



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0063147
(43) 공개일자 2020년06월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2827 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7008775
(22) 출원일자(국제) 2018년10월09일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년03월26일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/077511
(87) 국제공개번호 WO 2019/072869
국제공개일자 2019년04월18일
(30) 우선권주장
17195781.4 2017년10월10일
유럽특허청(EPO)(EP)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
누맙 세리퓨틱스 아게
스위스 8820 베덴스빌 아인지들러스트라체 34
(72) 발명자
군데 테
스위스 쥐리히 8005 투비넨스트라체 33
브록 마티아스
스위스 애쉬 8904 펠드스트라체 46
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아이엠

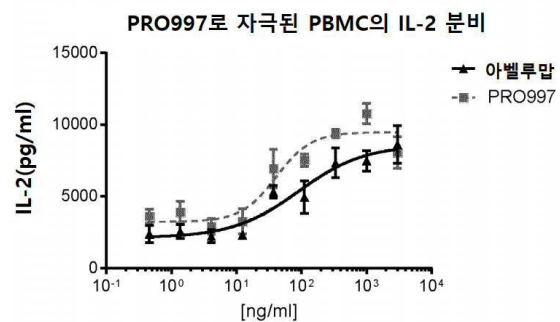
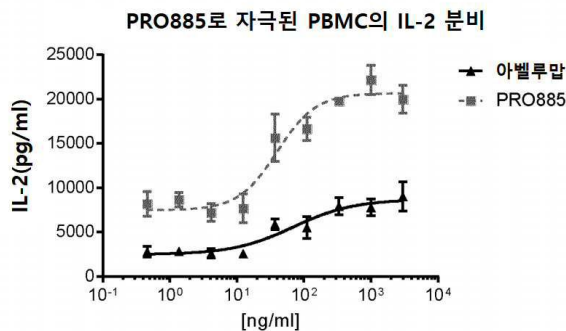
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 PDL1 표적화 항체 및 이의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 인간 PDL1과 특이적으로 결합하는 단리 항체와, 이의 약학 조성물 및 사용 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 항체를 암호화하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 핵산 또는 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포와, 상기 항체를 제조하는 방법에 관한 것이기도 하다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

헤스 크리스티안

스위스 주리히 8045 위에틀리베르크스트라쎄 304

시모낭 알렉산더

프랑스 로제나우 68128 5 루 드 라루

(30) 우선권주장

18167094.4 2018년04월12일
유럽특허청(EPO)(EP)
18180816.3 2018년06월29일
유럽특허청(EPO)(EP)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지고, 서열 번호 1, 2 및 3의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 17, 18 및 19의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각을 포함하는 단리 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하되, 단 상기 VH는 VH3 또는 VH4이고, 바람직하게는 VH3인 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하되, 단 상기 VL은 V_{κ} 틀 FR1, FR2 및 FR3, 구체적으로 $V_{\kappa 1}$ 또는 $V_{\kappa 3}$ FR1 ~ FR3, 바람직하게 $V_{\kappa 1}$ FR1 ~ FR3와, V_{κ} FR4, 구체적으로 $V_{\kappa 1}$ FR4, $V_{\kappa 3}$ FR4 및 V_{λ} FR4, 구체적으로 서열 번호 64 ~ 서열 번호 70 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하는 V_{λ} FR4, 바람직하게 서열 번호 64 ~ 서열 번호 70 중 임의의 것에 제시된 바와 같은 V_{λ} FR4, 바람직하게 서열 번호 64 또는 65에 제시된 바와 같은 V_{λ} FR4, 더욱 바람직하게 서열 번호 64에 제시된 바와 같은 V_{λ} FR4로부터 선택되는 틀 FR4를 포함하는 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 서열 번호 14, 15, 16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 14 또는 16의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 16의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과; 서열 번호 26 및 27로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 27의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 (a) 서열 번호 14의 VH 서열 및 서열 번호 26의 VL 서열; 또는 (b) 서열 번호 15의 VH 서열 및 서열 번호 26의 VL 서열; 또는 (c) 서열 번호 16의 VH 서열 및 서열 번호 27의 VL 서열을 포함하는 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는

(i) 표면플라스몬공명법(SPR)에 의해 측정된 바에 따르면 해리 상수(KD) 5 nM 미만, 구체적으로 1 nM 미만, 구체적으로 500 pM 미만, 더욱 구체적으로 100 pM 미만, 바람직하게 50 pM 미만, 더욱 바람직하게 10 pM 미만으로 인간 PDL1과 결합하고;

(ii) SPR에 의해 측정되는 바에 따르면 K_{off} 속도 $10^{-3} s^{-1}$ 이하, 또는 $10^{-4} s^{-1}$ 이하, 또는 $10^{-5} s^{-1}$ 이하로 인간 PDL1과 결합하며;

(iii) SPR에 의해 측정되는 바에 따르면 K_{on} 속도 적어도 $10^3 M^{-1} s^{-1}$ 이상, 적어도 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 이상, 적어도 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 이상, 적어도 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 이상으로 인간 PDL1과 결합하고;

(iv) 마카카 파스쿨라리스(사노모물거스) PDL1과 교차 반응성으로서, 구체적으로 표면플라스몬공명법에 의해 측정되는 바에 따르면 KD 5 nM 미만, 구체적으로 1 nM 미만, 구체적으로 500 pM 미만, 더욱 구체적으로 100 pM 미만, 바람직하게 50 pM 미만, 더욱 바람직하게 10 pM 미만으로 사노모물거스 PDL1과 결합하며;

- (v) 구체적으로 SPR에 의해 측정되는 바에 따르면 무스 머스클러스 PDL1과 비 교차 반응성이고;
- (vi) 구체적으로 SPR에 의해 측정되는 바에 따르면 인간 PDL2와 결합하지 않으며;
- (vii) ELISA 검정에서 확정되었을 때 2 이상, 바람직하게 3 이상, 더욱 바람직하게 4 이상인, 아벨루마의 역가에 상대적인 역가(상대적 역가)로 PDL1/PD-1 상호작용을 중화하는 능력을 가지고[단 상기 상대적 역가는 ELISA 검정에서 측정된 아벨루마의 IC₅₀ 값(ng/mL) 대 ELISA 검정에서 측정된 상기 항체의 IC₅₀ 값(ng/mL)의 비이고, 상기 항체는 구체적으로 scFv임];
- (viii) NFAT 리포터 유전자 검정에서 측정되었을 때 2 이상, 바람직하게 3 이상, 더욱 바람직하게 4 이상인, 아벨루마의 역가에 상대적인 역가(상대적 역가)로 PDL1/PD-1 상호작용을 중화하는 능력을 가지며/가지거나[단 상기 상대적 역가는 NFAT 리포터 유전자 검정에서 측정된 아벨루마의 IC₅₀ 값(ng/mL) 대 NFAT 리포터 유전자 검정에서 측정된 상기 항체의 IC₅₀ 값(ng/mL)의 비이고, 상기 항체는 구체적으로 scFv임];
- (ix) ELISA 검정에서 확정되었을 때 2 이상, 바람직하게 3 이상, 더욱 바람직하게 4 이상인, 아벨루마의 역가에 상대적인 역가(상대적 역가)로 PDL1/B7-1 상호작용을 중화하는 능력을 가지며[단 상기 상대적 역가는 ELISA 검정에서 측정된 아벨루마의 IC₅₀ 값(ng/mL) 대 ELISA 검정에서 측정된 상기 항체의 IC₅₀ 값(ng/mL)의 비이고, 상기 항체는 구체적으로 scFv임]

항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는

- (i) scFv 포맷일 때, 시차주사형광측정법에 의해 확정된 용융 온도(T_m)가 적어도 60℃, 바람직하게 적어도 65℃, 더욱 바람직하게 적어도 70℃이고[단 상기 항체는 구체적으로 50 mM 인산염-시트르산염 완충제(pH 6.4, 150 mM NaCl 포함) 중에 제제화됨];
- (ii) scFv 포맷일 때, 연속 동결-해동 주기를 5회 거친 후 단량체 함량 감소율이 5% 미만, 바람직하게 3% 미만, 더욱 바람직하게 1% 미만이며/미만이거나[단 이때 본 발명의 항체의 출발 농도는 10 mg/ml이고, 본 발명의 항체는 구체적으로 50 mM 인산염-시트르산염 완충제(pH 6.4, 150 mM NaCl 포함) 중에 제제화됨];
- (iii) scFv 포맷일 때, 적어도 2주 동안, 구체적으로 적어도 4주 동안 4℃에서 보관하였을 때 단량체 함량 감소율이 15% 미만, 예컨대 12% 미만, 10% 미만, 7% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 바람직하게 1% 미만인[단 이때 본 발명의 항체의 출발 농도는 10 mg/ml이고, 구체적으로 상기 항체는 50 mM 인산염-시트르산염 완충제(pH 6.4, 150 mM NaCl 포함) 중에 제제화됨]

항체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 모노클로날 항체, 키메라 항체, Fab, Fv, scFv, dsFv, scAb, STAB, 그리고 대안적 스캐폴드를 기반으로 하는 결합 도메인, 예컨대 안키린 기반 도메인, 파이노머, 아비머, 안티칼린, 피브로넥틴, 및 항체의 불변 영역으로 구축될 결합 부위들(예컨대 F-star의 Modular AntibodyTechnology)(이에 한정되는 것은 아님)로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 바람직하게 scFv인 항체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 항체는 scFv이고, 상기 scFv는 서열 번호 29, 서열 번호 30, 서열 번호 31로 이루어진 군 으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 31의 아미노산 서열을 가지는 항체.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 다중 특이적 분자이고, 구체적으로 상기 다중 특이적 분자는 적어도 제2의 기능성 분자를 포함하는 항체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 의한 단리 항체와 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 의한 항체 또는 제11항에 의한 조성물의 의약으로서 사용하기 위한 용도.

청구항 13

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 의한 항체 또는 제11항에 의한 약학 조성물의 암 치료에 사용하기 위한 용도.

청구항 14

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 의한 항체를 암호화하는 핵산.

청구항 15

제14항에 의한 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 의한 항체를 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 인간 PDL1에 특이적으로 결합하는 단리 항체와, 이의 약학 조성물 및 사용 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 항체를 암호화하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터, 상기 핵산 또는 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포, 그리고 상기 항체를 제조하는 방법에 관한 것이기도 하다.

배경 기술

[0002]

PDL1(CD274, B7-H1)은 40kDa의 I형 경막 단백질이다. PDL1은 PD-1에 대한 표면 당단백질 리간드로서, 활성화 T 세포 및 B 세포에 의해 발현되는 핵심 면역 관문 수용체이자, 면역억제를 매개한다. PDL1은 만성 감염, 임신, 조직 이종이식, 자가면역성질환 및 암이 발병하였을 때 면역계 반응의 억제에 연루되어 있다. PDL1은 항원 제시 세포와 인간 암 세포, 예컨대 두경부의 편평세포암종, 흑색종, 뇌종양, 그리고 갑상선, 흉선, 식도, 폐, 유방, 위장관, 결장직장, 간, 췌장, 신장, 부신피질, 방광, 요로상피, 난소 및 피부 암 세포 등 다에서 발견된다(Katsuya Y, et al., Lung Cancer.88(2):154-159 (2015); Nakanishi J, et al., Cancer Immunol Immunother. 56(8):1173-1182 (2007); Nomi T, et al., Clin Cancer Res. 13(7):2151-2157 (2007); Fay AP, et al., J Immunother Cancer. 3:3 (2015); Strome SE, et al., Cancer Res. 63(19):6501-6505 (2003); Jacobs JF, et al. Neuro Oncol.11(4):394-402 (2009); Wilmotte R, et al. Neuroreport. 16(10):1081-1085 (2005)). PDL1은 정상 조직에서는 드물게 발현되지만, 종양 부위에서는 유도적으로 발현된다(Dong H, et al., Nat Med. 8(8):793-800 (2002); Wang et al., Onco Targets Ther. 9: 5023-5039 (2016)). PDL1은 PD-1과 결합함으로써 T 세포 활성화 및 사이토카인 분비를 하향조절한다(Freeman et al., 2000; Latchman et al, 2001). PDL1에 의해 활성화된 PD-1은 종양의 발달 및 성장에 대한 면역 관용성 환경을 잠재적으로 제공한다. PDL1은 또한 다른 수용체 B7.1(B7-1, CD80)과의 상호작용을 통해 T 세포의 기능을 저하시키는 방향으로 조절한다.

[0003]

PDL1/PD-1 상호작용의 억제는 강력한 항 종양 활성을 허용한다. PDL1에 대항하는 다양한 항체가 이미 공지되어 있으며(예를 들어 WO 2013/079174 및 WO2017/118321 참조), PD-1 신호전달을 방해하는 항체 다수가 임상 개발에 들어갔다. 이러한 항체는 하기와 같은 주요 범주 2개, 즉 PD-1을 표적화하는 항체(니볼루맵, Bristol-Myers Squibb; 펠브롤리주맵, Merck, Whitehouse Station, NJ; 피딜리주맵, CureTech, Yavne, Israel), 그리고 PDL1을 표적화하는 항체(MPDL3280A, Genentech, South San Francisco, CA; MEDI4736, MedImmune/AstraZeneca; BMS-936559, Bristol-Myers Squibb; MSB0010718C, EMD Serono, Rockland, MA)(이에 관한 검토를 원하면 문헌(Postow MA et al., J Clin Oncol. Jun 10;33(17):1974-82 (2015))을 참조한다)에 속한다. PDL1 표적화 대 PD-1 표적화는 상이한 생물학적 효과를 발휘할 수 있다. PD-1 항체는, PD-1과 이의 두 리간드, 즉 PDL1 및 PDL2의 상호작용을 막는다. PDL1 항체는 PD-1이 PDL2와 상호작용하는 것을 막지는 않는데, 이 상호작용의 효과는 아직 공지되어 있지 않다. 그러나 PDL1 항체는 PDL1과, PD-1뿐 아니라 B7-1의 상호작용을 막는데(Butte MJ, et al., Immunity 27:111-122, (2007)), 이로써 T 세포상 "-" 신호가 발휘되는 것으로 생각된다. PDL1 차단은 주목받는 초기 데이터인 것으로 입증되었으며, 현재 4개의 임상 항 PDL1 mAb, 즉 아테졸리주맵 및 MEDI4736(둘 다 인간

IgG1의 무 Fc 변이체임), MSB001078C(IgG1) 그리고 BMS-936559(IgG4)가 시험중에 있다(Chester C., et al., Cancer Immunol Immunother Oct;65(10):1243-8 (2016)).

- [0004] 최근들어, 그 어떠한 접근법도 암 환자에서 만족스럽게 강력한 면역 반응을 유도한다고 입증되어 있지 않다. 당 분야에서는 PDL1/PD-1 상호작용의 개선된 치료 조정제를 제조하고, 암 환자에서 관찰되는 면역억제 기작을 극복하는 방법이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 목적은, 인간 PDL1 단백질과 특이적으로 결합하고, 치료법에 사용되기 유리한 특성, 예컨대 더 큰 친화성, 개선된 효능 및 개선된 생물물리학적 특성, 예컨대 용해성, 발현가능성 및 안정성을 가지는 항체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0006] 일 양태에서, 본 발명은 신규 PDL1 항체에 관한 것이다.
- [0007] 일 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체와 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0008] 다른 양태에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한 본 발명의 항체 또는 본 발명의 조성물에 관한 것이다.
- [0009] 일 양태에서, 본 발명은 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는데 사용하기 위한 본 발명의 항체 또는 본 발명의 조성물에 관한 것이다.
- [0010] 일 양태에서, 본 발명은 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하기 위한 의약을 제조함에 있어 본 발명의 항체 또는 본 발명의 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [0011] 다른 양태에서, 본 발명은, 본 발명의 항체 또는 본 발명의 조성물 치료적 유효량만큼을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0012] 또다른 양태에서, 본 발명은, 본 발명의 항체를 암호화하는 핵산에 관한 것이다. 추가의 양태에서, 본 발명은 상기 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 추가의 양태에서, 본 발명은 상기 핵산 또는 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0013] 다른 양태에서, 본 발명은, 본 발명의 항체를 제조하는 방법으로서, 본 발명의 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0014] 하기 항목들에 요약되어 있는 본 발명의 양태들, 유리한 특징들과 바람직한 구현예들은 각각 단독일 때 또는 조합될 때 본 발명의 과제를 해결하는데 더욱 기여한다:
- [0015] 1. 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지는 단리 항체로서, (a) 서열 번호 1, 4, 5, 8, 11, 32, 35, 36, 39 및 42 중 임의의 하나로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 1 또는 32의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 중쇄 가변 영역 CDR1; (b) 서열 번호 2, 6, 9, 12, 33, 37, 40 및 43 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 2 또는 33의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 중쇄 가변 영역 CDR2; (c) 서열 번호 3, 7, 10, 13, 34, 38, 41 및 44 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 3 또는 34의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 중쇄 가변 영역 CDR3; (d) 서열 번호 17, 20, 23, 48, 51 및 54 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 17 또는 48의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 경쇄 가변 영역 CDR1; (e) 서열 번호 18, 21, 24, 49, 52 및 55 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 18 또는 49의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 (f) 서열 번호 19, 22, 25, 50, 53 및 56 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 19 또는 50의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 경쇄 가변 영역 CDR3.

- [0016] 을 포함하는 단리 항체.
- [0017] 2. 항목 1의 항체로서, 항체는 (a) 서열 번호 1, 2 및 3의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 17, 18 및 19의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (b) 서열 번호 4, 6 및 7의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 20, 21 및 22의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (c) 서열 번호 5, 6 및 7의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 20, 21 및 22의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (d) 서열 번호 8, 9 및 10의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 17, 18 및 19의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (e) 서열 번호 11, 12 및 13의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 23, 24 및 25의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (f) 서열 번호 32, 33 및 34의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 48, 49 및 50의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (g) 서열 번호 35, 37 및 38의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 51, 52 및 53의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (h) 서열 번호 36, 37 및 38의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 51, 52 및 53의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (i) 서열 번호 39, 40 및 41의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 48, 49 및 50의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (j) 서열 번호 42, 43 및 44의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 54, 55 및 56의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각
- [0018] 을 포함하는 항체.
- [0019] 3. 항목 1의 항체로서, (a) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 HCDR1; (b) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 HCDR2; (c) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 HCDR3; (d) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 LCDR1; (e) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 LCDR2; 및 (f) 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 LCDR3
- [0020] 를 포함하는 항체.
- [0021] 4. 항목 1의 항체로서, (a) 서열 번호 4 또는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 HCDR1; (b) 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 HCDR2; (c) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 HCDR3; (d) 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 LCDR1; (e) 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 LCDR2; 및 (f) 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 LCDR3
- [0022] 를 포함하는 항체
- [0023] 5. 항목 1의 항체로서, (a) 서열 번호 32의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 HCDR1; (b) 서열 번호 33의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 HCDR2; (c) 서열 번호 34의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 HCDR3; (d) 서열 번호 48의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 LCDR1; (e) 서열 번호 49의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 LCDR2; 및 (f) 서열 번호 50의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 LCDR3
- [0024] 를 포함하는 항체.
- [0025] 6. 항목 1의 항체로서, (a) 서열 번호 35 또는 서열 번호 36의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 HCDR1; (b) 서열 번호 37의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 HCDR2; (c) 서열 번호 38의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 HCDR3; (d) 서열 번호 51의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 LCDR1; (e) 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 LCDR2; 및 (f) 서열 번호 53의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 LCDR3
- [0026] 를 포함하는 항체.
- [0027] 7. 상기 항목들 중 임의의 하나의 항체로서, 항체는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하되, 단 상기 VH는 VH1, VH3 또는 VH4, 바람직하게 VH3 또는 VH4, 더욱 바람직하게 VH3인 항체.
- [0028] 8. 상기 항목들 중 임의의 하나의 항체로서, 항체는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하되, 단 상기 VL은 V_{κ} 틀 FR1, FR2 및 FR3, 구체적으로 $V_{\kappa 1}$ 또는 $V_{\kappa 3}$ FR1 ~ FR3, 바람직하게 $V_{\kappa 1}$ FR1 ~ FR3와, V_{κ} FR4, 구체적으로 $V_{\kappa 1}$

FR4, Vκ3 FR4 및 Vλ FR4이되, 구체적으로 서열 번호 64 ~ 서열 번호 70 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하는 Vλ FR4, 바람직하게 서열 번호 64 ~ 서열 번호 70 중 임의의 것에 제시된 바와 같은 Vλ FR4, 바람직하게 서열 번호 64 또는 65에 제시된 바와 같은 Vλ FR4, 더욱 바람직하게 서열 번호 64에 제시된 바와 같은 Vλ FR4로부터 선택되는 틀 FR4를 포함하는 항체.

[0029] 9. 상기 항목들 중 임의의 하나의 항체로서, 항체는 서열 번호 14, 15, 16, 45, 46 및 47로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 14 또는 16의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 16의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과; 서열 번호 26, 27, 57 및 58로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 26 또는 27의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 27의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

[0030] 을 포함하는 항체.

[0031] 10. 상기 항목들 중 임의의 하나의 항체로서, 항체는 (a) 아미노산 서열인 서열 번호 14와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과, 아미노산 서열인 서열 번호 26과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; (b) 아미노산 서열인 서열 번호 15와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과, 아미노산 서열인 서열 번호 26과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; (c) 아미노산 서열인 서열 번호 16과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과, 아미노산 서열인 서열 번호 27과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; (d) 아미노산 서열인 서열 번호 45와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과, 아미노산 서열인 서열 번호 57과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; (f) 아미노산 서열인 서열 번호 46과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과, 아미노산 서열인 서열 번호 58과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; (g) 아미노산 서열인 서열 번호 47과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과, 아미노산 서열인 서열 번호 57과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

[0032] 을 포함하는 항체.

[0033] 11. 상기 항목들 중 임의의 하나의 항체로서, 항체는 서열 번호 14, 15, 16, 45, 46 및 47 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 14 또는 16의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과; 서열 번호 26, 27, 57 및 58 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 26 또는 27의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

[0034] 12. 상기 항목들 중 임의의 하나의 항체로서, (a) 서열 번호 14의 VH 서열 및 서열 번호 26의 VL 서열; (b) 서열 번호 15의 VH 서열 및 서열 번호 26의 VL 서열; (c) 서열 번호 16의 VH 서열 및 서열 번호 27의 VL 서열; (d) 서열 번호 45의 VH 서열 및 서열 번호 57의 VL 서열; (f) 서열 번호 46의 VH 서열 및 서열 번호 58의 VL 서열; 또는 (g) 서열 번호 47의 VH 서열 및 서열 번호 57의 VL 서열

[0035] 을 포함하는 항체.

[0036] 13. 상기 항목들 중 임의의 것의 항체로서, 상기 항체는

[0037] (i) 표면플라스몬공명법(SPR)에 의해 측정된 바에 따르면 해리 상수(KD) 5 nM 미만, 구체적으로 1 nM 미만, 구체적으로 500 pM 미만, 더욱 구체적으로 100 pM 미만, 바람직하게 50 pM 미만, 더욱 바람직하게 10 pM 미만으로 인간 PDL1과 결합하고[단 상기 항체는 구체적으로 scFv(1가 친화성)임];

[0038] (ii) SPR에 의해 측정되는 바에 따르면 K_{off} 속도 $10^{-3} s^{-1}$ 이하, 또는 $10^{-4} s^{-1}$ 이하, 또는 $10^{-5} s^{-1}$ 이하로 인간 PDL1과 결합하며[단 상기 항체는 scFv임];

[0039] (iii) SPR에 의해 측정되는 바에 따르면 K_{on} 속도 적어도 $10^3 M^{-1} s^{-1}$ 이상, 적어도 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 이상, 적어도 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 이상, 적어도 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 이상으로 인간 PDL1과 결합하고[단 상기 항체는 구체적으로 scFv임];

[0040] (iv) 마카카 파스쿨라리스(*Macaca fascicularis*)(사이노몰거스(*Cynomolgus*)) PDL1과 교차 반응성으로서, 구체적으로 SPR에 의해 측정되는 바에 따르면 KD 5 nM 미만, 구체적으로 1 nM 미만, 구체적으로 500 pM 미만, 더욱

구체적으로 100 pM 미만, 바람직하게 10 pM 미만으로 사이노몰거스 PDL1과 결합하며[단 상기 항체는 scFv임];

[0041] (v) 구체적으로 SPR에 의해 측정되는 바에 따르면 무스 머스쿨러스(*Mus musculus*) PDL1과 비 교차 반응성이고/이거나;

[0042] (vi) 구체적으로 SPR에 의해 측정되는 바에 따르면 인간 PDL2와 결합하지 않는 항체.

[0043] 14. 상기 항목들 중 임의의 하나의 항체로서, 상기 항체는 하기의 특성들, 즉

[0044] (i) ELISA 검정에서 측정되었을 때 1.5 이상, 예컨대 2 이상, 2.5 이상, 바람직하게 3 이상, 더욱 바람직하게 4 이상인, 아벨루마의 역가에 상대적인 역가(상대적 역가; relative potency)로 PDL1/PD-1 상호작용을 중화하는 능력을 가지고/가지거나[단 상기 상대적 역가는 ELISA 검정에서 측정된 아벨루마의 IC₅₀ 값(ng/mL) 대 ELISA 검정에서 측정된 상기 항체의 IC₅₀ 값(ng/mL)의 비이고, 상기 항체는 구체적으로 scFv임];

[0045] (ii) 선택적으로 NFAT 리포터 유전자 검정에서 측정되었을 때 1.5 이상, 예컨대 2 이상, 2.5 이상, 바람직하게 3 이상, 더욱 바람직하게 4 이상인, 아벨루마의 역가에 상대적인 역가(상대적 역가)로 PDL1/PD-1 상호작용을 중화하는 능력을 가지고/가지거나[단 상기 상대적 역가는 NFAT 리포터 유전자 검정에서 측정된 아벨루마의 IC₅₀ 값(ng/mL) 대 NFAT 리포터 유전자 검정에서 측정된 상기 항체의 IC₅₀ 값(ng/mL)의 비이고, 상기 항체는 구체적으로 scFv임];

[0046] (iii) ELISA 검정에서 측정되었을 때 1.5 이상, 예컨대 2 이상, 2.5 이상, 바람직하게 3 이상, 더욱 바람직하게 4 이상인, 아벨루마의 역가에 상대적인 역가(상대적 역가)로 PDL1/B7-1 상호작용을 중화하는 능력을 가지는[단 상기 상대적 역가는 ELISA 검정에서 측정된 아벨루마의 IC₅₀ 값(ng/mL) 대 ELISA 검정에서 측정된 상기 항체의 IC₅₀ 값(ng/mL)의 비이고, 상기 항체는 구체적으로 scFv임]

[0047] 항체.

[0048] 15. 상기 항목들 중 임의의 것의 항체로서, 상기 항체는

[0049] (i) scFv 포맷일 때, 시차 주사형광측정법(differential scanning fluorimetry)에 의해 측정된 용융 온도(T_m)가 적어도 60°C, 바람직하게 적어도 65°C, 더욱 바람직하게 적어도 70°C이고[단 상기 항체는 구체적으로 50 mM 인산염-시트르산염 완충제(pH 6.4, 150 mM NaCl 포함) 중에 제제화됨];

[0050] (ii) scFv 포맷일 때, 연속 동결-해동 주기를 5회 거친 후 단량체 함량 감소율이 5% 미만, 바람직하게 3% 미만, 더욱 바람직하게 1% 미만이며/이거나[단 이때 본 발명의 항체의 출발 농도는 10 mg/ml이고, 항체는 구체적으로 50 mM 인산염-시트르산염 완충제(pH 6.4, 150 mM NaCl 포함) 중에 제제화됨];

[0051] (iii) scFv 포맷일 때, 적어도 2주 동안, 구체적으로 적어도 4주 동안 4°C에서 보관하였을 때 단량체 함량 감소율이 15% 미만, 예컨대 12% 미만, 10% 미만, 7% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 바람직하게 1% 미만인[단 이때 본 발명의 항체의 출발 농도는 10 mg/ml이고, 구체적으로 본 발명의 항체는 50 mM 인산염-시트르산염 완충제(pH 6.4, 150 mM NaCl 포함) 중에 제제화됨]

[0052] 항체.

[0053] 16. 상기 항목들 중 임의의 것의 항체로서, 상기 항체는 모노클로날 항체, 키메라 항체, Fab, Fv, scFv, dsFv, scAb, 대안적 스캐폴드를 기반으로 하는 결합 도메인, 예컨대 안키린 기반 도메인, 파이노머, 아비머, 안티칼린, 피브로넥틴, 및 항체의 불변 영역으로 구축될 결합 부위들(예컨대 F-star의 Modular AntibodyTechnology™)(이에 한정되는 것은 아님)로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체.

[0054] 17. 상기 항목들 중 임의의 하나의 항체로서, 상기 항체는 단일 사슬 가변 단편(scFv) 또는 Fv인 항체.

[0055] 18. 항목 17의 항체로서, 상기 scFv는 서열 번호 29, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 60, 서열 번호 61 및 서열 번호 62로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 29 및 서열 번호 31로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 31의 아미노산 서열을 가지는 항체.

[0056] 19. 항목 16의 항체로서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택되는 IgG이고, 바람직하게 상기 항체는 IgG1인 항체.

- [0057] 20. 상기 항목들 중 임의의 것의 항체로서, 상기 항체는 키메라 또는 인간화된 것인 항체.
- [0058] 21. 항목 1 내지 20 중 임의의 하나의 항체가 결합하는 에피토프와 본질적으로 동일한 에피토프에 결합하는 항체.
- [0059] 22. 다중 특이적 분자, 구체적으로는 적어도 제2의 기능성 분자를 가지는 다중 특이적 분자인, 상기 항목들 중 임의의 하나의 항체.
- [0060] 23. 항목 22의 항체로서, 상기 항체는 단일 사슬 다이아바디(scDb), 탠덤 scDb(Tandab), 선형 이량체 scDb(LD-scDb), 환형 이량체 scDb(CD-scDb), 2중 특이적 T 세포 점유체(engager)(BiTE; 탠덤 디-scFv), 탠덤 트리-scFv, 트리바디(Fab-(scFv)2) 또는 바이바디(Fab-(scFv)1), Fab, Fab-Fv2, Morrison(IgG CH₃-scFv 융합체(Morrison L) 또는 IgG CL-scFv 융합체(Morrison H)), 트리아바디, scDb-scFv, 2중 특이적 Fab2, 디-미니항체, 테트라바디, scFv-Fc-scFv 융합체, scFv-HSA-scFv 융합체, 디-다이아바디, DVD-Ig, COVD, IgG-scFab, scFab-dsscFv, Fv2-Fc, IgG-scFv 융합체, 예컨대 bsAb(경쇄의 C-말단에 결합된 scFv), Bs1Ab(경쇄의 N-말단에 결합된 scFv), Bs2Ab(중쇄의 N-말단에 결합된 scFv), Bs3Ab(중쇄의 C-말단에 결합된 scFv), Ts1Ab(중쇄 및 경쇄 둘 다의 N-말단에 결합된 scFv), Ts2Ab(중쇄의 C-말단에 결합된 dsscFv), 헤테로이량체 Fc 도메인을 기반으로 한 2중 특이적 항체, 예컨대 낱-인투-홀(Knob-into-Hole) 항체(KiHs); Fv, scFv, scDb, 탠덤-디-scFv, 탠덤 트리-scFv, Fab-(scFv)2, Fab-(scFv)1, Fab, Fab-Fv2, 헤테로이량체 Fc 도메인 또는 기타 임의의 헤테로이량체화 도메인의 사슬 중 어느 하나의 N-말단 및/또는 C-말단에 융합된 COVD, MATCH 및 듀오바디(DuoBody)로 이루어진 군으로부터 선택되는 포맷을 가지는 항체.
- [0061] 24. 항목 1 내지 23 중 임의의 하나의 항체와 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0062] 25. 의약으로서 사용하기 위한 항목 1 내지 23 중 임의의 하나의 항체, 또는 항목 24의 조성물.
- [0063] 26. 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 암의 치료에 사용하기 위한 항목 1 내지 23 중 임의의 하나의 항체, 또는 항목 24의 조성물.
- [0064] 27. 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하기 위한, 항목 1 내지 23 중 임의의 하나의 항체, 또는 항목 24의 조성물의 용도.
- [0065] 28. 암 치료를 필요로 하는 대상체의 암을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어 항목 1 내지 23 중 임의의 하나의 항체, 또는 항목 24의 조성물의 용도.
- [0066] 29. 항목 1 내지 23 중 임의의 하나의 항체, 또는 항목 24의 조성물 치료적 유효량만큼을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법.
- [0067] 30. 항목 1 내지 23 중 임의의 하나의 항체를 암호화하는 핵산.
- [0068] 31. 항목 31의 핵산을 포함하는 벡터.
- [0069] 32. 항목 31의 핵산 또는 항목 32의 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [0070] 33. 항목 31의 핵산 또는 항목 31의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 항목 1 내지 23 중 임의의 하나의 항체를 제조하는 방법.
- [0071] 34. 항목 1 내지 23 중 임의의 하나의 항체, 또는 항목 24의 조성물을 포함하는 키트.

도면의 간단한 설명

- [0072] 도 1: PDL1에 대해 최대의 친화성을 가지는 토끼 IgG 클론에 의한 PDL1/PD-1 상호작용의 중화. ELISA에 의해 측정된 흡광도는 33-03-G02(A) 분자 농도(ng/ml) 또는 37-20-B03(B) 분자 농도(ng/ml)의 함수로서 표시되어 있다. 아벨루마이 비교 기준으로서 사용되었다.
- 도 2: 선택된 토끼 IgG 클론으로서, PDL1에 대해 최대의 친화성을 가지는 클론 33-03-G02(A) 및 클론 37-20-B03(B)에 의한 PDL1/PD-1 상호작용의 중화. ELISA에 의해 측정된 흡광도는 분자 농도(ng/ml)의 함수로서 표시되어 있다. 아벨루마이 비교 기준으로서 사용되었다.
- 도 3: 세포 기반 리포터 유전자 검정에서 PDL1에 대해 최대의 친화성을 가지는, 선택된 토끼 IgG 클론에 의한 PDL1/PD-1 상호작용의 중화. 검정에서 얻어진 발광 신호에 비례하는 억제%는 분자 농도(ng/ml)의 함수로서 표시

되어 있다. 아벨루맵이 비교 기준으로서 사용되었다.

도 4: 도 4a는 CDR 세트 및 틀 선택이 PDL1/PD-1 상호작용 중화에 미치는 영향력을 NFAT-루시페라아제 리포터 유전자 검정에서 보여주는 것이다. 검정에서 얻어진 발광 신호에 비례하는 억제%는 scFv 농도(ng/ml)의 함수이다. 아벨루맵이 비교 기준으로서 사용되었다. 도 4b는 도메인 최적화가 PDL1/PD-1 상호작용의 중화 역가에 미치는 영향력을 NFAT-루시페라아제 리포터 유전자 검정을 통해 보여주는 것이다. 검정에서 얻어진 발광 신호에 비례하는 억제%는 scFv 농도(ng/ml)의 함수로 표시된다. 아벨루맵이 비교 기준으로서 사용되었다.

도 5: 리포터 유전자 검정에서 제조한 인간 혈청 알부민이 존재할 때 scDb-scFvsPRO963 및 PRO1057(A), PRO1186 및 PRO1430(B), PRO1431 및 PRO1432(C), PRO1473(D), PRO1476(E), PRO1479(F) 및 PRO1482(G)에 의한 PDL1/PD-1 상호작용의 중화 역가. 검정에서 얻어진 발광 신호에 비례하는 억제%는 분자 농도(ng/ml)의 함수로서 표시되어 있다. 아벨루맵이 비교 기준으로서 사용되었다.

도 6: 2가 분자의 역가와, NFAT-루시페라아제 리포터 유전자 검정에 있어 PDL1/PD-1 상호작용의 중화 역가에 LC 또는 HC scFv 융합체(Morrison 포맷)이 미치는 영향. 검정에서 얻어진 발광 신호에 비례하는 억제%는 분자 농도(ng/ml)의 함수로서 표시되어 있다. 아벨루맵이 비교 기준으로서 사용되었다.

도 7: PD-1/PDL1 경쟁 ELISA. 모든 분자는 기준 IgG인 아벨루맵의 IC₅₀ 값과 유사하거나 더 작은 IC₅₀ 값으로 PD-1 및 PDL1간 상호작용을 강력하게 차단하였다.

도 8: B7-1/PDL1 경쟁 ELISA. 아벨루맵과 유사하게, 모든 분자는 B7-1 및 PDL1간 상호작용을 강력하게 차단하였다.

도 9: 생체 외 T 세포 활성화 검정. PBMC는 10 ng/ml의 SEA로 자극되고 나서, 96 시간 동안 scFv PRO997 또는 scDb PRO885의 일련의 희석액으로 처리되었다. T 세포의 활성화는 수득된 상청액 중 IL-2를 ELISA에 의해 정량함으로써 평가되었다. PRO885 및 PRO997 처리는, IL-2 분비를 눈에 띄게 증가시켰다. PRO997은 아벨루맵의 역가보다 더 큰 역가를 보였다. PRO885는 아벨루맵과 비교되었을 때 훨씬 증가한 효과 크기(effect size)를 보였다. 데이터는 S자형 4PL 피트(GraphPad Prism)를 사용하여 피팅(fitting)되었다.

도 10: 면역결핍 NOG 마우스 변종 및 동종이제 인간 말초혈액단핵세포(hPBMC)를 사용하였을 때, 인간 HCC827 NSCLC 이종이식체에 있어 항 PDL1 IgG1(PRO1137) 치료법의 항 종양 활성. 마우스는 당일, 3일차, 7일차 및 10일차에 항 PDL1 IgG1(PRO1137) 또는 비이클로 i.p 처리되었다. 종양 부피는, 마우스를 죽일 때까지(17일차 및 18일차) 매주 2회씩 측정되었다. 종양 부피는 처리 개시시의 종양 부피에 대해 정규화되었다(상대적 종양 부피). (A) 2마리의 공여개체로부터 유래한 PBMC로 재구성된 마우스의 평균 상대적 종양 부피(n = 군당 8마리의 마우스). 점선은 처리 시간을 나타낸다. (B) 공여개체 B로부터 유래한 PBMC로 재구성된 마우스의 평균 상대적 종양 부피(n = 군당 4마리의 마우스). (C) 2마리의 공여개체로부터 유래한 PBMC로 재구성된 마우스의 개별 상대적 종양 부피. 각각의 기호는 동일 처리군에 있는 개별 동물을 나타낸다. (D) 공여개체 B로부터 유래한 PBMC로 재구성된 마우스의 개별 상대적 종양 부피. 각각의 기호는 동일 처리군에 있는 개별 동물을 나타낸다.

도 11: hPBMC 치환 NOG 마우스에 있어 HCC827 이종이식체. 항 PDL1 IgG1(PRO1137) 치료법으로 처리되었을 때 HCC827 면역결핍 NOG 마우스의 체중. 체중은, 마우스를 죽일 때까지(17일차 및 18일차) 매주 2회씩 측정되었다. 체중은 처리 개시시의 체중에 대해 정규화되었다(상대적 체중).

도 12: 인간 제대혈 유래 CD34+ 조혈줄기세포(UCB HSC)가 이식된 NOG 마우스에 있어 인간 HCC827 NSCLC 이종이식체를 대상으로 한 항 PDL1 IgG1(PRO1196)의 항 종양 효능 평가. PRO1196(0.1 mg)의 항 종양 활성은 아벨루맵(0.1 mg) 또는 비이클(팔리비주맙, 0.1 mg) 처리시의 항 종양 활성과 비교되었다. 당일, 5일차, 10일차, 15일차 및 20일차에 마우스가 처리되었다(점선). 종양 성장 및 체중은 매주 2회씩 기록되었다. 종양 부피는 처리 개시시의 종양 부피에 대해 정규화되었다(상대적 종양 부피).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0073] 본 발명은 인간 PDL1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 약학 조성물, 이러한 항체와 조성물의 제조 방법 및 사용 방법을 제공한다.

[0074] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명에 속하는 분야의 당 업자에 의해 통상 이해되는 의미와 동일한 의미를 가진다.

[0075] "~를 포함하는(comprising)" 및 "~를 포함하는(including)"과 같은 용어들은, 달리 명시되지 않는 한 본원에서

자체에 제약을 두지 않고 비제한적 의미로 사용된다. 이처럼 비제한적 의미로 사용되는 것과 관련하여 있을 때, "~를 포함하는(comprising)"이란 용어는 이보다 더 협소한 범위를 나타내는 용어 "~로 이루어진(consisting of)"을 포함한다.

[0076] 본 발명을 기술하는 내용(특히 하기 특허청구의 범위의 청구항들의 내용) 중 "하나의" 및 "한" 및 "본", 그리고 이와 유사한 용어는, 본원에 달리 명시되어 있거나 내용에 의해 명백하게 모순되지 않는 한, 단수의 것과 복수의 것 둘 다를 아우르는 것으로 해석되어야 할 것이다. 예를 들어 "하나의 세포"란 용어는, 세포들의 혼합물을 비롯한 복수의 세포를 포함한다. 복수의 형태가 화합물 및 염 등에 대해 사용되는 경우, 이는 단일 화합물 또는 염 등을 의미하기도 한다.

[0077] 제1 양태에서, 본 발명은 인간 PDL1에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것이다.

[0078] 본원에 사용된 바와 같은 "항체"등의 용어는 전항체 또는 이의 단일 사슬; 및 임의의 항원 결합 단편(즉 "항원 결합부") 또는 이의 단일 사슬; 및 항체 CDR, VH 영역들 또는 VL 영역들을 포함하는 분자(예컨대 다중 특이적 항체(이에 한정되는 것은 아님)를 포함한다. 자연 발생 "전항체"는 적어도 2개의 중(H)쇄 및 2개의 경(L)쇄가 이황화 결합에 의해 상호 연결되어 포함되어 있는 당단백질이다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 VH로서 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역으로 구성되어 있다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, 즉 CH1, CH2 및 CH3로 구성되어 있다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 VL로서 약칭됨)과 경쇄 불변 영역으로 구성되어 있다. 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인, 즉 CL로 구성되어 있다. VH 영역 및 VL 영역은 추가로, 틀 영역(FR)이라 칭하여지는 더욱 잘 보존된 영역들 사이에 배치된, 상보성 결정 영역(CDR)이라 칭하여지는 초가변 영역으로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노 말단으로부터 카복시 말단 방향으로 하기 순서로 배열된 CDR 3개와 FR 4개로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역들은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 면역글로불린과, 숙주 조직 또는 인자, 예컨대 면역계의 다양한 세포(예컨대 효과기 세포) 및 고전적 보체계의 제1 성분(C1q)의 결합을 매개할 수 있다.

[0079] 본원에 사용된 바와 같은 "항원 결합 단편", "이의 항원 결합 단편" 및 "항원 결합부"등의 용어는, 주어진 항원(예컨대 PDL1)과 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 비변형 전항체의 단편 1개 이상을 지칭한다. 항체의 "항원 결합부"란 용어에 포함되는 결합 단편의 예들로서는, VL, VH, CL 및 CH1 도메인들로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; 2개의 Fab 단편이 경첩 영역에서 이황화 가교에 의해 연결되어 포함되어 있는 2가 단편인 F(ab)₂ 단편; VH 및 CH1 도메인들로 이루어진 Fd 단편; 항체의 단일 팔(arm)의 VL 및 VH 도메인들로 이루어진 Fv 단편; 및 대안적 스캐폴드를 기반으로 하는 결합 도메인, 예컨대 안키린 기반 도메인, 파이노머, 아비머, 안티칼린, 피브로넥틴, 및 항체의 불변 영역으로 구축될 결합 부위들(예컨대 F-star의 Modular AntibodyTechnology™)(이에 한정되는 것은 아님)을 포함한다.

[0080] "상보성 결정 영역"("CDR")이란 용어는, Kabat와 다수에 의해 기술된 체계(1991)("Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) ("Kabat" 번호매김 체계), Al-Lazikani와 다수에 의해 기술된 체계(1997)(JMB 273, 927-948) ("Chothia" 번호매김 체계) 및 ImMunoGenTics(IMGt) 번호매김 체계(Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P와 다수(Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003))("IMGt" 번호매김 체계) 및 문헌[Honegger & Pluckthun, J. Mol. Biol. 309 (2001) 657-670]에 기술된 번호매김 체계("Aho" 번호매김 체계)를 비롯한 다수의 널리 공지된 체계 중 임의의 것이 사용되어 경계가 결정되는 아미노산 서열이다. 예를 들어 고전적인 포맷의 경우 Kabat 체계하에서 중쇄 가변 도메인(VH) 중의 CDR 아미노산 잔기들은 31번 ~ 35번(HCDR1), 50번 ~ 65번(HCDR2) 및 95번 ~ 102번(HCDR3)과 같이 번호가 매겨지고; 경쇄 가변 도메인(VL) 중의 CDR 아미노산 잔기들은 24번 ~ 34번(LCDR1), 50번 ~ 56번(LCDR2), 그리고 89번 ~ 97번(LCDR3)과 같이 번호가 매겨진다. Chothia 체계하에서 VH 중의 CDR 아미노산은 26번 ~ 32번(HCDR1), 52번 ~ 56번(HCDR2) 및 95번 ~ 102번(HCDR3)과 같이 번호가 매겨지고; VL 중의 아미노산 잔기들은 24번 ~ 34번(LCDR1), 50번 ~ 56번(LCDR2) 및 89번 ~ 97번(LCDR3)과 같이 번호가 매겨진다. Kabat 체계 및 Chothia 체계 둘 다에 의한 CDR 정의들을 조합하였을 때, 인간 VH 중의 CDR은 26번 ~ 35번(HCDR1), 50번 ~ 65번(HCDR2) 및 95번 ~ 102번(HCDR3) 아미노산 잔기들로 이루어지고, 인간 VL 중의 CDR은 24번 ~ 34번(LCDR1), 50번 ~ 56번(LCDR2) 및 89번 ~ 97번(LCDR3) 아미노산 잔기들로 이루어진다. IMGt 체계 하에서 VH 중의 CDR 아미노산 잔기들은 대략 26번 ~ 35번(HCDR1), 51번 ~ 57번(HCDR2) 및 93번 ~ 102번(HCDR3)으로 번호가 매겨지고, VL 중의 CDR 아미노산 잔기들은 대략 27번 ~ 32번(LCDR1), 50번 ~ 52번(LCDR2) 및 89번 ~ 97번(LCDR3)으로 번호가 매겨진다("Kabat" 체계에 따른 번호매김). IMGt 체계 하에 항체의 CDR들은 IMGt/DomainGap Align이라는 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다. 본 발명의 내용에서는 특별히

달리 언급되지 않는 한, Honegger 및 Pluckthun에 의해 제안된 번호매김 체계("AHo")가 사용된다(Honegger & Pluckthun, J. Mol. Biol. 309 (2001) 657-670). 또한 하기 잔기들이 AHo 번호매김에 따라 CDR로서 정의된다: LCDR1(CDR-L1라고도 지칭됨): L24 ~ L42; LCDR2(CDR-L2라고도 지칭됨): L58 ~ L72; LCDR3(CDR-L3라고도 지칭됨): L107 ~ L138; HCDR1(CDR-H1라고도 지칭됨): H27-H42; HCDR2(CDR-H2라고도 지칭됨): H57 ~ H76; HCDR3(CDR-H3라고도 지칭됨): H108-H138. 명료함을 도모하기 위해, Honegger 및 Pluckthun에 따른 번호매김 체계는 자연 발생 항체의 상이한 VH 및 VL 하위 과, 구체적으로 CDR에서 발견되는 길이의 다양성을 고려하고, 서열들에 갭을 제공한다. 그러므로 주어진 항체에서 보통 1번 ~ 149번 위치 모두인 것은 아닌 가변 도메인은 아미노산 잔기들에 의해 점유될 것이다.

[0081] 항원 결합부는 또한 맥시바디, 미니바디, 인트라바디, 다이아바디, 트리아바디, 테트라바디, scDb-scFv, v-NAR 및 bis-scFv에 통합될 수 있다(예컨대 문헌(Hollinger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23:1126-1136) 참조). 항체의 항원 결합부는 제III형 피브로넥틴(Fn3)과 같은 폴리펩티드를 기반으로 하는 스캐폴드에 이식(grafting)될 수 있다(피브로넥틴 폴리펩티드 모노바디가 기술되어 있는 미국 특허 제6,703,199호 참조). 항원 결합부는 상보성 경쇄 폴리펩티드와 함께 항원 결합 영역 쌍을 형성하는, 텐덤 Fv 분절(VH-CH1-VH-CH1)의 쌍을 포함하는 단일 사슬 분자에 통합될 수 있다(Zapata et al., 1995 단백질 Eng. 8 (10): 1057-1062; 및 미국 특허 제5,641,870호).

[0082] 본원에 사용된 바와 같은 "결합 특이성"이란 용어는, 개별 항체가 하나의 항원 결정기와 반응하되, 상이한 항원 결정기와는 반응하지 않는 능력을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이 "에 특이적으로 결합하다" 또는 "에 특이적인"이란 용어는 측정 가능하거나 재현 가능한 상호작용, 예컨대 생체 분자를 비롯한 분자의 이중 집단이 존재할 때 표적이 존재함을 나타내는, 표적과 항체 사이의 결합을 지칭한다. 예를 들어 표적(에피토프일 수 있음)과 특이적으로 결합하는 항체는, 더욱 큰 친화성, 결합력으로 더욱 용이하게, 그리고/또는 다른 표적과 결합하는 기간 보다 더 오랜 기간 해당 표적과 결합하는 항체이다. 이것이 가장 일반적인 형태를 가질 때(그리고 한정된 기준이 언급되지 않을 때) "특이적 결합"이란, 항체가, 예를 들어 당 분야에 공지된 특이성 검정 방법에 따라 확정되는 바와 같이, 관심 표적과 무관 분자를 구별할 수 있는 능력을 지칭한다. 이러한 방법으로서 웨스턴 블롯팅(Western blotting), ELISA, RIA, ECL, IRMA, SPR(표면플라스몬공명법) 검사 및 펩티드 스캔을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어 표준 ELISA 검정이 수행될 수 있다. 점수매김(scoring)은 표준 발색법(예컨대 서양고추냉이 과산화물과 2차 항체, 그리고 테트라메틸벤지딘과 과산화수소)에 의해 수행될 수 있다. 임의의 웰 내에서의 반응은, 예컨대 450 nm에서의 광학 밀도에 의해 점수가 매겨진다. 통상의 백그라운드(= 음성 반응)는 약 0.1 OD일 수 있고, 통상의 양성 반응은 약 1 OD일 수 있다. 이는, 양의 점수와 음의 점수 사이의 비가 10배 이상일 수 있음을 의미한다. 추가의 예에서, SPR 검정이 수행될 수 있는데, 이때 백그라운드와 신호 간 적어도 10배, 바람직하게는 적어도 100배 차이가 있음은 특이적 결합이 이루어졌음을 나타낸다. 통상적으로 결합 특이성의 확정은 단일 기준 생물분자를 사용하여 수행되는 것이 아니라, 약 3개 내지 약 5개의 무관한 분자, 예컨대 분유 또는 트랜스페린 등으로 이루어진 세트를 사용하여 수행된다. 본 발명의 항체는 인간 PDL1에 대해 결합 특이성을 가진다. 특정의 구현예에서, 본 발명의 항체는, 구체적으로 SPR에 의해 확정되는 바에 따르면, 인간 PDL1에 대해 결합 특이성을 가지지만, 인간 PDL2는 결합하지 않는다.

[0083] 적합하게 본 발명의 항체는 단리 항체다. 본원에 사용된 바와 같은 "단리 항체"란 용어는 상이한 항원 특이성을 가지는 기타 항체로부터 실질적으로 분리되어 있는 항체를 지칭한다(예컨대 PDL1과 특이적으로 결합하는 단리 항체는 실질적으로 PDL1 이외의 항원과 특이적으로 결합하는 항체로부터 실질적으로 분리되어 있음). 그러나 PDL1과 특이적으로 결합하는 단리 항체는 다른 항원, 예컨대 다른 종으로부터 유래한 PDL1 분자에 대해 교차 반응성을 가질 수 있다. 그러므로 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 인간 PDL1 및 마카카 파스쿨라리스(사이노몰거스 원숭이 또는 "사이노몰거스"라고도 공지됨) PDL1에 대한 결합 특이성을 가진다. 게다가 단리 항체는 기타 세포성 물질 및/또는 화학물질로부터 실질적으로 분리되어 있을 수 있다.

[0084] 적합하게 본 발명의 항체는 모노클로날 항체이다. 본원에 사용되는 바와 같은 "모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조성물"이란 용어는, 아미노산 서열이 동일한 유전자 공급원의 아미노산 서열과 실질적으로 동일하거나 이러한 공급원으로부터 유래하는 항체를 지칭한다. 모노클로날 항체 조성물은 특정의 에피토프에 결합 특이성 및 친화성을 보이거나, 특이 에피토프에 결합 특이성 및 친화성을 보인다.

[0085] 본 발명의 항체는 키메라 및 인간화된 것을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0086] "키메라 항체"란 용어는, (a) 불변 영역 또는 이의 일부가 변경, 치환 또는 교체되어, 항원 결합 부위(가변 영역)가 상이하거나 변경된 군의 불변 영역, 효과기 기능을 보이는 불변 영역 및/또는 종들의 불변 영역과 결합되

거나, 또는 키메라 항체에 새로운 특성들을 부여하는 완전히 상이한 분자, 예컨대 효소, 독소, 호르몬, 성장 인자, 약물 등과 결합되었거나; 또는 (b) 가변 영역 또는 이의 일부가, 상이하거나 변경된 항원 특이성을 가지는 가변 영역으로 변경, 치환 또는 교체된 항체 분자이다. 예를 들어 마우스 항체는 이의 불변 영역을 인간 면역글로불린 유래 불변 영역으로 치환함으로써 변형될 수 있다. 인간 불변 영역으로 치환됨으로 말미암아, 키메라 항체는 항원을 인지함에 있어서 특이성을 보유할 수 있는 동시에, 인간에서의 항원성은 원래 마우스 항체와 비교되었을 때 감소한다.

[0087] 본원에 사용된 바와 같은 "인간화" 항체는 비인간 항체의 반응성을 보유하되, 인간에서의 면역원성은 작은 항체이다. 이는, 예를 들어 비인간 CDR 영역은 유지시키면서, 항체의 나머지 부분들은 인간에 있어 대응 부분(즉 불변 영역과, 가변 영역의 틀 부분)으로 치환하여 달성될 수 있다. 추가의 틀 영역 변형은 인간 틀 서열뿐만 아니라 다른 포유류 종의 생식계열로부터 유래하는 CDR 서열 내에서 이루어질 수 있다. 본 발명의 인간화 항체는 인간 서열에 의해 암호화되지 않는 아미노산 잔기(예컨대 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이유발법에 의해 시험관 내 도입된 돌연변이, 또는 체세포 돌연변이에 의해 생체내 도입된 돌연변이, 또는 안정성을 촉진하거나 제조를 용이하게 만들기 위한 보존적 치환에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 예를 들어 문헌[Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855, 1984; Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92, 1988; Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536, 1988; Padlan, Molec. Immun., 28:489-498, 1991; 및 Padlan, Molec. Immun., 31: 169-217, 1994]을 참조한다. 항체 공학 기법의 다른 예로서는 미국 특허 제5,766,886호에 개시된 Xoma 기법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0088] 본원에 사용된 바와 같은 "제조합 인간화 항체"란 용어는, 제조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 인간 항체 모두, 예컨대 인간화 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포, 예컨대 트랜스펙토마(transfectoma), 그리고 인간 면역글로불린 유전자 서열 전부 또는 일부를 다른 DNA 서열에 스플라이싱(splicing)하는 것을 수반하는 임의의 기타 방법에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리 항체를 포함한다.

[0089] "PDL1"이란 용어는, 구체적으로 UniProt 식별 번호 Q9NZQ7(본원에서는 서열 번호 63에 해당함)을 가지는 인간 PDL1을 지칭한다. 적합하게 본 발명의 항체는 PDL1, 구체적으로 UniProt 식별 번호 Q9NZQ7(본원에서는 서열 번호 63에 해당함)에 보인 바와 같은 인간 PDL1을 표적화한다. 적합하게 본 발명의 항체는 인간 및 사이노몰거스(마카카 파스쿨라리스) PDL1을 표적화하되, 바람직하게는 구체적으로 표면플라스몬공명법(SPR)에 의해 측정되는 바에 따르면 무스 머스쿨러스 PDL1과는 교차 반응하지 않는다. 적합하게 본 발명의 항체는 인간 PDL1에 대해 결합 특이성을 가진다. 구체적으로 본 발명의 항체는, 구체적으로 SPR에 의해 측정되는 바에 따르면 인간 PDL2과 결합하지 않는다.

[0090] 본 발명의 항체는 PDL1 억제제이다. "차단제" 또는 "차단 항체" 또는 "억제제" 또는 "억제 항체" 또는 "길항제" 또는 "길항제 항체"란 용어는, 이것이 결합하는 항원의 생물 활성을 억제 또는 감소시키는 항체를 지칭한다. 몇몇 구현예에서, 차단 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물 활성을 실질적으로나 완전히 억제한다. 본 발명의 항체는 PDL1과 이의 결합 파트너의 결합능을 표적화, 감소 및 억제함으로써, PDL1 기능을 방해한다. 구체적으로 본 발명의 항체는 PDL1과 PD-1의 상호작용을 차단한다. 몇몇 구현예에서, 본 발명의 항체는 PDL1과, PD-1 및 B7-1의 상호작용을 차단한다.

[0091] 본 발명의 항체로서는 실시예에 기술된 바를 비롯하여 본원에 기술된 바와 같이 단리된 인간화 모노클로날 항체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 항 인간 PDL1 항체의 예로서는 자체의 서열들이 표 1에 나열된 항체가 있다. 본원에 기술된 항체의 제조 및 특성규명에 관한 추가의 상세한 설명은 실시예에 제공되어 있다.

[0092] 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지는 본 발명의 단리 항체는 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는데, 단 (a) 상기 VH는 3개의 상보성 결정 영역 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3를 이 순서로 포함하고, (b) 상기 VL은 3개의 상보성 결정 영역 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 이 순서로 포함한다.

[0093] 본 발명은 PDL1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하는데, 상기 항체는 표 1에 나열된 VH CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가지는 VH CDR을 포함한다. 구체적으로 본 발명은 PDL1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하는데, 상기 항체는 표 1에 나열된 VH CDR 중 임의의 것의 아미노산 서열을 가지는 VH CDR을 1개, 2개, 3개 또는 그 이상 포함한다.

[0094] 본 발명은 또한 PDL1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하는데, 단 상기 항체는 표 1에 나열된 VL CDR 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 가지는 VL CDR을 포함한다. 구체적으로 본 발명은 PDL1 단백질에 특이적으로

결합하는 항체를 제공하는데, 상기 항체는 표 1에 나열된 VL CDR 중 임의의 것의 아미노산 서열을 가지는 VL CDR을 1개, 2개, 3개 또는 그 이상 포함한다.

[0095] 본 발명의 다른 항체는 돌연변이되었으되, PDL1 단백질과 특이적으로 결합하는 항체를 포함하고, CDR 영역은 표 1에 기술된 서열들에 서사되는 CDR 영역과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 일 양태에서, 본 발명의 다른 항체는 PDL1 단백질과 특이적으로 결합하는 돌연변이 아미노산 서열을 포함하되, 단 여기서 CDR 영역은 표 1에 기술된 서열들에 서사되는 CDR 영역과 비교되었을 때, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 이하의 아미노산 돌연변이를 가진다.

[0096] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열에 관한 내용중 "동일한" 또는 "동일성"이란 용어는, 서열 또는 종속서열 2개 이상이 동일한 경우를 지칭한다. 핵산, 펩티드, 폴리펩티드 또는 항체 서열과 관련하여 "서열 동일성" 및 "상동성"은, 필요에 따라 최대의 서열 동일성%를 달성하기 위해 서열들을 정렬하고 갭을 도입한 후, 서열 동일성의 일환으로서 어떠한 보존적 치환도 고려하지 않았을 때 특정 핵산, 펩티드 또는 폴리펩티드 서열 중 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기와 동일한, 후보 서열 중 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 아미노산 서열 동일성% 확정을 목표로 하는 정렬은 당 업자의 능력안에 있는 다양한 방법, 예컨대 공중이 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2 또는 ALIGN 소프트웨어로 달성될 수 있다. 당 업자들은 정렬 결과를 측정하기에 적당한 매개변수, 예컨대 비교되는 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 확인할 수 있다.

[0097] 서열 비교를 위해, 통상 하나의 서열은 시험 서열이 비교되는 기준 서열로서의 역할을 한다. 서열 비교 알고리즘이 사용될 때, 시험 서열 및 기준 서열은 컴퓨터에 입력되고, 필요에 따라 종속 서열 좌표가 지정되며, 서열 알고리즘 프로그램 매개변수가 지정된다. 디폴트 프로그램 매개변수가 사용될 수 있거나, 또는 대안적 매개변수가 지정될 수 있다. 그 다음, 서열 비교 알고리즘은 기준 서열을 기준으로 프로그램 매개변수에 입각하여 시험 서열에 대한 서열 동일성%를 산정한다.

[0098] 서열 동일성%와 서열 유사성%를 확정하기에 적합한 알고리즘 2가지 예로서는 BLAST 알고리즘 및 BLAST 2.0 알고리즘이 있는데, 이 알고리즘들은 각각 문헌[Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402, 1977] 및 문헌[Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990]에 기술되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립생물정보센터를 통해 공중이 이용 가능하다. 아미노산 서열 2개 사이의 동일성%는 또한, PAM120 가중 잔기표, 갭 길이 패널티 12 및 갭 패널티 4를 적용하는 ALIGN 프로그램(2.0 버전)에 통합된 E. Meyers 및 W. Miller의 알고리즘(Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17, 1988)을 이용하여 확정될 수 있다. 또한, 아미노산 서열 2개 사이의 동일성%는, Blossom 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스 중 어느 하나와, 갭 가중치 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4, 그리고 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5 또는 6을 적용하여 GCG 소프트웨어 팩키지 내 GAP 프로그램(www.gcg.com으로부터 입수 가능함)에 통합된 Needleman 및 Wunsch 알고리즘(J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970)을 이용하여 확정될 수 있다.

[0099] "아미노산"이란 용어는, 자연 발생 및 합성 아미노산뿐만 아니라 자연 발생 아미노산의 작용 방식과 유사한 방식으로 작용을 하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모의체를 지칭한다. 자연 발생 아미노산은 유전자 코드에 의해 암호화된 것들뿐만 아니라, 사후에 변형된 아미노산, 예컨대 하이드록시프롤린, 감마-카복시글루타메이트 및 O-포스포세린이다. "폴리펩티드" 및 "단백질"이란 용어는 본원에서 아미노산 잔기들로 이루어진 중합체를 지칭하는 것으로서 호환되어 사용되고 있다. 이 용어는 1개 이상의 아미노산 잔기가 대응하는 자연 발생 아미노산의 화학적 인공 모의체인 아미노산 중합체에 적용될 뿐만 아니라 자연 발생 아미노산 중합체 및 비 자연 발생 아미노산 중합체에도 적용된다. 달리 명시되지 않는 한, 특정의 폴리펩티드 서열은 또한 명백하게 이 서열의 보존적으로 변형된 변이체도 포함한다.

[0100] 본 발명은 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지는 단리 항체로서, (a) 서열 번호 1, 4, 5, 8, 11, 32, 35, 36, 39 및 42 중 임의의 하나로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 1 또는 32의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 중쇄 가변 영역 CDR1(HCDR1); (b) 서열 번호 2, 6, 9, 12, 33, 37, 40 및 43 중 임의의 것로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 2 또는 33의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 중쇄 가변 영역 CDR2(HCDR2); (c) 서열 번호 3, 7, 10, 13, 34, 38, 41 및 44 중 임의의 것로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 3 또는 34의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 중쇄 가변 영역 CDR3(HCDR3); (d) 서열 번호 17, 20, 23, 48, 51 및 54 중 임의의 것로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직

하게 서열 번호 17 또는 48의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 경쇄 가변 영역 CDR1(LCDR1); (e) 서열 번호 18, 21, 24, 49, 52 및 55 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 18 또는 49의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 경쇄 가변 영역 CDR2(LCDR2); 및 (f) 서열 번호 19, 22, 25, 50, 53 및 56 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 19 또는 50의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 경쇄 가변 영역 CDR3(LCDR3)을 포함하는 단리 항체를 제공한다.

[0101] 적합하게, 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지는 단리 항체는 (a) 서열 번호 1, 4, 5, 8, 11, 32, 35, 36, 39 및 42 중 임의의 하나, 바람직하게 서열 번호 1 또는 32, 더욱 바람직하게 서열 번호 1에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 중쇄 가변 영역 CDR1(HCDR1); (b) 서열 번호 2, 6, 9, 12, 33, 37, 40 및 43 중 임의의 것, 바람직하게 서열 번호 2 또는 33, 더욱 바람직하게 서열 번호 2에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 중쇄 가변 영역 CDR2(HCDR2); (c) 서열 번호 3, 7, 10, 13, 34, 38, 41 및 44 중 임의의 것, 바람직하게 서열 번호 3 또는 34, 더욱 바람직하게 서열 번호 3에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 중쇄 가변 영역 CDR3(HCDR3); (d) 서열 번호 17, 20, 23, 48, 51 및 54 중 임의의 것, 바람직하게 서열 번호 17 또는 48, 더욱 바람직하게 서열 번호 17에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 경쇄 가변 영역 CDR1(LCDR1); (e) 서열 번호 18, 21, 24, 49, 52 및 55 중 임의의 것, 바람직하게 서열 번호 18 또는 49, 더욱 바람직하게 서열 번호 18에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 경쇄 가변 영역 CDR2(LCDR2); 및 (f) 서열 번호 19, 22, 25, 50, 53 및 56 중 임의의 것, 바람직하게 서열 번호 19 또는 50, 더욱 바람직하게 서열 번호 19와 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 경쇄 가변 영역 CDR3(LCDR3)을 포함한다.

[0102] 일 구현예에서, 인간 PDL1에 대하여 결합 특이성을 가지는 본 발명의 항체는 (a) 서열 번호 1, 2 및 3의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 17, 18 및 19의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (b) 서열 번호 4, 6 및 7의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 20, 21 및 22의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (c) 서열 번호 5, 6 및 7의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 20, 21 및 22의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (d) 서열 번호 8, 9 및 10의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 17, 18 및 19의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (e) 서열 번호 11, 12 및 13의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 23, 24 및 25의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (f) 서열 번호 32, 33 및 34의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 48, 49 및 50의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (g) 서열 번호 35, 37 및 38의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 51, 52 및 53의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (h) 서열 번호 36, 37 및 38의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 51, 52 및 53의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (i) 서열 번호 39, 40 및 41의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 48, 49 및 50의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (j) 서열 번호 42, 43 및 44의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 54, 55 및 56의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각을 포함한다. 일 구현예에서, 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지는 본 발명의 항체는 서열 번호 1, 2 및 3의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 17, 18 및 19의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각을 포함한다. 다른 구현예에서, 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지는 본 발명의 항체는 서열 번호 32, 33 및 34의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 48, 49 및 50의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각을 포함한다.

[0103] 적합하게, 인간 PDL1에 대하여 결합 특이성을 가지는 본 발명의 항체는 (a) 서열 번호 1, 2 및 3에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 17, 18 및 19에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (b) 서열 번호 4, 6 및 7에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 20, 21 및 22에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (c) 서열 번호 5, 6

및 7에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 20, 21 및 22에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (d) 서열 번호 8, 9 및 10에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 17, 18 및 19에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (e) 서열 번호 11, 12 및 13에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 23, 24 및 25에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (f) 서열 번호 32, 33 및 34에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 48, 49 및 50에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (g) 서열 번호 35, 37 및 38에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 51, 52 및 53에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (h) 서열 번호 36, 37 및 38에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 51, 52 및 53에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (i) 서열 번호 39, 40 및 41에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 48, 49 및 50에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각; (j) 서열 번호 42, 43 및 44에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 54, 55 및 56에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각을 포함한다. 일 구현예에서, 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지는 본 발명의 항체는 서열 번호 1, 2 및 3에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 17, 18 및 19에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각을 포함한다. 다른 구현예에서, 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지는 본 발명의 항체는 서열 번호 32, 33 및 34에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 48, 49 및 50에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각을 포함한다.

[0104] 적합하게 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지는 본 발명의 항체는 (a) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 HCDR1; (b) 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 HCDR2; (c) 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 HCDR3; (d) 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 LCDR1; (e) 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 LCDR2; 및 (f) 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 LCDR3을 포함한다. 적합하게 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지는 본 발명의 항체는 (a) 서열 번호 1에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 HCDR1; (b) 서열 번호 2에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 HCDR2; (c) 서열 번호 3에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 HCDR3; (d) 서열 번호 17에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 LCDR1; (e) 서열 번호 18에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 LCDR2; 및 (f) 서열 번호 19에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하거나, 바람직하게 이것으로 이루어진 LCDR3을 포함한다.

[0106]

[0107]

- 18 -

로 이루어진 LCDR3를 포함한다.

- [0108] 추가의 구현예에서, 본 발명은 PDL1(예컨대 인간 PDL1)에 특이적으로 결합하는 단리 항체를 제공하는데, 단 상기 항체는 VH 도메인과 VL 도메인을 포함한다. 본 발명의 내용 중 "VH"(가변 중쇄), "VL"(가변 경쇄), "V_K" 및 "V_L"란 용어는, 서열 동일성 및 상동성에 따라서 분류되는 항체 중쇄 서열 및 항체 경쇄 서열의 과들을 지칭한다. 예컨대 상동성 검색 매트릭스, 예컨대 BLOSUM(Henikoff, S. & Henikoff, J. G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 10915-10919)을 사용하여 서열 상동성을 확정하기 위한 방법과, 상동성에 따라서 서열을 분류하기 위한 방법은 당 업자에게 널리 공지되어 있다. VH의 경우 상이한 하위 과 V_K 및 V_L는, 예컨대 VH1A, VH1B 및 VH2 ~ VH6인 VH, V_K1 ~ V_K4인 V_K, 그리고 V_L1 ~ V_L3인 V_L로 구분한 문헌[Knappik et al., J. Mol. Biol. 296 (2000) 57-86]에 보인 바와 같이 식별될 수 있다. 항체 V_K 사슬, V_L 사슬 및 VH 사슬은 생식계열 K 사슬 V 및 J 분절, 생식계열 L 사슬 V 및 J 분절, 그리고 중쇄 V, D 및 J 분절 각각의 생체 내 무작위 재배열의 결과이다. 주어진 항체 가변 사슬이 어느 하위 과에 속하는지는, 대응하는 V 분절, 구체적으로 틀 영역 FR1 ~ FR3에 의해 결정된다. 그러므로 본 출원에서 오로지 특정의 틀 영역 HFR1 ~ HFR3 세트에 의해서만 특징지어지는 임의의 VH 서열은 임의의 HFR4 서열, 예컨대 중쇄 생식계열 J 분절로부터 취하여진 HFR4 서열, 또는 재배열된 VH 서열로부터 취하여진 HFR4 서열과 합하여질 수 있다.
- [0109] 적합하게 본 발명은 PDL1(예컨대 인간 PDL1 단백질)에 특이적으로 결합하는 단리 항체를 제공하는데, 다만 상기 항체는 VH1A, VH1B, VH3 또는 VH4를 포함한다.
- [0110] VH1 과에 속하는 VH의 구체적인 예는 서열 번호 15로 표시된다. 구체적으로 서열 번호 15로부터 취하여진 틀 영역 FR1 ~ FR4는 VH1 과에 속한다(표 1의 보통의 글씨체로 표시된 영역). 본원에 사용된 바와 같이, 적합하게는 VH1 과에 속하는 VH는 서열 번호 15의 FR1 ~ FR4에 대하여 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 95%의 서열 동일성을 보이는 FR1 ~ FR4를 포함하는 VH이다.
- [0111] VH3 과에 속하는 VH의 구체적인 예는 서열 번호 16으로 표시된다. 구체적으로 서열 번호 16으로부터 취하여진 틀 영역 FR1 ~ FR4는 VH3 과에 속한다(표 1의 보통의 글씨체로 표시된 영역). 본원에 사용된 바와 같이, 적합하게는 VH3 과에 속하는 VH는 서열 번호 16의 FR1 ~ FR4에 대하여 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 95%의 서열 동일성을 보이는 FR1 ~ FR4를 포함하는 VH이다.
- [0112] VH4 과에 속하는 VH의 구체적인 예는 서열 번호 14로 표시된다. 구체적으로 서열 번호 14로부터 취하여진 틀 영역 FR1 ~ FR4는 VH4 과에 속한다(표 1의 보통의 글씨체로 표시된 영역). 본원에 사용된 바와 같이, 적합하게는 VH4 과에 속하는 VH는 서열 번호 14의 FR1 ~ FR4에 대하여 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 95%의 서열 동일성을 보이는 FR1 ~ FR4를 포함하는 VH이다.
- [0113] VH 서열의 대안적 예들은 문헌[Knappik et al., J. Mol. Biol. 296 (2000) 57-86]에서 살펴볼 수 있다.
- [0114] 일 구현예에서, 본 발명의 단리 항체는 VH4 도메인 또는 VH3 도메인을 포함한다.
- [0115] 적합하게, 본 발명은 PDL1(예컨대 인간 PDL1 단백질)에 특이적으로 결합하는 단리 항체를 제공하는데, 단 상기 항체는 V_K 틀 FR1, FR2 및 FR3, 구체적으로 V_K1 또는 V_K3 틀, 바람직하게 V_K1 틀 FR1 ~ 3, 및 V_K FR4, 구체적으로 V_K1 FR4, V_K3 FR4 및 V_L FR4로부터 선택되는 틀 FR4를 포함한다. 적합한 V_K1 틀 FR1 ~ 3은 서열 번호 26에 제시되어 있다(표 1에 FR 영역들은 일반 글씨체로 표시됨). 적합한 V_K1 틀 FR1 ~ 3은 서열 번호 26으로부터 취하여진 FR1 ~ 3에 대응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90% 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함한다(표 1에 FR 영역들은 일반 글씨체로 표시됨).
- [0116] V_K1 서열의 대안적 예와, V_K2, V_K3 또는 V_K4 서열의 대안적 예는 문헌[Knappik et al., J. Mol. Biol. 296 (2000) 57-86]에서 살펴볼 수 있다.
- [0117] 적합한 V_L FR4는 서열 번호 64 ~ 서열 번호 70에 제시된 바와 같다. 바람직한 구현예에서, V_L FR4는 서열 번호 64 또는 65에 제시된 바와 같고, 더욱 바람직하게 V_L FR4는 서열 번호 64에 제시된 바와 같다. 일 구현예에서, 본 발명은 PDL1(예컨대 인간 PDL1 단백질)에 특이적으로 결합하는 단리 항체를 제공하는데, 단 상기 항체는 서열 번호 64 ~ 서열 번호 70 중 임의의 것로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 64 또는 65의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 64의 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하는 V_L FR4를 포함한다.
- [0118] 그러므로 일 구현예에서, 본 발명은
- [0119] (i) a. 서열 번호 4, 6, 및 7의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 20, 21, 및 22의 LCDR1,

LCDR2 및 LCDR3 서열 각각;

- [0120] b. 서열 번호 35, 37, 및 38의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 51, 52, 및 53의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 서열 각각; 또는
- [0121] c. 서열 번호 36, 37, 및 38의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 51, 52, 및 53의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 서열 각각
- [0122] 인 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 서열
- [0123] (ii) VH3 또는 VH4 도메인 틀 서열; 및
- [0124] (iii) V_K 틀 FR1, FR2 및 FR3, 구체적으로 V_{K1} 또는 V_{K3} FR1 ~ FR3, 바람직하게 V_{K1} FR1 ~ FR3, 및 V_K FR4, 구체적으로 V_{K1} FR4, V_{K3} FR4, 및 V_L FR4, 구체적으로 서열 번호 64 ~ 서열 번호 70 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하는 V_L FR4로부터 선택되는 틀 FR4를 포함하는 VL 틀을 포함하는 VL 도메인[단 바람직하게 V_L FR4는 서열 번호 64 ~ 서열 번호 70에 제시된 바와 같고, 더욱 바람직하게 V_L FR4는 서열 번호 64에 제시된 바와 같음]
- [0125] 을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0126] 다른 구현예에서, 본 발명은 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지고,
- [0127] (i) 서열 번호 5, 6, 및 7의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 20, 21, 및 22의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각;
- [0128] (ii) VH1A, VH1B, VH3 또는 VH4 도메인 틀 서열, 바람직하게 VH1A 또는 VH1B 도메인 틀 서열; 그리고
- [0129] (iii) V_K 틀 FR1, FR2 및 FR3, 구체적으로 V_{K1} 또는 V_{K3} FR1 ~ FR3, 바람직하게 V_{K1} FR1 ~ FR3, 및 V_K FR4, 구체적으로 V_{K1} FR4, V_{K3} FR4, 및 V_L FR4, 구체적으로 서열 번호 64 ~ 서열 번호 70 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하는 V_L FR4로부터 선택되는 틀 FR4를 포함하는 VL 틀을 포함하는 VL 도메인[단 바람직하게 V_L FR4는 서열 번호 64 ~ 서열 번호 70 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, 더욱 바람직하게 V_L FR4는 서열 번호 64에 제시된 바와 같음]
- [0130] 을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0131] 특정 구현예에서, 본 발명은
- [0132] (i) 서열 번호 32, 33 및 34의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 48, 49 및 50의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 서열 각각;
- [0133] (ii) VH3 또는 VH4 도메인 틀 서열, 바람직하게 VH4 도메인 틀 서열; 및
- [0134] (iii) V_K 틀 FR1, FR2 및 FR3, 구체적으로 V_{K1} 또는 V_{K3} FR1 ~ FR3, 바람직하게 V_{K1} FR1 ~ FR3, 및 V_K FR4, 구체적으로 V_{K1} FR4, V_{K3} FR4, 및 V_L FR4, 구체적으로 서열 번호 64 ~ 서열 번호 70 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하는 V_L FR4로부터 선택되는 틀 FR4를 포함하는 VL 틀을 포함하는 VL 도메인[단 바람직하게 V_L FR4는 서열 번호 64 ~ 서열 번호 70에 제시된 바와 같고, 더욱 바람직하게 V_L FR4는 서열 번호 64에 제시된 바와 같음]
- [0135] 을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0136] 바람직한 구현예에서, 본 발명은
- [0137] (i) 서열 번호 1, 2 및 3의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 17, 18 및 19의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 서열 각각;
- [0138] (ii) VH3 또는 VH4 도메인 틀 서열, 바람직하게 VH3 도메인 틀 서열; 및
- [0139] (iii) V_K 틀 FR1, FR2 및 FR3, 구체적으로 V_{K1} 또는 V_{K3} FR1 ~ FR3, 바람직하게 V_{K1} FR1 ~ FR3, 및 V_K FR4, 구체적으로 V_{K1} FR4, V_{K3} FR4, 및 V_L FR4, 구체적으로 서열 번호 64 ~ 서열 번호 70 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90%의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 포함하는 V_L FR4로부터 선택되는 틀 FR4를 포함하는 VL 틀을 포함하는 VL 도메인[단 바람직하게 V_L FR4는 서열 번호 64

~ 서열 번호 70에 제시된 바와 같고, 더욱 바람직하게 VL FR4는 서열 번호 64에 제시된 바와 같음]

- [0140] 을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0141] 일 구현예에서, 본 발명은 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지고,
- [0142] (i) CDR 도메인, 즉 CDR1, CDR2 및 CDR3;
- [0143] (ii) 인간 V_K 틀 영역 FR1 ~ FR3, 구체적으로 인간 V_K1 틀 영역 FR1 ~ FR3; 및
- [0144] (iii) (a) FR4에 대한 인간 V_L 생식계열 서열, 구체적으로 목록 서열 번호 64 ~ 70으로부터 선택되거나, 바람직하게 서열 번호 64인 V_L 생식계열 서열; 및 (b) 서열 번호 64 ~ 서열 번호 70 중 임의의 것으로부터 선택되거나, 바람직하게 서열 번호 64인 아미노산 서열을 포함하는 FR4에 대해 가장 가까운 인간 V_L 생식계열 서열에 비하여 1개 또는 2개의 돌연변이, 구체적으로 1개의 돌연변이를 가지는 V_L 기반 서열로부터 선택되는 FR4
- [0145] 를 포함하는 VL을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0146] 본 발명은 PDL1(예컨대 인간 PDL1 단백질에 특이적으로 결합하는 단리 항체를 제공하는데, 단 상기 항체는 표 1에 나열된 VH 도메인을 포함한다.
- [0147] 본 발명은 또한 PDL1에 특이적으로 결합하는 단리 항체를 제공하는데, 단 상기 항체는 표 1에 나열된 VH 아미노산 서열을 포함하고, 틀 서열(예컨대 CDR이 아닌 서열) 내 약 10개 이하의 아미노산은 돌연변이되었다(돌연변이는 부가, 치환 또는 결실로서 다양하되, 이에 한정되는 것은 아님).
- [0148] 본 발명은 또한 PDL1에 특이적으로 결합하는 단리 항체를 제공하는데, 단 상기 항체는 표 1에 나열된 VH 아미노산 서열을 포함하고, 틀 서열(예컨대 CDR이 아닌 서열) 내 약 20개 이하의 아미노산은 돌연변이되었다(돌연변이는 부가, 치환 또는 결실로서 다양하되, 이에 한정되는 것은 아님).
- [0149] 본 발명의 기타 항체는 돌연변이된 아미노산을 포함하되, PDL1에 특이적으로 결합하고, VH 영역은 표 1에 기술된 서열에 서사된 VH 영역과 적어도 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 보인다.
- [0150] 본 발명은 PDL1 단백질에 특이적으로 결합하는 단리 항체를 제공하는데, 상기 항체는 표 1에 나열된 VL 도메인을 포함한다.
- [0151] 본 발명은 또한 PDL1에 특이적으로 결합하는 단리 항체를 제공하는데, 상기 항체는 표 1에 나열된 VL 아미노산 서열을 포함하고, 틀 서열(예컨대 CDR이 아닌 서열)에 약 10개 이하의 아미노산이 돌연변이되었다(돌연변이는 부가, 치환 또는 결실로서 다양하되, 이에 한정되는 것은 아님).
- [0152] 본 발명은 또한 PDL1에 특이적으로 결합하는 단리 항체를 제공하는데, 상기 항체는 표 1에 나열된 VL 아미노산 서열을 포함하고, 틀 서열(예컨대 CDR이 아닌 서열)에 약 20개 이하의 아미노산이 돌연변이되었다(돌연변이는 부가, 치환 또는 결실로서 다양하되, 이에 한정되는 것은 아님).
- [0153] 본 발명의 기타 항체는 돌연변이된 아미노산을 포함하되, PDL1에 특이적으로 결합하고, VL 영역은 표 1에 기술된 서열에 서사된 VL 영역과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 보인다.
- [0154] 본 발명은 또한 PDL1에 특이적으로 결합하는 단리 항체를 제공하는데, 상기 항체는 서열 번호 14, 15, 16, 45, 46 및 47로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 14 또는 16의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 16의 아미노산 서열과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과; 서열 번호 26, 27, 57 및 58로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 26 또는 27의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 27의 아미노산 서열과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0155] 일 구현예에서, 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지는 본 발명의 항체는 서열 번호 14, 15, 16, 45, 46 및 47 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 14 또는 16의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열 번호 26, 27, 57 및 58 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 26 또는 27의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

- [0156] 일 구현예에서, 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지는 본 발명의 항체는
- [0157] (a) 서열 번호 4, 6, 및 7의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 20, 21, 및 22의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 14와 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열, 및 서열 번호 26과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열;
- [0158] (b) 서열 번호 5, 6, 및 7의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 20, 21, 및 22의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 15와 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열, 및 서열 번호 26과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열;
- [0159] (c) 서열 번호 4, 6, 및 7의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 20, 21, 및 22의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 16과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열, 및 서열 번호 27과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열[단 바람직하게 상기 VH 서열은 G56A 및 Y105F 돌연변이(AHo 번호매김)를 포함하고, 상기 VL은 S9A 및 A51P 돌연변이(AHo 번호매김)를 포함함];
- [0160] (d) 서열 번호 35, 37 및 38의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 51, 52 및 53의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 45와 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열, 및 서열 번호 57과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열;
- [0161] (e) 서열 번호 36, 37 및 38의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 51, 52 및 53의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 46과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열, 및 서열 번호 58과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열[단 바람직하게 상기 VH 서열은 V2S, V25A, I44V, G56A, V82K, F89V 및 Y105F 돌연변이(AHo 번호매김)를 포함하고, 상기 VL은 I2F, M4L 및 A51P 돌연변이(AHo 번호매김)를 포함함]; 또는
- [0162] (f) 서열 번호 35, 37 및 38의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 51, 52 및 53의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 47과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 VH 서열, 및 서열 번호 57과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 VL 서열[단 바람직하게 상기 VH는 V25A, I44V, G56A, V82K 및 F89V 돌연변이(AHo 번호매김)를 포함함];
- [0163] 을 포함한다.
- [0164] 일 구현예에서, 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지는 본 발명의 항체는
- [0165] (a) 서열 번호 1, 2, 및 3의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 17, 18 및 19의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 14와 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열, 및 서열 번호 26과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열;
- [0166] (b) 서열 번호 1, 2, 및 3의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 17, 18, 및 19의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 15와 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열, 및 서열 번호 26과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열;
- [0167] (c) 서열 번호 1, 2 및 3의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 17, 18 및 19의 LCDR1, LCDR2,

및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 16과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열, 및 서열 번호 27과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열[단 바람직하게 상기 VH는 G56A 및 Y105F 돌연변이(AHo 번호매김)를 포함하고, 상기 VL은 S9A 및 A51P 돌연변이(AHo 번호매김)를 포함함];

[0168] (d) 서열 번호 32, 33 및 34의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 48, 49 및 50의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 45와 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열, 및 서열 번호 57과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열;

[0169] (e) 서열 번호 32, 33 및 34의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 48, 49 및 50의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 46과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열, 및 서열 번호 58과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열[단 바람직하게 상기 VH 서열은 V2S, V25A, I44V, G56A, V82K, F89V 및 Y105F 돌연변이(AHo 번호매김)를 포함하고, 상기 VL은 I2F, M4L 및 A51P 돌연변이(AHo 번호매김)를 포함함]; 또는

[0170] (f) 서열 번호 32, 33 및 34의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 48, 49 및 50의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 47과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 VH, 및 서열 번호 57과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 VL[단 바람직하게 상기 VH는 V25A, I44V, G56A, V82K 및 F89V 돌연변이(AHo 번호매김)를 포함함];

[0171] 바람직한 구현예에서, 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지는 본 발명의 항체는 서열 번호 1, 2 및 3의 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3 서열 각각, 및 서열 번호 17, 18 및 19의 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 16과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열, 및 서열 번호 27과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열을 포함하되, 단 바람직하게 상기 VH는 G56A 및 Y105F 돌연변이(AHo 번호매김)를 포함하고, 상기 VL은 S9A 및 A51P 돌연변이(AHo 번호매김)를 포함한다.

[0172] 추가의 구현예에서, 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지는 본 발명의 단리 항체는 (a) 서열 번호 14의 VH 서열 및 서열 번호 26의 VL 서열; (b) 서열 번호 15의 VH 서열 및 서열 번호 26의 VL 서열; (c) 서열 번호 16의 VH 서열 및 서열 번호 27의 VL 서열; (d) 서열 번호 45의 VH 서열 및 서열 번호 57의 VL 서열; (e) 서열 번호 46의 VH 서열 및 서열 번호 58의 VL 서열 ; 또는 (f) 서열 번호 47의 VH 서열 및 서열 번호 57의 VL 서열을 포함한다. 바람직한 구현예에서, 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지는 본 발명의 단리 항체는 서열 번호 14의 VH 서열 및 서열 번호 26의 VL 서열을 포함한다. 더욱 바람직한 구현예에서, 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지는 본 발명의 단리 항체는 서열 번호 16의 VH 서열 및 서열 번호 27의 VL 서열을 포함한다.

[0173] 일 구현예에서, PDL1에 특이적으로 결합하는 항체는 표 1에 기술된 항체이다. 일 구현예에서, PDL1에 특이적으로 결합하는 항체는 서열 번호 29, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 60, 서열 번호 61 및 서열 번호 62로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, PDL1에 특이적으로 결합하는 항체는 서열 번호 29 또는 서열 번호 30 또는 서열 번호 31, 바람직하게 서열 번호 29, 더욱 바람직하게 서열 번호 31에 제시된 바와 같다. 일 구현예에서, PDL1에 특이적으로 결합하는 항체는 서열 번호 60 또는 서열 번호 61 또는 서열 번호 62, 바람직하게 서열 번호 60, 더욱 바람직하게 서열 번호 62에 제시된 바와 같다.

[0174] 인간 PDL1에 대한 결합 특이성을 가지는 본 발명의 기타 항체는 아미노산 또는 이 아미노산을 암호화하는 핵산이 돌연변이되었지만, 표 1에 기술된 서열에 대해 적어도 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%의 동일성을 보이는 것들을 포함한다. 일 구현예에서, 이는 돌연변이 아미노산 서열을 포함하는데, 단 가변 영역 중 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 이하의 아미노산이, 표 1에 기술된 서열에 서사된 가변 영역의 아미노산과 비교되었을 때 돌연변이되었으되, 실질적으로 동일한 활성을 보유하고 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "실질적으로 동일한 활성"이란 용

어는, 모 항체, 예컨대 본 발명의 항체, 구체적으로 표 1에 기술된 본 발명의 항체에 대해 측정되었을 때, 그 활성이 이러한 항체 활성의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 심지어 적어도 100% 또는 적어도 110%, 또는 적어도 120%, 또는 적어도 130%, 또는 적어도 140%, 또는 적어도 150%, 또는 적어도 160%, 또는 적어도 170%, 또는 적어도 180%, 또는 적어도 190%, 예컨대 200% 이하인 것과 같이 실질적으로 동일한 것으로 나타나는 경우를 지칭한다.

[0175] 만일 이러한 항체 각각이 PDL1에 결합할 수 있고, 항원 결합 특이성이 주로 CDR1, 2 및 3 영역에 의해 제공된다면, VH CDR1, 2 및 3 서열 및 VL CDR1, 2 및 3 서열은 "혼합(mixing) 및 매칭(matching)"될 수 있다(즉, 비록 각각의 항체는 기타 본 발명의 PDL1 결합 분자를 생성하기 위해 VH CDR1, 2 및 3 및 VL CDR1, 2 및 3을 함유하여야 하지만, 상이한 항체로부터 유래한 CDR들은 혼합 및 매칭될 수 있다). 이처럼 "혼합 및 매칭"된 PDL1 결합 항체는 당 분야에 공지된 결합 검정과 실시예에 기술된 방법(예컨대 ELISA)을 사용하여 시험될 수 있다. VH CDR 서열이 혼합 및 매칭될 때, 특정의 VH 서열로부터 유래한 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열은 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 치환되어야 한다. 이와 유사하게, VL CDR 서열이 혼합 및 매칭될 때, 특정의 VL 서열로부터 유래한 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3은 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 치환되어야 한다. 본 발명의 모노클로날 항체에 대해 본원에 보인 CDR 서열로부터 유래한 구조적으로 유사한 서열로 1개 이상의 VH 및/또는 VL CDR 영역 서열을 돌연변이시킴으로써 신규 VH 및 VL 서열이 생성될 수 있음은 당업자가 용이하게 인식할 것이다.

[0176] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 표 1에 기술된 서열에 상동성인 아미노산 서열을 포함하는 항체를 제공하는데, 상기 항체는 PDL1과 결합하고, 표 1에 기술된 항체들의 원하는 기능상 특성들을 보유한다.

[0177] 예를 들어 본 발명은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리 모노클로날 항체를 제공하는데, 단 이 중쇄 가변 영역은 서열 번호 14, 15, 16, 45, 46 및 47로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 14 또는 16의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 16의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하고; 이 경쇄 가변 영역은 서열 번호 26, 27, 57 및 58로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 26 또는 27의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 27의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하며; 항체는 인간 PDL1 단백질에 특이적으로 결합한다.

[0178] 일 구현예에서, VH 및/또는 VL 아미노산 서열은 표 1에 제시된 서열과 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일할 수 있다. 일 구현예에서, VH 및/또는 VL 아미노산 서열은 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 이하의 아미노산 위치에 아미노산 치환이 일어났다는 점을 제외하고는 동일할 수 있다.

[0179] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과, CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 가지는데, 이러한 CDR 서열들 중 1개 이상은 본원에 기술된 항체를 기반으로한 특정의 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 가지고, 항체는 본 발명의 PDL1 결합 항체의 원하던 기능상 특성을 보유한다.

[0180] "보존적으로 변형된 변이체" 또는 "보존적 변이체"란 용어는 아미노산 서열과 핵산 서열 둘 다에 적용된다. 특정의 핵산 서열에 관하였을 때, 보존적으로 변형된 변이체란, 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 지칭하거나, 또는 핵산이 아미노산 서열을 암호화하지 않는 경우에는 본질적으로 동일한 서열을 지칭한다. 유전자 코드의 축퇴성으로 말미암아 기능상 동일한 핵산 다수가 임의의 주어진 단백질을 암호화한다. 예를 들어 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 암호화한다. 그러므로 알라닌이 코돈에 의해 특정되는 모든 위치에서 이 코돈은, 암호화된 폴리펩티드를 변경시키지 않고, 기술된 대응 코돈들 중 임의의 것으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이는 보존적으로 변형되는 변이의 일종인 "침묵 변이"이다. 어떤 폴리펩티드를 암호화하는 본원의 모든 핵산 서열은 또한 핵산에 일어날 수 있는 모든 침묵 변형을 기술하기도 한다. 당 업자는 핵산 내에 있는 각각의 코돈(보통 메티오닌의 유일한 코돈인 AUG와, 보통 트립토판의 유일한 코돈인 TGG는 제외)이 변형되어, 기능상 동일한 분자가 수득될 수 있음을 인지할 것이다. 그러므로 어떤 폴리펩티드를 암호화하는 핵산에 일어나는 침묵 변이 각각은 기술된 각각의 서열 내에 내포되어 있다.

[0181] 폴리펩티드 서열에 있어서 "보존적으로 변형된 변이체" 또는 "보존적 변이체"는 어떤 아미노산의 화학적으로 유사한 아미노산으로의 치환을 일으키는, 폴리펩티드 서열에 대한 각각의 치환, 결실 또는 부가를 포함한다. 기능상 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당 분야에 널리 공지되어 있다. 이처럼 보존적으로 변형된 변이체는 본 발명의 대립형질, 중간 상동체 및 다형성 변이체에 부가적이고, 이것들을 배제하지 않는다. 하기 8개의 군은 서로 간에 보존적 치환인 아미노산들을 함유한다: 1) 알라닌(A), 글리신(G); 2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E); 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q); 4) 아르기닌(R), 리신(K); 5) 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌

(M), 발린(V); 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W); 7) 세린(S), 트레오닌(T); 그리고 8) 시스테인(C), 메티오닌(M)(예컨대 문헌(Creighton, Proteins (1984)) 참조). 일 구현예에서, "보존적 서열 변형"이란 용어는, 어떤 아미노산 서열을 함유하는 항체의 결합 특징에 유의미한 영향을 미치지 않거나, 이를 유의미하게 변경하지 않는 아미노산 변형을 지칭하는데 사용된다.

[0182] 그러므로 본 발명은 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과, CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하거나, 이것으로 이루어진 단리 모노클로날 항체를 제공하는데; 단

[0183] 중쇄 가변 영역 CDR1은 서열 번호 1, 4, 5, 8, 11, 32, 35, 36, 39 및 42 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 1 또는 32의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 1의 아미노산 서열, 또는 이것들의 보존적 변이체를 포함하거나, 바람직하게는 이것으로 이루어지고; 중쇄 가변 영역 CDR2는 서열 번호 2, 6, 9, 12, 33, 37, 40 및 43 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 2 또는 33의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 2의 아미노산 서열, 또는 이것들의 보존적 변이체를 포함하거나, 바람직하게는 이것으로 이루어지며; 중쇄 가변 영역 CDR3은 서열 번호 3, 7, 10, 13, 34, 38, 41 및 44 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 3 또는 34의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 3의 아미노산 서열, 또는 이것들의 보존적 변이체를 포함하거나, 바람직하게는 이것으로 이루어지고;

[0184] 경쇄 가변 영역 CDR1은 서열 번호 17, 20, 23, 48, 51 및 54 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 17 또는 48의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 17의 아미노산 서열, 또는 이것들의 보존적 변이체를 포함하거나, 바람직하게는 이것으로 이루어지고; 경쇄 가변 영역 CDR2는 서열 번호 18, 21, 24, 49, 52 및 55 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 18 또는 49의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 18의 아미노산 서열, 또는 이것들의 보존적 변이체를 포함하거나, 바람직하게는 이것으로 이루어지며; 경쇄 가변 영역 CDR3은 서열 번호 19, 22, 25, 50, 53 및 56 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 19 또는 50의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 19의 아미노산 서열, 또는 이것들의 보존적 변이체를 포함하거나, 바람직하게는 이것으로 이루어지고;

[0185] 항체는 PDL1에 특이적으로 결합하고, PD-1/PDL1 상호작용을 차단할 수 있다.

[0186] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 포유류 세포내 발현에 대해 최적화되도록 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 가지는데, 이 경우 이러한 서열들 중 1개 이상은 본원의 항체를 기반으로한 지정 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 가지고, 이 항체는 본 발명의 PDL1 결합 항체의 원하던 기능상 특성들을 보유한다. 그러므로 본 발명은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리 모노클로날 항체로서, 포유류 세포에서의 발현에 최적화된 항체를 제공하는데; 중쇄 가변 영역은 서열 번호 14, 15, 16, 45, 46 및 47 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 14 또는 16의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 16의 아미노산 서열과 이의 보존적 변형을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 서열 번호 26, 27, 57 및 58 중 임의의 것으로부터 선택되는 아미노산 서열, 바람직하게 서열 번호 26 또는 27의 아미노산 서열, 더욱 바람직하게 서열 번호 27의 아미노산 서열과 이의 보존적 변형을 포함하며; 항체는 PDL1에 특이적으로 결합하고, PD-1/PDL1 상호작용을 차단할 수 있다.

[0187] 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 포유류 세포에서의 발현에 대해 최적화되도록 전장 중쇄 서열과 전장 경쇄 서열을 가지는데, 이러한 서열들 중 1개 이상은 본원에 기술된 항체를 기반으로한 지정 아미노산 서열 또는 이의 보존적 변형을 가지고, 항체는 본 발명의 PDL1 결합 항체의 원하던 기능상 특성들을 보유한다.

[0188] 본원에 사용된 바와 같은 "최적화된"이란 용어는, 뉴클레오타이드 서열이 변경되어, 생산 세포 또는 유기체, 일반적으로는 진핵생물 세포, 예컨대 피치아(*Pichia*) 세포, 중국 햄스터 난소 세포(CHO) 또는 인간 세포에서 바람직한 코돈을 이용하여 아미노산 서열을 암호하게 됨을 의미한다. 최적화된 뉴클레오타이드 서열은 원래 출발 뉴클레오타이드 서열("모" 서열이라고도 공지됨)에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 전부 또는 가능한 많이 보유하고 조작된다. 본원에 있어 최적화된 서열은 포유류 세포에서 바람직한 코돈을 가지도록 조작되었다. 그러나 이러한 서열의 다른 진핵생물 세포 또는 원핵생물 세포 내 최적화된 발현도 또한 본원에서 상상된다. 최적화된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열도 또한 최적화되었다고 지칭된다.

[0189] 가변 영역 변형의 또다른 유형은 VH 및/또는 VL CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 영역 내 아미노산 잔기를 돌연변이시켜, 관심 항체의 결합 특성(예컨대 친화성) 1가지 이상을 개선하는 것이다("친화성 성숙"이라 공지됨). 돌연변이(들)를 도입하기 위해 부위 유도성 돌연변이유발 또는 PCR 매개 돌연변이유발이 수행될 수 있으며, 항체 결합

또는 기타 관심이 있는 기능상의 특성에 대한 영향력이, 본원에 기술되어 있고 실시예에 제공된 시험관내 또는 생체내 검정에서 평가될 수 있다. (상기 논의된 바와 같은) 보존적 변형이 도입될 수 있다. 돌연변이는 아미노산 치환, 부가 또는 결실일 수 있다. 더욱이 통상적으로는 CDR 영역내 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 이하의 잔기가 변경된다.

[0190] "친화성 성숙된(affinity-matured)" 항체는 가변 도메인 1개 이상에 1회 이상의 변경이 발생하여, 항원에 대한 항체의 친화성이, 이러한 변경(들)이 발생하지 않은 모 항체의 항원에 대한 친화성과 비교되었을 때 개선된 항체이다. 일 구현예에서, 친화성 성숙 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화성을 가진다. 친화성 성숙된 항체는 당 분야에 공지된 방법에 의해 제조된다. 예를 들어 문헌[Marks et al, Bio/Technology 10:779-783 (1992)]에는 VH-도메인 및 VL-도메인 셔플링(shuffling)에 의한 친화성 성숙이 기술되어 있다. 초가변 영역("HVR") 및/또는 틀 잔기의 무작위 돌연변이유발은, 예를 들어 문헌[Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147-155 (1995); Jackson et al, J. Immunol. 154(7):3310- 9 (1995); 및 Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)]에 기술되어 있다.

[0191] 일 구현예에서, 본 발명은 G56A 및 Y105F 돌연변이, 구체적으로 서열 번호 16에 따른 아미노산 서열을 포함하는 VH3과; 바람직하게 S9A, A51P 돌연변이, 구체적으로 서열 번호 27에 따른 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 단리 모노클로날 항체를 제공한다.

[0192] 일 구현예에서, 본 발명의 "친화성 성숙" 항체는 V25A; I44V; G56A; V82K; F89V 돌연변이, 구체적으로 서열 번호 47에 따른 아미노산 서열을 포함하는 VH4와; 바람직하게 서열 번호 57에 따른 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다. 추가의 구현예에서, 본 발명의 "친화성 성숙" 항체는 V2S; V25A; I44V; G56A; V82K; F89V; Y105F 돌연변이, 구체적으로 서열 번호 46에 따른 아미노산 서열을 포함하는 VH4와; I2F; M4L; A51P 돌연변이, 구체적으로 서열 번호 58에 따른 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다.

[0193] 본 발명의 항체는 또한 변형 항체를 조작하기 위해 출발 물질로서 본원에 보인 VH 및/또는 VL 서열들 중 1개 이상을 가지는 항체를 사용하여 제조될 수 있는데, 단 이 변형 항체는 출발 항체의 특성과는 달리 변경된 특성을 가질 수 있다. 항체는 가변 영역(즉 VH 및/또는 VL) 1개 또는 둘 다의 내부, 예를 들어 1개 이상의 CDR 영역 및/또는 1개 이상의 틀 영역 내부에 있는 잔기 1개 이상을 변형시킴으로써 조작될 수 있다. 추가로, 또는 대안적으로 항체는, 예를 들어 항체의 효과기 기능(들)을 변경하기 위해 불변 영역(들) 내부에 있는 잔기들을 변형시켜 조작될 수 있다.

[0194] 수행될 수 있는 가변 영역 조작의 한 유형은 CDR 이식이다. 주로 항체는 6개의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역(CDR)들에 위치하는 아미노산 잔기들을 통해 표적 항원과 상호작용한다. 이러한 이유로 말미암아, 개별 항체들 간 CDR 외부 아미노산 서열보다는 CDR 내부 아미노산 서열이 더욱 가변적이다. CDR 서열은 대부분의 항체-항원 상호작용에 관여하므로, 상이한 특성을 가지는 상이한 항체로부터 유래한 틀 서열상에 이식된 특성의 자연 발생 항체로부터 유래한 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 구성함으로써 특성의 자연 발생 항체의 특성을 모의하는 재조합 항체를 발현시키는 것이 가능하다[예컨대 문헌(Riechmann, L. et al., 1998 Nature 332:323-327; Jones, P. et al., 1986 Nature 321:522- 525; Queen, C. et al., 1989 Proc. Natl. Acad., U.S.A. 86: 10029-10033; 미국 특허 제5,225,539호(Winter), 및 미국 특허 제5,530,101호; 동 제5,585,089호; 동 제5,693,762호 및 동 제6,180,370호(Queen et al.))을 참조한다].

[0195] 이러한 틀 서열은 생식계열 항체 유전자 서열 또는 재배열된 항체 서열을 포함하는 간행된 참고문헌 또는 공공의 DNA 데이터베이스로부터 입수될 수 있다. 예를 들어 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자에 대한 생식계열 DNA 서열은 "VBase" 인간 생식계열 서열 데이터베이스(인터넷 사이트 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase에서 입수 가능함)에서뿐 아니라, 문헌[Kabat, E. A., et al., 1991 sequences of proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al., 1992 J. Mol. Biol. 227:776-798; 및 Cox, J. P. L. et al., 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836]에서도 살펴볼 수 있는데; 단 이것들 각각의 내용은 본원에 참조로 명백하게 인용되어 있다. 예를 들어 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자에 대한 생식계열 DNA 서열과 재배열된 항체 서열은 "IMGT" 데이터베이스(인터넷 사이트 www.imgt.org에서 입수 가능; Lefranc, M.P. et al., 1999 Nucleic Acids Res. 27:209-212 참조(이것들 각각의 내용은 본원에 참조로 명백하게 인용됨))에서 살펴볼 수 있다.

[0196] 본 발명의 항체에 사용하기 위한 틀 서열의 예는 본 발명의 선택된 항체에 의해 사용되는 틀 서열과 구조상 유사한 틀 서열, 예컨대 본 발명의 모노클로날 항체에 의해 사용되는 공통 서열 및/또는 틀 서열이다. VH CDR1, 2 및 3 서열, 및 VL CDR1, 2 및 3 서열은 틀 서열의 기원이 되는 생식 계열 면역글로불린 유전자에서 발견되는 서

열과 동일한 서열을 가지는 틀 영역에 이식될 수 있거나, 또는 CDR 서열은 생식계열 서열에 비하여 돌연변이를 1개 이상 함유하는 틀 영역에 이식될 수 있다. 예를 들어 임의의 경우 틀 영역 내 잔기들을 돌연변이시켜, 항체의 항원 결합능을 유지시키거나 향상시키는 것이 유리할 수 있음이 확인되었다(예를 들어 미국 특허 제 5,530,101호; 동 제5,585,089호; 동 제5,693,762호 및 동 제6,180,370호(Queen의 다수) 참조).

- [0197] 생성되는 폴리펩티드가 PDL1에 특이적으로 결합하는 결합 영역 적어도 1개를 포함하는 한, 매우 다양한 항체/면역글로불린 틀 또는 스캐폴드가 사용될 수 있다. 이러한 틀 또는 스캐폴드는 인간 면역글로불린, 이의 항원 결합 단편의 주요 이디오타입(idiotypic) 5개를 포함하고, 다른 동물종의 면역글로불린, 바람직하게 인간화된 양태들을 가지는 면역글로불린을 포함한다.
- [0198] 일 양태에서, 본 발명은 자체에 본 발명의 CDR들이 이식될 수 있는 비 면역글로불린 스캐폴드를 사용하여 비 면역글로불린 기반 항체를 생성하는 방법에 관한 것이다. 공지되었거나 미래의 비 면역글로불린 틀 및 스캐폴드가 표적 PDL1 단백질에 특이적인 결합 영역을 포함하는 한, 이것들이 사용될 수 있다. 공지된 비 면역글로불린 틀 또는 스캐폴드는 피브로넥틴(Compound Therapeutics, Inc., Waltham, Mass.), 안키린(Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland), 리포칼린(Pieris Proteolab AG, Freising, Germany), 소형 조절성 면역약제(immunopharmaceutical)(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, Wash.), 맥시바디(Avidia, Inc., Mountain View, Calif), 단백질 A(Affibody AG, Sweden) 및 아필린(감마-크리스탈린 또는 유비퀴틴)(Scil proteins GmbH, Halle, Germany)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0199] 적합하게 본 발명의 항체는 PDL1에 특이적으로 결합하고, 하기 매개변수들 중 1개 이상에 의해 특징지어진다:
- [0200] (i) 구체적으로 표면플라스몬공명법(SPR)에 의해 측정된 바에 따르면 해리 상수(KD) 10 nM 미만, 구체적으로 5 nM 미만, 구체적으로 1 nM 미만, 구체적으로 500 pM 미만, 더욱 구체적으로 100 pM 미만, 바람직하게 50 pM 미만, 더욱 바람직하게 10 pM 미만, 더욱 바람직하게 5 pM 미만으로 인간 PDL1과 결합하고[단 상기 항체는 구체적으로 scFv임];
- [0201] (ii) SPR에 의해 측정되는 바에 따르면 K_{off} 속도 $10^{-3} s^{-1}$ 이하, 또는 $10^{-4} s^{-1}$ 이하, 또는 $10^{-5} s^{-1}$ 이하로 인간 PDL1과 결합하며[단 상기 항체는 scFv임];
- [0202] (iii) SPR에 의해 측정되는 바에 따르면 K_{on} 속도 적어도 $10^3 M^{-1} s^{-1}$ 이상, 적어도 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 이상, 적어도 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 이상, 적어도 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 이상으로 인간 PDL1과 결합하고[단 구체적으로 상기 항체는 scFv임];
- [0203] (iv) 마카카 파스쿨라리스(사이노물거스) PDL1과 교차 반응성으로서, SPR에 의해 측정되는 바에 따르면 구체적으로 KD 5 nM 미만, 구체적으로 1 nM 미만, 구체적으로 500 pM 미만, 더욱 구체적으로 100 pM 미만, 바람직하게 10 pM 미만으로 사이노물거스 PDL1과 결합하며[단 상기 항체는 구체적으로 scFv임]; 구체적으로 SPR에 의해 측정되는 바에 따르면 무스 머스쿨러스(*Mus musculus*) PDL1과 비 교차 반응성이고/이거나;
- [0204] (v) 구체적으로 SPR에 의해 측정되는 바에 따르면 인간 PDL2와 결합하지 않음.
- [0205] 본원에 사용된 바와 같은 "친화성"이란 용어는, 단일 항원성 부위에서의 항체와 항원간 상호작용의 세기를 지칭한다. 각각의 항원성 부위내에서 항체 "팔"의 가변 영역은 약한 비공유성 외력을 통해 다양한 부위에서 항원과 상호작용하고; 그 상호작용이 클수록 친화성도 더 크다.
- [0206] "결합 친화성"이란, 일반적으로 분자(예컨대 항체)의 단일 결합 부위와 이의 결합 파트너(예컨대 항원)간 비 공유 상호작용을 모두 합하였을 때의 세기를 지칭한다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같은 "결합 친화성", "에 결합한다", "에 결합하다" 또는 "에 결합하는"이란, 결합 쌍의 일원들(예컨대 항체 단편과 항원)간 1:1 상호작용을 반영하는 고유의 결합 친화성을 지칭한다. 분자 X와, 이의 파트너인 Y의 친화성은, 일반적으로 해리 상수(K_D)로 표시될 수 있다. 친화성은 당 분야에 공지된 통상의 방법, 예컨대 본원에 기술된 방법들로 측정될 수 있다. 저 친화성 항체는, 일반적으로 천천히 항원과 결합하고, 쉽게 항원과 해리되는 경향이 있는 반면, 고 친화성 항체는, 일반적으로 항원과 더 빨리 결합하고, 결합된 채 더 오래 유지되는 경향이 있다. 결합 친화성을 측정하는 방법 다수가 당 분야에 공지되어 있는데, 이 방법들 중 임의의 방법이 본 발명을 위해 사용될 수 있다. 결합 친화성, 즉 결합 세기를 측정하기 위한 방법으로서, 특정의 예시적 및 모범적 구현예가 이하에 기술되어 있다.
- [0207] 본원에 사용된 바와 같은 "K_{결합}", "Ka" 또는 "K_{on}"이란 용어는, 특정의 항체-항원 상호작용에서의 결합 속도를

지칭하도록 의도되는 반면, 본원에 사용된 바와 같은 " $K_{\text{해리}}$ ", " K_d " 또는 " K_{off} "란 용어는, 특정의 항체-항원 상호작용에서의 해리 속도를 지칭하도록 의도된다. 일 구현예에서, 본원에 사용된 바와 같은 " KD "란 용어는, K_d 대 K_a 의 비(즉 K_d/K_a)로부터 구하여진 해리 상수를 지칭하도록 의도되고, 몰 농도(M)로서 표현된다. 일 구현예에서, 본 발명에 따른 " KD " 또는 " KD 값" 또는 " K_D " 또는 " K_D 값"은 MASS-1 SPR 기기(Sierra Sensors)를 사용하는 표면 플라스몬공명검정에 의해 측정된다. 친화성을 측정하기 위해 토끼 IgG Fc 영역에 특이적인 항체(Bethyl Laboratories, Cat. No. A120-111A)는 표준 아민 커플링 방법을 이용하여 센서 칩(2 Affinity Sensor, High Capacity Amine, Sierra Sensors) 상에 부동화된다. B 세포 상청액 중 토끼 모노클로날 항체는 부동화된 항 토끼 IgG 항체에 의해 포착된다. B 세포 상청액 중 최저 IgG 농도는 충분한 포착을 허용하여야 한다. 모노클로날 항체를 포착한 후, 인간 PDL1(Peprrotech)은 유동 세포에 3분 동안 90 nM의 농도로 주입되고, 센서 칩상에 포착된 IgG로부터의 단백질 해리는 5분 동안 그 진행이 허용된다. 매 주입 주기 이후에 표면은 10 mM 글리신-HCl 2회 주입으로 재생된다. 겔보기 해리 속도 상수(k_d) 및 겔보기 결합 속도 상수(k_a)와, 겔보기 해리 평형 상수(KD)는 1:1 랑뮈르(Langmuir) 결합 모델을 이용하여 MASS-1 분석 소프트웨어(Analyzer, Sierra Sensors)로 산정되고, 피팅의 품질은 상대적 χ^2 (즉 피분석물의 외삽된 최고 결합 수준에 대해 정규화된 χ^2)를 기반으로 모니터링되는데, 여기서 상대적 χ^2 는 곡선 피팅의 품질에 대한 척도이다. χ^2 에 대한 값이 작으면, 1:1 랑뮈르 결합 모델에 더욱 정확하게 피팅된다. 만일 리간드 결합에 대한 반응 단위(response unit; RU)가 항체 포착에 대한 RU의 적어도 2%라면, 결과는 유효한 것으로 여겨진다. 리간드 결합에 대한 RU가 항체 포착에 대한 RU의 2% 미만인 시료는 포착된 항체에 대한 PDL1의 특이적 결합을 보이지 않는 것으로 간주된다. 평형 해리 상수(K_D)는 비 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 으로서 산정된다. 예컨대 문헌[Chen et al, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)]을 참조한다.

[0208] 적합하게 본 발명의 항체의 PDL1에 대한 친화성은, PDL1의 PD-1에 대한 친화성보다 더 클 수 있다. PDL1의 PD-1에 대한 친화성에 비하여 더 큰, PDL1 항체의 PDL1에 대한 친화성은, 예비 생성 PD-1/PDL1 복합체를 해리 또는 중화하는데 특히 유용할 수 있음이 인식될 것이다. 일 구현예에서, 본 발명의 PDL1 항체는 PD-1/PDL1 상호작용을 중화한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 PDL1 항체는 B7-1/PDL1 상호작용을 중화한다. 적합하게 본 발명의 PDL1 항체의 PDL1에 대한 친화성은, 아벨루마의 PD-1에 대한 친화성과 거의 동일할 수 있거나 더 클 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 PDL1 항체는 PD-1/PDL1 상호작용을, 아벨루마의 역가와 동일하거나 더 큰 역가로 중화한다. 추가의 구현예에서, 본 발명의 PDL1 항체는 B7-1/PDL1 상호작용을, 아벨루마의 역가와 동일하거나 더 큰 역가로 중화한다. 항체의 결합 친화성은, 예를 들어 해리 상수(KD)에 의해 확정될 수 있다. 더 큰 친화성은 더 낮은 KD 로써 나타내어지는 반면에, 더 작은 친화성은 더 큰 KD 로써 나타내어진다.

[0209] 그러므로 적합한 구현예에서, 본 발명의 항체의 KD 는 1 pM ~ 50,000 pM, 1 pM ~ 40,000 pM, 1 pM ~ 30,000 pM, 1 pM ~ 20,000 pM, 1 pM ~ 10,000 pM, 1 pM ~ 5,000 pM, 1 pM ~ 2,500 pM, 1 pM ~ 1,000 pM, 1 pM ~ 750 pM, 1 pM ~ 500 pM, 1 pM ~ 250 pM, 1 pM ~ 100 pM, 1 pM ~ 50 pM, 1 pM ~ 10 pM일 수 있다. 적합한 구현예에서, 본 발명의 항체의 KD 는, 구체적으로 SPR에 의해 측정되었을 때, 약 50 nM 미만, 약 45 nM 미만, 약 40 nM 미만, 약 35 nM 미만, 약 30 nM 미만, 약 25 nM, 약 20 nM 미만, 약 15 nM 미만, 약 10 nM 미만, 약 9 nM 미만, 약 8 nM 미만, 약 7 nM 미만, 약 6 nM 미만, 약 5 nM 미만, 약 4 nM 미만, 약 3 nM 미만, 약 2 nM 미만, 약 1 nM 미만, 약 0.5 nM 미만, 약 0.25 nM 미만, 약 100 pM 미만, 약 10 pM 미만, 또는 약 5 pM 미만일 수 있되, 단 상기 항체는 구체적으로 scFv이다. 적합하게 본 발명의 항체의 KD 는, 구체적으로 SPR에 의해 측정되었을 때 5 nM 미만이다. 적합하게 본 발명의 항체의 KD 는, 구체적으로 SPR에 의해 측정되었을 때 1 nM 미만이다. 적합하게 본 발명의 항체의 KD 는, 구체적으로 SPR에 의해 측정되었을 때 100 pM 미만이다. 적합하게 본 발명의 항체의 KD 는, 구체적으로 SPR에 의해 측정되었을 때 50 pM 미만이다. 바람직하게 본 발명의 PDL1-BD는, 구체적으로 SPR에 의해 측정되었을 때 10 pM 미만의 KD 로 인간 PDL1에 결합한다. 더욱 바람직하게 본 발명의 PDL1-BD는, 구체적으로 SPR에 의해 측정되었을 때 5 pM 미만의 KD 로 인간 PDL1에 결합한다.

[0210] 적합하게 본 발명의 항체는 표면 플라스몬공명법(SPR)에 의해 측정되었을 때 인간 PDL1과 적어도 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, 적어도 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, 적어도 $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, 적어도 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, 적어도 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, 적어도 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, 적어도 $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, 적어도 $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, 적어도 $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, 구체적으로 적어도 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상의 K_{on} 속도로 결합한다. 바람직하게 본 발명의 항체는 SPR에 의해 측정되었을 때 K_{on} 속도가 적어도 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상, 구체적으로 적어도 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이상이다.

- [0211] 적합하게 본 발명의 항체는 표면 플라스몬공명법(SPR)에 의해 측정되었을 때 인간 PDL1과 10^{-3} s^{-1} 이하, $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 이하, $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 이하, 10^{-4} s^{-1} 이하, $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 이하, 10^{-5} s^{-1} 이하, $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 이하, 10^{-6} s^{-1} 이하, 또는 10^{-7} s^{-1} 이하의 K_{off} 속도로 결합한다. 바람직하게 본 발명의 항체의 K_{off} 속도는 SPR에 의해 측정되었을 때 10^{-3} s^{-1} 이하, 10^{-4} s^{-1} 이하, 구체적으로 10^{-5} s^{-1} 이하이다.
- [0212] 적합하게 본 발명의 항체는 PDL1과 특이적으로 결합하고, 하기 매개변수들 중 1가지 이상에 의해 특징지어진다:
- [0213] (i) ELISA 검정에서 측정되었을 때 1.5 이상, 예컨대 2 이상, 2.5 이상, 바람직하게 3 이상, 더욱 바람직하게 4 이상인, 아벨루마의 역가에 상대적인 역가(상대적 역가; relative potency)로 PDL1/PD-1 상호작용을 중화하는 능력을 가지고[단 상기 상대적 역가는 ELISA 검정에서 측정된 바와 같은 아벨루마의 IC_{50} 값(ng/mL) 대 ELISA 검정에서 측정된 바와 같은 상기 항체의 IC_{50} 값(ng/mL)의 비이고, 구체적으로 상기 항체는 scFv임];
- [0214] (ii) 선택적으로 NFAT 리포터 유전자 검정에서 측정되었을 때 1.5 이상, 예컨대 2 이상, 2.5 이상, 바람직하게 3 이상, 더욱 바람직하게 4 이상인, 아벨루마의 역가에 상대적인 역가(상대적 역가)로 PDL1/PD-1 상호작용을 중화하는 능력을 가지고[단 상기 상대적 역가는 NFAT 리포터 유전자 검정에서 측정된 바와 같은 아벨루마의 IC_{50} 값(ng/mL) 대 NFAT 리포터 유전자 검정에서 측정된 바와 같은 상기 항체의 IC_{50} 값(ng/mL)의 비이고, 구체적으로 상기 항체는 scFv임];
- [0215] (iii) ELISA 검정에서 측정되었을 때 1.5 이상, 예컨대 2 이상, 2.5 이상, 바람직하게 3 이상, 더욱 바람직하게 4 이상인, 아벨루마의 역가에 상대적인 역가(상대적 역가)로 PDL1/B7-1 상호작용을 중화하는 능력을 가짐[단 상기 상대적 역가는 ELISA 검정에서 측정된 바와 같은 아벨루마의 IC_{50} 값(ng/mL) 대 ELISA 검정에서 측정된 바와 같은 상기 항체의 IC_{50} 값(ng/mL)의 비이고, 구체적으로 상기 항체는 scFv임].
- [0216] 적합하게, 본 발명의 항체는 유리한 생물물리학적 특성을 가진다.
- [0217] 적합하게 본 발명의 항체는 scFv 포맷일 때, 시차 주사형광측정법에 의해 측정된 용융 온도(T_m)가 적어도 55°C , 예컨대 적어도 60°C , 바람직하게 적어도 65°C , 더욱 바람직하게 적어도 70°C 이고, 상기 항체는 구체적으로 50 mM 인산염-시트르산염 완충제(pH 6.4, 150 mM NaCl 포함) 중에 제제화된다. DSF는 이미 기술되어 있다(Egan, et al., MAbs, 9(1) (2017), 68-84; Niesen, et al., Nature Protocols, 2(9) (2007) 2212-2221). scFv 구조체의 열 언폴딩(thermal unfolding)에 대한 전이의 중간점은 형광 염료인 SYPRO® 오렌지를 사용하여 시차주사형광측정법에 의해 측정된다(Wong & Raleigh, Protein Science 25 (2016) 1834-1840 참조). 인산염-시트르산염 완충제(pH 6.4) 중 시료는 최종 단백질 농도가 50 $\mu\text{g/mL}$ 이고, 총 부피 100 μl 중 5x SYPRO® 오렌지 최종 농도만큼을 함유하도록 제조된다. 제조된 시료 25 마이크로리터만큼이 백색의 벽으로 둘러싸인 AB 유전자 PCR 평판에 3회 첨가된다. 이 검정은 열 순환기로서 사용되는 qPCR 기계 안에서 수행되고, 형광 발광은 소프트웨어의 맞춤 염료 보정 루틴에 따라서 검출된다. 검정 시료가 담긴 PCR 평판 온도는 1°C 씩 승온하여 25°C 에서 96°C 까지 상승되고, 매 승온 시마다 30초씩 휴지기를 둔다. 총 검정 시간은 약 2시간이다. T_m 은 곡선의 변곡점을 산정하기 위한 산술적 2차도함수법을 이용하여 소프트웨어 GraphPad Prism에 의해 산정된다. 보고된 T_m 은 3회 측정값의 평균이다.
- [0218] 적합하게, 본 발명의 항체는 scFv 포맷일 때, 연속 동결-해동 주기를 5회 거친 후 단량체 함량 감소율이 5% 미만, 바람직하게 3% 미만, 더욱 바람직하게 1% 미만이되, 단 이때 본 발명의 항체의 출발 농도는 10 mg/ml이고, 구체적으로 상기 항체는 50 mM 인산염-시트르산염 완충제(pH 6.4, 150 mM NaCl 포함) 중에 제제화된다.
- [0219] 적합하게 본 발명의 항체는 scFv 포맷일 때, 적어도 2주 동안, 특히 적어도 4주 동안 4°C 에 보관된 후 단량체 함량 감소율이 15% 미만, 예컨대 12% 미만, 10% 미만, 7% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 바람직하게 1% 미만이되, 단 이때 본 발명의 항체의 출발 농도는 10 mg/ml이고, 구체적으로 본 발명의 항체는 50 mM 인산염-시트르산염 완충제(pH 6.4, 150 mM NaCl 포함) 중에 제제화된다.
- [0220] 단량체 함량 감소율은 SE-HPLC 크로마토그램의 곡선하 면적 산정에 의하여 측정되는 바와 같다. SE-HPLC는 USP의 첩터 621에 개략적으로 기술된 바와 같이 고체 정지상 및 액체 이동상을 기반으로 하는 분리 기술이다. 이 방법은 소수성 정지상과 수성 이동상을 이용하여 분자들을 자체의 크기와 형상을 바탕으로 분리한다. 분자의 분리는 특정 컬럼의 허공부피(void volume; V_0)와 총 투과 부피(total permeation volume; V_T) 사이에 일어난다. SE-HPLC에 의한 측정은 자동 시료 주입장치 및 UV 검출기(검출 파장 280 nm로 설정)가 장착된 Chromaster HPLC

시스템(Hitachi High-Technologies Corporation)에서 수행된다. 장비는 얻어지는 크로마토그램의 분석을 지원 해주기도 하는 소프트웨어 EZChrom Elite(Agilent Technologies, Version 3.3.2 SP2)로 제어된다. 단백질 시료는 원심분리에 의해 청정화되고, 주입되기 전 자동시료추출기 안에 담긴다(온도 4℃ ~ 6℃로 유지). scFv 시료를 분석하기 위해 컬럼 Shodex KW403-4F(Showa Denko Inc., #F6989202)가 사용되는데, 이 경우 표준화된 완충염 이동상(50 mM 인산나트륨 pH6.5, 300 mM 염화나트륨)이 0.35 mL/분의 권장 유속으로 흐른다. 1회 주입당 표적 시료량은 5 µg이었다. 시료는 280 nm의 파장에서 UV 검출기로 검출되고, 데이터는 적합한 소프트웨어 슈트로 기록되었다. 구하여진 크로마토그램은 V0 ~ VT의 범위에서 분석되고, 이로써 매트릭스 결합 피크(용리 시간: 10분 초과)가 배제된다.

[0221] 본원에 사용된 바와 같은 "인지하다"란 용어는, 항체가 자신의 입체적 에피토프를 찾아서 이것과 상호작용(예컨대 결합)하는 경우를 지칭한다.

[0222] "경쟁하다" 또는 "교차 경쟁하다(cross-compete)" 및 관련 용어들은 본원에서 항체가, 표준 경쟁 결합 검정에서 다른 항체 또는 결합 제제와 PDL1의 결합을 방해하는 능력을 의미하는 것으로서 호환되어 사용된다.

[0223] 항체가, 다른 항체 또는 결합 분자와 PDL1의 결합을 방해할 수 있는 능력 또는 정도와, 항체가 본 발명에 따라서 교차 경쟁한다고 일컬어질 수 있는지 여부는, 표준 경쟁 결합 검정을 사용하여 확정될 수 있다. 특히 적합한 정량적 교차 경쟁 검정 한 가지는, 표지화된(예컨대 His 태깅, 바이오틴화 또는 방사능 표지화된) 항체 또는 이의 단편과, 다른 항체 또는 그의 단편 사이의 경쟁, 즉 이것들의 표적과의 결합의 관점에서의 경쟁을 측정하기 위해 FACS-기반 또는 AlphaScreen-기반 접근법을 사용한다. 일반적으로 교차 경쟁 항체 또는 이의 단편은, 예를 들어 교차 경쟁 검정에서 표적과 결합하여, 검정 동안에 제2의 항체 또는 그의 단편이 존재할 때, 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 면역글로불린 단일 가변 도메인의 기록된 치환율이, (예컨대 FACS 기반 경쟁 검정에서) 소정량으로 존재하는 시험 대상 잠재적 교차 차단성 항체 또는 이의 단편에 의한 이론상 최고 치환율(예컨대 교차 차단되어야 하는 냉각(예컨대 비표지화) 항체 또는 이의 단편에 의한 치환율)의 100% 이하가 되는 항체 또는 이의 단편이다. 바람직하게 교차 경쟁 항체 또는 이의 단편은 10% 내지 100%, 더욱 바람직하게 50% 내지 100%의 기록된 치환율을 보인다.

[0224] "에피토프"란 용어는, 항체와 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정기를 의미한다. 에피토프는 보통 화학적으로 활성인 표면 분자군, 예컨대 아미노산 또는 당 측쇄로 이루어져있으며, 일반적으로 특이적인 3차원 구조적 특징뿐 아니라, 특이적 전하 특징도 가진다. "입체" 에피토프와 "선형" 에피토프는, 이 입체 에피토프는 변성 용매가 존재할 때 소실되고, 선형 에피토프는 소실되지 않는다는 점에서 구별된다. 본원에 사용된 바와 같은 "입체" 에피토프란 용어는, 폴리펩티드 사슬이 폴딩(folding)되어 원산 단백질을 형성할 때 표면에 함께 존재하게 되고, Fab 결합으로 말미암아 유의미하게 감소한 HD 교환율을 보이는 항원의 아미노산 잔기들을 지칭한다. 입체 에피토프는 기능적 에피토프를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. "선형 에피토프"란 용어는, 단백질과 상호작용 분자(예컨대 항체) 사이의 상호작용 점 모두가 단백질의 1차 아미노산 서열을 따라서 직선으로(연속적으로) 존재하는 에피토프를 지칭한다.

[0225] 본 발명은 또한 표 1에 나열된 PDL1 결합 항체가 결합하는 에피토프와 동일한 에피토프와 결합하는 항체를 제공한다. 그러므로 추가의 항체는, PDL1 결합 검정에 있어 이 항체가 본 발명의 다른 항체와 교차 경쟁하는 능력(예컨대 통계학적으로 유의미한 방식으로 본 발명의 다른 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 능력)을 기반으로 동정될 수 있다.

[0226] 적합하게 본 발명의 단리 항체는 모노클로날 항체, 키메라 항체, IgG 항체, Fab, Fv, scFv, dsFv, scAb, STAB, 그리고 대안적 스캐폴드를 기반으로 한 결합 도메인, 예컨대 안키린 기반 도메인, 파이노머, 아비머, 안티칼린, 피브로넥틴, 및 항체의 불변 영역으로 구축될 결합 부위들(예컨대 F-star의 Modular AntibodyTechnology™)(이에 한정되는 것은 아님)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0227] 적합하게, 본 발명의 단리 항체는 Fv이다. 적합하게 본 발명의 단리 항체는 scFv 항체 단편이다. "단일 사슬 Fv" 또는 "scFv" 또는 "sFv" 항체 단편은 항체의 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하는데, 단 이들 도메인은 하나의 폴리펩티드 사슬 내에 존재한다. 일반적으로 Fv 폴리펩티드는 VH 도메인 및 VL 도메인 사이에, sFv가 표적 결합에 요망되는 구조를 형성하도록 만들 수 있는 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. "단일 사슬 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하는데, 단 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬 내에 존재한다. 일반적으로 scFv 폴리펩티드는 VH 도메인 및 VL 도메인 사이에, sFv가 항원 결합에 요망되는 구조를 형성하도록 만들 수 있는 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다(예컨대 문헌(Pluckthun, The pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, 1994, pp. 269-

315) 참조). 특정 구현예에서, 상기 기능성 단편은 서열 번호 28에 따르는 링커를 포함하는 scFv 포맷이다. 추가의 구현예에서, 본 발명의 단리 항체는 서열 번호 29, 서열 번호 30, 서열 번호 31, 서열 번호 60, 서열 번호 61 또는 서열 번호 62에 보인 바와 같은 단일 사슬 가변 단편(scFv)이다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 단리 항체는 서열 번호 31에 보인 바와 같은 단일 사슬 가변 단편(scFv)이다.

[0228] 적합하게 본 발명의 단리 항체는 IgG 항체 단편이다. "이소타입"이란 용어는, 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 제공되는 항체 군(예컨대 IgM, IgE, IgG, 예컨대 IgG1 또는 IgG4)을 지칭한다. 이소타입은 또한 이러한 군들 중 하나의 변형된 것도 포함하는데, 이 경우 변형은 Fc 기능을 좇아 이루어지고, 그 결과, 예컨대 Fc 수용체에의 결합 또는 효과기 기능이 향상되거나 감소된다. 일 구현예에서, 본 발명의 단리 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택되는 IgG, 바람직하게는 IgG1이다.

[0229] 적합하게 본 발명의 단리 항체는 서열 번호 4, 6 및 7의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 20, 21 및 22의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 14와 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열, 그리고 서열 번호 26과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열을 포함하는 IgG1이다. 더욱 구체적인 구현예에서, 본 발명의 항체는 서열 번호 4, 6 및 7의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 20, 21 및 22의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 93과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 서열, 그리고 서열 번호 92와 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 서열을 포함하는 IgG1이다. 적합하게 본 발명의 단리 항체는 서열 번호 1, 2 및 3의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 17, 18 및 19의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 14와 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열, 그리고 서열 번호 26과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열을 포함하는 IgG1이다. 더욱 구체적인 구현예에서, 본 발명의 항체는 서열 번호 1, 2 및 3의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 17, 18 및 19의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 16과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열, 그리고 서열 번호 27과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열을 포함하는 IgG1이다.

[0230] 적합하게 본 발명의 단리 항체는 서열 번호 35, 37 및 38의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 51, 52 및 53의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 45와 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열, 그리고 서열 번호 57과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열을 포함하는 IgG1이다. 더욱 구체적인 구현예에서, 본 발명의 항체는 서열 번호 35, 37 및 38의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 51, 52 및 53의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 91과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 서열, 그리고 서열 번호 90과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 서열을 포함하는 IgG1이다.

[0231] 적합하게 본 발명의 단리 항체는 서열 번호 32, 33 및 34의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 48, 49 및 50의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 45와 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열, 그리고 서열 번호 57과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열을 포함하는 IgG1이다. 더욱 구체적인 구현예에서, 본 발명의 항체는 서열 번호 32, 33 및 34의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 각각과, 서열 번호 48, 49 및 50의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열 각각, 서열 번호 47과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하거나, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열, 그리고 서열 번호 57과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%

또는 99% 동일하거나, 바람직하게 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열을 포함하는 IgG1이다.

- [0232] 본 발명의 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 단리 항체는 다중 특이적 분자, 구체적으로 적어도 제2의 기능성 분자를 가지는 다중 특이적 분자, 예컨대 2중 특이적 분자, 3중 특이적 분자, 4중 특이적 분자, 5중 특이적 분자 또는 6중 특이적 분자이다.
- [0233] 본원에 사용된 바와 같은 "다중 특이적 분자" 또는 다중 특이적 항체"란 용어는, 적어도 2개 이상의 상이한 표적(예컨대 PDL1, 및 PDL1과 상이한 다른 표적) 상에 존재하는 상이한 에피토프 2개 이상과 결합하거나, 또는 동일한 표적의 상이한 에피토프 2개 이상과 결합하는 항체를 지칭한다. "다중 특이적 분자"란 용어는 2중 특이적, 3중 특이적, 4중 특이적, 5중 특이적 및 6중 특이적 항체를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 "2중 특이적 항체"란 용어는, 상이한 표적 2개에 존재하는 상이한 에피토프 2개 또는 동일 표적에 존재하는 상이한 에피토프 2개와 결합하는 항체를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 "3중 특이적 항체"란 용어는, 상이한 표적 3개에 존재하는 상이한 에피토프 3개 또는 동일 표적에 존재하는 상이한 에피토프 3개와 결합하는 항체를 지칭한다.
- [0234] 본 발명의 항체는 다른 기능성 분자, 예컨대 다른 펩티드 또는 단백질(예컨대 다른 항체 또는 수용체의 리간드)에 결합하거나 유도체화될 수 있어서, 적어도 2개의 결합 부위 및/또는 상이한 표적 분자와 결합하는 다중 특이적 분자로 생성될 수 있다. 본 발명의 항체는 사실상 1개를 초과하는 기타 기능성 분자와 결합 또는 유도체화될 수 있어서, 2개를 초과하는 상이한 결합 부위 및/또는 표적 분자와 결합하는 다중 특이적 분자로 생성될 수 있다. 본 발명의 다중 특이적 분자를 생성하기 위해 본 발명의 항체는 (예컨대 화학적 커플링(chemical coupling), 유전자 융합 또는 비공유 결합 등에 의해) 1개 이상의 기타 결합 분자, 예컨대 다른 항체, 항체 단편, 펩티드 또는 결합 모의체에 기능상 연결될 수 있고, 그 결과 다중 특이적 분자가 얻어진다.
- [0235] 그러므로 본 발명은 적어도 1개의 PDL1에 대한 제1 결합 특이성 및 제2의 표적 에피토프에 대한 제2 결합 특이성을 포함하는 다중 특이적 분자를 포함한다. 예를 들어 제2의 표적 에피토프는 PDL1과 상이한 다른 표적 분자 상에 존재한다. 그러므로 본 발명은 적어도 1개의 PDL1에 대한 제1 결합 특이성과 제2 표적 에피토프에 대한 제2 결합 특이성을 포함하는 다중 특이적 분자를 포함한다. 예를 들어 제2의 표적 에피토프는 제1 표적 에피토프와 상이한 PDL1의 다른 에피토프이다. 다중 특이적 분자는 제1 및 제2 표적 에피토프 이외에도 제3 결합 특이성을 추가로 포함할 수 있다.
- [0236] 추가의 구현예에서, 본 발명은 PDL1 특이성에 대해 1가, 2가 또는 다가, 바람직하게는 1가인 다중 특이적 분자를 포함한다.
- [0237] 본 발명의 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 단리 항체는 PDL1 특이성에 대해 1가이거나 또는 다가인 분자, 예컨대 2가, 3가, 4가, 5가, 6가인 분자이다.
- [0238] 본원에 사용된 바와 같은 "1가 분자" 또는 "1가 항체"란 용어는, 표적 분자, 예컨대 PDL1에 존재하는 단일 에피토프와 결합하는 항체를 지칭한다.
- [0239] "다가 항체"란 용어는, 1가를 초과하는 가 수(valency)를 가지는 단일 결합 분자를 지칭하는데, 여기서 "가 수"는 동일한 표적 분자상 에피토프와 결합하는 항원 결합단의 수로서 기술된다. 그러므로 단일 결합 분자는 1개를 초과하는 표적 분자 또는 다수 개의 에피토프 복사체를 함유하는 표적 분자상 1개를 초과하는 결합 부위와 결합할 수 있다. 다가 항체의 예로서는 2가 항체, 3가 항체, 4가 항체 및 5가 항체 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본원에 사용된 바와 같은 "2가 항체"란 용어는, 각각 동일한 에피토프와 결합하는 항원 결합단을 2개 가지는 항체를 지칭한다.
- [0240] 본 발명의 단리 항체로서 적합한 것은 다중 특이적 분자, 예컨대 2중 특이적 분자, 및/또는 다가 분자, 예컨대 PDL1 특이성에 대해 1가인 분자, PDL1 특이성에 대해 2가인 분자인데, 이는 당 분야에 공지된 것으로서, 임의의 적합한 다중 특이적 포맷, 예컨대 2중 특이적 포맷으로부터 선택되는 항체 포맷, 예컨대 단일 사슬 다이아바디(scDb), 탠덤 scDb(Tandab), 선형 이량체 scDb(LD-scDb), 원형 이량체 scDb(CD-scDb), 2중 특이적 T 세포 점유체(Bispecific T-cell Engager; BiTE; 탠덤 디-scFv), 탠덤 트리-scFv, 트리바디(Fab-(scFv)2), 바이바디(Fab-(scFv)1), Fab, , Fab-Fv2, Morrison (IgG CH₃-scFv 융합체(Morrison L) 또는 IgG CL-scFv 융합체(Morrison H)), 트리아바디, scDb-scFv, 2중 특이적 Fab2, 디-미니항체, 테트라바디, scFv-Fc-scFv 융합체, scFv-HSA-scFv 융합체, 디-다이아바디, DVD-Ig, COVD, IgG-scFab, scFab-dsscFv, Fv2-Fc, IgG-scFv 융합체, 예컨대 bsAb(경쇄의 C 말단에 결합된 scFv), Bs1Ab(경쇄의 N 말단에 결합된 scFv), Bs2Ab(중쇄의 N 말단에 결합된 scFv), Bs3Ab(중쇄의 C 말단에 결합된 scFv), Ts1Ab(경쇄와 중쇄 둘 다의 N 말단에 결합된 scFv), Ts2Ab(중쇄의 C 말단에 결합된 dsscFv), 헤테로이량체 Fc 도메인을 기반으로 하는 2중 특이적 항체, 예컨대 납-인투-홀

(Knob-into-Hole) 항체(KiHs)(KiH 기법에 의해 제조된 2중 특이적 IgG); Fv, scFv, scDb, 탠덤 디-scFv, 탠덤 트리-scFv, Fab-(scFv)2, Fab-(scFv)1, Fab, Fab-Fv2, 헤테로이량체 Fc 도메인 또는 기타 임의의 헤테로이량체 도메인의 사슬 중 어느 하나의 N-말단 및/또는 C-말단에 융합된 COVD, MATCH(WO2016/0202457에 기술; Egan T., et al., mAbs 9 (2017) 68-84에 기술됨) 그리고 듀오바디(DuoBody)(듀오바디 기법에 의해 제조된 2중 특이적 IgG)(MAbs. 2017 Feb/Mar;9(2):182-212. doi: 10.1080/19420862.2016.1268307)를 기반으로 하는 포맷(이에 한정되는 것은 아님)이다. 구체적으로 본원에 사용되기 적합한 것은 단일 사슬 다이아바디(scDb) 또는 scDb-scFv이다.

[0241] "다이아바디"란 용어는 항원 결합 부위를 2개 가지는 항체 단편을 지칭하는데, 이 단편은 동일 폴리펩티드 사슬 내 VL과 결합된 VH(VH-VL)를 포함한다. 지나치게 짧아서 동일 사슬상 도메인 2개 사이의 쌍 형성을 허용하지 않는 링커가 사용되면, 이들 도메인은 다른 사슬의 상보성 도메인과 강제로 쌍을 형성하게 되고, 이로써 2개의 항원 결합 부위가 생성된다. 특정의 구현예에서, 상기 폴리펩티드 링커는, 4개(4)의 글리신 아미노산 잔기 및 1개(1)의 세린 아미노산 잔기의 단위 1개 또는 2개를 포함한다[(GGGGS)_n로서, 단 n=1 또는 2, 바람직하게는 1임]. 다이아바디는 2가 또는 2중 특이적일 수 있다. 다이아바디는, 예컨대 문헌[EP404097, WO1993/01161, Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003), 및 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]에 더욱 자세히 기술되어 있다. 트리아바디 및 테트라바디도 또한 문헌[Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)]에 기술되어 있다.

[0242] 2중 특이적 scDb, 구체적으로 2중 특이적 단량체 scDb는, 구체적으로 링커 L1, L2 및 L3에 의해 VHA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VLA, VHA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VLA, VLA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VHA, VLA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VHA, VHB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VLB, VHB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VLB, VLB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VHB 또는 VLB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VHB와 같은 순서로 결합되어 있는, 2개의 가변 중쇄 도메인(VH) 또는 이의 단편과, 2개의 가변 경쇄 도메인(VL) 또는 이의 단편을 포함하되, 단 상기 VLA 도메인 및 VHA 도메인은 함께 제1 항원에 대한 항원 결합 부위를 형성하고, 상기 VLB 및 VHB는 함께 제2 항원에 대한 항원 결합 부위를 형성한다.

[0243] 링커 L1은, 구체적으로 2개 ~ 10개 아미노산, 더욱 구체적으로 3개 ~ 7개 아미노산, 그리고 가장 구체적으로 5개 아미노산으로 이루어진 펩티드이고, 링커 L3은, 구체적으로 1개 ~ 10개 아미노산, 더욱 구체적으로 2개 ~ 7개 아미노산, 그리고 가장 구체적으로 5개 아미노산으로 이루어진 펩티드이다. 특정의 구현예에서, 링커 L1 및/또는 L3는 4개(4)의 글리신 아미노산 잔기 및 1개(1)의 세린 아미노산 잔기의 단위 1개 또는 2개를 포함한다[(GGGGS)_n [식 중, n=1 또는 2이고, 바람직하게 n=1임]].

[0244] 중간 링커인 L2는, 구체적으로 10개 ~ 40개 아미노산, 더욱 구체적으로 15개 ~ 30개 아미노산, 그리고 가장 구체적으로 20개 ~ 25개 아미노산으로 이루어진 펩티드이다. 특정의 구현예에서, 상기 링커 L2는 4개(4)의 글리신 아미노산 잔기 및 1개(1)의 세린 아미노산 잔기의 단위 1개 이상을 포함한다[(GGGGS)_n [식 중, n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8이고, 바람직하게 n=4임]].

[0245] 본 발명의 일 구현예에서, 단일 항체는 scDb-scFv 포맷일 때 다중 특이적 및/또는 다가인 항체이다. "scDb-scFv"란 용어는, 단일 사슬 Fv(scFv) 단편이 가요성 Gly-Ser 링커에 의해 단일 사슬 다이아바디(scDb)에 융합된 항체 포맷을 지칭한다. 일 구현예에서, 상기 가요성 Gly-Ser 링커는 2개 ~ 40개의 아미노산, 예컨대 2개 ~ 35개, 2개 ~ 30개, 2개 ~ 25개, 2개 ~ 20개, 2개 ~ 15개, 2개 ~ 10개의 아미노산, 구체적으로 10개의 아미노산으로 이루어진 펩티드이다. 특정의 구현예에서, 상기 링커는 4개(4)의 글리신 아미노산 잔기 및 1개(1)의 세린 아미노산 잔기를 포함한다[(GGGGS)_n [식 중, n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8이고, 바람직하게 n=2임]].

[0246] 본 발명의 일 구현예에서, 단일 항체는 문헌[WO2016/0202457; Egan T., et al., mAbs 9 (2017) 68-84]에 기술된 MATCH 포맷의 다중 특이적 및/또는 다가 항체이다.

[0247] 본 발명의 다중 특이적 및/또는 다가 분자는 당 분야에 공지된 임의의 편리한 항체 제조 방법을 사용하여 제조될 수 있다[예컨대 2중 특이적 구조체의 제조에 관한 문헌(Fischer, N. & Leger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14); 2중 특이적 다이아바디 및 탠덤 scFv에 관한 문헌(Hornig, N. & Frerker-Schwarz, A., Methods Mol. Biol. 907 (2012)713-727, 및 WO 99/57150) 참조]. 본 발명의 2중 특이적 구조체를 제조하는데 적합한 방법의 구체 예로서는, 여타의 것들 중 Genmab 기법(Labrijn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110 (2013) 5145-5150 참조) 및 Merus 기법(de Kruif et al., Biotechnol. Bioeng. 106 (2010) 741-750 참조)을 추가로 포함한다. 기능성 항체 Fc 부분을 포함하는 2중 특이적 항체를 제조하기 위한 방법도 또한 당 분야에 공지되어 있다[예컨대 문헌(Zhu et al., Cancer Lett. 86 (1994) 127-134; 및 Suresh et al., Methods Enzymol. 121 (1986)

210-228) 참조].

- [0248] 본 발명의 다중 특이적 분자 및 다가 분자에 사용될 수 있는 기타 항체는 마우스, 키메라 및 인간화 모노클로날 항체이다.
- [0249] 본 발명의 다중 특이적 분자는 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 구성적 결합 특이성을 접합함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어 2중 특이적 분자의 각각의 결합 특이성은 별도로 생성된 다음, 서로 접합될 수 있다. 결합 특이성이 단백질 또는 펩티드일 때, 다양한 커플링제 또는 가교제가 공유 접합을 위해 사용될 수 있다. 가교제의 예로서는 단백질 A, 카보디이미드, N-숙신이미딜-5-아세틸-티오아세트산염(SATA), 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산)(DNTB), o-페닐렌말레이미드(oPDM), N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피온산염(SPDP) 및 설포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실산염(설포-SMCC)을 포함한다[예를 들어 문헌(Karpovsky et al., 1984 J. Exp. Med. 160: 1686; Liu, M A et al., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)을 참조한다]. 기타 방법으로서 문헌[Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al., 1985 Science 229:81-83] 및 문헌[Glennie et al., 1987 J. Immunol.139: 2367-2375]에 기술된 방법을 포함한다. 접합제는 SATA 및 설포-SMCC인데, 이것들 둘 다는 Pierce Chemical Co.(Rockford, Ill.)로부터 입수 가능하다.
- [0250] 결합 특이성이 항체일 때, 이는 중쇄 2개의 C-말단 경첩 영역의 설프히드릴 결합에 의해 접합될 수 있다. 특정의 구현예에서, 경첩 영역은 접합 전 홀수 개(예컨대 1개)의 설프히드릴 잔기를 함유하도록 변형된다.
- [0251] 대안적으로 2개 이상의 결합 특이성은 동일 벡터에서 암호화되어, 동일 숙주 세포에서 발현 및 조립될 수 있다. 이 방법은 2중 특이적 분자가 mAb X mAb, mAb X Fab, Fab X F (ab')₂ 또는 리간드 X Fab 융합 단백질일 때 특히 유용하다. 본 발명의 다중 특이적 분자는 단일 사슬 항체 및 결합 결정기를 포함하는 단일 사슬 분자, 또는 결합 결정기 2개를 포함하는 단일 사슬 다중 특이적 분자일 수 있다. 다중 특이적 분자는 단일 사슬 분자 적어도 2개를 포함할 수 있다. 다중 특이적 분자를 제조하기 위한 방법은, 예를 들어 미국 특허 제5,260,203호; 미국 특허 제5,455,030호; 미국 특허 제4,881,175호; 미국 특허 제5,132,405호; 미국 특허 제5,091,513호; 미국 특허 제5,476,786호; 미국 특허 제5,013,653호; 미국 특허 제5,258,498호; 및 미국 특허 제5,482,858호에 기술되어 있다.
- [0252] 2중 특이적 분자와 이의 특이적 표적의 결합은, 예를 들어 효소결합면역흡착검정(ELISA), 방사성면역검정(REA), FACS 분석, 바이오검정(예컨대 생장 억제) 또는 웨스턴블롯검정(Western Blot assay)에 의해 확인될 수 있다. 이 검정들 각각은, 일반적으로 관심 복합체에 특이적인 표지화된 시약(예컨대 항체)를 사용하여 특히 관심있는 단백질-항체 복합체의 존재를 확인한다.
- [0253] 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 암호화하는 핵산을 제공한다. 본 발명은 또한 PDL1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 CDR, VH, VL, 전장 중쇄 및 전장 경쇄를 암호화하는 핵산 서열을 제공한다. 이러한 핵산 서열은 포유류 세포에서의 발현에 대해 최적화될 수 있다.
- [0254] "핵산"이란 용어는 본원에서 "폴리뉴클레오타이드(들)"란 용어와 호환되어 사용되고 있으며, 1개 이상의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드와 이것들의 중합체(단일 가닥 형태 또는 이중 가닥 형태)를 지칭한다. 이 용어는 공지의 뉴클레오타이드 유사체 또는 변형된 백본(backbone) 잔기 또는 결합을 함유하는 핵산을 포함하는데, 이것들은 합성, 자연발생 및 비 자연발생되는 것이고, 기준 핵산의 결합 특성과 유사한 결합 특성을 가지며, 기준 뉴클레오타이드의 대사 방식과 유사한 방식으로 대사된다. 이러한 유사체의 예들로서는 포스포로티오에이트, 포스포라미데이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-메틸 포스포레이트, 2'-O-메틸 리보뉴클레오타이드, 펩티드-핵산(PNA)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 달리 명시되지 않는 한, 특정의 핵산 서열은 또한 암묵적으로(예컨대 축퇴성 코돈 치환으로 인한) 자체의 보존적 변형 변이체와 상보성 서열을 포함할뿐만 아니라, 명백하게 명시된 서열을 포함하기도 한다. 특히 이하에 기술된 바와 같이, 축퇴성 코돈 치환은 1개 이상의 선택 코돈(또는 모든 코돈)의 세 번째 위치가 혼합 염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608, 1985; 및 Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98, 1994).
- [0255] 본 발명은 전술된 PDL1 결합 항체 사슬의 분절 또는 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는, 실질적으로 정제된 핵산 분자를 제공한다. 핵산이 적당한 발현 벡터로부터 발현될 때, 이 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩티드는 PDL1 항원 결합 능력을 보일 수 있다.
- [0256] 본 발명에서는 또한 표 1에 제시된 PDL1 결합 항체의 중쇄 또는 경쇄로부터 유래하는 CDR 영역 적어도 1개, 보통은 CDR 영역 3개 모두를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드도 제공된다. 기타 폴리뉴클레오타이드 몇몇은 표 1에 제

시킨 PDL1 결합 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 영역 서열 모두 또는 실질적으로 모두를 암호화한다. 암호의 축퇴성으로 말미암아, 다양한 핵산 서열은 번역글로불린 아미노산 서열 각각을 암호화할 것이다.

[0257] 폴리뉴클레오티드 서열은 PDL1 결합 항체를 암호화하는 기존 서열(예컨대 이하 실시예에 기술된 서열)의 신규 고체상 DNA 합성 또는 PCR 돌연변이유발에 의해 제조될 수 있다. 핵산의 직접적인 화학 합성은 당 분야에 공지된 방법, 예컨대 문헌[Narang et al., 1979, Meth. Enzymol.68:90]의 포스포트리에스테르 방법; 문헌[Brown et al., Meth.Enzymol.68: 109, 1979]의 포스포디에스테르 방법; 문헌[Beaucage et al., Tetra.Lett., 22: 1859, 1981]의 디에틸포스포라미다이트 방법; 및 미국 특허 제4,458,066호의 고체 지지체 방법에 의해 달성될 수 있다. PCR에 의해 폴리뉴클레오티드 서열에 돌연변이를 도입하는 것은, 예컨대 문헌[PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, N.Y., 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods 및 Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, Calif, 1990; Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; 및 Eckert et al., PCR Methods 및 Applications 1:17, 1991]에 기술된 바와 같이 수행될 수 있다.

[0258] 본 발명에서는 또한 전술된 PDL1 결합 항체를 제조하기 위한 발현 벡터 및 숙주 세포도 제공된다.

[0259] "벡터"란 용어는, 결합된 다른 폴리뉴클레오티드를 운반할 수 있는 폴리뉴클레오티드 분자를 지칭한다. 벡터의 한 가지 유형으로서는 "플라스미드"가 있는데, 이는 내부에 추가의 DNA 분절이 결합될 수 있는 환형 이중 가닥 DNA 루프라고 지칭된다. 벡터의 또 다른 유형으로서는 추가의 DNA 분절이 바이러스 게놈 안에 들어가 결합될 수 있는 바이러스 벡터가 있다. 임의의 벡터는 이 벡터가 도입되는 숙주 세포내에서 자율 복제가 가능하다(예컨대 세균 복제 기원을 가지는 세균 벡터 및 에피솜 포유류 벡터). 기타 벡터(예컨대 비 에피솜 포유류 벡터)가 숙주 세포에 도입될 때, 이 벡터는 숙주 세포 게놈에 통합될 수 있으며, 이로써 숙주 게놈과 함께 복제된다.

[0260] 게다가 임의의 벡터는 작동 가능하도록 결합된 유전자들의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터"(또는 간단하게 "발현 벡터")라 지칭된다. 일반적으로 재조합 DNA 기술에 사용되는 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태를 가진다. 본 명세서에 있어서, "플라스미드"와 "벡터"는 호환되어 사용될 수 있는데, 그 이유는 플라스미드가 가장 일반적으로 사용되는 벡터의 형태이기 때문이다. 그러나 본 발명은 이처럼 동일한 기능을 보이는 다른 형태의 발현 벡터, 예컨대 바이러스 벡터(예컨대 복제 결합 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 연관 바이러스)를 포함하도록 의도된다.

[0261] "작동 가능하도록 결합된"이란 용어는, 2개 이상의 폴리뉴클레오티드(예컨대 DNA) 분절간 기능상 관계를 지칭한다. 통상적으로 이는, 전사된 서열에 대한 전사 조절 서열의 기능상 관계를 지칭한다. 예를 들어 프로모터 또는 인핸서 서열은, 만일 이것이 적당한 숙주 세포 또는 기타 발현계에 있는 암호화 서열의 전사를 자극하거나 조정한다면, 암호화 서열과 작동 가능하도록 결합되어 있는 것이다. 일반적으로 전사된 서열과 작동 가능하도록 결합되어 있는 프로모터 전사 조절 서열은 전사된 서열에 대해 물리적으로 연속적인데, 즉 이 프로모터 전사 서열은 시스 작동성(cis-acting)이다. 그러나 몇몇 전사 조절 서열, 예컨대 인핸서는, 이것의 전사 향상 대상인 암호화 서열에 물리적으로 연속적이어야 한다거나, 가까이에 위치하여야 한다거나 할 필요가 없다.

[0262] PDL1 결합 항체 사슬 또는 결합 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키기 위해서는 다양한 발현 벡터가 사용될 수 있다. 바이러스 기반 발현 벡터 및 비 바이러스 발현 벡터 둘 다 포유류 숙주 세포 내에서 항체를 생산하는데 사용될 수 있다. 비 바이러스 벡터 및 계로서는 통상 단백질 또는 RNA를 발현시키기 위한 발현 카세트(를 가지는) 플라스미드, 에피솜 벡터, 그리고 인간 인공 염색체를 포함한다(예컨대 문헌(Harrington et al., Nat Genet. 15:345, 1997)을 참조한다). 예를 들어 포유류(예컨대 인간) 세포에서 PDL1 결합 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 발현에 유용한 비 바이러스 벡터로서는 pThioHis A, B 및 C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B 및 C(Invitrogen, San Diego, Calif.), MPS V 벡터와, 기타 단백질을 발현시키기 위한 것으로서 당 분야에 공지된 다수의 기타 벡터를 포함한다. 유용한 바이러스 벡터로서는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스, 헤르페스 바이러스를 기반으로 한 벡터, SV40, 인간유두종바이러스, HBP 엡스타인 바 바이러스를 기반으로 한 벡터, 백시니아 바이러스 벡터 및 쉼리키 포레스트 바이러스(Semliki Forest virus; SFV)를 포함한다. 문헌[Brent et al., supra; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; 및 Rosenfeld et al., Cell 68: 143, 1992]을 참조한다.

[0263] 발현 벡터의 선택은, 벡터가 발현되도록 의도된 숙주 세포에 의존적이다. 통상적으로 발현 벡터는 PDL1 결합 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하도록 결합된 프로모터와 기타 조절 서열(예컨대 인핸서)을 함유한다. 일 구현예에서, 유도성 프로모터는, 유도 조건하에 있을 때를 제외하고, 삽입된 서열의 발현을 막기 위해 사용된다. 유도성 프로모터로서는, 예컨대 아라비노스, lacZ, 메탈로티오네인 프로모터 또는 열 충격 프로모

터를 포함한다. 형질전환된 유기체의 배양액은, 발현 생성물이 숙주 세포에 의해 더 잘 관용되는 암호화 서열 군집의 편향(biasing) 없이 비유도성 조건하에서 증폭될 수 있다. 프로모터에 더하여 기타 조절 요소들도 또한 PDL1 결합 항체의 효율적인 발현에 필요할 수 있거나, 요망될 수 있다. 이러한 요소는 통상 ATG 개시 코돈 및 인접 리보솜 결합 부위 또는 기타 서열을 포함한다. 뿐만 아니라 발현 효율은 세포계에서 사용되기 적당한 인헨서를 포함시킴으로써 향상될 수 있다[예를 들어 문헌(Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20: 125, 1994; 및 Bittner et al., Meth.Enzymol. 153:516, 1987)을 참조한다]. 예를 들어 SV40 인헨서 또는 CMV 인헨서는 포유류 숙주 세포 내에서 발현을 증가시키는데 사용될 수 있다.

[0264] 발현 벡터는 또한 분비 신호 서열 위치를 제공하여, 삽입된 PDL1 결합 항체 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드를 가지는 융합 단백질을 생성할 수도 있다. 더 빈번하게, 삽입된 PDL1 결합 항체 서열은 벡터에 포함되기 전 신호 서열에 결합된다. PDL1 결합 항체 경쇄 및 중쇄 가변 도메인을 암호화하는 서열을 수용하는데 사용될 벡터는 또한 종종 불변 영역 또는 이의 일부를 암호화하기도 한다. 이러한 벡터는 가변 영역이 불변 영역을 가지는 융합 단백질로서 발현되는 것을 허용하고, 이를 통하여 비변형 항체 및 이의 항원 결합 단편의 생성이 유도된다. 통상적으로 이러한 불변 영역은 인간의 것이다.

[0265] "재조합 숙주 세포"(또는 간단히 "숙주 세포")란 용어는, 내부에 재조합 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭한다. 이러한 용어는 특정의 대상 세포뿐만 아니라, 이러한 세포의 자손까지라도 지칭하도록 의도된다. 돌연변이 또는 환경의 영향 중 어느 하나로 말미암은 임의의 변형은 후세대에서 일어날 수 있으므로, 이러한 후손은 실상 모 세포와 동일할 수는 없지만, 본원에 사용된 바와 같은 "숙주 세포"란 용어의 범위 안에는 여전히 포함된다.

[0266] PDL1 결합 항체 사슬을 보유하면서 이를 발현하기 위한 숙주 세포는 원핵생물 또는 진핵생물 중 어느 하나일 수 있다. 이.콜라이(*E. coli*)는 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 클로닝과 발현에 유용한 원핵생물 숙주 중 하나이다. 사용하기 적합한 기타 미생물 숙주로서는 간균류, 예컨대 바실러스 서브틸리스 및 기타 장내세균, 예컨대 살모넬라(*Salmonella*), 세라티아(*Serratia*) 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종을 포함한다. 이러한 원핵생물 숙주에 있어, 통상 숙주 세포와 양립 가능한 발현 제어 서열(예컨대 복제 기원)을 함유하는 발현 벡터가 제조될 수도 있다. 더욱이 널리 공지된 다수의 프로모터, 예컨대 락토스 프로모터계, 트립토판(trp) 프로모터계, 베타-락타마아제 프로모터계 또는 파아지 람다로부터 유래하는 프로모터계 임의의 수만큼 존재할 것이다. 프로모터는 통상 선택적으로 작동인자 서열과 함께 발현을 제어하고, 전사와 번역을 개시 및 종결하기 위해 리보솜 결합 부위 서열 등을 가진다. 본 발명의 PDL1 결합 폴리펩티드를 발현시키기 위해 기타 미생물, 예컨대 효모도 또한 사용될 수 있다. 바콜로바이러스 벡터와 함께 곤충 세포도 또한 사용될 수 있다.

[0267] 일 구현예에서, 본 발명의 PDL1 결합 폴리펩티드를 발현 및 생산하는데 포유류 숙주 세포가 사용된다. 예를 들어 이 포유류 숙주 세포는 내인성 면역글로불린 유전자를 발현하는 하이브리도마 세포주 또는 외인성 발현 벡터를 보유하는 포유류 세포주 중 어느 하나일 수 있다. 이 포유류 숙주 세포는 임의의 정상 유한증식성 동물 세포 또는 인간 세포, 또는 정상이거나 비정상인 무한증식성 동물 세포 또는 인간 세포를 포함한다. 예를 들어 비변형 면역글로불린을 분비할 수 있는 숙주 세포주로서 적합한 것 다수(예컨대 CHO 세포주, 다양한 Cos 세포주, HeLa 세포, 골수종 세포주, 형질전환된 B 세포 및 하이브리도마)가 개발되었다. 폴리펩티드를 발현시키기 위해 포유류 조직 세포 배양액을 사용하는 것은, 일반적으로 문헌, 예컨대 문헌[Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987]에 논의되어 있다. 포유류 숙주 세포용 발현 벡터는 발현 제어 서열, 예컨대 복제 기원, 프로모터 및 인헨서[예를 들어 문헌(Queen, et al., Immunol. Rev. 89:49-68, 1986) 참조], 그리고 필요한 가공 정보 부위, 예컨대 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이싱 부위, 폴리아데닐화 부위, 그리고 전사 종결인자 서열을 포함할 수 있다. 이러한 발현 벡터는, 보통 포유류 유전자 또는 포유류 바이러스로부터 유래한 프로모터를 함유한다. 적합한 프로모터는 구성적, 세포 유형 특이적, 단계 특이적 및/또는 변조 가능한 것이거나, 조절 가능한 것일 수 있다. 유용한 프로모터로서는, 메탈로티오네인 프로모터, 구성적 아데노바이러스 주요 후기 프로모터(major late promoter), 텍사메타손 유도성 MMTV 프로모터, SV40 프로모터, MRP polIII 프로모터, 구성적 MPS V 프로모터, 테트라사이클린 유도성 CMV 프로모터(예컨대 인간 즉시 초기(immediate-early) CMV 프로모터), 구성적 CMV 프로모터, 그리고 당 분야에 공지된 프로모터-인헨서 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0268] 관심 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 발현 벡터를 도입하기 위한 방법은 세포성 숙주의 유형에 따라서 달라진다. 예를 들어 염화칼슘 형질감염은 보통 원핵생물 세포에 사용되는 반면, 인산칼슘 처리 또는 전기천공법은 기타 세포성 숙주에 사용된다, [일반적으로 문헌(Sambrook, et al. 상동)을 참조한다]. 기타 방법으로서, 예컨대 전기천공법, 인산칼슘 처리, 리포솜 매개 형질전환법, 주입법 및 미세주입법, 탄도 방법(ballistic method), 바이로솜(virosome), 면역리포솜, 다가 양이온:핵산 접합체, 나출 DNA, 인공 비리온, 헤르페스 바이러

스 구조 단백질 VP22에의 융합(Elliot & O'Hare, Cell 88:223, 1997), 제제에 의해 향상되는 DNA의 흡수, 그리고 생체의 형질도입을 포함한다. 재조합 단백질의 장기 고수를 생산을 위해, 안정적인 발현이 종종 요망될 것이다. 예를 들어 PDL1 결합 항체 사슬 또는 결합 단백을 안정적으로 발현하는 세포주는 바이러스 복제 기원 또는 내인성 발현 요소 및 선택 마커 유전자를 함유하는 본 발명의 발현 벡터를 사용하여 제조될 수 있다. 벡터 도입 후 세포는 선택적 배지에 대해 스위칭(switching)되기 전, 농축 배지 중에서 1일 ~ 2일 동안 성장하도록 허용될 수 있다. 선택 마커의 목적은 선택에 대한 내성을 부여하는 것으로서, 이 마커의 존재는 도입된 서열을 선택 배지에서 성공적으로 발현하는 세포의 성장을 허용한다. 내성으로서, 안정적으로 형질감염된 세포는 세포 유형에 적당한 조직 배양 기술을 이용하여 증식될 수 있다. 그러므로 본 발명은 본 발명의 항체를 제조하는 방법을 제공하는데, 이 경우 상기 방법은 본 발명의 항체를 암호화하는 핵산 또는 벡터를 포함, 구체적으로 발현하는 숙주 세포를 배양함으로써, 상기 본 발명의 항체 또는 이의 단편이 발현되도록 만드는 단계를 포함한다.

[0269] 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 향상 또는 안정화하거나, 조성물의 제조를 가속화한다. 약학적으로 허용 가능한 담체로서는 생리적으로 양립 가능한 용매, 분산 매질, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다.

[0270] 본 발명의 약학 조성물은 당 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라서 달라진다. 투여는 정맥내, 근육내, 복막내 또는 피하 투여될 수 있거나, 표적 부위에 가까운 부위에서 투여가 이루어질 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 (예컨대 주사 또는 주입에 의한) 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척추 또는 표피 투여에 적합하여야 할 것이다. 투여 경로에 따라서, 활성 화합물, 즉 항체 및 다중특이적 분자가 재료에 코팅될 수 있고, 이로써 화합물은, 이 화합물을 비활성화할 수 있는 산 및 기타 자연 조건으로부터 보호될 수 있다.

[0271] 본 발명의 약학 조성물은 널리 공지되어 있고, 당 분야에서 일상적으로 행하여지는 방법에 따라 제조될 수 있다. 예컨대 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; 및 Sustained 및 Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]을 참조한다. 약학 조성물은, 바람직하게 GMP 조건 하에서 제조될 수 있다. 통상적으로 PDL1 결합 항체 치료적 유효 용량 또는 유효 용량만큼이 본 발명의 약학 조성물에 사용된다. PDL1 결합 항체는 당 업자들에게 공지된 종래의 방법에 의해 약학적으로 허용 가능한 투여형으로 제제화된다. 투여 계획은 최적의 원하던 반응(예컨대 치료 반응)이 제공되도록 조정된다. 예를 들어 단일 볼루스 투여가 수행될 수 있거나, 수 회 분할 용량만큼이 경시적으로 투여될 수 있으며, 용량은 치료 상황의 응급도에 의해 의해 알려지는 바와 비례하여 감소 또는 증가할 수 있다. 투여의 용이함과 투여량의 균일성을 도모하기 위해 비경구 조성물을 투여 단위형으로 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본원에 사용된 바와 같은 투여량 단위형이란, 치료될 대상체에 맞춘, 단위 투여형과 같이 물리적으로 별개인 단위들을 지칭하는데; 이 경우 각각의 단위에는 원하던 치료 효과가 발휘되도록 산정된 소정량만큼의 활성 화합물이, 필요한 약학 담체와 함께 담겨있다.

[0272] 본 발명의 약학 조성물 중 활성 성분의 실제 투여량 수준은, 환자에게 독성을 미치지 않고 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해 원하는 치료 반응을 달성하는데 유효한 활성 성분 양만큼을 수득하기 위해 변경될 수 있다. 선택된 투여량 수준은 다양한 약동학적 인자, 예컨대 본 발명에서 사용된 특정 조성물, 또는 이의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배출 속도, 치료 기간, 사용된 특정 조성물과 함께 사용되는 기타 약물, 화합물 및/또는 재료, 치료중인 환자의 나이, 성별, 체중, 상태, 전반적인 건강상태 및 지금까지의 병력, 그리고 이와 유사한 인자들에 의존적이다.

[0273] 항체는 보통 다수의 때에 투여된다. 단일 투여간 간격은 1주일, 1개월 또는 1년일 수 있다. 간격은 또한 환자에 있어 PDL1 결합 항체의 혈중 수준을 측정함으로써 알려지는 바와 같이 불규칙적일 수도 있다. 대안적으로 항체는 투여 횟수가 감소되어야 하는 경우 지연 방출 제제로서 투여될 수 있다. 투여량과 투여횟수는 환자에 있어 항체의 반감기에 따라 달라진다. 일반적으로 인간화된 항체는 키메라 항체 및 비 인간 항체의 반감기보다 더 긴 반감기를 보인다. 투여량과 투여 횟수는 치료가 예방적인 것인지 또는 치료적인 것인지에 따라서 달라질 수 있다. 예방적 적용의 경우, 비교적 적은 투여량이 비교적 빈번하지 않은 간격을 두고 오랜 기간에 걸쳐 투여된다. 일부 환자들은 자신의 남은 생애 동안 계속해서 치료를 받기도 한다. 치료적 적용의 경우, 비교적 많은 투여량이 비교적 짧은 간격을 두고 투여되는데, 이는 종종 질환의 진행이 느려지거나 종결될 때까지 이루어져야 하고, 바람직하게는 환자가 부분적으로나 완전하게 경감된 질환의 증상을 보일 때까지 이루어져야 한다. 그 다음, 환자는 예방적 계획에 따라 치료될 수 있다.

- [0274] 본 발명의 항체는 시험관내 및 생체내 진단용 및 치료용으로서 사용된다. 예를 들어 이러한 분자는 배양액 중의 세포에 투여될 수 있거나(예컨대 시험관내 또는 생체내), 또는 대상체에 투여될 수 있고(예컨대 생체내), 그 결과 다양한 장애가 치료, 예방 또는 진단될 수 있다.
- [0275] 일 양태에서, 본 발명은 의약으로 사용하기 위한 본 발명의 항체 또는 본 발명의 조성물에 관한 것이다.
- [0276] 일 양태에서, 본 발명은 증식성 질환, 구체적으로 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 증식성 질환, 구체적으로 암을 치료하는데 사용하기 위한 본 발명의 항체 또는 본 발명의 조성물에 관한 것이다.
- [0277] 다른 양태에서, 본 발명은 증식성 질환, 구체적으로 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 증식성 질환, 구체적으로 암을 치료함에 있어 본 발명의 항체 또는 본 발명의 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [0278] 추가의 양태에서, 본 발명은 증식성 질환, 구체적으로 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 증식성 질환, 구체적으로 암을 치료하기 위한 의약을 제조합에 있어 본 발명의 항체 또는 본 발명의 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [0279] 일 양태에서, 본 발명은 증식성 질환, 구체적으로 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 증식성 질환, 구체적으로 암을 치료하는 방법으로서, 대상체에 본 발명의 항체 또는 본 발명의 조성물 치료적 유효량만큼을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0280] "대상체"란 용어는 인간 및 비인간 동물을 포함한다. 비인간 동물은 모든 척추동물, 예컨대 포유류 및 비포유류, 예컨대 비인간 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류 및 파충류를 포함한다. 명시된 경우를 제외하고, "환자" 또는 "대상체"란 용어들은 본원에서 호환되어 사용된다.
- [0281] 본원에 사용된 바와 같은 "치료", "치료하는 것", "치료하다", "치료된" 등과 같은 용어는, 요망되는 약리학적 및/또는 생리적 효과를 수득하는 것을 지칭한다. 이 효과는 어떤 질환 및/또는 해당 질환으로 인할 수 있는 부작용을 부분적으로나 완전히 치유하거나, 해당 질환의 진행을 지연시킨다는 관점에서 치료적일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "치료"는, 포유류, 예컨대 인간에서 어떤 질환에 대한 임의의 치료를 포괄하며, (a) 해당 질환을 억제하는 것, 예컨대 이 질환의 발현을 중단시키는 것; 그리고 (b) 해당 질환을 완화시키는 것, 즉 이 질환의 퇴행을 유발시키는 것을 포함한다.
- [0282] "치료적 유효량" 또는 "효과적 양"이란 용어들은, 어떤 질환을 치료하기 위해 포유류 또는 기타 대상체에 투여될 때 해당 질환의 이와 같은 치료를 달성하기 충분한, 어떤 제제의 양을 지칭한다. "치료적 유효량"은 제제, 질환 및 이의 심각성, 치료받을 대상체의 나이, 체중 등에 따라서 달라질 것이다.
- [0283] 일 구현예에서, 증식성 질환은 암이다. "암"이란 용어는 급속하고 제어가 불가능한 비정상 세포의 생장으로 특징지어지는 질환을 지칭한다. 암 세포는 국소적으로, 또는 혈류 및 림프계를 통해서 몸의 다른 부분으로 퍼져나갈 수 있다. 다양한 암의 예가 본원에 기술되어 있으며, 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장직장암, 신암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병 및 폐암 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. "종양" 및 "암"이란 용어는 본원에서 호환되어 사용되고 있는데, 예컨대 상기 두 용어는 고형 및 액체형, 예컨대 확산성 또는 순환성 종양을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 "암" 또는 "종양"이란 용어는 전악성뿐만 아니라, 악성인 암과 종양을 포함한다. "암"이란 용어는 본원에서 광범위한 종양, 예컨대 모든 고형 악성종양 및 혈액학적 악성종양을 의미하는 것으로서 사용된다. 이러한 종양의 예로서는 양성 또는 특히 악성인 종양, 고형 종양, 뇌암, 신장암, 간암, 부신암, 방광암, 유방암, 위암(예컨대 위 종양), 식도암, 난소암, 자궁경부암, 결장암, 직장암, 전립선암, 췌장암, 폐암(예컨대 비소세포 폐암 및 소세포 폐암), 질암, 갑상선암, 흑색종(예컨대 절제불가능 또는 전이성 흑색종), 신세포 암종, 육종, 교모세포종, 다발성 골수종 또는 위장관암, 특히 결장암종 또는 결장직장 선암종, 두경부 종양, 자궁내막암, 코든 증후군(Cowden syndrome), 레미테-듀클로병(Lhermitte-Duclos disease), 마나얀-조나나 증후군(Bannayan-Zonana syndrome), 전립선 비대증, 신생물, 특히 상피 조직 특성 신생물, 바람직하게 유방암종 또는 편평세포암종, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병(예컨대 필라델피아 염색체 양성 만성 골수성 백혈병), 급성 림프아구성 백혈병(예컨대 필라델피아 염색체 양성 급성 림프아구성 백혈병), 비호지킨 림프종, 형질세포골수종, 호지킨 림프종, 백혈병 및 이것들의 임의의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직한 구현예에서, 암은 폐암, 바람직하게는 비소세포 폐암(NSCLC)이다. 다른 구현예에서, 상기 암은 결장직장암이다.
- [0284] 본 발명의 항체 또는 본 발명의 조성물은 고형 종양의 성장을 억제할뿐더러, 액체형 종양의 성장도 억제한다. 추가의 구현예에서, 증식성 질환은 고형 종양이다. "고형 종양"이란 용어는, 특히 유방암, 난소암, 결장암, 직장암, 전립선암, 위암(특히 위의 암), 자궁경부암, 폐암(예컨대 비 소세포 폐암 및 소 세포 폐암), 그리고 두경

부의 종양을 의미한다. 또한 종양의 유형과 적용된 구체적 조합에 따라서, 종양 부피의 감소가 달성될 수 있다. 본 발명이 항체 또는 본 발명의 조성물은 또한 암이 발병한 대상체에서 종양의 전이적 전파와 성장, 또는 소전이의 발현을 예방하도록 맞추어진다.

[0285] "예방하다" 또는 "예방"이란 용어는, 질환의 발현 또는 질환의 임의의 2차적 영향을 완전히 억제하는 것을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 "예방하다" 또는 "예방"이란 용어는, 어떤 질환이 발생할 경향이 있을 수 있되, 해당 질환이 발생하였다는 진단은 아직 받지 못한 개체에서 질환 또는 병태의 발생을 예방하는 것을 아우른다.

[0286] 일 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 본 발명의 약학 조성물을 포함하는 키트에 관한 것이다. 이 키트는 1개 이상의 다른 요소, 예컨대 사용 지침; 기타 시약, 예컨대 표지, 치료제, 또는 항체의 표지 또는 치료제에 대한 킬레이트화 또는 커플링에 유용한 제제, 또는 방사선 방호 조성물; 투여될 항체 분자를 제조하기 위한 디바이스 또는 기타 재료; 약학적으로 허용 가능한 담체; 그리고 대상체로의 투여를 위한 디바이스 또는 기타 재료를 포함할 수 있다. 특정의 구현예에서, 키트는 본 발명의 항체를 약학적 유효량만큼 포함한다. 추가의 구현예에서, 키트는 동결건조된 형태를 가지는 본 발명의 항체 약학적 유효량만큼과 희석제, 그리고 선택적으로는 사용 지침을 포함한다. 상기 키트는 재구성(reconstitution)을 위한 필터 바늘 및 주사를 위한 바늘을 추가로 포함할 수 있다.

표 1

본 발명의 PDL1 항체의 예(CDR 잔기는 굵은 이탤릭체로 표시함)			
시열 식별 번호	Ab 영역	시열	
37-20-B03			
시열번호 1	HCDR1 (H27-H42; AHo 번호매김)	GFSFNSDYWIY	
시열번호 2	HCDR2 (H57-H76; AHo 번호매김)	SIYGGSSGNTQYASWAQG	
시열번호 3	HCDR3 (H108-H138; AHo 번호매김)	RGYYDYGGATDL	
시열번호 4	HCDR1 (AHo 정의) (37-20-B03sc01)	VSGFSFNSDYW	
시열번호 5	HCDR1 (AHo 정의) (37-20-B03sc02) (37-20-B03 sc09.1)	ASGFSFNSDYW	
시열번호 6	HCDR2 (AHo 정의)	IYGGSSGNTQYASWAQGR	

[0287]

서열번호 7	HCDR3 (Aho 정의)	GYVDYGGATD
서열번호 8	HCDR1 (Kabat 정의)	SDYWIY
서열번호 9	HCDR2 (Kabat 정의)	SIYGGSSGNTQYASWAQG
서열번호 10	HCDR3 (Kabat 정의)	GYVDYGGATDL
서열번호 11	HCDR1 (Chothia 정의)	GFSFNSDY
서열번호 12	HCDR2 (Chothia 정의)	GGSSG
서열번호 13	HCDR3 (Chothia 정의)	YVDYGGATD
서열번호 14	VH (VH4) (37-20-B03sc01)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLCKVSGFSFNSDYPFWIRQPPCKGLEWIGSIYGGSSGNTQIA SWAQGRVTISVDSSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARGYFDYGGATDLWGQGTLTVSS
서열번호 15	VH (VH1) (37-20-B03sc02)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSFNSDYPFWIRQAPQGLEWMGSIYGGSSGNT QYASWAGGRVTMTTRDTSISITAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYFDYGGATDLWGQGTLTVSS

[0288]

서열번호 16	VH (VH3) (37-20-B03 sc09.1) 돌연변이: G56A; Y105F	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFNSDTHWVVRQAPGKGLIEWIASIHGGSGNTQY ASW4QGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDIAVYFCARGYDYGGATDLWGQGTLVTVSS
서열번호 17	LCDR1 (L24-L42; AHo 변호매김) (Kabat 정의)	QASQSIGTYLA
서열번호 18	LCDR2 (L58-L72; AHo 변호매김) (Kabat 정의)	RAFILAS
서열번호 19	LCDR3 (L107-L138; AHo 변호매김) (Kabat 정의)	QSNFYSDSTTIGPNA
서열번호 20	LCDR1 (AHo 정의)	ASQSIGTY
서열번호 21	LCDR2 (AHo 정의)	RAFILASGVPSR
서열번호 22	LCDR3 (AHo 정의)	NFYSDSTTIGPN
서열번호 23	LCDR1	SQSIGTY

[0289]

서열번호 31	scFv (VL-링커-VH) (37-20-B03 sc09.1)	GTLVTYSS DIQMTQSPASLSASVGRVTITCOASQSIGTYLAWYQOKPGKPKLLIYRAFILASGVPSRFS GSGSGTDFLTITSSSLQPEDFATYCCSNFYSDSTTIGFNAFGTGKTVLGGGGSGGGGSG GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFNSDYWYVWRQAPGKGLLEWIASI YGGSSGNTQVASWAQGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRADTAVYFCARGYVDYGGATDL WGQGTLLVTVSS
33-01-G02		
서열번호 32	HCDR1 (H27-H42; AHo 번호매김)	GFSFSSGYDMC
서열번호 33	HCDR2 (H57-H76; AHo 번호매김)	CVVAGSVDITYYASWAKG
서열번호 34	HCDR3 (H108-H138; AHo 번호매김)	RKDAYSDAFNL
서열번호 35	HCDR1 (AHo 정의) (33-03-G02 sc01)	VSGFSFSSGYD
서열번호 36	HCDR1 (AHo 정의) (33-03-G02 sc03 Full) (33-03-G02 sc18)	ASGFSFSSGYD
서열번호 37	HCDR2	VVAGSVDITYYASWAKGR

[0291]

	(AHO 정의)	
서열번호 38	HCDR3 (AHO 정의)	KDAYSDAFN
서열번호 39	HCDR1(Kabat 정의)	SGYDMC
서열번호 40	HCDR2 (Kabat 정의)	CVVAGSVDTYYASWAKG
서열번호 41	HCDR3 (Kabat 정의)	KDAYSDAFNL
서열번호 42	HCDR1 (Chothia 정의)	GFSFSSGY
서열번호 43	HCDR2 (Chothia 정의)	AGSVD
서열번호 44	HCDR3 (Chothia 정의)	DAYSDAFN
서열번호 45	VH (VH4) (33-03-G02 sc01)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFGSDMCWIRQPPGKGLWIGCTVAGSFDTITYA SWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCARDAFSDAFNLWGQGLTVTVSS
서열번호 46	VH	QSOLQESGPGLVKPSSETLSLTCKASGFSFGSDMCWVRQPPGKGLWIACTVAGSFDTITYA

[0292]

	(VH4) (33-03-G02 sc03 Full) (불연변이: V2S; V25A; I44V; G56A; V82K; F89V; Y105F)	SWAKGRVTISKDSSKNQVSLKLSSTAAADTAAYVFCARRDAISDAFNLWGQGLVTVSS
서열번호 47	VH (VH4) (33-03-G02 sc18) 불연변이 VH: V25A; I44; G56A; V82K; F89V (AHo 변호매김)	QVQLQESGPGLVKPESETLSLTCKASGFSSGYDMCWVRPPGKCLEWIACTP4GSDITYY ASWAKGRVTISKDSSKNQVSLKLSSTAAADTAAYVFCARRDAISDAFNLWGQGLVTVSS
서열번호 48	LCDR1 (L24-L42: AHo 변호매김) (Kabat 정의)	QASQSINDYLA
서열번호 49	LCDR2 (L58-L72: AHo 변호매김) (Kabat 정의)	KASTLAS
서열번호 50	LCDR3 (L107-L138: AHo 변호매김) (Kabat 정의)	QQGYITDIDNV
서열번호 51	LCDR1	ASQSINDY

[0293]

	(AHo 정의)	
시열번호 52	LCDR2 (AHo 정의)	KASTLASGVPSR
시열번호 53	LCDR3 (AHo 정의)	GYITDIDN
시열번호 54	LCDR1 (Chothia 정의)	SQSINDY
시열번호 55	LCDR2 (Chothia 정의)	KAS
시열번호 56	LCDR3 (Chothia 정의)	GYITDIDN
시열번호 57	VL (Vk1-sk17) (33_03_G02 sc01) (33-03-G02 sc18)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCQASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFS GSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYITDIDN/FGTGKVTVLG
시열번호 58	VL (Vk1-sk17) (33_03_G02 sc03 전장) (동연번호 VL: 12F; M4L; A51P)	DFQLTQSPSSLSASVGDRTVITTCQASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFS GSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYITDIDN/FGTGKVTVLG
시열번호 59	링크	GGGGGGGGGGGGGGGGGG

[0294]

시열번호 60	scFv (VL-링커-VH) (33_03_G02 sc01)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIINDYLAWYQOKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFS SGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQGYHTIDINVFGTGKVTVLGGGGSGGGGGGGG GGGSGVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFGYDMCWVRQPPGKGLEWICVYAGSV DITYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR KDA YSDAFNFWGQGLTVTV SS
시열번호 61	scFv (VL-링커-VH) (33_03_G02 sc03 전정)	DFQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIINDYLAWYQOKPGKSPKLLIYKASTLASGVPSRFS SGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQGYHTIDINVFGTGKVTVLGGGGSGGGGGGGG GGGSQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKASGFSFGYDMCWVRQPPGKGLEWICVYAGSV ITYYASWAKGRVTISKSSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAR KDA YSDAFNFWGQGLTVTVSS
시열번호 62	scFv (VL-링커-VH) (33-03-G02 sc18)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIINDYLAWYQOKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFS SGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQGYHTIDINVFGTGKVTVLGGGGSGGGGGGGG GGGSGVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKASGFSFGYDMCWVRQPPGKGLEWICVYAGS VDITYYASWAKGRVTISKSSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAR KDA YSDAFNFWGQGLTVTV VSS

[0295]

표 2

본 발명에 관련된 기타 서열		
서열 식별 번호	Ab 영역	서열
서열번호 63	인간 PDL1	MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLVVEYGSNMTECKFPVEKQLDLAALIVYWEMED KNHQFYHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGAD YKRITVKVNAPYNKINQRIQVDPVTSEHETCQAEVYKAEVWTSDDHQVLSGKITTINS KREKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELYIPELPLAHPNERTHLVILGAILLC LGVALTFIFRLRKGRMDVKKOGIQDTSKQSDTHLEET
서열번호 64	Vλ 생식계열 기반FR4 Sk17	FGGTGKVTVLG
서열번호 65	Vλ 생식계열 기반FR4 Sk12	FGGTGKLTVLG
서열번호 66	Vλ 생식계열 기반FR4	FGGTQQLILG
서열번호 67	Vλ 생식계열 기반FR4	FGGTGLTVLG
서열번호 68	Vλ 생식계열 기반FR4	FGGTGKVTVLG
서열번호 69	Vλ 생식계열 기반FR4	FGGTQQLTVLG
서열번호 70	Vλ 생식계열 기반FR4	FGGTQQLTALG

[0296]

표 3

본 발명의 형체를 포함하는 다중 핵이력 분자의 예			
서열 식별 번호	Ab 포맷	서열	
PRO885(38-02-A04 sc01 scDb-i/33-03-G02 sc01 scDb-o)			
서열번호 71	scDb	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCQASQSIINDYLAWYQOKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFS GSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQGYITIDINVFGTGKVTVLGGGGGSGVQLQESGPG LVKPSSETLSLTCKVSGFSFNSYWCWIRQPPKGLWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTIS VDSSKNQFSLKLSVTAADTAVYCARHPDAVYGYANNLWVGQGLTVTVSSGGGCGGCGG SGGGGGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCQASQSIINDYLAWYQOKPGKAPKLLIYRAS TLASGVPSRFSGSGGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQSSYGNYGDFGTGKVTVLGGGGGCGG VQLQESGPGILVKPSETLSLTCKVSGFSFSGYDMCWIRQPPKGLWIGCVVAGSVDTIYYAS WAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSVTAADTAVYVCARKDAYSDAFNLWGQGLTVTVSS	
PRO951 (38-27-C05 sc02 scDb-i/33-03-G02 sc01 scDb-o)			
서열번호 72	scDb	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCQASQSIINDYLAWYQOKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFS GSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQGYITIDINVFGTGKVTVLGGGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFSFNNDYDMCWVRAQAPKGLWIGCTIDGTSTYYASWAKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNLSLRAEDTAVYVCAREASSSGYGMGYFDLWVGQGLTVTVSSGGGCGS GGGGGGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCQASQSIINDYLAWYQOKPGKAP KLLIYRASNLASGVPSRFSGSGGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQGTLYSSNWWYAFGTGKTV TVLGGGGGSGVQLQESGPGILVKPSETLSLTCKVSGFSFSGYDMCWIRQPPKGLWIGCVV AGSVDTIYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSVTAADTAVYVCARKDAYSDAFNLWGQGL TLTVTVSS	
PRO1123 (38-02-A04 sc05 IF scDb-i/33_03_G02 sc01 scDb-o)			
서열번호 73	scDb	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCQASQSIINDYLAWYQOKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFS GSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQGYITIDINVFGTGKVTVLGGGGGSGVQLQESGPG LVKPSSETLSLTCKVSGFSFNSYWCWIRQPPKGLWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTIS	

[0297]

		VDSSKNQVSLKLSVTAADTAVYFCARHPSDAVYGYANNLWGQGTTLTVSSGGGSGGGGG SGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCQASQINNVLAWYQKPKPKPKLLIYRAS TLASGVPSRFSGSGGTDFTLTSSLPEDFATYQCSSYGNVYDFTGKTVTVLGGGGGGSQ VOLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCVWAGSVDTITYAS WAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSVTAADTAVYFCARHPSDAVYGYANNLWGQGTTLTVSS
PRO1124 (38-02-A04 sc06 전장 scDb-i/33_03_G02 sc01 scDb-o)	scDb	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCQASQINNVLAWYQKPKPKPKLLIYKASTLASGVPSRFS GSGSGTDFTLTSSLPEDFATYQCQGYITDIDNVFGTGTCTVTLGGGGGSGVQLQESGPG LVKPSSETLSLTCKVSGFSFGSYWICWIRQPPGKGLEWIGCTFVGSSTSTYANWAKGRVTIS KDSKKNQVSLKLSVTAADTAVYFCARHPSDAVYGYANNLWGQGTTLTVSSGGGSGGGGG SGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCQASQINNVLAWYQKPKPKPKLLIYRAS TLASGVPSRFSGSGGTDFTLTSSLPEDFATYQCSSYGNVYDFTGKTVTVLGGGGGGSQ VOLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCVWAGSVDTITYAS WAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSVTAADTAVYFCARHPSDAVYGYANNLWGQGTTLTVSS
PRO1125 (38-02-A04 sc01 scDb-i/33_03_G02 sc02 IF scDb-o)	scDb	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCQASQINNVLAWYQKPKPKPKLLIYKASTLASGVPSRFS GSGSGTDFTLTSSLPEDFATYQCQGYITDIDNVFGTGTCTVTLGGGGGSGVQLQESGPG LVKPSSETLSLTCKVSGFSFGSYWICWIRQPPGKGLEWIGCTFVGSSTSTYANWAKGRVTIS VDSSKNQFSLKLSVTAADTAVYFCARHPSDAVYGYANNLWGQGTTLTVSSGGGSGGGGG SGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCQASQINNVLAWYQKPKPKPKLLIYRAS TLASGVPSRFSGSGGTDFTLTSSLPEDFATYQCSSYGNVYDFTGKTVTVLGGGGGGSQ VOLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCVWAGSVDTITYA SWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSVTAADTAVYFCARHPSDAVYGYANNLWGQGTTLTVSS
PRO1126 (38-02-A04 sc01 scDb-i/33_03_G02 sc03 전장 scDb-o)	scDb	DFQLTQSPSSLSASVGDRTTTCQASQINNVLAWYQKPKPKPKPKLLIYKASTLASGVPSRFS GSGSGTDFTLTSSLPEDFATYQCQGYITDIDNVFGTGTCTVTLGGGGGSGVQLQESGPG LVKPSSETLSLTCKVSGFSFGSYWICWIRQPPGKGLEWIGCTFVGSSTSTYANWAKGRVTIS VDSSKNQFSLKLSVTAADTAVYFCARHPSDAVYGYANNLWGQGTTLTVSSGGGSGGGGG SGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCQASQINNVLAWYQKPKPKPKLLIYRAS

[0298]

PRO1134 (38-02-A04 sc01 scDb-i/33_03_G02 sc07 GL VH3 scDb-o)		TLASGVPSRFSGSGGTDFTLTSSIQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGTGKTVTVLGGGGGQS QLQESGPGLVKPSSETLSLTCKASGFSSGYDMCWVRQPPGKLEWACVVGSDITYYAS WAKGRVTISKSSKNQVSLKLSSTVTAADTAVYFCARKDAYSDAFNLWGQGTTLTVSS
서열번호 77	scDb	DIQMTQSPFSLASVGDVAVTITQASQSDINDYLAWYQQKPKSPKLLIYKASTLASGVPSRFS GSGGTDFTLTSSIQPEDFATYYCQGYITIDNVFGTGKTVTVLGGGGGQVQLQESGPG LVKPSSETLSLTCKVSGFSFSNYWICWIRQPPGKLEWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTIS VDSKNQFSLKLSSTVTAADTAVYCARHPSDAVYGYANNLWGQGTTLTVSSGGGGGSGGGG SGGGGGGGGQMTQSPFSLASVGDVAVTITQASQSDINDYLAWYQQKPKAPKLLIYRAS TLASGVPSRFSGSGGTDFTLTSSIQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGTGKTVTVLGGGGGSEV QLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFSFGYDMCWVRQAPGKLEWVGCVAGSDITYYA SWAKGRFTISRDNSKNTVYLMNSLRADATATYCARCKDAYSDAFNLWGPGTLTVSS
PRO963 (= PRO1051) (38_02_A04 sc01 scDb-i/33-03-G02 sc01 scDb-o/19-01-H04-sc03 scFv)		
서열번호 78	scDb-scFv	DIQMTQSPFSLASVGDVAVTITQASQSDINDYLAWYQQKPKAPKLLIYKASTLASGVPSRFS GSGGTDFTLTSSIQPEDFATYYCQGYITIDNVFGTGKTVTVLGGGGGQVQLQESGPG LVKPSSETLSLTCKVSGFSFSNYWICWIRQPPGKLEWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTIS VDSKNQFSLKLSSTVTAADTAVYCARHPSDAVYGYANNLWGQGTTLTVSSGGGGGSGGGG SGGGGGGGGQMTQSPFSLASVGDVAVTITQASQSDINDYLAWYQQKPKAPKLLIYRAS TLASGVPSRFSGSGGTDFTLTSSIQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGTGKTVTVLGGGGGSGQ VQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFGYDMCWIRQPPGKLEWIGCVAGSDITYYAS WAKGRVTISVDSKNQFSLKLSSTVTAADTAVYCARCKDAYSDAFNLWGQGTTLTVSSGGGG SGGGGQMTQSPFSLASVGDVAVTITQASQSDINDYLAWYQQKPKAPKLLIYDASDLA SGVPSRFSGSGGTDFTLTSSIQPEDFATYYCAGFSFGYDMCWIRQPPGKLEWIGCVAGSDITYY CSGGGGGGGQVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFSLSNMGWVRQAPGKLEWY GIISWGFTYYASWAKGRFTISRDNSKNTVYLMNSLRADATATYFCARDRHGGGDSGAFYL WGQGTTLTVSS
PRO966 (= PRO1052) (38_27_C05 sc01 scDb-i/33-03-G02 sc01 scDb-o/19-01-H04-sc03 scFv)		
서열번호 79	scDb-scFv	DIQMTQSPFSLASVGDVAVTITQASQSDINDYLAWYQQKPKAPKLLIYKASTLASGVPSRFS GSGGTDFTLTSSIQPEDFATYYCQGYITIDNVFGTGKTVTVLGGGGGQVQLQESGPG

[0299]

[0300]

[illegible]

HNHYTQKSLSLSPGK		
PRO1196 (37-20-B03 sc01 IgG1)		
서열번호 92	경쇄 IgG	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITTCQASQSIGTYLAWYQQKPGKAPKLLIYRAFLASGVPSRFSG SGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQSNFYSDSTTIGPNAFGTKVTVLGTVAAPSVFIFFPSDE QLKSGTASVVCILLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
서열번호 93	중쇄 IgG	QVQLQESGPGLVKPSEFSLTSLCKVSGFSFNSDYWIYWIQPPGKGLEWIGSIYGGSSQNTQYA SWAQGRVTISVDSSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCARGYVDYGGATDLWGQGTLTITVSSAS TKGPSVEPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

[0304]

[0305]

본 출원의 텍스트 전반에 걸쳐, 명세서 텍스트(예컨대 표 1~ 표 3)와 서열 목록 사이의 불일치가 존재하면, 명세서 텍스트가 우선되어야 할 것이다.

[0306]

명확함을 구현하기 위해 별도의 구현예들의 내용에 기술된 본 발명의 임의의 특징들은 또한 하나의 구현예와 조합하여 제공될 수 있다. 거꾸로 말하면, 간략함을 도모하기 위하여 하나의 구현예의 내용에 기술된 본 발명의 다양한 특징은 또한 별도로 제공될 수 있거나 임의의 적합한 하위 조합을 통해 제공될 수 있다. 본 발명에 관한 구현예들의 모든 조합들은, 특히 본 발명에 포함되고, 마치 각각의 조합과 모든 조합들이 개별적으로나 명백하게 개시되어 있는 것처럼 본원에 개시되어 있다. 더욱이 다양한 구현예 및 이를 이루는 요소의 모든 하위 조합도 또한 본 발명에 의해 특별히 포함되고, 마치 각각의 하위 조합과 모든 하위 조합이 개별적으로나 명백하게 개시되어 있는 것처럼 본원에 개시되어 있다.

[0307]

본 발명은 본원에 기술된 특정 구현예들이 이루는 범위에 제한되지 않을 것이다. 실제로 본원에 기술된 변형 이외의 본 발명의 다양한 변형은 전술된 발명의 설명을 통해 당 업자들에게 명료해질 것이다. 이러한 변형은 첨부된 특허 청구의 범위 안에 속하도록 의도된다.

- [0308] 본원에 인용된 모든 특허, 특허출원, 간행물, 시험 방법, 문헌 및 기타 자료들은 각각의 특허법하에서 허용될 수 있는 정도로 본원에 참조로 인용되어 있다.
- [0309] 하기 실시예들은 전술된 본 발명을 설명하는 것이지, 본 발명의 범위를 어떤 방식으로든 제한하고자 하는 것은 아니다. 당 업자에게 공지되어 있는, 보통 말하는 그런 시험 모델로서 기타의 것도 또한 청구된 발명의 유리한 효과를 확정할 수 있다.
- [0310] **실시예**
- [0311] **인간 PDL1에 대항하여 유도된 신규 항체**
- [0312] **실시예 1: 인간 PDL1에 대항하여 유도된 토끼 항체의 생성**
- [0313] 재조합 생산하여 정제한 인간의 PDL1 세포외 도메인으로 토끼를 면역화하였다. 면역화 과정 중 항원에 대항하는 체액성 면역 반응의 세기를, 폴리클로날 형질종 항체와 항원의 측정 가능한 결합을 여전히 보였던 각각의 토끼 혈청에 대한 최고 희석률(역가)을 확정함으로써 정량적으로 평가하였다. 면역화한 항원(재조합 인간 PDL1 세포외 도메인)에 대항하는 혈청중 항체의 역가를 효소결합 면역흡착검정(ELISA)을 이용하여 평가하였다. 면역화한 토끼 모두는 매우 높은 역가, 즉 적어도 $1:2.64 \times 10^6$ 의 혈청중 희석률을 보였다. 1차 항원 주입 전 동일한 토끼로부터 채취한 혈청은 백그라운드 대조군으로 사용하였다.
- [0314] **실시예 2: 히트의 동정 및 선택**
- [0315] 히트의 동정 절차의 일환으로, 고 친화성 hPDL1 결합 B 세포를 특이적으로 검출하고 이의 단리를 허용하는 유세포분석법 기반 분류 과정을 진행하였다. hPDL1 결합 B 세포를 동정하기 위해 hPDL1 ECD를 형광염료인 R-피코에리트린(R-PE)으로 표지화하였다. 표지화된 PDL1상 항 PDL1 중화 항체의 결합 부위뿐 아니라 PD-1 결합 부위는 부피가 큰 R-PE 표지에 의해 잠재적으로 차단될 수 있었으므로, 에프토프의 접근가능성을 유세포분석법으로 확인하였다. 인간 IgG1 또는 아벨루마의 Fc부에 융합된 PD-1 세포외 도메인을 단백질 G 비드상에 포착하고 나서, R-PE 표지화 PDL1의 결합을 유세포분석법에 의해 확인하였다. 형광 세기는 비드상에 부동화한 수용체들과 결합한 표지화 PDL1의 양에 비례하였다. PDL1과, PD-1 및 중화 항체의 결합이 확인되었는데, 이때 무관한 사이토카인과 항 PDL1 항체의 결합은 검출되지 않았다.
- [0316] **스크리닝:**
- [0317] 고처리량 배양의 규모는 개별 토끼 항체의 정제를 허용하지 않았으므로, 스크리닝 단계 중 얻어진 결과들은, 항체 분비 세포(ASC)의 배양 상청액 유래 미정제 항체로 수행된 검정을 기반으로 한 것이었다. 이러한 상청액은 항체 다수의 서로에 대한 순위 매김을 허용하였으나, 결합 친화성을 제외한 절대 값을 제공하지는 못하였다. 적어도 4주 동안의 과정에서, 개별적으로 배양한 클론 모두로부터 상청액을 수집하였다. 배양 기간의 막바지에 각각의 세포 배양 상청액 중 토끼 모노클로날 항체를 대상으로 고 처리량 ELISA를 수행하여, 재조합 인간 PDL1 세포외 도메인과의 결합에 대해 특성규명하였다. PDL1 결합 상청액을 대상으로 인간 PDL1 및 사이노몰거스 PDL1에 대한 결합 역학에 대해 추가로 특성규명하였다. 뿐만 아니라, 경쟁 ELISA 및 세포 기반 리포터 유전자 검정에 의해 PDL1/PD-1 상호작용의 중화 잠재성을 확정하였다. PDL1/B7-1 상호작용의 중화도 또한 경쟁 ELISA에 의해 평가하였다. 결합 역학을 제외하고, 고 처리량 스크리닝에 대해 보고되는 값을 단일 점 측정(무 용량 응답)을 기반으로 "예" 또는 "아니오"응답으로 전환하여야 했다. 상청액 중 마우스 PDL1 결합 잠재성을 직접 ELISA에 의해 분석하였으며, 오로지 양성인 상청액에 대해서만 결합 역학을 확정하였다.
- [0318] hPDL1 결합에 대한 직접 ELISA
- [0319] 4℃에서 밤새도록 500 ng/ml의 PDL1을 함유하는 PBS 50 μ l를 첨가하여 ELISA 평판을 코팅하였다. 다음 날, 평판에 세척 완충제(PBS, 0.005% Tween 20) 웰당 450 μ l를 범람(overflow) 방식으로 흘려 평판을 3회 세척하였으며, RT에서 1시간 동안 뉴테이팅 믹서(nutating mixer)에서 차단 완충제(PBS, 1% BSA, 0.2% Tween 20) 300 μ l를 각각의 웰에 첨가하였다. 그 다음, 세척 완충제 450 μ l를 범람 방식으로 흘려 평판을 3회 세척하였으며, 각각의 상청액 50 μ l씩을 첨가한 후, 평판을 RT에서 1.5시간 동안 항온처리하면서, 가만히 진탕을 수행하였다. 세척 완충제 450 μ l를 범람 방식으로 흘려 평판을 3회 세척한 후, HRP와 커플링한 염소 및 토끼 IgG 항체 50 μ l를 각각의 웰에 첨가하였다. RT 및 뉴테이팅 믹서에서 1시간 동안 항온처리한 후, 평판을 웰당 450 μ l의 세척 완충제로 세척한 후, TMB(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, KPL, Cat. No. 53-00-00) 50 μ l를 첨가하였다. 5분 ~ 10분 동안 진행한 후, 여기에 웰당 1M HCl 50 μ l씩을 첨가하여 효소 반응을 중단시켰고, 기준 파장을 690 nm

로 삼아 450 nm에서 평판을 판독하였다.

[0320] hPDL1에의 친화성(SPR에 의한 분석)

[0321] 인간PDL1에 대한 항체의 결합 친화성을, MASS-1 SPR 기기(Sierra Sensors)를 사용하는 표면플라스몬공명법(SPR)에 의해 측정하였다. 친화성 스크리닝을 위해 표준적 아민 커플링 방법을 이용하여 토끼 IgG의 Fc 영역에 특이적인 항체(Bethyl Laboratories, Cat. No. A120-111A)를 센서 칩(SPR-1 Affinity Sensor, High Capacity Amine, Sierra Sensors)에 부동화시켰다. 부동화한 항 토끼 IgG 항체로써 B 세포 상청액 중 토끼 모노클로날 항체를 포착하였다. B 세포 상청액 중 최저 IgG 농도는 충분한 포착을 허용하는데 필요하였다. 모노클로날 항체를 포착한 다음, 인간 PDL1(Peprotech)을 3분 동안 유세포에 주입하였으며(농도 90 nM), 센서 칩상에 포착된 IgG로부터의 단백질 해리를 5분 동안 진행시켰다. 매 주입 주기 후, 10 mM 글리신-HCl을 2회 주입하여 표면을 재생하였다. 겔보기 해리 속도 상수(k_d) 및 겔보기 결합 속도 상수(k_a), 그리고 겔보기 해리 평형 상수(K_D)를, 1:1 랑뮈르 결합 모델을 이용하여 MASS-1 분석 소프트웨어(Analyzer, Sierra Sensors)로 산정하였으며, 피팅의 품질은 상대적 χ^2 (즉 피분석물의 외삽된 최고 결합 수준에 대해 정규화된 χ^2)를 기반으로 모니터링하였는데, 여기서 상대적 χ^2 는 곡선 피팅의 품질에 대한 척도이다. χ^2 에 대한 값이 작으면, 1:1 랑뮈르 결합 모델에 더욱 정확하게 피팅된다. 히트의 대부분에 있어서 상대적 χ^2 값은 10% 이하였다. 만일 리간드 결합에 대한 반응 단위(RU)가 항체 포착에 대한 RU의 적어도 2%라면, 결과를 유효한 것으로 여겼다. 리간드 결합에 대한 RU가 항체 포착에 대한 RU의 2% 미만인 시료는 포착된 항체에 대한 PDL1의 특이적 결합을 보이지 않는 것으로 간주하였다.

[0322] PDL1/PD-1 차단 ELISA

[0323] 4℃에서 밤새도록 2 μ g/ml의 PD-1을 함유하는 PBS 50 μ l를 첨가하여 ELISA 평판을 코팅하였다. 다음 날, 평판에 세척 완충제 450 μ l를 웰당 범람 방식으로 흘려 평판을 3회 세척하였으며, RT에서 1시간 동안 뉴테이팅 믹서에서 차단 완충제 300 μ l를 각각의 웰에 첨가하였다. 그 다음, PDL1을 차단 완충제 중에 희석하여, 원하는 최종 농도인 250 ng/ml보다 20배 더 높은 농도로 만들었다. 검정의 감도를 추가로 조정하여, 40 ng/ml PDL1 존재하에 몇몇 클론을 분석하였다. 그 다음, 비 결합 평판에 각각의 상청액 114 μ l씩을 PDL1 함유 차단 완충제 6 μ l로 희석한 다음, 평판을 RT 및 뉴테이팅 믹서에서 1시간동안 항온처리하였다. 웰당 세척 완충제 450 μ l를 범람 방식으로 흘려 ELISA 평판을 3회 세척하였으며, 이 ELISA 평판상에 각각의 희석액 50 μ l씩을 첨가하였다. 평판을 RT에서 1.5시간 동안 항온처리하면서, 가만히 진탕을 수행하였다. 웰당 세척 완충제 450 μ l로 평판을 3회 세척한 후, 스트렙타비딘-폴리HRP40(10 ng/ml) 50 μ l를 ELISA 평판의 각각의 웰에 첨가하였다. RT에서 1시간 동안 항온 처리한 후, 평판을 세척 완충제 450 μ l로 3회 세척한 다음, TMB 50 μ l를 첨가하여 5분 ~ 10분 동안 전개시켰다. 마지막으로 여기에 1M HCl 50 μ l를 첨가하여 효소 반응을 중단시켰고, 기준 파장을 690 nm로 삼아 450 nm에서 평판을 판독하였다.

[0324] PDL1/B7-1 차단 ELISA

[0325] 4 μ g/ml의 B7-1을 함유하는 PBS 50 μ l를 첨가하여 ELISA 평판을 코팅하였다(4℃). 다음 날, 평판에 세척 완충제 450 μ l를 웰당 범람 방식으로 흘려 평판을 3회 세척하였으며, RT에서 1시간 동안 뉴테이팅 믹서에서 차단 완충제 300 μ l를 각각의 웰에 첨가하였다. 그 다음, PDL1을 차단 완충제 중에 희석하여, 원하는 최종 농도인 500 ng/ml보다 20배 더 높은 농도로 만들었다. 그 다음, 비 결합 평판에 각각의 상청액 114 μ l씩을 PDL1 함유 차단 완충제 6 μ l로 희석한 다음, 평판을 RT 및 뉴테이팅 믹서에서 1시간 동안 항온처리하였다. 웰당 세척 완충제 450 μ l를 범람 방식으로 흘려 ELISA 평판을 3회 세척하였으며, 이 ELISA 평판상에 각각의 희석액 50 μ l씩을 첨가하였다. 평판을 RT에서 1.5시간 동안 항온처리하면서, 가만히 진탕을 수행하였다. 웰당 세척 완충제 450 μ l로 평판을 3회 세척한 후, 스트렙타비딘-폴리HRP40(10 ng/ml) 50 μ l를 ELISA 평판의 각각의 웰에 첨가하였다. RT에서 1시간 동안 항온 처리한 후, 평판을 세척 완충제 450 μ l로 3회 세척한 다음, TMB 50 μ l를 첨가하여 5분 ~ 10분 동안 전개시켰다. 마지막으로 여기에 1M HCl 50 μ l를 첨가하여 효소 반응을 중단시켰고, 기준 파장을 690 nm로 삼아 450 nm에서 평판을 판독하였다.

[0326] 세포 기반 검정에 있어 PDL1/PD-1 차단(리포터 유전자)

[0327] 히트를 추가로 특성규명하기 위해, PDL1 및 PD-1 상호작용 분자 둘 다가 세포 표면상에 발현되었을 때 히트가 PDL1/PD-1 상호작용을 증화하는 능력을, CHO/PDL1/TCR 활성 인자 및 Jurkat/PD-1 세포를 사용하여 시험하였다. 세포 배양 배지(DMEM/F12, 10% FCS) 100 μ l 중 35,000개의 CHO/PDL1/TCR 활성 인자 세포를, 백색의 세포 배양 평판 내벽에 첨가하고 나서, 37℃ 및 5% CO₂에서 16시간 ~ 20시간 동안 항온처리하였다. 다음 날, 세포 배양 배

지 95 μ l를 각각의 웰로부터 제거하고, 스크리닝한 B 세포 상청액 50 μ l 또는 양성 대조군, 아벨루맵(최대 신호의 0%, 50% 및 100%를 발생시킬 것으로 확인된 농도)을 첨가한 다음, 평판을 37°C에서 30분 동안 항온처리하였다. 그 다음, 검정 완충제(10% FCS 포함 RPMI1640) 중 400,000개 세포/ml로 희석한 효과기 Jurkat 세포 50 μ l를 각각의 웰에 첨가한 후, 평판을 37°C 및 5% CO₂에서 6시간 동안 항온처리하였다. 마지막으로 제조자의 프로토콜에 따라 제조한 루시페라아제 기질(BPS Bioscience) 50 μ L를 각각의 웰에 첨가하고, 평판을 암실에서 30분 동안 항온처리한 후, Topcount를 사용하여 발광도를 측정하였다.

[0328] 중간(사이노 및 마우스) 특이성(SPR에 의한 분석)

[0329] 사이노몰거스 PDL1 및 마우스의 PDL1에 대한 결합 역학도 또한, 인간 PDL1에 대한 결합에 관하여 기술한 바와 동일하되, 다만 인간 PDL1을 사이노몰거스 PDL1 또는 마우스 PDL1 각각으로 바꾼 SPR 환경을 적용하여 확정하였다.

[0330] 스크리닝 히트의 선택

[0331] B 세포 상청액 중 최종 클론의 모노클로날 항체의 약리학적 특성을 표 4에 제시하였다.

[0332] **실시예 3: 히트 확인**

[0333] 클로닝 및 제조

[0334] 히트 확인을 위해 선택한 클론의 동정 후, 이 토끼 항체를 클로닝하여 발현시킨 다음 정제하여 추가로 특성규명하였다. 대응하는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 클로닝 후, DNA 단편의 적합한 포유류 발현 벡터로의 시험관내 결합을 수행하였다. 이 발현 벡터는 공동 발현될 때 완전 기능성 토끼 모노클로날 IgG의 조립과 분비를 허용하는 토끼 IgG 경쇄 및 중쇄의 불변 도메인들에 대한 공통 서열을 함유하였다. 벡터 구성 후 이로부터 생성된 구조체의 서열을 다시 확인하였으며, 포유류 세포 형질감염을 위해 플라스미드 DNA를 증폭 및 정제하였다.

[0335] 토끼 항체 중쇄 및 경쇄에 대한 발현 벡터를 지질 기반 형질감염 시약으로 포유류 현탁 세포주에 형질감염시켜 일시적 이중 발현을 도모하였다. 분비된 모노클로날 IgG의 확고한 발현 수준을 구현하기 위해 중쇄 벡터 대 경쇄 벡터의 비와 같은 조건을 최적화하였다. 발현 배양액을 진탕 항온처리기 내에서 7일 동안 배양하였다. 이중 발현기의 막바지에 세포 배양 상청액을 원심분리로 수집하였다. 그 다음, 분비된 토끼 IgG를, 단백질을 A 비드로 친화성 정제하였다. IgG를 로딩한 비드를 세척한 후, 정제된 항체를 pH 전환(pH shift)에 의해 용리하였다. 황산도데실나트륨 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE), 280 nm에서의 UV 흡광도 측정 및 크기별 배제 고성능 액체 크로마토그래피(SE-HPLC)에 의해 용리 분획들을 분석하여, 동일성, 함량 및 순도를 확인하였다. 표 5에는 rIgG의 제조 및 특성규명에 대해 요약되어 있다.

표 4

B 세포 상정액중 모노클로날 항체의 약동학적 특성 : 33-03-G02 및 37-20-B03.

클론 ID	hPD-L1 에 대한 친화성 (SPR)				사이토툴거스PD-L1에 대한 친화성 (SPR)				마우스 PD-L1에 대한 친화성 (SPR)				리포터 유전자 결정에 있어 PD-D1의 중화		약제 ELISA에 있어 PD-L1/PD-1의 중화		약제 ELISA에 있어 PD-L1/PD-1 중화	
	k_a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	K_D [M]	K_D [M]	k_a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	K_D [M]	K_D [M]	k_a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	K_D [M]	K_D [M]	약제물(%)	250 ng/ml hPD-L1 약제물(%)	40 ng/ml hPD-L1 약제물(%)	500ng/ml hPD-L1 약제물(%)	100	58
33-03-G02	1.02E+05	3.41E-05	3.34E-10	1.31E+05	7.33E-06	5.60E-11	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	100	101	100	100	100	
37-20-B03	5.98E+05	7.39E-04	1.24E-09	8.11E+05	3.23E-04	3.99E-10	8.45E+04	9.40E-03	1.11E-07	51								

표 5

토끼 모노클로날 항체 제조 분석 데이터 요약

클론 ID	평균 농도 [μg/μl]	분취액 부피 [mL]	양 [μg]	최종수득량 [mg/L]	발현 부피 [mL]	단량체 함량 [%]
33-03-G02	0.816	0.75	612	15.3	40	98.4
구조체 ID	발현 부피 [mL]	최종수득량 [mg]	발현에 따른 1L당 수득량 [mg/L]	순도 SE-HPLC [단량체%]	완충제	
33-03-G02	40	0.61	15.3	98.4	PBS 1X, pH 7.4	
37-20-B03	40	0.29	6.7	99.0	PBS 1X, pH 7.4	

[0337]

[0338] *hPDL1에 대한 친화성(SPR에 의한 분석)*

[0339] 정제된 모노클로날 토끼 항체의, 인간 PDL1에 대한 결합 역학을 MASS-1 SPR 기기(Sierra Sensors)를 이용하여 표면플라스몬공명법(SPR)에 의해 확정하였다. 항체 대부분은 매우 느린 오프 속도(off-rate)를 보였으므로, 실험은 염을 고 농도로 함유하는 완충제 중에서 수행하였고(37℃), 이로써 상이한 항체들의 결합 친화성들간 식별이 가능하게 되었다. 표준 아민 커플링 방법을 통해 토끼 IgG의 Fc 영역에 특이적인 항체(Bethyl Laboratories, Cat. No. A120-111A)를 센서 칩(SPR-2 Affinity Sensor, High Capacity Amine, Sierra Sensors)상에 부동화하였다. 부동화한 항 토끼 IgG 항체에 의해 토끼 모노클로날 항체를 포착하였다. 모노클로날 항체를 포착한 다음, 150 mM NaCl 및 150 mM MgCl₂를 함유하는 HEPES 완충제 중 PDL1의 2배 연속 희석액(90 nM ~ 0.35 nM)을, 바이오센서 칩상에 포착된 IgG와의 결합에 대해 시험하였으며, 센서 칩상에 포착된 IgG로부터의 단백질 해리를 5분 동안 진행시켰다. 각각의 주입 주기 후, 10 mM 글리신-HCl을 2회 주입하여 표면을 재생하였다. 겔보기 해리 속도 상수(k_d) 및 겔보기 결합 속도 상수(k_a), 그리고 겔보기 해리 평형 상수(K_D)를, 1:1 랑뮈르(Langmuir) 결합 모델을 이용하여 MASS-1 분석 소프트웨어(Analyzer, Sierra Sensors)로 산정하였으며, 피팅의 품질은 상대적 Chi²(즉 피분석물의 외삽된 최고 결합 수준에 대해 정규화된 Chi²)를 기반으로 모니터링하였는데, 여기서 상대적 Chi²는 곡선 피팅의 품질에 대한 척도이다. Chi²에 대한 값이 작으면, 1:1 랑뮈르 결합 모델에 더욱 정확하게 피팅된다. 히트의 대부분에 대해 상대적 Chi² 값은 10% 이하였다. 표 6은 추가 발현을 위해 선택한 토끼 IgG 항체를 보여준다.

표 6

토끼 IgG 33-03-G02 및 37-20-B03에 대한 hPDL1의 친화성 측정 결과 요약

클론 ID	k _a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k _d [s ⁻¹]	K _D [M]	이론상 Rmax에 대해 정규화된 결합 수준 (%)
33-03-G02	3.76E+05	1.99E-05	5.28E-11	70.00%
37-20-B03	5.26E+05	4.08E-05	7.76E-11	94.00%

[0340]

[0341] *PDL1/PD-1 차단 ELISA에서의 효능*

[0342] PDL1과 PD-1의 결합을 중화하는 효능을 경쟁 ELISA에서 평가하였다. 4℃에서 밤새도록 4 µg/ml PD-1을 함유하는 PBS 50 µl를 첨가하여 ELISA 평판을 코팅하였다. 다음 날, 평판에 세척 완충제(PBS, 0.005% Tween 20) 웰당 450 µl를 범람 방식으로 흘려 평판을 3회 세척하였으며, RT에서 1시간 동안 뉴테이팅 믹서에서 차단 완충제(PBS, 1% BSA, 0.2% Tween 20) 300 µl를 각각의 웰에 첨가하였다. 그 다음, PDL1을 차단 완충제 중에 희석하여, 최종 농도 1 ng/ml로 만들었다. 이후, 비 결합 평판에서 웰당 PDL1 함유 차단 완충제 중 연속 희석액 120 µl(시험 rIgG 300 ng/ml ~ 0.005 ng/ml)를 제조하였으며, 이 평판을 RT에서 30분 동안 항온처리하였다. ELISA 평판에 세척 완충제 450 µl를 범람의 방식으로 흘려 ELISA 평판을 3회 세척하였고, 이 ELISA 평판의 인접 웰들에 각각의 희석액 50 µl씩을 2회 첨가하여 2개씩 만들었다. 평판을 RT에서 90분 동안 항온처리하면서, 가만히 진탕을 수행하였다. 세척 완충제 450 µl로 3회 세척한 다음, 스트렙타비딘-폴리HRP40(10 ng/ml) 50 µl를 ELISA 평판의 각각의 웰에 첨가하였다. RT에서 1시간 동안 항온 처리한 후, 평판을 세척 완충제 450 µl로 3회 세척한 다음, TMB 50 µl를 첨가하여 5분 ~ 10분 동안 전개시켰다. 마지막으로 여기에 1M HCl 50 µl를 첨가하여 효소 반응을 중단시켰고, 기준 파장을 690 nm로 삼아 450 nm에서 평판을 판독하였다.

[0343] 클론 33-03-G02 및 클론 37-20-B03으로부터 유래한 토끼 IgG는, PDL1/PD-1 상호작용을 중화하는데 있어 큰 효능을 보였다. 클론 37-20-B03은 아벨루마의 효능보다 거의 2배 더 큰 효능을 보였다(표 7). 선택한 클론에 대하여 얻어진 용량 반응 곡선을 도 1에 도시하였다.

표 7

PDL1/PD-1 경쟁 ELISA에 있어 토끼 IgG 33-03-G02 및 37-20-B03의 중화 효능 요약

클론 ID	PDL1/PD-1 경쟁 ELISA에 있어 효능		
	IC ₅₀ [ng/ml]	상대적 IC ₅₀ [IC ₅₀ , 아벨루마 / IC ₅₀ , IgG]	최대 억제율 (%)
33-03-G02	2.13	0.85	100.0
37-20-B03	1.44	2.03	99.9

[0344]

[0345] PDL1/B7-1 차단 ELISA에서의 효능

[0346] PDL1과 B7-1의 상호작용을 중화하는 효능을 경쟁 ELISA에서 평가하였다. 4℃에서 밤새도록 4 µg/ml B7-1을 함유하는 PBS 50 µl를 첨가하여 ELISA 평판을 코팅하였다. 다음 날, 평판에 세척 완충제(PBS, 0.005% Tween 20) 웰당 450 µl를 범람 방식으로 흘려 평판을 3회 세척하였으며, RT에서 1시간 동안 뉴테이팅 믹서에서 차단 완충제(PBS, 1% BSA, 0.2% Tween 20) 300 µl를 각각의 웰에 첨가하였다. 그 다음, PDL1을 차단 완충제 중에 희석하여, 농도 40 ng/ml로 만들었다. 이후, 비 결합 평판에서 웰당 PDL1 함유 완충제 중 연속 희석액 120 µl(시험 rIgG 900 ng/ml ~ 0.015 ng/ml)를 제조하였으며, 이 평판을 RT에서 30분 동안 항온처리하였다. ELISA 평판에 세척 완충제 450 µl를 범람의 방식으로 흘려 이 ELISA 평판을 3회 세척하였고, 이 ELISA 평판의 인접 웰들에 각각의 희석액 50 µl씩을 2회 첨가하여 2개씩 만들었다. 평판을 RT에서 90분 동안 항온처리하면서, 가만히 진탕을 수행하였다. 세척 완충제 450 µl로 3회 세척한 다음, 스트렙타비딘-폴리HRP40 50 µl를 ELISA 평판의 각각의 웰에 첨가하였다. RT에서 1시간 동안 평판을 항온 처리한 후, 이 평판을 세척 완충제 450 µl로 3회 세척한 다음, TMB 50 µl를 첨가하여 5분 ~ 10분 동안 전개시켰다. 마지막으로 여기에 1M HCl 50 µl를 첨가하여 효소 반응을 중단시켰고, 기준 파장을 690 nm로 삼아 450 nm에서 평판을 판독하였다. 선택한 토끼 IgG는 PDL1/B7-1 상호작용을, 표 8에 보인 바와 같이 아벨루마의 효능과 유사한 효능으로 차단할 수 있었다. 선택한 클론에 대하여 얻어진 용량 반응 곡선을 도 2에 도시하였다.

표 8

PDL1/B7-1 경쟁 ELISA에 있어, 선택된 rIgG의 중화 효능

클론 ID	PDL1 / B7-1 경쟁 ELISA에 있어 효능		
	IC ₅₀ [ng/ml]	상대적 IC ₅₀ [IC ₅₀ , 아벨루맵 / IC ₅₀ , IgG]	최대 억제율 (%)
33-03-G02	14.85	1.01	94.7
37-20-B03	14.82	1.02	95.0

[0347]

[0348] 세포 기반 PDL1/PD-1 차단 검정에서의 효능(리포터 유전자)

[0349] PDL1과 PD-1의 결합을 중화하는 효능을 세포 기반 리포터 유전자 검정에서 평가하였다. 세포 배양 배지 (DMEM/F12, 10% FCS) 100 μ l 중 35,000개의 CHO/PDL1/TCR 활성 인자 세포를, 백색의 세포 배양 평판 내벽에 첨가하고 나서, 37°C 및 5% CO₂에서 16시간 ~ 20시간 동안 항온처리하였다. 다음 날, 세포 배양 배지 95 μ l를 각각의 웰로부터 제거하고, 시험할 각각의 분자의 2배 농축 연속 희석액 50 μ l(3000 ng/ml ~ 0.46 ng/ml)(기준인 아벨루맵 포함)를 첨가하였다. 그 다음, 검정 완충제(10% FCS 포함 RPMI1640) 중 400,000개 세포/ml로 희석한 효과기 Jurkat 세포 50 μ l를 각각의 웰에 첨가한 후, 평판을 37°C 및 5% CO₂에서 6시간 동안 항온처리하였다. 마지막으로 제조자의 프로토콜에 따라 제조한 루시페라아제 기질(BPS Bioscience) 50 μ L를 각각의 웰에 첨가하고, 평판을 암실에서 30분 동안 항온처리한 후, Topcount를 사용하여 발광도를 측정하였다. 선택한 클론들은 PDL1/PD-1 상호작용을, 세포 기반 리포터 유전자 검정에서 차단할 수 있었다(표 9). 선택한 클론에 대하여 얻어진 용량 반응 곡선을 도 3에 도시하였다.

표 9

선택된 rIgG의 리포터 유전자 검정에 있어 PDL1/PD-1 상호작용의 중화 효능 요약

클론 ID	NFAT 리포터 유전자 검정		
	EC ₅₀ [ng/ml]	상대적 EC ₅₀ [EC ₅₀ , 아벨루맵 / EC ₅₀ , IgG]	(아벨루맵의 경우에 비해 상대적인) 최대 억제율 (%)
33-03-G02	50.99	1.01	114.5

[0350]

[0351] PDL1 발현 세포와의 결합(FACS에 의한 분석)

[0352] PDL1 발현 세포에 대한 결합 효능도 또한 선택한 IgG에 대해 확정하였다. 50,000개의 CHO-PDL1 발현 세포를 둥근 바닥 비 조직 배양액 처리 96웰 편판에 분배하였다. 400 x g에서 5분 동안 원심분리하여 세포를 PBS 100 μ l로 2회 세척하였다. 세포를, 시험한 rIgG 및 대조군 IgG 아벨루맵의 염색 완충제(PBS, 2% BCS 열 불활성화, 2 mM EDTA) 중에 제조한 연속 희석액(2,000 ng/ml ~ 0.128 ng/ml) 100 μ l에 재현탁하였다. 뉴테이팅 믹서상에서 1시간 동안 항온처리(4°C)한 다음, 100 μ l 염색 완충제를 사용하여 원심분리단계(5분, 400 x g)를 거쳐 세포를 3회 세척하였다. 그 다음, 토끼 IgG로 처리한 세포를, 염소 항 토끼 IgG APC(표지화) 2 μ g/ml 함유 염색 완충제 100 μ l중에 재현탁한 후, 아벨루맵(인간 IgG1) 처리한 세포를, 염소 항 인간 IgG APC(표지화) 2 μ g/ml 함유 염색 완충제 100 μ l중에 재현탁하였다. 평판을 뉴테이팅 믹서에서 1시간 동안 항온처리(4°C)하였다. 염색

완충제 100 μ l로 평판을 3회 세척하여 재현탁함으로써, 염색 완충제의 최종 부피를 50 μ l로 만들었다. 마지막으로 웰당 APC 신호 20,000 이벤트(event)를, Novocyte 유세포분석시스템(ACEA Bioscience)을 사용하여 유세포 분석법으로 분석하였다. PDL1 발현 세포 결합을, 평균한 토끼 IgG 모두에 대해 확인할 수 있었다. 선택한 토끼 IgG의 세포성 PDL1에 대한 결합 효능을 표 10에 보였다.

표 10

선택된 토끼 IgG의 세포성 PDL1에 대한 결합 효능

세포성 PD-L1에 대한 결합			
클론 ID	EC ₅₀ [ng/ml]	상대적 EC ₅₀ [EC ₅₀ , 아벨루마 / EC ₅₀ , IgG]	(아벨루마의 경우에 비해 상대적인) 최대 억제율 (%)
33-03-G02	113.7	1.091	85%

[0353]

[0354] 중 특이성(SPR에 의한 분석): 사이노

[0355] 사이노물거스 PDL1에 대한 결합 역학도 또한 인간 PDL1에 대한 결합에 대해 기술된 조건과 동일한 조건을 적용 하되, 단 이 경우 인간 PDL1을 사이노물거스 PDL1으로 바꾸어 조건을 적용하여 확정하였다. 선택한 IgG 모두에 대해 사이노물거스 PDL1에 대한 결합을 확인하였다(표 11).

표 11

선택된 토끼 IgG에 대한 사이노물거스 PDL1의 친화성 측정 결과 요약

클론 ID	k _a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k _d [s ⁻¹]	K _D [M]	이론상 Rmax에 대해 정규화한 결합 수준 (%)
33-03-G02	1.68E+05	3.91E-06	2.34E-11	39.59%

[0356]

[0357] 중 특이성(SPR에 의한 분석): 마우스

[0358] 사이노물거스 PDL1에 대한 결합 역학도 또한 인간 PDL1에 대한 결합에 대해 기술된 조건과 동일한 조건을 적용 하되, 단 이 경우 인간 PDL1을 마우스 PDL1으로 바꾸어 조건을 적용하여 확정하였다. 클론 33-03-G02 및 37-20-B03으로부터 유래한 것으로서, 선택한 토끼 IgG에 대한 마우스 PDL1의 결합은 확인되지 않았다.

[0359] 실시예 4: 인간화를 위한 클론의 선택

[0360] 히트 확인중에 얻어진 데이터를 기반으로, CDR들을 VH3, VH4 또는 VH1A 또는 VH1B 기반 틀에 이식함으로써 모든 클론을 인간화하였다. 최대의 친화성과 효능을 달성하기 위하여, 인간 PDL1(rIgG)에 대해 최대의 친화성을 보였던 클론 2개(33-03-G02 및 37-20-B03)에 대해 상이한 구조적 이식편으로 추가 최적화를 수행하였다. 이식 후, 클론 33-03-G02 및 37-20-B03에 대한 변이체를 만들었다: CDR 이식편 - 인간 틀 상에의 토끼 CDR 이식; IF 이식 - CDR 이식 + 모든 토끼 VL/VH 계면 잔기의 이식; 전체 이식 - CDR 이식 + AHo 인간화 프로토콜에 따른 틀 잔기(항원 계면(AIF) 잔기(AHo에 따르면) 항원과 잠재적으로 접촉하는 토끼 잔기)는, 돌연변이 총 횟수를 줄이기 위해 계면 형성시의 용매 접근성이 20% 초과하여 변경된 잔기(토끼 틀 잔기)에 제한적이었다).

[0361] 작은 규모로 발새도록 유도성 발현을 진행하여 이.콜라이에서 단백질의 불용성 봉입체로서의 이중 발현을 수행 하였다(전술된 rIgG 발현과 유사하게 포유류 CHO-S 세포에서 생산된 PRO997 제외). 균질화한 세포 펠릿으로부터 원심분리 프로토콜(세포 파편 및 기타 숙주 세포 불순물 제거를 위한 세척 단계 수 회 포함)에 따라 봉입체를

단리하였다. 정제한 봉입체를 변성 완충제 중에서 가용화하였으며, 원래대로 폴딩된 단량체 scFv가 밀리그램 단위의 양만큼 생성되는, 규모를 바꾸어도 난조가 생기지 않는(scalable) 리폴딩 프로토콜에 의해 scFv를 리폴딩하였다. 이 시점에서, 표준화된 프로토콜을 이용하여 scFv를 정제하였다. 리폴딩 후 생성물을 친화성 크로마토그래피에 의해 포착하여, 정제 scFv를 수득하였다. 이용 가능한 양만큼은 시료들의 SEC 폴리싱(polishing)을 허용하지 않았으므로, 원하던 순도를 보이는 주요 분획만을 사용하였다. 이에 더하여, (이하 더욱 상세히 기술한) 시차주사형광측정법(DSF)에 의해 scFv의 용융 온도를 확정하였다. 표 12는 VH4 CDR 이식된 scFv 분자의 제조를 요약한 것이다. 클론 2개는 자체의 CDR 루프에 쌍을 이루지 않는 시스테인 잔기들을 포함하였으므로, 표 12에 명시한 바와 같이 클론 37-20-B03에 C57S 돌연변이를 도입하였다.

[0362] 선택한 몇몇 클론에 대한 추가의 이식 변이체를 디자인하였으며, 그에 관하여는 이 클론들의 초기 생산 및 특성 규명결과 요약한 표 13(AHo 번호매김) 및 표 14에 기술하였다.

[0363] **실시예 5: 인간화된 scFv의 약동학적 특성규명**

[0364] 이하에서는 히트 확인 단계에 대해 기술한 검정 시스템과 동일한 검정 시스템을 이용하여, 인간화된 scFv를 대상으로 1차 약동학적 특성에 대해 특성규명하였는데, 단 scFv 분자의 상이한 포맷에 맞추기 위해 일부 수정을 가하였다.

[0365] 5.1 인간 PDL1에 대한 친화성

[0366] 인간 PDL1에 대한 인간화 scFv의 친화성을 SPR 분석에 의해 T200 디바이스(Biacore, GE Healthcare) 상에서 확정하였다. 이 실험에서, Fc 태깅한 인간 PDL1을 인간 항체 포착 키트(GE healthcare)를 이용하여 포착하였다. 매 피분석물 주입 주기 이후, CM5 센서 칩을 재생하고 나서, 새로운 항원을 포착시켰다. 용량 반응 다 주기 역학 검정을 이용하여 scFv를 피분석물로서 5분 동안 주입하였는데, 이때 전개 완충제중에 희석한 피분석물의 농도는 0.12 nM ~ 30 nM였고, 단백질의 해리는 12분에 걸쳐 진행시켰다. 이때 얻어진 센서그램을 1:1 결합 모델을 사용하여 피팅하였다. 표 15에 보인 바와 같이, 시험 대상인 인간화 scFv가 인간 PDL1과 결합하는 것이 확인되었다.

[0367] 5.2 PDL1/PD-1 상호작용의 중화(경쟁 ELISA에 의한 분석)

[0368] PD-1과 PDL1의 결합을 중화하는 효능을, 앞서 기술한 방법과 동일한 방법으로 수행되는 경쟁 ELISA에 의해 평가하였다. 각각의 평판에 대한 개별 IC₅₀ 값을, 기준 분자인 아벨루맵의 (각각의 평판에 대해 취한) IC₅₀ 값에 대항하여 보정하였다(상대적 IC₅₀: IC₅₀, 아벨루맵/IC₅₀, 시험대상 scFv). 효능을 표 16에 요약하였는데, 이 표 16은 본 검정에서 IC₅₀은 아벨루맵 IC₅₀의 5배 이하인 것으로 해석될 수 있음을 보여주었다. 시험대상인 scFv 모두는 아벨루맵의 효능과 유사하거나 더 큰 효능을 보였다.

[0369] 5.3 PDL1/B7-1 상호작용의 중화(경쟁 ELISA에 의한 분석)

[0370] B7-1과 PDL1의 결합을 중화하는 효능을, 앞서 기술한 방법과 동일한 방법으로 수행되는 경쟁 ELISA에 의해 평가하였다. 각각의 평판에 대한 개별 IC₅₀ 값을, 기준 분자인 아벨루맵의 (각각의 평판에 대해 취한) IC₅₀ 값에 대항하여 보정하였다(상대적 IC₅₀: IC₅₀, 아벨루맵/IC₅₀, 시험대상 scFv). 효능을 표 17에 요약하였는데, 이 표 17은 본 검정에서 IC₅₀이 아벨루맵 IC₅₀의 10배 이하인 것으로 해석될 수 있음을 보여주었다. 시험대상인 scFv 모두는 아벨루맵의 효능과 유사하거나 더 큰 효능을 보였다.

[0371] 5.4 PDL1/PD-1 상호작용의 중화(NFAT 리포터 유전자 검정에 의한 분석)

[0372] PD-1과 PDL1의 결합을 중화하는 효능을, 앞서 기술한 세포 기반 리포터 유전자 검정에서 평가하였다. 시험대상인 분자 각각뿐 아니라 기준인 아벨루맵의 연속 희석액을 평판에 첨가하였다. 각각의 평판에 대한 개별 IC₅₀ 값을, 기준 분자인 아벨루맵의 (각각의 평판에 대해 취한) IC₅₀ 값에 대항하여 보정하였다(상대적 IC₅₀: IC₅₀, 아벨루맵/IC₅₀, 시험대상 scFv). 효능을 표 18에 요약하였는데, 이 표 18은 본 검정에서 IC₅₀이 아벨루맵 IC₅₀의 5배 이하인 것으로 해석될 수 있음을 보여주었다. 시험대상인 scFv 모두는 아벨루맵의 효능과 유사하거나 더 큰 효능을 보였다.

표 12

scFv 제조 및 초기 안정성 데이터 요약

클론 ID	PRO ID	물	이식전량	발원 부피 [mL]	CaptoL 이후 수득량 [mg]	최종 수득량 [mg]	발원에 의한 1L당 수득량 [mg/L]	순도SE-HPLC (단량체%)	Tm [°C]
33-03-G02-sc01	PRO830	VH4	CDR	300.00	2.00	2.00	6.67	100.0	80.00
37-20-B03-sc01	PRO997 (PRO908)	VH4	CDR	1,000.00	0.72	0.72	0.72	71.9	-

표 13

인간화 scFv 변이체 목록

클론 ID	단백질 ID	VH 돌연변이(람다 캄핑 Vκ1)	VH 돌연변이	VH 틀	이식 전략
33-03-G02-sc02	PRO1066			VH3	CDR
33-03-G02-sc03	PRO1183			VH4	전체
33-03-G02-sc18	PRO1392		V25A;I44V;G56A;V82K;F89V	VH4	PRO1183
37-20-B03-sc09**	PRO1347	S9A;A51P	G56A;Y105F	VH3	최적화 IF

** CDRH2내 57번 위치의 비 쌍형성 Cys(AHO 번호매김)

[0374]

표 14

제조에 관한 요약 표

클론 ID	단백질 ID	VH클	이식 전략	발원 부피 [mL]	Capto L 후 수득량 [mg]	최종 수득량 [mg]	발원시 1L당 수득량 [mg/L]	순도 SE- HPLC [단량체%]	T _m [°C]
33-03-G02-sc02	PRO1066	VH3	CDR	300.00	2.80	1.36	9.07	99.0	
33-03-G02-sc03	PRO1183	VH4	전체	1200.00	16.90	4.00	3.33	99.0	
33-03-G02-sc18	PRO1392	VH4	PRO1183 (최적화)	200.00	46.70	7.44	37.18	97.0	66.19
37-20-B03-sc09	PRO1347	VH3	IF	200.00	38.90	2.30	11.50	98.1	74.85
37-20-B03-sc10	PRO1355	VH3	GL	200.00	59.63	4.59	22.95	98.2	74.64

표 15

인간 PDL1에 대한 scFv의 친화성

클론 ID	단백질 ID	종	이식 전략	k_{on} [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{off} [s ⁻¹]	K_D [M]	이론상 Rmax에 대해 정규화된 결합 수준 (%)
33-03-G02-sc01	PRO830	VH4	CDR	2.10E+06	1.59E-04	7.60E-11	68.7
33-03-G02-sc02	PRO1066	VH3	CDR	3.27E+06	6.95E-05	2.13E-11	127.8
33-03-G02-sc03	PRO1183	VH4	전체	4.77E+06	< 1.00E-05	< 2.10E-12	84.1
33-03-G02-sc18	PRO1392	VH4	돌연변이 감소	6.19E+06	6.16E-05	9.94E-12	91.0
37-20-B03-sc01	PRO997/PRO908	VH4	CDR	6.76E+06	4.02E-05	5.94E-12	85.8
37-20-B03-sc09	PRO1347	VH3	IF	7.38E+06	6.64E-05	9.00E-12	90.7

표 16

PDL1과 PD-1 사이의 상호작용을 억제하는 scFv의 효능

클론 ID	단백질 ID	VH 틀	이식 전략	IC ₅₀ [ng/ml]	상대적 IC ₅₀ [IC ₅₀ , 아벨루맙/ IC ₅₀ , scFv]	최대 억제(%)
33-03-G02-sc01	PRO830	VH4	CDR	3.446	0.47	99.84
33-03-G02-sc02	PRO1066	VH3	CDR	2.073	0.93	99.90
33-03-G02-sc03	PRO1183	VH4	전체	0.36	3.57	99.80
33-03-G02-sc18	PRO1392	VH4	돌연변이감소	0.4699	2.77	99.91
37-20-B03-sc01	PRO997/PRO908	VH4	CDR	0.33	3.81	100.00
37-20-B03-sc09	PRO1347	VH3	IF	0.29	5.16	100.10

[0377]

표 17

PDL1과 B7-1 사이의 상호작용을 억제하는 scFv의 효능

클론 ID	단백질 ID	VH 틀	이식 전략	IC ₅₀ [ng/ml]	상대적 IC ₅₀ [IC ₅₀ , 아벨루맙/ IC ₅₀ , scFv]	최대 억제(%)
33-03-G02-sc01	PRO830	VH4	CDR	6.11	1.76	94.5
33-03-G02-sc02	PRO1066	VH3	CDR		측정되지 않음	
33-03-G02-sc03	PRO1183	VH4	전체	0.977	4.67	95.4
33-03-G02-sc18	PRO1392	VH4	돌연변이감소	1.19	3.51	93.24
37-20-B03-sc01	PRO997/PRO908	VH4	CDR	1.212	3.77	93.08
37-20-B03-sc09	PRO1347	VH3	IF	0.541	8.04	91.8

[0378]

표 18

리포터 유전자 검정에 있어 PDL1/PD-1 상호작용을 중화하는 scFv의 효능

클론 ID	단백질 ID	VH 틀	이식 전략	IC ₅₀ [ng/ml]	상대적 IC ₅₀ [IC ₅₀ , 아벨루맙/ IC ₅₀ , scFv]	최대 억제(%)
33-03-G02-sc01	PRO830	VH4	CDR	37.52	1.62	105%
33-03-G02-sc02	PRO1066	VH3	CDR		측정되지 않음	
33-03-G02-sc03	PRO1183	VH4	전체	9.98	3.84	102.40
33-03-G02-sc18	PRO1392	VH4	돌연변이감소	11.98	4.13	96.68
37-20-B03-sc01	PRO997/PRO908	VH4	CDR	8.02	4.78	95.28
37-20-B03-sc09	PRO1347	VH3	IF	7.53	4.68	88.88

[0379]

[0380]

5.5 hPDL1 발현 세포와의 결합(유세포분석법에 의한 분석)

[0381]

PDL1 발현 세포에 대한 결합 효능을 몇몇 분자에 대해 확인하였다. 히트 확인에 사용하였던 세포주와 동일한 세포주(CHO-PDL1 및 CHO-K1)를 사용하되, 단 scFv는 APC 표지화 단백질 L로써 검출하였다. 시험대상 분자 각각뿐 아니라, 기준인 아벨루맙의 일련의 희석액을 평판에 첨가하였다. 각각의 평판에 대한 개별 IC₅₀ 값을, 기준 분자인 아벨루맙의 (각각의 평판에 대해 취한) IC₅₀ 값에 대항하여 보정하였다(상대적 IC₅₀: IC₅₀, 아벨루맙/IC₅₀, 시험대상

scFv). 효능을 표 19에 요약하였다.

표 19

시험한 scFv의 세포성 PDL1에 대한 결합 효능 요약

클론 ID	단백질 ID	VH 틀	이식 전략	EC ₅₀ [ng/ml]	상대적 EC50 (EC ₅₀ , 아벨루마 /EC ₅₀ , scFv)	최대 결합 (Δ MFI; (MFI시험- MFI 대조군 ; (RFU)))	상대적 최대결합 (Max _{scFv} /Max _{아벨루마})
33-03-G02-sc01	PRO830	VH4	CDR	20.2	4.8	21455	0.48

[0382]

[0383] 5.6 종간 교차 반응성(SPR에 의해 분석되는, 사이노몰거스 원숭이 PDL1과 마우스 PDL1에 대한 결합)

[0384] 사이노몰거스 PDL1에 대한 교차 반응성을, 인간PDL1에 대한 결합을 측정하는데 사용된 검정과 유사한 검정에서 측정하였는데, 단 이때 Sino Biological에 의해 생산된 재조합 PDL1을 사용하였다. 표 20은 시험한 scFv 모두에 대하여 얻어진 친화성을 요약한 것이다. 시험한 scFv로서, 인간 PDL1에 대하여 결합능을 보였던 scFv 모두는 또한 사이노몰거스 PDL1에 대한 결합능도 보였다.

표 20

사이노몰거스 PDL1에 대한 scFv의 친화성

클론 ID	단백질 ID	VH 틀	이식 전략	k_a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	K_D [M]	이론상 Rmax에 대해 정규화한 결합 수준 (%)	
							$\frac{K_D, \text{사이노}}{K_D, \text{인진}}$	
33-03-G02-sc01	PRO830	VH4	CDR	2.46E+06	1.82E-04	7.40E-11	0.97	77.52
33-03-G02-sc02	PRO1066	VH3	CDR	측정되지 않음				
33-03-G02-sc03	PRO1183	VH4	전체	1.55E+06	1.82E-05	1.17E-11	< 5.58	65.4%
33-03-G02-sc18	PRO1392	VH4	돌연변이 감소	4.45E+06	8.87E-05	1.99E-11	2.00	70.3%
33-03-G02-sc19	PRO1393	VH4	돌연변이 감소	측정되지 않음				
37-20-B03-sc01	PRO997/PRO908	VH4	CDR	5.96E+06	< 1E-05	< 1.68E-12	< 0.28	79.4
37-20-B03-sc09	PRO1347	VH3	IF	6.88E+06	8.77E-05	1.27E-11	1.41	71.2%

[0385]

[0386] 5.7 PDL1 대 PDL2에 대한 선택성(SPR에 의한 분석)

[0387] 인간화 scFv를 대상으로 PDL2와의 결합에 대해 시험하여, T200 디바이스(Biacore, GE Healthcare)에서 SPR 분석법으로 분석하였다. 이 실험에서, Fc 태깅한 인간 PDL2를 인간 항체 포착 키트(GE healthcare)를 이용하여 포착하였다. 매 피분석물 주입 주기 이후, CM5 센서 칩을 재생하고 나서, 새로운 항원을 포착시켰다. scFv를 피분석물로서 5분 동안 주입하였는데, 이때의 농도는 전개 완충제 중 희석되어 180 nM로 만들었고, 단백질의 해리를

12분 동안 진행시켰다. 표 21에 나열된 시험 대상 인간화 scFv 모두에 있어 PDL2와의 결합은 관찰되지 않았다.

표 21

마우스 PDL1 및 PDL2와의결합에 대해 시험한 scFv(SPR에 의한 분석)

클론 ID	단백질 ID	VH 틀	이식 전략
33-03-G02-sc03	PRO1183	VH4	전체 돌연변이 감소 IF
33-03-G02-sc18	PRO1392	VH4	
37-20-B03-sc09	PRO1347	VH3	

[0388]

[0389]

실시예 6: 인간화 scFv의 생물물리학적 특성규명

[0390]

친화성이 아벨루마의 친화성보다 더 큰, 선택 도메인을 더 큰 규모(발현 부피 0.2L ~ 1.2 L)로 생산하였다. 또한, 원심분리농축관을 이용하여 단백질을 농축하여 10 mg/mL를 초과하도록 만들었는데, 단 이때 정제후 분자량 컷-오프(cut-off)는 5 kDa였다. 안정성 평가를 위한 재료들의 제조에 관하여 표 22에 편집 제시하였다.

[0391]

6.1 보관 안정성 연구

[0392]

인간화 scFv를 대상으로 안정성 연구, 예컨대 4주간 안정성 연구를 수행하였는데, 즉 scFv를 수성 완충제(최종 완충제, 50 mM NaCl, 150 mM NaCl, pH6.4)중에 제제화하여 10 mg/ml로 만들고, 이를 -80℃ 미만, 4℃ 및 40℃에 4주 동안 보관하여 두었다. 최저한도에서, 1주 경과후, 2주 경과후, 그리고 각 연구의 막바지에 SE-HPLC 피크 면적을 통합함으로써 제제중 단량체 및 올리고머 분율을 평가하였다. 분자 몇몇에 대해서는 추가의 시점을 기록하였다. 표 23은 본 연구의 7일차에서의 측정치와, 28일차에 얻은 종말점 측정치를 비교한 것이다.

표 22

안정성 연구를 위한 도메인 제조

클론 ID	단백질 ID	들	발현 부피 [mL]	CaptoL 후 포획후 수득량 [mg]	SEC 정제 수령여부	최종 수득량 [mg]	발현시 1L당 최종 수득량 [mg/L]	순도 SE-HPLC [단량체%]	T _m [°C]	10 mg/mL 인대 단량체 함량 [단량체%]	농축시 단량체 감소율 [%]
33-03-G02-sc01	PRO830*	VH4	300	2.0	6.7	2.0	6.7	99.0	80.0	98.3	-0.7
33-03-G02-sc02	PRO1066	VH3	300	0.8	2.8	1.4	9.1	99.0	NA	92.7	-6.4
33-03-G02-sc03	PRO1183	VH4	1200	16.9	14.1	4.0	3.3	100.0	NA	99.7	-0.3
33-03-G02-sc18	PRO1392	VH4	200	9.3	46.7	7.4	37.2	97.0	72.4	97.4	0.4
37-20-B03-sc01	PRO908*	VH4	1200	18.6	15.5	5.3	4.4	89.0	NA	75.4	-15.3
37-20-B03-sc09	PRO1347	VH3	200	8.0	38.9	2.3	11.5	98.1	74.8	98.5	0.4

* 세균 발현

표 23

선택된 도메인의 4주간 안정성 연구

클론 ID	단백질 ID	온도 [°C]	단량체 함량 [%]			단량체 함량 감소율 [%]			단백질 농도 [mg/ml]			단백질 함량 감소율 [%]		
			당일	7일차	28일차	7일차	28일차	28일차	당일	7일차	28일차	7일차	28일차	28일차
33-03-G02-sc01	PRO630	-80	98.3	98.5	98.4	-0.2	-0.1		10.5	12.0	11.4	-14.2		-9.2
		4	98.3	97.9	96.8	0.4	1.6		10.5	12.4	12.0	-18.6		-14.5
		40	98.3	93.3	84.9	5.0	13.6		10.5	10.4	11.6	0.6		-10.6
33-03-G02-sc02	PRO1066	-80	NA	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA		NA
		4	92.7	81.7	77.7	11.9	16.2		10.7	10.9	11.7	-1.7		-9.2
		40	92.7	84.5	NA	8.8	100.0		10.7	10.4	NA	2.7		100.0
33-03-G02-sc03	PRO1183	-80	99.7	NA	99.4	NA	0.3		20.6	20.8	21.1	NA		-2.6
		4	99.7	NA	87.9	NA	11.8		20.6	20.8	21.0	NA		-1.9
		40	99.7	NA	71.0	NA	28.8		20.6	21.0	22.0	NA		-7.1
33-03-G02-sc18	PRO1392	-80	97.4	97.4	97.2	0.0	0.2		10.6	9.4	11.0	11.7		-3.9
		4	97.4	97.1	96.9	0.2	0.5		10.6	10.7	10.7	-0.9		-1.3
		40	97.4	94.2	84.7	3.2	13.0		10.6	10.7	11.2	-0.8		-5.9
37-20-B03-sc01	PRO906	-80	75.4	74.4	73.5	1.4	2.5		10.4	10.3	9.9	1.1		4.8
		4	75.4	74.1	73.8	1.7	2.1		10.4	9.9	9.9	4.9		4.7
		40	75.4	75.4	73.2	0.0	3.0		10.4	11.5	11.4	-11.0		-9.6
37-20-B03-sc02	PRO1013	-80	90.5	88.2	85.5	2.6	5.5		10.1	12.2	10.3	-21.0		-1.5
		4	90.5	78.8	76.9	12.9	15.0		10.1	13.3	10.7	-31.3		-5.8
		40	90.5	79.7	79.4	12.0	12.3		10.1	14.7	12.8	-45.1		-26.1
37-20-B03-sc09	PRO1347	-80	NA	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA		NA
		4	98.5	97.1	94.6	1.4	4.0		10.6	11.4	11.5	-7.6		-8.0
		40	98.5	83.1	75.6	15.6	23.3		10.6	11.9	11.7	-12.1		-10.0

6.2 동결-해동시 안정성 연구

전술한 보관 안정성 연구에 더하여, 효능이 최고인 scFv 분자의 동결-해동(F/T) 주기에 관한 양립가능성(콜로이드 안정성)을 평가하였다. F/T 안정성 평가를 위해 동일한 분석 방법과 매개변수(단량체 함량% 및 단량체 소실%)를 보관 안정성 연구(SE-HPLC, SDS-PAGE)에 대해 적용하여, 분자의 품질을 5회의 F/T 주기에 걸쳐 모니터링하였다. 표 24는, 5회 반복 진행되는 F/T 주기에 걸친 단량체 함량 감소% 과정을 제시한다. 전용의 동결-해동 연구를 수행하지 않았던 관계로, -80℃의 시료를 사용하여 보관 안정성 연구로부터 얻은 동결-해동 데이터(28일에 걸쳐 획득)를 하기 그래프에 보였다. F/T 주기의 반복 진행 후 분자들 중 그 어느 것도 단량체 함량이 4% 초과하여 감소하지 않았다.

표 24

F/T 안정성 - 반복적 동결/해동시 단량체 감소율(%)								
클론 ID	이식전략	물	PRO ID	F/T-1*	F/T-2*	F/T-3*	F/T-4*	F/T-5*
37-20-B03-sc01	CDR	VH4	PRO908	-0.8	-1.0	-1.1	-0.4	-1.9
33-03-G02-sc03	전체	VH4	PRO1183	-0.1	-0.4	-0.3	-0.4	-0.3
33-03-G02-sc18	PRO1183 (최적화)	VH4	PRO1392	-0.1	0.0	0.0	-0.2	-0.2
33-03-G02-sc01	CDR	VH4	PRO830	0.2	0.1	0.1	NA	NA
* X회차 F/T 주기기 단량체 감소율(%)								
NA: 평가되지 않음								

6.3 열 언폴딩

선택 scFv 구조체의 DSF 측정에서 얻은 열 언폴딩 데이터를 표 25에 보였다. 이때 얻어진 T_m 값은 데이터를 볼츠만(Boltzmann) 방정식에 피팅함으로써 확정되었다. 표 25는 DSF에 의해 측정함으로써 추산되는 용융 온도를 요약한 것이다.

표 25

성공 기준에 부합하는 도메인의 DSF

클론 ID	단백질 ID	T _m [°C]	개시시 T [°C]
33-03-G02-sc02	PRO1066	NA	NA
33-03-G02-sc18	PRO1392	72.40	67.00
37-20-B03-sc01	PRO997	64.39	59.00
37-20-B03-sc09	PRO1347	74.85	67.33
NA: 평가되지 않음, ND: 확정 불가			

본 발명의 항체를 포함하는 예시적 다중 특이적 분자는 표 3에 포함되어 있다.

실시예 7: PDL1, CD137, HSA 및 MSA에 대한 친화성

방법:

Biacore T200 디바이스(GE Healthcare)를 사용하는 SPR 측정에 의해 상이한 종의 PDL에 대한 친화성을 확정하였다. 아민 커플링에 의해 센서 칩(CM5 센서 칩, GE Healthcare) 상에 인간 IgG의 Fc 영역에 특이적인 항체를 부동화하였다. Fc 함유 Morrison 포맷을 제외하고 모든 포맷에 대해, 상이한 종으로부터 유래하는 PDL1-Fc 키메라 단백질을 부동화 항체에 의해 포착하였다. PDL1에 특이적인 분자의 3배 연속 희석액(0.12 nM ~ 90 nM)을 3분 동안 유동 세포에 주입하고, 10분 동안 해리 여부를 모니터링하였다. 매 주입 주기 후, 3 M MgCl₂ 용액을 1회 주입

하여 표면을 재생시켰다. 겔보기 해리 속도 상수(kd) 및 겔보기 결합 속도 상수(ka)와, 겔보기 해리 평형 상수(KD)를 1:1 랑뮈르 결합 모델을 이용하여 산정하였다. 상이한 종으로부터 유래한 CD137-Fc 키메라 단백질을 부동화한 항체로 포착하였다는 점을 제외하고 PDL1에 대한 조건과 동일한 조건을 적용하여 상이한 종의 CD137에 대한 친화성을 확정하였다.

[0405] Fc 함유 포맷을 인간 IgG의 Fc 영역에 특이적인 항체로 직접 포착하였다. PDL1 세포의 도메인 또는 CD137 세포의 도메인의 2배 연속 희석액(90 nM ~ 0.35 nM)을, 바이오센서 칩상에 포착된 IgG와의 결합에 대해 시험하였다. 매 주입 주기 후, 3 M MgCl₂ 용액을 1회 주입하여 표면을 재생시켰다.

[0406] Biacore T200 디바이스(GE Healthcare)를 사용하는 SPR 측정에 의해 상이한 종의 혈청 알부민(SA)에 대한 분자의 친화성을 확정하였다. 아민 커플링 화학을 이용하여 SA를 CM5 센서 칩(GE Healthcare)에 직접 커플링시켰다. 재생 스카우팅(regeneration scouting) 및 표면 성능 시험을 수행하여 최고의 검정 조건을 확인한 후 용량 반응을 측정하고, 이때 얻어진 결합 곡선을 이중 참조하였으며(공 기준 채널(empty reference channel) 및 제로 피 분석물 주입), 1:1 랑뮈르 결합 모델을 이용하여 피팅함으로써 역학적 매개변수를 검색하였다. 1 X PBS-Tween 완충제(pH 5.5)에서 검정을 진행하였다.

[0407] 결과:

[0408] 인간화 구조체에 대한 결합 역학의 측정은, 클론 33-03-G02의 CDR과 구조적 이식편(STR)을 비교하였을 때, PDL1에 대한 결합 친화성에 차이가 있었을 보여주었고, STR 이식편은 동일 클론의 CDR 이식편과 비교하였을 때 친화성이 20배 개선되었음을 보였다(표 26의 PR0885 대 PR01126). 클론 37-20-B03 유래 CDR 이식편(PR0997)은, 클론 33-03-G02의 STR 이식편과 비교되었을 때 대략적으로 2배 더 큰 친화성을 보였다. 33-03-G02의 CDR 이식편에 대한 결합 친화성은, 이것이 상이한 다중 특이적 포맷으로 합하여졌을 때, 모 scFv의 결합 친화성과 유사하게 되었다 (PR0830과, PR0885, PR0951, PR01123, PR01124, PR0963, PR0966, PR01057, PR01058, PR01059 및 PR01060 비교, 표 26). 두 클론으로부터 유래한 scFv는 인간 PDL1 및 사이노몰거스 원숭이 PDL1에 대하여 거의 동일한 친화성을 보였다(표 26의 PR0977 및 PR0830 참조).

표 26

상이한 종의 PDL1, CD137 및 혈청알부민에 대한 상이한 포맷들의 친화성									
인간PD-L1에 대한 친화성 시이노들거스 PD-L1에 대한 인간CD137에 대한 친화성 친화성									
PRO ID	클론 ID PD-L1	클론 ID CD137	클론 ID SA	포맷	K_D (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_D (M)	K_D (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_D (M)	K_D (M ⁻¹ s ⁻¹)
PRO885	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	sc0b	2.1E+06	1.4E-04	6.5E-11	ND	2.4E+05
PRO951	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	sc0b	2.2E+06	1.5E-04	7.0E-11	ND	1.5E+06
PRO1123	33-03-G02 CDR	38-02-A04 IF	NA	sc0b	2.3E+06	1.7E-04	7.5E-11	ND	6.3E-03
PRO1124	33-03-G02 CDR	38-02-A04 STR	NA	sc0b	3.1E+06	2.0E-04	6.7E-11	ND	2.7E-04
PRO1125	33-03-G02 IF	38-02-A04 CDR	NA	sc0b	1.7E+06	1.1E-04	6.7E-11	ND	6.8E+05
PRO1126	33-03-G02 STR	38-02-A04 CDR	NA	sc0b	2.8E+06	<1.0E-05	3.5E-12	ND	<1.0E-05
PRO1134	33-03-G02 STR2, VHB	38-02-A04 CDR	NA	sc0b	2.8E+06	7.6E-05	2.8E-11	ND	7.5E-04
PRO963	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	19-01-H04 STR	sc0b-scFv	2.0E+06	1.3E-04	6.6E-11	ND	8.4E-04
PRO966	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	19-01-H04 STR	sc0b-scFv	1.6E+06	1.4E-04	8.3E-11	ND	6.2E-04
PRO1057	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	23-13-A01 STR	sc0b-scFv	1.6E+06	1.7E-04	1.1E-10	ND	2.2E-03
PRO1058	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	23-13-A01 STR	sc0b-scFv	1.2E+06	1.9E-04	1.6E-10	ND	7.0E-04
PRO1059	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-L	1.2E+06	6.5E-05	5.6E-11	ND	2.1E+06
PRO1060	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-H	1.3E+06	4.6E-05	3.6E-11	ND	3.9E-04
PRO1061	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	Morrison-L	ND	ND	ND	ND	ND
PRO1062	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	Morrison-H	1.3E+06	5.0E-05	3.8E-11	ND	ND
PRO997	37-20-B03 CDR	NA	NA	scFv	5.9E+06	<1.0E-05	1.7E-12	6.0E+06	5.0E-04
PRO1013	37-20-B03 CDR, WH1	NA	NA	scFv	6.0E+06	2.7E-04	4.5E-11	5.9E+06	7.1E-04
PRO830	33-03-G02 CDR	NA	NA	scFv	2.1E+06	1.6E-04	7.6E-11	2.2E+06	5.4E-04
PRO1186	37-20-B03 sc01	38-02-A04 sc01	23-13-A01 sc03	sc0b-scFv	6.2E+06	2.3E-05	3.7E-12	TBD	1.9E+05
PRO1430	37-20-B03 sc01	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	sc0b-scFv	5.3E+06	2.4E-05	4.5E-12	TBD	4.6E+05
PRO1479	37-20-B03 sc05.1	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	sc0b-scFv	4.2E+06	3.9E-05	9.2E-12	TBD	3.3E+05
PRO1482	37-20-B03 sc06.1	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	sc0b-scFv	3.4E+06	3.3E-05	9.8E-12	TBD	3.2E+05
PRO1431	33-03-G02 sc18	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	sc0b-scFv	3.3E+06	4.5E-05	1.4E-11	ND	4.5E+05
PRO1473	33-03-G02 sc03	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	sc0b-scFv	3.6E+06	2.9E-05	8.2E-12	ND	3.1E+05
PRO1476	33-03-G02 sc08	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	sc0b-scFv	3.4E+06	3.1E-05	9.0E-12	ND	3.5E+05
PRO1432	33-03-G02 sc18	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	sc0b-scFv	4.2E+06	4.4E-05	1.1E-11	ND	6.0E+05
NA: 적용 불가		TBD: 확정 대상		NB: 유의미한 결합이 일어나지 않음		ND: 확정되지 않음			

상이한 종의 PDL1, CD137 및 혈청알부민에 대한 상이한 포맷들의 친화성

사이노물거스 CD137에대한 친화성				마우스 CD137에대한 친화성				인간 SA에 대한 친화성			
PRO ID	k_s ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (M)	k_s ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (M)	k_s ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (M)	k_s ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})
PRO885	3.4E+05	7.0E-04	2.1E-09	2.9E+05	1.8E-01	6.0E-07	NA	NA	NA	NA	NA
PRO951	1.5E+06	1.0E-02	6.9E-09	NB	NB	NB	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1123	2.6E+05	3.3E-04	1.3E-09	6.5E+04	2.7E-02	4.1E-07	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1124	5.6E+05	3.3E-04	5.9E-10	2.0E+05	2.2E-03	1.1E-08	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1125	ND	ND	ND	5.4E+05	2.7E-01	5.1E-07	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1126	ND	ND	ND	NB	NB	NB	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1134	ND	ND	ND	4.5E+05	1.9E-01	4.2E-07	NA	NA	NA	NA	NA
PRO963	ND	ND	ND	NB	NB	NB	1.1E+05	3.0E-04	2.8E-09	NB	NB
PRO966	ND	ND	ND	5.1E+03	1.0E-03	2.0E-07	ND	ND	ND	NA	NA
PRO1057	1.6E+05	7.9E-04	4.8E-09	6.9E+04	8.5E-02	1.2E-06	2.4E+05	6.7E-04	2.8E-09	1.3E+05	8.5E-03
PRO1058	ND	ND	ND	1.1E+06	7.5E-04	7.0E-10	ND	ND	ND	ND	ND
PRO1059	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1060	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1061	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1062	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA
PRO997	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1013	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO830	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1186	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	2.5E+05	7.2E-04	2.9E-09	2.2E+05	9.5E-03
PRO1430	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	TBD	TBD	TBD	NA	NA
PRO1479	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	TBD	TBD	TBD	NA	NA
PRO1482	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	TBD	TBD	TBD	NA	NA
PRO1431	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA
PRO1473	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA
PRO1476	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA
PRO1432	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA

실시예 8: PDL1 및 TCR 활성 인자의 분자를 발현하는 CHO 세포와, PD-1을 발현하고, NFAT 반응 요소의 제어하에 있는 루시퍼라아제 유전자를 함유하는 Jurkat 세포를 사용하는 세포 기반 리포터 유전자 검정에서, PDL1/PD-1 상호작용의 차단

방법

생물발광 리포터 유전자 검정에서, NFAT(활성화 T 세포의 핵내 인자)-루시퍼라아제 리포터 및 인간 PD-1을 안정적으로 발현하도록 조작한 Jurkat T 세포를 효과기 T 세포로 삼았다. 인간 PDL1과 T 세포 수용체(TCR) 활성 인자를 안정적으로 발현하는 세포는 항원 제시 세포로서 역할을 하였다. 상기 세포주 2개를 공동 배양하였을 때, TCR 활성 인자/TCR 복합체의 가교를 통해 Jurkat NFAT 경로의 활성화가 유도되었다. PDL1 발현 세포의 점유가 이루어졌을 때, PD-1 효과기 T 세포에서의 PD-1 신호전달은 T 세포 기능을 억제하였고, NFAT 경로 억제를 초래하였다. PD-1 및 PDL1 수용체 상호작용의 차단은 NFAT 경로의 재활성을 유도하였다.

세포 배양 배지(DMEM/F12, 10% FCS) 100 μ l 중 35,000개의 CHO/PDL1/TCR 활성 인자 세포(BPS Bioscience)를, 백색의 세포 배양 평판 내벽에 첨가하고 나서, 37℃ 및 5% CO₂에서 16시간 ~ 20시간 동안 항온처리하였다. 다음 날, 세포 배양 배지 95 μ l를 각각의 웰로부터 제거하고, 시험대상인 각각의 분자 2배 농축 연속 희석액 50 μ

1(3000 ng/ml ~ 0.46 ng/ml)(기준인 아벨루맵 포함)를 첨가하였다. 그 다음, 검정 완충제(10% FCS 포함 RPMI1640) 중 400,000개 세포/ml로 희석한, PD-1 발현 효과기 Jurkat 세포(BPS Bioscience) 50 μ l를 각각의 웰에 첨가한 후, 평판을 37°C 및 5% CO₂에서 6시간 동안 항온처리하였다. 마지막으로 제조자의 프로토콜에 따라 제조한 루시퍼라아제 기질(BPS Bioscience) 50 μ l를 각각의 웰에 첨가하고, 평판을 암실에서 30분 동안 항온처리한 후, Topcount를 사용하여 발광도를 측정하였다.

[0415] 결과

[0416] CDR 세트 및 틀 선택이 PDL1/PD-1 결합을 중화시키는 효능에 미치는 영향력을 평가하기 위해, NFAT 리포터 유전자 세포 기반 검정을 통해 항 PDL1 scFv 3개를 시험하였다. PRO830은 VH4 틀에 이식된 클론 33-03-G02의 CDR 세트를 포함하였고, PRO997 및 PRO1013은 VH4 틀 또는 VH1 틀 중 어느 하나에 각각 이식된 클론 37-20-B03의 CDR 세트를 포함하였다. PRO830은 시험한 scFv 3개의 효능보다 더 작은 효능을 보였고, IC₅₀ 값은 42.88 ng/ml이었으며, 아벨루맵(IC₅₀ 값 34.09 ng/ml)의 효능과 유사한 효능을 보였다. PRO997은 가장 강력한 분자였다. CDR 세트가 VH4 틀에 이식되었을 때 이 CDR 세트의 효능은, CDR 세트가 VH1 틀에 이식되었을 때보다 약 2배 더 컸다. IC₅₀ 값은 각각 11.12 ng/ml 및 21.29 ng/ml였다(도 4a 및 표 27 참조).

[0417] (CDR 이식편) 도메인 최적화 이전과 (구조적 이식편) 도메인 최적화 이후에 PD-1과 PDL1의 결합 중화 효능을, 33-03-G02 PDL1 도메인을 보유하는 2중 특이적 분자에 대해 확정하였다. CDR 이식편(PRO885)을 구조적 이식편(PRO1126)과 비교하였다. 도메인 최적화는 중화 효능을 3 팩터(factor)만큼 개선하여, PRO885에 대한 IC₅₀ 값은 137.2 ng/ml였고, PRO1126에 대한 IC₅₀ 값은 48.15 ng/ml였다(도 4b 및 표 27).

[0418] 클론 33-03-G02의 CDR 이식편 항 PDL1 도메인과, 2개의 상이한 인간 혈청 알부민 결합 도메인을 보유하는 3중 특이적 분자 2개를 대상으로, 연장된 반감기 동안 PDL1/PD-1 상호작용을 중화하는 효능도 또한 평가하였다. PRO1057의 HSA 도메인은 또한 결합 마우스 혈청 알부민이다. 25 mg/ml의 HSA 존재하에 실험을 수행하였다. 중화 효능(IC₅₀ = 665.1 ng/ml)은, 아벨루맵에 대한 경우보다 더 작았다(도 5 및 표 27).

표 27

NFAT 리포터 유전자 검정에 있어 PDL1/PD-1 상호작용의 증화

PRO ID	클론 ID PD-L1	클론 ID CD137	클론 ID SA	포맷	NFAT 효능 검정에 있어 PD-L1의 증화		
					IC ₅₀ (ng/ml)	상대적 IC ₅₀ [*]	HSA
PRO885	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	scDb	137.20	0.28	아니오
PRO951	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	scDb	88.50	0.47	아니오
PRO963	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	19-01-H04 STR	scDb-scFv	274.80	0.25	예
PRO1057	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	23-13-A01 STR	scDb-scFv	665.10	0.10	예
PRO1059	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-L	93.76	0.52	아니오
PRO1060	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-H	132.70	0.44	아니오
PRO1062	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	Morrison-H	96.55	0.68	아니오
PRO997	37-20-B03 CDR	NA	NA	scFv	11.12	3.07	아니오
PRO1013	37-20-B03 CDR, VH1	NA	NA	scFv	21.29	1.60	아니오
PRO830	33-03-G02 CDR	NA	NA	scFv	42.88	0.73	아니오
PRO1186	37-20-B03 sc01	38-02-A04 sc01	23-13-A01 sc03	scDb-scFv	10.17	2.31	예
PRO1430	37-20-B03 sc01	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	16.19	1.45	예
PRO1479	37-20-B03 sc09.1	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	50.36	1.04	예
PRO1482	37-20-B03 sc09.1	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	54.79	0.68	예
PRO1431	33-03-G02 sc18	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	9.83	3.73	예
PRO1473	33-03-G02 sc03	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	35.17	1.11	예
PRO1476	33-03-G02 sc03	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	53.53	0.66	예
PRO1432	33-03-G02 sc18	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	18.51	1.98	예

NA: 적용 불가

* : IC₅₀, 아벨루맵 (ng/ml)/IC₅₀, 시험분자 (ng/ml)

[0419]

[0420]

혈청 중 소위 Morrison 포맷이라 칭하여지는 포맷을 세포 기반 효능 리포터 유전자 검정을 통해 시험하였다. 이 포맷에서 특이성 1개는 IgG 단(2가)에 의해 운반되었고, 제2 표적에 대한 특이성을 가지는 scFv 2개는 가요성 펩티드 링커에 의해 IgG의 중쇄(HC) 또는 경쇄(LC) 중 어느 하나에 결합되었다. 시험한 Morrison 분자 모두는 IgG 팔 둘 다에 클론 33-03-G02의 CDR 이식편의 항 PDL1 도메인을 운반하였다. 구조체 2개, 즉 PRO1059 및 PRO1060은 중쇄(HC) 또는 경쇄(LC) 중 어느 하나에 항 CD137 scFv를 융합함으로써 차이를 보였다. PRO1062는 상이한 CD137 도메인을 가지는 PRO1060의 아키텍처(architecture)와 동일한 아키텍처를 가졌다. 모든 분자의 증화 효능은 유사하였다(도 6 및 표 27).

[0421]

실시예 9: PDL1과, PD-1 및 B7-1의 상호작용 차단(경쟁 ELISA를 이용한 분석)

[0422]

본 검정은 PDL1 억제제가 PDL1 및 PD-1 사이, 또는 PDL1 및 B.71 사이의 상호작용을 차단하는 능력을 평가하기 위해 수행하였다. scFv, scDb, scDb-scFv 및 Morrison을 비롯한 상이한 포맷을 경쟁 ELISA를 통해 분석하여, 기준 IgG인 아벨루맵과 비교하였다.

[0423]

PDL1/PD-1 경쟁 ELISA

[0424]

ELISA 미세평판을 4°C에서 밤새도록 4 µg/ml 인간 PD-1로 코팅한 다음, 웰당 세척 완충제 450 µl로 3회 세척하였다. 1% BSA 및 0.2% Tween 포함 PBS(희석 완충제) 300 µl를 각각의 웰에 첨가하여 평판을 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 억제제를 3단계로 연속 희석하여, 1 ng/ml 바이오틴화 인간 PDL1 함유 희석 완충제 중 최종 농도를 300 ng/ml ~ 0.005 ng/ml로 만들었다. 이 혼합물을 실온에서 1시간 동안 예비 항온처리한 다음(단 이때 회전 믹서(21 rpm)에 의해 느린 진탕이 행하여짐), 웰당 세척 완충제 450 µl를 사용하여 세척 주기를 3회 진행

하고 나서 이 혼합물을 미세평판에 첨가하였다. 평판을 실온에서 1.5시간 동안 항온처리한 다음(단 이때 느린 진탕이 행하여짐), 웰당 세척 완충제 450 μ l를 사용하여 3회 세척하고 나서, 각각의 미세평판 웰에 10 ng/ml의 스트렙타비딘-폴리HRP40을 첨가하였다. RT에서 1시간 동안 항온처리한 다음, 평판을 세척 완충제 450 μ l로 3회 세척한 후, 여기에 TMB 기질 용액을 첨가하였다. 6분 후 1M HCl을 첨가하여 효소 반응을 중단시켰고, 기준 파장을 690 nm로 삼아 450 nm에서 평판을 판독하였다. IC₅₀ 값을 산정하기 위해, Graph Pad Prism으로 4 매개변수 로지스틱(4PL) 곡선 피팅을 수행하였다(기준 공제값 적용).

[0425] 도 7과 표 28에 도시 및 제시한 바와 같이, PDL1 억제제 모두는 경쟁 ELISA에서 시험되었을 때, PD-1과 PDL1의 상호작용을 차단하였다. scFv PRO830은 유사한 효능으로 상호작용을 차단하였던 반면에, PRO997 및 PRO1013은 아벨루마브의 IC₅₀ 값보다 유의미하게 더 낮은 IC₅₀ 값을 보였으므로, 더욱 효능이 큰 억제제였다. 분자들이 다중 특이적 포맷(즉 scDb 또는 Morrison)으로 합하여질 때, 이 분자들 모두는 자체의 억제 특성을 그대로 가졌다. PRO885는 아벨루마브보다 그 효능이 더 작았던 반면에, 개선된 항 PDL1 도메인을 포함하는 PRO1126은 IC₅₀ 값이 더 작은 것으로 확인되었다. Morrison 포맷은 그 효능이 아벨루마브의 효능과 비교하였을 때 약간 더 작았다. PRO1057의 중화 효과도 또한 인간 형질 알부민의 존재하에 보였는데, 이 경우 IC₅₀ 값은 거의 2배 더 컸다.

[0426] PDL1/B7-1 경쟁 ELISA

[0427] 4 μ g/ml 인간 B7-1로 4℃에서 밤새 코팅한 ELISA 미세평판을, 웰당 450 μ l 세척 완충제로 3회 세척하였다. 1% BSA 및 0.2% Tween 포함 PBS(희석 완충제) 300 μ l를 각각의 웰에 첨가하여 평판을 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 억제제를 3단계로 연속 희석하여, 40 ng/ml 바이오틴화 PDL1 함유 희석 완충제 중 최종 농도를 900 ng/ml ~ 0.015 ng/ml로 만들었다. 이 혼합물을 실온에서 1시간 동안 예비 항온처리한 다음(단 이때 회전 믹서(21 rpm)에 의해 느린 진탕이 행하여짐), 웰당 세척 완충제 450 μ l를 사용하여 세척 주기를 3회 진행하고 나서 이 혼합물을 미세평판에 첨가하였다. 평판을 실온에서 1.5시간 동안 항온처리한 다음(단 이때 느린 진탕이 행하여짐), 웰당 세척 완충제 450 μ l를 사용하여 3회 세척한 다음 각각의 미세평판 웰에 10 ng/ml의 스트렙타비딘-폴리HRP40을 첨가하였다. RT에서 1시간 동안 항온처리한 다음, 평판을 세척 완충제 450 μ l로 3회 세척한 후, 여기에 TMB 기질 용액을 첨가하였다. 6분 후 1M HCl을 첨가하여 효소 반응을 중단시켰고, 기준 파장을 690 nm로 삼아 450 nm에서 평판을 판독하였다. IC₅₀ 값을 산정하기 위해, Graph Pad Prism으로 4 매개변수 로지스틱(4PL) 곡선 피팅을 수행하였다(기준 공제값 적용).

[0428] PRO1126을 제외하고 모든 PDL1 억제제들을 대상으로도 이것들이 또한 PD-1과 B7-1의 상호작용을 차단하는 능력을 시험하였다. PRO830은 아벨루마브의 효능과 유사한 효능을 보였던 반면에, PRO997 및 PRO1013의 경우에는 더 작은 IC₅₀ 값이 확정되었다. scDb 및 Morrison 모두는 또한 PDL1 및 B.7-1 사이의 상호작용을 억제하였다. scDb PRO885는 아벨루마브의 효능과 유사한 효능을 보였던 반면에, Morrison의 IC₅₀ 값은 약 2배 ~ 약 3.4배 더 작았다. 도 8과 표 28에 데이터를 보였다.

표 28

PDL1과 PD-1 및 B7-1의 상호작용 차단(경쟁 ELISA를 사용한 분석)

PRO ID	클론 ID PD-1	클론 ID CD137	클론 ID SA	포뮬	PD-1/PD-1 상호작용 차단 PD-1/B7.1 상호작용 차단		
					IC ₅₀ (ng/ml)	IC ₅₀ (ng/ml)	IC ₅₀ (ng/ml)
PRO885	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	scDb	8.35	0.17	12.2
PRO951	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	scDb	9.30	0.15	9.30
PRO1126	33-03-G02 STR	38-02-A04 CDR	NA	scDb	1.28	1.59	TBD
PRO1057	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	23-13-A01 STR	scDb-scFv	8.61	0.20	16.29
PRO1059	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-L	4.54	0.37	28.98
PRO1060	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-H	5.67	0.30	17.42
PRO1062	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	Morrison-H	11.33	0.32	19.53
PRO997	37-20-B03 CDR	NA	NA	scFv	0.50	4.16	6.359
PRO1013	37-20-B03 CDR, VH1	NA	NA	scFv	0.57	3.67	4.05
PRO830	33-03-G02 CDR	NA	NA	scFv	3.40	0.61	12.87
PRO1186	37-20-B03 sc01	38-02-A04 sc01	23-13-A01 sc03	scDb-scFv	1.74	1.26	7.81
PRO1430	37-20-B03 sc01	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	1.92	0.73	2.42
PRO1479	37-20-B03 sc09.1	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	2.65	0.86	10.71
PRO1482	37-20-B03 sc09.1	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	1.78	1.24	8.18
PRO1431	33-03-G02 sc18	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	2.75	0.51	3.31
PRO1473	33-03-G02 sc03	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	4.14	0.56	8.89
PRO1476	33-03-G02 sc03	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	2.84	0.80	9.49
PRO1432	33-03-G02 sc18	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	3.26	0.43	2.83

NA: 반응 없음

* : IC_{50, 50% 억제} (ng/ml)/IC_{50, 100% 억제} (ng/ml)

[0429]

[0430]

실시예 10: 초항원 SEA로 자극된 인간 PBMC를 사용하는 세포 기반 검정에서 수반성 PDL1 차단 및 CD137 자극에 대한 자극 효과 평가

[0431]

이 실험에서 PD-1/PDL1 억제제의 상승 효과와 CD137의 효현작용을 평가하였다. 본 검정은 초항원 스타필로코커스 장내독소 A(SEA)로 자극한 말초혈액단핵세포(PBMC)를 사용하여, 항원 제시 세포(APC) 및 T 세포 각각에서의 PDL1 발현과 T 세포에서의 CD137 발현을 유도하였다. 항 PDL1xCD137 분자들을 적용하여 T 세포 조절 신호전달 경로 2가지, 즉 억제 PD-1/PDL1 경로의 억제, 그리고 2중 특이적 항 PDL1xCD137 분자(PRO885)에 의해 매개되는 면역학적 시냅스 형성을 통한 CD137 경로의 활성화를 수반하여 표적화하였다. 인터루킨-2(IL-2)의 분비를 통해 T 세포의 활성화를 평가하여, 벤치마킹 기준 항체 아벨루맵에 의해 매개되는 PDL1 억제에 의해 매개되는 효과와 비교하였다. 이에 더하여, 동일한 실험 조건에서 항 PDL1 scFv인 PRO997을 시험하여, 아벨루맵과 비교하였다.

[0432]

새로 마련한 인간의 전혈로부터 말초혈액단핵세포(PBMC)를 밀도 구배 원심분리에 의해 분리하였다. 그 다음, 항 CD56 항체 및 MACS 세포 분리 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 PBMC를 NK 세포에 대해 감소(depletion)시켰다. 이후 PBMC를 웰당 100,000개씩 96웰 평판에 첨가하고 나서, 여기에 SEA를 농도 10 ng/ml로 함유하는 검정

완충제 중 PRO885, PRO997 및 아벨루맵의 연속 희석액을 첨가하였다. 37℃ 및 5% CO₂에서 96시간 동안 항온처리 한 다음, 세포의 상청액을 수집하여, 배양 상청액 중 인간 인터루킨-2(IL-2) 수준을, 키트 지침에 따라 IL-2 인간 ELISA MAX 검정(BioLegend)을 이용하여 정량하였다. IL-2 농도를, IL-2 표준 곡선으로부터 내삽하여, 다시 역산정하고, 아벨루맵 및 PRO885 농도에 대해 그래프를 작성하여 EC₅₀ 값을 산정하였다.

[0433] 도 9에 보인 바와 같이, 2중 특이적 분자인 PRO885를 첨가하여 PD-1/PDL1 상호작용의 수반적 차단과 CD137 억제 를 일으킨 후 T 세포에 의해 IL-2를 분비시켰다. 아벨루맵의 경우와 비교하였을 때, PRO885는 더 큰 T 세포 활 성화와 더 우수한 효능을 보였다(PRO885, EC₅₀ = 39.92 ng/ml; 아벨루맵, EC₅₀ = 69.89 ng/ml; 표 29). 이러한 관찰 결과는, 2중 특이적 항 PDL1xCD137 scDb PRO885가, 아벨루맵에 의한 순수한 PDL1 차단보다 더욱 강력하게 T 세포 자극을 유도할 수 있음을 입증해준다. 게다가, 고 친화성 항 PDL1 scFv PRO997은 T 세포 자극에 있어 아 벨루맵보다 그 효능이 더 큰 것으로 확인되었다(PRO997, EC₅₀ = 40.86 ng/ml; 아벨루맵, EC₅₀ = 90.18 ng/ml, 표 29).

표 29

PBMC 검정에 있어 PRO885 및 PRO997의 EC50 값(SEA 자극 이용)

	아벨루맵	PRO885		아벨루맵	PRO997
최저	2479	7463	최저	2117	3226
최고	8687	20663	최고	8588	9480
EC50 (ng/ml)	69.89	39.92	EC50 (ng/ml)	90.18	40.86
R 제곱	0.8589	0.9052	R 제곱	0.8783	0.867

[0434]

[0435] 실시예 11: 인간 세포주 유래 폐암 이종이식체 모델 HCC827에 있어 항PDL1 항체의 항 종양 효능 평가

[0436] 항 PDL1 IgG1 항체 PRO1137(서열 번호 90 및 91)의 항 종양 활성을, 면역결핍 NOG 마우스 변종(Taconic) 및 동 종이계 인간 말초혈액단핵세포를 이용하여 인간 HCC827 NSCLC 이종이식체에서 평가하였다. 이식한 인간 T 림프 구는 외래 주조직접합성(MHC) I군 항원 및 II군 항원과 마우스 세포로부터 유래한 기타 항원에 대해 이종 반응 성(xeno-reactivity)을 보였다. 결과적으로 T 림프구는 상이한 장기에서 염증 침습을 일으켰으며, 이로 말미암 아 수 주후 동물은 폐사하였다(이 과정은 이종이식편 대 숙주병(xGVHD)이라 공지됨). 면역조절성 항체, 예컨대 항 PDL1 및 항 CD137 처리는 xGVHD를 악화시키는 것으로 보였다(Sanmamed MF et al. Nivolumab and urelumab enhance antitumor activity of human T lymphocytes engrafted in Rag2-/-IL2Rnull immunodeficient mice. Cancer Res 2015;75(17):3466-3478).

[0437] 연구 조건 및 처리 계획:

[0438] 암컷 NOG 마우스에 5x10⁶개 HCC827 세포를 단독 주입하였다. PBS 중 50% 세포 현탁액과 50% 매트릭젤의 혼합물 중 세포를, 총 주입 부피 100 µl만큼 주입하였다. 종양 세포를 NOG 마우스에 주입하여 종양 이식을 성공적으로 수행하고 나서(종양값 군에 속하는 종양의 부피 80 mm³ ~ 100 mm³), 마우스를 5x10⁶개의 인간 PBMC로 교체하였다 (정맥 주입). 무작위화 당일에 각 군에 속하는 마우스 4마리를 공여개체 A의 PBMC로 재구성하였고, 다른 마우스 4마리는 공여개체 B의 PBMC로 재구성하였다. PBMC를 주입한 지 1시간 ~ 2시간 후 처리를 개시하였으며, 하기와 같이 진행하였다.

군 ID	화합물	1일 총용량(mg)	상대적 단위(r.U)	투여일 (일)	투여 경로	마우스 수(마리)
1	비이클	na	na	0,3,7,10	복막내	8
2	PRO1137	0.2	1 r.U	0,3,7,10	복막내	8

[0439]

[0440] NF-AT 리포터 유전자 검정에서 PD-1/PDL1 상호작용을 차단하는, 항체의 시험관내 활성을 기반으로 (마우스당) 아벨루맙 용량 0.1 mg일 때를 표준으로 한 상대적 활성과 동일한 상대적 활성을 달성하기 위해 PRO1137의 용량을 0.2 mg으로 설정하였다. 따라서 PRO1137 용량 0.2 mg만큼은 아벨루맙 용량 0.1 mg에 대해 1 상대적 단위(1 r.U)로 나타낼 수 있었다. 체중 측정과, 캘리퍼에 의한 종양 부피 측정을 매주 2회 수행하였다. 연구 결과에 따라 지정 시점에 동물을 죽였다. 모든 동물은 "동일한" 시점(17일차 및 18일차)에 죽었다. 용량을 이유로 1일차에 각 군의 절반에 대한 시료 수집 및 처리를 수행하였고, 다음 날에는 각 군의 나머지 절반에 대한 시료 수집 및 처리를 수행하였다. 상이한 공여개체 2마리로부터 유래한 PBMC로 재구성한 동물을 시료채취 코호트 2개에 균등하게 할당하였다.

[0441] 결과: 면역결핍 NOG 마우스 변종 및 동종이계 인간 말초혈액단핵세포(hPBMC)를 대상으로 종양 부피를 측정함으로써 인간 HCC827 NSCLC 이종이식체에 있어 항 PDL1 PRO1137의 항 종양 활성을 평가하였다(도 10). 마우스를 죽일 때까지(17일차 및 18일차) 종양 부피를 매주 2회씩 측정하였다. 종양 부피를, 처리 개시시의 종양 부피에 대해 정규화하였다(상대적 종양 부피). 도 10에 보인 바와 같이, PRO1137 모노클로날 항체 처리는 비이클 처리 대조군에서 비하여 감소한 종양 성장을 보였다. 특히 PRO1137 처리는 체중 중앙값의 감소를 유도하지 않았는데, 이는 분자가 시험된 용량 수준에서 잘 관용됨을 암시한다(도 11).

[0442] **실시예 12: 인간 제대혈 유래 CD34+ 조혈줄기세포(UCB HSC)가 이식된 NOG 마우스에 있어 PRO1137의 항 종양 효능 평가**

[0443] 인간 HCC827 NSCLC 이종이식체에서 인간 제대혈 유래 CD34+ 조혈줄기세포(UCB HSC)가 이식된 NOG 마우스 변종을 사용하여 PRO1196(항 PDL1 IgG1; 서열 번호 92 및 93)의 항 종양 활성을, 비이클 치료법 및 아벨루맙 처리시의 항 종양 활성과 비교하였다.

[0444] 연구 조건 및 처리 계획: 인간 제대혈 유래 CD34+ 조혈줄기세포(UCB HSC)가 이식된 암컷 NOG 마우스에 HCC827 NSCLC 세포를 피하 주입하였다. 마우스에 5×10^6 개 HCC827 세포를 단독 주입하였다. 세포에 PBS 중 50% 세포 현탁액 및 50% 매트릭셀의 혼합물(총 부피 100 μ l)을 주입하였다. 종양 세포를 NOG 마우스에 주입하여 종양 이식을 성공적으로 마친 후(중양 군 종양 부피 80 mm³ ~ 100 mm³), 마우스(n=10)를 치료군들에 무작위로 할당하였다.

군 ID	화합물	1일 총용량(mg)	투여일 (일)	투여경로	마우스수 (마리)
1	비이클(팔리비주맙)	0.1 mg	0,5,10,15, 20	복막내	10
2	항 PDL1 IgG (PRO1196)	0.1 mg	0,5,10,15, 20	복막내	10
3	아벨루맙	0.1 mg	0,5,10,15, 20	복막내	10

[0445] 체중 측정과, 캘리퍼에 의한 종양 부피 측정을 매주 2회 수행하였다. 처리후 25일차, 29일차 및 30일차에 종양을 수집하였다.

[0447] 결과: 인간 제대혈 유래 CD34+ 조혈줄기세포(UCB HSC)가 이식된 면역결핍 NOG 마우스 변종을 사용하여 인간 HCC827 NSCLC 이종이식체에서 PRO1196(항 PDL1 IgG1; 서열 번호 92 및 93)의 항 종양 활성을, 종양 부피를 측정함으로써 평가하였다(도 12). 마우스를 죽일 때까지(25일차, 29일차 및 30일차) 종양 부피를 매주 2회씩 측정하였다. 종양 부피를, 처리 개시시의 종양 부피에 대해 정규화하였다(상대적 종양 부피). 도 12에 보인 바와 같이, PRO1196 처리시뿐 아니라 아벨루맙 처리시 종양 생장은 대조군에 비해 안정화되었다.

[0448] **실시예 13: 동계 MC38 결장암 모델에 있어 PDL1 차단 및 CD137의 수반성 국소 자극에 대한 항 종양 효능 평가**

[0449] 추가로, 비변형 면역계를 가지는 동계 C57BL/6 마우스의 MC38 결장 암종 모델에서 본 발명의 PDL1 도메인을 포함하는 다중 특이적 항체의 항 종양 활성을 시험하였다. 이 모델은 CD137 효현제 및 PD-1/PDL1 길항제가 조합 처리될 때 항 종양 활성이 향상됨을 보여주기 위하여 다른 연구자들에 의해 사용되어 왔다(Chen S et al. "Combination of 4-1BB agonist and PD-1 antagonist promotes antitumor effector/memory CD8 T cells in a poorly immunogenic tumor model". Cancer Immunol Res 2014;3(2):149-160 및 Rodriguez-Ruiz ME et al. "Abscopal effects of radiotherapy are enhanced by combined immunostimulatory mAbs and are dependent on

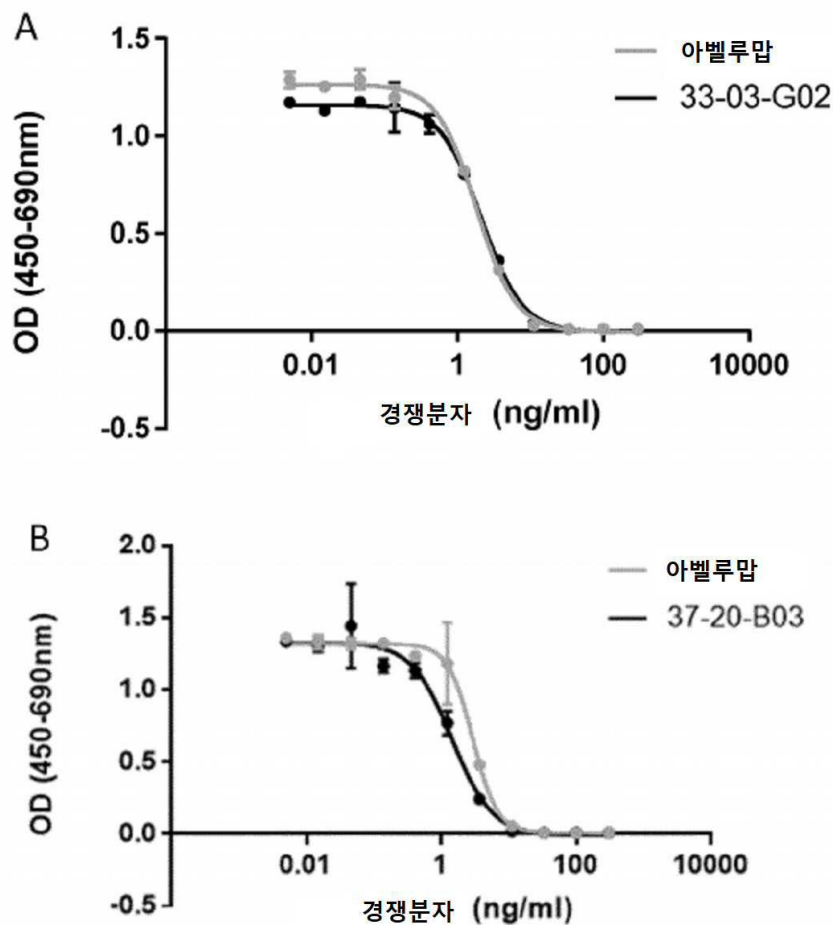
CD8 T cells and crosspriming" Cancer Res 2016;76(20):5994-6005).

[0450]

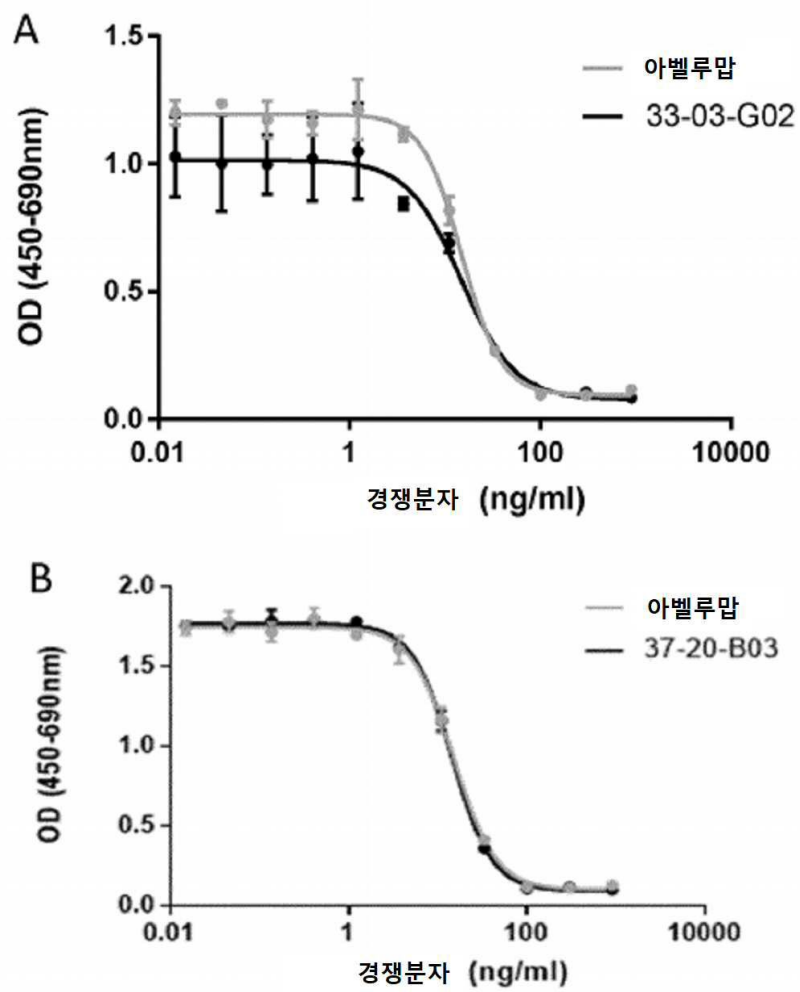
시험대상인 다중 특이적 항체의 항 CD137 도메인과 항 PDL1 도메인 둘 다는 마우스 PDL1 및 마우스 CD137에 교차 반응성이 아니므로, 조작한 인간 CD137 녹-인(knock-in) 모델(CrownBio에 의해 확립됨)을 사용하였다. 이 모델에서, 마우스 CD137의 세포외 및 경막 도메인을 C57BL/6 마우스 백그라운드에서 CRISPR/Cas9 계를 사용하여 인간 CD137의 각 서열로 치환하였다. 뿐 아니라, CMV 프로모터의 제어 하에 있으면서 마우스 PDL1 대신 인간 PDL1을 발현하는 변형 MC38 종양 세포주를 사용하였다. 종양 부피에 대한 상기 다중 특이적 항체의 효과를, 이 다중 특이적 항체의 PDL1 특이적 가변 도메인과 동일한 PDL1 특이적 가변 도메인을 함유하는 인간화 IgG1과, 동일한 CD137 특이적 가변 도메인을 가지는 인간화 IgG4의 조합 처리시 효과와 비교하였다. 국소화 항 종양 면역 반응에 대한 추가 증거를 제공하기 위해 종양 침습성 림프구, 예컨대 CD8+, CD4+ 및 조절 T 세포의 출현빈도를 유세포분석법으로 분석하였다. 항 CD137/항 PDL1의 처리 후 면역계의 전신상의 조절을 이용하기 위해, 간과 비장에서의 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포 출현빈도를 유세포분석법과, 가능하게는 면역조직화학적방법으로 분석하였다. 게다가 정량적 ELISA 방법을 사용하여 IFN γ 의 전신 수준을 분석할 수 있었다. 항 CD137/항 PDL1 조합 치료법의 안전성 프로필을 추가로 특성규명하기 위해, (임상상 항 CD137 치료법에서 관찰되는) 간 독성과 주로 연관된 임상화학병리학적 매개변수, 예컨대 알라닌 아미노기전이효소, 글루탐산염 탈수소효소 및 아스파르트산염 아미노기전이효소의 증가한 수준을 평가할 수 있었다.

도면

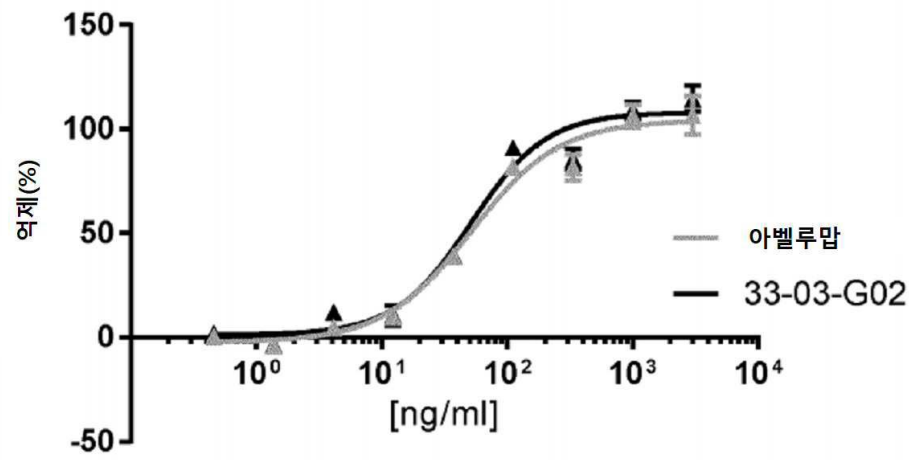
도면1



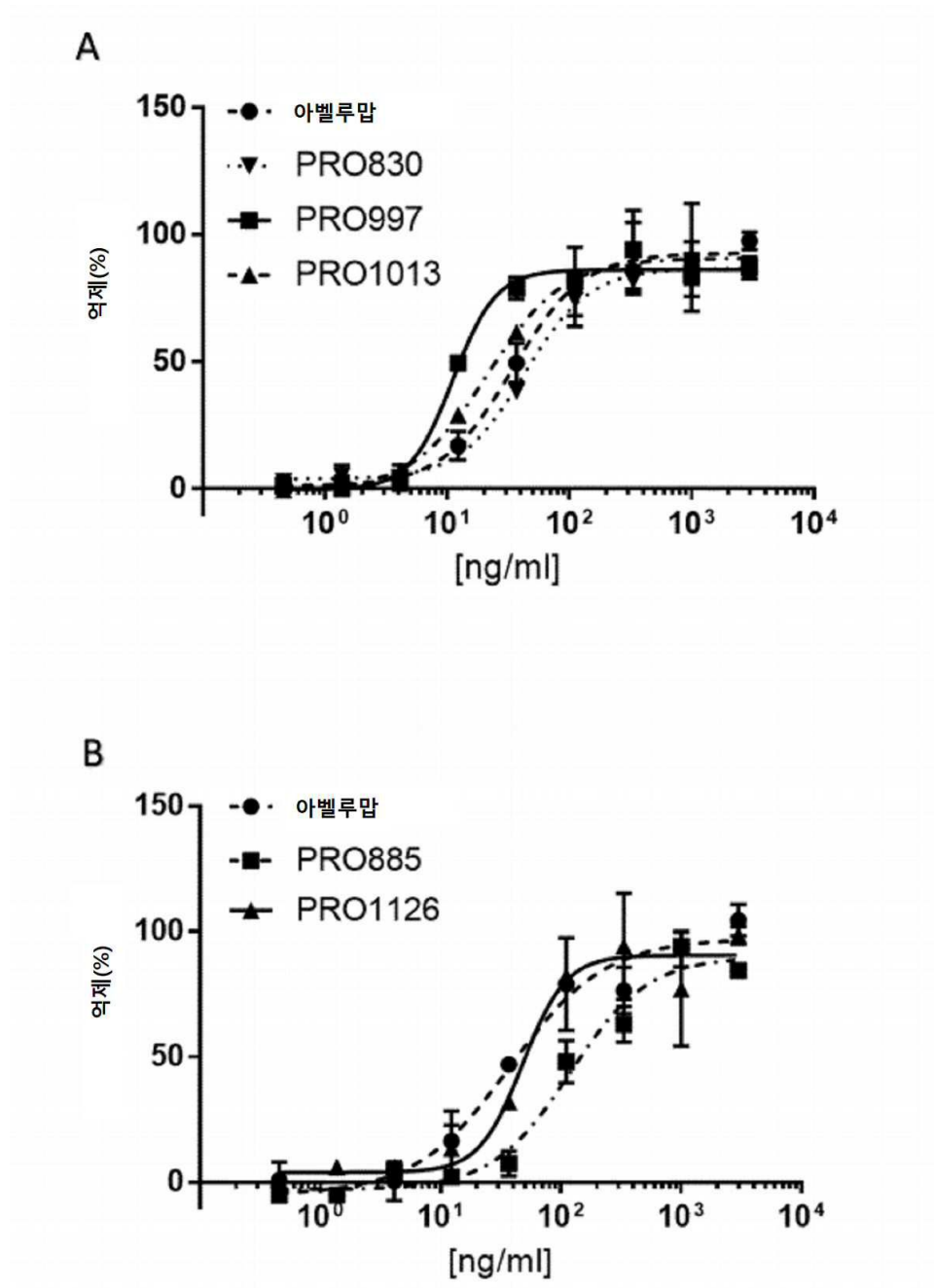
도면2



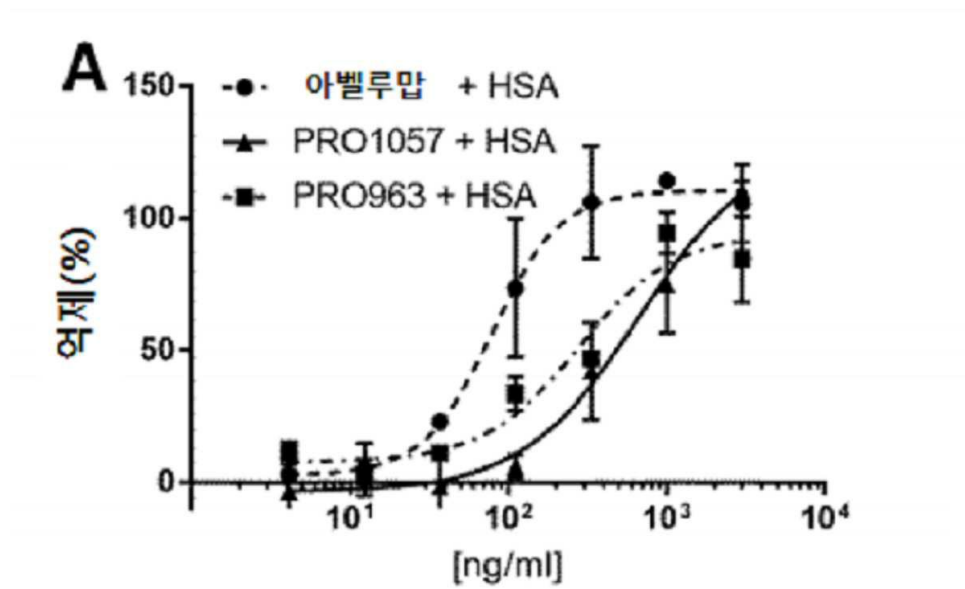
도면3



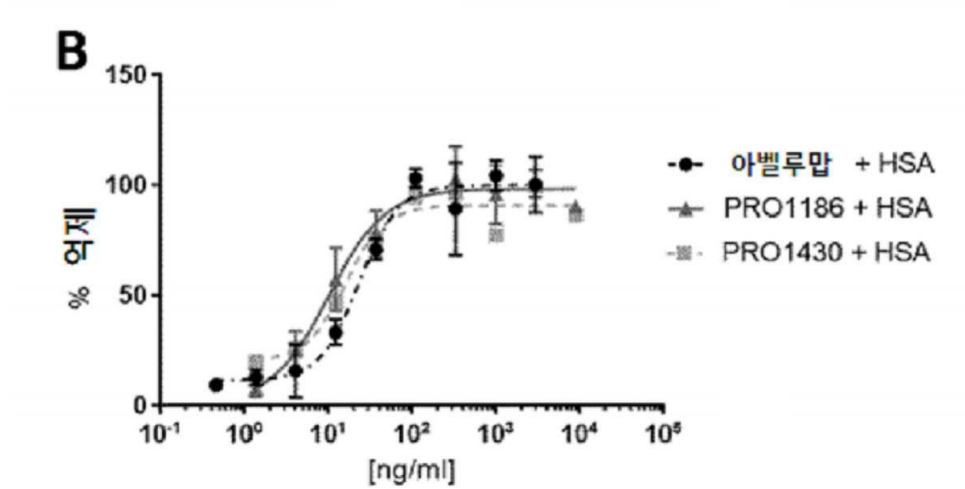
도면4



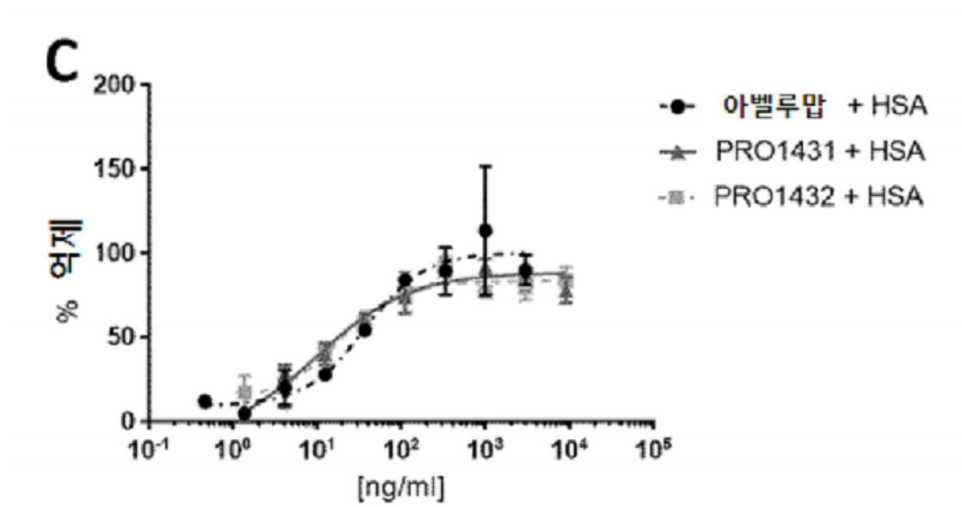
도면5a



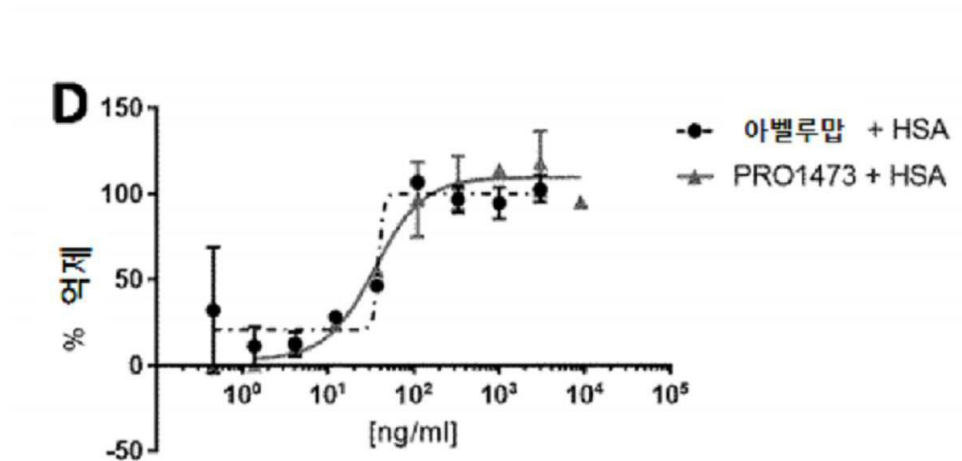
도면5b



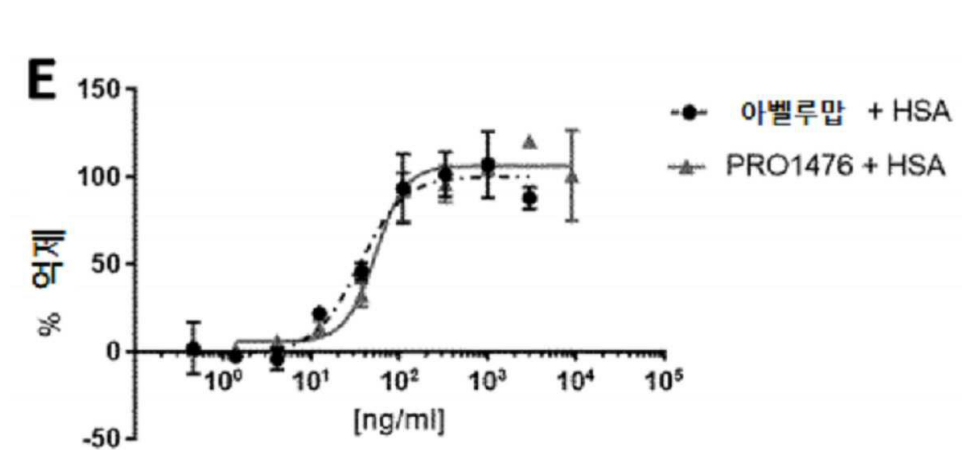
도면5c



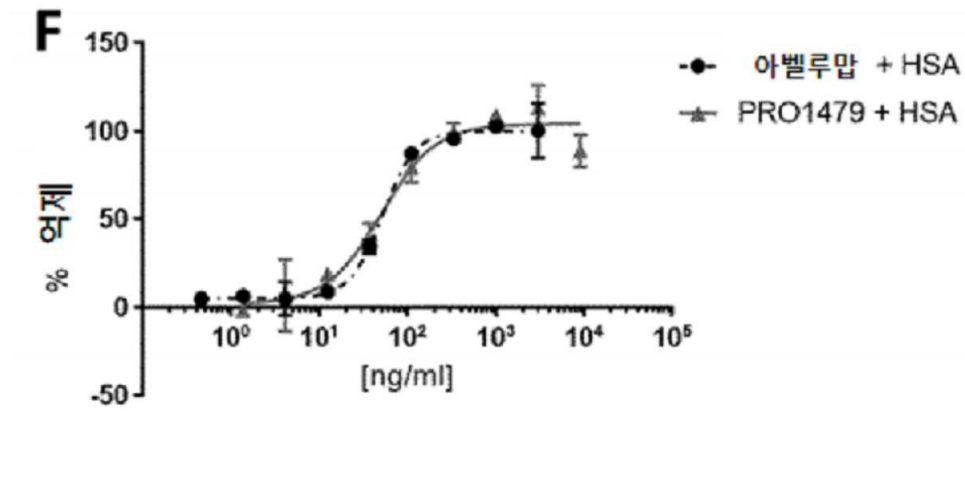
도면5d



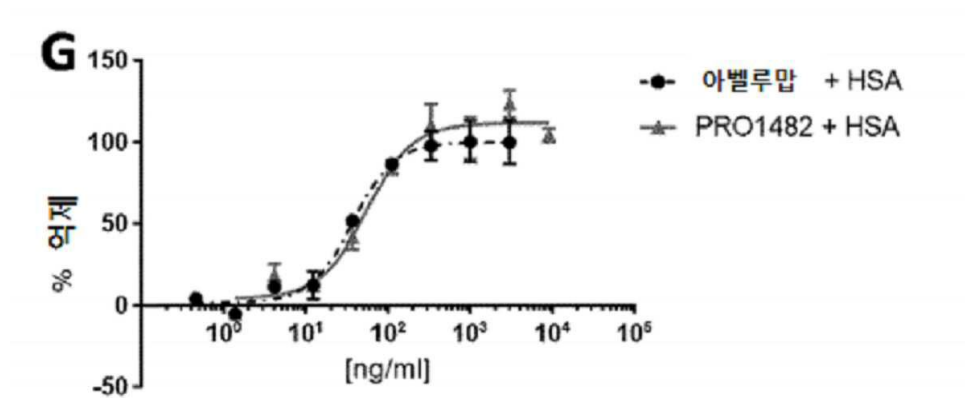
도면5e



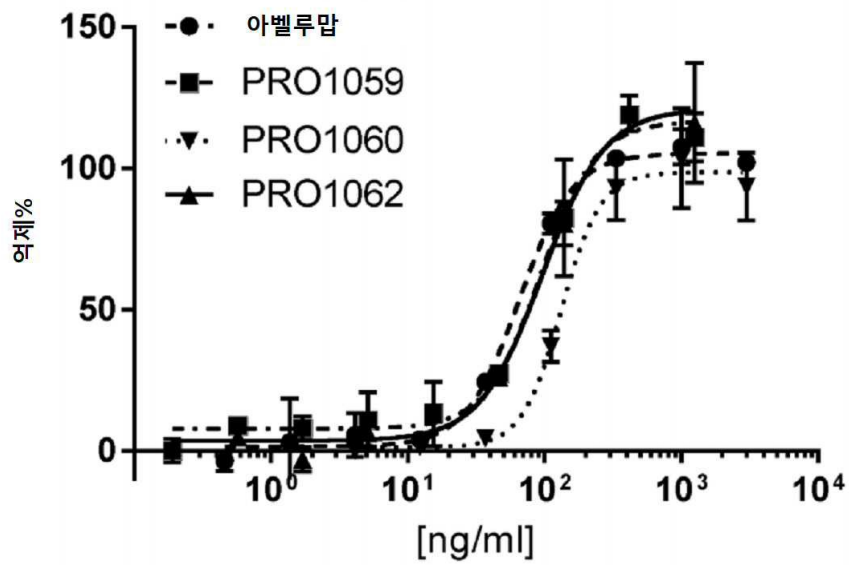
도면5f



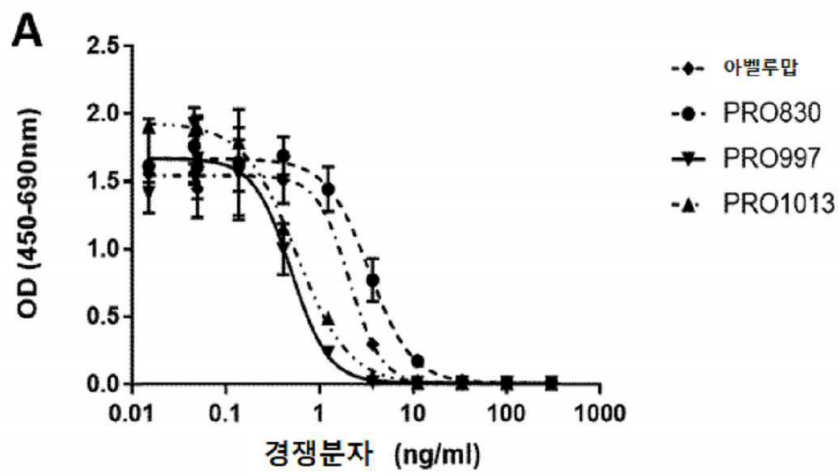
도면5g



도면6

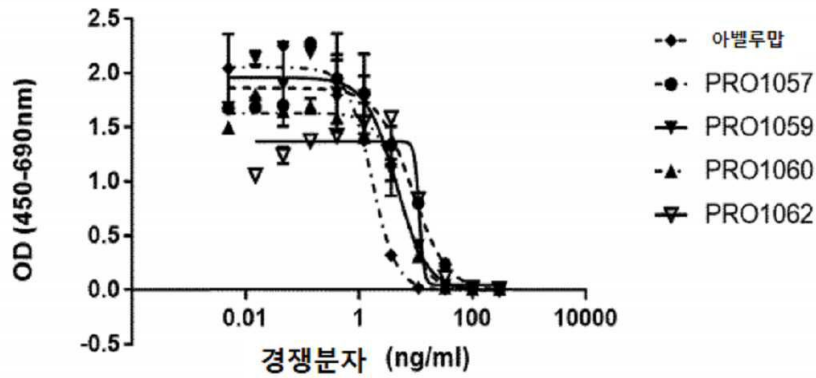


도면7a



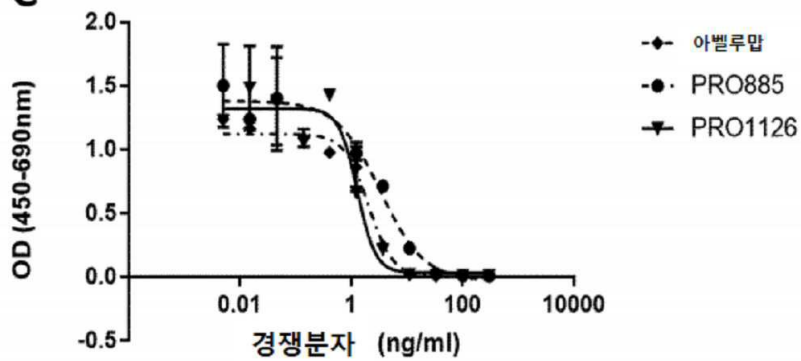
도면7b

B



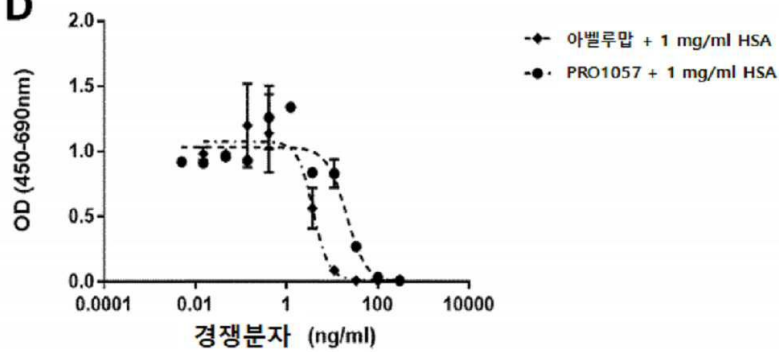
도면7c

C

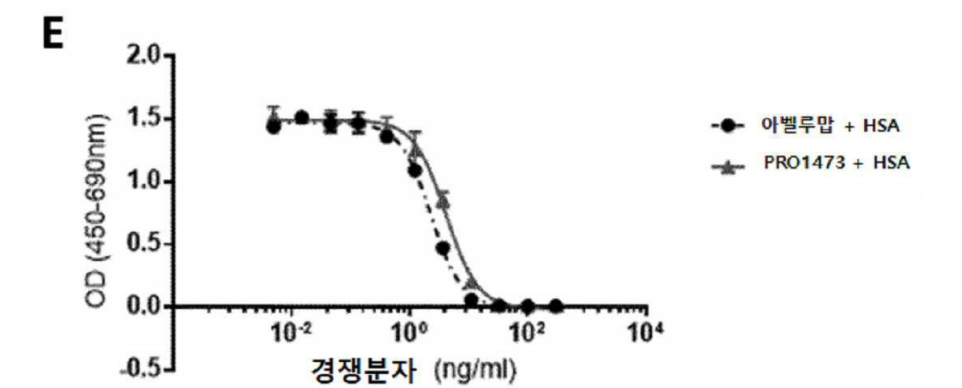


도면7d

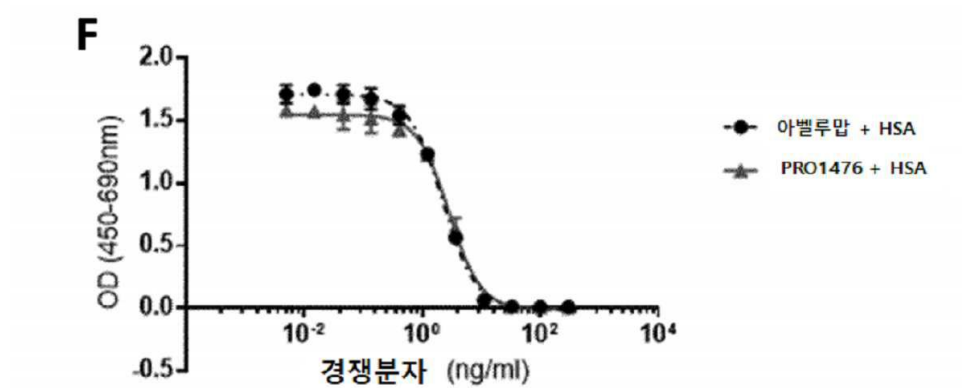
D



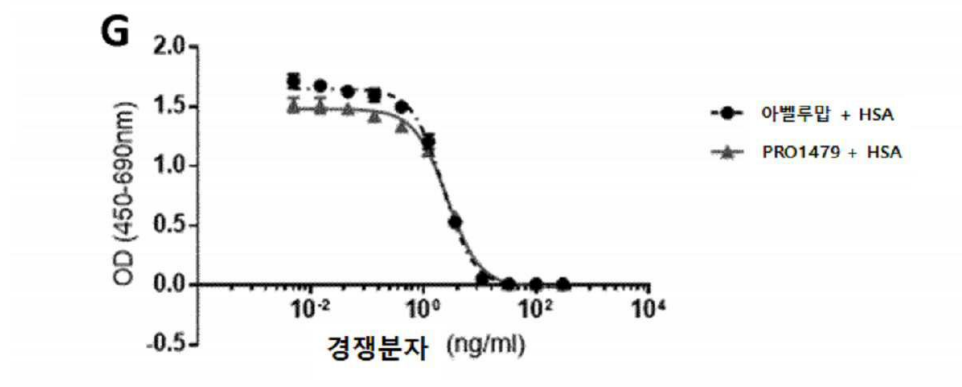
도면7e



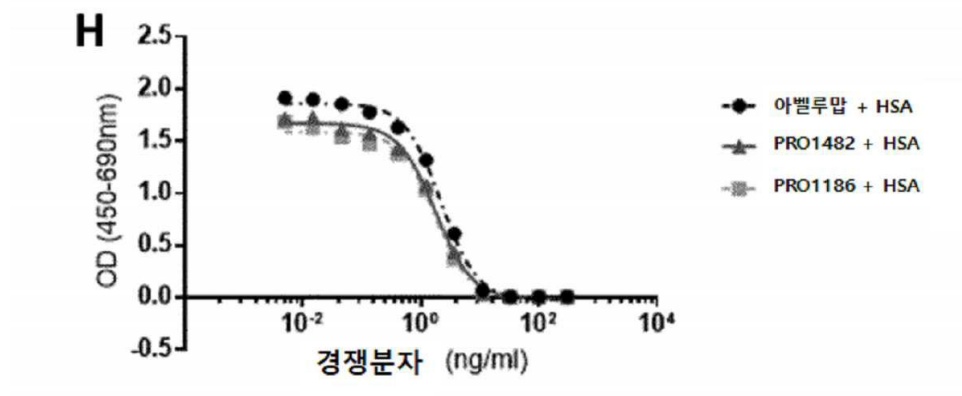
도면7f



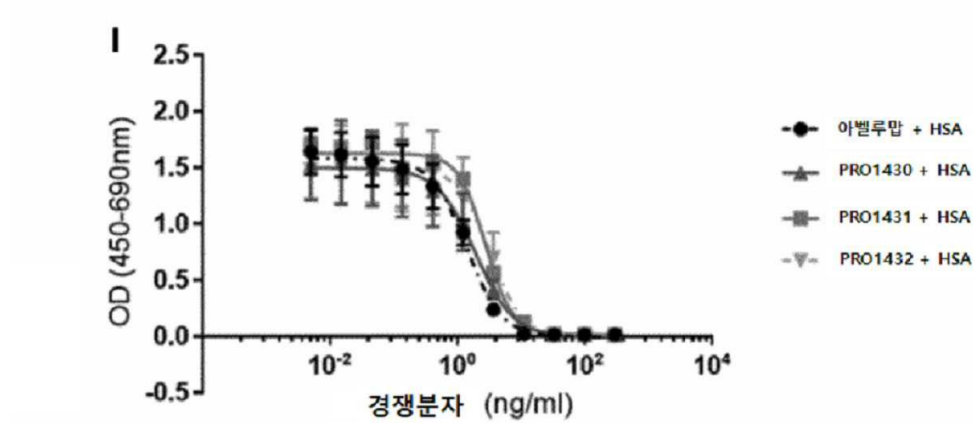
도면7g



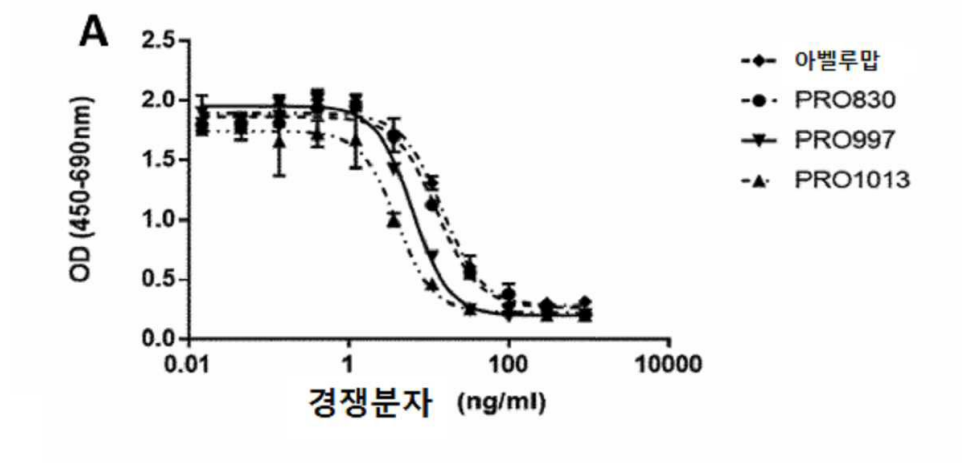
도면7h



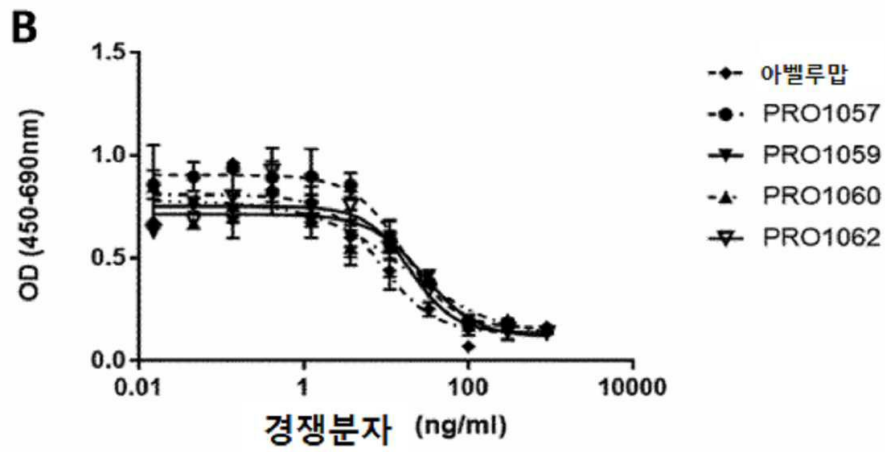
도면7i



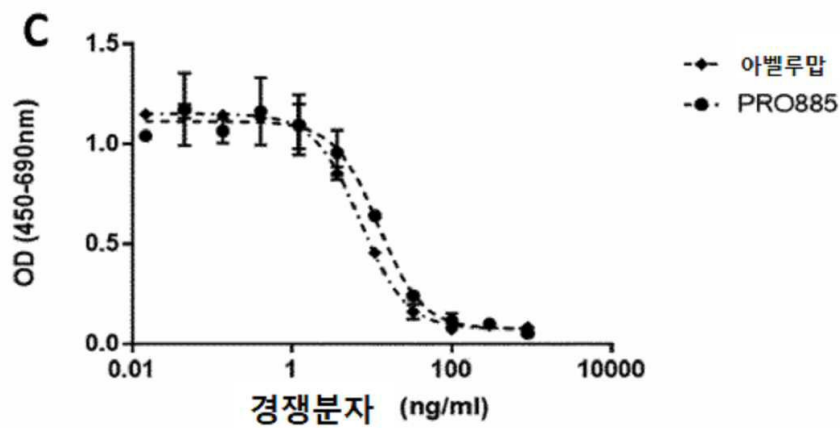
도면8a



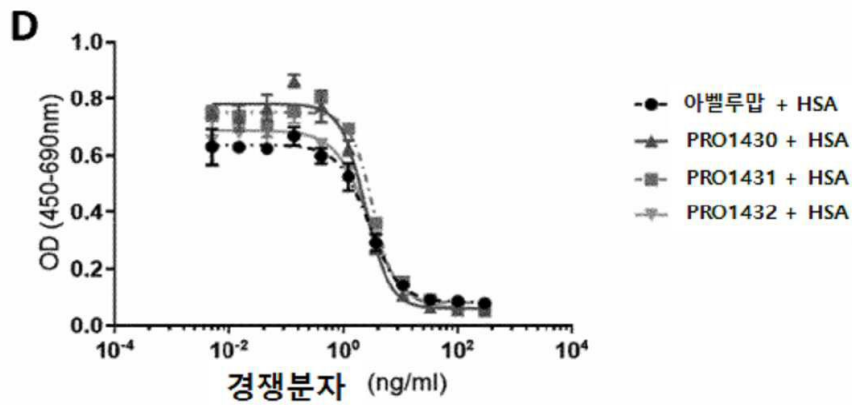
도면8b



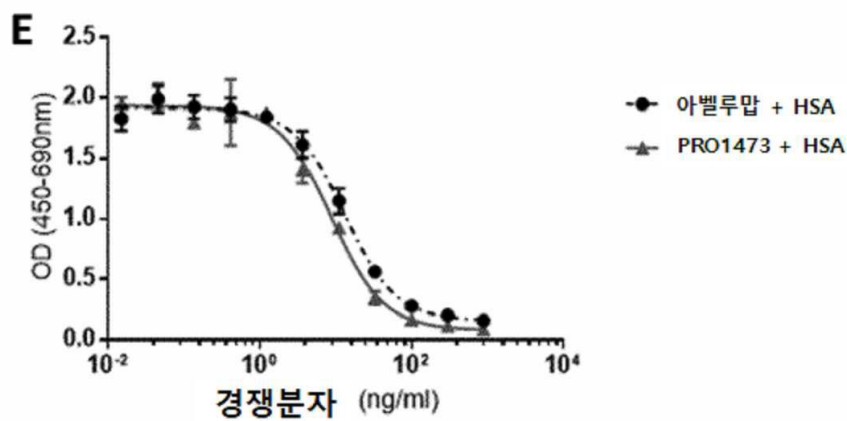
도면8c



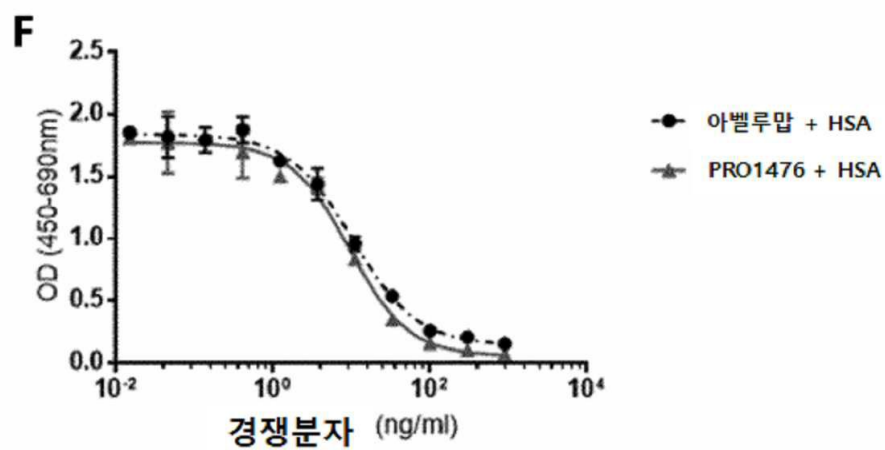
도면8d



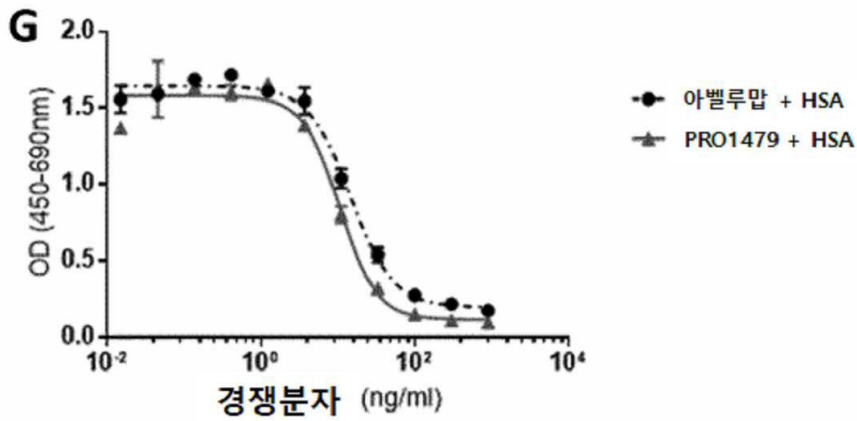
도면8e



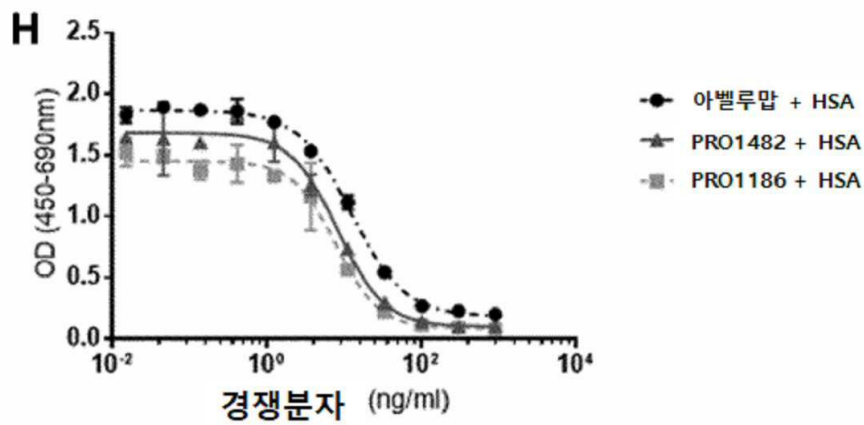
도면8f



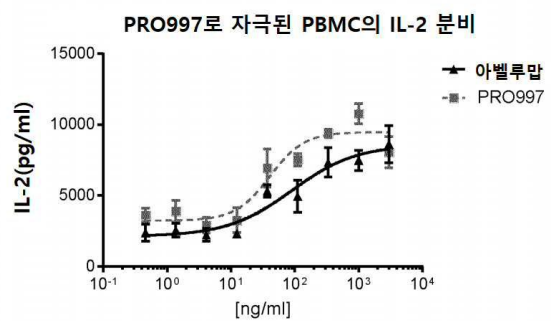
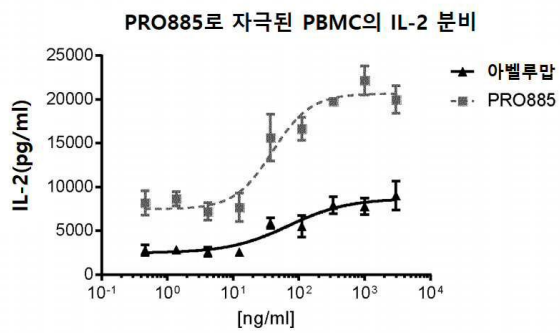
도면8g



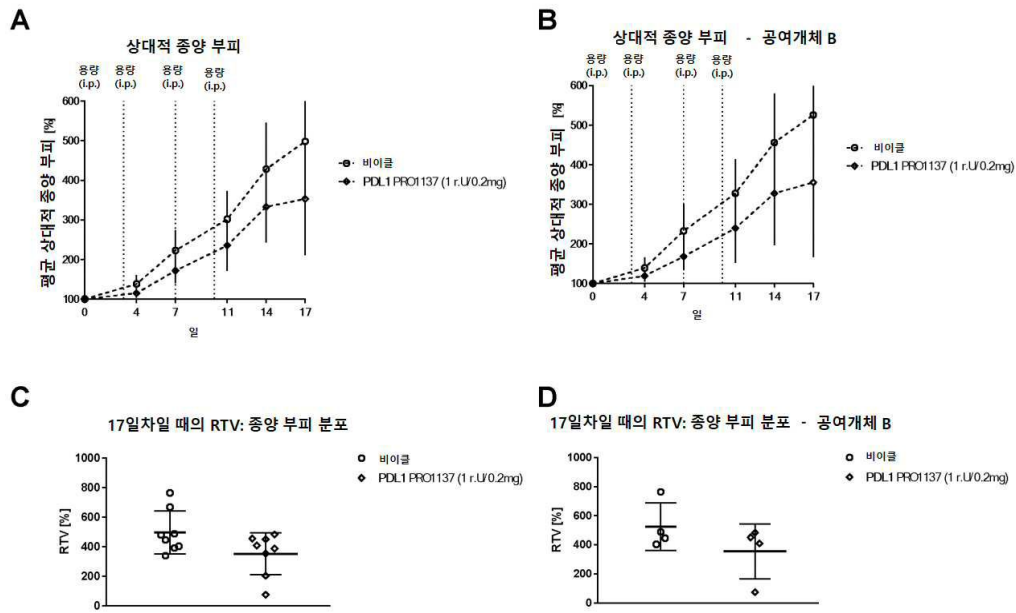
도면8h



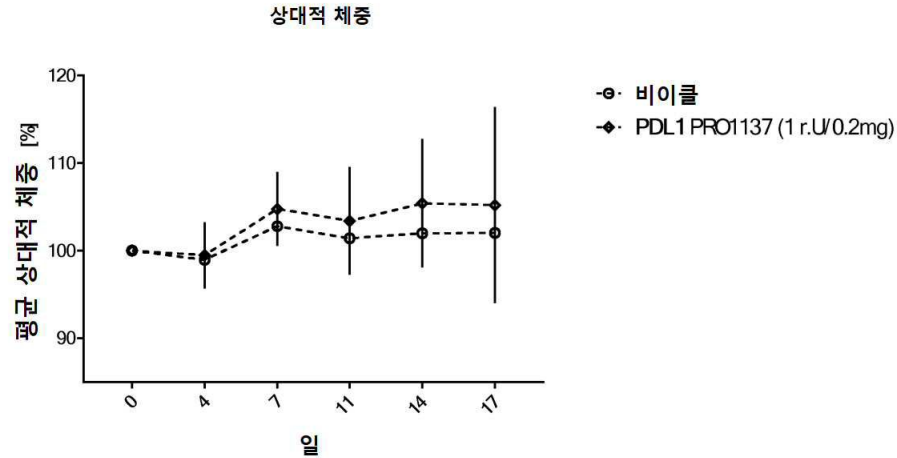
도면9



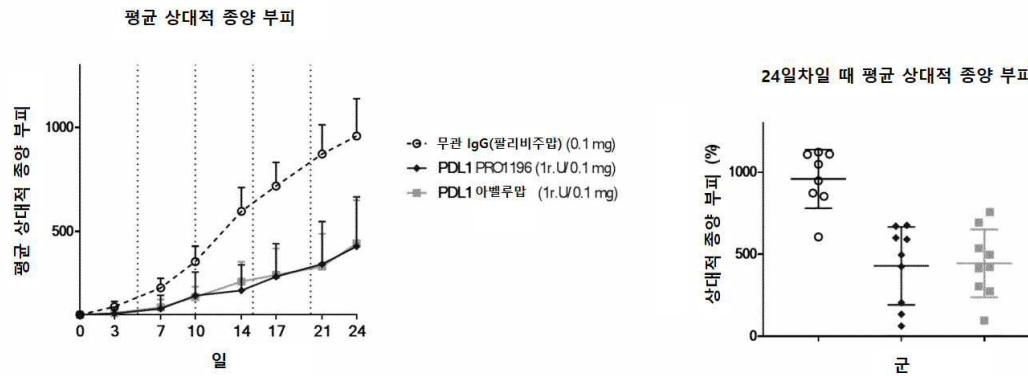
도면10



도면11



도면12



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Numab Innovation AG
- <120> ANTIBODIES TARGETING PDL1 AND METHODS OF USE THEREOF
- <130> 115263P877PC
- <140> PCT/EP2018/077511
- <141> 2018-10-09
- <150> EP17195781.4
- <151> 2017-10-10
- <150> EP18167094.4
- <151> 2018-04-12
- <150> EP18180816.3
- <151> 2018-06-29
- <160> 93
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof
- <400> 1
- Gly Phe Ser Phe Asn Ser Asp Tyr Trp Ile Tyr
- 1 5 10

<210> 2
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof
 <400> 2
 Ser Ile Tyr Gly Gly Ser Ser Gly Asn Thr Gln Tyr Ala Ser Trp Ala
 1 5 10 15
 Gln Gly

<210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 3
 Arg Gly Tyr Val Asp Tyr Gly Gly Ala Thr Asp Leu
 1 5 10

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 4
 Val Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Asp Tyr Trp
 1 5 10

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 5
 Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Asp Tyr Trp

1 5 10

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 6

Ile Tyr Gly Gly Ser Ser Gly Asn Thr Gln Tyr Ala Ser Trp Ala Gln

1 5 10 15

Gly Arg

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 7

Gly Tyr Val Asp Tyr Gly Gly Ala Thr Asp

1 5 10

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 8

Ser Asp Tyr Trp Ile Tyr

1 5

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 9

Ser Ile Tyr Gly Gly Ser Ser Gly Asn Thr Gln Tyr Ala Ser Trp Ala

1 5 10 15

Gln Gly

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 10

Gly Tyr Val Asp Tyr Gly Gly Ala Thr Asp Leu

1 5 10

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 11

Gly Phe Ser Phe Asn Ser Asp Tyr

1 5

<210> 12

<211> 5

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 12

Gly Gly Ser Ser Gly

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 13

Tyr Val Asp Tyr Gly Gly Ala Thr Asp

1 5

<210> 14

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 14

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Asp

20 25 30

Tyr Trp Ile Tyr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr Gly Gly Ser Ser Gly Asn Thr Gln Tyr Ala Ser

50 55 60

Trp Ala Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser Lys Asn Gln

65 70 75 80

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 15

<211> 122

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 15

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Asp
20 25 30

Tyr Trp Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Ser Ile Tyr Gly Gly Ser Ser Gly Asn Thr Gln Tyr Ala Ser
50 55 60

Trp Ala Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr
65 70 75 80

Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Val Asp Tyr Gly Gly Ala Thr Asp Leu Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 16

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Asp
20 25 30

Tyr Trp Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Ala Ser Ile Tyr Gly Gly Ser Ser Gly Asn Thr Gln Tyr Ala Ser
50 55 60

Trp Ala Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Phe Cys Ala Arg Gly Tyr Val Asp Tyr Gly Gly Ala Thr Asp Leu Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 17

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 18

Arg Ala Phe Ile Leu Ala Ser

1 5

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 19

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

1 5 10 15

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 20

Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Tyr

1 5

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 21

Arg Ala Phe Ile Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg

1 5 10

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 22

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

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 23

Ser Gln Ser Ile Gly Thr Tyr

1 5

<210> 24

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 24

Arg Ala Phe

1

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 25

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

1 5 10

<210> 26

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 26

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Asn Phe Tyr Ser Asp Ser

85 90 95

Thr Thr Ile Gly Pro Asn Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val

100 105 110

Leu Gly

<210> 27

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 27

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Asn Phe Tyr Ser Asp Ser

85 90 95

Thr Thr Ile Gly Pro Asn Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val

100 105 110

Leu Gly

<210> 28

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 28

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 29

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 29

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Asn Phe Tyr Ser Asp Ser

85 90 95

Thr Thr Ile Gly Pro Asn Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val

100 105 110

Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly

145 150 155 160

Phe Ser Phe Asn Ser Asp Tyr Trp Ile Tyr Trp Ile Arg Gln Pro Pro

165 170 175

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Gly Gly Ser Ser Gly

180 185 190

Asn Thr Gln Tyr Ala Ser Trp Ala Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Val

195 200 205

Asp Ser Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
 210 215 220
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Val Asp Tyr Gly
 225 230 235 240

Gly Ala Thr Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250 255

<210> 30

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Tyr
 20 25 30

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

Thr Thr Ile Gly Pro Asn Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val
 100 105 110
 Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
 130 135 140
 Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

145 150 155 160

Phe Ser Phe Asn Ser Asp Tyr Trp Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro

165 170 175

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Ser Ile Tyr Gly Gly Ser Ser Gly

180 185 190

Asn Thr Gln Tyr Ala Ser Trp Ala Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Gly Ala Thr Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

245 250 255

<210> 31

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 31

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Asn Phe Tyr Ser Asp Ser

85 90 95

Thr Thr Ile Gly Pro Asn Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val
 100 105 110
 Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 145 150 155 160
 Phe Ser Phe Asn Ser Asp Tyr Trp Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro
 165 170 175
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala Ser Ile Tyr Gly Gly Ser Ser Gly
 180 185 190
 Asn Thr Gln Tyr Ala Ser Trp Ala Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 195 200 205

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 210 215 220
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Tyr Val Asp Tyr Gly
 225 230 235 240
 Gly Ala Thr Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250 255

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 32

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Asp Met Cys
 1 5 10

<210> 33

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 33

Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 34

Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe Asn Leu

1 5 10

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 35

Val Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Asp

1 5 10

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 36

Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Asp

1 5 10

<210> 37

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 37

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

1 5 10 15

Gly Arg

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 38

Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe Asn

1 5

<210> 39

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 39

Ser Gly Tyr Asp Met Cys

1 5

<210> 40

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 40

Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 41

Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe Asn Leu

1 5 10

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 42

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly Tyr

1 5

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 43

Ala Gly Ser Val Asp

1 5

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 44

Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe Asn

1 5

<210> 45

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Asp Met Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser

50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser Lys Asn Gln

65 70 75 80

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe Asn Leu Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 46

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Asp Met Cys Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45
 Ile Ala Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser
 50 55 60
 Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Gln
 65 70 75 80
 Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Phe Cys Ala Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe Asn Leu Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 47

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 47

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Asp Met Cys Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45
 Ile Ala Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser
 50 55 60
 Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Gln
 65 70 75 80
 Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe Asn Leu Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 48

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asp Tyr Leu Ala

1

5

10

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 49

Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1

5

<210> 50

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 50

Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp Ile Asp Asn Val

1

5

10

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 51

Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asp Tyr

1 5

<210> 52

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 52

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

1 5 10

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 53

Gly Tyr Ile Ile Thr Asp Ile Asp Asn

1 5

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 54

Ser Gln Ser Ile Asn Asp Tyr

1 5

<210> 55

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 55

Lys Ala Ser

1

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 56

Gly Tyr Ile Ile Thr Asp Ile Asp Asn

1 5

<210> 57

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 57

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp

85 90 95

Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

100 105 110

<210> 58

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 58

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp

85 90 95

Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

100 105 110

<210> 59

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 59

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 60

<211> 252

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 60

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

 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp
 85 90 95
 Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

 Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 130 135 140
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser Phe
 145 150 155 160
 Ser Ser Gly Tyr Asp Met Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
 165 170 175
 Leu Glu Trp Ile Gly Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr Tyr
 180 185 190

 Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser
 195 200 205
 Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
 210 215 220
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe Asn
 225 230 235 240
 Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 61

<211

> 252

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 61

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp

85 90 95

Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe

145 150 155 160

Ser Ser Gly Tyr Asp Met Cys Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly

165 170 175

Leu Glu Trp Ile Ala Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr Tyr

180 185 190

Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser

195 200 205
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
 210 215 220
 Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe Asn
 225 230 235 240

Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 62

<211> 252

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 62

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asp Tyr
 20 25 30

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

Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 130 135 140
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe

145 150 155 160

Ser Ser Gly Tyr Asp Met Cys Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly

165 170 175

Leu Glu Trp Ile Ala Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr Tyr

180 185 190

Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser

195 200 205

Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr

210 215 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe Asn

225 230 235 240

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

245 250

<210> 63

<211> 290

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 63

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu

1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr

20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu

35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 100 105 110
 Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
 115 120 125
 Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
 130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
 145 150 155 160
 Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
 165 170 175
 Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
 180 185 190
 Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
 195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
 210 215 220
 Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
 225 230 235 240
 Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
 245 250 255
 Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
 260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
 275 280 285

Glu Thr
 290

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

1 5 10

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

1 5 10

<210> 66

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Ile Ile Leu Gly

1 5 10

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Phe Gly Glu Gly Thr Glu Leu Thr Val Leu Gly

1 5 10

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

1 5 10

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly

1 5 10

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Ala Leu Gly

1 5 10

<210> 71

<211> 493

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 71

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp

85 90 95

Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly

100 105 110

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

115 120 125

Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser

130 135 140
 Phe Ser Asn Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 145 150 155 160
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Thr Phe Val Gly Ser Ser Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser
 180 185 190
 Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
 195 200 205

 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Pro Ser Asp Ala Val Tyr Gly
 210 215 220
 Tyr Ala Asn Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 245 250 255
 Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 260 265 270

 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile
 275 280 285
 Asn Asn Val Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 290 295 300
 Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
 305 310 315 320
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 325 330 335

 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Gly
 340 345 350
 Asn Tyr Gly Asp Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
 355 360 365
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
 370 375 380

Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser
385 390 395 400

Phe Ser Ser Gly Tyr Asp Met Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
405 410 415

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr
420 425 430

Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser
435 440 445

Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
450 455 460

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe
465 470 475 480

Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
485 490

<210> 72

<211> 499

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 72

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asp Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp

85	90	95
Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly		
100	105	110
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val		
115	120	125
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser		
130	135	140
Phe Asn Asn Asp Tyr Asp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys		
145	150	155
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Asp Thr Gly Asp Gly Ser Thr Tyr		
165	170	175
Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser		
180	185	190
Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr		
195	200	205
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Ala Ser Ser Ser Gly Tyr Gly		
210	215	220
Met Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser		
225	230	235
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
245	250	255
Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser		
260	265	270
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser		
275	280	285
Val Tyr Asp Asn Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys		
290	295	300
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val		
305	310	315
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
325	330	335

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly
 340 345 350
 Thr Tyr Leu Ser Ser Asn Trp Tyr Trp Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys
 355 360 365
 Val Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu
 370 375 380
 Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys
 385 390 395 400

Lys Val Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Asp Met Cys Trp Ile
 405 410 415
 Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Val Val Ala
 420 425 430
 Gly Ser Val Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Val
 435 440 445
 Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser
 450 455 460

Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Asp
 465 470 475 480
 Ala Tyr Ser Asp Ala Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 485 490 495
 Val Ser Ser

<210> 73

<211> 493

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 73

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

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asp Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp
 85 90 95
 Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
 115 120 125
 Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser

 130 135 140
 Phe Ser Asn Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 145 150 155 160
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Thr Phe Val Gly Ser Ser Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser
 180 185 190
 Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp

 195 200 205
 Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg His Pro Ser Asp Ala Val Tyr Gly
 210 215 220
 Tyr Ala Asn Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 245 250 255
 Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala

 260 265 270
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile

275 280 285
 Asn Asn Val Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys
 290 295 300
 Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
 305 310 315 320
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser

325 330 335
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Gly
 340 345 350
 Asn Tyr Gly Asp Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
 355 360 365
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
 370 375 380
 Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser

385 390 395 400
 Phe Ser Ser Gly Tyr Asp Met Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 405 410 415
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr
 420 425 430
 Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser
 435 440 445
 Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp

450 455 460
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe
 465 470 475 480
 Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 485 490

<210> 74

<211> 493

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 74

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

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

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp
85 90 95
Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110
Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
115 120 125
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser

130 135 140
Phe Ser Asn Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145 150 155 160
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Thr Phe Val Gly Ser Ser Asp Ser Thr
165 170 175
Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Ser
180 185 190
Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp

195 200 205
Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg His Pro Ser Asp Ala Val Tyr Gly
210 215 220
Tyr Ala Asn Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
260 265 270

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile
275 280 285

Asn Asn Val Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys
290 295 300

Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
305 310 315 320

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
325 330 335

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Gly
340 345 350

Asn Tyr Gly Asp Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
370 375 380

Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser
385 390 395 400

Phe Ser Ser Gly Tyr Asp Met Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
405 410 415

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr
420 425 430

Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser
435 440 445

Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
450 455 460

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe
465 470 475 480

Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

485

490

<210> 75

<211> 493

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 75

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

1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asp Tyr

20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp

85 90 95
Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly

100 105 110
Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val

115 120 125
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser

130 135 140
Phe Ser Asn Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys

145 150 155 160
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Thr Phe Val Gly Ser Ser Asp Ser Thr

165 170 175
Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser

180 185 190

Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp

195 200 205
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Pro Ser Asp Ala Val Tyr Gly

210 215 220
Tyr Ala Asn Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
245 250 255

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

260 265 270
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile

275 280 285
Asn Asn Val Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
290 295 300

Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
305 310 315 320
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser

325 330 335
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Gly

340 345 350
Asn Tyr Gly Asp Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
370 375 380

Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser

385 390 395 400
Phe Ser Ser Gly Tyr Asp Met Cys Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys

405 410 415
Gly Leu Glu Trp Ile Ala Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr
420 425 430

Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser

435 440 445
Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp

450 455 460
Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe
465 470 475 480
Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

485 490
<210> 76
<211> 493
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof
<400> 76

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

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

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp
85 90 95
Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110
Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
115 120 125
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser

130 135 140

Phe Ser Asn Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 145 150 155 160
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Thr Phe Val Gly Ser Ser Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser
 180 185 190
 Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp

 195 200 205
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Pro Ser Asp Ala Val Tyr Gly
 210 215 220
 Tyr Ala Asn Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 245 250 255
 Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala

 260 265 270
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile
 275 280 285
 Asn Asn Val Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 290 295 300
 Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
 305 310 315 320
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser

 325 330 335
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Gly
 340 345 350
 Asn Tyr Gly Asp Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
 355 360 365
 Gly Gly Gly Ser Gln Ser Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
 370 375 380
 Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser

385 390 395 400
Phe Ser Ser Gly Tyr Asp Met Cys Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 405 410 415
Gly Leu Glu Trp Ile Ala Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr
 420 425 430
Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Ser
 435 440 445
Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp

450 455 460
Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe
465 470 475 480
Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 485 490

<210> 77

<211> 493

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 77

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

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

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp
 85 90 95
Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly

100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
 115 120 125
 Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser

 130 135 140
 Phe Ser Asn Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 145 150 155 160
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Thr Phe Val Gly Ser Ser Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser
 180 185 190
 Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp

 195 200 205
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Pro Ser Asp Ala Val Tyr Gly
 210 215 220
 Tyr Ala Asn Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 245 250 255
 Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala

 260 265 270
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile
 275 280 285
 Asn Asn Val Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 290 295 300
 Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
 305 310 315 320
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser

 325 330 335
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Gly
 340 345 350

Asn Tyr Gly Asp Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
355 360 365
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
370 375 380
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser
385 390 395 400
Phe Ser Ser Gly Tyr Asp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
405 410 415
Gly Leu Glu Trp Val Gly Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr
420 425 430
Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
435 440 445
Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
450 455 460
Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe
465 470 475 480
Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
485 490
<210> 78
<211> 755
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof
<400> 78
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asp Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp

85 90 95

Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly

100 105 110

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

115 120 125

Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser

130 135 140

Phe Ser Asn Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys

145 150 155 160

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Thr Phe Val Gly Ser Ser Asp Ser Thr

165 170 175

Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser

180 185 190

Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp

195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Pro Ser Asp Ala Val Tyr Gly

210 215 220

Tyr Ala Asn Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile

275 280 285

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

290 295 300

Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg

305 310 315 320
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser

 325 330 335
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Gly
 340 345 350
 Asn Tyr Gly Asp Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
 355 360 365
 Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
 370 375 380
 Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser

 385 390 395 400
 Phe Ser Ser Gly Tyr Asp Met Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 405 410 415
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr
 420 425 430
 Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser
 435 440 445
 Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp

 450 455 460
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe
 465 470 475 480
 Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 485 490 495
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 500 505 510
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser

 515 520 525
 Glu Ser Val Tyr Ser Asn Asn Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 530 535 540
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asp Leu Ala Ser
 545 550 555 560

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
565 570 575

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

580 585 590
Ala Gly Gly Phe Ser Ser Ser Ser Asp Thr Ala Phe Gly Gly Gly Thr
595 600 605

Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
610 615 620

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
625 630 635 640

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys

645 650 655
Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Asn Ala Met Gly Trp Val Arg
660 665 670

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly Ile Ile Ser Val Gly
675 680 685

Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
690 695 700

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg

705 710 715 720
Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg His Gly Gly
725 730 735

Asp Ser Ser Gly Ala Phe Tyr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
740 745 750

Val Ser Ser
755

<210> 79

<211> 761

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 79

```

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp
          85          90          95
Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly
          100         105         110
Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
          115         120         125

Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser
          130         135         140
Phe Asn Asn Asp Tyr Asp Met Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
145          150          155          160
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Asp Thr Gly Asp Gly Ser Thr Tyr
          165         170         175
Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser
          180         185         190

Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
          195         200         205
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Ala Ser Ser Ser Gly Tyr Gly
          210         215         220
Met Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
225          230         235         240

```

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
260 265 270

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser
275 280 285

Val Tyr Asp Asn Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
290 295 300

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
305 310 315 320

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
325 330 335

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly
340 345 350

Thr Tyr Leu Ser Ser Asn Trp Tyr Trp Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys
355 360 365

Val Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu
370 375 380

Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys
385 390 395 400

Lys Val Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Asp Met Cys Trp Ile
405 410 415

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Val Val Ala
420 425 430

Gly Ser Val Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Val
435 440 445

Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser
450 455 460

Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Asp
465 470 475 480

Ala Tyr Ser Asp Ala Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

485 490 495
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met
 500 505 510

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

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

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

 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 705 710 715 720
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 725 730 735

Arg Asp Arg His Gly Gly Asp Ser Ser Gly Ala Phe Tyr Leu Trp Gly

740 745 750

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

755 760

<210> 80

<211> 753

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 80

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp

85 90 95

Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly

100 105 110

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

115 120 125

Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser

130 135 140

Phe Ser Asn Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys

145 150 155 160

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Thr Phe Val Gly Ser Ser Asp Ser Thr

165	170	175
Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser		
180	185	190
Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp		
195	200	205
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Pro Ser Asp Ala Val Tyr Gly		
210	215	220
Tyr Ala Asn Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
225	230	235
		240
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
245	250	255
Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala		
260	265	270
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile		
275	280	285
Asn Asn Val Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys		
290	295	300
Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg		
305	310	315
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser		
325	330	335
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Gly		
340	345	350
Asn Tyr Gly Asp Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly		
355	360	365
Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val		
370	375	380
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser		
385	390	395
Phe Ser Ser Gly Tyr Asp Met Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys		
405	410	415

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr
420 425 430

Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser
435 440 445

Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
450 455 460

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe
465 470 475 480

Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
485 490 495

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
500 505 510

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser
515 520 525

Gln Ile Ile Ser Ser Arg Ser Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
530 535 540

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val
545 550 555 560

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
565 570 575

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys
580 585 590

Thr Tyr Ile Asp Ser Asn Phe Gly Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
595 600 605

Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
610 615 620

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
625 630 635 640

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
645 650 655

Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln

660 665 670
Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Cys Val Phe Thr Gly Asp
675 680 685

Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
690 695 700
Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
705 710 715 720
Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Val Ser Val Tyr
725 730 735
Tyr Tyr Gly Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
740 745 750

Ser

<210> 81

<211> 759

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 81

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

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

100	105	110	
Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val			
115	120	125	
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser			
130	135	140	
Phe Asn Asn Asp Tyr Asp Met Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys			
145	150	155	160
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Asp Thr Gly Asp Gly Ser Thr Tyr			
165	170	175	
Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser			
180	185	190	
Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr			
195	200	205	
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Ala Ser Ser Ser Gly Tyr Gly			
210	215	220	
Met Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser			
225	230	235	240
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
245	250	255	
Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser			
260	265	270	
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Gln Ser			
275	280	285	
Val Tyr Asp Asn Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys			
290	295	300	
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val			
305	310	315	320
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
325	330	335	
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly			
340	345	350	

Thr Tyr Leu Ser Ser Asn Trp Tyr Trp Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys
355 360 365

Val Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu
370 375 380

Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys
385 390 395 400

Lys Val Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Asp Met Cys Trp Ile
405 410 415

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Val Val Ala
420 425 430

Gly Ser Val Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Val
435 440 445

Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser
450 455 460

Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Asp
465 470 475 480

Ala Tyr Ser Asp Ala Phe Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
485 490 495

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Val Met
500 505 510

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
515 520 525

Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ile Ile Ser Ser Arg Ser Ala Trp Tyr
530 535 540

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser
545 550 555 560

Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
565 570 575

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
580 585 590

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

595 600 605
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 610 615 620

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
 625 630 635 640
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
 645 650 655
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ser Tyr Trp
 660 665 670
 Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 675 680 685

Cys Val Phe Thr Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 690 695 700
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 705 710 715 720
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 725 730 735
 Arg Pro Val Ser Val Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly
 740 745 750

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 755

<210> 82

<211> 478

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 82

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asp Tyr
 20 25 30

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

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

 100 105 110
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 115 120 125
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 145 150 155 160
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr

 165 170 175
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 180 185 190
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 195 200 205
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 210 215 220
 Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser

 225 230 235 240
 Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn
 245 250 255
 Asn Val Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 260 265 270
 Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

275 280 285
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

290 295 300
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Gly Asn
305 310 315 320
Tyr Gly Asp Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly Gly
325 330 335
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
340 345 350
Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro

355 360 365
Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser Phe Ser
370 375 380
Asn Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
385 390 395 400
Glu Trp Ile Gly Cys Thr Phe Val Gly Ser Ser Asp Ser Thr Tyr Tyr
405 410 415
Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser Lys

420 425 430
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
435 440 445
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Pro Ser Asp Ala Val Tyr Gly Tyr Ala
450 455 460
Asn Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
465 470 475

<210> 83

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 83

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

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

 115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

 180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445
 Pro Gly Lys
 450

<210> 84

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 84

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asp Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp
85 90 95

Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Thr
100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 85

<211> 712

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 85

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Asp Met Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser

50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser Lys Asn Gln

65 70 75 80

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe Asn Leu Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

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

210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240

 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met
 450 455 460

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
465 470 475 480
Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Val Leu Ala Trp Tyr
485 490 495

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser
500 505 510
Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
515 520 525
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
530 535 540
Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Gly Asn Tyr Gly Asp Phe Gly Thr
545 550 555 560

Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
565 570 575
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
580 585 590
Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu
595 600 605
Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asn Ser Tyr Trp Ile Cys
610 615 620

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Thr
625 630 635 640
Phe Val Gly Ser Ser Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
645 650 655
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
660 665 670
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
675 680 685

His Pro Ser Asp Ala Val Tyr Gly Tyr Ala Asn Asn Leu Trp Gly Gln
690 695 700
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

705 710

<210> 86

<211> 478

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 86

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp

85 90 95

Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Thr

100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

115 120 125

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

130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly

145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr

165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His

180 185 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val

195 200 205
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

 210 215 220
 Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 225 230 235 240
 Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn
 245 250 255
 Asn Val Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 260 265 270
 Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

 275 280 285
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 290 295 300
 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Gly Asn
 305 310 315 320
 Tyr Gly Asp Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly Gly
 325 330 335
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

 340 345 350
 Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
 355 360 365
 Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser Phe Ser
 370 375 380
 Asn Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 385 390 395 400
 Glu Trp Ile Gly Cys Thr Phe Val Gly Ser Ser Asp Ser Thr Tyr Tyr

 405 410 415
 Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser Lys
 420 425 430
 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 435 440 445

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Pro Ser Asp Ala Val Tyr Gly Tyr Ala

450 455 460

Asn Asn Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

465 470 475

<210> 87

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 87

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Asp Met Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser

50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser Lys Asn Gln

65 70 75 80

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe Asn Leu Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

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

165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 88

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 88

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp

85 90 95

Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Thr

100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

115 120 125

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

130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly

145 150 155 160
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 165 170 175
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 180 185 190
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 89

<211> 712

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 89

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Asp Met Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Cys Val Val Ala Gly Ser Val Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser

50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser Lys Asn Gln

65 70 75 80

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe Asn Leu Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met
 450 455 460
 Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
 465 470 475 480
 Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Val Leu Ala Trp Tyr
 485 490 495
 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser
 500 505 510
 Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 515 520 525
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 530 535 540
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Gly Asn Tyr Gly Asp Phe Gly Thr
 545 550 555 560
 Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 565 570 575
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
 580 585 590
 Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu
 595 600 605
 Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asn Ser Tyr Trp Ile Cys
 610 615 620
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Cys Thr

625 630 635 640
Phe Val Gly Ser Ser Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 645 650 655
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Ser Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 660 665 670
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

 675 680 685
His Pro Ser Asp Ala Val Tyr Gly Tyr Ala Asn Asn Leu Trp Gly Gln
 690 695 700
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
705 710

<210> 90

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 90

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ile Ile Thr Asp
 85 90 95
Ile Asp Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Thr
 100 105 110
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

115 120 125
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 91

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 91

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30
Tyr Asp Met Cys Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

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

Tyr Cys Ala Arg Lys Asp Ala Tyr Ser Asp Ala Phe Asn Leu Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

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

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255

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

260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320

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

325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445
Pro Gly Lys

450

<210> 92

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 92

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Phe Ile Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Asn Phe Tyr Ser Asp Ser
85 90 95
Thr Thr Ile Gly Pro Asn Ala Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val
100 105 110
Leu Gly Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 93

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sequence of recombinant antibody or functional part thereof

<400> 93

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Asp
20 25 30

Tyr Trp Ile Tyr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Ile Gly Ser Ile Tyr Gly Gly Ser Ser Gly Asn Thr Gln Tyr Ala Ser
50 55 60

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

 Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Val Asp Tyr Gly Gly Ala Thr Asp Leu Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160

 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415

 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450