

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0061408

(43) 공개일자 2020년06월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/2827 (2013.01)

A61K 39/395 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7013300

(22) 출원일자(국제) 2018년12월27일

심사청구일자 2020년05월08일

(85) 번역문제출일자 2020년05월08일

(86) 국제출원번호 PCT/CN2018/124314

(87) 국제공개번호 WO 2019/129136

국제공개일자 2019년07월04일

(30) 우선권주장

201711449321.X 2017년12월27일 중국(CN)

201811567281.3 2018년12월19일 중국(CN)

(71) 출원인

이노벤티 바이오로직스 (쑤저우) 컴퍼니, 리미티드

중국 215123 장쑤 쑤저우 쑤저우 인더스트리얼 파크 동평 스트리트 168

(72) 발명자

마오 샤오니우

중국 215123 장쑤 쑤저우 쑤저우 인더스트리얼 파크 동평 스트리트 168

후 후아징

중국 215123 장쑤 쑤저우 쑤저우 인더스트리얼 파크 동평 스트리트 168

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인한얼

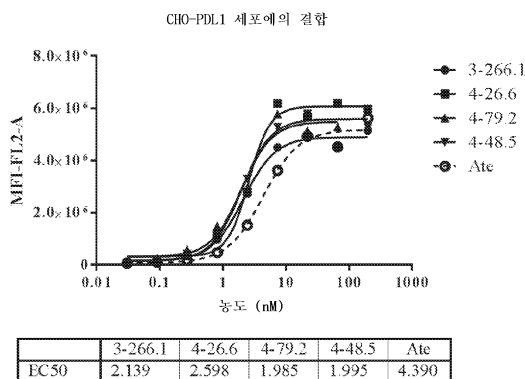
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 항-PD-L1 항체 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체 및 그의 단편, 항체 또는 그의 단편을 함유하는 조성물, 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 핵산, 상응하는 숙주 세포 및 그의 용도를 제공한다. 더욱이, 본 발명은 또한 항체 및 그의 단편과 다른 요법의 조합을 이용하는 한 유형의 요법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 35/02 (2018.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

(72) 발명자

리우 준지안

중국 215123 장쑤 쑤저우 쑤저우 인터스트리얼 파
크 동펑 스트리트 168

첸 빙리앙

중국 215123 장쑤 쑤저우 쑤저우 인터스트리얼 파
크 동펑 스트리트 168

리 리

중국 215123 장쑤 쑤저우 쑤저우 인터스트리얼 파
크 동펑 스트리트 168

명세서

청구범위

청구항 1

PD-L1에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서, 여기서, 항체는

- (i) 서열 번호: 26 또는 30에 제시된 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 HCDR, 및 서열 번호: 32 또는 36에 제시된 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 LCDR, 또는
- (ii) 서열 번호: 27에 제시된 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 HCDR, 및 서열 번호: 33에 제시된 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 LCDR, 또는
- (iii) 서열 번호: 28에 제시된 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 HCDR, 및 서열 번호: 34에 제시된 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 LCDR, 또는
- (iv) 서열 번호: 29 또는 31에 제시된 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 HCDR, 및 서열 번호: 35 또는 37에 제시된 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 LCDR을 포함하는 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 2

PD-L1에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서, 항체는 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 (HCDR) 및 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 (LCDR)을 포함하고, 여기서,

HCDR1은 서열 번호: 1, 2, 3, 또는 4에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 서열 번호: 5, 6, 7, 8, 또는 9에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 서열 번호: 10, 11, 12, 또는 13에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 서열 번호: 14, 15, 또는 16에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 서열 번호: 17, 18, 19, 또는 20에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열 번호: 21, 22, 23, 24, 또는 25에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 3

PD-L1에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서, 항체는 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서,

중쇄 가변 영역은

- (i) 표 B에 열거된 항체 중 어느 하나의 VH 중에 함유되어 있는 3개의 상보성 결정 영역 (HCDR); 또는
- (ii) 표 A에 제시된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 조합을 포함하고/거나;

경쇄 가변 영역은

- (i) 표 B에 열거된 항체 중 어느 하나의 VL 중에 함유되어 있는 3개의 상보성 결정 영역 (LCDR); 또는
- (ii) 표 A에 제시된 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3의 조합을 포함하는 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서,

- (i) 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 26 또는 30으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되고/거나;

경쇄 가변 영역은 서열 번호: 32 또는 36으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나;

- (ii) 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 27의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하

거나, 또는 그로 구성되고/거나;

경쇄 가변 영역은 서열 번호: 33의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나;

(iii) 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 28의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되고/거나;

경쇄 가변 영역은 서열 번호: 34의 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나;

(iv) 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 29 또는 31로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되고/거나;

경쇄 가변 영역은 서열 번호: 35 또는 37로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서,

(i) 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 26 또는 30의 아미노산 서열을 포함하고/거나;

경쇄 가변 영역은 서열 번호: 32 또는 36의 아미노산 서열을 포함하거나;

(ii) 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하고/거나;

경쇄 가변 영역은 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 포함하거나;

(iii) 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하고/거나;

경쇄 가변 영역은 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 포함하거나;

(iv) 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 29 또는 31의 아미노산 서열을 포함하고/거나;

경쇄 가변 영역은 서열 번호: 35 또는 37의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가

(a) (i) 서열 번호: 38, 42, 43, 또는 44로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 85%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나;

(ii) 서열 번호: 38, 42, 43, 또는 44로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 중쇄; 및/또는

(b) (i) 서열 번호: 46 또는 50으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 85%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나;

(ii) 서열 번호: 46 또는 50으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 경쇄를 포함하거나;

(a) (i) 서열 번호: 39의 아미노산 서열과 적어도 85%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나;

(ii) 서열 번호: 39의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 중쇄; 및/또는

(b) (i) 서열 번호: 47의 아미노산 서열과 적어도 85%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나;

(ii) 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 경쇄를 포함하거나;

(a) (i) 서열 번호: 40의 아미노산 서열과 적어도 85%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로

구성되거나;

(ii) 서열 번호: 40의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 중쇄; 및/또는

(b) (i) 서열 번호: 48의 아미노산 서열과 적어도 85%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나;

(ii) 서열 번호: 48의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 경쇄를 포함하거나;

(a) (i) 서열 번호: 41 또는 45로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 85%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나;

(ii) 서열 번호: 41 또는 45로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 중쇄; 및/또는

(b) (i) 서열 번호: 49 또는 51로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 85%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나;

(ii) 서열 번호: 49 또는 51로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되는 경쇄를 포함하는 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 특징:

(1) 높은 친화도로 PD-L1 (예컨대, 인간 PD-L1)에 결합, 예를 들어, 약 2 nM 미만의 평형 해리 상수 (K_D)로 PD-L1에 결합하는 특징;

(2) 예컨대 약 2 nM 이하의 EC_{50} 으로, 인간 PD-L1을 발현하는 세포에 결합하는 항체 또는 그의 단편;

(3) 예컨대 약 0.7 nM 이하의 EC_{50} 으로, PD-L1과 연관된 활성을 차단하는 항체 또는 그의 단편;

(4) 예컨대 공지된 항-PD-L1 항체, 예컨대 테센트릭(Tecentriq)보다 우수한, T 세포 기능을 증가시키는 항체 또는 그의 단편;

(5) 예컨대 MLR에서, 예컨대 공지된 항-PD-L1 항체, 예컨대 테센트릭보다 우수한, T 세포 증식을 증가시키는 항체 또는 그의 단편;

(6) 예컨대 공지된 항-PD-L1 항체, 예컨대 테센트릭보다 우수한, IFN- γ 분비를 증가시키는 항체 또는 그의 단편;

(7) 예컨대 공지된 항-PD-L1 항체, 예컨대 테센트릭보다 우수한, IL-2 분비를 증가시키는 항체 또는 그의 단편;

(8) 제닉스 칼럼 검정법에서, 체류 시간 (RT)이 약 10분 미만인 것인 특징;

(9) PD-L1의 하나 이상의 활성을 억제시켜, 예를 들어, 하기: 종양-침윤성 림프구 증가, T 세포 수용체-매개 증식 증가, 또는 암 세포의 면역 회피 감소 중 하나 이상의 것을 유발하는 것인 특징;

(10) 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 유도하는 특징;

(11) 표 3에 열거된 항체 중 어느 하나와 동일하거나, 또는 유사한, PD-L1에 대한 결합 친화도 및/또는 특이성을 보이는 특징;

(12) 표 3에 열거된 항체 중 어느 하나의 PD-L1에의 결합을 억제시키는 (예컨대, 경쟁적으로 억제시키는) 특징;

(13) 표 3에 열거된 항체 중 어느 하나와 동일한 또는 중복 에피토프에 결합하는 특징;

(14) 표 3에 열거된 항체 중 어느 하나와 PD-L1에의 결합에 대해 경쟁하는 특징;

(15) 표 3에 열거된 항체 중 어느 하나의 하나 이상의 생물학적 특징을 갖는 특징; 중 하나 이상의 것을 갖는, PD-L1에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 IgG1 또는 IgG4 형태의 항체 또는 항원 결합 단편이고, 임의

적으로, 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 κ 경쇄 불변 영역, 예컨대 인간 κ 경쇄 불변 영역을 포함하는 것인, 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체인 것인, 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간화 항체 또는 인간 항체 또는 키메라 항체인 것인, 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단편이 Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, 단일 쇠 항체, 예컨대 scFv, (Fab')₂ 단편, 단일 도메인 항체, 디아바디 (dAb), 또는 선형 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 항체 단편인 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 이중특이적 또는 다중특이적 항체이고, 바람직하게, 이중특이적 항체가 PD-L1 및 LAG-3에 결합하는 것인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 단리된 핵산.

청구항 14

제13항에 따른 핵산을 포함하는 벡터로서, 여기서, 바람직하게, 벡터는 발현 벡터, 예컨대 pTT5 벡터인 것인, 벡터.

청구항 15

제13항에 따른 핵산 또는 제14항에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포로서, 여기서, 숙주 세포는 바람직하게, 원핵성 또는 진핵성 숙주 세포이고, 더욱 바람직하게, 숙주 세포는 E. 콜라이(E. coli) 세포, 효모 세포, 포유동물 세포, 또는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조에 적합한 다른 세포로 구성된 군으로부터 선택되고, 가장 바람직하게, 숙주 세포는 293 세포 또는 CHO 세포인 것인, 숙주 세포.

청구항 16

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 발현시키는 데 적합한 조건에서 제15항에 따른 숙주 세포를 인큐베이션시키는 단계, 및 임의적으로, 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 단리시키는 단계를 포함하고; 임의적으로, 숙주 세포로부터 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제조하는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 및 추가 물질, 예컨대 세포독성제를 포함하는, 면역접합체.

청구항 18

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 제17항에 따른 면역접합체, 및 임의적으로 제약 보충 물질을 포함하는, 제약 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 제17항에 따른 면역접

합체, 추가 치료제, 및 임의적으로 제약 보충 물질을 포함하는, 제약 조성물로서; 여기서, 바람직하게, 추가 치료제가 화학요법제, 다른 항체 (예컨대, 항-LAG-3 항체, 예컨대, 인간 항원에 결합하는 항-LAG-3 항체, 바람직하게, 항-LAG-3 항체는 인간화 항체임), 세포독성제, 백신, 항감염 활성제, 또는 면역조절제 (예컨대, 공동 자극 분자의 활성제 또는 면역 체크포인트 분자의 억제제)로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 제약 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 항-LAG-3 항체가

- (i) 서열 번호: 75에 제시된 중쇄 가변 영역의 3개의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR), 및/또는
- (ii) 서열 번호: 76에 제시된 경쇄 가변 영역의 3개의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR)을 포함하는 것인, 제약 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서, 항-LAG-3 항체가 중쇄 가변 영역 (VH) 및/또는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서,

- (i) VH는 상보성 결정 영역 (CDR) HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 여기서, HCDR1은 서열 번호: 69의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되고; HCDR2는 서열 번호: 70으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 상기 아미노산 서열로 구성되고; HCDR3은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되고/거나;
- (ii) VL은 상보성 결정 영역 (CDR) LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하고, 여기서, LCDR1은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되고; LCDR2는 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되고; LCDR3은 서열 번호: 74로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 상기 아미노산 서열로 구성되는 것인, 제약 조성물.

청구항 22

대상체 또는 개체에서의 종양 또는 감염성 질환의 예방 또는 치료를 위한 약물의 제조에서의, 유효량의 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편 또는 제17항에 따른 면역접합체의 용도.

청구항 23

대상체 또는 개체에서의 종양 또는 감염성 질환의 예방 또는 치료를 위한 약물의 제조에서의, 유효량의 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편 또는 제17항에 따른 면역접합체 또는 제18항 또는 제19항에 따른 제약 조성물, 및 항-LAG-3 항체 (예컨대, 인간 항원에 결합하는 항-LAG-3 항체, 바람직하게, 항-LAG-3 항체는 인간화 항체임)의 용도.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 종양이 암, 예컨대 위장관 종양, 예컨대 위장관암, 예컨대 결장암이거나; 또는 감염성 질환이 만성 감염인 것인, 용도.

청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 약물이 다른 요법 중 하나 이상의 것과 함께 조합하여 투여될 수 있고, 여기서, 요법은 예를 들어, 치료 방식 및/또는 다른 치료제를 포함하고, 바람직하게, 치료 방식은 외과 치료 및/또는 방사선요법을 포함하거나, 또는 치료제는 화학요법제, 세포독성제, 백신, 항감염 활성제, 다른 항체 (예컨대, 항-LAG-3 항체, 예컨대, 인간 항원에 결합하는 항-LAG-3 항체, 바람직하게, 항-LAG-3 항체는 인간화 항체임), 또는 면역조절제 (예컨대, 공동 자극 분자의 활성제 또는 면역 체크포인트 분자의 억제제)로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 용도.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 항-LAG-3 항체가

- (i) 서열 번호: 75에 제시된 중쇄 가변 영역의 3개의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR), 및/또는

(ii) 서열 번호: 76에 제시된 경쇄 가변 영역의 3개의 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR)을 포함하는 것인, 용도.

청구항 27

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 항-LAG-3 항체가 중쇄 가변 영역 (VH) 및/또는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서,

(i) VH는 상보성 결정 영역 (CDR) HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 여기서, HCDR1은 서열 번호: 69의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되고; HCDR2는 서열 번호: 70으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 상기 아미노산 서열로 구성되고; HCDR3은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되고/거나;

(ii) VL은 상보성 결정 영역 (CDR) LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하고, 여기서, LCDR1은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되고; LCDR2는 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되고; LCDR3은 서열 번호: 74로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 상기 아미노산 서열로 구성되는 것인, 용도.

청구항 28

(a) 샘플을 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계; 및

(b) 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 PD-L1에 의한 복합체 형성을 검출하고 PD-L1이 검출되는 단계를 포함하고, 임의적으로, 항-PD-L1 항체는 검출가능하게 표지되는 것인, 샘플 중 PD-L1을 검출하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 PD-L1에 특이적으로 결합하는 신규한 항체 및 그의 항체 단편, 및 항체 또는 항체 단편을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 추가로, 본 발명은 항체 또는 그의 항체 단편을 코딩하는 핵산, 핵산을 포함하는 숙주 세포, 및 관련된 용도에 관한 것이다. 추가로, 본 발명은 상기 항체 및 항체 단편의 치료적 및 진단적 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 상기 항체 및 항체 단편의, 다른 요법, 예컨대, 치료 방식 또는 치료제와의 조합 요법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 배경

[0003] 프로그램화된 사멸-리간드 1 (PD-L1)은 만성 간염, 임신, 조직 동종이식, 자가면역 질환, 및 암 동안 면역계 반응을 억제시키는 데 관여하는 단백질이다. PD-L1은, T 세포, B 세포, 및 단핵구의 표면 상에서 발현되는, 프로그램화된 사멸 1 (PD-1)로 불리는 억제성 수용체에 결합함으로써 면역 반응을 조절한다. PD-L1은 또한 (이는 또한 B7-1 또는 CD80로도 공지되어 있는) 또 다른 수용체 B7.1과의 상호작용을 통해 T 세포를 음성적으로 조절한다. PD-L1/PD-1 및 PD-L1/B7.1 복합체 형성이 T 세포 수용체 신호전달을 음성적으로 조절함으로써 후속하여 T 세포 활성화를 하향 조절시키고, 항-종양 면역 활성을 억제시킨다. PD-L1은 다양한 고형 종양, 예컨대, 방광 종양, 유방 종양, 결장 종양, 폐 종양, 흑색종, 난소 종양, 타액선 종양, 위 종양, 및 갑상선 종양을 비롯한, 다수의 암에서 과다발현된다. 종양 세포에서의 PD-L1 과다발현은 종양 침윤을 촉진시킬 수 있고, 이는 대개 불량한 예후와 연관이 있다.

[0004] 그러므로, 당업계에서는 PD-L1에 더욱 잘 결합하고, 우수한 약물성을 갖는, 신규한 항-PD-L1 항체가 여전히 요구되고 있다.

발명의 내용

[0005] 요약

[0006] 본원에서는 PD-L1에 결합하는 항체 분자를 개시한다. 항체 또는 그의 항체 단편을 코딩하는 핵산, 및 발현 벡터, 숙주 세포, 및 항체 분자를 제조하는 방법 또한 제공한다. 항-PD-L1 항체 분자, 다중특이적 또는 이중특이

적 항체 분자를 포함하는 면역접합체, 및 제약 조성물 또한 제공한다. 본원에 개시된 항-PD-L1 항체 분자는 종양 질환 및 감염성 질환을 치료, 예방 및/또는 진단하는 데 단독으로, 또는 다른 요법, 예컨대, 치료제 또는 치료 방식과 함께 조합하여 사용될 수 있다. 추가로, 본원에서는 PD-L1 검출을 위한 조성물 및 방법, 및 항-PD-L1 항체 분자를 이용하여 종양 및/또는 감염성 질환을 비롯한 다양한 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 개시한다.

[0007] 그러므로, 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 PD-L1에 (특이적으로) 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 인간 PD-L1에 (특이적으로) 결합한다

[0008] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편은 높은 친화도로 PD-L1 (예컨대, 인간 PD-L1)에 결합하고, 예를 들어, 약 50 nM 미만, 바람직하게, 약 20 nM 이하, 더욱 바람직하게, 약 15 nM 이하, 더욱 바람직하게, 약 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 또는 2 nM 이하, 및 가장 바람직하게, 약 1.5 nM, 1.4 nM, 1.3 nM, 1.2 nM, 1.1 nM, 1 nM, 0.9 nM, 또는 0.8 nM 이하의 평형 해리 상수 (K_D)로 PD-L1에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체는 0.1-10 nM, 바람직하게, 0.5-10 nM, 더욱 바람직하게, 0.6-10 nM, 0.7-8 nM, 및 0.7-5 nM, 및 가장 바람직하게, 0.5-1.5 nM, 0.7-1.5 nM, 및 0.7-1 nM의 K_D 로 PD-L1에 결합한다. 일부 실시양태에서, PD-L1은 인간 PD-L1이다. 일부 실시양태에서, 항체 결합 친화도는 생물학적 광학 간섭법 (예컨대, 포르테바이오(Fortebio) 친화도 측정)을 이용하여 측정된다.

[0009] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 예를 들어, 약 4 nM, 3.5 nM, 3 nM, 2.9 nM, 2.8 nM, 2.7 nM, 2.6 nM, 2.5 nM, 2.4 nM, 2.3 nM, 2.2 nM, 2.1 nM, 2 nM, 1.9 nM, 1.8 nM, 1.7 nM, 또는 1.6 nM 이하의 EC_{50} 으로 인간 PD-L1을 발현하는 세포에 결합한다. 일부 실시양태에서, 결합은 유세포 분석법 (예컨대, FACS)을 이용하여 측정된다. 일부 실시양태에서, 인간 PD-L1을 발현하는 세포는 인간 PD-L1을 발현하는 CHO 세포이다.

[0010] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 예를 들어, 약 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0.9 nM, 0.8 nM, 또는 0.7 nM, 및 바람직하게, 0.1-1 nM, 0.5-1 nM, 0.6-1 nM, 0.6 nM, 0.7 nM, 0.8 nM, 0.9 nM, 또는 1 nM 이하의 EC_{50} 으로 PD-L1의 관련 활성을 차단한다. 일부 실시양태에서, PD-L1의 관련 활성은 PD-L1의 PD-1에의 결합이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 MOA 검정법에서 약 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0.9 nM, 0.8 nM, 또는 0.7 nM, 및 바람직하게, 0.1-1 nM, 0.5-1 nM, 0.6-1 nM, 0.6 nM, 0.7 nM, 0.8 nM, 0.9 nM, 또는 1 nM 이하의 EC_{50} 으로 PD-L1의 PD-1에의 결합을 억제시킨다. 일부 실시양태에서, 세포는 CHO 세포이다.

[0011] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 T 세포 기능을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 T 세포 증식을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 IFN- γ 분비를 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 IL-2 분비를 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 IFN- γ 분비 및 IL-2 분비, 둘 모두를 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 증가는 혼합 림프구 반응 (MLR)으로 측정된다. 일부 실시양태에서, T 세포를 활성화시킬 수 있는 본 발명의 항체 또는 그의 단편의 능력은 공지된 항-PD-L1 항체, 예컨대, 테센트릭(Tecentriq)보다 우수하다.

[0012] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편의 점성은 공지된 항-PD-L1 항체 (예컨대, 테센트릭)보다 더 낮고, 그러므로, 더 우수한 약물성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 제닉스(Zenix) 칼럼 크로마토그래피에서 약 10분, 약 9분, 또는 약 8분, 바람직하게, 약 7-9분, 및 바람직하게, 약 7-8.5분, 약 7.5-8.5분, 약 7-8분, 또는 약 7.5-8분, 예컨대, 약 7.5분, 7.6분, 7.7분, 7.8분, 7.9분, 8분, 8.1분, 8.2분, 8.3분, 8.4분, 8.5분 미만의 체류 시간 (RT)을 갖는다.

[0013] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 예를 들어, 하기: 종양-침윤성 림프구 증가, T 세포 수용체-매개 증식 증가, 또는 암 세포의 면역 회피 감소 중 하나 이상의 것을 유발하는, PD-L1의 하나 이상의 활성을 억제시킨다.

[0014] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편은 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 유도할 수 있다.

[0015] 일부 실시양태에서, 단독으로, 또는 다른 요법 (예컨대, 치료 방식 및/또는 치료제)과 함께 조합하여 본 발명의 항-PD-L1 항체는 종양 (예컨대, 암) 또는 감염 (예컨대, 만성 감염)을 치료하는 데 효과적이다. 일부 실시양태

에서, 종양은 종양 면역 회피이다. 일부 실시양태에서, 종양은 암이다. 일부 실시양태에서, 종양은 위장 종양이다. 일부 실시양태에서, 암은 결장암이다.

- [0016] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편의 중쇄 및/또는 경쇄는 신호 펩티드 서열, 예컨대, METDTLLLVLLLVWPGSTG (서열 번호: 68)를 추가로 포함한다.
- [0017] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 항-PD-L1 항체 뿐만 아니라, 상기 기술된 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편 중 임의의 것과 동일한 에피토프에 결합하는 항체의 아미노산 서열의 변이체 또한 포함한다.
- [0018] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체는 인간 또는 무인 불변 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, 또는 IgE 형태의 항체이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체는 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, 및 IgE의 중쇄 불변 영역으로 구성된 군으로부터 선택되는; 특히, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4의 중쇄 불변 영역으로 구성된 군으로부터 선택되는 중쇄 불변 영역, 및 더욱 특히, IgG1 또는 IgG4의 중쇄 불변 영역, 예컨대, 인간 IgG1 또는 IgG4의 중쇄 불변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 인간 IgG1 또는 인간 IgG4의 중쇄 불변 영역이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체에 포함된 무인 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, 및 IgG3으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0019] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 분자는 예컨대, 카파 또는 람다 경쇄 불변 영역, 및 바람직하게, κ (예컨대, 인간 κ) 경쇄 불변 영역으로부터 선택되는 경쇄 불변 영역을 갖는다.
- [0020] 또 다른 실시양태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 IgG4 (예컨대, 인간 IgG4)의 중쇄 불변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 IgG4는 EU 넘버링에 따른 228번 위치에 치환 (예컨대, Ser에서 Pro로의 치환)을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 인간 IgG4는 114-115번 위치에 (EU 넘버링) AA로의 돌연변이를 함유한다 (문헌 [Armour KL1, Clark MR, Hadley AG, Williamson LM, Eur J Immunol., Aug., 1999; 29(8):2613-24, Recombinant human IgG molecules lacking Fc γ receptor I binding and monocyte triggering activities]). 또 다른 실시양태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 IgG1 (예컨대, 인간 IgG1)의 중쇄 불변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 IgG1은 EU 넘버링에 따른 297번 위치에 치환 (예컨대, Asn에서 Ala로의 치환)을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 IgG1은 EU 넘버링에 따른 265번 위치에 치환, EU 넘버링에 따른 329번 위치에 치환, 또는 그 둘 모두 (예컨대, EU 넘버링에 따른 265번 위치의 Asp에서 Ala로의 치환 및/또는 EU 넘버링에 따른 329번 위치의 Pro에서 Ala로의 치환)를 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 IgG1은 EU 넘버링에 따른 234번 위치에 치환, EU 넘버링에 따른 235번 위치에 치환, 또는 그 둘 모두 (예컨대, 인간 IgG1은 EU 넘버링에 따른 234번 위치의 Leu에서 Ala로의 치환 및/또는 EU 넘버링에 따른 235번 위치의 Leu에서 Ala로의 치환)를 포함한다. 한 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 서열 번호: 64, 65, 또는 66에 제시된 아미노산 서열, 또는 상기와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 또는 상기 서열로 구성된다.
- [0021] 또 다른 실시양태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 카파 경쇄 불변 영역, 예컨대, 인간 카파 경쇄 불변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 경쇄 불변 영역은 서열 번호: 67에 제시된 아미노산 서열, 또는 상기와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 또는 상기 서열로 구성된다.
- [0022] 한 실시양태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 IgG1의 중쇄 불변 영역 (예컨대, 인간 IgG1의 중쇄 불변 영역) 및 카파 경쇄 불변 영역 (예컨대, 인간 카파 경쇄 불변 영역)을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 IgG1은 EU 넘버링에 따른 297번 위치에 치환 (예컨대, Asn에서 Ala로의 치환)을 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG1 중쇄 불변 영역은 서열 번호: 64 또는 65에 제시된 아미노산 서열, 또는 상기와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 또는 상기 서열로 구성된다. 한 실시양태에서, 인간 카파 경쇄 불변 영역은 서열 번호: 67에 제시된 아미노산 서열, 또는 상기와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 또는 상기 서열로 구성된다.
- [0023] 또 다른 실시양태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 IgG4의 중쇄 불변 영역 (예컨대, 인간 IgG4 중쇄 불변 영역) 및 카파 경쇄 불변 영역 (예컨대, 인간 카파 경쇄 불변 영역)을 포함한다. 한 실시양태에서, 불변 영역은 돌연변이화된 IgG4 불변 영역, 예컨대, 돌연변이화된 인간 IgG4 불변 영역 (예컨대, EU 넘버링에 따른 228번 위치에 돌연변이, 예컨대, S228P 돌연변이를 갖는 것, 및/또는 114-115번 위치에 (EU 넘버링) AA로의 돌연변이를 갖는

것)이다. 일부 실시양태에서, IgG4 중쇄 불변 영역은 서열 번호: 66에 제시된 아미노산 서열, 또는 상기와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 또는 상기 서열로 구성된다. 한 실시양태에서, 인간 카파 경쇄 불변 영역은 서열 번호: 67에 제시된 아미노산 서열, 또는 상기와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 또는 상기 서열로 구성된다.

[0024] 한 실시양태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 단리된 항-PD-L1 항체 분자 또는 재조합 항-PD-L1 항체 분자이다.

[0025] 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 모노클로날 항체 또는 단일특이성의 항체이다. 항-PD-L1 항체 분자는 또한 인간화, 키메라, 또는 또는 인간 항체 분자일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 키메라 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체의 프레임워크 서열의 적어도 일부는 인간 공통 프레임워크 서열이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또한 그의 항체 단편, 바람직하게, Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, 단일쇄 가변 단편 (예컨대, scFv) 또는 (Fab')₂, 단일 도메인 항체, 디아바디 (dAb), 또는 선형 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 항체 단편을 포함한다.

[0026] 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 이중특이적 또는 다중특이적 항체 분자 형태이다. 한 실시양태에서, 이중특이적 항체 분자는 PD-L1에 대해 제1 결합 특이성, 및 LAG-3에 대해 제2 결합 특이성을 갖는다. 한 실시양태에서, 이중특이적 항체 분자는 PD-L1 및 LAG-3에 결합한다. 다중특이적 항체 분자는 PD-L1 및 다른 표적에 대한 결합 특이성의 임의 조합을 가질 수 있다.

[0027] 한 측면에서, 본 발명은 상기 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편 중 임의의 것을 코딩하는 핵산을 제공한다. 한 실시양태에서, 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 한 실시양태에서, 벡터는 발현 벡터이다. 한 실시양태에서, 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵성 숙주 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 숙주 세포는 효모 세포, 포유동물 세포 (예컨대, CHO 세포 또는 293 세포), 또는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조에 적합한 다른 세포로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 숙주 세포는 원핵성 숙주 세포, 예컨대, E. 콜라이(E. coli) 세포이다.

[0028] 한 실시양태에서, 본 발명은 항체 또는 그의 단편 (바람직하게, 항원 결합 단편)을 코딩하는 핵산의 발현에 적합한 조건하에서 숙주 세포를 인큐베이션시키는 단계, 및 임의적으로, 항체 또는 그의 단편 (바람직하게, 항원 결합 단편)을 단리시키는 단계를 포함하는, 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편 (바람직하게, 항원 결합 단편)을 제조하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 방법은 숙주 세포로부터 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편 (바람직하게, 항원 결합 단편)을 회수하는 단계를 추가로 포함한다.

[0029] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 중 임의의 것 및 다른 물질, 예컨대, 세포독성제 또는 마커를 포함하는 면역접합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 면역접합체는 종양 (예컨대, 암) 또는 감염성 질환을 예방 또는 치료하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 종양은 종양 면역 회피이다. 바람직하게, 종양은 위장 종양 (예컨대, 암), 예컨대, 결장암이다. 바람직하게, 감염성 질환은 만성 감염이다.

[0030] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기술된, 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편 (바람직하게, 항원 결합 단편) 중 임의의 것, 또는 그의 면역접합체를 포함하는 조성물로서, 여기서, 바람직하게, 조성물은 제약 조성물인 것인 조성물을 제공한다. 한 실시양태에서, 조성물은 제약 보충 물질을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물, 예컨대, 제약 조성물은 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편, 또는 그의 면역접합체, 및 하나 이상의 다른 치료제 (예컨대, 화학요법제, 다른 항체, 세포독성제, 백신, 활성 항감염제, 또는 면역조절제, 예컨대, 공동 자극 분자의 활성제 또는 면역 체크포인트 분자의 억제제)의 조합을 포함한다.

[0031] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 종양 (예컨대, 암) 또는 감염을 예방 또는 치료하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 종양은 종양 면역 회피이다. 바람직하게, 종양은 위장 종양 (예컨대, 암), 예컨대, 결장암. 바람직하게, 감염성 질환은 만성 감염이다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 본원에 기술된 임의의 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편, 제약 조성물, 또는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체 또는 개체에서 종양 (예컨대, 암) 또는 감염성 질환을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 종양은 종양 면역 회피이다. 한 실시양태에서, 종양은 위장 종양 (예컨대, 암), 예컨대, 결장암이다. 한 실시양태에서, 감염성 질환은 만성 감염이다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 또한 대상체에서 종양 (예컨대, 암) 또는 감염을 치료하기 위한 의약 제조를 위한 본원에 기술된 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편 중 임의의 것의 용도에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 종양은 종양 면역 회피이다. 한 실시양태에서, 종양은 위장 종양 (예컨대, 암), 예컨대, 결장암이다.

대, 암), 예컨대, 결장암이다. 한 실시양태에서, 감염성 질환은 만성 감염이다.

[0032] 일부 추가 실시양태에서, 본원에 기술된 예방 또는 치료 방법은 대상체 또는 개체에게 하나 이상의 요법 (예컨대, 치료 방식 및/또는 다른 치료제)을 수행하는 단계로 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료 방식으로 는 외과 치료 및/또는 방사선 요법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다른 치료제는 화학요법제, 세포독성제, 백신, 활성 항감염제, 다른 항체, 및 면역조정제 (예컨대, 공동 자극 분자 활성제, 또는 면역 체크포인트 분자 억제제)로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0033] 일부 실시양태에서, 대상체 또는 개체는 비-인간 동물, 예컨대, 포유동물, 바람직하게, 인간이다.

[0034] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 샘플을 본원에 기술된 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편 중 임의의 것과 접촉시키는 단계; 및 (b) 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편 및 PD-L1의 복합체의 형성을 검출하는 단계를 포함하는, 샘플 중 PD-L1을 검출하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 검출가능하게 표지된다.

[0035] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편을 포함하는 키트 또는 인공물에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 키트 또는 인공물은 본원에 기술된 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편 및 임의적 제약 보충 물질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트 또는 인공물은 종양 또는 감염을 치료하기 위해 약물을 투여하는 것에 관한 설명서를 추가로 포함한다.

[0036] 본 발명은 또한 본원에 기술된 실시양태 중 임의의 것의 임의 조합을 포함한다. 본원에 기술된 실시양태 중 임의의 것 또는 그의 임의 조합(들)은 본원에 기술된 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편, 방법 및 용도 중 임의의 것 및 모두에 적용가능하다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도면의 간단한 설명

도 1은 FACS에 의해 측정된, 본 발명의 항-PD-L1 항체의 CHO-PDL1 세포에의 결합을 보여주는 것이다.

도 2는 FACS에 의해 측정된, 본 발명의 항-PD-L1 항체의 CHO-PDL1 세포에의 결합을 보여주는 것이다.

도 3은 MOA 검정법에 의해 측정된, PD-1/PD-L1 상호작용에 대한 본 발명의 항체의 차단 활성을 보여주는 것이다.

도 4a 및 4b는 MLR 검정법에 의해 측정된, 본 발명의 항체에 의한 T 세포의 활성화 (IL-2의 상대적 발현)를 보여주는 것이다.

도 5a 및 5b는 MLR 검정법에 의해 측정된, 본 발명의 항체에 의한 T 세포의 활성화 (IFN- γ 의 상대적 발현)를 보여주는 것이다.

도 6은 종양에 대한 본 발명의 항체의 억제 효과를 보여주는 것이다.

도 7은 항-LAG-3 항체와 함께 조합된 본 발명의 항체의 억제 효과를 보여주는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 상세한 설명

[0039] 약어

[0040] 달리 언급되지 않는 한, 본 명세서에서 약어는 하기 의미를 갖는다:

[0041] 하기 약어가 사용된다:

[0042] ADCC 항체-의존성 세포-매개 세포독성

[0043] CDC 보체 의존성 세포독성

[0044] CDR 면역글로불린의 가변 영역 중 상보성 결정 영역

[0045] CHO 차이나이즈 햄스터 난소

[0046] EC₅₀ 효력 또는 결합의 50%를 얻는 데 필요한 농도

- [0047] K_D 평형 해리 상수
- [0048] ELISA 효소 결합 면역흡착 검정법
- [0049] FACS 형광 활성화 세포 분류
- [0050] MOA 작용 기전
- [0051] MLR 혼합 림프구 반응
- [0052] FR 항체 프레임워크 영역
- [0053] IC_{50} 50% 억제시키는 데 필요한 농도
- [0054] Ig 면역글로불린
- [0055] 카바트(Kabat) 엘빈 A. 카바트(Elvin A. Kabat) (문헌 [(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.])에 의해 확립된 면역글로불린 정렬 및 넘버링 체계
- [0056] mAb/Mab/MAB 모노클로날 항체
- [0057] PCR 중합효소 연쇄 반응
- [0058] IFN 인터페론
- [0059] VL 경쇄 가변 영역
- [0060] VH 중쇄 가변 영역
- [0061] LC 경쇄
- [0062] HC 중쇄
- [0063] HCDR 중쇄 상보성 결정 영역
- [0064] LCDR 경쇄 상보성 결정 영역
- [0065] **정의**
- [0066] 하기에서 본 발명을 상세하게 기술하기 이전에, 본 발명은 달라질 수 있는 바, 본 발명이 본원에 기술된 특정 방법, 프로토콜 및 시약에 제한되지 않는다는 것을 이해하여야 한다. 또한, 본원에서 사용된 용어는 단지 특정 실시양태를 기술하기 위한 것이며, 첨부된 청구 범위에 의해서만 제한되는 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아님을 이해하여야 한다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 숙련가에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0067] 본 명세서를 설명하기 위해, 하기 정의가 사용될 것이며, 적절한 경우, 단수로 사용된 용어는 또한 복수형을 포함할 수 있고, 그 반대의 경우도 가능하다. 본원에서 사용되는 용어는 단지 특정 실시양태를 설명하기 위한 것이며, 제한하는 것으로 의도되지 않는다는 것을 이해하여야 한다.
- [0068] 수치와 함께 조합하여 사용되는 "약"이라는 용어는 언급된 수치보다 5%만큼 낮은 하한에서 언급된 수치보다 5%만큼 큰 상한까지인 범위의 수치를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0069] "친화도"는 분자 (예컨대, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예컨대, 항원) 사이의 모든 비-공유 상호작용의 총합의 강도를 지칭한다. 달리 언급되지 않는 한, 본원에서 사용될 때, "결합 친화도"는 결합 쌍 (예컨대, 항체 및 항원)의 구성원 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 내인적 결합 친화도를 지칭한다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 평형 해리 상수 (K_D)로 나타낼 수 있다. 친화도는 선행 기술에 공지된 것 및 본원에 기술된 것을 비롯한, 당업계에 공지된 일반 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0070] 본원에서 사용되는 바, "프로그램화된 세포 사멸 리간드 1," "PD-L1," "프로그램화된 사멸 리간드 1," "분화 클러스터 274," "CD274", 또는 "B7 동족체 1"이라는 용어는 포유동물, 예컨대, 영장류 (예컨대, 인간) 및 설치류 (예컨대, 마우스 및 래트)를 비롯한, 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 PD-L1을 지칭한다. 상기 용어는 "전장," 프로세싱되지 않은 PD-L1, 및 세포에서의 프로세싱으로부터 생성된 임의 형태의 PD-L1을 포

함한다. PD-L1은 막통과 단백질로서 또는 가용성 단백질로서 존재할 수 있다. 상기 용어는 또한 자연적으로 발생된 PD-L1의 변이체, 예컨대, 스플라이싱 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. PD-L1의 기본 구조는 4개 도메인: 세포외 Ig 유사 V형 도메인 및 Ig 유사 C2형 도메인, 막통과 도메인 및 세포질 도메인을 포함한다. 게놈 DNA 서열을 포함하는 인간 PD-L1 유전자에 관한 추가 정보는 NCBI 유전자 번호(NCBI Gene ID No.) 29126 하에서 살펴볼 수 있다. 게놈 DNA 서열을 포함하는 인간 PD-L1 유전자에 관한 추가 정보는 NCBI 유전자 번호 60533하에서 살펴볼 수 있다. 예시적인 전장의 인간 PD-L1 단백질의 아미노산 서열은 예컨대, NCBI 수탁 번호 NP_001254653 또는 유니프로트(UniProt) 수탁 번호 Q9NZQ7하에서 살펴볼 수 있고, 예시적인 전장의 마우스 PD-L1 단백질의 서열은 예컨대, NCBI 수탁 번호 NP_068693 또는 유니프로트 수탁 번호 Q9EP73하에서 살펴볼 수 있다.

[0071] 본원에서 사용되는 바, "항-PD-L1 항체," "항-PD-L1," "PD-L1 항체" 또는 "PD-L1-결합 항체"라는 용어는 충분한 친화도로 PD-L1 단백질에 결합할 수 있는 항체, 또는 그의 단편을 지칭한다. 한 실시양태에서, 항-PD-L1 항체가 비-PD-L1 단백질에 결합하는 정도는 예컨대, 방사성면역검정법 (RIA) 또는 생물-광학 간섭 검정법 또는 MSD 검정법에 의해 측정된 바, 항체가 PD-L1 단백질에 결합하는 정도의 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 또는 약 90% 또는 그 초과 미만이다.

[0072] 본원에서 사용되는 바, "모노클로날 항체" 또는 "mAb" 또는 "Mab"란, 그의 제조 방법이 아닌, 예컨대, 진핵성, 원핵성, 또는 파지 클론으로부터 유래된 단일 카피 또는 클론의 항체를 지칭한다. 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 예컨대, 하이브리도마 기술, 재조합 기술, 파지 디스플레이 기술, 합성 기술, 예컨대, CDR 이식, 또는 상기 기술 또는 당업계에 공지된 다른 기술의 조합에 의해 제조될 수 있다.

[0073] "천연 항체"란, 상이한 구조의 자연적으로 발생된 면역글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들어, 천연 IgG 항체는 디설피드 결합으로 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 구성된, 약 150,000 달톤의 이중사량체 당단백질이다. N-말단에서 C-말단 방향으로, 각 중쇄는 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인으로도 또한 지칭되는 가변 영역 (VH), 이어서, 3개의 불변 도메인 (CH1, CH2, 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N-말단에서 C-말단 방향으로, 각 경쇄는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인으로도 또한 지칭되는 가변 영역 (VL), 이어서, 불변 경쇄 (CL) 도메인을 갖는다. 항체의 경쇄는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 불리는 2가지 타입 중 하나로 지정될 수 있다. "천연 서열의 Fc 영역"은 자연상에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연 서열의 인간 Fc 영역은 천연 서열 (비-A 및 A 알로타입)의 인간 IgG1 Fc 영역, 천연 서열의 인간 IgG2 Fc 영역, 천연 서열의 인간 IgG3 Fc 영역, 및 천연 서열의 인간 IgG4 Fc 영역, 및 상기의 자연적으로 발생된 변이체를 포함한다.

[0074] "항체 단편"이란, 무손상 항체의 일부를 포함하고, 무손상 항체가 결합하는 항원에 결합하는, 무손상 항체와 상이한 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예로는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아마디; 선형 항체; 단일 쇠 항체 (예컨대, scFv); 단일 도메인 항체; 2가 또는 이중특이적 항체 또는 그의 단편; 카멜리드 항체; 및 항체 단편으로부터 형성된 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0075] 본원에서 사용되는 바, "에피토프"라는 용어는 항체 분자와 특이적으로 상호작용하는 항원 (예컨대, 인간 PD-L1)의 모이어티를 지칭한다. (본원에서 항원 결정기로 지칭되는) 상기 모이어티는 일반적으로 예컨대, 아미노산 측쇄 또는 당 측쇄와 같은 요소를 포함하거나, 또는 그의 일부이다. 항원 결정기는 당업계에 공지되거나, 또는 본원에 개시된 방법을 사용하여 (예컨대, 결정학에 의해 또는 수소-중수소 교환에 의해) 정의될 수 있다. 항원 결정기와 특이적으로 상호작용하는 항체 분자 중 적어도 하나의 모이어티 또는 일부 모이어티는 일반적으로 CDR 내에 위치한다. 일반적으로, 에피토프는 특이적인 3차원 구조적 특징을 갖는다. 일반적으로, 에피토프는 특이적인 전하 특징을 갖는다. 일부 에피토프는 선형 에피토프인 반면, 나머지 다른 것은 입체형태 에피토프이다.

[0076] 참조 항체와 "동일한 또는 중첩 에피토프에 결합하는 항체"란, 경쟁 검정법에서 참조 항체의 그의 항원에의 결합의 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95% 또는 그 초과를 차단하는 항체를 지칭하거나, 또는 반대로, 참조 항체는 경쟁 검정법에서 항체의 그의 항원에의 결합의 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95% 또는 그 초과를 차단한다.

[0077] 그의 항원에의 결합에 대해 참조 항체와 경쟁하는 항체란, 경쟁 검정법에서 참조 항체의 그의 항원에의 결합의 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95% 또는 그 초과를 차단하는 항체를 지칭한다. 반대로, 참조 항체는 경쟁 검정법에서 항체의 그의 항원에의 결합의 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95% 또는 그 초과를 차단한다. 항체가 또 다른 항체와 경쟁하는지 여부를 결정하는 데 많은 타입의 경쟁적 결합 검정법, 예컨대, 예컨대, 직접 또는

간접 고체상 방사성면역검정법 (RIA), 직접 또는 간접 고체상 효소 면역검정법 (EIA), 샌드위치 경쟁 검정법 (예컨대, 문헌 [Stahli et al., 1983, Methods in Enzymology 9:242-253] 참조)이 사용될 수 있다.

[0078] 참조 항체의 그의 항원에의 결합을 억제시키는 (예컨대, 경쟁적으로 억제시키는) 항체란, 참조 항체의 그의 항원에의 결합의 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95% 또는 그 초과를 억제시키는 항체를 지칭한다. 반대로, 참조 항체는 항체의 그의 항원에의 결합의 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95% 또는 그 초과를 억제시킨다. 항체의 그의 항원에의 결합은 친화도 (예컨대, 평형 해리 상수)에 의해 측정될 수 있다. 친화도를 측정하는 방법은 당 업계에 공지되어 있다.

[0079] 참조 항체와 동일하거나, 또는 유사한 결합 친화도 및/또는 특이성을 나타내는 항체란, 참조 항체의 결합 친화도 및/또는 특이성의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95% 또는 그 초과를 가질 수 있는 항체를 지칭한다. 이는 당업계에 공지된, 임의의 결합 친화도 및/또는 특이성 측정 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0080] "상보성 결정 영역" 또는 "CDR 영역" 또는 "CDR"은 서열 중 고도로 가변성이고, 구조적으로 정의된 루프 ("초가변 루프")를 형성하고/거나, 항원-접촉 잔기 ("항원 접촉 지점")를 포함하는, 항체 가변 도메인 중의 영역이다. CDR은 주로 에피토프에의 결합을 담당한다. 중쇄 및 경쇄의 CDR은 일반적으로 CDR1, CDR2, 및 CDR3으로 지칭되고, N-말단으로부터 순차적으로 넘버링된다. 항체 중쇄의 가변 도메인에 위치하는 CDR은 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3으로 지칭되는 반면, 항체 경쇄의 가변 도메인에 위치하는 CDR은 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3으로 지칭된다. 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역의 주어진 아미노산 서열에서, 각 CDR의 정확한 아미노산 서열 경계는 예컨대, 항체의 3차원 구조 및 CDR 루프의 위상기하에 기초하는 코티아(Chothia) 체계 (문헌 [Chothia et al. (1989) Nature 342:877-883]; [Al-Lazikani et al., "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 273:927-948 (1997)]), 항체 서열 가변성에 기초한 카바트(Kabat) 체계 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th edition, US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)]), AbM (바스 대학 (University of Bath)), 콘택트(Contact) (유니버시티 칼리지 런던(University College London)), 인터내셔널 이뮤노제네틱스 데이터베이스(International ImMunoGeneTics database) (IMGT) (월드 와이드 웹상의 imgt.cines.fr/), 및 다수의 결정 구조를 이용한 유사도 전파 군집화에 기초한 노쓰 CDR 정의(North CDR definition) 체계를 비롯한, 다수의 널리 공지된 항체 CDR 지정 체계 중 어느 하나 또는 그의 조합을 사용하여 결정될 수 있다.

[0081] 예를 들어, 상이한 CDR 결정 방식에 따라, 각 CDR의 잔기는 하기와 같다.

CDR	카바트 방식	AbM 방식	코티아 방식	콘택트 방식
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
HCDR1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(카바트 넘버링 체계)				
HCDR1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(코티아 넘버링 체계)				
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101
(카바트 넘버링 체계)				

[0082]

[0083] CDR은 또한 참조 CDR 서열 (예컨대, 본 발명의 예시적인 CDR 중 임의의 것)과 동일한 카바트 넘버링 위치를 갖는 것에 기초하여 결정될 수 있다.

[0084] 달리 언급되지 않는 한, 본 발명에서, "CDR" 또는 "CDR 서열"이라는 용어는 상기 기술된 방식 중 임의의 것에 의해 결정된 CDR 서열을 포함한다.

[0085] 달리 언급되지 않는 한, 본 발명에서, 항체 가변 영역 중의 잔기 (중쇄 가변 영역 잔기 및 경쇄 가변 영역 잔기 포함)의 위치를 지칭할 때, 이는 카바트 넘버링 체계에 따른 넘버링 위치를 지칭한다 (문헌 [Kabat et al.,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]).

- [0086] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체의 CDR의 경계는 예컨대, 표 1에 제시된 서열의 항체와 같이, 코티아 규칙 또는 카바트 규칙에 의해 결정된다.
- [0087] 상이한 지정 체계에 의해 획득한 항체의 가변 영역의 CDR의 경계는 상이할 수 있다는 점에 주의하여야 한다. 즉, 상이한 지정 체계에 의해 정의된 항체의 가변 영역의 CDR 서열은 상이하다. 그러므로, 본 발명에서 정의된 특이적인 CDR 서열을 갖는 항체를 정의하는 것에 관한 한, 항체의 범주는 또한, 그의 가변 영역 서열이 특이적인 CDR 서열을 포함하지만, 상이한 프로토콜 (예컨대, 상이한 지정 체계 규칙 또는 그의 조합)이 적용됨에 따라, 본 발명에 의해 정의된 특이적인 CDR 경계와 상이한 청구된 CDR 경계를 갖는 상기 항체도 포함한다.
- [0088] 상이한 특이성 (즉, 상이한 항원에 대한 상이한 결합 부위)를 갖는 항체는 (동일한 지정 체계하에서) 상이한 CDR을 갖는다. 그러나, CDR이 항체마다 다르지만, CDR 내의 단지 제한된 개수의 아미노산 위치만이 항원 결합에 직접적으로 관여하다. 카바트, 코티아, AbM, 콘택트, 및 노쓰 방법 중 적어도 2개를 사용하여 최소 중첩 영역이 결정될 수 있고, 이로써, 항원 결합을 위한 "최소 결합 단위"를 제공할 수 있다. 최소 결합 단위는 CDR의 서브 부분일 수 있다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 나머지 CDR 서열의 잔기는 항체 구조 및 단백질 폴딩에 의해 결정될 수 있다. 그러므로, 본원에 제공된 CDR의 임의의 변이체 또한 본 발명에서 고려될 것이다. 예를 들어, 한 CDR 변이체에서, 최소 결합 단위 중의 아미노산 잔기는 변함없이 그대로 유지될 수 있는 반면, 카바트 또는 코티아에 의해 정의된 그 나머지 CDR 잔기는 보존적 아미노산 잔기에 의해 치환될 수 있다.
- [0089] 5개의 주요 항체 부류: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 공지되어 있고, 상기 부류 중 수개는 하위부류 (이소타입), 예컨대, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, 및 IgA₂로 추가로 분류될 수 있다. 상이한 부류의 면역글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ , 및 μ 로 지칭된다.
- [0090] "IgG 형태의 항체"는 항체의 중쇄 불변 영역이 속하는 IgG 형태를 지칭한다. 동일한 타입의 모든 항체의 중쇄 불변 영역은 동일하고, 상이한 타입의 항체의 중쇄 불변 영역은 상이하다. 예를 들어, IgG1 형태의 항체는 그의 중쇄 불변 영역의 Ig 도메인이 IgG1의 Ig 도메인인 것을 지칭한다.
- [0091] "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"란, 특정 세포독성 세포 (예컨대, NK 세포, 호중구 및 대식세포) 상에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합하는 분비된 면역글로불린이 상기 세포독성 이펙터 세포가 항원 보유 표적 세포에 특이적으로 결합하고, 이어서, 세포독성으로 표적 세포를 사멸시킬 수 있도록 하는 세포독성의 한 형태를 지칭한다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 오직 NK 세포만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII, 및 Fc γ RIII를 발현한다. 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)] 464페이지의 표 3에는 조혈 세포 상의 FcR 발현이 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 예컨대, 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337, 또는 미국 특허 번호 6,737,056 (프레스타(Presta))에 기술되어 있는 바와 같이, 시험관내 ADCC 검정법을 수행할 수 있다. 상기 검정법에 유용한 이펙터 세포로는 PBMC 및 NK 세포를 포함한다. 임의적으로/대안적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예컨대, 동물 모델, 예컨대, 문헌 [Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 것과 같은 동물 모델에서 사정될 수 있다.
- [0092] 본원에서 사용되는 "세포독성제" 또는 "세포독성 인자"라는 용어는 세포 기능을 억제 또는 방해하고/거나, 세포 사멸 또는 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 세포독성제의 예로는 W02015/153513, W02016/028672, W02015/138920, 및 W02016/007235에 개시되어 있는 것이 있다.
- [0093] 본원에 기술된 바와 같은 "치료제"라는 용어는 항-PD-L1 항체와 함께 조합하여 사용될 수 있는 화학요법제, 세포독성제, 백신, 다른 항체, 활성 항감염제, 면역조절제, 예컨대, W02016/007235 또는 W02010/077634 또는 US60/696426에 개시되어 있는 물질 중 임의의 것을 비롯한, 예방 또는 치료 종양 (예컨대, 암) 및 감염 (예컨대, 만성 감염)에 효과적인 임의의 물질을 포함한다.
- [0094] "화학요법제"로는 암 치료에서 유용한 화학 화합물을 포함한다. 화학요법제의 예로는 W02016/007235, W02010/077634, US60/696426 또는 W02016/061142, US61/264061, 또는 W02016/007235에 개시되어 있는 것이 있다.
- [0095] "시토카인"이라는 용어는 세포 집단에 의해 방출되고, 또 다른 세포에 대해 세포내 매개인자로서 작용하는 단백질에 대한 일반 용어이다. 상기 시토카인의 예로는 림포카인 및 모노카인; 인터류킨 (IL), 예컨대, IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, 및 IL-15; 종양 괴사 인자, 예컨대,

TNF- α 또는 TNF- β ; 및 LIF 및 kit 리간드 (KL) 및 γ -인터페론을 비롯한 다른 폴리펩티드 인자가 있다. 본원에서 사용되는 바, 시토카인이라는 용어는 천연 공급원으로부터의 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질, 및 인공 합성에 의해 제조된 소분자 엔티티를 비롯한, 천연 서열의 시토카인의 생물학적으로 활성인 등가물, 및 그의 약리학적으로 허용되는 유도제 및 염을 포함한다.

[0096] "공동 자극 분자"라는 용어는 T 세포 상의 공동 자극 리간드에 특이적으로 결합하여, T 세포 매개 공동 자극 반응 (예를 들어, 제한하는 것은 아니지만, 증식)을 허용하는 관련된 결합 파트너를 지칭한다. 공동 자극 분자는 항원 수용체 이외의, 고도로 효율적인 면역 반응을 위해 요구되는 세포 표면 분자 또는 그의 리간드이다. 공동 자극 분자로는 MHC 클래스 I 분자, TNF 수용체 단백질, 면역글로불린 유사 단백질, 시토카인 수용체, 인테그린, 신호전달 림프구성 활성화 분자 (SLAM 단백질), NK 세포 활성화 수용체, BTLA, 톨(Toll) 리간드 수용체, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFTR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, Nkp80 (KLRF1), Nkp44, Nkp30, Nkp46, CD19, CD4, CD8 α , CD8 β , IL2R β , IL2R γ , IL7R α , ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, 및 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0097] "활성제" 또는 "효능제"라는 용어는 주어진 분자 (예컨대, 공동 자극 분자)의 특정 파라미터 (예컨대, 활성)를 증가시키는 물질을 포함한다. 예를 들어, 상기 용어는 주어진 분자의 활성 (예컨대, 공동 자극 활성)을 적어도 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 또는 그 초과만큼 증가시키는 물질을 포함한다.

[0098] "면역 체크포인트 분자"라는 용어는 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포의 세포 표면 상의 분자 그룹을 지칭한다. 이들 분자는 항-종양 면역 반응을 하향조절하거나, 또는 억제시키는 "브레이크"로서 효과적으로 작용할 수 있다. 면역 체크포인트 분자로는 면역 세포를 직접적으로 억제시키는 프로그램화된 사멸 수용체 1 (PD-1), 세포독성 T 림프구 항원 4 (CTLA-4), B7H1, B7H4, OX-40, CD137, CD40, 및 LAG-3을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0099] "억제제" 또는 "길항제"라는 용어는 주어진 분자 (예컨대, 면역 체크포인트 억제성 단백질)의 특정 파라미터 (예컨대, 활성)를 감소시키는 물질을 포함한다. 예를 들어, 상기 용어는 주어진 분자의 활성 (예컨대, LAG-3 활성)을 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 그 초과만큼 억제시키는 물질을 포함한다. 그러므로, 억제 효과는 100%일 필요는 없다.

[0100] "디아바디"라는 용어는 한 폴리펩티드 쇠 (VH-VL)로 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함하는, 2개의 항원 결합 부위를 갖는 항체 단편을 지칭한다. 너무 짧아서 각 쇠 중의 두 도메인 사이에 쌍을 형성할 수 없는 링커를 사용하여, 도메인이 또 다른 쇠의 상보적인 도메인과 쌍을 형성하여 2개의 항원 결합 부위를 형성할 수 있도록 한다. 디아바디는 2가 또는 이중특이적일 수 있다. 디아바디는 예컨대, EP 404,097; WO 1993/01161; 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)]; 및 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 더욱 상세하게 기술되어 있다. 트리바디 및 테트라바디 또한 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)]에 기술되어 있다.

[0101] "기능성 Fc 영역"은 천연 서열의 Fc 영역의 "이펙터 기능"을 갖는다. 예시적인 "이펙터 기능"으로는 C1q 결합, CDC, Fc 수용체 결합, ADCC, 식세포작용, 세포 표면 수용체 (예컨대, B 세포 수용체, 또는 BCR) 하향조절 등을 포함한다. 상기 이펙터 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인 (예컨대, 항체 가변 도메인)과 연관이 있는 것을 필요로 하고, 이는 다양한 검정법, 예컨대, 본원에 개시된 것을 사용하여 사정될 수 있다.

[0102] "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역에 기인하고, 항체 이소타입에 따라 달라질 수 있는 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 이펙터 기능의 예로는 C1q 결합 및 보체-의존성 세포독성 (CDC), Fc 수용체 결합, 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC), 식세포작용, 세포 표면 수용체 (예컨대, B 세포 수용체) 하향조절, 및 B 세포 활성화를 포함한다.

[0103] "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고, 이펙터 기능을 수행하는 백혈구를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 세포는 적어도 Fc γ RIII를 발현하고, ADCC의 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예로는 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC), 자연 살세포 (NK), 단핵구s, 세포독성 T 세포, 및 호중구를 포함한다. 이펙터 세포는 그의 천연 공급원, 예컨대, 혈액으로부터 분리될 수 있다.

- [0104] "유효량"이라는 용어는, 치료 또는 예방을 필요로 하는 환자에게 단일 또는 다중 투여량으로 투여된 후, 상기 환자에서 예상되는 효과를 일으키는, 본 발명의 항체 또는 단편 또는 접합체 또는 조성물의 양 또는 투여량을 지칭한다. 유효량은 하기와 같은 다양한 인자: 종, 예컨대, 포유동물; 그의 크기, 연령, 및 일반적인 건강 상태; 특정 관련 질환; 질환의 정도 또는 중증도; 개별 환자에서의 반응; 투여되는 특정 항체; 투여 경로; 투여되는 제제의 생체이용률 특징; 선택된 투약 요법; 및 임의의 동시 요법의 사용을 고려함으로써 당업자와 같은 주치의에 의해 쉽게 결정될 수 있다.
- [0105] "치료 유효량"은 원하는 기간 동안 필요한 투여량으로 원하는 치료 결과를 달성하는 데 효과적인 양을 지칭한다. 항체 또는 항체 단편, 또는 그의 접합체 또는 조성물의 치료 유효량은 예컨대, 개체의 질환 상태, 연령, 성별, 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 유도할 수 있는 항체 또는 항체 일부의 능력을 비롯한, 다양한 인자에 따라 달라질 수 있다. 치료 유효량은 또한 항체 또는 항체 단편, 또는 그의 접합체 또는 조성물의 임의의 독성 또는 원치않는 효과보다 치료상 유익한 효과가 더 큰 상기와 같은 양이다. "치료 유효량"은 바람직하게 측정가능한 파라미터 (예컨대, 종양 성장률)를 치료받지 않은 대상체와 비교하여 적어도 약 20%, 더욱 바람직하게, 적어도 약 40%, 더욱더 바람직하게, 적어도 약 50%, 60%, 또는 70%, 및 더욱더 바람직하게, 적어도 약 80% 또는 90%만큼 억제시킨다. 측정가능한 파라미터 (예컨대, 암)를 억제시킬 수 있는 화합물의 능력은 인간 종양에서의 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 임의적으로, 조성물의 상기 특성은, 당업자에게 공지된 검정법에 의해 시험관내에서 측정될 수 있는 화합물의 억제 능력을 조사함으로써 평가될 수 있다.
- [0106] "예방 유효량"은 원하는 기간 동안 필요한 투여량으로 원하는 예방 결과를 달성하는 데 효과적인 양을 지칭한다. 일반적으로 예방 용량은 질환 발병 이전에 또는 그의 초기 단계에서 대상체에 투여되기 때문에, 예방 유효량은 치료 유효량보다 더 적을 것이다.
- [0107] 본 발명에 적합한 "항체 및 그의 항원 결합 단편"으로는 폴리클로날, 모노클로날, 1가, 이중특이적, 이중접합체, 다중특이적, 재조합, 이중성, 이중하이브리드, 키메라, 인간화된 것 (특히 CDR 이식된 것), 탈면역화된 것, 또는 인간 항체, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fab 발현 라이브러리로부터 생성된 단편, Fd, Fv, 디술포드 안정화된 Fv (dsFv), 단일쇄 항체 (예컨대, scFv), 디아바디 또는 테트라바디 (문헌 [Holliger P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (14), 6444-6448]), 나노바디 (이는 또한 단일 도메인 항체로도 지칭된다), 항-이디오타입 (항-Id) 항체 (예컨대, 본 발명의 항체에 대한 항-Id 항체), 및 상기 중 임의의 것의 에피토프 결합 단편을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0108] "Fab" 단편은 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 이는 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인도 포함한다. Fab' 단편은 (항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는) 일부 잔기의 중쇄 CH1 도메인의 카르복실 말단에의 부가에 기인하여 Fab 단편과는 다르다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기가 유리 티올 기를 보유하는 Fab'를 지칭한다. F(ab')₂ 항체 단편은 원래 Fab' 단편 사이에 힌지 시스테인을 포함하는 쌍으로 형성된 Fab' 단편으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링 또한 공지되어 있다.
- [0109] "Fc 영역"이라는 용어는 본원에서 사용되는 바, 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는, 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의한다. 상기 용어는 천연 서열의 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 중쇄의 Cys226 또는 Pro230부터 카르보닐 말단까지이다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 리신 (Lys447)이 존재할 수 있거나, 또는 존재하지 않을 수 있다. 달리 언급되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변 영역에서 아미노산 잔기의 넘버링은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991]에 기술된 바와 같은 EU 인덱스로도 불리는 EU 넘버링 체계에 기초한다.
- [0110] "가변 영역" 또는 "가변 도메인"이라는 용어는 항체의 항원에의 결합에 관여하는 항체의 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 대개 유사한 구조를 갖고, 여기서, 각 도메인은 4개의 프레임워크 영역 (FR) 및 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 함유한다 (예컨대, 문헌 [Kindt et al., Kuby Immunology, 6th Ed., W.H. Freeman and Co. p91 (2007)] 참조). 항원 결합 특이성을 제공하는 데 단일 VH 또는 VL 도메인이면 충분할 수 있다. 추가로, 특정 항원에 결합하는 항체로부터의 VH 또는 VL 도메인은 각각 상보성 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해, 항원에 결합하는 항체를 단리시키는 데 사용될 수 있다. 예컨대, 문헌 [Portolano et al., J. Immunol., 150:880-887 (1993)]; [Clarkson et al., Nature,

352:624-628 (1991)]을 참조한다.

- [0111] "프레임워크" 또는 "FR"은 상보성 결정 영역 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인: FR1, FR2, FR3, 및 FR4로 구성된다. 그러므로, CDR 및 FR 서열은 일반적으로 하기 중쇄 가변 도메인 (VH) (또는 경쇄 가변 도메인 (VL)) 서열로 나타난다:
- [0112] FR1-HCDR1 (LCDR1)-FR2-HCDR2 (LCDR2)-FR3-HCDR3 (LCDR3)-FR4.
- [0113] 달리 언급되지 않는 한, 항체의 다양한 도메인 중의 잔기의 넘버링은, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Science Health, Bethesda, MD, 1991]에 기술된 바와 같은 EU 인덱스로도 불리는 EU 넘버링 체계에 기초한다.
- [0114] "전장의 항체," "완전 항체" 및 "무손상 항체"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 이는 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖는 항체 또는 본원에 정의된 바와 같은 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.
- [0115] "Fv"는 무손상 항원 결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 한 실시양태에서, 이중 쇄 Fv 타입은 밀접, 비 공유적으로 회합된 이량체로 1개의 중쇄 가변 도메인 및 1개의 경쇄 가변 도메인으로 구성된다. 단일 쇄 Fv (scFv) 타입에서, 1개의 중쇄 가변 도메인 및 1개의 경쇄 가변 도메인은 가요성 펩티드 링커를 통해 공유적으로 연결될 수 있고, 이로써, 경쇄 및 중쇄는 이중 쇄 타입의 "이량체" 구조와 유사한 구조로 회합될 수 있다. 상기 형상으로, 각 가변 도메인의 3개의 CDR이 VH-VL 이량체의 표면 상의 항원 결합 부위를 정의한다. 요약하면, 6개의 CDR이 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그럼에도 불구하고, 비록 친화도는 무손상 결합 부위보다는 더 낮지만, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 CDR의 Fv 중 절반만을 함유하는 것)은 항원을 인식하고, 그에 결합할 수 있는 능력을 갖는다. scFv의 리뷰를 위해, 예컨대, 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Edited by Rosenberg and Moore, (Springer-Verlag, New York, 1994), pages 269-315]를 참조한다.
- [0116] "숙주 세포," "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"이라는 용어는 상호교환적으로 사용되며, 상기 세포의 자손 세대를 비롯한, 외인성 핵산이 도입된 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함하고, 이는 1차 형질전환된 세포, 및 계대수와는 상관없이, 그로부터 유래된 자손 세대를 포함한다. 자손 세대는 핵산 내용물이 모체 세포와 완전히 동일하지 않을 수도 있지만, 돌연변이를 함유할 수 있다. 최초 형질전환된 세포로부터 스크리닝되거나, 또는 선택된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손 세대가 본원에 포함된다.
- [0117] "인간 항체"란, 인간 또는 인간 세포에 의해 생성된 항체 또는 인간 항체 라이브러리 또는 다른 인간 항체 코딩 서열을 이용하는 비-인간 공급원으로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체를 지칭한다. 인간 항체에 관한 상기 정의는 비-인간 항원 결합 잔기를 함유하는 인간화 항체를 명시적으로 배제한다.
- [0118] "인간 공통 프레임워크"란, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택에서 가장 빈번하게 존재하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크를 지칭한다. 일반적으로, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 서브타입으로부터의 선택이다. 일반적으로, 서열의 서브타입은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Public Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), Volumes 1-3]에 개시되어 있는 서브타입이다. 한 실시양태에서, VL에 대해, 서브타입은 문헌 [Kabat et al. (상기 참조)]에서와 같은 서브타입 카파 I이다. 한 실시양태에서, VH에 대해, 서브타입은 문헌 [Kabat et al. (상기 참조)]에서와 같은 서브타입 III이다.
- [0119] "인간화" 항체는 비-인간 CDR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 적어도 하나, 전형적으로 두 가변 도메인 중 실질적으로 모두를 포함할 것이며, 여기서, 모든 또는 실질적으로 모든 CDR (예컨대, CDR)은 비-인간 항체의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 항체의 것에 상응한다. 인간화 항체는 임의적으로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체 (예컨대, 비-인간 항체)의 "인간화 형태"는 인간화된 항체를 지칭한다.
- [0120] "암" 및 "암성"이라는 용어는 전형적으로 비조절되는 세포 성장을 특징으로 하는, 포유동물에서의 생리적 질환을 지칭하거나, 또는 기술한다. 암의 예로는 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 및 백혈병 또는 림프구성

(lymphoid) 악성 종양을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 암의 더욱 구체적인 예로는 편평 세포 암종(예컨대, 상피 편평 세포 암종), 폐암(소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐 선암종, 및 폐 편평 세포 암종 포함), 복막암, 간세포 암종, 위암(위장암 및 위장관 기질 암 포함), 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 요로암, 간 종양, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막암 또는 자궁암, 타액선 선암종, 신장암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간암, 항문암, 음경암, 흑색종, 표재성 미만성 흑색종(superficial diffuse melanoma), 악성 흑자 흑색종(lentigo maligna melanoma), 선단 흑색종(acral melanoma), 결절성 흑색종(nodular melanoma), 다발성 골수종 및 B 세포 림프종, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 모발상 세포 백혈병(hairy cell leukemia), 만성 골수성 백혈병, 및 이식 후 림프구증식성 장애 (PTLD: post-transplant lymphoproliferative disorder) 뿐만 아니라, 모반증(phakomatosis)과 연관된 비정상적인 혈관 증식, 부종(예컨대, 뇌 종양과 연관된 것), 및 메이그 증후군(Meigs syndrome), 뇌 종양 및 뇌암, 및 두부경부암, 및 관련된 전이를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체에 의한 치료에 적합한 암으로는 비소세포 폐암, 편평 세포 암종, 소세포 폐암, 복막암, 간세포 암종, 위장암, 췌장암, 신경교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포 암종, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막암 또는 자궁암, 타액선암, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간암, 백혈병, 및 두부경부암(상기 암의 전이성 형태 포함)을 포함한다.

[0121] "세포 증식성 장애" 및 "증식성 장애"라는 용어는 특정 정도의 비정상적인 세포 증식과 연관된 장애를 지칭한다. 한 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 암을 지칭한다.

[0122] "종양"이라는 용어는 악성인지 또는 양성인지 여부, 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직과 상관없이, 모든 신생물성 세포 성장 및 증식을 지칭한다. "암," "암성," "세포 증식성 장애," "증식성 장애," 및 "종양"이라는 용어는 본원에서 언급될 때, 상호 배타적이지 않다.

[0123] "감염성 질환"이라는 용어는 예를 들어, 바이러스성 감염, 박테리아성 감염, 진균성 감염, 또는 원생동물성, 예컨대, 기생충 감염에 의해 유발되는 질환을 지칭한다.

[0124] "종양 면역 회피"라는 용어는 종양이 면역 인식 및 제거를 회피하는 것을 지칭한다. 그러므로, 치료 개념으로서, 종양 면역은 "치료되고," 종양은 회피가 약화되었을 때, 면역계에 의해 인식되고, 공격을 받게 된다. 종양 인식의 예로는 종양 결합, 종양 위축, 및 종양 제거를 포함한다.

[0125] "만성 감염"이라는 용어는 감염체(예컨대, 병원체, 예컨대, 바이러스, 박테리아, 원생동물, 예컨대, 기생충, 진균 등)가 감염된 숙주에서 면역 반응을 유도하였지만, 급성 감염에서와 같이 숙주로부터 제거 또는 소거되지 않은 상기와 감염을 지칭한다. 만성 감염은 지속성, 잠복성 또는 지발성일 수 있다. 급성 감염(예컨대, 유행성 감기)은 일반적으로 수일 또는 수주 이내에 면역계에 의해 해소되는 반면, 지속성 감염(예컨대, B형 간염)은 비교적 더 낮은 수준으로 수개월, 수년, 수십년 또는 일생 동안 지속될 수 있다. 그에 반해, 잠복성 감염(예컨대, 단순 헤르페스)은 장기간 무증상 활성이 지속되고, 급속히 증가하는 고도 감염 및 병원체 수준 상승에 기인하여 때때로 중단되는 것을 특징으로 한다. 마지막으로, 지발성 감염은 질환 증상의 점진적이고, 연속적인 증가, 예컨대, 장기간의 잠복기, 이어서, 임상 증상 발병 후, 연장되고, 진전된 임상 과정을 특징으로 한다. 잠복성 및 지속성 감염과 달리, 만성 감염(예컨대, 피코르나바이러스 감염(picornaviruses infection), 비스나 바이러스(visna virus), 스크래피(scrapie), 크로이츠펬트 야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease))은 바이러스 증식의 급성기로 시작되지 않을 수도 있다. 만성 감염을 유발할 수 있는 예시적인 감염체로는 바이러스(예컨대, 시토크로마바이러스, EB 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 타입 I 및 II, 인간 면역결핍증 바이러스 타입 1 및 2, 인간 유두종 바이러스, 인간 T 림프구 바이러스 타입 1 및 2, 수두대상 포진 바이러스 등), 박테리아(예컨대, 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 리스테리아 종(*Listeria* spp.), 클레브시엘라 뉴모니아에(*Klebsiella pneumoniae*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 스탕필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 보렐리아 종(*Borrelia* spp.), 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 등), 원생동물 예컨대, 기생충(예컨대, 리슈마니아 종(*Leishmania* spp.), 플라즈모디움 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 쉬스토소마 종(*Schistosoma* spp.), 톡소플라즈마 종(*Toxoplasma* spp.), 트라파노소마 종(*Trypanosoma* spp.), 타에니아 카르시셉스(*Taenia carssiceps*) 등), 및 진균(예컨대, 아스페르길루스 종(*Aspergillus* spp.), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 콕시디오이데스 이미티스(*Coccidioides immitis*), 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 뉴모사이스티스 카리니이(*Pneumocystis carinii*) 등)를 포함한다. 추가 감염체로는 뇌 조직에서 추가로 단백질 미스폴딩을 전파시켜(세포 사멸, 조직 손상, 및 최종적으로는 사멸에 이르게 하는) 아밀로이드 플라크를 형성시킴으로써 뇌 또는 뉴런 구조에 영향을 주는 프리온 또는 미스폴딩된 단백질을 포함한다. 프리온 감염에 의해 유발되는 질환

의 예로는 크로이츠펔트 야콥병 및 그의 변종, 게르스트만-슈트로이스러-샤인커 증후군(Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome: GSS), 치명적 가족성 불면증(fatal familial insomnia: sFI), 쿠루병, 스크래피, 소에서 소 해면상 뇌병증(bovine spongiform encephalopathy: BSE) ("광우병"으로도 공지), 및 다양한 동물 형태의 다양한 다른 뇌병증 [예컨대, 전염성 밍크 뇌병증(transmissible mink encephalopathy: TME), 흰꼬리 사슴, 엘크, 및 노새 사슴에서의 만성 소모성 질환(chronic wasting disease: CWD), 고양이 해면상 뇌병증(feline spongiform encephalopathy), 니알라, 오릭스, 및 그레이터 쿠드에서의 외래 유제류 뇌병증(exotic ungulate encephalopathy: EUE), 타조의 해면상 뇌병증]을 포함한다.

[0126] "면역 접합체"는 세포독성제 또는 표지를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 하나 이상의 다른 물질에 접합된 항체이다.

[0127] 본원에서 사용되는 바, "표지"라는 용어는 작용제, 예컨대, 폴리뉴클레오티드 프로브 또는 항체에 직접 또는 간접적으로 접합, 또는 융합되고, 그에 접합 또는 융합된 작용제의 검출을 촉진시키는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 표지 그 자체는 검출가능한 것 (예컨대, 방사성 동위 원소 표지 또는 형광성 표지)이거나, 또는 효소적 표지화인 경우, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변화를 촉매화할 수 있다. 본 용어는 검출가능한 물질을 프로브 또는 항체에 커플링시킴으로써 (즉, 물리적으로 연결시킴으로써) 프로브 또는 항체를 직접 표지화하는 것, 및 직접 표지화된 또 다른 시약과 반응함으로써 프로브 또는 항체를 간접 표지화하는 것을 포함하는 것으로 의도된다. 간접 표지화의 예로는 형광 표지된 2차 항체를 사용한 1차 항체의 검출, 및 형광 표지된 스트렙토아비딘으로 검출될 수 있도록 하는 비오틴화된 DNA 프로브의 단부 표지화를 포함한다.

[0128] "개체" 또는 "대상체"로는 포유동물을 포함한다. 포유동물은 가축 (예컨대, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류 (예컨대, 인간 및 비-인간 영장류, 예컨대, 원숭이), 토끼, 및 설치류 (예컨대, 마우스 및 래트)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.

[0129] "단리된" 항체는 그의 자연 환경의 성분으로부터 분리된 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 예컨대, 전기영동 [예컨대, SDS-PAGE, 등전 집속 (IEF), 모세관 전기 영동] 또는 크로마토그래피 (예컨대, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해 측정된 바, 95% 또는 99% 초과 순도로 정제된다. 항체 순도를 사정하는 방법에 관한 리뷰를 위해, 예컨대, 문헌 [Flatman et al., J. Chromatogr., B848:79-87 (2007)]을 참조한다.

[0130] "단리된" 핵산은 그의 자연 환경의 성분으로부터 분리된 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산은 일반적으로 핵산 분자를 포함하는 세포에 함유되어 있지만, 염색체의 위치 또는 그의 천연 염색체 위치와 다른 염색체 위치에 존재하는 핵산 분자를 포함한다.

[0131] "항-PD-L1 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 단리된 핵산"은 항체 중쇄 또는 경쇄 (또는 그의 단편)를 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자로서, 단일 벡터 또는 별개의 벡터 중의 상기 핵산 분자를 포함하며, 상기 핵산 분자는 숙주 세포 중에 하나 이상의 위치에 존재하는 것을 지칭한다.

[0132] "핵산," "핵산 서열," "뉴클레오티드 서열," 또는 "폴리뉴클레오티드 서열," 및 "폴리뉴클레오티드"는 상호교환적으로 사용된다. 이들은 중합체 형태의 임의 길이의 뉴클레오티드 (데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드), 또는 그의 유사체를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥 또는 이중-가닥일 수 있고, 단일 가닥일 경우, 코딩 가닥 또는 비-코딩 (안티센스) 가닥일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예컨대, 메틸화된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드의 서열에는 비-뉴클레오티드 성분이 개재될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 중합화 후에, 예컨대, 표지화 성분과의 접합에 의해 추가로 변형될 수 있다. 핵산은 자연상 존재하지 않거나, 비천연 배열로 게놈 공급원, cDNA 공급원, 반합성 공급원, 또는 합성 공급원으로부터의 또 다른 폴리뉴클레오티드에 연결된다.

[0133] "폴리펩티드," "펩티드" 및 "단백질" (단일 체인 경우)이라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 임의의 길이의 아미노산 중합체를 지칭한다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 변형된 아미노산을 포함할 수 있고, 비-아미노산이 개재될 수 있다. 상기 용어는 또한 변형된 (예컨대, 디설피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 다른 조작, 예컨대, 표지화 성분과의 접합에 의해 변형) 아미노산 중합체를 포함한다. 폴리펩티드는 천연 공급원으로부터 단리될 수 있거나, 또는 진행 또는 원핵 숙주로부터 재조합 기술에 의해 제조될 수 있거나, 또는 합성 방법의 생성물일 수 있다.

[0134] 서열 사이의 서열 동일성 계산은 하기와 같이 수행된다.

[0135] 2개의 아미노산 서열, 또는 2개의 핵산 서열의 동일성(%)을 결정하기 위해, 서열은 최적의 비교 목적을 위해 정렬된다 (예컨대, gaps 최적의 정렬을 위해 제1 및 제2 아미노산에, 또는 핵산 서열 중의 하나 또는 그 둘 모두

에 도입될 수 있고, 비-상동성 서열은 비교 목적을 위해 폐기될 수 있다). 한 바람직한 실시양태에서, 비교 목적으로, 정렬된 참조 서열의 길이는 참조 서열의 길이의 적어도 30%, 바람직하게, 적어도 40%, 더욱 바람직하게, 적어도 50%, 60%, 및 더욱더 바람직하게, 적어도 70%, 80%, 90%, 100%이다. 이어서, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 비교한다. 제1 서열 내의 위치가 제2 서열 내의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드에 의해 점유될 때, 분자는 그 위치에서 동일한 것이다.

- [0136] 두 서열 사이의 서열 비교 및 동일성(%)의 결정은 수학 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다. 한 바람직한 실시양태에서, 두 아미노산 서열 사이의 동일성(%)은 Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 갭 가중치 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4 및 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6을 사용하는 GCG 소프트웨어 패키지의 GAP 프로그램에 통합된 니들만(Needleman) 및 운쉬(Wunsch) (문헌 [(1970) J. Mol. Biol., 48:444-453])의 알고리즘 (<http://www.gcg.com>에서 이용가능)을 사용하여 결정될 수 있다. 추가의 또 다른 바람직한 실시양태에서, 두 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성(%)은 NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 갭 가중치 40, 50, 60, 70, 또는 80 및 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5 또는 6을 사용하는 GCG 소프트웨어 패키지의 GAP 프로그램 (<http://www.gcg.com>에서 이용가능)을 사용하여 결정된다. 특히 바람직한 세트의 파라미터 (및 달리 언급되지 않는다면, 사용되어야 하는 파라미터)는 갭 페널티 12, 갭 연장 페널티 4, 및 프레임시프트 갭 페널티 5의 Blossum 62 스코어링 매트릭스이다.
- [0137] 두 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성(%)은 PAM120 가중화 잔기 표, 갭 길이 페널티 12 및 갭 페널티 4를 사용하는 ALIGN 프로그램 (버전 2.0) (문헌 [(1989) CABIOS, 4:11-17]) 내로 통합된 문헌 E. 메이어스(E. Meyers) 및 W. 밀러(W. Miller) 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0138] 추가로 또는 대안적으로, 본원에 기술된 핵산 서열 및 단백질 서열은 추가로 예컨대, 다른 패밀리 구성원 또는 관련 서열을 확인하기 위해 공개 데이터베이스에 대해 검색을 수행하기 위한 "질의 서열"로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 검색은 문헌 [Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol., 215:403-10]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램을 사용하여 수행될 수 있다. BLAST 뉴클레오티드 검색은 본 발명의 핵산 분자에 상동성인 뉴클레오티드 서열을 얻기 위해 NBLAST 프로그램, 점수 = 100, 워드 길이 = 12를 사용하여 수행될 수 있다. BLAST 단백질 검색은 본 발명의 단백질 분자에 상동성인 아미노산 서열을 얻기 위해 XBLAST 프로그램, 점수 = 50, 워드 길이 = 3을 사용하여 수행될 수 있다. 비교를 위한 갭이 도입된 정렬 결과를 얻기 위해, 문헌 [Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402]에 기술된 바와 같이, 갭이 도입된 BLAST가 사용될 수 있다. BLAST 및 갭이 도입된 BLAST 프로그램을 이용할 때, 각 프로그램 (예컨대, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터가 사용될 수 있다. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>를 참조한다.
- [0139] 본원에서 사용되는 바, "낮은 엄격성, 중간 정도의 엄격성, 높은 엄격성, 또는 매우 높은 엄격성 조건하에서의 하이브리드화"라는 용어는 하이브리드화 및 세척 조건을 기술한다. 하이브리드화 반응을 수행하기 위한 지침은 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6] (상기 문헌은 참조로 포함된다)에서 살펴볼 수 있다. 수성 및 비수성 방법이 상기 문헌에 기술되어 있고, 어느 한 방법이 사용될 수 있다. 본원에서 언급되는 구체적인 하이브리드화 조건은 하기와 같다: 1) 낮은 엄격성 하이브리드화 조건은 약 45°C에서 6X 염화나트륨/시트르산나트륨 (SSC), 이어서, 적어도 50°C에서 0.2 X SSC, 0.1% SDS에서 2회 세척이고 (낮은 엄격성 조건을 위해, 세척 온도는 55°C로 증가될 수 있다); 2) 중간 정도의 엄격성 하이브리드화 조건은 약 45°C에서 6X SSC, 이어서, 약 60°C에서 0.2 X SSC, 0.1% SDS에서 1회 이상의 세척이고; 3) 높은 엄격성 하이브리드화 조건은 약 45°C에서 6X SSC, 이어서, 65°C에서 0.2 X SSC, 0.1% SDS에서 1회 이상의 세척이고; 바람직하게, 4) 매우 높은 엄격성 하이브리드화 조건은 65°C에서 0.5 M 인산나트륨, 7% SDS, 이어서, 65°C에서 0.2 X SSC, 0.1% SDS에서 1회 이상의 세척이다. 매우 높은 엄격성 조건 (4)은 바람직한 조건이며, 달리 언급되지 않는다면, 사용되어야 하는 조건이다.
- [0140] "제약 조성물"이라는 용어는 제약 조성물에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이라도 하는 형태로 존재하고, 조성물을 투여받는 대상체에게 허용되지 않는 독성을 갖는 추가의 성분은 함유하지 않는 상기 조성물을 지칭한다.
- [0141] "제약 보충 물질"이라는 용어는 희석제, 애주번트, (예컨대, 프로인트 애주번트(Freund's adjuvant) (완전 및 불완전)), 부형제, 담체, 또는 안정제 등을 지칭하며, 이는 활성 물질과 함께 투여된다.
- [0142] 본원에서 사용되는 바, "치료" (또는 "치료하다" 또는 "치료하는")란, 기존의 증상, 장애, 병태 또는 질환의 진행 또는 중증도를 저속화, 방해, 정지, 경감, 중단, 감소, 또는 역전시키는 것을 지칭한다.

- [0143] 본원에서 사용되는 바, "예방" (또는 "예방하다" 또는 "예방하는")이란, 질환 또는 장애, 또는 특정 질환 또는 장애의 증상의 발병 또는 진행을 억제시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암의 가족력이 있는 대상체는 예방 요법을 위한 후보가 된다. 일반적으로, 암과 관련하여, "예방"이라는 용어는 특히, 암의 위험이 있는 대상체에서 암의 징후 또는 증상이 발병되기 이전에 약물을 투여하는 것을 지칭한다.
- [0144] "항감염제"라는 용어는 미생물, 예컨대, 바이러스, 박테리아, 진균, 또는 원생동물, 예컨대, 기생충의 성장을 특이적으로 억제 또는 제거하고, 투여 농도 및 투여 간격에서는 숙주에게 치명적이지 않은 임의의 분자를 포함한다. 본원에서 사용되는 바, 항감염제라는 항생제, 항박테리아제, 항바이러스제, 항진균제, 및 항원생동물제를 포함한다. 한 구체적인 측면에서, 항감염제는 투여 농도 및 투여 간격에서는 숙주에게 비독성이다.
- [0145] 항박테리아성 항감염제 또는 항박테리아제는 광범위하게 살균성 (즉, 직접적으로 사멸) 또는 정균성 (즉, 분열 방해)인 것으로 분류될 수 있다. 항박테리아성 항감염제는 좁은 범위의 항박테리아제 (즉, 오직 제한된 박테리아 서브타입, 예컨대, 그람 음성 등에만 영향을 미치는 것), 또는 광범위한 항박테리아제 (즉, 광범위한 다양한 종에 영향을 미치는 것)로 추가 분류될 수 있다. 예로는 아미카신, 젠타마이신, 겔다나마이신, 허비마이신, 무피로신, 푸란토인, 피라지나미드, 키누프리스틴/달포프리스틴, 리팜피신/리팜핀, 이소니아지드 및 피라지나미드 정제, 또는 티니다졸을 포함한다.
- [0146] "항바이러스제"라는 용어는 바이러스의 성장, 병원성, 및/또는 생존을 억제 및/또는 제거하는 임의의 물질을 포함한다. 이는 아시클로비르, 시도포비르, 지도부딘, 디다노신 (ddI, 비텍스(VIDEX)), 잘시타빈 (ddC, 히비드(HIVID)), 스타부딘 (d4T, 제리트(ZERIT)), 라미부딘 (3TC, 에피비르(EPIVIR)), 아바카비르 (지아겐(ZIAGEN)), 엠트리시타빈 (엠트리바(EMTRIVA)) 등을 포함한다.
- [0147] "항진균제"라는 용어는 진균의 성장, 병원성, 및/또는 생존을 억제 및/또는 제거하는 임의의 물질을 포함한다. 이는 예컨대, 나타마이신, 리모시딘, 필리핀, 니스타틴, 암포테리신 B, 칸디신, 파출리(patchouli), 님 종자유(neem seed oil), 코코넛유 등을 포함한다.
- [0148] "항원생동물제"라는 용어는 원생동물 유기체 (예컨대, 기생충)의 성장, 병원성, 및/또는 생존을 억제 및/또는 제거하는 임의의 물질을 포함한다. 항원생동물제의 예로는 항말라리아제, 예컨대, 퀴닌, 퀴니딘 등을 포함한다.
- [0149] 항박테리아제, 항바이러스제, 항진균제, 및 항원생동물제에 대해서, 예컨대, W02010/077634 등을 참조한다.
- [0150] 항감염제에 대해서는 또한 예컨대, W02014/008218, W02016/028672, W02015/138920 또는 W02016/061142를 참조한다.
- [0151] 본원에서 사용되는 바, "백터"라는 용어는 그에 연결된 또 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 상기 용어는 자기 복제 핵산 구조로서 작용하는 백터 뿐만 아니라, 내부로 백터가 도입되어진 숙주 세포의 게놈에 결합하는 백터를 포함한다. 일부 백터는 그가 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 상기 백터는 본원에서 "발현 백터"로 명명된다.
- [0152] "대상체/환자 샘플"이란, 환자 또는 대상체로부터 수득된 세포 또는 유체 수집물을 지칭한다. 조직 또는 세포 샘플의 공급원은 예컨대, 신선, 냉동 및/또는 보존된 기관 또는 조직 샘플 또는 생검 샘플 또는 천자 샘플로부터의 것과 같은 고체 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 성분; 체액, 예컨대, 뇌척수액, 양수, 복막액, 또는 간질액; 임신 또는 발달 동안의 어느 시점에서든 대상체로부터의 세포일 수 있다. 조직 샘플은 자연적으로 조직과 자연적으로 혼합되지 않은 화합물, 예컨대, 보존제, 항응고제, 완충제, 고정제, 영양소, 항생제 등을 포함할 수 있다. 종양 샘플의 예로는 종양 생검, 미세 바늘 흡인물, 기관지 세척액, 흉막액, 객담, 소변, 수술 표본, 순환 종양 세포, 혈청, 혈장, 순환 혈장 단백질, 복수, 종양으로부터 유래되거나, 또는 종양과 유사한 특성을 보이는 1차 세포 배양물 또는 세포주, 및 보존된 종양 샘플, 예컨대, 포르말린 고정, 파라핀 포매 종양 샘플 또는 냉동 종양 샘플을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0153] "패키지 인서트"라는 용어는 치료 제품의 적용과 관련된 적응증, 용법, 투여량, 투여, 조합 요법, 사용 금지 사항 및/또는 주의 사항에 관한 정보를 포함하는, 일반적으로 상기 치료 제품의 상업적 패키지에 함유되어 있는 설명서를 지칭하는 것으로 사용된다.
- [0154] **본 발명의 항체**
- [0155] 그러므로, 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 PD-L1에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 포유동물 PD-L1, 예컨대, 인간 PD-L1에 결합한다. 예를 들어, 항체 분자는 PD-

L1의 에피토프 (예컨대, 선형 또는 입체형태 에피토프)에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 분자는 PD-L1의 하나 이상의 세포의 도메인에 결합한다.

[0156] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편은 하기 특성 중 하나 이상의 것을 갖는다:

[0157] (1) 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편은 높은 친화도로 PD-L1 (예컨대, 인간 PD-L1)에 결합하고, 예를 들어, 약 50 nM 미만, 바람직하게, 약 20 nM 이하, 더욱 바람직하게, 약 15 nM 이하, 더욱 바람직하게, 약 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 또는 2 nM 이하, 및 가장 바람직하게, 약 1.5 nM, 1.4 nM, 1.3 nM, 1.2 nM, 1.1 nM, 1 nM, 0.9 nM, 또는 0.8 nM 이하의 평형 해리 상수 (K_D)로 PD-L1에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체는 0.1-10 nM, 바람직하게, 0.5-10 nM, 더욱 바람직하게, 0.6-10 nM, 0.7-8 nM, 및 0.7-5 nM, 및 가장 바람직하게, 0.5-1.5 nM, 0.7-1.5 nM, 및 0.7-1 nM의 K_D 로 PD-L1에 결합한다. 일부 실시양태에서, PD-L1은 인간 PD-L1이다. 일부 실시양태에서, 항체 결합 친화도는 생물학적 광학 간섭법 (예컨대, 포르테바이오 친화도 측정)을 사용하여 측정된다.

[0158] (2) 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 예를 들어, 약 4 nM, 3.5 nM, 3 nM, 2.9 nM, 2.8 nM, 2.7 nM, 2.6 nM, 2.5 nM, 2.4 nM, 2.3 nM, 2.2 nM, 2.1 nM, 2 nM, 1.9 nM, 1.8 nM, 1.7 nM, 또는 1.6 nM 이하의 EC_{50} 으로 인간 PD-L1을 발현하는 세포에 결합한다. 일부 실시양태에서, 결합은 유세포 분석법 (예컨대, FACS)을 사용하여 측정된다. 일부 실시양태에서, 인간 PD-L1을 발현하는 세포는 인간 PD-L1을 발현하는 CHO 세포이다.

[0159] (3) 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 예를 들어, 약 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0.9 nM, 0.8 nM, 또는 0.7 nM, 및 바람직하게, 0.1-1 nM, 0.5-1 nM, 0.6-1 nM, 0.6 nM, 0.7 nM, 0.8 nM, 0.9 nM, 또는 1 nM 이하의 EC_{50} 으로 PD-L1의 관련 활성을 차단한다. 일부 실시양태에서, PD-L1의 관련 활성은 PD-L1의 PD-1에의 결합이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 MOA 검정법에서 약 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0.9 nM, 0.8 nM, 또는 0.7 nM, 및 바람직하게, 0.1-1 nM, 0.5-1 nM, 0.6-1 nM, 0.6 nM, 0.7 nM, 0.8 nM, 0.9 nM, 또는 1 nM 이하의 EC_{50} 으로 PD-L1의 PD-1에의 결합을 억제시킨다. 일부 실시양태에서, 세포는 CHO 세포이다.

[0160] (4) T 세포 기능을 개선시킬 수 있는 본 발명의 항체 또는 그의 단편의 능력은 예컨대, 공지된 항-PD-L1 항체, 예컨대, 테센트릭보다 우수하다.

[0161] (5) 예를 들어, MLR에서 T 세포를 활성화시킬 수 있는 본 발명의 항체 또는 그의 단편의 능력은 예컨대, 공지된 항-PD-L1 항체, 예컨대, 테센트릭보다 우수하다.

[0162] (6) 예를 들어, MLR에서 IFN- γ 분비를 증가시킬 수 있는 본 발명의 항체 또는 그의 단편의 능력은 예컨대, 공지된 항-PD-L1 항체, 예컨대, 테센트릭보다 우수하다.

[0163] (7) 예를 들어, MLR에서 IL-2 분비를 증가시킬 수 있는 본 발명의 항체 또는 그의 단편의 능력은 예컨대, 공지된 항-PD-L1 항체, 예컨대, 테센트릭보다 우수하다.

[0164] (8) 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 공지된 항-PD-L1 항체 (예컨대, 테센트릭)보다 더 작은 점성을 띠고, 그러므로, 더 우수한 약물성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 제닉스 칼럼 크로마토그래피에서 약 10분, 약 9분, 또는 약 8분, 바람직하게, 약 7-9분, 및 바람직하게, 약 7-8.5분, 약 7.5-8.5분, 약 7-8분, 또는 약 7.5-8분, 예컨대, 약 7.5분, 7.6분, 7.7분, 7.8분, 7.9분, 8분, 8.1분, 8.2분, 8.3분, 8.4분, 8.5분 미만의 체류 시간 (RT)을 갖는다.

[0165] (9) 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 예를 들어, 하기: 종양-침윤성 림프구 증가, T 세포 수용체-매개 증식 증가, 또는 암 세포의 면역 회피 감소 중 하나 이상의 것을 유발하는, PD-L1의 하나 이상의 활성을 억제시킨다.

[0166] (10) 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편은 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 유도할 수 있다.

[0167] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 하기 특징들 중 하나 이상의 것을 갖는다:

[0168] (i) 본 발명의 항체 (예컨대, 표 3에 열거된 항체 중 임의의 것)와 동일하거나, 또는 유사한, PD-L1에 대한 친화도 및/또는 친화성을 보이는 특징;

[0169] (ii) 본 발명의 항체 (예컨대, 표 3에 열거된 항체 중 임의의 것)의 PD-L1에의 결합을 억제시키는 (예컨대, 경

쟁적으로 억제시키는) 특징;

[0170] (iii) 본 발명의 항체 (예컨대, 표 3에 열거된 항체 중 임의의 것)와 동일한 또는 중복 에피토프에 결합하는 특징;

[0171] (iv) PD-L1에의 결합에 대해 본 발명의 항체 (예컨대, 표 3에 열거된 항체 중 임의의 것)와 경쟁하는 특징;

[0172] (v) 본 발명의 항체 (예컨대, 표 3에 열거된 항체 중 임의의 것)의 하나 이상의 생물학적 특징을 갖는 특징.

[0173] **예시적인 항체**

[0174] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하고, 여기서, VH는

[0175] (i) 표 B에 열거된 항체 중 임의의 것의 VH 중에 함유되어 있는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR), 또는

[0176] (ii) (i)의 서열과 비교하여, 3개의 CDR 영역 중 총 적어도 하나 내지 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 바람직하게, 보존적 치환)을 포함하는 서열을 포함한다.

[0177] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서, VL은

[0178] (i) 표 B에 열거된 항체 중 임의의 것의 VL 중에 함유되어 있는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR), 또는

[0179] (ii) (i)의 서열과 비교하여, 3개의 CDR 영역 중 총 적어도 하나 내지 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 바람직하게, 보존적 치환)을 포함하는 서열을 포함한다.

[0180] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 VH 및 경쇄 가변 영역 VL을 포함하고, 여기서,

[0181] (a) VH는

[0182] (i) 표 B에 열거된 항체 중 임의의 것의 VH 중에 함유되어 있는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR), 또는

[0183] (ii) (i)의 서열과 비교하여, 3개의 CDR 영역 중 총 적어도 하나 내지 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 바람직하게, 보존적 치환)을 포함하는 서열을 포함하고/거나;

[0184] (b) VL은

[0185] (i) 표 B에 열거된 항체 중 임의의 것의 VL 중에 함유되어 있는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR), 또는

[0186] (ii) (i)의 서열과 비교하여, 3개의 CDR 영역 중 총 적어도 하나 내지 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 바람직하게, 보존적 치환)을 포함하는 서열을 포함한다.

[0187] 바람직한 실시양태에서, VH는 서열 번호: 26, 27, 28, 29, 30, 또는 31로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된다.

[0188] 바람직한 실시양태에서, VL은 서열 번호: 32, 33, 34, 35, 36, 또는 37로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된다.

[0189] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은

[0190] (i) 서열 번호: 26 또는 30에 제시된 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 HCDR, 및 서열 번호: 32 또는 36에 제시된 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 LCDR, 또는

[0191] (ii) 서열 번호: 27에 제시된 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 HCDR, 및 서열 번호: 33에 제시된 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 LCDR, 또는

[0192] (iii) 서열 번호: 28에 제시된 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 HCDR, 및 서열 번호: 34에 제시된 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 LCDR, 또는

[0193] (iv) 서열 번호: 29 또는 31에 제시된 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 HCDR, 및 서열 번호: 35 또는 37에 제시된 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 LCDR을 포함한다.

[0194] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 (VH) 및/또는 경쇄

가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서,

- [0195] (i) VH는 상보성 결정 영역 (CDR), HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3을 포함하고, 여기서, HCDR1은 서열 번호: 1, 2, 3, 또는 4로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나, 또는 HCDR1은 서열 번호: 1, 2, 3, 또는 4로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 비교하여 1, 2, 또는 3개의 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 바람직하게, 보존적 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; HCDR2는 서열 번호: 5, 6, 7, 8, 또는 9로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나, 또는 HCDR2는 서열 번호: 5, 6, 7, 8, 또는 9로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 비교하여 1, 2, 또는 3개의 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 바람직하게, 보존적 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; HCDR3은 서열 번호: 10, 11, 12, 또는 13으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나, 또는 HCDR3은 서열 번호: 10, 11, 12, 또는 13으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 비교하여 1, 2, 또는 3개의 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 바람직하게, 보존적 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/거나;
- [0196] (ii) VL은 상보성 결정 영역 (CDR), LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하고, 여기서, LCDR1은 서열 번호: 14, 15, 또는 16으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나, 또는 LCDR1은 서열 번호: 14, 15, 또는 16으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 비교하여 1, 2, 또는 3개의 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 바람직하게, 보존적 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; LCDR2는 서열 번호: 17, 18, 19, 또는 20으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나, 또는 LCDR2는 서열 번호: 17, 18, 19, 또는 20으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 비교하여 1, 2, 또는 3개의 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 바람직하게, 보존적 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함하고; LCDR3은 서열 번호: 21, 22, 23, 24, 또는 25로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나, 또는 LCDR3서열 번호: 21, 22, 23, 24, 또는 25로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 비교하여 1, 2, 또는 3개의 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 바람직하게, 보존적 치환)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0197] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 중쇄 가변 영역 (VH) 및/또는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서,
- [0198] 여기서,
- [0199] (a) VH는
- [0200] (i) 표 A에 제시된 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3의 조합; 또는
- [0201] (ii) 3개의 CDR 영역 중 총 적어도 하나 내지 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 바람직하게, 보존적 치환)을 포함하는, (i)의 HCDR 조합의 변이체를 포함하고/거나;
- [0202] (ii) VL은
- [0203] (i) 표 A에 제시된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 조합; 또는
- [0204] (ii) 3개의 CDR 영역 중 총 적어도 하나 내지 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 바람직하게, 보존적 치환)을 포함하는, (i)의 LCDR 조합의 변이체를 포함하는 것인 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0205] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 중쇄 가변 영역 (VH) 및 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서, 여기서, VH는 상보성 결정 영역 (CDR), HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3을 포함하고, VL은 CDR, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하고, 여기서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편 중에 함유되어 있는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3의 조합이 하기 표 (표 A)에 제시되어 있는 것인 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다:

[0206] <표 A>

본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편 중의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3의 예시적인 조합

조합	HCDR1 (이는 하기 서열 번호에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된다)	HCDR2 (이는 하기 서열 번호에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된다)	HCDR3 (이는 하기 서열 번호에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된다)	LCDR1 (이는 하기 서열 번호에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된다)	LCDR2 (이는 하기 서열 번호에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된다)	LCDR3 (이는 하기 서열 번호에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된다)
(1)	서열 번호: 1	서열 번호: 5	서열 번호: 10	서열 번호: 14	서열 번호: 17	서열 번호: 21
(2)	서열 번호: 2	서열 번호: 6	서열 번호: 11	서열 번호: 15	서열 번호: 18	서열 번호: 22
(3)	서열 번호: 2	서열 번호: 7	서열 번호: 12	서열 번호: 15	서열 번호: 18	서열 번호: 23
(4)	서열 번호: 3	서열 번호: 8	서열 번호: 13	서열 번호: 16	서열 번호: 19	서열 번호: 24
(5)	서열 번호: 4	서열 번호: 9	서열 번호: 10, 11, 12, 또는 13	서열 번호: 14, 15, 또는 16	서열 번호: 20	서열 번호: 25

[0207]

[0208] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 VH 및/또는 경쇄 가변 영역 VL을 포함하고, 여기서,

[0209] (a) 중쇄 가변 영역 VH는

[0210] (i) 서열 번호: 26, 27, 28, 29, 30, 또는 31로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나;

[0211] (ii) 서열 번호: 26, 27, 28, 29, 30, 또는 31로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나;

[0212] (iii) 서열 번호: 26, 27, 28, 29, 30, 또는 31로부터 선택되는 아미노산 서열과 비교하여 1개 이상의 (바람직하게, 10개 이하, 더욱 바람직하게, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하) 아미노산 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 더욱 바람직하게, 아미노산 보존적 치환)을 갖는 아미노산을 포함하고/거나;

[0213] (b) 경쇄 가변 영역 VL은

[0214] (i) 서열 번호: 32, 33, 34, 35, 36, 또는 37로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나;

[0215] (ii) 서열 번호: 32, 33, 34, 35, 36, 또는 37로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나;

[0216] (iii) 서열 번호: 32, 33, 34, 35, 36, 또는 37로부터 선택되는 아미노산 서열과 비교하여 1개 이상의 (바람직하게, 10개 이하, 더욱 바람직하게, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하) 아미노산 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 더욱 바람직하게, 아미노산 보존적 치환)을 갖는 아미노산을 포함하고, 여기서, 바람직하게, 아미노산 변경은 CDR 중에 존재하지 않는다.

[0217] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 중쇄 가변 영역 (VH) 및 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서, 여기서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편 중에 함유되어 있는 중쇄 가변 영역 VH 및 경쇄 가변 영역 VL의 조합이 하기 표 (표 B)에 제시되어 있는 것인 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다:

[0218] <표 B>

본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편 중의 중쇄 가변 영역 VH 및 경쇄 가변 영역 VL의 예시적인 조합

조합	VH (이는 하기 서열 번호에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된다)	VL (이는 하기 서열 번호에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된다)
(1)	서열 번호: 26	서열 번호: 32
(2)	서열 번호: 27	서열 번호: 33
(3)	서열 번호: 28	서열 번호: 34
(4)	서열 번호: 29	서열 번호: 35
(5)	서열 번호: 30	서열 번호: 36
(6)	서열 번호: 31	서열 번호: 37

[0219]

[0220] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 중쇄 및/또는 경쇄를 포함하고, 여기서,

[0221] (a) 중쇄는

[0222] (i) 서열 번호: 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 또는 45로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나;

[0223] (ii) 서열 번호: 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 또는 45로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나;

[0224] (iii) 서열 번호: 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 또는 45로부터 선택되는 아미노산 서열과 비교하여 1개 이상의 (바람직하게, 20 또는 10개 이하, 더욱 바람직하게, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하) 아미노산 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 더욱 바람직하게, 아미노산 보존적 치환)을 갖는 아미노산을 포함하고, 여기서, 바람직하게, 아미노산 변경은 중쇄의 CDR 중에 존재하지 않고, 더욱 바람직하게, 아미노산 변경은 중쇄 가변 영역 중에 존재하지 않고/거나;

[0225] (b) 경쇄는

[0226] (i) 서열 번호: 46, 47, 48, 49, 50, 또는 51로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나;

[0227] (ii) 서열 번호: 46, 47, 48, 49, 50, 또는 51로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나;

[0228] (iii) 서열 번호: 46, 47, 48, 49, 50 또는 51로부터 선택되는 아미노산 서열과 비교하여 1개 이상의 (바람직하게, 20 또는 10개 이하, 더욱 바람직하게, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하) 아미노산 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 더욱 바람직하게, 아미노산 보존적 치환)을 갖는 아미노산을 포함하고, 여기서, 바람직하게, 아미노산 변경은 경쇄의 CDR 중에 존재하지 않고, 더욱 바람직하게, 아미노산 변경은 경쇄 가변 영역 중에 존재하지 않는다.

[0229] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서, 여기서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편 중에 함유되어 있는 중쇄 및 경쇄의 조합이 하기 표 (표 C)에 제시되어 있는 것인 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제공한다:

[0230] <표 C>

본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 단편 중의 중쇄 및 경쇄의 예시적인 조합

조합	HC (이는 하기 서열 번호에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된다)	LC (이는 하기 서열 번호에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된다)
(1)	서열 번호: 38	서열 번호: 46
(2)	서열 번호: 39	서열 번호: 47
(3)	서열 번호: 40	서열 번호: 48
(4)	서열 번호: 41	서열 번호: 49
(5)	서열 번호: 42	서열 번호: 50
(6)	서열 번호: 43	서열 번호: 50
(7)	서열 번호: 44	서열 번호: 50
(8)	서열 번호: 45	서열 번호: 51

[0231]

[0232] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편의 중쇄 및/또는 경쇄는 신호 펩티드 서열, 예컨대, METDTLLWVLLWVPGSTG (서열 번호: 68)을 추가로 포함한다.

[0233] 본 발명의 한 실시양태에서, 본원에 기술된 아미노산 변경은 아미노산 치환, 삽입, 또는 결실을 포함한다. 바람직하게, 본원에 기술된 아미노산 변경은 아미노산 치환, 바람직하게, 보존적 치환이다.

[0234] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기술된 아미노산 변경은 CDR 밖의 영역에 (예컨대, FR 중에) 존재한다. 더욱 바람직하게, 본원에 기술된 아미노산 변경은 중쇄 가변 영역 밖, 및/또는 경쇄 가변 영역 밖의 영역에 존재한다.

[0235] 임의적으로, 본 발명의 항-PD-L1 항체는 경쇄 가변 영역, 중쇄 가변 영역, 경쇄, 또는 중쇄에 대한 번역 후 변형을 포함한다. 예시적인 번역 후 변형으로는 디설파이드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 다른 조작, 예컨대, 표지 성분과의 접합을 포함한다.

[0236] 일부 실시양태에서, 치환은 보존적 치환이다. 보존적 치환이란, 아미노산을 동일한 부류의 또 다른 아미노산으로 대체하는 것, 예컨대, 산성 아미노산을 또 다른 산성 아미노산으로 대체하는 것, 염기성 아미노산을 또 다른 염기성 아미노산으로 대체하는 것, 또는 중성 아미노산을 또 다른 중성 아미노산으로 대체하는 것을 지칭한다. 예시적인 치환은 하기 표 D에 제시되어 있다:

[0237] <표 D>

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

[0238]

[0239] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가 또는 감소시키도록 변경된다.

항체에의 글리코실화 부위 부가 또는 결실은, 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성 또는 제거되도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 달성될 수 있다.

[0240] 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 치환은 하나 이상의 가변 영역 프레임워크 글리코실화 부위를 제거하여 상기 부위에서의 글리코실화를 제거하도록 수행될 수 있다. 상기 아글리코실화(aglycosylation)는 항원에 대한 항체의 친화도를 증가시킬 수 있다. 예컨대, 미국 특허 번호 5,714,350 및 6,350,861을 참조한다. 예컨대, 푸코실 잔기의 양이 감소된 저 푸코실화된 항체, 또는 양분화 GlcNac 구조가 증가된 항체와 같이, 변경된 부류의 글리코실화를 갖는 항체가 제조될 수 있다. 상기 변경된 글리코실화 패턴은 항체의 ADCC를 증가시킬 수 있는 능력을 보였다. 상기 탄수화물 변형은 예컨대, 글리코실화 시스템이 변경된 숙주 세포에서 항체를 발현시킴으로써 달성될 수 있다. 글리코실화 시스템이 변경된 세포는 당업계에 기술되어 있고, 이는, 여기서 본 발명의 항체가 발현되고, 이로써, 글리코실화가 변경된 항체를 제조할 수 있는 것인 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포주 Ms704, Ms705, 및 Ms709에는 푸코실트랜스퍼라제 유전자 FUT8 ($\alpha(1,6)$ -푸코실트랜스퍼라제)이 결여되어 있고, 이로써, 세포주 Ms704, Ms705, 및 Ms709에서 발현된 항체에는 그의 탄수화물 중에 푸코스가 결여되어 있다. 세포주 Ms704, Ms705, 및 Ms709FUT8-/-은 파괴를 위해 CHO/DG44 세포 중의 FUT8 유전자를 표적화하는 2개의 대안적 벡터를 이용함으로써 생성된다 (미국 특허 공개 번호 20040110704 및 문헌 [Yamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22] 참조). EP 1,176,195에는 푸코실트랜스퍼라제를 코딩하는 FUT8 유전자가 기능적으로 파괴되어 있는 세포주가 기술되어 있으며, 이로써, 상기 세포주에서 발현된 항체는 α -1,6 결합-관련 효소를 감소 또는 제거함으로써 저 푸코실화를 나타낸다. EP 1,176,195에는 또한 항체의 Fc 영역에 결합하는 N-아세틸글루코사민에 푸코스를 부가하는 효소 활성이 낮거나, 또는 없는 세포주, 예컨대, 래트 골수종 세포주 YB2/0 (ATCC CRL 1662)이 기술되어 있다. PCT 공개 W003/035835에는 푸코스를 Asn (297)-연결 탄수화물에 부착시킬 수 있는 능력이 감소되고, 이로써, 숙주 세포에서 발현되는 항체의 저 푸코실화 또한 유도하는 것인 변이체 CHO 세포주 Lec13 세포가 기술되어 있다 (문헌 [Shields et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740] 또한 참조). PCT 공개 W006/089231에 기술된 바와 같이, 글리코실화 프로파일이 변형된 항체 또한 계란에서 제조될 수 있다. 대안적으로, 글리코실화 프로파일이 변형된 항체는 식물 세포, 예컨대, 좁개구리박속(*Lemna*)에서 제조될 수 있다. 식물 시스템에서 항체를 제조하는 방법은 알스톤 앤드 버드 LLP.(Alston and Bird LLP.) 대리인 사건 번호(Attorney Docket No.) 040989/314911에 상응하는, 2006년 8월 11일 출원된 미국 특허 출원에 개시되어 있다. PCT 공개 W099/54342에는 당단백질 변형 글리코실트랜스퍼라제 [예컨대, $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코사미니드트랜스퍼라제 III (GnTIII)]를 발현하도록 조작된 세포주가 기술되어 있으며, 이를 통해, 조작된 세포주에서 발현된 항체는 증가된 양분화 GlcNac 구조를 나타내며, 그 결과로 항체의 ADCC 활성은 증가된다 (또한 문헌 [Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180] 참조). 대안적으로, 푸코시다제는 항체로부터 푸코실 잔기를 절단하는 데 사용될 수 있고; 예를 들어, α -L-푸코시다제는 항체로부터 푸코실 잔기를 제거한다 (문헌 [Tarentino et al. (1975) Biochem. 14:5516-23]).

[0241] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 단편은 조작된 효모 N-연결 글리칸 또는 CHO N-연결 글리칸으로 글리코실화된다.

[0242] 본원에 기술된 항체 또는 그의 단편에 대한 본 발명에 의해 포함되는 또 다른 변형은 PEG화이다. 항체는 예컨대, 항체의 생물학적 (예컨대, 혈청) 반감기를 증가시키기 위해 PEG화될 수 있다. 항체 PEG화를 위해, 항체 또는 그의 단편은 전형적으로 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) (예컨대, 반응성 에스테르 또는 PEG의 알데히드 유도체)과, 하나 이상의 PEG 기가 항체 또는 항체 단편에 부착되는 조건하에서 반응한다. 바람직하게, PEG화는 반응성 PEG 분자 (또는 유사한 반응성 수용성 중합체)를 사용하여 아실화 반응 또는 알킬화 반응을 통해 수행된다. 본원에서 사용되는 바, "폴리에틸렌 글리콜"이라는 용어는 다른 단백질을 유도체화하는 데 사용되어 온 임의 형태의 PEG, 예컨대, 모노 (C1-C10) 알콕시- 또는 아릴옥시 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-말레이미드를 포함하는 것으로 의도된다. 특정 실시양태에서, PEG화되는 항체는 아글리코실화된 항체이다. 단백질의 PEG화 방법은 당업계에 공지되어 있고, 이는 본 발명의 항체에 적용될 수 있다 (예를 들어, EP 0154316 및 EP 0401384 참조).

[0243] 특정 실시양태에서, 예를 들어, 암 또는 세포 증식성 질환의 치료에서의 항체의 효능이 증진되도록, 하나 이상의 아미노산 변형이 본원에 제공된 항체의 Fc 영역 내로 도입될 수 있고, 이로써, Fc 영역 변이체를 제조할 수 있다. 본원에 개시된 항-PD-L1 항체 (예컨대, 인간화 또는 키메라 항체) 및 그의 항원 결합 단편은 또한 변경된 이펙터 기능을 제공하도록 변형된 (또는 폐쇄된) Fc 영역을 갖는 항체 및 단편을 포함한다. 예컨대, 미국 특허 번호 5,624,821, W02003/086310, W02005/120571, W02006/0057702를 참조한다. 상기 변형은 면역계의 다양한 반응을 증진 또는 억제시키는 데 사용될 수 있고, 진단 및 치료에서 유익한 효과를 가질 수 있다. Fc 영

역의 변형으로는 아미노산 변경 (치환, 결실 및 삽입), 글리코실화 또는 데글리코실화, 및 다중 Fc 부가를 포함한다. Fc에의 변형은 또한 치료 항체에서 항체의 반감기를 변경시킬 수 있고, 이로써, 투여 빈도는 감소될 수 있고, 이에 편의성은 증가되고, 물질 사용은 감소될 수 있다. 문헌 [Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731, pages 734-735]를 참조한다.

[0244] 한 실시양태에서, 항체의 시스테인 잔기의 개수는 항체 특성을 변형시키기 위해 변경될 수 있다. 예를 들어, CH1의 힌지 영역은 힌지 영역 중의 시스테인 잔기의 개수를 변경 (예컨대, 증가 또는 감소)시키기 위해 변형된다. 이러한 변형은 미국 특허 번호 5,677,425에 추가로 기술되어 있다. CH1의 힌지 영역 중의 시스테인 잔기의 개수는 예컨대, 경쇄 및 중쇄의 어셈블리를 촉진시키기 위해, 또는 항체의 안정성을 증가 또는 감소시키기 위해 변경될 수 있다.

[0245] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 당업계에 공지되어 있고, 용이하게 이용가능한 다른 비-단백질 부분을 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 항체의 유도체화에 적합한 부분으로는 수용성 중합체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 수용성 중합체의 비제한적인 예로는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜 공중합체, 카르복시메틸 셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥산, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레인 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (동중중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-에틸렌 메틸피롤리돈) 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 동중중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화된 폴리올 (예컨대, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 그의 혼합물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 개수는 달라질 수 있고, 1개 초과 중합체가 부착된다면, 이는 동일하거나, 또는 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 개수 및/또는 타입은 개선하고자 하는 항체의 구체적인 특징 또는 기능, 항체 유도체가 정의된 조건하에서 사용될 수 있는지 여부 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 고려 사항에 기초하여 결정될 수 있다.

[0246] 일부 실시양태에서, 본 발명은 항-PD-L1 항체의 단편을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, 디아바디, 선형 항체, 단일 쇠 항체 (예컨대, scFv), 단일 도메인 항체, 및 항체 단편으로부터 형성된 이중특이적 항체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0247] 예를 들어, 항체 분자는 중쇄 (HC) 가변 도메인 서열 및 경쇄 (LC) 가변 도메인 서열을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, (본원에서 불완전 항체로 지칭되는) 항체 분자는 중쇄 및 경쇄를 포함하거나, 또는 그로 구성된다. 또 다른 예에서, 항체 분자는 2개의 중쇄 가변 도메인 서열 및 2개의 경쇄 가변 도메인 서열을 함유하며, 이로써, 2개의 항원 결합 부위를 형성한다. 예컨대, Fab, Fab', F(ab')₂, Fc, Fd, Fd', Fv, 단일 쇠 항체 (예컨대, scFv), 단일 도메인 항체, 디아바디 (Dab) (2가 및 이중특이적) 및 키메라 (예컨대, 인간화) 항체는 무손상 항체를 변형시킴으로써 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 기술을 이용하여 새로(*de novo*) 합성될 수 있다. 상기 기능성 항체 단편은 그의 상응하는 항원 또는 수용체에 선택적으로 결합할 수 있는 능력을 보유한다. 항체 및 항체 단편은 IgG, IgA, IgM, IgD, 및 IgE를 포함하나, 이에 제한되지 않는 임의의 항체 부류로부터, 및 임의의 항체 하위부류 (예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4)로부터의 것일 수 있다. 항체 분자의 제조는 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있다. 항체는 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, CDR 이식된 항체, 또는 시험관 내에서 제조된 항체일 수 있다. 항체는 예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4로부터 선택되는 중쇄 불변 영역을 가질 수 있다. 항체는 또한 예컨대, κ 또는 λ 로부터 선택되는 경쇄를 가질 수 있다.

[0248] 본 발명의 항체는 또한 단일 도메인 항체일 수 있다. 단일 도메인 항체는 그의 상보성 결정 영역이 단일 도메인 폴리펩티드의 일부인 것인 항체를 포함할 수 있다. 예로는 중쇄 항체, 자연적으로 경쇄가 없는 항체, 단일 도메인 항체 또는 통상의 4-쇄 항체로부터 유래된 조작된 항체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 단일 도메인 항체는 선행 기술의 임의의 항체, 또는 추후의 임의의 단일 도메인 항체일 수 있다. 단일 도메인 항체는 마우스, 인간, 낙타, 알파카, 어류, 상어, 염소, 토끼, 및 소를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 임의의 종으로부터 유래된 것일 수 있다. 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 단일 도메인 항체는 자연적으로 발생된 단일 도메인-항체이며, 이는 경쇄가 없는 중쇄 항체로서 지칭된다. 상기 단일 도메인 항체는 예컨대, WO94/04678에 개시되어 있다. 단일 도메인 항체 또는 나노바디는 낙타과 종, 예컨대, 낙타, 알파카, 단봉 낙타, 라마, 및 과나코로부터 생산되는 항체일 수 있다. 낙타 이외의 종은 자연적으로 경쇄가 없는 중쇄 항체를 생산할 수 있고; 상기 단일 도메인 항체는 본 발명의 범주 내에 있다.

[0249] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체는 인간화 항체이다. 알마르고(Almagro) & 프란손(Fransson)에 의해 요약된 바와 같은 (그에 의한 문헌의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다 (문헌 [Almagro J.C. and

Fransson J (2008) *Frontiers in Bioscience* 13:1619-1633]) 항체를 인간화하는 상이한 방법이 당업자에게 알려져 있다. 알마르고 & 프란손은 이성적 접근법과 경험적 접근법을 구별한다. 이성적 접근법은 소수의 조작된 항체 변이체를 생성하고, 그의 결합 또는 임의의 다른 관심 특징을 사정하는 것을 특징으로 한다. 디자인된 변이체가 예상 결과를 일으키지 못한다면, 새 회차의 디자인 및 통합 평가가 시작된다. 이성적 접근법은 CDR 이식, 표면재건(resurfacing), 초인간화 및 인간 스트링 콘텐츠 최적화(human string content optimization)를 포함한다. 그에 반해, 경험적 방법은 큰 인간화 변이체 라이브러리를 생성하는 것에 기초하고, 농축 기술 또는 고처리량 스크리닝을 사용하여 최적의 클론을 선택한다. 따라서, 경험적 접근법은 신뢰가능한 선택 및/또는 다수의 항체 변이체를 검색할 수 있는 스크리닝 시스템에 의존한다. 시험관내 디스플레이 기술, 예컨대, 파지 디스플레이 및 리보솜 디스플레이는 이러한 요건을 충족시키며, 당업자에게 널리 공지되어 있다. 경험적 접근법으로는 FR 라이브러리 구축, 가이드된 선택, 프레임워크-셔플링(-framework-shuffling), 및 휴머니어링(humaneering)을 포함한다.

[0250] 일부 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 당업계에 공지된 다양한 기술을 통해 제조될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 문헌 [van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol* 5:368-74(2001)] 및 [Lonberg, *Curr. Opin. Immunol* 20:450-459(2008)]에 기술되어 있다. 예를 들어, 마우스 시스템 보다는 인간 면역글로불린 유전자를 보유하는 트랜스제닉 마우스이 인간 모노클로날 항체를 제조하는 데 사용될 수 있다 (예컨대, 우드(Wood 등)의 국제 출원 WO 91/00906; 쿠처라파티(Kucherlapati) 등의 PCT 공개 WO 91/10741; 론버그(Lonberg) 등의 국제 출원 WO 92/03918; 카이(Kay) 등의 국제 출원 92/03917; 문헌 [Lonberg, N. et al., 1994 *Nature* 368:856-859]; [Green, L.L. et al., 1994 *Nature Genet.* 7:13-21]; [Morrison, S.L. et al., 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855]; [Bruggeman et al., 1993 *Yeast Immunol* 7:33-40]; [Tuailon et al., 1993 *PNAS* 90:3720-3724]; 및 [Bruggeman et al., 1991 *Eur J Immunol* 21:1323-1326] 참조).

[0251] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체는 비-인간 항체, 예컨대, 설치류 (마우스 또는 래트) 항체, 염소 항체, 영장류 (예컨대, 원숭이) 항체 및 카멜리드 항체이다. 바람직하게, 비-인간 항체는 설치류 (마우스 또는 래트) 항체이다. 설치류 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0252] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 키메라 항체이다. 일부 키메라 항체는 예를 들어, 예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855, 1984]에 기술되어 있다. 한 실시양태에서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역 (예컨대, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 또는 비-인간 영장류, 예컨대, 원숭이로부터 유래된 가변 영역), 및 인간 불변 영역을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 키메라 항체는 모체 항체의 부류 또는 하위부류와 비교하여 그의 부류 또는 하위 부류가 변경된 것인 "부류 전환" 항체이다. 키메라 항체는 그의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0253] 특정 실시양태에서, 키메라 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 그의 모체 비-인간 항체의 특이성 및 친화도를 유지하면서, 인간에서의 그의 면역원성을 감소시키도록 인간화된다. 일반적으로, 인간화 항체는, 예를 들어, CDR (또는 그의 일부)은 비-인간 항체로부터 유래되고, FR (또는 그의 일부)은 인간 항체 서열로부터 유래된 것인, 하나 이상의 가변 도메인을 포함한다. 임의적으로, 인간화 항체는 인간 불변 영역의 적어도 일부를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체 중 일부 FR 잔기는 예컨대, 항체 특이성 또는 친화성을 회복 또는 개선시키기 위해, 비-인간 항체 (예컨대, CDR 잔기의 유래 기점이 되는 항체)의 상응하는 잔기에 의해 치환된다.

[0254] 본 발명의 항체는 조합 라이브러리를 원하는 활성을 갖는 항체에 대해 스크리닝함으로써 단리될 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고, 상기 라이브러리를 원하는 결합 특징을 갖는 항체에 대해 스크리닝하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 방법은 예를 들어, 문헌 [Hoogenboom et al., *Methods in Molecular Biology* 178:1-37] ([O' Brien et al., Human Press, Totowa, NJ, 2001]에 의해 편찬)에 기술되어 있고, 예를 들어, 문헌 [McCafferty et al., *Nature* 348:552-554]; [Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)]; [Marks et al., *J.Mol.Biol.* 222:581-597(1992)]; [Marks and Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175] ([Lo, Human Press, Totowa, NJ, 2003]에 의해 편찬); [Sidhu et al., *J.Mol.Biol.* 338(2):299-310(2004)]; [Lee et al., *J.Mol.Biol* 340(5):1073-1093(2004)]; [Fellouse, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 101 (34):12467-12472(2004)]; 및 [Lee et al., *J.Immunol.Methods* 284(1-2):119-132(2004)]에도 추가로 기술되어 있다.

[0255] 한 실시양태에서, 항체 분자는 단일특이적 항체 분자이고, 단일 에피토프에 결합한다. 예를 들어, 단일특이적

항체 분자는, 각각이 동일한 에피토프에 결합하는 것인 복수의 면역글로불린 가변 도메인 서열을 포함한다.

[0256] 한 실시양태에서, 항체 분자는 다중특이적 항체 분자이고, 예를 들어, 항체 분자는 복수의 면역글로불린 가변 도메인 서열을 포함하고, 여기서, 복수의 면역글로불린 가변 도메인 서열의 제1 면역글로불린 가변 도메인 서열은 제1 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖고, 복수의 면역글로불린 가변 도메인 서열의 제2 면역글로불린 가변 도메인 서열은 제2 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 에피토프는 동일한 항원 (예컨대, 동일한 단백질 또는 다량체 단백질의 동일한 서브유닛) 상에 존재한다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 에피토프는 중첩된다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 에피토프는 중첩되지 않는다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 에피토프는 상이한 항원 (예컨대, 상이한 단백질 또는 다량체 단백질의 상이한 서브유닛) 상에 위치한다. 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 제3, 제4 또는 제5 면역글로불린 가변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 이중특이적 항체 분자 또는 삼중특이적 항체 분자 또는 사중특이적 항체 분자이다.

[0257] 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 분자는 이중특이적 항체 분자이다. 이중특이적 항체는 2개 이하의 항원에 대해 특이적이다. 이중특이적 항체 분자는 제1 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 제1 면역글로불린 가변 도메인 서열, 및 제2 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 제2 면역글로불린 가변 도메인 서열을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 에피토프는 동일한 항원 (예컨대, 동일한 단백질 또는 다량체 단백질의 동일한 서브유닛) 상에 존재한다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 에피토프는 중첩된다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 에피토프는 중첩되지 않는다. 한 실시양태에서, 제1 및 제2 에피토프는 상이한 항원 (예컨대, 상이한 단백질 또는 다량체 단백질의 상이한 서브유닛) 상에 위치한다. 한 실시양태에서, 이중특이적 항체 분자는 제1 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 서열, 및 제2 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 이중특이적 항체 분자는 제1 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 불완전 항체, 및 제2 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 불완전 항체를 포함한다. 한 실시양태에서, 이중특이적 항체 분자는 제1 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 불완전 항체 또는 그의 단편, 및 제2 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 불완전 항체 또는 그의 단편을 포함한다. 한 실시양태에서, 이중특이적 항체 분자는 제1 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 scFv 또는 그의 단편, 및 제2 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 scFv 또는 그의 단편을 포함한다. 한 실시양태에서, 제1 에피토프는 PD-L1 상에 있고, 제2 에피토프는 LAG-3, OX40, TIM-3, CEACAM (예컨대, CEACAM-1 및/또는 CEACAM-5), 또는 PD-L2 상에 있다.

[0258] 일부 실시양태에서, 본 발명은 추가로 다른 물질, 예컨대, 치료 모이어티 또는 마커, 예컨대, 세포독성제 또는 면역조절제에 접합된 항-PD-L1 모노클로날 항체 ("면역접합체")를 제공한다. 세포독성제는 세포에 유해한 임의의 작용제를 포함한다. 면역접합체를 형성하는 데 적합한 세포독성제 (예컨대 화학요법제)의 예는 당업계에 공지되어 있고, 예컨대, W02015/153513 또는 W02015/138920 등을 참조한다. 예를 들어, 세포독성제는 방사성 동위 원소, 예컨대, 아이오딘 (^{131}I 또는 ^{125}I), 이트륨 (^{90}Y), 루테튬 (^{177}Lu), 악티늄 (^{225}Ac), 프라세오디뮴, 아스타틴 (^{211}At), 레늄 (^{186}Re), 비스무트 (^{212}Bi 또는 ^{213}Bi), 인듐 (^{111}In), 테크네튬 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), 인 (^{32}P), 로듐 (^{188}Rh), 황 (^{35}S), 철 (^{54}Fe), 트리튬 (^3H), 크로뮴 (^{51}Cr), 염소 (^{36}Cl), 코발트 (^{57}Co 또는 ^{58}Co), 철 (^{59}Fe), 셀레늄 (^{75}Se), 또는 갈륨 (^{67}Ga)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 세포독성제의 예로는 추가로 화학요법제 또는 다른 치료 물질, 예컨대, 파클리탁셀, 시토크알라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테니포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노마이신, 디히드로록시안트라센 디케톤(dihydroxyanthracene diketone), 미토크산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-디히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 퓨로마이신 및 상기의 모든 치료제의 유사체 또는 동족체를 포함한다. 세포독성제로는 예를 들어, 항대사산물 (예컨대, 메토타렉세이트, 6-메르캅토퓨린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실, 및 디카르바진), 알킬화제 (예컨대, 메클로레타딘, 티오에파클로람부실(thioepachlorambucil), 멜팔란, 카무스틴 (BSNU), 로무스틴 (CCNU), 시클로포스파미드, 부술판, 디브로모만넛톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민디아미네플라티늄 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라마이신 (예컨대, 다우노루비신 (이전에 다우노마이신으로 공지) 및 독소루비신), 항생제 (예컨대, 악티노마이신 D (이전에 악티노마이신으로 공지), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신 (AMC)), 및 유사분열 억제제 (예컨대, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)를 추가로 포함한다.

[0259] 항-PD-L1 항체에 접합/커플링될 수 있는 물질에 대해서는 예를 들어, W02010/077634 또는 US60/696426 또는 W02016/007235 또는 W02016/061142 등에서 참조할 수 있다.

[0260] **본 발명의 핵산 및 상기를 포함하는 숙주 세포**

[0261] 한 측면에서, 본 발명은 상기 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편 중 임의의 것을 코딩하는 핵산을 제공한다. 핵산은 항체의 경쇄 가변 영역 및/또는 중쇄 가변 영역을 포함하는 아미노산 서열, 또는 항체의 경쇄 및/또는 중쇄를 포함하는 아미노산 서열을 코딩할 수 있다.

[0262] 예를 들어, 본 발명의 예시적인 핵산은 서열 번호: 26 내지 51 중 어느 하나로부터 선택되는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산, 또는 서열 번호: 26 내지 51 중 어느 하나로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함한다.

[0263] 본 발명은 엄격한 조건하에서, 서열 번호: 26 내지 51 중 어느 하나로부터 선택되는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산; 또는 서열 번호: 26 내지 51 중 어느 하나로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산인 상기 핵산 또는 하나 이상의 치환 (예컨대, 보존적 치환), 결실 또는 삽입을 갖는 상기 핵산의 변이와 하이브리드화되는 핵산을 추가로 제공한다.

[0264] 한 실시양태에서, 핵산을 함유하는 하나 이상의 벡터를 제공한다. 한 실시양태에서, 벡터는 발현 벡터, 예컨대, 진핵성 발현 벡터이다. 벡터는 바이러스, 플라스미드, 코스미드, 람다 파지 또는 효모 인공 염색체 (YAC)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 다수의 벡터 시스템이 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 부류의 벡터는 동물 바이러스, 예컨대, 소 유두종바이러스, 폴리오마바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 배큘로 바이러스, 레트로바이러스 (라우스 육종 바이러스 또는 MMTV 또는 MOMLV) 및 SV40 바이러스로부터 유래된 DNA 요소를 이용한다. 또 다른 부류의 벡터는 RNA 바이러스, 예컨대, 쉼리키 삼림 열(Semliki Forest) 바이러스, 동부 말 뇌염(eastern equine encephalitis) 바이러스 및 플라비바이러스(flavivirus)로부터 유래된 RNA 요소를 이용한다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 발현 벡터는 pTT5 발현 벡터이다.

[0265] 추가로, DNA가 그의 염색체 내에 안정적으로 도입되어 있는 세포는 형질감염된 숙주 세포의 선별을 허용하는 하나 이상의 마커를 도입함으로써 선별될 수 있다. 마커는 예를 들어, 영양요구성 숙주에 원형양성, 살생물제 (예컨대, 항생제) 내성, 또는 중금속 (예컨대, 구리) 내성 등을 제공할 수 있다. 선별가능한 마커 유전자는 발현되는 DNA 서열에 직접 연결될 수 있거나, 또는 공동 형질전환을 통해 동일한 세포 내로 도입될 수 있다. mRNA의 최적 합성을 위해 추가의 요소가 또한 요구될 수 있다. 이들 요소는 스플라이싱 신호, 및 전사 프로모터, 인핸서, 및 종결 신호를 포함할 수 있다.

[0266] 일단 발현을 위해 발현 벡터 또는 DNA 서열이 제조되고 나면, 발현 벡터를 적절한 숙주 세포 내로 형질감염시키거나 도입시킬 수 있다. 상기 목적을 위해 다양한 기술, 예를 들어, 원형질체 융합, 인산칼슘 침전, 전기천공, 레트로바이러스 형질도입, 바이러스 형질감염, 유전자 총, 지질 기반 형질감염, 또는 다른 통상적인 기술이 사용될 수 있다. 원형질체 융합의 경우, 세포를 배양 배지 중에서 인큐베이션시키고, 적절한 활성화에 대해 스크리닝한다. 생성된 형질감염된 세포의 인큐베이션 및 생성된 항체 분자의 회수를 위한 방법 및 조건은 당업자에게 공지되어 있고, 본 설명 및 당업계에 공지된 방법에 기초하여 사용되는 특정 발현 벡터 및 특정 포유동물 숙주 세포에 따라 달라지거나, 또는 최적화될 수 있다.

[0267] 한 실시양태에서, 본원에 기술된 항체 분자를 코딩하는 핵산, 또는 본원에 기술된 벡터를 함유하는 숙주 세포를 제공한다. 항체를 코딩하는 핵산 또는 벡터를 클로닝 또는 발현하는 데 적합한 숙주 세포로는 원에 기술된 것과 같은 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 항체는 예를 들어, 특히, 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 요구되지 않을 때, 박테리아에서 제조될 수 있다. 박테리아에서의 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현은 예를 들어, 미국 특허 번호 제5648237호, 제5789199호 및 제5840523호에 기술되어 있고, 이는 또한, E. 콜라이에서의 항체 단편의 발현을 기술하는 문헌 [Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pg. 245-254]에도 기술되어 있다. 발현 후, 항체는 가용성 분획 중 박테리아 페이스트로부터 분리될 수 있고, 추가로 정제될 수 있다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 E. 콜라이이다.

[0268] 한 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 숙주 세포는 효모, 포유동물 세포 (예컨대, 인간 세포), 곤충 세포, 식물 세포, 또는 항체 또는 그의 항원 결합 단편 제조에 적합한 다른 세포로 구성된 군으로부터 선택된다. 예를 들어, 진핵성 미생물, 예컨대, 사상성 진균 또는 효모는, 글리코실화 경로가 "인간화"되고, 그 결과로 부분적으로 또는 완전한 인간 글리코실화 패턴을 갖는 항체가 제조되는 것인 진균 및 효모 균주를 비롯한, 항체를 코딩하는 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이며, 이는 문헌 [Gerngross, Nat.

Biotech. 22: 1409-1414(2004)], 및 [Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)]를 참조할 수 있다. 글리코실화된 항체를 발현하는 데 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된 것이다.

[0269] 척추동물 세포 또한 숙주로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 현탁 성장에 적합하도록 조작된 포유동물 세포주가 사용될 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예로는 SV40로 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7), 인간 배아 신장 세포주 (예컨대, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36: 59 (1977)]에 기술되어 있는 것과 같은 293HEK 또는 293 세포) 등이 있다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주로는 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 (DHFR⁻ CHO 세포 포함) (문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 216 (1980)]), 및 골수종 세포주 예컨대, Y0, NS0, 및 Sp2/0이 있다.

[0270] 항체 제조에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주에 관한 리뷰는 예컨대, 문헌 [Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pg. 255-268 (2003)]으로부터 참조할 수 있다. 다른 유용한 숙주 세포로는 Vero 세포, Hela 세포, COS 세포, CHO 세포, HEK293 세포, BHK 세포, MDCKII 세포, PerC6 세포주로부터의 난모 세포 (예컨대, 크루셀(Crucell)로부터의 PERC6 세포), 및 트랜스제닉 동물로부터의 세포, 예컨대, 유선 상피 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 적합한 곤충 세포로는 Sf9 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0271] 항체 및 그의 항원 결합 단편을 제조하는 방법

[0272] 본원에 개시된 항-PD-L1 항체는 재조합적으로 제조될 수 있다. 재조합 항체를 제조하는 수개의 방법이 당업계에 공지되어 있다. 항체를 재조합적으로 제조하는 방법의 예는 미국 특허 번호 제4,816,567호에 개시되어 있다.

[0273] 한 실시양태에서, 상기 제공된 것과 같은, 항체를 코딩하는 핵산을 함유하는 숙주 세포를, 항체를 발현하는 데 적합한 조건하에서 인큐베이션시키는 단계, 및 임의적으로, 숙주 세포 (또는 숙주 세포 배양물)로부터 항체를 회수하는 단계를 포함하는, 항-PD-L1 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 항-PD-L1 항체를 재조합적으로 제조하기 위해, 항체 (예컨대, 상기 기술된 항체)를 코딩하는 핵산을 단리시키고, 숙주 세포에서의 추가의 클로닝 및/또는 발현을 위해 하나 이상의 벡터 내로 삽입한다. 핵산은 통상적인 방법을 사용하여 (예컨대, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리 및 서열분석한다.

[0274] 한 실시양태에서, 숙주 세포는 항체의 VL의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산, 및 항체의 VH의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 함유한다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 항체의 VL의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제1 벡터, 및 항체의 VH의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제2 벡터를 함유한다.

[0275] 검정법

[0276] 본원에서 제공되는 항-PD-L1 항체는 당업계에 공지된 다양한 검정법을 위해 그의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성에 대해 확인, 스크리닝, 또는 특징화될 수 있다. 한 측면에서, 본 발명의 항체의 항원 결합 활성은 예를 들어, 공지된 방법, 예컨대, ELISA, 웨스턴 블롯팅, 유세포 분석법, 및 항체 분자로 코팅된 자기 비드에 의해 시험된다. PD-L1 결합은 당업계에 공지된 방법에 의해 측정될 수 있고, 예시적인 방법은 본원에 개시되어 있다. 일부 실시양태에서, 생물학적 광학 간섭법 (예컨대, 포르테바이오 친화도 측정) 또는 MSD 검정법 또는 유세포 분석법이 사용된다.

[0277] 또 다른 측면에서, 경쟁적 결합 검정법은 PD-L1에의 결합에 대하여 본원에 개시된 항-PD-L1 항체 중 임의의 것과 경쟁하는 항체를 확인하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 경쟁적 항체는 본원에 개시된 항-PD-L1 항체 중 임의의 것과 동일한 에피토프 (예컨대, 선형 또는 입체형태 에피토프)에 결합한다. 항체 결합 에피토프를 국제화시키는 상세한 예시적 방법은 문헌 [Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)]에 기술되어 있다.

[0278] 본 발명은 상기 기술된 특성들 중 하나 이상의 것을 갖는 항-PD-L1 항체를 확인하는 검정법을 추가로 제공한다. 생체내 및/또는 시험관내에서 상기 생물학적 활성을 갖는 항체를 추가로 제공한다.

[0279] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 상기 기술된 특성들 중 하나 이상의 것에 대해 시험된다.

[0280] 상기 시험관내 검정법 중 임의의 것에서 사용하기 위한 세포로는 PD-L1을 천연적으로 발현하거나, 또는 PD-L1을

발현하도록 조작된 세포 또는 세포주를 포함한다.

[0281] 상기 검정법 중 임의의 것은 항-PD-L1 항체 대신 또는 그 이외의 본 발명의 면역접합체를 사용함으로써 수행될 수 있음을 이해할 것이다.

[0282] 상기 검정법 중 임의의 것은 항-PD-L1 항체 및 다른 치료제를 사용함으로써 수행될 수 있음을 이해할 것이다.

[0283] 제약 조성물 및 제약 제제

[0284] 본 발명은 항-PD-L1 항체 또는 항체의 단편 또는 그의 면역접합체를 포함하는 조성물 (제약 조성물 또는 제약 제제 포함), 및 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 핵산을 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 PD-L1에 결합하는 하나 이상의 항체 또는 항체의 단편 또는 그의 면역접합체, 또는 PD-L1에 결합하는 하나 이상의 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 하나 이상의 핵산을 포함한다. 상기 조성물은 적합한 제약 보충 물질, 예컨대, 제약 담체, 부형제, 및 완충제를 비롯한, 당업계에 공지된 기타 다른 것을 추가로 함유할 수 있다.

[0285] 본 발명에서 사용하기에 적합한 제약 담체는 멸균 액체, 예컨대, 물 및 오일 (페트롤륨, 또는 동물, 식물 또는 합성 공급원의 오일, 예컨대, 땅콩유, 대두유, 광유, 참깨유 등 포함)일 수 있다. 제약 조성물이 정맥내로 투여될 때, 물이 바람직한 담체이다. 염수 용액 및 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액은 또한 액체 담체로서, 특히 주사액용으로 사용될 수 있다.

[0286] 적합한 부형제로는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크, 실리카겔, 스테아르산 나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 탈지분유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 부형제의 사용에 대해서는 문헌 [Handbook of Pharmaceutical Excipients", the fifth edition, R. C. Rowe, P. J. Seskey and S. C. Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago]를 참조한다.

[0287] 조성물은 원하는 경우, 소량의 습윤화제 또는 유화제 또는 pH 완충제를 추가로 함유할 수 있다.

[0288] 조성물은 액체, 현탁제, 에멀전, 정제, 환제, 캡슐제, 분제, 서방형 제제 등의 형태를 취할 수 있다. 경구용 제제는 표준 담체 및/또는 부형제, 예컨대, 제약 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산 마그네슘 및 사카린을 함유할 수 있다.

[0289] 본원에 기술된 항-PD-L1 항체를 포함하는, 바람직하게, 동결건조된 제제 또는 수성 액체 형태의 제약 제제는 원하는 순도의 항-PD-L1 항체를 하나 이상의 임의적 제약 보충 물질과 함께 혼합함으로써 제조될 수 있다 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, the 16th edition, Osol, A. ed. (1980)]).

[0290] 예시적인 동결건조된 항체 제제는 미국 특허 번호 제6267958호에 기술되어 있다. 수성 항체 제제는 미국 특허 번호 제6171586호 및 W02006/044908에 기술되어 있는 것을 포함하고, 후자의 제제는 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다.

[0291] 본 발명의 제약 조성물 또는 제제는 또한 치료하고자 하는 특정 적응증에 의해 요구되는 1개 초과 활성 성분, 바람직하게, 서로 약영향을 미치지 않는 보완적인 활성을 갖는 활성 성분을 함유할 수 있다. 예를 들어, 다른 항암 활성 성분, 예컨대, 화학요법제 및/또는 세포독성제를 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 활성 성분은 의도 목적에 효과적인 양으로 적합하게 조합된다. 활성 성분은 화학요법제, 다른 항체, 및 다른 치료제를 비롯한, 당업계에 공지되고, 항-PD-L1 항체와 함께 조합될 수 있는 임의의 물질일 수 있다. 활성 성분의 예는 예를 들어, W02010/077634, W02016/061142, US61/264061, US60/696426, W02016/007235 등에서 참조할 수 있다.

[0292] 일부 실시양태에서, 활성 성분은 항-LAG-3 항체, 예컨대, 인간 항원에 결합하는 항-LAG-3 항체이고, 바람직하게, 항-LAG-3 항체는 인간화 항-LAG-3 항체이다.

[0293] 서방형 제제가 제조될 수 있다. 서방형 제제의 적합한 예로는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 매트릭스는 예컨대, 필름, 또는 마이크로캡슐과 같이, 성형화된 물품 형태의 것이다.

[0294] 항체의 용도

[0295] 한 측면에서, 본 발명은 대상체에서 면역 반응을 조절하는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 대상체에게 유효량의, 본원에 개시된 항체 분자 (예컨대, 항-PD-L1 항체) 또는 제약 조성물 또는 면역접합체를 투여하여 대상체에서 면역 반응을 조절하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 분자 (예컨대, 치료학상 유효량의 항-PD-L1 항체 분자) 또는 제약 조성물 또는 면역접합체는 대상체에서 면역 반응을 회복시키거나, 증진

시키거나, 자극시키거나, 또는 증가시킨다.

- [0296] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의, 본원에 개시된 항체 분자 (예컨대, 항-PD-L1 항체) 또는 제 약 조성물 또는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 종양 (예컨대, 암)을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 종양은 종양 면역 회피이다. 바람직하게, 종양은 위장 종양 (예컨대, 암), 예컨대, 결장암이다.
- [0297] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의, 본원에 개시된 항체 분자 (예컨대, 항-PD-L1 항체) 또는 제 약 조성물 또는 면역접합체를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 감염성 질환을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 감염성 질환은 만성 감염이다.
- [0298] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에서 항체-의존성 세포-매개 세포독성을 유도하는 방법에 관한 것이고, 본 방법은 대상체에게 유효량의, 본원에 개시된 항체 분자 (예컨대, 항-PD-L1 항체) 또는 제 약 조성물 또는 면역 접합체를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0299] 대상체는 포유동물, 예컨대, 영장류, 바람직하게, 고등 영장류, 예컨대, 인간 (예컨대, 본원에 기술된 질환을 앓거나, 또는 앓을 위험이 있는 환자)일 수 있다. 한 실시양태에서, 대상체는 면역 반응 증진을 필요로 하는 대상체이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 항-PD-L1 항체 분자는 T 세포 증식을 촉진시킨다. 일부 실시 양태에서, 본원에 기술된 항-PD-L1 항체 분자는 대상체에서 항원 특이적 T 세포 반응을, 예컨대, 항원 특이적 T 세포 반응에서 인터류킨-2 (IL-2) 또는 인터페론- γ (IFN- γ) 생산을 회복시키거나, 증진시키거나, 또는 자극시 킨다. 일부 실시양태에서, 면역 반응은 항-종양 반응이다. 한 실시양태에서, 대상체는 본원에 기술된 질환 (예컨대, 본원에 기술된 것과 같은 종양 또는 감염성 질환)을 앓거나, 또는 앓을 위험이 있는 대상체이다. 특 정 실시양태에서, 대상체는 면역이 손상되거나, 또는 면역이 손상될 위험이 있는 대상체이다. 예를 들어, 대상 체는 화학요법 및/또는 방사선 요법을 받거나, 또는 받아온 대상체이다. 대안적으로 또는 조합하여, 대상체는 감염에 기인하여 면역이 손상되거나, 또는 감염에 기인하여 면역이 손상될 위험이 있는 대상체이다.
- [0300] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 종양, 예컨대, 암으로는 고형 종양, 혈액학적 암, 연조직 종양, 및 전이성 병변을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0301] 고형 종양의 예로는 악성 종양, 예컨대, 각종 기관계의 육종 및 암종 (선암종 및 편평 세포 암종 포함), 예컨대, 간, 폐, 유방, 림프, 위장관 (예컨대, 결장), 비뇨생식관 (예컨대, 신장 및 방광 상피 세포), 전립선, 및 인두에서 이화된 암종을 포함한다. 선암종으로는 악성 종양, 예컨대, 대부분의 결장암, 직장암, 신세포 암 종, 간암, 폐암에서 비소세포 암종, 소장암, 및 식도암을 포함한다. 편평 세포 암종으로는 악성 종양, 예컨대, 폐암종, 식도 암종, 피부 암종, 두부경부 암종, 구강 암종, 항문 암종, 및 자궁경부 암종을 포함한다. 한 실시 양태에서, 암은 흑색종, 예컨대, 진행성 흑색종이다. 한 실시양태에서, 암은 위장암, 예컨대, 결장암이다. 상 기 언급된 암종의 전이성 병변 또한 본 발명의 방법 및 조성물을 사용함으로써 치료 또는 예방될 수 있다.
- [0302] 치료하고자 하는 바람직한 암의 비제한적인 예로는 림프종 (예컨대, 미만성 거대 B세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma) 및 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma)), 유방 암 (예컨대, 전이성 유방암), 폐암 (예컨대, 비소세포 폐암 (NSCLC), 예컨대, IV기 또는 재발성 비소세포 폐암, NSCLC 선암종, 또는 NSCLC 편평 세포 암종), 골수종 (예컨대, 다발성 골수종), 백혈병 (예컨대, 만성 골수성 백 혈병(chronic myelogenous leukemia)), 피부암 (예컨대, 흑색종 (예컨대, III기 또는 IV기 흑색종) 또는 메르 켈 세포(Merkel cell) 암종), 두부경부암 (예컨대, 두부경부 편평 세포 암종 (HNSCC)), 골수 형성이상 증후군 (myelodysplastic syndrome), 방광암 (예컨대, 이행 세포 암종), 신장암 (예컨대, 신세포 암종, 예컨대, 투명 세포 신세포 암종, 및 예컨대, 진행성 또는 전이성 투명 세포 신세포 암종), 및 결장암을 포함한다. 추가로, 난치성 또는 재발성 악성 종양도 본원에 기술된 항체 분자를 사용함으로써 치료될 수 있다.
- [0303] 치료될 수 있는 다른 암의 예로는 골암종, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁 암, 난소암, 직장암, 항문암, 위-식도암, 위암, 고환암, 자궁암, 난관암(fallopian tube cancer), 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 외음부암, 메르켈 세포 암종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 식도암, 소장암, 내분비 암 종, 갑상선암, 부갑상선암, 부신피질 암종, 연조직 육종, 요도 암종, 음경 암종, 만성 또는 급성 백혈병 (급성 골수구성(myeloid) 백혈병, 만성 골수구성 백혈병, 급성 림프모구성(lymphoblastic) 백혈병, 및 만성 림프구성 백혈병 포함), 소아 고형 종양, 림프구성 림프종, 방광암, 다발성 골수종, 골수 형성이상 증후군, 신장암 또는 요관암, 신우암, 중추 신경계 (CNS) 종양, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 제2 경추(epistropheus) 종양, 뇌간 교종, 뇌하수체 선종(pituitary adenoma), 카포시 육종(Kaposi's sarcoma), 표피양 암종, 편평 세포

암종, T 세포 림프종, 및 환경적으로 유발된 암 (석면에 의해 유발된 암, 예컨대, 중피종(mesothelioma) 포함), 및 그의 조합을 포함한다.

- [0304] 전이성 암, 예를 들어, PD-L1을 발현하는 전이성 암 (문헌 [Iwai et al., (2005) Int. Immunol. 17:133-144]) 치료는 본원에 기술된 항체 분자를 사용함으로써 수행될 수 있다.
- [0305] 종양 면역 회피 또한 본원에 기술된 항체 분자를 사용함으로써 치료될 수 있다.
- [0306] 한 실시양태에서, 종양은 상승된 수준으로 PD-L1을 발현하는 암이다.
- [0307] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 암은 결장암 및 그의 전이성 암이다.
- [0308] 일부 실시양태에서, 감염은 급성 또는 만성 감염이다. 일부 실시양태에서, 만성 감염은 지속성 감염, 잠복성 감염 또는 지발성 감염이다. 일부 실시양태에서, 만성 감염은 박테리아, 바이러스, 진균, 및 원생동물로 구성된 군으로부터 선택되는 병원체에 의해 유발된다.
- [0309] 일부 실시양태에서, 병원체는 박테리아이다. 한 실시양태에서, 박테리아는 마이코박테리움(*Mycobacterium*) 종 (마이코박테리움 종(*Mycobacterium* spp.)), 살모넬라(*Salmonella*) 종 (살모넬라 종(*Salmonella* spp.)), 리스테리아(*Listeria*) 종 (리스트েরিয়া 종), 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*) 종 (스트렙토코쿠스 종(*Streptococcus* spp.)), 헤모필루스(*Haemophilus*) 종 (헤모필루스 종(*Haemophilus* spp.)), 네이세리아(*Neisseria*) 종 (네이세리아 종(*Neisseria* spp.)), 클레브시엘라(*Klebsiella*) 종 (클레브시엘라 종(*Klebsiella* spp.)), 보렐리아 종 (보렐리아 종), 박테리오티데스 프라길리스(*Bacterioides fragilis*), 트레포네마(*Treponema*) 종 (트레포네마 종(*Treponema* spp.)), 및 헬리코박터 파일로리로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0310] 일부 실시양태에서, 병원체는 바이러스이다. 한 실시양태에서, 바이러스는 감염 바이러스, 예를 들어, B형 간염 바이러스 또는 C형 간염 바이러스 (HBV 또는 HCV), 단순 헤르페스 바이러스 I 또는 II, 인간 면역결핍 바이러스 I 또는 II, 시토메갈로바이러스, 엡스타인바 바이러스 (EBV), 인간 유두종바이러스, 인간 T 림프친화 백혈병 바이러스 I 또는 II, 및 수두 대상 포진 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0311] 일부 실시양태에서, 병원체는 진균이다. 한 실시양태에서, 진균 유발성 장애는 아스페르길루스증(aspergillosis), 블라스토미세스증(blastomycosis), 칸디다아시스 알비칸스(candidiasis albicans), 콕시디오이오드마이코시스 이미티스(coccidioidomycosis immitis), 히스토플라스마증(histoplasmosis), 파라코시디오이오마이코시스(paracoccidioidomycosis), 및 미포자충증(microsporidiosis)으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0312] 일부 실시양태에서, 병원체는 원생동물, 예컨대, 기생충이다. 한 실시양태에서, 원생동물에 의해 유발되는 장애는 리슈마니아증(leishmaniasis), 플라즈모디오시스(plasmodiosis) (즉, 말라리아), 크립토스포리디아증(cryptosporidiosis), 톡소플라스마증(toxoplasmosis), 트리파노소마증(trypanosomiasis), 및 흡충류 (예컨대, 주혈흡충증(schistosomiasis)), 촌충류 (예컨대, 포충증(echinococcosis)) 및 선충류 (예컨대, 선모충증(trichinosis), 회충증(ascariasis), 사상충증(filariasis) 및 분선충증(strongyloidosis))로부터 유발된 질환을 비롯한 연충 감염으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0313] 또 다른 실시양태에서, 감염은 간염 감염, 예컨대, B형 간염 또는 C형 간염 감염이다. 항-PD-L1 항체 분자는 치료상의 이익을 위해 B형 간염 감염 또는 C형 간염 감염을 위한 통상의 치료법과 함께 조합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 B형 간염 항원 (예컨대, 엔제릭스 B(Engerix B)) 또는 백신과 함께 조합하여, 및 임의적으로, 알루미늄 함유 애드루벤트와 함께 조합하여 투여된다.
- [0314] 또 다른 실시양태에서, 감염성 질환은 인플루엔자이다. 특정 실시양태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 인플루엔자 항원 또는 백신과 함께 조합하여 투여된다.
- [0315] 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편을 이용하여 예방 또는 치료하기에 적합한 질환에 대해서는 추가로 W02010/077634, W02016/061142, US60/696426, W02016/007235 또는 US61/264061에서 참조할 수 있다.
- [0316] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 언급된 관련 질환 또는 병태의 예방용 또는 치료용 약물의 생산 또는 제조에서의 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편, 또는 그의 면역접합체의 용도를 제공한다.
- [0317] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 항체 단편 또는 면역접합체는 병태, 및/또는 병태와 연관된 증상의 발병을 지연시킨다.
- [0318] 조합 요법

- [0319] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 예방 또는 치료 방법은 대상체 또는 개체에게 하나 이상의 다른 요법, 예컨대, 치료 방식 및/또는 다른 치료제와 함께 조합하여, 본원에 개시된 항체 분자 (예컨대, 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편) 또는 제약 조성물 또는 면역접합체를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0320] 일부 실시양태에서, 치료 방식은 수술 (예컨대, 중앙 절제술), 방사선 요법 (예컨대, 방사선 조사 영역이 디자인된 3차원 입체조형 방사선 요법을 포함하는 외부 빔 요법), 국부 방사선 조사 (예컨대, 미리 선택된 표적 또는 기관 지향 방사선 조사), 집속 방사선 조사 등을 포함한다. 집속 방사선 조사는 정위 방사선수술, 분할 정위 방사선수술, 및 강도 변조 방사선요법으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 집속 방사선 조사는 예를 들어, WO 2012/177624에 기술된 바와 같이, 입자 빔 (양성자), 코발트-60 (광자) 및 선형 가속기 (X-선)로 구성된 군으로부터 선택되는 방사선원을 가질 수 있다.
- [0321] 방사선 요법은 외부 빔 요법, 내부 방사선 요법, 임플란트 방사선 조사, 정위 방사선수술, 전신 방사선요법, 방사선요법, 및 영구적 또는 일시적 조직내 근접치료를 포함하나, 이에 제한되지 않는 한 방법, 또는 그의 조합을 통해 수행될 수 있다. "근접치료"라는 용어는 종양 또는 다른 증식성 조직 질환의 부위에서 또는 그 근처에서 신체 내로 삽입되는 공간이 제한된 방사성 물질에 의해 전달되는 방사선 요법을 지칭한다. 상기 용어는 방사성 동위 원소 (예컨대, At-211, I-131, I-125, Y-90, Re-186, Re-188, Sm-153, Bi-212, P-32, 및 Lu의 방사성 동위 원소)에의 노출을 포함하나, 이에 제한되지 않는 것으로 의도된다. 적합한 방사선원은 고체 및 액체를 포함한다. 비제한적인 예로서, 방사선원 고체 방사선원으로서 예컨대, I-125, I-131, Yb-169 및 Ir-192와 같은 방사성 핵종, 고체 방사선원으로서 I-125, 또는 광자, 베타 입자, 감마 방사선 또는 다른 치료용 광선을 방출하는 다른 방사성 핵종일 수 있다. 방사성 물질은 또한 임의의 방사성 핵종 용액으로부터 제조된 유체, 예를 들어, I-125 또는 I-131 용액일 수 있거나, 또는 방사성 유체는 고체 방사성 핵종 (예컨대, Au-198 및 Y-90)의 작은 입자를 함유하는 적합한 유체의 슬러리를 사용함으로써 제조될 수 있다. 추가로, 방사성 핵종은 겔 또는 방사성 미소구체 내에 함유 될 수 있다.
- [0322] 일부 실시양태에서, 치료제는 화학요법제, 세포독성제, 백신, 다른 항체, 항감염 활성제, 및 면역조정제 (예컨대, 공동 자극 분자 활성제 또는 면역 체크포인트 분자 억제제)로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0323] 예시적인 세포독성제로는 항미세관 약물, 토포이소머라제 억제제, 항대사산물, 유사분열 억제제, 알킬화제, 안트라시클린, 빈카 알칼로이드, 인터칼레이팅제, 신호 전달 경로를 방해할 수 있는 활성제, 활성 아포토시스제, 프로테아좀 억제제, 및 방사선 조사 (예컨대, 국부 또는 전신 방사선 조사 (예컨대, 감마 방사선))를 포함한다.
- [0324] 다른 예시적인 항체로는 면역 체크포인트 억제제 (예컨대, 항-CTLA-4, 항-TIM-3, 항-CEACAM 또는 항-LAG-3), 면역 세포를 자극하는 항체 (예컨대, 효능작용 G1TR 항체 또는 CD137 항체), 항암 항체 (예컨대, 리툽시맙 (리툽산(Rituxan)® 또는 마테라(MabThera)®), 트라스투주맙 (허셉틴(Herceptin)®), 토시투모맙 (벡사르(Bexxar)®), 이브리투모맙 (제바린(Zevalin)®), 알렘투주맙 (캄파스(Campath)®), 에프라투주맙 (림포시드(Lymphocide)®), 베마시주맙 (아바스티(Avastin)®), 에를로티닙 (타르세바(Tarceva)®), 세툽시맙 (에르비투스(Erbix)®)) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0325] 예시적인 화학요법제로는 아나스트로졸 (아리미덱스(Arimidex)®), 비칼루타미드 (카소덱스(Casodex)®), 블레오마이신 술페이트 (블레녹산(Blenoxane)®), 부술판 (밀레란(Myleran)®), 부술판 주사제 (부술팩스(Busulfe x)®), 카페시타빈 (젤로다(Xeloda)®), N4-펜틸옥시카르보닐-5-데옥시-5-플루오로시티딘, 카르보플라틴 (파라플라틴(Paraplatin)®), 카르무스틴 (BiCNU®), 클로람부실 (류케란(Leukeran)®), 시스플라틴 (플라티놀(Platinol)®), 클라드리빈 (류스타틴(Leustatin)®), 시클로포스파미드 (시톡산(Cytosan)® 또는 네오사르(Neosar)®), 시토신 아라비노시드, 시토신 아라비노시드 (시토사르-U(Cytosar-U)®), 데포시트 (데포 Cyt(DepoCyt)®), 디카르바진 (DTIC-돔(DTIC-Dome)®), 닥티노마이신 (악티노마이신 D 및 코스메간(Cosmegen)), 다우노마이신 히드로클로라이드 (세루비딘(Cerubidine)®), 다우노마이신 시트레이트 리포솜 주사제 (다우노솜(DaunoXome)®), 텍사메타존, 도세탁셀 (탁소테레(Taxotere)®), 독소루비신 히드로클로라이드 (아드리아마이신(Adriamycin)® 및 루벡스(Rubex)®), 에토포시드 (베페시드(Vepesid)®), 플루다라빈 포스페이트 (플루다라(Fludara)®), 5-플루오로우라실 (아드루실(Adrucil)® 및 에프덱스(Efudex)®, 플루타미드 (유렉신(Eulexin)®), 테자시타빈, 젬시타빈 (디플루오로데옥시시티딘), 히드록시우레아 (히드레아(Hydra)®), 이다루비신 (이다마이신(Idamycin)®), 이포스파미드 (IFEX®), 이리노테칸 (캄프토사르(Camptosar)®), L-아스파라기나제 (ELSPAR®), 칼슘 폴리네이트, 멜파란 (알케란(Alkeran)®), 6-메르캅토프린 (퓨리네톨(Purinethol)®), 메토티렉세이트 (폴렉스(Folex)®), 미톡크산트론, 젬투주맙 오조가미신 (밀로타르그(mylotarg)), 파클리탁셀 (탁솔(Taxol)®), 피닉스 (이트롭 90/MX-DTPA), 펜토스타틴, 카르무스틴 임플란트와 조합된 폴리페프로산 20

(글리아델(Gliadel)®), 타목시펜 시트레이트 (놀바덱스(Nolvadex)®), 테니포시드 (부몬(Vumon)®), 6-티오구아닌, 티오테파, 티라파자민 (티라존(Tirazone)®), 주사용 토포테칸 히드로클로라이드 (히캄프틴(Hycamptin)®), 빈블라스틴 (벨반(Velban)®), 빈크리스틴 (온코빈(Oncovin)®), 비노렐빈, 이브루티닙, 자이데리그(Zydelig) (이델랄리십) 및 브렌톡시맙 베도틴을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0326] 예시적인 백신으로는 암 백신을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 백신은 DNA 기반 백신, RNA 기반 백신 또는 바이러스 형질도입 기반 백신일 수 있다. 암 백신은 예방용 또는 치료용 백신일 수 있다. 일부 실시양태에서, 암 백신은 실시양태에서, 개인맞춤형 펩티드 백신인 펩티드 암 백신이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 암 백신은 다가 긴 펩티드, 다중 펩티드, 펩티드 혼합물, 하이브리드 펩티드, 또는 펩티드로 펄스된 수지상 세포 백신이다 (예컨대, 문헌 [Yamada et al., Cancer Sci, 104:14-21, 2013] 참조).

[0327] 예시적인 활성 항감염제로는 상기 기술된 바와 같은, 항바이러스제, 항진균제, 항원생동물제 및 박테리아제, 예컨대, 뉴클레오시드 유사체 (지도부딘 (AST), 간시클로비르, 포스카넷, 또는 시도비르(cidovir))를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0328] 면역조정제로는 면역 체크포인트 분자 억제제 및 공동 자극 분자 활성제를 포함한다.

[0329] 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 분자 억제제는 PD-1, PD-L2, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, CEACAM (예컨대, CEACAM-1, -3, 및/또는 -5), VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 및/또는 TGFR β 의 억제제이다. 분자 억제제는 DNA, RNA, 또는 단백질 수준으로 발생할 수 있다. 일부 실시양태에서, 억제성 핵산 (예컨대, dsRNA, siRNA, 또는 shRNA)은 면역 체크포인트 분자의 발현을 억제시키는 데 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, 면역 체크포인트 분자 억제제는 면역 체크포인트 분자, 예컨대, 가용성 리간드에 결합하는 폴리펩티드 (예컨대, PD-1-Ig 또는 CTLA-4Ig), 또는 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 예를 들어, PD-1, PD-L2, CEACAM (예컨대, CEACAM-1, -3, 및/또는 -5), CTLA-4, TIM-3, LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, 및/또는 TGFR 베타에 결합하는 항체 또는 그의 단편, 또는 그의 조합이다. 다른 실시양태에서, 면역조정제는 CEACAM (예컨대, CEACAM-1, -3 및/또는 -5) (예컨대, 인간 CEACAM (예컨대, CEACAM-1, -3 및/또는 -5))의 억제제이다. 다른 실시양태에서, 면역조정제는 LAG-3 (예컨대, 인간 LAG-3)의 억제제이다. 한 실시양태에서, LAG-3의 억제제는 LAG-3에 대한 항체 분자, 예컨대, 인간 LAG-3에 결합하는 항-LAG-3 항체, 바람직하게, 인간화 항-LAG-3 항체이다. 다른 실시양태에서, 면역조정제는 TIM-3 (예컨대, 인간 TIM-3)의 억제제이다. 한 실시양태에서, TIM-3의 억제제는 TIM-3에 대한 항체 분자이다.

[0330] 일부 실시양태에서, 면역조정제는 공동 자극 분자 활성제 또는 효능제이다. 한 실시양태에서, 공동 자극 분자 효능제는 OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD30, CD40, BAFTR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, 또는 CD83 리간드로 구성된 군으로부터 선택되는 분자의 효능제 (예컨대, 효능작용 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 가용성 융합체)이다. 다른 실시양태에서, 면역조정제는 GITR 효능제이다. 한 실시양태에서, GITR 효능제는 GITR에 대한 항체 분자이다. 다른 실시양태에서, 면역조정제는 OX40 효능제이다. 한 실시양태에서, OX40 효능제는 OX40에 대한 항체 분자이다.

[0331] 일부 추가 실시양태에서, 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편은 또한 티로신 키나제 억제제 (예컨대, 수용체 티로신 키나제 (RTK) 억제제)와 함께 조합하여 사용될 수 있다. 예시적인 티로신 키나제 억제제로는 표피 성장 인자 (EGF) 경로 억제제 (예컨대, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 억제제), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 경로 억제제 (예컨대, 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR) 억제제, 예를 들어, VEGFR-1 억제제, VEGFR-2 억제제, 및 VEGFR-3 억제제), 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF) 경로 억제제 (예컨대, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 (PDGFR) 억제제, 예를 들어, PDGFR-베타 억제제), RAF-1 억제제, KIT 억제제, 및 RET 억제제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0332] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편은 또한 PI3K 억제제, mTOR 억제제, BRAF 억제제, MEK 억제제, JAK2 억제제, 및/또는 기타 다른 것과 조합하여 사용될 수 있다.

[0333] 본 발명의 방법 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편의 투여는 항원 투여와 함께 조합된다. 항원은 예를 들어, 종양 항원, 바이러스 항원, 박테리아 항원, 또는 병원체로부터의 항원일 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 항원은 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 종양 항원은 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 종양 항원은 종양 세포이다.

[0334] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 T 세포

(예컨대, 세포독성 T 림프구 또는 CTL)의 입양 전달을 포함하는 요법과 함께 조합하여 투여될 수 있다.

[0335] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편은 항종양제와 함께 조합하여 투여될 수 있다.

[0336] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편은 종양 용해 바이러스와 함께 조합하여 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 용해 바이러스는 암 세포에서 선택적으로 복제할 수 있고, 암 세포 사멸을 일으키거나, 또는 암 세포의 성장을 지연시킬 수 있다. 일부 경우에서, 종양 용해 바이러스는 비-암 세포에는 어떤 영향도 미치지 않거나, 또는 그에 대해 최소의 영향을 준다. 종양 용해 바이러스로는 종양 용해 아데노바이러스, 종양 용해 단순 헤르페스 바이러스, 종양 용해 레트로바이러스, 종양 용해 파르보바이러스, 종양 용해 백시니아 바이러스, 종양 용해 신드비스 바이러스, 종양 용해 인플루엔자 바이러스, 또는 종양 용해 RNA 바이러스 (예컨대, 종양 용해 레오바이러스, 종양 용해 뉴캐슬 질환(Newcastle disease) 바이러스 (NDV), 종양 용해 홍역 바이러스, 또는 종양 용해 수포성 구내염(vesicular stomatitis) 바이러스 (VSV))를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 종양 용해 바이러스는 US 2010/0178684 A1에 기술된 바이러스, 예를 들어, 재조합 종양 용해 바이러스이다.

[0337] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체 또는 그의 단편은 시토카인과 함께 조합하여 투여될 수 있다.

[0338] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 (i) 암 세포를 사멸시키고, 종양을 감소시키는 방사선 요법 (예컨대, 방사선 요법, X선 요법 및 방사선 조사) 또는 전리 방사선으로서, 여기서, 방사선 요법은 외부 빔 방사선 요법 (EBRT) 또는 내부 근접치료를 통해 수행될 수 있는 것; (ii) 일반적으로, 빠르게 분열하는 세포에 영향을 주는 것인 화학요법, 또는 세포독성 약물의 적용; (iii) 표적화 요법, 또는 특이적으로 암 세포 단백질의 탈조절에 영향을 주는 작용제 (예컨대, 티로신 키나제 억제제 예컨대, 이마티닙 및 게피티닙; 모노클로날 항체; 광역학적 요법); (iv) 면역요법, 또는 숙주 면역 반응 증강 (예컨대, 백신); (v) 호르몬 요법, 또는 호르몬 차단 (예컨대, 종양이 호르몬에 감수성일 때); (vi) 혈관신생 억제제, 또는 혈관신생 및 성장을 차단하는 요법; 및 (vii) 완화 치료, 또는 통증, 구역, 구토, 설사 및 출혈을 관리하기 위해 건강관리의 질을 향상시키는 것에 관한 상기 요법으로, 여기서, 진통제, 예컨대, 모르핀 및 옥시코돈, 및 구토 방지제, 예컨대, 온단세트론 및 아프레피탄트는 보다 적극적인 치료 요법을 허용하기 위해 제공되는 것인 것을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 당 업계의 통상의 암 요법과 함께 조합될 수 있다.

[0339] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 숙주 면역 기능을 증강시키는 통상적인 방법과 함께 조합될 수 있다. 통상적인 방법으로는 (i) 예를 들어, (a) 이중성 MHC 동종항원을 코딩하는 DNA를 종양에 주사하거나, 또는 (b) 면역 항원 인식 가능성을 증가시키는 유전자 (예컨대, 면역자극성 시토카인, GM-CSF, 공동 자극 분자 B7.1, 및 공동 자극 분자 B7.2)로 생검화된 종양 세포를 형질감염시킴으로써 이루어지는 APC 증강, (ii) 입양 세포 면역요법, 또는 활성화된 종양 특이적 T 세포 요법을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 입양 세포 면역요법은 종양-침윤성 숙주 T 림프구를 단리시키고, 예를 들어, IL-2 또는 종양, 또는 그 둘 모두를 통해 시험관내에서 집단 확장을 자극시키는 것을 포함하고; 추가로 단리된 기능 장애 T 세포를 시험관내에서 본 발명의 항체를 적용시킴으로써 활성화시킬 수 있고, 이어서, 활성화된 T 세포를 숙주에 다시 투여할 수 있다.

[0340] 상기 기술된 다양한 조합 요법은 치료를 위해 추가로 조합될 수 있다.

[0341] 항-PD-L1 항체와 다른 치료 방식 또는 치료제와의 조합의 더 많은 예는 W02016/061142, W02010/077634, US60/696426, US61/264061, W02016/007235 등에서 살펴볼 수 있다.

[0342] 상기 조합 요법은 공동 투여 (2개 이상의 치료제가 동일 제제 또는 별개의 제제 중에 함유되어 있는 경우), 및 본 발명의 항체의 투여가 다른 요법, 예컨대, 치료 방식 또는 치료제 투여 이전, 그와 동시에, 및/또는 그 이후에 이루어질 수 있는 것인 별개의 투여, 둘 모두를 포함한다. 항체 분자 및/또는 다른 요법, 예컨대, 치료제 또는 치료 방식은 활동성 질환 또는 완화 또는 질환 활동성이 감소된 기간에 투여될 수 있다. 항체 분자는 다른 요법 이전에, 다른 요법과 함께 동시에, 다른 요법 이후에, 또는 질환 완화 동안에 투여될 수 있다.

[0343] 한 실시양태에서, 항-PD-L1 항체 투여 및 다른 요법 (치료 방식 또는 치료제)의 투여는 서로 약 1개월 이내, 또는 약 1, 2, 또는 3주 이내에, 또는 약 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 이내에 이루어진다.

[0344] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 항체 조합은 별개로 (예컨대, 별개의 항체로서), 또는 연결 방식으로 (예컨대, 이중특이적 또는 삼중특이적 항체 분자로서) 투여될 수 있다.

[0345] 본 발명의 면역접합체를 항-PD-L1 항체 대신으로 또는 그에 대해 추가로 사용함으로써 임의의 요법을 수행할 수 있음을 이해할 것이다.

[0346] **항-LAG-3 항체와의 조합 요법**

[0347] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체는 치료를 위해 항-LAG-3 항체와 함께 조합하여 사용될 수 있다.

[0348] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-LAG-3 항체는 항-인간 LAG-3 항체이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-LAG-3 항체는 IgG1 항체 또는 IgG2 항체 또는 IgG4 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-LAG-3 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-LAG-3 항체는 인간화 항-LAG-3 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-LAG-3 항체는 키메라 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-LAG-3 항체의 프레임워크 서열의 적어도 일부는 인간 공통 프레임워크 서열이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항-LAG-3 항체는 또한 그의 항체 단편, 바람직하게, Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, 단일 체 가변 단편 (예컨대, scFv) 또는 (Fab')₂, 단일 도메인 항체, 디아바디 (dAb), 또는 선형 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 항체 단편을 포함한다.

[0349] 일부 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 항-LAG-3 항체 또는 그의 항원 결합 단편은

[0350] (i) 서열 번호: 75에 제시된 중쇄 가변 영역의 3개의 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR), 및/또는

[0351] (ii) 서열 번호: 76에 제시된 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 (LCDR)을 포함한다.

[0352] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-LAG-3 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 (VH) 및/또는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, 여기서,

[0353] (i) VH는 상보성 결정 영역 (CDR) HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, 여기서, HCDR1은 서열 번호: 69의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되고; HCDR2는 서열 번호: 70으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 상기 아미노산 서열로 구성되고; HCDR3은 서열 번호: 71의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되고/거나,

[0354] (ii) VL은 상보성 결정 영역 (CDR) LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하고, 여기서, LCDR1은 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되고; LCDR2는 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되고; LCDR3은 서열 번호: 74로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 상기 아미노산 서열로 구성된다.

[0355] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-LAG-3 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 영역 VH 및/또는 경쇄 가변 영역 VL을 포함하고, 여기서,

[0356] (a) 중쇄 가변 영역 VH는

[0357] (i) 서열 번호: 75로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나,

[0358] (ii) 서열 번호: 75로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나,

[0359] (iii) 서열 번호: 75로부터 선택되는 아미노산 서열과 비교하여 1개 이상의 (바람직하게, 10개 이하, 더욱 바람직하게, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하) 아미노산 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 더욱 바람직하게, 아미노산 보존적 치환)을 갖는 아미노산을 포함하고, 여기서, 바람직하게, 아미노산 변경은 CDR 중에 존재하지 않고/거나;

[0360] (b) 경쇄 가변 영역 VL은

[0361] (i) 서열 번호: 76으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나,

[0362] (ii) 서열 번호: 76으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나,

[0363] (iii) 서열 번호: 76으로부터 선택되는 아미노산 서열과 비교하여 1개 이상의 (바람직하게, 10개 이하, 더욱 바람직하게, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하) 아미노산 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 더욱 바람직하게, 아미노산 보존적 치환)을 갖는 아미노산을 포함하고, 여기서, 바람직하게, 아미노산 변경은 CDR 중에 존재하지 않는다.

[0364] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-LAG-3 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 중쇄 및/또는 경쇄를 포함하고, 여기서,

[0365] (a) 중쇄

[0366] (i) 서열 번호: 77로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또

는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나,

[0367] (ii) 서열 번호: 77로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나,

[0368] (iii) 서열 번호: 77로부터 선택되는 아미노산 서열과 비교하여 1개 이상의 (바람직하게, 20 또는 10개 이하, 더욱 바람직하게, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하) 아미노산 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 더욱 바람직하게, 아미노산 보존적 치환)을 갖는 아미노산을 포함하고, 여기서, 바람직하게, 아미노산 변경은 중쇄의 CDR 중에 존재하지 않고, 더욱 바람직하게, 아미노산 변경은 중쇄 가변 영역 중에 존재하지 않고/거나;

[0369] (b) 경쇄는

[0370] (i) 서열 번호: 78로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나,

[0371] (ii) 서열 번호: 78로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나,

[0372] (iii) 서열 번호: 78로부터 선택되는 아미노산 서열과 비교하여 1개 이상의 (바람직하게, 20 또는 10개 이하, 더욱 바람직하게, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하) 아미노산 변경 (바람직하게, 아미노산 치환, 더욱 바람직하게, 아미노산 보존적 치환)을 갖는 아미노산을 포함하고, 여기서, 바람직하게, 아미노산 변경은 경쇄의 CDR 중에 존재하지 않고, 더욱 바람직하게, 아미노산 변경은 경쇄 가변 영역 중에 존재하지 않는다.

[0373] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-PD-L1 항체에 대한 변형은 항-LAG-3 항체에도 또한 적용한다.

[0374] 투여 경로 및 투여량

[0375] 본 발명의 항체 (또는 항체, 또는 임의의 다른 치료제를 함유하는 제약 조성물 또는 면역접합체)는 필요한 경우, 국소 치료에 의해, 비경구적 투여, 폐내 투여, 비내 투여, 및 병변내 투여를 비롯한, 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있다. 비경구적 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 또는 피하 투여를 포함한다. 약물은 어느 정도까지는 단기 또는 장기 치료에 의존하여 임의의 적합한 수단에 의해, 예컨대, 주사, 예컨대, 정맥내 또는 피하 주사에 의해 투여될 수 있다. 본원에서는 단일 투여 또는 다회 투여, 볼루스 주사, 및 다중 시점에서의 펄스 주입을 포함하나, 이에 제한되지 않는 다양한 투약 스케줄이 고려된다.

[0376] 질환을 예방 또는 치료하기 위해, (단독으로 또는 다른 치료제 중 하나 이상의 것과 함께 조합하여 사용될 때) 본 발명의 항체의 적절한 투여량은 치료하고자 하는 질환 타입, 항체의 타입, 질환의 중증도 및 진행 상태, 항체 투여 목적이 예방인지 또는 치료인지 여부, 이전 치료, 환자의 임상적 이력 및 항체에 대한 반응, 및 주치의의 재량에 의존할 것이다. 항체는 단일 투약을 통해 또는 연속 치료를 통해 환자에게 적합하게 투여된다.

[0377] 일부 실시양태에서, 용량 요법은 최적의 원하는 반응 (예를 들어, 치료 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 볼루스 주사가 제공될 수 있거나, 시간이 경과함에 따라 여러 별개의 용량이 투여될 수 있거나, 또는 용량은 치료 조건의 임계에 의해 나타나는 바와 따라 비례적으로 감량 또는 증량될 수 있다. 용량 투여의 용이성 및 균일성을 위해 비경구적 조성물을 투여 단위 형태로 제제화하는 것이 특히 이롭다. 본원에서 사용되는 바, 투여 단위 형태란, 대상체에 대한 단위 용량으로 적합한 물리적으로 별개의 단위를 지칭하고; 각 단위는 필요한 제약 담체와 함께 조합하여 원하는 치료 효과를 발휘할 수 있도록 계산된, 미리 결정된 양의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 투여 단위 형태에 대한 상세 내역은 (a) 활성 화합물의 고유한 특징 및 달성하고자 하는 특정 치료 효과, 및 (b) 개체에서 감수성 요법을 위한 활성 화합물의 조합 분야에서 고유한 특유의 특성상의 한계에 직접적으로 의존한다.

[0378] 항-PD-L1 항체 분자의 투여량 및 요법은 담당자에 의해 결정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 약 1 내지 30 mg/kg, 예컨대, 약 5 내지 25 mg/kg, 약 10 내지 20 mg/kg, 약 1 내지 5 mg/kg, 또는 약 3 mg/kg의 용량으로 주사를 통해 (예컨대, 피하로 또는 정맥내로) 투여된다. 요법은 예를 들어, 주 1회 내지 매 2, 3, 또는 4주마다 1회인 범위일 수 있다. 한 실시양태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 약 10 내지 20 mg/kg의 용량으로 격주로 투여된다. 한 실시양태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 약 5 mg/kg 이하인 용량으로, 약 4 mg/kg 이하인 용량으로, 약 3 mg/kg 이하인 용량으로, 약 2 mg/kg 이하인 용량으로, 또는 약 1 mg/kg 이하인 용량으로 단독으로 또는 조합하여 (예컨대, 항-LAG-3 항체 분자와 함께 조합하여) 격주로 투여된다. 한 실시양태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 약 1 내지 5 mg/kg인 용량으로 격주로, 약 1 내지 4 mg/kg인 용량으로 격주로, 약 1 내지 3 mg/kg인 용량으로 격주로, 또는 약 1 내지 2 mg/kg인 용량으로 격주로 투여된다. 한 실시양태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 약 1 내지 5 mg/kg인 용량으로 격주로, 약 1 내지 4 mg/kg인 용량으로 격주로, 약 1 내지 3 mg/kg인 용량으로 격주로, 또는 약 1 내지 2 mg/kg인 용량으로 격주로 단독으로 또는 조합하여 (예컨대, 항-LAG-3 항

체 분자와 함께 조합하여) 투여된다.

[0379] **진단 및 검출을 위한 방법 및 조성물**

[0380] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편 중 임의의 것은 생물학적 샘플 중 PD-L1의 존재를 검출하는 데 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "검출"이라는 용어는 정량적 또는 정성적 검출을 포함하고, 예시적인 검출은 면역조직화학법, 면역세포화학법, 유세포 분석법 (예컨대, FACS), 항체 분자와 복합체를 형성하는 자기 비드, ELISA, 및 PCR 기술 (예컨대, RT-PCR)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈청, 또는 생물학적 공급원의 다른 유체 샘플이다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 또는 조직을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 증식성 또는 암성 병변으로부터 유래된 것이다.

[0381] 한 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 진단 또는 검출 방법에서의 사용을 위해 제공된다. 또 다른 측면에서, 생물학적 샘플 중 PD-L1의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 방법은 생물학적 샘플 중 PD-L1 단백질의 존재를 검출하는 단계를 포함한다. 특정 실시양태에서, PD-L1은 인간 PD-L1이다. 특정 실시양태에서, 본 방법은 항-PD-L1 항체가 PD-L1에 결합할 수 있도록 허용하는 조건하에서 생물학적 샘플을 본원에 기술된 항-PD-L1 항체와 접촉시키는 단계, 및 항-PD-L1 항체 및 PD-L1에 의해 복합체가 형성되었는지 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 복합체가 형성되었다면, 이는 PD-L1이 존재함을 나타낸다. 본 방법은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다. 한 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 항-PD-L1 항체를 이용하는 치료에 적합한 대상체를 선별하는 데 사용되며, 예컨대, 여기서, PD-L1은 대상체 선별을 위한 바이오마커이다.

[0382] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 암 또는 종양을 진단하는 데, 예컨대, 대상체에서 본원에 기술된 질환 (예컨대, 과증식성 또는 암성 질환)의 치료 또는 진행, 진단 및/또는 병기분류를 사정하는 데 (예컨대, 모니터링하는 데) 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 표지된 항-PD-L1 항체를 제공한다. 표지로는 직접 검출되는 표지 또는 모이어티 (예컨대, 형광성 표지, 발색성 표지, 고전자밀도 표지, 화학발광성 표지, 및 방사성 표지) 뿐만 아니라, 예컨대, 효소 또는 리간드와 같이, 예를 들어, 효소 반응 또는 분자 상호작용에 의해 간접적으로 검출되는 모이어티를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 표지로는 ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , 및 ^{131}I 의 방사성 동위원소, 형광단 (예컨대, 희토류 킬레이트 또는 루시페린 및 그의 유도체), 로다민 및 그의 유도체, 단실, 움벨리페론, 루세리페라제 (luciferase) [예컨대, 반딧불이 루시페라제 및 박테리아 루시페라제 (미국 특허 번호 제 4737456호)], 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 호스레디시 퍼옥시다제 (HR), 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리사제, 탄수화물 옥시다제 (예컨대, 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제), 헤테로시클릭 옥시다제 (예컨대, 우리카제 및 크산틴 옥시다제), 과산화수소를 이용하여 염료 전구체를 산화시키는 효소 (예컨대, HR, 락토퍼옥시다제, 또는 마이크로퍼옥시다제), 비오틴/아비딘, 스핀 표지, 파지 표지, 안정한 자유 라디칼 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0383] 본원에 제공된 본 발명의 일부 실시양태에서, 샘플은 항-PD-L1 항체로 치료하기 이전에 획득된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 항암 약물로 치료하기 이전에 획득된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 암이 전이된 이후에 획득된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 포르말린 고정, 파라핀 포매된 (FFPE) 샘플이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 생검 (예컨대, 중심 생검) 표본, 수술 표본 (예컨대, 수술에 의한 절제로부터의 표본), 또는 미세 바늘 흡인물이다.

[0384] 일부 실시양태에서, PD-L1은 치료 이전에, 예컨대, 초기 치료 이전에 또는 특정 치료로부터 일정 간격 이후의 치료 이전에 검출된다.

[0385] 일부 실시양태에서, (예를 들어, 샘플, 예컨대, 대상체의 암 세포를 함유하는 샘플을 이용하여) 대상체에서 PD-L1의 존재를 검출하여 PD-L1 값을 측정하는 단계; PD-L1 값을 대조군 값과 비교하는 단계; 및 PD-L1 값이 대조군 값보다 크다면, 대상체에게 치료학상 유효량의 항-PD-L1 항체 (예컨대, 본원에 기술된 항-PD-L1 항체)를 임의적으로 다른 요법 중 하나 이상의 것과 함께 조합하여 투여함으로써 종양 또는 감염을 치료하는 단계를 포함하는, 종양 또는 감염을 치료하는 방법을 제공한다.

[0386] **본 발명의 항-PD-L1 항체의 예시적인 서열**

표 1

본 발명의 예시적인 항체 및 본원에 기술된 대조군 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 CDR 시열 (화장 규칙은 괄호 안에 기재되어 있다)

항체	HCDR1 (코티아)	HCDR2 (코티아)	HCDR3 (코티아)	LCDR1 (카마트)	LCDR2 (코티아)	LCDR3 (코티아)
3-266.1	GFNIEDT (서열 번호: 1)	DFANDD (서열 번호: 5)	GLORWEAY (서열 번호: 10)	KASQDVINAVA (서열 번호: 14)	SASNRYT (서열 번호: 17)	QQHYSPPPLT (서열 번호: 21)
4-79.2	GDSITSG (서열 번호: 2)	SYTGS (서열 번호: 6)	APPWLSAMDY (서열 번호: 11)	KSSQSLYSNQKNSLA (서열 번호: 15)	WASTRES (서열 번호: 18)	QQYYSYPWT (서열 번호: 22)
4-26.6	GDSITSG (서열 번호: 2)	SYSGSi (서열 번호: 7)	GDLWPPWFAY (서열 번호: 12)	KSSQSLYSNQKNSLA (서열 번호: 15)	WASTRES (서열 번호: 18)	QQYGYGYPLT (서열 번호: 23)
4-48.5	GYTFITY (서열 번호: 3)	NPNSDY (서열 번호: 8)	QSFDFY (서열 번호: 13)	RASESVEFYGTSLQ (서열 번호: 16)	AASNVES (서열 번호: 19)	HQGRKVPYT (서열 번호: 24)
HZ3266-IgGIN2 97A	GFNIEDT (서열 번호: 1)	DFANDD (서열 번호: 5)	GLORWEAY (서열 번호: 10)	KASQDVINAVA (서열 번호: 14)	SASNRYT (서열 번호: 17)	QQHYSPPPLT (서열 번호: 21)
HZ3266-IgG1	GFNIEDT (서열 번호: 1)	DFANDD (서열 번호: 5)	GLGRWEAY (서열 번호: 10)	KASQDVINAVA (서열 번호: 14)	SASNRYT (서열 번호: 17)	QQHYSPPPLT (서열 번호: 21)
HZ3266-IgG4PA AK	GFNIEDT (서열 번호: 1)	DFANDD (서열 번호: 5)	GLORWEAY (서열 번호: 10)	KASQDVINAVA (서열 번호: 14)	SASNRYT (서열 번호: 17)	QQHYSPPPLT (서열 번호: 21)
HZ4485-IgGIN2 97A	GYTFITY (서열 번호: 3)	NPNSDY (서열 번호: 8)	QSFDFY (서열 번호: 13)	RASESVEFYGTSLQ (서열 번호: 16)	AASNVES (서열 번호: 19)	HQGRKVPYT (서열 번호: 24)
광통 시열	XXXXXXXXXX (여기서, X는 G이고, X는 D, F, 또는 Y로부터 선택되고, X는 N, S, 또는 T로부터 선택되고, X는 I 또는 P로부터 선택되고, X는 T 또는 E로부터 선택되고, X는 S, D, 또는 T로부터 선택되고, X는 G, T, 또는 Y로부터 선택된다) (서열 번호: 4)	SYXGS (여기서, X는 T 또는 S로부터 선택된다) (서열 번호: 9)			XXXXXXXXXX (여기서, X는 S, W, 또는 A로부터 선택되고, X는 Q이고, X는 H, Y, 또는 G로부터 선택되고, X는 N 또는 T로부터 선택되고, X는 S, G, 또는 R 또는 V로부터 선택되고, X는 P, Y, 또는 V로부터 선택되고, X는 L, W, 또는 Y로부터 선택되고, X는 T이다) (서열 번호: 20)	XXXXXXXXXX (여기서, X는 Q 또는 H로부터 선택되고, X는 Q이고, X는 H, Y, 또는 G로부터 선택되고, X는 N 또는 T로부터 선택되고, X는 S, G, 또는 R 또는 V로부터 선택되고, X는 P, Y, 또는 V로부터 선택되고, X는 L, W, 또는 Y로부터 선택되고, X는 T이다) (서열 번호: 25)
ATE	GFTFSDS (서열 번호: 52)	SPYGGS (서열 번호: 53)	RHWPGGFDY (서열 번호: 54)	QDVSTAVA (서열 번호: 55)	SASFLYS (서열 번호: 56)	QQYLYHPAT (서열 번호: 57)
ADI-31853*	GSISSESYWG (서열 번호: 69)	SIVSYGYTYNPSLKS (서열 번호: 70) (카마트 규칙)	ARVRTWDAAFDI (서열 번호: 71) (IMGT 규칙)	QASQDISNYLN (서열 번호: 72) (카마트 규칙)	DASNLET (서열 번호: 73) (카마트 규칙)	QQVLELPWT (서열 번호: 74) (카마트 규칙)

* ADI-31853의 CDR 장의 규칙은 그 라인에 열거되어 있다.

표 2

본 발명의 예시적인 항체 및 본원에 기술된 대조군 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역

항체	중쇄 가변 영역 (VH)	경쇄 가변 영역 (VL)
3-266.1	EVQLQSSVAELV KPGASVKLSCTASGFNIETV IHWVKORPEQGLEWIGRI DPANDDTKYDPKFGKATITADTSNTAYLQLSLTPEDTAVYYCORGRLR WEAYWGQGLTVVSA (서열 번호: 26)	SIVMTQSHKFMSTIGDRVNISCKASQDVINAVWCQKPGQSPKLLI YSASNRYTGVDPDRFTGSGGTDFTLTSSVQAEDLAVYYCQQHYSPPL LTFGGGKLEIK (서열 번호: 32)
4-79.2	EVQLQSSGPSLV KPSQTLSLICSVTGDSTSGYWNWIREPFGNKLEYLGVI SYGTSTYINPSLKSRSITRDTSKNQYSLQNSVTEDTATYYCAKAPRWL SAMDYWGQGSTVTVSS (서열 번호: 27)	DIVMSQSPSLASVGEKITMSCKSSQSLLYSSNQKNSLAWYYQKPG QSPKLLIY WASITRESGVDPDRFTGSGGTDFTLTSSVKAEDLAVYYCQ QYYSPWTFGGGKLEIK (서열 번호: 33)
4-26.6	QVQLKESGPSLV KPSQTLSLTCSVTGDSTSGYWNWIRKFPNGKLEYMGVI SYSGSTYHNPSLKSRSITRDTSKNQYSLQNSVTEDTATYYCARGDLWP PWEAYWGQGLTVVSA (서열 번호: 28)	NIVMTQTPSLASVGEKITMSCKSSQSLLYSSNQKNSLAWYYQKPG QSPKLLIY WASITRESGVDPDRFTGSGGTDFTLTSSVKAEDLAVYYCQ QYYGYPLTFGAGTKLEIK (서열 번호: 34)
4-48.5	EVQLQSSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTMHWVKORPGQGLEWI GNINPNSDYAIYNOKFKDKATLTADKSSNTAYMQLSGLTSEDSAVYYCAK QSFDYWGQGLTVVSS (서열 번호: 29)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEFYGTSLQLQWYYQKPGQPP KLLIYAASNVEESGVPARFSGSGGTDFTSLNHPVEVDVALYFCHQGR KVPYTFGGGKLEIK (서열 번호: 35)
HZ3266 -IgG1N 297A	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIETV IHWVQOAPGQGLEWIGRI DPANDDTKYAPKFGRAITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRGLG RWEAYWGQGLTVVSS (서열 번호: 30)	GIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVINAVAWYYQKPGQSPKLLI YSASNRYTGVDPDRFSGSGGTDFTLTSSLQAEDLAVYYCQQHYSPPL TFGGGKVEIK (서열 번호: 36)
HZ3266 -IgG1	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIETV IHWVQOAPGQGLEWIGRI DPANDDTKYAPKFGRAITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRGLG RWEAYWGQGLTVVSS (서열 번호: 30)	GIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVINAVAWYYQKPGQSPKLLI YSASNRYTGVDPDRFSGSGGTDFTLTSSLQAEDLAVYYCQQHYSPPL TFGGGKVEIK (서열 번호: 36)
HZ3266 -IgG4P AAK	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIETV IHWVQOAPGQGLEWIGRI DPANDDTKYAPKFGRAITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRGLG RWEAYWGQGLTVVSS (서열 번호: 30)	GIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVINAVAWYYQKPGQSPKLLI YSASNRYTGVDPDRFSGSGGTDFTLTSSLQAEDLAVYYCQQHYSPPL TFGGGKVEIK (서열 번호: 36)
HZ4485 -IgG1N 297A	QVQLVQSGAEVAKPGASVKVCKASGYTFTTYTMHWVRQRPQGQGLEWI GNINPNSDYAIYAKFOGRAITADKSTNTAYMELSSLRSEDSAVYYCAK QSFDYWGQGLTVVSS (서열 번호: 31)	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVEFYGTSLQLQWYYQKPGQPP KLLIYAASNVEESGVPARFSGSGGTDFTLTINPVEADDTANY YCHQG RKVPYTFGGGKLEIK (서열 번호: 37)
ATE	EVQLVESGGGLVOPGGSRLSCAASGFTESDSWIHWVRQAPGKGLEWVA WISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQNSLRADDTAVYYCARR HWPGGFDYWGQGLTVVSS (서열 번호: 58)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQDVSTAVAWYYQKPGKAPKLL IYSAFLYSGVPSRFSGSGGTDFTLTSSLQPEDFATYYCQYLYHPAT FQGGTKVEIK (서열 번호: 59)
ADI-31 853	QLQLQESGPGLV KPSSETLSLTCTVSGGSYSESYYWGWIRQPPGKGLEWIG SIVYSGYTYINPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSTVTAADTAVYYCARVRI WDAAFDIWGQGTMTVTVSS (서열 번호: 75)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQDISNLYNWYYQKPGKAPKLL IYDASNLFTGVPSRFSGSGGTDFTLTSSLQPEDIATYYCQVLELPP WTFGGGKVEIK (서열 번호: 76)

표 3

본 발명의 예시적인 항체 및 본원에 기술된 대조군 항체의 중쇄 및 경쇄

항체	중쇄 (HC)	경쇄 (LC)
3-26 6.1	EVQLQQSVAELVKPGASVKLSCTASGFNIEDTYIHWWKORPEQGLEWIGRI DPANDDTKYDPKFOGKATITADTSNTAYLQLSSLTPEDTAVYYCGRGLGR WEAYWGQGTLLVTVSAASTKGPSVEPLAPSSKSTSGTAAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDITLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 38)	SIVMTQSHKFMSTSIGDRVNISCCKASQDVINAWCQQKPGQSPKLLIYS ASNRYTGVDPDRFTGSGSGTDFTTISSVQAEDLAVYYCQQHYSPPLTFGG GTKLELKRTVAAPSVFHEPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLTLTKADYEKHKVYACEVTH QGILSPVTKSFNRGEC (서열 번호: 46)
4-79 .2	EVQLQQSGPSLVKPSQTLSTCSVTGDSITSGYWNWIREFPGNKLEYLGYS YTGSTYYNPSLKSRISITRDTSKNQYSLQNSVTTEDTATYYCAKAPRWLS AMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVEPLAPSSKSTSGTAAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDITLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVS VLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF	DIVMSQSPSLAVSVGEKHTMSCKSSQSLLYSSNQKNSLAWYQQKPGQS PKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTSSVKAEDLAVYYCQQYYS YPWTFGGGTGLEIKRTVAAPSVFHEPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLTLTKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호: 47)

4-26 .6	LYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSPGK (서열 번호: 39) QVQLKESGPSLVKPSQTLSTCSVTGDSITSGYWNWIRKFPGNKLEYMGYI SYSGSTYHNPSLKSRISTRDTSKNQFYQLNSVTKEIDATYYCARGDLWP PWFAYWQGTLTVTVAASATKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGQPSVFLPPKPKDITLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVS VLTVLHQDLWLNKGYCKVSNKALPAIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSPGK (서열 번호: 40)	NIVMTQTPSSLAVSVGEKITMSCSSQSLYSSNQKNSLAWYQQKPGQS PKLLIYWASTRESGVPRFTSGSGTDFTLTSSVEAEDLAVYYCQYYG YPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (서열 번호: 48)
4-48 .5	EVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTVMHWVKQRPQGGLWEI GNINPNSDYAIYNQKFQKDKAITADKSSNTAYMQLSGLTSEDSAVYYCAKQ SFQYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVN KPSNTKVVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGQPSVFLPPKPKDITLMISR PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVS LTVLHQDLWLNKGYCKVSNKALPAIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSPGK (서열 번호: 41)	DIVLTQSPASLAVSLQQRATISCRASESVEFYGTSLQWYQQKPGQPPKL LIYAASNVEGVPARTSGSGGTDFSLNIHPVEVDDVALYFCHQGRKVPY TFGGGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSPVTKSFNRGEC (서열 번호: 49)
HZ3 266- IgG IN2 97A	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIETVYIHWVQQAPGQGLEWIGRI DPANDDTKYAPKQGRATITADTSDIAYMELSLRSEDTAVYYCGRGLGR WEAYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVN KPSNTKVVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGQPSVFLPPKPKDITLMISR PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVS	GIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVINAVAWYQQKPGQSPKLLIYS ASNRYTCVPDRFSGSGGTDFTLTSSLQAEDLAVYYCQHYSPPLTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호: 50)

[0390]

[0391]

	LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 42)	GIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKASQDVINAVAWYQQKPGQSPKLLIYS ASNRYTGVPDRFSGSGGTDFLTISSLQAEDLAVYYCQOHYSPLTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGGLSSPVTKSFNRGEC(서열 번호: 50)
HZ3 266- IgG 1	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIETYIHVVQQAPGQGLEWIGRI DPANDDTKYPAPKQGRATITADTSTDTAYMELSSLRSEDYAVYCGRGLGR WEAYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 43)	GIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKASQDVINAVAWYQQKPGQSPKLLIYS ASNRYTGVPDRFSGSGGTDFLTISSLQAEDLAVYYCQOHYSPLTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGGLSSPVTKSFNRGEC(서열 번호: 50)
HZ3 266- IgG 4PA AK	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIETYIHVVQQAPGQGLEWIGRI DPANDDTKYPAPKQGRATITADTSTDTAYMELSSLRSEDYAVYCGRGLGR WEAYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPAEAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVEFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLGL(서열 번호: 44)	GIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKASQDVINAVAWYQQKPGQSPKLLIYS ASNRYTGVPDRFSGSGGTDFLTISSLQAEDLAVYYCQOHYSPLTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGGLSSPVTKSFNRGEC(서열 번호: 50)
HZ4 485- IgG IN2 97A	QVQLVQSGAEVAKPGASVKVCKASGYTFITTYTMHWVRQRPGQGLEWIG NINPNSDYAIYAQKFFQGRATIMTADKSTNTAYMELSSLRSEDSAVYYCAKQS FDYWGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTIP	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVEFYGTSLLQWYQQKPGQPPKL LIYAASNVEGVPARFSGSGGTDFLTINPVEADDTANFYCHQGRKVP YTFGGGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(서열 번호: 51)

	EVTCVVVDVSHEDPEVKENWYVDGVEVHNATKPREEQVASTYRVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 45)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITTCRASQDYSYAVAWYQOKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLSQPEDFATYYCQQLYHPHATFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호: 61)
ATE	EVQLVESGGGLYQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPKGLEWVA WISPYGGSTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYFCARR HWPGGFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YHPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDIL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQVASTY RVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD GSFELYSKLTIVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 60)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITTCRASQSISSYLNWYQOKPGKAPKLLIYA ASSLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPQPEDFATYYCQADLPAPAFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호: 63)
IgG 1	EVRLLLESGGGLYQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPKGLEWVS AISGGGSTYYADSVKGRFTTSRDSDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYFCARG GPGWYAADVWVGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDIT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQVNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD DGSFELYSKLTIVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 62)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITTCRASQDINSYLNWYQOKPGKAPKLLIY DASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTITSSLPQEDATYYCQQVLELPPTFTG GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVT HQLGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호: 78)
ADI -318 53	QLQLQESGGLVKPSETLSLTCTVSGGSIYSESYWGWIRQPPGKGLEWIG SIVYSGYTYYNPSLSKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYICARVRT WDAAFDIWVGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISR TPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFEL YSRLTIVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (서열 번호: 77)	

[0392]

표 4

예시적인 IgG1 중쇄 불변 영역	중쇄 및 경쇄 불변 영역 ASTKGPSVFPLAASSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEP KSCDKTHITCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNLN GKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSR WQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 64)
(207년 외 제 N207A 동원변이를 포함하는) IgG1 중쇄 불변 영역	ASTKGPSVFPLAASSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEP KSCDKTHITCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNLN GKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSR RWQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 65)
IgG4 중쇄 불변 영역	ASTKGPSVFPLAASSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEP YGPCCPCPAPAEAAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNLN KCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYVTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 번호: 66)
K 경쇄 불변 영역	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV KSFNRGEC (서열 번호: 67)

[0393]

[0394]

본 발명의 상기 측면 및 실시양태 및 다른 측면 및 실시양태는 도면에서 (하기의 도면에 관한 간단한 설명) 및 하기의 본 발명의 상세한 설명에서 기술되고, 하기 실시예에서 예시된다. 상기 및 본 출원 전역에 걸쳐 논의된 임의의 모든 특징들은 본 발명의 다양한 실시양태에서 조합될 수 있다. 하기 실시예는 본 발명을 추가로 예시한다. 그러나, 본 실시예는 제한하는 것이 아니라, 예시로 기술되는 것이며, 당업자에 의해 다양하게 변형될 수 있음을 이해하여야 한다.

[0395]

실시예

[0396]

실시예 1. 하이브리도마 세포 제조

[0397]

하이브리도마 기술은 두 세포 모두의 주된 특징은 유지시키면서, 두 세포를 융합시키는 방법이다. 두 세포는 항원-면역화된 마우스 비장세포 및 마우스 골수종 세포를 지칭한다. 특이적인 항원에 의해 면역화된 마우스 비장세포 (B 림프구)는 항체 분비 기능을 특징으로 하지만, 시험관내에 계대배양될 수 없다. 마우스 골수종 세포는 배양 조건하에서 무한정으로 분열 및 증식할 수 있고, 즉, 소위 불멸화된다. 선택 배지의 작용에서, 오직

골수종 세포 및 B 세포 융합에 의해 형성된 하이브리드 세포만이 계대접종 능력을 가질 수 있고, 항체 분비 기능 및 불멸화, 이 둘 모두를 갖는 세포 클론이 형성된다. 실험에서, 마우스를 hPD-L1 단백질로 면역화시키고, 마우스의 비장세포 및 골수종 세포를 융합시켜 양성 항체를 발현할 수 있는 하이브리도마 세포를 수득하였다.

[0398] 하이브리도마 융합

[0399] 실험 동물 및 면역학적 정보

마우스	Balb/c (베이징 바이탈 리버 라보라토리 애니멀 테크놀로지 컴퍼니, 리미티드(Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.))
면역화 항원	인간 PD-L1 단백질 (세포외 도메인), ACRO BIOSYSTEMS, 카탈로그 번호 PD1-H5229
면역화 방법	50 µg/마우스, 피하 (SC), 50 µl/스폿, 4개 스폿
면역화 횟수	5
최종 부스터 면역화	50 µg의 PD-L1 단백질, 복강내 (IP), 융합 전 3일째

[0400] 전기천공 준비: 디쉬를 70% 에탄올로 완전히 적시고, 사용 전 울트라 청정 벤치에서 건조시켰다.

[0401] 비장세포 분리: 마우스를 경추 탈골에 의해 희생시키고, 5 min 동안 75% 알콜로 멸균하고, 즉시 울트라 청정 벤치 중 마우스 해리용 플레이트 상에 좌측 측와위로 배치하고, 마우스의 사지를 7번 니들로 고정시켰고; 복강을 무균방식으로 개복한 후, 비장을 적출한 후, 이어서, (하기 표에 따라 제조된) 기초 배지로 세척하였다. 주변 연결 조직을 조심히 제거하였다. 이어서, 비장을 기초 배지를 함유하는 또 다른 디쉬로 옮겨 놓고; 엘보우 니들로 비장에 가압하고, 작은 니들로 천공한 후, 비장세포 현탁액을 수득하기 위해 검자로 가압하여 비장세포를 완전히 유리시켰고; 100 µM 세포 스트레이너를 통해 여과시킨 후, 30 mL 기초 배지에 의해 세포 현탁액을 1회 세척하고, 6 min 동안 1,200 rpm으로 원심분리하였다.

명칭	조성	제조
기초 배지	RPMI-1640 (하이클론(Hyclone)) FBS (하이클론) 글루타MAX™ 서플리먼트(GlutaMAX™ Supplement) (기브코(Gibco))	90% 10% 1x

[0402] 적혈구 용해: 상청액을 폐기하고, 세포를 10 mL RBC 용해 완충제 (기브코) 중에 재현탁시켰다. 이어서, 20 mL RBC 용해 완충제를 첨가하였고; 현탁액을 5 min 동안 그대로 방치하고, 6 min 동안 1,100 rpm으로 원심분리하였다. 상청액을 제거한 후, 세포를 10 mL 기초 배지 중에 재현탁시켰다. 이어서, 30 mL 기초 배지를 첨가하고, 세포를 6 min 동안 1,100 rpm으로 원심분리하였고; 상청액을 제거한 후, 세포를 20 mL 기초 배지 중에 재현탁시키고, 계수하였다.

[0403] 전기천공: SP2/0 세포 (마우스 골수종 세포) (ATCC)를 20 mL 기초 배지 중에 재현탁시키고, 계수하였고; SP2/0 세포 및 비장세포를 1:2 내지 1:1 비율로 혼합하고, 6 min 동안 1,100 rpm으로 원심분리하였고; 상청액을 제거한 후, 혼합된 세포를 10 mL 융합 완충제 (BTX프레스(BTXpress)) 중에 재현탁시켰고; 이어서, 15 mL 융합 완충제를 첨가하고, 상청액을 폐기하면서, 혼합물을 5 min 동안 1,000 rpm으로 원심분리하였고; 상기 단계를 반복한 후, 세포를 적절한 양의 융합 완충제 용액을 이용하여 재현탁시키고, 혼합된 세포 밀도를 1×10^7 개의 세포/mL로 조정하였다. 전기천공 장치의 설정 환경은 하기와 같았다. 전기천공을 위해 2 mL의 세포 현탁액을 각 디쉬에 첨가하였다.

조건	마우스 (SP2/0-ECF-F)
정렬	60 V, 3 sec
막 파괴	1500 V, 30 µs, 3X
융합 후 펄스	60 V, 3 sec

[0404] 융합 후 플레이팅: 세포를 실온에서 5 min 동안 디쉬에 그대로 방치하였고; 세포를 원심분리관으로 옮기고, (하

기 표에 따라 제조된) 선택 배지를 이용하여 $1-2 \times 10^4$ 개의 세포/mL로 희석하였다. 100 μ l의 세포 현탁액을 96 웰 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 융합 후 7일째 선택 배지를 교체하였다. 인큐베이션 10일째 (또는 세포 성장 상태에 따라, 그 이후에) 세포를 스크리닝하였다. 특이적인 항-PD-L1 항체를 발현하는 하이브리도마 세포를 FACS [FACS ARIA (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences))]를 통해 선별하였다.

명칭	조성	제조
선택 배지	RPMI-1640 (하이클론)	90%
	FBS (하이클론)	10%
	HAT 배지 (기브코)	1x
	글루타MAX™ 서플리먼트 (기브코)	1x

양성 하이브리도마 세포 계대배양

계대배양: 상기 기술된 200 μ l의 기초 배지를 96 웰 플레이트의 제2 내지 제8 열의 각 웰에 첨가하였고; 선택된 양성 웰로부터의 세포를 사용하여 현탁액을 제조하고, 제1 열에 첨가하고; 제1 열 중의 100 μ l의 세포 현탁액을 제2 열로 옮기고, 웰을 혼합한 후, 100 μ l의 혼합물을 다음 열로 옮겨 놓았다. 마지막 열에서 300 μ l의 혼합물을 수득할 때까지 상기 단계를 반복하였다. 15 min 동안 정지시킨 후, 현미경하에서 세포를 계수하였다. 혼합 및 각 웰마다 200 μ l씩 플레이팅하기 위해 약 100개의 세포를 함유하는 상응하는 부피를 상기 기술된 20 mL의 기초 배지에 첨가하였다. 1주 후, 현미경하에서 세포를 관찰하였다. 모노클로날 웰을 마킹하고, 양성 웰을 검출하였다.

세포 동결보존: 세포를 그의 상태에 대하여 모니터링하였다. 생존능이 90%를 초과하는 상기 성장 웰을 5 min 동안 1,000 rpm으로 원심분리하고, 상청액을 폐기하였고; 동결보호제 (45.5%의 FBS, 44.5%의 RPMI-1640 및 10%의 DMSO)를 이용하여 세포를 1×10^7 개의 세포/mL로 재현탁시키고, 동결보존 튜브에 분취하고, 프로그램화된 냉각 용기에 배치하고, -80°C에서 동결보존시켰다.

실시예 2. 키메라 항체의 제조 및 정제

본 발명은 분자 생명공학을 이용하여, 항-PD-L1 양성 하이브리도마 세포에서 항체 서열을 제조하고, 항체 서열을 이용하여 인간-마우스 키메라 항체를 구축한다.

하이브리도마 서열분석

RNA 추출: 신선한 세포를 5 min 동안 300 g로 원심분리하고, 상청액을 폐기하였다. 500 μ l의 LY 완충제 (바이오미가(Biomiga)) (사용 전 1 mL당 20 μ l의 β 메르캅토에탄올)를 침전물에 첨가하고, 투명해질 때까지 진탕시켰다. 혼합물을 원심분리관으로 옮기고, 2 min 동안 13,000 rpm으로 원심분리하였다. 통과액을 수집하였다. 100% 에탄올을 통과액에 1/2의 비율로 첨가하고, 투명 용액을 수득할 때까지 5회 동안 유체를 혼합하였다. 투명 용액을 RNA 수집관에 첨가하고, 1 min 동안 13,000 rpm으로 원심분리하고, 액체 부분을 폐기하였다. 500 μ l의 회수 완충제 (다카라(Takara))를 첨가하고, 혼합물을 30 s 동안 13,000 rpm으로 원심분리하고, 500 μ l의 RNA 세척 완충제 (바이오미가) (사용 전 에탄올 첨가)를 첨가한 후, 또 다른 30 s 동안 원심분리하였다. 상기 프로세스를 반복한 후, 에탄올을 완전히 제거하기 위해 추가 원심분리 및 증발을 수행하였다. 수집 칼럼을 30 μ l의, DEPC로 처리된 물로 미리 처리하고, 혼합물을 2 min 동안 12,000 g로 원심분리하고, 용출액을 수집하였다. RNA 농도를 측정하였다.

역전사를 통한 cDNA 제조:

반응 시스템 I는 하기와 같이 구성되었다:

명칭	양
올리고 dT 프라이머(Oligo dT Primer)*	1 μ l
dNTP*	1 μ l
주형 RNA (상기 수득된 RNA)	5 ug
RNase 무함유 ddH ₂ O*	10 μ l 가 될 때까지
* 다카라로부터 구입된, 프라이스크립트 II 제1 가닥 cDNA 합성 키트(PrimeScript II 1 st Strand cDNA Synthesis Kit)로부터 나온 것.	

[0419] 65℃에서 5 min 동안 인큐베이션시킨 후, 시스템을 얼음 상에서 빠르게 냉각시켰고; 반응 시스템 I에 하기 역전사 시스템을 총 20 μl 인 양으로 첨가하였다:

명칭	양
반응 시스템 I	10 μl
5 x 프라임스크립트 II 완충제*	4 μl
RNase 억제제 (40 U/ μl)*	0.5 μl (20 U)
프라임스크립트 II RTase (200 U/ μl)*	1 μl (200 U)
RNase 무함유 ddH ₂ O*	20 μl 가 될 때까지
* 다카라로부터 구입된, 프라임스크립트 II 제1 가닥 cDNA 합성 키트로부터 나온 것.	

[0420]

[0421] 천천히 혼합한 후, 42℃에서 60 min 동안 → 95℃에서 5 min 동안인 조건하에서 역전사를 유도하였다. 이어서, 혼합물을 얼음 상에서 냉각시킨 후, cDNA를 수집하였다.

[0422]

cDNA와 T 벡터와의 연결:

[0423]

PCR을 통해 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 별개로 증폭시켰다. PCR 반응 시스템은 하기 성분으로 구성되었다:

명칭	양
다카라 EX 태그 HS	0.25 μl
프라이머 믹스 1 (하기 표 5)	1 μl
프라이머 믹스 2 (하기 표 6)	1 μl
cDNA (상기 언급된 바와 같이 수득)	1 μl
10x EX 태그 완충제	5 μl
dNTP 혼합물 (각각 2.5 mM)	4 μl
RNase 무함유 ddH ₂ O	50 μl 가 될 때까지

[0424]

[0425]

PCR 반응 조건은 하기와 같았다:

94℃	5 min	
94℃	30 s	30 사이클
55℃	30 s	
72℃	60 s	
72℃	5 min	

[0426]

[0427]

0.5 μl 의 pMD20-T 벡터 (클론테크(Clontech)) 및 5 μl 의 라이게이션 마이티 믹스(Ligation Mighty Mix) (다카라)를 PCR 반응으로부터의 4.5 μl 의 PCR 생성물에 첨가하였다. 혼합물을 가볍게 혼합하고, 37℃에서 2 h 동안 인큐베이션시켜 라이게이션 생성물을 수득하였다.

[0428]

세포 형질전환:

[0429]

TOP10 수용 능력이 있는 세포 [티안젠 바이오테크 (베이징) 컴퍼니, 리미티드(Tiangen Biotech (Beijing) Co., Ltd.)]를 -80℃에서 취하고, 얼음 상에서 해동시켰다. 5 μl 의 수득된 라이게이션 생성물을 해동된 TOP10 수용 능력이 있는 세포에 첨가하였다. 혼합물을 진탕시키고, 30 min 동안 얼음 상에서 인큐베이션시켰다. 42℃에서 90 s 동안 열 쇼크시킨 후, 수득된 혼합물을 2 min 동안 얼음 상에서 빠르게 냉각시켰다. 900 μl 의 LB 배양 배지 [산곤 바이오테크 (상하이) 컴퍼니, 리미티드(Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd.)]를 EP 튜브에 첨가하고, 혼합물을 1시간 동안 220 rpm으로 진탕기 상에서 37℃에서 인큐베이션시켰다. 박테리아를 2 min 동안 3,000 g로 원심분리하였다. 800 μl 의 상청액을 제거하고, 암피실린 플레이트 상에 접종하기 위해 남은 배지를 이용하여 박테리아를 재현탁시켰다. 박테리아를 37℃에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 서열분석을 위해 클론을 분리하였다.

[0430]

키메라 항체 구축

[0431] 실시예 1의 하이브리도마로부터 생성된 마우스 항-PD-L1 항체의, 서열분석된 VH 및 VL 영역을 PCR에 의해 증폭시켰고: 상류 및 하류 프라이머의 서열은 하기 표 5 및 6에 제시되어 있다.

표 5

마우스 항-PD-L1 항체의 중쇄 가변 영역 (VH)에 대한 프라이머 (프라이머 믹스 1)

프라이머	서열 (5'-3')	비율 (%)
OVH1	SAGGTCCAGCTGCAGCAGYYTGG	28.6
OVH2	CAGGTRCAGCTGAAGSAGTCAGG	10.7
OVH3	GAKGTGCAGCTTCAGCAGTCRGG	8.9
OVH5	GAVGTGAWGCTGGTGGAGTCTGR	7.1
OVH11	GAAGTGCAGCTGTTGGAGACTGG	3.6
OVH14	GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGK	16.1
OVH15	CAGGTTACCTACAACAGTCTGG	3.5
REVESE-6	CTGAGGARACGGTGACCG	6
REVESE-4	CTGAGGAGACTGTGAGAGWGGT	4
REVESE-2-1	CTGAGGAGACGGTGACTGAGGT	2
REVESE-2-2	CTGCAGAGACAGTGACCAGAGT	2
물		q.s.

[0432]

[0433] 성분을 비율로 혼합한 후, 후속 VH PCR 증폭을 위해 생성된 프라이머 믹스 1을 사용하였다.

표 6

마우스 항-PD-L1 항체의 경쇄 가변 영역 (VL)에 대한 프라이머 (프라이머 믹스 2)

프라이머	서열 (5'-3')	비율 (%)
	P1	총합 ~75
OVK1	GATGYTKTKVTGACCCAAACTCC	21.3
OVK3	RACATTGTGCTGACMCAATCTCC	6.7
OVK4a	SAAAWTGTKCTCWCCCAGTCTCC	5.97
OVK4b	SAAAWTCTKCTCWCCCAGTCTCC	5.97
OVK4c	SAAAWTTTKCTCWCCCAGTCTCC	5.97
OVK6a	ARCATTGTGATGACCCAGWCTCA	2.63
OVK6b	ARCATTGTGATGACCCAGWCTCC	2.63
OVK6c	GRCATTGTGATGACCCAGWCTCA	2.63
OVK6d	GRCATTGTGATGACCCAGWCTCC	2.63
OVK10	GATATCCAGATGACACAGACTAC	10.8
OVK14	GAMATCMWGATGACCCARTCTCC	7.7
	P2	총합 10
mlGKV1-1	GATGYTGTGATGACCCAAACTCC	1
mlGKV1-2	GATGTTTTGATGACCCAAACTCC	1
mlGKV2-1	GATATTGTGATGACGCAGGCTGC	1
mlGKV2-2	GATATTGTGATAACCCAGGATGA	1
mlGKV4-1	GAAAATGTGCTCACYCAGTCTCC	1
mlGKV5-1	GACATCTTGCTGACTCAGTCTCC	1
mlGKV5-2	GACATTGTGATGACTCAGTCTCC	1
mlGKV9-1	GACATCCAGATGATTCAGTCTCC	1
mlGKV9-2	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC	1
mlGKV12-19	GACATCCAGATGACHCAGTCTCC	1

[0434]

	P3	총합 15
IGKV1	GATGYTKTGATGACCCAAACTCCA	6
IGKV2-109	GATATTGTGATGACGCAGGCTGCA	2
IGKV2-112	GATATTGTGATAACCCAGGATGAA	2
IGKV3-7	GACATTGTGCTAACACAGTCTCCT	1
IGKV3-1-5.10	RACATTGTGCTSACCCAATCTCCA	10
IGKV5-48	GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCA	1
IGKV6-13	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAA	1
IGKV6-32	AGTATTGTGATGACCCAGACTCCC	1
IGKV14	GACATCMAGATGACMCAGTCTCCA	4
IGKV4-51.86	GAAAATGTGCTCACYCAGTCTCCA	1
IGKV7-33	GACATTGTGATGACTCAGTCTCCA	1
IGKV9-123	GACATCCAGATGATTCAGTCTCCA	1
IGKV9-124	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCA	1
IGKV10-95	GATATCCAGATGACACAGACTACT	1
IGKV11-125	GATGTCCAGATGATTCAGTCTCCA	1
mK-Rev	TACAGTTGGTGCAGCATCAG	

[0435]

[0436]

성분을 비율로 혼합한 후, 후속 VL PCR 증폭을 위해 생성된 프라이머 믹스 2를 사용하였다.

[0437]

PCR 시스템은 하기와 같았다:

명칭	양
2X프라이머 STAR HS (프리믹스(Premix))	25 μ l
프라이머 믹스*	2 μ l
플라스미드 주형	0.5 μ l
dNTP 혼합물 (각각2.5 mM)	4 μ l
RNase 무함유 ddH ₂ O	50 μ l가 될 때까지
* VH 증폭을 위해, 프라이머 믹스 1을 적용시켰고; VL 증폭을 위해, 프라이머 믹스 2를 적용시켰다.	

[0438]

[0439]

PCR 증폭 생성물을 회수하기 위해 겔을 커팅하였다.

[0440]

상동성 재조합:

[0441]

상동성 재조합 시스템은 하기와 같이 구성되었다:

명칭	양
회수 단편	1 μ l
pTT5 벡터	2 μ l
5x 완충제 (다카라)	2 μ l
상동성 재조합 효소 (다카라)	1 μ l
ddH ₂ O	10 μ l가 될 때까지

[0442]

[0443]

37°C에서 30 min 동안 인큐베이션시킨 후, TOP10 수용 능력이 있는 세포를 재조합 생성물에 의해 형질전환시키고, 서열분석을 위해 모노클론을 분리시켰다. 올바른 삽입 방향을 갖는 플라스미드를 함유하는 클론을 양성 클론으로서 선택하고, 보존하였다.

- [0444] 키메라 항체의 발현 및 정제
- [0445] 상기 수득된 양성 클론으로부터 항-PD-L1 항체 서열을 함유하는 플라스미드를 추출하였다.
- [0446] 293F 세포 (인비트로젠(Invitrogen))를 원하는 형질감염 부피에 따라 계대접종하고, 형질감염 전달, 세포 밀도를 1.5×10^6 개의 세포/mL로 조정하였다. 형질감염 당일 세포 밀도는 대략 3×10^6 개의 세포/mL였다. 형질감염시 최종 부피의 1/10로 F17 배양 배지 (기브코, A13835-01)에 적절한 양의 플라스미드를 첨가하고, 혼합하였다. 적절한 양의 폴리에틸렌이민 (PEI) (폴리사이언시스(Polysciences), 23966)을 (293F 세포 중 플라스미드 대 PEI의 비율 = 1:3으로) 혼합물에 첨가하고, 혼합하고, 실온에서 10 min 동안 인큐베이션시켜 DNA/PEI 혼합물을 수득하였다. DNA/PEI 혼합물을 이용하여 재현탁시킨 후, 세포를 36.5°C , 8% CO_2 에서 도입하였다. 24 h 후, 세포를 형질감염 부피의 2%로 FEED (시그마)로 보충하고, 36.5°C , 8% CO_2 에서 120 rpm으로 인큐베이션시켰다. 계대배양 6일째 또는 생존능이 60% 아래로 하락할 때까지, 세포를 원심분리하고, 상청액을 수집하고, 정제하였다.
- [0447] 0.5 M NaOH로 밤새도록 처리한 후, 정제를 위해 중력 칼럼을 180°C 에서 4시간 동안 건조시켜 정제 칼럼을 수득하였다. 유리 용기를 증류수로 세척하고, 건조시켰다. 정제 전, 수집된 배양물을 30 min 동안 4,500 rpm으로 원심분리하고, 세포를 폐기하였다. 상청액을 $0.22 \mu\text{L}$ 필털르 통해 여과하였다. 각 튜브를 1 mL 단백질 A로 충전시키고, 10 mL의 결합 완충제 (인산나트륨 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.0)로 평형화시켰다. 여과된 상청액을 정제 칼럼에 로딩한 후, 이어서, 15 mL 결합 완충제로 다시 평형화시켰다. 5 mL의 용리제 완충제 (시트르산 + 시트르산 나트륨 0.1 M, pH 3.5)를 첨가하였다. 용출액을 수집하고, 용출액 1 mL당 $80 \mu\text{L}$ 의 트리스(Tris)-HCl을 첨가하였다. 수집된 항체의 완충제를 한외여과/정용여과에 의해 PBS (기브코, 70011-044)로 교체하고, 농도를 측정하였다.
- [0448] 본 발명의 수득된 4개의 키메라 항체의 CDR, 경쇄 및 중쇄 가변 영역, 및 경쇄 및 중쇄의 아미노산 서열, 및 그의 서열 번호는 상기 표 1 내지 3에 제시되어 있다.
- [0449] 본 발명에서 사용된 참조 항체는 로슈(Roche)의 PD-L1 항체인 아테졸리주맙(Atezolizumab) (이하 ATE 또는 Ate, 또는 상표명: 테센트릭으로 지칭된다)이고, 그의 CDR, 경쇄 및 중쇄 가변 영역, 및 경쇄 및 중쇄의 아미노산 서열 또한 상기 표 1 내지 3에 제시되어 있다.
- [0450] **실시예 3. 생물학적 광학 간섭법에 의해 측정된, 키메라 항체의 항원에 대한 결합 동역학적 성질**
- [0451] 본 발명의 항체의 인간 PD-L1에의 결합에 대한 평형 해리 상수 (K_D)를 생물학적 광학 간섭법 (포르테바이오)에 의해 측정하였다. 선행 기술의 포르테바이오 친화도 측정법을 수행하였다 (문헌 [Estep, P., et al, High throughput solution based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2):270-8]).
- [0452] 실험 30분 전, 샘플 개수에 의존하여 적절한 개수의 AMQ (팔(Pal1), 1506091) (샘플 검출을 위해) 또는 AHQ (팔, 1502051) (양성 대조군 검출을 위해) 센서를 SD 완충제 (PBS 1x, BSA 0.1%, 트윈(Tween)-20 0.05%) 중에 침지시켰다.
- [0453] SD 완충제, 항체, 및 항원 (인간 PD-L1, 마우스 PD-L1 및 마카카 파스시쿨라리스(*macaca fascicularis*) PD-L1 포함, 이들 모두 아크로바이오시스템즈(Acrobiosystems)로부터 구입)을 각각 $100 \mu\text{L}$ 씩 96 웰 검은색 폴리스티렌 마이크로플레이트 (그라이너(Greiner), 675076) 면적 절반부에 첨가하였다. 샘플 위치에 따라 센서를 배열하였다. 장치 환경은 하기와 같았다: 작동 절차는 기준선, $\sim 1 \text{ nm}$ 로딩, 기준선, 회합, 및 해리였다. 각 절차의 실행 시간은 회합 및 해리 속도에 의존하였다. 회전 속도는 400 rpm이고, 온도는 30°C 였다. 포르테바이오 분석 소프트웨어에 의해 K_D 값을 분석하였다.
- [0454] 상기 기술된 측정법에서, 항체 3-266.1, 4-79.2, 4-26.6, 및 4-48.5의 친화도는 하기 표 7에 제시되어 있다:

표 7

포르테바이오 검정법에 의한 항원 및 항체의 결합에 대한 친화도 상수 (평형 해리 상수)

항체	K_D (M)
3-266.1	9.80E-10
4-79.2	7.56E-09
4-26.6	3.85E-09
4-48.5	1.23E-09
ATE	2.94E-09

[0455]

[0456]

본 검정법에서, 키메라 항체 3-266.1, 4-79.2, 4-26.6, 및 4-48.5의 K_D 값은 각각 $9.80E^{-10}$ M, $7.56E^{-09}$ M, $3.85E^{-09}$ M, 및 $1.23E^{-09}$ M이었다. 본 연구에서의 항체는 참조와 비교하였을 때, 유사하거나, 또는 우수한 K_D 값을 가졌다.

[0457]

실시예 4. 키메라 항체 및 PD-L1을 과다발현하는 세포의 결합 검정법

[0458]

본 연구에서, 구배로 희석된, 본 발명의 키메라 항체의, 세포 표면 상에 인간 PD-L1을 과다발현하는 안정한 CHO 세포주에의 결합을 유세포 분석법에 의해 측정하였다.

[0459]

다중 클로닝 부위 (MCS)로 클로닝된 인간 PD-L1 cDNA (시노 바이오로지컬 (Sino biological))를 보유하는 pCHO1.0 벡터 (인비트로젠)로 CHO-S 세포 (인비트로젠, 엑스피CHO™ 발현 시스템 키트(Expicho™ Expression System Kit), 카탈로그 번호 A29133)를 형질감염시킴으로써 인간 PD-L1을 과다발현하는 CHO 세포 (CHO-PDL1)를 생성하였다.

[0460]

CHO-PDL1 세포를 계수하고, 1×10^6 개의 세포/mL로 희석하고, U자 형상의 바닥 96 웰 플레이트의 각 웰에 $100 \mu\text{l}$ / 웰로 첨가하였다. 현탁액을 5 min 동안 400 g로 원심분리하고, 상청액을 폐기하였다. 샘플 (각각 키메라 항체 3-266.1, 4-79.2, 4-26.6 및 4-48.5, 및 양성 대조군 Ate) (항체를 500 nM 농도로부터 8번째 농도까지 0.1% 소 혈청 albumin (BSA)을 함유하는 PBS 중에서 연속하여 3배로 희석하였다)을 U자 형상의 플레이트에 첨가하였다. 세포를 $100 \mu\text{l}$ / 웰로 재현탁시킨 후, 이어서, 얼음 상에서 30 min 동안 방치하였다. 현탁액을 5 min 동안 400 g로 원심분리하고, 상청액을 폐기하였다. 세포를 PBS로 1회 세척하였다. 혼합물을 5 min 동안 400 g로 원심분리하고, 상청액을 폐기하였다. (PBS 중에서 1:500으로 희석된) 항-마우스-Fab (잭슨 이뮤노 리서치(Jackson Immuno Research))에 대한 FITC 표지된 2차 항체를 웰당 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하고, 항-인간-Fab (잭슨 이뮤노 리서치)에 대한 FITC 표지된 2차 항체를, 양성 대조군 항체가 첨가된 세포에 첨가하였다. 세포를 암실에서 얼음 상에서 30 min 동안 인큐베이션시켰다. 상청액을 폐기하면서, 세포를 5 min 동안 400 g로 원심분리하고, PBS로 1회 세척하였다. 세포를 $100 \mu\text{l}$ 의 1x PBS를 이용하여 재현탁시키고, FACS에 의해 검출하였다.

[0461]

상기 기술된 검정법에서, 항체 3-266.1, 4-79.2, 4-26.6 및 4-48.5의 CHO-PDL1 세포에의 결합은 도 1에 제시되어 있다.

[0462]

본 검정법에서, 항체 3-266.1, 4-79.2, 4-26.6, 및 4-48.5는 모두 CHO 세포 상에 과다발현된 인간 PD-L1에 결합하였고, EC_{50} 은 각각 2.139 nM, 2.598 nM, 1.985 nM, 및 1.995 nM이었다. 참조 항체 ATE와 비교하였을 때, 항체 3-266.1, 4-79.2, 4-26.6, 및 4-48.5는 우수한 친화도를 가지고 있고, 일부 항체의 결합 능력은 참조 항체의 2배를 초과하였다.

[0463]

실시예 5. 키메라 항체의 인간화

[0464]

실시예 1에서 수득된 키메라 항체를 인간화하였다. 항체 인간화는 마크로몰테크(Macromoltek)로부터의 SmrtMol 휴먼나이즈(SmrtMolHumanize) 특허 소프트웨어 프로그램을 이용하여 수행하였다. 서열을 소프트웨어에 입력하고, 시스템은 서열의 3차원 모델을 생성하였다. 이어서, 서열을 하기 단계를 통해 인간화하였다:

[0465]

1) CDR 루프의 구조를 결정하는 단계;

[0466]

2) 중쇄 및 경쇄의 각 V/J 영역에 대하여 가장 가까운 상동성 서열에 대해 인간 생식계열 서열 데이터베이스 검

색하는 단계;

[0467] 3) 중쇄 및 경쇄와 가장 유사하고, 최소량의 복귀 돌연변이를 갖는 인간 생식계열에 대해 스크리닝하는 단계;

[0468] 4) 키메라 항체의 CDR 영역을 인간 항체의 백본 상에서 구축하는 단계;

[0469] 5) 서열 및 구조적 특징에 기초하여 백본 중에서 CDR 기능을 유지하는 아미노산의 위치를 결정하는 단계;

[0470] 6) 서열의 중요한 위치에서 (입력된 아미노산으로 다시) 복귀 돌연변이를 부가하는 단계;

[0471] 7) 인간화 서열의 3차원 모델을 생성하는 단계;

[0472] 8) 서열 및 구조를 수동으로 조사하여 미스폴딩 또는 안정성 감소를 유발할 수 있는 위험 부위를 확인하는 단계;

[0473] 9) 위험 부위에서 아미노산을 최적화하는 단계.

[0474] 본 발명의 수득된 4개의 키메라 항체의 (HZ3266-IgG1N297A, HZ3266-IgG1, HZ3266-IgG4PAK, 및 HZ4485-IgG1N297A) CDR, 경쇄 및 중쇄 가변 영역, 및 경쇄 및 중쇄의 아미노산 서열은 상기 표 1 내지 3에 제시되어 있다.

[0475] 실시예 6. 포르테바이오에 의해 측정된, 인간화 항체의 항원에 대한 결합 동역학적 성질

[0476] 본 발명의 상이한 Fc 서브타입의 인간화 항체의 인간 PD-L1에의 결합에 대한 평형 해리 상수 (K_D)를 포르테바이오에 의해 측정하였다. 포르테바이오 친화도 측정법은 실시예 2에 제시되어 있다. 상기 기술된 측정법에서, 항체 HZ3266-IgG1N297A, HZ3266-IgG1, HZ3266-IgG4PAK, 및 HZ4485-IgG1N297A의 친화도는 하기 표 8에 제시되어 있다:

표 8

포르테바이오 측정법에 의한 항원 및 항체의 결합에 대한 친화도 상수

항체	K_D (M)
ATE	1.62E-09
HZ3266-IgG1N297A	7.24E-10
HZ 3266-IgG1	9.35E-10
HZ3266-G4PAAK	1.32E-09
HZ4485-IgG1N297A	3.17E-09

[0478] 본 측정법에서, 본원에 기술된 인간화 항체 HZ3266-IgG1N297A, HZ3266-IgG1, HZ3266-G4PAAK 및 HZ4485-IgG1N297A의 K_D 값은 각각 $7.24E^{-10}$ M, $9.35E^{-10}$ M, $1.32E^{-09}$ M, 및 $3.17E^{-09}$ M이었고, 본 연구에서, 인간화 항체는 참조의 것과 비교하였을 때, 유사하거나, 또는 우수한 K_D 값을 가졌다.

[0479] 실시예 7. 인간화 항체 및 PD-L1을 과다발현하는 세포의 결합 측정법

[0480] 본 연구에서, 구배로 희석된, 본 발명의 인간화 항체의, 세포 표면 상에 인간 PD-L1을 과다발현하는 안정한 CHO 세포주 (CHO-PDL1)에의 결합을 유세포 분석법에 의해 측정하였다. 본 측정법은 실시예 3에 제시되어 있되, 단, 예외적으로, 사용된 항체는 인간화 항체 HZ3266-IgG1N297A, HZ3266-IgG1, HZ3266-G4PAAK, 및 HZ4485-IgG1N297A였다. 항체를 500 nM 농도로부터 8번째 농도까지 0.1% 소 혈청 albumin (BSA)을 함유하는 PBS 중에서 연속하여 3배로 희석하였다. 인간화 항체 HZ3266-IgG1N297A, HZ3266-IgG1, HZ3266-G4PAAK, HZ4485-IgG1N297A, 및 CHO-PDL1의 결합 조건은 도 2에 제시되어 있다.

[0481] 본 측정법에서, 인간화 항체 HZ3266-IgG1, HZ3266-IgG1N297A, HZ3266-G4PAAK, 및 HZ4485-IgG1N297A는 CHO 세포 상에 과다발현된 인간 PD-L1에 결합하였고, EC50은 각각 1.813 nM, 1.784 nM, 1.862 nM, 및 1.561 nM이었다. 참조 항체 ATE와 비교하였을 때, 상기 항체들은 우수한 결합 능력을 가졌다.

[0482] 실시예 8. MOA에 의한 항체의 생물학적 활성 검출

- [0483] 항-PD-1/PD-L1 항체는 PD-1 및 PD-L1의 결합을 차단함으로써 하류 NFAT 신호 경로에 대한 억제 효과를 완화시킬 수 있다. 본 연구에서, 프로메가, 인크.(Promega, Inc.)로부터 이용가능한 MOA 검출 시스템 (PD-1/PD-L1 블록케이드 바이오어세이(PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay), 셀 프로파게이션 모델(Cell Propagation Model), 카탈로그 J1252)을 이용하였다. 제품 매뉴얼에 제공된 방법에 따라, 형광성 리포터 유전자의 발현을 검출함으로써 NFAT 신호의 활성화를 반영하였고, 이로써, 항체가 PD-1 및 PD-L1 결합에 미치는 억제 효과를 검출하였다.
- [0484] (상기 기술된 MOA 검출 시스템으로부터의) CHOK1-PDL1 세포를 활성 검정법 하루 전날 플레이팅하였다. 세포를 플레이팅 1 내지 2일 전에 계대접종하였다. 배양 상청액을 폐기하고, 세포를 PBS (기브코)로 1회 세척하였다. 분해를 위해 적절한 양의 트립신 (기브코)을 37℃, 5% CO₂에서 3-5 min 동안 첨가하였고; 트립신 부피의 4배인 부피로 배양 배지를 첨가하고, 세포를 50 mL 원심분리관으로 옮기고, 계수하였다. 원하는 부피의 세포를 10 min 동안 230 g로 원심분리하였다. 세포를 1640 배양 배지 (기브코) 중에 첨가하고, 4x10⁵개의 세포/mL로 재현탁시켰다. 세포를 100 μl/웰로 96 웰 흰색 배양 플레이트 (nunclon(Nunc))에 첨가하였다. PBS를 200 μl/웰로 가장자리에 있는 웰로 첨가하였다. 세포를 인큐베이터에서 37℃, 5% CO₂에서 밤새도록 인큐베이션시켰다.
- [0485] (상기 기술된 MOA 검출 시스템으로부터의) 주르카트(Jurkat)-PD1 세포 처리:
- [0486] 세포를 활성 검정법 2일 전에 계대접종하였다. 계수한 후, 원하는 부피의 세포를 5 min 동안 170 g로 원심분리하였고; 세포를 검정 완충제 [1640 배양 배지 (기브코) + 1% FBS]를 이용하여 1.25x10⁶개의 세포/mL로 재현탁시켰다.
- [0487] (상기 기술된 MOA 검출 시스템으로부터의) 검정 플레이트에의 샘플 및 주르카트-PD1 세포의 첨가: 95 μl/웰의 CHOK1-PDL1 세포 상청액을 폐기하였다. 40 μl의 샘플 [본 발명에서 제조된 인간화 항체 HZ3266-IgG1, HZ3266-IgG1N297A 및 HZ4485-IgG1N297A, 양성 대조군 (Ate) 및 음성 대조군 (IgG1)]을 첨가하였다 [항체를 100 nM 농도로부터 8번째 농도까지 검정 완충제 중에서 연속하여 3배로 희석하였다]. 40 μl의 주르카트-PD1 세포를 첨가하였다. 세포를 인큐베이터에서 37℃, 5% CO₂에서 6 h 동안 인큐베이션시켰다.
- [0488] 검출: (상기 기술된 MOA 검출 시스템으로부터의) 바이오-글로(Bio-Glo)TM 완충제를 미리 해동시키고, (상기 기술된 MOA 검출 시스템으로부터의) 바이오-글로TM 기질을 첨가하고, 잘 혼합하였다. 6시간 후, (상기 기술된 MOA 검출 시스템으로부터의) 바이오-글로TM 시약을 80 μl/웰로 첨가하였다. 생성된 혼합물을 판독 전 5-10 min 동안 실온에서 그대로 방치하였다.
- [0489] 본 검정법에서는 도 3에 제시되어 있는 바와 같이, 항체 HZ3266-IgG1, HZ3266-IgG1N297A, 및 HZ4485-IgG1N297A는 PD1/PD-L1 상호작용을 효과적으로 차단시킬 수 있다.
- [0490] **실시예 9. 혼합 림프구 반응**
- [0491] 본 연구에서, 항체, 및 상이한 공여자로부터 유래된 성숙한 DC 세포 및 CD4+T 세포를 공동으로 인큐베이션시켰다. 시스템에서 IL2 및 IFN-γ의 상대적 발현량을 검출하였고, 이로써, 상이한 항체가 T 세포에 미치는 활성화 효과를 반영하였다.
- [0492] PBMC 분리: 2.5배 PBS를 공여자로부터의 50 mL의 신선한 혈액에 첨가하였다. 혼합물을 피콜(Ficoll) (써모(Thermo))에 부드럽게 첨가하고, 12.5 mL씩인 각 튜브를 이용하여 4개 튜브로 분취하였다. 감속도 0으로 정지시키기 전에 30 min 동안 400 g로 샘플을 원심분리하였다. 중간의 흰색 스트립을 PBS 내로 피펫팅하고, PBS로 2회 세척하였다.
- [0493] DC 세포 분리: (하기 표에 따라 제조된) 5 mL T 세포 배양 배지를 첨가한 후, 상기 분리된 PBMC 세포를 37℃, 6% CO₂에서 2시간 동안 부착 방식으로 인큐베이션시켰다. CD4+ 세포 분리를 위해 세포 현탁액을 피펫팅하였다. (하기 표에 따라 제조된) 3 mL DC 배양 배지를 2일간의 인큐베이션을 위해 남은 세포에 첨가하고, 또 다른 3 mL의 DC 배양 배지를 첨가하였다. 배양 5일째, 또 다른 2일간의 인큐베이션을 위해 rTNFα (R&D 시스템즈(R&D Systems)) (1,000 U/mL), IL-1b (R&D 시스템즈) (5 ng/mL), IL-6 (R&D 시스템즈) (10 ng/mL) 및 1 μM PGE2 (토크리스(Tocris))를 첨가하였고, 이로써, 혼합 림프구 반응 (MLR)을 위한 DC 세포를 수득하였다.

명칭	조성	제조
T 세포 배양 배지:	X-VIVO 15 (론자(Lonza))	93%
	인간 AB 혈청	5%
	Na-Pyr (기브코)	1%
	NEAA (기브코)	1%
	P/S (기브코)	1%
	글루타맥스(기브코)	1%
DC 세포 배양 배지	X-VIVO 15 (론자)	99%
	인간 AB 혈청	1%
	HEPES (시그마)	10 mM
	β -Me(시그마)	50 μ M
	IL-4 (R&D 시스템즈)	{1000U/ml}
	GM-CSF (R&D 시스템즈)	{1000U/ml}

[0494]

[0495]

CD4+ T 세포 분리: 이는 '언터치트 CD4+T 세포 분리('Untouched CD4+T cell isolation)' 키트 설명서 (11346D, 인비트로젠)에 따라 수행하였다. 세포 현탁액을 15 mL 원심분리관으로 피펫팅하기 전 2 h 동안 PBMC를 그대로 방치하였다. 세포를 10 min 동안 200 g로 원심분리하고, 침전물을 500 μ l의 분리 배지, 100 μ l의 AB형 혈청 및 100 μ l의 정제된 항체를 이용하여 재현탁시켰다. 혼합물을 4℃에서 20 min 동안 인큐베이션시키고, 분리 배지를 이용하여 1회 세척하였다. 15 min 동안의 인큐베이션을 위해, 500 μ l의 비드 버퍼(Bead Buffer) (인비트로젠)를 첨가한 후, 자기장에 의해 비드를 제거하였다. 혼합물을 T 세포 배양 배지로 1회 세척하고, 8 mL의 배양 배지를 이용하여 재현탁시켰다. 이어서, 생성된 혼합물을 37℃, 6% CO₂에서 인큐베이션시켰다.

[0496]

MLR: 10,000개의 DC 세포 및 100,000개의 CD4+ 세포로, 상기 수득된 성숙된 DC 세포를 200 μ l/웰로 CD4+ 세포와 함께 혼합하였다. 본 발명의 항체 (농도: 100 nM, 20 nM, 4 nM, 0.8 nM, 0.16 nM 및 0.032 nM)를 첨가하였다. (하기 표에 DC로 제시된) 상기 제조된 DC 세포의 혼합물, (하기 표에 CD4로 제시된) CD4+T 세포, (하기 표에 세포로 제시된) DC 세포의 혼합물 및 음성 대조군으로서의 역할을 하는, 본원 표 3에 개시된 CD4+ 세포 및 IgG1, 및 양성 대조군으로서의 역할을 하는, (하기 표에 비드로 제시된) DC + CD4+T 세포 + 항-CD3/CD28 자기 비드 (퀴아젠(QIAGEN)). 샘플을 5일 동안 인큐베이션시키고, IL2 및 IFN-감마의 농도 (상대적 발현량 (델타F% 단위로 표시))를 시스바이오(cisbio) 키트 (휴먼 IL2 Kit 1000 테스트(Human IL2 Kit 1000 Test), 휴먼 IFN 감마 1000(Human IFN gamma 1000 Test))에 의해 검출하였다.

[0497]

결과는 하기 표 9, 10, 11, 및 12, 및 도 4 및 5에 제시되어 있다. 표에 제시된 데이터 단위는 델타F%이다.

표 9

공여자 1로부터의 세포 중 IL2의 상대적 발현량

명칭	100 nM	20 nM	4 nM	0.8 nM	0.16 nM	0.032 nM
HZ3266-IgG1	29.21	18.35	25.44	18.19	27.15	26.75
HZ3266-IgG4PAAK	27.23	31.54	49.54	37.47	27.76	12.7
HZ3266-IgG1N297A	26.68	36.48	24.78	45.85	10.09	25.71
HZ4485-IgG1N297A	46.79	57.07	43.51	14.1	6.655	28.83
ATE	63.66	42.66	9.989	23.34	8.729	37.55
DC	19.71*					
CD4	21.67*					
세포	27.17*					
비드	17.85					
IgG1	2.47					

* 음성 대조군; 항체 또는 자기 비드를 첨가하지 않았다.

[0498]

표 10

공여자 2로부터의 세포 중 IL2의 상대적 발현량

명칭	100 nM	20 nM	4 nM	0.8 nM	0.16 nM	0.032 nM
HZ3266-IgG1	36.91	6.659	27.29	12.83	52.58	33.79
HZ3266-IgG4PAAK	35.59	17.76	16.9	40.03	27.13	34.2
HZ3266-IgG1N297A	43.74	25.01	24.49	23.83	13.2	32.88
HZ4485-IgG1N297A	21.29	19.11	54.91	33.08	52.22	7.629
ATE	22.68	36.87	18.62	47.91	25.62	45.62
DC	8.379*					
CD4	53.96*					
세포	39.05*					
비드	9.422					
IgG1	29.71					

* 음성 대조군; 항체 또는 자기 비드를 첨가하지 않았다.

[0499]

표 11

공여자 1로부터의 세포 중 IFN- γ 의 상대적 발현량

명칭	100 nM	20 nM	4 nM	0.8 nM	0.16 nM	0.032 nM
HZ3266-IgG1	482.7	452.4	453.5	412.3	166.3	101.1
HZ3266-IgG4PAAK	384.7	259.3	310.8	326.7	188.9	120.9
HZ3266-IgG1N297A	332.1	349.5	369.7	354.5	143.7	92.12
HZ4485-IgG1N297A	379	350.3	357.5	288.3	156.6	66.73
ATE	380.1	338.4	438.8	348.3	155.1	58.48
DC	-18.8*					
CD4	-14.6*					
MLR 세포	69.89*					
비드	215.1					
IgG1	49.66					

* 음성 대조군; 항체 또는 자기 비드를 첨가하지 않았다.

[0500]

표 12

공여자 2로부터의 세포 중 IFN- γ 의 상대적 발현량

명칭	100 nM	20 nM	4 nM	0.8 nM	0.16 nM	0.032 nM
HZ3266-IgG1	286.7	267.3	449.1	236.7	194	48.33
HZ3266-IgG4PAAK	402.1	260.2	266.7	205.4	119.6	48.5
HZ3266-IgG1N297A	284.2	306.8	210.5	190.1	138.3	66.4
HZ4485-IgG1N297A	327	382.9	371.9	258.7	144.7	112.7
ATE	349.8	352.4	314.1	317.6	114.5	87.25
DC	-4.12*					
CD4	-7.17*					
세포	67.53*					
비드	367.8					
IgG1	57.15					

* 음성 대조군; 항체 또는 자기 비드를 첨가하지 않았다.

[0501]

[0502] 그러므로, 본 발명의 항체는 시험관내에서 T 세포를 효과적으로 활성화시킬 수 있고, 활성화 효과 중 일부는 양성 대조군 항체의 것보다 우수하다.

[0503] **실시예 10. 제닉스 칼럼에 의한 항체 약물성에 관한 검정**

[0504] 본 검정법에서, 제닉스 칼럼 (세팍스 테크놀로지스, 인크.(Sepax Technologies, Inc.))에서 본 발명의 예시적인 인간화 항체의 체류 시간을 분석함으로써 항체 약물성을 검출하였다. 체류 시간이 짧을수록, 항체 점성은 더 낮았고, 약물성은 더욱 우수하였다.

[0505] 크로마토그래피 조건: 파장: 214 nm, 칼럼 온도: 25℃, 유속: 0.35 mL/min, 주입 부피: 10 μ l.

[0506] 샘플 제조: 100 μ l의 샘플 (항체 HZ3266-IgG1, HZ3266-IgG4PAAK, HZ3266-IgG1N297A, 및 HZ4485-IgG1N297A; 양성 대조군으로서 ATE, 농도는 1 mg/mL)을 5 min 동안 13,000 rpm으로 원심분리하였다. 80 μ l의 상청액을 액상 인서트 내로 옮겨 놓고, 주입용 액상 샘플 트레이 상에 배치하였다.

[0507] 표 13에 제시된 바와 같이, 칼럼 상의 상이한 HZ3266 이소타입 및 HZ4485의 체류 시간은 참조 항체의 체류 시간 보다 더 짧았고, 이는 항체 HZ3266 및 HZ4485의 약물성이 우수하다는 것을 시사하는 것이다.

표 13

제닉스 칼럼에 의한 항체 약물성에 관한 검정

샘플	체류 시간 (RT)(min)
HZ3266-IgG1	7.744
HZ3266-IgG4PAAK	7.73
HZ3266-IgG1N297A	7.749
HZ4485-IgG1N297A	8.429
ATE	10.317

[0508]

[0509] **실시예 11. 항-종양 효능 검정**

[0510] 본 검정법에서는 hPD-L1 트랜스제닉 마우스에서 인간 PD-L1을 발현하는 MC38 세포 (MC38-hPDL1) (난징 인헤 바이오테크(Nanjing Yinhe Biotech))에서 본 발명의 PD-L1 항체의 항-종양 효과를 시험하였다.

[0511] hPD-L1 트랜스제닉 마우스:

[0512] C57B1/6 배경의 암컷 hPD-L1 트랜스제닉 마우스 (약 8주령), 상하이 모델 오가니즘즈 센터, 인크.(Shanghai Model Organisms Center, Inc.)로부터 구입. 연구 전, 마우스를 도착 후 7일 동안 적응시켰다

[0513] 세포:

[0514] 인간 PD-L1을 발현하는 MC38 세포 (MC38-hPDL1)를 난징 인헤 바이오테크로부터 구입하고, 추가의 시험관내 검정을 위해 설명서에 따라 엄격하게 계대배양하였다. 세포를 원심분리에 의해 수집하고, 멸균 PBS 중에 재현탁시키고, 세포 밀도를 5×10^6 개의 세포/mL로 조정하였다. 0일째, 0.2 mL의 세포 현탁액을 hPD-L1 트랜스제닉 마우스의 복부 부위에 피하로 이식하여 MC38-hPDL1 종양을 보유하는 마우스 모델을 확립하였다.

[0515] 투여:

[0516] 이식 후 6일째에 마우스의 종양 부피를 측정하고, 종양 부피가 87.4 mm³ 내지 228.4 mm³ 범위인 마우스를 선택하고, 종양 부피에 의해서 군으로 균등하게 나누었다 (각 군당 마우스 8마리씩, 한 군은 IgG1을 받고, 나머지 다른 한 군은 본 발명의 HZ3266-IgG1N297A를 받는다). 마우스를 이식 후 6, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31 및 35 일째에 주 2회에 걸쳐 처리하였다. 투여량 및 투여 경로는 표 12에 제시되어 있다. 5주 동안의 주 2회의 처리 기간 동안 마우스의 종양 부피 및 체중 변화를 모니터링하였다. 각 투약 이전에 체중 및 종양 부피를 측정하였다. 종양 부피 측정: 버니어 캘리퍼(vernier caliper)로 종양의 장축의 최대 길이 (L) 및 단축의 최대 길이

(W)를 측정하였고, 하기 공식을 사용하여 종양 부피를 계산하였다: $V=L \times W^2/2$. 전자 저울을 이용하여 주 2회에 걸쳐 마우스 체중을 측정하였다.

표 14

[0517]

연구 디자인				
군	용량	투약 부피	농도	투여 경로
IgG1 (서열은 표 3에 제시되어 있다)	20 mg/kg	10 mL/kg	2.0 mg/mL	복강내
본 발명의 항체	20 mg/kg	10 mL/kg	2.0 mg/mL	복강내

[0518]

본 발명의 항체는 투여 후 1주째 현저한 항-종양 효능을 보였고 (도 6), 35일째까지, 본 발명의 를 받은 한 마우스에서는 종양이 완전히 퇴행되었다. 본 결과에서는 상이한 항체 투여량이 종양을 보유하는 마우스의 체중에는 어떤 영향도 미치지 않는 것으로 나타났다.

[0519]

그러므로, 본 발명의 항체는 종양에 대해 명백한 억제 효과를 갖는다.

[0520]

실시예 12. 본 발명의 항-PD-L1 항체와 항-인간-LAG-3 항체의 조합

[0521]

본 연구에서, 항-PD-L1 항체 (HZ3266-IgG1N297A) 및 항-인간-LAG-3 항체 (ADI-31853)의 조합 사용의 항-종양 활성을 인간화 마우스 모델에서 시험하였다.

[0522]

본 연구에서, 항-PD-L1 항체의 항-종양 효능을 A375 (ATCC) 인간 피부암 세포를 보유하는 NCG 마우스에서 시험하였다. 인간 PBMC (모든 세포) (2×10^6 개의 세포/마우스)를 미리 정맥내로 주사한 후, 피하 이식을 통해 A375 종양을 보유하는 마우스 모델을 확립하였다. 종양 형성 후, 마우스를 군으로 나누고, 상이한 항체를 이용하여 처리하였다. 처리 기간 동안 마우스의 종양 크기 및 체중 변화를 모니터링하였다. 2주 동안 주 2회에 걸쳐 총 5회 투약으로 처리하였다. 4주 동안 주 2회로 마우스를 모니터링하였다. 투여량 및 투여 경로는 하기와 같다. 종양 성장 억제율 (TGI%)은 처리 종료 이후에 계산하였다.

[0523]

항-인간-LAG-3 항체 ADI-31853

[0524]

당업계의 통상의 방법에 따라 항-LAG-3 항체 ADI-31853의 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열 (표 3)을 코딩하는 cDNA를 발현 벡터 pTT5로 클로닝하였다.

[0525]

표적 항체 유전자 및 형질감염 시약 PEI (폴리사이언시스)를 함유하는 발현 벡터를 인큐베이션된 인간 배아 신장 세포 293 (인비트로젠)으로 제조사가 제공한 방식에 일시적으로 형질감염시켰다. 형질감염 후, 상청액을 폐기하고, 신선한 EXPI293 배지 (기브코)를 이용하여 세포를 4×10^6 /mL로 희석하였다. 매 48시간마다 신선한 배지를 공급하면서, 세포를 37°C, 5% CO₂에서 7일 동안 인큐베이션시켰다. 7일 후, 세포를 20 min 동안 1,300 rpm으로 원심분리하였다. 상청액을 단백질 A로 정제하여 순도가 95%를 초과하는 항체를 수득하였다.

[0526]

ADI31853의 인간 LAG-3 (hLAG-3)에의 결합에 대한 평형 해리 상수 (K_D)를 생물학적 광학 간섭법 (포르테바이오)에 의해 측정하였다. 선행 기술의 포르테바이오 친화도 검정법을 수행하였다 (문헌 [Estep, P., et al, High throughput solution based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2):270-8]). 간략하면, 센서를 30분 동안 검정 완충제 중에서 오프 라인으로 평형화시킨 후, 이어서, 60초 동안 온라인으로 검출을 수행하여 기저선을 확립하였다. 상기 기술된 바와 같이 수득된 정제된 항체를 포르테바이오 친화도 검정용 AHQ 센서 (포르테바이오) 상에 온라인으로 로딩하였다. 이어서, 해리 속도 측정을 위해 5분 동안 해리용 검정 완충제로 센서를 옮기기 전 5분 동안 로딩된 항체가 있는 센서를 100 nM의 인간 LAG-3 항원 (아르코바이오시스템즈ArcoBiosystems(ArcoBiosystems))에 노출시켰다. 1:1 결합 모델을 이용하여 동역학적 정질 분석을 수행하였다.

[0527]

상기 기술된 검정법에서, ADI-31853 친화도는 하기와 같았다:

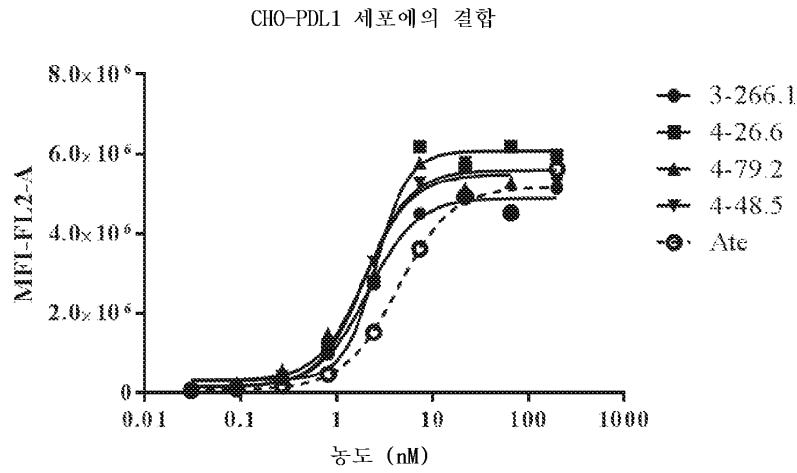
[0528]

항체	항체는 AHQ 팁 상에 있었고, 인간 LAG-3-His는 용액 (100 nM) 중에 있었다 [1가 친화도, 평형 해리 상수 K_D (M)]	회합 상수 (M ⁻¹ S ⁻¹)	해리 상수 (S ⁻¹)
ADI-31853	6.22×10^{-10}	3.22×10^5	2.00×10^{-4}

- [0529] 마우스:
- [0530] 체중이 17.6-24.2 g인, (종양 세포 이식 시점에) 7-8주령된 암컷 NOG 마우스, 베이진 바이탈 리버 라보라토리 애니멀 테크놀로지 컴퍼니, 리미티드로부터 구입. 연구 전, 마우스를 도착 후 7일 동안 적응시켰다
- [0531] 세포:
- [0532] 인간 피부암 세포 A375 (ATCC#CRL-1619)를 ATCC로부터 구입하고, 추가의 시험관내 검정을 위해 ATCC가 제공한 요건에 따라 엄격하게 계대배양하였다. 세포를 원심분리에 의해 수집하고, 멸균 PBS 중에 재현탁시키고, 세포 밀도를 30×10^6 개의 세포/mL로 조정하였다. NOG 마우스에 인간 PBMC (모든 세포)를 정맥내로 주사한 후, 이어서, 우측 등을 면도하고, A375 세포를 0.2 mL/마우스로 피하 주사하였다. 이식 후 7일째에 마우스의 종양 부피를 측정하고, 종양 부피가 70-71 mm³ 범위인 마우스를 선택하고, 종양 부피에 의해서 군으로 무작위로 나누었다.
- [0533] 처리:
- [0534] 다양한 군에서 하기 항체를 피하로 주사하였다:
- [0535] (1) 인간 IgG (에퀴테크-바이오(equitech-Bio)), 20 mg/kg;
- [0536] (2) LAG-3 (ADI-31853), 10 mg/kg;
- [0537] (3) PD-L1 (HZ3266-IgG1N297A), 10 mg/kg;
- [0538] (4) LAG-3 (ADI-31853), 10 mg/kg + PD-L1 (HZ3266-IgG1N297A), 10 mg/kg.
- [0539] 이식 후 7일째, 평균 종양 크기가 요건을 충족하는 마우스를 군당 마우스 8마리씩 군으로 무작위로 나누었다. 7, 10, 14 및 17일째에 각 군의 마우스에 각각 상기 용량으로 4개의 요법으로 투여하였다.
- [0540] 분석: 연구 전 기간 동안에 걸쳐 주 2회로 종양 부피 및 체중을 측정하고, 종양이 종점에 도달하였을 때, 또는 마우스의 체중이 20% 초과로 손실되었을 때, 마우스를 안락사시켰다. 버니어 캘리퍼로 종양의 장축의 최대 길이 (L) 및 단축의 최대 길이 (W)를 측정하였고, 하기 공식을 사용하여 종양 부피를 계산하였다: $V = L \times W^2 / 2$. 시간 경과에 따른 다양한 군 중의 마우스의 종양 부피를 플롯팅하였다. 분산 분석 (ANOVA)을 이용하여 통계학적 유의도를 결정하였다. 모든 분석에서 P 값이 0.05 미만일 때, 이는 통계학적 유의적인 것으로 간주되었다.
- [0541] 도 7에 제시된 바와 같이, 인간 IgG 대조군 (에퀴테크-바이오) (hIgG) 사용 및 두 항체 각각의 개별 사용과 비교하였을 때, 항-LAG-3 모노클로날 항체 ADI-31853 (31853) 및 항-PD-L1 모노클로날 항체 (HZ3266-IgG1N297A) (HZ 3266)의 조합 사용이 종양 성장을 유의적으로 억제시켰다는 것을 알 수 있다.

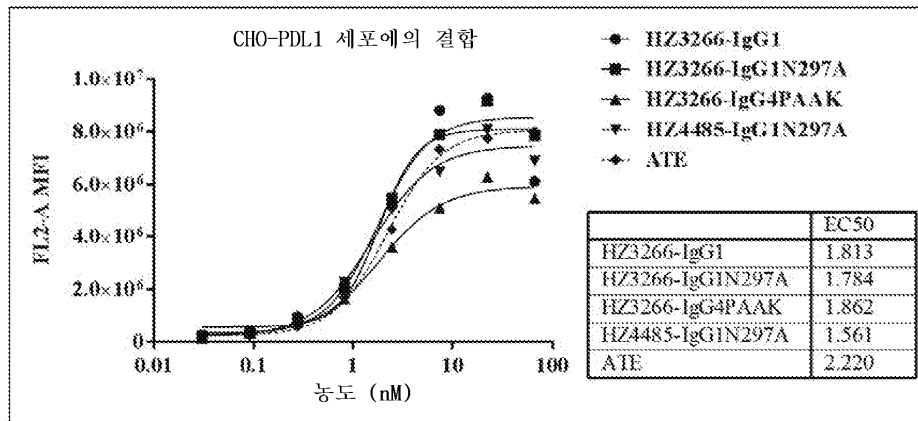
도면

도면1

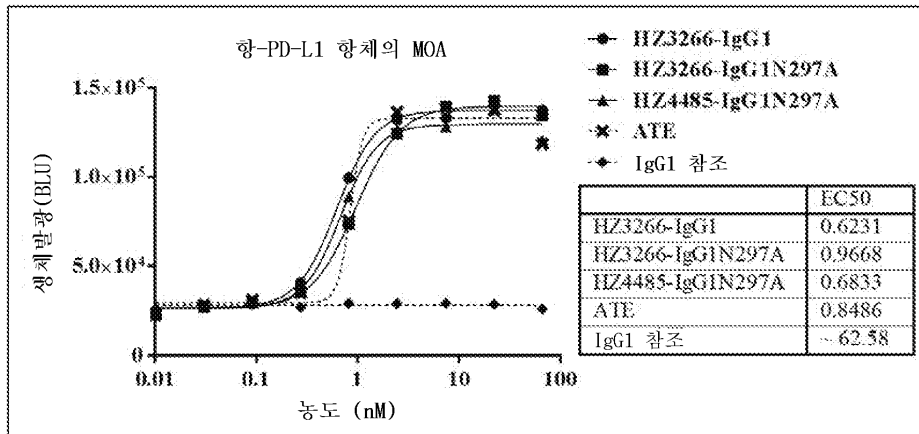


	3-266.1	4-26.6	4-79.2	4-48.5	Ate
EC50	2.139	2.598	1.985	1.995	4.390

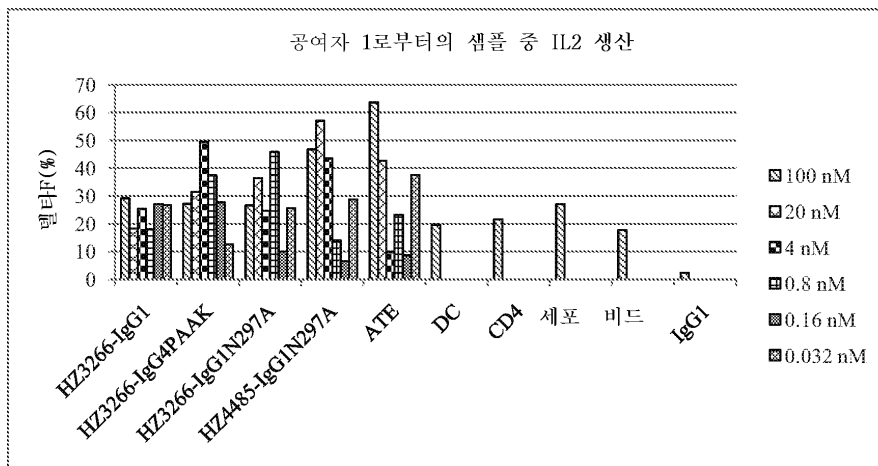
도면2



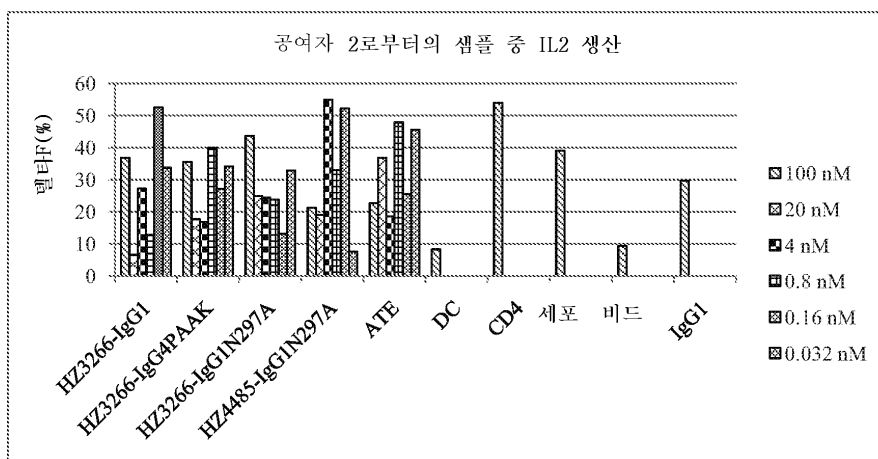
도면3



도면4

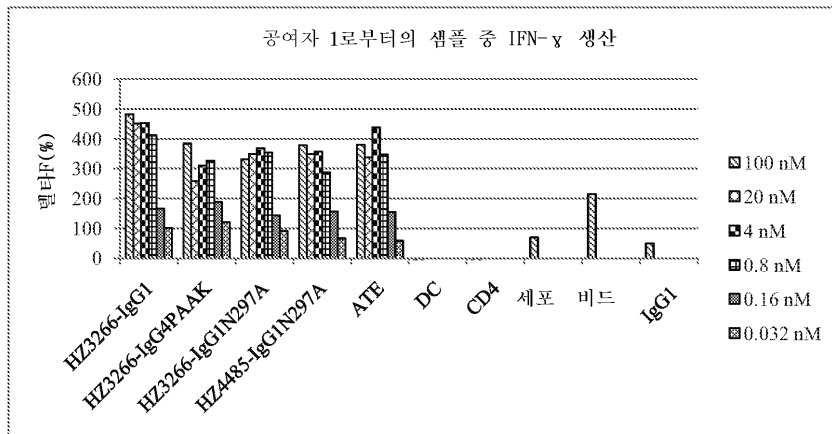


도 4a

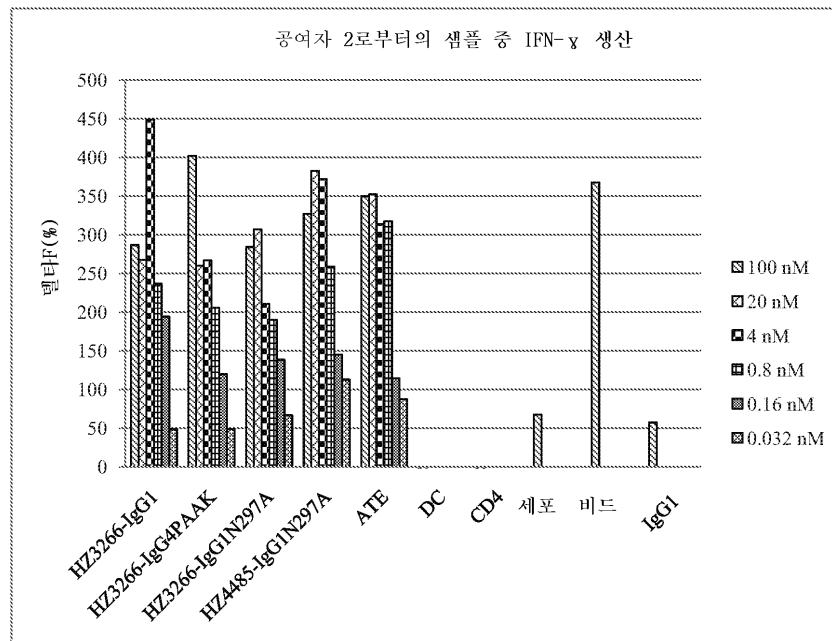


도 4b

도면5



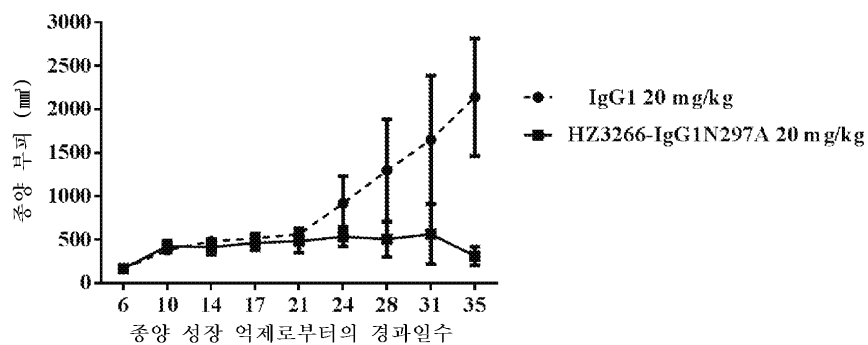
도 5a



도 5b

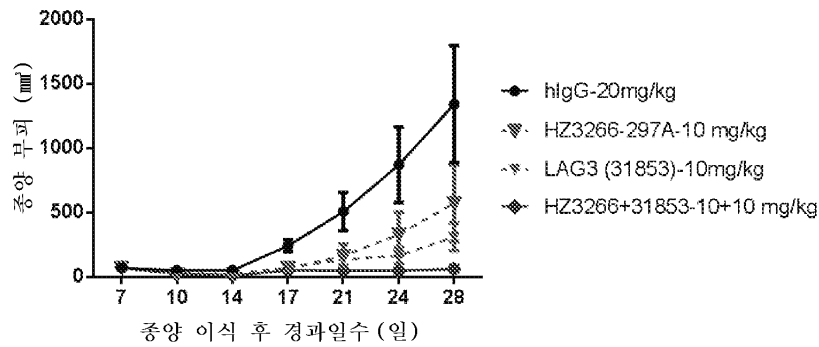
도면6

MC38-Hpd11 트랜스제닉 마우스에서 HZ3266-IgG1 N297A의 효능



도면7

(h-PBMC를 갖는) NOG 모델에서 A375에 대한 조합된 항-LAG-3 및 항-PD-L1 항체의 효능



서열 목록

<110> INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.

<120> Anti-PD-L1 Antibody and Uses Thereof

<130> PF 180590PCT

<160> 78

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 1

Gly Phe Asn Ile Glu Asp Thr

1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 2

Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly

1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 3
 Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 1 5
 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)
 <223> Xaa can be G
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)
 <223> Xaa can be D, F or Y
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (3)
 <223> Xaa can be N, S or T.
 <220>
 ><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)
 <223> Xaa can be I or F
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)
 <223> Xaa can be T or E
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (6)
 <223> Xaa can be S, D or T
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (7)
 <223> Xaa can be G, T or Y
 <400> 4
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5
 <210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 5
 Asp Pro Ala Asn Asp Asp

1 5
 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 6
 Ser Tyr Thr Gly Ser

1 5
 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 7
 Ser Tyr Ser Gly Ser

1 5
 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 8
 Asn Pro Asn Ser Asp Tyr

1 5

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (3)
 <223> Xaa can be T or S
 <400> 9
 Ser Tyr Xaa Gly Ser
 1 5
 <210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 10
 Gly Leu Gly Arg Trp Phe Ala Tyr
 1 5
 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 Synthetic construct
 <400> 11
 Ala Pro Pro Trp Leu Ser Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 12
 Gly Asp Leu Trp Pro Pro Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 13

Gln Ser Phe Asp Tyr

1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 14

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Asn Ala Val Ala

1 5 10

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 15

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Ser Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 16

Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Phe Tyr Gly Thr Ser Leu Leu Gln

1 5 10 15

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 17

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 18

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 19

Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser

1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> Xaa can be S, W or A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa can be A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223>

> Xaa can be S

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa can be N or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> Xaa can be R or V

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)

<223> Xaa can be Y or E

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)

<223> Xaa can be T or S

<400> 20

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 21

Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Leu Thr

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 22

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 23

Gln Gln Tyr Tyr Gly Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Synthetic construct

<400> 24

His Gln Gly Arg Lys Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> Xaa can be Q or H

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> Xaa can be Q

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> Xaa can be H, Y or G

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> Xaa can be Y or R

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> Xaa can be S, G or K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)

<223> Xaa can be P, Y or V

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)

<223> Xaa can be P

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)

<223> Xaa can be L, W or Y

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)

<223> Xaa can be T

<400> 25

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 26

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 26

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Leu Gly Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 27

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic construct

<400> 27

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Glu Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Leu
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

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

Lys Ala Pro Arg Trp Leu Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 28

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic construct

<400> 28

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly

20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Lys Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 29

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic construct

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

<210> 30
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct

<400> 30
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asp Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp 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
 Gly Arg Gly Leu Gly Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 31

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 32

Ser Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Ile Gly

1 5 10 15

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

85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 33

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 33

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

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

100 105 110

Lys

<210> 34

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 34

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

1 5 10 15

Glu Lys Ile Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Gly Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu

100 105 110

Lys

<210> 35

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 35

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Phe Tyr

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

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

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223

> Synthetic construct

<400> 36
Gly Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Asn Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

<210> 37

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 37

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

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys His Gln Gly Arg
85 90 95
Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 38

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 38

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

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

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

 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 39

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 39

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly

20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Glu Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Leu

35 40 45

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

50 55 60
 Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
 65 70 75 80
 Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Ala Pro Arg Trp Leu Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

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

 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

 <210> 40
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 40
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly

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

65					70					75					80				
Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Lys	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala				
					85					90					95				
Arg	Gly	Asp	Leu	Trp	Pro	Pro	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr				
					100					105					110				
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro				
					115					120					125				
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly				
					130					135					140				
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn				
145					150					155					160				
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln				
					165					170					175				
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser				
					180					185					190				
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser				
					195					200					205				
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr				
210					215					220									
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser				
225					230					235					240				
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg				
					245					250					255				
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro				
					260					265					270				
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala				
					275					280					285				
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val				
290					295					300									
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr				
305					310					315					320				

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

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

<210> 41

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 41

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

50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

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

340 345 350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 42

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Thr

20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asp Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp 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
Gly Arg Gly Leu Gly Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
	100	105	110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu			
	115	120	125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys			
	130	135	140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
145	150	155	160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
	165	170	175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
	180	185	190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn			
	195	200	205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His			
	210	215	220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val			
225	230	235	240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
	245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			
	260	265	270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
	275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
	290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
305	310	315	320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile			
	325	330	335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 43

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 43

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

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

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

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

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

Gly Arg Gly Leu Gly Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

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

340 345 350
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 44
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 44
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Thr

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

 Gly Arg Gly Leu Gly Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

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

 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 340 345 350
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440
 <210> 45
 <211> 444
 <212> PRT

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 45
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Asn Pro Asn Ser Asp Tyr Ala Ile Tyr Ala Gln Lys Phe

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

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

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

 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 46
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 46
 Ser Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Asn Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Cys Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Leu
 85 90 95

 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 47

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 47

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

1 5 10 15

Glu Lys Ile Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

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

145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 48
<211> 220
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic construct
<400> 48

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

Glu Lys Ile Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

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

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

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Gly Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125

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

 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220
 <210> 49
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 49
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Phe Tyr
 20 25 30

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

Pro Val Glu Val Asp Asp Val Ala Leu Tyr Phe Cys His Gln Gly Arg
85 90 95

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

100 105 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 50

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 50

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

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

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 51

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 51

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

Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Phe Tyr
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Leu Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys His Gln Gly Arg
 85 90 95
 Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

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

195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser

1 5

<210> 53

<211> 6

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 53

Ser Pro Tyr Gly Gly Ser

1 5

<210> 54

<211>

> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 54

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr

1 5

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 55

Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 56

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 57

Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr

1 5

<210> 58

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 58

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 59

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 59

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

100 105

<210> 60

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 60

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

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

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

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

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

 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 61
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 61
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

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

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

<210> 62
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct

<400> 62
 Glu Val Arg Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Thr Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ala Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Pro Gly Trp Tyr Ala Ala Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

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

 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

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

340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

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

435 440 445

Lys

<210> 63

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 63

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 Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu 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 Ala Asp Leu Pro Ala Phe

85 90 95
Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 64

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 64

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

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

20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

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

65						70						75						80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys				
					85					90					95				
Lys	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys				
					100					105					110				
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro				
					115					120					125				
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys				
					130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp				
145					150					155					160				
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu				
					165					170					175				
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu				
					180					185					190				
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn				
195					200					205									
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly				
210					215					220									
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu				
225					230					235					240				
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr				
					245					250					255				
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn				
260					265					270									
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe				
275					280					285									
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn				
290					295					300									
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr				
305					310					315					320				

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 65

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 65

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 66
<211> 326
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic construct
<400> 66

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

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

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

 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly

325

<210> 67

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 67

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 68

<211> 20

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 68

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly

20

<210> 69
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 69
 Gly Ser Ile Tyr Ser Glu Ser Tyr Tyr Trp Gly
 1 5 10

<210> 70
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct
 <400> 70
 Ser Ile Val Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 71
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct
 <400> 71
 Ala Arg Val Arg Thr Trp Asp Ala Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 72
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<

<400> 72
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10
 <210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 73

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr

1 5

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 74

Gln Gln Val Leu Glu Leu Pro Pro Trp Thr

1 5 10

<210> 75

<211

> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 75

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Ser Glu

20 25 30

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

35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Val Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg Val Arg Thr Trp Asp Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 76

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 76

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Leu Glu Leu Pro Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 77

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 77

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

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

 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Val Arg Thr Trp Asp Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140

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

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

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

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

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

<210> 78

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 78

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

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

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

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Leu Glu Leu Pro Pro

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215