펩티드의 생물학적 또는 생화학적 기능의 상실을 유발하지 않도록 유사한 생화학적 특성을 갖는 아미노산으로 치환되는 것인 폴리펩티드의 변형을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "보존적 서열 변이체" 또는 "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기의, 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로의 치환이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기는 관련 기술분야에 정의되어 있다. 이들 잔기는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 리신, 아르기닌 및 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 아스파르트산 및 글루타메이트), 비-하전된 극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신 및 시스테인), 비-극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌 및 트립토판), 베타-분지형 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 트레오닌, 발린 및 이소류신), 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판 및 히스티딘)을 포괄한다. 따라서, 본 발명의 항체는 보존적 아미노산 치환을 가질 수 있으며, 여전히 활성을 보장할 수 있는 것으로 예상된다.

[0094] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 IgG1 불변 도메인, IgG2 불변 도메인, IgG1/IgG2 하이브리드 불변 도메인, 인간 IgG4 불변 도메인, IgA 불변 도메인, IgE 불변 도메인, IgM 불변 도메인 및 IgD 불변 도메인으로부터 선택된 불변 영역을 포함할 수 있다.

[0095] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 IgA, IgD, IgE, IgM, IgG 또는 그의 변이체이거나 또는 그를 포함한다.

[0096] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체는 234, 235, 236, 237, 238, 239, 253, 254, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 288, 297, 298, 299, 307, 311, 322, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 434 및 435 중 하나 이상의 위치에서의 아미노산 돌연변이 및/또는 치환을 갖는 변이체 Fc-영역을 포함한다.

[0097] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 IgG1 이소형이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 변이체 IgG1을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 233, 234, 235, 236, 265, 297, 329, 331 및 322 중 하나 이상의 위치에서의 아미노산 돌연변이를 갖는 IgG1 폴리펩티드를 포함한다.

[0098] 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 및 P329에서의 1종 이상의 돌연변이를 함유하는 IgG1 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 및 P329에서의 2종, 3종, 4종 또는 그 초과의 돌연변이를 함유하는 IgG1 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 L234A 및 L235A의 돌연변이를 갖는 IgG1 폴리펩티드를 포함한다.

[0099] 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 경쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 카파 (κ) 및/또는 람다 (λ) 경쇄 및/또는 그의 변이체를 포함한다.

[0100] 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')2 단편, Fv 단편, 디술피드-결합된 Fv 단편, scFv 단편, 단일 도메인 항체, 휴마바디, 나노바디 및/또는 디아바디이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 1가 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 다가 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 다중-특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체)이다.

[0101] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 글리코실화 부위를 부가 또는 결실시킴으로써 본 개시내용의 항체의 탄수화물 함량을 변형시키는 방법을 포괄한다. 항체의 탄수화물 함량을 변형시키는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며 본 개시내용 내에 포괄되고, 예를 들어, 미국 특허 번호 6,218,149; EP 0 359 096 B1; 미국 공개 번호 US 2002/0028486; WO 03/035835; 미국 공개 번호 2003/0115614; 미국 특허 번호 6,218,149; 미국 특허 번호 6,472,511을 참조하며, 이들은 모두 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 항체의 1종 이상의 내인성 탄수화물 모이어티를 결실시킴으로써 본 개시내용의 항체의 탄수화물 함량을 변형시키는 방법을 포괄한다. 구체적 실시양태에서, 본 개시내용은 위치 297을 아스파라긴에서 알라닌으로 변형시킴으로써, 항체의 Fc 영역의 글리코실화 부위를 결실시키는 것을 포괄한다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 CH2 도메인에서의 N297A 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, N297A 돌연변이는 비-글리코실화를 초래하며, 이는 FcR 또는 C1q 결합을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 N297A 돌연변이 및 K322A 돌연변이를 포함하는 Fc 영역을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 N297A 돌연변이 및 D265A 돌연변이를 포함하는 Fc 영역을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 N297A 돌연변이, D265A 돌연변이 및 K322A 돌연변이를 포함하는 Fc 영역을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 L234A 돌연변이 및/또는 L235A 돌연변이를 갖는 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 L234A, L235A, N297A, D265A 및 K322A로부터 선택된 1종 이상의 돌연변이를 갖는 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 L234A, L235A, N297A, D265A 및 K322A로부터 선택된 2종 이상의 돌연변이를 갖는 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 L234A, L235A, N297A, D265A 및 K322A로부터 선택된 3, 4 또는 5종의 돌연변이를 갖는 Fc 영역을 포함한다.

[0102] 조작된 당형태는 이펙터 기능의 증강 또는 감소를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 다양한 목적에 유용할 수 있다. 조작된 당형태는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 방법에 의해, 예를 들어 조작된 또는 변이체 발현 균주를 사용함으로써, 1종 이상의 효소, 예를 들어 DI N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III (GnTIII)과의 공동-발현에 의해, 다양한 유기체 또는 다양한 유기체로부터의 세포주에서 Fc 영역을 포함하는 분자를 발현시킴으로써, 또는 Fc 영역을 포함하는 분자가 발현된 후 탄수화물(들)을 변형시킴으로써 생성될 수 있다. 조작된 당형태를 생성하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 문헌 [Umana et al., 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180]; [Davies et al., 20017 Biotechnol Bioeng 74:288-294]; [Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740]; [Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473]; 미국 특허 번호 6,602,684; 미국 일련 번호 10/277,370; 미국 일련 번호 10/113,929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1에 기재된 것들; 포틸레전트(POTILLEGENT)™ 기술 (바이오와, 인크.(Biowa, Inc.), 뉴저지주 프린스톤); 글리코마브(GLYCOMAB)™글리코실화 조작 기술 (글리카트 바이오테크놀로지 아게(GLYCART biotechnology AG), 스위스 취리히)을 포함하나 이에 제한되지는 않으며; 이들 문헌은 각각 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 예를 들어, WO 00061739; EA01229125; US 20030115614; 문헌 [Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49]을 참조하며, 이들 문헌은 각각 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0103] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 4-1BB에 대한 효능제이다.

[0104] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 4-1BB 분자에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 4-1BB 분자에 특이적으로 결합한다.

[0105] 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 서열식별번호: 15의 서열이거나 또는 그를 포함

하는 서열에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 서열식별번호: 15의 서열이거나 또는 그를 포함하는 4-1BB 세포외 도메인의 에피토프에 결합한다.

[0106] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편의 인간 4-1BB 세포외 도메인과의 결합은 N30, D38, N39, R41, A56, G57, R60 또는 T61로부터 선택된 서열식별번호: 44의 1종 이상의 돌연변이에 의해 제거된다.

[0107] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 $1x10^{-7}$ 내지 $1x10^{-12}$ M의 결합 친화도 (K_D)로 인간 4-1BB 분자에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 $1x10^{-8}$ 내지 $1x10^{-12}$ M의 결합 친화도 (K_D)로 인간 4-1BB 분자에 결합한다. 결합 친화도 (K_D)는, 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명에 의해, 예를 들어, 비아코어 시스템을 사용하여 측정될 수 있다.

[0108] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 $1.0x10^{-8}$ M 미만의 결합 친화도 (K_D)로 인간 4-1BB 분자 또는 그의 단편에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간화 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 $1.0x10^{-9}$ M 미만의 결합 친화도 (K_D)로 인간 4-1BB 분자 또는 그의 단편에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간화 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 $1.0x10^{-10}$ M 미만의 결합 친화도 (K_D)로 인간 4-1BB 분자 또는 그의 단편에 결합한다.

[0109] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 비-영장류 4-1BB 폴리펩티드 (예를 들어, 개, 마우스 및 래트 4-1BB 폴리펩티드)에 결합하지 못하거나 또는 약하게 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 또는 원숭이 4-1BB에 효율적으로 결합한다. 이러한 결합 친화도는 영장류 4-1BB 항체에 대한 에피토프의 구조 및/또는 서열이 개, 마우스 및 래트와 꽤 상이할 수 있다는 것을 시사한다.

[0110] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 효능작용 항체이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 T 세포 활성화를 매개한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 4-1BB를 발현하는 $CD8^+$ 및/또는 $CD4^+$ T 세포에 결합한다.

[0111] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 ADCC 활성을 갖지 않거나 또는 낮은 ADCC 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 CDC 활성을 갖지 않거나 또는 낮은 CDC 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 ADCC 활성 및 CDC 활성을 갖지 않거나 또는 낮은 ADCC 활성 및 CDC 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 약 20% 미만, 약 10% 미만, 약 8% 미만 또는 약 5% 미만의 ADCC 세포 사멸 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 약 10% 미만의 ADCC 세포 사멸 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 10% 미만, 약 8% 미만 또는 약 5% 미만의 CDC 세포 사멸 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 약 20% 미만의 CDC 세포 사멸 활성을 갖는다.

[0112] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 낮은 독성 (예를 들어, 낮은 정도의 투여후 세포 사멸)을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 낮은 간독성을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 치료 용량으로 투여받은 적이 있는 대상체는 ALT, AST 및 총 빌리루빈 중 1종 이상을 정상 범위의 수준으로 갖는다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 증상의 측정 가능한 완화 및 낮고/거나 허용가능한 독성으로 연장된 기간 동안 환자를 치료하는 능력을 특징으로 한다. 낮거나 또는 허용가능한 면역원성 및/또는 높은 친화도, 뿐만 아니라 다른 적합한 특성이 달성되는 치료 결과에 기여할 수 있다. "낮은 면역원성"은 치료된 환자의 약 75% 미만, 또는 바람직하게는 약 50% 미만에서 유의한 HAHA, HACA 또는 HAMA 반응을 일으키고/거나 치료된 환자에서 낮은 역가를 일으키는 것으로서 본원에서 정의된다 (문헌 [Elliott et al., Lancet 344:1125-1127 (1994)], 이 문헌은 전체가 본원에 참조로 포함됨).

[0113] 핵산

[0114] 본 개시내용은 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 및 그의 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 본원에 기재된 바와 같은 항-인간 4-1BB 항체 및 그의 단편은 관련 기술분야에 공지된 분자 생물학적 방법을 사용하여 핵산 분자로부터 생산될 수 있다. 본 개시내용의 핵산은, 예를 들어, DNA 및/또는 RNA를 포함한다.

[0115] 일부 실시양태에서, 핵산 구축물은 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편 (예를 들어, 94K, 94KV, 94KVT, EU101)을 코딩하는 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체 또는 그의 단편은 V_H 및/또는 V_L 영역을 포함할 것이다. 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편은 목적하는 결합 및/또는 기능적 특성에 대해 확인 및/또는 선택될 수 있으며, 상기 항체의 가변 영역이 단리, 증폭, 클로닝 및/또는 서열분석될 수 있다. 아미노산을 코딩하고/거나 제한 부위를 보유하는 뉴클레오티드 서열의 부가 및/또는 아미노산을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 치환을 포함한 변형이 V_H 및 V_L 뉴클레오티드 서열에 대해 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 인트론 서열을 포함할 수 있거나 또는 그를 포함하지 않을 수 있다.

[0116] 적절한 경우에, 항-인간 4-1BB 항체 및 그의 단편 (예를 들어, 94K, 94KV, 94KVT, EU101)을 코딩하는 핵산 서열은 특정한 세포 유형 또는 유기체에서의 발현을 위해 최적화된 코돈을 포함하도록 변형될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,670,356 및 미국 특허 번호 5,874,304 참조). 코돈 최적화된 서열은 합성 서열이며, 바람직하게는 코돈 최적화되지 않은 모 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 동일한 폴리펩티드 (또는 전장 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 활성을 갖는 전장 폴리펩티드의 생물학적 활성 단편)를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 항체 구성요소를 코딩하는 유전 물질의 코딩 영역은, 전체적으로 또는 부분적으로, 특정한 세포 유형 (예를 들어, 진핵 또는 원핵 세포)을 위한 코돈 용법을 최적화하도록 변경된 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 인간화 중쇄 (또는 경쇄) 가변 영역에 대한 코딩 서열은 박테리아 세포에서의 발현을 위해 최적화될 수 있다. 대안적으로, 코딩 서열은 포유동물 세포 (예를 들어, CHO 세포)에서의 발현을 위해 최적화될 수 있다. 이러한 서열은 코돈-최적화된 서열로서 기재될 수 있다.

[0117] 본 개시내용의 핵산 구축물은 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 발현 벡터 또는 바이러스 벡터 내로 삽입될 수 있고, 핵산 분자는 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 임의의 상기 기재된 핵산 분자 또는 그의 단편을 포함하는 벡터가 본 개시내용에 의해 추가로 제공된다. 임의의 상기 핵산 분자 또는 그의 단편은 임의의 적합한 벡터 내로 클로닝될 수 있으며, 임의의 적합한 숙주를 형질전환 또는 형질감염시키는데 사용될 수 있다. 벡터의 선택 및 그를 구축하는 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 통상적으로 공지되어 있으며, 일반 기술 참고문헌에 기재되어 있다 (일반적으로, 문헌 ["Recombinant DNA Part D," Methods in Enzymology, Vol. 153, Wu and Grossman, eds., Academic Press (1987)] 참조).

[0118] 일부 실시양태에서, 통상적으로 사용되는 기술, 예컨대, 예를 들어, 전기영동, 인산칼슘 침전, DEAE-덱스트란 형질감염, 리포펙션 등이 외래 핵산 (DNA 또는 RNA)을 원핵 또는 진핵 숙주 세포 내로 도입하는데 사용될 수 있다. 바람직하게는, 벡터는, 적절한 경우에, 벡터가 DNA인지 또는 RNA인지를 고려하여, 벡터가 도입될 숙주의 유형 (예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물)에 특이적인 조절 서열, 예컨대 전사 및 번역 개시 및 종결 코돈을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 숙주의 속에 특이적인 조절 서열을 포함한다. 바람직하게는, 벡터는 숙주의 종에 특이적인 조절 서열을 포함한다.

[0119] 복제 시스템 및 삽입된 핵산 이외에도, 핵산 구축물은 형질전환 또는 형질감염된 숙주의 선택을 가능하게 하는 1종 이상의 마커 유전자를 포함할 수 있다. 마커 유전자는 살생물제 내성, 예를 들어, 항생제, 중금속 등에 대한 내성, 원영양성을 제공하기 위한 영양요구성 숙주에서의 보완성 등을 포함한다.

[0120] 적합한 벡터는 증식 및 확장을 위해 또는 발현을 위해 또는 이들 둘 다를 위해 설계된 것들을 포함한다. 예를 들어, 클로닝 벡터는 pUC 시리즈, pBluescript 시리즈 (스트라타진(Stratagene), 캘리포니아주 라호야), pET 시리즈 (노바젠(Novagen), 위스콘신주 매디슨), pGEX 시리즈 (파마시아 바이오테크(Pharmacia Biotech), 스웨덴 웁살라) 및 pEX 시리즈 (클론테크(Clontech), 캘리포니아주 팔로 알토)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 박테리오파지 벡터, 예컨대 λGT10, λGT11, λZapII (스트라타진), λEMBL4 및 λNM1149가 또한 사용될 수 있다. 식물 발현 벡터의 예는 pBI110, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 및 pBIN19 (클론테크)를 포함한다. 동물 발현 벡터의 예는 pEUK-C1, pMAM 및 pMAMneo (클론테크)를 포함한다. TOPO 클로닝 시스템 (인비트로젠(Invitrogen), 캘리포니아주 칼스배드)이 또한 제조업체의 권장사항에 따라 사용될 수 있다.

[0121] 발현 벡터는 상기 기재된 바와 같은 단리 또는 정제된 핵산 분자에 작동가능하게 연결된 천연 또는 비천연 프로모터를 포함할 수 있다. 프로모터, 예를 들어, 강력한, 약한, 유도성인, 조직-특이적인 및 발생-특이적인 프로

모터의 선택은 관련 기술분야의 기술 내에 있다. 마찬가지로, 상기 기재된 바와 같은 핵산 분자 또는 그의 단편의 프로모터와의 조합이 또한 관련 기술분야의 기술 내에 있다.

[0122] 적합한 바이러스 벡터는, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터, 파르보바이러스-기반 벡터, 예를 들어, 아데노-연관 바이러스 (AAV)-기반 벡터, AAV-아데노바이러스 키메라 벡터 및 아데노바이러스-기반 벡터, 및 렌티바이러스 벡터, 예컨대 단순 포진 바이러스 (HSV)-기반 벡터를 포함한다. 이들 바이러스 벡터는, 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)]; 및 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994)]에 기재된 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있다.

[0123] 레트로바이러스 벡터는 레트로바이러스로부터 유래된다. 레트로바이러스는 매우 다양한 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 RNA 바이러스이다. 감염 시, 레트로바이러스 게놈은 그의 숙주 세포의 게놈 내로 통합되어 숙주 세포 DNA와 함께 복제됨으로써, 레트로바이러스 게놈 내로 혼입된 바이러스 RNA 및 임의의 핵산 서열을 지속적으로 생산한다. 그러므로, 레트로바이러스를 사용하는 경우에 치료 인자(들)의 장기간 발현이 달성가능하다. 유전자 요법에서의 사용을 위해 고려되는 레트로바이러스는 상대적으로 비-병원성이지만, 병원성 레트로바이러스가 존재하기도 한다. 병원성 레트로바이러스, 예를 들어, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 또는 인간 T-세포 림프영양성 바이러스 (HTLV)를 이용하는 경우에, 숙주에 대한 독성을 제거하도록 바이러스 게놈을 변경하는 것에 주의하여야 한다. 레트로바이러스 벡터는 추가적으로 바이러스 복제가 결핍되도록 가공될 수 있다. 그러므로, 레트로바이러스 벡터는 생체내에서의 안정한 유전자 전달에 특히 유용한 것으로 간주된다. 렌티바이러스 벡터, 예컨대 HIV-기반 벡터는 유전자 전달에 사용되는 레트로바이러스 벡터의 예시이다. 다른 레트로바이러스와 달리, HIV-기반 벡터는 그의 패신저 유전자를 비-분열 세포 내로 혼입시키는 것으로 공지되어 있으며, 따라서 지속적 형태의 질환을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0124] 이러한 클로닝 및/또는 발현 서열에 추가의 서열이 부가되어, 클로닝 및/또는 발현에서의 이들의 기능을 최적화하거나, 폴리뉴클레오티드의 단리를 보조하거나, 또는 폴리뉴클레오티드의 세포 내로의 도입을 개선시킬 수 있다. 클로닝 벡터, 발현 벡터, 어댑터 및 링커의 사용은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. (예를 들어, 상기 문헌 [Ausubel]; 또는 상기 문헌 [Sambrook] 참조).

[0125] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 핵산 및 벡터는 단리 및/또는 정제될 수 있다. 본 개시내용은 또한 상기 기재된 단리 또는 정제된 핵산 분자를, 임의로 벡터의 형태로 포함하는 조성물을 제공한다. 단리된 핵산 및 벡터는 관련 기술분야에 공지된 표준 기술 예컨대, 예를 들어, 알칼리/SDS 처리, CsCl 결합, 칼럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기영동 및 관련 기술분야에 널리 공지된 다른 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 조성물은 본원에 추가로 기재된 바와 같은 다른 구성요소를 포함할 수 있다.

[0126] 일부 실시양태에서, 핵산 분자는, 적절한 숙주 세포 내로 도입되는 경우에 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편을 발현시킬 수 있는 벡터 내로 삽입된다. 적절한 숙주 세포는 박테리아, 효모, 곤충 및 포유동물 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 숙주 세포는 원핵생물 (예를 들어, 이. 콜라이) 및 진핵생물 (예를 들어, COS 또는 CHO 세포)을 포함한다. 사용될 수 있는 포유동물 숙주 세포는 인간 Hela 293, H9 및 Jurkat 세포, 마우스 NIH3T3 및 C127 세포, Cos 1, Cos 7 및 CV 1, 메추라기 QC1-3 세포, 마우스 L 세포 및 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 (예를 들어, DG44 세포)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체의 발현에 적합한 포유동물 숙주 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 (예를 들어, DHFR-선택가능한 마커와 함께 사용되는 DHFR-CHO 세포 포함), NSO 골수종 세포, COS 세포 또는 SP2 세포일 수 있다.

[0127] DNA 단편의 벡터 내로의 삽입을 위한 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 방법(들)이 전사/번역 제어 신호의 제어 하에 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 발현 벡터를 구축하는데 사용될 수 있다. 이들 방법은 시험관내 재조합 DNA 및 합성 기술 및 생체내 재조합을 포함할 수 있다 (예를 들어, 상기 문헌 [Ausubel]; 또는 상기 문헌 [Sambrook] 참조).

[0128] 항체의 생산

[0129] 본 발명의 항체 및 항원-결합 단편은 관련 기술분야에 공지된 임의의 기술에 의해 제조 및/또는 정제될 수 있으며, 이는 안정한 항체 또는 항체 단편의 후속 형성을 가능하게 한다.

[0130] 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 및/또는 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산은 통상적인 절차에 의해 용이하게 단리되고 서열분석될 수 있다. 예를 들어, 하이브리도마 또는 파지 주형 DNA로부터 상응하는 중쇄 및 경쇄-코

딩 영역을 특이적으로 증폭시키도록 설계된 올리고뉴클레오티드 프라이머가 사용될 수 있다. 단리된 핵산은 발현 벡터 내로 삽입될 수 있고, 이어서 목적하는 모노클로날 항체가 발현 벡터를 숙주 세포에 도입함으로써 형질전환된 적합한 숙주 세포 (즉, 형질전환체)로부터 생산될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 및/또는 항원-결합 단편을 제조하는 방법은 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터를 증폭시키는 것을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0131] 일부 실시양태에서, 숙주 세포는, 예를 들어, 효모, 고등 식물, 곤충 및 포유동물 세포를 포함한 진핵 숙주 세포이다. 재조합 생산 절차에서 이용되는 숙주에 따라, 본 개시내용의 항체 및 항체 단편은 글리코실화될 수 있거나 또는 비-글리코실화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 및/또는 항원-결합 단편을 코딩하는 재조합 발현 벡터는 포유동물 숙주 세포 내로 도입되고, 항체는 항체를 발현시키기에 충분한 시간 동안 숙주 세포를 배양함으로써 제조될 수 있다. 일부 실시양태에서, 포유동물 숙주 세포는 배양 배지에서 본 개시내용의 항체 또는 항체 단편을 분비하기에 충분한 시간 동안 배양된다.

[0132] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 발현된 항체는 숙주 세포로부터 단리된 후 균일하게 정제될 수 있다. 본 개시내용의 항체의 단리 및/또는 정제는 단백질을 단리 및 정제하는 통상적인 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 및/또는 항원-결합 단편은 단백질 A 정제, 단백질 G 정제, 황산암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피를 포함하나 이에 제한되지는 않는 널리 공지된 방법에 의해 재조합 세포 배양물로부터 회수되고 정제될 수 있다. 고성능 액체 크로마토그래피 ("HPLC")가 또한 정제를 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Colligan, Current Protocols in Immunology, or Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001)]의, 예를 들어 챕터 1, 4, 6, 8, 9 및 10을 참조하며, 이들은 각각 전체가 본원에 참조로 포함된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 추가적으로 여과, 초여과, 염석, 투석 등을 조합함으로써 단리 및/또는 정제될 수 있다.

[0133] 본 개시내용의 정제된 항-인간 4-1BB 항체 및/또는 항원-결합 단편은, 예를 들어, ELISA, ELISPOT, 유동 세포측정법, 면역세포학, 비아코어(BIACORE)™ 분석, 사피다인 키넥사(SAPIDYNE KINEXA)™ 동적 배제 검정, SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯에 의해, 또는 HPLC 분석에 의해 뿐만 아니라 본원에 개시된 다수의 다른 기능적 검정에 의해 특징화될 수 있다.

[0134] 치료 용도

[0135] 본 개시내용은 조작된 항-인간 4-1BB 항체 및 항원-결합 단편이 특정 질환 예컨대, 예를 들어, 암의 진단, 예방 및/또는 치료에 유용할 수 있다는 인식을 포괄한다. 본원에 제공된 임의의 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편이 치료 방법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은, 예를 들어 악성 질환 (예를 들어, 암)의 치료에서 면역요법제로서 사용될 수 있다.

[0136] 본 개시내용은 악성 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법으로서, 본 개시내용의 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에서의 적어도 1종의 악성 질환을 조정 또는 치료하는 방법은 암 및/또는 염증성 질환의 치료를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0137] 본 개시내용과 관련하여 암 치료는 증가하는 세포독성 T 세포 및 항암 시토카인을 통해 매개될 수 있다. 일반적으로, 항원-특이적 세포-매개 면역은 세포독성 T 세포에 의해 유발되며, 2가지의 신호전달 사건을 포함한다: 제1 신호전달 사건은 T 세포가 수용체를 통해 항원-제시 세포로부터의 항원을 인식할 때 유도되고, 제2 신호전달은 공동-자극 분자에 의해 유도된다. 제1 및 제2 자극으로 인해, T 세포 활성 및 관련된 인자가 증가되고, 이에 의해 암 치료에서 특이적으로 기능하는 T 세포가 형성되며, 형성된 T 세포는 공동-자극 분자로의 자극으로 인해 세포독성, 세포 분열, 세포 생존율 및 항암 시토카인 분비가 증가된다.

[0138] 구체적으로, 4-1BB에 의한 자극이 $CD8^+$ T 세포의 활성을 증강시키고/거나, 항암 시토카인 예컨대 인터페론 감마 (IFNγ)의 분비를 증가시키고/거나, 항아폽토시스 분자 예컨대 Bcl-2, BclXL 및 Bfl-1의 발현을 증가시키고/거나, 활성화-유도된 세포 사멸 (AICD)을 억제할 수 있다는 것이 입증된 바 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 $CD8^+$ T 세포 활성, 항암 시토카인 예컨대 인터페론 감마 (IFNγ)의 분비, 항아폽토시스 분자 예컨대 Bcl-2, BclXL 및 Bfl-1의 발현 및 활성화-유도된 세포 사멸 (AICD)의 억제 중 하나 이상을 증강 또는 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는

항원-결합 단편을 사용한 치유적 치료는 암 세포의 성장을 감소시키고/거나 억제할 수 있다.

[0139] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 투여함으로써 생체내 또는 시험관내에서 시토카인 분비를 조절하는 것을 포함하는, 종양 성장을 지연시키거나 또는 억제하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 투여함으로써 생체내 또는 시험관내에서 시토카인 분비를 조절하는 것을 포함하는, 종양 부담을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0140] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기 단계를 포함하는, 치료될 암 또는 종양의 생물학적 대상체에 대해 모니터링함으로써 암 또는 종양을 치료하는 방법을 제공한다: (i) 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 단계, (ii) 대상체로부터 생물학적 샘플을 분리하고 단리하는 단계, (iii) 샘플로부터 INFγ 또는 TGFβ의 분비 양을 측정하고, 부분 비를 추정하는 단계, 및 (iv) 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 투여되거나 또는 투여되지 않은 대조군 샘플을 비교함으로써 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 치료 유효량을 결정하는 단계.

[0141] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법으로서, 본 개시내용의 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편 및/또는 그의 핵산을 포함하거나 또는 그를 전달하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖거나 또는 그의 발생 위험이 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 인간화 4-1BB 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 치료 유효량을 암 또는 종양을 갖는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 환자의 암 또는 종양을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0142] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 면역 반응의 유도를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 본 개시내용의 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편 및/또는 그의 핵산을 포함하거나 또는 그를 전달하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖거나 또는 그의 발생 위험이 있다.

[0143] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 면역 반응의 증강 또는 면역 세포의 활성의 증가를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 증강시키거나 또는 면역 세포의 활성을 증가시키는 방법으로서, 본 개시내용의 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편 및/또는 그의 핵산을 포함하거나 또는 그를 전달하는 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖거나 또는 그의 발생 위험이 있다.

[0144] 본 개시내용의 방법을 사용한 치료에 적합한 암은 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 난관암, 담낭암, 위장암, 두경부암, 혈액암, 후두암, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 중피종, 난소암, 원발성 복막암, 타액선암, 육종, 위암, 갑상선암, 췌장암 및 전립선암을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 사용한 치료를 위한 암은 암종, 림프종 (예를 들어, 호지킨 및 비-호지킨 림프종), 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 암은 편평 세포 암종, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐 선암종, 폐의 편평 세포 암종, 복막암, 간세포성 암종, 위암, 췌장암, 신경교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포성 암종, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간암종, 백혈병 및 다른 림프증식성 장애, 및 다양한 유형의 두경부암을 포함할 수 있다.

[0145] 본 개시내용의 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 조성물은 암 세포 또는 그의 전이를 치료하거나 또는 암의 성장을 억제하는 제약 유효량으로 투여될 수 있다. 치료 방법에서의 사용을 위해, 본 개시내용의 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 알맞은 의료 행위에 부합하는 방식으로 제제화, 투약 및 투여될 것이다. 이와 관련하여 고려할 인자는 치료될 특정한 장애, 치료될 특정한 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 환자의 연령, 환자의 체중, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄링, 및 의료 진료의에게 공지된 다른 인자를 포함한다.

[0146] 본 개시내용은 참조 항체에 비해 우월한 특성을 가질 수 있는 고친화도 항-인간 4-1BB 항체를 제공한다. 본 개시내용은 이들 항체가 T 세포 활성화 및/또는 시토카인 예컨대 IFNγ의 분비를 유도하는 개선된 능력을 가질 수 있다는 인식을 포괄한다. 따라서, 본 개시내용은 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원 결합 단편이 참조 항체보다 더 낮은 용량으로 투여될 수 있다는 인식을 포괄한다.

[0147] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 조성물은 필요한 경우에 볼루스로서 또는 연속 주사에 의해 환자에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 볼루스 투여는 본 개시내용의 항-4-1BB Fab의 투여이며, 0.0025 내지 100 mg/kg, 0.025 내지 0.25 mg/kg, 0.010 내지 0.10 mg/kg 또는 0.10

내지 0.50 mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다. 연속 주사의 경우에, Fab 단편으로서 제시된 본 발명의 항체는 1 내지 24시간, 1 내지 12시간, 2 내지 12시간, 6 내지 12시간, 2 내지 8시간 또는 1 내지 2시간 동안 0.001 내지 100 mg/kg/min, 0.0125 내지 1.25 mg/kg/min, 0.010 내지 0.75 mg/kg/min, 0.010 내지 1.0 mg/kg/min 또는 0.10 내지 0.50 mg/kg/min의 용량으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 전장 항체(완전한 불변 도메인을 가짐)이다. 일부 실시양태에서, 전장 항체는 대략 0.01 내지 10 mg/kg, 1 내지 8 mg/kg 또는 2 내지 6 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 전장 항체는 30 내지 35분 동안 주사에 의해 투여된다. 투여 빈도는 상태의 중증도에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 빈도는 2 내지 7일마다 1회, 1주에 1회, 또는 1, 2, 3 또는 4주마다 1회일 수 있다.

[0148] 일부 실시양태에서, 조성물은 피하 주사에 의해 환자에게 투여될 수 있다. 구체적으로, 항체는 2 내지 7일마다 1회, 매주, 2주마다 1회 또는 매달 피하 주사에 의해 0.1 내지 100 mg의 용량으로 환자에게 투여될 수 있다.

[0149] 조합 요법

[0150] 본 개시내용은 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 1종 이상의 다른 요법과 조합하여 투여하는 것을 포함하는 치료 방법을 제공한다.

[0151] 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 암의 치료에 대해 승인되어 있는 1종 이상의 요법과 조합되어 투여된다. 예를 들어, 항-4-1BB 항체 및 통상적인 화학요법제인 시스플라틴을 사용한 조합 치료는 종양 사멸 및 기관-특이적 독성의 예방에 있어서 상승작용적 활성을 갖는 것으로 제시된 바 있다 (Kim et al., Cancer Research (2008) 68(18):7264-9).

[0152] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 면역 체크포인트 억제제, 인터류킨 12 (IL-12), 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF), 항-CD4 작용제 및 화학요법제로부터 선택된 제2 요법과 조합되어 투여되어, 대상체가 둘 다를 사용한 치료를 받는다.

[0153] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 화학요법제를 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여되어, 대상체가 둘 다를 사용한 치료를 받는다. 본 개시내용의 치료 방법은 관련 기술분야에 공지된 임의의 화학요법제의 투여를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 화학요법제는 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여된다.

[0154] 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 플루오로우라실을 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 플루오로우라실은 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 독소루비신을 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 독소루비신은 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 이리노테칸을 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 이리노테칸은 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 파클리탁셀을 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 파클리탁셀은 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여된다.

[0155] 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 시스플라틴을 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 시스플라틴은 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 시클로포스파미드를 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 시클로포스파미드는 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여된다.

[0156] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 GM-CSF를 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여되어, 대상체가 둘 다를 사용한 치료를 받는다. 일부 실시양태에서, GM-CSF는 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여된다.

[0157] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 IL-12를 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여되어, 대상체가 둘 다를 사용한 치료를 받는다. 일부 실시양태에서, IL-12는 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여된다.

[0158] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 항-CD4 작용제를 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여되어, 대상체가 둘 다를 사용한 치료를 받는다. 일부 실시양태에서, 항-CD4 작용제는 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여된다.

[0159] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 체크포인트 억제제 (예를 들어, 면역 체크포인트 억제제)를 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여되어, 대상체가 둘 다를 사용한 치료를 받는다. 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 억제제는 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 투여받은 적이 있거나 또는 투여받을 대상체에게 투여된다.

[0160] 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편과 조합되어 사용되는 체크포인트 억제제는, 예를 들어, 임의의 면역 체크포인트 억제제일 수 있다. 억제 체크포인트 분자의 예는 A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, CD277, IDO, KIR, PD-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT 및 VISTA를 포함한다. 면역 체크포인트 억제제는 면역 억제 체크포인트 단백질의 기능을 억제하는 임의의 화합물을 지칭할 수 있다. 억제는 기능의 감소 및 완전한 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 억제제는 면역 체크포인트 단백질을 특이적으로 인식하는 항체이다. 다수의 면역 체크포인트 억제제가 공지되어 있으며, 이들 공지된 면역 체크포인트 단백질 억제제로부터 유추하여, 대안적 면역 체크포인트 억제제가 (가까운) 미래에 개발될 수 있다. 면역 체크포인트 억제제는 펩티드, 항체, 핵산 분자 및 소분자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0161] 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 억제제는 CTLA-4의 억제제이다. 일부 실시양태에서, 체크포인트 억제제는 CTLA-4를 표적화하는 항체, 예컨대, 예를 들어, 이필리무맙이다. 일부 실시양태에서, 체크포인트 억제제는 T 세포 이뮤노글로불린 및 뮤신 도메인 함유 단백질-3 (TIM-3)으로도 공지된 막횡단 단백질인 CD366을 표적화한다. 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 억제제는 PD-1 신호전달을 억제하는 작용제이다.

[0162] PD-1 (즉, 프로그램화된 세포 사멸 단백질-1)은 면역 세포 예컨대 T 또는 B 세포의 표면 상에 분포된 단백질이며, 또한 CD279로서 공지되어 있다. 인간에서, PD-1은 염색체 2 상의 2p37.3 위치에 배치된 PDCD1 유전자에 의해 발현된다. PD-1은 2종의 리간드, 즉 PD-L1 및 PD-L2에 결합하는 것으로 공지되어 있다.

[0163] 일부 실시양태에서, 항-PD-1 작용제는 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 사용한 치료를 받고 있거나, 받은 적이 있거나 또는 받을 환자에게 투여된다. 일부 특정의 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 항-PD-1 작용제를 사용한 치료를 받고 있거나, 받은 적이 있거나 또는 받을 환자에게 투여된다.

[0164] 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 작용제는 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 사용한 치료를 받고 있거나, 받은 적이 있거나 또는 받을 환자에게 투여된다. 일부 특정의 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 항-PD-L1 작용제를 사용한 치료를 받고 있거나, 받은 적이 있거나 또는 받을 환자에게 투여된다. 일부 실시양태에서, PD-L1을 억제하는 작용제는, 예를 들어, AMP-244, MEDI-4736, MPDL328 OA, MIH1을 포함한다.

[0165] 일부 실시양태에서, 항-PD-1 작용제는 PD-1을 억제하는 작용제이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1 작용제는 PD-L1 및/또는 PD-L2를 억제하는 작용제이다. 일부 실시양태에서, PD-1 신호전달을 억제하는 항체 작용제는 모노클로날 항체 또는 그의 단편이다. 일부 실시양태에서, PD-1 신호전달을 억제하는 항체 작용제는 항-PD-1 항체 또는 그의 단편이다.

[0166] 일부 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 사용한 치료를 받고 있거나, 받은 적이 있거나 또는 받을 환자에게 투여된다. 일부 특정의 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 항-PD-1 항체를 사용한 치료를 받고 있거나, 받은 적이 있거나 또는 받을 환자에게 투여된다. 항-PD-1 항체는, 예를 들어, 니볼루맙, 펨브롤리주맙, 아테졸리주맙, 두르발루맙 및 아벨루맙을 포함한다. 펨브롤리주맙 (키트루다, 머크(Merck))은 PD-1 활성을 억제하는 항체 치료제이다.

[0167] 본 출원의 실시예에 기재된 바와 같이, 항-PD-1 항체와 조합된 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결

합 단편의 투여는 어느 하나의 치료 단독에 비해 효능을 증강시킬 수 있으며, 추가로 또한 통상적으로 공지된 부작용을 감소시킬 수 있다.

[0168] 일부 특정의 실시양태에서, 펨브롤리주맙은 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 사용한 치료를 받고 있거나, 받은 적이 있거나 또는 받을 환자에게 투여된다. 일부 특정의 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편은 펨브롤리주맙을 사용한 치료를 받고 있거나, 받은 적이 있거나 또는 받을 환자에게 투여된다.

[0169] 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 억제제 (예를 들어, 항-PD-1 작용제)는 약 0.01 mg/kg 내지 약 100 mg/kg의 양으로 환자에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 억제제 (예를 들어, 항-PD-1 작용제)는, 상한치를 하한치보다 크게 한 하한치 및 상한치에 의해 한정되는 범위 내의 양으로 환자에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 하한치는 약 0.01 mg/kg, 0.025 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.075 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 8 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 50 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg 또는 90 mg/kg일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상한치는 약 0.025 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.075 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 8 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 50 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg 또는 100 mg/kg일 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 억제제 (예를 들어, 항-PD-1 작용제)는 약 1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 2 mg/kg 내지 약 5 mg/kg, 약 2 mg/kg 내지 약 4 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 5 mg/kg 또는 약 3 mg/kg 내지 약 4 mg/kg의 양으로 환자에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 억제제 (예를 들어, 항-PD-1 작용제)는 약 1 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 4 mg/kg 또는 약 5 mg/kg의 양으로 환자에게 투여될 수 있다.

[0170] 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 억제제 및 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편의 조합을 사용한 치료는 대상체에서 $CD8^+$ T 세포의 증식, 이동, 지속성 및/또는 세포독성 활성을 증강시킬 수 있다.

[0171] 세포-기반 적용

[0172] 본 발명의 또 다른 목적은 4-1BB 인간화 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 투여함으로써 생체외에서 활성화된 T 세포를 증식시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0173] 일부 실시양태에서, 활성화된 T 세포의 생체외 증식 및/또는 단리 방법은 T 세포의 집단을 본 개시내용의 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편과 접촉시킴으로써, 활성화된 T 세포의 증식을 증가시키는 것을 포함한다.

[0174] 일부 실시양태에서, 활성화된 T 세포를 생체외에서 증식시키는 방법은 본 개시내용의 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 활성화된 T 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 샘플로부터 증식 및/또는 단리된다. PBMC는 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 수득/단리될 수 있다.

[0175] 일부 실시양태에서, 활성화된 T 세포의 생체외 증식 및/또는 단리 방법은 항-CD3 모노클로날 항체를 배양 배지에 투여하는 것을 포함한다 (예를 들어, 적어도 약 0.5 ng/ml의 농도). 일부 실시양태에서, 활성화된 T 세포의 생체외 증식 및/또는 단리 방법은 IL-2 및/또는 IL-15를 배양 배지에 투여하는 것을 포함한다 (예를 들어, 적어도 약 10 유닛/ml의 농도).

[0176] 일부 실시양태에서, 항원-특이적 활성화된 T 세포를 단리하는 방법은 (a) 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 관심 에피토프의 펩티드 및 IL-2와 함께 배지에서 배양하는 단계; (b) 관심 에피토프의 펩티드를 첨가함으로써, 배양된 세포에서의 4-1BB 발현을 유도하는 단계; (c) 배양된 세포를 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편으로 코팅된 표면과 접촉시키며, 여기서 4-1BB를 발현하는 배양된 세포는 코팅된 표면에 달라붙는 것인 단계; 및 (d) 비부착된 세포를 제거함으로써, 항원-특이적 활성화된 T 세포를 단리하는 단계를 포함한다.

[0177] 일부 실시양태에서, 활성화된 T 세포는 $CD8^+$ T 세포이다.

[0178] 일부 실시양태에서, 림프구 (예를 들어, T 세포)는 적어도 약 25℃, 바람직하게는 적어도 약 30℃, 보다 바람직하게는 약 37℃의 온도에서 배양된다.

[0179] 본 개시내용은 본원에 기재된 방법에 의해 생성되는 활성화된 T 세포 (예를 들어, $CD8^+$ T 세포)가 치료적으로 유용할 수 있다 (예를 들어, 암의 치료)는 인식을 포괄한다.

[0180] 세포-기반 요법

[0181] 본 개시내용은 자가 암 항원 (자기-종양 항원), 예를 들어, 암 세포에서는 과다발현하나, 정상 세포에서는 낮은 비로 존재하는 자가 암 항원을 인식하는 $CD8^+$ T 세포를 선택적으로 단리하고 대량 배양하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 이들 방법에 의해 단리된 세포 (예를 들어, $CD8^+$ T)가 암의 치료에 유용할 수 있다는 인식을 포괄한다.

[0182] 일부 실시양태에서, 암의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 암을 치료 및/또는 예방하는 방법은 생체외 방법 예컨대 본원에 기재된 것들에 의해 생산되는 활성화된 T 세포의 치료 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0183] 적절한 재활성화 시, 종양 항원 특이적 T 세포는 자가 종양 세포를 인식하고 제거할 수 있다. 예를 들어, 종양 항원 특이적 T 세포는 본원에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 생체외에서 생성될 수 있다. 입양 전달 시, 암 환자로부터의 특이적으로 재활성화된 T 세포는 생체내에서 자가 인간 종양을 효율적으로 거부할 수 있다.

[0184] 본 개시내용은 본 개시내용의 항-4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 투여함으로써 생체외에서 제조되는 활성화된 T 세포의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 환자의 암 및/또는 종양을 예방 및/또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0185] 일부 실시양태에서, 치료 방법에서 사용하기 위한 T 세포는 수용자 대상체와 동종 세포이다 (동일한 종이지만, 상이한 공여자로부터의 것임). 일부 실시양태에서, 치료 방법에서 사용하기 위한 T 세포는 자가 세포이다 (공여자 및 수용자가 동일함). 일부 실시양태에서, 치료 방법에서 사용하기 위한 T 세포는 동계 세포이다 (공여자 및 수용자가 상이하지만, 일란성 쌍둥이임).

[0186] 일부 실시양태에서, 세포는 먼저 그의 배양 배지로부터 세포를 수거하고, 이어서 세포를 세척하고, 투여에 적합한 매질 및 용기 시스템 ("제약상 허용되는" 담체) 중에 치료-유효량으로 농축시킴으로써 제제화된다. 적합한 주입 매질은 임의의 등장성 매질 배합물, 전형적으로는 생리 염수, 노르모졸 R (애보트(Abbott)) 또는 플라즈마-라이트 A (백스터(Baxter))일 수 있지만, 물 중 5% 덱스트로스 또는 링거 락테이트가 또한 이용될 수 있다. 주입 매질은 인간 혈청 알부민이 보충될 수 있다.

[0187] 조성물 중 세포의 치료-유효량은 적어도 10^8개, 전형적으로 10^8개 초과, 적어도 10^9개 세포이며, 일반적으로 10^{10}개 초과이다. 세포의 수는 조성물이 의도되는 궁극적인 용도에 좌우될 것이며, 그 안에 포함되는 세포의 유형도 마찬가지일 것이다. 예를 들어, 특정한 항원에 대해 특이적인 세포가 바람직하다면, 집단은 70% 초과, 일반적으로 80%, 85% 및 90-95% 초과의 이러한 세포를 함유할 것이다. 본원에 제공된 용도를 위해, 세포는 일반적으로 1 리터 이하의 부피이다. 일부 실시양태에서, 투여를 위한 세포는 500 ml 미만, 250 ml 미만 또는 100 ml 이하의 부피이다. 일부 실시양태에서, 목적하는 세포의 밀도는 전형적으로 10^6개 세포/ml 초과이며, 일반적으로 10^7개 세포/ml 초과, 일반적으로 10^8개 세포/ml 이상이다. 면역 세포의 임상적으로 적절한 수는 누적해서 10^8개 세포, 10^9개 세포, 10^{10}개 세포, 10^{11}개 세포 또는 10^{12}개 세포 이상인 다중 주입으로 배분될 수 있다.

[0188] 조성물

[0189] 인간 4-1BB 폴리펩티드의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 및 항원 결합 단편을 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 본 개시내용의 조성물 (예를 들어, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항체 단편을 전달하는 조성물)은 제공된 항-인간 4-1BB 항체 또는 항체 단편을 이러한 조정, 치료 또는 요법을 필요로 하는 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에게 전달하는데 사용하기 위한 조성물의 임의의 적합하고 유효한 양을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 방법 (예를 들어, 세포를 항-인간 4-1BB 항체 또는 항체 단편과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법)을 통해 생성되어 있는 활성화된 세포 집단 (예를 들어, 활성화된 T 세포 집단)을 포함하는 조성물이 또한 본원에 제공된다.

[0190] 본 개시내용의 조성물은 본원에 개시된 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편 및/또는 본원에 개시된 방법에 의해 수득된 세포 집단을 포함하는 제약 조성물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 완충제, 희석제, 부형제 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은, 원하는 경우에, 또한 1종 이상의 추가의 치료 활성 물질을 함유할 수 있다.

[0191] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-4-1BB 항체, 항원-결합 단편 및/또는 세포 집단은 포유동물 (예를 들어,

인간)에 대한 투여에 적합하다. 본원에 제공된 제약 조성물의 설명이 주로 인간에 대한 윤리적 투여에 적합한 제약 조성물에 관한 것이지만, 이러한 조성물은 일반적으로 모든 종류의 동물에 대한 투여에 적합하다는 것이 통상의 기술자에 의해 이해될 것이다. 조성물을 다양한 동물에 대한 투여에 적합하게 하기 위한, 인간에 대한 투여에 적합한 제약 조성물의 변형은 잘 이해되고 있으며, 통상의 숙련된 수의과 약리학자는, 필요하다면, 단지 통상의 실험으로 이러한 변형을 설계 및/또는 수행할 수 있다.

[0192] 일부 실시양태에서, 조성물은 비경구 투여를 위해 제제화된다. 예를 들어, 본원에 제공된 제약 조성물은 멸균성의 주사가능한 형태 (예를 들어, 피하 주사 또는 정맥내 주입에 적합한 형태)로 제공될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 주사에 적합한 액체 투여 형태로 제공된다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은, 임의로 진공 하의 분말 (예를 들어, 동결건조 및/또는 멸균된 것)로서 제공되며, 이는 주사 전에 수성 희석제 (예를 들어, 물, 완충제, 염 용액 등)로 재구성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 물, 염화나트륨 용액, 아세트산나트륨 용액, 벤질 알콜 용액, 포스페이트 완충 염수 등으로 희석 및/또는 재구성된다. 일부 실시양태에서, 분말은 수성 희석제와 서서히 혼합되어야 한다 (예를 들어, 진탕되지 않음).

[0193] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-4-1BB 항체, 항원-결합 단편 및/또는 세포 집단은 제약상 허용되는 비경구 비히클과 함께 제제화된다. 이러한 비히클의 예는 물, 염수, 링거액, 덱스트로스 용액 및 1-10% 인간 혈청 알부민이다. 리포솜 및 비수성 비히클 예컨대 고정 오일이 또한 사용될 수 있다. 비히클 또는 동결건조된 분말은 등장성을 유지하는 첨가제 (예를 들어, 염화나트륨, 만니톨) 및 화학적 안정성을 유지하는 첨가제 (예를 들어, 완충제 및 보존제)를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제제는 공지되어 있거나 또는 적합한 기술에 의해 멸균된다.

[0194] 본원에 기재된 제약 조성물의 제제는 약리학 기술분야에 공지되어 있거나 또는 이후 개발될 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 제조 방법은 활성 성분을 희석제 또는 또 다른 부형제 및/또는 1종 이상의 다른 보조 성분과 회합되도록 하고, 이어서, 필요하고/거나 바람직한 경우에, 생성물을 목적하는 단일- 또는 다중-용량 단위로 성형 및/또는 패키징하는 단계를 포함한다.

[0195] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-4-1BB 항체, 항원-결합 단편 및/또는 세포 집단을 포함하는 제약 조성물은 저장 또는 투여를 위한 용기, 예를 들어, 바이알, 시린지 (예를 들어, IV 시린지) 또는 백 (예를 들어, IV 백)에 포함될 수 있다. 본 개시내용에 따른 제약 조성물은 벌크로, 단일 단위 용량으로, 및/또는 복수의 단일 단위 용량으로 제조, 패키징 및/또는 판매될 수 있다. 본원에 사용된 "단위 용량"은 활성 성분의 미리 결정된 양을 포함하는 제약 조성물의 분리량이다. 활성 성분의 양은 일반적으로 대상체에게 투여될 활성 성분의 투여량 및/또는 이러한 투여량의 편리한 분획량 예컨대, 예를 들어, 이러한 투여량의 1/2 또는 1/3과 같다.

[0196] 본 개시내용에 따른 제약 조성물 중 활성 성분, 제약상 허용되는 부형제 및/또는 임의의 추가의 성분의 상대량은 치료되는 대상체의 정체, 사이즈 및/또는 상태에 따라, 또한 추가로 조성물이 투여될 경로에 따라 달라질 것이다. 하기 실시예는, 부분적으로, 예시적인 항-인간 4-1BB 항체를 설치류에게 투약하는 것을 기재한다. 동물 시스템에서 투약을 규모조정하는 방식의 표준 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [J Basic Clin Pharm. March 2016-May 2016; 7(2): 27-31]을 참조하며, 이 문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 예로서, 조성물은 0.1% 내지 100% (w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있다.

[0197] 일부 실시양태에서, 조성물은 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 0.01 mg/kg 내지 100 mg/kg의 용량으로 포함하거나 또는 그를 전달한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을, 상한치를 하한치보다 크게 한 하한치 및 상한치에 의해 한정되는 범위 내의 양을 갖는 용량으로 포함하거나 또는 그를 전달한다. 일부 실시양태에서, 하한치는 약 0.01 mg/kg, 0.025 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.075 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 8 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 50 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg 또는 90 mg/kg일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상한치는 약 0.025 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.075 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 8 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 50 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg 또는 100 mg/kg일 수 있다.

[0198] 제약 조성물은 목적하는 특정한 투여 형태에 적합한 제약상 허용되는 부형제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 이는 본원에 사용된 바와 같이 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 희석제 또는 다른 액체 비히클, 분산 또는 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장화제, 증점제 또는 유화제, 보존제, 고체 결합제, 윤활제 등을 포함한다. 문헌 [Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams &

Wilkins, Baltimore, MD, 2006)]에 제약 조성물을 제제화하는데 사용되는 다양한 부형제 및 그의 제조를 위한 공지된 기술이 개시되어 있다. 임의의 통상적인 부형제 매질이, 예컨대 임의의 바람직하지 않은 생물학적 효과를 발생시키거나 또는 그렇지 않으면 제약 조성물의 임의의 다른 구성요소(들)와 유해한 방식으로 상호작용함으로써 물질 또는 그의 유도체와 비상용성인 경우를 제외하고는, 그의 사용이 본 개시내용의 범주 내에 있는 것으로 고려된다.

[0199] 일부 실시양태에서, 제약상 허용되는 부형제는 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 순수하다. 일부 실시양태에서, 부형제는 인간에서의 용도 및 수의학적 용도에 대해 승인된 것이다. 일부 실시양태에서, 부형제는 미국 식품 의약품국에 의해 승인된 것이다. 일부 실시양태에서, 부형제는 제약 등급이다. 일부 실시양태에서, 부형제는 미국 약전 (USP), 유럽 약전 (EP), 영국 약전 및/또는 국제 약전의 표준을 충족시킨다.

[0200] 제약 조성물의 제조에서 사용되는 제약상 허용되는 부형제는 불활성 희석제, 분산제 및/또는 과립화제, 표면 활성제 및/또는 유화제, 붕해제, 결합제, 보존제, 완충제, 윤활제 및/또는 오일을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 부형제는 제약 제제에 임의로 포함될 수 있다. 부형제 예컨대 코코아 버터 및 좌제 왁스, 착색제, 코팅제, 감미제, 향미제 및/또는 퍼퓸제가 제제화 기술자의 판단에 따라 조성물에 존재할 수 있다.

[0201] 일부 실시양태에서, 제공된 제약 조성물은 1종 이상의 제약상 허용되는 부형제 (예를 들어, 보존제, 불활성 희석제, 분산제, 표면 활성제 및/또는 유화제, 완충제 등)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 1종 이상의 보존제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 보존제를 포함하지 않는다.

[0202] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 조성물은 안정하게 제제화된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항원-결합 단편의 안정한 제제는 염수 또는 선택된 염과 함께 포스페이트 완충제, 뿐만 아니라 제약 또는 수의학적 용도에 적합한 보존된 용액 및 보존제를 함유하는 제제 뿐만 아니라 다회-사용의 보존된 제제를 포함할 수 있다. 보존된 제제는 적어도 1종의 공지된 보존제 또는 적어도 1종의 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알콜, 아질산페닐제2수은, 페녹시에탄올, 포름알데히드, 클로로부탄올, 염화마그네슘 (예를 들어, 6수화물), 알킬파라벤 (메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 나트륨 데히드로아세테이트 및 티메로살 또는 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 임의로 선택된 보존제를 수성 희석제 중에 함유한다. 임의의 적합한 농축물 또는 혼합물이 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 예컨대 0.001-5%, 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값, 예컨대, 비제한적으로 0.001, 0.003, 0.005, 0.009, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.3, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값으로 사용될 수 있다. 비제한적 예는 보존제가 없는 것, 0.1-2% m-크레졸 (예를 들어, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.9, 1.0%), 0.1-3% 벤질 알콜 (예를 들어, 0.5, 0.9, 1.1, 1.5, 1.9, 2.0, 2.5%), 0.001-0.5% 티메로살 (예를 들어, 0.005, 0.01), 0.001-2.0% 페놀 (예를 들어, 0.05, 0.25, 0.28, 0.5, 0.9, 1.0%), 0.0005-1.0% 알킬파라벤(들) (예를 들어, 0.00075, 0.0009, 0.001, 0.002, 0.005, 0.0075, 0.009, 0.01, 0.02, 0.05, 0.075, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.75, 0.9, 1.0%) 등을 포함한다.

[0203] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 냉장 및/또는 냉동될 수 있는 형태로 제공된다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 냉장 및/또는 냉동될 수 없는 형태로 제공된다. 일부 실시양태에서, 재구성된 용액 및/또는 액체 투여 형태는 재구성 후 특정 시간 기간 동안 (예를 들어, 2시간, 12시간, 24시간, 2일, 5일, 7일, 10일, 2주, 1개월, 2개월 또는 그 초과) 저장될 수 있다. 일부 실시양태에서, 명시된 시간보다 더 긴 기간 동안의 항체 조성물의 저장은 항체 분해를 초래한다.

[0204] 액체 투여 형태 및/또는 재구성된 용액은 투여 전에 미립자 물질 및/또는 변색을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 용액은 변색되거나 또는 혼탁해진 경우 및/또는 여과 후에 미립자 물질이 남아있는 경우에는 사용되지 않아야 한다.

[0205] 제약 작용제의 제제화 및/또는 제조에 있어서의 일반적 고려사항은, 예를 들어, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005]에서 찾아볼 수 있다.

[0206] 키트

[0207] 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 적어도 1종의 항-인간 4-1BB 항체 또는 항체 단편이 충전된 1종 이상의 용기를 포함하는 제약 팩 또는 키트를 추가로 제공한다. 키트는, 예를 들어, 치료 방법, 진단 방법, 세포 증식

및/또는 단리 방법 등을 포함한 임의의 적용가능한 방법에서 사용될 수 있다. 임의로, 이러한 용기(들)에는 제약 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태의 안내문이 동반될 수 있으며, 이러한 안내문에는 (a) 인간 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매에 대한 기관의 승인, (b) 사용 지침서, 또는 이들 둘 다가 반영된다.

[0208] 일부 실시양태에서, 키트는 검출 (예를 들어, 항-인간 4-1BB 항체 또는 항체 단편의 검출)을 위한 1종 이상의 시약을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 항-인간 4-1BB 항체 또는 항체 단편을 검출가능한 형태로 (예를 들어, 검출가능한 모이어티 또는 개체와 공유적으로 회합됨) 포함할 수 있다.

[0209] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 바와 같은 항-인간 4-1BB 항체 또는 항체 단편은 대상체의 치료를 위해 사용되는 키트에 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 바와 같은 항-인간 4-1BB 항체 또는 항체 단편은 T 세포 (예를 들어, $CD8^+$ T 세포)의 증식 및/또는 단리를 위해 사용되는 키트에 포함될 수 있다.

[0210] 본 출원 전반에 걸쳐 인용된, 모든 인용된 참고문헌 (참조 문헌, 허여된 특허, 공개 특허 출원 및 동시-계류 중인 특허 출원 포함)의 내용은 명백히 본원에 참조로 포함된다.

[0211] 본 발명의 다른 특색은 예시적 실시양태의 하기 설명 동안 명백해질 것이다. 그러나, 하기 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위해 제공된 것이며, 본 발명의 범주는 하기 실시예로 제한되지 않는다.

[0212] 실시예

[0213] 본 개시내용은, 적어도 부분적으로, 참조 인간화 항-인간 4-1BB 항체, 즉 94G1에서 발견되지 않는 1종 이상의 구조적 특색을 함유하는, 개선된 특성을 갖는 인간화 항-인간 4-1BB 항체 및 그의 단편을 제공한다. 94G1은 뮤린 항-인간 4-1BB 항체 BBK-4 항체의 인간화에 의해 생성되었다. 항원-인식 부위 (CDR 영역)는 CDR 루프 배정 (IMGT: 르프랑(Lefranc), 1997) 및 3-D 모델 (Swiss-Pdb Viewer (www.expasy.org))을 사용하여 결정되었다. 경쇄의 아미노산 서열 상의 4개 부위 및 중쇄의 6개 부위를 포함한 총 10개 부위에서 다양성을 갖는 파지 디스플레이 라이브러리를 준비하였다. 패닝 후, 1,000개의 클론 중에서 대략 14개의 인간화 항체 클론을 선택하고 (총 6개의 인간화 scFv), 선택된 클론 중에, 94G1을 수득하였다 (Son et al. J. Immunol. Methods (2004) 286: 187-201). 94G1을 포함한, 이들 인간화 항체는 BBK-4의 1/10 미만의 인간 4-1BB 항원에 대한 친화도를 갖지만, 시험관내에서 활성이었다. 본 개시내용은 94G1의 구조적 변이체가 개선된 특성을 가질 수 있다는 인식을 포괄하였다. 변이체 인간화 항-인간 4-1BB 항체 및 그의 단편의 생성 및 특징화가 하기 실시예에서 더욱 상세히 기재된다.

[0214] 실시예 1 - 인간화 항-인간 4-1BB 항체의 제조

[0215] 본 실시예는 참조 94G1 항체보다 개선된 친화도를 갖는 예시적인 항-인간 4-1BB 항체의 생산을 기재한다. 94G1은 문헌 [Son et al. J. Immunol. Methods (2004) 286: 187-201]에 기재된 바와 같이 뮤린 항-인간 4-1BB 항체 (BBK 4)를 인간화함으로써 생성되었으며, 이 문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 활성화된 T 세포 (예를 들어, 활성화된 T 세포주)로부터 특이적으로 단리되며, 비자극된 T 세포로부터는 확인되지 않았던 H4-1BB 항원 (수탁 번호: KCTC 0952BP)이 또한 본원에서 사용된다. 예를 들어, H4-1BB 항원은 포르볼 미리스테이트 아세테이트 (PMA), 이오노마이신, 콘카나발린 A 또는 항 CD3i에 의해 성숙된 T 세포로부터 단리될 수 있다. 이러한 H4-1BB 항원은 1.4 kb의 크기 및 마우스 4-1BB와 60%의 상동성을 갖는다 (문헌 [Garni-Wagner et al., Cellular Immunology (1996) 169: 91-98], 이 문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨). 본 실시예에서, 94G1은 경쇄 및 중쇄 벡터로 분할되었으며, 이들은 각각 개선된 인간화 항체를 생성하도록 최적화되었다.

[0216] 본 개시내용은 개선된 인간화 항-인간 4-1BB 항체 또는 그의 단편을 생성하기 위한 적합한 방법이 단일의, 단계적 아미노산 치환 및/또는 그의 조합을 통한 것이라는 인식을 포괄한다. 본 개시내용은 94G1 항체에서 발견되지 않는 1종 이상의 구조적 특색 (예를 들어, 아미노산 치환)을 갖는 인간화 항-인간 4-1BB 항체 및 그의 단편의 다양한 구조적 변이체를 제공한다. 본 개시내용은 구조적 특색이 1종 이상의 항체 특성 (예를 들어, 증가된 항원 친화도)에서의 단계적 개선을 위해 조합될 수 있다는 인식을 추가로 포괄한다.

[0217] 먼저, 94G1 참조 항체에 비해 증가된 친화도를 갖는 인간화 항-인간 4-1BB 항체를 중쇄보다는, 경쇄의 CDR 영역을 변화시킴으로써 수득하였다. 이러한 경쇄 구조적 변이체를 고정시키고, 예를 들어, 94G1의 CDR 영역에서의 돌연변이를 갖는 인간화 항-인간 4-1BB 항체 중쇄 구조적 변이체와 조합하였다. 높은 친화도 및/또는 다른 개선된 특징을 갖는 인간화 항-인간 4-1BB 항체를 생성하기 위해 추가의 구조적 특색을 통합하였다.

[0218] 1.1 벡터의 구축

[0219] 94G1 경쇄 및 94G1 중쇄를 각각 갖는 벡터를, 이. 콜라이에서 인간화 항체의 중쇄 및 경쇄를 개선시키기 위해 Fab 유형으로 발현되도록 pComb3H-HA를 변화시킴으로써 구축하였다 (J. Immunol Methods (2008) 329(1-2):176-83; Virology (2004) 318: 598). 구체적으로, AP2 태그 (서열식별번호: 42 - NANNPDWDFNP)를 플래그 태그 (서열식별번호: 43 - DYKDDDDK)로 변화시킴으로써 설계된 벡터에 94G1 경쇄를 삽입하였고, 플래그 태그는 그의 하류에 배치되도록 설계되며, NCBI 진뱅크의 공지된 데이터로부터 입수된 인간 중쇄 서열 (수탁 번호 AB019438)이 중쇄 위치에서 불변 도메인으로서 배치되었다. 추가로, 94G1 경쇄 서열이 벡터 내로 클로닝된 후, 이를 형질전환에 의해 이.콜라이 (예를 들어, TG1) (F' [traD36 proAB+lacIqlacZΔM15]supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5, (rK-mK-)로 전달하고, 이어서 pCOM-Fab-94G1-L이라 칭해지는 형질전환된 벡터를 선택하고, 이를 경쇄의 친화도 성숙을 유도하기 위한 백본으로서 사용하였다 (표 1). 상기 기재된 방법을 94G1 중쇄에 대해서도 유사하게 수행하고, 선택된 벡터를 pCOM-Fab-94G1-H라 칭하였다. 개선된 경쇄, 즉 94/w를 pCOM-Fab-94G1의 경쇄로서 설계하며, 이는 개선된 친화도를 갖는 중쇄 변이체의 생산을 위한 백본으로서의 역할을 하였다.

[0220] 표 1 - 94G1 및 94/w LCDR 아미노산 서열

SEQ ID NO.	아미노산 서열	CDR
SEQ ID NO: 1	QTISDY	LCDR 1
SEQ ID NO: 2	YAS	LCDR 2
SEQ ID NO: 3	QDGHSFPPT	LCDR 3
SEQ ID NO: 4	QDGHSWPPT	LCDR 3.6 변이체 94/w

[0221]

[0222] 1.2 인간화 항-인간 4-1BB 항체 경쇄의 친화도 성숙

[0223] 개선된 결합 친화도를 갖는 경쇄 변이체의 인간화 항-인간 4-1BB 항체의 개발이 본원에 기재되어 있다. 상기 기재된 pCOM-Fab-94G1-L 벡터와 관련하여 94G1 경쇄의 LCDR3 (서열식별번호: 3)을 하기와 같이 변화시킴으로써 높은 친화도를 갖는 항체를 수득하였다. 경쇄를 코딩하는 다양한 DNA 서열을, 94G1 경쇄의 LCDR3 부분을 구성하는 9개 아미노산 서열식별번호: 3의 각 아미노산 위치에 19종의 상이한 아미노산을 삽입하도록 설계된 프라이머를 사용하여 [NNS (N: A, T, C, G; S: C, G)를 사용함] PCR에 의해 증폭시켰다. 증폭된 생성물을 벡터의 경쇄 위치에 라이게이션하고, 이어서 이.콜라이 TG1 내로 형질전환시켰다. LCDR3의 경쇄 구조 변이체를 갖는 모든 클론은 상이한 형태로 치환되었고, 수집하여 9종의 위치 믹스를 제조하였다. 각 아미노산 위치가 상이한 아미노산으로 치환되었는지의 여부를 사정하기 위해, 각각의 위치에서 변화된 2개의 클론을 무작위로 선택하여 ABI-3730xl 서열분석기를 사용하여 서열분석함으로써 분석하였고, 이는 각각의 위치에서의 아미노산 잔기가 다양한 위치에서 치환되었다는 것을 제시하였다.

[0224] 상이한 LCDR3 위치에서의 돌연변이를 갖는 94G1 Fab 변이체가 증가된 항체 친화도를 갖는지의 여부를 확인하기 위해, 이.콜라이 TG1에 IPTG를 첨가함으로써 (1mM의 최종 농도로) 각 위치 믹스를 발현시키고, 이어서 상청액에 존재하는 Fab 항체를 ELISA에 적용하였다. 구체적으로, 각 위치 믹스를 배양물이 600 nm에서 0.8 이상의 흡광도를 가질 때까지 37℃ 인큐베이터에서 2YT 배지 중에 진탕시키면서 배양하고, 이어서 IPTG와 함께 (예를 들어, 1 mM의 최종 농도에서) 30℃에서 밤새 배양하였다. 다음 날에 ELISA를 4℃에서 10분 동안 12,000 rpm으로 원심분리함으로써 수득된 상청액에 대해 수행하였다. 4-1BB Fab에 대한 각 클론의 결합 활성을 각각의 돌연변이체 클론에 대한 발현 수준으로 나누어 다양한 94G1 LCDR3 변이체 Fab에 대한 결합 친화도를 결정하였다. 돌연변이 위치 6의 LCDR3을 갖는 94G1 LCDR3 변이체 (LCDR3.6)가 가장 높은 결합 친화도를 제시하였다.

[0225] 후속적으로, LCDR3.6 위치에서의 94G1의 다양한 돌연변이가 항체 친화도에 어떻게 영향을 미치는지를 결정하기 위해, 25종의 모노클로날 항체를 pCOM-Fab94G1-LCDR3.6 위치 믹스로부터 단리하고, 이.콜라이 (예를 들어, TG1)에 IPTG를 첨가함으로써 (예를 들어, 1 mM의 최종 농도에서) 발현시키고, 배양하고, 상청액에 존재하는 Fab 항체에 대해 ELISA를 수행하였다. 각 클론의 4-1BB Fab 결합 활성을 각각에 대한 발현 수준으로 나누어 다양한 94G1 LCDR3.6 클론에 대한 결합 친화도를 결정하였다.

[0226] LCDR3.6 위치에서의 페닐알라닌이 트립토판으로 치환된 94G1 LCDR3.6 변이체가 가장 높은 결합 친화도를 나타냈다. 개선된 94G1 경쇄 상의 pCOM-Fab94G1-L의 불변 중쇄를 백본 94G1의 중쇄로 치환함으로써 제조된 Fab 항체를 94/w라 칭하였다. 따라서, 94/w 변이체는, LCDR3의 6번째 아미노산이 트립토판 (W)으로 치환되어 있는 개선

된 94G1 경쇄 (QDGHSWPPT - 서열식별번호: 4) 및 94G1 중쇄를 포함한다. 94/w Fab의 이.콜라이에서의 IPTG-유도된 발현 및 ELISA를 사용하여 상기 기재된 바와 같이 결합 친화도를 결정하였다. 이 방법을 사용하여, 94/w Fab 항체는 94G1 (Fab 항체)보다 3.5배 더 높은 결합 활성을 갖는 것으로 결정되었다 (데이터는 제시되지 않음).

[0227] 1.3 인간화 항-인간 4-1BB 항체 중쇄 CDR의 친화도 성숙

[0228] 개선된 결합 친화도를 갖는 중쇄 구조적 변이체의 인간화 항-인간 4-1BB 항체의 개발이 본원에 기재되어 있다. 추가의 개선된 항-인간 4-1BB 항체를 달성하기 위해, 상기 기재된 바와 같은 94/w 경쇄를 사용하고, 94G1 중쇄를 친화도 성숙시켰다. 참조 94G1 항체 중쇄의 HCDR 아미노산 서열이 하기 표 2에 제공된다.

[0229] 표 2 - 94G1 및 94K HCDR 아미노산 서열

SEQ ID NO.	아미노산 서열	CDR
SEQ ID NO: 5	GYTFSSYW	HCDR 1
SEQ ID NO: 6	INPGNGHT	HCDR 2
SEQ ID NO: 7	ARSFTTARAFAY	HCDR 3
SEQ ID NO: 8	ARSFKTARAFAY	HCDR 3.5 변이체 94K

[0230]

[0231] 출발 서열로서 94/w를 사용하는 중쇄의 개선은 상기 94G1 경쇄에 대해 기재된 바와 같은 유사한 방법에 의해 수행되었다. 특히, 94G1 중쇄를 개선시키기 위해, 아미노산 잔기를 HDR2 및/또는 HCDR3의 각각의 아미노산 위치에서 다양한 아미노산으로 치환하였다. 중쇄의 제3 CDR (HCDR3, 서열식별번호: 7)의 경우에, 상이한 아미노산에 의해 94/w HCDR3의 아미노산 잔기를 무작위 치환하여 클론을 생산하고, 수집하여 12종의 위치 믹스를 제조하였다. HCDR3의 길이를 증가시킨 돌연변이체 클론을 또한 제조하였다. HCDR3의 5번째 아미노산 잔기가 상이한 아미노산으로 치환된 경우에, 친화도 증가가 관찰되었다. 후속적으로, HCDR3.5 위치에서의 다양한 돌연변이가 94/w 항체의 친화도에 어떻게 영향을 미치는지를 결정하기 위해, 94/w 항체의 HCDR3.5 위치가 무작위로 치환된 위치 믹스로부터 19종의 모노클로날 항체를 단리하였다. 이.콜라이에서 IPTG를 첨가함으로써 (예를 들어, 1 mM의 농도로) HCDR3.5 변이체 Fab를 발현시키고, 상청액에 존재하는 Fab 항체를 사용하여 ELISA를 수행하였다. 서열분석을 통해, HCDR3.5 위치 (5번째 위치)에서의 트레오닌이 리신으로 치환된 경우에 (서열식별번호: 8 - ARSFKTARAFAY), 가장 높은 친화도가 제시되었다는 것을 확인하였고, 생성된 생성물을 94K/w라 칭하였다.

[0232] 중쇄의 제2 CDR (HCDR2)의 경우에, ELISA를 위해 위치 믹스를 94G1 HCDR2 (서열식별번호: 6)의 9개 아미노산 각각의 무작위 치환에 의해 제조하였다. ELISA 결과는 2번째, 5번째 및 6번째 위치에서의 아미노산 잔기가 변화한 경우에, 친화도가 증가하였다는 것을 제시하였다. 각각의 94/w HCDR2.2, HCDR2.5 및 HCDR2.6 위치 믹스로부터, 각각 22, 19 및 36종의 모노클로날 항체를 단리하였고, 4-1BB에 대한 각 클론의 결합 활성을 Fab 발현 수준에 따라 분석하였다. HCDR2.5의 경우에, ELISA 값은 아스파라긴이 발린 (V), 글리신 (G) 또는 프롤린 (P)으로 치환된 경우에 상대적으로 더 높았다. 추가로, 항체 중쇄에 대한 서열분석 데이터에 따르면, HCDR2 (서열식별번호: 6)의 5번째 아미노산, 즉 아스파라긴 (N)에서의 탈아미노화의 위험이 있고, 또한 이 잔기에서 글루타민 (Q), 글루탐산 (E) 및 세린 (S) 각각으로 치환된 변이체 HCDR2 서열을 제조하였다.

[0233] 상기 기재된 바와 같이 제조된 중쇄의 HCDR3 및/또는 HDR2에서의 돌연변이를 갖는 94G1 구조적 변이체의 DNA를 3-염기 서열 NNS를 사용하여 PCR에 의해 증폭시키고, 94/w 경쇄의 불변 도메인을 갖는 벡터의 중쇄 위치에 라이게이션하고, 이어서 상기 기재된 바와 같은 경쇄의 개선에 사용된 방법에 의해 이. 콜라이 TG1 내로 형질전환시켰다.

[0234] 1.4 인간화 항-인간 4-1BB 항체 중쇄 프레임워크 영역의 최적화

[0235] 최적화된 프레임워크 서열을 갖는 중쇄 변이체를 또한 생산하였다. 예를 들어, 중쇄 프레임워크 1 (FR1) 영역을 생산하며, 여기서 5번째 아미노산, 즉 글루타민 (Q)이 발린 (V)으로 치환되도록 중쇄 FR1 (서열식별번호: 16)을 변형시켰다. 예시적인 FR1 영역이 하기 표 3에 제공된다.

[0236] 표 3 - 94G1 중쇄 FR1 및 그의 변이

SEQ ID NO.	아미노산 서열	
SEQ ID NO: 16	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKAS	94G1 FR1
SEQ ID NO: 17	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKAS	FR1 Gln 5 Val

[0237]

[0238] 또한, 프레임워크 3 (FR3) 영역을 생산하며, 여기서 뮤린 서열에서의 10번째 아미노산, 즉 알라닌 (A) 및/또는 33번째 아미노산, 즉 세린 (S)이 각각 발린 (V) 및 트레오닌 (T)으로 치환되도록 중쇄 FR3 (서열식별번호: 18)을 변형시켰다. 예시적인 FR3 영역이 하기 표 4에 제공된다.

[0239] 표 4 - 94G1 중쇄 FR3 및 그의 변이

SEQ ID NO.	아미노산 서열	
SEQ ID NO: 18	NYNEKFKSRATMTRDTSTSTAYMELSSLRSED SAVYYC	94G1 FR3
SEQ ID NO: 19	NYNEKFKSRVTMTRDTSTSTAYMELSSLRSED SAVYYC	FR3 Ala 10 Val
SEQ ID NO: 20	NYNEKFKSRVTMTRDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYC	FR3 Ala 10 Val; FR3 Ser 33 Thr

[0240]

[0241] 1.5 인간화 항-인간 4-1BB 가변 영역 및 전장 항체의 제조

[0242] 상기 기재된 중쇄 및 경쇄 CDR 및 프레임워크 영역의 다양한 조합을 포함하는 항-인간 4-1BB 항체 가변 영역을 생산하였다. 예를 들어, 중쇄의 CDR3에서의 5번째 아미노산, 즉 트레오닌이 리신 (K)으로 치환되고, 중쇄 FR3의 10번째 아미노산, 즉 알라닌 및 중쇄 FR3의 33번째 아미노산, 즉 세린이 각각 발린 (V) 및 트레오닌 (T)으로 치환되어, 각각 서열식별번호: 30 및 서열식별번호: 34이거나 또는 그를 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 생산함으로써 Fab-유형 94KVT/w 항체를 생산하였다. 추가로, 94KVT 중쇄 변이체를 생산하며, 여기서 HCDR2 (서열식별번호: 6)의 5번째 아미노산, 즉 아스파라긴 (N)은 글루타민 (Q), 글루탐산 (E) 또는 세린 (S)으로 치환되었다. 예시적인 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 서열이 하기 표 5에 제공된다 (CDR 서열은 밑줄로 나타냄).

[0243] 표 5 - 예시적인 인간화 항-인간 4-1BB 항체 가변 도메인

항체	경쇄 가변 도메인	중쇄 가변 도메인
94G1	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASQTISDYLHWYQQKPDQ APKLLIKYASQSISGIPSRFSGS GSGTDFTFTISSLEAEDAATYY CQDGHSFPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 9)	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLS CKASGYTFSSYWMHWVRQAP GQGLEWIGEINPGNGHTNYNEK FKSRATMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDSAVYYCARSFTTARAFA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 11)
94w	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASQTISDYLHWYQQKPDQ APKLLIKYASQSISGIPSRFSGS GSGTDFTFTISSLEAEDAATYY CQDGHSWPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 10)	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLS CKASGYTFSSYWMHWVRQAP GQGLEWIGEINPGNGHTNYNEK FKSRATMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDSAVYYCARSFTTARAFA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 11)
94K/w	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASQTISDYLHWYQQKPDQ APKLLIKYASQSISGIPSRFSGS GSGTDFTFTISSLEAEDAATYY CQDGHSWPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 10)	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLS CKASGYTFSSYWMHWVRQAP GQGLEWIGEINPGNGHTNYNEK FKSRATMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDSAVYYCARSFKTARAFA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 12)
94KV/w	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASQTISDYLHWYQQKPDQ APKLLIKYASQSISGIPSRFSGS GSGTDFTFTISSLEAEDAATYY CQDGHSWPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 10)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLS CKASGYTFSSYWMHWVRQAP GQGLEWIGEINPGNGHTNYNEK FKSRVTMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDSAVYYCARSFKTARAFA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 13)

[0244]

94KVT/w, EU101	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT CRASQTISDYLHWYQQKPDQ APKLLIKYASQSISGIPSRFSGS GSGTDFTFTISSLEAEDAATYY CQDGHSWPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 10)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLS CKASGYTFSSYWMHWVRQAP GQGLEWIGEINPGNGHTNYNEK FKSRVTMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARSFKTARAFA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14)

[0245]

[0246] 전장 항-인간 4-1BB 항체 (전체 Ig 유형)로의 전환을 위해, Fc 도메인을 각각의 Fab에 연결하였다. 예를 들어, HCDR3.5에서의 트레오닌이 리신으로 치환된 중쇄 및 LCDR3의 6번째 아미노산이 트립토판 (W)으로 치환된 94/w

변이체의 경쇄로 구성된 94K/w Fab, 및 CH2 및 CH3 도메인으로부터 연장된 각각의 영역, 및 인간 IgG1의 서열을 오버랩 PCR에 의해 증폭시키고 스플라이스 PCR에 적용하여 전체 IgG DNA를 생산하고, 이어서 생성된 DNA를 포유동물 발현 벡터에 클로닝하였다. 본원에 기재된 다른 인간화 항-인간 4-1BB 항체의 전장 항체를 유사한 방식으로 생산하였다. 예시적인 이뮤노글로불린 불변 영역 서열이 하기 표 6에 제공된다.

[0247] 표 6 - 예시적인 이뮤노글로불린 불변 도메인

SEQ ID NO.	아미노산 서열	설명
SEQ ID NO: 21	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	κ 불변 도메인
SEQ ID NO: 22	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	IgG1
SEQ ID NO: 23	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	IgG1 변이체 (L234; L235; K322)

[0248]

[0249] 본원에 사용된 바와 같이 전장 94KVT/w 항체는 IgG1 서열, 예컨대 서열식별번호: 22의 서열을 포함한다. 추가적으로, 상기 기재된 94KVT/w 가변 도메인 (서열식별번호: 10 및 14, 각각 경쇄 및 중쇄 가변 도메인)을, 3종의 돌연변이: L234, L235 및 K322를 포함하는 변이체 IgG1 불변 도메인 (서열식별번호: 23)과 함께 포함하는 전장 항체를 생산하며, 이를 본원에서는 EU101이라 지칭한다. 이와 같이, 실시예는 항원 결합 친화도를 잠재적으로 증강시키도록 조작되어 있는 다수의 예시적인 인간화 항-인간 4-1BB 항체 및 항체 단편을 제공한다. 이들 예시적인 항체 및 단편은 하기 실시예에서 특징화된다.

[0250] 실시예 2 - 인간화 항-인간 4-1BB 항체의 결합의 특징화

[0251] 2.1 항-인간 4-1BB 항체의 결합 에피토프의 결정

[0252] 본 개시내용은 본원에 제공된 인간화 항-인간 4-1BB 항체가 4-1BB 공동-자극에 유용할 수 있다는 인식을 포괄한다. 본 개시내용의 항체의 치료 용도는 항암 면역 및/또는 항바이러스 면역을 촉진하는 것을 포함할 수 있다. 그러나, 임상 용도에 있어서, 인간 4-1BB의 어느 부분이 항-인간화 4-1BB 항체에 의해 인식되고/거나 그와 반응하는지를 확인하는 것이 중요하다 (즉, 결합 에피토프). 4-1BB 분자의 상이한 에피토프를 인식하는 4-1BB 항체가 확인된 바 있으며, 이들 항체는 상이한 임상 효과를 갖는 것으로 제시될 수 있었다. (예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Kwon et al. Eur. J. Immunogenetics (2002) 29: 449-452] 참조). 에피토프 맵핑은 항체-항원 인식의 분자 결정기를 확인하는 방법을 포괄한다. 본 실시예는 상기 실시예 1에서 조작된 바와 같은 예시적인 항-인간 4-1BB 항체의 에피토프 맵핑을 기재한다. 구체적으로, 본 실시예는 94KVT/w 가변 도메인을 갖는 인간화 항-인간 4-1BB 항체, 즉 EU101의 결합 에피토프를 사정한다.

[0253] 인간화 4-1BB 항체의 에피토프를 조사하기 위한 인간 4-1BB 항원은 본 출원의 적어도 일부 발명자들에 의해 생성된 인간 말초 혈액 림프구로부터 제작된 cDNA 라이브러리로부터 유래된다 (예를 들어, 문헌 [Kwon et al. Cellular Immunology (1996) 169: 91-98]; [Immunol. Lett. (1995) 45: 67-73]; 및 한국 특허 번호 10-0500286 참조, 이들 문헌은 각각 본원에 참조로 포함됨). 4-1BB cDNA의 수득된 인간 상동체 (이하, H4-1BB라 지칭됨)의 세포외 도메인 (ECD)을 코딩하는 cDNA를 선택하고, GST와 융합시키고, 이어서 발현을 위한 벡터 (pGEX-6T) 내로 삽입하였다. 본원에서 사용된 바와 같은 GST-4-1BB 융합 폴리펩티드를 생산하는 세포주는 한국 특허 번호 10-0500286의 개시내용의 일부로서, 수탁 번호: KCTC 0952BP 하에 기탁되었다. 인간 4-1BB의 전장 서열이 하기에 서열식별번호: 44로서 제공된다. 인간 4-1BB의 세포외 도메인은 전장 H4-1BB 서열의 아미노산 1 내지 167에 상응한다.

[0254] 서열식별번호: 44 - 전장 인간 4-1BB 서열

[0255] MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMC
EQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLF
FLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[0256] 본 개시내용의 인간화 항-인간 4-1BB 항체에 의해 인식되는 4-1BB의 에피토프를 결정하기 위해, 다양한 크기의 4-1BB 세포외 도메인의 단편을 갖는 구축물 (예를 들어, R1, R2, R3)을 생성하고, GST에 융합시키고, 복제하였다. 본 실시예에서 사용된 바와 같은 GST-4-1BB 폴리펩티드의 개략도가 도 1a에 제공되고, 상이한 4-1BB 세포외 도메인 구축물을 생성하기 위해 본원에서 사용된 예시적인 프라이머 서열이 하기 표 7에 제공된다. 개별 재조합 GST-H-4-1BB 구축물을 1 mM IPTG와 함께 배양하고, 이. 콜라이 BL21DX5α 세포에서 생산하고, 융합 폴리펩티드를 글루타티온-아가로스 칼럼을 사용하여 정제하였다.

[0257] 표 7 - 에피토프 맵핑에 유용한 인간 4-1BB 세포외 도메인 단편을 생성하는데 사용되는 예시적인 프라이머

	정방향	역방향
R1	5'-GGATCCACAAGATCATTGCAG-3' (SEQ ID NO. 24)	5'-TTGAGCTCGAGCCTGGTCCTGAAAACA-3' (SEQ ID NO. 25)
R2	5'-CGCGTGGATCCAAGGAGTGTTCCTCCA-3' (SEQ ID NO. 26)	5'-TTGAGCTCGAGACGTTTCTGATCGTTA-3' (SEQ ID NO. 27)
R3	5'-CGCGTGGATCCGGCATCTGTCGACCCT-3' (SEQ ID NO. 28)	5'-TTGAGCTCGAGGATCTGCGGAGAGTGT-3' (SEQ ID NO. 29)
R1.1	5'-GGATCCACAAGATCATTGCAG-3' (SEQ ID NO. 30)	5'-CTCGAGGCATATGTCACAGGT-3' (SEQ ID NO. 31)
R1.2	5'-GGATCCACAAGATCATTGCAG-3' (SEQ ID NO. 32)	5'-CTCGAGGCTGGAGAAACTAT-3' (SEQ ID NO. 33)
R1.3	5'-GGATCCTGCCCAGCTGGTAC-3' (SEQ ID NO. 34)	5'-TTGAGCTCGAGCCTGGTCCTGAAAACA-3' (SEQ ID NO. 35)
R1.4	5'-GGATCCAGGAATCAGATTTGC-3' (SEQ ID NO. 36)	5'-TTGAGCTCGAGCCTGGTCCTGAAAACA-3' (SEQ ID NO. 37)
R1.5	5'-GGATCCACAAGATCATTGCAG-3' (SEQ ID NO. 38)	5'-CTCGAGGCAAATCTGATTCCT-3' (SEQ ID NO. 39)
R1.6	5'-GGATCCACAAGATCATTGCAG-3' (SEQ ID NO. 40)	5'-CTCGAGTGGAGGACAGGGACT-3' (SEQ ID NO. 41)

[0258]

[0259] 정제된 단백질 샘플을 형질전환된 박테리아 세포로부터 용해 완충제 (예를 들어, 10 mM 트리스-HCl - pH 7.4, 50 mM NaCl, 5mM EDTA, 30 mM NaF, 0.1 mM Na3VO4, 1% 트리톤 X-100, 0.5% 노니데트 P-40, 1 mM PMSF 및 프로테아제 억제제 혼합물)에 의해 수득하였다. 대략 20 μg의 각 융합 폴리펩티드 샘플을 4X SDS 샘플 완충제로 희석하고, SDS-PAGE 겔 상에서의 전기영동에 적용하고, 이어서 니트로셀룰로스 막 (밀리포어(Millipore), 매사추세츠주 베드포드)으로 전달하였다. 셀룰로스 막 상에서, 항-인간 4-1BB mAb를 항-마우스 IgG 양고추냉이 퍼옥시드 (HRP)와 반응시켰다. 결합 항체는 증강된 화학발광 (ECL) (아머샴 파마시아 바이오테크(Amersham Pharmacia Biotech), 영국 리틀 챌폰트)에 의해 인식되었다.

[0260] 상기 기재되었으며 도 1b에 제시된 바와 같이, 각각의 3종의 비-중첩 H4-1BB ECD 단편-GST 융합 폴리펩티드, 즉 R1, R2 및 R3을 각각 GST-결합으로 처리하였다. 웨스턴 블롯팅에 의해, 본 개시내용에 의해 포괄된 예시적인 인간화 항-4-1BB 항체 (EU101)는 대략 32 kDa의 N-말단 단편 구축물 (R1) 융합 구축물 (4-1BB의 아미노산 1 내지 55)에 결합하는 것으로 결정되었다. 더욱이, R2 또는 R3 융합 구축물 어느 것도 결합이 관찰되지 않았으므로, 상기 결합은 특이적이었다. 도 1b를 참조한다.

[0261] 게다가, 인간화 항-4-1BB 항체의 최소 결합 부위를 결정하기 위해, R1 세포외 도메인 단편을 도 1a에 도시된 바와 같이 6종의 보다 작은 단편: R1.1 (4-1BB의 아미노산 1 내지 45), R1.2 (4-1BB의 아미노산 1 내지 35), R1.3 (4-1BB의 아미노산 11 내지 55), R1.4 (4-1BB의 아미노산 21 내지 55), R1.5 (4-1BB의 아미노산 1 내지 25), 및 R1.6 (4-1BB의 아미노산 1 내지 30) 폴리펩티드 단편으로 추가로 분할하고, GST (글루타티온 S-트랜스퍼라제, 27 kDa)에 융합시켰다. 이들 구축물의 생성을 위해 사용된 예시적인 프라이머 쌍이 상기 표 7에 제공된다. 융합 폴리펩티드 구축물을 IPTG 유도 (예를 들어, 1mM IPTG) 하에 이. 콜라이 BL21 세포에서 생산하고, 박테리아 전체 세포 추출물을 12% SDS-PAGE에 의해 분해하였다. 도 2a에 제시된 바와 같이, SDS-PAGE는 개별

4-1BB 융합 폴리펩티드가 잘 발현된다는 것을 확인해 주었다.

[0262] SDS-PAGE를 니트로셀룰로스 막으로 전달하고, 이뮤노블롯팅을 예시적인 항-인간 4-1BB 항체, 즉 EU101을 사용하여 수행하였다. 도 2b에 제시된 바와 같이, H4-1BB의 세포외 도메인의 아미노산 10 내지 30의 서열이 예시적인 인간화 항-4-1BB 항체와의 결합에 있어서 유의하다는 것이 확인되었다. 이러한 분석은 본 개시내용의 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101)가, 그의 서열이 CPAGTFCDNNRNQICSPCPP (서열식별번호: 15)이거나 또는 그를 포함하는 인간 4-1BB의 에피토프에 결합한다는 것을 나타낸다. 4-1BB 세포외 도메인의 아미노산 35 내지 50을 포함하는 서열은 본원에 기재된 예시적인 인간화 항체와의 결합에 있어서 유의하지 않다는 것이 또한 확인되었다 (도 2b).

[0263] 2.2 4-1BB 항원에 대한 예시적인 인간화 항-인간 4-1BB 항체의 결합 친화도의 사정

[0264] 예시적인 항-인간 4-1BB 항체의 결합 능력

[0265] 인간 4-1BB 항원 (H4-1BB)에 대한 실시예 1에 기재된 예시적인 인간화 항-인간 4-1BB 항체의 결합 능력을 검사하기 위해, ELISA를 수행하였다. 이. 콜라이-발현된 재조합 인간 4-1BB를 항원으로 사용하였다.

[0266] 뮤린 BBK-4 항체, 참조 94G1 인간화 항체, 및 실시예 1에 기재된 바와 같은 예시적인 조작된 항체 94K, 94KV, 94KVT 및 EU101을 각각 히스티딘-태그부착된 4-1BB 세포외 도메인 재조합 단백질 (H4-1BB)로 코팅된 96 웰 플레이트 상에 처리하였다. 예시적인 ELISA 친화도 분석은 1.0 μg/ml의 농도에서 100 μl의 총 부피를 이용하였고, 반응은 1시간 동안 실온에서 진행되도록 하였다. 적절한 경우에, 항체를 인식하는 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)-표지된 항-인간 IgG 및 항-mIgG-HRP를 여기에 처리하고, 40분 동안 실온에서 반응하도록 하였다. 세척 후, 착색 반응을 위한 기질인 ABTS 용액 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich))으로 처리하고, 반응을 30분 동안 실온에서 진행되도록 하고, 착색 반응의 450 nm에서의 흡광도를 ELISA 판독기를 사용하여 검출하여 항체의 결합 활성을 분석하였다. 결과가 도 3에 제시된다. 도 3에 제시된 바와 같이, 항체 농도가 증가할수록, 각 항체와 4-1BB 항원 (H4-1BB) 사이의 결합이 개선된다. 이러한 데이터는 본 개시내용에 의해 포괄된 항체가 4-1BB에 특이적으로 결합한다는 것을 확인해 준다.

[0267] 세포-발현된 항원에 대한 예시적인 항-인간 4-1BB 항체의 결합

[0268] 세포 상황에서 인간 4-1BB 항원 (H4-1BB)에 결합하는 예시적인 인간화 항-인간 4-1BB 항체의 능력을 사정하였다. Jurkat 8-1 세포를 4-1BB의 과다발현을 위해 유전자 조작하였다. 뮤린 BBK-4 항체 및 참조 94G1 인간화 항체와 함께, 실시예 1에 기재된 바와 같은 예시적인 조작된 항체 94K, 94KV, 94KVT 및 EU101을 각각 Jurkat 8-1 세포에의 결합에 대해, 적절한 경우에, 항-mIgG-HRP 또는 항-hIgG-HRP 2차 항체를 사용하여 사정하고, FACS에 의해 분석하였다. 도 4에 제시된 바와 같이, 각각의 항체는 Jurkat 8-1 세포에 의해 발현된 4-1BB에 효과적으로 결합할 수 있으며, 94KVT 및 EU101의 친화도가 BBK-4 및 94G1보다 더 높았다.

[0269] 항원에 대한 예시적인 항-인간 4-1BB 항체의 시험관내 결합 친화도

[0270] 참조 94G1 인간화 항체와 함께, 실시예 1에 기재된 바와 같은 예시적인 조작된 항체 EU101의 시험관내 결합 친화도를 각각 비아코어 분석에 의해 결정하였다. 항-인간 IgG를 CM5 칩 상에 고정화시키고, 칩 위로 유동시켜 상기 제조된 Fab 항체에 커플링시키고, 궁극적으로 인간 4-1BB 항원 (H4-1BB)과 반응시켜 항체와 항원 사이의 결합 활성을 측정하였다 (비아코어3000, 센서 칩 CM5). 친화도 측정 결과가 도 5에 제시된다. Ka (1/Ms) 및 Kd (1/s) 값은 각각 항체가 얼마나 신속히 항원과 회합되고 그로부터 해리되는지를 나타낸다. 해리 상수 (K_D)는 Kd를 Ka로 나누어 얻는다 (Kd/Ka= K_D).

[0271] 해리 상수가 저하될수록, 해리가 보다 낮은 농도에서 발생하고 친화도가 증가하는 것으로 해석될 수 있다. 도 5에 제시된 바와 같이, 예시적인 조작된 항-인간 4-1BB 항체는 참조 94G1에 비해 개선된 결합 친화도를 가졌다.

[0272] 예시적인 항-인간 4-1BB 항체는 활성화된 $CD8^+$ T 세포에 의해 발현된 4-1BB를 인식함

[0273] $CD8^+$ T 세포를 인간 PBMC로부터 단리하고, 2일 동안 1μg/ml의 항-CD3 항체로 활성화시켰다. 활성화된 $CD8^+$ T 세포의 표면 상의 4-1BB를 검출하는 실시예 1에 기재된 예시적인 인간화 항-인간 4-1BB 항체 (94K, 94KV, 94KVT 및 EU101)의 능력을 예시적인 상업적으로 입수가능한 항-4-1BB 항체 (4-1BB-PE)와 관련하여 사정하였다. BBK-4 뮤린 항-인간 4-1BB 항체 및 94G1 참조 인간화 항체에 의한 검출도 또한 제시된다. 4-1BB 항체는 25 ng/ml의 농도로 처리하였다.

[0274] 예시적인 항체를, 적절한 경우에, 항-mIgG-다이라이트488 또는 항-hIgG-다이라이트488로 검출하고, FACS에 의해 분석하였다. 결과가 도 6에 제시된다. 참조 94G1 항체는 17.93%의 $CD8^+$ T 세포 상에서 4-1BB를 검출하지만, 각각의 94KVT 및 EU101 항체는 각각 25.3% 및 28.33%의 강건한 검출을 제시하였다. 이는 예시적인 항체 94KVT 및 EU101 둘 다가 BBK-4 및 94G1보다 개선된 결합 특성을 갖는다는 것을 입증한다. 따라서, 본 개시내용의 인간화 변이체 항체는 시험관내에서 활성화된 T 세포에 대해 우월한 결합을 갖는다.

[0275] 실시예 3 - 인간화 항-인간 4-1BB 항체의 시험관내 효능의 분석

[0276] 항-4-1BB 항체는 활성화된 $CD8^+$ T 세포에서 발현되는 공동-자극 분자, 즉 4-1BB에 신호 자극을 제공하고, $CD8^+$ T 세포를 활성화시키고, 증식을 유도하고, T_H1-유형 시토카인 발현을 증가시키는 것으로 이미 입증된 바 있다. 본 실시예에서는, $CD8^+$ T 세포의 증식 및 T_H1-유형 시토카인 발현을 유도하는 실시예 1에 기재된 예시적인 인간화 항-인간 4-1BB 항체의 활성을 검사하였다.

[0277] 3.1 예시적인 항-인간 4-1BB 항체는 $CD8^+$ T 세포의 세포 증식을 유도함

[0278] $CD8^+$ T 세포의 증식을 사정하기 위해, 세포를 세포 증식 시약인 WST-1 (수용성 테트라졸륨 염)로 염색하였다. WST-1-표지된 $CD8^+$ T 세포를 제조하고, 0.5 μg/ml의 항-CD3 항체로 활성화시켰다. 활성화된 $CD8^+$ T 세포를 1.0 μg/ml의 이소형 대조군 항체, 뮤린 BBK-4 항체, 참조 94G1 항체, 및 실시예 1에 기재된 예시적인 인간화 항-인간 4-1BB 항체 (94K, 94KV, 94KVT 및 EU101)로 처리하였다. 세포를 MACS 시스템을 사용하여 분석하였고, 결과가 도 7에 제시된다. 도 7을 참조하면, 본 개시내용의 예시적인 인간화 항-인간 4-1BB 항체는 $CD8^+$ T 세포의 세포 증식을 유도하는 것으로 확인되었다. 더욱이, $CD8^+$ T 세포의 활성화 정도는 94G1 < 94K/94KV < 94KVT / EU101의 순서로 증가한다.

[0279] 3.2 예시적인 항-인간 4-1BB 항체는 시토카인 분비를 자극함

[0280] IFN-γ는 주로 T 림프구 또는 자연 킬러 세포 (NK 세포)로부터 분비되며, 증식 및 항바이러스 활성을 나타내는 대표적인 시토카인이다. 추가로, IFN-γ는 대식세포를 위한 주요 활성화제이며, 특히 T_H1 세포를 다른 유형의 세포와 구별하는 주요 시토카인이다. IFN-γ 분비는 세포독성 T 세포, 식세포 및 B 세포의 활성화에 있어서 주요 역할을 한다. 결과적으로, 항암제의 효율은 IFN-γ를 유도하는 T_H1의 증가된 양으로 평가될 수 있다. 이러한 이유로, 특정한 자극에 의한 IFN-γ 분비의 측정치는 T 세포의 기능적 변화에 대한 정량적 기준으로서 사용될 수 있는 최적의 표준일 수 있다.

[0281] $CD8^+$ T 세포를 인간 PBMC로부터 단리하고, 0.5 μg/ml의 항-CD3 mAb 항체로 처리하고, 이어서 항체로 처리하지 않거나, 또는 1.0 μg/ml의 항-4-1BB 항체: BBK-4, 94G1, 94K, 94KV, 94KVT 및 EU101로 처리하였다. IFNγ 분비를 제1일, 제3일 및 제5일에 평가하였다. 결과가 도 8에 제시된다. 도 8에서 알 수 있는 것처럼, IFNγ 분비는 모든 항-4-1BB 항체 처리된 샘플에서 증가하였고, 이러한 증가는 항체 치료의 지속기간과 상관관계가 있다. 94KVT 및 EU101 항체로의 처리는 제5일에 대조군 그룹보다 13-배수 더 높은 분비 수준에 도달하였다. 따라서, 예시적인 인간화 항체 94KVT 및 EU101은 둘 다 94G1 참조 항체보다 더 효율적으로 IFNγ 분비를 유도할 수 있다.

[0282] 3.3 활성화된 $CD4^+$ T 세포 또는 $CD8^+$ T 세포의 예시적인 항-인간 4-1BB 항체로의 처리에 따른 IFN-γ 수준의 증가

[0283] 혈액을 3명의 건강한 공여자로부터 수집하고, 그로부터 수득된 PBMC를 피콜-플라크 구배 원심분리에 의해 단리하고, PBMC에 존재하는 활성 T 세포를 24시간 동안 RPMI-1640+2% FBS 배지 중에 정치해 두었다. 정치해 둔 PBMC를 철 비드-부착된 항-CD4 항체 또는 항-CD8 항체로 처리하고, $CD4^+$ 세포 또는 $CD8^+$ 세포를 MACS 자기 분리기를 사용하여 단리하였다. 단리된 $CD4^+$ T 세포 또는 $CD8^+$ T 세포를 T 세포 활성화제인 항-CD3으로 처리하여 4-1BB 발현을 유도하고, 상이한 농도 (0.5, 1.0, 2.5 및 5.0 μg/ml)의 EU101로 3일 동안 처리하였다. 3일 후, 세포를 배제한 배양 배지를 수득하고, 배양 배지에서의 인간 IFN-γ의 형광을 ELISA (이바이오사이언스)에 의해 사정하였고, 결과를 IFN-γ ELISA 키트에 제공된 표준 곡선과 비교하였다 (도 9).

[0284] 도 9에 제시된 바와 같이, $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포에서의 IFN-γ의 발현 수준은 용량-의존 방식으로 증가하였다. 특히, 5.0 μg/ml의 EU101이 처리된 경우에, $CD4^+$ T 세포에서의 278% 증가와 비교하여, $CD8^+$ T 세포에서는 IFN-γ의 발현 수준이 612% 증가하였다. T 세포의 T_H1로의 전환에 수반된 IFN-γ의 T-세포 특이적 발현 패턴에 따르면, 본 개시내용의 예시적인 항-인간 4-1BB 항체, 즉 EU101은 충분한 시험관내 활성을 가지며, 이는 암의 예방 및/또는 치료에 효과적일 수 있다는 것을 시사한다.

[0285] 3.4 예시적인 항-인간 4-1BB 항체의 ADCC 및 CDC 활성의 측정

[0286] 면역계는 바이러스-감염된 세포 또는 암 세포를 인식하여 공격하고, 항체는 세포독성 매개되는 아폽토시스를 유도하는데 사용될 수 있다. 이러한 면역계에 있어서, 2가지 유형의 메카니즘 예컨대 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC) 및 보체-의존성 세포독성 (CDC)이 사용될 수 있다. 둘 다의 경우에서, 아폽토시스는 세포 표면 상의 표적에 결합하는 항체에 의해 매개될 수 있다. 즉, 항체가 ADCC 활성을 갖는 경우에는, 항체에 의해 인식된 세포가 자연 킬러 (NK) 세포에 의해 매개되는 아폽토시스를 초래하고, 항체가 CDC 활성을 갖는 경우에는, 사멸이 보체 단백질에 의해 매개된다. 따라서, 길항작용 항체 치료제의 개발의 경우에, 항체에 의해 인식된 세포의 사멸 정도가 ADCC 및 CDC 활성의 분석을 통해 확인될 수 있다. 그러나, 본 개시내용에 개시된 인간화 4-1BB 항체에 대한 표적은 암 세포가 아닌 T 세포이다. 즉, 효능작용 항체로서의 4-1BB 항체와 결합함으로써 T 세포의 활성화를 유도하는 메카니즘을 고려하면, ADCC 및 CDC 활성을 갖지 않는 항체가 치료 용도로 바람직할 수 있다.

[0287] 본 개시내용에서, ADCC 검정을 위해, 인간 PBMC를 피콜 원심분리에 의해 동일한 밀도차를 사용하여 단리하였다. PBMC를 RPMI (써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)) 및 IL-2 (100U/ml)가 함유된 10% FBS 중에서 밤새 배양을 위해 인큐베이션하였다. 표적 세포 (4-1BB 발현 세포주)를 수거하고, 1 ml의 배양 배지 중에 재현탁시키고, 5 min 동안 37℃에서 5 uM CFSE로 표지하였다. 본 개시내용의 이펙터/표적 세포를 10:1의 비로 세척하고, 카운팅하고, 이어서 분주하였다. 분석을 위해, 본 개시내용의 항체를 10 nM (1.5 μg/ml)의 최종 농도로 제조하고, 플레이트 상에서 4시간 동안 37℃에서 배양하였다. 5 μl의 7-AAD를 각 웰에 첨가하고, FACS 튜브로 전달하고, 이어서 샘플을 BDFACScan에 의해 제작된 FACS에 의해 분석하였다. 비-생존 표적 세포 ($CFSE^+$ $7\text{-}AAD^+$), 생존 표적 세포 ($CFSE^+$ $7\text{-}AAD^-$)의 빈도를 측정하였다. ADCC는 전체 세포 중 생존 세포의 빈도로 사정되었다 (도 10a).

[0288] 보체-의존성 세포독성 (CDC) 검정을 상기 기재된 ADCC 검정과 유사하게 판독 값으로서 FACS를 사용하여 수행하며, 여기서 상기 표적 세포를 30 min 동안 얼음에서 항-4-1BB 항체와 함께 인큐베이션하고, 이어서 인간 보충 혈청을 20%의 최종 농도로 30분 동안 37℃에서 첨가하였다. 그 후에, 생성된 샘플을 각각 FACS 튜브로 전달하고, BDFACScan에 의해 제작된 FACS에 의해 사정하였다 (도 10b). 도 10a 및 도 10b의 결과는 예시적인 인간화 4-1BB 항체, 즉 EU101이 ADCC 및 CDC 효과를 거의 갖지 않는다는 것을 확인해 준다. 따라서, 본 개시내용의 예시적인 EU101 항체는 효능제 항체로서 유익한 ADCC 및 CDC 특성을 가지며, 생체내 항암 치료를 위한 우수한 후보라고 할 수 있다.

[0289] 실시예 4 - 예시적인 인간화 항-인간 4-1BB 항체의 생체내 효율의 확인

[0290] 본 개시내용의 항-인간 4-1BB 항체, 즉 EU101은 시험관내 실시예에서 용량-의존성 효과를 제시하였으며, 통상적인 항체보다 상당히 우월한 효과를 제시하였다. 본 실시예는 항-인간 4-1BB 항체, 즉 EU101이 단독으로 또는 상이한 조성물과 조합되어, 생체내에서 암 또는 종양을 진단, 예방 또는 치료하며 종양의 성장을 효과적으로 억제하는데 사용될 수 있는지를 조사하기 위한 것이다.

[0291] 4.1 인간 말초 혈액 단핵 세포의 NOD-scid IL2R감마^{null} 마우스 생착 및 항-인간 4-1BB 항체의 항종양 활성

[0292] HLA-A24-유형 건강한 공여자로부터 수집된 말초 정맥 혈액을 헤파린으로 처리하고, 피콜-플라크 (지이 헬스케어 (GE Healthcare), 뉴저지주 피스카타웨이) 상에서의 농도-구배 원심분리에 적용하여 PBMC를 수거하였다. PBMC를 RPMI-1640 배지로 세척하고, $3x10^6$개의 세포를 면역결핍 마우스, 즉 NSG 마우스 (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ; NOD-scid IL2rγ^{null}, 잭슨 래보러토리(Jackson Laboratory))에 복강내로 주사하였다.

[0293] 인간화 마우스의 분석을 유동 세포측정법에 의해 수행하여, 인간 PBMC의 생착으로부터 5주 후에 마우스 안와 혈액 수집에 의해 수집된 마우스 혈액에 인간 T 세포가 존재하는지의 여부를 조사하였다. 7주령 NSG 마우스 (잭슨 래보러토리, 메인주 바하버)를 특정 병원체-부재 (SPF) 환경 하에 사육하였다.

[0294] 세포를 인간 혈액 세포 마커 예컨대 APC-cy7 형광-표지된 CD45 항체 및 FITC 형광-표지된 CD4 항체 및 BV510 형광-표지된 CD8 항체로 염색한 후에, 유동 세포측정법을 수행하여 CD4 및 CD8의 비를 조사하였다. 각 마우스로부터의 안와 혈액 수집 후, 마우스 혈액 샘플로부터의 인간 T 세포를 관찰하여, 인간 면역계가 마우스 내로 생착되는지의 여부를 조사하였다. 인간 종양 세포를 HLA 유형 인간화 마우스 모델에서 제조하고, 1 x 10^7개의 세포를 각 마우스의 등쪽에 피하로 주사하였다. 종양 크기가 100 내지 200 mm^3에 도달하면, 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101)의 제제를 체중 1 kg당 1.0 mg, 5.0 mg 또는 10.0 mg으로 5일마다 1회, 총 3차례 정맥내로 투여하였다. 대조군으로서, 인간 IgG를 사용하였다. 각 마우스의 종양 부피 (mm^3)를 3일마다 측정하였다 (도 11). 도 11에 제시된 결과는 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101)로 치료된 마우스에서의 종양 크기가 인간 IgG로 치료된 마우스에 비해 감소되었고, 더욱이 이러한 감소가 항체 농도에 비례하였다는 것을 확인해 준다. 특히, 5 mg/kg 항체-투여 그룹에서 종양 퇴행이 급속히 발생하였다. 5 mg/kg 용량으로의 투여 후 1주 이내에, 인간화 마우스에서 종양 크기가 진정되었고 종양 성장이 근절되었다. 따라서, 본 개시내용의 예시적인 항체 EU101은 생체내에서 항암 효과를 제시한다.

[0295] 결과적으로, 상기 결과는 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101)가 H4-1BB의 에피토프 (서열식별번호: 15)를 특이적으로 인식하나, 이러한 예시적인 항체의 개선된 특징, 예컨대, 예를 들어, 개선된 친화도로 인해, 이 항체가 생체내 마우스 모델에서 우월한 효과를 제시한다는 것을 제시한다. 따라서, 본 실시예는 본 개시내용에 의해 포괄된 항체가 참조 항체보다 더 낮은 투여량으로 항암제로서 사용될 수 있다는 것을 시사한다.

[0296] 4.2 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 및 항-PD-1 작용제를 사용하여 종양 성장을 억제하는 효과

[0297] 인간화 마우스에 대한 종양 주사 후 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101) 및 예시적인 항-PD-1 작용제의 개별 치료에 의해 유발되는 효과의 비교

[0298] 인간화 마우스를 상기 실시예 4.1에 기재된 동일한 방법에 의해 준비하였다. 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101) 및 예시적인 항-PD-1 작용제 (키트루다) (독일 MSD로부터 구입됨)의 용량에 따른 항암 효과의 증가를 확인하는 실험을 수행하기 위해, HLA-A-유형 매칭 인간 결장직장 선암종 세포주 HT29의 1 x 10^7개 세포를 이전에 준비된 인간화 마우스에 피하로 주사하였다. 주사된 종양의 부피가 100 내지 150 mm^3에 도달하면, 마우스를 3마리 마우스의 총 5개 그룹으로 나누고, 종양 억제에 대한 EU101의 효과를 비교하기 위해 마우스의 각 그룹을 3가지 투여 조건 (대조군: IgG, 치료 그룹 1: 5 mg/kg 및 치료 그룹 2: 10 mg/kg) 각각으로 5일 간격으로 3차례 치료하고, 항-PD-1에 대해서도 동일한 절차를 수행하였다 (도 12). 실험의 결과로서, EU101 및 키트루다 (항-PD1) 둘 다의 경우에서, 종양 부피는 용량-의존 방식으로 감소되었다. 그러나, 도 12에서, 5 mg/kg의 EU101은 종양 성장에 영향을 미치지 않았지만, 5 mg/kg 및 10 mg/kg의 EU101을 사용한 치료에 따르면, 항종양 활성이 용량-의존 방식으로 나타났다. 추가로, EU101이 키트루다 (항-PD-1)보다 더 낮은 용량으로 보다 높은 효율을 나타내고, 종양 성장이 특히 5 mg/kg의 EU101을 사용한 치료에 의해 완전히 차단되었다는 것이 확인되었다.

[0299] 종양 주사 후 EU101 및 항-PD-1 작용제의 조합을 사용한 인간화 마우스의 치료

[0300] 공동-억제 수용체 (PD-1 및 CTLA-4) 신호 및 공동-자극 (CD137) T 세포 신호는 종양 성장을 억제하는 동일한 목적을 위해 파생되므로, 2종의 수용체의 자극은 상승작용적 효과가 예상될 수 있다 (문헌 [Chen et al., Cancer Immunol. Res. (2015) 3:149-160]; [Bartkowiak et al., Front. Oncol. (2015) 5: 117]: 이들 문헌은 둘 다 본원에 참조로 포함됨). 추가로, PD1 면역요법이 일부 암 환자 집단에 대해 항암 치료 효과의 가능성을 제시하였지만, 보다 광범위한 환자 집단에서 상이한 항암제와의 조합 요법으로 저용량의 투여가 여전히 요구될 수 있다. 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101) 및 예시적인 항-PD-1 작용제 (키트루다)의 조합 요법에 의해 유발되는 항종양 효과를 조사하기 위해, 종양-보유 인간화 마우스를 EU101 및 키트루다의 조합 요법으로 치료하였다. 인간화 마우스의 준비는 실시예 4.1에 기재된 바와 같은 동일한 방법에 의해 수행하였다.

[0301] 인간화 마우스를 확인하기 위해 안구 채혈을 수행하였다. 인간화 마우스 중에, 결장 암종인 HT29를 정상 상태를 유지하는 HLA-A24 마우스에 1x10^7개 세포/마우스로 피하로 주사하였다. 종양 크기가 300 내지 450 mm^3가 되면, 실험을 하기와 같이 수행하였다.

[0302] 본 실시예로부터 이해된 바와 같이, 종양 성장이 최소 농도 이하에서의 (EU101: 2.5 mg/kg, 키트루다 (독일 MSD로부터 제조됨): 2.5 mg/kg) 개별 주사로는 지연되지 않았지만, 종양은 EU101 및 키트루다의 조합 요법으로 크

게 퇴행되었다. 이는 본원에 제공된 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (예를 들어, EU101)가 상이한 항암제와의 조합 요법, 예컨대 1종 이상의 면역 체크포인트 억제제와의 조합을 위한 우수한 후보라는 것을 제시하는 결과이다 (도 13).

[0303] 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 및 예시적인 항-PD-1 작용제의 개별 및 조합 치료 후 정상 조직 및 인간 결장직장 선암종 조직 내 T 세포 침윤 림프구 (TIL)의 분석

[0304] HT29-이식된 인간화 마우스에 대한 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101) 및 예시적인 항-PD-1 작용제 (키트루다) (독일 MSD로부터 구입됨)의 개별 투여 및 EU101과 키트루다의 조합 투여 후, 효과 분석이 종료된 당일에, 모든 그룹을 해부하여 종양 및 혈액을 분리하였다. 분리된 종양을 30분 동안 37℃에서 콜라게나제 IV로 처리한 후, 종양 조직 내 세포를 기계적 방법에 의해 해리시키고, 이어서 1xPBS로 세척하였다. 분리된 혈액으로부터 피콜 구배 원심분리에 의해 PBMC를 분리하고, 분리된 종양 세포 및 PBMC를 하기 실험에 적용하였다. 세척된 세포로부터 RBC 용해 완충제를 사용하여 적혈구 (RBC)를 제거하고, 이어서 1xPBS로 세척하였다. 세척된 세포로부터 40-μm 나일론 세포 스트레이너를 사용하여 엉켜있는 세포 파편을 제거하여 단세포 상태를 만들고, 단세포를 1xPBS로 세척하고, 이어서 각 그룹으로부터 분리된 T 세포를 세포 계수기를 사용하여 카운팅하였다.

[0305] 별개의 T 세포를 인간 혈액 세포 마커 예컨대 CD45 항체 (형광 APC-cy7 표지됨), 형광 FITC-표지된 인간 CD4 항체 및 형광 BV510-표지된 인간 CD8 항체로 염색하고, 이어서 FACS 검정에 적용하였다. FACS 검정은, CD45 그룹으로부터 게이팅된 CD4 및 CD8 세포 그룹의 비 (%)에 기반하여 수행하였다 (도 14a).

[0306] 특히, 분리된 T 세포 중에서 Treg 그룹을 확인하기 위해, 세포의 표면을 인간 혈액 세포 마커 예컨대 CD45 항체 (형광 APC-cy7 표지됨), 인간 형광 FITC-표지된 CD4 항체 및 인간 형광 PE-cy5-표지된 CD25 항체로 염색하고, 세포 전사 인자 Foxp3 (인간 형광 APC-표지된 Foxp3 항체)으로의 세포내 및 핵내 염색을 Foxp3/ 전사 인자 염색 완충제 세트 키트 (이바이오사이언스)를 사용하여 수행하였다. FACS 검정에서, CD45 그룹을 분리하여 R1을 게이팅하고, $CD4^{+}CD25^{high}$ 그룹을 분리하여 R2를 게이팅하고, $Foxp3^{high}$ 그룹의 비 (%)를 R1 및 R2 그룹에서 측정하였다. 분리된 세포 중 IFN-γ^{+}CD8^{+} T 세포를 확인하기 위해, 세포 표면을 혈액 세포 마커 예컨대 형광 APC-cy7-표지된 인간 CD45 항체 및 형광 BV510-표지된 인간 CD8 항체로 염색하고, 2% PFA로 고정시키고, 0.5% 사포닌 용액 및 형광 PE-cy7-표지된 인간 IFN-γ 항체와 반응시켰다. 그 후에, CD8 T 세포 그룹 중 시토카인 IFN-γ^{+} 세포를 FACS 검정에 의해 측정하였다. 세포를 상기 기재된 바와 같은 동일한 방법에 의해 비로 확인하고, CD8^{+}IFN-γ^{+} 비 및 Treg 비의 부분 비를 계산하였으며, 이는 도 14b에 제시된다.

[0307] 이러한 실시양태의 결과에 따르면, 개별 투여가 아닌, EU101 및 키트루다의 조합 투여는 종양 조직 및 T 림프구의 조합의 침윤을 크게 증가시켰다. 조합 치료의 보다 더 구체적인 결과는 하기와 같다. 조합 치료가 대조군으로서 건강한 인간화 마우스의 PBMC에 대해 수행되는 경우에, 림프구의 수는 대략 3배 증가하고, 종양 1 g당 침윤된 림프구는 종양 조직에서 76배 증가하였다. 이는 대부분의 종양-특이적 림프구가 활성화되고 종양 조직으로 동원되어, 표적 세포를 사멸시켰다는 것을 의미한다. 특히, 조합 요법 그룹에서 PBMC를 측정하였을 때, 도 14a에 제시된 바와 같이, CD4^{+} T 세포는 많이 증가되지 않지만, 세포독성 CD8^{+} T 세포는 대략 5배 증가되었다. 더욱이, 조합 요법 그룹은 종양 조직 1 g당 CD8^{+} T 세포 카운트의 100-배수 증가를 제시하였다. 추가로, 그 결과로서, IFN-γ를 분비하는 CD8^{+} T 세포 및 조절 T 세포의 비가 또한 크게 증가되었다 (도 14b). 즉, EU101 및 항-PD-1 작용제의 조합 치료는 이펙터 T 세포의 급격한 증가를 제공하며, 따라서 종양 억제가 효과적으로 수행된다고 할 수 있다.

[0308] 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101) 및 예시적인 항-PD-1 작용제 (키트루다)를 사용한 개별 및 조합 치료 후 인간 결장직장 선암종 조직으로부터 수득된 혈청 또는 종양액 중의 IFN-γ의 분석

[0309] HT29-이식된 인간화 마우스에 대한 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 (EU101) 및 예시적인 항-PD-1 작용제 (키트루다)의 개별 투여 및 조합 투여 후, 효과 분석이 종료된 당일에, 모든 그룹을 해부하여 종양 및 혈액을 분리하였다. 분리된 종양에 존재하는 종양액을 분리하기 위한 종양 해부에서, 300 μl의 1x PBS를 1cc-시린지를 사용하여 종양 막의 윗 부분에 주사하고, 유동하는 용액을 인슐린 시린지를 사용하여 종양 막의 아래 부분으로부터 채취하였다. 추가로, 종양 조직의 해리에서, 채취한 용액을 첨가하여 종양 조직을 해리시키고, 이어서 저장하였다. 추가로, 혈청으로서, PBMC가 피콜 구배 원심분리에 의해 혈액으로부터 분리될 때 혈청을 저장하였다. 저장된 혈청 및 종양액을 용해시키고, 0.22 μm 필터 유닛 (제조업체: 코닝(corning))을 사용하여 여과하였다.

각 그룹에 대해 10 μl의 혈청을 사용하고, 100 μl의 종양액을 사용하여, 인간 IFN-γ ELISA 레디-세트-고 키트 (이바이오사이언스) 및 인간 TGF 베타 1 ELISA 레디-세트-고 키트 (이바이오사이언스)에 의해 인간 IFN-γ 및 인간 TGF-β를 측정하였다. 각각의 ELISA 키트에서 제공된 표준 곡선을 비교함으로써 결과를 분석하였다.

[0310] 그 결과, EU101 및 키트루다의 개별 투여와 비교하여, 조합 투여에서, 종양 그룹의 혈청 중 인터페론의 농도가 가장 높았다. EU101 메카니즘이 IFN-γ와 항종양 효과 사이의 상관관계로 설명될 수 있으므로, 건강한 공여자의 혈청 및 조합 요법이 적용된 바 있는 종양 그룹의 혈청 중 IFN-γ 및 TGF-β의 발현 수준을 평가하였다. 건강한 공여자의 혈청에 대한 실시예의 물질에 따르면, 도 15a에 제시된 조합 요법 그룹에서, IFN-γ는 대략 16배 증가되었지만, Treg 세포로부터 분비되는 시토카인인 TGF-β는 대략 65% 저하되었다. 추가로, 도 15b에서, 종양액 중의 조합 투여에 의해 유발된 IFN-γ 농도는 대조군보다 상당히 더 높았다 (대략 213-배수). 실시예의 결과로서, 특히 EU101 때문에, 대조군 그룹과 비교하여, 조합 그룹은 IFN-γ 분비의 급격한 증가를 제시하였다. 따라서, 본 개시내용의 개선된 항-인간화 4-1BB 항체에 의해 유발되는 항암 효과는 비-치료 그룹과 비교하여, 암 세포의 아폽토시스와 직접적으로 관련된 이펙터 T 세포의 효과적인 종양-침윤 및 종양 조직에서의 상당히 특이적인 효과를 제공한다는 것이 확인될 수 있다. 다시 말해서, 본 개시내용에서, EU101은, 항암제로서, 암 세포의 아폽토시스를 위한 최적의 조건을 갖는다는 것이 확인되었다. 통상적으로, 암 환자에서, 항암 시토카인 및 항암 세포성 면역은 상당히 감소되지만, 본 개시내용에서 EU101은 항암 시토카인 및 항암 세포성 면역의 증가를 유도하여, 상당한 치료 효과를 초래하는 것으로 예상될 수 있다.

[0311] 따라서, 예시적인 항-인간 4-1BB 항체 EU101은 IFN-γ의 고발현에 의해 매개되는 항종양 효과를 나타내고, 이러한 효과는 용량-의존 방식으로 나타나며, 따라서 암 환자의 혈청 중 IFN-γ 농도는 종양을 진단하고 추정하기 위한 바이오마커로서 사용될 수 있다. 따라서, EU101 및 항-PD-1의 조합 치료를 통한 암 또는 종양의 유효 치료 및 IFN-γ 농도의 측정을 통한 예후에 따라, 각 환자에 대해 보다 유효한 치료가 수행되는 것으로 예상된다.

[0312] 실시예 5 - 예시적인 인간화 항-인간 4-1BB 항체를 사용한 생체외 4-1BB$^+$CD8$^+$T 세포의 분리 및 대량 증식

[0313] 본 발명자들은 항-4-1BB 항체 (한국 특허 번호 10-1503341)를 사용하는 다양한 항원에 대해 특이적인 4-1BB$^+$CD8$^+$ T 세포의 단리 및 정제에 항원-특이적으로 활성화된 CD8$^+$ T 세포에서의 4-1BB 발현을 사용하였다. 후속 실험을 수행하여, 본원에서 개발된 EU101 항체가 또한 항원-특이적 CD8$^+$ T 세포의 단리 및 대량-증식에 사용되는지를 검사하였다.

[0314] 암 환자의 말초 혈액으로부터의 PBMC의 구축을 실시예 4.1에 기재된 바와 같이 수행하였다. 그러나, 본 실시예에서, 암 항원-특이적 미분화 T 세포는 본 발명자들에 의해 출원된 한국 특허 출원 번호 10-2016-0165224에 기재된 방법에 의해 수득될 수 있다. 본 실시예에서, 4-1BB$^+$CD8$^+$T 세포의 효과적 분리 및 높은 순도를 갖는 4-1BB$^+$CD8$^+$T 세포의 대량-생산을 위해, 항-인간 4-1BB 항체 (EU101)를 사용하는 패닝 방법을 사용하였다. PBS 중에 희석된 항체로서, 10 μg/ml의 항-인간 4-1BB 항체 (EU101)를 10 ml 플라스크에 첨가하고, 이어서 20 내지 24시간 동안 4℃에서 저장하였다. 저장 후, 항체를 함유하는 상청액을 제거하고, 세척 없이, PBS 중에 2.5%로 용해된 BSA의 용액을 10 ml 플라스크 내 세포 펠릿에 첨가하고, 이어서 20 내지 24시간 동안 4℃에서 저장하였다. 그 후에, BSA 용액을 제거하고, 각 플라스크를 15 ml의 PBS로 2회 세척하였다. 이전에-제조된 세포를 X-VIVO 10 배지에 현탁시키고, EU101 항체-코팅된 플라스크에 첨가하고, 이어서 1시간 동안 37℃의 CO_2 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 상청액을 제거하고, 세포 펠릿을 10 ml의 RPMI1640 배지로 2회 세척하여 비-특이적 결합 세포를 제거하였다. 1%의 자기 혈청 및 1000 IU/ml의 IL-2-함유 X-VIVO 10 배지를 플라스크에 첨가하고, 이어서 14일 동안 배양하였다. 본 실시예에서, 일부 세포를 수거한 다음 염색하여, 단리된 세포의 순도 및 표현형을 측정하였다. 도 16a 및 도 16b에 제시된 바와 같이, 94 kvt 항체로의 패닝 전, 항원-특이적 4-1BB$^+$CD8$^+$ T 세포의 비는 43.2% 증가하였고 (CD8$^+$ T 세포 비: 58.6%), EU101 항체로의 패닝 후, 항원-특이적 pCMV$^+$CD8$^+$ T 세포의 비는 60.0% 증가하였다 (CD8$^+$ T 세포 비: 79.3%)는 것이 확인되었다. 이는 항원-특이적 4-1BB$^+$CD8$^+$ T 세포가 EU101을 사용하여 높은 순도로 단리될 수 있다는 것을 의미한다. 상기 기재된 바와 같이 단리된 항원-특이적 4-1BB$^+$CD8$^+$ T 세포는 본 발명자들에 의해 출원된 한국 특허 출원 번호 10-2016-0165224에 기재된 방법에 의해 용이하게 대량-생산될 수 있다.

[0315] 상기 설명으로부터, 본 발명은 본 발명의 기술적 사상 또는 본질적 특징을 변화시키지 않으면서 다양한 구체적 형태로 실현될 수 있다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 것이다. 그러나, 본 발명을 구체

적인 예시적 실시양태로 제한하려는 의도는 없으며, 상세한 설명이 아니라, 하기 청구범위 및 그의 등가물의 의미 및 범위로부터 추론된 모든 변형 또는 변형된 형태가 본 개시내용의 범주에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0316] 본 개시내용에 의해 포괄된 항-인간 4-1BB 항체는 다수의 유익한 특성, 예컨대, 예를 들어, 참조 항체보다 우월한 친화도를 입증하였고/거나, 단독으로 또는 또 다른 항암제와 조합되어 암 또는 종양을 진단, 예방 또는 치료하는데 사용되거나 또는 암의 성장을 억제하는데 사용될 수 있다.

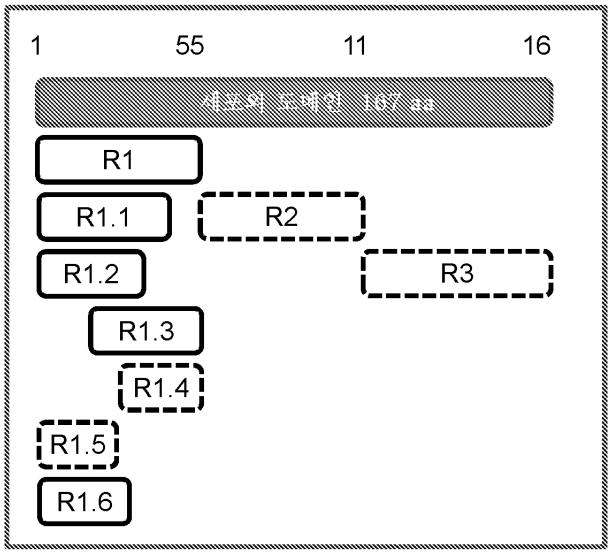
[0317] 상기에서, 본 발명이 실시예를 참조하여 기재되었지만, 본 발명은 첨부 청구범위에 기재된 본 발명의 취지 및 범주로부터 벗어나지 않으면서 다양한 형태로 변화 및 변형될 수 있다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 수 있다.

[0318] 등가물

[0319] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 단지 상용 실험을 사용하여, 본원에 기재된 본 발명의 구체적 실시양태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 본 발명의 범주는 상기 설명으로 제한되도록 의도되지 않으며, 오히려 청구범위에 제시된 바와 같다.

도면

도면1a



ECD

R1 (1-55 aa)

R2 (56-110 aa)

R3 (110-167 aa)

R1.1 (1-45 aa)

R1.2 (1-35 aa)

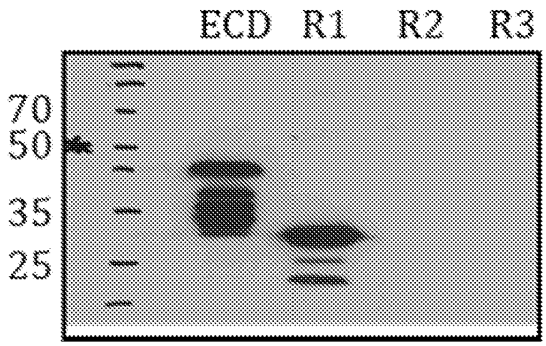
R1.3 (11-55 aa)

R1.4 (21-55 aa)

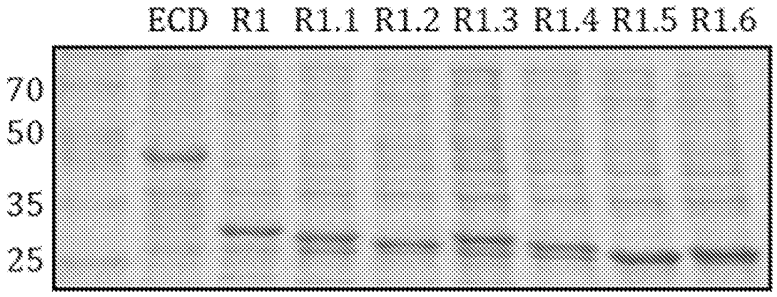
R1.5 (1-25 aa)

R1.6 (1-30 aa)

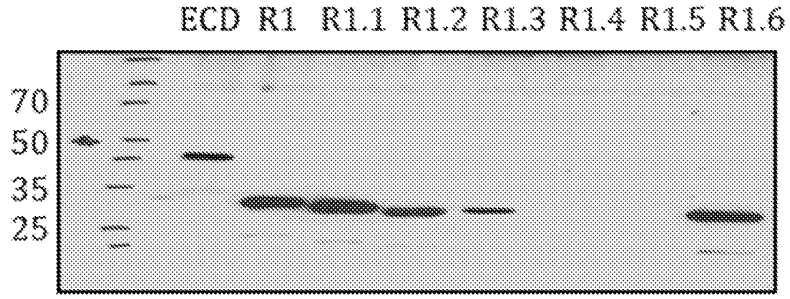
도면1b



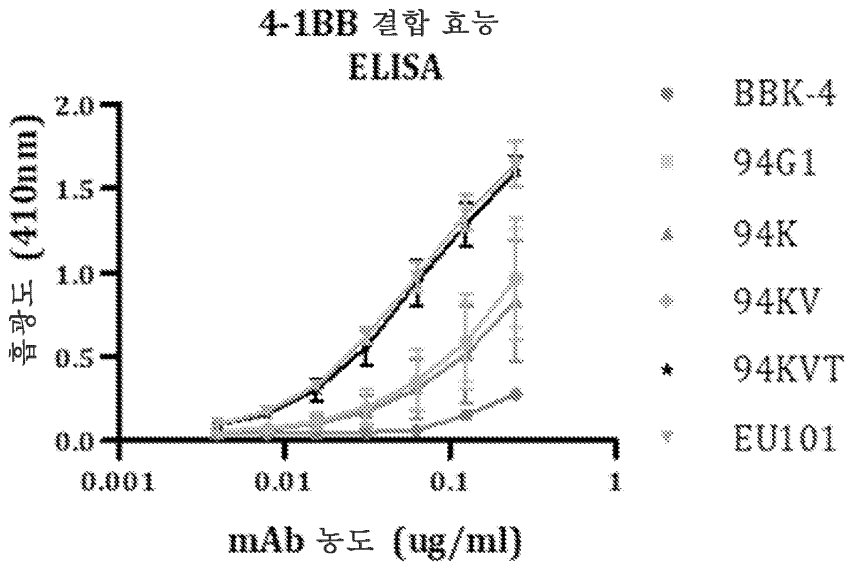
도면2a



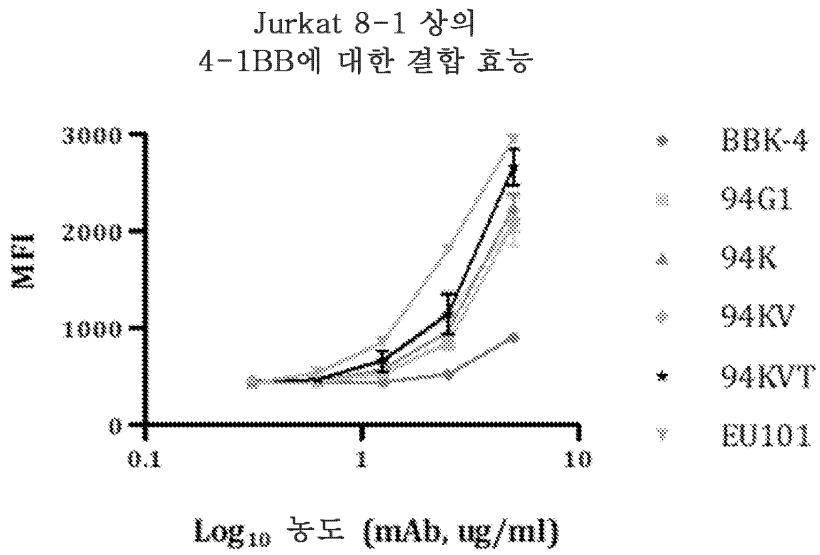
도면2b



도면3



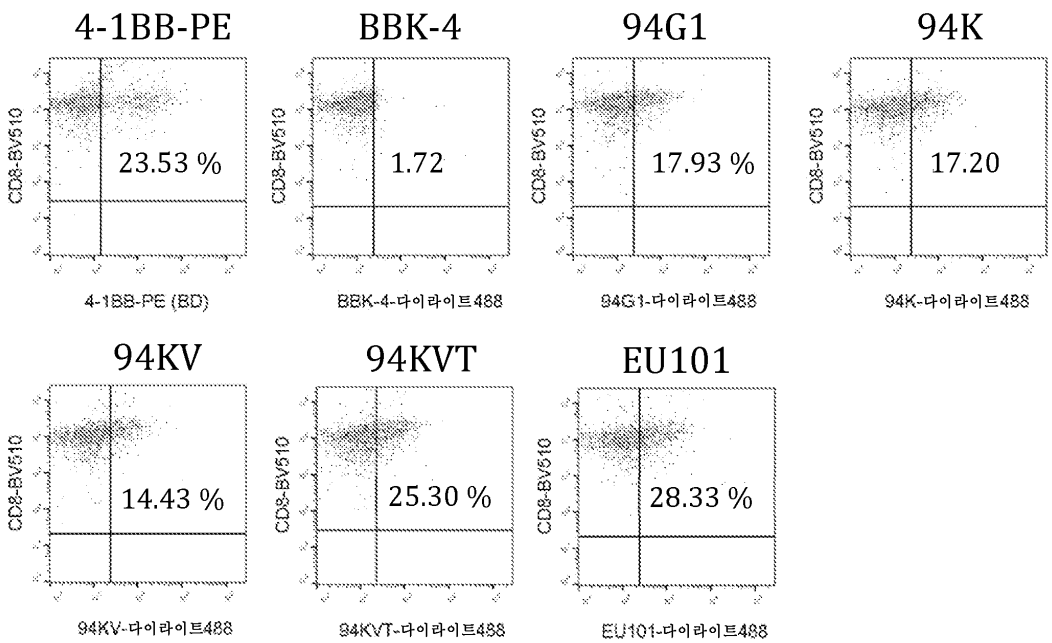
도면4

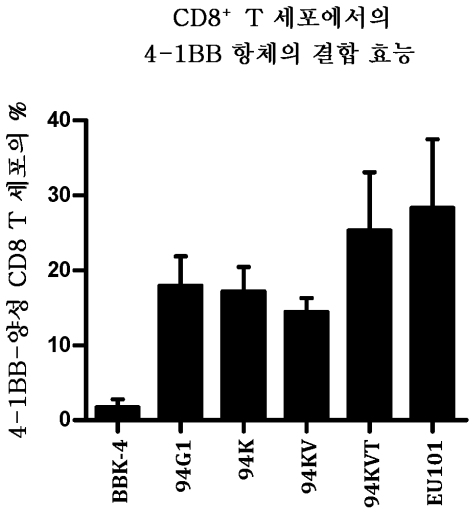


도면5

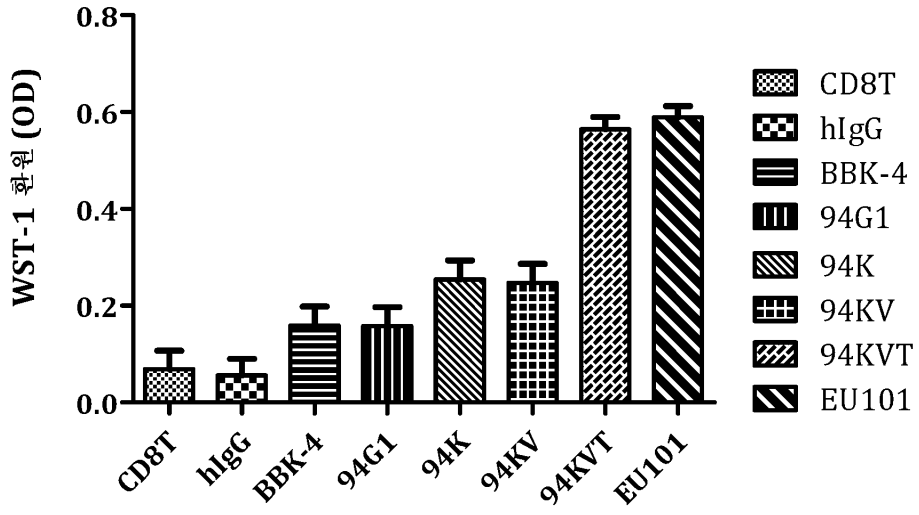
항체	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	K_D (M)
EU101	1.57e10	1.8e-5	6.36e-11
94G1	1.66e9	1.18e-4	6.02e-10

도면6

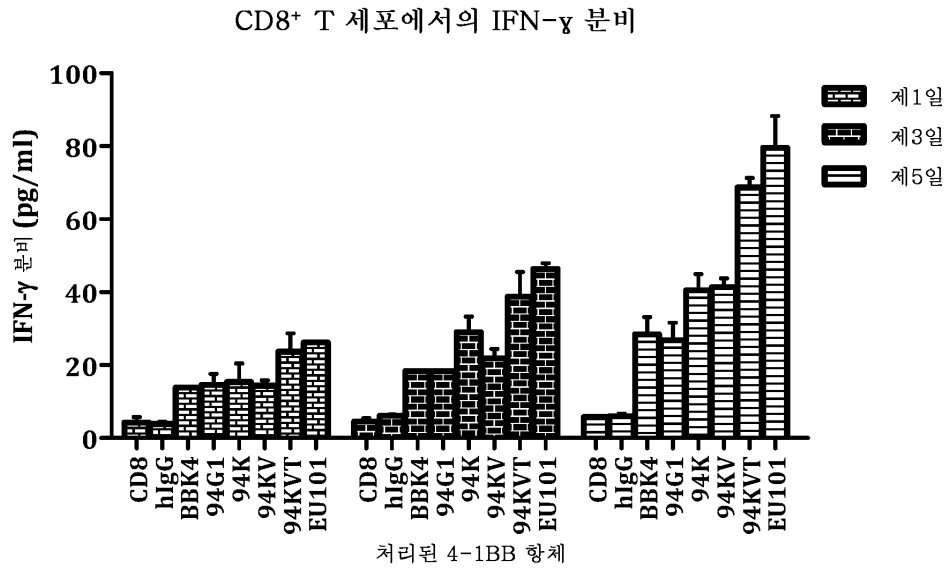

4-1BB-PE
BBK-4
94G1
94K
94KV
94KVT
EU101
CD8-BV510
23.53 %
1.72
17.93 %
17.20
14.43 %
25.30 %
28.33 %
4-1BB-PE (BD)
BBK-4-다이라이트488
94G1-다이라이트488
94K-다이라이트488
94KV-다이라이트488
94KVT-다이라이트488
EU101-다이라이트488


CD8⁺ T 세포에서의
4-1BB 항체의 결합 효능
4-1BB-양성 CD8 T 세포의 %
40
30
20
10
0
BBK-4
94G1
94K
94KV
94KVT
EU101

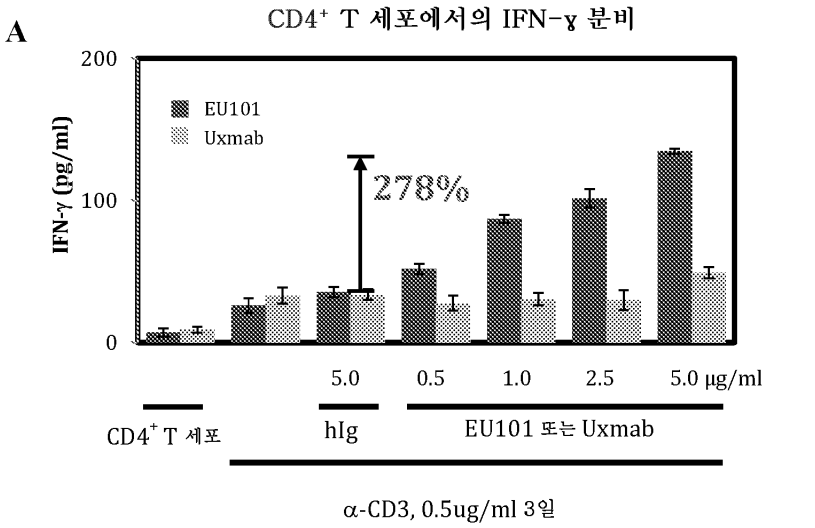
도면7

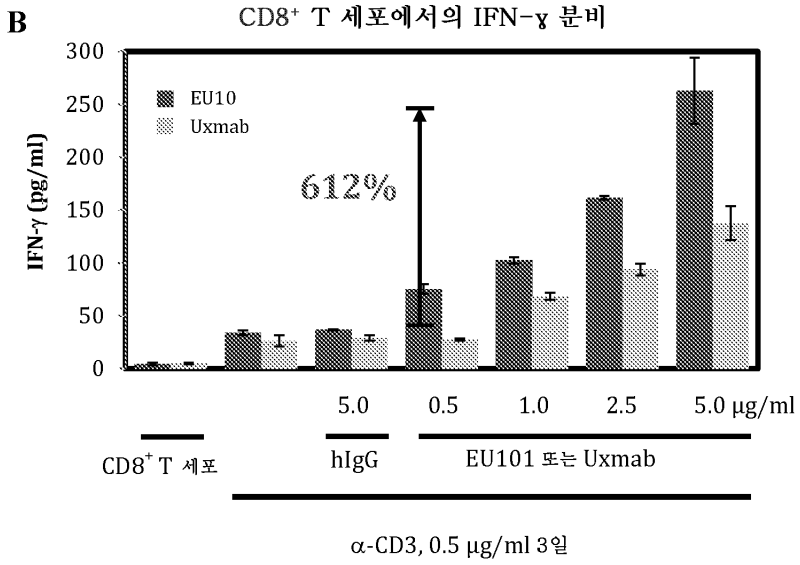

WST-1 환원 (OD)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
CD8T
hIgG
BBK-4
94G1
94K
94KV
94KVT
EU101

도면8

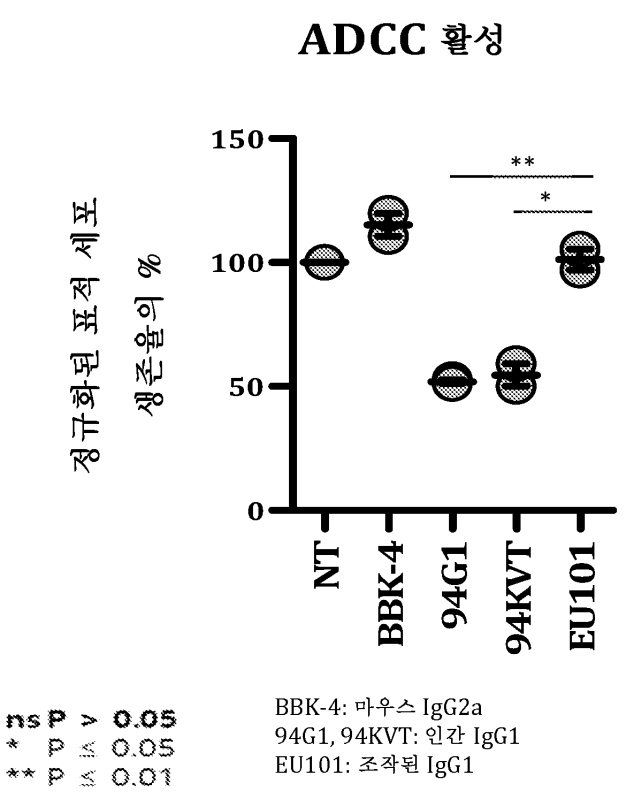

CD8⁺ T 세포에서의 IFN-γ 분비
IFN-γ 분비 (pg/ml)
100
80
60
40
20
0
제1일
제3일
제5일
CD8
hIgG
BBK4
94G1
94K
94KV
94KVT
EU101
처리된 4-1BB 항체

도면9

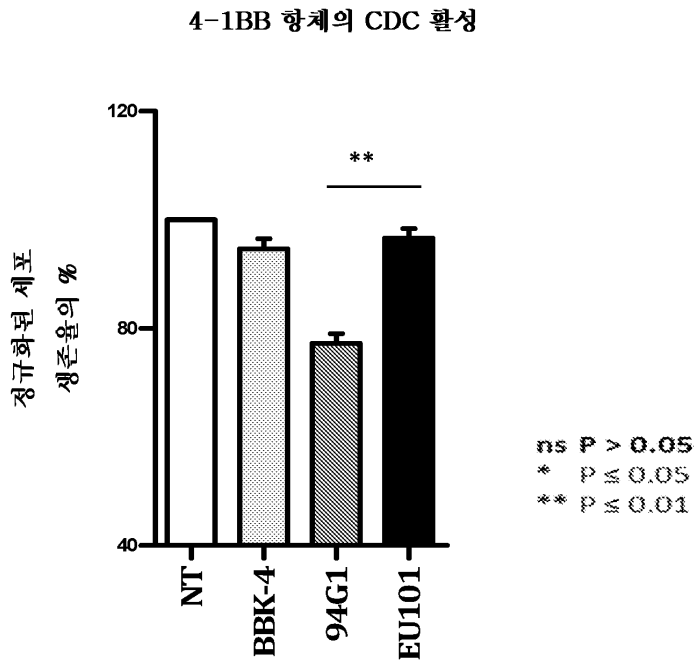

A
CD4⁺ T 세포에서의 IFN-γ 분비
IFN-γ (pg/ml)
200
100
0
EU101
Uxmab
278%
5.0
0.5
1.0
2.5
5.0 μg/ml
CD4⁺ T 세포
hIg
EU101 또는 Uxmab
α-CD3, 0.5ug/ml 3일


B
CD8⁺ T 세포에서의 IFN-γ 분비
IFN-γ (pg/ml)
300
250
200
150
100
50
0
EU10
Uxmab
612%
5.0
0.5
1.0
2.5
5.0 μg/ml
CD8⁺ T 세포
hIgG
EU101 또는 Uxmab
α-CD3, 0.5 μg/ml 3일

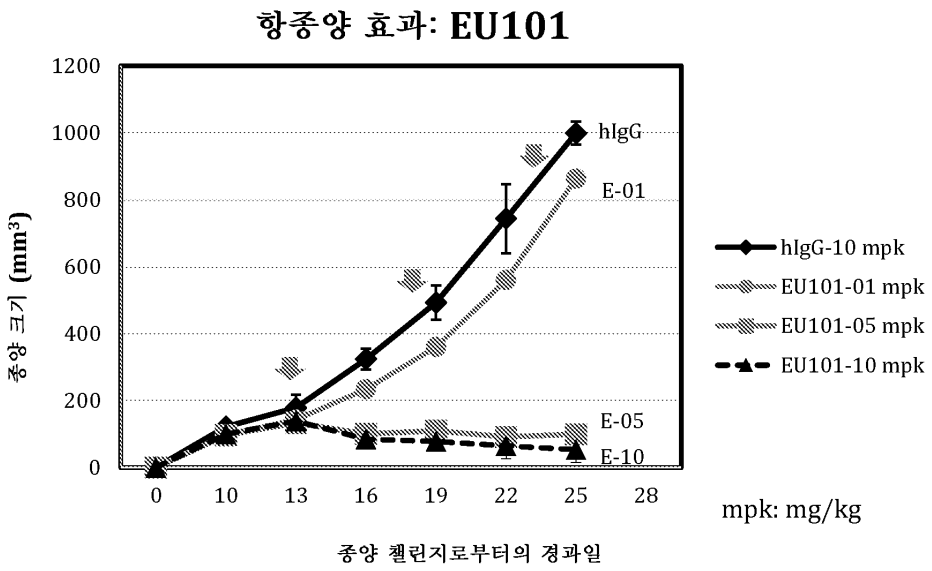
도면10a


ADCC 활성
정규화된 표적 세포
생존율의 %
150
100
50
0
**
*
NT
BBK-4
94G1
94KVT
EU101
ns P > 0.05
* P ≤ 0.05
** P ≤ 0.01
BBK-4: 마우스 IgG2a
94G1, 94KVT: 인간 IgG1
EU101: 조작된 IgG1

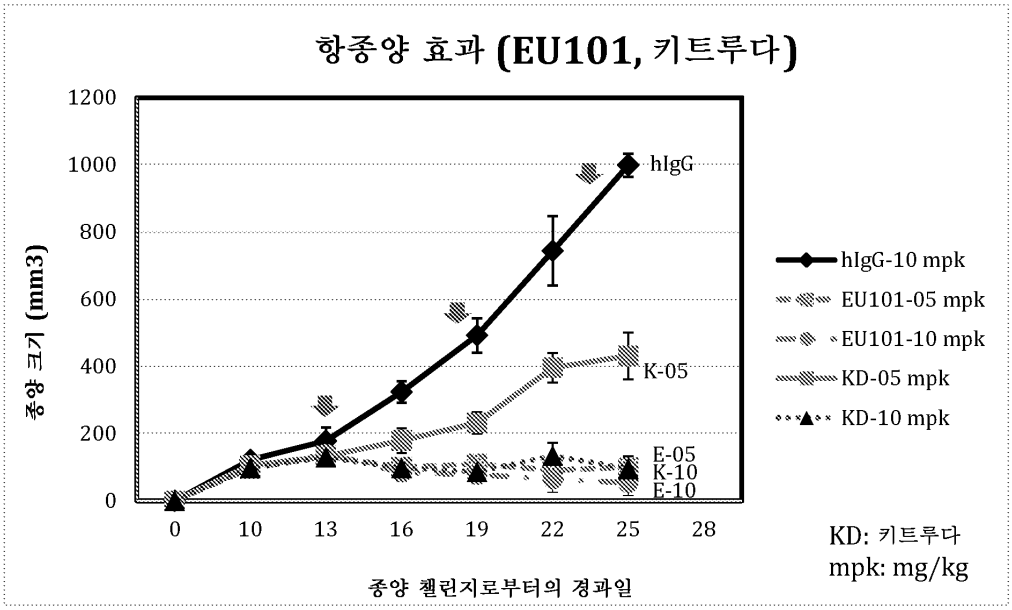
도면10b


4-1BB 항체의 CDC 활성
정규화된 세포
생존율의 %
120
80
40
**
NT
BBK-4
94G1
EU101
ns P > 0.05
* P ≤ 0.05
** P ≤ 0.01

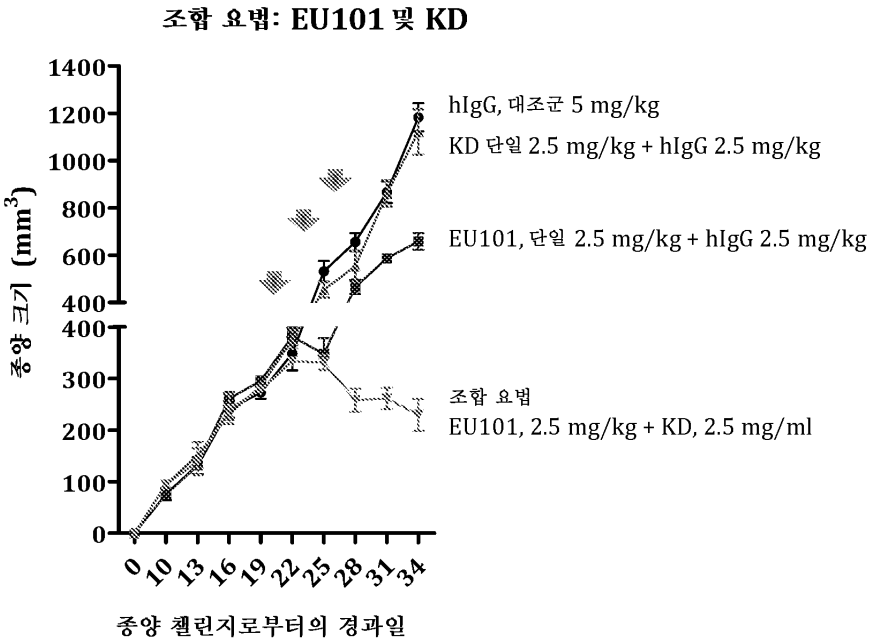
도면11


항종양 효과: EU101
종양 크기 (mm³)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
13
16
19
22
25
28
종양 첼린지로부터의 경과일
hIgG
E-01
E-05
E-10
hIgG-10 mpk
EU101-01 mpk
EU101-05 mpk
EU101-10 mpk
mpk: mg/kg

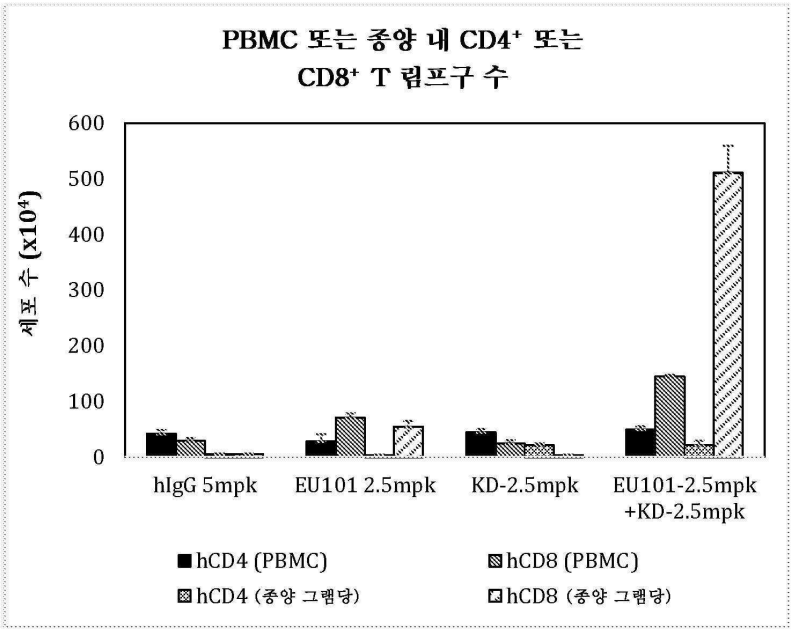
도면12


항종양 효과 (EU101, 키트루다)
종양 크기 (mm3)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
13
16
19
22
25
28
종양 첼린지로부터의 경과일
hIgG
K-05
E-05
K-10
E-10
hIgG-10 mpk
EU101-05 mpk
EU101-10 mpk
KD-05 mpk
KD-10 mpk
KD: 키트루다
mpk: mg/kg

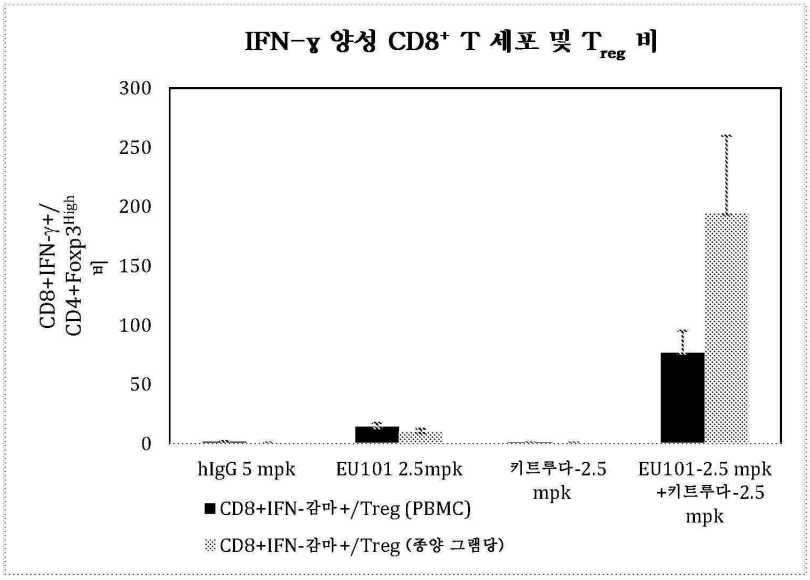
도면13


조합 요법: EU101 및 KD
종양 크기 (mm3)
1400
1200
1000
800
600
400
400
300
200
100
0
0 10 13 16 19 22 25 28 31 34
종양 챌린지로부터의 경과일
hIgG, 대조군 5 mg/kg
KD 단일 2.5 mg/kg + hIgG 2.5 mg/kg
EU101, 단일 2.5 mg/kg + hIgG 2.5 mg/kg
조합 요법
EU101, 2.5 mg/kg + KD, 2.5 mg/ml

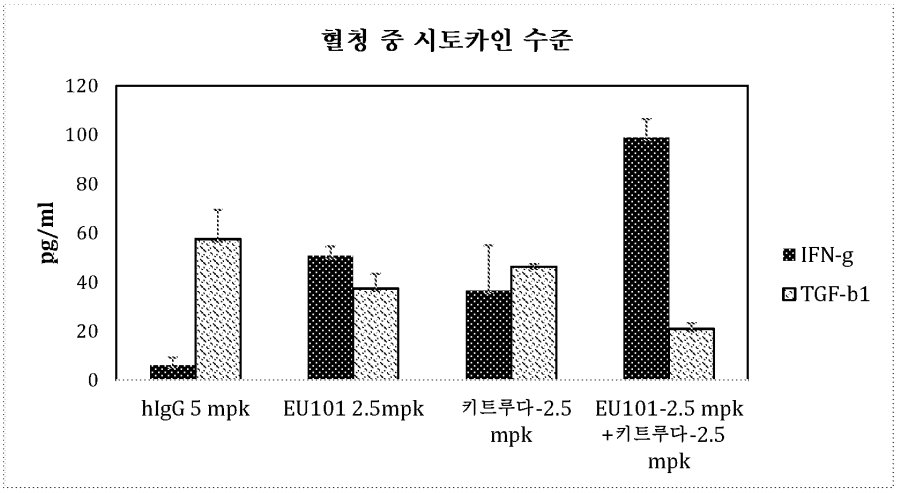
도면14a


PBMC 또는 종양 내 CD4+ 또는
CD8+ T 림프구 수
세포 수 (x10⁴)
600
500
400
300
200
100
0
hIgG 5mpk
EU101 2.5mpk
KD-2.5mpk
EU101-2.5mpk
+KD-2.5mpk
hCD4 (PBMC)
hCD8 (PBMC)
hCD4 (종양 그램당)
hCD8 (종양 그램당)

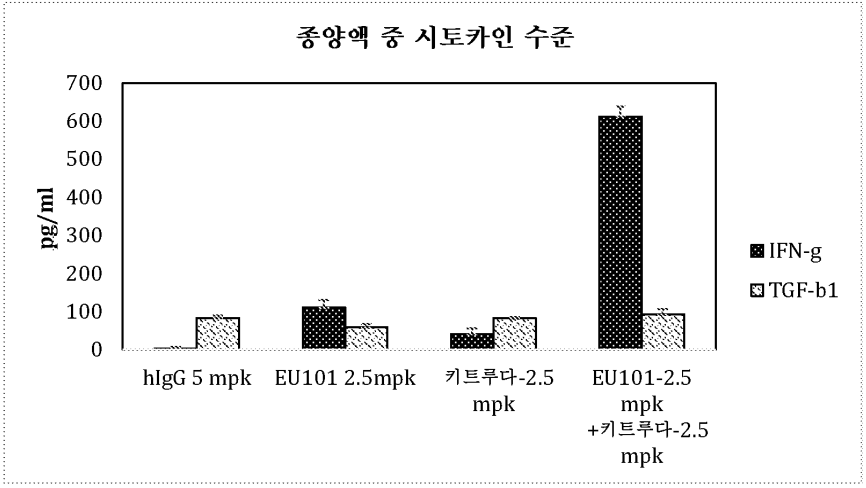
도면14b


IFN-γ 양성 CD8+ T 세포 및 Treg 비
CD8+IFN-γ+/ CD4+Foxp3High 비
300
250
200
150
100
50
0
hIgG 5 mpk
EU101 2.5mpk
키트루다-2.5 mpk
EU101-2.5 mpk +키트루다-2.5 mpk
CD8+IFN-감마+/Treg (PBMC)
CD8+IFN-감마+/Treg (중앙 그램당)

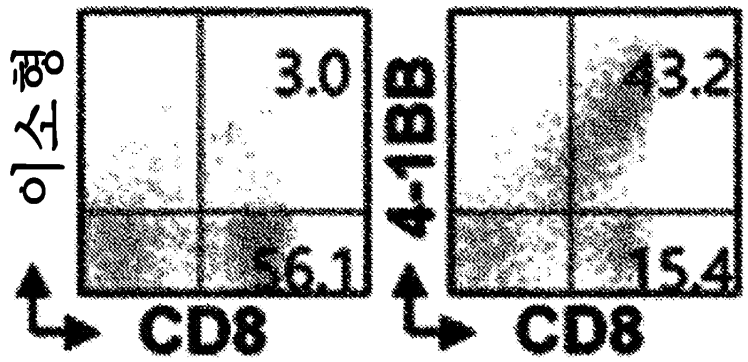
도면15a


혈청 중 시토카인 수준
pg/ml
120
100
80
60
40
20
0
hIgG 5 mpk
EU101 2.5mpk
키트루다-2.5 mpk
EU101-2.5 mpk +키트루다-2.5 mpk
IFN-g
TGF-b1

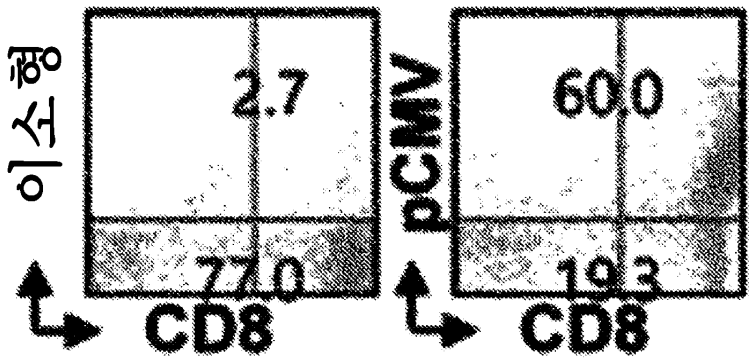
도면15b



도면16a



도면16b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> EUTILEX CO., LTD.

<120> ANTI-HUMAN 4-1BB ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> FE18042WO

<140> PCT/IB2018/000043

<141> 2018-01-05

<150> 62/443,281

<151> 2017-01-06

<160> 44

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 1

Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
1 5

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223
> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 2

Tyr Ala Ser
1

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 3

Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro Thr
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 4

Gln Asp Gly His Ser Trp Pro Pro Thr

1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 5

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 6

Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr

1 5

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 7

Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 8

Ala Arg Ser Phe Lys Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 9

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 10

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Trp Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 11

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 12

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

1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Phe Lys Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 13

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Phe Lys Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 14

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 14

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

50 55 60
Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Phe Lys Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser
1 5 10 15
Pro Cys Pro Pro
20

<210> 16

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 16

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 17

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 17

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 18

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 18

Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr
1 5 10 15
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
20 25 30
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 19

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 19

Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 20

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 20

Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 22
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 22

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

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

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

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

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 23

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 23

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

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

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

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

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

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 24

ggatccacaa gatcattgca g 21

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 25

ttgagctcga gcctggtcct gaaaaca 27

<210> 26

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 26

cgcgtggatc caaggagtgt tcctcca 27

<210> 27

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 27

ttgagctcga gacgtttctg atcgtta 27

<210> 28

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 28

cgcgtggatc cggcatctgt cgaccct 27

<210> 29

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 29

ttgagctcga ggatctgcgg agagtgt 27

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 30

ggatccacaa gatcattgca g 21

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 31

ctcgaggcat atgtcacagg t 21

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 32

ggatccacaa gatcattgca g 21

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 33

ctcgaggctg gagaaactat 20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 34

ggatcctgcc cagctggtac 20

<210> 35

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 35

ttgagctcga gcctggtcct gaaaaca 27

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 36

ggatccagga atcagatttg c 21

<210> 37

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 37

ttgagctcga gcctggtcct gaaaaca 27

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 38

ggatccacaa gatcattgca g 21

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 39

ctcgaggcaa atctgattcc t 21

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 40

ggatccacaa gatcattgca g 21

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 41

ctcgagtgga ggacagggac t 21

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 42

Asn Ala Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro

1 5 10

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 43

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 44

<211> 255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
35 40 45

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

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
85 90 95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu

180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu

195 200 205

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

210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly

225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

245 250 255