



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0013881
(43) 공개일자 2018년02월07일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2013.01)
C12Q 2600/106 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-7032871</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2016년05월27일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2017년11월14일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2016/034856</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2016/196381
국제공개일자 2016년12월08일</p> <p>(30) 우선권주장
62/168,668 2015년05월29일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1</p> <p>(72) 발명자
카텔, 에드워드
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
코와네츠, 마신
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
월터, 김벌리
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내</p> <p>(74) 대리인
양영준, 이귀동</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 35 항

(54) 발명의 명칭 **암에서의 PD-L1 프로모터 메틸화**

(57) 요약

본 발명은 PD-L1 프로모터 영역에서 중간 또는 낮은 메틸화 수준을 갖는 대상체에서의 암의 치료를 위한 방법을 제공한다. 또한 관련된 키트 및 제조 물품이 제공된다.

(52) CPC특허분류
C12Q 2600/154 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서 암을 치료하는 방법으로서,

상기 대상체에 유효량의 항-PD-L1 항체를 투여하는 단계를 포함하되,

치료는 상기 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 상기 대상체를 기반으로 하는, 방법.

청구항 2

대상체에서 암을 치료하는 방법으로서,

단, 상기 대상체는 상기 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 것으로 발견되었고, 상기 치료는 상기 대상체에 유효량의 항-PD-L1 항체를 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 3

암을 치료하는 방법으로서,

(a) 암을 갖는 대상체를 선택하는 단계로서, 상기 대상체는 상기 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는, 상기 선택 단계; 및

(b) 단계 a)에서 선택된 상기 대상체에게 유효량의 항-PD-L1 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 4

암을 갖는 대상체가 항-PD-L1 항체로의 치료에 반응할 공산이 있는지 예측하는 방법으로서,

상기 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하되,

상기 샘플에서의 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화는 상기 대상체가 상기 치료에 반응할 공산이 있다는 것을 표시하는, 방법.

청구항 5

대상체에서 암을 치료하는 방법으로서,

(a) 상기 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 것으로 예측된 상기 대상체에 유효량의 항-PD-L1 항체를 투여하여, 이로써 상기 대상체 내 암을 치료하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 6

항-PD-L1 항체 치료에 반응할 공산이 있는 암을 갖는 대상체를 식별하는 방법으로서,

(a) 상기 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 메틸화를 평가하는 단계; 및

(b) 상기 샘플에서 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 상기 PD-L1 프

로모터 영역 내 CpG에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 상기 대상체를 식별하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 대상체에 유효량의 항-PD-L1 항체를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는, 방법.

청구항 9

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는, 방법.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 메틸화 수준은 중아황산염 서열분석(bisulfite sequencing)에 의하여 측정되는, 방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 중간 수준의 메틸화는 약 20% 내지 약 40%의 메틸화인, 방법.

청구항 12

청구항 10 또는 11에 있어서, 낮은 수준의 메틸화는 약 20% 미만의 메틸화인, 방법.

청구항 13

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 메틸화 수준은 중아황산염 차세대 서열분석(bisulfite next-generation sequencing)에 의하여 측정되는, 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 중간 수준의 메틸화는 약 5% 내지 약 60%의 메틸화인, 방법.

청구항 15

청구항 13 또는 14에 있어서, 낮은 수준의 메틸화는 약 5% 미만의 메틸화인, 방법.

청구항 16

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 메틸화 수준은 메틸화 칩 배열(methylation chip array)에 의하여 측정되는, 방법.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 중간 수준의 메틸화는 약 0.2 내지 0.3의 베타 값인, 방법.

청구항 18

청구항 16 또는 17에 있어서, 낮은 수준의 메틸화는 약 0.2 미만의 베타 값인, 방법.

청구항 19

청구항 1 내지 18 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체 유래의 상기 샘플이 면역 세포 침윤의 증거를 나타내는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 면역 세포 침윤의 증거는 웨스턴 블랏, ELISA, 유동 세포측정, qPCR, qRT-PCR, 전사체 프로파일링, 마이크로배열 분석, 또는 차세대 서열분석을 통해 검출된 CD8+ 림프구에 의해 표지되는, 방법.

청구항 21

청구항 1 내지 20 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 폐암, 유방암, 방광암, 또는 흑색종인, 방법.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 암은 폐암이고, 그리고 상기 폐암은 비-소세포 폐암, 폐 편평상피 세포 암종, 또는 폐 선암종인, 방법.

청구항 23

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-PD-L1 항체는 PD-1로의 PD-L1의 결합을 억제하는, 방법.

청구항 24

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-PD-L1 항체는 B7-1로의 PD-L1의 결합을 억제하는, 방법.

청구항 25

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-PD-L1 항체는 PD-1 및 B7-1 둘 모두로의 PD-L1의 결합을 억제하는, 방법.

청구항 26

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-PD-L1 항체가 단클론성 항체인, 방법.

청구항 27

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-PD-L1 항체는 Fab, Fab' -SH, Fv, scFv, 및 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 항체 단편인, 방법.

청구항 28

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-PD-L1 항체는 인간화된 항체 또는 인간 항체인, 방법.

청구항 29

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-PD-L1 항체는 YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105, MEDI4736, 및 MSB0010718C로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 30

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-PD-L1 항체는 서열 번호: 15의 HVR-H1 서열, 서열 번호: 16의 HVR-H2 서열, 및 서열 번호: 3의 HVR-H3 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열 번호: 17의 HVR-L1 서열, 서열 번호: 18의 HVR-L2 서열, 및 서열 번호: 19의 HVR-L3 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 방법.

청구항 31

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-PD-L1 항체는 서열 번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 방법.

청구항 32

제조물품으로서,

함께 포장된, 상기 항-PD-L1 항체 또는 약제학적 조성물이, 상기 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플 내 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 암을 갖는 대상체를 치료하기 위하여 표지되는 것을 나타내는, 표지

및 항-PD-L1 항체 및 억제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 억제학적 조성물을 포함하는, 제조물품.

청구항 33

샘플에서 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 메틸화 수준을 측정하기 위한 시약을 포함하는, 키트.

청구항 34

청구항 33에 있어서, 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 것으로 상기 대상체를 분류하기 위한 설명서를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 35

청구항 33 또는 34에 있어서, 상기 대상체가 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 가질 경우, 항-PD-L1 항체, 및 상기 대상체에 상기 항-PD-L1 항체를 투여하기 위한 설명서를 추가로 포함하는, 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 출원은 2015년 5월 29일 출원된 미국 가출원 시리즈번호 제62/168,668호의 우선권 이점을 청구하며, 이는 전 문이 본원에 참고로 인용된다.

[0003] ASCII 텍스트 파일 상에서의 서열목록 제출

[0004] ASCII 텍스트 파일 상에서의 하기 제출된 내용은 이들의 전문이 본원에 참조로 인용된다: 서열 목록의 컴퓨터 판독가능 형태 (CRF) (파일명: 146392027040SeqList.txt, 기록된 날짜: 2016년 5월 27일 금요일, 크기: 19 KB).

[0005] 기술 분야

[0006] 본 발명은 항-PD-L1 항체로의 치료를 위하여 암 환자를 계층화하는 방법에 관한 것이며, 이는 상기 환자 유래의 암 세포를 함유하는 샘플 내 PD-L1의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역의 업스트림 영역에서 메틸화 수준을 계층화에 의한 것이다.

배경 기술

[0007] PD-L1은 많은 암에서 과발현되고 그리고 때로는 불량한 진단과 관련된다 (문헌 [Okazaki T 등, Intern. Immun. 2007 19(7):813]) (문헌 [Thompson RH 등, Cancer Res 2006, 66(7):3381]). 흥미롭게도, 대다수의 종양 침투하 는 T 림프구는 종양-반응성 T 세포에서 PD-1의 상향조절이 손상된 항종양 면역 반응에 기여할 수 있다는 것을 나타내는 정상 조직 및 말초 혈액 T 림프구에서 T 림프구와 달리 PD-1을 우세하게 발현한다 (문헌 [Blood 2009 114 (8):1537]). 이것은 T 세포 활성화의 감쇠 및 면역 감시의 회피를 초래하는 PD-1 발현 T 세포와 상호 작용 하는 PD-L1 발현 종양 세포에 의해 매개된 PD-L1 신호 전달의 개척에 기인될 수 있다 (Sharpe et al., Nat Rev 2002) (Keir ME et al., 2008 Annu. Rev. Immunol. 26:677). 따라서, PD-L1/PD-1 상호 작용의 억제체는 CD8+ T 세포-매개된 종양의 사멸을 증진시킬 수 있다.

[0008] 항-PD-L1 항체와 악성종양을 치료하는데 그것의 용도가 기재되어 있다 (예를 들면, 문헌 [Philips et al.] 참조 (2015) *Int Immunol* 27, 39-461; Herbst et al. (2014) *Nature* 515, 563-567). 특정 환자는 면역-관문 억제제 에 대해 근본적인 내성을 가진다 (참고: 예컨대, Taube et al. (2012) *Sci Transl Med.* 4, 127; Sznol et al. (2014) *Clin Cancer Res.* 19,1021-34; 및 Gajewski et al. (2011) *Curr Opin Immunol.* 23:286-92). 따라서, 항-PD-L1 항체 요법에 대한 암 환자의 반응성을 예측할 필요가 남아 있다.

[0009] 본원에 개시된 모든 참고, 공보 및 특허 출원은 그 전체가 참고로써 본원에 통합되어 있다.

발명의 내용

- [0010] 발명의 간략한 요지
- [0011] 특정 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 암을 치료하거나 이의 진행을 지연시키는 방법을 제공하고, 상기 대상체에 유효량의 항-PD-L1 항체를 투여하는 단계를 포함하고, 치료 (또는 이의 진행의 지연)는 상기 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 상기 대상체를 기반으로 한다.
- [0012] 특정 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 암을 치료하거나 이의 진행을 지연시키는 방법을 제공하고, 단, 상기 대상체는 상기 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 것으로 발견되었고, 상기 방법은 상기 대상체에 유효량의 항-PD-L1 항체를 투여하는 것을 포함한다.
- [0013] 특정 구현예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 암을 치료하거나 이의 진행을 지연시키는 방법을 제공한다: (a) 암을 갖는 대상체를 선택하는 단계로서, 상기 대상체는 상기 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는, 상기 선택 단계; 및 (b) 이에 따라 선택된 상기 대상체에 유효량의 항-PD-L1 항체를 투여하는 단계.
- [0014] 특정 구현예에서, 본 발명은 암을 갖는 대상체가 항-PD-L1 항체로의 치료에 반응할 공산이 있는지 예측하는 방법을 제공하고, 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플 내 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하고, 상기 샘플 내 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화는 상기 대상체가 상기 치료에 반응할 공산이 있다는 것을 표지한다.
- [0015] 특정 구현예에서, 하기를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공된다: (a) 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 메틸화를 평가하는 단계; 및 (b) PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의 또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 것으로 예측된 상기 대상체에 유효량의 항-PD-L1 항체를 투여하는 단계.
- [0016] 특정 구현예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 항-PD-L1 항체 치료에 반응할 공산이 있는 암을 갖는 대상체를 식별하는 방법을 제공한다: (a) 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 메틸화를 평가하는 단계; 및 (b) 샘플에서 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 대상체를 식별하는 단계.
- [0017] 상기 구현예 중 임의의 것에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 상기 방법은 대상체에 유효량의 항-PD-L1 항체를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 상기 대상체는 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 중간 또는 낮은 수준을 갖는다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 메틸화 수준은 중아황산염 서열분석에 의하여 측정된다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 메틸화 수준은 중아황산염 차세대 서열분석에 의하여 측정된다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 메틸화 수준은 메틸화 칩 배열에 의하여 측정된다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 대상체 유래의 샘플은 면역 세포 침윤의 증거를 나타낸다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 면역 세포 침윤의 증거는 웨스턴 블랏, ELISA, 유동 세포측정, qPCR, qRT-PCR, 전사체 프로파일링, 마이크로배열 분석, 또는 차세대 서열분석을 통해 검출된 CD8⁺ 림프구에 의해 표지된다.
- [0018] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 중간 수준의 메틸화는 중아황산염 서열분석에 의하여 측정 시 약 20% 내지 약 40% 메틸화이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 낮은 수준의 메틸화는 중아황산염 서열분석에 의하여 측정 시 약 20% 미만의 메틸화이다.
- [0019] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 중간 수준의 메틸화는 중아황산염 차세대 서열분석에 의하여 측정 시 약 5% 내지 약 60% 메틸화이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부

구현예에서, 낮은 수준의 메틸화는 중아황산염 차세대 서열분석에 의하여 계측 시 약 5% 미만의 메틸화이다.

[0020] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 중간 수준의 메틸화는 메틸화 칩 배열에 의하여 계측 시 베타 값이 약 0.2 내지 약 0.3이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 낮은 수준의 메틸화는 메틸화 칩 배열에 의하여 계측 시 계측 시 베타 값이 약 0.2 미만이다.

[0021] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 암은 폐암, 유방암, 방광암 또는 흑색종이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 암은 폐암이고, 그리고 상기 폐암은 비-소세포 폐암, 폐 편평상피 세포 암종, 또는 폐 선암종이다.

[0022] 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 PD-1에 대한 PD-L1의 결합을 억제한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 B7-1에 대한 PD-L1의 결합을 억제한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 PD-1 및 B7-1 둘 모두에 대한 PD-L1의 결합을 억제한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 단클론성 항체이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 Fab, Fab' -SH, Fv, scFv, 및 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 항체 단편이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 인간화 항체 또는 인간 항체이다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105, 및 MEDI4736. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 서열 번호: 15의 HVR-H1 서열, 서열 번호: 16의 HVR-H2 서열, 및 서열 번호: 3의 HVR-H3 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열 번호: 17의 HVR-L1 서열, 서열 번호: 18의 HVR-L2 서열, 및 서열 번호: 19의 HVR-L3 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 하기를 포함한다: 서열 번호: 24의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0023] 일부 구현예에서, 본 발명은 함께 포장된, 표지 및 항-PD-L1 항체 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 포함하는, 제조물품을 제공하며, 이는 항-PD-L1 항체 또는 약제학적 조성물이, 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플 내 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 암을 갖는 대상체를 치료하기 위하여 표지되는 것을 나타낸다.

[0024] 일부 구현예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 키트를 제공한다: 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 메틸화를 측정하기 위한 시약, 및 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 메틸화 수준을 갖는 것으로 상기 대상체를 분류하기 위한 설명서. 상기 임의의 구현예에 따른 (또는 이에 적용된) 일부 구현예에서, 대상체가 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 낮은 메틸화 수준 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 메틸화 수준을 가질 경우, 키트 또는 제조물품은 추가로, 항-PD-L1 항체, 및 상기 대상체에 항-PD-L1 항체를 투여하기 위한 설명서를 포함한다.

[0025] 본 명세서에 기재된 다양한 구현예의 특성 중 하나, 일부 또는 전부가 조합될 수 있어 본 발명의 다른 구현예를 형성할 수 있음을 이해해야 한다. 본 발명의 이들 및 다른 측면은 당해 분야의 숙련자에게 명백할 것이다. 본 발명의 이들 및 다른 구현예는 후술하는 상세한 설명에 의해 추가로 기재된다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 91 비-소세포 폐암 (NSCLC) 세포주에 대한 PD-L1 발현 수준 및 PD-L1 프로모터 메틸화 열 지도를 도시한다.

도 2a는 암 게놈 지도(The Cancer Genome Atlas)로부터의 폐 선암종 종양의 수집에서 PD-L1 RNA 발현과 PD-L1 프로모터 메틸화의 상관관계 분석의 결과를 도시한다.

도 2b는 암 게놈 지도(The Cancer Genome Atlas)로부터의 편평상피 세포 암종 종양의 수집에서 PD-L1 RNA 발현과 PD-L1 프로모터 메틸화의 상관관계 분석의 결과를 도시한다.

도 2c는 암 게놈 지도(The Cancer Genome Atlas)로부터의 유방암 종양의 수집에서 PD-L1 RNA 발현과 PD-L1 프

로모터 메틸화의 상관관계 분석의 결과를 도시한다.

도 2d는 암 게놈 지도(The Cancer Genome Atlas)로부터의 피부 암종 종양의 수집에서 PD-L1 RNA 발현과 PD-L1 프로모터 메틸화의 상관관계 분석의 결과를 도시한다.

도 3은 5개 폐암 세포주 (즉, H661, LXFL529, A427, H2073, H322T, 및 H1993) 내 PD-L1 RNA의 발현 상에서의 5아자(aza)-dC, TSA, IFNg, 또는 5아자(aza)-dC + TSA + IFNg 치료의 효과를 평가하기 위하여 수행된 실험의 결과를 도시한다.

도 4a는 4개의 상이한 폐암 세포주 (A427, H292, H322T, 및 H358) 내 RNA 발현 및 PD-L1 단백질 상에서의 IFNg 치료의 효과를 평가하기 위하여 수행된 실험의 결과를 도시한다.

도 4b는 A427, H292, H322T, 및 H358 세포주에서 IFNg/JAK/STAT 신호전달 경로 상에 30-분 IFNg 처리 및 24-시간 IFNg 처리의 효과를 측정하기 위해 수행된 실험의 결과를 도시한다.

도 4c는 A427 및 H358에서 STAT1, STAT3 및 PD-L1 발현에 대한 IFNg 처리 및/또는 STAT1 및 STAT3 녹다운의 효과를 측정하기 위해 수행된 실험의 결과를 도시한다.

도 5a는 말초 혈액 단핵 세포 서브세트에 대한 가능한 CpG 메틸화 부위의 지도 상에 중아황산염 서열분석 데이터의 중첩 기법을 도시한다.

도 5b는 PD-L1 프로모터 영역 내 높은, 중간, 또는 낮은 메틸화 수준을 갖는, NSCLC 폐암 세포주 및 불멸화 정상 폐 세포주에 대한 가능한 CpG 메틸화 부위의 맵 상에서의 중아황산염 서열분석 데이터의 중첩 기법을 도시한다.

도 6a는 X축 상에 평활화된 CpG1 및 CpG5 메틸화 (M-값)와 Y축 상에 PD-L1 발현 (RNA-서열, Log2-계수)을 직접적으로 비교하는 NSCLC 세포주의 암 게놈 프로젝트 (CGP)로부터 만들어진 산포도를 도시한다.

도 6b는 도 6a 유래의 NSCLC 세포주가 분류된 3개의 메틸화 수준 그룹 (즉, "낮은", "중간" 및 "높은")의 통계적인 관련성을 측정하기 위해 수행된 ANOVA 분석의 결과를 도시한다.

도 6c는 도 6a 유래의 NSCLC 세포주에서 PD-L1 RNA 발현에 대한 5아자(aza)-dC 처리의 효과의 통계적인 관련성을 측정하기 위해 수행된 ANOVA 분석의 결과를 도시한다.

도 6d는 연결된 NSCLC 세포주 H1993 및 H2073 내 PD-L1 RNA 발현 상에서의 5아자(aza)-dC 치료의 효과를 측정하기 위하여 수행된 실험의 결과를 도시한다.

도 7a는 NSCLC 세포주 내에서 CpG5에서의 T-세포 침윤인 메틸화 (mut7)와 PD-L1 단백질 수준 사이의 관계의 통계적인 관련성을 측정하기 위해 수행된 ANOVA 분석의 결과를 도시한다.

도 7b는 NSCLC 세포주 내에서 CpG5에서의 T-세포 침윤인 메틸화 (mut7)와 PD-L1 전사체 수준 사이의 관계의 통계적인 관련성을 측정하기 위해 수행된 ANOVA 분석의 결과를 도시한다.

도 8은 IgV 통합 유전체학 뷰어 (브로드 연구소(Broad Institute))에 나타난 .bed 파일을 제공한다. .bed 파일은, STAT1 및/또는 STAT3가 A427 및 H358 세포주 내 PD-L1 프로모터 영역에 결합하는지 여부를 측정하기 위하여 수행된 ChIP-Seq 실험의 결과를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 일반적인 기술

본원에 기술 또는 참조된 기술 및 절차는, 본 분야의 숙련가에 의하여 기존의 방법, 예컨대 예를 들어, 하기 기술된 널리 이용되는 방법들을 사용하여 잘 이해되고, 통상적으로 채용될 것이다: Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P.

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

II. 정의

본원에 사용된 바와 같이, “치료”는 임상 병리학적 과정 동안 치료받는 개체 또는 세포의 본래의 과정을 변화시키려는 시도에서의 임상적 중재술을 지칭한다. 목적 치료 효과는 하기를 포함한다: 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 완화 또는 경감, 차도, 또는 개선된 진단성. 예를 들어, 개체는, 만약 암과 관련된 하나 이상의 증상이 비제한적으로 하기를 포함하여 경감 또는 제거되었다면 성공적으로 “치료된” 것이다: 암성 세포의 증식 감소 (또는 파괴), 질환으로 유발된 증상의 감소, 질환을 앓는 군의 생활의 질 증가, 질환을 치료하는데 요구되는 기타 약제의 투여량 감소, 및/또는 개체 생존의 연장.

본 명세서에서 사용된 바와 같이, “예 기반된”은 (1) 본원에서 기재된 바와 같은 환자 특징을 평가, 결정 또는 측정하는 것 (그리고 바람직하게는 치료를 받기에 적합한 환자를 선택하는 것; 및 (2) 본원에서 기재된 바와 같은 치료를 투여하는 것을 포함한다.

치료의 목적을 위한 “대상체” “환자” 또는 “개체”는, 인간, 가정용 및 농장용 동물, 및 동물원, 스포츠, 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 고양이, 소, 등을 포함하여, 포유동물로서 분류된 임의의 동물을 지칭한다. 바람직하게는 포유동물은 인간이다.

본원에서 사용된 바와 같이, “질환의 진행 지연”은 질환 (예컨대 암)의 진행을 보류, 방해, 지체, 저지, 안정화, 및/또는 연기하는 것을 의미한다. 상기 지연은 질환의 이력 및/또는 치료받는 개체에 따라 다양한 시간의 길이일 수 있다. 당해분야의 숙련자에게 명백한 바와 같이, 충분한 또는 유의미한 지연은, 사실상, 개체에서 질환이 발병하지 않는다는 점에서, 예방을 포함할 수 있다. 예를 들어, 말기 암, 예컨대 전이의 발병이 지연될 수 있다.

“유효량”은 특정 장애의 측정가능한 개선 또는 예방을 부여하는데 요구되는 최소한의 최소량이다. 본원의 유효량은 개체의 질환 단계, 연령, 성별 및 체중과 같은 요인, 및 환자에서의 목적 반응을 일으키는 항체의 능력에 따라 가변될 수 있다. 유효량은 또한, 치료의 임의의 독성 또는 유해 효과가 치료적 유익 효과를 능가하는 것이다. 예방 용도에 대하여, 유익한 또는 원하는 결과는 결과 예컨대 위험 제거 또는 감소, 중증도 약화, 또는 질환의 생화학적, 조직학적 및/또는 행동 증상, 질환의 발달 동안 나타나는 그 합병증 및 중간체 병리적 표현형을 포함하여, 질환의 개시 지연을 포함한다. 치료 용도에 대하여, 유익한 또는 원하는 결과는 임상 결과 예컨대 질환에서 비롯되는 하나 이상의 증상 감소, 질환을 앓는 군의 삶의 질 증가, 질환을 치료하는데 필요한 다른 약제의 용량 감소, 예컨대 질환의 표적화, 질환 진행의 지연을 통한 기타 약제의 효과 증강, 및/또는 생존 연장을 포함한다. 암 또는 종양의 경우, 치료학적 유효량의 약물은 암 세포수를 감소시키고/시키거나; 종양 크기를 감소시키고/시키거나; 말초 장기로의 암 세포 침윤을 억제(즉, 일정 정도 느리게 하거나 정지)하고/하거나; 종양 전이를 억제(즉, 일정 정도 느리게 하거나 바람직하게는 정지)하고/하거나; 종양 성장을 일정 정도로 억제하고/하거나; 장애와 관련된 하나 이상의 증상을 일정 정도로 완화시키는 것에 대한 효과를 가질 수 있다. 유효량은 하나 이상의 투여로 투여될 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 약물, 화합물, 또는 약제학적 조성물의 유효량은 직접적으로 또는 간접적으로 예방적 또는 치료적 처치를 달성하는데 충분한 양이다. 임상 맥락에서 이해되는 바와 같이, 약물, 화합물, 또는 약제학적 조성물의 유효량은 또 다른 약물, 화합물, 또는 약제학적 조성물과 함께 달성될 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 따라서, “유효량”은 하나 이상의 치료제 투여의 맥락에서 고려될 수 있고, 그리고 만일 하나 이상의 다른 제제와 함께 바람직한 결과가 달성될 수 있거나 달성되면 단일 제제는 효과적인 양으로 제공되는 것으로 고려될 수 있다.

용어 “세포 증식성 장애” 및 “증식성 장애”는 일정 정도의 비정상 B 세포 증식과 연관된 장애를 지칭한다.

일 구현예에서, 세포 증식성 장애는 암이다. 일 구현예에서, 세포 증식성 장애는 종양이다.

[0036] 본원에서 사용된 "종양"은 악성이든 양성이든, 모든 신생물성 세포 성장 및 증식, 그리고 모든 전-암성 및 암성 세포 및 조직을 나타낸다. 용어들 "암", "암성", "세포 증식성 장애", "증식성 장애" 및 "종양"은 본원에서 상호 배타적인 것이 아니다.

[0037] 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 조절되지 않은 세포 성장에 의해 특징되는 포유동물의 생리 조건을 지칭하거나 설명한다. 암의 예시는 비제한적으로 하기를 포함한다: 암종, 림프종, 아세포종, 육종, 백혈병 또는 림프성 악성종양, 편평상피 세포 암 (예컨대, 상피 편평상피 세포 암), 복막의 암, 간세포 암, 위 또는 위암 (예컨대 위장관 암 및 위장관 기질 암), 췌장암, 교아세포종, 자궁경부 암, 난소암, 간암, 방광암, 요로암, 간세포암, 결장암, 직장 암, 결장직장 암 (CRC), 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장 또는 신장 암, 전립선암, 외음부 암, 갑상선 암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 다발성 골수종 및 B-세포 림프종 (예컨대 낮은 등급/여포성 비-호지킨 림프종 (NHL), 소 림프성 (SL) NHL, 중간 등급/여포성 NHL, 중간 등급 미만성 NHL, 높은 등급 면역아세포성 NHL, 높은 등급 림프구성 NHL, 높은 등급 소 비-절단 세포 NHL, 대부피성 질환 NHL, 외투 세포 림프종, AIDS-관련 림프종, 및 발덴스트롬 거대글로불린혈증), 만성 림프성 백혈병 (CLL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 모양 세포 백혈병, 만성 골수아구성 백혈병, 및 이식 후 림프증식성 장애 (PTLD), 뿐만 아니라 모반증, 부종과 연관된 (예컨대 뇌종양과 연관된) 비정상 혈관 증식, 메기스 증후군, 뇌, 뿐만 아니라 두경부 암, 연질-조직 육종, 카포시 육종, 카시노이드 암종, 및 중피종, 교아세포종, 신경아세포종, 및 연관된 전이. 암의 기타 예시는 비제한적으로 하기를 포함한다: 유방암 (예컨대 유방 암종), 폐암 (예컨대 소 세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종, 및 폐의 편평상피 세포 암종), 및 피부 암 (예컨대 흑색종, 표제 확산 흑색종, 악성 흑색점 흑색종, 말단 흑색점 흑색종, 결절성 흑색종, 및 피부 암종) (상기 암의 전이성 형태를 포함함).

[0038] 본원에 사용된 바와 같은 "샘플,"은 예를 들어, 물리적, 생화학적, 화학적 및/또는 생리학적인 특성을 기준으로 특성 분석되고/되거나 식별되어야만 하는 세포 및/또는 다른 분자 실체를 함유하는 목적하는 대상체로부터 수득되거나 유래된 조성물을 지칭한다. 예를 들어, 어구 "질환 샘플" 및 이의 변화는 특성화되는 세포성 및/또는 분자 독립체를 함유하기 위해 공지된 또는 예상될 해당 대상체로부터 수득된 임의의 샘플을 지칭한다. 샘플은 핵산 (예컨대 폴리뉴클레오타이드, 예를 들면, 게놈 DNA 및/또는 전사체) 및/또는 폴리펩티드가 단리될 수 있는 대상체로부터 암 세포 및/또는 종양 세포를 함유하는 생물학적 조직 또는 유체의 생물학적 샘플 (예컨대 생체의 생물학적 샘플)일 수 있다. 이러한 샘플은 전형적으로 인간 대상체 유래의 것이지만, (본 명세서에서 다른 곳에 기재된 바와 같이, 포유동물로 분류된 임의의 동물 같은) 다른 대상체로부터 단리된 조직을 포함한다. 샘플은 또한 조직학적 목적을 위하여 취해진, 예컨대 생검 및 부검 샘플과 같은 조직의 섹션, 동결 절편을 포함할 수 있다. 샘플은 상기 대상체로부터의 신선한 샘플 또는 보존된 조직 샘플, 예컨대 포르말린-고정 파라핀-포매된 (FFPE) 샘플을 포함할 수 있다. 샘플은 또한 환자 조직 유래의 외식편 및 1차 및/또는 전환된 세포 배양물을 포함한다.

[0039] "조직 또는 세포 샘플"은 대상체 또는 환자의 조직으로부터 수득된 유사한 세포의 수집물을 의미한다. 조직 또는 세포 샘플의 공급원은 신선, 동결 및/또는 보존 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡입액에서 유래된 것과 같은 고체 조직; 혈액 또는 모든 혈액 구성성분; 체액, 예컨대 뇌척수액, 양수, 복막액 또는 세포간질액; 개체의 임신 또는 발달 중 어느 시점에서 유래된 세포일 수 있다. 조직 샘플은 또한 원발성 또는 배양된 세포 또는 세포주일 수 있다. 임의로, 조직 또는 세포 샘플은 질환 조직/장기로부터 수득된다. 상기 조직 샘플은 자연적으로 상기 조직과 혼합되지 않는 화합물, 예컨대 보존제, 항응고제, 완충용액, 고정액, 영양분, 항생제 등을 함유할 수 있다.

[0040] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "세포독성제"는 세포에 해로운 (예를 들면, 세포사를 야기하고, 증식을 억제하고, 또는 달리는 세포질의 기능을 방해하는) 임의의 제제를 지칭한다. 세포독성제는, 비제한적으로, 방사성 동위원소 (예를 들면, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb 및 ^{177}Lu 의 방사성 동위원소); 화학치료제; 성장 억제제 제제; 효소 및 그 단편 예컨대 핵산분해 효소; 및 독소 예컨대 작은 분자 독소 또는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성 독소, 단편 및/또는 이의 변이체를 포함한다. 예시적 세포독성제는 하기로부터 선택될 수 있다: 항-미세소관 제제, 백금 배위 착물, 알킬화제, 항생제 제제, 토포이소머라제 II 억제제, 항대사물질, 토포이소머라제 I 억제제, 호르몬 및 호르몬 유사체, 신호 전달 경로 억제제, 비-수용체 티로신 키나아제 혈관신생 억제제, 면역치료제, 세포자멸 유도 제제, LDH-A의 억제제; 지방산 생합성의 억제제; 세포 주기 신호전달 억제제; HDAC 억제제, 프로테아솜 억제제; 및 암 대사의 억제제. 일 구현예에서, 세포독성제는 타산이다. 일 구현예에서 타산은 파클리탁셀 또는 도세탁셀이다. 일 구현예에서, 세

포도독성제는 백금 제제이다. 일 구현예에서 세포독성제는 EGFR의 길항제이다. 일 구현예에서 EGFR의 길항제는 N-(3-에티닐페닐)-6,7-비스(2-메톡시에톡시)퀴나졸린-4-아민 (예를 들면, 에를로티닙)이다. 일 구현예에서 세포독성제는 RAF 억제제이다. 일 구현예에서, RAF 억제제는 BRAF 및/또는 CRAF 억제제이다. 일부 구현예에서, RAF 억제제는 베무라페닙이다. 일 구현예에서 세포독성제는 PI3K 억제제이다.

[0041]

“화학치료제”는 암의 치료에 유용한 화합물을 지칭한다. 화학치료제의 예시는 하기를 포함한다: 에를로티닙 (TARCEVA[®], Genentech/OSI Pharm.), 보르테조미 (VELCADE[®], Millennium Pharm.), 디설피람, 에피갈로카테킨 갈레이트, 살리노스포라마이드 A, 카르필조미, 17-AAG (젤다나마이신), 라디시콜, 락테이트 탈수소효소 A (LDH-A), 폴베스트란트 (FASLODEX[®], AstraZeneca), 서니티 (SUTENT[®], Pfizer/Sugen), 레트로졸 (FEMARA[®], Novartis), 이마티닙 메실레이트 (GLEEVEC[®], Novartis), 피나서네이트 (VATALANIB[®], Novartis), 옥살리플라틴 (ELOXATIN[®], Sanofi), 5-FU (5-플루오로우라실), 류코보린, 라파마이신 (시롤리무스, RAPAMUNE[®], Wyeth), 라파티닙 (TYKERB[®], GSK572016, Glaxo Smith Kline), 로나파미 (SCH 66336), 소라페닙 (NEXAVAR[®], Bayer Labs), 게피티닙 (IRESSA[®], AstraZeneca), AG1478, 알킬화제 예컨대 티오테파 및 CYTOXAN[®] 사이클로포스파마이드; 알킬 설포네이트 예컨대 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘 예컨대 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민 (하기 포함: 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸로멜라민(trimethylomelamine); 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 캅토테신 (하기 포함: 토포테칸 및 이리노테칸); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (하기 포함: 그것의 아도젤레신, 카르젤레신 및 바이젤레신 합성 유사체); 크립토파이신 (특히 크립토파이신 1 및 크립토파이신 8); 아드레노코르티코스테로이드 (하기 포함: 프레드니손 및 프레드니솔론); 사이프로테론 아세테이트; 5 α -환원효소 (하기 포함: 피나스테라이드 및 두타스테라이드)); 보리노스테트, 로미렙신, 파노비노스테트, 발프로산, 모세티노스테트 돌라스타틴; 알데스류킨, 탈크 듀오카르마이신 (하기 포함: 합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1); 엘루테로빈; 판크라티스타틴; 사르코덕티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드 예컨대 클로르암부실, 클로마파진, 클로로포스파마이드, 에스트라무스틴, 이포스파마이드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비친, 펜에스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파마이드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라넘무스틴; 항생제 예컨대 엔디인 항생제 (예를 들면, 칼리키아마이신, 특히 칼리키아마이신 γ II 및 칼리키아마이신 ω II (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. 1994 33:183-186); 다이네마이신 (하기 포함: 다이네마이신 A; 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트; 에스페라마이신; 뿐만 아니라 네오키리노스타틴 발색단 및 관련된 색소단백질 엔디인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오프라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캇티노마이신, 카라비신, 카미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, ADRIAMYCIN[®] (독소루비신), 모폴리노-독소루비신, 시아노모폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 예컨대 미토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 펠포로마이신, 포르피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물 예컨대 메토크세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 염산 유사체 예컨대 데노프테린, 메토크세이트, 프테로프테린, 트리메토크세이트; 퓨린 유사체 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카모푸르, 사이타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로젠 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-부신 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 염산 보충물 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파마이드 글리코사이드; 아미노레벌린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비스안트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이딘; 메이탄시노이드 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피담놀; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로소크산트론; 포도필린산; 2-에틸 하이드라자이드; 프로카바진; PSK[®] 다당류 복합체(JHS 다당류 복합체 (JHS 천연 생성물, Eugene, Oreg.); 라족산; 라이족신; 시조푸란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2''-트리클로로트리메틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("아라(Ara)-C"); 사이클로포스파마이드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들면, 탁솔(TAXOL) (파클리탁셀; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE[®]

(크레모포어 부제), 파클리탁셀의 알부민-가공된 나노입자 제형 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.), 및 TAXOTERE[®] (도세탁셀, 독세탁셀; Sanofi-Aventis); 클로르람부실; GEMZAR[®] (젬시타빈); 6-티오구아닌; 머캅토프린; 메토티렉세이트; 백금 유사체 예컨대 시스플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 에토포시드 (VP-16); 이포스파마이드; 미톡산트론; 빈크리스틴; NAVELBINE[®] (비노렐빈); 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 카페시타빈 (XELODA[®]); 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드 예컨대 레티노산; 및 상기 중 임의의 것의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 및 유도체.

[0042]

이러한 정의에는 하기가 또한 포함된다: (i) 예를 들면, 타목시펜 (NOLVADEX[®]; 타목시펜 시트레이트를 포함함), 탈록시펜, 드롤록시펜, 아오독시펜, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케녹시펜, LY117018, 오나프리스톤, 및 FARESTON[®] (토레미펜 시트레이트)을 포함하는, 항-에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절물질 (SERM)과 같은 종양에 대한 호르몬 작용을 조절 또는 억제하는 작용을 하는 항-호르몬제; (ii) 예를 들면, 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, MEGASE[®] (메게스트롤 아세테이트), AROMASIN[®] (엑세메스탄; 화이자), 포르메스타니, 파드로졸, RIVISOR[®] (보로졸), FEMARA[®] (레트로졸; 노바티스), 및 ARIMIDEX[®] (아나스트로졸; AstraZeneca)와 같은 효소 방향화효소를 억제하고, 부신에서 에스트로겐 생산을 조절하는 방향화효소 억제제; (iii) 항-안드로겐 예컨대 플루타미드, 닐루타마이드, 바이칼루타마이드, 류프롤라이드 및 고세렐린; 부세렐린, 트립테레린, 메드록시프로게스테론 아세테이트, 디에틸실베스트롤, 프레마린, 플루옥시메스테론, 모든 트랜스레티노산, 펜레티나이드 뿐만 아니라 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오사이드 시토신 유사체); (iv) 단백질 키나제 억제제; (v) 지질 키나제 억제제; (vi) 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 특히 예를 들면, PKC-알파, Ralf 및 H-Ras와 같은, 비정상적인 세포 증식에 관련된 신호전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것들; (vii) 리보자임 예컨대 VEGF 발현 억제제 (예를 들면, ANGIOZYME[®]) 및 HER2 발현 억제제; (viii) 백신 예컨대 유전자 요법 백신, 예를 들면, ALLOVECTIN[®], LEUVECTIN[®], 및 VAXID[®]; PROLEUKIN[®], rIL-2; 토포이소머라제 1 억제제 예컨대 LURTOTECAN[®]; ABARELIX[®] rmRH; 및 (ix) 임의의 상기의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 및 유도체를 포함한다.

[0043]

화학치료제는 또한 하기를 포함한다: 알렘투주맵(캄파스(Campath)), 베바시주맵(AVASTIN[®], Genentech); 세특시맵(ERBITUX[®], Imclone); 파니투주맵(VECTIBIX[®], Amgen), 리툽시맵(RITUXAN[®], Genentech/Biogen Idec), 퍼투주맵(OMNITARG[®], 2C4, Genentech), 트라스투주맵(HERCEPTIN[®], Genentech), 토시투모맵(Bexxar, Corixa) 및 항체 약물 콘주게이트, 젬투주맵 오조가미신(MYLOTARG[®], Wyeth). 본 발명의 화합물과 조합된 제제로서 치료적 잠재력을 갖는 추가의 인간화된 단클론성 항체는 하기를 포함한다: 아폴리주맵, 아셀리주맵, 아틀리주맵, 바피뉴주맵, 비바투주맵 메르탄신, 칸투주맵 메르탄신, 세멜리주맵, 세르톨리주맵 페골, 시드푸시투주맵, 시드투주맵, 다클리주맵, 에쿨리주맵, 에팔리주맵, 에프라투주맵, 에를리주맵, 펠비주맵, 폰톨리주맵, 젬투주맵 오조가미신, 이노투주맵 오조가미신, 이필리무맵, 라베투주맵, 린투주맵, 마투주맵, 메폴리주맵, 모타비주맵, 모토비주맵, 나탈리주맵, 니모투주맵, 놀로비주맵, 누마비주맵, 오크렐리주맵, 오말리주맵, 팔리비주맵, 파스콜리주맵, 펙푸시투주맵, 펙투주맵, 펙셀리주맵, 랄리비주맵, 라니비주맵, 레슬리비주맵, 레슬리주맵, 레시비주맵, 로벨리주맵, 루폴리주맵, 시브로투주맵, 시폴리주맵, 손투주맵, 타카투주맵 테트라세탄, 타도시주맵, 탈리주맵, 테피바주맵, 토실리주맵, 토랄리주맵, 트라스투주맵, 투코투주맵 셀모류킨, 투쿠시투주맵, 우마비주맵, 유르톡사주맵, 우스테키누맵, 및 비실리주맵, 항-인터류킨-12 (예컨대, ABT-874/J695, Wyeth Research and Abbott Laboratories (인터류킨-12 p40 단백질을 인식하기 위하여 유전적으로 변형된 재조합 배타적 인간-서열, 전장 IgG₁ λ 항체).

[0044]

본원에서 사용되는 "성장 억제성 제제"는 시험관내 또는 생체내 세포의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 일 구현예에서, 성장 억제성 제제는 항원이 결합하는 항원을 발현하는 세포의 증식을 예방 또는 감소시키는 성장 억제성 항체이다. 또 다른 구현예에서, 성장 억제성 제제는 S 상에서 세포의 핵분열을 유의미하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제성 제제의 예는 (S 상 이외의 위치에서) 세포 주기 진행을 차단하는 제제, 예컨대 G1 상 및 M-상 정지를 유도하는 제제를 포함한다. 고전적 M-상 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산 및 토포이소머라제 II 억제제 예컨대 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드, 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 제제, 예를 들면, DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로르에타민, 시스플라틴, 메토티렉세이트, 5-플루오로우라실, 및 아라-C 또한 S-상 정지에 영향을 미친

다. 추가 정보는 하기에서 발견될 수 있다: Mendelsohn and Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), 예컨대, p. 13. 탁산(파클리탁셀 및 도세탁셀)은 둘 다 주목(yew tree)에서 유도된 항암 약물이다. 유럽 주목에서 유도된 도세탁셀(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer)은 파클리탁셀의 반합성 유사체(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb)이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜불린 이량체로부터 미세소관의 조립을 촉진하고, 탈중합 방지에 의해 미세소관을 안정화하여 세포에서 유사분열의 억제를 야기한다.

[0045] 본 명세서에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고 구체적으로 단클론성 항체, 다클론성 항체, 적어도 2종의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예컨대 이중특이적 항체), 및 이들이 목적 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함한다.

[0046] 본원에 사용된 용어 "항-PD-L1 항체"는, PD-L1 의, 이의 결합 상대 예컨대 PD-1, B7-1 중 하나 이상과의 상호작용으로부터 유발된 신호 형질도입을 감소, 차단, 억제, 폐지 또는 억제하는 길항제 항체를 지칭한다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 이의 결합상대로의 PD-L1 결합을 억제하는 항체이다. 특정 양태에서, 항-PD-L1 항체는 PD-1 및/또는 B7-1로의 PD-L1 결합을 억제한다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 하기를 포함한다: PD-L1 의, 이의 결합 상대 예컨대 PD-1 및/또는 B7-1 중 하나 또는 그 이상과의 상호작용으로부터 유발된 신호 형질도입을 감소, 차단, 억제, 폐지 또는 억제하는, 이의 항원-결합 단편. 일 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 PD-L1을 통한 T 림프구 매개된 신호전달에서 발현된 세포 표면 단백질에 의해 또는 통해 매개된 음성 공통자극 신호를 감소시켜서 기능이상 T-세포에 기능이상을 경감시킨다 (예를 들면, 항원 인식에 대한 효과기 반응을 증진함). 일 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 본원에 기술된 YW243.55.S70이다. 또 다른 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 본원에 기술된 MDX-1105이다. 또 다른 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 본원에 기술된 MPDL3280A이다. 또 다른 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 본원에 기술된 MEDI4736이다.

[0047] "차단" 항체 또는 "길항제" 항체는 이 항체가 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 것이다. 일부 구현예에서, 차단 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다. 본 발명의 항-PD-L1 항체는 PD-1을 통한 신호전달을 차단한다.

[0048] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "결합하는", "이에 특이적으로 결합하는" 또는 "이에 특이적인"은, 표적 및 항체 간의 결합과 같은 측정가능하고 재생가능한 상호작용을 지칭하며, 이는 생물학적 분자를 포함하는 분자의 이중성 집단의 존재 하에서의 표적의 존재에 대한 결정요인이다. 예를 들면, 표적 (에피토프일 수 있음)에 결합하거나, 또는 특이적으로 결합하는 항체는 다른 표적에 결합하는 것보다 더 큰 친화도, 결합능으로, 더욱 쉽게, 그리고/또는 더 긴 지속시간으로 상기 표적에 결합하는 항체이다. 일 구현예에서, 비관련 표적에 대한 항체의 결합 정도는, 예를 들면, 방사면역검정법(RIA)으로 측정 시, 상기 표적에 대한, 약 10% 미만의 항체의 결합이다. 특정 구현예에서, 표적에 특이적으로 결합하는 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, 또는 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 의 해리 상수 (Kd)를 갖는다. 특정 구현예에서, 항체는 상이한 종으로부터의 단백질 중에서 보존된 단백질의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 또 다른 구현예에서, 특이적 결합은 필연적으로 (비록 포함할 수 있어도) 배타적인 결합을 요구하지 않는다.

[0049] "항체 단편"은 바람직하게는 이들의 항원-결합 영역을 포함하는 무손상 항체의 일부를 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체(linear antibodies); 단일-쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0050] 본원에서 사용된 용어들 "전장 항체", "무손상 항체" 및 "전체 항체"는 상호교환적으로 아래에서 정의된 바와 같이 항체 단편이 아닌 그 실질적으로 무손상 형태의 항체를 나타낸다. 상기 용어는 특히 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 나타낸다.

[0051] "단리된" 항체는 그것의 천연 환경의 성분으로부터 식별되고 분리되고 및/또는 회수된 항체이다. 그 천연 환경의 오염물질 성분은 항체에 대한 연구, 진단적 또는 치료적 사용을 방해할 물질이며, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 물질이 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 (1) 예를 들면, Lowry 방법에 의해 측정 시 항체의 95 중량% 초과로, 일부 구현예에서 99 중량% 초과로; (2) 예를 들면, 회전 컵 시퀀네이터(spinning cup sequenator)를 이용해서 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15 개 잔기를 획득하기 충분한 정도로, 또는 (3) 예를 들면, 쿠마씨 블루 또는 은 염색을 이용해서 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질성으로까지, 정제된다. 단리된 항체는 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않기 때문에 재조합 세포 내에서 동일계내에 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 적어도 하나의 정제

단계에 의해 제조될 것이다.

- [0052] "천연 항체"는 보통 2개의 동일한 가벼운 (L) 쇠 및 2개의 동일한 중 (H) 쇠로 구성된, 약 150,000 달톤의 이중 사량체 당단백질이다. 각 경쇄는 하나의 공유 이황화 결합에 의해 중쇄에 연결되고, 반면 이황화 연결기의 수는 상이한 면역글로불린 이소형의 중쇄 중에서 다변한다. 각 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 이격된 쇠내 이황화 가교를 가진다. 각 중쇄는 하나의 말단에 가변 도메인 (V_H)과 그 다음 수많은 불변 도메인을 가진다. 각각의 경쇄는 하나의 말단에 가변 도메인(V_L) 그리고 그 다른 말단에 불변 도메인을 갖는다; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되며, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정한 아미노산 잔기가 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 간 계면을 형성하는 것으로 여겨진다.
- [0053] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체 중에 서열에서 광범위하게 상이하고 그리고 이의 특정한 항원에 대한 각각의 특정한 항체의 결합 및 특이성에서 사용된다는 사실을 지칭한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전체를 통해 고르게 분포되어 있지 않다. 그것은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인에서 모두 초가변성 영역으로 불리는 3개의 분절에 집중되어 있다. 가변 도메인의 더 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)이라고 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 각각은 3개의 초가변성 영역에 의해 연결된, 크게는 β -시트 입체배치를 채택한 4개의 FR을 포함하여, β -시트 구조를 연결하고, 그리고 일부 경우에는 β -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각 쇠의 초가변성 영역은 FR에 의해 근접하여 함께 유지되고, 그리고 다른 쇠로부터의 초가변성 영역과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다 (참고: Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). 불변 도메인은 항원에 항체를 결합하는 것에 직접적으로 관여하지는 않지만, 항체 의존성 세포 독성 (ADCC)에서의 항체의 참여와 같은 다양한 효과기 작용을 나타낸다.
- [0054] 항체의 파파인 분해는, 각각이 단일 항원-결합 부위, 및 잔류 "Fc" 단편을 가지고, 그의 명칭이 쉽게 측정화하는 이들의 능력을 반영한 것으로, "Fab" 단편이라 불리는 2개의 동일한 항원-결합 단편을 생산한다. 펩신 처리는 2개의 항원-결합 부위를 가지며 여전히 항원을 가교결합시킬 수 있는 $F(ab')_2$ 단편을 생성한다.
- [0055] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 영역은 단단하고 비-공유 회합으로 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 구성된다. V_H - V_L 이량체의 표면에 항원-결합 부위를 정의하기 위해 각 가변 도메인의 3개의 초가변성 영역이 상호 작용하는 것이 이 입체배치에 있다. 종합적으로, 6개의 초가변성 영역은 항체에 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 단지 3개의 초가변성 영역만을 포함하는 Fv의 절반)조차도, 비록 전체 결합 부위보다 낮은 친화도로 이지만, 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.
- [0056] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역 아래의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카복시 말단에서 몇 개의 잔기를 부가함으로써 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 적어도 하나의 유리 티올 기를 갖는 Fab'에 대한 본 명세서에서의 지정이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 본래 이들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생산되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어있다.
- [0057] 임의의 척추동물 중으로부터의 항체(면역글로불린) "경쇄"는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기반하여, 카파(κ) 및 람다(λ)로 불리는 2개의 명확히 구별되는 유형 중 하나에 배정될 수 있다.
- [0058] 이들의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체는 상이한 부류 또는 이소형에 할당될 수 있다. 하기 5개 주요 부류의 무손상 항체가 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM (이들 중 몇몇은 하위부류(이소형), 예를 들면 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 및 IgA2 로 추가 구분될 수 있음). 항체의 상이한 부류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ , 및 μ 로 지칭된다. 면역글로불린의 상이한 클래스의 서브유닛 구조 및 3-차원 입체배치는 잘 알려지고 일반적으로, 예를 들어, 하기에 기술된다: Abbas et al. *Cellular and Mol. Immunology*, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). 항체는 하나 이상의 다른 단백질 또는 펩티드와 항체의 공유 또는 비-공유 회합에 의해 형성된 더 큰 융합 분자의 일부일 수 있다.
- [0059] "단일-쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하고, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇠에 존재한다. 일부 구현예에서, Fv 폴리펩티드는 V_H 와 V_L 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 더욱 포함하는데, 이것은 scFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있게 한다. scFv의 재고를 위해, 하기를 참고한

다: Plückthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

- [0060] 용어 "디아바디"는 2 개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 나타내며, 이 단편은 동일한 폴리펩티드쇄 (V_H-V_L)에서 경쇄 가변 도메인(V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인(V_H)을 포함한다. 동일한쇄 상에서 2 개의 도메인 간 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 이용함으로써, 도메인은 또 하나의쇄의 상보적 도메인과 쌍을 이루고 2 개의 항원-결합 부위를 생성하도록 유도된다. 디아바디는 하기에 더욱 충분히 기술된다: 예를 들면, EP 404,097; WO 93/11161; 및 Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).
- [0061] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단클론성 항체"는 실질적으로 균질 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 즉, 상기 집단을 포함하는 개별 항체는, 단클론성 항체의 생산 동안 발생할 수 있는 가능한 변이체 항체(상기 변이체는 일반적으로 소량으로 존재한다)를 제외하고, 동일하고/하거나 동일한 에피토프에 결합한다. 전형적으로 상이한 결정인자(에피토프)에 관련된 상이한 항체를 포함하는 다클론성 항체 제조와 대조되게, 각각의 단클론성 항체는 항원에서 단일 결정인자에 관련된다. 이들의 특이성에 부가하여, 단클론성 항체는 이들이 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다. 수식어 "단클론성"은 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 것으로서의 항체의 특성을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 요하는 것으로서 해석되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 단클론성 항체는 우선 하기에 의해 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 재조합 DNA 방법(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조)에 의해 제조될 수 있다: Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975). 단클론성 항체는 또한 예를 들면 하기에 기재된 기술을 사용하여 파아지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다: 예를 들어, Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991) 및 Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991).
- [0062] 본원의 단클론성 항체는 구체적으로 "키메라" 항체(면역글로불린)를 포함하고, 여기서, 중쇄 및/또는 경쇄 부분은 특정 종으로부터 유래된 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 이에 동일성이거나 특정 항체 부류 또는 하위 부류에 속하고,쇄(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유래된 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 동일성이거나 이들이 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 상기 항체의 단편 뿐만 아니라 또 다른 항체 부류 또는 하위 부류에 속한다(미국 특허 번호 4,816,567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). 본 명세서에서 관심 키메라성 항체는 비-인간 영장류(예를 들면 구대륙 원숭이, 예컨대 개코원숭이, 레수스 또는 사이노몰구스 원숭이)로부터 유도된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화된" 항체를 포함한다(미국 특허번호 5,693,780).
- [0063] 비인간(예를 들어, 뮤린) 항체의 "인간화된" 형태는 비인간 면역글로불린으로부터 유래하는 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대개, 인간화된 항체는 수령체의 추가변성 영역으로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화도, 및 수용력을 가지는 비-인간 종(공여체 항체) 예컨대 마우스, 랫트, 토끼 또는 비인간 영장류의 추가변성 영역으로부터의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린(수령체 항체)이다. 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 더욱이, 인간화된 항체는 수령체 항체에서 또는 공여체 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 더욱 개선하기 위해 만들어졌다. 일반적으로, 인간화된 항체는 실질적으로 적어도 하나, 그리고 전형적으로는 2개의 모든 가변 도메인을 포함할 것이며, 모든 또는 실질적으로 모든 추가변성 루프는 비-인간 면역글로불린의 것과 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 것들이다(상기 주지된 FR 치환(들) 제외). 인간화된 항체는 임의로 또한 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 부분을 포함할 것이다. 추가 세부사항에 대해서는, 하기를 참고한다: Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); 및 Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).
- [0064] "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체에 대응하고/하거나 본원에서 개시된 바와 같은 인간 항체를 제조하기 위한 임의의 기술을 이용해서 제조된 아미노산 서열을 보유하는 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 특히 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 배제한다. 인간 항체는 파지-디스플레이 라이브러리를 포함하는 당해기술에 공지된 다양한 기술을 이용해서 생성될 수 있다. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). 또한 인간 단클론성 항체의 제조를 위해 하기에 기재된 방법이 이용 가능하다: Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). 또한 하기를 참고한다: van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). 인간 항체는 항원 유발접종에 반응하여 그와 같은 항체를 생성하기 위해 개질되었지만, 그 내인성 유전자위가 불활성화된 형질전환(transgenic) 동물, 예를 들면 면역화

된 제노마우스(예를 들면, 참고: XENOMOUSE™ 기술에 관한 미국 특허 6,075,181 및 6,150,584)에 항원을 투여함으로써 제조될 수 있다. 또한 예를 들어, 하기를 참고한다: Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) (인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체에 관한).

- [0065] 수많은 HVR 묘사가 사용되며, 본원에서 포괄된다. 카바트 상보성-결정 영역(CDR)은 서열 가변성에 기반하며, 가장 일반적으로 사용된다(Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). 초티아는 대신에, 구조적 루프의 위치를 지칭한다(Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). AbM HVR은 카바트 CDR 및 초티아 구조적 루프 간 절충을 나타내며, Oxford Molecular의 AbM 항체-모델링 소프트웨어에 의해 이용된다. "접촉" HVR은 이용 가능한 복합체 결정 구조의 분석에 기반한다. 이들 HVR 각각으로부터의 잔기가 아래에 주지된다.
- [0066] 루프 카바트 AbM 초티아 접촉점
- [0067] L1 L24-L34 L24-L34 L26-L32 L30-L36
- [0068] L2 L50-L56 L50-L56 L50-L52 L46-L55
- [0069] L3 L89-L97 L89-L97 L91-L96 L89-L96
- [0070] H1 H31-H35B H26-H35B H26-H32 H30-H35B (카바트 넘버링)
- [0071] H1 H31-H35 H26-H35 H26-H32 H30-H35 (초티아 넘버링)
- [0072] H2 H50-H65 H50-H58 H53-H55 H47-H58
- [0073] H3 H95-H102 H95-H102 H96-H101 H93-H101
- [0074] HVR은 하기와 같이 "연장된 HVR" 을 포함할 수 있다: 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 또는 89-96 (L3) (VL 내) 및 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3) (VH 내). 초가변 도메인 잔기들은 이들 정의의 각각에 대해 문헌(Kabat *et al.*, *상기*)에 따라 넘버링한다.
- [0075] "프레임워크" 또는 "FR" 잔기들은 본원에 정의된 바와 같이 초가변 영역 잔기들 이외의 다른 가변 도메인 잔기들이다.
- [0076] "네이키드(naked) 항체" (본원에 정의됨)는 이중성 분자, 예컨대 세포독성 모이어티 또는 방사성 표지에 콘주게이트되지 않은 항체이다.
- [0077] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "약"은 본 기술 분야의 숙련자에게 쉽게 공지된 각각의 값에 대한 통상적인 오차 범위를 나타낸다. 본원에서 "약(about)" 값 또는 파라미터에 대한 지칭은 상기 값 또는 파라미터 그 자체에 관한 구현예를 포함한다 (그리고 기술한다). 예를 들면, "약 X"를 지칭하는 기술은 "X"의 지칭을 포함한다.
- [0078] 본 명세서에서 그리고 첨부되는 청구범위에서, 단수 형태는 달리 명확하게 표시되지 않는 한 복수의 대상을 포함한다. 본원에 기재된 발명의 양태 및 구현예는 "구성되는(consisting)" 및/또는 "~로 본질적으로 구성되는"의 양태 및 구현예를 포함하는 것으로 이해된다.
- [0079] 본 발명을 상세히 기재하기 전에, 본 발명은 특정한 조성물 또는 생물학적 시스템에 제한되지 않으며, 그것은 물론 가변적일 수 있음이 이해되어야 한다. 본원에 사용된 용어는 단지 특정한 구현예를 기재하기 위한 것이며 제한하는 것으로 의도되지 않음이 또한 이해되어야 한다.
- [0080] **III. 방법**
- [0081] 일부 구현예에서, 대상체에서 암을 치료하거나 이의 진행을 지연시키는 방법 제공되고, 이는 상기 대상체에 유효량의 항-PD-L1 항체를 투여하는 단계를 포함하고, 치료 (또는 이의 진행의 지연)는 상기 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 상기 대상체를 기반으로 한다.
- [0082] 일부 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 암을 치료하거나 이의 진행을 지연시키는 방법이 제공되고, 단, 상기 대상체는 상기 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 것으로 발견되었고, 상기 방법은 상기 대상체에 유효량의 항-PD-L1 항체를 투여하는 것을 포함한다.
- [0083] 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 암을 치료하거나 이의 진행을 지연시키는 방법이 제공된다: (a) 암을 갖는

대상체를 선택하는 단계로서, 상기 대상체는 상기 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는, 상기 선택 단계; 및 (b) 이에 따라 선택된 (예를 들어, 단계 (a)에서 선택된) 상기 대상체에 유효량의 항-PD-L1 항체를 투여하는 단계.

[0084] 일부 구현예에서, 암을 갖는 대상체가 항-PD-L1 항체로 치료에 반응할 공산이 있는지 예측하는 방법이 제공되고, 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플 내 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 메틸화 수준을 측정하는 단계를 포함하고, 상기 샘플 내 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화는 상기 대상체가 상기 치료에 반응성일 공산이 있다는 것을 표시한다.

[0085] 일부 구현예에서, 하기를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공된다: (a) 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 메틸화를 평가하는 단계; 및 (b) PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의 또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 것으로 예측된 상기 대상체에 유효량의 항-PD-L1 항체를 투여하는 단계.

[0086] 일부 구현예에서, 하기를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공된다: (a) 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 메틸화를 평가하는 단계; 및 (b) 단계 (a)에서 측정 시, PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의 또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 상기 대상체에 유효량의 항-PD-L1 항체를 투여하는 단계.

[0087] 일부 구현예에서, 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1 그리고/또는 PD-L1의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 만일 상기 대상체가 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 가질 경우, 상기 대상체에 유효량의 항-PD-L1 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공된다.

[0088] 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 항-PD-L1 항체 치료에 반응할 공산이 있는 암을 갖는 대상체를 식별하는 방법이 제공된다: (a) 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 메틸화 수준을 평가 또는 측정하는 단계; 및 (b) 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의 또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 대상체를 식별하는 단계. 일부 구현예에서, 상기 방법은 대상체에 유효량의 항-PD-L1 항체를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0089] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 메틸화 수준을 평가하는 단계를 포함한다.

[0090] PD-L1 프로모터 영역에서의 CpG1 (또한 본 명세서에서 Mut 2로 지칭됨)의 게놈 좌표는 hg19 chr9:5449887-5449891이다. PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위 (또한 CpG5 또는 Mut 7로 지칭됨)에 대한 게놈 좌표는 hg19 chr9:5450934-5451072이다. 이들 좌표의 서열은 공공 온라인 게놈 데이터베이스, 예컨대 UCSC 게놈 브라우저 (genome.ucsc.edu/)에서 수득될 수 있다.

[0091] CpG1의 핵산 서열은 하기이다: GCTCG (서열 번호: 22)

[0092] CpG5의 핵산 서열은 하기이다:

[0093] CACGGGTCCAAGTCCACCGCCAGCT GCTTGCTAGTAACATGACTTGTGTAAGTTATCCCAGCTGCAGCATCTAAGTAAGTCTCTTCTGCGCTAAGCAGGTCAGGATCCCTGAACGGAATTTATTTGCTCTGTCCATT (서열 번호: 23)

[0094] hg19 chr9:5449887-5451072의 서열은 하기 제공된다 (CpG1 및 CpG5는 밑줄로 표시됨):

[0095] GCTCGGGATGGGAAGTTCTTTAATGACAAAGCAATGAAGTTTCATTAT GTCGAGGAACCTTGAGGAAGTCACAGAATCCACGATTTAAAAATATATTT
CCTATTATACACCCATACACACACACACCTACTTTCTAGAATAAAA ACCAAAGCCATATGGGTCTGCTGCTGACTTTTATATGTTGTAGAGTTAT
ATCAAGTTATGTCAAGATGTTCAAGTCACCTTGAAGAGGCTTTTATCAGAA AGGGGACGCTTTCTGATAAAGGTTAAGGGTAACCTTAAGCTCTTACC
CCTCTGAAGGTAAAAATCAAGGTGCGTTCAGATGTTGGCTTGTGTAAATT TCTTTTTTTATTAATAACATACTAAATGTGGATTTGCTTTAATCTTCGAA
ACTCTCCCGGTGAAAATCTCATTTACAAGAAAAGTGGACTGACATGTTT CACCTTCTGTTTCATTCTATACACAGCTTTATTCCTAGGACACCAACAC

TAGATACCTAAACTGAAAGCTTCGCCGATTTCACCGAAGGTCAGGAAAG TCCAACGCCCGCAAACCTGGATTGCTGCCTTGGGCAGAGGTGGGCGGGA
 CCCCCTCCGGGCTGGCGCAACGCTGAGCAGCTGGCGCGTCCCGCGCG GCGCCAGTTCTGCGCAGCTTCCCGAGGCTCCGCACCAGCCGCGCTTCTGT
 CCGCTGCAGGTAGGGAGCGTTGTTCTCCGCGGTGCCACGCGCCAGT ATCTCTGGCTAGCTCGCTGGGCACTTTAGGACGGAGGGTCTCTACACCT
 TTCTTTGGGTGGAGAGAGGAGAAGGAAAGGGAACGCGATGGTCTAGGG GGCAGTAGAGCCAATTACCTGTTGGGGTTAATAAGAACAGGCAATGCATC
 TGGCCTTCCTCCAGGCGCGATTCACTTTTGTCTAAAAATAATTTATACC TCTAAAAATAAATAGATAGGTAGTATAGGTAGGTAGTCAATTCTTATGC
 GACTGTGTGTTTCAATATAGCTCTGATGCTAGGCTGGAGGTCTGGACAC GGGTCCAAGTCCACCGCCAGCTGCTTGCTAGTAACATGACTTGTGTAAGT
TATCCAGCTGCAGCATCTAAGTAAGTCTCTTCCTGCGCTAAGCAGGTCC AGGATCCCTGAACGGAATTTATTTGCTCTGTCCATT (서열 번호:
 30)

[0096] **메틸화 수준을 결정하는 방법**

[0097] PD-L1의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 메틸화 정도가 다양한 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 특정 구현예에서, PD-L1의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 메틸화 정도가 중아황산염 DNA 서열분석에 의해 측정된다. 중아황산염으로의 DNA의 처리는 시토신 ("C") 잔기를 우라실 ("U")로 전환하지만, 5-메틸시토신 잔기는 영향을 받지 않았다. 따라서, 중아황산염 처리는 개별적인 시토신 잔기의 메틸화 상태에 의존하는 DNA 서열에 특이적인 변화를 유도하여, DNA 절편의 메틸화 상태에 대한 단일-뉴클레오타이드 해상도 정보를 산출한다. 다양한 분석이 이 정보를 검색하기 위해 변경된 서열에 대해 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 관심 중아황산염-변형 서열 (예컨대 PD-L1의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의)는 이후, 모든 우라실 및 티민 잔기가 티민으로서 증폭되고, 그리고 5-메틸시토신 잔기만이 시토신으로서 증폭되는, 각 가닥 유래의 것을 갖는, 단편 쌍을 산출하는 2개 세트의 가닥-특이적 프라이머에 의한 PCR로 증폭된다. PCR 생성물이 직접적으로 서열분석될 수 있거나 또는 단일 DNA 분자의 메틸화 지도를 제공하기 위해 클로닝 및 서열분석될 수 있다 (예를 들면, 참고: Frommer, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 1827-1831, 1992).

[0098] 일부 구현예에서 중아황산염 서열분석에 의하여 측정 시 메틸화의 낮은 수준은 CpG에서 약 20% 미만 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 약 1% 미만 중 약 임의의 하나의 메틸화)이다. 일부 구현예에서, 중아황산염 서열분석에 의하여 측정 시 메틸화의 낮은 수준은 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의 약 20% 미만의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 약 1% 미만 중 약 임의의 하나의 메틸화)이다. 일부 구현예에서, 중아황산염 서열분석에 의하여 측정 시 낮은 수준의 메틸화는 CpG에서의 약 20% 미만의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 약 1% 미만 중 약 임의의 하나의 메틸화) 및 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의 약 20% 미만의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 약 1% 미만 중 약 임의의 하나의 메틸화)이다.

[0099] 일부 구현예에서, 중아황산염 서열분석에 의하여 측정 시 메틸화의 중간 수준은 CpG에서 약 20% 내지 약 40%의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 또는 40% 중 약 임의의 하나)이다. 일부 구현예에서, 중아황산염 서열분석에 의하여 측정 시 메틸화의 중간 수준은 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의 약 20% 내지 약 40%의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 또는 40% 중 약 임의의 하나의 메틸화)이다. 일부 구현예에서, 중아황산염 서열분석에 의하여 측정 시 중간 수준의 메틸화는 CpG에서의 약 20% 내지 약 40%의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 또는 40% 중 약 임의의 하나의 메틸화) 및 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의 약 20% 내지 약 40%의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 또는 40% 중 약 임의의 하나의 메틸화)이다.

[0100] 일부 구현예에서, 중아황산염 서열분석에 의하여 측정 시 메틸화의 높은 수준은 CpG에서 약 40% 초과 내지 약 100% 사이의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100% 메틸화 중 약 임의의 하나)이다. 일부 구현예에서, 중아황산염 서열분석에 의하여 측정 시 메틸화의 높은 수준은 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서 약 40% 초

과 내지 약 100% 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100% 중 약 임의의 하나의 메틸화)이다 일부 구현예에서, 중아황산염 서열분석에 의하여 계측 시 메틸화의 높은 수준은 CpG 부위에서 약 40% 초과 내지 약 100% 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100% 중 약 임의의 하나의 메틸화) 및 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서 약 40% 초과 내지 약 100% 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100% 중 약 임의의 하나의 메틸화)이다.

[0101] 특정 구현예에서, PD-L1의 인트론 1 내 하나 이상 CpG 부위에서의, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 메틸화의 정도는, 중아황산염 차세대 서열분석 (BS-NGS)에 의하여 계측되며, 여기서 중아황산염-처리된 DNA는 높은-처리율 차세대 서열분석 시스템, 예컨대 ILLUMINA® HI SEQ™ 서열분석 시스템을 사용하여 분석된다. 중아황산염 차세대 서열분석에 관한 추가의 세부사항에 대하여, 하기를 참고한다: 예를 들어, Farlik *et al.* (2015) *Cell Reports* doi:10.1016/j.celrep.2015.02.001; Tiedemann *et al.* (2014) *Cell Reports*. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.013; Fernandez *et al.* (2015) *Genome Research*. doi:10.1101/gr.169011.113; Lim *et al.* (2014) *PLOS Genetics*. doi:10.1371/journal.pgen.1004792.

[0102] 일부 구현예에서, 중아황산염 차세대 서열분석에 의하여 계측 시 메틸화의 낮은 수준은 CpG에서의 약 5% 미만의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 약 1%, 또는 약 1% 미만의 메틸화)이다. 일부 구현예에서, 중아황산염 차세대 서열분석에 의하여 계측 시 메틸화의 낮은 수준은 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의 약 5% 미만의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 약 1%, 또는 약 1% 미만의 메틸화)이다. 일부 구현예에서, 중아황산염 차세대 서열분석에 의하여 계측 시 낮은 수준의 메틸화는 CpG에서의 약 5% 미만의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 약 1%, 또는 약 1% 미만의 메틸화) 및 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의 약 5% 미만의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 약 1%, 또는 약 1% 미만의 메틸화)이다.

[0103] 일부 구현예에서, 중아황산염 차세대 서열분석에 의하여 계측 시 메틸화의 중간 수준은 CpG에서 약 5% 내지 약 60%의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 또는 약 60% 미만의 메틸화 중 약 임의의 하나)이다. 일부 구현예에서, 중아황산염 차세대 서열분석에 의하여 계측 시 메틸화의 중간 수준은 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의 약 5% 내지 약 60%의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 또는 약 60% 미만의 메틸화 중 약 임의의 하나)이다. 일부 구현예에서, 중아황산염 차세대 서열분석에 의하여 계측 시 중간 수준의 메틸화는 CpG에서의 약 5% 내지 약 60%의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 또는 약 60% 미만의 메틸화) 및 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의 약 5% 내지 약 60%의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 또는 약 60% 미만의 메틸화 중 약 임의의 하나)이다.

[0104] 일부 구현예에서, 중아황산염 차세대 서열분석에 의하여 계측 시 메틸화의 높은 수준은 CpG에서 약 60% 내지 약 100%의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 약 99% 초과, 또는 약 100% 메틸화 중 약 임의의 하나)이다. 일부 구현예에서, 중아황산염 차세대 서열분석에 의하여 계측 시 메틸화의 높은 수준은 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의 약 60% 내지 약 100%의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 약 99% 초과, 또는 약 100%의 메틸화 중 약 임의의 하나)이다. 일부 구현예에서, 중아황산염 차세대 서열분석에 의하여 계측 시 높은 수준의 메틸화는 CpG에서의 약 60% 내지 약 100%의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 약 60%, 약 60% 초과, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 약 99% 초과, 또는 약 100%의 메틸화) 및 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의 약 60% 내지 약 100%의 메틸화 (예컨대, 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 약 99% 초과, 또는 약 100%의 메틸화 중 약 임의의 하나)이다.

[0105] 특정 구현예에서, PD-L1의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 메틸화 정도가 메틸화 칩 배열, 예컨대 ILLUMINA®로부터의 INFINIUM® 인간메틸화 450(HumanMethylation450) 비드칩(BeadChip) 배열을 사용하여 계측된다. 간단히, 중아황산염으로의 처리에 따라, 게놈 DNA는 전체의-게놈 증폭 (WGA)되고, 효소로 단편화되고, 정제되고 그리고 99%의 RefSeq 유전자를 망

라하는 485,512 프로브를 함유하는 인간메틸화450 비드칩에 첨가된다. 이 프로브는 주위 영역과 miRNA 프로모터 뿐만 아니라 비-CpG 부위에서 3091개 프로브에서 추가로 적용범위로 19,755개 고유 CpG 아일랜드로부터 정보를 얻는다. 하이브리드화 동안, 중아황산염-처리된 WGA-DNA 분자는 개별적인 비드 유형에 연결된 유전자좌-특이적 FNA 올리고머에 어닐링된다. 두 개의 비드 유형은 각각의 CpG 유전자좌, 즉 하나는 메틸화된 것 ("C"), 다른 하나는 메틸화되지 않은 것("T") 것으로 지칭된 것에 상응한다. 대립유전자-특이적 프라이머 어닐링은 그 다음 DNP- 및 바이오틴-표지된 ddNTP를 사용한 단일-염기 확장이 따른다. 동일한 CpG 유전자좌에 대한 양자 비드 유형은 CpG 유전자좌 내에서 조사된 "C"에 선행하는 염기에 의해 계측된, 표지된 뉴클레오타이드의 동일한 유형을 합체할 것이고 그리고 따라서 동일한 색상 채널에서 검출될 것이다. 확장 후, 배열은 형광으로 염색되고, 스캐닝되고, 그리고 비메틸화된 및 메틸화된 비드 유형에 의해 생산된 신호의 강도가 측정된다. 소프트웨어는 각각의 샘플 내 각각의 유전자좌에 대한, "베타 값"으로 기재된 DNA 메틸화 값을 기록하기 위해 사용된다. DNA 메틸화 베타 값은 0 내지 1 사이의 연속 변수이고, 메틸화된 비드 유형의 강도 대 조합된 유전자좌 강도의 비를 나타낸다. INFINIUM® 인간메틸화450 비드칩 배열 및 검정 플랫폼을 기술하는 추가의 세부사항이, 예를 들면, 하기에 기술된다: Morris et al. (2015) *Methods* 72, 3-8; Sandoval et al. (2011) *Epigenetics* 6, 692-702; de Ruijter et al. (2015) *Laboratory Investigation* doi:10.1038/labinvest.2015.53; Lehne et al. (2015) *Genome Biology* 16, 37-49; 및 다른 출처.

[0106] 일부 구현예에서, 메틸화 칩 배열 (예컨대 INFINIUM® 인간메틸화450 비드칩 배열)을 사용하여 계측시 메틸화의 낮은 수준은 CpG1에 대한 약 0 내지 약 0.2 미만 (예컨대 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 및 0.19 중 약 임의의 하나)의 베타 값이다. 일부 구현예에서, 메틸화 칩 배열 (예컨대 INFINIUM® 인간메틸화450 비드칩 배열)을 사용하여 계측시 메틸화의 낮은 수준은 PD-L1 유전자좌의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에 대한 약 0 내지 약 0.2 미만 (예컨대 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 및 0.19 중 약 임의의 하나)의 베타 값이다. 일부 구현예에서, 메틸화 칩 배열 (예컨대 INFINIUM® 인간메틸화450 비드칩 배열)을 사용하여 계측시 메틸화의 낮은 수준은, CpG1에 대한 약 0 내지 약 0.2 미만 (예컨대 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 및 0.19 중 약 임의의 하나)의 베타 값 및 PD-L1 유전자좌의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에 대한 약 0 내지 약 0.2 미만 (예컨대 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 및 0.19 중 약 임의의 하나)의 베타 값이다.

[0107] 일부 구현예에서, 메틸화 칩 배열 (예컨대 INFINIUM® 인간메틸화450 비드칩 배열)을 사용하여 결정된 바와 같은 메틸화의 중간 수준은 CpG1에 대한 약 0.2 내지 약 0.3 사이 (예컨대 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 0.2, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24, 0.25, 0.26, 0.27, 0.28, 또는 0.29 중 약 임의의 하나)의 베타 값이다. 일부 구현예에서, 메틸화 칩 배열 (예컨대 INFINIUM® 인간메틸화450 비드칩 배열)을 사용하여 결정된 바와 같은 메틸화의 중간 수준은 PD-L1 유전자좌의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에 대한 약 0.2 내지 약 0.3 사이 (예컨대 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 0.2, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24, 0.25, 0.26, 0.27, 0.28, 또는 0.29 중 약 임의의 하나)의 베타 값이다. 일부 구현예에서, 메틸화 칩 배열 (예컨대 INFINIUM® 인간메틸화450 비드칩 배열)을 사용하여 계측시 메틸화의 중간 수준은, CpG1에 대한 약 0.2 내지 약 0.3 (예컨대 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 0.2, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24, 0.25, 0.26, 0.27, 0.28, 또는 0.29 중 약 임의의 하나)의 베타 값 및 PD-L1 유전자좌의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에 대한 약 0.2 내지 약 0.3 (예컨대 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 0.2, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24, 0.25, 0.26, 0.27, 0.28, 또는 0.29 중 약 임의의 하나)의 베타 값이다.

[0108] 일부 구현예에서, 메틸화 칩 배열 (예컨대 INFINIUM® 인간메틸화450 비드칩 배열)을 사용하여 계측시 메틸화의 높은 수준은 CpG1에 대한 약 0.3 초과 내지 약 1.0 (예컨대 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95, 또는 1.0 초과 중 약 임의의 하나)의 베타 값이다. 일부 구현예에서, 메틸화 칩 배열 (예컨대 INFINIUM® 인간메틸화450 비드칩 배열)을 사용하여 계측시 메틸화의 높은 수준은 PD-L1 유전자좌의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에 대한 약 0.3 초과 내지 약 1.0 (예컨대 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95, 또는 1.0 초과 중 약 임의의 하나)의 베타 값이다. 일부 구현예에서, 메틸화 칩 배열 (예컨대 INFINIUM® 인간메틸화450 비드칩 배열)을 사용하여 계측시 메틸화의 높은 수준은, CpG1에 대한 약 0.3 초과 내지 약 1.0 (예컨대 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5,

0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95, 또는 1.0 초과 중 약 임의의 하나)의 베타 값 및 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에 대한 약 0.3 초과 내지 약 1.0 (예컨대 이들 값 사이의 임의의 범위를 포함하는, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95, 또는 1.0 초과 중 약 임의의 하나)의 베타 값이다.

[0109] 일부 구현예에서, 대상체 유래의 샘플은 핵산 (예컨대 폴리뉴클레오티드, 예를 들면, 게놈 DNA 및/또는 전사체) 및/또는 폴리펩티드가 단리될 수 있는 대상체 유래의 암 세포 및/또는 종양 세포를 함유하는 생물학적 조직 또는 유체의 생물학적 샘플 (예컨대 생체의 생물학적 샘플)일 수 있다. 일부 구현예에서, 샘플은 동결 부위의 조직, 예컨대 조직학적 목적을 위해 취해진 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, 샘플은 생검으로부터 취해진 샘플이다. 일부 구현예에서, 샘플은 부검으로부터 취해진 샘플이다. 일부 구현예에서, 샘플은 동결 조직 샘플이다. 일부 구현예에서, 샘플은 개체로부터 취해진 새로운 샘플이다. 일부 구현예에서, 샘플은 보존된 조직 샘플이다. 일부 구현예에서, 샘플은 포르말린-고정 파라핀-포매 (FFPE) 샘플이다. 일부 구현예에서, 샘플은 대상체의 조직으로부터 유래된 외식편 또는 1차 및/또는 전환된 세포 배양물이다.

[0110] 본원에 기술된 상기 방법들의 일부 구현예에서, 상기 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플은 면역 세포 침윤의 증거를 나타낸다. 특정 구현예에서, 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플 내 $CD16^+$, $CD4^+$, $CD3^+$, $CD56^+$, $CD45^+$, $CD68^+$, $CD20^+$, $CD163^+$, 또는 $CD8^+$ 림프구 중 임의의 하나 이상의 존재는 면역 세포 침윤을 표지한다. 특정 구현예에서, 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플 내 $CD8^+$ 림프구의 존재는 면역 세포 침윤을 표지한다. 특정 구현예에서, 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플 내 $CD16^+$, $CD4^+$, $CD3^+$, $CD56^+$, $CD45^+$, $CD68^+$, $CD20^+$, $CD163^+$, 또는 $CD8^+$ 림프구 중 하나 이상의 존재는 본 분야의 숙련가에 의하여 널리 사용되고 공지된 면역조직화학 (IHC) 검정 웰을 사용하여 검출된다. 이러한 방법은, 비제한적으로, 예를 들면, 웨스턴 블랏, ELISA, 및 유동 세포측정을 포함한다. 특정 구현예에서, 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플 내 $CD16^+$, $CD4^+$, $CD3^+$, $CD56^+$, $CD45^+$, $CD68^+$, $CD20^+$, $CD163^+$, 또는 $CD8^+$ 림프구 중 하나 이상의 존재는 비제한적으로 정량적 PCR (qPCR), qRT-PCR, 전사체 프로파일링 (예컨대 RNAseq), 마이크로배열 분석, 차세대 서열분석, 등을 포함하는 유전자 발현 분석 기술을 사용하여 검출된다. 상기 서비스는 예컨대 FLUIDIGM®, NANOSTRING TECHNOLOGIES®, 등에 의하여 제공된다.

[0111] 특정 구현예에서, 상기 대상체는, 만일 상기 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플이 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 내 CpG1 에서의 메틸화의 중간 수준을 가지고, 면역 세포 침윤의 증거가 없을 경우, 항-PD-L1 항체로 치료되지 않는다. 특정 구현예에서, 상기 대상체는, 만일 상기 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플이 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 내 CpG1 에서의 메틸화의 중간 수준을 가지고, 면역 세포 침윤의 증거가 있을 경우, 항-PD-L1 항체로 치료된다.

[0112] **암**

[0113] 본 명세서에서 기재된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 상기 암은 암종, 림프종, 아세포종, 육종, 백혈병 또는 림프양 악성종양이다. 본 명세서에서 기재된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 상기 암은 암종, 림프종, 아세포종, 육종, 백혈병 또는 림프양 악성종양이다. 일부 구현예에서, 암은 하기이다: 암종, 림프종, 아세포종, 육종, 백혈병 또는 림프성 악성종양, 편평상피 세포 암 (예컨대, 상피 편평상피 세포 암), 복막의 암, 간세포 암, 위 또는 위암 (예컨대 위장관 암 및 위장관 기질 암), 췌장암, 교아세포종, 자궁경부 암, 난소암, 간암, 방광암, 요로암, 간세포암, 결장암, 직장 암, 결장직장 암 (CRC), 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장 또는 신장 암, 전립선암, 외음부 암, 갑상선 암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 다발성 골수종 및 B-세포 림프종 (예컨대 낮은 등급/여포성 비-호지킨 림프종 (NHL), 소 림프성 (SL) NHL, 중간 등급/여포성 NHL, 중간 등급 미만성 NHL, 높은 등급 면역아세포성 NHL, 높은 등급 림프구성 NHL, 높은 등급 소 비-절단 세포 NHL, 대부피성 질환 NHL, 외투 세포 림프종, AIDS-관련 림프종, 및 발덴스트롬 거대글로불린혈증), 만성 림프성 백혈병 (CLL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 모양 세포 백혈병, 만성 골수아구성 백혈병, 및 이식 후 림프증식성 장애 (PTLD), 뿐만 아니라 모반증, 부종과 연관된 (예컨대 뇌종양과 연관된) 비정상 혈관 증식, 메기스 증후군, 뇌, 뿐만 아니라 두경부 암, 연질-조직 육종, 카포시 육종, 카시노이드 암종, 및 중피종, 교아세포종, 신경아세포종, 및 연관된 전이.

[0114] 특정 구현예에서, 본 발명의 방법에 의한 치료를 잘 받아들이는 암은 이들 암의 전이성 형태를 포함하여

유방암, 폐암, 및 피부암을 포함한다. 특정 구현예에서, 유방암은 유방 암종이다. 일부 구현예에서, 폐암은 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종, 또는 폐의 편평상피 세포 암종이다. 특정 구현예에서, 피부암은 흑색종, 표재 확장성 흑색종, 악성 흑자 흑색종, 선단 흑자성 흑색종, 결절성 흑색종, 피부 암종 또는 방광암이다.

[0115] **항-PD-L1 항체**

[0116] PD-L1 ("프로그래밍된 사망-리간드 1", PDCD1L1, PDCD1LG1, B7-H1, B7-H, 및 CD274로도 공지됨)은 활성화된 T 세포, B 세포, 및 골수 세포 상에서 발견된 수용체인 PD-1에 결합하는 40kDa 1형 막관통 단백질이다. PD-1과 PD-L1의 결합은 IL-2 생산 및 T 세포 증식의 TCR-매개된 활성화를 억제하는 신호를 전달한다. PD-L1/PD-1 경로는 종양이 면역계에 의한 제거를 피하는 주요 기전으로 관련되어있다 (Lipson EJ, et al. Cancer Immunol Res 2013;1(1):54-63). 이론에 의한 구속됨 없이, 항-PD-L1 항체에 의한 PD-L1의 억제는 T 세포의 활성화를 허용할 수 있고 따라서 암세포 및 종양 세포를 효과적으로 검출하고 공격하는 그것의 능력을 회복시킨다.

[0117] 본원에 제공된 방법 중 임의의 것의 특정 구현예에서, 항-PD-L1 항체 (또는 이의 항원 결합 단편)은 이의 결합 상대로의 PD-L1 결합을 억제한다. 특정 양태에서, PD-L1 결합 상대는 PD-1 및/또는 B7-1이다. 특정 구현예에서, 항-PD-L1 항체 (또는 이의 항원 결합 단편)은 하기로 구성된 군으로부터 선택된다: YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105, MEDI4736, 및 MSB0010718C. MDX-1105 (또한 BMS-936559로 공지됨)은 WO2007/005874 에 기술된 항-PD-L1 항체이다. 항체 YW243.55.S70 (서열 번호 20 및 21, 각각에서 보여진 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열)은 WO 2010/077634 A1에 기재된 항-PD-L1 항체이다. MEDI4736은 하기에 기술된 항-PD-L1 항체이다: WO2011/066389 및 US2013/034559.

[0118] 본원에 제공된 방법에 유용한 항-PD-L1 항체 (또는 이의 항원 결합 단편) 및 이를 제조하기 위한 방법의 예시는 하기에 기술된다: PCT 특허 출원 WO 2010/077634 A1 및 US 8,217,149 (이의 각각의 전체내용이 본 출원에 참조로서 편입됨).

[0119] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체 (또는 이의 항원 결합 단편)는 PD-L1 및 PD-1 사이의 및/또는 PD-L1 및 B7-1 사이의 결합을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 단클론성 항체이다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 Fab, Fab' -SH, Fv, scFv, 및 (Fab')₂ 단편으로 구성된 군으로부터 선택된 항체 단편이다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 인간화 항체이다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 인간 항체이다.

[0120] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 하기를 포함한다: 서열 번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 21의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0121] 일 구현예에서, 상기 항-PD-L1 항체는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 폴리펩티드를 함유하고, 여기서:

[0122] (a) HVR-H1 서열은 하기이다: GFTFSX₁SWIH (서열 번호: 1);

[0123] (b) HVR-H2 서열은 하기이다: AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (서열 번호: 2);

[0124] (c) HVR-H3 서열은 하기이다: RHWPGGFDY (서열 번호: 3);

[0125] 추가로, 상기 식 중에서, X₁ 는 D 또는 G이며; X₂ 는 S 또는 L이며; X₃ 는 T 또는 S이다.

[0126] 일 특정 양태에서, X₁ 는 D이며; X₂ 는 S이며, 그리고 X₃ 는 T이다. 또 다른 측면에서, 상기 폴리펩티드는 다음 구조식에 따른 HVR들 사이에 병치된 가변 영역 중쇄 프레임워크 서열을 더 포함한다: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4). 또 다른 측면에서, 상기 프레임워크 서열은 인간 공통 프레임워크 서열로부터 유도된다. 추가 측면에서, 상기 프레임워크 서열은 VH 하위그룹 III 공통 프레임워크이다. 또 다른 추가의 양태에서, 상기 프레임워크 서열 중 적어도 하나는 하기와 같다:

[0127] HC-FR1 은 하기임: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 번호: 4)

[0128] HC-FR2 은 하기임: WVRQAPGKLEWV (서열 번호: 5)

[0129] HC-FR3 은 하기임: RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 6)

[0130] HC-FR4 는 하기임: WGQGTLVTVSA (서열 번호: 7).

[0131] 또 다른 추가의 양태에서, 중쇄 폴리펩티드는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3를 포함하는 가변 영역 경쇄와 추가로

조합되고, 여기서:

[0132] (a) HVR-L1 서열은 하기이다: RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (서열 번호: 8);

[0133] (b) HVR-L2 서열은 하기이다: SASX₉LX₁₀S, (서열 번호: 9);

[0134] (c) HVR-L3 서열은 하기이다: QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (서열 번호: 10);

[0135] 추가로, 상기 식 중에서, X₄는 D 또는 V이며; X₅는 V 또는 I이며; X₆은 S 또는 N이며; X₇은 A 또는 F이며; X₈은 V 또는 L이며; X₉는 F 또는 T이며; X₁₀은 Y 또는 A이며; X₁₁은 Y, G, F, 또는 S이며; X₁₂는 L, Y, F 또는 W이며; X₁₃은 Y, N, A, T, G, F 또는 I이며; X₁₄는 H, V, P, T 또는 I이며; X₁₅는 A, W, R, P 또는 T이다.

[0136] 또 다른 추가의 양태에서, X₄는 D이며; X₅는 V이며; X₆은 S이며; X₇은 A이며; X₈은 V이며; X₉는 F이며; X₁₀은 Y이며; X₁₁은 Y이며; X₁₂는 L이며; X₁₃은 Y이며; X₁₄는 H이며; X₁₅는 A이다. 또 다른 추가 양태에서, 경쇄는 하기 화학식에 따라 HVR들 사이에 병치된 가변 영역 중쇄 프레임워크 서열을 포함한다: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). 또 다른 추가의 양태에서, 상기 프레임워크 서열은 인간 공통 프레임워크 서열로부터 유도된다. 또 다른 추가의 양태에서, 상기 프레임워크 서열은 VL 카파 I 공통 프레임워크이다. 또 다른 추가의 양태에서, 상기 프레임워크 서열 중 적어도 하나는 하기와 같다:

[0137] LC-FR1은 하기임: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열 번호: 11)

[0138] LC-FR2은 하기임: WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 12)

[0139] LC-FR3은 하기임: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (서열 번호: 13)

[0140] LC-FR4은 하기임: FGQGTKVEIKR (서열 번호: 14).

[0141] 또 다른 구현예에서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 단리된 항-PD-L1 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서:

[0142] 상기 중쇄는 그리고 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3를 포함하고, 여기서 더욱이:

[0143] (i) HVR-H1 서열은 하기이다: GFTFSX₁SWIH (서열 번호: 1);

[0144] (ii) HVR-H2 서열은 하기이다: AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (서열 번호: 2);

[0145] (iii) HVR-H3 서열은 하기이다: RHWPGGFDY (서열 번호: 3); 그리고

[0146] 상기 경쇄는 그리고 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3를 포함하고, 여기서 더욱이:

[0147] (i) HVR-L1 서열은 하기이다: RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (서열 번호: 8);

[0148] (ii) HVR-L2 서열은 하기이다: SASX₉LX₁₀S, (서열 번호: 9); 그리고

[0149] (iii) HVR-L3 서열은 하기이다: QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (서열 번호: 10);

[0150] 추가로, 상기 식 중에서, X₁은 D 또는 G이며; X₂는 S 또는 L이며; X₃은 T 또는 S이며; X₄는 D 또는 V이며; X₅는 V 또는 I이며; X₆은 S 또는 N이며; X₇은 A 또는 F이며; X₈은 V 또는 L이며; X₉는 F 또는 T이며; X₁₀은 Y 또는 A이며; X₁₁은 Y, G, F, 또는 S이며; X₁₂는 L, Y, F 또는 W이며; X₁₃은 Y, N, A, T, G, F 또는 I이며; X₁₄는 H, V, P, T 또는 I이며; X₁₅는 A, W, R, P 또는 T이다.

[0151] 특정 양태에서, X₁은 D이며; X₂는 S이고 X₃은 T이다. 또 다른 양태에서, X₄는 D이며; X₅는 V이며; X₆은 S이며; X₇은 A이며; X₈은 V이며; X₉는 F이며; X₁₀은 Y이며; X₁₁은 Y이며; X₁₂는 L이며; X₁₃은 Y이며; X₁₄는 H이며; X₁₅는 A이다. 또 다른 양태에서, X₁은 D이며; X₂는 S이고 X₃은 T이며, X₄는 D이며; X₅는 V이며; X₆은 S이며; X₇은 A이며; X₈은 V이며; X₉는 F이며; X₁₀은 Y이며; X₁₁은 Y이며; X₁₂는 L이며; X₁₃은 Y이며; X₁₄는 H이고 X₁₅는 A이다.

- [0152] 추가 양태에서, 중쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR들 사이에 병치된 하나 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), 그리고 경쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR들 사이에 병치된 하나 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). 또 다른 추가의 양태에서, 상기 프레임워크 서열은 인간 공통 프레임워크 서열로부터 유도된다. 또 다른 추가의 양태에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카바트 하위그룹 I, II, 또는 III 서열로부터 유도된다. 또 다른 추가의 양태에서, 중쇄 프레임워크 서열은 VH 하위그룹 III 공통 프레임워크이다. 또 다른 추가 양태에서, 하나 이상의 중쇄 프레임워크 서열은 하기이다:
- [0153] HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 번호: 4)
- [0154] HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (서열 번호: 5)
- [0155] HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 6)
- [0156] HC-FR4 WGQGTLVTVSA (서열 번호: 7).
- [0157] 또 다른 추가 양태에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카바트 카파 I, II, III, 또는 IV 하위그룹 서열로부터 유도된다. 또 다른 추가 양태에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카파 I 공통 프레임워크이다. 또 다른 추가 양태에서, 하나 이상의 경쇄 프레임워크 서열은 하기이다:
- [0158] LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열 번호: 11)
- [0159] LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 12)
- [0160] LC-FR3 GVPSSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYC (서열 번호: 13)
- [0161] LC-FR4 FGQGTKVEIKR (서열 번호: 14).
- [0162] 추가의 특정 양태에서, 항체는 인간 또는 무린 불변 영역을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 양태에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 추가의 특정 양태에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 또 다른 추가 양태에서, 무린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3로 이루어진 군 으로부터 선택된다. 또 다른 추가 양태에서, 무린 불변 영역은 IgG2A이다. 또 다른 추가의 특정 양태에서, 항체는 감소되거나 최소의 효과기 작용을 갖는다. 또 다른 추가의 특정 양태에서, 최소의 효과기 작용은 "효과기-미만(effector-less) Fc 변형" 또는 탈글리코실화로부터 유발된다. 또 다른 추가 구현예에서, 효과기-없는 Fc 돌연변이는 불변 영역에서 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.
- [0163] 추가의 또 다른 구현예에서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-PD-L1 항체가 제공되고, 여기서:
- [0164] 중쇄는 GFTFSDSWIH (서열 번호: 15), AWISPYGGSTYYADSVKG (서열 번호: 16) 및 RHWPGGFDY (서열 번호: 3), 각각에 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 서열을 추가로 포함하고/하거나,
- [0165] 경쇄는 RASQDVSTAVA (서열 번호: 17), SASFLYS (서열 번호: 18) 및 QQYLYHPAT (서열 번호: 19), 각각에 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 서열을 추가로 포함한다.
- [0166] 특정 양태에서, 서열 동일성은 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다. 또 다른 양태에서, 중쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR들 사이에 병치된 하나 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), 그리고 경쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR들 사이에 병치된 하나 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). 또 다른 측면에서, 상기 프레임워크 서열은 인간 공통 프레임워크 서열로부터 유도된다. 또 다른 추가의 양태에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카바트 하위그룹 I, II, 또는 III 서열로부터 유도된다. 또 다른 추가의 양태에서, 중쇄 프레임워크 서열은 VH 하위그룹 III 공통 프레임워크이다. 또 다른 추가 양태에서, 하나 이상의 중쇄 프레임워크 서열은 하기이다:
- [0167] HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 번호: 4)
- [0168] HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (서열 번호: 5)
- [0169] HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 6)
- [0170] HC-FR4 WGQGTLVTVSA (서열 번호: 7).
- [0171] 또 다른 추가 양태에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카바트 카파 I, II, III, 또는 IV 하위그룹 서열로부터

유도된다. 또 다른 추가 양태에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카파 I 공통 프레임워크이다. 또 다른 추가 양태에서, 하나 이상의 경쇄 프레임워크 서열은 하기이다:

- [0172] LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열 번호: 11)
- [0173] LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 12)
- [0174] LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (서열 번호: 13)
- [0175] LC-FR4 FGQGTKVEIKR (서열 번호: 14).
- [0176] 추가의 특정 양태에서, 항체는 인간 또는 무린 불변 영역을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 양태에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 추가의 특정 양태에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 또 다른 추가 양태에서, 무린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 추가 양태에서, 무린 불변 영역은 IgG2A이다. 또 다른 추가의 특정 양태에서, 항체는 감소되거나 최소의 효과기 작용을 갖는다. 또 다른 추가의 특정 양태에서, 최소의 효과기 작용은 "효과기-미만(effector-less) Fc 변형" 또는 탈글리코실화로부터 유발된다. 또 다른 추가 구현예에서, 효과기-없는 Fc 돌연변이는 불변 영역에서 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.
- [0177] 또한 추가의 구현예에서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 단리된 항-PD-L1 항체가 본원에서 제공되고, 여기서:
- [0178] (a) 중쇄 서열은 하기 중쇄에 적어도 85% 서열 동일성을 갖는다:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWIS
PYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGGTLVTVSA (서열 번호: 20), 또는
- [0179] (b) 경쇄 서열은 하기 경쇄에 적어도 85% 서열 동일성을 갖는다:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGT
KVEIKR (서열 번호: 21).
- [0180] 특정 양태에서, 서열 동일성은 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다. 또 다른 양태에서, 중쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR들 사이에 병치된 하나 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), 그리고 경쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR들 사이에 병치된 하나 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). 또 다른 측면에서, 상기 프레임워크 서열은 인간 공통 프레임워크 서열로부터 유도된다. 추가 양태에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카뮈 하위그룹 I, II, 또는 III 서열로부터 유도된다. 또 다른 추가의 양태에서, 중쇄 프레임워크 서열은 VH 하위그룹 III 공통 프레임워크이다. 또 다른 추가 양태에서, 하나 이상의 중쇄 프레임워크 서열은 하기이다:
- [0181] HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 번호: 4)
- [0182] HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (서열 번호: 5)
- [0183] HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 6)
- [0184] HC-FR4 WGQGTLVTVSA (서열 번호: 7).
- [0185] 또 다른 추가 양태에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카뮈 카파 I, II, III, 또는 IV 하위그룹 서열로부터 유도된다. 또 다른 추가 양태에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카파 I 공통 프레임워크이다. 또 다른 추가 양태에서, 하나 이상의 경쇄 프레임워크 서열은 하기이다:
- [0186] LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열 번호: 11)
- [0187] LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 12)
- [0188] LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (서열 번호: 13)
- [0189] LC-FR4 FGQGTKVEIKR (서열 번호: 14).
- [0190] 추가의 특정 양태에서, 항체는 인간 또는 무린 불변 영역을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 양태에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 추가의 특정 양태에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 또 다른 추가 양태에서, 무린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3로 이루어진 군

으로부터 선택된다. 또 다른 추가 양태에서, 무린 불변 영역은 IgG2A이다. 또 다른 추가의 특정 양태에서, 항체는 감소되거나 최소의 효과기 작용을 갖는다. 또 다른 추가의 특정 양태에서, 최소의 효과기 작용은 원핵세포 생산으로부터 유발된다. 또 다른 추가의 특정 양태에서, 최소의 효과기 작용은 "효과기-미만(effector-less) Fc 변형" 또는 탈글리코실화로부터 유발된다. 또 다른 추가 구현예에서, 효과기-없는 Fc 돌연변이는 불변 영역에서 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.

[0191] 또 다른 추가의 구현예에서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 단리된 항-PD-L1 항체가 본원에서 제공되고, 여기서:

[0192] (a) 중쇄 서열은 하기 중쇄에 적어도 85% 서열 동일성을 갖는다: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWP GGFDFYWGQGLTVTVSS (서열 번호: 24), 또는

[0193] (b) 경쇄 서열은 하기 경쇄에 적어도 85% 서열 동일성을 갖는다: DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGT KVEIKR (서열 번호: 21).

[0194] 또한 추가의 구현예에서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 단리된 항-PDL1 항체가 본원에서 제공되고, 여기서:

[0195] (a) 중쇄 서열은 하기 중쇄에 적어도 85% 서열 동일성을 갖는다: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEWVAWI SPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWP GGFDFYWGQGLTVTVSSASTK (서열 번호: 28), 또는

[0196] (b) 경쇄 서열은 하기 경쇄에 적어도 85% 서열 동일성을 갖는다: DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGT KVEIKR (서열 번호: 29).

[0197] 특정 양태에서, 서열 동일성은 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다. 또 다른 양태에서, 중쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR들 사이에 병치된 하나 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), 그리고 경쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR들 사이에 병치된 하나 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). 또 다른 측면에서, 상기 프레임워크 서열은 인간 공통 프레임워크 서열로부터 유도된다. 추가 양태에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카뎀 하위그룹 I, II, 또는 III 서열로부터 유도된다. 또 다른 추가의 양태에서, 중쇄 프레임워크 서열은 VH 하위그룹 III 공통 프레임워크이다. 또 다른 추가 양태에서, 하나 이상의 중쇄 프레임워크 서열은 하기이다:

[0198] HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 번호: 4)

[0199] HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (서열 번호: 5)

[0200] HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 6)

[0201] HC-FR4 WGQGLTVTVSS (서열 번호: 25).

[0202] 또 다른 추가 양태에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카뎀 카파 I, II, III, 또는 IV 하위그룹 서열로부터 유도된다. 또 다른 추가 양태에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카파 I 공통 프레임워크이다. 또 다른 추가 양태에서, 하나 이상의 경쇄 프레임워크 서열은 하기이다:

[0203] LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열 번호: 11)

[0204] LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 12)

[0205] LC-FR3 GVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (서열 번호: 13)

[0206] LC-FR4 FGQGT KVEIKR (서열 번호: 14).

[0207] 추가의 특정 양태에서, 항체는 인간 또는 무린 불변 영역을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 양태에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 추가의 특정 양태에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 또 다른 추가 양태에서, 무린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 추가 양태에서, 무린 불변 영역은 IgG2A이다. 또 다른 추가의 특정 양태에서, 항체

는 감소되거나 최소의 효과기 작용을 갖는다. 또 다른 추가의 특정 양태에서, 최소의 효과기 작용은 원핵세포 생산으로부터 유발된다. 또 다른 추가의 특정 양태에서, 최소의 효과기 작용은 "효과기-미만(effector-less) Fc 변형" 또는 탈글리코실화로부터 유발된다. 또 다른 추가 구현예에서, 효과기-없는 Fc 돌연변이는 불변 영역에서 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.

[0208] 또 다른 추가 구현예에서, 항-PD-1 항체는 하기이다: MPDL3280A (CAS 등록 번호: 1422185-06-5). 또 추가의 구현예에서, 서열 번호: 24 유래의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 번호: 25 유래의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-PD-1 항체가 제공된다. 또한 추가의 구현예에서, 중쇄 및 경쇄 서열을 포함하는 단리된 항-PDL-1 항체가 제공되고, 여기서:

[0209] (a) 중쇄 서열은, 상기 중쇄 서열에 대한 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖고: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWIIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWP GGFDFYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열 번호: 26), 또는

[0210] (b) 경쇄 서열은, 상기 경쇄 서열에 대한 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖고: DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (서열 번호: 27).

[0211] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체의 경쇄 또는 중쇄 가변 영역 서열을 암호화하는 단리된 핵산이 제공되며, 여기서:

[0212] (a) 중쇄는 GFTFSDSWIH (서열 번호: 15), AWISPYGGSTYYADSVKG (서열 번호: 16) 및 RHWPGGFDY (서열 번호: 3), 각각에 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 서열을 추가로 포함하고, 그리고

[0213] (b) 경쇄는 RASQDVSTAVA (서열 번호: 17), SASFLYS (서열 번호: 18) 및 QQYLYHPAT (서열 번호: 19), 각각에 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 서열을 추가로 포함한다.

[0214] 특정 양태에서, 서열 동일성은 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다. 측면에서, 중쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR들 사이에 병치된 하나 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), 그리고 경쇄 가변 영역은 다음과 같이 HVR들 사이에 병치된 하나 이상의 프레임워크 서열을 포함한다: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). 또 다른 측면에서, 상기 프레임워크 서열은 인간 공통 프레임워크 서열로부터 유도된다. 추가 양태에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카뮈 하위그룹 I, II, 또는 III 서열로부터 유도된다. 또 다른 추가의 양태에서, 중쇄 프레임워크 서열은 VH 하위그룹 III 공통 프레임워크이다. 또 다른 추가 양태에서, 하나 이상의 중쇄 프레임워크 서열은 하기이다:

[0215] HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 번호: 4)

[0216] HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (서열 번호: 5)

[0217] HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열 번호: 6)

[0218] HC-FR4 WGQGLTVTVSA (서열 번호: 7).

[0219] 또 다른 추가 양태에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카뮈 카파 I, II, III, 또는 IV 하위그룹 서열로부터 유도된다. 또 다른 추가 양태에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카파 I 공통 프레임워크이다. 또 다른 추가 양태에서, 하나 이상의 경쇄 프레임워크 서열은 하기이다:

[0220] LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열 번호: 11)

[0221] LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (서열 번호: 12)

[0222] LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYC (서열 번호: 13)

- [0223] LC-FR4 FGQGTKVEIKR (서열 번호: 14).
- [0224] 추가의 특정 양태에서, 본원에 기술된 항-PD-L1 항체는 인간 또는 무린 불변 영역을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 양태에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 추가의 특정 양태에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 또 다른 추가 양태에서, 무린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 추가 양태에서, 무린 불변 영역은 IgG2A이다. 또 다른 추가의 특정 양태에서, 항체는 감소되거나 최소의 효과기 작용을 갖는다. 또 다른 추가의 특정 양태에서, 최소의 효과기 작용은 진핵세포 생산으로부터 유발된다. 또 다른 추가의 특정 양태에서, 최소의 효과기 작용은 "효과기-미만(effector-less) Fc 변형" 또는 탈글리코실화로부터 유발된다. 더욱 추가 측면에서, 효과기-없는 Fc 돌연변이는 불변 영역에서 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.
- [0225] 또 다른 추가의 양태에서, 본원에 기술된 항체 중 임의의 것을 암호화하는 핵산이 제공된다. 일부 구현예에서, 핵산은 추가로 하기를 포함한다: 본원에 기술된 항-PD-L1 항체 중 임의의 것을 암호화하는 핵산의 발현에 적절한 벡터. 또 다른 추가 특정 양태에서, 벡터는 핵산의 발현에 적절한 숙주 세포를 추가로 포함한다. 또 다른 추가 특정 양태에서, 숙주 세포는 진핵생물 세포 또는 원핵생물 세포이다. 또 다른 추가 특정 양태에서, 진핵생물 세포는 포유동물 세포, 예컨대 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO)이다.
- [0226] 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 예를 들면, 하기 단계를 포함하는 공정에 의하여 본 분야에 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있다: 상기 항체 또는 단편을 생산하기에 적절한 조건 하에서 발현에 적절한 형태의, 이전에 기술된 항-PD-L1 항체 또는 항원 결합 단편 중 임의의 것을 암호화하는 핵산을 함유하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 항체 또는 단편을 회수하는 단계.
- [0227] **IV. 항체 제조**
- [0228] 본 명세서에서 제공된 방법, 키트, 및 제조 물품은 PD-L1에 결합하는 항체를 사용하거나 또는 합체한다. 이러한 항체를 발생하거나 생산하기 위한 예시적인 기술이 아래에 기재되어 있다.
- [0229] **항원 제조**
- [0230] 기타 분자에 임의로 콘주게이트된, PD-L1 (예컨대 세포외 도메인), 또는 이의 단편의 가용성 형태는, 항-PD-L1 항체의 생성 및/또는 항-PD-L1 항체의 스크리닝을 위한 면역원으로서 사용될 수 있다. 대안적으로, PD-L1을 발현하는 세포가 면역원으로 또는 선별을 위해 사용될 수 있다. 상기 세포는 천연 공급원 (예를 들면 암 세포주) 으로부터 유도될 수 있거나 또는 막투과성 분자를 발현시키기 위해 재조합 기술로 형질전환되는 세포일 수 있다. 항-PD-L1 항체를 제조 및/또는 스크리닝을 위한 유용한 PD-L1의 다른 형태는 당해 기술의 숙련자에게 분명할 것이다.
- [0231] **다클론성 항체**
- [0232] 다클론성 항체는 관련된 항원 및 아주반트의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 바람직하게는 상승된다. 면역화되기 위해 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들면, 키흐 림프 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린, 또는 이중작용성을 갖는 대두 트립신 억제제 또는 유도화제, 예를 들어, 말레이미도벤조일 설포석신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 콘주게이트), N-하이드록시석신이미드 (라이신 잔기를 통한), 글루타르알데하이드, 석신산 무수물, SOCl_2 , 또는 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (여기에서 R 및 R^1 은 상이한 알킬기임)에 관련된 항원을 콘주게이션하는 것이 유용할 수 있다.
- [0233] 동물은, 예를 들면, (토끼 또는 마우스, 각각용) 100 μg 또는 5 μg 의 단백질 또는 콘주게이트를 3 용적의 프로인트 완전 아주반트와 조합 및 다중 부위에서 진피내로 용액 주사에 의해 항원, 면역원성 콘주게이트, 또는 유도체에 대해 면역화된다. 1 개월 후 동물은 다중 부위에서 피하 주사에 의해 프로인트 완전 아주반트에서 펩티드 또는 콘주게이트의 최초 양의 1/5 내지 1/10로 부스팅된다. 7 내지 14 일 후 동물은 채혈되고 혈청은 항체 역가에 대하여 검정된다. 동물은 역가 안정기까지 부스팅된다. 일부 구현예에서, 동물은 동일한 항원의 콘주게이트로 부스팅되지만, 상이한 단백질에, 그리고/또는 상이한 가교결합 시약을 통해 콘주게이트된다. 콘주게이트는 또한 단백질 용합으로서 재조합 세포 배양물에서 제조될 수 있다. 또한, 응집화 제제 예컨대 명반은 면역 반응을 증진시키기 위해 적합하게 사용된다.
- [0234] **단클론성 항체**
- [0235] 단클론성 항체는 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 얻어지며, 즉 집단을 포함하는 개별적인 항체는 단클

론성 항체의 생산 동안 발생하는 가능한 변이체를 제외하고 동일한 에피토프에 동일하거나 및/또는 결합하며, 이러한 변이체는 일반적으로 소량으로 존재한다. 따라서, 수식어 "단클론성"은 구별되거나 다클론성 항체의 혼합물이 아닌 항체의 특징을 나타낸다.

- [0236] 예를 들어, 상기에 기재된 바와 같이, 단클론성 항체는 먼저 문헌 [Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975)]에 의해 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 제작될 수 있거나, 재조합 DNA 방법(미국 특허 번호 4,816,567)에 의해 제작될 수 있다.
- [0237] 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터가 본원에 기술된 바와 같이 면역화되어 면역화를 위해 사용된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 또는 생산할 수 있는 림프구를 유도한다. 대안적으로, 림프구는 *시험관내* 면역화될 수 있다. 림프구는 그런 다음 하이브리도마 세포를 형성하기 위해 적합한 융합 제제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포와 융합된다 (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).
- [0238] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포를 바람직하게는 비융합된, 친계 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에 시딩하고 성장시킨다. 예를 들어, 만약 친계 골수종 세포에 효소 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실전달효소 (HGPRT 또는 HPRT)가 부재하다면, 하이브리도마를 위한 배양 배지는 전형적으로 하기를 포함할 것이다: HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지하는 물질인, 하이포잔틴, 아미노프테린, 및 티미딘 (HAT 배지).
- [0239] 일부 구현예에서, 골수종 세포는 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 안정한 고 수준의 항체 생산을 지지하는 것들이고, 이는 예컨대 HAT 배지와 같은 배지에 민감성이다. 무엇보다도, 일부 구현예에서, 골수종 세포주는, 비제한적으로, 뮤린 골수종 세포주, 예컨대 미국 캘리포니아주 샌디에이고 소재의 솔크 연구소 세포 분배 센터로부터 이용가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양, 및 메릴랜드주 록빌 소재의 미국 종균 협회로부터 이용가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포로부터 유도된 것들을 포함한다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종성골수종 세포주가 또한, 인간 단클론성 항체의 생산에 대해 하기와 같이 기술되었다: Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987).
- [0240] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지는 항원에 대한 단클론성 항체의 생성에 대해 분석된다. 일부 구현예에서, 하이브리도마 세포에 의하여 생산된 단클론성 항체의 결합 특이성은 하기에 의하여 측정된다: 면역 침전 또는 *시험관내* 결합 검정, 예컨대 방사면역검정 (RIA) 또는 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA).
- [0241] 단클론성 항체의 결합 친화도는, 예를 들어 하기에 의하여 측정될 수 있다: 스캐처드(Scatchard) 분석 (Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)).
- [0242] 목적 특이성, 친화도, 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포가 식별된 후, 클론은 회식 절차를 제한함에 의해 서브클로닝되고 그리고 표준 방법에 의해 성장될 수 있다 (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). 이러한 목적을 위해 적합한 배양 배지는, 예를 들면, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포는 동물에서 복수 종양으로 *생체내*에서 성장될 수 있다.
- [0243] 서브클론에 의하여 분비된 단클론성 항체는 기존 면역글로불린 정제 절차, 예컨대 단백질 A-세파로오스(세파로오스), 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 배지 또는 복수 유체 또는 혈청으로부터 적절하게 분리된다.
- [0244] 단클론성 항체를 암호화하는 DNA는 통상적인 방법을 사용하여 용이하게 분리시키고 서열화한다 (예를 들어, 특히 뮤린 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합될 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써). 일부 구현예에서, 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 공급원으로서 사용된다. 일단 단리되면, DNA는 발현 벡터 내에 배치될 수 있으며, 그 다음 발현 벡터는 숙주 세포, 예컨대 *이.콜라이(E. coli)* 세포, 원숭이 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 달리는 면역글로불린 단백질을 생성하지 않는 골수종 세포 내로 형질감염되어, 재조합 숙주 세포에서 단클론성 항체의 합성물을 얻는다. 항체를 암호화하는 DNA의 세균내 재조합 발현에 대한 검토 문헌은 하기를 포함한다: Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) 및 Pluckthün, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

- [0245] **라이브러리-유래 항체**
- [0246] 항체 또는 항체 단편은, 예를 들면 하기에 기재된 기술을 사용하여 생성된 항체 파아지 라이브러리로부터 단리될 수 있다: McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). 문헌 [Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) 및 Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]는 각각 파아지 라이브러리를 사용한, 무린 및 인간 항체의 단리를 기술한다. 후속의 공보는 매우 큰 파아지 라이브러리(하기 문헌)에 대한 전략으로서 섀서 플링(문헌 [Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)])에 의한 고친화도(nM 범위) 인간 항체의 생산뿐만 아니라 조합 감염 및 생체내 재조합을 기술한다: Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). 따라서, 이들 기술은 단클론성 항체의 단리를 위한 전통적인 단클론성 항체 하이브리도마 기술에 대한 실행 가능한 대안이다.
- [0247] DNA는 또한, 예를 들면, 동일성 무린 서열 [하기 문헌] 대신 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인을 위한 암호화 서열을 치환함으로써, 또는 비-면역글로불린 폴리펩티드를 위한 면역글로불린 암호화 서열 모두 또는 암호화 서열의 일부에 공유적으로 연결함으로써 변형될 수 있다: 미국 특허 번호 4,816,567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81:6851 (1984)).
- [0248] 전형적으로 이러한 비-면역글로불린 폴리펩티드는 항체의 불변 도메인에 대해 치환되거나, 또는 이들은 항체의 일 항원-결합 부위의 가변 도메인에 대해 치환되어 항원에 대한 특이성을 갖는 일 항원-결합 부위 및 상이한 항원에 대한 특이성을 갖는 또 다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라성 2가 항체를 만든다.
- [0249] 본 발명의 항체는 목적하는 활성 또는 활성들을 갖는 항체에 대해 조합 라이브러리를 스크리닝함으로써 단리될 수 있다. 예를 들면, 파아지 디스플레이 라이브러리를 생산하고 목적하는 결합 특징 예컨대 실시예 3에 기술된 방법을 갖는 항체에 대해 이러한 라이브러리를 스크리닝하기 위한 각종 방법들이 당업계에 공지되어 있다. 추가의 방법은 예를 들어, 하기에 검토되며: Hoogenboom *et al.* in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O' Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) 추가로 하기에 검토된다: 예를 들어, the McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).
- [0250] 일부 파아지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자 레퍼토리는 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해 별도로 클로닝되고 파아지 라이브러리에서 무작위로 재조합되며, 이후 하기에 기술된 바와 같이 항원-결합 파아지에 대해 스크리닝될 수 있다: Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). 파아지는 전형적으로 단일쇄 Fv (scFv) 단편 또는 Fab 단편으로서 항체 단편을 디스플레이한다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 작제할 필요 없이 면역원에 대한 고친화성 항체를 제공한다. 대안적으로, 단순 레퍼토리는 (예를 들면, 인간으로부터) 클로닝되어 하기에 기재된 바와 같이 임의의 면역화 없이 광범위한 비자가 및 또한 자가 항원에 항체의 단일 공급원을 제공할 수 있다: Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). 최종적으로, 순수 라이브러리는 또한 줄기 세포로부터 비재배열된 V-유전자 분절을 클로닝하고 고도의 가변성 CDR3 영역을 암호화하고 시험관내 재배열을 성취하기 위해 랜덤 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함에 의해 합성적으로 제조될 수 있고, 이는 다음 문헌에 기재된 바와 같다: Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). 인간 항체 파아지 라이브러리를 기재하는 특허 공보는 예를 들어, 다음의 문헌을 포함한다: 미국 특허 번호 5,750,373, 및 미국 특허 공개 번호 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, 및 2009/0002360.
- [0251] 인간 항체 라이브러리에서 단리된 항체 또는 항체 단편은 본원의 인간 항체 또는 인간 항체 단편으로 간주된다.
- [0252] **키메라 및 인간화된 항체**
- [0253] 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 항체는 키메라성 항체이다. 특정 키메라성 항체는, 예를 들면 하기에 기재되어 있다: 미국 특허 번호 4,816,567 및 Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). 일 예에서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역 (예를 들어, 마우스, 랫트, 햄스터, 토끼, 또는 비-인간 영장류, 예를 들어, 원숭이로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 추가의 예에서, 키메라 항체는 부류 또는 서브부류가 친계 항체의 부류로부터 변화된 “부류 스위칭된” 항체이다. 키메라 항체는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

- [0254] 특정 구현예에서, 키메라 항체는 인간화된 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 인간화되어 인간에 대한 면역 원성이 감소되어 있고 친계 비-인간 항체의 특이성 및 친화성을 보유한다. 일반적으로, 인간화 항체는, HVR, 예를 들면, CDR, (또는 그 일부)가 비인간 항체로부터 유도되고, FR (또는 그 일부)가 인간 항체 서열로부터 유도 되는 하나 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화된 항체는 임의로 또한 인간 불변 영역의 적어도 일부를 포함 한다. 일부 양태에서, 인간화된 항체에서 일부 FR 잔기들은 예를 들어, 항체 특이성 또는 친화성을 복구하거나 개선시키기 위해 비-인간 항체 (예를 들어, HVR 잔기가 유래된 항체) 기원의 상응하는 잔기들로 치환된다.
- [0255] 비-인간 항체의 인간화 방법은 당해기술에 기술되어 있다. 일부 구현예에서, 인간화된 항체는 비-인간인 공급원 으로부터 이것대로 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 흔히 도입 가변 도메인으로부터 전형적으로 취해지는 유입 잔기로 지칭된다. 인간화는 Winter와 동료들의 방법 (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988))에 따라서, 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 인간 항체의 대응하는 서열을 치환함으로써, 필 수적으로 수행될 수 있다. 따라서, 그와 같은 인간화된 항체는 키메라성 항체(미국 특허 번호 4,816,567)이며, 여기서 실질적으로 1개 미만의 무순상 인간 가변 도메인은 비-사람 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 치환된 다. 실제로, 인간화된 항체는 전형적으로 인간 항체이며, 여기서 일부 초가변 영역 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기는 설치류 항체에서 비슷한 부위로부터의 잔기로 치환된다.
- [0256] 인간화 항체를 제조하는 데 있어서 사용되는 인간 가변 도메인, 즉 경쇄 및 중쇄 둘 다의 선택은 항원성을 감소 시키기 위해 매우 중요하다. 소위 “베스트-핏” 방법에 따라서, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열은 공지된 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대하여 스크리닝된다. 설치류의 것에 가장 밀접한 인간 서열이 그 런 다음 인간화된 항체에 대한 인간 프레임워크 영역 (FR)으로 허용된다 (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정 하 위 그룹의 모든 인간 항체의 공통 서열로부터 유래한 특정 프레임워크 영역을 사용한다. 동일한 프레임워크가 여러 가지 상이한 인간화 항체에 사용될 수 있다 (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).
- [0257] 항체는 항원에 대한 높은 친화도의 유지 및 다른 유리한 생물학적 특성으로 인간화되는 것이 더 중요하다. 이러 한 목적을 달성하기 위하여, 상기 방법의 일부 구현예에서, 인간화 항체는 친계 서열의 분석 공정 및 부모 및 인간화 서열의 3차원 모델을 사용한 다양한 개념의 인간화 산물에 의해 제조된다. 3차원 면역글로불린 모델이 일반적으로 이용가능하며, 당업자에게 익숙하다. 선택되는 후보 면역글로불린 서열의 공산이 있는 3차원 입체 구조를 설명하고 표시하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 표시의 검사는 후보 면역글로불린 서열의 작용에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔 기의 분석을 가능하게 한다. 이러한 방법으로, FR 잔기는 수용자 및 유입 서열로부터 선택되고 조합되어 원하는 항체 특징, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도가 달성된다. 일반적으로, 초가변 영역 잔기는 항원 결 합에 영향을 미치는 데 직접적이면서 가장 실질적으로 수반된다.
- [0258] 상기 CDR 서열은 인간 가변 가벼운 및 가변 무거운 프레임워크 서열, 예컨대 실질적으로 인간 경쇄 카파 하위그 룽 I (V_LGI)의 인간 공통 FR 잔기 및 실질적으로 인간 중쇄 하위그룹 III (V_HIII)의 인간 공통 FR 잔기 내에 일 반적으로 존재한다. 또한 참고: WO 2004/056312 (Lowman *et al.*).
- [0259] 일부 구현예에서, 가변 무거운 영역은 인간 IgG 쇄 불변 영역에 연결될 수 있고, 여기서 상기 영역은, 예를 들 면, 천연 서열 및 변이체 불변 영역을 포함하는 IgG1 또는 IgG3일 수 있다.
- [0260] 일부 구현예에서, 본원에서 항체는 하기를 추가로 포함할 수 있다: ADCC 활성을 개선하는 Fc 영역 내 적어도 하 나의 아미노산 치환, 예컨대 상기 아미노산 치환이 중쇄 잔기의 EU 넘버링을 사용하여 위치 298, 333, 및 334, 바람직하게는 S298A, E333A, 및 K334A에 존재하는 것. 또한 하기를 참조한다: Presta의 미국 특허 번호 6,737,056B1. 이러한 항체 중 임의의 것은 하기를 포함할 수 있다: FcRn 결합 또는 혈청 반감기를 개선하는 Fc 영역 내 적어도 하나의 치환, 예를 들어 중쇄 위치 434, 예컨대 N434W에서의 치환. 또한 하기를 참조한다: Presta의 미국 특허 번호 6,737,056B1. 이러한 항체 중 임의의 것은 하기를 추가로 포함할 수 있다: CDC 활성을 증가시키는 Fc 영역 내 적어도 하나의 치환 (예를 들어, 위치 326, 바람직하게는 K326A 또는 K326W에서의 적어 도 하나의 아미노산 치환을 포함함). 또한 하기를 참조한다: 미국 특허 번호 6,528,624B1 (Idusogie *et al.*).
- [0261] **인간 항체**
- [0262] 인간화에 대한 대안으로, 인간 항체가 생성될 수 있다. 예를 들면, 면역화에 의해, 내인성 면역글로불린 생산의

부재에서 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 형질전환 동물 (예를 들면, 마우스)을 생산하는 것이 현재 가능하다. 예를 들면, 키메라성 및 생식계열 돌연변이체 마우스에서 항체 중쇄 결합 영역 (J_H) 유전자의 동종 접합성 결실이 내인성 항체 생산의 완전한 억제를 초래한다는 것이 기재되어 있다. 이러한 생식계열 돌연변이체 마우스에서 인간 생식계열 면역글로불린 유전자 배열의 전이는 항원 공격에 의한 인간 항체의 생성을 초래할 것이다. **참고:** 예를 들면, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); 및 미국 특허 번호 5,591,669, 5,589,369 및 5,545,807.

[0263] 대안적으로, 파아지 디스플레이 기술 (McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553 (1990))은 비면역화된 공여체로부터 면역글로불린 가변 (V) 도메인 유전자 레퍼토리로부터 **시험관내** 인간 항체 및 항체 단편을 생산하는데 사용될 수 있다. 상기 기술에 따라, 항체 V 도메인 유전자는 섬유상 박테리오파아지, 예컨대 M13 또는 fd의 대 또는 소 피막 단백질 유전자에 인프레임 클로닝되고, 그리고 파아지 입자의 표면에 기능적 항체 단편으로서 표시된다. 섬유상 입자는 파아지 게놈의 단일 가닥 DNA 카피를 포함하기 때문에, 항체의 기능적 특성에 기반한 선별로 또한 결과적으로 그 특성을 나타내는 항체를 암호화하는 유전자를 선별한다. 따라서, 파아지는 B 세포의 일부 특성을 모방한다. 파아지 디스플레이는 다양한 포맷으로 수행될 수 있다; 검토투를 위해 하기를 **참고**한다: 예를 들면, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). V-유전자 분절의 몇 개의 공급원은 파아지 디스플레이를 위해 사용될 수 있다. 문헌 [Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991)]은 면역화된 마우스의 비장으로부터 유도된 V 유전자의 작은 랜덤 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 배열을 단리하였다. 비면역화된 인간 공여체로부터 V 유전자의 레퍼토리는 제작될 수 있고 그리고 항원 (자가-항원 포함)의 다양한 배열에 대한 항체는 하기에 기재된 기술에 따라 본질적으로 단리될 수 있다: Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), 또는 Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). **또한 참고:** 미국 특허 번호 5,565,332 및 5,573,905.

[0264] 인간 항체는 또한 **시험관내**에서 활성화된 B 세포에 의해 생산될 수 있다 (**참고:** 미국 특허 5,567,610 및 5,229,275).

[0265] 항체 단편

[0266] 항체 단편의 생산을 위하여 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백질 분해 소화를 통해 유도되었다 (**참고:** 예를 들면, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) 및 Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). 그러나, 이들 단편은 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 이제 생산될 수 있다. 예를 들어, 항체 단편은 상기 고찰된 항체 파아지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 항체 단편은 항체 파아지 라이브러리에서 단리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편은 *in vitro* 콜라이에서 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다 (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). 또 다른 접근에 따르면, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리될 수 있다. 항체 단편을 생산하기 위한 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 기타 구현예에서, 선택된 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다. **참고:** WO 93/16185; 미국 특허 번호 5,571,894; 및 미국 특허 번호 5,587,458. 항체 단편은 또한, 예를 들면, 미국 특허 5,641,870에서, 예를 들어 기재된 바와 같이 "선형 항체"일 수 있다. 상기 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0267] 다중특이적 항체

[0268] 다중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 결합 특이성을 갖고, 여기에서 에피토프는 보통 상이한 항원 출신이다. 상기 분자가 정상적으로 2개의 상이한 에피토프 (즉 이중특이적 항체, BsAbs)를 단지 결합하는 반면, 추가의 특이성을 갖는 항체 예컨대 삼중특이적 항체는 본원에서 사용될 때 상기 발현에 의해 포함된다. 이중특이성 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예컨대, F(ab')₂ 이중특이적 항체)으로 제조될 수 있다.

[0269] 이중특이적 항체를 제조하는 방법은 본 분야에 알려져 있다. 전장 이중특이적 항체의 전통적 생산은 두 면역글로불린 중쇄-경쇄 페어의 공동 발현에 근거하며, 여기서 두 쇠는 상이한 특이성을 갖는다 (Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 집합으로 인하여, 이러한 하이브리도마 (4 혼성체 (quadroma))는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적 혼합물을 생산하며, 이중 오직 하나만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 보통 친화도 크로마토그래피 단계에 의하여 수행되는, 정확한 분자의 정제는 다소 번거롭고, 생물물 산출량은 낮다. 유사한 절차가 하기에 개시된다: WO 93/08829, 및 Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

[0270] 이중특이적 항체 제조를 위한 당해 기술에 공지된 하나의 접근법은 "크롭-인투-홀" 또는 "돌출부-인투-공동" 접근법이다 (참고: 예를 들면, 미국 특허 번호 5,731,168). 상기 접근법에서, 2개의 면역글로불린 폴리펩티드 (예를 들면, 중쇄 폴리펩티드) 각각은 계면을 포함한다. 하나의 면역글로불린 폴리펩티드의 계면은 다른 면역글로불린 폴리펩티드 상에서 상응하는 계면과 상호작용하고, 그렇게 함으로써 2개 면역글로불린 폴리펩티드를 결합시킨다. 이들 계면은 하나의 면역글로불린 폴리펩티드의 계면에 위치한 "크롭" 또는 "돌출부" (이들 용어들은 본원에서 교환가능하게 사용될 수 있다)가 다른 면역글로불린 폴리펩티드의 계면에 위치한 "홀" 또는 "공동" (이들 용어들은 본원에서 교환가능하게 사용될 수 있다)과 상응하도록 가공될 수 있다. 일부 구현예에서, 홀은 크롭과 동일한 또는 유사한 크기이고, 2개의 계면이 상호작용하는 경우, 하나의 계면의 크롭이 다른 계면의 상응하는 홀에 위치할 수 있는 정도로 적합하게 배치된다. 이론에 제한되도록 하는 바램 없이, 이중다량체를 안정화시키고 다른 종, 예를 들어 동종다량체보다 이중다량체의 형성을 선호한다고 생각된다. 일부 구현예에서, 상기 접근법은, 상이한 에피토프에 대하여 결합 특이성을 갖는 2개의 면역글로불린 폴리펩티드를 포함한 이중특이적 항체를 창출하는, 2개의 상이한 면역글로불린 폴리펩티드의 이중다량체화를 촉진시키기 위해 사용될 수 있다.

[0271] 일부 구현예에서, 크롭은 작은 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄로 대체함으로써 작제될 수 있다. 일부 구현예에서, 홀은 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 측쇄로 대체함으로써 작제될 수 있다. 크롭 또는 홀은 본래 계면에 존재할 수 있거나, 또는 이들은 합성으로 도입될 수 있다. 예를 들어, 크롭 또는 홀은 적어도 하나의 "최초" 아미노산 잔기를 적어도 하나의 "도입" 아미노산 잔기로 대체하기 위해 계면을 암호화한 핵산 서열을 변경함으로써 합성으로 도입될 수 있다. 핵산 서열의 변경 방법은 당해 기술에서 잘 알려진 표준 분자 생물학 기술을 포함할 수 있다. 다양한 아미노산 잔기의 측쇄 용적은 하기 표에 나타난다. 일부 구현예에서, 본래 잔기는 작은 측쇄 용적 (예를 들면, 알라닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 글리신, 세린, 트레오닌, 또는 발린)을 갖고, 노브 형성용 유입 잔기는 천연 발생 아미노산이고 아르기닌, 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본래 잔기는 큰 측쇄 용적 (예를 들면, 아르기닌, 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판)을 가질 수 있고, 홀 형성용 유입 잔기는 천연 발생 아미노산이고 알라닌, 세린, 트레오닌, 및 발린을 포함할 수 있다.

[0272] 표 1: 아미노산 잔기의 특성

표 1

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

[0274] ^a아미노산 분자량 - 물 분자량 값은 하기에서 유래됨: Handbook of Chemistry and Physics, 43rd ed. Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961.

- [0275] ^b값은 하기에서 유래됨: A.A. Zamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24:107-123, 1972.
- [0276] ^c값은 하기에서 유래됨: C. Chothia, J. Mol. Biol. 105:1-14, 1975. 접근가능한 표면적은 이 참조문헌의 도 6 내지 20에서 정의된다.
- [0277] 일부 구현예에서, 크롭 또는 홀 형성용 본래 잔기는 이중다량체의 3-차원 구조에 기반하여 식별된다. 3-차원 구조를 획득하기 위하여 당해 기술에 공지된 기술은 X-선 결정학(crystallography) 및 NMR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 계면은 면역글로불린 불변 도메인의 CH3 도메인이다. 이들 구현예에서, 인간 IgG₁의 CH3/CH3 계면은 4 항-평행한 β-가닥에 위치한 각 도메인 상에 16 잔기를 포함한다. 이론에 제한되도록 하는 바램 없이, 돌연변이된 잔기는 2개의 중심 항-평행한 β-가닥에 바람직하게는 위치하여 크롭이 파트너 CH3 도메인에서 보상성 홀 보다는 주위의 용매에 의해 수용될 수 있는 위험을 최소화시킨다. 일부 구현예에서, 2개의 면역글로불린 폴리펩티드에서 상응하는 크롭 및 홀을 형성한 돌연변이는 하기 표에서 제공된 하나 이상의 쌍에 상응한다.

[0278] 표 2:상응하는 크롭-및 홀-형성 돌연변이의 예시적 세트

표 2

제1 면역글로불린의 CH3	제2 면역글로불린의 CH3
T366Y	Y407T
T366W	Y407A
F405A	T394W
Y407T	T366Y
T366Y:F405A	T394W:Y407T
T366W:F405W	T394S: Y407A
F405W: Y407A	T366W:T394S
F405W	T394S

- [0280] 돌연변이는 본래 잔기, 그 다음 카바트 넘버링 시스템을 이용한 위치, 및 그 다음 유입 잔기에 의해 표시된다 (모든 잔기는 단일-문자 아미노산 코드로 주어진다). 다중 돌연변이는 결장(colon)에 의해 분리된다.
- [0281] 일부 구현예에서, 면역글로불린 폴리펩티드는 상기 표 2에서 열거된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한 CH3 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 표 2의 왼쪽 컬럼에서 열거된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한 CH3 도메인을 포함한 제1 면역글로불린 폴리펩티드, 및 표 2의 오른쪽 컬럼에서 열거된 하나 이상의 상응하는 아미노산 치환을 포함한 CH3 도메인을 포함한 제2 면역글로불린 폴리펩티드를 포함한다.
- [0282] 상기에서 논의된 바와 같이 DNA의 돌연변이 이후, 하나 이상의 상응하는 크롭- 또는 홀-형성 돌연변이를 갖는 변형된 면역글로불린 폴리펩티드를 암호화한 폴리뉴클레오티드는 당해 기술에서 공지된 표준 재조합 기술 및 세포 시스템을 이용하여 발현 및 정제될 수 있다. 참고: 예를 들어, 미국 특허 번호 5,731,168; 5,807,706; 5,821,333; 7,642,228; 7,695,936; 8,216,805; 미국 공보 번호 2013/0089553; 및 Spiess et al., Nature Biotechnology 31: 753-758, 2013. 변형된 면역글로불린 폴리펩티드는 원핵 숙주세포, 예컨대 *E. 콜라이*, 또는 진핵 숙주 세포, 예컨대 CHO 세포를 사용하여 생산될 수 있다. 상응하는 크롭- 및 홀-보유 면역글로불린 폴리펩티드는 공-배양물내 숙주 세포에서 발현될 수 있고 이중다량체로서 함께 정제될 수 있거나, 또는 이들은 단일 배양물에서 발현, 별도로 정제, 및 시험관내 조립될 수 있다. 일부 구현예에서, 박테리아성 숙주 세포의 2개 균주 (하나는 크롭을 갖는 면역글로불린 폴리펩티드를 발현하고, 다른 것은 홀을 갖는 면역글로불린 폴리펩티드를 발현한다)는 당해 기술에서 공지된 표준 박테리아성 배양 기술을 이용하여 공-배양된다. 일부 구현예에서, 2개 균주는, 예를 들면, 배양물에서 동등한 발현 수준을 달성하기 위해 특이적 비로 혼합될 수 있다. 일부 구현예에서, 2개 균주는 50:50, 60:40, 또는 70:30 비로 혼합될 수 있다. 폴리펩티드 발현 이후, 세포는 함께 용해될 수 있고, 단백질은 추출될 수 있다. 동중-다량체 대 이중-다량체 종의 존재도 측정을 허용하는 당해 기술에서 공지된 표준 기술은 크기 배제 크로마토그래피를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 각 변형된 면역글로불린 폴리펩티드는 표준 재조합 기술을 이용하여 별도로 발현되고, 이들은 시험관내 함께 조립될 수 있다. 조립은, 예를 들어, 각 변형된 면역글로불린 폴리펩티드의 정제, 이들을 함께 동등한 질량으로 혼합 및 인큐베이팅, 이황화 환원 (예를 들면, 디티오프레이틀로 처리), 농축, 및 폴리펩티드의 재산화에 의해 달성될 수 있다. 형성된 이중특이적 항체는 양이온-교환 크로마토그래피를 포함한 표준 기술을 이용하여 정제될 수 있고 크기 배제 크로마토그래피를 포함한 표준 기술을 이용하여 측정될 수 있다. 이들 방법의 더욱 상세한 설명에 대하여, 다음을 참고한

다: Spiess et al., *Nat Biotechnol* 31:753-8, 2013. 일부 구현예에서, 변형된 면역글로불린 폴리펩티드는 CHO 세포에서 분리하여 발현될 수 있고 그리고 상기 기재된 방법을 사용하여 *시험관내*에서 조립될 수 있다.

[0283] 상이한 접근에 따라, 원하는 결합 특이성을 갖는 항체 가변 도메인 (항체-항원 조합 부위)은 면역글로불린 불변 도메인 서열로 융합된다. 융합은 바람직하게는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인을 갖고, 힌지, CH2 및 CH3 영역의 적어도 일부를 포함한다. 융합의 적어도 하나에 존재하는, 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)을 갖는 것이 전형적이다. 면역글로불린 중쇄 융합 및, 원할 시 면역글로불린 경쇄를 암호화하는 DNA는 개별 발현 벡터에 삽입되고, 적절한 숙주 유기체에 공-형질감염된다. 이것은 작제물에서 사용된 3개의 폴리펩티드 세트의 불균등 비가 최적의 수율을 제공하는 경우 구현예에서 3개의 폴리펩티드 단편의 상호 분율 조정에서 큰 가요성을 제공한다. 그러나, 균등 비에서 적어도 2 폴리펩티드 세트의 발현이 고수율을 초래하는 경우 또는 비가 특정한 유의성이 없는 경우 한 발현 벡터에서 2 또는 모든 3개의 폴리펩티드 세트에 대한 암호화 서열을 삽입하는 것이 가능하다.

[0284] 일 구현예에서, 이중특이적 항체는 하나의 아암 내의 제1 결합 특이성을 갖는 혼성체 면역글로불린 중쇄 및 다른 아암 내의 혼성체 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공)으로 구성된다. 이중특이적 분자의 오직 1/2 내의 면역글로불린 경쇄의 존재가 분리의 용이한 방법을 제공하므로, 이러한 비대칭 구조는 비목적 면역글로불린 세트 조합으로부터의 목적 이중특이적 화합물의 분리를 촉진하는 것으로 발견되었다. 이러한 접근은 WO 94/04690에 개시된다. 이중특이적 항체 생성의 추가적인 세부사항에 대해서는, 예를 들어, 하기를 참조한다: Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

[0285] WO96/27011에 기술된 또 다른 접근에 따르면, 항체 분자 쌍 간의 계면은 재조합 세포 배양으로부터 회수되는 이중이량체 백분율을 최대화하기 위해 가공될 수 있다. 일 계면은 항체 불변 도메인의 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 상기 방법에서, 제1 항체 분자 계면으로부터 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 더 큰 측쇄(예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 작은 것(예로, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체하여 큰 측쇄(들)에 대해 동일하거나 유사한 크기의 보상적 "공동"이 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 원치 않는 최종 산물에 비해 이중이량체 수율을 증가시키기 위한 기전을 제공한다.

[0286] 이중특이적 항체에는 가교결합되거나, "이중콘주게이트" 항체가 포함된다. 그러한 항체는, 예를 들어, 면역계 세포를 원치 않는 세포로 표적화하는데 제안되어 왔다 (미국 특허 번호 번호 4,676,980), 및 HIV 감염의 치료에 대하여 (WO 91/00360, WO 92/200373, 및 EP 03089). 이중콘주게이트 항체는 임의의 편리한 가교결합 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 적합한 가교결합 제제 및 기술은 당해기술에서 잘 알려지고, 그리고 미국 특허 번호 4,676,980에 기재된다 (다수의 가교결합 기술과 함께).

[0287] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하기 위한 기술은 또한 하기 문헌에 기술되어 있다. 예를 들면, 이중특이적 항체는 화학적 연결을 사용하여 제조될 수 있다. [Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)]은 무손상 항체가 F(ab')₂ 단편을 생성하기 위하여 단백질가수분해적으로 절단되는 절차를 기술한다. 이러한 단편은 이웃한 디티올을 안정화하고 분자간 이황화 형성을 방지하기 위하여 디티올 복합화제 아비산나트륨의 존재 하에서 환원된다. 생성된 Fab' 단편은 이후 티오니트르벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환된다. Fab' -TNB 유도체 중 하나는 이후 메르캅토에틸아민으로의 환원에 의하여 Fab' -티올로 재전환되고, 기타 Fab' -TNB 유도체의 등몰량으로 혼합되어 이중특이적 항체를 형성한다. 생성된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 제제로서 사용될 수 있다.

[0288] 최근 발전은 이. 콜라이로부터 Fab'-SH 단편의 직접적인 회수를 용이하게 하였고, 이는 이중특이적 항체를 형성하기 위해 화학적으로 커플링될 수 있다. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)는 완전히 인간화된 이중특이적 항체 F(ab')₂ 분자의 생산을 기술한다. 각 Fab' 단편은 이. 콜라이로부터 개별 분리되고, 시험관내에서 화학적으로 커플링 지시되어 이중특이적 항체를 형성하였다.

[0289] 재조합 세포 배양물로부터 직접 유래한 이중특이적 항체 단편을 제조하고 분리하는 다양한 기술이 또한 기술되었다. 예를 들면, 이중특이적 항체는 류신 지퍼를 사용하여 생산되었다. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Fos 및 Jun 단백질 유래의 류신 지퍼 펩티드는 유전자 융합에 의한 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결되었다. 항체 동종이량체는 힌지 영역에서 환원되어 모노머를 형성하고, 이후 재-산화되어 항체 이중이량체를 형성하였다. 이러한 방법이 또한 항체 동종이량체의 생산을 위하여 이용될 수 있다. "디아바디" 기술은 하기에 의하여 기술되며: Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993), 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 대안적 기전을 제공하였다. 단편은 동일한 세트 상의 두 도메인

간 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (V_L) 과 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H) 을 포함한다. 따라서, 한 단편의 V_H 및 V_L 도메인이 또 다른 단편의 상보적 V_H 및 V_L 도메인과 쌍형성하도록 유도되어 두 항원-결합 부위를 형성한다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체의 사용에 의한, 이중특이적 항체 단편의 제조를 위한 기타 전략이 또한 보고되었다. 참고: Gruber et al, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

[0290] 이중특이적 항체 단편 제조를 위한 또 다른 기술은 "이중특이적 T 세포 연관체" 또는 BiTE® 접근법이다 (참고, 예를 들면, W02004/106381, W02005/061547, W02007/042261, 및 W02008/119567). 상기 접근법은 단일 폴리펩티드상에 배열된 2개 항체 가변 도메인을 사용한다. 예를 들어, 단일 폴리펩티드쇄는 2 단일쇄 Fv (scFv) 단편을 포함하고, 각각은 2개 도메인 사이에서 분자내 회합을 허용하기에 충분한 길이의 폴리펩티드 링커에 의해 분리된 가변형 중쇄 (V_H) 및 가변형 경쇄 (V_L) 도메인을 갖는다. 상기 단일 폴리펩티드는 추가로 2개 scFv 단편 사이에서 폴리펩티드 스페이스 서열을 포함한다. 각 scFv는 상이한 에피토프를 인식하고, 이들 에피토프는 상이한 세포 유형에 특이적일 수 있어서, 이로써 각 scFv가 그의 동족 에피토프와 연관되는 경우 2개의 상이한 세포 유형의 세포가 근접해서 접촉되거나 또는 묶여진다. 상기 접근법의 하나의 특정한 구현에는, 표적 세포, 예컨대 악성 또는 종양 세포에 의해 발현된 세포-표면 항원을 인식하는 또 다른 scFv에 연결된, 면역 세포에 의해 발현된 세포-표면 항원, 예를 들면, T 세포상의 CD3 폴리펩티드를 인식한 scFv를 포함한다.

[0291] 단일 폴리펩티드임에 따라, 이중특이적 T 세포 연관체는 당해 기술에서 공지된 임의의 원핵 또는 진핵 세포 발현계, 예를 들어, CHO 세포주를 이용하여 발현될 수 있다. 그러나, 특이적 정제 기술 (참고, 예를 들면, EP1691833)은, 모노머의 의도된 활성 이외의 생물학적 활성을 가질 수 있는, 다른 다량체 종으로부터 모노머성 이중특이적 T 세포 연관체를 분리하는데 필요할 수 있다. 하나의 예시적 정제 반응식에서, 분비된 폴리펩티드를 함유한 용액은 먼저 금속 친화성 크로마토그래피 처리되고, 폴리펩티드는 이미다졸 농도의 구배로 용출된다. 상기 용출물은 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제되고, 폴리펩티드는 염화나트륨 농도의 구배로 이용하여 용출된다. 마지막으로, 상기 용출물은 크기 배제 크로마토그래피 처리되어 다량체 종으로부터 모노머를 분리시킨다.

[0292] “디아바디” 기술은 하기에 의하여 기술되며: Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993), 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 대안적 기전을 제공하였다. 단편은 동일한쇄 상의 두 도메인 간 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (V_L) 과 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H) 을 포함한다. 따라서, 한 단편의 V_H 및 V_L 도메인이 또 다른 단편의 상보적 V_H 및 V_L 도메인과 쌍형성하도록 유도되어 두 항원-결합 부위를 형성한다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체의 사용에 의한, 이중특이적 항체 단편의 제조를 위한 기타 전략이 또한 보고되었다. 참고: Gruber et al, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

[0293] 2 초과 의 원자가를 갖는 항체가 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체가 제조될 수 있다. Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

[0294] **콘주게이트되거나 또는 달리는 변형된 항체**

[0295] 본 명세서에서의 방법에 사용된 또는 제조 물품에 포함된 항체가 세포독성제에 선택적으로 콘주게이트된다. 예를 들면, 항체는 W02004/032828에 기재된 바와 같이 약물에 콘주게이트될 수 있다.

[0296] 이러한 항체-세포독성제 콘주게이트의 생성에 유용한 화학치료제가 상기에 기재되어 졌다.

[0297] 항체 및 하나 이상의 소분자 독소, 예컨대 칼리키아마이신, 메이탄신 (미국 특허 번호 5,208,020), 트리코텐, 및 CC1065의 콘주게이트가 또한 본 명세서에서 고려된다. 본 발명의 일 구현예에서, 항체는 하나 이상의 메이탄신 분자 (예컨대 항체 분자 당 약 1 내지 약 10의 메이탄신 분자)에 콘주게이트된다. 메이탄신은, 예를 들면, May-SS-Me로 전환될 수 있어, May-SH3로 환원될 수 있고 그리고 변형된 항체와 반응할 수 있어 (문헌 [Chari et al. *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)]) 메이탄시노이드-항체 콘주게이트를 생성한다.

[0298] 대안적으로, 항체는 하나 이상의 칼리키아마이신 분자에 콘주게이트된다. 항체제의 칼리키아미신 그룹은 서브피코몰 농도로 이중-가닥 DNA 절단물을 생성할 수 있다. 사용될 수 있는 칼리키아미신의 구조적 유사체는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-아세틸- γ_1^I , PSAG 및 θ_1^I 을 포함한다 (Hinman et al. *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993) 및 Lode et al. *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998)).

[0299] 사용될 수 있는 효소적으로 활성인 독소 및 이의 단편은 비제한적으로 하기를 포함한다: 디프테리아 A쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, (슈도모나스 애틀기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터의) 외독소 A쇄, 리

신 A 쇠, 아브린 A 쇠, 모텍신 A 쇠, 알파-사르신, 유동(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 미국 자리콩(*Phytolacca americana*) 단백질(PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(*Saponaaria officinalis*) 억제제, 젤로닌, 미토젤린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신, 및 트리코테센). 예를 들면, 다음을 참고한다: 1993년 10월 28일 공개된 WO 93/21232.

- [0300] 본 발명은 핵산분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들면 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제 예컨대 데옥시리보뉴클레아제; DNase)와 콘주게이트된 항체를 추가로 고려한다.
- [0301] 각종 방사성 동위원소가 방사콘주게이트된 항체의 생산을 위해 이용 가능하다. 예시는 하기를 포함한다: At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , 및 Lu의 방사성 동위원소.
- [0302] 항체 및 세포독성제의 콘주게이트는 다양한 이작용성 단백질 커플링제, 예를 들면, N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트(SPDP), 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카복실레이트, 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이작용성 유도체(예를 들면, 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르(예를 들면, 디석신이미딜 수베레이트), 알데히드(예를 들면, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물(예를 들면, 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체(예를 들면, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예를 들면, 톨리엔(toluene) 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물(예를 들면, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 하기에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다: Vitetta *et al.* *Science* 238: 1098 (1987). 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸 디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 항체와의 방사성 뉴클레오타이드의 콘주게이션을 위한 예시적인 킬레이트제이다. 참고 WO94/11026. 상기 링커는 상기 세포에서 세포독성제의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정 링커, 펩티다아제-민감성 링커, 디메틸 링커 또는 이황화물-함유 링커 (Chari *et al.* *Cancer Research* 52: 127-131 (1992))가 사용될 수 있다.
- [0303] 대안적으로, 항체 및 세포독성제를 포함한 융합 단백질은, 예를 들면, 재조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다.
- [0304] 추가의 또 다른 구현예에서, 항체는 항체-수용체 콘주게이트가 환자에 투여되는 종양 사전-표적화에서 이용하기 위해, 이어서 투명제(clearing agent)를 이용하여 순환으로부터 미결합된 콘주게이트의 제거 및 그 다음 세포독성제 (예를 들면, 방사성뉴클레오타이드)에 콘주게이트된 "리간드" (예를 들면, 아비딘)의 투여를 위하여 "수용체" (예컨대 스트렙타비딘)에 콘주게이트될 수 있다.
- [0305] 본 발명의 항체는 또한 전구약물 (예를 들면 펩티드 화학치료제, WO81/01145 참고)을 활성 항암 약물로 전환하는 전구약물-활성화 효소와 콘주게이트될 수 있다. 하기를 참고한다: 예를 들면, WO 88/07378 및 미국 특허 번호 4,975,278.
- [0306] 이러한 콘주게이트의 효소 성분은 이것을 그것의 보다 활성인 세포독성 형태로 전환하기 위한 그와 같은 방식으로 전구약물에 작용할 수 있는 임의의 효소를 포함한다.
- [0307] 본 발명의 방법에 유용한 효소는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 포스페이트-함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키기에 유용한 알칼리성 포스파타제; 설페이트-함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키기에 유용한 아릴설페타제; 비독성 5-플루오로시토신을 항-암 약물, 5-플루오로우라실로 전환시키기에 유용한 시토신 데아미나제; 펩티드-함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키기에 유용한 프로테아제, 예컨대 세라티아 프로테아제, 서브릴리신, 카복시펩티다아제 및 카텝신 (예컨대 카텝신 B 및 L); D-아미노산 치환체를 함유하는 전구약물을 전환시키기에 유용한 D-알라닐카복시펩티다아제; 글리코실화된 전구약물을 유리 약물로 전환시키기에 유용한 탄수화물-절단 효소 예컨대 β -갈락토시다아제 및 뉴라미니다아제; β -락탐으로 유도된 약물을 유리 약물로 전환시키기에 유용한 β -락타마아제; 및 페녹시아세틸 또는 페닐아세틸 기, 각각을 갖는 그의 아민 질소에서 유도된 약물을 유리 약물로 전환시키기에 유용한 페닐실린 아마이드아제, 예컨대 페닐실린 V 아마이드아제 또는 페닐실린 G 아마이드아제. 대안적으로, 또한 당해 기술에서 "항체효소"로 공지된 효소 활성을 갖는 항체가 본 발명의 전구약물을 무 활성 약물로 전환하기 위해 사용될 수 있다 (예를 들면, 참고: Massey, *Nature* 328: 457-458 (1987)). 종양 세포 군집에 항체효소의 전달을 위한 항체-항체효소 콘주게이트가 본원에서 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.
- [0308] 본 발명의 효소는 당해 기술에서 잘 알려진 기술 예컨대 상기 논의된 이중이중작용성 가교결합 시약의 사용에

의해 항체에 공유결합될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 효소의 적어도 기능적으로 활성인 부분에 연결된 본 발명의 항체의 적어도 항원 결합 영역을 포함하는 융합 단백질이 당해 기술에서 잘 알려진 재조합 DNA 기법을 사용하여 제작될 수 있다 (예를 들면, 참고: Neuberger *et al.*, *Nature*, 312: 604-608 (1984)).

[0309] 항체의 다른 변형이 본 명세서에서 고려된다. 예를 들어, 상기 항체는 다양한 비-단백질성 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체 중 하나에 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체 단편, 예컨대 Fab'가 하나 이상의 PEG 분자에 연결된다.

[0310] 본 명세서에 개시된 항체는 또한 리포솜으로 제형화될 수 있다. 항체를 포함하는 리포솜은 다음 문헌에 기재된 바와 같이 당업자에게 공지된 방법에 의해 제조된다: Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); 미국 특허 번호 4,485,045 및 4,544,545; 및 W097/38731 (1997년 10월 23일 공개됨). 증대된 순환 시간을 갖는 리포솜은 미국 특허 번호 5,013,556에 기재되어 있다.

[0311] 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화된 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물과 함께 역상 증발 방법에 의해 생성될 수 있다. 리포솜은 한정된 공극 크기의 필터를 통해 압출하여 목적하는 직경을 갖는 리포솜이 된다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 이항화 교환 반응을 통해 하기 문헌에 기재된 바와 같이 리포솜에 콘주게이트될 수 있다: Martin *et al.* *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982). 화학치료제는 리포솜 내에 선택적으로 함유된다. 하기를 참고한다: Gabizon *et al.* *J. National Cancer Inst.* 81(19)1484 (1989).

[0312] 항체 변이체

[0313] 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 적절한 뉴클레오타이드 변화를 항체 핵산에 도입하거나 펩티드 합성에 의해 제조된다. 이러한 변형은, 예를 들면, 항체의 아미노산 서열 내의 잔기의 결실, 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 작제물에 도달하도록 결실, 삽입, 및 치환의 임의의 조합이 이루어지며, 단 최종 작제물은 목적 특징, 예컨대, 항원-결합을 가져야 한다. 아미노산 변화는 또한 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시키는 것과 같은 항체의 번역 후 과정을 변화시킬 수 있다.

[0314] 돌연변이유발을 위한 바람직한 위치인, 항체의 특정 잔기들 또는 영역들의 식별을 위해 유용한 방법은 다음 문헌에 기재된 바와 같이 “알라닌 스캐닝 돌연변이유발”로 불리운다: Cunningham and Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989). 본원에서, 잔기 또는 표적 잔기의 그룹이 식별되었고 (예컨대, 하전된 잔기 예컨대 arg, asp, his, lys, 및 glu) 중성 또는 음으로 하전된 아미노산(가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어 항원과 아미노산의 상호작용에 영향을 미친다. 치환에 대한 작용성 민감성을 입증하는 아미노산 위치는 그런 다음 치환의 부위에 대해 또는 치환 부위에 다른 변이체를 추가로 도입함에 의해 정제된다. 따라서, 아미노산 서열 변동을 도입하기 위한 부위는 예정된 반면, 돌연변이 자체의 특성은 예정될 필요가 없다. 예를 들면, 주어진 부위에서 돌연변이의 수행을 분석하기 위해, ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발이 표적 코돈 또는 영역에서 수행되고, 그리고 과발현된 항체 변이체가 목적 활성에 대해 선별된다.

[0315] 아미노산 서열 삽입은 하나의 잔기 내지는 백 개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드의 길이에 이르는 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열 내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체 또는 세포독성 폴리펩티드에 융합된 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 효소 또는 폴리펩티드의 항체의 N- 또는 C-말단에 대한 융합을 포함한다.

[0316] 또 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이들 변이체는 상이한 잔기에 의해 대체된 항체 분자 내 적어도 하나의 아미노산 잔기를 가진다. 항체 항체들의 치환적 돌연변이유발에 관심이 큰 부위는 초가변 영역을 포함하지만, FR 변형이 또한 고려된다. 보존적 치환은 "바람직한 치환"의 표제하에 표 3에 제공된다. 만일 상기 치환이 생물학적 활성에서 변화를 초래한다면, 표 3에서 "예시적인 치환"으로 명명된, 더욱 실질적인 변화가 도입될 수 있고 생성물이 스크리닝될 수 있다.

[0317] 표 3: 보존적 아미노산 치환

표 3

본래 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

항체의 생물학적 특성에서 실질적인 변형은 (a) 예를 들면, 시트 또는 나선 형태로서, 치환의 구역에서 폴리펩티드 프레임워크의 구조, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크 유지에서 그 효과가 유의미하게 상이한 치환을 선택함으로써 달성된다. 아미노산은 이들의 측쇄의 특성의 유사성에 따라 그룹화될 수 있다 (참고: A. L. Lehninger, in *Biochemistry*, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

(1) 비-극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) 비하전 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) 산성: Asp (D), Glu (E)

(4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His(H)

대안적으로, 천연 발생 잔기는 하기 공통의 측쇄 특성에 기반하여 그룹으로 분할될 수 있다:

(1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) 산성: Asp, Glu;

(4) 염기성: His, Lys, Arg;

(5) 쇠 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;

(6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

비-보존적 치환은 이들 부류 중 하나의 구성원을 다른 부류로 교환하는 것을 수반할 것이다.

항체의 적절한 형태 유지에 관여되지 않은 임의의 시스템인 잔기는 또한, 일반적으로 세린과 함께, 치환되어, 분자의 산화적 안정성을 개선할 수 있고 그리고 비정상적인 가교결합을 예방할 수 있다. 반대로, 시스템인 결합(들)은, 특히 항체가 항체 단편 예컨대 Fv 단편인 경우, 항체에 부가되어 그 안정성을 개선할 수 있다.

특히 바람직한 치환형 변이체의 유형은 친계 항체의 하나 이상의 초가변 영역 잔기의 치환을 포함한다. 일반적으로, 추가의 전개를 위해 선택된 수득한 변이체(들)는 이들이 생성된 친계 항체와 비교하여 개선된 생물학적 특성을 가질 것이다. 이러한 치환형 변이체를 생성하는데 편리한 방법은 파아지 디스플레이를 이용한 친화도 성

숙이다. 간단하게는, 몇 개의 추가변성 영역 부위(예컨대, 6-7 부위)가 돌연변이되어 각 부위에서 모든 가능한 아미노 치환을 생성한다. 이와 같이 생성된 항체 변이체는 각각의 입자 내 포장된 M13의 유전자 III 생성물로의 융합부로서 필라멘트성 파지 입자로부터의 1가 양상으로 나타난다. 파아지-표시된 변이체는 그런 다음 본 명세서에서 개시된 바와 같은 이의 생물학적 활성(예컨대, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다. 변형을 위한 후보 추가변 영역을 식별하기 위해, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발은 항원 결합에 상당히 기여하는 추가변 영역 잔기들을 식별하기 위해 수행될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 항체와 항원 간의 접촉 지점을 식별하기 위한 항원-항체 착물의 결정 구조를 분석하는 것이 이점을 가질 수 있다. 상기 접촉 잔기들 및 이웃하는 잔기들은 본원에서 고안된 기술에 따른 치환을 위한 후보물이다. 일단 이러한 변이체가 생성되면, 변이체의 패널은 본 명세서에서 기재된 바와 같이 스크리닝되고, 그리고 하나 이상의 관련된 검정에서 우수한 특성을 갖는 항체를 추가의 개발을 위해 선택될 수 있다.

[0334] 항체의 또 다른 유형의 아미노산 변이체는 항체의 본래 글리코실화 패턴을 변경한다. 상기 변경은 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 결실하는 것 및/또는 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 첨가하는 것을 포함한다.

[0335] 폴리펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. “N-연결됨”은 탄수화물 잔기가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 결합하는 것을 말한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린, 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기에서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다)은 아스파라긴 측쇄에 탄수화물 모이어티의 효소 부착을 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩티드내 상기 트리펩티드 서열의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. O-연결된 글리코실화는 하이드록시아미노산, 가장 일반적으로는 세린 또는 트레오닌으로의 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토오스 또는 자일로스의 부착을 의미하지만, 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시라이신이 또한 사용될 수 있다.

[0336] 항체에 글리코실화 부위의 부가는 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성되고 이로써 (N-연결 글리코실화 부위에 대한) 상기-기재된 트리펩티드 서열 중 하나 이상을 함유한다. 변경은 또한 (O-연결 글리코실화 부위에 대한) 최초 항체의 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 첨가, 또는 치환에 의해 실시될 수 있다.

[0337] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변형될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코스가 없는 성숙한 탄수화물 구조를 갖는 항체는 문헌[미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1 (Presta, L.)에 기재되어 있으며; 또한 하기를 참고한다: US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd) (CD20 항체 조성물에 관하여). 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물에서 이등분 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)을 갖는 항체는 다음 문헌에 기재되어 있다: W003/011878, Jean-Mairet *et al.* 및 미국 특허 번호 6,602,684, Umana *et al.* 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고당 내에 적어도 하나의 갈락토오스 잔기를 갖는 항체가 W097/30087 (Patel *et al.*)에 보고되어 있으며; 또한 이들의 Fc 영역에 부착된 변경된 탄수화물을 갖는 항체에 관해 W098/58964 (Raju, S.) 및 W099/22764 (Raju, S.)를 참고한다.

[0338] 일부 구현예에서, 본 명세서에서의 글리코실화 변이체는 Fc 영역을 포함하고, 여기서 Fc 영역에 부착된 탄수화물 구조는 푸코스를 결한다. 상기 변이체는 ADCC 작용을 개선하였다. 임의로, Fc 영역은 추가로 ADCC를 추가로 증진시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 예컨대, Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334에서의 치환을 포함한다 (잔기의 EU 넘버링). “탈푸코실화된” 또는 “푸코스-결핍” 항체와 관련된 공보의 예는 다음을 포함한다: 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1, Presta, L; WO 00/61739A1; W001/29246A1; US2003/0115614A1; US2002/0164328A1; US2004/0093621A1; US2004/0132140A1; US2004/0110704A1; US2004/0110282A1; US2004/0109865A1; W003/085119A1; W003/084570A1; W02005/035778; W02005/035586 (푸코실화의 RNA 억제 (RNAi)를 기술); Okazaki *et al. J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). 탈푸코실화된 항체를 생성하는 세포주의 예시는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포를 포함한다 (Ripka *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1, Presta, L; 및 WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, 특히 실시예 11), 및 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실전달효소 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포 (Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

[0339] 항체의 아미노산 서열 변이체를 암호화하는 핵산 분자는 본 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이들 방법은, 비제한적으로, (천연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우에) 천연 공급원으로부터의 단리 또는 항체의 초기에 제조된 변이체 또는 비-변이체 버전의 올리고뉴클레오티드-매개된 (또는 부위 지향적) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발, 및 카세트 돌연변이유발에 의한 제조를 포함한다.

- [0340] 예를 들면, 항체의 항원-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존적 세포독성 (CDC)을 고양하기 위해, 효과기 기능에 관해 본 발명의 항체를 변경하는 것이 바람직할 수 있다. 이것은 항체의 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 치환을 도입함에 의해 달성될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 시스테인 잔기(들)은 Fc 영역 내 도입되어, 이로써 상기 영역 내에 쇄간 이황화 결합을 형성하도록 할 수 있다. 이로써 생성된 동종이량체 항체는 하기를 가질 수 있다: 개선된 내재화 능력 및/또는 증가된 보체-매개된 세포 사멸, 및 항체-의존적 세포 세포독성 (ADCC). 하기를 참고한다: Caron *et al.*, *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) 및 Shopes, B. J. *Immunol.* 148:2918-2922 (1992). 증진된 항-종양 활성을 갖는 동종이량체 항체는 또한, 하기에 기술된 이중작용성 가교결합제를 사용하여 또한 제조될 수 있다: Wolff *et al. Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). 대안적으로, 이중 Fc 영역을 갖는 항체가 가공될 수 있고, 이로써 증진된 보체 용해 및 ADCC 능력을 가질 수 있다. 하기를 참고한다: Stevenson *et al. Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).
- [0341] WO 00/42072 (Presta, L.)는 인간 효과기 세포의 존재에서 개선된 ADCC 기능을 갖는 항체를 기술하고, 여기서 본 항체는 이들의 Fc 영역에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 개선된 ADCC를 갖는 항체는 Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334에서의 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 변경된 Fc 영역은 이들 위치 중 1, 2 또는 3곳에서의 치환을 포함하거나 이로 구성된 인간 IgG1 Fc 영역이다.
- [0342] 변경된 C1q 결합 및/또는 보체 의존적 세포독성 (CDC)을 갖는 항체는 W099/51642, 미국 특허 번호 6,194,551B1, 미국 특허 번호 6,242,195B1, 미국 특허 번호 6,528,624B1 및 미국 특허 번호 6,538,124 (Idusogie *et al.*)에 기재된다. 항체는 이들의 Fc 영역의 아미노산 위치 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 및/또는 334 중 하나 이상에서 아미노산 치환을 포함한다.
- [0343] 항체의 혈청반감기를 증가하기 위해, 예를 들면, 미국 특허 5,739,277에 기재된 바와 같이 항체 (특히 항체 단편) 안으로 회수 수용체 결합 에피토프를 합체할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "구체(salvage) 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 Fc 영역의 에피토프를 지칭하며 (예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄), 이는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기를 증가시키는데 원인으로 작용한다. 이들의 Fc 영역에서 치환 및 증가된 혈청 반감기를 갖는 항체가 또한 W000/42072 (Presta, L.)에 기재된다.
- [0344] 세 개 또는 그 초과 (바람직하게는 네 개) 작용성 항원 결합 부위를 갖는 가공된 항체가 또한 고려된다 (미국 출원번호 US2002/0004587 A1, Miller *et al.*).
- [0345] 본 발명의 항체는 당해 기술에 공지되어 있고 및 쉽게 이용가능한 추가의 비단백질성 모이어티를 함유하기 위해 추가로 변형될 수 있다. 특정 구현예에서, 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 폴리머이다. 수용성 중합체의 비제한적인 예는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시 에톡시화 폴리올(예컨대, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 이들의 혼합물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드가 수중 안정성으로 인해 제조시 이점을 가질 수 있다. 폴리머는 임의의 분자량일 수 있고, 그리고 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착된 폴리머의 수는 다양할 수 있고, 만일 1 초과 폴리머가 부착되면, 이들은 동일 또는 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용된 폴리머의 수 및/또는 유형은, 만일 항체 유도체가 한정된 조건하에서의 요법 등에서 사용된다면, 비제한적으로, 개선되는 항체의 특정한 특성 또는 기능을 포함하는 고려사항에 기반하여 결정될 수 있다.
- [0346] **백터, 숙주 세포 및 제조법**
- [0347] 항체는 재조합 방법을 이용하여 또한 생산될 수 있다. 항-항원 항체의 재조합 생산을 위해, 항체를 암호화하는 핵산을 단리하고 추가의 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제가능한 백터 내로 삽입한다. 항체를 암호화하는 DNA는 쉽게 단리되고 (예를 들면, 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 종래의 절차를 사용하여 서열분석될 수 있다. 많은 백터가 이용가능하다. 백터 성분은 일반적으로, 비제한적으로, 하기 중 하나 이상을 포함한다: 신호 서열, 복제 기원, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종료 서열.
- [0348] **신호 서열 성분**
- [0349] 본 개시내용의 항체는 직접적으로 뿐만 아니라 이중 폴리펩티드와 함께 융합 폴리펩티드로서 재조합으로 생산될 수 있으며, 상기 이중 펩티드는 바람직하게 신호 서열, 또는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적

절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드이다. 선택된 이중 신호 서열은 바람직하게는 숙주 세포에 의해 인식되고 처리되는 (예를 들면, 신호 펩티다아제에 의해 절단되는) 것이다. 천연 항체 신호 서열을 인지하고 처리하지 못하는 원핵 숙주 세포의 경우, 신호 서열은, 예를 들면, 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, lpp, 또는 열안정성 장독소 II 리더의 그룹으로부터 선택된 원핵 신호 서열로 치환된다. 효모 분비의 경우, 천연 신호 서열은, 예를 들면, 효모 인버타제 리더, 인자 리더 (사카로마이세스 및 클루이베로마이세스 α-인자 리더 포함), 또는 산 포스파타제 리더, *썬. 알비칸스(C. albicans)* 글루코아밀라아제 리더, 또는 WO 90/13646에 기재된 신호로 치환될 수 있다. 포유동물 세포 발현에서, 포유동물 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스 분비성 리더(viral secretory leaders), 예를 들면, 단순 헤르페스 gD 신호가 이용가능하다.

[0350] 복제 기점

[0351] 모든 발현 및 클로닝 벡터는 벡터를 하나 이상의 선택된 숙주 세포를 복제하게 할 수 있는 핵산 서열을 함유한다. 일반적으로, 클로닝 벡터에서 상기 서열은 벡터를 숙주 염색체 DNA와 별개로 복제하게 할 수 있는 것이고, 복제의 기원 또는 자율적으로 복제 서열을 포함한다. 이러한 서열은 다양한 박테리아, 효모, 및 바이러스에 대해 잘 알려져 있다. 플라스미드 pBR322로부터 복제 기점은 대부분 그람-음성 박테리아, 2μ에 대해 적합하고, 플라스미드 기원은 효모에 대해 적합하고 그리고 다양한 바이러스 기원 (SV40, 폴리오마, 아테노바이러스, VSV 또는 BPV)은 포유동물 세포에서 벡터를 클로닝하는데 유용하다. 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에 요구되지 않는다 (SV40 기원은 단지 이것이 초기 프로모터를 함유하기 때문에 전형적으로 사용될 수 있다).

[0352] 선택 유전자 성분

[0353] 발현 및 클로닝 벡터는 선택 유전자, 또한 일명 선택가능한 마커를 함유할 수 있다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들면, 암피실린, 네오마이신, 메토틱세이트, 또는 테트라사이클린에 내성을 부여하는, (b) 영양요구성 결핍을 보완하는, 또는 (c) 복합체 배지, 예를 들면, 바실러스용 유전자 암호화 D-알라닌 라세마제로부터 이용불가능한 결정적 영양소를 공급하는 단백질을 암호화한다.

[0354] 선택 반응식의 하나의 예는 숙주 세포의 성장을 억제하기 위해 약물을 이용한다. 이중성 유전자로 성공적으로 변형된 상기 세포는 약물 내성을 부여한 단백질을 생산하고 따라서 선택 레지멘에 대해 생존한다. 상기 우세한 선택의 예는 약물 네오마이신, 마이코페놀산 및 하이그로마이신을 이용한다.

[0355] 포유동물 세포에 대한 적합한 선별 마커의 또 다른 예는 항체-암호화 핵산, 예컨대 DHFR, 글루타민 합성효소 (GS), 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아테노신 테아미나제, 오르니틴 탈탄산효소, 등을 취할 능력이 있는 세포의 식별을 가능하게 하는 것들이다.

[0356] 예를 들어, DHFR 유전자로 전환된 세포는 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토틱세이트 (Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 형질전환체를 배양함에 의해 식별된다. 이들 조건 하에서, DHFR 유전자는 임의의 다른 함께-전환된 핵산과 함께 증폭된다. 내인성 DHFR 활성이 결핍된 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포주 (예를 들면, ATCC CRL-9096)가 사용될 수 있다.

[0357] 대안적으로, GS 유전자로 전환된 세포는 GS의 억제제인 L-메티오닌 설폭시민 (Msx)을 함유하는 배양 배지에서 형질전환체를 배양함에 의해 확인된다. 이들 조건 하에서, GS 유전자는 임의의 다른 함께-전환된 핵산과 함께 증폭된다. GS 선택/증폭 시스템은 상기에 기재된 DHFR 선택/증폭 시스템과 함께 사용될 수 있다.

[0358] 대안적으로, 관심 항체, 야생형 DHFR 유전자, 및 또 다른 선별 마커 예컨대 아미노글리코시드 3'-인산전달효소 (APH)를 암호화하는 DNA 서열로 전환된 또는 함께-전환된 숙주세포 (특히 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)가 선별 마커 예컨대 아미노글리코시드 항생제, 예를 들면, 카나마이신, 네오마이신, 또는 G418에 대한 선택 체제를 함유하는 배지에서 세포 성장에 의해 선택될 수 있다. 참고: 미국 특허 번호 4,965,199.

[0359] 효모에 사용하기에 적합한 선택 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 *trp1* 유전자이다 (문헌 [Stinchcomb 등, Nature, 282:39 (1979)]). *trp1* 유전자는 트립토판에서 성장하는 능력을 결하는 효모의 돌연변이체 균주, 예를 들면, ATCC 번호 44076 또는 PEP4-1에 대한 선택 마커를 제공한다. 문헌 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)]. 효모 숙주세포 계능에 *trp1* 병변의 존재는 그런 다음 트립토판의 부재에서 성장에 의해 형질전환을 검출하기에 유효한 환경을 제공한다. 유사하게, *Leu2*-결핍된 효모 균주 (ATCC 20,622 또는 38,626)는 *Leu2* 유전자를 갖는 공지된 플라스미드에 의해 보완된다.

[0360] 또한, 1.6 μm 원형 플라스미드 pKD1으로부터 유도된 벡터는 *클루이베로마이세스* 효모의 형질전환을 위해 사용된

다. 대안적으로, 재조합 소 카이모신의 대규모 생산을 위한 발현계가 하기에 보고된다: *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). *클루이베로마이세스*의 산업적 균주에 의해 성숙한 재조합 인간 혈청 알부민의 분비를 위한 안정한 멀티-카피 발현 벡터가 또한 개시되었다. Flier *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

[0361] 프로모터 성분

[0362] 발현 및 클로닝 벡터는 일반적으로 숙주 유기체에 의해 기술적으로 인식된 및 항체를 암호화한 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 원핵생물 숙주와 함께 사용되기에 적절한 프로모터는, *phoA* 프로모터, β -락타마제 및 락토오스 프로모터 시스템, 알칼리성 포스포타아제 프로모터, 트립토판 (*trp*) 프로모터, 및 혼성체 프로모터 예컨대 *tac* 프로모터를 포함한다. 그러나, 다른 공지된 박테리아성 프로모터가 적합하다. 박테리아성 시스템에서 사용하기 위한 프로모터는 또한 항체를 암호화한 DNA에 작동가능하게 연결된 샤인-달가르노 (S.D.) 서열을 함유할 것이다.

[0363] 프로모터 서열은 진핵생물에 대해 공지되었다. 사실상 모든 진핵생물 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30 염기 업스트림에 위치한 AT-풍부 영역을 갖는다. 많은 유전자의 전사의 시작으로부터 70 내지 80 염기 업스트림에서 발견되는 또 다른 서열은 N이 임의의 뉴클레오티드일 수 있는 CNCAAT 영역이다. 대부분의 진핵생물 유전자의 3' 말단에는 암호화 서열의 3' 말단에 폴리 A 꼬리의 부가를 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 있다. 모든 이들 서열은 진핵생물 발현 벡터에 적합하게 삽입된다.

[0364] 효모 숙주로 사용하기 위한 적합한 프로모터 서열은 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 당분해 효소, 예컨대 에놀라제, 글리세르알데하이드-3-포스페이트 탈수소효소, 헥소키나제, 피루베이트 탈탄산효소, 포스포프룩토키나제, 글루코오스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오포스페이트 이소머라제, 포스포글루코오스 이소머라제, 및 글루코키나제에 대한 프로모터를 포함한다.

[0365] 성장 조건에 의해 조절된 전사의 추가의 이점을 갖는 유도성 프로모터인 다른 효모 프로모터는 알코올 탈수소효소 2, 이소사이토크롬 C, 산 포스포타아제, 질소 대사와 관련된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데하이드-3-포스페이트 탈수소효소, 및 말토오스 및 갈락토오스 이용에 관여하는 효소에 대한 프로모터 영역이다. 효모 발현에서 사용하기 위한 적합한 벡터 및 프로모터는 EP 73,657에 추가로 기재된다. 효모 인헨서는 유리하게는 효모 프로모터와 함께 또한 사용된다.

[0366] 포유동물 숙주세포 내 벡터로부터 항체 전사는, 그러한 프로모터가 숙주 세포 시스템과 양립할 수 있다면, 예를 들면, 바이러스 예컨대 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스 (예컨대 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, 간염-B 바이러스, 유인원 바이러스 40 (SV40)의 계놈으로부터 수득된 프로모터에 의해, 또는 이중성 포유동물 프로모터, 예를 들면, 액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터, 열-충격 프로모터로부터 조절될 수 있다.

[0367] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스 복제 기점을 또한 함유하는 SV40 제약 단편으로서 편리하게 수득된다. 인간 사이토메갈로바이러스의 즉각적인 초기 프로모터는 HindIII E 제약 단편으로서 편리하게 수득된다. 벡터로서의 소 과필로마 바이러스를 사용한 포유동물 숙주 내 DNA를 발현하기 위한 시스템이 하기에 개시된다: 미국 특허 번호 4,419,446. 이러한 시스템에 대한 변형이 하기에 기술된다: 미국 특허 번호 4,601,978. 또한 참고: Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) (단순 포진 바이러스 유래의 티미딘 키나아제 프로모터의 조절 하에서의 마우스 세포 내 인간 β -인터페론 cDNA의 발현 상에서의). 대안적으로, 루 육종 바이러스 장 말단 반복이 프로모터로서 사용될 수 있다.

[0368] 인헨서 구성요소 성분

[0369] 고등 진핵생물에 의한 본 발명의 항체를 암호화하는 DNA의 전사는 종종 벡터에 인헨서 서열을 삽입함으로써 증가된다. 많은 인헨서 서열이 현재 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α -태아단백, 및 인슐린)로부터 공지되어 저 있다. 전형적으로, 그러나, 진핵생물 세포 바이러스로부터 인헨서를 사용할 것이다. 예는 복제 기원 (bp 100-270)의 후기 쪽 상의 SV40 인헨서, 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 복제 기원의 후기 쪽 상의 폴리오마 인헨서, 및 아데노바이러스 인헨서를 포함한다. 또한 진핵생물 프로모터의 활성화를 향상시키는 요소에 대해 문헌 [Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982)]을 참조한다. 인헨서는 항체 암호화 서열에 대해 위치 5' 또는 3'에서 벡터로 스플라이싱될 수 있지만, 그러나 바람직하게는 프로모터로부터 부위 5'에 위치한다.

[0370] 전사 종결 성분

- [0371] 진핵생물 숙주 세포 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다중세포 유기체로부터의 유핵 세포)에 사용되는 발현 벡터는 또한 전사의 종료 및 mRNA를 안정화하는데 필요한 서열을 함유할 것이다. 이러한 서열은 진핵 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5'의, 그리고 경우에 따라 3'의 미번역된 영역으로부터 통상적으로 이용가능하다. 이들 영역은 항체를 암호화하는 mRNA의 미번역된 부분에 폴리아데닐레이트화된 단편으로 전사된 뉴클레오타이드 절편을 함유한다. 일 유용한 전사 종료 성분은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다. 하기를 참고한다: W094/11026 및 상기에 개시된 발현 벡터.
- [0372] **숙주 세포의 선택 및 변형**
- [0373] 본 명세서에서 벡터에 DNA를 클로닝 또는 발현하기에 적합한 숙주세포는 상기에 기재된 원핵생물, 효모, 또는 고등 진핵생물 세포이다. 이러한 목적을 위하여 적합한 원핵생물은 진정박테리아, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어, *엔테로박테리아세에 예컨대 에스케리치아*, 예를 들면, *이. 콜라이*, *엔테로박터*, *어위니아*, *클렙시엘라*, *프로테우스*, *살모넬라*, 예를 들면, *살모넬라 타이피리움*, *세라티아*, 예를 들면, *세라티아 마르체칸스*, 및 *시겔라*, 뿐만 아니라 바실러스 예컨대 *B. 서브틸리스* 및 *B. 리케니포르미스* (예를 들면, 1989년 4월 12일 공개된 DD 266,710에 개시된 *B. 리케니포르미스 41P*), *슈도모나스* 예컨대 *P. 에어루기노사*, 및 *스트렙토마이세스*를 포함한다. 일 바람직한 *이.콜라이* 클로닝 숙주는 *이.콜라이* 294 (ATCC 31,446)이며, 한편 기타 균주 예컨대 *이.콜라이 B*, *이.콜라이 X1776* (ATCC 31,537), 및 *이.콜라이 W3110* (ATCC 27,325)가 적합하다. 이러한 예시는 제한적이라기보다 예시적이다.
- [0374] 특히 글리코실화 및 Fc 효과기 기능이 필요없는 경우, 예컨대 치료적 항체가 종양 세포 파괴에서 그 자체로 유효성을 보이는 세포독성제 (예를 들면, 독소)에 콘주게이트된 경우, 전장 항체, 항체 융합 단백질, 및 항체 단편은 박테리아에서 생산될 수 있다. 전장 항체는 순환에서 더 큰 반감기를 갖는다. *이. 콜라이*에서 생산은 더 빠르고 더욱 비용 효율적이다. 박테리아에서 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현을 위해, 다음 문헌을 참조한다: 예를 들어, 미국 특허 번호 5,648,237 (Carter et. al.), 미국 특허 번호 5,789,199 (Joly et al.), 미국 특허 번호 5,840,523 (Simmons et al.) (발현 및 분비 최적화를 위한 번역 개시 영역 (TIR) 및 신호 서열을 기술함). 또한 참고: Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254 (*이. 콜라이* 내 항체 단편의 발현을 기술함). 발현 후, 상기 항체는 *이. 콜라이* 세포 페이스트로부터 분리될 수 있고, 예를 들면, 이소형에 의존한 단백질 A 또는 G 결합을 통해 정제될 수 있다. 최종 정제는 예를 들면, CHO 세포에서 발현된 항체의 정제 방법과 유사하게 수행될 수 있다.
- [0375] 원핵생물 이외에, 진핵 미생물 예컨대 섬사상 진균 또는 효모가 항체-암호화 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. *사카로마이세스 세레비시아에*(*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 보통의 빵 효모(baker's yeast)가 하등 진핵 숙주 미생물 중에서 가장 통상적으로 사용된다. 그러나, 수많은 다른 속, 종 및 균주, 예컨대 *쉬조사카로마이세스 폼베*(*Schizosaccharomyces pombe*); *클루이베로마이세스*(*Kluyveromyces*) 숙주, 예를 들면, *케이. 락티스*(*K. lactis*), *케이. 프라질리스*(*K. fragilis*) (ATCC 12,424), *케이. 불가리쿠스*(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045), *케이. 위케라미이*(*K. wickeramii*) (ATCC 24,178), *케이. 왈티이*(*K. waltii*) (ATCC 56,500), *케이. 드로소필라룸*(*K. drosophilum*) (ATCC 36,906), *케이. 테르모톨레란스*(*K. thermotolerans*), 및 *케이. 막시아누스*(*K. marxianus*); *야로위아*(*Yarrowia*) (EP 402,226); *피치아 파스토리스*(*Pichia pastoris*) (EP 183,070); *칸디다*(*Candida*); *트리초테르마 레에시아*(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234); *뉴로스포라 크라사*(*Neurospora crassa*); *스와니오마이세스*(*Schwanniomyces*) 예컨대 *스와니오마이세스 오시덴탈리스*(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 섬사상 진균, 예컨대, 예를 들어 *뉴로스포라*(*Neurospora*), *펜시실리움*(*Penicillium*), *톨리포클라디움*(*Tolypocladium*), 및 *아스페르길루스*(*Aspergillus*) 숙주, 예컨대 *에이. 니둘란스*(*A. nidulans*) 및 *에이. 니게르*(*A. niger*)와 같은 수많은 다른 속, 종, 및 균주가 본 명세서에서 통상적으로 이용가능하고 그리고 유용하다. 치료 단백질의 생산을 위한 효모 및 섬사상 진균의 사용을 논의하는 검토를 위해, 예를 들면, 하기를 참고한다: Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004).
- [0376] 당화 경로가 "인간화"되어 부분적 또는 완전 인간 글리코실화 패턴을 갖는 항체의 생산을 초래하는 어떤 진균 및 효모 균주가 선택될 수 있다. 참고: 예를 들면, Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006) (*피치아 파스토리스*에서 글리코실화 경로의 인간화를 기재함); 및 상기 Gerngross et al..
- [0377] 글리코실화된 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다중세포 유기체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유도된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 수많은 바칼로바이러스 균주 및 변이체, 및 숙주 예컨대 *스포도프테라 프루지페르다*(*Spodoptera frugiperda*) (유충), *아에테스 아에집티*(*Aedes aegypti*) (모기), *아에테스 알보픽투스*(*Aedes albopictus*) (모기), *드로소필라 멜라노가스테르*(*Drosophila melanogaster*)

(초파리), 및 *봄박스 모리(Bombyx mori)* 유래의 상용 허용되는 곤충 숙주 세포가 확인되었다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주, 예를 들면, *오토그라파 칼리포르니카(Autographa californica)* NPV의 L-1 변이체 및 *봄박스 모리* NPV의 Bm-5 균주가 공공연하게 이용가능하며, 그와 같은 바이러스는, 특히 *스포도프테라 프루지페르* 다 세포의 형질감염을 위한 본 발명에 따르는 바이러스로서 본원에 사용될 수 있다.

[0378] 면, 옥수수, 감자, 대두, 피튜니아, 토마토, 잠개구리밥(duckweed) (*Leninaceae*), 알팔파 (*M. truncatula*) 및 담배의 식물 세포 배양물이 또한 숙주로서 이용될 수 있다. 참고: 예를 들면, 미국 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, 및 6,417,429 (형질전환 식물에서 항체 생산용 PLANTIBODIES™ 기술 기재).

[0379] 척추동물 세포가 숙주로서 사용될 수 있고, 배양 (조직 배양)시 척추동물 세포의 증식은 일상적인 절차가 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 하기이다: SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651)에 의해 변형된 원숭이 신장 CV1 세포주; 인간 배아 신장 세포주 (예를 들면, 293개 세포 또는 현탁 배양물 내 성장을 위하여 하위-클로닝된 293개 세포, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); 베이비 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 마우스 세르틀리 세포 (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 그린 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 랫트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방암 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간세포암 세포주 (Hep G2). 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포를 포함하고, 이는 DHFR⁻ CHO 세포 (참고: Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))를 포함하는 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포; 및 골수종 세포주 예컨대 Y0, NS0 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해, 예를 들면, 하기를 참조한다: Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 255-268.

[0380] 숙주 세포는 항체 생산을 위한 상기 기술된 발현 또는 클로닝 벡터로 변형되고, 프로모터를 유도하거나, 변형체를 선택하거나, 또는 원하는 서열을 암호화하는 유전자를 증폭하는데 적절한 것으로서 변형된 기존 영양 배지 내에서 배양된다.

[0381] **숙주 세포 배양**

[0382] 본 발명의 항체를 생산하기 위해 사용된 숙주세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 이용가능한 배지 예컨대 Ham's F10 (Sigma), 최소 필수 배지 ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), 및 돌베코 변형된 이글 배지 ((DMEM), 시그마)가 숙주세포를 배양하는데 적합하다. 또한, 임의의 배지가 하기에 기술되며: Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985는 숙주 세포를 위한 배양 배지로서 사용될 수 있다. 이러한 배지 중 임의의 것은 필요하다면 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대 나트륨, 클로라이드, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대 HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항체 (예컨대 GENTAMYCIN™ 약물), 미량 원소 (마이크로몰 범위의 최종 농도로 통상적으로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 및 글루코스 또는 상응하는 에너지 공급원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필수적인 보충물을 또한 당해기술의 숙련자에게 공지된 적절한 농도로 포함할 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 조건이며, 숙련자에게 분명할 것이다.

[0383] **항체의 정제**

[0384] 제조합 기술을 이용하는 경우, 항체는 세포 내에서 생산되거나, 원형질막 주위 공간에서 생산되거나 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생산되는 경우, 제1 단계로서, 숙주 세포 또는 용해된 단편인 특정한 파편은, 예를 들면, 원심분리 또는 초미세여과에 의해 제거된다. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)은 *이. 콜라이*의 원형질막 주위 공간에 분비되는 항체를 단리하기 위한 절차를 기재한다. 간략히, 세포 폐효모를 나트륨 아세테이트 (pH 3.5), EDTA, 및 페닐메틸설포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재 하에 약 30분에 걸쳐서 해동시킨다. 세포 파편을 원심분리로 제거할 수 있다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우, 그와 같은 발현계로부터의 상청액은 일반적으로 우선 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들면, 아미콘 (Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 초미세여과 유닛을 사용하여 농축된다. 프로테아제 억제제, 예컨대 PMSF가 단백질분해를 억제하기 위해 임의의 전술된 단계에 포함될 수 있고, 항생제가 우발적인

오염물질의 성장을 예방하기 위해 포함될 수 있다.

[0385] 세포로부터 제조된 항체 조성물은, 예를 들면, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피(hydroxylapatite chromatography), 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있으며, 친화도 크로마토그래피가 전형적으로 바람직한 정제 단계 중 하나이다. 친화성 리간드로서 단백질 A의 적합성은 항체에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소형에 의존적이다. 단백질 A는 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$, 또는 $\gamma 4$ 중쇄에 기반하는 항체를 정제하기 위해 사용될 수 있다(Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 $\gamma 3$ 에 대해 권장된다(Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 매우 종종 아가로스이지만, 다른 매트릭스가 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 조절된 기공 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스로 달성될 수 있는 것보다 더 빠른 유속 및 더 짧은 가공 시간을 허용한다. 항체가 C_H3 도메인을 포함한 경우, Bakerbond ABXTM 수지 (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.)는 정제에 유용하다. 단백질 정제를 위한 다른 기술 예컨대 이온-교환 컬럼 상의 분획화, 에탄올 침전법, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 상의 SEPHAROSETM 크로마토그래피 (예컨대 폴리아스파르트산 컬럼), 크로마토포커싱(chromatofocusing), SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전법이 또한 회수되는 항체에 따라 이용가능하다.

[0386] 일반적으로, 상기-기재된 방법론과 일치하고/하거나 목적하는 특정 항체에 대해 당해기술의 숙련가에 의해 적절한 것으로 간주되는, 연구, 시험 및 임상에 사용하기 위한 항체를 제조하기 위한 다양한 방법론은 당해기술에 잘-확립되어 있다.

[0387] 생물학적 활성 항체의 선택

[0388] 상기에서 기재된 바와 같이 생산된 항체는 치료적 관점으로부터 유익한 특성을 갖는 항체를 선택하거나 또는 항체의 생물학적 활성을 보유하는 제형 및 조건을 선택하기 위해 하나 이상의 "생물학적 활성" 검정에 적용될 수 있다. 항체는 항원에 결합하는, 상승되는 이의 능력에 대해 시험될 수 있다. 예를 들어, 당해 분야에서 공지된 방법 (예컨대 ELISA, 웨스턴 블랏, 등)이 사용될 수 있다.

[0389] 예를 들어, 항-PDL1 항체에 대해, 항체의 항원 결합 특성은 PDL1에 결합하는 능력을 검출하는 검정에서 평가될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체의 결합은 예를 들면 포화 결합; ELISA; 및/또는 경쟁 검정 (예를 들면 RIA's)에 의해 측정될 수 있다. 또한 상기 항체는 예컨대, 치료로서 효과성을 평가하기 위해 기타 생물학적 활성 분석을 받을 수 있다. 이와 같은 분석은 당해기술에 알려져 있고 표적 항원 및 상기 항체에 대한 의도된 사용에 의존한다. 예를 들어, 항체에 의한 PD-L1 봉쇄의 생물학적 효과는, 예를 들면 US 특허 8,217,149에 기재된 바와 같이 CD8+T 세포, 림프구 맥락수막염 바이러스 (LCMV) 마우스 모델 및/또는 동계의 종양 모델에서 평가될 수 있다.

[0390] 관심 항원에 대한 특정한 에피토프에 결합하는 항체 (예를 들면, PD-L1에 대한 실예의 항-PDL1 항체의 결합을 차단하는 것)를 스크리닝하기 위해, 예컨대 문헌 [*Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 일상적인 교차-차단 검정이 수행될 수 있다. 대안적으로, 예를 들면 문헌 [Champe *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394 (1995)]에 기재된 바와 같은 에피토프 맵핑은 항체가 관심 에피토프를 결합하는지 여부에 대해 측정하기 위해 수행될 수 있다.

[0391] V. 약제학적 제형

[0392] 본 발명에 따라 사용된 항체의 치료적 제형은 원하는 정도의 순도를 갖는 항체를 선택적인 약제학적으로 허용가능한 캐리어, 부형제 또는 안정제와 혼합함으로써 보관을 위하여 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), 동결건조된 제형 또는 수용액 형태로 제조된다. 허용 가능한 담체, 부형제, 또는 안정화제는 이용된 투여량 및 농도에서 수형체에 비독성이며, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 주기로헥산을; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 폴리머, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당류, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 짝이온, 예컨대

나트륨; 금속 착물(예를 들면, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN™, PLURONICS™, 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 포함된다.

[0393] 피하 투여를 위해 채택된 동결건조된 제형은, 예를 들면 미국 특허 번호 6,267,958 (Andya *et al.*)에서 기재된다. 상기 동결건조된 제형은 높은 단백질 농도까지 적합한 희석제로 재구성될 수 있고 재구성된 제형은 본원에서 치료되는 포유동물에 피하로 투여될 수 있다.

[0394] 항체 또는 항체의 결정화된 형태가 또한 고려된다. 하기를 참고한다: 예를 들면, US 2002/0136719A1 (Shenoy *et al.*).

[0395] 본원의 제제는 또한 치료되는 특정 명시를 위해 필요한 것으로서 둘 이상의 활성 화합물(일부 구현예에서 서로에게 부작용을 일으키지 않는 보완적 활성을 갖는 것)을 함유할 수 있다. 예를 들면, 제형 내에 세포독성제; 화학치료제; 면역억제제; 사이토카인; 사이토카인 길항제 또는 항체; 성장 인자; 호르몬; 인테그린; 바이오젠 이펙/엘란 파마슈티칼스 인코포레이션으로부터 이용가능한 인테그린 길항제 또는 항체 (예를 들면 LFA-1 항체 예컨대 제넨텍(Genentech)으로부터 상업적으로 입수가 가능한 에팔리주맙/RAPTIVA, 또는 알파 4 인테그린 항체 예컨대 나탈리주맙/TYSABRI®); 인터페론 부류 약물 예컨대 IFN베타-1a (REBIF® 및 AVONEX®) 또는 IFN베타-1b (BETASERON®); 갈라티라머 아세테이트 같은 올리고펩티드 (COPAXONE®); 세포독성제 예컨대 미톡산트론 (NOVANTRONE®), 메토트렉세이트, 사이클로포스파마이드, 클로르암부실, 또는 아자티오프린; 정맥내 면역글로불린 (감마 글로불린); 림프구-고갈 약물 (예를 들면, 미톡산트론, 사이클로포스파마이드, 캄파쓰, 항-CD4, 또는 클라드리빈); 비-림프구 고갈 면역억제제 약물 (예를 들면, 마이코페놀레이트 모페틸 (MMF) 또는 사이클로스포린); "스타틴" 부류의 콜레스테롤저하 약물; 에스트라디올; 테스토스테론; 호르몬 대체 요법; MS (예를 들면, 경직, 실금, 통증, 피로)에 관련된 또는 2차 증상을 치료하는 약물; TNF 억제제; 질환-조절 항-류마티스성 약물 (DMARD); 비-스테로이드 항-염증성 약물 (NSAID); 코르티코스테로이드 (예를 들면 메틸프레드니솔론, 프레드니손, 텍사메타손, 또는 글루코르티코이드); 레보티록신; 사이클로스포린 A; 소마타스타틴 유사체; 사이토카인 길항제; 항-대사물; 면역억제제; 인테그린 길항제 또는 항체 (예를 들면 LFA-1 항체, 예컨대 에팔리주맙 또는 알파 4 인테그린 항체 예컨대 나탈리주맙); 또는 또 다른 B-세포 표면 길항제/항체 등을 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 기타 제제의 유형 및 유효량은, 예를 들어, 제제 내 존재하는 항체의 양, 치료되는 다발성 경화증의 유형, 및 환자의 임상적 파라미터에 의존한다. 이들은 일반적으로 본원에 앞서 사용된 것과 동일한 투여량 및 투여 경로로 사용되거나 또는 지금까지 사용된 용량의 약 1 내지 99%로 사용된다.

[0396] 활성 성분은 또한, 예를 들어, 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타실레이트) 마이크로캡슐, 각각에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로구형체, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐)에 또는 매크로에멀전에 포집될 수 있다. 상기 기술은 하기에서 개시되어 있다: Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

[0397] 지속-방출 제제가 제조될 수 있다. 서방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투성 매트릭스를 포함하며, 당해 매트릭스는 성형품, 예컨대, 필름, 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 지속-방출 매트릭스의 예는 하기를 포함한다: 폴리에스테르, 하이드로겔 (예를 들면, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락타이드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산과 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락탄-글리콜산 공중합체, 예를 들어, LUPRON DEPOT™ (락탄-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능한 미소구), 및 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산을 포함한다.

[0398] 생체내 투여를 위해 사용될 제형은 멸균되어야 한다. 이는 멸균된 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.

[0399] VI. 투여

[0400] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 하기로 투여된다: 정맥내로, 근육내로, 피하로, 국소로, 경구로, 경피로, 복강내로, 안와내로, 이식에 의하여, 흡입으로, 척추강내로, 심실내로, 또는 비강내로. 유효량의 항-PD-L1 항체는 질환의 예방 또는 치료를 위해 투여될 수 있다. 적절한 투여량의 항-PD-L1 항체는 치료되는 질환의 유형, 항-PD-L1 항체의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 개체의 임상 조건, 치료에 대한 개체의 임상 이력 및 반응 및 주치의의 재량에 기반하여 결정될 수 있다.

- [0401] 일반적인 경우에서, 인간에게 투여된 항체의 치료적 유효량은, 1회 이상의 투여에 의해 환자 체중당 약 0.01 내지 약 50 mg/kg의 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, 사용된 항체는, 예를 들어, 매일 하기로 투여된다: 약 0.01 내지 약 45 mg/kg, 약 0.01 내지 약 40 mg/kg, 약 0.01 내지 약 35 mg/kg, 약 0.01 내지 약 30 mg/kg, 약 0.01 내지 약 25 mg/kg, 약 0.01 내지 약 20 mg/kg, 약 0.01 내지 약 15 mg/kg, 약 0.01 내지 약 10 mg/kg, 약 0.01 내지 약 5 mg/kg, 또는 약 0.01 내지 약 1 mg/kg. 일부 구현예에서, 항체는 15 mg/kg 로 투여된다. 그러나, 다른 투약량 레지멘이 유용할 수 있다. 일 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 항-PDL1 항체는 21-일 주기의 1일에 약 100mg, 약 200mg, 약 300mg, 약 400mg, 약 500mg, 약 600mg, 약 700mg, 약 800mg, 약 900mg, 약 1000mg, 약 1100mg, 약 1200mg, 약 1300mg 또는 약 1400mg의 용량으로 인간에게 투여된다. 용량은 단위 용량 또는 다중 용량(예를 들면, 2 또는 3회 용량)으로, 예컨대 주입(infusion)으로 투여될 수 있다. 병용 치료 중 투여된 항체의 투여는, 단일 치료와 비교하여, 감소될 수 있다. 이 치료법의 과정은 통상적인 기술에 의해 용이하게 관찰된다.
- [0402] 일부 구현예에서, 본 방법은 추가의 요법을 더 포함할 수 있다. 본 추가의 요법은 방사선 요법, 수술 (예컨대, 종괴절제술 및 유방절제술), 화학요법, 유전자 요법, DNA 요법, 바이러스 요법, RNA 요법, 면역요법, 골수 이식, 나노요법, 단클론성 항체 요법, 또는 전술한 것의 조합일 수 있다. 추가 요법은 아쥬반트 또는 네오아쥬반트(neoadjuvant) 요법의 형태일 수 있다. 일부 구현예에서, 본 추가의 요법은 소분자 효소 억제제 또는 항-전 이성 제제의 투여이다. 일부 구현예에서, 추가의 요법은 부작용 제한 제제 (예컨대, 치료 부작용의 발생 및/또는 중증도를 경감하도록 의도된 제제, 예컨대 항-어지럼증 제제 등)의 투여이다. 일부 구현예에서, 추가의 요법은 방사선 요법이다. 일부 구현예에서, 추가의 요법은 수술이다. 일부 구현예에서, 본 추가의 요법은 방사선 요법 및 수술의 조합이다. 일부 구현예에서, 본 추가의 요법은 감마 조사이다. 일부 구현예에서, 추가의 요법은 PI3K/AKT/mTOR 경로, HSP90 억제제, 튜블린 억제제, 세포자멸사 억제제, 및/또는 화학예방적 제제를 표적한 요법이다. 추가의 요법은 본원에 기술된 하나 이상의 화학치료제일 수 있다.
- [0403] **병용 요법**
- [0404] 특정 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 또 다른 항암제 또는 암 치료제와 병용하여 투여된다. "~와 결합하여" 는 기타 치료 양식에 더하여 일 치료 양식을 투여하는 것을 지칭한다. 이와 같이, "이와 연계하여" 는 다른 치료 양상의 개체로의 투여 전, 투여 동안에 (예컨대 겹침하여 또는 동시에) 또는 투여 후 하나의 치료 양상의 투여를 지칭한다.
- [0405] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 화학요법 또는 화학치료제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 방사선 요법 또는 방사성치료제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 표적화 요법 또는 표적화 치료제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 면역요법 또는 면역치료제, 예를 들어 단클론성 항체와 결합되어 투여될 수 있다.
- [0406] 이론에 구속됨이 없이, 활성화 공-자극성 분자를 촉진시킴에 의하여, 또는 음성 공-자극성 분자를 억제함에 의하여 T 세포 자극을 증진시키는 것은, 종양 세포사를 촉진하여 이로써 암을 치료하거나 이의 진행을 지연시킬 수 있다는 것이 고려된다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 활성화 공통자극 분자에 대해 지향된 효능제와 조합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 활성화 공통자극 분자는 CD40, CD226, CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, HVEM, 또는 CD127을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 활성화 공통자극 분자에 대해 지향된 효능제는 CD40, CD226, CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, HVEM, 또는 CD127에 결합하는 효능제 항체이다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 억제성 공-자극 분자에 대해 지향된 길항제와 조합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 억제 공통자극 분자는 CTLA-4 (CD152로도 공지됨), PD-1, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, B7-H3, B7-H4, IDO, TIGIT, MICA/B, 또는 아르기나제를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 억제성 공통자극 분자에 대해 지향된 길항제는 CTLA-4, PD-1, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3, B7-H3, B7-H4, IDO, TIGIT, MICA/B, 또는 아르기나제에 결합하는 길항제 항체이다.
- [0407] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 (또한 CD152로서 공지된) CTLA-4, 예를 들면, 차단 항체로 지향된 길항제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 이필리무맙 (또한 MDX-010, MDX-101, 또는 Yervoy®로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 트레멜리무맙 (또한 티실리무맙 또는 CP-675,206으로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 (또한 CD276로서 공지된) B7-H3, 예를 들면, 차단 항체로 지향된 길항제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 MGA271과 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 TGF 베타에 대해 지시된 길항제, 예컨대, 메텔리무맙 (또한 CAT-192로 공지됨), 프레솔리무맙 (또한 GC1008로도 공지됨), 또는 LY2157299과 결합하여 투여

될 수 있다.

- [0408] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 T 세포 (예컨대, 세포독성 T 세포 또는 CTL)의 입양성 전이를 포함하는 치료와 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 우성-음성 TGF 베타 수용체, 예컨대, 우성-음성 TGF 베타 유형 II 수용체를 포함하는 T 세포 (예컨대, 세포독성 T 세포 또는 CTL)의 입양성 전이를 포함하는 치료와 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 HERCREEM 프로토콜 (참고: 예컨대, ClinicalTrials.gov 식별자 NCT00889954)를 포함하는 치료와 결합하여 투여될 수 있다.
- [0409] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 (또한 TNFRSF9, 4-1BB, 또는 ILA로서 공지된) CD137, 예를 들면, 활성화 항체로 지향된 효능제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 우렐리맵 (또한 BMS-663513으로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 CD40, 예를 들면, 활성화 항체로 지향된 효능제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 CP-870893과 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 (또한 CD134로서 공지된) OX40, 예를 들면, 활성화 항체로 지향된 효능제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 항-OX40 항체 (예컨대, AgonOX)와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 CD27, 예를 들면, 활성화 항체로 지향된 효능제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 CDX-1127과 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 인돌아민-2,3-산소화효소 (IDO)로 지향된 길항제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, IDO 길항제는 1-메틸-D-트립토판 (또한 1-D-MT로 공지됨)이다.
- [0410] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 항체-약물 콘주게이트와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체-약물 콘주게이트는 메르탄신 또는 모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE)을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 항-NaPi2b 항체-MMAE 콘주게이트 (또한 DNIB0600A 또는 RG7599로 공지됨)와 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 트라스투주맙 엠탄신 (또한 T-DM1로 공지됨, 아도-트라스투주맙 엠탄신, 또는 KADCYLA®, Genentech)와 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 DMUC5754A와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 엔도텔린 B 수용체 (EDNBR), 예컨대 MMAE와 콘주게이트된 EDNBR에 대해 지향된 항체를 표적화하는 항체-약물 콘주게이트와 함께 투여될 수 있다.
- [0411] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 혈관형성 억제제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 VEGF, 예컨대, VEGF-A에 대해 지향된 항체와 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 베바시주맙 (또한 AVASTIN®로 공지됨, Genentech)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 안지오프로틴 2 (또한 Ang2로서 공지됨)로 지향된 항체와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 MEDI3617와 함께 투여될 수 있다.
- [0412] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 항신생물성 제제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 CSF-1R (또한 M-CSFR 또는 CD115로 공지됨)을 표적화하는 제제와 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 항-CSF-1R (또한 IMC-CS4로서 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 인터페론, 예를 들어 인터페론 알파 또는 인터페론 감마와 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 로페론-A (또한 재조합 인터페론 알파-2a로서 공지됨)와 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 GM-CSF (또한 재조합 인간 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자, rhu GM-CSF, 사르그라모스틴, 또는 Leukine®로 공지됨)와 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 IL-2 (또한 알데스류킨 또는 Proleukin®로서 공지됨)와 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 IL-12와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 CD20를 표적화하는 항체와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, CD20를 표적화하는 항체는 오비누투주맙 (또한 GA101 또는 Gazyva®로 공지됨) 또는 리툽시맙이다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 항체 표적화 GITR와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체 표적 GITR은 TRX518이다.
- [0413] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 암 백신과 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 암 백신은, 일부 구현예에서 개인화된 펩티드 백신인, 펩티드 암 백신을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서 펩티드 암 백신은, 다가의 긴 펩티드, 다중-펩티드, 펩티드 콕테일, 혼성 펩티드, 또는 펩티드-펄스(peptide-pulsed) 수지상 세포 백신 (참고: 예컨대, Yamada et al., Cancer Sci, 104:14-21, 2013). 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 아주반트와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 TLR 효능제, 예컨대, Poly-ICLC (또한 Hiltonol®로 공지됨), LPS, MPL, 또는 CpG ODN을 포함한 치료와 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 종양 괴사 인자 (TNF) 알파와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 IL-1과 함께 투여될

수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 HMGB1과 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 IL-10 길항제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 IL-4 길항제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 IL-13 길항제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 HVEM 길항제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 ICOS 효능제와 결합하여, 예컨대, ICOS-L, 또는 ICOS에 대해 지향된 길항제성 항체의 투여에 의하여, 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 CX3CL1를 표적화하는 치료와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 CXCL9를 표적화하는 치료와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 CXCL10을 표적화하는 치료와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 CCL5를 표적화하는 치료와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 ILFA-1 또는 ICAM1 효능제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 셀렉틴 효능제와 함께 투여될 수 있다.

[0414] 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 표적화 요법과 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 B-Raf의 억제제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 베무라페닙 (또한 Zelboraf®로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 다브라페닙 (또한 Tafinlar®로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 엘로티닙 (또한 Tarceva®로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 MEK 억제제, 예컨대 MEK1 (또한 MAP2K1로 공지됨) 또는 MEK2 (또한 MAP2K2로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 코비메티닙 (또한 GDC-0973 또는 XL-518로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 트라메티닙 (또한 Mekinist®로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 K-Ras의 억제제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 c-Met의 억제제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 오나투주맙 (또한 MetMab로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 A1k의 억제제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 AF802 (또한 CH5424802 또는 알렉티닙으로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 포스포티딜이노시톨 3-키나아제 (PI3K)의 억제제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 BKM120과 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 이델라리십 (또한 GS-1101 또는 CAL-101로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 페리포신 (또한 KRX-0401로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 Akt의 억제제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 MK2206과 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 GSK690693과 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 GDC-0941과 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 mTOR의 억제제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 시롤리무스 (또한 라파마이신으로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 템시롤리무스 (또한 CCI-779 또는 Torisel®로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 에베롤리무스 (또한 RAD001로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 리다포롤리무스 (또한 AP-23573, MK-8669, 또는 테포롤리무스로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 OSI-027과 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 AZD8055와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 INK128과 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 이중 PI3K/mTOR 억제제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 XL765와 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 GDC-0980과 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 BEZ235 (또한 NVP-BEZ235로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 BGT226과 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 GSK2126458과 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 PF-04691502과 함께 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체는 PF-05212384 (또한 PKI-587로 공지됨)과 결합하여 투여될 수 있다.

[0415] VII. 키트 및 제조 물품

[0416] 본 발명은 더욱이 본 명세서에서 기재된 방법에 따른 암의 치료에 유용한 물질을 함유하는 키트 및 제조 물품을 추가로 제공한다.

[0417] 일부 구현예에서, 본 발명은 함께 포장된, 표지 및 항-PD-L1 항체 (또는 이의 항원 결합 단편) 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 포함하는, 제조품을 제공하며, 이는 항-PD-L1 항체 (또는 이의 항원 결합 단편) 또는 약제학적 조성물이, 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플 내 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 암을 갖는 대상체를 치료하기 위하여 표지되는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 제조물품은 추가로, 대상체

유래의 암 세포를 함유하는 샘플 내 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 메틸화 수준을 갖는 암을 갖는 대상체에 항-PD-L1 항체 (또는 이의 항원 결합 단편) 또는 억제학적 조성물을 투여하기 위한 설명서를 포함한다.

[0418] 일부 구현예에서, 본 발명은 함께 포장된, 표지 및 항-PD-L1 항체 (또는 이의 항원 결합 단편) 및 억제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 억제학적 조성물을 포함하는, 제조품을 제공하며, 이는 항-PD-L1 항체 (또는 이의 항원 결합 단편) 또는 억제학적 조성물의 투여가, 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플 내 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 환자를 기준으로 한다는 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 제조물품은 추가로, 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플 내 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 메틸화 수준을 갖는 암을 갖는 대상체에 항-PD-L1 항체 (또는 이의 항원 결합 단편) 또는 억제학적 조성물을 투여하기 위한 설명서를 포함한다.

[0419] 일부 구현예에서, 본 발명은 함께 포장된, 표지 및 항-PD-L1 항체 (또는 이의 항원 결합 단편) 및 억제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 억제학적 조성물을 포함하는, 제조품을 제공하며, 이는 항-PD-L1 항체 (또는 이의 항원 결합 단편) 또는 억제학적 조성물이 선택된 환자에게 투여되고, 상기 대상체는 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플 내 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 것으로 발견된 것을 나타낸다. 일부 구현예에서, 제조물품은 추가로, 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플 내 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 메틸화 수준을 갖는 암을 갖는 대상체에 항-PD-L1 항체 (또는 이의 항원 결합 단편 이의) 또는 억제학적 조성물을 투여하기 위한 설명서를 포함한다.

[0420] 일부 구현예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 키트를 제공한다: 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 메틸화를 측정하기 위한 시약, 및 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 메틸화 수준을 갖는 것으로 상기 대상체를 분류하기 위한 설명서. 특정 구현예에서, 대상체가 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고/또는 낮은 메틸화 수준 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 메틸화 수준을 가질 경우, 키트는 추가로, 항-PD-L1 항체, 및 상기 대상체에 항-PD-L1 항체를 투여하기 위한 설명서를 포함한다.

[0421] 본원에 기술된 제조물품 또는 키트 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 상기 대상체는 상기 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 상기 PD-L1 유전자의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의, 그리고 상기 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 중간 또는 낮은 수준의 메틸화를 갖는 것으로 발견된다.

[0422] 본원에 기술된 제조물품 또는 키트 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 상기 표지는, PD-L1의 인트론 1 내 하나 이상 CpG 부위에서의, 또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 메틸화 정도가 중아황산염 DNA 서열분석에 의하여 측정되는 것을 나타내며, 본원에 기술된 제조물품 또는 키트 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 상기 표지는, PD-L1의 인트론 1 내 하나 이상 CpG 부위에서의, 또는 PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서의 메틸화 정도가 중아황산염 차세대 서열분석에 의하여 측정되는 것을 나타낸다. 본원에 기술된 제조물품 또는 키트 중 임의의 것의 일부 구현예에서, PD-L1 프로모터 영역 내 CpG1에서 또는 PD-L1의 인트론 1 내 하나 이상의 CpG 부위에서의 메틸화 정도가 메틸화 칩 배열, 예컨대 INFINIUM® 인간메틸화450 비드칩 배열을 사용하여 측정된다.

[0423] 일부 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 키트 또는 제조 물품은 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플에서 면역 세포 침윤을 검출하기 위한 시약을 포함한다.

[0424] 일부 구현예에서 시약은 하기 중 하나 이상을 포함한다: 항-CD16 항체, 항-CD4 항체, 항-CD3 항체, 항-CD56 항체, 항-CD45 항체, 항-CD68 항체, 항-CD20 항체, 항-CD163 항체, 또는 항-CD8 항체. 일부 구현예에서, 시약은 항-CD8 리간드 항체이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 키트 또는 제조물품은 추가로, 대상체 유래의 암 세포를 함유하는 샘플 내 면역 세포 침윤을 검출하기 위하여 면역조직화학 검정 (비제한적으로 하기를 포함: 웨스턴 블롯, ELISA, 또는 유동 세포측정)을 수행하기 위한 설명서를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에서 제공된 키트 또는 제조 물품은, 비제한적으로 정량적 PCR (qPCR), qRT-PCR, 전사체 프로파일링 (예컨대 RNAseq), 마이크로배열 분석, 차세대 서열분석, 등을 포함하는 유전자 발현 분석 검정을 수행하기 위한 설명서를 추가로 포함한다.

[0425] 본 명세서에서 제공된 임의의 키트 또는 제조 물품의 일부 구현예에서, 상기 암은 이들 암의 전이성 형태를 포

함하는, 유방암, 폐암, 또는 피부암이다. 특정 구현예에서, 유방암은 유방 암종이다. 일부 구현예에서, 폐암은 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종, 또는 폐의 편평상피 세포 암종이다. 특정 구현예에서, 피부암은 흑색종, 표제 확산 흑색종, 악성 흑색점 흑색종, 말단 흑색점 흑색종, 결절성 흑색종, 또는 피부 암종이다.

[0426] 임의의 키트 또는 제조 물품의 일부 구현예에서, 키트 또는 제조물품 내 포함된 항-PD-L1 항체 (또는 이의 항원 결합 단편)은 본원에 기술된 항-PD-L1 항체(anitibody)이다. 임의의 키트 또는 제조 물품의 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체 (또는 그것의 항원 결합 단편)은 YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105, 및 MEDI4736으로 구성된 군으로부터 선택된다. 본 명세서에 제공된 제조 물품에 포함될 수 있거나 또는 본 명세서에 제공된 제조 물품 또는 키트에 포함될 수 있는 다른 예시적인 항-PD-L1 항체 (또는 이들의 항원 결합 단편)는 WO 2010/077634, WO 2007/005874, WO 2011/066389, 및 US 2013/034559에 기재되고, 이들 각각은 그 전문이 참고로 본 명세서에 편입된다.

[0427] 키트 또는 제조물품은 용기 및 용기상에 또는 이와 관련하여 표지 또는 패키지 삽입물을 포함한다. 적절한 용기에는 예로서, 병, 바이알, 주사기 등이 포함된다. 상기 용기는 다양한 재료, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다. 상기 용기는 암을 치료하는데 유효한 항-PD-L1 항체 (또는 이의 항원 결합 단편) 또는 약제학적 조성물을 보유 또는 함유하며, 멸균 접근 포트를 가질 수도 있다(예를 들어, 상기 용기는 정맥내 용액 백 또는 피하 주사바늘로 뚫을 수 있는 마개가 있는 바이알일 수 있다). 상기 조성물 내 적어도 하나의 활성제는 항-PD-L1 항체이다

[0428] 표지 또는 포장 삽입물은 제공되는 항체 및 임의의 다른 약물의 투여 양 및 간격에 관한 구체적인 설명서에 따라 이로부터 고통받는 환자에서의 암을 치료하기 위해 본 조성물이 사용된다는 것을 나타낸다. 제조물품은 약제학적으로 허용가능한 희석 완충용액, 예컨대 정균처리한 주사용수(BWFI), 인산-완충용액 식염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 2차 용기를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제조물품은 상업적으로 그리고 사용자 입장에서 목적 기타 재료들, 예를 들면 기타 완충제, 희석제, 여과제, 니들 및 주사기를 추가로 포함할 수 있다.

[0429] 선택적으로, 본 명세서의 제조 물품은 치료를 위한 항체 이외의 제제를 포함하고 이러한 제제로 환자를 치료하는 설명서를 추가로 포함하는 용기를 추가로 포함하고, 이러한 제제는, 예를 들면, 화학치료제 (예컨대 본 명세서에서 다른 곳에 기재된 화학치료 제제), 세포독성제 (예컨대 본 명세서에서 다른 곳에 기재된 세포독성제), 등이다.

[0430] 본 발명의 추가의 세부사항은 하기 비-제한적인 예에 의해 예시된다. 본 명세서의 모든 인용의 개시내용은 본 명세서에 참고로 명확히 편입된다.

[0431] 실시예

[0432] 실시예는 본 발명의 순전히 예시적인 것으로, 따라서 본 발명을 어떤 식으로든 제한하는 것으로 간주되어서는 안되며, 또한 상기 검토된 본 발명의 구체적인 양태 및 구현예를 기술하는 것으로 의도된다. 전술한 실시예 및 상세한 기술은 예시하기 위한 것으로 제공되며, 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0433] 실시예 1: 재료 및 방법

[0434] 하기 재료 및 방법을 하기 실시예 2에서 사용했다.

[0435] 세포주 및 배양 조건

[0436] NSCLC 세포주는 미국 유형 세포 배양 (ATCC) 또는 학술 자료에서 조달되고 10% 우태 혈청 (FBS) 및 2mM L-글루타민이 보충된 RPMI 1640 배지에서 배양되었다. 세포는 PBS 세척 및 아큐타제 탈착 매질 (Sigma)로 배양 후에 분리 및/또는 실험적 분석을 위해 탈착되었다. 세포는 24시간 동안 0.1mM 트리코스타틴 A ("TSA", 시그마) 및/또는 1ng/mL 인터페론 감마 (IFN γ) 및 3일 qd (즉, 1일 1회) 또는 6일 q2d (즉, 하루걸러) 동안 1mM 5-아자시티딘-dC (5-아자(aza)-dC, 시그마)로 처리되었다.

[0437] 종양 샘플

[0438] NSCLC 환자로부터 기록 종양 시료는 더 MT 그룹, 큐어라인 인코포레이션, 캄가교 바이오소스, 트리스타 테크놀로지 그룹 LLC 또는 크린페스 어드바이서스로부터 IRB-승인된 판매인 수집물에서 입수되었다.

[0439] DNA/RNA 분석

[0440] 완충액 RLT 플러스 (Qiagen)가 AllPrep DNA/RNA 미니 키트 (Qiagen)를 사용하여 동일한 용해물로부터 RNA 및

DNA 추출을 위해 세포를 용해하기 위해 사용되었다. RNA 발현은 아수라젠 인코포레이션에 의한 GeneChip 인간 게놈 U133 플러스 2.0 배열 (Affymetrix) 상에 마이크로배열에 의해 그리고 TaqMan 유전자 발현 검정 (Life Technologies)을 사용한 qPCR에 의해 분석되었다. 데이터는 유전체학 스위트 (Partek), 스포파이어 (TIBCO), JMP (SAS), 및 IPA (Ingenuity)를 사용하여 분석되었다. DNA는 INFINIUM® 인간메틸화450 비드칩 (Illumina) 상에서 분석되었다. DNA는 Zymo DNA 금 메틸화 키트 (Zymo Research)를 사용하여 중아황산염-변형되었고 그리고 CD274 프로모터 영역을 표적화하는 중아황산염 특이적 서열분석 프라이머로 증폭되었다. PCR 생성물은 표준 방법 (ABI)을 사용하여 TA-서브클로닝되고 서열분석되었다. ABI 서열 파일은 BIQ 분석기 소프트웨어 (C. Bock)를 사용하여 분석하였다.

[0441] **단백질 분석**

[0442] 단백질 용해물은 세포 추출물 완충제 (Life Technologies)을 사용하여 생성되고, SigmaFAST 프로테아제 억제제 정제 (Sigma) 및 포스파타제 억제제 카테일 1 및 2 (Sigma)로 보강된다. 4°C에서 10분 동안 20,000 x g에서 원심분리된 용해물 및 상청액은 그런 다음 웨스턴 블랏 (WB)에 의한 분석을 위해 제거되었다. 샘플은 NuPage Novex LDS 및 SRA 완충제 (Life Technologies)으로 처리되고 그리고 SeeBlue Plus2 분자량 표준 (Life Technologies)과 함께 비스-트리스 겔 (Life Technologies) 상에 부하되었다. 겔은 iBlot 시스템 (Life Technologies)을 사용하여 니트로셀룰로오스 막으로 이동되었고 그리고 그 다음 실온에서 1시간 동안 오딧세이 블로킹 완충제 (LI-COR)으로 차단되었다. 겔은 인간 PD-L1 (in-house), β -액틴 (Sigma)에 대한 항체로 염색되었고; p/t STAT1, p-STAT3-Y705, p-STAT3-S727, 및 t-STAT3 (all Cell Signaling)은 오딧세이 블로킹 완충제 + 0.01% 트윈-20에서 희석되었다. 1차 항체는 오딧세이 블로킹 완충제 + 0.01% 트윈-20 + 0.001% SDS 내 LI-COR로부터 2차 항체로 검출되었고 그리고 오딧세이 CLx 시스템 (LI-COR) 상에서 분석되었다.

[0443] FACS 분석을 위해, 세포는 탈착되고 그런 다음 FBS 염색 완충제 (BD Biosciences)에서 2회 세정되었다. 세포는 그런 다음 PE-콘주게이트된 항-인간 PD-L1 또는 이소형 대조군 (BD Biosciences)로 염색되고 그리고 그 다음 세정되고 FACSCanto II 분석기 (BD Biosciences) 상에서 분석되었다.

[0444] 면역조직화학 (IHC) 분석은 하기에서 기재된 바와 같이 수행되었다: Herbst et al. (2014) *Nature* 515, 563-574.

[0445] **염색질 면역침강 (ChIP, 활성 모티프)**

[0446] NSCLC 세포주는 적절한 밀집도로 성장되었고, 처리된 세포는 15분 동안 1% 포름알데하이드로 고정되었고 그리고 0.125 M 글리신으로 퀀칭되었다. 염색질은 세포용해 완충제의 첨가 및 다운스 균질기로 파괴에 의해 단리되었다. 용해물은 초음파처리되고, 그리고 DNA는 300-500 bp의 평균 길이로 전단되었다. 게놈 DNA (유입)는 염색질의 분취액을 RNase, 프로테아제 K, 그리고 탈-가교결합을 위한 열로 처리함에 의해 제조되었다. 처리 후 그 다음 에탄올 침전되었다. 게놈 DNA의 펠렛이 재현탁되고, 수득한 DNA는 NanoDrop 분광측정기에서 정량화되었다. 최초 염색질 용적에 대한 외삽은 총 염색질 수율의 정량화를 가능하게 했다.

[0447] 분취량의 염색질 (30 μ g)이 단백질 A 아가로스 비드 (Invitrogen)로 미리-제거되었다. 대상의 게놈 DNA 영역은 STAT1 (Santa Cruz, cat # sc-345) 및 STAT3 (Santa Cruz, sc-482)에 대해 4 μ g 항체를 사용하여 단리되었다. 복합체가 세정되고, SDS 완충제로 비드로부터 용출되고 그리고 RNase 및 프로테아제 K 처리되어졌다. 65°C에서 밤새 인큐베이션에 의해 가교가 역전되고 염색질-면역 침전된 (ChIP) DNA가 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 정제되었다.

[0448] ChIP 농축의 품질은 후보 STAT1 및 STAT3 조절 부위에 대한 프라이머를 사용하여 qPCR에 의해 분석되었다. qPCR 반응은 SYBR 그린 슈퍼믹스 (Bio-Rad)를 사용하여 3중으로 수행되었다. 수득한 신호는 유입 DNA를 사용하여 각각의 프라이머 쌍에 대한 qPCR을 수행함에 의해 프라이머 효율에 대해 정규화되었다.

[0449] **ChIP 서열분석 (일루미나, 활성 모티프)**

[0450] 일루미나 서열분석 라이브러리가 말단-폴리싱, dA-첨가, 및 어댑터 결합의 표준 연속적인 효소 단계에 의해 ChIP 및 입력 DNA로부터 제조되었다. 최종 PCR 증폭 단계 후, 수득한 DNA 라이브러리가 정량화되고 그리고 HiSeq 2500 또는 NexSeq 500에서 서열분석되었다. 서열 (50 nt 판독, 단일 말단 또는 75 nt 판독, 단일 말단)은 BWA 알고리즘을 사용하여 인간 게놈 (hg19)에 정렬되었다. 정렬된 서열은 이들의 3'-말단에서 200 bp의 길이, 즉, 크기-선택된 라이브러리에서 평균 게놈 단편 길이로 인실리코로 각각 확장되었고 게놈을 따라 32-nt 빈에 할당되었다. 수득한 히스토그램 (게놈 "신호 맵")은 bigWig 파일에 저장되었다. 피크 위치는 p 값 = 1×10^{-7}

의 컷오프를 갖는 MACS 알고리즘 (v1.4.2.)을 사용하여 결정되었다. 신호 맵 및 피크 위치는 샘플 비교, 피크 매트릭스, 피크 위치 및 유전자 주석에 대한 상세한 정보를 함유하는 엑셀 표를 만드는 활성 모티프 전용 분석 프로그램에 유입 데이터로 사용되었다.

[0451] **중아황산염 차세대 서열분석 (중아황산염 NGS, 활성 모티프)**

[0452] ChIP-Seq에 의해 분석된 NSCLC 세포주는 또한 PD-L1 프로모터의 메틸화 상태에 대해 중아황산염 차세대 서열분석 (NGS)을 통해 분석되었다. 표적 영역에 대한 PCR 프라이머 (plus strand)가 MethPrimer 소프트웨어 (world-wide-web.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi)로 설계되었다. 프라이머는 중아황산염 전환된 게놈 DNA로부터 표적 영역을 증폭하기 위해 사용되었다. 6개 샘플의 각각에 대해, 대략 동등량의 9개 PCR 생성물이 풀링되고, 결합되고, 150-300 염기쌍의 평균 단편 길이로 초음파 처리되고, 표준 바코드된 일루미나 서열분석 라이브러리로 처리되었다. 일루미나 서열분석 라이브러리는 NextSeq 500에서 서열분석되었다. 서열분석 판독은 비스마크 정렬 프로그램 (v 0.7.7) (world-wide-web.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/bismark/)을 사용하여 분석되었다. 인간 chr6 및 chr9 (hg19 조립)가 참조 서열로 사용되었다. 비스마크 정렬 보고서는 "2674Genentech bismark reports.xlsx" 파일에 컴파일링되었다. 5.1 내지 7.4백만 판독이 샘플당 분석되었다.

[0453] **실시예 2: PD-L1 메틸화 및 발현의 분석**

[0454] RNA 및 DNA가 91 NSCLC 세포주로부터 추출되었고 그리고 PD-L1 발현 수준 (RNA-seq, log2-계수) 및 프로모터 메틸화 (INFINIUM® Array(배열))에 대해 시험되었다. 다섯 CpG 부위 중 두 개 (즉, CpG1 - CpG5)가 PD-L1 RNA 발현과 역으로 상관된 차별적인 메틸화 패턴을 나타냈다. 하기를 참고한다: **도 1**. 제1 CpG 부위, 즉, CpG1 (**도 1**에 좌측으로 가장 먼 CpG 부위로서 도시됨)은 TSS의 예상된 PD-L1 프로모터 부위 업스트림에서 발견되었다. 제2 CpG 부위, 즉, CpG5 (**도 1**에 우측으로 가장 먼 CpG 부위로서 도시됨)은 인트론 1에 위치되었다. 각각의 CpGs 1-5 평균 베타 값의 열 지도는, 유전자좌 9p24.1에서 PD-L1 프로모터 지도의 우측에 위치한 그것의 동반하는 발현 열 지도와 함께, CD274 전사체 NM_014143에서 그것의 위치와 관련하여 도시되었다. **도 1**은 시험된 각각의 세포주에 대한 PD-L1 프로모터 영역 발현 및 메틸화 열 지도를 도시한다. 본 열 지도는 PD-L1 RNA 발현에 의해 높은 것(적색)에서 낮은 것(녹색)으로 분류되었다. 높은 PD-L1 발현을 갖는 세포주는 낮은 메틸화 (청색)로 발견되었다.

[0455] 암 게놈 지도 (TCGA 3.0)로부터의 종양 데이터는 PD-L1 발현 (RNA-seq, log2-계수) 대 DNA 메틸화 (INFINIUM® 배열, 평균 m-값 CpG1 & CpG5) 사이의 회합에서의 추가의 연구를 위해 분석되었다. 4개 수집물 유래의 종양이 포함되었다: 폐 선암종 (LUAD), 폐 편평상피 세포 암종 (LUSC), 유방암 (BRCA) 및 피부 암종 (SKCM). RNA 발현과 메틸화 사이의 역 상관관계가 또한 이들 환자 종양 분석에서 나타났다: LUAD = -0.33, LUSC = -0.38, BRCA = -0.4, 그리고 SKCM = -0.25. 종양 샘플은 각각의 종양에서 면역 침윤물의 양에 의해 PD-L1 발현을 추가로 분석하기 위해 추가로 하위-그룹화되었고 그리고 CD8A 발현 (RNA-seq, 중앙 컷오프)에 의해 착색되었다. 높은 CD8A 발현을 갖는 종양은 또한 보다 높은 PD-L1 발현 및 보다 낮은 PD-L1 프로모터 메틸화를 가지는 경향이 있었다. 하기를 참고한다: **도 2a** (폐 선암종), **2b** (폐 편평상피 세포 암종), **2c** (유방암) 및 **2d** (피부 암종) 참조.

[0456] PD-L1 발현 수준 및 프로모터 메틸화 (**도 1** 참고)에 대해 시험된 NSCLC 세포주의 선택된 수가 추가로 *시험관내*에서 PD-L1 프로모터 메틸화 및 PD-L1 발현 사이의 관계를 조사하기 위해 분석되었다. 추가 분석을 위해 선택된 세포주는 CpG1 및 CpG5에서의 평균 메틸화 수준에 기초하여 선택되었다. 세포주 H661, LXFL529 및 A427은 CpG1 및 CpG5에서 높은 평균 메틸화 수준을 갖는 것으로 분류되었다; 세포주 H2073 및 H322T는 CpG1 및 CpG5에서 중간 평균 메틸화 수준을 갖는 것으로 분류되었다; 그리고 세포주 H1993은 CpG1 및 CpG5에서 낮은 평균 메틸화 수준을 갖는 것으로 분류되었다

[0457] 각각의 세포주로부터의 세포는 5가지 조건 중 하나에 노출되었다: (1) 처리 없음; (2) 1mM 5-아자시티딘-dC (5-아자(aza)-dC, DNA 탈메틸화 제제)로 처리; (3) 0.1mM 트리코스타틴 A (TSA, 부류 I 및 부류 II 포유동물 히스톤 탈아세틸화효소)로 처리; (4) 1ng/mL 인터페론 감마 (IFNg)로 처리; 또는 (5) 5-아자(aza)-dC, TSA, 및 IFNg의 조합으로 처리. PD-L1 RNA 발현은 그런 다음 qRT-PCR에 의해 측정되었다. **도 3**에 나타난 바와 같이, PD-L1 RNA 발현이 5-아자(aza)-dC 처리의 3일 후에 H661, LXFL529, A427, 및 H322T에서 증가했다. 단지 H322T만이 TSA 처리 후 PD-L1 RNA 발현에서 증가를 실증했다. 5-아자(aza)-dC, TSA, 및 IFNg의 조합으로 처리는 H1993 (즉, CpG1 및 CpG5에서 낮은 평균 메틸화 수준을 갖는 세포주)을 제외한 모든 세포주에서 증가된 PD-L1 발현을 초래했다. H1993은 이미 기준치 PD-L1 발현의 높은 수준을 실증했다.

- [0458] 4개 세포주, 즉, A427 (여기서 CpG1 및 CpG5는 높은 수준의 메틸화를 가짐); H322T (여기서 CpG1 및 CpG5는 중간 수준의 메틸화를 가지고, 그리고 여기서 PD-L1 발현은 IFN γ 로 처리에 의해 유도될 수 있음; H292 (여기서 CpG1 및 CpG5는 낮은 수준의 메틸화를 가짐); 및 H358 (여기서 CpG1 및 CpG5는 낮은 수준의 메틸화를 가짐)이 IFN γ 존재 및 부재에서 PD-L1 RNA와 단백질 발현의 관계를 추가로 조사하기 위한 실험에 사용하기 위해 선택되었다. IFN γ 로 자극될 때, A427, H322T, H292, 및 H358은 그것의 최초 기저 발현에 무관하게, PD-L1 RNA 유도에서의 증가를 나타냈다. 하기를 참고한다: 도 4a. IFN γ 의 부재에서 낮은 수준으로 PD-L1 RNA를 발현하는 A427 및 H292는 A427은 낮게 ($0.012 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 로) 잔존하는 반면 H292는 증가된 RNA 수준 ($0.102 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 로)을 나타내는 IFN γ 자극에 가변하는 반응을 보였다. PD-L1 RNA 발현에서 가장 큰 변화는 0.018 에서 $1.356 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 로 증가된 H322T 세포주에서 관측되었다. CpG1 및 CpG5에서의 높은 수준의 기준 PD-L1 발현 및 낮은 메틸화 수준을 이미 나타낸 H358 세포주는, 자극 후 이의 RNA 발현에 대해 유의미한 변화를 나타내지 않았다.
- [0459] PD-L1 단백질 발현은 기준치 및 IFN γ 자극에 따른 양자에서 세포주의 이 서브세트에서 RNA 발현과 느슨하게 상관되었다. A427은 20의 정규화된 중앙 형광 강도 (nMFI)로 FACS에 의해 배경 위에 거의 발현을 나타내지 않았다. H322T는 또한 낮은 수준의 PD-L1 발현을 보였다 (107의 nMFI). 하기를 참고한다: 도 4a. H292는 1580의 nMFI로 상당히 높은 단백질 발현을 나타내었고, 그리고 H358은 최고 기준치 발현을 실증하였다 (4204의 nMFI). 4개의 세포주 모두는 IFN γ 처리 후 증가된 표면 PD-L1 단백질 수준을 보였다. A427 세포주에서, PD-L1 단백질 발현은 낮게 유지되었다. H292 및 H358 세포주에서, PD-L1 단백질 발현은 3-4 배 증가되었고, 그리고 H322T에서, PD-L1 단백질 발현은 기준치 수준과 비교될 때 48-배 초과로 증가되었다. 비교적으로, IFN γ 처리 후 A427에서의 PD-L1 단백질 수준은 H322T에서 관찰된 전처리 수준으로 증가했다. 이어서 H322T에서 IFN γ 처리는 PD-L1 단백질 발현이 매우 유도성임을 나타냈다. 상기에 논의된 바와 같이, H322T에서 PD-L1 단백질의 기준치 수준은 낮았다. 반대로, IFN γ 처리 후 H322T에서의 PD-L1 단백질 수준은 IFN γ 처리 후 H292 및 H358에서의 PD-L1 단백질 수준에 비교할만했다.
- [0460] 다음으로, IFN γ /JAK/STAT 신호전달 경로가 A427, H322T, H292 및 H358에서 단백질 수준 및 PD-L1 전사체의 IFN γ -매개된 유도에서 역할을 하는지를 예측하기 위해 웨스턴 블랏이 수행되었다. 간단히, A427, H322T, H292, 및 H358로부터의 세포가 (a) 비처리; (b) 30분 동안 IFN γ 로 처리; 또는 (c) 24시간 동안 IFN γ 로 처리되었다. 세포는 그런 다음 단백질 용해물로 가공되고 그리고 겔 상에 이행되고, 하기 항체로 블랏팅되고 탐침되었다: (1) 항-포스포-STAT1; (2) 항-총-STAT1; (3) 항-포스포-STAT3-Y705; (4) 항-포스포-STAT3-S727; (5) 항-총-STAT3; 및 (6) β -액틴 (부하 대조군). 4개의 세포주 모두는 IFN γ 자극 후 강력한 p-STAT1 활성화를 나타내었고, 기저 p-STAT1로는 H358에서만 관측되었다. 하기를 참고한다: 도 4b. STAT3에 대한 초기 활성화 부위인 p-STAT3-Y705는 H292 (30분 IFN γ 처리 후) 및 H358에서 구성적으로 활성화되었지만, IFN γ 자극 후 24시간에 H358에서는 소실되었다. STAT3는 S727에서 mTOR 및 MAPK 경로에 의해 추가로 활성화되었다. JAK/STAT 신호전달 경로의 활성화는, 초기 및 후기 시점 모두에서 자극 전후에 p-STAT3-S727 활성화를 나타내지 않은 H358 세포에서는 제외하고, 24시간까지 모든 세포주에서 관찰되었다. 이들 결과는 JAK/STAT 경로 (STAT1 경로를 포함함)가 시험된 4개의 세포주 모두에서 활성임을 보여준다.
- [0461] 다음으로, PD-L1 프로모터 메틸화와 IFN γ /JAK/STAT 경로 사이의 관계가 siRNA를 이용하여 A427 및 H358에서 조사되었다. 상기 주지된 바와 같이, CpG1 및 CpG5는 A427 내에서 낮은 수준의 메틸화를 가졌고, 그리고 A427은 IFN γ 자극 후, 그리고 기준선에서 낮거나 전무한 PD-L1 단백질 발현을 나타내었다. 대조적으로, CpG1 및 CpG5는 H358 내에서 낮은 수준의 메틸화를 가졌고, 그리고 H358은 IFN γ 자극 후 증가된, 기준선에서의 높은 PD-L1 단백질 발현을 나타내었다. 어떤 STAT가 메틸화의 맥락에서 PD-L1 발현에 가장 결정적이었는지를 예측하기 위해, 각각의 세포주로부터의 세포에는 (1) siRNA 없음; (2) 스크램블드 조절; (3) siSTAT1; (4) siSTAT3; (5) IFN γ , 또는 (6) siSTAT1, siSTAT3 및 IFN γ 가 복용되었다.
- [0462] A427은 IFN γ 로 자극 후 활성화된 STAT1 및 STAT3의 강한 유도에도 불구하고 처리에 무관하게 PD-L1 발현을 나타내지 않았다. 하기를 참고한다: 도 4c. 비메틸화된 H358 세포는 IFN γ 자극으로 추가로 유도된 기저 구성적 PD-L1 발현을 나타냈다. siSTAT3는 PD-L1 기저 발현을 더욱 감소시켰다. siSTAT1 및 siSTAT3 모두는 PDL1 발현을 기준치에 가깝게 떨어뜨렸고, 반면에 IFN γ 및 양 siRNA의 조합은 siRNA 간섭과 동시 자극에도 불구하고 가장 적은 양의 PD-L1 발현을 나타냈다. 이들 결과는 PD-L1 프로모터의 메틸화는 IFN γ /JAK/STAT1 또는 IFN γ /JAK/STAT3 활성화에도 불구하고 PD-L1 발현을 차단했다는 것을 보여준다. 이들 결과는 또한 STAT1 및 STAT3는 IFN γ -자극된 PD-L1 발현에 둘 모두 필요로 되고 그리고 STAT3는 또한 PD-L1 기저 발현에 부분적으로 필요한 것으로 나타났다는 것을 보여준다.

- [0463] 그 다음, 중아황산염-서열분석 데이터들, 모든 3 PD-L1 프로모터 메틸화 범주 (즉, 높은, 배지, 및 낮은 메틸화 수준)의 대표적인 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 서브세트, 불멸화 정상 폐 세포주, 및 NSCLC 폐 세포주에 대한 가능한 CpG 메틸화 부위의 맵 상에서 중첩시켰다. 도 5a 및 5b에서, Mut2/Cpg1 및 Mut7/CpG5는 적색으로 박스표시되어 있다. 환자 종양에서 면역 침윤물로 발견될 수 있는 다양한 PBMC 서브세트에서 메틸화가 거의 내지 전혀 보이지 않았다. 하기를 참고한다: 도 5a. 정상적인 폐 세포주는 또한 이들 부위에서 메틸화를 보이지 않았다. 하기를 참고한다: 도 5a 및 5b. PD-L1을 높은 수준으로 발현하는 세포주 H358 및 H1993은 CpG1 및 5에서 메틸화를 보이지 않았다. 하기를 참고한다: 도 5b. 낮은 기준치 PD-L1 발현을 보인 세포주 H322T 및 H2073은 양 CpG 부위에서 부분적인 메틸화를 실증했다. 하기를 참고한다: 도 5b. 낮은 기준치 PD-L1 발현을 갖는 것을 나타냈던 A427은 CpG1 및 CpG5에서 높은 수준의 메틸화를 나타냈다. PBMC 서브세트 및 정상 간 세포주 내 CpG1 및 CpG5에서 메틸화가 거의 내지 전혀 없는 것처럼 보이기 때문에, 환자의 전체 종양 샘플에서 검출되는 PD-L1 프로모터 영역의 메틸화는 따라서, 샘플의 임의의 다른 세포성 서브세트로부터가 아닌, 종양 세포에서 두드러지게 발생해야 한다.
- [0464] 암 게놈 프로젝트 (CGP)로부터의 NSCLC 세포주를 사용하여 X축 상에 평활화된 CpG1 및 CpG5 메틸화 (M-값)와 Y축 상에 PD-L1 발현 (RNA-서열, Log2-계수)을 직접적으로 비교하는 산포도를 형성하였다. 도 6a에 나타난 바와 같이, 데이터는 -0.7의 피어슨의 상관관계로, 고도로 역 상관된 관계를 가진다. 이들 세포주에서의 PD-L1 기준치 발현은 프로모터 메틸화 수준에 의해 크게 영향을 받는다. 도 6a에서 분석된 CGP 세포주는 그런 다음 3개의 메틸화 그룹으로 분류되었다: (1) 낮은 (즉, CpG1 및 CpG5 양자에서 메틸화가 낮은 내지 없음), (2) 중간 (즉, CpG1 또는 CpG5 부위 메틸화됨), 또는 (3) 높은 (CpG1 및 CpG5 양자가 메틸화됨). 이들 그룹이 X 축 상에 도식화되고, RNA-seq에 의한 기저 PD-L1 발현은 Y 상에 도식화되고, 각 그룹에 대한 중앙 발현이 도식되었다. ANOVA 분석은 PD-L1 발현에 의한 각각의 그룹에 대해 높은 통계적 관련성을 보였다. 낮은 중앙 PD-L1 발현을 나타내는 그룹 (2) (즉, 중간) 및 그룹 (3) (즉, 높은)과 함께, 그룹 (1) (즉, 낮은)은 가장 높은 중앙 PD-L1 발현을 가졌다. 하기를 참고한다: 도 6b. 이들 데이터는 기저 PD-L1 발현이 CpG1 또는 CpG5에서의 프로모터 메틸화의 수준에 의해서 뿐만 아니라 메틸화되는 CpG 부위의 수에 의해 역으로 조절된다는 것을 나타낸다.
- [0465] CPG NSCLC 세포주 패널 내 세포주는 그런 다음 다수의 세포주를 갖는 데이터세트에서 PD-L1 발현에 대한 전면적인 탈메틸화 효과를 가지도록 5-아자(aza)-dC로 처리되었다. PD-L1 발현이 상당히 유도되었다. 그룹 (3) (즉, 높은) 세포주만이 메틸화-억제된 PD-L1 발현의 상당한 유도를 나타냈다. 하기를 참고한다: 도 6c. 추가로, 이 패널 내 두 세포주는 한 환자로부터의 2개의 별개의 샘플인, H1993 (낮음) 및 H2073 (중간)에서 상승되었다는 것으로 공지되었다. H1993은 5-아자(aza)-dC 처리 후 PD-L1 발현에서 유의미한 변화를 나타내지 않은 반면에 H2073은 PD-L1 프로모터의 탈메틸화 후에 상당한 PD-L1 발현 유도를 나타냈다. 하기를 참고한다: 도 6d. 이들 결과는 PD-L1 메틸화가, CpG1과 CpG5에서 메틸화의 비유사 패턴을 가진 상이한 세포주가 동일한 환자에서 유래했기 때문에, PD-L1 발현에 영향을 주는 구동 인자가 될 수 있음을 입증한다.
- [0466] 적응성 면역력은 면역 침윤물이 IFNg 및 활성화된 T 세포로부터의 다른 인자의 방출에 의해 종양에서 면역 관문 단백질, 예컨대 PD-L1을 활성화시키고 상향 조절할 수 있는 과정이다. 상기 기재된 실험의 결과는 이 PD-L1 활성화가 CpG1 및/또는 CpG5에서 높은 수준의 메틸화를 갖는 세포주에서 차단됨을 시사한다. 인간 NSCLC 종양 샘플의 수집은 활성화된 T 세포 침윤 (CD8A 유전자 발현, 플루이다임) 및 CpG5에서 종양 세포 PD-L1 프로모터 메틸화 (또한 mut7로 지칭됨)를 검출하기 위해 분석되었다. 도 7a 및 7b에 나타난 바와 같이, 낮은 CpG5/mut7 메틸화를 갖는 고도로 침윤된 종양 샘플만이 IHC (단백질, 참고: 도 7a) 및 qRT-PCR (RNA, 참고: 도 7b) 양자에 의해 높은 PD-L1 종양 세포 발현을 나타냈다. 높은 CpG5 메틸화를 갖는 종양 또는 낮거나 침투되지 않은 종양 모두는 낮은 PD-L1 단백질 및 RNA 발현을 보였다. 활성화된 T 세포의 침윤에 의한 종양 세포 PD-L1 상향조절은 이들 NSCLC 환자 종양 샘플 내 CpG5에서의 프로모터 메틸화에 의해 여전히 차단된다.
- [0467] 그 다음, 실험이, CpG1 및 CpG5에서의 CpG 메틸화가 PD-L1 프로모터 영역 (CpG1) 및 인터론 1 (CpG5)로의 STAT1 및/또는 STAT3의 결합을 물리적으로 차단할 수 있는지 여부를 예측하기 위하여 수행되었다. PD-L1 프로모터에서 CpG1에 아주 근접한 2개의 공지된 STAT 결합 모티프가 있다. 상기 기재된 A427 (즉, 메틸화됨) 및 H358 (즉, 비메틸화됨) 세포주는 거의 합류점까지 성장되고 그런 다음 상기에 기재된 바와 같이 대조군 완충제 또는 IFN γ 로 자극되었다. 다음날 아침에, 세포는 중아황산염 서열분석에 사용하기 위한 하나와 STAT1 및 STAT3 결합을 평가하기 위해 ChIP-Seq에 사용하기 위한 두 번째의 것으로, 두 개의 분취액으로 분할되었다. 중아황산염 서열분석은 양 세포주에 대해 메틸화 상태를 확인했으며, MACS 피크 콜링에 의한 상당한 피크 분석에 의해 나타난 바와 같이, 두 세포주 사이에서 차별적인 결합 패턴이 관측되었다.
- [0468] ChIP-Seq 실험의 결과는 도 8에 나타나며, 이때 .bed 파일은 IgV 통합 유전체학 뷰어 (브로드 연구소(Broad

Institute))를 디스플레이하였다. 도 8에서, 최상부 베드 파일은 PD-L1 프로모터 영역 및 인트론 1에서 발견되는 CpG들의 좌표를 함유한다. CpG1 및 CpG5가 표지된다. 제2 베드(bed) 파일은 PD-L1 프로모터 영역 내 공지된 STAT 결합 모티프의 좌표를 함유한다. 세 번째 베드 파일은 PD-L1/CD274에 대한 Hg19 서열과 유전자 구조를 함유한다. 4-11번째 베드 파일 (1-8로 넘버링됨)은 NSCLC 세포주 A427 및 H358에서 STAT1과 STAT3으로 본 발명자의 ChIP-Seq 실험에서 하류에 생성된 MACS의 상당한 결합 파일이다.

[0469] 메틸화된 A427 세포주는 IFN γ 자극을 갖는 또는 갖지 않는 STAT 단백질에 결합을 나타내지 않았다. 표 4를 참고한다. 상기 결과는, A427 내 CpG1의, 그리고 가능하게는 CpG5의 메틸화가 PD-L1 프로모터 내 CpG1에 근접한 STAT 결합 모티프로의 STAT1 및 STAT3의 결합을 완전히 차단한다는 것을 표지한다. 비자극된 H358은 STAT1에 의한 결합을 나타내지 않았지만, STAT1은 IFN γ 자극 후 PD-L1 프로모터에 결합하는 것으로 나타났다. 표 4를 참고한다. H358 세포주는 자극에 무관하게 STAT3에 의해 결합되었다. 표 4를 참고한다. 이미 나타난 바와 같이, H358은 이미 PD-L1 RNA 발현의 매우 높은 기저 수준을 가지며, 이들 결과는 STAT3 전사 인자가 이 세포주에서 높은 수준의 기저 PD-L1 발현의 원동력이 될 수 있음을 시사한다.

[0470] 표 4: PD-L1 프로모터에서 CpG1 근처의 STAT1과 STAT3의 결합

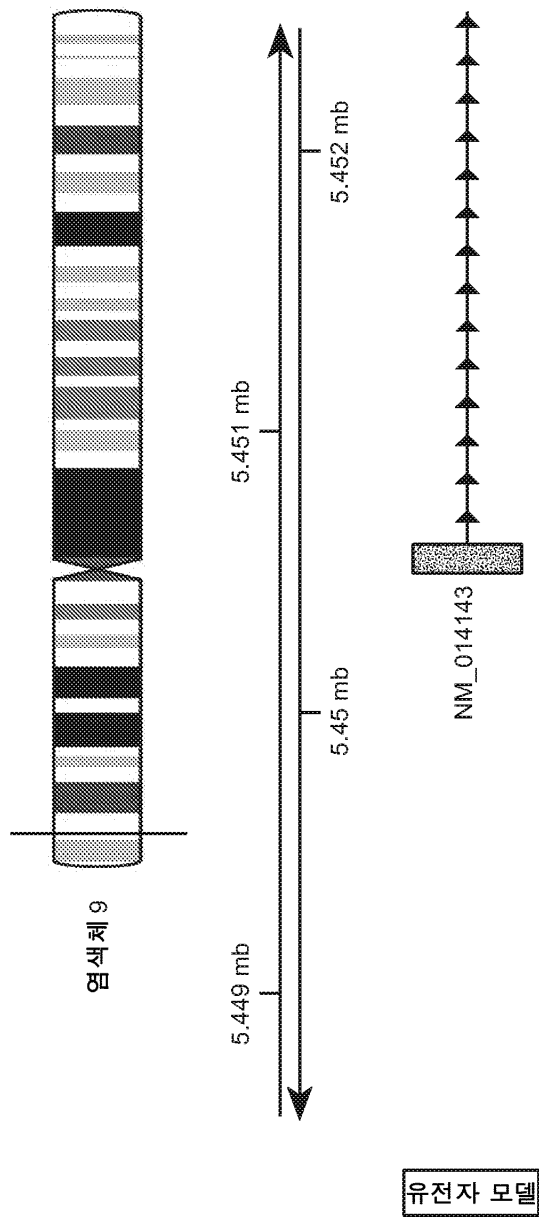
표 4

샘플 #	세포주	PD-L1 프로모터에서의 메틸화	자극	chIP	결합
1	A427	높음	대조군	STAT1	무
2	A427	높음	IFN γ	STAT1	무
3	A427	높음	대조군	STAT3	무
4	A427	높음	IFN γ	STAT3	무
5	H358	낮음	대조군	STAT1	무
6	H358	낮음	IFN γ	STAT1	유
7	H358	낮음	대조군	STAT3	유
8	H358	낮음	IFN γ	STAT3	유

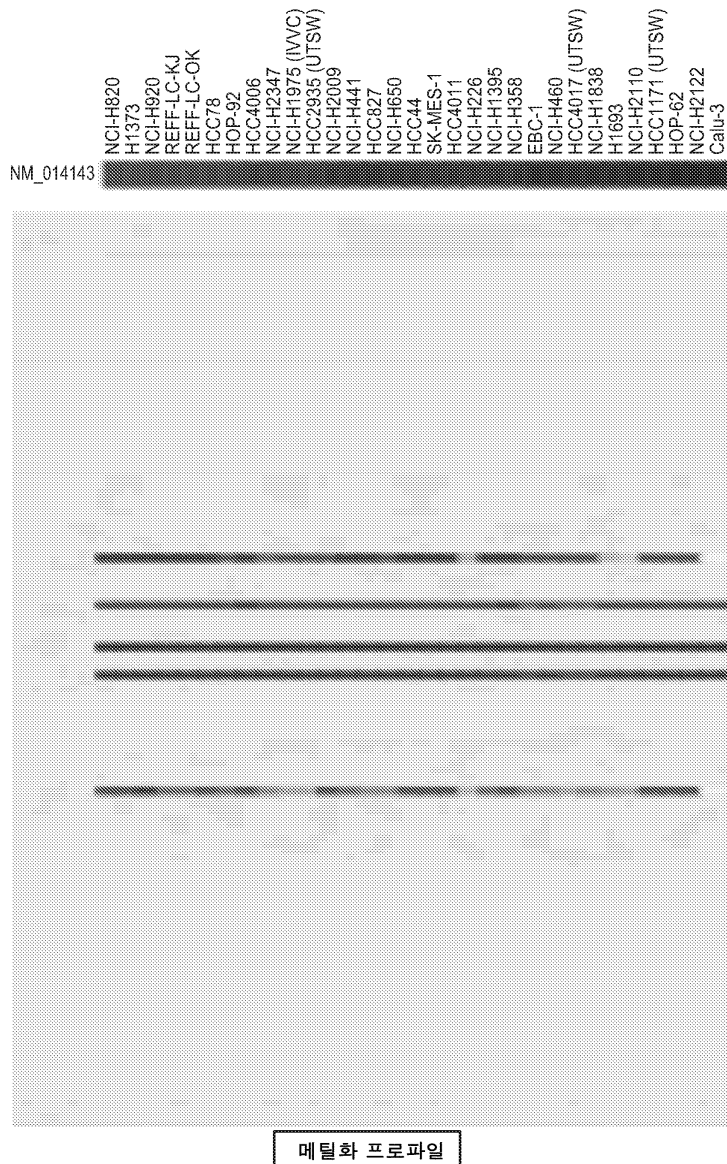
[0472] 선행 실시예는 단지 설명하기 위하여 제공되고, 어떤 식으로든 본 발명의 범위를 제한할 의도는 아니다. 본원에 도시되고 설명된 것들 이외에 본 발명의 다양한 변형들이 상기 설명으로부터 당업계의 숙련자들에게 명백하고, 첨부된 청구항의 범위 내에 속할 것이다.

도면

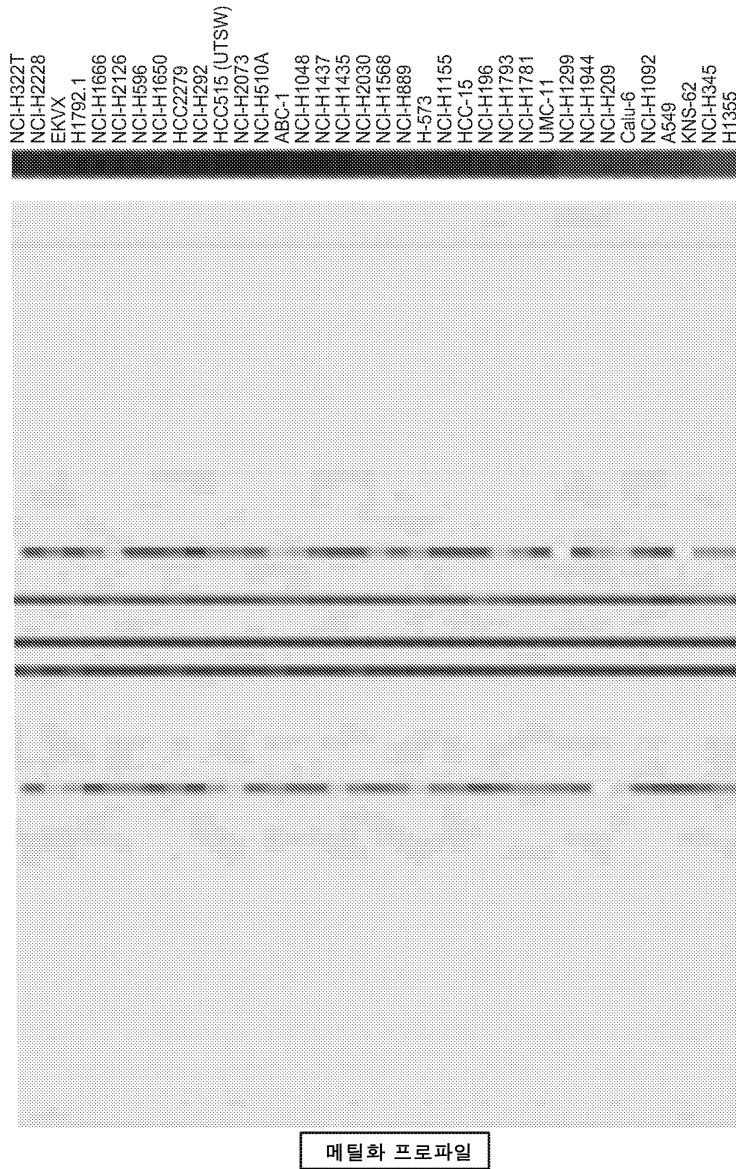
도면1a



도면1b

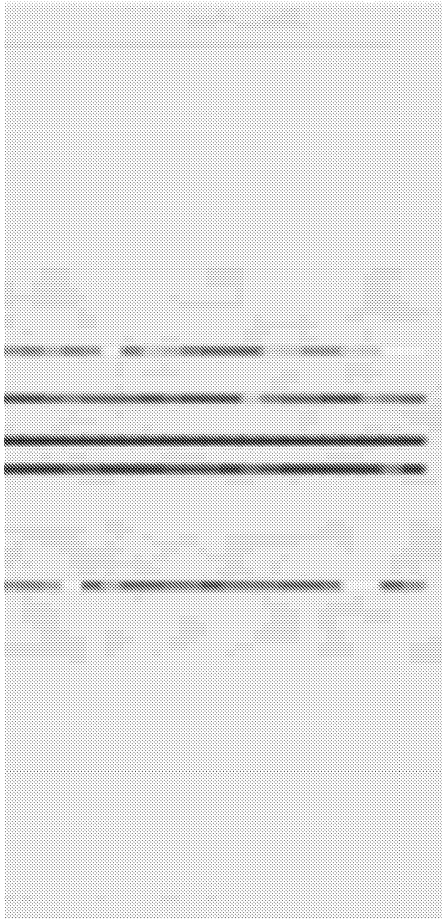


도면1c



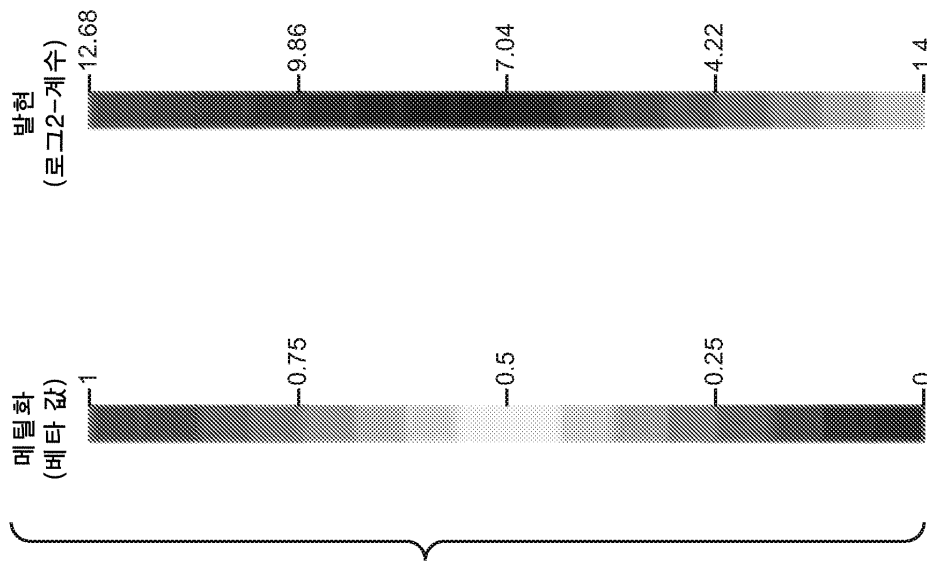
도면1d

NCI-H120
NCI-H2172
NCI-H2170
NCI-H727 (ATCC)
A-427
REF- LC-MS
NCI-H1651
ChaGo-K-1
LXFL529
NCI-H1703
HCC38 (DSMZ)
NCI-H82
NCI-H2171
VMRC-LCD
SW1573
NCI-2106
NCI-H187
NCI-H522
NCI-H23
NCI-H810
H1770

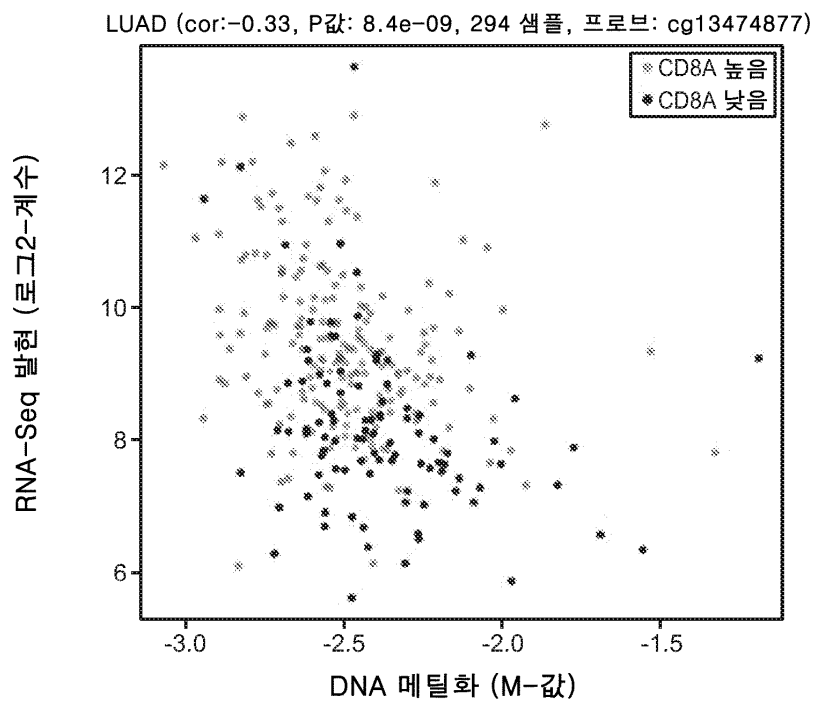


메틸화 프로파일

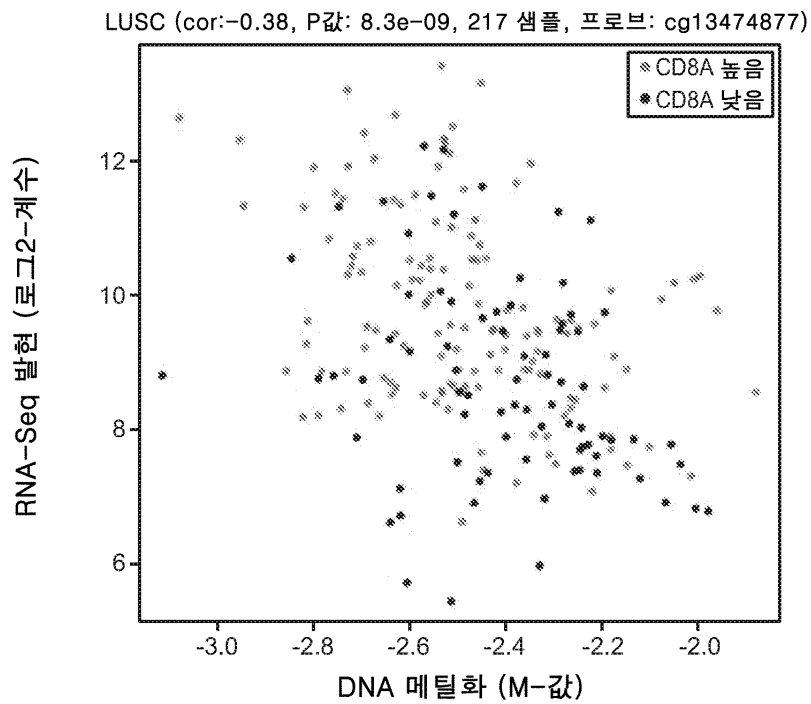
도면1e



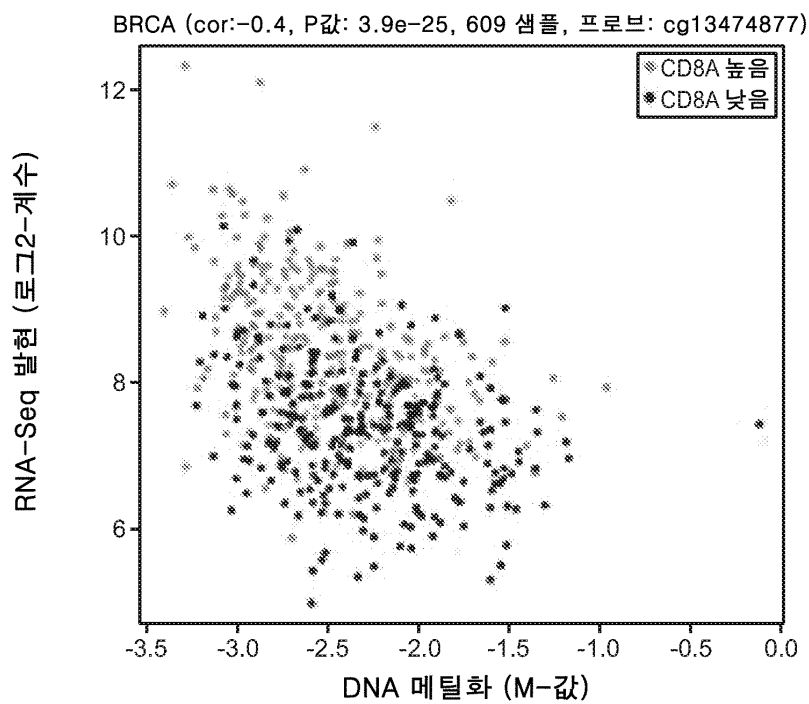
도면2a



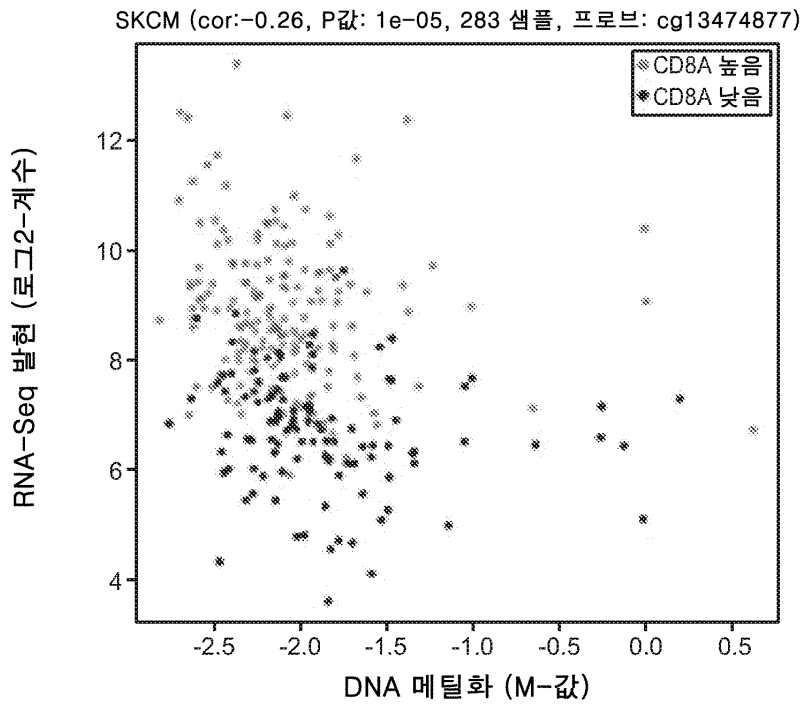
도면2b



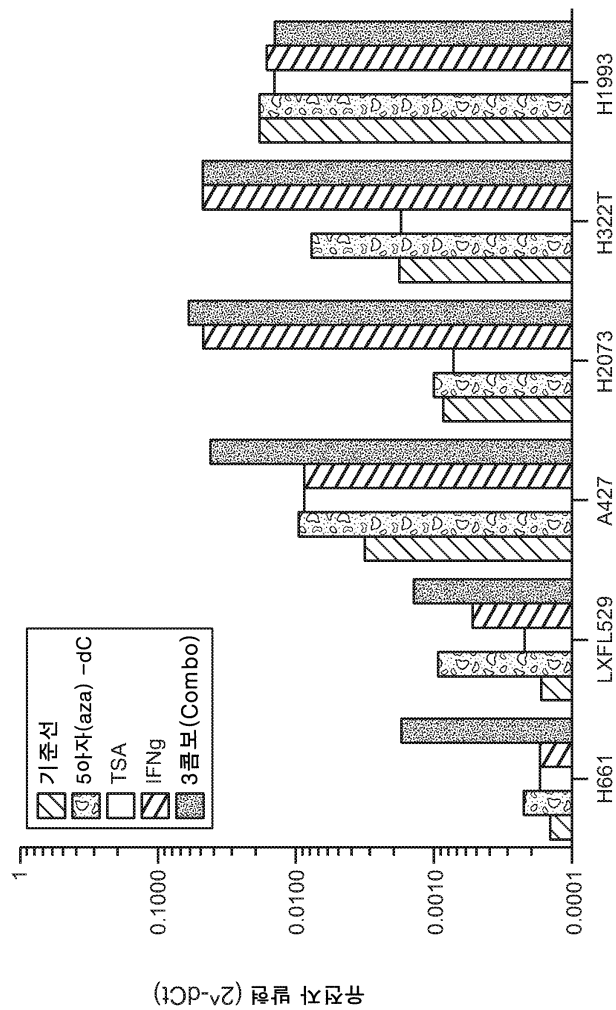
도면2c



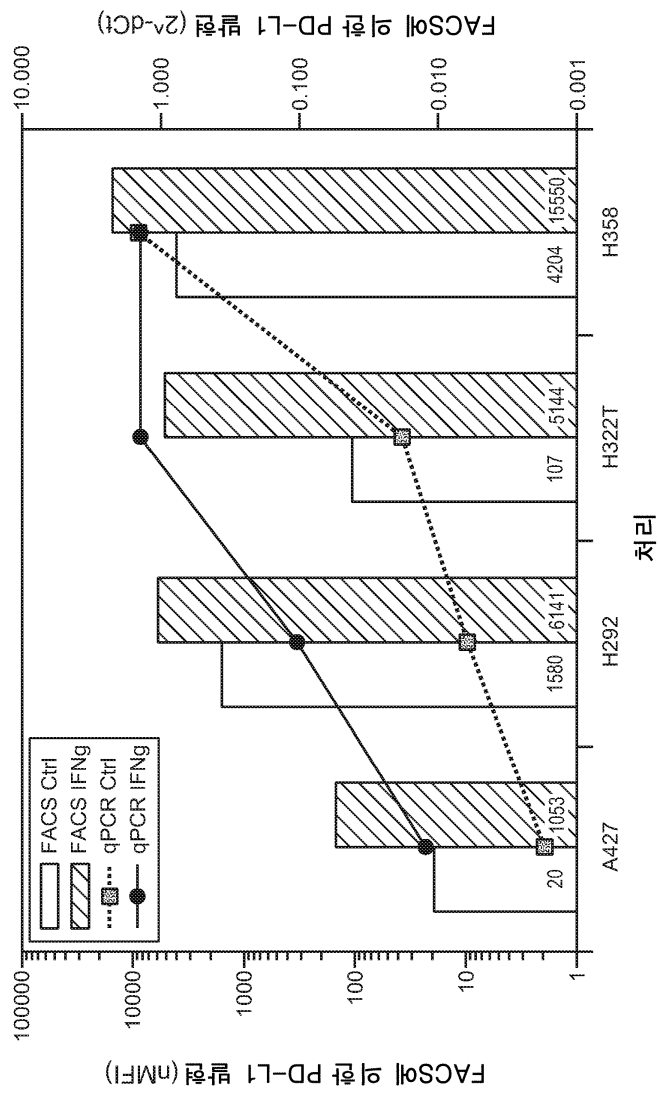
도면2d



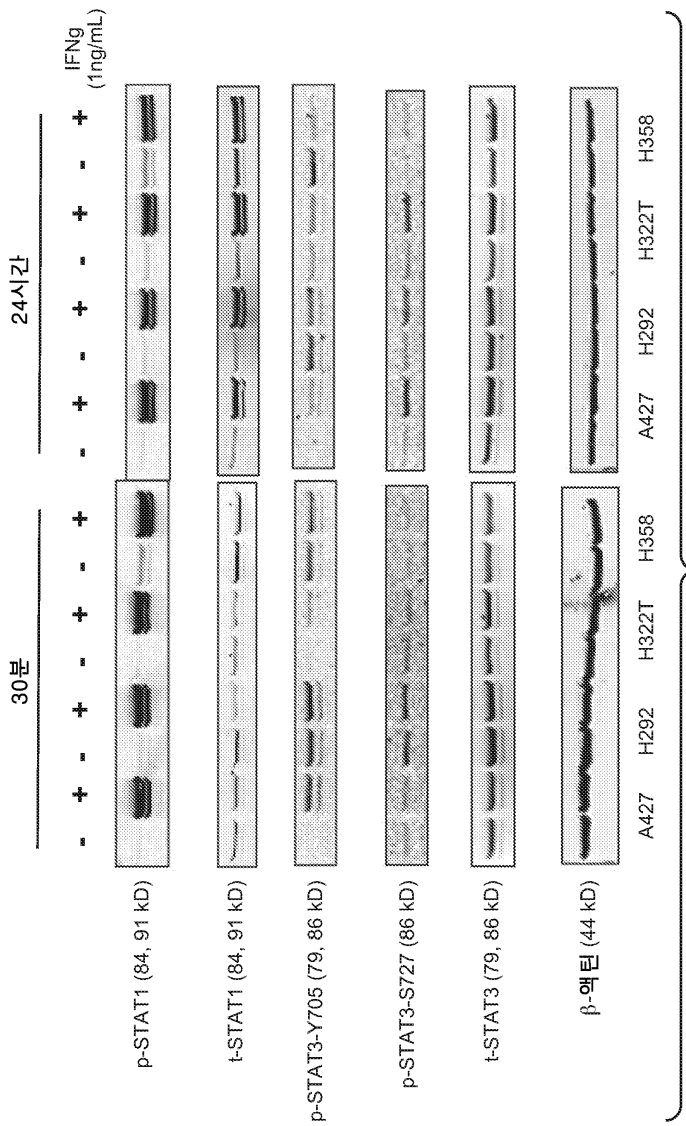
도면3



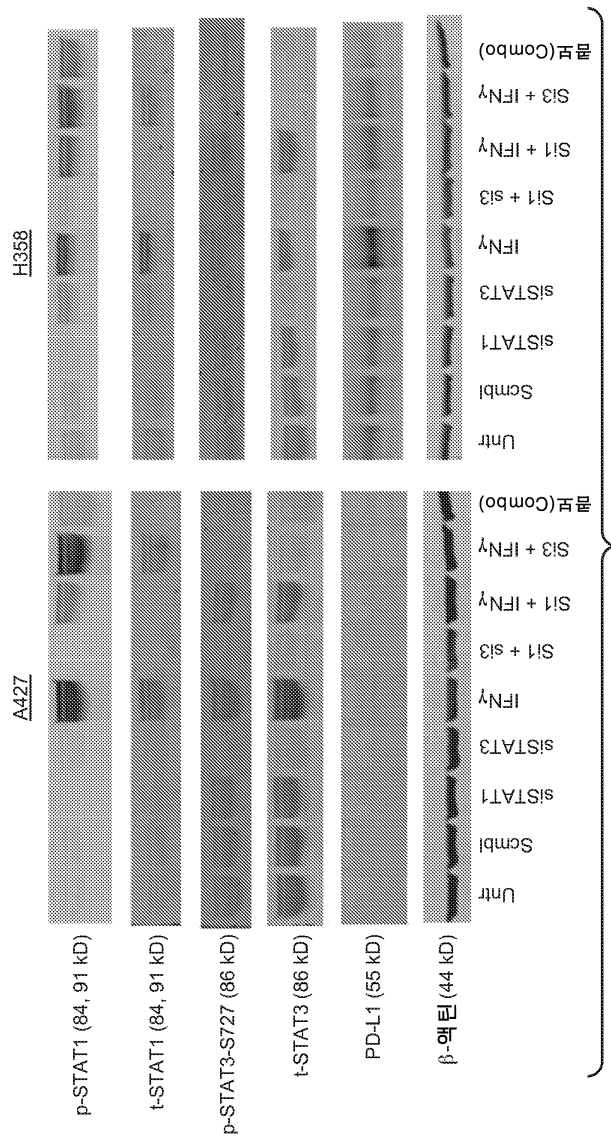
도면4a



도면4b

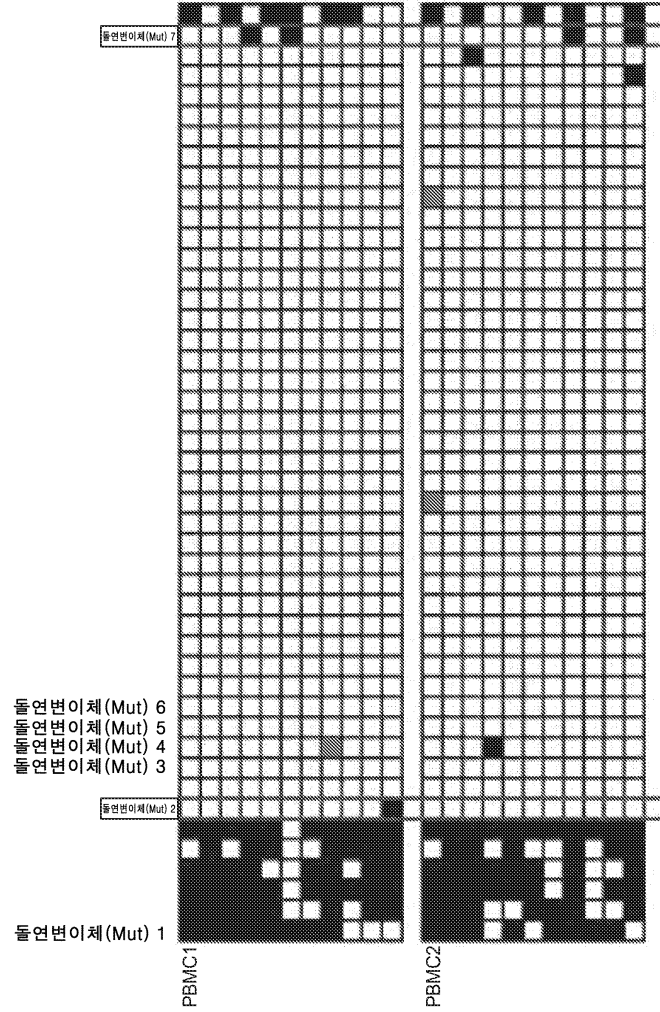


도면4c

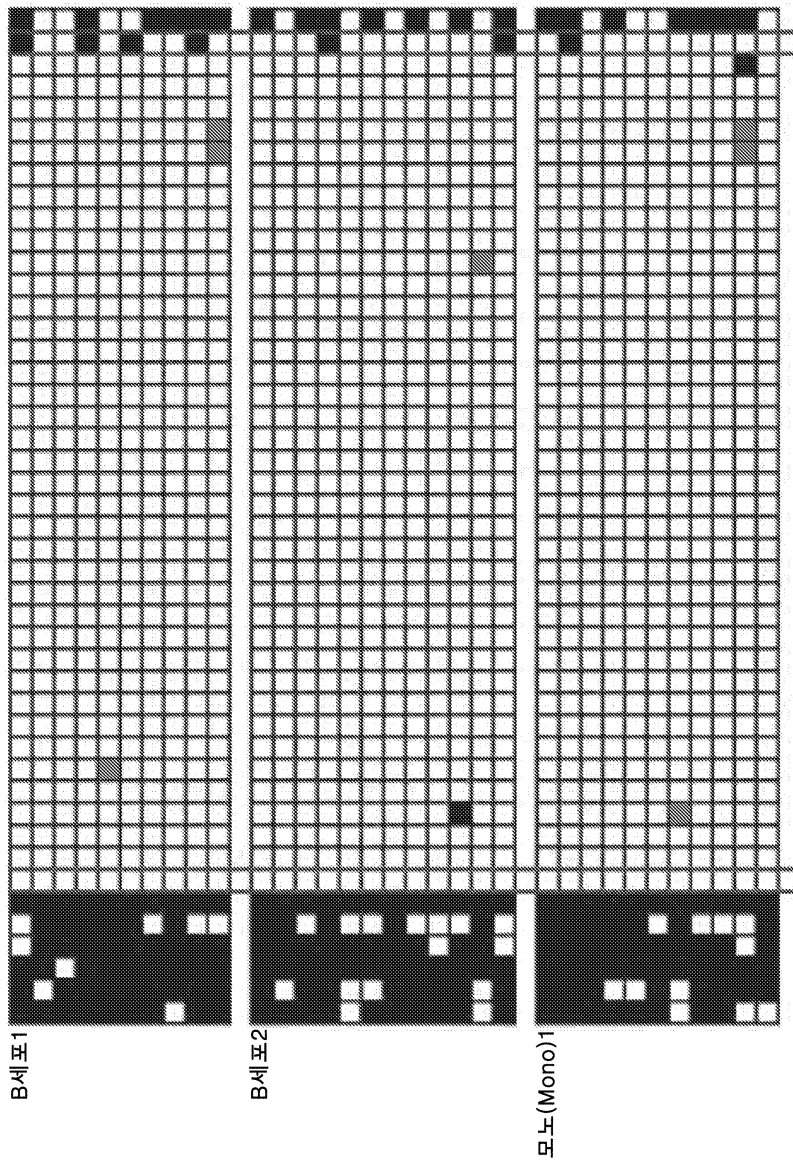


도면5aa

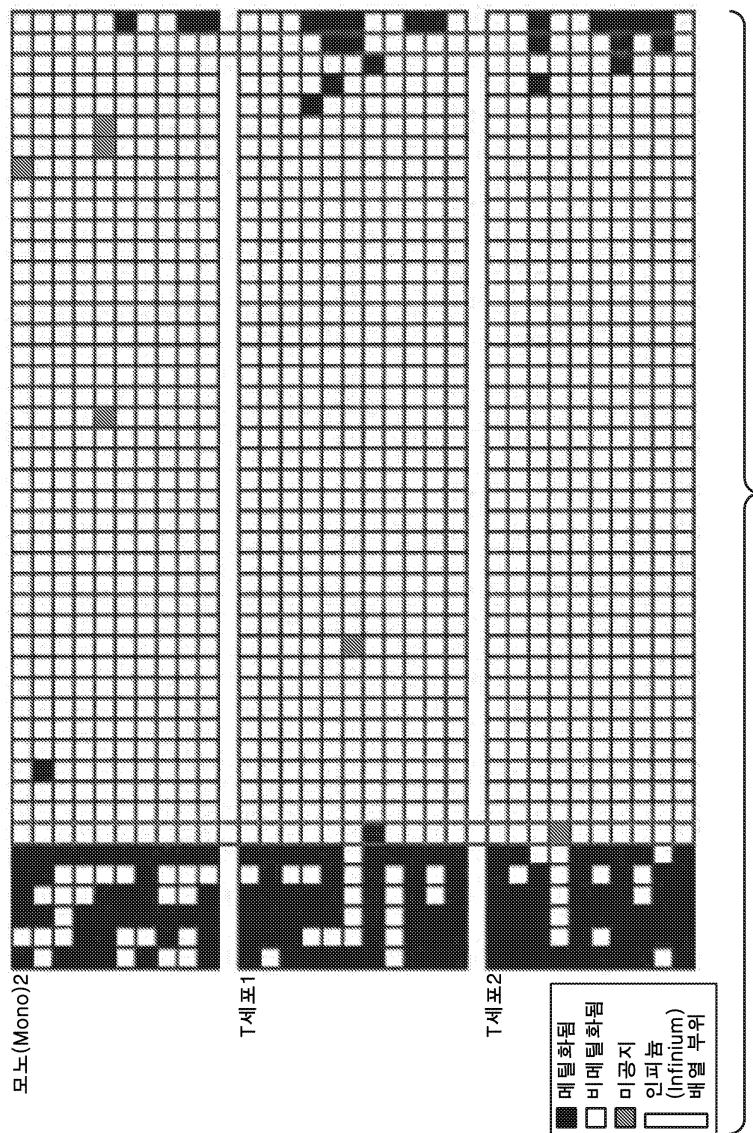
돌연변이체 (Mut) 8



도면5ab

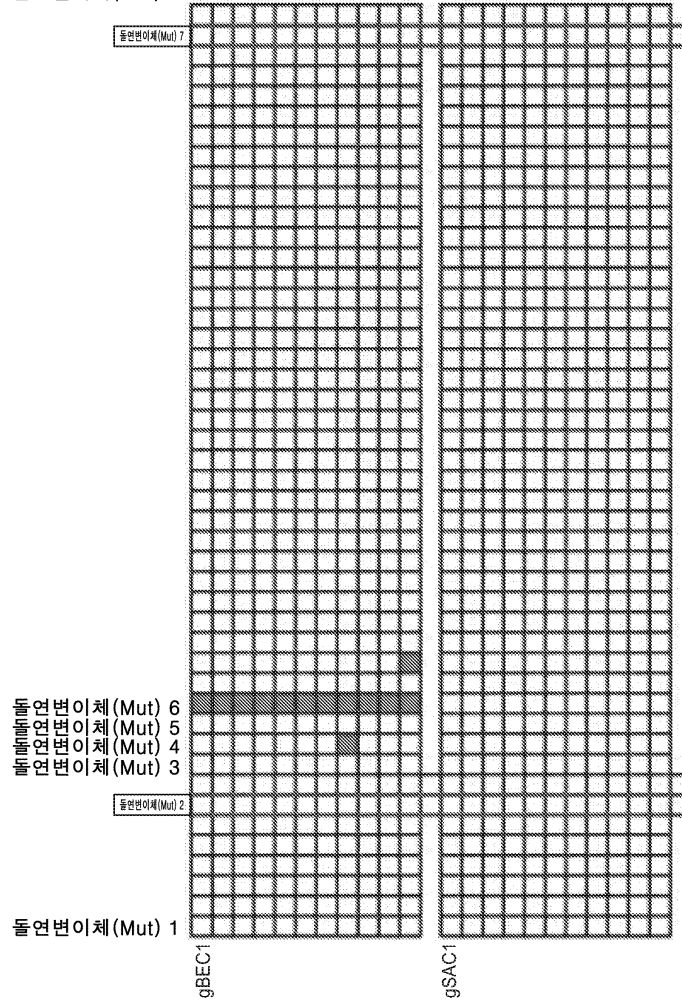


도면5ac

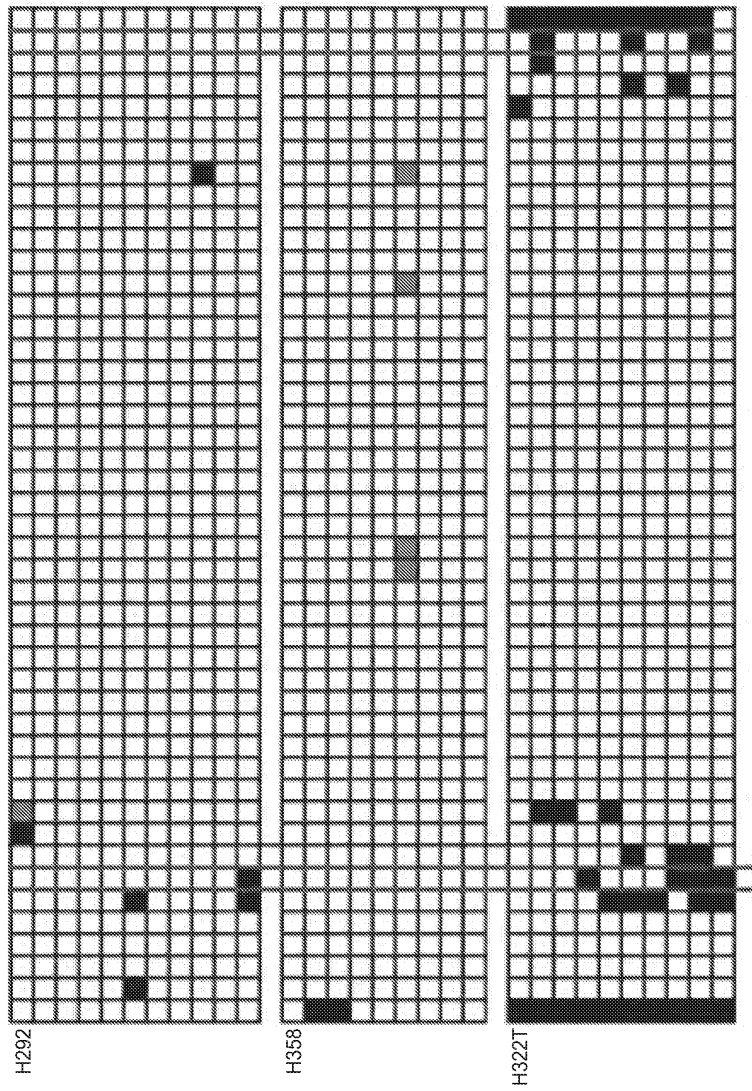


도면5ba

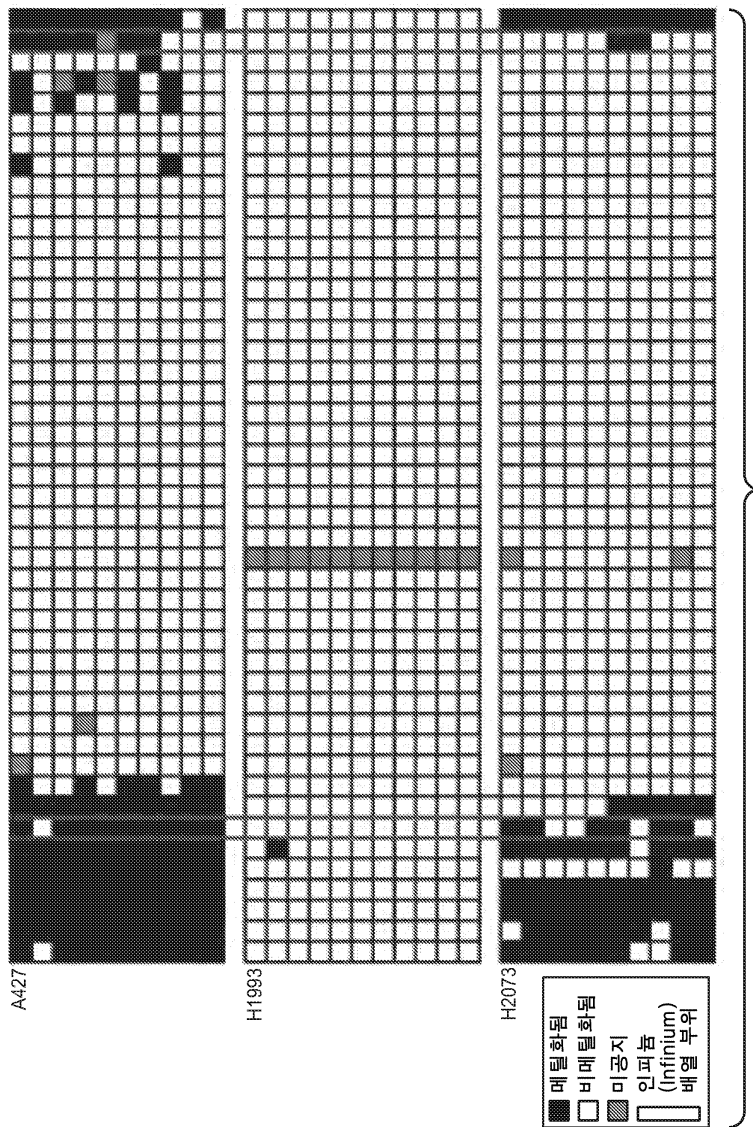
돌연변이체 (Mut) 8



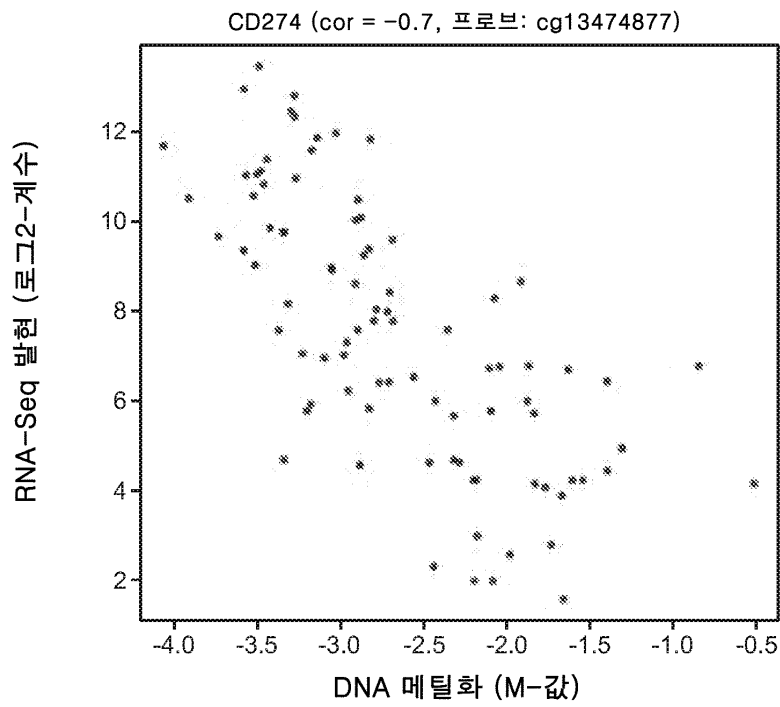
도면5bb



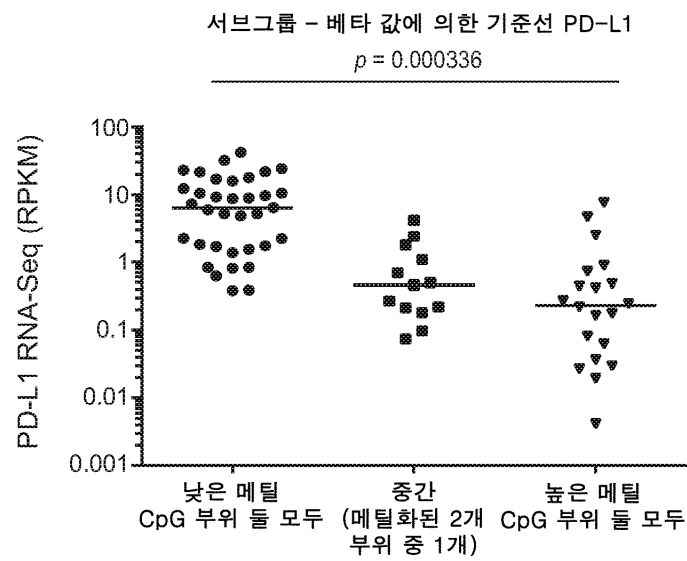
도면5bc



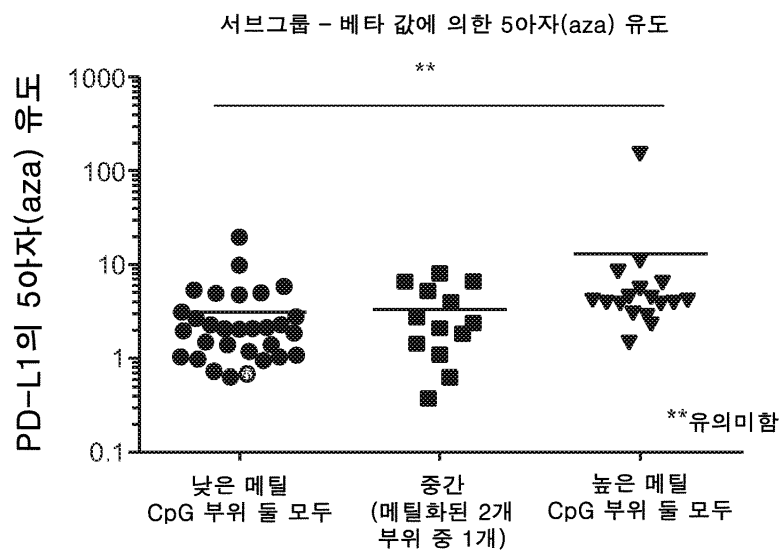
도면6a



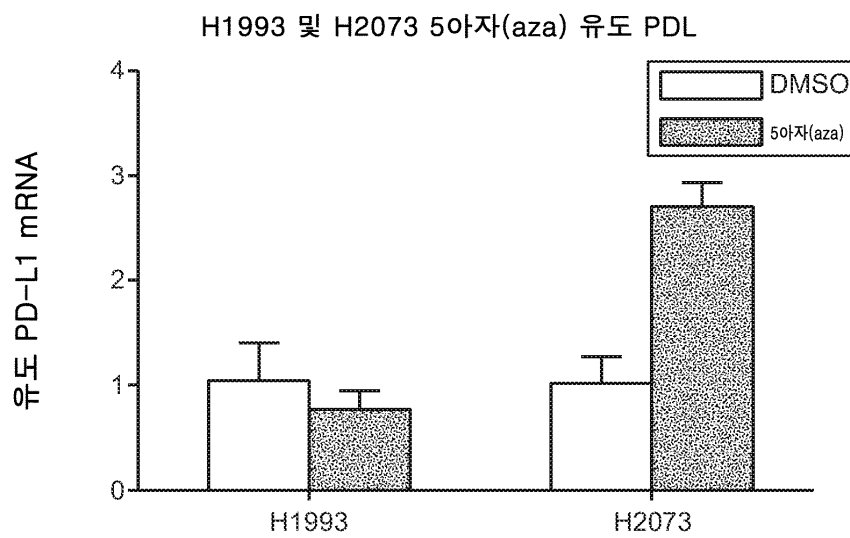
도면6b



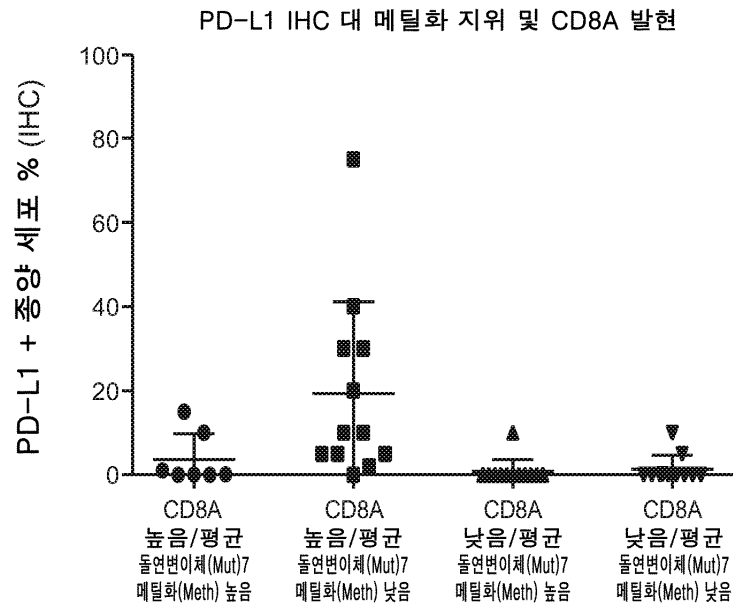
도면6c



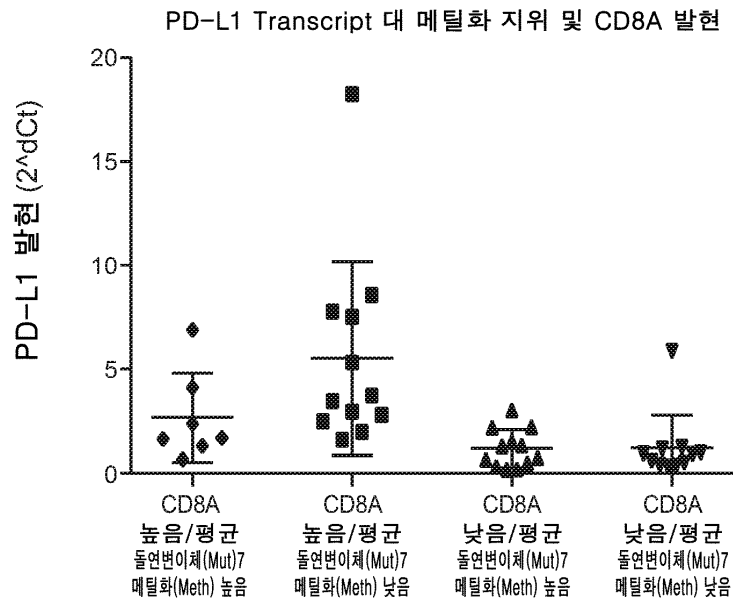
도면6d



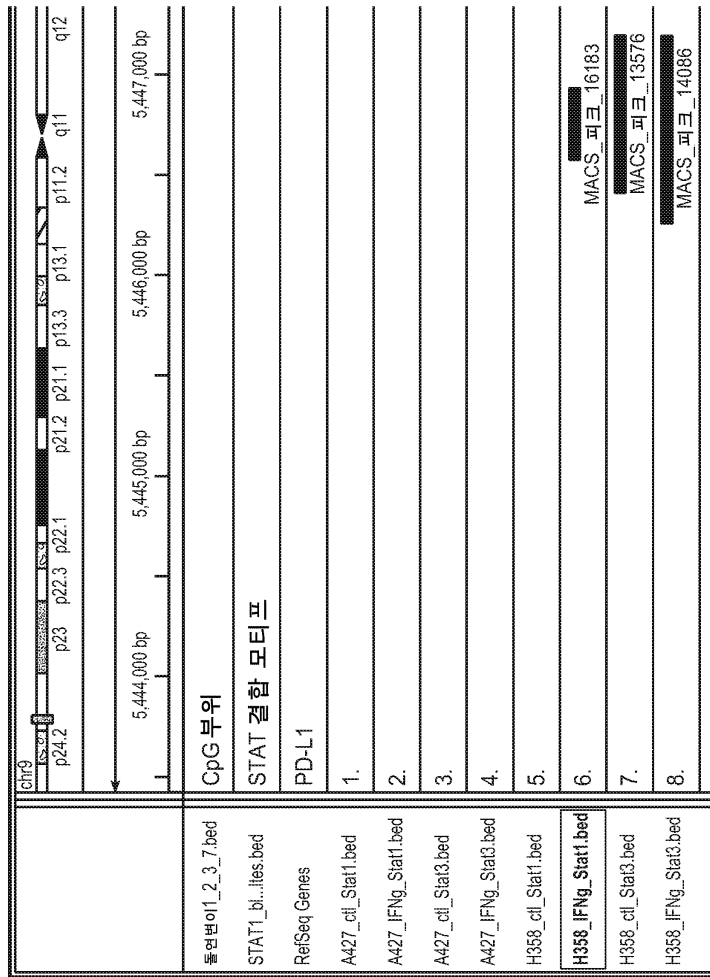
도면7a



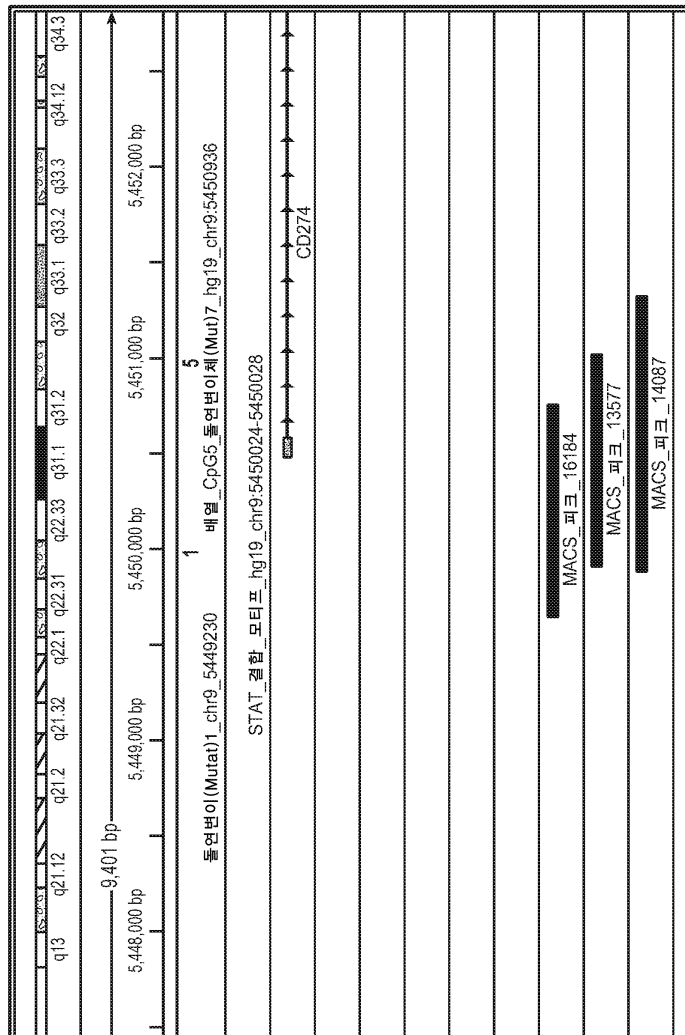
도면7b



도면8a



도면8b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Genentech, Inc.

<120> PD-L1 PROMOTER METHYLATION IN CANCER

<130> 146392027040

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/168,668

<151> 2015-05-29

<160> 30

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = D or G

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Ser Trp Ile His

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

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = S or L

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

<223> Xaa = T or S

<400> 2

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

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

Lys Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 3

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 4

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 5

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

1 5 10

<210> 6

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20

25

30

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 7

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

1

5

10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa = D or V

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = V or I

<220>

<221> VARIANT

<222> 7

<223> Xaa = S or N

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa = A or F

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

<223> Xaa = V or L

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Ala

1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = F or T

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = Y or A

<400> 9

Ser Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = Y, G, F, or S

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = L, Y, F or W

<220>

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa = Y, N, A, T, G, F or I

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = H, V, P, T or I

<220>

<221> VARIANT

<222> 8

<223> Xaa = A, W, R, P or T

<400> 10

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr

1 5

<210> 11

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 11

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 12

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

1 5 10 15

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 14

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 15

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His

1 5 10

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 16

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 17

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 18

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 19

Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr

1 5

<210> 20

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 21

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala

85 90 95

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

100 105

<210> 22

<211> 5

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

gctcg 5

<210> 23

<211> 139

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

cacgggtcca agtcaccgc cagctgcttg ctagtaacat gacttgtgta agttatccca 60

gctgcagcat ctaagtaagt ctcttcctgc gctaagcagg tccaggatcc ctgaacggaa 120

tttatttgct ctgtccatt 139

<210> 24

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 24

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> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 25

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 26

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly 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

 435 440 445
 <210> 27
 <211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 28

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

115 120

<210> 29

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 29

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

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

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

 100 105

<210> 30

<211> 1186

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

gctcgggatg ggaagtcttt ttaatgacaa agcaaatgaa gtttcattat gtcgaggaac 60
 tttaggaag tcacagaatc cacgatttaa aaatatatct cctattatac acccatacac 120
 acacacacac acctactttc tagaataaaa accaaagcca tatgggtctg ctgctgactt 180

tttatatggt gtagagtat atcaagtat gtcaagatgt tcagtcacct tgaaggagct 240
 ttatcagaa agggggacgc ctttctgata aagggttaagg ggtaacctta agctcttacc 300
 cctctgaagg taaaatcaag gtgcgttcag atgttggtt gttgtaaatt tcttttttta 360
 ttaataacat actaaatgtg gatttgcttt aatcttcgaa actcttcccg gtgaaaaatc 420
 catttacaag aaaactggac tgacatgttt cactttctgt ttcatttcta tacacagctt 480
 tattcctagg acaccaacac tagataccta aactgaaagc ttccgccgat ttcaccgaag 540
 gtcaggaaag tccaacgccc ggcaaactgg atttgctgcc ttgggcagag gtgggcggga 600
 cccgcctcc gggcctggcg caacgtgag cagctggcgc gtccgcgcgc gccccagttc 660

tgccgagctt cccgaggtc cgcaccagcc gcgtttctgt ccgcctgcag gtagggagcg 720
 ttgttctcc gcgggtgccc acggcccagt atctctggct agctcgctgg gcacttagg 780
 acggagggtc tctacacct ttctttggga tggagagagg agaagggaaa gggaacgcga 840

tggcttaggg ggcagtagag ccaattacct gttggggtta ataagaacag gcaatgcac 900
 tggccttcct ccaggcgga ttcagttttg ctctaaaaat aatttatacc tctaaaaata 960
 aataagatag gtagtatagg ataggtatgc attcttatgc gactgtgtgt tcagaatata 1020
 gctctgatgc taggctggag gtctggacac gggccaagt ccaccgccag ctgcttgcta 1080
 gtaacatgac ttgtgtaagt tatcccagct gcagcatcta agtaagtctc ttctgcgct 1140

 aagcaggtec aggatecctg aacggaattt atttgctctg tccatt 1186