



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0089532
(43) 공개일자 2016년07월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/3955 (2013.01)
A61K 39/39558 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7018822

(22) 출원일자(국제) 2014년12월17일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2016년07월13일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/070983

(87) 국제공개번호 WO 2015/095410

국제공개일자 2015년06월25일

(30) 우선권주장

61/917,264 2013년12월17일 미국(US)

62/034,766 2014년08월07일 미국(US)

(71) 출원인

제넨테크, 임크.

미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 별명자

김, 정

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크 임크. 내

(74) 대리인

양영준, 이귀동

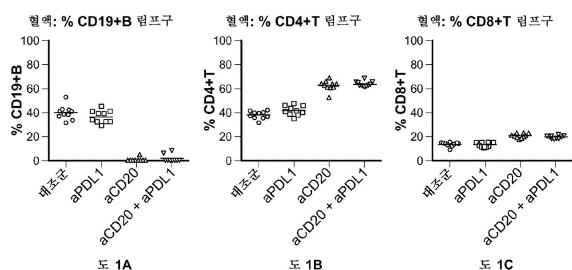
전체 청구항 수 : 총 108 항

(54) 발명의 명칭 PD-1 측 결합 길항체 및 항-CD20 항체를 사용하여 암을 치료하는 방법

(57) 요약

본 발명은 PD-1 측 결합 길항체 및 항-CD20 항체를 포함하는 조합 치료, 및 증진된 면역원성이 요구되는 상태를 치료하는 방법, 예컨대 암의 치료를 위해 종양 면역원성을 증가시키는 방법을 포함한 그의 사용 방법을 기재한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

C07K 16/2803 (2013.01)

C07K 16/2827 (2013.01)

C07K 16/2887 (2013.01)

C07K 16/3061 (2013.01)

C07K 16/468 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/507 (2013.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

개체에게 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 항-CD20 항체를 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, PD-1 축 결합 길항제가 PD-1 결합 길항제, PD-L1 결합 길항제 및 PD-L2 결합 길항제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, PD-1 축 결합 길항제가 PD-1 결합 길항제인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 PD-1의 그의 리간드 결합 파트너에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 PD-1의 PD-L1에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 PD-1의 PD-L2에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 PD-1의 PD-L1 및 PD-L2 둘 다에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 8

제4항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 항체인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 MDX-1106인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 머크(Merck) 3745인 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 CT-011인 방법.

청구항 12

제4항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 AMP-224인 방법.

청구항 13

제2항에 있어서, PD-1 축 결합 길항제가 PD-L1 결합 길항제인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, PD-L1 결합 길항제가 PD-L1의 PD-1에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, PD-L1 결합 길항체가 PD-L1의 B7-1에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, PD-L1 결합 길항체가 PD-L1의 PD-1 및 B7-1 둘 다에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 17

제13항에 있어서, PD-L1 결합 길항체가 항-PD-L1 항체인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 항-PD-L1 항체가 모노클로날 항체인 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 항-PD-L1 항체가 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 및 $(Fab')_2$ 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 단편인 방법.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 항-PD-L1 항체가 인간화 항체 또는 인간 항체인 방법.

청구항 21

제13항에 있어서, PD-L1 결합 길항체가 YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 및 MEDI4736으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 22

제17항에 있어서, 항-PD-L1 항체가 서열식별번호: 15의 HVR-H1 서열, 서열식별번호: 16의 HVR-H2 서열 및 서열식별번호: 3의 HVR-H3 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열식별번호: 17의 HVR-L1 서열, 서열식별번호: 18의 HVR-L2 서열 및 서열식별번호: 19의 HVR-L3 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제17항에 있어서, 항-PD-L1 항체가 서열식별번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제2항에 있어서, PD-1 측 결합 길항체가 PD-L2 결합 길항체인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, PD-L2 결합 길항체가 항체인 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, PD-L2 결합 길항체가 이뮤노어드헤신인 방법.

청구항 27

제8항, 제17항 내지 제23항 및 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 EU 넘버링에 따른 위치 297에 Asn에서 Ala로의 치환을 갖는 인간 IgG1인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20 항체가 인간화 B-Ly1 항체인 방법.

청구항 29

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20 항체가 GA101 항체인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, GA101이 서열식별번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 서열식별번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열식별번호: 53의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열식별번호: 54의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2 및 서열식별번호: 55의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-인간 CD20 항체인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, GA101 항체가 서열식별번호: 56의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 57의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, GA101 항체가 서열식별번호: 58의 아미노산 서열 및 서열식별번호: 59의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 33

제30항에 있어서, GA101 항체가 오비누투주맙인 방법.

청구항 34

제30항에 있어서, GA101 항체가 서열식별번호: 58의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 및 서열식별번호: 59의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 35

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20 항체가 다중특이적 항체인 방법.

청구항 36

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20 항체가 이중특이적 항체인 방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 인간인 방법.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 암을 가지고 있거나 암으로 진단된 것인 방법.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 CD20-발현 암인 방법.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 비-고형 종양인 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 암이 립프종 또는 백혈병인 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 백혈병이 만성 립프구성 백혈병 (CLL) 또는 급성 골수성 백혈병 (AML)인 방법.

청구항 43

제41항에 있어서, 림프종이 비-호지킨 림프종 (NHL)인 방법.

청구항 44

제39항 또는 제40항에 있어서, 개체가 재발성 또는 불응성 또는 이전에 치료되지 않은 만성 림프구성 백혈병을 앓고 있는 것인 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 개체가 불응성 또는 재발성 여포성 림프종 또는 미만성 대 B-세포 림프종 (DLBCL)을 앓고 있는 것인 방법.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 치료가 치료 중지 후에 개체에서 지속된 반응을 유발하는 것인 방법.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20 항체 또는 PD-1 축 결합 길항제가 연속적으로 또는 간헐적으로 투여되는 것인 방법.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20 항체가 PD-1 축 결합 길항제 전에 투여되는 것인 방법.

청구항 49

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20 항체가 PD-1 축 결합 길항제와 동시에 투여되는 것인 방법.

청구항 50

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20 항체가 PD-1 축 결합 길항제 후에 투여되는 것인 방법.

청구항 51

유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 항-CD20 항체의 조합물을 투여하는 것을 포함하는, 암을 갖는 개체에서 면역 기능을 증진시키는 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 개체에서의 CD8 T 세포가 조합물의 투여 전에 비해 증진된 프라이밍, 활성화, 증식 및/또는 세포용해 활성을 갖는 것인 방법.

청구항 53

제51항에 있어서, CD8 T 세포 활성화가 조합물의 투여 전에 비해 γ -IFN⁺ CD8 T 세포의 상승된 빈도 및/또는 증진된 세포용해 활성을 특징으로 하는 것인 방법.

청구항 54

제51항에 있어서, CD8 T 세포의 수가 조합물의 투여 전에 비해 상승되는 것인 방법.

청구항 55

제51항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, CD8 T 세포가 항원-특이적 CD8 T 세포인 방법.

청구항 56

제51항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1 축 결합 길항제가 PD-1 결합 길항제, PD-L1 결합 길항제 및

PD-L2 결합 길항제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, PD-1 측 결합 길항제가 PD-1 결합 길항제인 방법.

청구항 58

제57항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 PD-1의 그의 리간드 결합 파트너에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 59

제57항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 PD-1의 PD-L1에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 60

제57항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 PD-1의 PD-L2에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 61

제57항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 PD-1의 PD-L1 및 PD-L2 둘 다에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 62

제57항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 항-PD-1 항체인 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 MDX-1106, 머크 3745 또는 CT-011인 방법.

청구항 64

제57항에 있어서, PD-1 결합 길항제가 AMP-224인 방법.

청구항 65

제56항에 있어서, PD-1 측 결합 길항제가 PD-L1 결합 길항제인 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, PD-L1 결합 길항제가 PD-L1의 PD-1에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 67

제65항에 있어서, PD-L1 결합 길항제가 PD-L1의 B7-1에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 68

제65항에 있어서, PD-L1 결합 길항제가 PD-L1의 PD-1 및 B7-1 둘 다에 대한 결합을 억제하는 것인 방법.

청구항 69

제65항에 있어서, PD-L1 결합 길항제가 항-PD-L1 항체인 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 항-PD-L1 항체가 모노클로날 항체인 방법.

청구항 71

제69항에 있어서, 항-PD-L1 항체가 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 단편인 방법.

청구항 72

제69항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 항-PD-L1 항체가 인간화 항체 또는 인간 항체인 방법.

청구항 73

제65항에 있어서, PD-L1 결합 길항체가 YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 및 MEDI4736으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 74

제69항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 항-PD-L1 항체가 서열식별번호: 15의 HVR-H1 서열, 서열식별번호: 16의 HVR-H2 서열 및 서열식별번호: 3의 HVR-H3 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열식별번호: 17의 HVR-L1 서열, 서열식별번호: 18의 HVR-L2 서열 및 서열식별번호: 19의 HVR-L3 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것인 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, 항-PD-L1 항체가 서열식별번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 76

제56항에 있어서, PD-1 측 결합 길항체가 PD-L2 결합 길항체인 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, PD-L2 결합 길항체가 항체인 방법.

청구항 78

제76항에 있어서, PD-L2 결합 길항체가 이뮤노어드헤신인 방법.

청구항 79

제62항, 제69항 내지 제75항 및 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 EU 넘버링에 따른 위치 297에 Asn에서 Ala로의 치환을 갖는 인간 IgG1인 방법.

청구항 80

제51항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20 항체가 인간화 B-Ly1 항체인 방법.

청구항 81

제51항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20 항체가 GA101 항체인 방법.

청구항 82

제81항에 있어서, GA101이 서열식별번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 서열식별번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열식별번호: 53의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열식별번호: 54의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2 및 서열식별번호: 55의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-인간 CD20 항체인 방법.

청구항 83

제81항에 있어서, GA101 항체가 서열식별번호: 56의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 57의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 84

제81항에 있어서, GA101 항체가 서열식별번호: 58의 아미노산 서열 및 서열식별번호: 59의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 85

제81항에 있어서, GA101 항체가 오비누투주맙인 방법.

청구항 86

제81항에 있어서, GA101 항체가 서열식별번호: 58의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 및 서열식별번호: 59의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 87

제51항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20 항체가 다중특이적 항체인 방법.

청구항 88

제51항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20 항체가 이중특이적 항체인 방법.

청구항 89

제51항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 인간인 방법.

청구항 90

제51항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 암을 가지고 있거나 암으로 진단된 것인 방법.

청구항 91

제51항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 CD20-발현 암인 방법.

청구항 92

제51항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 비-고형 종양인 방법.

청구항 93

제92항에 있어서, 암이 림프종 또는 백혈병인 방법.

청구항 94

제93항에 있어서, 백혈병이 만성 림프구성 백혈병 (CLL) 또는 급성 골수성 백혈병 (AML)인 방법.

청구항 95

제93항에 있어서, 림프종이 비-호지킨 림프종 (NHL)인 방법.

청구항 96

제91항에 있어서, 개체가 재발성 또는 불응성 또는 이전에 치료되지 않은 만성 림프구성 백혈병을 앓고 있는 것인 방법.

청구항 97

제96항에 있어서, 개체가 불응성 또는 재발성 여포성 림프종 또는 미만성 대 B-세포 림프종 (DLBCL)을 앓고 있는 것인 방법.

청구항 98

제51항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20 항체 또는 PD-1 축 결합 길항체가 연속적으로 또는 간헐적으로 투여되는 것인 방법.

청구항 99

제51항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20 항체가 PD-1 축 결합 길항체 전에 투여되는 것인 방법.

청구항 100

제51항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20 항체가 PD-1 축 결합 길항제와 동시 투여되는 것인 방법.

청구항 101

제51항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20 항체가 PD-1 축 결합 길항제 후에 투여되는 것인 방법.

청구항 102

제1항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1 축 결합 길항제 또는 항-CD20 항체가 정맥내로, 근육내로, 피하로, 국소로, 경구로, 경피로, 복강내로, 안와내로, 이식에 의해, 흡입에 의해, 척수강내로, 뇌실내로 또는 비강내로 투여되는 것인 방법.

청구항 103

제23항, 제24항, 제74항 및 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 항-PD-L1 항체가 1200 mg의 용량으로 3주마다 1회 개체에게 정맥내로 투여되는 것인 방법.

청구항 104

제30항 내지 제34항 및 제82항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20 항체가 1000 mg의 용량으로 제1 주기의 제1일, 제8일 및 제15일, 및 제2 내지 제8 주기의 제1일에 1회 개체에게 정맥내로 투여되는 것인 방법.

청구항 105

PD-1 축 결합 길항제, 및 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위해 PD-1 축 결합 길항제를 항-CD20 항체와 조합하여 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 포함하는 키트.

청구항 106

PD-1 축 결합 길항제 및 항-CD20 항체를 포함하는 키트.

청구항 107

제106항에 있어서, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위해 PD-1 축 결합 길항제 및 항-CD20 항체를 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 추가로 포함하는 키트.

청구항 108

항-CD20 항체, 및 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위해 항-CD20 항체를 PD-1 축 결합 길항제와 조합하여 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 포함하는 키트.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2013년 12월 17일에 출원된 미국 가출원 번호 61/917,264 및 2014년 8월 7일에 출원된 미국 가출원 번호 62/034,766의 우선권 이익을 주장하며, 이를 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] ASCII 텍스트 파일의 서열 목록 제출

[0004] ASCII 텍스트 파일의 하기 제출 내용: 서열 목록의 컴퓨터 판독가능 형태 (CRF) (파일명: 146392027940SeqList.txt, 기록 일자: 2014년 12월 16일, 크기: 57 KB)는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0005] T-세포에 2가지 별개의 신호를 제공하는 것은 항원-제시 세포 (APC)에 의한 휴지 T 림프구의 림프구 활성화에 널리 허용되는 모델이다. 문헌 [Lafferty et al., Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 53: 27-42 (1975)]. 이러한

한 모델은 추가로 비-자기 면역 관용으로부터 자기 면역 관용의 구별을 제공한다. 문헌 [Bretscher et al., Science 169: 1042-1049 (1970); Bretscher, P.A., P.N.A.S. USA 96: 185-190 (1999); Jenkins et al., J. Exp. Med. 165: 302-319 (1987)]. 1차 신호 또는 항원 특이적 신호는 주요 조직적합성-복합체 (MHC)와 관련하여 제시된 외래 항원 펩티드의 인식 후에 T-세포 수용체 (TCR)를 통해 전달된다. 2차 또는 공동-자극 신호는 항원-제시 세포 (APC) 상에서 발현된 공동-자극 분자에 의해 T-세포로 전달되고, T-세포가 클론 확장, 시토카인 분비 및 이팩터 기능을 촉진하도록 유도한다. 문헌 [Lenschow et al., Ann. Rev. Immunol. 14:233 (1996)]. 공동-자극의 부재 하에, T-세포는 항원 자극에 대해 불응성이 될 수 있고, 효과적인 면역 반응을 탑재하지 않을 수 있으며, 추가로 외래 항원에 대해 소진되거나 관용이 생길 수 있다.

[0006] 2-신호 모델에서 T-세포는 양성 및 음성 2차 공동-자극 신호를 둘 다 받는다. 이러한 양성 및 음성 신호의 조절은 면역 관용을 유지하고 자가면역을 방지하면서 숙주의 보호성 면역 반응을 최대화하는데 중요하다. 음성 2차 신호는 T-세포 관용을 유도하는데 필요한 것으로 보이는 반면에, 양성 신호는 T-세포 활성화를 촉진한다. 간단한 2-신호 모델이 나이브 럼프구에 대해서는 여전히 유효한 설명을 제공하지만, 숙주의 면역 반응은 동적 과정이고, 공동-자극 신호는 또한 항원-노출된 T-세포에도 제공될 수 있다. 공동-자극 신호의 조작이 세포-기반 면역 반응을 증진시키거나 종결시키는 수단을 제공하는 것으로 나타났기 때문에, 공동-자극의 메카니즘이 치료 관심사이다. 최근에, T 세포 기능이상 또는 무반응은 억제 수용체인 프로그램화된 사멸 1 폴리펩티드 (PD-1)의 유도된 발현 및 지속된 발현과 공동으로 일어나는 것으로 밝혀졌다. 그 결과, PD-1 및 PD-1과의 상호작용을 통해 신호를 전달하는 다른 분자, 예컨대 프로그램화된 사멸 리간드 1 (PD-L1) 및 프로그램화된 사멸 리간드 2 (PD-L2)를 표적화하는 요법이 관심이 집중되는 영역이다.

[0007] PD-L1은 많은 암에서 과다발현되며, 종종 불량한 예후와 연관된다 (Okazaki T et al., Intern. Immun. 2007 19(7):813) (Thompson RH et al., Cancer Res 2006, 66(7):3381). 흥미롭게도, 대다수의 종양 침윤 T 럼프구는 정상 조직 내의 T 럼프구 및 말초 혈액 T 럼프구와 달리 PD-1을 우세하게 발현하며, 이는 종양-반응성 T 세포 상에서의 PD-1의 상향-조절이 손상된 항종양 면역 반응에 대한 원인이 될 수 있다는 것을 나타낸다 (Blood 2009 114(8):1537). 이것은 T 세포 활성화의 감쇠 및 면역 감시의 회피를 유발하도록 PD-1 발현 T 세포와 상호작용하는 PD-L1 발현 종양 세포에 의해 매개되는 PD-L1 신호전달의 이용으로 인한 것일 수 있다 (Sharpe et al., Nat Rev 2002) (Keir ME et al., 2008 Annu. Rev. Immunol. 26:677). 따라서, PD-L1/PD-1 상호작용의 억제는 종양의 CD8+ T 세포-매개 사멸을 증진시킬 수 있다.

[0008] 직접적 리간드 (예를 들어, PD-L1, PD-L2)를 통한 PD-1 축 신호전달의 억제는 암의 치료를 위한 T 세포 면역 (예를 들어, 종양 면역)을 증진시키기 위한 수단으로 제안되었다. 또한, T 세포 면역에 대한 유사한 증진이 PD-L1의 결합 파트너 B7-1에 대한 결합을 억제함으로써 관찰되었다. 또한, 종양 세포에서 탈조절되는 다른 신호전달 경로 (예를 들어, MAPK 경로, "MEK")와 PD-1 신호전달의 억제를 조합하는 것은 치료 효능을 추가로 증진시킬 수 있다. 그러나, 최적의 치유적 치료는 PD-1 수용체/리간드 상호작용의 차단을 종양을 직접 억제하는 작용제와 조합할 것이며, 이는 임의로 단독의 PD-1 차단에 의해 제공되지 않는 특유한 면역 증진 특성을 추가로 포함한다. 다양한 암의 치료, 안정화, 예방 및/또는 발생 지연을 위한 이러한 최적의 요법에 대한 필요성이 계속 존재한다.

[0009] 본원에 개시된 모든 참고문헌, 공개물 및 특허 출원은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

발명의 내용

[0010] 한 측면에서, 개체에게 유효량의 PD-1 축 결합 길항체 및 항-CD20 항체를 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키는 방법이 본원에 제공된다.

[0011] 또 다른 측면에서, 유효량의 PD-1 축 결합 길항체 및 항-CD20 항체의 조합물을 투여하는 것을 포함하는, 암을 갖는 개체에서 면역 기능을 증진시키는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 개체에서의 CD8 T 세포는 조합물의 투여 전에 비해 증진된 프라이밍, 활성화, 증식 및/또는 세포용해 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포 활성화는 조합물의 투여 전에 비해 γ -IFN⁺ CD8 T 세포의 상승된 빈도 및/또는 증진된 세포용해 활성을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포의 수는 조합물의 투여 전에 비해 상승된다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포는 항원-특이적 CD8 T 세포이다.

[0012] 또 다른 측면에서, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위한 의약의 제조에서의 인간 PD-1 축 결합 길항체의 용도가 본원에 제공되며, 여기서 의약은 인간 PD-1 축 결합 길항체 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하고, 여기서 치료는 의약을 항-CD20 항체 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물과

조합하여 투여하는 것을 포함한다.

[0013] 또 다른 측면에서, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위한 의약의 제조에서의 항-CD20 항체의 용도가 본원에 제공되며, 여기서 의약은 항-CD20 항체 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하고, 여기서 치료는 의약을 인간 PD-1 축 결합 길항체 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물과 조합하여 투여하는 것을 포함한다.

[0014] 또 다른 측면에서, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키는데 사용하기 위한 인간 PD-1 축 결합 길항체 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 치료는 상기 조성물을 제2 조성물과 조합하여 투여하는 것을 포함하고, 여기서 제2 조성물은 항-CD20 항체 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함한다.

[0015] 또 다른 측면에서, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키는데 사용하기 위한 항-CD20 항체 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 치료는 상기 조성물을 제2 조성물과 조합하여 투여하는 것을 포함하고, 여기서 제2 조성물은 인간 PD-1 축 결합 길항체 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함한다.

[0016] 또 다른 측면에서, 암을 갖는 개체에서 면역 기능을 증진시키기 위한 의약의 제조에서의 인간 PD-1 축 결합 길항체의 용도가 본원에 제공되며, 여기서 의약은 인간 PD-1 축 결합 길항체 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하고, 여기서 치료는 의약을 항-CD20 항체 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물과 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 개체에서의 CD8 T 세포는 조합물의 투여 전에 비해 증진된 프라이밍, 활성화, 증식 및/또는 세포용해 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포 활성화는 조합물의 투여 전에 비해 γ -IFN⁺ CD8 T 세포의 상승된 빈도 및/또는 증진된 세포용해 활성을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포 활성화는 조합물의 투여 전에 비해 상승된다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포는 항원-특이적 CD8 T 세포이다.

[0017] 또 다른 측면에서, 암을 갖는 개체에서 면역 기능을 증진시키기 위한 의약의 제조에서의 항-CD20 항체의 용도가 본원에 제공되며, 여기서 의약은 항-CD20 항체 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하고, 여기서 치료는 의약을 인간 PD-1 축 결합 길항체 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물과 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 개체에서의 CD8 T 세포는 조합물의 투여 전에 비해 증진된 프라이밍, 활성화, 증식 및/또는 세포용해 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포 활성화는 조합물의 투여 전에 비해 γ -IFN⁺ CD8 T 세포의 상승된 빈도 및/또는 증진된 세포용해 활성을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포의 수는 조합물의 투여 전에 비해 상승된다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포는 항원-특이적 CD8 T 세포이다.

[0018] 또 다른 측면에서, 암을 갖는 개체에서 면역 기능을 증진시키는데 사용하기 위한 인간 PD-1 축 결합 길항체 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 치료는 상기 조성물을 제2 조성물과 조합하여 투여하는 것을 포함하고, 여기서 제2 조성물은 항-CD20 항체 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 개체에서의 CD8 T 세포는 조합물의 투여 전에 비해 증진된 프라이밍, 활성화, 증식 및/또는 세포용해 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포 활성화는 조합물의 투여 전에 비해 γ -IFN⁺ CD8 T 세포의 상승된 빈도 및/또는 증진된 세포용해 활성을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포의 수는 조합물의 투여 전에 비해 상승된다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포는 항원-특이적 CD8 T 세포이다.

[0019] 또 다른 측면에서, 암을 갖는 개체의 면역 기능을 증진시키는데 사용하기 위한 항-CD20 항체 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 치료는 상기 조성물을 제2 조성물과 조합하여 투여하는 것을 포함하고, 여기서 제2 조성물은 인간 PD-1 축 결합 길항체 및 임의적인 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 개체에서의 CD8 T 세포는 조합물의 투여 전에 비해 증진된 프라이밍, 활성화, 증식 및/또는 세포용해 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포 활성화는 조합물의 투여 전에 비해 γ -IFN⁺ CD8 T 세포의 상승된 빈도 및/또는 증진된 세포용해 활성을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포의 수는 조합물의 투여 전에 비해 상승된다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포는 항원-특이적 CD8 T 세포이다.

[0020] 상기 및 본원에 기재된 방법, 용도, 조성물 및 키트의 일부 실시양태에서, 암은 비-고형 종양이다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병 또는 림프종이다. 일부 실시양태에서, 백혈병은 만성 림프구성 백혈병 (CLL) 또는 급성

골수성 백혈병 (AML)이다. 일부 실시양태에서, 림프종은 여포성 림프종 (FL), 미만성 대 B-세포 림프종 (DLBCL) 또는 비-호지킨 림프종 (NHL)이다.

[0021]

상기 및 본원에 기재된 방법, 용도, 조성물 및 키트의 일부 실시양태에서, PD-1 측 결합 길항체는 PD-1 결합 길항체, PD-L1 결합 길항체 및 PD-L2 결합 길항체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PD-1 측 결합 길항체는 PD-1의 그의 리간드 결합 파트너에 대한 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항체는 PD-1의 PD-L1에 대한 결합, PD-1의 PD-L2에 대한 결합, 또는 PD-1의 PD-L1 및 PD-L2 둘 다에 대한 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항체는 항체이다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항체는 MDX-1106, 머크(Merck) 3745, CT-011 또는 AMP-224이다. 일부 실시양태에서, PD-1 측 결합 길항체는 PD-L1 결합 길항체이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 길항체는 PD-L1의 PD-1에 대한 결합, PD-L1의 B7-1에 대한 결합, 또는 PD-L1의 PD-1 및 B7-1 둘 다에 대한 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 길항체는 항-PD-L1 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 인간화 항체 또는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 길항체는 YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 및 MEDI4736으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열식별번호(SEQ ID NO): 15의 HVR-H1 서열, 서열식별번호: 16의 HVR-H2 서열 및 서열식별번호: 3의 HVR-H3 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열식별번호: 17의 HVR-L1 서열, 서열식별번호: 18의 HVR-L2 서열 및 서열식별번호: 19의 HVR-L3 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 24 또는 28의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 서열식별번호: 26에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 27에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-1 측 결합 길항체는 PD-L2 결합 길항체이다. 일부 실시양태에서, PD-L2 결합 길항체는 이뮤노어드헤신이다. 일부 실시양태에서, PD-1 측 결합 길항체는 1개 이상의 비-글리코실화 부위 돌연변이 (예를 들어, 치환)를 포함하는 항체 (예를 들어, 항-PD1 항체, 항-PDL1 항체 또는 항-PDL2 항체)이다. 일부 실시양태에서, 치환 돌연변이는 아미노산 위치 N297, L234, L235 및 D265 (EU 넘버링)에 1개 이상의 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치환 돌연변이는 N297G, N297A, L234A, L235A 및 D265A (EU 넘버링)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 IgG1이다. 일부 실시양태에서, 항체 (예를 들어, 항-PD1 항체, 항-PDL1 항체 또는 항-PDL2 항체)는 EU 넘버링에 따른 위치 297에 Asn에서 A1a로의 치환을 갖는 인간 IgG1이다.

[0022]

상기 및 본원에 기재된 방법, 용도, 조성물 및 키트의 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 본원에 기재된 리툭시맙이다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 본원에 기재된 인간화 B-Ly1 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 본원에 기재된 GA101 항체이다. 일부 실시양태에서, GA101은 서열식별번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 서열식별번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열식별번호: 53의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열식별번호: 54의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2 및 서열식별번호: 55의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-인간 CD20 항체이다. 일부 실시양태에서, GA101 항체는 서열식별번호: 56의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 57의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, GA101 항체는 서열식별번호: 58의 아미노산 서열 및 서열식별번호: 59의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, GA101 항체는 오비누투주맙으로 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 기재된 GA101 항체는 오비누투주맙이 아니다. 일부 실시양태에서, GA101 항체는 서열식별번호: 58의 아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 및 서열식별번호: 59의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 리툭시맙 또는 오비누투주맙이 아니다.

[0023]

상기 및 본원에 기재된 방법, 용도, 조성물 및 키트의 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 다중특이적 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 이중특이적 항체이다.

[0024]

상기 및 본원에 기재된 방법, 용도, 조성물 및 키트의 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체 또는 PD-1 측 결합 길항체는 연속적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체 또는 PD-1 측 결합 길항체는 간헐적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 PD-1 측 결합 길항체 전에 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 PD-1 측 결합 길항체와 동시에 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 PD-1 측 결합 길항체 후에 투여된다. 일부 실시양태에서, PD-1 측 결합 길항체 및/또는 항-CD20 항체는 정맥내로, 근육내로, 피하로, 국소로, 경구로, 경피로, 복강내로, 안와내로, 이식에 의해, 흡입에 의해, 척수강내로, 뇌실내로 또는 비강내로

투여된다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 1200 mg의 용량으로 3주마다 1회 개체에게 정맥내로 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 1000 mg의 용량으로 제1 주기의 제1일, 제8일 및 제15일, 및 제2 내지 제8 주기의 제1일에 1회 개체에게 정맥내로 투여된다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0025] 또 다른 측면에서, PD-1 축 결합 길항체, 및 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위해 PD-1 축 결합 길항체를 항-CD20 항체와 조합하여 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 포함하는 키트가 본원에 제공된다. 또 다른 측면에서, PD-1 축 결합 길항체 및 항-CD20 항체를 포함하는 키트가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 키트는 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위해 PD-1 축 결합 길항체 및 항-CD20 항체를 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 추가로 포함한다. 또 다른 측면에서, 항-CD20 항체, 및 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위해 항-CD20 항체를 PD-1 축 결합 길항체와 조합하여 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 포함하는 키트가 본원에 제공된다. 또 다른 측면에서, PD-1 축 결합 길항체, 및 암을 갖는 개체에서 면역 기능을 증진시키기 위해 PD-1 축 결합 길항체를 항-CD20 항체와 조합하여 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 포함하는 키트가 본원에 제공된다. 또 다른 측면에서, PD-1 축 결합 길항체 및 항-CD20 항체, 및 암을 갖는 개체에서 면역 기능을 증진시키기 위해 PD-1 축 결합 길항체 및 항-CD20 항체를 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 포함하는 키트가 본원에 제공된다. 또 다른 측면에서, 항-CD20 항체, 및 암을 갖는 개체에서 면역 기능을 증진시키기 위해 항-CD20 항체를 PD-1 축 결합 길항체와 조합하여 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 포함하는 키트가 본원에 제공된다.

[0026] 상기 및 본원에 기재된 방법, 용도, 조성물 및 키트의 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 개체는 암을 가지고 있거나 암으로 진단되었다. 일부 실시양태에서, 개체는 재발성 또는 불응성 암 (예를 들어, 비-고형 종양)을 앓고 있다. 일부 실시양태에서, 개체는 백혈병 (예를 들어, CLL, AML) 또는 림프종 (예를 들어, NHL)을 앓고 있다. 일부 실시양태에서, 개체는 재발성 또는 불응성 또는 이전에 치료되지 않은 CLL을 앓고 있다. 일부 실시양태에서, 개체는 불응성 또는 재발성 여포성 림프종 또는 미만성 대 B-세포 림프종 (DLBCL)을 앓고 있다.

[0027] 본원에 기재된 다양한 실시양태의 특성 중 하나, 일부 또는 전부가 조합되어 본 발명의 다른 실시양태를 형성할 수 있는 것으로 이해된다. 본 발명의 이들 및 다른 측면은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백하게 될 것이다. 본 발명의 이들 및 다른 실시양태는 하기 상세한 설명에 추가로 기재된다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1A-1C는 B 세포 고갈에 대한 항-CD20 항체와 조합한 항-PD-L1 항체의 투여의 효과를 결정하기 위해 수행된 실험의 결과를 보여준다. 도 1A는 CD19+ B 림프구의 퍼센트 (%)를 도시한다. 도 1B는 CD4+ T 림프구의 퍼센트 (%)를 도시한다. 도 1C는 CD8+ T 림프구의 퍼센트 (%)를 도시한다.

도 2는 A20 세포를 사용하는 마우스 모델에서 종양 성장에 대한 항-CD20 항체와 조합한 항-PD-L1 항체의 투여의 효과를 결정하기 위해 수행된 실험의 결과를 보여준다. 치료군 1-4는 실시예 2에서 상세히 기재된다. 그래프는 개별 플롯 (트렐리스(Trellis) 플롯)를 보여주고, 시간 경과에 따른 각 치료의 종양 부피의 "3차 스플라인 피트"를 나타낸다. 이것은 치료군당 모든 데이터를 피팅한 최고 평활 곡선을 선택하는 수학적 알고리즘이다.

도 3은 A20pRK-CD20-GFP 세포를 사용하는 마우스 모델에서 종양 성장에 대한 항-CD20 항체와 조합한 항-PD-L1 항체의 투여의 효과를 결정하기 위해 수행된 실험의 결과를 보여준다. 치료군 1-6은 실시예 2에 상세히 기재된다. 그래프는 개별 플롯 (트렐리스 플롯)를 보여주고, 시간 경과에 따른 각 치료의 종양 부피의 "3차 스플라인 피트"를 나타낸다. 이것은 치료군당 모든 데이터를 피팅한 최고 평활 곡선을 선택하는 수학적 알고리즘이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 일반적 기술

[0029] 본원에 기재되거나 언급된 기술 및 절차는 일반적으로 널리 이해되어 있고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해, 예를 들어 하기 문헌에 기재된 널리 이용되는 방법과 같은 통상적인 방법의 이용을 통해 통상적으로 사용된다: [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988)

Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); 및 Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993)).

[0031] II. 정의

용어 "길항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 본원에 개시된 천연 폴리펩티드의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단, 억제 또는 중화하는 임의의 분자를 포함한다. 유사한 방식으로, 용어 "효능체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 본원에 개시된 천연 폴리펩티드의 생물학적 활성을 모방하는 임의의 분자를 포함한다. 적합한 효능체 또는 길항체 분자는 구체적으로 효능체 또는 길항체 항체 또는 항체 단편, 천연 폴리펩티드의 단편 또는 아미노산 서열 변이체, 웨프티드, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 유기 소분자 등을 포함한다. 폴리펩티드의 효능체 또는 길항체를 확인하는 방법은 폴리펩티드를 후보 효능체 또는 길항체 분자와 접촉시키고, 폴리펩티드와 통상적으로 연관된 1종 이상의 생물학적 활성의 검출가능한 변화를 측정하는 것을 포함할 수 있다.

용어 "압타머"는 표적 분자, 예컨대 폴리펩티드에 결합할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 예를 들어, 본 발명의 압타머는 B-raf 폴리펩티드, 또는 B-raf의 발현 또는 활성을 조절하는 신호전달 경로에서의 분자에 특이적으로 결합할 수 있다. 압타머의 생성 및 치료 용도는 관련 기술분야에 널리 확립되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,475,096, 및 연령-관련 황반 변성의 치료를 위한 마류젠(Macugen)® (아이테크(Eyetech), 미국 뉴욕주)의 치료 효능을 참조한다.

용어 "PD-1 축 결합 길항체"는 PD-1 신호전달 축 상의 신호전달로부터 발생한 T-세포 기능이상이 제거되어 T-세포 기능 (예를 들어, 증식, 시토카인 생산, 표적 세포 사멸)을 회복 또는 증진시키는 결과를 나타내도록, PD-1 축 결합 파트너와 그의 결합 파트너 중 1종 이상의 상호작용을 억제하는 분자이다. 본원에 사용된 PD-1 축 결합 길항체는 PD-1 결합 길항체, PD-L1 결합 길항체 및 PD-L2 결합 길항체를 포함한다.

용어 "PD-1 결합 길항체"는 PD-1과 그의 결합 파트너, 예컨대 PD-L1, PD-L2 중 1종 이상과의 상호작용으로부터 발생한 신호 전달을 감소, 차단, 억제, 제거 또는 방해하는 분자이다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항체는 PD-1의 그의 결합 파트너에 대한 결합을 억제하는 분자이다. 구체적 측면에서, PD-1 결합 길항체는 PD-1의 PD-L1 및/또는 PD-L2에 대한 결합을 억제한다. 예를 들어, PD-1 결합 길항체는 항-PD-1 항체, 그의 항원 결합 단편, 이뮤노어드헤신, 융합 단백질, 올리고펩티드, 및 PD-1과 PD-L1 및/또는 PD-L2와의 상호작용으로부터 발생한 신호 전달을 감소, 차단, 억제, 제거 또는 방해하는 다른 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, PD-1 결합 길항체는 기능이상적 T-세포가 보다 덜 기능이상적이 되도록 (예를 들어, 항원 인식에 대한 이펙터 반응을 증진시킴) PD-1을 통한 T 림프구 매개된 신호전달시에 발현된 세포 표면 단백질에 의해 또는 이를 통해 매개되는 음성 공동-자극 신호를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항체는 항-PD-1 항체이다. 구체적 측면에서, PD-1 결합 길항체는 본원에 기재된 MDX-1106이다. 또 다른 구체적 측면에서, PD-1 결합 길항체는 본원에 기재된 머크 3745이다. 또 다른 구체적 측면에서, PD-1 결합 길항체는 본원에 기재된 CT-011이다.

용어 "PD-L1 결합 길항체"는 PD-L1과 그의 결합 파트너, 예컨대 PD-1, B7-1 중 1종 이상과의 상호작용으로부터 발생한 신호 전달을 감소, 차단, 억제, 제거 또는 방해하는 분자이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 길항체는 PD-L1의 그의 결합 파트너에 대한 결합을 억제하는 분자이다. 구체적 측면에서, PD-L1 결합 길항체는 PD-L1의 PD-1 및/또는 B7-1에 대한 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 길항체는 항-PD-L1 항체, 그의 항원 결합 단편, 이뮤노어드헤신, 융합 단백질, 올리고펩티드, 및 PD-L1과 그의 결합 파트너, 예컨대 PD-1, B7-

1 중 1종 이상과의 상호작용으로부터 발생한 신호 전달을 감소, 차단, 억제, 제거 또는 방해하는 다른 문자를 포함한다. 한 실시양태에서, PD-L1 결합 길항체는 기능이상적 T-세포가 보다 덜 기능이상적이 되도록 (예를 들어, 항원 인식에 대한 이펙터 반응을 증진시킴) PD-L1을 통한 T 림프구 매개된 신호전달시에 발현된 세포 표면 단백질에 의해 또는 이를 통해 매개되는 음성 공동-자극 신호를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 길항체는 항-PD-L1 항체이다. 구체적 측면에서, 항-PD-L1 항체는 본원에 기재된 YW243.55.S70이다. 또 다른 구체적 측면에서, 항-PD-L1 항체는 본원에 기재된 MDX-1105이다. 또 다른 구체적 측면에서, 항-PD-L1 항체는 본원에 기재된 MPDL3280A이다.

[0037] 용어 "PD-L2 결합 길항체"는 PD-L2 및 그의 결합 파트너 중 1종 이상, 예컨대 PD-1과의 상호작용으로부터 발생한 신호 전달을 감소, 차단, 억제, 폐지 또는 방해하는 문자이다. 일부 실시양태에서, PD-L2 결합 길항체는 PD-L2의 그의 결합 파트너에 대한 결합을 억제하는 문자이다. 구체적 측면에서, PD-L2 결합 길항체는 PD-L2의 PD-1에 대한 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, PD-L2 길항체는 항-PD-L2 항체, 그의 항원 결합 단편, 이뮤노어드헤신, 융합 단백질, 올리고펩티드, 및 PD-L2 및 그의 결합 파트너 중 1종 이상, 예컨대 PD-1과의 상호작용으로부터 발생한 신호 전달을 감소, 차단, 억제, 폐지 또는 방해하는 다른 문자를 포함한다. 한 실시양태에서, PD-L2 결합 길항체는 기능이상적 T-세포가 보다 덜 기능이상적이 되도록 (예를 들어, 항원 인식에 대한 이펙터 반응을 증진시킴) PD-L2를 통한 T 림프구 매개된 신호전달시에 발현된 세포 표면 단백질에 의해 또는 이를 통해 매개되는 음성 공동-자극 신호를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, PD-L2 결합 길항체는 이뮤노어드헤신이다.

[0038] 면역 기능이상과 관련된 용어 "기능이상"은 항원 자극에 대한 감소된 면역 반응성의 상태를 지칭한다. 이러한 용어는 항원 인식이 일어날 수 있지만 그로 인한 면역 반응이 감염 또는 종양 성장을 제어하는데 효과적이지 않은 소진 및/또는 무반응 둘 다의 공통 요소를 포함한다.

[0039] 본원에 사용된 용어 "기능이상적"은 또한 항원 인식에 대한 불응성 또는 비반응성, 구체적으로 항원 인식을 하류 T-세포 이펙터 기능, 예컨대 증식, 시토카인 생산 (예를 들어, IL-2) 및/또는 표적 세포 사멸로 번역하는 능력의 손상을 포함한다.

[0040] 용어 "무반응"은 T-세포 수용체를 통해 전달된 불완전한 또는 불충분한 신호로부터 발생한 항원 자극에 대한 비반응성의 상태 (예를 들어, ras-활성화의 부재 하에 세포내 Ca^{+2} 를 증가시킴)를 지칭한다. T 세포 무반응은 또한 공동-자극의 부재 하에 항원으로의 자극시에 발생할 수 있으며, 이는 세포가 심지어 공동자극과 관련하여 항원에 의한 후속 활성화에 불응성이 되도록 한다. 비반응성 상태는 종종 인터류킨-2의 존재에 의해 무효화될 수 있다. 무반응성 T-세포는 물론 확장을 겪고/거나 이펙터 기능을 획득하지 않는다.

[0041] 용어 "소진"은 다수의 만성 감염 및 암 동안 일어나는 지속된 TCR 신호전달로부터 발생한 T 세포 기능이상의 상태로서 T 세포 소진을 지칭한다. 이는 불완전한 또는 결함이 있는 신호전달을 통해서가 아니라 지속된 신호전달로부터 발생한다는 점에서 무반응과 구별된다. 이는 불량한 이펙터 기능, 억제 수용체의 지속된 발현 및 기능적 이펙터 또는 기억 T 세포의 것과 구별되는 전사 상태에 의해 정의된다. 소진은 감염 및 종양의 최적의 제어를 방해한다. 소진은 외인성 음성 조절 경로 (예를 들어, 면역조절 시토카인), 뿐만 아니라 세포 내인성 음성 조절 (공동자극) 경로 (PD-1, B7-H3, B7-H4 등) 둘 다로부터 발생할 수 있다.

[0042] "T-세포 기능을 증진시키는 것"은 T-세포가 지속된 또는 증폭된 생물학적 기능을 갖도록 유도, 유발 또는 자극하는 것, 또는 소진된 또는 불활성 T-세포를 재생 또는 재활성화시키는 것을 의미한다. T-세포 기능을 증진시키는 것의 예는 개입 전의 수준에 비해 CD8+ T-세포로부터의 γ -인터페론의 증가된 분비, 증가된 증식, 증가된 항원 반응성 (예를 들어, 바이러스, 병원체 또는 종양 클리어런스)을 포함한다. 한 실시양태에서, 증진 수준은 적어도 50%, 대안적으로 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150% 또는 200%이다. 이러한 증진을 측정하는 방식은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다.

[0043] "T 세포 기능이상 장애"는 항원 자극에 대한 감소된 반응성을 특징으로 하는 T-세포의 장애 또는 상태이다. 특정한 실시양태에서, T-세포 기능이상 장애는 PD-1을 통한 부적절한 증가된 신호전달과 특이적으로 연관된 장애이다. 또 다른 실시양태에서, T-세포 기능이상 장애는 T-세포가 무반응이거나 또는 시토카인 분비, 증식 또는 세포용해 활성을 수행하는 능력이 감소된 것이다. 구체적 측면에서, 감소된 반응성은 면역원을 발현하는 병원체 또는 종양을 비효과적으로 제어한다. T-세포 기능이상을 특징으로 하는 T 세포 기능이상 장애의 예는 미해결 급성 감염, 만성 감염 및 종양 면역을 포함한다.

[0044] "종양 면역"은 종양이 면역 인식 및 클리어런스를 회피하는 과정을 지칭한다. 이에 따라, 치료 개념으로서 종

양 면역은 이러한 회피가 감쇠되는 경우에 "치료"되고, 종양은 면역계에 의해 인식되어 공격받는다. 종양 인식의 예는 종양 결합, 종양 수축 및 종양 클리어런스를 포함한다.

[0045] "면역원성"은 면역 반응을 일으키기 위한 특정한 물질의 능력을 지칭한다. 종양은 면역원성이고, 면역 반응에 의한 종양 세포의 클리어런스에서 종양 면역원성 도움을 증진시킨다. 종양 면역원성을 증진시키는 것의 예는 항-PDL 항체 및 항-CD20 항체를 사용한 치료를 포함한다.

[0046] "지속된 반응"은 치료 중지 후에 종양 성장 감소에 대한 지속된 효과를 지칭한다. 예를 들어, 종양 크기는 투여 단계 초기의 크기와 비교하여 동일하거나 보다 작게 남아 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, 지속된 반응은 적어도 치료 지속기간과 동일한 지속기간, 치료 지속기간의 적어도 1.5X, 2.0X, 2.5X 또는 3.0X 길이의 지속기간을 갖는다.

[0047] 본원에 사용된 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 비조절된 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물에서의 생리학적 상태를 지칭하거나 기재한다. 이러한 정의에는 양성 및 악성 암, 뿐만 아니라 휴면 종양 또는 미세전이가 포함된다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예는, 편평세포암, 폐암 (소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평세포 암종 포함), 복막암, 간세포성암, 위암 또는 복부암 (위장암 포함), 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암 또는 신암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종 및 각종 유형의 두경부암, 뿐만 아니라 B-세포 림프종 (저등급/여포성 비-호지킨 림프종 (NHL); 소림프구성 (SL) NHL; 중등급/여포성 NHL; 중등급 미만성 NHL; 고등급 면역모세포성 NHL; 고등급 림프모구성 NHL; 고등급 비-분할 소세포 NHL; 거대 종양 NHL; 외투 세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 밸텐스트롬 마크로글로불린혈증 포함); 만성 림프구성 백혈병 (CLL); 급성 림프모구성 백혈병 (ALL); 모발상 세포 백혈병; 만성 골수모구성 백혈병; 및 이식 후 림프증식성 장애 (PTLD), 뿐만 아니라 모반증에 연관된 비정상적 혈관 증식, 부종 (예컨대 뇌 종양에 연관된 부종), 및 메이그스 증후군을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 암의 예는 상기 유형의 암 중 임의의 것의 원발성 종양 또는 상기 유형의 암 중 임의의 것으로부터 유래된 제2 부위에서의 전이성 종양을 포함할 수 있다.

[0048] 용어 "항체"는 모노클로날 항체 (이뮤노글로불린 Fc 영역을 갖는 전장 항체 포함), 폴리에피토프 특이성을 갖는 항체 조성물, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체, 디아바디 및 단일-쇄 분자, 뿐만 아니라 항체 단편 (예를 들어, Fab, F(ab')₂ 및 Fv)을 포함한다. 용어 "이뮤노글로불린" (Ig)은 본원에서 "항체"와 상호교환 가능하게 사용된다.

[0049] 기본 4-쇄 항체 단위는 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된 이종사량체 당단백질이다. IgM 항체는 J 쇄로 불리는 추가의 폴리펩티드와 함께 5개의 기본 이종사량체 단위로 이루어지고, 10개의 항원 결합 부위를 함유하는 한편, IgA 항체는 중합되어 J 쇄와 조합된 다가 조립체를 형성할 수 있는 2-5개의 기본 4-쇄 단위를 포함한다. IgG의 경우에, 4-쇄 단위는 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각각의 L 쇄는 1개의 공유 디슬퍼드 결합에 의해 H 쇄에 연결되지만, 2개의 H 쇄는 H 쇄 이소형에 따라 1개 이상의 디슬퍼드 결합에 의해 서로 연결된다. 또한, 각각의 H 및 L 쇄는 일정한 간격을 두고 이격된 쇄내 디슬퍼드 가교를 갖는다. 각각의 H 쇄는 N-말단에 가변 도메인 (V_H)을 갖고, 이어서 α 및 γ 쇄 각각의 경우에는 3개의 불변 도메인 (C_H), μ 및 ϵ 이소형의 경우에는 4개의 C_H 도메인을 갖는다. 각각의 L 쇄는 N-말단에 가변 도메인 (V_L)을 갖고, 이어서 그의 다른 말단에서 불변 도메인을 갖는다. V_L 은 V_H 와 정렬되고, C_L 은 중쇄의 제1 불변 도메인 (C_H1) 및 정렬된다. 특정한 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이에 계면을 형성한다고 여겨진다. V_H 및 V_L 의 쌍형성은 함께 단일 항원-결합 부위를 형성한다. 상이한 부류의 항체의 구조 및 특성에 대해서는 예를 들어 문헌 [Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parsolw (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6]을 참조한다. 임의의 척추동물 종으로부터의 L 쇄는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 카파 및 람다라고 불리는 명백하게 구분되는 2종의 유형 중 1종에 배정될 수 있다. 이뮤노글로불린은 중쇄의 불변 도메인 (CH)의 아미노산 서열에 따라 상이한 부류 또는 이소형으로 배정될 수 있다. 5종 부류의 이뮤노글로불린, 즉, 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 칭하는 중쇄를 갖는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재한다. γ 및 α 부류는 CH 서열 및 기능에서 비교적 작은 차이에 기초하여 하위부류로 추가로 분류되고, 예를 들어 인간은 하기 하위부류: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2를 발현한다.

[0050] 항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 지칭한다. 중쇄 및

경쇄의 가변 도메인은 각각 "VH" 및 "VL"로 지칭될 수 있다. 이들 도메인은 일반적으로 (동일한 부류의 다른 항체에 비해) 항체의 가장 가변적인 부분이고, 항원 결합 부위를 함유한다.

[0051] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 절편의 서열이 항체마다 광범위하게 상이하다는 사실을 지칭한다. V 도메인은 항원 결합을 매개하고, 그의 특정한 항원에 대한 특정한 항체의 특이성을 규정한다. 그러나, 가변성은 가변 도메인의 전체 범위에 걸쳐 균등하게 분포되지 않는다. 대신에, 이는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 둘 다에서 초 가변 영역 (HVR)으로 불리는 3개의 절편에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)으로 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은, 주로 베타-시트 형상을 채택하여 3개의 HVR에 의해 연결되어 있는 4개의 FR 영역을 포함하며, 이는 베타-시트 구조를 연결하고 일부 경우에는 그의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각각의 쇄 내의 HVR은 FR 영역에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 쇄로부터의 HVR과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체의 항원에 대한 결합에 직접 수반되지 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체-의존성 세포 독성에서 항체의 참여를 나타낸다.

[0052] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하고, 즉 이러한 집단을 구성하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이 및/또는 번역후 변형 (예를 들어, 이성질체화, 아미드화)을 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이고, 단일 항원 부위에 대해 지시되는 것이다. 전형적으로 상이한 결정기 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해 지시된다. 그의 특이성 이외에도, 모노클로날 항체는 하이브리도마 배양에 의해 합성되고, 다른 이뮤노글로불린에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다. 수식어 "모노클로날"은 항체의 특징이 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 것임을 나타내며, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 생산을 요구한다는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용하고자 하는 모노클로날 항체는, 예를 들어 하이브리도마 방법 (예를 들어, 문헌 [Kohler and Milstein., Nature, 256:495-97 (1975); Hongo et al., Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)]], 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조), 파지-디스플레이 기술 (예를 들어, 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004)] 참조), 및 인간 이뮤노글로불린 유전자좌 또는 인간 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 유전자의 일부 또는 전부를 갖는 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체를 생산하는 기술 (예를 들어, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993)]; 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016; 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996); 및 Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)] 참조)을 포함한 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0053] 용어 "네이키드 항체"는 세포독성 모이어티 또는 방사성표지에 접합되지 않은 항체를 지칭한다.

[0054] 용어 "전장 항체", "무손상 항체" 및 "전체 항체"는 항체 단편과 대조적으로, 그의 실질적으로 무손상인 형태의 항체를 지칭하기 위해 상호교환가능하게 사용된다. 구체적으로, 전체 항체는 Fc 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 갖는 것들을 포함한다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 일부 경우에, 무손상 항체는 1종 이상의 이펙터 기능을 가질 수 있다.

[0055] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부, 바람직하게는 무손상 항체의 항원 결합 및/또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체 (미국 특허 5,641,870의 실시예 2; 문헌 [Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]] 참조); 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 항체의 파파인 소화는 "Fab" 단편으로 불리는 2개의 동일한 항원-결합

단편, 및 나머지 "Fc" 단편 (이 명칭은 용이하게 결정화되는 능력을 반영함)을 생산한다. Fab 단편은 H 쇄의 가변 영역 도메인 (V_H) 및 1개의 중쇄의 제1 불변 도메인 (C_H1) 및 함께 전체 L 쇄로 이루어진다. 각각의 Fab 단편은 항원 결합에 대해 1가이고, 즉 단일 항원-결합 부위를 갖는다. 항체의 펩신 처리는 상이한 항원-결합 활성을 갖는 2개의 디슬피드 연결된 Fab 단편에 대략 상응하는 단일의 대형 $F(ab')_2$ 단편을 생성시키고, 여전히 항원에 가교될 수 있다. Fab' 단편은 항체 헌자 영역으로부터의 1개 이상의 시스테인을 포함하는 C_H1 도메인의 카르복시 말단에 몇 개의 추가의 잔기를 갖는다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 기를 보유하는 Fab'에 대한 명칭이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 본래 이를 사이에 헌자 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생산되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

[0056] Fc 단편은 디슬피드에 의해 함께 유지되어 있는 H 쇄 둘 다의 카르복시-말단 부분을 포함한다. 항체의 이펙터 기능은 Fc 영역 내의 서열에 의해 결정되고, 이러한 영역은 또한 특정 유형의 세포 상에서 발견되는 Fc 수용체 (FcR)에 의해 인식된다.

[0057] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 -결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이러한 단편은 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 영역 도메인이 단단하게 비공유 회합된 이량체로 이루어진다. 이를 2개 도메인이 폴딩되어 6개의 초가변 루프 (H 및 L 쇄로부터 각각 3개의 루프)가 형성되는데, 이는 항원 결합을 위한 아미노산 잔기를 제공하고 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 HVR만을 포함하는 Fv의 절반)은 전체 결합 부위보다 친화도가 낮긴 하지만 항원을 인식하고 그에 결합하는 능력을 갖는다.

[0058] "sFv" 또는 "scFv"로도 약칭되는 "단일-쇄 Fv"는 단일 폴리펩티드 쇄에 연결된 V_H 및 V_L 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 바람직하게는, sFv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합에 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 하는, V_H 및 V_L 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. sFv의 검토를 위해서는 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.

[0059] 본 발명의 항체의 "기능적 단편"은 일반적으로 무손상 항체의 항원 결합 또는 가변 영역, 또는 변형된 FcR 결합 능력을 보유하거나 갖는 항체의 Fc 영역을 포함하는 무손상 항체의 일부를 포함한다. 항체 단편의 예는 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0060] 용어 "디아바디"는 V_H 와 V_L 도메인 사이의 짧은 링커 (약 5-10개 잔기)를 갖는 sFv 단편 (상기 단락 참조)을 구축함으로써 V 도메인의 쇄내 쌍 형성이 아닌 쇄간 쌍 형성을 달성하여 2가 단편, 즉 2개의 항원-결합 부위를 갖는 단편을 생성하여 제조된 소형 항체 단편을 지칭한다. 이중특이적 디아바디는 2개 항체의 V_H 및 V_L 도메인이 상이한 폴리펩티드 쇄에 존재하는 2개의 "가교" sFv 단편으로 이루어진 이종이량체이다. 디아바디는, 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0061] 본원에서 모노클로날 항체는 구체적으로 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 종으로부터 유래되거나 특정한 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고, 쇄(들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체 (이뮤노글로불린), 뿐만 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 번호 4,816,567; 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]). 본원에서 관심 키메라 항체는 프리마티즈드(PRIMATIZED)® 항체를 포함하며, 여기서 항체의 항원-결합 영역은, 예를 들어 마카크 원숭이를 관심 항원으로 면역시킴으로써 생산된 항체로부터 유래된다. 본원에 사용된 "인간화 항체"는 "키메라 항체"의 하위세트로 사용된다.

[0062] 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 한 실시양태에서, 인간화 항체는 수용자의 HVR (이하 정의됨)로부터의 잔기가 비-인간 종 (공여자 항체), 예컨대 목적하는 특이성, 친화도 및/또는 능력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 HVR로부터의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 ("FR") 잔기를 상응하는 비-인간 잔기로 대체한다. 추가로, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이를 변형은 항체 성능, 예컨대 결합 친화도를 보다

정밀화하기 위해 이루어질 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 이뮤노글로불린 서열의 그것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 서열의 그것이지만, FR 영역은 항체 성능, 예컨대 결합 친화도, 이성질체화, 면역원성 등을 개선하는 1개 이상의 개별 FR 잔기 치환을 포함할 수 있다. FR 내의 이들 아미노산 치환의 수는 전형적으로 H 쇄에서 6개 이하, 및 L 쇄에서는 3개 이하이다. 인간화 항체는 임의로 또한 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc) 중 적어도 일부분, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 적어도 일부분을 포함할 것이다. 추가의 상세한 내용에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); 및 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)]을 참조한다. 또한, 예를 들어 문헌 [Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)]; 및 미국 특허 번호 6,982,321 및 7,087,409를 참조한다.

[0063] "인간 항체"는 인간에 의해 생산되고/되거나 본원에 개시된 임의의 인간 항체 제조 기술을 사용하여 제조된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유하는 항체이다. 인간 항체의 이러한 정의는 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 분명히 배제한다. 인간 항체는 파지-디스플레이 라이브러리를 포함한 관련 기술분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 문헌 [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. 또한, 문헌 [Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)]에 기재된 방법도 인간 모노클로날 항체의 제조에 이용가능하다. 또한 문헌 [van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001)]을 참조한다. 인간 항체는, 항원 챌린지에 반응하여 이러한 항체를 생산하도록 변형되었으나 내인성 유전자좌는 무력화시킨 트랜스제닉 동물, 예를 들어 면역화된 제노마우스에게 항원을 투여함으로써 제조될 수 있다 (예를 들어, 제노마우스(XENOMOUSE)TM 기술에 관한 미국 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584 참조). 또한, 예를 들어 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체에 관한 문헌 [Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)]을 참조한다.

[0064] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역", "HVR" 또는 "HV"는 서열 내에서 초가변적이고/거나 구조적으로 한정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR; VH 내에 3개 (H1, H2, H3), 및 VL 내에 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. 천연 항체에서, H3 및 L3은 6개의 HVR 중 가장 높은 다양성을 나타내고, H3은 특히 항체에 대한 정밀한 특이성을 부여하는데 고유한 역할을 수행하는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 문헌 [Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, in *Methods in Molecular Biology* 248: 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)]을 참조한다. 실제로, 중쇄만으로 이루어진 자연 발생 낙타류 항체는 경쇄의 부재 하에 기능적이고 안정하다. 예를 들어, 문헌 [Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996)]을 참조한다.

[0065] 다수의 HVR 설명이 사용되고 있으며 본원에 포함된다. 카바트(Kabat) 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 가변성을 기반으로 하며, 가장 통상적으로 사용된다 (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). 코티아(Chothia)는 그 대신 구조 루프의 위치를 지칭한다 (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). AbM HVR은 카바트 HVR과 코티아 구조적 루프 사이의 절충안을 나타내고, 옥스포드 몰래큘라(Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다. "접촉" HVR은 이용가능한 복합체 결정 구조의 분석을 기반으로 한다. 각각의 이들 HVR로부터의 잔기를 하기에 나타낸다.

루프	카바트	AbM	코티아	접촉
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (카바트 넘버링)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (코티아 넘버링)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0066] [0067] HVR은 하기와 같이 "연장된 HVR"을 포함할 수 있다: VL에서의 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 또는 89-96 (L3), 및 VH에서의 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기는 각각의 이들 정의에 대해 카바트 등의 상기 문헌에 따라 넘버링된다.

- [0068] 표현 "카바트에서와 같은 가변-도메인 잔기-넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산-위치 넘버링" 및 그의 변형은 카바트 등의 상기 문헌에서의 항체의 편집의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대해 사용된 넘버링 시스템을 지칭한다. 이러한 넘버링 시스템을 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축, 또는 그 내로의 삽입에 상응하게 보다 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 다음에 단일 아미노산 삽입 (카바트에 따라 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 다음에 삽입된 잔기 (예를 들어, 카바트에 따라 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 항체 서열을 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 상동성 영역에서 정렬함으로써 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다.
- [0069] "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 HVR 잔기 이외의 가변-도메인 잔기이다.
- [0070] "인간 컨센서스 프레임워크" 또는 "수용자 인간 프레임워크"는 인간 이谬노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택시에 가장 통상적으로 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 이谬노글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 행한다. 일반적으로, 서열의 하위군은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에서와 같은 하위군이다. 그 예는, VL의 경우에 하위군이 카바트 등의 상기 문헌에서와 같은 하위군 카파 I, 카파 II, 카파 III 또는 카파 IV일 수 있는 것을 포함한다. 추가로, VH의 경우에 하위군은 카바트 등의 상기 문헌에서와 같은 하위군 I, 하위군 II 또는 하위군 III일 수 있다. 대안적으로, 인간 컨센서스 프레임워크는 공여자 프레임워크 서열을 다양한 인간 프레임워크 서열의 집합과 정렬하여 인간 프레임워크 잔기를 공여자 프레임워크에 대한 상동성에 기초하여 선택하는 경우에서와 같이 상기 특정 잔기로부터 유래될 수 있다. 인간 이谬노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크"로부터 유래된" 수용자 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 이미 존재하는 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이미 존재하는 아미노산 변화의 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하 또는 2개 이하이다.
- [0071] "VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크"는 카바트 등의 상기 문헌의 가변 중쇄 하위군 III 내의 아미노산 서열로부터 수득한 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 하기 서열 각각의 적어도 일부 또는 모두를 포함한다:
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
(HC-FR1)(SEQ ID NO:4), WVRQAPGKGLEWV (HC-FR2), (SEQ ID NO:5),
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (HC-FR3, SEQ ID NO:6),
WGQGTLVTVSA (HC-FR4), (SEQ ID NO:7).
- [0072] "VL 카파 I 컨센서스 프레임워크"는 카바트 등의 상기 문헌의 가변 경쇄 카파 하위군 I 내의 아미노산 서열로부터 수득한 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 하기 서열 각각의 적어도 일부 또는 모두를 포함한다:
- DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (LC-FR1)
(SEQ ID NO:11), WYQQKPGKAPKLLIY (LC-FR2) (SEQ ID NO:12),
GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (LC-FR3)(SEQ ID NO:13), FGQGTKVEIKR
(LC-FR4)(SEQ ID NO:14).
- [0073] 예를 들어 Fc 영역의 명시된 위치에서의 "아미노산 변형"은 명시된 잔기의 치환 또는 결실, 또는 명시된 잔기에 인접한 적어도 1개의 아미노산 잔기의 삽입을 지칭한다. 명시된 잔기에 "인접한" 삽입은 그의 1 내지 2개의 잔기 내의 삽입을 의미한다. 삽입은 명시된 잔기에 대해 N-말단 또는 C-말단일 수 있다. 본원에서 바람직한 아미노산 변형은 치환이다.
- [0074] "친화도-성숙" 항체는 변경(들)을 보유하지 않는 모 항체와 비교하여 항원에 대한 항체의 친화도를 개선시키는, 그의 1개 이상의 HVR에 1개 이상의 변경을 갖는 항체이다. 한 실시양태에서, 친화도-성숙 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화도를 갖는다. 친화도-성숙 항체는 관련 기술분야에 공지된 절차에 의해 생산된다. 예를 들어, 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)]은 VH- 및 VL-도메인 셔플링에 의한 친화도 성숙을 기재한다. HVR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이유발은, 예를 들어 문헌

[Barbas et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al., Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); 및 Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)]에 기재되어 있다.

[0077] 본원에 사용된 용어 "에 특이적으로 결합한다" 또는 "에 특이적인"은 생물학적 분자를 포함하는 이종 분자 집단의 존재 하에 표적의 존재를 결정할 수 있는 것으로, 측정가능하고 재생가능한 상호작용, 예컨대 표적 및 항체 사이의 결합을 지칭한다. 예를 들어, 표적 (에피토프일 수 있음)에 특이적으로 결합하는 항체는 다른 표적에 결합하는 경우보다 더 큰 친화도, 결합력으로, 더 용이하게 및/또는 더 긴 기간 동안 상기 표적에 결합하는 항체이다. 한 실시양태에서, 비관련 표적에 항체가 결합하는 정도는, 예를 들어 방사성면역검정 (RIA)에 의한 측정 시에 표적에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시양태에서, 표적에 특이적으로 결합하는 항체의 해리 상수 (K_d)는 $\leq 1 \mu M$, $\leq 100 nM$, $\leq 10 nM$, $\leq 1 nM$ 또는 $\leq 0.1 nM$ 이다. 특정 실시양태에서, 항체는 상이한 종으로부터의 단백질 사이에 보존되는, 단백질 상의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 특이적 결합은 배타적 결합을 포함할 수 있지만, 이를 필요로 하지는 않는다.

[0078] 본원에 사용된 용어 "이뮤노어드헤신"은 이종 단백질 ("어드헤신")의 결합 특이성을 이뮤노글로불린 불변 도메인의 이펙터 기능과 조합한 항체-유사 분자를 지칭한다. 구조적으로, 이뮤노어드헤신은 항체의 항원 인식 및 결합 부위가 다른 (즉, "이종") 목적하는 결합 특이성을 갖는 아미노산 서열 및 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열의 융합체를 포함한다. 이뮤노어드헤신 분자의 어드헤신 부분은 전형적으로 적어도 수용체 또는 리간드의 결합 부위를 포함하는 인접 아미노산 서열이다. 이뮤노어드헤신 내의 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열은 임의의 이뮤노글로불린, 예컨대 IgG-1, IgG-2 (IgG2A 및 IgG2B 포함), IgG-3 또는 IgG-4 하위유형, IgA (IgA-1 및 IgA-2 포함), IgE, IgD 또는 IgM으로부터 수득될 수 있다. Ig 융합체는 바람직하게는 Ig 분자 내의 적어도 1개의 가변 영역 대신 본원에 기재된 폴리펩티드 또는 항체 도메인의 치환을 포함한다. 특히 바람직한 실시양태에서, 이뮤노글로불린 융합체는 헌지, CH2 및 CH3, 또는 IgG1분자의 헌지, CH1, CH2 및 CH3 영역을 포함한다. 이뮤노글로불린 융합체의 생산에 대해 또한 1995년 6월 27일에 허여된 미국 특허 번호 5,428,130을 참조한다. 예를 들어, 본원의 조합 요법에 유용한 제2 의약으로서 유용한 이뮤노어드헤신은 이뮤노글로불린 서열의 불변 도메인에 융합된, PD-L1 또는 PD-L2의 세포외 또는 PD-1 결합 부분 또는 PD-1의 세포외 또는 PD-L1 또는 PD-L2 결합 부분을 포함하는 폴리펩티드, 예컨대 각각 PD-L1 ECD - Fc, PD-L2 ECD - Fc 및 PD-1 ECD - Fc를 포함한다. 세포 표면 수용체의 Ig Fc 및 ECD의 이뮤노어드헤신 조합은 때때로 가용성 수용체로 지칭된다.

[0079] "융합 단백질" 및 "융합 폴리펩티드"는 함께 공유 연결된 2개의 부분을 갖는 폴리펩티드를 지칭하며, 여기서 각각의 일부는 상이한 특성을 갖는 폴리펩티드이다. 특성은 생물학적 특성, 예컨대 시험관내 또는 생체내 활성일 수 있다. 또한, 특성은 간단한 화학적 또는 물리적 특성, 예컨대 표적 분자에 대한 결합, 반응의 촉매작용 등일 수 있다. 2개의 부분은 단일 웨프티드 결합에 의해 직접 연결될 수 있거나 또는 웨프티드 링커를 통해 서로 리딩 프레임으로 연결될 수 있다.

[0080] "PD-1 올리고펩티드", "PD-L1 올리고펩티드" 또는 "PD-L2 올리고펩티드"는 본원에 기재된 바와 같은, 각각 수용체, 리간드 또는 신호전달 성분을 포함하는, 각각 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 음성 공동자극 폴리펩티드에 바람직하게는 특이적으로 결합하는 올리고펩티드이다. 이러한 올리고펩티드는 공지된 올리고펩티드 합성 방법을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있거나, 또는 재조합 기술을 사용하여 제조 및 정제될 수 있다. 이러한 올리고펩티드는 통상적으로 적어도 약 5개의 아미노산 길이, 대안적으로 적어도 약 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100개 또는 그 초과의 아미노산 길이를 가질 수 있다. 이러한 올리고펩티드는 널리 공지된 기술을 사용하여 확인될 수 있다. 이와 관련하여, 폴리펩티드 표적에 특이적으로 결합 할 수 있는 결합 폴리펩티드에 대해 폴리펩티드 라이브러리를 스크리닝하는 기술이 관련 기술분야에 널리 공지되어 있음을 주목한다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; PCT 공개 번호 WO 84/03506 및 WO84/03564; 문헌 [Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen et al., in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378 (1990); Lowman, H.B. et al. Biochemistry, 30:10832 (1991); Clarkson, T. et al. Nature, 352: 624 (1991); Marks, J. D. et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991); Kang, A.S. et al.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363 (1991), 및 Smith, G. P., Current Opin. Biotechnol., 2:668 (1991)] 참조).

[0081] "차단" 항체 또는 "길항체" 항체는 그가 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 것이다. 일부 실시양태에서, 차단 항체 또는 길항체 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다. 본 발명의 항-PD-L1 항체는 기능이상 상태로부터 항원 자극까지 T-세포에 의한 기능적 반응 (예를 들어, 증식, 시토카인 생산, 표적 세포 사멸)이 회복되도록 PD-1을 통한 신호전달을 차단한다.

[0082] "효능제" 또는 활성화 항체는 그것이 결합하는 항원에 의한 신호전달을 증진시키거나 개시하는 것이다. 일부 실시양태에서, 효능제 항체는 천연 리간드의 존재 없이 신호전달을 유발하거나 활성화한다.

[0083] 본원의 용어 "Fc 영역"은 천연-서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함하는, 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는데 사용된다. 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 달라질 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 통상적으로 위치 Cys226의 아미노산 잔기 또는 위치 Pro230으로부터 그의 카르복실-말단까지의 스트레치로 정의된다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은, 예를 들어 항체의 생산 또는 정제 동안 또는 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산의 재조합적 조작에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 무순상 항체의 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 항체 집단, K447 잔기가 제거되지 않은 항체 집단, 및 K447 잔기가 존재하는 항체와 존재하지 않는 항체의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다. 본 발명의 항체에 사용하기에 적합한 천연-서열 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 및 IgG4를 포함한다.

[0084] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 또한, 바람직한 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하는 것이고, Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII 하위부류의 수용체 (이들 수용체의 대립유전자 변이체 및 대안적으로 스플라이싱된 형태 포함)를 포함하며, Fc γ RII 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 포함하고, 이들은 그의 세포질 도메인에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다. (문헌 [M. Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 예를 들어 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4: 25-34 (1994); 및 de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995)]에 개시되어 있다. 추후로 확인될 것들을 포함한 다른 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다.

[0085] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 또한 태아로의 모체 IgG의 전달을 담당하는 신생아 수용체, FcRn을 포함한다. 문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) 및 Kim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994)]. FcRn에 대한 결합을 측정하는 방법은 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Ghetie and Ward, Immunol. Today 18: (12): 592-8 (1997); Ghetie et al., Nature Biotechnology 15 (7): 637-40 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem. 279 (8): 6213-6 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al.) 참조). 생체내 FcRn에 대한 결합 및 인간 FcRn 고친화도 결합 폴리펩ти드의 혈청 반감기는 예를 들어 인간 FcRn을 발현하는 트랜스제닉 마우스 또는 형질감염된 인간 세포주에서, 또는 변이체 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드가 투여된 영장류에서 검정될 수 있다. WO 2004/42072 (Presta)에는 FcR에 대한 결합이 개선 또는 감소된 항체 변이체가 기재되어 있다. 또한, 예를 들어 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)]을 참조한다.

[0086] 본원에 사용된 어구 "실질적으로 감소된" 또는 "실질적으로 상이한"은 통상의 기술자가 2개의 수치 값 (일반적으로 1개는 분자와 연관되고, 다른 것은 참조/비교 분자와 연관됨)에 의해 측정된 생물학적 특성의 맥락 내에서 2개의 값 사이의 차이를 통계적 유의성을 갖는 것으로 간주하도록 하는, 상기 값 (예를 들어, Kd 값) 사이의 충분히 높은 정도의 차이를 나타낸다. 상기 2개의 값 사이의 차이는 참조/비교 분자에 대한 값의 함수로서, 예를 들어 약 10% 초과, 약 20% 초과, 약 30% 초과, 약 40% 초과 및/또는 약 50% 초과이다.

[0087] 본원에 사용된 용어 "실질적으로 유사한" 또는 "실질적으로 동일한"은 통상의 기술자가 2개의 수치 값 (예를 들어, 1개는 본 발명의 항체와 연관되고, 다른 것은 참조/비교 항체와 연관됨)에 의해 측정된 생물학적 특성의 맥락 내에서 2개의 값 사이의 차이를 생물학적 및/또는 통계적 유의성이 거의 또는 전혀 없는 것으로 간주하도록 하는, 상기 값 (예를 들어, Kd 값) 사이의 충분히 높은 정도의 유사성을 나타낸다. 상기 2개의 값 사이의 차이는 참조/비교 값의 함수로서, 예를 들어 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만 및/또는 약 10% 미만이다.

[0088] 본원에서 사용된 "담체"는 사용되는 투여량 및 농도에서 이에 노출되는 세포 또는 포유동물에 비독성인 제약상

허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함한다. 종종 생리학상 허용되는 담체는 수성 pH 완충 용액이다. 생리학상 허용되는 담체의 예는 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산; 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 또는 엑스트린; 칼레이트화제, 예컨대 EDTA; 당 알콜, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 트윈(TWEEN)TM, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 플루로닉스(PLURONICS)TM를 포함한다.

[0089] "페키지 삽입물"은 적응증, 용법, 투여량, 투여, 금기사항, 포장 제품과 조합되는 다른 의약에 대한 정보, 및/또는 이러한 의약의 사용에 대한 경고 등을 함유하는, 의약의 상업용 패키지에 통상적으로 포함되는 지침서를 지칭한다.

[0090] 본원에 사용된 용어 "치료"는 임상 병리상태의 과정 동안 치료될 개체 또는 세포의 자연 과정을 변경하도록 설계된 임상 개입을 지칭한다. 치료의 바람직한 효과는 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 호전 또는 완화, 및 경감 또는 개선된 예후를 포함한다. 예를 들어, 개체는 암성 세포의 증식의 감소 (또는 파괴), 질환으로부터 발생하는 증상의 감소, 질환을 앓고 있는 개체의 삶의 질의 증가, 질환을 치료하는데 요구되는 다른 의약의 용량의 감소, 질환 진행의 지연 및/또는 개체의 생존 연장을 포함하나 이에 제한되지는 않는 암과 연관된 1종 이상의 증상이 완화되거나 제거되는 경우에 성공적으로 "치료된다".

[0091] 본원에 사용된 "질환의 진행을 지연시키는"은 질환 (예컨대 암)의 발생이 연기, 저지, 지연, 자체, 안정화 및/또는 연장되는 것을 의미한다. 이러한 지연은 치료할 질환 및/또는 개체의 병력에 따라 다양한 기간일 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이, 충분한 또는 유의한 지연은 사실상 개체에서 질환이 발생하지 않는 방지를 포괄할 수 있다. 예를 들어, 후기 단계 암, 예컨대 전이의 발생이 지연될 수 있다.

[0092] 본원에 사용된 "암 재발을 감소시키거나 억제하는"은 종양 또는 암 재발 또는 종양 또는 암 진행을 감소시키거나 억제하는 것을 의미한다. 본원에 개시된 바와 같이, 암 재발 및/또는 암 진행은 비제한적으로 암 전이를 포함한다.

[0093] "유효량"은 특정한 장애의 측정가능한 개선 또는 예방을 야기하는데 요구되는 적어도 최소한의 농도이다. 본원에서 유효량은 환자의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 도출하는 항체의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 유효량은 또한 치료상 유익한 효과가 치료의 임의의 독성 또는 유해한 효과를 능가하는 것이다. 예방적 용도의 경우에, 유익한 또는 목적하는 결과는 질환의 생화학적, 조직학적 및/또는 거동적 증상, 그의 합병증 및 질환의 발생 동안 제시되는 중간 병리학적 표현형을 포함한 질환의 위험을 제거 또는 감소시키거나, 상기 질환의 중증도를 경감시키거나, 또는 상기 질환의 발병을 지연시키는 것과 같은 결과를 포함한다. 치료적 용도의 경우에, 유익한 또는 목적하는 결과는 질환으로부터 발생하는 1종 이상의 증상을 감소시키고/거나, 질환을 앓고 있는 개체의 삶의 질을 증가시키고/거나, 질환을 치료하는데 요구되는 다른 의약의 용량을 감소시키고/거나, 표적화를 통해서와 같이 또 다른 의약의 효과를 증진시키고/거나, 질환의 진행을 지연시키고/거나, 생존을 연장시키는 것과 같은 임상 결과를 포함한다. 암 또는 종양의 경우에, 유효량의 약물은 암 세포의 수를 감소시키고/거나; 종양 크기를 감소시키고/거나; 말초 기관으로의 암 세포 침윤을 억제하고/거나 (즉, 어느 정도 늦추거나 바람직하게는 정지시키는 것); 종양 전이를 억제하고/거나 (즉, 어느 정도 늦추거나 바람직하게는 정지시키는 것); 종양 성장을 어느 정도 억제하고/거나; 장애와 연관된 증상 중 1종 이상을 어느 정도 경감시킬 수 있다. 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 본 발명의 목적상, 약물, 화합물 또는 제약 조성물의 유효량은 직접 또는 간접적으로 예방적 또는 치유적 치료를 달성하는데 충분한 양이다. 임상 환경에서 이해되는 바와 같이, 약물, 화합물 또는 제약 조성물의 유효량은 또 다른 약물, 화합물 또는 제약 조성물과 함께 달성될 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 따라서, 1종 이상의 치료제를 투여하는 맥락에서 "유효량"이 고려될 수 있고, 1종 이상의 기타 작용제와 함께 목적하는 결과가 달성될 수 있거나 달성되는 경우에 단일 작용제가 유효량으로 제공된 것으로 간주될 수 있다.

[0094] 본원에 사용된 "와 함께"는 한 치료 양식, 뿐만 아니라 또 다른 치료 양식의 투여를 지칭한다. 따라서, "와 함께"는 한 치료 양식을 개체에게 다른 치료 양식을 투여하기 전에, 그 동안 또는 그 후에 투여하는 것을 지칭한다.

[0095] 본원에 사용된 "완전 반응" 또는 "CR"은 모든 표적 병변의 소멸을 지칭하고; "부분 반응" 또는 "PR"은 기준선 최장 직경의 합 (SLD)을 참조하여 표적 병변의 SLD의 적어도 30% 감소를 지칭하고; "안정 질환" 또는 "SD"는 치

료가 시작된 이후의 최소 SLD를 참조하여 PR을 만족시키는 표적 병변의 충분한 수축도 아니고 PD를 만족시키는 충분한 증가도 아닌 상태를 지칭한다.

[0096] 본원에 사용된 "진행성 질환" 또는 "PD"는 치료가 시작된 이후에 기록된 최소 SLD를 참조하여 표적 병변의 SLD의 적어도 20% 증가 또는 1개 이상의 새로운 병변의 존재를 지칭한다.

[0097] 본원에 사용된 "무진행 생존" (PFS)은 치료 동안 및 후에 치료될 질환 (예를 들어, 암)이 악화되지 않는 기간을 지칭한다. 무진행 생존은 환자가 완전 반응 또는 부분 반응을 경험한 시간의 양, 뿐만 아니라 환자가 안정 질환을 경험한 시간의 양을 포함할 수 있다.

[0098] 본원에 사용된 "전체 반응률" (ORR)은 완전 반응 (CR) 비율 및 부분 반응 (PR) 비율의 합을 지칭한다.

[0099] 본원에 사용된 "전체 생존"은 특정한 지속 기간 후에 살아있을 가능성이 있는 군 내의 개체의 백분율을 지칭한다.

[0100] "화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 시클로포스파미드 (시톡산(CYTOXAN)®); 알킬 술포네이트, 예컨대 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예컨대 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오프스포르아미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 엘타-9-테트라하이드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)®); 베타-라파콘; 라파콜; 콜키신; 베타글루칸; 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 (하이캄틴(HYCANTIN)®), CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)®), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴 및 9-아미노캄프토테신 포함); 브리오스타틴; 폐메트렉세드; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비겔레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; TLK-286; CDP323, 경구 알파-4 인테그린 억제제; 사르코디티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대 에네디인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마1I 및 칼리케아미신 오메가1I (예를 들어, 문헌 [Nicolau et al., Angew. Chem Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); 디네미신, 예컨대 디네미신 A; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색소단백질 에네디인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 칙티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (아드리아마이신(ADRIAMYCIN)®, 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피클리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리포솜주사 (독실(DOXIL)®) 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물, 예컨대 메토트렉세이트, 겹시타빈 (겹자르(GEMZAR)®), 테가푸르 (유프토랄(UFTORAL)®), 카페시타빈 (겔로다(XELODA)®), 에포티론 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 프데로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토퓨린, 티아미프린, 티오페리아닌; 페리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘 및 이마티닙 (2-페닐아미노페리미딘 유도체), 뿐만 아니라 다른 c-Kit 억제제; 항부신제, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 폴리사카라이드 복합체 (JHS 내츄럴 프로덕츠(JHS Natural Products), 오레곤주 유진); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로케르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라큐린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신(ELDISINE)®, 필데신(FILDESIN)®); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오페파; 탁소이드, 예를 들어, 과클리탁셀 (탁솔(TAXOL)®), 과클리탁셀의 알부민-조작된 나노입자 제제 (아브락산(ABRAXANE)™) 및 도세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)®); 클로란부실; 6-티오구아닌; 메르캅토퓨린; 메토트렉세

이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)®); 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빙크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)®); 옥살리플라틴; 류코보린; 비노렐빈 (나벨빈 (NAVELBINE)®); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산; 임의의 상기한 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기한 것 중 2종 이상의 조합물, 예컨대 시클로포스파미드, 독소루비신, 빙크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법에 대한 약어 CHOP, 및 5-FU 및 류코보린과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴(ELOXATIN)™)에 의한 치료 요법에 대한 약어 FOLFOX를 포함한다.

[0101]

화학요법제의 추가의 예는 암의 성장을 촉진시킬 수 있는 호르몬의 영향을 조절, 감소, 차단 또는 억제하도록 작용하는 항호르몬제를 포함하며, 이는 종종 전신성 또는 전신 치료제의 형태이다. 이는 호르몬 그 자체일 수 있다. 예는 항에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (놀바넥스 (NOLVADEX)® 타목시펜 포함), 랄로시펜 (에비스타(EVISTA)®), 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 토레미펜 (파레스톤(FARESTON)®); 항프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향-조절제 (ERD); 에스트로겐 수용체 길항제, 예컨대 폴베스트란트 (파슬로덱스(FASLODEX)®); 난소를 저해하거나 정지시키는 기능을 하는 작용제, 예를 들어 황체형성 호르몬-방출 호르몬 (LHRH) 효능제, 예컨대 류프롤리드 아세테이트 (루프론(LUPRON)® 및 엘리가드(ELIGARD)®), 고세렐린 아세테이트, 부세렐린 아세테이트 및 트립테렐린; 항안드로겐, 예컨대 플루타미드, 널루타미드 및 비칼루타미드; 및 부신에서 에스트로겐 생산을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예컨대 예를 들어 4(5)-아미다졸, 아미노글루테티미드, 메게스트롤 아세테이트 (메가세(MEGASE)®), 엑세메스탄 (아로마신(AROMASIN)®), 포르메스타니, 파드로졸, 보로졸 (리비소르(RIVISOR)®), 레트로졸 (페마라(FEMARA)®), 및 아나스트로졸 (아리미덱스(ARIMIDEX)®)을 포함한다. 또한, 이러한 화학요법제의 정의는 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스 (BONEFOS)® 또는 오스탁(OSTAC)®), 에티드로네이트 (디드로칼(DIDROCAL)®), NE-58095, 졸레드론산/졸레드로네이트 (조메타(ZOMETA)®), 알렌드로네이트 (포사맥스(FOSAMAX)®), 파미드로네이트 (아레디아(AREDIA)®), 틸루드로네이트 (스켈리드(SKELID)®) 또는 리세드로네이트 (액토넬(ACTONEL)®) 뿐만 아니라 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오사이드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식에 관련된 신호전달 경로에서의 유전자의 발현을 억제하는 것, 예컨대 예를 들어, PKC-알파, Raf, H-Ras 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신, 예컨대 테라토프(THERATOPE)® 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)® 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)® 백신 및 박시드(VAXID)® 백신; 토포이소머라제 1 억제제 (예를 들어, 루르토테칸 (LURTOTECAN)®); 항에스트로겐, 예컨대 폴베스트란트; 키트 억제제, 예컨대 이마티닙 또는 EXEL-0862 (티로신 키나제 억제제); EGFR 억제제, 예컨대 에를로티닙 또는 세툭시맙; 항-VEGF 억제제, 예컨대 베바시주맙; 아리노테칸; rmRH (예를 들어, 아바렐릭스(ABARELIX)®); 라파티닙 및 라파티닙 디토실레이트 (또한 GW572016으로 공지된 ErbB-2 및 EGFR 이중 티로신 키나제 소분자 억제제); 17AAG (열 충격 단백질 (Hsp) 90 독성 물질인 젤다나 마이신 유도체) 및 임의의 상기의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0102]

본원에 사용된 용어 "시토카인"은 일반적으로 또 다른 세포에 대해 세포간 매개자로서 작용하거나 또는 단백질을 생산하는 세포에 대해 자가분비 효과를 갖는 한 세포 집단에 의해 방출되는 단백질을 지칭한다. 이러한 시토카인의 예는 림포카인, 모노카인; 인터류킨 ("IL"), 예컨대 IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17A-F, IL-18 내지 IL-29 (예컨대, IL-23), IL-31, 예를 들어 프로류킨(PROLEUKIN)® rIL-2; 종양-괴사 인자, 예컨대 TNF- α 또는 TNF- β , TGF- β 1-3; 및 다른 폴리펩ти드 인자, 예를 들어 백혈병 억제 인자 ("LIF"), 섬모 신경영양 인자 ("CNTF"), CNTF-유사 시토카인 ("CLC"), 카디오토로핀 ("CT") 및 키트 리간드 ("KL")를 포함한다.

[0103]

본원에 사용된 용어 "케모카인"은 선택적으로 백혈구의 화학주성 및 활성화를 유도하는 능력을 갖는 가용성 인자 (예를 들어, 시토카인)를 지칭한다. 이들은 또한 혈관신생, 염증, 상처 치유 및 종양발생의 과정을 촉발한다. 케모카인의 예는 뮤린 각질세포 화학유인물질 (KC)의 인간 상동체인 IL-8을 포함한다.

[0104]

본원에 사용된 "CD20"은 인간 B-림프구 항원 CD20 (CD20, B-림프구 표면 항원 B1, Leu-16, Bp35, BM5, 및 LF5 으로도 공지됨; 서열은 스위스프롯(SwissProt) 데이터베이스 입력 P11836임)으로 지칭되고, 프리-B 및 성숙 B 림프구 상에 위치하는 대략 35 kD의 분자량을 갖는 소수성 막횡단 단백질이다. (문헌 [Valentine, M.A., et al., J. Biol. Chem. 264(19) (1989) 11282-11287; Tedder, T.F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 (1988) 208-12; Stamenkovic, I., et al., J. Exp. Med. 167 (1988) 1975-80; Einfeld, D.A., et al., EMBO J. 7 (1988) 711-7; Tedder, T.F., et al., J. Immunol. 142 (1989) 2560-8]). 상응하는 인간 유전자는 MS4A1로도 공지된 막-관통 4-도메인, 서브페밀리 A, 구성원 1이다. 이러한 유전자는 막-관통 4A 유전자 패밀리

의 구성원을 코딩한다. 이러한 신생 단백질 패밀리의 구성원은 통상의 구조적 특징 및 유사한 인트론/엑손 스플라이스 경계를 특징으로 하고, 조혈 세포 및 비림프구성 조직 중에서 고유의 발현 패턴을 나타낸다. 이러한 유전자는 혈장 세포 내로의 B-세포 발생 및 분화에서 역할하는 B-림프구 표면 분자를 코딩한다. 이러한 패밀리 구성원은 패밀리 구성원의 클러스터 중 11q12에 국소화된다. 이러한 유전자의 대안적 스플라이싱은 동일한 단백질을 코딩하는 2개의 전사체 변이체를 생성한다.

[0105] 용어 "CD20" 및 "CD20 항원"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 세포에 의해 자연적으로 발현되거나 또는 CD20 유전자로 형질감염된 세포 상에서 발현되는 인간 CD20의 임의의 변이체, 이소형 및 종 상동체를 포함한다. CD20 항원에 대한 본 발명의 항체의 결합은 CD20을 불활성화함으로써 CD20 (예를 들어, 종양 세포)을 발현하는 세포의 사멸을 매개한다. CD20을 발현하는 세포의 사멸은 하기 메카니즘 중 1종 이상에서 발생할 수 있다: 세포 사멸/아폽토시스 유도, ADCC 및 CDC.

[0106] 관련 기술분야에 인식된 바와 같은 CD20의 동의어는 B-림프구 항원 CD20, B-림프구 표면 항원 B1, Leu-16, Bp35, BM5, 및 LF5를 포함한다.

[0107] 본 발명에 따른 용어 "항-CD20 항체"는 CD20 항원에 특이적으로 결합하는 항체이다. CD20 항원에 대한 항-CD20 항체의 결합 특성 및 생물학적 활성에 따라, 2종 유형의 항-CD20 항체 (유형 I 및 유형 II 항-CD20 항체)가 문헌 [Cragg, M.S., et al., Blood 103 (2004) 2738-2743; 및 Cragg, M.S., et al., Blood 101 (2003) 1045-1052]에 따라 구별될 수 있으며, 하기 표 1을 참조한다.

[0108] <표 1> 유형 I 및 유형 II 항-CD20 항체의 특성

유형 I 항-CD20 항체	유형 II 항-CD20 항체
유형 I CD20 에피토프	유형 II CD20 에피토프
CD20을 지질 래프트로 국재화시킴	CD20을 지질 래프트로 국재화시키지 못함
증가된 CDC (IgG1 이소형인 경우)	감소된 CDC (IgG1 이소형인 경우)
ADCC 활성 (IgG1 이소형인 경우)	ADCC 활성 (IgG1 이소형인 경우)
완전 결합 능력	감소된 결합 능력
동형 응집	보다 강한 동형 응집
가교 시에 아폽토시스 유도	가교 없이 강한 세포 사멸 유도

[0109]

[0110] 유형 II 항-CD20 항체의 예는, 예를 들어 인간화 B-Ly1 항체 IgG1 (WO 2005/044859에 개시된 바와 같은 키메라 인간화 IgG1 항체), 11B8 IgG1 (WO 2004/035607에 개시된 바와 같음), 및 AT80 IgG1을 포함한다. 전형적으로 IgG1 이소형의 유형 II 항-CD20 항체는 특징적인 CDC 특성을 나타낸다. 유형 II 항-CD20 항체는 IgG1 이소형의 유형 I 항체와 비교하여 감소된 CDC (IgG1 이소형인 경우)를 갖는다.

[0111] 유형 I 항-CD20 항체의 예는, 예를 들어 리툭시맙, HI47 IgG3 (ECACC, 하이브리도마), 2C6 IgG1 (WO 2005/103081에 개시된 바와 같음), 2F2 IgG1 (WO 2004/035607 및 WO 2005/103081에 개시된 바와 같음) 및 2H7 IgG1 (WO 2004/056312에 개시된 바와 같음)을 포함한다.

[0112] 본 발명에 따른 비푸코실화 항-CD20 항체는, 바람직하게는 유형 II 항-CD20 항체, 보다 바람직하게는 WO 2005/044859 및 WO 2007/031875에 기재된 바와 같은 비푸코실화 인간화 B-Ly1 항체이다.

[0113] "리툭시맙" 항체 (참조 항체; 유형 I 항-CD20 항체의 예)는 인간 CD20 항원에 대해 지정된 모노클로날 항체를 함유하는 유전자 조작된 키메라 인간 감마 1 뮤린 불변 도메인이다. 그러나 이러한 항체는 당조작되거나 비푸코실화된 것이 아니기 때문에 적어도 85%의 푸코스의 양을 갖는다. 이러한 키메라 항체는 인간 감마 1 불변 도메인을 함유하고, 1998년 4월 17일에 허여되고, 아이텍 파마슈티칼스 코포레이션(IDEC Pharmaceuticals Corporation)에게 배정된 US 5,736,137 (Andersen, et al.)에서 명칭 "C2B8"로 확인된다. 리툭시맙은 재발성 또는 불응성 저등급 또는 여포성, CD20 양성인 B 세포 비-호지킨 림프종을 갖는 환자의 치료를 위해 승인되었다. 시험관내 작용 메카니즘 연구에서는, 리툭시맙이 인간 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 나타낸다는 것을 보여준 바 있다 (Reff, M.E., et al., Blood 83(2) (1994) 435-445). 추가적으로, 이것은 항체-의존성 세포독성 (ADCC)을 측정하는 검정에서 활성을 나타낸다.

[0114] 본원에 사용된 용어 "GA101 항체"는 인간 CD20에 결합하는 하기 항체 중 어느 한 항체를 지칭한다: (1) 서열식 별번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 서열식

별번호: 52의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열식별번호: 53의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열식별번호: 54의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2 및 서열식별번호: 55의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체; (2) 서열식별번호: 56의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 57의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항체; (3) 서열식별번호: 58의 아미노산 서열 및 서열식별번호: 59의 아미노산 서열을 포함하는 항체; (4) 오비누투주맙으로 공지된 항체; 또는 (5) 서열식별번호: 58의 아미노산 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고 서열식별번호: 59의 아미노산 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 항체. 한 실시양태에서, GA101 항체는 IgG1 이소형 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 인간화 B-Ly1 항체이다.

[0115] 용어 "인간화 B-Ly1 항체"는 WO 2005/044859 및 WO 2007/031875에 개시된 바와 같은 인간화 B-Ly1 항체를 지칭하고, 이는 뮤린 모노클로날 항-CD20 항체 B-Ly1 (뮤린 중쇄 (VH)의 가변 영역: 서열식별번호: 30; 뮤린 경쇄 (VL)의 가변 영역: 서열식별번호: 31 - 문헌 [Poppema, S. and Visser, L., Biostest Bulletin 3 (1987) 131-139] 참조)을 IgG1로부터의 인간 불변 도메인과 키메라화한 다음에 인간화함으로써 수득되었다 (WO 2005/044859 및 WO 2007/031875 참조). 이를 "인간화 B-Ly1 항체"는 WO 2005/044859 및 WO 2007/031875에 상세히 개시되어 있다.

[0116] 한 실시양태에서, "인간화 B-Ly1 항체"는 서열식별번호: 32 내지 서열식별번호: 48 (WO 2005/044859 및 WO 2007/031875의 B-HH2 내지 B-HH9 및 B-HL8 내지 B-HL17)의 군으로부터 선택된 중쇄 (VH)의 가변 영역을 갖는다. 한 구체적 실시양태에서, 이러한 가변 도메인은 서열식별번호: 32, 33, 36, 38, 40, 42 및 44 (WO 2005/044859 및 WO 2007/031875의 B-HH2, BHH-3, B-HH6, B-HH8, B-HL8, B-HL11 및 B-HL13)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 구체적 실시양태에서, "인간화 B-Ly1 항체"는 서열식별번호: 49의 경쇄 (VL)의 가변 영역 (WO 2005/044859 및 WO 2007/031875의 B-KV1)을 갖는다. 한 구체적 실시양태에서, "인간화 B-Ly1 항체"는 서열식별번호: 36의 중쇄 (VH)의 가변 영역 (WO 2005/044859 및 WO 2007/031875의 B-HH6) 및 서열식별번호: 49의 경쇄 (VL)의 가변 영역 (WO 2005/044859 및 WO 2007/031875의 B-KV1)을 갖는다. 또한 한 실시양태에서, 인간화 B-Ly1 항체는 IgG1 항체이다. 본 발명에 따르면 이러한 비푸코실 인간화 B-Ly1 항체는 WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, 문헌 [Umana, P. et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180] 및 WO 99/154342에 기재된 절차에 따라 Fc 영역에서 당조작 (GE)된다. 한 실시양태에서, 비푸코실화 당조작 인간화 B-Ly1은 B-HH6-B-KV1 GE이다. 한 실시양태에서, 항-CD20 항체는 오비누투주맙 (권장된 INN, WHO 약물 정보, Vol. 26, No. 4, 2012, p. 453)이다. 본원에 사용된 오비누투주맙은 GA101 또는 R05072759와 동의어이다. 이것은 모든 이전 버전 (예를 들어, Vol. 25, No. 1, 2011, p.75-76)을 대체하고, 아푸투주맙 (권장된 INN, WHO 약물 정보, Vol. 23, No. 2, 2009, p. 176; Vol. 22, No. 2, 2008, p. 124)으로서 이전에 공지된 것이다. 일부 실시양태에서, 인간화 B-Ly1 항체는 서열식별번호: 60의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 인간화 B-Ly1 항체는 서열식별번호: 60의 3개의 중쇄 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 61의 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

중쇄 (SEQ ID NO:60)

```
QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQA PGQGLEWMGR 50
IFPGDGDTDY NGKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARNV 100
FDGYWLVYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD 150
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY 200
ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK 250
DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY DVGVENVHNAAK TKPREEQYNS 300
TYRVSLSLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV 350
YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPPVL 400
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG 449
```

경쇄 (SEQ ID NO:61)

```
DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSLL HSNGITYLYW YLQKPGQSPQ 50
LLIYQMSNLV SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCAQNLELP 100
YTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVCL LNNFYPREAK 150
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTTLSKAD YEHKVYACE 200
VTHQGLSSPV TKSFRNRGEC 219
```

[0117] 일부 실시양태에서, 인간화 B-Ly1 항체는 비푸코실화 당조작 인간화 B-Ly1이다. 이러한 당조작된 인간화 B-Ly1

[0118] 일부 실시양태에서, 인간화 B-Ly1 항체는 비푸코실화 당조작 인간화 B-Ly1이다. 이러한 당조작된 인간화 B-Ly1

항체는, 바람직하게는 감소된 수준의 푸코스 잔기를 갖는 Fc 영역에서의 변경된 패턴의 글리코실화를 갖는다. 바람직하게는, 푸코스의 양은 Asn297에서 올리고사카라이드의 총량의 60% 이하이다 (한 실시양태에서 푸코스의 양은 40% 내지 60%이고, 또 다른 실시양태에서 푸코스의 양은 50% 이하이고, 또 다른 실시양태에서 푸코스의 양은 30% 이하임). 또한, Fc 영역의 올리고사카라이드는 바람직하게는 이등분된다. 이들 당조작된 인간화 B-Ly1 항체는 증가된 ADCC를 갖는다.

[0119] "리툭시맙과 비교하여 항-CD20 항체의 Raji 세포 (ATCC-번호 CCL-86) 상의 CD20에 대한 결합 능력의 비"는 실시 예 번호 2에 기재된 바와 같이 Raji 세포 (ATCC-번호 CCL-86)를 사용하는 FACS아레이 (벡톤 디킨슨(Becton Dickinson))에서 Cy5와 접합된 상기 항-CD20 항체 및 Cy5와 접합된 리툭시맙을 사용하여 직접적 면역형광 측정 (평균 형광 강도 (MFI)가 측정됨)에 의해 결정되며, 하기와 같이 계산된다:

[0120] Raji 세포 (ATCC-번호 CCL-86) 상의 CD20에 대한 결합 능력의 비 =

$$\frac{\text{MFI}(\text{Cy5- 항-CD20 항체})}{\text{MFI}(\text{Cy5-리툭시맙})} \times \frac{\text{Cy5- 표지 비}(\text{Cy5-리툭시맙})}{\text{Cy5- 표지 비}(\text{Cy5- 항-CD20 항체})}$$

[0121] MFI는 평균 형광 강도이다. 본원에 사용된 "Cy5-표지 비"는 분자 항체당 Cy5-표지 분자의 수를 의미한다.

[0123] 전형적으로 상기 유형 II 항-CD20 항체는 리툭시맙과 비교하여 상기 제2 항-CD20 항체의 Raji 세포 (ATCC-번호 CCL-86) 상의 CD20에 대한 결합 능력의 비가 0.3 내지 0.6이고, 한 실시양태에서는 0.35 내지 0.55이고, 또 다른 실시양태에서는 0.4 내지 0.5이다.

[0124] 한 실시양태에서, 상기 유형 II 항-CD20 항체, 예를 들어 GA101 항체는 증가된 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 갖는다.

[0125] "증가된 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 갖는 항체"는, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 결정된 바와 같은 증가된 ADCC를 갖는, 본원에 정의된 바와 같은 용어인 항체를 의미한다. 하나의 허용되는 시험관내 ADCC 검정은 하기와 같다:

[0126] 1) 검정은 항체의 항원-결합 영역에 의해 인식된 표적 항원을 발현하는 것으로 공지된 표적 세포를 사용함;

[0127] 2) 검정은 이펙터 세포로서 무작위로 선택된 건강한 공여자의 혈액으로부터 단리된 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 사용함;

[0128] 3) 검정은 하기 프로토콜에 따라 수행됨:

[0129] i) PBMC를 표준 밀도 원심분리 절차를 사용하여 단리하고, RPMI 세포 배양 배지에 5×10^6 개 세포/ml로 혼탁시킴;

[0130] ii) 표적 세포를 표준 조직 배양 방법에 의해 성장시키고, 90% 초과의 생존율을 갖는 지수 성장기로부터 수거하고, RPMI 세포 배양 배지에서 세척하고, 100 마이크로쿼리의 ^{51}Cr 로 표지하고, 세포 배양 배지로 2회 세척하고, 세포 배양 배지에 10^5 개 세포/ml의 밀도로 재현탁시킴;

[0131] iii) 상기 100 마이크로리터의 최종 표적 세포 혼탁액을 96-웰 마이크로타이터 플레이트의 각 웰로 옮김;

[0132] iv) 항체를 세포 배양 배지에 4000 ng/ml에서 0.04 ng/ml로 연속 희석시키고, 생성된 항체 용액 50 마이크로리터를 96-웰 마이크로타이터 플레이트 내 표적 세포에 첨가하고, 상기 전체 농도 범위를 커버하는 다양한 항체 농도를 3중으로 시험함;

[0133] v) 최대 방출 (MR) 대조군을 위해, 표지된 표적 세포를 함유하는 플레이트 내 3개의 추가의 웰에 항체 용액 (상기 항목 iv) 대신에 비-이온성 세제 (노니데트(Nonidet), 시그마(Sigma), 세인트 루이스)의 2% (VN) 수용액 50 마이크로리터를 공급함;

[0134] vi) 자발적 방출 (SR) 대조군을 위해, 표지된 표적 세포를 함유하는 플레이트 내 3개의 추가의 웰에 항체 용액 (상기 항목 iv) 대신에 RPMI 세포 배양 배지 50 마이크로리터를 공급함;

[0135] vii) 이어서 96-웰 마이크로타이터 플레이트를 50 x g에서 1분 동안 원심분리하고, 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션함;

[0136] viii) PBMC 혼탁액 (상기 항목 i) 50 마이크로리터를 각 웰에 첨가하여 이펙터:표적 세포 비 25:1를

생성시키고, 플레이트를 5% CO₂ 분위기 하에 37°C에서 4시간 동안 인큐베이터에 넣음;

[0137] ix) 각 웰로부터의 세포-무함유 상청액을 수거하고, 실험적으로 방출된 방사능 (ER)을 감마 계수기를 사용하여 정량화함;

[0138] x) 비용해도의 백분율은 식 (ER-MR)/(MR-SR) × 100에 따라 각 항체 농도에 대해 계산하며, 상기 식에서 ER은 항체 농도에 대해 정량화된 평균 방사능 (상기 항목 ix 참조)이고, MR은 MR 대조군 (상기 항목 v 참조)에 대해 정량화된 평균 방사능 (상기 항목 ix 참조)이고, SR은 SR 대조군 (상기 항목 vi 참조)에 대해 정량화된 평균 방사능 (상기 항목 ix 참조)임;

[0139] 4) "증가된 ADCC"는 상기 시험된 항체 농도 범위 내에 관찰된 비용해도의 최대 백분율의 증가 및/또는 상기 시험된 항체 농도 범위 내에 관찰된 비용해도의 최대 백분율의 절반을 달성하는데 요구되는 항체의 농도의 감소로 정의된다. 한 실시양태에서, ADCC의 증가는, 비교자 항체 (증가된 ADCC가 결여됨)가 GnTIII을 과다발현하도록 설계되고/거나 푸코실트랜스퍼라제 8 (FUT8) 유전자로부터의 감소된 발현을 갖도록 조작 (예를 들어, FUT8 녹아웃 조작 포함)된 숙주 세포에 의해 생산되지 않았다는 것을 제외하고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 동일한 표준 생산, 정제, 제제화 및 저장 방법을 사용하여 동일한 유형의 숙주 세포에 의해 생산된 동일한 항체에 의해 매개된, 상기 검정으로 측정된 ADCC에 대비된다.

[0140] 상기 "증가된 ADCC"는, 예를 들어 상기 항체를 돌연변이시키고/거나 당조작함으로써 수득될 수 있다. 한 실시양태에서, 항체는, 예를 들어 WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); 미국 특허 번호 6,602,684 (Umana et al.); US 2005/0123546 (Umana et al.), 문헌 [Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180]에서의 GlcNAc에 의해 이등분된 항체의 Fc 영역에 부착된 이중안테나 올리고사카라이드를 갖도록 당조작된다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 단백질 푸코실화가 결핍된 숙주 세포 (예를 들어, Lec13 CHO 세포 또는 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자 (FUT8)가 결핍되거나 FUT 유전자 발현이 늑다운된 세포)에서 항체를 발현함으로써 Fc 영역에 부착된 탄수화물 상에 푸코스가 결여되도록 당조작된다 (예를 들어, 문헌 [Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006)]; 및 WO2003/085107 참조). 또 다른 실시양태에서, 항체 서열은 ADCC를 증진시키도록 그의 Fc 영역에서 조작되었다 (예를 들어, 한 실시양태에서, 이러한 조작된 항체 변이체는 Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334 (잔기의 EU 넘버링)에 1개 이상의 아미노산 치환을 갖는 Fc 영역을 포함함).

[0141] 용어 "보체-의존성 세포독성 (CDC)"은 보체의 존재 하에 본 발명에 따른 항체에 의한 인간 종양 표적 세포의 용해를 지칭한다. CDC는 보체의 존재 하에 본 발명에 따른 항-CD20 항체를 사용하여 CD20 발현 세포의 제제를 처리함으로써 측정될 수 있다. CDC는 항체가 100 nM의 농도에서 4시간 후에 종양 세포의 20% 이상의 용해 (세포 사멸)를 유도하는 경우에 발견된다. 한 실시양태에서, 검정은 ⁵¹Cr 또는 Eu 표지된 종양 세포 및 방출된 ⁵¹Cr 또는 Eu의 측정으로 수행된다. 대조군은 항체 부재 하에 보체와 종양 표적 세포의 인큐베이션을 포함한다.

[0142] 용어 "CD20 항원의 발현"은 세포, 예를 들어 T- 또는 B- 세포에서 CD20 항원의 발현의 유의한 수준을 나타내는 것으로 의도된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따라 치료되는 환자는 B-세포 종양 또는 암 상에 CD20의 유의한 수준을 발현한다. "CD20 발현 암"을 갖는 환자는 관련 기술분야에 공지된 표준 검정에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, CD20 항원 발현은 면역조직화학 (IHC) 검출, FACS를 사용하거나 또는 상응하는 mRNA의 PCR-기반 검출을 통해 측정된다.

[0143] 본원에 사용된 용어 "CD20 발현 암"은 암 세포가 CD20 항원의 발현을 보이는 모든 암을 지칭한다. 이러한 CD20 발현 암은, 예를 들어 림프종, 림프구성 백혈병, 폐암, 비소세포 폐 (NSCL) 암, 세기관지폐포 세포 폐암, 골암, 체장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문부암, 위암, 위암, 결장암, 유방암, 자궁암, 난관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부 암종, 질 암종, 외음부 암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연부 조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 방광암, 신장암 또는 요관암, 신세포 암종, 신우 암종, 중피종, 간세포성암, 담도암, 중추 신경계 (CNS)의 신생물, 척수축 종양, 뇌간 신경교종, 다형성 교모세포종, 성상세포종, 슈반세포종, 상의세포종, 수모세포종, 수막종, 편평 세포 암종, 뇌하수체 선종, 임의의 상기 암의 불웅성 버전 또는 상기 암 중 1종 이상의 조합일 수 있다.

[0144] 한 실시양태에서, 본원에 사용된 바와 같은 CD20 발현 암은 림프종 (예를 들어, B-세포 비-호지킨 림프종 (NHL)) 및 림프구성 백혈병을 지칭한다. 이러한 림프종 및 림프구성 백혈병은, 예를 들어 a) 여포성 림프종, b) 비-분할 소세포 림프종/버킷 림프종 (풍토병성 버킷 림프종, 산발성 버킷 림프종 및 비-버킷 림프종 포함), c) 변연부 림프종 (림프절외 변연부 B 세포 림프종 (점막-연관 림프 조직 림프종, MALT), 결절성 변연부 B 세포

림프종 및 비장 변연부 림프종 포함), d) 외투 세포 림프종 (MCL), e) 대세포 림프종 (B-세포 미만성 대세포 림프종 (DLCL), 미만성 혼합 세포 림프종, 면역모세포성 림프종, 원발성 종격 B-세포 림프종, 혈관중심성 림프종-폐 B-세포 림프종 포함), f) 모발상 세포 백혈병, g) 림프구성 림프종, 발텐스트롬 마크로글로불린혈증, h) 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL)/소림프구성 림프종 (SLL), B-세포 전림프구성 백혈병, i) 혈장 세포 신생물, 혈장 세포 골수종, 다발성 골수종, 형질세포종, j) 호지킨병을 지칭한다.

[0145] 한 실시양태에서, CD20 발현 암은 B-세포 비-호지킨 림프종 (NHL)이다. 또 다른 실시양태에서, CD20 발현 암은 외투 세포 림프종 (MCL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), B-세포 미만성 대세포 림프종 (DLCL), 베킷 림프종, 모발상 세포 백혈병, 여포성 림프종, 다발성 골수종, 변연부 림프종, 이식 후 림프증식성 장애 (PTLD), HIV 연관 림프종, 발텐스트롬 마크로글로불린혈증 또는 원발성 CNS 림프종이다.

[0146] 본원에 사용된 "재발성 또는 불응성" CLL은 적어도 1회의 선행 화학요법 함유 치료 요법을 받은적이 있는 CLL 환자를 포함한다. 재발성 환자는 일반적으로 선행 화학요법-함유 치료 요법에 대한 반응 후에 진행성 질환을 발달시켰다. 불응성 환자는 일반적으로 마지막 선행 화학요법-함유 치료 요법에 대해 반응하지 못하거나 6개월 이내에 재발하였다.

[0147] 본원에 사용된 "이전에 치료되지 않은" CLL은 CLL로 진단되었으나 일반적으로 선행 화학요법 또는 면역요법을 받은적이 없는 환자를 포함한다. 응급, 국소-영역 방사선요법 (예를 들어, 압축성 징후 또는 증상의 완화를 위함) 또는 코르티코스테로이드의 병력을 갖는 환자는 이전에 치료되지 않은 것으로 또한 간주될 수 있다.

[0148] 본원 및 첨부된 청구범위에서 사용된 단수 형태는 문맥상 달리 분명하게 언급되지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다.

[0149] 본원에서 값 또는 파라미터에 대해 언급되는 "약"은 해당 값 또는 파라미터 자체에 대해 지시된 변화를 포함 (및 기재)한다. 예를 들어, "약 X"를 언급하는 기재는 "X"의 기재를 포함한다.

[0150] 본원에 기재된 본 발명의 측면 및 변화가 측면 및 변화로 "이루어지는" 및/또는 "본질적으로 이루어지는" 것을 포함하는 것으로 이해된다.

III. 방법

[0152] 한 측면에서, 개체에게 유효량의 PD-1 측 결합 길항제 및 항-CD20 항체를 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키는 방법이 본원에 제공된다.

[0153] 본 발명의 방법은 암의 치료를 위해 종양 면역원성을 증가시키는 것과 같이 증진된 면역원성이 요구되는 상태를 치료하는데 있어서 용도를 발견할 수 있다. 비-고형 종양인 암을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 암이 치료될 수 있거나 또는 그의 진행이 지연될 수 있다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병 또는 림프종이다. 일부 실시양태에서, 백혈병은 만성 림프구성 백혈병 (CLL) 또는 급성 골수성 백혈병 (AML)이다. 일부 실시양태에서, 림프종은 여포성 림프종 (FL), 미만성 대 B-세포 림프종 (DLBCL) 또는 비-호지킨 림프종 (NHL)이다.

[0154] 상기 기재된 암은 항-CD20 항체로 치료될 수 있고, PD-1 측 결합 길항제는 CD20 발현 암의 치료를 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료된 개체는 CD20 발현 암을 앓고 있다.

[0155] 한 실시양태에서, 항-CD20 항체는 리툭시맙과 비교하여 상기 유형 II 항-CD20 항체의 Raji 세포 (ATCC-번호 CCL-86) 상의 CD20에 대한 결합 능력의 비가 0.3 내지 0.6이고, 한 실시양태에서는 0.35 내지 0.55이고, 또 다른 실시양태에서는 0.4 내지 0.5이다.

[0156] 한 실시양태에서, 상기 유형 II 항-CD20 항체는 GA101 항체이다.

[0157] 한 실시양태에서, 상기 유형 II 항-CD20 항체는 증가된 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)를 갖는다.

[0158] 본원에 제공된 환자에서의 암의 치료 방법의 특정 실시양태에서, 암은 비-고형 종양이다. 한 실시양태에서, 비-고형 종양은 CD20 발현 비-고형 종양이다. 본원에 제공된 방법에서 치료될 수 있는 예시적인 비-고형 종양은, 예를 들어 백혈병 또는 림프종을 포함한다. 한 실시양태에서, 비-고형 종양은 B 세포 림프종이다.

[0159] 한 실시양태에서, CD20 발현 암은 B-세포 비-호지킨 림프종 (NHL)이다.

[0160] 일부 실시양태에서, 개체는 암을 가지고 있거나 그를 발달시킬 위험이 있다. 일부 실시양태에서, 치료는 치료 중지 후에 개체에서 지속된 반응을 유발한다. 일부 실시양태에서, 개체는 초기 단계 또는 후기 단계에 있을 수 있는 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 암이다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

- [0161] 일부 실시양태에서, 개체는 포유동물, 예컨대 가축 동물(예를 들어, 소, 양, 고양이, 개, 및 말), 영장류(예를 들어, 인간 및 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이), 토끼 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)이다. 일부 실시양태에서, 치료되는 개체는 인간이다.
- [0162] 또 다른 측면에서, 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 항-CD20 항체를 투여하는 것을 포함하는, 암을 갖는 개체에서 면역 기능을 증진시키는 방법이 본원에 제공된다.
- [0163] 일부 실시양태에서, 개체에서의 CD8 T 세포는 PD-1 경로 길항제 및 항-CD20 항체의 투여 전에 비해 증진된 프라이밍, 활성화, 증식 및/또는 세포용해 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포 프라이밍은 CD8 T 세포에서 상승된 CD44 발현 및/또는 증진된 세포용해 활성을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포 활성화는 γ -IFN⁺ CD8 T 세포의 상승된 빈도를 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, CD8 T 세포는 항원-특이적 T-세포이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 표면 발현을 통한 신호전달에 의한 면역 회피가 억제된다.
- [0164] 일부 실시양태에서, 개체에서의 암 세포는 PD-1 경로 길항제 및 항-CD20 항체의 투여 전에 비해 MHC 부류 I 항원 발현의 상승된 발현을 갖는다.
- [0165] 일부 실시양태에서, 개체에서의 항원 제시 세포는 PD-1 경로 길항제 및 항-CD20 항체의 투여 전에 비해 증진된 성숙 및 활성화를 갖는다. 일부 실시양태에서, 항원 제시 세포는 수지상 세포이다. 일부 실시양태에서, 항원 제시 세포의 성숙은 CD83⁺ 수지상 세포의 증가된 빈도를 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 항원 제시 세포의 활성화는 수지상 세포 상의 CD80 및 CD86의 상승된 발현을 특징으로 한다.
- [0166] 일부 실시양태에서, 개체에서의 시토카인 IL-10 및/또는 케모카인 IL-8, 뮤린 KC의 인간 상동체의 혈청 수준이 항-PD-L1 항체 및 항-CD20 항체의 투여 전에 비해 감소된다.
- [0167] 일부 실시양태에서, 암은 상승된 수준의 T-세포 침윤을 갖는다.
- [0168] 일부 실시양태에서, 본 발명의 조합 요법은 PD-1 축 결합 길항제 및 항-CD20 항체의 투여를 포함한다. PD-1 축 결합 길항제 및 항-CD20 항체는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방식으로 투여될 수 있다. 예를 들어, PD-1 축 결합 길항제 및 항-CD20 항체는 순차적으로(상이한 시간에) 또는 공동으로(동시에) 투여될 수 있다.
- [0169] 일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항제 또는 항-CD20 항체는 연속적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항제 또는 항-CD20 항체는 간헐적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 PD-1 축 결합 길항제의 투여 전에 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 PD-1 축 결합 길항제의 투여와 동시에 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 PD-1 축 결합 길항제의 투여 후에 투여된다.
- [0170] 일부 실시양태에서, 개체에게 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 항-CD20 항체를 투여하는 것을 포함하며, 추가의 요법을 투여하는 것을 추가로 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키는 방법이 제공된다. 추가의 요법은 방사선 요법, 수술(예를 들어, 종괴절제술 및 유방절제술), 화학요법, 유전자 요법, DNA 요법, 바이러스 요법, RNA 요법, 면역요법, 골수 이식, 나노요법, 모노클로날 항체 요법 또는 상기의 조합일 수 있다. 추가의 요법은 아주반트 또는 네오아주반트 요법의 형태일 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 소분자 효소 억제제 또는 항전이제의 투여이다. 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 부작용 제한 작용제(예를 들어, 치료의 부작용의 발생 및/또는 중증도를 경감시키고자 하는 작용제, 예컨대 항구토제 등)의 투여이다. 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 방사선 요법이다. 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 수술이다. 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 방사선 요법 및 수술의 조합이다. 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 감마선 조사이다. 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 PI3K/AKT/mTOR 경로를 표적화하는 요법, HSP90 억제제, 튜불린 억제제, 아폽토시스 억제제 및/또는 화학예방제이다. 추가의 요법은 상기 기재된 화학요법제 중 1종 이상일 수 있다.
- [0171] PD-1 축 결합 길항제 및 항-CD20 항체는 투여의 동일한 경로 또는 투여의 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항제는 정맥내로, 근육내로, 피하로, 국소로, 경구로, 경피로, 복강내로, 안와내로, 이식에 의해, 흡입에 의해, 척수강내로, 뇌실내로 또는 비강내로 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 정맥내로, 근육내로, 피하로, 국소로, 경구로, 경피로, 복강내로, 안와내로, 이식에 의해, 흡입에 의해, 척수강내로, 뇌실내로 또는 비강내로 투여된다. 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 항-CD20 항체는 질환의 예방 또는 치료를 위해 투여될 수 있다. PD-1 축 결합 길항제 및/또는 항-CD20 항체의 적절한 투여량은 치료될 질환의 유형, PD-1 축 결합 길항제 및 항-CD20 항체의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 개체의 임상 상태,

개체의 임상 병력 및 치료에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 기초하여 결정될 수 있다.

[0172] 일부 실시양태에서, 암을 치료하는 방법은 심지어 낮은 성공 가능성으로도 수행될 것이지만, 그럼에도 불구하고 환자의 병력 및 추정 기대 생존기간을 고려하여 전체적으로 유익한 활동 과정을 유도하는 것처럼 보인다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체 및 PD-1 축 결합 길항체는 공-투여되고, 예를 들어 상기 항-CD20 항체 및 PD-1 축 결합 길항체가 2개의 개별 제제로서 투여된다. 공-투여는 동시일 수 있거나 어느 순서이든 순차적일 수 있다. 하나의 추가 실시양태에서, 둘 다의 (또는 모든) 활성제가 동시에 이들의 생물학적 활성을 발휘하는 기간이 있다. 상기 항-CD20 항체 및 상기 PD-1 축 결합 길항체는 (예를 들어 연속 주입을 통하여 정맥내 (i.v.)를 통해) 동시에 또는 순차적으로 공-투여될 수 있다. 둘 다의 치료제가 순차적으로 공-투여되는 경우에, 작용제는 "특정 기간"으로 이격되는 2개의 개별 투여로 투여된다. 용어 특정 기간은 1시간에서 15일까지 중 임의의 기간을 의미한다. 예를 들어, 작용제 중 1종은 다른 작용제의 투여로부터 약 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1일, 또는 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1시간 이내에 투여될 수 있고, 한 실시양태에서 특정 기간은 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1일, 또는 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1시간이다.

[0173] 일부 실시양태에서, 동시 투여는 동시에 또는 단기간, 통상적으로 1시간 미만 내를 의미한다.

[0174] 본원에 사용된 투여 기간은 각각의 치료제가 적어도 1회 투여되는 동안의 기간을 의미한다. 투여 주기는 통상적으로 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30일이고, 한 실시양태에서는 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일, 예를 들어 7 또는 14일이다.

[0175] 일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항체는 항-PD-L1 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 1200 mg의 용량으로 3주마다 1회 개체에게 정맥내로 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 항-CD20 항체와 함께 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 1000 mg의 용량으로 제1 주기의 제1일, 제8일 및 제15일, 및 제2 내지 제8 주기의 제1일에 1회 개체에게 정맥내로 투여된다.

[0176] 관련 기술분야에 공지되거나 하기 기재된 임의의 PD-1 축 결합 길항제 및 항-CD20 항체가 방법에 사용될 수 있다.

PD-1 축 결합 길항제

[0177] 개체에게 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 항-CD20 항체를 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키는 방법이 본원에 제공된다. 예를 들어, PD-1 축 결합 길항체는 PD-1 결합 길항제, PD-L1 결합 길항제 및 PD-L2 결합 길항제를 포함한다. "PD-1"에 대한 대체 명칭은 CD279 및 SLEB2를 포함한다. "PD-L1"에 대한 대체 명칭은 B7-H1, B7-4, CD274 및 B7-H를 포함한다. "PD-L2"에 대한 대체 명칭은 B7-DC, Btdc 및 CD273을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-1, PD-L1 및 PD-L2는 인간 PD-1, PD-L1 및 PD-L2이다.

[0178] 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항체는 PD-1의 그의 리간드 결합 파트너에 대한 결합을 억제하는 분자이다. 구체적 측면에서, PD-1 리간드 결합 파트너는 PD-L1 및/또는 PD-L2이다. 또 다른 실시양태에서, PD-L1 결합 길항체는 PD-L1의 그의 결합 파트너에 대한 결합을 억제하는 분자이다. 구체적 측면에서, PD-L1 결합 파트너는 PD-1 및/또는 B7-1이다. 또 다른 실시양태에서, PD-L2 결합 길항체는 PD-L2의 그의 결합 파트너에 대한 결합을 억제하는 분자이다. 구체적 측면에서, PD-L2 결합 파트너는 PD-1이다. 길항체는 항체, 그의 항원 결합 단편, 이뮤노어드헤신, 융합 단백질 또는 올리고펩티드일 수 있다.

[0179] 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항체는 항-PD-1 항체 (예를 들어, 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체)이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 MDX-1106 (또한 니볼루맙, MDX-1106-04, ONO-4538, BMS-936558 및 옴디보(OPDIVO)®로 공지됨), 머크 3475 (또한 펌브롤리주맙, MK-3475, 람브롤리주맙, 키트루다(KEYTRUDA)® 및 SCH-900475로 공지됨) 및 CT-011 (또한 피딜리주맙, hBAT 및 hBAT-1로 공지됨)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항체는 이뮤노어드헤신 (예를 들어, 불변 영역 (예를 들어, 이뮤노글로불린 서열의 Fc 영역)에 융합된 PD-L1 또는 PD-L2의 세포외 또는 PD-1 결합 부분을 포함하는 이뮤노어드헤신)이다. 일부 실시양태에서, PD-1 결합 길항체는 AMP-224 (또한 B7-DC Ig로 공지됨)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 길항체는 항-PD-L1 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 결합 길항체는 YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 및 MEDI4736로 이루어진 군으로부터 선택된다. BMS-936559로도 공지된 MDX-1105는 WO2007/005874에 기재되어 있는 항-PD-L1 항체이다. 항체 YW243.55.S70 (각각 서열식별번호: 20

및 21에 제시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열)은 WO 2010/077634 A1에 기재되어 있는 항-PD-L1이다. MEDI4736은 WO2011/066389 및 US2013/034559에 기재되어 있는 항-PD-L1 항체이다. MDX-1106-04, ONO-4538 또는 BMS-936558로도 공지된 MDX-1106은 WO2006/121168에 기재되어 있는 항-PD-1 항체이다. MK-3475 또는 SCH-900475로도 공지된 머크 3745는 WO2009/114335에 기재되어 있는 항-PD-1 항체이다. hBAT 또는 hBAT-1로도 공지된 CT-011은 WO2009/101611에 기재되어 있는 항-PD-1 항체이다. B7-DC Ig로도 공지된 AMP-224는 WO2010/027827 및 WO2011/066342에 기재되어 있는 PD-L2-Fc 융합 가용성 수용체이다.

[0181] 일부 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 MDX-1106이다. "MDX-1106"에 대한 대체 명칭은 MDX-1106-04, ONO-4538, BMS-936558 또는 니볼루맙을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 니볼루맙 (CAS 등록 번호: 946414-94-4)이다. 추가 실시양태에서, 서열식별번호: 22로부터의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 23으로부터의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-PD-1 항체가 제공된다. 추가 실시양태에서, 중쇄 및/또는 여기서 경쇄 서열을 포함하는 단리된 항-PD-1 항체가 제공되며, 여기서

[0182] (a) 중쇄 서열은 다음 중쇄 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖거나:

QVQLVESGGVVQPGRSRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWY
DGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWQGTLVT
VSSASTKGPSVPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPABL
QSSGLYSLSSVVTVPSSLGKTYYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCCPAPEFLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVGVEVHNAKTKPREEQF
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK
SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:22)

[0183] (b) 경쇄 서열은 다음 경쇄 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는다:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RAT
GIPARFSGSGSGTDFLTISLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:23)

[0184] 본 발명의 방법에 유용한 항-PD-L1 항체 및 그의 제조 방법의 예는 본원에 참조로 포함된 PCT 특허 출원 WO 2010/077634 A1에 기재되어 있다.

[0185] 일부 실시양태에서, PD-1 축 결합 길항체는 항-PD-L1 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 PD-L1과 PD-1 사이 및/또는 PD-L1과 B7-1 사이의 결합을 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 인간 항체이다.

[0186] 본 발명에 유용한 항-PD-L1 항체 (이러한 항체를 함유하는 조성물 포함, 예컨대 WO 2010/077634 A1 및 US 8,217,149에 기재된 것)는 암을 치료하기 위해 항-CD20 항체와 조합하여 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 서열식별번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0187] 한 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 폴리펩티드를 함유하며, 여기서

[0188] (a) HVR-H1 서열은 GFTFSX₁SWIH (SEQ ID NO: 1)이고;

- [0191] (b) HVR-H2 서열은 AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO: 2)이고;
- [0192] (c) HVR-H3 서열은 RHWPGGF DY (SEQ ID NO: 3)이고;
- [0193] 추가로 여기서 X₁은 D 또는 G이고; X₂는 S 또는 L이고; X₃은 T 또는 S이다.
- [0194] 한 구체적 측면에서, X₁은 D이고; X₂는 S이고; X₃은 T이다. 또 다른 측면에서, 폴리펩티드는 다음 화학식에 따라 HVR 사이에 병렬배치된 가변 영역 중쇄 프레임워크 서열을 추가로 포함한다: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4). 또 다른 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 프레임워크 서열은 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 프레임워크 서열 중 적어도 1개는 하기와 같다:
- [0195] HC-FR1은 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 4)이다.
- [0196] HC-FR2는 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 5)이다.
- [0197] HC-FR3은 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 6)이다.
- [0198] HC-FR4는 WGQGTLTVSA (SEQ ID NO: 7)이다.
- [0199] 추가 측면에서, 중쇄 폴리펩티드는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3을 포함하는 가변 영역 경쇄와 추가로 조합되며, 여기서
- [0200] (a) HVR-L1 서열은 RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO: 8)이고;
- [0201] (b) HVR-L2 서열은 SASX₉LX₁₀S, (SEQ ID NO: 9)이고;
- [0202] (c) HVR-L3 서열은 QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NO: 10)이고;
- [0203] 추가로 여기서 X₄는 D 또는 V이고; X₅는 V 또는 I이고; X₆은 S 또는 N이고; X₇은 A 또는 F이고; X₈은 V 또는 L이고; X₉는 F 또는 T이고; X₁₀은 Y 또는 A이고; X₁₁은 Y, G, F 또는 S이고; X₁₂는 L, Y, F 또는 W이고; X₁₃은 Y, N, A, T, G, F 또는 I이고; X₁₄는 H, V, P, T 또는 I이고; X₁₅는 A, W, R, P 또는 T이다.
- [0204] 추가 측면에서, X₄는 D이고; X₅는 V이고; X₆은 S이고; X₇은 A이고; X₈은 V이고; X₉는 F이고; X₁₀은 Y이고; X₁₁은 Y이고; X₁₂는 L이고; X₁₃은 Y이고; X₁₄는 H이고; X₁₅는 A이다. 추가 측면에서, 경쇄는 다음 화학식에 따라 HVR 사이에 병렬배치된 가변 영역 경쇄 프레임워크 서열을 추가로 포함한다: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). 추가 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 프레임워크 서열은 VL 카파 I 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 프레임워크 서열 중 적어도 1개는 하기와 같다:
- [0205] LC-FR1은 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 11)이다.
- [0206] LC-FR2는 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 12)이다.
- [0207] LC-FR3은 GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 13)이다.
- [0208] LC-FR4는 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 14)이다.
- [0209] 또 다른 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 단리된 항-PD-L1 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되며, 여기서
- [0210] (a) 중쇄는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3을 포함하며, 여기서 추가로
- [0211] (i) HVR-H1 서열은 GFTFSX1SWIH (SEQ ID NO: 1)이고;
- [0212] (ii) HVR-H2 서열은 AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO: 2)이고;
- [0213] (iii) HVR-H3 서열은 RHWPGGF DY (SEQ ID NO: 3)이고;
- [0214] (b) 경쇄는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3을 포함하고, 여기서 추가로

- [0215] (i) HVR-L1 서열은 RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO: 8)이고;
- [0216] (ii) HVR-L2 서열은 SASX₉LX₁₀S (SEQ ID NO: 9)이고;
- [0217] (iii) HVR-L3 서열은 QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NO: 10)이고;
- [0218] 추가로 여기서 X₁은 D 또는 G이고; X₂는 S 또는 L이고; X₃은 T 또는 S이고; X₄는 D 또는 V이고; X₅는 V 또는 I이고; X₆은 S 또는 N이고; X₇은 A 또는 F이고; X₈은 V 또는 L이고; X₉는 F 또는 T이고; X₁₀은 Y 또는 A이고; X₁₁은 Y, G, F 또는 S이고; X₁₂는 L, Y, F 또는 W이고; X₁₃은 Y, N, A, T, G, F 또는 I이고; X₁₄는 H, V, P, T 또는 I이고; X₁₅는 A, W, R, P 또는 T이다.
- [0219] 구체적 측면에서, X₁은 D이고; X₂는 S이고; X₃은 T이다. 또 다른 측면에서, X₄는 D이고; X₅는 V이고; X₆은 S이고; X₇은 A이고; X₈은 V이고; X₉는 F이고; X₁₀은 Y이고; X₁₁은 Y이고; X₁₂는 L이고; X₁₃은 Y이고; X₁₄는 H이고; X₁₅는 A이다. 또 다른 측면에서, X₁은 D이고; X₂는 S이고; X₃은 T이고; X₄는 D이고; X₅는 V이고; X₆은 S이고; X₇은 A이고; X₈은 V이고; X₉는 F이고; X₁₀은 Y이고; X₁₁은 Y이고; X₁₂는 L이고; X₁₃은 Y이고; X₁₄는 H이고; X₁₅는 A이다.
- [0220] 추가 측면에서, 중쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함하고: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), 경쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). 추가 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카바트 하위군 I, II 또는 III 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:
- | | | |
|--------|----------------------------------|---------------|
| HC-FR1 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS | (SEQ ID NO:4) |
| HC-FR2 | WVRQAPGKGLEWW | (SEQ ID NO:5) |
| HC-FR3 | RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR | (SEQ ID NO:6) |
| HC-FR4 | WGQGTLVTVSA | (SEQ ID NO:7) |
- [0221] 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카바트 카파 I, II, II 또는 IV 하위군 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카파 I 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:
- | | | |
|--------|-------------------------------|----------------|
| LC-FR1 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC | (SEQ ID NO:11) |
| LC-FR2 | WYQQKPGKAPKLLIY | (SEQ ID NO:12) |
| LC-FR3 | GVPSRFSGSGTDFTLTSSLQPEDFATYYC | (SEQ ID NO:13) |
| LC-FR4 | FGQGTKVEIKR | (SEQ ID NO:14) |
- [0224] 추가의 구체적 측면에서, 항체는 인간 또는 뮤린 불변 영역을 추가로 포함한다. 추가 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 구체적 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 추가 측면에서, 뮤린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 측면에서, 뮤린 불변 영역은 IgG2A이다. 추가의 구체적 측면에서, 항체는 감소된 또는 최소 이펙터 기능을 갖는다. 추가의 구체적 측면에서 최소 이펙터 기능은 "이펙터-무함유 Fc 돌연변이" 또는 비-글리코실화로부터 발생한다. 추가 실시양태에서, 이펙터-무함유 Fc 돌연변이는 불변 영역에서의 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.
- [0225] 또 다른 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-PD-L1 항체가 제공되며, 여기서
- [0226] (a) 중쇄는 각각 GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 15), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 16) 및 RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 3)에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 서열을 추가로 포함하거나, 또는
- [0227] (b) 경쇄는 각각의 RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 17), SASFLYS (SEQ ID NO: 18) 및 QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 19)에

대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 서열을 추가로 포함한다.

[0228] 구체적 측면에서, 서열 동일성은 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다. 또 다른 측면에서, 중쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함하고: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), 및 경쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). 또 다른 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카바트 하위군 I, II 또는 III 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO:4)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO:5)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:6)
HC-FR4	WGQGTLVTVSA	(SEQ ID NO:7)

[0229] [0230] 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카바트 카파 I, II, II 또는 IV 하위군 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카파 I 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO:11)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:12)
LC-FR3	GVPSRFSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:13)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:14)

[0231] [0232] 추가의 구체적 측면에서, 항체는 인간 또는 뮤린 불변 영역을 추가로 포함한다. 추가 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 구체적 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 추가 측면에서, 뮤린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 측면에서, 뮤린 불변 영역은 IgG2A이다. 추가의 구체적 측면에서, 항체는 감소된 또는 최소 이펙터 기능을 갖는다. 추가의 구체적 측면에서 최소 이펙터 기능은 "이펙터-무함유 Fc 돌연변이" 또는 비-글리코실화로부터 발생한다. 추가 실시양태에서, 이펙터-무함유 Fc 돌연변이는 불변 영역에서의 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.

[0233] 추가 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 단리된 항-PD-L1 항체가 제공되며, 여기서

[0234] (a) 중쇄 서열은 다음 중쇄 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖거나:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWIS
PYGGSTYYADSVKGRTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWG
QGTLVTVSA (SEQ ID NO:20)

[0235] [0236] (b) 경쇄 서열은 다음 경쇄 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖는다:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASF
LYSGVPSRFSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ
ID NO:21)

[0237] [0238] 구체적 측면에서, 서열 동일성은 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다. 또 다른 측면에서, 중쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함하고: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), 및 경쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). 또 다른 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카바트 하위군 I, II 또는 III 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO:4)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO:5)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:6)
HC-FR4	WGQGTLVTVSA	(SEQ ID NO:7)

[0239] 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카바트 카파 I, II, II 또는 IV 하위군 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카파 I 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO:11)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:12)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:13)
LC-FR4	FGQGTLVTVSA	(SEQ ID NO:14)

[0240] 추가의 구체적 측면에서, 항체는 인간 또는 뮤린 불변 영역을 추가로 포함한다. 추가 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 구체적 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 추가 측면에서, 뮤린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 측면에서, 뮤린 불변 영역은 IgG2A이다. 추가의 구체적 측면에서, 항체는 감소된 또는 최소 이펙터 기능을 갖는다. 추가의 구체적 측면에서, 최소 이펙터 기능은 원핵 세포에서의 생산으로부터 발생한다. 추가의 구체적 측면에서 최소 이펙터 기능은 "이펙터-무함유 Fc 돌연변이" 또는 비-글리코실화로부터 발생한다. 추가 실시양태에서, 이펙터-무함유 Fc 돌연변이는 불변 영역에서의 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.

[0241] 또 다른 추가 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 단리된 항-PD-L1 항체가 제공되며, 여기서:

[0242] (a) 중쇄 서열은 다음 중쇄 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖거나:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWIS
PYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFYWG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:24)

[0243] (b) 경쇄 서열은 다음 경쇄 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖는다:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASF
LYSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTLVTVSS (SEQ
ID NO:21).

[0244] 추가 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 단리된 항-PDL1 항체가 제공되며, 여기서

[0245] (a) 중쇄 서열은 다음 중쇄 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖거나:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWI
SPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFYWG
GQGTLVTVSSASTK (SEQ ID NO:28)

[0246] (b) 경쇄 서열은 다음 경쇄 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖는다:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF
LYSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTLVTVSS (SEQ
ID NO:29)

[0247] 구체적 측면에서, 서열 동일성은 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다. 또 다른 측면에서, 중쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크

서열을 포함하고: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), 및 경쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). 또 다른 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카바트 하위군 I, II 또는 III 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO:4)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWW	(SEQ ID NO:5)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:6)
HC-FR4	WGQQGTLVTVSS	(SEQ ID NO:25)

[0254] [0255] 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카바트 카파 I, II, II 또는 IV 하위군 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카파 I 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSAVGDRVTITC	(SEQ ID NO:11)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:12)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:13)
LC-FR4	FGQQGTLVTVSS	(SEQ ID NO:14)

[0256] [0257] 추가의 구체적 측면에서, 항체는 인간 또는 뮤린 불변 영역을 추가로 포함한다. 추가 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 구체적 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 추가 측면에서, 뮤린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 측면에서, 뮤린 불변 영역은 IgG2A이다. 추가의 구체적 측면에서, 항체는 감소된 또는 최소 이펙터 기능을 갖는다. 추가의 구체적 측면에서, 최소 이펙터 기능은 원핵 세포에서의 생산으로부터 발생한다. 추가의 구체적 측면에서 최소 이펙터 기능은 "이펙터-무함유 Fc 돌연변이" 또는 비-글리코실화로부터 발생한다. 추가 실시양태에서, 이펙터-무함유 Fc 돌연변이는 불변 영역에서의 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.

[0258] [0259] 또 다른 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 MPDL3280A이다. 추가 실시양태에서, 서열식별번호: 24로부터의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 25로부터의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-PD-1 항체가 제공된다. 추가 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 서열을 포함하는 단리된 항-PD-L1 항체가 제공되며, 여기서

(a) 중쇄 서열은 다음 중쇄 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖거나:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGST
YYADSVKGRTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGF DYWGQQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALV
QSSGLYSLSSVVTVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREGQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:26)

[0260] [0261] (b) 경쇄 서열은 다음 경쇄 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는다:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSL
 TLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:27)

[0262]

[0263] 추가 실시양태에서, 본 발명은 임의의 상기 기재된 항-PD-L1 항체를 적어도 1종의 제약상 허용되는 담체와 조합하여 포함하는 조성물을 제공한다.

[0264]

[0264] 추가 실시양태에서, 항-PD-L1 항체의 경쇄 또는 중쇄 가변 영역 서열을 코딩하는 단리된 핵산이 제공되며, 여기서

[0265]

(a) 중쇄는 각각 GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 15), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 16) 및 RHWPGGF DY (SEQ ID NO: 3)에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 서열을 추가로 포함하고,

[0266]

(b) 경쇄는 각각 RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 17), SASFLYS (SEQ ID NO: 18) 및 QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 19)에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 서열을 추가로 포함한다.

[0267]

구체적 측면에서, 서열 동일성은 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다. 측면에서, 중쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함하고: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), 및 경쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR 사이에 병렬배치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). 또 다른 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카바트 하위군 I, II 또는 III 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:4)

HC-FR2 WVRQAPGKGLEWW (SEQ ID NO:5)

HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:6)

HC-FR4 WGQGTLTVSA (SEQ ID NO:7)

[0268]

[0269] 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카바트 카파 I, II, II 또는 IV 하위군 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카파 I 컨센서스 프레임워크이다. 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기와 같다:

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:11)

LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:12)

LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:13)

LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:14)

[0270]

[0271] 추가의 구체적 측면에서, 본원에 기재된 항체 (예컨대, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 또는 항-PD-L2 항체)는 인간 또는 뮤린 불변 영역을 추가로 포함한다. 추가 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 구체적 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 추가 측면에서, 뮤린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 측면에서, 뮤린 불변 영역은 IgG2A이다. 추가의 구체적 측면에서, 항체는 감소된 또는 최소 이펙터 기능을 갖는다. 추가의 구체적 측면에서, 최소 이펙터 기능은 원핵 세포에서의 생산으로부터 발생한다. 추가의 구체적 측면에서 최소 이펙터 기능은 "이펙터-무함유 Fc 돌연변이" 또는 비-글리코실화로부터 발생한다. 추가 측면에서, 이펙터-무함유 Fc 돌연변이는 불변 영역에서의 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.

[0272]

[0272] 추가 측면에서, 본원에 기재된 임의의 항체를 코딩하는 핵산이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 임의의 이전에 기재된 항-PD-L1, 항-PD-1 또는 항-PD-L2 항체를 코딩하는 핵산의 발현에 적합한 벡터를 추가로 포함한다. 추가의 구체적 측면에서, 벡터는 핵산의 발현에 적합한 숙주 세포를 추가로 포함한다. 추가의 구체적 측면에서, 숙주 세포는 진핵 세포 또는 원핵 세포이다. 추가의 구체적 측면에서, 진핵 세포는 포유동물 세포, 예컨대 차이니즈 햄스터 난소 (CHO)이다.

- [0273] 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 관련 기술분야에 공지된 방법을 이용하여, 예를 들어 발현에 적합한 형태의 임의의 이전에 기재된 항-PD-L1, 항-PD-1 또는 항-PD-L2 항체 또는 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산을 함유하는 숙주 세포를 이러한 항체 또는 단편을 생산하는데 적합한 조건 하에 배양하고, 상기 항체 또는 단편을 회수하는 것을 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0274] 추가 실시양태에서, 본 발명은 본원에 제공된 바와 같은 항-PD-L1, 항-PD-1 또는 항-PD-L2 항체, 또는 그의 항원 결합 단편 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 개체에게 투여되는 항-PD-L1, 항-PD-1 또는 항-PD-L2 항체, 또는 그의 항원 결합 단편은 적어도 1종의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물이다. 본원에 기재되거나 관련 기술분야에 공지된 임의의 제약상 허용되는 담체가 사용될 수 있다.
- [0275] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-PD-L1 항체는 약 60 mg/mL의 양의 항체, 약 20 mM의 농도의 히스티딘 아세테이트, 약 120 mM의 농도의 수크로스 및 0.04% (w/v)의 농도의 폴리소르베이트 (예를 들어, 폴리소르베이트 20)를 포함하는 제제 중에 존재하고, 제제는 약 5.8의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-PD-L1 항체는 약 125 mg/mL의 양의 항체, 약 20 mM의 농도의 히스티딘 아세테이트, 약 240 mM의 농도의 수크로스 및 0.02% (w/v)의 농도의 폴리소르베이트 (예를 들어, 폴리소르베이트 20)를 포함하는 제제 중에 존재하고, 제제는 약 5.5의 pH를 갖는다.
- [0276] 항-CD20 항체
- [0277] 개체에게 유효량의 PD-1 축 결합 길항제 및 항-CD20 항체를 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키는 방법이 본원에 제공된다. 관련 기술분야에 공지되어 있고 본원에 기재된 임의의 CD20 항체가 방법에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 인간 CD20에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 유형 I 항체 또는 유형 II 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 비-푸코실화된다.
- [0278] 유형 II 항-CD20 항체의 예는, 예를 들어 인간화 B-Ly1 항체 IgG1 (WO 2005/044859에 개시된 바와 같은 키메라 인간화 IgG1 항체), 11B8 IgG1 (WO 2004/035607에 개시된 바와 같음) 및 AT80 IgG1을 포함한다. 전형적으로 IgG1 이소형의 유형 II 항-CD20 항체는 특징적인 CDC 특성을 나타낸다. 유형 II 항-CD20 항체는 IgG1 이소형의 유형 I 항체와 비교하여 감소된 CDC (IgG1 이소형인 경우)를 갖는다.
- [0279] 유형 I 항-CD20 항체의 예는, 예를 들어 리툭시맙, HI47 IgG3 (ECACC, 하이브리도마), 2C6 IgG1 (WO 2005/103081에 개시된 바와 같음), 2F2 IgG1 (WO 2004/035607 및 WO 2005/103081에 개시된 바와 같음) 및 2H7 IgG1 (WO 2004/056312에 개시된 바와 같음)을 포함한다.
- [0280] 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 본원에 기재된 GA101 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-CD20은 인간 CD20에 결합하는 하기 항체 중 어느 한 항체이다: (1) GYAFSY (SEQ ID NO: 50)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, FPGDGDTD (SEQ ID NO: 51)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, NVFDGYWLVY (SEQ ID NO: 52)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, RSSKSLLHSNGITYLY (SEQ ID NO: 53)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, QMSNLVS (SEQ ID NO: 54)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2 및 AQNLELPYT (SEQ ID NO: 55)의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체; (2) 서열식별번호: 56의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인 및 서열식별번호: 57의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항체; (3) 서열식별번호: 58의 아미노산 서열 및 서열식별번호: 59의 아미노산 서열을 포함하는 항체; (4) 오비누투주맙으로 공지된 항체; 또는 (5) 서열식별번호: 58의 아미노산 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 및 서열식별번호: 59의 아미노산 서열과 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 항체. 한 실시양태에서, GA101 항체는 IgG1 이소형 항체이다.
- [0281] 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 서열식별번호: 56의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 서열식별번호: 57의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다.
- QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS**GYAFSY**SWINWVRQAPGQGLEWMGRIF**FPGDGDT**
DYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**NVF****DGYWLVY**WGQGTLVTVSS
- [0282] (SEQ ID NO:56)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYOMSN

LVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGVVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKRTV (SEQ ID

[0283] NO: 57)

[0284] 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 서열식별번호: 58의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 59의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRFPGDGDTDYNGKF
KGRTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVF**DGYWLVY**WGQGTLTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 58)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYOMSNLVSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGVVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 59)

[0285] [0286] 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 인간화 B-Ly1 항체이다. 일부 실시양태에서, 인간화 B-Ly1 항체는 서열식별번호: 60의 3개의 중쇄 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 61의 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간화 B-Ly1 항체는 서열식별번호: 60의 서열을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 61의 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

중쇄(SEQ ID NO:60)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQA PGQGLEWMGR 50
IFPGDGDTDY NGFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARNV 100
FDGYWLVYWG QGTLTVSSA STKGPSVFP APSSKSTSGG TAALGCLVKD 150
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY 200
ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCSDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK 250
DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS 300
TYRVSVSLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTIASK AKGQPREPQV 350
YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESENQPE NNYKTPPVL 400
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHTQ KSLSLSPG 449

경쇄(SEQ ID NO:61)

DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSLL HSNGITYLYW YLQKPGQSPQ 50
LLIYQMSNLV SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDGVG YYCAQNLELP 100
YTFGGTKVE IKRTVAAPS V FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK 150
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTTLSKAD YEKHKVYACE 200
VTHQGLSSPV TKSFNRGEC 219

[0287] [0288] 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 비-푸코실화 당조작된 항체이다. 이러한 당조작된 항체는 바람직하게는 감소된 수준의 푸코스 잔기를 갖는, Fc 영역에서의 변경된 패턴의 글리코실화를 갖는다. 바람직하게는 푸코스의 양은 Asn297에서 올리고사카라이드의 총량의 60% 이하이다 (한 실시양태에서 푸코스의 양은 40% 내지 60%이고, 또 다른 실시양태에서 푸코스의 양은 50% 이하이고, 또 다른 실시양태에서 푸코스의 양은 30% 이하이다). 게다가, Fc 영역의 올리고사카라이드는 바람직하게는 이등분된다. 이를 당조작된 인간화 항-CD20 (예를 들어, B-Ly1) 항체는 증가된 ADCC를 갖는다.

[0289] 올리고사카라이드 성분은 치료 당단백질의 효능과 관련된 특성, 예컨대 물리적 안정성, 프로테아제 공격에 대한 저항성, 면역계와의 상호작용, 약동학 및 특정한 생물학적 활성에 유의하게 영향을 미칠 수 있다. 이러한 특성은 올리고사카라이드의 존재 또는 부재, 뿐만 아니라 특이적 구조에 좌우될 수 있다. 올리고사카라이드 구조와 당단백질 기능 사이에 일부 일반화가 이루어질 수 있다. 예를 들어, 특정 올리고사카라이드 구조는 특정 탄수화물 결합 단백질과의 상호작용을 통해 혈류로부터 당단백질의 신속한 클리어런스를 매개하고, 다른 것은 항체에 의해 결합되어 바람직하지 않은 면역 반응을 일으킬 수 있다. (문헌 [Jenkins, N., et al., Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-81]).

[0290] 포유동물 세포는, 인간 적용에 가장 상용성인 형태로 단백질을 글리코실화하는 그의 능력으로 인해 치료 당단백

질의 생산을 위한 바람직한 숙주이다. (문헌 [Cumming, D.A., et al., Glycobiology 1 (1991) 115-30; Jenkins, N., et al., Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-81]). 박테리아는 아주 드물게 단백질을 글리코실화하고, 유사한 다른 유형의 통상의 숙주, 예컨대 효모, 사상 진균, 곤충 및 식물 세포는 혈류로부터의 신속한 클리어런스, 바람직하지 않은 면역 상호작용, 및 일부 특정한 경우에 있어서의 감소된 생물학적 활성과 연관된 글리코실화 패턴을 생산한다. 포유동물 세포 중에서는, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포가 지난 20년 동안 가장 통상적으로 사용되어 왔다. 적합한 글리코실화 패턴을 제공하는 것에 더하여, 이들 세포는 유전적으로 안정하고 매우 생산적인 클론 세포주의 일관된 생산을 허용한다. 이들은 무혈청 배지를 사용하여 단순한 생물반응기에서 높은 밀도로 생산될 수 있고, 안전하고 재현가능한 생물공정의 개발을 허용한다. 통상적으로 사용되는 다른 동물 세포는 새끼 햄스터 신장 (BHK) 세포, NSO- 및 SP2/0-마우스 골수종 세포를 포함한다. 보다 최근에는, 트랜스제닉 동물으로부터의 생산이 또한 시험된 바 있다. (문헌 [Jenkins, N., et al., Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-981]).

[0291] 모든 항체는 중쇄 불변 영역의 보존된 위치에서 뚜렷한 배열의 N-연결된 탄수화물 구조를 갖는 각각의 이소형을 갖는 탄수화물 구조를 함유하고, 이는 단백질 조립, 분비 또는 기능적 활성에 가변적으로 영향을 미친다. (문헌 [Wright, A., and Morrison, S.L., Trends Biotech. 15 (1997) 26-32]). 부착된 N-연결된 탄수화물의 구조는 프로세싱 정도에 따라 상당히 달라지고, 고-만노스, 다중 분지형, 뿐만 아니라 이중안테나 복합 올리고사카라이드를 포함할 수 있다. (문헌 [Wright, A., and Morrison, S.L., Trends Biotech. 15 (1997) 26-32]). 전형적으로, 특정한 글리코실화 부위에 부착된 코어 올리고사카라이드 구조의 불균질 프로세싱은 심지어 모노클로날 항체도 다중 당형태로서 존재하도록 존재한다. 마찬가지로, 항체 글리코실화의 주요 차이가 세포주 사이에서 발생하고 심지어 부차적인 차이가 상이한 배양 조건 하에 성장한 소정의 세포주에 대해 보이는 것으로 나타났다. (문헌 [Lifely, M.R., et al., Glycobiology 5(8) (1995) 813-22]).

[0292] 단순한 생산 과정을 유지하고 바람직하지 않은 부작용을 잠재적으로 회피하면서 효력의 큰 증가를 얻기 위한 한방식은, 문헌 [Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180] 및 US 6,602,684에 기재된 바와 같이 모노클로날 항체의 올리고사카라이드 성분을 조작함으로써 모노클로날 항체의 천연, 세포-매개 이펙터 기능을 증진시키는 것이다. 암 면역요법에서 가장 통상적으로 사용되는 항체인 IgG1 유형 항체는 각각의 CH2 도메인 내의 Asn297에서 보존된 N-연결된 글리코실화 부위를 갖는 당단백질이다. Asn297에 부착된 2개의 복합 이중안테나 올리고사카라이드는 CH2 도메인 사이에 묻혀, 폴리펩티드 백본과의 광범위한 접촉을 형성하고, 그의 존재는 항체가 이펙터 기능, 예컨대 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 매개하는데 필수적이다 (Lifely, M.R., et al., Glycobiology 5 (1995) 813-822; Jefferis, R., et al., Immunol. Rev. 163 (1998) 59-76; Wright, A., and Morrison, S.L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32).

[0293] 이등분된 올리고사카라이드의 형성을 촉매하는 글리코실트랜스퍼라제인 β (1,4)-N-아세틸글루코사미널트랜스퍼라제 I11 ("GnTII17y")의 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포에서의 파디발현은, 조작된 CHO 세포에 의해 생성된 항신경모세포종 키메라 모노클로날 항체 (chCE7)의 시험관내 ADCC 활성을 유의하게 증가시키는 것으로 이전에 확인되었다. (문헌 [Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180]; 및 WO 99/154342 참조, 이들의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨). 항체 chCE7은 높은 종양 친화도 및 특이성을 갖는 큰 부류의 비접합 모노클로날 항체를 포함하지만, GnTIII 효소가 결여된 표준 산업 세포주에서 생산되는 경우에는 임상적으로 유용한 효력을 너무 적게 갖는다 (Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180). 그 연구는 ADCC 활성의 큰 증가는 GnTIII를 발현하도록 세포를 생산하는 항체를 조작함으로써 얻을 수 있고, 이는 또한 불변 영역 (Fc)-연관 이등분된 올리고사카라이드 (이등분된 비-푸코실화 올리고사카라이드 포함)가 자연-발생 항체에서 확인되는 수준 초과의 비율로의 증가를 유도한다는 것을 나타낸 첫 연구이다.

[0294] 일부 실시양태에서, 항-CD20 항체는 다중특이적 항체 또는 이중특이적 항체이다.

IV. 항체 제조

[0296] 본원에 기재된 항체는 항체의 생성을 위해 관련 기술분야에서 이용가능한 기술, 하기 섹션에 보다 상세히 기재되어 있는 예시적인 방법을 사용하여 제조된다.

[0297] 항체는 관심 항원 (즉, PD-L1 (예컨대 인간 PD-L1) 또는 CD20 (예컨대 인간 CD20))에 대해 지시된다. 바람직하게는, 항원은 생물학적으로 중요한 폴리펩티드이고, 장애를 앓고 있는 포유동물에게 항체를 투여하는 것은 그 포유동물에서 치료 이익을 가져올 수 있다.

[0298] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 특정 관심 항원에 대해 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 150 \text{ nM}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 50 \text{ nM}$,

$\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$ 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예를 들어, 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (K_d)를 갖는다.

[0299]

한 실시양태에서, K_d 는 하기 검정에 의해 기재된 바와 같이 관심 항체의 Fab 버전 및 그의 항원을 사용하여 수행된 방사성표지된 항원 결합 검정 (RIA)에 의해 측정된다. 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도는 비표지된 항원의 적정 시리즈의 존재 하에 최소 농도의 (^{125}I)-표지된 항원으로 Fab를 평형화시킨 후, 항-Fab 항체-코팅된 플레이트를 사용하여 결합된 항원을 포획함으로써 측정한다 (예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)] 참조). 검정 조건을 확립하기 위해, 마이크로타이터(MICROTITER)® 멀티-웰 플레이트 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중 5 $\mu\text{g/ml}$ 포획 항-Fab 항체 (카펠 랩스 (Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후, PBS 중 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 2 내지 5시간 동안 실온 (대략 23°C)에서 차단한다. 비-흡착 플레이트 (눈크(Nunc) #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [^{125}I]-항원을 관심 Fab의 연속 희석물과 혼합한다. 이어서, 관심 Fab를 밤새 인큐베이션하지만; 평형에 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 기간 (예를 들어, 약 65시간) 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 이후에, 혼합물을 포획 플레이트로 옮겨 실온에서 (예를 들어, 1시간 동안) 인큐베이션한다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% 폴리소르베이트 20 (트윈(TWEEN)-20®)으로 8회 세척한다. 플레이트가 건조된 경우에, 150 $\mu\text{l}/\text{웰}$ 의 섬광제 (마이크로신트(MICROSCINT)-20™; 팩커드(Packard))를 첨가하고, 플레이트를 탑카운트(TOPCOUNT)™ 감마 계수기 (팩커드) 상에서 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의 농도를 선택하여 경쟁적 결합 검정에 사용한다.

[0300]

또 다른 실시양태에 따르면, K_d 는 예를 들어 ~10 반응 단위 (RU)로 고정화된 항원 CM5 칩을 사용하여 25°C에서 비아코어(BIACORE)®-2000 또는 비아코어®-3000 (비아코어, 인크.(BIAcore, Inc.), 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하는 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용하여 측정된다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어, 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨, pH 4.8을 사용하여 5 $\mu\text{g/ml}$ (~0.2 μM)로 희석한 후에 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)가 달성되도록 5 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유량으로 주입한다. 항원의 주입 후, 1 M 에탄올아민을 주입하여 미반응기를 차단한다. 동역학적 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석물 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유량으로 25°C에서 0.05% 폴리소르베이트 20 (트윈-20™) 계면활성제를 갖는 PBS (PBST) 내에 주입한다. 간단한 일-대-일 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델 (비아코어® 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 이용하여 회합 및 해리 센서그램을 동시에 피팅시켜 회합률 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})을 계산한다. 평형 해리 상수 (K_d)는 k_{off}/k_{on} 의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)]을 참조한다. 회합률이 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 을 초과하는 경우에, 회합률은 분광계, 예컨대 정지-유동 설비 분광광도계 (아비브 인스트루먼츠(Aviv Instruments)) 또는 교반 큐벳이 장착된 8000-시리즈 SLM-아민코(AMINCO)™ 분광광도계 (써모스펙트로닉(ThermoSpectronic))에서 측정되는 바와 같은, 증가하는 농도의 항원의 존재 하에 PBS, pH 7.2 중 20 nM의 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 대역-통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용하는 것에 의해 결정될 수 있다.

[0301]

(i) 항원 제조

[0302]

임의로 다른 분자에 접합된 가용성 항원 또는 그의 단편은 항체를 생성하기 위한 면역원으로서 사용될 수 있다. 막횡단 분자, 예컨대 수용체에 대해, 이들의 단편 (예를 들어 수용체의 세포외 도메인)이 면역원으로서 사용될 수 있다. 대안적으로, 막횡단 분자를 발현하는 세포가 면역원으로서 사용될 수 있다. 이러한 세포는 천연 공급원 (예를 들어 암 세포주)으로부터 유래될 수 있거나, 또는 막횡단 분자를 발현하도록 재조합 기술에 의해 형질전환된 세포일 수 있다. 항체의 제조에 유용한 다른 항원 및 그의 형태는 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0303]

(ii) 특정 항체-기반 방법

[0304]

폴리클로날 항체는 관련 항원 및 아주반트의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 바람직하게 생성된다. 이관능성 작용제 또는 유도체화제, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통합), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOCl_2 또는 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (여기서 R 및 R^1 은 상이한 알킬 기임)을 사용하여, 면역화될 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들

어 키홀 럼펫 혜모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제제에 관련 항원을 접합시키는 것이 유용할 수 있다.

[0305] 예를 들어 단백질 또는 접합체 100 µg 또는 5 µg (각각, 토끼 또는 마우스의 경우)을 3 부피의 프로인트 완전 아주반트와 합하고, 상기 용액을 다중 부위에 피내로 주사함으로써, 동물을 항원, 면역원성 접합체 또는 유도체에 대해 면역화한다. 1개월 후에 프로인트 완전 아주반트 중 펩티드 또는 접합체를 원래 양의 1/5 내지 1/10으로 다중 부위에 피하 주사하여 동물을 부스팅한다. 7 내지 14일 후에 동물에서 채혈하여, 혈청을 항체 역가에 대해 검정한다. 역자가 정체기에 도달할 때까지 동물을 부스팅한다. 바람직하게는, 상이한 단백질에 접합되었고/거나 상이한 가교 시약을 통해 접합되었으나 동일한 항원의 접합체로 동물을 부스팅한다. 접합체는 또한 재조합 세포 배양에서 단백질 융합체로서 제조될 수 있다. 또한, 응집제, 예컨대 명반인 면역 반응을 증진시키는데 적합하게 사용된다.

[0306] 본 발명의 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 최초로 기재되고, 예를 들어 인간-인간 하이브리도마에 관하여 문헌 [Hongo et al., Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), 및 Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)]에 추가로 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 추가의 방법은, 예를 들어 하이브리도마 세포주로부터의 모노클로날 인간 천연 IgM 항체의 생산에 관하여 미국 특허 번호 7,189,826에 기재된 것을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술 (트리오마 기술)은 문헌 [Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)]에 기재되어 있다.

[0307] 다양한 다른 하이브리도마 기술에 대해서는, 예를 들어 US 2006/258841; US 2006/183887 (완전 인간 항체), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; 및 미국 특허 번호 7,078,492 및 7,153,507을 참조한다. 하이브리도마 방법을 사용하여 모노클로날 항체를 생산하는 예시적인 프로토콜은 하기와 같이 기재된다. 한 실시양태에서, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터를, 면역화에 사용되는 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 도출하도록 면역화시킨다. 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 단편, 및 보조제, 예컨대 모노포스포릴 지질 A (MPL)/트레할로스 디크리노미콜레이트 (TDM) (리비 이뮤노켐, 리서치, 인크.(Ribi Immunochem. Research, Inc.), 몬타나주 해밀턴)의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 항체를 유도한다. 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 항원) 또는 그의 단편은 관련 기술분야에 널리 공지된 방법, 예컨대 재조합 방법 (이의 일부는 본원에 추가로 기재되어 있음)을 사용하여 제조할 수 있다. 면역화된 동물로부터의 혈청을 항-항원 항체에 대해 검정하고, 부스터 면역화를 임의로 투여한다. 항-항원 항체를 생산하는 동물로부터 림프구를 단리한다. 대안적으로, 림프구를 시험관내 면역화시킬 수 있다.

[0308] 이어서, 림프구를 적합한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성한다. 예를 들어, 문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]을 참조한다. 효율적으로 융합되고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 안정한 고수준 생산을 지지하며, 배지, 예컨대 HAT 배지에 감수성인 골수종 세포를 사용할 수 있다. 예시적인 골수종 세포는 뮤런 골수종 세포주, 예컨대 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center) (미국 캘리포니아주 샌디에고)로부터 입수가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터 유래된 것, 및 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection) (미국 메릴랜드주 롤빌)으로부터 입수가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 또한 인간 모노클로날 항체의 생산에 대해 기재되었다 (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[0309] 이와 같이 제조한 하이브리도마 세포는 적합한 배양 배지, 예를 들어 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 1종 이상의 물질을 함유하는 배지에 접종하여 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스페라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결여된 경우에, 하이브리도마를 위한 배양 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이며 (HAT 배지), 이러한 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다. 바람직하게는, 예를 들어 문헌 [Even et al., Trends in Biotechnology, 24(3), 105-108 (2006)]에 기재된 바와 같이, 소 태아 혈청과 같은 동물-유래 혈청의 사용을 감소시키기 위해

혈청-무함유 하이브리도마 세포 배양 방법을 사용한다.

- [0310] 문헌 [Franek, Trends in Monoclonal Antibody Research, 111-122 (2005)]에는 하이브리도마 세포 배양의 생산성을 개선하기 위한 도구로서의 올리고펩티드가 기재되어 있다. 구체적으로, 표준 배양 배지를 특정 아미노산(알라닌, 세린, 아스파라긴, 프롤린) 또는 단백질 가수분해물 분획으로 풍부화시키면, 3 내지 6개의 아미노산 잔기로 구성된 합성 올리고펩티드에 의해 아폽토시스가 유의하게 저해될 수 있다. 펩티드는 밀리몰 또는 더 높은 농도로 존재한다.
- [0311] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 본 발명의 항체에 결합하는 모노클로날 항체의 생산에 대해 검정할 수 있다. 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전에 의해 또는 시험관내 결합 검정, 예컨대 방사선면역검정 (RIA) 또는 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 결정할 수 있다. 모노클로날 항체의 결합 친화도는, 예를 들어 스캐트차드(Scatchard) 분석에 의해 결정할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)]을 참조한다.
- [0312] 목적하는 특이성, 친화도 및/또는 활성을 갖는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후에, 클론을 한계 회색 절차에 의해 서브클로닝하고, 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 문헌 [Goding]을 참조한다. 이러한 목적에 적합한 배양 배지는, 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 추가로, 하이브리도마 세포는 동물에서 복수 종양으로서 생체내 성장시킬 수 있다. 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 통상의 이му노글로불린 정제 절차, 예컨대 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적합하게 분리한다. 하이브리도마 세포로부터 단백질을 단리하는 하나의 절차가 US 2005/176122 및 미국 특허 번호 6,919,436에 기재되어 있다. 방법은 결합 과정에서 최소 염, 예컨대 액방성 염을 사용하고, 바람직하게는 또한 용리 과정에서 소량의 유기 용매를 사용하는 것을 포함한다.
- [0313] (iii) 라이브러리-유래 항체
- [0314] 본 발명의 항체는 목적 활성 또는 활성들을 갖는 항체에 대해 조합 라이브러리를 스크리닝하는 것에 의해 단리될 수 있다. 예를 들어, 실시예 3에 기재된 방법과 같은, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고, 목적하는 결합 특성을 보유하는 항체에 대해 이러한 라이브러리를 스크리닝하는 다양한 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 추가의 방법은 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)]에 검토되어 있고, 예를 들어 문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)]에 추가로 기재되어 있다.
- [0315] 특정 파지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레페토리는 개별적으로 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 클로닝되고, 파지 라이브러리에 무작위 재조합되며, 이는 이어서 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 항원-결합 파지에 대해 스크리닝될 수 있다. 파지는 전형적으로 항체 단편을 단일-쇄 Fv (scFv) 단편 또는 Fab 단편으로 디스플레이한다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요없이 면역원에 대한 고-친화도 항체를 제공한다. 대안적으로, 나이브 레페토리를 클로닝 (예를 들어, 인간으로부터)하여, 문헌 [Griffiths et al., EMBO J., 12: 725-734 (1993)]에 기재된 바와 같이 어떠한 면역화도 없이 광범위한 비-자기 및 또한 자기 항원에 대한 항체의 단일 공급원을 제공할 수 있다. 최종적으로, 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터의 재배열되지 않은 V-유전자 절편을 클로닝하고, 고도로 가변성인 CDR3 영역을 코딩하고 시험관내 재배열이 달성되도록 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써, 나이브 라이브러리를 또한 합성적으로 제조할 수 있다. 인간 항체 파지 라이브러리를 기재하는 특허 공개는, 예를 들어 다음을 포함한다: 미국 특허 번호 5,750,373 및 미국 특허 공개 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 및 2009/0002360.
- [0316] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 단편은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편으로 간주된다.
- [0317] (iv) 키메라, 인간화 및 인간 항체

- [0318] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 키메라 항체이다. 특정 키메라 항체는, 예를 들어 미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]에 기재되어 있다. 한 예에서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역 (예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 또는 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 추가의 예에서, 키메라 항체는 부류 또는 하위부류가 모 항체의 것으로부터 변화된 "부류 교체된" 항체이다. 키메라 항체는 그의 항원-결합 단편을 포함한다.
- [0319] 특정 실시양태에서, 키메라 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 모 비-인간 항체의 특이성 및 친화도를 보유하면서 인간에 대한 면역원성이 감소되도록 인간화된다. 일반적으로, 인간화 항체는 HVR, 예를 들어 CDR (또는 그의 일부)이 비-인간 항체로부터 유래되고, FR (또는 그의 일부)이 인간 항체 서열로부터 유래된 1개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 또한 임의로 인간 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체 내의 일부 FR 잔기는, 예를 들어 항체 특이성 또는 친화도를 복원하거나 또는 개선시키기 위해, 비-인간 항체 (예를 들어, HVR 잔기가 유래된 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.
- [0320] 인간화 항체 및 그의 제조 방법은 예를 들어 문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)]에 검토되어 있고, 추가로 예를 들어 문헌 [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)]; 미국 특허 번호 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321, 및 7,087,409; [Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005)] (SDR (a-CDR) 이식을 기재함); [Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991)] ("재표면화"를 기재함); [Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005)] ("FR 셔플링"을 기재함); 및 [Osbourne et al., Methods 36:61-68 (2005) 및 Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000)] (FR 셔플링에 대한 "가이드 선택" 접근법을 기재함)에 기재되어 있다.
- [0321] 인간화에 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 "최적-적합" 방법을 사용하여 선택된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993)] 참조); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정한 하위군의 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); 및 Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)] 참조); 인간 성숙 (체세포 성숙) 프레임워크 영역 또는 인간 배선 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)] 참조); 및 FR 라이브러리 스크리닝으로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) 및 Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)] 참조)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0322] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 관련 기술분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 문헌 [van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) 및 Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008)]에 기재되어 있다.
- [0323] 인간 항체는 항원 챌린지에 반응하여 인간 가변 영역을 갖는 무손상 인간 항체 또는 무손상 항체를 생산하도록 변형된 트랜스제닉 동물에게 면역원을 투여하는 것에 의해 제조할 수 있다. 이러한 동물은 전형적으로 내인성 이뮤노글로불린 유전자좌를 대체하거나 또는 염색체외에 존재하거나 동물의 염색체로 무작위적으로 통합된 인간 이뮤노글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 함유한다. 이러한 트랜스제닉 마우스에서, 내인성 이뮤노글로불린 유전자좌는 일반적으로 불활성화된다. 트랜스제닉 동물로부터 인간 항체를 수득하는 방법의 검토를 위해, 문헌 [Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005)]을 참조한다. 또한, 예를 들어 제노마우스(XENOMOUSE)TM 기술을 기재하는 미국 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584; HuMab[®] 기술을 기재하는 미국 특허 번호 5,770,429; K-M 마우스(K-M MOUSE)[®] 기술을 기재하는 미국 특허 번호 7,041,870, 및 벨로시마우스 (VelociMouse)[®] 기술을 기재하는 미국 특허 출원 공개 번호 US 2007/0061900을 참조한다. 이러한 동물에 의해 생성된 무손상 항체로부터의 인간 가변 영역은 예를 들어 상이한 인간 불변 영역과 조합시키는 것에 의해 추가로 변형될 수 있다.
- [0324] 인간 항체는 또한 하이브리도마-기반 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 기재되어 있다. (예를 들어, 문헌 [Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 및 Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)] 참조.) 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체는 또한 문헌 [Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)]에 기재되어 있다. 추가의 방법은, 예를 들어 미국 특허 번호 7,189,826 (하이브리도마-

세포주로부터의 모노클로날 인간 IgM 항체의 생산 기재) 및 문헌 [Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)] (인간-인간 하이브리도마 기재)에 기재된 것을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술 (트리오마(Trioma) 기술)은 또한 문헌 [Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)]에 기재되어 있다.

[0325] 인간 항체는 또한 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리하는 것에 의해 생성될 수 있다. 이어서, 이러한 가변 도메인 서열은 목적하는 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선택하는 기술은 하기 기재된다.

[0326] (v) 항체 단편

[0327] 항체 단편은 전통적인 수단, 예컨대 효소적 소화에 의해 또는 재조합 기술에 의해 생성될 수 있다. 특정 상황에서는, 전체 항체가 아닌 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 단편의 크기가 작을거 클리어런스가 신속하고, 고형 종양에 대한 접근을 개선시킬 수 있다. 특정 항체 단편의 검토를 위해, 문헌 [Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134]을 참조한다.

[0328] 항체 단편의 생산을 위한 다양한 기술이 개발되어 왔다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백질분해적 소화를 통해 유래되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); 및 Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 이들 단편은 현재 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생산될 수 있다. Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편은 모두 이. 콜라이(*E. coli*)에서 발현되어 그로부터 분비될 수 있어서 다량의 이를 단편의 용이한 생산을 가능하게 한다. 항체 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 $F(ab')_2$ 단편을 형성할 수 있다 (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). 또 다른 접근법에 따르면, $F(ab')_2$ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리될 수 있다. 셀비지 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하는, 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 $F(ab')_2$ 단편이 미국 특허 번호 5,869,046에 기재되어 있다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술들이 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 특정 실시양태에서, 항체는 단일 쇄 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 번호 5,571,894; 및 5,587,458을 참조한다. Fv 및 scFv는 불변 영역이 결여된 무손상 결합 부위를 갖는 유일한 종이고; 따라서 생체내 사용 동안 비특이적 결합의 감소에 적합할 수 있다. scFv 융합 단백질은 scFv의 아미노 또는 카르복시 말단에 이펙터 단백질의 융합체를 생성시키도록 구축될 수 있다. 상기 문헌 [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck]을 참조한다. 또한, 항체 단편은, 예를 들어 미국 특허 번호 5,641,870에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체는 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0329] (vi) 다중특이적 항체

[0330] 다중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖고, 여기서 에피토프는 통상적으로 상이한 항원으로부터의 것이다. 이러한 분자는 정상적으로 단지 2개의 상이한 에피토프에 결합할 것이지만 (즉, 이중특이적 항체, BsAb), 추가의 특이성을 갖는 항체, 예컨대 삼중특이적 항체가 본원에 사용될 때 이러한 표현에 포괄된다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, $F(ab')_2$ 이중특이적 항체)으로 제조될 수 있다.

[0331] 이중특이적 항체의 제조 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 전통적인 생산은 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동발현을 기반으로 하며, 여기서 2개의 쇄는 상이한 특이성을 갖는다 (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 편성으로 인해, 이들 하이브리도마 (쿼드로마)는 10종의 상이한 항체 분자의 잠재적 혼합물을 생산하며, 이 중 1종만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 통상적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 정확한 분자의 정체는 다소 번거롭고, 산물 수율이 낮다. 유사한 절차가 WO 93/08829 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0332] 이중특이적 항체를 제조하기 위한 관련 기술분야에 공지된 하나의 접근법은 "노브-인투-홀" 또는 "돌출부-대-함몰부" 접근법이다 (예를 들어 미국 특허 번호 5,731,168 참조). 이러한 접근법에서, 두 이뮤노글로불린 폴리펩티드 (예를 들어, 중쇄 폴리펩티드)는 각각 계면을 포함한다. 하나의 이뮤노글로불린 폴리펩티드의 계면은 다른 이뮤노글로불린 폴리펩티드 상의 상응하는 계면과 상호작용하며, 이에 의해 두 이뮤노글로불린 폴리펩티드가

회합하게 된다. 이들 계면은 하나의 이뮤노글로불린 폴리펩티드의 계면에 위치한 "노브" 또는 "돌출부" (이들 용어는 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있음)는 다른 이뮤노글로불린 폴리펩티드의 계면에 위치한 "홀" 또는 "함몰부" (이들 용어는 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있음)와 상응하도록 조작될 수 있다. 일부 실시양태에서, 홀은 노브와 동일하거나 유사한 크기를 갖고 두 계면이 상호작용할 때, 하나의 계면의 노브가 다른 계면의 상응하는 홀에 위치가능하도록 적합하게 위치한다. 이론에 얹매이기를 바라지는 않지만, 이것은 이종다량체를 안정화시키고 다른 종, 예를 들어 동종다량체에 비해 이종다량체의 형성을 선호하는 것으로 생각된다. 일부 실시양태에서, 이러한 접근법을 사용하여 두 상이한 이뮤노글로불린 폴리펩티드의 이종다량체화를 촉진할 수 있으며, 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 두 이뮤노글로불린 폴리펩티드를 포함하는 이종특이적 항체를 생성할 수 있다.

[0333] 일부 실시양태에서, 노브는 소형 아미노산 측쇄를 보다 대형의 측쇄로 대체함으로써 구축될 수 있다. 일부 실시양태에서, 홀은 대형 아미노산 측쇄를 보다 소형의 측쇄로 대체함으로써 구축될 수 있다. 노브 또는 홀은 원래 계면에 존재할 수 있거나 또는 합성적으로 도입될 수 있다. 예를 들어, 노브 또는 홀은 적어도 1개의 "원래" 아미노산 잔기를 적어도 1개의 "유입" 아미노산 잔기로 대체하도록 계면을 코딩하는 핵산 서열을 변경시킴으로써 합성적으로 도입될 수 있다. 핵산 서열을 변경하기 위한 방법은 관련 기술분야에 널리 공지된 표준분자 생물학 기술을 포함할 수 있다. 다양한 아미노산 잔기의 측쇄 부피는 하기 표에 제시되어 있다. 일부 실시양태에서, 원래 잔기는 소형 측쇄 부피 (예를 들어, 알라닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 글리신, 세린, 트레오닌 또는 발린)를 갖고, 노브를 형성하기 위한 유입 잔기는 자연 발생 아미노산이며 아르기닌, 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 원래 잔기는 대형 측쇄 부피 (예를 들어, 아르기닌, 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판)를 갖고, 홀을 형성하기 위한 유입 잔기는 자연 발생 아미노산이며 알라닌, 세린, 트레오닌 및 발린을 포함할 수 있다.

[0334] <표 2> 아미노산 잔기의 특성

아미노산	1-문자 약어	질량 ^a (달톤)	부-피 ^b (Å ³)	접근가능한 표면적 ^c (Å ²)
알라닌 (Ala)	A	71.08	88.6	115
아르기닌 (Arg)	R	156.20	173.4	225
아스파라긴 (Asn)	N	114.11	117.7	160
아스파르트산 (Asp)	D	115.09	111.1	150
시스테인 (Cys)	C	103.14	108.5	135
글루타민 (Gln)	Q	128.14	143.9	180
글루탐산 (Glu)	E	129.12	138.4	190
글리신 (Gly)	G	57.06	60.1	75
히스티딘 (His)	H	137.15	153.2	195
이소류신 (Ile)	I	113.17	166.7	175
류신 (Leu)	L	113.17	166.7	170
리신 (Lys)	K	128.18	168.6	200
메티오닌 (Met)	M	131.21	162.9	185
페닐알라닌 (Phe)	F	147.18	189.9	210
프롤린 (Pro)	P	97.12	122.7	145
세린 (Ser)	S	87.08	89.0	115
트레오닌 (Thr)	T	101.11	116.1	140
트립토판 (Trp)	W	186.21	227.8	255
티로신 (Tyr)	Y	163.18	193.6	230
발린 (Val)	V	99.14	140.0	155

[0335]
[0336]^a 아미노산의 분자량 마이너스 물의 분자량. 문헌 [Handbook of Chemistry and Physics, 43rd ed. Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961]으로부터의 값.

[0337]^b 문헌 [A.A. Zamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24:107-123, 1972]으로부터의 값.

[0338]^c 문헌 [C. Chothia, J. Mol. Biol. 105:1-14, 1975]으로부터의 값. 접근가능한 표면적은 이러한 참고문헌의 도 6-20에 정의되어 있다.

[0339]

일부 실시양태에서, 노브 또는 홀을 형성하기 위한 원래 잔기는 이종다량체의 3차원 구조를 기초로 하여 확인된다. 3차원 구조를 획득하기 위한 관련 기술분야에 공지된 기술은 X선 결정학 및 NMR을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 계면은 이뮤노글로불린 불변 도메인의 CH3 도메인이다. 이들 실시양태에서, 인간 IgG₁의 CH3/CH3 계면은 4개의 역평행 β-가닥에 위치한 각 도메인 상의 16개 잔기를 수반한다. 이론에 얹매이는 것을 바라지는 않지만, 돌연변이된 잔기는 바람직하게는 노브가 파트너 CH3 도메인의 보상성 홀 보다는 주위 용매에 의해 수용될 수 있는 위험을 최소화하기 위해 2개의 중심 역평행 β-가닥 상에 위치한다. 일부 실시양태에서, 두 이뮤노글로불린 폴리펩티드 내 상응하는 노브 및 홀을 형성하는 돌연변이는 하기 표에 제공된 1개 이상의 쌍에 상응한다.

[0340]

<표 3> 상응하는 노브- 및 홀-형성 돌연변이의 예시적인 세트

제 1 이뮤노글로불린의 CH3	제 2 이뮤노글로불린의 CH3
T366Y	Y407T
T366W	Y407A
F405A	T394W
Y407T	T366Y
T366Y:F405A	T394W:Y407T
T366W:F405W	T394S:Y407A
F405W:Y407A	T366W:T394S
F405W	T394S

[0341]

돌연변이는 원래 잔기, 이어서 카바트 넘버링 시스템을 사용한 위치, 및 그 다음 유입 잔기로 표시된다 (모든 잔기는 단일-문자 아미노산 코드로 주어진다). 다중 돌연변이는 콜론에 의해 분리된다.

[0342]

일부 실시양태에서, 이뮤노글로불린 폴리펩티드는 상기 표 3에 열거된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 CH3 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이종특이적 항체는 표 3의 좌측 칼럼에 열거된 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 CH3 도메인을 포함하는 제1 이뮤노글로불린 폴리펩티드 및 표 3의 우측 칼럼에 열거된 1개 이상의 상응하는 아미노산 치환을 포함하는 CH3 도메인을 포함하는 제2 이뮤노글로불린 폴리펩티드를 포함한다.

[0343]

상기 논의된 바와 같은 DNA의 돌연변이에 따라, 1개 이상의 상응하는 노브- 또는 홀-형성 돌연변이를 갖는 변형된 이뮤노글로불린 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 관련 기술분야에 공지된 표준 재조합 기술 및 세포 시스템을 사용하여 발현 및 정제할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,731,168; 5,807,706; 5,821,333; 7,642,228; 7,695,936; 8,216,805; 미국 공개 번호 2013/0089553; 및 문헌 [Spiess et al., Nature Biotechnology 31: 753-758, 2013]을 참조한다. 변형된 이뮤노글로불린 폴리펩티드는 원핵 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이 또는 진핵 숙주 세포, 예컨대 CHO 세포를 사용하여 생산할 수 있다. 상응하는 노브- 및 홀-보유 이뮤노글로불린 폴리펩티드를 공동-배양으로 숙주 세포에서 발현시키고 이종다량체로서 함께 정제할 수 있거나, 또는 단일 배양으로 발현시키고 개별적으로 정제하고 시험관내에서 조립할 수 있다. 일부 실시양태에서, 박테리아 숙주 세포의 두 균주 (하나는 노브를 갖는 이뮤노글로불린 폴리펩티드를 발현하는 것이고, 다른 것은 홀을 갖는 이뮤노글로불린 폴리펩티드를 발현하는 것임)는 관련 기술분야에 공지된 표준 박테리아 배양 기술을 사용하여 공동-배양한다. 일부 실시양태에서, 두 균주를, 예를 들어 배양 중 동일한 발현 수준을 달성하기 위해 특정 비로 혼합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 두 균주를 50:50, 60:40 또는 70:30 비로 혼합할 수 있다. 폴리펩티드 발현 후에, 세포를 함께 용해시킬 수 있고, 단백질을 추출할 수 있다. 동종다량체 vs. 이종다량체 종의 존재비를 측정할 수 있도록 하는 관련 기술분야에 공지된 표준 기술은 크기 배제 크로마토그래피를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 변형된 이뮤노글로불린 폴리펩티드는 표준 재조합 기술을 사용하여 개별적으로 발현시키고 시험관내에서 함께 조립할 수 있다. 조립은, 예를 들어 각각의 변형된 이뮤노글로불린 폴리펩티드를 정제하고, 그를 동일한 질량으로 함께 혼합 및 인큐베이션하고, 디슬피드를 환원시키고 (예를 들어, 디티오트레이탈로 처리함으로써), 농축시키고, 폴리펩티드를 재산화시킴으로써 달성할 수 있다. 형성된 이종특이적 항체는 양이온-교환 크로마토그래피를 포함한 표준 기술을 사용하여 정제하고 크기 배제 크로마토그래피를 포함한 표준 기법을 사용하여 측정할 수 있다. 이들 방법의 보다 상세한 설명에 대해서는, 문헌 [Speiss et al., Nat Biotechnol 31:753-8, 2013]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 변형된 이뮤노글로불린 폴리펩티드를 CHO 세포에서 개별적으로 발현시키고, 상기 기재된 방법 사용하여 시험관내에서 조립할 수 있다.

[0344]

다른 접근법에 따르면, 목적하는 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)을 갖는 항체 가변 도메인이 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 바람직하게는, 융합체는 힌지, CH2 및 CH3 영역 중 적어도 일부를 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인을 갖는다. 융합체 중 적어도 1개에 존재하는, 경쇄 결합에 필요한 부위를 함

유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)을 갖는 것이 전형적이다. 이뮤노글로불린 중쇄 융합체 및 목적하는 경우에 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 개별 발현 벡터 내로 삽입하고, 적합한 숙주 유기체 내로 공동-형질감염시킨다. 이는, 구축에 사용된 3종의 폴리펩티드 쇄의 동등하지 않은 비가 최적의 수율을 제공하는 경우의 실시양태에서 상기 3종의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조정하는데 있어서 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 적어도 2종의 폴리펩티드 쇄의 동등한 비의 발현이 고수율을 발생시키거나 또는 비가 특정한 유의성을 갖지 않는 경우에, 2종 또는 모든 3종의 폴리펩티드 쇄에 대한 코딩 서열을 1개의 발현 벡터에 삽입하는 것이 가능하다.

[0346] 이러한 접근법의 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한쪽 아암 내에 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄, 및 다른쪽 아암 내의 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공함)으로 구성된다. 이중특이적 분자의 한쪽 절반에만 이뮤노글로불린 경쇄가 존재하는 것이 용이한 분리 방식을 제공하기 때문에, 이러한 비대칭 구조는 원치않는 이뮤노글로불린 쇄 조합물로부터 목적하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 접근법이 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체의 생성에 대한 추가의 상세내용에 대해서는 예를 들어 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0347] WO96/27011에 기재된 또 다른 접근법에 따르면, 한 쌍의 항체 분자 사이의 계면을 조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이종이량체의 백분율을 최대화할 수 있다. 하나의 계면은 항체 불변 도메인의 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터 1개 이상의 소형 아미노산 측쇄가 보다 대형의 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 대형 아미노산 측쇄를 보다 소형의 것 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써 대형 측쇄(들)에 대해 동일하거나 유사한 크기의 보상성 "함몰부"가 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이것은 다른 원치않는 최종-산물, 예컨대 동종이량체에 비해 이종이량체의 수율을 증가시키기 위한 메카니즘을 제공한다.

[0348] 이중특이적 항체는 가교된 또는 "이종접합체" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이종접합체 내의 항체들 중 1개는 아비딘에 커플링되고, 다른 것은 비오텐에 커플링될 수 있다. 이러한 항체는, 예를 들어 면역계 세포의 원치않는 세포로의 표적화 (미국 특허 번호 4,676,980) 및 HIV 감염의 치료 (WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP 03089)를 위해 제안된 바 있다. 임의의 편리한 가교 방법을 사용하여 이종접합체 항체를 제조할 수 있다. 적합한 가교제가 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 다수의 가교 기술과 함께 미국 특허 번호 4,676,980에 개시되어 있다.

[0349] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하는 기술이 또한 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 화학적 연결을 사용하여 이중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)]은 무손상 항체를 단백질분해적으로 절단하여 F(ab')₂ 단편을 생성하는 절차를 기재한다. 이들 단편을 디티올 착화제 아비산나트륨의 존재 하에서 환원시켜, 이웃자리 디티올을 안정화시키고 분자간 디슬퍼드 형성을 방지한다. 이어서 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 이어서 Fab'-TNB 유도체 중 1종을 메르캅토에틸아민에 의한 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환시키고, 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이중특이적 항체를 형성한다. 생산된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 작용제로서 사용될 수 있다.

[0350] 최근 진전은 이중특이적 항체를 형성하기 위해 화학적으로 커플링될 수 있는 이. 콜라이로부터의 Fab'-SH 단편의 직접 회수를 용이하게 하였다. 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)]은 완전히 인간화된 이중특이적 항체 F(ab')₂ 분자의 생산을 기재한다. 각각의 Fab' 단편은 이. 콜라이로부터 개별적으로 분비되었고, 이중특이적 항체를 형성하기 위해 시험관내에서 유도 화학적 커플링에 적용되었다.

[0351] 재조합 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조 및 단리하기 위한 다양한 기술이 또한 기재되어 있다. 예를 들어, 류신 지퍼를 사용하여 이중특이적 항체가 생산되었다. 문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 웨프티드가 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 유전자 융합에 의해 연결되었다. 항체 동종이량체가 헌지 영역에서 환원되어 단량체가 형성된 후, 재-산화되어 항체 이종이량체가 형성되었다. 이러한 방법은 항체 동종이량체의 생산에 또한 사용될 수 있다. 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편의 제조를 위한 대안적인 메카니즘을 제공한다. 상기 단편은 동일 쇄 상의 2개의 도메인 사이의 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함한다. 따라서, 한 단편의 V_H 및 V_L 도메인이 또 다른 단편의 상보적인 V_L 및 V_H 도메인과 쌍형성하도록 강제되어 그에 의해 2개의 항원-결합 부위가 형성된다. 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하여 이중특이적 항체 단

편을 제조하기 위한 또 다른 전략이 또한 보고되어 있다. 문헌 [Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)]을 참조한다.

[0352] 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 또 다른 기술은 "이중특이적 T 세포 연관체" 또는 BiTE® 접근법이다 (예를 들어, WO2004/106381, WO2005/061547, WO2007/042261 및 WO2008/119567 참조). 이러한 접근법은 단일 폴리펩티드 상에 배열된 두 항체 가변 도메인을 이용한다. 예를 들어, 단일 폴리펩티드 쇄는 두 단일 쇄 Fv (scFv) 단편을 포함하고, 각각 가변 중쇄 (V_H) 및 가변 경쇄 (V_L) 도메인을 가지며, 이들은 두 도메인 사이의 분자내 회합을 허용하기에 충분한 길이의 폴리펩티드 링커에 의해 분리되어 있다. 이러한 단일 폴리펩티드는 두 scFv 단편 사이에 폴리펩티드 스페이서 서열을 추가로 포함한다. 각각의 scFv는 상이한 에피토프를 인식하고, 이를 에피토프는 상이한 세포 유형에 특이적이어서, 각각의 scFv가 그의 동족 에피토프와 연관될 때 두 상이한 세포 유형의 세포가 근접하게 되거나 테더링되도록 한다. 이러한 접근법의 하나의 특정한 실시양태는 표적 세포, 예컨대 악성 또는 종양 세포에 의해 발현된 세포-표면 항원을 인식하는 또 다른 scFv에 연결된, 면역 세포에 의해 발현된 세포-표면 항원, 예를 들어 T 세포 상의 CD3 폴리펩티드를 인식하는 scFv를 포함한다.

[0353] 단일 폴리펩티드이기 때문에, 이중특이적 T 세포 연관체는 관련 기술분야에 공지된 임의의 원핵 또는 진핵 세포 발현 시스템, 예를 들어 CHO 세포주를 사용하여 발현될 수 있다. 그러나, 특정 정제 기술 (예를 들어, EP1691833 참조)은 단량체의 의도된 활성 이외의 생물학적 활성을 가질 수 있는, 다른 다량체 종으로부터의 단량체성 이중특이적 T 세포 연관체를 분리하는 것이 필요할 수 있다. 하나의 예시적인 정제 반응식에서, 분비된 폴리펩티드를 함유하는 용액을 먼저 금속 친화성 크로마토그래피에 적용하고, 폴리펩티드를 이미다졸 농도의 구배로 용리시킨다. 이러한 용리액을 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 추가로 정제하고, 폴리펩티드를 염화나트륨 농도의 구배를 사용하여 용리시킨다. 최종적으로, 이러한 용리액을 크기 배제 크로마토그래피에 적용하여 다량체 종으로부터 단량체를 분리한다.

[0354] 2가 초파의 원자가를 갖는 항체가 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체가 제조될 수 있다. 문헌 [Tuft et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)].

[0355] (vii) 단일-도메인 항체

[0356] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 단일-도메인 항체이다. 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 단일 폴리펩티드 쇄이다. 특정 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다 (도만티스, 인크.(Domantis, Inc.), 매사추세츠주 월섬; 예를 들어 미국 특허 번호 6,248,516 B1 참조). 한 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부로 이루어진다.

[0357] (viii) 항체 변이체

[0358] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 적절한 변화를 도입하거나 웹티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구축물에 도달하기 위해 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어질 수 있으며, 단 최종 구축물은 목적하는 특징을 보유해야 한다. 아미노산 변경은 서열이 제조되는 시점에 대상 항체 아미노산 서열에 도입될 수 있다.

[0359] (ix) 치환, 삽입 및 결실 변이체

[0360] 특정 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체가 제공된다. 치환 돌연변이유발을 위한 관심 부위는 HVR 및 FR을 포함한다. 보존적 치환은 표 1에서 "보존적 치환"의 표제 하에 제시된다. 보다 실질적인 변화는 표 1에서 "예시적인 치환"의 표제 하에 제공되고, 아미노산 측쇄 부류에 관하여 하기에 추가로 기재된다. 아미노산 치환은 관심 항체에 도입될 수 있고, 산물은 목적 활성, 예를 들어 보유/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0361]

<표 4> 예시적인 치환

원래 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0362]

[0363] 아미노산은 공통적인 측쇄 특성에 따라 그룹화될 수 있다:

[0364] a. 소수성 : 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0365] b. 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0366] c. 산성 : Asp, Glu;

[0367] d. 염기성: His, Lys, Arg;

[0368] e. 쇄 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0369] f. 방향족 : Trp, Tyr, Phe.

[0370] 비-보존적 치환은 이들 부류 중 1종의 구성원을 또 다른 부류로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0371] 치환 변이체의 한 유형은 모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 1개 이상의 초가변 영역 잔기를 치환하는 것을 수반한다. 일반적으로, 추가의 연구를 위해 선택된 생성된 변이체(들)는 모 항체에 비해 특정 생물학적 특성 (예를 들어, 증가된 친화도, 감소된 면역원성)에서 변형 (예를 들어, 개선)을 가질 것이고/거나 모 항체의 특정 생물학적 특성을 실질적으로 보유할 것이다. 예시적인 치환 변이체는, 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 파지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기술을 사용하여 편리하게 생성될 수 있는 친화도 성숙 항체이다. 간략하게, 1개 이상의 HVR 잔기가 돌연변이되고, 변이체 항체가 파지 상에 디스플레이되고, 특정한 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다.

[0372] 변형 (예를 들어, 치환)은 예를 들어 항체 친화도를 개선시키기 위해 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟"에서, 즉, 체세포 성숙 과정 동안 고 빈도로 돌연변이를 겪는 코돈에 의해 코딩된 잔기 (예를 들어, 문헌 [Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)] 참조), 및/또는 SDR (a-CDR)에서 이루어질 수 있고, 여기서 생성 변이체 VH 또는 VL은 결합 친화도에 대해 검사된다. 2차 라이브러리로부터 구축 및 재선택하는 것에 의한 친화도 성숙은, 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))]에 기재되어 있다. 친화도 성숙의 일부 실시양태에서, 다양성은 임의의 다양한 방법 (예를 들어, 오류-유발 PCR, 쇄 셔플링 또는 올리고뉴클레오티드-지시된 돌연변이유발)에 의한 성숙을 위해 선택된 가변 유전자로 도입된다. 이어서, 2차 라이브러리가 생성된다. 이어서, 라이브러리를 스크리닝하여 목적 친화도를 갖는 임의의 항체 변이체를 확인한다. 다양성을 도입하는 또 다른 방법은 HVR-지시된 접근법을 수반하며, 여기서 여러 HVR 잔기 (예를 들어, 한 번에 4-6개 잔기)가 무작위화된다. 항원 결합에 수반되는 HVR 잔기는 예를 들어 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 사용하여 구체적으로 확인될 수 있다. 특히, CDR-H3 및 CDR-L3이 종종 표적화된다.

- [0373] 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 이러한 변경이 항체가 항원에 결합하는 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 1개 이상의 HVR 내에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경 (예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환)이 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟" 또는 SDR의 외부일 수 있다. 상기 제공된 변이체 VH 및 VL 서열의 특정 실시양태에서, 각각의 HVR은 변경되지 않거나, 또는 1, 2 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 함유한다.
- [0374] 문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085]에 기재된 바와 같이, 돌연변이유발을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역의 확인에 유용한 방법은 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"로 불린다. 이러한 방법에서, 잔기 또는 표적 잔기의 군 (예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys 및 glu)이 확인되고, 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)에 의해 대체되어 항체와 항원의 상호작용에 영향을 미치는지 여부를 결정한다. 추가의 치환은 초기 치환에 대한 기능적 감수성이 입증된 아미노산 위치에 도입될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조가 사용된다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃 잔기는 치환을 위한 후보로 표적화되거나 또는 제거될 수 있다. 변이체는 그들이 목적하는 특성을 함유하는지 여부를 결정하기 위해 스크리닝될 수 있다.
- [0375] 아미노산 서열 삽입은 길이 범위가 1개의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 N- 또는 C-말단에 대한 효소 (예를 들어, ADEPT의 경우) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드의 융합을 포함한다.
- [0376] (x) 글리코실화 변이체
- [0377] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키도록 변경된다. 항체에 대한 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 1개 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성될 수 있다.
- [0378] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우에, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생산된 천연 항체는 전형적으로 Fc 영역의 CH₂ 도메인의 Asn297에의 N-연결에 의해 일반적으로 부착되는 분지형, 이중안테나 올리고사카라이드를 포함한다. 예를 들어 문헌 [Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997)]을 참조한다. 올리고사카라이드는 다양한 탄수화물, 예를 들어 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스 및 시알산, 뿐만 아니라 이중안테나 올리고사카라이드 구조의 "줄기" 내 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 내 올리고사카라이드의 변형은 특정 개선된 특성을 갖는 항체 변이체를 생성하기 위해 이루어질 수 있다.
- [0379] 한 실시양태에서, Fc 영역에 부착된 탄수화물 구조에서 푸코스가 감소되거나 푸코스가 결여되어 있는 Fc 영역을 포함하는 항체 변이체가 제공되며, 이는 ADCC 기능을 개선시킬 수 있다. 구체적으로, 야생형 CHO 세포에서 생산된 동일한 항체 상의 푸코스의 양에 비해 푸코스가 감소된 항체가 본원에서 고려된다. 즉, 이들은 천연 CHO 세포 (예를 들어, 천연 글리코실화 패턴을 생산하는 CHO 세포, 예컨대 천연 FUT8 유전자를 함유하는 CHO 세포)에 의해 생산된 경우에 이들이 달리 갖게 될 것보다 더 적은 양의 푸코스를 갖는 것을 특징으로 한다. 특정 실시양태에서, 항체는 그 상의 N-연결 글리칸의 약 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% 미만이 푸코스를 포함하는 것이다. 예를 들어, 이러한 항체에서 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체는 그 상의 N-연결 글리칸 중 어느 것도 푸코스를 포함하지 않는 항체이며, 즉 항체는 푸코스가 완전히 없거나, 또는 푸코스를 전혀 갖지 않거나, 또는 비-푸코실화된다. 푸코스의 양은 예를 들어 WO 2008/077546에 기재된 바와 같이 MALDI-TOF 질량 분광측정법에 의한 측정 시, Asn 297에 부착된 모든 당구조물 (예를 들어, 복합체, 하이브리드 및 높은 만노스 구조물)의 합계에 관하여 Asn297에서 당쇄 내의 푸코스의 평균 양을 계산하는 것에 의해 결정된다. Asn297은 Fc 영역 내의 약 위치 297 (Fc 영역 잔기의 Eu 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하지만; Asn297은 또한 항체에서의 부차적 서열 변이로 인해 위치 297의 약 ± 3 아미노산 상류 또는 하류, 즉 위치 294 내지 300에 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공보 번호 US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (교와 핫코 고교 캄파니 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))을 참조한다. "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체 변이체에 대한 문헌의 예는 하기를 포함한다: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778;

WO2005/053742; WO2002/031140; 문헌 [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]. 탈푸코실화 항체를 생산할 수 있는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (문헌 [Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]; 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1 (Presta, L); 및 WO 2004/056312 A1 (Adams et al., 특히 실시예 11)), 및 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포 (예를 들어, 문헌 [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)]; 및 WO2003/085107 참조)가 포함된다.

[0380] 이등분된 올리고사카라이드를 갖는 항체 변이체가 추가로 제공되며, 예를 들어 여기서 항체의 Fc 영역에 부착된 이중안테나 올리고사카라이드는 GlcNAc에 의해 이등분된다. 이러한 항체 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체의 예는, 예를 들어 WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); 미국 특허 번호 6,602,684 (Umana et al.); US 2005/0123546 (Umana et al.), 및 문헌 [Ferrara et al., Biotechnology and Bioengineering, 93(5): 851-861 (2006)]에 기재되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고사카라이드 내에 적어도 1개의 갈락토스 잔기를 갖는 항체 변이체가 또한 제공된다. 이러한 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는, 예를 들어 WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); 및 WO 1999/22764 (Raju, S.)에 기재되어 있다.

[0381] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 Fc 영역을 포함하는 항체 변이체는 FcγRIII에 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 Fc 영역을 포함하는 항체 변이체는 인간 이펙터 세포의 존재 하에 ADCC 활성을 갖거나, 또는 인간 야생형 IgG1Fc 영역을 포함하는 달리 동일한 항체와 비교하여 인간 이펙터 세포의 존재 하에 증가된 ADCC 활성을 갖는다.

[0382] (xi) Fc 영역 변이체

[0383] 특정 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 변형이 본원에 제공된 항체의 Fc 영역에 도입되어 Fc 영역 변이체가 생성될 수 있다. Fc 영역 변이체는 1개 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0384] 특정 실시양태에서, 본 발명은 모든 이펙터 기능은 아니지만, 일부 이펙터 기능을 보유하고 있으므로, 생체내에서의 항체의 반감기가 중요하긴 하지만 특정의 이펙터 기능 (예컨대 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 해로운 많은 적용 분야에 대한 바람직한 후보가 되는 항체 변이체를 고려한다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 시험판내 및/또는 생체내 세포독성 검정이 수행될 수 있다. 예를 들어, 항체에 FcγR 결합이 결여되어 있지만 (따라서 ADCC 활성 결여 가능성이 있음) FcRn 결합 능력은 보유하는 것을 보장하기 위해 Fc 수용체 (FcR) 결합 검정이 수행될 수 있다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 단지 Fc(RIII만)을 발현하고, 반면에 단핵구는 Fc(RI), Fc(RII) 및 Fc(RIII)를 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험판내 검정의 비제한적 예가 미국 특허 번호 5,500,362 (예를 들어, 문헌 [Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)] 및 Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985)] 참조); 5,821,337 (문헌 [Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)] 참조)에 기재되어 있다. 대안적으로, 비-방사성 검정 방법을 사용할 수 있다 (예를 들어, 유동 세포측정법을 위한 액티(ACTI)™ 비-방사성 세포독성 검정 (캘리포니아주 마운틴 뷰 소재의 셀테크놀로지, 인크.(CellTechnology, Inc.)); 및 사이토톡스(CytoTox) 96® 비-방사성 세포독성 검정 (위스콘신주 매디슨 소재의 프로메가(Promega) 참조)). 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다. 또한, C1q 결합 검정을 수행하여, 항체가 C1q에 결합할 수 없고 따라서 CDC 활성이 결여되어 있음을 확인할 수 있다. 예를 들어, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402에서 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위해 CDC 검정을 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); 및 Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)] 참조). FcRn 결합 및 생체내 클리어런스/반감기 결정은 또한 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)] 참조).

[0385] 감소된 이펙터 기능을 갖는 항체는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 1개 이상의 치환을

갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 6,737,056). 이러한 Fc 돌연변이체는 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2개 이상에서 치환을 갖는 Fc 돌연변이체 (잔기 265 및 297의 알라닌으로의 치환을 갖는, 소위 "DANA" Fc 돌연변이체 포함)를 포함한다 (미국 특허 번호 7,332,581).

[0386] FcR에 대해 개선되거나 감소된 결합을 갖는 특정 항체 변이체가 기재되어 있다. (예를 들어, 미국 특허 번호 6,737,056; WO 2004/056312 및 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)] 참조.)

[0387] 특정 실시양태에서, 항체 변이체는 ADCC를 개선시키는 1개 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334 (잔기의 EU 넘버링)에서 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 예시적인 실시양태에서, 항체는 그의 Fc 영역에 하기 아미노산 치환을 포함한다: S298A, E333A 및 K334A.

[0388] 일부 실시양태에서, 예를 들어 미국 특허 번호 6,194,551, WO 99/51642 및 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]에 기재된 바와 같이, 변경된 (즉, 개선된 또는 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 나타내는 변경들이 Fc 영역에서 만들어진다.

[0389] 증가된 반감기, 및 모체 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 개선된 결합을 갖는 항체 (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 및 Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994))가 US2005/0014934A1 (Hinton et al.)에 기재되어 있다. 이들 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 개선시키는 1개 이상의 치환을 그 내부에 갖는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434 중 1개 이상에서 치환, 예를 들어 Fc 영역 잔기 434의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 7,371,826). Fc 영역 변이체의 다른 예에 관하여 또한 문헌 [Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 WO 94/29351을 참조한다.

[0390] (xi) 항체 유도체

[0391] 본 발명의 항체는 관련 기술분야에 공지되고 용이하게 입수 가능한 추가의 비단백질성 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체이다. 수용성 중합체의 비제한적 예는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 그의 혼합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로파온알데히드가 물에서의 안정성으로 인해 제조에 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 문자량을 가질 수 있고, 분자형 또는 비분자형일 수 있다. 항체에 부착되는 중합체의 수는 달라질 수 있고, 1개 초과의 중합체가 부착되는 경우에 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선시킬 항체의 특정한 특성 또는 기능, 항체 유도체가 요법에서 규정된 조건 하에 사용될 것인지 여부 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 고려사항을 기초로 하여 결정될 수 있다.

[0392] (xi i) 벡터, 숙주 세포 및 재조합 방법

[0393] 항체는 또한 재조합 방법을 사용하여 생산할 수 있다. 항-항원 항체의 재조합 생산을 위해, 항체를 코딩하는 핵산을 단리하고, 추가의 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 밸현을 위한 복제가능한 벡터 내로 삽입한다. 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리하고 서열분석할 수 있다. 다수의 벡터가 이용가능하다. 벡터 성분은 일반적으로 하기 중 1종 이상을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 1종 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열.

[0394] (a) 신호 서열 성분

[0395] 본 발명의 항체는 직접적으로뿐만 아니라 이종 폴리펩티드, 바람직하게는 신호 서열, 또는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드와의 융합 폴리펩티드로서 재조합적으로 생산될 수 있다. 바람직하게는, 선택된 이종 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식 및 프로세싱 (예를 들어, 신호 웨პ티다제에 의해 절단)되는 것이다. 천연 항체 신호 서열을 인식 및 프로세싱하지 못하는 원핵 숙주 세포의 경우에는, 신호 서열을 예를 들어 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, lpp 또는 열-안정성 엔테로톡신 II 리더의 군으로부터 선택된 원핵 신호 서열로 치환한다. 효모 분비의 경우에, 천연 신호 서열은 예를 들어 효모 인버타제 리더, 인자 리더 (사카로미세스(*Saccharomyces*) 및 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*) α-인자 리더 포함), 또는

산 포스파타제 리더, 씨. 알비칸스(*C. albicans*) 글루코아밀라제 리더, 또는 WO 90/13646에 기재된 신호에 의해 치환될 수 있다. 포유동물 세포 발현 시에는, 포유동물 신호 서열뿐만 아니라 바이러스 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호가 이용가능하다.

[0396] (b) 복제 기점

[0397] 발현 벡터 및 클로닝 벡터 둘 다는 벡터가 1종 이상의 선택된 숙주 세포 내에서 복제될 수 있게 하는 핵산 서열을 함유한다. 일반적으로, 클로닝 벡터에서 상기 서열은 벡터가 숙주 염색체 DNA와 독립적으로 복제될 수 있게 하는 것이고, 복제 기점 또는 자율 복제 서열을 포함한다. 이러한 서열은 다양한 박테리아, 효모 및 바이러스에 대해 널리 공지되어 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기점은 대부분의 그람-음성 박테리아에 적합하고, 2μ 플라스미드 기점은 효모에 적합하고, 다양한 바이러스 기점 (SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또는 BPV)은 포유동물 세포에서의 클로닝 벡터에 유용하다. 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에서는 필요하지 않다 (단지 SV40 기점이 초기 프로모터를 함유하기 때문에, 전형적으로 이것이 사용될 수 있음).

[0398] (c) 선택 유전자 성분

[0399] 발현 및 클로닝 벡터는 선택 마커라고도 불리는 선택 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암페실린, 네오마이신, 메토트렉세이트 또는 테트라시클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 영양요구성 결핍을 보완하거나, 또는 (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요 영양분을 공급하는 단백질을 코딩하며, 예를 들어 바실루스의 경우에는 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자이다.

[0400] 선택 계획의 한 예는 숙주 세포의 성장을 정지시키는 약물을 이용한다. 이종 유전자로 성공적으로 형질전환된 이를 세포는 약물 내성을 부여하는 단백질을 생산하고, 따라서 선택 요법에서 생존한다. 이러한 우성 선택의 예는 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 히그로마이신을 사용한다.

[0401] 포유동물 세포를 위한 적합한 선택 마커의 또 다른 예는 항체-코딩 핵산을 취하는데 적격인 세포의 확인을 가능하게 하는 마커, 예컨대 DHFR, 글루타민 신테타제 (GS), 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 테아미나제, 오르니틴 데카르복실라제 등이다.

[0402] 예를 들어, DHFR 유전자로 형질전환시킨 세포는 형질전환체를 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토트렉세이트 (MTX)를 함유하는 배양 배지에서 배양함으로써 확인한다. 이를 조건 하에서, DHFR 유전자를 임의의 다른 공동-형질전환된 핵산과 함께 증폭시킨다. 내인성 DHFR 활성이 결핍된 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포주 (예를 들어, ATCC CRL-9096)를 사용할 수 있다.

[0403] 대안적으로, GS 유전자로 형질전환시킨 세포는 형질전환체를 GS의 억제제인 L-메티오닌 술폭시민 (MSX)을 함유하는 배양 배지에서 배양함으로써 확인한다. 이를 조건 하에서, GS 유전자를 임의의 다른 공동-형질전환시킨 핵산과 함께 증폭시킨다. GS 선택/증폭 시스템을 상기 기재된 DHFR 선택/증폭 시스템과 조합하여 사용할 수 있다.

[0404] 대안적으로, 관심 항체를 코딩하는 DNA 서열, 야생형 DHFR 유전자 및 다른 선택 마커, 예컨대 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스퍼라제 (APH)로 형질전환시키거나 공동-형질전환시킨 숙주 세포 (특히 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)는 선택 마커, 예컨대 아미노글리코시드계 항생제, 예를 들어 카나마이신, 네오마이신 또는 G418에 대한 선택제를 함유하는 배지에서의 세포 성장에 의해 선택될 수 있다. 미국 특히 번호 4,965,199를 참조한다.

[0405] 효모에 사용하기 적합한 선택 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 trp1 유전자이다 (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979)). trp1 유전자는 트립토판에서 성장하는 능력이 결여된 효모의 돌연변이체 균주, 예를 들어 ATCC 번호 44076 또는 PEP4-1에 대한 선택 마커를 제공한다. 문헌 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)]. 이어서, 효모 숙주 세포 계놈 내의 trp1 병변의 존재는 트립토판의 부재 하의 성장에 의해 형질전환을 검출하는데 효과적인 환경을 제공한다. 유사하게, Leu2-결핍 효모 균주 (ATCC 20,622 또는 38,626)는 Leu2 유전자를 보유하는 공지된 플라스미드에 의해 보완된다.

[0406] 추가로, $1.6\ \mu\text{m}$ 원형 플라스미드 pKD1로부터 유래된 벡터는 클루이베로미세스 효모의 형질전환에 사용될 수 있다. 대안적으로, 재조합 소 키모신의 대규모 생산을 위한 발현 시스템으로 케이. 락티스(*K. lactis*)가 보고되었다. 문헌 [Van den Berg, Bio/Technology, 8: 135 (1990)]. 클루이베로미세스의 산업적 균주에 의한 성숙 재조합 인간 혈청 알부민의 분비를 위한 안정한 다중-카페 발현 벡터가 또한 개시되었다. 문헌 [Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)].

[0407] (d) 프로모터 성분

[0408] 발현 및 클로닝 벡터는 일반적으로, 숙주 유기체에 의해 인식되고 항체를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결되는 프로모터를 함유한다. 원핵 숙주에 사용하기 적합한 프로모터는 phoA 프로모터, β -락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 알칼리성 포스파타제 프로모터, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템 및 하이브리드 프로모터, 예컨대 tac 프로모터를 포함한다. 그러나, 다른 공지된 박테리아 프로모터도 적합하다. 박테리아 시스템에 사용하기 위한 프로모터는 또한, 항체를 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 샤인-달가노 (S.D.) 서열을 함유할 것이다.

[0409] 진핵생물에 대한 프로모터 서열이 공지되어 있다. 실질적으로 모든 진핵 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30개 염기 상류에 위치하는 AT-풍부 영역을 갖는다. 다수의 유전자의 전사 시작점으로부터 70 내지 80개 염기 상류에서 발견되는 또 다른 서열은 CNCAAT 영역 (여기서 N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있음)이다. 코딩 서열의 3' 말단에 폴리 A 꼬리를 부가하기 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 대부분의 진핵 유전자의 3' 말단에 존재한다. 이들 모든 서열들이 진핵 발현 벡터 내로 적합하게 삽입된다.

[0410] 효모 숙주에 사용하기 적합한 프로모터 서열의 예는 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 당분해 효소, 예컨대 엔올라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로제나제, 혼소키나제, 피루베이트 데카르복실라제, 포스포프룩토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오스 포스페이트 이소머라제, 포스포글루코스 이소머라제 및 글루코키나제에 대한 프로모터를 포함한다.

[0411] 성장 조건에 의해 제어되는 전사의 추가의 이점을 갖는 유도성 프로모터인 다른 효모 프로모터는 알콜 데히드로제나제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사와 연관된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로제나제, 및 말토스 및 갈락토스 이용을 담당하는 효소에 대한 프로모터 영역이다. 효모 발현에 사용하기에 적합한 벡터 및 프로모터는 EP 73,657에 추가로 기재되어 있다. 또한, 효모 인핸서는 효모 프로모터와 함께 유리하게 사용된다.

[0412] 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터의 항체 전사는, 예를 들어 바이러스, 예컨대 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스 (예컨대 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 시토메갈로바이러스, 레트로바이러스, 간염-B 바이러스, 원숭이 바이러스 40 (SV40)의 계놈으로부터 수득한 프로모터에 의해, 또는 이종 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터, 열 쇼크 프로모터에 의해, 이러한 프로모터가 숙주 세포 시스템과 상용성인 한 제어될 수 있다.

[0413] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스 복제 기점을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득된다. 인간 시토메갈로바이러스의 극초기 프로모터가 HindIII E 제한 단편으로 편리하게 수득된다. 소 유두종 바이러스를 벡터로 사용하여 포유동물 숙주에서 DNA를 발현시키기 위한 시스템이 미국 특허 번호 4,419,446에 개시되어 있다. 이러한 시스템의 변형이 미국 특허 번호 4,601,978에 기재되어 있다. 또한, 단순 헤르페스 바이러스로부터의 티미딘 키나제 프로모터의 제어 하에 마우스 세포에서 인간 β -인터페론 cDNA를 발현시키는 것에 대해서는 문헌 [Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982)]을 참조한다. 대안적으로, 라우스 육종 바이러스의 긴 말단 반복부를 프로모터로 사용할 수 있다.

[0414] (e) 인핸서 요소 성분

[0415] 고등 진핵생물에 의해 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA를 전사하는 것은 종종, 인핸서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가된다. 다수의 인핸서 서열이 현재 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α -태아단백질 및 인슐린)로부터 공지되어 있다. 그러나, 전형적으로는 진핵 세포 바이러스로부터의 인핸서를 사용할 것이다. 예는 복제 기점의 하류 쪽 (bp 100-270)의 SV40 인핸서, 시토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점의 하류 쪽의 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 또한, 진핵 프로모터의 활성화를 위한 인핸서 요소에 대해 문헌 [Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)]을 참조한다. 인핸서는 항체-코딩 서열에 대해 위치 5' 또는 3'에서 벡터 내로 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 부위 5'에 위치한다.

[0416] (f) 전사 종결 성분

[0417] 진핵 숙주 세포 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다세포 유기체로부터의 유핵 세포)에 사용되는 발현 벡터는 또한 전사의 종결 및 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 함유할 것이다. 이러한 서열은 통상적으로 진핵 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 영역으로부터 이용가능하다. 이들 영역은 항체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사된 뉴클레오티드 절편을 함유한다. 유용

한 전사 종결 성분 중 1종은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다. WO94/11026 및 그에 개시된 발현 벡터를 참조한다.

[0418] (g) 숙주 세포의 선택 및 형질전환

[0419] 본원에서 벡터에 DNA를 클로닝하거나 발현시키기에 적합한 숙주 세포는 상기 기재된 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포이다. 이러한 목적에 적합한 원핵생물은 유박테리아, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어 엔테로박테리아세아에, 예컨대 에스케리키아(*Escherichia*), 예를 들어 이. 콜라이, 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예를 들어 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*), 예를 들어 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*) 및 시겔라(*Shigella*), 뿐만 아니라 바실루스, 예컨대 비. 서브틸리스(*B. subtilis*) 및 비. 리케니포르미스(*B. licheniformis*) (예를 들어, 1989년 4월 12일에 공개된 DD 266,710에 개시된 비. 리케니포르미스 41P), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 예컨대 피. 애에루기노사(*P. aeruginosa*) 및 스트렙토미세스(*Streptomyces*)를 포함한다. 한 바람직한 이. 콜라이 클로닝 숙주는 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446)이지만, 다른 균주, 예컨대 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 X1776 (ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 W3110 (ATCC 27,325)도 적합하다. 이들 예는 제한적이기보다는 예시적이다.

[0420] 전장 항체, 항체 융합 단백질 및 항체 단편은 박테리아에서, 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않을 때, 예컨대 치료 항체가 종양 세포 과괴에 있어서 그 차제로 유효성을 나타내는 세포독성제 (예를 들어, 독소)에 접합될 때 생산될 수 있다. 전장 항체는 순환 반감기가 보다 길다. 이. 콜라이에서의 생산은 보다 신속하고 보다 비용 효율적이다. 박테리아에서의 항체 단편 및 폴리펩ти드의 발현에 대해서는, 예를 들어 발현 및 분비 최적화를 위한 번역 개시 영역 (TIR) 및 신호 서열이 기재되어 있는 미국 특허 번호 5,648,237 (Carter et al.), 미국 특허 번호 5,789,199 (Joly et al.), 미국 특허 번호 5,840,523 (Simmons et al.)을 참조한다. 또한, 이. 콜라이에서의 항체 단편의 발현을 기재하고 있는 문헌 [Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254]을 참조한다. 발현 후에, 항체는 이. 콜라이 세포 페이스트로부터 가용성 분획으로 단리될 수 있고, 예를 들어 이소형에 따라 단백질 A 또는 G 칼럼을 통해 정제될 수 있다. 최종 정제는, 예를 들어 CHO 세포에서 발현된 항체를 정제하는 방법과 유사하게 수행될 수 있다.

[0421] 원핵생물에 추가로, 진핵 미생물, 예컨대 사상 진균 또는 효모가 항체-코딩 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로미세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 통상적인 제빵 효모는 하등 진핵 숙주 미생물 중에서 가장 통상적으로 사용된다. 그러나, 다수의 다른 속, 종 및 균주가 본원에서 통상적으로 이용가능하고 유용하며, 예컨대 쉬조사카로미세스 품베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로미세스 숙주, 예컨대 케이. 락티스, 케이. 프라길리스(*K. fragilis*) (ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045), 케이. 위케라미이(*K. wickeramii*) (ATCC 24,178), 케이. 왈티이(*K. waltii*) (ATCC 56,500), 케이. 드로소필라룸(*K. drosophilae*) (ATCC 36,906), 케이. 써모톨레란스(*K. thermotolerans*) 및 케이. 마르시아누스(*K. marxianus*); 야로위아(*yarrowia*) (EP 402,226); 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) (EP 183,070); 칸디다(*Candida*); 트리코더마 레에시아(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 슈완니오미세스(*Schwanniomyces*), 예컨대 슈완니오미세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 사상 진균, 예컨대 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*) 및 아스페르길루스(*Aspergillus*) 숙주, 예컨대 에이. 니들란스(*A. nidulans*) 및 에이. 니거(*A. niger*)가 있다. 치료 단백질을 생산하기 위한 효모 및 사상 진균의 사용에 관한 논의를 검토하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004)]을 참조한다.

[0422] 글리코실화 경로가 "인간화"됨으로써 부분 또는 완전 인간 글리코실화 패턴을 갖는 항체를 생산하는 특정 진균 및 효모 균주가 선택될 수 있다. 예를 들어 문헌 [Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)] (피키아 파스토리스에서의 글리코실화 경로의 인간화 기재); 및 상기 문헌 [Gerngross et al.]을 참조한다.

[0423] 글리코실화 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 수많은 바클로바이러스 균주 및 변이체 및 숙주, 예컨대 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) (모충), 아에데스 아에깁티(*Aedes aegypti*) (모기), 아에데스 알보피كت스(*Aedes albopictus*) (모기), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*) (과실파리) 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*)로부터의 상응하는 허용 곤충 숙주 세포가 확인되었다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주, 예를 들어 아우토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체, 및 봄빅스

모리 NPV의 Bm-5 균주가 공중 이용가능하고, 이러한 바이러스는 특히 스포도프테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해 본 발명에 따라 본원의 바이러스로서 사용될 수 있다.

[0424] 목화, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토, 좀개구리밥 (렘나세아에(*Leninaceae*)), 알팔파 (엠. 트룬카틀라 (*M. truncatula*)) 및 담배의 식물 세포 배양물을 또한 숙주로서 이용할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 및 6,417,429 (트랜스제닉 식물에서 항체를 생산하기 위한 플랜티바디스(PLANTIBODIES)TM 기술을 기재함)를 참조한다.

[0425] 척추동물 세포를 숙주로서 사용할 수 있고, 척추동물 세포를 배양하여 증식시키는 것 (조직 배양)이 상용 절차가 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (현탁 배양의 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)])]; 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 베팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간세포암 세포주 (Hep G2)이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 예를 들어 DHFR⁻ CHO 세포 (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); 및 골수종 세포주, 예컨대 NS0 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해서는, 예를 들어 문헌 [Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 255-268]을 참조한다.

[0426] 숙주 세포는 항체 생산을 위해 상기 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환되고, 프로모터를 유도하거나 형질전환체를 선택하거나 또는 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형된 통상의 영양 배지에서 배양된다.

[0427] (h) 숙주 세포의 배양

[0428] 본 발명의 항체를 생산하는데 사용된 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 입수 가능한 배지, 예컨대 햄(Ham)의 F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM, 시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 둘베코의 변형 이글 배지 (DMEM, 시그마)는 숙주 세포를 배양하는데 적합하다. 또한, 문헌 [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985에 기재된 배지들 중 임의의 것을 숙주 세포에 대한 배양 배지로 사용할 수 있다. 임의의 이들 배지는 필요에 따라 호르몬 및 /또는 다른 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린, 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘, 및 포스페이트), 완충제 (예컨대 HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대 겐타마이신(GENTAMYCIN)TM 약물), 미량 원소 (통상적으로 마이크로몰 범위로 최종 농축물에 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 및 글루코스 또는 등가의 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필요한 보충제가 또한 통상의 기술자에게 공지된 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 이전에 발현을 위해 선택된 숙주 세포에 사용된 것들이고, 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0429] (xiv) 항체의 정제

[0430] 재조합 기술을 사용하는 경우에, 항체는 세포내에서 생산되거나, 주변세포질 공간에서 생산되거나, 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포내에서 생산되는 경우에, 제1 단계로서 미립자 과편인 숙주 세포 또는 용해된 단편을, 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거한다. 문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]은 이. 콜라이의 주변세포질 공간으로 분비된 항체를 단리하는 절차를 기재한다. 간략하게, 세포 페이스트를 아세트산나트륨 (pH 3.5), EDTA 및 페닐메틸솔포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재 하에 약 30분에 걸쳐 해동시킨다. 세포 과편을 원심분리에 의해 제거할 수 있다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우에, 일반적으로 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 상업적으로 입수 가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘 (Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 유닛을 사용하여 먼저 농축시킨다. 프로테아제 억제제, 예컨대 PMSF는 단백질분해를 억제하기 위해 상기 단계 중 임의의 단계에 포함될 수 있고, 항생제는 우연한 오염물의 성장을 방지하기 위해 포함될 수 있다.

- [0431] 세포로부터 제조된 항체 조성물은, 예를 들어 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있으며, 여기서 친화성 크로마토그래피가 전형적으로 바람직한 정제 단계 중 한 단계이다. 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 종 및 이소형에 따라 달라진다. 단백질 A는 인간 γ 1, γ 2 또는 γ 4 중 쇄를 기반으로 하는 항체를 정제하는데 사용될 수 있다 (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 γ 3에 대해 권장된다 (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 제어형 세공 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스에 의해 달성될 수 있는 것보다 더 신속한 유량 및 더 짧은 가공 시간을 가능하게 한다. 항체가 C α 3 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABX™ 수지 (제이. 티. 베이커(J. T. Baker), 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 회수될 항체에 따라 다른 단백질 정제 기술, 예컨대 이온-교환 칼럼 상에서의 분별증류, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스(SEPHAROSE)™ 상에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예컨대 폴리아스파르트산 칼럼) 상에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전이 또한 이용가능하다.
- [0432] 일반적으로, 조사, 시험 및 임상에 사용하기 위한 항체를 제조하는 다양한 방법론이 관련 기술분야에 널리 확립되고 있고, 이는 상기 기재된 방법론과 일치하고/거나 특정한 관심 항체에 대해 통상의 기술자에게 인지되는 바와 같다.
- [0433] 생물학적 활성 항체의 선택
- [0434] 상기 기재된 바와 같이 생산된 항체는 치료 관점 또는 항체의 생물학적 활성을 보유하는 제제 또는 조건 선택에 있어서 유익한 특성을 갖는 항체를 선택하기 위해 1종 이상의 "생물학적 활성" 검정에 적용될 수 있다. 항체는 그를 생성하는 항원에 결합하는 능력에 대해 시험될 수 있다. 예를 들어, 관련 기술분야에 공지된 방법 (예컨대 ELISA, 웨스턴 블로트 등)이 사용될 수 있다.
- [0435] 예를 들어, 항-PDL1 항체의 경우, 항체의 항원 결합 특성은 PDL1에 결합하는 능력을 검출하는 검정에서 평가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체의 결합은, 예를 들어 포화 결합; ELISA; 및/또는 경쟁 검정 (예를 들어 RIA)에 의해 결정될 수 있다. 또한, 항체는, 예를 들어 치료제로서의 그의 유효성을 평가하기 위해 다른 생물학적 활성 검정에 적용될 수 있다. 이러한 검정은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 항체에 대한 표적 항원 및 의도된 용도에 따라 달라진다. 예를 들어, 항체에 의한 PD-L1 차단의 생물학적 효과는, 예를 들어 미국 특허 8,217,149에 기재된 바와 같이, CD8+T 세포, 림프구성 맥락수막염 바이러스 (LCMV) 마우스 모델 및/또는 동계 종양 모델에서 평가될 수 있다.
- [0436] 관심 항원 상의 특정한 애피토프에 결합하는 항체 (예를 들어, 실시예의 항-PD-L1 항체가 PD-L1에 결합하는 것을 차단하는 항체)를 스크리닝하기 위해, 문헌 [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 바와 같은 상용 교차-차단 검정을 수행할 수 있다. 대안적으로, 예를 들어 문헌 [Champe et al., J. Biol. Chem. 270:1388-1394 (1995)]에 기재된 바와 같은 애피토프 맵핑을 수행하여, 항체가 관심 애피토프에 결합하는지 여부를 결정할 수 있다.
- [0437] 제약 조성물 및 제제
- [0438] PD-1 축 결합 길항체 및/또는 본원에 기재된 항체 (예컨대 항-PD-L1 항체 또는 항-CD20 항체) 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물 및 제제가 또한 본원에 제공된다.
- [0439] 본원에 기재된 바와 같은 제약 조성물 및 제제는 목적하는 정도의 순도를 갖는 활성 성분 (예컨대 항체 또는 폴리펩티드) 및/또는 항-HER2 항체를 1종 이상의 임의적인 제약상 허용되는 담체와 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 혼합하는 것에 의해 제조될 수 있다 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)). 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 일반적으로 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기 산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 폐놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코스,

만노스 또는 벡스트린을 포함한 다른 탄수화물; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대-이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에서 예시적인 제약상 허용되는 담체는 간질성 약물 분산액 작용제, 예컨대 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질 (sHASEGP), 예를 들어 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예컨대 rHuPH20 (힐레넥스(HYLENEX)®, 백스터 인터내셔널, 인크.(Baxter International, Inc.))을 추가로 포함한다. rHuPH20을 포함한, 특정의 예시적인 sHASEGP 및 사용 방법은 미국 특허 번호 2005/0260186 및 2006/0104968에 기재되어 있다. 한 측면에서, sHASEGP는 1개 이상의 추가의 글리코사미노글리카나제, 예컨대 콘드로이티나제와 조합된다.

[0440] 예시적인 동결건조 항체 제제는 미국 특허 번호 6,267,958에 기재되어 있다. 수성 항체 제제는 미국 특허 번호 6,171,586 및 WO2006/044908에 기재된 것을 포함하고, 후자의 제제는 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다.

[0441] 본원의 조성물 및 제제는 또한 치료되는 특정한 적응증에의 필요에 따라 1종 초과의 활성 성분, 바람직하게는 서로 유해한 영향을 미치지 않는 보완적 활성을 갖는 것을 함유할 수 있다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.

[0442] 활성 성분은 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 일부 마이크로구체, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐) 내에, 또는 마크로에멀젼 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0443] 지속-방출 제제가 제조될 수 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이러한 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 생체내 투여에 사용되는 제제는 일반적으로 멸균성이다. 멸균은 예를 들어 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다.

V. 키트

[0445] 또 다른 측면에서, 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위한 또는 암을 갖는 개체의 면역 기능을 증진시키기 위한 PD-1 축 결합 길항제 및/또는 항-CD20 항체를 포함하는 키트가 제공된다. 일부 실시양태에서, 키트는 PD-1 축 결합 길항제, 및 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위해 또는 암을 갖는 개체의 면역 기능을 증진시키기 위해 PD-1 축 결합 길항제를 항-CD20 항체와 조합하여 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 항-CD20 항체, 및 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위해 또는 암을 갖는 개체의 면역 기능을 증진시키기 위해 PD-1 축 결합 길항제를 항-CD20 항체를 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 PD-1축 결합 길항제 및 항-CD20 항체, 및 개체에서 암을 치료하거나 그의 진행을 지연시키기 위해 또는 암을 갖는 개체의 면역 기능을 증진시키기 위해 PD-1 축 결합 길항제 및 항-CD20 항체를 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는 패키지 삽입물을 포함한다. 본원에 기재된 임의의 PD-1 축 결합 길항제 및/또는 항-CD20 항체가 키트에 포함될 수 있다.

[0446] 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 PD-1 축 결합 길항제 및 항-CD20 항체 중 1종 이상을 함유하는 용기를 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알 (예를 들어, 이중 챔버 바이알), 시린지 (예컨대, 단일 또는 이중 챔버 시린지) 및 시험 튜브를 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 라벨 (예를 들어, 용기 상 또는 이와 연관됨) 또는 패키지 삽입물을 포함할 수 있다. 라벨 또는 패키지 삽입물은 그에 함유된 화합물이 개체에서의 암의 치료 또는 그의 진행의 지연 또는 암을 갖는 개체의 면역 기능의 증진을 위한 방법에 유용하거나 이를 의도할 수 있다는 것을 나타낼 수 있다. 키트는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 포함한, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0447]

항-CD20 항체 서열

<210> 30
<211> 112
<212> PRT
<213> 무스 종
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 유린 모노클로날 항-CD20 항체 B-Ly1의 중쇄 (VH)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 30

Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
1 5 10 15
Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Leu
20 25 30
Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp
35 40 45
Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
50 55 60
Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr
65 70 75 80
Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly
85 90 95

[0448]

Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
100 105 110

<210> 31
<211> 103
<212> PRT
<213> 무스 종
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 유린 모노클로날 항-CD20 항체 B-Ly1의 경쇄 (VL)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 31

Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
1 5 10 15
Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu
20 25 30
Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn
35 40 45
Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Gly Ser Gly Thr
50 55 60
Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
65 70 75 80
Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
85 90 95
Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100

<210> 32
<211> 119
<212> PRT
<213> 인공
<220>
<223> 인간화 B-Ly1 항체 (B-HH2)의 중쇄 (VH)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 32

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

[0449]

<210> 33
<211> 119
<212> PRT
<213> 인공

<220>
<223> 인간화 B-Ly1 항체 (B-HH3)의 중쇄 (VH)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 33

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 119
<212> PRT
<213> 인공

<220>
<223> 인간화 B-Ly1 항체 (B-HH4)의 중쇄 (VH)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 34

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 Val Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 119

[0450]

<212> PRT
 <213> 인공

<220>
 <223> 인간화 B-Ly1 항체 (B-HH5)의 중쇄 (VH)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 35

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1           5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20          25          30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35          40          45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50          55          60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85          90          95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100         105         110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
```

<210> 36
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 인공

<220>
 <223> 인간화 B-Ly1 항체 (B-HH6)의 중쇄 (VH)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 36

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1           5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20          25          30
Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35          40          45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50          55          60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85          90          95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100         105         110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
```

<210> 37
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 인공

[0451]

<220>

<223> 인간화 B-Ly1 항체 (B-HH7)의 중쇄 (VH)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 37

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 38

<211> 119
<212> PRT
<213> 인공

<220>

<223> 인간화 B-Ly1 항체 (B-HH8)의 중쇄 (VH)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 38

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 Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 39

<211> 119
<212> PRT
<213> 인공

<220>

[0452]

<223> 인간화 B-Ly1 항체 (B-HH9)의 중쇄 (VH)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 39

```

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 Tyr Thr Phe Ser Tyr Ser
20         25         30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35         40         45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50         55         60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65         70         75         80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85         90         95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100        105        110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 40

<211> 119
<212> PRT
<213> 인공

<220>

<223> 인간화 B-Ly1 항체 (B-HL8)의 중쇄 (VH)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 40

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
20         25         30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35         40         45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50         55         60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65         70         75         80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85         90         95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100        105        110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 41

<211> 119
<212> PRT
<213> 인공

<220>

<223> 인간화 B-Ly1 항체 (B-HL10)의 중쇄 (VH)의 가변 영역의 아미노산 서열

[0453]

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 42

<211> 119
 <212> PRT
 <213> 인공

<220>

<223> 인간화 B-Ly1 항체 (B-HL11)의 중쇄 (VH)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 42

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 43

<211> 119
 <212> PRT
 <213> 인공

<220>

<223> 인간화 B-Ly1 항체 (B-HL12)의 중쇄 (VH)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 43

[0454]

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 44
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 인공

<220>
<223> 인간화 B-Ly1 항체 (B-HL13)의 중쇄 (VH)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 44

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 45
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 인공

<220>
<223> 인간화 B-Ly1 항체 (B-HL14)의 중쇄 (VH)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 45

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

[0455]

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 46
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 인공

<220>
 <223> 인간화 B-Ly1 항체 (B-HL15)의 중쇄 (VH)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 47
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 인공

<220>
 <223> 인간화 B-Ly1 항체 (B-HL16)의 중쇄 (VH)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 47

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser

[0456]

20	25	30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe		
50	55	60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
85	90	95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115	

<210> 48
<211> 119
<212> PRT
<213> 인공

<220>
<223> 인간화 B-Ly1 항체 (B-HL17)의 중쇄 (VH)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser		15
20	25	30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe		
50	55	60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
85	90	95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115	

<210> 49
<211> 115
<212> PRT
<213> 인공

<220>
<223> 인간화 B-Ly1 항체 B-KV1의 경쇄 (VL)의 가변 영역의 아미노산 서열

<400> 49

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

[0457]

35	40	45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro		
50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
65	70	75
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn		80
85	90	95
Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	110
Arg Thr Val		
115		

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> 인공

<220>

<223> GA101 항체의 HVR-H1의 서열

<400> 50

Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Tyr
1		5			

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> 인공

<220>

<223> GA101 항체의 HVR-H2의 서열

<400> 51

Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asp
1				5			

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> 인공

<220>

<223> GA101 항체의 HVR-H3의 서열

<400> 52

Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr
1					5			10	

<210> 53

<211> 16

<212> PRT

<213> 인공

[0458]

<220>

<223> GA101 항체의 HVR-L1의 서열

<400> 53

Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asn	Gly	Ile	Thr	Tyr	Leu	Tyr
1				5				10					15		

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> 인공

<220>

<223> GA101 항체의 HVR-L2의 서열

<400> 54

Gln	Met	Ser	Asn	Leu	Val	Ser
1				5		

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> 인공

<220>

<223> GA101 항체의 HVR-L3의 서열

<400> 55

Ala	Gln	Asn	Leu	Glu	Leu	Pro	Tyr	Thr
1				5				

<210> 56

<211> 119

<212> PRT

<213> 인공

<220>

<223> GA101 항체의 VH의 서열

<400> 56

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1					5			10			15				
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Tyr	Ser
					20			25			30				
Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
					35			40			45				
Gly	Arg	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe
					50			55			60				
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
					65			70			75			80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys

[0459]

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

<210> 57
<211> 115
<212> PRT
<213> 인공

<220>
<223> GA101 항체의 VL의 서열

<400> 57

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser			
20	25	30	
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
35	40	45	
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro			
50	55	60	
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn			
85	90	95	
Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105	110	
Arg Thr Val			
115			

<210> 58
<211> 448
<212> PRT
<213> 인공

<220>
<223> GA101 항체의 중쇄 전장 서열의 서열

<400> 58

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser			
20	25	30	
Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe			
50	55	60	
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 59
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 인공

<220>
 <223> GA101 항체의 경체 전장 서열의 서열

<400> 59

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

35	40	45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro		
50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
65	70	75
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn		
85	90	95
Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
115	120	125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
130	135	140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
145	150	155
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
165	170	175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
180	185	190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
195	200	205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	

[0462]

[0463]

실시예

[0464]

본 발명은 하기 실시예를 참조하여 추가로 이해될 수 있으며, 이들은 예시로서 제공된 것이며 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0465]

실시예 1: 재발성/불응성 여포성 림프종 및 미만성 대 B-세포 림프종을 갖는 환자에서 오비누투주맙과 함께 투여된 MPDL3280A의 안전성 및 약리학 연구

[0466]

이러한 1상 개입 개방-표지 다기관 세계적 연구는 불응성 또는 재발성 여포성 림프종 (FL) 또는 미만성 대 B-세포 림프종 (DLBCL)을 갖는 환자에게 조합하여 투여된 정맥내 MPDL3280A (즉, 항-PD-L1 항체) 및 오비누투주맙 (즉, 항-CD20 항체)의 안전성, 내약성 및 약동학을 평가하기 위해 설계되었다. 이러한 연구의 예상되는 지속기간은 대략 44개월이다. 연구 설계는 치료, 단일 군 배정, 개방 표지, 비-무작위화 안전성 연구이다.

[0467]

단계 1의 1차 결과 척도는 (a) 21일 이하의 시간 프레임 내에서 용량-제한 독성 (DLT)의 발생률 및 (b) 21일 이하의 시간 프레임 내에서 관찰된 DLT의 성질이다.

[0468]

2차 결과 척도는 다음과 같다: (a) 44개월 이하의 시간 프레임에서 국립 암 연구소의 유해 사례에 대한 통상 용어 기준 (NCI CTCAE) v4.0에 따라 등급화된 유해 사례 (AE)의 발생률; (b) 44개월 이하의 시간 프레임에서 항-치료 항체 반응의 발생률; (c) 제2 주기의 제1일에 MPDL3280A 최대 혈청 농도 (C_{max}); (d) 제1, 제3, 제4 및 제9 주기의 제1일, 및 연구 종료 시에 MPDL3280A 최소 혈청 농도 (C_{min}); 및 (e) 제1 내지 제4 주기의 제1일, 및 제1 주기의 제8일에 오비누투주맙 투여전 및 주입 말기 혈청 농도 (C_{max}, C_{min}).

[0469]

이러한 연구의 추정되는 등록은 52명의 개체이다. 연구에 2개의 부문이 존재한다. 제1 부문은 실험적 안전성 평가 단계 (단계 1)이다. 제1 부문에서 배정된 개입은 (a) MPDL3280A: 21-일 오비누투주맙 준비 기간 후에, 1200 mg MPDL3280A를 3주마다 IV 투여, 및 (b) 오비누투주맙: 1000 mg 오비누투주맙을 제1 주기의 제1일 (제1 용량을 분할하여 2일에 걸쳐 투여), 제8일 및 제15일, 및 제2 내지 제8 주기의 제1일에 IV 투여. 제2 부문은 확장 단계 (단계 2)이다. 제2 부문에서 배정된 개입은 (a) MPDL3280A: 21-일 오비누투주맙 준비 기간 후에, 1200 mg MPDL3280A를 3주마다 IV 투여, 및 (b) 오비누투주맙: 1000 mg 오비누투주맙을 제1 주기의 제1일 (제1 용량을 분할하여 2일에 걸쳐 투여), 제8일 및 제15일, 및 제2 내지 제8 주기의 제1일에 IV 투여.

[0470]

18세 이상인 두 성별의 개체가 이러한 연구에 적격이다. 포함 기준은 다음과 같다: (a) 조직학적으로 문서화된, CD20-양성, 재발성 또는 불응성 (이전의 치료에 대해 6개월 이내에 재발된 것으로 정의됨) 여포성 림프종 (FL), 또는 원발성 종격 대 B-세포 림프종 (PMLBCL)을 포함한 미만성 대 B-세포 림프종 (DLBC); (b) 스크리닝에서의 골수 생검 (스크리닝 전 3개월 이내에 수행되지 않은 경우); (c) 동부 협동 종양학 그룹 수행 상태 (ECOG) 수행 상태 0 또는 1; (d) 기대 수명 ≥ 12주; (e) 악성 림프종에 대한 개정된 반응 기준에 의해 정의된 바와 같이, 컴퓨터 단층촬영 (CT) 스캔 또는 MRI에 의해 적어도 1개의 2차원적으로 측정가능한 병변 ≥ 2 cm (그의 최대 치수); (f) 적당한 혈액 및 말단-기관 기능; (g) 가임 여성 환자 및 가임 파트너를 갖는 남성 환자의 경우, 고도로 효과적인 형태(들)의 피임을 사용하기 위한 동의 (환자 및/또는 파트너에 의함); 및 (h) 기록상의 종양 조직.

[0471]

배제 기준은 다음과 같다: (a) 중추 신경계 림프종, 연수막 림프종, 또는 고등급 또는 DLBCL로의 변환의 조직학

적 증거; (b) 등급 3b FL, 소림프구성 림프종 (SLL) 또는 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 (WM); (c) 제어되지 않은 흉막 삼출, 심막 삼출, 또는 반복적 배수 절차 (매월 1회 또는 보다 빈번하게)를 요구하는 복수^{*}; (d) 비스포스포네이트 요법 또는 데노수맙의 연속적 사용을 요구하는 제어되지 않은 고칼슘혈증 또는 증후성 고칼슘혈증; (e) 모노클로날 항체 요법에 대한 중증 알레르기성 또는 아나필락시스성 반응의 병력; (f) < 30 mg/일 프레드니손/프레드니솔론에 동등한 용량으로 비-호지킨 림프종 이외의 적응증에 대해 투여되지 않은 경우에, 제1 주기의 시작 전 4주 이내에 코르티코스테로이드를 사용한 정기적 치료; (g) 임신 및 수유 여성; (h) 자가면역 질환의 병력; (i) 확증된 진행성 다초점성 백질뇌병증 (PML)의 병력을 갖는 환자; (j) 선행 동종 골수 이식 또는 선행 실질 기관 이식을 갖는 환자; (k) 특발성 폐 섭유증, 기질화 폐렴 (예를 들어, 폐쇄성 세기관지염), 약물-유도된 폐장염, 특발성 폐장염, 또는 스크리닝에서의 흉부 CT 스캔당 활성 폐장염의 증거의 병력^{**}; (l) HIV에 대한 양성 시험; (m) 만성 B형 간염 감염의 병력, 또는 활성 또는 만성 B형 간염 또는 C형 간염에 대한 양성 시험 결과; (m) 유의한 심혈관 질환, 예컨대 심장 질환 (뉴욕 심장 학회 부류 II 이상), 이전 3개월 이내에 심근 경색, 불안정형 부정맥 또는 불안정형 협심증; (n) 과민성 또는 오비누투주맙을 사용한 선행 치료; (o) 연구 진입 전 12개월 이내에 플루다라빈 또는 캄파트(Campath)®; (p) CD137 효능제, 또는 항-CTLA4, 항-PD-1 및 항-PD-L1 치료 항체를 포함한 면역 체크포인트 차단 요법을 사용한 선행 치료; (q) 제1 주기, 제1일 전에, 6주 이내 또는 약물의 5회 반감기 둘 중 보다 짧은 기간에 전신 면역자극제 (인터페론, 인터류킨-2를 포함하나 이에 제한되지는 않음)를 사용한 치료; 및 (r) 제1 주기, 제1일 전 2주 이내에 프레드니손, 시클로포스파미드, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 탈리도미드 및 항종양 괴사 인자 (항-TNF) 작용제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 전신 면역저해성 약제를 사용한 치료^{***}.

[0472] ^{*}유치 카테터를 갖는 환자가 적격이다.

[0473] ^{**}방사선조사 영역에서 방사선 폐장염 (섭유증)의 병력은 허용된다.

[0474] ^{***}흡입 코르티코스테로이드 및 미네랄로코르티코이드는 허용된다.

[0475] 실시예 2: 마우스에서 종양 부피 및 림프구 집단에 대한 항-PD-L1 항체와 조합된 항-CD20 항체의 효과

[0476] 마우스의 우편측 흉부 영역 내에 100ul 내지 200ul 부피의 HBSS + 매트리겔(Matrigel) 중 2.5백만개의 A20 세포를 피하로 접종하였다. 마우스에서 종양이 성장하도록 하였다. 종양이 대략 80-150 mm³의 평균 종양 부피에 이르렀을 때 (제0일, 접종 후 대략 6일), 마우스를 하기 약술한 치료군 내로 동원하였다. 치료는 제0일에 개시하였다. (치료군 내로 동원되지 않은 마우스 (즉, 다른 종양 부피로 인함)는 안락사시켰다.)

[0477] 치료군:

[0478] 1. 항-돼지풀 (mIgG2a) 제0일, 제3일에 10mg/kg 용량, 제10일 및 제17일에 5mg/kg IP + Mu IgG1 항-gp120 9338, 10 mg/kg IP, TIWx3 n=10

[0479] 2. 항-돼지풀 (mIgG2a) 제0일, 제3일에 10mg/kg 용량, 제10일 및 제17일에 5mg/kg IP + Mu IgG1 항-PD-L1 6E11.1.9, 10 mg/kg, IP, TIWx3 n=10

[0480] 3. Mu IgG2a 항-CD20 돼지풀/5D2 제0일, 제3일에 10mg/kg 용량, 제10일 및 제17일에 5mg/kg + Mu IgG1 gp120 9338, 10 mg/kg, IP, TIWx3 n=10

[0481] 4. Mu IgG2a 항-CD20 돼지풀/5D2 제0일, 제3일에 10mg/kg 용량, 제10일 및 제17일에 5mg/kg + Mu IgG1 항-PD-L1 6E11.1.9, 10 mg/kg, IP, TIWx3 n=10

[0482] Mu IgG1 항-gp120, Mu IgG2a 항-PD-L1을 제3일, 제5일, 제7일, 제10일, 제12일, 제14일, 제17일, 제19일 및 제21일에 투여하였다. 조합 군의 항체를 차례로 투여하였다. 조합된 용량 부피는 마우스당 300 μL를 초과하였다. 항-PD-L1 항체를 PBS 또는 20 mM 히스티딘 아세테이트, 240 mM 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 20 (트윈-20) (pH=5.5) 중에 희석하였다.

[0483] 모든 마우스는 B 세포 고갈의 유효성을 결정하기 위해 제4일 또는 제5일에 채혈하였다. 혈액은 이소플루란-유도된 마취 (흡입하여 수행) 하에 안와 채혈에 의해 수집하였다 (수집 부피는 200ul를 초과하였다). 안와를 교대하였다. 각각의 치료군에 대한 % CD19+ B 림프구, % CD4+ T 림프구 및 % CD8+ T 림프구를 결정하기 위한 제4 일 혈액 FACS 분석은 각각 도 1A, 도 1B 및 도 1C에 도시된다.

- [0484] 측정치 및 체중을 1주에 적어도 2회 수집하였다. >15%의 체중 감소를 나타내는 마우스는 매일 칭량하고, 체중이 >20% 감소된 경우에는 안락사시켰다. 전체 연구에 걸쳐, 모든 마우스의 임상 관찰을 1주에 2회 수행하였다. 유해한 임상 문제를 보이는 마우스는 중증도에 따라 보다 빈번하게, 예를 들어 매일 이하로 관찰하였다. 마우스가 빈사상태에 있는 경우에는 안락사시켰다. 마우스는 종양 부피가 $3,000 \text{ mm}^3$ 을 초과한 경우에 또는 종양이 형성되지 않았다면 3개월 후에 안락시켰다. 이전 연구는 8주 후에 남아있는 종양이 감소된 성장 속도를 갖고 유의하게 덜 공격적이라는 것을 제시하였다. 이를 남아있는 종양을 1주 1회 측정 및 칭량하였다. 8주 후에 존재하는 임의의 큰 또는 공격적으로 성장하는 종양의 경우, 이를 특정 마우스에 대한 측정치 및 체중을 1주에 2회 수집하였다. 각각의 치료군에 대한 종양 부피 vs. 시간 (제0일 내지 제30일)의 플롯은 도 2에 도시된다. 혼합 모델링 접근법을 사용하여 시간 경과에 따른 동일한 동물로부터의 종양 부피의 반복 측정치를 분석하였다. 문헌 [Pinheiro et al., Stat Med. 2014 May 10;33(10):1646-61 (Epub 2013 Dec 3)]. 이러한 접근법은 연구의 종료 전에 반복 측정 및 적당한 드롭아웃 둘 다를 다룬다. 3차 회귀 스플라인을 사용하여 비선형 프로파일을 상이한 치료에서 \log_2 (종양 부피)의 시간 경과에 피팅하였다. 피팅은 nlme 패키지, 버전 3.1 108 (R 파운데이션 포 스탠티스티칼 컴퓨팅(R Foundation for Statistical Computing); 오스트리아 비엔나)을 사용하여 R, 버전 2.15.2 내에서 선형 혼합 효과 모델을 통해 수행하였다. 항-CD20 항체와 조합된 항-PD-L1 항체를 사용한 치료는 종양 성장을 억제하는데 및 종양 성장을 지연시키는데 있어서 어느 하나의 단일 작용제를 사용한 치료보다 더 효과적이었다.
- [0485] 상기 기재된 실험은 A20pRK-CD20-GFP를 사용하여 마우스에서 반복하였다. 100마리의 마우스에 상기 기재된 바와 같이 2.5백만개의 A20pRK-CD20-GFP 세포를 접종하고, 마우스에서 종양이 성장하도록 하였다. 종양이 대략 $100-200 \text{ mm}^3$ 의 평균 종양 부피에 이르렀을 때 (제0일, 접종 후 대략 7일), 동물을 하기 약술한 치료군 내로 동원하였다. 치료는 제1일에 개시하였다. (예를 들어 다른 종양 부피로 인해 치료군 내로 동원되지 않은 마우스는 안락사시켰다.)
- [0486] 치료군:
- [0487] 1. 항-돼지풀 (mIgG2a) 제-2일, 제1일에 10mg/kg 용량, 제8일 및 제15일에 5mg/kg IP + Mu IgG1 항-gp120 9338, 10 mg/kg IP, tiwx3 n=10
- [0488] 2. 항-돼지풀 (mIgG2a) 제-2일, 제1일에 10mg/kg 용량, 제8일 및 제15일에 5mg/kg IP + Mu IgG2a 항-PDL1 25A1 DANA, 10 mg/kg, IP, tiwx3 n=10
- [0489] 3. Mu IgG2a 항-CD20 돼지풀/5D2 제-2일, 제1일에 10mg/kg 용량, 제8일 및 제15일에 5mg/kg + Mu IgG1 gp120 9338, 10 mg/kg, IP, tiwx3 n=10
- [0490] 4. Mu IgG2a 항-CD20 돼지풀/5D2 제-2일, 제1일에 10mg/kg 용량, 제8일 및 제15일에 5mg/kg + Mu IgG2a 항-PDL1 25A1 DANA, 10 mg/kg, IP, tiwx3 n=10
- [0491] 5. Mu IgG2a 항-hCD20 2H7-mIgG2a/5D2 제1일에 10mg/kg 및 제8일 및 제15일에 5mg/kg + Mu IgG1 gp120 9338, 10 mg/kg, IP, tiwx3 n=10
- [0492] 6. Mu IgG2a 항-hCD20 2H7-mIgG2a/5D2 제1일에 10mg/kg 및 제8일 및 제15일에 5mg/kg + Mu IgG2a 항-PDL1 25A1 DANA, 10 mg/kg, IP, tiwx3 n=10
- [0493] Mu IgG1 항-gp120, Mu IgG2a 항-PD-L1을 제3일, 제5일, 제7일, 제10일, 제12일, 제14일, 제17일, 제19일 및 제21일에 투여하였다. 조합 군의 항체를 차례로 투여하였다. 조합된 용량 부피는 마우스당 300 μL 을 초과하였다. 항-PD-L1 항체를 PBS 또는 20 mM 히스티딘 아세테이트, 240 mM 수크로스, 0.02% 폴리소르베이트 20 (트윈-20) (pH=5.5) 중에 희석하였다.
- [0494] 모든 동물은 B 세포 고갈의 유효성을 결정하기 위해 제2일 또는 제3일에 채혈하였다. 혈액은 이소플루란-유도된 마취 (흡입하여 수행) 하에 안와 채혈에 의해 수집하였다 (수집 부피는 200 μl 을 초과하지 않았다). 안와를 교대하였다.
- [0495] 측정치 및 체중을 1주에 적어도 2회 수집하였다. >15%의 체중 감소를 나타내는 마우스는 매일 칭량하고, 체중이 >20% 감소된 경우에는 안락사시켰다. 전체 연구에 걸쳐, 모든 마우스의 임상 관찰을 1주에 2회 수행하였다. 유해한 임상 문제를 보이는 마우스는 중증도에 따라 보다 빈번하게, 예를 들어 매일 이하로 관찰하였다. 마우스가 빈사상태에 있는 경우에는 안락사시켰다. 마우스는 종양 부피가 $3,000 \text{ mm}^3$ 을 초과한 경우에

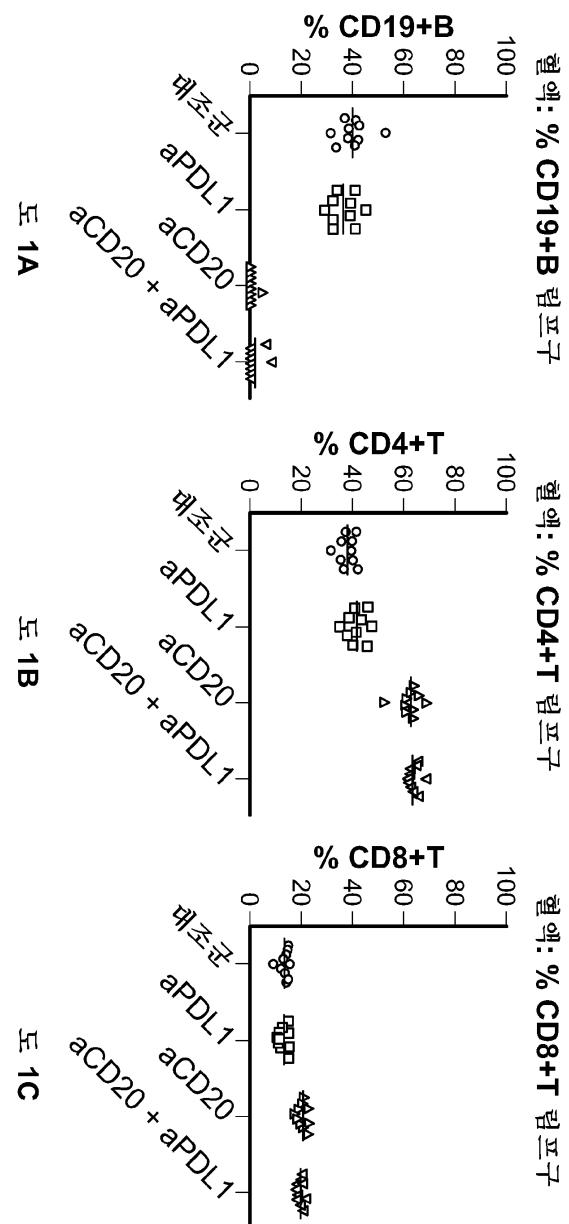
또는 종양이 형성되지 않았다면 3개월 후에 안락시켰다. 이전 연구는 8주 후에 남아있는 종양이 감소된 성장 속도를 갖고 유의하게 덜 공격적이라는 것을 제시하였다. 이를 남아있는 종양을 1주 1회 측정 및 청량하였다. 8주 후에 존재하는 임의의 큰 또는 공격적으로 성장하는 종양의 경우, 이를 특정 마우스에 대한 측정치 및 체중을 1주에 2회 수집하였다. 각각의 치료군에 대한 종양 부피 vs. 시간 (제0일 내지 제30일)의 플롯은 도 3에도 시된다. 도 2에 대해 이용된 동일한 혼합 모델링 접근법을 사용하여 시간 경과에 따른 동일한 동물로부터의 종양 부피의 반복 측정치를 분석하였다. 항-CD20 항체와 조합된 항-PD-L1 항체를 사용한 치료는 종양 성장을 억제하는데 및 종양 성장을 지연시키는데 있어서 어느 하나의 단일 작용제를 사용한 치료보다 더 효과적이었다.

[0496]

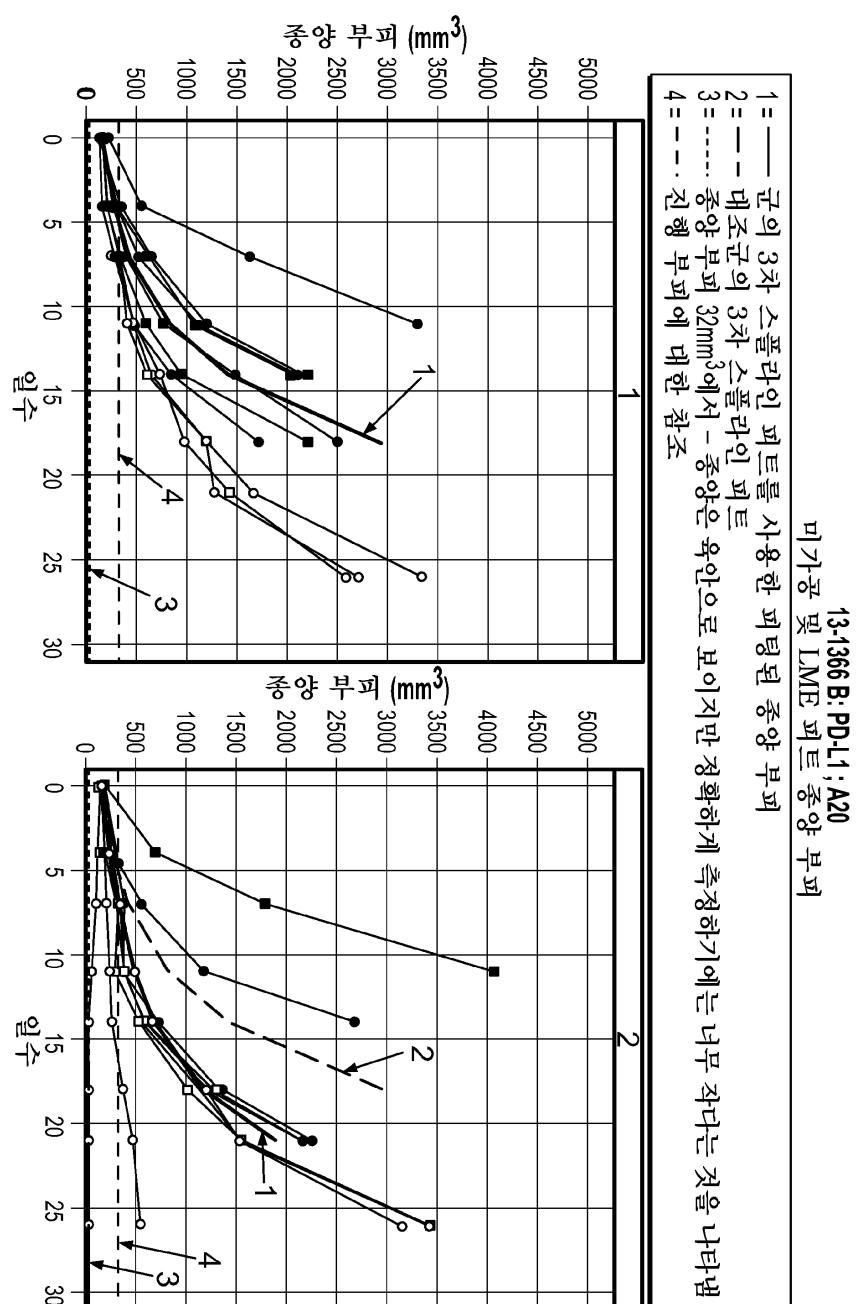
본원에 인용된 모든 특허, 특히 출원, 문헌 및 논문은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

도면

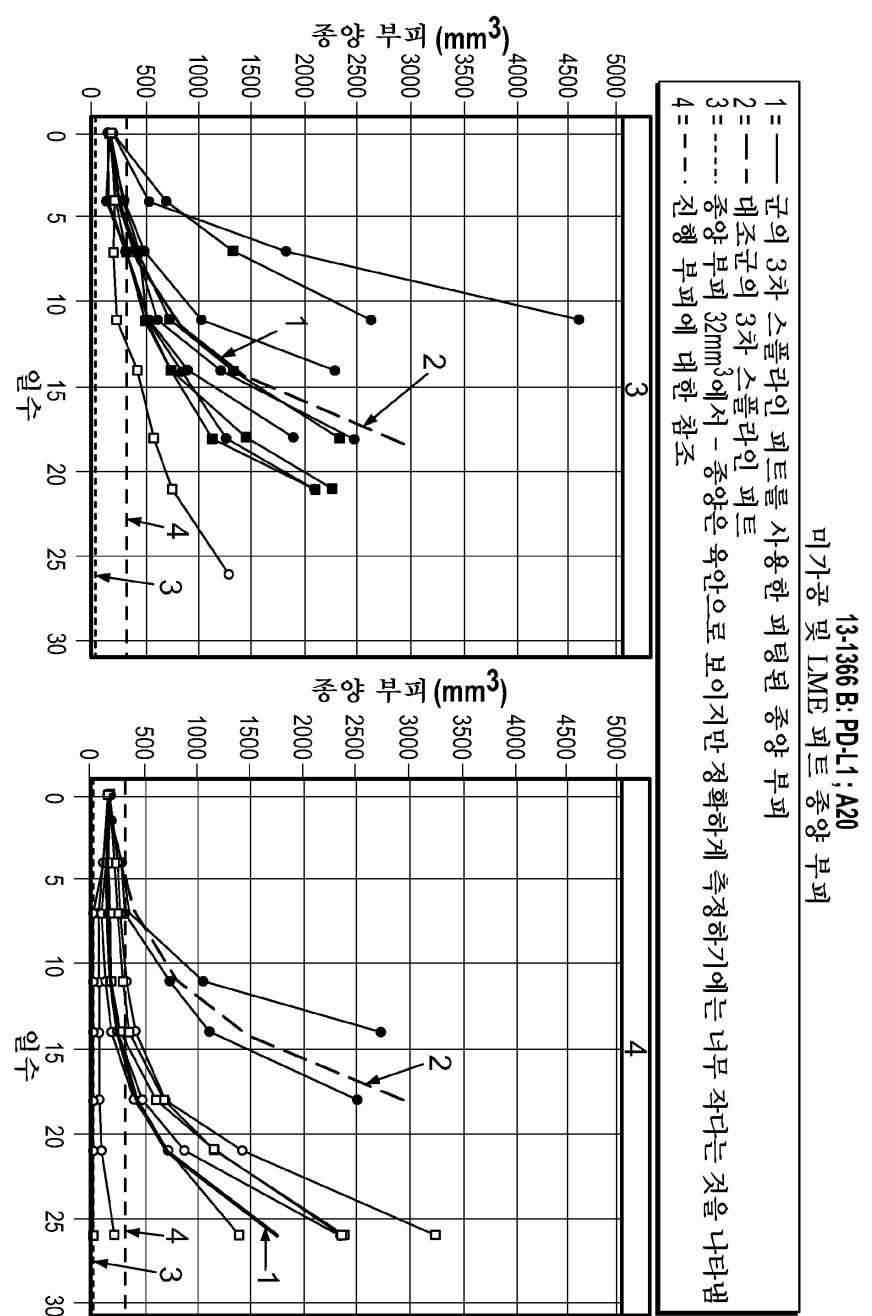
도면1



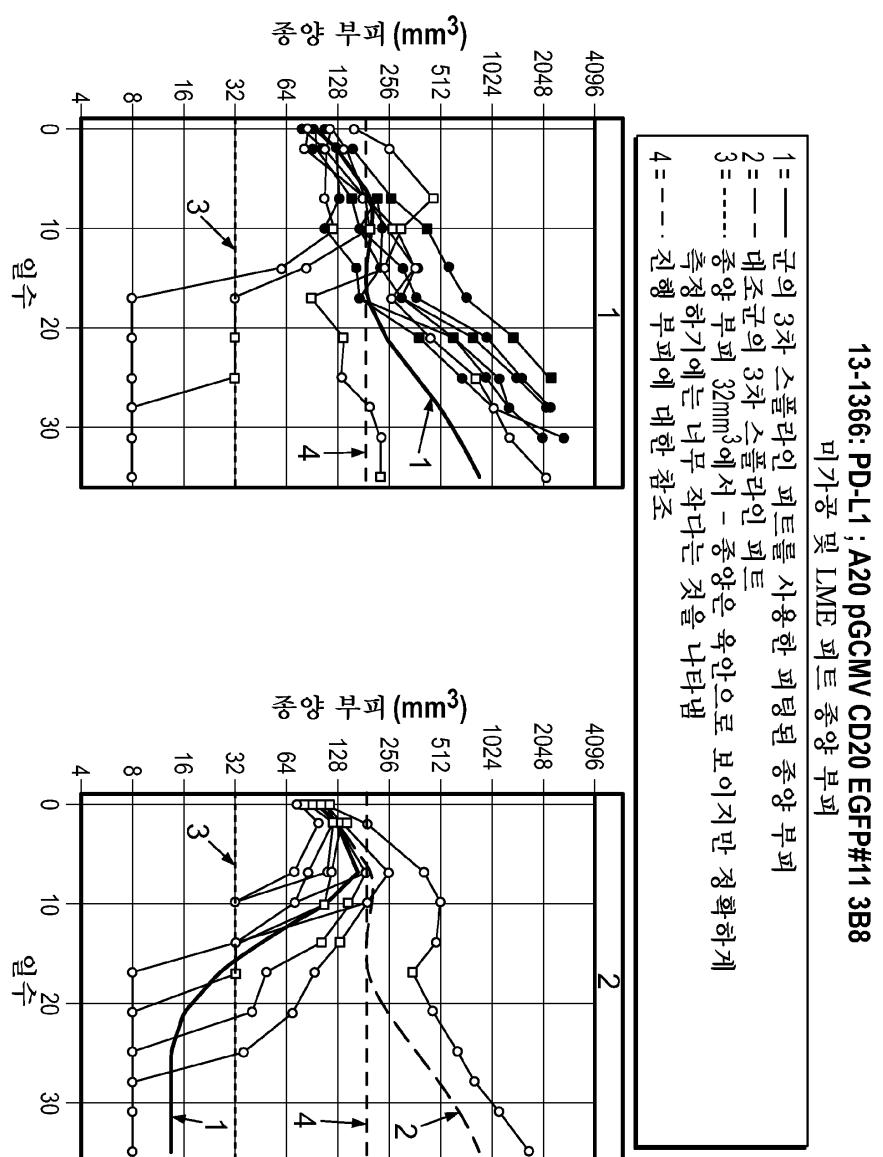
도면2i



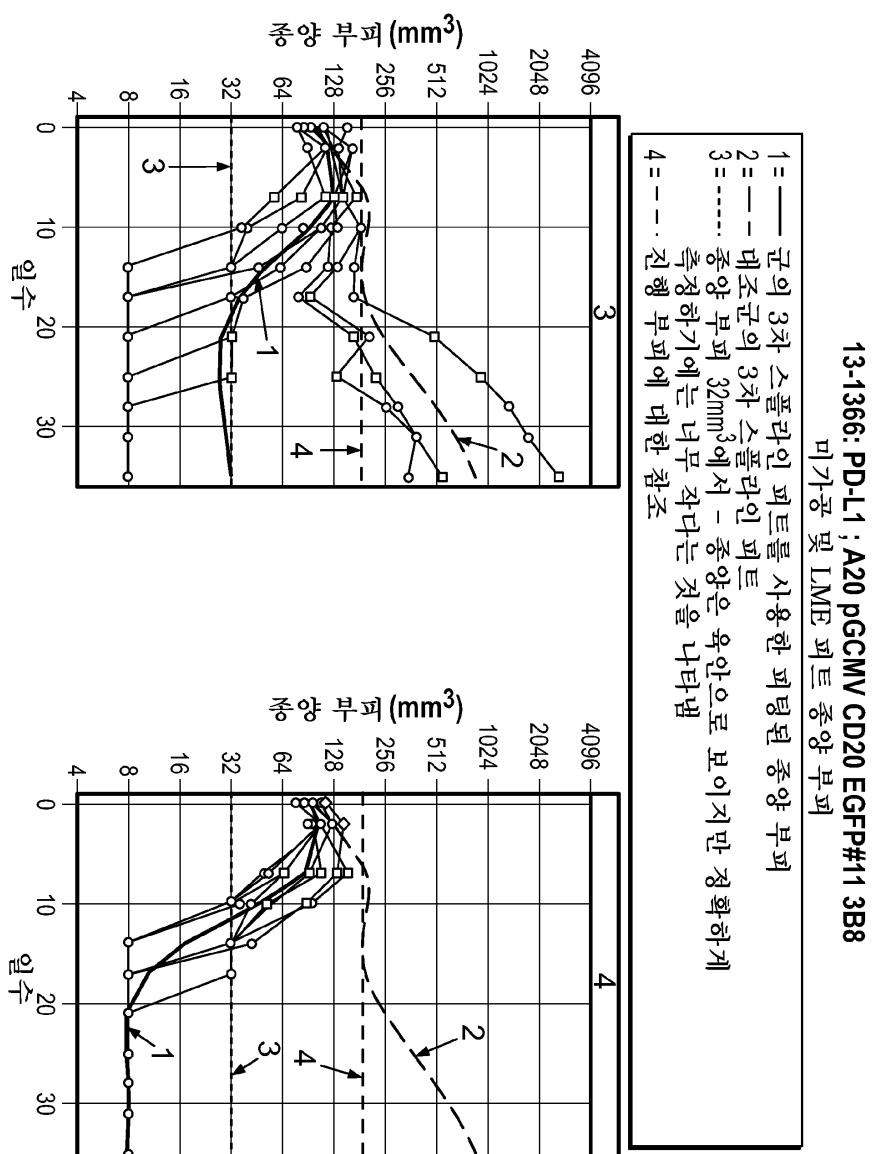
도면2ii



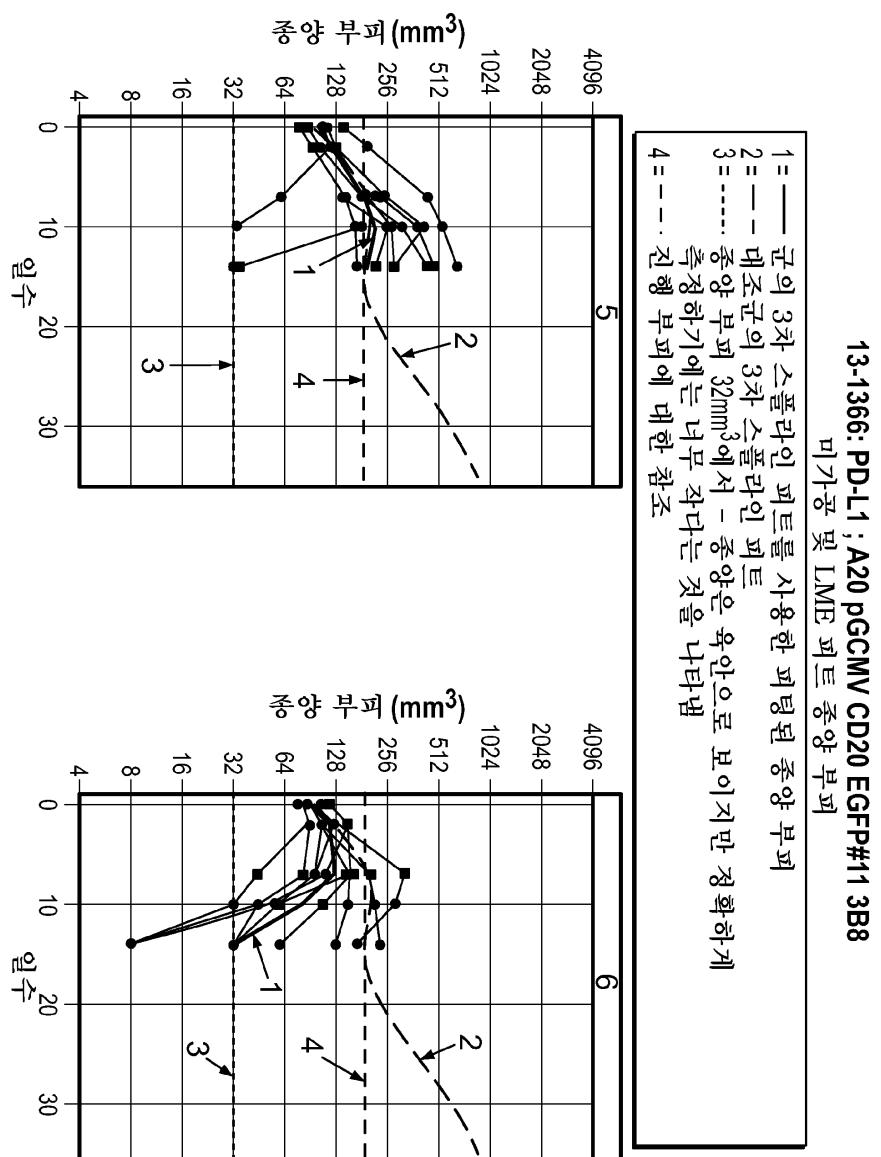
도면3i



도면3ii



도면3iii



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC.

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

Jeong KIM

<120> METHODS OF TREATING CANCER USING PD-1

AXIS BINDING ANTAGONISTS AND AN ANTI-CD20 ANTIBODY

<130> 146392027940

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/034 766

<151> 2014-08-07

<150> US 61/917,264

<151> 2013-12-17

<160> 61

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = Asp or Gly

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Ser Trp Ile His

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

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = Ser or Leu

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

<223> Xaa = Thr or Ser

<400> 2

Ala Trp Ile Xaa Pro Tyr Gly Gly Ser Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 3

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 4

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 5

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

1 5 10

<210> 6

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 6

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 7

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa = Asp or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = Val or Ile

<220>

<221>

> VARIANT

<222> 7

<223> Xaa = Ser or Asn

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa = Ala or Phe

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

<223> Xaa = Val or Leu

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Ala

1

5

10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = F or T

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = Y or A

<400> 9

Ser Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser

1

5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = Tyr, Gly, Phe or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = Leu, Tyr, Phe or Trp

<220>

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa = Tyr, Asn, Ala, Thr, Gly, Phe or Ile

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = His, Val, Pro, Thr or Ile

<220>

<221>

> VARIANT

<222> 8

<223> Xaa = Ala, Trp, Arg, Pro or Thr

<400> 10

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr

1	5
---	---

<210> 11

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 11

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

20

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 12

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

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

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 13

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

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

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

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

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 14

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

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

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 15

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His

1

5

10

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 16

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

1

5

10

15

Lys Gly

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 17

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1

5

10

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 18

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 19

Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr

1 5

<210> 20

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 21

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 21

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 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Tyr Leu Tyr His Pro Ala

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 22

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys

180 185 190

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

195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245	250	255
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val		
260	265	270
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
275	280	285
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
290	295	300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly		
305	310	315
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
325	330	335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr		
340	345	350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
355	360	365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
370	375	380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
385	390	395
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe		
405	410	415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
420	425	430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	
<210> 23		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<400> 23		

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 24

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 25

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 26

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

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

210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445

<210> 27

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 27

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 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Tyr Leu Tyr His Pro Ala

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 28

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 28

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 Thr Phe Ser Asp Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

115 120

<210> 29

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<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 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20	25	30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Tyr Leu Tyr His Pro Ala			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
100	105		

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 30

Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys			
1	5	10	15
Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Leu			

20	25	30
Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp		
35	40	45
Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr		
50	55	60
Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr		
65	70	75
Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly		

85	90	95
Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala		
100	105	110
<210> 31		
<211> 103		

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 31

Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser

1 5 10 15

Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu

20 25 30

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

<210> 32

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 33

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 33

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 34

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 34

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 Val Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 35

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 36

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 37

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 38

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 38

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 Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 39

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 39

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 Tyr Thr Phe Ser Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 40

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 41

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 41

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 42

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 42

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 43

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 44

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 44

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 45

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 46

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 47

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 48

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 49

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 49

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn

85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val

115

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 50

Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr

1 5

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 51

Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp

1 5

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 52

Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr

1 5 10

<210> 53

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 53

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 54

Gln Met Ser Asn Leu Val Ser

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 55

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 56

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 57

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 57

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn

85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val

115

<210> 58

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 58

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

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

210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
435	440	445
<210> 59		
<211> 219		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Construct		
<400> 59		
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly		
1	5	10
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser		
20	25	30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser		
35	40	45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro		
50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
65	70	75
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn		

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

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

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

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

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165	170	175
-----	-----	-----

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

180	185	190
-----	-----	-----

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195	200	205
-----	-----	-----

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210	215	
-----	-----	--

<210> 60

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 60

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50	55	60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145	150	155
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Pro		
225	230	235
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
245	250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445

<210> 61

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 61

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

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

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