(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0081977
(43) 공개일자 2022년06월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2827 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7008153
(22) 출원일자(국제) 2020년09월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년03월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/051589
(87) 국제공개번호 WO 2021/055816
국제공개일자 2021년03월25일
(30) 우선권주장
62/902,243 2019년09월18일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
몰레큘러 템플레이츠, 인코퍼레이션.
미국, 텍사스 78729, 오스틴, 슈트 100, 앰버글렌 블러바드 9301
(72) 발명자
포마, 에릭
미국, 뉴욕 10014, 뉴욕, 크리스토퍼 스트리트 165
라모스, 힐라리오
미국, 텍사스 78750, 오스틴, 픽페어 드라이브 11304
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최덕규

전체 청구항 수 : 총 64 항

(54) 발명의 명칭 **시가 독소 A 서브유닛 스캐폴드를 포함하는 PD-L1 결합분자(PD-L1 BINDING MOLECULES COMPRISING SHIGA TOXIN A SUBUNIT SCAFFOLDS)**

(57) 요 약

독소, 예를 들어, 시가 독소 A 서브유닛 유래 폴리펩티드를 포함하거나 이에 접합된 PD-L1 결합 분자가 본 명세서에서 제공된다. 일부 실시예에서, PD-L1 결합 분자는 세포독성이다. 일부 실시예에서, PD-L1 결합 분자는 PD-L1 양성 세포 내부의 MHC 클래스 분자에 CD8+ T-세포 에피토프를 전달할 수 있다. 본 명세서에 기재된 PD-L1 결합 분자는, 특이적 세포(예: PD-L1 양성 종양 세포 및/또는 면역 세포)를 선택적으로 사멸시키고; 특정 세포(예: PD-L1 양성 종양 세포 또는 면역 세포)에 카고(cargos)를 선택적으로 전달하고, 그리고 PD-L1 발현 세포(예: PD-L1 양성 종양 세포 또는 면역 세포)와 관련된 암 및 종양을 비롯한 다양한 질환을 치료 및 진단하기 위한 치료 및/또는 진단 분자로 사용된다.

(52) CPC특허분류
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)

(72) 발명자
윌렛, 에린
미국, 텍사스 78681, 라운드 록, 모킹버드 드라이브 2230
심케츠, 리차드
미국, 조지아 30529, 커머스, 시더 트레일 62
잭슨, 크리스탈
미국, 조지아 30549, 제퍼슨, 벤트그라스 레인 3886
빈센트, 토마스
미국, 조지아 30601, 에던스, 두보스 애브뉴 361

(30) 우선권주장
62/933,197 2019년11월08일 미국(US)
62/970,610 2020년02월05일 미국(US)
63/041,288 2020년06월19일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드 및 PD-L1의 세포 외 부분에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 PD-L1 결합 분자로서;

상기 결합 영역은:

(a) (i) 아미노산 서열 EYTMH(SEQ ID NO:27)를 포함하는 CDR1,

(ii) 아미노산 서열 GINPNNGGTWYNQKFKG(SEQ ID NO:29)를 포함하는 CDR2, 및

(iii) 아미노산 서열 PYYYGSREDYFDY(SEQ ID NO:32)를 포함하는 CDR3,

를 포함하는 중쇄 가변 영역(VH); 및

(b) (i) 아미노산 서열 SASSSVSYMY(SEQ ID NO:19)를 포함하는 CDR1,

(ii) 아미노산 서열 LTSNLAS(SEQ ID NO:20)를 포함하는 CDR2, 및

(iii) 아미노산 서열 QQWSSNPPT(SEQ ID NO:26)를 포함하는 CDR3,

를 포함하는 경쇄 가변 영역(VL);

을 포함하는 것을 특징으로 하는 PD1-L1 결합 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 41의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 PD1-L1 결합 분자.

청구항 3

제1항 내지 제2항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 VH는 SEQ ID NO: 34의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 VL은 SEQ ID NO: 35의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 5

제1항 내지 제2항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 VH는 SEQ ID NO: 34의 서열을 포함하고 VL은 SEQ ID NO: 35의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 영역은 VH 및 VL을 연결하는 scFv 링커를 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 scFv 링커의 길이는 약 3 내지 약 12개 아미노산 잔기인 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 8

제6항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 scFv 링커는 가요성(flexible) 링커인 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 scFv 링커는 SEQ ID NO: 72의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 영역은 단일 사슬 가변 단편(scFv)인 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 영역은 SEQ ID NO: 106의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD-L1 결합 분자는 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드 및 결합 영역을 연결하는 결합 도메인 링커를 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 결합 도메인 링커는 SEQ ID NO: 73의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 14

제12항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 분자는, N-말단에서 C-말단으로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, 및 결합 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 15

제12항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 분자는, N-말단에서 C-말단으로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, VH, 및 VL을 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 16

제12항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 분자는, N-말단에서 C-말단으로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, VH, scFv 링커, 및 VL을 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD-L1 결합 분자는 시가 독소 A 서브유닛에 이종성인 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 CD8+ T-세포 에피토프는 서열 NLVPMVATV(SEQ ID NO: 78)을 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 19

제17항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD8+ T-세포 에피토프는 스페이서를 통해 결합 영역에 연결된 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 스페이서는 서열 HHAA(SEQ ID NO: 265)를 갖는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 21

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 분자는, N-말단에서 C-말단으로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, 결합 영역, 및 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 22

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 분자는, N-말단에서 C-말단으로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, VH, scFv 링커, VL, 및 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 23

제19항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 분자는, N-말단에서 C-말단으로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, 결합 영역, 스페이서, 및 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD-L1 결합 분자는 SEQ ID NO: 128의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD-L1 결합 분자는 단일 연속 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 26

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD-L1 결합 분자는 2개의 폴리펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 2개의 폴리펩티드 각각은 SEQ ID NO: 128의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 28

제26항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 2개의 폴리펩티드는 서로 비공유적으로 연결된 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 29

제26항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 2개의 폴리펩티드는 결합 영역을 통해 서로 비공유적으로 연결된 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 분자는 세포독성인 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 31

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 분자는 비-세포독성인 것을 특징으로 하는 PD-L1 결합 분자.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 PD-L1 결합 분자, 및 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 33

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 PD-L1 결합 분자를 암호화하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드, 또는 그의 상보체.

청구항 34

제33항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 35

제33항에 따른 폴리뉴클레오티드 또는 제34항에 따른 발현 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 36

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 PD-L1 결합 분자를 제조하는 방법으로서, 상기 방법은 (a) 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 PD-L1 결합 분자를 발현시키고 (b) PD-L1 결합 분자를 회수하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 PD-L1 결합 분자를 발현시키는 단계는, 상기 PD-L1 결합 분자가 발현되는 조건하에, 제35항의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

PD-L1 결합 분자를 포함하는 발현 시스템 조성물로부터 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 PD-L1 결합 분자를 정제하는 방법으로서, 상기 방법은 (i) 발현 시스템 조성물을 박테리아 단백질 L과 접촉시켜 PD-L1 결합 분자-단백질 L 복합체를 생성하고, 그리고 (ii) PD-L1 결합 분자-단백질 L 복합체를 회수하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 발현 시스템 조성물은 세포 용해물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

제38항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 L은 *F. 마그나*로부터 단리되거나 유래되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

제38항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 L은 수지에 접합되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

PD-L1 발현 세포를 사멸시키는 방법으로서, 상기 방법은 세포를 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 따른 PD-L1 결합 분자 또는 제32항에 따른 약학 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43

대상체의 질병, 장애, 또는 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 따른 PD-L1 결합 분자 또는 제32항에 따른 약학 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 질병, 장애, 또는 질환은 면역 장애 또는 미생물 감염인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 45

암을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 PD-L1 결합 분자 또는 제32항의 약학 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 암은 높은 돌연변이 부담(mutational burden) 및/또는 높은 빈도의 삽입-결실(indel)을 특징으로 하는 방법.

청구항 47

제45항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 고형 종양인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 방광암, 유방암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 자궁관암, 위장관암, 신경교종, 두경부암, 신장암, 간암, 폐암, 림프종, 메르켈 세포 암종, 중피종, 골수종, 비인두 신생물, 난소암, 췌장암, 복막 신생물, 전립선암, 피부암, 이행상피암종, 또는 요로상피암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 49

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 방광암이고, 상기 방광암은 요로상피암종인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 유방암이고, 상기 유방암은 HER2 양성 유방암 또는 삼중 음성 유방암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 51

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 결장암이고, 상기 결장암은 대장암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 위장관암이고, 상기 위장관암은 위암, 담도 신생물, 또는 위식도 접합부 암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 53

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 신경교종이고, 상기 신경교종은 교모세포종인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 두경부암이고, 상기 두경부암은 두경부 편평 세포 암종인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 55

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 신장암이고, 상기 신장암은 신장 세포 암종인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 56

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 간암이고, 상기 간암은 간세포 암종인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 57

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 폐암이고, 상기 폐암은 비-소세포성 폐암 또는 소세포성 폐암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 58

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 림프종이고, 상기 림프종은 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 원발 가슴세로칸 큰 B-세포 림프종, 또는 미만성 거대 B-세포 림프종인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 59

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 중피종이고, 상기 중피 암종은 흉막 중피종인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 60

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 골수종이고, 상기 골수종은 다발성 골수종인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 61

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 피부암이고, 상기 피부암은 피부 또는 흑색종의 편평세포암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 62

제45항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 이필리무맙, 니볼루맙, 펨브롤리주맙, 아테졸리주맙, 더발루맙, 아벨루맙, 트레멜리무맙, 및 세미플리맙 중 적어도 하나를 포함하는 치료에 대해 재발하거나 불응성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 63

제45항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 전이성인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 64

면역요법을 사용하여 암을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 PD-L1 결합 분자 또는 제32항의 약학 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] [1] 본 출원은 2020년 6월 19일에 출원된 미국 가출원 제63/041,288호, 2020년 2월 5일에 출원된 제62/970,610호, 2019년 11월 8일에 출원된 제62/933,197호, 및 2019년 11월 8일에 출원된 제62/902,243호에 대한 우선권을 주장하고, 이들 각각은 전체 내용이 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0003] **서열 목록에 관한 진술**

[0004] [2] 본 출원과 관련된 서열 목록(sequence listing)은 종이 사본 대신에 텍스트 형식으로 제공되고 참조에 의해 명세서에 통합된다. 서열 목록이 포함된 텍스트 파일의 이름은 MTEM_016_04WO_SeqList_ST25.txt이다. 파일 크기는 ~490kb이고 2020년 9월 18일에 생성되었고 전자적으로 제출된다.

[0005] **기술 분야**

[0006] [3] 본 출원은 독소, 예를 들어 촉매 활성 단백질 독소(catalytic active protein toxin) 또는 이의 단편(fragment)을 포함하는 PD-L1 결합 분자(PD-L1 binding molecule)에 관한 것이다. 일부 구체예들에서, 본 명세서에 기재된 PD-L1-표적화 분자(targeing molecule)는 독소 성분의 촉매 활성(catalytic activity)으로 인해 PD-L1-발현 세포를 사멸시킬 수 있다.

[0007] 일부 구체예들에서, 본 명세서에 기재된 PD-L1 결합 분자는 PD-L1-발현 세포의 MHC 클래스 I 시스템에 CD8+ T-세포 에피토프(epitope)를 전달할 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 명세서에 기재된 PD-L1-표적화 분자는 천연 발생 시가 독소의 A 서브유닛으로부터 유래된 시가 독소 효과기 폴리펩티드(Shiga toxin effector polypeptide)를 포함한다. 일부 구체예들에서, 본 명세서에 기재된 PD-L1-표적화 분자는 야생형 시가 독소에 비해 다중 아미노산 치환 돌연변이를 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함한다. 본 명세서에 기재된 PD-L1 결합 분자는 (1) 다른 세포 중에서 특정 PD-L1-발현 세포 유형(들)을 선택적으로 사멸시키기 위해서, 및 (2) 암 및 종양을 포함한 PD-L1 발현 세포를 포함하는 다양한 질병, 장애, 및 질환을 치료하기 위한 치료 분자로서 유용하다.

배 경 기 술

[0008] [4] 다음은 본 명세서에 설명된 발명(들)을 이해하는 데 유용할 수 있는 정보를 포함한다. 본 명세서에 제공된 정보가 선행 기술이거나 현재 기술되거나 청구된 발명(들)과 관련이 있거나 본 명세서에 구체적으로 또는 묵시적으로 언급된 출판물이나 문서가 선행 기술이라는 것을 인정하는 것은 아니다.

[0009] [5] 프로그래밍된 세포 사멸 리간드 1(programmed cell death ligand 1)(CD274로도 알려짐)인 PD-L1은 다양한 악성 종양들(malignancies)의 종양 세포 표면에서 발현된다. PD-L1은 T-세포의 면역 관문 수용체(immune checkpoint receptor) PD-1에 결합할 수 있고 T-세포 활성화 신호를 억제하여 종양 미세환경에서 종양 세포, 종양, 및/또는 다른 세포들에 의한 면역 감시(immune surveillance)의 회피, 즉 T-세포 억제 및/또는 T-세포 무반응(anergy)을 유도할 수 있다.

[0010] [6] 치료 항체에 의한 PD-L1/PD-1 신호전달 축의 차단은 특정 다양한 징후에 대해 임상적 효능을 가질 수 있고 정상적인 생리학적 상태를 넘어 항종양 T-세포의 증식 및/또는 활성화를 허용할 수 있다. PD-L1 표적화 제제(targeted agent)의 이점을 얻을 수 있는 종양학적 징후에는 폐암, 흑색종(melanoma), 방광암(bladder cancer), 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 유방암(HER2, 에스트로겐 수용체 및 프로게스테론 수용체에 대해 음성인 삼중 음성 유방암(triple negative breast cancer)을 포함하지만 이에 국한되지 않음) 뿐만 아니라 높은 돌연변이 부담 및/또는 삽입결실(indel) 빈도를 갖는 종양 세포와 같이 PD-L1을 발현하는 세포를 포함하는 기타 신생물(neoplasm)이 포함된다. 따라서 PD-L1은 특정 질병, 장애, 및 질환의 완화 및 치료를 위한 면역독소들(immunotoxins)을 포함하는 항신생물제의 전달을 위한 표적이다.

[0011] [7] PD-L1은 특정 면역 세포 유형의 표면에서도 발현된다. 따라서 PD-L1은 면역조절제제(immunomodulatory agent)(면역독소, 면역원 및 백신)를 특정 면역 장애와 같은 특정 질병, 장애, 및 질환의 예방, 완화, 및 치료를 위한 그러한 면역 세포들로 전달하기 위한 추정 표적(putative target)이다.

[0012] [8] PD-L1 발현은 세포 유형, 조직, 질병, 장애, 또는 질환의 특성화를 위한 진단 마커(diagnostic marker) 역할을 할 수 있다. PD-L1 발현은 특정 요법 또는 치료 접근법에 가장 잘 반응할 것 같은 환자의 선택 또는 계층화(stratification)를 위한, 또는 치료 요법(therapeutic regimen) 또는 기타 개입을 받는 동안 또는 이후에 환자의 변화를 모니터링하기 위한 진단 마커 역할을 할 수 있다. 따라서 PD-L1은 예를 들어 그 치료의 진행 및 효과를 포함하는 특정 질병, 장애, 및, 질환의 현상에 관하여 정보수집을 위한 면역독소 연결 진단제를 내재화할 수 있는 세포를 검출하거나 특성화하기 위한 것과 같은 진단 검출 및 특성화의 표적이다.

[0013] [9] 치료 또는 진단 목적을 위해 당업계에서 PD-L1-발현 세포에 독소를 전달하는 PD-L1-표적화 분자의 생성을 위한 PD-L1-표적화 면역글로불린 결합 도메인(immunoglobulin binding domain) 및 독소 성분을 포함하는 분자를 개발할 필요가 있다. 예를 들어, PD-L1 보유 신생물을 죽이는 것을 목표로 하는 현재의 치료법을 보완할 새로운 치료법이 시급히 필요하다.

[0014] [10] 따라서, 예를 들어 PD-L1 양성 세포의 선택적 사멸 또는 유익한 제제의 그 안으로의 전달에 의해 치료될 수 있는 암 또는 종양과 같은 다양한 질병의 치료 및 진단을 위한 치료 및/또는 진단 분자로 사용하기 위해 PD-L1에 결합하는 세포독성 분자를 갖는 것이 바람직할 것이다. 특히, 낮은 면역원성(immunogenicity), 낮은 표적외 독성 및 강력한 표적상 세포독성을 나타내는 독소를 포함하는 PD-L1 결합, 세포독성, 결합 분자를 갖는 것이 바람직할 것이다. 더욱이, 낮은 면역원성, 낮은 표적 외 독성, 높은 안정성, 및/또는 표적 세포의 MHC 클래스 I 시스템에 의해 제시되는 펩티드-에피토프 카고를 전달하는 능력을 나타내는 PD-L1-표적화 치료 및/또는 진단 분자를 갖는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 1) 원치 않는 항원성(antigenicity) 및/또는 면역원성(immunogenicity)에 대한 잠재성을 감소시키고, 2) 비-특이적 독성에 대한 잠재성을 감소시키고, 및/또는 3) 표적 세포의 MHC 클래스 I 시스템에 의한 제시를 위해 펩티드드-에피토프 카고를 전달하는 능력을 갖고 또한 표적 세포에 대한 강력한 시가 독소 A 서브유닛 기반 세포독성을 나타내는 한편, 강력한 세포독성을 유지하는 시가 독소 A 서브유닛 유래 성분을 포함하는 PD-L1 결합 분자를 갖는 것이 바람직할 것이다. 인간 PD-L1을 표적으로 하는 특정 PD-L1 결합 분자는 이미 승인된 항-PD-L1 치료제(들) 및/또는 진단제(들)와의 결합에 대해 경쟁하지 않는 경우 추가 이점을 제공할 수 있다. 독소(예: 면역독소)를 포함하는 PD-L1 결합 분자는 PD-L1에 대한 결합이 PD-L1/PD-1 신호전달 축을 조절하는 기능을 하는 경우 고유한 작용 기전을 나타낼 수 있다.

[0015] **발명의 요약**

[0016] [11] PD-L1 결합 분자, 및 이의 조성물의 다양한 구체예들이 본 명세서에 제공된다. 예를 들어, 일부 구체예들에서, PD-L1 결합 분자는 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드 및 PD-L1의 세포 외 부분에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하고, 여기서 결합 영역은 (a) (i) 아미노산 서열 EYTMH(SEQ ID NO:27)을 포함하는

CDR1, (ii) 아미노산 서열 GINPNNGGTWYNQKFKG(SEQ ID NO:29)를 포함하는 CDR2, (iii) 아미노산 서열 PYYYGSREDYFDY(SEQ ID NO:32)를 포함하는 CDR3;를 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 (b) (i) 아미노산 서열 SASSSVSYMY(SEQ ID NO:19)를 포함하는 CDR1, (ii) 아미노산 서열 LTSNLAS(SEQ ID NO:20)을 포함하는 CDR2, 및 (iii) 아미노산 서열 QQWSSNPPT(SEQ ID NO:26)을 포함하는 CDR3;를 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다.

[0017] [12] 또한, 본 명세서는 본 명세서에 기재된 PD-L1 결합 분자 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제(excipient) 또는 담체(carrier)를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0018] [13] 또한, 본 명세서에 기재된 PD-L1 결합 분자, 또는 그의 상보체(complement)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 이를 포함하는 발현 벡터(expression vector) 또는 숙주 세포(host cell)가 제공된다.

[0019] [14] 또한 PD-L1 결합 분자를 발현시키는 단계 및 PD-L1 결합 분자를 회수(recovering)하는 단계를 포함하는, 본 명세서에 기재된 PD-L1 결합 분자를 제조하는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0020] [15] 또한 본 명세서에서는 PD-L1 결합 분자 및 하나 이상의 다른 생체분자를 포함하는 발현 시스템 조성물로부터 본 명세서에 기재된 PD-L1 결합 분자를 정제하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 (i) PD-L1 결합 분자-단백질 L 복합체를 생성하기 위하여 발현 시스템 조성물을 박테리아 단백질 L과 접촉시키는 단계, 및 (ii) PD-L1 결합 분자-단백질 L 복합체를 회수하는 단계를 포함한다.

[0021] [16] 또한 세포를 본 명세서에 기재된 바와 같이 PD-L1 결합 분자 또는 약학 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는 PD-L1 발현 세포를 사멸시키는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0022] [17] 또한 치료적 유효량의 PD-L1 결합 분자 또는 본 명세서에 기재된 약학 조성물을 이를 필요로 하는 대상체(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 질환, 장애, 또는 질환을 치료하는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0023] [18] 또한 면역요법을 사용하여 환자에서 암을 치료하는 방법이 제공되고, 각각의 방법은 본 명세서에 기재된 PD-L1 결합 분자 및/또는 약학 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0024] [19] 또한 본 명세서에 기재된 PD-L1 결합 분자 또는 약학 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 구체예들에서, 암은 다음 중 임의의 것이다: 방광암(예: 요로상피암(urothelial carcinoma)), 유방암(예: HER2 양성 유방암, 삼중 음성 유방암), 결장암(colon cancer)(예: 전이성 미세위성 불안정성-높음(metastatic microsatellite instability-high) 또는 불일치 복구 결핍 결장직장암(mismatch repair deficient colorectal cancer)과 같은 결장직장암(colorectal cancer)), 자궁내막암(endometrial cancer), 식도암, 나팔관암, 위장관암(예: 위암, 담도종양, 위식도연접부암), 교모세포종(glioblastoma), 신경교종(glioma), 두경부암(예: 두경부 편평세포암), 신장암(예: 신세포암(renal cell carcinoma)), 간암(예: 간세포암), 폐암(예: 비소세포폐암, 소세포폐암), 림프종(예: 미만성 거대 B 세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma), 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 원발성 종격동 거대 B 세포 림프종(primary mediastinal large B-cell lymphoma)), 메르켈 세포 암종, 중피종(mesothelioma)(예: 흉막 중피종), 골수종(myeloma)(예: 다발성 골수종), 비인두 신생물(nasopharyngeal neoplasm), 난소암, 췌장암, 복막 신생물(peritoneal neoplasm), 전립선암, 피부암(예: 피부의 편평 세포암, 흑색종, 이행 세포 암종 또는 요로상피암).

[0025] [20] 본 발명의 이들 및 다른 특징, 측면 및 이점은 다음 설명, 첨부된 청구범위 및 첨부 도면과 관련하여 더 잘 이해될 것이다. 본 발명의 전술한 요소들은 이하에서 그러한 합성 또는 제거에 반대하는 어떠한 진술 없이, 본 발명의 다른 구체예를 만들기 위해 개별적으로 조합되거나 자유롭게 제거될 수 있다.

발명의 내용

도면의 간단한 설명

[0026] [21] **도 1**은 하나 이상의 독소 또는 독소 서브유닛, 예컨대 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 및 하나 이상의 PD-L1 결합 영역을 포함하는 예시적인 PD-L1 결합 분자를 도시한다. 하나의 예시적인 PD-L1 결합 분자에서, PD-L1 결합 영역은 scFv이고, scFv는 이웃하는 scFv와의 분자 간 가변 도메인 교환에 참여하는 것으로 나타난다(좌측 하단). **도 1**에서 예시적인 분자의 묘사는 본 명세서에 기재된 PD-L1 결합 분자의 일부 구체예의 구조적 특징의 특정, 일반적인 배열의 예시 목적을 위한 것이다. 이들 예시적인 분자는 본 명세서에 기재된 바와 같은 분자의 임의의 구조적 특징 및/또는 성분의 배열에 대해 완전히 확정적인 것으로 의도되지 않고, 그러한 것

으로 해석되어서도 안 된다는 것을 이해해야 한다. **도 1**의 개략도에 표시된 상대적 크기, 위치 또는 기능의 수는 단순화되었다. **도 1**의 개략도는 본 명세서에 기재된 바와 같은 임의의 구체예에서 분자 구조의 상대적 크기에 관한 정보를 정확하게 묘사하기 위한 것이 아니다.

[22] **도 2**는 상이한 포유동물 종으로부터의 재조합 PD-L1 단백질을 사용하는 예시적인 PD-L1 결합 분자의 PD-L1 결합 특성을 그래프로 나타낸다. 예시적인 PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO:113) 및 115750(SEQ ID NO:114)을 효소 결합 면역 분석(ELISA) 형식을 사용하여 인간, 시노몰구스 마카크(cynomolgus macaque) 또는 쥐에서 유래한 재조합 PD-L1 단백질에 대한 결합에 대해 시험하였다. DI-SLT-A1 융합 단백질(114964)로 구성된 대조군 PD-L1 결합 분자(아테졸리주맙에 존재하는 면역글로불린 결합 도메인을 포함하고, 이는 이전에 인간, 원숭이(macaque) 및 쥐 기원의 PD-L1 단백질에 결합하는 것으로 밝혀짐)가 PD-L1 결합에 대한 양성 대조군으로 사용되었다. 플레이트 판독기를 사용하여 450 나노미터(nm)에서 흡광도(absorbance) 값으로 검출된 배경 제거(Background subtracted) ELISA 신호가 Y축에 표시된다. **도 2-3**에서 "bkg sub"라는 용어는 버퍼 전용 컨트롤과 관련하여 측정 값을 조정하는 데 사용되는 "배경 제거(background subtraction)"를 나타낸다. PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO:113) 및 115750(SEQ ID NO:114) 둘 모두는 인간 PD-L1 및 시노몰구스 마카크 PD-L1에 결합했지만 이 분석에서 뮤린(murine) PD-L1에는 결합하지 않았다.

[23] **도 3**은 인간 또는 시노몰구스 마카크 기원의 재조합 PD-L1 단백질을 사용한 예시적인 PD-L1 결합 분자의 PD-L1 결합 특성을 그래프로 나타낸 것이다. 예시적인 PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO:113), 116188(SEQ ID NO:126), 및 116297(SEQ ID NO:128)을 ELISA 형식을 사용하여 재조합 PD-L1 단백질에 대한 결합에 대해 시험하였다. 450nm에서 흡광도에서 측정된 일련의 PD-L1 결합 분자 농도에 걸쳐 시험된 115749(SEQ ID NO: 113), 116188(SEQ ID NO: 126), 및 116297(SEQ ID NO: 128)에 대한 배경 제거 ELISA 신호가 X-축에서 ng/mL 단위의 PD-L1 결합 분자 농도의 상용로그에 대하여 Y-축에 그래프로 표시되었다. PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO: 113), 116188(SEQ ID NO: 126), 및 116297(SEQ ID NO: 128)은 유사한 결합 특성으로 인간 PD-L1 단백질 및 시노몰구스 마카크 PD-L1 단백질 둘 모두에 결합하였다. **도 3-5** 및 10A-10B, 11 및 12에 사용된 용어 "결합 분자(binding molecule)"는 시가 독소 A 서브유닛 및 PD-L1 표적화를 위한 항체 면역글로불린 도메인을 포함하는 PD-L1 결합 분자로서 아래 실시예들에서 설명된 PD-L1-표적화 면역독소의 일 유형을 가리킨다.

[24] **도 4**는 유세포 분석법(flow cytometry method)을 사용하여 결정된 PD-L1 양성 HCC1954 세포에 대한 예시적인 PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO: 113)의 PD-L1 결합 특성을 그래프로 나타낸 것이다. 평균 형광 강도(mean fluorescent intensity; MFI)로 측정된 FITC의 형광 신호는 시험된 PD-L1 결합 분자의 농도(μg/mL)에 대해 로그 스케일의 그래프로 플롯팅(plotting)하였다. 이 분석(assay)에서, 115749(SEQ ID NO: 113)는 HCC1954 세포를 발현하는 PD-L1에 대한 용량 의존적 결합(dose-dependent binding)을 나타냈다.

[25] **도 5**는 농도 범위에 걸친 예시적인 PD-L1 결합 분자의 시험관 내 단백질 합성 억제 활성(protein synthesis inhibition activities)을 그래프로 나타낸 것이다. 각 샘플 분자에 대해, 상대적 발광 단위(RLU x e^3)로 분석 동안 발현된 루시페라제의 발광 강도를 밀리리터당 나노그램(ng/mL)으로 시험된 PD-L1 결합 분자 농도의 상용대수에 대해 플롯팅되었다. 115961(SEQ ID NO: 123)이 단백질 합성의 약간 더 적은 억제를 나타내긴 했지만, 이들 예시적인 PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO: 113) 및 115961(SEQ ID NO: 123)은 임의의 표적화 제 또는 결합 영역(즉, SEQ ID NO: 41을 포함하는 폴리펩티드)과 결합되지 않은 양성 "대조군(control)" 분자인 시가 독소 효과기 폴리펩티드(DI-SLTA) 단독에 비교할 수 있는 리보솜 억제 활성을 나타내었다. **도 5, 9 및 11**에 사용된 용어 "DI-SLTA"는 예시적인 PD-L1 결합 분자에서 시가 독소 성분을 지칭하고, 여기서 시가 독소 성분은 탈면역화되었다(또한 위에서 본 명세서의 실시예들에서 "DI-SLT-A1"으로 언급됨). "결합 분자 없음 양성 대조군(No binding molecule Positive Control)"은 임의의 PD-L1 결합 분자(즉, SEQ ID NO: 4을 포함하는 폴리펩티드)가 결여된 시험된 샘플을 지칭한다. 용어 "Neg. 대조군(Neg. control)"은 루시퍼라제가 첨가되지 않았지만 발광 신호가 여전히 측정된 샘플을 의미한다.

[26] **도 6a-6b**는 예시적인 PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO:113)(**도 6a**) 및 115750(SEQ ID NO:114)(**도 6b**)의 인간, 시노몰구스 마카크(cynomolgus macaque), 또는 쥐 기원과 다른 PD-L1 단백질을 발현하는 CHO-K1 세포들에 대한 세포독성 활성을 조사하는 세포 사멸 분석(cell-kill assay)의 결과를 그래프로 보여준다. 각 세포 유형에 대한 세포의 생존율(%)은 각 세포에 투여된 PD-L1 결합 분자 농도의 상용 로그에 대해 플롯팅되었다. PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO: 113) 및 115750(SEQ ID NO: 114)은 인간 또는 시노몰구스 마카크 PD-L1 표적을 발현하는 세포들을 사멸시켰지만 이 분석정에서 뮤린 PD-L1을 발현하는 세포는 사멸시키지 않았다.

[27] **도 7-9**는 PD-L1 양성 및/또는 PD-L1 음성 세포 유형에 대한 예시적인 PD-L1 결합 분자의 활성을 조사하는 세포 사멸 분석 결과를 그래프로 보여준다. 각각의 세포 유형에 대한 세포의 생존율(%)은 각각의 세포 샘플에 투여된 PD-L1 결합 분자 농도의 상용 대수에 대해 플롯팅하였다. 특정 실험에서 PD-L1의 세포 표면 발현에 대해 음성인 세포주와 동일한 분석을 사용하여 세포 표적화의 특이성을 나타내었다. 특정 실험에서, 표적화되지 않은 촉매 활성 DI-SLT-A1 단편(114951)이 대조군으로 사용되었다(실시예에서 "DI-SLT-1A 단독"으로도 지칭됨).

[28] **도 7**은 115749(SEQ ID NO:113) 및 115750(SEQ ID NO:114)이 4가지 상이한 PD-L1-발현 세포 유형 HCC-1954, HCC-827, JIMT-1, 및 MDA- MB-231에 대해 세포독성을 나타내었지만, 세포 표면에서 PD-L1을 발현하지 않는 대조군 세포주 MDA-MB-486에 대해서는 세포독성을 나타내지 않았음을 보여준다. 표적화되지 않은 DI SLT-1A 단독("114951")은 시험된 농도에서 비교적 낮은 세포독성을 나타내었고 고농도에서만 세포독성이었다. PD-L1 음성 세포주 MDA-MB-468을 115749(SEQ ID NO:113) 및 115750(SEQ ID NO:114)과 접촉시킬 때 관찰된 세포독성은 비표적화 세포독성과 일관성이 있다(아래 **도 9** 참조, 비표적화 DI SLT-1A 단독("DI-SLT-1A만 해당")).

[29] **도 8**은 115744(SEQ ID NO:108), 115745(SEQ ID NO:109), 115747(SEQ ID NO:111), 115748(SEQ ID NO:112), 115749(SEQ ID NO:113), 115750(SEQ ID NO:114), 115751(SEQ ID NO:115), 115752(SEQ ID NO:116), 115753(SEQ ID NO:117), 115754(SEQ ID NO:118), 115755(SEQ ID NO:119), 115756(SEQ ID NO:120), 및 115757(SEQ ID NO:121)이 2개의 상이한 PD-L1 발현 세포 HCC-1954 및 MDA-MB-231(인간 PD를 발현하도록 형질감염됨(transfected))에 대해 세포독성을 나타내었음을 보여준다.

[30] **도 9**는 116297 및 116299가 4가지 상이한 PD-L1 발현 세포 유형 HCC 1954, JIMT-1, HCC 827, 및 MDA-MB-231에 대해 세포독성을 나타내었음을 보여준다. 표적화되지 않은 DI SLT-1A 단독("DI-SLT-1A 단독")은 시험된 농도에서 비교적 낮은 세포독성을 나타냈다(DI SLT-1A는 고농도에서만 특정 세포주에 대해서만 세포독성이었다). PD-L1 음성 세포 SKBR3 및 MCF-7을 시험된 농도에서 116297(SEQ ID NO: 128) 및 116299(SEQ ID NO: 129)와 접촉시킬 때 측정 가능한 세포독성은 관찰되지 않았다.

[31] **도 10a 및 10b**는 예시적인 PD-L1 결합 분자에 의한 바이러스 항원 카고 전달(viral antigen cargo delivery)에 대한 T-세포 반응의 세포 간 결합(intercellular engagement)을 조사하는 실험 결과를 보여준다. **도 10a**는 사이토카인 분비를 증가시키는 T-세포 결합과 관련된 결과를 보여준다. 예시적인 PD-L1 결합 분자의 쌍을 시험하였고, 여기서 쌍 사이의 유일한 차이점은 하나는 카복시-말단 바이러스 항원 카고를 포함하고 다른 하나는 그렇지 않다는 점이다. **도 10b**는 종양 세포 사멸을 초래하는 세포독성 T-세포 결합과 관련된 결과(CD50)를 보여준다.

[32] **도 10a**는 공배양물(co-culture)로부터 채취한 상청액(supernatant)의 ELISA로 측정한 인터페론 감마(IFN-ɣ) 분비 형태에서 면역 반응 유도를 그래프로 나타낸 것이다. 예시적인 PD-L1 결합 분자(115749(SEQ ID NO:113) 및 115961(SEQ ID NO:123)) 또는 (115750(SEQ ID NO:114) 및 115962(SEQ ID NO:124))의 쌍을 일련의 PD-L1 결합 분자 농도 시리즈에서 IFN-ɣ 유도(induction)에 대해 시험하였다. 450nm에서 흡광도에 의해 측정된 결과 IFN-ɣ 수준은 로그 척도를 사용하여 X축에 ng/mL 단위의 PD-L1 결합 분자 농도 대 Y축에 그래프로 표시되었다. "항원 없음(no antigen)"이라는 어구는 시험된 PD-L1-표적화 면역독소(immunotoxin) 분자가 어떠한 카복시-말단 바이러스 CD8+ T-세포 에피토프 카고도 포함하지 않은 시험된 샘플을 지칭한다(아래 실시예에서 "항원 없음 대조군(no antigen control)", "대조군 PD-L1 결합 분자(control PD-L1 binding molecule)", 또는 "매치 쌍(match pair)" 내의 대조군으로도 지칭됨). "AST 가능(AST capable)" DI-SLT-A1 융합 단백질 115749(SEQ ID NO: 113) 및 115750(SEQ ID NO: 114)은 CMV 항원(CMV-CTL)을 인식하는 인간 세포독성 T 림프구(lymphocyte)를 자극하여 IFN-ɣ 분비를 이끌 수 있는 반면, "항원 없음 대조군" 단백질 115961(SEQ ID NO: 123) 및 115962(SEQ ID NO: 124)는 유의한 양의 IFN-ɣ 분비를 유도하지 않았다. PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO: 113) 또는 115750(SEQ ID NO: 114)을 운반하는 항원-카고를 MDA-MB-231을 발현하는 PD-L1 세포에 투여하면 CMV-CTL 세포를 자극하여 1:1의 CMV-CTL 대 표적 세포의 비율로 세포의 공동 배양에서 사이토카인 IFN-ɣ 분비를 증가시킬 수 있었다.

[33] **도 10b**는 예시적인 PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO: 113) 및 115962(SEQ ID NO: 124)가 CMV-CTL 세포와 공동 배양에서 MDA-MB-231 세포들을 발현하는 PD-L1에 대해 세포독성을 나타내었음을 그래프로 나타낸다("NR"은 세포가 핵적색 염료로 형질 감염되었음을 나타냄). 80시간 시점에서 대조군에 대한 세포의 생존율(%)을 로그 척도로 그래프로 나타낸 투여된 PD-L1 결합 분자의 농도에 대해 플롯팅하였다. 예시적인 PD-L1 결합 분자(115749(SEQ ID NO:113) 및 115961(SEQ ID NO:123)) 또는 (115750(SEQ ID NO:114) 및 115962(SEQ ID NO:124))의 쌍을 이 공동 배양 세포 사멸 분석에서 세포 독성(CD50)에 대해 시험하였다. "항원 없음"이라는 어구는

시험된 PD-L1-표적화 면역독소 분자가 어떤 카복시-말단 바이러스 CD8+ T-세포 카고를 포함하지 않은 시험된 샘플을 지칭한다. "AST 가능" PD-L1 결합 분자는 카복시-말단 CMV 항원을 포함하고 PD-L1 양성/HLA:A2 양성 세포에 항원을 전달함으로써 인간 세포독성 T 림프구를 자극할 수 있는 것들이다.

[34] **도 11**은 1:1의 비율로 CMV-CTL과 MDA-MB-231(NR) 세포를 발현하는 PD-L1의 공배양물(co-culture)으로부터 취한 상청액의 ELISA로 측정한 IFN-γ 분비 형태에서 면역 반응 유도를 그래프로 보여준다. 예시적인 PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO:113), 116297(SEQ ID NO:128), 116299(SEQ ID NO:129), 115961(SEQ ID NO:123), 및 116187(SEQ ID NO:125)을 일련의 PD-L1 결합 분자 농도를 사용하여 IFN-γ의 유도에 대해 시험하였다. 450nm에서 흡광도에 의해 측정된 결과 IFN-γ 수준은 로그 척도를 사용하여 X축에 ng/mL 단위의 PD-L1 결합 분자 농도 대 Y축에 그래프로 표시되었다. "Ag 대조군 없음(no Ag control)"이라는 어구는 시험된 PD-L1-표적화 면역독소 분자가 어떤 카복시-말단 바이러스 항원 카고도 포함하지 않은 시험된 샘플을 지칭한다(이하 실시예에서 "항원 대조군 없음(no antigen control)", "항원 없음(no antigen)", "대조군 결합 분자(control binding molecule)", 또는 "매치 쌍" 내의 대조군으로 지칭됨). PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO:113), 116297(SEQ ID NO:128), 및 116299(SEQ ID NO:129)는 CMV-CTL 세포가 IFN-γ을 분비하도록 자극할 수 있었던 반면, "Ag 대조군 없음" 단백질 115961(SEQ ID NO: 123) 및 116187(SEQ ID NO: 125) 및 동일한 단백질 농도에서 투여된 "DI-SLT-1A단독(DI-SLT-1A only)"은 이 분석에서 유의한 양의 IFN-γ 분비를 유도하지 않았다.

[35] **도 12**는 프로메가(Promega) PD-1/PD-L1 차단 생물분석 실험의 결과를 그래프로 보여준다. RLU로 측정된 T-세포 활성화는 로그 척도로 그래프로 표시된 나노몰(nM)의 PD-L1 결합 분자 또는 항체 농도에 대해 Y-축에 플롯팅되었다. 예시적인 PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO:113), 115750(SEQ ID NO:114), 및 115962(SEQ ID NO:124)는 모두 이 분석에서 PD-1은 일부 농도에서 PD-L1과 PD-1의 상호작용을 차단(block)하는 능력을 나타내었지만, 양성 대조군인 항-hPD-L1-hIgG1 단일클론항체를 투여한 샘플보다 활성이 낮았다.

[36] **도 13**은 PD-L1 결합 분자 기능 및 이와 관련된 활성/효능(activity/potency)(예: IC50, CD50, 및 K_D(ng/mL))를 보여주는 표이다.

[37] **도 14**는 농도 범위에 걸친 예시적인 PD-L1 결합 분자의 시험관 내 단백질 합성 억제 활성을 그래프로 나타낸 것이다. 각 샘플 분자에 대해, 상대적 발광 단위(RLU x e^3)로 분석 동안 발현된 루시페라제의 발광 강도를 밀리리터당 나노그램(ng/mL)으로 시험된 PD-L1 결합 분자 농도의 상용 대수에 대해 플롯팅하였다. 이들 예시적인 PD-L1 결합 분자 116297(SEQ ID NO: 128) 및 115749(SEQ ID NO: 113)는 임의의 표적화제 또는 결합 영역(즉, SEQ ID NO: 41을 포함하는 폴리펩티드)과 결합되지 않은 양성 "대조군" 분자인 시가 독소 효과기 폴리펩티드(DI-SLTA) 단독에 비교할 수 있는 리보솜 억제 활성을 나타내었다.

[38] **도 15**는 결합 분자 농도에 대한 인간 또는 시노몰구스 PD-L1 결합(450nm에서의 흡광도)을 나타내는 그래프이다.

[39] **도 16**은 PD-L1+ 세포주에서 결합 분자 농도(ng/mL)에 대한 세포 생존율 백분율을 나타내는 그래프이다. **도 16**은 116297(SEQ ID NO:128)이 115749(SEQ ID NO:113)보다 더 큰 세포독성을 나타낼 수 있음을 보여준다.

[40] **도 17a**는 형질전환(transgenic) CHO-K1 세포에 의해 발현된 인간(Hu) 및 시노몰구스(Cyno) PD-L1에 대한 116297(SEQ ID NO: 128) 결합을 시험하는 결합 분석 결과를 보여준다. 대조군 항-인간-PD-L1 항체("PD-L1 mAb") 아테졸리주맙을 결합 분석에 사용하였다. **도 17b**는 세포 생존력 분석의 결과를 보여준다. 세포 생존율 백분율(Cell viability percent)은 결합 분자 농도에 대해 플롯팅된다.

[41] **도 18a 및 18b**는 다양한 임상적으로 관련된 종양 세포주에 대한 116297(SEQ ID NO: 128)에 대한 세포 표면 PD-L1 발현 수준 및 CD_{50} 값을 보고한다.

[42] **도 19**는 IFN-γ의 존재 또는 부재하에 배양된 단핵구 및 림프구를 포함하는, 인간 공여자 PBMC 샘플을 사용한 유세포 분석(flow cytometry assay)의 결과를 보여준다. 단핵구는 PD-L1의 발현을 증가시키기 위해 인터페론 감마 처리에 의해 유도되었다.

[43] **도 20a-20b**는 다양한 농도의 116297(SEQ ID NO: 128)의 처리 후 및 선택적으로 IFN-γ로 치료 후의 CD14 양성 단핵구(상단 패널) 및 림프구(하단 패널)를 포함하는 생체 외 PD-L1 양성 인간 면역 세포의 생존율(%)을 보여준다.

[44] **도 21a**는 처리되지 않거나 IFN-γ로 처리된 단핵구(monocyte) 또는 림프구(lymphocyte)의 집단에서 평균

형광 강도(MFI)를 사용하여 결정된 PD-L1 발현을 나타낸다. **도 21b**는 처리되지 않거나 IFN-γ로 처리된 단핵구 또는 림프구의 집단에서 효능(potency)(IC_{50} - ng/mL)에 대한 PD-L1 발현을 나타낸다.

[45] **도 22**는 이전에 116297(SEQ ID NO: 128) 또는 116296(SEQ ID NO: 127)과 함께 배양된 MDA-MB231 세포(HLA:A02 양성)가 항원 특이적 세포독성 T-림프구와 접촉된 세포독성 분석의 결과를 보여준다(CTL, 공배양).

[46] **도 23**은 다양한 세포주에서 116297에 의한 인터페론-감마 분비의 세포독성 효능 및 배수 유도(fold induction)를 보여주는 차트이다.

[47] **도 24a**는 세포독성 T 림프구(CTL)의 존재 또는 부재하에 생존성 연구의 결과를 나타내고, 여기서 퍼센트 생존 세포(MDA-MB231)는 116297(ng/mL)의 농도에 대해 플롯팅된다. **도 24b**는 116297(ng/mL)의 다양한 농도에서 인터페론 감마 분비를 보여준다.

[48] **도 25**는 여러 세포 유형에서 표면 표적 PD-L1 및 HLA:A*02의 평균 형광 강도(MFI)를 사용하여 측정된 발현을 나타낸다.

[49] **도 26**은 다양한 농도의 116297(SEQ ID NO: 128)로 처리 후 항원-특이적 CTL("CMV-CTL")와 공배양물에서의 HLA:A*02 및 PD-L1 양성 종양 세포가 있는 모델에서 IFN-γ의 분비를 보여준다.

[50] 도27은 다양한 농도의 116297(SEQ ID NO:128) 투여 후 항원-특이적 CTL("CMV-CTL")과의 공배양물에서의 HLA:A*02 양성 종양 세포의 생존성을 보여준다.

[51] **도 28a**는 인간 환자 유래 종양을 사용하는 이종이식(PDX) 동물 모델에 대한 실험 프로토콜을 보여주는 개략도이다. 쥐에 종양 세포를 주입한다. 종양 부피가 100-150mm^3에 도달한 후, 0일째에, 쥐에 115749 또는 116297 중 6mg/kg을 투여하였다. 쥐에 2, 4, 7, 9, 11, 21, 23, 및 27일째에 2mg/kg의 후속 용량을 제공한다. 종양 부피를 주기적으로 측정하고 27일째에 최종 종양 측정을 수행한다. **도 28b**는 시간 경과에 따른 종양 부피를 보여주는 그래프이다. **도 28c**는 카플란-마이어 생존 곡선이다.

[52] **도 29a**는 인간 환자 유래 종양을 사용하는 이종이식(xenograft)(PDX) 동물 모델에 대한 실험 프로토콜을 보여주는 개략도이다. 쥐에 종양 세포를 주입한다. 종양 부피가 100-150mm^3에 도달한 후, 0일째에, 쥐에 115749 또는 116297 중 6mg/kg을 투여하였다. 쥐에 2, 4, 7, 9, 11, 16, 18, 21 및 33일에 2mg/kg의 후속 용량을 제공하고 14일에 6mg/kg의 용량을 제공한다. 종양 부피는 주기적으로 측정되고, 최종 종양 측정은 60일에 발생한다. **도 29b**는 시간 경과에 따른 종양 부피를 보여주는 그래프이다. **도 29c**는 카플란-마이어 생존 곡선이다.

[53] **도 30**은 비히클 대조군 또는 116297로 처리된 쥐에서 접종 후 다양한 일수에서의 종양 부피를 보여주는 그래프이다.

[54] **도 31**은 116297(SEQ ID NO: 128)의 다양한 용량을 투여한 후 15일 및 23일째에 영장류에서 혈청 유형 I 사이토카인 수준(인터류킨-2(IL-2), IFN-γ, 종양 괴사 인자-알파(TNF-α))을 보여주는 그래프이다.

[55] **도 32**는 예시적인 PD-L1 결합 분자, 예를 들어, 116297(SEQ ID NO: 128)의 잠재적인 작용 기전을 보여주는 개략도이다.

[56] **도 33**은 예시적인 PD-L1 결합 분자 116297(SEQ ID NO: 128)에 대한 리보솜 억제 분석의 결과를 보여준다.

[57] **도 34**는 예시적인 PD-L1 결합 분자 116297(SEQ ID NO: 128)에 대한 PD-L1 표적 결합 분석의 결과를 보여준다.

[58] **도 35**는 PD-L1 결합 분자 치료(들)가 예를 들어 PD-L1-발현 종양 세포 및 PD-L1 양성 면역 세포를 직접 사멸시켜 종양 면역 표현형(tumor immunophenotypes)을 초래하는 것과 같은 항-종양 효과를 유도할 수 있음을 보여주는 개략도이다.

[59] **도 36**은 PD-L1 종양(TC) 및 면역 세포(IC)의 고갈을 위해 설계된 세포독성 융합 단백질인 116297의 구조 및 활성을 보여주는 개략도이다. 116297은 탈면역화된 제거된 시가-유사 독소 A 및 CMV 제한 펩티드 항원을 세포에 전달한다. 116297은 T 세포 및 면역 세포 표면의 PD-L1에 대한 특정 표적화 도메인을 포함한다. 116297은 세포의 리보솜으로 라우팅되고 DI SLTA에 의해 매개되는 효소 및 비가역적 비활성화를 통해 세포 사멸을 매개한다. 116297은 비자기(non-self) 항원성 펩티드를 전달함으로써 종양에 대한 CMV 반응성 CD8+ T 세포 반응을 모집할 수 있다. 116297은 현재의 단일클론항체 치료법으로는 달성할 수 없는 독특한 이중 작용 기전을 갖고

있다. 그것은 T 세포와 면역 세포를 직접 고갈시킨다. PD-L1+ TC는 PD-L1을 발현하는 종양 세포를 의미하고, PD-L1+ IC는 PD-L1을 발현하는 면역 세포를 의미한다.

[60] **도 37a-37d**는 116297이 별개의 작용 방식을 통한 고갈을 위해 PD-L1 종양 세포(TC)를 표적화한다는 것을 보여준다. **도 37a**는 PD-L1 발현 수준의 범위에 걸쳐 종양 폐, 피부, 유방, 및 난소 종양 세포주에 대해 116297에 대해 측정된 세포독성 효능(CD_{50})의 범위를 보여주는 그래프이다. **도 37b**는 면역조직화학(immunohistochemistry)(22C3)을 사용하여 측정된 표면 PD-L1 발현을 나타내고, 강도에 대해 TC0-3(하부 패널)으로 점수가 매겨져 있다. **도 37c**는 PD-L1 또는 HLA:A02를 발현하고, 세포독성 T-림프구(CTL)와 공동 배양되고 116297 또는 대조군 결합 분자로 처리된 MDA-MB-231 세포에서의 세포 생존율(%)을 보여준다.

"Ag 결합 분자 대조군 없음(no Ag binding molecule control)"이라는 어구는 시험된 PD-L1-표적화 면역독소 분자가 어떤 카복시-말단 바이러스 항원 카고도 포함하지 않은 시험된 샘플을 지칭한다. "비활성 결합 분자 대조군(Inactive binding molecule control)"은 효소적으로 비활성인 시가 독소 서브유닛 A 효과기를 포함하는 PD-L1 결합 분자를 의미한다. "CTL 없음(No CTL)"은 세포독성 T 림프구들이 첨가되지 않은 샘플을 의미하고, "CTL"은 그것들이 첨가된 샘플을 의미한다. **도 37d**는 세포독성 T-림프구(CTL)와 공동 배양된 PD-L1 또는 HLA:A02를 발현하는 MDA-MB-231 세포에서 인터페론 감마의 분비를 보여준다.

[61] **도 38a-38d**는 116297이 생체 내에서 PD-L1 양성 종양을 제어함을 보여준다. 종양 부피 성장은 116297로 처리한 후 삼중 음성 유방암주 MDA-MB-231(**도 38a**) 및 PDX2(**도 38b**)를 비롯한 다양한 인간 종양 세포주가 이식된 면역결핍 쥐(immunodeficient mice)에서 나타난다. **도 38a-38b**에서 별표(*)는 통계적 유의성을 나타낸다. **도 38c**는 비-소세포 폐암 세포(PDX2b)가 이식되고 116297로 처리된 면역결핍 쥐에서 종양 부피(0일의 퍼센트로서)를 보여주는 그래프이다.

"촉매적으로 불활성인 SLTA 불활성 변이체를 포함하는 결합 분자"는 효소적으로 불활성인 시가 독소 서브유닛 A 효과기를 포함하는 PD-L1 결합 분자를 지칭한다. **도 38d**는 다양한 세포 유형에서 모델 및 효능 종점(efficacy endpoint)을 요약한 표이다.

[62] **도 39a**는 대표적인 PD-L1 고(HCC1954) 중/고(MDA-MB-231) 및 음성(MCF7) 종양 및 PD-L1 발현을 유도하는 IFN-γ로 처리되지 않거나 처리된 단리된 인간 CD14 양성 단핵구에서 다양한 용량의 116297로 처리한 후 세포 생존율을 나타내는 그래프이다. **도 39b**는 대표적인 PD-L1 고(HCC1954) 중/고(MDA-MB-231) 및 음성(MCF7) 종양 세포에 대한 효능(CD50, ng/mL)과 PD-L1 표면 분자 사이의 상관관계를 보여주는 그래프이다.

[63] **도 40a**는 116297의 약동학 및 혈청 반감기를 나타낸다. **도 40b**는 C_{MAX}에 대한 116297 시험관 내 효능 및 수용체 점유율을 나타내는 그래프이다.

[64] **도 41a**는 비인간 영장류 연구를 위한 투여 요법을 보여주는 개략도이다. **도 41b**는 베이스라인(baseline)의 퍼센트로서 비인간 영장류의 말초 단핵구(peripheral monocyte) 수준을 나타낸다. 단핵구의 고갈은 T 세포, B 세포, NK 세포, 및 호산구(Eosinophil)가 확장되기 전에 나타났고, 이들은 15일째에 말초적으로 확장되었고 연구 종료점까지 지속되었다. "비활성 변이체(Inactive variant)"는 효소적으로 비활성인 시가 독소 서브유닛 A 효과기를 포함하는 PD-L1 결합 분자를 의미한다. **도 41c**는 베이스라인의 퍼센트로서 비인간 영장류의 말초 T-림프구 수준을 보여준다. **도 41d**는 비인간 영장류에 대한 2개의 독립적인 연구에 걸친 혈청 사이토카인 반응의 분석이다. 데이터는 연구 1(n=2 NHP) 및 연구 2(116297 그룹의 경우 n=8 NHP 및 비활성 변이 그룹의 경우 n=5)에 대한 응답자의 백분율로 표시된다. 데이터는 연구에서 투여용량 3(dose 3) 후 언제든지 사이토카인의 유도를 반영한다.

[65] **도 42a**는 116297을 사용한 NHP에서 PD-L1 발현 세포의 직접적인 세포 사멸 및 PD-L1 신호전달의 물리적 억제("차단")를 프로파일링하는 개략도이다. **도 42b**는 NHP 연구에서 관찰된 면역 효과 및 약력학(pharmacodynamics) 반응을 요약한 차트이다.

[66] **도 43a-43b**는 HCC 1954 세포(**도 43a**) 및 MDA-MB-231 세포(**도 43b**)에서 상이한 PD-L1 결합 분자(116297, 115749, 115765, 및 114985)에 대한 비교 시험관 내 데이터를 나타낸다.

[67] **도 44**는 상이한 PD-L1 결합 분자(16297, 116555, 115749, 115765, 및 115695)에 대한 비교 생체 내 데이터를 나타낸다.

[68] **도 45a-45b**는 표적 세포를 4시간(급성) 또는 24시간(지속) 동안 PD-L1 결합 분자로 처리한 실험의 결과를 보여준다. PD-L1 결합 분자가 세척된 후, 세포를 CTL과 접촉시키고, IFN-γ 생산(**도 45a**) 및 세포독성(**도 45b**)

을 측정하였다.

[69] **도 46a-46b**는 공여자 환자(donor patient) 또는 종양 세포(HCC1954)로부터 분리된 단핵구(IC)를 20㎍/mL(**도 46a**) 또는 2㎍/mL(**도 46b**)의 다양한 PD-L1 표적화 분자로 처리한 실험 결과를 보여준다. 표준 세포 타이터 글로 분석(Cell Titer Glo assay)을 사용하여 세포 사멸을 측정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] **발명의 상세한 설명**

[0028] [70] 본 발명은 예시적이고 비제한적인 실시예들과 첨부 도면을 참조하여 이하에서 더 완전하게 설명된다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 이하에서 설명하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 오히려, 이들 실시예들은 본 개시가 철저하고 본 발명의 범위를 당업자에게 전달하기 위해 제공된다.

[0029] [71] 본 발명을 보다 쉽게 이해할 수 있도록 하기에서 특정 용어를 정의한다. 추가 정의는 본 발명의 상세한 설명에서 찾을 수 있다.

[0030] [72] 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 용어 "a", "an" 및 "the"는 문맥에서 명백하게 달리 지시하지 않는 한 단수 및 복수 지시 대상을 모두 포함한다.

[0031] [73] 명세서 및 첨부된 특허청구범위에 사용된 바와 같이, "및/또는(and/or)"이라는 용어는 A 및 B의 두 종을 언급할 때 A 및 B 중 적어도 하나를 의미한다. 명세서 및 첨부된 특허청구범위에 사용된 바와 같이, A, B 및 C와 같은 2종 초과를 언급할 때 용어 "및/또는"은 A, B, 또는 C 중 적어도 하나, 또는 A, B, 또는 C의 모든 조합(각 종은 단수 또는 다중 가능성) 중 적어도 하나를 의미한다.

[0032] [74] "아미노산 잔기(amino acid residue)" 또는 "아미노산(amino acid)"이라는 용어는 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드에 혼입되는 아미노산에 대한 언급을 포함한다. 용어 "폴리펩티드(polypeptide)"는 아미노산 또는 아미노산 잔기의 임의의 중합체를 포함한다. 용어 "폴리펩티드 서열(polypeptide sequence)"은 폴리펩티드를 물리적으로 포함하는 일련의 아미노산 또는 아미노산 잔기를 지칭한다. "단백질"은 하나 이상의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 "사슬(chains)"을 포함하는 거대분자이다. "펩티드"는 총 약 15 내지 20개의 아미노산 잔기보다 작은 크기의 작은 폴리펩티드다. "아미노산 서열(amino acid sequence)"이라는 용어는 길이에 따라 펩티드 또는 폴리펩티드를 물리적으로 포함하는 일련의 아미노산 또는 아미노산 잔기를 지칭한다. 달리 표시되지 않는 한, 본 명세서에 개시된 폴리펩티드 및 단백질 서열은 아미노-말단(amino-terminus)에서 카복시-말단(carboxy-terminus)으로의 순서를 나타내는 왼쪽에서 오른쪽으로 작성된다.

[0033] [75] 용어 "아미노산", "아미노산 잔기", "아미노산 서열", 또는 폴리펩티드 서열은 천연 발생 아미노산(L 및 D 아이소스테레아이소머 포함)을 포함하고, 달리 제한되지 않는 한 셀레노시스테인, 피롤리신, N-포르밀메티오닌, 감마-카복시글루타메이트, 히드록시프롤린히푸신, 피로글루탐산, 및 셀레노메티오닌과 같이 천연 발생 아미노산과 유사하게 기능할 수 있는 천연 아미노산의 공지된 유사체(analog)들도 포함한다. 본 명세서에 언급된 아미노산은 표 1에서 하기와 같이 약칭으로 기술된다:

표 1

[0034] **표 1. 아미노산 명명법**

명칭	3-자 약어	1-자 약어
알라닌(Alanine)	Ala	A
아르기닌(Arginine)	Arg	R
아스파라긴(Asparagine)	Asn	N
아스파르트산(Aspartic Acid or Aspartate)	Asp	D
시스테인(Cysteine)	Cys	C
글루탐산(Glutamic Acid or Glutamate)	Glu	E
글루타민(Glutamine)	Gln	Q
글리신(Glycine)	Gly	G
히스티딘(Histidine)	His	H
이소류신(Isoleucine)	Ile	I
류신(Leucine)	Leu	L
라이신(Lysine)	Lys	K

메티오닌(Methionine)	Met	M
페닐알라닌(Phenylalanine)	Phe	F
프롤린(Proline)	Pro	P
세린(Serine)	Ser	S
트레오닌(Threonine)	Thr	T
트립토판(Tryptophan)	Trp	W
티로신(Tyrosine)	Tyr	Y
발린(Valine)	Val	V

[0035] [76] 펩티드, 펩티드 영역, 폴리펩티드 영역, 단백질, 또는 분자의 아미노산 잔기와 관련된 "보존적 치환(conservative substitution)"이라는 어구는 전체 펩티드, 펩티드 영역, 폴리펩티드 영역, 단백질, 또는 분자의 기능 및 구조를 실질적으로 변경하지 않는 펩티드, 펩티드 영역, 폴리펩티드 영역, 단백질, 또는 분자의 아미노산 조성의 변화를 의미한다(Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman and Company, New York (2nd ed., 1992) 참조).

[0036] [77] 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 영역을 언급할 때 "~로부터 유래된(derived from)"이라는 어구는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 영역이 "모체(parental)" 단백질에서 원래 발견되고, 이제 "모체" 분자의 특정 기능(들) 및 구조(들)가 실질적으로 보존되는 한 원래의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 영역에 대한 현재 특정 아미노산 잔기 추가(addition), 결실(deletion), 절단(truncation), 재배열(rearrangement), 다른 변경(alteration)을 포함할 수 있는 아미노산 서열을 포함한다는 것을 의미한다. 당업자는 당업계에 공지된 기술, 예를 들어 단백질 서열 정렬 소프트웨어를 사용하여 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 영역이 유래된 모분자(parental molecule)를 확인할 수 있을 것이다.

[0037] [78] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "비교할 수 있는(comparable)"이라는 용어는 유사한 것을 의미한다. "비교할 수 있는"이 특정 값(예를 들어, 결합 친화도)을 언급하는 경우, 이 용어는 서로 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 또는 약 25% 내에 있는 값을 포괄할 수 있다.

[0038] [79] 본 명세서에 사용된 용어 "항체(antibody)"는 면역글로불린(immunoglobulin) 단백질을 지칭하고 항원 결합 능력을 갖는 가장 광범위한 항체 형식, 원하는 항원 결합 활성을 나타내는 한 예를 들어 단일클론(monoclonal) 항체, 다클론(polyclonal) 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 낙타화 항체, 또는 항원 결합 항체 단편(예: Fab, Fv, scFv, sdAb 단편)을 포함하나 이에 제한되지 않는 적어도 하나의 면역글로불린 도메인을 포함하는 다양한 단백질 구조를 포괄한다.

[0039] [80] 본 명세서에 사용된 용어 "항체 단편(antibody fragment)"은 온전한 항체(intact antibody)의 일부를 포함하고 온전한 항체가 결합하는 항원에 결합하는 온전한 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2; 디아바디(diabodies); 선형 항체(linear antibodies); 단일-사슬 항체 분자(single-chain antibody molecules)(예: scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체(multispecific antibodies)를 포함하지만 이에 국한되지는 않는다. 항체 단편은 본 명세서에 기재된 바와 같이 온전한 항체의 단백질 분해 소화(proteolytic digestion) 뿐만 아니라 재조합 숙주 세포(recombinant host cells)(예를 들어, *E. coli* 또는 파지(phage))에 의한 생산을 포함하나 이에 국한되지 않는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0040] [81] 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 항체 단편은 단일 도메인 항체 단편, 단일 사슬 가변 단편, 항체 가변 단편, Fd 단편, Fab(항원-결합 단편), 자율 VH 도메인, 단일 도메인 면역글로불린 유래 영역 VHH, 낙타류(camelid) VHH 단편 또는 VH 도메인 단편 유래 중쇄(heavy-chain) 항체 도메인, 연골 어류(cartilaginous fish) VHH 단편 또는 VH 도메인 단편 유래 중쇄 항체 도메인, 면역글로불린 신규 항원 수용체(IgNAR), VNAR 단편, 디설파이드 안정화 항체 가변(Fv) 단편, 아르마딜로(Armadillo) 반복 폴리펩티드, 피브로넥틴 유래 제10 피브로넥틴 III형 도메인, 테나신(tenascin) III형 도메인, 안키린(ankyrin) 반복 모티브 도메인, 저밀도 리포프로틴 수용체 유래 A-도메인, 리포칼린, 쿠니츠 도메인, 단백질-A 유래 Z 도메인, 감마 B 결정체-유래 도메인, 유비퀴틴-유래 도메인, Sac7d-유래 폴리펩티드, Fyn-유래 SH2 도메인, 미니단백질, C형 렉틴-유사 도메인 스캐폴드 등이다.

[0041] [82] 일부 실시예들에서, 항체 또는 항체 단편은 다가 항체(multivalent antibody)이다. 예를 들어, 항체 또는 항체 단편은 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 이중특이적 탠덤 scFv 단편, 이중특이적 탠덤 VHH 단편, 이중특이적 미니바디 또는 2가(bivalent) 미니바디와 같은 다량체화(multimerizing) scFv 단편일 수 있다.

[0042] [83] 본 명세서에 사용된 용어 "키메라(chimeric)" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 원천(source) 또는 종으로부터 유래되는 반면, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지는 다른 원천 또는 종으로부터 유래되는 항체를 지칭한다.

[0043] [84] 본 명세서에 사용된 "인간화 항체(humanized antibody)"는 비인간 원천으로부터 유래된 아미노산 서열 및/또는 항원 결합에 관여하는 잔기(예: CDR)를 보유하는 것이고, 여기서 하나 이상의 다른 아미노산 서열은 인간 원천(예: 프레임워크 서열)으로부터 유래된다.

[0044] [85] 본 명세서에 사용된 "인간 항체(human antibody)"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생성되거나 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체-암호화 서열을 활용하는 비인간 공급원(source)으로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 비인간 항원-결합 잔기(예: CDR)를 포함하는 인간화 항체를 구체적으로 배제한다. 인간 단일-도메인 항체는 인간 중쇄 또는 인간 경쇄만을 포함하는 항체인데, 그러나 CDR 서열은 천연 발생 또는 합성일 수 있다(예를 들어, U.S. 6,248,516 참조).

[0045] [86] 본 명세서에 사용된 "낙타화된 항체(camelized antibody)"는 비-낙타과의 공급원으로부터 유래된 아미노산 서열을 보유하고 2개의 중쇄를 포함하고 경쇄는 포함하지 않으며 낙타과(camelid)의 공급원 또는 종들로부터 유래된 힌지 영역(hinge region)을 포함하는 것이다.

[0046] [87] 본 명세서에 사용된 용어 "독소(toxin)", "독소 제제(toxin agent)", "독소 성분(toxin component)", 또는 "세포독소(cytotoxin)"는 세포 기능을 억제(inhibit) 또는 방지(prevent)하고, 및/또는 조직 손상을 비롯한 세포 사멸 또는 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 결합 분자 또는 항체 독소 접합체(conjugate)의 독소 성분에는 천연 독소, 생물독소, 단백질성 독소, 독(venom), 세포독소, 소분자 독소, 및 예를 들어 ABx 독소, 리보솜 불활성화 단백질 독소, 아브린, 탄저독소, Aspf1, 부가닌, 브리오딘, 콜릭스 독소, 클라우딘, 디프테리아 독소, 젤로닌, 열에 불안정한 장독소(heat-labile enterotoxin), 미토길린, 페르투시스 독소(pertussis toxin), 포크위드 항바이러스 단백질, 풀첼린(pulchellin), 슈도모나스 엔토톡신 A(*Pseudomonas* exotoxin A), 리스트릭토신(restrictocin), 리신, 사포린, 사르신, 시가 독소 및 서브틸라제 세포독소과 같이 상기 언급된 임의의 것으로부터 유도된 합성 독소(synthetic toxicant); 및 본 명세서에 기재된 또는 당업자에게 알려진 다양한 독소 제제들이 있지만 이에 국한되지는 않는다.

[0047] [88] 본 개시내용의 목적을 위해 그리고 시가 독소 폴리펩티드 서열 또는 시가 독소 유래 폴리펩티드와 관련하여, 용어 "야생형(wild-type)"은 일반적으로 예를 들어, 시가 독소 단백질 서열(들)이 가장 빈번하게 발생하는 변이체 중 하나인 병원성 박테리아와 같은 살아있는 종에서 발견되는 자연 발생 시가 독소 단백질 서열(들)을 지칭한다. 이것은 최소한 하나의 시가 독소 단백질 변이체를 포함하는 해당 종의 자연 발생 개별 유기체의 통계적으로 강력한 수를 샘플링할 때 주어진 종의 개별 유기체의 1퍼센트 미만으로 발견되는 드물게 발생하는 시가 독소 단백질 서열과 대조적이다. 자연 환경 외부에서 분리된 천연 균주의 클론 확장(단리주(isolate)가 생물학적 서열 정보를 포함하는 유기체 또는 분자인지 여부에 관계없이)은 클론 확장이 해당 종의 자연발생적 개체군에 존재하지 않는 새로운 서열 다양성을 도입하지 않는 한 및/또는 서로에 대한 서열 변이들의 상대적 비율을 변경하지 않는 한 자연 발생 요건을 변경하지 않는다.

[0048] [89] "연관된(associated)", "연관되는(associating)", "연결된(linked)" 또는 "연결하는(linking)"이라는 용어는 결합(joined), 부착(attached), 연결(connected), 또는 달리 결합(coupled)되어 단일 분자를 형성하는 분자의 두 개 이상의 구성 요소의 상태 또는 연관(association), 연결(linkage), 부착, 및/또는 두 분자 사이의 기타 연결을 생성하여 단일 분자를 형성하기 위해 서로 결합된 두 분자를 만드는 작용을 지칭한다. 예를 들어, 용어 "연결된(linked)"은 단일 분자가 형성되고 원자 상호작용이 공유 및/또는 비공유일 수 있도록 하나 이상의 원자 상호작용에 의해 연관된 둘 이상의 성분(component)을 지칭할 수 있다. 2개의 성분(component) 사이의 공유 결합의 비제한적 예는 펩티드 결합 및 시스테인-시스테인 디설파이드 결합을 포함한다. 2개의 분자 성분 사이의 비공유 연관(non-covalent associations)의 비제한적 예에는 이온 결합이 포함된다.

[0049] [90] 용어 "연결된(linked)"은 단일 분자가 형성되고 원자 상호작용이 적어도 하나의 공유 결합(covalent bond)을 포함하도록 하나 이상의 원자 상호작용에 의해 연관된 둘 이상의 분자 성분을 지칭한다. "연결하는(linking)"이라는 용어는 전술한 바와 같이 연결된 분자를 생성하는 작용을 의미한다.

[0050] [91] 본 명세서에서 "링커(linker)"는 scFv 및/또는 다른 단백질 및 단백질 융합 구조에서 사용되는 것과 같이 2개의 단백질 도메인을 함께 연결하는 도메인 링커를 의미한다. 예를 들어, "결합 영역 링커(binding region linker)"는 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드를 결합 영역과 연결하는 데 사용될 수 있고 "scFv 링커"는

scFv에서 VH 및 VL을 연결하는 데 사용될 수 있다. "절단 가능한 스페이서(cleavable spacer)"는 하나 이상의 프로테아제에 대한 절단 부위(cleavage site)를 포함하는 링커 유형이다. 일반적으로, 각 도메인이 그 생물학적 기능을 유지할 수 있도록 충분한 길이와 유연성으로 두 도메인의 재조합 부착을 허용하는 재조합 기술에 의해 생성된 전통적인 펩티드 결합을 포함하여 사용할 수 있는 적합한 링커가 많이 있다. 일부 실시예들에서, 링커 펩티드는 주로 다음 아미노산 잔기를 포함할 수 있다: Gly, Ser, Ala, 또는 Thr. 링커 펩티드는 원하는 활성을 유지하도록 서로에 대해 올바른 형태를 띠는 방식으로 두 분자를 연결하기에 적합한 길이를 가져야 한다. 일부 실시예들에서, 링커는 길이가 약 1 내지 약 50개 아미노산이다. 일부 실시예들에서, 링커는 길이가 약 1 내지 약 30개 아미노산이다. 일 실시예에서, 1 내지 20개 아미노산 길이의 링커가 사용될 수 있으며, 일부 실시예들에서는 약 5 내지 약 10개 아미노산을 가진 링커가 사용될 수 있다. 유용한 링커는 예를 들어 (GS)n(SEQ ID NO: 201), (GSGGS)n(SEQ ID NO: 202), (GGGGS)n(SEQ ID NO: 203), 및 (GGGS)n(SEQ ID NO: 204)를 포함하는 글리신-세린 중합체(여기서 n은 1 이상의 정수, 일반적으로 3 내지 4), 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체, 및 기타 유연한 링커들을 포함한다. 대안적으로, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체를 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 비단백질성 중합체가 링커로서 사용될 수 있다. 다른 링커 서열은 CL/CH1 도메인의 모든 잔기가 아닌 임의의 길이의 임의의 서열을 포함할 수 있으며, CL/CH1 도메인의 처음 5-12개 아미노산 잔기를 예로 들 수 있다. 링커는 또한 예를 들어 Ck 또는 Cl와 같은 면역글로불린 경쇄로부터 유래할 수 있다. 링커는 예를 들어 Cg1, Cg2, Cg3, Cg4, Ca1, Ca2, Cd, Ce, 및 Cm를 포함하는 임의의 아이소타입(isotype)의 면역글로불린 중쇄로부터 유래될 수 있다. 링커 서열은 또한 Ig-유사 단백질(예를 들어, TCR, FcR, KIR), 힌지 영역 유래 서열, 및 다른 단백질로부터의 다른 천연 서열과 같은 다른 단백질로부터 유래될 수 있다. 임의의 적절한 링커가 사용될 수 있지만, 일부 실시예는 예를 들어 (GS)n(SEQ ID NO: 201), (GSGGS)n(SEQ ID NO: 202), (GGGGS)n(SEQ ID NO: 203), 및 (GGGS)n(SEQ ID NO: 204)을 포함하는 글리신-세린 중합체를 활용하며, 여기서 n은 적어도 1(및 일반적으로 2 내지 3 내지 4 내지 5)의 정수이다. "scFv 링커"는 일반적으로 이러한 글리신-세린 중합체를 포함한다.

[0051] [92] "융합된(fused)"이라는 용어는 펩티드 결합이 카복실산기의 탄소 원자의 참여를 포함하는지 또는 예를 들어 α-탄소, β-탄소, γ-탄소, σ-탄소 등과 같은 다른 탄소 원자를 포함하는지 여부에 관계없이 펩티드 결합인 적어도 하나의 공유 결합에 의해 연관된 둘 이상의 단백질성 성분을 의미한다. 함께 융합된 2개의 단백질성 성분의 비제한적인 예는, 예를 들어 생성된 분자가 단일의 연속적인 폴리펩티드가 되도록 펩티드 결합을 통해 폴리펩티드에 융합된 아미노산, 펩티드, 또는 폴리펩티드를 포함한다. 용어 "융합(fusing)"은 예를 들어 번역될 때 단일 단백질성 분자를 생성하는 유전자 영역의 재조합 융합으로부터 생성된 융합 단백질과 같이 위에서 기술된 바와 같은 융합된 분자를 생성하는 작용를 지칭한다.

[0052] [93] 기호 "::"는 연속적인 폴리펩티드를 형성하기 위해 물리적으로 함께 연결되기 전후의 폴리펩티드 영역들을 의미한다.

[0053] [94] 본 명세서에 사용된 용어 "발현된(expressed)", "발현하는(expressing)", 또는 "발현하다(expresse)" 및 이들의 문법적 변형들은 폴리뉴클레오티드 또는 핵산의 단백질로의 번역을 지칭한다. 발현된 단백질은 세포 내에 남아 있거나, 세포 표면 막의 성분이 되거나, 세포 외 공간으로 분비될 수 있다.

[0054] [95] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 적어도 하나의 세포 표면에서 상당한 양의 세포 외 표적 생체분자를 발현하는 세포는 "표적 양성 세포(target positive cell)", "표적+ 세포(target+ cell)" 또는 "+ve 세포(+ve cells)"이고 특정된 세포 외 표적 생체분자에 물리적으로 결합된 세포이다.

[0055] [96] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 기호 "α"는 기호 다음의 생체분자에 결합할 수 있는 면역글로불린형 결합 영역의 약칭이다. 기호 "α"는 10^{-5} 이하의 해리 상수(K_D)로 기술되는 결합 친화도로 기호 다음의 생체 분자에 결합하는 능력을 기반으로 하는 면역글로불린 유형 결합 영역의 기능적 특성을 나타내는 데 사용된다.

[0056] [97] 본 명세서에 사용된 용어 "중쇄 가변(V_H) 도메인" 또는 "경쇄 가변(V_L) 도메인"은 각각 임의의 항체 V_H 또는 V_L 도메인(예: 인간 V_H 또는 V_L 도메인) 뿐만 아니라 상응하는 천연 항체(예를 들어, 천연 뮤린 V_H 또는 V_L 도메인으로부터 유래된 인간화 V_H 또는 V_L 도메인)의 적어도 정성적 항원 결합 능력을 유지하는 이의 임의의 유도체를 지칭한다. V_H 또는 V_L 도메인은 3개의 CDR 또는 ABR에 의해 중단된(interrupted) "프레임워크" 영역으로 구성된다. 본 명세서에 사용된 용어 "프레임워크" 또는 "FR"은 초가변(hypervariable) 영역(HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인(FR1, FR2, FR3, 및 FR4)으로 구성된다. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH(또는 VL)에서 하기 서열로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-

H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4. 프레임워크 영역은 항원의 에피토프에 대한 특이적 결합을 위해 CDR 또는 ABR을 정렬하는 역할을 한다. 아미노-말단에서 카복시-말단까지, VH 및 VL 도메인 모두는 하기 프레임워크(FR) 및 CDR 영역 또는 ABR 영역을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4; 또는, 유사하게, FR1, ABR1, FR2, ABR2, FR3, ABR3, 및 FR4. 본 명세서에서 "HCDR1", "HCDR2", 또는 "HCDR3"이라는 용어는 V_H 도메인에서 각각 CDR 1, 2, 또는 3을 지칭하는 것으로 사용되며, 용어 "LCDR1", "LCDR2", 및 "LCDR3"은 V_L 도메인에서 각각 CDR 1, 2, 또는 3을 나타내는 데 사용된다. 본 명세서에서 "HABR1", "HABR2", 또는 "HABR3"이라는 용어는 V_H 도메인에서 각각 ABR 1, 2, 또는 3을 지칭하는 것으로 사용되며, 용어 "LABR1", "LABR2", 또는 "LABR3"은 V_L 도메인에서 각각 CDR 1, 2, 또는 3을 나타내는 데 사용된다. 낙타류 V_HH 단편, 연골 어류의 IgNAR, V_{NAR} 단편, 특정 단일 도메인 항체, 및 이들의 유도체의 경우 동일한 기본 배열을 포함하는 단일 중쇄 가변 도메인이 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4. 본 명세서에서 사용된 용어 "HCDR1", "HCDR2", 또는 "HCDR3"은 단일 중쇄 가변 도메인에서 각각 CDR 1, 2, 또는 3을 지칭하기 위해 사용될 수 있다. 단일 V_H 또는 V_L 도메인은 항원 결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다.

[0057] [98] "효과기(effector)"라는 용어는 세포독성, 생물학적 신호전달, 효소 촉매 작용, 세포 이하 라우팅, 및/또는 분자간 결합과 같은 생물학적 활성을 제공하여 알로스테릭 효과(들) 및/또는 하나 이상의 인자 모집을 초래하는 것을 의미한다.

[0058] [99] "시가 독소 효과기 폴리펩티드(Shiga toxin effector polypeptide)", "시가 독소 효과기 폴리펩티드 영역", 및 "시가 독소 효과기 영역"이라는 어구는 시가 독소 패밀리의 구성원의 적어도 하나의 시가 독소 A 서브유닛으로부터 유래된 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 영역을 지칭하고, 여기서 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 영역은 적어도 하나의 시가 독소 기능을 나타낼 수 있다. 예를 들어, SEQ ID NO: 40-68은 StxA 및 SLT-1A에서 파생된다.

[0059] [100] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 시가 독소 효과기 기능은 시가 독소 A 서브유닛으로부터 유래된 폴리펩티드 영역에 의해 부여되는 생물학적 활성이다. 시가 독소 효과기 기능의 비제한적 예에는 세포 진입 촉진; 지질막 변형; 세포 내재화 촉진; 클라트린 매개 엔도사이토시스 자극; 예를 들어, 골지체, 소포체, 및 세포질과 같은 다양한 세포 내 구획으로의 세포 내 라우팅 지시; 카고로 세포 내 라우팅 지시; 리보솜 기능(들) 억제; 예를 들어 N-글리코시다제 활성 및 촉매적으로 리보솜을 억제하는 것과 같은 촉매 활성; 단백질 합성 감소; 카스파제 활성 유도, 효과기 카스파제 활성화, 세포 증식 억제 효과, 및 세포 독성 등을 포함한다. 시가 독소 촉매 활성은 예를 들어 리보솜 불활성화, 단백질 합성 억제, N-글리코시다제 활성, 폴리뉴클레오티드:아데노신 글리코시다제 활성, RNAase 활성, 및 DNAase 활성을 포함한다. 시가 독소는 리보솜 비활성화 단백질(RIP)이다. RIP는 핵산, 폴리뉴클레오시드, 폴리뉴클레오티드, rRNA, ssDNA, dsDNA, mRNA(및 polyA), 및 바이러스 핵산을 탈퓨린화(depurinate)할 수 있다(*참조:* Barbieri L et al., *Biochem J* 286: 1-4 (1992); Barbieri L et al., *Nature* 372: 624 (1994); Ling J et al., *FEBS Lett* 345: 143-6 (1994); Barbieri L et al., *Biochem J* 319: 507-13 (1996); Roncuzzi L, Gasperi-Campani A, *FEBS Lett* 392: 16-20 (1996); Stirpe F et al., *FEBS Lett* 382: 309-12 (1996); Barbieri L et al., Nucleic Acids Res 25: 518-22 (1997); Wang P, Tumer N, *Nucleic Acids Res* 27: 1900-5 (1999); Barbieri L et al., *Biochim Biophys Acta* 1480: 258-66 (2000); Barbieri L et al., *J Biochem* 128: 883-9 (2000); Brigotti M et al., *Toxicon* 39: 341-8 (2001); Brigotti M et al., *FASEB J* 16: 365-72 (2002); Bagga S et al., *J Biol Chem* 278: 4813-20 (2003); Picard D et al., *J Biol Chem* 280: 20069-75 (2005)). 일부 RIP는 항바이러스 활성 및 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(dismutase) 활성을 나타낸다(Erice A et al., *Antimicrob Agents Chemother* 37: 835-8 (1993); Au T et al., *FEBS Lett* 471: 169-72 (2000); Parikh B, Tumer N, *Mini Rev Med Chem* 4: 523-43 (2004); Sharma N et al., *Plant Physiol* 134: 171-81 (2004) 등 참조). 시가 독소 촉매 활성은 시험관 내 및 생체 내 모두에서 관찰되었다. 시가 독소 효과기 활성에 대한 분석의 비제한적 예는 다양한 활성, 예를 들어 단백질 합성 억제 활성, 탈퓨린화 활성, 세포 성장 억제, 세포독성, 초나선(supercoiled) DNA 이완 활성, 및 뉴클레아제 활성을 측정한다.

[0060] [101] 용어 "IC50" 또는 "IC_{50}"은 시험관 내 리보솜 기능 시험에서 사용하여 측정된 최대 억제 농도의 절반을 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 용어 "CD50" 또는 "CD_{50}"은 시험관 내 세포 사멸 및/또는 생존 분석에서 최대 세포독성 농도의 절반을 나타내기 위해 본 명세서에서 사용된다. "EC50" 또는 "EC_{50}"이라는 용어는 최대 반응의 절반(예를 들어, 신호전달의 억제)을 제공하는 농도를 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 숙련된 기

술자는 문맥을 고려할 때 이러한 용어 각각의 의미를 쉽게 이해할 것이다. IC_{50}, CD_{50}, 및 EC_{50} 각각은 서로 다른 분자 농도 또는 농도 계열을 사용하여 다중 데이터 포인트를 생성하여 측정할 수 있다. 일부 샘플의 경우 정확한 곡선 피팅(fitting)에 필요한 데이터 포인트를 수집할 수 없기 때문에 IC_{50} 또는 CD_{50}에 대한 정확한 값을 얻지 못할 수 있다. 예를 들어, 이론적으로 IC_{50}과 CD_{50}은 각각 50% 이상의 리보솜 억제 또는 세포 사멸이 주어진 샘플에 대한 농도 시리즈에서 발생하지 않는 경우 결정할 수 없다. 곡선을 정확하게 피팅하기에 데이터가 불충분하면 실제 분자 활성을 나타내는 것으로 간주되어서는 안 된다.

[0061] [102] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 시가 독소 효과기 기능의 보유는 재현성을 갖는 적절한 정량 분석에 의해 측정된 바와 같이 야생형 시가 독소 효과기 폴리펩티드 대조군(시가 독소 A1 단편) 또는 동일한 조건하에서 야생형 시가 독소 효과기 폴리펩티드(예를 들어, 시가 독소 A1 단편)를 포함하는 PD-L1 결합 분자와 비교할 만한 시가 독소 기능 활성의 수준을 나타낼 수 있다. 리보솜 비활성화 또는 리보솜 억제의 시가 독소 효과기 기능의 경우, 보유된 시가 독소 효과기 기능은 예를 들어 숙련된 작업자에게 알려진 분석 및/또는 본 명세서에 기술된 분석을 사용하여 시험관 내 세팅에서 10,000pM 이하의 IC_{50}을 나타낸다. 표적 양성 세포-사멸 분석에서 세포독성의 시가 독소 효과기 기능의 경우, 유지된 시가 독소 효과기 기능은 예를 들어 숙련된 작업자에게 알려진 및/또는 본 명세서에 기재된 분석을 사용하여, 보여진 바와 같이, 세포주 및 적절한 세포 외 표적 생체분자의 발현에 따라 1,000nM 이하의 CD_{50}을 나타낸다.

[0062] [103] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 리보솜 억제와 관련하여 "동등한(equivalent)"이라는 용어는 재현성이 있는 적절한 정량 분석에 의해 측정된 리보솜 억제 활성의 경험적으로 측정된 수준을 의미하며, 이는 재현성을 갖고 동일한 조건하의 참조 분자(reference molecule)(예를 들어, 제2 PD-L1 결합 분자 또는 제3 PD-L1 결합 분자)의 활성의 10% 이내이다.

[0063] [104] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 세포독성과 관련하여 "동등한"이라는 용어는 재현성을 갖는 적절한 정량적 분석에 의해 측정된 바와 같이 세포독성의 경험적으로 측정된 수준을 의미하여, 이는 재현성을 갖고 동일한 조건하의 참조 분자(예를 들어, 제2 PD-L1 결합 분자 또는 제3 결합 분자)의 활성의 10% 이내이다.

[0064] [105] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 세포독성과 관련하여 "약독화된(attenuated)"이라는 용어는 동일한 조건하에 참조 분자에 의해 나타나는 CD_{50}의 10배 내지 100배 사이의 CD_{50}을 나타내거나 나타내었던 분자를 의미한다.

[0065] [106] 시가 독소 효과기 기능 활성 수준을 결정할 때 부정확한 IC_{50} 및 CD_{50} 값을 고려해서는 안 된다. 일부 샘플의 경우, 정확한 곡선 피팅에 필요한 데이터 포인트를 수집할 수 없기 때문에 IC_{50} 또는 CD_{50}에 대한 정확한 값을 얻지 못할 수 있다. 예를 들어, 이론적으로 IC_{50}과 CD_{50}은 각각 50% 이상의 리보솜 억제 또는 세포 사멸이 주어진 샘플에 대한 농도 시리즈에서 발생하지 않는 경우 결정할 수 없다. 예를 들어 아래 실시예에 설명된 분석과 같은 예시적인 시가 독소 효과기 기능 분석의 데이터 분석에 설명된 대로 곡선을 정확히 피팅(fitting)하기에 데이터가 불충분하면 실제 시가 독소 효과기 기능을 대표하는 것으로 간주되어서는 안 된다.

[0066] [107] 시가 독소 효과기 기능의 활성을 감지하지 못하는 것은 세포 진입, 세포 이하 라우팅, 및/또는 효소 활성의 부족이라기보다는 부적절한 발현, 폴리펩티드 폴딩(folding), 및/또는 단백질 안정성 때문일 수 있다. 시가 독소 효과기 기능에 대한 분석은 상당한 양의 시가 독소 효과기 기능 활성을 측정하기 위해 많은 폴리펩티드를 필요로 하지 않을 수 있다. 효과기 기능이 낮거나 없는 근본적인 원인이 단백질 발현 또는 안정성과 관련하여 경험적으로 결정되는 한, 시가 독소 기능적 효과기 활성이 회복되고 측정될 수 있도록 당업자는 당업계에 공지된 단백질 화학 및 분자 공학 기술을 사용하여 이러한 요인을 보상할 수 있다. 예를 들어, 부적절한 세포 기반 발현은 다른 발현 조절 서열을 사용하여 보상될 수 있다. 부적절한 폴리펩티드 폴딩 및/또는 안정성은 안정화 말단 서열, 또는 분자의 3차원 구조를 안정화시키는 비-효과기 영역의 보상 돌연변이로부터 유익을 얻을 수 있다.

[0067] [108] 특정 시가 독소 효과기 기능, 예를 들어 세포 이하 라우팅 기능은 쉽게 측정할 수 없다. 예를 들어, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 세포독성 및/또는 이종 에피토프 전달의 실패가 부적절한 세포 이하 경로로 인한 것인지 구별하기 위한 일상적인 정량 분석은 없지만 시험이 가능한 시점에서 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 적절한 야생형 시가 독소 효과기 폴리펩티드와 비교하여 임의의 유의한 수준의 세포 이하 라우팅에 대해 분석될 수 있다. 그러나, 결합 분자의 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분이 야생형 시가 독소 A 서브유닛 구조체

(construct)에 비교할 수 있거나 동등한 세포독성을 나타내는 경우, 세포 이하(subcellular) 라우팅 활성 수준은 최소한 시험된 환경하에서 각각 야생형 시가 독소 A 구조체의 세포 이하 라우팅 활성과 유사하거나 동등한 것으로 추론된다.

[0068] [109] 개별 시가 독소 기능에 대한 새로운 분석이 가능해지면 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및/또는 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하는 결합 분자를 야생형 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 활성의 1000배 또는 100배 이내에 있다든지, 또는 기능적 녹아웃 시가 독소 효과기 폴리펩티드와 비교하여 3배 내지 30배의 활성을 시현한다든지 그렇게 시가 독소 효과기 기능의 모든 수준에 대해 분석할 수 있다.

[0069] [110] 충분한 세포 이하 라우팅은 세포독성 분석, 예를 들어 T-세포 에피토프 제시에 기초한 세포독성 분석 또는 세포질 및/또는 소포체-국소화, 표적 기질(substrate)을 포함하는 독소 효과기 기능에 기초한 세포독성 분석에서 분자의 세포독성 활성 수준을 관찰함으로써 단순히 추론될 수 있다.

[0070] [111] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "유의한(significant)" 시가 독소 효과기 기능의 보유는 야생형 시가 독소 효과기 폴리펩티드 대조군(예: 시가 독소 A1 단편)에 재현성을 갖고 비교할 수 있는 적절한 정량적 분석에 의해 측정되는 것과 같은 시가 독소 기능 활성의 수준을 지칭한다. 시험관 내 리보솜 억제의 경우, 유의한 시가 독소 효과기 기능은 분석에 사용된 리보솜의 원천(예: 박테리아, 고세균, 또는 진핵생물(조류, 진균, 식물, 또는 동물))에 따라 300pM 이하의 IC_{50}을 나타낸다. 이는 촉매적으로 파괴된 SLT-1A 1-251 이중 돌연변이체(Y77S/E167D)에 대한 100,000pM의 대략적인 IC_{50}과 비교하여 상당히 더 큰 억제이다. 실험실 세포 배양에서 표적 양성 세포 사멸 분석에서 세포독성의 경우, 유의한 시가 독소 효과기 기능은 결합 영역의 표적 생체분자(들) 및 세포 유형, 특히 평가되는 분자에 의해 표적화된 적절한 세포 외 표적 생체분자(들) 및/또는 세포 외 에피토프(들)의 세포 유형의 발현 및/또는 세포 표면 발현에 따라 100, 50, 30 nM, 또는 그 이하의 CD_{50}을 나타낸다. 이것은 세포주에 따라 CD_{50}이 100-10,000nM인, 세포 표적화 결합 영역이 없는 시가 독소 A 서브유닛 단독(또는 야생형 시가 독소 A1 단편)과 비교하여 적절한 표적 양성 세포 집단에 대해 훨씬 더 큰 세포 독성이다.

[0071] [112] 본 개시의 목적을 위해, 그리고 본 명세서에 기재된 바와 같은 분자의 시가 독소 효과기 기능과 관련하여, 용어 "합리적인 활성(reasonable activity)"은 천연 발생 시가 독소를 포함하는 분자와 관련하여 본 명세서에 정의된 것과 같이 시가 독소 효과기 활성의 적어도 중간 정도의 수준(예를 들어 11배 내지 1,000배)을 나타내는 것을 지칭하고, 여기서 시가 독소 효과기 활성은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된다: 내재화 효율, 세포질로의 세포 이하 라우팅 효율, 표적 세포(들)에 의한 전달된 에피토프 제시, 리보솜 억제 및 세포독성. 세포독성의 경우, 합리적인 수준의 시가 독소 효과기 활성은 야생형 시가 독소 구조체의 1,000배 이내, 예를 들어 야생형 시가 독소 구조체(예: 야생형 시가 독소 A1 단편을 포함하는 결합 분자)가 0.5nM의 CD_{50}을 나타낼 때 500nM 이하의 CD_{50}을 나타내는 것을 포함한다.

[0072] [113] 본 개시의 목적을 위해, 그리고 본 명세서에 기재된 바와 같은 분자의 세포독성과 관련하여, 용어 "최적(optimal)"은 야생형 시가 독소 A1 단편(예: 시가 독소 A 서브유닛 또는 이의 특정 절단 변이체) 및/또는 자연 발생 시가 독소를 포함하는 분자의 세포독성의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10-배 이내인 시가 독소 촉매 도메인 매개 세포독성의 수준을 지칭한다.

[0073] [114] 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 세포독성이 야생형 시가 독소 A 서브유닛 또는 이의 단편에 비해 감소하더라도 실제로는 약독화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 사용하는 적용이 야생형 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 사용하는 것보다 동일하거나 보다 효과적일 수 있는데 그것은 가장 높은 효능 변이체는 감소된 세포독성-효능 변이체에서 최소화된 또는 감소된 바람직하지 못한 효과를 나타낼 수 있기 때문이다. 야생형 시가 독소는 매우 강력하여 단 하나의 독소 분자가 중독된(intoxicated) 세포의 세포질에 도달한 후 또는 아마도 40개의 독소 분자가 중독된 세포로 내부화된 후에 중독된 세포를 죽일 수 있다. 야생형 시가 독소 효과기 폴리펩티드와 비교하여 세포 이하 라우팅(subcellular routing) 또는 세포독성과 같은 시가 독소 효과기 기능이 상당히 감소된 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 예를 들어, 표적화된 세포-사멸, 이종 에피토프 전달, 및/또는 특정 세포 및 이들의 세포 이하 구획의 검출과 같은 실제 적용에 대해 여전히 충분히 강력할 것이다. 또한, 특정한 감소-활성 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 카고(예: 추가 외인성 물질 또는 T-세포 에피토프)를 표적 세포의 특정 세포 내 위치 또는 세포 이하 구획으로 전달하는 데 특히 유용할 수 있다.

[0074] [115] 본 명세서에 사용된 "항체 효과기 기능(antibody effector function)"이라는 어구는 항체 아이소타입에 따라 달라지는 항체 또는 이의 유도체의 Fc 영역에 기인할 수 있는 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 효과기 기

능의 예는 다음을 포함한다: C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성(complement dependent cytotoxicity, CDC); Fc 수용체 결합(신생(neonatal) Fc 수용체(FcRn) 또는 브람벨 수용체(Brambell receptor) 포함), 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC); 식균 작용(phagocytosis); 세포 표면 수용체(예: PD-L1)의 하향 조절; T-세포 활성화 및 B-세포 활성화.

[0075] [116] 분자의 세포독성 활성과 관련하여 용어 "선택적 세포독성(selective cytotoxicity)"은 생체분자 표적 양성 세포 집단(예: 표적 세포-유형)과 비표적 방관자 세포 집단(예: 생체분자 표적 음성 세포-유형) 사이의 상대적인 세포독성 수분을 지칭하고, 이는 표적 세포 유형에 대한 반-최대 세포 독성 농도(CD_{50}) 대 비표적 세포 유형에 대한 CD_{50}의 비율로 표현될 수 있고 표적화 세포 대 비표적화 세포의 세포독성 선택성 측정 기준 또는 사멸 우선순위 표시를 제공할 수 있다.

[0076] [117] 주어진 세포 외 표적 생체분자(또는 주어진 표적 생체분자의 세포 외 에피토프)의 세포 표면 표현 및/또는 밀도는 특정 결합 분자가 가장 적합하게 사용될 수 있는 응용 분야에 영향을 미칠 수 있다. 세포들 사이의 주어진 표적 생체분자의 세포 표면 표현 및/또는 밀도의 차이는 세포 내재화의 효율성 및/또는 주어진 결합 분자의 세포독성 효능을 양적 및 질적으로 모두 변경할 수 있다. 주어진 표적 생체분자의 세포 표면 표현 및/또는 밀도는 표적 생체분자 양성 세포 간에 또는 심지어 세포 주기 또는 세포 분화의 상이한 지점에서 동일한 세포에서조차 크게 다를 수 있다. 특정 세포 또는 세포 집단에 대한 주어진 표적 생체분자 및/또는 주어진 표적 생체분자의 특정 세포 외 에피토프의 전체 세포 표면 표현은 FACS(fluorescence-activated cell sorting) 유세포분석과 같이 숙련된 작업자에게 알려진 방법을 사용하여 결정할 수 있다.

[0077] [118] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 폴리펩티드 영역 또는 폴리펩티드 내의 특징과 관련하여 용어 "파괴된(disrupted)", "파괴(disruption)", 또는 "파괴하는(disrupting)" 및 이들의 문법적 변형들은 그 영역 내의 또는 파괴된 특징을 구성하는 적어도 하나의 아미노산의 변경을 지칭한다. 아미노산 변경은 다양한 돌연변이, 예를 들어, 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변경하는 결실(deletion), 역위(inversion), 삽입(insertion), 또는 치환(substitution)을 포함한다. 아미노산 변경은 또한 화학적 변화, 예를 들어 아미노산 작용기의 하나 이상의 원자 변경 또는 아미노산 작용기에 대한 하나 이상의 원자의 추가를 포함한다.

[0078] [119] 본 명세서에 사용된 "탈면역화된(de-immunized)"은 참조 분자(reference molecule), 예를 들어, 야생형 펩티드 영역, 폴리펩티드 영역, 또는 폴리펩티드와 비교하여 척색동물(chordate)에 투여한 후 항원성 및/또는 면역원성 잠재력이 감소된 것을 의미한다. 이것은 참조 분자와 비교하여 하나 이상의 새로운, 항원 및/또는 면역원성 에피토프의 도입에도 불구하고 전반적인 항원성 및/또는 면역원성 잠재력의 감소를 포함한다. 일부 실시예들에서, "탈면역화된"은 예를 들어 야생형 시가 독소 A1 단편 또는 전술한 것을 포함하는 결합 분자와 같이 그것이 유해된 “모(parental)” 분자와 비교하여 포유동물에 투여한 후 감소된 항원성 및/또는 면역원성을 나타내는 분자를 의미한다. 일부 실시예들에서, 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 참조 “모” 분자와 비교하여 예를 들어, 정량적 ELISA 또는 웨스턴 블롯 분석과 같이 숙련된 작업자에게 알려진 및/또는 본 명세서에 기술된 분석과 같이 동일한 분석에 의해 동일한 조건하에서 측정된 참조 분자의 항원성보다 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 이상 감소된 상대적 항원성을 나타낼 수 있다. 일부 실시예들에서, 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 동일한 분석, 예를 들어 주어진 시점에서 분자의 비경구 투여(parenteral administration)를 받은 후 포유동물(들)에서 생성된 항-분자 항체의 정량적 측정과 같이 숙련된 작업자에게 알려진 및/또는 본 명세서에 기술된 분석에 의해 동일한 조건하에서 측정되었을 때 참조 “모(parental)”분자와 비교하여 참조 분자의 면역원성보다 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 그 이상 감소된 상대적 면역원성을 나타낼 수 있다.

[0079] [120] 예시적인 결합 분자의 상대적 면역원성은 일정 기간 동안 반복 비경구 투여 후 결합 분자에 대한 생체 내 항체 반응에 대한 분석을 사용하여 결정하였다.

[0080] [121] "탈면역화된 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포"라는 어구는 B-세포 항원성 또는 면역원성 및/또는 CD4+ T-세포 항원성 또는 면역원성과 관련하여 포유동물에 투여한 후 분자가 감소된 항원성 및/또는 면역원성 잠재력을 갖는다는 것을 의미한다. 일부 실시예들에서, "탈면역화된 B-세포"는 분자가 예를 들어 야생형 시가 독소 A1 단편과 같이 그것이 유래된 “모” 분자와 비교하여 포유동물에 투여한 후 감소된 B-세포 항원성 및/또는 면역원성을 나타내었다는 것을 의미한다. 일부 실시예들에서, "CD4+ T-세포 탈면역화된(CD4+ T-cell de-immunized)"이라는 어구는 분자가 예를 들어, 야생형 시가 독소 A1 단편과 같이 그것이 유래된 “모” 분자에 비교하여 포유동물에 투여 후 감소된 CD4 T-세포 항원성 및/또는 면역원성을 나타내었다는 것을 의미한다.

[0081] [122] 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 B-세포 에피토프, CD4+ T-세포 에피토프, B-세포 에피토프 영역, 또는 CD4+ T-세포 에피토프 영역과 관련된 용어 "내인성(endogenous)"은 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 존재하는 에피토프를 지칭한다.

[0082] [123] "CD8+ T-세포 과면역화된(CD8+ T-cell hyper-immunized)"이라는 어구는 분자가 살아있는 척색동물 내의 유핵의(nucleated) 척색동물 세포 내부에 존재할 때 CD8+ T-세포 항원성 또는 면역원성과 관련하여 증가된 항원성 및/또는 면역원성 잠재력을 가짐을 의미한다. 일반적으로, CD8+ T-세포 면역화된 분자는 고유한 특징(들) 또는 결합 분자의 성분으로 인해 유핵의 척색 세포의 초기 엔도솜 구획(early endosomal compartment)으로 세포 내재화할 수 있다.

[0083] [124] "이종(heterologous)"이라는 용어는 자연적으로 발생하는 시가 독소의 A 서브유닛과 다른 원천을 의미한다. 예를 들어, 이종 폴리펩티드는 천연 시가 독소의 A 서브유닛의 일부로 자연적으로 발견되지 않는다. 결합 분자의 T-세포 에피토프 또는 T-세포 에피토프-펩티드 성분과 관련하여 용어 "이종"은 본 명세서에 기재된 바와 같은 내장(embedding), 융합, 삽입, 및/또는 아미노산 치환의 과정을 통해서든 또는 임의의 다른 공학적 수단에 의해 첨가되든 간에 변형될 폴리펩티드 성분에서 초기에 발생하지 않았지만 추가된 에피토프 또는 펩티드 서열을 지칭한다. 결과는 원래의 비변형된 폴리펩티드에 외래(foreign)인 T-세포 에피토프를 포함하는 변형된 폴리펩티드이다. 즉 그 T-세포 에피토프는 원래의 폴리펩티드에 존재하지 않았다.

[0084] [125] 결합 분자의 T-세포 에피토프 또는 T-세포 에피토프-펩티드 성분과 관련하여 용어 "내장된(embedded)" 및 그의 문법적 변형은 출발 폴리펩티드 영역과 동일한 총 아미노산 잔기 수를 공유하는 새로운 폴리펩티드 서열을 생성하기 위해 폴리펩티드 영역 내의 하나 이상의 아미노산을 상이한 아미노산으로 내부 대체하는 것을 지칭한다. 따라서, "내장된"이라는 용어는 출발 폴리펩티드에 대한 임의의 추가 아미노산, 펩티드, 또는 폴리펩티드 성분의 임의의 외부 말단 융합 또는 임의의 추가 아미노산 잔기의 임의의 추가 내부 삽입을 포함하지 않으며, 오히려 기존 아미노산에 대한 치환만을 포함한다. 내부 대체(replacement)는 단순히 아미노산 잔기 치환에 의해 또는 일련의 치환, 결실, 삽입, 및/또는 역위(inversion)에 의해 달성될 수 있다. 하나 이상의 아미노산 삽입이 사용되는 경우 내장된 T-세포 에피토프를 생성하기 위해 동일한 수의 근위 아미노산이 삽입 옆에서 결실되어야 한다. 이것은 결합 분자의 폴리펩티드 성분 내에 포함된 T-세포 에피토프와 관련하여 "삽입된(inserted)"이라는 용어를 사용하여 폴리펩티드 내에 하나 이상의 아미노산이 삽입되어 출발 폴리펩티드와 비교하여 증가된 수의 아미노산 잔기를 갖는 새로운 폴리펩티드가 생성되는 것과 대조된다.

[0085] [126] 결합 분자의 폴리펩티드 성분 내에 함유된 T-세포 에피토프와 관련하여 용어 "삽입된(inserted)" 및 이의 문법적 변형들은 출발 폴리펩티드(starting polypeptide)와 비교하여 증가한 수의 아미노산 잔기를 갖는 새로운 폴리펩티드 서열을 초래하도록 폴리펩티드 내에 하나 이상의 아미노산들이 삽입되는 것을 지칭한다. T-세포 에피토프-펩티드의 "순수한(pure)" 삽입은 생성된 폴리펩티드의 길이가 삽입된 전체 T-세포 에피토프-펩티드의 아미노산 잔기 수와 동일한 아미노산 잔기 수만큼 증가할 때이다. 결합 분자의 폴리펩티드 성분 내에 함유된 T-세포 에피토프와 관련하여 "부분적으로 삽입된(partially inserted)", "내장된 및 삽입된(embedded and inserted)"이라는 어구 및 이들의 문법적 변형들은 생성된 폴리펩티드의 길이가 증가하지만 삽입된 전체 T-세포 에피토프 펩티드의 길이와 동등한 아미노산 잔기의 수보다는 적게 증가한다는 것을 지칭한다. "순수한" 또는 "부분적인" 삽입은 폴리펩티드 내의 삽입 부위에 근접하지 않은 폴리펩티드의 다른 영역들이 결실되어 최종 폴리펩티드가 여전히 폴리펩티드 영역 내에 T-세포 에피토프-펩티드의 하나 이상의 아미노산의 내부 삽입을 포함하기 때문에 최종 폴리펩티드의 전체 길이가 감소되는 결과가 그로 말미암아 초래되더라도 이전에 기재된 임의의 삽입을 포함한다.

[0086] [127] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 분자의 기능적 활성을 기술할 때 용어 "T-세포 에피토프 전달(T-cell epitope delivering)"은 분자가 세포 내에서 T-세포 에피토프-펩티드를 포함하는 분자의 단백질성 부분의 프로테아좀 절단을 야기할 수 있는 하위세포 구획으로의 국소화의 생물학적 활성을 제공한다는 의미한다. 분자의 "T-세포 에피토프 전달" 기능은 분자가 외인성으로 투여되거나 분석이 하나 이상의 엔도솜 구획에 분자를 포함하는 세포에서 시작된 세포 표면에서 분자의 T-세포 에피토프-펩티드 카고의 MHC 제시를 관찰함으로써 분석될 수 있다. 일반적으로, T-세포 에피토프를 프로테아좀으로 전달하는 분자의 능력은 "T-세포 에피토프 전달" 분자의 초기 위치가 세포의 초기 엔도솜 구획이고, 그 다음 분자가 경험적으로 세포의 프로테아좀에 에피토프-펩티드를 전달하는 것으로 나타나는 곳에서 결정될 수 있다. 그러나, "T-세포 에피토프 전달" 능력은 분자가 세포 외 위치에서 시작하고 에피토프를 세포 내로 및 세포의 프로테아좀(proteasomes)으로 전달하는 것으로 직접 또는 간접적으로 경험적으로 보여지는 곳에서도 결정될 수 있다. 예를 들어, "분자"를 전달하는 특정 "T-세포 에피토프"는 예를 들어 그 세포로의 엔도시토시스 진입(endocytotic entry) 후와 같이 세포의 엔도솜 구획을 통과

한다. 대안적으로, "T-세포 에피토프 전달" 활성은 분자가 세포의 엔도솜 구획에 들어가지 않는 세포 외 위치에서 시작하는 분자에 대해 관찰될 수 있다. 대신 "T-세포 에피토프 전달" 분자는 세포에 들어가서 T-세포 에피토프-펩티드를 세포의 프로테아좀으로 전달하는데, 아마도 "T-세포 에피토프 전달" 분자가 그 T-세포 에피토프-펩티드 성분의 프로테아좀 절단을 초래할 수 있는 세포 이하 구획으로 자체 경로를 지정했기 때문일 것이다.

[0087] [128] 결합 분자의 시가 독소 효과기 폴리펩티드 영역의 위치와 관련하여 "아미노-말단에 근접한(proximal to an amino-terminus)"이라는 어구는 결합 분자가 본 명세서에 언급된 적절한 수준의 시가 독소 효과기 기능적 활성(예를 들어, 특정 수준의 세포독성 효능)을 나타낼 수 있는 한, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 영역의 적어도 하나의 아미노산 잔기가 결합 분자의 아미노-말단의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 그 이상, 예를 들어 18-20까지 이내인 거리에 있음을 지칭한다. 따라서, 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 아미노 말단이 융합된 임의의 아미노산 잔기(들)는 (예를 들어, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 영역의 아미노 말단 근처의 구조(들)를 입체적으로 방해함으로써) 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 기능적 활성이 본 명세서에서 요구되는 적절한 활성 수준 미만으로 감소되도록 시가 독소 효과기 기능을 감소시키지 않는다.

[0088] [129] 다른 성분들(예를 들어, 세포 표적화, 결합 영역, 분자 모이어티, 및/또는 추가적인 외인성 물질)과 비교하여 결합 분자 내의 시가 독소 효과기 폴리펩티드 영역의 위치와 관련하여 “아미노-말단에 보다 근접한(more proximal to an amino-terminus)"이라는 어구는 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 아미노 말단의 적어도 하나의 아미노산 잔기가 다른 참조 성분과 비교하여 결합 분자의 선형 폴리펩티드 성분의 아미노 말단에 더 가까운 그런 위치를 지칭한다.

[0089] [130] "시가 독소 패밀리 구성원의 하나의 A 서브유닛으로부터 유래된 활성 효소 도메인(active enzymatic domain derived from one A Subunit of a member of the Shiga toxin family)"이라는 어구는 촉매적 리보솜 불활성화 메카니즘을 통해 단백질 합성을 억제하는 능력을 갖는 것을 의미한다. 자연 발생 시가 독소의 효소 활성은 예를 들어, 살아 있는 세포의 부재에서 RNA 번역을 포함하는 시험관 내 분석 또는 살아 있는 세포에서 RNA 번역을 포함하는 생체 내 분석과 같은 숙련된 작업자에게 알려진 분석법을 사용하여 단백질 번역을 억제하는 능력으로 정의될 수 있다. 숙련된 작업자에게 알려져 있고 그리고/또는 본 명세서에 기술된 분석법을 사용하여, 시가 독소 효소 활성의 효능은 리보솜 RNA(rRNA)에 대한 N-글리코시다제 활성을 관찰함으로써 직접 평가될 수 있거나 그리고/또는 리보솜 기능 및/또는 단백질 합성의 억제를 관찰함으로써 간접적으로 평가될 수 있다.

[0090] [131] 용어 "시가 독소 A1 단편 영역(Shiga toxin A1 fragment region)"은 필수적으로 시가 독소 A1 단편으로만 구성되고 그리고/또는 시가 독소의 시가 독소 A1 단편으로부터 유래된 폴리펩티드 영역을 지칭한다.

[0091] [132] 결합 분자와 관련하여 용어 "말단(terminus)", "아미노-말단(amino-terminus)", 또는 "카복시-말단(carboxy-terminus)"은 일반적으로 결합 분자의 폴리펩티드 사슬의 마지막 아미노산 잔기(예를 들어, 단일, 연속 폴리펩티드 사슬)를 지칭한다. 결합 분자는 하나 이상의 폴리펩티드 또는 단백질을 포함할 수 있고, 따라서 결합 분자는 다중 아미노-말단 및 카복시-말단을 포함할 수 있다. 예를 들어, 결합 분자의 "아미노-말단"은 폴리펩티드의 아미노-말단 말단을 나타내는 폴리펩티드 사슬의 첫 번째 아미노산 잔기로 정의될 수 있고, 이는 일반적으로 출발 아미노산 잔기의 1차 아미노기(primary amino group)를 포함하거나 또는 N-알킬화된 알파 아미노산 잔기 부류의 구성원인 출발 아미노산 잔기에 대해 동등한 질소를 포함하는 임의의 아미노산 잔기와 펩티드 결합을 갖지 않는 출발 아미노산 잔기로 특징지어진다. 유사하게, 결합 분자의 "카복시-말단"은 폴리펩티드의 카복시-말단 끝을 나타내는 폴리펩티드 사슬의 마지막 아미노산 잔기로 정의될 수 있고, 이는 일반적으로 1차 카복실기의 알파-탄소에 펩티드 결합으로 연결된 임의의 아미노산 잔기를 갖지 않는 최종 아미노산 잔기를 특징으로 한다.

[0092] [133] 폴리펩티드 영역과 관련하여 용어 "말단", "아미노-말단", 또는 "카복시-말단"은 추가 아미노산 잔기가 해당 영역 외부의 펩티드 결합에 의해 연결되어 있는지 여부에 관계없이 해당 영역의 영역 경계를 의미한다. 다시 말해서, 그 영역이 다른 펩티드 또는 폴리펩티드에 융합되는지 여부에 관계없이 폴리펩티드 영역의 말단이다. 예를 들어, 2개의 단백질성 영역, 예를 들어 펩티드 또는 폴리펩티드 및 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하는 결합 영역을 포함하는 융합 단백질은 다른 단백질성 영역, 예를 들어 결합 영역의 시작을 나타내는 위치 252의 아미노산 잔기에 대한 잔기 251을 포함하는 펩티드 결합에도 불구하고 시가 독소 효과기 폴리펩티드 영역의 아미노산 잔기 251에서 끝나는 카복시-말단을 갖는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 영역을 가질 수 있다. 이 예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 영역의 카복시 말단은 융합 단백질의 말단이 아니라 내부, 영역 경계를 나타내는 잔기 251을 지칭한다. 따라서 폴리펩티드 영역의 경우 "말단(terminus)", "아미노-말단", 및 "카복시-말단"이라는 용어는 경계가 물리적 말단이든 또는 더 큰 폴리펩티드 사슬 내에 내장된 내부 위치이든

폴리펩티드 영역의 경계를 나타내는 데 사용된다.

[0093] [134] "시가 독소 A1 단편의 카복시 말단 영역(carboxy-terminus region of a Shiga toxin A1 fragment)"이라는 어구는 천연 발생 시가 독소 A1 단편으로부터 유래된 폴리펩티드 영역으로서, 상기 영역은 소수성 잔기로 시작하는 영역(예를 들어, StxA-A1 및 SLT-1A1의 V236, 및 SLT-2A1의 V235) 뒤에 소수성 잔기와 시가 독소 A1 단편 폴리펩티드 중 퓨린(furin)-절단 부위로 끝나는 영역 및 천연 시가 독소 A 서브유닛에서 A1 단편과 A2 단편 사이의 접합부에서 끝나는 영역이 있다. 시가 독소 A1 단편의 카복시-말단 영역은 예를 들어 시가 독소 A1 단편의 카복시-말단을 포함하거나 필수적으로 이로만 구성된 펩티드 영역과 같은 시가 독소 A1 단편 폴리펩티드의 카복시-말단으로부터 유래된 펩티드 영역을 포함한다. 시가 독소 A1 단편의 카복시 말단으로부터 유래된 펩티드 영역의 비제한적 예는 Stx1A(SEQ ID NO:2) 또는 SLT-1A(SEQ ID NO:1)의 위치 236내지 위치 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 또는 251; 및 SLT-2A(SEQ ID NO:3)에서 위치 235 내지 위치 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 또는 250에 천연 위치한 아미노산 잔기 서열을 포함한다.

[0094] [135] 연결된 분자 모이어티 및/또는 결합 영역과 관련하여 "A1 단편 폴리펩티드의 카복시 말단에 근접한(proximal to the carboxy-terminus of an A1 fragment polypeptide)"이라는 어구는 시가 독소 A1 단편 폴리펩티드의 마지막 잔기를 정의하는 아미노산 잔기로부터 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개 아미노산 잔기 이내에 있음을 지칭한다.

[0095] [136] "A1 단편-유래 영역의 카복시 말단을 입체적으로 덮는다(sterically covers the carboxy-terminus of the A1 fragment-derived region)"라는 어구는 예를 들어 Stx1A(SEQ ID NO:2) 또는 SLT-1A(SEQ ID NO:1)에서 위치 236 내지 251 또는 SLT-2A(SEQ ID NO:3)에서 235 내지 250의 임의의 하나에 천연적으로 위치한 아미노산으로부터 유래된 아미노산 잔기와 같이 A1 단편-유래 영역의 카복시-말단에 있는 아미노산 잔기에 연결된 및/또는 융합된 4.5kDa 이상의 크기의 임의의 분자 모이어티(예: 면역글로불린 유형 결합 영역)를 포함한다. "A1 단편-유래 영역의 카복시 말단을 입체적으로 덮는다"라는 어구는 또한 예를 들어 마지막 아미노산 A1 단편-유래 영역 및/또는 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 대한 아미노산 잔기와 같이 A1 단편-유래 영역의 카복시-말단에서 아미노산 잔기에 연결된 및/또는 융합된 4.5kDa 이상의 크기(예를 들어, 면역글로불린 유형 결합 영역)의 임의의 분자 모이어티를 포함한다. "A1 단편-유래 영역의 카복시-말단을 입체적으로 덮는다(sterically covers the carboxy-terminus of the A1 fragment-derived region)"라는 어구는 또한 예를 들어 진핵 세포의 ERAD 기계에 의한 인식과 같이 A1 단편-유래 영역의 카복시-말단의 세포 인식을 물리적으로 방지하는 4.5kDa 이상의 크기의 임의의 분자 모이어티(예를 들어, 면역글로불린-유형 결합 영역)를 포함한다.

[0096] [137] 적어도 40개 이상의 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 포함하고 A1 단편-유래 영역을 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 카복시-말단에 연결된(예: 융합된) 면역글로불린 유형 결합 영역과 같은 결합 영역은 "A1 단편 유래 영역의 카복시 말단을 입체적으로 덮는" 분자 모이어티이다.

[0097] [138] 적어도 40개 이상의 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 포함하고 A1 단편-유래 영역을 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 카복시-말단에 연결된(예: 융합된) 면역글로불린 유형 결합 영역과 같은 결합 영역은 영역은 "A1 단편-유래 영역의 카복시 말단을 둘러싸고 있는(encumbering the carboxy-terminus of the A1 fragment-derived region)" 분자 모이어티이다.

[0098] [139] "시가 독소 패밀리 구성원의 A1 단편(A1 fragment of a member of the Shiga toxin family)"이라는 용어는 시가 독소 A 서브유닛 중에서 보존되고 야생형 시가 독소 A 서브유닛에서 A1 단편 및 A2 단편 사이에 위치한 퓨린-절단 부위에서 퓨린에 의한 단백질 분해 후 시가 독소 A 서브유닛의 남은 아미노-말단 단편을 지칭한다.

[0099] [140] "A1 단편 영역의 카복시-말단에서 퓨린-절단 모티프(furin-cleavage motif at the carboxy-terminus of the A1 fragment region)"라는 어구는 시가 독소 A 서브유닛 사이에서 보존되고 자연적으로 발생하는 시가 독소 A 서브유닛에서 A1 단편과 A2 단편 사이의 접합부를 가교하는 특정한 퓨린 절단 모티프를 지칭한다.

[0100] [141] "A1 단편 영역의 카복시-말단에 근접한 퓨린-절단 부위(furin-cleavage site proximal to the carboxy-terminus of the A1 fragment region)"라는 어구는 A1 단편 영역 또는 A1 단편 유래 영역에서 마지막 아미노산 잔기를 정의하는 아미노산 잔기의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 그 이상의 아미노산 잔기 거리 이내에 아미노산 잔기를 갖는 임의의 식별 가능한 퓨린-절단 부위를 지칭하며, 예를 들어 결합 분자의 분자 모이어티와 같은 분자의 다른 성분에 대한 예를 들어 A1 단편 유래 영역의 연결에 근접한 위치에서와 같이 A1 단편 영역 또는 A1 단편 유래 영역의 퓨린-절단 모티프 위치 카복시-말단을 포함한다.

[0101] [142] "파괴된 퓨린-절단 모티프(disrupted furin-cleavage)"라는 어구는 (i) 섹션 I-B에서 본 명세서에 기재된 바와 같은 특정 퓨린-절단 모티프 및 (ii) 참조 분자에 비교하여 퓨린-절단의 감소를 분자에 부여할 수 있는 돌연변이 및/또는 절단을 포함하는 것을 지칭하는데, 예를 들어 동일한 조건하의 동일한 분석에서 관찰된 참조 분자의 퓨린 절단보다 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이하(절단되지 않은 경우 100% 포함)로 재현 가능하게 관찰된 것과 같은 것이다. 참조 분자와 비교한 퓨린-절단의 백분율은 관심 분자의 절단:비절단 물질을 참조 분자의 절단:비절단 물질로 나눈 비율로 표현될 수 있다(예: WO 2015/191764; WO 2016/196344). 적합한 참조 분자의 비제한적인 예는 본 명세서에 기재된 야생형 시가 독소 퓨린-절단 모티프 및/또는 퓨린-절단 부위를 포함하는 특정 분자를 포함한다.

[0102] [143] "퓨린-절단 내성(furin-cleavage resistant)"이라는 어구는 (i) 야생형 시가 독소 A 서브유닛에서 시가 독소 A1 단편의 카복시 말단 또는 (ii) A1 및 A2 단편 사이의 접합부에 자연적으로 위치하는 자연 발생 퓨린 절단 부위가 파괴되지 않은 구조체의 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시-말단보다 더 작은 퓨린-절단을 재현 가능하게 보이는 이의 분자 또는 특정한 폴리펩티드 영역을 의미하고, 본 명세서에 기술된 방법을 사용하는 것을 포함하여 숙련된 작업자에게 가용한 임의의 분석에 의한다.

[0103] [144] "시가 독소 패밀리의 구성원의 A 서브유닛으로부터 유래된 활성 효소 도메인(active enzymatic domain derived form an A Subunit of a member of the Shiga toxin family)"이라는 어구는 시가 독소 효소 활성에 기초한 리보솜의 촉매적 불활성화를 통해 단백질 합성을 억제하는 능력을 갖는 폴리펩티드 구조를 지칭한다. 단백질 합성의 억제 활성 및/또는 리보솜의 촉매적 불활성화를 나타내는 분자 구조의 능력은 숙련된 작업자에게 공지된 다양한 분석법, 예를 들어 살아 있는 세포가 없는 상태에서 RNA 번역 분석법을 포함하는 시험관 내 분석법을 사용하여, 또는 살아있는 세포의 리보솜을 포함하는 생체 내 분석을 사용하여 관찰될 수 있다. 예를 들어, 숙련된 작업자에게 알려진 분석법을 사용하여, 시가 독소 효소 활성에 기초한 분자의 효소 활성은 예를 들어 리보솜 닉킹(nicking) 분석과 같은 리보솜 RNA(rRNA)에 대한 N-글리코시다제 활성을 관찰함으로써 직접 평가될 수 있거나 그리고/또는 리보솜 기능, RNA 번역 및/또는 단백질 합성의 억제를 관찰함으로써 간접적으로 평가될 수 있다. 시가 독소 효과기 폴리펩티드와 관련하여 본 명세서에 사용된 "조합(combination)"은 2개 이상의 하위-영역을 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 설명하고, 여기서 각 하위-영역은 다음 중 하나 이상을 포함한다: (1) 내인성 에피토프 또는 에피토프 영역에서의 파괴; (2) 내장된 이종성 T-세포 에피토프-펩티드; (3) 삽입된 이종성 T-세포 에피토프-펩티드; 및 (4) A1 단편 영역의 카복시-말단에서 파괴된 퓨린-절단 모티프.

[0104] [146] 본 명세서에 사용된 "결합 분자(binding molecule)"는 "DI-SLT-1A 융합 단백질" 및 "SLT-1A 융합 단백질"을 포괄하는 "PD-L1 결합 분자(PD-L1 binding molecule)" 및 "PD-L1 결합 분자"와 상호교환적으로 사용된다. 앞서 언급한 모든 분자 유형에는 다양한 "PD-L1 결합 단백질(PD-L1-binding proteins)"이 포함된다.

[0105] PD-L1 결합 분자

[0106] [147] PD-L1에 결합하고 독소 성분(본 명세서에서 "PD-L1 결합 분자(PD-L1 binding molecules)" 또는 "PD-L1 결합 분자"로 지칭됨)을 포함하는 다양한 결합 분자가 본 명세서에서 제공된다. 앞서 언급한 모든 분자 유형에는 다양한 "PD-L1 결합 단백질" 이 포함된다. PD-L1 결합 분자는 예를 들어 (1) PD-L1 발현 세포를 사멸시키기 위한 세포독성 분자로서, (2) 다른 세포 중에서 특정 PD-L1 양성 세포 유형(들)을 선택적으로 사멸시키기 위해, (3) PD-L1 발현 세포의 MHC 클래스 I 제시 경로에 CD8+ T-세포 에피토프를 전달하기 위한 전달 비히클로서, (4) PD-L1 발현 세포의 내부로 원자 또는 분자를 전달하기 위한 무독성 전달 비히클로서, (5) PD-L1 발현 세포와 관련된 질병 및 질환의 진단, 예후, 또는 특성화를 위한 진단 분자로서, 및 (6) 각종 암 및 종양과 같은 PD-L1 발현 세포와 관련된 다양한 질병, 장애, 및 질환을 치료하기 위한 치료 분자로서 유용하다.

[0107] [148] 일부 실시예들에서, 결합 분자는 PD-L1 결합 면역글로불린 도메인 및 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드를 포함한다. 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드는 새로운 결합 분자를 엔지니어링하기 위한 튼튼하고(robust) 강력한 스캐폴드를 제공한다(참조: WO 2014/164680, WO 2014/164693, WO 2015/138435, WO 2015/138452, WO 2015/113005, WO 2015/113007, WO 2015/191764, WO 2016/196344, WO 2017/019623, WO 2018/106895, 및 WO 2018/140427). 세포 표적화 모이어티(cell-targeting moiety)로서 PD-L1 결합 면역글로불린 유래 단편과 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드의 결합은 PD-L1을 표적으로 하는 치료 및 진단 분자의 조작을 가능하게 한다.

[0108] I. PD-L1 결합 분자의 일반 구조

[0109] [149] 본 명세서에 기재된 PD-L1 결합 분자는 각각 (1) 세포 표적화를 위한 PD-L1 결합 영역 및 (2) 독소를 포

함한다.

[0110] [150] 일부 실시예들에서, 결합 분자는 (1) 세포 표면과 연관된 PD-L1의 세포 외 부분에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 영역 및 (2) 독소 효과기 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 (1) 세포 표면과 연관된 PD-L1의 세포 외 부분에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 영역 및 (2) 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드를 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 영역(본 명세서에서 "시가 독소 효과기 폴리펩티드"로 기재)을 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 동일하거나 상이하든 2개 이상의 PD-L1 결합 영역, 및 동일하든 상이하든 2개 이상의 시가 독소 효과기 폴리펩티드 영역을 포함한다. 결합 분자의 하나의 비제한적인 예는 단일 사슬 가변 단편, 또는 상기 언급된 동종이량체 또는 이종이량체를 포함하는 면역글로불린-유형 결합 영역에 융합된 시가 독소 효과기 폴리펩티드이다. 본 명세서에 기재된 PD-L1 결합 분자는 표적 세포의 내부로의 전달 및 후속적인 세포-표면 제시를 위한 T-세포 에피토프를 선택적으로 포함할 수 있다.

[0111] [151] 일부 실시예들에서, 결합 분자는 동종이량체(homo-dimer) 또는 이종이량체(hetero-dimer)이다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 2개의 단량체를 포함하는 동종이량체이고, 여기서 각각의 단량체는 PD-L1 결합 영역 및 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예들에서, 이량체 결합 분자는 동일한 결합 영역 및 독소 영역을 포함하는 단량체 변이체의 특성보다 더 유리한 특성을 나타낸다. 예를 들어, 일부 실시예들에서, 이량체 형태의 결합 분자는 단량체 형태의 유사한 분자보다 항원 에피토프(즉, CD8+ T-세포 에피토프)를 표적 세포에 보다 효율적으로 전달할 수 있다.

[0112] [152] 일부 실시예들에서, 결합 분자의 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드는 단일 분자에서 2개 이상의 특성을 초래하는 구조적 요소들을 조합하는데, 다음과 같은 능력을 예로 들 수 있다: 1) 특정 구조적 요소(들)를 결여한 분자 변이체에 비교하여 감소된 항원성 및/또는 면역원성을 나타내고, 2) 특정 구조적 요소(들)를 결여한 분자 변이체에 비교하여 감소된 프로테아제 절단을 나타내고, 3) 그 특정 요소(들)를 결여한 분자 변이체에 비교하여 특정 용량에서 다세포 유기체에 대한 감소된 비특이적 독성을 나타내고, 4) 세포-표면 제시를 위해 내장되거나 삽입된 CD8+ T-세포 에피토프를 MHC 클래스 I 시스템에 전달하고, 및/또는 5) 강력한 세포독성을 나타낸다.

[0113] A. PD-L1 결합 영역

[0114] [153] 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 분자는 예를 들어, PD-L1 발현 세포 또는 PD-L1 양성 세포와 같은 세포의 세포 표면에 존재하는 인간 PD-L1 및/또는 PD-L1에 특이적이고 고친화도의 결합을 나타낼 수 있는 면역글로불린 유형 폴리펩티드를 포함하는 결합 영역을 포함한다.

[0115] [154] 일부 실시예들에서, 결합 분자의 결합 영역은 예를 들어 도메인, 분자 모이어티 또는 작용제(agent)와 같이 세포 표면의 PD-L1 표적 생체분자의 세포 외 부분에 높은 친화성을 갖고 특이적으로 결합할 수 있는 세포-표적화 성분(즉, 세포 외 표적 생체분자)이다. 본 명세서에 사용된 용어 "PD-L1 결합 영역"은 예를 들어, PD-L1에 대한 해리 상수가 10^{-5} 내지 10^{-12} 몰인 높은 친화력(affinity)을 갖고 PD-L1 분자의 세포 외 부분에 특이적으로 결합할 수 있는 분자 모이어티(예: 단백질성 분자) 또는 제제(agent)를 지칭한다. 본 명세서에 사용된 PD-L1 결합은 인간 PD-L1의 아이소형(isoform) 또는 변이체를 포함하여 PD-L1의 세포 외 부분에 결합하는 능력을 지칭한다.

[0116] [155] 표적 생체분자의 세포 외 부분은 예를 들어 표적 생체분자가 세포에 의해 세포 표면에서 발현되는 경우와 같이 분자가 세포에 물리적으로 커플링될 때 세포 외 환경에 노출된 구조의 일부를 지칭한다. 이러한 맥락에서, 세포 외 환경에 노출된다는 것은 표적 생체분자의 일부가 예를 들어 항체 또는 최소한 단일-도메인 항체 도메인, 나노바디, 낙타과, 또는 연골 어류에서 유래한 중쇄 항체 도메인, 단쇄 가변 단편 또는 면역글로불린에 대한 임의의 수의 조작된 대체 스캐폴드(아래 참조)와 같은 항체보다 작은 결합 모이어티에 의해 접근 가능함을 의미한다. 세포에 물리적으로 결합된 표적 생체분자의 일부에 대한 세포 외 환경에 대한 노출 또는 접근 가능성은 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 숙련된 작업자에 의해 경험적으로 결정될 수 있다.

[0117] [156] 일부 실시예들에서, 결합 분자는 PD-L1의 세포 외 부분에 선택적으로 및 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 폴리펩티드를 포함하는 결합 영역을 포함한다.

[0118] [157] 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 영역은 면역글로불린 유형 결합 영역이다. 일부 실시예들에서, 면역글로불린 유형 PD-L1 결합 영역은 PD-L1의 세포 외 부분에 결합할 수 있는 항체 파라토프(paratope)와 같은 면역글로불린 PD-L1 결합 영역으로부터 유래된다. 이 조작된 폴리펩티드는 선택적으로 본 명세서에 기술된 면역글로불린으로부터의 상보적 결정 영역(complementary determining regions) 및/또는 항원 결합 영역을 포함하거나 필

수적으로 이들로만 구성된 폴리펩티드 스캐폴드를 포함할 수 있다.

[0119] [158] 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 영역은 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역(HVR-H)을 포함하고, 각각은 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 SEQ ID NO: 22-24 및 27-32의 임의의 것에 대해 갖거나 또는 필수적으로 SEQ ID NO: 22-24 및 27-32의 임의의 것에서 보이는 아미노산 서열로만 구성된다. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 (a) 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변영역(HVR-L)을 더 포함하고, 각각은 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:25, 및 SEQ ID NO:26의 임의의 것에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖거나 또는 필수적으로 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:25, 및 SEQ ID NO:26의 임의의 것에 보이는 아미노산 서열로만 구성된다. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 (a) 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변영역(HVR-L)을 더 포함하고, 이들은 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:21에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖거나 또는 필수적으로 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:21의 임의의 것에 보이는 아미노산 서열만으로 구성된다. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 (a) SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:21에 대해 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖거나 또는 필수적으로 SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:21의 임의의 것에 보이는 아미노산 서열로만 구성되는 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변영역(HVR-L)을 더 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 (a) SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:26에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성 갖는, 또는 필수적으로 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:26의 어느 하나에 보인 아미노산 서열로만 이루어지는, 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L)을 더 포함한다.

[0120] [159] 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 영역은 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역(HVR-H)을 포함하고, 각각은 SEQ ID NO: 22-24 및 27-32 의 어느 하나에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나, 또는 필수적으로 SEQ ID NO: 22-24 및 27-32의 어느 하나에 보인 아미노산 서열로만 이루어진다. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 (a) SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:25, 및 SEQ ID NO:26에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나, 또는 필수적으로 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:25, 및 SEQ ID NO:26에 보인 아미노산 서열로만 이루어지는, 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L)을 더 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 (a) SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:26에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나, 또는 필수적으로 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:26의 어느 하나에 보인 아미노산 서열로만 구성되는, 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L)을 더 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 다음을 포함한다: (a) 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L)으로, 각각은 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:25, 및 SEQ ID NO:26의 임의의 것에 보이는 아미노산 서열을 포함하거나 필수적으로 이로만 구성되고; 및 (b) 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역(HVR-H)으로, 각각은 SEQ ID NO: 22-24 및 27-32의 임의의 것에 보이는 아미노산 서열을 포함하거나 필수적으로 이로만 구성된다. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 다음을 포함한다: a) (i) SEQ ID NO:27의 아미노산 서열을 포함하거나 필수적으로 이로만 구성되거나 또는 이로 구성되는 HCDR1; (ii) SEQ ID NO:29 또는 30의 아미노산 서열을 포함하거나 필수적으로 이로만 구성되거나 또는 이로 구성되는 HCDR2; (iii) SEQ ID NO:32의 아미노산 서열을 포함하거나 필수적으로 이로만 구성되거나 또는 이로 구성되는 HCDR3;을 포함하는 중쇄 가변 영역(HVR-H); 및/또는 b) (i) SEQ ID: 19의 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이로만 구성되거나, 이로 구성된 LCDR1; (ii) SEQ ID NO:20의 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이로만 구성되거나, 이로 구성되는 LCDR2; 및 (iii) SEQ ID NO:26의 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이로만 구성되거나, 이로 구성되는 LCDR3;을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L). 일부 실시예들에서, 결합 영역은 다음을 포함한다: a) (i) SEQ ID: 27의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR1; (ii) SEQ ID NO:29 또는 30의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR2; 및 (iii) SEQ ID NO:32의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR3;을 포함하는 중쇄 가변 영역(HVR-H); 및 b) (i) SEQ ID NO:19의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR1; (ii) SEQ ID NO:20의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR2; 및 (iii) SEQ ID NO:26의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR3;을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L). 일부 실시예들에서, 결합 영역은 다음을 포함한다: a) (i) SEQ ID: 27의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR1; (ii) SEQ ID NO:29의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR2; 및 (iii) SEQ ID NO:32의 아미노산 서열로 이루어진 HCDR3;을 포함하는 중쇄 가변 영역(HVR-H); 및 b) (i) SEQ ID NO:19의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR1; (ii) SEQ ID NO:20의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR2; 및 (iii) SEQ ID NO:26의 아미노산 서열로 이루어진 LCDR3;을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L).

[0121] [160] 일부 실시예들에서, 결합 영역은 다음을 포함한다: (a) SEQ ID NO: 33, 35-36, 및 38 중 임의의 하나에 대하여 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖거나 SEQ ID NO:

33, 35-36, 및 38의 임의의 하나의 아미노산 서열로만 필수적으로 구성되는 경쇄 영역; 및/또는 (b) SEQ ID NO: 34, 37, 및 39 중 임의의 하나에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖거나 또는 SEQ ID NO: 34, 37, 및 39 중 임의의 하나의 아미노산 서열로만 필수적으로 구성되는 중쇄 영역. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 SEQ ID NO: 85-107 및 156-157의 임의의 하나에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖거나 또는 SEQ ID NO: 85-107 및 156-157의 임의의 하나에서 보이는 폴리펩티드로만 필수적으로 구성되는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 예를 들어 SEQ ID: 85-107 및 156-157 중 임의의 하나의 폴리펩티드로 구성되거나, 포함하거나, 필수적으로 이로만 구성된 단일 사슬 가변 단편이다. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 다음을 포함한다: (a) 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L)으로서, 각각은 SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, 및 SEQ ID NO:38의 임의의 하나에 보이는 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이로만 구성되거나 이로 구성되고; 및 (b) 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역(HVR-H), 각각은 SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:37, 및 SEQ ID NO:39의 임의의 하나에 보이는 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이로만 구성되거나 이로 구성된다.

[0122] [161] 일부 실시예들에서, 결합 분자의 결합 영역은 예를 들어 단일클론 항체(monoclonal antibody) 또는 조작된 항체 유도체일 수 있다. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 항체 단편, 예를 들어 Fv, Fab, Fab', scFv, 디아바디, Fab'-SH, 또는 F(ab')2 단편이다. 다른 실시예에서, 결합 영역은 전장 항체, 예를 들어 온전한 IgG1 항체 또는 본 명세서에 정의되고 및/또는 숙련된 작업자에게 공지된 다른 항체 부류 또는 아이소타입(isotype)이다. 항체의 "클래스(class)"는 중쇄에 존재하는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 의미한다. 항체에는 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM의 5가지 주요 부류가 있으며, 이들 중 몇 가지는 아이소형(예: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2)으로 더 나눌 수 있다. 면역글로불린의 다른 부류에 해당하는 중쇄 불변 도메인을 각각 α, δ, ε, γ, 및 μ라고 한다.

[0123] [162] 일부 실시예들에서, 결합 영역은 합성 조작된 항체 유도체이고, 예를 들어, 자율 V_H 도메인(예: 낙타과, 뮤린, 또는 인간 공급원), 단일-도메인 항체 도메인(sdAb), 낙타과 유래 중쇄 항체 도메인(V_HH 단편 또는 V_H 도메인 단편), 낙타과 V_HH 단편 또는 V_H 도메인 단편 유래 중쇄 항체 도메인, 연골어류 유래 중쇄 항체 도메인, 면역글로불린 신항원 수용체(IgNAR), V_{NAR} 단편, 단일 사슬 가변(scFv) 단편, 나노바디, V_H 도메인을 포함하는 "낙타화된" 스캐폴드, 중쇄, 및 C_H1 도메인으로 구성된 Fd 단편, 단일 사슬 Fv-C_H3 미니바디, Fc 항원 결합 도메인(Fcabs), scFv-Fc 융합, 다량체 scFv 단편(디아바디, 트리아바디, 테트라바디), 디설파이드-안정화 항체 가변(Fv) 단편(dsFv), V_L, V_H, C_L, 및 C_H1 도메인들로 이루어진 디설파이드-안정화 항원-결합(Fab) 단편, 디설파이드-안정화 중쇄 및 경쇄(sc-dsFvs)를 포함하는 단일 사슬 가변-영역 단편, 2가 나노바디, 2가 미니바디, 2가 $F(ab')_2$ 단편(Fab 이량체), 이중특이적 탠덤 V_HH 단편, 이중특이적 탠덤 scFv 단편, 이중특이적 나노바디, 이중특이적 미니바디, Fab-FCab(mAb^2's), 및 파라토프 및 결합 기능을 유지하는 전술한 것의 임의의 유전자 조작된 대응물, 예를 들어, 여기서 중쇄 및 경쇄의 상대적 배향 또는 순서가 역전되거나 뒤집혀진(flipped) 것과 같은 것들이 있다.

[0124] [163] 구체적이지만 비제한적인 일 측면에 따르면, 결합 영역은 면역글로불린 유형의 결합 영역을 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "면역글로불린-유형 결합 영역(immunoglobulin-type binding region)"은 항원 또는 에피토프와 같은 하나 이상의 표적 생체분자에 결합할 수 있는 폴리펩티드 영역을 지칭한다. 결합 영역은 표적 분자에 결합하는 능력에 의해 기능적으로 정의될 수 있다. 면역글로불린-유형 결합 영역은 일반적으로 항체 또는 항체-유사 구조에서 유래한다.

[0125] [164] 면역글로불린(Ig) 단백질은 Ig 도메인으로 알려진 구조적 도메인을 갖고 있다. Ig 도메인은 길이가 약 70-110개의 아미노산 잔기 범위이고 일반적으로 7-9개의 역평행 베타 가닥(antiparallel beta strands)이 샌드위치 같은 구조를 형성하는 2개의 베타 시트로 배열되는 특징적인 Ig-폴딩(Ig fold)을 보유한다. Ig 접힘은 샌드위치 내부 표면의 소수성 아미노산 상호작용과 가닥의 시스테인 잔기 사이에 고도로 보존된 디설파이드 결합에 의해 안정화된다. Ig 도메인은 가변(IgV 또는 V-세트), 불변(IgC 또는 C-세트) 또는 중간(IgI 또는 I-세트)일 수 있다. 일부 Ig 도메인은 에피토프에 결합하는 항체의 특이성에 중요한 "상보적 결정 영역(complementary determining region)"이라고도 하는 상보성 결정 영역(complementarity determining region; CDR)과 연관될 수 있다. Ig-유사 도메인(Ig-like domains)은 비면역글로불린 단백질에서도 발견되고 이를 기반으로 단백질의 Ig 슈퍼패밀리의 구성원으로 분류된다. HUGO 유전자 명명 위원회(HGNC)는 패밀리를 포함하는 Ig 유사 도메인의 구

성원 목록을 제공한다.

[0126] [165] 면역글로불린-유형 결합 영역은 항체의 폴리펩티드 서열 또는 그의 항원-결합 단편일 수 있으며, 여기서 아미노산 서열은 천연 항체 또는 비면역글로불린 단백질의 Ig-유사 도메인의 아미노산 서열로부터 다양하고, 예를 들어 분자 공학 또는 라이브러리 스크리닝에 의한 선택일 수 있다. 면역글로불린 유형의 결합 영역 생성에서 재조합 DNA 기술 및 시험관 내 라이브러리 스크리닝의 관련성 때문에 항체는, 예를 들어 더 작은 크기, 세포 진입 또는 생체 내 및/또는 치료 적용을 위한 기타 개선 사항과 같은 원하는 특성을 얻기 위해 재설계될 수 있다. 가능한 변형은 많고 단 하나의 아미노산 변경에서 예를 들어 가변 영역의 완전한 재설계에 이를 수도 있다. 전형적으로, 가변 영역의 변화는 항원-결합 특성을 개선하거나 가변 영역 안정성을 개선하거나 면역원성 반응의 잠재성을 감소시키기 위해 이루어질 것이다.

[0127] [166] 본 명세서에 기재된 분자의 성분으로서 고려되는 다수의 면역글로불린-유형 결합 영역이 있다. 일부 실시예들에서, 면역글로불린-유형 결합 영역은 PD-L1의 세포 외 부분에 결합할 수 있는 항체 파라토프와 같은 면역글로불린 결합 영역으로부터 유래된다. 특정의 다른 실시예들에서, 면역글로불린-유형 결합 영역은 어떤 면역글로불린 도메인에서도 유래되지 않았지만 PD-L1의 세포 외 부분에 고친화도 결합을 제공함으로써 면역글로불린 결합 영역처럼 기능하는 조작된 폴리펩티드를 포함한다. 이 조작된 폴리펩티드는 선택적으로 본 명세서에 기술된 면역글로불린으로부터의 상보적 결정 영역을 포함하거나 필수적으로 이들로만 구성된 폴리펩티드 스캐폴드를 포함할 수 있다.

[0128] [167] 또한 고친화성 결합 특성을 통해 특정 세포-유형에 대해 폴리펩티드를 표적화하는데 유용한 선행 기술에 다수의 결합 영역이 있다. 일부 실시예들에서, 결합 분자의 결합 영역은 다음을 포함하는 군으로부터 선택된다: 자율 V_H 도메인, 단일-도메인 항체 도메인(sdAbs), 낙타과 유래된 중쇄 항체 도메인(V_HH 단편 또는 V_H 도메인 단편), 낙타과 V_HH 단편 또는 V_H 도메인 단편에서 유래한 중쇄 항체 도메인, 연골 어류 유래 중쇄 항체 도메인, 면역글로불린 신규 항원 수용체(IgNAR), V_{NAR} 단편, 단일 사슬 가변(scFv) 단편, 나노바디, 중쇄 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편, 단일 사슬 Fv-C_H3 미니바디, 이량체 C_H2 도메인 단편(C_H2D), Fc 항원 결합 도메인(Fcabs), 분리된 상보적 결정 영역 3(CDR3) 단편, 제한된(constrained) 프레임워크 영역 3, CDR3, 프레임워크 영역 4(FR3-CDR3-FR4) 폴리펩티드, 소형 모듈 면역약제(SMIP) 도메인, scFv-Fc 융합, 다량체화 scFv 단편(디아바디, 트리아바디, 테트라바디), 디설파이드 안정화 항체 가변(Fv) 단편, V_L, V_H, C_L, 및 C_H1 도메인들로 구성된 디설파이드 안정화 항원 결합(Fab) 단편, 2가(bivalent) 나노바디, 2가 미니바디, 2가 F(ab')2 단편(Fab 이량체), 이중특이적 탠덤 V_HH 단편, 이중특이적 탠덤 scFv 단편, 이중특이적 나노바디, 이중특이적 미니바디, 그 파라토프, 및 결합 기능을 유지하는 전술한 것의 모든 유전자 조작 대응물, 예를 들어, 여기서 중쇄 및 경쇄의 상대적인 방향 또는 순서는 역전되거나 뒤집혀진(flipped) 것(*참조:* Ward E et al., *Nature* 341: 544-6 (1989); Davies J, Riechmann L, *Biotechnology (NY)* 13: 475-9 (1995); Reiter Y et al., *Mol Biol* 290: 685-98 (1999); Riechmann L, Muyldermans S, *J Immunol Methods* 231: 25-38 (1999); Tanha J et al., *J Immunol Methods* 263: 97-109 (2002); Vranken W et al., *Biochemistry* 41: 8570-9 (2002); Jespers L et al., *J Mol Biol* 337: 893-903 (2004); Jespers L et al., *Nat Biotechnol* 22: 1161-5 (2004); To R et al., *J Biol Chem* 280: 41395-403 (2005); Saerens D et al., *Curr Opin Pharmacol* 8: 600-8 (2008); Dimitrov D, *MAbs* 1: 26-8 (2009); Weiner L, *Cell* 148: 1081-4 (2012); Ahmad Z et al., *Clin Dev Immunol* 2012: 980250 (2012)).

[0129] [168] 면역글로불린의 불변 영역으로부터 유래된 폴리펩티드를 포함하는 다양한 결합 영역들이 있는데, 예를 들어 조작된 이량체 Fc 도메인, 단량체 Fc(mFcs), scFv-Fcs, V_HH-Fcs, C_H2 도메인, 단량체 C_H3s도메인(mC_Hs3), 합성적으로 재프로그래밍된 면역글로불린 도메인, 및/또는 면역글로불린 도메인과 리간드의 하이브리드 융합과 같은 것들이다(Hofer T et al., *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 105: 12451-6 (2008); Xiao J et al., *J Am Chem Soc* 131: 13616-13618 (2009); Xiao X et al., *Biochem Biophys Res Commun* 387: 387-92 (2009); Wozniak-Knopp G et al., *Protein Eng Des Sel* 23 289-97 (2010); Gong R et al., *PLoS ONE* 7: e42288 (2012); Wozniak-Knopp G et al., *PLoS ONE* 7: e30083 (2012); Ying T et al., *J Biol Chem* 287: 19399-408 (2012); Ying T et al., *J Biol Chem* 288: 25154-64 (2013); Chiang M et al., *J Am Chem Soc* 136: 3370-3 (2014); Rader C, *Trends Biotechnol* 32: 186-97 (2014); Ying T et al., *Biochimica Biophys Acta* 1844: 1977-82 (2014)).

[0130] [169] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자의 결합 영역은 온전한 항체(intact antibody)이거나 및/또는 Fc

영역을 포함한다. 용어 "Fc 영역(Fc region)"은 불변 영역의 적어도 일부, 예를 들어 적어도 제2 및 제3 불변(C_H) 도메인 및 글리코실화 부위와 같은 적어도 불변 영역의 일부를 포함하는 천연 면역글로불린의 특정 중쇄의 C-말단 근접 영역인 단편 결정화 가능한 영역의 일부를 의미한다. 그러나, 본 명세서에서 사용된 용어 "Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 또는 돌연변이된 Fc 영역 또는 이의 단편을 포함한다. 본 명세서에서 달리 명시되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변 영역에서 아미노산 잔기의 넘버링은 EU 인덱스라고도 하는 EU 넘버링 시스템에 의하고, 이는 "Kabat, E.A., *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA (1991)"에 기술된 바와 같다.

[0131] [170] 본 발명의 특정 다른 실시예에 따르면, 결합 영역은 면역글로불린 도메인에 대한 조작된 대안적 스캐폴드를 포함한다. 조작된 대체 스캐폴드는 표적 생체분자의 고친화도 및 특이적 결합과 같은 면역글로불린 유래 구조와 유사한 기능적 특성을 나타내고, 예를 들어 더 큰 안정성 또는 감소된 면역원성과 같이 특정 면역글로불린 도메인에 대한 개선된 특성을 제공할 수 있다. 일반적으로, 면역글로불린에 대한 대체 스캐폴드는 20킬로달톤 미만이고 단일 폴리펩티드 사슬로 구성되며 시스테인 잔기가 없고 비교적 높은 열역학적 안정성을 나타낸다.

[0132] [171] 전술한 PD-L1 결합 분자 중 임의의 것은 PD-L1 결합 영역으로서 사용하기에 적합하거나 결합 분자에서 사용하기 위한 하나 이상의 PD-L1 결합 영역을 생성하도록 변형될 수 있다. 위의 결합 영역 구조의 임의의 것은 결합 영역 성분이 PD-L1 분자의 세포 외 부분에 대해 리터당 10^{-5} 내지 10^{-12} 몰, 바람직하게는 200 나노몰(nM) 미만의 해리 상수를 갖는 한, 분자의 성분으로서 사용될 수 있다.

[0133] B. 시가 독소 효과기 폴리펩티드

[0134] [172] 결합 분자는 하나 이상의 독소 성분을 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 시가 독소 A 서브유닛으로부터 유래된 시가 독소 효과기 폴리펩티드인 독소 성분을 포함한다. 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 하나 이상의 시가 독소 기능을 나타낼 수 있는 시가 독소 패밀리의 시가 독소 A 서브유닛으로부터 유래된 폴리펩티드이다(예를 들어 다음을 참조: Cheung M et al., *Mol Cancer* 9: 28 (2010); WO 2014/164680, WO 2014/164693, WO 2015/138435, WO 2015/138452, WO 2015/113005, WO 2015/113007, WO 2015/191764, WO 2016/196344, WO 2017/019623, WO 2018/106895, 및 WO 2018/140427). 시가 독소 기능에는 예를 들어 세포 내재화 증가, 엔도솜 구획에서 세포질로의 세포 이하 라우팅 지시, 세포 내 분해 방지, 촉매적인 리보솜 비활성화, 세포 증식 억제, 및/또는 세포독성 효과가 포함된다.

[0135] [173] 본 발명의 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 결합 분자는 SEQ ID: 1-18, 40-68, 169, 170, 또는 173의 어느 하나를 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 결합 분자는 SEQ ID NO: 1-18, 40-68, 169, 170, 또는 173 중 어느 하나의 변이체를 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 결합 분자는 SEQ ID NO: 1-18, 40-68, 169, 170, 또는 173의 어느 하나에 대하여 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 결합 분자는 SEQ ID NO: 1-18, 40-68, 169, 170, 또는 173의 어느 하나를 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 10개와 같은 하나 이상의 돌연변이와 함께 포함한다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기는 SEQ ID NO: 1-18, 40-68, 169, 170, 또는 173의 어느 하나를 1-5, 5-10, 11-5, 15-20, 10-25, 25-30, 또는 30개 이상의 돌연변이와 함께 포함한다. 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 결합 분자는 SEQ ID: 1-18, 40-68, 169, 170, 또는 173 중 어느 하나의 변이체를 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 변이체는 S45C 돌연변이를 포함한다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 돌연변이는 폴리펩티드를 촉매적으로 불활성화시킨다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 돌연변이는 폴리펩티드의 촉매 활성에 영향을 미치지 않는다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 돌연변이는 폴리펩티드의 촉매 활성을 증가시킨다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 돌연변이는 폴리펩티드의 촉매 활성을 감소시킨다.

[0136] [174] 본 발명의 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 결합 분자는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 SEQ ID NO: 41을 포함한다. 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 결합 분자는 SEQ ID NO: 41의 변이체인 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 결합 분자는 SEQ ID NO: 41에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 결합 분자는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 10개의 돌연변이와 같은 하나 이상의 돌연변이를 갖는 SEQ ID NO: 41을 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기는 1-5, 5-10, 11-5, 15-20, 10-25, 25-30,

또는 30개 초과의 돌연변이를 갖는 SEQ ID NO: 41을 포함한다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 돌연변이는 폴리펩티드를 촉매적으로 불활성화시킨다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 돌연변이는 폴리펩티드의 촉매 활성에 영향을 미치지 않는다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 돌연변이는 폴리펩티드의 촉매 활성을 증가시킨다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 돌연변이는 폴리펩티드의 촉매 활성을 감소시킨다.

[0137] [175] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기는 SEQ ID NO: 41에 E167D 돌연변이, R170S 돌연변이, 또는 E167D 및 R170S 돌연변이를 더하여 포함한다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기는 SEQ ID NO: 167, 170, 또는 173 중 임의의 하나를 포함한다.

[0138] [176] 단백질 독소의 시가 독소 패밀리는 예를 들어 시가 독소, 시가 유사 독소 1, 및 시가 유사 독소 2와 같이 구조적 및 기능적으로 관련된 다양한 자연 발생 독소들로 구성된다(Johannes L, RΦmer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16(2010)). 시가 독소 패밀리의 홀로톡신 구성원은 일부 숙주 세포의 표면에 존재하는 특정 글리코스핑고리피드(glycosphingolipid)에 우선적으로 결합하는 표적화 도메인과 세포 내부에서 일단 리보솜을 영구적으로 비활성화할 수 있는 효소 도메인을 포함한다(Johannes L, RΦmer W, Nat Rev Microbiol 8: 105 -16(2010)). 시가 독소 패밀리의 구성원은 동일한 전체 구조 및 작용 기전을 공유한다(Engedal N et al., Microbial Biotech 4: 32-46 (2011)). 예를 들어, Stx, SLT-1, 및 SLT-2는 무세포 시스템에서 구별할 수 없는 효소 활성을 나타낸다(Head S et al., *J Biol Chem* 266: 3617-21 (1991); Tesh V et al., *Infect Immun* 61: 3392-402 (1993); Brigotti M et al., *Toxicon* 35:1431-1437 (1997)).

[0139] [177] 시가 독소 패밀리는 S. dysenteriae 혈청형(serotype) 1에서 분리된 진정한 시가 독소(Stx), 장출혈성(enterohemorrhagic) *E. coli*의 혈청형에서 분리된 시가 유사 독소 1 변이체(SLT1 또는 Stx1 또는 SLT-1 또는 Slt-I) 및 장출혈성(enterohemorrhagic) *E. coli*의 혈청형에서 분리된 시가-유사 독소 2 변이체(SLT2 또는 Stx2 또는 SLT-2) 등을 포괄한다. SLT1은 Stx와 단 하나의 아미노산 잔기만 다르고 둘 다 베로세포독소(Verocytotoxins) 또는 베로톡신(Verotoxin)(VT)으로 지칭된다(O'Brien A, Curr Top Microbiol Immunol 180: 65-94 (1992)). SLT1 및 SLT2 변이체는 1차 아미노산 서열 수준에서 서로 약 53-60%만 유사하지만 시가 독소 패밀리의 구성원들에게 공통적인 효소 활성 및 세포독성 메커니즘을 공유한다(Johannes L, RΦmer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). 정의된 하위 유형 Stx1a, Stx1c, Stx1d, 및 Stx2a-g와 같은 39개 이상의 상이한 시가 독소가 설명되었다(Scheutz F et al., J Clin Microbiol 50: 2951-63 (2012)). 시가 독소 패밀리의 구성원은 시가 독소 암호화 유전자가 수평 유전자 전달(horizontal gene transfer)을 통해 박테리아 종 사이에 퍼질 수 있기 때문에 자연적으로 어떤 박테리아 종에도 제한되지 않는다(Strauch E et al., *Infect Immun* 69: 7588-95 (2001); Bielaszewska M et al., *Appl Environ Micrbiol* 73: 3144-50 (2007); Zhaxybayeva O, Doolittle W, *Curr Biol* 21: R242-6 (2011)). 종간 이동(interspecies transfer)의 예로서, 시가 독소가 환자로부터 분리된 A. haemolyticus 균주에서 발견되었다(Grotiuz G et al., J Clin Microbiol 44: 3838-41 (2006)). 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 시가 독소가 새로운 아종(subspecies) 또는 종에 진입하면 시가 독소 아미노산 서열은 유전적 드리프트 및/또는 선택 압력으로 인해 시가 독소 패밀리의 구성원에 공통적인 세포독성 메커니즘을 여전히 유지하면서 약간의 서열 변이를 일으킬 수 있을 것으로 간주된다(Scheutz F et al., J Clin Microbiol 50: 2951-63 (2012) 참조).

[0140] [178] 본 명세서에 기재된 PD-L1 결합 분자의 일부 실시예들에서, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드 성분은 하기 시가 독소 효과기 폴리펩티드 하위영역 중 2개 이상의 조합을 포함한다: (1) 탈면역화된 하위영역, (2) 시가 독소 A1 단편 영역의 카복시 말단 근처에 있는 프로테아제-절단 내성 하위 영역, 및 (3) T-세포 에피토프-펩티드 내장 또는 삽입 하위 영역.

[0141] 1. 탈면역화된 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드

[0142] [179] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자의 시가 독소 효과기 폴리펩티드는, 예를 들어 야생형 폴리펩티드 서열만을 포함하는 야생형 시가 독소, 야생형 시가 독소 폴리펩티드, 및/또는 야생형 시가 독소 효과기 폴리펩티드와 비교하여 탈면역화된다. 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및/또는 시가 독소 A 서브유닛 폴리펩티드는 천연 발생 여부에 관계없이 본 명세서에 기술된, WO 2015/113005, WO 2015/113007, WO 2016/196344, 및 WO 2018/14042에 기재된 및/또는 숙련된 작업자에게 알려진 방법에 의해 탈면역화될 수 있으며, 여기서 생성된 분자는 하나 이상의 시가 독소 A 서브유닛 기능을 보유한다. 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 척삭동물(chordate)에 대해 폴리펩티드를 투여한 후 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 항원성 및/또는 면역원성 잠재력을 감소시키기 위해 적어도 하나의 추정되는 내인성 에피토프 영역의 파괴를 포함할 수 있다.

[0143] [180] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 예를 들어 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 에피토프와 같은 내인성 에피토프 또는 에피토프 영역의 파괴를 포함한다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 본 명세서에 기재된 적어도 하나의 내인성 에피토프 영역의 파괴를 포함하고, 여기서 파괴(disruption)는 척삭동물에 폴리펩티드를 투여한 후 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 항원성 및/또는 면역원성 잠재력을 감소시키고, 및 여기서 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 하나 이상의 시가 독소 A 서브유닛 기능, 예를 들어 상당한 수준의 시가 독소 세포독성을 나타낼 수 있다.

[0144] [181] 에피토프 영역과 관련하여 본 명세서에 사용된 용어 "파괴된(disrupted)" 또는 "파괴(disruption)"는 에피토프 영역에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실, 2개 이상의 아미노산 잔기의 역전(여기서 역전된 아미노산 잔기 중 하나 이상이 에피토프 영역에 있음), 에피토프 영역에서 하나 이상의 아미노산이 삽입, 에피토프 영역에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 지칭한다. 돌연변이에 의한 에피토프 영역 파괴는 비표준 아미노산 및/또는 비천연 아미노산으로의 아미노산 치환을 포함한다. 에피토프 영역은 대안적으로 에피토프 영역에서 적어도 하나의 아미노산을 차폐하는 공유 결합 화학 구조의 추가에 의한 아미노산 변형을 포함하는 돌연변이에 의해 파괴될 수 있다(예: 문헌 참조 - PEG화(PEGylation)(Zhang C et al., BioDrugs 26: 209-15 (2012) 참조), 소분자 보조제(Flower D, Expert Opin Drug Discov 7: 807-17 (2012), 및 부위 특이적 알부민화(Lim S et al., J Control Release 207-93(2015)).

[0145] [182] 특정 에피토프 영역 및 파괴는 서열 목록에 제공된 천연 시가 독소 A 서브유닛의 특정 아미노산 위치를 참조하여 본 명세서에 표시되고, 천연 발생 시가 독소 A 서브유닛은 성숙한 시가 독소 A 서브유닛체 생산하기 위해 제거되고 숙련된 작업자가 인식할 수 있는 아미노-말단에서 약 22개 아미노산의 신호 서열을 함유하는 전구체 형태를 포함할 수 있음을 언급한다. 추가로, 특정 에피토프 영역 파괴는 천연 시가 독소 A 서브유닛 내의 특정 위치에 천연적으로 존재하는 특정 아미노산(예: 세린 잔기의 경우 S)을 참조하여 본 명세서에 표시되고(예: 아미노 말단으로부터 위치 33의 세린 잔기의 경우 S33), 그 뒤에 해당 잔기가 논의 중인 특정 돌연변이에서 치환된 아미노산이 온다(예: S33I는 아미노 말단의 아미노산 잔기 33에서 세린에 대한 이소류신의 아미노산 치환을 나타냄).

[0146] [183] 본 발명의 일부 실시예들에서, 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 본 명세서에 제공된 적어도 하나의 에피토프 영역의 파괴를 포함한다. 일부 실시예들에서, 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 WO 2015/113005 또는 WO 2015/113007에 기재된 적어도 하나의 에피토프 영역의 파괴를 포함한다.

[0147] [184] 본 발명의 일부 실시예들에서, 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 다음으로 이루어지는 천연 위치 아미노산의 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 적어도 하나의 파괴를 포함하는 전장 시가 독소 A 서브유닛(예: SLT-1A(SEQ ID NO:1), StxA(SEQ ID NO:2), 또는 SLT-2A(SEQ ID NO:3))을 포함하거나 필수적으로 이들로만 이루어진다: SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1-15; SEQ ID NO:3의 3-14; SEQ ID NO:3의 26-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 27-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 39-48; SEQ ID NO:3의 42-48; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 53-66; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94-115; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141-153; SEQ ID NO:3의 140-156; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 179-190; SEQ ID NO:3의 179-191; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; SEQ ID NO:3의 210-218; SEQ ID NO:3의 240-258; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 243-257; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 254-268; SEQ ID NO:3의 262-278; SEQ ID NO:3의 281-297; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 285-293; 또는 시가 독소 A 서브유닛 폴리펩티드, 보존된 시가 독소 효과기 폴리펩티드 하위-영역. 및/또는 비-천연 시가 독소 효과기 폴리펩티드 서열에서 동등한 위치.

[0148] [185] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 169의 서열을 포함한다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 170의 서열을 포함한다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 173의 서열을 포함한다.

[0149] [186] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 절단된 시가 독소 A 서브유닛을 포함하거나 필수적으로 이로만 이루어진다. 시가 독소 A 서브유닛의 절단은 시가 독소 효과기 기능에 영향을 미치지 않고 전체 에피토프 영역(들)의 결실을 초래할 수 있다. 유의한 효소 활성을 나타내는 것으로 나타난 가장 작은 시가 독소 A 서브유닛 단편은 StxA의 잔기 75-247로 구성된 폴리펩티드였다(Al-Jaufy A et al., Infect Immun 62: 956-60 (1994)). SLT-1A, StxA, 또는 SLT-2A의 카복시 말단을 아미노산 1-251로 절단하면 예측된 B-세포 에피토프 영역 2개, 예측된 CD4 양성(CD4+) T-세포 에피토프 2개, 및 예측된 불연속 B-세포 에피토프가 제거된다. SLT-1A, StxA, 또는 SLT-2A의 아미노 말단을 75-293으로 절단하면 최소한 3개의 예측된 B 세포 에피토프 영

역과 3개의 예측된 CD4+ T-세포 에피토프가 제거된다. SLT-1A, StxA, 또는 SLT-2A의 아미노 말단과 카복시 말단을 모두 75-251로 절단하면 예측된 B 세포 에피토프 영역이 5개 이상; 4개의 추정 CD4+ T-세포 에피토프; 및 하나의 예측된 불연속 B 세포 에피토프가 결실된다.

[0150] [187] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 적어도 하나의 돌연변이, 예를 들어 제공된 에피토프 영역에서 결실, 삽입, 역위, 또는 치환을 갖는 전장 또는 절단된 시가 독소 A 서브유닛을 포함하거나 필수적으로 이로만 이루어진다. 일부 실시예들에서, 폴리펩티드는 에피토프 영역 내의 적어도 하나의 아미노산의 결실을 포함하는 파괴를 포함한다. 일부 실시예들에서, 폴리펩티드는 에피토프 영역 내에 적어도 하나의 아미노산의 삽입을 포함하는 파괴를 포함한다. 일부 실시예들에서, 폴리펩티드는 아미노산의 역전을 포함하는 파괴를 포함하고, 여기서 적어도 하나의 역전된 아미노산은 에피토프 영역 내에 있다. 일부 실시예들에서, 폴리펩티드는 비표준 아미노산 또는 화학적으로 변형된 측쇄를 갖는 아미노산으로의 아미노산 치환과 같은 돌연변이를 포함하는 파괴를 포함한다.

[0151] [188] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 천연 서열에 비교하여 하나 이상의 돌연변이를 갖는 전장 또는 절단된 시가 독소 A 서브유닛을 포함하거나 필수적으로 이로만 이루어진다: A, G, V, L, I, P, C, M, F, S, D, N, Q, H, 및 K. 일부 실시예들에서, 폴리펩티드는 치환이 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 천연 서열에 비교하여 단일 돌연변이를 갖는 전장 또는 절단된 시가 독소 A 서브유닛을 포함하거나 필수적으로 이로만 이루어진다: D에서 A, D에서 G, D에서 V, D에서 L, D에서 I, D에서 F, D에서 S, D에서 Q, E에서 A, E에서 G, E에서 V, E에서 L, E에서 I, E에서 F, E에서 S, E에서 Q, E에서 N, E에서 D, E에서 M, E에서 R, G에서 A, H에서 A, H에서 G, H에서 V, H에서 L, H에서 I, H에서 F, H에서 M, K에서 A, K에서 G, K에서 V, K에서 L, K에서 I, K에서 M, K에서 H, L에서 A, L에서 G, N에서 A, N에서 G, N에서 V, N에서 L, N에서 I, N에서 F, P에서 A, P에서 G, P에서 F, R에서 A, R에서 G, R에서 V, R에서 L, R에서 I, R에서 F, R에서 M, R에서 Q, R에서 S, R에서 K, R에서 H, S에서 A, S에서 G, S에서 V, S에서 L, S에서 I, S에서 F, S에서 M, T에서 A, T에서 G, T에서 V, T에서 L, T에서 I, T에서 F, T에서 M, T에서 S, Y에서 A, Y에서 G, Y에서 V, Y에서 L, Y에서 I, Y에서 F, 및 Y에서 M.

[0152] [189] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 면역원성 잔기의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 천연 아미노산 잔기 서열에 비교하여 하나 이상의 돌연변이를 갖는 및/또는 에피토프 영역 내의 전장 또는 절단된 시가 독소 A 서브유닛을 포함하거나 필수적으로 이로만 이루어지고, 여기서 적어도 하나의 치환은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산의 천연 위치한 군에서 발생한다: SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 4; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 8; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 9; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 11; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 33; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 43; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 44; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 45; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 46; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 47; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 48; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 49; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 50; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 51; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 53; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 54; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 55; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 56; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 57; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 58; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 59; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 60; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 61; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 62; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 84; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 88; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 96; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 104; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 105; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 107; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 108; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 109; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 110; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 111; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 112; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 147; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 154; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 179; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 180; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 181; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 183; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 184; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 185; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 186; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 187; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 188; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 189; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 198; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; SEQ ID NO:3의 241; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 242; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 247; SEQ ID NO:3의 247; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 248; SEQ ID NO:3의 250; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 251; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 264; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의

265; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 286.

[0153] [190] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 면역원성 잔기의 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 및/또는 에피토프 영역 내의 전장 또는 절단된 시가 독소 A 서브유닛을 포함하거나 필수적으로 이로만 이루어지고, 여기서 적어도 하나의 치환은 다음의 천연 위치들 중 하나에 위치한 자연 발생 아미노산에 대하여 비-보존적 아미노산(예를 들어 하기 표 4 참조)에 대한 것이다: SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 4; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 8; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 9; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 11; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 33; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 43; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 44; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 45; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 46; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 47; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 48; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 49; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 50; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 51; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 53; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 54; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 55; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 56; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 57; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 58; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 59; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 60; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 61; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 62; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 84; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 88; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 96; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 104; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 105; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 107; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 108; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 109; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 110; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 111; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 112; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 147; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 154; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 179; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 180; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 181; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 183; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 184; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 185; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 186; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 187; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 188; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 189; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 198; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; SEQ ID NO:3의 241; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 242; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 247; SEQ ID NO:3의 247; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 248; SEQ ID NO:3의 250; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 251; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 264; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 265; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 286.

[0154] [191] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된 전장 또는 절단된 시가 독소 A 서브유닛을 포함하거나 필수적으로 이로만 구성된다: K1에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 H; T4에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; D6에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; S8에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; T8에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; T9에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; S9에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; K11에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 H; T12에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; S33에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; S43에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; G44에서 A 및 L; S45에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; T45에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; G46에서 A 및 P; D47에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; N48에서 A, G, V, L, 및 M; L49에서 A 또는 G; F50; A51에서 V; D53에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; V54에서 A, G, 및 L; R55에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; G56에서 A 및 P; I57에서 A, G, M, 및 F; L57에서 A, G, M, 및 F; D58에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; P59에서 A, G, 및 F; E60에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, 및 R; E61에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, 및 R; G62에서 A; D94에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; R84에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; V88에서 A 및 G; I88에서 A, G, 및 V; D94; S96에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; T104에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; A105에서 L; T107에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; S107에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; L108에서 A, G, 및 M; S109에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; T109에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; G110에서 A; D111에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; S112에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; D141에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; G147에서 A; V154에서 A 및 G; R179에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; T180에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; T181에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; D183에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; D184에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; L185에서 A, G, 및 V; S186에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; G187에서 A; R188에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; S189에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; D197에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; D198에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; R204에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R205에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; C242에서 A, G, V, 및 S; S247에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; Y247에서 A, G, V, L, I, F, 및

M; R248에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R250에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R251에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; C262에서 A, G, V, 및 S; D264에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; G264에서 A; 및 T286에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S.

[0155] [192] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 하기 아미노산 치환 중 적어도 하나를 갖는 전장 또는 절단된 시가 독소 A 서브유닛을 포함하거나 필수적으로 이로만 이루어진다: K1A, K1M, T4I, D6R, S8I, T8V, T9I, S9I, K11A, K11H, T12K, S33I, S33C, S43N, G44L, S45V, S45I, T45V, T45I, G46P, D47M, D47G, N48V, N48F, L49A, F50T, A51V, D53A, D53N, D53G, V54L, V54I, R55A, R55V, R55L, G56P, I57F, I57M, D58A, D58V, D58F, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, R84A, V88A, D94A, S96I, T104N, A105L, T107P, L108M, S109V, T109V, G110A, D111T, S112V, D141A, G147A, V154A, R179A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184A, D184F, L185V, L185D, S186A, S186F, G187A, G187T, R188A, R188L, S189A, D198A, R204A, R205A, C242S, S247I, Y247A, R248A, R250A, R251A, 또는 D264A, G264A, T286A, 및/또는 T286I. 이러한 에피토프 파괴 치환은 결합되어 에피토프 영역당 다중 치환 및/또는 시가 독소 효과기 기능을 여전히 유지하면서 파괴된 다중 에피토프 영역을 갖는 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 형성할 수 있다. 예를 들어 천연적으로 위치한 치환들인 K1A, K1M, T4I, D6R, S8I, T8V, T9I, S9I, K11A, K11H, T12K, S33I, S33C, S43N, G44L, S45V, S45I, T45V, T45I, G46P, D47M, D47G, N48V, N48F, L49A, F50T, A51V, D53A, D53N, D53G, V54L, V54I, R55A, R55V, R55L, G56P, I57F, I57M, D58A, D58V, D58F, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, R84A, V88A, D94A, S96I, T104N, A105L, T107P, L108M, S109V, T109V, G110A, D111T, S112V, D141A, G147A, V154A, R179A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184A, D184F, L185V, L185D, S186A, S186F, G187A, G187T, R188A, R188L, S189A, D198A, R204A, R205A, C242S, S247I, Y247A, R248A, R250A, R251A, 또는 D264A, G264A, T286A, 및/또는 T286I은 천연적으로 위치한 잔기에서의 치환들인 K1A, K1M, T4I, D6R, S8I, T8V, T9I, S9I, K11A, K11H, T12K, S33I, S33C, S43N, G44L, S45V, S45I, T45V, T45I, G46P, D47M, D47G, N48V, N48F, L49A, F50T, A51V, D53A, D53N, D53G, V54L, V54I, R55A, R55V, R55L, G56P, I57F, I57M, D58A, D58V, D58F, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, R84A, V88A, D94A, S96I, T104N, A105L, T107P, L108M, S109V, T109V, G110A, D111T, S112V, D141A, G147A, V154A, R179A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184A, D184F, L185V, L185D, S186A, S186F, G187A, G187T, R188A, R188L, S189A, D198A, R204A, R205A, C242S, S247I, Y247A, R248A, R250A, R251A, 또는 D264A, G264A, T286A, 및/또는 T286I과 가능한 곳에서 조합되어 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 생성할 수 있다.

[0156] [193] 본 명세서에 기재된 임의의 탈면역된 시가 독소 효과기 폴리펩티드 하위영역 및/또는 에피토프 파괴 돌연변이는 단독으로 또는 본 명세서에 기재된 방법을 포함하여 본 명세서에 기재된 바와 같은 각각의 개별 실시예와 조합하여 사용될 수 있다.

[0157] 2. 프로테아제 절단 내성, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드

[0158] [194] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자의 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 (1) 카복시-말단을 갖는 시가 독소 A1 단편 유래 영역 및 (2) 시가 독소 A1 단편 영역의 카복시-말단에 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함한다. 시가 독소 성분과 결합 분자의 다른 성분(예: 세포 표적 결합 영역) 사이의 연결 안정성을 개선하면 예를 들어 단백질 분해의 결과와 같은 세포-표적화의 연결 파괴 및 손실로 인한 비특이적 독성을 감소시켜 유기체에 투여한 후 독성 프로파일을 개선할 수 있다.

[0159] [195] 시가 독소 패밀리의 구성원의 시가 독소 A 서브유닛은 시가 독소 기능에 중요한 A1 단편 영역의 카복시 말단에 보존된 퓨린-절단 부위를 포함한다. 퓨린-절단 부위 모티프 및 퓨린-절단 부위는 표준 기술 및/또는 본 명세서의 정보를 사용하여 숙련된 작업자에 의해 확인될 수 있다.

[0160] [196] 시가 독소 A 서브유닛 및 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 퓨린-절단 모티프 및 퓨린-절단 부위는 표준 방법 및/또는 본 명세서의 정보를 사용하여 숙련된 작업자에 의해 확인될 수 있다. 퓨린은 최소 공통 모티프(consensus motif) R-x-x-R을 절단한다(Schalken J et al., *J Clin Invest* 80: 1545-9 (1987); Bresnahan P et al., *J Cell Biol* 111: 2851-9 (1990); Hatsuzawa K et al., *J Biol Chem* 265: 22075-8 (1990); Wise R et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9378-82 (1990); Molloy S et al., *J Biol Chem* 267: 16396-402 (1992)). 이와 일관되게, 많은 퓨린 억제제는 모티프 R-x-x-R을 포함하는 펩티드를 포함한다. 퓨린의 합성 억제제의 예는 펩티드 R-V-K-R을 포함하는 분자이다(Henrich S et al., *Nat Struct Biol* 10: 520-6 (2003)). 일반적으로, 두 개의 아미노산 잔기에 의해 분리된 두 개의 양전하를 띤 아미노산이 있는 표면 접근 가능한 이염기성(dibasic) 아미노산 모티프를 포함하는 펩티드 또는 단백질은 모티프의 마지막 염기성 아미노산의 카복시 결합에서 일어나

는 절단으로 퓨린-절단에 대해 민감할 것으로 예측할 수 있다.

[0161] [197] 퓨린에 의해 절단된 기질의 공통 모티프는 어느 정도 특이성으로 확인되었다. 퓨린-절단 부위 모티프는 P14에서 P6'으로 표지될 수 있는 20개의 연속 아미노산 잔기 영역을 포함하는 것으로 "Schechter I, Berger, A, *Biochem Biophys Res Commun* 32: 898-902 (1968)"에 기술된 명명법을 사용하여 설명되었다(Tian S et al., Int J Mol Sci 12: 1060-5 (2011)). 이 명명법에 따르면 퓨린-절단 부위는 P1으로 지정된 아미노산 잔기의 카복시 결합에 있고, 퓨린-절단 모티프의 아미노산 잔기는 P2, P3, P4 등으로 이 참조 P1 잔기로부터 아미노-말단을 향하여 가는 방향으로 번호가 매겨진다. P1 참조 잔기(reference residue)에서 카복시-말단을 향하는 모티프의 아미노산 잔기는 프라임 표기법(prime notation) P2', P3', P4' 등으로 넘버링이 된다. 이 명명법을 사용하여 P6에서 P2' 영역은 퓨린(furin)의 효소 도메인에 의해 결합되는 퓨린 절단 모티프의 코어 기질(substrate)을 나타낸다. 두 개의 측면 영역 P14~P7 및 P3'~P6'에는 종종 극성 아미노산 잔기가 풍부하여 이들 사이에 위치한 코어 퓨린 절단 부위에 대한 접근성을 높인다.

[0162] [198] 시가 독소 A1 단편 및 A2 단편 사이의 접합점에서 천연 시가 독소 A 서브유닛에서 발견되는 20개의 아미노산 잔기, 퓨린-절단 모티프, 및 퓨린-절단 부위는 특정 시가 독소에서 잘 특징지어진다. 예를 들어, StxA(SEQ ID NO:2) 및 SLT-1A(SEQ ID NO:1)에서, 이 퓨린-절단 모티프는 L238에서 F257에 천연적으로 위치하고, SLT-2A(SEQ ID NO:3)에서 이 퓨린-절단 모티프는 V237에서 Q256에 천연적으로 위치한다. 본 명세서에 기술된 아미노산 상동성(amino acid homology), 실험 및/또는 퓨린 절단 분석에 기초하여, 숙련된 작업자는 다른 천연 시가 독소 A 서브유닛 또는 시가 독소 효과기 폴리펩티드에서 퓨린-절단 모티프를 식별할 수 있는데, 여기서 모티프들은 실제 퓨린-절단 모티프이거나 또는 진핵 세포 내에서 그 분자들의 퓨린-절단 이후 A1 및 A2 단편들의 생성을 초래할 것으로 예측된다.

[0163] [199] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 (1) 카복시-말단을 갖는 시가 독소 A1 단편 유래 폴리펩티드 및 (2) 시가 독소 A1 단편 유래 폴리펩티드의 카복시-말단에서 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함한다. 시가 독소 A1 단편 유래 폴리펩티드의 카복시-말단은 숙련된 작업자가 당업계에 공지된 기술을 사용함으로써 확인할 수 있는데, 예를 들어 (i) 자연 발생 시가 독소와 함께 보존된 퓨린-절단 모티프, (ii) 자연 발생 시가 독소로 보존된 표면 노출, 확장 루프 및/또는 (iii) ERAD 시스템에 의해 인식될 수 있는 주로 소수성인 아미노산 잔기의 스트레치(즉, 소수성 "패치")를 확인하기 위하여 단백질 서열 정렬 소프트웨어를 사용할 수 있다.

[0164] [200] 결합 분자의 프로테아제-절단 내성 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 (1) 시가 독소 A1 단편 영역의 카복시-말단에서 퓨린-절단 모티프가 완전히 결여되어 있을 수 있고 및/또는 (2) 시가 독소 A1 단편 영역 및/또는 시가 독소 A1 단편의 카복시-말단에서 유래된 영역의 카복시 말단에서 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함할 수 있다. 퓨린-절단 모티프의 파괴는 퓨린-절단 모티프의 아미노산 잔기에 대한 다양한 변경을 포함하는데, 예를 들어, 번역 후 변형(들), 아미노산 작용기의 하나 이상의 원자 변경, 아미노산 작용기에 대한 하나 이상의 원자의 추가, 비-단백질성 모이어티(들)에 대한 연관, 및/또는 분지형 단백질성 구조를 초래하는 것과 같은 아미노산 잔기, 펩티드, 폴리펩티드에 대한 연결과 같은 것들이다.

[0165] [201] 프로테아제-절단 내성, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 천연 발생 여부에 상관없이 본 명세서에 기술된, WO 2015/191764에 기술된 및/또는 숙련된 작업자에게 공지된 방법을 사용하여 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및/또는 시가 독소 A 서브유닛 폴리펩티드로부터 생성될 수 있고, 여기서 생성된 분자는 여전히 하나 이상의 시가 독소 A 서브유닛 기능을 유지한다.

[0166] [202] 퓨린-절단 부위 또는 퓨린-절단 모티프와 관련하여, 용어 "파괴(disruption)" 또는 "파괴된(disrupted)"은 야생형 시가 독소 A 서브유닛 또는 야생형 폴리펩티드 서열만을 포함하는 야생형 시가 독소 A 서브유닛으로부터 유래한 폴리펩티드의 퓨린-절단에 비교하여 시가 독소 A1 단편 영역 또는 이에서 유래된 식별가능한 영역의 카복시-말단에 근접한 퓨린-절단의 감소를 초래하는 돌연변이와 같이 천연 발생 퓨린-절단 부위 및/또는 퓨린-절단 모티프로부터의 변경을 지칭한다. 퓨린-절단 모티프의 아미노산 잔기에 대한 변경(alteration)은 예를 들어 퓨린-절단 모티프의 결실, 삽입, 역위, 치환, 및/또는 카복시-말단 절단과 같은 퓨린-절단 모티프의 돌연변이뿐만 아니라 예를 들어, 아미노산 잔기의 작용기(functional group)에 분자를 접합 또는 연결하는 것을 수반하는 글리코실화, 알부민화 등의 결과와 같은 번역-후 변형(post-translation modification)을 포함한다. 퓨린-절단 모티프는 약 20개의 아미노산 잔기로 구성되어 있기 때문에 이론상 이러한 20개 위치 중 어느 하나의 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 변경, 변형, 돌연변이, 결실, 삽입, 및/또는 절단은 퓨린-절단 민감성(sensitivity)의 감소를 초래할 수 있다(Tian S et al., Sci Rep 2: 261 (2012)). 퓨린-절단 부위 및/또는 퓨

린-절단 모티프의 파괴는 포유동물의 혈관계에서 흔히 볼 수 있는 트립신 및 세포 외 프로테아제와 같은 다른 프로테아제에 의한 절단에 대한 내성을 증가시키거나 증가시키지 않을 수 있다. 주어진 프로테아제의 절단 민감성에 대한 주어진 파괴의 효과는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 숙련된 작업자에 의해 시험될 수 있다.

[0167] [203] "파괴된 퓨린-절단 모티프(disrupted furin-cleavage motif)"는 시가 독소 A1 단편 및 A2 단편 영역 사이의 접합부에서 천연 시가 독소 A 서브유닛에서 발견되고, 시가 독소 A 서브유닛의 퓨린-절단이 A1 및 A2 단편의 생성을 초래하도록 위치한 보존된 퓨린-절단 모티프를 나타내는 20개의 아미노산 잔기로부터 유래된 하나 이상의 아미노산 잔기에 대한 변경을 포함하는 퓨린-절단 모티프이고, 여기서 파괴된 퓨린-절단 모티프는 숙련된 작업자에게 알려진 또는 본 명세서에 기술된 적합한 분석을 사용하여 퓨린 절단을 모니터링하기에 충분한 사이즈의 카복시-말단 폴리펩티드에 융합된 야생형, 시가 독소 A1 단편 영역을 포함하는 참조 분자에 비교하여 재현 가능한 방식으로 실험적으로 감소된 퓨린 절단을 나타낸다.

[0168] [204] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 (1) 카복시-말단을 갖는 시가 독소 A1 단편 유래 폴리펩티드 및 (2) 시가 독소 A1 단편 폴리펩티드 영역의 카복시-말단에서 파괴된 퓨린-절단 모티프르르 포함하고, 여기서 시가 독소 효과기 폴리펩티드(및 이를 포함하는 임의의 결합 분자)는 참조 분자, 예를 들어 A1 단편의 카복시-말단을 포함하는 야생형 시가 독소 폴리펩티드 및/또는 또는 A1과 A2 단편 사이의 보존된 퓨린-절단 모티프에 비교하여 더욱 퓨린-절단 내성이다. 예를 들어, 참조 분자와 비교하여 한 분자의 퓨린 절단 감소는 WO 2015/191764에 기재된 시험관 내 퓨린 절단 분석을 사용하여 결정할 수 있고, 동일한 조건을 사용하여 수행한 다음 퓨린-절단의 변화를 정량적으로 측정하기 위해 절단으로부터의 임의의 단편의 밴드 밀도의 정량을 수행한다.

[0169] [205] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 야생형, 시가 독소 A 서브유닛과 비교하여 시험관 내 및/또는 생체 내에서 퓨린-절단에 대해 더 내성이 있다.

[0170] [206] 일반적으로, 결합 분자의 프로테아제-절단 민감성은 시가 독소 A1 단편을 포함하는 야생형 시가 독소 효과기 폴리펩티드로 대체된 퓨린-절단 저항성 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 갖는 동일한 분자와 비교함으로써 시험된다. 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함하는 PD-L1 결합 분자는 그 카복시-말단에서 펩티드 또는 폴리펩티드에 융합된 야생형 시가 독소 A1 단편을 포함하는 참조분자에 비교하여 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 또는 그 이상의 시험관 내 퓨린 절단의 감소를 나타낸다.

[0171] [207] 여러 퓨린-절단 모티프 파괴가 설명되었다. 예를 들어, 최소 R-x-x-R 모티프에서 2개의 보존된 아르기닌을 알라닌으로 돌연변이시키면 퓨린 및/또는 퓨린 유사 프로테아제에 의한 처리가 완전히 차단된다(예: Duda A et al., J Virology 78: 13865-70 (2004) 참조). 퓨린 절단 부위 모티프는 약 20개의 아미노산 잔기로 구성되어 있기 때문에 이론적으로 이들 20개 아미노산 잔기 위치 중 하나 이상을 포함하는 특정 돌연변이는 퓨린 절단을 폐지하거나 퓨린 절단 효율을 감소시킬 수 있다(예: Tian S et al., Sci Rep 2: 261 (2012) 참조).

[0172] [208] 본 발명의 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 분자는 시가 독소 패밀리의 구성원의 하나 이상의 A 서브유닛으로부터 유래된 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 보존되고 고도로 접근 가능하고 시가 독소 A 서브유닛의 프로테아제-절단에 민감한 루프로부터 유래된 하나 이상의 아미노산에서의 파괴를 포함한다. 예를 들어, StxA 및 SLT-1A에서 이 고도로 접근 가능한 프로테아제-민감성 루프는 천연적으로 아미노산 잔기 242에서 261 사이에 위치하고, SLT-2A에서 이 보존된 루프는 천연적으로 아미노산 잔기 241에서 260 사이에 위치한다. 폴리펩티드 서열 상동성을 기반으로 숙련된 작업자는 다른 시가 독소 A 서브유닛에서 이 보존되고 고도로 접근가능한 루프 구조를 확인할 수 있다. 이 루프에서 아미노산 잔기에 대한 특정 돌연변이는 루프 내의 특정 아미노산 잔기의 단백질 분해 절단에 대한 접근성을 감소시킬 수 있고 이는 퓨린-절단 민감성을 감소시킬 수 있다.

[0173] [209] 본 발명의 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 분자는 시가 독소 A 서브유닛 사이에 보존된 표면-노출된 프로테아제 민감성 루프의 돌연변이를 포함하는 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 분자는 시가 독소 A 서브유닛의 이러한 프로테아제-민감성 루프에서의 돌연변이를 포함하는 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하고, 상기 돌연변이는 퓨린-절단 민감성이 감소되도록 루프 내에서 특정 아미노산 잔기의 표면 접근성을 감소시킨다.

[0174] [210] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 파괴된 퓨린-절단 모티프는 예를 들어, 최소 퓨린 절단 모티프 R/Y-x-x-R의 위치 1 및 4에 있는 아미노산 잔기와 같이 공통(consensus) 아미노산 잔기 P1 및 P4 중 하나 또는 둘 모두의 존재, 위치, 또는 작용기의 파괴를 포함한다. 예를 들어, 최소 퓨린 공통 부위

R-x-x-R에서 2개의 아르기닌 잔기 중 하나 또는 둘 모두의 알라닌으로의 돌연변이는 퓨린-절단 모티프가 파괴하고 해당 부위에서 퓨린-절단을 방지할 것이다. 유사하게, 최소 퓨린-절단 모티프 R-x-x-R에서 아르기닌 잔기 중 하나 또는 둘 모두의 아미노산 잔기를 숙련가에게 알려진 임의의 비보존적 아미노산 잔기로 치환하면 모티프의 퓨린-절단 민감성이 감소될 것이다. 특히, 예를 들어, A, G, P, S, T, D, E, Q, N, C, I, L, M, V, F, W, 및 Y와 같이 양전하가 없는 임의의 비염기성 아미노산 잔기로의 아르기닌의 아미노산 잔기 치환은 파괴된 퓨린-절단 모티프를 생성할 것이다.

[0175] [211] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 파괴된 퓨린-절단 모티프는 2개가 아닌 개재(intervening) 아미노산 잔기의 수의 관점에서 공통 아미노산 잔기 P4 및 P1 사이의 간격(spacing)에서의 파괴를 포함하고, 따라서, P4 및/또는 P1을 다른 위치로 변경하고 P4 및/또는 P1 지정을 제거한다. 예를 들어, 최소 퓨린-절단 부위 또는 코어 퓨린-절단 모티프의 퓨린-절단 모티프 내의 결실은 퓨린-절단 모티프의 퓨린-절단 민감도를 감소시킬 것이다.

[0176] [212] 본 발명의 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 야생형 시가 독소 A 서브유닛과 비교하여 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 최소 퓨린-절단 부위 R/Y-x-x-R 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함하는데, 예를 들어 StxA 및 SLT-1A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 경우, 천연 위치 아미노산 잔기 R248은 임의의 비-양(non-positively)으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되고 및/또는 R251은 임의의 비-양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되며; 및 SLT-2A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 경우, 천연 위치의 아미노산 잔기 Y247은 임의의 비-양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되고 그리고/또는 R250은 임의의 비-양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환된다.

[0177] [213] 본 발명의 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 비-파괴된 최소 퓨린-절단 부위 R/Y-x-x-R을 포함하지만, 대신 예를 들어, 예를 들어, 241-247 및/또는 252-259에 천연 위치하는 퓨린-절단 모티프 측면 영역에서 하나 이상의 아미노산 잔기에서 아미노산 치환과 같은 파괴된 측면 영역(flanking region)을 포함한다. 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린 절단 모티프는 퓨린-절단 모티프의 P1-P6 영역에 위치한 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환을 포함하고; P1'을 R, W, Y, F, 및 H와 같은 부피가 큰 아미노산으로 돌연변이시키는 것; 및 P2'를 극성 및 친수성 아미노산 잔기로 돌연변이시키는 것; 및 퓨린-절단 모티프의 P1'-P6' 영역에 위치한 하나 이상의 아미노산 잔기를 하나 이상의 부피가 크고 소수성인 아미노산 잔기로 치환하는 것을 포함한다.

[0178] [214] 본 발명의 일부 실시예들에서, 퓨린-절단 모티프의 파괴는 퓨린-절단 모티프 내의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 결실, 삽입, 역위, 및/또는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시예들에서, 프로테아제-절단 내성 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 시가 유사 독소 1(SEQ ID NO: 1) 또는 시가 독소(SEQ ID NO: 2)의 A 서브유닛의 249-251, 또는 시가-유사 독소 2(SEQ ID NO:3)의 247-250에, 또는 보존된 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및/또는 비-천연 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 등가 위치에 천연적으로 위치하는 아미노산 서열의 파괴를 포함한다. 일부 실시예들에서, 프로테아제-절단 내성, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 퓨린-절단 모티프 내의 적어도 하나의 아미노산의 결실을 포함하는 파괴를 포함한다. 일부 실시예들에서, 프로테아제-절단 내성, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 프로테아제-절단 모티프 영역 내에 적어도 하나의 아미노산의 삽입을 포함하는 파괴를 포함한다. 일부 실시예들에서, 프로테아제-절단 내성, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 아미노산의 역전을 포함하는 파괴를 포함하고, 여기서 적어도 하나의 역전된 아미노산은 프로테아제 모티프 영역 내에 있다. 일부 실시예들에서, 프로테아제-절단 내성(protease-cleavage resistant) 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 비표준 아미노산 또는 화학적으로 변형된 측쇄를 갖는 아미노산으로의 아미노산 치환과 같은 돌연변이를 포함하는 파괴를 포함한다.

[0179] [215] 본 발명의 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 퓨린-절단 모티프 내의 카복시-말단 아미노산 잔기의 9개, 10개, 11개, 또는 그 이상의 결실을 포함한다. 이들 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 퓨린-절단 부위 또는 최소 퓨린-절단 모티프를 포함하지 않을 것이다. 다시 말해서, 특정 실시예들은 A1 단편 영역의 카복시-말단에서 퓨린-절단 부위가 결여되어 있다.

[0180] [216] 본 발명의 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 야생형 시가 독소 A 서브유닛과 비교하여 아미노산 잔기 결실 및 아미노산 잔기 치환 둘 다를 포함한다. 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 최소 퓨린-절단 부위 R/Y-x-x-R 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 결실 및 치환을 포함하는데, 예를 들어 StxA 및 SLT-1A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 대해, 천연적으로 위치된 아미노산 잔기 R248은 임의의 비-양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되고 그리고/또는 R251은 임의의 비-양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되고; 및 SLT-2A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 경우, 천연 위치의 아미노산 잔기 Y247은 임의의 비-양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환되고 및/또는 R250은 비-양으로 대전된 임의의 아미노산 잔기로 치환된다.

[0181] [217] 본 발명의 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 야생형 시가 독소 A 서브유닛과 비교하여 아미노산 잔기 결실 및 아미노산 잔기 치환뿐만 아니라 카복시-말단 절단을 포함한다. 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 최소 퓨린-절단 부위 R/Y-x-x-R 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 결실 및 치환을 포함하는데, 예를 들어, StxA 및 SLT-1A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 경우, 임의의 비-양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환된 천연 위치 아미노산 잔기 R248 및/또는 임의의 비-양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환된 R251과 같은 것; 및 SLT-2A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 경우, 임의의 비-양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환된 천연 위치 아미노산 잔기 Y247 및/또는 임의의 비-양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환된 R250과 같은 것을 들 수 있다.

[0182] [218] 본 발명의 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 야생형 시가 독소 A 서브유닛과 비교하여 최소 퓨린-절단 부위 R/Y-x-x-R 내에 아미노산 치환 및 카복시-말단 절단을 둘 다 포함하는데, 예를 들어, StxA 및 SLT-1A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 경우, 천연 아미노산 위치 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 또는 그 이상에서 끝나는 절단 및 적절한 경우 임의의 비-양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환된 천연 위치 아미노산 잔기 R248 및/또는 R251을 포함하고; 및 SLT-2A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 경우, 천연 아미노산 위치 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 또는 그 이상에서 끝나는 절단 및 적절한 경우 임의의 비-양으로 대전된 아미노산 잔기로 치환된 천연 위치 아미노산 잔기 Y247 및/또는 R250을 포함한다.

[0183] [219] 본 발명의 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 삽입된 아미노 잔기(들)가 새롭게 퓨린-절단 부위를 생성하지 않는 한 야생형 시가 독소 A 서브유닛과 비교하여 하나 이상의 아미노산 잔기의 삽입을 포함한다. 일부 실시예들에서, 하나 이상의 아미노산 잔기의 삽입은 최소 퓨린 절단 부위 R/Y-x-x-R에서 아르기닌 잔기 사이의 자연적 간격을 파괴하는데, 예를 들어, 249 또는 250에서, 따라서 R248과 R251 사이에 하나 이상의 아미노산 잔기의 삽입을 포함하는 StxA 및 SLT-1A 유래 폴리펩티드, 또는 248 또는 249에서, 따라서 Y247과 R250 사이에 하나 이상의 아미노산 잔기의 삽입을 포함하는 SLT-2A 유래 폴리펩티드와 같은 것이다.

[0184] [220] 본 발명의 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 야생형 시가 독소 A 서브유닛과 비교하여 아미노산 잔기 삽입 및 카복시-말단 절단 둘 다를 포함한다. 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 야생형 시가 독소 A 서브유닛과 비교하여 아미노산 잔기 삽입 및 아미노산 잔기 치환을 둘 다 포함한다. 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 야생형 시가 독소 A 서브유닛과 비교하여 아미노산 잔기 삽입 및 아미노산 잔기 결실 둘 다를 포함한다.

[0185] [221] 본 발명의 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 야생형 시가 독소 A 서브유닛과 비교하여 아미노산 잔기 결실, 아미노산 잔기 삽입, 및 아미노산 잔기 치환을 포함한다.

[0186] [222] 본 발명의 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 야생형 시가 독소 A 서브유닛과 비교하여 아미노산 잔기 결실, 삽입, 치환, 및 카복시-말단 절단을 포함한다.

[0187] [223] 본 발명의 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 아미노산, 펩티드, 및/또는 폴리펩티드를 포함하는 분자 모이어티에 직접 융합되고, 여기서 융합된 구조는 단일의 연속 폴리펩티드를 포함한다. 이들 융합 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프 다음의 아미노산 서열은 융합 접합부(fusion junction)에서 새로운 퓨린-절단 부위를 생성해서는 안 된다.

[0188] [224] 임의의 상기 프로테아제-절단 내성, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 하위 영역, 및/또는 파괴된 퓨린-절단 모티프는 단독으로 또는 본 명세서에 기재된 방법을 포함하여 본 명세서에 기재된 바와 같은 각각의 개별 실시예와 조합하여 사용될 수 있다.

[0189] 3. T-세포 과면역화된, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드

[0190] [225] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자의 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 내장되거나 삽입된 에피토프-펩티드를 포함한다. 일부 실시예들에서, 에피토프-펩티드는 이종성 T-세포 에피토프-펩티드, 예를 들어 시가 독소 A 서브유닛에 대해 이종성인 것으로 간주되는 에피토프이다. 일부 실시예들에서, 에피토프-펩티드는 CD8+ T-세포 에피토프이다. 일부 실시예들에서, CD8+ T-세포 에피토프-펩티드는 10^{-4}몰 이하의 해리 상수(K_D)를 특징으

로 하는 MHC 클래스 I 분자에 대한 결합 친화성을 갖고 그리고/또는 생성된 MHC 클래스 I-에피토프-펩티드 복합체는 10^{-4}몰 이하의 해리 상수(K_D)를 특징으로 하는 T-세포 수용체(TCR)에 대한 결합 친화도를 갖는다.

[0191] [226] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 예를 들어 인간 CD8+ T-세포 에피토프와 같이 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 이종 T-세포 에피토프는 자연 발생 시가 독소 폴리펩티드 또는 시가 독소 효과기 폴리펩티드가 유래된 모 시가 독소 효과기 폴리펩티드에서 식별가능한 내인성 에페토프 또는 에피토프 영역(예: B-세포 에피토프 및/또는 CD4+ T-세포 에피토프)을 파괴하기 위하여 내장되거나 삽입된다.

[0192] [227] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드(및 이를 포함하는 임의의 결합 분자)는 예를 들어 야생형 시가 독소 폴리펩티드와 비교하여 CD8+ T-세포 과면역화된다. 각각의 CD8+ T-세포 과면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 내장되거나 삽입된 T-세포 에피토프-펩티드를 포함한다. 과면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드는, 자연 발생이든 아니든, 본 명세서에 기술된, WO 2015/113005에 기술된, 및/또는 당업자에게 알려진 방법을 사용하여 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및/또는 시가 독소 A 서브유닛 폴리펩티드로부터 생성될 수 있고, 여기서 생성되는 분자는 여전히 하나 이상의 시가 독소 A 서브유닛 기능을 보유한다.

[0193] [228] T 세포 에피토프는 항원성 펩티드로 구성되고 선형 아미노산 서열로 나타낼 수 있는 분자 구조이다. 일반적으로, T-세포 에피토프는 8 내지 11개의 아미노산 잔기 크기의 펩티드이다(Townsend A, Bodmer H, Annu Rev Immunol 7: 601-24 (1989)); 그러나, 특정 T-세포 에피토프-펩티드는 길이가 8개보다 작거나 11개 아미노산보다 큰 길이를 갖는다(예를 들어, Livingstone A, Fathman C, Annu Rev Immunol 5: 477-501(1987); Green K et al., Eur J Immunol 34: 2510-9(2004) 참조). 일부 실시예들에서, 내장되거나 삽입된 에피토프는 길이가 7개 이상의 아미노산 잔기이다. 일부 실시예들에서, 내장되거나 삽입된 에피토프는 Stone J et al., Immunology 126: 165-76(2009)의 공식을 사용하여 계산된 바와 같이 10mM 미만(예: 1-100μM)의 K_D를 특징으로 하는 결합 친화도를 갖는 TCR에 의해 결합된다. 그러나 MHC-에피토프와 TCR 사이의 주어진 범위 내에서 결합 친화도는 항원성 및/또는 면역원성과 상관관계가 없을 수 있다는 점에 유의해야 하는데(예를 들어, Al-Ramadi B et al., *J Immunol* 155: 662-73 (1995) 참조), MHC-펩티드-TCR 복합체 안정성, MHC-펩티드 밀도, 및 CD8과 같은 TCR 보조 인자의 MHC-비의존적 기능과 같은 것들 때문이다(Baker B et al., *Immunity* 13: 475-84 (2000); Hornell T et al., *J Immunol* 170: 4506-14 (2003); Woolridge L et al., *J Immunol* 171: 6650-60 (2003)).

[0194] [229] 본 발명의 일부 실시예들에서, 분자는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 추가 실시예에서, CD8+ T-세포 에피토프는 인간 면역계에 대한 CD8+ T-세포 에피토프이다. 일부 실시예들에서, CD8+ T-세포 에피토프는 적어도 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산 잔기를 갖는 펩티드이다. 일부 실시예들에서, CD8+ T-세포 에피토프는 9개의 아미노산 잔기를 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예들에서, CD8+ T-세포 에피토프는 숙련된 작업자에게 알려진 시험관 내 분석을 사용하여 결정되는 10mM 미만(예를 들어, 1-100μM)의 K_D를 특징으로 하는 결합 친화도로 인간 TCR에 의해 결합될 수 있다.

[0195] [230] 본 발명의 일부 실시예들에서, 분자는 NLVPMVATV(SEQ ID NO: 78)의 서열을 갖는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 분자는 서열 VTEHDTLLY(SEQ ID NO: 79)를 갖는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 분자는 서열 SIINFEKYL(SEQ ID NO: 80)을 갖는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 분자는 서열 GLDRNSGNY(SEQ ID NO: 81)를 갖는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 분자는 서열 GVMTRGRLK(SEQ ID NO: 82)를 갖는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 분자는 서열 GILGFVFTL(SEQ ID NO: 83)을 갖는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 분자는 서열 ILRGSVAHK(SEQ ID NO:: 84)를 갖는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다.

[0196] [231] 본 발명의 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 결합 분자는 SEQ ID NO: 1-18, 40-68, 169, 170, 또는 173 중 어느 하나를 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 어느 하나의 SEQ ID NO: 78-84중 어느 하나의 서열을 포함하는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 SEQ ID NO: 41을 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 SEQ ID NO: 78-84 중 어느 하나의 서열을 포함하는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 SEQ ID NO: 41을 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 SEQ ID NO: 78의 서열을 포함하는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 SEQ ID NO: 41을 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 SEQ ID NO: 79의 서열을 포함하는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 SEQ ID NO: 41을 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 SEQ ID NO: 80의

서열을 포함하는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 SEQ ID NO: 41을 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 SEQ ID NO: 81의 서열을 포함하는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 SEQ ID NO: 41을 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 SEQ ID NO: 82의 서열을 포함하는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 SEQ ID NO: 41을 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 SEQ ID NO: 83의 서열을 포함하는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 SEQ ID NO: 41을 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 SEQ ID NO: 84의 서열을 포함하는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다.

[0197] [232] 이종 T-세포 에피토프는 야생형 시가 독소 A 서브유닛; 자연 발생 시가 독소 A 서브유닛; 및/또는 본 명세서에 기술된, WO 2015/113005에 기술된, 및/또는 당업자에게 공지된 방법에 의한 변형을 위한 공급원 폴리펩티드로서 사용되는 모(parental) 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 이미 존재하지 않는 에피토프이다.

[0198] [233] 이종 T-세포 에피토프-펩티드는, 예를 들어, 공급원 폴리펩티드 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 생성하고, 하나 이상의 아미노산을 공급원 폴리펩티드에 융합시키고, 하나 이상의 아미노산을 공급원 폴리펩티드 내로 삽입하고, 하나의 펩티드를 공급원 펩티드에 연결하는 프로세스 및/또는 상기 프로세스들의 조합을 포함하여 숙련된 작업자에에 알려진 수많은 방법들을 통해 공급원 폴리펩티드 내로 통합될 수 있다. 이러한 방법의 결과는 하나 이상의 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프-펩티드를 포함하는 공급원 폴리펩티드의 변형된 변이체를 생성하는 것이다.

[0199] [234] T-세포 에피토프는 본 명세서에 기재된 바와 같이 사용하기 위한 다수의 공급원 분자로부터 선택되거나 유래될 수 있다. T-세포 에피토프는 다양한 자연 발생 단백질에서 생성되거나 유래될 수 있다. T-세포 에피토프는 예를 들어 미생물의 단백질과 같은 포유동물에 외래인 다양한 자연 발생 단백질로부터 생성되거나 유래될 수 있다. T-세포 에피토프는 돌연변이된 인간 단백질 및/또는 악성 인간 세포에 의해 비정상적으로 발현된 인간 단백질로부터 생성되거나 유래될 수 있다. T-세포 에피토프는 합성 분자에서 합성으로 생성되거나 유래될 수 있다(예를 들어, Carbone F et al., *J Exp Med* 167: 1767-9 (1988); Del Val M et al., *J Virol* 65: 3641-6 (1991); Appella E et al., *Biomed Pept Proteins Nucleic Acids* 1: 177-84 (1995); Perez S et al., *Cancer* 116: 2071-80 (2010) 참조).

[0200] [235] 임의의 T-세포 에피토프-펩티드가 이종 T-세포 에피토프로 사용되는 것으로 고려되지만, 특정 에피토프는 바람직한 특성에 기초하여 선택될 수 있다. 본 명세서에 기술된 한 가지 목적은 척추동물에 투여하기 위한 CD8+ T-세포 과면역 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 생성하는 것이고, 이는 이종 T-세포 에피토프가 고도로 면역원성이고 세포 표면에 있는 클래스 I 분자 MHC와 복합적으로 표시될 때 생체 내에서 강력한 면역 반응을 이끌어낼 수 있음을 의미한다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 CD8+ T-세포 에피토프인 하나 이상의 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프를 포함한다. 이종 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 CD8+ T-세포 과면역 시가 독소 효과기 폴리펩티드로 간주된다.

[0201] [236] T-세포 에피토프 성분은 척추동물 면역 반응을 유발할 수 있는 것으로 이미 알려진 다수의 공급원 분자로부터 선택되거나 유래될 수 있다. T-세포 에피토프는 예를 들어 병원성 미생물 및 비자기 암 항원의 단백질과 같은 척추동물에 외래인 다양한 자연 발생 단백질로부터 유래될 수 있다. 특히, 감염성 미생물은 알려진 항원 및/또는 면역원성 특성을 가진 수많은 단백질을 함유할 수 있다. 또한, 감염성 미생물은 항원성 및/또는 면역원성 하위 영역 또는 에피토프가 알려진 수많은 단백질을 함유할 수 있다.

[0202] [237] 예를 들어, 포유동물 숙주가 있는 세포 내 병원체의 단백질은 T-세포 에피토프의 공급원이다. 잘 연구된 항원 단백질 또는 펩티드와 함께 바이러스, 박테리아, 진균, 및 단세포 진핵생물과 같은 수많은 세포 내 병원체가 있다. T-세포 에피토프는 인간 바이러스 또는 다른 세포 내 병원체, 예를 들어, 미코박테리움과 같은 박테리아, 톡소플라스마와 같은 진균, 및 트리파노솜과 같은 원생생물로부터 선택되거나 확인될 수 있다.

[0203] [238] 예를 들어, 인간에게 감염되는 바이러스로부터의 바이러스 단백질의 면역원성 바이러스 펩티드 성분이 많이 있다. 수많은 인간 T-세포 에피토프는 HA 글리코프로틴 FE17, S139/1, CH65, C05, 헤마그글루티닌 1(HA1), 헤마그글루티닌 2(HA2), 비구조 단백질 1 및 2(NS1 및 NS 2), 매트릭스 단백질 1 및 2(M1 및 M2), 핵단백질(NP), 뉴라미니다제(NA))와 같은 단백질의 펩티드와 같이 인플루엔자 A 바이러스의 단백질 내의 펩티드에 매핑되었으며, 이들 펩티드 중 다수는 생체 외 분석의 사용에서와 같이 인간 면역 반응을 유도하는 것으로 나타났다. 유사하게, 수많은 인간 T 세포 에피토프는 단백질 pp65(UL83), UL128-131, 즉시 초기(immediate-early) 1(IE-1, UL123), 글리코프로틴 B, 외피 단백질(tegument proteins)과 같은 인간 거대 세포 바이러스(human cytomegaloviruses, HCMV)의 단백질의 펩티드 성분에 매핑되었고, 이들 펩티드의 다수는 생체 외 분석의

사용에서와 같이 인간 면역 반응을 유도하는 것으로 나타났다.

[0204] [239] 또 다른 예는 인간에게 많은 면역원성 암 항원이 있다는 것이다. 암 및/또는 종양 세포 항원의 CD8+ T-세포 에피토프는, 예를 들어, 차등 게놈학(differential genomics), 차등 단백질체학(differential proteomics), 면역단백질체학(immunoproteomics), 예측 후 검증(prediction then validation), 및 역-유전적 형질감염(reverse-genetic transfection)과 같은 유전적 접근 등의 당업계에 공지된 기술을 사용하여 숙련가에 의해 확인될 수 있다(예를 들어, Admon A et al., *Mol Cell Proteomics* 2: 388-98 (2003); Purcell A, Gorman J, *Mol Cell Proteomics* 3: 193-208 (2004); Comber J, Philip R, *Ther Adv Vaccines* 2: 77-89 (2014) 참조). 인간 암 및/또는 종양 세포에서 이미 확인되거나 발생할 것으로 예측되는 많은 항원 및/또는 면역원성 T-세포 에피토프가 있다. 예를 들어, T-세포 에피토프는 예를 들어 ALK, CEA, N-아세틸글루코사미닐-트랜스퍼라제 V(GnT-V), HCA587, PD-L1/neu, MAGE, Melan-A/MART-1, MUC-1, p53, 및 TRAG-3과 같이 네오플라스틱 세포들에서 일반적으로 돌연변이되거나 과발현된 인간 단백질에서 예측되어 왔다(*예를 들어,* van der Bruggen P et al., *Science* 254: 1643-7 (1991); Kawakami Y et al., *J Exp Med* 180: 347-52 (1994); Fisk B et al., *J Exp Med* 181: 2109-17 (1995); Guilloux Y et al., *J Exp Med* 183: 1173 (1996); Skipper J et al., *J Exp Med* 183: 527 (1996); Brossart P et al., 93: 4309-17 (1999); Kawashima I et al., *Cancer Res* 59: 431-5 (1999); Papadopoulos K et al., *Clin Cancer Res* 5: 2089-93 (1999); Zhu B et al., *Clin Cancer Res* 9: 1850-7 (2003); Li B et al., *Clin Exp Immunol* 140: 310-9 (2005); Ait-Tahar K et al., *Int J Cancer* 118: 688-95 (2006); Akiyama Y et al., *Cancer Immunol Immunother* 61: 2311-9 (2012) 참조). 또한, 인간 암 세포에서 T-세포 에피토프의 합성 변이체가 만들어졌다(예를 들어, Lazoura E, Apostolopoulos V, *Curr Med Chem* 12: 629-39 (2005); Douat-Casassus C et al., *J Med Chem* 50: 1598-609 (2007) 참조).

[0205] [240] 또한, MHC 클래스 I 제시를 위한 다중 면역원성 T-세포 에피토프는 예를 들어 복수의 T-세포 에피토프의 동시 표적화된 전달에서 사용하기 위해 동일한 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 내장될 수 있다.

[0206] [241] 본 명세서에 기술된 프로테아제-절단 내성, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 하위영역 및/또는 파괴된 퓨린-절단 모티프는 단독으로 또는 본 명세서에 기술된 방법을 포함하여 본 명세서에 기술된 각각의 개별 실시예와 조합하여 사용될 수 있다.

[0207] C. 추가 외인성 물질

[0208] [242] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 추가 외인성 물질(additional exogenous material)을 포함한다. 본 명세서에 사용된 "추가 외인성 물질(additional exogenous material)"은 결합 분자에 의해 세포 내부로 수송될 수 있는 하나 이상의 원자 또는 분자를 지칭한다. 일부 실시예들에서, 추가적인 외인성 물질은 그것이 전형적으로 천연 표적 세포에 존재하든 천연 시가 독소에 존재하든, 결합 분자에 의해 세포 내부로 수송되는 임의의 물질이다. 일부 실시예들에서, 추가적인 외인성 물질은 일반적으로 시가 독소 및/또는 천연 표적 세포에 존재하지 않는 물질이다. 어떤 의미에서 전체 결합 분자는 세포로 들어가는 외인성 물질이다. 따라서 "추가" 외인성 물질은 코어 결합 분자 자체에 연결되지만 그것이 아닌 이종 물질이다. 추가 외인성 물질의 비제한적 예는 방사성 핵종(radionucleides), 펩티드, 검출 촉진제, 단백질, 소분자 화학요법제, 및 폴리뉴클레오티드이다.

[0209] [243] 결합 분자의 일부 실시예들에서, 추가의 외인성 물질은 하나 이상의 방사성 핵종(radionucleides), 예를 들어, ^{211}At, ^{131}I, ^{125}I, ^{90}Y, ^{111}In, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{212}Bi, ^{32}P, ^{60}C, 및/또는 루테튬의 방사성 동위원소이다.

[0210] [244] 본 발명의 일부 실시예들에서, 추가적인 외인성 물질은 예를 들어 BCL-2, 카스파제(예를 들어, 카스파제-3 또는 카스파제-6의 단편), 사이토크롬, 그랜자임 B, 아폽토시스-유도 인자(AIF), BAX, tBid(절단된 Bid), 및 이들의 프로아폽토시스 단편 또는 유도체와 같은 프로아폽토시스 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질을 포함한다(예를 들어 다음을 참조: Ellerby H et al., *Nat Med* 5: 1032-8 (1999); Mai J et al., *Cancer Res* 61: 7709-12 (2001); Jia L et al., *Cancer Res* 63: 3257-62 (2003); Liu Y et al., *Mol Cancer Ther* 2: 1341-50 (2003); Perea S et al., *Cancer Res* 64: 7127-9 (2004); Xu Y et al., *J Immunol* 173: 61-7 (2004); Dδlken B et al., *Cell Death Differ* 13: 576-85 (2006); Wang T et al., *Cancer Res* 67: 11830-9 (2007); Kwon M et al., *Mol Cancer Ther* 7: 1514-22 (2008); Qiu X et al., *Mol Cancer Ther* 7: 1890-9 (2008); Shan L et al., *Cancer Biol Ther* 11: 1717-22 (2008); Wang F et al., *Clin Cancer Res* 16: 2284-94 (2010); Kim J et al., *J Virol* 85: 1507-16 (2011)).

[0211] [245] 본 발명의 일부 실시예들에서, 추가의 외인성 물질은 효소를 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드를 포함한다. 특정 다른 실시예들에서, 추가적인 외인성 물질은 핵산, 예를 들어, 소억제 RNA(siRNA) 또는 마이크로

RNA(miRNA)로 기능하는 리보핵산과 같은 핵산이다. 일부 실시예들에서, 추가적인 외인성 물질은 항원, 예컨대 병원체, 박테리아 단백질, 바이러스 단백질, 암에서 돌연변이된 단백질, 암에서 비정상적으로 발현된 단백질, 또는 T-세포 상보적 결정 영역으로부터 유래된 항원이다. 예를 들어, 외인성 물질은 박테리아에 의해 감염된 항원 제시 세포의 특징과 같은 항원, 및 외인성 항원으로 기능할 수 있는 T-세포 상보적 결정 영역을 포함한다. 폴리펩티드 또는 단백질을 포함하는 외인성 물질은 당업자에게 알려져 있든 알려지지 않았든 선택적으로 하나 이상의 항원을 포함할 수 있다.

[0212] [246] 결합 분자의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드와 관련된 모든 이종 항원 및/또는 에피토프는 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 시가 독소 A1 단편 영역의 아미노-말단에서 카복시-말단으로 결합 영역에서 배열된다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드와 관련된 모든 이종 항원 및/또는 에피토프는 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 시가 독소 A1 단편 영역의 아미노-말단에서 카복시-말단으로의 위치에서 시가 독소 효과기 폴리펩티드와 직접 또는 간접적으로 연관된다. 일부 실시예들에서, 항원인 모든 추가 외인성 물질(들)은 예를 들어, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 아미노 말단에 직접 또는 간접적으로 융합된 것과 같이 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 대한 아미노-말단에 배열된다.

[0213] [247] 결합 분자의 일부 실시예들에서, 추가 외인성 물질은 세포독성제, 예를 들어, 소분자 화학요법제, 항종양제(anti-neoplastic), 세포독성 항생제, 알킬화제, 항대사물질, 토포이소머라제 억제제, 및/또는 튜불린 억제제이다. 본 명세서에 기술된 것과 같이 사용하기에 적합한 세포 독성 제제의 비제한적인 예는 다음을 포함한다: 아지리딘, 시스플라틴, 테트라진, 프로카바진, 헥사메틸멜라닌, 빈카 알칼로이드, 탁산, 캄포테신, 에토포시드, 독소루비신, 미토잔트론, 테니포시드, 노보바이오신, 아클라루비신, 안트라사이클린, 악티노마이신, 아마니틴, 블레오마이신, 센터마이신(일돌카르복사마이드), 플리카마이신, 미토마이신, 다우노루비신, 에피루비신, 이다루비신, 돌사스타틴, 마이탄신, 마이탄시노이드, 두로마이신, 도세탁셀, 두오카르마이신, 아드리아마이신, 칼리케아미신, 아우리스타틴, 피롤로벤조디아제핀, 피롤로벤조디아제핀 이량체(PBDs), 카보플라틴, 5-플루오로유라실(5-FU), 카펙시타빈, 미토마이신 C, 파클리탁셀, 1,3-비스(2-글로로에틸)-1-니트로소유레아(BCNU), 리팜피신, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 겜시타빈, 아세글라톤, 아세토게닌(예: 불라타신 및 불라타시논), 아클라시노미신, AG1478, AG1571, 알도포스파미드 글리코사이드, 알킬 설포네이트(예: 부설판, 임프로설판 및 피포설판), 알킬화제(예: 티오테파 및 시클로포스파미드), 아미노레불리닉산, 아미노프테린, 암사크린, 안시타빈, 안트라마이신, 아라비노사이드, 아자시티딘, 아자세린, 아지리딘(예: 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파), 아자우리딘, 베스트라부실, 비산트렌, 비스포스포네이트(예: 클로드로네이트), 블레오마이신, 보르테조밉, 브라이오스타틴, 칵티노마이신, 칼리스타틴, 카라비신, 카르미노마이신, 카르모푸르, 카르무스틴, 카르지노필린, CC-1065, 클로람부실, 클로란부실, 클로르나파진, 클로로조토신, 크로모마이신, 크로모프로틴 엔디인 항생 크로모포어, CPT-11, 크립토피신(예: 크립토피신 1 및 크립토피신 8), 시클로포스파미드, 사이타라빈, 다카르바진, 닥티노마이신, 다우노마이신, 데포파민, 데메콜신, 데토루비신, 디아지쿠온, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 디데옥시우리딘, 디플루오로메틸오르니틴(DMFO), 독시플루리딘, 독소루비신(예: 모르폴리노독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노독소루비신, 및 데옥시독소루비신), 다이네미신, 에다트락세이트, 에다트렉세이트, 엘류테로빈, 엘포르미틴, 엘립티늄 아세테이트, 엔디인 항생제(예: 칼리케아미신), 에닐루라실, 에노시타빈, 에피루비신, 에포틸론, 에소루비신, 에스페라미신, 에스트라무스틴, 에틸렌이민, 2-에틸히드라지드, 에토글루시드, 플루다라빈, 엽산 유사체(예: 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테닌, 및 트리메트렉세이트), 엽산 보충제(예: 프롤린산), 포테무스틴, 풀베스트란트, 가시토신, 질산갈륨, 게피티닙, 젬시타빈, 히드록시우레아, 이반드로네이트, 이포스파미드, 이마티닙 메실레이트, 에를로티닙, 풀베스트란트, 레트로졸, PTK787/ZK 222584(Novartis, Basel, CH), 옥살리플라틴, 류코보린, 라파마이신, 라파티닙, 로나파르닙, 소라페닙, 메틸아멜라민(예: 알트레타민, 트리에틸 에네멜라민, 트리에틸 에네포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드, 및 트리메틸로멜라민), 판크라티스타틴, 사르코딕틴, 스폰지스타틴, 질소 머스타드(예: 클로람부실, 클로르나파진, 시클로포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드), 니트로우레아(예: 카르무스틴, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴), 다이네미신, 네오카르지노스타틴 크로모포어, 안트라마이신, 데토루비신, 에피루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신(예: 미토마이신 C), 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 퀘라마이신, 로도루비신, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신, 퓨린 유사체(예: 플루다라빈, 6-메르캅토퓨린, 티아미프린, 및 티오구아닌), 피리미딘 유사체(예: 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 및 플록수리딘), 아세글라톤, 렌티난, 로니다이닌, 메이탄시노이드(예: 메이탄신 및 안사미토신), 미토구아존, 미톡산트론, 모피단몰, 니트라에린, 펜토스타틴, 페나메트, 피라루비신, 포도필린산, 2-에틸히드라지드,

리족신, 시조푸란, 스피로게르마늄, 테누아존산, 트리아지쿠온, 2,2',2"트리클로로트리에틸아민, 트리코테센(예: T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A, 및 안귀딘), 우레탄, 빈데신, 만노무스틴, 미토브로니톨, 미톨락톨, 피포브로만, 아라비노사이드, 사이클로포스파미드, 톡소이드(예: 파클리탁셀 및 독세탁셀), 6-티오구아닌, 메르캅토퓨린, 백금, 백금 유사체(예: 시스플라틴 및 카보플라틴), 에토포사이드(VP-16), 미톡산트론, 비노렐빈, 노반트론, 다우노마이신, 젤로다, 토포이소머라제 억제제 RFS 2000, 레티노이드(예: 레티노산), 카페시타빈, 로무스틴, 로속산트론, 메르캅토퓨린, 니무스틴, 니트라에린, 라파마이신, 라조산, 로리딘 A, 스폰지스타틴, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 수텐트, T-2 독소, 티아미프린, 티오테파, 톡소이드(예: 파클리탁셀 및 독세탁셀), 투베르시딘, 베라쿠린 A, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 및 전술한 것 중 어느 것의 구조적 유사체(예: 합성 유사체), 및/또는 전술한 것 중 임의의 것의 유도체(예를 들어 다음을 참조: Lindell T et al., *Science* 170: 447-9 (1970); Remillard S et al., *Science* 189: 1002-5 (1975); Ravry M et al., *Am J Clin Oncol* 8: 148-50 (1985); Ravry M et al., *Cancer Treat Rep* 69: 1457-8 (1985); Sternberg C et al., *Cancer* 64: 2448-58 (1989); Bai R et al., *Biochem Pharmacol* 39: 1941-9 (1990); Boger D, Johnson D, *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3642-9 (1995); Beck J et al., *Leuk Lymphoma* 41: 117-24 (2001); Cassady J et al., *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 52: 1-26 (2004); Sapra P et al., *Clin Cancer Res* 11: 5257-64 (2005); Okeley N et al., *Clinc Cancer Res* 16: 888-97 (2010); Oroudjev E et al., *Mol Cancer Ther* 9: 2700-13 (2010); Ellestad G, *Chirality* 23: 660-71 (2011); Kantarjian H et al., Lancet Oncol 13: 403-11 (2012); Moldenhauer G et al., *J Natl Cancer Inst* 104: 622-34 (2012); Meulendijks D et al., *Invest New Drugs* 34: 119-28 (2016)).

[0214] [248] 예시적인 카복시-말단 외인성 물질의 비제한적인 목록은 하기 표 2에 제공된다. 이러한 카복시-말단 외인성 물질은 예를 들어 결합 분자에 의해 표적 세포로 전달될 수 있다.

표 2

[0215] **표 2. 예시적인 카복시-말단 모이어티**

서열	SEQ ID NO:
HHAANLVPMVATV	176
HHAANLVPMVATVRRNLVPMVATVRRNLVP	177
NLVPMVATVRRNLVPMVATVRRNLVPMVATV	175
NLVPMVATVRRNLVPMVATVRRNLVP	174
NLVPMVATVRRNLVPMVATV	178
NLVPMVATVHHAANLVPMVATV	179
RRNLVPMVATV	180
RRNLVPMVATVRRNLVPMVATVRRNLVP	181
NLVPMVATVRRNLVPMVATVHHAANLVPMVATV	182
NLVPMVATVRRAANLVPMVATVHHAANLVP	183
NLVPMVATVHHAANLVPMVATVRRNLVPMVATV	184
NLVPMVATVHHAANLVPMVATVRRNLVP	185
NLVPMVATVHHAANLVPMVATVHHAANLVPMVATV	186
NLVPMVATVHHAANLVPMVATVHHAANLVP	187

[0216] [249] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 카복시-말단 모이어티, 예를 들어 SEQ ID NO: 174-187 중 어느 하나의 서열을 포함하는 카복시 말단 모이어티를 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 카복시 말단 모이어티를 포함하고, 여기서 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 1-18, 40-68, 169, 170, 또는 173 중 어느 하나의 서열을 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 카복시 말단 모이어티를 포함하고, 여기서 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 41의 서열을 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 카복시 말단 모이어티를 포함하고, 여기서 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 41의 서열을 포함하고, 카복시 말단 모이어티는 SEQ ID NO: 174-178 중 어느 하나의 서열을 포함한다.

[0217] Ⅱ. 성분들(Components) 및/또는 그 하위 성분들(Subcomponent)을 연결하는 연결들(Linkages)

[0218] [250] 개별 PD-L1 결합 영역, 독소 성분, 및/또는 본 명세서에 기재된 결합 분자의 다른 성분은 각각에 적절하게 연결될 수 있고, 예를 들어, 당업계에 널리 공지된 및/또는 본 명세서에 기술된 하나 이상의 링커를 통해 서

로 직접적으로 또는 간접적으로 연결되는 것과 같이 융합될 수 있다. 결합 영역의 개별 폴리펩티드 하위 성분, 예: 중쇄 가변 영역(V_H), 경쇄 가변 영역(V_L), CDR, 및/또는 ABR 영역들은, 있거나 화학적 접합을 통한 것을 포함하여 당업계에 잘 알려진 및/또는 본 명세서에 기술된 하나 이상의 링커(예: scFv 링커)를 통해 서로 적절하게 연결될 수 있다. 단백질 성분, 예를 들어, 다중-사슬(multi-chain) 결합 영역들은 펩티드 결합을 통해 직접적으로 및/또는 당업계에 널리 공지된 하나 이상의 링커를 통해 간접적으로 서로 또는 다른 폴리펩티드 성분에 적합하게 연결될 수 있다. 펩티드 성분, 예를 들어 KDEL 패밀리 소포체 보유/회수 신호 모티프들(endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motifs)(SEQ ID NO: 205-252 참조)은 펩티드 결합을 통해 직접적으로 또는 하나 이상의 링커, 예를 들어 당업계에 잘 알려진 단백질성 링커를 통해 간접적으로 다른 성분에 적합하게 연결될 수 있다. 예를 들어, 결합 분자의 일부 실시예들에서, 개별 PD-L1 결합 영역 및 시가 독소 효과기 폴리펩티드(및/또는 결합 분자의 추가 성분, 예를 들어, T-세포 에피토프, 추가 외인성 물질, 및/또는 KDEL 모티프)는 당업계에 잘 알려져 있고 그리고/또는 본 명세서에 기재된 하나 이상의 결합 영역 링커를 통해 서로 적절하게 연결 및/또는 접합된다.

[0219] [251] 적합한 링커는 일반적으로 각각의 폴리펩티드 성분이 링커 또는 다른 성분 없이 개별적으로 생성된 폴리펩티드 성분과 매우 유사한 3차원 구조로 접힐 수 있도록 하는 것이다. 적합한 링커들은 단일 아미노산, 펩티드, 폴리펩티드, 및 분지형(branched)이든 환형(cyclic)이든 다양한 비단백질성 탄소 사슬과 같은 전술한 것 중 어느 것이 결핍된 링커들을 포함한다.

[0220] [252] 적합한 링커는 단백질성일 수 있고 하나 이상의 아미노산, 펩티드, 및/또는 폴리펩티드를 포함한다. 단백질성 링커는 재조합 융합 단백질과 화학적으로 연결된 접합체 모두에 적합한다. 단백질성 링커는 전형적으로 약 2 내지 약 50개의 아미노산 잔기, 예를 들어, 약 5 내지 약 30개 또는 약 6 내지 약 25개의 아미노산 잔기를 갖는다. 선택되는 링커의 길이는 예를 들어 링커가 선택되는 원하는 특성 또는 특성들과 같은 다양한 요인에 따라 달라질 것이다. 일부 실시예들에서, 링커는 단백질성이고 단백질 성분의 말단 근처, 일반적으로 말단의 약 20개 아미노산 내에서 연결된다.

[0221] [253] 적합한 링커는 예를 들어, 화학적 링커와 같이 비-단백질성일 수 있다. 당업계에 공지된 다양한 비-단백질성 링커는 면역글로불린 폴리펩티드를 이종 폴리펩티드에 접합시키는 데 일반적으로 사용되는 링커와 같은 결합 분자의 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분에 세포-표적화 결합 영역을 연결하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 영역은 예를 들어 카복시, 아민, 술프히드릴, 카복실산, 카보닐, 히드록실, 및/또는 사이클릭 링 기(cyclic ring group)와 같은 아미노산 잔기의 기능적 측쇄 및 탄수화물 모이어티를 사용하여 연결될 수 있다. 예를 들어, 디설파이드 결합 및 티오에테르 결합을 사용하여 둘 이상의 폴리펩티드를 연결할 수 있다. 또한, 비천연 아미노산 잔기는 케톤기와 같은 다른 기능적 측쇄와 함께 사용될 수 있다(예: Axup J et al., *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 109: 16101-6 (2012); Sun S et al., *Chembiochem* Jul 18 (2014); Tian F et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 1766-71 (2014) 참조). 또한, 비천연 아미노산 잔기는 케톤기, 알킨기, 또는 아지드와 같은 다른 기능적 측쇄와 함께 사용될 수 있다(예: 카고에 대한 접합을 위한 p-아세틸-L-페닐알라닌 또는 p-아지도메틸- N-페닐알라닌 잔기를 포함하도록 조작된 항체의 사용 참조. 미국 특허 출원 공개 번호 14/786,402, US 2017/0362334). 비-단백질성 화학적 링커들은 다음을 포함하지만 이에 국한되지는 않는다: N-하이드록시숙신이미드 에스테르(NHS 에스테르), 예를 들어 설포-NHS 에스테르, 이소티오시아네이트, 이소시아네이트, 아실 아지드, 설포닐 클로라이드, 알데히드, 글리옥살, 에폭사이드, 옥시란, 카보네이트, 아릴 할라이드, 이미도에스테르, 카르보디이미드, 안하이드라이드, 및 플루오로페닐 에스테르. 추가적인 비-단백질성 화학적 링커들은 다음을 포함하지만 이에 국한되지는 않는다: N-숙신이미딜(4-요오도아세틸)-아미노벤조에이트, S-(N-숙신이미딜)티오아세테이트(SATA), N-숙신이미딜-옥시카보닐-cu-메틸-a-(2-피리딜디티오)톨루엔(SMPT), N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)-펜타노에이트(SPP), 숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산 카복실레이트(SMCC 또는 MCC), 술포숙신이미딜(4-요오도아세틸)-아미노벤조에이트, 4-숙신이미딜-옥시카보닐-α-(2-피리딜디티오)톨루엔, 술포숙신이미딜-6-(α-메틸-α-(피리딜디티올)-톨루아미도)헥사노에이트, N-숙신이미딜-3-(-2-피리딜디티오)-프로피오네이트(SPDP), 숙신이미딜 6(3(-(-2-피리딜디티오)-프로피온아미도)헥사노에이트, 설포숙신이미딜 6(3(-(-2-피리딜디티오)-프로피온아미도) 헥사노에이트, 말레이미도카프로일(MC), 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카보닐(MC-vc-PAB), 3-말레이미도벤조산 N-히드록시숙신이미드 에스테르(MBS), 알파-알킬 유도체, 설포NHS-ATMBA(설포숙신이미딜 N-[3-(아세틸티오)-3-메틸부티릴-베타-알라닌]), 설포디클로로페놀, 2-이미노티올란, 3-(2-피리딜디티오)-프로피오닐 히드라지드, Ellman 시약, 디클로로트리아진산, 및 S-(2-티오피리딜)-L-시스테인.

[0222] [254] 단백질성이든 비-단백질성이든, 적합한 링커는 예를 들어 프로테아제 민감성, 환경 레독스 포텐셜

민감성, pH 민감성, 산 절단성, 광절단성, 및/또는 열 민감성 링커를 포함할 수 있다.

[0223] [255] 단백질성 링커는 재조합 융합 결합 분자로의 통합을 위해 선택될 수 있다. 재조합 융합 세포-표적화 단백질의 경우, 링커는 일반적으로 약 2 내지 50개의 아미노산 잔기, 바람직하게는 약 5 내지 30개의 아미노산 잔기를 포함한다. 일반적으로, 단백질성 링커는 예를 들어 트레오닌, 프롤린, 글루타민, 글리신, 및 알라닌과 같은 극성, 비하전 및/또는 하전 잔기를 갖는 아미노산 잔기의 대부분을 포함한다. 단백질성 링커의 비제한적인 예는 알라닌-세린-글리신-글리신-프롤린-글루타메이트(ASGGPE), 발린-메티오닌(VM), 알라닌-메티오닌(AM), AM(G_2-$_4$S)$_x$AM을 포함하고, 여기서 G는 글리신, S는 세린이고 x는 1에서 10 사이의 정수이다.

[0224] [256] 단백질성 링커는 원하는 특성에 기초하여 선택될 수 있다. 단백질성 링커는 동일한 도메인 자체의 활성과 비교하여 융합 구조체(fusion construct)의 맥락에서 융합 분자의 접힘, 안정성, 발현, 용해도, 약동학적 특성, 약력학적 특성, 및/또는 융합 도메인의 활성 중 하나 이상을 최적화하는 것과 같은 특정 특징을 염두에 두고 숙련된 작업자가 선택할 수 있다. 예를 들어, 단백질성 링커는 유연성(flexibility), 강성(rigidity), 및/또는 절단성(cleavability)에 기초하여 선택될 수 있다. 숙련된 작업자는 링커를 선택할 때 데이터베이스 및 링커 설계 소프트웨어 도구를 사용할 수 있다. 특정 링커는 발현을 최적화하기 위해 선택될 수 있다. 특정 링커는 동일한 폴리펩티드 또는 단백질 간의 분자 간 상호작용을 촉진하여 동종다량체(homomultimer)를 형성하거나 상이한 폴리펩티드 또는 단백질이 이종다량체(heteromultimer)를 형성하도록 선택될 수 있다. 예를 들어, 결합 분자의 폴리펩티드 성분 사이의 원하는 비공유 상호작용, 예를 들어 형성 이량체(formation dimers) 및 다른 고차 다량체(higher order multimers)와 관련된 상호작용을 허용하는 단백질성 링커가 선택될 수 있다.

[0225] [257] 유연한 단백질성 링커는 종종 길이가 12개보다 큰 아미노산 잔기이고 작은 비극성 아미노산 잔기, 극성 아미노산 잔기, 및/또는 친수성 아미노산 잔기, 예를 들어 글리신, 세린, 및 트레오닌이 풍부한다. 유연한 단백질성 링커는 성분 사이의 공간적 분리를 증가시키고 및/또는 성분 간의 분자 내 상호작용을 허용하도록 선택될 수 있다. 예를 들어, 다양한 "GS" 링커는 숙련된 작업자에게 알려져 있고, 다중 글리신 및/또는 하나 이상의 세린으로 구성되며, 때때로 예를 들어 $(G_xS)_n$, $(S_xG)_n$, $(GGGGS)_n$, 및 $(G)_n$과 같은 반복 단위로 구성되는데, 여기서 x는 1 내지 6이고 n은 1 내지 30이다(SEQ ID NOs. 262-264, 266). 유연한 단백질성 링커의 비제한적인 예는 다음을 포함한다: GKSSGSGSESKS(SEQ ID NO: 188), EGKSSGSGSESKEF(SEQ ID NO: 189), GSTSGSGKSSEGKG(SEQ ID NO: 190), GSTSGSGKSSEGSGSTKG(SEQ ID NO: 191), GSTSGSGKPGSGEGSTKG(SEQ ID NO: 192), SRSSG(SEQ ID NO: 193), 및 SGSSC(SEQ ID NO: 194).

[0226] [258] 강성 단백질성 링커는 종종 뻣뻣한 알파-나선 구조이고 프롤린 잔기 및/또는 하나 이상의 전략적으로 배치된 프롤린이 풍부하다. 연결된 성분 간의 분자 내 상호작용을 방지하기 위해 강성 링커를 선택할 수 있다.

[0227] [259] 적절한 링커는 예를 들어 절단 및/또는 환경-특이적 불안정성으로 인한 것과 같은 성분의 생체 내 분리를 허용하도록 선택될 수 있다. 생체 내 절단 가능한 단백질성 링커는 종종 유기체 내 또는 특정 세포 유형 내부의 특정 부위에서 단백질분해 처리 및/또는 환원 환경에 의해 연결해제(unlinking)가 될 수 있다. 생체 내 절단 가능한 단백질성 링커는 종종 하나 이상의 시스테인 쌍에 의해 형성된 프로테아제 민감성 모티프 및/또는 디설파이드 결합을 포함한다. 생체 내 절단 가능한 단백질성 링커는 유기체의 특정 위치, 세포 내의 구획에만 존재하고 및/또는 특정 생리학적 또는 병리학적 조건(예: 비정상적으로 높은 수준의 프로테아제, 특정 질병 부위에서 과발현되는 프로테아제 및 병원성 미생물에 의해 특이적으로 발현되는 프로테아제 관련)에서만 활성화되는 프로테아제에 민감하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 세포 내에만 존재하는 프로테아제, 특정 세포 유형 내에만 존재하는 프로테아제, 및 암 또는 염증과 같은 병리학적 조건하에서만 존재하는 프로테아제에 의해 절단되는 당업계에 공지된 단백질성 링커들이 있는데, 예를 들어 R-x-x-R 모티프 및 AMGRSGGGCAGNRVGSSLSCGGLNLQAM(SEQ ID NO: 195)와 같은 것이다.

[0228] [260] 결합 분자의 일부 실시예들에서, 표적 세포 내에 존재하는 프로테아제에 의한 절단을 제공하기 위해 하나 이상의 프로테아제 민감성 부위를 포함하는 링커가 사용될 수 있다. 일부 실시예들에서, 척추동물 유기체에 투여한 후 원치 않는 독성을 감소시키기 위해 절단할 수 없는 링커가 사용될 수 있다.

[0229] [261] 적합한 링커는 예를 들어 프로테아제 민감성, 환경 레독스(redox) 포텐셜 민감성, pH 민감성, 산 절단성, 광분해성, 및/또는 열 민감성 링커(단백질성 또는 비-단백질성 여부에 상관없이)를 포함할 수 있다(예: Doronina S et al., *Bioconjug Chem* 17: 114-24 (2003); Saito G et al., *Adv Drug Deliv Rev* 55: 199-215 (2003); Jeffrey S et al., J Med Chem 48: 1344-58 (2005); Sanderson R et al., *Clin Cancer Res* 11: 843-52 (2005); Erickson H et al., *Cancer Res* 66: 4426-33 (2006); Chen X et al., *Adv Drug Deliv Rev* 65:

1357-69 (2013) 참조). 적합한 절단 가능한 링커는 당업계에 공지된 절단가능한 기(group)를 포함하는 링커를 포함할 수 있다.

[0230] [262] 적합한 링커는 pH 민감성 링커를 포함할 수 있다. 예를 들어, 표적 세포의 하위 세포 구획 내부의 해리(dissociation)를 제공하기 위해 낮은 pH 환경에서의 불안정성을 위해 특정한 적절한 링커를 선택할 수 있다(예를 들어 van Der Velden V et al., *Blood* 97: 3197-204 (2001); Ulbrich K, Subr V, *Adv Drug Deliv Rev* 56: 1023-50 (2004) 참조). 예를 들어, 하나 이상의 트리틸 기(trityl group), 유도체화된 트리틸 기, 비스말레이미드에톡시 프로판 기, 아디프산 디히드라지드 기, 및/또는 산 불안정(labile) 트랜스페린 기를 포함하는 링커는 예를 들어, 특정 pH 범위의 환경에서 폴리펩티드 성분과 같은 결합 분자의 성분의 방출을 제공할 수 있다. 특정 링커에서, 예를 들어 종양 조직의 pH가 건강한 조직보다 낮은 것과 같이 조직 간의 생리학적 pH 차이에 상응하는 pH 범위에서 절단되는 링커가 선택될 수 있다.

[0231] [263] 광절단 가능(Photocleavable) 링커는 가시광선 범위의 빛과 같은 특정 파장 범위의 전자기 방사선(electromagnetic radiation)에 노출되면 절단되는 링커이다. 광절단 가능 링커는 특정 파장의 빛에 노출되면 예를 들어 폴리펩티드 성분과 같은 결합 분자의 성분을 방출(release)하는 데 사용될 수 있다. 광절단 가능 링커의 비제한적 예는 시스테인에 대한 광절단성 보호기로서의 니트로벤질기, 니트로벤질옥시카보닐 클로라이드 가교제(cross-linkers), 히드록시프로필메타크릴아미드 공중합체, 글리신 공중합체, 플루오레세인 공중합체, 및 메틸로다민 공중합체를 포함한다. 광절단 가능 링커는 광섬유를 사용하여 빛에 노출될 수 있는 질병, 장애, 및 질환을 치료하기 위해 설계된 결합 분자를 형성하기 위해 성분을 연결하는 데 특별한 용도를 가질 수 있다.

[0232] [264] 결합 분자의 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 영역은 공유 및 비공유 결합 둘 다를 포함하여 숙련된 작업자에게 공지된 임의의 수의 수단을 사용하여 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 연결된다.

[0233] [265] 결합 분자의 일부 실시예들에서, 분자는 중쇄 가변(V_H) 도메인 및 경쇄 가변(V_L) 도메인을 연결하는 링커(즉, scFv 링커)를 갖는 scFv인 결합 영역을 포함한다. 예를 들어, 15-잔기$(Gly_4Ser)_3$ 펩티드와 같이 이러한 목적에 적합한 당업계에 공지된 수많은 링커가 있다. 비공유 다가 구조(multivalent structures)를 형성하는데 사용될 수 있는 적합한 scFv 링커는 다음을 포함한다: GGS, GGGS(SEQ ID NO: 196), GGGGS(SEQ ID NO: 72), GGGGSGGG(SEQ ID NO: 197), GGSGGGG(SEQ ID NO: 198), GSTSGGGSGGGSGGGGSS(SEQ ID NO: 199), 및 GSTSGSGKPGSSEGSTKG(SEQ ID NO: 200).

[0234] [266] 결합 분자의 성분을 연결하기 위한 적절한 방법은 부착이 세포-표적화 결합 영역의 결합 능력, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분의 세포 내재화, 및/또는 적절한 경우 본 명세서에 기재된 분석을 포함하는 적절한 분석에 의해 측정된 원하는 시가 독소 효과기 기능(들)을 실질적으로 저해하지 않는 한 그러한 목적을 달성하기 위한 당업계에 현재 알려진 임의의 방법에 의한 것일 수 있다.

[0235] [267] 결합 분자의 성분, 예를 들어 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린형 PD-L1 결합 영역은 결합 영역 링커를 통해 연결될 수 있다. 일부 실시예들에서, 성분들은 추가 성분, 예를 들어, 추가적인 외인성 물질(WO 2018/106895 참조)의 연결을 위한 적합한 부착 모이어티를 제공하도록 조작될 수 있다.

[0236] [268] 결합 분자의 목적을 위해, 시가 독소 효과기 폴리펩티드(들), 결합 영역(들) 및 선택적 링커(들)에 대한 특정 순서 또는 방향은 특별하게 언급되지 않는 한 서로에 대해 또는 전체 결합 분자에 대해 고정되지 않는다(예: **도 1** 참조). 결합 분자의 성분은 결합 영역 및 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 원하는 활성(들)이 제거되지 않는 한 임의의 순서로 배열될 수 있다.

[0237] III. 결합 분자의 구조적 변형의 예

[0238] [269] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자의 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 절단된 시가 독소 A 서브유닛을 포함하거나 필수적으로 이로만 이루어진다. 시가 독소 A 서브유닛의 절단은 촉매 활성 및 세포독성과 같은 시가 독소 효과기 기능들에 영향을 미치지 않고 전체 에피토프(들) 및/또는 에피토프 영역(들), B-세포 에피토프, CD4+ T-세포 에피토프, 및/또는 퓨린-절단 부위의 결실을 초래할 수 있다. 완전한 효소 활성을 나타내는 것으로 나타난 가장 작은 시가 독소 A 서브유닛 단편은 Slt1A의 잔기 1-239로 구성된 폴리펩티드였다(LaPointe P et al., J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). 유의한 효소 활성을 나타내는 것으로 나타난 가장 작은 시가 독소 A 서브유닛 단편은 StxA의 잔기 75-247로 구성된 폴리펩티드였다(Al-Jaufy A et al., Infect Immun 62: 956-60 (1994)).

[0239] [270] 시가 독소 효과기 폴리펩티드가 일반적으로 전장 시가 독소 A 서브유닛보다 작을 수 있지만, 결합 분자의

시가 독소 효과기 폴리펩티드 영역은 아미노산 위치 77에서 239(SLT-1A(SEQ ID NO:1) 또는 StxA(SEQ ID NO:2)) 또는 시가 독소 패밀리 구성원의 다른 A 서브유닛에서 등가의 위치(예: SEQ ID NO:3의 77 내지 238)로부터 폴리펩티드 영역을 유지하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 일부 실시예들에서, SLT-1A로부터 유래된 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1의 아미노산 75 내지 251, SEQ ID NO:1의 1 내지 241, SEQ ID NO:1의 1 내지 251 또는 SEQ ID NO:1의 아미노산 1 내지 261을 포함하거나 필수적으로 이들로만 이루어질 수 있고, 여기서 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해 적어도 하나의 아미노산 잔기가 내인성 에피토프 및/또는 에피토프 영역에서 돌연변이되거나 결실되었고, 및/또는 여기서 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시-말단에 파괴된 퓨린-절단 모티프 영역이 존재한다. 유사하게, StxA로부터 유래된 시가 독소 효과기 폴리펩티드 영역은 SEQ ID NO:2의 아미노산 75 내지 251, SEQ ID NO:2의 1 내지 241, SEQ ID NO:2의 1 내지 251, 또는 SEQ ID NO:2의 아미노산 1 내지 261을 포함하거나 필수적으로 이들로만 이루어지고, 여기서 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해 내인성 에피토프 및/또는 에피토프 영역에서 적어도 하나의 아미노산 잔기가 돌연변이되거나 결실되었고, 및/또는 여기서 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시-말단에서 파괴된 퓨린-절단 모티프 영역이 있다. 또한, SLT-2로부터 유래된 시가 독소 효과기 폴리펩티드 영역은 SEQ ID NO: 3의 아미노산 75 내지 251, SEQ ID NO: 3의 1 내지 241, SEQ ID NO: 3의 1 내지 251, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1 내지 261을 포함하거나 필수적으로 이들로만 구성될 수 있는데, 여기서 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해 적어도 하나의 아미노산 잔기는 돌연변이되거나 내인성 에피토프 및/또는 에피토프 영역에서 결실되고, 그리고/또는 여기서 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시-말단에 파괴된 퓨린-절단 모티프 영역이 있다.

[0240] [271] 또한 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 결합 분자의 변이체가 제공되고, 여기서 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 천연 발생 시가 독소 A 서브유닛과 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 또는 그 이상의 아미노산 잔기(그러나 적어도 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 이상의 아미노산 서열 동일성을 유지하는 것을 넘어서는 안 됨). 따라서, 시가 독소 패밀리의 구성원의 A 서브유닛에서 유래된 분자는 천연 발생 시가 독소 A 서브유닛에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 이상의 아미노산 서열 동일성이 유지되는 한 원래 서열에서 추가, 결실, 절단, 또는 기타 변경을 포함할 수 있고, 여기서 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해 적어도 하나의 아미노산 잔기가 내인성 에피토프 및/또는 에피토프 영역에서 돌연변이되거나 결실되고, 및/또는 여기서 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시-말단에 파괴된 퓨린-절단 모티프 영역이 존재한다.

[0241] [272] 따라서, 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 분자의 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 예컨대 SLT-1A(SEQ ID NO:1), StxA(SEQ ID NO:2), 및/또는 SLT-2A(SEQ ID NO:3)와 같은 자연 발생 시가 독소 A 서브유닛에 대해 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 또는 99.7%의 전체 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 필수적으로 이들로만 구성되고, 여기서 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해 적어도 하나의 아미노산 잔기가 내인성 에피토프 및/또는 에피토프 영역에서 돌연변이되거나 결실되었고, 그리고/또는 여기서 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시-말단에 파괴된 퓨린-절단 모티프 영역이 존재한다.

[0242] [273] 선택적으로, 시가 독소 A 서브유닛의 전장 또는 절단된 버전은 현재 분자의 시가 독소 효과기 폴리펩티드 영역을 포함할 수 있고, 여기서 시가 독소 유래 폴리펩티드는 자연 발생 시가 독소와 비교하여 하나 이상의 돌연변이(예: 치환, 결실, 삽입, 또는 역전)를 포함한다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 숙주 세포 형질전환(transformation), 형질감염(transfection), 감염, 또는 유도(induction)의 잘 알려진 방법에 의해, 또는 시가 독소 효과기 폴리펩티드와 연결된 세포 표적화 결합 영역에 의해 매개되는 내재화에 의해 세포 내로 유입된 후 세포독성을 유지하기 위해 천연 발생 시가 독소 A 서브유닛에 대해 충분한 서열 동일성을 갖는 것이 바람직하다. 시가 독소 A 서브유닛에서 효소 활성 및/또는 세포독성에 대한 가장 중요한 잔기는 다음 잔기 위치에 매핑되었다: 특히, 아스파라긴-75, 티로신-77, 글루타메이트-167, 아르기닌-170 및 아르기닌-176(Di R et al., *Toxicon* 57: 525-39 (2011)). 본 명세서에 기재된 실시예들 중 어느 하나에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 바람직하게는 StxA, SLT-1A에서 위치 77, 167, 170, 및 176, 또는 세포독성 활성을 위하여 전형적으로 필요한 시가 독소 패밀리의 다른 구성원에서 보존된 동등한 위치와 같은 위치들에서 하나 이상의 보존된 아미노산을 유지할 수 있으나 반드시 필요한 것은 아니다. 세포 사멸을 일으키는 세포독성 분자의 능력, 예를 들어, 그의 세포독성은 당업계에 널리 공지된 다수의 분석 중 임의의 하나 이상을 사용하여 측정될 수 있다.

[0243] A. 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 예

[0244] [274] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자의 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 필수적으로 2개 이상의 돌연변이를 갖는 절단된 시가 독소 A 서브유닛으로만 구성될 수 있다. 시가 독소 A 서브유닛의 절단은 예를 들어, 촉매 활성 및 세포독성과 같은 시가 독소 효과기 기능에 영향을 미치지 않고 전체 에피토프 및/또는

에피토프 영역, B-세포 에피토프, CD4+ T 세포 에피토프, 및/또는 퓨린 절단 부위의 결실을 초래할 수 있다. SLT-1A, StxA, 또는 SLT-2A의 카복시-말단을 아미노산 1-251로 자르면 2개의 예측된 B-세포 에피토프 영역, 2개의 예측된 CD4 양성(CD4+) T-세포 에피토프, 및 예측된 불연속적인 B-세포 에피토프가 제거된다. SLT-1A, StxA, 또는 SLT-2A의 아미노-말단을 75-293으로 자르면 최소 3개의 예측된 B-세포 에피토프 영역과 3개의 예측된 CD4+ T-세포 에피토프가 제거된다. SLT-1A, StxA, 또는 SLT-2A의 아미노-말단과 카복시-말단을 모두 75-251로 자르면 최소 5개의 예측된 B-세포 에피토프 영역, 4개의 추정 CD4+ T-세포 에피토프, 및 1개의 예측된 불연속 B-세포 에피토프가 결실된다.

[0245] [275] 본 발명의 일부 실시예들에서, 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 (야생형 시가 독소 폴리펩티드에 비해) 예를 들어, 제공된 내인성 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 에피토프 영역에서 결실, 삽입, 역위, 또는 치환과 같은 적어도 하나의 돌연변이를 갖는 전장 또는 절단된 시가 독소 A 서브유닛을 포함하거나 필수적으로 이로만 구성될 수 있다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 내인성 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 에피토프 영역 내의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 결실을 포함하는 돌연변이(야생형 시가 독소 폴리펩티드에 비해)를 포함하는 파괴를 포함한다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 내인성, B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 에피토프 영역 내에 적어도 하나의 아미노산 잔기의 삽입을 포함하는 파괴를 포함한다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 아미노산 잔기의 역전을 포함하는 파괴를 포함하고, 여기서 적어도 하나의 역전된 아미노산 잔기는 내인성, B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 에피토프 영역 내에 있다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 예를 들어, 아미노산 치환, 비표준 아미노산으로의 아미노산 치환, 및/또는 화학적으로 변형된 측쇄를 갖는 아미노산 잔기와 같은 돌연변이(야생형 시가 독소 폴리펩티드에 비해)를 포함하는 파괴를 포함한다. 본 명세서에 기재된 바와 같이 사용하기에 적합한 탈면역화된 시가 독소 효과기 하위 영역의 비제한적 예는 WO 2015/113005, WO 2015/113007, WO 2015/191764, WO 2016/196344, 및 WO 2018/140427에 기재되어 있다.

[0246] [276] 본 발명의 다른 실시예들에서, 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 전장 시가 독소 A 서브유닛보다 더 짧은 절단된 시가 독소 A 서브유닛을 포함하고, 여기서 적어도 하나의 아미노산 잔기는 천연적으로 위치된 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 에피토프 영역에서 파괴된다.

[0247] [277] 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 생성하기 위해, 원칙적으로 다양한 수단에 의해 제공된 에피토프 영역에서 임의의 아미노산 잔기를 변형시키는 것은 예를 들어 야생형 시가 독소 폴리펩티드에 대한 측쇄의 결실, 삽입, 역전, 재배열, 치환, 및 화학적 변형을 나타내는 변형과 같은 에피토프의 파괴를 초래할 수 있다. 그러나 특정 아미노산 잔기를 변형하고 특정 아미노산 변형을 사용하면 특정 수준의 시가 독소 효과기 기능(들)을 유지하면서 항원성 및/또는 면역원성을 성공적으로 감소시킬 가능성이 더 높다. 예를 들어, 말단 절단 및 내부 아미노산 치환은 이러한 유형의 변형이 시가 독소 효과기 폴리펩티드에서 아미노산 잔기의 전체 간격을 유지하고 따라서 시가 독소 효과기 폴리펩티드 구조 및 기능을 유지할 가능성이 더 높기 때문에 바람직한다.

[0248] [278] 본 발명의 일부 실시예들에서, 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 SLT-1A(SEQ ID NO:1), StxA(SEQ ID NO:2), 및/또는 SLT-2A(SEQ ID NO:3)의 아미노산 75 내지 251을 포함하거나 필수적으로 이들로만 구성되고, 여기서 적어도 하나의 아미노산 잔기는 천연 위치의 에피토프 영역에서 파괴된다. 특정 다른 실시예들 중에는 SLT-1A(SEQ ID NO:1), StxA(SEQ ID NO:2), 및/또는 SLT-2A(SEQ ID NO:3)의 아미노산 1 내지 241을 포함하거나 필수적으로 이들로만 구성된 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드가 있고, 여기서 적어도 하나의 아미노산 잔기는 천연적으로 위치된 에피토프 영역에서 파괴된다. 추가 실시예들은 SLT-1A(SEQ ID NO:1), StxA(SEQ ID NO:2), 및/또는 SLT-2A(SEQ ID NO:3)의 아미노산 1 내지 251을 포함하거나 필수적으로 이들로만 구성된 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드가 있으며, 여기서 적어도 하나의 아미노산 잔기는 제공된 천연 위치의 에피토프 영역에서 파괴된다. 추가 실시예들은 SLT-1A(SEQ ID NO:1), StxA(SEQ ID NO:2), 및/또는 SLT-2A(SEQ ID NO:3)의 아미노산 1 내지 261을 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드이며, 여기서 적어도 하나의 아미노산 잔기는 천연 위치의 에피토프 영역에서 파괴된다.

[0249] [279] 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 생성하는 데 사용할 수 있는 수많은 다양한 내부 아미노산 치환이 있다. 에피토프 영역 내에서 사용할 수 있는 대체 아미노산 중 다음 대체 아미노산 잔기는 에피토프의 항원성 및/또는 면역원성을 감소시킬 가능성이 가장 높은 것으로 예측된다 - G, D, E, S, T, R, K, 및 H. 글리신을 제외하고, 이들 아미노산 잔기들은 모두 극성 및/또는 하전된 잔기로 분류될 수 있다. 치환할 수 있는 아미노산 중 다음 아미노산 A, G, V, L, I, P, C, M, F, S, D, N, Q, H, 및 K가 치환된 아미노산에 따라 상당한 수준의 시가 독소 효과기 기능을 유지하면서 항원성 및/또는 면역원성을 감소시킬 가능성이 가장 높을 것으로 예측된다. 일반적으로, 치환은 극성 및/또는 하전된 아미노산 잔기를 비극성 및 비하전 잔기로 변경해야 한다(예:

WO 2015/113007 참조). 또한, 아미노산 잔기의 R-기 기능적 측쇄의 전체 크기 및/또는 길이를 줄이기 위해 에피토프 파괴가 유리할 수 있다(예: WO 2015/113007 참조). 그러나 에피토프 파괴를 일으킬 가능성이 가장 큰 이러한 치환의 일반성에도 불구하고, 목적은 유의한 시가 독소 효과기 기능(들)을 보존하는 것이기 때문에 예를 들어 그것이 극성 및/또는 하전된 잔기에 대해 치환된 유사한 크기의 비극성 및/또는 비하전된 잔기와 같은 치환된 아미노산과 유사하다면, 대체 아미노산은 시가 독소 효과기 기능(들)을 보존할 가능성이 더 높을 수 있다.

[0250] [280] WO 2015/113007 및 WO 2016/196344는 다양한 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 결합 분자의 시가 독소 효과기 기능에 대한 효과(들)에 대한 많은 상이한 돌연변이 및 돌연변이 조합의 경험적 시험으로부터의 결과를 보고했다. 표 3은 WO 2015/113007 및 WO 2016/196344에 기술된 결과들을 정리하고 있는데, 여기서 아미노산 치환은 단독으로 또는 하나 이상의 다른 치환들과 조합하여 시가 독소 효과기 기능(들)의 강력한 수준의 시현을 방지하지 않는다.

표 3

[0251] **표 3. 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 아미노산 치환**

파괴된 에피토프 영역	천연 위치의 아미노산 위치		
	치환	B-세포 에피토프 영역	T-세포 에피토프
1	K1A	1-15	
1	K1M	1-15	
1	T4I	1-15	4-33
1	D6R	1-15	4-33
1	S8I	1-15	4-33
1	T9V	1-15	4-33
1	T9I	1-15	4-33
1	K11A	1-15	4-33
1	K11H	1-15	4-33
1	T12K	1-15	4-33
2	S33I	27-37	4-33
2	S33C	27-37	4-33
3	S43N	39-48	34-78
3	G44L	39-48	34-78
3	T45V	39-48	34-78
3	T45I	39-48	34-78
3	S45V	39-48	34-78
3	S45I	39-48	34-78
3	G46P	39-48	34-78
3	D47G	39-48	34-78
3	D47M	39-48	34-78
3	N48V	39-48	34-78
3	N48F	39-48	34-78
-	L49A	면역원성 잔기	34-78
-	F50T		34-78
-	A51V		34-78
4	D53A	53-66	34-78
4	D53G	53-66	34-78
4	D53N	53-66	34-78
4	V54L	53-66	34-78
4	V54I	53-66	34-78
4	R55A	53-66	34-78
4	R55V	53-66	34-78
4	R55L	53-66	34-78
4	G56P	53-66	34-78
4	I57M	53-66	34-78
4	I57F	53-66	34-78
4	D58A	53-66	34-78
4	D58V	53-66	34-78
4	D58F	53-66	34-78

4	P59A	53-66	34-78
4	P59F	53-66	34-78
4	E60I	53-66	34-78
4	E60T	53-66	34-78
4	E60R	53-66	34-78
4	E61A	53-66	34-78
4	E61V	53-66	34-78
4	E61L	53-66	34-78
4	G62A	53-66	34-78
-	R84A		77-103
-	V88A		77-103
5	D94A	94-115	77-103
5	S96I	94-115	77-103
5	T104N	94-115	
5	A105L	94-115	
5	T107P	94-115	
5	L108M	94-115	
5	S109V	94-115	
5	G110A	94-115	
5	D111T	94-115	
5	S112V	94-115	
6	D141A	141-153	128-168
6	G147A	141-153	128-168
-	V154A		128-168
7	R179A	179-190	160-183
7	T180G	179-190	160-183
7	T181I	179-190	160-183
7	D183A	179-190	160-183
7	D183G	179-190	160-183
7	D184A	179-190	
7	D184F	179-190	
7	L185V	179-190	
7	S186A	179-190	
7	S186F	179-190	
7	G187A	179-190	
7	G187T	179-190	
7	R188A	179-190	
7	R188L	179-190	
7	S189A	179-190	
-	D198A	면역원성 잔기	
-	R205A	면역원성 잔기	
-	C242S		236-258
8	R248A	243-257	236-258
8	R251A	243-257	236-258

[0252] [281] WO 2015/113007 및 WO 2016/196344의 경험적 증거에 기초하여, 시가 독소의 A 서브유닛에 있는 특정 아미노산 위치는 여전히 유의한 시가 독소 효과기 기능을 유지하면서 에피토프 파괴를 견딜 것으로 예측된다. 예를 들어, 다음의 자연 발생 위치는 세포독성과 같은 시가 독소 효과기 기능을 유지하면서 단독 또는 조합으로 아미노산 치환을 허용한다: SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 4; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 8; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 9; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 11; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 33; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 43; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 44; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 45; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 46; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 47; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 48; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 49; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 50; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 51; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 53; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 54; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 55; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 56; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 57; SEQ ID NO:1, SEQ ID

NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 58; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 59; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 60; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 61; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 62; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 84; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 88; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 96; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 104; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 105; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 107; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 108; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 109; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 110; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 111; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 112; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 147; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 154; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 179; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 180; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 181; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 183; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 184; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 185; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 186; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 187; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 188; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 189; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 198; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; SEQ ID NO:3의 241; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 242; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 247; SEQ ID NO:3의 247; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 248; SEQ ID NO:3의 250; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 251; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 264; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 265; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 286.

[0253] [282] WO 2015/113007 및 WO 2016/196344의 경험적 데이터는 예를 들어, 관련된 시가 독소 A 서브유닛에서 동일한 위치 또는 보존된 위치에서의 새로운 치환뿐만 아니라 전술한 절단 및 위치 허용 치환의 새로운 조합과 같이 유의한 시가 독소 효과기 기능을 보이기 위한 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 능력을 유지하면서 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 항원성 및/또는 면역원성을 감소시킬 수 있는 다른 에피토프 파괴 치환 및 에피토프 파괴 치환들의 조합을 가리킨다.

[0254] [283] 본 명세서에서 시험된 치환의 보존적 기능 기(conservative functional group)의 아미노산 잔기에 대한 다른 아미노산 치환은 유의한 시가 독소 효과기 기능을 유지하면서 항원성 및/또는 면역원성을 감소시킬 수 있을 것으로 예측된다. 예를 들어, 다음 중 임의의 것에 유사한 것으로 숙련된 작업자에게 알려진 다른 치환들은 적어도 시가 독소 효과기 기능을 유지하면서 내인성 에피토프를 파괴할 수 있다: K1A, K1M, T4I, D6R, S8I, T8V, T9I, S9I, K11A, K11H, T12K, S33I, S33C, S43N, G44L, S45V, S45I, T45V, T45I, G46P, D47M, D47G, N48V, N48F, L49A, F50T, A51V, D53A, D53N, D53G, V54L, V54I, R55A, R55V, R55L, G56P, I57F, I57M, D58A, D58V, D58F, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, R84A, V88A, D94A, S96I, T104N, A105L, T107P, L108M, S109V, T109V, G110A, D111T, S112V, D141A, G147A, V154A, R179A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184A, D184F, L185V, L185D, S186A, S186F, G187A, G187T, R188A, R188L, S189A, D198A, R204A, R205A, C242S, S247I, Y247A, R248A, R250A, R251A, 또는 D264A, G264A, T286A, 및/또는 T286I. 특히, 다음과 유사한 보본적 아미노산 잔기에 대한 아미노산 치환은 동일한 또한 유사한 효과를 가질 수 있다: K1A, K1M, T4I, S8I, T8V, T9I, S9I, K11A, K11H, S33I, S33C, S43N, G44L, S45V, S45I, T45V, T45I, G46P, D47M, N48V, N48F, L49A, A51V, D53A, D53N, V54L, V54I, R55A, R55V, R55L, G56P, I57F, I57M, D58A, D58V, D58F, P59A, E60I, E60T, E61A, E61V, E61L, G62A, R84A, V88A, D94A, S96I, T104N, T107P, L108M, S109V, T109V, G110A, D111T, S112V, D141A, G147A, V154A, R179A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184F, L185V, S186A, S186F, G187A, R188A, R188L, S189A, D198A, R204A, R205A, C242S, S247I, Y247A, R248A, R250A, R251A, D264A, G264A, T286A, 및 T286I. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 예를 들어 다음과 같은 경험적으로 시험된 유사한 보존적 아미노선 치환을 포함할 수 있다: K1에서 G, V, L, I, F, 및 H; T4에서 A, G, V, L, F, M, 및 S; S8에서 A, G, V, L, F, 및 M; T9에서 A, G, L, F, M, 및 S; S9에서 A, G, L, I, F, 및 M; K11에서 G, V, L, I, F, 및 M; S33에서 A, G, V, L, F, 및 M; S43에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; S45에서 A, G, L, F, 및 M; T45에서 A, G, L, F, 및 M; D47에서 A, V, L, I, F, S, 및 Q; N48에서 A, G, L, 및 M; L49에서 G; Y49에서 A; D53에서 V, L, I, F, S, 및 Q; R55에서 G, I, F, M, Q, S, K, 및 H; D58에서 G, L, I, S, 및 Q; P59에서 G; E60에서 A, G, V, L, F, S, Q, N, D, 및 M; E61에서 G, I, F, S, Q, N, D, M, 및 R; R84에서 G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; V88에서 G; I88에서 G; D94에서 G, V, L, I, F, S, 및 Q; S96에서 A, G, V, L, F, 및 M; T107에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; S107에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; S109에서 A, G, I, L, F, 및 M; T109에서 A, G, I, L, F, M, 및 S; S112에서 A, G, L, I, F, 및 M; D141에서 V, L, I, F, S, 및 Q; V154에서 G; R179에서 G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; T180에서 A, V, L, I, F, M, 및 S; T181에서 A, G, V, L, F, M, 및 S; D183에서 V, L, I, F, S, 및 Q; D184에서 G, V, L, I, S, 및 Q; S186에서 G, V, I, L, 및 M; R188에서 G, V, I, F, M, Q, S, K, 및 H; S189에서 G, V, I, L, F, 및 M; D197에서 V, L,

I, F, S, 및 Q; D198에서 A, V, L, I, F, S, 및 Q; R204에서 G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R205에서 G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; S247에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; Y247에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; R248에서 G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R250에서 G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R251에서 G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; D264에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; 및 T286에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S.

[0255] [284] 유사하게, 전하, 극성을 제거하고 및/또는 측쇄 길이를 감소시키는 아미노산 치환은 하나 이상의 시가 독소 효과기 기능을 유지하면서 에피토프를 파괴할 수 있다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 측쇄 전하가 제거되고, 극성이 제거되고 및/또는 측쇄 길이가 줄어들도록 하는 치환, 예를 들어 다음의 위치에서 아미노산 잔기에 대해 다음의 군 A, G, V, L, I, P, C, M, F, S, D, N, Q, H, 또는 K로부터 선택되는 적절한 아미노산을 치환하는 것과 같은 치환에 의해 파괴된 하나 이상의 에피토프들을 포함할 수 있다: SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 4; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 6; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 8; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 9; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 11; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 12; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 33; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 43; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 44; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 45; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 46; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 47; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 48; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 49; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 50; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 51; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 53; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 54; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 55; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 56; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 57; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 58; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 59; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 60; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 61; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 62; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 84; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 88; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 96; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 104; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 105; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 107; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 108; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 109; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 110; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 111; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 112; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 147; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 154; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 179; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 180; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 181; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 183; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 184; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 185; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 186; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 187; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 188; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 189; SEQ ID NO:3의 197; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 198; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; SEQ ID NO:3의 241; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 242; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 247; SEQ ID NO:3의 247; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 248; SEQ ID NO:3의 250; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 251; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 264; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 265; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2 의 286. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 다음 아미노산 치환 중 하나 이상을 포함할 수 있다: K1에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 H; T4에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; D6에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; S8에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; T8에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; T9에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; S9에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; K11에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 H; T12에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; S33에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; S43에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; G44에서 A, 및 L; S45에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; T45에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; G46에서 A 및 P; D47에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; N48에서 A, G, V, L, 및 M; L49에서 A 또는 G; F50; A51에서 V; D53에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; V54에서 A, G, 및 L; R55에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; G56에서 A 및 P; I57에서 A, G, M, 및 F; L57에서 A, G, M, 및 F; D58에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; P59에서 A, G, 및 F; E60에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, 및 R; E61에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, 및 R; G62에서 A; D94에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; R84에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; V88에서 A 및 G; I88에서 A, G, 및 V; D94; S96에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; T104에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; A105에서 L; T107에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; S107에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; L108에서 A, G, 및 M; S109에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; T109에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; G110에서 A; D111에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; S112에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; D141에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; G147에서 A; V154에서 A 및 G; R179에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; T180에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; T181에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; D183에서 A, G, V,

L, I, F, S, 및 Q; D184에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; L185에서 A, G, 및 V; S186에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; G187에서 A; R188에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; S189에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; D197에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; D198에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; R204에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R205에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; C242에서 A, G, V, 및 S; S247에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; Y247에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; R248에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R250에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R251에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; C262에서 A, G, V, 및 S; D264에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; G264에서 A; 및 T286에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S.

[0256] [285] 또한, 유의한 시가 독소 효과기 기능을 유지하면서 에피토프를 파괴하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 한 에피토프 영역에서 임의의 아미노산 치환은 유의한 수준의 시가 독소 효과기 기능을 여전히 유지하면서 파괴된 다수의 에피토프 영역들을 갖는 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 형성하기 위하여 유의한 시가 독소 효과기 기능을 유지하면서 에피토프를 파괴하는 동일한 또는 상이한 에피토프 영역에서의 임의의 다른 아미노산 치환과 조합될 수 있다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 WO 2015/113007, WO 2016/196344, 및/또는 WO 2018/140427에 기재된 전술한 치환 및/또는 치환의 조합 중 2개 이상의 조합을 포함할 수 있다.

[0257] [286] WO 2015/113007, WO 2016/196344, 및 WO 2018/140427에 기술된 작업에 기초하여, 시가 독소의 A 서브유닛에 있는 특정 아미노산 영역은 여전히 유의한 시가 독소 효과기 기능을 유지하면서 에피토프 파괴를 견딜 것으로 예측된다. 예를 들어, 1-15, 39-48, 53-66, 55-66, 94-115, 180-190, 179-190, 및 243-257에 천연 위치하는 에피토프 영역들은 시가 독소 효소 활성 및 세포 독성의 손상 없이 동시에 여러 아미노산 치환 조합을 허용하였다.

[0258] B. 퓨린-절단 저항성, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 예

[0259] [287] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시-말단에 파괴된 퓨린 절단 모티프 및/또는 퓨린 절단 부위를 포함할 수 있다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시 말단에 근접한 퓨린 절단을 제공할 수 있는 임의의 공지된 보상 구조(compensatory structure)를 포함하지 않는다. 파괴된 퓨린 절단 모티프 및 퓨린 절단 부위의 비제한적 예는 WO 2015/191764에 기재되어 있다.

[0260] [288] 특정 퓨린-절단 모티프 파괴는 서열 목록에 제공된 천연 시가 독소 A 서브유닛의 특정 아미노산 위치를 참조하여 본 명세서에 표시되고, 천연 발생 시가 독소 A 서브유닛은 성숙한 시가 독소 A 서브유닛체를 생산하기 위해 제거되고 숙련된 작업자가 인식할 수 있는 그들의 아미노-말단에 약 22개 아미노산의 신호 서열을 함유하는 전구체 형태를 포함한다는 점에 유의해야 한다. 또한, 돌연변이를 포함하는 특정 퓨린-절단 모티프 파괴는 천연 시가 독소 A 서브유닛 내의 특정 위치(아미노-말단으로부터 위치 251에서 아르기닌 잔기에 대해 R251)에 천연적으로 존재하고 논의 중인 특정 돌연변이에서 그것으로 치환되는 아미노산이 뒤따르는 특정 아미노산(예: 아르기닌 잔기의 경우 R)(R251A는 아미노-말단의 아미노산 잔기 251에서 아르기닌에 대한 알라닌의 아미노산 치환을 나타냄)을 참조하여 본 명세서에 표시된다.

[0261] [289] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시-말단에 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함하고, 이러한 실시예들은 본 명세서에서 야생형, 시가 독소 A 서브유닛 및/또는 야생형, 시가 독소 A1 단편 융합 단백질에 상대적인 이들의 특성(들)을 기술하기 위해 "퓨린-절단 내성(furin-cleavage resistant)" 또는 "프로테아제-절단 내성(protease-cleavage resistant)" 시가 독소 효과기 폴리펩티드로 지칭된다.

[0262] [290] 본 발명의 일부 실시예들에서, 프로테아제-절단 내성, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 필수적으로 2개 이상의 돌연변이를 갖는 절단된 시가 독소 A 서브유닛으로만 이루어진다.

[0263] [291] 본 발명의 일부 실시예들에서, 프로테아제-절단 내성 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 A, G, 또는 H가 있는 최소 퓨린-절단 부위 공통 모티프(consensus motif)에 있는 아르기닌 잔기의 하나 또는 둘 다의 아미노산 치환(야생형 시가 독소 폴리펩티드에 비해)을 포함하는 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 프로테아제-절단 내성, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 퓨린-절단 모티프 영역 내에 아미노산 치환을 포함하는 파괴를 포함하고, 여기서 치환은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된 천연 위치의 아미노산에서 발생한다: SEQ ID NO:3의 247, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 248, SEQ ID NO:3의 250, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 251, 또는 보존된 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및/또는 비천연 시가 독소 효과기 폴리펩티드 서열의 등가

위치. 일부 실시예들에서, 치환은 임의의 비보존적 아미노산에 대한 것이고 상기 치환은 천연 위치의 아미노산 잔기 위치에서 발생한다. 일부 실시예들에서, 돌연변이는 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 치환을 포함한다: R247A, R248A, R250A R251A, 또는 보존된 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및/또는 비천연 시가 독소 효과기 폴리펩티드 서열 내의 등가 위치.

[0264] [292] 본 발명의 일부 실시예들에서, 프로테아제-절단 내성 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 결실인 돌연변이를 포함하는 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 다음과 같은 둘 연변이를 포함한다: StxA(SEQ ID NO: 2) 및 SLT-1A(SEQ ID NO: 3)에서 247-252, 또는 SLT-2A(SEQ ID NO:3)의 246-251에 천연적으로 위치하는 영역의 결실; StxA(SEQ ID NO:2) 및 SLT-1A(SEQ ID NO:3)에서 244-246, 또는 SLT-2A(SEQ ID NO:3)에서 243-245에 천연적으로 위치하는 영역의 결실; StxA(SEQ ID NO:2) 및 SLT-1A(SEQ ID NO:3)에서 253-259, 또는 SLT-2A(SEQ ID NO:3)에서 252-258에 천연적으로 위치하는 영역의 결실.

[0265] [293] 본 발명의 일부 실시예들에서, 프로테아제-절단 내성 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해 카복시-말단 절단인 돌연변이를 포함하는 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함하고, 상기 절단은 퓨린-절단 모티프 내의 하나 이상의 아미노산의 결실을 초래한다. 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 최소 절단 부위 Y/R-x-x-R 내에서 하나 이상의 아미노산 잔기를 결실시키는 카복시-말단 절단을 포함하는데, 예를 들어 StxA 및 SLT-1A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 경우, 천연 아미노산 잔기 위치 250, 249, 248, 247, 246, 245, 244, 243, 242, 241, 240, 또는 그 이하에서 끝나는 절단; 및 SLT-2A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 경우 천연 아미노산 잔기 위치 249, 248, 247, 246, 245, 244, 243, 242, 241, 또는 그 이하에서 끝나는 절단과 같은 것이다. 일부 실시예들은 가능한 경우 전술한 돌연변이 중 임의의 것의 조합을 포함하는 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함한다.

[0266] [294] 본 발명의 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 퓨린-절단 모티프의 부분적인 카복시-말단 절단인 돌연변이(들)를 포함하지만, 그러나, 본 명세서에 기재된 일부 분자는 전체 20개 아미노산 잔기의 완전한 카복시-말단 절단인 퓨린-절단 모티프인 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함하지 않는다. 예를 들어, 특정 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 StxA(SEQ ID NO:2) 또는 SLT-1A(SEQ ID NO:1)에서 천연 위치 240까지의 시가 독소 A1 단편 영역의 부분적인 카복시-말단 절단을 포함하지만 위치 239 이하에서는 카복시-말단 절단이 아닌 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함한다. 유사하게, 특정 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 SLT-2A(SEQ ID NO: 3)의 천연 위치 239까지 시가 독소 A1 단편 영역의 부분적 카복시-말단 절단을 포함하지만 위치 238 또는 그 이하에서는 카복시-말단 절단이 아닌 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함한다. 퓨린 절단 내성 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 가장 큰 카복시-말단 절단에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프, 퓨린-절단 모티프의 위치 P14 및 P13을 포함하는 돌연변이들이 여전히 존재한다.

[0267] [295] 본 발명의 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 야생형, 시가 독소 A 서브유닛과 비교하여 퓨린-절단 모티프 내의 아미노산 잔기 치환 및 카복시-말단 절단 둘 다를 포함한다. 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 야생형, 시가 독소 A 서브유닛에 비해 최소 퓨린-절단 부위 R/Y-x-x-R 내의 아미노산 잔기 치환 및 카복시-말단 절단 둘 다를 포함하는데, 예를 들어, StxA 및 SLT-1A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 경우, 천연 아미노산 잔기 위치 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 또는 그 이상에서 끝나고 적절한 경우 임의의 비양전하를 띤 아미노산 잔기로 치환된 천연 위치의 아미노산 잔기 R248 및/또는 R251을 포함하는 절단; 및 SLT-2A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 경우 천연 아미노산 잔기 위치 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 또는 그 이상에서 끝나고 적절한 경우 임의의 비양전하를 띤 아미노산 잔기로 치환된 천연 위치의 아미노산 잔기 Y247 및/또는 R250을 포함하는 절단과 같은 것이다. 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함하는 절단된 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 또한 최적의 세포독성을 유지하기 위해 위치 P9, P8, 및/또는 P7에 퓨린-절단 모티프, 아미노산 잔기를 포함한다.

[0268] [296] 본 발명의 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 야생형 시가 독소 A 서브유닛과 비교하여 하나 이상의 내부 아미노산 잔기 결실인 돌연변이(들)를 포함한다. 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 최소 퓨린-절단 부위 R/Y-x-x-R 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 결실을 갖는 돌연변이(들)를 포함한다. 예를 들어, 249, 250, 247, 252 등과 같은 주변 잔기의 결실과 조합될 수 있는 천연 위치의 아미노산 잔기 R248 및/또는 R251의 내부 결실을 포함하는 StxA 및 SLT-1A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드; 및 예를 들어, 248,

249, 246, 251 등과 같은 주변 잔기의 결실과 조합될 수 있는 천연 위치의 아미노산 잔기 Y247 및/또는 R250의 내부 결실을 포함하는 SLT-2A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드가 있다. 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 예를 들어, R248-R251이 결여된 StxA 및 SLT-1A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 Y247-R250이 결여된 SLT-2A유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드와 같이 최소 퓨린-절단 부위 R/Y-x-x-R을 결실시키는 4개의 연속적인 아미노선 잔기의 결실인 돌연변이를 포함한다. 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 예를 들어, SLT-1A 또는 StxA에서 244-247 및/또는 252-255의 결실과 같이 코어 퓨린-절단 모티프에 인접하는 아미노산 잔기에서 하나 이상의 아미노산 잔기 결실을 갖는 돌연변이를 포함한다. 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 예를 들어 StxA 및 SLT-1A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 대해 천연 위치 아미노산 잔기 241-262의 결실; 및 SLT-2A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 대해 천연 위치 아미노산 잔기 240-261과 같이 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비교하여 전체 표면-노출 프로테아제-절단 민감성 루프의 내부 결실인 돌연변이를 포함한다.

[0269] [297] 본 발명의 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 퓨린-절단 모티프 내의 내부 아미노산 잔기 결실인 돌연변이 및 야생형 시가 독소 A 서브유닛과 비교하여 카복시-말단 절단인 돌연변이 둘 다를 포함한다. 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 야생형 시가 독소 A 서브유닛과 비교하여 최소 퓨린-절단 부위 R/Y-x-x-R 내의 아미노산 잔기 결실인 돌연변이 및 카복시-말단 절단인 돌연변이 둘 다를 포함한다. 예를 들어, 프로테아제 절단 내성 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 여전히 아미노산 잔기 247 및/또는 252를 갖는 절단된 StxA 또는 SLT-1A에서 천연 위치 아미노산 잔기 248-249 및/또는 250-251의 결실인 또는 여전히 아미노산 잔기 246 및/또는 251을 갖는 절단된 SLT-2A에서 아미노산 잔기 247-248 및/또는 249-250의 결실인 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함할 수 있다. 일부 실시예들에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 야생형 시가 독소 A 서브유닛과 비교하여 최소 퓨린-절단 부위 R/Y-x-x-R을 결실시키는 4개의 연속적 아미노산 잔기의 결실을 갖는 돌연변이 및 카복시-말단 절단을 포함하는데, 예를 들어, StxA 및 SLT-1A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 대해서는 천연 아미노산 잔기 위치 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 또는 그 이상에서 끝나고 R248-R251을 결여하는 절단; 및 SLT-2A 유래 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 대해서는 천연 아미노산 잔기 위치 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 또는 그 이상에서 끝나고 Y247-R250을 결여하는 절단과 같은 것이다.

[0270] C. 내장된 에피토프를 갖는 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 예

[0271] [298] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 탈면역화 및/또는 표적 세포의 MHC 클래스 I 제시 경로로의 전달을 위한 하나 이상의 내장된 또는 삽입된 이종 T-세포 에피토프를 포함할 수 있다. 일부 실시예 및/또는 특정 시가 독소 효과기 폴리펩티드 하위-영역에서 T-세포 에피토프를 내장하거나 부분적으로 내장하는 것이 T-세포 에피토프를 삽입하는 것보다 선호될 수 있는데, 내장-유형 변형은 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 다양한 하위-영역들에서 더욱 성공적일 수 있는 한편 성공적인 삽입은 시가 독소 효과기 폴리펩티드 하위 영역의 보다 작은 부분 집합에 한정될 수 있기 때문이다. 여기에서 "성공적인(successful)"이라는 용어는 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 대한 변형(예: 이종성 T-세포 에피토프의 도입)이 단독으로 또는 결합분자의 성분으로서 요구되는 수준의 활성에서 하나 이상의 시가 독소 효과기 기능들을 유지하면서 변형된 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 초래한다는 것을 의미한다.

[0272] [299] WO 2015/113007에 기술된 시가 독소 효과기 폴리펩티드 하위 영역 중 임의의 것이 적합할 수 있다. 일부 실시예들에서, WO 2015/113007에 기술된 시가 독소 효과기 폴리펩티드 중 임의의 것은, 예를 들어 탈면역화를 위한 하나 이상의 새로운 에피토프 영역 파괴의 추가(본 명세서에 기재된 것과 같은 것) 및/또는 퓨린-절단 모티프 파괴(본 명세서에 기재된 것과 같은 것)에 의해 결합 분자의 시가 독소 효과기 폴리펩티드로 변형될 수 있다.

[0273] [300] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 필수적으로 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프 및 하나 이상의 다른 돌연변이를 포함하는 절단된 시가 독소 A 서브유닛으로만 이루어진다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 내장되거나 삽입된 이종성 T-세포 에피토프를 포함하고 예를 들어 SLT-1A(SEQ ID NO:1) 또는 StxA(SEQ ID NO:2)의 아미노산 77 내지 239에 의해 나타내어지는 폴리펩티드 또는 시가 독소 패밀리의 구성원의 다른 A 서브유닛의 등가물(예: SLT-2A(SEQ ID NO:3)의 아미노산 77 내지 238)로 이루어지는 것과 같은 전장 시가 독소 A 서브유닛보다 작다. 예를 들어, 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과

기 폴리펩티드는 아미노산 SEQ ID NO:1의 75내지 251, SEQ ID NO:1의 1 내지 241, SEQ ID NO:1 의 1내지 251 또는 아미노산 SEQ ID NO:1의 1 내지 261로부터 유래되고, 여기서 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 적어도 하나의 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프를 포함하고 적어도 하나의 아미노산은 내인성, B-세포 및/또는 CD4+ T-세포에서 파괴되고, 그리고 여기서 파괴된 아미노산은 내장된 또는 삽입된 에피토프와 중첩되지 않는다. 유사하게 다른 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2의 아미노산 75 내지 251, SEQ ID NO:2의 1 내지 241, SEQ ID NO:2의 1 내지 251, 또는 SEQ ID NO:2의 1 내지 261로부터 유래되고, 여기서 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 적어도 하나의 내장된 또는 삽입된 이종 T-세포 에피토프를 포함하고 적어도 하나의 아미노산은 내인성 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 에피토프에서 파괴되고, 그리고 여기서 파괴된 아미노산은 내장되거나 삽입된 에피토프와 중첩되지 않는다. 추가로, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 SEQ ID NO:3의 아미노산 75 내지 251, SEQ ID NO:3의 1 내지 241, SEQ ID NO:3의 1 내지 251, 또는 SEQ ID NO:3의 아미노산 1 내지 261로부터 유래될 수 있고, 여기서 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 적어도 하나의 내장된 또는 삽입된 이종 T-세포 에피토프를 포함하고 적어도 하나의 아미노산은 내인성 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 에피토프 영역에서 파괴되고, 및 여기서 파괴된 아미노산은 내장되거나 삽입된 에피토프와 중첩되지 않는다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시-말단에서 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프 및 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1의 아미노산 75 내지 251, SEQ ID NO:1의 1 내지 241, SEQ ID NO:1의 1 내지 251, 또는 SEQ ID NO:1 아미노산 1 내지 261로부터 유래되고, 여기서 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시-말단에서 적어도 하나의 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프 및 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함한다. 유사하게 다른 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2의 아미노산 75 내지 251, SEQ ID NO:2의 1 내지 241, SEQ ID NO:2의 1 내지 251, 또는 SEQ ID NO:2의 아미노산 1 내지 261로부터 유래되고, 여기서 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시-말단에서 적어도 하나의 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프 및 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함한다. 추가로, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 3의 아미노산 75 내지 251, SEQ ID NO: 3의 1 내지 241, SEQ ID NO: 3의 1 내지 251, 또는 SEQ ID NO: 3의 아미노산 1 내지 261로부터 유래될 수 있고, 여기서 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시 말단에서 적어도 하나의 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프 및 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함한다.

[0274] D. 조합 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 예

[0275] [301] 조합 시가 독소 효과기 폴리펩티드(combination Shiga toxin effector polypeptide)는 2개 이상의 하위-영역(즉, 비중첩 하위-영역)을 포함하고, 여기서 각 하위-영역은 다음 중 하나 이상을 포함한다: (1) 내인성 에피토프 또는 에피토프 영역의 파괴; (2) 내장된 이종 T-세포 에피토프 펩티드; (3) 삽입된 이종 T-세포 에피토프 펩티드; 및 (4) A1 단편 유래 영역의 카복시-말단에서 파괴된 퓨린-절단 모티프.

[0276] [302] 조합 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 특정 실시예들은 (1) 내인성 에피토프 또는 에피토프 영역에서의 파괴 및 (2) A1 단편 유래 영역의 카복시-말단에서 파괴된 퓨린-절단 모티프 둘 다를 포함한다. WO 2015/113007, WO 2016/196344, 및 WO 2018/140427(예를 들어, 위의 표 3 참조)에 기술된 개별적인 탈면역화된 시가 독소 효과기 하위-영역 중 임의의 것이 일반적으로 본 명세서에 기술된, WO 2015/191764에 기술된, 및/또는 결합 분자의 성분으로 사용하기 위한 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 생성하기 위해 당업계에 알려진 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함하는 임의의 시가 독소 효과기 하위-영역과 조합될 수 있다.

[0277] [303] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 내장된 또는 삽입된 이종성 CD8+ T-세포 에피토프와 중첩되지 않는 적어도 하나의 B-세포 및/또는 T-세포 에피토프 영역의 파괴를 포함하고, 여기서 파괴는 야생형 시가 독소에 비해 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시예들에서, 치환은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된다: K1에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 H; T4에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; D6에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, 및 R; S8에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; T9에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; S9에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; K11에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 H; T12에서 A, G, V, I, L, F, M, S, 및 K; S12에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; S33에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 C; S43에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; G44에서 A 또는 L; S45에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; T45에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; G46에서 A 및 P; D47에서 A, G, V, L, I, F, S, M, 및 Q; N48에서 A, G, V, L, M, 및 F; L49에서 A, V, C, 및 G; Y49에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 T; F50에서 A, G, V, L, I, 및 T; A51 ; D53에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; V54에서 A, G, I, 및 L; R55에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; G56에서 A 및 P; I57에서 A, G, V, 및 M; L57에서 A, V, C, G, M, 및 F; D58에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; P59에서 A, G, 및 F; E60에서 A, G, V, L, I, F, S, Q,

N, D, M, T, 및 R; E61에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, 및 R; G62에서 A; R84에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; V88에서 A 및 G; I88에서 A, V, C, 및 G; D94에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; S96에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; T104에서 A, G, V, L, I, F, M; 및 N; A105에서 L; T107에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 P; S107에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 P; L108에서 A, V, C, 및 G; S109에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; T109에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; G110에서 A; S112에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; D111에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, 및 T; S112에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; D141에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; G147에서 A; V154에서 A 및 G. R179에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; T180에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; T181에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; D183에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; D184에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; L185에서 A, G, V, 및 C; S186에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; G187에서 A; R188에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; S189에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; D198에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; R204에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R205에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; S247에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; Y247에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; R248에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R250에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R251에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; D264에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; G264에서 A; 및 T286에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S. 일부 실시예들에서, 다중의(multiple) 내인성 B-세포 및/또는 CD8+ T-세포 에피토프 영역들의 다중의 파괴가 있고, 여기서 각 파괴는 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 아미노산 잔기 치환을 포함한다: K1에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 H; T4에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; D6에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, 및 R; S8에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; T9에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; S9에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; K11에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 H; T12에서 A, G, V, I, L, F, M, S, 및 K; S12에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; S33에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 C; S43에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; G44에서 A 또는 L; S45에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; T45에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; G46에서 A 및 P; D47에서 A, G, V, L, I, F, S, M, 및 Q; N48에서 A, G, V, L, M, 및 F; L49에서 A, V, C, 및 G; Y49에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 T; F50에서 A, G, V, L, I, 및 T; A51 ; D53에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; V54에서 A, G, I, 및 L; R55에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; G56에서 A 및 P; I57에서 A, G, V, 및 M; L57에서 A, V, C, G, M, 및 F; D58에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; P59에서 A, G, 및 F; E60에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, T, 및 R; E61에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, 및 R; G62에서 A; R84에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; V88에서 A 및 G; I88에서 A, V, C, 및 G; D94에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; S96에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; T104에서 A, G, V, L, I, F, M; 및 N; A105에서 L; T107에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 P; S107에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 P; L108에서 A, V, C, 및 G; S109에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; T109에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; G110에서 A; S112에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; D111에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, 및 T; S112에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; D141에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; G147에서 A; V154에서 A 및 G. R179에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; T180에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; T181에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; D183에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; D184에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; L185에서 A, G, V ,및 C; S186에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; G187에서 A; R188에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; S189에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; D198에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; R204에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R205에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; S247에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; Y247에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; R248에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R250에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R251에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; D264에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; G264에서 A; 및 T286에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S.

[0278] [304] 본 발명의 특정 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 (1) 내장되거나 삽입된 이종성 T-세포 에피토프-펩티드 및 (2) A1 단편 유래 영역의 카복시-말단에서 파괴된 퓨린-절단 모티프 둘 다를 포함한다. WO 2015/113007에 기술된 내장된 또는 삽입된 이종 T-세포 에피토프를 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 하위-영역 중 임의의 것은 일반적으로 결합 분자의 성분으로서, 프로테아제-절단 내성이고 이종 T-세포 에피토프를 표적 세포의 MHC 클래스 I 제시 경로에 전달할 수 있는 조합 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 생성하기 위해 프로테아제-절단 내성 시가 독소 효과기 폴리펩티드 하위-영역(예를 들어, 본 명세서에 기술된, WO 2015/191764에 기술된 및/또는 당업계에 알려진 변형된 시가 독소 A 서브유닛 하위-영역)과 조합될 수 있다. 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 이 유형의 비-제한적 예는 SEQ ID NO: 19-21에 제시되어 있다.

[0279] [305] 조합 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 특정 실시예는 (1) 내인성 에피토프 또는 에피토프 영역의 파괴 및 (2) 내장된 이종 T-세포 에피토프-펩티드 둘 다를 포함한다. 그러나, 본 명세서에 또는 WO 2015/191764에 기재된 삽입되거나 내장된 이종 T-세포 에피토프를 포함하는 시가 독소 효과기 하위-영역은 일반적으로 본 명세서에 기술된 각 탈면역화된 시가 독소 효과기 하위-영역들과 조합될 수 없지만 시가 독소 효과기 기능(들)의 충분한

수준을 결과적인 조합 분자가 보유하도록 성공적으로 조합된 것으로 경험적으로 나타난 곳에서는 예외이다. 본 명세서의 개시는 이러한 실시예들이 성공을 경험적으로 입증하기 위해 어떻게 만들어지고 시험될 수 있는지를 보여준다.

[0280] [306] "성공적인(successful)"이라는 용어는 여기에서 시가 독소 효과기 폴리펩티드에서 2개 이상의 아미노산 잔기 치환이 기능적 특징, 예를 들어, 탈면역화, 퓨린-절단 감소 및/또는 내장되거나 삽입된 에피토프의 전달 능력을 초래하는 한편, 변형된 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 하나 이상의 시가 독소 효과기 기능들을 유지한다는 것을 의미하기 위해 사용된다. 본 명세서에 기술된 접근법 및 분석은 조합, 시가 독소 효과기 폴리펩티드, 및 이를 포함하는 결합 분자를 나타내는 본 명세서에 기술된 실시예들을 설계, 제조, 및 경험적으로 시험하는 방법을 보여준다.

[0281] [307] 조합, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 예를 들어, 퓨린-절단 모티프 파괴, 개별 에피토프 파괴, 및/또는 이종 T 세포 에피토프 카고와 같은 각각의 하위-영역의 특징을 조합할 수 있고, 이러한 조합은 때때로 그것들의 부분적으로 탈면역화된 하위-영역의 합과 비교하여 면역원성이 상승적으로 감소한 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 초래한다.

[0282] [308] 특정 농도에서 세포독성을 나타내지 않거나 감소된 세포독성을 나타내는 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드, 예를 들어, R179A를 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 외인성 물질을 세포 내로 전달하기 위한 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드로서 여전히 유용할 수 있다. 유사하게, 특정 농도에서 세포독성을 나타내지 않거나 감소된 세포독성을 나타내는 CD8+ T-세포 과면역화된, 시가 독소 효과기 폴리펩티드, 예를 들어, 촉매 도메인에 내장된 에피토프를 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드(예: WO 2015/113005: 실시예 1-F 참조)는 T-세포 에피토프(들)를 시가 독소 효과기 폴리펩티드가 존재하는 세포의 원하는 세포 이하 구획으로 전달하기 위해 또는 T-세포 에피토프(들)를 표적 세포로 전달하기 위한 결합 분자의 성분으로서 여전히 유용할 수 있다.

[0283] E. 결합 분자의 예

[0284] [309] 하기 실시예들은 예를 들어, PD-L1 및/또는 PD-L1 양성 세포를 발현하는 세포들과 같이 세포 표면에서 PD-L1에 물리적으로 커플링된 세포를 표적으로 하는 예시적인 결합 분자의 특정 구조를 보다 상세히 기술한다.

[0285] [310] PD-L1 결합 분자, 및 그의 조성물의 다양한 실시예가 본 명세서에 제공되고, 여기서, 각각의 PD-L1 결합 분자는 (1) 적어도 하나의 독소 성분 및 (2) PD-L1 분자의 세포 외 부분에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의 PD-L1 결합 영역을 포함한다. 본 명세서에 기재된 각각의 PD-L1 결합 분자에 대해, 적어도 하나의 결합 영역은 독소 효과기 폴리펩티드가 유래된 독소, 예를 들어 독소와 관련이 없는 면역글로불린 도메인을 포함하는 PD-L1 결합 영역에 대해 이종성이다. 일부 실시예들에서, 적어도 하나의 독소 성분은 독소 효과기 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예들에서, 독소 효과기 폴리펩티드는 시가 독소의 A 서브유닛으로부터 유래된 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드이다.

[0286] [311] 본 발명의 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 분자는 (1) 시가 독소 패밀리의 적어도 하나의 구성원의 A 서브유닛으로부터 유래된 적어도 하나의 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드 및 (2) PD-L1 분자의 세포 외 부분에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의 PD-L1 결합 영역을 포함한다.

[0287] [312] 본 발명의 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 영역은 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역(HVR-H)을 포함하고, 각각은 SEQ ID NO: 22-24 및 27-32의 임의의 하나에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖거나, 또는 필수적으로 SEQ ID NO: 22-24 및 27-32의 임의의 하나에 보인 아미노산 서열만으로 이루어진다. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 (a) 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L)을 포함하고, 각각은 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:25, 및 SEQ ID NO:26의 임의의 하나에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나, 또는 필수적으로 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:25, 및 SEQ ID NO:26의 임의의 하나에 나타난 아미노산 서열로만 이루어진다. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 (a) SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:21에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는, 또는 필수적으로 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:21의 임의의 하나에 제시된 아미노산 서열로만 이루어지는 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L)을 더 포함한다. 특정의 다른 추가 실시예들에서, 결합 영역은 (a) SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:21에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는, 또는 필수적으로 SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID

NO:21의 임의의 하나에 제시된 아미노산 서열로만 이루어지는 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L)을 더 포함한다. 특정의 다른 추가 실시예에서, 결합 영역은 (a) SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:26에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는, 또는 필수적으로 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:26의 임의의 하나에 제시된 아미노산 서열로만 이루어지는 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L)을 더 포함한다.

[0288] [313] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 영역은 다음을 포함한다: (a) 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L)으로서, 각각은 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:25, 및 SEQ ID NO:26의 임의의 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 필수적으로 이로만 구성되고, 및 (b) 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역(HVR-H)으로서, 각각은 SEQ ID NO: 22-24 및 27-32의 임의의 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 필수적으로 이로만 이루어진다.

[0289] [314] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 영역은 다음을 포함한다: (a) SEQ ID NOs: 33, 35-36의 임의의 하나에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖거나, 또는 SEQ ID NOs: 33, 35-36, 및 38의 임의의 하나의 아미노산 서열로만 필수적으로 이루어지는 경쇄 영역; 및/또는 (b) SEQ ID NO: 34, 37, 및 39의 임의의 하나에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 또는 SEQ ID NO: 34, 37, 및 39의 임의의 하나의 아미노산 서열로만 필수적으로 이루어지는 중쇄 영역. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 SEQ ID NO: 85-107 및 156-157의 임의의 하나에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하거나 또는 SEQ ID NO: 85-107 및 156-157의 임의의 하나에 제시된 폴리펩티드로만 필수적으로 이루어진다. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 예를 들어 SEQ ID NO: 85-107 및 156-157 중 어느 하나의 폴리펩티드로 구성되거나, 이를 포함하거나, 필수적으로 이로만 이루어지는 단일 사슬 가변 단편(single-chain variable fragment)이다.

[0290] [315] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드 및 PD-L1의 세포 외 부분에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 PD-L1 결합 분자이고, 여기서 결합 영역은 다음을 포함한다: (a) (i) 아미노산 서열 EYTMH(SEQ ID NO:27)를 포함하는 CDR1, (ii) 아미노산 서열 GINPNNGGTWYNQKFKG(SEQ ID NO:29)를 포함하는 CDR2, 및 (iii) 아미노산 서열 PYYYGSREDYFDY(SEQ ID NO:32) 를 포함하는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH); 및 (b) (i) 아미노산 서열 SASSSVSYMY(SEQ ID NO:19)를 포함하는 CDR1, (ii) 아미노산 서열 LTSNLAS(SEQ ID NO:20)를 포함하는 CDR2, (iii) 아미노산 서열 QQWSSNPPT(SEQ ID NO:26)를 포함하는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL). 일부 실시예들에서, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드 및 PD-L1의 세포 외 부분에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 PD-L1 결합 분자이고, 여기서 결합 영역은 (a) (i) 아미노산 서열 EYTMH(SEQ ID NO: 27)로 이루어진 CDR1, (ii) 아미노산 서열 GINPNNGGTWYNQKFKG(SEQ ID NO:29)로 이루어진 CDR2, 및 (iii) 아미노산 서열 PYYYGSREDYFDY(SEQ ID NO:32)로 이루어진 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH); 및 (b) (i) 아미노산 서열 SASSSVSYMY(SEQ ID NO:19)로 이루어지는 CDR1, (ii) LTSNLAS(SEQ ID NO:20)로 이루어지는 CDR2, 및 (iii) 아미노산 서열 QQWSSNPPT(SEQ ID NO:26)로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드 및 PD-L1의 세포 외 부분에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 PD-L1 결합 분자이고, 여기서 결합 영역은 (a) (i) 아미노산 서열 EYTMH(SEQ ID NO: 27)를 갖는 CDR1, (ii) 아미노산 서열 GINPNNGGTWYNQKFKG(SEQ ID NO:29)를 갖는 CDR2, 및 (iii) 아미노산 서열 PYYYGSREDYFDY(SEQ ID NO:32)를 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH); 및 (b) (i) 아미노산 서열 SASSSVSYMY(SEQ ID NO:19)를 갖는 CDR1, (ii) 아미노산 서열 LTSNLAS(SEQ ID NO:20)를 갖는 CDR2, 및 (iii) 아미노산 서열 QQWSSNPPT(SEQ ID NO:26)를 갖는 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다.

[0291] [316] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드는 SEQ ID NO:41의 서열을 포함하거나, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다.

[0292] [317] 본 발명의 일부 실시예들에서, VH는 SEQ ID NO:34의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시예들에서, VL은 SEQ ID NO:35의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시예들에서, VH는 SEQ ID NO:34의 서열을 포함하고 VL은 SEQ ID NO:35의 서열을 포함한다.

[0293] [318] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 영역은 VH 및 VL을 연결하는 scFv 링커를 포함한다. 일부 실시예들에서, scFv 링커는 길이가 3 내지 12개 아미노산이다. 일부 실시예들에서, scFv 링커는 길이가 3 내지 약 12개 아미노산이다. 일부 실시예들에서, scFv 링커는 길이가 약 3 내지 약 12개 아미노산이다. 일부 실시예들에서,

scFv 링커는 길이가 약 10-20개 아미노산이다. 일부 실시예들에서, scFv 링커는 길이가 20개 초과의 아미노산이다. 일부 실시예들에서, scFv 링커는 가요성(flexible) 링커이다. 일부 실시예들에서, scFv 링커는 SEQ ID NO:72의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 단일 사슬 가변 단편(scFv)이다. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 SEQ ID NO:106의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다.

[0294] [319] 본 명세서에 사용된 용어 "결합 도메인 링커(binding domain linker)"는 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드와 결합 영역(예를 들어, scFv)을 연결하는 링커를 지칭한다. 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 분자는 결합 도메인 링커를 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 도메인 링커는 SEQ ID NO:73의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 도메인 링커는 SEQ ID NO:74-77 중 어느 하나의 서열, 또는 그에 대해 90% 이상 또는 95% 이상 동일한 서열을 포함한다.

[0295] [320] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 시가 독소 A 서브유닛에 이종성인 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, CD8+ T-세포 에피토프는 서열 NLVPMVATV(SEQ ID NO:78), 또는 이에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시예들에서, CD8+ T-세포 에피토프는 절단 가능한 스페이서(spacer)를 통해 결합 영역에 연결된다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 서열 HHAA(SEQ ID NO: 265)을 갖는 스페이서를 갖는다.

[0296] [321] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 N-말단에서 C-말단까지 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, 및 결합 영역을 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 N-말단에서 C-말단까지 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, VH, 및 VL을 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 N-말단에서 C-말단으로 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, VH, scFv 링커, 및 VL을 포함한다.

[0297] [322] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 N-말단에서 C-말단으로 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, 결합 영역, 및 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 N-말단에서 C-말단까지 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, VH, scFv 링커, VL, 및 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 N-말단에서 C-말단으로 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, 결합 영역, 절단 가능한 스페이서, 및 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다.

[0298] [323] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 단일 연속 폴리펩티드이다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 SEQ ID NO:128의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 SEQ ID NO: 108-155, 158-159, 또는 160-168 중 어느 하나의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다.

[0299] [324] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 2개 이상(예를 들어, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 또는 8개)의 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예들에서, 각각의 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 128의 서열을 포함한다. 일부 실시예들에서, 2개의 폴리펩티드는 예를 들어 결합 영역을 통해 서로 비공유적으로 연결된다.

[0300] [325] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 세포독성이다. 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 분자는 비-세포독성이다. 예를 들어, PD-L1 결합 분자는 시가 독소 서브유닛 효과기 폴리펩티드가 절단되거나 그의 세포독성 활성을 제거하는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 경우 비-세포독성일 수 있다.

[0301] [326] PD-L1 결합 분자의 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 분자를 PD-L1-발현 세포에 투여하면 (i) 세포에 의한 PD-L1 결합 분자의 내재화 및 (ii) 세포의 사멸을 초래한다. PD-L1 결합 분자의 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 분자를 PD-L1-발현 세포에 투여하면 (i) 세포에 의한 PD-L1 결합 분자의 내재화 및 (ii) 촉매 활성 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드로 인한 세포 사멸을 초래한다. PD-L1 결합 분자의 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 분자를 PD-L1-발현 세포에 투여하면 (i) 세포에 의한 PD-L1 결합 분자의 내재화 및 (ii) T 세포 에피토프 카고의 전달 및 제시로 인한 세포 사멸을 초래한다. 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 분자는 세포에 도입될 때 300nM 이하의 반-최대 억제 농도(CD_{50}) 값으로 세포독성을 나타낼 수 있고 그리고/또는 유의한 수준의 시가 독소 세포독성을 나타낼 수 있다.

[0302] [327] PD-L1 결합 분자의 일부 실시예들에서, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드는 10,000, 5,000, 1,000, 500, 또는 200 피코몰 미만의 반-최대 억제 농도(CD_{50}) 값으로 리보솜 억제 활성을 나타낼 수 있다.

[0303] [328] PD-L1 결합 분자의 일부 실시예들에서, 적어도 하나의 시가 독소 A 서브유닛 유래 폴리펩티드는 특징들의

조합을 갖는다(예를 들어, 탈면역화된 하위-영역(들), 하위-영역(들)을 포함하는 이종 에피토프, 프로테아제-절단 내성 하위-영역, 및/또는 카복시-말단, 소포체 보유/회수 신호 모티프). 본 명세서에 기재된 특정 PD-L1 결합 분자는 단일 분자에서 여러 특성의 조합, 예를 들어 효율적인 세포 내재화, 강력한 세포-표적화 세포독성, 선택적 세포독성, 탈면역화, 고용량에서의 낮은 비특이적 독성, 높은 안정성, CD8+ T-세포 과면역화, 및/또는 표적 세포의 MHC I 클래스 경로에 이종 T-세포 에피토프(들)를 전달하는 능력과 같은 것을 제공한다.

[0304] [329] 본 발명의 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 분자는 척색동물에 투여하기에 유용한데, 예를 들어 (1) 투여된 분자로부터 야기되는 특정 면역 반응(들)을 감소 또는 제거하고, (2) 또는 투여된 분자로부터 야기되는 비특이적 독성을 제거하고, (3) 생체 내에서 PD-L1-발현 표적 세포(들)를 특이적으로 사멸시키고, 그리고/또는 (4) 표적 세포, 표적 세포-유형을 포함하는 종양 덩어리, 및/또는 이러한 표적 세포-유형을 포함하는 조직 로커스에 대한 유익한 면역 반응(들)을, 예를 들어 표적 세포-유형을 표시하는 특정 MHC 클래스-I 에피토프 복합체와 척색동물의 CD8+ T 세포(들)의 세포 간 결합 자극을 통한 것과 같이 표적화한다.

[0305] [330] 본 발명의 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 분자는 SEQ ID NO: 85-107 및 156-157 중 어느 하나에 제시된 폴리펩티드를 포함하거나 필수적으로 이로만 구성되고, 선택적으로 PD-L1 결합 분자는 아미노-말단 메티오닌 잔기를 포함한다.

[0306] [331] 본 명세서에 사용된 용어 "Cmax"는 그것이 대상체에게 투여된 후 결합 분자가 달성하는 최고 혈청 농도를 지칭한다. 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 PD-L1 결합 분자는 약 1000 내지 약 50,000ng/mL 범위의 Cmax를 갖는다. 예를 들어, PD-L1 결합 분자는 약 1 내지 약 1,000 ng/mL, 약 1,000 내지 약 3,000 ng/mL, 약 2,000 내지 약 5,000 ng/mL, 약 5000 내지 약 10,000 ng/mL, 약 10,000 ng/mL 내지 약 15,000 ng/mL, 약 15,000 ng/mL 내지 약 20,000 ng/mL, 약 20,000 ng/mL 내지 약 25,000 ng/mL, 약 25,000 ng/mL 내지 약 30,000 ng/mL, 또는 약 30,000 ng/mL 내지 약 35,000 ng/mL, 또는 약 35,000 ng/mL 내지 약 50,000 ng/mL 범위의 Cmax를 가질 수 있다. 일부 실시예들에서 Cmax는 약 1,000, 약 2,000, 약 3,000, 약 4,000, 약 5,000, 약 6,00, 약 7,000, 약 8,000, 약 9,000, 또는 약 10,000 ng/mL이다. 일부 실시예들에서, Cmax는 약 약 21,000, 약 22,000, 약 23,000, 약 24,000, 약 25,000, 약 26,000, 약 27,000, 약 28,000, 약 29,000, 또는 약 30,000 ng/mL이다. 일부 실시예들에서, Cmax는 2,096, 27,063, 또는 22,375 ng/mL이다.

[0307] [332] 본 명세서에 사용된 용어 "반감기(half-life)" 또는 "$T_{1/2}$"는 투여된 PD-L1 결합 분자의 초기 용량의 절반이 체내에서 제거되는 데 걸리는 시간을 지칭한다. 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 PD-L1 분자의 반감기는 약 1분 내지 약 1시간, 약 1시간 내지 약 3시간, 약 3시간 내지 약 5시간, 또는 약 5시간 내지 약 10시간이다. 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 분자의 반감기는 약 5분, 약 10분, 약 15분, 약 20분, 약 25분, 약 30분, 약 35분, 약 40분, 약 45분, 약 50분, 약 55분, 또는 약 60분이다. 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 분자의 반감기는 약 1시간, 약 1.5시간, 약 2시간, 약 2.5시간, 약 3시간, 약 3.5시간, 약 4시간, 약 4.5시간, 약 5시간, 약 5.5시간, 약 6시간, 약 6.5시간, 약 7시간, 약 7.5시간, 약 8시간, 약 8.5시간, 약 9시간, 약 9.6시간, 또는 약 10시간이다. 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 분자의 반감기는 약 2.8시간, 약 3.7시간, 또는 약 5.6시간이다.

[0308] [333] PD-L1 결합 분자의 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 분자를 PD-L1-발현 세포에 투여하면 (i) 세포에 의한 PD-L1 결합 분자의 내재화 및 (ii) MHC 클래스 I 분자와 복합된 PD-L1 결합 분자에 의해 전달되는 이종 CD8+ T-세포 에피토프-펩티드 카고를 세포 표면에 제시하는 세포를 초래한다.

[0309] 기타 구조적 변이

[0310] [334] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자의 단편, 변이체, 및/또는 유도체(derivative)가 사용되고, 이는 PD-L1 표적 생체분자의 임의의 세포 외 부분에 대한 기능적 결합 부위를 함유하고, 훨씬 더 바람직하게는 표적 생체분자에 고친화도로 결합할 수 있다(예를 들어, K_D에 의해 표시된 바와 같이). 예를 들어, 10^{-5} 내지 10^{-12} 몰/리터, 바람직하게는 200nM 미만의 해리 상수(K_D)로 표적 생체분자의 세포 외 부분에 결합하는 임의의 결합 영역은 결합 분자 제조 및 본 명세서에 설명된 방법에 사용하기 위하여 대체될 수 있다.

[0311] [335] 숙련된 작업자는 하나 이상의 1) 항원성 및/또는 면역원성 잠재력을 감소시키는 내인성 에피토프 파괴, 2) 단백질 분해 절단을 감소시키는 퓨린-절단 모티프 파괴, 및/또는 3) 항원성 및/또는 면역원성 잠재력을 감소시키거나 또는 세포 표면에 제시하기 위해 MHC I 분자로 전달될 수 있는 내장된 또는 삽입된 에피토프와 연결된 것과 같이 예를 들어 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 전체 구조 및 기능을 유지함으로써 그들의 생물학적 활성

을 감소시키지 않으면서 시가 독소 효과기 폴리펩티드, 항체, 및 결합 분자 및 전자의 임의의 것을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 대한 변이가 만들어질 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들어, 일부 변형은 발현을 촉진하고, 정제를 촉진하고, 약동학적 특성을 개선하고, 및/또는 면역원성을 개선할 수 있다. 이러한 변형은 숙련된 작업자에게 잘 알려져 있고, 예를 들어 아미노-말단에 추가되어 개시 부위(initiation site)를 제공하는 메티오닌, 편리하게 위치한 제한 부위 또는 종결 코돈을 생성하기 위해 어느 한쪽 말단에 배치된 추가 아미노산, 및 편리한 검출 및/또는 정제를 제공하기 위해 어느 한 쪽 말단에 융합된 생화학적 친화성 태그를 포함한다. 비-척색동물 시스템(예: 원핵 세포)을 사용하여 폴리펩티드의 생산된 폴리펩티드의 면역원성을 개선하기 위한 일반적인 변형은, 그 폴리펩티드의 생산 후 후 출발 메티오닌 잔기를 제거하기 위한 것인데, 이는 예를 들어 박테리아 숙주 시스템에서와 같이 생산 동안 포르밀화될 수 있는데, 예를 들어 N-포르밀메티오닌(fMet)의 존재가 척색동물에서 바람직하지 않은 면역 반응을 유도할 수 있기 때문이다.

[0312] [336] 또한, 결합 분자의 아미노 및/또는 카복시 말단에 추가의 아미노산 잔기, 또는 에피토프 태그 또는 다른 모이어티에 대한 서열과 같은 결합 분자의 단백질성 성분의 포함이 본 명세서에서 고려된다. 추가 아미노산 잔기는 예를 들어, 클로닝 촉진, 발현 촉진, 번역후 변형, 합성 촉진, 정제, 검출 촉진, 및 투여를 포함하는 다양한 목적을 위해 사용될 수 있다. 에피토프 태그 및 모이어티의 비제한적 예는 키틴 결합 단백질 도메인, 엔테로펩티다제 절단 부위, 인자 Xa 절단 부위, FIAsH 태그, FLAG 태그, 녹색 형광 단백질(GFP), 글루타티온-S-트랜스퍼라제 모이어티, HA 태그, 말토스 결합 단백질 도메인, myc 태그, 폴리히스티딘 태그, ReAsH 태그, 스트렙-태그, 스트랩-태그 II, TEV 프로테아제 부위, 티오레독신 도메인, 트롬빈 절단 부위, 및 V5 에피토프 태그를 포함한다.

[0313] [337] 상기 특정 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및/또는 결합 분자의 폴리펩티드 서열은 필요한 모든 구조적 특징이 여전히 존재하는 한 폴리펩티드 영역(들)에 도입된 하나 이상의 보존적 아미노산 치환에 의해 변하고 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 단독으로 또는 결합 분자의 성분으로서 어떤 요구되는 기능(들)도 나타낼 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "보존적 치환(conservative substitution)"은 하나 이상의 아미노산이 생물학적으로 유사한 다른 아미노산 잔기로 대체됨을 의미한다. 예에는 작은 아미노산, 산성 아미노산, 극성 아미노산, 염기성 아미노산, 소수성 아미노산, 및 방향족 아미노산과 같은 유사한 특성을 가진 아미노산 잔기의 치환이 포함된다(예를 들어, 표 4 참조). 내인성 포유동물 펩티드 및 단백질에서 일반적으로 발견되지 않는 잔기로의 보존적 치환의 예는 아르기닌 또는 라이신 잔기를 예를 들어 오르니틴, 카나바닌, 아미노에틸시스테인, 또는 다른 염기성 아미노산으로 보존적 치환하는 것이다. 펩티드 및 단백질의 표현형 침묵 치환(phenotypically silent substitutions)에 관한 추가 정보는 예를 들어, Bowie J et al., Science 247: 1306-10 (1990)을 참조할 수 있다.

표 4

[0314] **표 4. 보존적 아미노산 치환의 예**

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
A	D	H	C	F	N	A	C	F	A	C	A	A	D
G	E	K	I	W	Q	G	M	H	C	D	C	C	E
P	Q	R	L	Y	S	I	P	W	F	E	D	D	G
S	N		M		T	L		Y	G	H	G	E	K
T			V			V			H	K	N	G	P
									I	N	P	H	Q
									L	Q	S	K	R
									M	R	T	N	S
									R	S	V	Q	T
									T	T		R	
									V			S	
									W			P	
									Y			T	

[0315] [338] 표 4의 보존적 치환 구도에서 아미노산의 예시적인 보존적 치환은 물리화학적 특성에 따라 분류된다. I: 중성, 친수성; II: 산 및 아미드; III: 염기성; IV: 소수성; V: 방향족, 부피가 큰 아미노산, VI 친수성 비하전, VII 지방족 비하전, VIII 비극성 비하전, IX 시클로알케닐 결합, X 소수성, XI 극성, XII 소형, XIII

회전 허용, 및 XIV 유연성. 예를 들어, 보존적 아미노산 치환은 다음을 포함한다: 1) S는 C로 치환될 수 있고; 2) M 또는 L은 F로 치환될 수 있고; 3) Y는 M으로 치환될 수 있고; 4) Q 또는 E는 K로 치환될 수 있고; 5) N 또는 Q는 H로 치환될 수 있고; 6) H는 N으로 치환될 수 있다.

[0316] [339] 추가적인 보존적 아미노산 치환은 다음을 포함한다: 1) S는 C로 치환될 수 있고; 2) M 또는 L은 F로 치환될 수 있고; 3) Y는 M으로 치환될 수 있고; 4) Q 또는 E는 K로 치환될 수 있음; 5) N 또는 Q는 H로 치환될 수 있음; 6) H는 N으로 치환될 수 있다.

[0317] [340] 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 결합 분자의 변이체는 변화된 세포독성, 변화된 세포증식 억제 효과, 변화된 면역원성, 및/또는 변화된 혈청 반감기와 같은 바람직한 성질을 획득하기 위하여 결합 영역 또는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 영역 내에서와 같이 본 명세서에 기술된 폴리펩티드를 변화시켜서 또는 하나 이상의 아미노산 잔기를 변경하거나 하나 이상의 아미노산 잔기를 결실 또는 삽입하여 제조할 수 있다. 하나 이상의 아미노산 잔기를 변경하거나 하나 이상의 아미노산 잔기를 결실 또는 삽입함으로써 본 명세서에 기재된 폴리펩티드를 변경함으로써 제조될 수 있다. 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 결합 분자는 추가로 신호 서열이 있거나 없을 수 있다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 본 명세서에 인용된 폴리펩티드 서열에 비교하여 최대 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 아미노산 치환을 갖는 본 명세서에 기술된 폴리펩티드 영역의 기능적 단편 또는 변이를 포함할 수 있다.

[0318] [341] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 결합 분자는 그것이 1) 적어도 하나의 내장된 또는 삽입된 이종 T-세포 에피토프를 포함하고 적어도 하나의 아미노산이 내인성 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 에피토프 영역에서 파괴되고, 여기서 파괴된 아미노산은 내장된 또는 삽입된 에피토프와 중첩되지 않으며; (2) 적어도 하나의 내장된 또는 삽입된 이종 T-세포 에피토프 및 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시-말단에서 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함하고; 또는 (3) 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시-말단에서 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함하고 그리고 내인성 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 에피토프 영역에서 적어도 하나의 아미노산을 포함하고, 여기서 파괴된 아미노산은 파괴된 퓨린-절단 모티프와 중첩되지 않는다는 조건을 만족하는 한 본 명세서에 인용된 폴리펩티드 서열에 비교하여 최대 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 아미노산 치환을 갖는 본 명세서에 기술된 폴리펩티드 영역의 기능적 단편 또는 변이를 포함할 수 있다.

[0319] [342] 따라서, 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 예를 들어 SLT-1A(SEQ ID NO: 1), StxA(SEQ ID NO: 2), 및/또는 SLT-2A(SEQ ID NO:3)와 같은 시가 독소 A 서브유닛과 같은 천연 발생 시가 독소 A 서브유닛에 대해 적어도 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 또는 99%의 전체 서열 동일성을 갖는 아미노선 서열을 포함하거나 필수적으로 이들로만 이루어지고, 여기서 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 (1) 적어도 하나의 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프를 포함하고 그리고 적어도 하나의 아미노산은 내인성, B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 에피토프 영역에서 파괴되며, 여기서 파괴된 아미노산은 내장되거나 삽입된 에피토프와 중첩되지 않으며; (2) 적어도 하나의 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프 및 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시-말단에서 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함하고; 또는 (3) 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시-말단에서 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함하고 그리고 내인성, B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 에피토프 영역에서 적어도 하나의 파괴된 아미노산을 포함하며, 여기서 파괴된 아미노산은 파괴된 퓨린-절단 모티프와 중첩되지 않는다.

[0320] [343] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 효소 활성을 증가시키기 위해 돌연변이, 삽입, 또는 결실될 수 있는 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 촉매 및/또는 세포독성 활성을 감소 또는 제거하기 위해 돌연변이되거나 결실될 수 있는 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 예를 들어, 시가 독소 패밀리 구성원의 A 서브유닛의 촉매 및/또는 세포독성 활성은 돌연변이 또는 절단에 의해 감소되거나 제거될 수 있다.

[0321] [344] 시가 독소 패밀리 구성원의 A 서브유닛의 세포독성은 돌연변이 및/또는 절단에 의해 변경, 감소, 또는 제거될 수 있다. 티로신-77, 글루타메이트-167, 아르기닌-170, 티로신-114, 및 트립토판-203으로 표시된 위치는 Stx, Stx1, 및 Stx2의 촉매 활성에 중요한 것으로 나타났다(Hovde C et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2568-72 (1988); Deresiewicz R et al., *Biochemistry* 31: 3272-80 (1992); Deresiewicz R et al., *Mol Gen Genet* 241: 467-73 (1993); Ohmura M et al., *Microb Pathog* 15: 169-76 (1993); Cao C et al., *Microbiol Immunol* 38: 441-7 (1994); Suhan M, Hovde C, *Infect Immun* 66: 5252-9 (1998)). 무세포 리보솜 비활성화 분석에서 글루타메이트-167과 아르기닌-170을 모두 돌연변이시키면 Slt-I A1의 효소 활성이 제거되었다(LaPointe

P et al., *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005)). 소포체에서 Slt-I A1의 새로운 발현을 사용하는 또 다른 접근법에서, 글루타메이트-167과 아르기닌-170을 모두 돌연변이시키면 해당 발현 수준에서 Slt-I A1 단편 세포독성이 제거되었다(LaPointe P et al., J Biol Chem 280: 23310-18(2005)). 절단 분석은 잔기 75 내지 268의 StxA 단편이 시험관 내에서 여전히 상당한 효소 활성을 유지한다는 것을 보여주었다(Haddad J et al., J Bacteriol 175: 4970-8 (1993)). 잔기 1-239를 함유하는 Slt-I A1의 절단된 단편은 시험관 내에서 상당한 효소 활성 및 세포질에서의 새로운 발현에 의한 세포독성을 나타냈다(LaPointe P et al., J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). 소포체에서 잔기 1-239로 절단된 Slt-I A1 단편의 발현은 그것이 세포질로 역전위(retrotranslocate)될 수 없기 때문에 세포독성이 아니었다(LaPointe P et al., J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

[0322] [345] 시가 독소 A 서브유닛의 효소 활성 및/또는 세포독성에 대한 가장 중요한 잔기들은 다음 잔기 위치에 매핑되었다: 특히, 아스파라긴-75, 티로신-77, 티로신-114, 글루타메이트-167, 아르기닌-170, 아르기닌-176, 및 트립토판-203(Di R et al., *Toxicon* 57: 525-39 (2011)). 특히, 글루타메이트-E167-에서-라이신 및 아르기닌-176-에서-라이신 돌연변이를 포함하는 Stx2A의 이중 돌연변이 구조체(construct)는 완전히 비활성화되었고, 한편 Stx1 및 Stx2의 많은 단일 돌연변이는 세포독성에서 10배 감소를 보여주었다. 또한 Stx1A를 1-239 또는 1-240으로 절단하면 세포 독성이 감소하고 유사하게 Stx2A를 보존된 소수성 잔기로 절단하면 그 세포 독성이 감소했다. 시가 독소 A 서브유닛에서 진핵생물 리보솜 결합 및/또는 진핵생물 리보솜 억제를 위한 가장 중요한 잔기는 특히 다음 잔기 위치인 아르기닌-172, 아르기닌-176, 아르기닌-179, 아르기닌-188, 티로신-189, 발린-191, 및 류신-233에 매핑되었다((McCluskey A et al., PLoS One 7: e31191(2012)). 그러나 특정 변형은 시가 독소 효과기 폴리펩티드가 나타내는 시가 독소 기능적 활성을 증가시킬 수 있다. 예를 들어, Stx1A의 잔기 위치 알라닌-231을 글루타메이트로 돌연변이시키면 시험관 내에서 Stx1A의 효소 활성이 증가한다(Suhan M, Hovde C, Infect Immun 66: 5252-9 (1998)).

[0323] [346] 본 발명의 일부 실시예들에서, SLT-1A(SEQ ID NO: 1) 또는 StxA(SEQ ID NO: 2)로부터 유래된 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 위치 75에서 아스파라긴, 위치 77에서 티로신, 위치 114에서 티로신, 위치 167에서 글루타메이트, 위치 170에서 아르기닌, 위치 176에서 아르기닌, 및/또는 위치 203에서 트립토판의 치환을 포함하는 돌연변이된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이러한 치환의 예는 위치 75의 아스파라긴을 알라닌으로, 위치 77의 티로신을 세린으로, 위치 114의 티로신을 세린으로, 글루타메이트 위치 167에서 글루타메이트로, 위치 170에서 아르기닌의 알라닌으로의 치환, 위치 176번에서 아르기닌의 라이신으로의 치환, 위치 203에서 트립토판의 알라닌으로의 치환, 및/또는 위치 231에서 알라닌의 글루타메이트로의 치환과 같이 숙련된 작업자에게 잘 알려져 있을 것이다. 시가 독소 효소 활성 및/또는 세포독성을 향상시키거나 감소시키는 다른 돌연변이는 본 개시 내용의 범위 내에 있으며 본 명세서에 개시된 잘 알려진 기술 및 분석을 사용하여 결정될 수 있다.

[0324] [347] 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 결합 분자는 치료제, 진단제, 및/또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 제제를 비롯한 당업계에 공지된 기타 추가 외인성 물질을 포함할 수 있는 하나 이상의 추가 제제에 선택적으로 접합될 수 있다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 또는 결합 분자는 예를 들어 탈면역화를 제공하고, 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시-말단에서 연장된 루프 및/또는 퓨린-절단 모티프를 차폐함으로써 퓨린-절단을 파괴하고, 약동학적 특성 및/또는 면역원성을 개선하기 위하여 PEG화 또는 알부민화된다(예: Wang Q et al., *Cancer Res* 53: 4588-94 (1993); Tsutsumi Y et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8548-53 (2000); Buse J, El-Aneed A, *Nanomed* 5: 1237-60 (2010); Lim S et al., *J Control Release* 207-93 (2015) 참조).

[0325] 1. 항체 성분 변이체

[0326] [348] 본 발명의 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 결합 분자(예를 들어, 항체-독소 접합체)의 항체 성분의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예를 들어, 항체-독소 접합체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체 성분을 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 적절한 변형을 도입함으로써 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내의 잔기로부터의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구조체(construct)가 원하는 특성, 예를 들어 항원 결합 및/또는 독소 전달을 보유한다면, 결실, 삽입, 및 치환의 임의의 조합이 최종 구조체에 도달하도록 만들어질 수 있다.

[0327] a) 치환, 삽입, 및 결실 변이체들

[0328] [349] 본 발명의 일부 실시예들에서, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체가 제공된다. 치환 돌연변이 유발에 대한 관심 부위는 HVR 및 FR을 포함한다. 아미노산 치환을 관심 항체에 도입하고 항체-독소 접합체 생성물을 원하는 활성, 예를 들어 유지/향상된 항원 결합, 감소된 면역원성, 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해

스크리닝할 수 있다.

[0329] [350] 한 유형의 치환 변이체는 모 항체의 하나 이상의 초가변 영역 잔기(hypervariable region residues)를 치환하는 것을 포함한다(예를 들어, 인간화 항체를 생성하기 위해). 일반적으로, 추가 연구를 위해 선택된 결과적인 변이체(들)는 모 항체에 비해 특정 생물학적 특성(예: 증가된 친화성 또는 감소된 면역원성)에서 변형(예: 개선)을 갖고, 그리고/또는 모 항체의 특정 생물학적 특성을 실질적으로 보유할 것이다. 예시적인 치환 변이체는 예를 들어 파지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기술을 사용하여 편리하게 생성될 수 있는 친화도 성숙 항체(affinity matured antibody)이다. 간략하게, 하나 이상의 HVR 잔기가 돌연변이되고 변이체 항체가 표시되고 특정 생물학적 활성(예: 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다(예: WO 2015/120058 참조).

[0330] [351] 예를 들어, 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 항체 친화성을 개선하기 위해 HVR에서 변경(예: 치환)이 이루어질 수 있다. 예를 들어, 변경들은 체세포 성숙 과정(somatic maturation process)(Chowdhury P, Methods Mol Biol 207: 179-196 (2008)) 및/또는 SDR(-CDR) 동안 고주파에서 돌연변이를 겪는 코돈에 암호화되는 HVR "핫스팟" 또는 잔기에서 만들어질 수 있으며, 생성된 변이체 중쇄 및/또는 경쇄는 결합 친화도에 대해 시험된다. 일부 실시예들에서, 이러한 변경이 항원에 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 치환, 삽입, 또는 결실은 하나 이상의 HVR 내에서 발생할 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경은 HVR "핫스팟" 또는 SDR 외부를 포함하여 HVR에서 이루어질 수 있다. 상기 제공된 변이체 VH 및 VL 서열의 일부 실시예들에서, 각각의 HVR은 변경되지 않거나 1, 2, 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 함유한다.

[0331] [352] 아미노산 서열 삽입은 1개 잔기에서 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 길이 범위의 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열 내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 아미- 말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 효소(예: 항체 유도 효소 전구약물(prodrug) 요법의 경우) 또는 폴리펩티드에 대한 항체의 아미노- 및/또는 카복실-말단에 대한 융합을 포함한다.

[0332] b) 탈면역화 및/또는 키메라 변이체(De-Immunized and/or Chimeric Variants)

[0333] [353] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자(예를 들어, 항체-독소 접합체(antibody-toxin conjugate))의 항체 성분은 키메라이다. 예를 들어, 키메라 항체(chimeric antibody)는 비인간 가변 영역(예를 들어, 마우스, 랫(rat), 햄스터, 토끼, 또는 비인간 영장류로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 추가 예에서, 키메라 항체는 그것이 유래된 모 항체의 클래스 또는 아이소타입(isotype)이 변경된 "클래스 전환된(class switched)" 항체이다. 일부 실시예들에서, 키메라 항체는 인간화 항체이다. 키메라 항체는 그의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0334] [354] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자의 항체 성분(예를 들어, 항체-독소 접합체)은 인간화된다. 전형적으로, 비-인간 항체는 모 비-인간 항체의 특이성 및 친화성을 유지하면서 인간에서 면역원성을 감소시키기 위해 인간화된다. 전형적으로, 인간화 항체는 HVR, 예를 들어 CDR(또는 그의 일부)이 비-인간 항체로부터 유래되고 FR(또는 그의 일부)이 인간 항체 서열로부터 유래되는 하나 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 선택적으로 인간 항체로부터의 불변 영역의 적어도 일부를 또한 포함할 것이다. 일부 실시예들에서, 인간화 항체의 일부 FR 잔기는 예를 들어 항체 특이성 및/또는 친화성을 회복 또는 개선하기 위해 비-인간 항체(예를 들어, HVR 잔기가 유래된 항체)의 상응하는 잔기로 치환되었다.

[0335] c) Fc 영역 변이체

[0336] [355] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자(예를 들어, 항체-독소 접합체)의 항체 성분은 Fc 영역을 포함한다. 예를 들어, Fc 영역 변이체는 인간 Fc 영역 서열(예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4로부터의 Fc 영역)을 포함할 수 있고 선택적으로 하나 이상의 아미노산 변경(예를 들어, 하나 이상의 아미노산 위치에서의 치환)을 포함할 수 있다. 일부 실시예들에서, 항체 성분은 ADCC 및/또는 CDC 활성을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 항체는 표적 발현 세포의 사멸을 매개하는데 특히 유용하다. 개선된 Fc 효과기 기능을 갖는 항체는 예를 들어 Fc 도메인과 Fc 수용체(FcR)(예: FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, 또는 FcRn을 갖는 FcγRIII) 간의 상호작용에 관여하는 아미노산 잔기의 변화를 통해 생성될 수 있고, 이는 증가된 세포독성 및/또는 증가된 혈청 반감기와 같은 변경된 약동학을 초래한다. FcR에 대한 결합이 개선되거나 감소된 특정 항체 변이체는 숙련된 작업자에게 공지되어 있고 그리고/또는 Shields R et al., J Biol Chem 9: 6591-6604 (2001)에 기재되어 있다.

[0337] [356] 본 발명의 일부 실시예들에서, 항체 성분은 하나 이상의 효과기 기능이 결여된(예를 들어, ADCC 및/또는

CDC 활성이 결여된) Fc 영역을 포함한다. 효과기 기능이 결여되거나 실질적으로 감소된 Fc 영역은 예를 들어 Fc 영역이 세포용해성 Fc 수용체(예를 들어 DANA 돌연변이체) 및/또는 C1q 보체 단백질(complement protein)에 결합하지 않거나 실질적으로 감소된 결합을 갖도록 천연 Fc 영역 서열에 하나 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 획득될 수 있다(예를 들어 Wilson N et al., Cancer Cell 19: 101-113 (2011); Idusogie E et al. J Immunol 164: 4178-4184 (2000) 참조). 일부 실시예들에서, 항체 성분은 그것이 함체 효과기 기능의 전부는 아니지만 일부 가진다는 점에서 변화되는데, 이는 결합 분자의 생체 내 반감기는 중요하지만 특정 효과기 기능(예를 들어, CDC 또는 ADCC)은 바람직하지 않거나 유해하다.

[0338] [357] 본 발명의 일부 실시예들에서, 항체 성분은 ADCC를 개선하는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334에서의 치환(잔기의 EU 넘버링)을 갖는 Fc 영역을 포함한다.

[0339] [358] 본 발명의 일부 실시예들에서, 항체 성분은 변경된 C1q 결합 및/또는 CDC 효과기 기능(예를 들어 개선되거나 감소됨)을 초래하는 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다(예를 들어 WO 1999/051642; U.S. 6,194,551 참조).

[0340] d) 글리코실화(Glycosylation) 변이체

[0341] [359] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자의 항체 성분(예를 들어, 항체-독소 접합체)은 항체가 글리코실화되는 정도를 증가 또는 감소시키도록 변경된다. 항체에 대한 글리코실화 부위의 추가 또는 결실은 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성될 수 있다. 예를 들어, 글리코실화된 Fc 영역을 포함하는 항체 성분은 그에 부착된 탄수화물이 변경되도록 변경될 수 있다. 다른 예에서, 항체 성분에 부착된 탄수화물은 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 변경될 수 있다.

[0342] e) 시스테인 조작된 항체 변이체

[0343] [360] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자(예를 들어, 항체-독소 접합체)의 항체 성분은 하나 이상의 조작된 시스테인 잔기를 보유한다. 항체의 일부 실시예들에서, 예를 들어 항체의 하나 이상의 잔기가 시스테인 잔기(예를 들어, ThioFab)로 치환된 시스테인 조작된 항체를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 실시예들에서, 치환된 잔기는 접합에 용이하게 이용 가능한 항체 부위에서 발생한다(예를 들어, Junutula J et al., Nature Biotech 26: 925-32 (2008); Dornan D et al, *Blood* 114: 2721-29 (2009) 참조). 이들 잔기를 시스테인으로 치환함으로써, 반응성 티올 기는 항체의 접근가능한 부위에 위치되고 항체를 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티와 같은 다른 모이어티에 접합시켜 본 명세서에 추가로 기재된 바와 같은 면역접합체를 생성하는데 사용될 수 있다. 항체의 일부 실시예들에서, 항체 폴딩 및 조립을 상당히 교란시키지 않고 항원 결합 및/또는 항체 효과기 기능을 유의하게 변경하지 않는 하나 이상의 시스테인 잔기 치환을 통해 시스테인 조작된 항체를 생성하는 것이 바람직할 수 있다.

[0344] 2. 면역접합체(Immunoconjugates)

[0345] [361] 또한 PD-L1 결합 분자의 다양한 실시예들이 본 명세서에 제공되고, 여기서 각각의 PD-L1 결합 분자는 (1) 적어도 하나의 독소 성분 및 (2) PD-L1 분자의 세포 외 부분에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의 PD-L1 결합 영역을 포함하는데, 하나 이상의 독소 성분(예를 들어, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물, 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 이의 단편)에 접합된 항-PD-L1 항체를 포함하는 면역접합체를 포함한다. "면역접합체(immunoconjugate)"는 세포독성제를 포함하나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 이종 분자(들)에 접합된 항체(항원-결합 항체 단편 포함)이다.

[0346] [362] 결합 분자의 일부 실시예들에서, 면역접합체는 항체-독소 접합체이고, 이는 독소, 예를 들어 디프테리아 A 사슬, 엑소톡신 A 사슬(P. aeruginosa 유래), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디(Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 단백질(예: PAPI, PAPII, 또는 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 커신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 젤로닌, 미토겔린, 리스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신, 시가 독소 A 서브유닛, 및 트리코테센과 같은 독소에 접합된 항체이다. PD-L1 결합 영역(예를 들어, 항체 또는 항체 단편)에 연결된 독소(예를 들어, 시가 독소 A 서브유닛 단편)를 포함하는 생물학적 면역접합체는 치료 또는 진단 생물학적 분자로서 유용하다. 또한, 이러한 치료 또는 진단 분자는 예를 들어 용해도-변경제, 약동학적-변경제, 면역원성-변경제, 및/또는 약력학적-변경제와 같은 추가 제제에 접합된 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 가짐으로써 개선될 수 있다(예: WO 2018/106895 참조). 전형적으로, 생물약제학적(biopharmaceutical) 면역접합체는 생물학적 분자의 작용기(들) 및 작용제 또는 카고의 작용기, 또는 대안적으로 생물학적 분자 및 제제 또는 카고 사이를 연결하도록 설계된 링커의 작용기를 포함하는

화학 반응을 사용하여 항체를 다른 제제(agent) 또는 카고에 접합함으로써 생성된다(상기 섹션 II. 연결 구성요소 및/또는 이들의 하위 구성요소를 연결하는 연결 참조).

[0347] [363] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 예를 들어 결합 분자가 시스테인 조작된 항체를 포함하는 PD-L1 결합 영역 내로 조작된 시스테인을 이용하는 면역접합체이다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 접합을 위해 면역글로불린 가변 영역의 프레임워크 영역(예를 들어, FR1)으로 조작된 시스테인을 이용하는 면역접합체이다(예를 들어 WO 2011/000054 참조).

[0348] [364] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 예를 들어 결합 분자가 글리코실화된 항체 또는 항체 단편을 포함하는 것과 같이 Fc 영역에 부착된 탄수화물 모이어티(carbohydrate moiety)를 이용하는 면역접합체이다.

[0349] [365] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 항체 또는 항체 단편 및 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드를 포함하는 면역접합체이다.

[0350] [366] 본 명세서에 기재된 바와 같은 결합 분자 또는 항체 독소 접합체의 독소 성분은 다음을 포함할 수 있지만 이에 국한되지는 않는다. 천연 독소, 생물 독소, 단백질성 독소, 독(venom), 세포독소, 소분자 독소, 및 상기 언급된 것으로부터 유래된 합성 독성물질, 예를 들어, 아코니틴, 아드리아마이신, 아마니틴, 아마톡신, 안트라사이클린, 아로인, 아피톡신, 아트로핀, 부포톡신, 카디악 글리코사이드, 칼리케아미신, 셀란딘, 시큐톡신, 콜히친, 코니인, 콘발라톡신, 크로타민, 큐라레, 커신, 다우리신, 디기탈리스, 돌라스타틴, 듀오카르마이신, 에보모노사이드, 그레이아노톡신, 젤세민, 젤세미닌, 헬레브린, 헬레보린, 히오시아민, 리가톡신, 리구스트린, 메이탄신, 미토마이신 C, 무스카린, 팔로톡신, 포라톡신, 파이토독소, 피크로톡신, 바다 쐐기풀 독소, 탁신 알칼로이드, 티오닌, 빈카 알칼로이드, 비스코톡신, 및 본 명세서에 기재된 다양한 독소 제제. 독소 성분으로 사용하기에 적합한 약학적 활성 세포독소에는 다음이 포함되지만 이에 국한되지는 않는다: ABx 독소, 리보솜 불활성화 단백질 독소, 탄저병 독소, 콜릭스 독소, 클라우딘, 디프테리아 독소, 열변성 엔테로톡신, 백일해 독소, 슈도모나스 엑소톡신 A, 리신, 시가 독소, 및 서브틸라제 세포독소; 알킬화제(예: 벤다무스틴, 부설판, 카르무스틴, 클로람부실, 사이클로포스파미드, 에트라무스틴, 이포스파미드, 로무스틴, 메클로레타민, 멜팔란, 무스틴, 티오테파, 및 트레오설판), 항생제(예: 안트라사이클린), 항미세소관제(예: 빈크리스틴, 빈블라스틴, 및 에토포시드와 같은 빈카 알칼로이드 또는 파클리탁셀 및 도세탁셀과 같은 톡소이드), 삽입제(intercalating agent)(예: 다우노루비신, 블레오마이신, 닥티노마이신, 독소루비신, 에피루비신, 미톡사트론, 이다루비신, 플리카마이신, 미토마이신, 및 스텝토조토신), 항대사물질(예: 메토트렉세이트, 피리미딘 길항제, 및 퓨린 길항제), 성장 억제제(예: 토포이소머라제 억제제 및 캄프토테신, 콜히친, 다우노루비신, 피세틴, 제니스테인, 이리노테칸, 라멜라린, 미리세틴, 파클리탁셀, 타스핀, 트리시트리놀 B, 토포테칸, 빈카 알칼로이드와 같은 스핀들 독소); 효소 및 이의 단편, 예를 들어 아스파라기나아제와 같은 핵산분해 효소 및 특정 RNAses, 예를 들어 박테리아 RNase, 진균 리보톡신, 아르고노트 폴리펩티드, 비나아제, 양서류 RNase, 란피르나아제, Onconase®, 및 포유동물 RNase, 예를 들어, 보바인 세먼 RNase, 및 인간 RNase; 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소 활성 독소와 같은 독소, 예를 들어 아브린, 아그로스틴, 아마란딘, 아마란틴, 아마란투스 항바이러스/RIP, 안지오제닌, A. 파텐스 RIP, 아티큘라틴 D, 아스파린, 아스퍼길린, Aspf1, 발사민, B. 히스피다 RIP, 부가닌, 부겐빌레아 x 부티아나 항바이러스 단백질1, 베닌카신, 부가닌, B. 루브라 RIP, 브리오딘(예: 브리오딘 1, 브리오딘 2), B. 스펙타빌리스 RIP, B. v. 알붐 RIP, 캄포린, *C.아큐레아툼-전신내성 유도 단백질*, *C. 크리스타타 RIP*, *C. 피가레이 RIP*, *카란틴*, 카리브딘, 시나모민, 클라빈, C. 모스카타 RIP, 코치닌 B, 콜코신, 크로틴, 큐커모신, 커르신, 패랭이꽃 종 RIP, 코리네박테리움 종 디프테리아 독소(C.울세란, C.오메가, C.슈도튜버큘로시스의 디프테리아 독소), 도데칸드린, 에불린, 에불리틴, E. 히에말리스 RIP, 유세라틴, 유티루칼린, 플라민, 플라믈린, 포에티디시민, 젤로닌, 기간틴, 집소필린, H. 크레피탄스 RIP, 헤테로테팔린, 히스핀, 히르수텔린 A, H. 오리엔탈리스 RIP, H. 불가라레 RIP, 힙신, I 홀란디카 RIP, 라게닌, 람자핀, 란세올린, L. 실린더형 RIP, 루파실린, 루파큘린, 루파굴린, 루핀, *L. 우시타티시뭄*RIP, 라이치닌, 필오필린, 마누틴, 마모린, 맘팔민, *M. 카란티아 렉틴*, *M. 크리스탈리뭄* RIP, 멜로닌, 멕신, 미라빌리스 종 RIP, 미토길린, 모데신, MOR, 모르모디카 종 RIP, 모모스그로빈, 모샤틴, 무사르민, N. 타바쿰 RIP, 니그린, 니그리틴, 오시모이딘, 파체로신, P. 캘리포니쿰 렉틴, 페포신, 페트로글라우신, 페트로그란딘, 파이토라카 종 RIP, 피사빈, 플레우투레긴, 플루투레긴, A. 탈리아나 펙틴 메틸 트랜스퍼라제(PME), P. 멀티포럼 RIP, 포크위드 항바이러스 단백질(PAP), 포렉틴, 아에로모나스 종 슈도모나스 독소(A. 하이드로필라 슈도모나스-유사 독소), 폴첼린, 퀸커긴신, R. 코뮤니스 아글루티닌, 리스트릭토신, 리신, 리프록시민, 사포린, 사르신, 사티빈, S.세랄레 RIP, 세치민, 시가 독소, 시가-유사 독소, 시볼딘 b, S. 니그라 RIP(예: S. 니그라 아글루티닌 I-V), S. 오시모이데스 RIP, 스피나시아 올레라세아 단백질, 스텔라린, 스테노닥틸린, 텍사닌, 트리콜린, 트리코산테스 종 RIP(예: 카라수린, 키릴

로윈, 트리코앙귄, 트리코키린, 트리코산틴, TYchi), 트리티쿰 종. RIP, V. 알붐 RIP, 벨린, 벨루틴, 베로톡신, V. 히스패니카 RIP, 비르큐민, 볼켄신, V. 볼바세아 RIP, 볼바린, 유카 잎 단백질, Z. 디플로페레니스 RIP, Z. 메이스 RIP, 및 전술한 것 중 임의의 것의 임의의 리보독성 단편; 및 본 명세서에 기재된 다양한 항종양제 또는 항암제.

[0351] [367] 본 명세서에 기재된 바와 같이 독소 성분으로서 사용하기에 적합한 수많은 단백질성 독소가 있다. 예를 들어, 아르고노트 효소 도메인 또는 진균 리보톡신 및 아르고노트 서열로 구성된 하이브리드 효소 도메인은 리보솜 불활성화를 위해 조작될 수 있다(Picchinuk E, Wreschner D, Protein Sci 19: 1272-8 (2010) 참조). 리보독성 영역으로서 유용한 효소 도메인을 갖는 RNase의 예는 박테리아 RNase, 예를 들어, 바이나제(binase), 양서류 RNase, 예를 들어 란피르나제(ranpirnase), 및 Onconase®, 및 포유동물 RNase, 예를 들어 보바인 세먼(bovine semen) RNase 및 인간 RNase: RNase2, RNase3 및 RNase5를 포함한다 RNase5 (Newton D et al., *J Biol Chem* 269: 739-45 (1994); Netwon D et al., *J Immunol Meth* 231: 159-67 (1999); Yoon J et al., *Life Sci* 64: 1435-45 (1999); Hugh M et al., *Cancer Res* 61: 8737-42 (2001); Makarov A, Ilinskaya N, *FEBS Lett* 540: 15-20 (2003)).

표 5

[0352] **표 5. 예시적인 단백질 독소 및 독소 효과기 폴리펩티드의 공급원**

단백질 독소	기질-세포 이하 위치(Substrate - Subcellular Location)
아브린	사르신-리신 루프 - 세포질
탄저병 치사 인자	MAPKK - 세포질
Aspf1	사르신-리신 루프 - 세포질
부가닌	사르신-리신 루프 - 세포질
브리오딘	사르신-리신 루프 - 세포질
콜릭스 독소	이종삼량체 G 단백질 - 세포질
시나모민	사르신-리신 루프 - 세포질
클라우딘	사르신-리신 루프 - 세포질
클라빈	사르신-리신 루프 - 세포질
C. difficile TcdA	Ras GTPases - 세포질
C. difficile TcdA	Rho GTPases - 세포질
C. perfringens iota	Rho GTPases - 세포질
사이토리탈 디스텐딩(cytolethal distending)	DNA - 핵
다이앤틴	사르신-리신 루프 - 세포질
디프테리아 독소	신장 인자-2(EF2) - 세포질
에불린	사르신-리신 루프 - 세포질
겔로닌	사르신-리신 루프 - 세포질
기간틴	사르신-리신 루프 - 세포질
열변성 엔테로톡신(heat-labile enterotoxins)	이종삼량체 G 단백질 - 세포질
메이즈 RIP	사르신-리신 루프 - 세포질
미토길린	사르신-리신 루프 - 세포질
니그린	사르신-리신 루프 - 세포질
백일해 독소(Pertussis toxins)	이종삼량체 G 단백질 - 세포질
PD-L	사르신-리신 루프 - 세포질
PAP	사르신-리신 루프 - 세포질
슈도모나스 독소(Pseudomonas toxins)	신장 인자-2(EF2) - 세포질
풀첼린(Pulchellin)	사르신-리신 루프 - 세포질
리스트릭토신(Restrictocin)	사르신-리신 루프 - 세포질
리신	사르신-리신 루프 - 세포질
사포린	사르신-리신 루프 - 세포질
사르신	사르신-리신 루프 - 세포질
시가 독소	사르신-리신 루프 - 세포질
서브틸라제 세포 독소	소포체 샤페론 - ER
트리코산틴	사르신-리신 루프 - 세포질

[0353] IV. 결합 분자의 일반적인 기능

[0354] [368] 결합 분자는 예를 들어 세포 사멸; 세포 성장 억제; 세포 내, 카고 전달; 생물학적 정보 수집; 면역 반응 자극 및/또는 건강 상태의 개선 등을 포함하는 다양한 적용에 유용하다. 결합 분자는 예를 들어 세포 표적화, 세포독성, 치료 분자와 같은 치료 및/또는 진단 분자; 세포 표적화, 무독성, 전달 비히클; 및/또는 세포 표적화, 진단 분자; 예를 들어 암, 면역 장애, 및 미생물 감염을 포함한 다양한 질병의 진단 또는 치료를 위해 특정 세포 유형의 생체 내 표적화와 관련된 응용 분야에 적용할 수 있는 치료 및/또는 진단 분자로서 유용하다.

[0355] [369] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 특정 세포 유형의 세포 표면과 연관된 PD-L1 분자의 세포 외부분에 결합하고 이러한 세포에 들어갈 수 있다. 일단 표적화된 세포 유형 내에서 내재화되면, 결합 분자의 특정 실시예들은 독소 성분의 작용(들)을 통해 세포를 죽일 수 있다. 예를 들어, 일단 표적화된 세포 유형 내에 내재화되면, 결합 분자의 특정 실시예들은 효소적으로 활성인 세포독성 시가 독소 효과기 폴리펩티드 단편을 표적 세포의 세포질 내로 라우팅하고 궁극적으로 세포를 사멸시킬 수 있다. 또 다른 예에서, 일단 표적화된 세포 유형 내에서 내재화되면, 결합 분자의 특정 실시예들은 독소 성분의 작용으로 인해 CD8+ T-세포 에피토프 카고를 표적 세포의 MHC 클래스 I 제시 경로에 전달할 수 있어, MHC 클래스 I 분자와 복합체를 형성하는 에피토프의 세포 표면 제시로, 결국 세포의 죽음을 초래한다. 또 다른 예에서, 일단 표적화된 세포 유형 내에 내재화되면, 결합 분자의 특정 실시예들은 독소 성분의 작용으로 인해 표적 세포에 세포독성 카고를 전달할 수 있고 그에 따라 세포의 사멸을 초래한다.

[0356] [370] 대안적으로, 결합 분자의 비독성 또는 감소된 독성 변이체는 에피토프, 펩티드, 단백질, 폴리뉴클레오티드, 및 검출-촉진제와 같은 추가 외인성 물질을 표적 세포로 전달하는 데 사용될 수 있다. 이 시스템은 임의의 수의 다양한 독소 성분이 PD-L1 결합 영역(들)과 연관되어 예를 들어, 결합 분자를 척색동물에 투여하는 것을 포함하는 적용을 위한 탈면역된 독소 효과기, 특히 생체 내 안정성을 개선하기 위한 환원된 프로테아제-절단 민감성 독소 효과기, 및 면역요법 적용을 위한 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 독소 효과기와 같은 다양한 기능적 특성을 갖는 결합 분자의 변이체를 생성할 수 있다는 점에서 모듈식이다.

[0357] A. 독소 성분 세포독성을 통한 세포 사멸

[0358] [371] 결합 분자의 일부 실시예들은 세포독성이다. 결합 분자의 일부 실시예들은 하나 이상의 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분의 존재로 인해서만 세포독성이다. 시가 독소 패밀리 구성원의 A 서브유닛은 일단 세포의 세포질 내에서는 진핵 세포를 죽일 수 있는 효소 활성 폴리펩티드 영역을 포함한다. 시가 독소 패밀리의 구성원이 진핵 세포를 사멸시키도록 적응되기 때문에, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 특정 실시예들을 포함하는 PD-L1 결합 분자와 같은 시가 독소 유래 분자는 강력한 세포-사멸 활성을 나타낼 수 있다.

[0359] [372] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자의 결합 영역에 의해 결합된 PD-L1과 물리적으로 커플링된 세포(예를 들어, PD-L1 양성 세포)와 접촉시, 결합 분자는 세포의 사멸을 일으킬 수 있다. 일부 실시예들의 경우, 결합 분자의 CD_{50} 값은 5, 2.5, 1, 0.5, 또는 0.25 nM 미만이고, 이는 비표적, 야생형, 시가 독소 효과기 폴리펩티드(예: SEQ ID NO: 1-18)보다 훨씬 더 강력하다.

[0360] [373] 세포-사멸은 표적 세포, 예를 들어, 생체 외 조작된 표적 세포, 시험관 내 배양된 표적 세포, 시험관 내 배양된 조직 샘플 내의 표적 세포, 또는 다세포 유기체 내에서와 같은 생체 내 설정에서 표적 세포의 다양한 상태하에서 본 명세서에 기술된 분자를 사용하여 달성될 수 있다.

[0361] [374] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 결합 분자는 (1) 탈면역화된 시가 독소 효과기 하위 영역, (2) 시가 독소 A1 단편 유래 영역의 카복시-말단 근처에 있는 프로테아제-절단 내성 영역, (3) 카복시-말단, 소포체 보유/검색 신호 모티프; 및/또는 (4) 이종, T-세포 에피토프 내장 또는 삽입 영역을 포함한다. 그러나 일부 실시예의 경우, 이러한 구조적 변형은 야생형 시가 독소 A 서브유닛 폴리펩티드, 예를 들어, 야생형 시가 독소 A1 단편을 포함하는 참조 분자와 비교하여 시가 독소 세포독성의 효능을 유의하게 변경하지 않는다. 따라서, 탈면역화되고, 프로테아제 절단 내성이 있고, 그리고/또는 내장되거나 삽입된 이종 에피토프를 운반하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 결합 분자는 하나 이상의 다양한 다른 기능 또는 특성을 제공하면서 강력한 세포독성을 유지할 수 있다.

[0362] [375] 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하는 이미 세포독성인 결합 분자는 본 명세서에 제공된 정보 및 방법을 사용하여 숙련된 작업자에 의해 더 많은 세포독성 및/또는 완전히 다른 메커니즘을 통해 작동하는 중복 백업 세포독성을 갖도록 조작될 수 있다. 이러한 다중 세포독성 메커니즘은 기능의 다양성(예: 직접 및 간접의 두 가지 세포-사멸 메커니즘과 국부 면역-자극 메커니즘을 통해 강력한 사멸을 제공함)으로 서로를 보완하고 중복적으로 백업할 수 있고(예: 표적 세포가 이전에 활성화된 메커니즘의 하위 집합에 대해 내성을 갖거나 일부 면역

을 획득하는 경우와 같이 다른 메커니즘이 없는 상태에서 하나의 세포 사멸 메커니즘을 제공함으로써), 그리고/또는 발달된 내성으로부터 보호할 수 있다(악성 또는 감염된 세포가 여러 개의 서로 다른 세포 사멸 메커니즘을 동시에 차단하는 덜 가능성 있는 상황에 대한 저항을 제한함으로써).

[0363] B. 세포 표면 상의 MHC 클래스 I 제시를 위한 T-세포 에피토프의 전달

[0364] [376] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 T-세포 에피토프를 포함하고, 이는 핵화된 척색동물 세포(nucleated, chordate cell)에 의한 전달 및 세포-표면 제시를 위한 에피토프-펩티드 카고의 사실상 무제한 선택을 갖는 "T-세포 에피토프 전달" 분자의 조작을 가능하게 한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 T-세포 에피토프를 포함하는 독소 효과기를 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 그들의 독소 성분을 통해 하나 이상의 T-세포 에피토프를 세포의 프로테아좀으로 전달할 수 있다. 전달된 T-세포 에피토프는 단백질 분해 처리되어 세포 표면의 MHC 클래스 I 경로에 의해 제시된다. MHC 클래스 I 에피토프를 결합 분자로 조작함으로써, 면역-자극 항원의 표적화된 전달 및 제시는 척색동물 면역계의 유익한 기능(들)을 이용하고 지시하기 위해 달성될 수 있다.

[0365] [377] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 또는 결합 분자는 세포-표면 제시를 위해 세포의 MHC 클래스 I 분자에 T-세포 에피토프를 전달할 수 있다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 또는 결합 분자는 추가적인 외인성 물질로서 또는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 내에 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 또는 결합 분자는 내장되거나 삽입된 T-세포 에피토프를 세포-표면 제시를 위해 MHC 클래스 I 분자에 전달할 수 있다.

[0366] [378] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 내장되거나 삽입된 T 세포 에피토프를 세포 표면의 MHC 클래스 I 분자에 의한 T 세포 에피토프의 제시를 위해 시가 독소 효과기 폴리펩티드가 존재하는 세포의 MHC 클래스 I 분자에 전달할 수 있다. 일부 실시예의 경우, T-세포 에피토프는 이종 T-세포 에피토프이다. 일부 실시예의 경우, T-세포 에피토프는 CD8+ T-세포 에피토프로서 기능하고, 이미 알려져 있거나 숙련된 작업자에게 일상적인 방법을 사용하여 미래에 확인된다.

[0367] [379] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 결합 분자와 연관된 T-세포 에피토프를 세포 표면의 MHC 클래스 I 분자에 의한 T-세포 에피토프의 제시를 위해 세포의 MHC 클래스 I 분자에 전달할 수 있다. 일부 실시예의 경우, T-세포 에피토프는 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프이다. 일부 실시예의 경우, T-세포 에피토프는 CD8+ T-세포 에피토프로서 기능하고, 이미 알려져 있거나 숙련된 작업자에게 일상적인 방법을 사용하여 미래에 확인된다.

[0368] [380] 본 발명의 일부 실시예들에서, 세포를 결합 분자와 접촉 시, 결합 분자는 결합 분자와 연관된 T-세포 에피토프-펩티드를 세포의 표면에 있는 MHC 클래스 I 분자에 의한 T-세포 에피토프-펩티드의 제시를 위해 세포의 MHC 클래스 I 분자에 전달할 수 있다. 일부 실시예들의 경우, T-세포 에피토프-펩티드는 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 내장되거나 삽입된 이종 에피토프이다. 일부 실시예의 경우, T-세포 에피토프-펩티드는 CD8+ T-세포 에피토프로 기능하고, 이미 알려져 있거나 숙련된 작업자에게 일상적인 방법을 사용하여 미래에 확인된다.

[0369] [381] 이종 에피토프의 결합 분자 안으로 추가 또는 결합 분자에서 그 존재는 추가 외인성 물질로서든 또는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 내에 내장된 또는 삽입된 것으로든 척추동물 내의 유핵 표적 세포에 의한 세포-표면 제시를 위한 선택된 에피토프의 세포-표적화 전달을 위해 그러한 결합 분자의 사용 방법을 가능하게 한다.

[0370] [382] 특정 CD8+ T-세포 과면역, 시가 독소 효과기 폴리펩티드, 및 결합 분자의 기능 중 하나는 세포에 의한 MHC 클래스 I 제시를 위해 MHC 클래스 I 분자에 하나 이상의 T-세포 에피토프 펩티드를 전달하는 것이다. 표적 세포의 MHC 클래스 I 시스템에 대한 외인성 T-세포 에피토프-펩티드의 전달은 표적 세포가 세포 표면 상의 MHC 클래스 I 분자와 연관하여 T-세포 에피토프-펩티드를 제시하도록 유도하는 데 사용될 수 있고, 이에 뒤따라서 CD8+ 효과기 T-세포가 표적 세포를 공격하도록 활성화된다.

[0371] [383] 숙련된 작업자는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 세포에 물리적으로 결합된 특정 세포 외 표적 생체분자를 표적화하는 결합 분자들을 생성하도록 특정 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 다양한 다른 PD-L1-표적화 결합 영역에 연관, 결합, 및/또는 연결하여 이들 결합 분자들의 표적-세포 내재화를 촉진할 수 있다. 모든 유핵 척추동물 세포는 MHC 클래스 I 시스템을 사용하여 세포 내 에피토프를 제시할 수 있는 것으로 믿어진다. 따라서, 결합 분자의 세포 외 표적 생체분자는 원칙적으로 이러한 세포의 MHC 클래스 I 제시 경로로의 T-세포 에피토프 전달을 위해 임의의 유핵 척추동물 세포를 표적화할 수 있다.

[0372] [384] 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 결합 분자의 에피토프 전달 기능은 당업자에게 공지되고 그리고/또는 본

명세서에 기재된 다양한 표준 방법에 의해 검출 및 모니터링될 수 있다. 예를 들어, 표적 세포의 MHC 클래스 I 시스템에 의해 T-세포 에피토프-펩티드를 전달하고 에피토프-펩티드의 제시를 유도하는 결합 분자의 능력은 다양한 시험관 내 및 생체 내 분석을 사용하여 조사할 수 있는데, 예를 들어, MHC 클래스 I/펩티드 복합체의 직접 검출/시각화, MHC 클래스 I 분자에 대한 이종 T-세포 에피토프-펩티드의 결합 친화도 측정 및/또는 세포독성 T-림프구(CTL) 반응의 모니터링에 의한 표적 세포에 대한 MHC 클래스 I-펩티드 복합체 제시의 기능적 결과 측정과 같은 것들이 있다(아래 실시예 참조).

[0373] [385] 폴리펩티드 및 분자의 이러한 기능을 모니터링하기 위한 특정 분석은 시험관 내 또는 생체 외에서 특정 MHC 클래스 I/펩티드 항원 복합체의 직접 검출을 포함한다. 펩티드-MHC 클래스 I 복합체의 직접적인 시각화 및 정량화를 위한 일반적인 방법은 숙련된 작업자에게 알려진 다양한 면역 검출 시약을 포함한다. 예를 들어, 특정 MHC/클래스 I/펩티드 항원 복합체를 인식하기 위해 특정 단일클론(monoclonal) 항체를 개발할 수 있다. 유사하게, TCR-STAR 시약(Altor Bioscience Corp., Mirmar, FL, USA)과 같은 가용성, 다량체 T 세포 수용체는 특정 MHC I/항원 복합체를 직접적으로 시각화하거나 정량화하는데 사용될 수 있다(Zhu X et al., J Immunol 176: 3223-32 (2006)). 이러한 특정 mAb 또는 가용성, 다량체 T-세포 수용체는 예를 들어, 면역 조직 화학(immunohistochemistry), 유세포 분석 및 효소 결합 면역 분석(ELISA)을 포함한 다양한 검출 방법과 함께 사용될 수 있다.

[0374] [386] MHC I/펩티드 복합체의 직접 식별 및 정량화를 위한 대안적 방법은 예를 들어 "ProPresent Antigen Presentation Assay(ProImmune, Inc., Sarasota, FL, USA)"와 같은 질량 스펙트로메트리 분석(mass spectrometry analyse)을 포함하는데, 여기에서는 펩티드-MCH 클래스 I 복합체가 세포 표면에서 추출된 다음 펩티드를 정제하고 시퀀싱 질량 스펙트로메트리로 식별한다(Falk K et al., Nature 351: 290-6 (1991)).

[0375] [387] 본 명세서에 기재된 폴리펩티드 및 분자의 T-세포 에피토프 전달 및 MHC 클래스 I 제시 기능을 모니터링하기 위한 특정 분석은 MHC 클래스 I 및 펩티드 결합 및 안정성을 모니터링하기 위한 컴퓨터 및/또는 실험 방법을 포함한다. MHC 클래스 I 대립유전자에 대한 펩티드의 결합 반응을 예측하기 위해 숙련된 작업자가 사용할 수 있는 여러 소프트웨어 프로그램이 있는데, 예를 들면, The Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB) Analysis Resource MHC-I 결합 예측 컨센서스 툴과 같은 것이다(Kim Y et al., *Nucleic Acid Res* 40: W525-30 (2012). 결합 역학을 정량화 및/또는 비교하기 위해 세포 표면 결합 분석 및/또는 표면 플라즈몬 공명 분석과 같은 여러 실험 분석이 일상적으로 적용되었다. 또한, 알려진 대조군과 비교하여 주어진 MHC 클래스 I 대립유전자에 대한 3원 MHC-펩티드 복합체를 안정화시키는 펩티드의 능력 측정에 기반한 다른 MHC-펩티드 결합 분석이 개발되었다(예: ProImmmune, Inc.의 MHC-펩티드 결합 분석).

[0376] [388] 대안적으로, 세포 표면 상의 MHC 클래스 I/펩티드 항원 복합체 제시의 결과의 측정은 특정 복합체에 대한 세포독성 T-세포(CTL) 반응을 모니터링함으로써 수행될 수 있다. 이러한 측정에는 MHC 클래스 I 사량체 또는 오량체 시약을 사용한 CTL의 직접 라벨링이 포함된다. 4량체 또는 5량체는 MHC(Major Histocompatibility Complex) 대립유전자 및 펩티드 복합체에 의해 결정되는 특정 특이성의 T 세포 수용체에 직접 결합한다. 또한, ELISA 또는 ELIspot(enzyme-linked immunospot)에 의한 인터페론 감마 또는 인터루킨과 같은 방출된 사이토카인의 정량화는 일반적으로 특정 CTL 반응을 식별하기 위해 분석된다. CTL의 세포독성 용량은 기존의 51 크롬(Cr) 방출 분석 또는 대체 비방사성 세포독성 분석(예: CytoTox96® 비방사성 키트 및 CellTox™ CellTiter-GLO® 키트 (Promega Corp., Madison, WI, USA)), Granzyme B ELISpot, Caspase Activity Assays 또는 LAMP-1 전좌 유세포 분석 분석을 포함한 다수의 분석을 사용하여 측정될 수 있다. 표적 세포의 사멸을 구체적으로 모니터링하기 위해 CFSE(카복시플루오레세인 디아세테이트 숙신이미딜 에스테르)를 사용하여 에피토프 특이적 CSFE 표지된 표적 세포의 사멸을 모니터링하기 위한 시험관 내 또는 생체 내 조사를 위해 관심 있는 세포 집단에 쉽고 빠르게 라벨을 붙일 수 있다.

[0377] [389] MHC 클래스 I 제시에 대한 생체 내 반응은 MHC 클래스 I/항원 촉진제(예: 펩티드, 단백질, 또는 불활성화/약독화 바이러스 백신)를 투여한 후 활성제(예: 바이러스)로 공격하고 반응을 모니터링할 수 있는데, 일반적으로 백신을 접종하지 않은 대조군과 비교된다. 생체 외 샘플은 이전에 설명한 것과 유사한 방법으로 CTL 활성을 모니터링할 수 있다(예: CTL 세포독성 분석 및 사이토카인 방출 정량화).

[0378] [390] HLA-A, HLA-B, 및/또는 HLA-C 분자는 면역 친화성을 이용한 용해(예: 항-MHC 항체 "풀다운" 정제) 후 중독된 세포로부터 단리되고, 관련 펩티드(즉, 분리된 MHC 분자에 의해 제시된 펩티드)는 정제된 복합체에서 회수된다. 회수된 펩티드는 시퀀싱 질량 스펙트로메트리에 의해 분석된다. 질량 스펙트로메트리 데이터는 외인성(비자가) 펩티드(T-세포 에피토프 X)의 서열로 구성된 단백질 데이터베이스 라이브러리와 인간에 대한 국제 단백질

지수("자체" 또는 비면역원성 펩티드를 나타냄)와 비교된다. 펩티드는 확률 데이터베이스에 따라 중요도에 의한 순위가 매겨진다. 검출된 모든 항원성(비-자기) 펩티드 서열이 나열된다. 잘못된 히트를 줄이기 위해 스크램블된 미끼 데이터베이스에 대해 검색하여 데이터를 확인한다(예: Ma B, Johnson R, Mol Cell Proteomics 11: 0111.014902(2012) 참조). 결과는 T-세포 에피토프 X의 펩티드가 중독된 표적 세포의 표면 상의 MHC 복합체에 존재한다는 것을 입증할 것이다.

[0379] [391] 제시된 펩티드-항원-MHC 복합체 세트는 발현된 항원 특이적 HLA 분자로 인해 세포마다 다를 수 있다. T-세포는 다른 항원-특이성을 가진 다른 TCR 분자를 사용하여 세포 표면에 표시된 특정 펩티드-항원-MHC 복합체를 인식할 수 있다.

[0380] [392] 예를 들어 단일 프로테아좀 전달 효과기 폴리펩티드에 2개 이상의 상이한 T-세포 에피토프를 내장함으로써와 같이, 다중 T-세포 에피토프는 결합 분자에 의해 전달될 수 있기 때문에, 단일 결합 분자는 예를 들어, 상이한 HLA 대립유전자를 갖는 인간에서와 같이 상이한 MHC 클래스 변이체를 갖는 동일한 종의 척색동물에 효과적일 수 있다. 이것은 MHC 복합 단백질 다양성 및 다형성(polymorphism)을 기반으로 하는 대상의 상이한 하위-집단에서 상이한 효과를 갖는 상이한 T-세포 에피토프의 단일 분자 내에서 조합을 허용할 수 있다. 예를 들어, 인간 MHC 복합 단백질인 HLA 단백질은 예를 들어, 아프리카(서브-사하라), 아메리카 원주민, 코카시오드, 몽골로이드, 뉴기니 및 오스트레일리아 또는 태평양 섬 주민과 같이 유전적 조상에 따라 인간마다 다르다.

[0381] [393] 폴리펩티드 및 분자를 전달하는 T-세포 에피토프와 관련된 적용은 방대하다. 포유동물 유기체의 모든 유핵 세포는 MHC 클래스 I 분자와 복합체를 이루는 세포 외부 표면에서 면역원성 T-세포 에피토프-펩티드의 MHC 클래스 I 경로 제시가 가능할 수 있다. 또한 T 세포 에피토프 인식의 민감도는 매우 정교하여 면역 반응을 일으키기 위해 몇 개의 MHC-I 펩티드 복합체만 제시하면 된다. 예를 들어, 단일 복합체의 제시로도 효과기 T-세포에 의한 인식에 충분하다(Sykulev Y et al., Immunity 4: 565-71 (1996)).

[0382] [394] T 세포 반응의 활성화는 표적 세포에 대한 환자 자신의 면역 체계를 자극하기 위해 특정 항암, 항-신생물(anti-neoplastic), 항종양, 및/또는 항미생물 생물학적 약물의 바람직한 특성이다. 튼튼하고 강력한 T-세포 반응의 활성화는 또한 많은 백신의 바람직한 특성이다. 유기체 내의 표적 세포에 의한 T-세포 에피토프의 제시는 유기체 내의 표적 세포 및/또는 그의 일반적인 위치(locale)에 대한 강력한 면역 반응의 활성화로 이어질 수 있다. 따라서, 제시를 위한 T-세포 에피토프의 표적화된 전달은 치료 요법 동안 T-세포 반응을 활성화하기 위한 메커니즘으로서 이용될 수 있다.

[0383] [395] MHC 클래스 I 시스템에 의한 T-세포 면역원성 에피토프-펩티드의 제시는 CTL-매개 용해에 의한 사멸을 위해 제시 세포를 표적으로 하고 또한 국소 미세환경에서 면역 자극을 유발한다. 표적 세포 내재화 치료 분자의 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분 내의 면역원성 에피토프 서열을 조작함으로써 면역 자극 항원의 표적 전달 및 제시가 달성될 수 있다. 예를 들어, 높은 면역원성을 가진 알려진 바이러스 항원과 같은 면역-자극성 비-자기 항원의 표적 세포에 의한 제시는 다른 면역 세포에 신호를 보내 표적 세포를 파괴할 뿐만 아니라 해당 영역에 더 많은 면역 세포를 모집한다.

[0384] [396] MHC 클래스 I 복합체에 의한 면역원성 T-세포 에피토프-펩티드의 제시는 CTL-매개 세포용해에 의한 사멸을 위한 제시 세포를 표적으로 한다. 면역원성이 높은 알려진 바이러스 에피토프-펩티드와 같은 면역 자극성 비-자기 항원의 표적 세포에 의한 제시는 다른 면역 세포에 신호를 보내 표적 세포를 파괴하고 척색동물 내에서 더 많은 면역 세포를 표적 세포 부위로 모집할 수 있다.

[0385] [397] 따라서, 이미 세포독성인 분자, 예를 들어, 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하는 치료 또는 잠재적 치료 분자는 본 명세서에 기술된 방법을 사용하여 더 많은 세포독성 분자로 조작될 수 있고, 그리고/또는 T-세포 에피토프의 전달, 제시, 및 효과기 T-세포의 자극을 통해 작동하는 추가 세포독성 메커니즘을 갖도록 조작될 수 있다. 이러한 다중 세포독성 메커니즘은 서로를 보완할 수 있고(예: 직접적인 표적 세포 사멸 및 간접(CTL-매개) 세포 사멸 제공, 서로 중복 백업(예: 다른 하나의 부재 하에 세포-사멸의 하나의 메커니즘을 제공하는 것과 같이), 그리고/또는 치료 내성의 발달로부터 보호(두 개의 상이한 세포 사멸 메커니즘을 동시에 차단하기 위해 진화하는 악성 또는 감염된 세포의 가능성이 덜한 상황에 대한 내성을 제한함으로써)).

[0386] [398] 또한, 촉매-기반 세포독성을 나타내는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 영역을 포함하는 세포독성 분자는 통상적인 방법을 사용하여 효소적으로 불활성인 변이체로 숙련된 작업자에 의해 조작될 수 있다. 예를 들어, 세포독성 분자의 세포독성 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분은 감소된 활성이 부여되고 그리고/또는 하나 이상의 돌연변이 및/또는 절단의 도입에 의해 불활성화되어 생성된 분자가 표적 세포의 MHC 클래스 I 시스템에 대한 그

T-세포 에피토프 전달 능력 및 표적 세포의 표면에 대한 후속 제시를 통해 여전히 세포독성일 수 있다. 또 다른 예에서, T-세포 에피토프는 시가 독소 효과기 폴리펩티드가 추가된 에피토프에 의해 비활성화되도록 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 삽입되거나 내장될 수 있다(예를 들어, WO 2015/113005: 실시예 1-F 참조). 이 접근법은 하나의 세포독성 메커니즘을 제거하고 다른 메커니즘을 유지하거나 추가하고 전달된 T-세포 에피토프 제시 또는 "항원 씨딩(antigen seeding)"을 통해 유기체 내의 표적 세포(들)의 국소 영역에 면역 자극을 나타낼 수 있는 분자를 제공할 수도 있다. 또한, 내장된 또는 삽입된 이종 T-세포 에피토프를 포함하는 결합 분자의 비-세포독성 변이체는 척색동물 내 면역 자극 및/또는 MHC 클래스 I 분자 표시 에피토프로 척색동물 내에서 표적 세포를 표지(labeling)하는 것을 포함하는 적용들에 유용할 수 있다.

[0387] [399] 특정 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 결합 분자의 T-세포 에피토프를 전달하는 능력은 다양한 조건 및 비-표적화 방관자(bystander 세포, 예를 들어 생체 외 조작된 표적 세포, 시험관 내 배양된 표적 세포, 시험관 내 배양된 조직 샘플 내의 표적 세포, 또는 다세포 유기체 내와 같은 생체 내 세팅의 표적 세포의 존재하에 달성될 수 있다.

[0388] C. 표적화된 세포독성 및/또는 세포독성 T-세포의 참여를 통한 세포 사멸

[0389] [400] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 1) 표적 세포에 의한 MHC 클래스 I 제시를 위한 T-세포 에피토프의 전달 및/또는 2) 강력한 세포독성을 제공할 수 있다. 결합 분자의 일부 실시예들에서, 세포-표적화 결합 영역에 의해 결합된 세포 외 PD-L1과 물리적으로 커플링된 세포와 접촉 시, 결합 분자는 세포의 사멸을 유발할 수 있다. 세포 사멸의 메커니즘은 독소 효과기 폴리펩티드 영역의 효소 활성을 통한 직접적인 것 또는 CTL-매개 세포용해를 통한 간접적인 것일 수 있다.

[0390] 1. T-세포 에피토프 전달 및 MHC 클래스 I 프레젠테이션을 통한 간접 세포 사멸

[0391] [401] 결합 분자의 특정 실시예들은 표적 세포의 MHC 클래스 I 제시 경로에 전달될 수 있고 표적 세포의 세포 표면 상에 제시될 수 있는 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하기 때문에 세포독성이다. 예를 들어, T-세포 에피토프 전달, CD8+ T-세포 과면역화된, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 내인성 에피토프 탈면역이 있거나 없이 간접적인 세포 사멸을 포함하는 적용을 위한 결합 분자의 성분으로 사용될 수 있다.

[0392] [402] 결합 분자의 특정 실시예들에서, 세포-표적화 결합 영역에 의해 결합된 세포 외 PD-L1과 물리적으로 커플링된 세포와 접촉시, 결합 분자는 예를 들어 표적 세포에 의한 하나 이상의 T-세포 에피토프의 제시 및 표적 세포를 사멸시키는 후속적인 CTL의 모집(recruitment)을 통해 간접적으로 세포의 사멸을 유발할 수 있다. 일부 실시예들에서, 모집은 결합 분자의 항원 카고에 특이적인 내인성 CTL을 포함한다.

[0393] [403] 세포에 의해 MHC 클래스 I 분자와 복합된 항원성 펩티드의 제시는 아폽토시스, 용해, 및/또는 괴사(necrosis)의 유도를 통해 세포독성 T-세포(CTL)에 의한 표적화된 사멸에 대해 제시하는 세포를 감작(sensitize)시킨다. 또한, 표적 세포를 인식하는 CTL은 예를 들어, 인터페론 감마(IFN-감마), 종양 괴사 인자 알파(TNF), 대식세포 염증 단백질-1 베타(MIP-1베타), 및 IL-17, IL-4 및 IL-22와 같은 인터루킨과 같은 면역-자극 사이토카인을 방출할 수 있다. 더욱이, 제시된 에피토프의 인식에 의해 활성화된 CTL은 그러한 근위 세포에 의해 제시된 펩티드-MHC 클래스 I 복합 레퍼토리에 관계없이 제시된 세포에 근접한 다른 세포를 무차별적으로 사멸시킬 수 있다(Wiedemann A et al., Proc Natl Acad Sci USA 103: 10985-90(2006)).

[0394] [404] 상이한 종 내의 MHC 대립유전자 다양성으로 인해, 단일 에피토프만을 포함하는 결합 분자는 동일한 종의 상이한 환자 또는 대상체에 대해 다양한 효과를 나타낼 수 있다. 그러나, 결합 분자의 특정 실시예들은 표적 세포의 MHC 클래스 I 시스템에 동시에 전달될 수 있는 다중(multiple) T-세포 에피토프를 각각 포함할 수 있다. 따라서, 결합 분자의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 MHC 분자의 에피토프-펩티드 결합 친화도에서 상당한 차이(즉, MHC 대립 유전자(alleles) 및/또는 MHC 유전자형에서 상당한 차이)를 갖는 상이한 대상을 치료하는 데 사용된다. 또한, 결합 분자의 특정 실시예들은 다중 세포-사멸 메커니즘(예: 직접 사멸 및 다중 T-세포 에피토프를 통한 간접 사멸을 동시에)을 동시에 사용함으로써 사멸을 회피하기 위한 표적 세포 적응(예: 치료 효과를 피하기 위한 표적 암 세포 돌연변이 또는 "돌연변이 탈출(mutant escape)")을 감소 또는 방지한다).

[0395] [405] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 면역 활성화를 촉진하기 위한 시가 독소 A 서브유닛 효과기 활성 및 항원성 펩티드 전달의 2개 이상의 별개의 작용 메커니즘을 통해 표적 세포-사멸을 유도하고, 이는 특정 MHC 클래스 I 에피토프-특이적인 제한된 CD8+ T 세포의 존재하에서 더 많은 표적 세포 사멸을 유도한다. 면역 활성화를 촉진하기 위한 시가 독소 A 서브유닛 효과기 활성 및 항원성 펩티드 전달의 2개의 별개의 작용 메커니즘을 통해 표적 세포-사멸을 유도하는 표적 세포의 실시예들에서, 결과적인 표적 세포 사멸은 둘 중 하나의 분

리된 사멸 메커니즘과 비교하여 추가적인 것이거나 시너지를 내는 것이다.

[0396] 2. 세포 표적화된 시가 독소 세포 독성을 통한 직접적인 세포 사멸

[0397] [406] 결합 분자의 특정 실시예들은 분자 내 면역원성 CD8+ T-세포 에피토프의 존재와 무관하게 촉매 활성 독소 성분을 포함하기 때문에 세포독성이다. 예를 들어, 내인성 에피토프 탈면역화가 있거나 없는 CD8+ T-세포 과면역화된, 시가 독소 효과기 또는 디프테리아 독소 효과기 폴리펩티드는 예를 들어, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 리보독성, 효소 활성 또는 리보솜 결합 및 비촉매 메커니즘(들)으로 인한 리보솜 기능 간섭을 통해서와 같이 직접적 세포-사멸을 포함하는 적용을 위한 결합 세포의 성분으로 사용될 수 있다(예: WO 2015/113005 참조). 특정 결합 분자는 표적 세포 내의 리보솜을 영구적으로 비활성화할 수 있다.

[0398] [407] CD8+ T-세포 과면역화된 결합 분자의 일부 실시예들에서, 세포-표적화 결합 영역에 의해 결합된 세포 외 PD-L1과 물리적으로 커플링된 세포와 접촉 시, 결합 분자는 예를 들어, 표적화되지 않은 세포독성 T-세포의 개입 없이 세포의 사멸을 직접 유발할 수 있다(상기 섹션 V-D 참조).

[0399] [408] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 PD-L1 양성 말초 혈액 단핵 세포와 접촉 시, 결합 분자가 PD-L1 양성 말초 혈액 단핵 세포의 사멸을, 예를 들어 생체 내에서, 유발할 수 있다.

[0400] C. 세포 유형들 중의 선택적 세포독성

[0401] [409] 특정 결합 분자는 표적화되지 않은 방관자 세포의 존재하에 특정 표적 세포를 선택적으로 사멸시키는 용도를 갖는다. 세포 표적화 결합 영역(들)을 통해 특정 세포에 독소 성분의 전달을 표적화함으로써, 결합 분자는 비표적화된 세포들의 존재하에 선택된 세포 유형을 배타적 또는 우선적으로 죽이는 세포 유형 특이적 제한된 세포-사멸 활성을 나타낼 수 있다. 유사하게, 표적 세포의 MHC 클래스 I 경로에 대한 면역원성 T-세포 에피토프의 전달을 표적화함으로써, 결합 분자에 의해 유도된 표적 세포의 T-세포 에피토프 및 CTL-매개 세포용해의 후속 제시가 비표적화된 없는 세포의 존재하에 선택된 세포 유형을 배타적으로 또는 우선적으로 사멸시키는 것에 제한될 수 있다. 또한, 세포독성, 독소 성분 및 면역원성, T-세포 에피토프의 세포-표적화 전달은 잠재적인 세포독성 성분 둘 다를 전달하는 것이 비표적 세포의 존재하에 배타적으로 또는 우선적으로 표적 세포에 한정되도록 단일 결합 분자에 의해 달성될 수 있다.

[0402] [410] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 특정 농도에서 세포독성이다. 일부 실시예들에서, 결합 분자를 세포 유형의 혼합물에 투여하면, 세포독성 결합 분자는 임의의 세포 외 PD-L1에 물리적으로 결합되지 않은 세포 유형과 비교하여 결합 영역에 의해 결합된 세포 외 PD-L1과 물리적으로 결합된 세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있다. 일부 실시예들에서, 세포독성 결합 분자는 2개 이상의 상이한 세포 유형의 혼합물 내에서 특정 세포 유형의 사멸을 선택적으로 또는 우선적으로 유발할 수 있다. 이를 통해 표적 생체분자를 발현하지 않는 "방관자(bystander)" 세포 유형에 비해 3배의 세포독성 효과와 같은 높은 우선순위로 특정 세포 유형에 대한 세포독성 활성을 표적화할 수 있다. 대안적으로, 결합 영역의 표적 생체분자의 발현은 표적 생체분자가 충분히 적은 양으로 발현되고 그리고/또는 표적화되지 않을 세포 유형과 물리적으로 적은 양으로 커플링되는 경우 하나의 세포 유형에 대해 비-배타적일 수 있다. 이것은 표적 생체 분자의 상당한 양을 발현하지 않거나 표적 생체분자의 상당한 양에 물리적으로 커플링되지 않은 "방관자" 세포 유형에 비해 3배 세포 독성 효과와 같은 높은 우선순위로 특정 세포 유형의 표적 세포 사멸을 가능하게 한다.

[0403] [411] 본 발명의 일부 실시예들의 경우, 세포독성 결합 분자를 2개의 상이한 세포 유형 집단에 투여할 때, 세포독성 결합 분자는 표적 세포 집단에 대한 반-최대 세포독성 농도(CD_{50})에 의해 정의된 바와 같이 세포사를 유발할 수 있고, 그의 구성원들은 그 구성원들이 세포독성 결합 분자의 결합 영역의 세포 외 표적 생체분자를 발현하지 않는 세포 집단에 대해 동일한 세포독성 결합 분자의 CD_{50} 용량보다 3배 이상 낮은 용량으로 세포독성 결합 분자의 결합 영역의 세포 외 표적 생체분자를 발현한다.

[0404] [412] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 영역에 의해 결합된 세포 외 PD-L1과 물리적으로 커플링된 세포 유형의 집단에 대한 결합 분자의 세포독성 활성은 결합 영역에 의해 결합된 임의의 세포 외 PD-L1과 물리적으로 커플링되지 않은 세포 유형의 집단에 대한 세포독성 활성보다 적어도 3배 더 높다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 선택적 세포독성은 (a) 결합 영역에 의해 결합된 세포 외 PD-L1과 물리적으로 커플링된 특정 세포 유형의 세포 집단에 대한 세포독성 대 (b) 결합 영역에 의해 결합된 임의의 세포 외 PD-L1과 물리적으로 커플링되지 않은 세포 유형의 세포 집단에 대한 세포독성의 비(a/b)로 정량화될 수 있다. 일부 실시예들에서, 세포독성 비는 결합 영역의 표적 생체분자와 물리적으로 커플링되지 않은 세포 또는 세포 유형의 집단에 비해 결합 영역의 표

적 생체분자와 물리적으로 커플링된 세포 또는 세포 유형에 대해 적어도 적어도 3-배, 5-배, 10-배, 15-배, 20-배, 25-배, 30-배, 40-배, 50-배, 75-배, 100-배, 250-배, 500-배, 750-배, 또는 1000-배 더 높은 선택적 세포독성을 나타낸다.

[0405] [413] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자의 우선적인 세포-사멸 기능 또는 선택적 세포독성은 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 존재하는 추가 외인성 물질(예: 세포독성 물질) 및/또는 이종 T-세포 에피토프에 기인하고 반드시 시가 독소 효과기 폴리펩티드 영역의 촉매 활성의 결과인 것은 아니다.

[0406] [414] 이 우선적인 세포 사멸 기능은 표적 세포가 다양한 조건하에 및 비-표적화 방관자 세포의 존재하에, 예를 들어, 세포 유형의 생체 외 조작된 혼합물, 세포 유형들의 혼합물과 시험관 내 배양된 조직, 또는 생체 내 다중 세포 유형들의 존재하(예: 인 시추(*in situ*) 또는 *다세포 유기체의 천연 위치에서)에서와 같은 경우에,* 특정 세포독성, 결합 분자들에 의해 사멸되도록 한다.

[0407] [415] PD-L1 발현 세포가 선택적으로 표적화될 수 있지만, 특정 결합 분자는 PD-L1 발현 말초 혈액 단핵 세포 유형의 존재하에 PD-L1 발현 종양 세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있다.

[0408] D. PD-L1/PD-1 신호 간섭

[0409] [416] 세포독성, 세포증식억제, 및 면역 자극 적용에 추가하여, 결합 분자는 예를 들어 면역 체크포인트 억제 및 항암 면역요법을 포함하는 적용에서와 같이 PD-1 신호전달을 억제하기 위해 선택적으로 사용될 수 있다. 일부 실시예들에서, PD-L1 결합 분자는 세포에 외인성으로 투여되는 경우 PD-1/PD-L1 상호작용을 차단할 수 있다. 결합 분자의 일부 실시예들은 주어진 표적 세포 유형에 대해 그들의 세포독성 CD_{50}(예: 0.1 내지 50 nM)보다 훨씬 덜 강력한(예: 500nM 또는 1μM 초과) PD-L1 신호전달 억제(EC_{50})에 대한 반-최대 억제 농도를 나타내지만, 항상 그런 것은 아니다. 결합 분자의 일부 실시예들은 그 CD_{50} 값과 등가인 EC_{50} 값을 나타낼 수 있고, 이는 PD-1 신호전달 억제 및 세포독성 둘 다의 강력한 수준이 동시에 발생할 수 있음을 나타낸다. 일부 실시예들에서, 결합 분자들은 예를 들어 116296(SEQ ID NO:127)과 같은 비활성 또는 감소된-활성 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하는 PD-L1 결합 분자와 같은 불활성화된 독소를 포함하는 결합 분자와 같이, 그들의 세포독성 CD_{50} 값(예를 들어, 1,000 또는 10,000 nM 초과)보다 큰 EC_{50} 값(예를 들어, 1 내지 200 nM)을 나타낸다. 그들의 세포독성 CD_{50} 값보다 더 큰 EC_{50} 값을 나타내는 특정 결합 분자는 임의의 유의한 세포독성 활성의 부재하에 PD-1 신호전달 억제 효과를 위해 특정 농도에서 사용될 수 있다.

[0410] E. 표적 세포의 내부로의 추가적인 외인성 물질의 전달

[0411] [417] 세포독성, 세포증식억제, 면역 자극, 및 항암 면역요법 적용에 더하여, 결합 분자는 표적화된 선택적 세포 내 전달 기능, 예를 들어 정보 수집 및 진단 기능을 포함하는 적용에 사용될 수 있다.

[0412] [418] 감소된 세포독성 및/또는 이의 비독성 형태를 포함하는 결합 분자가 결합 분자의 결합 영역에 의해 인식되는 세포 외 PD-L1 분자와 물리적으로 커플링된 세포에 들어갈 수 있기 때문에, 결합 분자의 특정 실시예들은 추가적인 외인성 물질들을 표적 세포 유형의 내부로 전달하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포독성, 결합 분자의 무독성 변이체들, 또는 선택적으로 세포독성 변이체들은 추가 외인성 물질을 결합 분자의 결합 영역에 의해 결합된 세포 외 PD-L1과 물리적으로 커플링된 세포의 내부로 전달하고 표지하는 데 사용될 수 있다. 하나 이상의 세포 표면에 표적 생체분자를 발현하는 다양한 유형의 세포 및/또는 세포 집단은 외인성 물질을 수용하기 위한 결합 분자에 의해 표적화될 수 있다. 다양한 독소 성분, 추가 외인성 물질 및 결합 영역이 서로 연관되어 카고 전달을 포함하는 예를 들어 종양세포의 비침습적 생체 내 이미징과 같은 다양한 응용에 적합한 결합분자를 제공할 수 있다.

[0413] [419] 특정 결합 분자의 외인성 물질 기능의 전달은 다양한 조건 및 비표적 방관자 세포, 예를 들어, 생체 외 조작된 표적 세포, 시험관 내에서 배양된 표적 세포, 시험관 내에서 배양된 조직 샘플, 또는 다세포 유기체 내에서와 같은 생체 내 세팅의 표적 세포의 존재하에서 달성될 수 있다. 또한, 특정 결합 분자에 의한 특정 세포로의 외인성 물질의 선택적 전달은 다양한 조건 및 세포 유형의 생체 외 조작된 혼합물, 세포 유형의 혼합물과 시험관 내 배양된 조작, 또는 생체 내 다중 세포 유형의 존재하에서(예를 들어, 제자리에서 또는 다세포 유기체 내의 천연 위치에서)와 같이 비-표적화된 방관자 세포의 존재하에 달성될 수 있다.

[0414] [420] 특정 농도 범위와 같이 표적 세포를 죽이고 그리고/또는 표적 세포의 MHC 분자에 의한 세포 표면 제시를 위해 내장되거나 삽입된 에피토프를 전달할 수 없는 독소 효과기 폴리펩티드 및 결합 분자도 예를 들어, 검출

촉진제와 같은 외인성 물질을 세포 내로 전달하기 위해 여전히 유용할 수 있다.

[0415] [421] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기는 낮거나 0인 세포독성을 나타내므로 본 명세서에서 "비세포독성 및/또는 감소된 세포독성"으로 지칭된다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 낮거나 0인 세포독성을 나타내고 "비세포독성" 및/또는 "감소된 세포독성 변이체"로 지칭될 수 있다. 예를 들어, 일부 분자는 1000nM, 500nM, 100nM, 75nM, 50nM 미만의 용량에서 유의한 수준의 시가 독소 기반 세포독성을 나타내지 않고, 예를 들어, 당업자에게 알려져 있고 그리고/또는 본 명세서에 기술된 분석에 의해 측정된 바와 같은 적절한 참조 분자와 비교하여, 유의한 양의 세포 사멸이 없다. 일부 실시예들에서, 분자는 포유동물 수용자의 kg당 1-100㎍의 투여량에서 어떠한 독성도 나타내지 않는다. 감소된 세포독성 변이체는 특정 농도 또는 투여량에서 여전히 세포독성을 나타낼 수 있지만, 예를 들어 특정 상황에서 유의한 수준의 시가 독소 세포독성을 나타낼 수 없는 것과 같이, 감소된 세포독성을 나타낼 수 있다.

[0416] [422] 이를 포함하는 특정 결합 분자는, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 예시적인 치환을 포함하는 독소 효과기 폴리펩티드를 불활성화시키기 위해 숙련된 작업자에게 공지된 하나 이상의 아미노산 치환의 추가를 통해서와 같이, 비-세포독성이 될 수 있다. 결합 분자의 비-세포독성 및 감소된 세포독성 변이체는 특정 상황에서 더욱 세포독성인 변이체보다 추가 외인성 물질의 전달에 더 적합할 수 있다.

[0417] 진단 기능

[0418] [423] 특정 결합 분자는 시험관 내 및/또는 생체 내 검출에서 특정 세포, 세포 유형, 및/또는 세포 집단뿐만 아니라 전술한 임의의 특정 세포 이하 구획의 용도를 갖는다. 검출 촉진제에 접합된 세포독성 결합 분자의 감소된 세포독성 및/또는 비독성 형태는 예를 들어 동일한 표적 생체분자, 중첩 에피토프 및/또는 동일한 에피토프에 대한 고친화성 결합을 가진 결합 영역과 같은 동일한 또는 관련된 결합 영역을 포함하는 치료 요법과 함께 사용되는 동반 진단과 같은 진단 기능을 위해 사용될 수 있다.

[0419] [424] 본 발명의 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 결합 분자는 진단 및 치료 둘 다에, 또는 진단 단독에 사용된다. 동일한 세포독성 결합 분자가 진단 및 치료 둘 모두에 사용되는 경우, 일부 실시예들에서 진단용 검출 촉진제를 포함하는 결합 분자 변이체는 본 명세서에 기재된 예시적 치환을 포함하여 하나 이상의 아미노산 치환을 통하여 그 시가 독소 효과기 폴리펩티드 영역(들)의 촉매적 불활성화에 의해 그 세포독성이 감소되거나 비독성이 되게 할 수 있다. 예를 들어, 결합 분자의 특정 비독성 변이체는 1mg/kg 미만의 용량을 투여한 후 표적 세포의 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의 사멸을 나타낸다. 감소된 세포독성 변이체는 특정 농도 또는 투여량에서 여전히 세포독성일 수 있지만, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같이 상당한 수준의 시가 독소 세포독성을 나타낼 수 없는 것과 같이, 감소된 세포독성을 나타낼 수 있다.

[0420] [425] 다양한 결합 분자에 당업계에 공지된 검출 촉진제를 접합하는 능력은 예를 들어, 암, 종양, 면역, 및/또는 감염된 세포와 같은 특정 세포의 검출을 위한 유용한 조성물을 제공한다. 결합 분자의 이러한 진단적 실시예들은 당업계에 공지된 다양한 영상화 기술 및 분석을 통한 정보 수집에 사용될 수 있다. 예를 들어, 결합 분자의 진단 실시예들은 환자 또는 생검 샘플에서 개별 암세포, 면역 세포, 및/또는 감염된 세포의 세포 내 소기관(예: 세포 내, 골지체, 소포체, 및 세포질 구획)의 영상화를 통한 정보 수집에 사용될 수 있다.

[0421] [426] 진단 용도 또는 기타 용도에 관계없이 결합 분자의 진단 실시예들을 사용하여 다양한 유형의 정보를 수집할 수 있다. 이 정보는 예를 들어 신생물 세포 유형 진단, 환자 질병의 치료적 감수성 결정, 시간 경과에 따른 항종양 요법 진행 분석, 시간 경과에 따른 면역조절 요법 진행 분석, 시간 경과에 따른 항균 요법 진행 분석, 이식 재료에서 감염된 세포의 존재 평가, 및/또는 이식 재료에서 원치 않는 세포 유형의 존재 평가 및/또는 종양 덩어리의 외과적 절제 후 잔류 종양 세포의 존재 평가에 유용할 수 있다.

[0422] [427] 예를 들어, 환자의 하위 집단(subpopulations)은 결합 분자의 진단 변이체를 사용하여 수집된 정보를 사용하여 확인될 수 있고, 그런 다음 개별 환자는 이러한 진단 실시예들을 사용하여 밝혀진 고유한 특성(들)에 기초하여 하위 집단으로 더 분류될 수 있다. 예를 들어, 특정 의약품 또는 요법의 효과는 환자 하위 집단을 정의하는 데 사용되는 기준이 될 수 있다. 예를 들어, 특정 세포독성 결합 분자의 비독성 진단 변이체는 어떤 환자가 해당 결합 분자의 세포독성 변이체에 긍정적으로 반응할 것으로 예측되는 환자의 부류 또는 하위 집단에 속하는지를 구별하는 데 사용될 수 있다. 따라서, 세포독성 결합 분자의 비독성 변이체를 포함하는 결합 분자를 사용하여 환자 식별, 환자 계층화, 및 진단을 위한 관련 방법이 또한 본 명세서에 제공된다.

[0423] [428] 세포에 의한 표적 생체분자의 발현은 예를 들어 직접 세포-사멸, 간접 세포-사멸, T-세포 에피토프와 같은 외인성 물질의 전달, 및/또는 정보 수집과 같이 결합 분자에 의한 세포-표적화를 위하여 천연(native)일 필

요가 없다. 표적 생체분자의 세포 표면 발현은 감염, 병원체의 존재, 및/또는 세포 내 미생물 병원체의 존재의 결과일 수 있다. 표적 생체분자의 발현은 예를 들어 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 및 레트로바이러스 시스템과 같은 바이러스 발현 벡터로 감염 후 강제된 또는 유도된 발현에 의한 것과 같이 인공적일 수 있다. PD-L1의 발현은 세포를 이온화 방사선에 노출시킴으로써 유도될 수 있다(Wattenberg M et al., Br J Cancer 110: 1472-80 (2014)).

[0424] 면역억제성(Immunosuppressive) 면역 세포 표적화

[0425] [429] 본 발명의 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 PD-L1 결합 분자는 면역억제성 면역 세포(IIC)와 같은 세포의 표면 상의 PD-L1에 특이적으로 결합할 수 있다. 세포 상의 PD-L1에 결합할 때, 결합 분자는 내재화될 수 있고 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드의 활성은 세포를 효과적이고 특이적으로 사멸시킨다. 일부 실시예들에서, 이러한 직접적인 세포 사멸 활성은 종양 미세환경(TME)에서 Treg와 같은 면역억제성 면역 세포를 고갈시킨다. TME의 면역억제가 해제되면 비억제성 면역 세포(예: 세포독성 T 세포)가 종양을 공격할 수 있다.

[0426] [430] 본 발명의 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 결합 분자는 IIC 상에 및 종양 세포 상에 있는 PD-L1에 결합한다. 따라서, 일부 실시예들에서, TME에서 면역억제성 면역 세포를 고갈시키는 것 외에, 결합 분자는 또한 종양 세포에 결합하여 직접적으로 사멸시킨다. 이러한 이중 작용 메커니즘은 암 치료에서 개시된(disclosed) 결합 분자의 효과를 향상시킬 수 있다.

[0427] [431] 본 발명의 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 결합 분자는 면역 세포와 같은 하나 이상의 유형의 세포의 확장을 야기한다. 예를 들어, 일부 실시예들에서 PD-L1 결합 분자는 B-세포, T-세포, 또는 호산구(eosinophils)의 확장을 야기한다.

[0428] [432] 본 발명의 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 결합 분자는 항원성 에피토프, 예컨대 CD8+ T-세포 에피토프를 포함한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자가 PD-L1에 결합하고 세포 내로 내재화된 후, 항원성 에피토프는 세포의 MHC 클래스 I 시스템으로 전달되어 면역-매개 파괴를 위해 세포를 표적화한다. 따라서, TME에서 면역억제성 면역 세포를 고갈시키고 일부 실시예들에서 종양 세포를 직접 사멸시키는 것 외에도, 결합 분자는 또한 면역계에 의한 종양의 인식을 향상시킨다.

[0429] [433] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 결합 분자의 결합 영역이 결합하는 PD-L1의 발현을 조절한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 PD-L1의 발현을 감소 또는 하향조절(downregulate)한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 PD-L1의 세포-표면 밀도를 감소시킨다. 일부 실시예들에서, PD-L1의 발현 조절은 면역억제를 감소시킨다. 일부 실시예들에서, PD-L1의 발현 조절은 세포 사멸을 유도한다.

[0430] [434] 따라서, 개시된 결합 분자는 (1) 다른 세포들 중에서 PD-1을 발현하는 세포 유형(들)을 선택적으로 사멸시키고, (2) 암을 비롯한 다양한 질병, 장애, 및 질환을 치료하기 위한 치료 분자로서 유용하다. **도 35**는 예시적인 결합 분자가 대상체에서 항종양 효과를 유도할 수 있는 작용 메커니즘을 추가로 예시한다.

[0431] [435] 본 명세서에 기재된 결합 분자는 세포, 예를 들어 PD-L1 양성 세포의 표면 상의 PD-L1에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 영역을 포함한다. 일부 실시예들에서, PD-L1 양성 세포는 종양 세포이다. 일부 실시예들에서, PD-L1 양성 세포는 면역억제성 면역 세포, 예컨대 면역억제성 T 세포, 면역억제성 B 세포, 면역억제성 형질 세포, 또는 면역억제성 골수 세포이다. 일부 실시예들에서, 면역억제성 면역 세포는 Treg, MDSC, 또는 TAM이다. 일부 실시예들에서, 면역억제성 면역 세포는 TAN 또는 CAF이다. 일부 실시예들에서, 결합 영역은 상주 기억 T 세포, 종양 배제 수지상 세포, 및/또는 CD14+ 단핵구에 특이적으로 결합하지 않는다.

[0432] [436] 본 명세서에 사용된 용어 "직접적으로 사멸시키지 않는다(does not directly kill)" 또는 "간접적으로 사멸시키다(indirectly kills)"는 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드 및 결합 영역을 포함하는 결합 분자가 표적 세포(예: ICC)에 결합하는 과정을 지칭하고, 제2 세포(예: 암세포)의 다운스트림 사멸을 초래한다. 예를 들어, 결합 분자는 종양 미세환경(TME)에서 면역억제성 면역 세포에 결합하고 이를 사멸시킴으로써 종양 세포를 간접적으로 사멸시킬 수 있다. TME에서 면역 억제가 해제되면 암세포는 비-억제 면역 세포(예: 세포독성 T 세포 등)에 의해 사멸될 수 있다.

[0433] [437] 본 발명의 일부 실시예들에서, 이를 필요로 하는 대상체에서 면역 세포의 면역억제 활성을 감소시키는 방법은 대상체에게 유효량의 (i) 결합 분자, (ii) 결합 분자를 암호화하는 핵산(예를 들어, 발현 벡터), 또는 (iii) 결합 분자 또는 이를 암호화하는 핵산을 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0434] [438] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 대상체의 면역억제성 면역 세포의 표면에 존재하지만 대상체

의 암세포 표면에는 존재하지 않는 PD-L1에 결합한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 면역억제성 면역 세포를 직접 사멸시키지만 대상체의 암세포를 직접 사멸시키지는 않는다.

[0435] [439] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자는 대상체의 면역억제성 세포 및 대상체의 암 세포의 표면에 존재하는 PD-L1에 결합한다. 일부 실시예들에서, 결합 분자는 면역억제성 면역 세포 및 대상체의 암세포를 직접 사멸시킨다.

[0436] [440] 본 발명의 일부 실시예들에서, 대상체는 암을 갖는다. 일부 실시예들에서, 암은 예를 들어 종양 미세환경에서 하나 이상의 면역억제 세포의 존재를 특징으로 한다. 일부 실시예들에서, 암은 높은 돌연변이 부담(TMB) 및/또는 높은 빈도의 삽입-결실(indel)을 특징으로 한다. 돌연변이 부담은 하이브리드 기반 차세대 시퀀싱을 비롯한 다양한 방법으로 분석할 수 있고, 분석된 종양 게놈 영역당 총 서열 변이체 또는 돌연변이 수로 보고된다(예: 메가베이스당 돌연변이). 암은 메가베이스당 20개 이상의 돌연변이가 있는 경우 "높은" 돌연변이 부담을 갖는 것으로 분류될 수 있다. 높은 돌연변이 부담은 담배 연기 및 다환 방향족 탄화수소와 같은 강력한 발암 물질에 대한 노출(예: 폐암 및 방광암)과 돌연변이원(예: 흑색종의 자외선)에 대한 노출의 결과로 발생하는 암의 전형이다. 인델(삽입 및 결실; indel- insertion and deletions)은 암세포에서 흔히 볼 수 있는 돌연변이의 한 유형이다. 프레임시프트(frameshift) 돌연변이를 생성하는 인델은 면역원성이 높은 종양 신생항원을 생성할 수 있다. 따라서, 높은 빈도의 인델의 존재는 본 명세서에 기술된 치료적 접근에 대한 더 나은 반응으로 이어질 수 있다. 암은 메가베이스(magabase)당 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 9, 또는 10개 이상의 삽입-결실이 있는 경우 인델의 "높은" 빈도를 갖는 것으로 분류된다. 일부 실시예들에서, 암은 메가베이스당 0.1-1, 1-10, 10-50, 50-100, 또는 100개 초과의 인델을 갖는 경우 높은 빈도의 인델을 갖는 것으로 분류된다.

[0437] V. 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 결합 분자의 생산, 제조 및 정제

[0438] [441] 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 특정 결합 분자는 당업자에게 잘 알려진 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 결합 분자는 표준 합성 방법, 재조합 발현 시스템의 사용, 또는 임의의 다른 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 결합 분자는 예를 들어, (1) 단계적으로(stepwise) 또는 단편 조립(fragment assembly)에 의해 표준 고체상 또는 액체상 방법을 사용하여 결합 분자의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 성분을 합성하고, 최종 폴리펩티드 화합물 생성물을 단리(isolating) 및 정제하는 단계; (2) 단백질 또는 결합 분자의 단백질 성분을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에서 발현시키고 숙주 세포 또는 숙주 세포 배양물로부터 발현 생성물을 회수하는 단계; 또는 (3) 결합 분자의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 성분을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 무세포 시험관 내 발현 및 발현 생성물의 회수 단계를 포함하는 방법; 또는 (1), (2), 또는 (3)의 방법의 임의의 조합에 의해 단백질 성분의 단편을 수득하고, 후속적으로 펩티드 또는 폴리펩티드 단편을 연결(예를 들어, 결찰(ligating))하여 폴리펩티드 성분을 수득하고, 폴리펩티드 성분을 회수하는 방법 등 다양한 방식으로 합성될 수 있다.

[0439] [442] 결합 분자 또는 결합 분자의 단백질 성분을 고체상 또는 액체상 펩티드 합성에 의해 합성하는 것이 바람직할 수 있다. 폴리펩티드 및 결합 분자는 표준 합성 방법에 의해 적합하게 제조될 수 있다. 따라서, 펩티드는 예를 들어 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 표준 고체상 또는 액체상 방법에 의해 펩티드를 합성하고, 최종 펩티드 생성물을 단리 및 정제하는 단계를 포함하는 방법에 의해 합성될 수 있다. 이러한 맥락에서, WO 1998/011125 또는 특히 Fields G et al., Principles and Practice of Solid-Phase Peptide Synthesis (Synthetic Peptides, Grant G, ed., Oxford University Press, UK, 2nd ed., 2002) 및 그 안의 합성 예를 참조할 수 있다.

[0440] [443] 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 결합 분자는 당업계에 잘 알려진 재조합 기술을 사용하여 제조(생산 및 정제)될 수 있다. 일반적으로, 암호화 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포를 배양하고 세포 배양물로부터 단백질을 정제 또는 회수함으로써 단백질을 제조하는 방법은 예를 들어 "Sambrook J et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, U.S., 1989); Dieffenbach C et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., U.S., 1995)"을 참조할 수 있다. 임의의 적합한 숙주 세포를 사용하여 폴리펩티드 및/또는 세포-표적화 단백질을 생성할 수 있다. 숙주 세포는 폴리펩티드의 발현을 유도하는 하나 이상의 발현 벡터로 안정적으로 또는 일시적으로 형질감염, 형질전환, 형질도입, 또는 감염된 세포일 수 있다. 또한, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및/또는 결합 분자는 변화된 세포독성, 변화된 세포증식억제 효과 및/또는 변화된 혈청 반감기와 같은 원하는 특성을 달성하기 위해 하나 이상의 아미노산을 변경하거나 하나 이상의 아미노산을 결실 또는 삽입하는 결과를 초래하는 폴리펩티드 또는 세포 표적화 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 변형함으로써 생성될

수 있다.

[0441] [444] 본 명세서에 기술된 바와 같이 폴리펩티드 또는 세포-표적화 단백질을 생성하도록 선택될 수 있는 매우 다양한 발현 시스템이 있다. 예를 들어, 세포 표적 단백질의 발현을 위한 숙주 유기체는 E. coli 및 B. subtilis와 같은 원핵생물, 효모 및 사상균(예: S. 세레비시에(cerevisiae), P. 파스토리스, A. 아와모리 및 K. 락티스)과 같은 진핵 세포, 조류(예: C. 레인하르트티), 곤충 세포주, 포유동물 세포(예: CHO 세포), 식물 세포주, 및 형질전환 식물(예: A. 탈리아나 및 N. 벤타미아나)과 같은 진핵 유기체를 포함한다.

[0442] [445] 따라서, 또한 상기 인용된 방법에 따라 및/또는 폴피펩티드 또는 세포-표적화 단백질의 단백질 성분의 부분 또는 전체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 숙주 세포에 도입되었을 때 폴리펩티드 또는 세포-표적화 단백질의 일부 또는 전부를 암호화할 수 있는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이를 포함하는 발현 벡터, 및/또는 폴리뉴클레오티드 또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 사용하여 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및/또는 결합 분자를 생산하는 방법이 제공된다.

[0443] [446] 단백질이 숙주 세포 또는 무세포 시스템에서 재조합 기술을 사용하여 발현될 때, 높은 순도 또는 실질적으로 균질한 생성물을 얻기 위해 숙주 세포 인자와 같은 다른 성분으로부터 원하는 단백질을 분리(또는 정제)하는 것이 유리하다. 정제는 원심분리 기술, 추출 기술, 크로마토그래피 및 분별 기술(예: 겔 여과에 의한 크기 분리, 이온 교환 컬럼에 의한 전하 분리, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 실리카 또는 DEAE 등과 같은 양이온 교환 수지, 크로마토포커싱, 및 오염물을 제거하기 위한 단백질 A 세파로스 크로마토그래피) 및 침전 기술(예: 에탄올 침전 또는 황산암모늄 침전)과 같은 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 달성될 수 있다. 임의의 수의 생화학적 정제 기술을 사용하여 폴리펩티드 및/또는 결합 분자의 순도를 높일 수 있다. 일부 실시예들에서, 폴리펩티드 및 결합 분자는 동종-다량체 형태(예를 들어, 2개 이상의 폴리펩티드 또는 결합 분자를 포함하는 분자 복합체)로 임의로 정제될 수 있다.

[0444] [447] 항체는 재조합 방법 및 조성물을 사용하여 생산할 수 있다(예: U.S. 4,816,567 참조). 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 항체 단편을 암호화하는 단리된 핵산이 제공된다. 이러한 핵산은 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열(예를 들어, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)을 암호화할 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체를 제조하는 방법은 상기 제공된 바와 같이 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 항체의 발현에 적합한 조건하에 배양하고, 선택적으로 숙주 세포(또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 항체를 회수하는 것을 포함한다. 항체의 재조합 생산을 위해, 항체를 암호화하는 핵산, 예를 들어, 상기 기재된 바와 같이, 숙주 세포에서의 추가 클로닝 및/또는 발현을 위해 단리되고 하나 이상의 벡터에 삽입된다. 이러한 핵산은 숙련된 작업자에게 공지된 일상적인 방법을 사용하여 쉽게 단리되고 시퀀싱될 수 있다.

[0445] [448] 항체-암호화 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 본 명세서에 기술되고 및/또는 숙련된 작업자에게 공지된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 항체는 특히 글리코실화 및/또는 Fc 효과기 기능이 필요하지 않은 경우 박테리아에서 생성될 수 있다(예를 들어, U.S. 5,648,237, U.S. 5,789,199, 및 U.S. 5,840,523 참조). 발현 후, 항체는 가용성 분획으로 박테리아 세포 페이스트로부터 단리될 수 있고 추가로 정제될 수 있다.

[0446] [449] 원핵생물 외에도 사상균(filamentous fungi)이나 효모와 같은 진핵 미생물은 글리코실화 경로가 "인간화"되어 부분적으로 또는 완전히 인간 글리코실화 패턴을 갖는 균류 또는 효모 균주를 포함하여 항체-암호화 벡터에 대한 적합한 복제 또는 발현 숙주들이다(예: Gerngross T, *Nat Biotech* 22: 1409-14 (2004); Li H et al., *Nat Biotech* 24: 210-15 (2006) 참조).

[0447] [450] 글리코실화된 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체(무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 식물 세포는 숙주로서 이용될 수 있다(예를 들어, U.S. 5,959,177, U.S. 6,040,498, U.S. 6,420,548, U.S. 7,125,978, 및 U.S. 6,417,429 참조). 특히 스포돕테라 펑기페르다(Spodoptera frugiperda) 세포의 형질감염을 위해 곤충 세포와 함께 사용될 수 있는 수많은 바큘로바이러스(baculoviral) 균주가 확인되었다. 척추동물 세포를 숙주로 사용할 수 있다. 예를 들어, 현탁액에서 성장하도록 적응된 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7); 인간 배아 신장 계통 293 세포; 아기 햄스터 신장 세포(BHK); 마우스 세르톨리 세포(예: TM4 세포); 원숭이 신장 세포(CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76); 인간 자궁경부암 세포(HELA); 개 신장 세포(MDCK, 버팔로 쥐 간 세포(BRL 3A), 인간 폐 세포(W138), 인간 간 세포(Hep G2), 마우스 유선 종양(MMT 060562), TRI 세포, MRC 5 세포 및 FS4 세포 등이다(Graham F et al., *J Gen*

Virol 36: 59-74 (1977); Mather J et al., *Biol Reprod* 23: 243-52 (1980); Mather J et al., *Ann NY Acad Sci* 383: 44-68 (1992)). 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 DHFR-CHO를 포함하는 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포, 및 Y0, NS0, 및 Sp2/0 세포와 같은 골수종 세포주를 포함한다(예를 들어 Urlaub G et al., Proc Natl Acad Sci USA 77 참조: 4216-20(1980) 참조). 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토는 Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003)을 참조할 수 있다.

[0448] [451] 본 명세서에 제공된 항체는 당업계에 공지된 다양한 분석에 의해 그의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성에 대해 확인, 스크리닝 또는 특성화될 수 있다.

[0449] [452] 면역-접합 방법에는 반응성 티올, 알데히드-태그, 소르타제-매개 접합, MTGase-매개 접합, 트랜스글루타미나제 접합, 비스-연결, 스페이서, 또는 다기능 링커 사용이 포함되지만 이에 국한되지는 않는다(예를 들어, WO 2009/052249, WO 2012/097333, WO2013/173391, WO 2014/140317, WO 2014/159835, WO 2015/155753, WO 2015/191883, WO 2016/102632, WO 2018/185526 참조).

[0450] [453] 항체-독소 접합체 또는 면역접합체는 항체의 친핵성 그룹과 2가 링커 시약의 반응으로 링커와 항체 사이의 공유 결합을 형성하고 그 후 독소 성분과의 반응; 및 독소 성분의 친핵기(nucleophilic group)와 2가 링커 시약과의 반응으로 링커와 독소 사이의 공유 결합을 형성하고 그 후 힝체의 친핵기와의 반응을 포함하여 당업자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건, 및 시약을 채택한 여러 경로에 의해 제조될 수 있다.

[0451] [454] 항체 상의 친핵성 기는 (i) 아미노-말단 아민 기, (ii) 측쇄 아민 기, 예를 들어 라이신 잔기, (iii) 측쇄 티올 기, 예를 들어 시스테인 잔기, 및 (iv) 항체가 글리코실화될 때 탄수화물 모이어티의 당 히드록실 또는 아미노 기를 포함하지만 이에 국한되지는 않는다. 아민, 히드록실 및 티올 기는 친핵성이고 (i) NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트, 및 산 할로겐화물과 같은 활성 에스테르; (ii) 할로아세트아미드와 같은 알킬 및 벤질 할라이드; 및 (iii) 알데히드, 케톤, 카복실 및 말레이미드 기를 포함한 링커 모이어티 및 링커 시약상의 친전자성 기(electrophilic group)와의 공유 결합을 형성하도록 반응시킬 수 있다. 특정 항체에는 예를 들어 시스테인 디설파이드 브리지와 같은 환원성 사슬 간 디설파이드(interchain disulfides)가 있다. 항체가 완전히 또는 부분적으로 환원되도록 디티오트레이톨(DTT) 또는 트리카보닐에틸포스핀(TCEP)과 같은 환원제로 처리하여 링커 시약과의 접합에 대해 항체를 반응성으로 만들 수 있다(예를 들어, WO 2013/173391, WO 2013/173392, WO 2013/173393, WO 2013/190272, WO 2014/064424, WO 2014/114207, WO 2015/155753, WO 2018/185526 참조). 예를 들어, 라이신 잔기를 2-이미노티올란(Traut 시약)과 반응시켜 아민을 티올로 전환시키는 것과 같이 라이신 잔기의 변형을 통해 추가 친핵성 기(group)를 항체에 도입할 수 있다. 반응성 티올기(thiol group)는 또한 1, 2, 3, 4, 또는 그 이상의 시스테인 잔기를 도입함으로써(예를 들어, 하나 이상의 비-천연 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 변이체 항체를 제조함으로써) 항체에 도입될 수 있다.

[0452] [455] 항체-독소 접합체 또는 면역접합체는 또한 알데히드 또는 케톤 카보닐 기와 같은 항체 상의 친전자성 기와 링커 시약 또는 독소 성분상의 친핵성 기와의 반응에 의해 생성될 수 있다. 링커 시약상의 유용한 친핵성 기는 히드라지드, 옥심, 아미노, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카복실레이트, 및 아릴히드라지드를 포함하지만 이에 국한되지는 않는다. 일 실시예에서, 항체는 링커 시약 또는 독소 성분 상의 친핵성 치환체와 반응할 수 있는 친전자성 모이어티를 도입하도록 변형된다. 또 다른 실시예에서, 글리코실화된 항체의 당은 예를 들어 링커 시약 또는 독소 성분의 아민 그룹과 반응할 수 있는 알데히드 또는 케톤 기를 형성하기 위해 과요오드산염 산화 시약으로 산화될 수 있다. 생성된 이민 쉬프 염기 그룹은 안정한 아민 결합을 형성하기 위해 수소화붕소 시약에 의해 안정한 결합을 형성하거나 환원될 수 있다. 일 실시예에서, 글리코실화된 항체의 탄수화물 부분과 갈락토스 옥시다제(galactose oxidase) 또는 나트륨 메타-퍼요오데이트(sodium meta-periodate)의 반응은 독소 성분상의 적절한 기와 반응할 수 있는 항체에서 카보닐(알데히드 및 케톤) 기를 생성할 수 있다. 또 다른 실시예에서, 아미노-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 함유하는 항체는 나트륨 메타-퍼요오데이트와 반응하여 제1 아미노산 대신 알데히드를 생성할 수 있다(예를 들어, U.S. 5,362,852 참조). 이러한 알데히드는 독소 성분 또는 링커 친핵체(nucleophile)와 반응할 수 있다.

[0453] [456] 항체의 Fc 영역에 있는 탄수화물(들)은 화합물을 부착하기 위한 천연 부위이다. 일반적으로 탄수화물은 과요오드산염(periodate) 산화에 의해 변형되어 반응성 알데히드를 생성하고, 이 알데히드는 쉬프(Schiff) 염기 형성에 의해 반응성 아민 함유 화합물을 부착하는 데 사용할 수 있다. 알데히드는 아민기와 반응할 수 있으므로, 항체 또는 항원 결합 도메인의 라이신 잔기가 양성자화되어(protonated) 반응성이 없도록 낮은 pH에서 반응이 수행된다. 히드라지드(Hydrazide) 기는 히드라존(hydrazone) 결합을 형성하기 위해 낮은 pH에서 반응

성이기 때문에 생성된 알데히드에 부착하는 데 가장 적합하다. 그런 다음 연결은 히드라진(hydrazine) 연결을 형성하기 위해 니트륨 시아노보로하이드라이드를 사용한 환원에 의해 추가로 안정화될 수 있다.

[0454] [457] 독소 성분상의 예시적인 친핵성 기는 (i) NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트, 및 산 할로겐화물과 같은 활성 에스테르; (ii) 할로아세트아미드와 같은 알킬 및 벤질 할라이드; (iii) 알데히드, 케톤, 카복실 및 말레이미드 기를 포함하는 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 공유결합을 형성하도록 반응할 수 있는 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카복실레이트, 및 아릴히드라지드 기를 포함하지만 이에 국한되지는 않는다.

[0455] [458] 접합체 로딩은 항체당 접합체 모이어티의 평균 수(x)로 표현될 수 있다. 접합체 로딩은 항체당 1 내지 20개의 접합체 모이어티 범위일 수 있다. 접합 반응으로부터 항체-독소 접합체 또는 면역접합체의 제조에서 항체당 접합체 모이어티의 평균 수는 질량 스펙트로메트리, ELISA 분석, 및 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)와 같은 통상적인 수단에 의해 특성화될 수 있다. x에 대한 면역접합체의 정량적 분포는 또한 예를 들어, 균질 면역접합체의 분리, 정제, 및 특성화에 의해 결정될 수 있고, p가 다른 접합체 로딩을 갖는 면역접합체로부터의 특정 값일 때 역상 HPLC 또는 전기영동과 같은 수단에 의해 달성될 수 있다.

[0456] [459] 하기 실시예에서 예시적인 결합 분자를 생산하는 방법의 비제한적 예, 뿐만 아니라 생산 방법의 특이적이지만 비제한적인 측면에 대한 설명이 있다.

[0457] VI. 결합 분자를 포함하는 약학 및 진단 조성물

[0458] [460] 또한 하기에 추가로 상세하게 기술된 질환, 질병, 장애, 또는 증상(예: 암, 악성 종양, 비악성 종양, 성장 이상, 면역 장애, 및 미생물 감염)의 치료 또는 예방을 위해 약학 조성물에서 단독으로 또는 하나 이상의 추가 치료제와 조합하여 사용하기 위한 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 결합 분자가 제공된다. 또한, 결합 분자, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물을 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 또는 비히클과 함께 포함하는 약학 조성물이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시예들에서, 약학 조성물은 결합 분자의 동종-다량체 및/또는 이종-다량체 형태를 포함할 수 있다. 약학 조성물은 하기에 추가로 상세히 기재된 질환, 상태, 장애, 또는 증상을 치료, 개선, 또는 예방하는 방법에 유용하다. 각각의 이러한 질병, 질환, 장애, 또는 증상은 본 명세서에 기재된 바와 같은 약학 조성물의 용도와 관련하여 별도의 실시예들인 것으로 구상된다. 또한, 하기에 보다 상세히 기재된 바와 같이, 적어도 하나의 치료 방법에 사용하기 위한 약학 조성물이 제공된다.

[0459] [461] 본 명세서에 사용된 용어 "환자(patient)" 및 "대상체(subject)"는 하나 이상의 질병, 장애, 또는 질환의 증상, 징후, 및/또는 표시를 나타내는 모든 유기체, 일반적으로 인간 및 동물과 같은 척추동물을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 이러한 용어는 영장류, 가축 동물(예: 소, 말, 돼지, 양, 염소 등), 반려 동물(예: 고양이, 개 등) 및 실험 동물(예: 생쥐, 토끼, 쥐 등) 등과 같은 포유류를 포함한다.

[0460] [462] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "치료하다(treat)", "치료하는(treating)", 또는 "치료(treatment)" 및 이들의 문법적 변형은 유익하거나 원하는 임상 결과를 얻기 위한 접근법을 지칭한다. 이 용어는 질환, 장애, 또는 질병의 발병 또는 발달 속도를 늦추고, 이와 관련된 증상을 줄이거나 완화하고, 상태의 완전한 또는 부분적 퇴행을 생성하거나, 위의 것들의 임의의 일부 조합을 나타낼 수 있다. 일부 실시예들에서, 유익하거나 원하는 임상 결과에는, 검출 가능하든지 그렇지 않든지, 증상의 감소 또는 완화, 질병의 정도 감소, 질병 상태의 안정화(예: 악화되지 않음), 질병 진행의 지연 또는 감속, 질병 상태의 개선 또는 일시적 완화, 및 완화(부분적이든 전체적이든)가 포함되지만 이에 국한되지는 않는다. "치료하다", "치료하는", 또는 "치료"는 또한 치료를 받지 않는 경우 예상 생존 시간에 비해 생존을 연장하는 것을 의미할 수 있다. 따라서 치료가 필요한 대상체(예: 인간)는 해당 질병 또는 장애를 이미 앓고 있는 대상체일 수 있다. "치료하다", "치료하는", 또는 "치료"라는 용어는 치료의 부재와 비교하여 병리학적 상태 또는 증상의 중증도 증가의 억제 또는 감소를 포함하고, 반드시 관련 질병, 장애, 또는 질환의 완전한 중단을 의미하는 것은 아니다. 종양 및/또는 암과 관련하여 치료에는 전체 종양 부담 및/또는 개별 종양 크기의 감소가 포함된다.

[0461] [463] 본 명세서에 사용된 용어 "예방하다(prevent)", "예방하는(preventing)", "예방(prevention)", 및 이들의 문법적 변형은 질환, 질병, 또는 장애의 발병을 예방하거나 그 병리를 변경하기 위한 접근법을 지칭한다. 따라서 "예방"은 예방적인(prophylactic) 또는 미리 방지하는(preventive) 조치를 의미할 수 있다. 일부 실시예들에서, 유익하거나 원하는 임상 결과는 검출가능 여부에 관계없이 증상, 질병의 진행 또는 발달의 예방 또는 감속을 포함하지만 이에 국한되지는 않는다. 따라서 예방이 필요한 대상체(예: 인간)는 해당 질병 또는 장애를 아직 앓고 있지 않은 대상체일 수 있다. "예방(prevention)"이라는 용어는 치료의 부재에 비해 질병의 발병을 늦

추는 것을 포함하고 반드시 관련 질병, 장애, 또는 질환의 영구적인 예방을 의미하는 것은 아니다. 따라서 특정 상황에서 질환의 "예방하는(preventing)" 또는 "예방(prevention)"은 질환이 발생할 위험을 감소시키거나 질환과 관련된 증상의 발달을 예방 또는 지연시키는 것을 의미할 수 있다.

[0462] [464] 본 명세서에 사용된 "유효량(effective amount)" 또는 "치료적 유효량(therapeutically effective amount)"은 예방 또는 표적 질환을 치료하거나 질환과 관련된 증상을 이롭게 완화시키는 것과 같이 대상체에서 적어도 하나의 원하는 치료 효과를 생성하는 조성물(예를 들어, 치료 조성물, 화합물, 또는 제제)의 양 또는 용량(dose)이다. 가장 바람직한 치료학적 유효량은 이를 필요로 하는 주어진 대상체에 대해 당업자에 의해 선택된 특정 치료의 원하는 효능을 생성할 양이다. 이 양은 치료 조성물의 특성(활성, 약동학, 약력학, 및 생체이용률 포함), 대상체의 생리학적 상태(나이, 성별, 질병 유형, 질병 단계, 일반적인 신체 상태, 주어진 투여량에 대한 반응성, 및 약물 유형), 제형 내 약학적으로 허용되는 담체 또는 담체들의 성질, 및 투여 경로를 포함하는 숙련된 작업자에 의해 이해되는 다양한 요인들에 따라 달라질 것이다. 임상 및 약리학 분야의 숙련자는 일상적인 실험, 즉 조성물 투여에 대한 대상체의 반응을 모니터링하고 그에 따라 투여량을 조정함으로써 치료 유효량을 결정할 수 있을 것이다(예를 들어, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (Gennaro A, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, U.S., 19th ed., 1995) 참조).

[0463] [465] 제제(agent)의 유효량, 예를 들어 결합 분자의 약학 제형(pharmaceutical formulation)은 필요한 투여량 및 기간 동안 원하는 치료 또는 예방 결과를 달성하기 위해 효과적인 양을 지칭한다. 암 치료를 위한 약물의 유효량은 암세포의 수를 감소시키고, 종양 크기를 줄이고, 말초 기관으로의 암세포 침윤을 억제(예를 들어, 어느 정도 늦추고 바람직하게는 중지); 종양 전이를 억제(예를 들어, 어느 정도 늦추고 바람직하게는 중지); 종양 성장을 어느 정도 억제하고, 그리고/또는 암과 관련된 하나 이상의 증상을 어느 정도 완화시킨다. 약물이 성장을 방지하고 그리고/또는 기존 암 세포를 죽일 수 있는 정도까지는 세포 증식 억제 및/또는 세포 독성이 있을 수 있다. 유효량은 무진행 생존 기간을 연장하고(예: RECIST(Response Evaluation Criteria for Solid Tumors) 또는 CA-125 변경으로 측정) 객관적 반응(부분 반응, PR 또는 완전 반응, CR 포함)을 초래하고, 전체 생존 시간을 증가시키고 그리고/또는 하나 이상의 암 증상을 개선할 수 있다(예: FOSI에 의해 평가됨).

[0464] [466] 진단 조성물은 결합 분자 및 하나 이상의 검출 촉진제를 포함한다. 진단 조성물을 생산하거나 제조할 때, 결합 분자는 하나 이상의 검출 촉진제에 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 다양한 검출 촉진제를 분자의 단백질 또는 단백질 성분, 특히 면역글로불린 및 면역글로불린-유래 도메인에 혼입, 부착 및/또는 접합하기 위해 당업자에게 공지된 수많은 표준 기술이 있다.

[0465] [467] 예를 들어 유기체의 질병, 장애, 또는 질환에 대한 진단 및/또는 예후 적용을 위한 것과 같이 정보 수집 방법을 위해 폴리펩티드 또는 결합 분자에 작동 가능하게 연결될 수 있는 동위원소, 염료, 비색제, 조영제, 형광제, 생물발광제, 및 자성제와 같이 숙련된 작업자에게 알려진 수많은 검출 촉진제가 있다(예를 들어, Cai W et al., *J Nucl Med* 48: 304-10 (2007); Nayak T, Brechbiel M, *Bioconjug Chem* 20: 825-41 (2009); Paudyal P et al., *Oncol Rep* 22: 115-9 (2009); Qiao J et al., *PLoS ONE* 6: e18103 (2011); Sano K et al., *Breast Cancer Res* 14: R61 (2012) 참조). 이들 제제들은 임의의 적합한 위치에서 폴리펩티드 또는 결합 분자와 연관, 연결, 및/또는 그 안에 혼입될 수 있다. 예를 들어, 검출 촉진제의 연결 또는 혼입은 분자의 아미노산 잔기(들)를 통하거나, 링커 및/또는 킬레이터(chelator)를 통하는 것을 포함하는 당업계에 공지된 일부 유형의 연결을 통하여 할 수 있다. 제제의 혼입은 스크리닝, 분석, 진단 절차, 및/또는 영상 기술에서 진단 조성물의 존재를 검출할 수 있도록 하는 방식이다.

[0466] [468] 유사하게, 의료 분야에서 일반적으로 사용되는 비침습적 생체 내 이미징 기술과 같이 숙련된 작업자에게 알려진 수많은 이미징 접근 방식이 있는데, 예로서, 컴퓨터 단층 촬영 영상(CT 스캐닝), 광학 영상(직접, 형광, 및 생물발광 영상 포함), 자기 공명 영상(MRI), 양전자 방출 단층 촬영(PET), 단일 광자 방출 컴퓨터 단층 촬영(SPECT), 초음파 및 x-선 컴퓨터 단층 촬영 영상 등을 들 수 있다.

[0467] VII. 결합 분자를 포함하는 약학 및/또는 진단 조성물의 생산 또는 제조

[0468] [469] 임의의 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 결합 분자의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물이 또한 본 명세서에 제공된다.

[0469] [470] 용어 "용매화물(solvate)"은 용질(경우에 따라 단백질성 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염)과 용매 사이에 형성된 정의된 화학량론의 복합체를 의미한다. 이와 관련하여 용매는 예를 들어 물, 에탄올, 또는 다른 약학적으로 허용되는, 전형적으로 소분자 유기 종(small-molecular organic species), 예를 들어 아세트산

또는 젖산일 수 있지만 이에 국한되지는 않는다. 문제의 용매가 물인 경우, 이러한 용매화물은 일반적으로 수화물이라고 한다.

[0470] [471] 폴리펩티드 및 단백질, 또는 이의 염은 일반적으로 약학적으로 허용되는 담체에 치료학적 유효량의 분자 또는 이의 염을 포함하는 저장 또는 투여를 위해 제조된 약학 조성물로서 제형화될 수 있다. 용어 "약학적으로 허용되는 담체(pharmaceutically acceptable carrier)"는 임의의 표준 약학적 담체를 포함한다. 치료 분자 사용을 위한 약학적으로 허용되는 담체는 약학 분야에 잘 알려져 있고, 예를 들어 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Co. (A. Gennaro, ed., 1985)에 기재되어 있다. 본 명세서에 사용된 "약학적으로 허용되는 담체"는 생리학적으로 허용되는 모든 것, 즉 함께 사용될 수 있는 용매, 분산 매질, 코팅, 항균제, 등장성, 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제는 경구, 직장, 비강, 또는 비경구(피하, 근육 내, 정맥 내, 피 내, 및 경피 포함) 투여에 적합한 제형에 사용되는 것을 포함한다. 예시적인 약학적으로 허용되는 담체는 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 약학 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(예: 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예를 들어 올리브유, 및 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 유기 에스테르를 포함한다. 적절한 유동성(fluidity)은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅 물질의 사용, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 일부 실시예들에서, 담체는 정맥 내, 근육 내, 피하, 비경구, 척수, 또는 표피 투여(예를 들어 주사 또는 주입)에 적합하다. 선택된 투여 경로(route of administration)에 따라, 단백질 또는 기타 약학적 성분은 특정 투여 경로에 의해 환자에게 투여될 때 활성 단백질이 직면할 수 있는 낮은 pH 및 기타 자연적 불활성화 조건의 작용으로부터 화합물을 보호하기 위한 물질로 코팅될 수 있다.

[0471] [472] 약학 조성물의 제형은 단위 용량 형태(unit dosage form)로 편리하게 제공될 수 있고 약학 분야에 잘 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 형태에서, 조성물은 적절한 양의 활성 성분을 함유하는 단위 용량(unit dose)으로 분할된다. 단위 용량 형태(unit dosage form)는 포장된 제제일 수 있으며, 포장된 제제의 개별 양을 포함하는 패키지, 예를 들어 바이알 또는 앰플에 포장된 정제, 캡슐, 및 분말이 있다. 단위 용량 형태는 캡슐, 카세(cachet), 또는 정제 자체일 수도 있고, 이러한 포장 형태의 적절한 수일 수도 있다. 이는 예를 들어 펜 형태로 단일 용량 주사 가능한 형태로 제공될 수 있다. 조성물은 임의의 적합한 경로 및 투여 수단을 위해 제형화될 수 있다. 피하 또는 경피 투여 방식은 본 명세서에 기재된 치료 단백질에 특히 적합할 수 있다.

[0472] [473] 약학 조성물은 또한 보존제, 습윤제, 유화제, 및 분산제와 같은 보조제(adjuvant)를 함유할 수 있다. 미생물의 존재를 방지하는 것은 살균 절차와 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등을 포함함으로써 보장될 수 있다. 조성물에 당, 염화나트륨 등과 같은 등장제(Isotonic agent)가 또한 바람직할 수 있다. 또한, 주사 가능한 약학적 형태의 장기간 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제의 포함에 의해 야기될 수 있다.

[0473] [474] 약학 조성물은 또한 선택적으로 약학적으로 허용되는 항산화제(antioxidant)를 포함한다. 예시적인 약학적으로 허용되는 항산화제는 아스코르브산, 시스테인 히드로클로라이드, 중황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 아황산나트륨 등과 같은 수용성 항산화제; 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔(BHA), 부틸화 히드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필갈레이트, 알파-토코페롤 등과 같은 유용성(oil-soluble) 항산화제; 및 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등과 같은 금속 킬레이트제를 포함한다.

[0474] [475] 또한, 상이한 결합 분자 중 하나 또는 이들의 조합, 또는 전술한 것 중 임의의 것의 에스테르, 염 또는 아미드, 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0475] [476] 치료 조성물은 일반적으로 제조 및 보관 조건하에서 무균이고 안정하다. 조성물은 용액, 마이크로에멀젼, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 순서 구조(ordered structure)로 제형화될 수 있다. 담체는 예를 들어 물, 알코올, 예를 들어 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜), 또는 임의의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산의 경우 필요한 입자 크기의 유지 및 당업계에 잘 알려진 제형 화학에 따른 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 일부 실시예들에서, 등장화제(isotonic agent), 예를 들어 당 및 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨과 같은 다가알코올이 조성물에 바람직할 수 있다. 주사 가능한 조성물의 연장된 흡수는 조성물에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함함으로써 야기될 수 있다.

[0476] [477] 피내 또는 피하 적용에 사용되는 용액 또는 현탁액은 일반적으로 다음 중 하나 이상을 포함한다: 주사용

수, 식염수, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 합성 용매와 같은 멸균 희석제; 벤질알코올, 메틸파라벤 등의 항균제; 아스코르브산 또는 아황산수소나트륨과 같은 항산화제; 에틸렌디아민테트라아세트산과 같은 킬레이트제; 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트와 같은 완충제; 및 예를 들어 염화나트륨 또는 덱스트로스 장성 조절제. pH는 염산 또는 수산화나트륨과 같은 산 또는 염기, 또는 시트레이트, 포스페이트, 아세테이트 등의 완충제로 조정할 수 있다. 이러한 제제는 앰플, 일회용 주사기 또는 유리 또는 플라스틱으로 만든 다중 용량 바이알에 동봉될 수 있다.

[0477] [478] 멸균 주사 용액은 필요한 양의 폴리펩티드 또는 결합 분자를 적절한 용매에 필요에 따라 하나 또는 필요에 따라 위에서 기술한 성분의 조합과 혼입시킨 후 멸균 미세여과하여 제조할 수 있다. 분산액은 활성 화합물을 분산 매질 및 상기 기재된 것과 같은 기타 성분을 함유하는 멸균 비히클에 혼입함으로써 제조될 수 있다. 무균 주사액 제조를 위한 무균 분말의 경우, 그 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조(lyophilization)로, 이의 무균 여과 용액으로부터 원하는 추가 성분에 더하여 활성 성분의 분말을 수득한다.

[0478] [479] 치료적 유효량의 폴리펩티드 및/또는 결합 분자가 예를 들어, 정맥 내, 피부 또는 피하 주사의 경우, 결합제는 발열원이 없는(pyrogen-free) 비경구적으로 허용되는 수용액의 형태일 것이다. 적절한 pH, 등장성(isotonicity), 안정성 등을 고려하여 비경구적으로 허용되는 단백질 용액을 제조하는 방법은 당업계의 기술 범위 내에 있다. 정맥 내, 피부 또는 피하 주사를 위한 바람직한 약학 조성물은 결합제 이외에, 염화나트륨 주사, 링거 주사, 덱스트로스 주사, 덱스트로스 및 염화나트륨 주사, 젖산 링거 주사 또는 기타 비히클과 같은 당업계에 알려져 있는 등장성 비히클을 함유할 것이다. 약학 조성물은 또한 안정화제, 방부제, 완충제, 항산화제, 또는 당업자에게 잘 알려진 기타 첨가제를 함유할 수 있다.

[0479] [480] 본 명세서의 다른 곳에서 기술된 바와 같이, 폴리펩티드 및/또는 결합 분자는 임플란트, 경피 패치 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 제어 방출 제형(controlled release formulation)과 같은 신속한 방출에 대항하여 활성 치료제를 보호할 담체와 함께 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안히드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 생분해성, 생체 적합성 중합체를 사용할 수 있다. 이러한 제형의 제조를 위한 많은 방법이 특허를 받았거나 일반적으로 당업자에게 알려져 있다(예를 들어, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems* (Robinson J, ed., Marcel Dekker, Inc., NY, U.S., 1978) 참조).

[0480] [481] 본 발명의 일부 실시예들에서, 조성물(예를 들어, 약학 및/또는 진단 조성물)은 결합 분자의 원하는 생체 내 분포를 보장하도록 제제화될 수 있다. 예를 들어, 혈액-뇌 장벽은 많은 대형 및/또는 친수성 화합물을 배제한다. 특정 생체 내 위치로 치료 분자 또는 조성물을 표적화하기 위해, 이들은 예를 들어 특정 세포 또는 기관으로 선택적으로 수송되어 표적화된 약물 전달을 향상시키는 하나 이상의 모이어티를 포함할 수 있는 리포솜으로 제형화될 수 있다. 예시적인 표적화 모이어티는 엽산(folate) 또는 비오틴(biotin); 만노사이드; 항체; 계면활성제 단백질 A 수용체; p120 카테닌 등을 포함한다.

[0481] [482] 약학 조성물은 임플란트 또는 미립자 시스템(particulate systems)으로 사용하도록 설계된 비경구 제형을 포함한다. 임플란트의 예는 에멀젼, 이온 교환 수지 및 용해성 염 용액과 같은 고분자 또는 소수성 성분으로 구성된 데포 제형(depot formulation)이다. 미립자 시스템의 예는 마이크로스피어, 마이크로입자, 나노캡슐, 나노스피어 및 나노입자이다(예를 들어, Honda M et al., *Int J Nanomedicine* 8: 495-503 (2013); Sharma A et al., *Biomed Res Int* 2013: 960821 (2013); Ramishetti S, Huang L, *Ther Deliv* 3: 1429-45 (2012) 참조). 제어 방출 제형(Controlled release formulation)은 이온에 민감한 중합체를 사용하여 제조할 수 있는데, 예를 들어, 리포솜, 폴락사머 407 및 히드록시아파타이트와 같은 것들이다.

[0482] VIII. 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터, 및 숙주 세포

[0483] [483] 폴리펩티드 및 결합 분자 외에, 폴리펩티드 성분 및 결합 분자, 또는 이의 기능적 부분을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 명세서에 제공된다. "폴리뉴클레오티드"라는 용어는 "핵산"이라는 용어와 동일하고, 각각은 다음 중 하나 이상을 포함한다: 디옥시리보 핵산의 중합체(DNAs), 리보 핵산의 중합체(RNAs), 뉴클레오티드 유사체들을 사용하여 생성된 이들 DNA 및 RNA의 유사체들, 및 이들의 유도체, 단편 및 동족체(homolog). 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥, 이중 가닥, 또는 삼중 가닥일 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 RNA 코돈의 세 번째 위치에서 허용되지만 다른 RNA 코돈과 동일한 아미노산을 암호화하는 것으로 알려진 워블(wobble)을 고려하여 예시적인 단백질을 암호화할 수 있는 모든 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것으로 구체적으로 개시되어 있다(Stothard P, Biotechniques 28: 1102-4 (2000) 참조).

[0484] [484] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및/또는 결합 분자, 또는 그의 단편 또는 유도체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 본 명세서에 제공된다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 폴리펩티드 또는 결합 분자의 아미노산 서열의 하나를 포함하는 폴리펩티드에 대해 적어도 50%, 55%, 60% , 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 이상 동일한 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 또한 엄격한 조건하에 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분 및/또는 결합 분자, 또는 이의 단편 또는 유도체, 또는 임의의 이러한 서열의 안티센스(antisense) 또는 상보체(complement)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 혼성화(hybridize)하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 본 명세서에 제공된다.

[0485] [485] 본 명세서에 기재된 분자(예를 들어, PD-L1 결합 분자)의 유도체 또는 유사체는 특히, 예를 들어 당업계에 알려진 컴퓨터 상동성 프로그램에 의해 수행되는 정렬에서 정렬된 서열에 비교하여 동일한 크기의 폴리뉴클레오티드(또는 폴리펩티드)에 대해 적어도 45%, 50%, 70%, 80%, 95%, 98%, 또는 99%까지도 동일성을 갖는(바람직한 동일성은 80-99%) 폴리뉴클레오티드(또는 결합 분자)에 실질적으로 상동인 영역을 갖는 폴리뉴클레오티드(또는 폴리펩티드) 분자들을 포함한다. 예시적인 프로그램은 Smith T, Waterman M, *Adv Appl Math* 2: 482-9 (1981)의 알고리즘을 사용하는 기본 설정 사용의 GAP 프로그램(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI, U.S.)이다. 또한 엄격한 조건하에서 세포-표적화 단백질을 암호화하는 서열의 상보체에 혼성화할 수 있는 폴리뉴클레오티드가 포함된다. 엄격한 조건은 당업자에게 알려져 있고, 예를 들어 *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, NY, U.S., Ch. Sec. 6.3.1-6.3.6 (1989))에서 찾을 수 있다.

[0486] [486] 또한 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터가 본 명세서에 제공된다. 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분 및/또는 결합 분자를 암호화할 수 있는 폴리뉴클레오티드는 발현 벡터를 생성하기 위해 당업계에 잘 알려진 물질 및 방법을 사용하여 박테리아 플라스미드, 바이러스 벡터, 및 파지 벡터를 포함하는 공지된 벡터에 삽입될 수 있다. 이러한 발현 벡터는 선택된 숙주 세포 또는 무세포 발현 시스템 내에서 고려되는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및/또는 결합 분자의 생산을 지원하는 데 필요한 폴리뉴클레오티드를 포함할 것이다(예 pTxb1 및 pIVEX2.3). 특정 유형의 숙주 세포 또는 무세포 발현 시스템과 함께 사용하기 위한 발현 벡터를 포함하는 특정 폴리뉴클레오티드는 당업자에게 잘 알려져 있고, 일상적인 실험을 사용하여 결정될 수 있고 그리고/또는 구입할 수 있다.

[0487] [487] 본 명세서에 사용된 용어 "발현 벡터(expression vector)"는 하나 이상의 발현 단위를 포함하는 선형 또는 원형의 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 용어 "발현 단위(expression unit)"는 관심 폴리펩티드를 암호화하고 숙주 세포에서 핵산 단편의 발현을 제공할 수 있는 폴리뉴클레오티드 단편을 나타낸다. 발현 단위는 전형적으로 전사 프로모터, 관심 폴리펩티드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임, 및 전사 종결자(transcription terminator)를 모두 작동 가능한 구성으로 포함한다. 발현 벡터는 하나 이상의 발현 단위를 포함한다. 따라서, 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및/또는 단일 폴리펩티드 사슬을 포함하는 결합 분자를 암호화하는 발현 벡터는 적어도 단일 폴리펩티드 사슬에 대한 발현 단위를 포함하는 반면, 예를 들어 2 이상의 폴리펩티드 사슬들(V_L 도메인을 포함하는 1개 사슬 및 독소 효과기 폴리펩티드에 연결된 V_H 도메인을 포함하는 제2 사슬)을 포함하는 단백질은 적어도 2개의 발현 단위를 포함하고, 단백질의 폴리펩티드 사슬 각각에 대해 하나씩이다. 다중-사슬 세포-표적화 단백질의 발현을 위해, 각 폴리펩티드 사슬에 대한 발현 단위는 또한 상이한 발현 벡터에 별도로 포함될 수 있다(예를 들어, 발현은 각 폴리펩티드 사슬에 대한 발현 벡터가 도입된 단일 숙주 세포로 달성될 수 있음).

[0488] [488] 폴리펩티드 및 단백질의 일시적 또는 안정한 발현을 지시할 수 있는 발현 벡터는 당업계에 잘 알려져 있다. 발현 벡터는 일반적으로 다음 중 하나 이상을 포함하지만 이에 국한되지는 않는다: 이종 신호 서열 또는 펩티드, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열(이들 각각은 당업계에 잘 알려져 있음). 사용될 수 있는 선택적 조절 제어 서열, 통합 서열, 및 유용한 마커는 당업계에 공지되어 있다.

[0489] [489] "숙주 세포(host cell)"라는 용어는 발현 벡터의 복제 또는 발현을 지원할 수 있는 세포를 의미한다. 숙주 세포는 *E. coli*와 같은 원핵 세포 또는 진핵 세포(예를 들어, 효모, 곤충, 양서류, 조류, 또는 포유동물 세포)일 수 있다. 폴리뉴클레오티드를 포함하거나 폴리펩티드 및/또는 결합 분자를 생성할 수 있는 숙주 세포주의 생성 및 분리는 당업계에 공지된 표준 기술을 사용하여 달성될 수 있다.

[0490] [490] 본 명세서에 기재된 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및/또는 단백질은 하나 이상의 단백질을 변경하거나 또는 숙주 세포의 보다 최적의 발현과 같은 원하는 특성을 획득하기에 더욱 적합하게 할 수 있는 하나 이상의 아

미노산들을 결실시키거나 삽입함으로써 폴리펩티드를 암호화하는 폴리큐클레오티드 및/또는 결합 분자의 단백질성 성분을 변형하여 생산되는 본 명세서에 기술된 폴리펩티드 및 분자들의 변이체 또는 유도체일 수 있다.

[0491] IX. 고체 기질에 고정화된 PD-L1 결합 분자

[0492] [491] 본 발명의 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 분자(예를 들어, 결합 분자, 융합 단백질, 또는 폴리뉴클레오티드), 또는 그의 임의의 효과기 단편은 고체 기질 상에 고정화(immobilized)된다. 본 명세서에서 고려되는 고체 기질은 마이크로비드, 나노입자, 중합체, 매트릭스 물질, 마이크로어레이, 마이크로타이터 플레이트, 또는 당업계에 공지된 임의의 고체 표면을 포함하지만 이에 국한되지는 않는다(예를 들어 US 7,771,955 참조). 이들 실시예에 따르면, 분자는 당업자에게 공지된 기술을 사용하여, 예를 들어 비드, 입자, 또는 플레이트와 같은 고체 기질에 공유 또는 비공유 연결될 수 있다(예를 들어, Jung Y et al., Analyst 133: 697-701(2008) 참조). 고정된 분자는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 스크리닝 적용에 사용될 수 있다(예를 들어, Bradbury A et al., *Nat Biotechnol* 29: 245-54 (2011); Sutton C, *Br J Pharmacol* 166: 457-75 (2012); Diamante L et al., *Protein Eng Des Sel* 26: 713-24 (2013); Houlihan G et al., *J Immunol Methods* 405: 47-56 (2014) 참조).

[0493] [492] 분자가 고정될 수 있는 고체 기질의 비제한적인 예는 다음을 포함한다: 마이크로비드, 나노입자, 폴리머, 나노폴리머, 나노튜브, 자기 비드, 상자성 비드, 초상자성 비드, 스트렙타비딘 코팅 비드, 역상 자기 비드, 카복시 말단 비드, 히드라진 말단 비드, 실리카(나트륨 실리카) 비드, 및 이미노디아세트산(IDA)-변성 비드, 알데히드-변성 비드, 에폭시-활성화 비드, 디아미노디프로필아민(DADPA)-변성 비드(1차 아민 표면 그룹을 갖는 비드), 생분해성 중합체 비드, 폴리스티렌 기질, 아미노-폴리스티렌 입자, 카복실-폴리스티렌 입자, 에폭시-폴리스티렌 입자, 디메틸아미노-폴리스티렌 입자, 히드록시-폴리스티렌 입자, 착색 입자, 유세포 분석 입자, 술포네이트-폴리스티렌 입자, 니트로셀룰로오스 표면, 강화 니트로셀룰로오스 멤브레인, 나일론 멤브레인, 유리 표면, 활성화된 유리 표면, 활성화된 석영 표면, 폴리비닐리덴 디플루오라이드(PVDF) 멤브레인, 폴리아크릴아미드 기반 기질, 폴리염화비닐 기질, 폴리-메틸 메타크릴레이트 기질, 폴리(디메틸 실록산) 기질, 및 공유 결합을 형성할 수 있는 광반응성 종(예: 니트렌, 카르벤, 및 케틸 라디칼)을 함유하는 광중합체. 분자가 고정될 수 있는 고체 기질의 다른 예는 예를 들어 세포 표면, 파지(phages), 및 바이러스 입자와 같은 분자 디스플레이 시스템에서 일반적으로 사용된다.

[0494] X. 전달 장치 및 키트

[0495] [493] 본 발명의 일부 실시예들에서, 본 개시 내용은 이를 필요로 하는 대상체에게 전달하기 위한 약학 조성물 또는 진단 조성물과 같은 물질의 하나 이상의 조성물을 포함하는 장치에 관한 것이다. 따라서, 하나 이상의 조성물을 포함하는 전달 장치는 정맥 내, 피하, 근육 내 또는 복강 내 주사; 경구 투여; 경피 투여; 폐 또는 경점막 투여; 임플란트, 삼투압 펌프, 카트리지, 또는 마이크로 펌프에 의한 투여; 또는 당업자가 인정하는 다른 수단을 포함하는 다양한 전달 수단에 의해 환자에게 조성물을 투여하기 위해 사용될 수 있다.

[0496] [494] 또한, 본 명세서에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 조성물, 및 선택적으로, 사용을 위한 포장 및 설명서를 포함하는 키트가 제공된다. 키트는 약물 투여 및/또는 진단 정보 수집에 유용할 수 있다. 키트는 선택적으로 하나 이상의 추가 시약(예: 표준, 마커 등)을 포함할 수 있다. 키트에는 일반적으로 키트 내용물의 용도를 나타내는 라벨이 포함되어 있다. 키트는 샘플 또는 대상체에서 세포 유형(예: 종양 세포)을 검출하거나 환자가 화합물, 조성물 또는 본 명세서에 기술된 방법과 같은 관련 방법을 사용하는 치료 전략에 반응하는 그룹에 속하는지 여부를 진단하기 위한 시약 및 기타 도구를 추가로 포함할 수 있다.

[0497] XI. 결합 분자 및/또는 그의 약학 및/또는 진단 조성물의 사용 방법

[0498] [495] 일반적으로, 본 개시 내용의 목적은 특정 암, 종양, 성장 이상, 면역 장애, 또는 본 명세서에 언급된 추가 병리학적 상태와 같은 질병, 장애, 및 질환의 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있는 약리학적 활성제뿐 아니라 이를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다. 따라서, 세포의 표적 사멸, 표적 세포 내로의 추가 외인성 물질 전달, 표적 세포 내부의 표지화, 진단 정보 수집, 표적 세포의 MHC 클래스 I 제시 경로에 대한 T-세포 에피토프 전달, 및 본 명세서에 기술된 질병, 장애, 및 질환을 치료하기 위한 폴리펩티드, 결합 분자 및 약학 조성물의 사용 방법이 제공된다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 방법은 암, 암 개시, 종양 개시, 전이(metastasis) 및/또는 질병 재발을 예방하거나 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0499] [496] 특히, 본 개시 내용의 목적은 당업계에 공지된 제제, 조성물 및/또는 방법과 비교하여 특정 이점을 갖는 이러한 약리학적 활성제, 조성물 및/또는 방법을 제공하는 것이다. 따라서, 본 개시 내용은 시가 독소 효과기

폴리펩티드 및 특정 단백질 서열을 갖는 결합 분자 및 그의 약학 조성물을 사용하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 명세서에 기술된 임의의 아미노산 서열은 하기 방법 또는 예를 들어 WO 2014/164680, WO 2014/164693, WO 2015/138435, WO 2015/138452, WO 2015/113005, WO 2015/113007, WO 2015/191764, US20150259428, WO 2016/196344, WO 2017/019623, WO 2018/106895, 및 WO 2018/140427에 기술된 다양한 방법과 같이 당업자에게 알려진 결합 분자를 사용하는 방법에서 사용된 결합 분자의 성분으로서 특정하게 활용될 수 있다.

[0500] [497] 시험관 내 또는 생체 내에서 세포를 본 명세서에 기재된 바와 같이 시가 독소 효과기 폴리펩티드, 결합 분자 또는 약학 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는 세포를 사멸시키는 방법이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 기재된 시가 독소 효과기 폴리펩티드, 결합 분자, 및 약학 조성물은 세포 또는 세포들을 청구된 조성물 중 하나와 접촉 시 특정 세포 유형을 사멸시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시예들에서, 결합 분자 또는 약학 조성물은 상이한 세포 유형의 혼합물, 예컨대 암 세포, 감염된 세포 및/또는 혈액 세포를 포함하는 혼합물에서 특정 세포 유형을 사멸시키는 데 사용될 수 있다. 일부 실시예들에서, 결합 분자, 또는 약학 조성물을 사용하여 상이한 세포 유형의 혼합물에서 암 세포를 사멸시키는 데 사용될 수 있다. 일부 실시예들에서, 세포독성 시가 결합 분자, 또는 약학 조성물은 이식 전 조직과 같은 상이한 세포 유형의 혼합물에서 특정 세포 유형을 사멸시키는 데 사용될 수 있다. 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드, 결합 분자, 또는 약학 조성물은 치료 목적을 위한 사전 투여 조직 물질과 같은 세포 유형의 혼합물에서 특정 세포 유형을 사멸시키는 데 사용될 수 있다. 일부 실시예들에서, 결합 분자 또는 약학 조성물을 사용하여 바이러스 또는 미생물에 의해 감염된 세포를 선택적으로 사멸시키거나, 그렇지 않으면 세포 표면 생체분자와 같은 특정 세포 외 표적 생체분자를 발현하는 세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있다. 시가 독소 효과기 폴리펩티드, 결합 분자 및 약학 조성물은 예를 들어 시험관 내 또는 생체 내 조직에서 원치 않는 세포 유형을 고갈시키는 용도, 이식편 대 숙주를 치료하기 위한 면역 반응 조절 용도, 항바이러스제로서의 용도, 구충제로서의 용도, 및 원치 않는 세포 유형의 이식 조직을 퍼지하는 용도를 포함하는 다양한 용도를 갖고 있다.

[0501] [498] 본 발명의 일부 실시예들에서, 특정 시가 독소 효과기 폴리펩티드, 결합 분자 및 약학 조성물은 단독으로 또는 다른 화합물 또는 약학 조성물과 조합하여 치료가 필요한 환자와 같은 대상체에서 시험관 내 또는 생체 내에서 세포 집단에 투여될 때 강력한 세포 사멸 활성을 나타낼 수 있다. 특정 세포 유형에 대한 고친화도 결합 영역을 사용하여 효소적으로 활성인 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드 및/또는 T-세포 에피토프의 전달을 목표로 함으로써, 세포 사멸 활성은 특정 암세포, 신생물 세포, 악성 세포, 비악성 종양 세포 및/또는 감염된 세포와 같은 유기체 내의 특정 세포 유형을 특이적이고 선택적으로 죽이는 것으로 제한될 수 있다.

[0502] [499] 본 발명의 일부 실시예들에서, 이를 필요로 하는 환자에서 세포를 사멸시키는 방법은 환자에게 적어도 하나의 결합 분자 또는 그의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0503] [500] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자 또는 그의 약학 조성물은 암 또는 종양 세포와 물리적으로 커플링된 것으로 발견되는 세포 외 PD-L1을 표적화함으로써 환자에서 암 세포를 사멸시키기 위해 사용될 수 있다. 용어 "암 세포" 또는 "암성 세포(cancerous cell)"는 비정상적으로 가속화되고 그리고/또는 조절되지 않는 방식으로 성장 및 분열하는 다양한 신생물 세포(neoplastic cells)를 지칭하고 이는 당업자에게 명백할 것이다. 용어 "종양 세포(tumor cell)"는 악성 및 비악성 세포를 모두 포함한다. 일반적으로, 암 및/또는 종양은 치료 및/또는 예방이 가능한 질병, 장애, 또는 상태로 정의될 수 있다. 방법 및 조성물로부터 이익을 얻을 수 있는 암 세포 및/또는 종양 세포로 구성된 암 및 종양(악성 또는 비-악성)은 당업자에게 명백할 것이다. 신생물 세포는 종종 다음 중 하나 이상과 연관된다: 조절되지 않은 성장, 분화 부족, 국소 조직 침습, 혈관신생 및 전이. 특정 암 세포 및/또는 종양 세포를 표적화하기 위해 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물로부터 이익을 얻을 수 있는 암 및/또는 종양(악성 또는 비-악성)으로 인한 질병, 장애, 및 질환은 당업자에게 명백할 것이다.

[0504] [501] 본 발명의 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 결합 분자 및 조성물은 일반적으로 느리게 분열하고 화학요법 및 방사선과 같은 암 요법에 내성인 암 줄기 세포, 종양 줄기 세포, 전암성 암 개시 세포(pre-malignant cancer-initiating cells), 및 종양 개시 세포를 사멸시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 급성 골수성 백혈병(AML)은 AML 줄기 세포 및/또는 휴면 AML 전구 세포를 사멸시켜 치료할 수 있다(예: Shlush L et al., Blood 120: 603-12 (2012) 참조).

[0505] [502] 시가 독소 A 서브유닛 기반 작용 메커니즘으로 인해, 본 명세서에 기재된 물질의 조성물은 예를 들어, 화학요법, 면역요법, 방사선, 줄기 세포 이식 및 면역 체크포인트 억제제와 같은 다른 요법과의 조합 또는 보완적 방식을 포함하는 방법에서 보다 효과적으로 사용될 수 있고 그리고/또는 내화학성/방사선 내성 및/또는 휴지기 종양 세포/종양 개시 세포/줄기 세포에 대해 효과적이다. 유사하게, 조성물은 동일한 질병 장애 또는 질환에 대

한 동일한 에피토프 상의, 비중첩, 또는 상이한 표적 이외를 표적으로 하는 다른 세포 표적 요법과 조합하여 포함하는 방법에서 보다 효과적으로 사용될 수 있다.

[0506] [503] 결합 분자 또는 이의 약학 조성물의 특정 실시예들은 면역 세포와 물리적으로 커플링된 것으로 발견되는 세포 외 PD-L1을 표적화함으로써 환자의 면역 세포(건강하든 악성이든)를 사멸시키는 데 사용될 수 있다.

[0507] [504] 악성, 신생물, 또는 기타 원치 않는 T-세포 및/또는 B-세포의 환자 세포 집단(예: 골수)을 퍼징하고 그런 다음 T-세포 및/또는 B-세포 고갈된 물질을 환자에게 재주입하기 위한 목적으로 결합 분자 또는 이의 약학 조성물을 사용하는 것은 본 개시 내용의 범위 내에 있다(예: van Heeckeren W et al., *Br J Haematol* 132: 42-55 (2006); (*see e.g.* Alpdogan O, van den Brink M, *Semin Oncol* 39: 629-42 (2012) 참조).

[0508] [505] 환자로부터 제거된 단리된 세포 집단으로부터 T-세포 및/또는 B-세포의 생체 외 고갈의 목적을 위해 결합 분자 또는 이의 약학 조성물을 이용하는 것은 본 개시 내용의 범위 내에 있다. 하나의 비제한적 예에서, 결합 분자는 장기 및/또는 조직 이식 거부의 예방을 위한 방법에 사용될 수 있고, 여기서 공여자 장기 또는 조직은 공여자 T-세포 및/또는 B-세포의 장기를 퍼징하기 위해 이식 전에 세포독성, 결합 분자 또는 이의 약학 조성물로 관류(perfused)된다(예: Alpdogan O, van den Brink M, Semin Oncol 39: 629-42 (2012) 참조).

[0509] [506] 이식편-대-숙주 질환에 대한 예방으로서 공여자 세포 집단으로부터 T-세포 및/또는 B-세포를 고갈 및 골수 및/또는 줄기 세포 이식을 받는 환자에서 내성 유도를 목적으로 결합 분자 또는 그의 약학 조성물을 이용하는 것도 본 개시 내용의 범위 내에 있다.

[0510] [507] 시가 독소 효과기 폴리펩티드 또는 결합 분자, 또는 이의 약학 조성물의 일부 실시예들에서, 감염된 세포와 물리적으로 커플링된 것으로 발견되는 세포 외 PD-L1을 표적화함으로써 환자에서 감염된 세포를 사멸시키기 위해 사용될 수 있다.

[0511] [508] 결합 분자 또는 이의 약학 조성물의 일부 실시예들에서, 로커스의 폴리싱(policing of the locus) 향상을 위한 면역 시스템 활성화를 위해 척색동물 내에서 비-자기, T-세포 에피토프-펩티드 제시 세포로 로커스를 "씨딩(seeding)"하는 데 사용될 수 있다. 이 "씨딩" 방법의 일부 실시예들에서, 로커스는 종양 덩어리 또는 감염된 조직 부위이다. 이 "씨딩" 방법의 바람직한 실시예들에서, 비자기, T-세포 에피토프-펩티드는 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된다: 결합 분자의 표적 세포에 의해 이미 제시되지 않은 펩티드, 표적 세포에 의해 제시된 임의의 단백질에 존재하지 않는 펩티드, 표적 세포의 프로테옴 또는 전사체 내에 존재하지 않는 펩티드, 씨딩할 부위의 세포 외 미세환경에 존재하지 않는 펩티드, 및 표적화할 종양 덩어리 또는 감염 조직 부위에 존재하지 않는 펩티드.

[0512] [509] 이 "씨딩" 방법은 효과기 T-세포에 의한 인식 및 다운스트림 면역 반응의 활성화를 위해 하나 이상의 MHC 클래스 I 제시 T-세포 에피토프로 척색동물 내의 하나 이상의 표적 세포를 표지하는 기능을 한다. 세포 내재화, 세포 내 라우팅 및 결합 분자의 기능을 전달하는 T-세포 에피토프를 이용함으로써, 전달된 T-세포 에피토프를 나타내는 표적 세포를 이용하여 숙주 T-세포에 의한 제시 표적 세포의 인식 및 CTL에 의한 표적 세포 사멸을 포함한 추가 면역 반응을 유도하는데 이용될 수 있다. 결합 분자를 사용하는 이러한 "씨딩" 방법은 예를 들어 결합 분자-전달 T-세포 에피토프(들)의 제시 여부와 상관없이 종양 덩어리 또는 감염된 조직 부위와 같은 씨딩된 미세환경 내에서 세포를 공격하는 적응 면역 반응을 유도함으로써 일시적인 백신 접종 효과를 제공할 수 있다. 이 "씨딩" 방법은 또한 표적 세포 집단, 종양 덩어리 및/또는 척색동물 내의 감염된 조직 부위에 대한 면역 내성의 파괴를 유도할 수 있다.

[0513] [510] 본 발명의 일부 실시예들에서, 하나 이상의 항원성 및/또는 면역원성 에피토프가 있는 척색동물 내 로커스의 씨딩(seeding)을 포함하는 방법은 예를 들어, 사이토카인, 박테리아 제품, 또는 식물 사포닌과 같은 하나 이상의 면역 보조제와 본 명세서에 기재된 조성물의 공동-투여와 같이, 국소적 투여든 전신 투여든, 특정 항원에 대한 면역 반응을 자극하기 위하여 면역 보조제의 투여와 조합될 수 있다. 본 명세서에 기술된 방법에 사용하기에 적합할 수 있는 면역 보조제의 다른 예는 알루미늄 염 및 오일, 예를 들어 명반, 수산화알루미늄, 미네랄 오일, 스쿠알렌, 파라핀 오일, 땅콩 오일, 및 티메로살을 포함한다.

[0514] [511] 추가로, 유효량의 적어도 하나의 결합 분자 또는 이의 약학 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 환자의 질병, 장애, 또는 질환을 치료하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시예들에서, 질병, 장애, 또는 질환은 PD-L1 발현 세포를 포함한다. 이 방법을 사용하여 치료할 수 있는 고려되는 질병, 장애, 및 질환은 암, 악성 종양, 비악성 종양, 성장 이상, 면역 장애, 및 미생물 감염을 포함한다. 본 명세서에 기재된 조성물의 "치료학적 유효 투여량(therapeutically effective dosage)"의 투여는 질병 증상의 중증도 감

소, 질병 무증상 기간의 빈도 및 지속 기간의 증가, 또는 질병 고통으로 인한 손상 또는 장애의 예방을 초래할 수 있다.

[0515] [512] 조성물의 치료학적 유효량은 투여 경로, 치료되는 유기체의 유형, 및 고려 중인 특정 환자의 신체적 특성에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자 및 이 양을 결정하는 것과의 관계는 의료 분야의 숙련된 당업자들에게 잘 알려져 있다. 이 양 및 투여 방법은 최적의 효능을 달성하도록 맞춤화될 수 있고, 체중, 식이, 병용 약물 및 기타 요소와 같은 요소에 따라 달라질 수 있으며, 이는 의학 분야의 숙련가에게 잘 알려져 있다. 인간 사용에 가장 적합한 투여량 크기 및 투여 요법은 여기에서 얻은 결과에 따라 결정될 수 있으며 적절하게 설계된 임상 시험에서 확인할 수 있다. 효과적인 투여량 및 치료 프로토콜은 실험 동물에서 낮은 투여량으로 시작하여 효과를 모니터링하면서 투여량을 늘리고 투여 요법을 체계적으로 변경하는 전통적인 방법으로 결정할 수 있다. 임상의는 주어진 대상에 대한 최적의 투여량을 결정할 때 수많은 요인을 고려할 수 있다. 이러한 고려 사항은 당업자에게 알려져 있다.

[0516] [513] 허용되는 투여 경로는 에어로졸, 장, 비강, 안과, 경구, 비경구, 직장, 질, 또는 경피(예: 크림, 겔 또는 연고의 국소 투여 또는 경피 패치를 통해)를 포함하나 이에 국한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 투여 경로를 지칭할 수 있다. "비경구 투여(Parenteral administration)"는 전형적으로 안와 내, 주입, 동맥 내, 피막 내, 심장 내, 피 내, 근육 내, 복강 내, 폐 내, 척수 내, 흉골 내, 척수강 내, 자궁 내, 정맥 내, 지주막하, 피막하, 피하, 경점막 또는 기관지 투여를 포함하는 의도된 작용 부위에서의 또는 이와 소통하는 주사와 관련된다.

[0517] [514] 약학 조성물의 투여를 위해, 투여량 범위는 일반적으로 대상체 체중의 약 0.001 내지 10 밀리그램/킬로그램(mg/kg), 및 그 이상, 일반적으로 0.001 내지 0.5 mg/kg일 것이다. 예시적인 투여량은 0.01mg/kg 체중, 0.03mg/kg 체중, 0.07mg/kg 체중, 0.09mg/kg 체중 또는 0.1mg/kg 체중 또는 0.01 내지 0.1 mg/kg 범위 내일 수 있다. 예시적인 치료 요법은 1일 1회 또는 2회 투여, 또는 1주 1회 또는 2회 투여, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 월 1회, 2 또는 3개월마다 1회, 또는 3 내지 6 개월 1회 등이다. 특정 환자에 대한 치료 효과를 최대화하기 위해 필요한 만큼 숙련된 의료 전문가가 복용량을 선택하고 재조정할 수 있다.

[0518] [515] 약학 조성물은 전형적으로 동일한 환자에게 여러 번 투여될 것이다. 단일 투여량 사이의 간격은 예를 들어 2 내지 5 일, 매주, 매월, 2 또는 3 개월마다, 6개월마다 또는 매년일 수 있다. 투여 사이의 간격은 또한 대상체 또는 환자의 혈액 수준 또는 기타 마커의 조절을 기반으로 불규칙할 수 있다. 조성물에 대한 투여 요법은 예를 들어 0.01mg/kg 체중 또는 0.03mg/kg 체중의 정맥 내 투여를 포함하고, 6회 투여량 동안 2 내지 4 주마다, 그 다음 0.03mg/kg 체중 또는 0.01mg/kg 체중으로 3개월마다 조성물을 투여한다.

[0519] [516] 약학 조성물은 당업계에 공지된 다양한 방법 중 하나 이상을 사용하여 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 숙련된 작업자에 의해 이해되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라질 것이다. 결합 분자 및 약학 조성물에 대한 투여 경로는 예를 들어 정맥 내, 근육 내, 피 내, 복강 내, 피하, 척수 또는 기타 비경구 투여 경로, 예를 들어 주사 또는 주입을 포함한다. 다른 실시예들의 경우, 결합 분자 또는 약학 조성물은 비경구 경로, 예컨대 국소, 표피 또는 점막 투여 경로, 예를 들어 비내, 경구, 질, 직장, 설하, 또는 국소로 투여될 수 있다.

[0520] [517] 치료 결합 분자 또는 약학 조성물은 당업계에 공지된 다양한 의료 장치 중 하나 이상으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 한 실시예들에서, 약학 조성물은 무바늘 피하 주사 장치로 투여될 수 있다. 잘 알려진 이식 및 유용한 모듈의 예는 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 제어된 속도 전달을 위한 이식 가능한 미세 주입 펌프; 피부를 통해 투여하기 위한 장치; 정확한 주입 속도로 전달하기 위한 주입 펌프; 지속적인 약물 전달을 위한 가변 흐름 이식형 주입 장치; 및 삼투성 약물 전달 시스템을 포함한다. 이들 및 기타 이러한 임플란트, 전달 시스템, 및 모듈은 당업자에게 공지되어 있다.

[0521] [518] 결합 분자 또는 약학 조성물은 단독으로 또는 하나 이상의 다른 치료제 또는 진단제와 조합하여 투여될 수 있다. 조합 요법은 치료할 특정 환자, 질환, 또는 질환에 기초하여 선택된 적어도 하나의 다른 치료제와 조합된 결합 분자 또는 그의 약학 조성물을 포함할 수 있다. 다른 이러한 제제의 예는 특히 세포독성제, 항암제 또는 화학요법제, 항염증제 또는 항증식제, 항미생물제 또는 항바이러스제, 성장 인자, 사이토카인, 진통제, 치료 활성 소분자 또는 폴리펩티드, 단일 사슬 항체, 클래식 항체 또는 이의 단편, 또는 하나 이상의 신호전달 경로를 조절하는 핵산 분자, 및 치료 또는 예방 치료 요법을 보완하거나 달리 유익할 수 있는 유사한 조절 치료 분자를 포함한다.

[0522] [519] 결합 분자 또는 약학 조성물을 사용한 환자의 치료는 일부 실시예들에서 표적 세포의 세포 사멸 및/또는 표적 세포의 성장 억제를 유발할 수 있다. 이와 같이, 세포독성, 결합 분자, 및 이들을 포함하는 약학 조성물은 표적 세포를 사멸시키거나 고갈시키는 것이 유익할 수 있는 다양한 병리학적 장애, 예컨대 특히 암, 종양, 기타 성장 이상, 면역 장애, 및 감염된 세포들을 치료하는 방법에 유용할 것이다. 또한 세포 증식을 억제하고 신생물(neoplasia), 과활성 B-세포 및 과활성 T-세포를 비롯한 세포 장애를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0523] [520] 본 발명의 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 결합 분자 및 약학 조성물은 암, 종양(악성 및 비-악성), 성장 이상, 면역 장애, 및 미생물 감염을 치료 또는 예방하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시예들에서, 상기 생체 외 방법은 상기 생체 내 방법과 조합되어 골수 이식 수용자의 거부를 치료 또는 예방하고 면역학적 관용을 달성하는 방법을 제공할 수 있다.

[0524] [521] 본 발명의 일부 실시예들에서, 인간과 같은 포유동물 대상체에서 악성종양 또는 신생물(neoplasms) 및 기타 혈구 관련 암을 치료하는 방법은 치료적 유효량의 세포독성 결합 분자 또는 약학 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0525] [522] 결합 분자 및 약학 조성물은 예를 들어 원치 않는 T-세포를 제거하기 위한 용도, 이식편 대 숙주를 치료하기 위한 면역 반응 조절에서의 용도, 항바이러스제로서의 용도, 항균제로서의 용도 및 원하지 않는 세포 유형의 이식 조직의 퍼징(purging)에서의 용도를 포함하는 다양한 용도를 갖는다. 본 명세서에 기술된 결합 분자 및 약학 조성물은 일반적으로 항신생물제이고, 이는 이들이 암 또는 종양 세포의 성장을 억제하거나 그리고/또는 사멸을 유발함으로써 신생물 또는 악성 세포의 발달, 성숙 또는 확산을 치료 및/또는 예방할 수 있음을 의미한다.

[0526] [523] 본 발명의 일부 실시예들에서, 결합 분자 또는 약학 조성물은 B-세포-, 형질 세포- 또는 항체-매개 질환 또는 장애를 치료하는데 사용되는데, 예를 들어 백혈병, 림프종(예를 들어, 원발성 종격 B-세포 림프종, 호지킨 림프종, 또는 비호지킨 림프종), 골수종, 류마티스 질환, 척추염, 인간 면역결핍 바이러스 관련 질환, 아밀로이드증, 용혈성 요독 증후군, 다발동맥염, 패혈성 쇼크, 크론병, 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 궤양성 대장염, 건선, 천식, 쇼그렌 증후군, 이식편 대 숙주 질환, 이식 거부, 당뇨병, 혈관염, 경피증 및 전신성 홍반성 루푸스와 같은 것들이다.

[0527] [524] 본 발명의 일부 실시예들에서, 본 명세서에 기재된 결합 분자 및 약학 조성물의 특정 실시예들은 항미생물제이고, 이는 이들이 바이러스, 박테리아, 진균, 프리온 또는 원생동물에 의해 야기되는 것과 같은 미생물학적 병원성 감염의 획득, 발달 또는 결과를 치료 및/또는 예방할 수 있음을 의미한다.

[0528] [525] 환자의 T-세포 또는 B-세포를 사멸할 목적으로 환자에게 본 명세서에 기재된 결합 분자 또는 그의 약학 조성물을 투여함으로써 T-세포 또는 B-세포에 의해 매개되는 질환 또는 상태에 대한 예방 또는 치료를 제공하는 것은 본 개시 내용의 범위 내에 있다. 이 사용법은 예를 들어, 인간 또는 비인간 공급원이거나 이식된 물질의 출처에 관계없이 골수 이식, 줄기 세포 이식, 조직 이식 또는 장기 이식을 위해 환자를 준비하거나 조절하는 것과 호환된다.

[0529] [526] 본 명세서에 기재된 바와 같은 세포독성 결합 분자 또는 약학 조성물을 사용하여 숙주 T-세포의 표적화된 세포-사멸을 통한 숙주 대 이식편 질환의 예방 또는 치료를 위한 골수 수용자를 제공하는 것은 본 개시 내용의 범위 내에 있다.

[0530] [527] 본 발명의 일부 실시예들에서, 암을 치료하는 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 PDL-1 결합 분자 또는 이를 포함하는 약학 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시예들에서, 암을 치료하는 방법은 PD-L1 결합 분자를 암호화하는 유효량의 핵산(예를 들어, 발현 벡터)을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시예들에서, 암은 다음 중 임의의 것이다: 방광암(예: 요로상피암), 유방암(예: HER2 양성 유방암, 삼중 음성 유방암), 결장암(예: 전이성 미세위성 불안정성-높음 또는 불일치 복구 결핍 결장직장암과 같은 결장직장암), 자궁내막암, 식도암, 나팔관암, 위장관암(예: 위암, 담도 신생물, 위식도 접합부 암), 교모세포종, 신경아교종, 두경부암(예: 두경부 편평세포암), 신장암(예: 신세포 암종), 간암(예: 간세포 암종), 폐암(예: 비소세포폐암, 소세포폐암), 림프종(예: 미만성 거대 B-세포 림프종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 원발성 종격동 대형 B-세포 림프종), 메르켈 세포 암종, 중피종(예: 흉막 중피종), 골수종(예: 다발성 골수종), 비인두 신생물, 난소암, 췌장암, 복막 신생물, 전립선암, 피부암(예: 피부의 편평 세포암, 흑색종, 이행 세포 암종 또는 요로상피암).

[0531] [528] 결합 분자 및 약학 조성물의 일부 실시예들은 치료적 유효량의 결합 분자 및/또는 약학 조성물을 이를 필

요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 암을 치료하는 방법에서 이용될 수 있다. 일부 실시예들에서, 치료되는 암은 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된다: 골암(예: 다발성 골수종 또는 유잉 육종), 유방암(예: HER2 양성 유방암 또는 삼중 음성 유방암), 중추/말초 신경계 암(예: 뇌암, 신경섬유종증 또는 교모세포종), 위장암(예: 위암 또는 결장직장암), 생식세포암(예: 난소암 및 고환암), 선암(예: 췌장암, 부갑상선암, 갈색세포종, 침샘암 또는 갑상선암), 두경부암(비인두암, 구강암, 인두암과 같은), 혈액암(예: 백혈병, 림프종 또는 골수종), 신장-요로암(예: 신장암 및 방광암), 간암(예: 간세포 암종), 폐/흉막암(예: 중피종, 소세포 폐암, 또는 비소세포폐암), 전립선암, 육종(예: 혈관육종, 섬유육종, 카포시 육종 또는 활막 육종), 피부암(예: 기저 세포 암종, 편평 세포 암종 또는 흑색종), 요로상피암, 위암, 식도암, 두경부 편평 세포 암, 자궁경부암, 메르켈 세포 암종, 자궁내막암 및 자궁암.

[0532] [529] 본 명세서에 기재된 암을 치료하는 방법의 일부 실시예들에서, 대상체는 결합 분자를 투여하기 전에 이전 치료의 적어도 하나의 라인 또는 요법을 받았다. 일부 실시예들에서, 대상체는 암을 갖고, 암은 체크포인트 억제제 요법과 같은 적어도 하나의 이전 치료에 대해 재발하거나 불응성이다. 일부 실시예들에서, 암은 이필리무맙, 니볼루맙, 펨브롤리주맙, 아테졸리주맙, 더발루맙, 아벨루맙, 트레멜리무맙 또는 세미플리맙에 대해 재발되거나 불응성이다. 일부 실시예들에서, 암은 하기 표 6에 열거된 암 중 하나이고, 표에서 "X"로 표시된 적어도 하나의 선행 치료에 대해 재발되거나 불응성이다.

표 6

[0533] **표 6: 이전 치료에 대해 재발하거나 불응성일 수 있는 본 개시 내용의 결합 분자로 치료 가능한 암**

암	이필리무맙	니볼루맙	펨브롤리주맙	아테졸리주맙	더발루맙	아벨루맙	세미플리맙
흑색종	X	X	X				
메르켈 세포			X			X	
피부 편평 세포 암종							X
비소세포폐암		X	X	X	X		
소세포폐암		X	X	X			
머리와 목의 편평 세포 암종		X	X		X		
식도암			X				
위암		X	X				
대장암		X	X				
간세포 암		X					
방광암		X	X	X	X	X	
신세포암	X	X	X			X	

[0534] [530] 본 발명의 일부 실시예들에서, 암을 치료하는 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 PDL-1 결합 분자 또는 이를 포함하는 약학 조성물을 투여하는 것을 포함하고, 여기서 암은 전이성이다.

[0535] [531] 결합 분자 및 약학 조성물의 일부 실시예들은 치료적 유효량의 결합 분자 및/또는 약학 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 면역 장애를 치료하는 방법에서 이용될 수 있다. 일부 실시예들에서, 면역 장애는 류마티스 질환, 척추염, 아밀로이드증, 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 천식, 크론병, 당뇨병, 이식 거부, 이식편 대 숙주 질환, 하시모토 갑상선염, 용혈성 요독 증후군, HIV 관련 질환, 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 다발성 동맥염, 건선, 건선성 관절염, 류마티스 관절염, 경피증, 패혈성 쇼크, 쇼그렌 증후군, 궤양성 대장염 및 혈관염으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환과 관련된 염증과 관련된다.

[0536] [532] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 또는 결합 분자는 암, 종양, 기타 성장 이상, 면역 장애, 및/또는 미생물 감염의 치료 또는 예방을 위한 약학 조성물 또는 의약의 성분으로서 사용된다. 예를 들어, 환자의 피부에 나타나는 면역 장애는 염증을 줄이기 위한 노력의 일환으로 이러한 약제로 치료될 수 있다. 다른 예에서, 피부 종양은 종양 크기를 감소시키거나 종양을 완전히 제거하기 위한 노력으로 이러한 약제로 치료될 수 있다.

[0537] [533] 특정 세포독성 결합 분자 및 이의 조성물은 면역병변(immunolesioning) 및 신경 추적(neuronal tracing)과 같은 분자 신경외과 적용(molecular neurosurgery applications)에 사용될 수 있다(검토를 위해 Wiley R, Lappi D, *Adv Drug Deliv Rev* 55: 1043-54 (2003) 참조). 예를 들어, 표적화 도메인은 뉴런 회로 특이적 G-단

백질 결합 수용체와 같은 뉴런 표면 수용체에 결합함으로써 특정 뉴런 세포 유형을 표적화하는 신경전달물질 및 신경펩티드와 같은 다양한 리간드로부터 선택되거나 유래될 수 있다. 유사하게, 표적화 도메인은 뉴런 표면 수용체에 결합하는 항체로부터 선택되거나 유래될 수 있다. 특정 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 역행성 축삭 수송(retrograde axonal transport)을 강력하게 지시하기 때문에, 특정 결합 분자는 세포체에서 멀리 떨어진 세포 독성 단백질 주입 부위에서 세포 외 표적을 발현하는 뉴런(들)을 사멸시키는 데 사용될 수 있다(Llewellyn-Smith I et al., *J Neurosci Methods* 103: 83-90 (2000) 참조). 신경 세포 유형을 특이적으로 표적으로 하는 이들 표적화된 세포독성 분자는 감각 메커니즘을 설명하기 위한 것(예를 들어, Mishra S, Hoon M, *Science* 340: 968-71 (2013) 참조) 및 예를 들어 파킨슨병 및 알츠하이머병과 같은 신경퇴행성 질환의 모델 시스템 생성(예를 들어, Hamlin A et al., *PLoS One* e53472 (2013) 참조).

[0538] [534] 본 발명의 일부 실시예들에서, 신생물 세포 및/또는 면역 세포 유형의 내부를 표지하거나 검출하기 위해 본 명세서에 기재된 바와 같은 시가 독소 효과기 폴리펩티드, 결합 분자, 약학 조성물, 및/또는 진단 조성물을 사용하는 방법이 제공된다. 이 방법은 특정 결합 분자가 특정 세포 유형으로 들어가고 역행성 세포 내 수송을 통해 세포 내 경로를 따라가는 능력을 기반으로 할 수 있고, 특정 세포 유형의 내부 구획은 검출을 위해 표지된다. 이것은 환자 내의 제자리에 있는 세포에서 또는 예를 들어 생검 재료와 같이 유기체에서 제거된 세포 및 조직에서 수행될 수 있다.

[0539] [535] 본 발명의 일부 실시예들에서, 질병, 질환, 및/또는 장애에 관한 정보 수집을 목적으로 세포 유형의 존재를 검출하기 위해 시가 독소 효과기 폴리펩티드, 결합 분자, 약학 조성물, 및/또는 진단 조성물을 사용하는 방법이 제공된다. 방법은 분석 또는 진단 기술에 의해 분자를 검출하기 위해 세포를 진단 유효량의 결합 분자와 접촉시키는 것을 포함한다. "진단 유효량(diagnostically effective amount)"이라는 문구는 사용된 특정 분석 또는 진단 기술에 의해 정보 수집 목적을 위해 적절한 검출 및 정확한 측정을 제공하는 양을 의미한다. 일반적으로, 전체 유기체 생체 내 진단 용도를 위한 진단 유효량은 대상체당 대상체 kg당 검출 촉진제 연결된 결합 분자의 0.001 내지 10 mg의 비-누적 용량일 것이다. 일반적으로, 이러한 정보 수집 방법에 사용되는 시가 독소 효과기 폴리펩티드 또는 결합 분자의 양은 여전히 진단 유효량이라고 하면 가능한 한 낮다. 예를 들어, 유기체에서 생체 내 검출을 위해, 대상체에게 투여되는 시가 독소 효과기 폴리펩티드, 결합 분자, 또는 약학 조성물의 양은 가능한 한 낮을 것이다.

[0540] [536] 검출 촉진제와 결합된 결합 분자의 세포-유형 특이적 표적화는 분자의 결합 영역에 의해 결합된 세포 외 PD-L1과 물리적으로 커플링된 세포를 검출하고 이미지화하는 방법을 제공한다. 결합 분자를 사용한 세포의 영상화는 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 기술에 의해 시험관 내 또는 생체 내에서 수행될 수 있다. 진단 정보는 유기체의 전신 영상화 또는 유기체로부터 채취한 생체 외 샘플을 사용하는 것을 포함하는 당업계에 공지된 다양한 방법을 사용하여 수집될 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "샘플(sample)"은 혈액, 소변, 혈청, 림프, 타액, 항문 분비물, 질 분비물, 정액과 같은 체액 및 생검 절차에 의해 수득된 조직을 포함하나 이에 국한되지 않는 임의의 수의 물질을 지칭한다. 예를 들어, 다양한 검출 촉진제가 자기 공명 영상(MRI), 광학 방법(직접, 형광 및 생물발광 영상과 같은), 양전자 방출 단층 촬영(PET), 단일 광자 방출 컴퓨터 단층 촬영(SPECT), 초음파, x-선 컴퓨터 단층 촬영, 및 상기 언급된 것의 조합(검토를 위해 Kaur S et al., Cancer Lett 315: 97-111 (2012) 참조)과 같은 비침습 생체 내 종양 이미징을 위해 활용될 수 있다.

[0541] [537] 또한 혈액 세포, 암세포, 종양 세포, 감염된 세포 및/또는 면역 세포의 내부를 표지하거나 검출하기 위해 진단 조성물에서 시가 독소 효과기 폴리펩티드, 결합 분자 또는 약학 조성물을 사용하는 방법이 제공된다(예를 들어, Koyama Y et al., *Clin Cancer Res* 13: 2936-45 (2007); Ogawa M et al., *Cancer Res* 69: 1268-72 (2009); Yang L et al., *Small* 5: 235-43 (2009) 참조). 특정 결합 분자가 특정 세포 유형으로 들어가고 역행성 세포 내 수송(retrograde intracellular transport)을 통해 세포 내 경로를 통과하는 능력을 기반으로 특정 세포 유형의 내부 구획이 검출을 위해 표지된다. 이것은 환자 내의 제자리에 있는 세포에서 또는 예를 들어, 생검 재료와 같이 유기체에서 제거된 세포 및 조직에서 수행될 수 있다.

[0542] [538] 진단 조성물은 관련된 약학 조성물에 의해 잠재적으로 치료 가능한 질환, 장애, 또는 질환을 특징짓기 위해 사용될 수 있다. 물질의 일부 조성물은 환자가 본 명세서에 기재된 바와 같은 화합물, 조성물 또는 관련 방법을 사용하는 치료 전략에 반응하는 그룹에 속하는지 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 전달 장치를 사용하는 데 매우 적합한지를 결정하기 위해 사용될 수 있다.

[0543] [539] 진단 조성물은 예를 들어, 암과 같은 질병이 검출된 후 원격 전이, 이질성 및 암 진행 단계를 모니터링하는 것과 같이 그것을 더 잘 특성화하기 위해 사용될 수 있다. 질병 장애 또는 감염의 표현형 평가는 치료 결정

을 내리는 동안 예후 및 예측에 도움이 될 수 있다. 질병 재발의 경우 특정 방법을 사용하여 국소 또는 전신 문제 여부를 확인할 수 있다.

[0544] [540] 진단 조성물은 예를 들어, 소분자 약물, 생물학적 약물 또는 세포 기반 요법과 같은 치료 유형에 관계없이 치료에 대한 반응을 평가하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 진단의 특정 실시예들은 종양 크기의 변화, 수 및 분포를 포함하는 항원 양성 세포 집단의 변화를 측정하거나 또는 이미 환자에게 투여되고 있는 치료법에 의해 표적화된 항원이 아닌 다른 마커를 모니터링하기 위하여 사용될 수 있다(Smith-Jones P et al., *Nat. Biotechnol* 22: 701-6 (2004); Evans M et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 9578-82 (2011) 참조).

[0545] [541] 세포 유형의 존재를 검출하기 위해 사용되는 방법의 일부 실시예들은 예를 들어 다음의 질병, 장애, 및 질환에 관한 정보 수집을 위해 사용될 수 있다: 골암(예: 다발성 골수종 또는 유잉 육종), 유방암, 중추/말초 신경계 암(예: 뇌암, 신경섬유종증 또는 교모세포종), 위암(위암 또는 결장직장암 등), 생식세포암(난소암 및 고환암 등), 선암(췌장암, 부갑상선암, 갈색세포종, 침샘암 또는 갑상선암 등), 두경부암(예: 비인두암, 구강암 또는 인두암), 혈액암(예: 백혈병, 림프종 또는 골수종), 신장-요로암(예: 신장암 및 방광암), 간암, 폐암/흉막암(예: 중피종, 소세포폐암 또는 비소세포폐암), 전립선암, 육종(예: 혈관육종, 섬유육종, 카포시 육종 또는 활액 육종), 피부암(예: 기저 세포 암종, 편평 세포 암종 또는 흑색종), 자궁암, AIDS, 류마티스 질환, 척추염, 아밀로이드증, 강직염, 천식, 자폐증, 심혈관계 질환, 크론병, 당뇨병, 홍반, 위염, 이식거부, 이식편대숙주병, 그레이브병, 하시모토갑상선염, 용혈성요독증후군, HIV 관련 질환, 홍반루푸스, 림프증식성 장애(이식 후 림프증식성 장애 포함), 다발성 경화증, 중증 근무력증, 신경염, 다발성 동맥염, 건선, 건선성 관절염, 류마티스 관절염, 경피증, 패혈성 쇼크, 쇼그렌 증후군, 전신성 홍반성 루푸스, 궤양성 대장염, 혈관염, 세포 증식, 염증, 백혈구 활성화, 백혈구 부착, 백혈구 화학주성, 백혈구 성숙, 백혈구 이동, 신경 분화, 급성 림프구성 백혈병(ALL), T 급성 림프구성 백혈병/림프종(ALL), 급성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병(AML), B-세포 만성 림프성 백혈병(B-CLL), B 세포 전림프성 림프종, 버킷 림프종(BL), 만성 림프성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML-BP), 만성 골수성 백혈병(CML), 미만성 거대 B-세포 림프종, 여포성 림프종, 모발 세포 백혈병(HCL), 호지킨 림프종(HL), 혈관 내 거대 B -포 림프종, 림프종 육아종증, 림프형질구성 림프종, MALT 림프종, 외투 세포 림프종, 다발성 골수종(MM), 자연 살해 세포 백혈병, 결절 변연 B-세포 림프종, 비호지킨 림프종(NHL), 형질 세포 백혈병, 형질세포종, 원발성 삼출 림프종, 전림프구성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 소림프구성 림프종, 비장 변연부 림프종, T-세포 림프종(TCL), 중쇄 질환, 단일클론 감마병증, 단일클론 면역글로불린 침착 질환, 골수이형성 증후군(MDS), 스몰더링 다발성 골수종 및 발덴스트롬 거대글로불린혈증.

[0546] [542] 본 발명의 일부 실시예들에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드 및 결합 분자, 또는 그의 약학 조성물은 진단 및 치료 모두에, 또는 진단 단독에 사용된다. 일부 상황에서, 치료에서 사용하기 위한 시가 독소 효과기 폴리펩티드 또는 결합 분자를 선택하기 전에, 치료를 필요로 하는 환자와 같은 대상체 및/또는 대상체으 병든 조직에서 발현된 HLA 변이체 및/또는 HLA 대립유전자를 결정하거나 확인하는 것이 바람직할 것이다.

[0547] [543] 결합 분자의 임의의 실시예(예를 들어, 요약의 실시예 세트 #1-13 중 어느 하나의 실시예)는 본 명세서에 기재된 방법의 각각의 개별 실시예와 함께 사용될 수 있다.

[0548] [544] 본 발명은 하기 번호가 매겨진 실시예들, 및 PD-L1을 특이적으로 표적화할 수 있고 하나 이상의 단백질성 독소 성분을 포함하는 결합 분자의 비제한적인 예들에 의해 추가로 예시된다.

[0549] **번호가 매겨진 실시예**

[0550] [545] PD-L1 결합 분자의 상이한 실시예는 #1-3으로 번호가 매겨진 실시예 세트와 관련하여 하기에 기재되어 있다.

[0551] <u>실시예 세트 #1 - 내장 또는 삽입된 이종 T-세포 에피토프 및 비-중첩 탈-면역 하위-영역을 포함하는 탈-면역된 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하는 PD-L1 결합 분자</u>

[0552] [546] 예를 들어, 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 분자는 (i) 세포 외 표적 생체분자에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 영역 및 (ii) 적어도 하나의 삽입되거나 내장된 이종 에피토프 (a) 및 적어도 하나의 파괴된 내인성 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 에피토프 영역 (b)를 포함하는 탈-면역된 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 이종 에피토프는 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프와 중첩되지 않는다. 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는, 예를 들어 폴리펩티드가 존재하는 세포의 소포체 및/또는 세포질로 세포내 전달을 지시하고, 리보솜 기능을 억제하고, 리보솜을 효소적으로 비활성화하고, 세포성색전을 야기하고/하거나 세포독성을 야기하는 것과 같은, 적어도 하나의 시가 독소 효과기 기능을 나타낼 수 있다. 일부 실시예에서,

이종 T-세포 에피토프는, 예를 들어 인간 면역계와 관련하여, CD8+ T-세포 에피토프이다. 일부 실시예에서, 이종 T-세포 에피토프는 세포의 MHC 클래스 I 분자에 의해 제시될 수 있다. 일부 실시예에서, 결합 분자는 다음 중 하나 이상을 할 수 있다: 세포에 진입, 리보솜 기능을 억제, 세포성색전을 유발, 세포 사멸을 야기, 및/또는 세포 표면 상의 제시를 위해 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프를 MHC 클래스 I 분자에 전달. 일부 실시예에서, 결합 분자는, 세포에 도입될 때, 참조 분자와 유사하거나 보다 우수한 세포독성을 나타낼 수 있고, 예를 들어 각각 그의 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분(들) 모두를 제외하고 결합 분자로 구성된 제2 결합 분자는 야생형 시가 독소 A1 단편을 포함한다.

[0553] [547] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 분자는 시가 독소 A1 단편 영역의 카복시-말단에 대한 카복시-말단에 위치한 분자 모이어티를 포함한다.

[0554] [548] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 분자는, 척삭동물에 도입될 때, 참조 분자, 예를 들어 A1 단편 영역의 카복시 말단에 야생형 시가 독소 A1 단편 및/또는 야생형 시가 독소 퓨린-절단 부위를 포함하는 그의 모든 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분(들) 각각을 제외하고 결합 분자로 구성된 제2 결합 분자와 비교하여 개선된 생체 내 내약성 및/또는 안정성을 나타낼 수 있다. 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 세포독성이 아니고 분자 모이어티는 세포독성이다.

[0555] [549] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 영역 및 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 직접적으로 또는 간접적으로 함께 연결된다.

[0556] [550] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 영역은 면역글로불린형 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 결합 영역은 자율 V_H 도메인, 단일-도메인 항체 단편(sdAb), 나노바디, 낙타류로부터 유래된 중쇄-항체 도메인(V_HH 또는 V_H 도메인 단편), 연골어류 유래 중쇄 항체 도메인(V_HH 또는 V_H 도메인 단편), 면역글로불린 신규 항원 수용체(IgNAR), V_{NAR} 단편, 단일 사슬 가변 단편(scFv), 항체 가변 단편(Fv), 상보적 결정 영역 3 단편(CDR3), 제한된 FR3-CDR3-FR4 폴리펩티드(FR3-CDR3-FR4), Fd 단편, SMIP(Small Modular Immunopharmaceutical) 도메인, 항원-결합 단편(Fab), 아르마딜로 반복 폴리펩티드(ArmRP), 피브로넥틴-유래 10번째 피브로넥틴 유형 III 도메인(10Fn3), 테나신 유형 III 도메인(TNfn3), 안키린 반복 모티프(ankyrin repeat motif) 도메인, LDLR-A(low-density-lipoprotein-receptor-derived A-domain), 리포칼린(lipocalin)(안티칼린(anticalin)), Kunitz 도메인, Protein-A-유래 Z 도메인, 감마-B 크리스탈린 유래 도메인, 유비퀴틴-유래 도메인, Sac7d-유래 폴리펩티드(아피틴), Fyn-유래 SH2 도메인, 미니단백질, C-형 렉틴-유사 도메인 스캐폴드, 조작된 항체 모방체, 및 결합 기능을 유지하는 전술한 것의 임의의 유전자 조작된 대응물로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩티드를 포함한다.

[0557] [551] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 분자는 (i) 야생형 시가 독소 A1 단편 또는 야생형 시가 독소 효과기 폴리펩티드와 비슷한 촉매 활성 수준, (ii) 10,000 피코몰 이하의 IC_{50}(half-maximal inhibitory concentration) 값을 갖는 리보솜 억제 활성, 및/또는 (iii) 상당한 수준의 시가 독소 촉매 활성을 나타낼 수 있다.

[0558] [552] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 분자 및/또는 이의 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 야생형 시가 독소 A1 단편 또는 야생형 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하는 참조 결합 분자와 유사한 세포 이하 라우팅 효율을 나타낼 수 있고/있거나 세포의 엔도솜 출발 위치로부터 소포체 및/또는 세포질에 대한 상당한 수준의 세포 내 라우팅 활성 수준을 나타낼 수 있다.

[0559] [553] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 분자의 결합 영역의 세포 외 표적 생체분자와 물리적으로 커플링된 세포로의 결합 분자의 투여는, 결합 분자가 세포의 사멸을 유발할 수 있다. 일부 실시예에서, 세포 외 표적 생체분자의 존재 또는 수준과 관련하여 상이한 2개의 상이한 세포 유형 집단에 결합 분자를 투여하는 경우, 결합 분자는 결합 분자의 결합 영역의 세포 외 표적 생체분자와 물리적으로 커플링되지 않은 세포 유형에 대해 CD_{50}보다 적어도 3배 이하인 CD_{50}에서 세포독성 결합 분자의 결합 영역의 세포 외 표적 생체분자와 물리적으로 커플링된 세포-유형에 대해 사멸을 유발할 수 있다. 일부 실시예에서, 이에 의해 구성원이 결합 분자의 결합 영역의 세포 외 표적 생체분자에 물리적으로 커플링된 제1 세포 집단, 및 그의 구성원이 결합 영역의 임의의 세포 외 표적 생체분자에 물리적으로 커플링되지 않은 제2 세포 집단에 대한 결합 분자의 투여는, 상기 제2 세포 집단의 구성원에 비해 상기 제1 세포 집단의 구성원에 대한 결합 분자의 세포독성 효과가 적어도 3배 더 크다. 일부 실시예에서, 이에 의해 구성원이 결합 분자의 결합 영역의 상당량의 세포 외 표적 생체분자에 물리적으로 커플링된 제1 세포 집단, 및 구성원이 결합 영역의 상당량의 임의의 세포 외 표적 생체분자에 물리적으로 커플링

되지 않은 제2 세포 집단에 대한 결합 분자의 투여는, 상기 제2 세포 집단의 구성원에 비해 상기 제1 세포 집단의 구성원에 대한 결합 분자의 세포독성 효과가 적어도 3배 더 크다. 일부 실시예에서, 표적 생체분자 양성 제1 세포 집단, 및 그의 구성원이 세포 표면에서 결합 분자의 결합 영역의 표적 생체분자의 상당한 양을 발현하지 않는 제2 세포 집단에 결합 분자를 투여함으로써, 제2 세포 집단의 구성원에 비해 제1 세포 집단의 구성원에 대한 결합 분자의 세포독성 효과가 적어도 3배 더 크다.

[0560] [554] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 분자는, 세포에 도입될 때, 300nM 이하의 CD_{50}(half-maximal inhibitory concentration) 값으로 세포독성을 나타낼 수 있고/있거나 시가 독소 세포독성의 유의한 수준을 나타낼 수 있다.

[0561] [555] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 분자는, MHC 클래스 I 분자에 의해 결합된 에피토프의 세포-표면 제시를 위한 세포의 MHC 클래스 I 제시 경로에 내장되거나 삽입된 이종 CD8+ T-세포 에피토프를 전달할 수 있다.

[0562] [556] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 분자는 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 카복시-말단과 관련된 분자 모이어티를 포함한다. 일부 실시예에서, 분자 모이어티는 결합 영역을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시예에서, 분자 모이어티는 적어도 하나의 아미노산을 포함하고 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 분자 모이어티의 적어도 하나의 아미노산 잔기에 연결된다. 일부 실시예에서, 분자 모이어티 및 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 융합되어 연속 폴리펩티드를 형성한다.

[0563] [557] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 분자는 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 카복시-말단과 관련된 세포독성 분자 모이어티를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 세포독성 분자 모이어티는 세포독성제, 예를 들어, 소분자 화학요법제, 항-신생물제, 세포독성 항생제, 알킬화제, 항대사물질, 토포이소머라제 억제제, 및/또는 당업자에게 공지되고/되거나 본 명세서에 설명된 튜불린 억제제와 같은 세포독성제이다. 일부 실시예의 경우, 세포독성 분자 모이어티는 10,000, 5,000, 1,000, 500, 또는 200 pM 미만의 농도에서 세포독성이다.

[0564] [558] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 영역은, 이황화 결합이 아닌 적어도 하나의 공유 결합에 의해 시가 독소 효과기 폴리펩티드에, 직접 또는 간접적으로 연결된다. 일부 실시예에서, 결합 영역은, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 카복시-말단에, 직접 또는 간접적으로 융합되어 단일의 연속 폴리펩티드를 형성한다. 일부 실시예에서, 결합 영역은 면역글로불린형 결합 영역이다.

[0565] [559] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는, 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해 최소 퓨린-절단 부위에서, 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시예에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 최소 퓨린-절단 부위의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 일부 또는 전부와 중첩되는 서열의 아미노-말단 절단이 아니다. 일부 실시예에서, 최소 퓨린-절단 부위의 돌연변이는, R/Y-x-x-R 퓨린 절단 모티프에서 하나 이상의 아미노산 잔기의 아미노산 결실, 삽입, 및/또는 치환이다. 일부 실시예에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는, 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해 적어도 하나의 돌연변이를 포함하고, 돌연변이는 1) 시가-유사 독소 1(SEQ ID NO: 1) 또는 시가 독소(SEQ ID NO: 2)의 A 서브유닛의 248-251, 또는 2) 시가-유사 독소 2(SEQ ID NO: 3)의 A 서브유닛의 247-250, 또는 임의의 시가 독소 A 서브유닛의 동등한 아미노산 서열 위치에 천연적으로 위치하는 영역에서 적어도 하나의 아미노산 잔기를 변경한다. 일부 실시예에서, 돌연변이는 비-양전하를 띤 아미노산 잔기로의 아르기닌 잔기의 아미노산 잔기 치환이다.

[0566] [560] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 분자는, 세포에 도입될 때, 참조 분자, 예를 들어, 야생형 시가 독소 A1 단편을 포함하는 그의 모든 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분(들) 각각을 제외하고 결합 분자로 구성된 제2 결합 분자의 세포독성과 유사한 세포독성을 나타낼 수 있다.

[0567] [561] 본 발명의 일부 실시예에서, 결합 영역은 SEQ ID NOs: 85-107 및 156-157 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함하거나 이로 본질적으로 구성된다.

[0568] [562] 본 발명의 일부 실시예에서, 결합 영역은 SEQ ID NOs: 85-107 및 156-157 중 어느 하나와 적어도 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 98.5%, 또는 99% 동일한 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 폴리펩티드는: (a) 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L)(각각은 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:25, 및 SEQ ID NO:26 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 본질적으로 구성됨); 및 (b) 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역(HVR-H)(각각은 SEQ ID NOs: 22-24 및 27-32 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 본질적으로 구성됨)을 포함한다.

[0569] [563] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 분자는 SEQ ID NOs: 108-155 중 어느 하나에 제시된 폴리펩티드를 포함하거나 이로 본질적으로 구성된다.

[0570] [564] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 영역은 A1 단편 영역의 카복시-말단을 입체적으로 덮는다.

[0571] [565] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 분자 모이어티는 A1 단편 영역의 카복시-말단을 입체적으로 덮는다. 일부 실시예에서, 분자 모이어티는 결합 영역을 포함한다.

[0572] [566] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 분자는 시가 독소 A1 단편 영역의 카복시-말단에 대한 카복시-말단에 위치한 결합 영역 및/또는 분자 모이어티를 포함한다. 일부 실시예에서, 결합 영역 및/또는 분자 모이어티의 질량은 적어도 4.5kDa, 6,kDa, 9kDa, 12kDa, 15kDa, 20kDa, 25kDa, 28kDa, 30kDa, 41kDa, 50kDa, 100kDa 이상이다.

[0573] [567] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 본 명세서에 언급된 적절한 수준의 시가 독소 생물학적 활성(예: 세포독성 및/또는 세포 내 라우팅)을 유지하는 한, 결합 분자는 적어도 4.5kDa, 6,kDa, 9kDa, 12kDa, 15kDa, 20kDa, 25kDa, 28kDa, 30kDa, 41kDa, 50kDa, 100kDa 이상의 질량을 갖는 결합 영역을 포함한다.

[0574] [568] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 영역은, 결합 분자가 본 명세서에 언급된 적절한 수준의 시가 독소 생물학적 활성을 유지하는 한, 예를 들어, 적어도 4.5kDa, 6,kDa, 9kDa, 12kDa, 15kDa, 20kDa, 25kDa, 28kDa, 30kDa, 41kDa, 50kDa, 100kDa 이상의 질량을 갖는 분자 모이어티를 포함하는 비교적 큰 분자 모이어티 내에 포함된다.

[0575] [569] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 아미노-말단은 결합 분자의 폴리펩티드 성분의 아미노-말단에 및/또는 이에 근접한다. 일부 실시예에서, 결합 영역은 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 비해 결합 분자의 아미노-말단에 근접하게 위치하지 않는다. 일부 실시예에서, 결합 영역 및 시가 독소 효과기 폴리펩티드는, 결합 영역이 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 아미노-말단에 근접하게 위치하지 않도록 결합 분자 내에서 물리적으로 배열되거나 배향된다. 일부 실시예에서, 결합 영역은 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 아미노-말단보다 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 카복시-말단에 더 근접한 결합 분자 내에 위치한다. 일부 실시예의 경우, 결합 분자는, 세포에 도입될 때, 아미노-말단을 갖고 결합 영역 및 제3 결합 분자의 아미노-말단에 또는 그 아미노-말단에 근접하지 않은 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하는 제3 결합 분자의 세포독성보다 더 큰 세포독성을 나타낼 수 있다. 일부 실시예의 경우, 결합 분자는 제3 결합 분자의 세포독성과 비교하여 예를 들어, 4배, 5배, 6배, 9배 또는 더 큰 세포독성과 같은 더 최적화된 세포독성 효능을 갖는 세포독성을 나타낸다. 일부 실시예의 경우, 표적 양성 세포의 집단에 대한 결합 분자의 세포독성은 CD_{50} 값에 의해 분석된 표적 양성 제2 세포 집단에 대한 제3 결합 분자의 세포독성보다 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배 이상 더 크다. 일부 실시예에서, 제3 결합 분자는 KDEL 패밀리의 임의의 카복시-말단, 소포체 보유/회수 신호 모티프를 포함하지 않는다(SEQ ID NO: 205-252 참조).

[0576] [570] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 아미노-말단은 결합 분자의 폴리펩티드 성분의 아미노-말단에 및/또는 이에 근접한다. 일부 실시예에서, 결합 영역은 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 비해 결합 분자의 아미노-말단에 근접하게 위치하지 않는다. 일부 실시예에서, 결합 영역 및 시가 독소 효과기 폴리펩티드는, 결합 영역이 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 아미노-말단에 근접하게 위치하지 않도록, 결합 분자 내에서 물리적으로 배열되거나 배향된다. 일부 실시예에서, 결합 영역은 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 아미노-말단보다 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 카복시-말단에 더 근접한 결합 분자 내에 위치한다. 일부 실시예의 경우, 결합 분자는 세포독성이 없고, 세포에 도입될 때, 아미노-말단을 갖고 결합 영역 및 제3 결합 분자의 아미노-말단에 또는 그 아미노-말단에 근접하지 않은 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하는 제3 결합 분자의 세포독성과 비교하여 세포 외 공간으로부터 소포체 및/또는 세포질의 세포 이하 구획까지의 더 큰 세포 내 라우팅 효율을 나타낼 수 있다. 일부 실시예에서, 제3 결합 분자는 KDEL 패밀리의 임의의 카복시-말단, 소포체 보유/회수 신호 모티프를 포함하지 않는다(SEQ ID NO: 205-252 참조).

[0577] [571] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 아미노-말단은 결합 분자의 폴리펩티드 성분의 아미노-말단에 및/또는 이에 근접한다. 일부 실시예에서, 결합 영역은 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 비해 결합 분자의 아미노-말단에 근접하게 위치하지 않는다. 일부 실시예에서, 결합 영역 및 시가 독소 효과기 폴리펩티드는, 결합 영역이 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 아미노-말단에 근접하게 위치하지 않도록, 결합 분자 내에서 물리적으로 배열되거나 배향된다. 일부 실시예에서, 결합 영역은 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 아미노-말단보다 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 카복시-말단에 더 근접한 결합 분자 내에 위치한다. 일부 실시

예에서, 결합 분자는 낮은 세포독성 효능을 나타내고(즉, 1000nM, 500nM, 100nM, 75nM, 또는 50nM의 결합 분자 농도에서 세포 집단의 1% 세포 사멸보다 큰 세포독성을 나타내는 특정 양성 표적 세포 유형에 도입될 때 불가능하다), 세포에 도입될 때, 아미노-말단을 갖고 결합 영역 및 제3 결합 분자의 아미노-말단에 또는 그 아미노-말단에 근접하지 않은 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하는 제3 결합 분자의 세포독성과 비교하여 세포 외 공간으로부터 소포체 및/또는 세포질의 세포 이하 구획까지의 더 큰 세포 내 라우팅 효율을 나타낼 수 있다. 일부 실시예에서, 제3 결합 분자는 KDEL 패밀리의 임의의 카복시-말단, 소포체 보유/회수 신호 모티프를 포함하지 않는다(SEQ ID NO: 205-252 참조).

[0578] [572] 실시예 세트 #1의 일부 실시예에서, 결합 분자 또는 이의 폴리펩티드 성분은, KDEL 패밀리의 구성원의 카복시-말단, 소포체 보유/회수 신호 모티프를 포함한다. 일부 실시예의 경우, 카복시-말단 소포체 보유/회수 신호 모티프는 KDEL(SEQ ID NO: 205), HDEF(SEQ ID NO: 206), HDEL(SEQ ID NO: 207), RDEF(SEQ ID NO: 208), RDEL(SEQ ID NO: 209), WDEL(SEQ ID NO: 210), YDEL(SEQ ID NO: 211), HEEF(SEQ ID NO: 212), HEEL(SEQ ID NO: 213), KEEL(SEQ ID NO: 214), REEL(SEQ ID NO: 215), KAEL(SEQ ID NO: 216), KCEL(SEQ ID NO: 217), KFEL(SEQ ID NO: 218), KGEL(SEQ ID NO: 219), KHEL(SEQ ID NO: 220), KLEL(SEQ ID NO: 221), KNEL(SEQ ID NO: 222), KQEL(SEQ ID NO: 223), KREL(SEQ ID NO: 224), KSEL(SEQ ID NO: 225), KVEL(SEQ ID NO: 226), KWEL(SEQ ID NO: 227), KYEL(SEQ ID NO: 228), KEDL(SEQ ID NO: 229), KIEL(SEQ ID NO: 230), DKEL(SEQ ID NO: 231), FDEL(SEQ ID NO: 232), KDEF(SEQ ID NO: 233), KKEL(SEQ ID NO: 234), HADL(SEQ ID NO: 235), HAEL(SEQ ID NO: 236), HIEL(SEQ ID NO: 237), HNEL(SEQ ID NO: 238), HTEL(SEQ ID NO: 239), KTEL(SEQ ID NO: 240), HVEL(SEQ ID NO: 241), NDEL(SEQ ID NO: 242), QDEL(SEQ ID NO: 243), REDL(SEQ ID NO: 244), RNEL(SEQ ID NO: 245), RTDL(SEQ ID NO: 246), RTEL(SEQ ID NO: 247), SDEL(SEQ ID NO: 248), TDEL(SEQ ID NO: 249), SKEL(SEQ ID NO: 250), STEL(SEQ ID NO: 251), 및 EDEL(SEQ ID NO: 252)로 구성된 군에서 선택된다. 일부 실시예에서, 결합 분자는, 세포에 도입될 때, KDEL 패밀리의 카복시-말단, 소포체 보유/회수 신호 모티프를 포함하지 않는 것을 제외하고는 결합 분자로 구성된 제4 결합 분자의 세포독성보다 더 큰 세포독성을 나타낼 수 있다(SEQ ID NO: 205-252 참조). 일부 실시예에서, 결합 분자는, 예를 들어 제4 결합 분자와 같은, 참조 분자와 비교하여 예를 들어, 4배, 5배, 6배, 9배 또는 더 큰 세포독성과 같은 더 최적화된 세포독성 효능을 갖는 세포독성을 나타낼 수 있다. 일부 실시예에서, 표적 양성 세포의 집단에 대한 결합 분자의 세포독성은 CD_{50} 값에 의해 분석된 바와 같이 표적 양성 제2 세포 집단에 대한 제4 결합 분자의 세포독성보다 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배 또는 더 크다.

[0579] 실시예 세트 #2 - (i) 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프 및 (ii) 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하는 결합 분자

[0580] [573] 또한 (i) 세포 외 표적 생체분자(PD-L1)에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 영역; (ii) 삽입되거나 내장된 이종 에피토프를 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드; 및 (iii) 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함하는 결합 분자가 본 명세서에 제공된다. 일부 실시예에서, 세포-결합 분자는 (i) 세포 외 표적 생체분자에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 영역; (ii) (a) 삽입되거나 내장된 이종 에피토프; (b) 카복시 말단을 갖는 시가 독소 A1 단편 유래 영역; 및 (c) A1 단편 영역의 카복시-말단에서 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함하는 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예의 경우, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는, 예를 들어 폴리펩티드가 존재하는 세포의 소포체 및/또는 세포질로 세포 내 라우팅을 지시하고, 리보솜 기능을 억제하고, 리보솜을 효소적으로 비활성화하고, 세포성색전을 야기하고/하거나 세포독성을 야기하는 것과 같은, 적어도 하나의 시가 독소 효과기 기능을 나타낼 수 있다. 일부 실시예에서, 이종 T-세포 에피토프는, 예를 들어 인간 면역계와 관련하여, CD8+ T-세포 에피토프이다. 일부 실시예에서, 이종 T-세포 에피토프는 세포의 MHC 클래스 I 분자에 의해 제시될 수 있다. 일부 실시예에서, 세포-결합 분자는 다음 중 하나 이상을 할 수 있다: 세포에 진입, 리보솜 기능을 억제, 세포성색전을 유발, 세포 사멸을 유발, 및/또는 세포 표면 상의 제시를 위해 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프를 MHC 클래스 I 분자에 전달. 일부 실시예에서, 결합 분자는, 세포에 도입될 때, 참조 분자와 유사하거나 보다 우수한 세포독성을 나타낼 수 있고, 예를 들어 그의 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분 모두를 제외하고 결합 분자로 구성된 제2 결합 분자는 A1 단편 영역의 카복시 말단에 야생형 시가 독소 퓨린-절단 부위를 포함한다.

[0581] [574] 실시예 세트 #2의 일부 실시예에서, 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프는 (i) SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1-15; SEQ ID NO:3의 3-14; SEQ ID NO:3의 26-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 27-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 39-48; SEQ ID NO:3의 42-48; 및 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 53-66, 또는 시가 독소 A 서브유닛 또는 이의 유도체의 등가 영역; (ii) SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ

ID NO:3의 94-115; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141-153; SEQ ID NO:3의 140-156; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 179-190; SEQ ID NO:3의 179-191; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; 및 SEQ ID NO:3의 210-218; 및 (iii) SEQ ID NO:3의 240-260; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 243-257; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 254-268; SEQ ID NO:3의 262-278; SEQ ID NO:3의 281-297; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 285-293, 또는 시가 독소 A 서브유닛 또는 이의 유도체의 등가 영역으로 구성된 천연적으로 위치한 시가 독소 A 서브유닛 영역 군에서 선택된 내인성 B-세포 및/또는 T-세포 에피토프 영역을 파괴한다.

[0582] [575] 실시예 세트 #2의 일부 실시예에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는, 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해, 하나 이상의 돌연변이를 포함하고, 돌연변이는 시가-유사 독소 1(SEQ ID NO:1) 또는 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 A 서브유닛의 248-251, 또는 시가-유사 독소(SEQ ID NO:3)의 A 서브유닛의 247-250에 천역적으로 위치한 영역; 또는 시가 독소 A 서브유닛 또는 이의 유도체의 등가 영역에서 최소한 하나의 아미노산 잔기를 변경한다. 일부 실시예에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는, 퓨린-절단 모티프의 최소 퓨린 절단 부위에서, 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해, 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시예에서, 최소 퓨린 절단 부위는 공통 아미노산 서열 R/Y-x-x-R 및/또는 R-x-x-R로 표시된다.

[0583] [576] 실시예 세트 #2의 일부 실시예에서, 결합 분자는 시가 독소 A1 단편 영역의 카복시-말단에 대한 카복시-말단에 위치한 분자 모이어티를 포함한다.

[0584] [577] 실시예 세트 #2의 일부 실시예에서, 결합 영역은 A1 단편 영역의 카복시-말단을 입체적으로 덮는다.

[0585] [578] 실시예 세트 #2의 일부 실시예에서, 분자 모이어티는 A1 단편 영역의 카복시-말단을 입체적으로 덮는다. 일부 실시예에서, 분자 모이어티는 결합 영역을 포함한다.

[0586] [579] 실시예 세트 #2의 일부 실시예에서, 결합 분자는 시가 독소 A1 단편 영역의 카복시-말단에 대한 카복시-말단에 위치한 결합 영역 및/또는 분자 모이어티를 포함한다. 일부 실시예에서, 결합 영역 및/또는 분자 모이어티의 질량은 적어도 4.5kDa, 6,kDa, 9kDa, 12kDa, 15kDa, 20kDa, 25kDa, 28kDa, 30kDa, 41kDa, 50kDa, 100kDa 이상이다.

[0587] [580] 실시예 세트 #2의 일부 실시예에서, 결합 분자가 본 명세서에 언급된 적절한 수준의 시가 독소 생물학적 활성(예: 세포독성 및/또는 세포 내 라우팅)을 유지하는 한, 결합 분자는 질량이 적어도 4.5kDa, 6,kDa, 9kDa, 12kDa, 15kDa, 20kDa, 25kDa, 28kDa, 30kDa, 41kDa, 50kDa, 100kDa 이상인 결합 영역을 포함한다.

[0588] [581] 실시예 세트 #2의 일부 실시예에서, 결합 분자가 본 명세서에 언급된 적절한 수준의 시가 독소 생물학적 활성을 유지하는 한, 결합 분자는 예를 들어 질량이 적어도 4.5kDa, 6,kDa, 9kDa, 12kDa, 15kDa, 20kDa, 25kDa, 28kDa, 30kDa, 41kDa, 50kDa, 100kDa 이상인 분자 모이어티를 포함하는 비교적 큰 분자 모이어티 내에 포함된다.

[0589] [582] 실시예 세트 #2의 일부 실시예에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해 퓨린-절단 모티프에서 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 일부 실시예에서, 퓨린-절단 모티프에서 아미노산 잔기의 치환은, 알라닌, 글리신, 프롤린, 세린, 트레오닌, 아스파르테이트, 아스파라긴, 글루타메이트, 글루타민, 시스테인, 이소류신, 류신, 메티오닌, 발린, 페닐알라닌, 트립토판, 및 티로신으로 구성된 군으로부터 선택되는 비-양전하를 띤 아미노산 잔기로 아르기닌 잔기로 치환된다. 일부 실시예에서, 퓨린-절단 모티프에서 아미노산 잔기의 치환은 아르기닌 잔기의 히스티딘으로의 치환이다.

[0590] [583] 실시예 세트 #2의 일부 실시예에서, 결합 분자는, 세포에 도입될 때, A1 단편 영역의 카복시 말단에서 야생형 시가 독소 A1 단편 및/또는 야생형 시가 독소 퓨린-절단 부위를 포함하는 그의 모든 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분(들) 각각을 제외하고 결합 분자로 구성된 제2 결합 분자의 세포독성과 유사한 세포독성을 나타낼 수 있다. 일부 실시예에서, 결합 분자는, 세포에 도입될 때, 제2 결합 분자에 의해 나타나는 세포독성의 0.1배, 0.5배, 또는 0.75배 내지 1.2배, 1.5배, 1.75배, 2배, 3배, 4배, 또는 5배 범위의 세포독성을 나타낼 수 있다.

[0591] [584] 실시예 세트 #2의 일부 실시예에서, 결합 분자는, 척삭에 도입될 때, 제2 결합 분자의 생체 내 내약성과 비교하여 개선된 생체 내 내약성을 나타낼 수 있다.

[0592] [585] 실시예 세트 #2의 일부 실시예에서, 결합 분자는 내장되거나 삽입된 이종 에피토프로 인해 탈-면역화된다. 일부 실시예에서, 결합 분자는, 참조 분자, 예를 들어 세포 결합 분자에 존재하는 하나 이상의 내장되거나 삽입된 에피토프가 결여되어 있는 것을 제외하고는 결합 분자로 구성된 제3 세포-결합 분자와 같은 참조 분자와 비교하여 더 적은 상대적 항원성 및/또는 상대적 면역원성을 나타낼 수 있다.

[0593] [586] 실시예 세트 #2의 일부 실시예에서, 결합 분자는 퓨린-절단 모티프 파괴로 인해 탈-면역화된다. 일부 실시예에서, 결합 분자는 퓨린-절단 모티프가 야생형이고/이거나 모든 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분이 야생형 시가 독소 A1 단편으로 구성되는 것을 제외하고 결합 분자로 구성된 제4 세포-결합 분자와 비교하여 더 적은 상대적 항원성 및/또는 상대적 면역원성을 나타낼 수 있다.

[0594] 실시예 세트 #3 - 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함하는 탈-면역된 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하는 결합 분자

[0595] [587] 또한 각각이 (i) 세포 외 표적 생체분자(PD-L1)에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 영역 및 (ii) 파괴된 퓨린-절단 모티프를 포함하는 탈-면역된 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하는 결합 분자가 본 명세서에 제공된다. 일부 실시예에서, 결합 분자는 (i) 세포 외 표적 생체분자에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 영역 및 (ii) (a) 카복시 말단을 갖는 시가 독소 A1 단편 유래 영역, (b) A1 단편 영역의 카복시-말단에서 파괴된 퓨린-절단 모티프, 및 (c) 적어도 하나의 파괴된, 내인성, B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 에피토프 및/또는 에피토프 영역을 포함하는 탈-면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예의 경우, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는, 예를 들어 폴리펩티드가 존재하는 세포의 소포체 및/또는 세포질로 세포 내 라우팅을 지시하고, 리보솜 기능을 억제하고, 리보솜을 효소적으로 비활성화하고, 세포성색전을 유발하고/하거나, 세포독성을 유발하는 것과 같은, 적어도 하나의 시가 독소 효과기 기능을 나타낼 수 있다. 일부 실시예에서, 결합 분자는 다음 중 하나 이상을 할 수 있다: 세포에 진입, 리보솜 기능을 억제, 세포성색전을 유발, 세포 사멸을 유발. 일부 실시예에서, 결합 분자는, 세포에 도입될 때, 참조 분자와 유사하거나 보다 우수한 세포독성을 나타낼 수 있고, 예를 들어 그의 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분 모두를 제외하고 결합 분자로 구성된 제2 결합 분자는 A1 단편 영역의 카복시 말단에 야생형 시가 독소 퓨린-절단 부위를 포함한다.

[0596] [588] 실시예 세트 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1-15; SEQ ID NO:3의 3-14; SEQ ID NO:3의 26-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 27-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 39-48; SEQ ID NO:3의 42-48; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 53-66; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94-115; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141-153; SEQ ID NO:3의 140-156; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 179-190; SEQ ID NO:3의 179-191; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205, 및 SEQ ID NO:3의 210-218; SEQ ID NO:3의 240-260; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 243-257; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 254-268; SEQ ID NO:3의 262-278; SEQ ID NO:3의 281-297; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 285-293; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 4-33; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 34-78; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 77-103; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 128-168; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 160-183; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 236-258; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 274-293; 또는 시가 독소 A 서브유닛 또는 이의 유도체의 등가 영역으로 구성된 천연적으로 위치하는 시가 독소 A 서브유닛 영역의 군으로부터 선택된 B-세포 및/또는 T-세포 에피토프 영역에서, 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해, 돌연변이를 포함한다. 일부 실시예에서, 적어도 하나의 파괴된 내인성 B-세포 및/또는 T-세포 에피토프 및/또는 에피토프 영역의 일부 또는 전부와 중첩되는 아미노산 잔기의 카복시-말단 절단인 파괴는 존재하지 않는다.

[0597] [589] 실시예 세트 #3의 일부 실시예에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는, 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해, 하나 이상의 돌연변이를 포함하고, 돌연변이는 시가-유사 독소 1(SEQ ID NO:1) 또는 시가 독소(SEQ ID NO:2)의 A 서브유닛의 248-251, 또는 시가-유사 독소(SEQ ID NO:3)의 A 서브유닛의 247-250; 또는 시가 독소 A 서브유닛 또는 이의 유도체의 등가 영역에 천연적으로 위치하는 영역에서 적어도 하나의 아미노산 잔기를 변경한다. 일부 실시예에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는, 퓨린-절단 모티프의 최소 퓨린 절단 부위에서, 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해, 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시예에서, 최소 퓨린 절단 부위는 공통 아미노산 서열 R/Y-x-x-R 및/또는 R-x-x-R로 표시된다.

[0598] [590] 실시예 세트 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자는 시가 독소 A1 단편 영역의 카복시-말단에 대한 카복시-말단에 위치한 분자 모이어티를 포함한다.

[0599] [591] 실시예 세트 #3의 일부 실시예에서, 결합 영역은 A1 단편 영역의 카복시-말단을 입체적으로 덮는다.

[0600] [592] 실시예 세트 #3의 일부 실시예에서, 분자 모이어티는 A1 단편 영역의 카복시-말단을 입체적으로 덮는다. 일부 실시예에서, 분자 모이어티는 결합 영역을 포함한다.

[0601] [593] 실시예 세트 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자는 시가 독소 A1 단편 영역의 카복시-말단에 대한 카복시-

말단에 위치한 결합 영역 및/또는 분자 모이어티를 포함한다. 일부 실시예에서, 결합 영역 및/또는 분자 모이어티의 질량은 적어도 4.5kDa, 6,kDa, 9kDa, 12kDa, 15kDa, 20kDa, 25kDa, 28kDa, 30kDa, 41kDa, 50kDa, 100kDa 이상이다.

[0602] [594] 실시예 세트 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자가 본 명세서에 언급된 적절한 수준의 시가 독소 생물학적 활성(예: 세포독성 및/또는 세포 내 라우팅)을 유지하는 한, 결합 분자는 적어도 4.5kDa, 6,kDa, 9kDa, 12kDa, 15kDa, 20kDa, 25kDa, 28kDa, 30kDa, 41kDa, 50kDa, 100kDa 이상의 질량을 갖는 결합 영역을 포함한다.

[0603] [595] 실시예 세트 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자가 본 명세서에 언급된 적절한 수준의 시가 독소 생물학적 활성을 유지하는 한, 결합 영역은, 예를 들어 적어도 4.5kDa, 6,kDa, 9kDa, 12kDa, 15kDa, 20kDa, 25kDa, 28kDa, 30kDa, 41kDa, 50kDa, 100kDa, 또는 그 이상의 질량을 갖는 분자 모이어티를 포함하는 비교적 큰 분자 모이어티 내에 포함된다.

[0604] [596] 실시예 세트 #3의 일부 실시예에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해 퓨린-절단 모티프에서 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 일부 실시예에서, 퓨린-절단 모티프에서 아미노산 잔기의 치환은, 알라닌, 글리신, 프롤린, 세린, 트레오닌, 아스파르테이트, 아스파라긴, 글루타메이트, 글루타민, 시스테인, 이소류신, 류신, 메티오닌, 발린, 페닐알라닌, 트립토판, 및 티로신으로 구성된 군으로부터 선택되는 비-양전하를 띤 아미노산 잔기로 아르기닌 잔기로 치환된다. 일부 실시예에서, 퓨린-절단 모티프에서 아미노산 잔기의 치환은 아르기닌 잔기의 히스티딘으로의 치환이다.

[0605] [597] 실시예 세트 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자는, 세포에 도입될 때, 참조 분자의 세포독성과 유사한 세포독성을 나타낼 수 있고, 예를 들어 그의 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분(들) 모두를 제외하고 결합 분자로 구성된 제5 결합 분자 각각은 그의 A1 단편 영역의 카복시 말단에서 야생형 시가 독소 A1 단편 및/또는 야생형 시가 독소 퓨린-절단 부위를 포함한다. 일부 실시예에서, 결합 분자는, 세포에 도입될 때, 제5 결합 분자가 나타내는 세포독성의 0.1배, 0.5배, 또는 0.75배 내지 1.2배, 1.5배, 1.75배, 2배, 3배, 4배, 또는 5배 범위인 세포독성을 나타낼 수 있다.

[0606] [598] 실시예 세트 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자는, 척삭에 도입될 때, 제5 결합 분자의 생체 내 내약성과 비교하여 개선된 생체 내 내약성을 나타낼 수 있다.

[0607] [599] 실시예 세트 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자는 퓨린-절단 모티프 파괴로 인해 탈-면역화된다. 일부 실시예에서, 결합 분자는, 퓨린-절단 모티프가 야생형이고/이거나 모든 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분이 야생형 시가 독소 A1 단편, 예를 들어 제5 결합 분자로 구성되는 것을 제외하고 결합 분자로 구성된 참조 결합 분자와 비교하여 더 적은 상대적 항원성 및/또는 상대적 면역원성을 나타낼 수 있다.

[0608] 실시예 세트 #1-#3의 추가 실시예

[0609] [600] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 예를 들어, 당업자에게 공지된 링커를 통해, 직접적으로 또는 간접적으로, 결합 영역에 융합된다.

[0610] [601] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자는 시가 독소 A1 단편 영역의 카복시-말단에 대한 카복시-말단에 위치한 분자 모이어티를 포함한다.

[0611] [602] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 카복시 말단을 갖는 시가 독소 A1 단편 유래 영역을 갖고 A1 단편 영역의 카복시-말단에 파괴된 퓨린-절단 모티프를 추가로 포함한다.

[0612] [603] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자, 또는 그의 폴리펩티드 성분은 KDEL 패밀리의 구성원의 카복시-말단, 소포체 보유/회수 신호 모티프를 포함한다. 일부 실시예의 경우, 카복시-말단 소포체 보유/회수 신호 모티프는, KDEL(SEQ ID NO: 205), HDEF(SEQ ID NO: 206), HDEL(SEQ ID NO: 207), RDEF(SEQ ID NO: 208), RDEL(SEQ ID NO: 209), WDEL(SEQ ID NO: 210), YDEL(SEQ ID NO: 211), HEEF(SEQ ID NO: 212), HEEL(SEQ ID NO: 213), KEEL(SEQ ID NO: 214), REEL(SEQ ID NO: 215), KAEL(SEQ ID NO: 216), KCEL(SEQ ID NO: 217), KFEL(SEQ ID NO: 218), KGEL(SEQ ID NO: 219), KHEL(SEQ ID NO: 220), KLEL(SEQ ID NO: 221), KNEL(SEQ ID NO: 222), KQEL(SEQ ID NO: 223), KREL(SEQ ID NO: 224), KSEL(SEQ ID NO: 225), KVEL(SEQ ID NO: 226), KWEL(SEQ ID NO: 227), KYEL(SEQ ID NO: 228), KEDL(SEQ ID NO: 229), KIEL(SEQ ID NO: 230), DKEL(SEQ ID NO: 231), FDEL(SEQ ID NO: 232), KDEF(SEQ ID NO: 233), KKEL(SEQ ID NO: 234), HADL(SEQ ID NO: 235), HAEL(SEQ ID NO: 236), HIEL(SEQ ID NO: 237), HNEL(SEQ ID NO: 238), HTEL(SEQ ID NO: 239), KTEL(SEQ ID NO: 240), HVEL(SEQ ID NO: 241), NDEL(SEQ ID NO: 242), QDEL(SEQ ID NO: 243), REDL(SEQ ID NO: 244),

RNEL(SEQ ID NO: 245), RTDL(SEQ ID NO: 246), RTEL(SEQ ID NO: 247), SDEL(SEQ ID NO: 248), TDEL(SEQ ID NO: 249), SKEL(SEQ ID NO: 250), STEL(SEQ ID NO: 251), 및 EDEL(SEQ ID NO: 252)로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 결합 분자는, 세포에 도입될 때, 예를 들어 KDEL 패밀리의 임의의 카복시-말단, 소포체 보유/회수 신호 모티프를 포함하지 않는 것을 제외하고 결합 분자로 구성된 제6 결합 분자와 같은 참조 분자의 세포독성보다 더 큰 세포독성을 나타낼 수 있다(SEQ ID NO: 205-252 참조). 일부 실시예에서, 결합 분자는, 예를 들어 제6 결합 분자와 같은, 참조 분자와 비교하여 예를 들어, 4배, 5배, 6배, 9배, 또는 더 큰 세포독성과 같은 더 최적화된 세포독성 효능을 갖는 세포독성을 나타낼 수 있다. 일부 실시예에서, 표적 양성 세포의 집단에 대한 결합 분자의 세포독성은 CD_{50} 값에 의해 분석된 바와 같이 표적 양성 제2 세포 집단에 대한 제6 결합 분자의 세포독성보다 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 또는 더 크다.

[0613] [604] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 적어도 하나의 삽입되거나 내장된 이종 에피토프를 추가로 포함한다.

[0614] [605] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 적어도 1, 2, 또는 3개의 파괴된 내인성 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 에피토프 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 적어도 1, 2, 또는 3개의 내인성, B-세포 및/또는 T-세포 에피토프 및/또는 에피토프 영역의 파괴를 포함한다. 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 적어도 하나의 삽입되거나 내장된 이종 에피토프와 중첩되지 않는 적어도 하나의 파괴된 내인성 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 에피토프 영역을 추가로 포함한다.

[0615] [606] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 아미노-말단은 결합 분자의 폴리펩티드 성분의 아미노-말단에 및/또는 이에 근접한다. 일부 실시예에서, 결합 영역은 시가 독소 효과기 폴리펩티드에 비해 결합 분자의 아미노 말단에 근접하게 위치하지 않는다. 일부 실시예에서, 결합 영역 및 시가 독소 효과기 폴리펩티드는, 결합 영역이 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 아미노-말단에 근접하게 위치하지 않도록, 결합 분자 내에서 물리적으로 배열되거나 배향된다. 일부 실시예에서, 결합 영역은 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 아미노-말단보다 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 카복시-말단에 더 근접한 결합 분자 내에 위치한다. 일부 실시예의 경우, 결합 분자는 세포독성이 없고, 세포에 도입될 때, 참조 분자, 예를 들어 아미노-말단을 갖고 결합 영역 및 아미노-말단에 또는 아미노-말단에 근접하지 않은 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하는 제7 결합 분자의 세포독성과 비교하여 소포체 및/또는 세포질의 세포 외 공간에서 세포 이하 구획까지 더 큰 세포 이하 라우팅 효율을 나타낼 수 있다. 일부 실시예의 경우, 결합 분자는 제7 결합 분자의 세포독성과 비교하여 예를 들어 4배, 5배, 6배, 9배, 또는 더 큰 세포독성과 같이, 더 최적화된 세포독성 효능을 갖는 세포독성을 나타낸다. 일부 실시예에서, 표적 양성 세포의 집단에 대한 결합 분자의 세포독성은 CD_{50} 값에 의해 분석된 바와 같이 표적 양성 제2 세포 집단에 대한 제7 결합 분자의 세포독성보다 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 또는 더 크다. 일부 실시예에서, 제7 세포-결합 분자는 KDEL 패밀리의 카복시-말단, 소포체 보유/회수 신호 모티프를 포함하지 않는다(SEQ ID NO: 205-252 참조).

[0616] [607] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1-15; SEQ ID NO:3의 3-14; SEQ ID NO:3의 26-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 27-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 39-48; SEQ ID NO:3의 42-48; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 53-66; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94-115; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141-153; SEQ ID NO:3의 140-156; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 179-190; SEQ ID NO:3의 179-191; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205, 및 SEQ ID NO:3의 210-218; SEQ ID NO:3의 240-260; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 243-257; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 254-268; SEQ ID NO:3의 262-278; SEQ ID NO:3의 281-297; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 285-293; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 4-33; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 34-78; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 77-103; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 128-168; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 160-183; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 236-258; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 274-293; 또는 시가 독소 A 서브유닛 또는 이의 유도체의 등가 영역으로 구성된 천연적으로 위치한 시가 독소 A 서브유닛 영역의 군에서 선택되는 B-세포 및/또는 T-세포 에피토프 영역의 파괴를 추가로 포함한다.

[0617] [608] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는, 천연적으로 위치한 시가 독소 A 서브유닛 아미노산 잔기 L49, D197, D198, R204, 및 R205의 군으로부터 선택된 B-세포 면역원성 아미노산 잔기에서, 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해, 돌연변이를 추가로 포함한다.

[0618] [609] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프가 내인성을 파괴하는 경우, B-세포 및/또는 T-세포 에피토프 영역은, (i) SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1-15; SEQ ID NO:3의 3-14; SEQ ID NO:3의 26-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 27-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 39-48; SEQ ID NO:3의 42-48; 및 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3; 53-66; 또는 시가 독소 A 서브유닛 또는 이의 유도체의 등가 영역으로 구성된 천연 위치 시가 독소 A 서브유닛 영역의 군에서 선택되고, 여기서 적어도 하나의 파괴된 에피토프 영역 (ii) SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94-115; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141-153; SEQ ID NO:3의 140-156; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 179-190; SEQ ID NO:3의 179-191; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; 및 SEQ ID NO:3의 210-218; 및 (iii) SEQ ID NO:3의 240-260; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 243-257; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 254-268; SEQ ID NO:3의 262-278; SEQ ID NO:3의 281-297; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 285-293; 또는 시가 독소 A 서브유닛 또는 이의 유도체의 등가 영역의 일부 또는 전부와 중첩되는 서열의 아미노-말단 절단인 파괴가 없다.

[0619] [610] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 (i) SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1-15; SEQ ID NO:3의 3-14; SEQ ID NO:3의 26-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 27-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 39-48; SEQ ID NO:3의 42-48; 및 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 53-66으로 구성된 천연 위치 시가 독소 A 서브유닛 영역의 군에서 선택되는 B-세포 및/또는 T-세포 영역, 또는 시가 독소 A 서브유닛 또는 이의 유도체의 등가 영역에서, 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 대한 돌연변이를 포함하고, 여기서 적어도 하나의 파괴된 에피토프 영역 (ii) SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94-115; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141-153; SEQ ID NO:3의 140-156; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 179-190; SEQ ID NO:3의 179-191; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; 및 SEQ ID NO:3의 210-218; 및 (iii) SEQ ID NO:3의 240-260; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 243-257; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 254-268; SEQ ID NO:3의 262-278; SEQ ID NO:3의 281-297; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 285-293, 또는 시가 독소 A 서브유닛 또는 그 유도체의 등가 영역의 일부 또는 전부와 중첩되는 서열의 아미노-말단 절단인 파괴가 없거나, 적어도 하나의 파괴된 에피토프 영역의 일부 또는 전부와 중첩되는 서열의 아미노-말단 절단인 파괴가 존재하지 않는다.

[0620] [611] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94-115; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141-153; SEQ ID NO:3의 140-156; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 179-190; SEQ ID NO:3의 179-191; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; 또는 SEQ ID NO:3의 210-218로 구성된 천연 위치 시가 독소 A 서브유닛의 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 내인성 에피토프 영역의 파괴를 포함한다.

[0621] [612] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 적어도 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 또는 그 이상의 내인성 B-세포 및/또는 T-세포 에피토프 영역의 파괴를 포함한다.

[0622] [613] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 하나 이상의 파괴는 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 대한 아미노산 잔기 치환을 포함한다.

[0623] [614] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 하나 이상의 내인성, B-세포 및/또는 T-세포 에피토프 영역은 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해 복수의 아미노산 잔기 치환을 포함한다.

[0624] [615] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 적어도 1, 2, 3, 또는 4개의 파괴는 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해 내인성, B-세포 및/또는 T-세포 에피토프 영역에서 복수의 아미노산 잔기 치환을 포함한다.

[0625] [616] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 적어도 하나의 파괴는 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 대한 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 그 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함하고, 선택적으로 여기서 적어도 하나의 치환은 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 4; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 6; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 8; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 9; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 11; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 12; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 33; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 43; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 44; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 45; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 46; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 47; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 48; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 49; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 50; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 51번; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 53; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 54; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 55번; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 56; SEQ ID NO:1,

SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 57; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 58; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 59; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 60; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 61; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 62; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 84; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 88; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 96; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 104; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 105; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 107; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 108; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 109; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 110; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 111; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 112; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 141; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 147; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 154; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 179; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 180; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 181; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 183; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 184; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 185; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 186; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 187; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 188; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 189; SEQ ID NO:3의 197; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 198; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 247; SEQ ID NO:3의 247; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 248; SEQ ID NO:3의 250; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 251; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 264; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 265; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 286로 구성된 군으로부터 선택된 천연 위치 시가 독소 A 서브유닛 아미노산 잔기, 또는 시가 독소 A 서브유닛 또는 이의 유도체의 등가 아미노산 잔기에서 발생한다. 일부 실시예에서, 적어도 2개의 파괴 각각은, SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 4; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 8; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 9; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 11; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 33; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 43; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 45; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 47; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 48; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 49; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 53; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 55; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 58; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 59; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 60; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 61; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 62; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 96; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 109; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 110; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 112; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 147; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 179; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 180; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 181; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 183; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 184; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 185; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 186; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 187; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 188; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 189; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 247; SEQ ID NO:3의 247; SEQ ID NO:3의 250; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 264; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 265; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 286으로 구성된 군으로부터 선택된 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 대해 적어도 1개의 아미노산 잔기 치환, 또는 시가 독소 A 서브유닛 또는 이의 유도체의 등가 아미노산 잔기를 포함한다.

[0626] [617] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 (i) SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 1-15; SEQ ID NO:3의 3-14; SEQ ID NO:3의 26-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 27-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 39-48; SEQ ID NO:3의 42-48; 및 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 또는 SEQ ID NO:3의 53-66, 또는 시가 독소 A 서브유닛 또는 이의 유도체의 등가 영역(여기서 적어도 하나의 파괴된 내인성 B-세포 및/또는 T-세포 에피토프 영역의 일부 또는 전부와 중첩되는 아미노산 잔기의 아미노-말단 절단인 파괴가 없음); (ii) SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 94-115; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 141-153; SEQ ID NO:3의 140-156; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 179-190; SEQ ID NO:3의 179-191; SEQ ID NO:3의 204; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 205; 및 SEQ ID NO:3의 210-218; 및 (iii) SEQ ID NO:3의 240-260; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 243-257; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 254-268; SEQ ID NO:3의 262-278; SEQ ID NO:3의 281-297; 및 SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 285-293; 또는 시가 독소 A 서브유닛 또는 이의 유도체의 등가 영역(여기서 적어도 하나의 파괴된 내인성 B-세포 및/또는 T-세포 에피토프 및/또는 에피토프 영역의 일부 또는 전부와 중첩되는 아미노산 잔기의 아미노-말단 절단인 파괴가 없음)으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 3개의 내인성 B-세포 및/또는 T-세포 에피토프 영역의 파괴를 포함한다.

[0627] [618] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 적어도 2개의 내인성, B-세포 및/또는 T-세포 에피토프 영역의 파괴를 포함하고, 여기서 각각의 파괴는 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함하고, 여기서 내인성 B-세포 및/또는 T-세포 에피토프 영역은 SEQ ID NO:3의 3-14; SEQ ID NO:3의 26-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 27-37; SEQ ID NO:1 또는 SEQ ID NO:2의 39-48; SEQ ID NO:3의 42-48; SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 53-66; 또는 시가 독소 A 서브유닛 또는 이의 유도체의 등가 영역으로 구성된 천연 위치 시가 독소 A 서브유닛 영역의 군에서 선택된다.

[0628] [619] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 내장되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프는, 본 명세서에 기재된 임의의 내인성 B-세포 및/또는 CD4+ T-세포 에피토프 영역을 파괴하지 않는다.

[0629] [620] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 적어도 하나의 파괴는 D에서 A, D에서 G, D에서 V, D에서 L, D에서 I, D에서 F, D에서 S, D에서 Q, D에서 M, D에서 R, E에서 A, E에서 G, E에서 V, E에서 L, E에서 I, E에서 F, E에서 S, E에서 Q, E에서 N, E에서 D, E에서 M, E에서 R, F에서 A, F에서 G, F에서 V, F에서 L, F에서 I, G에서 A, G에서 P, H에서 A, H에서 G, H에서 V, H에서 L, H에서 I, H에서 F, H에서 M, I에서 A, I에서 V, I에서 G, I에서 C, K에서 A, K에서 G, K에서 V, K에서 L, K에서 I, K에서 M, K에서 H, L에서 A, L에서 V, L에서 G, L에서 C, N에서 A, N에서 G, N에서 V, N에서 L, N에서 I, N에서 F, P에서 A, P에서 G, P에서 F, R에서 A, R에서 G, R에서 V, R에서 L, R에서 I, R에서 F, R에서 M, R에서 Q, R에서 S, R에서 K, R에서 H, S에서 A, S에서 G, S에서 V, S에서 L, S에서 I, S에서 F, S에서 M, T에서 A, T에서 G, T에서 V, T에서 L, T에서 I, T에서 F, T에서 M, T에서 S, V에서 A, V에서 G, Y에서 A, Y에서 G, Y에서 V, Y에서 L, Y에서 I, Y에서 F, Y에서 M, 및 Y에서 T로 구성된 군으로부터 선택되는 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 대한 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 일부 실시예에서, 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 대한 하나 이상의 아미노산 잔기 치환은 D에서 A, D에서 G, D에서 V, D에서 L, D에서 I, D에서 F, D에서 S, D에서 Q, E에서 A, E에서 G, E에서 V, E에서 L, E에서 I, E에서 F, E에서 S, E에서 Q, E에서 N, E에서 D, E에서 M, E에서 R, G에서 A, H에서 A, H에서 G, H에서 V, H에서 L, H에서 I, H에서 F, H에서 M, K에서 A, K에서 G, K에서 V, K에서 L, K에서 I, K에서 M, K에서 H, L에서 A, L에서 G, N에서 A, N에서 G, N에서 V, N에서 L, N에서 I, N에서 F, P에서 A, P에서 G, P에서 F, R에서 A, R에서 G, R에서 V, R에서 L, R에서 I, R에서 F, R에서 M, R에서 Q, R에서 S, R에서 K, R에서 H, S에서 A, S에서 G, S에서 V, S에서 L, S에서 I, S에서 F, S에서 M, T에서 A, T에서 G, T에서 V, T에서 L, T에서 I, T에서 F, T에서 M, T에서 S, Y에서 A, Y에서 G, Y에서 V, Y에서 L, Y에서 I, Y에서 F, 및 Y에서 M으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0630] [621] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 파괴(들) 중 적어도 하나는 K1에서 A, G, V, L, I, F, M 및 H; T4에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; D6에서 A, G, V, L, I, F, S, Q 및 R; S8에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; T9에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; S9에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; K11에서 A, G, V, L, I, F, M 및 H; T12에서 A, G, V, I, L, F, M, S, 및 K; S12에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; S33에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 C; S43에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; G44에서 A 또는 L; S45에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; T45에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; G46에서 A 및 P; D47에서 A, G, V, L, I, F, S, M, 및 Q; N48에서 A, G, V, L, M 및 F; L49에서 A, V, C, 및 G; Y49에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 T; F50에서 A, G, V, L, I, 및 T; A51 ; D53에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; V54에서 A, G, I, 및 L; R55에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; G56에서 A 및 P; I57에서 A, G, V, 및 M; L57에서 A, V, C, G, M, 및 F; D58에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; P59에서 A, G, 및 F; E60에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, T, 및 R; E61에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, 및 R; G62에서 A; R84에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; V88에서 A 및 G; I88에서 A, V, C, 및 G; D94에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; S96에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; T104에서 A, G, V, L, I, F, M; 및 N; A105에서 L; T107에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 P; S107에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 P; L108에서 A, V, C, 및 G; S109에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; T109에서 A, G, V, I, L, F, M, 및 S; G110에서 A; S112에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; D111에서 A, G, V, L, I, F, S, Q, 및 T; S112에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; D141에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; G147에서 A; V154에서 A 및 G. R179에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; T180에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; T181에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S; D183에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; D184에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; L185에서 A, G, V 및 C; S186에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; G187에서 A; R188에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; S189에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; D197에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; D198에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; R204에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R205에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K 및 H; S247에서 A, G, V, I, L, F, 및 M; Y247에서 A, G, V, L, I, F, 및 M; R248에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R250에서 A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; R251에서 A, G,

V, L, I, F, M, Q, S, K, 및 H; D264에서 A, G, V, L, I, F, S, 및 Q; G264에서 A; 및 T286에서 A, G, V, L, I, F, M, 및 S로 구성된 군으로부터 선택된 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 대한 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함한다.

[0631] [622] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자는, 척삭에 도입될 때, 참조 분자, 예를 들어 A1 단편 영역의 카복시 말단에 야생형 시가 독소 A1 단편 및/또는 야생형 시가 독소 퓨린-절단 부위를 포함하는 그의 모든 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분(들) 각각을 제외하고 결합 분자로 구성된 24개의 결합 분자와 비교하여 개선된 생체 내 내약성 및/또는 안정성을 나타낼 수 있다. 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 세포독성이 아니고 분자 모이어티는 세포독성이다.

[0632] [623] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 영역 및 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 직접적으로 또는 간접적으로 함께 연결된다.

[0633] [624] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 영역은 적어도 하나의 펩티드 및/또는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 결합 영역은 면역글로불린형 결합 영역이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, 결합 영역은: 자율 V_H 도메인, 단일-도메인 항체 단편(sdAb), 나노바디, 낙타류로부터 유래된 중쇄-항체 도메인(V_HH 또는 V_H 도메인 단편), 연골어류 유래 중쇄 항체 도메인(V_HH 또는 V_H 도메인 단편), 면역글로불린 신규 항원 수용체(IgNAR), V_{NAR} 단편, 단일 사슬 가변 단편(scFv), 항체 가변 단편(Fv), 상보적 결정 영역 3 단편(CDR3), 제한된 FR3-CDR3-FR4 폴리펩티드(FR3-CDR3-FR4), Fd 단편, SMIP(Small Modular Immunopharmaceutical) 도메인, 항원-결합 단편(Fab), 아르마딜로 반복 폴리펩티드(ArmRP), 피브로넥틴-유래 10th 피브로넥틴 type III 도메인(10Fn3), 테나신 type III 도메인(TNfn3), 안키린 반복 모티프(ankyrin repeat motif) 도메인, LDLR-A(low-density-lipoprotein-receptor-derived A-domain), 리포칼린(lipocalin)(안티칼린(anticalin)), Kunitz 도메인, Protein-A-유래 Z 도메인, 감마-B 크리스탈린-유래 도메인, 유비퀴틴-유래 도메인, Sac7d-유래 폴리펩티드(아피틴), Fyn-유래 SH2 도메인, 미니단백질, C-형 렉틴-유사 도메인 스캐폴드, 조작된 항체 유사체, 및 결합 기능을 유지하는 전술한 것의 유전자 조작된 대응물로 구성된 군으로부터 선택된 폴리펩티드를 포함한다.

[0634] [625] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자는 (i) 야생형 시가 독소 A1 단편 또는 야생형 시가 독소 효과기 폴리펩티드와 유사한 촉매 활성 수준, (ii) 10,000 피코몰 이하의 IC_{50}(a half-maximal inhibitory concentration) 값을 갖는 리보솜 억제 활성, 및/또는 (iii) 상당한 수준의 시가 독소 촉매 활성을 나타낼 수 있다.

[0635] [626] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자 및/또는 그의 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 야생형 시가 독소 A1 단편 또는 야생형 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하는 참조 결합 분자와 유사한 세포 이하 라우팅 효율을 나타낼 수 있고/있거나 세포의 엔도솜 시작 위치로부터 소포체 및/또는 세포질에 대한 상당한 수준의 세포 내 라우팅 활성을 나타낼 수 있다.

[0636] [627] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자의 결합 영역의 세포 외 표적 생체분자와 물리적으로 커플링된 세포에 대한 결합 분자를 투여하면, 결합 분자가 세포의 사멸을 유발할 수 있다. 일부 실시예에서, 세포 외 표적 생체분자의 존재 또는 수준과 관련하여 상이한 2개의 상이한 세포 유형 집단에 결합 분자를 투여하는 경우, 결합 분자는, 결합 분자의 결합 영역의 세포 외 표적 생체분자와 물리적으로 커플링되지 않은 세포 유형에 대한 CD_{50}보다 적어도 3배 이하의 CD_{50}에서 세포독성 결합 분자의 결합 영역의 세포 외 표적 생체분자와 물리적으로 커플링된 세포-유형에 세포 사멸을 일으킬 수 있다. 일부 실시예에서, 구성원이 결합 분자의 결합 영역의 세포 외 표적 생체분자에 물리적으로 커플링된 제1 세포 집단, 및 구성원이 결합 영역의 임의의 세포 외 표적 생체분자에 물리적으로 커플링되지 않은 제2 세포 집단에 결합 분자를 투여하면, 상기 제2 세포 집단의 구성원에 비해 상기 제1 세포 집단의 구성원에 대한 결합 분자의 세포독성 효과는 적어도 3배 더 크다. 일부 실시예에서, 구성원이 결합 분자의 결합 영역의 상당량의 세포 외 표적 생체분자에 물리적으로 커플링된 제1 세포 집단, 및 구성원이 결합 영역의 상당량의 임의의 세포 외 표적 생체분자에 물리적으로 커플링되지 않은 제2 세포 집단에 결합 분자를 투여하면, 상기 제2 세포 집단의 구성원에 비해 상기 제1 세포 집단의 구성원에 대한 결합 분자의 세포독성 효과는 적어도 3배 더 크다. 일부 실시예에서, 표적 생체분자 양성 제1 세포 집단, 및 그의 구성원이 세포 표면에서 결합 분자의 결합 영역의 표적 생체분자의 상당한 양을 발현하지 않는 제2 세포 집단에 대해 결합 분자를 투여하면, 제2 세포 집단의 구성원에 비해 제1 세포 집단의 구성원에 대한 결합 분자의 세포독성 효과는 적어도 3배 더 크다.

[0637] [628] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자는, 세포에 도입될 때, 300nM 이하의 CD_{50}(a half-maximal inhibitory concentration) 값으로 세포독성을 나타낼 수 있고/있거나 상당한 수준의 시가 독소 세포독성을 나타낼 수 있다.

[0638] [629] 실시예 세트 #2 내지 #11의 일부 실시예에서, 결합 분자는 MHC 클래스 I 분자에 의해 결합된 에피토프의 세포-표면 제시를 위한 세포의 MHC 클래스 I 제시 경로에 내장되거나 삽입된 이종 CD8+ T-세포 에피토프를 전달할 수 있다.

[0639] [630] 실시예 세트 #2 내지 #11의 일부 실시예에서, 결합 분자는 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 카복시-말단과 관련된 분자 모이어티를 포함한다. 일부 실시예에서, 분자 모이어티는 결합 영역을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시예에서, 분자 모이어티는 적어도 하나의 아미노산을 포함하고 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 분자 모이어티의 적어도 하나의 아미노산 잔기에 연결된다. 일부 실시예에서, 분자 모이어티 및 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 융합되어 연속 폴리펩티드를 형성한다.

[0640] [631] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자는 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 카복시-말단과 관련된 세포독성 분자 모이어티를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 세포독성 분자 모이어티는 세포독성제, 예를 들어, 소분자 화학요법제, 항신생물제, 세포독성 항생제, 알킬화제, 항대사물질, 토포이소머라제 억제제, 및/또는 당업자에게 공지되고/되거나 본 명세서에 기재된 튜불린 억제제와 같은 세포독성제이다. 일부 실시예의 경우, 세포독성 분자 모이어티는 10,000, 5,000, 1,000, 500, 또는 200pM 미만의 농도에서 세포독성이다.

[0641] [632] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 영역은, 이황화 결합이 아닌 적어도 하나의 공유 결합에 의해 시가 독소 효과기 폴리펩티드에, 직접적으로 또는 간접적으로 연결된다. 일부 실시예에서, 결합 영역은, 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 카복시-말단에 직접 또는 간접적으로 융합되어 단일의 연속 폴리펩티드를 형성한다. 일부 실시예에서, 결합 영역은 면역글로불린형 결합 영역이다.

[0642] [633] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해 최소 퓨린-절단 부위에서 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시예에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 최소 퓨린-절단 부위의 적어도 하나의 아미노산 잔기의 일부 또는 전부와 중첩되는 서열의 아미노-말단 절단이 아니다. 일부 실시예에서, 최소 퓨린-절단 부위의 돌연변이는 R/Y-x-x-R 퓨린 절단 모티프에서 적어도 하나의 아미노산 잔기의 아미노산 결실, 삽입, 및/또는 치환이다. 일부 실시예에서, 파괴된 퓨린-절단 모티프는 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 비해 적어도 하나의 돌연변이를 포함하고, 돌연변이는 1) 시가-유사 독소 1(SEQ ID NO: 1) 또는 시가 독소(SEQ ID NO: 2)의 A 서브유닛의 248-251, 2) 시가-유사 독소 2(SEQ ID NO:3)의 A 서브유닛의 247-250, 또는 시가 독소 A 서브유닛의 등가 아미노산 서열 위치에 천연적으로 위치한 영역에서 적어도 하나의 아미노산 잔기를 변경한다. 일부 실시예에서, 돌연변이는 비-양전하를 띤 아미노산 잔기로의 아르기닌 잔기의 아미노산 잔기 치환이다.

[0643] [634] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자는, 세포에 도입될 때, 참조 분자의 세포독성과 유사한 세포독성을 나타낼 수 있고, 예를 들어 그의 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분(들) 모두를 제외하고 결합 분자로 구성된 제5 결합 분자 각각은 야생형 시가 독소 A1 단편을 포함한다.

[0644] [635] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 영역은 SEQ ID NOs: 85-107 및 156-157 중 어느 하나로 제시되는 폴리펩티드를 포함하거나 이로 본질적으로 구성된다.

[0645] [636] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 영역은 A1 단편 영역의 카복시-말단을 입체적으로 덮는다.

[0646] [637] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 분자 모이어티는 A1 단편 영역의 카복시-말단을 입체적으로 덮는다. 일부 실시예에서, 분자 모이어티는 결합 영역을 포함한다.

[0647] [638] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자는 시가 독소 A1 단편 영역의 카복시-말단에 대한 카복시-말단에 위치한 결합 영역 및/또는 분자 모이어티를 포함한다. 일부 실시예에서, 결합 영역 및/또는 분자 모이어티의 질량은 적어도 4.5kDa, 6,kDa, 9kDa, 12kDa, 15kDa, 20kDa, 25kDa, 28kDa, 30kDa, 41kDa, 50kDa, 100kDa, 또는 그 이상이다.

[0648] [639] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자가 본 명세서에 언급된 적절한 수준의 시가 독소 생물학적 활성(예: 세포독성 및/또는 세포 내 라우팅)을 유지하는 한, 결합 분자는 적어도 4.5kDa, 6,kDa, 9kDa, 12kDa, 15kDa, 20kDa, 25kDa, 28kDa, 30kDa, 41kDa, 50kDa, 100kDa, 또는 그 이상의 질량을 갖는 결합

영역을 포함한다.

[0649] [640] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자가 본 명세서에 언급된 적절한 수준의 시가 독소 생물학적 활성을 유지하는 한, 결합 영역은 예를 들어, 적어도 4.5kDa, 6,kDa, 9kDa, 12kDa, 15kDa, 20kDa, 25kDa, 28kDa, 30kDa, 41kDa, 50kDa, 100kDa, 또는 그 이상의 질량을 갖는 분자 모이어티와 같은 것을 포함하는 비교적 큰 분자 모이어티 내에 포함된다.

[0650] [641] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자는 낮은 세포독성 효능을 나타내고(즉, 1000nM, 500nM, 100nM, 75nM, 또는 50nM의 결합 분자 농도에서 세포 집단의 1% 세포 사멸 초과의 세포 독성을 나타내는 특정 양성 표적 세포 유형에 도입될 때 불가능), 세포에 도입될 때, 참조 분자, 예를 들어 아미노-말단을 갖고 결합 영역 및 아미노-말단에 또는 아미노-말단에 근접하지 않은 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하는 제9 결합 분자의 세포독성과 비교하여 소포체 및/또는 세포질의 세포 외 공간에서 세포 이하 구획까지 더 큰 세포 이하 라우팅 효율을 나타낼 수 있다. 일부 실시예에서, 제9 세포-결합 분자는 KDEL 패밀리의 임의의 카복시-말단, 소포체 보유/회수 신호 모티프를 포함하지 않는다(SEQ ID NO: 205-252 참조).

[0651] [642] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 일부 실시예에서, 분자 모이어티는 천연 발생 시가 독소의 시가 독소 A2 단편으로부터 유래된 펩티드 및/또는 폴리펩티드를 포함한다.

[0652] [643] 본 명세서에 기술된 실시예는 천연적으로 발생하는 시가 홀로톡신(Shiga holotoxin) 또는 시가 독소 A 서브유닛을 포함하도록 의도되지 않는다. 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 결합 분자는 천연 발생 시가 독소 B 서브유닛을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 결합 분자는 천연 시가 독소 B 서브유닛의 기능적 결합 도메인을 포함하거나 이로 본질적으로 구성된 임의의 폴리펩티드를 포함하지 않는다. 오히려, 결합 분자의 일부 실시예에서, 시가 독소 A 서브유닛 유래 영역은 세포-표적화를 달성하기 위해 이종 결합 영역과 기능적으로 결합된다.

[0653] [644] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 적어도 2개의 내장되거나 삽입된 이종 에피토프를 포함한다.

[0654] [645] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는: (1) R248H 및 R251H; (2) R248G 및 R251G; (3) A246G, S247A, A253G, 및 S254A; 및 (4) A246G, S247A, R248G, R251G, A253G, 및 S254A 세트로부터 선택된 야생형 시가 독소 A 서브유닛에 대한 아미노산 잔기 치환 세트를 포함하지 않는다.

[0655] [646] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 야생형 시가 독소 A 서브유닛에서 247-252에 천연적으로 위치하는 영역의 결실을 포함하지 않는다. 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 야생형 시가 독소 A 서브유닛에서 245-247 및 253-255에 천연적으로 위치하는 영역의 결실을 포함하지 않는다.

[0656] [647] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 효소 활성을 변화시키는 시가 독소 패밀리의 구성원의 천연 발생 A 서브유닛에 대한 하나 이상의 돌연변이를 포함하고, 돌연변이는 적어도 하나의 아미노산 잔기 결실, 삽입, 또는 치환으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 천연 발생 A 서브유닛에 대한 돌연변이는 시가 독소 효과기 폴리펩티드의 세포독성 활성을 감소시키거나 제거하지만 시가 독소 효과기 폴리펩티드는, 예를 들어 세포 내재화 촉진 및/또는 특정 세포 이하 구획(들)으로의 세포 내 라우팅 지시와 같은, 적어도 하나의 다른 시가 독소 효과기 기능을 유지한다. 일부 실시예에서, 천연 발생 A 서브유닛에 대한 돌연변이는, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 또는 SEQ ID NO:3의 A231E, R75A, Y77S, Y114S, E167D, R170A, R176K, 및/또는 W203A와 같은, 적어도 하나의 아미노산 잔기 치환으로부터 선택된다.

[0657] [648] 실시예 세트 #1 내지 #3의 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는: (i) 세포질, 소포체, 및 리소좀 중에서 선택되는, 시가 독소 효과기 폴리펩티드가 존재하는 세포의 세포 이하 구획으로의 라우팅; (ii) 초기 엔도솜 구획으로부터 시가 독소 효과기 폴리펩티드가 존재하는 세포의 프로테아솜으로 에피토프의 세포 내 전달; 및/또는 (iii) 시가 독소 효과기 폴리펩티드가 존재하는 세포의 초기 엔도솜 구획으로부터 MHC 클래스 I 분자로 에피토프의 세포 내 전달이 가능하다. 일부 실시예에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는, 시가 독소 효과기 폴리펩티드가 존재하는 세포 표면 상의 MHC 클래스 I 분자에 의한 제시를 위한 CD 8+ T-세포 에피토프의 세포 내 전달이 가능하다.

[0658] 실시예 세트 #4 - 항체-독소 접합체를 포함하는 결합 분자

[0659] [649] 또한 PD-L1 결합 분자의 다양한 실시예가 본 명세서에 제공되고, 여기서 각각의 PD-L1 결합 분자는 (1)

적어도 하나의 독소 성분 및 (2) PD-L1 분자의 세포 외 부분에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의 PD-L1 결합 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, PD-L1 결합 분자는 약학적 활성 독소를 포함한다. 일부 실시예에서, PD-L1 결합 분자는 약학적 활성 독소와 접합되어 "항체 약물 접합체"(ADC)를 형성한다.

[0660] [650] 일부 실시예에서, PD-L1 결합 분자는 (1) 독소 및 (2) 항-PD-L1 항체를 포함하는 PD-L1 결합 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 독소는 약학적으로 활성인 세포독소이다. 일부 실시예에서, PD-L1 결합 분자는 "항체 약물 접합체(antibody drug conjugate)"(ADC)이고, 여기서 항체 및 독소 성분은 본 명세서에 기재된 바와 같이 연결된다. 본 명세서에 사용된 용어 “항체(antibody)"는 면역글로불린 단백질, 즉, 면역글로불린 패밀리의 폴리펩티드, 또는 이의 항원-결합 단편을 지칭하고, 이는 예를 들어, 다클론 항체, 단일클론 항체, 인간 항체, 낙타화 항체, 인간화 항체, 또는 항원-결합 항체 단편(예를 들어, Fab, Fv, scFv, sdAb 단편)과 같은 특이적 항원에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 함유한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 “접합체(conjugate)”는 광범위하게 사용되고 결합 방법에 관계없이 항체와 임의의 독소 제제의 공유 또는 비-공유 결합을 의미한다. ADC의 독소 작용제 성분은 천연 독소, 생물독소, 단백질성 독소, 독, 세포독소, 소분자 독소, 및 전술한 것 중 임의의 것에서 유래된 합성 독성물질을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. ADC는 치료 및 진단 목적으로 사용될 수 있다.

[0661] [651] 일부 실시예에서, PD-L1 결합 영역은 각각 SEQ ID NOs: 22-24 및 27-32 중 어느 하나에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나; SEQ ID NOs: 22-24 및 27-32 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열로 본질적으로 구성된 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역(HVR-H)을 포함한다. 일부 실시예에서, 결합 영역은: (a) 각각 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:25, 및 SEQ ID NO:26 중 어느 하나에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나; SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:25, 및 SEQ ID NO:26 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열로 본질적으로 구성된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L)을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 결합 영역은: (a) SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:21에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나; SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:21 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열로 본질적으로 구성된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L)을 추가로 포함한다. 특정 다른 추가 실시예에서, 결합 영역은: (a) SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:21에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나; SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:21 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열로 본질적으로 구성된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L)을 추가로 포함한다. 특정 다른 추가 실시예에서, 결합 영역은: (a) SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:26에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나; SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, 및 SEQ ID NO:26 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열로 본질적으로 구성된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L)을 추가로 포함한다.

[0662] [652] 일부 실시예에서, 결합 영역은: (a) 각각 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:25, 및 SEQ ID NO:26 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 본질적으로 구성된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역(HVR-L); 및 (b) 각각 SEQ ID NOs: 22-24 및 27-32 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 본질적으로 구성된 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역(HVR-H)을 포함한다.

[0663] [653] 일부 실시예에서, 결합 영역은: (a) SEQ ID NOs: 33, 35-36, 및 38 중 어느 하나에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나, SEQ ID NOs : 33, 35-36, 및 38 중 어느 하나의 아미노산 서열로 본질적으로 구성된 경쇄 영역; 및/또는 (b) SEQ ID NOs: 34, 37, 및 39 중 어느 하나에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나, SEQ ID NOs: 34, 37, 및 39 중 어느 하나의 아미노산 서열로 본질적으로 구성된 중쇄 영역을 포함한다. 일부 실시예에서, 결합 영역은 SEQ ID NOs: 85-107 및 156-157 중 어느 하나에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함하거나 SEQ ID NOs: 85-107 및 156-157 중 어느 하나에 제시된 폴리펩티드로 본질적으로 구성된다. 일부 실시예에서, 결합 영역은 예를 들어 SEQ ID NOs: 85-107 및 156-157 중 어느 하나의 폴리펩티드로 구성되거나, 이를 포함하거나, 본질적으로 구성된 단일-사슬 가변 단편이다.

[0664] [654] PD-L1 결합 분자의 일부 실시예에서, PD-L1 결합 분자를 PD-L1-발현 세포에 투여하면 (i) 세포에 의한 PD-L1 결합 분자의 독소 성분의 내재화 및 (ii) 세포의 사멸을 일으킨다. 일부 실시예의 경우, PD-L1 결합 분자를 PD-L1-발현 세포에 투여하면 (i) 세포에 의한 PD-L1 결합 분자의 내재화 및 (ii) 촉매 활성 독소 성분으로 인한 세포 사멸을 일으킨다. 일부 실시예에서, 실시예 세트 #4의 PD-L1 결합 분자는, 세포에 도입될 때, 500nM,

100nM, 50nM, 10nM, 1nM 또는 그 이하의 반-최대 억제 농도(CD_{50}) 값으로 세포독성을 나타낼 수 있다.

[0665] [655] PD-L1 결합 분자의 일부 실시예에서, PD-L1 결합 영역은 Fab, Fab', $(Fab')_2$, Fv, scFv(단일 사슬 Fv), 단일 도메인 항체(예: 낙타 또는 연골 어류에서 유래한 중쇄 항체 도메인 단편), 서로바디(surrobody)(대리 경쇄 구조체 포함), 낙타화 항체, 인간화 항체 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 전장 항체, 이중특이적 항체, 이중 가변 도메인 항체, 다중 사슬 또는 단일 사슬 항체, 및/또는 인간 PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체 단편(들)의 형태이다. PD-L1 결합 영역은, 예를 들어 IgA(예: IgA_1, IgA_2, 또는 sIgA), IgD, IgE, IgG(예: IgG_1, IgG_2, IgG_3, 또는 IgG_4), 또는 IgM을 포함하는, 임의의 항체 아이소타입이거나 그로부터 유래할 수 있다. PD-L1 결합 영역은, 포유동물 기원의 종(예를 들어, 유인원, 설치류, 염소, 및 토끼)을 포함하나 이에 제한되지 않는, 임의의 종의 임의의 항체이거나 그로부터 유래할 수 있다. PD-L1 결합 영역은, 당업계에 공지된 것과 같이, 반감기를 증가시키거나 ADCC, CDC, PD-L1 길항작용, PD-L1 작용제 활성 등을 증가 또는 감소시키는 것과 같은, 항체 및/또는 항원-결합 단편의 특성을 변경하는 변형 및/또는 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0666] [656] 본 발명의 일부 실시예에서, 결합 분자는, 표적 세포로의 전달을 위해 존재할 수 있는, 추가의 외인성 물질을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 추가의 외인성 물질은 결합 분자에 직접적으로 또는 간접적으로 결합, 연결, 및/또는 커플링된다.

[0667] [657] 본 발명의 일부 실시예에서, 결합 분자는 검출 촉진제를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 검출 촉진제는 결합 분자에 직접적으로 또는 간접적으로 결합, 연결, 및/또는 커플링된다.

[0668] [658] 본 발명의 일부 실시예에서, 결합 영역은 다중특이적 또는 이중특이적이 아니고, 즉 PD-L1 결합 영역은 단일특이적이다. 일부 실시예에서, PD-L1 결합 분자는 PD-L1 분자의 세포 외 부분에 특이적으로 결합할 수 있지만 임의의 다른 세포-표면 표적에 대한 높은 친화도 및 특이적 결합이 결여되어 있고, 즉 PD-L1 결합 분자는 PD-L1 및/또는 PD-L1 분자의 세포 외 부분 내의 단일 에피토프에 단일특이적 결합을 나타낼 수 있다. 일부 실시예에서, PD-L1 결합 분자는 세포의 세포 표면 상에 존재하는 PD-L1에 특이적 및 고-친화성 결합을 나타낼 수 있는 단 하나의 면역글로불린-유형 결합 영역, 즉 단일특이적 결합 특성을 제공하는 분자당 단일 항원 결합 부위를 포함한다. 실시예 세트 #1 내지 #4의 일부 실시예에서, PD-L1 결합 분자는 세포의 세포 표면 즉, 단일 항원 결합 부위의 2개 이상의 동일한 카피상에 존재하는 PD-L1에 특이적 및 고-친화성 결합을 나타낼 수 있는 면역글로불린-유형 결합 영역의 단 하나의 종을 포함하고, 예를 들어 PD-L1 결합 분자는 다가 PD-L1 결합 특성을 나타내지만 PD-L1에 대한 결합에서는 단일특이성만을 나타낸다.

[0669] [659] 또한, 상기 결합 분자 중 어느 하나 및 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 포함하는 약학 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0670] [660] 또한, 본 발명은 상기 결합 분자 중 어느 하나 및 검출 촉진제를 포함하는 진단 조성물을 제공한다. 일부 실시예는, 검출 촉진제가 이종 에피토프이고 결합 분자가 이종 에피토프를 포함하는, 결합 분자이다.

[0671] [661] 결합 분자, 및 이의 조성물 외에도, 결합 분자를 암호화할 수 있는 폴리뉴클레오티드, 뿐만 아니라 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 임의의 폴리뉴클레오티드 및/또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 또한 본 명세서에 제공된다. 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포는 예를 들어 재조합 발현에 의한 본 명세서에 기재된 분자 또는 폴리펩티드 성분 또는 그의 단편을 생산하는 방법에서 사용될 수 있다.

[0672] [662] 또한, 세포를 본 명세서에 기재된 임의의 상기 결합 분자 또는 상기 약학 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포(예를 들어, PD-L1-발현 세포)를 사멸시키는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시예에서, 세포(들)를 접촉시키는 단계는 시험관 내에서 발생한다. 특정 다른 실시예에서, 세포(들)와 접촉하는 단계는 생체 내에서 일어난다. 세포 사멸 방법의 일부 실시예에서, 방법은, 결합 분자의 결합 영역의 세포 외 표적 생체분자의 세포 외 존재 및/또는 발현 수준과 관련하여 상이한 세포의 혼합물과 접촉할 때, 다른 세포(들) 및/또는 세포 유형보다 우선적으로 세포(들) 및/또는 세포 유형을 선택적으로 사멸시킬 수 있다.

[0673] [663] PD-L1 발현 세포를 본 명세서에 기재된 임의의 상기 결합 분자 또는 약학 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, PD-L1/PD1 상호작용 및/또는 다운스트림 신호전달을 억제하는 방법이 또한 본 명세서에 제공된다. 일부 실시예에서, 세포(들)를 접촉시키는 단계는 시험관 내에서 발생한다. 특정 다른 실시예에서, 세포(들)와 접촉하는 단계는 생체 내에서 일어난다.

[0674] [664] 동시에 PD-L1/PD1 상호작용을 억제하고 PD-L1-발현 세포의 사멸을 유도하는 방법이 또한 본 명세서에 제공되고, 이 방법은 PD-L1 발현 세포를 임의의 상기 결합 분자 또는 상기 약학 조성물과 접촉시키는 단계를 포함

한다. 일부 실시예에서, 세포(들)를 접촉시키는 단계는 시험관 내에서 발생한다. 특정 다른 실시예에서, 세포(들)와 접촉하는 단계는 생체 내에서 일어난다.

[0675] [665] 본 발명의 일부 실시예에서, 질병, 장애, 또는 질환을 치료하는 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 PDL-1 결합 분자 또는 이를 포함하는 약학 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시예에서, 암은: 방광암(예: 요로상피암), 유방암(예: HER2 양성 유방암, 삼중 음성 유방암), 결장암(예: MSI-H(metastatic microsatellite instability-high) 또는 dMMR(mismatch repair deficient) 결장직장암과 같은 결장직장암), 자궁내막암, 식도암, 자궁관암, 위장관암(예: 위암, 담도 신생물, 위식도 접합부 암), 교모세포종, 신경교종, 두경부암(예: 편평 세포 두경부암), 신장암(예: 신세포암), 간암(예: 간세포암), 폐암(예: 비-소세포폐암, 소세포폐암), 림프종(예: 미만성 거대 B 세포 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 원발성 종격동 거대 B 세포 림프종), 메르켈 세포 암종, 중피종(예: 흉막 중피종), 골수종(예: 다발성 골수종), 비인두 신생물, 난소암, 췌장암, 복막 신생물, 전립선암, 피부암(예: 피부의 편평 세포암), 흑색종, 이행 세포 암종, 또는 요로상피암 중 임의의 하나이다.

[0676] [666] 본 발명의 일부 실시예에서, 환자의 질병, 장애, 및/또는 질환을 치료하는 방법은 치료 유효량의 결합 분자 및/또는 약학 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 방법을 사용하여 치료될 질병, 장애, 또는 질환은: 암, 종양, 성장 이상, 면역 장애, 또는 미생물 감염으로부터 선택된다. 이들 방법의 일부 실시예에서, 치료될 암은: 폐암, 흑색종, 방광암, 호지킨 림프종, 및 유방암으로 구성된 군으로부터 선택된다. 이들 방법의 일부 실시예에서, 치료될 면역 장애는: 류마티스 질환, 척추염, 아밀로이드증, 강직성 척추염, 천식, 크론병, 당뇨병, 이식 거부, 이식편대숙주병, 하시모토 갑상선염, 용혈성요독증후군, HIV-관련 질환, 홍반 루푸스, 다발성 경화증, 결절 다발동맥염, 다발관절염, 건선, 건선성 관절염, 류마티스 관절염, 경피증, 패혈성 쇼크, 쇼그렌염 증후군, 궤양성 대장염, 및 혈관염으로 구성된 군으로부터 선택된 질환과 관련된 면역 장애이다.

[0677] [667] 결합 분자의 특정 실시예는 결합 분자의 세포 외 표적 생체분자와 물리적으로 커플링된 세포 내로의 추가 외인성 물질의 전달에 사용될 수 있다. 추가로, 본 명세서는, 시험관 내 또는 생체 내에서, 세포(들)를, 결합 분자, 약학 조성물, 및/또는 진단 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는 세포(들) 내부로 외인성 물질을 전달하는 방법을 제공한다. 또한 환자의 세포(들) 내부로 외인성 물질을 전달하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 환자에게 결합 분자(세포독성 활성이 있거나 없는)를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 표적 세포(들)는 결합 분자의 세포 외 표적 생체분자와 물리적으로 커플링된다.

[0678] [668] 또한, 세포의 MHC 클래스 I 분자에 의해 제시될 수 있는 T-세포 에피토프를 세포 내로 전달하는 방법이 제공되고, 이 방법은 이종성, T-세포 에피토프 및/또는 이의 조성물(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 약학 또는 진단 조성물)과 결합된 결합 분자와 세포를 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0679] [669] 본 발명의 일부 실시예에서, 본 명세서에 기재된 PD-L1 결합 분자의 제조 방법은 PD-L1 결합 분자를 발현시키는 단계 및 PD-L1 결합 분자를 회수하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, PD-L1 결합 분자를 발현시키는 단계는, PD-L1 결합 분자가 발현되는 조건하에 PD-L1 결합 분자를 암호화하는 핵산(예를 들어, 발현 벡터)을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0680] [670] 본 발명의 일부 실시예에서, PD-L1 결합 분자 및 적어도 하나의 다른 생체분자를 포함하는 발현 시스템 조성물로부터 본 명세서에 기재된 PD-L1 결합 분자를 정제하는 방법은 (i) 발현 시스템 조성물을 박테리아 단백질 L과 접촉시켜 PD-L1 결합 분자-단백질 L 복합체를 생성하는 단계, 및 (ii) PD-L1 결합 분자-단백질 L 복합체를 회수하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 발현 시스템 조성물은 세포 용해물이다. 일부 실시예에서, 단백질 L은 *F. 마그나*로부터 단리되거나 유래된다. 일부 실시예에서, 단백질 L은 수지에 접합된다.

[0681] [671] 본 발명의 일부 실시예에서, 본 명세서에 기재된 분자를 생성하는 방법은 박테리아 세포-벽 단백질 도메인 상호작용을 사용하여 분자 또는 이의 폴리펩티드 성분을 정제하는 단계, 예를 들어 *P. 마그누스*로부터의 단백질 L 또는 이의 유도체 및 결합 도메인 단편 또는 *S. 아레우스*로부터의 단백질 A 또는 이의 유도체 및 결합 도메인 단편을 포함한다. 일부 실시예에서, 방법의 정제 단계는 SEQ ID NOs: 1-18 및 40-68에 제시된 폴리펩티드 중 어느 하나를 포함하거나 이로 본질적으로 구성된 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 방법의 정제 단계는 SEQ ID NOs: 108-155에 제시된 폴리펩티드 중 어느 하나를 포함하거나 본질적으로 구성된 결합 분자를 포함한다.

[0682] [672] 본 발명의 실시예에서, PD-L1 결합 분자를 제조하는 방법은 PD-L1 결합 분자가 발현되는 조건하에 숙주

세포를 배양하고 단백질을 회수하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 결합 분자는 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있게 하는 에피토프를 포함한다. 일부 실시예에서, 결합 분자는 Ig 결합 도메인, 예컨대 박테리아 Ig 결합 도메인, 또는 그의 단편 또는 기능적 변이체를 포함한다.

[0683] [673] 본 발명의 일부 실시예에서, 본 명세서에 기재된 정제 방법에 사용된 Ig 결합 도메인은 단백질 L, 또는 그의 유도체 또는 결합 도메인 단편이다. *Finegoldia magna*(구 *Peptostreptococcus magnus*)에서 최초로 분리된 단백질 L은, 항체, scFv, Fab 단편, 또는 다른 결합 단백질의 항원-결합 부위를 방해하지 않고 카파 경쇄 상호작용을 통해 결합하는 독특한 능력을 가진 면역글로불린-결합 단백질이다. 단백질 L은 천연 카파 경쇄 서브타입 I, III, 및 IV에 결합한다. 단백질 L은 천연 카파 경쇄 서브타입 II 또는 천연 람다 경쇄에 결합하지 않는다. 단백질 L은 인간 IgG, IgA, IgM, IgE, 및 IgD에 결합한다. 일부 실시예에서, 단백질 L은 *F. 마그나*로부터 단리되거나 유래된다. 단백질 L은 예를 들어 대장균에서 재조합적으로 생산될 수 있다. 일부 실시예에서, 단백질 L은 SEQ ID NO: 279의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함한다.

[0684] [674] 본 발명의 일부 실시예에서, Ig 결합 도메인은 그룹 C 및 G 스트렙토코커스 박테리아로부터의 단백질 G, 또는 *S. 아우레우스*로부터의 단백질 A, 또는 상기 중 임의의 것의 유도체 및 결합 도메인 단편이다.

[0685] [675] 본 발명의 일부 실시예에서, 정제 방법은 Ig 결합 도메인 에피토프를 포함하는 결합 분자를 Ig 결합 도메인(예를 들어, 단백질 L 또는 그의 단편 또는 유도체)과 접촉시키는 것을 포함한다.

[0686] [676] 본 발명의 일부 실시예에서, 방법은: 결합 단계, 세척 단계, 및 용리 단계의 3단계를 포함한다. 결합 단계에서, 키메라 면역글로불린 결합 도메인을 포함하는 단백질은 매트릭스 상에 고정된 단백질 L과 접촉된다. 매트릭스는 비드, 수지 등과 같은 임의의 고체 지지체일 수 있다. 일부 실시예에서, 매트릭스는 컬럼 내 또는 카트리지 내에 패킹될(packed) 수 있다.

[0687] [677] 세척 단계에서는, 매트릭스를 세척하여 불순물을 제거한다. 세척 단계는 실질적으로 모든 불순물이 제거될 때까지, 예를 들어 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 또는 적어도 5회 반복될 수 있다. 일부 실시예에서, 세척 단계는 불순물의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%가 제거될 때까지 반복된다.

[0688] [678] 용출 단계에서, 키메라 면역글로불린 결합 도메인을 포함하는 단백질은 단백질 L-매트릭스로부터 용출된다. 단백질은 예를 들어 고염 세척 용액(예: 1M NaCl) 또는 pH 변화를 사용하여 용출될 수 있다. 용출 후, 표준 방법에 따라, 단백질을 수집하고 적절하게 추가 정제 및/또는 탈염할 수 있다.

[0689] [679] 본 발명의 일부 실시예에서, PD-L1 결합 분자 및 적어도 하나의 다른 생체분자를 포함하는 발현 시스템 조성물로부터 PD-L1 결합 분자를 정제하는 방법은 (i) 발현 시스템 조성물을 박테리아 단백질 L과 접촉시켜 PD-L1 결합 분자-단백질 L 복합체를 생성하는 단계, 및 (ii) PD-L1 결합 분자-단백질 L 복합체를 회수하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 발현 시스템 조성물은 세포 용해물이다. 일부 실시예에서, 단백질 L은 *F. 마그나*로부터 단리되거나 유래된다. 일부 실시예에서, 단백질 L은 수지에 접합된다.

[0690] [680] 본 발명의 일부 실시예에서, 결합 분자를 제조하는 방법은 결합 분자가 발현되는 조건하에 숙주 세포를 배양하고 단백질을 회수하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 결합 분자를 정제하는 방법은 결합 분자를 박테리아 단백질 L과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 단백질 L은 단리되거나 *F. 마그나*로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 단백질 L은 수지에 접합된다.

[0691] [681] 또한, 본 명세서에 기재된 바와 같은 물질의 조성물, 및 선택적으로 사용 설명서, 추가 시약(들), 및/또는 약학적 전달 장치(들)를 포함하는 키트가 제공된다. 키트는 샘플 또는 대상체에서 세포 유형(예: 종양 세포)을 검출하기 위한 시약 및 기타 도구를 추가로 포함할 수 있다.

[0692] 추가 번호가 매겨진 실시예

[0693] [682] 1. 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드 및 PD-L1의 세포 외 부분에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 영역을 포함하는 PD-L1 결합 분자로서; 여기서 결합 영역은: (a) (i) 아미노산 서열 EYTMH(SEQ ID NO:27)를 포함하는 CDR1, (ii) 아미노산 서열 GINPNNGGTWYNQKFKG(SEQ ID NO:29)를 포함하는 CDR2, 및 (iii) 아미노산 서열 PYYYGSREDYFDY(SEQ ID NO:32)를 포함하는 CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역(VH); 및 (b) (i) 아미노산 서열 SASSSVSYMY(SEQ ID NO:19)를 포함하는 CDR1, (ii) 아미노산 서열 LTSNLAS(SEQ ID NO:20)를 포함하는 CDR2, 및 (iii) 아미노산 서열 QQWSSNPPT(SEQ ID NO:26)를 포함하는 CDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다.

[0694] [683] 2. 실시예 1에 있어서, 상기 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 41의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 PD1-L1 결합 분자.

[0695] [684] 3. 실시예 1-2 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 VH는 SEQ ID NO: 34의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0696] [685] 4. 실시예 1-3 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 VL은 SEQ ID NO: 35의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0697] [686] 5. 실시예 1-2 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 VH는 SEQ ID NO: 34의 서열을 포함하고 VL은 SEQ ID NO: 35의 서열을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0698] [687] 6. 실시예 1-5 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 결합 영역은 VH 및 VL을 연결하는 scFv 링커를 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0699] [688] 7. 실시예 6에 있어서, 상기 scFv 링커의 길이는 약 3 내지 약 12개 아미노산인 PD-L1 결합 분자.

[0700] [689] 8. 실시예 6-7 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 scFv 링커는 가요성 링커인 PD-L1 결합 분자.

[0701] [690] 9. 실시예 6에 있어서, 상기 scFv 링커는 SEQ ID NO: 72의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0702] [691] 10. 실시예 1-9 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 결합 영역은 단일 사슬 가변 단편(scFv)인 PD-L1 결합 분자.

[0703] [692] 11. 실시예 1-9 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 결합 영역은 SEQ ID NO: 106의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0704] [693] 12. 실시예 1-11 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 PD-L1 결합 분자는 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드 및 결합 영역을 연결하는 결합 도메인 링커를 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0705] [694] 13. 실시예 12에 있어서, 상기 결합 도메인 링커는 SEQ ID NO: 73의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0706] [695] 14. 실시예 12-13 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 결합 분자는, N-말단에서 C-말단으로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, 및 결합 부위를 포함한다.

[0707] [696] 15. 실시예 12-13 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 결합 분자는, N-말단에서 C-말단으로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, VH 및 VL을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0708] [697] 16. 실시예 12-13 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 결합 분자는, N-말단에서 C-말단으로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, VH, scFv 링커, 및 VL을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0709] [698] 17. 실시예 1-16 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 PD-L1 결합 분자는 시가 독소 A 서브유닛에 이종성인 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0710] [699] 18. 실시예 17에 있어서, 상기 CD8+ T-세포 에피토프는 서열 NLVPMVATV(SEQ ID NO: 78), 또는 이에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0711] [700] 19. 실시예 17-18 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 CD8+ T-세포 에피토프는 절단 가능한 스페이서를 통해 결합 영역에 연결된 PD-L1 결합 분자.

[0712] [701] 20. 실시예 19에 있어서, 상기 절단 가능한 스페이서는 서열 HHAA(SEQ ID NO: 265)를 갖는 PD-L1 결합 분자.

[0713] [702] 21. 실시예 17-20 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 결합 분자는, N-말단에서 C-말단으로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, 결합 영역, 및 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0714] [703] 22. 실시예 17-20 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 결합 분자는, N-말단에서 C-말단으로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, VH, scFv 링커, VL, 및 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0715] [704] 23. 실시예 19-20 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 결합 분자는, N-말단에서 C-말단으로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, 결합 영역, 절단 가능한 스페이서, 및 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0716] [705] 24. 실시예 1-23 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 PD-L1 결합 분자는 SEQ ID NO: 128의 서열, 또는 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0717] [706] 25. 실시예 1-24 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 PD-L1 결합 분자는 단일 연속 폴리펩티드인 PD-L1 결합 분자.

[0718] [707] 26. 실시예 1-24 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 PD-L1 결합 분자는 2개의 폴리펩티드를 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0719] [708] 27. 실시예 26에 있어서, 상기 2개의 폴리펩티드 각각은 SEQ ID NO: 128의 서열을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0720] [709] 28. 실시예 26-27 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 2개의 폴리펩티드는 서로 비공유적으로 연결된 PD-L1 결합 분자.

[0721] [710] 29. 실시예 26-27 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 2개의 폴리펩티드는 결합 영역을 통해 서로 비공유적으로 연결된 PD-L1 결합 분자.

[0722] [711] 30. 실시예 1-29 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 결합 분자는 세포독성인 PD-L1 결합 분자.

[0723] [712] 31. 실시예 1-29 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 결합 분자는 비-세포독성인 PD-L1 결합 분자.

[0724] [713] 32. 실시예 1-31 중 어느 한 실시예의 PD-L1 결합 분자, 및 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 포함하는 약학 조성물.

[0725] [714] 33. 실시예 1-31 중 어느 한 실시예의 PD-L1 결합 분자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 또는 그의 상보체.

[0726] [715] 34. 실시예 33에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

[0727] [716] 35. 실시예 33에 따른 폴리뉴클레오티드 또는 실시예 34에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

[0728] [717] 36. (a) 실시예 1-31 중 어느 하나의 PD-L1 결합 분자를 발현시키고 (b) PD-L1 결합 분자를 회수하는 단계를 포함하는, 실시예 1-31 중 어느 한 실시예의 PD-L1 결합 분자를 제조하는 방법.

[0729] [718] 37. 실시예 36에 있어서, 상기 PD-L1 결합 분자를 발현시키는 단계는 PD-L1 결합 분자가 발현되는 조건하에 실시예 35의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법.

[0730] [719] 38. PD-L1 결합 분자 및 적어도 하나의 다른 생체분자를 포함하는 발현 시스템 조성물로부터 실시예 1-31 중 어느 한 실시예의 PD-L1 결합 분자를 정제하는 방법으로서, 상기 방법은 (i) 발현 시스템 조성물을 박테리아 단백질 L과 접촉시켜 PD-L1 결합 분자-단백질 L 복합체를 생성하고, 그리고 (ii) PD-L1 결합 분자-단백질 L 복합체를 회수하는 단계를 포함하는 방법.

[0731] [720] 39. 실시예 38에 있어서, 상기 발현 시스템 조성물은 세포 용해물인 방법.

[0732] [721] 40. 실시예 38-39 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 단백질 L은 *F. 마그나*로부터 단리되거나 유래되는 방법.

[0733] [722] 41. 실시예 38-40 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 단백질 L은 수지에 접합되는 방법.

[0734] [723] 42. PD-L1 발현 세포를 사멸시키는 방법으로서, 상기 방법은 세포를 실시예 1-31 중 어느 한 실시예에 따른 PD-L1 결합 분자 또는 실시예 32에 따른 약학 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

[0735] [724] 43. 대상체의 질병, 장애, 또는 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 실시예 1-31 중 어느 하나에 따른 PD-L1 결합 분자 또는 실시예 32에 따른 약학 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0736] [725] 44. 실시예 43에 있어서, 상기 질병, 장애, 또는 질환은 면역 장애 또는 미생물 감염인 방법.

[0737] [726] 45. 암을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 실시예 1-31 중 어느 한 실시예의 PD-L1 결합 분자 또는 실시예 32의 약학 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0738] [727] 46. 실시예 45에 있어서, 상기 암은 높은 돌연변이 부담(mutational burden) 및/또는 높은 빈도의 삽입-결실(indel)을 특징으로 하는 방법.

[0739] [728] 47. 실시예 45-46 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 암은 고형 종양인 방법.

[0740] [729] 48. 실시예 45-47 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 암은 방광암, 유방암, 결장암, 자궁내막암, 식도암, 자궁관암, 위장관암, 신경교종, 두경부암, 신장암, 간암, 폐암, 림프종, 메르켈 세포 암종, 중피종, 골수종, 비인두 신생물, 난소암, 췌장암, 복막 신생물, 전립선암, 피부암, 이행상피암종, 또는 요로상피암인 방법.

[0741] [730] 49. 실시예 45-47 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 암은 방광암이고, 방광암은 요로상피암종인 방법.

[0742] [731] 50. 실시예 45-47 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 암은 유방암이고, 유방암은 HER2 양성 유방암 또는 삼중 음성 유방암인 방법.

[0743] [732] 51. 실시예 45-47 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 암은 결장암이고, 결장암은 대장암인 방법.

[0744] [733] 52. 실시예 45-47 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 암은 위장관암이고, 위장관암은 위암, 담도 신생물, 또는 위식도 접합부 암인 방법.

[0745] [734] 53. 실시예 45-47 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 암은 신경교종이고, 신경교종은 교모세포종인 방법.

[0746] [735] 54. 실시예 45-47 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 암은 두경부암이고, 두경부암은 두경부 편평 세포 암종인 방법.

[0747] [736] 55. 실시예 45-47 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 암은 신장암이고, 신장암은 신장 세포 암종인 방법.

[0748] [737] 56. 실시예 45-47 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 암은 간암이고, 간암은 간세포 암종인 방법.

[0749] [738] 57. 실시예 45-47 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 암은 폐암이고, 폐암은 비-소세포성 폐암 또는 소세포성 폐암인 방법.

[0750] [739] 58. 실시예 45-47 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 암은 림프종이고, 림프종은 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 원발 가슴세로칸 큰 B-세포 림프종, 또는 미만성 거대 B-세포 림프종인 방법.

[0751] [740] 59. 실시예 45-47 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 암은 중피종이고, 중피 암종은 흉막 중피종인 방법.

[0752] [741] 60. 실시예 45-47 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 암은 골수종이고, 골수종은 다발성 골수종인 방법.

[0753] [742] 61. 실시예 45-47 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 암은 피부암이고, 피부암은 피부 또는 흑색종의 편평세포암종인 방법.

[0754] [743] 62. 실시예 45-61 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 암은 이필리무맙, 니볼루맙, 펨브롤리주맙, 아테졸리주맙, 더발루맙, 아벨루맙, 트레멜리무맙, 및 세미플리맙 중 적어도 하나를 포함하는 치료에 대해 재발하거나 불응성인 방법.

[0755] [744] 63. 실시예 45-62 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 암은 전이성인 방법.

[0756] [745] 64. SEQ ID NO: 41과 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드; PD-L1의 세포 외 부분에 특이적으로 결합할 수 있는 단일 사슬 가변 단편(scFv)(상기 scFv는 (a) (i) 아미노산 서열 EYTMH(SEQ ID NO:27)를 포함하는 CDR1, (ii) 아미노산 서열 GINPNNGGTWYNQKFKG(SEQ ID NO:29)를 포함하는 CDR2, 및 (iii) 아미노산 서열 PYYYGSREDYFDY(SEQ ID NO:32)를 포함하는 CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역(VH); 및 (b) (i) 아미노산 서열 SASSSVSYMY(SEQ ID NO:19)를 포함하는 CDR1, (ii) 아미노산 서열 LTSNLAS(SEQ ID NO:20)를 포함하는 CDR2, 및 (iii) 아미노산 서열 QQWSSNPPT(SEQ ID NO:26)를 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함함); 및 3 내지 12개 아미노산 길이인 VH와 VL 사이의 scFv 링커; 및 인간 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 세포독성 PD-L1 결합 분자.

[0757] [746] 65. 실시예 64에 있어서, 상기 VH는 SEQ ID NO: 34의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0758] [747] 66. 실시예 64 또는 65에 있어서, 상기 VL은 SEQ ID NO: 35의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 동일한

서열을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0759] [748] 67. 실시예 64에 있어서, 상기 VH는 SEQ ID NO: 34의 서열을 포함하고 VL은 SEQ ID NO: 35의 서열을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0760] [749] 68. 실시예 64-67 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 scFv 링커는 SEQ ID NO: 72의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0761] [750] 69. 실시예 64-68 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 scFv는 SEQ ID NO: 106의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0762] [751] 70. 실시예 64-69 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 PD-L1 결합 분자는 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드 및 scFv를 연결하는 결합 도메인 링커를 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0763] [752] 71. 실시예 70에 있어서, 상기 결합 도메인 링커는 SEQ ID NO: 73의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0764] [753] 72. 실시예 64-71 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 CD8+ T-세포 에피토프는 서열 NLVPMVATV(SEQ ID NO: 78)를 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0765] [754] 73. 실시예 64-72 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 CD8+ T-세포 에피토프는 스페이서(spacer)를 통해 scFv에 연결된 PD-L1 결합 분자.

[0766] [755] 74. 실시예 73에 있어서, 상기 스페이서는 서열 HHAA(SEQ ID NO: 265)를 갖는 PD-L1 결합 분자.

[0767] [756] 75. 실시예 64-74 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 PD-L1 결합 분자는 SEQ ID NO: 128의 서열, 또는 그에 대해 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0768] [757] 76. 실시예 64-75 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 PD-L1 결합 분자는 단일 연속 폴리펩티드인 PD-L1 결합 분자.

[0769] [758] 77. 실시예 76에 있어서, 상기 PD-L1 결합 분자는, N-말단에서 C-말단으로 순서대로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, scFv, 및 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 단일 연속 폴리펩티드인 PD-L1 결합 분자.

[0770] [759] 78. 실시예 76에 있어서, 상기 결합 분자는, N-말단에서 C-말단으로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, scFv, 및 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 단일 연속 폴리펩티드인 PD-L1 결합 분자.

[0771] [760] 79. 실시예 76에 있어서, 상기 결합 분자는, N-말단에서 C-말단으로 순서대로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, VH, scFv 링커, VL, 및 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 단일 연속 폴리펩티드인 PD-L1 결합 분자.

[0772] [761] 실시예 76에 있어서, 상기 결합 분자는, N-말단에서 C-말단으로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, scFv, 스페이서, 및 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 단일 연속 폴리펩티드인 PD-L1 결합 분자.

[0773] [762] 81. 실시예 64-75 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 PD-L1 결합 분자는 2개의 폴리펩티드를 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0774] [763] 82. 실시예 81에 있어서, 상기 2개의 폴리펩티드는 서로 비공유적으로 연결된 PD-L1 결합 분자.

[0775] [764] 83. 실시예 81 또는 82에 있어서, 상기 2개의 폴리펩티드는 결합 영역을 통해 서로 비공유적으로 연결된 PD-L1 결합 분자.

[0776] [765] 84. 실시예 81-83 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 2개의 폴리펩티드 각각은, N-말단에서 C-말단으로 순서대로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, scFv, 및 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0777] [766] 85. 실시예 81-83 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 2개의 폴리펩티드 각각은, N-말단에서 C-말단으로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, scFv, 및 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0778] [767] 86. 실시예 81-83 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 2개의 폴리펩티드 각각은, N-말단에서 C-말단으로 순서대로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, VH, scFv 링커, VL, 및 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0779] [768] 87. 실시예 81-83 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 2개의 폴리펩티드 각각은, N-말단에서 C-말단으로, 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드, 결합 도메인 링커, scFv, 스페이서, 및 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0780] [769] 88. 실시예 81-87 중 어느 한 실시예에 있어서, 상기 2개의 폴리펩티드 각각은 SEQ ID NO: 128의 서열을 포함하는 PD-L1 결합 분자.

[0781] [770] 89. SEQ ID NO: 128의 서열을 포함하는 단백질.

[0782] [771] 90. SEQ ID NO: 128의 서열로 구성되는 단백질.

[0783] **실시예**

[0784] [772] 하기 실시예는 본 발명의 특정 실시예를 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 단지 예시를 위한 것이고, 본 발명의 조건 및 범위에 대해 완전히 한정적인 의도가 아니며 그러한 것으로 해석되어서도 안 된다는 것을 이해해야 한다. 하기 실시예에서의 실험은, 달리 설명되지 않는 한, 당업자에게 잘 알려져 있고 일상적인 표준 기술을 사용하여 수행하였다.

[0785] [773] 다음 실시예는 몇 가지 예시적인 PD-L1 결합 분자를 설명한다. 하기 각각의 예시적인 PD-L1 결합 분자는, 세포-표적화 PD-L1 결합 영역에, 직접 또는 간접적으로 연결된 적어도 하나의 독소를 포함한다(예를 들어, 도 1 참조). 하기에 기술된 예시적인 세포독성 결합 분자는 표적화된 종양 세포-유형에 의해 발현되는 세포-표면 PD-L1 분자에 결합하고 그러한 표적 세포에 들어갔다. 실시예에 나타낸 내재화된 PD-L1 결합 분자 중 일부는, 독소가 리보솜을 불활성화시키고 후속적으로 표적 세포의 세포자멸사를 유발하는 표적 세포의 시토졸 구획(cytosolic compartments)으로 효과적으로 라우팅되는 독소 성분을 가졌다. 일부 예시적인 결합 분자는 면역원성 T-세포 에피토프-펩티드를 종양 표적 세포의 세포 내 MHC 클래스 I 경로에 효과적으로 전달할 수 있어, 세포-표면 제시, 세포 간 T-세포 결합, 및 사이토카인 분비 및/또는 표적 세포 사멸을 비롯한 면역 반응을 야기할 수 있었다.

[0786] [774] 실시예에서 예시적인 PD-L1 결합 분자에 사용된 단백질 독소 효과기 폴리펩티드는, 본 명세서에서 “불활성화된(inactivated)” 것으로 표시되지 않는 한, 촉매 및/또는 세포독성 활성을 유지하면서 탈면역화되었다. 일부 예시적인 PD-L1 결합 분자는 (1) 탈면역화되고; (2) 결합 분자의 폴리펩티드 성분의 아미노-말단 상에 또는 이에 근접하게 위치되고; (3) 본 명세서에 기술된 바와 같이 퓨린-절단 내성이고; 그리고/또는 (4) 내장되거나 삽입된 CD8+ T-세포 에피토프를 포함하는 적어도 하나의 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분을 포함한다.

[0787] **실시예 1. PD-L1 결합 도메인 발견**

[0788] [775] PD-L1 결합 도메인은 Abeome Corporation(Bogart, Georgia, U.S.A.)에 의해 확인되었거나 Abeome Corporation에 의해 확인된 PD-L1 결합 단백질에서 파생되었다(예: PCT/US2019/022971 참조). PD-L1 결합 단백질은 Abeome Corporation의 PD-L1 결합 친화도에 대해 친화성 성숙 단일클론 항-PD-L1 항체를 발현하는 형질전환 뮤린 B-세포를 스크리닝하는 방법과 관련된 문헌에 설명된 방법을 사용하여 확인되었다. 특정 항-PD-L1 항체 후보를 재조합 방법을 사용하여 선택적으로 인간화하여 뮤린/인간 키메라 서열을 만들고, 생성된 키메라 항-PD-L1 단일클론 항체를 PD-L1 결합 친화도 및 PD-L1/PD-1 결합의 억제 모두에 대해 스크리닝하였다. 특정 분자의 경우, 비정규 또는 짝을 이루지 않은 시스테인 잔기 및 N-글리코실화 부위와 같이, 추정되는 번역-후 변형 부위 및/또는 제조에 잠재적으로 불리한 것으로 확인된 아미노산 잔기가 변경되거나 제거되었다. 더 큰 PD-L1 결합 친화도가 필요한 경우, Abeome Corporation의 독점 방법을 사용하여 상보성 결정 영역(CDR)의 돌연변이 유발이 수행되었다.

[0789] [776] 항-PD-L1 항체를 발현하는 형질전환 뮤린 B-세포는 면역원으로서 재조합 PD-L1 세포 외 도메인(인간 PD-L1의 처음 239개 아미노산을 포함)을 사용하여 프라임/부스트 일정으로 피하 면역화된 형질전환 AbeoMice™로부터 얻었다. 림프 조직 샘플과 골수를 채취하고 모았고, 세포 표면에서 단일클론 항체(mAb)를 발현하는 B-세포를 분류하고 인간 PD-L1에 대한 결합에 대해 스크리닝하였다. 특정 B-세포 클론의 단일클론 항체의 가변 영역을 확인하고 키메라 mAb로 클로닝하였다. 후보 mAb는 PD-L1 결합 및 PD-1/PD-L1 상호작용 및/또는 PD-1 신호전달 축을 파괴하는 능력에 대해 특성화되었다.

[0790] **실시예 2. 시가 독소 A 서브유닛 성분을 포함하는 PD-L1 결합 분자**

[0791] I. PD-L1-표적화 면역독소의 구성 및 시험

[0792] [777] 실시예 1의 시가 독소 성분 및 후보 mAb 면역글로불린 도메인을 포함하는 PD-L1 결합 분자를 WO 2016/196344 및 WO 2018/140427에 이전에 기재된 바와 같이 설계, 발현, 및 정제하였다. 시가 독소 A1 단편에 대한 다양한 돌연변이가 이들 실시예에 기재된 PD-L1-표적화 면역독소의 독소 성분에 이용되었다. 예를 들어, 실시예 2의 예시적인 PD-L1-표적화 면역독소에 사용된 모든 시가 독소 A1 단편은 탈면역화되었다(본 명세서에서 "DI-SLT-A1"로 지칭됨). 예시적인 PD-L1-표적화 면역독소는, 각각 실시예 1에서 확인된 가변 영역 PD-L1 결합 도메인 및 "DI-SLT-A1"의 하나 이상의 변이체로부터 유래된 예시적인 항-PD-L1 scFv를 포함하는, 융합 단백질로서 구성되었다. 이들 PD-L1-표적화 면역독소는 본 명세서에서 "DI-SLT-A1 융합 단백질"로 지칭된다. 116297의 단백질 제제는, 동종이량체가 압도적으로 우세한 이량체보다 큰 크기의, 단량체(즉, SEQ ID NO: 128을 포함하는 단백질의 단량체), 동종이량체(즉, 각각 SEQ ID NO: 128의 서열을 포함하는 두 단백질의 이량체), 및 동종다량체(즉, 각각 SEQ ID NO: 128의 서열을 포함하는 3개 이상의 단백질의 다량체)의 혼합물을 포함한다. 115749의 제제는 주로 단량체(즉, SEQ ID NO: 113을 포함하는 단백질의 단량체)를 포함한다.

[0793] [778] 예시적인 항-PD-L1 scFv를 포함하는 PD-L1-표적화 면역독소(DI-SLT-A1 융합 단백질)를 ELISA(enzyme-linked immuno assay) 형식으로 PD-L1 재조합 단백질에 대한 결합에 대해 시험하였다. 간략하게, Nunc Maxisorp® 플레이트를 재조합 인간 또는 시노몰구스 마카크(cynomolgus macaque) PD-L1 세포 외 도메인(ECD) 단백질로 코팅하고, PBS로 세척하고, 비특이적 배경 잡음을 줄이기 위해 차단하였다. DI-SLT-A1 융합 단백질을 PD-L1 ECD 단백질과 함께 배양하고, 샘플을 세척한 다음, 겨자무과산화효소(HRP: horseradish peroxidase)에 접합된 항 DI-SLT-A1 mAb를 사용하여 DI-SLT-A1 융합 단백질 수준을 검출하였다. ELISA 신호는 TMB-Ultra(3',5,5'-테트라메틸벤지딘)와 함께 배양한 후 염산으로 중화한 후 검출되었다. 450 나노미터(nm)에서의 흡광도 값(Abs)을 플레이트 판독기를 사용하여 판독하고, 완충액 단독 대조군으로부터의 배경 ELISA 신호를 감한다. 비선형 곡선 회귀 분석(Prism (GraphPad Prism, San Diego, CA, U.S.A., Prism software function sigmoidal 4PL)을 사용하여 Bmax 및 K_D를 결정하기 위해, MFI(mean fluorescent intensity) 값을 로그 변환된 DI-SLT-A1 융합 단백질 농도의 함수로 플롯팅하였다. 이러한 결합 실험의 일부 결과는 표 7 및 **도 2, 3, 15, 및 34**에 제시되어 있다. 표 7은 밀리리터당 나노그램(ng/mL)으로 측정된 해리 상수(K_D) 및 MFI로 측정된 Bmax를 보여준다.

[0794] [779] DI-SLT-A1 융합 단백질 115749(SEQ ID NO:113) 및 115750(SEQ ID NO:114)은 다른 종의 PD-L1에 대한 결합에 대해 시험되었고, 도 2에 도시된 것처럼 인간 및 시노몰구스 마카크 PD-L1에는 결합하지만 쥐 PD-L1에는 결합하지 않는 것으로 결정되었다. 인간, 마카크, 및 쥐의 PD-L1에 결합하는 것으로 알려진 아테졸리주맙에 존재하는 면역글로불린 결합 도메인을 포함하는 PD-L1을 표적으로 하는 대조군 DI-SLT-A1 융합 단백질(114964)을 양성 대조군으로 사용하였다.

[0795] [780] PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO:113) 및 115750(SEQ ID NO:114) 모두 이 분석에서 인간 PD-L1 및 시노몰구스 마카크 PD-L1에 결합하였지만 뮤린 PD-L1에는 결합하지 않았다(**도 2**; 표 7).

[0796] [781] 경쇄 도메인과 중쇄 도메인 사이의 scFv 도메인 간 링커에서만 다른, 밀접하게 관련된 DI-SLT-A1 융합 단백질은 PD-L1에 대한 결합 친화성을 특성화하기 위해 유사한 분석에서 시험되었다. 이 실험에서, DI-SLT-A1 융합 단백질의 희석 시리즈는 인간 또는 시노몰구스 마카크 PD-L1 재조합 단백질에 대한 결합에 대해 시험되었다. 이러한 결합 실험의 일부 결과는 표 7 및 **도 3, 15, 및 34**에 제시되어 있다.

[0797] [782] PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO:113) 및 116297(SEQ ID NO:128) 둘 모두는 재조합 인간 PD-L1 및 시노몰구스 마카크 PD-L1에 결합하였다(표 7; **도 3, 15, 및 34**).

표 7

[0798] **표 7. 인간 또는 시노몰구스 마카크 기원으로부터의 재조합 PD-L1 단백질에 대한 예시적인 PD-L1 결합 DI-SLT-1A 융합 단백질의 결합 특성**

DI-SLT-1A 융합 단백질	재조합 단백질	K_D (ng/mL)	Bmax(MFI)
115749(SEQ ID NO:113)	인간 PD-L1-Fc	2.10	3.95
	시노몰구스 PD-L1-Fc	2.16	3.95
116297(SEQ ID NO:128)	인간 PD-L1-Fc	1.75	3.98

시노몰구스 PD-L1-Fc	1.66	3.99

[0799] [783] PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO:113), 116188(SEQ ID NO:126), 및 116297(SEQ ID NO:128)은 각각 유사한 결합 특성을 갖는 인간 및 시노몰구스 마카크 PD-L1 단백질 둘 다를 결합하였다(**도 3, 13, 15, 17A-17B, 및 34**). 표 7 및 **도 3 및 15**에 제시된 결과는 115749(SEQ ID NO:113) 및 116297(SEQ ID NO:128) 둘 모두가 유사한 친화도 및 Bmax 값으로 인간 및 시노몰구스 마카크(cynomolgus macaque) PD-L1에 결합한다는 것을 입증한다. 또한, **도 3**의 결과는 116297(SEQ ID NO:128)의 관련 변이체인 116188(SEQ ID NO:126)이 PD-L1에 대한 유사한 결합 특성을 나타냄을 보여준다. 동일한 분석을 사용하는 또 다른 실험에서, PD-L1 재조합 단백질에 대한 115749(SEQ ID NO:113)의 친화도는 동일한 PD-L1 재조합 단백질에 대한 115961(SEQ ID NO:123)의 친화도와 유사한 것으로 나타났다.

[0800] [784] 예시적인 PD-L1 결합 분자 116297(SEQ ID NO:128)은 유사한 친화도로 재조합 인간 및 시노몰구스 단백질에 결합하였지만(**도 3, 13, 15, 17A-17B, 및 34**); 116297(SEQ ID NO:128)은 설치류 PD-L1에 결합하지 않았다(**도 17a-17b**).

[0801] [785] HCC1954 세포를 발현하는 PD-L1에 대한 115749(SEQ ID NO:113)의 결합을 유세포 분석에 의해 측정하였다. 세포를 하기와 같이 수행된 결합 분석 전에 하루 동안 IFN-감마(IFN-γ)로 처리하였다. 융합 단백질 115749(SEQ ID NO:113)를 세포에 첨가하고 샘플을 얼음 위에서 1시간 동안 배양하였다. 세포를 세척하고, FITC에 접합된 항-DI SLT-A1 mAb를 사용하여 DI-SLT-A1 융합 단백질을 검출하였다. **도 4**는 이 분석 결과를 보여준다. PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO:113)는 HCC1954 세포를 발현하는 PD-L1에 대한 용량-의존적 결합을 나타내었다(**도 4**).

[0802] [786] 특히, PD-L1 발현 세포 결합 분석에서, 116297, 115749, 115695, 및 116555의 결합 친화도는 비슷하다(예를 들어, 도 15 참조). PD-L1 양성 세포-사멸 분석에서, 116297 및 115765에 대한 CD50 값은 비슷하다(예: 도 14 참조).

[0803] Ⅱ. 독소 효소 활성 및 면역독소 세포독성 결정

[0804] [787] 예시적인 PD-L1 결합 영역을 포함하는 DI-SLT-A1 융합 단백질은 DI SLT-A1 시가 독소 효과기 폴리펩티드 단독과 유사한 리보솜 불활성화 활성을 갖는 것으로 입증되었다. 리보솜 억제 분석은 TNT® Quick Coupled Transcription/Translation 키트(L1170 Promega Madison, WI, U.S.A.)를 사용하여 세포가 없는 시험관 내 단백질 번역 분석을 사용하였다. 키트에는 Luciferase T7 Control DNA(L4821 Promega Madison, WI, U.S.A.) 및 TNT® Quick Master Mix가 포함되어 있다. 리보솜 활성 반응은 제조사 지침에 따라 준비되었다. 일련의 희석액(일반적으로 10배)을 적절한 완충액에서 제조하고 각 희석액에 대해 일련의 동일한 TNT 반응 혼합물 성분을 생성하였다. 단백질 샘플을 루시퍼라제 T7 대조군 DNA와 함께 각각의 TNT 반응 혼합물과 조합하였다. 시험 샘플을 30° C에서 1.5시간 동안 배양하였다. 배양 후, 루시퍼라제 분석 시약(E1483 Promega, Madison, WI, U.S.A.)을 모든 시험 샘플에 첨가하고 루시퍼라제 단백질 번역의 양을 제조사 지침에 따라 발광에 의해 측정하였다. 번역 억제 수준은 로그-변환된 총 단백질 농도 대 상대적 발광 단위의 비선형 회귀 분석에 의해 결정되었다. 통계 소프트웨어(GraphPad Prism, San Diego, CA, USA)를 사용하여, 용량-반응-억제 표제 아래의 log(억제제) 대 반응(3개 매개변수) [Y = 하단 + ((상단 - 하단)/(1+10^(X-LogIC$_{50}$)))]의 Prism 소프트웨어 함수를 사용하여 각 샘플에 대해 IC$_{50}$(half maximal inhibitory concentration) 값을 계산하였다. 이 리보솜 억제 분석의 일부 결과는 표 8, **도 5, 도 13-14, 및 도 33**에 도시되어 있다.

표 8

[0805] **표 8. 단백질 합성 억제를 통해 분석된 예시적인 PD-L1-표적화 DI-SLT-1A 융합 단백질의 촉매 활성**

DI-SLT-1A 융합 단백질	IC$_{50}$(ng/mL)
115749(SEQ ID NO:113)	0.25
115961(SEQ ID NO:123)	0.88
DI-SLT-1A 단독	0.20

[0806] [788] 예시적인 PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO:113) 및 115961(SEQ ID NO:123)은, 115961(SEQ ID NO:123)이 약간 덜 강함에도, 양성 "대조군" 분자인 시가 독소 효과기 폴리펩티드(DI-SLTA) 단독과 유사한 리보솜 억

제 활성을 나타내었지만, 어떠한 표적화제 또는 결합 영역(즉, SEQ ID NO: 41을 포함하는 폴리펩티드)과도 결합되지 않았다(**도 5**; 표 8). 115749(SEQ ID NO:113)는 예를 들어, DI-SLTA 단독 수준에서와 같은(즉, SEQ ID NO: 41을 포함하는 폴리펩티드), 강력한 단백질 합성 억제의 시가 독소 기능을 유지하였다(표 8; **도 5**).

[0807] [789] **도 13, 14, 및 33**은 또한 116297(SEQ ID NO:128)에 대한 리보솜 억제 분석 결과를 보고한다. 예시적인 PD-L1 결합 분자 116297(SEQ ID NO:128)은 115749(SEQ ID NO:113)(IC50 0.25ng/mL)와 유사한 리보솜 억제 활성 수준(IC50 0.36ng/mL)을 나타내었다(표 8 참조). 116297(SEQ ID NO:128)은 115749(SEQ ID NO:113)와 유사한 리보솜 억제 활성을 나타내었고 어떠한 표적화제 또는 결합 영역(즉, SEQ ID NO: 41을 포함하는 폴리펩티드)과도 결합되지 않은 양성 "대조군" 분자인 시가 독소 효과기 폴리펩티드(DI-SLTA) 단독을 나타내었다(**도 14 및 33**).

[0808] [790] 예시적인 scFv 및 다른 PD-L1 표적화된 결합 도메인을 포함하는 DI-SLT-A1 융합 단백질을 세포 표면에서 PD-L1을 발현하는 세포에 대한 특이적 세포독성에 대해 시험하였다. 간략하게, 세포를 플레이팅한 다음 희석 시리즈의 DI-SLT-A1 융합 단백질과 함께 배양하고, 3 내지 5일 동안 배양한 다음 CellTiter-Glo로 생존력을 판독한다. RLU(Relative Luminescence value)를 측정하고 세포만 대조군 웰로 정규화하였다. 생존력을 로그 변환 농도의 함수로 플롯팅하고 CD_{50}을 GraphPad Prism에서 비선형 회귀(log(억제제) 대 반응(3개 매개변수))로 계산하였다. CD_{50} 값이 시험된 농도에 대한 곡선의 모양을 기반으로 계산될 수 없을 때, 시험된 최고 샘플 농도에서 세포의 50%를 사멸시키지 않은 샘플의 경우, 최대 CD_{50} 값은 최대 시험 값을 초과하는 것으로 기록되었다(예: 20,000ng/mL 초과("> 20,000ng/mL")). 인간, 시노몰구스 마카크(cynomolgus macaque), 또는 쥐 PD-L1을 발현하도록 형질감염된 CHO-K1 세포주를 세포 생존율 판독 전 4일 동안 115749(SEQ ID NO:113) 또는 115750(SEQ ID NO:114)(희석 시리즈에서)과 함께 배양하였다(Cell Titer Glo, Promega, Madison, WI, USA). 이 세포독성 실험의 일부 결과는 표 9 및 **도 6a-6b**에 제시되어 있다.

표 9

[0809] **표 9. 시험관 내 세포 생존력 분석을 통해 분석된 인간 또는 시노몰구스 마카크 PD-L1을 발현하는 세포에 대한 예시적인 PD-L1 표적화 DI-SLT-1A 융합 단백질의 세포독성**

DI-SLT-1A 융합 단백질	CD_{50}(ng/mL)		
	인간 PD-L1/ CHO-K1	시노몰구스 PD-L1/ CHO-K1	쥐 PD-L1/ CHO-K1
115749	48.85	7.09	> 20,000
115750	50.78	6.74	> 20,000

[0810] [791] **도 6a**는 PD-L1 결합 분자 115749(SEQ ID NO:113)를 도시하고 **도 6b**는 PD-L1 인간 또는 시노몰구스 마카크 PD-L1을 발현하지만 뮤린 PD-L1은 발현하지 않는 115750(SEQ ID NO:114) 사멸 세포를 도시한다. 표 9 및 **도 6a-6b**에 제시된 결과는 115749(SEQ ID NO:113) 및 115750(SEQ ID NO:114)의 세포독성 특이성이 인간 및 시노몰구스 마카크로부터의 PD-L1의 존재와 상관관계가 있지만, 쥐로부터는 그렇지 않음을 입증하였다.

[0811] [792] 상기 기재된 시험관 내 세포 생존력 분석을 사용하여, 예시적인 PD-L1 결합 분자 116297(SEQ ID NO:128)은 인간 또는 시노몰구스 PD-L1을 발현하는 세포를 사멸시켰지만 쥐 PD-L1은 그렇지 않았다(**도 17a-17b**).

[0812] [793] 인간 불멸화 암 세포를 115749(SEQ ID NO:113) 또는 115750(SEQ ID NO:114) 또는 DI-SLT-1A 시가 독소 효과기 폴리펩티드(희석 시리즈에서)와 함께 5일 동안 배양한 후(배지는 이 기간 동안 모든 샘플에 대해 한 번 리프레시하였음(refreshed)) 전술한 분석을 사용하여 세포 생존력을 판독하였다(Cell Titer Glo, Promega, Madison, WI, U.S.A.). 별도의 유세포 분석 실험에서, 이러한 세포주는 세포 표면의 PD-L1 발현에 대해 프로파일링되었다. 이러한 세포주를 포함하는 실험은 상호 1주일 이내에 실행되었다. 이 세포독성 실험의 일부 결과는 표 10 및 **도 7**에 제시되어 있다.

표 10

[0813] **표 10. 시험관 내 세포 생존력 분석을 통해 분석된 PD-L1 발현 인간 종양 세포에 대한 예시적인 PD-L1 표적화 DI-SLT-1A 융합 단백질의 세포독성**

	CD_{50}(ng/mL)				
	HCC1954	HCC-827	JIMT-1	MDA-MB-231	MDA-MB-468

PD-L1 발현	양성	양성	양성	양성	음성
115749	14.26	439	480	70.04	> 20,000
115750	8.27	371	351	44.08	> 20,000
DI-SLT-1A 단독	4,783	> 20,000	19,049	6,360	DNT

[0814] *"DNT"는 시험하지 않음을 의미함.

[0815] [794] 표 10 및 **도 7**에 제시된 결과는, 115749(SEQ ID NO:113)가 PD-L1을 발현하는 인간 암 세포주에 대해 농도 범위에 걸쳐 세포독성인 반면, 표적화되지 않은 DI SLT-1A 단독("DI-SLT-1A 단독", 즉 SEQ ID NO: 41을 포함하는 폴리펩티드)은 시험된 농도에서 비교적 낮은 세포독성을 나타내었다(DI SLT-1A는 고농도에서만 그리고 특정 세포주에 대해서만 세포독성이었음). **도 16**은 116297(SEQ ID NO:128)이 115749(SEQ ID NO:113)보다 더 큰 세포독성을 나타낼 수 있음을 보여준다.

[0816] [795] 관련 DI-SLT-A1 융합 단백질에 대해 상기 기술한 바와 같이 추가의 세포 생존력 실험을 본질적으로 수행하였다. 대표적인 PD-L1 양성 세포주인 HCC-1954 및 MDA-MB-231에 대한 이러한 실험의 일부 결과는 표 11 및 **도 8**에 제시되어 있다. 이러한 세포독성 실험에서 시험된 DI-SLT-A1 융합 단백질은 면역글로불린형 결합 도메인의 가변 영역에서 동일하거나 유사한 CDR 서열을 갖는다.

표 11

[0817] **표 11. 시험관 내 세포 생존력 분석을 통해 분석된 PD-L1 발현 인간 종양 세포에 대한 예시적인 PD-L1 표적화 DI-SLT-1A 융합 단백질의 세포독성**

DI-SLT-1A 융합 단백질	CD_{50}(ng/mL)	
	HCC1954	MDA-MB-231
115744(SEQ ID NO:108)	24	453
115745(SEQ ID NO:109)	1	7.85
115747(SEQ ID NO:111)	376	287
115748(SEQ ID NO:112)	254	708
115749(SEQ ID NO:113)	9	34
115750(SEQ ID NO:114)	13	47
115751(SEQ ID NO:115)	14.36	177.3
115752(SEQ ID NO:116)	26.54	99.43
115753(SEQ ID NO:117)	20.14	103.2
115754(SEQ ID NO:118)	12.25	54.03
115755(SEQ ID NO:119)	42.24	138.3
115756(SEQ ID NO:120)	19.81	60.76
115757(SEQ ID NO:121)	18.61	68.31
115758(SEQ ID NO:122)	18.9	59.64

[0818] [796] PD-L1 결합 분자 115744(SEQ ID NO:108), 115745(SEQ ID NO:109), 115747(SEQ ID NO:111), 115748(SEQ ID NO:112), 115749(SEQ ID NO:113), 115750(SEQ ID NO:114), 115751(SEQ ID NO:115), 115752(SEQ ID NO:116), 115753(SEQ ID NO:117), 115754(SEQ ID NO:118), 115755(SEQ ID NO:119), 115756(SEQ ID NO:120), 및 115757(SEQ ID NO:121)은 2개의 상이한 PD-L1-발현 세포-유형: HCC-1954 및 MDA-MB-231 세포에 대해 세포독성을 나타냈다(표 11; **도 8**).

[0819] [797] 관련 DI-SLT-A1 융합 단백질에 대해 유사한 형식으로 추가 세포 생존력 실험을 수행하였다. 이들 실험에서 시험된 DI-SLT-A1 융합 단백질은 면역글로불린형 결합 도메인의 가변 영역에서 동일하거나 유사한 CDR 서열을 갖는다. 대표적인 PD-L1 양성 세포주인 HCC-1954 및 MDA-MB-231에 대한 이러한 실험의 일부 결과는 표 12 및 **도 9**에 제시되어 있다. 표 12에서 사용된 "DI-SLTA-1A 단독"은 SEQ ID NO: 41을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

표 12

[0820] **표 12. PD-L1 양성 또는 음성 인간 종양 세포에 대한 예시적인 PD-L1 결합 DI-SLT-A1 융합 단백질의 세포독성**

활성

	CD_{50}(ng/mL)					
세포주	**HCC1954**	**HCC-827**	**JIMT-1**	**MDA-MB-231**	**MCF-7**	**SKBR3**
PD-L1	양성	양성	양성	양성	낮은/음성	음성
116297	5.9	57.4	25.2	6.9	> 20,000	> 20,000
116299	8.2	31.0	36.2	9.8	> 20,000	> 20,000
DI-SLT-1A 단독	> 20,000	8,505	>20,000	1,208	> 20,000	> 20,000

[0821] [798] PD-L1 결합 분자 116297(SEQ ID NO:128) 및 116299(SEQ ID NO:129)는 4가지 상이한 PD-L1-발현 세포 유형: HCC 1954, JIMT-1, HCC 827, 및 MDA-MB-231에 대해 세포독성을 나타냈다(**도 9**; 표 12). 표 10-12 및 **도 7-9**에서 특성화된 PD-L1 결합 분자는 세포독성 T-세포가 없는 상태에서 약 1 내지 480 ng/mL의 CD_{50} 값을 나타내었다. 이론에 얽매이지 않고, 이러한 결과는, 특정 PD-L1 결합 분자가 생체 내에서 "차가운(cold)" 종양 세포 또는 "비염증성(non-inflamed)"으로 특성화되거나 면역감시에서 제외되는 종양의 종양 세포, 예를 들어 "면역-배제 종양(immune-excluded tumors)"에 대해 세포독성임을 시사한다. 예를 들어, 일부 PD-L1 결합 분자는 종양 침윤 림프구가 없고 종양 미세환경의 면역 조절 상태와 관계없이 생체 내에서 종양 세포에 세포독성일 수 있다. 이론에 얽매이지 않고, 일부 PD-L1 결합 분자는 종양 세포의 돌연변이 부담에 관계없이 생체 내에서 종양 세포에 세포독성일 수 있다. 따라서, 표적 세포-사멸 작용 메커니즘(들)은 종양 면역 상태(예: 면역-배제, 비염증성, 및/또는 "차가운")에 관계없이 생체 내 표적 종양 세포 사멸을 허용한다.

[0822] [799] 인간 불멸화 암 세포를 116297(SEQ ID NO:128), 115749(SEQ ID NO:113), 115765(SEQ ID NO: 161), 또는 114895(SEQ ID NO: 163)와 함께 5일 동안 배양한 후(배지는 이 기간 동안 모든 샘플에 대해 한 번 리프레시하였음(refreshed)) 전술한 분석을 사용하여 세포 생존력을 판독하였다(Cell Titer Glo, Promega, Madison, WI, U.S.A.). 이 세포독성 실험의 결과는 **도 43a-43b**에 도시되어 있다. 이들 결과는, 116297(SEQ ID NO:128)이 PD-L1을 발현하는 인간 암 세포주(HCC1954(**도 43a**) 및 MDA-MB-231(**도 43b**))에 대해 농도 범위에 걸쳐 세포독성을 나타내고, 115749(SEQ ID NO:113), 115765(SEQ ID NO:161), 및 114895(SEQ ID NO: 163)보다 더 큰 세포독성을 나타낼 수 있다는 것을 설명한다.

[0823] [800] **도 18**은 다양한 임상적으로 관련된 종양 세포주에 대한 116297(SEQ ID NO:128)에 대해 세포-표면 PD-L1 발현 수준(**도 18a**) 및 CD_{50} 값(**도 18b**)을 보고한다. PD-L1은, 인간 폐, 피부, 및 유방암 기원의 세포주에서 유래한 세포를 포함하여, 다양한 인간 종양 세포의 세포 표면에서 발현된다. 116297(SEQ ID NO:128)은 광범위한 항-종양 세포독성을 나타내었다. 116297(SEQ ID NO:128)은 PD-L1을 발현하는 표적 세포를 특이적이고 강력하게 사멸시킨다.

[0824] [801] **도 19, 20a-20b, 및 21a-21b**는 PBMC 샘플로부터의 면역 세포의 서브세트에 대한 PD-L1 발현 수준이 116297(SEQ ID NO:128) 처리의 세포독성 효능과 관련되어 있음을 보여준다. **도 19**는 인간 공여자 PBMC 샘플이 단핵구 및 림프구를 포함하고, 여기서 단핵구는 PD-L1의 발현을 상승시키기 위해 인터페론 감마 처리에 의해 유도될 수 있음을 입증한다. **도 20a**는 PBMC에 대한 116297(SEQ ID NO:128) 세포독성이 더 높은 수준의 PD-L1을 발현하는 IFN-γ 처리된 단핵구로 제한된다는 것을 입증한다. **도 20a-20b 및 도 21a-21b**는 116297(SEQ ID NO:128)이 PD-L1 음성 림프구에 대한 세포독성 없이 "PD-L1 고-발현(PD-L1 high-expressing)" 단핵구에 대해 선택적 세포독성을 나타낼 수 있음을 보여준다. **도 21b**는 시험된 조건하에 PD-L1 발현 수준 대 116297(SEQ ID NO:128)의 CD50 값의 플롯을 보여준다. **도 21a-21b**는 116297(SEQ ID NO:128)의 더 높은 PD-L1 발현과 더 큰 세포독성 효능(즉, 더 낮은 CD50 값) 사이에 일반적인 상관관계가 있음을 입증한다. 단핵구에서 PD-L1 발현은 염증성 사이토카인 IFN-γ에 의해 향상된다. **도 20a-20b**는 116297(SEQ ID NO:128)이 생체 외에서 PD-L1 양성 인간 면역 세포에 대해 세포독성을 나타낸다는 것을 보여준다. 116297(SEQ ID NO:128)에 의한 면역 세포의 직접적인 사멸은 PD-L1 발현을 필요로 한다. 116297(SEQ ID NO:128)은, IFN-γ의 존재 또는 부재하에 PD-L1을 발현하지 않는, 벌크 림프구 집단을 표적으로 하지 않는다. 116297(SEQ ID NO:128)은 종양 환경에서 PD-L1을 발현하는 종양 세포(TC) 및 면역 세포(IC)를 모두 고갈시키도록 설계되었다. 생체 외 단핵구에 의한 PD-L1 발현의 IFN-γ 유도는 종양의 IC에 대한 적응 PD-L1 발현과 일치한다(예: Kowanetz M et al., Proc Natl Acad Sci U. S. A. 115: E10119-E10126 (2018) 참조). 다른 PD-L1 표적 제제는 종양 세포 또는 면역 세포에 대해 PD-L1 양성인 환자에서 활성을 입증하였다(Kowanetz M et al., Proc Natl Acad Sci U. S. A. 115: E10119-E10126 (2018); Tang

F, Zheng P, Cell Biosci 8: 34 (2018)).

[0825] III. CD8+ T-세포 에피토프 전달 및 면역 반응 유도 시험

[0826] [802] 표적 세포의 표면 상의 항원의 기능적 제시에 대해 예시적인 분자를 시험하였다. 이 실시예에서, 인간에서 면역원성이 있는 것으로 알려진 바이러스 CD8+ T-세포 에피토프-펩티드를 DI-SLT-A1 융합 단백질에 융합하기 위해 선택하였다. 이 실시예에서 사용된 CD8+ T-세포 에피토프-펩티드 NLVPMVATV(SEQ ID NO:78)는 인간 MHC 클래스 I 분자에 결합하여 인간 CTL-매개 면역 반응(들)을 유발하는 이 펩티드의 능력을 기반으로 선택되었다. 이 바이러스 에피토프-펩티드는 소포체를 통한 역행 수송을 통해 시토졸로 세포 내 라우팅하는 고유 능력을 갖는 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 포함하는 PD-L1 표적화 단백질에 융합되었다(예: WO 2016/196344 및 WO 2018/140427 참조).

[0827] [803] 면역원성, 바이러스 에피토프-펩티드의 기능적 제시를 시험하기 위해, 공동-배양 분석을 사용하였다. 표적 암 세포주 MDA-MB-231(NR)(PD-L1 및 HLA-A02를 발현하고 형광 정량화를 위해 IncuCyte® NucLight Red Lentivirus 시약(Essen Bioscience, Ann Arbor, MI, U.S.A.)으로 형질감염된 MDA-MB-231 세포)을 면역원성 바이러스 펩티드가 없는 예시적인 DI-SLT-A1 융합 단백질 또는 관련 대조군 DI-SLT-A1 융합 단백질로 처리한 다음 NLVPMVATV(SEQ ID NO:78) 펩티드 특이적 CTL이 강화된(표준 조건에서 배양된 HLA-A02 양성, CMV 혈청 양성 공여자 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)가 강화된) 림프구에 노출시켰다. NLVPMVATV(SEQ ID NO:78) 펩티드 특이적 CTL이 강화된 림프구는 이하 CMV-CTL로 지칭된다.

[0828] [804] CMV-CTL 신호전달의 자극은 상청액(ELISA)의 IFN-γ 수준에 의해 측정되었고, 결합된 CMV-CTL에 의해 지시된 특정 표적 세포 용해는 표적 세포 생존력에 의해 측정되었다(IncuCyte®S3 Live-Cell Analysis System(Essen Bioscience, Ann Arbor, MI, U.S.A.) 판독에서 및 종말점 Cell Titer-Glo 분석으로 형광에 의해 동역학적으로). 간략하게, PD-L1 양성 세포주 MDA-MB-231(NR)은 인산염 완충 식염수(PBS) 단독("완충액만") 또는 DI-SLT-A1 융합 단백질과 함께 최대 24시간 동안 배양되었다. 배양 후, 세포를 세척하고 CMV-CTL을 함유하는 배지를 표적 세포와 공동-배양하였다. 24 내지 48시간 후, 상청액을 채취하고 제조사의 지침에 따라 사이토카인-특이적 IFN-γ ELISA 키트(Biolegend, Inc., San Diego, CA, U.S.A.)로 IFN-γ 농도를 측정하였다. 일부 실험에서, 상청액을 채취한 후, 부착된 표적 세포를 세척하여 PBMC를 제거하고 세포 생존력을 제조사의 지침에 따라 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay(G7573, Promega Corp., Madison, WI, USA)로 평가하였고, RLU에서 측정하였다.

[0829] [805] MDA-MB-231(NR) 표적 세포(분석 24시간 전에 IFN-γ의 존재하에 웰당 30,000개의 세포를 플레이팅함)를 (1) 이종 CD8+ T-세포 에피토프 카고(epitope cargo)("항원 전달(antigen delivering)")(예: 115749(SEQ ID NO:113)) 또는 (2) 바이러스 항원 카고가 결여된(본 명세서에서 "항원 없음" 또는 "대조군 결합 분자"로 지칭됨)(예: 115749(SEQ ID NO:113)와 밀접하게 관련된 115961(SEQ ID NO:123)) 일치하는 DI-SLT-A1 융합 단백질 쌍과 함께 24시간 동안 배양하였다. 바이러스 항원 카고가 있는 115749(SEQ ID NO:113)의 일치된 쌍 및 바이러스 항원 카고가 없는 관련 115961(SEQ ID NO:123)에 추가하여, 시험된 또 다른 일치된 쌍은 바이러스 항원 카고가 있는 DI-SLT-A1 융합 단백질 115750(SEQ ID NO:114) 및 바이러스 항원 카고가 없는 관련 DI-SLT-A1 융합 단백질 115962(SEQ ID NO:124)이었다. 결과는 **도 10a**에 도시되어 있다.

[0830] [806] 세포를 세척한 다음 CMV-CTL을 표적 세포에 1:1 CMV-CTL의 비율로 첨가하였다. 48시간에, IFN-γ 분비를 위해 상청액을 제거하고 배지를 교체하였다. 처리되지 않은 대조군과 비교하여 처리된 세포의 생존력을 시간 경과에 따라 모니터링하였고, 80시간 후의 생존력을 나타내었다. 이 면역원성 실험의 일부 결과는 표 13, **도 10a 및 10b, 및 도 24b**에 제시되어 있다.

표 13

[0831] **표 13. 바이러스 항원 카고를 포함하는 DI-SLT-1A 융합 단백질을 사용한 표적 세포 치료에 대한 CMV-CTL의 기능적 반응**

	Endpoint at 5,000 μg/mL		"항원 없음" 대조군 결합 분자에 대해 계산된 변화	
	IFN-γ 분비(Abs 450 nm, max 4.0)	세포 생존력(T0 대조군의 %)	배수 변화 IFN-γ 증가	배수 변화 세포 사멸 증가
융합 단백질 없음		167%	N/A	N/A
115749	4.00	45.8%	50	100
115961(항원 없음)	0.08	144%	N/A	N/A

115750	4.00	42.0%	50	100
115962(항원 없음)	0.08	142%	N/A	N/A

[0832] [807] 표 13 및 **도 10a 및 10b**에 제시된 데이터는 DI-SLT-A1 융합 단백질 115749(SEQ ID NO:113) 및 115750(SEQ ID NO:114)을 운반하는 항원 카고가 CMV-CTL 세포를 자극하여 사이토카인(IFN-γ) 분비 및 표적 세포 사멸을 유도할 수 있었고, 이러한 특성은 어떠한 바이러스 항원 화물도 포함하지 않는 대조군 DI-SLT-A1 융합 단백질 115961(SEQ ID NO:123) 및 115962(SEQ ID NO:124)에는 존재하지 않음을 입증한다.

[0833] [808] 유사한 면역원성 분석을 사용하여, IFN-γ 분비 유도를 DI-SLT-A1 융합 단백질의 추가 쌍을 투여한 후 측정하였고, 하나는 융합된 바이러스 항원을 포함하고 다른 하나는 바이러스 항원 카고가 없는 대조군 DI-SLT-A1 융합 단백질이다. MDA-MB-231(NR) 표적 세포(분석 24시간 전에 IFN-γ의 존재하에 웰당 10,000개의 세포를 플레이팅함)를 항원 전달 능력이 있거나 없는 DI-SLT-A1 융합 단백질의 일치된 쌍, 예를 들어 바이러스 항원이 없는 연관 DI-SLT-A1 융합 단백질 115961(SEQ ID NO:123)과 쌍을 이루는 115749(SEQ ID NO:113)를 전달하는 항원; 및 항원 카고가 없는 연관 DI-SLT-A1 융합 단백질 116187(SEQ ID NO:125)과 쌍을 이루는 항원 전달 116297(SEQ ID NO:128) 또는 116299(SEQ ID NO:129)와 함께 24시간 동안 배양되었다. 세포를 세척한 다음 CMV-CTL을 표적 세포에 1:1 CMV-CTL의 비율로 첨가하였다. 40시간에, IFN-γ 분비를 위해 상청액의 35%를 제거하고, 배지를 교체하였다. 치료되지 않은 대조군과 비교하여 치료된 세포의 생존력을 시간 경과에 따라 모니터링하였다. 이 면역원성 실험의 일부 결과는 표 14 및 **도 11**에 제시되어 있다.

표 14

[0834] **표 14. 항원 카고를 포함하는 DI-SLT-1A 융합 단백질을 사용한 표적 세포 치료에 대한 CMV-CTL의 기능적 반응**

	IFN-γ 분비 (Abs 450 nm, max 4.0; 35% 상청액)
115749(SEQ ID NO:113)	2.60
115961(SEQ ID NO:123)(항원 없음)	0.15
116297(SEQ ID NO:128)	2.90
116299(SEQ ID NO:129)	2.59
116187(SEQ ID NO:125)(항원 없음)	0.20
DI-SLT-1A 단독	0.08

[0835] [809] 표 14 및 **도 11**의 데이터는 DI-SLT-A1 융합 단백질 115749(SEQ ID NO:113), 116297(SEQ ID NO:128), 및 116299(SEQ ID NO:129)가 CMV-CTL 세포를 자극하여 사이토카인(IFN-γ) 분비를 유도할 수 있고, 이 기능은 바이러스 항원을 포함하지 않는 대조군 DI-SLT-A1 융합 단백질 115961(SEQ ID NO:123) 및 116187(SEQ ID NO:125)에는 존재하지 않는다. 표 14에 사용된 용어 "DI-SLT-1A 단독"은 SEQ ID NO: 41을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

[0836] [810] 공동-배양 실험에서, PD-L1 결합 분자에 노출된 PD-L1 발현 종양 세포의 존재하에 CMV 혈청 양성 공여자 PBMC는 자연 감염 동안 발생하고/하거나 내인성 기억 T 세포와 유사하게 만들어진 CTL 기억 확장과 같은 CTL 개체군을 확장할 수 있다.

[0837] [811] CD8+ T-세포 에피토프 제시의 결과를 평가하기 위해 CTL-기반 세포독성 분석이 사용되었다. 분석은 조직-배양 표적 세포와 T-세포를 포함한다. 표적 세포는 PD-L1-표적화에 의한 중독을 허용하기 위해 37℃ 및 5% 이산화탄소 대기를 포함한 표준 조건에서 세포를 배양(일반적으로 4시간 또는 16시간 이상)하여 예시적인 PD-L1 결합 분자로 중독되었다. 배양 후, 표적 세포를 세척하였다. 다음으로, CTL을 치료된 표적 세포에 첨가하고 CTL이 CD8+ T-세포 에피토프-펩티드/MHC 클래스 I 복합체(pMHC Is)를 표시하는 임의의 표적 세포를 인식하고 결합할 수 있도록 배양하였다. 그런 다음, CTL-매개 세포용해에 의한 에피토프-제시 표적 세포 사멸 및 ELISA에 의한 IFN-γ 또는 인터루킨과 같은 사이토카인의 방출을 포함하여, 숙련된 작업자에게 알려진 표준 방법을 사용하여 pMHC I 인식의 특정 기능적 결과를 조사하였다.

[0838] [812] 공동-배양 세포-사멸 분석: PD-L1 양성 세포를 96웰 플레이트에서 웰당 10,000 내지 20,000개의 세포로 플레이팅하고 5,000ng/mL 농도의 예시적인 PD-L1 결합 분자와 함께 배양하였다. 24시간 후, PD-L1 결합 분자를 세척한 다음 세포를 T-세포 또는 세포-배양 배지와 공동-배양하였다. 형광 꼬리표(fluorescent tag)를 발현하는

PD-L1 양성/HLA:A2 양성 MDA-MB-231 세포는 IncuCyte® 분석(Essen BioScience, Ann Arbor, MI, U.S.A.)에서 표적으로 사용되었다. 시간 경과에 따른 세포 생존율은 IncuCyte-S3-Live 세포 이미저(Essen BioScience, Ann Arbor, MI, U.S.A.)를 사용하여 측정하였고, 세포 샘플의 위상 및 형광 이미지를 4-6시간마다 캡처하였다. IncuCyte® S3 소프트웨어 패키지(Essen BioScience, Ann Arbor, MI, U.S.A)를 통해 형광 세포 수로 생존율을 측정하였다. 생존력 데이터를 총 형광 세포 수로 플롯팅하고 시간 0으로 정규화하였다.

[0839] [813] **도 22, 23, 및 24a-24b**는 116297(SEQ ID NO:128)이 표적 세포 사멸의 적어도 2가지 기전, 즉 직접 세포 사멸 및 항원-특이적 CTL-의존적 세포 사멸을 나타낸다는 것을 보여준다. **도 22**는 116297(SEQ ID NO:128)이 항원-특이적 CTL의 존재하에(공동-배양) 더 큰 표적 세포(MDA-MB-231(HLA:A02 양성)) 세포독성을 나타내지만 116296(SEQ ID NO:127)은 아님을 입증한다. 항원 특이적 CTL의 존재하에 116297(SEQ ID NO:128)의 세포독성 효과는 CTL의 부재 시보다 더 크다. CTL(빨간색, 열린 원(open circle))이 없는 116297(SEQ ID NO:128)의 세포독성 효과는 CTL이 있거나(녹색, 사각형) 없는(녹색, 열린 원) 116296(SEQ ID NO:127)의 세포독성 효과와 동일하다. HLA*A02+/PD-L1+ 표적 세포에 대한 116297(SEQ ID NO:128) 세포독성 효과는, 바이러스 항원 특이적 세포독성 T-세포(CMV-CTL)가 존재할 때, 증가하였다. 대조군으로서, 어떠한 바이러스 항원 카고도 결여된 대조군 PD-L1 결합 분자는 CMV-CTL의 존재하에서 세포독성의 증가를 나타내지 않았다. **도 24**는 종양 세포와 116297(SEQ ID NO:128)의 배양이 CTL의 존재하에 용량-의존적 세포독성 및 인터페론 감마 분비의 유도를 초래한다는 것을 입증한다. **도 22 및 24a-24b**는 항원 카고 전달이 내재화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드를 통한 직접적인 세포독성에 더하여 제2 세포독성 작용 기전으로서 존재함을 도시한다.

[0840] [814] **도 23, 25-27**은 종양 표적 세포에 의한 PD-L1 및 HLA:A*02의 발현이 항원 시딩(seeding)에 필요하지만 충분하지 않고, 즉 CTL의 존재하에 더 큰 116297(SEQ ID NO:128) 유도된 세포독성이 관찰되는 것을 입증한다. 이러한 결과는 이러한 공동-배양 실험에서 116297(SEQ ID NO:128)에 의해 유도된 CTL 활성화 및 CTL-매개 세포독성이 PD-L1 및 HLA:A*02의 표적 세포 발현 및 CTL-항원 특이성을 필요로 함을 시사한다. **도 25**는 MDA-MB-231(PD-L1 양성, HLA:A*02 양성); L1236((PD-L1 양성, HLA:A*02 양성); 또는 MCF-7(PD-L1 음성, HLA:A*02 양성) 세포 상에서 PD-L1 및 HLA:A*02의 표면 분자 발현을 도시한다. **도 26**은 항원-특이적 CTL("CMV-CTL")과의 공동-배양에서 HLA:A*02 및 PD-L1+ 종양 세포로의 투여가 인터페론 감마 분비를 유도함을 도시한다. **도 27**은 항원-특이적 CTL("CMV-CTL")과의 공동-배양에서 HLA:A*02 및 PD-L1+ 종양 세포에 대한 116297(SEQ ID NO:128) 투여는 No-CTL 샘플에서보다 더 많은 세포독성을 유도함을 도시한다. **도 27**은 PD-L1 양성 표적 세포에 대한 116297(SEQ ID NO:128)의 세포독성 효능은 CTL의 존재하에 증가됨을 도시한다.

[0841] [815] 이들 실험의 결과는, 예시적인 PD-L1 결합 분자 116296(SEQ ID NO:127) 및 116297(SEQ ID NO:128)이 인간 공여자 세포독성 T-세포의 부재 및 존재 둘 다에서 PD-L1 양성/HLA:A02 양성 MDA-MB-231 세포에 대해 세포독성임을 나타내었다(예를 들어, 도 9, 도 11, 도 24a 참조). 공여자 CTL의 존재하에, 116297(SEQ ID NO:128)의 사전 투여의 결과로, 훨씬 더 많은 MDA-MB-231 세포가 사멸되었지만, 116296(SEQ ID NO:127)의 투여는 그렇지 않았다.

[0842] <u>IV. PD-L1 결합 분자에 의한 PD-L1/PD-1 신호전달 간섭 시험</u>

[0843] [816] 어떠한 이론에도 구속되지 않고, PD-1/PD-L1 상호작용을 차단하는 PD-L1-표적화 DI-SLT-A1 융합 단백질의 능력은, 아마도 시가 독소 A 서브유닛 성분에 의한 세포 내재화 및 리보솜 억제를 필요로 하는, PD-L1 발현 표적 세포를 사멸시키는 데 있어 예시적인 DI-SLT-A1 융합 단백질 중 임의의 것의 세포독성 작용 기전에 대해 요구되지 않는다. 그러나, 특정 항체의 경우, PD-1/PD-L1 신호전달 축을 차단하는 능력이 치료 이점에 중요한 것으로 여겨진다(Ribas A, Wolchok J, Science 359: 1350-55 (2018) 참조).

[0844] [817] PD-1/PD-L1 상호작용을 교란시키는 DI-SLT-A1 융합 단백질의 능력을 시험하기 위해, 상업적으로 이용 가능한 세포-기반 PD-1 신호전달 생물분석(bioassay)(Promega PD-1/PD-L1 Blockage Bioassay, Promega Corp., Madison, WI, U.S.A.)을 제조사의 지침에 따라 사용하였다. 이 분석은 PD-1 억제의 방출에 의해 활성화된 Jurkat NFAT-Luc 리포터 시스템을 기반으로 한다. PD-L1을 발현하는 표적 세포(PD-L1 aAPC/CHO-K1 세포)를 시험 단백질(예: 항체 또는 PD-L1 결합 분자)과 함께 30분 동안 배양한 다음 TCR의 제어하에 NFAT-Luc 리포터를 발현하는 PD-1을 발현하는 Jurkat T-세포(PD-1 효과기 세포)와 37° C에서 6시간 동안 공동-배양하였다. BioGlo 시약(루시페린)을 플레이트의 웰에 첨가하고, 표준 절차에 따라 루미노미터(luminometer)를 사용하여 플레이트의 루미네선스를 판독하였다. 신호의 증가(RLU로 측정)는 PD-1/PD-L1 상호작용의 차단을 나타낸다. 이러한 상호작용을 차단하는 것으로 알려진 PD-L1-표적 단일클론 항체인 항-hPD-L1-hIgG1(N298A)(카탈로그 번호 hpdl1-mab12, InvivoGen, San Diego, CA, U.S.A.)을 대조군으로 시험하였다. 이들 PD-1/PD-L1 상호작용 실험의 결과

를 도 12에 도시하였다.

[0845] [818] PD-L1 표적화된 DI-SLT-A1 융합 단백질 115749(SEQ ID NO:113), 115750(SEQ ID NO:114), 및 115962(SEQ ID NO:124)는 모두 일부 농도에서 이 상호작용을 차단하는 능력을 보여주었지만, 활성은 **도 12**에 나타난 바와 같이 항-hPD-L1-hIgG1 대조군보다 훨씬 낮았다. 115749(SEQ ID NO:113), 115750(SEQ ID NO:114), 및 115962(SEQ ID NO:124)에 대한 PD-1/PD-L1 신호전달의 억제를 위한 EC_{50}(half-maximal effective concentration)은 이 분석에서 200nM 초과였다(**도 12** 참조). PD-L1 결합 분자의 특정 다른 실시예는 1 내지 50 nM 이하의 최대 억제 농도의 절반에서 PD-1/PD-L1 상호작용을 차단하는 능력을 나타내었다.

[0846] V. 생체 내에서 결합 분자 및 면역 반응 유도 시험을 위한 동물 모델

[0847] [819] 동물 모델을 사용하여 종양 세포 및/또는 면역계에 대한 예시적인 세포-표적화 융합 단백질의 생체 내 효과를 결정하였다.

[0848] A. 뮤린 연구

[0849] [820] 다양한 쥐 균주를 사용하여 세포 표면 상에 PD-L1을 발현하는 인간 신생물 세포, CTG-1444 또는 CTG-0192를 주사한 쥐에 투여한 후 세포-표적화 융합 단백질의 이종이식 종양에 대한 효과를 시험하였다(비-소세포 폐암(NSCLC) 종양 세포는 환자로부터 유래하고 쥐에서 생체 내 계대됨(passaged)). 이 실험에서 시험한 NSCLC 종양 세포는 HLA:A0201 양성이었다.

[0850] [821] 면역 저하(Nude) 또는 면역 결핍(NOG) 쥐 균주를 이종이식 모델로 사용하였다. 쥐에 먼저 CD8+ T-세포 에피토프를 인간 T-세포 시스템의 입양 전이 모델로 인식할 수 있는 CD8+ 인간 세포독성 T-세포(CTL)를 투여하였다. 인간 NSCLC의 환자-유래 이종이식 모델로서, 인간 종양 세포를 면역결핍 쥐에 투여하여 피하 종양 또는 파종성 종양을 생성하였다.

[0851] [822] 116297(SEQ ID NO:128)의 정맥 내 투여는 2개의 상이한 뮤린 모델에서 인간 환자 유래 비-소세포 폐암 이종이식편에 대한 생체 내 효능을 나타내었다(**도 28a-28c 및 29a-29c** 참조). 첫 번째 이종이식편 모델에서, 116297(SEQ ID NO:128)의 투여는 면역손상된 NOG 쥐에서 공격적인 형태의 NSCLC 이종이식편에 대해 종양 성장을 감소시키고 종말점 생존을 연장시켰다(**도 28b**). 116297(SEQ ID NO:128) 투여 일정은 연구 1일에 6mg/kg 및 연구 3, 5, 8, 10, 12, 22, 24, 및 28일에 2mg/kg이었다. 115749(SEQ ID NO:113) 및 116297(SEQ ID NO:128) 투여는 생존 이익을 초래하였다(**도 28c**). 116297(SEQ ID NO:128) 투여는 비히클 대조군의 67%의 종양 부피를 초래하였고, 115749(SEQ ID NO:113) 투여는 비히클 대조군의 85%의 종양 부피를 초래하였다(**도 28c**). 면역손상된 NOG 쥐를 사용한 두 번째 이종이식편 모델에서, 116297(SEQ ID NO:128)의 투여는 상대적으로 낮은 수준의 세포 표면 PD-L1을 발현하는 NSCLC 세포로부터 유래된 NSCLC 이종이식편에 대해 종양 퇴행을 촉진하고 종말점 생존을 증가시켰다(**도 29a-29c 및 30**). 116297(SEQ ID NO:128) 투여 일정은 연구 1일 및 15일에 6mg/kg이었고 연구 3, 5, 8, 10, 12, 17, 19, 22, 및 24일에 2mg/kg이었다. 116297(SEQ ID NO:128) 투여는 비히클 대조군의 21% 종양 부피를 초래한 반면, 115749(SEQ ID NO:113) 투여는 종양 성장을 감소시키지 않았다(**도 29a-c 및 도 30**). 60일 연구 동안, 116297(SEQ ID NO:128)의 투여는 비히클 대조군과 비교하여 생존을 증가시켰다(**도 29a-29c 및 30**).

[0852] [823] **도 30**은 116297(SEQ ID NO:128)이 이종이식편 동물 모델에서 인간 환자 유래 종양(PDX)에 대해 생체 내 활성을 나타냄을 보여준다. 116297(SEQ ID NO:128) 투여는 PD-L1 양성, 비소세포폐암(NSCLC) 환자 유래 이종이식편에 대한 강력하고 지속적인 반응을 초래하였다. 116297(SEQ ID NO:128)로 치료하면 이 NSCLC PDX 쥐 모델(NOG 쥐)에서 전신 퇴행 및 종양 성장 지연이 발생하였다.

[0853] [824]

[0854] B. 인간이 아닌 영장류 연구

[0855] [825] 예시적인 PD-L1 결합 분자 116297(SEQ ID NO:128)을 시노몰구스 마카크 원숭이에 투여하였고 특정 약력학적 효과가 관찰되었다. 116297(SEQ ID NO:128)은 인간과 시노몰구스 PD-L1을 모두 표적으로 하고 시노몰구스 PD-L1을 발현하는 세포를 사멸시키기 때문에(**도 13, 15, 17a-17b, 및 34** 참조), 시노몰구스 마카크는 내약성 및 약력학 연구에 대한 관련 모델로 간주되었다. 시노몰구스 PD-L1은 인간 PD-L1과 약 93%의 서열 상동성을 공유한다.

[0856] [826] 116297(SEQ ID NO:128)을 4주 동안 1주에 한 번 정맥 내 투여한 결과 시험된 두 동물 중 한 마리에서 TNF-알파, IFN-감마, 및 인터루킨-2(IL-2)(즉, I형 사이토카인)가 증가하였다(**도 31** 참조). I형 사이토카인 수

준의 증가는 116297(SEQ ID NO:128) 투여의 결과로서 T 세포 활성화의 지표이다.

[0857] [827] **도 17a**는 116297(SEQ ID NO:128)이 형질전환 CHO-K1 세포에 의해 발현되는 인간(Hu) 및 시노몰구스(Cyno) PD-L1 둘 다에 결합한다고 보고한다. 116297(SEQ ID NO:128)은 이러한 조건하에서 형질전환 CHO-K1 세포에 의해 발현된 쥐 PD-L1에 결합하지 않았다. 대조군 항-인간-PD-L1 항체("PD-L1 mAb") 아테졸리주맙을 결합 분석에 사용하였다. 유사하게, **도 17b**는 116297(SEQ ID NO:128)이 인간(Hu) 또는 시노몰구스(Cyno) PD-L1을 발현하지만 쥐 PD-L1을 발현하지 않는 형질전환 CHO-1 세포에 대해 세포독성임을 도시한다.

[0858] [828] **도 31**은 116297(SEQ ID NO:128) 투여가 비인간 영장류의 혈청에서 I형 사이토카인의 증가를 초래했음을 도시한다. 4주 동안 50μg/kg, 150μg/kg, 및 450μg/kg(1일, 8일, 15일, 및 22일에 투여)의 용량으로 시노몰구스 마카크(cynomolgus macaques)에 대한 탐색 연구(용량 수준 코호트당 n=2)에서 116297(SEQ ID NO:128)의 주간, 정맥 내, 반복 투여를 시험하였다. 이 연구는 116297(SEQ ID NO:128) 투여가 가장 높은 2개의 투여 코호트(150 및 450 μg/kg)에서 2마리의 시노몰구스 마카크 중 하나에서 15일 및 23일에 혈청 I형 사이토카인 TNF-α, IFN-γ, 및 IL-2의 수준을 증가시켰음을 보여주었다. PD-L1 및 PD-1 표적 제제에 의해 유발되는 면역 관련 반응은 환자 이익과 관련이 있다(예: Das S, Johnson D, *J Immunother Cancer 7*: 306 (2019) 참조). **도 31**에서, μg는 체중 1kg당 투여된 마이크로그램(μg)을 의미하고, pg/ml은 밀리리터당 피코그램(pg/mL)을 의미한다.

[0859] [829] **도 32**는 예시적인 PD-L1 결합 분자, 예를 들어, 116297(SEQ ID NO:128)의 잠재적인 작용 기전을 보여주는 개략도이다. 116297(SEQ ID NO:128)은 PD-L1 양성 종양 및 면역 세포를 고갈시키도록 설계되었다. PD-L1 결합 분자는 탈면역화된 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드(DI SLTA), 항-PD-L1 단일-사슬 가변 단편(scFv), 및 CD8+ T-세포 에피토프 펩티드 카고(예를 들어 인간 CMV-pp65 유래 펩티드)를 포함하는 연속 폴리펩티드를 포함할 수 있다(**도 32** 참조). 이 잠재적인 작용 기전은 두 가지 별개의 작용 기전, 즉 PD-L1 발현 종양 및 면역 세포의 강력한 사멸 및 종양 면역표현형 변경을 포함한다는 점에서 독특하다. 간략하게, 첫 번째 작용 기전은 PD-L1 발현 표적 세포에 대한 강력한 세포독성을 표적화하는 것을 포함한다. 첫째, PD-L1 결합 분자의 scFv 단편 영역은 세포-표면 PD-L1에 결합하고; 그런 다음 시가 독소 효과기 폴리펩티드 구성요소는 세포 내로의 내재화 및 골지를 통해 소포체 및 최종적으로 시토졸로의 세포 내 라우팅을 유도하고; 일단 시토졸에서, 시가 독소 효과기 폴리펩티드는 효소적 및 비가역적 리보솜 파괴를 통해 표적 세포를 강력하게 사멸시킨다. PD-L1 결합 분자가 소포체 또는 시토졸 내에 있으면, 항원성 펩티드 카고가 나머지 PD-L1 결합 분자로부터 절단되어 항원성 펩티드를 소포체의 내강으로 수송하고/하거나 MHC 클래스 I 분자에 의한 항원성 펩티드의 결합을 허용할 수 있다. 이는 예를 들어, "에피토프-펩티드 로딩된 MHC-I"를 형성하기 위해, 로딩되지 않은 MHC 클래스 I 분자가 항원성 펩티드 카고로 로딩되도록 한다. 항원 로딩된 MHC 클래스 I 분자는 소포체에서 골지를 통해 세포 표면으로 수송되어 적응 면역 시스템에 의한 인식을 위한 CD*+ T-세포 에피토프를 제시할 수 있다. 일단 세포-표면에 도달하면, 에피토프가 로딩된 MHC 클래스 I 분자 복합체는 CD8+ T-세포에 의해 인식될 수 있고, 이는 예를 들어 세포독성 T-세포 결합 및 항원-제시 표적 세포의 사멸로 이어진다. 종양 세포에 의한 전달된 항원의 제시는 "변경된 면역 표현형"을 초래할 수 있고 본 명세서에 기재된 바와 같은 항원 시딩을 초래할 수 있다. CD8+ T-세포 에피토프의 전달 및 제시를 통한 종양 표적 세포로의 내인성 세포독성 T-세포의 재지정(re-direction)은 치료된 대상체 내의 종양 또는 특정 유전자좌에 대한 변경된 면역 표현형을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 클래스 I CMV CD8+ T-세포 에피토프의 전달 및 제시는 내인성 CMV-특이적 세포독성 T-세포(CTL)를 종양 세포로 재지정할 수 있다. **도 32**에서, "CTL"은 CMV 바이러스 에피토프-펩티드 복합체를 표시한 MHC 클래스 I을 인식하는 TCR을 발현하는 CMV-특이적 T-세포를 의미한다. **도 32**에서, "변경된 면역 표현형" 또는 "종양 면역 표현형의 변경"이라는 문구는 바이러스 CD8+ T-세포 에피토프(항원)를 전달하여 내인성 CMV-특이적 T-세포를 종양으로 재지정한 결과를 의미한다 - "항원 시딩 기술" 또는 간단히 "AST". 바이러스 에피토프-펩티드 카고가 제거된 PD-L1 결합 분자는 시토졸에서 활성일 수 있고, 표적 세포 사멸을 유도하는 단백질 합성 억제를 포함하는 일차 작용 기전(MOA)을 가질 수 있다. 이 주요 작용 기전은 대상체의 면역 기능 상태와 무관하다.

[0860] [830] 이 잠재적인 작용 기전은 또한 억제 면역 세포를 포함한 PD-L1-발현 면역 세포의 사멸을 수반할 수 있고, 이는 종양 부위(들) 또는 특정 종양 미세 환경에서 억제 및/또는 아너지(anergic) 세포의 제거를 통해 항종양 면역감시에서 유리한 개선을 유도한다. 116297(SEQ ID NO:128)은 PD-L1 양성 종양 및 PD-L1 양성 억제(즉, 면역억제) 면역 세포를 고갈시키도록 설계되었다. 종양 세포(TC) 및 면역 세포(IC)에 대한 PD-L1 양성은 비소세포 폐암(NSCLC) 진단을 받은 환자의 아테졸리주맙(항 PD-L1 항체 치료제)에 대한 지속적인 임상 반응과 독립적으로 상관관계가 있다(Kowanetz M et al., Proc Natl Acad Sci U. S. A. 115: E10119-E10126 (2018)). 116297(SEQ ID NO:128)의 세포독성 잠재력은 (1) 환자의 종양 부담을 줄이기 위한 PD-L1 양성 종양 세포의 직접적인 표적화

및 (2) 환자의 종양 미세 환경에 대해 바람직하지 않은 영향을 줄이기 위한 억제 면역 세포의 표적화 모두에 대해 치료학적으로 활용될 수 있다. 예를 들어, 116297(SEQ ID NO:128)의 세포독성 잠재력은 종양 부담을 줄이기 위한 PD L1+ TC의 직접적인 표적화 및 종양에서 PD L1+ IC의 고갈에 의한 TME에 대한 억제 세포 및 관련 효과의 감소 모두에 활용될 수 있다.

[0861] [831] **도 33**은 예시적인 PD-L1 결합 분자 116297(SEQ ID NO:128)에 대한 리보솜 억제 분석의 결과를 도시한다. PD-L1 결합 분자 116297(SEQ ID NO:128)은 양성 "대조군" 분자인 시가 독소 효과기 폴리펩티드(DI-SLTA) 단독에 유사한 리보솜 억제 활성 수준을 나타내었고, 어떠한 표적 제제 또는 세포-결합 영역 또는 도메인(즉, SEQ ID NO: 41을 포함하는 폴리펩티드)과도 결합되지 않았다. 따라서, 116297(SEQ ID NO:128)은 탈면역화된 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분에서 DI-SLTA 단독 복합체의 촉매 도메인에 존재하는 단백질 합성 억제의 강력한 효소 활성을 유지하는 것으로 보인다.

[0862] [832] **도 34**는 예시적인 PD-L1 결합 분자 116297(SEQ ID NO:128)에 대한 PD-L1 표적 결합 분석의 결과를 도시한다. **도 34**는 PD-L1 결합 분자 116297(SEQ ID NO:128)이 재조합 인간 PD-L1 및 시노몰구스 마카크 PD-L1에 결합하였지만 이 분석에서 재조합 쥐 PD-L1에 대한 고친화도 결합을 나타내지 않았음을 도시한다.

[0863] [833] **도 35**는 PD-L1 결합 분자 치료(들)가, 예를 들어 PD-L1-발현 종양 세포 및 PD-L1 양성 면역 세포를 직접 사멸시켜 종양 면역표현형을 변경함으로써 항종양 효과를 유도할 수 있는 방법을 도시한다. 116297(SEQ ID NO:128)은 종양 및 억제 면역 세포를 고갈시키도록 설계된 독특한 작용제이다. 116297(SEQ ID NO:128)은 PD-L1+ 표적 세포를 특이적이고 직접적으로 사멸시키고, 종양 세포의 경우 시험관 내에서, 면역 세포의 경우 생체 외에서 입증되었다. 116297(SEQ ID NO:128)은 HLA*A02+/PD-L1+ 표적 세포의 표면에서 MHC 클래스 I 분자와 복합체로 표시하기 위한 바이러스 항원 카고를 전달할 수 있고, 이는 조직 부위, 종양, 및/또는 종양 미세환경의 면역표현형의 변경을 초래할 수 있어 효과기 T-세포에 의한 유익한 항종양 감시를 가능하게 한다. 116297(SEQ ID NO:128)은 인간 암 환자에서 예측된 효능과 관련된 용량에서 약력학적 관련 영장류 모델에서 내성이 있다. **도 35**에서, "Teff"는 효과기 T-세포를 의미하고, "바이러스 CTL"은 바이러스 항원 특이적 CTL을 의미하고, 그리고 "SLTA"는 PD-L1 결합 분자의 시가 독소 A 서브유닛 효과기 폴리펩티드 성분을 의미한다.

[0864] **실시예 4. 116297은 별개의 작용 방식을 통한 고갈을 위해 PD-L1 양성 종양 세포(TC)를 표적화한다**

[0865] [834] 이 실시예에서, 116297은 상이한 수준의 PD-L1 발현을 갖는 종양 세포에 대해 상이한 작용 기전을 통한 세포독성에 대해 시험하였다. 처음에, 29개의 대표적인 폐, 피부, 유방, 및 난소 종양 세포주(TC)를 면역조직화학에 의해 표면 PD-L1 발현에 대해 평가하고 강도에 대해 점수를 매겼다(TC1 = 낮은 발현, TC2 = 중간 발현, TC3 = 높은 발현). 대표적인 결과는 **도 37b**에 도시되어 있다.

[0866] [835] 그런 다음 29개 세포주를 유세포 분석에 의한 PD-L1 발현 및 시험관 내 116297에 대한 세포독성 민감성에 대해 평가하였다. HCC1954(유방암), MDA-MB-231(삼중 음성 유방암), HCC827(폐암), NCI-H225(폐암), A549(폐암), 및 MCF7(유방암)을 비롯한 다양한 예시적인 세포주의 결과가 **도 37a**에 도시되어 있다. 이러한 데이터는 116297이 다양한 PD-L1 발현 수준에 걸쳐 종양 세포주에 세포독성임을 보여준다.

[0867] [836] 116297에 대해 리보솜 억제-기반 세포독성 및 CTL-매개 세포독성을 조사하였다. 이 실험에서 CTL-매개 세포독성은 전달된 CMV CD8+ T-세포 에피토프 펩티드 카고를 세포 표면에 제시하는 항원-시드 PD-L1/HLA*A02 양성 표적 세포를 기반으로 한다. MDA-MB-231 세포를 PD-L1 결합 분자 116297, "No Ag" PD-L1 결합 분자 대조군(116297과 관련되지만 항원성 펩티드 도메인이 없는 분자), 또는 "비활성" PD-L1 결합 분자 대조군, 116555를 운반하는 CMV 에피토프-펩티드로 치료한 다음, CMV-HLA:A02 제한 T 세포의 존재 또는 부재하에 5일 동안 배양하여 IFN-감마 분비를 통한 세포 생존력 및 T 세포 활성화를 시험하였다. **도 37c**에 나타낸 바와 같이, PD-L1 결합 분자는 다양한 작용 기전에 따라 세포를 사멸시켰다: 리보솜 억제(“No Ag" PD-L1 결합 분자 대조군) 및 항원성 펩티드 전달("비활성" PD-L1 결합 분자 대조군). 116297은 두 가지 작용 기전에 따라 세포를 사멸시켰다. **도 37d**에 나타낸 바와 같이, 116297은 MHC 클래스 I 시스템을 통해 전달된 CMV CD8+ T-세포 펩티드를 제시하는 PD-L1/HLA*A02 표적 세포에 반응하여 IFN-감마를 분비하도록 CMV-특이적 CTL을 자극하였다.

[0868] **실시예 5. 116297은 생체 내 PD-L1 양성 종양을 조절한다**

[0869] [837] 이 실시예에서, 116297은 인간 종양이 이식된 면역결핍 쥐에서 PD-L1 양성 종양을 조절하는 능력에 대해 평가되었다. 116297 치료는 제한된 독성을 갖는 쥐에서 종양의 유의한 제어를 초래하였다(**도 38a-38b**). 116297 투여는 PD-L1 양성, 인간 삼중 음성 유방암(TNBC, MDA-MB-231 세포(**도 38a**)), 또는 PD-L1 양성, 인간 비소세포 폐암(NSCLC) 환자 유래 세포(도 38b)가 이식된 쥐에서 종양의 성장을 억제하였다. 또한, 이러한 쥐 이종이식 모

델에서 116297 활성은 생체 내 116927의 작용 기전(들)을 입증하기 위해 바이러스 항원(CMV 펩티드 없음)이 없거나 시가 독소 촉매 활성(116555, 116297의 촉매적 비활성 변이체)이 없는 관련 분자를 사용한 치료와 비교되었다(**도 38c**). 모델 및 효능 종점은 **도 38d**에 요약되어 있다. 이러한 데이터는 116297이 관련 종양 모델 전반에 걸쳐 생체 내에서 종양 성장을 제어하고 활성이 촉매 활성 시가 독소 성분에 의존함을 나타낸다.

[0870] **실시예 6. 116297은 생체 외에서 프로파일된 유사한 효능으로 종양 세포 및 면역 세포에 결합하고 표적화한다**

[0871] [838] 이 실시예에서, 다양한 PD-L1 발현을 갖는 종양 세포에 대한 116297 세포독성은 Cell Titer-Glo® (Promega) 분석, 높은 PD-L1 발현(HCC1954), mid/hi PD-L1 발현(MDA-MB-231), 및 PD-L1 음성(MCF7)을 나타내는 세포를 사용하여 평가되었다. PD-L1의 세포-표면 밀도는, 표적 발현, 116297 세포 결합, 및 세포독성 효능 사이의 관계를 평가하기 위해, 유세포 분석에 의해 종양 세포 및 면역 세포 서브세트에 대해 결정되었다. **도 39b**는 CD_{50} 값으로 표시되는 116297 세포독성 효능에 대해 플롯팅된 세포당 세포 표면 PD-L1 분자의 수(원형) 또는 세포당 결합된 116927 분자의 수(사각형)를 도시한다. 116297의 세포독성(CD_{50})은, 치료되지 않았거나 PD-L1 발현을 유도하기 위해 IFN-감마로 치료된, 분리된 인간 CD14 양성 단핵구에서도 측정되었다. 16297 효능(CD_{50})은 PD-L1 표면 발현 및 PD-L1 양성 종양 세포 및 면역 세포에 대한 결합과 상관관계가 있었다. **도 39a**에 나타낸 바와 같이, 116297은 PD-L1 발현 수준 의존적 방식으로 인간 종양 세포 및 면역 세포 서브세트를 강력하게 고갈시켰다.

[0872] **실시예 7. 116297은 비인간 영장류에서의 고갈을 위해 인간 PD-L1 양성 종양 세포를 표적으로 한다**

[0873] [839] 비인간 영장류(NHP) 연구는 생체 내에서 116297의 약동학(PK)을 결정하고, 종양 세포 및 면역 세포 서브세트에 대한 최대 세포-사멸 및 수용체 점유율을 추정하는 데 사용되었다. 116297 또는 결합 분자-SLTA-촉매적으로 불활성인 대조군 116555(SEQ ID NO: 160)를 4회 투여 동안 매주 50㎍/kg(116297) 또는 450㎍/kg(116297 및 116555)으로 NHP에 정맥 내 투여하였다.

[0874] [840] 연구 첫날에, 116297 또는 116555를 투여한 후 24시간 동안 주기적으로 혈액 샘플을 채취하였다. 약동학 곡선을 계산하고 **도 40a**에 도시하였다. 116297은 50㎍/kg 투여에 대해 약 2.8시간 및 450㎍/kg 투여에 대해 약 3.7시간의 반감기를 가졌다. 116555는 450㎍/kg의 투여 후 약 5.6시간의 반감기를 갖는 것으로 관찰되었다.

[0875] [841] 그런 다음 상기 설명한 연구의 NHP PK 데이터에서 인간 혈청 노출을 시뮬레이션하고 시험관 내 CD_{50} 값 및 PD-L1 결합 데이터와 상관하여 TC 및 IC 서브세트에 대한 최대 세포-사멸 및 수용체 점유율을 예측하였다. 결과는 도 40b에 도시되어 있다.

[0876] **실시예 8. 116297은 인간이 아닌 영장류에서 면역 관련 유해 사례의 분명한 프로파일을 도출한다**

[0877] [842] 비인간 영장류(NHP) 연구도 생체 내 면역 관련 부작용(irAE)을 관찰하고 측정하는 데 사용되었다. 116297 또는 116555(결합 분자-SLTA-촉매 불활성 대조군)는 4회 투여 동안 매주 50㎍/kg(116297) 또는 450㎍/kg(116297 및 11655)으로 NHP에 투여되었다. 이러한 투여 요법은 **도 41a**에 예시되어 있다.

[0878] [843] 말초 단핵구(**도 41b**) 및 말초 T 림프구(**도 41c**)를 포함하는 순환으로부터의 면역 세포 서브세트의 수준을 유세포 분석에 의해 평가하였다. 8일에 단핵구 샘플을 얻었고, 15일에 림프구 샘플을 얻었다. **도 41b**에 나타낸 바와 같이, 116297 치료는 분자의 2회 투여 후 NHP에서 CD14 양성 단핵구의 고갈을 초래하였다. 116297 치료에 의한 CD14 양성 단핵구 사멸은 용량-의존적이었고, 116555 치료가 단핵구 고갈을 초래하지 않았기 때문에, 촉매 활성 시가 독소 성분이 필요하였다. **도 41c**에 나타낸 바와 같이, 116297은 분자의 2회 투여 후에 NHP에서 T 및 B 림프구를 확장시켰다. 대조적으로, 116555의 투여는 NHP에서 면역 세포의 고갈을 초래하지 않았다. 이 NHP 연구는, 단핵구에 대한 116297 효과가 용량-의존적이었고 면역 세포 고갈의 효과가 PD-L1/PD-1 상호작용의 차단에 의해 야기된 것이 아니라 오히려 시가 독소 A 서브유닛 구성요소의 촉매 활성을 필요로 한다는 것을 보여준다.

[0879] [844] 혈청 사이토카인 반응은 2개의 독립적인 NHP 연구에 걸쳐 평가되었다. **도 41d**에서, 이들 연구의 결과는 연구 1(n=2 NHP) 및 연구 2(n=8 NHP(116297) 및 n=5(116555))에 대한 응답자의 백분율로 표시된다. 데이터는 연구에서 투여 3 후 사이토카인의 유도를 반영한다. 116297 면역 세포의 고갈 및 림프구 활성화는 면역 관문 억제제 염증 신호와 연관되었다. 특히, 116297 치료는 임상에서 면역 관문 억제제로 관찰된 T 세포 활성화 및 반응과 관련된 NHP에서 사이토카인 프로파일을 유도하였다. 116297의 투여는 또한 피부염(피부 박편) 및 심근염을 포함한 irAE의 발병과 관련된 면역 활성화 프로파일을 초래하였다.

[0880] [845] NHP 연구는 또한 생체 내 면역 관련 유해 사례(irAE)를 관찰하고 측정하는 데 사용되었다. 116297은 50㎍

g/kg 또는 450μg/kg으로 NHP에 투여되었고 116555(촉매 불활성 대조군)의 450μg/kg 투여와 비교하여 총 4회 투여 동안 매주 투여되었다. 추가 연구에서, 115749는 150, 450, 또는 750 μg/kg으로 NHP에 투여되었고; 115765는 25, 150, 또는 450 μg/kg으로 NHP에 투여되었고; 115695는 50, 150, 또는 450 μg/kg으로 NHP에 투여되었고, 모두 2주 동안 3일마다 투여되었다.

[0881] [846] 말초 단핵구(**도 41b**) 및 말초 T 림프구(**도 41c**)를 포함하는 순환으로부터의 면역 세포 서브세트의 수준을 유세포 분석에 의해 평가하였다. **도 41b**에 나타낸 바와 같이, 분자의 2회 투여 후에 관찰된 바와 같이 11629는 NHP에서 CD14+ 단핵구를 고갈시켰다. 세포-사멸은 용량-의존적이었고 촉매적으로 비활성화된 변이체인 116555가 이 반응을 유도하지 못했기 때문에 촉매 활성 시가 독소 성분이 필요하였다. **도 41c**에 나타낸 바와 같이, 116297 투여는 분자의 2회 투여 후에 관찰된 바와 같이 NHP에서 T 및 B 림프구 집단의 증가를 초래하였고; 림프구 집단의 이러한 증가는 촉매적으로 불활성인 116555 대조군 PD-L1 결합 분자를 NHP에 투여한 후에는 관찰되지 않았다. 이러한 반응은 115749, 115765, 또는 115695로 NHP를 치료한 경우에는 관찰되지 않았다(**도 44** 참조).

[0882] [847] 혈청 사이토카인 반응은 독립적인 NHP 연구에서도 평가되었다. **도 41d**에서, 데이터는 연구 1(2마리 동물의 샘플 크기) 및 연구 2(116297로 시험된 8마리 동물 및 116555로 시험된 5마리 동물)에 대한 응답자의 백분율로 표시된다. 데이터는 연구에서 116297의 투여 3 이후 시간에 사이토카인의 유도를 반영한다. 116297 면역 세포의 고갈 및 림프구 활성화는 면역 관문 억제제 염증 신호와 연관되었다. 특히, 116297 치료는 임상에서 면역 관문 억제제로 관찰된 T 세포 활성화 및 반응과 관련된 NHP에서 사이토카인 프로파일을 유도하였다. 115749, 115765, 또는 115695 치료 모두 시험된 모든 투여량에서 NHP의 irAE와 관련된 사이토카인 반응을 유발하지 않았다(**도 44**).

[0883] [848] 환자의 면역 세포를 표적으로 하는 것은 임상적 이점을 보여주었다. 예를 들어, 단일 제제 또는 조합 ICI(면역 관문 억제제) 치료의 투여는 유리한 반응과 관련하여 면역 활성화 및 면역 관련 유해 사례(irAE)를 유발할 수 있다. 그러나, 이 NHP 연구에서, irAE 반응은 고용량의 조합 ICI mAb 치료 후에만 관찰되었고, 단일 제제 ICI mAb 치료 후에는 관찰되지 않았다. 이 데이터는 NHP 모델이 응답에 대한 임계값이 더 높다는 것을 시사한다.

[0884] [849] **도 42a**에 나타낸 바와 같이, 116297 치료는 면역 활성화를 자극하고 인간에서 승인된 ICI 조합 요법(또는 NHP에서 고용량의 ICI 조합 치료)과 일치하지만 단일 제제 ICI NHP 연구와 일치하지 않는 약력학 및 irAE 프로파일을 초래하였다. 116297 치료 면역 관련 반응은 용량-의존적이고 시가 독소 촉매 활성에 의해 매개된다. 이러한 반응은, 시험된 용량(들)의 116555 치료가 생체 내에서 면역 활성화 또는 PD 반응을 유발하지 않았기 때문에, PD-L1 신호 전달 억제 및/또는 항원 전달에 의해서만 매개되지는 않을 것이다.

[0885] [850] 116297-기반 요법은, **도 42b**에 표시된 데이터에서 제시한 바와 같이, 단일 제제 요법으로서 인간에게 강력한 반응을 일으킬 가능성이 있는 독특한 치료 접근 방식을 나타낼 수 있다. 특히, 심근염과 피부염은 임상 환경에서 복합 면역 관문 억제제로 관찰되는 흔한 면역-관련 유해 사례(irAE)이고 유익한 치료 반응과 관련이 있다. 심근염 또는 피부염 형태의 irAE도 용량-의존적 방식으로 116297 치료에서 관찰되었고 투여 중단으로 해결되었다. 116927과 관련된 부작용은 분자의 상대적으로 짧은 반감기(몇 시간 정도)의 이점을 얻을 수 있다(**도 40a** 참조). 116297 유도 irAE는 T 림프구의 심장 조직 내로의 침윤과 관련이 있고, 116555로의 치료가 심근염, 피부염, 또는 T 림프구의 심장 조직으로의 침윤을 유발하지 않았기 때문에, 시가 독소 촉매 활성이 없는 경우에는 관찰되지 않았다. 추가로, 다른 PD-L1 결합 분자인 115765(SEQ ID NO: 161) 또는 115695(SEQ ID NO: 162)는 이러한 반응을 유도하지 못하였다. 116297과 동일한 Ig 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 영역을 포함하지만 다른 scFv 링커를 포함하는 115749의 투여는 심근염을 유발하지 않았지만 피부염을 유발하였다(**도 44** 참조).

[0886] [851] 종합하면, 이러한 데이터는, 116297이 시험된 PD-L1 결합 분자 중에서 독특한 특성을 갖고 있음을 나타낸다. 116297은 다양한 PD-L1 양성 종양 세포에 대해 가장 강력한 시험관 내 세포독성을 나타내었고, 116297을 사용한 치료는 NSCLC PDX 생체 내 모델에서 종양 성장 지연 및 생존 이점을 초래하였다(예를 들어, **도 29a-29c** 참조). 116297은 PD-L1 양성 면역 세포를 직접 사멸시켰다. 116297 치료는 면역 관문 억제제로 치료받은 환자의 임상적 이점과 관련된 irAE 프로파일과 유사한 NHP에서 면역 매개 irAE 프로파일을 유도한다. 116297로 세포를 고갈시키기 위해 표적화하면 **도 42a**에서와 같이 입체 블록만을 통해 활성을 매개하는 항체 블록에서는 관찰되지 않는 독특한 이점을 임상에서 얻을 수 있다. 116297은 NHP에서 단일 제제 관문 억제제가 아닌 조합과 일치하는 면역 활성화 및 약력학 및 irAE 프로파일을 자극한다.

[0887] [852] 단일요법 mAb 관문 억제제를 사용하는 NHP 모델에서 irAE가 나타나지 않았기 때문에, 116297 치료에 의해 유도된 irAE 반응은 독특한 PD-L1 표적 단일요법으로서 환자에게 이점의 가능성을 시사한다. 116297은 다중 작

용 기전으로 PD-L1을 표적으로 하고, 이는 승인된 용량으로 투여된 정부 규제 승인 PD-L1 단일클론 항체에서 관찰된 것보다 개선된 반응을 제공할 수 있다.

[0888] **실시예 9. PD-L1 결합 분자의 활성 비교**

[0889] [853] 이 연구의 목적은, 표적 세포가 분자에 노출되는 시간의 함수로서, 표적 세포에서 항원-특이적 T-림프구(AST) 반응을 유도하는 116297 및 기타 PD-L1 결합 분자의 능력을 비교하는 것이었다.

[0890] [854] 별개의 결합 도메인을 포함하는 PD-L1 결합 분자를 공동-배양 세포 생존력 분석에서 서로 비교하였다. 간략하게, PD-L1 결합 분자를 4시간 또는 24시간 동안 고밀도에서 PD-L1 양성 및 HLA:A*02 양성 표적 세포와 함께 배양하였다(표 15 참조). 그런 다음 결합 분자를 씻어 냈다. 시험된 각각의 PD-L1 결합 분자는 표적 세포로의 전달을 위한 펩티드 항원(NLVPMVATV, SEQ ID NO: 78)을 포함하였다. 후속적으로, 결합 분자에 의해 전달된 펩티드 항원에 제한된 세포독성 T 림프구(CTL)는, 1:1의 효과기 세포 대 표적 세포 비율에서, 사전-처리된 표적 세포와 공동-배양되었다. 48시간의 공동-배양 후, 상청액을 채취하고 ELISA에 의한 CTL 활성화에 대한 판독값으로서 IFN-γ의 검출에 사용하였다. 생존력은 또한, 단일층의 합류에 의해 결정된 바와 같이, IncuCtye S3(Sartorius) 시스템을 사용하여 60-72시간에서 측정되었다. PD-L1 결합 분자는, 급성 배양 및 세척(4시간) 또는 표적과의 지속적인 배양(24시간) 후 직접적인 세포 사멸을 촉진하거나 T 세포 활성화(즉, IFN-γ 분비)를 매개하는 능력에 대해 비교되었다.

표 15

[0891] **표 15: PD-L1 및 HLA:A*02 양성 표적 세포 및 HLA:A*02 NLVPMVATV(SEQ ID NO: 78) 제한된 효과기 세포**

공여자 ID 또는 세포주	세포 유형	형질
MDA-MB-231	상피; 선암종	PD-L1 + 및 HLA: A*02 + 96웰 플레이트의 40 μL 배지에서 10,000개 세포/웰
HCMV-CTL	1차 T 세포	HLA:A*02 NLVPMVATV 제한됨 1:1 효과기 대 타겟 비율로 사용

[0892] [855] 결과는 도 45a, 45b에 도시되어 있고 아래 표 16에 요약되어 있다. 시험된 PD-L1 결합 분자는 T 세포 의존적 활성화 및 세포 사멸을 입증하였다. IFN-γ 분비 및 CTL의 존재하에 유도된 세포-사멸 반응에 의해 측정된 T 세포 활성화의 효능은 4시간 '급성' PD-L1 결합 분자 배양 실험과 비교하여 24시간 '지속' 배양 실험에서 전반적으로 증가하였다(도 45a).

[0893] [856] 참고로, 116297 및 116555(이는 분자의 효소 활성을 감소시키기 위해 시가 독소 효과기 폴리펩티드 성분에 2개의 점 돌연변이를 포함함)는, 시험된 다른 PD-L1 결합 분자와 비교하여, '급성' 자극(~20pg/mL) 후 T 세포로부터 증가된 IFN-γ 분비를 유도하였고, IFN-γ 분비는 '지속된' PD-L1 결합 분자 노출 후 ~40-80pg/mL로 추가로 증가하였다. 이는, 관련되지 않은 결합 도메인(115765 및 114895)으로 구성된, 2개의 다른 PD-L1 결합 분자에서는 관찰되지 않았고, 이는 지속되지만 급성 노출은 아닌 IFN-γ 분비를 ~20pg/mL만 유도하였다(도 45a).

[0894] [857] 또한, 116297은 4시간 배양 및 세척 후 PD-L1-발현 세포 집단의 약 40%에 대해 CTL 매개 세포 사멸을 유도하는 능력을 입증하였다. 이 40% 세포-사멸 수준은 상이한 결합 도메인을 포함하는 시험된 다른 PD-L1 결합 분자에서 관찰되지 않았다. 시험된 다른 PD-L1 결합 분자(115765 및 115749)는 표적 세포 집단의 적어도 40%의 CTL 매개 사멸을 유도하기 위해 24시간의 지속적인 노출을 필요로 하였다(도 45b).

[0895] [858] 상기 기술된 데이터는, 116297이 상이한 scFv 결합 도메인 또는 scFv 링커를 포함하는 다른 PD-L1 결합 분자와 비교하여 더 빠르고 강력한 T 세포 활성화를 보인다는 것을 나타낸다. 116297, 116555의 촉매적으로 비활성화된 변이체에 대해 위에서 설명한 데이터는, 시험된 PD-L1 결합 분자가 116297 및 116555의 결합 도메인 구조와 상관관계가 있는 것으로 나타나는 바람직한 특성을 뒷받침하는 증거를 제공한다. 115749를 사용한 실험에서 이 활성의 부재(이는 116297 결합 도메인과 동일한 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 유지하지만 scFv 링커가 상이하여 동종이량체 분자가 아닌 단량체 분자를 생성함)는, 116297의 활성 및 효능이 결합 도메인의 구조/기능과 전체적인 동종이량체 구조의 조합에 기인할 수 있음을 시사한다.

표 16

[0896] **표 16: 분석 결과**

PD-L1 결합 분자	T-세포 활성화(IFN-γ, pg/mL)		T-세포 세포독성(Max % kill)	
	급성(4h)	지속성(24h)	급성(4h)	지속성(24h)
116297	38	82	67	54
116555	34	154	95	65
115749	13	29	96	53
115765	15	46	96	48
114895	1.7	59	99	50
PD-L1 결합 분자	T-세포 활성화(IFN-γ, pg/mL)		T-세포 세포독성(CD50 ng/mL)	
	급성(4h)	지속성(24h)	급성(4h)	지속성(24h)
116297	>10,000	502	>10,000	218
116555	>10,000	5038	>10,000	685
115749	>10,000	>10,000	>10,000	869
115765	>10,000	>10,000	>10,000	1338
114895	>10,000	>10,000	>10,000	2488

[0897] [859] 면역 세포를 특이적으로 고갈시키는 116297 및 기타 고유한 PD-L1 결합 분자의 능력도 시험하였다. 이 연구의 목표는, 116297이 다른 PD-L1 결합 분자에서 관찰되지 않은 비인간 영장류(NHP)에서 단핵구 고갈 및 면역-관련 유해 사례(irAE)의 발병과 관련된 활성을 보이는지 여부를 확인하는 것이었다.

[0898] [860] PD-L1 결합 분자는 (i) PD-L1 발현을 유도하기 위해 IFN-γ(100IU/mL)로 치료된 1차 인간 단핵구(IC), (ii) 높은 수준의 PD-L1을 발현하는 HCC1954 종양 세포, 또는 (iii) PD-L1을 발현하지 않는 MCF7 종양 세포와 함께 배양되었다(표 17 참조). PD-L1 결합 분자는, 최종 PD-L1 결합 분자 농도가 0.631-20,000ng/mL(6배 또는 8배 희석) 범위인 용량 시리즈를 사용하여 세포에 첨가되었고, 연구 기간 동안 배양물에 그대로 두었다. 분석의 5일째에, 상기 기재된 바와 같이, 표준 Cell Titer Glo 분석을 사용하여 세포의 생존력을 평가하였다.

표 17

[0899] **표 17: 표적 세포**

공여자 ID 또는 세포주	**세포 유형**	**세포독성 분석을 위한 세포 번호**
공여자 1 CC00152	CD14+ 단핵구	384웰 플레이트의 20μL 배지에서 5,000개 세포/웰
공여자 1 M6206	CD14+ 단핵구	384웰 플레이트의 20μL 배지에서 5,000개 세포/웰
공여자 3 M6541	CD14+ 단핵구	384웰 플레이트의 20μL 배지에서 5,000개 세포/웰
공여자 4 M7488	CD14+ 단핵구	384웰 플레이트의 20μL 배지에서 5,000개 세포/웰
HCC1954	상피 ; 유관암	384웰 플레이트의 20μL 배지에서 1,000개 세포/웰
MCF7	상피 ; 선암종	384웰 플레이트의 20μL 배지에서 1,000개 세포/웰

[0900] [861] 결과를 도 46a, 46b에 도시하였고 표 18에 요약하였다. 116297은 4명의 개체 공여자의 세포에 걸쳐 생존력을 20μg/mL에서 60%, 2μg/mL에서 40%까지 감소시켜 1차 단핵구의 대표적인 IC 집단의 용량-의존적 고갈을 유도하였다. 유사한 반응이, C-말단 CD8+ T-세포 에피토프 카고가 결여된, PD-L1 결합 분자 114963(SEQ ID NO: 260), 114964(SEQ ID NO: 261), 및 115695(SEQ ID NO: 162)에서 관찰되었다. 참고로, 추가 PD-L1 결합 분자는, 116297과 동일한 결합 도메인 및 항원성 펩티드 카고를 함유하는 116297의 단량체 변이체 115749뿐만 아니라 상이한 결합 도메인을 포함하고 동일한 펩티드 항원 카고를 포함하는 추가 PD-L1 결합 분자 115765 및 114895를 포함하여, 116297과 비교하여 단핵구에서 감소된 효능을 나타내었다.

[0901] [862] C-말단 펩티드-항원 카고가 없는 114962(SEQ ID NO: 259)는, SLTA-I의 효소 효능을 심각하게 약화시키는 점 돌연변이(Y77S, E167D)가 있는 116297의 유사체인, 116555에서와 같이 세포 고갈을 위해 단핵구를 표적화하지 못하였다. 음성 대조군인 DI-SLTA 단독은 분석에서 시험된 단핵구에 대한 직접적인 활성을 나타내지 않았다.

[0902] [863] 단핵구에 대한 상이한 PD-L1 결합 분자의 차등 활성과 대조적으로, PD-L1 결합 분자는, PD-L1 표적을 발현하는 TC 라인, HCC1954에 대해 유사한 효능을 보였고, PD-L1 음성 대조군 라인 MCF7에 대해 유사한 활성 결핍을 나타냈다.

표 18

[0903] **표 18: 표적 세포**

PD-L1 결합 분자	세포독성(CD50ng/mL)		세포독성(Max % kill)	
	TC	IC	TC	IC
116297	7.2	8531	98	38
116555	>20,000	>20,000	0	9
115749	35	>20,000	97	15
115695	29	5969	99	34
115765	4.7	>20,000	99	27
114895	87	>20,000	98	0
114963	6.4	10,248	99	3
114964	8.4	2218	98	36
114962	35.6	>20,000	96	0

[0904] [864] 시험한 모든 PD-L1 결합 분자는 TC 대조군의 강력한 세포 사멸을 유도하였고(최대 반응 > 90%) 114962, 115749, 및 114895(> 35ng/mL)를 제외하고 10ng/mL 미만에서 효능을 나타내었다. 116297, 115695, 114964, 및 115963은 각각 PD-L1 양성 세포에 대해 유사한 선택적 세포독성을 나타내었다. 115765, 115749, 및 114895는 20㎍/mL에서 116297에 비해 감소된 활성을 보였고 더 낮은 2㎍/mL 농도에서 단핵구(촉매 불활성 116555와 유사한 반응)를 고갈시킬 수 없었다.

[0905] [865] 함께 이러한 데이터는, PD-L1 결합 분자가 시험관 내에서 TC에 대해 유사한 효능 범위를 나타내지만, 단핵구와 같은 IC 서브세트에 대한 효능은 이러한 분자의 서브세트에만 존재한다는 것을 보여준다. 분자의 이 서브세트에는 116297, 115695, 114964, 및 115963이 포함된다. 참고로, 이 서브세트 내에서 116297만이 SLTA 효소 활성을 통해 직접적인 세포독성을 전달하고 CD8+ T-세포 에피토프-펩티드 및 CTL 결합의 전달을 통해 간접적인 세포독성을 전달할 수 있는 능력을 갖는 PD-L1 결합 분자를 나타낸다. 또한, 116297의 이러한 시험관 내 활성은 NHP에서 116297에 의한 단핵구의 생체 내 고갈의 관찰과 상관관계가 있고, 이는 시험된 다른 분자에서는 관찰되지 않은 것으로, 예를 들어, 115695, 115749, 또는 115765 치료는 생체 내 NHP 연구에서 IC 고갈, 면역 관련 유해 사례 발생, 또는 면역 자극 활성을 초래하지 않았다.

[0906] **실시예 10. PD-L1에 결합하고 시가 독소 A 서브유닛 스캐폴드를 포함하는 PD-L1 결합 분자**

[0907] [866] 이 실시예에서, 각각이 아미노산 서열을 포함하거나 이로 본질적으로 구성되는 3개의 CDR을 포함하는, 중쇄 가변 영역을 포함하는 PD-L1 표적 생체분자의 세포 외 부분에 결합하는 결합 영역은 SEQ ID NOs: 27, 29, 30, 및/또는 32 중 어느 하나에 나타나고, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:25, 및/또는 SEQ ID NO:26에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역은 독소 또는 이의 단편 또는 유도체에 융합된다. 일부 실시예에서, 결합 영역은 시가 독소 효과기 폴리펩티드(예를 들어, SEQ ID NOs: 1-18 및 40-68 중 임의의 하나)에 융합된다. 시가 독소 효과기 영역은, 선택적으로 1) 탈면역화, 2) 단백질분해효소-절단 저항성, 및/또는 3) 매립되거나 삽입된 이종 T-세포 에피토프(예: WO 2014/164680, WO 2014/164693, WO 2015/138435, WO 2015/138452, WO 2015/113005, WO 2015/113007, WO 2015/191764, WO 2016/196344, WO 2017/019623, WO 2018/106895, 및 WO 2018/140427 중 임의의 하나에 기재된 시가 독소 효과기 폴리펩티드) 중 2 이상을 제공하기 위해 본 명세서에 설명된 서브-영역의 조합을 포함하도록, 시가 독소 또는 시가-유사 독소(예: SEQ ID NOs: 1-18 중 임의의 하나)의 A 서브유닛에서 유래된다.

[0908] [867] 생성된 융합 단백질은, 선택적으로 다가(예: 2개 이상의 PD-L1 결합 영역 포함)인, 단일사슬 폴리펩티드 또는 다량체로서 생산 및 정제된다. 이 실시예의 예시적인 단백질은 당업계에 공지된 기술을 사용하여 카복시-말단 KDEL-유형 신호 모티프로 선택적으로 생성되고 선택적으로 CD8+ T-세포 에피토프-펩티드 카고 및/또는 검출 촉진제(들)와 같은 추가 외인성 물질에 연결된다. 이 실시예의 예시적인 단백질은 적절한 PD-L1 분자를 발현하는 세포를 사용하여 이전 실시예에 기재된 바와 같이 시험된다. 이 실시예의 예시적인 PD-L1 표적화 융합 단백질은, 예를 들어 PD-L1 발현 세포를 사멸시키고, 표적 세포의 세포 이하 구획을 표지하고, 예를 들어, 다양한

암과 종양과 같은, 질병, 질환, 및/또는 장애를 진단 및 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0909] 요약

[0910] [868] 116927은 시험관 내에서 PD-L1 발현 세포에 대한 세포독성 효능을 기반으로 시험된 다른 PD-L1 결합 분자 중에서 선택되었고 추가로 비인간 영장류 모델에서 예상치 못한 활성을 보여주었다. PD-L1 발현 세포에 116297 투여하면, 상이한 면역글로불린 결합 도메인(예: 115765 또는 114895) 또는 상이한 scFv-링커(115749)를 갖는 다른 PD-L1 표적 분자와 비교할 때, 2개의 PD-L1 양성 종양주, PD-L1 높음(+++) 및 중간(++)에 대해 가장 강력한 시가 독소 A 서브유닛 촉매 활성-매개 세포독성 효능을 나타내었다(**도 43a, 43b** 참조). 다른 PD-L1 표적 분자에 대한 116297의 더 큰 상대적 세포독성 효능은 PD-L1 세포-표면 발현 수준이 감소함에 따라 유지되었고, 이는 116297이 더 큰 치료 범위를 가질 수 있고/있거나 다른 PD-L1 결합 분자와 비교하여 더 적정한 PD-L1 발현으로 PD-L1 발현 세포를 더 강력하게 사멸시킬 수 있음을 시사한다(**도 43a, 43b** 참조). 또한, 116297(SEQ ID NO:128)은 종양 침윤 림프구가 없고 종양 미세 환경의 면역 조절 상태와 관계없이(예: 종양이 "뜨거운(hot)" 또는 "차가운(cold)", 염증이 없는 종양, 또는 면역-배제된 종양으로 특징지어지는지 여부에 관계없이) 생체 내에서 종양 세포에 대해 세포독성일 수 있다.

[0911] [869] 116297(SEQ ID NO:128)은 인간 환자 유래 이종이식 쥐 모델에서 생존 이점 및 항종양 활성을 나타낼 수 있었다. 4주에 걸쳐 450㎍/kg의 116297(SEQ ID NO:128)의 정맥 내 투여는 비인간 영장류에 의해 허용되었다. 116297(SEQ ID NO:128)은 PD-L1 발현 수준과 일부 관련이 있는 임상적으로 관련된 종양 세포 116297(SEQ ID NO:128)에 대해 강력한 세포독성 활성을 나타낸다. 116297(SEQ ID NO:128)은 3가지 별개의 작용 기전을 나타낼 수 있다: #1) 세포 내재화 및 촉매 활성을 통한 PD-L1 발현 세포의 직접적인 세포-사멸; #2) 항원 전달, 제시, 및 CTL 인식을 통한 PD-L1 발현 세포의 간접적인 세포-사멸; 및 #3) PD-1/PD-L1 상호작용의 차단. 116297(SEQ ID NO:128)이 PD-L1을 발현하는 건강한 말초 면역 세포를 사멸시킬 수 있지만, 이는 PD-L1 발현이 증가된 단핵구의 서브세트로 제한될 수 있고, PD-L1 수준이 상승한 이들 면역 세포가 종양 세포에 대한 면역 반응을 억제하는 경우 종양 부위에서 이점을 제공할 수 있다.

[0912] [870] PD-L1을 표적으로 하는 단일클론항체(mAb)는 면역 관문 억제제로 작용하고 PD-L1과 PD-1 사이의 상호작용을 물리적으로 억제하여 면역 관문 활성화를 방지하고 종양 세포에 대한 T 세포 기능을 복원한다.

[0913] [871] PD-1, PD-L1, 및 CTLA-4를 표적으로 하는 mAb를 포함하여 면역 관문 억제제(ICI)로 작용하는 MAb는 우수한 임상 이점을 제공하는 것으로 보고되었다. ICI를 투여받는 대부분의 환자는 면역 관련 유해 사례(irAE)를 경험하지 않지만, ICI 치료의 임상적 이점은 irAE와 같은 면역 관련 반응과 상관관계가 있었다(Das S et al. J Immunother Cancer 7: 306 (2019) 참조). 비인간 영장류(NHP) 연구에서, 승인된 ICI 단일 제제 치료는 어떤 용량에서도 irAE를 유발하지 않는다. 그러나, NHP 모델에서 단일 제제 ICI mAb 투여는, 2 이상의 ICI mAb의 조합으로 그리고 예상 임상 용량보다 훨씬 높은 용량으로 제공될 때, irAE를 유발할 수 있다(Changhua J et al., Clin Cancer Res 25: 4735-48 (2019)). 본 명세서의 실시예에 기재된 바와 같이, NHP에 대한 단일 제제로서 116297 투여가 상당한 비율의 동물에서 irAE를 초래한다는 것이 예기치 않게 관찰되었다.

[0914] [872] 실시예에 기술된 바와 같이, NHP에 대한 116297 투여는, ICI로 치료된 환자에서 유익한 반응과 상관된 것과 유사한, 면역 활성화 및 irAE의 제시를 초래할 수 있다(FIG 42B; Nakamura Y, Front Med (Lausanne) 6: 119 (2019) 참조). 116297의 활성은, 116297이 단일 제제로서 이러한 효과를 생성하므로, ICI mAb와 구별된다. 또한, 이러한 반응은, PD-L1 발현-의존적 방식으로 고갈되는 것으로 나타난 단핵구의 고갈과 관련이 있고, 따라서 면역 활성화 및 irAE를 유도하는 116297의 능력은 PD-L1 표적화와 관련된 약력학적 효과와 관련된다.

[0915] [873] NHP의 116297 치료는 T-림프구, B-림프구, NK 세포, 및 호산구를 포함한 면역 서브세트의 용량-의존적 말초 확장을 초래하였다. 면역 확장은 IL-6, IL-10, IFN-감마, TNF-알파, 및 IL-2를 비롯한 사이토카인 분비와 관련이 있었다(**도 42b** 참조). 관찰된 기능적 면역 활성은 심장 조직 내로의 면역 침윤(심근염) 및 임상 환경에서 ICI 치료 후 관찰된 irAE와 유사한 피부염 irAE의 발생과 더 관련이 있다(Nakamura et al. 2019). PD-L1 결합 분자에 의해 유도된 이러한 irAE는 116297의 짧은 반감기에 따라 투여 중단으로 해결되었다.

[0916] [874] 이 실시예에 나타난 바와 같이, 116297의 특성은, 시가 독소 성분의 촉매 활성을 불활성화시키는 점 돌연변이를 갖는 PD-L1 결합 분자 변이체, 116555의 투여가 NHP에서 어떠한 면역 활성화, 세포 고갈, 또는 irAE의 제시를 나타내지 않기 때문에, 세포 사멸의 시가 독소 A 서브유닛 촉매 메커니즘에 의존적이다(**도 41b, 41c, 및 41d** 참조).

[0917] [875] 또한, 116297의 특성은 scFv CDR, 중쇄 및 경쇄, 및/또는 scFv 링커와 상관관계가 있었는데, 이는

116297과 비교하여 NHP에서 유사한 용량 및 더 높은 빈도로 투여되었음에도 불구하고 가변 도메인이 다른 분자가 영장류 모델에서 동일한 효과를 나타내지 않았기 때문이다(**도 44**). 115765 및 115695는 NHP 연구에서 irAE 발생을 촉진하기 위한 면역 서브세트의 직접적인 제거, 면역 서브세트 확장, 또는 조직 침윤의 징후를 나타내지 않았다.

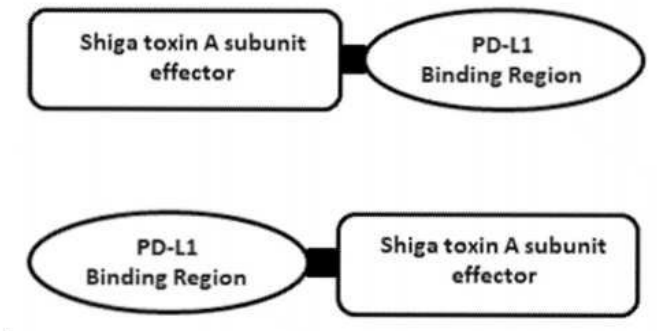
[0918] [876] 116297과 동일한 결합 도메인을 함유하지만 scFv-링커 길이가 다른, 단량체 및 1가 PD-L1 결합 분자, 115749는 면역 고갈 또는 활성화를 나타내지 않았지만 irAE 발생(피부염)의 일부 징후를 나타내어, 116297과 115749 사이에서 공유되는 Ig 도메인의 특이적 결합 특성에 대한 의존성을 제시하고 NHP에서 면역 활성화 및 irAE 발생이 중쇄 및 경쇄를 넘어 116297에 고유한 추가 구조/기능 때문일 수 있음을 입증한다.

[0919] [877] 본 발명의 일부 실시예가 예시의 방식으로 설명되었지만, 본 발명은 본 발명의 사상을 벗어남이 없이, 당업자의 범위 내에서 많은 수정, 변형 및 개조, 그리고 수많은 균등물 또는 대안 솔루션의 사용으로 실행될 수 있음이 명백할 것이다.

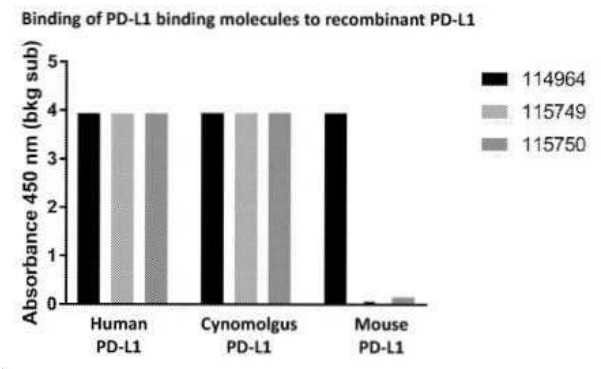
[0920] [878] 모든 간행물, 특허, 및 특허 출원은, 각각의 개별 간행물, 특허, 또는 특허 출원이 그 전체가 참조로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 그 전체가 참조로 본 명세서에 포함된다. 국제특허출원 공개 WO 2014/164680, WO 2014/164693, WO 2015/138435, WO 2015/138452, WO 2015/113005, WO 2015/113007, WO 2015/191764, WO 2016/196344, WO 2017/019623, WO 2018/106895, WO 2018/140427, WO 2019/183093, 및 WO 2020/154475는 각각 그 전체가 참조로 본 명세서에 포함된다. 미국 특허 출원 US2015/259428, US2016/17784, US2017/143814, 및 US62/644,832의 개시 내용은 각각 그 전체가 참조로 본 명세서에 포함된다. 본 명세서에 인용된 아미노산 및 뉴클레오티드 서열에 대한 GenBank(National Center for Biotechnology Information, U.S.A.)로부터 전자적으로 이용 가능한 모든 생물학적 서열 정보의 완전한 개시는 각각 그 전체가 참조로 본 명세서에 포함된다.

도면

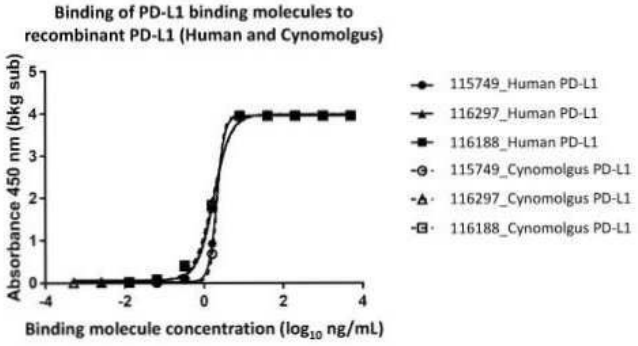
도면1



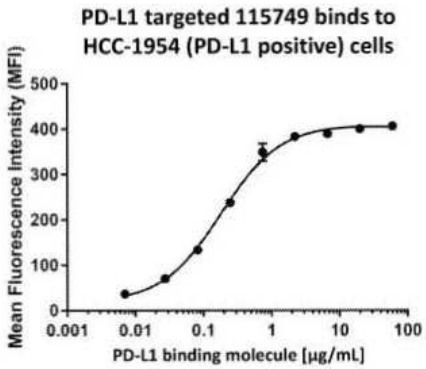
도면2



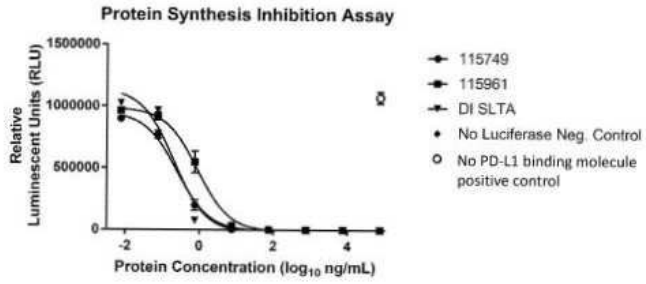
도면3



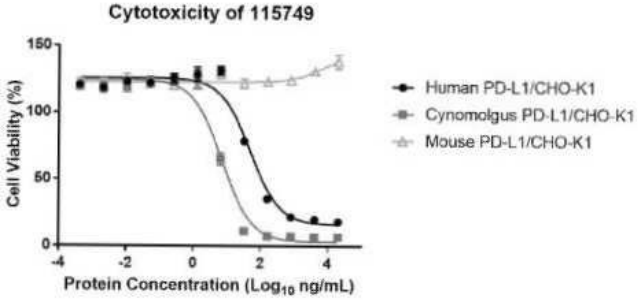
도면4



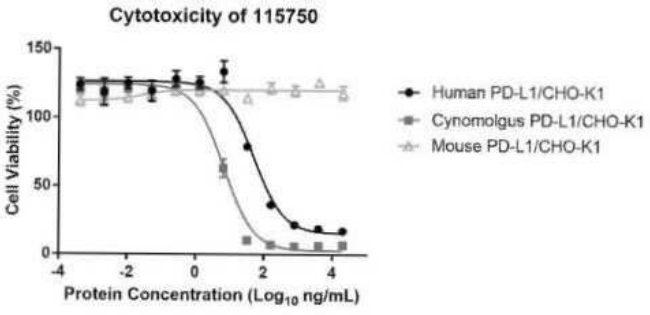
도면5



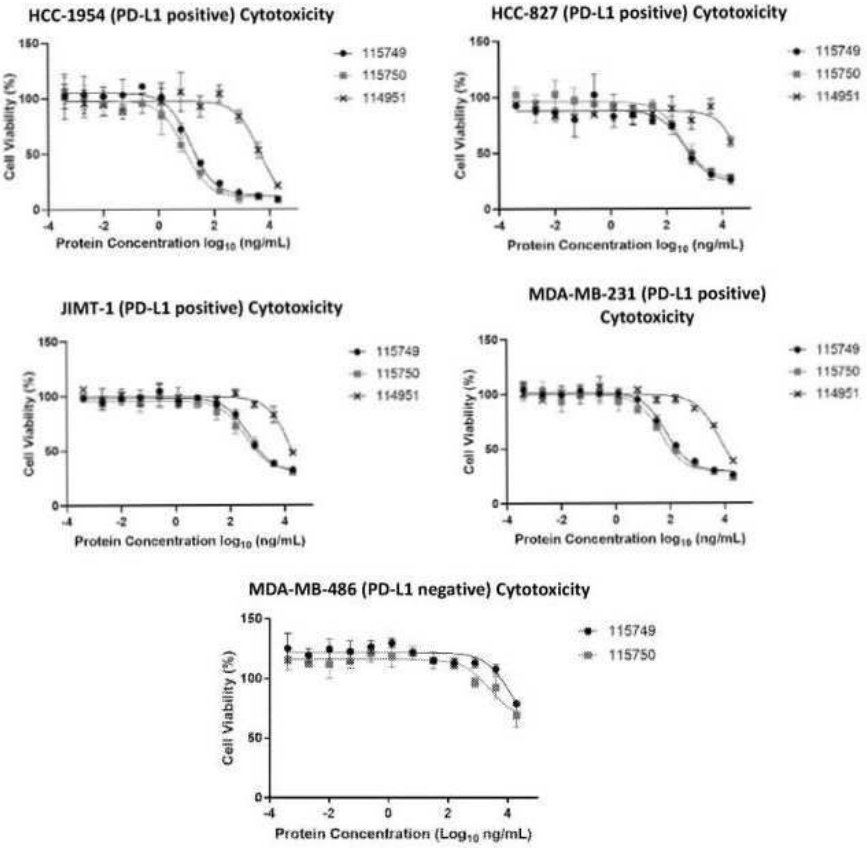
도면6a



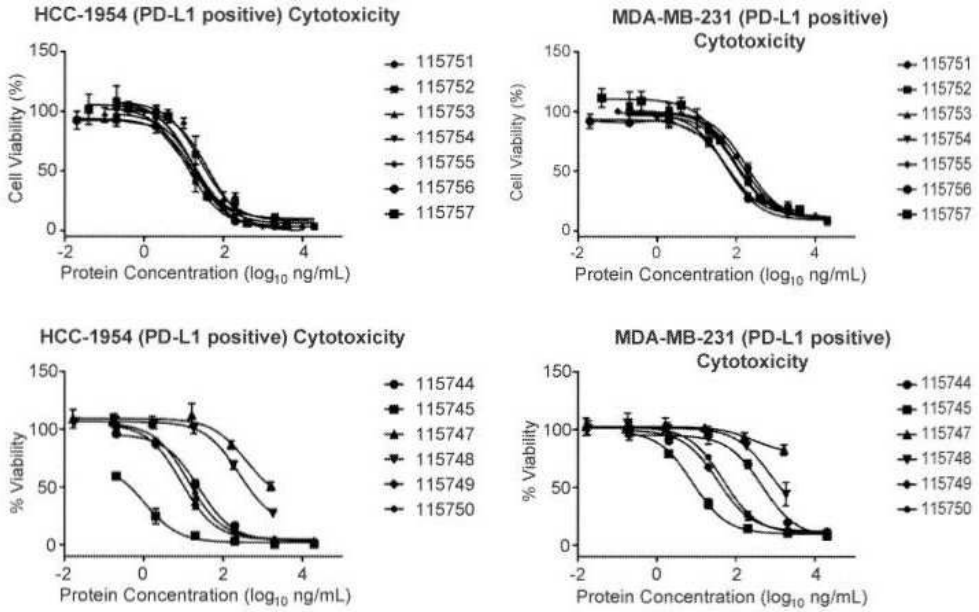
도면6b


Cytotoxicity of 115750
Cell Viability (%)
Protein Concentration (Log10 ng/mL)
Human PD-L1/CHO-K1
Cynomolgus PD-L1/CHO-K1
Mouse PD-L1/CHO-K1

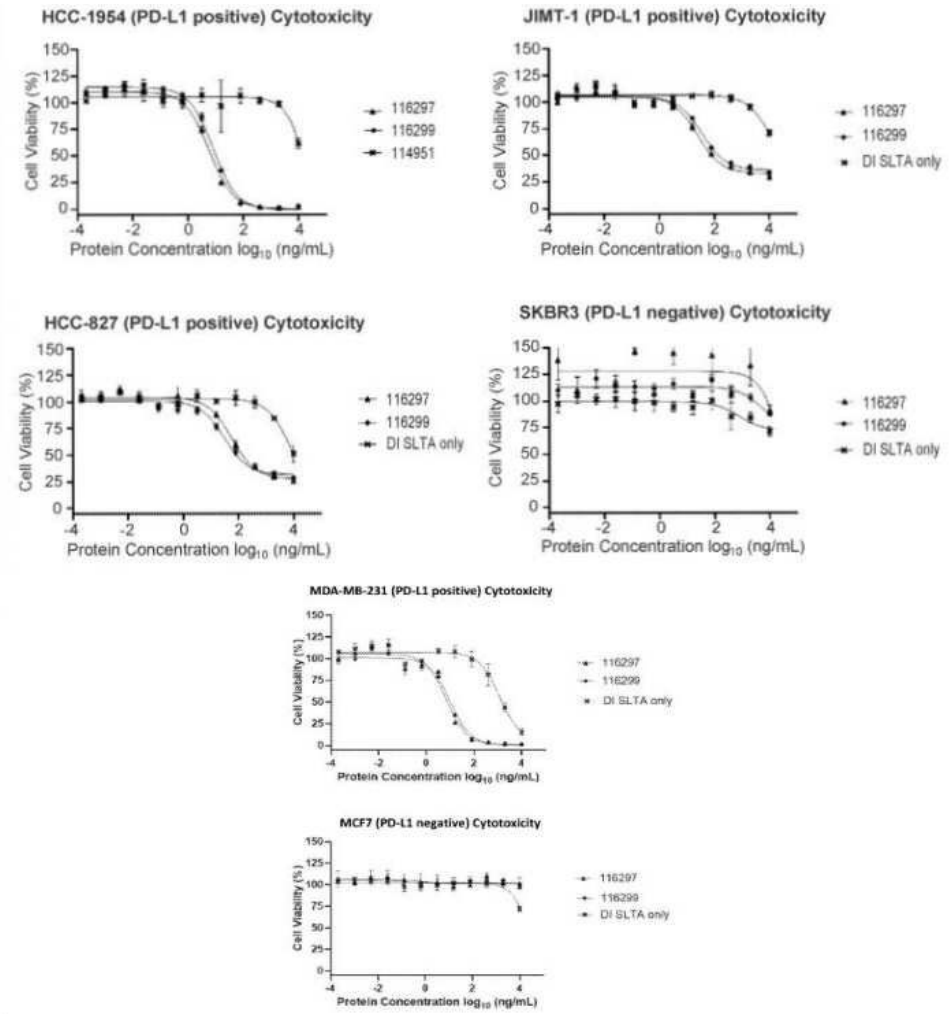
도면7


HCC-1954 (PD-L1 positive) Cytotoxicity
HCC-827 (PD-L1 positive) Cytotoxicity
JIMT-1 (PD-L1 positive) Cytotoxicity
MDA-MB-231 (PD-L1 positive) Cytotoxicity
MDA-MB-486 (PD-L1 negative) Cytotoxicity
Cell Viability (%)
Protein Concentration log10 (ng/mL)
115749
115750
114951

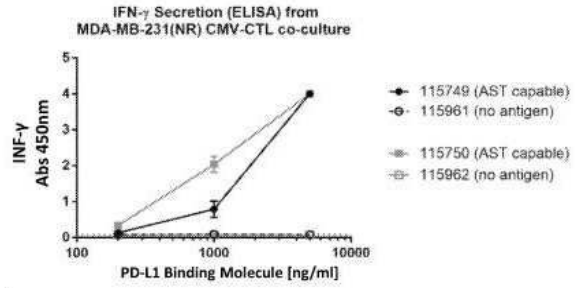
도면8


HCC-1954 (PD-L1 positive) Cytotoxicity
Cell Viability (%)
Protein Concentration (log10 ng/mL)
115751
115752
115753
115754
115755
115756
115757
MDA-MB-231 (PD-L1 positive) Cytotoxicity
Cell Viability (%)
Protein Concentration (log10 ng/mL)
115751
115752
115753
115754
115755
115756
115757
HCC-1954 (PD-L1 positive) Cytotoxicity
% Viability
Protein Concentration (log10 ng/mL)
115744
115745
115747
115748
115749
115750
MDA-MB-231 (PD-L1 positive) Cytotoxicity
% Viability
Protein Concentration (log10 ng/mL)
115744
115745
115747
115748
115749
115750

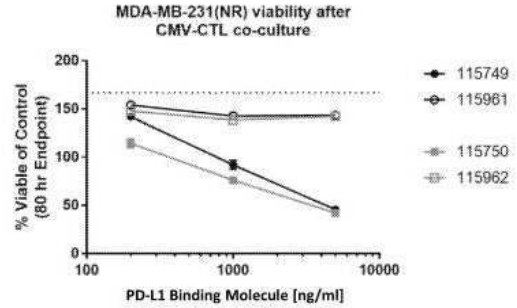
도면9


HCC-1954 (PD-L1 positive) Cytotoxicity
Cell Viability (%)
Protein Concentration log10 (ng/mL)
116297
116299
114951
JIMT-1 (PD-L1 positive) Cytotoxicity
Cell Viability (%)
Protein Concentration log10 (ng/mL)
116297
116299
DI SLTA only
HCC-827 (PD-L1 positive) Cytotoxicity
Cell Viability (%)
Protein Concentration log10 (ng/mL)
116297
116299
DI SLTA only
SKBR3 (PD-L1 negative) Cytotoxicity
Cell Viability (%)
Protein Concentration log10 (ng/mL)
116297
116299
DI SLTA only
MDA-MB-231 (PD-L1 positive) Cytotoxicity
Cell Viability (%)
Protein Concentration log10 (ng/mL)
116297
116299
DI SLTA only
MCF7 (PD-L1 negative) Cytotoxicity
Cell Viability (%)
Protein Concentration log10 (ng/mL)
116297
116299
DI SLTA only

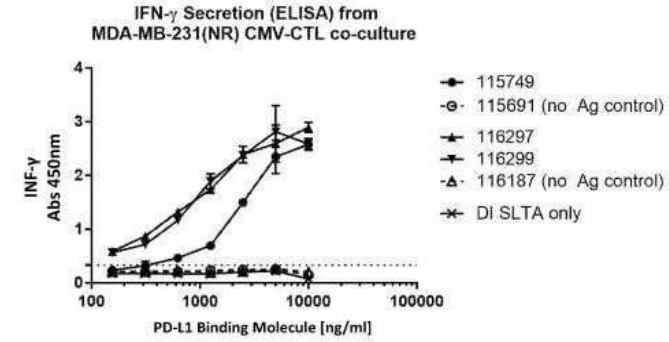
도면10a



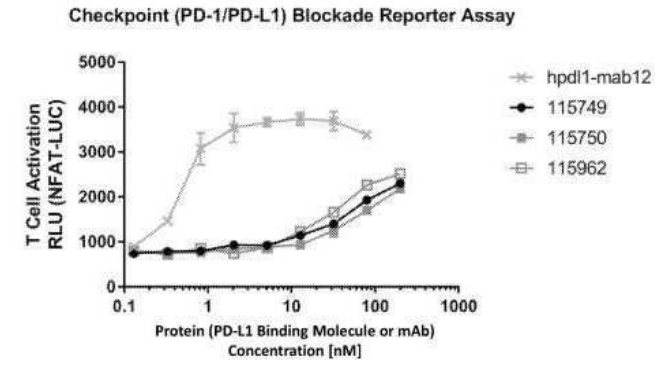
도면10b



도면11



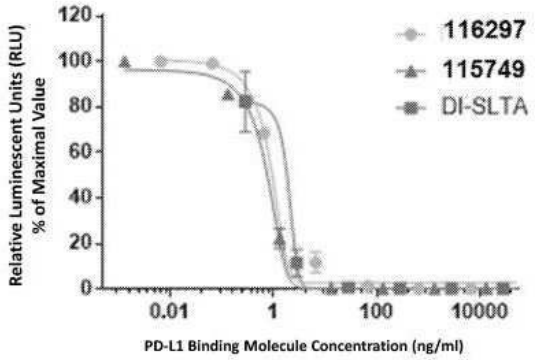
도면12



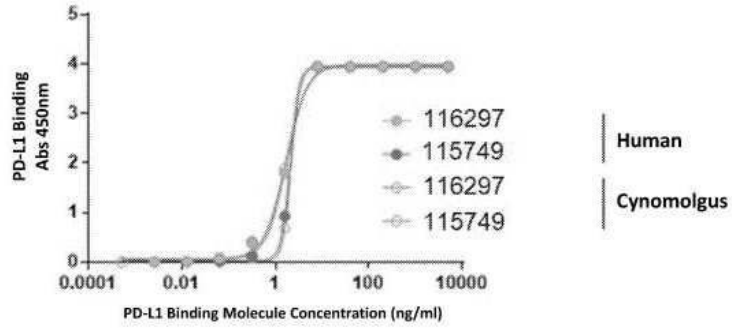
도면13

Cell-Targeting Molecule Function:	Potency (ng / mL)
Protein synthesis inhibition	0.36
Binding human PD-L1	1.8
Binding cynomolgus PD-L1	1.7
Cytotoxicity to PD-L1 positive tumor cells	1 to 110
Cytotoxicity to PD-L1 positive monocytes	2 to 200
Cytotoxicity to PD-L1 positive tumor cells in the presence of CTLs	20 to 250

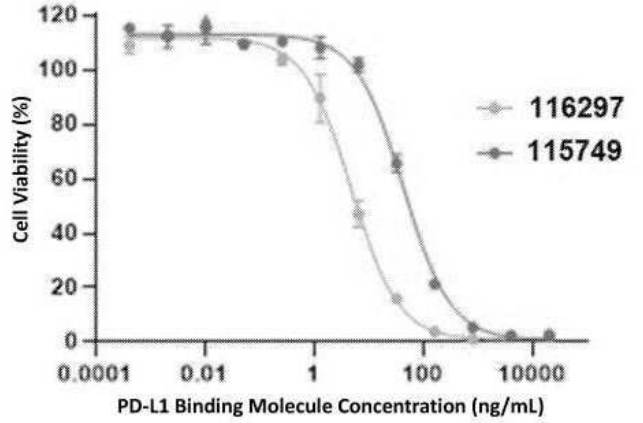
도면14



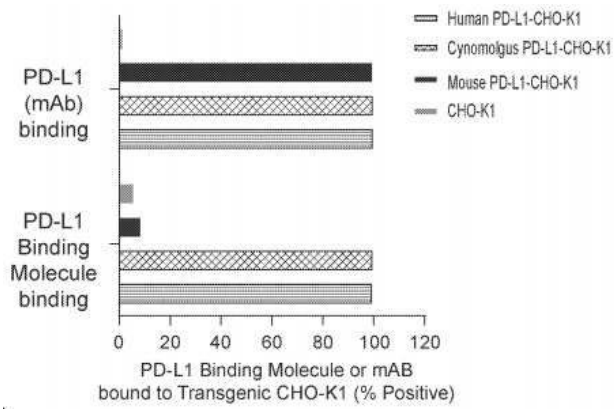
도면15



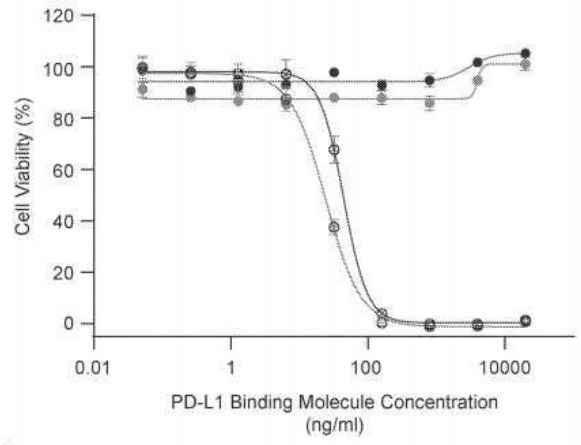
도면16



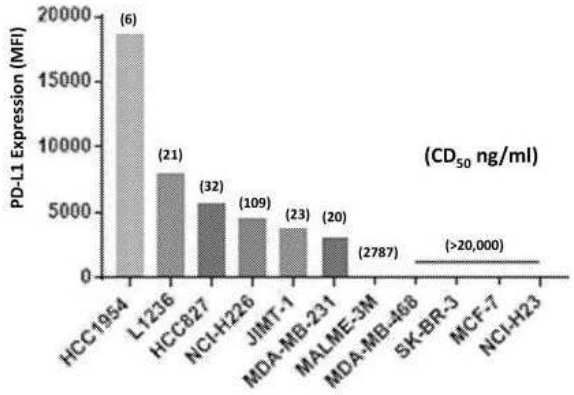
도면17a



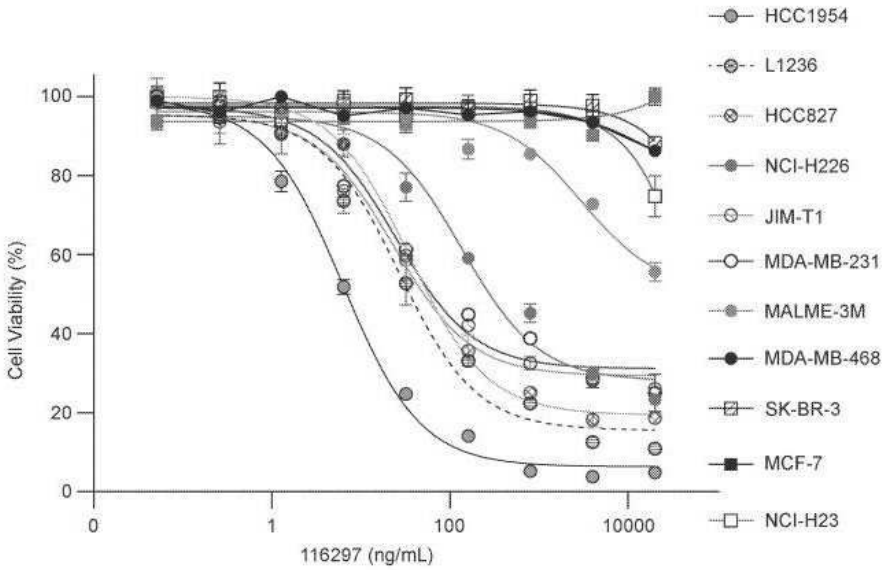
도면17b



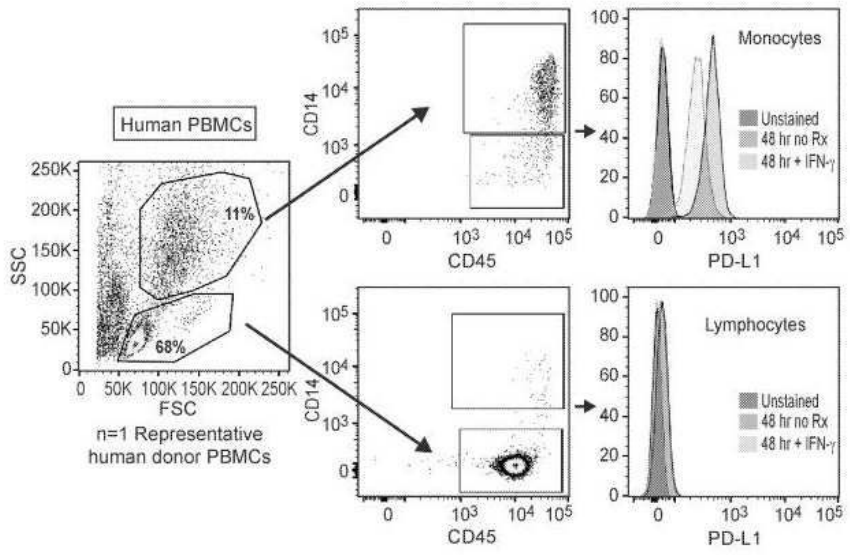
도면18a



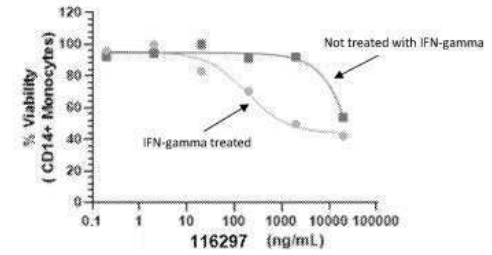
도면18b



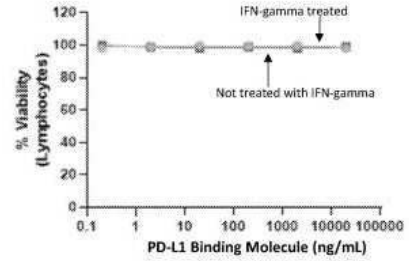
도면19



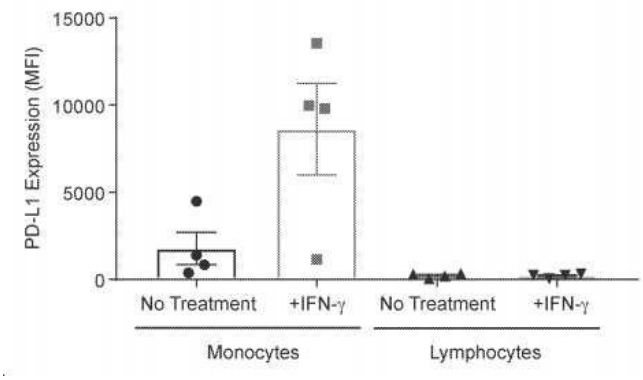
도면20a



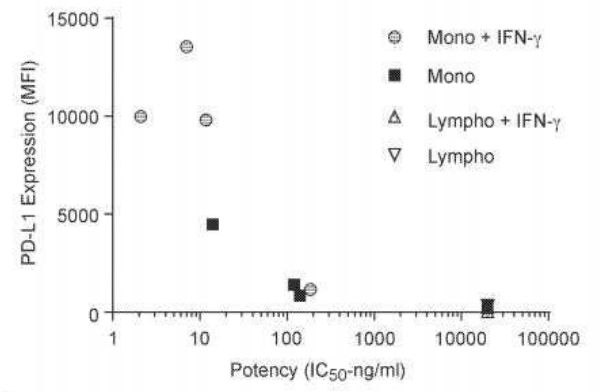
도면20b



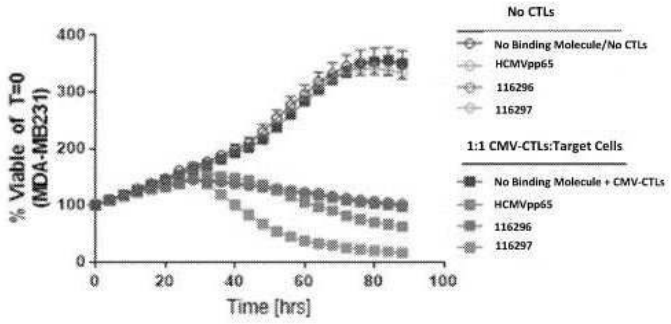
도면21a



도면21b



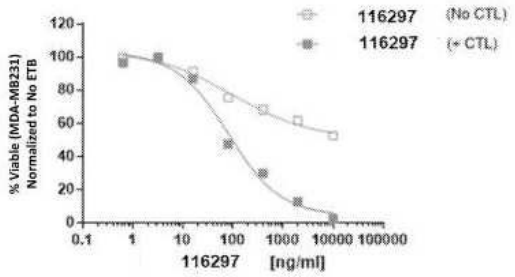
도면22



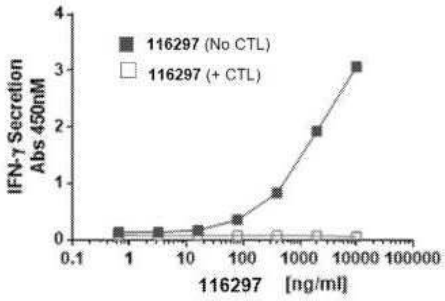
도면23

Cell line tested	Cytotoxic potency of 116297: CD_{50} (ng/mL) in the presence of CTLs	Fold induction of IFN-γ secretion by 116297-treated tumor cell / CTL co-culture over 116297-treated tumor cells alone
MDA-MB-231	18.4	55.0
L1236	253.0	38.0
MCF-7	> 20,000	6.6

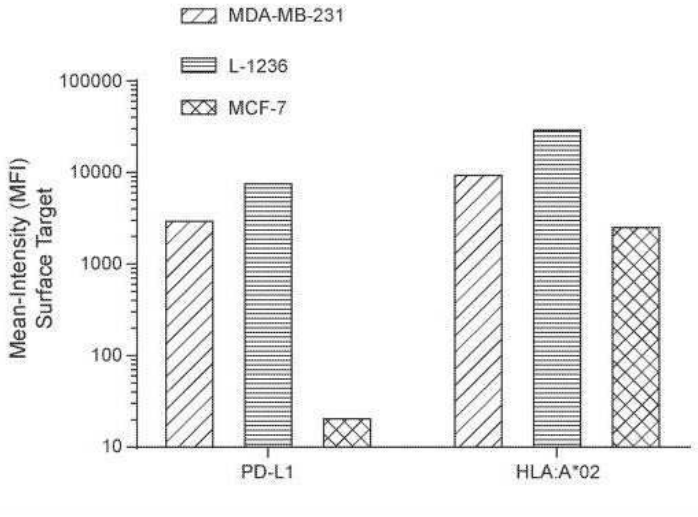
도면24a



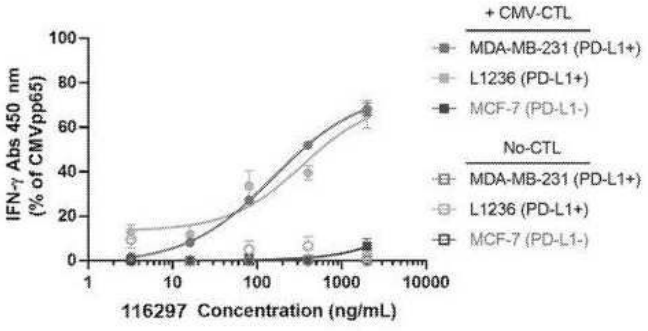
도면24b



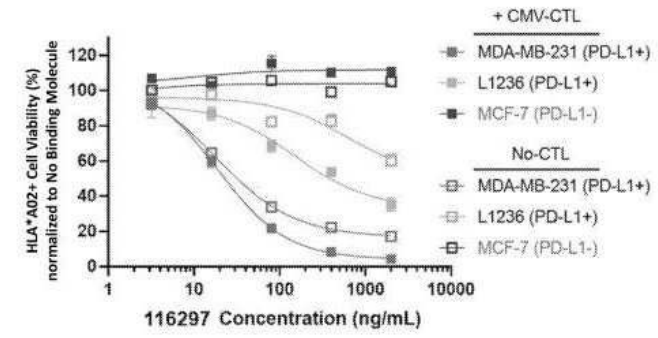
도면25



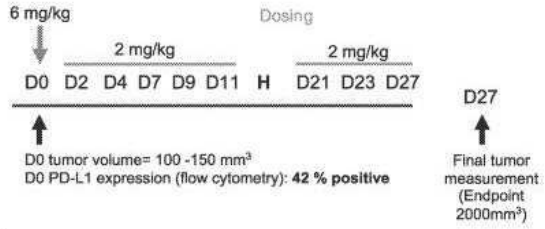
도면26



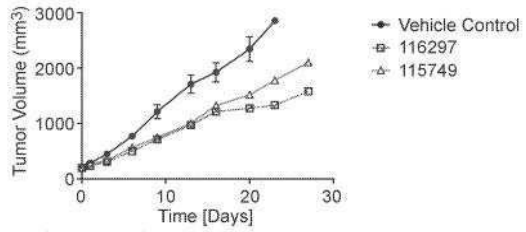
도면27



도면28a

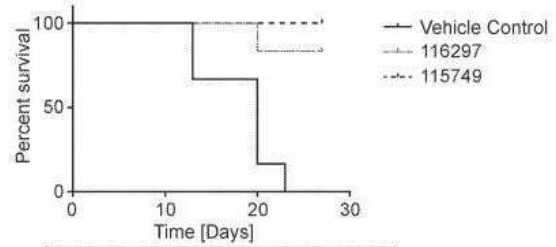


도면28b



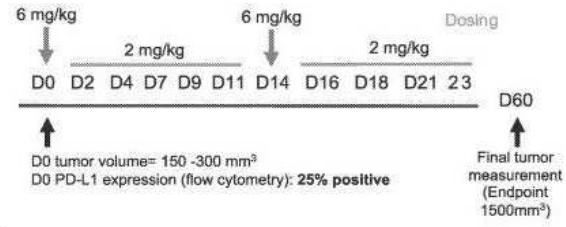
Tumor Volume T/C (endpoint)	Vehicle: 100%
	115749: 85%
	116297: 67%

도면28c

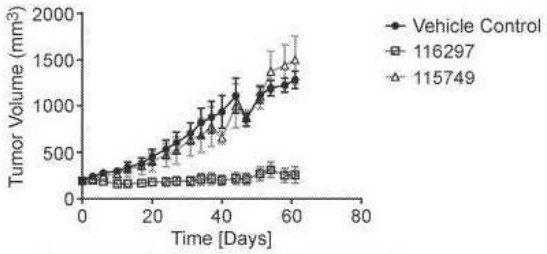


Mean Time to Endpoint	Vehicle: 20
	115749: >30
	116297: >30

도면29a

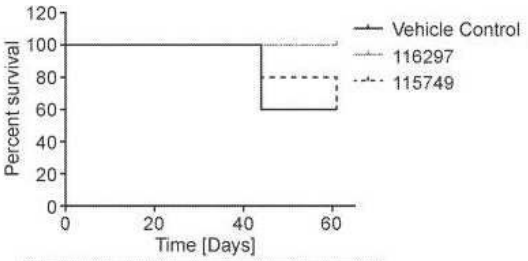


도면29b



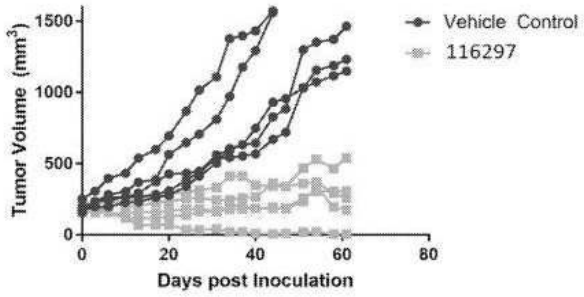
Tumor Volume T/C (endpoint)	Vehicle: 100%
	115749: 114%
	116297: 21%

도면29c



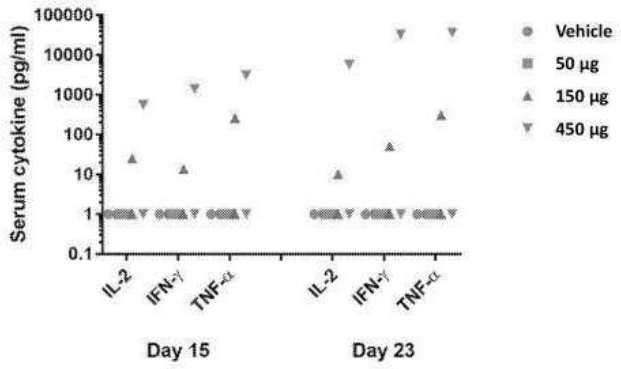
Mean Time to Endpoint	Vehicle: 52
	115749: 56
	116297: 60

도면30

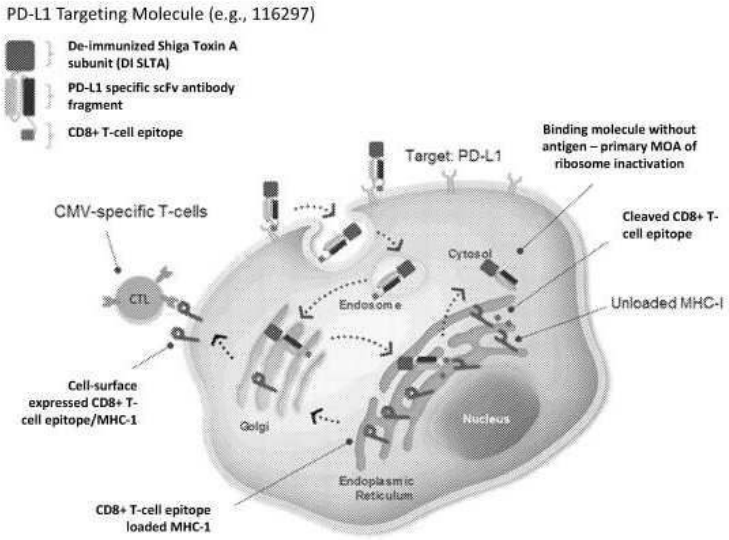


Tumor Volume T/C (endpoint)	Vehicle: 100%
	116297: 21%

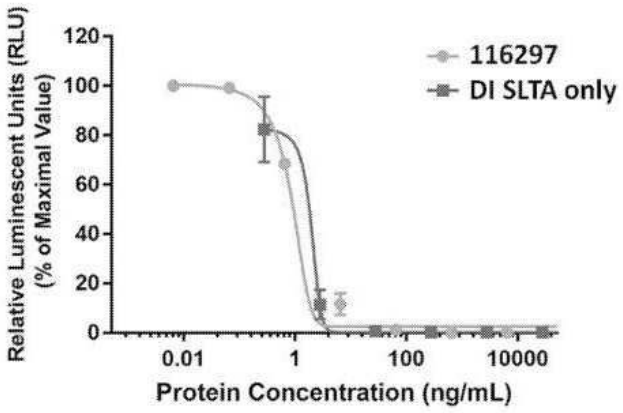
도면31



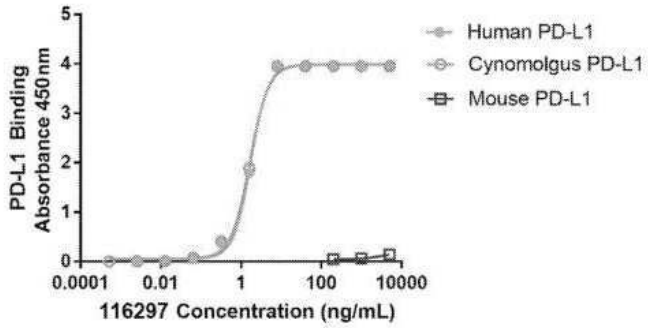
도면32



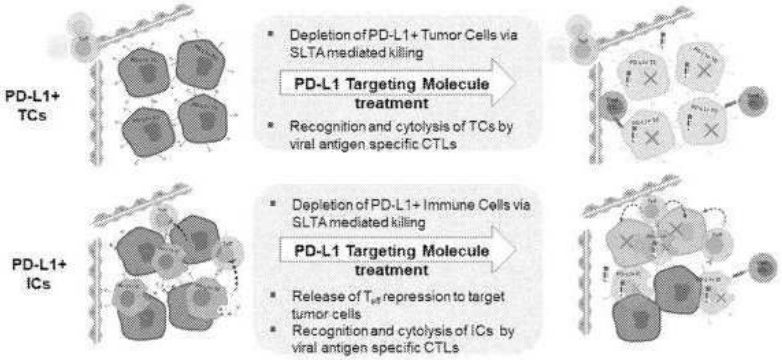
도면33



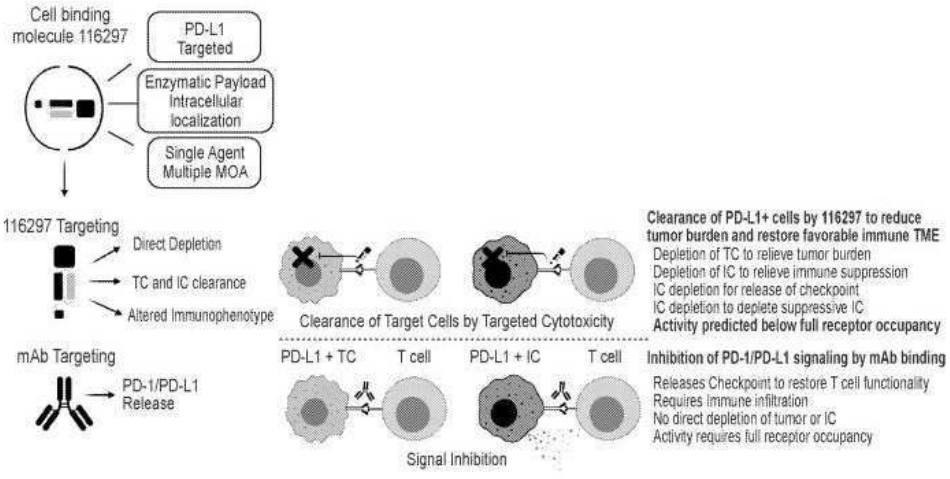
도면34



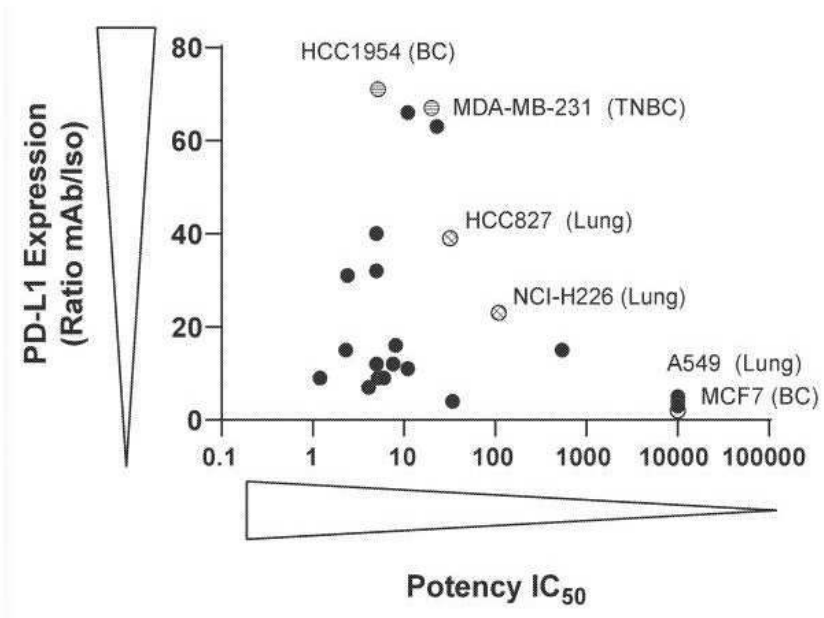
도면35



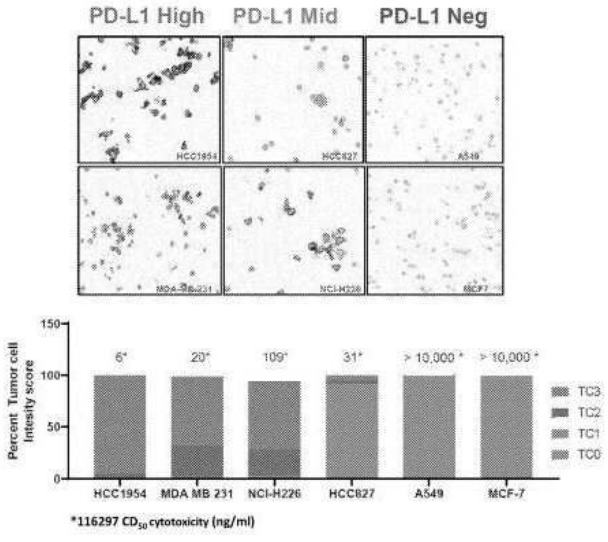
도면36



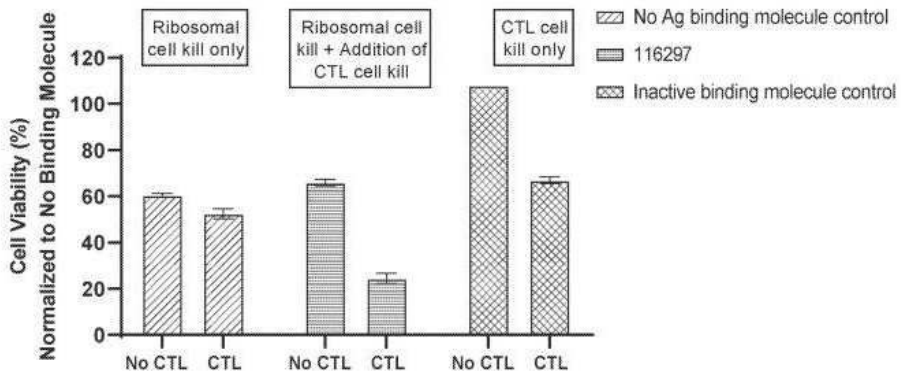
도면37a


PD-L1 Expression
(Ratio mAb/Iso)
80
60
40
20
0
HCC1954 (BC)
MDA-MB-231 (TNBC)
HCC827 (Lung)
NCI-H226 (Lung)
A549 (Lung)
MCF7 (BC)
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
Potency IC50

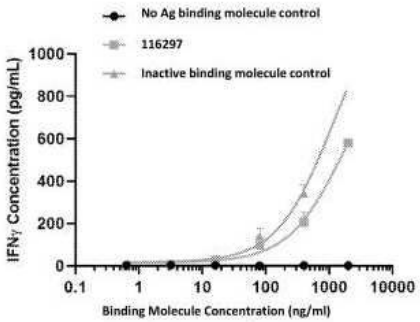
도면37b


PD-L1 High
PD-L1 Mid
PD-L1 Neg
Percent Tumor cell
Intesity score
150
100
50
0
6*
20*
109*
31*
> 10,000 *
> 10,000 *
TC3
TC2
TC1
TC0
HCC1954
MDA MB 231
NCI-H226
HCC827
A549
MCF-7
*116297 CD50 cytotoxicity (ng/ml)

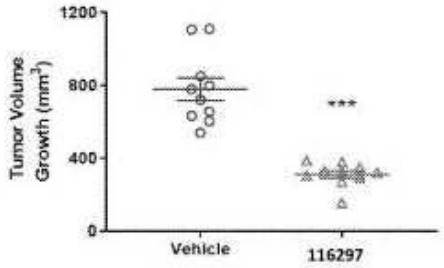
도면37c



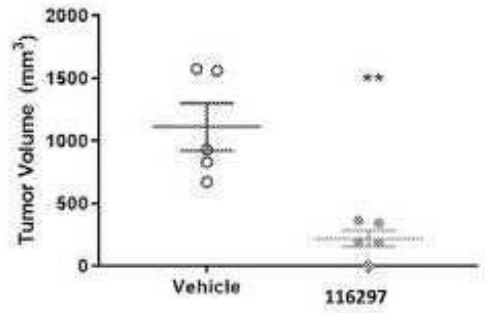
도면37d



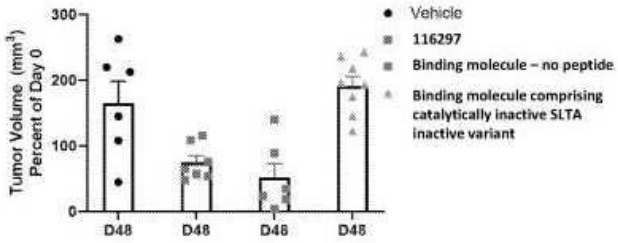
도면38a



도면38b



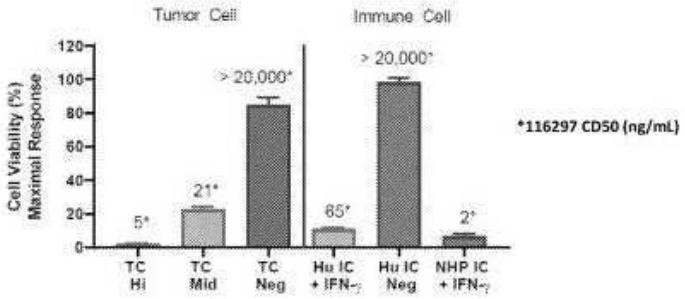
도면38c



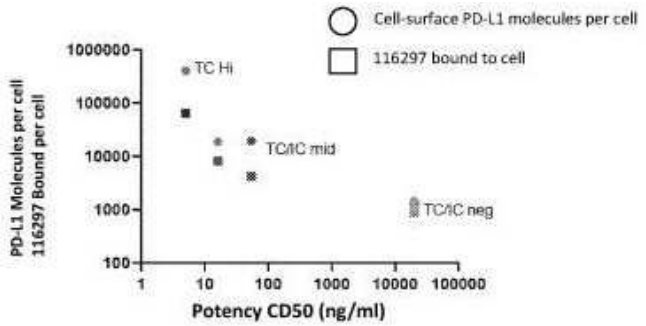
도면38d

Response	MDA-MB-231	PDX2	PDX2B
Dose	6 mg/kg (dose 1) 2m/kg (3 x week)	6 mg/kg (dose 1) 2m/kg (3 x week)	2 mg/kg (3 x week)
T/C response	60%	21%	43%
Mean to endpoint	Vehicle: 49	Vehicle: 52	Vehicle: 59
	116279: > 50	116279: >60	116279: >65

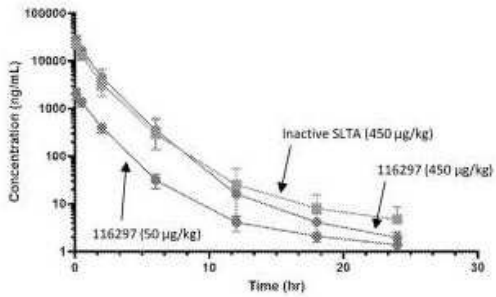
도면39a



도면39b

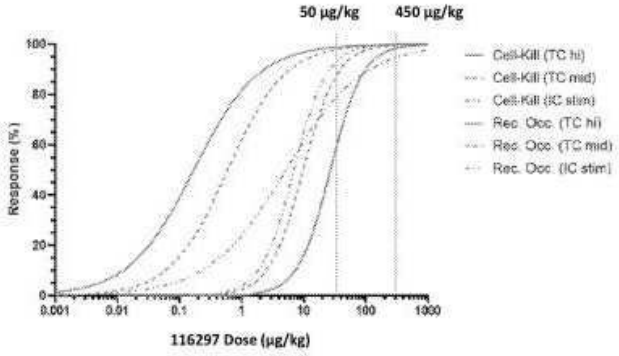


도면40a

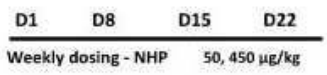


Group	C_{MAX} (ng/mL)	$T_{½}$ (hr)
116297 50 µg/kg	2096	2.8
116297 450 µg/kg	27063	3.7
Inactive SLTA 450 µg/kg	22375	5.6

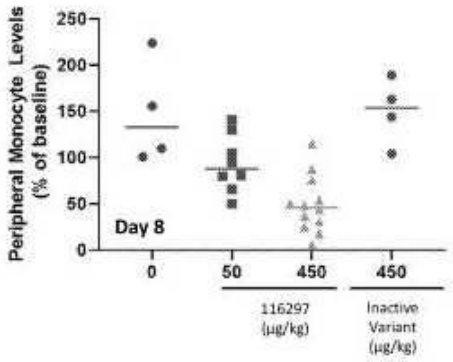
도면40b



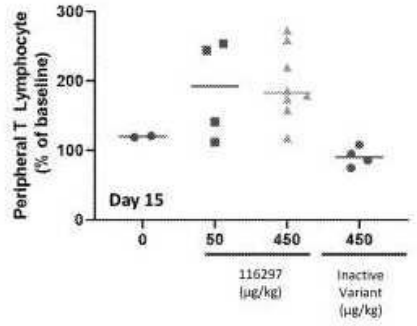
도면41a



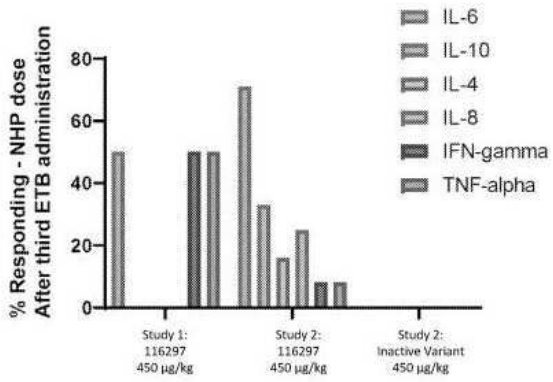
도면41b



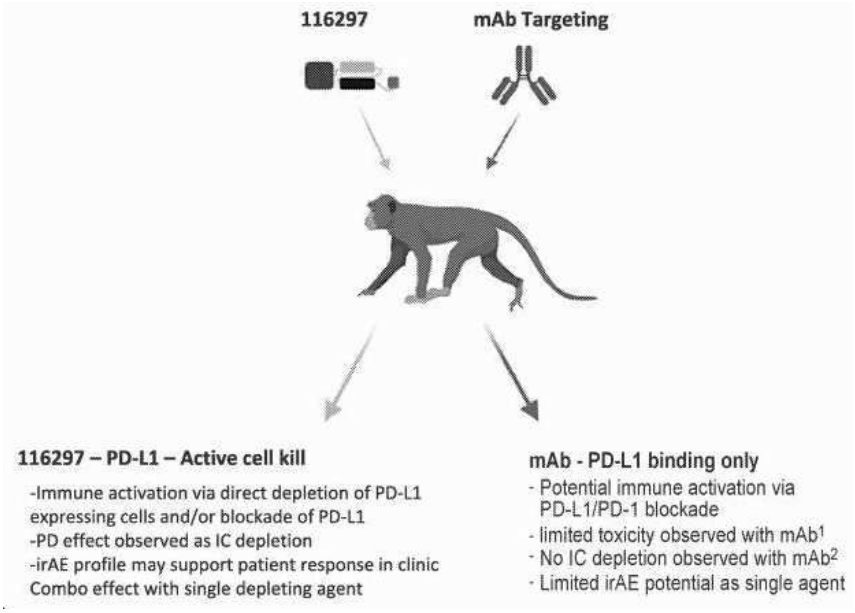
도면41c



도면41d



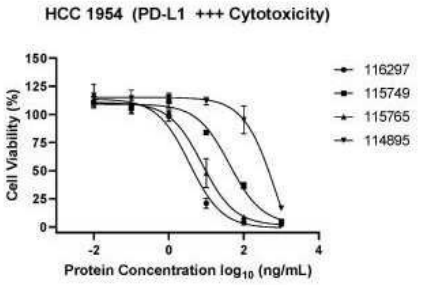
도면42a



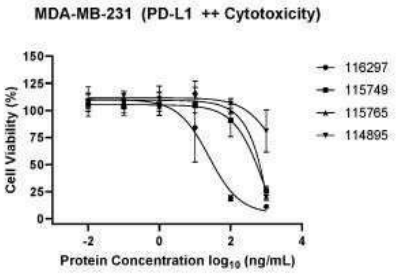
도면42b

Group	Dosing	Immune Effects	Pharmacodynamic Response
116297	50 µg/kg	↑Monocyte depletion ↑T cell, B cell, Eosinophil expansion increased with sequential dosing	Minimal Troponin-I release; no significant cardiac findings; evidence of skin inflammation
116297	450 µg/kg	↑↑Monocyte depletion ↑↑↑T cell, B cell, NK, Eosinophil expansion; increased with sequential dosing Cytokine induction IL-2, IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-10	Troponin-I release associated with CD3+ T cardiac infiltration minimal monocyte and B cell infiltration; resolving with dose cessation evidence of skin inflammation
SLTA-inactive	450 µg/kg	No remarkable findings	No Remarkable findings

도면43a



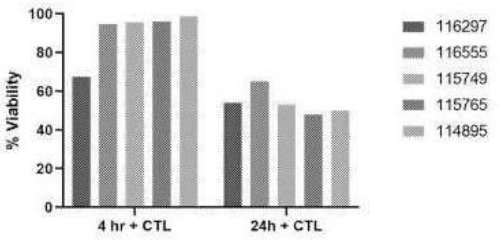
도면43b



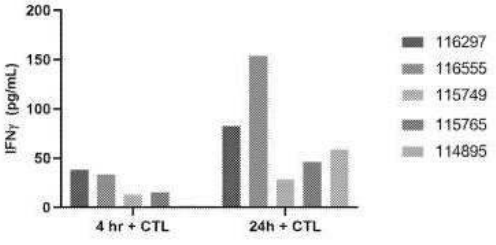
도면44

Treatment Group	Dosing	Immune Effects	Pharmacodynamic Response
116297	50 µg/kg 1 dose per week/4 weeks	↑Monocyte depletion ↑T cell, B cell, Eosinophil expansion increased with sequential dosing	no significant cardiac findings ✓ Evidence of skin inflammation
116297	450 µg/kg 1 dose per week/4 weeks	↑↑Monocyte depletion ↑↑↑T cell. B cell, NK, Eosinophil expansion; increased with sequential dosing Cytokine induction: IL-2, IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-10	✓ CD3+ T cardiac infiltration, minimal monocyte and B cell infiltration; resolving with dose cessation ✓ Evidence of skin inflammation
116555	450 µg/kg 1 dose per week/4 weeks	No remarkable findings	No Remarkable irAE findings
115749	450 µg/kg 3 doses per week/2 weeks	No remarkable findings	✓ Skin inflammation at >150 µg/kg
115765	450 µg/kg 3 doses per week/2 weeks	No remarkable findings	No Remarkable irAE findings
115695	450 µg/kg 3 doses per week/2 weeks	No remarkable findings	No Remarkable irAE findings

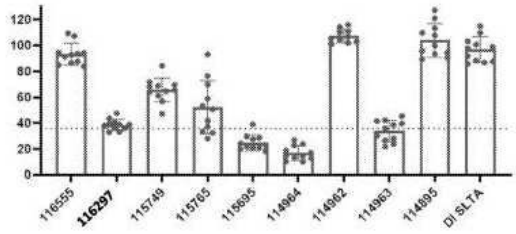
도면45a



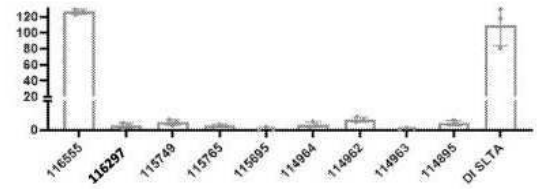
도면45b



도면46a



도면46b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Molecular Templates, Inc.

<120> PD-L1 BINDING MOLECULES COMPRISING SHIGA TOXIN A SUBUNIT SCAFFOLDS

<130> MTEM-016/04WO 333064-2107

<150> US 63/041,288

<151> 2020-06-19

<150> US 62/970,610

<151> 2020-02-05

<150> US 62/933,197

<151> 2019-11-08

<150> US 62/902,243

<151> 2019-09-18

<160> 266

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 293

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Shiga-like toxin 1 Subunit A (SLT-1A)

<400> 1

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

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

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg Met Ala Ser Asp Glu

245 250 255

Phe Pro Ser Met Cys Pro Ala Asp Gly Arg Val Arg Gly Ile Thr His

260 265 270

Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu Gly Ala Ile Leu Met Arg

275 280 285

Arg Thr Ile Ser Ser

290

<210> 2

<211> 293

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Shiga toxin Subunit A (StxA)

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

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

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

Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu Gly Ala Ile Leu Met Arg
275 280 285
Arg Thr Ile Ser Ser
290

<210> 3
<211> 297
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Shiga-like toxin 2 Subunit A (SLT-2A)
<400> 3
Asp Glu Phe Thr Val Asp Phe Ser Ser Gln Lys Ser Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Ser Ile Arg Ser Ala Ile Ser Thr Pro Leu Gly Asn Ile Ser

20 25 30

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

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

Phe Val Thr Val Ile Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175
Gly Phe Arg Pro Ala Leu Ser Glu Ala Ser Pro Leu Tyr Thr Met Thr
180 185 190
Ala Gln Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val
195 200 205
Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Glu Gly Val Arg Ile Gly Arg Ile Ser
210 215 220

Phe Asn Ser Leu Ser Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Val Ile Leu Asn
225 230 235 240
Cys His Ser Thr Gly Ser Tyr Ser Val Arg Ser Val Ser Gln Lys Gln
245 250 255
Lys Thr Glu Cys Gln Ile Val Gly Asp Arg Ala Ala Ile Lys Val Asn
260 265 270

Asn Val Leu Trp Glu Ala Asn Thr Ile Ala Ala Leu Leu Asn Arg Lys
275 280 285

Pro Gln Asp Leu Thr Glu Pro Asn Gln
290 295

<210> 4

<211> 251

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Shiga toxin subtype c Subunit A (Stx1cA)

<400> 4

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Val Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 5

<211> 251

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Shiga toxin subtype d Subunit A (Stx1dA)

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Ile Met Gly Leu Glu Pro Glu Glu Glu Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205
Ile Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 6
<211> 251
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> Shiga toxin subtype e Subunit A (Stx1eA)
<400> 6
Gln Asp Phe Thr Val Asp Phe Ser Thr Ala Lys Lys Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Ala Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu His Ser Ile Ser

20 25 30
Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Asn Gly Thr Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Ile Arg Gly Leu Asp Pro Glu Glu Glu Arg Phe

50 55 60

Asp Asn Leu Arg Leu Ile Ile Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Ser Asn Ile Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Gly Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

Tyr Ser Gly Ser Ser Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Val Ser Gly His Ser Tyr Thr Met

180 185 190

Thr Val Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Gly Val Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Thr Ser Arg Val Ser Arg

245 250

<210> 7

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin subtype 2c Subunit A (Stx2cA) variant 1

<400> 7

Arg Glu Phe Thr Ile Asp Phe Ser Thr Gln Gln Ser Tyr Val Ser Ser
1 5 10 15

Leu Asn Ser Ile Arg Thr Glu Ile Ser Thr Pro Leu Glu His Ile Ser
20 25 30

Gln Gly Thr Thr Ser Val Ser Val Ile Asn His Thr Pro Pro Gly Ser
35 40 45

Tyr Phe Ala Val Asp Ile Arg Gly Leu Asp Val Tyr Gln Ala Arg Phe
50 55 60

Asp His Leu Arg Leu Ile Ile Glu Gln Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Thr Ala Thr Asn Thr Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Thr
85 90 95

His Ile Ser Val Pro Gly Val Thr Thr Val Ser Met Thr Thr Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Ala Leu Glu Arg Ser Gly Met
115 120 125

Gln Ile Ser Arg His Ser Leu Val Ser Ser Tyr Leu Ala Leu Met Glu
130 135 140

Phe Ser Gly Asn Thr Met Thr Arg Asp Ala Ser Arg Ala Val Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Glu Phe Arg Gln Ala Leu Ser Glu Thr Ala Pro Val Tyr Thr Met Thr
180 185 190

Pro Gly Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val
195 200 205

Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Asp Gly Val Arg Val Gly Arg Ile Ser
210 215 220

Phe Asn Asn Ile Ser Ala Ile Leu Gly Thr Val Ala Val Ile Leu Asn

225 230 235 240

Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val Arg

245 250

<210> 8

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin subtype 2c Subunit A (Stx2cA) variant 2

<400> 8

Arg Glu Phe Thr Ile Asp Phe Ser Thr Gln Gln Ser Tyr Val Ser Ser

1 5 10 15

Leu Asn Ser Ile Arg Thr Glu Ile Ser Thr Pro Leu Glu His Ile Ser

20 25 30

Gln Gly Thr Thr Ser Val Ser Val Ile Asn His Thr Pro Pro Gly Ser

35 40 45

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

50 55 60

Asp His Leu Arg Leu Ile Ile Glu Gln Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Thr Ala Thr Asn Thr Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ala

85 90 95

His Ile Ser Val Pro Gly Val Thr Thr Val Ser Met Thr Thr Asp Ser

100 105 110

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

115 120 125

Gln Ile Ser Arg His Ser Leu Val Ser Ser Tyr Leu Ala Leu Met Glu

130 135 140

Phe Ser Gly Asn Thr Met Thr Arg Asp Ala Ser Arg Ala Val Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Glu Phe Arg Gln Ala Leu Ser Glu Thr Ala Pro Val Tyr Thr Met Thr
180 185 190
Pro Gly Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val

195 200 205
Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Asp Gly Val Arg Val Gly Arg Ile Ser
210 215 220
Phe Asn Asn Ile Ser Ala Ile Leu Gly Thr Val Ala Val Ile Leu Asn
225 230 235 240
Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val Arg
245 250

<210> 9
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Shiga toxin subtype 2c Subunit A (Stx2cA) variant 3

<400> 9
Arg Glu Phe Thr Ile Asp Phe Ser Thr Gln Gln Ser Tyr Val Ser Ser
1 5 10 15
Leu Asn Ser Ile Arg Thr Glu Ile Ser Thr Pro Leu Glu His Ile Ser
20 25 30
Gln Gly Thr Thr Ser Val Ser Val Ile Asn His Thr Pro Pro Gly Ser
35 40 45
Tyr Phe Ala Val Asp Ile Arg Gly Leu Asp Ile Tyr Gln Ala Arg Phe
50 55 60

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

115 120 125

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

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

<210> 10
<211> 250
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Shiga toxin subtype 2c Subunit A (Stx2cA) variant 4
<400> 10
Arg Glu Phe Thr Ile Asp Phe Ser Thr Gln Gln Ser Tyr Val Ser Ser
1 5 10 15
Leu Asn Ser Ile Arg Thr Glu Ile Ser Thr Pro Leu Glu His Ile Ser
20 25 30
Gln Gly Thr Thr Ser Val Ser Val Ile Asn His Thr Pro Pro Gly Ser
35 40 45
Tyr Phe Ala Val Asp Ile Arg Gly Leu Asp Val Tyr Gln Ala Arg Phe

50 55 60

Asp His Leu Arg Leu Ile Ile Glu Gln Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Thr Ala Thr Asn Thr Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Thr

85 90 95

His Ile Ser Val Pro Ser Val Thr Thr Val Ser Met Thr Thr Asp Ser

100 105 110

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

115 120 125

Gln Ile Ser Arg His Ser Leu Val Ser Ser Tyr Leu Ala Leu Met Glu

130 135 140

Phe Ser Gly Asn Thr Met Thr Arg Asp Ala Ser Arg Ala Val Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Glu Phe Arg Gln Ala Leu Ser Glu Thr Ala Pro Val Tyr Thr Met Thr

180 185 190

Pro Gly Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val

195 200 205

Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Asp Gly Val Arg Val Gly Arg Ile Ser

210 215 220

Phe Asn Asn Ile Ser Ala Ile Leu Gly Thr Val Ala Val Ile Leu Asn

225 230 235 240

Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val Arg

245 250

<210> 11

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin subtype 2c Subunit A (Stx2cA) variant 5

<400> 11

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

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

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

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

Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val Arg

245 250

<210> 12

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin subtype 2c Subunit A (Stx2cA) variant 6

<400> 12

Arg Glu Phe Thr Ile Asp Phe Ser Thr Gln Gln Ser Tyr Val Ser Ser
1 5 10 15

Leu Asn Ser Ile Arg Thr Glu Ile Ser Thr Pro Leu Glu His Ile Ser
20 25 30

Gln Gly Thr Thr Ser Val Ser Val Ile Asn His Thr Pro Pro Gly Ser

35 40 45

Tyr Phe Ala Val Asp Ile Arg Gly Leu Asp Val Tyr Gln Ala Arg Phe
50 55 60

Asp His Leu Arg Leu Ile Ile Glu Gln Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Thr Ala Thr Asn Thr Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Thr
85 90 95

His Ile Ser Val Pro Gly Val Thr Thr Val Ser Met Thr Thr Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Ala Leu Glu Arg Ser Gly Met
115 120 125

Gln Ile Ser Arg His Ser Leu Val Ser Ser Tyr Leu Ala Leu Met Glu
130 135 140

Phe Ser Gly Asn Thr Met Thr Arg Asp Ala Ser Arg Ala Val Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Glu Phe Arg Gln Val Leu Ser Glu Thr Ala Pro Val Tyr Thr Met Thr
180 185 190

Pro Gly Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val
195 200 205

Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Asp Gly Val Arg Val Gly Arg Ile Ser
210 215 220

Phe Asn Asn Ile Ser Ala Ile Leu Ser Thr Val Ala Val Ile Leu Asn

225 230 235 240

Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val Arg
245 250

<210> 13

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin subtype 2d Subunit A (Stx2dA) variant 1

<400> 13

Arg Glu Phe Thr Ile Asp Phe Ser Thr Gln Gln Ser Tyr Val Ser Ser
1 5 10 15

Leu Asn Ser Ile Arg Thr Glu Ile Ser Thr Pro Leu Glu His Ile Ser
20 25 30

Gln Gly Thr Thr Ser Val Ser Val Ile Asn His Thr Pro Pro Gly Ser
35 40 45

Tyr Phe Ala Val Asp Ile Arg Gly Leu Asp Val Tyr Gln Ala Arg Phe
50 55 60

Asp His Leu Arg Leu Ile Ile Glu Gln Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Thr Ala Thr Asn Thr Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ala
85 90 95

His Ile Ser Val Pro Gly Val Thr Thr Val Ser Met Thr Thr Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Ala Leu Glu Arg Ser Gly Met
115 120 125

Gln Ile Ser Arg His Ser Leu Val Ser Ser Tyr Leu Ala Leu Met Glu

130 135 140

Phe Ser Gly Asn Thr Met Thr Arg Asp Ala Ser Arg Ala Val Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Glu Phe Arg Gln Ala Leu Ser Glu Thr Ala Pro Val Tyr Thr Met Thr
180 185 190

Pro Gly Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val
195 200 205

Ile Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Asp Gly Val Arg Val Gly Arg Ile Ser
210 215 220

Phe Asn Asn Ile Ser Ala Ile Leu Gly Thr Val Ala Val Ile Leu Asn
225 230 235 240

Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val Arg
245 250

<210> 14

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin subtype 2d Subunit A (Stx2dA) variant 2

<400> 14

Arg Glu Phe Met Ile Asp Phe Ser Thr Gln Gln Ser Tyr Val Ser Ser
1 5 10 15

Leu Asn Ser Ile Arg Thr Glu Ile Ser Thr Pro Leu Glu His Ile Ser

20 25 30

Gln Gly Thr Thr Ser Val Ser Val Ile Asn His Thr Pro Pro Gly Ser
35 40 45

Tyr Phe Ala Val Asp Ile Arg Gly Leu Asp Val Tyr Gln Ala Arg Phe
50 55 60

Asp His Leu Arg Leu Ile Ile Glu Gln Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Thr Ala Thr Asn Thr Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Thr

85 90 95

His Ile Ser Val Pro Gly Val Thr Thr Val Ser Met Thr Thr Asp Ser

100 105 110

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

115 120 125

Gln Ile Ser Arg His Ser Leu Val Ser Ser Tyr Leu Ala Leu Met Glu

130 135 140

Phe Ser Gly Asn Thr Met Thr Arg Asp Ala Ser Arg Ala Val Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Glu Phe Arg Gln Ala Leu Ser Glu Thr Ala Pro Val Tyr Thr Met Thr

180 185 190

Pro Glu Glu Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val

195 200 205

Leu Pro Glu Phe Arg Gly Glu Gly Gly Val Arg Val Gly Arg Ile Ser

210 215 220

Phe Asn Asn Ile Ser Ala Ile Leu Gly Thr Val Ala Val Ile Leu Asn

225 230 235 240

Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val Arg

245 250

<210> 15

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin subtype 2d Subunit A (Stx2dA) variant 3

<400> 15

Arg Glu Phe Thr Ile Asp Phe Ser Thr Gln Gln Ser Tyr Val Ser Ser

1 5 10 15

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

Phe Val Asn Thr Ala Thr Asn Thr Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Thr
85 90 95
His Ile Ser Val Pro Gly Val Thr Thr Val Ser Met Thr Thr Asp Ser
100 105 110
Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Ala Leu Glu Arg Ser Gly Met
115 120 125
Gln Ile Ser Arg His Ser Leu Val Ser Ser Tyr Leu Ala Leu Met Glu
130 135 140

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

Ile Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Asp Gly Val Arg Val Gly Arg Ile Ser
210 215 220
Phe Asn Asn Ile Ser Ala Ile Leu Ser Thr Val Ala Val Ile Leu Asn
225 230 235 240
Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val Arg
245 250

<210> 16

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin subtype 2e Subunit A (Stx2eA) variant 1

<400> 16

Gln Glu Phe Thr Ile Asp Phe Ser Thr Gln Gln Ser Tyr Val Ser Ser

1 5 10 15

Leu Asn Ser Ile Arg Thr Ala Ile Ser Thr Pro Leu Glu His Ile Ser

20 25 30

Gln Gly Ala Thr Ser Val Ser Val Ile Asn His Thr Pro Pro Gly Ser

35 40 45

Tyr Ile Ser Val Gly Ile Arg Gly Leu Asp Val Tyr Gln Glu Arg Phe

50 55 60

Asp His Leu Arg Leu Ile Ile Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Thr Thr Thr Asn Thr Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ala

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gln Ile Ser Arg His Ser Leu Val Ser Ser Tyr Leu Ala Leu Met Glu

130 135 140

Phe Ser Gly Asn Thr Met Thr Arg Asp Ala Ser Arg Ala Val Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Glu Phe Arg Leu Ala Leu Ser Glu Thr Ala Pro Val Tyr Thr Met Thr

180 185 190

Pro Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val

195 200 205

Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Ala Gly Val Arg Val Gly Arg Ile Ser
210 215 220
Phe Asn Asn Ile Ser Ala Ile Leu Gly Thr Val Ala Val Ile Leu Asn
225 230 235 240
Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val Arg
245 250

<210> 17
<211> 250
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Shiga toxin subtype 2e Subunit A (Stx2eA) variant 2

<400> 17
Gln Glu Phe Thr Ile Asp Phe Ser Thr Gln Gln Ser Tyr Val Ser Ser
1 5 10 15
Leu Asn Ser Ile Arg Thr Ala Ile Ser Thr Pro Leu Glu His Ile Ser
20 25 30
Gln Gly Ala Thr Ser Val Ser Val Ile Asn His Thr Pro Pro Gly Ser
35 40 45
Tyr Ile Ser Val Gly Ile Arg Gly Leu Asp Val Tyr Gln Ala His Phe
50 55 60

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

Gln Ile Ser Arg His Ser Leu Val Ser Ser Tyr Leu Ala Leu Met Glu
130 135 140
Phe Ser Gly Asn Thr Met Thr Arg Glu Ala Ser Arg Ala Val Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Glu Phe Arg Gln Ala Leu Ser Glu Thr Ala Pro Val Tyr Thr Met Thr

180 185 190

Pro Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val

195 200 205

Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Asp Gly Val Arg Val Gly Arg Ile Ser

210 215 220

Phe Asn Asn Ile Ser Ala Ile Leu Gly Thr Val Ala Val Ile Leu Asn

225 230 235 240

Cys His His Gln Gly Ala Arg Ser Val Arg

245 250

<210> 18

<211> 250

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin subtype 2f Subunit A (Stx2fA)

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Gly Gly Val Ser Val Ser Val Ile Asn His Val Pro Gly Gly Asn

35 40 45

Tyr Ile Ser Leu Asn Val Arg Gly Leu Asp Pro Tyr Ser Glu Arg Phe

50 55 60

Asn His Leu Arg Leu Ile Met Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly

65 70 75 80

Phe Ile Asn Thr Glu Thr Asn Thr Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ser

85 90 95

His Ile Ser Val Pro Asp Val Ile Thr Val Ser Met Thr Thr Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Ser Ser Leu Gln Arg Ile Ala Asp Leu Glu Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Gly Arg His Ser Leu Val Gly Ser Tyr Leu Asp Leu Met Glu
130 135 140

Phe Arg Gly Arg Ser Met Thr Arg Ala Ser Ser Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Ile Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Pro Ala Leu Ser Glu Ala Ser Pro Leu Tyr Thr Met Thr

180 185 190

Ala Gln Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val
195 200 205

Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Glu Gly Val Arg Ile Gly Arg Ile Ser
210 215 220

Phe Asn Ser Leu Ser Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Val Ile Leu Asn
225 230 235 240

Cys His Ser Thr Gly Ser Tyr Ser Val Arg
245 250

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> Unknown
<220>
<223> light chain HVR CDR1
<400> 19
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10
<210> 20
<211> 7
<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> light chain HVR CDR2

<400> 20

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> light chain HVR CDR3

<400> 21

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> heavy chain HVR CDR1

<400> 22

Glu Asn Ser Met His

1 5

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> heavy chain HVR CDR2

<400> 23

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

1 5 10 15

Gly

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> heavy chain HVR CDR3

<400> 24

Pro Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> light chain HVR CDR1

<400> 25

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr

1 5 10

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> light chain HVR CDR3

<400> 26

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr

1 5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> heavy chain HVR CDR1

<400> 27

Glu Tyr Thr Met His

1 5

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> heavy chain HVR CDR2

<400> 28

Gly Ile Asp Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> heavy chain HVR CDR2

<400> 29

Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> heavy chain HVR CDR2

<400> 30

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

1 5 10 15

Gly

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> heavy chain HVR CDR2

<400> 31

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

1 5 10 15

Gly

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> heavy chain HVR CDR3

<400> 32

Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 33

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> light chain 1

<400> 33

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 34

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> heavy chain 1

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 35

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> light chain 2

<400> 35

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 36

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> light chain 3

<400> 36

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 37

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> heavy chain 2

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 38

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> light chain 4

<400> 38

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 39

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> heavy chain 3

<400> 39

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

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

100 105 110
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Shiga toxin effector polypeptide 1
<400> 40
Ala Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

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

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala
245 250

<210> 41

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 2

<400> 41

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala

245 250

<210> 42

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 3

<400> 42

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Ala Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala
245 250

<210> 43

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 4

<400> 43

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

1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Ala Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Ala Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Ala Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala

245 250

<210> 44

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 5

<400> 44

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95
His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110
Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

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

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

<210> 45
<211> 251

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Shiga toxin effector polypeptide 6
<400> 45
Ala Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Asp Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala

245 250

<210> 46

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 7

<400> 46

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Asp Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala

245 250

<210> 47

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 8

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Ala Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Asp Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala

245 250

<210> 48

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 9

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Ala Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

Phe Val Thr Val Thr Ala Asp Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala
245 250

<210> 49
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Shiga toxin effector polypeptide 10
<400> 49
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30
Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Asp Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala

245 250

<210> 50

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 11

<400> 50

Lys Glu Phe Ile Leu Arg Phe Ser Val Ala His Lys Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala

245 250

<210> 51

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 12

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala
245 250

<210> 52
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Shiga toxin effector polypeptide 13

<400> 52
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30
Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Asn Leu Val Pro Met
35 40 45
Val Ala Thr Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

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

115 120 125

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

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

<210> 53
<211> 251

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Shiga toxin effector polypeptide 14
<400> 53
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30
Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Leu Gly Phe
35 40 45
Val Phe Thr Leu Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala

245 250

<210> 54

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 15

<400> 54

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

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

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

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

Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala

245 250

<210> 55

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 16

<400> 55

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240
Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala
245 250

<210> 56
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Shiga toxin effector polypeptide 17
<400> 56
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

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

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110
Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125
Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala
245 250

<210> 57

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 18

<400> 57

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala

245 250

<210> 58

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 19

<400> 58

Lys Glu Phe Ile Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15

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

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

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

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala
245 250

<210> 59

<211> 252

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 20

<400> 59

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr

65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly

115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met

130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu

145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

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

180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser

195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg
210 215 220
Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile
225 230 235 240
Leu Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala
245 250

<210> 60

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223

> Shiga toxin effector polypeptide 21

<400> 60

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

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

115 120 125
Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140
His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala

245 250

<210> 61

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 22

<400> 61

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
100 105 110

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

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

Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala
245 250

<210> 62
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Shiga toxin effector polypeptide 23
<400> 62
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Gly Ile Leu Gly Asp Val Phe Thr Leu Ser Tyr Val Met

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala

245 250

<210> 63

<211> 260

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 24

<400> 63

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Cys His His His Ile Leu Arg Phe Ser Val Ala His Lys Ala Ser
245 250 255
Ala Val Ala Ala
260

<210> 64
<211> 262
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Shiga toxin effector polypeptide 25
<400> 64

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

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

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95
His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110
Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125
Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

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

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Cys His His His Ala Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
245 250 255
Ala Ser Ala Val Ala Ala
260

<210> 65
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Shiga toxin effector polypeptide 26
<400> 65
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30
Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45
Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala

245 250

<210> 66

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 27

<400> 66

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

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

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

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

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala
```

245 250

<210> 67

<211> 260

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 28

<400> 67

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240
Asn Cys His His His Ile Leu Arg Phe Ser Val Ala His Lys Ala Ser
245 250 255
Ala Val Ala Ala
260

<210> 68
<211> 262
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Shiga toxin effector polypeptide 29
<400> 68
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

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

85 90 95
His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110
Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

245 250 255

Ala Ser Ala Val Ala Ala

260

<210> 69

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker 1

<400> 69

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 70

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker 2

<400> 70

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 71

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker 3

<400> 71

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker 4

<400> 72

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 73

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker 5

<400> 73

Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro
1 5 10 15

<210> 74

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker 6

<400> 74

Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro
1 5 10 15
Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
20 25

<210> 75

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker 7

<400> 75

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
1 5 10 15

<210> 76

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker 8

<400> 76

Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser
1 5 10 15

<210> 77

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker 9

<400> 77

Ala His His Ser Glu Asp Pro Ser Ser Lys Ala Pro Lys Ala Pro

1 5 10 15

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> T-cell epitope-peptide C1

<400> 78

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

1 5

<210> 79

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> T-cell epitope-peptide C2

<400> 79

Val Thr Glu His Asp Thr Leu Leu Tyr

1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> T-cell epitope-peptide C4

<400> 80

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Tyr Leu

1 5

<210>

81

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> T-cell epitope-peptide C1-2

<400> 81

Gly Leu Asp Arg Asn Ser Gly Asn Tyr

1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> T-cell epitope-peptide C1-3

<400> 82

Gly Val Met Thr Arg Gly Arg Leu Lys

1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> T-cell epitope-peptide F2

<400> 83

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> T-cell epitope-peptide F3

<400> 84

Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys

1 5

<210> 85

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> single-chain variable fragment I

<400> 85

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu

100 105 110

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

115 120 125

Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Asn Ser

130 135 140

Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly

145 150 155 160

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

210 215 220
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
225 230
<210> 86
<211> 233
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> single-chain variable fragment II
<400> 86
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu
100 105 110
Val His Leu Val Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser

115 120 125

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

130 135 140

Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly

145 150 155 160

Gly Ile Asp Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Arg Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

210 215 220

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

225 230

<210> 87

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> single-chain variable fragment III

<400> 87

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu

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

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

<210> 88
<211> 233
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> single-chain variable fragment IV
<400> 88
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

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

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

<210> 89
<211> 253
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> single-chain variable fragment V

<400> 89

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

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

Ser Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
145 150 155 160

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
165 170 175

Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro
180 185 190

Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
195 200 205

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met
210 215 220

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr
225 230 235 240

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

245 250

<210> 90

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> single-chain variable fragment VI

<400> 90

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asp Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

225 230 235 240
Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245 250

<210> 91
<211> 253
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> single-chain variable fragment VII
<400> 91
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

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

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

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro

180 185 190

Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe

195 200 205

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met

210 215 220

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn

225 230 235 240

Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

245 250

<210> 92

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> single-chain variable fragment VIII

<400> 92

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

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

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

210 215 220
Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn
225 230 235 240
Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245 250

<210> 93
<211> 233
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> single-chain variable fragment IX
<400> 93
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

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

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

Arg Pro Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
210 215 220
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
225 230

<210> 94

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> single-chain variable fragment X

<400> 94

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

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

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

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gln
100 105 110

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser
115 120 125

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

Met His Trp Val Arg Gln Ala His Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly
145 150 155 160

Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
165 170 175

Gly Lys Ala Ala Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met
180 185 190

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
195 200 205

Arg Pro Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

210 215 220

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

225 230

<210> 95

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> single-chain variable fragment XI

<400> 95

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Met His Trp Val Arg Gln Ala His Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly

145 150 155 160

Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
165 170 175
Gly Lys Ala Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met
180 185 190
Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
195 200 205
Arg Pro Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
225 230

<210> 96
<211> 233
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> single-chain variable fragment XII
<400> 96

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

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

100 105 110
Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met

180 185 190

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

195 200 205

Arg Pro Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

210 215 220

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

225 230

<210> 97

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> single-chain variable fragment XIII

<400> 97

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Lys Val Thr Met Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
145 150 155 160
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val
165 170 175

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

Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
245 250

<210> 98
<211> 253
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> single-chain variable fragment XIV
<400> 98
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro

180 185 190

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

195 200 205

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250

<210> 99

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> single-chain variable fragment XV

<400> 99

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

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

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

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
145 150 155 160

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val
165 170 175

Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro
180 185 190

Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
195 200 205

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu

210 215 220

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr
225 230 235 240
Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
245 250

<210> 100
<211> 253
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> single-chain variable fragment XVI
<400> 100
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Asn

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

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro

180 185 190

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

195 200 205

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250

<210> 101

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> single-chain variable fragment XVII

<400> 101

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Ser Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met
210 215 220
Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn
225 230 235 240
Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
245 250

<210> 102
<211> 253
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> single-chain variable fragment XVIII
<400> 102
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro

180 185 190

Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe

195 200 205

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met

210 215 220

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn

225 230 235 240

Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

245 250

<210> 103

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

>

<223> single-chain variable fragment XIX

<400> 103

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

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

Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
145 150 155 160

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
165 170 175

Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro

180 185 190

Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
195 200 205

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met
210 215 220

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn

225 230 235 240

Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

245 250

<210> 104

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> single-chain variable fragment XX

<400> 104

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro

180 185 190

Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe

195 200 205

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met

210 215 220

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn

225 230 235 240

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

245 250

<210> 105

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> single-chain variable fragment XXI

<400> 105

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
115 120 125
Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
130 135 140
Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
145 150 155 160

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu
165 170 175
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
180 185 190
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
195 200 205
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe
210 215 220

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
225 230

<210> 106
<211> 233
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> single-chain variable fragment XXII
<400> 106

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

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp

115 120 125

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

130 135 140

Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp

195 200 205

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe

210 215 220

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

225 230

<210> 107

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> single-chain variable fragment XXIII

<400> 107

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

<210> 108
<211> 510
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> PD-L1 binding protein 115744

<400> 108

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15

Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Cys Gly Asp
35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg
50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr
65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe
85 90 95

Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp
100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly
115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met
130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu
145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln
165 170 175

Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val
180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser
195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg
210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

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

Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn
305 310 315 320
Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
325 330 335
Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr
340 345 350
Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly
355 360 365

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val His Leu Val
370 375 380
Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser
385 390 395 400
Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val
405 410 415
Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asp Pro
420 425 430

Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr
435 440 445
Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser
450 455 460
Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Tyr Tyr
465 470 475 480

Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
485 490 495

Leu Thr Val Ser Ser Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
500 505 510

<210> 109

<211> 510

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein 115745

<400> 109

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15

Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Cys Gly Asp
35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg
50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr
65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe
85 90 95

Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp
100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly
115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met
130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu
145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

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

180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser

195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr

340 345 350

Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly

355 360 365

Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln

370 375 380

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

385 390 395 400

Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val

405 410 415

Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

485 490 495

Leu Thr Val Ser Ser Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

500 505 510

<210> 110

<211> 510

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein 115746

<400> 110

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Cys Gly Asp

35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg

50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr

65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe

85 90 95

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

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln
165 170 175
Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val
180 185 190
Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser
195 200 205
Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg
210 215 220

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

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

Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr
340 345 350

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

Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro
420 425 430
Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Arg Lys Phe Lys Gly Lys Ala Ala
435 440 445
Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser
450 455 460
Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Tyr Tyr
465 470 475 480

Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
485 490 495
Leu Thr Val Ser Ser Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
500 505 510

<210> 111
<211> 534
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PD-L1 binding protein 115747
<400> 111

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp

35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg

50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr

65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly

115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met

130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu

145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

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

180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser

195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Asn Ser Met His Trp

290 295 300

Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

370 375 380

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp

405 410 415

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

420 425 430

Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp

485 490 495

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe

500 505 510

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His Ala Ala Asn Leu Val
515 520 525
Pro Met Val Ala Thr Val
530

<210> 112
<211> 534
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PD-L1 binding protein 115748
<400> 112
Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15
Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
20 25 30
Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp
35 40 45

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

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly
115 120 125
Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met
130 135 140
Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu
145 150 155 160
Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

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

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

Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asp
305 310 315 320
Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala
325 330 335
Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg
340 345 350
Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Tyr
355 360 365

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

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
420 425 430

Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
435 440 445
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu
450 455 460
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
465 470 475 480
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
485 490 495

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe
500 505 510
Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His Ala Ala Asn Leu Val
515 520 525
Pro Met Val Ala Thr Val
530

<210> 113
<211> 534
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PD-L1 binding protein 115749
<400> 113
Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp

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

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr

65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly

115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met

130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu

145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

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

180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser

195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp

290 295 300

Val Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn

305 310 315 320

Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

370 375 380

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp

405 410 415

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

420 425 430

Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp

485 490 495

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe

500 505 510

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys His His Ala Ala Asn Leu Val

515 520 525

Pro Met Val Ala Thr Val

530

<210> 114

<211> 534

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein 115750

<400> 114

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15

Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp
35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg
50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr
65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe
85 90 95

Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp
100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly
115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met
130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu
145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln
165 170 175

Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val
180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser
195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile
225 230 235 240
Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys
245 250 255
Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Glu Val Gln Leu
260 265 270
Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile
275 280 285

Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp
290 295 300
Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn
305 310 315 320
Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Arg Lys Phe Lys Gly Lys Ala
325 330 335
Ala Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg
340 345 350

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

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
420 425 430
Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
435 440 445
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu
450 455 460

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
465 470 475 480

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
485 490 495
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe
500 505 510
Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His Ala Ala Asn Leu Val
515 520 525
Pro Met Val Ala Thr Val
530

<210> 115
<211> 510
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PD-L1 binding protein 115751
<400> 115
Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15
Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
20 25 30
Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp
35 40 45
Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg

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

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly

115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met

130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu

145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

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

180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser

195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

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

245 250 255

Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser Asp Ile Gln Met

260 265 270

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

275 280 285

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln

290 295 300

Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Asn Ser Met His Trp Val

405 410 415

Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro

420 425 430

Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Val Thr

435 440 445

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

450 455 460

Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Tyr Tyr

465 470 475 480

Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

485 490 495

Leu Thr Val Ser Ser Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

500 505 510

<210> 116

<211> 510

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein 115752

<400> 116

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp

35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg

50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr

65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly

115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met

130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu

145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

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

180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser

195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

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

245 250 255

Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser Asp Ile Gln Met

260 265 270

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

275 280 285

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln

290 295 300

Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Asn Ser Met His Trp Val

405 410 415

Arg Gln Ala His Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro

420 425 430

Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Arg Lys Phe Lys Gly Lys Ala Ala

435 440 445

Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser

450 455 460

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

465 470 475 480

Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

485 490 495

Leu Thr Val Ser Ser Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

500 505 510

<210> 117

<211> 510

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein 115753

<400> 117

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15

Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp
35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg
50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr
65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe
85 90 95

Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp
100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly
115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met
130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu
145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln
165 170 175

Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val
180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser
195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile
225 230 235 240
Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Ser Pro Ser Thr
245 250 255
Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser Asp Ile Gln Met
260 265 270
Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
275 280 285

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln
290 295 300
Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn
305 310 315 320
Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
325 330 335
Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val
340 345 350

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

Arg Gln Ala His Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro
420 425 430
Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr
435 440 445
Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser
450 455 460

Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Tyr Tyr
465 470 475 480

Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
485 490 495
Leu Thr Val Ser Ser Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
500 505 510

<210> 118
<211> 510
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PD-L1 binding protein 115754
<400> 118
Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15
Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile

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

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

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu

145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

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

180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser

195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

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

245 250 255

Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser Asp Ile Gln Met

260 265 270

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

275 280 285

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln

290 295 300

Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Asn Ser Met His Trp Val

405 410 415

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

420 425 430

Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

485 490 495

Leu Thr Val Ser Ser Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

500 505 510

<210> 119

<211> 534

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein 115755

<400> 119

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp

35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg

50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr

65 70 75 80

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

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

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg
210 215 220
Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile
225 230 235 240
Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Ser Pro Ser Thr
245 250 255
Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser Gln Val Gln Leu
260 265 270

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

Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Val
325 330 335

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
405 410 415
Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
420 425 430
Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
435 440 445
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Leu
450 455 460

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
465 470 475 480
Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp
485 490 495
Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe
500 505 510
Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys His His Ala Ala Asn Leu Val
515 520 525

Pro Met Val Ala Thr Val
530

<210> 120
<211> 534
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein 115756

<400> 120

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15

Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp
35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg
50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr
65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe
85 90 95

Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp
100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly
115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met
130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu
145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln
165 170 175

Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val
180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser
195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg
210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

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

245 250 255

Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser Gln Val Gln Leu

260 265 270

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

275 280 285

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Asn Ser Met His Trp

290 295 300

Val Arg Gln Ala His Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn

305 310 315 320

Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Arg Lys Phe Lys Gly Lys Ala

325 330 335

Ala Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

370 375 380

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp

405 410 415

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

420 425 430

Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp

485 490 495

Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe

500 505 510

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys His His Ala Ala Asn Leu Val

515 520 525

Pro Met Val Ala Thr Val

530

<210> 121

<211> 534

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein 115757

<400> 121

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp

35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg

50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr

65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly

115 120 125

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

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

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

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

Tyr Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
370 375 380

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
385 390 395 400
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
405 410 415
Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
420 425 430
Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
435 440 445

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Leu
450 455 460
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
465 470 475 480
Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp
485 490 495
Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe
500 505 510

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys His His Ala Ala Asn Leu Val
515 520 525
Pro Met Val Ala Thr Val
530

<210> 122
<211> 534
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PD-L1 binding protein 115758
<400> 122
Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp

35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg

50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr

65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly

115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met

130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu

145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

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

180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser

195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

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

245 250 255

Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser Gln Val Gln Leu

260 265 270

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

275 280 285

Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Asn Ser Met His Trp

290 295 300

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

305 310 315 320

Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

370 375 380

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp

405 410 415

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

420 425 430

Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp

485 490 495

Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe

500 505 510

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys His His Ala Ala Asn Leu Val
515 520 525

Pro Met Val Ala Thr Val
530

<210> 123
<211> 521
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PD-L1 binding protein 115961
<400> 123

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15

Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp
35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg
50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr
65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe
85 90 95

Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp
100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly
115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met
130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu
145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

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

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

Val Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn
305 310 315 320
Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala
325 330 335
Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg
340 345 350
Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Tyr
355 360 365

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

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
420 425 430

Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
435 440 445
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu
450 455 460
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
465 470 475 480
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
485 490 495

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe
500 505 510
Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
515 520

<210> 124
<211> 521
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PD-L1 binding protein 115962
<400> 124
Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15
Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile

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

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly

115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met

130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu

145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

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

180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser

195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp

290 295 300

Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn

305 310 315 320

Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Arg Lys Phe Lys Gly Lys Ala

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

370 375 380

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp

405 410 415

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

420 425 430

Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp

485 490 495

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe

500 505 510

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

515 520

<210> 125

<211> 501

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein 116187

<400> 125

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

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

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

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser
195 200 205
Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg
210 215 220
Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile
225 230 235 240
Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys

245 250 255

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

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

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

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
450 455 460
Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
465 470 475 480
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr
485 490 495

Lys Leu Glu Ile Lys

500

<210> 126

<211> 514

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

>

<223> PD-L1 binding protein 116188

<400> 126

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp

35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg

50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr

65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly

115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met

130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu

145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

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

180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser

195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp

290 295 300

Val Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn

305 310 315 320

Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln

420 425 430

Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu

435 440 445

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser

450 455 460

Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr

465 470 475 480

Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr

485 490 495

Lys Leu Glu Ile Lys His His Ala Ala Asn Leu Val Pro Met Val Ala

500 505 510

Thr Val

<210> 127

<211> 501

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein 116296

<400> 127

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp

35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg

50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr

65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly

115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met

130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu

145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

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

180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser

195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp

290 295 300

Val Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn

305 310 315 320

Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln

420 425 430

Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu

435 440 445

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser

450 455 460

Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr

465 470 475 480

Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr

485 490 495

Lys Leu Glu Leu Lys

500

<210> 128

<211> 514

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein 116297

<400> 128

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp

35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg

50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr

65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly

115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met

130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu

145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

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

180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser

195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp

290 295 300

Val Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn

305 310 315 320

Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln

420 425 430

Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu

435 440 445

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser

450 455 460

Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr

465 470 475 480

Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr

485 490 495

Lys Leu Glu Leu Lys His His Ala Ala Asn Leu Val Pro Met Val Ala

500 505 510

Thr Val

<210> 129

<211> 519

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein 116299

<400> 129

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15

Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp
35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg
50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr
65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe
85 90 95

Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp
100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly
115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met
130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu
145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln
165 170 175

Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val
180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser

195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp

290 295 300

Val Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn

305 310 315 320

Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

370 375 380

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

385 390 395 400

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

405 410 415

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

420 425 430

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

435 440 445

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
450 455 460
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

465 470 475 480
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
485 490 495
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys His His Ala Ala Asn Leu
500 505 510
Val Pro Met Val Ala Thr Val
515

<210> 130
<211> 534
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PD-L1 binding protein 116324
<400
> 130
Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15
Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
20 25 30
Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp
35 40 45
Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg
50 55 60

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

115 120 125

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

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

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

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

Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
370 375 380

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

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu
450 455 460
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
465 470 475 480
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
485 490 495
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe
500 505 510

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys His His Ala Ala Asn Leu Val
515 520 525
Pro Met Val Ala Thr Val
530

<210> 131
<211> 514
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PD-L1 binding protein 116325
<400> 131
Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp

35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg

50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr

65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly

115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met

130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu

145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

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

180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser

195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp

290 295 300

Val Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn

305 310 315 320

Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

370 375 380

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

385 390 395 400

Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met

405 410 415

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln

420 425 430

Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu

435 440 445

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser

450 455 460

Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr

465 470 475 480

Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr

485 490 495

Lys Leu Glu Leu Lys His His Ala Ala Asn Leu Val Pro Met Val Ala

500 505 510

Thr Val

<210> 132

<211> 509

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #1

<400> 132

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Cys Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys Pro

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln

290 295 300

Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu

305 310 315 320

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser

325 330 335

Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr

340 345 350

Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr

355 360 365

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val His Leu Val Glu

370 375 380

Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys

385 390 395 400

Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val Lys

405 410 415

Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asp Pro Asn

420 425 430

Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu
435 440 445
Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu

450 455 460
Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr
465 470 475 480
Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
485 490 495
Thr Val Ser Ser Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
500 505

<210> 133
<211> 509
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220
>
<223> PD-L1 binding protein #2
<400> 133
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30
Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Cys Gly Asp Asn
35 40 45
Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg Phe

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

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys Pro

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln

290 295 300

Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu

305 310 315 320

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser

325 330 335

Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr

340 345 350

Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr

355 360 365

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

370 375 380

Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys

385 390 395 400

Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val Lys

405 410 415

Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Asn

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr

465 470 475 480

Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

485 490 495

Thr Val Ser Ser Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

500 505

<210> 134

<211> 509

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #3

<400> 134

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Cys Gly Asp Asn

35 40 45

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

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

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

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

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln
290 295 300

Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu
305 310 315 320
Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
325 330 335
Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
340 345 350
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr
355 360 365

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln
370 375 380
Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys
385 390 395 400
Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val Lys
405 410 415
Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Asn
420 425 430

Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Arg Lys Phe Lys Gly Lys Ala Ala Leu
435 440 445
Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu
450 455 460
Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr
465 470 475 480
Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
485 490 495

Thr Val Ser Ser Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
500 505

<210> 135
<211> 533
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #4

<400> 135

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys Pro

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Asn Ser Met His Trp Val

290 295 300

Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

370 375 380

Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

385 390 395 400

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile

405 410 415

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

420 425 430

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp

435 440 445

Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr

450 455 460

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

465 470 475 480

Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala

485 490 495

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly

500 505 510

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His Ala Ala Asn Leu Val Pro

515 520 525

Met Val Ala Thr Val

530

<210> 136

<211> 533

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #5

<400> 136

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys Pro

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val

290 295 300

Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asp Pro

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

370 375 380

Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

385 390 395 400

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile

405 410 415

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

420 425 430

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp

435 440 445

Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr

450 455 460

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

465 470 475 480

Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala

485 490 495

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly

500 505 510

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His Ala Ala Asn Leu Val Pro

515 520 525

Met Val Ala Thr Val

530

<210> 137

<211> 533

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #6

<400> 137

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys Pro

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val

290 295 300

Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

370 375 380

Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

385 390 395 400

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile

405 410 415

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

420 425 430

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp

435 440 445

Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr

450 455 460

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

465 470 475 480

Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala

485 490 495

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly

500 505 510

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys His His Ala Ala Asn Leu Val Pro

515 520 525

Met Val Ala Thr Val

530

<210> 138

<211> 533

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #7

<400> 138

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys Pro

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val

290 295 300

Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro

305 310 315 320

Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Arg Lys Phe Lys Gly Lys Ala Ala

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

370 375 380

Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

385 390 395 400

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile

405 410 415

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

420 425 430

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp
435 440 445
Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr

450 455 460
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
465 470 475 480
Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala
485 490 495
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly
500 505 510
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys His His Ala Ala Asn Leu Val Pro

515 520 525
Met Val Ala Thr Val
530

<210> 139
<211> 509
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PD-L1 binding protein #8
<400> 139
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30
Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Ser Pro Ser Thr Pro

245 250 255

Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser Asp Ile Gln Met Thr

260 265 270

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

275 280 285

Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln

290 295 300

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu

305 310 315 320

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

325 330 335

Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
340 345 350
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr

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

420 425 430
Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Val Thr Met
435 440 445
Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu
450 455 460
Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr
465 470 475 480
Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

485 490 495
Thr Val Ser Ser Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
500 505

<210> 140
<211> 509
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PD-L1 binding protein #9
<400> 140
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

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

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

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Ser Pro Ser Thr Pro
245 250 255
Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser Asp Ile Gln Met Thr
260 265 270

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
275 280 285

Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln
290 295 300
Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu
305 310 315 320
Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
325 330 335
Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
340 345 350

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

Gln Ala His Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Asn
420 425 430
Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Arg Lys Phe Lys Gly Lys Ala Ala Ile
435 440 445
Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
450 455 460
Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr
465 470 475 480

Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
485 490 495
Thr Val Ser Ser Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
500 505

<210> 141

<211> 509

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #10

<400> 141

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Ser Pro Ser Thr Pro

245 250 255

Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser Asp Ile Gln Met Thr

260 265 270

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

275 280 285

Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln

290 295 300

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr

355 360 365

Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln

370 375 380

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

385 390 395 400

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Asn Ser Met His Trp Val Arg

405 410 415

Gln Ala His Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Asn

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr

465 470 475 480

Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

485 490 495

Thr Val Ser Ser Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

500 505

<210> 142

<211> 509

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #11

<400> 142

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

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

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Ser Pro Ser Thr Pro
245 250 255
Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser Asp Ile Gln Met Thr
260 265 270

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
275 280 285
Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln
290 295 300
Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu
305 310 315 320
Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
325 330 335

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

Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys
385 390 395 400

Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Asn Ser Met His Trp Val Arg
405 410 415
Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Asn
420 425 430
Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Leu
435 440 445
Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
450 455 460

Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr
465 470 475 480
Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
485 490 495
Thr Val Ser Ser Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
500 505

<210> 143
<211> 533
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PD-L1 binding protein #12
<400> 143

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

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Ser Pro Ser Thr Pro

245 250 255

Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser Gln Val Gln Leu Val

260 265 270

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

275 280 285

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Asn Ser Met His Trp Val

290 295 300

Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro

305 310 315 320

Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Val Thr

325 330 335

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

340 345 350

Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Tyr Tyr

355 360 365

Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

370 375 380

Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

385 390 395 400

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile

405 410 415

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

420 425 430

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp

435 440 445

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

450 455 460

Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

465 470 475 480

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

485 490 495

Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly

500 505 510

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys His His Ala Ala Asn Leu Val Pro

515 520 525

Met Val Ala Thr Val

530

<210> 144

<211> 533

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #13

<400> 144

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Ser Pro Ser Thr Pro

245 250 255

Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser Gln Val Gln Leu Val

260 265 270

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

275 280 285

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Asn Ser Met His Trp Val

290 295 300

Arg Gln Ala His Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro

305 310 315 320

Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Arg Lys Phe Lys Gly Lys Ala Ala

325 330 335

Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

370 375 380

Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

385 390 395 400

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile

405 410 415

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

420 425 430

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp

435 440 445

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

450 455 460

Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

465 470 475 480

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

485 490 495

Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly

500 505 510

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys His His Ala Ala Asn Leu Val Pro

515 520 525

Met Val Ala Thr Val

530

<210> 145

<211> 533

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #14

<400> 145

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Ser Pro Ser Thr Pro

245 250 255

Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser Gln Val Gln Leu Val

260 265 270

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

275 280 285

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Asn Ser Met His Trp Val

290 295 300

Arg Gln Ala His Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro

305 310 315 320

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

325 330 335

Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Gly Tyr Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

370 375 380

Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

385 390 395 400

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile

405 410 415

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

420 425 430

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp

435 440 445

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

450 455 460

Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

465 470 475 480

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

485 490 495

Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly

500 505 510

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys His His Ala Ala Asn Leu Val Pro

515 520 525

Met Val Ala Thr Val

530

<210> 146

<211> 533

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #15

<400> 146

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Ser Pro Ser Thr Pro

245 250 255

Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser Gln Val Gln Leu Val

260 265 270

Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser
275 280 285
Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Asn Ser Met His Trp Val

290 295 300
Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro
305 310 315 320
Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr
325 330 335
Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser
340 345 350
Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Tyr Tyr

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

420 425 430
Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp
435 440 445
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile Tyr Leu Thr
450 455 460
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
465 470 475 480
Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe

485 490 495
Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly
500 505 510
Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys His His Ala Ala Asn Leu Val Pro

515 520 525

Met Val Ala Thr Val

530

<210> 147

<211> 520

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #16

<400> 147

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

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

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

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

385 390 395 400
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
405 410 415
Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg

420 425 430

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp

435 440 445

Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr

450 455 460

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

465 470 475 480

Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala

485 490 495

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly

500 505 510

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

515 520

<210> 148

<211> 520

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #17

<400> 148

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

```
His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
            100                 105                 110

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

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

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

Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro
305                 310                 315                 320
Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Arg Lys Phe Lys Gly Lys Ala Ala
                325                 330                 335
Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser
```

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

370 375 380

Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

385 390 395 400

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile

405 410 415

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

420 425 430

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp

435 440 445

Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr

450 455 460

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

465 470 475 480

Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala

485 490 495

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly

500 505 510

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

515 520

<210> 149

<211> 500

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #18

<400> 149

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys Pro

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val

290 295 300

Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys

420 425 430

Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala

435 440 445

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

450 455 460

Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr

465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

485 490 495

Leu Glu Ile Lys

500

<210> 150

<211> 513

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #19

<400> 150

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

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

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

145 150 155 160
Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys Pro

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val

290 295 300

Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys

420 425 430

Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala

435 440 445

Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr
450 455 460
Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr

465 470 475 480
Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
485 490 495
Leu Glu Ile Lys His His Ala Ala Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr
500 505 510
Val

<210> 151
<211> 500
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PD-L1 binding protein #20
<400> 151
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

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

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

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys Pro

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val

290 295 300

Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys

420 425 430

Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala

435 440 445

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

450 455 460

Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr

465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

485 490 495

Leu Glu Leu Lys

500

<210> 152

<211> 513

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #21

<400> 152

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys Pro

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val

290 295 300

Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro
305 310 315 320
Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr

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

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

450 455 460
Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
465 470 475 480
Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
485 490 495
Leu Glu Leu Lys His His Ala Ala Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr
500 505 510
Val

<210> 153
<211> 518
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #22

<400> 153

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys Pro

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

305 310 315 320
Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr
325 330 335
Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser
340 345 350
Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Tyr Tyr
355 360 365
Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

370 375 380
Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
385 390 395 400
Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
405 410 415
Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
420 425 430
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu

435 440 445
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
450 455 460
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp

465 470 475 480

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe

485 490 495

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys His His Ala Ala Asn Leu Val

500 505 510

Pro Met Val Ala Thr Val

515

<210> 154

<211> 533

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #23

<400> 154

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160
Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

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

290 295 300
Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro
305 310 315 320
Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr
325 330 335
Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser
340 345 350
Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Tyr Tyr

355 360 365
Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
370 375 380
Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

385 390 395 400

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile

405 410 415

Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys

420 425 430

Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp

435 440 445

Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr

450 455 460

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

465 470 475 480

Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala

485 490 495

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly

500 505 510

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys His His Ala Ala Asn Leu Val Pro

515 520 525

Met Val Ala Thr Val

530

<210> 155

<211> 513

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #24

<400> 155

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys Pro

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp Val

290 295 300

Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

370 375 380

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

385 390 395 400

Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr

405 410 415

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys

420 425 430

Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala

435 440 445

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

450 455 460

Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr

465 470 475 480

Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

485 490 495

Leu Glu Leu Lys His His Ala Ala Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr

500 505 510

Val

<210> 156

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> single-chain variable fragment XXIV

<400> 156

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

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

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

180 185 190
Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
195 200 205

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met

210 215 220

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn

225 230 235 240

Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

245 250

<210> 157

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> single-chain variable fragment XXV

<400> 157

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp

195 200 205

Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe

210 215 220

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

225 230

<210> 158

<211> 513

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 binding protein #25

<400> 158

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Ser Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

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

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

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

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

Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Tyr Tyr
355 360 365

Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
370 375 380
Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln
385 390 395 400
Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
405 410 415
Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys
420 425 430

Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala
435 440 445
Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr
450 455 460
Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
465 470 475 480
Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
485 490 495

Leu Glu Leu Lys His His Ala Ala Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr
500 505 510
Val

<210> 159
<211> 532
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PD-L1 binding protein #26
<400> 159
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

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

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

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val Met
180 185 190
Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Ser Pro Ser Thr Pro
245 250 255
Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser Asp Ile Gln Met Thr
260 265 270

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
275 280 285

Thr Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Arg Val Ser
290 295 300
Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Glu
305 310 315 320
Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys
325 330 335
Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp
340 345 350

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser His Thr Thr Ser Gly Thr Tyr Val
355 360 365
Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Glu
370 375 380
Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser
385 390 395 400
Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
405 410 415

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
420 425 430
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
435 440 445
Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
450 455 460
Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
465 470 475 480

Arg Asp Gln Gly Tyr Ala His Ala Phe Asp Ile Trp Gly Arg Gly Thr
485 490 495
Thr Val Thr Val Ser Ser His His Ala Ala Asn Leu Val Pro Met Val
500 505 510
Ala Thr Val Arg Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Arg Arg

515 520 525

Asn Leu Val Pro

530

<210> 160

<211> 514

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Binding Molecule 116555

<400> 160

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp

35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg

50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Ser Val Thr

65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly

115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met

130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu

145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Asp Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val
180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser
195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg
210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile
225 230 235 240

Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys
245 250 255

Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Glu Val Gln Leu
260 265 270

Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile
275 280 285

Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp
290 295 300

Val Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn
305 310 315 320

Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala
325 330 335

Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg
340 345 350

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Tyr
355 360 365

Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
370 375 380

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
385 390 395 400

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
405 410 415

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln

420 425 430

Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu

435 440 445

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser

450 455 460

Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr

465 470 475 480

Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr

485 490 495

Lys Leu Glu Leu Lys His His Ala Ala Asn Leu Val Pro Met Val Ala

500 505 510

Thr Val

<210> 161

<211> 533

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Binding Molecule 115765

<400> 161

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp

35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg

50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr

65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe

85 90 95

Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp
100 105 110

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

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

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

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

340 345 350

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser His Thr Thr Ser Gly Thr Tyr

355 360 365

Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser His His Ala Ala Asn Leu Val Pro Met

500 505 510

Val Ala Thr Val Arg Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Arg

515 520 525

Arg Asn Leu Val Pro

530

<210> 162

<211> 503

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Binding Molecule 115695

<400> 162

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15

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

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

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

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg
210 215 220
Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile
225 230 235 240
Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Ser Pro Ser Thr

245 250 255

Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser Asp Ile Gln Met

260 265 270

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

275 280 285

Ile Thr Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Arg Val

290 295 300

Ser Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr

305 310 315 320

Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser

325 330 335

Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu

340 345 350

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser His Thr Thr Ser Gly Thr Tyr

355 360 365

Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

500

<210> 163

<211> 508

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Binding Molecule 114895

<400> 163

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp

35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg

50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr

65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly

115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met

130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu

145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

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

180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser

195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Arg Val Pro Tyr

355 360 365

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

420 425 430

Gly Tyr Val Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe
435 440 445
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

450 455 460
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
465 470 475 480
Ala Arg Gln Ala Trp Gly Tyr Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
485 490 495
Val Ser Ala Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
500 505

<210> 164

<211> 532

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223

> Binding molecule V1

<400> 164

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

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

115 120 125

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

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

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

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

Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
370 375 380

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

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
450 455 460
Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
465 470 475 480
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr
485 490 495
Lys Leu Glu Leu Lys Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Arg Arg
500 505 510

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Arg Arg Asn Leu Val Pro Met
515 520 525
Val Ala Thr Val
530

<210> 165
<211> 527
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Binding molecule V2
<400> 165
Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15
Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile

20 25 30

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

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

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln
165 170 175
Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val
180 185 190
Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser
195 200 205
Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg
210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile
225 230 235 240
Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys
245 250 255
Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Glu Val Gln Leu
260 265 270

Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile
275 280 285

Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp
290 295 300
Val Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn
305 310 315 320
Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala
325 330 335
Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg
340 345 350

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

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln
420 425 430
Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu
435 440 445
Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
450 455 460
Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
465 470 475 480

Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr
485 490 495
Lys Leu Glu Leu Lys Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Arg Arg
500 505 510
Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Arg Arg Asn Leu Val Pro

515 520 525

<210> 166

<211> 502

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PD-L1 Binding protein #27

<400> 166

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

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

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140
His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160
Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val Met

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Ser Pro Ser Thr Pro
245 250 255

Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Ala Ser Asp Ile Gln Met Thr
260 265 270

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
275 280 285

Thr Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Arg Val Ser
290 295 300

Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Glu
305 310 315 320

Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys
325 330 335

Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp
340 345 350

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser His Thr Thr Ser Gly Thr Tyr Val
355 360 365

Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Glu
370 375 380

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser
385 390 395 400

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
405 410 415

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
420 425 430

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
435 440 445

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
450 455 460
Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
465 470 475 480
Arg Asp Gln Gly Tyr Ala His Ala Phe Asp Ile Trp Gly Arg Gly Thr
485 490 495
Thr Val Thr Val Ser Ser
500

<210> 167
<211> 507
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PD-L1 Binding Protein #28
<400> 167
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30
Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn
35 40 45
Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg Phe

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

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys Pro

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Ala Ala Ser Ser Val Asp Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

325 330 335

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

340 345 350

Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Arg Val Pro Tyr Thr

355 360 365

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

420 425 430

Tyr Val Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe Lys

435 440 445

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met

450 455 460

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

465 470 475 480

Arg Gln Ala Trp Gly Tyr Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

485 490 495

Ser Ala Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

500 505

<210> 168

<211> 531

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Binding Molecule V3

<400> 168

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp

35 40 45

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

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

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

Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys
245 250 255
Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Glu Val Gln Leu
260 265 270
Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile
275 280 285

Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His Trp
290 295 300

Val Lys Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn
305 310 315 320
Pro Asn Asn Gly Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala
325 330 335
Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg
340 345 350
Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Tyr
355 360 365

Tyr Tyr Gly Ser Arg Glu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
370 375 380
Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
385 390 395 400
Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
405 410 415
Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln
420 425 430

Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu
435 440 445
Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
450 455 460
Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
465 470 475 480
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr
485 490 495

Lys Leu Glu Leu Lys His His Ala Ala Asn Leu Val Pro Met Val Ala
500 505 510
Thr Val Arg Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Arg Arg Asn
515 520 525
Leu Val Pro

530

<210> 169

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 30

<400> 169

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Ser Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Asp Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220
Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240
Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala
245 250

<210> 170
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Shiga toxin effector polypeptide 31
<400> 170
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

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

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

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala

245 250

<210> 171

<400> 171

000

<210> 172

<400> 172

000

<210> 173

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Shiga toxin effector polypeptide 30

<400> 173

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

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

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Asp Ala Leu Ser Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala

245 250

<210> 174

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Carboxy-terminal moiety

<400> 174

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Arg Arg Asn Leu Val Pro Met

1 5 10 15

Val Ala Thr Val Arg Arg Asn Leu Val Pro

20 25

<210> 175

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Carboxy-terminal moiety

<400> 175

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Arg Arg Asn Leu Val Pro Met

1 5 10 15

Val Ala Thr Val Arg Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

20 25 30

<210> 176

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Carboxy-terminal moiety

<400> 176

His His Ala Ala Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

1 5 10

<210> 177

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Carboxy-terminal moiety

<400> 177

His His Ala Ala Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Arg Arg Asn
1 5 10 15

Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Arg Arg Asn Leu Val Pro
20 25 30

<210> 178

<211> 20

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Carboxy-terminal moiety

<400> 178

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Arg Arg Asn Leu Val Pro Met
1 5 10 15

Val Ala Thr Val

20

<210> 179

<211> 22

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Carboxy-terminal moiety

<400> 179

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val His His Ala Ala Asn Leu Val
1 5 10 15

Pro Met Val Ala Thr Val

20

<210> 180

<211> 11

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Carboxy-terminal moiety

<400> 180

Arg Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val

1 5 10

<210> 181

<211> 28

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Carboxy-terminal moiety

<400> 181

Arg Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Arg Arg Asn Leu Val

1 5 10 15

Pro Met Val Ala Thr Val Arg Arg Asn Leu Val Pro

20 25

<210> 182

<211> 33

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Carboxy-terminal moiety

<400> 182

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Arg Arg Asn Leu Val Pro Met

1 5 10 15

Val Ala Thr Val His His Ala Ala Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr

20 25 30

Val

<210> 183

<211> 30

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Carboxy-terminal moiety

<400> 183

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Arg Arg Ala Ala Asn Leu Val
1 5 10 15

Pro Met Val Ala Thr Val His His Ala Ala Asn Leu Val Pro

20 25 30

<210> 184

<211> 33

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Carboxy-terminal moiety

<400> 184

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val His His Ala Ala Asn Leu Val
1 5 10 15

Pro Met Val Ala Thr Val Arg Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr

20 25 30

Val

<210> 185

<211> 28

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Carboxy-terminal moiety

<400> 185

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val His His Ala Ala Asn Leu Val
1 5 10 15

Pro Met Val Ala Thr Val Arg Arg Asn Leu Val Pro

20 25

<210> 186

<211> 35

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Carboxy-terminal moiety

<400> 186

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val His His Ala Ala Asn Leu Val

1 5 10 15

Pro Met Val Ala Thr Val His His Ala Ala Asn Leu Val Pro Met Val

20 25 30

Ala Thr Val

35

<210> 187

<211> 30

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Carboxy-terminal moiety

<400> 187

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val His His Ala Ala Asn Leu Val

1 5 10 15

Pro Met Val Ala Thr Val His His Ala Ala Asn Leu Val Pro

20 25 30

<210> 188

<211> 12

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> proteinaceous linker

<400> 188

Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser

1 5 10

<210> 189

<211> 14

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> proteinaceous linker

<400> 189

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Glu Phe

1 5 10

<210> 190

<211> 14

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> proteinaceous linker

<400> 190

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly

1 5 10

<210> 191

<211> 18

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> proteinaceous linker

<400> 191

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Ser Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 192

<211> 18

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> proteinaceous linker

<400> 192

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 193

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> proteinaceous linker

<400> 193

Ser Arg Ser Ser Gly

1 5

<210> 194

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> proteinaceous linker

<400> 194

Ser Gly Ser Ser Cys

1 5

<210> 195

<211> 28

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> proteinaceous linker

<400> 195

Ala Met Gly Arg Ser Gly Gly Gly Cys Ala Gly Asn Arg Val Gly Ser

1 5 10 15

Ser Leu Ser Cys Gly Gly Leu Asn Leu Gln Ala Met

20 25

<210> 196

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv linker

<400> 196

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 197

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv linker

<400> 197

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 198

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv linker

<400> 198

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 199

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv linker

<400> 199

Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Ser

<210> 200

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv linker

<400

> 200

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Ser Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 201

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv linker

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(4)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(6)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(8)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<

222> (9)..(10)

<223> may be absent

<400> 201

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 202

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv linker

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(10)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(15)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(25)

<223> may be absent

<400> 202

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Ser

20 25

<210> 203

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv linker

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(10)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(15)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(25)

<223> may be absent

<400> 203

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 204

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv linker

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(8)

<223> may be absent

<

220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(12)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(16)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(20)

<223> may be absent

<400> 204

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 205

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 205

Lys Asp Glu Leu

1

<210> 206

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 206

His Asp Glu Phe

1

<210> 207

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 207

His Asp Glu Leu

1

<210> 208

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 208

Arg Asp Glu Phe

1

<210> 209

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 209

Arg Asp Glu Leu

1

<210> 210

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 210

Trp Asp Glu Leu

1

<210> 211

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 211

Tyr Asp Glu Leu

1

<210> 212

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 212

His Glu Glu Phe

1

<210> 213

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 213

His Glu Glu Leu

1

<210> 214

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 214

Lys Glu Glu Leu

1

<210> 215

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 215

Arg Glu Glu Leu

1

<210> 216

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 216

Lys Ala Glu Leu

1

<210> 217

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 217

Lys Cys Glu Leu

1

<210> 218

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 218

Lys Phe Glu Leu

1

<210> 219

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 219

Lys Gly Glu Leu

1

<210> 220

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 220

Lys His Glu Leu

1

<210> 221

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 221

Lys Leu Glu Leu

1

<210> 222

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 222

Lys Asn Glu Leu

1

<210> 223

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 223

Lys Gln Glu Leu

1

<210> 224

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 224

Lys Arg Glu Leu

1

<210> 225

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 225

Lys Ser Glu Leu

1

<210> 226

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 226

Lys Val Glu Leu

1

<210> 227

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 227

Lys Trp Glu Leu

1

<210> 228

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 228

Lys Tyr Glu Leu

1

<210> 229

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 229

Lys Glu Asp Leu

1

<210> 230

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 230

Lys Ile Glu Leu

1

<210> 231

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 231

Asp Lys Glu Leu

1

<210> 232

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 232

Phe Asp Glu Leu

1

<210> 233

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 233

Lys Asp Glu Phe

1

<210> 234

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 234

Lys Lys Glu Leu

1

<210> 235

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 235

His Ala Asp Leu

1

<210> 236

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 236

His Ala Glu Leu

1

<210> 237

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 237

His Ile Glu Leu

1

<210> 238

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 238

His Asn Glu Leu

1

<210> 239

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 239

His Thr Glu Leu

1

<210> 240

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 240

Lys Thr Glu Leu

1

<210> 241

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 241

His Val Glu Leu

1

<210> 242

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 242

Asn Asp Glu Leu

1

<210> 243

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 243

Gln Asp Glu Leu

1

<210> 244

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 244

Arg Glu Asp Leu

1

<210> 245

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 245

Arg Asn Glu Leu

1

<210> 246

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 246

Arg Thr Asp Leu

1

<210> 247

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 247

Arg Thr Glu Leu

1

<210> 248

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 248

Ser Asp Glu Leu

1

<210> 249

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 249

Thr Asp Glu Leu

1

<210> 250

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 250

Ser Lys Glu Leu

1

<210> 251

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 251

Ser Thr Glu Leu

1

<210> 252

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif

<400> 252

Glu Asp Glu Leu

1

<210> 253

<400> 253

000

<210> 254

<400> 254

000

<210> 255

<400> 255

000

<210> 256

<400> 256

000

<210> 257

<400> 257

000

<210> 258

<400> 258

000

<210> 259

<211> 498

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Binding Molecule 114962

<400> 259

Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15

Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
20 25 30

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp
35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg
50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr
65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe
85 90 95

Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp
100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly
115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met
130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu
145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln
165 170 175

Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Ala Ser Tyr Val
180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser
195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His Trp

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly

420 425 430

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly

435 440 445

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

450 455 460

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
465 470 475 480
Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

485 490 495
Ile Lys

<210> 260
<211> 498
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Binding Molecule 114963
<400> 260
Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15
Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
20 25 30
Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp

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

100 105 110
Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly
115 120 125
Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met
130 135 140
Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu

145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

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

180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser

195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asp Val His Trp
405 410 415
Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Trp Leu His

420 425 430
Ala Asp Thr Gly Ile Thr Lys Phe Ser Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val
435 440 445
Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser
450 455 460
Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Arg
465 470 475 480
Ile Gln Leu Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

485 490 495
Ser Ser

<210> 261
<211> 518
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Binding Molecule 114964
<400> 261
Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15
Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
20 25 30
Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp

35 40 45
Asn Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu Gly Arg
50 55 60
Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr
65 70 75 80
Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly

115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met

130 135 140

Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu

145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln

165 170 175

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

180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser

195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

225 230 235 240

Leu Asn Ser His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His Trp

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn
340 345 350
Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg His

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

420 425 430
Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln
435 440 445
Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe
450 455 460
Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
465 470 475 480
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr

485 490 495
Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly
500 505 510
Thr Lys Val Glu Ile Lys
515

<210> 262
<211> 210
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> linker
<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(6)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(14)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(14)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(21)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(28)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(27)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(34)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(33)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (35)..(42)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(41)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (43)..(49)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (44)..(48)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(56)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(55)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (57)..(63)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (58)..(62)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (64)..(70)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (65)..(69)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (71)..(77)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (72)..(76)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (78)..(84)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (79)..(83)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (85)..(91)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (86)..(90)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (92)..(98)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (93)..(97)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(105)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (100)..(104)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (106)..(112)

<223> may be absent

<220>

<221>

MISC_FEATURE

<222> (107)..(111)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (113)..(119)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (114)..(118)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (120)..(126)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (121)..(125)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (127)..(133)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (128)..(132)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (134)..(140)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (135)..(139)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (141)..(147)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (142)..(146)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (148)..(154)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (149)..(153)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (155)..(161)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (156)..(160)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (162)..(168)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (163)..(167)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (169)..(175)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (170)..(174)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (176)..(182)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (177)..(181)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (183)..(189)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (184)..(188)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (190)..(196)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (191)..(195)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (197)..(203)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (198)..(202)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (204)..(210)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (205)..(209)

<223> may be absent

<400> 262

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly

35 40 45

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly

50 55 60

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

65 70 75 80

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly

85 90 95

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly

145 150 155 160

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly

165 170 175

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

180 185 190

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly

195 200 205

Gly Ser

210

<210> 263

<211> 210

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(6)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(14)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(14)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(21)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(28)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(27)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(34)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(33)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (35)..(42)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(41)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (43)..(49)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (44)..(48)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(56)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(55)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (57)..(63)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (58)..(62)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (64)..(70)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (65)..(69)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (71)..(77)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (72)..(76)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (78)..(84)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (79)..(83)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (85)..(91)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (86)..(90)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (92)..(98)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (93)..(97)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(105)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (100)..(104)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (106)..(112)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (107)..(111)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (113)..(119)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (114)..(118)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (120)..(126)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (121)..(125)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (127)..(133)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (128)..(132)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (134)..(140)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (135)..(139)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (141)..(147)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (142)..(146)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (148)..(154)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (149)..(153)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (155)..(161)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (156)..(160)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (162)..(168)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (163)..(167)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (169)..(175)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (170)..(174)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (176)..(182)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (177)..(181)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (183)..(189)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (184)..(188)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (190)..(196)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (191)..(195)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (197)..(203)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (198)..(202)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (204)..(210)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (205)..(209)

<223> may be absent

<400> 263

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser
1 5 10 15

Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser
35 40 45

Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser
65 70 75 80

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser
85 90 95

Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly
100 105 110

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser
115 120 125

Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser
130 135 140

Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser
145 150 155 160

Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser
165 170 175

Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser
180 185 190

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser
195 200 205

Ser Gly
210

<210> 264

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(30)

<223> each residue individually may be absent or present

<400> 264

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

20 25 30

<210> 265

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cleavable spacer

<400> 265

His His Ala Ala

1

<210> 266

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(10)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(15)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(20)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(25)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(30)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(35)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(40)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (41)..(45)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (46)..(50)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(55)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (56)..(60)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (61)..(65)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (66)..(70)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (71)..(75)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (76)..(80)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (81)..(85)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (86)..(90)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (91)..(95)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (96)..(100)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (106)..(110)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (111)..(115)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (116)..(120)

<223

> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (121)..(125)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (126)..(130)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (131)..(135)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (136)..(140)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (141)..(145)

<223> may be absent

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (146)..(150)

<223> may be absent

<400> 266

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

35 40 45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

50 55 60

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser

145 150