



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년04월05일

(11) 등록번호 10-1607288

(24) 등록일자 2016년03월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7029908 (분할)

(22) 출원일자(국제) 2006년06월30일

심사청구일자 2013년12월06일

(85) 번역문제출일자 2013년11월12일

(65) 공개번호 10-2014-0002041

(43) 공개일자 2014년01월07일

(62) 원출원 특허 10-2008-7002586

원출원일자(국제) 2006년06월30일

심사청구일자 2011년05월04일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/026046

(87) 국제공개번호 WO 2007/005874

국제공개일자 2007년01월11일

(30) 우선권주장

60/696,426 2005년07월01일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2004004771 A1

(73) 특허권자

이.알.스퀴부 앤드 선즈, 엘.엘.씨.

미국 뉴저지주 08540 프린스턴 루트 206 앤드 프 로빈스 라인 로드

(72) 발명자

코어만, 알란, 제이.

미국, 94611 캘리포니아, 피드몬트, 엘 세리토 애 브뉴 301

셀비, 마크, 제이.

미국, 94131 캘리포니아, 샌프란시스코, 게일우드 씨클 136

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김태홍, 김진희

전체 청구항 수 : 총 12 항

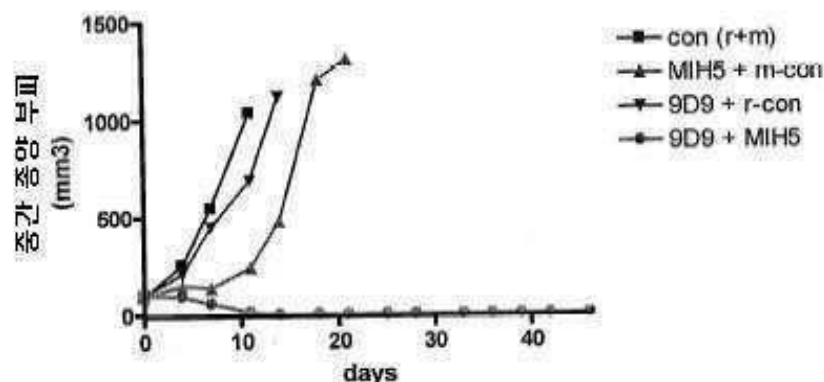
심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 예정 사멸 리간드 1 (피디-엘1)에 대한 인간 모노클로날 항체

(57) 요약

본 발명은 분리된 모노클로날 항체, 특히 PD-L1에 높은 친화도로 특이적으로 결합하는 인간 모노클로날 항체를 제공한다. 본 개시의 항체를 코딩하는 핵산 분자, 발현 벡터, 숙주세포 및 본 개시의 항체를 발현하는 방법이 또한 제공된다. 본 발명의 항체를 포함하는 면역조절제, 바이러스성 분자 및 약학적 조성물이 또한 제공된다. 본 개시는 또한 PD-L1을 검출하는 방법 뿐 아니라 항-PD-L1 항체를 사용하여 암과 감염성 질병을 포함하는 다양한 질병을 치료하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도47



(72) 발명자

왕, 창유

미국, 94555 캘리포니아, 프레몬트, 다윈 드라이브
3803, 에이퍼티. 203

스리니바산, 모한

미국, 95129 캘리포니아, 산 호세, 알링톤 레인
1044

패스모어, 데이비드, 비.

미국, 94070 캘리포니아, 산 카를로스, 헐 드라이브
1630

후앙, 하이춘

미국, 94538 캘리포니아, 프레몬트, 크레스트우드
스트리트 4329

첸, 하이빈

미국, 94087 캘리포니아, 서니배일, 콘네마라 웨이
125, 유니트 28

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위, 및 약학적으로 허용될 수 있는 담체를 포함하는, 흑색종, 신장암, 난소암 및 폐암으로부터 선택된 암 세포의 성장을 억제시키기 위한 조성물로서, 상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 다음을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

SEQ ID NO:22에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1 또는 이의 보존적 변이체;
 SEQ ID NO:32에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2 또는 이의 보존적 변이체;
 SEQ ID NO:42에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3 또는 이의 보존적 변이체;
 SEQ ID NO:52에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1 또는 이의 보존적 변이체;
 SEQ ID NO:62에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2 또는 이의 보존적 변이체; 및
 SEQ ID NO:72에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3 또는 이의 보존적 변이체.

청구항 11

모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위, 및 약학적으로 허용될 수 있는 담체를 포함하는, 흑색종, 신장암, 난소암 및 폐암으로부터 선택된 암 세포의 성장을 억제시키기 위한 조성물로서, 상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 다음을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

SEQ ID NO:2에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 또는 이의 보존적 변이체; 및 SEQ

ID NO:12에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 또는 이의 보존적 변이체.

청구항 12

모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위, 및 약학적으로 허용될 수 있는 담체를 포함하는, 인간 면역결핍 바이러스 질병을 치료하기 위한 조성물로서, 상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 다음을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

SEQ ID NO:22에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1 또는 이의 보존적 변이체;
SEQ ID NO:32에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2 또는 이의 보존적 변이체;
SEQ ID NO:42에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3 또는 이의 보존적 변이체;
SEQ ID NO:52에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1 또는 이의 보존적 변이체;
SEQ ID NO:62에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2 또는 이의 보존적 변이체; 및
SEQ ID NO:72에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3 또는 이의 보존적 변이체.

청구항 13

모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위, 및 약학적으로 허용될 수 있는 담체를 포함하는, 인간 면역결핍 바이러스 질병을 치료하기 위한 조성물로서, 상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 다음을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

SEQ ID NO:2에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 또는 이의 보존적 변이체; 및 SEQ ID NO:12에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 또는 이의 보존적 변이체.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

치료적 제제에 연결(link)된 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위를 포함하는 면역컨쥬게이트 및 약학적으로 허용될 수 있는 담체를 포함하는, 흑색종, 신장암, 난소암 및 폐암으로부터 선택된 암 세포의 성장을 억제시키기 위한 조성물로서, 상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 다음을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

SEQ ID NO:22에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1 또는 이의 보존적 변이체;
SEQ ID NO:32에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2 또는 이의 보존적 변이체;
SEQ ID NO:42에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3 또는 이의 보존적 변이체;
SEQ ID NO:52에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1 또는 이의 보존적 변이체;
SEQ ID NO:62에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2 또는 이의 보존적 변이체; 및
SEQ ID NO:72에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3 또는 이의 보존적 변이체.

청구항 17

치료적 제제에 연결된 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위를 포함하는 면역컨쥬게이트 및 약학적으로 허용될 수 있는 담체를 포함하는, 흑색종, 신장암, 난소암 및 폐암으로부터 선택된 암 세포의 성장을 억제시키기 위한 조성물로서, 상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 다음을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

SEQ ID NO:2에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 또는 이의 보존적 변이체; 및 SEQ ID NO:12에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 또는 이의 보존적 변이체.

청구항 18

치료적 제제에 연결된 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위를 포함하는 면역컨쥬게이트 및 약학적으로 허

용될 수 있는 담체를 포함하는, 인간 면역결핍 바이러스 질병을 치료하기 위한 조성물로서, 상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 다음을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

SEQ ID NO:22에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1 또는 이의 보존적 변이체;
SEQ ID NO:32에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2 또는 이의 보존적 변이체;
SEQ ID NO:42에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3 또는 이의 보존적 변이체;
SEQ ID NO:52에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1 또는 이의 보존적 변이체;
SEQ ID NO:62에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2 또는 이의 보존적 변이체; 및
SEQ ID NO:72에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3 또는 이의 보존적 변이체.

청구항 19

치료적 제제에 연결된 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위를 포함하는 면역컨쥬게이트 및 약학적으로 허용될 수 있는 담체를 포함하는, 인간 면역결핍 바이러스 질병을 치료하기 위한 조성물로서, 상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 다음을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

SEQ ID NO:2에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 또는 이의 보존적 변이체; 및 SEQ ID NO:12에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 또는 이의 보존적 변이체.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

약학적으로 허용될 수 있는 담체 및 바이스페시픽 분자를 포함하는, 흑색종, 신장암, 난소암 및 폐암으로부터 선택된 암 세포의 성장을 억제시키기 위한 조성물로서, 상기 바이스페시픽 분자는 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위를 포함하고, 상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 다음을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

SEQ ID NO:22에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1 또는 이의 보존적 변이체;
SEQ ID NO:32에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2 또는 이의 보존적 변이체;
SEQ ID NO:42에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3 또는 이의 보존적 변이체;
SEQ ID NO:52에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1 또는 이의 보존적 변이체;
SEQ ID NO:62에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2 또는 이의 보존적 변이체; 및
SEQ ID NO:72에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3 또는 이의 보존적 변이체.

청구항 24

약학적으로 허용될 수 있는 담체 및 바이스페시픽 분자를 포함하는, 흑색종, 신장암, 난소암 및 폐암으로부터 선택된 암 세포의 성장을 억제시키기 위한 조성물로서, 상기 바이스페시픽 분자는 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위를 포함하고, 상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 다음을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

SEQ ID NO:2에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 또는 이의 보존적 변이체; 및 SEQ ID NO:12에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 또는 이의 보존적 변이체.

청구항 25

약학적으로 허용될 수 있는 담체 및 바이스페시픽 분자를 포함하는, 인간 면역결핍 바이러스 질병을 치료하기 위한 조성물로서, 상기 바이스페시픽 분자는 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위를 포함하고, 상기 모노

클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 다음을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

SEQ ID NO:22에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1 또는 이의 보존적 변이체;
 SEQ ID NO:32에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2 또는 이의 보존적 변이체;
 SEQ ID NO:42에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3 또는 이의 보존적 변이체;
 SEQ ID NO:52에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1 또는 이의 보존적 변이체;
 SEQ ID NO:62에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2 또는 이의 보존적 변이체; 및
 SEQ ID NO:72에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3 또는 이의 보존적 변이체.

청구항 26

약학적으로 허용될 수 있는 담체 및 바이러스성 분자를 포함하는, 인간 면역결핍 바이러스 질병을 치료하기 위한 조성물로서, 상기 바이러스성 분자는 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위를 포함하고, 상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 다음을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물:

SEQ ID NO:2에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 중사슬 가변영역 또는 이의 보존적 변이체; 및 SEQ ID NO:12에 제시된 시퀀스를 갖는 아미노산을 포함하는 경사슬 가변영역 또는 이의 보존적 변이체.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 크로스-레퍼런스(Cross-Reference to Related Applications)

[0002] 본 출원은 그 전체로서 참고로 여기에 편입되어진 2005년 7월 1일자로 출원된 미국 가특허 출원 제60/696,426호의 이점을 청구한다.

배경 기술

[0003] 예정 사멸 1 (PD-1)은 CD28 패밀리의 수용체의 구성원으로, CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1, 및 BTLA를 포함한다. 패밀리의 최초 구성원인 CD28 및 ICOS은 모노클로날 항체의 부가에 따른 T 세포 증식을 증대하는 것에 대한 기능적 효과에 의해 발견되었다 (Hutloff *et al.* (1999) *Nature* 397:263-266; Hansen *et al.* (1980) *Immunogenics* 10:247-260). PD-1에 대한 두 세포 표면 당단백질 리간드는 PD-L1 및 PD-L2로 동정되었고, PD-1에 결합하는 것에 의해 T 세포 활성화 및 시토킨 분비를 다운레귤레이션하는 것을 보여주었다 (Freeman *et al.* (2000) *J Exp Med* 192: 1027-34; Latchman *et al.* (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter *et al.* (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43; Ohigashi *et al.* (2005) *Clin Cancer Res* 11:2947-53). PD-L1 (B7-H1) 및 PD-L2 (B7-DC) 양자는 PD-1에는 결합하지만 다른 CD28 패밀리 구성원에는 결합하지 않는 B7 동족체이다 (Blank *et al.* (2004)). 세포 표면 상에 PD-L1의 발현은 또한 IFN- γ 자극을 통하여 업레귤레이션되어 지는 것으로 나타났다.

[0004] PD-L1 발현은 인간의 폐, 난소 및 결장암과 각종 골수종을 포함하는 몇몇 묶여진 및 인간 암에서 발견되었다 (Iwai *et al.* (2002) *PNAS* 99:12293-7; Ohigashi *et al.* (2005) *Clin Cancer Res* 11:2947-53). PD-L1은 항원-특이적 T-세포 클론의 아포토시스(세포자살)를 증진함에 의해 중앙 면역학에서 역할을 하는 것으로 제안되어 왔다 (Dong *et al.* (2002) *Nat Med* 8:793-800). 또한, PD-L1은 결장암과 연계된 PD-L1 억제 소모성 질병의 저해 및 장내 점막 염증화에 포함되어 질 것이라고 제안되어 있다 (Kanai *et al.* (2003) *J Immunol* 171:4156-63).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 분리된 모노클로날 항체를 제공하며, 특히 PD-L1에 결합하고 다수의 바람직한 특성을 나타내는 인간 모노클로날 항체를 제공한다.

[0006] 본 발명은 분리된 모노클로날 항체, 특히 PD-L1에 높은 친화도로 특이적으로 결합하는 인간 모노클로날 항체를 제공한다.

[0007] 본 개시의 항체를 코딩하는 핵산 분자, 발현 벡터, 숙주세포 및 본 개시의 항체를 발현하는 방법이 또한 제공된다.

[0008] 본 발명의 항체를 포함하는 면역진주제이트, 바이오스페시픽 분자 및 약학적 조성물이 또한 제공된다.

[0009] 본 개시는 또한 PD-L1을 검출하는 방법 뿐 아니라 항-PD-L1 항체를 사용하여 암과 감염성 질병을 포함하는 다양한 질병을 치료하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 분리된 모노클로날 항체를 제공하며, 특히 PD-L1에 결합하고 다수의 바람직한 특성을 나타내는 인간 모노클로날 항체를 제공한다. 이들 특성은 인간 PD-L1에 대한 높은 친화성을 포함한다. 더욱이, 본 발명의 항체는 혼합된 림프구 반응에서 T-세포 증식, IFN- γ 분비 및 IL-2 분비를 증가하는 것을 보여주었다.

[0011] 일 측면에 있어서, 본 발명은 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원-결합 부위에 관한 것이며, 여기서 항체는 다음 특성의 적어도 하나를 보여준다:

[0012] (a) 1×10^{-7} M 또는 그 이하의 K_D 로 인간 PD-L1에 결합;

[0013] (b) 혼합된 림프구 반응(MLR) 분석에서 T-세포 증식 증가;

[0014] (c) MLR 분석에서 인터페론- γ 생산성 증가;

[0015] (d) MLR 분석에서 IL-2 분비 증가;

- [0016] (e) 항체 반응 자극; 또는
- [0017] (f) T 세포 이펙터 세포 및/또는 수지상 세포에 대한 T 조절 세포의 효과 반전.
- [0018] 비록 대안적으로 항체는, 예를 들어 묶어린 항체, 키메라 항체 또는 인체 적응 항체일 수 있지만, 바람직하기로는, 항체는 인간 항체이다.
- [0019] 바람직한 실시형태에서, 항체는 인간 PD-L1에 5×10^{-8} M 또는 그 이하의 K_D 로 결합하고, 인간 PD-L1에 1×10^{-8} M 또는 그 이하의 K_D 로 결합하고, 인간 PD-L1에 5×10^{-9} M 또는 그 이하의 K_D 로 결합하고, 인간 PD-L1에 5×10^{-9} M 또는 그 이하의 K_D 로 결합하고, 인간 PD-L1에 1×10^{-8} M 내지 1×10^{-10} M 사이의 K_D 로 결합한다.
- [0020] 다른 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부위를 제공하고, 여기서 항체는 다음을 포함하는 레퍼런스 항체와 PD-L1에 결합에 대해 교차 경쟁을 한다:
- [0021] (a) 인간 중사슬 가변 영역은 SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 및 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함함; 및
- [0022] (b) 인간 경사슬 가변 영역은 SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함함.
- [0023] 다양한 실시형태에서, 레퍼런스 항체는 다음을 포함한다:
- [0024] (a) SEQ ID NO:1의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변 영역; 및
- [0025] (b) SEQ ID NO:11의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변 영역;
- [0026] 또는 다른 레퍼런스 항체는 다음을 포함한다:
- [0027] (a) SEQ ID NO:2의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변 영역; 및
- [0028] (b) SEQ ID NO:12의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변 영역;
- [0029] 또는 다른 레퍼런스 항체는 다음을 포함한다:
- [0030] (a) SEQ ID NO:3의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변 영역; 및
- [0031] (b) SEQ ID NO:13의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변 영역;
- [0032] 또는 다른 레퍼런스 항체는 다음을 포함한다:
- [0033] (a) SEQ ID NO:4의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변 영역; 및
- [0034] (b) SEQ ID NO:14의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변 영역;
- [0035] 또는 다른 레퍼런스 항체는 다음을 포함한다:
- [0036] (a) SEQ ID NO:5의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변 영역; 및
- [0037] (b) SEQ ID NO:15의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변 영역;
- [0038] 또는 다른 레퍼런스 항체는 다음을 포함한다:
- [0039] (a) SEQ ID NO:6의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변 영역; 및
- [0040] (b) SEQ ID NO:16의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변 영역;
- [0041] 또는 다른 레퍼런스 항체는 다음을 포함한다:
- [0042] (a) SEQ ID NO:7의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변 영역; 및
- [0043] (b) SEQ ID NO:17의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변 영역;
- [0044] 또는 다른 레퍼런스 항체는 다음을 포함한다:
- [0045] (a) SEQ ID NO:8의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변 영역; 및

- [0046] (b) SEQ ID NO:18의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변 영역;
- [0047] 또는 다른 레퍼런스 항체는 다음을 포함한다:
- [0048] (a) SEQ ID NO:9의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변 영역; 및
- [0049] (b) SEQ ID NO:19의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변 영역;
- [0050] 또는 다른 레퍼런스 항체는 다음을 포함한다:
- [0051] (a) SEQ ID NO:10의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변 영역; 및
- [0052] (b) SEQ ID NO:20의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변 영역.
- [0053] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 V_H 1-18 유전자로부터 유래되거나 또는 그의 생산물인 중사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분에 관한 것으로, 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 본 발명은 더욱이 인간 V_H 1-69 유전자로부터 유래되거나 또는 그의 생산물인 중사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하는 것으로, 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 본 발명은 더욱이 인간 V_H 1-3 유전자로부터 유래되거나 또는 그의 생산물인 중사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하는 것으로, 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 본 발명은 더욱이 인간 V_H 3-9 유전자로부터 유래되거나 또는 그의 생산물인 중사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하는 것으로, 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 본 발명은 더욱이 인간 V_K L6 유전자로부터 유래되거나 또는 그의 생산물인 경사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하는 것으로, 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 본 발명은 더욱이 인간 V_K L1 5 유전자로부터 유래되거나 또는 그의 생산물인 경사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하는 것으로, 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 본 발명은 더욱이 인간 V_K A27 유전자로부터 유래되거나 또는 그의 생산물인 경사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하는 것으로, 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 본 발명은 더욱이 인간 V_K L1 8 유전자로부터 유래되거나 또는 그의 생산물인 경사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하는 것으로, 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합한다.
- [0054] 특히 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 다음을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공한다:
- [0055] (a) 인간 V_H 1-18 유전자의 중사슬 가변영역; 및
- [0056] (b) 인간 V_K L6 유전자의 경사슬 가변영역;
- [0057] 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합함.
- [0058] 또 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 다음을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공한다:
- [0059] (a) 인간 V_H 1-69 유전자의 중사슬 가변영역; 및
- [0060] (b) 인간 V_K L6 유전자의 경사슬 가변영역;
- [0061] 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합함.
- [0062] 또 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 다음을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공한다:
- [0063] (a) 인간 V_H 1-3 유전자의 중사슬 가변영역; 및
- [0064] (b) 인간 V_K L15 유전자의 경사슬 가변영역;
- [0065] 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합함.

- [0066] 또 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 다음을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공한다:
- [0067] (a) 인간 V_H 1-69 유전자의 중사슬 가변영역; 및
- [0068] (b) 인간 V_K A27 유전자의 경사슬 가변영역;
- [0069] 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합함.
- [0070] 또 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 다음을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공한다:
- [0071] (a) 인간 V_H 3-9 유전자의 중사슬 가변영역; 및
- [0072] (b) 인간 V_K L15 유전자의 경사슬 가변영역;
- [0073] 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합함.
- [0074] 또 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 다음을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공한다:
- [0075] (a) 인간 V_H 3-9 유전자의 중사슬 가변영역; 및
- [0076] (b) 인간 V_K L18 유전자의 경사슬 가변영역;
- [0077] 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합함.
- [0078] 또 다른 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하고;
- [0079] CDR13 CDR2, 및 CDR3 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및
- [0080] CDR1, CDR2, 및 CDR3 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역, 여기서:
- [0081] (a) 중사슬 가변영역 CDR3 시퀀스는 SEQ ID NOs:41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 및 50으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스 및 이들의 보존적 변이체류를 포함함;
- [0082] (b) 경사슬 가변영역 CDR3 시퀀스는 SEQ ID NOs:71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 및 80으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스 및 이들의 보존적 변이체류를 포함함; 및
- [0083] (c) 항체는 인간 PD-L1에 특이적으로 결합함.
- [0084] 바람직하기로는, 중사슬 가변영역 CDR2 시퀀스는 SEQ ID NOs:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 및 40의 아미노산 시퀀스로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스 및 이들의 보존적 변이체류를 포함하고; 그리고 경사슬 가변영역 CDR2 시퀀스는 SEQ ID NOs:61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 및 70의 아미노산 시퀀스로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스 및 이들의 보존적 변이체류를 포함한다. 바람직하기로는, 중사슬 가변영역 CDR1 시퀀스는 SEQ ID NOs:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 및 30의 아미노산 시퀀스로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스 및 이들의 보존적 변이체류를 포함하고; 그리고 경사슬 가변영역 CDR1 시퀀스는 SEQ ID NOs:51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 및 60의 아미노산 시퀀스로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스 및 이들의 보존적 변이체류를 포함한다.
- [0085] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 중사슬 가변영역 및 경사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하고; 여기서
- [0086] (a) 중사슬 가변영역은 SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 및 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스에 적어도 80% 유사한 아미노산 시퀀스를 포함하고;
- [0087] (b) 경사슬 가변영역은 SEQ ID NOs:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스에 적어도 80% 유사한 아미노산 시퀀스를 포함하고; 그리고
- [0088] (c) 항체는 인간 PD-L1에 $1 \times 10^{-7} M$ 또는 그 이하의 K_D 로 결합한다.

- [0089] 바람직한 실시형태에서, 항체는 부가적으로 적어도 하나의 다음의 특성을 포함한다:
- [0090] (a) 항체는 혼합된 림프구 반응 (MLR) 분석에서 T-증식을 증진함;
- [0091] (b) 항체는 MLR 분석에서 인터페론- γ 생산을 증진함; 또는
- [0092] (c) 항체는 MLR 분석에서 IL-2 분비를 증진함.
- [0093] 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공한다:
- [0094] (a) SEQ ID NOs:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 및 30으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0095] (b) SEQ ID NOs:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 및 40으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0096] (c) SEQ ID NOs:41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 및 50으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0097] (d) SEQ ID NOs:51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 및 60으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0098] (e) SEQ ID NOs:61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 및 70으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 그리고
- [0099] (f) SEQ ID NOs:71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 및 80으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3;
- [0100] 여기서, 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합함.
- [0101] 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0102] (a) SEQ ID NO:21을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0103] (b) SEQ ID NO:31을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0104] (c) SEQ ID NO:41을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0105] (d) SEQ ID NO:51을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0106] (e) SEQ ID NO:61을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0107] (f) SEQ ID NO:71을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0108] 다른 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0109] (a) SEQ ID NO:22을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0110] (b) SEQ ID NO:32을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0111] (c) SEQ ID NO:42을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0112] (d) SEQ ID NO:52을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0113] (e) SEQ ID NO:62을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0114] (f) SEQ ID NO:72을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0115] 다른 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0116] (a) SEQ ID NO:23을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0117] (b) SEQ ID NO:33을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0118] (c) SEQ ID NO:43을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0119] (d) SEQ ID NO:53을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;

- [0120] (e) SEQ ID NO:63을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0121] (f) SEQ ID NO:73을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0122] 다른 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0123] (a) SEQ ID NO:24을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0124] (b) SEQ ID NO:34을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0125] (c) SEQ ID NO:44을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0126] (d) SEQ ID NO:54을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0127] (e) SEQ ID NO:64을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0128] (f) SEQ ID NO:74을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0129] 다른 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0130] (a) SEQ ID NO:25을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0131] *(b) SEQ ID NO:35을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0132] (c) SEQ ID NO:45을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0133] (d) SEQ ID NO:55을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0134] (e) SEQ ID NO:65을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0135] (f) SEQ ID NO:75을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0136] 다른 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0137] (a) SEQ ID NO:26을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0138] (b) SEQ ID NO:36을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0139] (c) SEQ ID NO:46을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0140] (d) SEQ ID NO:56을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0141] (e) SEQ ID NO:66을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0142] (f) SEQ ID NO:76을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0143] 다른 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0144] (a) SEQ ID NO:27을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0145] (b) SEQ ID NO:37을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0146] (c) SEQ ID NO:47을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0147] (d) SEQ ID NO:57을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0148] (e) SEQ ID NO:67을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0149] (f) SEQ ID NO:77을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0150] 다른 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0151] (a) SEQ ID NO:28을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0152] (b) SEQ ID NO:38을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0153] *(c) SEQ ID NO:48을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;

- [0154] (d) SEQ ID NO:58을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0155] (e) SEQ ID NO:68을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0156] (f) SEQ ID NO:78을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0157] 다른 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0158] (a) SEQ ID NO:29을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0159] (b) SEQ ID NO:39을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0160] (c) SEQ ID NO:49을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0161] (d) SEQ ID NO:59을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0162] (e) SEQ ID NO:69을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0163] (f) SEQ ID NO:79을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0164] 다른 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0165] (a) SEQ ID NO:30을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0166] (b) SEQ ID NO:40을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0167] (c) SEQ ID NO:50을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0168] (d) SEQ ID NO:60을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0169] (e) SEQ ID NO:70을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0170] (f) SEQ ID NO:80을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0171] 본 발명의 다른 바람직한 항체 또는 이들의 항원 결합 부분은 다음을 포함한다:
- [0172] (a) SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 및 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및
- [0173] (b) SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역;
- [0174] 여기서, 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합함.
- [0175] 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0176] (a) SEQ ID NO:1의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및
- [0177] (b) SEQ ID NO:11의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역.
- [0178] 다른 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0179] (a) SEQ ID NO:2의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및
- [0180] (b) SEQ ID NO:12의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역.
- [0181] 다른 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0182] (a) SEQ ID NO:3의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및
- [0183] (b) SEQ ID NO:13의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역.
- [0184] 다른 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0185] (a) SEQ ID NO:4의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및
- [0186] (b) SEQ ID NO:14의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역.
- [0187] 다른 바람직한 조합을 다음을 포함한다:

- [0188] (a) SEQ ID NO:5의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및
- [0189] (b) SEQ ID NO:15의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역.
- [0190] 다른 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0191] (a) SEQ ID NO:6의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및
- [0192] (b) SEQ ID NO:16의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역.
- [0193] 다른 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0194] (a) SEQ ID NO:7의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및
- [0195] (b) SEQ ID NO:17의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역.
- [0196] 다른 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0197] (a) SEQ ID NO:8의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및
- [0198] (b) SEQ ID NO:18의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역.
- [0199] 다른 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0200] (a) SEQ ID NO:9의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및
- [0201] (b) SEQ ID NO:19의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역.
- [0202] 다른 바람직한 조합을 다음을 포함한다:
- [0203] (a) SEQ ID NO:10의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및
- [0204] (b) SEQ ID NO:20의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역.
- [0205] 본 개시의 또 다른 측면에 있어서는, PD-L1에 대한 결합에 대해 상기 언급된 어떤 항체와 경쟁하는 항체 또는 이들의 항원 결합 부분이 제공된다.
- [0206] 본 개시의 항원은 예를 들어 전 길이의 항원, 예를 들어 IgG1 또는 IgG4 이소타입의 것일 수 있다. 대안적으로는, 항체는 Fab 또는 Fab'2 분획, 또는 단일 사슬 항체와 같은 항체 분획일 수 있다.
- [0207] 본 개시는 또한 세포독소 또는 방사성동위원소와 같은 치료적 제제와 연계된, 본 발명의 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 포함하는 면역결합제를 제공한다. 본 발명은 또한 상기 항체 또는 이들의 항원 결합부분 보다 다른 결합 특이성을 갖는 제이 관능부에 연계된, 본 발명의 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 포함하는 바이스페시픽 분자(bispecific molecule)를 제공한다
- [0208] 본 개시의 항체 또는 이들의 항원 결합 부분, 또는 면역결합제 또는 바이스페시픽 분자 및 약학적으로 허용될 수 있는 담체를 포함하는 조성물이 또한 제공된다.
- [0209] 본 발명의 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 코딩하는 핵산 분자가 또한 본 발명에 의해 포함될 뿐 아니라 이러한 핵산을 포함하는 발현 벡터 및 이러한 발현 벡터를 포함하는 숙주세포도 본 발명에 의해 포함된다. 더욱이, 본 발명은 인간 면역글로불린 중 및 경사슬 트랜스유전자를 포함하는 트랜스유전자의 마우스를 제공하고, 여기서 마우스는 본 발명의 항체 뿐 아니라 이러한 마우스로부터 제조된 하이브리도마를 발현하고, 이 하이브리도마는 본 발명의 항체를 생산한다.
- [0210] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 대상에 있어서 면역 반응이 조절되어 지도록 본 발명의 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 대상에 투여하는 것을 포함하는 대상에 있어서의 면역 반응을 조절하는 방법을 제공한다. 바람직하기로는, 본 발명의 항체는 대상에서 면역 반응을 고양, 자극 또는 증진한다.
- [0211] 더 다른 측면에 있어서, 본 발명은 치료적으로 유효량의 항-PD-L1 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 대상에 투여하는 것을 포함하는 대상에 있어서의 종양 세포의 성장을 저해하는 방법을 제공한다. 본 발명의 항체는 비록 다른 항-PD-L1 항체가 대신 (또는 본 발명의 항-PD-L1 항체와 조합하여) 사용될 수 있지만 이 방법에서의 사용에 바람직하다. 예를 들어, 카메르, 인체적용된 또는 완전 인간 항-PD-L1 항체가 종양성장을 저해하는 방법에 사용될 수 있다.
- [0212] 더욱이 다른 측면에 있어서, 본 발명은 치료적으로 유효량의 항-PD-L1 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 대상

에 투여하는 것을 포함하는 대상에 있어서의 감염성 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 항체는 비록 다른 항-PD-L1 항체가 대신 (또는 본 발명의 항-PD-L1 항체와 조합하여) 사용될 수 있지만 이 방법에서의 사용에 바람직하다. 예를 들어, 카메르, 인체적용된 또는 완전 인간 항-PD-L1 항체가 감염성 질병을 치료하는 방법에 사용될 수 있다.

[0213] 더 더욱이, 본 발명은 대상에 있어서 항원에 대한 면역 반응이 고양되어 지도록 (i) 항원; 및 (ii) 항-PD-L1 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 대상에 투여하는 것을 포함하는 대상에 있어서의 항원에 대한 면역 반응을 고양하는 방법을 제공한다. 항원은 예를 들어, 종양 항원, 바이러스 항원, 세균 항원, 또는 병원체로부터의 항원일 수 있다. 본 발명의 항체는 비록 다른 항-PD-L1 항체가 대신 (또는 본 발명의 항-PD-L1 항체와 조합하여) 사용될 수 있지만 이 방법에서의 사용에 바람직하다. 예를 들어, 카메르, 인체적용된 또는 완전 인간 항-PD-L1 항체가 대상에서 항원에 대한 면역 반응을 고양하는 방법에 사용될 수 있다.

[0214] 본 발명은 또한 여기에서 제공되는 항-PD-L1 항체의 시퀀스에 기하여 "제이세대" 항-PD-L1 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 다음을 포함하는 항-PD-L1 항체를 제조하기 위한 방법을 제공한다:

[0215] (a) 제공: (i) SEQ ID NOs:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 및 30으로 구성된 군으로부터 선택된 CDR1 시퀀스, SEQ ID NOs:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 및 40으로 구성된 군으로부터 선택된 CDR2 시퀀스, 및 SEQ ID NOs:41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 및 50으로 구성된 군으로부터 선택된 CDR3 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역 항체 시퀀스; 또는 (ii) SEQ ID NOs:51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 및 60으로 구성된 군으로부터 선택된 CDR1 시퀀스, SEQ ID NOs:61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 및 70으로 구성된 군으로부터 선택된 CDR2 시퀀스, 및 SEQ ID NOs:71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 및 80으로 구성된 군으로부터 선택된 CDR3 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역 항체 시퀀스;

[0216] (b) 적어도 하나의 가변영역 항체 시퀀스 내의 적어도 하나의 아미노산 잔기를 개사하는 것, 상기 시퀀스는 적어도 하나의 개사된 항체 시퀀스를 만들기 위해 중사슬 가변영역 항체 시퀀스 및 경사슬 가변영역 항체 시퀀스로부터 선택된 것임; 및

[0217] (c) 개사된 항체 시퀀스를 단백질로 발현.

[0218] 본 발명의 다른 특징 및 이점은, 한정하는 것으로 해석되지 않는 다음의 자세한 설명 및 실시예로부터 명백해질 것이다. 본 출원 전체를 통해 인용된 모든 참고문헌, 유전자은행 기재사항, 특허 및 공개된 특허출원의 내용은 참고로 여기에 확실하게 편입된다.

도면의 간단한 설명

[0219] 도 1a는 3G10 인간 모노클로날 항체의 중사슬 가변영역의 뉴클레오타이드 시퀀스 (SEQ ID NO:81) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:1)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:21), CDR2 (SEQ ID NO:31) 및 CDR3 (SEQ ID NO:41) 영역이 묘사되고, V, D 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 1b는 3G10 인간 모노클로날 항체의 경사슬 가변영역의 뉴클레오타이드 시퀀스 (SEQ ID NO:91) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:11)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:51), CDR2 (SEQ ID NO:61) 및 CDR3 (SEQ ID NO:71) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 2a는 12A4 인간 모노클로날 항체의 중사슬 가변영역의 뉴클레오타이드 시퀀스 (SEQ ID NO:82) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:2)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:22), CDR2 (SEQ ID NO:32) 및 CDR3 (SEQ ID NO:42) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 2b는 12A4 인간 모노클로날 항체의 경사슬 가변영역의 뉴클레오타이드 시퀀스 (SEQ ID NO:92) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:12)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:52), CDR2 (SEQ ID NO:62) 및 CDR3 (SEQ ID NO: 72) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 3a는 10A5 인간 모노클로날 항체의 중사슬 가변영역의 뉴클레오타이드 시퀀스 (SEQ ID NO:83) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:3)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:23), CDR2 (SEQ ID NO:33) 및 CDR3 (SEQ ID NO:43) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 3b는 10A5 인간 모노클로날 항체의 경사슬 가변영역의 뉴클레오타이드 시퀀스 (SEQ ID NO:93) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:13)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:53), CDR2 (SEQ ID NO:63) 및 CDR3 (SEQ ID NO:73) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 4a는 5F8 인간 모노클로날 항체의 중사슬 가변영역의 뉴클레오티드 시퀀스 (SEQ ID NO:84) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:4)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:24), CDR2 (SEQ ID NO:34) 및 CDR3 (SEQ ID NO:44) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 4b는 5F8 인간 모노클로날 항체의 경사슬 가변영역의 뉴클레오티드 시퀀스 (SEQ ID NO:94) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:14)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:54), CDR2 (SEQ ID NO:64) 및 CDR3 (SEQ ID NO:74) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 5a는 10H10 인간 모노클로날 항체의 중사슬 가변영역의 뉴클레오티드 시퀀스 (SEQ ID NO:85) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:5)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:25), CDR2 (SEQ ID NO:35) 및 CDR3 (SEQ ID NO:45) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 5b는 10H10 인간 모노클로날 항체의 경사슬 가변영역의 뉴클레오티드 시퀀스 (SEQ ID NO:95) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:15)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:55), CDR2 (SEQ ID NO:65) 및 CDR3 (SEQ ID NO:75) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 6a는 1B12 인간 모노클로날 항체의 중사슬 가변영역의 뉴클레오티드 시퀀스 (SEQ ID NO:86) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:6)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:26), CDR2 (SEQ ID NO:36) 및 CDR3 (SEQ ID NO:46) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 6b는 1B12 인간 모노클로날 항체의 경사슬 가변영역의 뉴클레오티드 시퀀스 (SEQ ID NO:96) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:16)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:56), CDR2 (SEQ ID NO:66) 및 CDR3 (SEQ ID NO: 76) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 7a는 7H1 인간 모노클로날 항체의 중사슬 가변영역의 뉴클레오티드 시퀀스 (SEQ ID NO:87) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:7)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:27), CDR2 (SEQ ID NO:37) 및 CDR3 (SEQ ID NO:47) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 7b는 7H1 인간 모노클로날 항체의 경사슬 가변영역의 뉴클레오티드 시퀀스 (SEQ ID NO:97) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:17)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:57), CDR2 (SEQ ID NO:67) 및 CDR3 (SEQ ID NO: 77) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 8a는 11E6 인간 모노클로날 항체의 중사슬 가변영역의 뉴클레오티드 시퀀스 (SEQ ID NO:88) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:8)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:28), CDR2 (SEQ ID NO:38) 및 CDR3 (SEQ ID NO:48) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 8b는 11E6 인간 모노클로날 항체의 경사슬 가변영역의 뉴클레오티드 시퀀스 (SEQ ID NO:98) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:18)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:58), CDR2 (SEQ ID NO:68) 및 CDR3 (SEQ ID NO:78) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 9a는 12B7 인간 모노클로날 항체의 중사슬 가변영역의 뉴클레오티드 시퀀스 (SEQ ID NO:89) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:9)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:29), CDR2 (SEQ ID NO:39) 및 CDR3 (SEQ ID NO:49) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 9b는 12B7 인간 모노클로날 항체의 경사슬 가변영역의 뉴클레오티드 시퀀스 (SEQ ID NO:99) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:19)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:59), CDR2 (SEQ ID NO:69) 및 CDR3 (SEQ ID NO: 79) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 10a는 13G4 인간 모노클로날 항체의 중사슬 가변영역의 뉴클레오티드 시퀀스 (SEQ ID NO:90) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:10)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:30), CDR2 (SEQ ID NO:40) 및 CDR3 (SEQ ID NO: 50) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 10b는 13G4 인간 모노클로날 항체의 경사슬 가변영역의 뉴클레오티드 시퀀스 (SEQ ID NO:100) 및 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:20)를 나타낸다. CDR1 (SEQ ID NO:60), CDR2 (SEQ ID NO:70) 및 CDR3 (SEQ ID NO: 80) 영역이 묘사되고, V 및 J 생식계열 유래가 표시되었다.

도 11은 인간 생식계열 V_H 1-18 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO:101)를 갖는 3G10 (SEQ ID NO:1)의 중사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다.

- 도 12는 인간 생식계열 V_H 1-69 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 102)를 갖는 12A4 (SEQ ID NO:2)의 중사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JH6b 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:110으로 개시되어 졌다.
- 도 13은 인간 생식계열 V_H 1-3 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 103)를 갖는 10A5 (SEQ ID NO:3)의 중사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JH4b 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:111로 개시되어 졌다. _
- 도 14는 인간 생식계열 V_H 1-69 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 102)를 갖는 5F8 (SEQ ID NO:4)의 중사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JH4b 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:111로 개시되어 졌다.
- 도 15는 인간 생식계열 V_H 3-9 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 104)를 갖는 10H10 (SEQ ID NO:5)의 중사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JH4b 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:111로 개시되어 졌다.
- 도 16은 인간 생식계열 V_H 1-69 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 102)를 갖는 1B12 (SEQ ID NO:6)의 중사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JH6b 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:110으로 개시되어 졌다.
- 도 17은 인간 생식계열 V_H 1-69 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 102)를 갖는 7H1 (SEQ ID NO:7)의 중사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JH6b 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:110으로 개시되어 졌다.
- 도 18은 인간 생식계열 V_H 1-69 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 102)를 갖는 11E6 (SEQ ID NO:8)의 중사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JH6c 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:112로 개시되어 졌다.
- 도 19는 인간 생식계열 V_H 1-69 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 102)를 갖는 12B7 (SEQ ID NO:9)의 중사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JH6b 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:110으로 개시되어 졌다.
- 도 20은 인간 생식계열 V_H 3-9 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 104)를 갖는 13G4 (SEQ ID NO: 10)의 중사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JH4b 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:113으로 개시되어 졌다.
- 도 21은 인간 생식계열 V_K L6 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 105)를 갖는 3G10 (SEQ ID NO:11)의 경사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JK1 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:114로 개시되어 졌다.
- 도 22는 인간 생식계열 V_K L6 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 105)를 갖는 12A4 (SEQ ID NO:12)의 경사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JK1 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:115로 개시되어 졌다.
- 도 23은 인간 생식계열 V_K L15 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 106)를 갖는 10A5 (SEQ ID NO:13)의 경사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JK2 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:116으로 개시되어 졌다.
- 도 24는 인간 생식계열 V_K A27 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 107)를 갖는 5F8 (SEQ ID NO:14)의 경사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JK1 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:114로 개시되어 졌다.
- 도 25는 인간 생식계열 V_K L15 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 106)를 갖는 10H10 (SEQ ID NO:15)의 경사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JK2 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:116으로 개시되어 졌다.
- 도 26은 인간 생식계열 V_K L6 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 105)를 갖는 1B12 (SEQ ID NO:16)의 경사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JK1 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:115로 개시되어 졌다.
- 도 27은 인간 생식계열 V_K L6 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 105)를 갖는 7H1 (SEQ ID NO:17)의 경사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JK1 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:115로 개시되어 졌다.
- 도 28은 인간 생식계열 V_K A27 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 107)를 갖는 11E6 (SEQ ID NO:18)의 경사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JK4 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:117로 개시되어 졌다.
- 도 29는 인간 생식계열 V_K A27 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 107)를 갖는 11E6a (SEQ ID NO:109)의 경사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JK4 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:118로 개시되어 졌다.
- 도 30은 인간 생식계열 V_K L6 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 105)를 갖는 12B7 (SEQ ID NO:19)의 경사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 얼라인먼트를 나타낸다. JK5 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:119로 개시되어 졌다.

도 31은 인간 생식계열 V_K L18 아미노산 시퀀스 (SEQ ID NO: 108)를 갖는 13G4 (SEQ ID NO:20)의 경사슬 가변영역의 아미노산 시퀀스 열라인먼트를 나타낸다. JK3 생식계열 시퀀스는 SEQ ID NO:120으로 개시되어 졌다.

도 32는 인간 PD-L1에 대해 향하는 인간 모노클로날 항체 3G10, 10A5, 및 12A4는 전체-길이의 인간 PD-L1로 형질전환된 CHO 세포의 세포 표면에 결합하는 것을 입증하는 유동세포분석법 실험의 결과를 나타낸다. (A) 3G10에 대한 유동세포분석법 플롯 (B) 10A5에 대한 유동세포분석법 플롯 (C) 12A4에 대한 유동세포분석법 플롯.

도 33은 인간 PD-L1에 대해 향하는 인간 모노클로날 항체 3G10, 10A5, 및 12A4는 농도에 의존하는 형식으로 전체-길이의 인간 PD-L1로 형질전환된 CHO 세포의 세포 표면에 결합하는 것을 입증하는 유동세포분석법 실험의 결과를 나타낸다.

도 34는 인간 PD-L1에 대해 향하는 인간 모노클로날 항체 3G10, 10A5, 및 12A4는 PD-L1-Fc 용융 단백질에 결합하는 것을 입증하는 ELISA 실험의 결과를 나타낸다.

도 35는 자극된 인간 CD4+ T 세포 상에 HuMab 적정을 입증하는 실험의 결과를 나타낸다.

도 36은 자극된 시노몰거스(cynomolgus)(원숭이) PBMC 상에 HuMab 적정을 입증하는 실험의 결과를 나타낸다.

도 37은 PD-L1에 대해 향하는 인간 모노클로날 항체 3G10, 10A5, 및 12A4는 활성화된 T 세포의 세포 표면 상에서 PD-L1에 결합하는 것을 입증하는 유동세포분석법 실험의 결과를 나타낸다. (A) 3G10에 대한 유동세포분석법 플롯 (B) 10A5에 대한 유동세포분석법 플롯 (C) 12A4에 대한 유동세포분석법 플롯.

도 38은 ES-2 세포에 HuMabs의 결합을 입증한다.

도 39a-d는 인간 PD-L1에 대한 인간 모노클로날 항체가 혼합된 림프구 반응 분석에서 T-세포 증식, IFN- γ 분비 및 IL-2 분비를 증진한다는 것을 입증하는 실험의 결과를 나타낸다. 도 39a는 HuMab 10A5를 사용한 농도 의존성 T-세포 증식을 나타내는 막대 그래프이고; 도 39b는 HuMab 10A5를 사용한 농도 의존성 IFN- γ 분비를 나타내는 막대 그래프이고; 도 39c는 HuMabs 3G10 및 12A4를 사용한 IFN- γ 분비를 나타내는 막대 그래프이고; 도 39d는 HuMab 10A5를 사용한 농도 의존성 IL-2 분비를 나타내는 막대 그래프이다.

도 40은 동종이계 수지상의 세포 및 T 세포 (CD4+ 이펙터 T 세포) 수지상 세포를 사용하여 MLR에서 증식 및 IFN- γ 분비에 대한 인간 항-PD-L1 항체의 효과를 입증한다.

도 41a-b는 인간 PD-L1에 대한 인간 모노클로날 항체가 T 조절 세포를 포함하는 MLR에서 T-세포 증식 및 IFN- γ 분비를 증진하는 것을 입증하는 실험의 결과를 나타낸다. 도 41a는 HuMab 10A5를 사용한 농도 의존성 T-세포 증식을 나타내는 막대 그래프이고; 도 41b는 HuMab 10A5를 사용한 농도 의존성 IFN- γ 분비를 나타내는 막대 그래프이다.

도 42는 조절 T 세포의 존재하에서 혼합된 림프구 반응에서 세포 증식에 대한 항-PD-L1 항체의 결과를 입증한다.

도 43은 조절 T 세포의 존재하에서 혼합된 림프구 반응에서 시토킨 생산에 대한 항-PD-L1 항체의 결과를 입증한다.

도 44는 CMV 용해물 자극 인간 PBMC IFN- γ 분비에 대한 항-PD-L1 항체의 결과를 입증한다.

도 45는 인간 PD-L1에 대한 인간 모노클로날 항체가 CHO 형질전환 세포 발현 PD-I에 대한 PD-L1의 결합을 방지하는 것을 입증하는 유동세포분석법 실험의 결과를 나타낸다.

도 46는 항-PD-L1 항체가 IFN γ 처리 ES-2 세포에 대한 PD-I의 결합을 방지하는 것을 나타낸다.

도 47은 생체 내에서 종양 성장에 대한 항-PD-L1 항체의 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0220]

일 측면에 있어서, 본 개시는 분리된 모노클로날 항체에 관한 것이며, 특히 PD-L1에 특이적으로 결합하는 인간 모노클로날 항체에 관한 것이다. 어떤 실시형태에서, 본 발명의 항체는 PD-L1에 결합하는 높은 친화성, 혼합된 림프구 반응에서 T-세포 증식, IFN- γ 분비 및/또는 IL-2 분비를 증진하는 능력, PD-I 리셉터에 대한 PD-L1의 결합을 저해하는 능력, 항체 반응을 자극하는 능력 및/또는 T 조절 세포의 억제 작용에 반하는 능력과 같은 하나 또는 그 이상의 바람직한 기능적 특성을 나타낸다. 부가적으로 또는 대안적으로, 본 발명의 항체는 특히 중

및 경사슬 생식계열 시퀀스로부터 유래되어 지고 및/또는 특히 아미노산 시퀀스를 포함한다.

- [0221] 본 발명의 개시는 예를 들어, 분리된 항체, 이러한 항체의 제조 방법, 이러한 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트 및 바이오스페시픽 분자, 본 발명의 항체, 면역컨쥬게이트 및 바이오스페시픽 분자를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0222] 또 다른 측면에서, 본 개시는 항-PD-L1 항체를 사용하여 대상에 있어서 종양세포의 성장을 저해하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 면역 반응을 변경하기 위해서 뿐 아니라 암 또는 감염성 질병을 치료하기 위해 또는 방어적인 자가 면역 반응을 자극하거나 또는 항원 특이적 면역 반응을 자극하기 위해 (예를 들어, 주 항원과 항-PD-L1의 공동 투여에 의해) 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다.
- [0223] 본 개시를 보다 확실하게 이해되도록 하기 위해, 먼저 용어를 정의한다. 부가적 정의는 상세한 설명 전반을 통하여 설정되어 진다.
- [0224] 용어 "면역 반응"은 병원체, 종양성 세포, 또는 자가면역이나 병리학적 염증반응의 경우에는 정상적인 인간의 세포 또는 조직으로 감염된 병원균, 세포 또는 조직이 침입한 인체에 민감성 손상, 파괴 또는 제거를 초래하는, 예를 들어 림프구, 항원 표시 세포, 식세포, 과립성 백혈구, 및 상피 세포 또는 간(항체, 시토킨 및 보체 포함)에 의해 생성된 가용성 거대분자의 작용에 대한 것이다.
- [0225] "시그널 형질도입 경로"는 세포의 일 부분으로부터 세포의 다른 부분으로 신호의 전이에 어떤 역할을 하는 다양한 시그널 형질도입 간에 생화학적 상관관계에 대한 것이다.
- [0226] 여기서 사용된 것으로, 구 "세포 표면 수용체"는, 예를 들어 신호를 수용할 수 있고 그리고 이러한 신호를 세포의 플라스마 멤브레인을 가로질러 전이할 수 있는 분자 및 복합체를 포함한다. 본 발명의 "세포 표면 수용체"의 예는 PD-L1 수용체이다.
- [0227] 여기서 언급된 것으로 용어 "항체"는 전 항체 및 항원 결합 분획(예를 들어, "항원-결합 부위")이나 이들의 단일 사슬을 포함한다. "항체"는 디설파이드 결합에 의해 상호 연결된 적어도 두 개의 중(H) 사슬 및 두 개의 경(L) 사슬을 포함하는 당단백질 또는 이들의 항원 결합 부분을 언급한다. 각 중사슬은 중사슬 가변영역 (여기서는 V_H 로 약칭함) 및 중사슬 불변영역을 포함한다. 중사슬 불변영역은 C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 의 세 도메인을 포함한다. 각 경사슬은 경사슬 가변영역 (여기서는 V_L 로 약칭함) 및 경사슬 불변영역을 포함한다. 경사슬 불변영역은 C_L 의 하나의 도메인을 포함한다. V_H 및 V_L 영역은 과변이성의 영역인, 일명 상보성 결정 영역(CDR)으로 더 세분화될 수 있고, 일명 골격 영역(FR)인 보다 보전적인 영역으로 산재될 수 있다. 각 V_H 및 V_L 은 세 CDR 및 네 FR를 포함하여, 아미노-말단으로부터 카복시-말단 까지 다음의 순서로 배열되어 진다:FR1, CDR15 FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중 및 경사슬의 가변영역은 항원과 상호 작용하는 결합 도메인을 포함한다. 항체의 불변영역은 면역계의 다양한 세포(예를 들어 이펙터 세포) 및 고전적 보완계의 제1의 성분(C1q)을 포함하여, 숙주 조직에 이뮤노글로불린의 결합을 조절할 수 있다.
- [0228] 여기서 사용된 것으로 용어, 항체의 "항원-결합 부분" (또는 간단하게 "항체 부분")은 항원(예를 들어, PD-L1)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 또는 그 이상의 분획에 대한 것이다. 항체의 항원-결합 작용은 전-길이 항체의 분획에 의하여 수행되어 질 수 있다는 것이 밝혀져 있다. 항체의 용어 "항원-결합 부분" 내에 포함되어 지는 결합 분획의 예는 (i) Fab 분획으로, V_L , V_H , C_L 및 C_{H1} 도메인으로 구성된 1가의 분획; (ii) $F(ab')_2$ 분획으로, 힌지 영역에 디설파이드 다리에 의해 연결된 두 개의 Fab 분획을 포함하는 2가의 분획; (iii) V_H 및 C_{H1} 도메인으로 구성된 Fd 분획; (iv) 항체의 싱글 아암의 V_L 및 V_H 도메인으로 구성된 Fv 분획; (v) V_H 도메인을 구성하는 dAb 분획 (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546); 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 더욱이, 비록 Fv 분획의 두 도메인인 V_L 및 V_H 가 별개의 유전자에 의하여 코딩되어 지지만, 이들은 재조합 방법을 사용하여 1가의 분자를 형성하기 위하여 V_L 및 V_H 영역이 쌍을 이루는 단일 단백질 사슬로서 이들이 제조되어 질 수 있는 합성 링커에 의하여 연결되어 질 수 있다 (단일 사슬 Fv (scFv)로 알려진 것; 예를 들어, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; 및 Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 참고). 이러한 단일 사슬 항체는 또한 항체의 용어 "항원-결합 부분" 내에 포함되어 지도록 의도된다. 이들 항체 분획은 이 분야의 통상인에게 잘 알려진 통상적인 기술을 사용하여 수득되고, 분획은 온전한 항체로서 동일한 방식으로 실용성에 대해 스크린 되었다.

- [0229] 여기서 사용된 것으로, "분리된 항체"는 다른 항원적 특이성을 갖는 실질적으로 다른 항체가 없는 항체를 언급하기 위한 것이다(예를 들어, PD-L1에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 PD-L1 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없음). 그러나, PD-L1에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 다른 종으로부터의 PD-L1 분자와 같이 다른 항원에 크로스-반응성을 갖는다. 더욱이, 분리된 항원은 다른 세포성 물질 및/또는 화합물들이 실질적으로 없다.
- [0230] 여기서 사용된 것으로 용어 "모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조성물"은 단일 분자 조성물의 항체 분자의 조제를 언급한다. 모노클로날 항체 조성물은 특정 항원결정인자에 대한 친화성 및 단일 결합 특이성을 나타낸다.
- [0231] 여기서 사용된 것으로 용어 "인간 항체"는 골격 및 CDR 영역 양자가 인간 생식계열 이뮤노글로불린 시퀀스로부터 유래된 다양한 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 더욱이, 단일 항체가 불변 영역을 포함하면, 이 불변 영역은 또한 인간 생식계열 이뮤노글로불린 시퀀스로부터 유래된다. 본 발명의 인간 항체는 인간 생식계열 이뮤노글로불린 시퀀스에 의해 코드되지 않은 아미노산 잔기를 포함할 수 있다(예를 들어, 생체 외에서 랜덤 또는 사이트-특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체 내에서 체세포돌연변이에 의하여 도입된 돌연변이). 그러나, 여기서 사용된 것으로 용어 "인간 항체"는 마우스와 같은 다른 포유 동물 종의 생식계열로부터 유래된 CDR 시퀀스가 인간 골격 시퀀스 상으로 그래프트되어 진 항체를 포함하는 것을 의도하지는 않는다.
- [0232] 용어 "인간 모노클로날 항체"는 골격 및 CDR 영역 양자가 인간 생식계열 이뮤노글로불린 시퀀스로부터 유래된 다양한 영역을 갖는 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 언급한다. 일 실시형태에서, 인간 모노클로날 항체는 불사 세포에 융합된 인간 중사슬 형질전환 및 경사슬 형질전환을 포함하는 계능을 갖는 형질전환 비인간 동물, 예를 들어, 형질전환 마우스로부터 얻어진 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생산된다.
- [0233] 여기서 사용된 것으로 용어 "재조합 인간 항체"는 (a) 인간 이뮤노글로불린 유전자에 대해 형질전환 또는 트랜스크로모좀이거나 또는 이들로부터 제조된 하이브리도마(하기에 더 기술됨)인 동물(예를 들어, 마우스)로부터 분리된 항체, (b) 인간 항체를 발현하기 위해 변환된 숙주세포로부터, 예를 들어 트랜스펙토마로부터 분리된 항체, (c) 재조합, 결합 인간 항체 라이브러리로부터 분리된 항체 및 (d) 다른 DNA 시퀀스로 인간 이뮤노글로불린 유전자 시퀀스의 유전자 삽입을 포함하는 어떤 다른 수단에 의하여 제조, 발현, 생산 또는 분리된 항체와 같은 재조합 수단에 의하여 제조, 발현, 생산 또는 분리된 모든 인간 항체를 포함한다. 이러한 재조합 인간 항체는 골격 및 CDR 영역이 인간 생식계열 이뮤노글로불린 시퀀스로부터 유래된 가변 영역을 갖는다. 그러나, 어떤 실시형태에서, 이런 재조합 인간 항체는 생체 외에서 돌연변이가 유발되어 질 수 있고(또는, 인간 Ig 시퀀스에 대한 동물 형질전환이 사용될 때는 생체 내에서 체세포돌연변이), 따라서 재조합 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 시퀀스는, 인간 생식계열 V_H 및 V_L 시퀀스로부터 유래되고 관련되어질 때 생체 내에서 인간 항체 생식계열 레파토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있다.
- [0234] 여기서 사용된 것으로, "아이소타이프"는 중사슬 불변 영역 유전자에 의해 코드되는 항체 클래스(예를 들어, IgM 또는 IgG1)를 언급한다.
- [0235] 구 "항체 인지 항원" 및 "항원에 특이적인 항체"는 용어 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"와 여기서 상호 교환적으로 사용된다.
- [0236] 용어 "인간 항체 유도체류"는 인간 항체의 변형된 형태로, 예를 들어 항체의 컨주게이트 및 다른 제제나 항체를 언급한다.
- [0237] 용어 "인체적응된 항체"는 마우스와 같은 다른 포유 동물 종의 생식계열로부터 유래된 CDR 시퀀스가 인간 골격 시퀀스 상으로 그래프트되어 진 항체를 언급하기 위한 것이다. 부가적 골격 영역 변형이 인간 골격 시퀀스 내에서 이루어질 수 있다.
- [0238] 용어 "키메르 항체"는 가변 영역 시퀀스가 마우스 항체로부터 유래되고 불변 영역 시퀀스가 인간 항체로부터 유래된 항체와 같이 가변 영역 시퀀스가 일종으로부터 유래되고 불변 영역 시퀀스가 다른 종으로부터 유래된 항체를 언급하기 위한 것이다.
- [0239] 여기서 사용된 것으로, "인간 PD-L1에 특이적으로 결합하는" 항체는 인간 PD-L1에 1×10^{-7} M 또는 그 이하, 보다 바람직하기로는 5×10^{-8} M 또는 그 이하, 더 바람직하기로는 1×10^{-8} M 또는 그 이하, 더 보다 바람직하기로는 5×10^{-9} M 또는 그 이하, 더욱 보다 바람직하기로는 1×10^{-8} M과 1×10^{-10} M 또는 그 이하의 사이로 되는

K_D 로 결합하는 항체를 언급하기 위한 것이다.

[0240] 여기서 사용된 것으로, 용어 " K_{assoc} " 또는 " K_a "는 특정한 항체-항원 상호작용의 결합 비율을 언급하기 위한 것이고, 반면 여기서 사용된 것으로, 용어 " K_{dis} " 또는 " K_d ,"는 특정한 항체-항원 상호작용의 해리 비율을 언급하기 위한 것이다. 여기서 사용된 것으로, 용어 " K_D ,"는 해리 상수를 언급하기 위한 것으로, 이것은 K_a 에 대한 K_d 의 비(즉, K_d/K_a)로부터 얻어지고, 몰 농도(M)로 표시된다. 항체에 대한 K_D 값은 이 기술 분야에 잘 확립된 방법을 사용하여 결정되어 질 수 있다. 항체의 K_D 를 결정하기 위한 바람직한 방법은 표면 플라즈몬 공조, 바람직하기로는 Biacore® 시스템과 같은 바이오센서 시스템을 사용하는 것이다.

[0241] 여기서 사용된 것으로, IgG 항체에 대한 용어 "높은 친화도"는 타겟 항체에 대해 10^{-8} M 또는 그 이하, 보다 바람직하기로는 10^{-9} M 또는 그 이하, 그리고 더 보다 바람직하기로는 10^{-10} M 또는 그 이하의 K_D 를 갖는 항체를 말한다. 그러나, "높은 친화도" 결합은 다른 항체 아이소타입에 대해 변할 수 있다. 예를 들어, IgM 아이소타입에 대한 "높은 친화도" 결합은 10^{-7} M 또는 그 이하, 보다 바람직하기로는 10^{-8} M 또는 그 이하, 더 보다 바람직하기로는 10^{-9} M 또는 그 이하의 K_D 를 갖는 항체를 말한다.

[0242] 여기서 사용된 것으로, 용어 "대상"은 인간 또는 비인간 동물을 포함한다. 용어 "비인간 동물"은 척추동물, 즉 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류, 파충류 등과 같은 포유 및 비포유동물을 포함한다.

[0243] 본 개시의 다양한 측면은 이하의 항목별 설명에서 더 자세하게 기술되어 진다.

[0244] 항-PD-L1 항체

[0245] 본 발명의 항체는 특정한 항체의 기능적 특징 또는 특성으로 특징되어 진다. 예를 들어, 항체는 인간 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 바람직하기로는, 본 발명의 항체는 높은 친화도, 예를 들어 1×10^{-7} M 또는 그 이하의 K_D 로 PD-L1에 결합한다. 본 발명의 항-PD-L1 항체는 바람직하기로는 하나 또는 그 이상의 다음의 특징을 나타낸다:

[0246] (a) 1×10^{-7} M 또는 그 이하의 K_D 로 인간 PD-L1에 결합;

[0247] (b) 혼합된 림프구 반응(MLR) 분석에서 T-세포 증식 증가;

[0248] (c) MLR 분석에서 인터페론- γ 생산성 증가;

[0249] (d) MLR 분석에서 IL-2 분비 증가;

[0250] (e) 항체 반응 자극; 또는

[0251] (f) T 세포 이펙터 세포 및/또는 수지상 세포에 대한 T 조절 세포의 효과 반전.

[0252] 바람직하기로는, 항체는 인간 PD-L1에 5×10^{-8} M 또는 그 이하의 K_D 로 결합하고, 인간 PD-L1에 1×10^{-8} M 또는 그 이하의 K_D 로 결합하고, 인간 PD-L1에 5×10^{-9} M 또는 그 이하의 K_D 로 결합하고, 인간 PD-L1에 4×10^{-9} M 또는 그 이하의 K_D 로 결합하고, 인간 PD-L1에 2×10^{-9} M 또는 그 이하의 K_D 로 결합하고, 또는 인간 PD-L1에 1×10^{-9} M 내지 1×10^{-10} M 사이의 K_D 로 결합한다.

[0253] PD-L1에 대한 항체의 결합 능력을 평가하기 위한 표준 분석은, 예를 들어 ELISA, 웨스턴 블롯, 및 RIA를 포함하여 이 분야에 잘 알려진 것이다. 적절한 분석법은 실시예에 보다 자세하게 기술되어 진다. 항체의 결합 운동학(즉, 결합 친화도) 또한 Biacore® 아날리시스와 같은 이 기술 분야에 알려진 표준 분석법으로 평가되어 질 수 있다.

[0254] 모노클로날 항체 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 및 13G4.

[0255] 본 발명의 바람직한 항체는 실시예 1 및 2에서 기술된 바와 같이 분리되고 구조적으로 특징되어 지는, 인간 모노클로날 항체 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 및 13G4이다. 3G10, 12A4, 10A5, 5F8,

10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 및 13G4의 V_H 아미노산 시퀀스는 각각 SEQ ID NOs:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 및 10으로 나타난다. 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 및 13G4의 V_L 아미노산 시퀀스는 각각 SEQ ID NOs:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20으로 나타난다.

[0256] 이들 항체의 각각이 PD-L1에 결합할 수 있는 것으로 되면, V_H 및 V_L 시퀀스는 "혼합되고 매치될 수 있어" 본 발명의 다른 항-PD-L1 결합 분자를 생산한다. 이러한 "혼합되고 매치된" 항체의 PD-L1 결합은 상기 및 실시예들에 기술된 결합 어세이(즉, ELISA)를 사용하여 시험되어 질 수 있다. 바람직하기로는, V_H 및 V_L 사슬이 혼합되고 매치될 때, 특정한 V_H/V_L 쌍의 V_H 시퀀스가 구조적으로 유사한 V_H 시퀀스로 대체된다. 마찬가지로, 바람직하기로는 특정한 V_H/V_L 쌍의 V_L 시퀀스가 구조적으로 유사한 V_L 시퀀스로 대체된다.

[0257] 따라서, 일 측면에 있어서, 본 발명은 다음을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공한다:

[0258] (a) SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 및 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및

[0259] (b) SEQ ID NOs:11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역;

[0260] 여기서 항체는 PD-L1, 바람직하기로는 인간 PD-L1에 특이적으로 결합한다.

[0261] 바람직한 중 및 경사슬 조합은 다음을 포함한다:

[0262] (a) SEQ ID NO:1의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및 (b) SEQ ID NO:11의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역; 또는

[0263] (a) SEQ ID NO:2의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및 (b) SEQ ID NO: 12의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역; 또는

[0264] (a) SEQ ID NO:3의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및 (b) SEQ ID NO:13의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역; 또는

[0265] (a) SEQ ID NO:4의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및 (b) SEQ ID NO: 14의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역; 또는

[0266] (a) SEQ ID NO:5의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및 (b) SEQ ID NO: 15의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역; 또는

[0267] (a) SEQ ID NO:6의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및 (b) SEQ ID NO: 16의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역; 또는

[0268] (a) SEQ ID NO:7의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및 (b) SEQ ID NO: 17의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역; 또는

[0269] *(a) SEQ ID NO:8의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및 (b) SEQ ID NO: 18의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역; 또는

[0270] (a) SEQ ID NO:9의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및 (b) SEQ ID NO: 19의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역; 또는

[0271] (a) SEQ ID NO: 10의 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및 (b) SEQ ID NO:20의 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역.

[0272] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 및 13G4의 중사슬 및 경사슬 CDR1s, CDR2s 및 CDR3s, 또는 이들의 조합을 포함하는 항체를 제공한다. 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 및 13G4의 V_H CDR1s의 아미노산 시퀀스는 각각 SEQ ID NOs:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 및 30에 나타나 있다. 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 및 13G4

의 V_H CDR2s의 아미노산 시퀀스는 각각 SEQ ID NOs:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 및 40에 나타나 있다. 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 및 13G4의 V_H CDR3s의 아미노산 시퀀스는 각각 SEQ ID NOs:41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 및 50에 나타나 있다. 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 및 13G4의 V_k CDR1들의 아미노산 시퀀스는 각각 SEQ ID NOs:51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 및 60에 나타나 있다. 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 및 13G4의 V_k CDR2들의 아미노산 시퀀스는 각각 SEQ ID NOs:61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 및 70에 나타나 있다. 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 및 13G4의 V_k CDR3들의 아미노산 시퀀스는 각각 SEQ ID NOs:71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 및 80에 나타나 있다. CDR 영역은 카바트 시스템(Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)을 사용하여 묘사되어 진다.

- [0273] 이들 항체의 각각이 PD-L1에 결합할 수 있는 것으로 되고 그리고 항원-결합 특이성이 일차적으로 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역에 의하여 제공되어 진다면, V_H CDR1, CDR2, 및 CDR3 시퀀스 그리고 V_k CDR1, CDR2, 및 CDR3 시퀀스는 "혼합되고 매치될 수 있어" (즉, 비록 각 항체는 반드시 V_H CDR1, CDR2, 및 CDR3 그리고 V_k CDR1, CDR2, 및 CDR3를 포함하여야 하지만, 다른 항체로부터의 CDRs가 혼합되고 매치될 수 있다) 본 발명의 다른 항-PD-L1 결합 분자를 생산한다. 이러한 "혼합되고 매치된" 항체의 PD-L1 결합은 상기 및 실시예들에 기술된 결합 어세이 (즉, ELISA, Biacore 어날리시스)를 사용하여 시험되어 질 수 있다. 바람직하기로는, V_H CDR 시퀀스가 혼합되고 매치될 때, 특정한 V_H 시퀀스로부터 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 시퀀스가 구조적으로 유사한 CDR 시퀀스(들)로 대체된다. 마찬가지로, V_k CDR 시퀀스가 혼합되고 매치될 때, 바람직하기로는 특정한 V_k 시퀀스로부터 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 시퀀스가 구조적으로 유사한 CDR 시퀀스(들)로 대체된다. 신규한 V_H 및 V_L 시퀀스는 하나 또는 그 이상의 V_H 및/또는 V_L CDR 영역 시퀀스를 모노클로날 항체 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 및 13G4에 대해 여기서 개시된 CDR 시퀀스로부터 구조적으로 유사한 시퀀스로 치환함에 의해 만들어질 수 있다는 것은 통상적인 기술을 가진 자에게 확실히 명백할 것이다.
- [0274] 따라서, 다른 측면에 있어서, 본 발명은 다음을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공한다:
- [0275] (a) SEQ ID NOs :21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 및 30으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0276] (b) SEQ ID NOs:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 및 40으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0277] (c) SEQ ID NOs:41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 및 50으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0278] (d) SEQ ID NOs:51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 및 60으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0279] (e) SEQ ID NOs:61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 및 70으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0280] (f) SEQ ID NOs:71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 및 80으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3;
- [0281] 여기서 항체는 특이적으로 PD-L1에, 바람직하기로는 인간 PD-L1에 결합한다.
- [0282] 바람직한 실시형태로는, 항체는 다음을 포함한다:
- [0283] (a) SEQ ID NO:21을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0284] (b) SEQ ID NO:31을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0285] (c) SEQ ID NO:41을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;

- [0286] (d) SEQ ID NO:51을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0287] *(e) SEQ ID NO:61을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0288] (f) SEQ ID NO:71을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0289] 다른 바람직한 실시형태로는, 항체는 다음을 포함한다:
- [0290] (a) SEQ ID NO:22을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0291] (b) SEQ ID NO:32을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0292] (c) SEQ ID NO:42을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0293] (d) SEQ ID NO:52을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0294] (e) SEQ ID NO:62을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0295] (f) SEQ ID NO:72을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0296] 또 다른 바람직한 실시형태로는, 항체는 다음을 포함한다:
- [0297] (a) SEQ ID NO:23을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0298] (b) SEQ ID NO:33을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0299] (c) SEQ ID NO:43을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0300] (d) SEQ ID NO:53을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0301] (e) SEQ ID NO:63을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0302] (f) SEQ ID NO:73을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0303] 또 다른 바람직한 실시형태로는, 항체는 다음을 포함한다:
- [0304] (a) SEQ ID NO:24을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0305] (b) SEQ ID NO:34을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0306] (c) SEQ ID NO:44을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0307] (d) SEQ ID NO:54을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0308] (e) SEQ ID NO:64을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0309] (f) SEQ ID NO:74을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0310] 또 다른 바람직한 실시형태로는, 항체는 다음을 포함한다:
- [0311] (a) SEQ ID NO:25을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0312] (b) SEQ ID NO:35을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0313] (c) SEQ ID NO:45을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0314] (d) SEQ ID NO:55을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0315] (e) SEQ ID NO:65을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0316] (f) SEQ ID NO:75을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0317] 또 다른 바람직한 실시형태로는, 항체는 다음을 포함한다:
- [0318] (a) SEQ ID NO:26을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0319] (b) SEQ ID NO:36을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0320] (c) SEQ ID NO:46을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;

- [0321] (d) SEQ ID NO:56을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0322] (e) SEQ ID NO:66을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0323] (f) SEQ ID NO:76을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0324] 또 다른 바람직한 실시형태로는, 항체는 다음을 포함한다:
- [0325] (a) SEQ ID NO:27을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0326] (b) SEQ ID NO:37을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0327] (c) SEQ ID NO:47을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0328] (d) SEQ ID NO:57을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0329] (e) SEQ ID NO:67을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0330] (f) SEQ ID NO:77을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0331] 또 다른 바람직한 실시형태로는, 항체는 다음을 포함한다:
- [0332] (a) SEQ ID NO:28을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0333] (b) SEQ ID NO:38을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0334] (c) SEQ ID NO:48을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0335] (d) SEQ ID NO:58을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0336] (e) SEQ ID NO:68을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0337] (f) SEQ ID NO:78을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0338] 또 다른 바람직한 실시형태로는, 항체는 다음을 포함한다:
- [0339] (a) SEQ ID NO:29을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0340] (b) SEQ ID NO:39을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0341] (c) SEQ ID NO:49을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0342] (d) SEQ ID NO:59을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0343] (e) SEQ ID NO:69을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0344] (f) SEQ ID NO:79을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0345] 또 다른 바람직한 실시형태로는, 항체는 다음을 포함한다:
- [0346] (a) SEQ ID NO:30을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR1;
- [0347] (b) SEQ ID NO:40을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR2;
- [0348] (c) SEQ ID NO:50을 포함하는 중사슬 가변영역 CDR3;
- [0349] (d) SEQ ID NO:60을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR1;
- [0350] (e) SEQ ID NO:70을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR2; 및
- [0351] (f) SEQ ID NO:80을 포함하는 경사슬 가변영역 CDR3.
- [0352] CDR3 도메인은, CDR1 및/또는 CDR2 도메인(들)과는 독립적으로, 단독으로 동등한 항원에 대한 항체의 결합 특이성을 결정할 수 있고, 그리고 공통 CDR3 시퀀스에 기초한 동일한 결합 특이성을 갖는 복수 항체들이 예상대로 발생되어 질 수 있다는 것은 이 기술분야에 있어 잘 알려진 것이다. 예를 들어, Klimka *et al*, *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000) (뮤어라인 항-CD30 항체 Ki-4의 중사슬 가변 도메인 CDR3 만을 사용하여 인체적응된 항-CD30 항체의 생산을 기술함); Beiboer *et al*, *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000) (모체의 뮤어라인 MOC-31 항-EGP-2 항체의 중사슬 CDR3 시퀀스 만을 사용하여 재조합 상피조직의 당간백질-2 (EGP-2)항체를 기술

함); Rader *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998) (뮤어라인 항-인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 항체 LM609의 중 및 경사슬 가변 CDR3 도메인을 사용하여 인체적응된 항-인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 항체의 패널을 기술하고, 여기서 각 구성 항체는 CDR3 도메인 외측에 명확한 시퀀스를 포함하여 모체의 뮤어라인 항체와 동일한 항원결정인자를 모체의 뮤어라인 항체와 거의 같이 높거나 또는 보다 더 높은 친화도로 결합할 수 있음); Barbas *et al*, *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994) (CDR3 도메인이 항원 결합에 대해 가장 유의성 있는 기여를 제공하는 것을 기술함); Barbas *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2529-2533 (1995) (안티-테타너스 독소이드 Fab의 중사슬 상에 인간 태반 DNA에 대해 세 개의 Fabs (SI-I, SI-40, 및 SI-32)의 중사슬 CDR3 시퀀스의 그래프팅함과 이에 의한 존재하는 중사슬 CDR3를 대체하고 CDR3 도메인 단독으로 결합 특이성을 제공한다는 것을 기술함); 및 Ditzel *et al*, *J. Immunol.* 157:739-749 (1996) (단일특이적 IgG 테타너스 독소이드-바인딩 Fab p313 항체의 중사슬로 단지 모체의 다특이적 Fab LNA3의 중사슬 CDR3의 전이가 모체 Fab의 결합 특이성을 보유하는데 충분하다는 그래프팅 연구를 기술함) 참고. 이들 문헌 각각은 그 전체로서 참고로서 여기에 함체되어 진다.

[0353] 따라서, 어떤 측면 내에서 본 발명은 마우스 또는 랫트 항체와 같은 비-인간 항체로부터 하나 또는 그 이상의 중 및/또는 경사슬 CDR3 도메인을 포함하는 모노클로날 항체를 제공하며, 여기서 상기 모노클로날 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합할 수 있다. 몇 가지의 실시형태 내에서, 비-인간 항체로부터 하나 또는 그 이상의 중 및/또는 경사슬 CDR3 도메인을 포함하는 이러한 발명의 항체는 (a) 항원결정인자와 경쟁적으로 결합할 수 있고; (b) 항원결정인자에 기능적 특성을 보유하고; (c) 동일한 항원결정인자에 결합하고; 및/또는 (d) 반응하는 모체의 비-인간 항체에 유사한 결합 친화도를 가진다.

[0354] 다른 측면 내에서, 본 발명은 예를 들어 비-인간 항체로부터 얻어진 인간 항체와 같은 제일의 인간 항체로부터 하나 또는 그 이상의 중 및/또는 경사슬 CDR3 도메인을 포함하는 모노클로날 항체를 제공하며, 여기서 제일 인간 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합할 수 있고 그리고 제일 인간 항체로부터의 CDR3 도메인은 PD-L1에 대한 결합 특이성을 결한 인간 항체 내에 CDR3 도메인을 대체하여 PD-L1에 대한 특이적으로 결합할 수 있는 제일의 인간 항체를 발생한다. 몇 가지의 실시형태 내에서, 제일의 인간 항체로부터 하나 또는 그 이상의 중 및/또는 경사슬 CDR3 도메인을 포함하는 본 개시의 항체는 (a) 항원결정인자와 경쟁적으로 결합할 수 있고; (b) 항원결정인자에 기능적 특성을 보유하고; (c) 동일한 항원결정인자에 결합하고; 및/또는 (d) 반응하는 모체의 제일의 인간 항체에 유사한 결합 친화도를 가진다.

[0355] 특정 생식계열 시퀀스를 갖는 항체

[0356] 어떤 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 항체는 특정 생식계열 중사슬 이뮤노글로불린 유전자로부터의 중사슬 가변영역 및/또는 특정 생식계열 경사슬 이뮤노글로불린 유전자로부터 경사슬 가변영역을 포함한다.

[0357] 예를 들어, 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 인간 V_H 1-18 유전자의 산물 또는 이들로부터 유래된 중사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하고, 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 인간 V_H 1-69 유전자의 산물 또는 이들로부터 유래된 중사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하고, 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 또 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 인간 V_H 1-3 유전자의 산물 또는 이들로부터 유래된 중사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하고, 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 또 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 인간 V_H 3-9 유전자의 산물 또는 이들로부터 유래된 중사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하고, 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 더욱이 또 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 인간 V_K L6 유전자의 산물 또는 이들로부터 유래된 경사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하고, 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 더욱이 또 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 인간 V_K L15 유전자의 산물 또는 이들로부터 유래된 경사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하고, 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 더욱이 또 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 인간 V_K A27 유전자의 산물 또는 이들로부터 유래된 경사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하고, 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 더욱이 또 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 인간 V_K L18 유전자의 산물 또는 이들로부터 유래된 경사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날

항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하고, 여기서 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 더욱이 또 다른 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명은 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하는 것으로, 여기서 항체는:

[0358] (a) 인간 V_H 1-18, 1-69, 1-3 또는 3-9 유전자 (각각 SEQ ID NOs: 101, 102, 103 및 104로 설정된 아미노산 시퀀스를 코드하는 것임)의 산물 또는 이들로부터 유래된 중사슬 가변영역을 포함하고;

[0359] (b) V_K L6, L15, A27 또는 L18 유전자 (각각 SEQ ID NOs: 105, 106, 107 및 108로 설정된 아미노산 시퀀스를 코드하는 것임)의 산물 또는 이들로부터 유래된 경사슬 가변영역을 포함하고; 그리고

[0360] (c) PD-L1에, 바람직하기로는 인간 PD-L1에 특이적으로 결합한다.

[0361] 각각 V_H 1-18 및 V_K L6의 V_H 및 V_K 를 갖는 항체의 예는 3G10이다. 각각 V_H 1-69 및 V_K L6의 V_H 및 V_K 를 갖는 항체의 예는 12A4, 1B12, 7H1, 및 12B7이다. 각각 V_H 1-3 및 V_K L15의 V_H 및 V_K 를 갖는 항체의 예는 10A5이다. 각각 V_H 1-69 및 V_K A27의 V_H 및 V_K 를 갖는 항체의 예는 5F8, 11E6 및 11E6a이다. 각각 V_H 3-9 및 V_K L15의 V_H 및 V_K 를 갖는 항체의 예는 10H10이다. 각각 V_H 1-3 및 V_K L15의 V_H 및 V_K 를 갖는 항체의 예는 10A5이다. 각각 V_H 3-9 및 V_K L18의 V_H 및 V_K 를 갖는 항체의 예는 13G4이다.

[0362] *여기서 사용된 것으로, 만일 항체의 가변 영역이 인간 생식계열 이뮤노글로불린 유전자를 사용하는 계로부터 얻어진 것이라면, 인간 항체는 특정 생식계열 시퀀스의 "산물" 또는 "이들로부터 유래된" 중 또는 경사슬 가변영역을 포함한다. 이러한 계는 흥미있는 항원으로 인간 이뮤노글로불린 유전자를 담지하는 형질전환 마우스를 면역시키거나 또는 흥미있는 항원으로 파아지 상에 디스플레이된 인간 이뮤노글로불린 유전자 라이브러리를 스크리닝하는 것을 포함한다. 인간 생식계열 이뮤노글로불린 시퀀스의 "산물" 또는 "이들로부터 유래된" 인간 항체는 인간 생식계열 이뮤노글로불린의 아미노산 시퀀스에 인간 항체의 아미노산 시퀀스를 비교하고 그리고 인간 항체의 시퀀스에 시퀀스가 가장 밀접한(즉, 최대 % 동일성) 인간 생식계열 이뮤노글로불린 시퀀스를 선택함에 의해 동정되어 질 수 있다. 특정한 인간 생식계열 이뮤노글로불린 시퀀스의 "산물" 또는 "이들로부터 유래된" 인간 항체는, 예를 들어 자연적으로 발생하는 체세포돌연변이 또는 사이트-지정 돌연변이의 의도적인 유발에 기인하여 생식계열 시퀀스에 대비하여 다른 아미노산을 포함할 수 있다. 그러나, 선택된 인간 항체는 인간 생식계열 이뮤노글로불린 유전자에 의해 코드된 아미노산 시퀀스에 대해 아미노산 시퀀스에 있어 일반적으로 적어도 90% 동일하고, 그리고 인간 항체를 다른 종의 생식계열 이뮤노글로불린 아미노산 시퀀스 (즉, 뮤어라인 생식계열 시퀀스)에 비교할 때 인간으로 동정하는 아미노산 잔기를 포함한다. 어떤 경우에, 인간 항체는 생식계열 이뮤노글로불린 유전자에 의해 코드된 아미노산 시퀀스에 대하여 아미노산 시퀀스에 있어서 적어도 95%, 또는 더욱이 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일할 수 있다. 어떤 실시형태에서, 특정한 인간 생식계열 시퀀스로부터 유래된 인간 항체는 인간 생식계열 이뮤노글로불린 유전자에 의해 코드된 아미노산 시퀀스로부터 10개 이하의 아미노산 차이를 보일 것이다. 어떤 다른 실시형태에서, 인간 항체는 생식계열 이뮤노글로불린 유전자에 의해 코드된 아미노산 시퀀스로부터 5개 이하, 또는 더욱이 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 보일 것이다.

[0363] 상동 항체

[0364] 더욱이 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체는 여기에 기술된 바람직한 항체의 아미노산 시퀀스에 상동성인 아미노산 시퀀스를 포함하는 중 및 경사슬 가변영역을 포함하고, 여기서 항체는 본 발명의 항-PD-L1 항체의 바람직한 기능적 특성을 보유한다.

[0365] 예를 들어, 본 발명은 중사슬 가변영역 및 경사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하고, 여기서:

[0366] (a) 중사슬 가변영역은 SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 및 10으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스에 적어도 80% 유사한 아미노산 시퀀스를 포함하고;

[0367] (b) 경사슬 가변영역은 SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스에 적어도 80% 유사한 아미노산 시퀀스를 포함하고;

[0368] (c) 항체는 1×10^{-7} M 또는 그 이하의 K_D 로 인간 PD-L1에 결합하고;

- [0369] (d) 항체는 혼합된 림프구 반응(MLR) 분석에서 T-세포 증식을 증가하고;
- [0370] (e) 항체는 MLR 분석에서 인터페론- γ 생산성을 증가하고;
- [0371] (f) 항체는 MLR 분석에서 IL-2 분비를 증가하고;
- [0372] (g) 항체는 항체 반응을 자극하고; 그리고
- [0373] (h) T 세포 이펙터 세포 및/또는 수지상 세포에 대한 T 조절 세포의 효과를 반전한다.
- [0374] 다른 실시형태에서, V_H 및/또는 V_L 아미노산 시퀀스는 상기에 설정된 시퀀스에 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 유사할 수 있다. 상기 설정된 시퀀스의 V_H 및 V_L 영역에 대해 높은(즉, 80% 또는 그 이상) 유사성을 갖는 V_H 및 V_L 영역을 가지는 항체는 SEQ ID NOs:25, 26, 27, 28, 29, 및 30을 코드하는 핵산 분자의 돌연변이유발(즉, 사이트-지정 또는 PCR-매개 돌연변이유발)에 의해, 그리고 이에 따른 여기에 기술된 작용적 분석법을 사용하여 코드된 변형된 항체에 대한 보유된 작용(즉, 상기 (c) 내지 (h)에 설정된 작용)을 시험함에 의해 얻어질 수 있다.
- [0375] 여기서 사용된 것으로, 두 아미노산 시퀀스 간에 유사성의 백분율은 두 시퀀스 간의 동일성 백분율이 동등하다. 두 시퀀스 간의 동일성 백분율은 각 갭의 수와 각 갭의 길이를 고려하여 시퀀스에 의하여 공유된 다수의 동일한 위치의 기능(즉, 유사성 % = 동일한 위치의 #/위치의 전체 # x 100)으로, 두 시퀀스의 최적의 배열을 위하여 도입되어 질 필요가 있다. 시퀀스의 비교 및 두 개의 시퀀스 간의 동일성 백분율의 결정은 아래의 비제한적인 실시예에서 기술된 바와 같이, 수학적 알고리즘을 사용하여 수행되어 질 수 있다.
- [0376] 두 아미노산 시퀀스 간의 동일성 백분율은 PAM120 중량 잔기 테이블, 12의 갭 길이 패널티 및 4의 갭 패널티를 사용하여 ALIGN 프로그램 (version 2.0)으로 합체되는 이 메이어나 더블유 밀러(E. Meyers and W. Miller; *Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988))의 알고리즘을 사용하여 결정되어 질 수 있다. 부가하여, 두 아미노산 시퀀스 간의 동일성 백분율은 브로섬(Blossum) 62 매트릭스나 PAM250 매트릭스와 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 중량을 사용하여 GCG 소프트웨어 팩키지(www.gcg.com에서 이용할 수 있음) 내의 GAP 프로그램으로 합체되는 니들만과 분쉬(Needleman and Wunsch; *J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) 알고리즘을 사용하여 결정되어 질 수 있다.
- [0377] 어떤 경우에 있어서는 본 개시의 단백질 시퀀스는, 예를 들어 관련된 시퀀스를 동정하기 위한 공공 데이터베이스에 대해 검색을 수행하기 위한 "쿼리 시퀀스"로 더욱이 사용될 수 있다. 이러한 검색은 Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10의 XBLAST 프로그램 (version 2.0)을 사용하여 수행될 수 있다. BLAST 단백질 검색은 본 발명의 항체 분자에 유사한 아미노산 시퀀스를 얻기 위하여 XBLAST 프로그램으로, 스코어 = 50, 워드 길이 = 3으로 수행될 수 있다. 비교 목적을 위한 갭트 배열을 얻기 위하여, 갭트 BLAST가 Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402에 기술된 것과 같이 이용될 수 있다. BLAST 및 갭트 BLAST 프로그램을 이용할 때, 각 프로그램(즉, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터가 사용될 수 있다. www.ncbi.nlm.nih.gov 참고.
- [0378] 보존적 변이를 갖는 항체
- [0379] 어떤 실시형태에서, 본 발명의 항체는 CDR1, CDR2 및 CDR3 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역과 CDR1, CDR2 및 CDR3 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역을 포함하고, 여기서 하나 또는 그 이상의 이들 CDR 시퀀스는 여기에 기술된 바람직한 항체(즉, 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 또는 13G4)나 또는 이들의 보존적 변이에 기초한 특정된 아미노산 시퀀스를 포함하고, 그리고 여기서 항체는 본 발명의 항-PD-L1 항체의 소망하는 작용 특성을 보유한다.
- [0380] 따라서, 본 발명은 CDR1, CDR2 및 CDR3 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역과 CDR1, CDR2 및 CDR3 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공하고, 여기서;
- [0381] (a) 중사슬 가변영역 CDR3 시퀀스는 SEQ ID NOs:41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 및 50의 아미노산 시퀀스; 그리고 이들의 보존적 변이로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하고;
- [0382] (b) 경사슬 가변영역 CDR3 시퀀스는 SEQ ID NOs:71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 및 80의 아미노산 시퀀스; 그리고 이들의 보존적 변이로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하고;

- [0383] (c) 항체는 1×10^{-7} M 또는 그 이하의 K_D 로 인간 PD-L1에 결합하고;
- [0384] (d) 항체는 혼합된 림프구 반응(MLR) 분석에서 T-세포 증식을 증가하고;
- [0385] (e) 항체는 MLR 분석에서 인터페론- γ 생산성을 증가하고;
- [0386] (f) 항체는 MLR 분석에서 IL-2 분비를 증가하고;
- [0387] (g) 항체는 항체 반응을 자극하고; 그리고
- [0388] (h) T 세포 이펙터 세포 및/또는 수지상 세포에 대한 T 조절 세포의 효과를 반전한다.
- [0389] 바람직한 실시형태에 있어서, 중사슬 가변영역 CDR2 시퀀스는 SEQ ID NOs:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 및 40의 아미노산 시퀀스; 그리고 이들의 보존적 변이로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하고; 그리고 경사슬 가변영역 CDR2 시퀀스는 SEQ ID NOs:61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 및 70의 아미노산 시퀀스; 그리고 이들의 보존적 변이로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함한다. 또 바람직한 실시형태에 있어서, 중사슬 가변영역 CDR1 시퀀스는 SEQ ID NOs:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 및 30의 아미노산 시퀀스; 그리고 이들의 보존적 변이로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하고; 그리고 경사슬 가변영역 CDR1 시퀀스는 SEQ ID NOs:51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 및 60의 아미노산 시퀀스; 그리고 이들의 보존적 변이로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함한다.
- [0390] 여기서 사용된 것으로, 용어 "보존적 시퀀스 변이"는 아미노산 시퀀스를 포함하는 항체의 결합 특징이 유의적으로 영향을 받지 않거나 또는 변형되지 않는 아미노산 개변을 언급하기 위한 것이다. 이러한 보존적 변이는 아미노산, 치환, 부가, 및 결손을 포함한다. 변이는 사이트-지정 돌연변이유발 및 PCR-매개 돌연변이유발과 같은 이 분야에 공지된 표준 기술에 의해 본 발명의 항체에 도입되어 질 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 사이드 체인을 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 유사한 사이드 체인을 갖는 아미노산 잔기의 과(科)는 이 기술분야에 정의되어 저 있다. 이들 과는 염기성 측쇄(즉, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(즉, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄(즉, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄(즉, 알라닌, 발린, 류이신, 이소류이신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-사슬 측쇄(즉, 트레오닌, 발린, 이소류이신) 및 방향성 측쇄(즉, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다. 따라서, 본 발명의 항체의 CDR 영역 내에 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기가 동일한 측쇄 패밀리로부터의 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있고 그리고 변형된 항체는 여기에 기술된 기능 분석법을 사용하여 보유된 기능(즉, 상기에 설정된 (c) 내지 (h) 기능)에 대해 시험되어 질 수 있다.
- [0391] 본 발명의 항-PD-L1 항체와 동일한 항원결정인자에 결합하는 항체
- [0392] 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 어떤 PD-L1 모노클로날 항체(즉, 본 발명의 모노클로날 항체의 어떤 하나와 PD-L1에 결합에 대해 크로스-경쟁하는 능력을 갖는 항체)와 인간 PD-L1 상에 동일한 항원결정인자에 결합하는 항체를 제공한다. 바람직한 실시형태에서, 크로스-경쟁 연구에 대한 레퍼런스 항체는 모노클로날 항체 3G10 (각각, SEQ ID NOs: 1 및 11에 나타난 것과 같은 V_H 및 V_L 시퀀스를 가짐), 또는 모노클로날 항체 12A4 (각각, SEQ ID NOs: 2 및 12에 나타난 것과 같은 V_H 및 V_L 시퀀스를 가짐), 또는 모노클로날 항체 10A5 (각각, SEQ ID NOs: 3 및 13에 나타난 것과 같은 V_H 및 V_L 시퀀스를 가짐), 또는 모노클로날 항체 10A5 (각각, SEQ ID NOs: 3 및 13에 나타난 것과 같은 V_H 및 V_L 시퀀스를 가짐), 또는 모노클로날 항체 5F8 (각각, SEQ ID NOs: 4 및 14에 나타난 것과 같은 V_H 및 V_L 시퀀스를 가짐), 또는 모노클로날 항체 10H10 (각각, SEQ ID NOs: 5 및 15에 나타난 것과 같은 V_H 및 V_L 시퀀스를 가짐), 또는 모노클로날 항체 1B12 (각각, SEQ ID NOs: 6 및 16에 나타난 것과 같은 V_H 및 V_L 시퀀스를 가짐), 또는 모노클로날 항체 7H1 (각각, SEQ ID NOs: 7 및 17에 나타난 것과 같은 V_H 및 V_L 시퀀스를 가짐), 또는 모노클로날 항체 11E6 (각각, SEQ ID NOs: 8 및 18에 나타난 것과 같은 V_H 및 V_L 시퀀스를 가짐), 또는 모노클로날 항체 12B7 (각각, SEQ ID NOs: 9 및 19에 나타난 것과 같은 V_H 및 V_L 시퀀스를 가짐), 또는 모노클로날 항체 13G4 (각각, SEQ ID NOs: 10 및 20에 나타난 것과 같은 V_H 및 V_L 시퀀스를 가짐)일 수 있다. 이러한 크로스-경쟁 항체는 표준 PD-L1 결합 분석법으로 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 또는 13G4와 크로스-경쟁하는 그 능력에 기초하여 동정되어 질 수 있다. 예를 들어, BIAcore 분석법, ELISA 분석 또는 유동세포분석법이 현행 발명의 항체와의 크로스-경쟁을 입증하기 위하여 사용될 수 있을 것이다. 인간 PD-L1에, 예를 들어 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 또는

13G4의 결합을 저해하는 시험 항체의 능력은 시험 항체가 인간 PD-L1에 대한 결합에 대해 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 또는 13G4와 경쟁할 수 있고, 따라서 인간 PD-L1 상에 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 또는 13G4와 같은 항원결정인자에 결합한다는 것을 입증한다. 바람직한 실시형태에서, 인간 PD-L1 상에 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 또는 13G4와 같은 항원결정인자에 결합하는 항체는 인간 모노클로날 항체이다. 이러한 인간 모노클로날 항체는 실시예에서 기술되어 지는 바와 같이 제조되고 분리되어 질 수 있다.

[0393] 가공되고 변이된 항체

[0394] 본 발명의 항체는 더욱이 변이된 항체를 가공하는 시발 물질로서 여기에 기술된 하나 또는 그 이상의 V_H 및/또는 V_L 시퀀스를 갖는 항체를 사용하여 제조되어 질 수 있고, 여기서 변이된 항체는 시발 항체로부터 변형된 특성을 가질 수 있다. 항체는 하나 또는 양자의 가변 영역들 (즉, V_H 및/또는 V_L) 내에서, 예를 들어 하나 또는 그 이상의 CDR 영역 및/또는 하나 또는 그 이상의 골격 영역 내에서 하나 또는 그 이상의 잔기를 변형함에 의하여 가공되어 질 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, 항체는 불변영역들 내에서, 예를 들어 항체의 이펙터 기능을 개변하기 위하여 잔기를 변형함에 의하여 가공되어 질 수 있다.

[0395] 수행되어 질 수 있는 가변 영역을 가공하는 하나의 형태는 CDR 그래프팅이다. 항체는 여섯의 중 및 경사슬 상보성 결정 영역들 (CDRs) 내에 위치된 아미노산 잔기를 통하여 현저하게 타겟 항원과 상호작용한다. 이러한 이유 때문에, CDR 내에 아미노산 시퀀스가 CDR의 외측의 시퀀스 보다 개개의 항원들 사이에서 보다 다양하다. CDR 시퀀스는 대부분의 항체-항원 상호작용에 원인이 되기 때문에, 다른 특성을 갖는 다른 항원으로부터 골격 시퀀스 상에 그래프트된 특정 자연 발생 항원으로부터의 CDR 시퀀스를 포함하는 발현 벡터를 컨스트럭트함에 의해 특정 자연 발생 항원의 특성을 닮은 제조항체를 발현하는 것이 가능하다(즉, Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; Winter의 U.S. 특허번호 No. 5,225,539, 그리고 Queen 등의 U.S. 특허번호 Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370. 참고)

[0396] 따라서, 본 발명의 또 다른 실시형태는 각각 SEQ ID NOs:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 및 30, SEQ ID NOs:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 및 40, 및 SEQ ID NOs:41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 및 50 으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역; 및 각각 SEQ ID NOs:51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 및 60, SEQ ID NOs:61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 및 70, 및 SEQ ID NOs:71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 및 80으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스를 포함하는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역을 포함하는 분리된 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분에 속한다. 따라서, 이러한 항체는 모노클로날 항체 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 또는 13G4의 V_H 및 V_L CDR 시퀀스를 포함하고, 더욱이 이들 항체로부터의 다른 골격 시퀀스도 포함할 수 있다.

[0397] 이러한 골격 시퀀스는 생식계열 항체 유전자 시퀀스를 포함하는 공공 DNA 데이터베이스 또는 공개된 레퍼런스로부터 얻어질 수 있다. 예를 들어, 인간 중 또는 경사슬 가변 영역에 대한 생식계열 DNA 시퀀스는 "VBase" 인간 생식계열 시퀀스 데이터베이스(인터넷 상 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase에서 이용할 수 있음) 뿐 아니라 Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; and Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836에서 발견되어 질 수 있고; 이들 각각의 내용은 레퍼런스로 여기에 명백하게 함체되어 진다.

[0398] 항체 단백질 시퀀스는 이 분야의 통상인에게 잘 알려진 소위 갭트 BLAST (Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402)라고 불리는 일 시퀀스 유사성 검색 방법을 사용하여 축적된 단백질 시퀀스 데이터베이스에 대해 비교되어 진다. BLAST는 항체 시퀀스와 데이터베이스 시퀀스 간에 통계적으로 유의성이 있는 배열이 배열된 워드의 하이-스코어링 단편 쌍(HSP)을 포함하기 쉬운 발견적 알고리즘이다. 그 스코어가 신장이나 트리밍에 의하여 개선되어 질 수 없는 단편 쌍은 "히트(hit)"로 불린다. 간략하게는, VBASE 유래의 뉴클레오타이드 시퀀스(vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php)는 전사되고 그리고 FR1 내지 FR3 골격 영역 사이의 영역 및 이를 포함하는 영역은 보유되어 진다. 데이터베이스 시퀀스는 98 잔기의 평균 길이를 갖는다. 단백질의

전체 길이에 걸쳐 정확하게 매치하는 이중의 시퀀스가 제거된다. 디폴트, 턴 오프된 저 복잡성 필터를 제외한 스탠다드 파라미터 및 BLOSUM62의 대체 매트릭스로 프로그램 "blastp"를 사용하여 단백질에 대한 BLAST 검색은 탑 5 히트 생성 시퀀스 매치에 대하여 걸렸다. 뉴클레오타이드 시퀀스는 전체 여섯 프레임으로 전사되고 그리고 데이터베이스 시퀀스의 매치하는 단편에 정지 코돈을 갖지 않는 프레임은 잠정적인 히트로 간주되었다. 이것은 차례로 BLAST 프로그램 tblastx를 사용하는 것이 확인되었다. 이것은 항체 시퀀스를 전체 여섯 프레임으로 전사하고 이들 전사를 전체 여섯 프레임으로 극적으로 전사된 VBASE 뉴클레오타이드 시퀀스에 비교하였다.

[0399]

동일성은 시퀀스의 전체 길이에 걸쳐 단백질 데이터베이스와 항체 시퀀스 사이의 정확한 아미노산 매치이다. 양성(동일성 + 치환 매치)는 동일한 것이 아니라 치환 BLOSUM62 매트릭스에 의해 가이드된 아미노산 치환이다. 만일 항체 시퀀스가 두 개의 데이터베이스 시퀀스와 같은 동일성으로 매치된다면, 가장 양성을 갖는 히트가 매치되는 시퀀스 히트인 것으로 결정된다.

[0400]

본 발명의 항체에 사용되기 위한 바람직한 골격 시퀀스는 본 발명의 선택된 항체에 의해 사용된 골격 시퀀스에 구조적으로 유사한, 즉 본 발명의 바람직한 모노클로날 항체에 의해 사용된 V_H 1-18 골격 시퀀스 (SEQ ID NO: 101) 및/또는 V_H 1-69 골격 시퀀스 (SEQ ID NO: 102) 및/또는 V_H 1-3 골격 시퀀스 (SEQ ID NO: 103) 및/또는 V_H 3-9 골격 시퀀스 (SEQ ID NO: 104) 및/또는 V_K L6 골격 시퀀스 (SEQ ID NO: 105) 및/또는 V_K L1 5 골격 시퀀스 (SEQ ID NO: 106) 및/또는 V_K A27 골격 시퀀스 (SEQ ID NO: 107) 및/또는 V_K L1 8 골격 시퀀스 (SEQ ID NO: 107)에 유사한 것들이다. V_H CDR1, CDR2, 및 CDR3 시퀀스, 그리고 V_K CDR1, CDR2, 및 CDR3 시퀀스는 골격 시퀀스가 유도되는 생식계열 이뮤노글로불린 유전자에서 발견되는 것과 동일한 시퀀스를 가지는 골격 영역 상에 그래프트되어 질 수 있거나, 또는 CDR 시퀀스는 생식계열 시퀀스에 비하여 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 포함하는 골격 영역 상에 그래프트되어 질 수 있다. 예를 들어, 어떤 경우에는 항체의 항원 결합 능력을 유지하거나 또는 고양하기 위하여 골격 영역 내에서 잔기를 변이시키는 것이 유리하다는 것이 알려져 있다(즉, Queen 등의 U.S. 특허 번호 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370 참고).

[0401]

다른 타입의 가변 영역 변이는 V_H 및/또는 V_K CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 영역 내의 아미노산 잔기를 변이하고 이에 의해 대상 항체의 하나 또는 그 이상의 결합 특성(즉, 친화도)을 개선하기 위한 것이다. 사이트-지정 돌연변이 유발 또는 PCR-매개 돌연변이유발은 돌연변이를 도입하기 위해 수행되어 질 수 있고 그리고 항체 결합에 대한 효과 또는 흥미 대상의 다른 기능적 특성이 실시예에 제공되고 여기에서 기술된 것과 같은 생체 외 또는 생체 내 분석법으로 평가될 수 있다. 바람직하기로는 (위에서 기술된) 보존적 변이가 도입된다. 돌연변이는 아미노산 치환, 부가 또는 결손일 수 있지만, 그러나 바람직하기로는 치환이다. 더욱이, 전형적으로 CDR 영역 내에서 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 잔기 이하가 변형된다.

[0402]

따라서, 다른 실시형태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 중사슬 가변영역을 포함하는 분리된 항-PD-L1 모노클로날 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 제공한다: (a) SEQ ID NOs:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 및 30으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스, 또는 SEQ ID NOs:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 및 30에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 아미노산 치환, 결손 또는 부가를 갖는 아미노산 시퀀스를 포함하는 V_H CDR1 영역; (b) SEQ ID NOs:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 및 40으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스, 또는 SEQ ID NOs:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 및 40에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 아미노산 치환, 결손 또는 부가를 갖는 아미노산 시퀀스를 포함하는 V_H CDR2 영역; (c) SEQ ID NOs:41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 및 50으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스, 또는 SEQ ID NOs:41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 및 50에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 아미노산 치환, 결손 또는 부가를 갖는 아미노산 시퀀스를 포함하는 V_H CDR3 영역; (d) SEQ ID NOs:51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 및 60으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스, 또는 SEQ ID NOs:51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 및 60에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 아미노산 치환, 결손 또는 부가를 갖는 아미노산 시퀀스를 포함하는 V_K CDR1 영역; (e) SEQ ID NOs:61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 및 70으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스, 또는 SEQ ID NOs:61, 62, 63, 64, 65, 66, 61, 68, 69, 및 70에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 아미노산 치환, 결손 또는 부가를 갖는 아미노산 시퀀스를 포함하는 V_K CDR2 영역; 및 (f) SEQ ID NOs:71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 및 80으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 시퀀스, 또는 SEQ ID NOs:71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 및 80에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 아미노산 치환, 결손 또는 부가를 갖는 아미노산 시퀀스를 포함하는 V_K CDR3 영역.

- [0403] 본 발명의 가공된 항체는 그 변이가, 예를 들어 항체의 특성을 개선하기 위하여 V_H 및/또는 V_K 내에 골격 잔기에 대하여 이루어진 것이다. 전형적으로 이러한 골격 변이는 항체의 면역성을 감소하게 한다. 예를 들어, 하나의 접근법은 상응하는 생식계열 시퀀스에 대해 하나 또는 그 이상의 골격 잔기를 "후위 변이"하는 것이다. 더욱 자세히, 체세포돌연변이된 항체는 항체가 유도되어 진 생식계열 시퀀스와 다른 골격 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 잔기는 항체가 유도되어 진 생식계열 시퀀스에 항체 골격 시퀀스를 비교함에 의하여 동정되어 질 수 있다. 예를 들어, 아래에 기술되어 지는 바와 같이, 다수의 아미노산이 모체 생식계열 시퀀스와 다른 항-PD-L1 항체 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 및 13G4의 골격 영역에서 변한다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 체세포 돌연변이가, 예를 들어 사이트-지정 돌연변이유발 또는 PCR-매개 돌연변이유발에 의하여 생식계열 시퀀스에 "후위 변이"되어 질 수 있다. 모체 생식계열 V_H 1-18 시퀀스에 대한 3G10에 대한 V_H 영역의 얼라인먼트는 도 11에 나타나 있다. 모체 생식계열 V_H 1-69 시퀀스에 대한 12A4에 대한 V_H 영역의 얼라인먼트는 도 12에 나타나 있다. 모체 생식계열 V_H 1-3 시퀀스에 대한 10A5에 대한 V_H 영역의 얼라인먼트는 도 13에 나타나 있다. 모체 생식계열 V_H 1-69 시퀀스에 대한 5F8에 대한 V_H 영역의 얼라인먼트는 도 14에 나타나 있다. 모체 생식계열 V_H 3-9 시퀀스에 대한 10H10에 대한 V_H 영역의 얼라인먼트는 도 15에 나타나 있다. 모체 생식계열 V_H 1-69 시퀀스에 대한 1B12에 대한 V_H 영역의 얼라인먼트는 도 16에 나타나 있다. 모체 생식계열 V_H 1-69 시퀀스에 대한 7H1에 대한 V_H 영역의 얼라인먼트는 도 17에 나타나 있다. 모체 생식계열 V_H 1-69 시퀀스에 대한 11E6에 대한 V_H 영역의 얼라인먼트는 도 18에 나타나 있다. 모체 생식계열 V_H 1-69 시퀀스에 대한 12B7에 대한 V_H 영역의 얼라인먼트는 도 19에 나타나 있다. 모체 생식계열 V_H 3-9 시퀀스에 대한 13G4에 대한 V_H 영역의 얼라인먼트는 도 20에 나타나 있다.
- [0404] 예를 들어, 3G10에 대해서, V_H 의 아미노산 잔기 #79 (FR3 내)는 발린인 반면, 상응하는 V_H 1-18 생식계열 시퀀스에서의 이 잔기는 알라닌이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 체세포 돌연변이가, 예를 들어 사이트-지정 돌연변이유발 또는 PCR-매개 돌연변이유발에 의하여 생식계열 시퀀스에 "후위 변이"되어 질 수 있다 (즉, 3G10의 V_H 의 잔기 #79 (FR3의 잔기 #13)는 발린으로부터 알라닌으로 "후위 변이"될 수 있음).
- [0405] 다른 예로서, 12A4에 대해서, V_H 의 아미노산 잔기 #24 (FR1 내)는 트레오닌인 반면, 상응하는 V_H 1-69 생식계열 시퀀스에서의 이 잔기는 알라닌이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 예를 들어 12A4의 V_H 의 잔기 #24는 트레오닌으로부터 알라닌으로 "후위 변이"될 수 있다. 이런 "후위 변이"된 항체 또한 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0406] 또 다른 예로서, 12A4에 대해서, V_H 의 아미노산 잔기 #27 (FR1 내)는 아스파르트산인 반면, 상응하는 V_H 1-69 생식계열 시퀀스에서의 이 잔기는 글리신이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 예를 들어 12A4의 V_H 의 잔기 #27는 아스파르트산으로부터 글리신으로 "후위 변이"될 수 있다. 이런 "후위 변이"된 항체 또한 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0407] 또 다른 예로서, 12A4에 대해서, V_H 의 아미노산 잔기 #95 (FR3 내)는 페닐알라닌인 반면, 상응하는 V_H 1-69 생식계열 시퀀스에서의 이 잔기는 티로신이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 예를 들어 12A4의 V_H 의 잔기 #95(FR3의 잔기 #29)는 페닐알라닌으로부터 티로신으로 "후위 변이"될 수 있다. 이런 "후위 변이"된 항체 또한 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0408] 또 다른 예로서, 5F8에 대해서, 아미노산 잔기 #24 (FR1 내)는 발린인 반면, 상응하는 V_H 1-69 생식계열 시퀀스에서의 이 잔기는 알라닌이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 예를 들어 5F8의 V_H 의 잔기 #24는 발린으로부터 알라닌으로 "후위 변이"될 수 있다. 이런 "후위 변이"된 항체 또한 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0409] 또 다른 예로서, 5F8에 대해서, 아미노산 잔기 #28 (FR1 내)는 이소류이신인 반면, 상응하는 V_H 1-69 생식계열 시퀀스에서의 이 잔기는 트레오닌이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 예를 들어 5F8의 V_H 의 잔기 #28는 이소류이신으로부터 트레오닌으로 "후위 변이"될 수 있다. 이런 "후위 변이"된 항

체 또한 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.

- [0410] 또 다른 예로서, 10H10에 대해서, 아미노산 잔기 #24 (FR1 내)는 발린인 반면, 상응하는 V_H 3-9 생식계열 시퀀스에서의 이 잔기는 알라닌이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 예를 들어 10H10의 V_H 의 잔기 #24는 발린으로부터 알라닌으로 "후위 변이"될 수 있다. 이런 "후위 변이"된 항체 또한 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0411] 또 다른 예로서, 10H10에 대해서, 아미노산은 아미노산 잔기 #97 (FR3 내)에 따라 삽입되어 질 수 있다. 이 아미노산은 발린이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 예를 들어 10H10의 V_H 의 잔기 #97에 따라 삽입된 아미노산은 이 발린을 결손하도록 "후위 변이"될 수 있다. 이런 "후위 변이"된 항체 또한 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0412] 또 다른 예로서, IB12에 대해서, 아미노산 잔기 #24 (FR1 내)는 트레오닌인 반면, 상응하는 V_H 1-69 생식계열 시퀀스에서의 이 잔기는 알라닌이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 예를 들어 IB12의 V_H 의 잔기 #24는 트레오닌으로부터 알라닌으로 "후위 변이"될 수 있다. 이런 "후위 변이"된 항체 또한 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0413] 또 다른 예로서, IB12에 대해서, 아미노산 잔기 #27 (FR1 내)는 아스파르트산인 반면, 상응하는 V_H 1-69 생식계열 시퀀스에서의 이 잔기는 글리신이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 예를 들어 IB12의 V_H 의 잔기 #24는 아스파르트산으로부터 글리신으로 "후위 변이"될 수 있다. 이런 "후위 변이"된 항체 또한 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 의도된다. 또 다른 예로서, IB12에 대해서, 아미노산 잔기 #95 (FR3 내)는 페닐알라닌인 반면, 상응하는 V_H 1-69 생식계열 시퀀스에서의 이 잔기는 티로신이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 예를 들어 IB12의 V_H 의 잔기 #95(FR3의 잔기 #29)는 페닐알라닌으로부터 티로신으로 "후위 변이"될 수 있다. 이런 "후위 변이"된 항체 또한 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0414] 또 다른 예로서, 7H1에 대해서, 아미노산 잔기 #24 (FR1 내)는 트레오닌인 반면, 상응하는 V_H 1-69 생식계열 시퀀스에서의 이 잔기는 알라닌이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 예를 들어 7H1의 V_H 의 잔기 #24는 트레오닌으로부터 알라닌으로 "후위 변이"될 수 있다. 이런 "후위 변이"된 항체 또한 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0415] 또 다른 예로서, 7H1에 대해서, 아미노산 잔기 #77 (FR3 내)는 트레오닌인 반면, 상응하는 V_H 1-69 생식계열 시퀀스에서의 이 잔기는 세린이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 예를 들어 7H1의 V_H 의 잔기 #72(FR3의 잔기 #11)는 트레오닌으로부터 세린으로 "후위 변이"될 수 있다. 이런 "후위 변이"된 항체 또한 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0416] 또 다른 예로서, 11E6에 대해서, 아미노산 잔기 #78 (FR3 내)는 알라닌인 반면, 상응하는 V_H 1-69 생식계열 시퀀스에서의 이 잔기는 트레오닌이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 예를 들어 11E6의 V_H 의 잔기 #78(FR3의 잔기 12)는 알라닌으로부터 트레오닌으로 "후위 변이"될 수 있다. 이런 "후위 변이"된 항체 또한 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0417] 또 다른 예로서, 12B7에 대해서, 아미노산 잔기 #13 (FR1 내)는 글루탐산인 반면, 상응하는 V_H 1-69 생식계열 시퀀스에서의 이 잔기는 라이신이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 예를 들어 12B7의 V_H 의 잔기 #13은 글루탐산으로부터 라이신으로 "후위 변이"될 수 있다. 이런 "후위 변이"된 항체 또한 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0418] 또 다른 예로서, 12B7에 대해서, 아미노산 잔기 #30 (FR1 내)는 아스파라긴인 반면, 상응하는 V_H 1-69 생식계열 시퀀스에서의 이 잔기는 세린이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 예를 들어 12B7의 V_H 의 잔기 #30은 아스파라긴으로부터 세린으로 "후위 변이"될 수 있다. 이런 "후위 변이"된 항체 또한 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.

- [0419] 또 다른 예로서, 12B7에 대해서, 아미노산 잔기 #77 (FR3 내)는 아스파라긴인 반면, 상응하는 V_H 1-69 생식계열 시퀀스에서의 이 잔기는 세린이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 예를 들어 12B7의 V_H 의 잔기 #77(FR3의 잔기 11)은 아스파라긴으로부터 세린으로 "후위 변이"될 수 있다. 이런 "후위 변이"된 항체 또한 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0420] 또 다른 예로서, 12B7에 대해서, 아미노산 잔기 #82 (FR3 내)는 아스파르트산인 반면, 상응하는 V_H 1-69 생식계열 시퀀스에서의 이 잔기는 글루탐산이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 예를 들어 12B7의 V_H 의 잔기 #82는 아스파르트산으로부터 글루탐산으로 "후위 변이"될 수 있다. 이런 "후위 변이"된 항체 또한 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0421] 또 다른 예로서, 13G4에 대해서, 아미노산 잔기 #27 (FR1 내)는 이소류이신인 반면, 상응하는 V_H 1-69 생식계열 시퀀스에서의 이 잔기는 페닐알라닌이다. 골격 영역 시퀀스를 이들의 생식계열 형상으로 되돌리기 위하여, 예를 들어 12B7의 V_H 의 잔기 #27은 이소류이신으로부터 페닐알라닌으로 "후위 변이"될 수 있다. 이런 "후위 변이"된 항체 또한 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0422] 골격 변이의 다른 타입은 T 세포 항원결정인자를 제거하고 이에 의해 항체의 잠재적인 면역원성을 감소하기 위해 골격 영역 내에, 더욱이는 하나 또는 그 이상의 CDR 영역 내에 하나 또는 그 이상의 잔기를 돌연변이하는 것을 포함한다. 이 접근법은 또한 "탈면역화반응"으로 언급되고 그리고 Carr 등에 의한 미국 특허 공개번호 20030153043에 더 자세하게 기술되어 있다.
- [0423] 골격 또는 CDR 영역 내에서 이루어진 변이에 부가 또는 대안적으로, 본 발명의 항체는 Fc 영역 내에 변이를 포함하도록, 전형적으로는, 혈청 반감기, 보체고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원-의존성 세포의 세포독성과 같은 항체의 하나 또는 그 이상의 기능적 특성을 변형하기 위해 가공되어 질 수 있다. 더욱이, 본 발명의 항체는 화학적으로 수사되거나(즉, 하나 또는 그 이상의 화학적인 부분이 항체에 부착되어 질 수 있음) 또는 그의 글리코실화반응을 변형하고 다시 항체의 하나 또는 그 이상의 기능적 특성을 변형하기 위해 수사되어 질 수 있다. 각각의 이들 항체는 아래에 보다 자세하게 기술될 것이다. Fc 영역에서 잔기의 번호 부여는 Kabat의 EU 인덱스의 것이다.
- [0424] 일 실시형태에 있어서, CH1의 힌지 영역은 힌지 영역의 시스테인 잔기의 수가 변형되도록, 즉 증가 또는 감소되도록 수사된다. 이 접근법은 Bodmer 등의 U.S. 특허번호 No. 5,677,425에 다 자세하게 기술되어 있다. CH1의 힌지 영역에서의 시스테인 잔기의 수는, 예를 들어 중 및 경사슬의 조합을 용이하게 하거나 또는 항체의 안전성을 증가 또는 감소되도록 변형된다.
- [0425] 또 다른 실시형태에 있어서, 항체의 Fc 힌지 영역은 항체의 생물학적 반감기를 감소하도록 변이된다. 보다 자세하게는, 하나 또는 그 이상의 아미노산 돌연변이가, 항체가 본래의 Fc-힌지 도메인 스타필로코킬 단백질 A (SpA) 결합에 대해 손상된 SpA를 갖도록 Fc-힌지 분획의 CH2-CH3 도메인 계면 영역 안으로 도입된다. 이 접근법은 Ward 등의 U.S. 특허번호 No. 6,165,745에 다 자세하게 기술되어 있다.
- [0426] 또 다른 실시형태에 있어서, 항체는 항체의 생물학적 반감기를 증가하도록 변이된다. 다양한 접근법들이 가능하다. 예를 들어, 하나 또는 그 이상의 다음의 돌연변이가 도입될 수 있다: Ward에 의한 U.S. 특허번호 No. 6,277,375호에 기술된 바와 같은 T252L, T254S, T25. 대안적으로, 생물학적 반감기를 증가하기 위해, Presta 등에 의한 U.S. 특허번호 No. 5,869,046 및 6,121,022에 기술된 바와 같이, 항체는 IgG의 Fc 영역의 CH2 도메인의 두 개의 루프로부터 취해진 샬비지 리셉터 결합 항원결정인자를 포함하도록 CH1 또는 CL 영역 내에서 변형되어 질 수 있다.
- [0427] 더욱이 다른 실시형태에서, Fc 영역은 적어도 하나의 아미노산 잔기를 다른 아미노산 잔기로 대체함에 의해 변형되어 항체의 이펙터 작용을 변형한다. 예를 들어, 아미노산 잔기 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 및 322로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기가, 항체가 이펙터 리간드에 대해서는 변형된 친화도를 가지지만 모체 항체의 항원-결합 능력을 보유하도록 다른 아미노산 잔기로 치환되어 질 수 있다. 친화도가 변형된 이펙터 리간드는, 예를 들어 보체의 Fc 수용체 또는 C1 성분일 수 있다. 이 접근법은 Winter 등에 의한 U.S. 특허번호 Nos. 5,624,821와 5,648,260 양자에 보다 자세하게 기술되어 있다.
- [0428] 다른 예에서, 아미노산 잔기 329, 331 및 322로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기가, 항체가 변형된 CIq 결합 및/또는 감소된 또는 소멸된 보체 의존성 세포독성(CDC)을 가지도록 다른 아미노산 잔기로 대체되

어 질 수 있다. 이 접근법은 Idusogie 등에 의한 U.S. 특허번호 No. 6,194,551에 보다 자세하게 기술되어 있다.

[0429] 또 다른 예에서, 아미노산 위치 231 및 239 내의 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기가 변형되고 이에 의해 여섯 개의 보체에 대한 항체의 능력을 변형한다. 이 접근법은 Bodmer 등에 의한 PCT 공개공보 WO 94/29351에 보다 자세하게 기술되어 있다.

[0430] 더욱이 또 다른 예에서, Fc 영역은 다음의 위치에 하나 또는 그 이상의 아미노산을 수사함에 의하여 Fc γ 수용체에 대한 항체의 친화도를 증가하기 위한 및/또는 항체 의존성 세포의 세포독성(ADCC)을 조절하기 위한 항체의 능력을 증가하기 위해 수사되어 질 수 있다: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 또는 439. 이 접근법은 Presta 등에 의한 PCT 공개공보 WO 00/42072에 보다 자세하게 기술되어 있다. 더욱이, Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII 및 FcRn에 대한 인간 IgG1 상의 결합 사이트가 지도로 그려지고 그리고 개선된 결합을 갖는 변형체가 기술되어 저 있다 (Shields, R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 참고). 위치 256, 290, 298, 333, 334 및 339에 대한 특정 돌연변이가 Fc γ RIII에 대한 결합을 개선하기 위해 나타나 진다. 부가적으로, 다음의 조합 돌연변이가 Fc γ RIII 결합을 개선하기 위해 나타나 진다: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A 및 S298A/E333A/K334A.

[0431] 여전히 다른 실시형태에서는 항체의 글리코실화반응이 수사된다. 예를 들어, 글리코실화된 항체가 제조될 수 있다(즉, 항체는 글리코실화반응을 결한다). 글리코실화반응은, 예를 들어 항원에 대한 항체의 친화도를 증진하기 위해 변형되어 질 수 있다. 이러한 카르보하이드레이트 변이는, 예를 들어 항체 시퀀스 내의 글리코실화반응의 하나 또는 그 이상의 사이트를 변형함에 의해 성취되어 질 수 있다. 예를 들어, 하나 또는 그 이상의 가변 영역 골격 글리코실화반응 사이트의 제거를 초래하고 이에 의하여 그 사이트에서의 글리코실화반응을 제거하는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환이 만들어질 수 있다. 이러한 글리코실화반응은 항원에 대한 항체의 친화도를 증가할 수 있다. 이 접근법은 Co 등에 의한 U.S. 특허번호 Nos. 5,714,350 및 6,350,861에 보다 자세하게 기술되어 있다.

[0432] 어떤 다른 실시형태에서, 감소된 양의 퓨코실 잔기를 갖는 히포퓨코실화 항체 또는 증가된 이분할 GlcNac 구조를 갖는 항체와 같이 변형된 타입의 글리코실화반응을 가지는 항체가 만들어 질 수 있다. 이러한 변형된 글리코실화반응 패턴은 항체의 ADCC 능력을 증진하기 위해 입증되어져 있다. 이러한 카르보하이드레이트 변이는, 예를 들어 변형된 글리코실화반응 머시너리를 갖는 숙주세포에 항체를 발현함에 의해 성취되어 질 수 있다. 변형된 글리코실화반응 머시너리를 갖는 세포들은 이 기술분야에 잘 기술되어져 있고 그리고 여기에 본 발명의 재조합 항체를 발현하고 이에 의해 변형된 글리코실화반응을 갖는 항체를 생산하기 위해 숙주세포로 사용되어 질 수 있다. 예를 들어, 셀 라인 Ms704, Ms705, 및 Ms709는 이 Ms 704, Ms705, 및 Ms709 셀 라인에서 발현된 항체가 그들의 카르보하이드레이트 상에 퓨코스를 결합하도록 퓨코실트랜스퍼라제 유전자인 FUT8 (알파 (1,6) 퓨코실트랜스퍼라제)를 결한다. Ms704, Ms705, 및 Ms709 FUT8^{-/-} 셀 라인들은 두 개의 대체 벡터를 사용하여 CHO/DG44 세포 내에 FUT8 유전자의 타겟된 분열에 의해 만들어 진다(Yamane 등에 의한 U.S. 특허 공개 번호 No.20040110704 및 Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). 또 다른 예로서, Hanai 등에 의한 EP 1,176,195 호는 그 셀 라인에서 발현된 항체가 알파 1,6 결합-관련 효소를 감소하거나 또는 제거함에 의해 히포퓨코실화반응을 나타내도록 퓨코실 트랜스퍼라제를 코딩하는 기능적으로 파열된 FUT8 유전자를 갖는 셀 라인을 기술하고 있다. Hanai 등은 또한, 예를 들어 랫트 미엘로마 셀 라인 YB2/0 (ATCC CRL 1662)과 같이 항체의 Fc 영역에 결합하거나 또는 효소 활성을 갖지 않는 N-아세틸글루코사민에 퓨코스를 부가함에 대한 낮은 효소 활성을 갖는 셀 라인을 기술하고 있다. Presta에 의한 PCT 공개공보 WO 03/035835는 Asn(297)-링커된 탄수화물에 대해 퓨코스가 부착하는 감소된 능력을 갖을 뿐 아니라 그 숙주 세포에서 발현된 항체의 히포글리코실화 반응에서의 결과인 CHO 셀 라인인, Lee 13 셀을 기술하고 있다(또한, Shields, R.L. *et al* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740 참고). Umana 등에 의한 PCT 공개공보 WO 99/54342호는 가공된 셀 라인에서 발현된 항체가 항체의 증가된 ADCC 활성을 초래하는 증가된 이분 GlcNac 구조를 나타내도록 당단백질-수사 글리코실 크랜스퍼라제(즉, 베타 (1,4)-N-아세틸글루코사아미닐트랜스퍼라제 III (GnTIII))를 발현하도록 가공된 셀 라인을 기술한다(또한, Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180 참고). 대안적으로, 항체의 퓨코스 잔기는 퓨코시다제 효소를 사용하여 단리하여 버린다. 예를 들어, 퓨코시다제 알파-L-퓨코시다제는 항체로부터 퓨코스 잔기를 제거한다 (Tarentino, A.L. *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

- [0433] 본 발명에서 상찰된 여기에서의 항체의 또 다른 변이는 PEG화반응이다. 항체는, 예를 들어 항체의 생물학적(즉, 혈청) 반감기를 증가하기 위해 PEG화되어 질 수 있다. 항체를 PEG화하기 위하여, 항체, 또는 전형적으로는 이들의 분획이 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 반응성 에스테르 또는 알데하이드 유도체류와 같은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과, 하나 또는 그 이상의 PEG 기가 항체 또는 항체 분획에 부착되는 조건 하에서 반응된다. 바람직하기로, PEG화반응은 반응성 PEG 분자 (또는 유사한 반응성 수용성 폴리머)와 아실화반응 또는 알킬화반응을 통해 수행되어 진다. 여기서 사용된 것으로, 용어 "폴리에틸렌 글리콜"은 모노 (C_1-C_{10}) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-말레이미드와 같은 다른 단백질을 유도하기 위해 사용되어 지는 PEG의 어떤 형태도 포함하는 것으로 의도된다. 어떤 실시형태에 있어서, PEG화된 항체는 글리코실화 항체이다. 단백질을 PEG화하기 위한 방법은 이 기술 분야에 알려져 있고 그리고 본 발명의 항체에 대하여 적용되어 질 수 있다. 예를 들어, Nishimura 등에 의한 EP 0 154 316 및 Ishikawa 등에 의한 EP 0401 384 참고.
- [0434] 항체를 가공하는 방법
- [0435] 위에서 기술된 바와 같이, 여기에 기술된 V_H 및 V_K 시퀀스를 갖는 항-PD-L1 항체는 여기에 부착된 V_H 및/또는 V_K 시퀀스, 또는 불변 영역(들)을 변이함에 의해 신규한 항-PD-L1 항체를 만들기 위하여 사용되어 질 수 있다. 따라서, 본 발명의 또 다른 측면에 있어서는, 본 발명의 항-PD-L1 항체, 즉 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 또는 13G4의 구조적 특성은, 인간 PD-L1에 결합과 같은 본 발명의 항체의 적어도 하나의 기능적 특성을 보유하는 구조적으로 관련된 항-PD-L1 항체를 만들기 위하여 사용된다. 예를 들어, 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 또는 13G4나 이들의 변이체의 하나 또는 그 이상의 CDR 영역은, 상술한 바와 같이 본 발명의 부가적으로, 재조합적으로-가공된 항-PD-L1 항체를 만들기 위하여 공지된 골격 영역 및/또는 다른 CDRs과 재조합적으로 조합되어 질 수 있다. 다른 타입의 변이는 이전 부분에서 기술된 것을 포함한다. 가공하는 방법에 대하여 시발 물질로는 여기에 제공된 하나 또는 그 이상의 V_H 및/또는 V_K 시퀀스 또는 하나 또는 그 이상의 이들의 CDR 영역이다. 가공된 항체를 만들기 위하여서, 실질적으로 여기에 제공된 하나 또는 그 이상의 V_H 및/또는 V_K 시퀀스 또는 하나 또는 그 이상의 이들의 CDR 영역을 갖는 항체를 제조(즉, 단백질로서 발현)하는 것이 필요하지는 않다. 더욱이, 시퀀스(들)에 포함된 정보는 오리지널 시퀀스(들)로부터 유래된 "제이 세대" 시퀀스(들)을 만들기 위한 시발 물질로서 사용되고 그런 다음 "제이 세대" 시퀀스(들)은 준비되고 단백질로 발현된다.
- [0436] 따라서, 또 다른 실시형태에 있어서, 본 발명은 다음을 포함하는 항-PD-L1 항체를 제조하는 방법을 제공한다:
- [0437] (a) 다음을 제공: (i) SEQ ID NOs:21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 및 30으로 구성된 군으로부터 선택된 CDR1 시퀀스, SEQ ID NOs:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 및 40으로 구성된 군으로부터 선택된 CDR2 시퀀스, 및/또는 SEQ ID NOs:41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 및 50으로 구성된 군으로부터 선택된 CDR3 시퀀스를 포함하는 중사슬 가변영역 항체 시퀀스; 및/또는 (ii) SEQ ID NOs:51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 및 60으로 구성된 군으로부터 선택된 CDR1 시퀀스, SEQ ID NOs:61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 및 70으로 구성된 군으로부터 선택된 CDR2 시퀀스, 및/또는 SEQ ID NOs:71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 및 80으로 구성된 군으로부터 선택된 CDR3 시퀀스를 포함하는 경사슬 가변영역 항체 시퀀스;
- [0438] (b) 적어도 하나의 변형된 항체 시퀀스를 만들기 위하여 중사슬 가변영역 항체 시퀀스 및/또는 경사슬 가변영역 항체 시퀀스 내에 적어도 하나의 아미노산 잔기를 변형; 및
- [0439] (c) 변형된 항체 시퀀스를 단백질로 발현하는 것.
- [0440] 표준 분자 생물학 기술이 변형된 항체 시퀀스를 제조하고 발현하기 위하여 사용되어 질 수 있다.
- [0441] 바람직하기로, 변형된 항체 시퀀스에 의해 코드된 항체는 여기에 기술된 항-PD-L1 항체의 기능적 특성의 하나 또는 몇몇 또는 전부를 보유하는 것으로, 이 기능적 특성은, 여기에 한정되는 것은 아니지만 다음을 포함한다:
- [0442] (i) 1×10^{-7} M 또는 그 이하의 K_D 로 인간 PD-L1에 결합;
- [0443] (ii) 혼합된 림프구 반응(MLR) 분석에서 T-세포 증식을 증가;
- [0444] (iii) MLR 분석에서 인터페론- γ 생산성을 증가;
- [0445] (iv) MLR 분석에서 IL-2 분비를 증가;

- [0446] (v) 항체 반응을 자극; 및/또는
- [0447] (vi) T 세포 이펙터 세포 및/또는 수지상 세포에 대한 T 조절 세포의 효과를 반전.
- [0448] 변형된 항체의 기능적 특성은 이 기술분야에서 이용할 수 있는 및/또는 실시예에서 제시된 것(즉, 유동세포분석법, 결합 분석법)과 같은 여기에서 기술된 표준 분석법을 사용하여 평가되어 질 수 있다.
- [0449] 본 발명의 항체를 가공하는 방법의 실시형태에 있어서, 돌연변이가 시퀀스를 코딩하는 항-PD-L1 항체의 전부 또는 일부를 따라 랜덤하게 또는 선택적으로 도입되어 질 수 있고, 얻어진 변이된 항-PD-L1 항체는 결합 활성 및/또는 여기에 기술된 다른 기능적 특성에 대해 스크린되어 질 수 있다. 변이의 방법은 이 기술 분야에 기술되어 있다. 예를 들어, Short에 의한 PCT 공개공보 WO 02/092780은 포화 돌연변이유발, 합성적 결합 어셈블리 또는 이들의 조합을 사용하는 항체 돌연변이를 유발하고 스크리닝하는 방법을 기술하고 있다. 대안적으로, Lazar 등에 의한 PCT 공개공보 WO 03/074679는 항체의 물리 화학적 특성을 최적화하기 위하여 컴퓨터화된 스크리닝 방법을 사용하는 방법을 기술하고 있다.
- [0450] 개시의 항체를 코딩하는 핵산 분자
- [0451] 본 개시의 다른 측면은 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 본 핵산은 모든 세포에서, 세포 용융물에, 또는 부분적으로 정제된 또는 실질적으로 정제 형태로 존재할 수 있다. 핵산은 다른 세포성 구성분이거나 다른 오염물질, 즉 다른 세포성 핵산이나 단백질로부터, 알카린/SDS 처리, CsCl 밴딩, 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 일렉트로포레시스 및 이 분야에 잘 알려진 다른 방법을 포함하는 표준 기술에 의해 정제되어 질 때, "분리된" 또는 "실질적으로 부여된"다. (참고; F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York). 본 발명의 핵산은, 예를 들어 DNA 또는 RNA일 수 있고 그리고 고유의 시퀀스를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 바람직한 실시형태에 있어서, 핵산은 cDNA 분자이다. 본 발명의 핵산은 표준 분자생물학 기술을 사용하여 얻어질 수 있다. 하이브리도마(즉, 아래에 보다 자세히 기술되어 지는 바와 같이 인간 이뮤노글로불린 유전자를 담지하는 형질전환 마우스로부터 제조된 하이브리도마)에 의해 발현된 항체에 대해, 하이브리도마에 의해 제조된 항체의 중 및 경사슬을 코딩하는 cDNAs는 표준 PCR 증폭 또는 cDNA 클로닝 기술에 의하여 획득되어 질 수 있다. 이뮤노글로불린 유전자 라이브러리로부터 얻어진 항체(즉, 파아지 디스플레이 기술을 사용하여)에 대해서는, 항체를 코딩하는 핵산은 라이브러리로부터 회수되어 질 수 있다.
- [0452] 본 발명의 바람직한 핵산 분자는 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 및 13G4 모노클로날 항체의 V_H 및 V_L 시퀀스를 코딩하는 것이다. 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 및 13G4의 V_H 시퀀스를 코딩하는 DNA 시퀀스는 각각 SEQ ID NOs:81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 및 90에 나타나 있다. 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 및 13G4의 V_L 시퀀스를 코딩하는 DNA 시퀀스는 각각 SEQ ID NOs:91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 및 100에 나타나 있다.
- [0453] 일단 V_H 및 V_L 부분을 코딩하는 DNA 분획이 얻어지면, 이들 DNA 분획은, 예를 들어 가변 영역 유전자를 완전-길이의 항체 사슬 유전자로, Fab 분획 유전자로 또는 scFv 유전자로 전환하는 표준 재조합 DNA 기술에 의해 조작되어 질 수 있다. 이들 조작에 있어서, V_L - 또는 V_H -코딩하는 DNA 분획은 항체 불변 영역 또는 가변 링커와 같은 다른 단백질을 코딩하는 또 다른 DNA 분획에 조작적으로 연결되어 진다. 여기서 사용된 것으로 용어 "조작적으로 연결된,"은 두 개의 DNA 분획이 이 두 개의 DNA 분획에 의해 코딩된 아미노산 시퀀스가 프레임 안에 남아 있도록 연결되어진 것을 의미하기 위한 것이다.
- [0454] V_H 영역을 코딩하는 분리된 DNA는 중사슬 불변 영역 (CH1, CH2 및 CH3)을 코딩하는 다른 DNA 분자에 V_H -코딩하는 DNA를 조작적으로 연결함에 의해 완전-길이의 중사슬 유전자로 전환되어 질 수 있다. 인간 중사슬 불변 영역 유전자의 시퀀스는 이 기술 분야에 잘 알려져 있고(즉, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 참고), 그리고 이들 영역을 포괄하는 DNA 분획은 표준 PCR 증폭에 의하여 얻어질 수 있다. 중사슬 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역일 수 있지만, 가장 바람직하기로는 IgG1 또는 IgG4 불변 영역이다. Fab 분획 중사슬 유전자에 대하여, V_H -코딩하는 DNA는 단지 중사슬 CH1 불변 영역만을 코딩하는 다른 DNA 분자에 조작적으로 연결되어 질 수 있다.
- [0455] V_L 영역을 코딩하는 분리된 DNA는 경사슬 불변 영역, CL을 코딩하는 다른 DNA 분자에 V_L -코딩하는 DNA를 조작적

으로 연결함에 의해 완전-길이의 경사슬 유전자 (뿐 아니라 Fab 경사슬 유전자)로 전환되어 질 수 있다. 인간 경사슬 불변 영역 유전자의 시퀀스는 이 기술 분야에 잘 알려져 있고(즉, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 참고), 그리고 이들 영역을 포괄하는 DNA 분획은 표준 PCR 증폭에 의하여 얻어질 수 있다.

- [0456] 경사슬 불변 영역은 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있지만, 가장 바람직하기로는 카파 불변 영역이다.
- [0457] scFv 유전자를 제작하기 위하여, V_H - 및 V_L -코드하는 DNA 분획이 가변 링커를 코드하는, 즉 아미노산 시퀀스 (GIy4 -Ser)3를 코드하는 다른 분획에, V_H 및 V_L 시퀀스가 가변 링커에 의하여 연결된 V_L 및 V_H 영역을 갖는 접축성 단일-사슬 단백질로 발현되어 질 수 있도록 조작적으로 연결되어 진다 (즉, Bird et al (1988) Science 242:423-426; Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al, (1990) Nature 348:552-5541 참고)
- [0458] 본 발명의 모노클로날 항체의 생산
- [0459] 본 발명의 모노클로날 항체 (mAbs)는 통상적인 모노클로날 항체 방법론, 즉 콜러와 밀스타인(Kohler and Milstein (1975) Nature 256: 495)의 표준 체세포 하이브리드화반응 기술을 포함하는 다양한 기술에 의하여 생산되어 질 수 있다. 비록 체세포 하이브리드화반응 절차가 바람직하지만, 원론적으로는 모노클로날 항체를 생산하기 위한 다른 기술, 즉 B 림프구의 바이러스의 또는 발암의 형질전환이 채용되어 질 수 있다.
- [0460] 하이브리도마를 제조하기 위한 바람직한 동물 계는 뮤어라인 계이다. 마우스에서 하이브리도마 생산은 아주 잘 확립된 절차이다. 용융을 위해 면역화된 비장세포의 분리를 위한 면역화반응 프로토콜 및 기술은 이 분야에 잘 알려져 있다.용융 파트너(즉, 뮤어라인 미엘로마 세포) 및 용융 과정 또한 잘 알려져 있다.
- [0461] 본 발명의 키메르 또는 인체적응된 항체는 상술된 바와 같이 제조된 뮤어라인 모노클로날 항체의 시퀀스에 의하여 제조되어 질 수 있다. 중 및 경사슬 이뮤노글로불린을 코드하는 DNA는 표준 분자생물학 기술을 사용하여 흥미 대상의 뮤어라인 하이브리도마로부터 수득되어 질 수 있고 비-뮤어라인(즉, 인간) 이뮤노글로불린 시퀀스를 포함하도록 가공되어 질 수 있다. 예를 들어, 키메르 항체를 만들기 위해, 뮤어라인 가변 영역들은 이 분야의 공지된 방법을 사용하여 인간 불변 영역들에 연결되어 질 수 있다 (즉, Cabilly 등의 U.S. 특허번호 No.4,816,567 참고). 인체적응된 항체를 만들기 위해, 뮤어라인 CDR 영역들이 이 분야의 공지된 방법을 사용하여 인간 골격 영역 안으로 삽입되어 질 수 있다 (즉, Winter의 U.S. 특허번호 No. 5,225,539 및 Queen 등의 U.S. 특허번호 Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370 참고).
- [0462] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 항체는 인간 모노클로날 항체이다. PD-L1에 대항하는 이러한 인간 모노클로날 항체는 마우스 계 이외에 인간 면역계의 일부를 담지하는 형질전환 또는 염색체전환 마우스를 사용하여 생산되어 질 수 있다. 이들 형질전환 또는 염색체전환 마우스는 각각 HuMAb 마우스 및 KM 마우스™ 으로 여기서 언급된 마우스를 포함하고, 그리고 "인간 Ig 마우스"로 여기서 집합적으로 언급되어 진다.
- [0463] HuMAb 마우스® (Medarex, Inc.)는 내재성 μ 및 κ 사슬 유전자좌들을 비활성화하는 타겟된 돌연변이와 함께 비재배열된 인간 중사슬 (μ 및 γ) 및 κ 경사슬 이뮤노글로불린 시퀀스를 코드하는 인간 이뮤노글로불린 유전자의 미니 유전자좌를 포함한다 (즉, Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856- 859 참고). 따라서, 마우스는 면역화반응에 반응하여 마우스 IgM 또는 κ 의 감소된 발현을 나타내고 도입된 인간 중 및 경사슬 전환유전자는 클래스 스위칭 및 체세포돌연변이를 당하여 높은 친화성 인간 IgG κ 모노클로날을 발생한다(Lonberg, N. et al. (1994), *supra*; reviewed in Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, 및 Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. NY. Acad. Sci.* 764:536-546 참고). HuMAb 마우스의 제조 및 용도와 이들 마우스에 의해 수행된 계놈의 변이는 Taylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4: 117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; 및 Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851의 문헌에 더 자세하게 기술되어 있으며, 이들의 모든 내용은 그 전체로서 레퍼런스에 의해 특징적으로 합체되어 진다. 더욱이, Lonberg 및 Kay의 U.S. 특허번호 Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 및 5,770,429; Surani 등의 U.S. 특허번호 No. 5,545,807; Lonberg 및 Kay의 PCT 공개공보 Nos. WO

92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 및 WO 99/45962.; 그리고 Korman 등의 PCT 공개공보 No. WO 01/14424 참고.

- [0464] *또 다른 실시형태에서, 본 발명의 인간 항체는 인간 중사슬 전환유전자 및 인간 경사슬 전환염색체를 담지하는 마우스와 같이 전환유전자 및 전환염색체 상에 인간 이뮤노글로불린 시퀀스를 담지하는 마우스를 사용하여 변조되어 질 수 있다. 여기서는 "KM 마우스™,"로 언급되는 이런 마우스는 Ishida 등의 PCT 공개공보 WO 02/43478에 자세하게 기술되어 있다.
- [0465] 더 더욱이, 인간 이뮤노글로불린 유전자를 발현하는 대안적인 전환유전자의 동물계는 이 분야에서 이용될 수 있는 것이고 그리고 본 발명의 항-PD-L1 항체를 상승하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 제노마우스 (Abgenix, Inc.)로 언급된 대안적인 전환유전자의 계가 사용될 수 있고; 이러한 마우스는, 예를 들어 Kucherlapati 등의 U.S. 특허번호 Nos. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 및 6,162,963에 기술되어 있다.
- [0466] 더욱이, 인간 이뮤노글로불린 유전자를 발현하는 대안적인 전환염색체의 동물계는 이 분야에서 이용될 수 있는 것이고 그리고 본 발명의 항-PD-L1 항체를 상승하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들어, "TC 마우스"로 언급된 인간 중사슬 전환염색체 및 인간 경사슬 전환염색체 양자를 담지한 마우스가 사용될 수 있고; 이러한 마우스는, Tomizuka *et al* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727에 기술 되어 있다. 더욱이, 인간 중사슬 및 인간 경사슬 전환염색체를 담지한 카우는 이 기술분야(Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894)에 기술되어 있고 그리고 본 발명의 항-PD-L1 항체를 상승하기 위하여 사용될 수 있다.
- [0467] 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 또한 인간 이뮤노글로불린 유전자의 라이브러리를 스크리닝하기 위한 파아지 디스플레이 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 인간 항체를 분리하기 위한 이런 파아지 디스플레이 방법은 이 기술분야에 확립되어 있다. 예를 들어, Ladner 등의 U.S. 특허번호 Nos. 5,223,409; 5,403,484; 및 5,571,698; Dower 등의 U.S. 특허번호 Nos. 5,427,908 및 5,580,717; McCafferty 등의 U.S. 특허번호 Nos. 5,969,108 및 6,172,197; 그리고 Griffiths 등의 U.S. 특허번호 Nos. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 및 6,593,081 참고.
- [0468] 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 또한 인간 항체 반응이 면역화반응에 의해 발생될 수 있도록 인간 면역 세포가 재구성되어 진 SCID 마우스를 사용하여 제조되어 질 수 있다. 이러한 마우스는 예를 들어 Wilson 등의 U.S. 특허번호 Nos. 5,476,996 및 5,698,767에 기술되어 있다.
- [0469] 인간 Ig 마우스의 면역화반응
- [0470] 인간 Ig 마우스가 본 발명의 인간 항체를 상승하기 위해 사용될 때, 이러한 마우스는, Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; 그리고 PCT 공개공보 WO 98/24884 및 WO 01/14424에 기술된 바와 같이 PD-L1 항원 및/또는 재조합 PD-L1, 또는 PD-L1 용융 단백질의 정제된 또는 풍부한 제제로 면역화될 수 있다. 바람직하기로는, 마우스는 제일의 주입 후 6-16 주령의 것일 것이다. 예를 들어, PD-L1 항체의 정제되거나 재조합 제제(5-50 μ g)가 복강 내로 인간 Ig 마우스를 면역화하기 위해 사용될 수 있다.
- [0471] PD-L1에 대해 완전하게 인간 모노클로날 항체를 발생하기 위한 자세한 과정은 아래 실시예 1에 자세하게 기술되어 있다. 다양한 항원으로의 누적적 경험은, 불완전 프로인드 어쥬번트에 항원으로 매 격주로 IP 면역화(전체 여섯 번 까지)에 따른 완전 프로인드 어쥬번트에 항원으로 복강 내로 최초로 면역화될 때 형질전환 마우스가 반응하는 것을 보여준다. 그러나, 프로인드 외에 다른 어쥬번트가 또한 유효한 것으로 알려져 있다. 부가하여, 어쥬번트가 없는 전 세포가 아주 면역성인 것으로 알려져 있다. 면역 반응은 리트로비탈의 출혈에 의해 얻어지는 플라스마 샘플로 면역화 프로토콜의 경로 상에서 모니터될 수 있다. 이 플라스마는 (아래에 기술된) ELISA에 의해 선별될 수 있고 그리고 충분한 역가의 항-PD-L1 인간 이뮤노글로불린을 갖는 마우스가 용융을 위해 사용될 수 있다. 마우스는 희생하고 지라를 제거하기 3일 전 정맥주사로 항원으로 부양되어 질 수 있다. 각 면역화반응에 대해 2-3 용융이 수행되어 지는 것이 필요할 수 있다고 기대된다. 6 내지 24 마우스가 각 항원에 대해 전형적으로 면역화된다. 통상적으로 HCo7 및 HCo12 스트레인 양자가 사용된다. 부가하여, HCo7 및 HCo12 전환유전자 양자가 두 개의 다른 인간 중사슬 전환유전자(HCo7/HCo12)를 갖는 단일 마우스 내로 함께 증식되어 질 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, KM 마우스™ 스트레인이 실시예 1에서 기술된 바와 같이 사용되어 질 수 있다.

- [0472] 개시의 인간 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마의 발생
- [0473] 본 발명의 인간 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 발생하기 위하여, 면역된 마우스로부터의 지라세포 및/또는 림프절 세포가 분리될 수 있고 그리고 마우스 미엘로마 셀 라인과 같은 적절한 불멸화된 셀 라인에 용융될 수 있다. 얻어진 하이브리도마는 항원-특이적 항체의 생산을 위해 선별될 수 있다. 예를 들어, 면역화된 마우스로부터 지라 림프구의 단일 세포 현탁액은 50% PEG로 P3X63-Ag8.653 비분비 마우스 미엘로마 세포(ATCC, CRL 1580)의 일-여섯 번째 수에 용융될 수 있다. 세포는 20% 송아지 클론 혈청, 18% "653" 조건부 배지, 5% 오리젠 (IGEN), 4 mM L-글루타민, 1 mM 소듐 피루베이트, 5mM HEPES, 0.055 mM 2-머캅토에탄올, 50 units/ml 페니실린, 50 mg/ml 스트렙토마이신, 50 mg/ml 겐타마이신 및 1X HAT (시그마; HAT는 용융 24시간 후에 부가됨)를 포함하는 선택 배지에서 2주 동안 배양되어 진 후 평판 바닥 마이크로타이터 플레이트에 대략 2×10^5 로 이식되어 진다. 대략 2주 후, 세포는 HAT가 HT로 대체된 배지에 배양되어 질 수 있다. 각각의 웰은 그런 다음 인간 모노클로날 IgM 및 IgG 항체에 대하여 ELISA에 의해 선별되어 질 수 있다. 일단 광범위한 하이브리도마 성장이 일어나면, 배지는 통상적으로 10-14일 후에 관찰되어 질 수 있다. 항체 분비 하이브리도마는 재이식될 수 있고 다시 스크린될 수 있으며, 그리고 만일 여전히 인간 IgG에 대해 양성적이라면, 모노클로날 항체는 희석을 제한함에 의해 적어도 두 번 서브클론될 수 있다. 안정한 서브클론은 그런 다음 소량의 항체를 특징화를 위해 조직 배양 배지에서 발생하기 위해 생체 외에서 배양될 수 있다.
- [0474] 인간 모노클로날 항체를 정제하기 위하여, 선택된 하이브리도마가 2-리터의 스피너-플라스크에서 모노클로날 항체 정제를 위하여 성장되어 질 수 있다. 상등액은 단백질 A-세파로스(Pharmacia, Piscataway, NJ.)로 어피니티 크로마토그래피 수행 전에 여과되고 농축되어 질 수 있다. 용리된 IgG는 순도를 확실하게 하기 위해 겔 일렉트로포리시스 및 고성능액체크로마토그래피에 의해 체크되어 질 수 있다. 버퍼 용액은 PBS로 교체될 수 있으며 그리고 농축이 1.43 흡광계수를 이용하여 OD 280에 의해 결정되어 질 수 있다. 모노클로날 항체는 나누어 -80℃에서 저장될 수 있다.
- [0475] 개시의 모노클로날 항체를 생산하는 트랜스펙토마의 생성
- [0476] 본 발명의 항체는 또한 예를 들어, 이 기술 분야에서 잘 알려진 바와 같은 유전자 트랜스펙션 방법과 재조합 DNA 기술(즉, Morrison, S. (1985) Science 229: 1202)의 조합을 사용하여 숙주 세포 트랜스펙토마에서 생산되어 질 수 있다.
- [0477] 예를 들어, 항체 또는 이들의 항체 분획을 발현하기 위하여, 부분적 또는 완전-길이 경 및 중사슬을 코딩하는 DNAs가 표준 분자생물학 기술(즉, 흥미대상 항체를 발현하는 하이브리도마를 사용하여 PCR 증폭 또는 cDNA 클로닝)을 사용하여 얻어질 수 있고, 그리고 유전자가 복제의 및 전사의 제어 시퀀스에 조작적으로 연결되어 지도록 DNAs가 발현 벡터 내에 삽입되어 질 수 있다. 본 내용에서 용어 "조작적으로 연결"은 벡터 내의 복제의 및 전사의 제어 시퀀스가 항체 유전자의 복제 및 전사를 조절하는 이들의 의도된 기능으로 작용하도록 항체 유전자가 벡터 내에 결합되어 지는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 발현 벡터 및 발현 조절 시퀀스는 사용된 발현 숙주 세포에 필적할 수 있는 것으로 선택된다. 항체 경사슬 유전자 및 항체 중사슬 유전자는 별도의 벡터 내로 삽입되어 질 수 있거나 또는 더욱 전형적으로는 양 유전자가 동일한 발현 벡터 내로 삽입된다. 항체 유전자는 표준 방법(즉, 항체 유전자 분획 및 벡터 상에 상보적 제한 사이트의 결합, 또는 만일 제한사이트가 존재하지 않으면 불린트 말단 결합)에 의해 발현 벡터 내로 삽입된다. 여기에 기술된 항체의 경 및 중사슬 가변 영역들이, VH 분절이 벡터 내에서 CH 분절에 조작적으로 연결되고 VK 분절은 벡터 내에서 CL 분절에 조작적으로 연결되도록 바람직한 아이소타입의 중사슬 불변 및 경사슬 불변 영역들을 이미 코딩하는 발현 벡터 내에 이들을 삽입함에 의해 어떤 항체 아이소타입의 완전-길이 항체 유전자를 제작하기 위하여 사용되어 질 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, 재조합 발현 벡터가 숙주 세포로부터 항체 사슬의 분비를 용이하게 하는 시그널 펩티드를 코딩할 수 있다. 항체 사슬 유전자는 시그널 펩티드가 항체 사슬 유전자의 아미노 말단에 골격-내로 연결되도록 벡터 내에 클론될 수 있다. 시그널 펩티드는 이뮤노글로불린 시그널 펩티드이거나 또는 이형성 시그널 펩티드(즉, 비-이뮤노글로불린 단백질로부터의 시그널 펩티드)일 수 있다.
- [0478] 항체 사슬 유전자에 부가하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 항체 사슬 유전자의 발현을 조절하는 조절 시퀀스를 담지한다. 용어 "조절 시퀀스"는 항체 사슬 유전자의 복제 또는 전사를 조절하는 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 조절 요소(즉, 폴리아데닐화 시그널)를 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 조절 시퀀스는, 예를 들어 Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))에 기술되어 있다. 조절 시퀀스의 분비를 포함하는 발현 벡터의 디자인은 형질전환되어지는 숙주 세포의 선택, 소망하는 단백질의 발현 준위 등과 같은 인자에 의존할 수 있다는 것은 이 분야의 통상인에 의해 인

지될 수 있는 것일 것이다. 포유동물 숙주 세포 발현에 대한 바람직한 조절 시퀀스는 사이토메가바이러스(CMV), 시미안 바이러스 40 (SV40), 아테노바이러스(즉, 아테노바이러스 메이저 레이트 프로모터(AdMLP)) 및 폴리오마로부터 유래된 프로모터 및/또는 인핸서와 같은 포유동물의 세포에서 고준위의 단백질 발현을 하는 바이러스의 요소를 포함한다. 대안적으로, 유비퀴틴 프로모터나 β -글로빈 프로모터와 같은 비바이러스의 조절 시퀀스가 사용될 수 있다. 더 더욱이, 조절 요소는 SRa 프로모터 시스템과 같은 다른 근원으로부터의 시퀀스로 구성되고, 이것은 SV40 어얼리 프로모터 및 인간 T 세포 류케미아 바이러스 타입 1의 긴 말단 반복으로부터 시퀀스를 포함한다 (Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

[0479] 항체 사슬 유전자 및 조절 시퀀스에 부가하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주세포(즉, 복제의 근원)에서 벡터의 복제와 선택할 수 있는 마커 유전자를 조절하는 시퀀스와 같은 부가적인 시퀀스를 담지할 수 있다. 선택할 수 있는 마커 유전자는 벡터가 도입되어 지는 숙주 세포의 선택을 용이하게 한다(즉, Axcl 등에 의한 U.S. 특허번호 Nos. 4,399,216, 4,634,665 및 5,179,017). 예를 들어, 전형적으로 선택할 수 있는 마커 유전자는 벡터가 도입되어 지는 숙주세포 상에 G418, 하이그로마이신 또는 메토틱세이트와 같은 약물에 대한 저항성을 부여한다. 바람직한 선택할 수 있는 마커 유전자는 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 유전자 (메토틱세이트 선택/증폭으로 dhfr-숙주 세포에서 사용하기 위한 것) 및 네오 유전자 (G418 선택을 위한 것임)를 포함한다.

[0480] 경 및 중사슬의 발현을 위하여, 경 및 중사슬을 코드하는 발현 벡터(들)은 표준 기술에 의하여 숙주 세포 내로 트랜스펙트된다. 용어 "트랜스펙션"의 다양한 형태는 원핵생물 또는 진핵생물의 숙주 세포 내로 외래성 DNA의 도입, 즉 전기천공법, 칼슘-포스페이트 침전법, DEAE-덱스트란 트랜스펙션 등을 위해 공통적으로 사용되는 광범위한 기술을 포괄하는 것으로 의도된다. 비록 원핵생물 뿐 아니라 진핵생물 숙주 세포에 본 발명의 항체를 발현하는 것이 이론적으로는 가능하지만, 진핵생물 세포, 가장 바람직하기로는 포유동물 숙주 세포에 항체의 발현이 가장 바람직한데, 이는 이러한 진핵생물 세포, 특히 포유동물 세포가 적절하게 폴딩되고 면역학적으로 활성인 항체를 조합하고 분비하는 것이 원핵 세포보다 보다 쉽기 때문이다. 항체 유전자의 원핵 생물 발현이 활성인 항체의 고 수율의 생산에 비효율적인 것으로 보고되어 있다 (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

[0481] 본 발명의 재조합 항체를 발현하는 바람직한 포유동물의 숙주 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO 세포)(Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220에 기술되고, DHFR 선택가능한 마커, 즉 R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 755:601-621에 기술된 것 같은 것으로 사용된 dhfr-CHO 세포를 포함함), NSO 미엘로마 세포, COS 세포 및 SP2 세포를 포함한다. 특히, NSO 미엘로마 세포로 사용하기 위한, 다른 바람직한 발현 시스템은 WO 87/04462, WO 89/01036 및 EP 338,841에 개시된 GS 유전자 발현 시스템이다. 항체 유전자를 코드하는 재조합 발현 벡터가 포유동물의 숙주 세포 안으로 도입되어 질 때, 항체는 숙주 세포에 항체의 발현, 보다 바람직하기로는 숙주 세포가 성장하는 배양 배지 안으로 항체의 분비를 허용하기에 충분한 시간의 기간 동안 숙주 세포를 배양함에 의해 생산된다. 항체는 표준 단백질 정제 방법을 사용하는 배양 배지로부터 회수될 수 있다.

[0482] 항원에 결합하는 항체의 특징

[0483] 본 발명의 항체는, 예를 들어 표준 ELISA에 의해 PD-L1에 결합에 대해 시험되어 질 수 있다. 간략하게는, 마이크로타이터 플레이트가 PBS 내에 0.25 μ g/ml로 정제된 PD-L1로 도포되어지고 그런 다음 PBS 내에 5% 송아지 혈청 알부민으로 차단되어 진다. 항체의 희석(즉, PD-L1 - 면역화된 마우스로부터의 프라즈마의 희석)이 각 웰에 부가되고 37°C에서 1-2 시간 동안 배양되어 진다. 플레이트는 PBS/트윈으로 수세되고 그런 다음 알카린 포스파타제에 컨쥬게이트된 제이의 시약(즉, 인간 항체에 대해서는, 염소-항-인간 IgG Fc-특이적 폴리클로날 시약)으로 37°C에서 1 시간 동안 배양되어 진다. 수세 후, 플레이트는 pNPP 기질 (1 mg/ml)로 전개되고, 그리고 405-650의 OD에서 분석된다. 바람직하기로는, 가장 높은 역가를 전개하는 마우스가 용융을 위해 사용될 것이다.

[0484] 여기서 기술된 ELISA 분석법은 또한 PD-L1 면역원으로 양성적인 반응성을 보이는 하이브리도마에 대한 선별을 하기 위해 사용되어 질 수 있다. PD-L1에 대해 높은 항원항체결합력으로 결합하는 하이브리도마가 서브클로닝되고 더욱이 특징화된다. 모체 세포의 반응성을 보유하는(ELISA에 의해) 각 하이브리도마로부터의 일 클론이 -140°C에서 저장된 5-10 바이알 세포 은행을 만들기 위해 그리고 항체 정제를 위해 선택되어 질 수 있다.

[0485] 항-PD-L1 항체를 정제하기 위해, 선택된 하이브리도마는 모노클로날 항체 정제를 위해 2-리터의 스피너-프라스크에서 성장되어 질 수 있다. 상등액은 단백질 A-세파로스(Pharmacia, Piscataway, NJ.)로 어피니티 크로마토그래피 수행 전에 여과되고 농축되어 질 수 있다. 용리된 IgG는 순도를 확실하게 하기 위해 겔 일렉트로포리시스 및 고성능액체크로마토그래피에 의해 체크되어 질 수 있다. 버퍼 용액은 PBS로 교체될 수 있으며 그리고 농축이

1.43 흡광계수를 이용하여 OD280에 의해 결정되어 질 수 있다. 모노클로날 항체는 나누어 -80℃에서 저장될 수 있다.

[0486] 선택된 항-PD-L1 모노클로날 항체가 유일한 항원결정인자에 결합하는가를 결정하기 위해, 각 항체가 상업적으로 이용할 수 있는 시약(Pierce, Rockford, IL)을 사용하여 바이티닐화될 수 있다. 비표지된 모노클로날 항체 및 바이오티닐화된 모노클로날 항체를 사용한 경쟁성 연구가 상술한 바와 같은 PD-L1 도포-ELISA 플레이트를 사용하여 수행될 수 있다. 바이오티닐화된 mAb 결합은 스트렙-아비딘-알카린 포스파타제 프로브로 검지되어 질 수 있다.

[0487] 정제된 항체의 아이소타입을 결정하기 위해, 아이소타입 ELISA가 특정한 아이소타입의 항체에 대해 특이적인 시약을 사용하여 수행되어 질 수 있다. 예를 들어, 인간 모노클로날 항체의 아이소타입을 결정하기 위해, 마이크 로타이터 플레이트의 웰이 4℃에서 밤 세워 1 µg/ml의 항-인간 이뮤노글로불린으로 도포되어 질 수 있다. 1% BSA로 블럭킹 후, 플레이트는 1 내지 2시간 동안 대류 온도에서 1 µg /ml 또는 그 이하의 시험 모노클로날 항 체 또는 정제된 아이소타입 대조군으로 반응된다. 웰은 그런 다음 인간 IgG1 뿐 아니라 인간 IgM-특정 알카린 포스파타제-컨쥬게이트된 프로브와 반응되어 질 수 있다. 플레이트는 상술한 바와 같이 전개되어 지고 분석된다.

[0488] 항-PD-L1 인간 IgGs는 웨스턴 블롯팅에 의하여 PD-L1 항원으로 반응성에 대하여 더 시험되어 질 수 있다. 간단 하게는, PD-L1이 준비되어 질 수 있고 그리고 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 일렉트로포리시스되 어 질 수 있다. 전기영동 후, 분리된 항원은 니트로셀룰로스 멤브레인으로 전이되고, 10% 송아지 태반 혈청으로 차단되고 그리고 시험된 모노클로날 항체로 탐지된다. 인간 IgG 결합은 항-인간 IgG 알카린 포스파타제를 사용 하여 검지되어 질 수 있고 BCIP/NBT 기질 타블렛(Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.)으로 전개될 수 있다.

[0489] 항체 물리적 특성

[0490] 본 발명의 항체는 더욱이 항-PD-L1 항체의 다양한 물리적 특성에 의해 더욱더 특징지어 질 수 있다. 이들 물리 적 특성에 기하여 항체의 다른 클래스를 검출하고 및/또는 분화하기 위해 다양한 어세이가 사용될 수 있다.

[0491] 어떤 실시형태에서, 본 발명의 항체는 경 또는 중사슬 가변 영역 내에 하나 또는 그 이상의 글리코실화반응 사 이트를 포함할 수 있다. 가변 영역 내에 하나 또는 그 이상의 글리코실화반응 사이트의 존재는 변형된 항원 결 합에 기한 항체의 pK_i의 변형 또는 항체의 증가된 면역원성을 초래할 수 있을 것이다 (Marshall *et al* (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala FA and Morrison SL (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al* (1988) *J Exp Med* 168:1099- 109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al* (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.* (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). 글리코실화반응은 N-X-S/T 시퀀스를 포함하는 모 티프에서 일어나는 것이 알려져 있다. 가변 영역 글리코실화반응은 Fab를 생산하는 항체를 단리하는 글리코블롯 (Glycoblott) 어세이를 사용하여 시험되어 질 수 있고, 그런 다음 과옥소산염 산화 및 시프 염기 형성을 측정하 는 어세이를 사용하여 글리코실화반응에 대해 시험한다. 대안적으로, 가변 영역 글리코실화반응은 Fab로부터 당 류를 단당류로 단리하고 개개의 당류 함량을 분석하는 디오넥스 라이트 크로마토그래피(Dionex-LC)를 사용하여 시험되어 질 수 있다. 어떤 경우에는, 가변 영역 글리코실화반응을 포함하지 않는 항- PD-L1 항체를 갖는 것이 바람직하다. 이것은 가변 영역에 글리코실화반응 모티프를 포함하지 않는 항체를 선택함에 의해 또는 이 기술 분야에 잘 알려진 표준 기술을 사용하여 글리코실화반응 모티프 내의 잔기를 변이함에 의해 달성되어 질 수 있 다.

[0492] 바람직한 실시형태에서는, 본 발명의 항체는 아스파라긴 아이소머리즘 사이트를 포함하지 않는다. 탈아미드화 또는 이소아스파르트산 효과가 각각 N-G 또는 D-G 시퀀스 상에서 일어날 수 있을 것이다. 탈아미드화 또는 이소 아스파르트산 효과는 주 사슬 보다는 곁 사슬 카르복시 말단을 비꼬는 구조로 함에 의해 항체의 안전성을 감소 하는 아스파르트산의 창제를 초래한다. 아스파르트산의 창제는 아스파르트산에 대한 시험을 위해 역상 HPLC를 사용하는 이소-퀀트 어세이를 사용하여 측정되어 질 수 있다.

[0493] 각 항체는 유일한 등전점(pI)을 가질 것이지만, 일반적으로 항체는 6 내지 9.5 사이의 pH 범위로 될 것이다. IgG1 항체에 대한 pI는 전형적으로 7 내지 9.5 사이의 pH 범위로 될 것이고, IgG4 항체에 대한 pI는 전형적으로 6 내지 8 사이의 pH 범위로 될 것이다. 항체는 이 범위 외로 되는 pI를 가질 것이다. 비록 효과가 일반적으로 알려지지는 않았지만, 정상 범위 외의 pI를 갖는 항체는 약간의 접혀지지 않고 생체 내의 조건에서 불안정성을 가질 수 있다는 숙고가 있다. 등전점은 pH 기울기를 만들고 증진된 정확성을 위해 레이저 포커싱을 이용할 수

있는 캐필러리 이소일렉트릭 포커싱 어세이를 사용하여 시험되어 질 수 있다 (Janini *et al* (2002) *Electrophoresis* 23:1605-11; Ma *et al.* (2001) *Chromatographia* 53:S75-89; Hunt *et al* (1998) *J Chromatogr A* 800:355-67). 어떤 경우에는, 정상 범위로 되는 pI 값을 포함하는 항- PD-L1 항체를 갖는 것이 바람직하다. 이것은 정상 범위로 되는 pI를 갖는 항체를 선택함에 의하거나 또는 이 기술분야에 잘 알려진 표준 기술을 사용하여 하전된 표면 잔기를 변이함에 의해 달성될 수 있다.

[0494]

각 항체는 열적 안정성을 나타내는 용융 온도를 가질 것이다 (Krishnamurthy R and Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). 보다 높은 열적 안정성이 생체 내에서 보다 큰 전체 항체 안정성을 나타낸다. 항체의 용융점은 분화적 스캐닝 칼로리메트리를 사용하여 측정되어 질 수 있다 (Chen *et al* (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando *et al* (1999) *Immunol Lett* 68:47-52). T_{m1} 은 항체의 초기 비접힘의 온도를 나타낸다. T_{m2} 는 항체의 완전 비접힘의 온도를 나타낸다. 일반적으로, 본 발명의 항체의 T_{m1} 은 60℃ 보다 크고, 바람직하기로는 65℃ 보다 크며, 더욱 바람직하기로는 70℃ 보다 큰 것이 바람직하다. 대안적으로, 항체의 열적 안정성은 원편광 이색성 분광분석을 사용하여 측정될 수 있다 (Murray *et al.* (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9). 여기에 개시된 항-PD-L1 항체의 열적 안정성은 다음 표 1에 요약되어 있다.

표 1

[0495]

mAb	T_{m1} (℃)	T_{m2} (℃)
3G10	70	75
5F8	72	74
11E6	64	73
1B12	69	72
12A4	68	72
10A5		71
12B7		70
13G4	66	69
10H10		69

[0496]

바람직한 실시형태에서, 급속하게 분해되지 않는 항체가 선택되어 진다. 항- PD-L1 항체의 분획화는 이 기술분야에서 잘 이해되어 진 것과 같은 캐필러리 일렉트로포시스 (CE) 및 MALDI-MS를 사용하여 측정되어 질 수 있다 (Alexander AJ and Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

[0497]

다른 바람직한 실시형태에서, 최소한의 응집효과를 가지는 항체가 선택된다. 응집은 원하지 않는 면역 반응 및/또는 변형되거나 바람직하지 않은 약리운동학적 특성을 촉발할 수 있다. 일반적으로 25% 또는 그 이하, 바람직하기로는 20% 또는 그 이하, 보다 바람직하기로는 15% 또는 그 이하, 더 보다 바람직하기로는 10% 또는 그 이하 그리고 더 더욱 보다 바람직하기로는 5% 또는 그 이하의 응집을 갖는 항체가 허용가능할 수 있다. 응집은 사이즈-엑스클루전 컬럼 (SEC) 고수행성 액체 크로마토그래피(HPLC), 및 단량체, 이량체, 삼량체 또는 다량체를 동정하기 위한 광산란을 포함하는 이 기술분야에서 잘 알려진 몇 가지의 기술에 의하여 측정될 수 있다.

[0498]

면역컨쥬게이트

[0499]

또 다른 측면에서, 본 발명은 세포독소, 약물(즉, 면역억제제) 또는 방사성 독물과 같은 치료적인 부분과 컨쥬게이트된 항-PD-L1 항체 또는 이들의 분획으로 특징된다. 이러한 컨쥬게이트들은 여기에서는 "면역컨쥬게이트"로 언급되어 진다. 하나 또는 그 이상의 세포독소를 포함하는 면역컨쥬게이트는 "면역독소"로 언급된다. 세포독소 또는 세포독소 제제는 세포에 해로운(즉, 죽이는) 제제를 포함한다. 이 예들은 택솔, 시토피라신 B, 글라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 액티노마이신 D, 1-디하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로케인, 테트라케인, 리도케인, 프로프라놀롤 및 퓨로마이신 그리고 이들의 유사화합물들을 포함한다. 치료적 제제는 또한 예를 들어, 항대사산물들(즉, 메토폭세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 디카바진), 알킬화 제제(즉, 메클로르에탄, 티오에파클로르엠부실, 멜파란, 카르무스틴 (BSNU) 및 로뮤스틴 (CCNU), 시클로토스파미드, 뷰솔판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 cis-디클로로디아민 플레티늄 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린류(즉,

다우노루비신 (이전의 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제류 (즉, 닥티노마이신 (이전의 액티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신(AMC)), 및 세포분열 저지성 제제(즉, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)를 포함한다.

[0500] 본 발명의 항체에 컨쥬게이트될 수 있는 치료적 세포독소의 다른 바람직한 예는 듀오카르마이신, 칼리케아미신, 메이탄신 및 아우리스타틴과 이들의 유도체를 포함한다. 칼리케아미신 항체 컨쥬게이트의 예는 상업적으로 이용할 수 있다 (MylotargTM; Wyeth-Ayerst).

[0501] 세포독소는 이 기술 분야에서 이용할 수 있는 링커 기술을 사용하여 본 발명의 항체에 컨쥬게이트될 수 있다. 항체에 세포독소를 컨쥬게이트하기 위해 사용되어 지는 링커 타입의 예는 여기에 한정되는 것은 아니지만 하이드라존, 티오에테르, 에스테르, 디설파이드 및 펩티드-함유 링커를 포함한다. 링커는 예를 들어 리소솜 구획 내에서 낮은 pH에 의한 단리에 민감하거나 또는 카테프신(즉, 카테프신 B, C, D)와 같은 종양 조직에 우세하게 발현된 프로테아제와 같은 프로테아제에 의한 단리에 민감한 것이 선택될 수 있다.

[0502] 세포독소 타입, 항체에 치료적 제제를 컨쥬게이트하는 링커 및 방법의 추가적인 논의에 대해서는, 다음을 또한 참고한다: Saito, G. *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Invest. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (200Y) *Adv. DrugDeliv. Rev.* 53:247-264.

[0503] 본 발명의 항체는 또한 세포독소적 방사성 의약품을 생산하기 위해 방사성 동위원소에 컨쥬게이트 될 수 있고, 이것은 또한 방사면역컨쥬게이트로 언급될 수 있다. 진단학적으로 또는 치료학적으로 사용하기 위하여 항체에 컨쥬게이트될 수 있는 방사성 동위원소의 예는 여기에 한정되는 것은 아니지만, 요오딘¹³¹, 인듐¹¹¹, 이트리움⁹⁰ 및 루테튬¹⁷⁷. 방사면역컨쥬게이트를 제조하는 방법은 이 기술 분야에 확립되어 있다. 방사면역컨쥬게이트의 예는 제발린TM (IDEC Pharmaceuticals) 및 벡사르TM (Corixa Pharmaceuticals)을 포함하는 상업적으로 이용할 수 있고, 그리고 유사한 방법이 본 발명의 항체를 사용하여 방사면역컨쥬게이트를 제조하기 위해 사용될 수 있다.

[0504] 본 발명의 항체 컨쥬게이트는 주어진 생물학적 반응을 변형하기 위해 사용될 수 있고, 그리고 약물 부분은 고전적인 화학적 치료제에 한정된 것으로 해석되지 않는다. 예를 들어, 약물 부분은 원하는 생물학적 활성을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 이러한 단백질은, 예를 들어 아브린, 리신 A, 슈도모나스 엑소톡신 또는 디프테리아 독소와 같은 효소학적으로 활성인 독소 또는 이들의 활성 분획; 종양 괴사 인자 또는 인터페론- γ 와 같은 단백질; 또는 예를 들어, 림포카인, 인터류킨-1 ("IL-1"), 인터류킨-2 ("IL-2"), 인터류킨-6 ("IL-6"), 그랜ulo사이트 매크로파지 콜로니 자극 인자("GM-CSF"), 그랜ulo사이트 콜로니 자극 인자("G-CSF"), 또는 다른 성장 인자와 같은 생물학적 반응 개사자를 포함한다.

[0505] 항체에 이러한 치료적 부분을 컨쥬게이트하기 위한 기술은 잘 알려져 있다. 다음 참고; 즉, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243- 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 및 Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates," *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

[0506] 바이스페시픽 분자

[0507] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 이들의 분획을 포함하는 바이스페시픽 분자가 그 특징이다. 본 발명의 항체 또는 이들의 항체 결합 부분은 다른 기능적 분자, 즉 적어도 두 개의 다른 결합 사이트 또는 타겟 분자에 결합하는 바이스페시픽 분자를 발생하기 위한 또 다른 펩티드 또는 단백질(즉, 다른 항체 또는 리셉터용 리간드)로 유도되어 지거나 또는 링커되어 질 수 있다. 본 발명의 항체는 사실 두 개 이상의 다

른 결합 사이트 및/또는 타겟 분자에 결합하는 멀티스페시픽 분자를 발생하기 위한 하나 이상의 다른 기능적 분자로 유도되어 지거나 또는 링커되어 질 수 있고; 이러한 멀티스페시픽 분자는 또한 여기서 사용된 것으로 용어 "바이스페시픽 분자"에 의해 포괄되어 지는 것으로 의도된다. 본 발명의 바이스페시픽 분자를 만들기 위해, 본 발명의 항체가 다른 항체, 항체 분획, 펩티드 또는 결합 의태물과 같은 하나 또는 그 이상의 다른 결합 분자에 기능적으로 연결(즉, 화학적 커플링, 유전적 융합, 비공유결합적 연계 등등)되어 질 수 있어 바이스페시픽 분자를 초래한다.

[0508] 따라서, 본 발명은 적어도 하나의 PD-L1에 대한 제1 결합 특이성 및 제2 타겟 항원결정인자에 대한 제2 결합 특이성을 포함하는 바이스페시픽 분자를 포함한다. 본 발명의 특정한 실시형태에서, 제1 타겟 항원결정인자는 Fc 리셉터, 즉, 인간 Fc γ RI(CD64) 또는 인간 Fc α 리셉터(CD89)이다. 따라서, 본 발명은 Fc γ R 또는 Fc α R 발현 이펙터 세포(즉, 모노사이트, 매크로파아지 또는 다형핵백혈구 세포(PMNs)) 및 타겟 세포 발현 PD-L1 양자에 결합할 수 있는 바이스페시픽 분자를 포함한다. 이들 바이스페시픽 분자는 이펙터 세포에 PD-L1 발현 세포를 타겟으로 하고 그리고 PD-L1 발현 세포의 식세포작용, 항체 의존성 세포-매개 세포독성(ADCC), 사이토톡신 방출 또는 초산화물 음이온의 발생과 같은 Fc 리셉터-매개 이펙터 세포 활성을 촉발한다.

[0509] 바이스페시픽 분자가 멀티스페시픽인 본 발명의 일 실시형태에서, 분자는 더욱이 항-Fc 결합 특이성 및 항-PD-L1 결합 특이성에 부가하여 제삼 결합 특이성을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 제삼 결합 특이성은 항-증진 인자(EF) 부분, 즉 세포 독성 활성화에 포함된 표면 단백질에 결합하고 그리고 이에 의해 타겟 세포에 대하여 면역 반응을 증진하는 분자이다. "항-증진 인자 부분"은 주어진 분자, 즉 항원 또는 리셉터에 결합하고, 이에 의해 Fc 리셉터 또는 타겟 세포 항원에 대한 결합 결정소의 효과의 증진을 초래하는 항체, 기능적 항체 분획 또는 리간드일 수 있다. "항-증진 인자 부분"은 Fc 리셉터 또는 타겟 세포 항원을 결합할 수 있다. 대안적으로, 항-증진 인자 부분은 제1 및 제2 결합 특이성들이 결합하는 실체와 다른 실체에 결합할 수 있다. 예를 들어, 항-증진 인자 부분은 세포독성 T-세포에 결합할 수 있다(즉, 타겟 세포에 대해 증가된 면역 반응을 초래하는 CD2, CD3, CD4, CD8, CD28, CD40, ICAM-1 또는 다른 면역 세포를 통해).

[0510] 일 실시형태에 있어서, 본 발명의 바이스페시픽 분자는 결합 특이성으로 즉, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 또는 단일 사슬 Fv를 포함하는 적어도 하나의 항체, 또는 이들의 항체 분획을 포함한다. 항체는 또한 Ladner *et al.* U.S. 특허번호 No. 4,946,778에 기술된 바와 같이 Fv 또는 단일 사슬 컨스트럭트와 같은 경사슬 또는 중사슬 이량체 또는 이들의 최소한의 분획일 수 있으며, 여기에 기술된 내용은 명백하게 레퍼런스로 합체된다.

[0511] 일 실시형태에 있어서, Fc γ 리셉터에 대한 결합 특이성은 모노클로날 항체에 의하여 제공되어 지고, 이 결합은 인간 이뮤노글로불린 G (IgG)에 의해 차단되지 않는다. 여기에 사용된 것으로, 용어 "IgG 리셉터"는 크로모솜 1 상에 위치된 여덟의 γ -사슬 유전자의 하나를 언급한다. 이들 유전자는 세 개의 Fc γ 리셉터 클래스: Fc γ RI(CD64), Fc γ RII(CD32), 및 Fc γ RIII(CD16)로 분류된 전체 12의 트랜스멤브레인 또는 가용성 리셉터 이성형을 코드한다. 일 바람직한 실시형태에 있어서, Fc γ 리셉터는 인간 고 친화성 Fc γ RI이다. 인간 Fc γ RI은 72 kDa 분자로, 모노머의 IgG에 대해 높은 친화도를 보인다($10^8 - 10^9 M^{-1}$)

[0512] 어떤 바람직한 항-Fc γ 모노클로날 항체의 생산 및 특징화는 Fanger 등에 의한 PCT 공개공보 WO 88/00052 및 U.S. 특허번호 No. 4,954,617에 기술되어 있으며, 이 가르침은 여기에 레퍼런스로 완전히 합체된다. 이들 항체는 리셉터의 Fc γ 결합 사이트로부터 뚜렷이 다른 사이트에 Fc γ RI, Fc γ RII 또는 Fc γ RIII의 항원결정인자에 결합하고 따라서 이들의 결합이 IgG의 물리학적 준위에 의해 실질적으로 차단되지 않는다. 본 발명에 유용한 특이적 항-Fc γ RI 항체는 mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 및 mAb 197이다. mAb 32를 생산하는 하이브리도마는 American Type Culture Collection, ATCC Accession No. HB9469으로부터 이용할 수 있다. 일 다른 실시형태에 있어서, 항-Fc γ 리셉터 항체는 모노클로날 항체 22 (H22)의 인체적응된 형태이다. H22 항체의 생산 및 특성은 Graziano, R.F. *et al.* (1995,) *J. Immunol* 155 (10): 4996-5002 및 PCT 공개공보 WO 94/10332에 기술되어 있다. H22 항체 생산 셀 라인은 American Type Culture Collection에 기탁번호 HA022CL1로 기탁되어 있으며, 수납번호 CRL 11177를 가진다.

[0513] 일 다른 바람직한 실시형태에 있어서, Fc 리셉터에 대한 결합 특이성은 인간 IgA 리셉터에 결합하는 항체, 즉 Fc-알파 리셉터 (Fc α RI (CD89))에 의하여 제공되고, 이의 결합은 바람직하기로는 인간 이뮤노글로불린 A (IgA)에 의하여 차단되지 않는다. 용어 "IgA 리셉터"는 크로모솜 19 상에 위치된 일 α -유전자 (Fc α RI)의 유전자 생산을 포함하는 것을 의도한다. 이 유전자는 55 내지 110 kDa의 몇몇 대안적으로 스플라이스된 트랜스멤브레인 이형체를 코드하는 것이 알려져 있다. Fc α RI (CD89)은 본질적으로 모노사이트/매크로파아지, 호산성의 및 호중구의 그랜ulo사이트 상에서 발현되어 지지만 그러나 비-이펙터 세포 집단 상에서 발현되어 지지 않는다. Fc α

RI는 IgA1 및 IgA2 양자에 대해 중간의 친화도($\approx 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$)를 가지고, G-CSF E는 GM-CSF와 같은 시토키네 노출에 의해 증가된다 (Morton, H.C. *et al.* (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440). A3, A59, A62 및 A77로 동정되고, IgA 리간드 결합 도메인 외측으로 Fc α RI를 결합하는 네 개의 Fc α RI-특이적 모노클로날 항체가 기술되어 있다 (Monteiro, R.C. *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148:1764).

[0514] Fc α RI 및 Fc γ RI는 본 발명의 바이스페시픽 분자에서 사용되기 위한 촉발 리셉터로 바람직하는데, 이는 이들이 (1) 면역 이펙터 세포, 즉 모노사이트, PMNs, 매크로파아지 및 수지상 세포 상에서 일차적으로 발현되고; (2) 고준위(즉, 세포 당 5,000-100,000)로 발현되고; (3) 세포독성 활성의 매개자이고(즉, ADCC, 식세포작용); (4) 셀프-항원을 포함하여, 이들에 타겟된 항원의 증진된 항원 개시를 매개하기 때문이다.

[0515] 비록 인간 모노클로날 항체가 바람직하지만, 본 발명의 바이스페시픽 분자에서 채용될 수 있는 다른 항체는 뮤 어라인, 키메라 및 인체적용된 모노클로날 항체이다.

[0516] 본 발명의 바이스페시픽 분자는 이 분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 구성분 결합 특이성, 즉 항-FcR 및 항-PD-L1 결합 특이성을 컨쥬게이트함에 의해 제조되어 질 수 있다. 예를 들어, 바이스페시픽 분자의 각 결합 특이성은 별도로 발생되어 질 수 있고 그런 다음 각 다른 하나에 대해 컨쥬게이트되어 질 수 있다. 결합 특이성이 단백질이거나 펩티드일 때, 다양한 커플링 제제 또는 가교제가 공유결합의 컨쥬게이트를 위해 사용되어 질 수 있다. 가교제의 예는 단백질 A, 카르보다이미드, N-석신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트 (SATA), 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산) (DTNB), o-페닐렌디말레이미드 (oPDM), N-석신이미딜-3-(2-피리디닐티오)프로피오네이트 (SPDP), 및 술포석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카복실레이트 (sulfo-SMCC)를 포함한다 (즉, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). 다른 방법은 Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83, 및 Glennie *et al.* (1987) *J Immunol.* 139: 2367-2375에 기술된 것들을 포함한다. 바람직한 컨쥬게이트화 제제는 SATA 및 sulfo-SMCC로, 양자는 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)로부터 이용할 수 있다.

[0517] 결합 특이성이 항체일 때, 이들은 두 중사슬의 C-말단 힌지 영역의 설프하이드릴 결합을 통해 컨쥬게이트될 수 있다. 특히 바람직한 실시형태에서, 힌지 영역은 기수의 설프하이드릴 잔기, 바람직하기로는 컨쥬게이션 전에 이것을 포함하도록 변이되어 진다.

[0518] 대안적으로, 양 결합특이성은 동일한 벡터에 코딩되어 질 수 있고 그리고 동일한 숙주세포에 발현되고 조립되어 질 수 있다. 이 방법은 특히 바이스페시픽 분자가 mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ 또는 리간드 x Fab 용 용 단백질인 경우 유용하다. 본 발명의 바이스페시픽 분자는 하나의 단일 사슬 항체 및 결합 결정소를 포함하는 단일 사슬 분자 또는 두 결합 결정소를 포함하는 단일 사슬 바이스페시픽 분자일 수 있다. 바이스페시픽 분자는 적어도 두 개의 단일 사슬 분자를 포함할 수 있다. 바이스페시픽 분자를 제조하는 방법은 예를 들어 U.S. 특허번호 5,260,203; U.S. 특허번호 5,455,030; U.S. 특허번호 4,881,175; U.S. 특허번호 5,132,405; U.S. 특허번호 5,091,513; U.S. 특허번호 5,476,786; U.S. 특허번호 5,013,653; U.S. 특허번호 5,258,498; 및 U.S. 특허번호 5,482,858에 기술되어 있다.

[0519] 이들의 특이적 타겟에 대한 바이스페시픽 분자의 결합은, 예를 들어 효소-결합 면역흡착 검사 (ELISA), 방사면역측정법 (RIA), FACS 아날리시스, 바이오어세이 (즉, 성장저해), 또는 웨스턴 블롯 어세이에 의하여 확인되어 질 수 있다. 이들 어세이의 각각은 일반적으로 흥미대상의 복합체에 특이적인 표지된 시약(즉, 항체)를 채용함에 의해 특정한 흥미대상의 단백질-항체 복합체의 존재를 검출한다. 예를 들어, FcR-항체 복합체는 예를 들어 항체-FcR 복합체를 인지하고 특이적으로 결합하는 효소-결합 항체 또는 항체 분획을 사용하여 검출될 수 있다. 대안적으로, 복합체는 다양한 다른 면역분석을 사용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, 항체는 방사능활성적으로 표지되어 질 수 있고 그리고 방사면역측정법 (RIA)으로 사용되어 질 수 있다 (예를 들어, 여기에 참고로 함체된 Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986 참고). 방사활성 아이소토프는 γ 카운트 또는 신틸레이션 카운트와 같은 수단에 의해 또는 오토라디오그래피에 의해 검출될 수 있다.

[0520] 약학적 조성물

[0521] 또 다른 측면에서, 본 발명은 약학적으로 허용될 수 있는 담체와 함께 제형화된, 본 발명의 모노클로날 항체 또는 이들의 항원-결합 부분의 하나 또는 조합을 포함하는 조성물, 즉 약학적 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은 본 발명의 항체, 또는 면역컨쥬게이트나 바이스페시픽 분자의 하나 또는 조합(즉, 두 개 또는 그 이상의 다

른 것)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물은 타겟 항원 상에 다른 항원결정성인자를 결합하거나 또는 상보적인 활성을 갖는 항체 (또는 면역억제제나 바이스페시픽)의 조합을 포함할 수 있다.

[0522] 본 발명의 약학적 조성물은 또한 조합 치료로, 예를 들어 다른 제제와 조합하여 투여되어 질 수 있다. 예를 들어, 조합 치료는 적어도 하나의 다른 항-염증성 또는 면역억제제와 조합된 본 발명의 항-PD-L1 항체를 포함할 수 있다. 조합 치료에 사용될 수 있는 치료적인 제제의 예는 아래에 본 발명의 항체의 용도에 대한 부분에서 보다 자세하게 기술된다.

[0523] 여기서 사용된 것으로, "약학적으로 허용가능한 담체"는 생리학적으로 양립할 수 있는 일부 및 모든 용매류, 분산 배지, 도포제류, 향균 및 항곰팡이제, 등전제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하기로는, 담체는 정맥내, 근육내, 피하로, 비경구적으로, 척수로 또는 상피내로 투여(즉, 주사 또는 주입에 의해)에 적절하다. 투여의 경로에 의존하여, 활성 화합물, 즉 항체, 면역억제제 또는 바이스페시픽 분자는 화합물을 비활성화할 수 있는 산 및 다른 중성 조건의 작용으로부터 화합물을 보호하기 위한 물질에 도포되어 질 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 하나 또는 그 이상의 약학적으로 적절한 염을 포함할 수 있다. "약학적으로 적절한 염"은 모체 화합물의 원하는 생물학적 활성을 보유하고 어떤 바람직하지 않은 독소학적 영향을 부여하지 않는 염에 관한 것이다 (예를 들어, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19 참고). 이러한 염의 예는 산 부가염 및 염기 부가염을 포함한다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아인산 등과 같은 비독성의 무기산으로부터 유래된 것 뿐 아니라 지방족 모노- 및 디카르복실산, 페닐-치환 알카노이산, 하이드록시 알카노이산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 술폰산 등과 같은 비독성의 유기산으로부터 유래된 것을 포함한다. 염기 부가염은 소듐염, 포타슘, 마그네슘, 칼슘 등과 같은 알칼린 토금속류로부터 유래된 것 뿐 아니라 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등과 같은 비독성의 유기 아민으로부터 유래된 것을 포함한다.

[0524] 본 발명의 약학적 조성물은 또한 약학적으로 허용가능한 항-산화제를 포함한다. 약학적으로 허용가능한 항산화제의 예는: (1) 아스코르빅산, 시스테인 하이드로클로라이드, 소듐 비셀페이트, 소듐 메타비셀파이트, 소듐 비셀파이트 등과 같은 수용성 항산화제; (2) 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등과 같은 오일-가용성 항산화제; 그리고 (3) 시트르 산, 에틸렌디아민 테트라초산(EDTA), 솔비톨, 타르타르산, 인산 등과 같은 금속 킬레이팅 제제를 포함한다.

[0525] 본 발명의 약학적 조성물에 사용될 수 있는 적절한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 올리브 기름과 같은 식물성 오일, 에틸 올레이트와 같은 주사가능한 유기 에스테르, 적절한 이들의 혼합물을 포함한다. 적절한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅 물질을 사용함에 의해, 분산의 경우에는 요구되는 입자 사이즈로 유지함에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지되어 질 수 있다.

[0526] 이들 조성물은 또한 보전제, 습윤제, 에멀시화제, 및 분산제와 같은 어쥬번트를 포함할 수 있다. 미생물 존재의 방지는 멸균 절차에 의해, 그리고 그 위에 다양한 향균 및 항곰팡이제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 솔르브산 등의 유입에 의한 양자의 방법에 의해 공고하게 될 수 있다. 당, 염화나트륨 등과 같은 등전제를 조성물 내에 포함하는 것이 또한 바람직할 수 있다. 부가하여, 주사가 가능한 약학적 제형의 지연된 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연하는 제제의 유입에 의해 일어날 수 있다.

[0527] 약학적으로 허용가능한 담체는 멸균 수성 용액 또는 분산액 및 멸균 주사용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 약학적으로 활성인 기질에 대한 이러한 배지 및 제제의 사용은 이 기술 분야에 알려져 있다. 통상적인 배지 및 제제가 본 활성 화합물과 조화할 수 없는 것이 아닌 한, 본 발명의 약학적 조성물에서의 이들의 사용은 고려되어 진다. 보충적인 활성 화합물이 또한 본 조성물에 합체되어 질 수 있다.

[0528] 치료적 조성물은 제조 및 저장의 조건에서 전형적으로 멸균이어야 하고 안정하여야 한다. 조성물은 또한 용액, 마이크로에멀전, 리포솜 또는 높은 약물 농도에 적절한 다른 구조로 제형화되어 질 수 있다. 담체는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 리퀴드 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 적절한 이들의 혼합물을 포함하는 용매 또는 분산 배지일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅 물질을 사용함에 의해, 분산의 경우에는 요구되는 입자 사이즈로 유지함에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지되어 질 수 있다. 많은 경우에, 예를 들어 당, 만니톨, 솔비톨 같은 폴리알코올류 또는 염화나트륨과 같은 등전제를 조성물 내에 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사가 가능한 조성물의 지연된 흡수는 예를 들어 모노스테아레이트 염 및 젤라틴으로 흡수를 지연하는 제제를 조성물 내에 포함함에 의해 일어날 수 있다.

- [0529] 멸균의 주사가 가능한 용액은 상기 열거된 성분들의 하나 또는 조합으로, 필요하면 멸균 미세여과가 따르는, 활성 화합물을 필요한 양으로 적절한 용매에 합체함으로 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산은 기본적인 분산 배지와 상기에 열거된 것으로부터의 필요한 다른 성분을 포함하는 멸균 운반체에 활성 화합물을 합체함에 의해 제조된다. 주사가 가능한 멸균 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조의 방법은 미리 멸균-여과된 이들의 용액으로부터 어떤 부가적인 소망하는 성분이 더해진 활성 성분의 분말을 얻는 진공 건조 및 동결-건조(냉동 진공건조)이다.
- [0530] 단일 복용 형태를 생산하기 위해 담체 물질과 조합되어 질 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 대상, 특히 투여의 형식에 의존하여 다양하게 변할 것이다. 단일 복용 형태를 생산하기 위해 담체 물질과 조합되어 질 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 얻는 조성물의 양이 될 것이다. 일반적으로, 일백 퍼센트 중에서, 이 양은 약 0.01 퍼센트에서 99 퍼센트의 활성성분, 바람직하기로는 약 0.1 퍼센트에서 70 퍼센트, 가장 바람직하기로는 약 1 퍼센트에서 30 퍼센트의 활성성분이 약학적으로 허용될 수 있는 담체와 조합하는 범위일 것이다.
- [0531] 복용 요법은 최적의 바람직한 반응(예를 들어, 치료적 반응)을 제공하기 위해 조정된다. 예를 들어, 단일 환제가 투여되어 질 수 있고, 몇 개로 분할된 복용량이 시간에 걸쳐 투여되어 지거나 또는 복용량이 치료적 상황의 급박성에 의해 나타난 것에 따라 비례하여 감소하거나 증가될 수 있다. 복용량의 일정성과 투여의 편의성을 위한 복용단위 형태로는 비경구적 조성물로 제형화하는 것이 특별히 유익하다. 여기서 사용된 것으로 복용 단위 형태는 치료되는 대상에 단위로 사용하는 복용량으로 적합한 단위를 물리적으로 분리하는 것을 의미한다; 각 단위는 요구된 약학적 담체와 연계하여 원하는 치료적 효과를 생산하기 위해 계산된 소정 양의 활성 화합물을 포함한다. 본 발명의 복용 단위 형태에 대한 명세는 (a) 활성 화합물의 유일한 특징과 달성된 특정한 치료적 효과 및 (b) 개별적으로 민감성의 치료를 위해 이러한 활성 화합물을 포함하는 기술에서 내재하는 제한에 의해 기술되고 그리고 이에 직접적으로 의존한다.
- [0532] 항체의 투여를 위하여, 복용량은 호스트 체중당 약 0.0001 내지 100 mg/kg 그리고 보다 통상적으로는 0.01 내지 5 mg/kg의 범위로 된다. 예를 들어, 복용량은 0.3 mg/kg 체중, 1 mg/kg 체중, 3 mg/kg 체중, 5 mg/kg 체중 또는 10 mg/kg 체중 또는 1-10 mg/kg의 범위 내로 된다. 모범적인 치료 요법은 주당 일 회 투여, 매 이 주당 일 회, 매 삼 주당 일 회, 매 사 주당 일 회, 한 달에 일 회, 매 3 달에 일 회, 매 3 내지 6 달에 일 회 투여를 수반한다. 본 발명의 항-PD-L1 항체에 대한 바람직한 복용량 요법은 다음의 복용량 스케줄의 하나를 사용하여 주어질 항체로, 정맥 내 투여를 통해 1 mg/kg 체중 또는 3 mg/kg 체중을 포함한다: (i) 6회 복용에 대해서는 매 사 주, 그런 다음 매 세 달 간격; (ii) 매 삼 주; (iii) 일단 한번은 3 mg/kg 체중으로 하고 다음으로 매 삼 주 1 mg/kg 체중.
- [0533] 몇몇 방법에 있어서, 다른 결합 특이성을 갖는 둘 또는 그 이상의 모노클로날 항체가 동시에 투여되어 지고, 이 경우에 각 항체의 복용량은 지시된 범위 내로 되도록 투여된다. 항체는 통상적으로 복수의 경우로 투여되어 진다. 단일 복용 간의 간격은, 예를 들어 주 단위로, 월 단위로, 매 삼 개월 단위로 또는 매 년 단위로 될 수 있다. 간격은 또한 환자에 있어 타겟 항원에 대한 항체의 혈중 준위를 측정함에 의해 나타난 바에 따라 비규칙적으로 될 수 있다. 어떤 방법에서는, 복용은 약 1-1000 μg /ml의 플라스마 항체 농도, 어떤 방법에서는 약 25-300 μg /ml의 플라스마 항체 농도를 달성하도록 조정된다.
- [0534] 대안적으로, 항체는 지연된 방출 제형으로 투여되어 질 수 있고, 이 경우에 보다 적은 빈도 투여가 요구된다. 복용량 및 빈도는 환자에 있어서 항체의 반감기에 의존하여 다양하게 변한다. 일반적으로, 인간 항체는 가장 긴 반감기를 보이고 여기에 인체적용된 항체, 키메라 항체, 및 비인간 항체가 따른다. 투여의 복용량 및 빈도는 치료가 예방적인 것인지 또는 치료를 위한 것인지에 따라 다변할 수 있다. 예방적인 적용에 있어서, 상대적으로 낮은 복용량은 장기간의 시간으로 상대적으로 잦지 않은 간격으로 투여된다. 어떤 환자는 이들의 남은 일생 동안 치료를 받는 것을 계속한다. 치료적 적용에 있어서는, 질병의 진행이 감소되거나 또는 중단되어 질 때까지 그리고 바람직하기로는 환자가 부분적으로 또는 완전한 질병의 증상의 개선을 보일 때까지 상대적으로 짧은 간격에서 상대적으로 높은 복용량이 때로는 필요하다. 따라서, 환자는 예방적인 요법이 투여되어 질 수 있다.
- [0535] 본 발명의 약학적 조성물에서 활성 성분의 실질적인 복용량 준위는 환자에 독이 됨이 없이 특정 환자, 조성물 및 투여의 양식에 대한 소망하는 치료적 반응을 달성하기에 효과적인 활성 성분의 양을 얻기 위하여 다양하게 변할 수 있다. 선택된 복용량 준위는 사용된 본 발명의 특정 조성물, 이들의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여의 경로, 투여의 시간, 사용된 특정 화합물의 배출율, 치료의 기간, 사용된 특정의 조성물과 조합하여 사용된 다른 약물, 화합물 및/또는 물질들, 치료되어 지는 환자의 나이, 성, 체중, 상태, 일반적인 건강 및 이전의 병력 및 의료분야에 잘 알려진 다른 인자를 포함하는 다양한 약리운동학적 인자에 의존하여 변할 것이다.

- [0536] 본 발명의 항-PD-L1 항체의 "치료학적으로 유효한 복용량"은 바람직하기로는 질병 증상의 심각성을 감소하고, 질병 증상이 없는 기간 및 빈도를 증가하고, 또는 질병 고통에 기인한 손상 및 불구를 예방을 초래한다. 예를 들어, PD-L1 + 종양의 치료에 대해서, "치료학적으로 유효한 복용량"은 바람직하기로는 치료되지 않은 대상에 비하여 적어도 약 20%, 보다 바람직하기로는 적어도 약 40%, 더 보다 바람직하기로는 적어도 약 60%, 더더욱 보다 바람직하기로는 적어도 약 80%의 세포 성장 또는 종양 성장을 저해한다. 종양성장을 저해하는 화합물의 능력은 인간 종양에서 효능성에 진단적인 동물 모델 시스템으로 평가되어 질 수 있다. 대안적으로, 이 조성물의 특성은 숙달된 개업의에게 알려진 어세이에 의하여 생체 외에서의 저해와 같이, 저해하는 화합물의 능력을 검사함에 의해 평가될 수 있다. 치료적 화합물의 치료학적으로 유효한량은 종양의 사이즈를 감소하거나 그렇지 않으면 대상에서 증상을 개선한다. 이 기술 분야에서의 통상인은 대상의 사이즈, 대상의 증상의 심각성, 및 선택된 투여의 경로 또는 특정한 조성물과 같은 인자에 기초하여 이러한 양을 결정할 수 있을 것이다.
- [0537] 본 발명의 조성물은 이 기술 분야에 알려진 하나 또는 그 이상의 다양한 방법을 사용하여 하나 또는 그 이상의 투여의 경로를 통해 투여되어 질 수 있다. 숙련된 전문가에 의해 인식되어 질 것과 같이, 투여의 경로 및/또는 양식은 회망하는 결과에 의존하여 다양하게 변할 것이다. 본 발명의 항체의 바람직한 투여의 경로는 정맥내, 근육내, 상피내로, 복막내로, 피하로, 척수로 또는, 예를 들어 주사 또는 주입에 의하는 투여의 다른 비경구적 경로를 포함한다. 여기에서 사용되는 것으로 구 "비경구적 투여"는 통상적으로 주사에 의한 내부로 및 국부적 투여 이외의 투여의 양식을 의미하고, 제한됨이 없이, 정맥내, 근육내, 동맥내, 낭내로, 캡슐내, 캐도내, 심장내, 상피내, 복강내, 도관을 통해, 피하내, 큐티클아래, 관절내, 캡슐하, 거미막밑, 척수내, 경막외와 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.
- [0538] 대안적으로, 본 발명의 항체는 국부적으로, 상피로 또는 점막의 투여 경로와 같은 비-장관외의 경로를 통해, 예를 들어 비강으로, 구강으로, 질 동맥으로, 직장으로, 설하로 또는 국소적으로 투여되어 질 수 있다.
- [0539] 활성성분은 임플란트, 피부를 통한 패치, 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템과 같은 화합물을 빠른 방출에 대해 보호하는 담체로 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물류, 폴리글리콜산, 폴라젠, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락산과 같은 생분해가능하고 생체적합한 폴리머들이 사용될 수 있다. 이러한 제형의 제조에 대한 많은 방법들이 특허되어 지거나 이 분야의 통상인에게 일반적으로 공지되어 있다. 예를 들어, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 참고.
- [0540] 치료적 조성물들은 이 기술 분야에 알려진 의료적 장치로 투여되어 질 수 있다. 예를 들어, 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 치료적 조성물은 U.S. 특허번호 Nos. 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; 또는 4,596,556에 기술된 장치와 같은 무바늘 피하 주사 장치로 투여되어 질 수 있다. 본 발명에 유용한 잘-알려진 임플란트 및 모듈의 예는; 조절된 비율로 의약을 분배하는 이식가능한 마이크로-주입 펌프를 개시하는 U.S. 특허번호 No. 4,487,603; 피부를 통해 치료제를 투여하기 위한 치료장치를 개시하는 U.S. 특허번호 No. 4,486,194; 정확한 주입율로 치료약을 전달하는 의약 주입 펌프를 개시하는 U.S. 특허번호 No. 4,447,233; 지속적 약물 전달을 위한 가변 흐름의 이식가능한 유입 장치를 개시하는 U.S. 특허번호 No. 4,447,224; 멀티-챔버 구획부를 갖는 삼투적 약물 전달 시스템을 개시하는 U.S. 특허번호 No. 4,439,196; 및 삼투적 약물 전달 시스템을 개시하는 U.S. 특허번호 No. 4,475,196을 포함한다. 이들 특허는 여기에 레퍼런스로 합체된다. 많은 다른 이런 임플란트, 전달 시스템 및 모듈이 이 기술분야의 통상인에게 잘 알려져 있다.
- [0541] 어떤 실시형태에서, 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 생체 내에서 적절한 분산을 공고하게 하기 위해 제형되어 질 수 있다. 예를 들어, 혈액-뇌 배리어(BBB)는 아주 높은 친수성 화합물을 배제한다. 본 발명의 치료적 화합물이 BBB를 통과(만일 원한다면)하는 것을 확실하게 하기 위해, 이들은, 예를 들어 리포솜에 제형되어 질 수 있다. 리포솜을 제조하는 방법에 대해서는, 예를 들어 U.S. 특허번호 4,522,811; 5,374,548; 및 5,399,331를 참고. 리포솜은 특정한 세포 또는 조직으로 선택적으로 이전되고, 따라서 터겟된 약물 전달을 증진하는 하나 또는 그 이상의 부분을 포함할 수 있다(예를 들어, V. V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685 참고). 모범적인 타겟하는 부분은 플레이트 또는 바이오틴 (예를 들어, Low 등의 U.S. 특허번호 5,416,016 참고); 만노사이드류 (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); 항체 (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); 계면활성제 단백질 A 리셉터 (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090)을 포함하고; 또한 K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; L.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273 참고.

[0542] 본 발명의 용도 및 방법

[0543] 본 발명의 항체, 항체 조성물 및 방법은, 예를 들어 PD-L1의 검출이나 PD-L1의 차단에 의한 면역 반응의 증진과 같은 다수의 생체 외 및 생체 내의 이용성을 갖는다. 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 항체는 인간 항체이다. 예를 들어, 이들 분자는 실험실 또는 생체 외에서 배양에 있는 세포에 투여될 수 있고, 또는 다양한 상황에서 면역성을 증진하기 위해 인간 대상에, 즉 생체 내에 투여되어 질 수 있다. 따라서, 제일 측면에 따르면, 본 발명은 대상에서 면역 반응을 변이하도록 본 발명의 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 대상에 투여하는 것을 포함하는 대상에 있어서의 면역 반응을 변이하는 방법을 제공한다. 바람직하기로는, 이 반응은 고양되거나 자극되거나 또는 상황-조절되어 진다.

[0544] 여기서 사용된 것으로, 용어 "대상"은 인간 또는 비-인간 동물을 포함한다. 비-인간 동물은 척추동물, 즉 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 소, 말, 닭, 양서류 및 파충류 등과 같은 포유 및 비포유동물을 포함하지만, 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 소 및 말과 같은 포유류가 바람직하다. 바람직한 대상은 면역 반응의 증진이 필요한 인간 환자이다. 방법은 특히 T-세포 매개 면역 반응을 증진함에 의해 치료될 수 있는 질병을 갖는 인간 환자를 치료하는데 적절하다. 바람직한 실시형태에서, 방법은 특히 생체 내의 암세포를 치료하는데 적절하다. 면역 원성의 항원-특이성 증진을 이루기 위해, 항-PD-L1 항체가 종양대상의 항원과 같이 투여되어 질 수 있다. PD-L1에 대한 항체가 다른 제제와 함께 투여될 때, 이 두 개는 순차로 또는 동시에 투여되어 질 수 있다.

[0545] 더욱이 본 발명은 항체 또는 이들의 부분과 인간 PD-L1 사이의 복합체 형성을 허용하는 조건 하에서, 인간 PD-L1에 특이적으로 결합하는 인간 모노클로날 항체 또는 이들의 결합부분과 샘플 및 대조 샘플을 접촉하는 것을 포함하는, 샘플 내의 인간 PD-L1 항원의 존재를 검출하는 방법 또는 인간 PD-L1 항원의 양을 측정하는 방법을 제공한다. 복합체의 형성이 그런 다음 검출되는데, 여기서 대조 샘플에 대해 비교된 샘플 사이의 복합체 형성의 차이가 샘플 내에 인간 PD-L1 항원의 존재를 나타낸다.

[0546] 암

[0547] 항체에 의한 PD-L1의 차단은 환자에게서 암 세포에 대한 면역 반응을 증진할 수 있다. PD-L1은 정상적인 인간 세포에서는 발현되지 않지만, 각종 인간 암에는 풍부하다 (Dong *et al.* (2002) *Nat Med* 8:787-9). PD-1과 PD-L1 사이의 상호 작용은 종양 투과 림프구에서의 감소, T-세포 수용체 매개 증식에서의 감소 및 암 세포에 의한 면역 회피를 초래한다 (Dong *et al.* (2003) *J Mol Med* 81:281-7; Blank *et al.* (2004) *Cancer Immunol. Immunother.* [epub]; Konishi *et al.* (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). 면역 억제제는 PD-1에 대한 PD-L1의 국부적 상호 작용을 저해함에 의해 전파되어 질 수 있고 효과는 PD-1에 대한 PD-L2의 상호 작용이 차단될 때 더욱 부가적이다 (Iwai *et al.* (2002) *PNAS* 99:12293-7; Brown *et al.* (2003) *J. Immunol.* 170: 1257-66). 항-PD-L1 항체는 암 종양의 성장을 저해하기 위해 단독으로 사용될 수 있을 것이다. 대안적으로, 항-PD-L1 항체는 아래에 기술하는 바와 같이 다른 면역적 제제, 표준 암 치료 또는 다른 항체와 조합하여 사용될 수 있다.

[0548] 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명은 대상에 치료적으로 유효한 양의 항-PD-L1 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 투여하는 것을 포함하는 대상에 있어서의 종양의 성장을 저해하는 방법을 제공한다. 바람직하기로는, 항체는 인간 항-PD-L1 항체이다 (여기에 기술된 어떤 인간 항-인간 PD-L1 항체 같은 것). 부가적으로 또는 대안적으로, 항체는 키메라 또는 인체적응된 항-PD-L1 항체일 수 있다.

[0549] 그 성장이 본 발명의 항체를 사용함에 의해 저해되어 질 수 있는 바람직한 암은 면역 치료에 전형적으로 반응하는 암을 포함한다. 치료에 대한 바람직한 암의 비-제한적인 예는 흑색종 (예를 들면, 과도 악성 흑색종), 신장암, 전립선 암, 유방암, 대장암, 폐암을 포함한다. 본 발명의 방법을 사용하여 치료될 수 있는 다른 암의 예로는 골암, 췌장암, 피부암, 머리 또는 목의 암, 피부 또는 안구 악성 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문 지역의 암, 위암, 고환 암, 자궁암, 나팔관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 외음문암, 호킨스질병, 비-호킨스 림프종, 식도암, 작은 창자 암, 내분비계 암, 갑상선암, 부 동맥 암, 부신암, 연질 조직의 육종, 요도암, 성기암, 급성 미엘로마 백혈병, 만성 미엘로마 백혈병을 포함하는 만성 또는 급성 백혈병, 급성 림프 백혈병, 만성 림프 백혈병, 유년의 고체 종양, 림프 임파종, 방광암, 신장 또는 요관 암, 신장 골반 암, 중추 신경계(CNS) 종양, 기본 중추 신경계 림프종, 림프관발생 종양, 척추 축 종양, 뇌 줄기 신경아교종, 뇌하수체선종, 카포지의 종양, 상피 암, 비늘모양 세포 암, T-세포 림프종, 식면에 의해 유발된 것을 포함하는 환경적으로 유발된 암 및 상기 암들의 조합을 포함한다. 본 발명은 또한 전이성 암, 특히 PD-L1을 발현하는 전이성 암의 치료에 유용하

다 (Iwai *et al.* (2005) *Int. Immunol.* 17:133-144).

- [0550] 임의적으로, PD-L1에 대한 항체는 암 세포, 정제된 종양 항원(재조합 단백질, 펩티드 및 탄화수소 분자를 포함), 세포 및 면역 자극 시토킨을 코딩하는 유전자를 갖는 세포(He *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28)와 같은 면역성 제제와 조합되어질 수 있다. 사용될 수 있는 종양 백신의 비-제한적인 예는 gp100, MAGE 항원, Trp-2, MART1 및/또는 티로시나제의 펩티드와 같은 미엘로마 항원의 펩티드, 또는 시토킨 GM-CSF (아래에 더 기술됨)을 발현하도록 트랜스펙트된 종양 세포를 포함한다.
- [0551] 인간에 있어서, 몇몇 종양은 흑색종과 같은 면역성인 것으로 나타났다. PD-L1 차단에 의한 T 세포 활성화의 임계점을 상승함에 의해 우리는 숙주에서 종양 반응을 활성화하는 것이 기대된다는 것이 예측된다.
- [0552] PD-L1 차단은 백신화 프로토콜과 조합될 때 가장 유효한 것으로 되기 쉽다. 종양에 대한 백신화를 위한 많은 실험적인 전략이 고안되어 있다 (Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C, 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738 참고; 또한, Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita, V. *et al.* (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition 참고). 이들 전략 중에서, 백신은 자가조직의 또는 동종이계의 종양 세포를 사용하여 제조된다. 이들 세포성 백신은 종양 세포가 GM-CSF를 발현하기 위해 형질도입될 때 가장 유효한 것으로 나타났다. GM-CSF는 종양 백신화반응에 대한 항원 표시의 강력한 활성자인 것으로 나타났다 (Dranoff *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 3539-43).
- [0553] 다양한 종양으로의 유전자 발현 및 큰 스케일 유전자 발현 패턴의 연구는 소위 종양 특이적 항원의 정의로 이끈다 (Rosenberg, SA (1999) *Immunity* 10: 281-7). 많은 경우에, 이들 종양 특이적 항원은, 예를 들어 펠라노사이트 항원 gp100, MAGE 항원 및 Trp-2와 같은, 종양이 발생하는 세포에 그리고 종양에 발현된 분화 항원이다. 보다 중요하기로는, 이들 항원의 대부분은 숙주에서 발견된 종양 특이적 T 세포의 타겟인 것으로 나타난 수 있다. PD-L1 차단은 종양에서 발현된 재조합 단백질 및/또는 펩티드의 집합과 조합하여 이들 단백질에 반응하는 면역을 발생하기 위해 사용되어 질 수 있다. 이들 단백질은 자가 항원으로 면역계에 의하여 정상적으로 검토되고 따라서 이들에 내성인 것이다. 종양 항원은 또한 크로모솜의 말단 소립의 합성에 필요되고 그리고 인간 암의 85% 이상으로 그리고 단지 제한된 수의 체세포 조직에서만 발현되는 단백질 말단 소립을 포함한다 (Kim, N *et al.* (1994) *Science* 266: 2011-2013). (이들 체세포 조직은 다양한 수단에 의한 면역 공격으로부터 보호되어 질 수 있다). 종양 항원은 또한 단백질 시퀀스를 변형하거나 또는 두 개의 비관련 시퀀스 사이의 용융 단백질 (예를 들어, 필라델피아 크로모솜에서의 bcr-abl) 또는 B 세포 조양으로부터의 유전자형을 창출하는 체세포돌연변이 때문에 암 세포에서 발현된 "네오-항원"일 수 있다.
- [0554] 다른 종양 백신은 인간 파필로마 바이러스 (HPV), 간염 바이러스 (HBV 및 HCV) 그리고 카포지의 헤르페스 암종 바이러스 (KHSV)와 같은 인간 암에 유입된 바이러스로부터의 단백질을 포함할 수 있다. PD-L1 차단과 융합하여 사용될 수 있는 종양 특이적 항원의 다른 형태는 그 자체 종양 조직으로부터 분리된 정제된 열 충격 단백질 (HSP)이다. 이들 열 충격 단백질은 종양 세포로부터의 단백질의 분획을 포함하고 그리고 이들 HSP들은 종양 면역성을 이끌어 내기 위한 항원 내재 세포로 전달에 아주 효과적이다 (Suot, R & Srivastava, P (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura, Y. *et al.* (1997) *Science* 278:117-120).
- [0555] 수지상 세포 (DC)는 수위의 항원-특이적 반응에 사용될 수 있는 강력한 항원 내재 세포이다. DC들은 생체 외로 생산되어 질 수 있고 그리고 다양한 단백질 및 펩티드 항원 뿐 아니라 종양 세포 추출물들로 적하되어 질 수 있다 (Nestle, F. *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). DC들은 또한 이들 종양 항원을 보다 잘 발현하기 위해 유전적인 수단에 의해 형질도입되어 질 수 있다. DC들은 또한 면역화의 목적을 위해 종양 세포에 직접적으로 용융되어 진다 (Kugler, A. *et al.* (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). 백신화의 방법으로서 DC 면역화반응이 보다 강력한 항-종양 반응을 활성화하기 위하여 PD-L1 차단과 효과적으로 조합되어 질 수 있다.
- [0556] PD-L1 차단은 또한 표준 암 치료와 조합되어 질 수 있다. PD-L1 차단은 화학치료요법제와 효과적으로 조합되어 질 수 있다. 이들 경우에, 투여된 화학치료제의 복용량을 감소하는 것이 가능할 수 있다 (Mokyr, M. *et al.* (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). 이러한 조합의 예는 흑색종의 치료를 위한 디카르바진과 조합한 항-PD-L1 항체이다. 이러한 조합의 다른 예는 흑색종의 치료를 위한 인터류킨-2 (IL-2)와 조합한 항-PD-L1 항체이다. PD-L1 차단과 화학치료의 조합된 사용 뒤의 과학적인 이론적 근거는, 대부분 화학치료적 화합물의 세포 독성 작용의 귀결인 세포 사가 항원 내재 경로에서 종양 항원의 증가된 준위를 초래한다는 것이다. 세포 사를 통한 PD-L1 차단으로 시너지를 초래할 수 있는 다른 조합 치료법은 방사선, 수술 및 호르몬 상실이다. 이들 프

로토콜의 각각은 숙주에 있어서 종양 항원의 근원을 만든다. 혈관종생성 저해제는 또한 PD-L1 차단과 조합되어 질 수 있다. 혈관종생성의 저해는 숙주 항원 내재 경로로 종양 항원을 공급할 수 있는 종양 세포 사를 이끈다.

[0557] PD-L1 블럭킹 항체는 또한 종양 세포에 Fc 알파 또는 Fc γ 리셉터-발현 이펙터 세포를 타겟으로 하는 바이스페시픽 항체와 조합하여 사용될 수 있다 (예를 들어, U.S. 특허번호 Nos. 5,922,845 및 5,837,243 참고). 바이스페시픽 항체는 두 개의 별도의 항원을 타겟으로 하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 항-Fc 리셉터/항 종양 항원(예를 들어, Her-2/neu) 바이스페시픽 항체는 종양 사이트에 매크로파아지를 타겟으로 하기 위해 사용된다. 이 타겟화는 종양 특이적 반응을 보다 효과적으로 활성화할 수 있다. 이들 반응의 T 세포 암은 PD-L1 차단의 사용에 의하여 증강되어 질 것이다. 대안적으로 항원은 종양 항원 및 수지상 세포 특이적 세포 표면 마커에 결합하는 바이스페시픽 항체의 사용에 의해 DC들에 직접적으로 전달되어 질 수 있다.

[0558] 종양은 아주 다양한 메카니즘에 의해 숙주 면역 감시를 회피한다. 많은 이들 메카니즘은 종양에 의해 발현되고 그리고 면역억제적인 단백질의 비활성화에 의해 극복될 수 있다. 이들은 다른 것들 중에 TGF-베타 (Kehrl, J. *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard, M. & O'Garra, A. (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), 및 Fas 리간드 (Hahne, M. *et al.* (1996) *Science* 274: 1363-1365)를 포함한다. 이들 실체 각각의 항체는 면역억제제의 효과에 반대작용을 하고 숙주에 의한 종양 면역 반응에 유리한 항-PD-L1과 조합하여 사용될 수 있다.

[0559] 숙주 면역 반응성을 활성화하기 위해 사용될 수 있는 다른 항체는 항-PD-L1과 조합하여 사용될 수 있다. 이들은 DC 기능과 항원 내재를 활성화하는 수지상 세포의 표면상의 분자를 포함한다. 항-CD40 항체는 T 세포 헬퍼 활성화에 대해 효과적으로 치환될 수 있고 (Ridge, J. *et al* (1998) *Nature* 393: 474-478) 그리고 PD-L1 항체와 조합하여 사용될 수 있다 (Ito, N. *et al* (2000) *Immunobiology* 201 (5) 527-40). OX-40 (Weinberg, A. *et al.* (2000) *Immunol* 164: 2160- 2169), 4-1BB (Melero, I. *et al.* (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997)), 및 ICOS (Hutloff, A. *et al* (1999) *Nature* 397: 262-266)와 같은 T 세포 공동자극의 분자에 대한 활성화하는 항체 뿐 아니라 CTLA-4 (예를 들어, US 특허번호 No. 5,811,097) 또는 BTLA (Watanabe, N. *et al.* (2003) *Nat Immunol* 4:670-9), B7-H4 (Sica, GL *et al* (2003) *Immunity* 18:849-61)와 같은 네거티브 공동자극의 분자의 활성을 차단하는 항체가 또한 T 세포 활성화의 증진된 준위를 제공할 수 있다.

[0560] 골수이식은 조혈제 유래의 각종 종양을 치료하기 위해 현재 사용되어 지고 있다. 숙주 질병에 대한 이식이 이들 치료의 결과이지만, 치료적 이점은 종양 반응에 대해 이식으로부터 얻어질 수 있다. PD-L1 차단은 공여자 융합 종양 특이적 T 세포의 유효성을 증가하기 위하여 사용되어 질 수 있다. 또한, 항원 특이적 T 세포의 생체 외 활성화와 팽창을 포함하고 그리고 종양에 대해 항원 특이적 T 세포로 하기 위해 수용체로 이들 세포의 적응적 전이를 하는 몇 가지의 실험적 치료 프로토콜이 있다 (Greenberg, R. & Riddell, S. (1999) *Science* 285: 546-51). 이들 방법은 또한 CMV와 같은 전염성 제제에 대해 T 세포 반응을 활성화하기 위해 사용될 수 있다. 항-PD-L1 항체의 존재에서 생체 외 활성화는 채용적으로 전이된 T 세포의 빈도와 활성을 증가하는 것으로 기대될 수 있다.

[0561] **감염성 질병**

[0562] 본 발명의 다른 방법은 특정한 독성 또는 병원균에 노출된 환자를 치료하기 위해 사용된다. 따라서, 본 발명의 다른 측면은 대상이 감염성 질병에 대해 치료되도록 대상에 항-PD-L1 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 투여하는 것을 포함하는 대상에 있어서 감염성 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 바람직하기로는, 항체는 인간 항-인간 PD-L1 항체(여기에 기술된 어떤 인간 항-PD-L1 항체와 같은 것)이다. 부가적으로 또는 대안적으로, 항체는 키메라 또는 인체적용된 항체일 수 있다.

[0563] 상술한 바와 같이 이의 종양에 적용에 유사하게, 항체 매개 PD-L1 차단은 병원균, 독소 및 자가-항원에 대한 면역 반응을 자극하기 위하여 단독으로, 또는 어췌벤트로 백신과 조합하여 사용될 수 있다. 이 치료적 어프로치가 특히 유용할 수 있는 병원균의 예는 현재로는 효과적인 백신이 아닌 병원균, 또는 통상적인 백신이 완전하게 효과적이지 않는 병원균을 포함한다. 이들은 여기에 한정되는 것은 아니지만, HIV, 간염 (A, B, & C), 인플루엔자, 헤르페스, 편모충, 말라리아, 리슈마니아, 스타펠로코커스 아우레우스, 슈도모나스 에어루기노사를 포함한다. PD-L1 차단은 감염의 과정을 걸쳐 변형된 항원이 존재하는 HIV와 같은 항원에 의한 확립된 전염에 대해 특히 유용하다. 이들 신규한 항원결정인자는 항-인간 PD-L1 투여의 시에 외래성인 것으로 인지되고, 따라서 PD-L1을 통한 네거티브 신호에 의해 감소되지 않는 강력한 T 세포 반응을 일으킨다.

- [0564] 본 발명의 방법에 의하여 치료될 수 있는 감염을 유발하는 병원성 바이러스의 몇몇 예는 HIV, 간염 (A, B, 또는 C), 헤르페스 바이러스(예를 들어, VZV, HSV-I, HAV- 6, HSV-II, 및 CMV, 엡스타인바바이러스), 아데노바이러스, 인플루엔자 바이러스, 플라비바이러스, 에코바이러스, 리노바이러스, 콕사키 바이러스, 코르노바이러스, 호흡기세포융합바이러스, 유행성 이하선염 바이러스, 로타바이러스, 홍역 바이러스, 루벨라 바이러스, 파르보바이러스, 백시너 바이러스, HTLV 바이러스, 뎅기열 바이러스, 파필로마바이러스, 몰루스쿰 바이러스, 폴리오바이러스, 공수병 바이러스, JC 바이러스 및 아르보바이러스의 너염 바이러스를 포함한다.
- [0565] 본 발명의 방법에 의하여 치료될 수 있는 감염을 유발하는 병원성 세균의 몇몇 예는 클라미디아, 리켓치아 박테리아, 미코박테리아, 포도상 구균, 연쇄상 구균, 뉴모노 구균, 메닝고 구균 및 코노 구균, 클렙시엘라, 프로테우스, 세라티아, 슈도모나스, 레지오넬라, 디프테리아, 살모넬라, 바실리, 콜레라, 과상풍, 보툴리누스 중독증, 탄저병, 역병, 렙토스피로시스 및 라임 병 박테리아를 포함한다.
- [0566] 본 발명의 방법에 의하여 치료될 수 있는 감염을 유발하는 병원성 곰팡이의 몇몇 예는 칸디다(알비칸, 크루세이, 그라브라타, 트로피칼리스 등), 클립토크커스 네오포만스, 아스퍼길러스(퓨미가터스, 니거 등), 지너스 뮤코랄레스(뮤코르, 엡시디아, 리조푸스), 스포로트릭스 쉐키, 블라스토미세스 더마티티디스, 파라코찌디오이데스 브라실리엔시스, 코찌디오이데스 이미티스 및 히스토플라즈마 캡슐레툼을 포함한다.
- [0567] 본 발명의 방법에 의하여 치료될 수 있는 감염을 유발하는 병원성 기생충의 몇몇 예는 엔타모에바 히스토리티카, 발란티디움 콜리, 내그레리아포우레리, 아켄타모에바 에스피., 기알디아 람비아, 크립토스포리디움 에스피., 뉴모시스티스 카리니, 플라스모디움 비벡스, 바베시아 미크로티, 트립파노소마 부루세이, 트립파노소마 크루제, 레이쉬마니아 도노바니, 톡소플라즈마 곤디, 니포스트롱길러스 브라실리엔시스를 포함한다.
- [0568] 상기 방법의 모두에 있어서, PD-L1 차단은 시토킨 치료(예를 들어, 인터페론, GM-CSF, G-CSF, IL-2) 또는 바이스페시픽 항원 치료와 같은 다른 형태의 면역치료법과 조합될 수 있어, 종양 항원의 증진된 내재를 제공한다(예를 들어, Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2:1121-1123 참고).
- [0569] 자가면역 반응
- [0570] 항-PD-L1 항체는 자가면역 반응을 유발하고 증폭할 수 있다. 실제로, 종양 세포 및 펩티드 백신을 사용하는 항-종양 반응의 유도는 많은 항-종양 반응이 항-자가 반응성(depigmentation observed in anti- CTLA-4 + GM-CSF-modified B 16 melanoma in van Elsas *et al* supra; depigmentation in Trp-2 vaccinated mice (Overwijk, W. *et al* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 96: 2982- 2987); TRAMP 종양 세포 백신에 의해 유발된 자가면역 전립선염 (Hurwitz, A. (2000) *supra*), 인간의 임상적 실험에서 관찰된 흑색종 펩티드 항원 백신화반응 및 백피 (Rosenberg, SA and White, DE (1996) *J. Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19 (1): 81-4)를 포함한다는 것을 밝힌다.
- [0571] 따라서, 질병 치료를 위해 이들 자가 단백질에 대한 면역 발생을 효과적으로 일으키기 위한 백신화반응 프로토콜을 안출하기 위해서 다양한 자가 단백질과 조합하여 항-PD-L1 차단을 사용하는 것을 고려하는 것이 가능하다. 예를 들어, 알츠하이머 병은 뇌에 아밀로이드 증착에 있어서 A β 펩티드의 부적절한 축적을 포함하고; 아밀로이드에 대한 항체 반응은 이들 아밀로이드 증착을 깨끗하게 할 수 있다 (Schenk *et al*, (1999) *Nature* 400: 173-177).
- [0572] 다른 자가 단백질이 또한 알러지 및 천식의 치료를 위한 IgE 및 류마티스성 관절염 치료를 위한 TNF α 와 같은 타겟으로 사용되어 질 수 있을 것이다. 마지막으로, 다양한 호르몬에 대한 항체 반응은 항-PD-L1 항체의 사용에 의하여 유도되어 질 것이다. 재생성 호르몬에 대한 중화 항체 반응은 피임을 위해 사용되어 질 것이다. 특정 종양의 성장을 위해 필요로 되는 호르몬 및 기타 가용성 인자에 대한 중화 항체 반응은 또한 가능한 백신화반응 타겟으로 고려될 것이다.
- [0573] 항-PD-L1 항체의 사용에 대해 상술한 것과 유사한 방법이 알츠하이머 병에서 A β 를 포함하는 아밀로이드 증착과 같은 다른 자가-항원, TNF α 및 IgE와 같은 시토킨의 부적절한 축적을 갖는 환자를 치료하기 위한 치료적 자가면역 반응의 유발을 위해 사용될 수 있다.

- [0574] 백신
- [0575] 항-PD-L1 항체는 흥미대상의 항원(예를 들어, 백신)과 항-PD-L1 항체의 공동 투여에 의해 항원-특이적 면역 반응을 자극하기 위해 사용될 것이다. 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상에 있어서 항원에 대한 면역 반응이 고양되도록, 대상에 (i) 항원; 및 (ii) 항-PD-L1 항체 또는 이들의 항원 결합 부분을 투여하는 것을 포함하는 대상에 있어서의 항원에 대한 면역 반응을 증진하는 방법을 제공한다. 바람직하기로는, 항체는 인간 항-인간 PD-L1 항체(여기에 기술된 어떤 인간 항-PD-L1 항체와 같은 것)이다. 부가적으로 또는 대안적으로, 항체는 키메라 또는 인체적응된 항체일 수 있다. 항원은, 예를 들어 종양 항원, 바이러스 항원, 박테리아 항원 또는 병원체로부터의 항원일 수 있다. 이러한 항원의 비-제한적 예는 상기한 종양 항원(또는 종양 백신), 또는 바이러스, 박테리아 또는 다른 상기한 병원체로부터의 항원과 같은 상기 부분에 기술된 것들을 포함한다.
- [0576] 항-PD-L1 항체는 또한 대장염을 갖는 T 세포 억제 소모성 질병과 같은 질병과 연계된 부차적인 효과를 제거하기 위해 사용되어 질 수 있다 (Kanai *et al.* (2003) *J. Immunol.* 121:4156-63). 따라서, 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 T 세포에 의해 IFN- γ , IL-2, 및 IFN- α 의 생산을 감소하고 류코사이트 침입을 제거하는 방법을 제공한다. 바람직하기로는, 항체는 인간 항-인간 PD-L1 항체(여기에 기술된 어떤 인간 항-PD-L1 항체와 같은 것)이다. 부가적으로 또는 대안적으로, 항체는 키메라 또는 인체적응된 항체일 수 있다.
- [0577] 항-PD-L1 항체는 또한 편평태선과 같은 만성 염증성 질병, T-세포 매개 만성 염증성 류코큐테니어스 질병과 같은 질병을 치료하기 위해 사용되어 질 수 있다 (Youngnak-Piboonratanakit *et al.* (2004) *Immunol Letters* 94:215-22). 따라서, 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 T 세포에 의한 만성 염증성 질병을 제거하는 방법을 제공한다. 바람직하기로는, 항체는 인간 항-인간 PD-L1 항체(여기에 기술된 어떤 인간 항-PD-L1 항체와 같은 것)이다. 부가적으로 또는 대안적으로, 항체는 키메라 또는 인체적응된 항체일 수 있다.
- [0578] 생체 내 및 실험실 내에서 본 발명의 항체 조성물(예를 들어, 인간 모노클로날 항체, 멀티스페시픽 및 바이스페시픽 분자 및 면역컨쥬게이트)을 투여하는 적절한 경로는 이 기술분야에 잘 알려져 있으며 그리고 통상인에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, 항체 조성물은 주사(예를 들어, 정맥 내로 또는 피하로)에 의해 투여되어 질 수 있다. 사용된 분자의 적절한 복용량은 대상의 연령 및 체중과 항체 조성물의 농도 및/또는 제형에 의존할 것이다.
- [0579] 이미 기술한 바와 같이, 본 발명의 인간 항-PD-L1 항체는 하나 또는 그 이상의 다른 치료적 제제, 예를 들어 세포독소 제제, 방사독소 제제 또는 면역억제 제제와 같이 투여되어 질 수 있다. 항체는 제제에 연결되어 질 수 있고(면역 복합체로서) 또는 제제와 별도로 투여되어 질 수 있다. 후자의 경우(별도 투여)에, 항체는 전에, 후에 또는 제제 동시적으로 투여되어 질 수 있고 또는 다른 공지된 치료법, 예를 들어 방사와 같은 항암 치료와 같이 투여될 수 있다. 이러한 치료적 제제는, 다른 것 중에서 이들 자체로 환자에 독성이거나 독성 이하인 수준으로만 유효한 독소루비신(아드리아마이신), 시스플라틴 블레오마이신 설페이트, 카르뮤스틴, 크로르암부실 및 시클로포스파미드 하이드록시우레아와 같은 항-신생 제제를 포함한다. 시스플라틴은 매 4주에 한번 씩 100 mg/복용량으로 정맥 내로 투여되고, 그리고 아드리아마이신은 매 21일에 한번 씩 60-75 mg/ml 복용량으로 정맥 내로 투여된다. 화학치료제와 본 발명의 인간 항-PD-L1 항체 또는 이들의 항원 결합 부분의 공동 투여는 인간 종양 세포에 대해 세포독성 효과를 생성하는 다른 메커니즘을 통해 작동하는 두 개의 항암 제제를 제공한다. 이러한 공동 투여는 약물에 대한 저항성의 전개 또는 항체로 인해 이들 종양 세포에 비반응성을 부여하는 종양 세포의 항원성에 있어서의 변화에 기인한 문제점을 해결할 수 있다.
- [0580] 또한, 본 발명의 항체 조성물(예를 들어, 인간 항체, 바이스페시픽 또는 멀티스페시픽 분자 또는 면역컨쥬게이트) 및 사용 지시를 포함하는 키트도 본 발명의 범주 내이다. 이 키트는 더욱이 적어도 하나의 부가적인 시약 또는 본 발명의 하나 또는 그 이상의 부가적인 인간 항체(예를 들어, 제1 인간 항체와 구별되는 PD-L1 항원 내에서 항원결정인자에 결합하는 상보적인 활성을 갖는 인간 항체)를 포함할 수 있다. 키트는 전형적으로 키트 내용물의 의도된 사용을 지시하는 라벨을 포함한다. 이 용어 라벨은 키트와 같이 또는 그렇지 않으면 키트를 수반하여 공급된 활자 또는 기록물을 포함한다.
- [0581] 본 발명은 추가적인 제한으로서 해석되지 않는 다음의 실시예에 의하여 더욱 자세히 기술된다. 모든 도면 및 이출원 명세서 전체를 통해 인용된 모든 레퍼런스, 특허 및 공개된 특허출원은 분명하게 여기에 레퍼런스로 합체되어 진다.

- [0582] 실시예
- [0583] 실시예 1: PD-L1에 대한 인간 모노클로날 항체의 생성
- [0584] 항원
- [0585] 면역화반응 프로토콜이 항원 (i) PD-L1의 세포 외 부분을 포함하는 재조합 용융 단백질 및 (ii) 멤브레인 결합 전-질이 PD-L1 양자로 이용되었다. 양 항원은 재조합 트랜스펙션 방법에 의해 CHO 셀 라인에 생성되어 졌다.
- [0586] 형질전환 마우스(KM-마우스® 콜로니)
- [0587] PD-L1에 대해 완전한 인간 모노클로날 항체가 인간 항체 유전자를 발현하는 형질전환성 트랜스크로모솜 마우스의 KM 스트레인을 사용하여 제조되었다. 이 마우스 스트레인에, 내인성 마우스 카파 경사슬 유전자가 Chen *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:811-820에 기술된 바와 같이 균질하게 파열되고 그리고 내인성 마우스 카파 중사슬 유전자가 PCT 공개공보 WO 01/09187의 실시예 1에 기술된 바와 같이 균질하게 파열되었다. 더욱이, 이 마우스 스트레인은 Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851에 기술된 바와 같이 인간 카파 경사슬 이식 유전자인 KCo5, 및 PCT 공개공보 WO 02/43478에 기술된 바와 같은 SC20 트랜스크로모솜을 담지한다.
- [0588] KM-마우스® 면역화반응
- [0589] PD-L1에 대해 완전한 인간 모노클로날 항체를 생성하기 위해, KM-마우스® 스트레인의 마우스 지원자가 항원으로 정제된 재조합 PD-L1-Ig 및 PD-L1-트랜스펙트된 CHO 세포로 면역된다. HuMab 마우스에 대한 일반적인 면역화 계획은 Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 11: 845-851, 그리고 PCT 공개공보 WO 98/24884에 기술되어 있다. 마우스는 항원의 제 일차 주입 후 6-16 주령이 되었다. PD-L1-Ig 항원의 정제된 재조합 제제 (5-50 μ g) 및 $5-10 \times 10^6$ 세포가 복막 내로 (IP), 피하로 (Sc) 또는 발바닥 주입을 통해 HuMab 마우스를 면역화하기 위해 사용되었다.
- [0590] 유전자이식된 마우스는 컴플리트 프로이드 어쥬번트 또는 리비 어쥬번트 내에 항원으로 IP로 이회 면역되고, 컴플리트 프로이드 어쥬번트 또는 리비 어쥬번트 내 항원으로 3-21일 IP(전체 11회 면역까지)가 따른다. 면역 반응은 레트로오비탈 블리드에 의해 모니터링되어 진다. 플라즈마는 ELISA에 의해 선별되고(아래에 기술됨과 같음) 그리고 충분한 역가의 항-PD-L1 인간 이뮤노글로불린을 갖는 마우스가 용융을 위해 사용되었다. 마우스는 희생되어 비장이 제거되기 3일 전에 정맥 내로 항원으로 면역되었다. 전형적으로는, 각 항원에 대해 10-35 용융이 수행되었다. 다수 무리의 마우스가 각 항원에 대해 면역화되었다.
- [0591] 항-PD-L1 항체 생산 KM-마우스®의 셀렉션:
- [0592] PD-L1를 결합한 항체를 생산하는 HuMab 마우스를 선택하기 위해, 면역화된 마우스로부터의 혈청이 Fishwild, D. *et al.* (1996)에 기술된 바와 같이 ELISA에 의하여 시험되었다. 간략하게는, 마이크로타이터 플레이트가 PBS 내 1-2 μ g/ml로 트랜스펙트된 CHO로부터 정제된 재조합 PD-L1 용융 단백질로 도포되어 지고, 100 μ l/웰이 4°C에서 밤 세워 배양되고, 그런 다음 PBS/트윈 (0.05%) 내에 200 μ l/웰의 5% 송아지 태반 혈청으로 차단되었다. PD-L1-면역 마우스로부터의 혈청 희석이 각 웰에 부가되고 대류 온도에서 1-2 시간 동안 배양된다. 플레이트는 PBS/트윈으로 수세되고 그런 다음 홀스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)와 컨쥬게이트된 고트-항-인간 IgG 폴리클로날 항체로 1시간 동안 실온에서 배양된다. 수세 후, 플레이트는 ABTS 기판 (Sigma, A-1888, 0.22 mg/ml)으로 전개되고 그리고 OD 415-495에서 스펙트로포토미터에 의해 측정되었다. 가장 높은 역가의 항-PD-L1 항체를 전개한 마우스가 용융을 위해 사용되었다. 용융은 아래에 기술된 바와 같이 수행되었고, 하이브리도마 상등액이 ELISA에 의해 항-PD-L1 활성에 대해 시험되었다.
- [0593] PD-L1에 대해 인간 모노클로날 항체를 생산 하이브리도마의 생성:
- [0594] KM 마우스로부터 분리된 마우스 비장세포가 표준 기술에 기초하여 마우스 미엘로마 셀 라인에 PEG로 용융되었다. 얻어진 하이브리도마는 그런 다음 항원-특이적 항체의 생성에 대해 선별되었다. 면역된 마우스로부터 비장세포의 단일 세포 현탁액이 SP2/0 비분비 마우스 미엘로마 세포(ATCC, CRL 1581)의 사분의 일의 수에 50% PEG (Sigma)로 용융된다. 세포는 평판 바닥 마이크로타이터 플레이트에 대략적으로 1×10^5 /웰로 이식되어 지고, 10% 송아지 태반 혈청을 포함하는 선택배지, 10% P388D1 (ATCC, CRL TIB-63) 조건부 배지, 5 mM HEPES,

0.055 mM 2-머캅토에탄올, 50 mg/ml 겐타마이신 및 IxHAT (Sigma, CRL P-7185)가 더해진 DMEM (Mediatech, CRL 10013, 고 글루코스, L-글루타민 및 소듐 피루레이트를 가짐) 내에 3-5% 오리진 (IGEN)에서 약 2주간 배양되어 진다. 1-2 주 후, 세포는 HAT가 HT로 대체된 배지에서 배양된다. 개개의 세포는 그런 다음 인간 항-PD-L1 모노클로날 IgG 항체에 대해 ELISA (상술한 것)에 의해 선별된다. 일단 광범위한 하이브리도마 성장이 발생되면, 배지는 통상적으로 10-14일 후에 모니터된다. 항체-분비 하이브리도마가 재이식되고 다시 선별되고, 그리고 여전히 인간 IgG에 대해 양성이면, 항-PD-L1 모노클로날 항체가 희석을 제한함에 의해 적어도 이회 서브클론되어 진다. 안정한 서브클론은 그런 다른 추가적인 특징을 위해 조직 배양 배지에서 소량의 항체를 생성하기 위해 실험실 내에서 배양된다.

[0595] 하이브리도마 클론 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 및 13G4가 부가적인 분석을 위해 선택되어 졌다.

[0596] **실시예 2: 인간 모노클로날 항체 3G10, 12A4, 및 10A5의 구조적 특징**

[0597] 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 및 13G4 모노클로날 항체의 중 및 경사슬들을 코드하는 cDNA 시퀀스가 표준 PCR 기술을 사용하여 각각 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, 및 13G4 하이브리도마로부터 획득되어 지고 그리고 표준 DNA 시퀀싱 기술을 사용하여 시퀀스되었다.

[0598] 3G10의 중사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 1A와 SEQ ID NO:81 및 1에 각각 도시되어 있다.

[0599] 3G10의 경사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 1B와 SEQ ID NO:91 및 11에 각각 도시되어 있다.

[0600] *공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 중사슬 시퀀스에 3G10 중사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 3G10 중사슬이 인간 생식계열 VH 1-18로부터 VH 분절, 미결정 D 분절 및 인간 생식계열 JH 6b로부터 JH 분절을 이용하는 것을 증명한다. 생식계열 VH 1-18 시퀀스에 대한 3G10 VH 시퀀스의 얼라인먼트는 도 11에 나타나 있다. CDR 영역 결정을 위한 카바트 시스템을 사용한 3G10 VH 시퀀스의 부가적인 분석은 도 1A 및 11과 SEQ ID NOs:21, 31 및 41에 각각 나타난 바와 같이 중사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 영역의 윤곽을 끌어낸다. 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 경사슬 시퀀스에 3G10 경사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 3G10 경사슬이 인간 생식계열 VK L6로부터 VH 분절 및 인간 생식계열 JK 1로부터 JK 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 VK L6 시퀀스에 대한 3G10 VL 시퀀스의 얼라인먼트는 도 21에 나타나 있다. CDR 영역 결정을 위한 카바트 시스템을 사용한 3G10 VL 시퀀스의 부가적인 분석은 도 1B 및 21과 SEQ ID NOs:51, 61 및 71에 각각 나타난 바와 같이 경사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 영역의 윤곽을 끌어낸다.

[0601] 12A4의 중사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 2A와 SEQ ID NO:82 및 2에 각각 도시되어 있다.

[0602] 12A4의 경사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 2B와 SEQ ID NO:92 및 12에 각각 도시되어 있다.

[0603] 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 중사슬 시퀀스에 12A4 중사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 12A4 중사슬이 인간 생식계열 VH 1-69로부터 VH 분절, 인간 생식계열 3-10으로부터 D 분절 및 인간 생식계열 JH 6b로부터 JH 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 VH 1-69 시퀀스에 대한 12A4 VH 시퀀스의 얼라인먼트는 도 12에 나타나 있다. CDR 영역 결정을 위한 카바트 시스템을 사용한 12A4 VH 시퀀스의 부가적인 분석은 도 2A 및 12와 SEQ ID NOs:22, 32 및 42에 각각 나타난 바와 같이 중사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 영역의 윤곽을 끌어낸다.

[0604] 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 경사슬 시퀀스에 12A4 경사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 12A4 경사슬이 인간 생식계열 VK L6로부터 VL 분절 및 인간 생식계열 JK 1로부터 JK 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 VK L6 시퀀스에 대한 12A4 VL 시퀀스의 얼라인먼트는 도 22에 나타나 있다. CDR 영역 결정을 위한 카바트 시스템을 사용한 12A4 VL 시퀀스의 부가적인 분석은 도 2B 및 22와 SEQ ID NOs:52, 62 및 72에 각각 나타난 바와 같이 경사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 영역의 윤곽을 끌어낸다.

[0605] 10A5의 중사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 3A와 SEQ ID NO:83 및 3에 각각 도시되어 있

다.

- [0606] 10A5의 경사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 3B와 SEQ ID NO:93 및 13에 각각 도시되어 있다.
- [0607] 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 중사슬 시퀀스에 10A5 중사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 10A5 중사슬이 인간 생식계열 VH 1-3으로부터 VH 분절, 인간 생식계열 5-5으로부터 D 분절 및 인간 생식계열 JH 4b로부터 JH 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 VH 1-3 시퀀스에 대한 10A5 VH 시퀀스의 얼라인먼트는 도 13에 나타나 있다. CDR 영역 결정을 위한 카바트 시스템을 사용한 10A5 VH 시퀀스의 부가적인 분석은 도 3A 및 13과 SEQ ID NOs:23, 33 및 43에 각각 나타난 바와 같이 중사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 영역의 윤곽을 끌어낸다.
- [0608] 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 경사슬 시퀀스에 10A5 경사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 10A5 경사슬이 인간 생식계열 VK L15로부터 VL 분절 및 인간 생식계열 JK 2로부터 JK 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 10A5 VL 시퀀스에 대한 시퀀스의 얼라인먼트는 도 23에 나타나 있다. CDR 영역 결정을 위한 카바트 시스템을 사용한 10A5 VL 시퀀스의 부가적인 분석은 도 3B 및 23과 SEQ ID NOs:53, 63 및 73에 각각 나타난 바와 같이 경사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 영역의 윤곽을 끌어낸다.
- [0609] 5F8의 중사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 4A와 SEQ ID NO:84 및 4에 각각 도시되어 있다.
- [0610] 5F8의 경사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 4B와 SEQ ID NO:94 및 14에 각각 도시되어 있다.
- [0611] 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 중사슬 시퀀스에 5F8 중사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 5F8 중사슬이 인간 생식계열 VH 1-69으로부터 VH 분절, 인간 생식계열 6-13으로부터 D 분절 및 인간 생식계열 JH 4b로부터 JH 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 VH 1-69 시퀀스에 대한 5F8 VH 시퀀스의 얼라인먼트는 도 14에 나타나 있다. CDR 영역 결정을 위한 카바트 시스템을 사용한 5F8 VH 시퀀스의 부가적인 분석은 도 4A 및 14와 SEQ ID NOs:24, 34 및 44에 각각 나타난 바와 같이 중사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 영역의 윤곽을 끌어낸다.
- [0612] 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 경사슬 시퀀스에 5F8 경사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 5F8 경사슬이 인간 생식계열 VK A27로부터 VL 분절 및 인간 생식계열 JK 1로부터 JK 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 VK A27 시퀀스에 대한 5F8 VL 시퀀스의 얼라인먼트는 도 24에 나타나 있다. CDR 영역 결정을 위한 카바트 시스템을 사용한 5F8 VL 시퀀스의 부가적인 분석은 도 4B 및 24와 SEQ ID NOs:54, 64 및 74에 각각 나타난 바와 같이 경사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 영역의 윤곽을 끌어낸다.
- [0613] 10H10의 중사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 5A와 SEQ ID NO:85 및 5에 각각 도시되어 있다.
- [0614] 10H10의 경사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 5B와 SEQ ID NO:95 및 15에 각각 도시되어 있다.
- [0615] 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 중사슬 시퀀스에 10H10 중사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 10H10 중사슬이 인간 생식계열 VH 3-9로부터 VH 분절, 인간 생식계열 4-17로부터 D 분절 및 인간 생식계열 JH 4b로부터 JH 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 VH 3-9 시퀀스에 대한 10H10 VH 시퀀스의 얼라인먼트는 도 15에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카바트 시스템을 사용한 10H10 VH 시퀀스의 부가적인 분석은 도 5A 및 15와 SEQ ID NOs:25, 35 및 45에 각각 나타난 바와 같이 중사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 영역의 윤곽을 끌어낸다.
- [0616] 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 경사슬 시퀀스에 10H10 경사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 10H10 경사슬이 인간 생식계열 VK L15로부터 VL 분절 및 인간 생식계열 JK 2로부터 JK 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 VK L15 시퀀스에 대한 10H10 VL 시퀀스의 얼라인먼트는 도 25에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카바트 시스템을 사용한 10H10 VL 시퀀스의 부가적인 분석은 도 5B 및 25와 SEQ ID NOs:55, 65 및 75에 각각 나타난 바와 같이 경사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 영역의 윤곽을 끌어낸다.
- [0617] IB 12의 중사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 6A와 SEQ ID NO:86 및 6에 각각 도시되어 있다.
- [0618] 1B12의 경사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 6B와 SEQ ID NO:96 및 16에 각각 도시되어 있다.

- [0619] 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 중사슬 시퀀스에 IB12 중사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 IB12 중사슬이 인간 생식계열 VH 1-69로부터 VH 분절, 인간 생식계열 3-10으로부터 D 분절 및 인간 생식계열 JH 6b로부터 JH 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 VH 1-69 시퀀스에 대한 IB12 VH 시퀀스의 얼라인먼트는 도 16에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밋트 시스템을 사용한 IB12 VH 시퀀스의 부가적인 분석은 도 6A 및 16와 SEQ ID NOs:26, 36 및 46에 각각 나타난 바와 같이 중사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 영역의 윤곽을 끌어낸다.
- [0620] 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 경사슬 시퀀스에 IB12 경사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 IB12 경사슬이 인간 생식계열 VK L6으로부터 VL 분절 및 인간 생식계열 JK 1로부터 JK 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 VK L6 시퀀스에 대한 IB12 VL 시퀀스의 얼라인먼트는 도 26에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밋트 시스템을 사용한 IB12 VL 시퀀스의 부가적인 분석은 도 6B 및 26와 SEQ ID NOs:56, 66 및 76에 각각 나타난 바와 같이 경사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역의 윤곽을 끌어낸다.
- [0621] 7H1의 중사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 7A와 SEQ ID NO:87 및 7에 각각 도시되어 있다.
- [0622] 7H1의 경사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 7B와 SEQ ID NO:97 및 17에 각각 도시되어 있다.
- [0623] 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 중사슬 시퀀스에 7H1 중사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 7H1 중사슬이 인간 생식계열 VH 1-69로부터 VH 분절, 인간 생식계열 3-10으로부터 D 분절 및 인간 생식계열 JH 6b로부터 JH 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 VH 1-69 시퀀스에 대한 7H1 VH 시퀀스의 얼라인먼트는 도 17에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밋트 시스템을 사용한 7H1 VH 시퀀스의 부가적인 분석은 도 7A 및 17과 SEQ ID NOs:27, 37 및 47에 각각 나타난 바와 같이 중사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역의 윤곽을 끌어낸다.
- [0624] 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 경사슬 시퀀스에 7H1 경사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 7H1 경사슬이 인간 생식계열 VK L6으로부터 VL 분절 및 인간 생식계열 JK 1로부터 JK 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 VK L6 시퀀스에 대한 7H1 VL 시퀀스의 얼라인먼트는 도 27에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밋트 시스템을 사용한 7H1 VL 시퀀스의 부가적인 분석은 도 7B 및 27와 SEQ ID NOs:57, 67 및 77에 각각 나타난 바와 같이 경사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역의 윤곽을 끌어낸다.
- [0625] 11E6의 중사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 4A와 SEQ ID NO:84 및 4에 각각 도시되어 있다.
- [0626] 11E6의 경사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 4B와 SEQ ID NO:94 및 14에 각각 도시되어 있다.
- [0627] 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 중사슬 시퀀스에 11E6 중사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 11E6 중사슬이 인간 생식계열 VH 1-69로부터 VH 분절, 인간 생식계열 6-19로부터 D 분절 및 인간 생식계열 JH 6c로부터 JH 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 VH 1-69 시퀀스에 대한 11E6 VH 시퀀스의 얼라인먼트는 도 18에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밋트 시스템을 사용한 11E6 VH 시퀀스의 부가적인 분석은 도 8A 및 18와 SEQ ID NOs:28, 38 및 48에 각각 나타난 바와 같이 중사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역의 윤곽을 끌어낸다.
- [0628] 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 경사슬 시퀀스에 11E6 경사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 11E6 경사슬이 인간 생식계열 VK A27로부터 VL 분절 및 인간 생식계열 JK 4로부터 JK 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 VK A27 시퀀스에 대한 11E6 VL 시퀀스의 얼라인먼트는 도 27에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밋트 시스템을 사용한 11E6 VL 시퀀스의 부가적인 분석은 도 8B 및 28와 SEQ ID NOs:58, 68 및 78에 각각 나타난 바와 같이 경사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역의 윤곽을 끌어낸다. 부가하여, 제이의 관련 클론은 SEQ ID NO: 109에 나타난 바와 같은 VK 시퀀스를 포함했다. 이 항체는 여기서는 11E6a로 표시된다.
- [0629] 12B7의 중사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 9A와 SEQ ID NO:89 및 9에 각각 도시되어 있다. 12B7의 경사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 9B와 SEQ ID NO:99 및 19에 각각 도시되어 있다.
- [0630] 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 중사슬 시퀀스에 12B7 중사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 12B7 중사슬이 인간 생식계열 VH 1-69로부터 VH 분절, 인간 생식계열 3-10으로부터 D 분절 및 인간 생식계열 JH 6b로부터 JH 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 VH 1-69 시퀀스에 대한 12B7 VH 시퀀스의 얼라인먼트는 도 19에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카밋트 시스템을 사용한 12B7 VH 시퀀스의 부가적인 분석은 도 9A 및 19와 SEQ

ID NOs:29, 39 및 49에 각각 나타난 바와 같이 중사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역의 윤곽을 끌어낸다.

[0631] 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 경사슬 시퀀스에 12B7 경사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 12B7 경사슬이 인간 생식계열 VK L6으로부터 VL 분절 및 인간 생식계열 JK 5로부터 JK 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 VK L6 시퀀스에 대한 12B7 VL 시퀀스의 얼라인먼트는 도 29에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카바트 시스템을 사용한 12B7 VL 시퀀스의 부가적인 분석은 도 9B 및 29와 SEQ ID NOs:59, 69 및 79에 각각 나타난 바와 같이 경사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역의 윤곽을 끌어낸다.

[0632] 13G4의 중사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 10A와 SEQ ID NO:90 및 10에 각각 도시되어 있다.

[0633] 13G4의 경사슬 가변영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스는 도 10B와 SEQ ID NO:100 및 20에 각각 도시되어 있다.

[0634] 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 중사슬 시퀀스에 13G4 중사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 13G4 중사슬이 인간 생식계열 VH 3-9로부터 VH 분절, 인간 생식계열 3-9로부터 D 분절 및 인간 생식계열 JH 4b로부터 JH 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 VH 3-9 시퀀스에 대한 13G4 VH 시퀀스의 얼라인먼트는 도 20에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카바트 시스템을 사용한 13G4 VH 시퀀스의 부가적인 분석은 도 10A 및 20와 SEQ ID NOs:30, 40 및 50에 각각 나타난 바와 같이 중사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역의 윤곽을 끌어낸다.

[0635] 공지된 인간 생식계열 이뮤노글로불린 경사슬 시퀀스에 13G4 경사슬 이뮤노글로불린 시퀀스의 비교는 13G4 경사슬이 인간 생식계열 VK L18로부터 VL 분절 및 인간 생식계열 JK 3으로부터 JK 분절을 이용하는 것을 증명했다. 생식계열 VK L18 시퀀스에 대한 13G4 VL 시퀀스의 얼라인먼트는 도 30에 나타나 있다. CDR 영역 결정의 카바트 시스템을 사용한 13G4 VL 시퀀스의 부가적인 분석은 도 10B 및 30과 SEQ ID NOs:60, 70 및 80에 각각 나타난 바와 같이 경사슬 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역의 윤곽을 끌어낸다.

[0636] 실시예 3: 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체의 결합 특이성 및 결합 동역학의 특징

[0637] 이 실시예에서는 항-PD-L1 항체의 결합 특이성 및 결합 동역학이 Biacore 아날리시스에 의해 시험되었다. 결합 특이성 및 크로스-경쟁이 유동세포분석법에 의해 시험되었다.

[0638] 결합 친화도 및 동역학

[0639] 항-PD-L1 항체가 Biacore 아날리시스 (Biacore AB, Uppsala, Sweden)에 의해 친화도 및 결합 동역학에 대해 특징지어 졌다. 정제된 제조항 인간 PD-L1 용융 단백질이 Biacore에 의해 제공된 키트 및 표준 아민 커플링 화학을 사용하여 제일급 아민을 통해 CM5 칩 (카르복실 메틸 텍스트란 도포 칩)에 562 RUs의 밀도로 공유결합적으로 연결되어 졌다. 결합은 50 μ l/min의 유동비로 133 nM의 농도에서 HBS EP 완충액(Biacore AB에 의해 제공됨)에서 항체를 유동함에 의해 측정되었다. 항원-항체 연합 동역학이 1분 동안 뒤따르고, 해리 동역학이 1분 동안 이어졌다. 연합 및 해리 곡선은 BIAevaluation 소프트웨어 (Biacore AB)를 사용하여 1 : 1 Langmuir 결합 모델에 맞추어 졌다. 결합 상수의 추정에서 항체항원결합력의 효과를 최소화하기 위해, 연합 및 해리에 상응하는 데이터의 초기 분절 만이 피팅을 위해 사용된다. 측정된 KD, K_{on} 및 K_{off} 값을 표 2에 나타냈다.

표 2

[0640] PD-L1 인간 모노클로날 항체에 대한 Biacore 결합 데이터

샘플 #	샘플 ID	친화도 $K_D \times 10^{-9}$ (M)	온 비율 $K_{on} \times 10^5$ (1/MS)	오프 비율 $K_{off} \times 10^{-4}$ 1/s
1	3G10	3.39	5.25	17.8
3	10A5	1.45	2.58	3.72

[0641] 평형 결합방법에 의해 얻어지고 GraphPad 프리즘 상에서 분석된 부가적인 결합 데이터를 표 3에 나타냈다

표 3

[0642]

PD-L1 인간 모노클로날 항체에 대한 Biacore 평형 결합 데이터 .

클론 ID	K _D (nM)	K _D (nM)
	37C	25C
12A4	1.94	0.76
7H1	2.15	nd
1B12	1.38	0.61
12B7	0.82	0.53
10A5	2.41	0.57
10H10	5.93	5.48
13G4	1.87	3.3
11E6	0.53	2.9
5F8	2.17	0.75

[0643]

유동세포분석법에 의한 결합 특이성

[0644]

세포 표면에 재조합 인간 PD-L1을 발현하는 차이나이즈 햄스터 오버리(CHO) 셀라인이 유동세포분석법에 의해 PD-L1 인간 모노클로날 항체의 특이성을 결정하기 위해 전개되고 사용되었다. CHO 세포는 PD-L1의 트랜스멤브레인 형태를 코딩하는 완전 길이 cDNA를 포함하는 발현 플라스미드로 트랜스펙트된다. 3G10, 10A5, 및 12A4 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체의 결합은 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체를 갖는 트랜스펙트된 세포를 배양함에 의해 평가되었다. 세포는 수세되고 그리고 결합은 FITC-표지 항-인간 IgG Ab로 검출되었다. 유동세포분석 평가는 'FACScan 플로우 사이토메트리 (Becton Dickinson, San Jose, CA)'를 사용하여 수행되었다. 결합은 모체 CHO 셀 라인에 비교되었다. 결과는 도 32 A (HuMAb 3G10), 32B (HuMAb 10A5) 및 32C (HuMAb 12A4)에 나타났다. 결합은 또한 다양한 농도의 항-PD-L1 항체를 사용하여 시험되었다. 그 결과는 도 33에 나타났다. 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체 3G10, 10A5, 및 12A4는 농도의존 방식으로 PD-L1로 트랜스펙트된 CHO 세포에 결합하였다. 이들 데이터는 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체가 세포 표면 PD-L1에 특이적으로 결합하는 것을 입증한다.

[0645]

ELISA에 의한 결합 특이성

[0646]

항-PD-L1 모노클로날 항체의 특이성은 이뮤노글로불린 Fc 영역에 인간 PD-L1 용융의 결합에 대해 표준 ELISA 어레이를 사용하여 결정되었다. 인간 PD-L1의 Fc-용융 단백질은 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체 3G10, 12A4, 및 10A5에 대한 결합에 대해 시험되었다. 표준 ELISA 절차가 수행되었다. 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체는 다른 농도로 부가되었다. 홀스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)와 컨쥬게이트된 고트-항-인간 IgG (카파 사슬-특이적) 폴리클로날 항체가 제 1차 항체로 사용되었다. 결과는 도 34에 나타났다. 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체 3G10, 12A4, 및 10A5의 각각은 PD-L1에 높은 특이성으로 결합했다.

[0647]

실시예 4: 인간 및 원숭이 T 세포의 세포 표면 상에 발현된 PD-L1에 결합하는 항-PD-L1 항체의 특징

[0648]

항-PD-L1 항체는 그 표면 상에 PD-L1을 발현하는 활성화된 인간 또는 시노몰거스 원숭이 T 세포에 대한 결합에 대해 유동세포분석법에 의해 시험되었다.

[0649]

인간 또는 원숭이 T 세포는 인간 항-PD-L1 모노클로날 항체와 결합하기 전에 PD-L1 발현을 유도하기 위해 항-CD3 항체에 의해 활성화되어 졌다. 3G10, 1B12, 13G4, 및 12A4 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체의 결합은 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체의 일련의 희석으로 활성화된 세포를 배양함에 의해 평가되었다. 항원결정인자 조절 항체가 네거티브 대조군으로 사용되었다. 세포는 수세되고 그리고 결합은 FITC-표지 항-인간 Ig-카파 경사슬 Ab로 검출되었다. 유동세포분석 평가는 'FACScalibur 플로우 사이토메트리 (Becton Dickinson, San Jose, CA)'를 사용하여 수행되었다. 결과는 도 35 및 36에 나타났다. 항-PD-L1 모노클로날 항체 3G10, 1B12, 13G4, 및 12A4는 활성화된 인간 및 원숭이 T 세포에 결합했다. 이들 데이터는 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체가 인간 및 시노몰거스 원숭이 세포 표면 PD-L1에 결합하는 것을 입증한다.

[0650]

실시예 5: 인간 T 세포의 세포 표면 상에 발현된 PD-L1에 결합하는 항-PD-L1 항체의 특징

[0651] 항-PD-L1 항체는 그 세포 표면 상에 PD-L1을 발현하는 활성화된 인간 T 세포에 대한 결합에 대해 유동세포분석법에 의해 시험되었다. 인간 T 세포는 인간 항-PD-L1 모노클로날 항체와 결합하기 전에 T 세포 상에 PD-L1 발현을 유도하기 위해 항-CD3 항체에 의해 활성화되어 졌다. 3G10, 10A5 및 12A4 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체의 결합은 20 μ g/ml의 농도에서 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체를 갖는 활성화된 T 세포를 배양함에 의해 평가되었다. 항원결정인자 조절 항체가 네거티브 대조군으로 사용되었다. 세포는 수세되고 그리고 결합은 FITC-표지 항-인간 IgG Ab로 검출되었다. 유동세포분석 평가는 'FACScalibur 플로우 사이토메트리 (Becton Dickinson, San Jose, CA)'를 사용하여 수행되었다. 결과는 도 37A (HuMAb 3G10), 37B (HuMAb 10A5) 및 37C (HuMAb 12A4)에 나타났다. 항-PD-L1 모노클로날 항체 3G10, 10A5, 및 12A4는 히스토그램 그래프로 나타난 바와 같이 대조(가는 선)에 비하여 활성화된 인간 T 세포(굵은 선)에 결합했다. 이들 데이터는 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체가 인간 세포 표면 PD-L1에 결합하는 것을 입증한다.

[0652] **실시예 6: 유동세포분석법에 의한 결합 특이성**

[0653] 세포 표면에 인간 PD-L1을 발현하는 ES-2 인간 난소암 세포 라인이 유동세포분석법에 의해 PD-L1 인간 모노클로날 항체의 특이성을 결정하기 위해 사용되었다. ES-2 세포는 기본적인 수준 이상으로 PD-L1 발현을 증가하기 위해 500 IU/mL의 재조합 hIFN- γ 로 밤새도록 처리되었다. 12A4, 1B12, 3G10, 10A5, 12B7, 13G4, 11E6, 및 5F8 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체의 결합은 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체의 일련의 희석으로 유도된 세포를 배양함에 의해 평가되었다. 세포는 수세되고 그리고 결합은 PE-표지 항-인간 IgG Ab로 검출되었다. 유동세포분석 평가는 'FACScalibur 플로우 사이토메트리 (Becton Dickinson, San Jose, CA)'를 사용하여 수행되었다. 결합은 항원결정인자 조절 항체에 비교되었다. 결과는 도 38에 나타났다. 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체 12A4, 1B12, 3G10, 10A5, 12B7, 13G4, 11E6, 및 5F8는 농도 의존 형식으로 hIFN- γ -유도 ES-2 세포에 결합했다. 이들 데이터는 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체가 세포 표면 PD-L1에 특이적으로 결합하는 것을 입증한다.

[0654] **실시예 7: 혼합된 림프구 반응에 있어서 세포 증식 및 시토킨 생산에 대한 인간 항-PD-L1 항체의 효과**

[0655] 림프구 이펙터 세포에 대한 PD-L1/PD-1 경로를 차단하는 효과를 입증하기 위해 혼합된 림프구 반응이 채용되었다. 이 분석법에서 T 세포는 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체의 존재 또는 부재 하에서 증식, IFN- γ 분비 및 IL-2 분비에 대해 시험되었다.

[0656] 인간 CD4⁺ T-세포가 CD4⁺ 포지티브 셀렉션 키트 (Dynal Biotech)를 사용하여 PBMC로부터 정제되었다. 수지상 세포가 1000 U/ml의 IL-4 및 500 U/ml의 GM-CSF (R&D Biosystems)로 칠일 동안 배양된 정제 모노사이트로부터 유래되었다. 모노사이트는 모노사이트 네거티브 셀렉션 키트(Mitenyi Biotech)를 사용하여 준비되었다. 각 배양은 200 μ l의 전체 부피에 105 정제 T-세포 및 104 동종이계 수지상 세포를 포함했다. 항-PD-L1 모노클로날 항체 10A5, 12A4, 또는 3G10이 각 배양에 다른 항체 농도로 부가되어 졌다. 비 항체 뿐 아니라 항원결정인자 조절 항체가 네거티브 대조군으로 사용되었다. 세포는 5일 동안 37°C에서 배양되었다. 5일 후, 100 μ l의 배지가 각 배양으로부터 시토킨 측정을 위해 취해졌다. IFN- γ 및 IL-2 준위가 OptEIA ELISA 키트 (BD Biosciences)를 사용하여 측정되어 졌다. 세포는 ³H-티미딘으로 표지되고, 18시간 동안 더 배양되고, 그리고 세포 증식이 측정되었다. 결과는 도 39A (T 세포 증식), 39B (HuMAb 10A5를 사용한 IFN- γ 분비), 39C (HuMAb 12A4 또는 3G10을 사용한 IFN- γ 분비) 및 39D (IL-2 분비)에 나타났다. 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체 10A5는 T-세포 증식, IFN- γ 분비 및 IL-2 분비를 농도의존 방식으로 증진한다. 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체 12A4 및 3G10 또한 IFN- γ 분비에서의 증가를 보여주었다. 이에 대비하여, 대조 항체를 포함하는 배지는 T 세포 증식, IFN- γ 분비 또는 IL-2 분비에서 증가를 나타내지 않았다.

[0657] 별도의 실험에서, 동종이계의 혼합된 림프구 반응(MLR)은 림프구 이펙터 세포에 대한 PD-L1/PD-1 경로를 차단하는 효과를 입증하기 위해 채용되었다. 이 분석법에서 T 세포는 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체 또는 항원결정인자 조절 항체의 존재 또는 부재 하에서 증식 및 IFN- γ 분비에 대해 시험되었다.

[0658] 인간 CD4⁺ T-세포가 CD4⁺ 네거티브 셀렉션 키트 (Mitenyi)를 사용하여 PBMC로부터 정제되었다. 모노사이트는 모노사이트 네거티브 셀렉션 키트(Mitenyi Biotech)를 사용하여 준비되었다. 수지상 세포가 1000 U/ml의 IL-4 및 500 U/ml의 GM-CSF (R&D Biosystems)로 칠일 동안 배양된 정제 모노사이트로부터 유래되었다. 각 MLR 배양은 200 μ l의 전체 부피에 10⁵ 정제 T-세포 및 10⁴ 동종이계 수지상 세포를 포함했다. 항-PD-L1 모노클로날 항체

12A4, 11E6, 3G10, 13G4, 1B12, 10A5, 및 12B7이 각 배양에 다른 항체 농도로 부가되어 졌다. 비 항체 뿐 아니라 항원결정인자 조절 항체가 내거티브 대조군으로 사용되었다. 세포는 5일 동안 37℃에서 배양되었다. 5일 후, 50 μ l의 배지가 각 배양으로부터 시토킨 측정을 위해 취해졌고, 1 μ Ci의 3 H-티미딘을 포함하는 동일 부피의 배양 배지로 대체되었다. 세포는 18시간 동안 더 배양되고, 수확되어 세포 증식에 대해 측정되었다. 배양액에서의 IFN- γ 의 준위는 OptEIA hIFN- γ ELISA 키트(BD Biosciences)를 사용하여 측정되었다. 결과는 도 40에 나타났다. 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체는 농도의존 방식으로 T-세포 증식 및 IFN- γ 분비를 증진한다. 이에 대비하여, 대조 항체를 포함하는 배지는 T 세포 증식 또는 IFN- γ 분비에서 증가를 나타내지 않았다.

[0659] **실시예 8; T 조절 세포의 기능에 대한 인간 항-PD-L1 항체의 효과**

[0660] T 조절 세포 (CD4+, CD25+)는 면역 반응을 억제하는 림프구이다. 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체의 존재 또는 부재 하에서 동종이계 수지상 세포와 T 세포 MLR에서 증식 및 IFN- γ 분비에 대해 T 조절 세포의 부가의 효과가 시험되어 졌다.

[0661] T 조절 세포는 CD4+CD25+ 조절 T 세포 분리 키트 (Miltenyi Biotec)를 사용하여 PBMC로부터 정제되었다. T 조절 세포는 T 조절 세포에 대해 CD4+CD25-의 비율을 2:1로, 정제된 CD4+CD25- T 세포 및 동종이계 수지상 세포를 포함하는 혼합된 림프구 반응물(상기 참고)에 부가되어 졌다. 항-PD-L1 1 모노클로날 항체 10A5가 각 배지에 10 μ g/ml의 농도로 부가되었다. 비 항체 뿐 아니라 항원결정인자 조절 항체가 내거티브 대조군으로 사용되었다. 세포는 상등액이 비즈라이트 시토킨 검출 시스템(Upstate)을 사용하여 IFN- γ 분비에 대해 분석되는 시간인 5일 동안 37℃에서 배양되었다. 세포는 3 H-티미딘으로 표지되고, 18시간 동안 더 배양되고, 그리고 세포 증식에 대해 측정되었다. 결과는 도 41A (T 세포 증식) 및 41B (IFN- γ 분비)에 나타났다. 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체 10A5의 부가는 동종이계 수지상 세포, T 세포 및 T 조절 세포의 세포 배양에서 T 세포 증식 및 IFN- γ 분비 양자를 증진하여, 항-PD-L1 항체가 동종이계의 DC-T 세포-MLR에서 T 조절 세포의 효과에 반대될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0662] 별도의 실험에서, 인간 항-PD-L1 항체 12A4 및 13G4와 대조 항체 1D12가 T 조절 세포로 MLR 어세이에서 시험되었다. 결과는 도 42(T 세포 증식) 및 43(IFN- γ 분비)에 나타났다. 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체 12A4 또는 13G4의 부가는 동종이계 수지상 세포 및 T 조절 세포를 포함한 T 세포의 세포 배양에서 T 세포 증식 및 IFN- γ 분비 양자의 억제에 부분적으로 역행하여, 항-PD-L1 항체가 T 조절 세포에 대한 효과를 가질 수 있다는 것을 나타낸다.

[0663] **실시예 9; 포지티브 CMV 반응성 공여자로부터 바이러스 항원-자극 PBMC 세포에 의한 시토킨 분비에 대한 항-PD-L1 항체의 효과**

[0664] CMV 항원-반응성 인간 PBMC (Astarte Biologies, Redmond, WA)가 0.5 ug/ml CMV 용해물 (Astarte Biologies) +/- 적정된 항-PD-L1 항체의 존재하에, 평판 바닥 TC-처리 96 웰 플레이트에서 2e5 세포/웰로 배양되었다. 열로 비활성화된 FBS (10% final)로 보충된 AIM-V 배지 (Invitrogen)가 전체 200 μ l/웰의 부피로 사용되었다. 세포는 4일 동안 37℃, 5% CO₂에서 배양되고 이때 배양 상등액이 ELISA (OptEIA hIFN- γ ELISA kit - BD Biosciences)에 의해 분비된 인터페론- γ 의 측정을 위해 수확되었다. 그 결과는 도 44에 나타났다. 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체는 복용량-의존 방식으로 CMV-특이적 T-세포에 의해 IFN- γ 분비를 증진한다. 가장 강력한 반응은 항원결정인자 대조군에 비해 항체 13G4, 1B12, 및 12A4에 의해 발생되었다. 이들 결과는 항-PD-L1 HuMAbs가 항원에 대해 미리 자극된 PBMC 세포로부터 메모리 T 세포 반응에서 IFN- γ 분비를 자극할 수 있다는 것을 보여준다.

[0665] **실시예 10: 인간 항-PD-L1 항체에 의해 PD-I에 결합하는 PD-L1 리간드의 차단**

[0666] 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체가 트랜스펙트된 CHO 세포 상에 발현된 PD-I에 대한 리간드 PD-L1의 결합을 차단하는 능력에 대해 유동세포분석법을 사용함에 의해 시험되었다.

[0667] PD-I 발현 CHO 세포가 FACS 완충액 (4% 송아지 태반 혈청을 갖는 PBS)에 현탁된다. 항-PD-L1 HuMAbs 3G10, 10A5 또는 12A4의 다양한 농도가 세포 현탁액 튜브에 4℃에서 30분 동안 부가되고, 이뮤노글로불린 Fc-영역에

용용된 FITC-표지 PD-L1이 부가되었다. 유동세포분석 평가는 'FACScalibur 플로우 사이토메트리 (Becton Dickinson, San Jose, CA)'를 사용하여 수행되었다. 결과는 도 45에 나타났다. 항-PD-L1 모노클로날 항체 3G10, 10A5, 및 12A4는 염색의 평균 형광강도(MFI)에 의하여 측정된 것으로, 인간 PD-I로 트랜스펙트된 CHO 세포에 PD-L1의 결합을 차단했다. 이들 데이터는 항-PD-L1 HuMAbs가 세포 표면 PD-L1에 PD-L1 리간드의 결합을 차단한다는 것을 입증한다.

[0668] **실시예 11: 인간 항-PD-L1 항체에 의한 세포-표면 PD-L1에 가용성 PD-I의 결합의 저해.**

[0669] 항-PD-L1 인간 모노클로날 항체가 유동세포분석법을 사용하여 hIFN- γ -유도 ES-2 인간 난소암 세포 상에 발현된 PD-L1에 가용성 이량체 형태의 PD-I 리셉터 (PD-I-hFc)의 결합을 차단하는 능력에 대해 시험되었다. 차단은 항원결정성인자 대조 항체에 비교되었다.

[0670] ES-2 세포는 hPD-L1 세포 표면 발현을 상향조절하기 위해 500 ILV/mL의 hIFN- γ 로 밤새도록 유도되었다. 유도된 세포는 FACS 완충액에 현탁되었다. 항-PD-L1 HuMAbs 12A4, 1B12, 3G10, 10A5, 12B7, 13G4, 11E6, 및 5F8의 일련의 희석액이 세포 현탁액 튜브에 4°C에서 30분 동안 부가되고, 두 번의 수세에 의해 미결합 항체의 제거가 뒤따랐다. 다음으로 PD-I-hFc 단백질이 각 웰에 2 ug/mL로 일정하게 4°C에서 30분 동안 부가되고, 두 번의 수세에 의해 미결합 PD-I-hFc의 제거가 뒤따랐다. 다음 결합 PD-I-hFc는, 4°C에서 30분 동안 PD-L1에 결합할 때 PD-I에 결합하는, 바이오틴화-비-차단 항-PD-L1 HuMab 26D5의 부가에 의해 ES-2 세포 상에서 검출되고, 두 번의 수세에 의해 미결합 항체의 제거가 뒤따랐다. 마지막으로, 결합 26D5 항체는 4°C에서 30분 동안 스트렙타아비딘-PE 컨쥬게이트의 부가에 의해 검출되고, 두 번의 수세에 의해 미결합 컨쥬게이트의 제거가 뒤따랐다. 유동세포 분석 평가는 'FACScalibur 플로우 사이토메트리 (Becton Dickinson, San Jose, CA)'를 사용하여 수행되었다. 결과는 도 46에 나타났다. 항-PD-L1 모노클로날 항체 12A4, 1B12, 3G10, 10A5, 12B7, 13G4, 11E6, 및 5F8은 염색의 기하평균 형광강도(GMFI)에 의하여 측정된 것으로, 인간 PD-I를 발현하는 ES-2 세포에 PD-I의 결합을 차단했다. 이들 데이터는 항-PD-L1 HuMAbs가 세포 표면 PD-L1에 가용성 PD-I 리셉터의 결합을 차단한다는 것을 입증한다.

[0671] **실시예 12: 항-PD-L1 항체를 사용하여 생체 내에서 종양 모델의 처리**

[0672] 종양 성장에 대한 항체의 생체 내 효과를 시험하기 위해 암유발성 종양이 이식된 마우스가 항-PD-L1 항체로 생체 내에서 처리되었다. 종양 연구를 위하여, 6 내지 8주령의 암컷 AJ 마우스(Harlan Laboratories)가 중량에 의해 6개 그룹으로 무작위로 추출되었다. 마우스는 0일에 200 μ l의 DMEM 배지에 용해된 2×10^6 SA1/N 피브로사코마 세포가 우익에 피하로 이식되어 졌다. 마우스는 10 mg/kg으로 PBS 담체 또는 항-PD-L1 항체로 처리되었다. 동물들은 1, 4, 8 및 11일에 항체 또는 담체를 포함하는 대략 200 μ l의 PBS가 복막 내 주사에 의해 복용되어 졌다. 각 군은 10마리를 포함하고 그리고 군은: (i) 담체 군, (ii) 대조군 마우스 IgG, 및 (iii) 항-PD-L1 항체 군으로 구성된다. 마우스는 매주 이회 대략 6주 동안 종양 성장에 대해 모니터링되어 졌다. 일렉트로닉 캘리퍼를 사용하여, 종양이 삼차원적(높이 x 폭 x 길이)으로 측정되고, 종양 부피가 계산되었다. 종양이 종양 말단점 (1500 mm³)에 도달하거나 또는 15% 이상의 체중 감량을 보일 때 마우스는 안락사되었다.

[0673] **실시예 13: 종양 형성 및 성장에 대한 조합 치료법(항-CTLA-4 및 항-PD-L1 항체)의 생체 내 효용성**

[0674] MC38 결장 암 세포 (Dr. N. Restifo, National Cancer Institute, Bethesda, MD; 또는 Jeffrey Schlom, National Institutes of Health, Bethesda, MD로부터 이용할 수 있음)가 C57BL/6 마우스 (2×10^6 세포/마우스)에 이식되고 그리고 종양이 100-200 mm³의 크기에 도달하였을 때 치료를 위해 선택되었다. 0일 (즉, 치료의 첫째 날)에, 각 10마리 마우스의 네 그룹의 각각이 다음의 하나로 복막 내로(IP) 주입되었다: (1) 10 mg/kg 마우스 IgG 및 10 mg/kg의 랫트 IgG (대조), (2) 10 mg/kg 항-CTLA-4 모노클로날 항체 9D9 (마우스 항-마우스 CTLA-4, J. Allison, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY으로부터 입수) 및 10 mg/kg 랫트 IgG, (3) 항-PD-L1 모노클로날 항체 MIH5 (랫트 항-마우스 PD-L1, eBioscience) 및 10 mg/kg 마우스 IgG, 또는 (4) 10 mg/kg 항-CTLA-4 항체 9D9 및 10 mg/kg 항-PD-L1 항체 MIH5. 항체 주입은 그런 다음 3 및 6일에 더 투여되어 졌다. 일렉트로닉 캘리퍼를 사용하여, 종양이 삼차원적(높이 x 폭 x 길이)으로 측정되

고, 종양 부피가 계산되었다. 종양이 디자인된 종양 말단점에 도달하였을 때 마우스는 안락사되었다. 결과는 도 47에 도시되었다.

[0675] 이 연구는, MC38 뮌어라인 종양 모델에서 항-PD-L1 항체 단독 처리가 종양 성장의 지연을 초래하는 종양 성장에 대한 적당한 효과를 가지는 반면 항-CTLA-4는 이 모델에서 효과가 거의 없다는 것을 나타낸다. 그러나, CTLA-4 항체와 PD-L1 항체의 조합은 종양 성장에 대해 유의적으로 큰 효과를 가지고 종영이 없는 마우스를 초래한다.

[0676] 실시예 14: 항-PD-L1 항체를 사용한 면역조직화학

[0677] HuMab 항체-PD-L1의 조직 결합 프로필을 평가하기 위해, 비변이 12A4, 13G4, 3G10 및 12B7이 폐암 조직(1 샘플/각) 뿐 아니라 비장, 편도선, 대뇌, 소뇌, 심장, 간, 폐, 신장, 췌장, 뇌하수체, 피부 및 소장을 포함하는 정상 (비-종양) 인간 조직의 판넬에서 시험되었다. ES-2 세포는 포지티브 대조로 사용되었다. Hu-IgG1 및 Hu-IgG4가 항원결정인자 조절 항체로 사용되었다.

[0678] 순간 동결하고 OCT를 끼워넣은 정상 및 종양 조직을 Cooperative Human Tissue Network (Philadelphia, PA) 또는 National Disease Research Institute (Philadelphia, PA)로부터 입수하였다. 5 μ m 크리오스택트 분절이 실온에서 10분 동안 아세톤으로 고정되었고 사용시까지 -80°C 에서 저장되었다. Medarex 전개 면역조직화학 프로토콜이 비변이된 HuMab 항-PD-L1을 사용하여 분절 상에 적용되기 전에 일차적인 항체(12A4, 13G4, 3G10 및 12B7)와 이차적인 항체 (고트 항-Hu-IgG의 Fab 분획에 컨쥬게이트된 FITC, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)의 예비-복합체에 의해 수행되었다. 간략하게는, 1 $\mu\text{g/ml}$ 또는 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 비-컨쥬게이트된 일차적인 항체가 3배 과잉의 이차적인 항체와 각각 혼합되고 그리고 실온에서 30분 동안 배양되고 그런 다음 여분의 인간 감마 글로불린이 비결합 이차적인 항체를 차단하기 위해 추가적인 30분 동안 부가되었다. 나란하게, 항원결정인자 조절 항체 Hu-IgG1 또는 Hu-IgG4가 동일한 방식으로 예비-복합체가 된다. 슬라이드는 PBS (Sigma, St. Louis, MO)로 이회 수세되고, 그런 다음 10분 동안 Dako EnVision+System (Dako, Carpinteria, CA)으로부터 입수한 퍼옥시다제 블럭으로 배양되었다. PBS로 두 번 수세한 후, 슬라이드는 비-특이적 결합 사이트를 차단하기 위해 Dako 프로테인 블럭으로 배양되었다. 이어서, 일차적인 항체 또는 항원결정인자 대조의 예비-복합체가 분절 상에 적용되고 그리고 1시간 동안 배양되었다. PBS로 삼 회 수세하고 나서, 슬라이드는 마우스 항-FITC 항체 (20 $\mu\text{g/ml}$, Sigma)로 30분 동안 배양되었다. 다시 PBS로 삼 회 수세하고 나서, 슬라이드는 Dako EnVision+System으로부터 입수한 퍼옥시다제-컨쥬게이트 항-마우스 IgG 폴리머로 30분 동안 배양되었다. 마지막으로 슬라이드는 상기와 같이 수세되고 그리고 Dako EnVision+System으로부터 입수한 DAB 기질-크로모젠 용액과 6분 동안 반응되었다. 슬라이드는 그런 다음 탈이온수로 수세되고, 메이어 해마톡실린(Dako)으로 대비염색되고, 탈수되고, 청소되고 그리고 Permount (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ)로 슬립이 벗겨지고 통상적인 조직학적 절차가 따랐다.

[0679] 폐암 조직의 종양 세포에서 뿐 아니라 ES-2 세포에서 적당한 염색에 약한 것이 관찰되었다. 편도선 분절에서는, 강력한 염색이 임파 세포에 의해 주로 유입되어 지지만, 점액 층상 비닐모양의 상피조직으로는 유입되지 않는 상피 깊숙한 곳에서 관찰되었다. 적당한 염색은 소뇌 영역 간의 몇몇 세포에서 관찰되었고, 그리고 매우 약한 염색은 생식계의 중심에 흩어진 대세포 (수지상 세포-형 세포)에서 관찰되었다. 폐에서, 약한 염색이 폐포 매크로파이지에서 관찰되었다. 편도선 및 폐 조직에서 염색 패턴은 상업적 항-PD-L1 mAb (eBiosciences, San Diego, CA)를 사용한 면역조직화학 분절에서 유사하게 관찰되었다. 특히, 생식계 중심에서 염색에 대해, HuMabs에 의한 전반적으로 약한 강도 염색이 있었다. 비장에서는, 레드 펄프에서 확산 약한 면역반응성이 어느 정도 배경 염색 위로 있었다. 부가하여, 적당한 염색에 약한 것이 간의 쿠퍼-형 세포에서 나타났고, 세포는 페이어의 패치에 분산될 뿐 아니라, 매크로파이지-형 세포 및 소장근육층의 병소 영역에서 주로 섬유모세포에 분산되었다.

[0680] 소뇌, 대뇌, 심장, 신장, 췌장, 뇌하수체 및 피부 조직에서, 모두 네 개의 항-PD-L1 HuMabs로 염색될 때 의미있는 염색이 관찰되지 않았다. 염색에서 명백한 차이가 이들 네 항체 중에서 간과 ES-2 세포에서 어느 정도 강력한 염색을 나타낸 12B7 및/또는 3G10을 제외하고는 나타나지 않았다.

[0681]

PD-L1 항체 요약

SEQ ID NO:	SEQUENCE	SEQ ID NO:	SEQUENCE
1	VH a.a. 3G10	26	VH CDR1 a.a. 1B12
2	VH a.a. 12A4	27	VH CDR1 a.a. 7H1
3	VH a.a. 10A5	28	VH CDR1 a.a. 11E6
4	VH a.a. 5F8	29	VH CDR1 a.a. 12B7
5	VH a.a. 10H10	30	VH CDR1 a.a. 13G4
6	VH a.a. 1B12		
7	VH a.a. 7H1	31	VH CDR2 a.a. 3G10
8	VH a.a. 11E6	32	VH CDR2 a.a. 12A4
9	VH a.a. 12B7	33	VH CDR2 a.a. 10A5
10	VH a.a. 13G4	34	VH CDR2 a.a. 5F8
		35	VH CDR2 a.a. 10H10
11	VK a.a. 3G10	36	VH CDR2 a.a. 1B12
12	VK a.a. 12A4	37	VH CDR2 a.a. 7H1
13	VK a.a. 10A5	38	VH CDR2 a.a. 11E6
14	VK a.a. 5F8	39	VH CDR2 a.a. 12B7
15	VK a.a. 10H10	40	VH CDR2 a.a. 13G4
16	VK a.a. 1B12		
17	VK a.a. 7H1	41	VH CDR3 a.a. 3G10
18	VK a.a. 11E6	42	VH CDR3 a.a. 12A4
19	VK a.a. 12B7	43	VH CDR3 a.a. 10A5
20	VK a.a. 13G4	44	VH CDR3 a.a. 5F8
		45	VH CDR3 a.a. 10H10
21	VH CDR1 a.a. 3G10	46	VH CDR3 a.a. 1B12
22	VH CDR1 a.a. 12A4	47	VH CDR3 a.a. 7H1
23	VH CDR1 a.a. 10A5	48	VH CDR3 a.a. 11E6
24	VH CDR1 a.a. 5F8	49	VH CDR3 a.a. 12B7
25	VH CDR1 a.a. 10H10	50	VH CDR3 a.a. 13G4

[0682]

51	VK CDR1 a.a. 3G10	79	VK CDR3 a.a. 12B7
52	VK CDR1 a.a. 12A4	80	VK CDR3 a.a. 13G4
53	VK CDR1 a.a. 10A5		
54	VK CDR1 a.a. 5F8	81	VH n.t. 3G10
55	VK CDR1 a.a. 10H10	82	VH n.t. 12A4
56	VK CDR1 a.a. 1B12	83	VH n.t. 10A5
57	VK CDR1 a.a. 7H1	84	VH n.t. 5F8
58	VK CDR1 a.a. 11E6	85	VH n.t. 10H10
59	VK CDR1 a.a. 12B7	86	VH n.t. 1B12
60	VK CDR1 a.a. 13G4	87	VH n.t. 7H1
		88	VH n.t. 11E6
61	VK CDR2 a.a. 3G10	89	VH n.t. 12B7
62	VK CDR2 a.a. 12A4	90	VH n.t. 13G4
63	VK CDR2 a.a. 10A5		
64	VK CDR2 a.a. 5F8	91	VK n.t. 3G10
65	VK CDR2 a.a. 10H10	92	VK n.t. 12A4
66	VK CDR2 a.a. 1B12	93	VK n.t. 10A5
67	VK CDR2 a.a. 7H1	94	VK n.t. 5F8
68	VK CDR2 a.a. 11E6	95	VK n.t. 10H10
69	VK CDR2 a.a. 12B7	96	VK n.t. 1B12
70	VK CDR2 a.a. 13G4	97	VK n.t. 7H1
		98	VK n.t. 11E6
71	VK CDR3 a.a. 3G10	99	VK n.t. 12B7
72	VK CDR3 a.a. 12A4	100	VK n.t. 13G4
73	VK CDR3 a.a. 10A5		
74	VK CDR3 a.a. 5F8	101	VH 1-18 germline a.a.
75	VK CDR3 a.a. 10H10	102	VH 1-69 germline a.a.
76	VK CDR3 a.a. 1B12	103	VH 1-3 germline a.a.
77	VK CDR3 a.a. 7H1	104	VH 3-9 germline a.a.
78	VK CDR3 a.a. 11E6		

[0683]

105	VK L6 germline a.a.		
106	VK L15 germline a.a.		
107	VK A27 germline a.a.		
108	VK L18 germline a.a.		
109	VK a.a. 11E6a		

[0684]

도면

도면1a

항-PD-L1 3G10 VH

V 분절 : 1-19
D 분절 : 미정
J 분절 : JH6b

```

1   Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V
   CAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG

                                   CDR1
55  K V S C K A S G Y T F T D Y G F S W
   AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC ACC TTT ACC GAG TAT GGT TTC AGC TGG

                                   CDR2
109 V R Q A P G Q G L E W M G W I T A Y
   GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG ATC ACC GCT TAC

                                   CDR2
163 N G N T N Y A Q K L Q G R V T M T T
   AAT GGT AAC ACA AAC TAT GCA CAG AAG CTC CAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC ACA

217 D T S T S T V Y M E L R S L R S D D
   GAC ACA TCC ACG AGC ACA GTC TAC ATG GAG CTG AGG AGC CTG AGA TCT GAC GAC

                                   CDR3
271 T A V Y Y C A R D Y F Y G M D V W G
   ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAC TAC TTC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC

325 Q G T T V T V S S
   CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

도면1b

항 -PD-L1 3G10 VK

V 분절 : L6
J 분절 : JK1

```

1   E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
   GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
55  A T L S C R A S Q S V S S Y L V W Y
   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GTC TGG TAC

                                CDR2
109 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
   CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

                                CDR2
163 A T G I P A R F S G S G S G T D F T
   GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
217 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
   CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

                                CDR3
271 R S N W P R T F G Q G T K V E I K
   CGT AGC AAC TGG CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

도면2a

항 -PD-L1 12A4 VH

V 분절 : 1-69
D 분절 : 3-10
J 분절 : JH6b

```

1   Q   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   P   G   S   S   V
   CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                   CDR1
55  K   V   S   C   K   T   S   G   D   T   F   S   T   Y   A   I   S   W
   AAG GTC TCC TGC AAG ACT TCT GGA GAC ACC TTC AGC ACC TAT GCT ATC AGC TGG

                                   CDR2
109 V   R   Q   A   P   G   Q   G   L   E   W   M   G   G   I   I   P   I
   GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC OCT ATA

                                   CDR2
163 F   G   K   A   H   Y   A   Q   K   F   Q   G   R   V   T   I   T   A
   TTT GGT AAA GCA CAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

217 D   E   S   T   S   T   A   Y   M   E   L   S   S   L   R   S   E   D
   GAC GAA TCC ACG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

                                   CDR3
271 T   A   V   Y   F   C   A   R   K   F   H   F   V   S   G   S   P   F
   ACG GCC GTG TAT TTT TGT GCG AGA AAG TTT CAC TTT GTT TCG GGG AGC CCC TTC

                                   CDR3
325 G   M   D   V   W   G   Q   G   T   T   V   T   V   S   S
   GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

도면2b

항 -PD-L1 12A4 VK

V 분절 : L6
J 분절 : JK1

```

1   E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
   GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
55  A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                ~~~~~
109 Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
   CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

                                CDR2
                                ~~~~~
163 A T G I P A R F S G S G S G T D F T
   GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
217 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
   CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

                                CDR3
                                ~~~~~
271 R S N W P T F G Q G T K V E I K
   CGT AGC AAC TGG CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

도면3a

항 -PD-L1 10A5 VH

V 분절 : 1-3
D 분절 : 5-5
J 분절 : JH4b

```

      Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V
1 CAG GTC CAA CTT GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG

                                CDR1
      K V S C K A S G Y T F T S Y D V H W
55 AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC ACT AGC TAT GAT GTA CAT TGG

                                CDR2
      V R Q A P G Q R L E W M G W L H A D
109 GTG CGC CAG GCC CCC GGA CAA AGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG CTC CAC GCT GAC

                                CDR2
      T G I T K F S Q K F Q G R V T I T R
163 ACT GGT ATC ACA AAA TTT TCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACC ATT ACC AGG

      D T S A S T A Y M E L S S L R S E D
217 GAC ACA TCC GCG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAA GAC

                                CDR3
      T A V Y Y C A R E R I Q L W F D Y W
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GAG AGG ATA CAG CTA TGG TTT GAC TAC TGG

      G Q G T L V T V S S
325 GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

도면3b

항 -PD-L1 10A5 VK

V 분절 : L15

J 분절 : JK2

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
1 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

CDR1

V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

CDR2

Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

CDR2

Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

CDR3

L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

CDR3

Y N S Y P Y T F G Q G T K L E I K
271 TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

도면4a

항-PD-L1 5F8 VH

V 분절 : 1-69
D 분절 : 6-13
J 분절 : JH4b

```

1   Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
   CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                   CDR1
55  K V S C K V S G G I F S T Y A I N W
   AAG GTC TCC TGC AAG GTT TCT GGA GGC ATC TTC AGC ACC TAT GCT ATC AAC TGG

                                   CDR2
109 V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
   GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC

                                   CDR2
163 F G T A N H A Q K F Q G R V T I T A
   TTT GGT ACA GCA AAC CAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

217 D E S T S T A Y M E L S S L R S E D
   GAC GAA TCC ACG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

                                   CDR3
271 T A V Y Y C A R D Q G I A A A L F D
   ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CAG GGT ATA GCA GCA GCC CTT TTT GAC

CDR3
~~~
325 Y W G Q G T L V T V S S
   TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

도면4b

항 -PD-L1 5F8 VK1

V 분절 : A27

J 분절 : JK1

```

1      E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
      GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
55      A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
109     Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
      TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR2
      ~~~~~
163     R A T G I P D R F S G S G S G T D F
      AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR3
217     T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
      ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
      ~~~~~
271     Q Y G S S P W T F G Q G T K V E I K
      CAG TAT GGT AGC TCA CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
  
```

도면5a

항-PD-L1 10H10 VH

V 분절 : 3-9
D 분절 : 4-17
J 분절 : JH4b

```

1      E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L
      GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC CTG

                                         CDR1
55     R L S C A V S G F T F D D Y V V H W
      AGA CTC TCC TGT GCA GTC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GTC GTG CAC TGG

                                         CDR2
109    V R Q A P G K G L E W V S G I S G N
      GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT AGT GGG AAT

                                         CDR2
163    S G N I G Y A D S V K G R F T I S R
      AGT GGT AAC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

                                         CDR3
217    D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D
      GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCT GAG GAC

                                         CDR3
271    T A L Y Y C A V P F D Y W G Q G T L
      ACG GCC TTG TAT TAC TGT GCG GTC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG

325    V T V S S
      GTC ACC GTC TCC TCA

```

도면5b

항 -PD-L1 10H10 VK

V 분절 : L15
J 분절 : JK2

```

1      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
      GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

      CDR1
      ~~~~~
55     V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
      GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

      CDR2
      ~~~~~
109    Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
      CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      ~~~~~
163    Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
      CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

      CDR3
      ~~~~~
217    L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      ~~~~~
271    Y N S Y P Y T F G Q G T K L E I K
      TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
  
```

도면6a

항 -PD-L1 1B12 VH

V 분절 : 1-69
D 분절 : 3-10
J 분절 : JH6b

```

1   Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
   CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                CDR1
55  K V S C K T S G D T F S S Y A I S W
   AAG GTC TCC TGC AAG ACT TCT GGA GAC ACC TTC AGC AGC TAT GCT ATC AGC TGG

                                CDR2
109 V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
   GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC

                                CDR2
163 F G R A H Y A Q K F Q G R V T I T A
   TTT GGT AGA GCA CAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

217 D E S T S T A Y M E L S S L R S E D
   GAC GAA TCC ACG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

                                CDR3
271 T A V Y F C A R K F H F V S G S P F
   ACG GCC GTG TAT TTT TGT GCG AGA AAG TTT CAC TTT GTT TCG GGG AGC CCC TTC

                                CDR3
325 G M D V W G Q G T T V T V S S
   GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

도면6b

항 -PD-L1 1B12 VK

V 분절: L6
J 분절: JK1

```

1      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
      GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
55      A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
109     Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
      CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

                                CDR2
163     A T G I P A R F S G S G S G T D F T
      GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
217     L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

                                CDR3
271     R S N W P T F G Q G T K V E I K
      CGT AGC AAC TGG CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
  
```

도면7a

항 -PD-L1 7H1 VH

V 분절 : 1-69
D 분절 : 3-10
J 분절 : JH6b

```

1      Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
      CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                CDR1
                                이러한 서열은 본 발명의 항을 형성하는 데 필요한 서열이다.
55     K V S C K T S G G T F S S Y A I S W
      AAG GTC TCC TGC AAG ACT TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TAT GCT ATC AGC TGG

                                CDR2
                                이러한 서열은 본 발명의 항을 형성하는 데 필요한 서열이다.
109    V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
      GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC

                                CDR2
                                이러한 서열은 본 발명의 항을 형성하는 데 필요한 서열이다.
163    F G K A H Y A Q K F Q G R V T I T A
      TTT GGT AAA GCA CAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

217    D E S T T T A Y M E L S S L R S E D
      GAC GAA TCC ACG ACC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

                                CDR3
                                이러한 서열은 본 발명의 항을 형성하는 데 필요한 서열이다.
271    T A V Y Y C A R K Y D Y V S G S P F
      ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA AAG TAT GAC TAT GTT TCG GGG AGC CCC TTC

                                CDR3
                                이러한 서열은 본 발명의 항을 형성하는 데 필요한 서열이다.
325    G M D V W G Q G T T V T V S S
      GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

도면7b

항-PD-L1 7H1 VK

V 분절 : L6
J 분절 : JK1

```

1      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
      GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

      CDR1
      ~~~~~
55     A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

      CDR2
      ~~~~~
109    Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
      CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      ~~~~~
163    A T G I P A R F S G S G S G T D F T
      GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

      CDR3
      ~~~~~
217    L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      ~~~~~
271    R S N W P T F G Q G T K V E I K
      CGT AGC AAC TGG CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
  
```

도면8a

항-PD-L1 11E6 VH

V 분절 : 1-69
D 분절 : 6-19
J 분절 : JH6c

```

1      Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
      CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                         CDR1
                                         ~~~~~~
55     K V S C K A S G G T F S S Y A I N W
      AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TAT GCT ATC AAC TGG

                                         CDR2
                                         ~~~~~~
109    V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
      GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GCA GGG ATC ATC CCT ATC

                                         CDR2
                                         ~~~~~~
163    F G S A N Y A Q K F Q D R V T I T A
      TTT GGT TCA GCA AAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GAC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

                                         CDR3
                                         ~~~~~~
217    D E S T S A A Y M E L S S L R S E D
      GAC GAA TCC ACG AGC GCA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

                                         CDR3
                                         ~~~~~~
271    T A V Y Y C A R D S S G W S R Y Y M
      ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG AGA GAC AGC AGT GGC TGG TCT CGG TAC TAT ATG

                                         CDR3
                                         ~~~~~~
325    D V W G Q G T T V T V S S
      GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

도면8b

항 -PD-L1 11E6 VK1

V 분절: A27
J 분절: JK4

```

1      E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
      GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
55      A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
109     Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
      TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

                                CDR2
163     R A T G I P D R F S G S G S G T D F
      AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR3
217     T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
      ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

                                CDR3
271     Q Y G S S P F G G G T K V E I K
      CAG TAT GGT AGC TCA CCT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
  
```

도면9a

항 -PD-L1 12B7 VH

V 분절 : 1-69
D 분절 : 3-10
J 분절 : JH6b

```

1      Q V Q L V Q S G A E V K E P G S S V
    CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG GAG CCT GGG TCC TCG GTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55     K V S C K A S G G T F N S Y A I S W
    AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGA GGC ACC TTC AAC AGC TAT GCT ATC AGC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109    V R Q A P G Q G L E W M G G I I P L
    GTG CGA CAG GCG CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT CTT

                                CDR2
                                ~~~~~
163    F G I A H Y A Q K F Q G R V T I T A
    TTC GGT ATA GCA CAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACG ATT ACC GCG

217    D E S T N T A Y M D L S S L R S E D
    GAC GAA TCC ACG AAC ACA GCC TAT ATG GAC CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
271    T A V Y Y C A R K Y S Y V S G S P F
    ACG GCC GTA TAT TAT TGT GCG AGA AAG TAT TCC TAT GTT TCG GGG AGC CCC TTC

                                CDR3
                                ~~~~~
325    G M D V W G Q G T T V T V S S
    GGT ATG GAC CTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

도면9b

항.-PD-L1 12B7 VK

V 분절 : L6
J 분절 : JK5

```

1      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
      GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

      CDR1
      ~~~~~
55     A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

      CDR2
      ~~~~~
109    Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
      CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      ~~~~~
163    A T G I P A R F S G S G S G T D F T
      GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

      CDR3
      ~~~~~
217    L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      ~~~~~
271    R S N W P T F G Q G T R L E I K
      CGT AGC AAC TGG CCC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA
  
```

도면10a

항-PD-L1 13G4 VH

V 분절 : 3-9
D 분절 : 3-9
J 분절 : JH4b

```

1      E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L
    GAA GTG CAG TTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55     R L S C A A S G I T F D D Y G M H W
    AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA ATC ACC TTT GAT GAT TAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109    V R Q A P G K G L E W V S G I S W N
    GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT AGC TGG AAT

                                CDR2
                                ~~~~~
163    R G R I E Y A D S V K G R F T I S R
    AGA GGT AGA ATA GAG TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217    D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D
    GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCT GAG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
271    T A L Y Y C A K G R F R Y F D W F L
    ACG GCC TTG TAT TAC TGT GCA AAA GGG CGG TTC CGA TAT TTT GAC TGG TTT CTT

                                CDR3
                                ~~~~~
325    D Y W G Q G T L V T V S S
    GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

도면10b

항-PD-L1 13G4 VK

V 분절 : L18
J 분절 : JK3

```

1      A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
      GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
55      V T I T C R A S Q G I S S A L A W Y
      GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                ~~~~~
109     Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
      CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

      CDR2
      ~~~~~
163     E S G V P S R F S G S G S G T D F T
      GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
217     L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

      CDR3
      ~~~~~
271     F N S Y P F T F G P G T K V D I K
      TTT AAT AGT TAC CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA
  
```

도면11

Anti-CD-11a 3g10 VH 영역

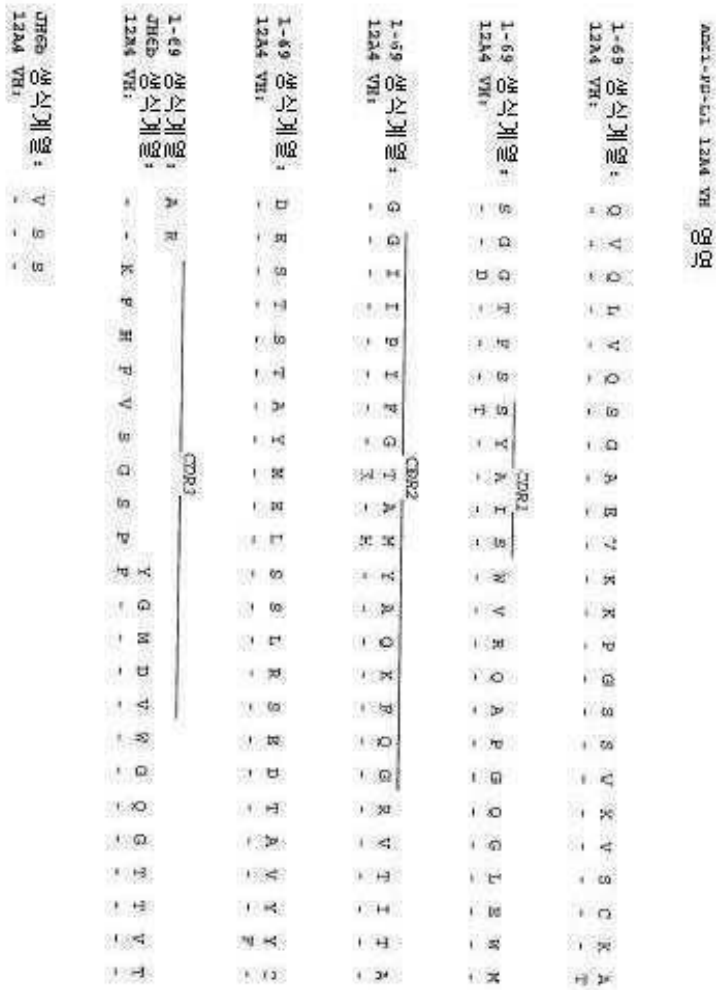
1-18 서식계열: QVQLVQSGAEVKKEPGASVKVSGHESGPTFQSYGTSWVRQ
3g10 VH: DPF

1-18 서식계열: AFGQLRWGITSAVNGNTNYAQRLTGSVTMTDTSTST
3g10 VH: T

1-18 서식계열: AYNELRSLRSDPTAVVYCAR
3g10 VH: DYFYGRDYWGQSTVTVSS
(JF6b)

CDR1
CDR2
CDR3

도면12



도면13

1-3 생식계영
10A5 VH Q V Q L V Q S G A E V R N P G A S V K V S C R A S G Y T F T S Y A N H W
COR1

1-3 생식계영
10A5 VH V R Q A P G Q R L R W N C W I N A G N G N T K Y S Q R F Q G R V T I T R
COR2

1-3 생식계영
10A5 VH D T S A S T A Y M E L S S I R S E D T A V Y I C A E COR3
E D Y W
E R I Q L W

10A5 VH G Q C T L V T V S S (JH4b)

Anti-PD-L1 10A5 VH 영영

도면14

51-PD-1.1 578 VH 0909

1-69 583 VH

O V O L Y Q S G A E V E R F G S S W K V S C X A S G G T F S S Y A I S M
- - - - -
CGR
- - - - - N -

1-69 생식계열
5FE VH

V R Q A P P G G G L E W M G C T I P I E C T A N Y A Q K P Q G R V T I T A
 - - - - -
 CDR2
 - - - - - H - - - - -

1-69 0502
JH4b JZ
SEE VN 9
0808

DBSTAYMELOSLAEBDTAVICYCAE CDK3
----- QGTAAL ----- FD

신원출
출발 5월 5일

U N C O G E L V T V S S
(JH4b)

도면15

201-PD-L1 10H10 VH 0904

SECRET
NOFORN
EX-107

E T V Q L Y E S G C I V O P R F R S T R E S C A V A S G F T E D O Z A M N H V R

V - - - - -

EX-107
SECRET
NOFORN

3.5 2011년 10월 10일 10:10 AM

Q A E G K G T E M V S G I S H M S G S T G Y A D S V K G R F T I S R D N A K

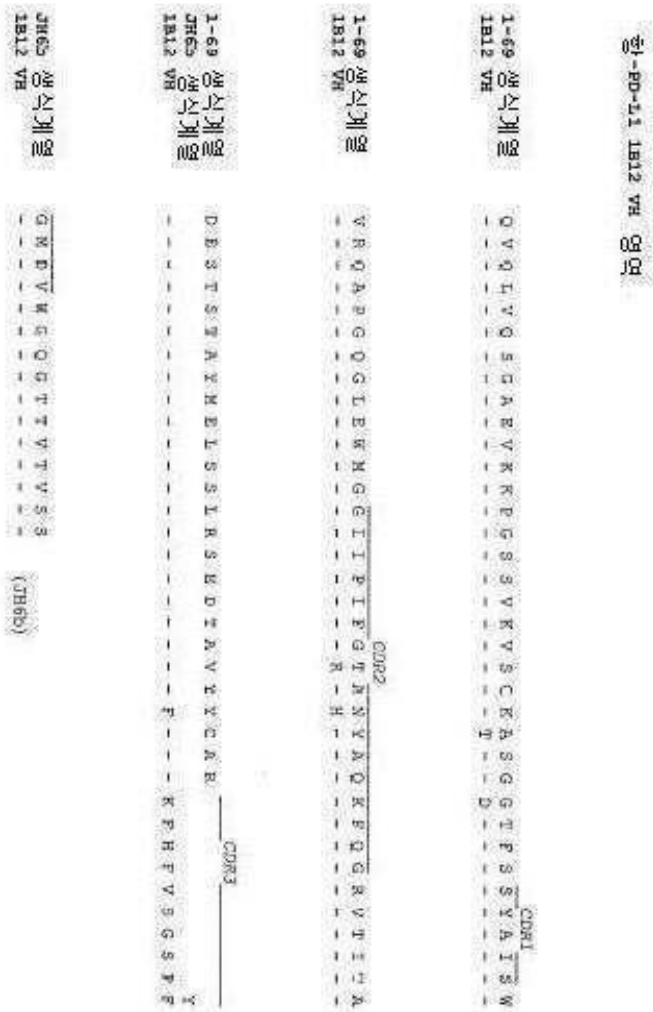
-----G-----M-----

CTP2

3-8 생식계열
3-9 생식계열
10810 Wm
(J134b)

MSLYLQXNHSTRAIDTALVYCA
-----V P
CDR5
FDXWQGQTLEVTVSS

도면16



환-PD-L1 7H1 VH 영역

1-69 생식계영
7H1 VH
Q V Q L V Q S G A R V K R P G S S V K V S C X A S G G W F S S Y A I S W
CDR1

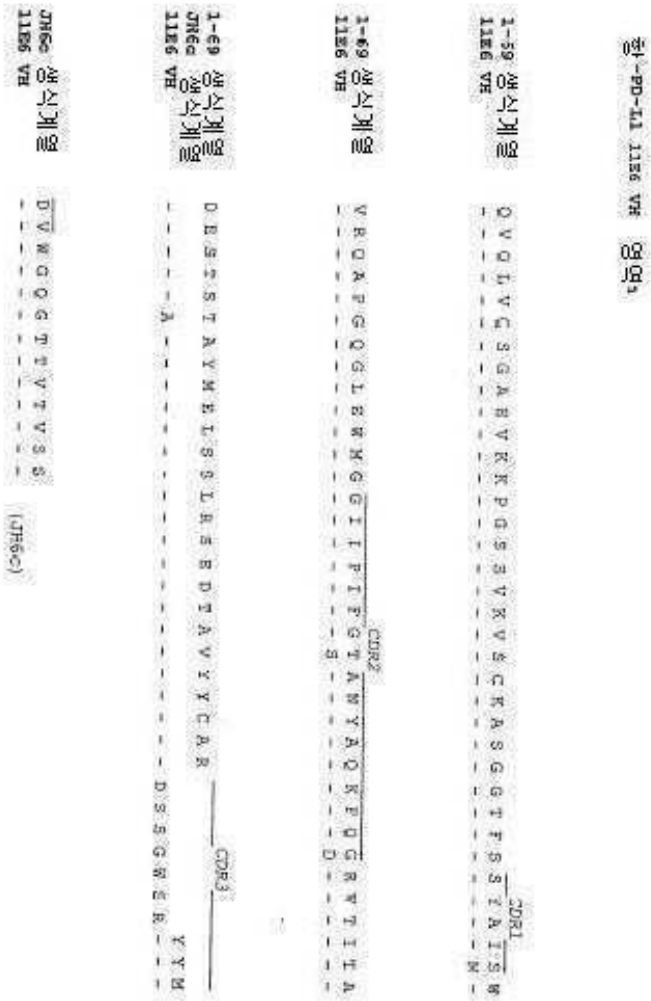
1-69 생식계영
7H1 VH
V R Q A F G Q G L E W N G G I I E I F G T A N Y A Q K F Q G R V I T A
CDR2 K H

1-69 생식계영
JH6b 생식계영
7H1 VH
D E S T S T A Y K E B L S S L R S E D T A V Y R C A E
CDR3
T K Y D Y V S G S E F

HA TRL C3HC 생식계영
G M D V N G G G T T V T V S S
{JH6b}

도면17

도면18



도면19

중1-FO-L1 1287 VH 영역

1-69 생식계열
1287 VH
Q V Q L V Q S G A F V K K F G S S V K V S C K A E G G T F S S Y A I S N CDR1
- - - - - L - - - - - N - - - - -

1-69 생식계열
1287 VH
V R Q R P G Q G L R W N G G I F I F G T A N Y A Q R F Q G R V T I T A CDR2
- - - - - L - - - - - I - - - - - H - - - - -

1-69 생식계열
CH6b 생식계열
1287 VH
D E S T S T A Y M E L S S I R S E D T A V Y Y C A R CDR3
- - - - - N - - - - - D - - - - - - - - - - - K Y S Y V S G S E F Y

CH6a 생식계열
1287 VH
G M D V W G Q G T T V T V S S {JH6b}

도면20

중-10-11 1304 VH 영역

3-9 생식계열
1304 VH
E V Q L V E S G G G L V Q P G R S I R L S C A A S G F T F D D Y A N N W
COR1

3-9 생식계열
1304 VH
V R Q A F G K G L E W V S G I S W N S G S I G Y A D S V K G R F T I S R
COR2

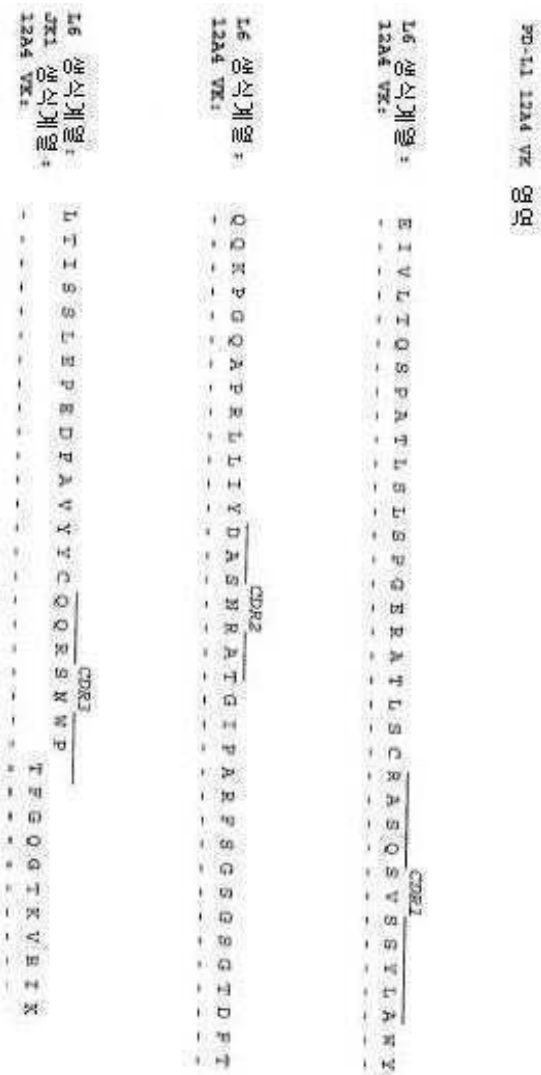
3-9 생식계열
1304 VH
D N A K N S L Y L Q M N S I R A S D T A L Y Y C A R
COR3
G R F R Y F D W F L

JH4b 생식계열
1304 VH
D Y W G Q G T L V T V S S
(JH4b)

도면21

항-PD-L1 3G10 VK 영역	
L6 생식계열 3G10 VK#1:	E I V L T Q S P A T L S L S P G R R A T L S C R A S Q S V S S Y L A - - - - - CDR1 - - - - - V
L6 생식계열 3G10 VK#1:	N Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G - - - - - CDR2 - - - - -
L6 생식계열 JTK1 생식계열 3G10 VK#1:	T D F T L T I S S L E P S D F A V Y C Q Q R S N W P - - - - - CDR3 - - - - - W T F G Q G T - - - - - R
JTK1 생식계열 3G10 VK#1:	K V E I K - - - - - (JTK1)

도면22



항-FD-L1 10A5 VR 영역

115 생식계영
10A5 VR
D I Q N T Q S P S S I S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S

115 생식계영
10A5 VR
M L A W Y Q Q R P E R A P R S I I Y A A S S L Q S G V P S R F

115 생식계영
10A5 VR
S G S G S G T D T T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S

115 생식계영
JK2 생식계영
10A5 VR
Y F
Y T F G Q G T K L E I K
{JK2}

도면23

도면24

51-PD-L1 578 VM1 0909

제출처 : 서울대학교
제출일자 : 8월 17일

N I V L T Q S P C T L S L S P C H R A T L S C R A S Q S V S S S V L A W
 (CNR)

227 2000년 5월 10일
578 1991년 5월 10일

Y Q Q K P G A e e l t i y g s c r a t g i r d a s g s g s o t r

COPY

227	20	20
221	20	20
228	20	20
(221)		

E L T I S R L E S E D E A V I N C C O V G S S F CDR3
 N T P S G Q G T K V E I K

한-PD-L1 10H10 VR 영역

L15 생식계영
JK2 생식계영
10H10 VR
D I Q M T O S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S
CDH1

L15 생식계영
10H10 VR
W L A W T Q Q K P B R A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R P
CDH2

L15 생식계영
10H10 VR
S G S G S G T D F T I T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S
CDH3

L15 생식계영
JK2 생식계영
10H10 VR
Y P
Y T F G Q G T R L E I R
(JK2)

도면25

도면26

한-PD-11 1B12 VR 영역

16 생식계영
1B12 VR
E I V L T Q S P A T L S L S E G E R A T L S C R A S Q S V S S

16 생식계영
1B12 VR
Y L A W Y Q Q K P G Q A E R L L I Y D A S N R A T G I F A R F

16 생식계영
1B12 VR
S G S G S G T D F T L T I S S L H F E D F A V Y C Q Q H S N

16 생식계영
1B12 VR
T E G Q G T K V E I R
(3K1)

항1-FC-L1 7H1 VR 영역

L6 생식계영
7H1 VR
E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S CDR1

L6 생식계영
7H1 VR
V I A N Y Q Q K F G Q A F R L L I Y D A S N R A T G I F A R F CDR2

L6 생식계영
7H1 VR
S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N CDR3

L6 생식계영
JTK1 생식계영
7H1 VR
W F
T F G Q G T N V E I K
{JTK1}

도면27

도면28

201-PD-L1 11E6 VK1 999

227 5551 000
1186 VR1

CDRI
R I V I T Q S P C T L S I S E G E R A T L S C R A S Q S V S S S Z L A M

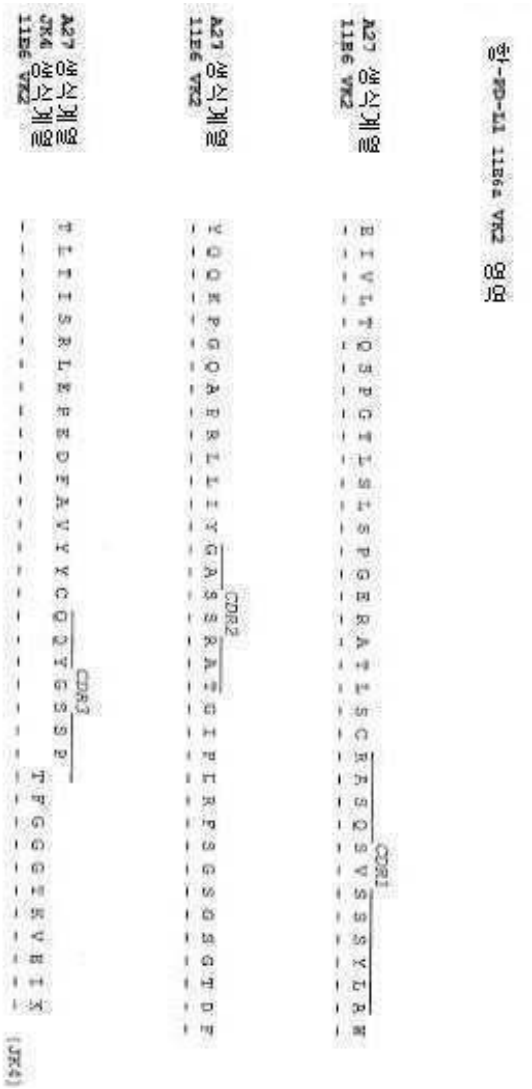
227 2000년
1186 원

Y Q Q K P G Q A P P A L I I Y G A S S R A I G I E D R F S G S G S G T D F

A27 30313
 JK4 30313
 1156 VK1

T L T I S R L E F E D E A V Y Y C Q Q Y G S S P
 ----- CDR3 -----
 F G G G T K V E I R
 J K 4

도면29



중-ED-L1 1287 VR 영역

L6 생식계영
1287 VR
E I V L I T Q S P A T L S L S P G R A T L S C R A S Q S V S S

L6 생식계영
1287 VR
Y L A W Y Q Q K E G Q A P R L I Y D A S N R A T G I P A R F

L6 생식계영
1287 VR
S G S G S G T D E T L T I S S L B F E D F A V Y C Q Q R S N

L6 생식계영
JRS 생식계영
1287 VR
W P
Y F G Q G E R L E I R
(JRS)

도면30

항-PD-L1 1364 VR 영역

L18 생식계영
1364 VR

A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T T T C R A S Q G I S S
CDR1

L18 생식계영
1364 VR

A I A W Y Q Q E P G R A P K L L I Y D A S S I E S G V P S R E
CDR2

L18 생식계영
1364 VR

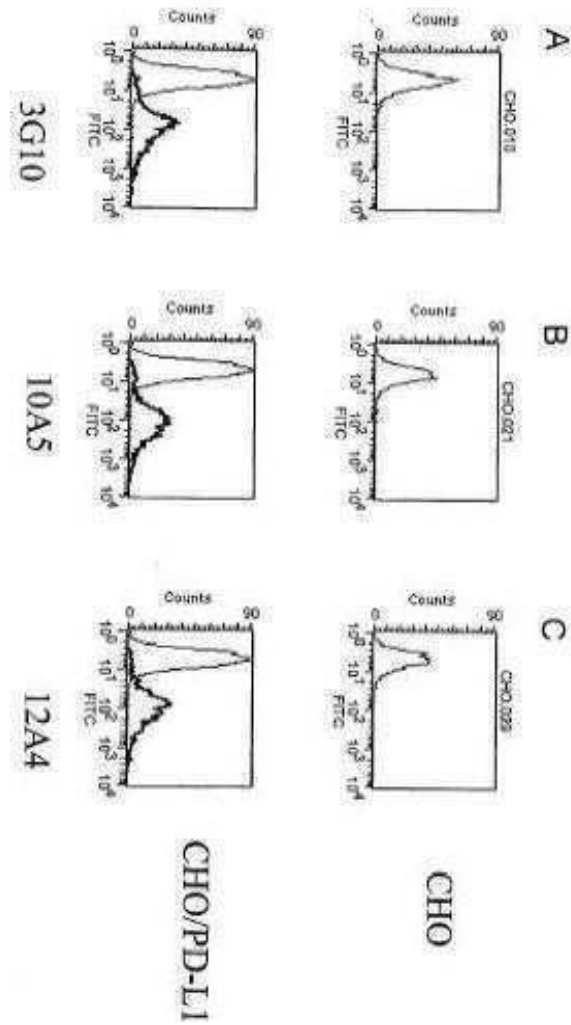
S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q T W S
CDR3

L18 생식계영
JK3 생식계영
1364 VR

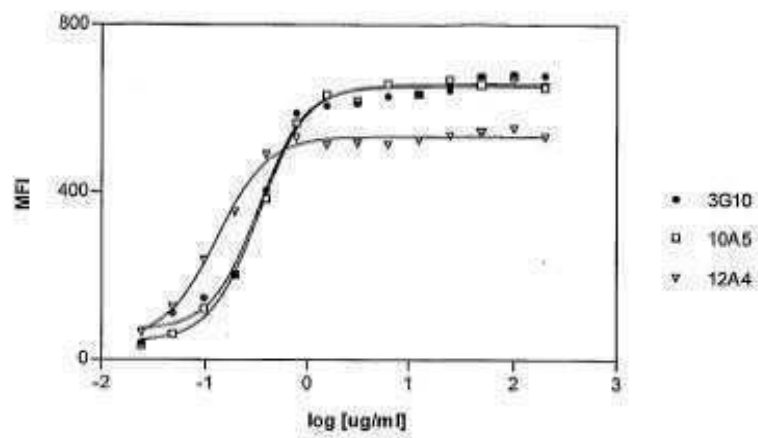
V P
F T F G F G T K V D I R
(JK3)

도면31

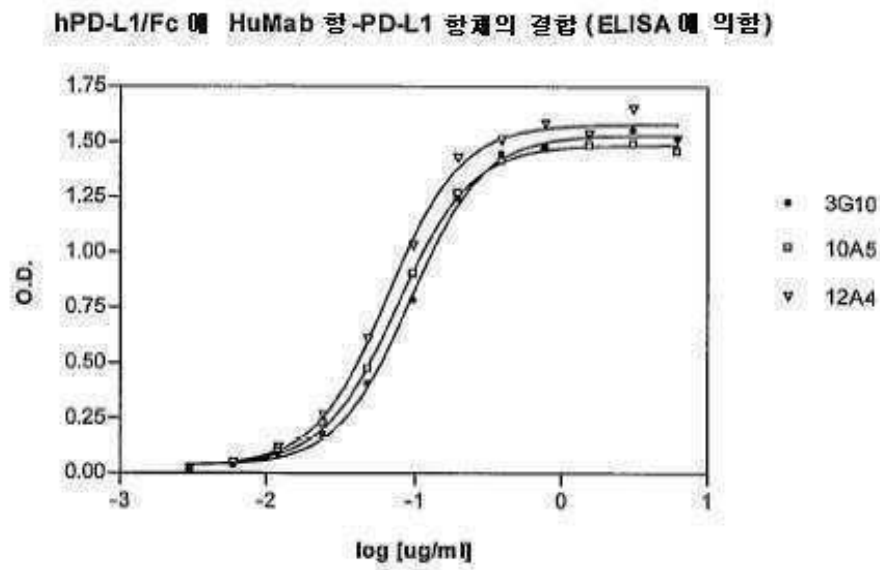
도면32



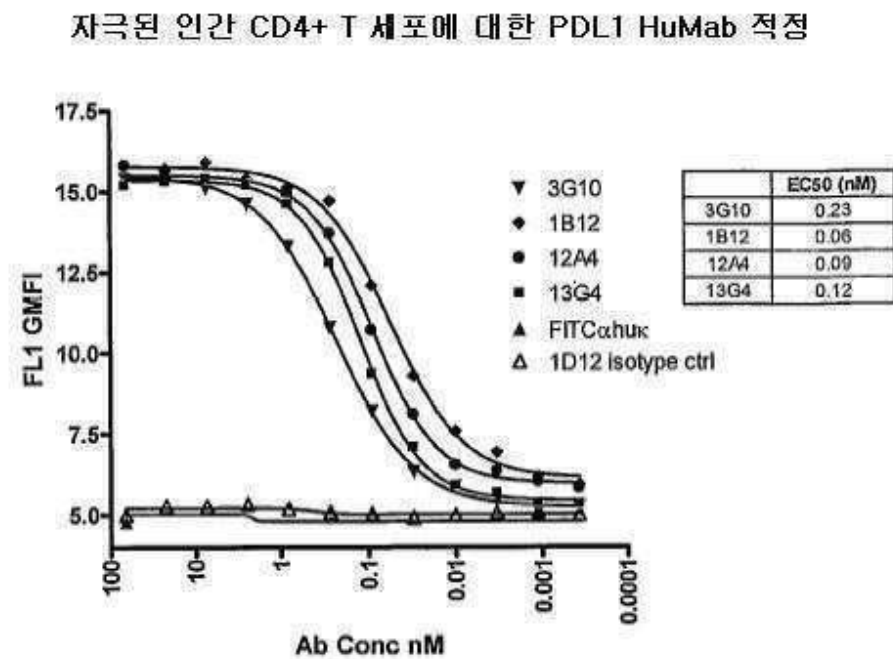
도면33



도면34

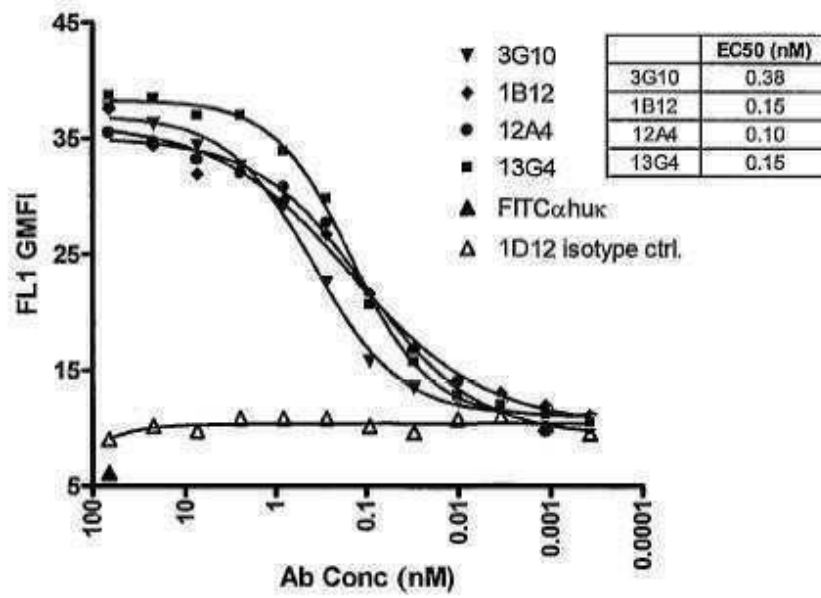


도면35

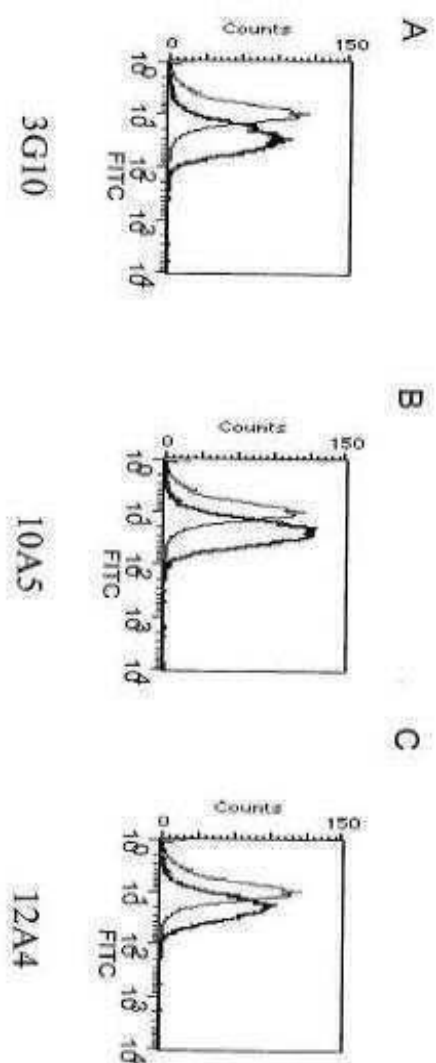


도면36

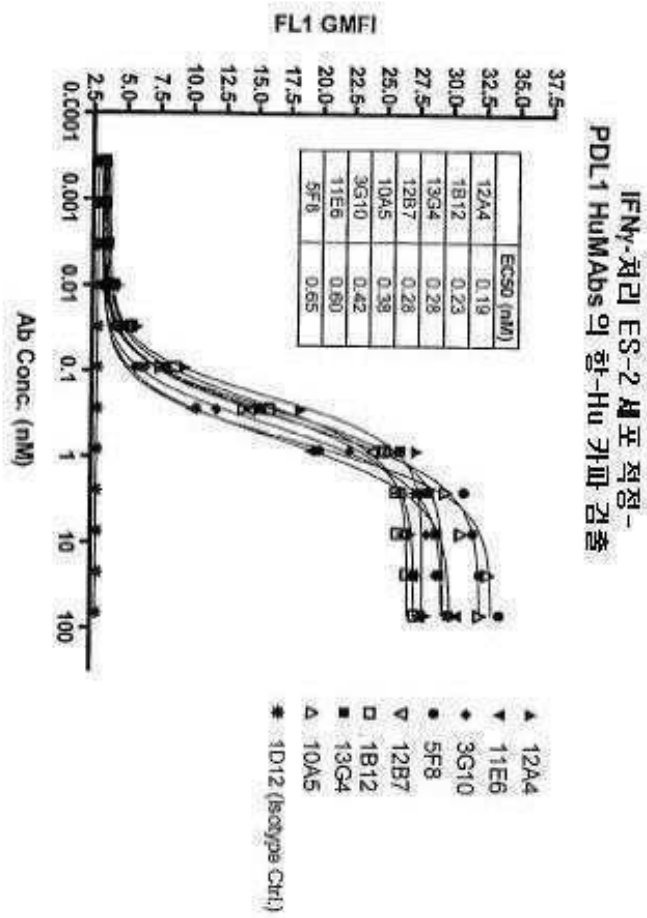
활성화된 시아노물거스 PBMC에 대한 PDL1 HuMab 적정



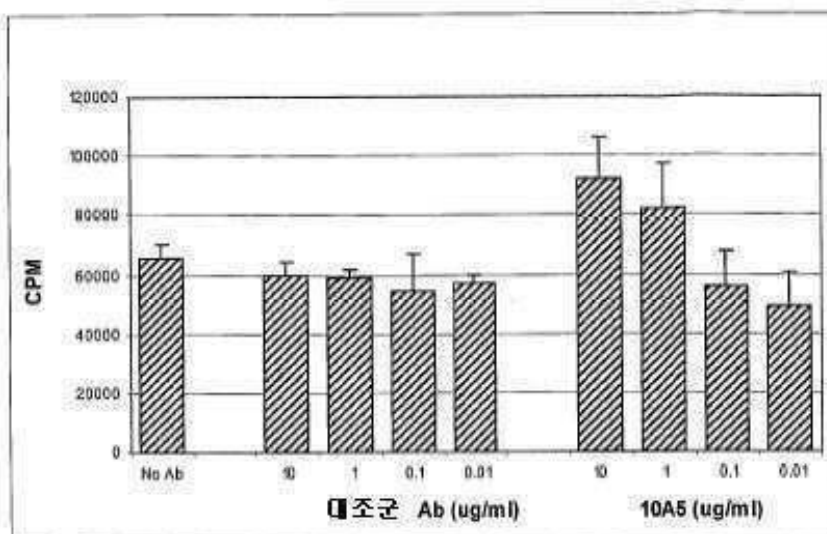
도면37



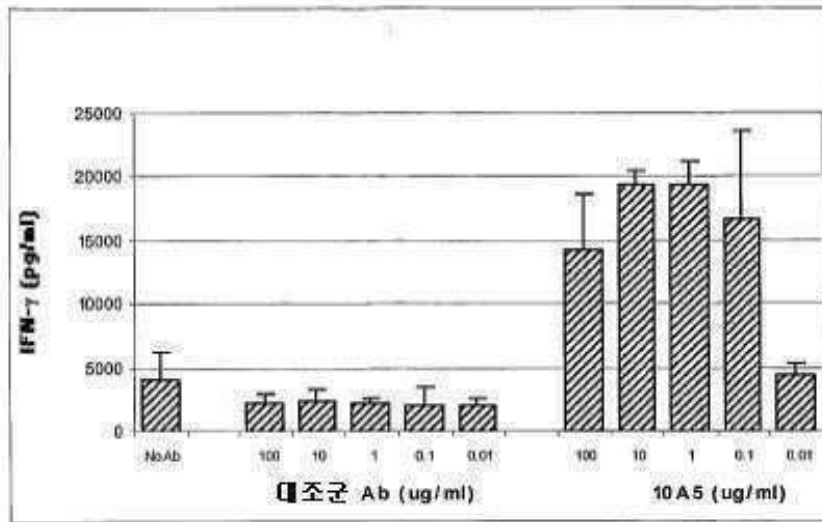
도면38



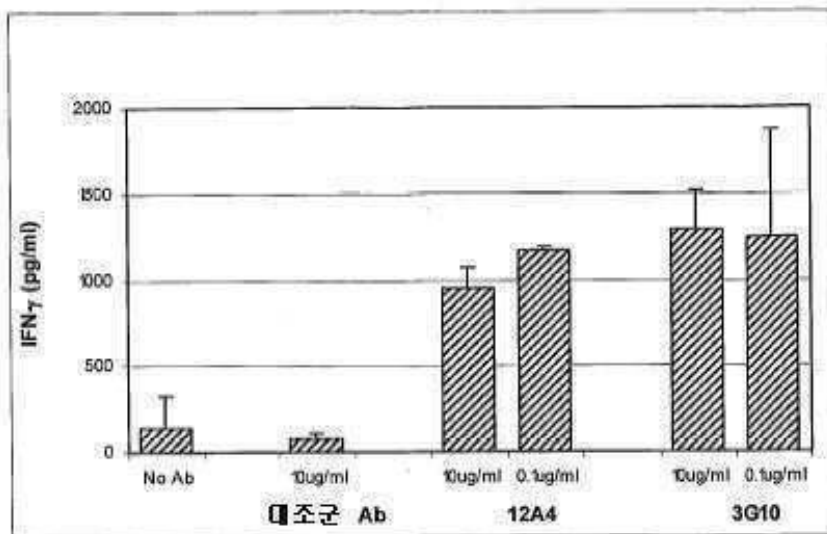
도면39a



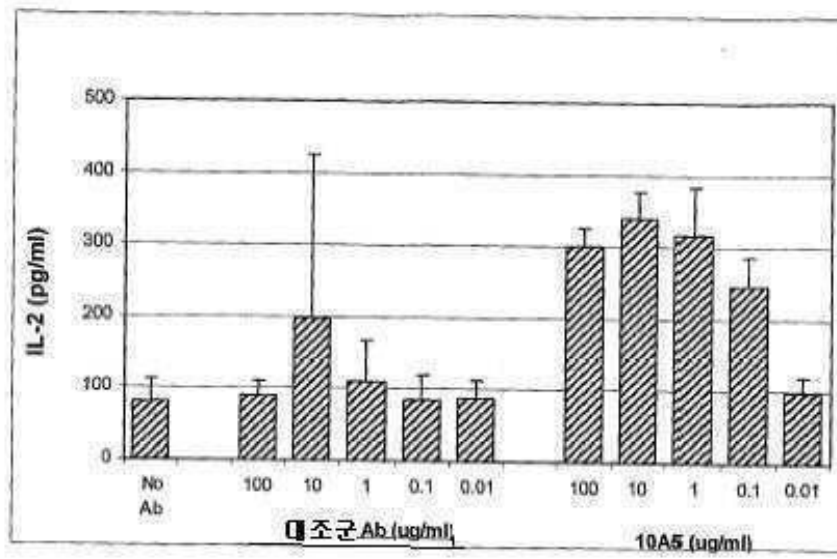
도면39b



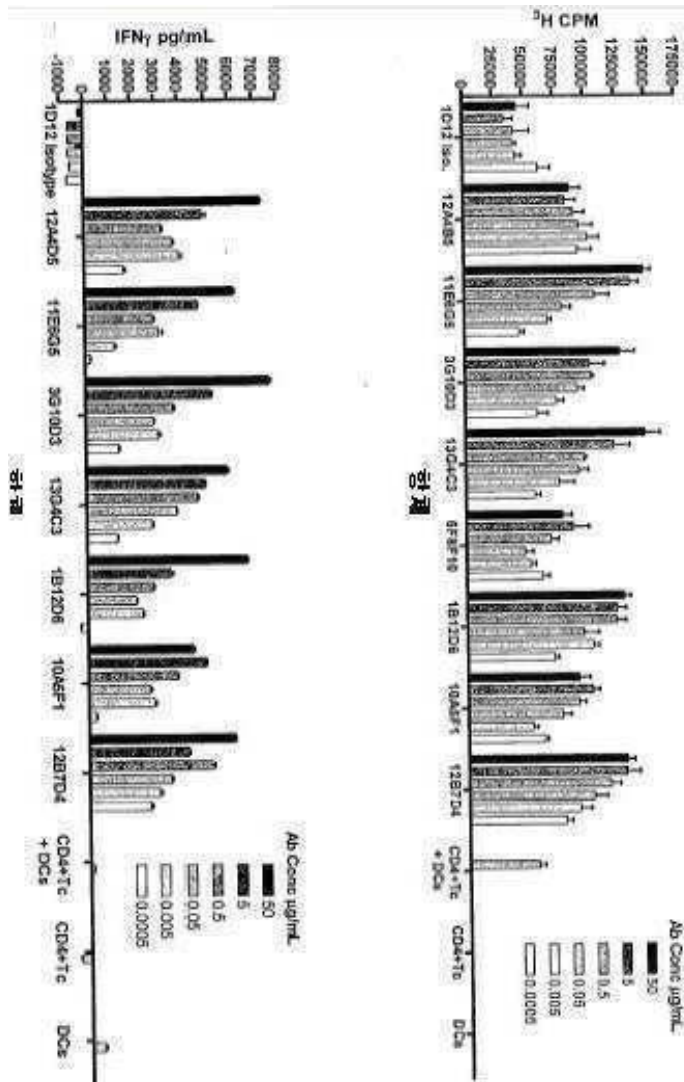
도면39c



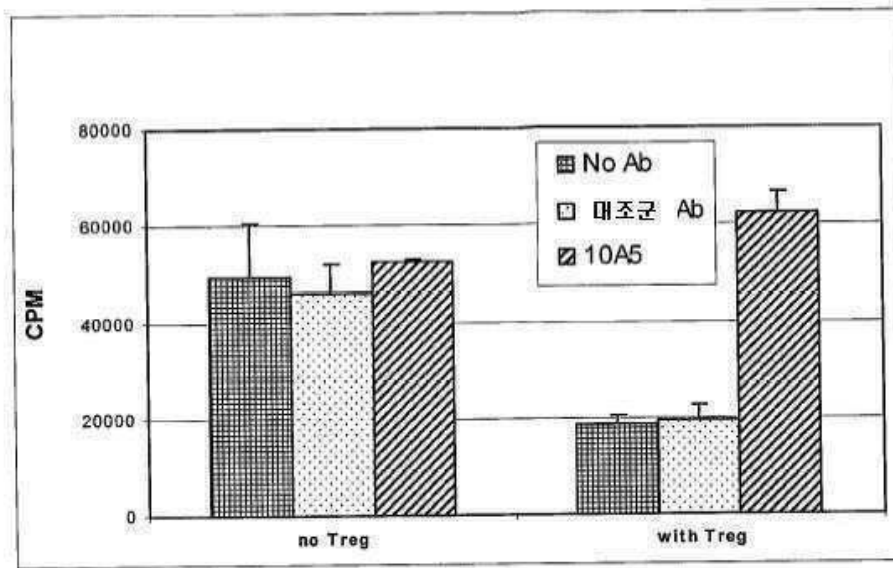
도면39d



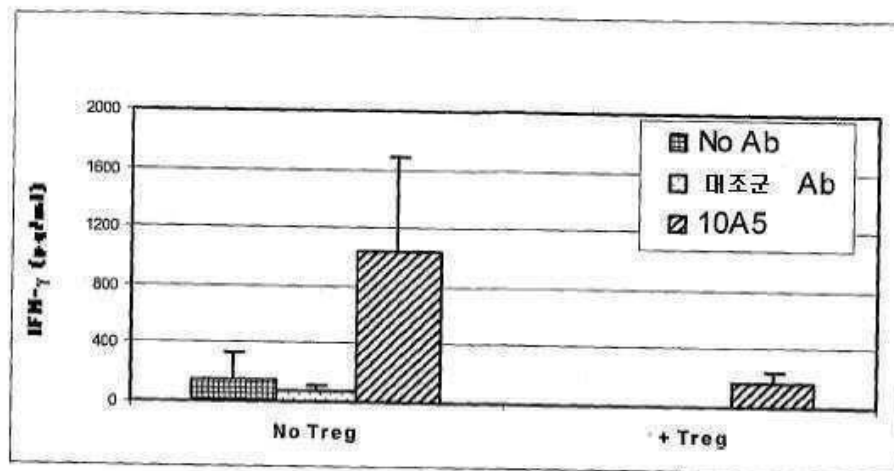
도면40



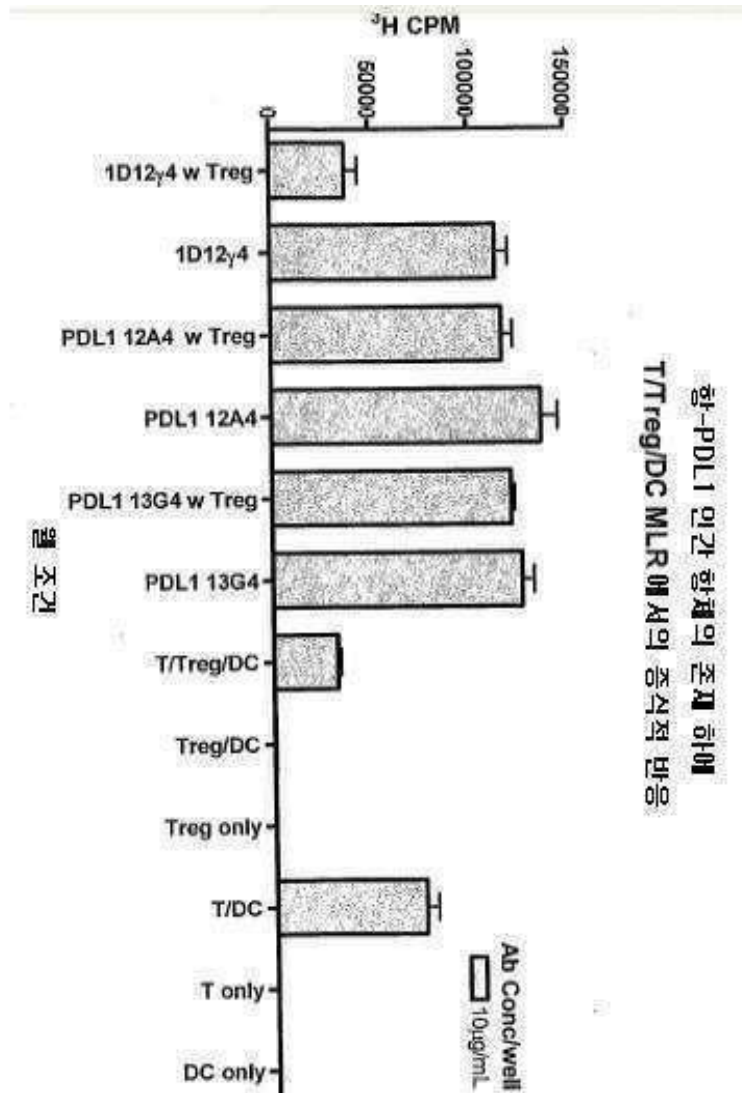
도면41a



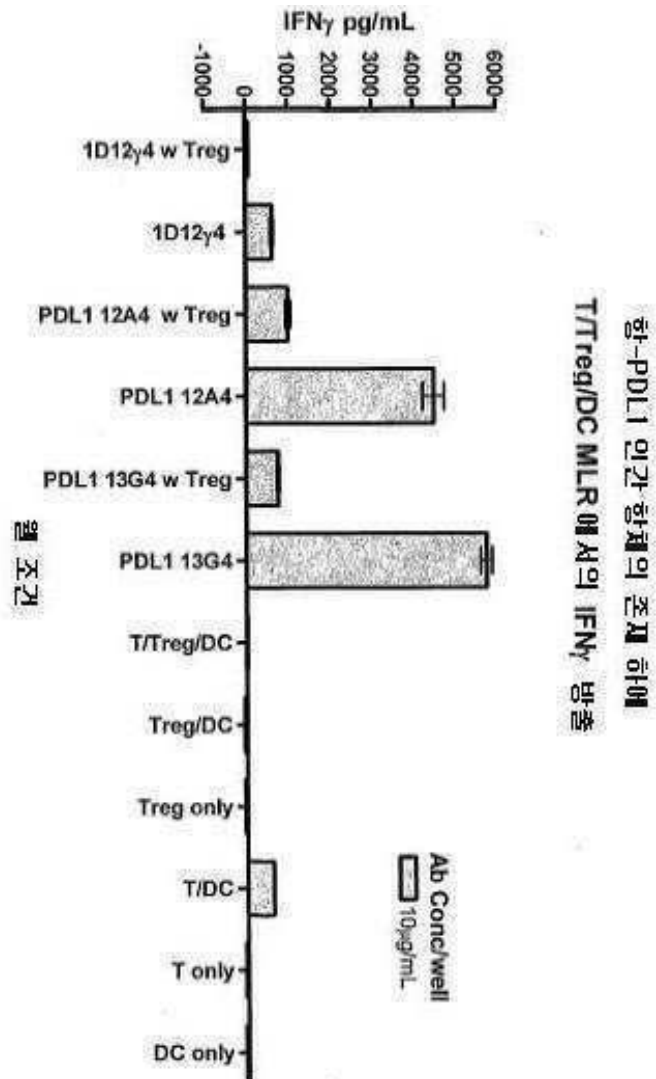
도면41b



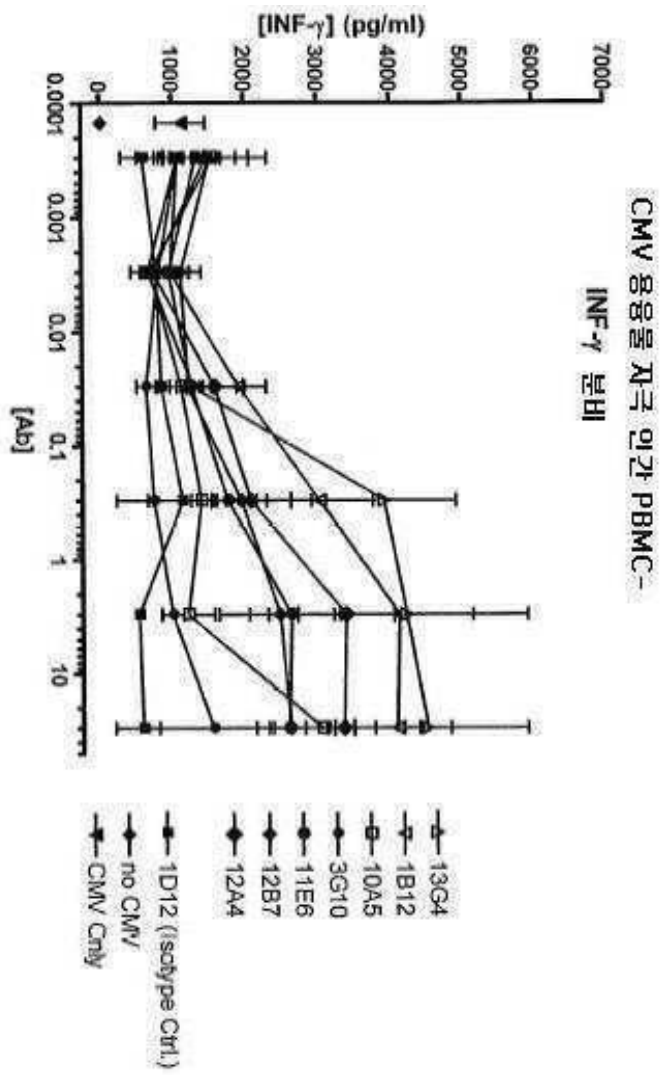
도면42



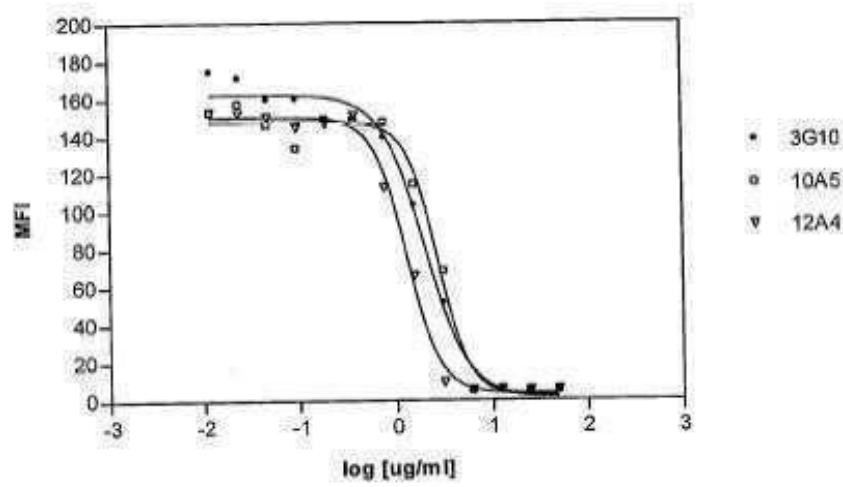
도면43



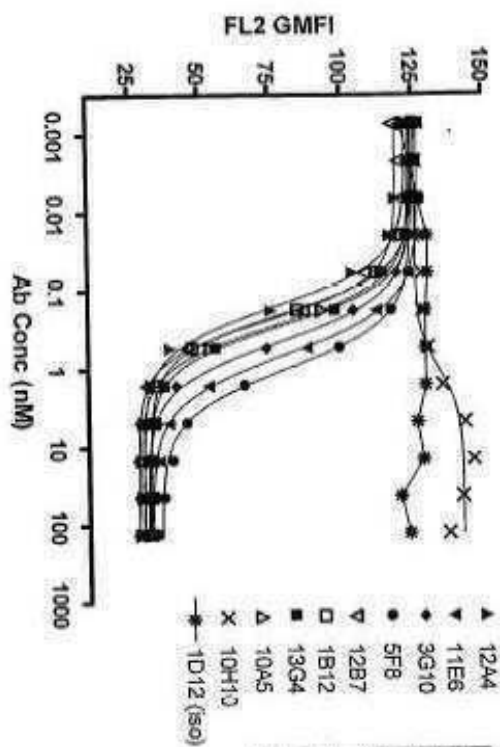
도면44



도면45



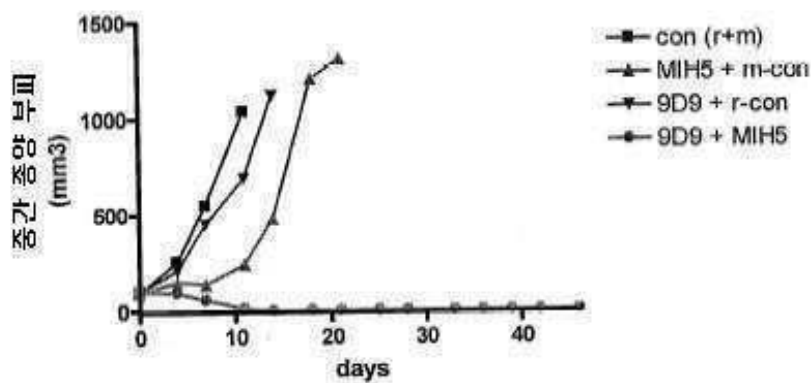
도면46



Antibody	IC50 (nM)
12A4	0.17
11E6	0.21
1B12	0.25
12B7	0.29
10A5	0.29
13G4	0.47
3G10	0.68
11E6	0.68
5F8	1.03

IFN-감마-처리 ES-2 세포에 대한 항-PDL1 Abs에 의한
PDL1-이 결합의 차단

도면47



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MEDAREX, INC.

<120> HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES TO
PROGRAMMED DEATH LIGAND 1 (PD-L1)

<130> 04280/2203107-W00

<140> PCT/US2006/026046

<141> 2006-06-30

<150> 60/696,426

<151> 2005-07-01

<160> 120

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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 Asp Tyr

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

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

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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 Thr Ser Gly Asp Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Lys Phe His Phe Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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 Ser Tyr

20

25

30

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

35

40

45

Gly Trp Leu His Ala Asp Thr Gly Ile Thr Lys Phe Ser Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala 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 Glu Arg Ile Gln Leu Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 4

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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 Val Ser Gly Gly Ile Phe Ser Thr Tyr

20

25

30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn His Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu 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 Asp Gln Gly Ile Ala Ala Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Asn Ser Gly Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Ser

<210> 6

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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 Thr Ser Gly Asp Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Arg Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95
Ala Arg Lys Phe His Phe Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val

100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 7

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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 Thr Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Thr 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 Lys Tyr Asp Tyr Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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 Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ser Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60
Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Ala 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 Asp Ser Ser Gly Trp Ser Arg Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 9

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Leu Phe Gly Ile Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Lys Tyr Ser Tyr Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 10

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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 Val 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 Arg Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 12

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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 Arg Ser Asn Trp Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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 Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Asn Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly 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 Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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 Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Asn Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 16

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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 Arg Ser Asn Trp Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

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 Arg Ser Asn Trp Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly 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 Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 19

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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 Arg Ser Asn Trp Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Phe

85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Asp Tyr Gly Phe Ser

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Thr Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 23

<211> 5

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ser Tyr Asp Val His

1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 Thr Tyr Ala Ile Asn
 1 5
 <210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 Asp Tyr Val Val His
 1 5
 <210> 26
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 Ser Tyr Ala Ile Ser

 1 5
 <210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 Ser Tyr Ala Ile Ser
 1 5
 <210> 28
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 Ser Tyr Ala Ile Asn
 1 5
 <210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 30

<211> 5

<212>

PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Asp Tyr Gly Met His

1 5

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Trp Ile Thr Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Trp Leu His Ala Asp Thr Gly Ile Thr Lys Phe Ser Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn His Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

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

1 5 10 15

Gly

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

1 5 10 15

Gly

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

1 5 10 15

Asp

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Gly Ile Ile Pro Leu Phe Gly Ile Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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

1 5 10 15
Gly

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Asp Tyr Phe Tyr Gly Met Asp Val

1 5

<210> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Lys Phe His Phe Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 43

<211

> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Glu Arg Ile Gln Leu Trp Phe Asp Tyr

1 5

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Asp Gln Gly Ile Ala Ala Ala Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 45

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Pro Phe Asp Tyr

1

<210> 46

<211> 14

<212>

PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Lys Phe His Phe Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val

1

5

10

<210> 47

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Lys Tyr Asp Tyr Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val

1

5

10

<210> 48

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Asp Ser Ser Gly Trp Ser Arg Tyr Tyr Met Asp Val

1

5

10

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Lys Tyr Ser Tyr Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 50

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Gly Arg Phe Arg Tyr Phe Asp Trp Phe Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Val

1 5 10

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 58

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 64

<211> 7

<212
 > PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 64
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 65
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 65
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 66
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 66
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 67
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 67
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 68
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 68
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1 5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr

1 5

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr

1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 76

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr

1 5

<210

> 77

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr

1 5

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

1 5

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr

1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 81

<211> 351

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(351)

<400> 81

cag gtt cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48

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

1 5 10 15

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac acc ttt acc gac tat 96

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

20 25 30

ggt ttc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144

Gly Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
gga tgg atc acc gct tac aat ggt aac aca aac tat gca cag aag ctc 192
Gly Trp Ile Thr Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60
cag ggc aga gtc acc atg acc aca gac aca tcc acg agc aca gtc tac 240
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
atg gag ctg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gcg aga gac tac ttc tac ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg 336
Ala Arg Asp Tyr Phe Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110
gtc acc gtc tcc tca 351
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 82
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(369)
<400> 82
cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
tcg gtg aag gtc tcc tgc aag act tct gga gac acc ttc agc acc tat 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Asp Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
gga ggg atc atc cct ata ttt ggt aaa gca cac tac gca cag aag ttc 192
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg agc aca gcc tac 240
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat ttt tgt 288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
gcg aga aag ttt cac ttt gtt tcg ggg agc ccc ttc ggt atg gac gtc 336
Ala Arg Lys Phe His Phe Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val
100 105 110
tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 369
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 83
<211> 354
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(354)
<400> 83
cag gtc caa ctt gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc act agc tat 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
gat gta cat tgg gtg cgc cag gcc ccc gga caa agg ctt gag tgg atg 144

Asp Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45
gga tgg ctc cac gct gac act ggt atc aca aaa ttt tca cag aag ttc 192
Gly Trp Leu His Ala Asp Thr Gly Ile Thr Lys Phe Ser Gln Lys Phe
50 55 60
cag ggc aga gtc acc att acc agg gac aca tcc gcg agc aca gcc tac 240
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
atg gag ctg agc agc ctg aga tct gaa gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gcg agg gag agg ata cag cta tgg ttt gac tac tgg ggc cag gga acc 336
Ala Arg Glu Arg Ile Gln Leu Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
ctg gtc acc gtc tcc tca 354
Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 84
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(360)
<400> 84
cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gtt tct gga ggc atc ttc agc acc tat 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Ile Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
gct atc aac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144

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

gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac cac gca cag aag ttc 192

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn His Ala Gln Lys Phe

50 55 60
 cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg agc aca gcc tac 240

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

65 70 75 80
 atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288

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

85 90 95
 gcg aga gat cag ggt ata gca gca gcc ctt ttt gac tac tgg ggc cag 336

Ala Arg Asp Gln Gly Ile Ala Ala Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110
 gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 360

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 85

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(339)

<400> 85

gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggc agg 48

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

1 5 10 15
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gtc tct gga ttc acc ttt gat gat tat 96

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

20 25 30
 gtc gtg cac tgg gtc cgg caa gct cca ggg aag ggc ctg gag tgg gtc 144

Val Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 tca ggt att agt ggg aat agt ggt aac ata ggc tat gcg gac tct gtg 192

Ser Gly Ile Ser Gly Asn Ser Gly Asn Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg caa atg aac agt ctg aga gct gag gac acg gcc ttg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg gtc ccc ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc 336
 Ala Val Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 tca 339

Ser

<210> 86

<211> 369

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(369)

<400> 86

cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15
 tcg gtg aag gtc tcc tgc aag act tct gga gac acc ttc agc agc tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Asp Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45
gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aga gca cac tac gca cag aag ttc 192

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

50 55 60
cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg agc aca gcc tac 240

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

65 70 75 80
atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat ttt tgt 288

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

85 90 95

gcg aga aag ttt cac ttt gtt tcg ggg agc ccc ttc ggt atg gac gtc 336

Ala Arg Lys Phe His Phe Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val

100 105 110

tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 369

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 87

<211> 369

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(369)

<400> 87

cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48

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

1 5 10 15

tgc gtg aag gtc tcc tgc aag act tct gga ggc acc ttc agc agc tat 96

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

20 25 30

gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144

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

35 40 45

gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aaa gca cac tac gca cag aag ttc 192
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg acc aca gcc tac 240
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

gcg aga aag tat gac tat gtt tcg ggg agc ccc ttc ggt atg gac gtc 336
 Ala Arg Lys Tyr Asp Tyr Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val

100 105 110

tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 369
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 88
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS

<222> (1)..(363)

<400> 88

cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc agc agc tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

gct atc aac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
gga ggg atc atc cct atc ttt ggt tca gca aac tac gca cag aag ttc 192
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ser Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
cag gac aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg agc gca gcc tac 240
Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Ala Ala Tyr
65 70 75 80

atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gta tat tac tgt 288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gcg aga gac agc agt ggc tgg tct cgg tac tat atg gac gtc tgg ggc 336
Ala Arg Asp Ser Ser Gly Trp Ser Arg Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly
100 105 110
caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 363
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 89

<211> 369

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(369)

<400> 89

cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag gag cct ggg tcc 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Ser
1 5 10 15
tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc aac agc tat 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Ser Tyr
20 25 30

gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
gga ggg atc atc cct ctt ttc ggt ata gca cac tac gca cag aag ttc 192
Gly Gly Ile Ile Pro Leu Phe Gly Ile Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg aac aca gcc tat 240
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
atg gac ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gta tat tat tgt 288
Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gcg aga aag tat tcc tat gtt tcg ggg agc ccc ttc ggt atg gac gtc 336
Ala Arg Lys Tyr Ser Tyr Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val
100 105 110
tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 369

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 90

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(363)

<400> 90

gaa gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggc agg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga atc acc ttt gat gat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30
ggc atg cac tgg gtc cgg caa gct cca ggg aag ggc ctg gag tgg gtc 144

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
tca ggt att agc tgg aat aga ggt aga ata gag tat gcg gac tct gtg 192
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Arg Gly Arg Ile Glu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc ctg tat 240

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
ctg caa atg aac agt ctg aga gct gag gac acg gcc ttg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
gca aaa ggg cgg ttc cga tat ttt gac tgg ttt ctt gac tac tgg ggc 336
Ala Lys Gly Arg Phe Arg Tyr Phe Asp Trp Phe Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 91

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 91

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
tta gtc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct cgg 288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95
acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 92

<211> 318

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(318)

<400> 92

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg ccg acg 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
 85 90 95
 ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 318
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 93
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222>
 > (1)..(321)
 <400> 93
 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144

 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240

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

gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac ccg tac 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 94
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<400> 94

gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48

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

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc 144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt 192
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca ccg 288

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95
tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 324

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

100 105

<210> 95

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 95

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48

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

1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96

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

20 25 30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144

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

35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192

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

50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240

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

65 70 75 80

gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac ccg tac 288

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

85 90 95

act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 321

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 96

<211> 318

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(318)

<400> 96

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48

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

1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96

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

20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144

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

35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192

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

50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240

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

65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg ccg acg 288

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

85 90 95

ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 318

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 97

<211

> 318

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(318)

<400> 97

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48

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

1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96

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

20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144

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

35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192

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

50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240

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

65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg ccg acg 288

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

85 90 95

ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 318

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 98

<211> 318

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(318)

<400> 98

gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48

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

1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc 96

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

20 25 30

tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc 144

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

35 40 45

atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt 192

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

50 55 60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag 240

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

65 70 75 80

cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca cct 288

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 318

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 99

<211> 318

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(318)

<400> 99

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48

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

1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96

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

20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144

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

35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192

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

50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240

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

65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg ccc acc 288

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

85 90 95

ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa 318

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 100

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 100

gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag ggc att agc agt gct 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30
tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gct cct aag ctc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
tat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag ttt aat agt tac cca ttc 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Phe
85 90 95
act ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa 321
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105
<210> 101
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 101
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 Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

<210> 102

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

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

<210> 103

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

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 Ser Tyr

20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

<210> 104

<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala

<210> 105

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

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 Arg Ser Asn Trp Pro

85 90 95

<210> 106

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

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 Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

<210> 107

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly 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 Ser
20 25 30

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

35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

<210> 108

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

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

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

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

35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Phe Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

<210> 109

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 110

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

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

1 5 10 15
 <210> 111
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 111

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

1 5 10

<210> 112
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 112

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

1 5 10 15

<210> 113
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 113

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

1 5 10

<210> 114
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 114

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

1 5 10

<210> 115
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 115

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 116

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 117

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 120

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

1

5

10