(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0167703
(43) 공개일자 2024년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2827 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7036517
(22) 출원일자(국제) 2023년03월31일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년10월31일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/065194
(87) 국제공개번호 WO 2023/192976
국제공개일자 2023년10월05일
(30) 우선권주장
63/326,456 2022년04월01일 미국(US)
63/378,196 2022년10월03일 미국(US)

(71) 출원인
더 보드 오브 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템
미국, 텍사스 78701, 오스틴, 210 웨스트 7 스트리트
(72) 발명자
커란 마이클 에이.
미국, 텍사스 77030, 휴스턴, 1515 홀콤 블러바드, 씨/오 유.티.엠.디. 앤더슨 캔서 센터
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 67 항

(54) 발명의 명칭 **인간 PD-L1 및 PD-L2에 대한 이중 특이성 항체 및 이의 사용 방법**

(57) 요 약

본 개시내용은 PD-L1 및 PD-L2 둘 모두에 대해 결합하는 이중 특이적 항체, 및 PD-L1, PD-L2, 또는 둘 모두를 발현하거나 과발현하는 것과 같은 암을 치료하기 위해 이러한 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도

IgG 지수	ADI 명칭	Octet IgG K_D 인간 PD-L1-Fc (M) Avid	Octet IgG K_D 인간 PD-L1-His (M) 일가	Octet IgG K_D 인간 PD-L2-Fc (M) Avid	Octet IgG K_D 인간 PD-L2-His (M) 일가	Octet IgG K_D 인간 INSR BioVendor (M) 일가	Octet IgG K_D 인간 INSR R&D (M) 일가	Biacore IgG K_D 인간 PD-L1-His (M) 일가	Biacore IgG K_D 인간 PD-L2-His (M) 일가
1	38002-hIgG1	1.28E-09	7.62E-09	6.01E-10	1.90E-09	N.B.	P.F.	3.76E-09	7.27E-10
2	38003-hIgG1	1.27E-09	1.42E-08	3.77E-10	1.02E-09	N.B.	P.F.	8.09E-09	1.75E-10
3	38004-hIgG1	1.22E-09	2.00E-08	5.97E-10	2.84E-09	N.B.	N.B.	3.77E-08	1.24E-09
4	ADI-37464-hIgG1	1.52E-09	6.23E-09	4.26E-10	1.60E-09	P.F.	P.F.	2.76E-09	5.08E-10
5	ADI-26140	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.D.	N.D.

(52) CPC특허분류
G01N 33/57484 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/35 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열 번호 7에 제시된 중쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열 번호 8에 제시된 중쇄 CDR2 아미노산 서열, 및 서열 번호 9에 제시된 중쇄 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 10에 제시된 경쇄 CDR1 아미노산 서열, 서열 번호 11에 제시된 경쇄 CDR2 서열, 및 서열 번호 12에 제시된 경쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 5에 제시된 바와 같은 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 3에 제시된 바와 같은 중쇄 가변 서열에 의해 코딩(encoding)되는, 항체 또는 항체 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 5에 대해 적어도 90% 동일성(identity)을 갖는 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 3에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열에 의해 코딩되는, 항체 또는 항체 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 5에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 3에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열에 의해 코딩되는, 항체 또는 항체 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 6의 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 4의 중쇄 가변 서열을 포함하는, 항체 또는 항체 단편.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 6에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 4에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열을 포함하는, 항체 또는 항체 단편.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 6에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 4에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열을 포함하는, 항체 또는 항체 단편.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 단편은 재조합 scFv (가변 단일 사슬 단편) 항체, Fab 단편, F(ab')2 단편, 또는 Fv 단편인, 항체 또는 항체 단편.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 키메라 항체(chimeric antibody)인, 항체 또는 항체 단편.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 IgG인, 항체 또는 항체 단편.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 세포 침투 펩티드(cell penetrating

peptide)를 추가로 포함하고/하거나 인트라바디(intrabody)인, 항체 또는 항체 단편.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 인간 항체 또는 인간화 항체인, 항체 또는 항체 단편.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 ADI-37464의 CDR 영역을 포함하는 항체와 비교하여, 인간 인슐린-유사 성장 인자 1 수용체 (IGF1R)에 대해 감소된 결합을 나타내는, 항체 또는 항체 단편.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 PD-L1에 결합되는, 항체.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 PD-L2에 결합되는, 항체.

청구항 16

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 $1x10^{-8}$ 이하의 PD-L1에 대한 K_D를 갖는, 항체.

청구항 17

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 $1x10^{-8}$ K_D 이하의 PD-L2에 대한 K_D를 갖는, 항체.

청구항 18

암을 갖는 대상체(subject)를 치료하는 방법으로서, 서열 번호 7, 서열 번호 8, 및 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열 및 서열 번호 10, 서열 번호 11, 및 서열 번호 12의 경쇄 CDR 서열을 갖는 항체 또는 항체 단편을 상기 대상체에 전달하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 5의 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 3의 중쇄 가변 서열에 의해 코딩되는, 방법.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 5에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 3에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열에 의해 코딩되는, 방법.

청구항 21

제18항 또는 제19항에 있어서, 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 5에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 3에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열에 의해 코딩되는, 방법.

청구항 22

제18항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 6의 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 4의 중쇄 가변 서열을 포함하는, 방법.

청구항 23

제18항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 6에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열

및 서열 번호 4에 대해 적어도 90%의 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열을 포함하는, 방법.

청구항 24

제18항에 있어서, 서열 번호 6에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 4에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열에 의해 코딩되는, 방법.

청구항 25

제18항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 단편은 재조합 scFv (가변 단일 사슬 단편) 항체, Fab 단편, F(ab')2 단편, 또는 Fv 단편인, 방법.

청구항 26

제18항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 IgG 또는 키메라 항체인, 방법.

청구항 27

제18항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 ADI-37464의 CDR 영역을 포함하는 항체와 비교하여, 인간 인슐린-유사 성장 인자 1 수용체 (IGF1R)에 대한 감소된 결합을 나타내는, 방법.

청구항 28

제18항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 전달은 항체 또는 항체 단편 투여, 또는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 RNA 또는 DNA 서열 또는 벡터(vector)를 사용한 유전적 전달(genetic delivery)을 포함하는, 방법.

청구항 29

항체 또는 항체 단편을 발현하는 하이브리도마 또는 조작된 세포(engineered cell)로서, 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 7, 서열 번호 8, 및 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열 및 서열 번호 10, 서열 번호 11, 및 서열 번호 12의 경쇄 CDR 서열을 갖는, 하이브리도마 또는 조작된 세포.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 5의 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 3의 중쇄 가변 서열을 포함하는, 하이브리도마 또는 조작된 세포.

청구항 31

제29항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 5에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 3에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열을 포함하는, 하이브리도마 또는 조작된 세포.

청구항 32

제29항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 5에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 3에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열을 포함하는, 하이브리도마 또는 조작된 세포.

청구항 33

제29항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 6의 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 4의 중쇄 가변 서열을 포함하는, 하이브리도마 또는 조작된 세포.

청구항 34

제29항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 6에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 4에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열을 포함하는, 하이브리도마 또는 조작된 세포.

청구항 35

제29항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 6에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 4에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열을 포함하는, 하이브리도마 또는 조작된 세포.

청구항 36

제29항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 단편은 재조합 scFv (가변 단일 사슬 단편) 항체, Fab 단편, F(ab')2 단편, 또는 Fv 단편인, 하이브리도마 또는 조작된 세포.

청구항 37

제29항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 키메라 항체인, 하이브리도마 또는 조작된 세포.

청구항 38

제29항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 IgG인, 하이브리도마 또는 조작된 세포.

청구항 39

제29항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 세포 침투 펩티드를 추가로 포함하고/하거나 인트라바디인, 하이브리도마 또는 조작된 세포.

청구항 40

서열 번호 7, 서열 번호 8, 및 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열; 및 서열 번호 10, 서열 번호 11, 및 서열 번호 12의 경쇄 CDR 서열을 특징으로 하는 하나 이상의 항체 또는 항체 단편을 포함하는, 백신 제형(vaccine formulation).

청구항 41

제40항에 있어서, 적어도 하나의 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 5의 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 3의 중쇄 가변 서열에 의해 코딩되는, 백신 제형.

청구항 42

제40항에 있어서, 적어도 하나의 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 5에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 3에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열에 의해 코딩되는, 백신 제형.

청구항 43

제42항에 있어서, 적어도 하나의 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 5에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 3에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열에 의해 코딩되는, 백신 제형.

청구항 44

제40항에 있어서, 적어도 하나의 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 6의 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 4의 중쇄 가변 서열을 포함하는, 백신 제형.

청구항 45

제40항에 있어서, 적어도 하나의 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 6에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 4에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열을 포함하는, 백신 제형.

청구항 46

제40항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 항체 단편은 재조합 scFv (가변 단일 사슬 단편) 항체, 단일 도메인 단편, Fab 단편, F(ab')2 단편, 또는 Fv 단편인, 백신 제형.

청구항 47

제40항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 항체는 키메라 항체인, 백신 제형.

청구항 48

제40항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 항체는 IgG인, 백신 제형.

청구항 49

제40항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 항체 또는 항체 단편은 세포 침투 펩티드를 추가로 포함하고/하거나 인트라바디인, 백신 제형.

청구항 50

대상체에서 PD-L1 또는 PD-L2 발현 세포를 검출하는 방법으로서,

(a) 상기 대상체로부터의 샘플을 서열 번호 4의 중쇄 CDR 서열 및 서열 번호 6의 경쇄 CDR 서열을 갖는 항체 또는 항체 단편과 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 항체 또는 항체 단편을 상기 샘플에서의 세포와 결합시킴으로써 상기 샘플에서 PD-L1 또는 PD-L2 발현 세포를 검출하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 샘플은 체액(body fluid)인, 방법.

청구항 52

제50항 또는 제51항에 있어서, 상기 샘플은 조직 샘플인, 방법.

청구항 53

제50항 또는 제51항에 있어서, 검출은 ELISA, RIA 또는 웨스턴 블롯(Western blot)을 포함하는, 방법.

청구항 54

제50항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 3 및 서열 번호 5에 제시된 바와 같은 가변 서열에 의해 코딩되는, 방법.

청구항 55

제50항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 5에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 3에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열에 의해 코딩되는, 방법.

청구항 56

제50항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 5에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 3에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열에 의해 코딩되는, 방법.

청구항 57

제50항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 6의 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 4의 중쇄 가변 서열을 포함하는, 방법.

청구항 58

제50항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 6에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 4에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열을 포함하는, 방법.

청구항 59

제50항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 6에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 경쇄 가변 서열 및 서열 번호 4에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 중쇄 가변 서열을 포함하는, 방법.

청구항 60

제50항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 단편은 재조합 scFv (가변 단일 사슬 단편) 항체, Fab 단편, F(ab')2 단편, 또는 Fv 단편인, 방법.

청구항 61

제50항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 암 세포인, 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 암 세포는 림프종 세포(lymphoma cell), 유방암 세포(breast cancer cell), 또는 신세포 암종 세포(renal cell carcinoma cell)인, 방법.

청구항 63

제50항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 면역 억제와 관련된 세포인, 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 면역 억제와 관련된 상기 세포는 종양 미세환경에서의 비-암성 세포(non-cancerous cell)인, 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 종양 미세환경에서의 상기 비-암성 세포는 기질(stromal) 또는 내피 세포인, 방법.

청구항 66

종양 미세환경에서 면역 억제를 치료하는 방법으로서, 서열 번호 7, 서열 번호 8, 및 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열, 및 서열 번호 10, 서열 번호 11, 및 서열 번호 12의 경쇄 CDR 서열을 갖는 항체 또는 항체 단편을 상기 대상체에 전달하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 67

종양 또는 암에 대한 면역 반응을 증가시키는 방법으로서, 서열 번호 7, 서열 번호 8, 및 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열 및 서열 번호 10, 서열 번호 11, 및 서열 번호 12의 경쇄 CDR 서열을 갖는 항체 또는 항체 단편을 상기 대상체에 전달하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **우선권 주장**

[0002] 본 출원은 2022년 4월 1일에 출원된 미국 가특허 출원 제63/326,456호, 및 2022년 10월 3일에 출원된 제63/378,196호에 대한 우선권의 이익을 주장하며, 두 출원의 전체 내용은 본원에 참조로 편입된다.

[0003] **서열 목록에 대한 참조**

[0004] 본 출원은 전자적으로 제출되고, 그의 전문이 본원에 참조로 편입된 서열 목록 XML을 포함한다. 2023년 3월 27일에 생성된 상기 서열 목록 XML은 UTFCP1514WO.xml로 명명되며, 크기는 ~30 킬로바이트이다.

[0005] **기술분야**

[0006] 본 개시내용은 일반적으로 의학, 종양학 및 면역학 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 이는 PD-L1 및 PD-L2에 대한 높은 친화성을 갖는 인간 이중 항체 및 암 요법에서의 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] T 세포 공동-억제 수용체 PD-1과 이의 리간드 PD-L1의 상호 작용의 차단은 현대 종양학의 기둥이 되었으며, 이는 현재 심지어 흑색종 및 폐암 하위세트 환자에 대한 1차 치료에서도 이용 가능하다 (Boussiotis, 2016). PD-1

또는 PD-L1을 표적화하는(targeting) 다수의 항체는 현재 FDA 승인을 받았거나 임상 시험 중에 있으며; 그러나, 제2 PD-1 리간드인 PD-L2를 표적화하는 제제는 임상 조사 중에 있지 않다. PD-L2는 PD-L1보다 대략 3배 더 높은 친화성으로 PD-1과 결합하며, PD-L1과 마찬가지로, T 세포 기능을 약화시키는 억제 신호를 전송한다 (Cheng *et al.*, 2013; Latchman *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017; Youngnak *et al.*, 2003). 과거에는, PD-L2는 대개 종양 기질에 한정된 발현을 갖는 유도성 공동-억제 분자로 간주되었고; 그러나, PD-L2에 대한 개선된 검출 시약은 종양 미세환경과 종양 세포 자체 모두에서 광범위한 PD-L2 발현을 보여주었다 (Baptista *et al.*, 2016; Danilova *et al.*, 2016; Derks *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2016; Howitt *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015; Nomi *et al.*, 2007; Obeid *et al.*, 2016; Ohigashi *et al.*, 2005; Roemer *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016). 최근에, PD-L2는 복수의 암에 대한 PD-1 항체 펨브롤리주맙(pembrolizumab)에 대한 반응의 독립적인 예측 인자인 것을 나타내었다 (Yearley *et al.*, 2017).

[0008] 대부분의 고전적인 호지킨 림프종 (cHL)에서 처음 기재된, 염색체 영역 9p24.1의 증폭은 향상된 JAK2 활성을 통한 (그안에 잔류하는) PD-L1 및 PD-L2의 직접적인 상향 조절뿐만 아니라 간접적인 유도를 유발한다 (Roemer *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2014; Green *et al.*, 2010; Van Roosbroeck *et al.*, 2016). cHL 이외에, 높은 PD-L1/PD-L2 공동-발현의 이러한 유전적 드라이버(genetic driver)는 또한 원발성 종격동 거대 B-세포 림프종 (Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma; PMBL), T 세포 림프종, 및 다양한 조직구 및 수지상 세포 악성 종양의 대부분에서 발견된다. 놀랍지 않게도, 다수의 이들 암은 PD-1 차단에 반응하는 것을 나타내었다. 보다 최근에, 9p24.1 증폭은 고형 종양 예컨대 3중-음성 유방암 (TNBC)에서 입증되었다 (Howitt *et al.*, 2016; Barrett *et al.*, 2015). PD-L1 및 PDL2의 상대적으로 높은 공동-발현은 또한 다수의 다른 암 예컨대 무엇보다도 위 암종, 흑색종, 폐, 두경부, 자궁경부 및 외음부의 편평세포 암종, 방광암, 및 간세포 암종에서 관찰되었다 (Baptista *et al.*, 2016; Danilova *et al.*, 2016; Derks *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2016; Howitt *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2015; Nomi *et al.*, 2007; Obeid *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016; Yearley *et al.*, 2017; Van Roosbroeck *et al.*, 2016; Barrett *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2016; Inoue *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2011). 이들 종양 그 자체의 발현 이외에, PD-L2의 기질 및 내피 발현이 또한 여러 이들 종양에 대해 문서화되었다 (Yearley *et al.*, 2017). 이들 발견은 이러한 암에서의 PD-L1 차단의 치료적 잠재력에 대한 한계를 시사한다.

[0009] PD-1 공동-억제 수용체는 활성화된 T 세포 및 NK 세포에 의해 주로 발현되며, 이에 결합되어 PD-리간드에 의한 결합을 방해하는 항체에 의해 표적화될 수 있다. 반면, PD-L1은 종양 세포 및 억제성 기질 집단에 의해 발현되며, 세포 독성 이펙터(cytotoxic effector) 기능을 가능하게 하는 항체를 사용하여 표적화될 수 있다. 이러한 항체-의존적 세포의 세포독성 (ADCC)이 가능한 PD-L1 항체의 이론적 장점은 시험관 내에서 입증될 수 있지만, 환자에서 실제 이펙터 기능 또는 순수한 차단 변이체에 비해 개선된 결과를 입증하는 환자 데이터는 존재하지 않는다 (Boyerinas *et al.*, 2015).

[0010] PD-L1 및 PD-L2는 각각 PD-1과 구별되는 추가적인 수용체에 결합되기 때문에 단지 대략 40% 동일성만을 공유한다 (Latchman *et al.*, 2001). PD-L1은 또한 추가적인 음성 T 세포 조절 상호 작용에서 B7-1과 결합한다 (Butte *et al.*, 2007; Butte *et al.*, 2008). 마우스에서, PD-L2는 골수 세포 또는 T 세포 상의 RGMb에 결합될 수 있고, 흡입된 항원에 대한 내성을 조절할 수 있다 (Xiao *et al.*, 2014; Nie *et al.*, 2017). 종양에서 RGMb에 결합하는 PD-L2의 역할은 인간에서의 상호 작용과 관련하여 아직 기재되어 있지 않다. 이는 PD-L1 및 PD-L2에 대한 이중 특이적 항체를 갖는 것으로 치료적 관점에서 극히 유리한 것으로 증명될 수 있다.

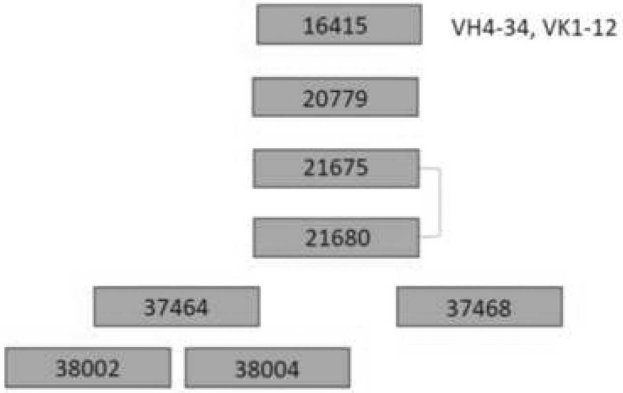
발명의 내용

[0011] **요약**

[0012] 본 개시내용은 비-표적 결합(off-target binding)을 나타내지 않거나 거의 나타내지 않으면서도, PD-L1 및 LD-L2 둘 모두에 대해 선택적으로 결합하는 매우 특이적인 이중 특이적 항체의 놀라운 발명자의 발견에 관한 것이다. 아래에 표 1에 예시된 바와 같이, 발명자는 ADI-16415로 시작하는 일련의 PD-L1/PD-L2 이중 결합 항체를 개발하였다. ADI-16415는 ADI-37464를 얻기 위해 여러 차례의 친화성 성숙이 이루어지며, 이는 PD-L1 및 PD-L2에 대해 높은 선택성을 나타내지만, 또한 큰 계열의 티로신 키나아제 수용체에 속하는 막관통 수용체인 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1) 수용체에 대한 비-표적 결합을 나타내었다. 발명자는 ADI-37464에 의해 나타나는 비-표적 결합을 또한 회피하는 PD-L1 및 LD-L2 둘 모두에 대한 선택적 결합을 유지하는 신규한 항체를 식별하기 위해 Ab-37464의 변형을 지속하였다. 발명자는 ADI-38000 시리즈의 항체 (예를 들어, Ab-38000 - Ab-38004)를 조작

하였고, 이는 비-표적 인슐린 수용체 결합을 회피하도록 설계된 경쇄 CDR 돌연변이를 갖는 37464의 유도체이다.

표 1



아테졸리주맙 PD-L1 에피토프에 근접
24F.10C12에 유사한 PD-L2 에피토프

[0013]

[0014] 아래의 표 2는 Ab-38000 시리즈의 항체에 대한 경쇄 CDR 서열의 변이뿐만 아니라 특징적인 비 표적 인슐린 수용체 결합 및 PD-L1 및 PD-L2 친화성을 요약하고 있다.

표 2

Ab 명칭	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	인슐린 수용체 결합	PD-L1 친화성	PD-L2 친화성
ADI-37464 (원래의 선도물질)	RASQGINSFLA (서열 번호 13)	AASSLNS (서열 번호 11)	QKAVYFPPT (서열 번호 15)	높음	높음	높음
ADI-38000	RASQGINSFLA (서열 번호 13)	AA**D**SI**Q**S (서열 번호 14)	QKAVYFPPT (서열 번호 15)	높음	높음	높음
ADI-38001	RASQGINSFLA (서열 번호 13)	AA**D**SI**Q**S (서열 번호 14)	QK**S**VYFPPT (서열 번호 12)	높음	높음	높음
ADI-38002	RASQ**D**INSFLA (서열 번호 10)	AASSLNS (서열 번호 11)	QK**S**VYFPPT (서열 번호 12)	매우 낮음	높음	높음
ADI-38003	RAS**K**GISSFLA (서열 번호 16)	AASSLNS (서열 번호 11)	QKAVYFPPT (서열 번호 15)	낮음	높음	높음
ADI-38004	RASQGI**S**SFLA (서열 번호 17)	AASSL**Q**S (서열 번호 14)	Q**S**AVYFPPT (서열 번호 19)	무시할 정도	중간	중간

[0015]

[0016] 따라서, 개시내용은 비-표적 결합을 또한 나타내거나 거의 나타내지 않으면서, PD-L1 및 LD-L2 둘 모두에 대한 높은 친화성을 나타내는 이중 특이적 항체인 ADI-38002의 놀랍고도 그리고 예상 밖의 식별에 기반한다. 발명자는 ADI-37464 및 ADI-38002를 구별하는 조작된 변형이 단일 비-보존적 아미노산 점 돌연변이 (예를 들어, ADI-38002의 아스파르트산에 대해 ADI-37464의 글리신으로의 치환)에 기반한다는 것점에 특히 놀랐으며, 이는 일반적으로 결합을 방해하고/하거나 결합 친화성을 감소시키는 것으로 예상될 것이다.

[0017] 이에 따라, 본 개시내용에 따르면, (i) CDR1 GSLSGYPWS (서열 번호 7), CDR2 ETDVSGWTDYNPSLKS (서열 번호 8), 및 CDR3 ARDGRRMGTPSFDI (서열 번호 9)의 중쇄 CDR 서열 및 CDR1 RASQDINSFLA (서열 번호 10), CDR2 AASSLNS (서열 번호 11), 및 CDR3 QKSVYFPPT (서열 번호 12)의 경쇄 CDR 서열을 갖거나; (ii) CDR1 GSLSGYPWS (서열 번

호 7), CDR2 ETDVSGWTDYNPSLKS (서열 번호 8), 및 CDR3 ARDGRRMGTPSFDI (서열 번호 9)의 중쇄 CDR 서열 및 CDR1 RASQGINSFLA (서열 번호 13), CDR2 AADSIQS (서열 번호 14), 및 CDR3 QKAVYFPPT (서열 번호 15)의 경쇄 CDR 서열을 갖거나; 또는 (iii) CDR1 GSLSGYPWS (서열 번호 7), CDR2 ETDVSGWTDYNPSLKS (서열 번호 8), 및 CDR3 ARDGRRMGTPSFDI (서열 번호 9)의 중쇄 CDR 서열 및 CDR1 RASQGINSFLA (서열 번호 13), CDR2 AADSIQS (서열 번호 14), 및 CDR3 QKSVYFPPT (서열 번호 12)의 경쇄 CDR 서열을 갖거나; (iv) CDR1 GSLSGYPWS (서열 번호 7), CDR2 ETDVSGWTDYNPSLKS (서열 번호 8), 및 CDR3 ARDGRRMGTPSFDI (서열 번호 9)의 중쇄 CDR 서열 및 CDR1 RASKGISSFLA (서열 번호 16), CDR2 AASSLNS (서열 번호 11), 및 CDR3 QKAVYFPPT (서열 번호 15)의 경쇄 CDR 서열을 갖거나; 또는 (v) CDR1 GSLSGYPWS (서열 번호 7), CDR2 ETDVSGWTDYNPSLKS (서열 번호 8), 및 CDR3 ARDGRRMGTPSFDI (서열 번호 9)의 중쇄 CDR 서열 및 CDR1 RASQGISSFLA (서열 번호 17), CDR2 AASSLQS (서열 번호 18), 및 CDR3 QSAVYFPPT (서열 번호 19)의 경쇄 CDR 서열을 갖는, PD-L1 및 PD-L2 둘 모두에 선택적으로 결합하는 항체 또는 항체 단편 (PD-L1 및 PD-L2에 대한 이중 특이적 항체 (DSPDL))를 제공한다. 항체 또는 항체 단편은 다음의 것을 갖는 가변 서열에 의해 코딩(encoding)될 수 있다:

[0018] (a) 다음의 서열 번호 3에 대해 적어도 또는 약 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 중쇄 뉴클레오티드 서열:

CAAGTTCAACTCCAACAATGGGGTGCCGGGCTGCTGAAGCCGTCCGAAACGTTG
AGTCTCACCTGCGCCGTGTACGGCGGCAGTCTTTCAGGCTATCCATGGTCCTGGA
TAAGGCAGCCCCCCGGCAAGGGTCTCGAATGGATAGGTGAGACGGACGTGTCTG
GCTGGACAGATTACAACCCTTCTCTGAAGTCTCGCGTTACCATTTCCGTAGATAC
AAGTAAGAATCAGTTCTCACTGAAGCTCAGTTCTGTAACCGCTGCCGACACCGCA
GTGTACTATTGTGCAAGAGATGGACGCAGGATGGGAACTCCAAGCTTTGACATTT
GGGGCCAGGGTACGATGGTGACTGTTTCCTCCGCCTCAACGAAAGGGCCATCTGT
ATTCCCATTGGCTCCGAGTAGTAAGAGTACAAGTGGTGGGACCGCAGCGCTGGG
ATGCCTCGTCAAGGATTATTTTCCCGAACCAGTAACTGTAAGTTGGAATAGCGGG
GCATTGACAAGCGGCGTTCACACCTTTCCAGCGGTGCTTCAATCTTCTGGACTCT
ACTCATTGAGCTCAGTTGTCACCGTTCCTTCAAGTTCCTTGGGCACGCAGACATA
TATCTGCAATGTGAATCATAAACCTTCTAATACGAAGGTCGATAAGAAAGTGGA
GCCAAAATCATGTGATAAGACGCATACTTGCCCCCCCTGCCCAGCCCCTGAGCTG
TTGGCAGGTCCCGATGTCTTTCTCTTTCCGCCCAAGCCGAAGGATACGCTTATGA
TCTCCAGGACTCCTGAGGTGACTTGCGTCGTTGTCGACGTATCCCACGAAGATCC
TGAGGTGAAGTTTAATTGGTATGTCGACGGAGTAGAGGTGCATAATGCTAAAAC
GAAACCTCGGGAAGAGCAATATAATTCCACTTACAGAGTAGTGAGCGTTCTCAC
AGTTTTGCATCAGGACTGGCTTAACGGAAAGGAGTATAAATGTAAGGTCAGTAA
CAAAGCTCTTCCAGCTCCCGAGGAGAAAACAATTTCAAAGGCAAAGGGCCAACC
TAGGGAACCGCAGGTGTATACTCTCCCCCCAAGCCGCGAAGAAATGACGAAAAA
CCAGGTGTCCCTCACTTGCCTGGTCAAAGGTTTCTATCCTTCTGACATAGCGGTG

[0019]

GAGTGGGAGAGTAACGGCCAACCAGAGAACAATTATAAGACCACGCCTCCAGTT
CTGGATTCCGATGGATCATTCTTTCTGTACTCTAAATTGACGGTTGACAAATCCC
GCTGGCAGCAGGGAAACGTATTTTCATGTTCCGTGATGCATGAAGCTTTGCACAA
TCACTACACTCAAAAGAGTTTGAGCTTGTCACCGGGAAAGTAA (서열 번호 3)

[0020] , 및

[0021] (b) 다음의 서열 번호 5에 대해 적어도 또는 약 70%, 80% 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 경쇄 뉴클레오티드 서열:

GACATTCAGATGACGCAAAGCCCCAGCTCTGTCTCAGCTTCCGTGGGTGATAGGG
TGACTATTACATGTCGAGCCTCACAAGATATTAATAGCTTTCTTGCATGGTATCA
GCAAAAGCCAGGGAAGGCACCTAAGCTCCTGATTTATGCTGCCTCTTCTTTGAAT
AGCGGGGTCCCCTCCCGCTTCTCAGGATCTGGGTCAGGGACTGACTTCACGCTGA
CTATATCCTCACTCCAACCAGAAGATTTCGCCACTTATTACTGCCAAAAATCCGT
ATATTTCCCGCCCACATTCGGTGGTGGGACAAAAGTGGAAATCAAGAGAACTGT
CGCTGCCCCATCTGTTTTCATCTTTCCACCGAGCGACGAACAGCTCAAAAGCGGC
ACTGCGAGTGTTGTTTGTCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGGGAAGCAAAGGTGC
AGTGGAAGGTAGACAATGCTCTGCAATCCGGGAATAGTCAGGAATCCGTCACGG
AGCAAGACAGTAAGGACTCCACGTATTCCTTGAGTAGTACATTGACCCTCAGTAA
AGCGGATTACGAGAAACACAAAGTTTACGCTTGTGAAGTAACGCATCAGGGGTT
GTCCAGTCCGGTTACCAAATCCTTCAATCGGGGAGAGTGTTGA (서열 번호 5).

[0022]

[0023] 항체 또는 항체 단편은 다음의 서열 번호 4에 대해 적어도 또는 약 70%, 80% 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 중쇄:

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSLSGYPWSWIRQPPGKGLEWIGETDVSGW
TDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGRRMGTPSFDIWGQG
TMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열
번호 4) 및

[0024]

[0025] 다음의 서열 번호 6에 대해 적어도 또는 약 70%, 80% 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 경쇄:

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDINSFLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLNSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQKSVYFPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열 번호 6)

[0026]

[0027] 를 포함할 수 있다.

[0028] 대상체(subject)에서 PD-L1-, PD-L2-, 또는 PD-L1 및 PDL2-양성 암 세포를 상기 기재된 바와 같은 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법을 또한 제공한다. PD-L1-, PD-L2-, 또는 PD-L1 및 PDL2-양성 암 세포는 고형 종양 세포, 예컨대 폐암 세포, 뇌암 세포, 두경부암 세포, 유방암 세포, 피부암 세포, 간암 세포, 췌장암 세포, 위암 세포, 결장암 세포, 직장암 세포, 자궁암 세포, 자궁경부암 세포, 난소암 세포, 고환암 세포, 피부암 세포, 식도암 세포, 림프종 세포, 신세포 암종 세포일 수 있거나, 또는 백혈병 또는 골수종 예컨대 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 또는 다발성 골수종일 수 있다.

[0029] 상기 방법은 PD-L1-, PD-L2-, 또는 PD-L1 및 PDL2-양성 암 세포와 제2 항암제 또는 치료제, 예컨대 화학요법제, 방사선 요법제, 면역 요법제, 호르몬 요법제, 또는 독소 요법제와 접촉시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 제2 항암제 또는 치료제는 세포내 PD-L1 또는 PD-L2 기능을 억제할 수 있다. 제2 항암제 또는 치료제는 제1 제제와 동시에 제공되거나 또는 제제 이전 및/또는 이후에 제공될 수 있다. PD-L1 또는 PD-L2-양성 암 세포는 전이성 암 세포, 다중 약물 내성 암 세포 또는 재발성 암 세포일 수 있다.

[0030] 항체 단편은 재조합 scFv (가변 단일 사슬 단편) 항체, 단일 도메인 항체, Fab 단편, F(ab')2 단편, 또는 Fv 단편일 수 있다. 항체는 키메라 항체(chimeric antibody), 인간화 항체, 또는 IgG일 수 있다. 항체는 인간 항체, 뮤린(murine) 항체, IgG, 인간화 항체 또는 인간화 IgG일 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 표지, 예컨대 펩티드 태그, 효소, 자기 입자, 발색단, 형광 분자, 화학 발광 분자 또는 염료를 추가로 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 이에 연결되는, 예컨대 광절단성 링커 또는 효소-절단형 링커를 통해 항체 또는 항체 단편에 연결되는 항종양 약물을 추가로 포함할 수 있다. 항종양 약물은 독소, 방사성 동위원소, 사이토카인 또는 효소일 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 나노입자 또는 리포좀에 접합될 수 있다.

[0031] 다른 실시양태에서, (i) CDR1 서열 번호 7, CDR2 서열 번호 8, 및 CDR3 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열; 및 CDR1 서열 번호 10, CDR2 서열 번호 11, 및 CDR3 서열 번호 12의 경쇄 CDR 서열; (ii) CDR1 서열 번호 7, CDR2 서열 번호 8, 및 CDR3 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열 및 CDR1 서열 번호 13, CDR2 서열 번호 14, 및 CDR3 서열 번호 15의 경쇄 CDR 서열을 갖거나; 또는 (iii) CDR1 서열 번호 7, CDR2 서열 번호 8, 및 CDR3 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열, 및 CDR1 서열 번호 13, CDR2 서열 번호 14, 및 CDR3 서열 번호 12의 경쇄 CDR 서열을 갖거나; 또는 (iv) CDR1 서열 번호 7, CDR2 서열 번호 8, 및 CDR3 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열, 및 CDR1 서열 번호 16, CDR2 서열 번호 11, 및 CDR3 서열 번호 15의 경쇄 CDR 서열을 갖거나; 또는 (v) CDR1 서열 번호 7, CDR2 서열 번호 8, 및 CDR3 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열 및 CDR1 서열 번호 17, CDR2 서열 번호 18, 및 CDR3 서열 번호 19의 경쇄 CDR 서열을 갖는 항체 또는 항체 단편을 대상체에 전달하는 단계를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 항체 단편은 재조합 scFv (가변 단일 사슬 단편) 항체, Fab 단편, F(ab'h 단편, 또는 Fv 단편일 수 있다. 항체는 IgG일 수 있다. 항체는 키메라 항체 또는 인간화 항체일 수 있다. 전달 단계는 항체 또는 항체 단편 투여, 또는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 RNA 또는 DNA 서열 또는 벡터를 사용한 유전적 전달을 포함할 수 있다.

[0032] 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 3 및 서열 번호 5에 제시된 바와 같은 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩될 수 있거나, 또는 서열 번호 3 및 서열 번호 5로부터의 서열에 대해 적어도 또는 약 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 4 및 서열 번호 6으로부터의 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있거나, 서열 번호 4 및 서열 번호 6으로부터의 서열에 대해 적어도 또는 약 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있거나, 또는 서열 번호 4 및 서열 번호 6으로부터의 서열에 대해 적어도 또는 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다.

[0033] 항체 또는 항체 단편이 (i) 서열 번호 7, 서열 번호 8, 및 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열 및 서열 번호 10, 서열 번호 11, 및 서열 번호 12의 경쇄 CDR 서열; (ii) CDR1 서열 번호 7, CDR2 서열 번호 8, 및 CDR3 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열 및 CDR1 서열 번호 13, CDR2 서열 번호 14, 및 CDR3 서열 번호 15의 경쇄 CDR 서열을 특징으로 하거나; 또는 (iii) CDR1 서열 번호 7, CDR2 서열 번호 8, 및 CDR3 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열; 및 CDR1 서열 번호 13, CDR2 서열 번호 14, 및 CDR3 서열 번호 12의 경쇄 CDR 서열을 갖거나; 또는 (iv) CDR1 서열 번호 7, CDR2 서열 번호 8, 및 CDR3 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열 및 CDR1 서열 번호 16, CDR2 서열 번호 11, 및 CDR3 서열 번호 15의 경쇄 CDR 서열을 갖거나; 또는 (v) CDR1 서열 번호 7, CDR2 서열 번호 8, 및 CDR3 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열 및 CDR1 서열 번호 17, CDR2 서열 번호 18, 및 CDR3 서열 번호 19의 경쇄 CDR 서열을 갖는 단클론 항체가 또한 제공된다. 항체 단편은 재조합 scFv (가변 단일 사슬 단편) 항체, Fab 단편, F(ab')2 단편, 또는 Fv 단편일 수 있다. 항체는 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 IgG일 수 있다.

[0034] 서열 번호 3 및 서열 번호 5에 제시된 바와 같은 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 갖는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 핵산, 또는 서열 번호 3 및 서열 번호 5로부터의 서열에 대해 적어도 또는 약 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 코딩하는 핵산이 또한 제공된다. 서열 번호 4 및 서열 번호 6으로부터의 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 갖는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 핵산, 또는 서열 번호 4 및 서열 번호 6으로부터의 서열에 대해 적어도 또는 약 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함하는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 핵산이 또한 제공된다.

[0035] 또 다른 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편을 발현하는 하이브리도마 또는 조작된 세포를 제공하며, 여기서 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 7, 서열 번호 8, 및 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열 및 서열 번호 10, 서열 번호 11, 및 서열 번호 12의 경쇄 CDR 서열; (ii) CDR1 서열 번호 7, CDR2 서열 번호 8, 및 CDR3 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열 및 CDR1 서열 번호 13, CDR2 서열 번호 14, 및 CDR3 서열 번호 15의 경쇄 CDR 서열을 특징으로 하

거나; 또는 (iii) CDR1 서열 번호 7, CDR2 서열 번호 8, 및 CDR3 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열, 및 CDR1 서열 번호 13, CDR2 서열 번호 14, 및 CDR3 서열 번호 12의 경쇄 CDR 서열을 갖거나; 또는 (iv) CDR1 서열 번호 7, CDR2 서열 번호 8, 및 CDR3 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열 및 CDR1 서열 번호 16, CDR2 서열 번호 11, 및 CDR3 서열 번호 15의 경쇄 CDR 서열을 갖거나; 또는 (v) CDR1 서열 번호 7, CDR2 서열 번호 8, 및 CDR3 서열 번호 9의 중쇄 CDR 서열 및 CDR1 서열 번호 17, CDR2 서열 번호 18, 및 CDR3 서열 번호 19의 경쇄 CDR 서열을 갖는다. 항체 단편은 재조합 scFv (가변 단일 사슬 단편) 항체, 단일 도메인 항체, Fab 단편, F(ab')2 단편, 또는 Fv 단편일 수 있다. 항체는 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 IgG일 수 있다.

[0036] 추가의 실시양태는 상기 기재된 바와 같은 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 특징으로 하는 하나 이상의 항체 또는 항체 단편을 포함하는 암 백신을 포함한다. 적어도 하나의 항체 단편은 재조합 scFv (가변 단일 사슬 단편) 항체, 단일 도메인 항체, Fab 단편, F(ab')2 단편, 또는 Fv 단편일 수 있다. 항체 중 적어도 하나는 키메라 항체, 또는 IgG일 수 있다. 적어도 하나의 항체 또는 항체 단편은 본원에 제시된 바와 같은 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩될 수 있고, 상기 기재된 바와 같은 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩될 수 있고, 상기 기재된 바와 같은 서열에 대해 적어도 또는 약 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 적어도 하나의 항체 또는 항체 단편은 상기 기재된 바와 같은 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있고, 상기 기재된 바와 같은 서열에 대해 적어도 또는 약 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다.

[0037] 다른 실시양태에서, 대상체에서 PD-L1 또는 PD-L2 발현 세포를 검출하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체로부터의 샘플을 기재된 바와 같은 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 특징으로 하는 항체 또는 항체 단편과 접촉시키는 단계 및 상기 항체 또는 항체 단편을 상기 샘플의 세포에 결합시킴으로써 상기 샘플에서 PD-L1 또는 PD-L2 발현 세포를 검출하는 단계를 포함한다. 샘플은 체액 또는 조직 샘플일 수 있다. 세포는 암 세포, 예컨대 림프종 세포, 유방암 세포, 또는 신세포 암종 세포일 수 있다. 세포는 면역 억제와 관련된 세포일 수 있다. 면역 억제와 관련된 세포는 종양 미세환경에서의 비-암 세포(non-cancerous cell), 예컨대 기질 세포 또는 내피 세포일 수 있다. 검출은 ELISA, RIA, 또는 웨스턴 블롯(Western blot)을 포함할 수 있다. 상기 방법은 추가로 방법을 2회 수행하는 단계 및 제1 검정과 비교하여 항원 수준의 변화를 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 상기 기재된 바와 같은 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩될 수 있고, 상기 기재된 바와 같은 서열에 대해 적어도 또는 약 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열에 의해 코딩될 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 상기 기재된 서열에 따른 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있고, 상기 기재된 서열에 대해 적어도 또는 약 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 포함할 수 있다.

[0038] 본원에 기재된 임의의 방법 또는 조성물은 본원에 기재된 임의의 다른 방법 또는 조성물과 관련하여 실시될 수 있는 것으로 고려된다. 본 개시내용의 다른 목적, 특징 및 장점은 다음의 상세한 설명으로부터 자명하게 될 것이다. 그러나, 개시내용의 사상 및 범위 내의 다양한 변화 및 변형이 이러한 상세한 설명으로부터 본 기술분야의 당업자에게 자명하게 될 것이기 때문에, 상세한 설명 및 특정 실시예는 개시내용의 특정 실시양태를 나타내지만, 단지 예시를 위해 제공되는 것으로 이해되어야 한다.

[0039] 본원에 사용되는 바와 같은, 특정된 성분과 관련하여 "본질적으로 함유하지 않는"은 특정된 성분의 어느 것도 조성물로 의도적으로 제형화되지 않고/않거나 단지 오염물로서 또는 미량으로 존재하는 것을 의미하기 위해 본원에 사용된다. 조성물의 임의의 의도하지 않는 오염으로부터 생성된 특정된 성분의 총량은 바람직하게는 0.01 % 미만이다. 특정된 성분의 어느 양도 표준 분석 방법을 사용하여 검출될 수 없는 조성물이 가장 바람직하다.

[0040] 본원에 사용되는 바와 같이 명세서 및 청구항에서, "a" 또는 "an"은 하나 이상을 의미할 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이 명세서 및 청구항에서, 단어 "포함하는"과 연관하여 사용될 때, 단어 "a" 또는 "an"는 하나 초과를 의미할 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같이 명세서 및 청구항에서, "다른" 또는 "추가의"는 적어도 2차 이상을 의미할 수 있다.

[0041] 본원에 사용되는 바와 같이 명세서 및 청구항에서, 용어 "약"은 값이 장치에 대해 내재적 오차 변화를 포함하는 값을 나타내기 위해 사용되며, 상기 방법은 연구 목적에 존재하는 값, 또는 변화를 결정하기 위해 이용된다.

[0042] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 장점은 다음의 상세한 설명으로부터 자명하게 될 것이다. 그러나, 발명의 사상 및 범위 내의 다양한 변화 및 변형이 이러한 상세한 설명으로부터 본 기술분야의 당업자에게 자명하게 될 것이기 때문에, 상세한 설명 및 특정 실시예는 발명의 특정 실시양태를 나타내지만, 단지 예시를 위해 제공되는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0043] 다음의 도면은 본 명세서의 일부를 형성하며, 본 발명의 특정 양태를 추가로 입증하기 위해 포함된다. 발명은 본원에 제공된 특정 실시양태의 상세한 설명과 조합하여 이들 도면 중 하나 이상을 참조하여 더 잘 이해될 수 있다.

도 1은 Octet에 의한 38000 시리즈 친화성 측정을 예시한다. 38000 시리즈의 낮은/부재하는 인슐린 수용체 결합 구성원의 각각에 대한 친화성은 종 지표의 PD-L1 및 PD-L2에 대해 Octet에 의해 측정되었다. 인간 1가 PD-L1 및 PD-L2 친화성은 또한 Biacore에 의해 측정되었다.

도 2a-b는 38000 시리즈 PD-L1/PD-L2 이중-특이적 항체를 사용한 CT26 모 및 CT26-PD-L2 종양의 치료를 예시한다. 도 2a는 모 CT26 종양이 BALB/C 마우스에 이식되어, 10mg/kg의 나타낸 항체를 사용하여 3, 6, 및 9일차에 처리되는 것을 예시한다. 도 2b는 CT26-PDL2 종양이 BALB/C 마우스에 이식되어, 10mg/kg의 나타낸 항체를 사용하여 3, 6, 및 9일차에 처리되는 것을 예시한다. 종양 크기는 종점으로서 1000mm^3을 사용하여 캘리퍼 측정되었다.

도 3은 38000 시리즈 PD-L1/PD-L2 이중-특이적 항체 - 제2 실험을 사용한 CT26 모체의 처리를 예시한다. 모 CT26 종양은 BALB/C 마우스에 이식되어, 10mg/kg의 나타낸 항체를 사용하여 3, 6, 및 9일차에 처리되었다. 종양 크기는 종점으로서 1000mm^3을 사용하여 캘리퍼 측정되었다.

도 4는 인간화 마우스에서의 BFTC-909 신세포 암종의 처리를 예시한다. BFTC-909 이종 이식 종양은 huNOG-ExL CD34+ 줄기 세포 인간화 마우스에 이식되었고, 종양이 50mm^3에 도달되었을 때 나타낸 항체를 사용하여 10mg/kg으로 격주로 처리되었다.

도 5는 38002 PD-L1/PD-L2 항체가 인간 말초 혈액 혼합 림프구 반응에서 IFN-감마 분비를 향상시키는 것을 예시한다. 다른 공여체 (공여체 1)로부터의 시험관내 생성된 수지상 세포는 2개의 다른 공여체 (공여체 2 또는 3)로부터의 T 세포와 공동 배양되었고, IFN-감마 분비는 72시간의 공동-배양 이후 ELISA에 의해 측정되었다.

도 6은 38002 및 38004가 생리학적 농도에서 인간 인슐린 수용체에 대한 결합을 가지지 않음을 예시한다. 고농도의 인슐린 수용체를 발현하는 CHO 세포는 나타낸 PD-L1/PD-L2 항체 및 2차 항-인간 PE 접합체로 염색되었다. 결합량은 BD LSRII 상에서의 유세포 분석에 의해 측정되었다.

도 7은 ADI-38002 완전 중쇄 가변 영역 서열을 예시한다. (서열 번호 20 및 21).

도 8은 ADI-38002 완전 경쇄 가변 영역 서열을 예시한다. (서열 번호 22 및 23).

도 9는 ADI-38002 인간 IgG1 (GASDIE) 불변 영역 서열을 예시한다. (서열 번호 24 및 25).

도 10은 연구에 사용된 CHO-INSR 세포에 대한 PE-표지화 아이소타입(PE-labeled isotype), 항-인간 INSR, 항-인간 PD-L1, 및 항-인간 PD-L2의 염색을 나타내는 히스토그램 플롯(histogram plot)을 예시한다. 게이트는 아이소타입 대조군 샘플 상에 고정되었다. PE 발현은 x-축에 보여진다.

도 11은 38002 (원), 37464 (사각형) 또는 대조군 (개방형 원) 항체의 연속 희석액와 함께 인큐베이션된 INSR+ CHO 세포의 결과를 예시한다. 형광은 유세포 분석에 의해 측정되었다. 평균 ± SDM (n=2)는 각각의 항체의 각각의 농도에 대해 보여진다. 33.333 - 0.00511 nM의 용량 범위가 INSR+ CHO 세포에 대해 시험되었다.

도 12a는 항체 의존적 세포의 세포 독성 리포터 생물 검정(antibody dependent cellular cytotoxicity reporter bioassay) (ADCC, Promega, 2020)의 도면을 예시한다. **도 12b**는 CHO-INSR 세포에 대한 38002 및 37464의 ADCC (항체 의존적 세포의 세포 독성 리포터 생물 검정 (Promega, 2020)) 활성을 예시한다. 38002, 37464, 또는 IgG 아이소타입의 농도는 x-축 상에 보여지며, 발광 활성은 y-축 상에 보여진다. 평균 ± SDM (n=2)는 각각의 항체의 각각의 농도에 대해 보여진다. 22.22 - 0.0302 nM의 용량 범위가 INSR+ CHO 세포에 대해 시험되었다.

도 13a는 항체 의존적 세포의 식세포 작용 리포터 생물 검정 (ADCP, Promega, 2016)의 도면을 예시한다. **도 13b**는 CHO-INSR 세포에 대한 38002 및 37464의 ADCP 활성을 예시한다. 38002, 37464, 또는 IgG 아이소타입의 농도는 x-축 상에 보여지며, 발광 활성은 y-축 상에 보여진다. 평균 ± SD (n=2)는 각각의 항체의 각각의 농도에 대해 보여진다. 22.22 - 0.0302 nM의 용량 범위가 INSR+ CHO 세포에 대해 시험되었다.

도 14a-e는 선택된 이중 특이적 항체가 Fcy 수용체에 결합하여, NK 세포 항체-의존적 세포의 세포 독성을 유도할 수 있음을 나타낸다. (도 14a) 칼세인으로 표지화된 U2940 표적 세포는 나타낸 마우스 IgG2a 이중 특이적 항체와 함께 인큐베이션되었고, 마우스 비장으로부터 단리된 NK 세포와 공동 배양되었다. 세포 용해물의 백분율은 샘플 및 대조군의 칼세인 방출을 사용하여 측정되었다. 평균 ± SEM (n=2)는 각각의 항체의 각각의 농도에 대해 보여진다. (도 14b-c) 중국 햄스터 난소 (CHO) PD-L1^{+} CHO 세포 및 PD-L2^{+} CHO 세포 (2개의 세포주의 1:1 혼합물)은 x-축 상에 보여진 농도에서 이중-특이적 항체와 함께 인큐베이션되었고, NFAT-RE 루시퍼라아제 리포터 Jurkat T 세포 (ADCC에 대해 FcgRIIIa 또는 ADCP에 대해 FcgRIIa-H)와 함께 공동-배양되었다. 더 높은 신호는 효과적인 ADCC (도 14b) 또는 ADCP (도 14c) 활성화 경로를 나타낸다. 평균 ± SEM (n=3)는 각각의 항체의 각각의 농도에 대해 보여진다. (도 14d-e) PD-L2를 이소성으로(ectopically) 발현하는 뮤린 흑색종 암 세포 B16F10은 x-축 상에 보여지는 농도에서 이중-특이적 항체와 함께 인큐베이션되었고, NFAT-RE 루시퍼라아제 리포터 Jurkat T 세포 (ADCC에 대해 FcgRIIIa 또는 ADCP에 대해 FcgRIIa-H)와 함께 공동-배양되었다. 더 높은 신호는 효과적인 ADCC (도 14d) 또는 ADCP (도 14e) 활성화 경로를 나타낸다. 평균 ± SEM (n=3)는 각각의 항체의 각각의 농도에 대해 보여진다. 비선형 회귀를 사용하여 GraphPad Prism에서 최적-핏 곡선(best-fit curve)을 생성하였다.

도 15a-h는 선택된 이중-특이적 항체가 종양 성장을 지연시키고, T 세포 활성화를 증가시키고, 골수 억제를 감소시킴으로써 B16 흑색종의 생존을 증가시키는 것을 나타내었다. 마우스 IgG1 항-PD-1 (클론 RMP1-14) 및 마우스 IgG2a 이중 특이적 항체를 갖는 처리제를 3, 6, 9, 및 12일차에 주입하였다. (도 15a-b) C57Bl/6 마우스에 50,000개의 PD-L2-과발현 B16 세포를 피하로 주사하였다. 종양 성장 (도 15a) 및 생존 (도 15b)을 결정하기 위해 마우스를 모니터링하였다. 평균 ± SEM (n=20)이 보여진다. (도 15c-h) C57Bl/6 마우스에 100,000개의 PD-L2-과발현 B16 세포를 피하로 주사하였고, (도 15a)에 나타낸 바와 같이 처리되었다. 림프절 (도 15c-e) 및 종양 (도 15f-h)을 수집하고, D14에서 유세포 분석에 의해 분석하였다. 개별적인 값 및 평균이 보여진다.

도 16a-b는 항체 37464가 27869 및 27907에 대한 치료적 장점을 제공하는 것을 나타낸다. (도 16a) Balb/c 마우스에 100,000개의 CT26 세포를 피하로 주사하였고, 마우스 IgG1 항-PD-1 (클론 RMP1-14) 또는 마우스 IgG2a 이중 특이적 항체를 사용하여 3, 6, 9, 및 12일차에 처리하였다. 종양 성장을 결정하기 위해 마우스를 모니터링하였다. 평균 ± SEM (n=10)이 보여진다. (도 16b) 아이소타입 대조군 항체에 대한 BiPDL의 연속 희석액을 인간 재조합 B7.1과 조합되는 CHO/PDL-1 세포와 함께 사전-인큐베이션하였고, 그 다음 PE-표지화 항-인간 B7.1 항체를 사용한 2차 염색이 후속되었다. 표지화된 PE-표지화 항-인간 B7.1 항체의 결합은 B7.1 결합을 위한 세포 표면에서 자유롭게 이용 가능한 PD-L1의 지표이었다. 비선형 회귀를 사용하여 GraphPad Prism에서 최적-핏 곡선을 생성하였다.

도 17a-i는 비-표적 결합이 없는 최적화된 이중-특이적 항체의 선택을 나타낸다. (도 17a-b) 라이브러리 스크린(library screen)으로부터의 모든 히트(hit)를 코딩하는 벡터 및 EGFR (형질감염 및 음성 대조군) 및 CD20 (양성 대조군)을 코딩하는 대조군 벡터를 2회 재배열/재발현시켰다. (도 17a) 5 μg/mL의 37464 또는 (도 17b) 20 μg/mL의 38002를 사용한 세포 고정 이후에 세포를 조사하였다. 1 μg/mL 리툭시맙(Rituximab) 바이오시밀러 (양성 대조군)을 사용하거나, 또는 시험 분자 (AF647 항-hIgG Fc 2차 단독) 없이 평행 슬라이드를 조사하였다. 시험 항체에 대한 특이적인 상호 작용은 청색 (약한 강도) 및 녹색 (약한/중간 강도 및 그 초과)으로 나타나며; 비특이적이지만, 시험과 대조군 처리 사이에 큰 강도 차이가 존재하는 상호 작용이 보라색으로 나타나며; 보다 강한 비특이적 상호 작용은 흑색으로 나타나며; 양성 대조군 상호 작용은 오렌지색으로 나타난다. INSR (긴 그리고 짧은 동형체(long and short isoform)) 및 INSR+IGF1R 세포 스팟(spot)은 적색으로 강조되어 표시된다. (도 17c) INSR^{+} CHO 세포는 38002 (적색), 37464 (청색) 또는 대조군 (흑색) 항체의 연속 희석액과 함께 인큐베이션되었다. 형광은 유세포 분석에 의해 측정되었다. 평균 ± SDM (n=2)는 각각의 항체의 각각의 농도에 대해 보여진다. 33.333 - 0.00511 nM의 용량 범위는 INSR^{+} CHO 세포에 대해 시험되었다. (도 17d-e) PD-L1 (D) 또는 PD-L2를 발현하는 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포 (도 17e)는 x-축에 보여지는 농도에서 이중-특이적 항체와 함께 인큐베이션되고, NFAT 루시퍼라아제 리포터 Jurkat T 세포와 공동-배양되었다. 더 높은 신호는 PD-1 경로의 보다 효과적인 차단을 나타낸다. (도 17f-g) 중국 햄스터 난소 (CHO) PD-L1+ CHO 세포 및 PD-L2+ CHO 세포 (2개의 세포주의 1:1 혼합물)은 x-축에 보여지는 농도에서 이중-특이적 항체와 인큐베이션되고, NFAT-RE 루시퍼라아제 리포터 Jurkat T 세포 (ADCC에 대해 FcgRIIIa 또는 ADCP에 대해 FcgRIIa-H)와 함께 공동-배양되었다. 더 높은 신호는 효과적인 ADCC (도 17f) 또는 ADCP (도 17g) 활성화 경로를 나타낸다. 평균 ± SEM (n=3)는 각각의 항체의 각각의 농도에 대해 보여진다. (도 17h-i) PD-L2를 이소성으로 발현하는 뮤린 흑색종 암 세포 B16F10은

x-축에 보여지는 농도에서 이중-특이적 항체와 함께 인큐베이션되고, NFAT-RE 루시퍼라아제 리포터 Jurkat T 세포 (ADCC에 대해 FcgRIIIa 또는 ADCP에 대해 FcgRIIa-H)와 함께 공동-배양되었다. 더 높은 신호는 효과적인 ADCC (도 17h) 또는 ADCP (도 17i) 활성화 경로를 나타낸다. 비선형 회귀를 사용하여 GraphPad Prism에서 최적-핏 곡선을 생성하였다.

도 18a-b는 유사한 친화성을 가지지만, INSR에 대한 결합이 없는 이중 특이적 항체 38002의 특성화를 나타낸다. (도 18a) 표는 단량체성 PD-L1 및 PD-L2에 대한 이중-특이적 항체 38002의 친화성을 나타낸다. KD는 Octet® 플랫폼 상에서 측정되었고, 몰로 나타낸다. (도 18b) 살아 있는 HEK293 세포 상에서 발현된 CD274 (PD-L1), PDCD1LG2 (PD-L2), INSR 긴 동형체, 및 INSR 짧은 동형체에 결합되는 38002의 적정 곡선.

도 19a-h는 이중-특이적 항체 38002는 T 세포 활성화를 증가시키고, 골수 억제를 감소시킴으로써 B16 흑색종의 생존을 증가시키는 것을 나타낸다. (도 19a) C57BL/6 마우스에 PD-L2-발현 B16F10 세포를 이식하였다. 마우스는 3, 6, 9, 및 12일차에 항-마우스 PD-1 (클론 RMP1-14), 마우스 IgG2a 항-PD-L1 항체, 마우스 IgG2a 항-PD-L2 항체, 마우스 IgG2a 항-PD-L1 및 항-PD-L2 항체의 1:1 혼합물, 또는 인간 IgG1-GASDIE 38002 이중 특이적 항체를 사용한 복강내 처리를 받았다. 평균 ± SEM 종양 부피 (mm^3)는 종양 접종 이후의 일수에 대해 플롯팅(plotting)된다. (도 19b-h) C57Bl/6 마우스에 100,000개의 PD-L2-과발현 B16 세포를 피하로 주사하였다. 마우스 IgG1 항-PD-1 (클론 RMP1-14) 및 마우스 IgG2a 38002를 갖는 처리제를 3, 6, 9 및 12일차에 주사하였고, 종양을 수집하였고, D14에 유세포 분석에 의해 분석하였다. 개별적인 값 및 평균이 보여진다.

도 20a-d는 C57BL/6 마우스에 500,000개의 B16-PD-L2 세포를 주사한 것을 나타낸다. 인간 IgG1-GASDIE 38002 이중 특이적 항체는 3, 6, 9 및 12일차에 IP를 통해 20 mg/kg로 제공되었다. 마우스를 18일차에 안락사시켰고, 림프절을 수집하였고, CD11b, Gr-1, 아르기나제-1(Arginase-1) 및 FOXP3 또는 아이소타입 대조군에 대해 PE-표지화 항체로 염색시켰고, 유세포 분석에 의해 분석되었다.

도 21a-b는 이중 IMGS-001를 사용한 MDA-MB-231 종양을 가진 nu/nu 마우스의 처리는 종양 성장을 억제하고, CD11b+ 세포의 침윤을 감소시키는 것을 나타낸다. (도 21a) 평균 ± SEM 종양 부피 (mm3)는 x-축 상의 종양내 투여(tumor challenge) 이후의 일수에 대해 y-축 상에 플롯팅된다. 쌍을 이루지 않은 t-시험(unpaired t-test)을 사용하여 그룹들을 비교하였다. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. (도 21b) 처리되지 않은 종양 및 이중 IMGS-001로 처리한 종양에서의 항-CD11b를 사용한 면역 조직 화학 (배율 x200). 히스토그램은 전체 슬라이드 종양 조직에서 검출된 CD11b+ 세포의 평균 백분율 ± SD를 나타낸다. 쌍을 이루지 않은 t-시험을 사용하여 그룹들을 비교하였다. p = 0.0001.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] **예시적인 실시양태의 설명**

[0045] 발명자는 인간 PD-L1 및 PD-L2 단백질 둘 모두에 대해 결합 특이성을 갖는 단클론 항체를 미리 생성하였다. 이들 항체는 PD-L1 및 PD-L2 둘 모두에 결합되고, 이에 따라 예컨대 PD-L1/PD-L2와 PD-1의 상호 작용 및 PD-L1과 B7-1의 상호 작용을 차단함으로써 PD-L1, PD-L2, 또는 PD-L1 및 PD-L2의 PD-1에 대한 결합을 차단하는 기회를 제공하는 것으로 입증되었다. 이는 또한 PD-L1, PD-L2, 또는 PD-L1 및 PD-L2를 발현하는 암 세포에 대해 치료적 페이로드(therapeutic payload)를 전달하기 위해 사용될 수 있다.

[0046] 최근에, 발명자들은 PD-L1/PD-L2 친화성을 유지하면서 인간 인슐린 수용체에 대한 상당한 결합을 회피하기 위해 이중 특이성 PD-L1/PD-L2 항체를 조작하였다. 이는 경쇄 CDR 아미노산을 변형시킴으로써 달성되었다. 놀랍게도, 비표적 효과의 감소는 PD-1 차단을 능가하고, 단일 요법으로서 치료 반응을 매개하는 항체의 능력에 영향을 미치지 않는다는 것을 발견하였다. 발명자들은 놀랍게도 체크포인트 세포 감퇴(cytoreduction)의 추가적인 특성을 갖는 면역 체크포인트 항체의 새로운 하위부류를 확인하였고, 이에 따라 종양의 T 세포 침윤에 대한 기질 배리어(stromal barrier)의 파괴뿐만 아니라 직접적인 종양 세포 감퇴 및 항-전이 활성(anti-metastatic activity)을 가능하게 한다. 이러한 놀라운 그리고 예상하지 못한 결과는 이펙터(effector) T 세포 반응의 배제 및 억제로 인해 기존의 PD-1 항체에 대해 반응성이 저조한 (< 5%) "차가운(cold)" 암과 특히 관련된다.

[0047] 또한, 발명자들은 이후 시험관내의 복수의 종양 세포주의 항체-의존적 세포의 세포 독성 (ADCC) 및 식세포 작용(ADCP)을 매개하기 위해 임상적으로 입증된 돌연변이 유도를 사용하여 항체의 Fc 부분을 조작하였다. 항-PD-L1/PD-L2 이중 특이적 항체를 사용하여 처리된, 면역 배제된(immune excluded) (B16-PDL-2) 및 면역 침투된(immune infiltrated) (CT26, CT26-PD-L2, MC38) 종양이 주사된 마우스는 50% 초과의 생존을 나타내었고, 한편

뮤린 항-PD1으로의 처리는 차가운 종양에서 생존율 이익이 없거나 거의 없음을 나타내었다. 이중 특이적 항체로 처리된 마우스로부터의 종양 및 기질 성분의 생체외 세포 분석은 T 세포 활성화의 증가와 골수 세포 구획(myeloid cell compartment)의 감소를 야기하였다. 마지막으로, 이중 PD-L1/PD-L2 항체를 사용한 인간 삼중 음성 유방암 (MDA-MB-231)을 가진 nu/nu 마우스의 처리는 종양 성장을 상당하게 억제하였고, $CD11b^{+}$ 세포의 침윤을 감소시켰으며, 한편 임상적으로 증명된 항-PD-L1은 매우 제한된 효과를 가졌다.

[0048] 이러한 발견 및 개시내용의 다른 양태는 보다 더 상세하게 아래에 기재된다.

[0049] I. PD-L1

[0050] A. 구조

[0051] 프로그램화 사멸-리간드 1 (programmed death-ligand 1; PD-L1)은 *CD274* 유전자에 의해 코딩된 단백질이다. PD-L1은 다양한 사례, 예컨대, 임신, 조직 동종이식, 자가면역 질환, 암 및 다른 질환 상태 과정에서 면역 억제에 있어서 중요한 역할을 할 수 있는 40 kDa 1형 막관통 단백질이다. 인간 PD-L1 단백질은 아래에 나타낸 아미노산 서열에 의해 코딩된다:

[0052] MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVY
WEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVY
RCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTS
SDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPE
LPLAHPPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDT
HLEET (서열 번호 1)

[0053] B. 기능

[0054] PD-L1은 이의 수용체인 PD-1에 대한 리간드이다. PD-1은 활성화된 T 세포, B 세포, 및 골수 세포에서 발견될 수 있다. PD-1에 대한 PD-L1의 결합은 T 세포 및 B 세포 활성화 또는 억제를 조절한다. 항원 특이적 CD8+ T 세포 및 CD4+ 헬퍼 T 세포의 증식을 감소시키는 억제제 신호를 전달한다. PD-1에 대한 PD-L1의 결합은 또한 세포자멸사를 유도한다. CD8+ T 세포 및 CD4+ 헬퍼 T 세포의 이러한 감소는 PD-L1 발현 암 세포가 항-종양 면역을 회피하는 데 도움이 되는 것으로 여겨졌다 (Dong *et al.*, 2002). PD-L1의 상향 조절은 숙주 면역계의 회피와 관련되었고, 증가된 종양 공격성의 원인인 것으로 여겨진다 (Thompson *et al.*, 2004). 항-종양 면역의 회피에 있어서의 PD-L1의 역할은 이를 치료적 개입을 위한 유리한 표적이 되게 만드는 것이다.

[0055] II. PD-L2

[0056] A. 구조

[0057] 프로그램화 사멸-리간드 2 (PD-L2)는 *CD273* 유전자에 의해 코딩된 단백질이다. PD-L2는 다양한 사건, 예컨대, 임신, 조직 동종이식, 자가면역 질환, 암 및 다른 질환 상태 과정에서 면역 억제에 있어서 중요한 역할을 할 수 있는 31 kDa 단백질이다. 인간 PD-L2 단백질은 아래에 나타낸 아미노산 서열에 의해 코딩된다:

[0058] MIFLLLMLSLELQLHQIAALFTVTVPKELYIIEHGSNVTLECNFDTGSHVNLGAITASL
QKVENDTSPHRERATLLEEQLPLGKASFHIPQVQVRDEGQYQCIIIYGVAWDYKYLT
LKVKASYRKINTHILKVPETDEVELTCQATGYPLAEVSWPNVSVPANTSHSRTPEGL

YQVTSVLRLKPPPGRNFSCVFWNTHVRELTLASIDLQSQMEPRTHPTWLLHIFIPFCII
AFIFIATVIALRKQLCQKLYSSKDTTKRPVTTTKREVNSAI (서열 번호 2)

[0059]

[0060] PD-L2는 서열 번호 2의 아미노산 1-19에 상응하는 신호 펩티드로 초기에 생성되며, 이는 이후 제거되어 성숙 단백질을 생성한다. 서열 번호 2의 아미노산 20-273에 상응하는 성숙 PD-L2 단백질은 g-유사 V-도메인, Ig-유사 C2-유형 도메인, 막관통 도메인, 및 세포질내 꼬리(cytoplasmic tail)로 구성된다.

[0061] B. 기능

[0062] PD-L2는 이의 수용체인 PD-1에 대한 리간드이다. PD-1은 활성화된 T 세포, B 세포, 및 골수 세포에서 발견될 수 있다. PD-1에 대한 PD-L2의 결합은 T 세포의 증식, 사이토카인 생성, 세포 용해 기능 및 생존을 방해하는 면역

학적 연쇄 반응(immunological cascade)을 개시한다. PD-1은 항원 특이적 CD8+ T 세포와 CD4+ 헬퍼 T 세포의 증식을 감소시키는 억제제 신호를 전달한다. PD-L2는 또한 여러 암에서 PD-1 항체 펨브롤리주맙에 대한 반응의 독립적인 예측 인자인 것으로 나타났다 (Yearley *et al.*, 2017).

[0063] **III. 단클론 항체 및 이의 생성**

[0064] **A. 일반 방법**

[0065] PD-L1 및 PD-L2에 대한 항체는 본 기술분야에 잘 알려진 표준 방법에 의해 생성될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]; 미국등록특허 제4,196,265호 참조). 단클론 항체 (mAb)를 생성하기 위한 방법은 일반적으로 다클론 항체를 제조하기 위한 것과 동일한 방식으로 시작된다. 이 두 방법에 대한 첫 번째 단계는 적절한 숙주의 면역화 또는 이전 자연 감염으로 인해 면역이 있는 대상의 식별이다. 본 기술분야에 잘 알려져 있는 바와 같이, 면역화를 위한 주어진 조성물은 이의 면역원성에 있어서 변화될 수 있다. 따라서, 숙주 면역계를 증강시키는 것이 종종 필요로 되며, 이는 펩티드 또는 폴리펩티드 면역원을 캐리어에 결합시킴으로써 달성될 수 있다. 예시적인 그리고 바람직한 캐리어는 키홀 림펫 헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin; KLH) 및 소 혈청 알부민 (BSA)이다. 다른 알부민 예컨대 오발부민 (ovalbumin), 마우스 혈청 알부민 또는 토끼 혈청 알부민이 또한 캐리어로서 사용될 수 있다. 캐리어 단백질에 폴리펩티드를 접합시키기 위한 수단은 본 기술분야에 잘 알려져 있고, 글루타르알데히드, m-말레이미도벤코일-N-하이드록시석신이미드 에스테르, 카르보디이미드 및 비스-비아조화 벤지딘(bis-biazotized benzidine)을 포함한다. 또한 본 기술분야에 잘 알려진 바와 같이, 특정 면역원 조성물의 면역원성은 아쥬반트(adjuvant)로서 알려진 면역 반응의 비-특이적 자극제를 사용하여 향상될 수 있다. 예시적인 그리고 바람직한 아쥬반트는 완전한 프로인드 아쥬반트(complete Freund's adjuvant) (사멸된 마이코박테리움 투버클로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)를 함유하는 면역 반응의 비-특이적 자극제), 불완전한 프로인드 아쥬반트 및 수산화알루미늄 아쥬반트를 포함한다.

[0066] 다클론 항체 생산에 사용되는 면역원 조성의 양은 면역원의 특성과 면역화에 사용되는 동물에 따라 변화된다. 면역원을 투여하기 위해 다양한 경로가 사용될 수 있다 (피하, 근육내, 피내, 정맥내 및 복강내). 다클론 항체의 생성은 면역화 이후 다양한 시점에 면역화된 동물의 혈액을 샘플링함으로써 모니터링될 수 있다. 두 번째 증강 주사가 또한 제공될 수 있다. 증강 및 역가 측정의 과정은 적절한 역가에 도달할 때까지 반복된다. 원하는 수준의 면역원성이 얻어지는 경우, 면역화된 동물은 채혈되고, 혈청을 단리하여 보관할 수 있고/있거나, 동물은 단클론 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0067] 면역화 이후, 항체를 생성할 가능성이 있는 체세포, 특히 B 림프구 (B 세포)가 mAb 생성 프로토콜에 사용되기 위해 선택된다. 이들 세포는 생검된 비장 또는 림프절로부터, 또는 순환 혈액으로부터 얻을 수 있다. 면역화된 동물의 항체-생성 B 림프구는 이후 일반적으로 면역화된 동물 또는 인간 또는 인간/마우스 키메라 세포와 동일한 종 중 하나인 불멸 골수종(immortal myeloma) 세포의 세포들과 융합된다. 하이브리도마-생성 융합 과정에 사용하기에 적합한 골수종 세포주는 항체를 생성하지 않고, 높은 융합 효율, 및 효소 결핍증을 가지며 이는 이후 원하는 융합 세포 (하이브리도마)만의 성장을 지원하는 특정 선택 배지에서 성장할 수 없게 만든다.

[0068] 본 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있는 바와 같이 다수의 골수종 세포 중 어느 하나가 사용될 수 있다 (Goding, pp. 65-66, 1986; Campbell, pp. 75-83, 1984). 예를 들어, 면역화된 동물이 마우스인 경우, P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 41, Sp210-Ag14, PO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 및 S194/5XX0 Bul을 사용할 수 있고; 래트(rat)의 경우, R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F 및 4B210을 사용할 수 있으며; 그리고 U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 및 UC729-6은 인간 세포 융합과 관련하여 모두 유용하다. 하나의 특정 뮤린 골수종 세포는 NS-1 골수종 세포주 (또한 P3-NS-1-Ag4-1로 명명됨)이고, 이는 세포주 저장소 번호 GM3573을 요청하여 NIGMS 인간 유전자 돌연변이 세포 저장소(Human Genetic Mutant Cell Repository)로부터 쉽게 이용 가능하다. 사용될 수 있는 다른 마우스 골수종 세포주는 8-아자구아닌-내성 마우스 뮤린 골수종 SP2/0 비-생산 세포주(8-azaguanine-resistant mouse murine myeloma SP2/0 non-producer cell line)이다. 보다 최근에, 인간 B 세포와 함께 사용하기 위한 추가적인 융합 대상 주(fusion partner line)가 기재되었으며, 이는 KR12 (ATCC CRL-8658; K6H6/B5 (ATCC CRL-1823 SHM-D33 (ATCC CRL-1668) 및 HMMA2.5를 포함한다 (Posner *et al.*, 1987). 이 개시내용에서의 항체는 SP2/0 주의 IL-6 분비 유도체인 SP2/0/mIL-6 세포주를 사용하여 생성되었다.

[0069] 항체를 생성하는 비장 또는 림프절 세포와 골수종 세포의 하이브리드를 생성하는 방법은 일반적으로 체세포와 골수종 세포를 2:1의 비율로 혼합하는 단계를 포함하지만, 세포막 융합을 촉진하는 제제 또는 제제들 (화학적 또는 전기적)의 존재 하에 비율은 각각 약 20:1에서 약 1:1까지 변화될 수 있다. 센다이(Sendai) 바이러스를 사

용하는 융합 방법은 문헌[Kohler and Milstein (1975; 1976)]에 의해 기재되었고, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 예컨대 37% (v/v) PEG를 사용하는 융합 방법은 문헌[Gefter et al.(1977)]에 기재되었다. 전기적으로 유도된 융합 방법을 사용하는 것도 적합하다 (Goding, pp. 71-74, 1986).

[0070] 융합 절차는 일반적으로 약 1 x 10^{-6} 내지 1 x 10^{-8}의 낮은 주파수에서 생존 가능한 하이브리드를 생성한다. 그러나, 이는 문제점을 부여하지 않으며, 그 이유는 생존 가능한 융합된 하이브리드는 선택 배지에서 배양시킴으로써 주입된 모 세포 (특히, 무한정으로 분열하는 것을 정상적으로 지속하는 주입된 골수종 세포)와 차별화되기 때문이다. 선택 배지는 일반적으로 조직 배양 배지에서 뉴클레오티드의 신생 합성을 차단하는 제제를 함유하는 것이다. 예시적인 그리고 바람직한 제제는 아미노프테린(aminopterin), 메토트렉세이트(methotrexate) 및 아자세린(azaserine)이다. 아미노프테린 및 메토트렉세이트는 퓨린 및 피리미딘 둘 모두의 신생 합성을 차단하고, 반면 아자세린은 퓨린 합성만을 차단한다. 아미노프테린 및 메토트렉세이트가 사용되는 경우, 배지에 뉴클레오티드의 공급원으로서 하이포잔틴(hypoxanthine) 및 티미딘이 보충된다 (HAT 배지). 아자세린이 사용되는 경우, 배지에 하이포잔틴이 보충된다. B 세포 공급원이 엡스타인 바 바이러스 (Epstein Barr virus; EBV)로 형질전환된 인간 B 세포주인 경우, 골수종에 융합되지 않는 EBV로 형질전환된 주를 제거하기 위해 우아바인(ouabain)을 첨가한다.

[0071] 바람직한 선택 배지는 HAT 또는 우아바인을 가진 HAT이다. 뉴클레오티드 회수 경로를 작동시킬 수 있는 세포만이 HAT 배지에서 생존할 수 있다. 골수종 세포는 회수 경로의 중요 효소, 예를 들어, 하이포잔틴 포스포리보실트랜스퍼라제 (hypoxanthine phosphoribosyl transferase; HPRT)이 결여되어 있고, 이는 생존할 수 없다. B 세포는 이 경로를 작동시킬 수 있으나, 이는 배양물에서 제한된 수명을 가지고, 일반적으로 약 2주 내에 사멸된다. 따라서, 선택 배지에서 생존할 수 있는 세포만이 골수종 및 B 세포로부터 형성된 하이브리드이다. 융합을 위해 사용되는 B 세포의 공급원이 EBY-형질전환된 B 세포의 주인 경우, 본원에서와 같이, 우아바인이 또한 하이브리드의 약물 선택을 위해 사용되며, 그 이유는 EB V-형질전환된 B 세포가 약물 사멸에 취약할 수 있기 때문이며, 반면 사용되는 골수종 대응물은 우아바인 내성을 갖도록 선택된다.

[0072] 배양은 특정 하이브리도마가 선택되는 하이브리도마 집단을 제공한다. 통상적으로, 하이브리도마의 선택은 마이크로티터 플레이트(microtiter plate)에서 단일 클론 희석을 통해 세포를 배양시키고, 그 다음 원하는 반응성에 대해 개별 클론 상층액 (약 2 내지 3주 후)을 시험함으로써 수행된다. 검정은 방사성 면역측정법, 효소 면역측정법, 세포독성 검정, 플라크(plaque) 검정, 도트 면역결합 검정(dot immunobinding assay) 등과 같이 민감하고 간단하며 신속하여야 한다.

[0073] 선택된 하이브리도마는 이후 연속 희석되거나 또는 유세포 분석 분류를 통해 단일 세포로 분류되고, 개별 항체-생성 세포주로 클로닝(cloning)되고, 이 클론은 이후 무한적으로 증식되어 mAb를 제공할 수 있다. 세포주는 두 가지 기본적인 방법으로 MAb 생산에 활용될 수 있다. 하이브리도마의 샘플은 동물 (예를 들어, 마우스)에 (종종 복강 내로) 주사될 수 있다. 선택적으로, 동물은 주사 전에 탄화수소, 특히 프리스탄 (테트라메틸펜타데칸)과 같은 오일을 사용하여 준비된다. 인간 하이브리도마가 이러한 방식으로 사용되는 경우, 종양 거부 반응을 방지하기 위해 SCID 마우스와 같은 면역저하 마우스에 주사하는 것이 최적이다. 주사를 받은 동물은 융합된 세포 하이브리드에 의해 생성된 특정 단클론 항체를 분비하는 종양을 발달시킨다. 이후 혈청 또는 복수액과 같은 동물의 체액은 이후 추출되어 고농도의 mAb를 제공할 수 있다. 개별적인 세포주는 시험관 내에서 배양될 수도 있으며, 여기서 mAb는 배양 배지에 자연적으로 분비되어 이로부터 이는 고농도로 쉽게 얻어질 수 있다. 대안적으로, 인간 하이브리도마 세포주는 세포 상층액에서 면역글로불린을 생성하기 위해 시험관 내에서 사용될 수 있다. 세포주는 무혈청 배지에서의 성장을 위해 조정되어 고순도의 인간 단클론 면역글로불린을 회수하는 능력이 최적화될 수 있다.

[0074] 어느 하나의 수단으로 생성된 단클론 항체는, 바람직한 경우, 여과, 원심분리 및 다양한 크로마토그래피 방법 예컨대 FPLC 또는 친화성 크로마토그래피를 사용하여 추가로 정제될 수 있다. 개시내용의 단클론 항체의 단편은 펩신 또는 파파인과 같은 효소를 사용한 분해를 포함하는 방법에 의해, 및/또는 화학적 환원에 의한 이황화 결합의 절단에 의해 정제된 단클론 항체로부터 얻을 수 있다. 대안적으로, 본 개시내용에 포괄되는 단클론 항체 단편은 자동화된 펩티드 합성기를 사용하여 합성될 수 있다.

[0075] 또한, 단클론 항체를 생성하기 위해 분자 클로닝 방법을 사용할 수 있는 것으로 고려된다. 이를 위해, RNA는 RT-PCR에 의해 얻어진 하이브리도마 주 및 항체 유전자로부터 단리되어, 면역글로불린 발현 벡터로 클로닝될 수 있다. 대안적으로, 세포주에서 단리된 RNA로부터 조합적 면역글로불린 파지미드 라이브러리(phagemid library)를 준비하고, 바이러스 항원을 사용하는 패닝(panning)에 의해 적절한 항체를 발현하는 파지미드를 선택한다.

종래의 하이브리도마 기술에 비해 이러한 방법의 장점은 대략 104배 더 많은 항체가 생성되어 단일 회차에서 스크리닝될 수 있다는 것과, H 및 L 사슬 조합에 의해 새로운 특이성이 생성되며 이는 적절한 항체를 발견할 기회를 더 증가시킨다는 것이다.

[0076] 효모-기반 항체 라이브러리는 합리적으로 설계될 수 있으며, 항체는 예를 들어 WO2012/009568; WO2009/036379; WO2010/105256; WO2003/074679; 미국등록특허 제8,691,730호; 및 미국등록특허 제9,354,228호에 개시된 바와 같이 이러한 효모-기반 항체 제시 라이브러리로부터 선택되고/되거나 단리될 수 있다. 항체는 상기 개시된 바와 같이 임의의 바람직한 세포 유형으로부터 전장 IgG로서 발현되고, 정제될 수 있다.

[0077] 본 개시내용에 유용한 항체의 생성을 교시하는 각각 본원에 참조로 포함되는 다른 미국등록특허는 미국등록특허 제5,565,332호 (이는 조합적 방법을 사용한 키메라 항체의 생성을 기재함); 미국등록특허 제4,816,567호 (이는 재조합 면역글로불린 제조를 기재함); 및 미국등록특허 제4,867,973호 (이는 항체-치료제 접합체를 기재함)를 포함한다.

[0078] **B. 본 개시내용의 항체**

[0079] 본 개시내용에 따른 항체는 첫 번째로 이의 결합 특이성, 즉, PD-L1 및 PD-L2에 대한 결합에 의해 정의될 수 있다. 본 기술분야의 당업자는 본 기술분야에 잘 알려진 기술을 사용하여 주어진 항체의 결합 특이성/친화성을 평가함으로써 이러한 항체가 본 청구항의 범위 내에 속하는지 여부를 결정할 수 있다. 일 양태에서, 상기 기재된 바와 같이 중쇄 및 경쇄로부터의 CDR을 갖는 단클론 항체를 제공한다. 이러한 항체는 본원에 기재된 방법을 사용하여 실시예 구간에서 아래에 논의된 클론에 의해 생성될 수 있다.

[0080] 제2 양태에서, 항체는 추가적인 "프레임워크(framework)" 영역을 포함하는 이의 가변 서열에 의해 정의될 수 있다. 이는 예를 들어 전체 가변 영역을 코딩하거나 이를 표현하는 서열 번호 3/서열 번호 4 및 서열 번호 5/서열 번호 6으로 제공된다. 게다가, 항체 서열은 임의로 아래에 보다 상세하게 논의된 방법을 사용하여 이들 서열과 다를 수 있다. 예를 들어, 핵산 서열은 (a) 가변 영역이 경쇄 및 중쇄의 불변 도메인으로부터 분리될 수 있는 점에서 상기 제시된 것과 다를 수 있거나, (b) 핵산은 이에 의해 코딩되는 잔기에 영향을 미치지 않으면서 상기 기재된 것과 다를 수 있거나, (c) 핵산은 소정의 백분율, 예를 들어, 적어도 또는 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성만큼 상기 제시된 것과 다를 수 있거나, (d) 핵산은 약 50℃ 내지 약 70℃의 온도에서 약 0.02 M 내지 약 0.15 M NaCl로 제공되는 것과 같은 낮은 염 및/또는 고온 조건에 의해 예시된 바와 같은 매우 엄격한 조건하에서 하이브리드화되는 능력에 의해 상기 제시된 것과 다를 수 있거나, (e) 아미노산은 소정의 백분율, 예를 들어, 적어도 또는 약 80%, 85%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성만큼 상기 제시된 것과 다를 수 있거나, 또는 (f) 아미노산은 (아래에 논의된) 보존적 치환을 허용하는 것에 의해 상기 제시된 것과 다를 수 있다. 상기 제시된 핵산 서열 및 상기 제시된 아미노산 서열에 대해 상기의 것 각각이 적용된다.

[0081] **C. 항체 서열의 조작**

[0082] 다양한 실시양태에서, 개선된 발현, 개선된 교차-반응성(cross-reactivity) 또는 감소된 비-표적 결합과 같은 다양한 이유로 식별된 항체의 서열을 조작하는 것을 선택할 수 있다. 항체 조작을 위한 관련 기술의 일반 논의는 다음과 같다.

[0083] 하이브리도마는 배양될 수 있고, 그 다음 세포를 용해시키고, 전체 RNA를 추출할 수 있다. 무작위 헥사머를 실온에서 사용하여 RNA의 cDNA 카피를 생성할 수 있고, 이후 PCR 프라이머의 다중복합 혼합물을 사용하여 수행되는 PCR은 모든 인간 가변 유전자 서열을 증폭시킬 것으로 예상된다. PCR 생성물은 pGEM-T Easy 벡터로 클로닝될 수 있고, 이후 표준 벡터 프라이머를 사용하는 자동화 DNA 시퀀싱에 의해 시퀀싱될 수 있다. 결합 및 중화의 검정은 하이브리도마 상층액으로부터 수집된 항체를 사용하여 수행되고, 단백질 G 컬럼을 사용하여 FPLC에 의해 정제될 수 있다.

[0084] 재조합 전장 IgG 항체는 클로닝 벡터로부터의 중쇄 및 경쇄 Fv DNA를 IgG 플라스미드 벡터로 서브클로닝(subcloning)함으로써 생성되고, 293 프리스타일(Freestyle) 세포 또는 CHO 세포로 형질감염될 수 있고, 항체는 293 또는 CHO 세포 상층액으로부터 수집되고 정제되었다.

[0085] 최종 cGMP 제조 공정과 동일한 숙주 세포 및 세포 배양 공정에서 생산된 항체의 신속한 이용 가능성은 공정 개발 프로그램의 기간을 단축시킬 잠재력을 가진다. 론자(Lonza)는 CHO 세포에서 소량 (최대 50 g)의 항체의 신속한 생성을 위한, CD ACF 배지에서 성장된 풀링된 형질감염체(pooled transfectant)를 사용하는 일반적 방법을 개발하였다. 적용되는 과도기 시스템(true transient system)보다 약간 느리기는 하지만, 생성물 농도가 더 높

고, 생산 세포주와 동일한 숙주 및 공정을 사용하는 장점을 포함한다. 일회용 생물 반응기에서 모델 항체를 발현시키는 GS-CHO 풀의 성장 및 생산성의 예는 다음과 같다: 유가식 방식(fed-batch mode)으로 작동되는 일회용 백 생물 반응기 배양 (5 L 작업 부피)으로, 9주간의 형질감염 내에 2 g/L의 수확 항체 농도가 달성되었다.

[0086] 이러한 항체가 선택되고/되거나 단리될 수 있는 항체, 및 항체 라이브러리를 예를 들어 WO2012/009568; WO2009/036379; WO2010/105256; WO2003/074679; 미국등록특허 제8,691,730호; 및 미국등록특허 제9,354,228호에 개시된 바와 같은 Adimab® 기술에 의해 합리적으로 설계되고 합성될 수 있다. 이러한 항체 합성 방법은 원하는 또는 설계된 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 이소성 발현을 위한 벡터에 삽입될 것이 요구된다. 이후, 원하는 항체는 전체 사슬 IgG 분자에서 발현되고, 정제될 수 있다.

[0087] 항체 분자는 예를 들어 mAb, 또는 예를 들어 재조합 수단을 통해 생산 가능한 단일-사슬 면역글로불린의 단백질분해 절단에 의해 생성된 단편 (예컨대 F(ab'), F(ab'h)을 포함할 것이다. 이러한 항체 유도체는 일가(monovalent)이다. 하나의 실시양태에서, 이러한 단편은 서로 조합되거나 또는 다른 항체 단편 또는 수용체 리간드와 조합되어 "키메라" 결합 분자를 형성할 수 있다. 중요하게는, 이러한 키메라 분자는 동일한 분자의 상이한 에피토프(epitope)에 결합할 수 있는 치환기를 포함할 수 있다.

[0088] 관련 실시양태에서, 항체는 개시된 항체의 유도체, 예를 들어, 개시된 항체 (예를 들어, 키메라, 또는 CDR-이식 항체)에서의 것과 동일한 CDR 서열을 포함하는 항체이다. 대안적으로, 예컨대 항체 분자에 보전적 변화(conservative change)를 도입시킴으로써 변형시키려 할 수 있다. 이러한 변화를 일으키는 데 있어서, 아미노산의 감수 지수(hydropathic index)가 고려될 수 있다. 단백질에 대한 상호 작용적 생물학적 기능을 부여하는 데 있어서의 아미노산 감수 지수의 중요성은 본 기술분야에서 일반적으로 이해된다 (Kyte and Doolittle, 1982). 아미노산의 상대적인 감수 특성은 결과적으로 생성되는 단백질의 2차 구조에 영향을 미치고, 이는 결국 단백질과 다른 분자들, 예를 들어 효소, 기질, 수용체, DNA, 항체, 항원 등의 상호 작용을 정의한다는 것으로 받아들여지고 있다.

[0089] 또한, 유사 아미노산의 치환은 친수성에 기반하여 효과적으로 이루어질 수 있는 것으로 본 기술분야에서 이해된다. 본원에 참조로 포함된 미국등록특허 제4,554,101호는 이의 인접한 아미노산의 친수성에 의해 지배되는 단백질의 가장 큰 국소적 평균 친수성이 단백질의 생물학적 특성과 상관 관계가 있음을 개시하고 있다. 미국등록특허 제4,554,101호에 상세된 바와 같이, 하기 친수성 값이 아미노산 잔기에 할당되었다: 염기성 아미노산: 아르기닌 (+3.0), 라이신 (+3.0), 및 히스티딘 (-0.5); 산성 아미노산: 아스파르테이트 (+3.0 ± 1), 글루타메이트 (+3.0 ± 1), 아스파라긴 (+0.2), 및 글루타민 (+0.2); 친수성, 음이온성 아미노산: 세린 (+0.3), 아스파라긴 (+0.2), 글루타민 (+0.2), 및 트레오닌 (-0.4), 황 함유 아미노산: 시스테인 (-1.0) 및 메티오닌 (-1.3); 소수성 비방향족 아미노산: 발린 (-1.5), 류신 (-1.8), 이소류신 (-1.8), 프랄린 (-0.5 ± 1), 알라닌 (-0.5), 및 글리신 (0); 소수성 방향족 아미노산: 트립토판 (-3.4), 페닐알라닌 (-2.5), 및 티로신 (-2.3).

[0090] 아미노산는 유사한 친수성을 갖는 다른 것에 대해 치환되어, 생물학적 또는 면역학적으로 변형된 단백질을 생성할 수 있는 것으로 이해된다. 이러한 변화에 있어서, 이의 친수성 값이 ± 2 이내인 아미노산의 치환이 바람직하며, ± 1 이내의 것이 특히 바람직하며, ± 0.5 이내의 것이 보다 더 특히 바람직하다.

[0091] 상기 개략된 바와 같이, 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 측쇄 치환기의 관련 유사성, 예를 들어, 이의 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기반한다. 상기 다양한 특성을 고려한 예시적인 치환은 본 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있고 다음의 것을 포함한다: 아르기닌 및 라이신; 글루타메이트 및 아스파르테이트; 세린 및 트레오닌; 글루타민 및 아스파라긴; 및 발린, 류신 및 이소류신.

[0092] 본 개시내용은 또한 아이소타입 변형을 고려한다. Fe 영역을 다양한 아이소타입을 갖도록 변형함으로써, 다양한 기능이 달성될 수 있다. 예를 들어, IgG1에 대한 변화는 항체 의존적 세포의 세포 독성을 증가시킬 수 있고, 클래스 A로 전환시켜 조직 분포를 개선할 수 있고, 클래스 M으로 전환시켜 원자가를 개선할 수 있다.

[0093] 변형된 항체는 폴리펩티드의 화학적 합성 또는 표준 분자 생물학적 기술을 통한 발현을 포함하는, 본 기술분야의 당업자에게 알려진 임의의 기술에 의해 만들어 질 수 있다. 재조합 발현을 위한 방법은 본 명세서의 임의의 부분에서 다루어진다.

[0094] **D. 단일 사슬 항체**

[0095] 단일 사슬 가변 단편 (scFv)은 짧은 (보통 세린, 글리신) 링커와 함께 연결되는 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 융합체이다. 이러한 키메라 분자는 불변 영역의 제거 및 링커 펩티드의 도입에도 불구하고 원래 면역글로불린의 특이성을 유지한다. 이러한 변형은 일반적으로 특이성을 변경하지 않는다. 이러한 분자는 과거에

파지 디스플레이를 용이하게 하도록 만들어졌으며, 여기서 항원 결합 도메인을 단일 펩티드로 발현시키는 것이 매우 편리하다. 대안적으로, scFv는 하이브리도마로부터 유래된 서브클로닝된 중쇄 및 경쇄로부터 직접적으로 만들어 질 수 있다. 단일 사슬 가변 단편은 완전 항체 분자에서 발견되는 불변 Fc 영역과, 이에 따른 항체를 정제하기 위해 사용되는 공통 결합 부위 (예를 들어, 단백질 A/G)가 결여된다. 이들 단편은 종종 단백질 L이 카파 경쇄의 가변 영역과 상호 작용하기 때문에 단백질 L을 사용하여 정제되고/고정화될 수 있다.

[0096] 가요성 링커는 일반적으로 나선- 및 회전-촉진(turn-promoting) 아미노산 잔기 예컨대 알라닌, 세린 및 글리신으로 이루어진다. 그러나, 다른 잔기가 또한 작용할 수 있다. 문헌 [Tang *et al.* (1996)]은 단백질 링커 라이브러리로부터의 단일-가슬 항체 (scFv)에 대한 맞춤형 링커를 신속하게 선택하는 수단으로서 파지 디스플레이를 사용하였다. 무작위 링커 라이브러리가 작제되었고 이에서 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 대한 유전자는 가변 조성의 18-아미노산 폴리펩티드를 코딩하는 세그먼트에 의해 연결되었다. scFv 레퍼토리(repertoire) (대략 5 x 106 상이한 구성원)는 필라멘트 파지에 디스플레이되어, 햅텐을 사용한 친화성 선택에 적용되었다. 선택된 변이체의 집단은 결합 활성에 있어서 상당한 증가를 나타내었으나, 상당한 서열 다양성을 유지하였다. 이후 1054개의 개별적인 변이체를 스크리닝하여 가용성 형태로 효율적으로 생산된 촉매적 활성 scFv를 생성하였다. 서열 분석은 V H C 말단 뒤의 두 잔기인 링커에서의 보존된 프로 라인(pro line) 및 선택된 테더(tether)의 유일한 공통적 특징으로서 다른 위치에서의 풍부한 아르기닌 및 프랄린을 나타내었다.

[0097] 본 개시내용의 재조합 항체는 또한 수용체의 이량체화 또는 다량체화를 허용하는 서열 또는 모이어티(moiety)를 포함할 수 있다. 이러한 서열은 IgA로부터 유래된 것을 포함하고, 이는 J-사슬과 함께 다량체의 형성을 허용한다. 다른 다량체화 도메인은 Gal4 이량체화 도메인이다. 다른 실시양태에서, 사슬은 두 항체의 조합을 허용하는 비오틴/아비딘과 같은 제제를 사용하여 변형될 수 있다.

[0098] 별개의 실시양태에서, 단일-사슬 항체는 비-펩티드 링커 또는 화학적 단위를 사용하여 수용체 경쇄 및 중쇄를 연결시킴으로써 생성될 수 있다. 일반적으로, 경쇄 및 중쇄는 별개의 세포에서 생성되고, 정제되고, 이후 적절한 방식으로 함께 연결될 것이다 (즉, 중쇄의 N-말단은 적절한 화학적 가교를 통해 경쇄의 C-말단에 부착된다).

[0099] 가교제는 예를 들어 안정화제 및 응고제와 같은 2개의 상이한 분자의 작용기를 연결시키는 분자적 가교(molecular bridge)를 형성하기 위해 사용된다. 그러나, 동일한 유사체의 이량체 또는 다량체 또는 상이한 유사체로 구성된 이종 복합체(heteromeric complex)가 생성될 수 있는 것으로 고려된다. 2개의 상이한 화합물을 단계적 방식으로 연결하기 위해, 원하지 않는 단독중합체 형성을 근절시키는 헤테로-이작용성 가교제가 사용될 수 있다.

[0100] 예시적인 헤테로-이작용성 가교제는 다음의 2개의 반응성 기를 포함한다: 1차 아민기와 반응하는 하나 (예를 들어, N-하이드록시 석신이미드), 및 티올기와 반응하는 다른 하나 (예를 들어, 피리딜 디설파이드, 말레이미드, 할로겐 등). 1차 아민 반응성 기를 통해, 가교제는 하나의 단백질 (예를 들어, 선택된 항체 또는 단편)의 라이신 잔기(들)과 반응할 수 있고, 티올 반응성 기를 통해, 이미 제1 단백질에 결합된 가교제는 다른 단백질 (예를 들어, 선택적 제제(selective agent))의 시스테인 잔기 (유리 설프하이드릴 기)와 반응한다.

[0101] 혈액에서 적절한 안정성을 갖는 가교제를 사용하는 것이 바람직하다. 표적화제 및 치료/예방 제제를 접합하는 데 성공적으로 사용할 수 있는 수많은 유형의 이황화 결합 함유 링커가 알려져 있다. 입체 장애형인 이황화 결합을 함유하는 링커는 생체 내에서 더 큰 안정성을 제공하여 작용 부위에 도달하기 전에 표적 펩티드가 방출되는 것을 방지할 수 있다. 따라서, 이러한 링커는 결합제(linking agent)의 하나의 그룹이다

[0102] 다른 가교 시약은 SMPT이며, 이는 "인접한 벤젠 고리 및 메틸기에 의해 "입체 장애형"인 이황화 결합을 함유하는 이작용성 가교제이다. 이황화 결합의 입체 장애는 조직과 혈액에 존재할 수 있는 글루타치온(glutathione)과 같은 티올레이트 음이온의 공격으로부터 결합을 보호하는 기능을 하며, 이에 의해 부착된 제제가 표적 부위에 전달되기 전에 접합체의 분리를 방지하는 데 도움이 된다고 여겨진다.

[0103] SMPT 가교 시약은 다른 알려진 가교 시약과 마찬가지로 시스테인의 SH 또는 1차 아민 (예를 들어, 라이신의 엡실론 아미노기)와 같은 작용기를 가교시키는 능력을 제공한다. 다른 가능한 유형의 가교제는 절단성 이황화 결합을 함유하는 헤테로-이작용성 광반응성 페닐아지드 예컨대 설포석신이미딜-2-(p-아지도 살리실아미도) 에틸-1,3'디티오프로피오네이트를 포함한다. N-하이드록시-석신이미딜기는 1차 아미노기와 반응하고, 페닐아지드 (광분해 시)는 임의의 아미노산 잔기와 비선택적으로 반응한다.

[0104] 장애형 가교제(hindered cross-linker) 이외에, 비-장애형 가교제도 이에 따라 사용될 수 있다. 보호된 이황화물을 포함하거나 생성하는 것으로 간주되지 않는 다른 유용한 가교제는 SATA, SPDP 및 2-이미노티올란

(iminothiolane)을 포함한다 (Wawrzynczak & Thorpe, 1987). 이러한 가교제의 사용은 본 기술분야에서 잘 이해된다. 다른 실시양태는 가요성 링커의 사용을 포함한다.

[0105] 미국등록특허 제4,680,338호는 특히 킬레이트제, 약물, 효소, 검출 가능한 표지 등을 사용하여 항체 접합체를 형성하기 위한, 아민-함유 중합체 및/또는 단백질과 리간드의 접합체의 생성을 위해 유용한 이작용성 링커를 기재하고 있다. 미국등록특허 제5,141,648호 및 제5,563,250호는 다양한 온화한 조건에서 절단 가능한 불안정성 결합을 함유하는 절단 가능한 접합체를 개시하고 있다. 이 링커는 관심 대상의 제제가 링커에 직접적으로 결합될 수 있다는 점에서 특히 유용하고, 절단으로 활성제의 방출이 일어난다. 특별한 용도에는 유리 아미노 또는 유리 설프하이드릴기를 단백질, 예컨대 항체 또는 약물에 첨가하는 것이 포함된다.

[0106] 미국등록특허 제5,856,456호는 융합 단백질, 예를 들어, 단일 사슬 항체를 제조하기 위해 폴리펩티드 성분을 연결하는 데 사용하기 위한 펩티드 링커를 제공한다. 상기 링커는 길이가 최대 약 50개의 아미노산이며, 적어도 하나의 경우에 하전된 아미노산 (바람직하게는 아르기닌 또는 라이신)과 그 다음 프랄린을 포함하고, 이는 더 큰 안정성을 특징으로 하며, 응집을 줄인다. 미국등록특허 제5,880,270호는 다양한 면역진단 및 분리 기술에 유용한 아미노옥시-함유 링커를 개시하고 있다.

[0107] **E. 정제**

[0108] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 정제될 수 있다. 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "정제된"은 다른 성분으로부터 단리될 수 있는 조성물을 지칭하기 위한 것으로 의도되며, 여기서 단백질은 그것의 자연적으로 얻을 수 있는 상태에 비해 어느 정도로 정제된다. 정제된 단백질은 이에 따라 또한 그것이 자연적으로 발생될 수 있는 환경으로부터 자유로운 단백질을 지칭한다. 용어 "실질적으로 정제된"이 사용되는 경우, 이 표현은 단백질 또는 펩티드가 조성물에서 단백질의 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95% 또는 그 초과를 구성하는 것과 같은 조성물의 주성분을 형성하는 조성물을 지칭할 것이다.

[0109] 단백질 정제 기술은 본 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있다. 이러한 기술은 한 수준에서 세포 환경을 폴리펩티드 및 비-폴리펩티드 분획으로 그대로 분획하는 것을 포함한다. 다른 단백질로부터 폴리펩티드를 분리하면, 관심 대상의 폴리펩티드는 크로마토그래피 또는 전기영동 기술을 사용하여 추가로 정제되어 부분적 또는 완전한 정제 (또는 균질성까지의 정제)를 달성할 수 있다. 순수 펩티드의 제조에 특히 적합한 분석 방법은 이온-교환 크로마토그래피, 배제 크로마토그래피; 폴리아크릴아미드 겔 전기영동; 등전 포커싱 (isoelectric focusing)이다. 단백질 정제를 위한 다른 방법은 황산암모늄, PEG, 항체 등을 이용한 침전 또는 열 변성 후 원심분리; 겔 여과, 역상, 하이드록실아파타이트 및 친화성 크로마토그래피법; 및 이러한 그리고 다른 기술의 조합을 포함한다.

[0110] 본 개시내용의 항체를 정제하는 데 있어서, 원핵 또는 진핵 발현 시스템에서 폴리펩티드를 발현시키고, 변성 조건을 사용하여 단백질을 추출하는 것이 바람직할 수 있다. 폴리펩티드는 친화성 컬럼을 사용하여 다른 세포 성분으로부터 정제될 수 있으며, 이는 폴리펩티드의 태그가 있는 부분에 결합된다. 본 기술분야에 일반적으로 알려져 있는 바와 같이, 다양한 정제 단계를 수행하는 순서를 변화시킬 수 있거나, 또는 특정 단계를 생략할 수 있으며, 여전히 상당히 정제된 단백질이나 펩티드를 제조하는 데 적합한 방법이 도출되는 것으로 여겨진다.

[0111] 일반적으로, 완전 항체는 항체의 Fe 부분에 결합하는 제제 (즉, 단백질 A)를 이용하여 분획화된다. 대안적으로, 항원은 동시에 정제하여 적절한 항체를 선택하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 방법은 종종 지지체, 예컨대 컬럼, 필터 또는 비드에 결합되는 선택제(selection agent)를 이용한다. 항체는 지지체, 제거된 (예를 들어, 세척된) 오염물에 결합되고, 항체는 조건 (염, 열 등)을 적용하여 방출된다.

[0112] 단백질 또는 펩티드의 정제도를 정량화하는 다양한 방법은 본 개시내용의 관점에서 본 기술분야의 당업자에게 알려져 있을 것이다. 이는 예를 들어 활성 분획물의 특정 활성을 결정하거나, 또는 SDS/PAGE 분석을 통해 분획물 내 폴리펩티드의 양을 평가하는 것을 포함한다. 분획물의 순도를 평가하기 위한 다른 방법은 초기 추출물의 특성 활성에 대해 이를 비교하기 위해 분획물의 특정 활성을 계산하고, 이에 따라 순도의 정도를 계산하는 것이다. 활성의 양을 표시하기 위해 사용되는 실제 단위는 물론 정제를 따르기 위해 선택된 특정 분석 기술 및 발현된 단백질 또는 펩티드가 검출 가능한 활성을 나타내는지 여부에 좌우될 것이다.

[0113] 폴리펩티드의 이동은 SDS/PAGE의 다양한 조건에 따라, 때로는 상당하게 변화될 수 있는 것으로 알려져 있다 (Capaldi *et al.*, 1977). 따라서, 상이한 전기영동 조건하에서, 정제되거나 부분적으로 정제된 발현 생성물의 명확한 분자량이 변화될 수 있는 것으로 이해될 것이다.

[0114] **IV. 약학적 제제 및 암의 치료**

[0115] **A. 암**

[0116] 암은 조직으로부터의 세포의 클론 집단의 증식으로부터 발생된다. 발암으로 지칭되는 암의 발병은 모델링되어, 여러 방식으로 특성화될 수 있다. 암의 발병과 염증 사이의 연관성은 오랫동안 이해되고 있다. 염증 반응은 미생물 감염에 대한 숙주 방어와 관련되고, 또한 조직 복구와 재생을 유도한다. 다수의 증거는 염증과 발암의 위험 사이의 연관성을 보여주며, 즉, 만성 염증은 이형성증을 유발할 수 있다.

[0117] 본 개시내용의 방법이 적용될 수 있는 암 세포는 일반적으로 PD-L1, PD-L2, 또는 PD-L1 및 PD-L2를 발현하는, 보다 특히 PD-L1, PD-L2, 또는 PD-L1 및 PD-L2를 과발현하는 임의의 세포를 포함한다. 적합한 암 세포는, 유방암, 폐암, 결장암, 췌장암, 신장암, 위암, 간암, 골암, 혈액암 (예를 들어, 백혈병 또는 림프종), 신경조직암, 흑색종, 난소암, 고환암, 전립선암, 자궁경부암, 질암 또는 방광암 세포일 수 있다. 또한, 개시내용의 방법은 넓은 범위의 종, 예를 들어, 인간, 비-인간 영장류 (예를 들어, 원숭이, 개코원숭이, 또는 침팬지), 말, 소, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이, 토끼, 기니 피그, 게르빌(gerbil), 햄스터, 래트, 및 마우스에 적용될 수 있다. 암은 또한 재발성, 전이성 및/또는 다중-약물 내성일 수 있으며, 본 개시내용의 방법은 특히 이러한 암에 적용되어 이를 절제 가능하게 만들고, 완화 기간을 연장하거나 재-유도하고, 혈관 신생을 억제하고, 전이를 예방하거나 제한하고/하거나, 다중-약물 내성 암을 치료할 수 있다. 세포 수준에서, 이는 암 세포를 사멸시키거나, 암 세포 성장을 억제하거나, 그렇지 않으면 종양 세포의 악성 표현형을 역전시키거나 감소시키는 것으로 이어질 수 있다.

[0118] **B. 제형 및 투여**

[0119] 본 개시내용은 PD-L1 및 PD-L2에 관한 이중 특이적 항체 (DSPDL)를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 용어 "약학적으로 허용 가능한"은 연방 또는 주 정부의 규제 기관에서 승인을 받거나 또는 미국 약전이나 다른 일반적으로 인정된 약전에 동물, 보다 특히 인간에게 사용하도록 열거되어 있음을 의미한다. 용어 "담체"는 치료제가 투여되는 희석제, 부형제 또는 비히클을 지칭한다. 이러한 약학적 담체는 물과 오일과 같은 멸균 액체일 수 있으며, 이는 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름 등과 같은 석유, 동물성, 식물성 또는 합성 기원의 것을 포함한다. 다른 적합한 약학적 부형제는 전분, 포도당, 락토오스, 수크로오스, 식염수, 덱스트로오스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 염화나트륨, 탈지분유, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다.

[0120] 조성물은 중성 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염는 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등에서 유래된 것과 같은 음이온으로 형성된 것과 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화철, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등에서 유래된 것과 같은 양이온으로 형성된 것을 포함한다.

[0121] 본 개시내용의 항체는 종래의 약학적 제제를 포함할 수 있다. 본 개시내용에 따른 이러한 조성물의 투여는 표적 조직이 이 경로를 통해 이용 가능한 경우에 한하여 임의의 일반 경로를 통해 이루어질 것이다. 이는 경구, 비강, 협측, 직장, 질 또는 국소를 포함한다. 대안적으로, 투여는 피내, 피하, 근육내, 복강내 또는 정맥 주사에 의할 수 있다. 이러한 조성물은 일반적으로 상기 기재된 바와 같이 약학적으로 허용 가능한 조성물로서 투여될 것이다. 특히 관심을 끄는 것은 종양 내 직접 투여, 종양의 관류 또는 종양의 국소적 또는 영역적 투여, 예를 들어 국소적 또는 영역적 혈관계 또는 림프계, 또는 절제된 종양 부위에의 투여이다.

[0122] 활성 화합물은 또한 비경구 또는 복강내 투여될 수 있다. 유리 염기 또는 약리학적으로 허용 가능한 염으로서의 활성 화합물의 용액은 하이드록시프로필셀룰로오스와 같은 계면활성제와 적절히 혼합된 물에서 제조될 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액상 폴리에틸렌 글리콜 및 이들의 혼합물과 오일에서 제조될 수 있다. 일반적인 보관 및 사용 조건에서, 이러한 제제는 미생물의 성장을 방지하기 위한 보존제를 포함한다.

[0123] **C. 조합 요법**

[0124] 본 개시내용의 맥락에서, 본원에 기재된 PD-L1 및 PD-L2 (이중 PDL)에 대한 이중 특이적 항체는 유사하게는 화학요법 또는 방사선 요법 개입, 또는 다른 치료와 함께 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 또한, 이중 특이적 PD-LI 및 PD-L2 항체와 PD-LI 또는 PD-L2 기능의 상이한 양태, 예컨대 PD-L 1 또는 PD-L2 세포질 도메인을 표적화하는 펩티드 및 소분자를 표적화하는 다른 요법을 조합하는 것이 효과적인 것으로 입증될 수 있다.

[0125] 본 개시내용의 방법 및 조성물을 사용하여 세포를 사멸시키기고, 세포 성장을 억제하고, 전이를 억제하고, 혈관

신생을 억제하거나 그렇지 않으면 종양 세포의 악성 표현형을 역전시키거나 감소시키기 위해, 일반적으로 "표적" 세포를 본 개시내용에 따른 이중 특이적 항-PD-LI 및 항-PD-L2 항체 및 적어도 하나의 다른 제제와 접촉시킬 것이다. 이러한 조성물은 세포를 사멸시키거나 이의 증식을 억제하는 데 유효한 조합된 양으로 제공될 것이다. 이 과정은 본 개시내용에 따른 이중 특이적 항-PD-LI 및 항-PD-L2 항체와 다른 제제(들) 또는 인자(factor)(들)을 동시에 세포에 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 이는 세포를 두 제제를 포함하는 단일 조성물 또는 약리학적 제형과 접촉시킴으로써, 또는 세포를 2개의 별개의 조성물 또는 제형과 동시에 접촉시킴으로써 달성될 수 있으며, 여기서 하나의 조성물은 본 개시내용에 따른 이중 특이적 항-PD-LI 및 항-PD-L2 항체를 포함하고, 나머지 하나는 다른 제제를 포함한다.

[0126] 대안적으로, 이중 특이적 항-PD-LI 및 항-PD-L2 항체 요법은 수분 내지 수주 범위의 간격으로 다른 제제 치료에 선행되거나 후행될 수 있다. 다른 제제 및 이중 특이적 항-PD-LI 및 항-PDL2 항체가 별개로 세포에 적용되는 실시양태에서, 일반적으로 제제 및 발현 작제물이 여전히 세포에 대해 유리한 조합 효과를 발휘할 수 있도록, 각 전달 사이에서 상당한 시간이 경과하지 않는 것이 보장될 것이다. 이러한 경우, 세포를 두 양식(modality)과 서로 약 12-24시간 이내에, 보다 바람직하게는 서로 약 6-12시간 이내에 접촉시킬 것이며, 지연 시간은 단지 약 12시간이 가장 바람직한 것으로 고려된다. 일부 상황에서, 그러나 각각의 투여 사이에 수일 (2, 3, 4, 5, 6 또는 7일)에서 수주 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8주)가 걸리는 경우 치료 기간을 상당히 연장시키는 것이 바람직할 수 있다.

[0127] 또한, 이중 특이적 항-PD-LI 및 항-PD-L2 항체 또는 다른 제제의 1회 초과의 투여가 바람직한 것으로 생각될 수 있다. 다양한 조합이 이용될 수 있으며, 여기서 아래에 예시된 바와 같이, 본 개시내용 요법에 따른 이중 특이적 항-PD-LI 및 항-PD-L2 항체는 "A"이고, 다른 요법은 "B"이다:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B

A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A

A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

[0128]

[0129] 환자에게의 본 발명의 치료제의 투여는, 존재하는 경우, 항체 치료의 독성을 고려하여 이 특정 2차 요법의 투여에 대한 일반 프로토콜을 따를 것이다. 치료 주기는 필요에 따라 반복될 것으로 예상된다. 또한, 다양한 표준 치료법뿐만 아니라 수술적 개입이 설명된 암 요법과 함께 적용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0130] 당업자는 문헌["Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, Chapter 33, 특히 페이지 624-652]을 참조한다. 용량의 일부 변화는 치료되는 대상체의 상태에 따라 필연적으로 있을 것이다. 투여를 담당하는 사람은 어떠한 경우에도 개별 대상체에 대해 적절한 용량을 결정할 것이다. 또한, 인간 투여의 경우, 제제는 FDA 생물공학 사무국 표준에서 요구하는 무균성, 발열성, 일반 안전 및 순도 표준을 충족하여야 한다.

[0131] **1. 화학요법**

[0132] 암 요법은 또한 화학 치료 및 방사선-기반 치료 둘 모두를 사용하는 다양한 조합 요법을 포함한다. 조합 화학요법은, 예를 들어, 시스플라틴(cisplatin) (CDDP), 카르보플라틴(carboplatin), 프로카르바진(procarbazine), 메클로레타민(mechlorethamine), 시클로포스파마이드(cyclophosphamide), 캄프토테신(camptothecin), 이포스파마이드(ifosfamide), 멜파란(melphalan), 클로람부실(chlorambucil), 부설판(busulfan), 니트로수레아(nitrosurea), 닥티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 블레오마이신(bleomycin), 플리코마이신(plicomycin), 미토마이신(mitomycin), 에토포사이드(etoposide) (VP16), 타목시펜(tamoxifen), 랄록시펜(raloxifene), 에스트로겐 수용체 결합제(estrogen receptor binding agent), 탁솔(taxol), 젬시타비엔(gemcitabien), 나벨빈(navelbine), 파네실-단백질 전이효소 억제제(farnesyl-protein transferase inhibitor), 트랜스플라티넘(transplatinum), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine) 및 메토트렉세이트(methotrexate), 테마졸로마이드(Temazolomide) (수성 형태의 DTIC), 또는 상기의 것의 임의의 유사체 또는 유도체 변이체를 포함한다. 화학요법과 생물학적 요법의 조합은 생화학 요법으로 알려져 있다. 본 발명은 암을 치료하거나 예방하기 위해 기술분야에서 이용될 수 있거나 알려져 있을 수 있는 임의의 화학 요법제를 고려한다.

[0133] **2. 방사선 요법**

[0134] DNA 손상을 유발하고 광범위하게 사용된 다른 요인에는 일반적으로 γ-선, X-선 및/또는 종양 세포에 대한 방사

성 동위 원소의 직접 전달로 알려진 것이 포함된다. 또한, 마이크로파와 UV-조사와 같은 다른 형태의 DNA 손상 요인이 또한 고려된다. 이러한 모든 요인들이 DNA, DNA 전구체, DNA 복제 및 복구, 염색체의 조립 및 유지에 대한 광범위한 손상에 영향을 미칠 가능성이 가장 높다. X-선의 선량 범위는 장기간 (3 내지 4주) 동안 50 내지 200 뢴트겐의 1일 선량으로부터 2000 내지 6000 뢴트겐의 단일 선량까지의 범위이다. 방사성 동위 원소의 선량 범위는 넓은 범위로 변화되며, 동위 원소의 반감기, 방출되는 방사선의 강도와 유형, 및 신생물 세포에 의한 흡수에 따라 달라진다.

[0135] 세포에 적용될 경우 용어 "접촉된" 및 "노출된"은 본원에서 치료제 및 화학 요법제 또는 방사선 요법제가 표적 세포에 전달되거나 표적 세포와 직접 병치되는 과정을 기술하기 위해 사용된다. 세포 사멸 또는 정지를 달성하기 위해, 두 제제는 세포를 사멸하거나 이것이 분열되는 것을 방지하는 데 유효한 조합된 양으로 세포에 전달된다.

[0136] **3. 면역 요법**

[0137] 면역 요법은 일반적으로 면역 이펙터 세포 및 분자를 사용하여 암 세포를 표적화하고, 파괴하는 데 의존한다. 면역 이펙터는 예를 들어 종양 세포의 표면의 일부 마커에 대한 특이적인 항체일 수 있다. 항체는 단독으로 요법의 이펙터로 작용할 수도 있거나, 또는 다른 세포를 모집하여 실제로 세포 사멸에 영향을 미칠 수 있다. 항체는 또한 약물 또는 독소 (화학 요법제, 방사성 핵종, 리신(ricin) A 사슬, 콜레라 독소, 백일해 독소 등)에 접합되어 단순히 표적화제로 작용할 수 있다. 대안적으로, 이펙터는 종양 세포 표적과 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 표면 분자를 운반하는 림프구일 수 있다. 다양한 이펙터 세포는 세포독성 T-세포 및 NK 세포를 포함한다. 치료 양식의 조합, 즉, 직접적인 세포독성 활동과 포르틸린(Fortilin)의 억제 또는 감소는 암 치료에 치료적 이점을 제공할 것이다.

[0138] 면역 요법은 또한 조합 요법의 일부로 사용될 수 있다. 조합 요법에 대한 일반적인 방법은 아래에 논의된다. 면역 요법의 하나의 양태에서, 종양 세포는 표적화에 적합한, 즉, 대부분의 다른 세포에는 존재하지 않는 일부 마커를 가져야 한다. 여러 종양 마커가 존재하며, 이들 중 어느 것도 본 발명의 맥락에서 표적화를 위해 적합할 수 있다. 일반적인 종양 마커는 암배아 항원, 전립선 특이적 항원, 요로 종양 관련 항원, 태아 항원, 티로시나아제 (p97), gp68, TAG-72, HMFG, 시알릴 루이스 항원(Sialyl Lewis Antigen), MucA, MucB, PLAP, 에스트로겐 수용체, 라미닌 수용체, *erb* B 및 p155를 포함한다. 면역요법의 대안적인 양태는 면역 자극 효과를 가진 항암 효과이다. 사이토카인 예컨대 IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSP, 감마-IFN, 케모카인 예컨대 MIP-1, MCP-1, IL-8 및 성장 인자 예컨대 FL T3 리간드를 포함하는 면역 자극 분자가 또한 존재한다. 단백질로서 또는 mda-7과 같은 종양 억제제와 조합되는 유전자 전달을 사용하여 면역 자극 분자를 조합하는 것이 항-종양 효과를 향상시키는 것으로 나타났다 (Ju *et al.*, 2000).

[0139] 초반에 논의된 바와 같이, 현재 연구 중이거나 사용되는 면역 요법의 예는 면역 아쥬반트 (예를 들어, 마이크로박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*), 플라스모듐 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 디니트로클로로벤젠 및 방향족 화합물) (미국등록특허 제5,801,005호; 미국등록특허 제5,739,169호; Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides *et al.*, 1998), 사이토카인 요법 (예를 들어, 인터페론 및; IL-1, GM-CSP 및 TNF) (Bukowski *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 1998; Hellstrand *et al.*, 1998) 유전자 요법 (예를 들어, TNF, IL-1, IL-2, p53) (Qin *et al.*, 1998; Austin-Ward and Villaseca, 1998; 미국등록특허 제5,830,880호 및 미국등록특허 제5,846,945호) 및 단클론 항체 (예를 들어, 항-강글리오사이드 GM2, 항-HER-2, 항-p185) (Pietras *et al.*, 1998; Hanibuchi *et al.*, 1998; 미국등록특허 제5,824,311호)이다. 허셉틴(herceptin) (트라스투주맙(trastuzumab))은 HER2-neu 수용체를 차단하는 키메라 (마우스-인간) 단클론 항체이다. 이는 항종양 활성을 가지며, 악성 종양의 치료 용도에 대해 입증되었다 (Dillman, 1999). 허셉틴 및 화학 요법과의 암의 조합 요법은 개별 요법보다 더 효과적인 것으로 나타났다. 따라서, 하나 이상의 항암 요법은 본원에 기재된 종양-관련 HLA-제한 펩티드 요법과 함께 이용되는 것으로 고려된다.

[0140] 입양 면역 요법에서, 환자의 순환 림프구 또는 종양 침윤 림프구는 시험관 내에서 단리되고 IL-2와 같은 림포카인에 의해 활성화되거나 종양괴사에 대한 유전자로 전환되어 재투여된다 (Rosenberg *et al.*, 1988; 1989). 이를 달성하기 위해, 본원에 기재된 바와 같이 활성화된 림프구의 면역학적 유효량을 아쥬반트-혼입된 항원성 펩티드 조성물과 조합하여 동물, 또는 인간 환자에게 투여할 것이다. 활성화된 림프구는 가장 바람직하게는 혈액이나 종양 샘플에서 이전에 단리되어 시험관 내에서 활성화된 (또는 "확장된") 환자 자신의 세포일 것이다. 이 형태의 면역 요법은 흑색종 및 신장 암종의 퇴행의 여러 사례를 이루었지만, 반응자의 비율은 반응하지 않는 사람에 비해 적었다.

[0141] 암의 수동 면역 요법에 대한 여러 다양한 방법이 존재한다. 이는 다음과 같이 광범위하게 분류될 수 있다: 항체 단독 주입; 독소 또는 화학 요법제와 결합된 항체 주입; 방사성 동위 원소와 결합된 항체 주입; 항-이디오타입 항체 주입; 마지막으로 골수에서 종양 세포의 제거.

[0142] 인간 단클론 항체는 환자에게 부작용을 거의 또는 전혀 일으키지 않기 때문에 수동 면역 요법에 사용된다. 그러나, 이의 응용분야는 이의 희소성으로 인해 다소 제한적이며 지금까지는 병변 내로만 투여되었다. 강글리오사이드 항원에 대한 인간 단클론 항체는 피부 재발 흑색종을 앓는 환자에게 병변 내로 투여되었다 (Irie & Morton, 1986). 10명 중 6명의 환자에서 매일 또는 매주 병변내 주사 후 퇴행이 관찰되었다. 다른 연구에서는, 두 개의 인간 단일클론 항체의 병변내 주사로 중간 정도의 성공이 달성되었다 (Irie et al., 1989). 가능한 치료 항체는 항-TNF, 항-CD25, 항-CD3, 항-CD20, CTLA-4-IG, 및 항-CD28을 포함한다.

[0143] 두 개의 상이한 항원에 대해 유도되는 하나 초과의 단클론 항체 또는 심지어 다중 항원 특이성을 갖는 항체를 투여하는 것이 유리할 수 있다. 치료 프로토콜은 또한 림포카인 또는 문헌[Bajorin *et al.* (1988)]에 기재된 바와 같은 다른 면역 증강제의 투여를 포함할 수 있다. 인간 단클론 항체의 개발은 명세서 중 임의의 부분에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0144] **4. 유전자 요법**

[0145] 또 다른 실시양태에서, 2차 치료는 치료용 폴리뉴클레오티드가 종양-관련 HLA-제한 펩티드가 투여되기 이전, 이후, 또는 그와 동시에 투여되는 유전자 요법이다. 다음의 유전자 생성물 중 하나를 코딩하는 제2 벡터와 함께 종양-관련 HLA-제한 펩티드를 코딩하는 벡터의 전달은 표적 조직에 대한 조합되는 항-과증식 효과를 가질 것이다. 대안적으로, 두 유전자를 코딩하는 단일 벡터가 사용될 수 있다. 다양한 단백질이 발명에 포함되며, 이의 일부는 아래에 기재되어 있다. 본 발명과 조합되는 일부 형태의 유전자 요법을 위해 표적화될 수 있는 다양한 유전자가 본 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있으며, 암에 관련된 임의의 유전자를 포함할 수 있다.

[0146] 세포 증식의 유도제. 세포 증식을 유도하는 단백질은 기능에 따라 다양한 범주로 추가로 나누어진다. 이러한 모든 단백질의 공통점은 세포 증식을 조절하는 이들의 능력이다. 예를 들어, PDGF의 한 형태인 sis 암 유전자 (oncogene)는 분비되는 성장 인자이다. 암 유전자는 성장 인자를 코딩하는 유전자로부터 드물게 발생하고, 현재로서는 sis가 유일하게 알려진 자연적으로 발생하는 암 유전자 성장 인자이다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 세포 증식의 특정 유도제에 유도되는 안티-센스 mRNA는 세포 증식의 유도제의 발현을 방지하기 위해 사용되는 것으로 고려된다.

[0147] 단백질 PMS, ErbA, ErbB 및 neu는 성장 인자 수용체이다. 이들 수용체에 대한 돌연변이는 조절 기능의 상실을 유발한다. 예를 들어, Neu 수용체 단백질의 막관통 도메인에 영향을 미치는 점 돌연변이는 neu 암 유전자를 생성한다. erbA 암 유전자는 갑상선 호르몬에 대한 세포내 수용체로부터 유래된다. 변형된 암 유전자 ErbA 수용체는 내인성 갑상선 호르몬 수용체와 경쟁하여 조절되지 않는 성장을 유발하는 것으로 여겨진다.

[0148] 가장 큰 부류의 암 유전자는 신호 전달 단백질 (예를 들어, Src, Abl 및 Ras)을 포함한다. 단백질 Src는 세포질 단백질-티로신 키나아제이며, 일부 경우에 전암 유전자(proto-oncogene)에서 암 유전자로의 형질전환은 티로신 잔기 527에서의 돌연변이를 통해 일어난다. 반면, 일례에서 전암 유전자로부터 암 유전자으로의 GTPase 단백질 ras의 형질전환은 서열 중 아미노산 12에서 발린이 글리신으로 돌연변이되게 하여 ras GTPase 활성이 감소된다. 단백질 Jun, Fos 및 Myc는 전사 인자로서 핵 기능에 이의 영향을 직접적으로 미치는 단백질이다.

[0149] 세포 증식의 억제제. 암 유전자의 종양 억제제는 과도한 세포 증식을 억제하는 기능을 한다. 이들 유전자의 불활성화는 그의 억제 활성을 파괴하여 조절되지 않은 증식을 초래한다. 가장 일반적인 종양 억제제는 Rb, p53, p21 및 pl 6이다. 본 발명에 따라 이용될 수 있는 다른 유전자는 APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, zacl, p73, VHL, C-CAM, MMAC1/PTEN, DBCCR-1, FCC, rsk-3, p27, p27/p16 융합체, 및 p21/p27 융합체를 포함한다.

[0150] 프로그램화 세포 사멸의 조절자. 세포자멸사, 또는 프로그램화된 세포 사멸은 정상적인 배아 발달, 성체 조직의 항상성 유지, 발암 억제를 위한 필수적인 과정이다 (Kerr *et al.*, 1972). Bcl-2 패밀리의 단백질 및 ICE-유사 프로테아제는 다른 계에서 세포자멸사의 중요한 조절자이며 이펙터인 것으로 입증되었다. 모낭 림프종과 관련하여 발견된 Bcl-2 단백질은 다양한 세포자멸사 자극에 대한 반응으로 세포자멸사를 제어하고 세포 생존을 향상시키는 데 중요한 역할을 한다 (Bakhshi *et al.*, 1985; Cleary and Sklar, 1985; Cleary *et al.*, 1986; Tsujimoto *et al.*, 1985; Tsujimoto and Croce, 1986). 진화적으로 보존된 Bcl-2 단백질은 현재 관련 단백질의 패밀리의 구성원인 것으로 인식되며, 이는 사멸 작용제 또는 사멸 길항제로서 분류될 수 있다.

[0151] Bcl-2는 이의 발견 이후 다양한 자극에 의해 유발되는 세포 사멸을 억제하는 것으로 나타났다. 또한, 공통적인 구조적 및 서열 상동성을 공유하는 Bcl-2 세포 사멸 조절 단백질의 패밀리가 존재하는 것이 현재 명확하다. 이러한 상이한 패밀리 구성원은 Bcl-2에 대해 유사한 기능을 가지는 것 (예를 들어, BclxL, Bclw, Bcls, Mcl-1, Al, Bfl-1) 또는 Bcl-2 기능에 대응하여 세포 사멸을 촉진하는 것 (예를 들어, Bax, Bak, Bik, Bim, Bid, Bad, Harakiri)을 나타내었다.

[0152] **5. 수술**

[0153] 암을 가진 환자의 대략 60%는 예방, 진단 또는 병기 분류를 포함하는 일부 유형의 수술, 치료 및 완화 수술을 받을 것이다. 치료 수술은 다른 요법, 예컨대 본 발명의 치료, 화학 요법, 방사선 요법, 호르몬 요법, 유전자 요법, 면역 요법 및/또는 대체 요법과 함께 사용될 수 있는 암 치료법이다.

[0154] 치료 수술은 암 조직의 전체 또는 일부를 물리적으로 제거, 절제 및/또는 파괴하는 절제를 포함한다. 종양 절제는 종양의 적어도 일부를 물리적으로 제거하는 것을 지칭한다. 종양 절제 이외에, 수술에 의한 치료는 레이저 수술, 냉동 수술, 전기 수술 및 미세 제어 수술 (모스 수술(Mohs' surgery))을 포함한다. 또한 본 발명은 표재성 암, 전암 또는 우발적인 양의 정상 조직의 제거와 함께 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0155] 모든 암 세포, 조직 또는 종양의 일부를 절제하는 경우, 신체에 공동이 형성될 수 있다. 치료는 관류, 직접 주사 또는 추가 항암 요법을 사용한 부위에의 국소 적용에 의해 달성될 수 있다. 이러한 치료는 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일 마다, 또는 1, 2, 3, 4, 및 5주 마다 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월 마다 반복될 수 있다. 이러한 치료는 또한 다양한 투여량으로 이루어질 수 있다.

[0156] **V. 항체 접합체**

[0157] 항체는 적어도 하나의 제제와 연결되어 항체 접합체를 형성할 수 있다. 진단적 또는 치료적 제제로서 항체 분자의 효능을 증가시키기 위해, 적어도 하나의 원하는 분자 또는 모이어티를 연결하거나 또는 공유적으로 결합시키거나 접합시키는 것이 종래 방식이다. 이러한 분자 또는 모이어티는 비제한적으로 적어도 하나의 이펙터 또는 리포터 분자일 수 있다. 이펙터 분자는 원하는 활성, 예를 들어, 면역 억제/항-염증을 갖는 분자를 포함한다. 이러한 분자의 비제한적인 예는 상기에 제시되어 있다. 이러한 분자는 분자가 표적 부위에서 또는 그 부근에서 방출될 수 있도록 설계된 절단성 링커를 통해 임의로 부착된다.

[0158] 대조적으로, 리포터 분자는 검정을 사용하여 검출될 수 있는 임의의 모이어티로서 정의된다. 항체에 접합된 리포터 분자의 비제한적인 예에는 효소, 방사성 표지, 햅텐, 형광 표지, 인광 분자, 화학 발광 분자, 발색단, 광친화성 분자, 착색 입자 또는 리간드, 예컨대 비오틴이 포함된다.

[0159] 항체 접합체는 일반적으로 진단제로서 사용하는 것이 바람직하다. 항체 진단제는 예컨대 다양한 면역 검정에서의 시험관내 진단에 사용하기 위한 것과 일반적으로 "항체-유도 영상화(antibody-directed imaging)"로 알려진 생체내 진단 프로토콜에 사용하기 위한 것인 2개의 부류에 속한다. 여러 적합한 영상화제는 항체에 대한 이의 부착을 위한 방법과 같은 기술분야에서 알려져 있다 (예를 들어, 미국등록특허 제5,021,236호, 제4,938,948호, 및 제4,472,509호 참조). 사용되는 영상화 모이어티는 상자성 이온, 방사성 동위 원소, 형광 염색체, NMR-검출 가능한 물질, 및 X-선 영상화제일 수 있다.

[0160] 상자성 이온의 경우, 예로서 크롬 (III), 망간 (II), 철 (III), 철 (II), 코발트 (II), 니켈 (II), 구리 (II), 네오디뮴 (III), 사마륨 (III), 이테르븀 (III), 가돌리늄 (III), 바나듐 (II), 테르븀 (III), 디스프로슘 (III), 홀뮴 (III) 및/또는 에르븀 (III)과 같은 이온을 언급할 수 있으며, 가돌리늄이 특히 바람직하다. X-선 영상화와 같은 다른 맥락에서 유용한 이온은, 비제한적으로, 란탄 (III), 금 (III), 납 (II) 및 특히 비스무트 (III)를 포함한다.

[0161] 치료적 및/또는 진단적 응용분야를 위한 방사성 동위원소의 경우, 아스타틴^{211}, ^{14}탄소, ^{51}크롬, ^{36}염소, ^{57}코발트, ^{58}코발트, 구리^{67}, ^{152}Eu, 갈륨^{67}, ^{3}수소, 요오드^{123}, 요오드^{125}, 요오드^{131}, 인듐^{111}, ^{59}철, ^{32}인, 레늄^{186}, 레늄^{188}, ^{75}셀레늄, ^{35}황, 테크니슘^{99m} 및/또는 이트륨^{90}이 특정 실시양태에 사용하기 위해 종종 바람직하고, 테크니슘^{99m} 및/또는 인듐^{111}이 또한 그것의 낮은 에너지 및 넓은 범위 검출에 대한 적합성으로 인해 종종 바람직한 것으로 한 것으로 언급될 수 있다. 방사성 표지화 단클론 항체는 본 기술분야에 잘 알려진 방법에 따라 생성될 수 있다. 예로서, 단클론 항체는 나트륨 및/또는 칼륨 요오드화물 및 화학적 산화제 예컨대 차아염소산나트륨, 또는 효소적 산화제 예컨대 락토퍼옥시다아제와 접촉시킴으로써 요오드화될 수 있다. 단클론 항체는 리간드 교환 공정에 의

해, 예를 들어, 주석 용액으로 퍼테크네이트(pertechnate)를 환원시키고, 환원된 테크네튬을 Sephadex 컬럼 상에서 킬레이트화시키고, 항체를 이 컬럼에 적용시킴으로써 테크네튬99m으로 표지화될 수 있다. 대안적으로, 직접 표지화 기술은 예를 들어 퍼테크네이트, 환원제 예컨대 SNCh, 버퍼 용액 예컨대 나트륨-칼륨 프탈레이트 용액, 및 항체를 인큐베이션시킴으로써 사용될 수 있다. 중간 작용기는 종종 방사성 동위원소를 항체에 결합시키기 위해 사용되며, 금속 이온으로 존재하며, 이는 디에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTPA) 또는 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA)이다.

[0162] 접합체로서 사용하기 위한 것으로 고려되는 형광 표지에는 Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPYFL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, 캐스케이드 블루(Cascade Blue), Cy3, Cy5,6-FAM, 플루오레세인 이소티오시아네이트(Fluorescein Isothiocyanate), HEX, 6-JOE, 오레곤 그린(egon Green) 488, 오레곤 그린 500, 오레곤 그린 514, 퍼시픽 블루(Pacific Blue), REG, 로다민 그린(Rhodamine Green), 로다민 레드(Rhodamine Red), 레노그래핀(Renographin), ROX, TAMRA, TET, 테트라메틸로다민(Tetramethylrhodamine), 및/또는 텍사스 레드(Texas Red)가 포함된다.

[0163] 고려되는 다른 유형의 항체 접합체는 주로 시험관 내에서 사용하기 위한 것으로 의도되는 것이며, 여기서 항체는 2차 결합 리간드에 및/또는 발색 기질과의 접촉 시 착색된 생성물을 발생시킬 것인 효소 (효소 태그)에 연결된다. 적합한 효소의 예는 우레아제, 알칼리성 포스파타아제, (겨자무(horseradish)) 수소 퍼옥시다아제 또는 글루코오스 옥시다아제를 포함한다. 바람직한 2차 결합 리간드는 비오틴 및 아비딘 및 스트렙타비딘 화합물이다. 이러한 표지의 사용은 본 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 미국등록특허 제3,817,837호, 제3,850,752호, 제3,939,350호, 제3,996,345호, 제4,277,437호, 제4,275,149호 및 제4,366,241호에 기재되어 있다.

[0164] 항체에 대한 분자의 위치-특이적 부착의 또 다른 알려진 방법은 햅텐-기반 친화성 표지와 항체의 반응을 포함한다. 본질적으로, 햅텐-기반 친화성 표지는 항원 결합 부위에서 아미노산과 반응하고, 이에 의해 이 위치를 파괴하여, 특이적 항원 반응을 차단한다. 그러나, 이는 이것이 항체 접합체에 의한 항원 결합의 손실을 야기할 수 있기 때문에 유리하지 않을 수 있다.

[0165] 아지도 기를 함유하는 분자는 또한 저강도 자외선 광에 의해 생성되는 반응성 니트렌 중간체를 통해 단백질에 대한 공유 결합을 형성하는 데 사용될 수 있다 (Potter and Haley, 1983). 특히, 퓨린 뉴클레오티드의 2- 및 8-아지도 유사체는 조 세포 추출물에서 뉴클레오타이드 결합 단백질을 식별하기 위한 위치-지향적 포토브로브(site-directed photoprobe)로 사용되었다 (Owens & Haley, 1987; Atherton *et al.*, 1985). 2- 및 8-아지도 뉴클레오티드는 또한 정제된 단백질의 뉴클레오티드 결합 도메인을 맵핑(mapping)하기 위해 사용되었고 (Khatoon *et al.*, 1989; King *et al.*, 1989; Dholakia *et al.*, 1989), 항체 결합제로서 사용될 수 있다.

[0166] 항체를 그의 접합체 모이어티에 부착 또는 접합시키기 위한 여러 방법이 본 기술분야에 알려져 있다. 일부 부착 방법은 예를 들어, 디에틸렌트리아민펜타아세트산 무수물 (DTPA); 에틸렌트리아민테트라아세트산; N-클로로-p-톨루엔설폰아마이드; 및/또는 항체에 부착된 테트라클로로-3a-6a-디페닐글리코우릴-3과 같은 유기 킬레이트제를 사용하는 금속 킬레이트 복합체의 사용을 포함한다 (미국등록특허 제4,472,509호 및 제4,938,948호). 단클론 항체는 또한 커플링제 예컨대 글루타르알데히드 또는 과요오드산염(periodate)의 존재하에서 효소와 반응될 수 있다. 플루오레세인 마커를 가진 접합체는 이러한 커플링제의 존재하에서 또는 이소티오시아네이트와의 반응에 의해 제조된다. 미국등록특허 제4,938,948호에서, 유방 종양의 영상화는 단클론 항체를 사용하여 달성되며, 검출 가능한 영상화 모이어티는 링커 예컨대 메틸-p-하이드록시벤즈이미데이트(methyl-p-hydroxybenzimidate) 또는 N-석신이미디 1-3-(4-하이드록시페닐)프로피오네이트(N-succinimidy 1-3-(4-hydroxypheny1)propionate)를 사용하여 항체에 결합된다.

[0167] 다른 실시양태에서, 항체 조합 부위를 변경하지 않는 반응 조건을 사용하여 면역글로불린의 Fe 영역에 설프하이드릴기를 선택적으로 도입시키는 것에 의한 면역글로불린의 유도체화가 고려된다. 이 방법론에 따라 생성된 항체 접합체는 개선된 수명, 특이성 및 감도를 나타내는 것으로 개시되어 있다 (미국등록특허 제5,196,066호, 본원에 참조로 포함됨). 리포터 또는 이펙터 분자가 Fe 영역에서 탄수화물 잔기에 접합되는 이펙터 또는 리포터 분자의 위치-특이적 부착이 또한 문헌에 개시되어 있다 (O'Shannessy *et al.*, 1987). 이 방법론은 현재 임상 평가 중인 진단적으로 그리고 치료적으로 유망한 항체를 생성하는 것으로 보고되었다.

[0168] **VI. 면역 검출 방법**

[0169] 다른 추가의 실시양태에서, PD-L1 또는 PD-L2 및 이의 관련 항원을 결합시키고, 정제하고, 제거하고, 정량화하

고 그리고 그렇지 않으면 일반적으로 검출하기 위한 면역 검출 방법이 존재한다. 일부 면역 검출 방법은 몇몇 언급하면 효소 결합 면역 흡착 검정 (ELISA), 방사면역 측정법 (RIA), 면역방사 측정법, 불소면역 측정법, 화학발광 검정, 생물 발광 검정, 및 웨스턴 블롯을 포함한다. 특히, PD-L1 및 PD-L2 항체의 검출 및 정량화를 위한 경쟁적 검정이 또한 제공된다. 다양한 유용한 면역 검출 방법의 단계들은 과학 문헌 예컨대, 예를 들어 문헌 [Doolittle and BenZeev (1999)], 문헌[Gulbis and Galand (1993)], 문헌[De Jager *et al.* (1993)], 및 문헌 [Nakamura *et al.* (1987)]에 기재되어 있다. 일반적으로, 면역 결합 방법은 샘플을 얻는 단계 및 본원에 논의된 실시양태에 따라 샘플을 1차 항체와 접촉시키는 단계를 포함하며, 이와 같은 경우는 면역 복합체의 형성을 허용하는 데 유효한 조건하에서 이루어질 수 있다.

[0170] 면역 복합체 (1차 면역 복합체)의 형성을 허용하기에 충분한 기간 동안 유효한 조건하에서 항체를 선택된 생물학적 샘플과 접촉시키는 것은 일반적으로 항체 조성물을 샘플에 간단하게 첨가하고, 면역 복합체를 형성하기 위해, 즉, 존재하는 PD-L1 및 PD-L2에 결합시키기 위해 항체에 대해 충분하게 긴 기간 동안 혼합물을 인큐베이션시키는 것이 문제이다. 이 시간 이후, 조직 절편, ELISA 플레이트, 도트 블롯 또는 웨스턴 블롯과 같은 샘플-항체 조성물은 일반적으로 세척되어 임의의 비특이적으로 결합된 항체 종이 제거되어, 1차 면역 복합체 내에서 특이적으로 결합된 항체만을 검출할 수 있을 것이다.

[0171] 일반적으로, 면역 복합체 형성의 검출은 본 기술분야에서 잘 알려져 있으며 여러 방법을 적용하여 달성될 수 있다. 이러한 방법은 일반적으로 방사성, 형광, 생물학적 및 효소적 태그 중 어느 하나와 같은 표지 또는 마커의 검출을 기반으로 한다. 이러한 표지의 사용과 관련된 특허는 미국등록특허 제3,817,837호, 제3,850,752호, 제3,939,350호, 제3,996,345호, 제4,277,437호, 제4,275,149호 및 제4,366,241호를 포함한다. 물론, 본 기술분야에 알려진 바와 같이, 2차 항체 및/또는 비오틴/아비딘 리간드 결합 배열과 같은 2차 결합 리간드의 사용을 통해 추가적인 장점을 발견할 수 있다.

[0172] 검출에 이용되는 항체 그 자체는 검출 가능한 표지에 연결될 수 있으며, 여기서 이후 이 표지를 간단하게 검출할 것이며, 이에 의해 조성물에서의 1차 면역 복합체의 양이 결정될 수 있다. 대안적으로, 1차 면역 복합체 내에 결합되는 1차 항체는 항체에 대한 결합 친화성을 갖는 2차 결합 리간드에 의해 검출될 수 있다. 이러한 경우, 2차 결합 리간드는 검출 가능한 표지에 연결될 수 있다. 2차 결합 리간드 자체는 종종 항체이며, 이는 이에 따라 "2차" 항체로 명명될 수 있다. 1차 면역 복합체는 2차 면역 복합체의 형성을 허용하기에 충분한 기간 동안 유효한 조건하에서 표지화 2차 결합 리간드, 또는 항체와 접촉된다. 2차 면역 접합체는 이후 일반적으로 세척되어 임의의 비특이적으로 결합된 표지화 2차 항체 또는 리간드가 제거되며, 2차 면역 복합체에서의 나머지 표지가 이후 검출된다.

[0173] 추가적인 방법은 2단계 방법에 의한 1차 면역 복합체의 검출을 포함한다. 2차 결합 리간드, 예컨대 항체에 대한 결합 친화성을 갖는 항체가 상기 기재된 바와 같이 2차 면역 복합체를 형성하기 위해 사용된다. 세척 후, 2차 면역 복합체는 마찬가지로 면역 복합체 (3차 면역 복합체)를 형성하기에 충분한 시간 동안 유효한 조건하에서 2차 항체에 대한 결합 친화성을 갖는 3차 결합 리간드 또는 항체와 접촉된다. 3차 리간드 또는 항체는 검출 가능한 표지에 연결되어, 이와 같이 형성된 3차 면역 복합체를 검출할 수 있다. 이 시스템은, 이것이 바람직한 경우, 신호 증폭을 제공할 수 있다.

[0174] 면역 검출의 한 방법은 2개의 상이한 항체를 사용한다. 1차 비오티닐화(biotinylated) 항체는 표적 항원을 검출하는 데 사용되고, 2차 항체는 이후 복합화 비오틴에 부착된 비오틴을 검출하는 데 사용된다. 이 방법에서, 시험되는 샘플은 먼저 제1 단계 항체를 포함하는 용액에서 인큐베이션된다. 표적 항원이 존재하는 경우, 항체 중 일부가 항원에 결합하여 비오티닐화 항체/항원 복합체를 형성한다. 항체/항원 복합체는 이후 스트렙타비딘 (또는 아비딘), 비오티닐화 DNA 및/또는 상보적 비오티닐화 DNA의 연속적인 용액에서의 인큐베이션에 의해 증폭되며, 각 단계에서 항체/항원 복합체에 추가적인 비오틴 부위가 첨가된다. 적절한 수준의 증폭이 달성될 때까지 증폭 단계가 반복되며, 이 시점에서 샘플은 비오틴에 대한 제2 단계 항체를 함유하는 용액에서 인큐베이션된다. 이러한 제2 단계 항체는 예를 들어 크로모겐 기질(chromogen substrate)을 사용하는 조직 효소학을 통해 항체/항원 복합체의 존재를 감지하는 데 사용할 수 있는 효소로 표지화된다. 적절한 증폭을 통해 거시적으로 볼 수 있는 접합체를 생성할 수 있다.

[0175] 면역 검출의 다른 알려진 방법은 면역-PCR (중합효소 연쇄 반응) 방법론을 이용한다. PCR 방법은 비오티닐화 DNA와 함께 인큐베이션하는 것까지는 칸토르(Cantor) 방법과 유사하지만, 스트렙타비딘과 비오티닐화 DNA 인큐베이션의 복수의 라운드를 사용하는 대신, DNA/비오틴/스트렙타비딘/항체 복합체를 항체를 방출하는 낮은 pH 또는 높은 염 버퍼로 세척한다. 생성된 세척 용액은 이후 적절한 대조군이 있는 적절한 프라이머를 사용하는 PCR

반응을 수행하는 데 사용된다. 적어도 이론적으로, PCR의 엄청난 증폭 능력 및 특이성을 이용하여 단일 항원 분자를 검출할 수 있다.

[0176] A. ELISA

[0177] 가장 단순한 의미에서 면역 검정은 결합 검정이다. 특정 바람직한 면역 검정은 본 기술분야에서 알려진 다양한 유형의 효소 결합 면역 흡착 검정 (ELISA) 및 방사면역 측정법 (RIA)이다. 조직 절편을 사용한 면역 조직 화학적 검출도 특히 유용하다. 그러나, 검출이 이러한 기술에 국한되지 않고, 웨스턴 블롯팅, 도트 블롯팅, FACS 분석 등이 또한 사용될 수 있는 것으로 쉽게 이해될 것이다.

[0178] 하나의 예시적인 ELISA에서, 개시내용의 항체는 단백질 친화성을 나타내는 선택된 표면, 예컨대 폴리스티렌 마이크로티터 플레이트 내의 웰(well)에 고정화된다. 이후, PD-L1 및/또는 PD-L2를 포함하는 것으로 의심되는 시험 조성물을 웰에 첨가한다. 결합, 및 비특이적으로 결합된 면역 복합체를 제거하기 위한 세척 이후, 결합된 항원이 검출될 수 있다. 검출 가능한 표지에 연결된 PD-L1 및 PD-L2에 유도되는 다른 이중 특이적 항체를 첨가함으로써, 또는 검출 가능한 표지에 연결된 항-PD-L1 또는 항-PD-L2 항체에 의해 검출이 달성될 수 있다. 이러한 유형의 ELISA는 간단한 "샌드위치 ELISA"이다. PD-L1 및 PD-2에 대한 2차 이중 특이적 항체, 또는 항-PD-L1 또는 항-PD-L2 항체의 첨가와 그 이후 2차 항체에 대한 결합 친화성을 갖는 3차 항체의 첨가에 의해 검출이 또한 달성될 수 있으며, 제3 항체는 검출 가능한 표지에 연결된다.

[0179] 다른 예시적인 ELISA에서, PD-L1 및/또는 PD-L2 항원을 포함하는 것으로 의심되는 샘플을 웰 표면 상에 고정시키고, 이후 이중 특이적 항-PD-L1 및 항-PD-L2 항체와 접촉시킨다. 결합, 및 비특이적으로 결합된 면역 복합체를 제거하기 위한 세척 이후, 결합된 이중 특이적 항-PD-L1 및 항-PD-L2 항체가 검출된다. 초기 이중 특이적 항-PD-L1 및 항-PDL2 항체가 검출 가능한 표지에 연결되는 경우, 면역 복합체가 직접적으로 검출될 수 있다. 마찬가지로, 면역 복합체는 1차 이중 특이적 항-PD-L1 및 항-PD-L2 항체에 대한 결합 친화성을 갖는 2차 항체를 사용하여 검출될 수 있으며, 2차 항체는 검출 가능한 표지에 연결된다.

[0180] 이용되는 형식과 관계 없이, ELISA는 코팅, 인큐베이션 및 결합, 비특이적으로 결합된 종을 제거하기 위한 세척 및 결합된 면역 복합체의 검출과 같은 특정 공통적인 특징을 갖고 있다. 이는 아래에 기재되어 있다.

[0181] 항원 또는 항체로 플레이트를 코팅함에 있어서, 일반적으로 항원 또는 항체의 용액과 함께 플레이트의 웰을 밤새 또는 특정 시간의 기간 동안 인큐베이션시킬 것이다. 플레이트의 웰은 이후 세척되어 불완전하게 흡착된 물질이 제거될 것이다. 웰의 임의의 나머지 이용 가능한 표면은 이후 시험 항혈청과 관련하여 항원적으로 중성인 비특이적 단백질로 "코팅된다". 이는 소 혈청 알부민 (BSA), 카세인 또는 분유 용액을 포함한다. 코팅은 고정화된 표면 상의 비특이적 흡착 부위의 차단을 가능하게 하며, 이에 따라 표면 상에의 항혈청의 비특이적 결합에 의해 야기된 배경(background)을 감소시킨다.

[0182] ELISA에서, 아마도 직접적인 절차보다는 2차 또는 3차 검출 수단을 사용하는 것이 보다 일반적이다. 따라서, 웰에의 단백질 또는 항체의 결합, 배경을 감소시키기 위한 비-반응성 물질을 사용한 코팅 및 미결합된 물질의 제거를 위한 세척 이후, 고정화된 표면은 면역 복합체 (항원/항체) 형성을 가능하게 하는 유효한 조건하에서 시험되는 생물학적 샘플과 접촉된다. 면역 복합체의 검출은 이후 표지화 2차 결합 리간드 또는 항체, 및 표지화 3차 항체 또는 3차 결합 리간드와 결합되는 2차 결합 리간드 또는 항체를 필요로 한다.

[0183] "면역 복합체 (항원/항체) 형성을 가능하게 하는 유효한 조건하에서"는 상기 조건이 바람직하게는 용액 예컨대 BSA, 소 감마 글로불린 (BGG) 또는 인산염 완충 식염수 (PBS)/Tween로 항원 및/또는 항체를 희석시키는 것을 포함하는 것을 의미한다. 이러한 첨가된 제제는 또한 비특이적 배경의 감소를 지원하는 경향이 있다.

[0184] "안정한" 조건은 또한 인큐베이션이 효과적인 결합을 가능하게 하는 데 충분한 온도 또는 기간에서 이루어지는 것을 의미한다. 인큐베이션 단계는 통상적으로 바람직하게는 대략 25℃ 내지 27℃의 온도에서 약 1시간으로부터 약 2 내지 4시간까지이거나, 또는 밤새 동안 약 4℃일 수 있다.

[0185] ELISA에서 모든 인큐베이션 단계 이후, 접촉된 표면은 복합체화되지 않은 물질을 제거하기 위해 세척된다. 바람직한 세척 절차는 용액 예컨대 PBS/Tween, 또는 보레이트 버퍼를 사용하는 세척을 포함한다. 시험 샘플과 원래 결합된 물질 간의 특정 면역 복합체의 형성 및 후속 세척 이후, 심지어 미량의 면역 복합체의 발생이 결정될 수 있다.

[0186] 검출 수단을 제공하기 위해, 2차 또는 3차 항체는 검출을 가능하게 하도록 연관된 표지를 가질 것이다. 바람직하게는, 이는 적절한 발색 기질과 함께 인큐베이션 시 색상 발현을 일으킬 것인 효소일 것이다. 따라서, 예를

들어, 추가적인 면역 복합 형성의 발달에 유리한 조건하에서 그리고 일정 기간 동안 우레아제, 글루코오스 옥시다아제, 알칼리성 포스파타아제 또는 수소 퍼옥시다아제-접합된 항체와 함께 1차 및 2차 면역 복합체를 접촉시키거나 인큐베이션시키는 것이 요망될 것이다 (예를 들어, PBS-함유 용액 예컨대 PBS-Tween에서 실온에서의 2시간 동안의 인큐베이션).

[0187] 표지화 항체와 함께 인큐베이션하고, 미결합된 물질을 제거하기 위한 세척을 후속한 후, 예를 들어 효소 표지로서의 퍼옥시다아제의 경우에 발색 기질 예컨대 우레아, 또는 브로모크레졸 퍼플(bromocresol purple), 또는 2,2'-아지노-디-(3-에틸벤즈티아졸린-6-설폰산 (ABTS), 또는 H202와 함께의 인큐베이션에 의해 표지의 양이 정량화된다. 정량화는 이후 예를 들어 가시광선 스펙트럼 분광광도계를 사용하여 생성된 색상의 정도를 측정하여 달성된다.

[0188] **B. 웨스턴 블롯**

[0189] 웨스턴 블롯 (대안적으로, 단백질 면역블롯)은 조직 균질물 또는 추출물의 주어진 샘플에서 특정 단백질을 검출하는 데 사용되는 분석 기술이다. 이것은 겔 전기영동을 사용하여 폴리펩티드의 길이 (변성 조건)에 의해 또는 단백질의 3-D 구조 (네이티브(native)/비변성 조건)에 의해 네이티브 또는 변성된 단백질을 분리한다. 단백질은 이후 막 (통상적으로 니트로셀룰로오스 또는 PVDF)으로 이동되어, 여기서 이는 표적 단백질에 특이적인 항체를 사용하여 조사된다 (검출된다).

[0190] 샘플은 전체 조직 또는 세포 배양물에서 채취할 수 있다. 대부분의 경우, 고형 조직은 먼저 블렌더 (더 큰 샘플 부피의 경우)를 사용하거나, 균질화기 (더 작은 부피의 경우)를 사용하거나 또는 음파 처리에 의해 기계적으로 분해된다. 세포는 또한 상기 기계적 방법 중 하나에 의해 파괴되어 개방될 수 있다. 그러나, 박테리아, 바이러스 또는 환경 샘플이 단백질의 공급원이 될 수 있고, 이에 따라 웨스턴 블롯팅은 세포 연구에만 국한되지 않는다는 점에 유의하여야 한다. 다양한 세제, 염 및 버퍼는 세포의 용해를 촉진하고, 단백질을 용해시키기 위해 이용될 수 있다. 프로테아제 및 포스파타아제 억제제는 종종 이의 자체 효소에 의한 샘플의 분해를 방지하기 위해 첨가된다. 조직 준비는 종종 백질 변성을 방지하기 위해 저온에서 수행된다.

[0191] 샘플의 단백질은 겔 전기영동을 사용하여 분리된다. 단백질의 분리는 등전점(isoelectric point; pl), 분자량, 전하, 또는 이들 요인의 조합에 의할 수 있다. 분리 특징은 샘플의 처리 및 겔의 특징에 좌우된다. 이는 단백질을 결정하기 위해 매우 유용한 방법이다. 또한, 단일 샘플로부터의 단백질을 2차원으로 분산시키는 2차원 (2-D) 겔을 사용하는 것이 가능하다. 단백질은 1차원에서 등전점 (이것이 중성 순전하를 갖는 pH)에 따라 그리고 2차원에서 이의 분자량에 따라 분리된다.

[0192] 단백질을 항체 검출에 이용 가능하게 하기 위해, 이를 겔 내부에서 니트로셀룰로오스 또는 폴리비닐리덴 디플루오라이드 (PVDF)로 제조한 막으로 이동시킨다. 막을 겔의 상단에 배치하고, 여과지의 스택을 이의 상단에 배치한다. 전체 스택을 버퍼 용액에 배치하고, 이는 모세관 현상에 의해 여과지 위로 이동되고, 단백질도 이와 함께 이동한다. 단백질을 이송시키기 위한 다른 방법은 전기블롯팅(electroblotting)으로 명명하며, 전류를 사용하여 겔로부터 PVDF 또는 니트로셀룰로오스 막으로 단백질을 당긴다. 단백질은 겔 내부에서의 구조를 유지하면서 겔 내부로부터 막으로 이동된다. 이러한 블롯팅 공정의 결과로서, 단백질은 검출을 위한 표면 박층 상에 노출된다 (하기 참조). 두 종류의 막은 이의 비특이적 단백질 결합 특성 (즉, 모든 단백질을 동등하게 잘 결합됨)에 대해 선택되었다. 단백질 결합은 소수성 상호 작용뿐만 아니라 막과 단백질 간의 하전된 상호 작용에 기반한다. 니트로셀룰로오스 막은 PVDF보다 더 저렴하지만, 훨씬 더 취약하고 반복적인 조사에 잘 견디지 못한다. 겔에서 막으로의 단백질의 수송의 균일성과 전반적인 효과는 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie Brilliant Blue) 또는 폰세우 S(Ponceau S) 염료를 사용하여 막을 염색시킴으로써 확인될 수 있다. 수송된 경우, 단백질은 표지화 1차 항체 또는 비표지화 1차 항체를 사용하고, 이후 표지화 단백질 A 또는 1차 항체의 Fe 영역에 결합되는 2차 표지화 항체를 사용하는 간접 검출을 후속하여 검출된다.

[0193] **C. 면역 조직 화학**

[0194] 항체는 또한 면역 조직 화학 (IHC)에 의한 연구를 위해 준비된 새롭게-동결된 및/또는 포르말린-고정된, 파라핀-포매된 조직 블록 모두와 함께 사용될 수 있다. 이러한 미립자 시편으로부터 조직 블록을 준비하는 방법은 다양한 예후 요인에 대한 이전 IHC 연구에서 성공적으로 사용되었으며, 이는 본 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있다 (Brown *et al.,* 1990; Abbondanzo *et al.,* 1990; Allred *et al.,* 1990).

[0195] 간략하게는, 플라스틱 소형 캡슐 중에서 인산염 완충 식염수 (PBS)에서 실온에서 50 ng의 동결된 "분쇄된" 조직을 재수화시키고; 원심분리에 의해 입자를 펠릿화(pelleting)하고; 이를 점성 포매 배지 (OCT)에 재현탁시키고;

캡슐을 역위시키고/시키거나 원심분리에 의해 다시 펠릿화하고; -70℃ 이소펜탄에서 급속-동결시키고; 플라스틱 캡슐을 절단하고/하거나 조직의 동결된 실린더를 빼내고; 냉동저온 마이크로톰 척(cryostat microtome chuck) 상에 조직 실린더를 고정시키고/시키거나; 캡슐로부터 25-50개의 연속 절편을 절단함으로써 동결된-절편을 준비할 수 있다. 대안적으로, 전체 동결 조직 샘플은 연속 절편 절단을 위해 사용될 수 있다.

[0196] 플라스틱 마이크로퓨즈 튜브(microfuge tub)에서 50 mg 샘플을 재수화시키고; 펠릿화하고; 4시간 고정화 동안 10% 포르말린에 재현탁시키고; 세척하고/펠릿화하고; 따듯한 2.5% 한천에 재현탁시키고; 펠릿화하고; 빙수에서 냉각시켜 한천을 경화시키고; 튜브로부터 조직/한천 블록을 빼내고; 파라핀에 블록을 침투시키고/시키거나 포매시키고/시키거나; 최대 50개의 연속 영구 절편을 절단하는 것을 포함하는 유사한 방법에 의해 영구-절편을 준비할 수 있다. 마찬가지로, 전체 조직 샘플은 교체될 수 있다.

[0197] **D. 면역 검출 키트(Immunodetection Kit)**

[0198] 다른 추가의 실시양태에서, 상기 기재된 면역 검출 방법과 함께 사용하기 위한 면역 검출 키트가 존재한다. 면역 검출 키트는 이에 따라 적합한 컨테이너 수단에 PD-L1 및/또는 PD-L2 항원에 결합하는 1차 이중 특이적 항체, 및 임의로 면역 검출 시약을 포함할 것이다.

[0199] 특정 실시양태에서, PD-L1 및 PD-L2에 대한 이중 특이적 항체는 컬럼 매트릭스 및/또는 마이크로티터 플레이트의 웰과 같은 고체 지지체에 미리 결합될 수 있다. 키트의 면역 검출 시약은 주어진 항체와 연관되거나 이에 연결된 검출 가능한 표지를 포함하여 다양한 형태 중 어느 하나를 취할 수 있다. 2차 결합 리간드와 연관되거나 또는 이에 부착되는 검출 가능한 표지가 또한 고려된다. 예시적인 2차 리간드는 1차 항체에 대한 결합 친화성을 갖는 2차 항체이다.

[0200] 본 키트에 사용하기 위한 추가의 적합한 면역 검출 시약은 1차 항체에 대한 결합 친화성을 갖는 2차 항체를, 2차 항체에 대한 결합 친화성을 갖는 3차 항체와 함께 포함하는 2-성분 시약을 포함하며, 3차 항체는 검출 가능한 표지에 연결된다. 상기 주지한 바와 같이, 다수의 예시적인 표지는 본 기술분야에 알려져 있고, 모든 이러한 표지는 본원에 논의된 실시양태와 연관하여 이용될 수 있다.

[0201] 키트는 검출 검정을 위한 표준 곡선을 준비하는 데 사용될 수 있는 표지화되거나 표지화되지 않은 PD-L1 및 PD-L2 항원의 적절히 분취된 조성물을 추가로 포함할 수 있다. 키트는 완전하게 접합된 형태로, 중간체의 형태로 또는 키트의 사용자에 의해 접합되는 별개의 모이어티로서 항체-표지 접합체를 포함할 수 있다. 키트의 성분은 수성 배지 내에 또는 동결건조된 형태로 패키징될 수 있다.

[0202] 키트의 컨테이너 수단은 일반적으로 항체를 그 안에 배치할 수 있거나, 또는 바람직하게는 적절하게 분취할 수 있는 적어도 하나의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 다른 컨테이너 수단을 포함할 것이다. 키트는 또한 상업적 시판을 위한 밀폐된 구획 내에 항체, 항원, 및 임의의 다른 시약 컨테이너를 포함하는 수단을 포함할 것이다. 이러한 컨테이너는 원하는 바이알을 보관되는 사출 또는 블로우-성형된 플라스틱 컨테이너를 포함할 수 있다.

[0203] **VII. 실시예**

[0204] 다음의 실시예는 발명의 바람직한 실시양태를 입증하기 위해 포함된다. 본 기술분야의 당업자는 발명자에 의해 개발된 나타낸 기술에 따라 실시예에 개시된 기술이 발명의 실시에서 잘 작용되며, 이에 따라 이의 실시를 위한 바람직한 방식을 구성하기 위한 것으로 간주될 수 있음을 이해하여야 한다. 그러나, 본 기술분야의 당업자는 본 개시내용의 관점에서 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고, 개시된 특정 실시양태에서 여러 변화가 이루어지고, 비슷하거나 유사한 결과를 여전히 얻을 수 있다는 것을 이해하여야 한다.

[0205] **실시예 1 - 물질 및 방법**

[0206] **항체 특성화.** 효모-표면 디스플레이 스크리닝으로부터 생성된 항체 후보물질을 PD-L1 또는 PD-L2에 대해 결합하는 능력에 대해 시험하였다. 인간 PD-L1 및 PD-L2에 대한 친화성 KD를 생성하기 위해, 후보물질 단클론 Ab를 100 nM (15 μg/mL)에서 항-인간 Fc 캡처 (AHC) 바이오센서(Anti-Human Fc Capture (AHC) Biosensors) 상에 로딩하였고, 인간 PD-L1 또는 PD-L2 단백질 결합 및 해리를 30-0.37 nM의 희석 시리즈에서 시험하였다. 분석물(PD-L1 또는 PD-L2)의 결합 및 방출을 Octet 기기에 의해 실시간으로 기록하고, 이후 KD, Kon, 및 Kdis를 계산하기 위해 사용하며; 결과는 참조 웰 차감(reference well subtraction)을 사용한 2:1 글로벌 핏 모델링(Global Fit Modeling)으로부터 도출된다. 뮤린 PD-L1 및 PD-L2에 대한 친화성 KD를 생성하기 위해, 후보물질 항체를 100 nM (15 μg/mL)에서 활성화된 아민 반응성 2세대 (AR2G) 바이오센서(activated Amine Reactive 2nd

Generation (AR2G) Biosensors)(단백질 로딩 이후 1M 에탄올아민 pH 8.5로 켄칭함) 상에 공유적으로 고정화시켰고, 마우스 PD-L1 또는 PD-L2 단백질 결합 및 해리를 300-1 nM의 희석 시리즈에서 시험하였다. 분석물의 결합 및 방출을 Octet 기기에 의해 실시간으로 기록하고, 이후 KD, Kon, 및 Kdis를 계산하기 위해 사용하며; 결과는 참조 웰 차감을 사용한 2:1 글로벌 핏 모델링으로부터 도출된다.

[0207] **혼합된 림프구 반응에서의 이중-PD-L1/PD-L2 특이적 항체 활성.** CD14+ 단핵구는 CD14 마이크로비드를 사용하여 말초 혈액 단핵구로부터 단리되었다. 10% FCS/RPMI/P/S 세포 배양 배지에서 1 백만/ml로 세포를 시딩(seeding)하고 IL-4 및 GM-CSF로 자극하였다. 세포를 7일 동안 배양하여 미성숙 수지상 세포 (IDC)로 분화시키고, 다양한 농도의 PD-L1, PD-L1과 PD-L2 둘 모두, DiPDL 또는 상업용 항체를 첨가하였다. IDC를 이후 사용하여 10:1 CD4:IDC의 비로 CD4+ T 세포를 자극하였다. IFN-γ를 R&D 시스템에 의해 제공되는 프로토콜에 따라 ELISA에 의해 검정하였다.

[0208] **동종 마우스 대장암에 대한 항체 활성.** $1x10^5$ 개의 CT26 또는 CT26-PDL2 대장암 세포를 암컷 BALB/c 마우스의 우측 옆구리에 피하로 이식하였다. 3, 6, 9, 12, 및 15일차에, 마우스에 PD-L1/PD-L2 항체 (250ug), 대조군 항체 (예를 들어 항-PD-1) 또는 비히클을 복강 내로 투여하였다. 종양 성장을 캘리퍼 측정에 의해 확인하고, 마우스는 이것이 사멸되거나 또는 종양 부피가 $1000mm^3$를 초과하는 경우 더 이상 생존하지 못하는 것으로 기록되었다.

[0209] **인간화 마우스에서의 BFTC909 신세포 암종에 대한 항체 활성.** $5x10^6$ 개의 BFTC909 신세포 암 세포를 인간 CD34+ 줄기 세포가 이식된 huNOG-ExL 마우스의 우측 옆구리에 피하로 이식하였다. 종양이 $>50mm^3$에 도달되었을 때, 마우스에 PD-L1/PD-L2 항체 (250μg), 대조군 항체 (예를 들어 항-PD-1) 또는 비히클을 복강 내로 3주 동안 1주 2회로 투여하였다. 종양 성장을 캘리퍼 측정에 의해 확인하고, 마우스는 이것이 사멸되거나 또는 종양 부피가 $1000mm^3$를 초과하는 경우 더 이상 생존하지 못하는 것으로 기록되었다.

[0210] **인간 인슐린 수용체 결합의 측정.** $2x10^6$ 개의 CHO-K 세포 또는 CHO-K-인간 인슐린 수용체 (CHO-INSR) 세포를 96 웰 둥근-바닥 조직 배양 플레이트의 웰에 배치하였고, 2000RPM에서 2분 동안 원심분리에 의해 펠릿화하였다. 다양한 농도의 PD-L1/PD-L2 이중 특이적 항체 (통상적으로, 0.1, 1, 10 μg/mL)를 가진 100μl의 유세포 분석 염색 버퍼에 펠릿(pellet)을 재현탁시켰고, 4 섭씨 온도에서 30분 - 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 이후 펠릿화하고, 항-인간 IgG PE 2차 항체의 1:300 희석액으로 재현탁시켰다. 추가 30분 인큐베이션 후, 세포를 마지막 시점에 펠릿화하고, 100μl의 유세포 분석 버퍼에 재현탁시켰다. 재현탁된 세포를 BD LSR II 유세포 분석기에서 실행하여 CHO-K 세포에 대해 CHO-INSR의 PE 형광의 강도를 평가하여 인간 인슐린 수용체에 대한 결합량을 평가하였다.

[0211] **실시예 2 - 결과**

[0212] **인슐린 수용체 교차-반응성이 없는 PD-L1/PD-L2 이중-특이적 항체의 생성.** 수회 라운드의 Adimab® 선별로부터의 PD-L1 및 PD-L2 중쇄 및 경쇄는 고친화성, PD-L1/PD-L2 이중-특이적 항체 ADI-37464를 생성하였다. 이 항체의 강력한 항-종양 활성에도 불구하고, 또한 인간 인슐린 수용체 (INSR)에 대해 높은 친화성을 가지며, 이는 임상적 사용을 위해 이를 적합하지 않게 만드는 것을 발견하였다. 도 1은 5개의 신규 클론 (38000-38004)이 인슐린 수용체 결합을 제거하지만, 높은 PD-L1/PD-L2 이중 친화성을 유지하게 하는 목표로 경쇄 상보성 결정 영역 (CDR)의 표적화된 점 돌연변이를 통해 생성된 것을 나타내었다. 놀랍게도, 이러한 변형은 모 클론(parent clone)과 변형된 항체 사이의 결합 친화성의 상당한 차이를 거의 유발하지 않았다. 이들 유도체 중 3개 (38002, 38003, 38004)는 PD-L1 / PD-L2 이중 친화성을 유지하며, INSR 결합이 현저하게 감소된 것을 나타내었고, 추가의 연구를 진행하였다.

[0213] **38000 시리즈 PD-L1/PD-L2 항체의 친화성 측정.** Octet 및 Biocore을 사용하여, 38000 시리즈의 항체의 PD-L1 및 PD-L2에 대한 친화성은 이의 모 항체 ADI-37464에 대비하여 측정되었다 (도 2). 모든 측정에 의해, 38002는 37464와 상당한 차이가 없는 PD-L1 및 PD-L2 결합 친화성을 보였다.

[0214] **38000 시리즈 PD-L1/PD-L2 이중-특이적 항체를 사용한 CT26 모체 및 CT26-PD-L2 종양의 처리.** 대장암의 모체 CT26 동종 모델에서, 38002는 모 항체 37464와 동등한 치료 활성을 나타내었다 (도 3a). PD-L2를 크게 과발현하는 CT26-PD-L2 모델에서, 38002는 모 37464 클론과 동등한 종양 성장 억제를 나타내었다 (도 3b). 38002 및 37464 둘 모두는 CT26-PD-L2의 동물을 치유할 수 있고, 37464가 더 많이 치유하였지만, 이 실험에서 38002와

37464 사이의 차이는 통계적으로 유의미하지 않았다. 두 번째 CT26 모체 실험에서, 38002는 PD-1를 차단하는 고도의 종양 성장 억제를 나타내었고, 마찬가지로 모체 PD-L1/PD-L2 이중-특이적 항체 37464와 통계적으로 동등하였다 (도 4).

[0215] **인간화 마우스에서의 BFTC-909 신세포 암종의 치료.** 골수 줄기 세포 인간화 huNOG-ExL 마우스의 인간 BFTC909 신세포 암종 종양을 치료함에 있어서, 38002는 키트루다(Keytruda) 또는 다른 PD-L1/PD-L2 이중-특이적 클론 27907과 비교하여 10일의 처리에 걸쳐 종양 성장의 가장 큰 감소를 나타내었다 (도 5).

[0216] **인간 혼합 림프구 반응 (MLR).** 2개의 별개의 공여체가 혼합된 림프구 반응 쌍에서, PD-L1/PD-L2 이중-특이적 항체 38002의 첨가는 PD-L1/PD-L2 이중-특이적 항체 27907과 비교하여 동등하거나 더 큰 수준으로 인터페론 감마의 방출을 상당하게 향상시켰다 (도 5).

[0217] **비-표적 인슐린 수용체 결합의 측정.** 37464 및 모든 38000 항체가 유세포 분석에 의해 PD-L1, PD-L2 및 이중 PD-L1 및 PD-L2 CHO 세포에 대한 높은 결합을 나타내는 한편, 37464는 또한 1 μg/mL에서 INSR을 과발현하는 CHO 세포에 대한 상당한 결합을 나타내었다. 2개의 파생 클론 38002 및 38004는 반면 도 6에 나타난 바와 같이 1 μg/mL에서 INSR에 대해 검출 가능한 결합을 나타내지 않았다. 생체 내에서 달성 가능한 농도에서 INSR 결합의 이러한 결여는 선행 37464 항체와 이를 구분하는 38000 시리즈의 PD-L1/PD-L2 항체의 중요한 특징이며, 이는 환자에서 치료적 사용을 위해 이를 적합하게 만든다.

[0218] **실시예 3 - CHO 세포 상의 인슐린 수용체에 대한 37464에 대비되는 38002의 결합, ADCC 및 ADCP 활성의 분석.**

[0219] **CHO-INSR 세포 상에서의 INSR, PD-L1 및 PD-L2 발현.** 이 실시예에서 사용되는 세포인 인간 인슐린 수용체를 발현하는 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포 (CHO-INSR)는 ATCC (CHO INSR 1284 - CRL-3307 | ATCC)로부터 얻었다. 우선 INSR, PD-L1, 및 PD-L2의 발현에 대해 유세포 분석에 의해 세포를 특성화하였다. 조작된 CHO 세포를 예상된 바와 같이 INSR의 높은 발현 (>96%) 및 PD-L1 또는 PD-L2의 발현 없음을 나타내었다 (도 10). INSR+ CHO 세포를 INSR, PD-L1, PD-L2, 대조군에 대한 PE-태그가 있는 항체와 함께 인큐베이션하였다. 형광은 유세포 분석에 의해 측정되었다.

[0220] **CHO 세포 상의 INSR에 대한 결합의 평가.** 인간 INSR을 발현하는 살아 있는 세포에 대해 결합하는 38002 및 37464 항체의 능력을 유세포 분석의 사용을 통해 평가하였다. INSR-CHO 세포를 38002, 37464 또는 아이소타입 대조군 항체의 연속 희석액과 함께 인큐베이션하였고 이후 4회 세척과 염소 항-인간 IgG (H+L) 이차 항체, Alexa Fluor 555와의 인큐베이션을 후속하였다. 형광은 유세포 분석에 의해 측정되었다. 데이터는 아이소타입-대조군과 비교하여 37464의 높은 농도에서의 결합을 나타내지만, INSR+ 세포에 대한 38002의 결합이 없었음을 나타낸다 (도 11).

[0221] **ADCC 활성.** INSR-발현 표적 세포에 대한 38002 및 37464의 ADCC 잠재력을 시험하기 위해, 루시퍼라아제 발현을 유도하는 NFAT 반응 요소를 사용하여 FcγRIIIa 수용체를 발현하도록 조작된 Jurkat 세포를 사용한 리포터 세포 검정을 사용하였다 (도 12a). 38002 및 37464 항체는 PD-L1 또는 PD-L2가 아닌 INSR을 발현하는 INSR-CHO 표적 세포와 함께 인큐베이션되었다. 항체 38002는 표적 세포를 발현하는 INSR에 대해 활성을 나타내지 않았고 한편 항체 37464는 활성을 나타내었다 (도 12b).

[0222] **ADCP 활성.** 38002의 ADCP 활성을 시험하기 위해, 루시퍼라아제 발현을 유도하는 NFAT 반응 요소를 사용하여 FcγRIIa 수용체를 발현하도록 조작된 Jurkat 세포를 사용한 리포터 세포 검정을 사용하였다 (도 13a). 항체 38002, 37464, 및 대조군-아이소타입을 INSR을 안정적으로 발현하는 표적 CHO 세포에 대해 시험하였다. 데이터는 INSR+ 세포에 대해 38002가 아닌 37464의 농도에서 활성을 나타내었다 (도 13b).

[0223] 이러한 실시예는 생체 내에서 달성 가능한 농도에서 38002의 INSR 결합의 놀라운 결여는 38000 시리즈의 PD-L1/PD-L2 항체의 중요한 특징이며, 이는 초기에 생성된 37464 항체와 이를 구분하게 하며, 이를 환자에서 치료적 사용을 위해 적합하게 만든다.

[0224] **실시예 4 - 인간 형질막 단백질 세포 검정을 사용한 38002, 38003 및 38004의 결합 프로파일의 평가**

[0225] 3개의 인간 IgG1 항체: 38002, 38003 및 38004 (총괄적으로 "시험 항체")의 특이적 비-표적 결합 상호 작용에 대해 스크리닝하는 데 세포 마이크로어레이를 사용되었다. 시험 항체는 인간 CD274 (PD-L1) 및 PDCD1LG2 (PD-L2)를 표적화한다.

[0226] 고정된 형질감염되지 않은 HEK293 세포에 그리고 CD274 (PD-L1) 및 PDCD1LG2 (PD-L2)를 과발현하는 세포에 대한 각 시험 항체의 결합 수준의 조사는 각 시험 항체의 20 μg/mL가 적절한 스크리닝 농도인 것을 나타내었다.

따라서, 20 μg/mL의 시험 항체 38002는 5861 전장 인간 형질막 단백질 및 추가의 371개의 인간 이종 이량체가 더해진 세포 표면-고정된 인간 분비 단백질을 개별적으로 발현하는 고정된 인간 HEK293 세포에 대한 결합에 대해 스크리닝되었다. 이는 37개의 라이브러리 히트가 함께 나타내었다.

[0227] 각각의 라이브러리 히트는 2개의 대조군 수용체와 함께 재발현되었고, 20 μg/mL의 각각의 시험 항체 또는 대조군 처리로 재시험되었다. 이는 고정된 그리고 살아 있는 세포 둘 모두에 대해 수행되었다.

[0228] 시험 항체 38002는 고정된 그리고 살아 있는 세포 마이크로어레이에서 이의 1차 표적인 CD274 (PD-L1) 및 PDCD1LG2 (PD-L2)와의 특이적 상호 작용을 나타내었다. CST1, CST4 및 FBLN1과의 추가적인 상호 작용은 고정된 세포 마이크로어레이에서 관찰되었고, CST1, CST4, INSR 긴 동형체, INSR 짧은 동형체 및 INSR + IGF1R 이종 이량체는 살아 있는 세포 마이크로어레이에서 관찰되었다. 1차 표적과 INSR 긴 그리고 짧은 동형체와의 상호 작용은 유세포 분석 용량-반응 연구에서 추가로 조사되었다. 1차 표적 CD274 (PD-L1) 및 PDCD1LG2 (PD-L2)와의 상호 작용에 대한 EC_{50} 값은 각각 0.03 및 0.1 μg/mL인 것으로 밝혀졌고, 한편 INSR 긴 그리고 짧은 동형체와의 상호 작용에 대한 EC50 값은 각각 144.9 및 87.5 μg/mL인 것으로 밝혀졌다. 긴 동형체에 대한 EC_{50} 값은 이에 따라 1차 표적인 CD274 (PD-L1) 및 PDCD1LG2 (PD-L2)보다 각각 4830배 및 1449배 더 크다. 짧은 동형체에 대한 EC_{50} 값은 1차 표적인 CD274 (PD-L1) 및 PDCD1LG2 (PD-L2)에 대한 것보다 각각 2930배 및 875배 더 크다. 이러한 데이터는 38002와 INSR의 2차 상호 작용이 생물학적으로 관련이 없음을 시사한다.

[0229] 전체 단백질 라이브러리에 대해 스크리닝되지 않지만, 시험 항체 38003이 시험 항체 38002에 의해 생성된 히트에 대해 스크리닝될 때, 이는 고정된 그리고 살아 있는 마이크로어레이 둘 모두에서 이의 1차 표적인 CD274 (PD-L1) 및 PDCD1LG2 (PD-L2)와의 특이적 상호 작용을 나타내었다. CST4 및 FBLN1과의 추가적인 상호 작용은 고정된 세포 마이크로어레이에서 관찰되었고, CST1, CST4 및 INSR 짧은 동형체는 살아 있는 마이크로어레이에서 관찰되었다. 유사하게는, 시험 항체 38004가 시험 항체 38002에 의해 생성된 히트에 대해 스크리닝될 때, 이는 고정된 그리고 살아 있는 마이크로어레이 둘 모두에서 이의 1차 표적인 CD274 (PD-L1) 및 PDCD1LG2 (PD-L2)와의 특이적 상호 작용을 나타내었다. CST1 및 CST4와의 추가적인 상호 작용은 살아 있는 마이크로어레이에서만 관찰되었다.

[0230] **후속 유세포 분석 검증 연구.** 인간 HEK293 세포를 ZsGreen1 단독, 또는 ZsGreen1 및 CD274 (PD-L1), PDCD1LG2 (PD-L2), INSR 긴 동형체, INSR 짧은 동형체또는 CD20 (검정 대조군)을 코딩하는 발현 벡터로 형질감염시켰다. 살아 있는 세포 형질감염체를 나타낸 바와 같이 용량 범위 (0 - 300 μg/mL)의 38002, 1μg/mL 리툭시맙 바이오시밀러 (검정 대조군) 또는 검정 버퍼 단독과 함께 인큐베이션하였다. 세포를 세척하고, 세포 마이크로어레이 스크린에서 사용된 것과 동일한 AF647 항-인간 IgG Fc 검출 항체와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 다시 세척하였고, Accuri 유세포 분석기 (BD)를 사용하는 유세포 분석에 의해 분석하였다. 7AAD 라이브/데드 염료 (live/dead dye)를 사용하여 분석에서 사멸 세포를 배제시키고, ZsGreen+ (형질감염된) 세포를 분석을 위해 선별하였다.

[0231] **확인/특이성 스크린 (고정된 세포).** 후속 확인/특이성 스크린에서, 모든 37개 라이브러리 히트, INSR + IGFR 및 2개 대조군 수용체 (CD20 및 EGFR)가 HEK293 세포에서 과발현되었다. 예상된 바와 같이, 리툭시맙 바이오시밀러는 과발현된 CD20과 중간/강한 강도 상호작용을 나타내었으며, 이는 인큐베이션 조건 및 검출 시스템을 검증한다.

[0232] 시험 항체 38002는 이의 1차 표적인 CD274 (PD-L1) (강한 강도) 및 PDCD1LG2 (PD-L2) (강한 강도)와의 특이적 상호 작용을 나타내었다. 시험 항체 38002는 CST1 (매우 약한 및 약한 강도), CST4 (약한/중간 강도) 및 FBLN1 (약한/중간 강도)과의 추가적인 상호 작용을 나타내었다.

[0233] 시험 항체 38002에 의해 생성된 라이브러리 히트에 대해 스크리닝되는 경우, 시험 항체 38003은 이의 1차 표적인 CD274 (PD-L1) (강한 강도) 및 PDCD1LG2 (PD-L2) (강한 강도)와의 특이적인 상호 작용을 나타내었다. 시험 항체 38003은 또한 CST4 (강한 및 중간/강한 강도) 및 FBLN1 (중간/강한 강도)과의 추가적인 상호 작용을 나타내었다.

[0234] 시험 항체 38002에 의해 생성된 라이브러리 히트에 대해 스크리닝되는 경우, 시험 항체 38004는 이의 1차 표적인 CD274 (PD-L1) (강한 강도) 및 PDCD1LG2 (PD-L2) (강한 강도)와 특이적 상호 작용을 나타내었다.

[0235] 확인/특이성 스크린 (살이 있는 세포). 세포 고정 없이 살아 있는 세포 상에서 수행한 확인/특이성 스크린에서, 시험 항체 38002는 이의 1차 표적인 CD274 (PD-L1) 및 PDCD1LG2 (PD-L2)와의 특이적 상호 작용 및 INSR (긴 그

리고 짧은 동형체), CST1, CST4 및 INSR_IGF1R과의 추가적인 상호 작용을 나타내었다. 고정된 세포 마이크로어레이에서 약한/중간 강도인 38002와 FBLN1과의 상호 작용은 살아 있는 세포 마이크로어레이에서 매우 약한 강도이었다 (유의미하지 않음).

[0236] 시험 항체 38003은 이의 1차 표적인 CD274 (PD-L1) 및 PDCD1LG2 (PD-L2)와의 특이적 상호 작용 및 INSR (짧은 동형체), CST1 및 CST4와의 추가적인 상호 작용을 나타내었다.

[0237] 시험 항체 38004는 이의 1차 표적인 CD274 (PD-L1) 및 PDCD1LG2 (PD-L2)와의 특이적 상호 작용 및 CST1 및 CST4와의 추가적인 상호 작용을 나타내었다.

[0238] **유세포 분석 후속 결과 (살아 있는 세포).** 시험 항체 38002의 확인된 특이적 상호 작용의 일부를 추가로 조사하기 위해, CD274 (PD-L1), PDCD1LG2 (PD-L2), INSR 긴 동형체, INSR 짧은 동형체 또는 CD20은 HEK293 세포에서 과발현되었다. ZsGreen1-단독 형질감염된 세포를 포함하는 살아 있는 세포 형질감염체는 용량 범위 (0 - 300 μg/mL)의 38002, 1 μg/mL 리툭시맙 바이오시밀러 (검정 대조군) 또는 검정 버퍼 단독과 함께 인큐베이션하였다. 상호 작용은 이후 유세포 분석에 의해 조사되었다.

[0239] 시험 항체 38002는 이의 1차 표적인 CD274 (PD-L1) 및 PDCD1LG2 (PD-L2)에 대한 결합을 나타내었고, 이는 각각 0.03 및 0.1 μg/mL의 EC_{50} 값을 갖는다. 각각 144.9 및 87.5 μg/mL의 EC_{50} 값을 갖는 INSR 긴 동형체 및 짧은 동형체와의 결합이 관찰되었다. 긴 동형체에 대한 EC50 값은 이에 따라 1차 표적인 CD274 (PD-L1) 및 PDCD1LG2 (PD-L2)에 대한 것보다 각각 4830배 및 1449배 더 크다. 짧은 동형체에 대한 EC50 값은 1차 표적인 CD274 (PD-L1) 및 PDCD1LG2 (PD-L2)에 대한 것보다 각각 2930배 및 875배 더 크다.

[0240] **결론.** 시험 항체 38002는 고정된 그리고 살아 있는 세포 마이크로어레이에서 이의 1차 표적인 CD274 (PD-L1) 및 PDCD1LG2 (PD-L2)와의 특이적 상호 작용을 나타내었다. CST1, CST4 및 FBLN1과의 추가적인 상호 작용은 고정된 세포 마이크로어레이에서 관찰되었고, CST1, CST4, INSR 긴 동형체, INSR 짧은 동형체 및 INSR + IGF1R 이종이량체는 살아 있는 세포 마이크로어레이에서 관찰되었다. 1차 표적 및 INSR 긴 그리고 짧은 동형체와의 상호 작용이 유세포 분석 용량-반응 연구에서 추가로 조사되는 경우, 1차 표적인 CD274 (PD-L1) 및 PDCD1LG2 (PD-L2)와의 상호 작용에 대한 EC50 값은 각각 0.03 및 0.1 μg/mL인 것으로 밝혀졌고, 한편 INSR 긴 그리고 짧은 동형체와의 상호 작용에 대한 EC_{50} 값은 각각 144.9 및 87.5 μg/mL인 것으로 밝혀졌다. 긴 동형체에 대한 EC_{50} 값은 이에 따라 1차 표적인 CD274 (PD-L1) 및 PDCD1LG2 (PD-L2)에 대한 것보다 각각 4830배 및 1449배 더 크다. 짧은 동형체에 대한 EC_{50} 값은 1차 표적인 CD274 (PD-L1) 및 PDCD1LG2 (PD-L2)에 대한 것보다 각각 2930배 및 875배 더 크다. 이러한 데이터는 38002의 INSR과의 2차 상호 작용은 생물학적으로 관련이 없음을 시사한다.

[0241] **실시예 5**

[0242] **이펙터 기능을 가진 BiPDL 항체는 PD-L1 및 PD-L2 발현 종양 세포에 대해 효과적인 ADCC를 매개한다.** 발명자는 1차 뮤린 NK 세포 및 칼세인-AM 표지화된 U9240 PMBL 표적 세포를 사용하여 BiPDL 항체의 이펙터 기능을 평가하였다. 특정 용해물 백분율은 마우스 IgG2a 21680 및 21661이 U2940에 대해 ADCC를 효과적으로 매개할 수 있음을 나타내었다 (도 14a). ADCC 및 ADCP에 대한 BiPDL 항체 이펙터 기능을 조사하기 위해, 발명자는 ADCC (Jurkat/FcyRIIa) 및 (Jurkat/FcyRIIIa)를 사용한 ADCP에 대해 Promega 리포터 생물검정을 이용하였다. 데이터는 27869, 27907, 및 37464가 아벨루맙(Avelumab) 또는 대조군 아이소타입과 비교할 때 훨씬 강한 ADCC 및 ADCP 신호전달을 유도할 수 있음을 나타내었다.

[0243] **BiPDL은 T 세포 활성화를 증가시키고, 골수 억제를 감소시킴으로써 종양 성장을 억제하고, "차가운" 종양 마우스 모델 B16-PD-L2 흑색종에서 생존을 증가시킨다.** '차가운' 종양의 맥락에서 BiPDL 항체의 효능을 평가하기 위해, 발명자는 뮤린 PD-L2를 과발현하는 B16F10 흑색종 세포를 이용하였다. 마우스는 대조군 항-마우스-PD-1 클론 RMP1-14, 마우스 IgG2a 항-PD-L1 및 항-PD-L2 항체의 조합, 또는 BiPDL 항체 27869 및 37464로 처리되었다. 앞서 관찰된 바와 같이, B16 종양 성장은 항-PD1 처리에 의해 영향을 받지 않았다. 그러나, BiPDL 항체를 사용한 처리는 종양 성장을 감소시키면서도 (도 15a) 마우스 생존을 증가시킬 수 있고 (도 15b), 이는 종양 미세환경에서 BiPDL 항체의 면역 조절 기능을 시사한다. 약간 더 높은 효능이 27869에 대해 나타내었다.

[0244] 이 치료 반응 배후의 메커니즘을 결정하기 위해, 발명자는 종양 및 림프절에서의 면역 세포 집단 및 이의 활성화 상태를 분석하였다. BiPDL 항체로 처리된 마우스의 림프절은 항-PD1, 항-PD-L1, 또는 항-PD-L2 항체에 의해 처리된 마우스의 것보다 CD4 (도 15c) 및 CD8 (도 15d) T 세포에 의해 더 높은 Ki67 형광을 나타내었다.

BiPDL-처리된 마우스는 또한 다른 처리 조건보다 이의 림프절에서 상당하게 더 높은 비율의 $CD8^+$ 수지상 세포를 나타내었다 (도 15e). 종양에서, 더 낮은 백분율의 대식세포 (도 15f), 억제 세포로부터 유래된 과립구 골수 (MDSC, 도 15g), 및 단핵구 MDSC (도 15h)가 항-PD1로 처리된 마우스와 비교하여 37464로 처리된 마우스에서 면역-억제 마커인 아르기나제를 발현하였다.

[0245] 27869 및 37464는 시험관 내에서 유사하게 거동하였고, 27869는 B16 모델에서 최소 치료적 장점을 나타내었다. 그러나, 결장 암 세포주 CT26가 이식된 마우스 (뜨거운 종양 마우스 모델로 간주됨)에서, 37464를 사용한 처리는 27869에 비해 종양 성장의 급격하게 강한 감소를 유발하였다 (도 16a). 이러한 차이점을 추가로 조사하기 위해, 발명자는 27869 및 37464가 T-세포에 대한 공동 자극 기능을 야기하는 PD-L1- B7.1 상호 작용에 대해 상이한 영향을 미칠 수 있다는 것을 가정하였다. 따라서, 발명자는 유세포 분석에 의해 분석되는 살아 있는 CHO/PD-L1 세포에 대해 PE-표지화 인간 재조합 B7.1을 사용함으로써 조합 생물 검정을 설계하였다. 이러한 데이터는 PE-표지화 인간 재조합 B7.1 결합이 CHO/PD-L1 세포에 대해 37464로 전처리한 경우에 차단되지만, 27869 또는 대조군 항체와 함께 사전 인큐베이션한 경우 차단되지 않았음을 나타내었다. 이는 BIPDL을 삼중 차단 ((PD-L1, PD-L2 및 B7.1 차단)이 되고, 향상된 이펙터 기능 ADCC 및 ADCP를 가지는 매우 희귀한 항체가 되게 하는 이러한 중요한 매우 중요한 기능적 그리고 구조적 결과이다. 모든 이러한 결과를 취합하면 37464 계통이 27869의 것보다 더 우수한 선도물질일 것임을 나타낸다.

[0246] **BiPDL 항체 비-표적 프로파일링 및 추가의 가변 영역 조작/선택 라운드는 비-표적 결합을 근절시키고, 삼중 차단 및 이펙터 기능을 보존하였다.** 비-표적 결합은 치료용 항체의 약동학 (PK), 조직 분포, 효능 및 독성에 상당한 영향을 미칠 수 있다. 여기서 발명자는 제1 스크린을 수행하였고, BiPDL 항체의 어떠한 주목할 만한 비-표적 결합을 보이지 않았으며, 추가적인 인간 형질막 단백질 세포 어레이는 37464가 인슐린 수용체 INSR과의 결합을 나타내는 것을 보여 주었다 (도 17a). INSR에 대한 비-표적 결합을 근절시키고, PD-L1 및 PD-L2에 대한 치료적 친화성을 유지하기 위해, 가변 영역 CDRL1 및 CDRL3에서의 2개의 표적화 점 돌연변이를 37464의 경쇄에서 수행하였다. 발명자는 INSR에 대한 비-표적 결합을 근절시키면서도, PD-L1에 대해 K_d=7.62x10^{-9} 및 PD-L2 (단량체성 인간 리간드, 도 18a)에 대해 K_d=1.9x10^{-9}로 측정되는 PD-L1 및 PD-L2에 대한 친화성을 보존하는 38002로서 지정된 새로운 조작된 항체를 얻었다.

[0247] INSR에 대한 38002의 결합의 근절을 확인하기 위해, BiPDL 항체를 INSR-발현 세포와 함께 상이한 농도에서 인큐베이션하였다. 37464는 1 nM 정도로 낮은 농도에서 INSR과의 결합을 나타내었고, 반면 INSR에 대한 38002의 결합은 33 nM에서 유의미한 결합을 나타내지 않았으며, 단백질의 짧고 그리고 긴 동형체 둘 모두 (도 18b)에 대해 100 nM에서 최소로 유지되었다 (도 17c). 또한, 유세포 분석 염색으로 38002이 PD-L1 및 PD-L2에 대한 높은 결합 활성을 보존하였고, 항-PD-1 키트루다에 대해 동등하게 유지된 이의 리간드를 사용한 Promega 생물 검정에서 이의 PD-1 차단 활성이 유지되었음을 확인하였다 (도 17d-e). 게다가, 38002는 세포가 INSR 또는 대조군이 아닌 PD-리간드를 발현하는 경우에만 (도> 174f), 이의 이펙터 기능 ADCC 및 ADCP를 유지하였다 (도 17f-g).

[0248] **신규한 항체는 B16-PD-L2 흑색종에서 세포 독성을 증가시키고, 억제 세포 침윤을 감소시킨다.** 신규한 항체 38002가 앞서 관찰된 바와 같이 생체내 효능을 유지하였는지 여부를 확인하기 위해, 마우스에 B16 흑색종을 이식하고, 마우스 IgG2a 항-PD-1, 항-PD-L1 및/또는 항-PD-L2, 또는 38002로 처리하였다. PD-1 차단은 이 모델에서의 생존을 개선시키지 못하였고, 38002는 임의의 다른 처리보다 더 효과적으로 생존을 증가시켰고, 50% 생존율이 관찰되었다). 종양이 유세포 분석에 의해 생체 외에서 분석되는 경우, 면역 침윤된 종양에서 NK 세포의 비율이 유의미하지 않게 증가한 것을 나타내었다 (도 19b). 흥미롭게도, CD8 T 세포의 백분율 (도 19c)뿐만 아니라 그랜자임 B에 의해 예시된 이의 세포독성 기능 (도 19d) 및 퍼포린 (도 19e) 발현은 38002를 사용한 처리 이후 상당하게 증가되었다. 이 세포 독성 반응과 관련하여, 발명자는 또한 과립구 (도 19f) 및 단핵구 (도 19g) MDSC뿐만 아니라 대식세포 (도 19h)를 포함하는 면역-억제 세포 비율의 감소를 관찰하였다.

[0249] **신규한 항체는 감소된 골수 세포와 관련된 인간 MDA-MB-231 유방암에서 종양 성장을 억제한다.** T-세포 무함유 미세환경에서 생체 내에서 MDA-MB-231의 성장에 대한 IMGS001의 영향을 평가하기 위해, 누드 마우스에 4번째 좌측 유선에 동소성으로 1 x 10^6 개의 MDA-MB-231 세포를 투여하였다. 투여 후 3일차에 시작하여, 총 7회 투여 동안 3일마다 IMGS-001, 아벨루맙, 또는 대조군으로서 PBS를 사용하여 i.p.로 마우스를 처리하였다. 종양을 1주 2회 측정하였다. IMGS-001 또는 아벨루맙을 투여 받은 마우스는 PBS-처리된 대조군과 비교하여 종양 성장이 더 느렸다 (도 21a). 14, 17, 및 19일차에, IMGS-001로 처리한 마우스는 대조군 그룹과 비교하여 상당하게 더 작은 종양 부피를 가졌고, 한편 아벨루맙으로 처리된 마우스는 17일차에만 대조군과 비교하여 상당하게 더 작은 종양

부피를 가졌다. 19일차에, 마우스를 안락사시키고, 현미경 검사를 위해 종양을 수집하였다. 면역 조직 화학 분석은 처리되지 않은 종양에서는 수많은 CD11b 양성 세포가 고르게 분포되어 침투한 것을 나타내었으며, 이는 IMGS-001로 처리된 마우스의 종양에서 약 3분의 1로 현저하고 지속적으로 감소되었다.

[0250] ❇ ❇ ❇ ❇ ❇ ❇ ❇ ❇ ❇ ❇ ❇ ❇ ❇

[0251] 본 발명의 다양한 실시양태의 요소는 본원의 도면에서 일반적으로 기술되고 예시된 바와 같이 매우 다양한 구성으로 배열되고 설계될 수 있음은 쉽게 이해될 것이다. 따라서 첨부된 도면에 나타난 바와 같이 본 발명의 실시양태의 상세한 설명은 청구된 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니라 단지 발명의 선택된 실시양태를 표현하기 위한 것이다.

[0252] 본 명세서 전반에 기재된 발명의 특징, 구조, 또는 특성은 임의의 적합한 방식으로, 하나 이상의 실시양태에서 조합될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서 전반에서 "특정 실시양태", "일부 실시양태" 또는 유사한 표현에 대한 언급은 실시양태와 연관하여 기재된 특정 특징, 구조, 또는 특성이 본 발명의 적어도 하나의 실시양태에 포함되는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전반에서 "특정 실시양태에서", "일부 실시양태에서", "다른 실시양태에서" 또는 유사한 표현의 문구가 보여진다고 반드시 모두 실시양태의 동일한 그룹을 지칭하는 것은 아니며, 기재된 특징, 구조, 또는 특성은 하나 이상의 실시양태에서 임의의 적절한 방식으로 조합될 수 있다.

[0253] 본 명세서 전반에서 특징, 장점 또는 유사한 표현에 대한 언급은 본 발명을 통해 실현될 수 있는 모든 특징 및 장점이 발명의 임의의 단일 실시양태에 있어야 하거나 이에 존재한다는 것을 의미하는 것이 아니라는 점에 유의해야 한다. 오히려, 특징 및 장점을 언급하는 표현은 실시양태와 관련하여 기재된 특정한 특징, 장점 또는 특성이 본 발명의 적어도 하나의 실시양태에 포함된다는 것을 의미하는 것으로 이해된다. 따라서 본 명세서 전반에 걸친 특징 및 장점에 대한 논의와 유사한 표현은 반드시 동일한 실시양태를 언급하는 것일 수 있지만 반드시 그런 것은 아니다.

[0254] 게다가, 발명의 기재된 특징, 장점, 및 특성은 임의의 적합한 방식으로, 하나 이상의 실시양태에서 조합될 수 있다. 본 기술분야의 당업자는 발명이 특정 실시양태의 특정한 특징 또는 장점 중 하나 이상이 없이 실시될 수 있음을 인식할 것이다. 다른 경우에, 추가적인 특징 및 장점이 발명의 모든 실시양태에 존재하지 않을 수 있는 특정 실시양태에서 인식될 수 있다.

[0255] 본 기술분야의 당업자는 상기 논의된 바와 같은 발명은 상이한 순서의 단계를 사용하고/하거나 개시된 것과 상이한 구조의 하드웨어 구성요소를 사용하여 실시될 수 있음을 쉽게 이해할 것이다. 따라서, 발명은 이러한 바람직한 실시양태에 기반하여 기재되지만, 발명의 사상 및 범위 내에서 유지되면서 특정 변형, 변화 및 대안적인 구조가 자명할 것임은 본 기술분야의 당업자에게 분명할 것이다. 따라서, 발명의 범위와 경계를 결정하기 위해, 첨부된 청구항을 참조하여야 한다.

[0256] **VIII. 참조문헌**

[0257] 다음의 참조문헌은 본원에 제시된 것을 보완하는 예시적인 절차 또는 기타 세부 사항을 제공하는 범위 내에서 본원에 참조로 구체적으로 포함된다.

"Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988.

Abbondanzo *et al., Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.,* 12(4), 480-489, 1990.

Allred *et al., Arch. Surg.,* 125(1), 107-113, 1990.

Atherton *et al., Biol. of Reproduction,* 32, 155-171, 1985.

Austin *et al., PLoS Pathog* 8, e1002930, 2012.

Baptista *et al., Hum. Pathol.,* 47: 78-84, 2016.

Barrett *et al., Oncotarget,* 6: 26483-26493, 2015.

Boussiotis, *N Engl J Med,* 375: 1767-1778, 2016.

Boyerinas *et al., Cancer Immunol. Res.,* 3: 1148-1157, 2015.

Brahmer *et al., J. Clin. Oncolo.,* 28:3167-3175, 2010.

Brahmer *et al., N. Eng. J. Med,* 366:2455-2465; 2012.

Brehin, *etal., Virology* 371:185-195, 2008.

Brown *etal., J. Immunol. Meth.,* 12;130(1): 111-121, 1990.

Butte *et al., Immunity,* 27: 111-122, 2007.

Butte *et al., Mol. Immunol.,* 45: 3567-3572, 2008.

Campbell, *In: Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology,* Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, Eds. pp. 75-83, Amsterdam, Elsevier, 1984.

Capaldi *et al., Biochem. Biophys. Res. Comm.,* 74(2):425-433, 1977.

Cheng *et al., J. Biol. Chem.,* 288: 11771-11785, 2013.

Christian *et al., Proc Natl Acad Sci USA,* 110:18662-18667, 2013.

Danilova *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.,* 113: E7769-E7777, 2016.

De Jager *et al., Semin. Nucl. Med.* 23(2): 165-179, 1993.

Derks *et al., Cancer. Immunol. Res.,* 3: 1123-1129, 2015.

Dholakia *et al., J. Biol. Chem.,* 264, 20638-20642, 1989.

Doolittle and Ben-Zeev, *Methods Mol. Biol.,* 109, 215-237, 1999.

Dong *et al., Hum. Pathol.,* 2016.

Dong *et al, Nat. Medicine,* 8:793-800, 2002.

[0258]

Estep *et al., Mabs*, 5(2): 270-278, 2013.

Frie *et al., J. Infect. Dis.* 207:319-322, 2013.

Gefter *et al., Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.

Goh *et al., Clin. Immunol.* 149:487-497, 2013.

Green *et al., Blood,* 116: 3268-3277, 2010.

Gulbis and Galand, *Hum. Pathol.* 24(12), 1271-1285, 1993.

Guo *etal., Sci. Transl. Med.* 3:99 ra85, 2001.

Howitt *et al., J.A.M.A. Oncol.*, 2: 518-522, 2016.

Inoue *et al., Oncotarget,* 7: 32113-32128, 2016.

Kam *et al., EMBO Mol. Med.* 4, 330-343, 2012b.

Kam *et al., J. Virol.* 86, 13005-13015, 2012a.

Kam *et al., PLoS One* 9, e95647, 2014.

Khatoon *et al., Ann. of Neurology,* 26, 210-219, 1989.

Kim *et al., Lung Cancer,* 88: 24-33, 2015.

Kim *et al., Eur. J. Cancer,* 51: 2698-2707, 2015.

King *et al., J. Biol. Chem.,* 269, 10210-10218, 1989.

Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.,* 6, 511-519, 1976.

Kohler and Milstein, *Nature,* 256, 495-497, 1975.

Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.,* 157(1):105-132, 1982.

Lanciotti & Valadere, *Emerg Infect Dis* 20, 2014.

Latchman *et al., Nat. Immunol.,* 2: 261-268, 2001.

Lee *et al., Nat. Commun.,* 7: 12220, 2016.

Lee *et al., PLoS Pathog.* 7:e1002390, 2011.

Levitt *et al., Vaccine* 4, 157-162, 1986.

Li *etal., J. Biol. Chem.,* 292: 6799-6809, 2017.

Lum *et al., J. Immunol.* 190:6295-6302, 2013.

Mainou *et al., MBio* 4, 2013.

Masrinoul *et al., Virology* 464-465, 111-117, 2014.

Messer *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:1939-1944, 2014.

Morrison *et al., Am J Pathol,* 178:32-40, 2011.

Nakamura *et al., In: Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems,* Chapter 27, 1987.

Nazareth *et al., J. Immunology,* 178(9): 5552-5562, 2007.

Nie *et al .. Cell Mol. Immunol.*, 2017.

[0259]

Nomi *et al., Clin. Cancer Res.*, 13: 2151-2157, 2007.

Obeid *et al., Oncoimmunolo gy,* 5: e 1235107, 2016.

Ohigashi *et al., Clin. Cancer Res.*, 11: 2947-2953, 2005.

O'Shannessy *et al., J. Immun. Meth.*, 99, 153-161, 1987.

Paes *etal., J. Am. Chem. Soc.*, 131:6952-6954, 2009.

Pal *et al., PLoS Pathog* 9, e1003312, 2013.

Persic *et al., Gene* 187: 1, 1997

Pinchuk *et al., Gastroenterology,* 135(4): 1228-1237, 2008.

Potter and Haley, *Meth. Enzymol.*, 91, 613-633, 1983.

Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., 3:624-652, 1990.

Roemer *et al., J. Clin. Oncol.*, 2016.

Rozali *et al., Clinical and Developmental Immunology;* 2012: 656340, 2012.

R.C. Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014.

Schilte *et al., PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2137, 2013.

Selvarajah *et al., PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2423, 2013.

Siegel *et al., J Immunol Methods,* 286(1-2): 141-153, 2004.

Shi *etal.,Am. J. Surg. Pathol.*, 38: 1715-1723, 2014.

Shin *et al., Ann. Surg. Oncol.*, 2015.

Shin *et al., Ann. Surg. Oncol.*, 23: 694-702, 2016.

Sissoko *et al., PLoS Negl. Trop. Dis.* 3:e389, 2009.

Smith *et al., MBio* 4, e00873-00813, 2013a.

Sun *et al., Elife* 2:e00435, 2013.

Sun *et al., J. Steroid Biochem.*, 26(1):83-92, 1987.

Sunshine and Taube, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 23: 32-38, 2015.

Tang *et al., J. Biol. Chem.*, 271:28324-28330, 1996.

Thompson *et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA,* 101(49) :17174-17179,2004.

[0260] Thornburg *et al., J. Clin. Invest.*, 123:4405-4409, 2013.

미국등록특허 제3,817,837호
미국등록특허 제3,850,752 호
미국등록특허 제3,939,350 호
미국등록특허 제3,996,345 호
미국등록특허 제4,196,265 호
미국등록특허 제4,275,149 호
미국등록특허 제4,277,437 호
미국등록특허 제4,366,241 호
미국등록특허 제4,472,509 호
미국등록특허 제4,554,101 호
미국등록특허 제4,680,338 호
미국등록특허 제4,816,567 호
미국등록특허 제4,867,973 호
미국등록특허 제4,938,948 호
미국등록특허 제5,021,236 호
미국등록특허 제5,141,648 호
미국등록특허 제5,196,066 호
미국등록특허 제5,563,250 호
미국등록특허 제5,565,332 호
미국등록특허 제5,856,456 호
미국등록특허 제5,880,270 호

[0261]

Vander Veen *et al.*, *Anim Health Res Rev,* 13:1-9, 2012.

Van Deventer and Wittrup, *Methods Mol. Biol.,* 1131: 151-181, 2014.

Van Roosbroeck *et al.*, *Genes Chromosomes Cancer,* 55: 428-441, 2016.

Voss *et al.*, *Nature,* 468:709-712, 2010.

Wang *et al.*, *World J. Gastroenterol.,* 17: 3322-3329, 2011.

Warter *et al.*, *J. Immunol.,* 186:3258-3264, 2011.

Wawrzynczak & Thorpe, In: *Immunoconjugates, Antibody Conjugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer,* Vogel (Ed.), NY, Oxford University Press, 28, 1987.

Xiao *et al.*, *J. Exp. Med.*, 211: 943-959, 2014.

Xu *et al.*, *PEDS* 26.10: 663-70, 2013.

Yearley *etal.*, *Clin. Cancer. Res.*, 23: 3158-3167, 2017.

Yu *et al.*, *Nature* 455:532-536, 2008.

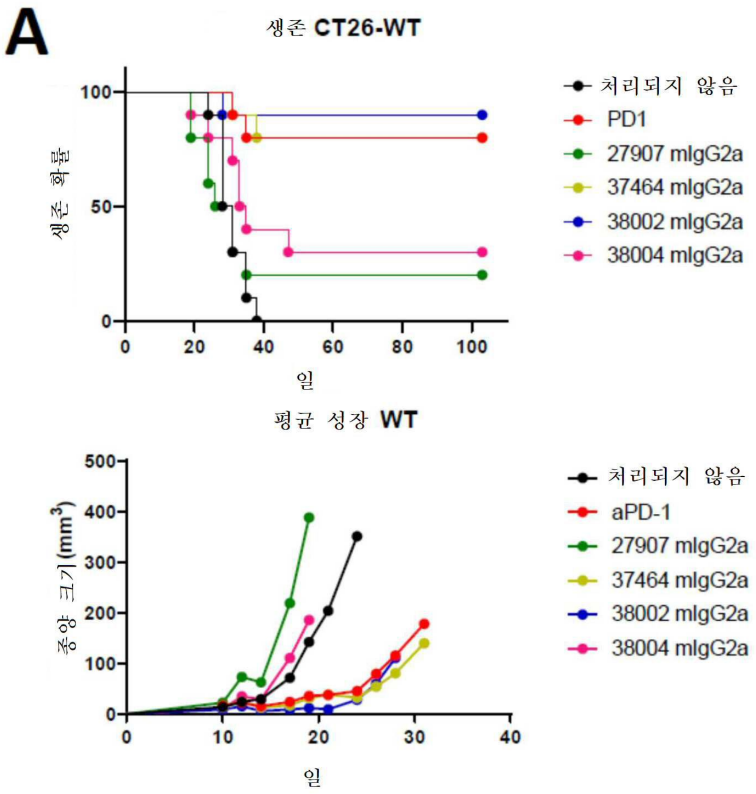
[0262]

도면

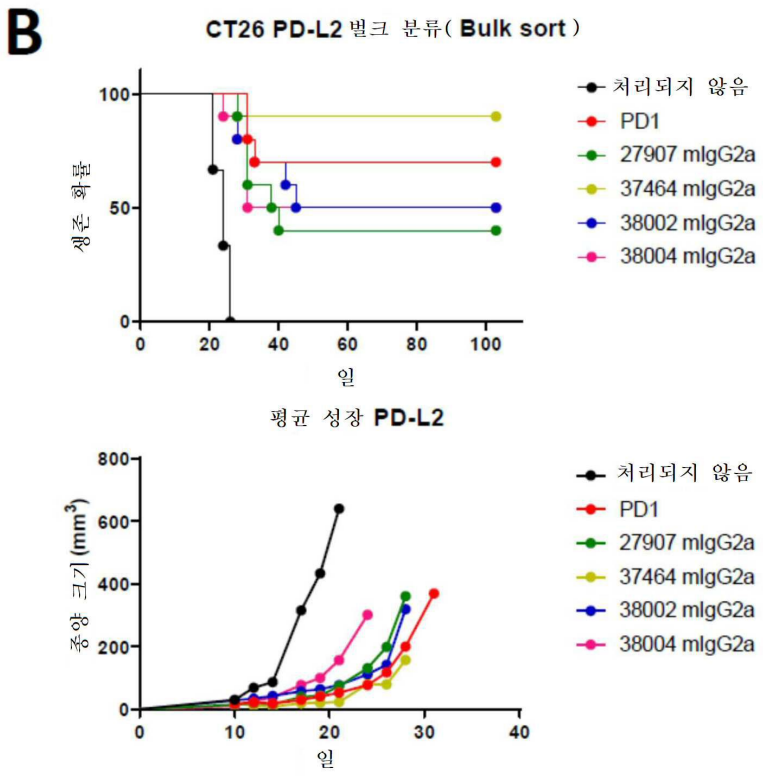
도면1

IgG 차수	ADI 명칭	Octet IgG K_D 인간 PD-L1-Fc (M) Avid	Octet IgG K_D 인간 PD-L1-His (M) 일가	Octet IgG K_D 인간 PD-L2-Fc (M) Avid	Octet IgG K_D 인간 PD-L2-His (M) 일가	Octet IgG K_D 인간 INSR BioVendor (M) 일가	Octet IgG K_D 인간 INSR R&D (M) 일가	Biacore IgG K_D 인간 PD-L1-His (M) 일가	Biacore IgG K_D 인간 PD-L2-His (M) 일가
1	38002-hIgG1	1.28E-09	7.62E-09	6.01E-10	1.90E-09	N.B.	P.F.	3.76E-09	7.27E-10
2	38003-hIgG1	1.27E-09	1.42E-08	3.77E-10	1.02E-09	N.B.	P.F.	8.09E-09	1.75E-10
3	38004-hIgG1	1.22E-09	2.00E-08	5.97E-10	2.84E-09	N.B.	N.B.	3.77E-08	1.24E-09
4	ADI-37464-hIgG1	1.52E-09	6.23E-09	4.26E-10	1.60E-09	P.F.	P.F.	2.76E-09	5.08E-10
5	ADI-26140	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.D.	N.D.

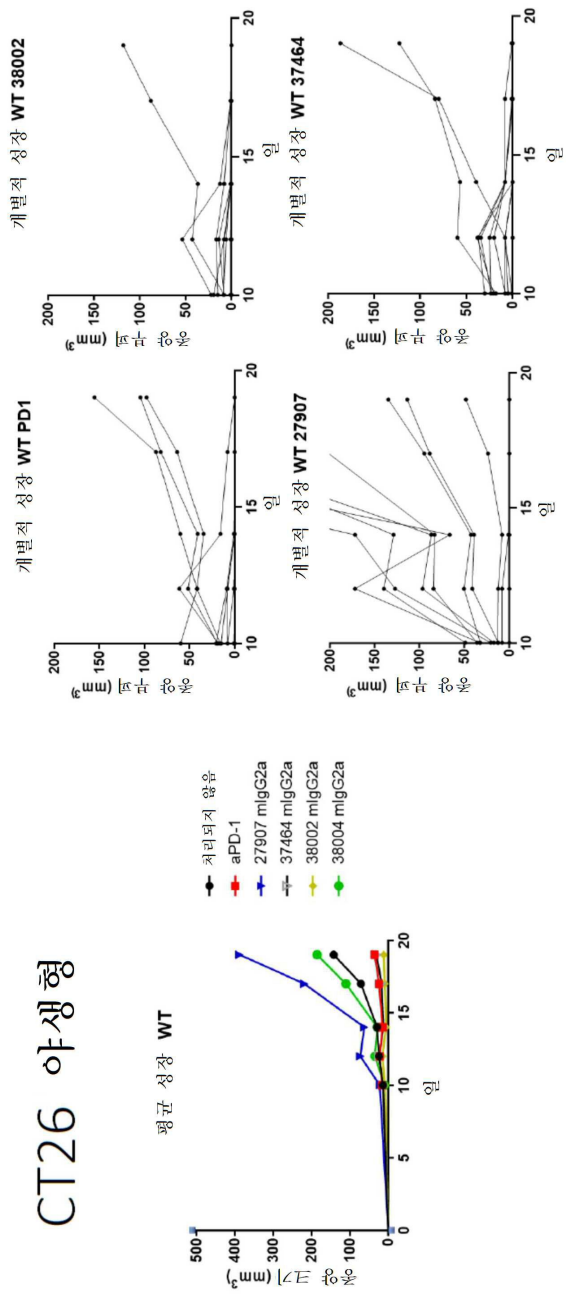
도면2a


A
생존 CT26-WT
생존 확률
일
처리되지 않음
PD1
27907 mIgG2a
37464 mIgG2a
38002 mIgG2a
38004 mIgG2a
평균 성장 WT
종양 크기 (mm3)
일
처리되지 않음
aPD-1
27907 mIgG2a
37464 mIgG2a
38002 mIgG2a
38004 mIgG2a

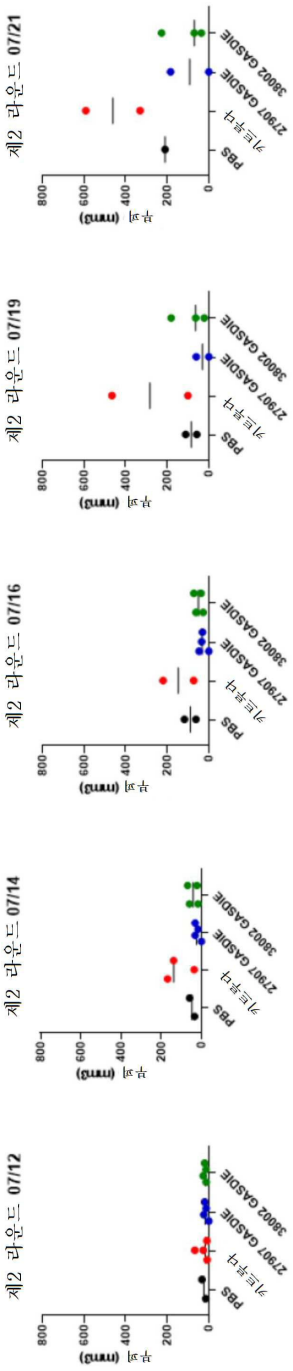
도면2b


B
CT26 PD-L2 벌크 분류(Bulk sort)
생존 확률
일
처리되지 않음
PD1
27907 mIgG2a
37464 mIgG2a
38002 mIgG2a
38004 mIgG2a
평균 성장 PD-L2
종양 크기 (mm3)
일
처리되지 않음
PD1
27907 mIgG2a
37464 mIgG2a
38002 mIgG2a
38004 mIgG2a

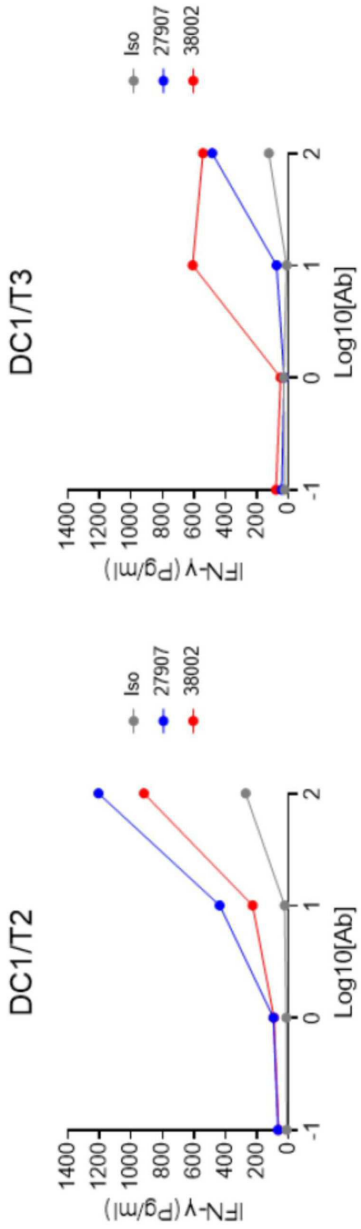
도면3


CT26 야생형
평균 성장 WT
종양 크기 (mm³)
일
처리되지 않음
aPD-1
27907 mIgG2a
37464 mIgG2a
38002 mIgG2a
38004 mIgG2a
개별적 성장 WT 38002
개별적 성장 WT 37464
개별적 성장 WT PD1
개별적 성장 WT 27907

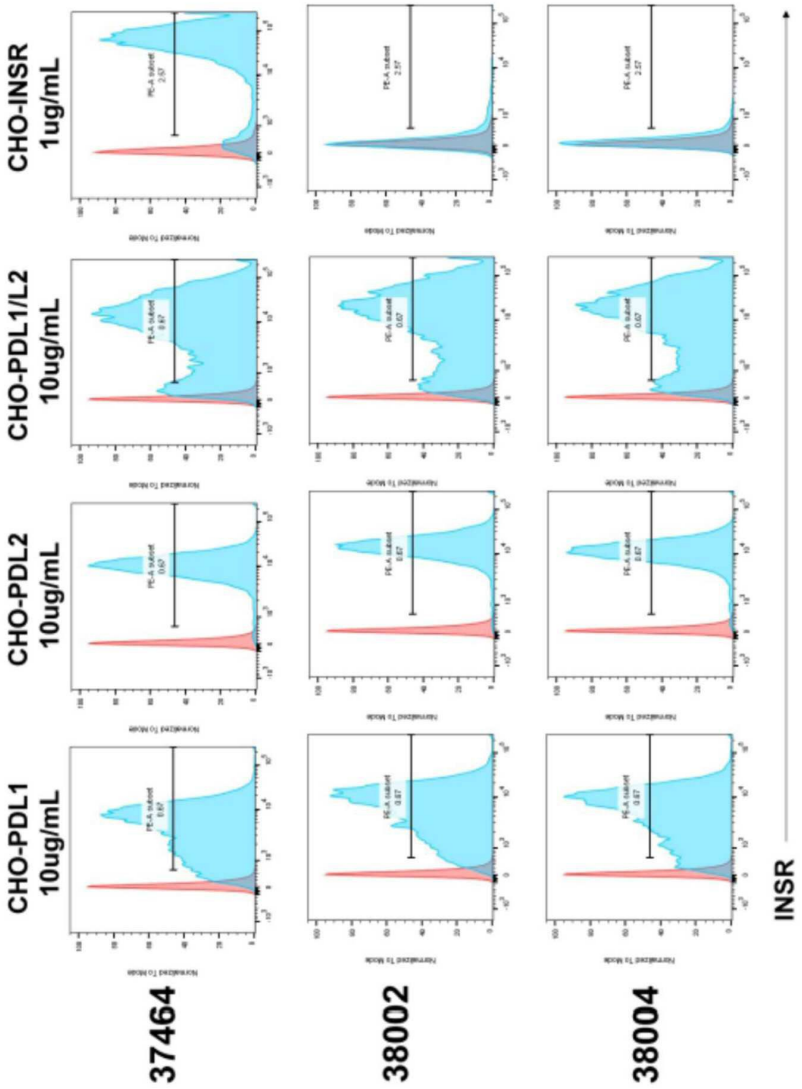
도면4


제2 라운드 07/21
제2 라운드 07/19
제2 라운드 07/16
제2 라운드 07/14
제2 라운드 07/12
부피 (mm3)
0
200
400
600
800
PBS
키트루다
27907 GASDIE
36002 GASDIE

도면5


DC1/T3
Iso
27907
38002
IFN-γ (Pg/ml)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-1
0
1
2
Log10[Ab]
DC1/T2
Iso
27907
38002
IFN-γ (Pg/ml)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-1
0
1
2
Log10[Ab]

도면6



표적은 조생리적 밀도의 인간 인슐린 수용체 (INSR)를 발현하는 CHO 세포이다. 검출은 다클론 2차 항체의 사용에 의해 추가로 증폭된다.

IMGS-001 중쇄 단백질 서열 (38002-인간 IgG1 [GASDIE])

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSLSGYPWSWIRQPPGKGLEWIGETDVSGWTDYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA
RDGRRMGTPSFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

IMGS-001 중쇄 뉴클레오티드 서열 (38002-인간 IgG1 [GASDIE])

CAA GTT CAA CTC CAA CAA TGG GGT GCC GGG CTG CTG AAG CCG TCC GAA ACG TTG AGT CTC ACC TGC GCC GTG TAC GGC GGC
AGT CTT TCA GGC TAT CCA TGG TCC TGG ATA AGG CAG CCC CCC GGC AAG GGT CTC GAA TGG ATA GGT GAG ACG GAC GTG TCT GGC
TGG ACA GAT TAC AAC CCT TCT CTG AAG TCT CGC GTT ACC ATT TCC GTA GAT ACA AGT AAG AAT CAG TTC TCA CTG AAG CTC AGT
TCT GTA ACC GCT GCC GAC ACC GCA GTG TAC TAT TGT GCA AGA GAT GGA CGC AGG ATG GGA ACT CCA AGC TTT GAC ATT TGG GGC
CAG GGT ACG ATG GTG ACT GTT TCC TCC GCC TCA ACG AAA GGG CCA TCT GTA TTC CCA TTG GCT CCG AGT AGT AAG AGT ACA AGT
GGT GGG ACC GCA GCG CTG GGA TGC CTC GTC AAG GAT TAT TTT CCC GAA CCA GTA ACT GTA AGT TGG AAT AGC GGG GCA TTG ACA
AGC GGC GTT CAC ACC TTT CCA GCG GTG CTT CAA TCT TCT GGA CTC TAC TCA TTG AGC TCA GTT GTC ACC GTT CCT TCA AGT TCC
TTG GGC ACG CAG ACA TAT ATC TGC AAT GTG AAT CAT AAA CCT TCT AAT ACG AAG GTC GAT AAG AAA GTG GAG CCA AAA TCA TGT
GAT AAG ACG CAT ACT TGC CCC CCC TGC CCA GCC CCT GAG CTG TTG GCA GGT CCC GAT GTC TTT CTC TTT CCG CCC AAG CCG AAG
GAT ACG CTT ATG ATC TCC AGG ACT CCT GAG GTG ACT TGC GTC GTT GTC GAC GTA TCC CAC GAA GAT CCT GAG GTG AAG TTT AAT
TGG TAT GTC GAC GGA GTA GAG GTG CAT AAT GCT AAA ACG AAA CCT CGG GAA GAG CAA TAT AAT TCC ACT TAC AGA GTA GTG AGC
GTT CTC ACA GTT TTG CAT CAG GAC TGG CTT AAC GGA AAG GAG TAT AAA TGT AAG GTC AGT AAC AAA GCT CTT CCA GCT CCC GAG
GAG AAA ACA ATT TCA AAG GCA AAG GGC CAA CCT AGG GAA CCG CAG GTG TAT ACT CTC CCC CCA AGC CGC GAA GAA ATG ACG
AAA AAC CAG GTG TCC CTC ACT TGC CTG GTC AAA GGT TTC TAT CCT TCT GAC ATA GCG GTG GAG TGG GAG AGT AAC GGC CAA CCA
GAG AAC AAT TAT AAG ACC ACG CCT CCA GTT CTG GAT TCC GAT GGA TCA TTC TTT CTG TAC TCT AAA TTG ACG GTT GAC AAA TCC
CGC TGG CAG CAG GGA AAC GTA TTT TCA TGT TCC GTG ATG CAT GAA GCT TTG CAC AAT CAC TAC ACT CAA AAG AGT TTG AGC TTG
TCA CCG GGA AAG TAA

공개특허 10-2024-0167703

도면8

IMGS-001 카파 경쇄 뉴클레오티드 서열 (38002- 인간 IgG1 [GASDIE])

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDINSFLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLNSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQKSVYFPPTFGGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC*

IMGS-001 카파 경쇄 뉴클레오티드 서열 (38002-인간 IgG1 [GASDIE])

GAC ATT CAG ATG ACG CAA AGC CCC AGC TCT GTC TCA GCT TCC GTG GGT GAT AGG GTG ACT ATT ACA TGT CGA GCC TCA CAA GAT ATT
AAT AGC TTT CTT GCA TGG TAT CAG CAA AAG CCA GGG AAG GCA CCT AAG CTC CTG ATT TAT GCT GCC TCT TCT TTG AAT AGC GGG GTC
CCC TCC CGC TTC TCA GGA TCT GGG TCA GGG ACT GAC TTC ACG CTG ACT ATA TCC TCA CTC CAA CCA GAA GAT TTC GCC ACT TAT TAC TGC
CAA AAA TCC GTA TAT TTC CCG CCC ACA TTC GGT GGT GGG ACA AAA GTG GAA ATC AAG AGA ACT GTC GCT GCC CCA TCT GTT TTC ATC
TTT CCA CCG AGC GAC GAA CAG CTC AAA AGC GGC ACT GCG AGT GTT GTT TGT CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGG GAA GCA AAG GTG
CAG TGG AAG GTA GAC AAT GCT CTG CAA TCC GGG AAT AGT CAG GAA TCC GTC ACG GAG CAA GAC AGT AAG GAC TCC ACG TAT TCC TTG
AGT AGT ACA TTG ACC CTC AGT AAA GCG GAT TAC GAG AAA CAC AAA GTT TAC GCT TGT GAA GTA ACG CAT CAG GGG TTG TCC AGT CCG
GTT ACC AAA TCC TTC AAT CGG GGA GAG TGT TGA

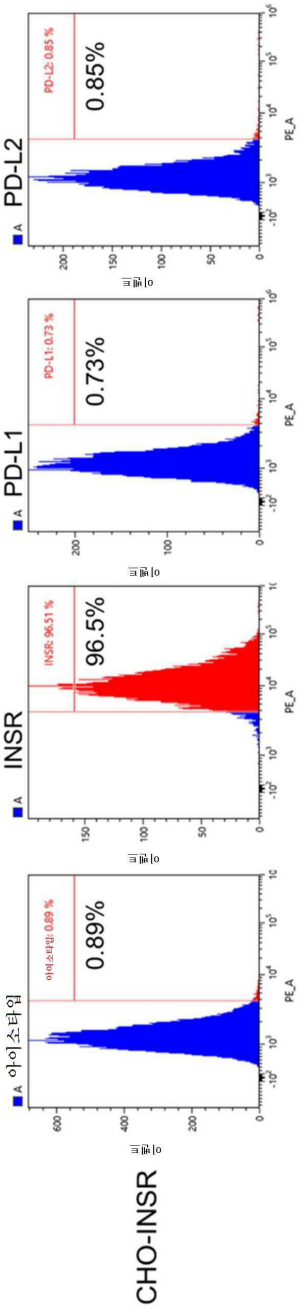
G236A / S239D / I332E (인간 IgG1) 중쇄

GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC
TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCA
CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGcGGGACCGGACGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG
TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAgcCC
CCGAGGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
TGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCA
CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTCCTAGCTGG

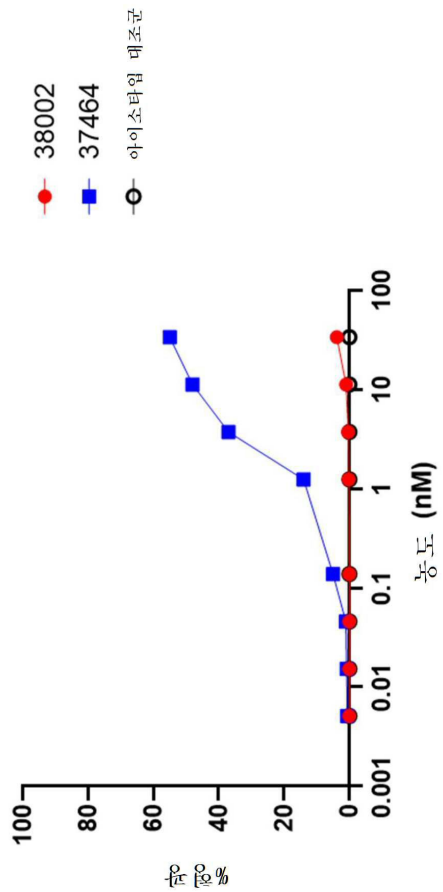
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL**A**GP**D**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP**E**EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK*

공개특허 10-2024-0167703

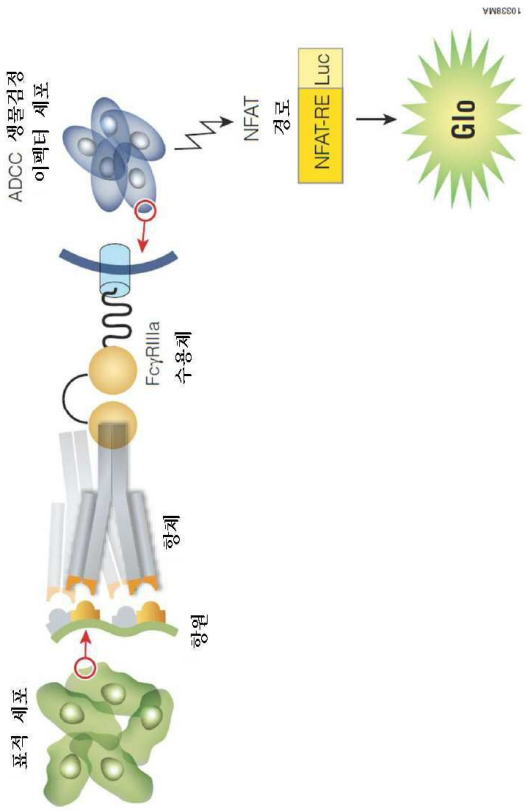
도면10



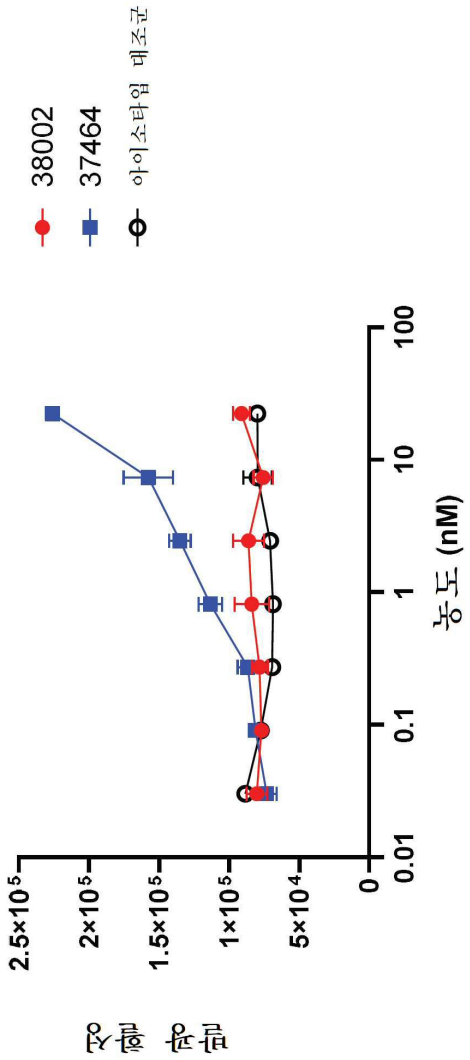
도면11


38002
37464
아이소타입 대조군
% 억제
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
농도 (nM)

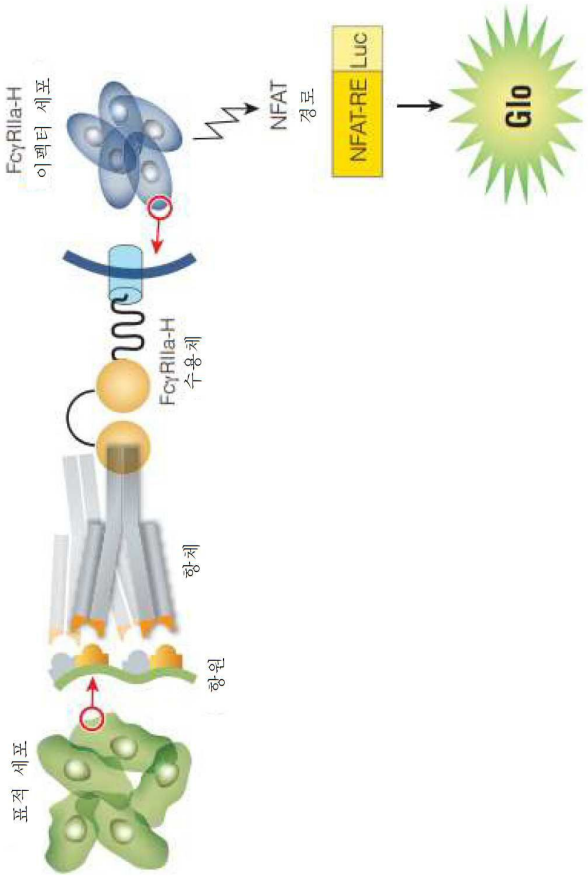
도면12a


ADCC 생물검정
이펙터 세포
NFAT
경로
NFAT-RE
Luc
Glo
FcγRIIIa
수용체
항체
항원
표적 세포

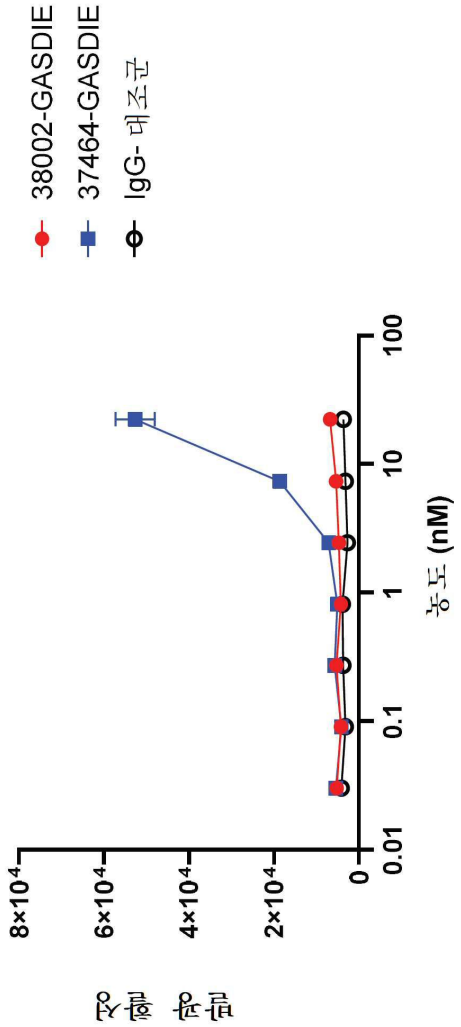
도면12b


38002
37464
아이소타입 대조군
발광 활성
2.5×10⁵
2×10⁵
1.5×10⁵
1×10⁵
5×10⁴
0
0.01
0.1
1
10
100
농도 (nM)

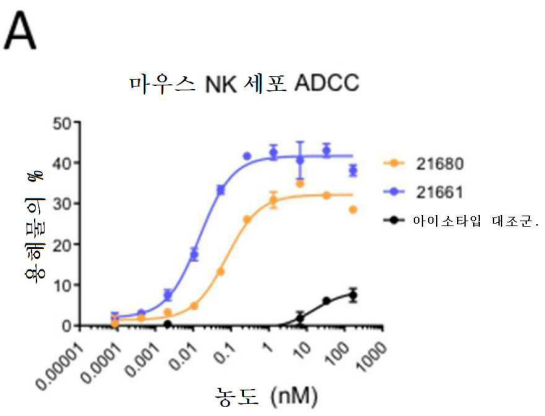
도면13a


FcγRIIa-H
이펙터 세포
NFAT
경로
NFAT-RE
Luc
Glo
FcγRIIa-H
수용체
항체
항원
표적 세포

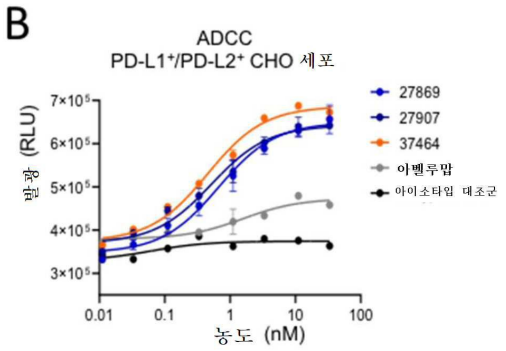
도면13b


38002-GASDIE
37464-GASDIE
IgG- 대조군
농도 (nM)
100
10
1
0.1
0.01
0
8×10⁴
6×10⁴
4×10⁴
2×10⁴
발광 활성

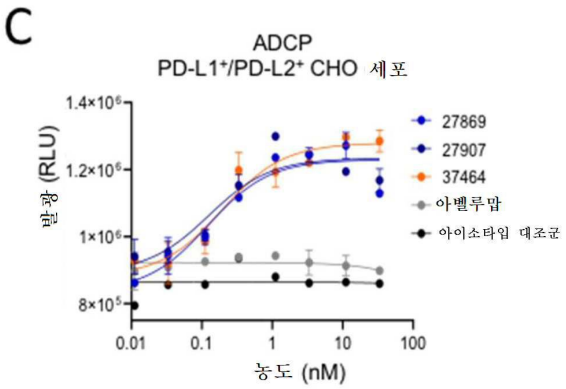
도면14a


A
마우스 NK 세포 ADCC
용해율의 %
50
40
30
20
10
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
농도 (nM)
21680
21661
아이소타입 대조군.

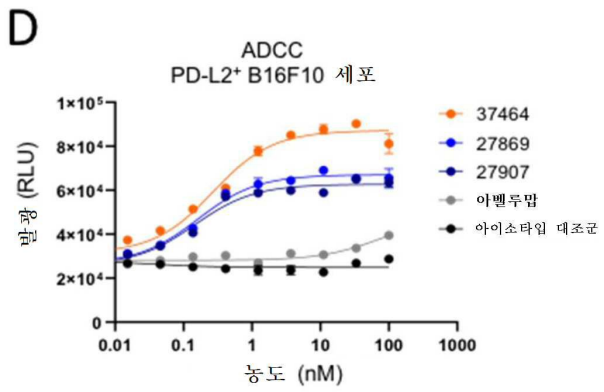
도면14b



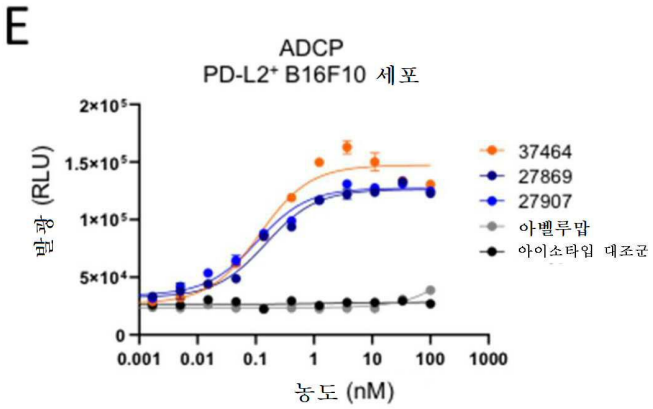
도면14c



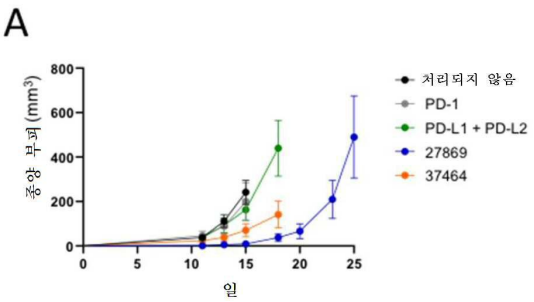
도면14d



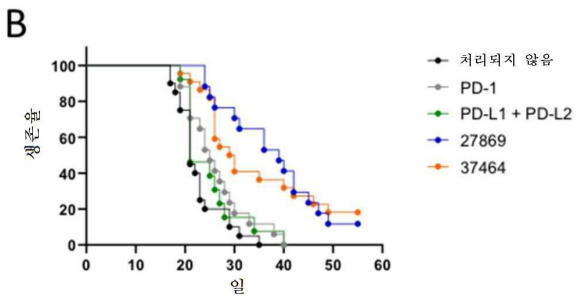
도면14e



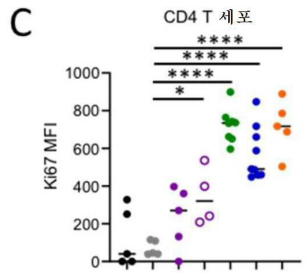
도면15a



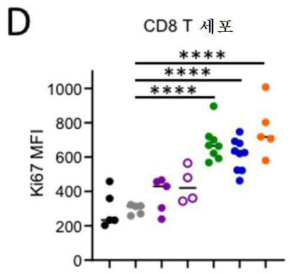
도면15b



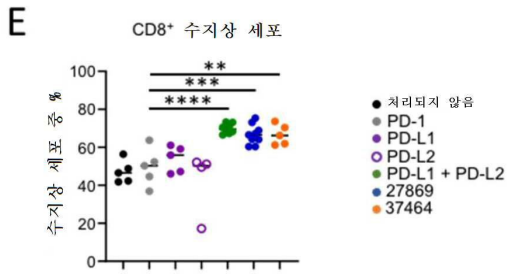
도면15c



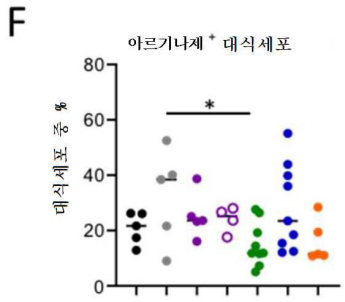
도면15d



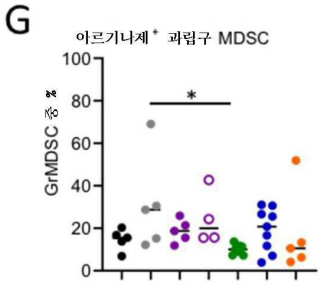
도면15e



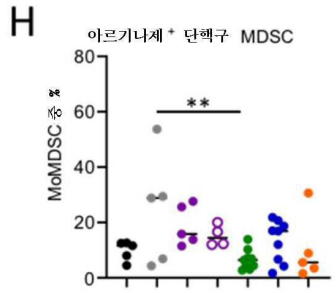
도면15f



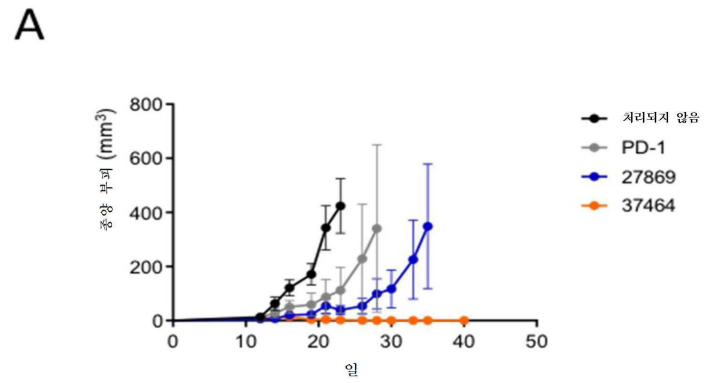
도면15g



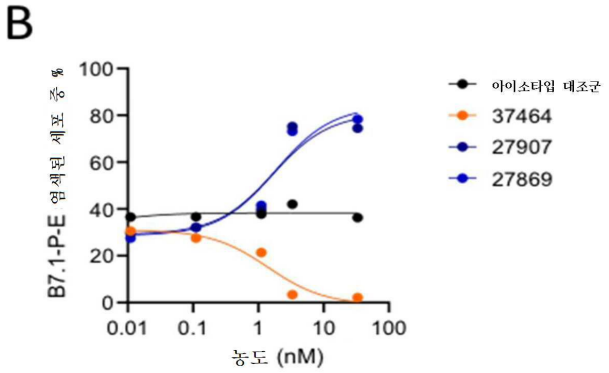
도면15h



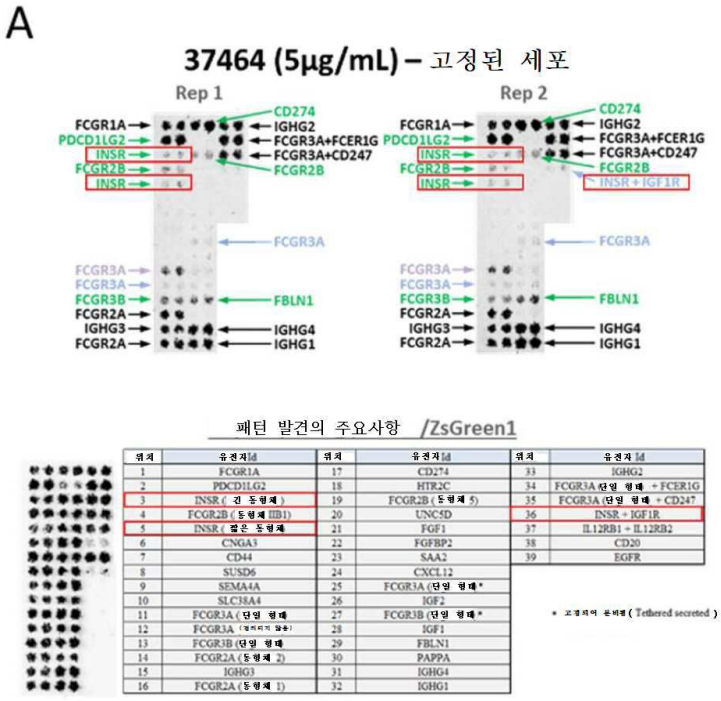
도면16a



도면16b



도면17a

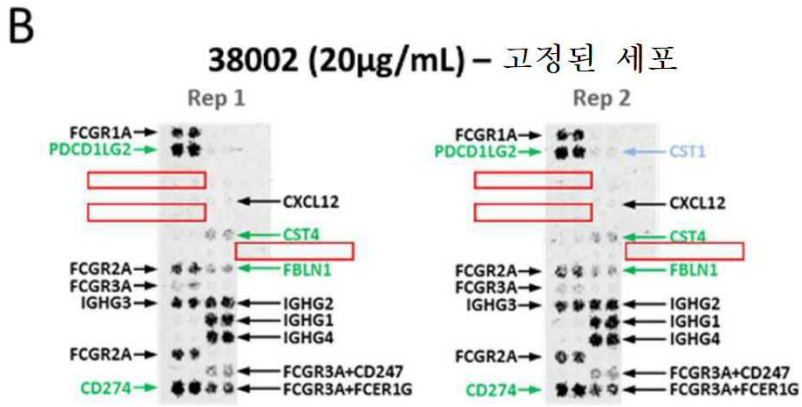


패턴 발견의 주요사항 /ZsGreen1

위치	유전자Id	위치	유전자Id	위치	유전자 Id
1	FCGR1A	17	CD274	33	IGHG2
2	PDCD1LG2	18	HTR2C	34	FCGR3A (단일 형태 + FCER1G
3	INSR (긴 동형체)	19	FCGR2B (동형체 5)	35	FCGR3A (단일 형태 + CD247
4	FCGR2B (동형체 IIB1)	20	UNC5D	36	INSR + IGF1R
5	INSR (짧은 동형체	21	FGF1	37	IL12RB1 + IL12RB2
6	CNGA3	22	FGFBP2	38	CD20
7	CD44	23	SAA2	39	EGFR
8	SUSD6	24	CXCL12		
9	SEMA4A	25	FCGR3A (단일 형태 *		
10	SLC38A4	26	IGF2		
11	FCGR3A (단일 형태	27	FCGR3B (단일 형태 *		
12	FCGR3A (정의되지 않음	28	IGF1		
13	FCGR3B (단일 형태	29	FBLN1		
14	FCGR2A (동형체 2)	30	PAPPA		
15	IGHG3	31	IGHG4		
16	FCGR2A (동형체 1)	32	IGHG1		

* 고정되어 분비됨 (Tethered secreted)

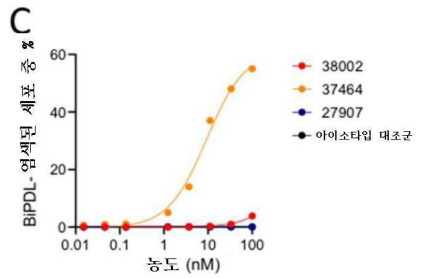
도면17b



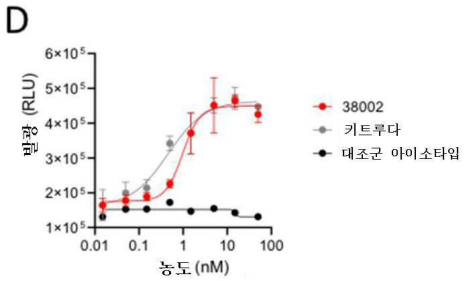
패턴 발견의 주요사항 /ZsGreen1

위치	유전자Id	위치	유전자Id	위치	유전자Id
1	FCGR1A	17	FCGR2B (동형체 5)	33	IGFBP4
2	PDCD1LG2 (PD-L2)	18	CST1	34	UNC5D
3	FCGR2B (동형체 IIB1)	19	IGFBP1	35	LDLR
4	INSR (긴 동형체)	20	ZG16B	36	LDLR (동형체 1)
5	PLXNC1	21	CXCL12	37	OXGR1
6	INSR (짧은 동형체)	22	IGFBP3	38	CD20
7	CD44	23	CST4	39	EGFR
8	PDGFRB	24	IGF2	40	INSR + IGF1R
9	FCGR2A (동형체 2)	25	FBLN1		
10	FCGR3A (단일 형태)	26	IGF1		
11	IGHG3	27	IGHG2		
12	MPZL2	28	IGHG1		
13	SLC22A23	29	IGHG4		
14	FCGR2A (동형체 1)	30	PAPPA		
15	PCDH8	31	FCGR3A + CD247		
16	CD274 (PD-L1)	32	FCGR3A + FCER1G		

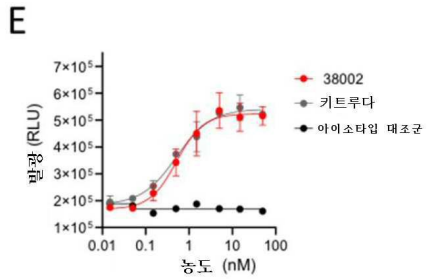
도면17c



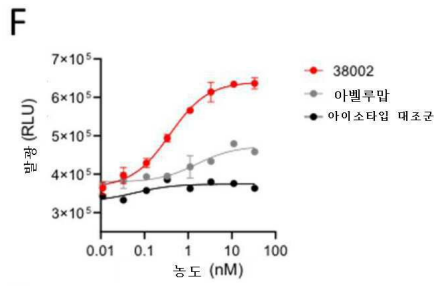
도면17d



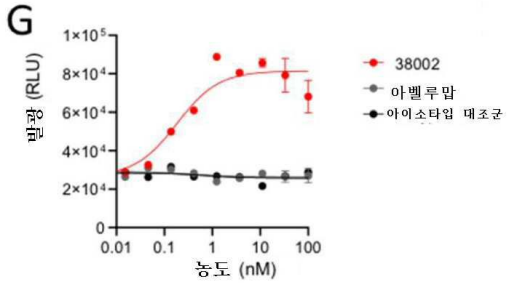
도면17e



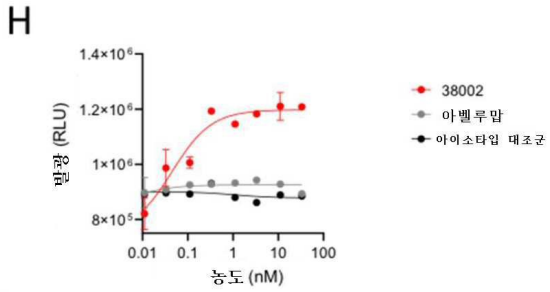
도면17f



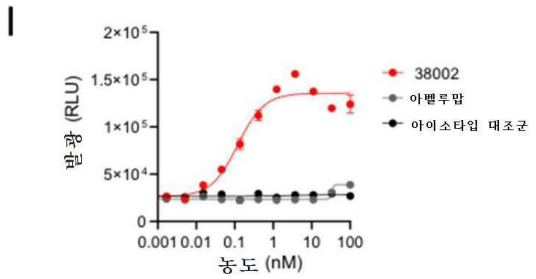
도면17g



도면17h



도면17i

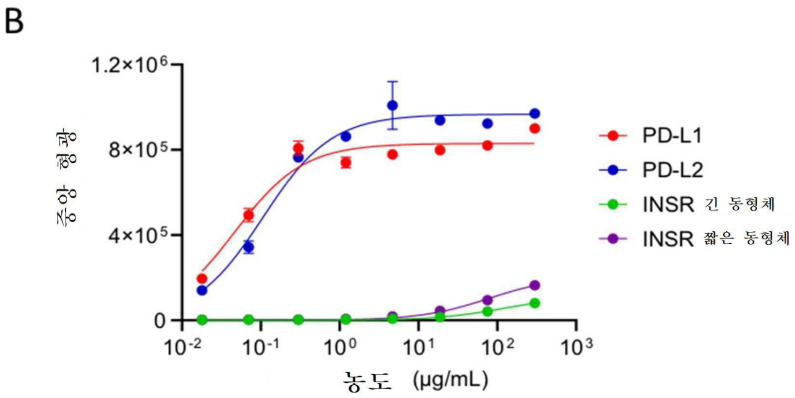


도면18a

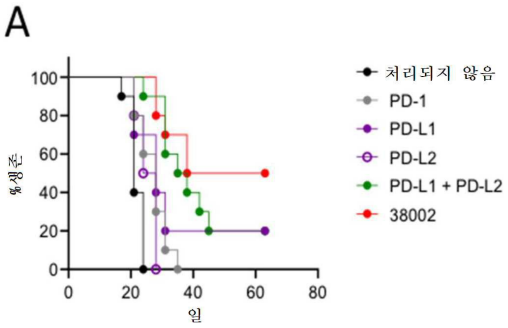
A

	hPD-L1 이량체	hPD-L2 이량체	hPD-L1 단량체	hPD-L2 단량체	mPD-L1 이량체	mPD-L2 이량체
38002	1.28E-09	6.01E-10	7.62E-09	1.90E-09	3.20E-09	7.00E-10

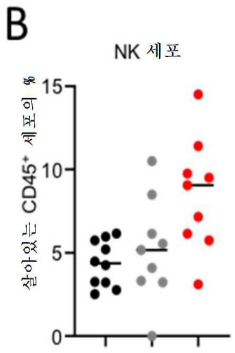
도면18b



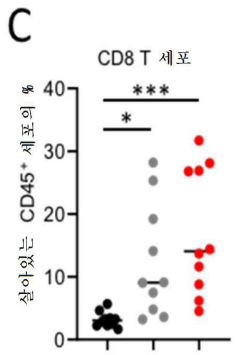
도면19a



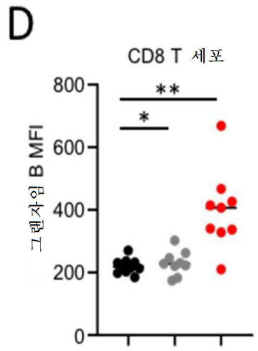
도면19b



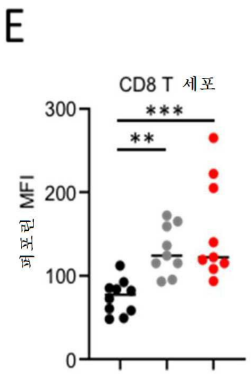
도면19c



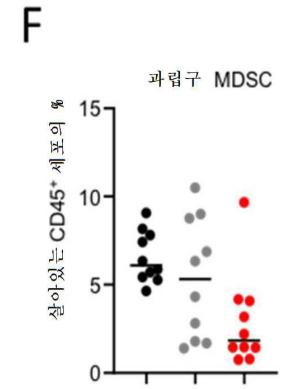
도면19d



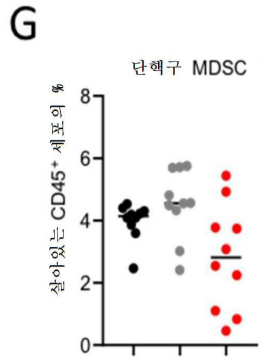
도면19e



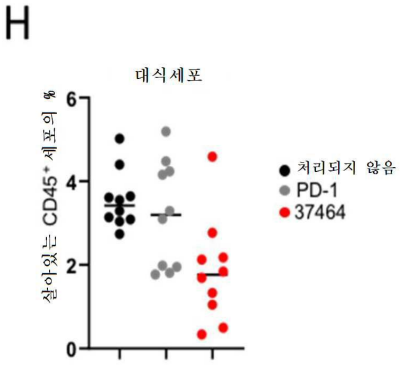
도면19f



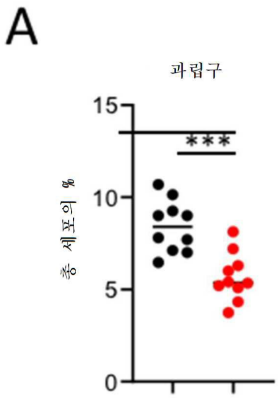
도면19g



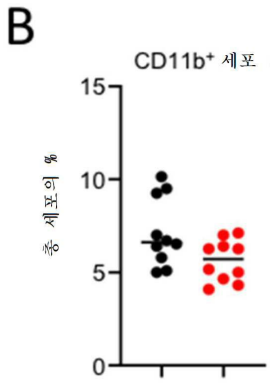
도면19h



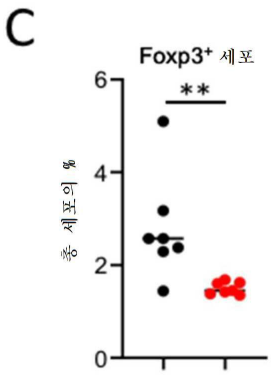
도면20a



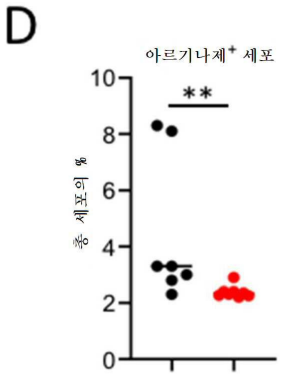
도면20b



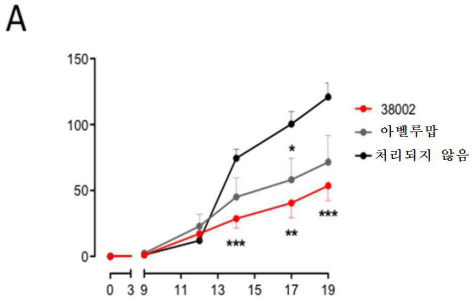
도면20c



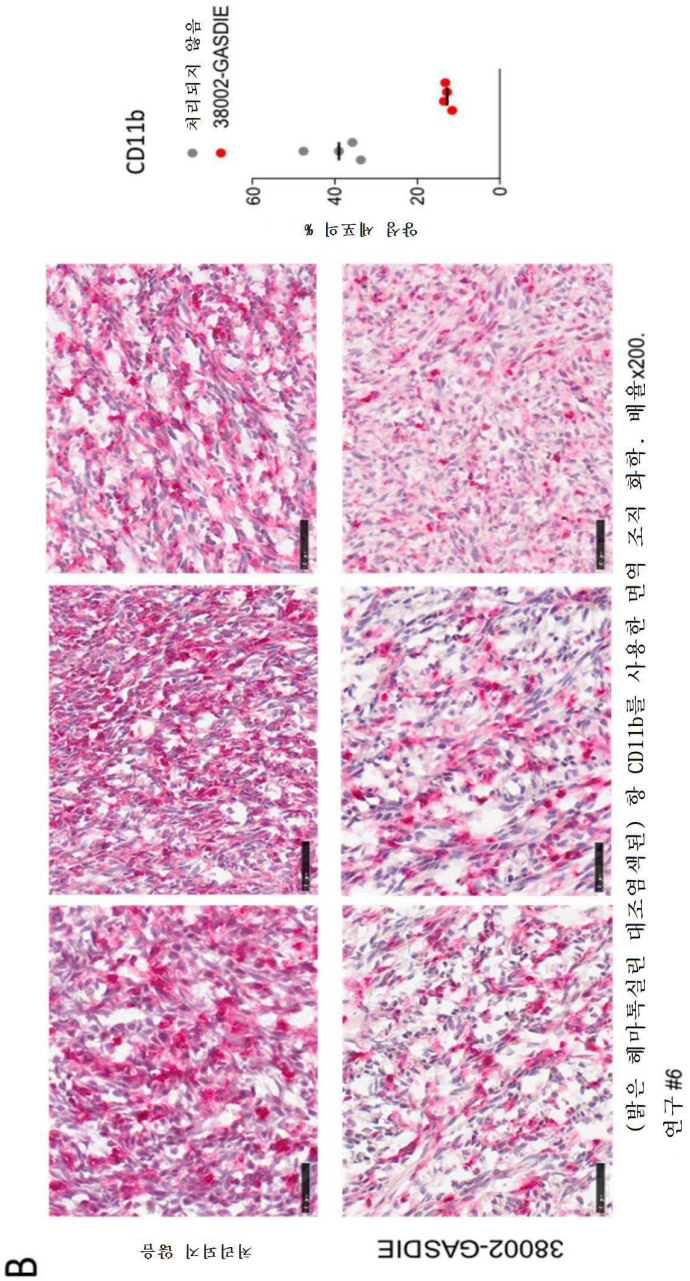
도면20d


D
아르기나제+ 세포
**
총 세포의 %
10
8
6
4
2
0

도면21a


A
150
100
50
0
0 3 9 11 13 15 17 19
38002
아벨루맙
처리되지 않음
*
**
***
***

도면21b



(밝은 헤마톡실린 대조염색됨) 항 CD11b를 사용한 면역 조직 화학. 배율x200.

연구 #6

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.