(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월31일
(11) 등록번호 10-2197527
(24) 등록일자 2020년12월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61K 39/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7026614(분할)
(22) 출원일자(국제) 2009년09월25일
심사청구일자 2019년10월08일
(85) 번역문제출일자 2019년09월10일
(65) 공개번호 10-2019-0107756
(43) 공개일자 2019년09월20일
(62) 원출원 특허 10-2018-7034308
원출원일자(국제) 2009년09월25일
심사청구일자 2018년12월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2009/058475
(87) 국제공개번호 WO 2010/036959
국제공개일자 2010년04월01일
(30) 우선권주장
61/100,534 2008년09월26일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020050107399 A
KR1020080011428 A
WO2004056875 A1

(73) 특허권자
다나-파버 캔서 인스티튜트 인크.
미국 메사추세츠 02215 보스턴 브룩클린 애비뉴 450
에모리 유니버시티
미국 조지아주 30322 아틀란타 포쓰 플로어 엔이 클리프턴 로드 1599
(72) 발명자
프리만, 고든, 제이.
미국 02445 메사추세츠주 브루클린 월넛 스트리트 305
아메드, 라피
미국 30307 조지아주 애틀랜타 엔이 두란드 밀 드라이브 1811
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

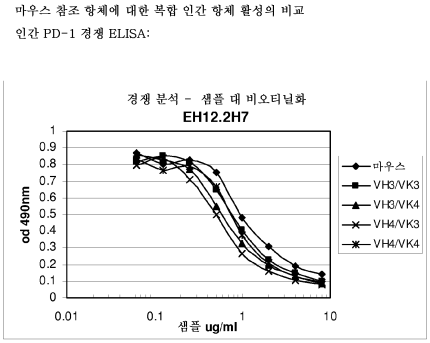
전체 청구항 수 : 총 21 항 심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **인간 항-PD-1, PD-L1, 및 PD-L2 항체 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 부분적으로, 신규한 인간 항-PD-1, PD-L1, 및 PD-L2 항체의 확인에 기초한 것이다. 따라서, 본 발명은 본원에 기재된 신규한 인간 항-PD-1, PD-L1, 및 PD-L2 항체를 사용하여 PD-1, PD-L1, 및/또는 PD-L2 활성을 조정하는 것이 유익할 병태 (예를 들어, 지속 감염성 질병, 자가면역 질병, 천식, 이식 거부반응, 염증성 질환 및 종양)를 진단, 예후 관측 및 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도9a



(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
C07K 16/00 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/72 (2013.01)
(72) 발명자
존스, 티모시, 디.
영국 시비22 3에이제이 케임브리지셔 바브라함 브릭 로우 27
카, 프란시스, 제이.
영국 에이비23 8더블유유 애버딘셔 발메디 더 홀딩스 비르클러
그렉슨, 제임스, 피.
영국 시엠1 6티유 에섹스 첼름스포드 다운즈웨이 10

명 세 서

청구범위

청구항 1

a) 서열 7의 중쇄 CDR1 서열,

서열 8의 중쇄 CDR2 서열, 및

서열 9의 중쇄 CDR3 서열; 및

b) 서열 10의 경쇄 CDR1 서열,

서열 11의 경쇄 CDR2 서열, 및

서열 12의 경쇄 CDR3 서열

을 포함하고, 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 PD-1 단백질에 결합하고, 키메라, 인간화, 복합 항체, 또는 인간 항체인 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 상향조절하기 위한 조성물.

청구항 2

a) 서열 7의 중쇄 CDR1 서열,

서열 8의 중쇄 CDR2 서열, 및

서열 9의 중쇄 CDR3 서열; 및

b) 서열 10의 경쇄 CDR1 서열,

서열 11의 경쇄 CDR2 서열, 및

서열 12의 경쇄 CDR3 서열

을 포함하고, 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 PD-1 단백질에 결합하고, 키메라, 인간화, 복합 항체, 또는 인간 항체인 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하며,

대상체로부터의 면역 세포를 시험관 내에서 의약과 접촉시킴으로써, 면역 세포를 자극하고;

시험관 내 자극된 면역 세포를 대상체 내에 재도입하는 것

을 포함하는 대상체에서 면역 반응을 상향조절하기 위한 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편이

a) 서열 25-29로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 서열; 및

b) 서열 30-33으로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 가변 영역 서열

을 포함하는, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편이

a) 서열 27 또는 28을 포함하는 중쇄 가변 영역 서열; 및

b) 서열 32 또는 33을 포함하는 경쇄 가변 영역 서열

을 포함하는, 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 Fc-PD-1에 대한 EH12.2H7 항체의 결합을 억제하며, 여기서 EH12.2H7 항체는 서열 76을 포함하는 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 77을 포함하는 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 PD-1-매개 신호를 억제하는, 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 대상체가 감염된 환자인 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 면역 반응을 상향조절하는 것이 존재하는 면역 반응을 향상시키는 것을 포함하는, 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 면역 반응을 상향조절하는 것이 초기 면역 반응을 불러일으키는 것을 포함하는, 조성물.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 대상체가 미생물 감염으로 고통받는, 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 미생물 감염이 세균 감염, 바이러스 감염, 및 기생충 감염으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 세균 감염이 헬리코박터(*Helicobacter*), 미코박테리움(*Mycobacterium*), 포르피로모나스(*Porphyromonas*), 및 클라미디아(*Chlamydia*) 감염으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 바이러스 감염이 사이토메갈로바이러스, 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 헤르페스 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, 인간 T 림프친화성 바이러스, 림프구성 맥락수막염 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 및 리노바이러스 감염으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서, 기생충 감염이 주혈흡충(*Schistosoma*), 촌충(*Taenia*), 리슈마니아 멕시카나(*Leishmania Mexicana*) 및 플라스모듐(*Plasmodium*) 감염으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 대상체가 바이러스 피부 질병으로 고통받는, 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 바이러스 피부 질병이 헤르페스 또는 대상포진인 조성물.

청구항 17

제1항 또는 제2항에 있어서, 대상체가 전신 바이러스 질병으로 고통받는, 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 전신 바이러스 질병이 인플루엔자, 감기, 및 뇌염으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 19

제1항 또는 제2항에 있어서, 면역 반응을 상향조절하는 것이 병원체에 대한 면역성을 유도하는 것을 포함하는, 조성물.

청구항 20

제1항 또는 제2항에 있어서, 면역 반응을 상향조절하는 것이 자가 항원, 또는 종양-특이적 항원에 대한 기존의 내성을 극복하는 것을 포함하는, 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 종양-특이적 항원이 고형 종양, 혈액암, 방광암, 뇌암, 유방암, 결장암, 위암(gastric cancer), 신경교종, 두부암, 백혈병, 간암, 폐암, 림프종, 골수종, 경부암, 난소암, 흑색종, 췌장암, 신장암, 타액선암, 위장암(stomach cancer), 흉선 상피암, 및 갑상선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암과 연관된, 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원

[0002] 본원은 그 전문이 본원에 참조로 포함되는, 2008년 9월 26일 출원된 미국 특허 가출원 61/100,534를 기초로 한 우선권을 주장한다.

배 경 기 술

[0003] T 세포가 외래 폴리펩티드에 반응하기 위해서, 항원-제시 세포 (APC)에 의해 적어도 2개의 신호가 휴지기 T 림프구로 제공되어야 한다 ([Jenkins, M. and Schwartz, R. (1987) J. Exp. Med. 165:302-319]; [Mueller, D.L. et al. (1990) J. Immunol. 144:3701-3709]). 면역 반응에 특이성을 부여하는 제1 신호는 주요 조직적합 복합체 (MHC)의 환경에서 제시된 외래 항원성 펩티드의 인식 후에 T 세포 수용체 (TCR)를 통해 신호전달된다. 동시자극으로 불리는 제2 신호는 T 세포가 증식하고 기능적이 되도록 유도한다 (Lenschow et al. (1996) Annu. Rev. Immunol. 14:233). 동시자극은 항원-특이적이지 않고 MHC-제한되지 않으며, APC에 의해 발현된 별개의 세포 표면 분자에 의해 제공된다 ([Jenkins, M.K. et al. (1988) J. Immunol. 140: 3324-3330]; [Linsley, P.S. et al. (1991) J. Exp. Med 173:721-730]; [Gimmi, C.D. et al. (1991) Proc. Natl. Acad Sci. USA 88:6575-6579]; [Young, J.W. et al. (1992) J. Clin. Invest. 90:229-237]; [Koulova, L. et al. (1991) J. Exp. Med. 173:759-762]; [Reiser, H. et al. (1992) Proc. Natl. Acad Sci. USA 89:271-275]; [van-Seventer, G.A. et al. (1990) J. Immunol. 144:4579-4586]; [LaSalle, J.M. et al. (1991) J. Immunol. 147:774-80]; [Dustin, M.I. et al. (1989) J. Exp. Med. 169:503]; [Armitage, R.J. et al. (1992) Nature 357:80-82]; [Liu, Y. et al. (1992) J. Exp. Med 175:437-445]).

[0004] 단백질 B7-1 (CD80) 및 B7-2 (CD86)은 중대한 동시자극성 분자이다 ([Freeman et al. (1991) J. Exp. Med. 174:625]; [Freeman et al. (1989) J. Immunol. 143:2714]; [Azuma et al. (1993) Nature 366:76]; [Freeman et al. (1993) Science 262:909]). B7-2는 1차 면역 반응 동안 우세한 역할을 하는 한편, 면역 반응 동안 나중에 상향조절되는 B7-1은 1차 T 세포 반응을 연장시키거나 2차 T 세포 반응을 동시자극하기 위해 중요할 수 있다 (Bluestone (1995) Immunity 2:555).

[0005] CD28은 B7-1 및 B7-2 모두에 대한 리간드이고, 이는 휴지기 T 세포에 의해 구성적으로 발현되고 T 세포 활성화 후에 발현이 증가한다. TCR 신호와 함께 CD28의 라이게이션은 T 세포가 증식하고 IL-2를 분비하도록 유도하는 동시자극 신호의 전달을 일으킨다 ([Linsley, P.S. et al. (1991) J. Exp. Med. 173:721-730]; [Gimmi, C.D. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6575-6579]; [June, C.H. et al. (1990) Immunol. Today

11:211-6]; [Harding, F.A. et al. (1992) Nature 356:607-609]). 제2의 B7-1 및 B7-2 리간드인 CTLA4 (CD152)는 CD28에 상동성이지만 휴지기 T 세포에 의해 발현되지 않는다. CTLA4 발현은 T 세포 활성화 후에 일어난다 (Brunet, J.F. et al. (1987) Nature 328:267-270). CTLA4의 라이게이션은 T 세포 증식 및 사이토킨 분비를 방지하는 억제성 신호의 전달을 일으킨다. 따라서, CTLA4는 T 세포 반응의 중대한 음성 조절인자이다 ([Waterhouse et al. (1995) Science 270:985], [Allison and Krummel (1995) Science 270:932]). 밝혀진 CD28 패밀리의 세 번째 구성원은 ICOS이다 ([Hutloff et al. (1999) Nature 397:263]; WO 98/38216). 그의 리간드 (ICOS-L)에 의한 ICOS의 라이게이션은 높은 수준의 사이토킨 발현을 일으키지만, T 세포 팽창을 제한한다 ([Riley J.L. et al. (2001) J. Immunol. 166:4943-48]; [Aicher A. et al. (2000) J. Immunol. 164:4689-96]; [Mages H.W. et al. (2000) Eur. J Immunol. 30:1040-7]; [Brodie D. et al. (2000) Curr. Biol. 10:333-6]; [Ling V. et al. (2000) J. Immunol. 164:1653-7]; [Yoshinaga S.K. et al. (1999) Nature 402:827-32]). T 세포가 동시자극 신호의 부재 하에 T 세포 수용체를 통해 자극되면 이들은 비반응성 또는 무반응으로 되거나 죽는다.

[0006] B7:CD28/CTLA4/ICOS 동시자극성 경로의 중요성이 시험관 내에서 및 몇몇 생체내 모델 시스템에서 입증되었다. 상기 동시자극성 경로의 차단은 쥐 및 인간 시스템에서 항원 특이적 내성을 발생시킨다 ([Harding, F.A. et al. (1992) Nature 356:607-609]; [Lenschow, D.J. et al. (1992) Science 257:789-792]; [Turka, L.A. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11102-11105]; [Gimmi, C.D. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6586-6590]; [Boussiotis, V. et al. (1993) J. Exp. Med. 178:1753-1763]). 이와 반대로, B7-음성 쥐 종양 세포에 의한 B7의 발현은 종양 거부 및 종양 시험접종에 대한 오래 지속하는 보호와 동반되는 T-세포 매개된 특이적 면역성을 유도한다 ([Chen, L. et al. (1992) Cell 71:1093-1102]; [Townsend, S.E. and Allison, J.P. (1993) Science 259:368-370]; [Baskar, S. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:5687-5690]). 따라서, 동시자극성 경로의 조작은 인간에서 면역 반응을 자극 또는 억제하기 위한 큰 잠재력을 제공한다.

[0007] B7-1 및 CD28 패밀리의 보다 많은 구성원을 발견하여 T 세포에 동시자극성 및 억제성 제2 신호를 제공하는 추가의 경로를 밝혔다. 보다 새로운 경로 중 하나는 프로그래밍된 사멸 (programmed death 1: PD-1; CD279로도 알려짐) 수용체 및 그의 리간드, 즉, PD-L1 (B7-H1; CD274) 및 PD-L2 (B7-DC; CD273)로 나타내어 진다. PD-1은 활성화된 T 세포 상에서 발현되지만 휴지기 T 세포 상에서 발현되지 않는 CD28/CTLA4 패밀리의 구성원이다 (Nishimura et al. (1996) Int. Immunol. 8:773). 그의 리간드에 의한 PD-1의 라이게이션은 사이토킨 생산을 감소시키고 T 세포 생존을 감소시키는 억제성 신호를 매개한다 ([Nishimura et al. (1999) Immunity 11:141]; [Nishimura et al. (2001) Science 291:319]; [Chemnitz et al. (2004) J. Immunol. 173:945]).

[0008] PD-L1은 APC 및 활성화된 T 세포를 포함한 많은 세포 종류 상에서 발현되는 B7 패밀리 구성원이다 (Yamazaki et al. (2002) J. Immunol. 169:5538). PD-L1은 PD-1 및 B7-1 모두에 결합한다. PD-L1에 의한 T-세포-발현된 B7-1의 결합 및 B7-1에 의한 T-세포-발현된 PD-L1의 결합은 모두 T 세포 억제를 일으킨다 (Butte et al. (2007) Immunity 27:111). 다른 B7 패밀리 구성원처럼, PD-L1은 또한 T 세포에 동시자극 신호를 제공할 수 있다는 증거가 또한 존재한다 ([Subudhi et al. (2004) J. Clin. Invest. 113:694]; [Tamura et al. (2001) Blood 97:1809]).

[0009] PD-L2는 수지상 세포, 대식세포 및 골수 유래 비만 세포를 포함한 다양한 APC 상에서 발현되는 B7 패밀리 구성원이다 (Zhong et al. (2007) Eur. J. Immunol. 37:2405). APC-발현된 PD-L2는 PD-1의 라이게이션을 통해 T 세포 활성화를 억제하고 PD-1 비의존 메카니즘을 통해 T 세포 활성화를 동시자극할 수 있다 (Shin et al. (2005) J. Exp. Med. 201:1531). 또한, 수지상 세포-발현된 PD-L2의 라이게이션은 수지상 세포 사이토킨 발현 및 생존을 향상시켰다 ([Radhakrishnan et al. (2003) J. Immunol. 37:1827]; [Nguyen et al. (2002) J. Exp. Med. 196:1393]). PD-1, PD-L1, 및 PD-L2의 구조 및 발현, 및 T 세포 활성화 및 내성을 조절하는 (예를 들어, 치료 효과) 문맥에서 이들 분자의 신호전달 특징 및 기능은 그 전부가 본원에 참고로 포함된 문헌 (Kier et al. (2008) Ann. Rev. Immunol. 26:677)에 보다 상세히 검토되어 있다. 상기 및 다른 동시자극성 경로의 조작은 인간에서 면역 반응을 자극 또는 억제하기 위한 큰 잠재력을 제공하고, 그러한 조작을 수행하기 위해 유용한 조성물 및 방법이 필요하다.

발명의 내용

[0010] 발명의 개요

[0011] 본 발명은 인간 PD-1, 인간 PD-L1, 및 인간 PD-L2에 특이적으로 결합하는 신규한 복합 인간 모노클로날 항체의

생성 및 단리뿐만 아니라 그러한 신규 항체의 특성 결정 및 PD-1, PD-L1, 및/또는 PD-L2에 의해 매개된 다양한 병태를 치료하는데 있어서 그의 치료 가치의 입증에 기초한 것이다. 쥐 항체를 인간화하기 위해 사용되는 일반적인 기술은 종종 원래의 쥐 항체에 비해 항원 결합 친화도가 감소된 인간화 항체를 생산한다 ([Almagro and Fransson (2008) Frontiers in Bioscience 13:1619-1633]; [Foote and Winter (1992) J. Mol. Biol. 224:487-499]; [Hwang et al. (2005) Methods 36:35-42]). 놀랍게도, 본 발명의 복합 인간 항체는 쥐 항체에 매우 유사한 친화도로 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2에 결합하는 것으로 나타났다. 또한, 통상적인 인간화 기술은 일부 쥐 서열을 보유하는 인간화 항체를 생산한다. 그 결과로서, 그러한 항체는 인간에게 투여될 때 면역원성을 보유할 수 있다. 예를 들어, 인간화 항체 CAMPATH®은 환자의 약 50%에서 면역원성을 일으킨다. 다른 한편으로, 본 발명의 복합 인간 항체는 전적으로 인간 기원의 서열로부터 유래한다. 따라서, 이들은 아마도 다른 항-인간 PD-1, PD-L1, 및/또는 PD-L2 항체보다 인간 환자에게 투여될 때 면역원성이 유의하게 더 낮고, 치료상 더 효과적이고 유용하다. 따라서, 본 발명의 복합 인간 항체는 PD-1, PD-L1, 및/또는 PD-L2에 의해 매개된 질환을 치료 및 예방하기 위한 개선된 수단을 제공하고, 이것은 부분적으로 그들의 특유의 특이성, 친화도, 구조, 기능적 활성 및 인간 항체 서열로부터 유래한다는 사실에 기인한다. 본 발명은 또한 본원에 기재된 복합 인간 항체를 투여함에 의한, 지속 감염성 질병, 천식, 염증성 질병, 및 암의 치료를 포함한 새로운 치료 용도의 발견에 기초한 것이다.

[0012] 본 발명의 한 실시양태는 PD-1 단백질, PD-L1 단백질, 또는 PD-L2 단백질 (예를 들어 인간 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 단백질)에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 관한 것이고, 여기서 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 키메라 (chimeric), 인간화, 복합 인간 또는 인간 항체이고, 서열 7-24로 이루어진 군으로부터 선택되는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 CDR 서열을 포함한다.

[0013] 본 발명은 또한 PD-1 단백질 (예를 들어, 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 PD-1 단백질)에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공하고, 여기서 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 키메라, 인간화, 복합 인간 또는 인간 항체이고, 서열 7-9 (서열 7의 CDR1 서열, 서열 8의 CDR2 서열, 및 서열 9의 CDR3 서열)를 포함하는 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 서열 10-12 (서열 10의 CDR1 서열, 서열 11의 CDR2 서열, 및 서열 12의 CDR3 서열)를 포함하는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0014] 본 발명은 또한 PD-L1 단백질 (예를 들어, 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 PD-L1 단백질)에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공하고, 여기서 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 키메라, 인간화, 복합 인간 또는 인간 항체이고, 서열 13-15 (서열 13의 CDR1 서열, 서열 14의 CDR2 서열, 및 서열 15의 CDR3 서열)을 포함하는 중쇄 가변 영역 서열, 및/또는 서열 16-18 (서열 16의 CDR1 서열, 서열 17의 CDR2 서열, 및 서열 18의 CDR3 서열)을 포함하는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0015] 본 발명은 또한 PD-L2 단백질 (예를 들어, 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 PD-L2 단백질)에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공하고, 여기서 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 키메라, 인간화, 복합 인간 또는 인간 항체이고, 서열 19-21 (서열 19의 CDR1 서열, 서열 20의 CDR2 서열, 및 서열 21의 CDR3 서열)을 포함하는 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 서열 22-24 (서열 22의 CDR1 서열, 서열 23의 CDR2 서열, 및 서열 24의 CDR3 서열)를 포함하는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0016] 본 발명은 또한 PD-1 단백질, PD-L1 단백질 또는 PD-L2 단백질 (예를 들어, 인간 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 단백질)에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공하고, 여기서 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 키메라, 인간화, 복합 및/또는 인간 항체이고, 서열 25-29, 34-38, 또는 43-47로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 서열, 또는 서열 25-29, 34-38, 또는 43-47에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 그 초과로 동일한 또는 상동성을 갖는 서열, 및/또는 서열 30-33, 39-42, 또는 48-51로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 서열, 또는 서열 30-33, 39-42, 또는 48-51에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 그 초과의 상동성을 갖는 서열을 포함한다.

[0017] 본 발명은 또한 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 PD-1 단백질에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공하고, 여기서 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 키메라, 인간화, 복합 또는 인간 항체이고, 서열 25-29로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 서열, 또는 서열 25-29에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 그 초과로 동일한 또는 상동성을 갖는 서열, 및/또는 서열 30-33로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 서열, 또는 서열 30-33에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 그 초과로 동일한 또는 상동성을 갖는 서열을 포함한다. 예를 들어, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 27 또는 28의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 32 또는 33의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서,

항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 28의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 32의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0018] 본 발명은 또한 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 PD-L1 단백질에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공하고, 여기서 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 키메라, 인간화, 복합, 또는 인간 항체이고, 서열 34-38로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 서열, 또는 서열 34-38에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 그 초과로 동일한 또는 상동성을 갖는 서열, 및/또는 서열 39-42로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 서열, 또는 서열 39-42에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 그 초과로 동일한 또는 상동성을 갖는 서열을 포함한다. 예를 들어, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 35 또는 37의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 39, 40 또는 42의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 35의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 42의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0019] 본 발명은 또한 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 PD-L2 단백질에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공하고, 여기서 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 키메라, 인간화, 복합, 또는 인간 항체이고, 서열 43-47로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 서열, 또는 서열 43-47에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 그 초과로 동일한 또는 상동성을 갖는 서열, 및/또는 서열 48-51로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 서열, 또는 서열 48-51에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 그 초과로 동일한 또는 상동성을 갖는 서열을 포함한다. 예를 들어, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 44 또는 46의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 49, 50 또는 51의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열 46의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 51의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

[0020] 본 발명의 다른 실시양태는 PD-1 단백질에 결합하는 본원에 기재된 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고, 여기서 단리된 항체는 경쟁 ELISA 분석에서 Fc-PD-1에 대한 비오티닐화 EH12.2H7 항체의 결합을 억제한다. 또 다른 실시양태는 PD-L1 단백질에 결합하는 본원에 기재된 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고, 여기서 단리된 항체는 경쟁 ELISA 분석에서 Fc-PD-L1에 대한 비오티닐화 29E.2A3 항체의 결합을 억제한다. 또 다른 실시양태는 PD-L2 단백질에 결합하는 본원에 기재된 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고, 여기서 단리된 항체는 경쟁 ELISA 분석에서 Fc-PD-L2에 대한 비오티닐화 24F.10C12 항체의 결합을 억제한다.

[0021] 본 발명의 다른 실시양태는 PD-1 단백질에 결합하는 본원에 기재된 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고, 여기서 단리된 항체는 PD-1-매개 신호를 억제한다. 또 다른 실시양태는 PD-L1 단백질에 결합하는 본원에 기재된 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고, 여기서 단리된 항체는 PD-L1-매개 신호를 억제한다. 또 다른 실시양태는 PD-L2 단백질에 결합하는 본원에 기재된 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고, 여기서 단리된 항체는 PD-L2-매개 신호를 억제한다.

[0022] 특히, 본 발명의 실시양태는 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산이고, 여기서 폴리펩티드는 서열 25-51로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열, 또는 서열 25-51에 대해 적어도 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과로 동일한 또는 상동성을 갖는 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태는 하나 이상의 이들 핵산을 포함하는 벡터, 숙주 세포 또는 동물이다. 또 다른 측면은 엄격한 조건 하에, 서열 25-51로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드, 또는 서열 25-51에 대해 적어도 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과로 동일한 또는 상동성을 갖는 서열을 코딩하는 핵산의 상보체와 혼성화하는 핵산이다.

[0023] 본 발명은 또한 본원에 기재된 임의의 항체 또는 그의 항원 결합-단편의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 벡터, 예를 들어 발현 벡터 내에 존재한다. 본 발명은 또한 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편의 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 항체 또는 항원-결합 단편을 생산한다. 본 발명은 또한 항체 또는 항원-결합 단편을 생산하는 세포를 배양하고, 세포 배양액으로부터 항체 또는 항원-결합 단편을 회수하는 것을 포함하는, 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편을 생산하는 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명은 본원에 기재된 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 추가로 포함한다.

[0025] 본 발명은 적어도 일부의 세포가 PD-1, PD-L1 및/또는 PD-L2를 발현하는 T 세포의 집단을 시험관 내에서, 생체 외에서, 또는 생체 내에서 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 사용하여 접촉시키는 것을 포함하는, 소모된 T 세포를 재활성화하는 방법을 포함한다.

[0026] 본 발명은 추가로 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 바이러스 감염, 세균 감염, 기생충 감염, 또는 원충 감염을 포함한 지속 감염으로 고통받는 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 바이러스 감염은 사이토메갈로바이러스, 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 헤르페스 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, 인간 T 림프친화성 바이러스, 림프구성 맥락수막염 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 및 리노바이러스 감염으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 세균 감염은 헬리코박터(*Helicobacter*), 미코박테리움(*Mycobacterium*), 포르피로모나스(*Porphyromonas*), 및 클라미디아(*Chlamydia*) 감염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0027] 본 발명은 추가로 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 포함하고, 여기서 단리된 항체는 항체-매개된 세포독성을 유도하거나, 항체-매개된 세포독성을 유도하도록 변형되거나, 독소 및 영상화제 (imaging agent)로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용제에 접합된다. 일부 실시양태에서, PD-L1에 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편은 PD-L1을 과다발현하는 암에 걸린 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, PD-L2에 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편은 PD-L2를 과다발현하는 암에 걸린 대상체에게 투여된다. 한 실시양태에서, 암은 고형 종양, 혈액암, 방광암, 뇌암, 유방암, 결장암, 위암(gastric cancer), 신경교종, 두부암, 백혈병, 간암, 폐암, 림프종, 골수종, 경부암, 난소암, 흑색종, 췌장암, 신장암, 타액선암, 위장암(stomach cancer), 흉선 상피암, 및 갑상선암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0028] 본 발명은 추가로 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 PD-L2 단백질에 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 천식으로 고통받는 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0029] 본 발명은 또한 대상체에게 유효량의 PD-L1 단백질 또는 PD-L2 단백질에 결합하는 본원에 기재된 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 염증성 질병 또는 이식 거부반응으로 고통받는 대상체를 치료하는 방법을 포함한다. 한 실시양태에서, 염증성 질병은 급성 파종 뇌척수염, 애디슨(Addison) 병, 강직성 척추염, 항인지질 항체 증후군, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 관절염, 베체트(Behcet) 병, 수포성 유천포창, 셀리악병, 샤가스(Chagas) 병, 크론(Crohn) 병, 피부근염, 1형 당뇨병, 굿파스처(Goodpasture) 증후군, 이식편-대-숙주 질병, 그레이브스(Graves) 병, 길랑-바레(Guillain-Barre) 증후군, 하시모토(Hashimoto) 병, 과 IgE 증후군, 특발성 혈소판감소성 자반증, 홍반성 루푸스, 다발 경화증, 중증 근무력증, 천포창, 악성 빈혈, 다발성건염, 원발성 담즙성 간경화증, 건선, 류마티스 관절염, 쇼그렌(Sjogren) 증후군, 측두 동맥염, 혈관염, 및 베게너(Wegener) 육아종증으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 이식 거부반응은 장기 거부반응, 골수 이식 거부반응, 및 골수비소멸성(non-myeloablative) 골수 이식 거부반응으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0030] 본 발명은 또한 본원에 기재된 임의의 방법에서 사용하기 위한 본원에 기재된 항체, 항원-결합 단편 또는 폴리펩티드를 포함한다. 본 발명은 또한 대상에서 본원에 기재된 임의의 질병 치료용 의약과 같은 의약의 제조를 위한 본원에 기재된 항체, 항원-결합 단편 또는 폴리펩티드의 용도를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 본 발명의 조립된 인간 면역글로불린 서열을 클로닝하기 위해 사용된 발현 벡터의 개략도이다.

도 2a-2e는 마우스 항-인간 PD-1 항체, EH12.2H7에 상응하도록 설계된 복합 인간 중쇄 (도 2a, VH1; 도 2b, VH2; 도 2c, VH3; 및 도 2d, VH4; 도 2e, VH5) 가변 영역 서열을 도시한 것이다.

도 3a-3d는 마우스 항-인간 PD-1 항체, EH12.2H7에 상응하도록 설계된 복합 인간 경쇄 (도 3a, Vκ1; 도 3b, Vκ2; 도 3c, Vκ3; 도 3d, Vκ4) 가변 영역 서열을 도시한 것이다.

도 4a-4e는 마우스 항-인간 PD-L1 항체, 29E.2A3에 상응하도록 설계된 복합 인간 중쇄 (도 4a, VH1; 도 4b, VH2; 도 4c, VH3; 도 4d, VH4; 도 4e, VH5) 가변 영역 서열을 도시한 것이다.

도 5a-5d는 마우스 항-인간 PD-L1 항체, 29E.2A3에 상응하도록 설계된 복합 인간 경쇄 (도 5a, Vκ1; 도 5b, V

κ2; 도 5c, Vκ3; 도 5d, Vκ4) 가변 영역 서열을 도시한 것이다.

도 6a-6e는 마우스 항-인간 PD-L2 항체, 24F.10C12에 상응하도록 설계된 복합 인간 중쇄 (도 6a, VH1; 도 6b, VH2; 도 6c, VH3; 도 6d, VH4; 도 6e, VH5) 가변 영역 서열을 도시한 것이다.

도 7a-7d는 마우스 항-인간 PD-L2 항체, 24F.10C12에 상응하도록 설계된 복합 인간 경쇄 (도 7a, Vκ1; 도 7b, Vκ2; 도 7c, Vκ3; 도 7d, Vκ4) 가변 영역 서열을 도시한 것이다.

도 8a-8c는 각각 마우스 항-인간 항체인 EH12.2H7, 29E.2A3, 및 24F.10C12에 상응하는 1 μg의 복합 인간 항체의 SDS-PAGE 결과를 보여준다.

도 9a-9c는 각각 마우스 항-인간 항체인 EH12.2H7, 29E.2A3, 및 24F.10C12에 상응하는 인간 항체의 각각에 비한 ELISA 경쟁 결과를 보여준다. 도 9a에서, 인간 PD-1에 대한 정제된 항체의 결합을 경쟁 ELISA를 통해 시험하였다. 변하는 농도의 각각의 항체 (0.06 μg/ml 내지 8 μg/ml)를 고정 농도의 비오티닐화 EH12.2H7 (40 ng/ml)과 혼합하고 PD-1 코팅된 이뮬론 맥시소브 (immulon maxisorb) 플레이트에 결합시켰다. 결합을 스트렙타비딘-HRP 및 OPD 기질을 통해 검출하였다. 490 nm에서 흡광도를 플레이트 판독기 상에서 측정하고, 이를 시험 항체 농도에 대해 플로팅하였다. 도 9b에서, 인간 PD-L1에 대한 정제된 항체의 결합을 경쟁 ELISA를 통해 시험하였다. 변하는 농도의 각각의 항체 (0.02 μg/ml 내지 8 μg/ml)를 고정 농도의 비오티닐화 29E.2A3 (40 ng/ml)와 혼합하고 PD-L1 코팅된 이뮬론 맥시소브 플레이트에 결합시켰다. 결합을 스트렙타비딘-HRP 및 OPD 기질을 통해 검출하였다. 490 nm에서 흡광도를 플레이트 판독기 상에서 측정하고, 이를 시험 항체 농도에 대해 플로팅하였다. 도 9c에서, 인간 PD-L2에 대한 정제된 항체의 결합을 경쟁 ELISA를 통해 시험하였다. 변하는 농도의 각각의 항체 (0.02 μg/ml 내지 8 μg/ml)를 고정 농도의 비오티닐화 24F.10C12 (40 ng/ml)와 혼합하고 PD-L2 코팅된 이뮬론 맥시소브 플레이트에 결합시켰다. 결합을 스트렙타비딘-HRP 및 OPD 기질을 통해 검출하였다. 490 nm에서 흡광도를 플레이트 판독기 상에서 측정하고, 이를 시험 항체 농도에 대해 플로팅하였다.

도 10A-10C는 각각 마우스 항-인간 항체인 EH12.2H7 (도 10A), 29E.2A3 (도 10B), 및 24F.10C12 (도 10C)에 상응하도록 설계된 복합 인간 중쇄 및 경쇄의 상이한 조합에 따라 형성된 복합 인간 항체의 ELISA 경쟁 분석으로부터 생성되는 IC_{50} 결합 데이타를 보여준다. 분석을 도 3에 기재된 바와 같이 수행하였다. 중쇄 및 경쇄의 각각의 조합에 대한 IC_{50}을 마우스 항체의 IC_{50}에 대해 표준화하였다. ND = 데이타 없음.

도 11은 PD-1, PD-L1 및 PD-L2의 아미노산 서열을 보여준다.

도 12는 본원에 기재된 일부의 복합 인간 항체의 CDR 영역의 아미노산 서열을 보여준다.

도 13은 본원에 기재된 일부의 복합 인간 항체의 가변 영역의 아미노산 서열을 보여준다.

도 14A 및 14B는 시험관 내에서 SIV Gag-특이적 CD8 T 세포의 증식 능력에 대한 인간화된 항-PD-1 항체 및 인간화된 항-PD-L1 항체의 효과를 보여준다. 각각의 기호는 개별 짧은꼬리 원숭이 (macaque)를 나타낸다. 괄호 안의 숫자는 차단 Ab의 부재 하에 비해 차단 Ab의 존재 하에 증식의 배수 증가를 나타낸다.

도 15는 PD-L1 차단이 간내 CD8 T 세포의 항원-유도된 증식을 복구하는 것을 보여준다 (동물 1564로부터 대표적인 데이타).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 본 발명은 PD-1, PD-L1, 및/또는 PD-L2에 의해 매개된 다양한 질환을 치료 및 진단하기 위한 (예를 들어, 지속 감염성 질병, 천식, 염증성 질병, 이식 거부반응 및 암의 치료를 위한) 신규한 항체-기반 치료제를 제공한다.

[0033] 본 발명을 더욱 잘 이해하기 위해서 특정 용어에 대한 정의를 먼저 제시한다. 추가의 정의는 상세한 설명 전체에 걸쳐 제시되어 있다.

[0034] 본원에서 사용될 때, 용어 "PD-1", "PD-L1", 및 "PD-L2"는 달리 명백하게 규정하지 않으면, 세포에 의해 천연 발현된 임의의 변이체 또는 이소형, 및/또는 전장 폴리펩티드의 적어도 하나의 생물학적 활성을 갖는 그의 단편을 포함한다. 또한, 용어 "PD-1 리간드"는 PD-L1 (Freeman et al. (2000) J. Exp. Med. 192:1027) 및 PD-L2 (Latchman et al. (2001) Nat. Immunol. 2:261) 중 어느 하나 또는 둘 모두 및 세포에 의해 천연 발현된 임의의 변이체 또는 이소형, 및/또는 전장 폴리펩티드의 적어도 하나의 생물학적 활성을 갖는 그의 단편을 포함한다. 예를 들어, 인간을 포함한 상이한 종으로부터의 PD-1, PD-L1, 및 PD-L2 서열은 당업계에 잘 공지되어 있다 (예를 들어, 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 5,629,204 (Honjo et al., 인간 및 마우스 PD-

1 서열을 개시함); 미국 특허 7,105,328 (Wood et al., 인간 PD-1 서열을 개시함); 미국 특허 6,803,192 (Chen et al., 인간 및 마우스 PD-L1 서열을 개시함); 미국 특허 7,105,328 (Wood et al., 인간 PD-L1 서열을 개시함); 미국 특허 공개 20020164600 (Freeman et al., 인간 및 마우스 PD-L2 서열을 개시함) 참조).

[0035] 본원에서 사용될 때, 용어 "항체"는 전체 항체 및 그의 임의의 항원 결합 단편 (즉, "항원-결합 부분") 또는 단일쇄를 포함한다. "항체"는 디술피드 결합에 의해 상호 연결되어 있는 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 당단백질, 또는 그의 항원 결합 부분을 의미한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 "V_H"로서 약칭함) 및 중쇄 불변 영역으로 이루어져 있다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, 즉 CH1, CH2 및 CH3으로 이루어져 있다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 "V_L"로서 약칭함) 및 경쇄 불변 영역으로 이루어져 있다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, 즉 CL로 이루어져 있다. V_H 및 V_L 영역은 프레임워크 영역 (FR)으로 불리는 보다 보존된 영역이 산재되어 있는, 상보성 결정 영역 (CDR)으로 불리는 초가변 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L은 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어져 있으며, 이들은 아미노-말단에서 카르복시-말단 방향으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열되어 있다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. "불활성화 항체"는 보체계를 유도하지 않는 항체를 의미한다.

[0036] 용어 "초가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는 본원에서 사용될 때 서열에서 초가변이고/이거나 구조상 규정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 나타낸다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR; 즉 VH 내에 3개 (H1, H2, H3) 및 VL 내에 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. 천연 항체에서, H3 및 L3은 6개의 HVR 중 가장 큰 다양성을 보이고, 특히 H3이 항체에 정교한 특이성을 부여하는데 특유한 역할을 수행하는 것으로 생각된다 (예를 들어, 문헌 [Xu et al. Immunity 13:37-45 (2000)]; [Johnson and Wu in Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)] 참조). 실제로, 중쇄만으로 이루어진 천연 발생 카멜리드 (camelid) 항체는 경쇄의 부재 하에 기능을 나타내고 안정하다 (예를 들어, 문헌 [Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993)] 및 [Sheriff et al., Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996)] 참조).

[0037] 많은 초가변 영역 묘사가 사용되고 있고 본원에 포함된다. 카바트 (Kabat) 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 가변성에 기초하고 가장 일반적으로 사용된다 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). 코티아 (Chothia)는 그 대신에 구조적 루프의 위치를 나타낸다 (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). 카바트 넘버링 방식을 사용하여 넘버링할 때 코티아 CDR-H1 루프의 말단은 루프의 길이에 따라 H32와 H34 (아래 참조) 사이에서 변한다 (이것은 카바트 넘버링 방식이 H35A 및 H35B에서 삽입을 두기 때문이고; 35A 및 35B가 존재하지 않는 경우에 루프는 32에서 끝나고; 35A만 존재하는 경우에 루프는 33에서 끝나고; 35A와 35B가 모두 존재하는 경우에 루프는 34에서 끝난다). AbM 초가변 영역은 카바트 CDR과 코티아 구조적 루프 사이의 절충안을 나타내고, 옥스포드 몰레큘라 (Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에서 사용된다. "접촉" 초가변 영역은 이용가능한 복합 결정 구조의 분석에 기초한다. 각각의 이들 초가변 영역의 잔기를 아래에 나타낸다.

루프	카바트	AbM	코티아	접촉
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32, 33 또는 34	H30-H35B (카바트 넘버링)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (코티아 넘버링)
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

[0038]

[0039] 초가변 영역은 다음과 같이 "연장된 초가변 영역"을 포함할 수 있다: VL에서 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 VH에서 26-35B (H1), 50-65, 47-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3). 상기 연장된 초가변 영역은 일반적으로 카바트 및 코티아 규정의 조합이고, 임의로 접촉 정의를 사용하여 확인된 잔기를 추가로 포함할 수 있다. 가변 도메인 잔기는 각각의 상기 정의에 대해 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.

[0040] "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 규정되는 HVR 잔기 이외의 다른 가변 도메인 잔기이다.

[0041] 용어 "카바트에서와 같은 가변 도메인 잔기 넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산 위치 넘버링" 및 그의 변형은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서 항체 편집 (compilation)의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 사용된 넘버링 시스템을 나타낸다. 상기 넘버링 시스템을 이용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축 또는 그 내부에 대한 삽입에 대응하는 보다 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 후에 단일 아미노산 삽입 (카바트에 따른 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 후에 삽입된 잔기 (예를 들어 카바트에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 항체 서열의 상동성 영역을 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 정렬시킴으로써 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다.

[0042] 본원에서 용어 "Fc 영역"은 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역, 예를 들어 천연 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역을 정의하기 위하여 사용된다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 다양할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 대략 위치 Cys226, 또는 위치 Pro230의 아미노산 잔기로부터 그의 카르복실-말단으로 확장되도록 규정된다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은 예를 들어 항체의 생산 또는 정제 동안 또는 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산의 재조합 처리에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 무손상 항체의 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 항체 집단, K447 잔기가 제거되지 않은 항체 집단, 및 K447 잔기가 존재하거나 존재하지 않는 항체의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다. 본 발명의 항체에 사용하기 적합한 천연 서열 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 및 IgG4를 포함한다.

[0043] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 설명한다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 또한, 바람직한 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하는 것이고, 상기 수용체의 대립유전자 변이체 및 선택적 스플라이싱 (splicing)된 형태를 포함하여 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII 하위클래스의 수용체를 포함한다. FcγRII 수용체는 FcγRIIA ("활성화 수용체") 및 FcγRIIB ("억제 수용체")를 포함하고, 이들은 그의 세포질 도메인에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 FcγRIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신계 활성화 모티프 (ITAM)를 포함한다. 억제 수용체 FcγRIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신계 억제 모티프 (ITIM)를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [M. Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 예를 들어 문헌 ([Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991)]; [Capel et al., Immunomethods 4: 25-34 (1994)]; 및 [de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995)]에 개시되어 있다. 미래에 확인되는 것을 포함하여 다른 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다.

[0044] 용어 "CDR", 및 그의 복수형 "CDRs"은 3개는 경쇄 가변 영역의 결합 특성을 구성하고 (CDRL1, CDRL2 및 CDRL3) 3개는 중쇄 가변 영역 (CDRH1, CDRH2 및 CDRH3)의 결합 특성을 구성하는 상보성 결정 영역 (CDR)을 의미한다. CDR은 항체 분자의 기능적 활성에 기여하고, 스캐폴딩 또는 프레임워크 영역을 포함하는 아미노산 서열에 의해 분리된다. 명확한 CDR 경계 및 길이는 상이한 분류 및 넘버링 시스템에 적용된다. CDR은 따라서 카바트, 코티아, 접촉 또는 본원에서 설명되는 넘버링 시스템을 포함하는 임의의 다른 경계 정의를 참조할 수 있다. 상이한 경계에도 불구하고, 각각의 이들 시스템은 가변 서열 내의 소위 "초가변 영역"을 구성하는 일정 정도의 중첩부를 갖는다. 따라서, 이들 시스템에 따른 CDR 정의는 인접한 프레임워크 영역에 대해 길이 및 경계 영역이 상이하다 (예를 들어, 각각 그 전부가 본원에 참고로 포함된 문헌 [Kabat et al., in "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Edition, U.S. Department of Health and Human Services, 1992]; [Chothia et al., J. Mol. Biol, 1987, 196:901]; 및 [MacCallum et al., J. Mol. Biol., 1996, 262:732] 참조).

[0045] 본원에서 사용될 때, 용어 항체의 "항원-결합 부분" (또는 간단히 "항체 부분")는 항원 (예를 들어, PD-1, PD-L1, 및/또는 PD-L2)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 의미한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있음이 밝혀졌다. 용어 항체의 "항원-결합 부분"에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) V_H, V_L, C_L, 및 CH1 도메인으로 이루어지는 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 가교되는 디술피드 다리에 의해 연결되는 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편, (iii) V_H 및 CH1 도메인으로 이루어지는 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암 (arm)의 V_H 및 V_L 도메인으로 이루어지는 Fv 단편; (v) V_H 도메인으로 이루어지는 dAb 단편 (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)); 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 (vii) 임의로 합성 링커에 의해 연결될 수 있는 2 이상의 단리된 CDR의 조합물을 포함한다. 또한, Fv 단편의 도메인인 V_H 및 V_L은 별개의 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 재조합 방법을 사용하여, V_H 및 V_L이 페어링 (pairing)되어 1가 분자 (단일쇄 Fv (scFv)로 알려짐; 예를 들어, 문헌 [Bird et al. (1988)

Science 242:423-426]; 및 [Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883] 참조)를 형성하는 단일 단백질 사슬이 되도록 하는 합성 링커에 의해 연결될 수 있다. 또한, 상기 단일쇄 항체는 용어 항체의 "항원-결합 부분" 내에 포함되는 것으로 의도된다. 상기 항체 단편은 당업자에게 알려진 통상적인 기술을 사용하여 얻고, 단편은 무손상 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝된다.

[0046] 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날; 이종 (xenogeneic), 동종이형 (allogeneic), 또는 동계 (syngeneic); 또는 그의 변형된 형태 (예를 들어, 인간화, 키메라 등)일 수 있다. 또한, 항체는 완전 인간 항체일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 특이적으로 또는 실질적으로 특이적으로 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 폴리펩티드에 결합한다. 본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체"는 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화도를 보이는 항체를 의미한다. 따라서, 용어 "인간 모노클로날 항체"는 단일 결합 특이성을 보이고 인간 생식계열 또는 비-생식계열 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 의미한다. 한 실시양태에서, 인간 모노클로날 항체는 트랜스제닉 비- 인간 동물, 예를 들어, 불멸화 세포에 융합된 인간 중쇄 도입유전자 (transgene) 및 경쇄 도입유전자를 포함하는 게놈을 갖는 트랜스제닉 마우스로부터 유도된 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생산된다.

[0047] 본원에서 사용될 때, 용어 "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 존재하지 않는 항체를 의미하는 것으로 의도된다 (예를 들어, PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2에 특이적으로 결합하는 단리된 항체에는 각각 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2에 결합하지 않는 항체가 실질적으로 존재하지 않는다). 그러나, PD-1, PD-L1, 및/또는 PD-L2의 에피토프에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 각각 상이한 종으로부터 유도된 다른 PD-1, PD-L1, 및/또는 PD-L2 단백질에 대한 교차-반응성을 가질 수 있다. 그러나, 항체는 바람직하게는 항상 인간 PD-1, PD-L1, 및/또는 PD-L2에 결합한다. 또한, 단리된 항체에는 일반적으로 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 존재하지 않는다. 본 발명의 한 실시양태에서, PD-1, PD-L1, 및/또는 PD-L2에 대한 상이한 특이성을 갖는 "단리된" 모노클로날 항체의 조합물은 잘 규정된 조성으로 조합된다.

[0048] 본원에서 사용될 때, 용어 "인간화 항체"는 인간 이외의 다른 포유동물로부터 유도된 항체의 CDR 및 인간 항체의 FR 영역 및 불변 영역으로 구성되는 항체를 의미한다. 인간화 항체는 인체에서 인간화 항체의 항원성이 감소되기 때문에 본 발명에 따른 치료제에서 효과적인 성분으로서 유용하다.

[0049] 본원에서 사용될 때, 용어 "복합 항체"는 2 이상의 비관련 가변 영역으로부터의 생식계열 또는 비-생식계열 면역글로불린 서열을 포함하는 가변 영역을 갖는 항체를 의미한다. 추가로, 용어 "복합 인간 항체"는 인간 생식계열 또는 비-생식계열 면역글로불린 서열로부터 유도된 불변 영역 및 2 이상의 비관련 인간 가변 영역으로부터의 인간 생식계열 또는 비-생식계열 서열을 포함하는 가변 영역을 갖는 항체를 의미한다. 복합 인간 항체는 인체에서 복합 인간 항체의 항원성이 감소되기 때문에 본 발명에 따른 치료제에서 효과적인 성분으로서 유용하다.

[0050] 본원에서 사용될 때, 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 모든 인간 항체, 예를 들어 (a) 인간 면역글로불린 유전자에 대해 트랜스제닉 (transgenic) 또는 트랜스염색체 (transchromosomal)인 동물 (예를 들어, 마우스) 또는 그로부터 제조된 하이브리도마로부터 단리된 항체 (하기 섹션 I에 추가로 설명됨), (b) 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포, 예를 들어 트랜스펙토마 (transfectoma)로부터 단리된 항체, (c) 재조합, 조합 (combinatorial) 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 및 (d) 인간 면역글로불린 유전자 서열의 다른 DNA 서열에 대한 스플라이싱을 수반하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체를 포함한다. 상기 재조합 인간 항체는 인간 생식계열 및/또는 비- 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나, 특정 실시양태에서, 상기 재조합 인간 항체는 시험관내 돌연변이 유발 (또는, 인간 Ig 서열에 트랜스제닉인 동물이 사용될 때, 생체내 체세포 돌연변이 유발)에 적용될 수 있고, 따라서 재조합 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열은 인간 생식계열 V_H 및 V_L 서열로부터 유도되고 이에 관련되지만 천연적으로 생체 내에서 인간 항체 생식계열 레퍼토리 (repertoire) 내에 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0051] 본원에서 사용될 때, 용어 "이종성 항체"는 상기 항체를 생산하는 트랜스제닉 비-인간 유기체에 관련하여 규정된다. 상기 용어는 트랜스제닉 비-인간 동물로 구성되지 않은, 일반적으로 트랜스제닉 비-인간 동물과 다른 종으로부터의 유기체에서 발견되는 것에 대응하는 아미노산 서열 또는 코딩 핵산 서열을 갖는 항체를 의미한다.

[0052] 본원에서 사용될 때, 용어 "K_D"는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 의미하고자 의도된다.

[0053] 본원에서 사용될 때, 용어 "특이적인 결합"은 소정의 항원에 대한 항체 결합을 의미한다. 일반적으로, 항체는 분석물로서 재조합 인간 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2를, 리간드로서 항체를 사용하여 BIACORE 3000 기기에서 표면

플라스몬 공명 (SPR) 기술에 의해 결정시에 약 10^{-7} M 미만, 예를 들어 약 $^{-8}$ M, 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 미만 또는 훨씬 더 낮은 친화도 (K_D)로 결합하고, 소정의 항원 또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 다른 비-특이적 항원 (예를 들어, BSA, 카제인)에 대한 그의 친화도보다 적어도 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 2.0배, 2.5배, 3.0배, 3.5배, 4.0배, 4.5배, 5.0배, 6.0배, 7.0배, 8.0배, 9.0배, 또는 10.0배 또는 이보다 더 큰 친화도로 소정의 항원에 결합한다. 구문 "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"는 용어 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"와 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.

[0054] 본원에서 사용될 때, 용어 "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 항체 클래스 (예를 들어, IgM 또는 IgG1)를 의미한다.

[0055] 본원에서 사용될 때, 용어 "글리코실화 패턴"은 단백질, 보다 구체적으로 면역글로불린 단백질에 공유 부착되는 탄수화물 단위의 패턴으로서 규정된다. 당업자가 이종성 항체의 글리코실화 패턴을, 도입유전자의 CH 유전자가 그로부터 유도되는 종에서보다 비인간 트랜스제닉 동물의 종에서의 글리코실화 패턴과 보다 유사한 것으로 인식할 때, 이종성 항체의 글리코실화 패턴은 비인간 트랜스제닉 동물의 종에 의해 생산되는 항체에서 천연적으로 발생하는 글리코실화 패턴에 실질적으로 유사한 것으로 특성화될 수 있다.

[0056] 본원에서 사용될 때, 사물에 대해 적용되는 용어 "천연 생성"은 사물이 자연에서 발견될 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 자연에서 공급원으로부터 단리될 수 있는 유기체 (바이러스 포함)에 존재하고 실험실에서 인간에 의해 의도적으로 변형되지 않은 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 천연 생성되는 것이다.

[0057] 본원에서 사용될 때, 용어 "재배열된"은 V 세그먼트가 각각 본질적으로 완전한 V_H 및 V_L 도메인을 코딩하는 입체형태로 D-J 또는 J 세그먼트에 바로 인접하여 위치하는 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린 로커스의 입체형태를 의미한다. 재배열된 면역글로불린 유전자 로커스는 생식계열 DNA와의 비교에 의해 확인될 수 있고; 재배열된 로커스는 적어도 하나의 재조합된 칠량체/구량체 상동성 요소를 가질 것이다.

[0058] 본원에서 사용될 때, V 세그먼트와 관련하여 용어 "비재배열된" 또는 "생식계열 입체형태"는 V 세그먼트가 D 또는 J 세그먼트에 바로 인접하도록 재조합되지 않은 입체형태를 의미한다.

[0059] 본원에서 사용될 때, 용어 "핵산 분자"는 DNA 분자 및 RNA 분자를 포함하도록 의도된다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있지만, 바람직하게는 이중 가닥 DNA이다.

[0060] 본원에서 사용될 때, PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2에 결합하는 항체 또는 항체 부분 (예를 들어, V_H, V_L, CDR3)을 코딩하는 핵산과 관련하여 용어 "단리된 핵산 분자"는 항체 또는 항체 부분을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 각각 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 이외의 다른 항원에 결합하는 항체 또는 항체 부분을 코딩하는 다른 뉴클레오티드 서열이 존재하지 않는 핵산 분자를 의미하고자 의도되고, 여기서 다른 서열은 천연에서 인간 게놈 DNA에서 상기 핵산의 측면에 위치할 수 있다. 도 2-7은 각각 본 발명의 인간 항-PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 항체의 중쇄 (V_H) 및 경쇄 (V_L) 가변 영역을 포함하는 뉴클레오티드 및 아미노산 서열에 대응한다.

[0061] 본 발명은 또한 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되거나 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합 특징에 유의하게 영향을 미치거나 변경하지 않는 뉴클레오티드 및 아미노산 서열 변형을 비롯하여 도면 (예를 들어, 도 2-7)에 제시된 서열의 "보존적 서열 변형"을 포함한다. 상기 보존적 서열 변형은 뉴클레오티드 및 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함한다. 변형은 당업계에 공지된 표준 기술, 예를 들어 부위 지정 돌연변이 유발 및 PCR-매개 돌연변이 유발에 의해 도면 (예를 들어, 도 2-7)에 제시된 서열 내로 도입될 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 교체된 것을 포함한다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당업계에 규정되어 있다. 상기 패밀리는 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지형 측쇄 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다. 따라서, 인간 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-PD-L2 항체에서 예측된 비필수 아미노산 잔기는 바람직하게는 동일한 측쇄 패밀리의 다른 아미노산 잔기로 교체된다.

[0062] 별법으로, 다른 실시양태에서, 돌연변이는 예를 들어 포화 돌연변이 유발에 의해 인간 항-PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 항체 코딩 서열의 전부 또는 일부를 따라 무작위로 도입될 수 있고, 생성되는 변형된 인간 항-PD-1, 항-

PD-L1, 또는 항-PD-L2 항체는 결합 활성에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0063] 따라서, 본원에 개시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 및/또는 본원에 개시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 항체 (예를 들어, 도 2-7)는 보존적으로 변형된 유사한 서열에 의해 코딩되거나 유사한 포함하는 실질적으로 유사한 항체를 포함한다. 또한, 상기 실질적으로 유사한 항체를 본원에 개시된 서열 (즉, 중쇄 및 경쇄 가변 영역) (예를 들어, 도 2-7)을 기초로 하여 생성시킬 수 있는 방법에 대한 추가의 논의가 아래에 제시된다.

[0064] 또한, 유전자 코드 (아래 제시됨)에 의해 규정된 바와 같이, 특정 단백질의 아미노산 서열과 단백질을 코딩할 수 있는 뉴클레오티드 서열 사이의 공지된 명확한 대응관계가 존재한다. 마찬가지로, 유전자 코드에 의해 규정된 바와 같이, 특정 핵산의 뉴클레오티드 서열과 핵산에 의해 코딩되는 아미노산 서열 사이의 공지된 명확한 대응관계가 존재한다.

유전자 코드	
알라닌 (Ala, A)	GCA, GCC, GCG, GCT
아르기닌 (Arg, R)	AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT
아스파라긴 (Asn, N)	AAC, AAT
아스파르트산 (Asp, D)	GAC, GAT
시스테인 (Cys, C)	TGC, TGT
글루탐산 (Glu, E)	GAA, GAG
글루타민 (Gln, Q)	CAA, CAG
글리신 (Gly, G)	GGA, GGC, GGG, GGT
히스티딘 (His, H)	CAC, CAT
이소류신 (Ile, I)	ATA, ATC, ATT
류신 (Leu, L)	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
리신 (Lys, K)	AAA, AAG
메티오닌 (Met, M)	ATG
페닐알라닌 (Phe, F)	TTC, TTT
프롤린 (Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT
세린 (Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
트레오닌 (Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT
트립토판 (Trp, W)	TGG
티로신 (Tyr, Y)	TAC, TAT
발린 (Val, V)	GTA, GTC, GTG, GTT
종결 신호 (종료)	TAA, TAG, TGA

[0065]

[0066] 유전자 코드의 중요하고 잘 공지된 특징은, 그에 의해 단백질 제조에 사용되는 대부분의 아미노산에 대해 하나 초과의 코딩 뉴클레오티드 3중체 (triplet)가 사용될 수 있는 그의 중복성 (redundancy)이다 (상기 예시됨). 따라서, 많은 상이한 뉴클레오티드 서열이 제시된 아미노산 서열을 코딩할 수 있다. 상기 뉴클레오티드 서열은 모든 유기체에서 동일한 아미노산 서열의 생산을 유도하기 때문에 기능적으로 동등한 것으로 간주된다 (특정 유기체가 다른 유기체보다 일부 서열을 보다 효율적으로 번역할 수 있지만). 또한, 때때로, 퓨린 또는 피리미딘의 메틸화된 변이체가 제시된 뉴클레오티드 서열에서 발견될 수 있다. 이러한 메틸화는 트리뉴클레오티드 코돈과 상응하는 아미노산 사이의 코딩 관계에 영향을 주지 않는다.

[0067] 핵산에 대해, 용어 "실질적인 상동성"은 2개의 핵산, 또는 지정된 서열이 뉴클레오티드를 적절하게 삽입하고 결실시키면서 최적으로 정렬되어 비교될 때, 적어도 약 80%의 뉴클레오티드, 대체로 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% 이상의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 적어도 약 97%, 98%, 99% 이상의 뉴클레오티드에서 동일함을 나타낸다. 별법으로, 실질적인 상동성은 세그먼트가 선택적인 혼성화 조건 하에서 가닥의 보체에 혼성화할 때 존재한다.

[0068] 두 서열 사이의 동일성 %는 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭 (gap)의 수 및 각각의 갭의 길이를 고려하면서 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이다 (즉, % 동일성 = 동일한 위치의 #/위치의 총 # x 100). 서열의 비교 및 두 서열 사이의 동일성 % 결정은 아래 비-제한적인 예에서 설명되는 바와 같이 수학적 알고리즘을 사용하여 수행할 수 있다.

[0069] 두 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성 %는 NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 갭 가중치 40, 50, 60, 70, 또는 80 및

길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6을 사용하여 GCG 소프트웨어 패키지 (GCG 컴퍼니의 인터넷 웹사이트에서 입수가능함)의 GAP 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다. 두 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 동일성 %는 또한 PAM120 가중치 잔기 표, 갭 길이 페널티 12 및 갭 페널티 4를 사용하여 ALIGN 프로그램 (버전 2.0) 내에 통합된 문헌 [E. Meyers and W. Miller (CABIOS, 4:11 17 (1989))]의 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다. 또한, 두 아미노산 서열 사이의 동일성 비율은 Blosum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 갭 가중치 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4 및 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6을 사용하여 GCG 소프트웨어 패키지 (GCG 컴퍼니의 인터넷 웹사이트에서 입수가능함) 내의 GAP 프로그램에 통합된 문헌 [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444 453 (1970))] 알고리즘을 사용하여 결정할 수 있다.

[0070] 본 발명의 핵산 및 단백질 서열은 추가로 예를 들어 관련 서열을 확인하기 위해 공공 데이타베이스에 대한 검색을 수행하기 위한 "질의 (query) 서열"로서 사용될 수 있다. 상기 검색은 문헌 [Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 (버전 2.0)을 사용하여 수행할 수 있다. BLAST 뉴클레오티드 검색은 본 발명의 핵산 분자에 상동성인 뉴클레오티드 서열을 얻기 위해 NBLAST 프로그램, 스코어 (score)=100, 문자 길이=12를 사용하여 수행할 수 있다. BLAST 단백질 검색은 본 발명의 단백질 분자에 상동성인 아미노산 서열을 얻기 위해 XBLAST 프로그램, 스코어=50, 문자 길이=3을 사용하여 수행할 수 있다. 비교를 위한 갭 도입 정렬을 얻기 위해, Gapped BLAST가 문헌 [Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402]에 기재된 바와 같이 이용될 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 이용할 때, 각각의 프로그램 (예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터가 사용될 수 있다 (NCBI의 인터넷 웹사이트에서 입수가능함).

[0071] 핵산은 전체 세포, 세포 용해물, 또는 부분적으로 정제된 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있다. 핵산은 표준 기술, 예를 들어 알칼린/SDS 처리, CsCl 밴딩 (banding), 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기영동 및 당업계에 공지된 다른 기술에 의해 다른 세포 성분 또는 다른 오염물질, 예를 들어, 다른 세포 핵산 또는 단백질로부터 정제될 때 "단리된" 또는 "실질적으로 순수하게 된" 것이다 (문헌 [F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)] 참조).

[0072] 종종 천연 서열 (변형된 제한 부위 등 제외)의 cDNA, 게놈 또는 그의 혼합물로부터 본 발명의 핵산 조성물은 유전자 서열을 제공하기 위해 표준 기술에 따라 돌연변이될 수 있다. 코딩 서열의 경우, 상기 돌연변이는 목적하는 아미노산 서열에 영향을 줄 수 있다. 특히, 천연 V, D, J, 불변, 스위치 (switch) 및 본원에서 설명되는 다른 상기 서열에 실질적으로 상동성이거나 이로부터 유도되는 DNA 서열이 고려된다 (여기서, "유도되는"은 서열이 다른 서열과 동일하거나 이로부터 변형됨을 나타낸다).

[0073] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 위치할 때 "작동가능하게 연결된" 것이다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 줄 때 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 전사 조절 서열의 경우, 작동가능하게 연결된은 연결되는 DNA 서열이 인접하고, 두 단백질 코딩 영역을 연결하는 것이 필요한 경우에는 인접하고 해독 프레임으로 존재함을 의미한다. 스위치 서열의 경우, 작동가능하게 연결된은 서열이 스위치 재조합을 수행할 수 있음을 나타낸다.

[0074] 본원에서 사용될 때, 용어 "벡터"는, 그가 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 나타내고자 의도된다. 한 종류의 벡터는 추가의 DNA 세그먼트가 그 내부에 라이게이팅될 수 있는 환상 이중 가닥 DNA 루프를 나타내는 "플라스미드"이다. 다른 종류의 벡터는 추가의 DNA 세그먼트가 바이러스 게놈 내로 라이게이팅될 수 있는 바이러스 벡터이다. 특정 벡터는 그 벡터가 내부로 도입되는 숙주 세포에서 자가 복제될 수 있다 (예를 들어, 세균 복제 기점을 갖는 세균 벡터 및 에피좀성 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예를 들어, 비-에피좀성 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입시에 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 작동가능하게 연결되는 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 상기 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 간단히 "발현 벡터")로 언급된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태이다. 본원에서, 플라스미드가 가장 일반적으로 사용되는 형태의 벡터이기 때문에 "플라스미드" 및 "벡터"는 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 수행하는 다른 형태의 발현 벡터, 예를 들어 바이러스 벡터 (예를 들어, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스)를 포함하고자 의도된다.

[0075] 본원에서 사용될 때, 용어 "재조합 숙주 세포" (또는 간단히 "숙주 세포")는 재조합 발현 벡터가 그 내부로 도입된 세포를 나타내고자 의도된다. 상기 용어는 특정 대상체 세포뿐만 아니라 상기 세포의 자손체도 나타내고

자 의도됨을 이해하여야 한다. 특정 변형이 돌연변이 또는 환경적 영향 때문에 후속 세대에서 발생할 수 있기 때문에, 상기 자손체는 사실상 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 본원에서 사용되는 용어 "숙주 세포"의 범위 내에 계속 포함된다.

[0076] 본원에서 사용될 때, 용어 "대상체"는 임의의 인간 또는 비-인간 동물을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 방법 및 조성물은 염증성 질병, 예를 들어 관절염, 예를 들어, 류마티스 관절염이 있는 대상체의 치료를 위해 사용될 수 있다. 용어 "비-인간 동물"은 모든 척추동물, 예를 들어, 포유동물 및 비-포유동물, 예를 들어 비-인간 영장류, 양, 돼지, 소, 닭, 양서류, 양서류 등을 포함한다.

[0077] 본원에서 사용될 때, 용어 "조정하다"는 상향-조절 및 하향-조절, 예를 들어, 반응의 향상 또는 억제를 포함한다.

[0078] 본원에서 사용될 때, 용어 "억제하다"는 예를 들어 특정 작용, 기능, 또는 상호작용의 감소, 제한 또는 차단을 포함한다.

[0079] 본원에서 사용될 때, 용어 "면역 세포"는 면역 반응에서 기능을 수행하는 세포를 의미한다. 면역 세포는 조혈 기원의 세포이고, 림프구, 예를 들어 B 세포 및 T 세포; 내추럴 킬러 세포; 골수성 세포, 예를 들어 단핵구, 대식세포, 호산구, 비만 세포, 호염기구, 및 과립구를 포함한다.

[0080] 본원에서 사용될 때, 용어 "T 세포"는 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 포함한다. 또한, 용어 T 세포는 T 헬퍼 1 타입 T 세포, T 헬퍼 2 타입 T 세포, T 헬퍼 17 타입 T 세포 및 억제성 T 세포를 포함한다. 용어 "항원 제시 세포"는 전문 항원 제시 세포 (예를 들어, B 림프구, 단핵구, 수지상 세포, 랑게르한스 (Langerhans) 세포) 및 다른 항원 제시 세포 (예를 들어, 각질세포, 내피 세포, 성상세포, 섬유모세포, 희소돌기아교세포)를 포함한다.

[0081] 본원에서 사용될 때, 용어 "면역 반응"은 T 세포 동시자극의 조정에 의해 영향받는 T 세포 매개 및/또는 B 세포 매개 면역 반응을 포함한다. 예시적인 면역 반응은 T 세포 반응, 예를 들어, 사이토킨 생산, 및 세포성 세포독성을 포함한다. 또한, 용어 면역 반응은 T 세포 활성화에 의해 간접적으로 영향받는 면역 반응, 예를 들어 항체 생산 (체액성 반응) 및 사이토킨 반응성 세포, 예를 들어, 대식세포의 활성화를 포함한다.

[0082] 본원에서 사용될 때, 활성화된 면역 세포와 관련하여 사용되는 용어 "동시자극하다"는 증식 및/또는 효과기 기능을 유도하는 제2의 비-활성화 수용체 매개 신호 ("동시자극 신호")를 제공하는 동시자극성 폴리펩티드의 능력을 포함한다. 예를 들어, 동시자극 신호는 예를 들어 T 세포-수용체-매개 신호를 받은 T 세포에서 사이토킨 분비를 유발할 수 있다. 예를 들어 활성화 수용체를 통해 세포-수용체 매개 신호를 받은 면역 세포는 본원에서 "활성화된 면역 세포"로 언급된다.

[0083] 본원에서 사용될 때, 용어 "억제성 신호"는 면역 세포 상의 폴리펩티드에 대한 억제 수용체 (예를 들어, CTLA4 또는 PD-1)를 통해 전달되는 신호를 의미한다. 그러한 신호는 활성화 수용체를 통한 (예를 들어, TCR 또는 CD3 폴리펩티드를 통한) 신호를 길항하고, 예를 들어 제2 메신저 생성의 억제; 증식의 억제; 면역 세포에서 효과기 기능의 억제, 예를 들어, 포식작용의 감소, 항체 생산의 감소, 세포성 세포독성의 감소, 면역 세포의 매개인자 (예를 들어 사이토킨 (예를 들어, IL-2) 및/또는 알레르기 반응의 매개인자) 생성 실패; 또는 무반응 (anergy) 발생을 야기할 수 있다.

[0084] 본원에서 사용될 때, 용어 "비반응성 (unresponsiveness)"에는 자극, 예를 들어 활성화 수용체 또는 사이토킨을 통한 자극에 대한 면역 세포의 불응성이 포함된다. 비반응성은 예를 들어 면역억제제에 대한 노출 또는 고용량의 항원에 대한 노출로 인해 일어날 수 있다. 본원에 사용되는 용어 "무반응" 또는 "내성 (tolerance)"에는 활성화 수용체-매개 자극에 대한 불응성이 포함된다. 그러한 불응성은 일반적으로 항원-특이적이고, 내성 항원에 대한 노출이 중단된 후에도 지속된다. 예를 들어, (비반응성과 달리) T 세포 내 무반응은 사이토킨 생산, 예를 들어 IL-2의 결여라는 특징을 갖는다. T 세포 무반응은, T 세포가 항원에 노출되어, 제2 신호(동시자극 신호)의 부재 하에 제1 신호 (T 세포 수용체 또는 CD-3 매개 신호)를 수용할 때 일어난다. 이 조건 하에서, 세포의 동일 항원에 대한 재노출은 (재노출이 동시자극성 분자의 존재 하에 일어나는 경우에도) 사이토킨이 생산되지 못하고, 이에 따라 증식하지 못한다. 그러나, 무반응 T 세포는 사이토킨 (예를 들어, IL-2)과 배양 시에 증식할 수 있다. 예를 들어, T 세포 무반응은 또한 ELISA 또는 지시자 세포주를 이용한 증식 분석에 의해 측정시에, T 림프구에 의한 IL-2 생산의 결여에 의해 관찰될 수 있다. 별법으로, 리포터 유전자 구성체가 사용될 수 있다. 예를 들어, 무반응 T 세포는 5' IL-2 유전자 인핸서의 제어 하의 이종성 프로모터에 의해, 또는 인핸서 내에서 발견될 수 있는 AP1 서열의 다량체에 의해 유도되는 IL-2 유전자 전사를 개시하지 못한다 (Kang et al. (1992) Science 257:1134).

[0085] 본원에서 사용될 때, 폴리펩티드, 예를 들어, PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 폴리펩티드에 대해 사용되는 용어 "활성"은 단백질 구조에 고유한 활성을 포함한다. 예를 들어, PD-1 리간드에 대해 용어 "활성"은 면역 세포 동시자극을 조정하거나 (예를 들어 활성화된 면역 세포에서 동시자극 신호의 조정에 의해) 또는 면역 세포에서 억제성 신호를 조정함으로써 억제를 조정하는 (예를 들어, 면역 세포 상의 천연 수용체에 결합함으로써) 능력을 포함한다. 당업자는 PD-1 리간드 폴리펩티드가 동시자극성 수용체에 결합할 때, 동시자극 신호가 면역 세포에서 생성됨을 알 것이다. PD-1 리간드 폴리펩티드가 억제 수용체에 결합할 때, 억제성 신호가 면역 세포에서 생성된다. 또한, PD-1 리간드가 B7-1 폴리펩티드에 결합할 때, 억제성 신호가 생성될 수 있다 (Butte et al. (2007) Immunity 27:111).

[0086] PD-1에 대해, 용어 "활성"은 예를 들어 천연 PD-1 리간드를 항원 제시 세포 상에 결합시킴으로써 면역 세포에서 억제성 신호를 조정하는 PD-1 폴리펩티드의 능력을 포함한다. PD-1은 CTLA4와 유사한 방식으로 면역 세포에 억제성 신호를 전달한다. 면역 세포에서 억제성 신호의 조정은 면역 세포의 증식 및/또는 면역 세포에 의한 사이토킨 분비의 조정을 야기한다. 따라서, 용어 "PD-1 활성"은 PD-1 폴리펩티드가 그의 천연 리간드(들)에 결합하는 능력, 면역 세포 동시자극성 또는 억제성 신호를 조정하는 능력, 및 면역 반응을 조정하는 능력을 포함한다.

[0087] 본원에서 사용될 때, 두 분자 사이의 상호작용을 언급할 때 용어 "상호작용"은 분자가 서로 물리적으로 접촉 (예를 들어, 결합)하는 것을 의미한다. 일반적으로, 상기 상호작용은 상기 분자의 하나 또는 둘 모두의 활성 (생물학적 효과를 생성하는)을 유발한다. 활성은 분자의 하나 또는 둘 모두의 직접적인 활성 (예를 들어, 신호 전달)일 수 있다. 별법으로, 상호작용에서 분자의 하나 또는 둘 모두는 리간드 결합이 억제될 수 있고, 따라서 리간드 결합 활성 (예를 들어, 그의 리간드에 대한 결합 및 동시자극의 촉발 또는 억제)에서 불활성으로 유지될 수 있다. 상기 상호작용의 억제는 상호작용에 관여하는 하나 이상의 분자의 활성을 붕괴시킨다. 상기 상호작용의 향상은 상기 물리적 접촉 가능성의 연장 또는 증가 및 상기 활성의 가능성의 연장 또는 증가이다.

[0088] 본원에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태 ("a", "an", 및 "the")는 문맥상 분명하게 다른 의미를 나타내지 않는 한 복수 참조물을 포함한다.

[0089] 본원에서 설명되는 본 발명의 측면 및 실시양태는 그 측면 및 실시양태로 "구성되고/되거나", "본질적으로 구성되는" 것으로 이해된다.

[0090] 본 발명의 다양한 측면이 다음 하위 섹션에서 추가로 설명된다

[0091] I. 단리된 핵산 분자

[0092] 본 발명의 한 측면은 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것) 또는 그의 생물학적 활성 부분, 및 이들 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 확인하기 위한 혼성화 프로브로서 사용하기 충분한 핵산 단편 및 핵산 분자의 증폭 또는 돌연변이를 위한 PCR 프라이머로서 사용하기 위한 단편에 관한 것이다. 본원에서 사용될 때, 용어 "핵산 분자"는 DNA 분자 (예를 들어, cDNA 또는 게놈 DNA) 및 RNA 분자 (예를 들어, mRNA) 및 뉴클레오티드 유사체를 사용하여 생성된 DNA 또는 RNA의 유사체를 포함하는 것으로 의도된다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있지만, 이중 가닥 DNA가 바람직하다.

[0093] 용어 "단리된 핵산 분자"는 핵산의 천연 공급원에 존재하는 다른 핵산 분자로부터 분리된 핵산 분자를 포함한다. 예를 들어, 게놈 DNA에 대해, 용어 "단리된"은 게놈 DNA가 천연에서 그와 회합하는 염색체로부터 분리된 핵산 분자를 포함한다. 바람직하게는, "단리된" 핵산 분자에는 핵산이 그로부터 유도되는 유기체의 게놈 DNA 내의 핵산의 측면에 천연적으로 인접하는 서열 (즉, 핵산 분자의 5' 및 3' 말단부에 위치하는 서열)이 존재하지 않는다. 예를 들어, "단리된" 핵산 분자, 예를 들어 cDNA 분자에는 재조합 기술에 의해 생산될 때 다른 세포 물질, 또는 배양 배지가 실질적으로 존재하지 않을 수 있거나, 또는 화학적으로 합성될 때 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 존재하지 않을 수 있다.

[0094] 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것), 또는 그의 일부는 본원에서 제공되는 표준 분자 생물학 기술 및 서열 정보를 사용하여 단리될 수 있다. 예를 들어, 도 2-7에 제시된 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 핵산 분자는 도 2-7에 제시된 서열을 기초로 하여 설계된 합성 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 단리될 수 있다.

[0095] 본 발명의 핵산 분자는 주형 (template)으로서 cDNA, mRNA 또는 별법으로 게놈 DNA 및 적절한 올리고뉴클레오티드 프라이머를 표준 PCR 증폭 기술에 따라 사용하여 증폭될 수 있다. 이렇게 증폭된 핵산 분자를 적절한 벡터 내로 클로닝하고, DNA 서열 분석에 의해 특성을 결정할 수 있다. 또한, 본 발명의 핵산 서열에 상응하는 올리

고뉴클레오티드는 표준 합성 기술에 의해, 예를 들어, 자동 DNA 합성기를 사용하여 제조될 수 있다.

[0096] 다른 실시양태에서, 본 발명의 단리된 핵산 분자는 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것)의 보체, 또는 그의 일부인 핵산 분자를 포함한다. 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것)에 상보성인 핵산 분자, 또는 그의 일부는 도 2-7에 제시된 각각의 뉴클레오티드 서열에 혼성화하여 안정한 이중체를 형성할 수 있도록 도 2-7에 제시된 뉴클레오티드 서열에 충분히 상보성인 것이다.

[0097] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 단리된 핵산 분자는 도 2-7에 제시된 뉴클레오티드 서열의 전체 길이에 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 임의의 뉴클레오티드 서열의 일부를 포함한다.

[0098] 또한, 본 발명의 핵산 분자는 단지 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것)의 일부, 또는 그의 일부, 예를 들어 프로브 또는 프라이머로서 사용될 수 있는 단편 또는 본 발명의 폴리펩티드, 예를 들어, 도 2-7의 것의 일부를 코딩하는 단편을 포함할 수 있다. 프로브/프라이머는 일반적으로 실질적으로 정제된 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것)의; 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것)의 안티-센스 서열의; 또는 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것)의 돌연변이체의 적어도 약 12 또는 15, 바람직하게는 약 20 또는 25, 보다 바람직하게는 약 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 또는 75개의 연속적인 뉴클레오티드에 엄격한 조건 하에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열의 영역을 포함한다.

[0099] 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것)를 기초로 한 프로브는 동일한 또는 상동성 폴리펩티드를 코딩하는 전사체 또는 게놈 서열을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 프로브는 그에 부착된 표지기추가로 포함할 수 있고, 예를 들어 표지기는 방사성 동위원소, 형광 화합물, 효소, 또는 효소 보조인자일 수 있다.

[0100] "본 발명의 폴리펩티드의 생물학적 활성 부분"을 코딩하는 핵산 단편은 본 발명의 폴리펩티드의 생물학적 활성 (예를 들어, 그의 항원성 표적에 결합하는 능력)을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것)의 뉴클레오티드 서열의 일부를 단리하고, 본 발명의 폴리펩티드의 코딩되는 부분을 발현시키고 (예를 들어, 시험관 내에서 재조합 발현에 의해), 본 발명의 폴리펩티드의 코딩되는 부분의 활성을 평가함으로써 제조될 수 있다.

[0101] 본 발명은 추가로 유전자 코드의 다의성에 의해 도 2-7에 제시된 뉴클레오티드 서열(들)과 상이하지만 도 2-7에 제시된 각각의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 것과 동일한 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 단리된 핵산 분자는 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7의 것)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다.

[0102] 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것)의 상동체에 대응하는 핵산 분자는 엄격한 혼성화 조건 하에 표준 혼성화 기술에 따라 본원에 개시된 cDNA 또는 그의 일부를 혼성화 프로브로서 사용하여 본원에 개시된 핵산에 대한 그의 상동성을 기초로 하여 단리될 수 있다.

[0103] 따라서, 다른 실시양태에서, 본 발명의 단리된 핵산 분자는 길이가 적어도 15, 20, 25, 30개 이상의 뉴클레오티드이고, 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것)를 포함하는 핵산 분자에 엄격한 조건 하에 혼성화한다.

[0104] 본원에서 사용될 때, 용어 "엄격한 조건 하에 혼성화하다"는 서로 유의하게 동일하거나 상동성인 뉴클레오티드 서열이 서로 혼성화된 상태로 유지되는 혼성화 및 세척 조건을 설명하기 위한 것이다. 바람직하게는, 조건은 서로 적어도 약 70%, 보다 바람직하게는 적어도 약 80%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 85% 또는 90% 동일한 서열이 서로 혼성화된 상태로 유지되는 조건이다. 상기 엄격한 조건은 당업자에게 알려져 있고, 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc. (1995), sections 2, 4 and 6]에서 볼 수 있다. 추가의 엄격한 조건은 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), chapters 7, 9 and 11]에서 볼 수 있다. 엄격한 혼성화 조건의 비-제한적인 예는 약 65-70℃에서 4x 또는 6x 염화나트륨/시트르산나트륨 (SSC) 내에서의 혼성화 (또는 약 42-50℃에서 4x SSC + 50% 포름아미드 내에서의 혼성화), 이어서 약 65-70℃에서 1x SSC 내에서의 1회 이상의 세척을 포함한다. 엄격한 혼성화 조건의 추가의 비제한적인 예는 45℃에서 6x SSC 내에서의 혼성화, 이어서 65℃에서 0.2x SSC, 0.1% SDS 내에서의 1회 이상의 세척을 포함한다. 고도로 엄격한 혼성화 조건의 비-제한적인 예는 약 65-70℃에서 1x SSC 내에서의 혼성화 (또는 약 42-50℃에서 1x SSC + 50% 포름아미드 내에서의 혼성화), 이어서 약 65-70℃에서 0.3x SSC 내에서의 1회 이상의 세척을 포함한다. 엄격성이 감소된

혼성화 조건의 비-제한적인 예는 약 50-60℃에서 4x 또는 6x SSC 내에서의 혼성화 (또는, 별법으로 약 40-45℃에서 6x SSC + 50% 포름아미드 내에서의 혼성화), 이어서 약 50-60℃에서 2x 내에서의 1회 이상의 세척을 포함한다. 상기 언급된 값의 중간 범위, 예를 들어 65-70℃ 또는 42-50℃도 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다. SSPE (1x SSPE는 0.15M NaCl, 10 mM NaH_2PO_4, 및 1.25 mM EDTA, pH 7.4임)가 혼성화 및 세척 버퍼에서 SSC (1x SSC는 0.15M NaCl 및 15 mM 시트르산나트륨임)를 대체할 수 있고; 세척은 혼성화가 완료된 후 각각 15분 동안 수행된다. 길이가 50 염기쌍 미만으로 예상되는 하이브리드에 대한 혼성화 온도는 하이브리드의 용융 온도 (T_m)보다 5-10℃ 더 낮아야 하고, 여기서 T_m은 다음 식에 따라 결정된다. 길이가 18 염기쌍 미만인 하이브리드의 경우, T_m (℃) = 2(A+T 염기의 #)+4(G+C 염기의 #). 길이가 18 내지 49 염기쌍인 하이브리드의 경우, T_m (℃) =81.5+16.6($\log_{10}[Na^+]$)+0.41(%G+C)-(600/N)이고, 여기서 N은 하이브리드 내의 염기의 수이고, $[Na^+]$는 혼성화 버퍼 내의 나트륨 이온의 농도이다 (1x SSC에 대한 $[Na^+]$=0.165 M). 또한, 막, 예를 들어 니트로셀룰로스 또는 나일론 막에 대한 핵산 분자의 비-특이적 혼성화를 감소시키기 위해, 차단제 (예를 들어, BSA 또는 연어 또는 청어 정자 담체 DNA), 세제 (예를 들어, SDS), 킬레이팅제 (예를 들어, EDTA), 피콜 (Ficoll), PVP 등을 포함하고 이로 제한되지 않는 추가의 시약이 혼성화 및/또는 세척 버퍼에 첨가될 수 있음을 당업자는 알 것이다. 특히 나일론 막을 사용할 때, 엄격한 혼성화 조건의 추가의 비-제한적인 예는 약 65℃에서 0.25-0.5M NaH_2PO_4, 7% SDS 내에서의 혼성화, 이어서 65℃에서 0.02M NaH_2PO_4, 1% SDS (예를 들어, 문헌 [Church and Gilbert (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1991-1995] 참조) (또는 별법으로 0.2x SSC, 1% SDS) 내에서의 1회 이상의 세척이다.

[0105] 당업자는 돌연변이에 의해 변화가 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것) 내로 도입되어, 폴리펩티드의 기능적 능력을 변경하지 않으면서 본 발명의 코딩된 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변경할 수 있음을 추가로 이해할 것이다. 예를 들어, "비-필수" 아미노산 잔기에서 아미노산 치환을 야기하는 뉴클레오티드 치환이 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것)에서 이루어질 수 있다. "비-필수" 아미노산 잔기는 생물학적 활성을 변경하지 않으면서 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것)로부터 변경될 수 있는 잔기이고, "필수" 아미노산 잔기는 생물학적 활성에 필요한 것이다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드 중에서 보존되는 아미노산 잔기, 예를 들어 그의 표적 항원에 대한 폴리펩티드의 결합에 필요한 잔기는 특히 쉽게 변경되지 않을 것으로 예측된다.

[0106] 따라서, 본 발명의 다른 측면은 활성에 필수적이지 않은 아미노산 잔기에 변화를 포함하는 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7의 것)를 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 상기 폴리펩티드는 도 2-7의 것과 아미노산 서열이 상이하지만, 생물학적 활성을 계속 보유한다. 한 실시양태에서, 단리된 핵산 분자는 도 2-7의 것에 적어도 약 71%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0107] 도 2-7의 폴리펩티드에 동일한 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실이 코딩된 폴리펩티드 내에 도입되도록 하나 이상의 뉴클레오티드 치환, 부가 또는 결실을 도 2-7의 뉴클레오티드 서열에 도입함으로써 생성될 수 있다. 돌연변이는 표준 기술, 예를 들어 부위 지정 돌연변이 유발 및 PCR-매개된 돌연변이 유발에 의해 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것) 내로 도입될 수 있다. 한 실시양태에서, 보존적 아미노산 치환은 하나 이상의 예측된 비-필수 아미노산 잔기에서 이루어진다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 교체되는 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당업계에 규정되어 있다. 상기 패밀리는 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄 (예를 들어, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다. 따라서, 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7의 것)에서 예측된 비필수 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리의 다른 아미노산 잔기로 교체될 수 있다. 별법으로, 다른 실시양태에서, 돌연변이는 예를 들어 포화 돌연변이 유발에 의해 본 발명의 핵산 분자(들) (예를 들어, 도 2-7의 것)의 전부 또는 일부를 따라 무작위로 도입될 수 있고, 활성을 보유하는 돌연변이체를 확인하기 위해 생성되는 돌연변이체를 생물학적 활성에 대해 스크리닝할 수 있다. 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것)의 돌연변이 유발 후에, 코딩된 폴리펩티드는 재조합 방식으로 발현될 수 있고, 폴리펩티드의 활성을 결정할 수 있다.

[0108] 한 실시양태에서, 본 발명의 돌연변이체 폴리펩티드는 천연 PD-1 (예를 들어, PD-1 리간드) 또는 PD-1 리간드 파트너 (예를 들어, PD-1 및 B7-1)에 대한 결합 및/또는 그의 활성의 조정, 세포내 또는 세포간 신호전달의 조정, T 림프구의 활성화의 조정, 및/또는 유기체의 면역 반응의 조정 능력에 대해 평가될 수 있다.

[0109] 본 발명의 또 다른 측면은 융합 단백질을 코딩하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7의 것)를 코딩하는 제2 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7의 것)를 코딩하는 제1 뉴클레오티드 서열을 적어도 포함하는 상기 핵산 분자는 표준 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0110] 세포주 또는 미생물 내에서 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것)의 발현 특징은 삽입된 조절 요소가 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것)와 작동가능하게 연결되도록 이종성 DNA 조절 요소를 안정한 세포주 또는 클로닝된 미생물의 게놈 내로 삽입함으로써 변형될 수 있다. 예를 들어, 이종성 조절 요소는 당업자에게 공지되고, 예를 들어 미국 특허 5,272,071 (Chappel); PCT 공개 WO 91/06667 (1991년 5월 16일 공개)에 기재된 표적화된 상동성 재조합과 같은 기술을 사용하여 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7의 것)와 작동가능하게 연결되도록 안정한 세포주 또는 클로닝된 미생물 내로 삽입될 수 있다

[0111] II. 단리된 폴리펩티드 분자

[0112] 본 발명의 한 측면은 본 발명의 단리된 폴리펩티드 (본원에 기재된 항체 및 그의 항원-결합 단편, 및 도 2-7의 것 포함), 및 그의 생물학적 활성 부분에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7의 것), 및 그의 생물학적 활성 부분은 표준 단백질 정제 기술을 사용하여 적절한 정제 계획에 의해 세포 또는 조직 공급원으로부터 단리될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7의 것), 및 그의 생물학적 활성 부분은 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 수 있다. 별법으로, 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7의 것), 및 그의 생물학적 활성 부분은 표준 펩티드 합성 기술을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다.

[0113] "단리된" 또는 "정제된" 폴리펩티드 또는 그의 생물학적 활성 부분에는 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7의 것)가 그로부터 유도되는 세포 또는 조직 공급원으로부터의 세포 물질 또는 다른 오염 단백질이 실질적으로 존재하지 않거나, 또는 화학적으로 합성될 때 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 존재하지 않는다. 용어 "세포 물질이 실질적으로 존재하지 않는"은 폴리펩티드가 그로부터 단리되거나 재조합 방식으로 생산되는 세포의 세포 성분으로부터 폴리펩티드가 분리된, 본 발명의 폴리펩티드(들) (예를 들어, 도 2-7의 것), 및 그의 생물학적 활성 부분의 제제를 포함한다. 한 실시양태에서, 용어 "세포 물질이 실질적으로 존재하지 않는"은 약 30% (건조 중량 기준) 미만의 본 발명의 폴리펩티드가 아닌 단백질 (본원에서 "오염 단백질"로도 언급됨), 보다 바람직하게는 약 20% 미만의 단백질, 훨씬 더 바람직하게는 약 10% 미만의 단백질, 가장 바람직하게는 약 5% 미만의 단백질을 갖는 본 발명의 폴리펩티드(들) (예를 들어, 도 2-7의 것), 및 그의 생물학적 활성 부분의 제제를 포함한다. 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7의 것) 또는 그의 생물학적 활성 부분이 재조합 방식으로 생산될 경우, 폴리펩티드에 배양 배지가 실질적으로 존재하지 않는 것이 바람직하다., 즉, 배양 배지는 단백질 제제 부피의 약 20% 미만, 보다 바람직하게는 약 10% 미만, 가장 바람직하게는 약 5% 미만을 나타낸다.

[0114] 용어 "화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 존재하지 않는"은 폴리펩티드의 합성에 관련되는 화학적 전구체 또는 다른 화학물질로부터 폴리펩티드가 분리된, 본 발명의 폴리펩티드(들) (예를 들어, 도 2-7의 것) 또는 그의 생물학적 활성 부분의 제제를 포함한다. 한 실시양태에서, 용어 "화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 존재하지 않는"은 약 30% (건조 중량 기준) 미만의 화학적 전구체 또는 본 발명의 폴리펩티드가 아닌 단백질, 보다 바람직하게는 약 20% 미만의 화학적 전구체 또는 단백질, 훨씬 더 바람직하게는 약 10% 미만의 화학적 전구체 또는 단백질, 가장 바람직하게는 약 5% 미만의 화학적 전구체 또는 단백질을 갖는 본 발명의 폴리펩티드(들) (예를 들어, 도 2-7의 것), 또는 그의 생물학적 활성 부분의 제제를 포함한다.

[0115] 본원에서 사용되는 바와 같이, 본 발명의 폴리펩티드(들) (예를 들어, 도 2-7의 것)의 "생물학적 활성 부분"은 각각 PD-1과 비-PD-1 분자, PD-L1과 비-PD-L1 분자, 또는 PD-L2와 비-PD-L2 분자, 예를 들어 PD-1의 천연 리간드, 예를 들어, PD-1 리간드, 또는 PD-1 리간드의 천연 리간드, 예를 들어, PD-1 또는 B7-1의 상호작용에 참여하는 폴리펩티드를 포함한다. 본 발명의 폴리펩티드(들) (예를 들어, 도 2-7의 것)의 생물학적 활성 부분은 본 발명의 각각의 전장 폴리펩티드(들) (예를 들어, 도 2-7의 것)보다 더 적은 아미노산을 포함하고 본 발명의 각각의 폴리펩티드(들) (예를 들어, 도 2-7의 것)의 적어도 하나의 활성을 보이는, 본 발명의 폴리펩티드(들) (예를 들어, 도 2-7의 것)의 아미노산 서열에 충분히 동일하거나 그로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 펩티

드를 포함한다. 한 실시양태에서, 생물학적 활성 부분은 항원에 따라 각각 PD-1 또는 PD-L1 리간드에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 도메인 또는 모티프 (항원에 대해 생성되거나 항원에 대해 결합하도록 설계됨)를 포함한다. 본 발명의 폴리펩티드(들) (예를 들어, 도 2-7의 것)의 생물학적 활성 부분은 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2에 의해 매개된 활성, 예를 들어, 면역 세포 활성화 또는 억제를 조정하는 물질의 개발을 위한 표적으로서 사용될 수 있다.

[0116] 다른 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드(들) (예를 들어, 도 2-7의 것)은 도 2-7에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. 다른 실시양태에서, 폴리펩티드는 도 2-7에 제시된 폴리펩티드(들)에 실질적으로 동일하고, 도 2-7에 제시된 각각의 폴리펩티드(들)의 기능적 활성을 보유하지만, 상기 하위섹션 I에서 상세히 설명한 바와 같은 돌연변이 유발에 의해 아미노산 서열이 상이하다. 따라서, 다른 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드(들)은 도 2-7에 제시된 폴리펩티드(들)에 적어도 약 71%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% 97%, 98%, 99%, 99.5%, 또는 99.9% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다.

[0117] 두 아미노산 서열 또는 두 핵산 서열의 동일성 비율을 결정하기 위해서, 서열을 최적 비교를 위해 정렬한다 (예를 들어, 최적 정렬을 위해 제1 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열 중의 하나 또는 둘 모두에 갭이 도입될 수 있고, 동일하지 않은 서열은 비교를 위해 무시될 수 있다). 한 실시양태에서, 비교를 위해 정렬된 참조 서열의 길이는 참조 서열의 길이의 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%, 보다 바람직하게는 적어도 50%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 60%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 또는 99.9%이다. 이어서, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드가 비교된다. 제1 서열의 위치에 제2 서열의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드가 존재할 때, 분자는 그 위치에서 동일하다 (본원에서 사용되는 바와 같이, 아미노산 또는 핵산 "동일성"은 아미노산 또는 핵산 "상동성"과 동등하다). 두 서열 사이의 동일성 비율은 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭의 수 및 각각의 갭의 길이를 고려하면서 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이다.

[0118] 본 발명은 또한 키메라 또는 융합 단백질을 제공한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "키메라 단백질" 또는 "융합 단백질"은 본 발명의 것이 아닌 폴리펩티드에 작동가능하게 연결된 본 발명의 폴리펩티드(들) (예를 들어, 도 2-7의 것)을 포함한다. "본 발명의 폴리펩티드(들)"은 도 2-7에 도시된 폴리펩티드에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 나타내는 한편, "본 발명의 것인 아닌 폴리펩티드"는 도 2-7에 제시된 폴리펩티드에 실질적으로 상동성이 아닌 폴리펩티드에 대응하는 아미노산 서열을 갖지 않는 폴리펩티드, 예를 들어 도 2-7에 제시된 폴리펩티드와 상이하고 동일하거나 상이한 유기체로부터 유도된 폴리펩티드를 의미한다. 융합 단백질에서, 용어 "작동가능하게 연결된"은 본 발명의 폴리펩티드(들) 및 본 발명의 것이 아닌 폴리펩티드(들)이 서로 인-프레임으로 (in-frame) 융합됨을 나타내고자 의도한 것이다. 본 발명의 것이 아닌 폴리펩티드(들)은 본 발명의 폴리펩티드(들)의 N-말단 또는 C-말단에 융합될 수 있고, 본 발명의 폴리펩티드(들)의 용해도, 결합 친화도, 안정성 또는 결합가 (valency)를 변경하는 모이어티 (moiety)에 대응한다.

[0119] 예를 들어, 한 실시양태에서, 융합 단백질은 본 발명의 폴리펩티드(들)의 GST 융합 단백질이다. 상기 융합 단백질은 본 발명의 재조합 폴리펩티드의 정제를 용이하게 할 수 있다. 다른 실시양태에서, 융합 단백질은 그의 N-말단에 이종성 신호 서열을 포함한다. 특정 숙주 세포 (예를 들어, 포유동물 숙주 세포)에서, 본 발명의 폴리펩티드(들)의 발현 및/또는 분비는 이종성 신호 서열을 사용함으로써 증가될 수 있다.

[0120] 본 발명의 키메라 또는 융합 폴리펩티드(들) (예를 들어, 도 2-7의 것)은 표준 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 상이한 폴리펩티드 서열을 코딩하는 DNA 단편은 통상적인 기술에 따라, 예를 들어 라이게이션을 위한 블런트 말단 (blunt-ended) 또는 지그재그 말단 (stagger-ended), 적절한 말단을 제공하기 위한 제한 효소 소화, 돌출 (cohesive) 말단의 충전, 바람직하지 않은 연결을 방지하기 위한 알칼린 포스파타제 처리 및 효소에 의한 라이게이션을 사용하여 함께 인-프레임으로 라이게이팅된다. 다른 실시양태에서, 융합 유전자는 자동화 DNA 합성기를 포함하여 통상적인 기술에 의해 합성될 수 있다. 별법으로, 유전자 단편의 PCR 증폭은 후속적으로 어닐링 (annealing)되고 재증폭되어 키메라 유전자 서열을 생성시킬 수 있는 2개의 연속적인 유전자 단편 사이의 상보성 오버행 (overhang)을 생성시키는 앵커 (anchor) 프라이머를 사용하여 수행될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons: 1992] 참조). 또한, 이미 융합 모이어티 (예를 들어, GST 폴리펩티드)를 코딩하는 많은 발현 벡터가 상업적으로 이용가능하다.

[0121] 당업자는 본원에서 확인된 본 발명의 폴리펩티드(들) (예를 들어, 도 2-7의 것)의 아미노산 서열을 사용하여 본 발명의 폴리펩티드(들) (예를 들어, 도 2-7의 것)에 대응하는 폴리펩티드를 생산할 수 있을 것이다. 상기 폴리

펩티드는 본 발명의 폴리펩티드(들) (예를 들어, 도 2-7의 것)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현에 의해 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 생산될 수 있다. 별법으로, 그러한 펩티드는 화학적 방법에 의해 합성될 수 있다. 재조합 숙주에서 이종성 폴리펩티드의 발현 방법, 폴리펩티드의 화학적 합성, 및 시험관내 번역은 당업계에 공지되어 있고, 본원에 참고로 포함된 문헌 [Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), 2nd Ed., Cold Spring Harbor, N. Y.]; [Berger and Kimmel, Methods in Enzymology, Volume 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (1987), Academic Press, Inc., San Diego, Calif.]; [Merrifield, J. (1969) J. Am. Chem. Soc. 91:501]; [Chaiken I. M. (1981) CRC Crit. Rev. Biochem. 11:255]; [Kaiser et al. (1989) Science 243:187]; [Merrifield, B. (1986) Science 232:342]; [Kent, S. B. H. (1988) Annu. Rev. Biochem. 57:957] 및 [Offord, R. E. (1980) Semisynthetic Proteins, Wiley Publishing]에 추가로 설명되어 있다.

[0122] III. PD-1, PD-L1, 및/또는 PD-L2에 대한 항체

[0123] 본원에 기재된 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2에 대한 항체는 본원에서 설명되거나 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 생산할 수 있다. 본 발명의 모노클로날 항체 (예를 들어, 인간 항체)는 다양한 공지의 기술, 예를 들어 문헌 [Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975)]에 기재된 표준 체세포 혼성화 기술을 사용하여 생산할 수 있다. 체세포 혼성화 절차가 원칙적으로 바람직하지만, 모노클로날 항체의 생산을 위한 다른 기술, 예를 들어, B 림프구의 바이러스 또는 종양형성 (oncogenic) 형질전환, 인간 항체 유전자의 라이브러리를 사용한 파지 디스플레이 기술도 사용될 수 있다.

[0124] 본 발명의 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 생성하는 한 방법은 쥐 시스템이다. 마우스에서 하이브리도마 생산은 면역화된 비장세포의 단리 및 융합을 위한 면역화 프로토콜 및 기술을 비롯하여 당업계에 공지되어 있다.

[0125] 폴리클로날 항체는 적합한 대상체를 폴리펩티드 면역원으로 면역화함으로써 상기 설명된 바와 같이 제조할 수 있다. 면역화된 대상체에서 폴리펩티드 항체 역가는 표준 기술에 의해, 예를 들어 고정된 폴리뉴클레오티드를 사용하는 효소 결합 면역흡착 분석 (ELISA)에 의해 시간에 걸쳐 모니터링될 수 있다. 필요한 경우, 항원에 대해 작용하는 항체는 포유동물 (예를 들어, 혈액)로부터 단리되고, IgG 분획을 얻기 위해 잘 공지된 기술, 예를 들어 단백질 A 크로마토그래피에 의해 추가로 정제될 수 있다. 면역화 후의 적절한 시간에, 예를 들어, 항체 역가가 가장 높을 때, 항체-생산 세포를 대상체로부터 얻고, 표준 기술, 예를 들어 문헌 [Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495-497]에 처음 기재된 하이브리도마 기술 (또한, 문헌 [Brown et al. (1981) J. Immunol. 127:539-46]; [Brown et al. (1980) J. Biol. Chem. 255:4980-83]; [Yeh et al. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. 76:2927-31]; 및 [Yeh et al. (1982) Int. J. Cancer 29:269-75] 참조), 보다 최근의 인간 B 세포 하이브리도마 기술 (Kozbor et al. (1983) Immunol. Today 4:72), EBV-하이브리도마 기술 (Cole et al. (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) 또는 트리오마 (trioma) 기술에 의해 모노클로날 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 모노클로날 항체 하이브리도마를 생산하기 위한 기술은 잘 알려져 있다 (일반적으로, 문헌 [Kenneth, R. H. in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980)]; [Lerner, E. A. (1981) Yale J. Biol. Med. 54:387-402]; [Gefter, M. L. et al. (1977) Somatic Cell Genet. 3:231-36] 참조). 간단히 설명하면, 불멸 세포주 (일반적으로 골수종)를 상기한 바와 같이 면역원으로 면역화된 포유동물로부터의 림프구 (일반적으로 비장세포)에 융합시키고, 생성되는 하이브리도마 세포의 배양 상등액은 폴리펩티드 항원에, 바람직하게는 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 확인하기 위해 스크리닝한다.

[0126] 림프구 및 불멸화 세포주의 융합에 사용되는 임의의 많은 잘 공지된 프로토콜이 항-PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 모노클로날 항체를 생성시키기 위해 적용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Galfre, G. et al. (1977) Nature 266:55052]; [Gefter et al. (1977) 상기 문헌]; [Lerner (1981) 상기 문헌]; [Kenneth (1980) 상기 문헌]). 또한, 당업자는 유용할 수 있는 상기 방법의 많은 변형이 존재함을 이해할 것이다. 일반적으로, 불멸 세포주 (예를 들어, 골수종 세포주)는 림프구와 동일한 포유동물 종으로부터 유도된다. 예를 들어, 쥐 하이브리도마는 본 발명의 면역원성 제제로 면역화된 마우스로부터의 림프구를 불멸화 마우스 세포주와 융합시켜 제조될 수 있다. 바람직한 불멸 세포주는 히포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘 함유 배양 배지 ("HAT 배지")에 감수성인 마우스 골수종 세포주이다. 임의의 많은 골수종 세포주, 예를 들어, P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 또는 Sp2/O-Ag14 골수종 세포주가 표준 기술에 따른 융합 파트너로서 사용될 수 있다. 이들 골수종 세포주는 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션 (American Type Culture Collection (ATCC), 미국 메릴랜드주 록빌)로부터 입수할 수 있다. 일반적으로, HAT-감수성 마우스 골수종 세포는 폴리에틸렌 글리콜 ("PEG")을 사용하여 마우스 비장세포에 융합

된다. 이어서, 융합으로부터 생성되는 하이브리도마 세포는, 비융합되고 비생식가능하게 융합된 골수종 세포를 치사시키는 HAT 배지를 이용하여 선택한다 (비융합된 비장세포는 형질전환되지 않기 때문에 수일 후에 죽는다). 본 발명의 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마 세포는 예를 들어 표준 ELISA 분석을 사용하여 하이브리도마 배양 상등액을 제시된 폴리펩티드에 결합하는 항체에 대해 스크리닝함으로써 검출된다.

[0127] 모노클로날 항체-분비 하이브리도마의 제조를 위한 대안으로서, 상기한 폴리뉴클레오티드의 하나에 특이적인 모노클로날 항체는 재조합 조합 (combinatorial) 면역글로불린 라이브러리 (예를 들어, 항체 파지 디스플레이 라이브러리)를 적절한 폴리펩티드로 스크리닝하여 폴리펩티드에 결합하는 면역글로불린 라이브러리 구성원을 단리함으로써 확인 및 단리될 수 있다. 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고 스크리닝하기 위한 키트는 상업적으로 이용가능하다 (예를 들어, 파마시아 재조합 파지 항체 시스템 (Pharmacia Recombinant Phage Antibody System), Catalog No. 27-9400-01; 및 스트라타젠 (Stratagene) SurfZAP™ 파지 디스플레이 키트, Catalog No. 240612). 추가로, 특히 항체 디스플레이 라이브러리의 생성 및 스크리닝에 사용하기 위해 사용될 수 있는 방법 및 시약의 예는 예를 들어 다음에서 볼 수 있다: 미국 특허 5,223,409 (Ladner et al.); 국제 특허 출원 공개 WO 92/18619 (Kang et al.); 국제 특허 출원 공개 WO 91/17271 (Dower et al.); 국제 특허 출원 공개 WO 92/20791 (Winter et al.); 국제 특허 출원 공개 WO 92/15679 (Markland et al.); 국제 특허 출원 공개 WO 93/01288 (Breitling et al.); 국제 특허 출원 공개 WO 92/01047 (McCafferty et al.); 국제 특허 출원 공개 WO 92/09690 (Garrard et al.); 국제 특허 출원 공개 WO 90/02809 (Ladner et al.); [Fuchs et al. (1991) Biotechnology (NY) 9:1369-1372]; [Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85]; [Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281]; [Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12:725-734]; [Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896]; [Clarkson et al. (1991) Nature 352:624-628]; [Gram et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580]; [Garrard et al. (1991) Biotechnology (NY) 9:1373-1377]; [Hoogenboom et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:4133-4137]; [Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982]; 및 [McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554].

[0128] 추가로, 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있는 재조합 항-PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 항체, 예를 들어 키메라, 복합, 및 인간화된 모노클로날 항체가 생성될 수 있다. 상기 키메라, 복합, 및 인간화된 모노클로날 항체는 당업계에 공지된 재조합 DNA 기술, 예를 들어 다음 문헌에 기재된 방법을 사용하여 생산될 수 있다: 국제 특허 출원 공개 PCT/US86/02269 (Robinson et al.); 유럽 특허 출원 184,187 (Akira et al.); 유럽 특허 출원 171,496 (Taniguchi, M.); 유럽 특허 출원 173,494 (Morrison et al.); PCT 출원 공개 WO 86/01533 (Neuberger et al.); 미국 특허 4,816,567 (Cabilly et al.); 유럽 특허 출원 125,023 (Cabilly et al.); [Better et al. (1988) Science 240:1041-1043]; [Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443]; [Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526]; [Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:214-218]; [Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47:999-1005]; [Wood et al. (1985) Nature 314:446-449]; [Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559)]; [Morrison, S. L. (1985) Science 229:1202-1207]; [Oi et al. (1986) Biotechniques 4:214]; 미국 특허 5,225,539 (Winter); [Jones et al. (1986) Nature 321:552-525]; [Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534]; 및 [Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060].

[0129] 또한, 인간화된 항체는 미국 특허 5,565,332에 개시된 바와 같은 표준 프로토콜에 따라 제조될 수 있다. 다른 실시양태에서, 항체 사슬 또는 특이적인 결합쌍 구성원은 예를 들어 미국 특허 5,565,332, 5,871,907, 또는 5,733,743에 기재된 바와 같은 당업계에 공지된 기술을 사용하여 특이적인 결합쌍 구성원 및 복제가능한 포괄적인 패키지의 성분의 폴리펩티드 사슬의 융합체를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터와 단일 결합쌍 구성원의 제2 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 벡터 사이의 재조합에 의해 생산될 수 있다. 세포에서 단백질 기능을 억제하기 위한 세포내 항체의 용도도 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Carlson, J. R. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:2638-2646]; [Biocca, S. et al. (1990) EMBO J. 9:101-108]; [Werge, T. M. et al. (1990) FEBS Lett. 274:193-198]; [Carlson, J. R. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7427-7428]; [Marasco, W. A. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893]; [Biocca, S. et al. (1994) Biotechnology (NY) 12:396-399]; [Chen, S-Y. et al. (1994) Hum. Gene Ther. 5:595-601]; [Duan, L et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5075-5079]; [Chen, S-Y. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5932-5936]; [Beerli, R. R. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:23931-23936]; [Beerli, R. R. et al. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 204:666-672]; [Mhashilkar, A. M. et al. (1995) EMBO J. 14:1542-1551]; [Richardson, J. H. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3137-3141]; PCT 공개 WO 94/02610

(Marasco et al.); 및 PCT 공개 WO 95/03832 (Duan et al.) 참조).

[0130] 다른 실시양태에서, PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2에 대해 작용하는 인간 모노클로날 항체는 마우스 면역계가 아니라 인간 면역계의 일부를 보유하는 트랜스제닉 또는 트랜스염색체 마우스를 사용하여 생성시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에서 "HuMAb 마우스"로 언급되는 트랜스제닉 마우스는 내인성 μ 및 κ 사슬 로커스를 불활성화시키는 표적화된 돌연변이와 함께, 비재배열된 인간 중쇄 (μ 및 γ) 및 κ 경쇄 면역글로불린 서열을 코딩하는 인간 면역글로불린 유전자 미니로커스 (minilocus)를 포함한다 (Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859). 따라서, 마우스는 감소된 마우스 IgM 또는 κ의 발현을 보이고, 면역화에 따라, 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 도입유전자는 클래스 스위칭 (switching) 및 체세포 돌연변이를 거쳐 고친화도 인간 IgGκ 모노클로날 항체를 생성한다 ([Lonberg, N. et al. (1994), 상기 문헌]; 문헌 [Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101]에서 검토됨; [Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93], 및 [Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y Acad. Sci 764:536-546]). HuMAb 마우스의 준비는 문헌 [Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295]; [Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5:647-656]; [Tuaillon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:3720-3724]; [Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123]; [Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830]; [Tuaillon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920]; [Lonberg et al., (1994) Nature 368(6474): 856-859]; [Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101]; [Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591]; [Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93]; [Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764:536-546]; [Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851]에 기재되어 있다. 또한, 미국 특허 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 및 5,770,429 (모두 Lonberg and Kay, 및 젠팜 인터내셔날 (GenPharm International)); 미국 특허 5,545,807 (Surani et al); 국제 특허 출원 공개 WO 98/24884 (1998년 6월 11일 공개; WO 94/25585 (1994년 11월 10일 공개; WO 93/1227 (1993년 6월 24일 공개); WO 92/22645 (1992년 12월 23일 공개); WO 92/03918 (1992년 3월 19일 공개)을 참조한다.

[0131] 다른 실시양태에서, 본 발명에 사용하기 위한 항체는 이중특이적 항체이다. 이중특이적 항체는 2개의 상이한 항원에 대한 결합 부위를 단일 항체 폴리펩티드 내에 갖는다. 항원 결합은 동시에 이루어지건 또는 순차적일 수 있다. 트리오마 및 하이브리드 하이브리도마는 이중특이적 항체를 분비할 수 있는 세포주의 2개의 예이다. 하이브리드 하이브리도마 또는 트리오마에 의해 생산되는 이중특이적 항체의 예는 미국 특허 4,474,893에 개시되어 있다. 이중특이적 항체는 화학적 수단 ([Staerz et al. (1985) Nature 314:628], 및 [Perez et al. (1985) Nature 316:354]) 및 하이브리도마 기술 ([Staerz and Bevan (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:1453], 및 [Staerz and Bevan (1986) Immunol. Today 7:241])에 의해 제조되었다. 또한, 이중특이적 항체는 미국 특허 5,959,084에도 기재되어 있다. 이중특이적 항체의 단편은 미국 특허 5,798,229에 기재되어 있다. 또한, 이중특이적 물질은 상이한 항체들을 생산하는 하이브리도마 또는 다른 세포를 융합하여 이종하이브리도마를 제조한 후, 두 항체를 생산하여 회합시키는 클론을 확인함으로써 생성될 수 있다. 또한, 완전한 면역글로불린 사슬 또는 그의 일부, 예를 들어 Fab 및 Fv 서열의 화학적 또는 유전자 접합에 의해 생성될 수도 있다. 항체 성분은 PD-1, PD-L1, 및/또는 PD-L2 폴리펩티드에 결합할 수 있다. 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 PD-1 리간드 및 PD-1 폴리펩티드 모두에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0132] 본 발명의 또 다른 측면은 동물을 각각 면역원성 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 폴리펩티드 또는 그의 면역원성 부분으로 면역화한 후, 동물로부터 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 단리하는 것을 포함하는 과정에 의해 얻을 수 있는 항-PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 폴리펩티드 항체에 관한 것이다.

[0133] 본 발명의 또 다른 측면에서, 부분적인 또는 공지의 항체 서열을 사용하여 새로운 항체를 생성 및/또는 발현시킬 수 있다. 항체는 6개의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역 (CDR)에 위치한 아미노산 잔기를 통해 표적 항원과 우세하게 상호작용한다. 이러한 이유로, CDR 내의 아미노산 서열은 CDR 외부의 서열보다 개별 항체 사이에서 더 다양하다. CDR 서열이 대부분의 항체-항원 상호작용을 담당하기 때문에, 상이한 특성을 갖는 상이한 항체로부터의 프레임워크 서열 상에 이식된, 특이적 천연 생성 항체로부터의 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 제조함으로써 특이적인 천연 생성 항체의 특성을 모방하는 재조합 항체를 발현하는 것이 가능하다 (예를 들어, [Riechmann, L. et al., 1998, Nature 332:323-327]; [Jones, P. et al., 1986, Nature 321:522-525]; 및 [Queen, C. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. See. U.S.A. 86:10029-10033] 참조). 상기 프레임워크 서열은 생식계열 또는 비-생식계열 항체 유전자 서열을 포함하는 공공 DNA 데이타베이스로부터 얻을 수 있다. 이들 생

식계열 서열은 B 세포 성숙 동안 V(D)J 연결에 의해 형성되는 완전히 회합된 가변 유전자를 포함하지 않을 것이기 때문에 성숙 항체 유전자 서열과 상이할 것이다. 또한, 생식계열 유전자 서열은 가변 영역 전체에서 균등하게 개체에서 고친화도 2차 레퍼토리 항체의 서열과 상이할 것이다. 예를 들어, 체세포 돌연변이는 프레임워크 서열의 아미노 말단 부분에서 비교적 드물게 발생한다. 예를 들어, 체세포 돌연변이는 프레임워크 영역 1의 아미노 말단 부분 및 프레임워크 영역 4의 카르복시-말단 부분에서 비교적 드물게 발생한다. 또한, 많은 체세포 돌연변이는 항체의 결합 특성을 유의하게 변경하지 않는다. 이 때문에, 원래의 항체와 유사한 결합 특성을 갖는 무손상 재조합 항체를 재생성하기 위해서 특정 항체의 전체 DNA 서열을 얻는 것이 필요하지 않다 (1999년 3월12일 출원된 PCT/US99/05535 참조). CDR 영역에 걸치는 부분적인 중쇄 및 경쇄 서열이 일반적으로 상기 목적에 충분하다. 부분적인 서열은 어떤 생식계열 및/또는 비-생식계열 가변 및 연결 유전자 세그먼트가 재조합된 항체 가변 유전자에 기여하는지 결정하기 위해 사용된다. 이어서, 생식계열 및/또는 비-생식계열 서열이 가변 영역의 상실 부분을 채우기 위해 사용된다. 중쇄 및 경쇄 리더 서열은 단백질 성숙 동안 절단되고, 최종 항체의 특성에 기여하지 않는다. 상실 서열을 부가하기 위해, 클로닝된 cDNA 서열은 라이게이션 또는 PCR 증폭에 의해 합성 올리고뉴클레오티드와 조합될 수 있다. 별법으로, 전체 가변 영역은 짧은 겹치는 올리고뉴클레오티드의 세트로서 합성될 수 있고, 완전한 합성 가변 영역 클론을 생성하기 위해 PCR 증폭에 의해 조합될 수 있다. 상기 과정은 특정 제한 부위의 제거 또는 도입, 또는 특정 코돈의 최적화와 같은 특정 잇점을 갖는다. 또한, 이 과정은 다른 종 (예를 들어, 마우스)에서 공지의 항체 서열로부터의 동족 (cognate) 면역글로불린 코딩 서열을 설계하기 위해서 한 종 (예를 들어, 인간)에서 특정 면역글로불린 코딩 서열의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 사용될 수 있다 (예를 들어, 아래 실시예 섹션 참조).

[0134] 하이브리도마로부터의 중쇄 및 경쇄 전사체의 뉴클레오티드 서열은 천연 서열과 동일한 아미노산 코딩 능력을 갖는 합성 V 서열을 생성하기 위해서 합성 올리고뉴클레오티드의 겹치는 세트를 설계하기 위해 사용된다. 합성 중쇄 및 카파쇄 서열은 다음과 같이 3가지 방식으로 천연 서열과 상이할 수 있다: 반복된 뉴클레오티드 염기의 스트링 (string)은 올리고뉴클레오티드 합성 및 PCR 증폭을 용이하게 하기 위해 차단되고; 최적 번역 개시 부위는 코작 (Kozak) 규칙에 따라 도입되고 (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266L19867019870); HindIII 부위는 번역 개시 부위의 상류에서 조작될 수 있다.

[0135] 중쇄 및 경쇄 가변 영역 모두에 대해, 최적화된 코딩 및 대응하는 비-코딩 가닥 서열은 대략 대응하는 비-코딩 올리고뉴클레오티드의 중간 지점에서 30-50개의 뉴클레오티드로 절단된다. 따라서, 각각의 사슬에 대해, 올리고뉴클레오티드는 150-400개 뉴클레오티드의 세그먼트에 걸치는 겹치는 이중 가닥 세트로 조립될 수 있다. 이어서, 풀 (pool)이 150-400개 뉴클레오티드의 PCR 증폭 생성물을 생산하기 위한 주형으로서 사용된다. 일반적으로, 단일 가변 영역 올리고뉴클레오티드 세트는 2개의 겹치는 PCR 생성물을 생성하기 위해 별개로 증폭되는 2개의 풀로 절단될 것이다. 상기 겹치는 생성물은 이어서 완전한 가변 영역을 형성하기 위해서 PCR 증폭에 의해 조합된다. 또한, 발현 벡터 구성체 내로 쉽게 클로닝될 수 있는 단편을 생성하기 위해 PCR 증폭에 중쇄 또는 경쇄 불변 영역의 겹치는 단편을 포함하는 것이 바람직할 수 있다.

[0136] 이어서, 재구성된 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 클로닝된 프로모터, 리더 서열, 번역 개시, 리더 서열, 불변 영역, 3' 비번역, 폴리아데닐화, 및 전사 종결 서열과 조합되어 발현 벡터 구성체를 형성한다. 중쇄 및 경쇄 발현 구성체는 단일 벡터 내로 조합되고, 숙주 세포 내로 동시-형질감염되거나, 연속적으로 형질감염되거나, 또는 별개로 형질감염될 수 있고, 이후에 두 사슬을 모두 발현하는 숙주 세포를 형성하기 위해 융합된다.

[0137] 상기 용도로 사용하기 위한 플라스미드는 당업계에 공지되어 있고, 아래 실시예 섹션에 제시되는 플라스미드를 포함한다. 본 발명의 완전 인간 및 키메라 항체는 또한 IgG2, IgG3, IgE, IgA, IgM, 및 IgD 항체를 포함한다. 다른 중쇄 이소형의 발현을 위한, 또는 람다 경쇄를 포함하는 항체의 발현을 위한 유사한 플라스미드가 제조될 수 있다.

[0138] 따라서, 본 발명의 다른 측면에서, 공지의 비-인간 또는 인간 항체 (예를 들어, 마우스 항-인간 항-PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 항체, 예를 들어 각각 항체 EH12.2H7, 29E.2A3, 및 24F.10C12)의 구조적 특징을 사용하여, 본 발명의 항체의 적어도 하나의 기능적 특성, 예를 들어 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2에 대한 결합을 보유하는 구조적으로 관련된 인간 항-인간 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 항체를 생성할 수 있다. 다른 기능적 특성은 경쟁 ELISA 분석에서 EH12.2H7의 PD-1에 대한, 29E.2A3의 PD-L1에 대한, 또는 24F.10C12의 PD-L2에 대한 결합의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 구조적으로 관련된 항-인간 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 항체는 실시예 2에 설명되는 IC50 값에 의해 측정시에 항체 EH12.2H7, 29E.2A3, 또는 24F.10C12에 비해 항원에 대한 더 낮은 친화도를 갖는다 (예를 들어, 쥐 참조 항체의 친화도는 구조적으로 관련된 항체의 3.0, 2.0, 1.9, 1.8, 1.7, 1.6, 1.5, 1.4, 1.3, 1.2 또는 1.1배 이하이다). 일부 실시양태에서, 구조적으로 관련된 항-인간 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 항

체는 실시예 2에 설명되는 IC50 값에 의해 측정시에 항체 EH12.2H7, 29E.2A3, 또는 24F.10C12에 비해 항원에 대한 더 높은 친화도를 갖는다 (예를 들어, 구조적으로 관련된 항체의 친화도는 참조 항체의 적어도 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 또는 2.0배이다). 또한, 본 발명의 하나 이상의 CDR 또는 가변 영역 (예를 들어, 도 2-7)은 공지의 인간 프레임워크 영역 및 CDR과 재조합 방식으로 조합되어, 본 발명의 추가의 재조합 방식으로 조작된 인간 항-PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 항체를 생성할 수 있다.

[0139] 항체 중쇄 및 경쇄 CDR3 도메인이 항원에 대한 항체의 결합 특이성/친화도에서 특히 중요한 역할을 수행한다고 당업계에 공지되어 있기 때문에, 상기 제시된 바와 같은 본 발명의 재조합 항체는 바람직하게는 본 발명의 가변 영역의 중쇄 및 경쇄 CDR3을 포함한다 (예를 들어, 도 2-7). 항체는 본 발명의 가변 영역의 CDR2를 추가로 포함할 수 있다 (예를 들어, 도 2-7). 항체는 본 발명의 가변 영역의 CDR1을 추가로 포함할 수 있다 (예를 들어, 도 2-7). 항체는 CDR의 임의의 조합을 추가로 포함할 수 있다.

[0140] 상기한 조작된 항체의 CDR1, 2, 및/또는 3 영역은 본원에 개시된 본 발명의 가변 영역 (예를 들어, 도 2-7)과 동일한 아미노산 서열(들)을 포함할 수 있다. 그러나, 당업자는 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2에 효과적으로 결합하는 항체의 능력을 계속 보유하면서 CDR 서열로부터의 일부 변화 (예를 들어, 보존적 서열 변형)가 가능할 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 다른 실시양태에서, 조작된 항체는 예를 들어 본 발명의 하나 이상의 CDR (예를 들어, 도 2-7)에 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 99.5% 동일한 하나 이상의 CDR로 이루어질 수 있다.

[0141] 단순히 결합하는 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 이외에, 상기한 바와 같은 조작된 항체는 다음과 같은 본 발명의 항체의 다른 기능적 특성의 보유에 대해 선택될 수 있다:

[0142] (1) 인간 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2에 대한 결합;

[0143] (2) EH12.2H7의 PD-1에 대한, 29E.2A3의 PD-L1에 대한, 또는 24F.10C12의 PD-L2에 대한 결합의 억제;

[0144] (3) 인간 PD-1에 대한 결합, 및 결합된 PD-1의 PD-1 리간드 (예를 들어, PD-L1 및/또는 PD-L2)에 결합하는 능력의 억제;

[0145] (4) 인간 PD-L1에 대한 결합, 및 결합된 PD-L1의 PD-L1 리간드 (예를 들어, PD-1 및/또는 B7-1)에 결합하는 능력의 억제;

[0146] (5) 인간 PD-L2에 대한 결합, 및 결합된 PD-L2의 PD-L2 리간드 (예를 들어, PD-1)에 결합하는 능력의 억제.

[0147] 항체 EH12.2H7, 29E.2A3 및 24F.10C12의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 아래에 제시한다.

[0148] EH12.2H7 중쇄 가변 영역

[0149] QVQLQQSGAELAKPGASVQMSCKASGYSFTSSWIHWVKQRPGQGLEWIGYIYPSTGFT EYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQG TSVTVSS (서열 76)

[0150] EH12.2H7 경쇄 가변 영역

[0151] DIVLTQSPASLTVSLGQRATISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKFGSNLES GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIK (서열 77)

[0152] 29E.2A3 중쇄 가변 영역

[0153] EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYVNPFNDG TKYNEMFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARQAWGYPWGQGTLVTVS A (서열 78)

[0154] 29E.2A3 경쇄 가변 영역

[0155] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDS GVPARFSGSGSGTDFSLTIHPVEEDDIAMYFCQQSRRVPYTFGGGTKLEIK (서열 79)

[0156] 24F.10C12 중쇄 가변 영역

QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKASGYTFTGYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPRSGY
TEYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARPWFAYWGQGTLVTVSA

[0157] (서열 80)

[0158] 24F.10C12 경쇄 가변 영역

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWAS
TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLELK (서열

[0159] 81)

[0160] 그의 리간드(들)에 대한 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2의 결합을 억제하는 항체의 활성은 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2와 그의 리간드 사이의 결합을 차단하는 항체의 능력을 시험함으로써 결정될 수 있다. 표지된 리간드 및 항체의 존재 하의 경쟁 ELISA 분석이 사용될 수 있다. 예를 들어, 항-PD-L1 항체가 PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용을 차단할 수 있는지 결정하기 위해서, 경쟁적 결합 실험을 수행한다. PD-L1을 발현하는 세포를 항-PD-L1 항체와 예비인큐베이팅한 후, 비오티닐화 PD-1-Ig 융합 단백질을 첨가한다. 항-PD-L1 항체가 용량-의존 방식으로 고결합력으로 PD-1-Ig의 결합을 차단할 경우, 항-PD-L1 항체는 PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용의 억제에 효과적인 것으로 간주된다. PD-1과 PD-L2 사이의 상호작용의 억제에 효과적인 항체를 시험하기 위해 유사한 시험을 수행할 수 있다.

[0161] IV. 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포

[0162] 본 발명의 다른 측면은 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7) (또는 그의 일부)를 코딩하는 1, 2, 또는 이보다 많은 핵산 분자를 포함하는 벡터, 바람직하게는 발현 벡터에 관한 것이다. 본원에서 사용될 때, 용어 "벡터"는, 그가 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 한 종류의 벡터는 추가의 DNA 세그먼트가 그 내부에 라이게이팅될 수 있는 환상 이중 가닥 DNA 루프를 나타내는 "플라스미드"이다. 다른 종류의 벡터는 추가의 DNA 세그먼트가 바이러스 게놈 내로 라이게이팅될 수 있는 바이러스 벡터이다. 특정 벡터는 그 벡터가 내부로 도입되는 숙주 세포에서 자가 복제될 수 있다 (예를 들어, 세균 복제 기점을 갖는 세균 벡터 및 에피좀성 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예를 들어, 비-에피좀성 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입 시에 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 작동가능하게 연결되는 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 상기 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 언급된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태이다. 본원에서, 플라스미드가 가장 일반적으로 사용되는 형태의 벡터이기 때문에 "플라스미드" 및 "벡터"는 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 수행하는 다른 형태의 발현 벡터, 예를 들어 바이러스 벡터 (예를 들어, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스)를 포함하고자 의도된다.

[0163] 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 핵산의 발현에 적합한 형태의 본 발명의 핵산을 포함하고, 이것은 재조합 발현 벡터가 발현될 핵산 서열에 작동가능하게 연결된, 발현을 위해 사용할 숙주 세포를 기초로 하여 선택된 하나 이상의 조절 서열을 포함함을 의미한다. 재조합 발현 벡터 내에서, "작동가능하게 연결된"은 관심있는 뉴클레오티드 서열이 (예를 들어, 시험관내 전사/번역 시스템에서 또는 벡터가 숙주 세포 내로 도입될 경우에는 숙주 세포에서) 뉴클레오티드 서열의 발현을 허용하는 방식으로 조절 서열(들)에 연결됨을 의미하는 것으로 의도된다. 용어 "조절 서열"은 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 제어 요소 (예를 들어, 폴리아데닐화 신호)를 포함하는 것으로 의도된다. 그러한 조절 서열 예를 들어 문헌 [Goeddel (1990) Methods Enzymol. 185:3-7]에 기재되어 있다. 조절 서열은 많은 종류의 숙주 세포에서 뉴클레오티드 서열의 구성적 발현을 유도하는 것 및 특정 숙주 세포에서만 뉴클레오티드 서열의 발현을 유도하는 것 (예를 들어, 조직-특이적 조절 서열)을 포함한다. 당업자는 발현 벡터의 설계가 형질전환되는 숙주 세포의 선택, 요구되는 단백질의 발현 수준 등과 같은 요인에 따라 결정될 수 있음을 이해할 것이다. 본 발명의 발현 벡터는 숙주 세포 내로 도입되어, 단백질 또는 펩티드, 예를 들어 본원에서 설명되는 핵산에 의해 코딩되는 융합 단백질 또는 펩티드를 생산할 수 있다.

[0164] 본 발명의 재조합 발현 벡터는 원핵 또는 진핵 세포에서 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7)의 발현을 위해 설계될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드는 세균 세포, 예를 들어 이. 콜라이 (*E. coli*), 곤충 세포 (바큘로바이러스 발현 벡터 사용), 효모 세포, 또는 포유동물 세포에서 발현될 수 있다. 적합한 숙주 세포는 문헌 [Goeddel (1990) 상기 문헌]에 추가로 설명되어 있다. 별법으로, 재조합 발현 벡터는 예를 들어 T7 프로모터 조절 서열 및 T7 중합효소를 사용하여 시험관 내에서 전사되고 번역될 수 있다.

[0165] 원핵생물에서의 폴리펩티드의 발현은 융합 또는 비-융합 단백질의 발현을 유도하는 구성적 또는 유도가능 프로모터를 포함하는 벡터를 사용하여 이. 콜라이에서 가장 흔히 수행된다. 융합 벡터는 많은 아미노산을 그에 의해 코딩되는 폴리펩티드에, 대체로 재조합 폴리펩티드의 아미노 말단에 부가한다. 상기 융합 벡터는 일반적으로 다음과 같은 3가지 목적을 위해 사용된다: 1) 재조합 폴리펩티드의 발현 증가; 2) 재조합 폴리펩티드의 용해도 증가; 및 3) 친화도 정제에서 리간드로서 작용함으로써 재조합 폴리펩티드의 정제를 도움. 종종, 융합 발현 벡터에서, 융합 단백질의 정제 후에 융합 모이어티로부터 재조합 폴리펩티드를 분리할 수 있도록 단백질 분해 절단 부위가 융합 모이어티와 재조합 폴리펩티드의 연결부에 도입된다. 상기 효소 및 그의 동족 인식 서열은 인자 Xa, 트롬빈 및 엔테로키나제를 포함한다. 전형적인 융합 발현 벡터는 각각 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (GST), 말토스 E 결합 단백질, 또는 단백질 A를 표적 재조합 폴리펩티드에 융합하는 pGEX (파마시아 바이오테크 인크 (Pharmacia Biotech Inc); [Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988) Gene 67:31-40]), pMAL (뉴 잉글랜드 바이오랩스 (New England Biolabs, 미국 매사추세츠주 비벌리)) 및 pRIT5 (파마시아, 미국 뉴저지주 피스카타웨이)를 포함한다.

[0166] 적합한 유도가능한 비-융합 이. 콜라이 발현 벡터의 예는 pTrc (Amann et al. (1988) Gene 69:301-315) 및 pET 11d (Studier et al. (1990) Methods Enzymol. 185:60-89)를 포함한다. pTrc 벡터로부터 표적 유전자 발현은 하이브리드 trp-lac 융합 프로모터로부터의 숙주 RNA 중합효소 전사에 의존한다. pET 11d 벡터로부터의 표적 유전자 발현은 동시발현된 바이러스 RNA 중합효소 (T7 gn1)에 의해 매개된 T7 gn10-lac 융합 프로모터로부터의 전사에 의존한다. 상기 바이러스 중합효소는 lacUV 5 프로모터의 전사 제어 하에 T7 gn1 유전자를 보유하는 상주하는 프로파지로부터 숙주 균주 BL21(DE3) 또는 HMS174(DE3)에 의해 공급된다.

[0167] 이. 콜라이에서 재조합 폴리펩티드 발현을 최대화하기 위한 하나의 전략은 단백질 분해에 의해 재조합 폴리펩티드를 절단하는 능력이 손상된 숙주 세균에서 폴리펩티드를 발현시키는 것이다 (Gottesman, S. (1990) Methods Enzymol. 185:119-128). 다른 전략은 각각의 아미노산에 대한 개별적인 코돈이 이. 콜라이에서 우선적으로 이용되는 코돈이 되도록 발현 벡터 내로 삽입되는 핵산의 핵산 서열을 변경하는 것이다 (Wada et al. (1992) Nucleic Acids Res. 20:2111-2118). 상기 본 발명의 핵산 서열의 변경은 표준 DNA 합성 기술에 의해 수행될 수 있다.

[0168] 다른 실시양태에서, 발현 벡터는 효모 발현 벡터이다. 효모 에스. 세레비지아에 (*S. cerevisiae*) 내에서 발현을 위한 벡터의 예는 pYepSec1 (Baldari et al. (1987) EMBO J. 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123), pYES2 (인비트로겐 코퍼레이션 (Invitrogen Corporation, 미국 캘리포니아주 샌디에고) 및 picZ (인비트로겐 코퍼레이션)를 포함한다.

[0169] 별법으로, 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7)는 바큘로바이러스 발현 벡터를 사용하여 곤충 세포에서 발현될 수 있다. 배양된 곤충 세포 (예를 들어, Sf9 세포)에서 폴리펩티드의 발현을 위해 이용가능한 바큘로바이러스 벡터는 pAc 시리즈 (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) 및 pVL 시리즈 (Lucklow and Summers (1989) Virology 170:31-39)를 포함한다.

[0170] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 핵산 (예를 들어, 도 2-7)은 포유동물 발현 벡터를 사용하여 포유동물 세포에서 발현된다. 포유동물 발현 벡터의 예는 pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) 및 pMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187-195)를 포함한다. 포유동물 세포에서 사용될 때, 발현 벡터의 제어 기능은 종종 바이러스 조절 요소에 의해 제공된다. 예를 들어, 통상적으로 사용되는 프로모터는 폴리오마, 아데노바이러스 2, 사이토메갈로바이러스 및 원숭이 바이러스 (Simian Virus) 40으로부터 유도된다. 원핵 및 진핵 세포 모두에 적합한 다른 발현 시스템에 대해서는 문헌 [Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989]의 16 및 17장을 참조한다.

[0171] 다른 실시양태에서, 재조합 포유동물 발현 벡터는 핵산의 발현을 특정 세포 종류에서 우선적으로 유도할 수 있다 (예를 들어, 조직-특이적 조절 요소가 핵산을 발현하기 위해 사용된다). 조직-특이적 조절 요소는 당업계에 공지되어 있다. 적합한 조직-특이적 프로모터의 비제한적인 예는 알부민 프로모터 (간-특이적; [Pinkert et al. (1987) Genes Dev. 1:268-277]), 림프구-특이적 프로모터 (Calame and Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275), T 세포 수용체의 특정 프로모터 (Winoto and Baltimore (1989) EMBO J. 8:729-733) 및 면역글로불린 ([Banerji et al. (1983) Cell 33:729-740]; [Queen and Baltimore (1983) Cell 33:741-748]), 뉴런-특이적 프로모터 (예를 들어, 신경미세섬유 프로모터; [Byrne and Ruddle (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477]), 췌장-특이적 프로모터 (Edlund et al. (1985) Science 230:912-916), 및 유선-특이적 프로모

터 (예를 들어, 유장 (milk whey) 프로모터; 미국 특허 4,873,316 및 유럽 특허 출원 공개 264,166)를 포함한다. 발생 수준에서 조절된 프로모터, 예를 들어 쥐 hox 프로모터 (Kessel and Grass (1990) Science 249:374-379) 및 α-태아단백질 프로모터 (Campes and Tilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546)도 포함된다.

[0172] 본 발명의 다른 측면은 본 발명의 핵산 분자 (예를 들어, 도 2-7)가, 숙주 세포 게놈의 특이적 부위 내로 상동성 재조합되도록 하는 서열을 함유하는 재조합 발현 벡터 또는 핵산 분자에 의해 그 내부에 도입된 숙주 세포에 관한 것이다. 용어 "숙주 세포" 및 "재조합 숙주 세포"는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 상기 용어는 특정 대상체 세포뿐만 아니라 상기 세포의 자손체 또는 잠재적인 자손체를 의미하는 것으로 이해된다. 특정 변형이 돌연변이 또는 환경적 영향 때문에 후속 세대에서 발생할 수 있기 때문에, 상기 자손체는 사실상 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 본원에서 사용되는 상기 용어의 범위 내에 계속 포함된다.

[0173] 숙주 세포는 임의의 원핵 또는 진핵 세포일 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7)는 세균 세포, 예를 들어 이. 콜라이, 곤충 세포, 효모 또는 포유동물 세포 (예를 들어 차이니즈 햄스터 난소 세포 (CHO) 또는 COS 세포)에서 발현될 수 있다. 다른 적합한 숙주 세포는 당업자에게 알려져 있다.

[0174] 벡터 DNA는 통상적인 형질전환 또는 형질감염 기술을 통해 원핵 또는 진핵 세포 내로 도입될 수 있다. 본원에서 사용될 때, 용어 "형질전환" 및 "형질감염"은 외래 핵산 (예를 들어, DNA)를 숙주 세포 내로 도입하기 위해 당업계에서 인정되는 다양한 기술, 예를 들어 인산칼슘 또는 염화칼슘 동시-침전, DEAE-덱스트란-매개된 형질감염, 리포펙션, 또는 전기천공을 의미하는 것으로 의도된다. 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시키기 위한 적합한 방법은 문헌 [Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989)], 및 다른 실험 매뉴얼에서 볼 수 있다.

[0175] 포유동물 세포의 안정한 형질감염을 위해, 사용되는 발현 벡터 및 형질감염 기술에 따라, 단지 작은 세포 분획만이 외래 DNA를 그의 게놈 내로 통합할 수 있다고 알려져 있다. 이들 통합체를 확인하기 선택하기 위해, 선택가능한 마커 (예를 들어, 항생제에 대한 저항성)를 코딩하는 유전자가 일반적으로 관심있는 유전자와 함께 숙주 세포 내로 도입된다. 바람직한 선택가능한 마커는 약물, 예를 들어 G418, 히그로마이신 및 메토트렉세이트에 대한 저항성을 부여하는 것을 포함한다. 선택가능한 마커를 코딩하는 핵산은 PD-L2 폴리펩티드를 코딩하는 것과 동일한 벡터 상의 숙주 세포 내로 도입될 수 있거나 또는 별개의 벡터 상에 도입될 수 있다. 도입된 핵산으로 안정하게 형질감염된된 세포는 약물 선택에 의해 확인될 수 있다 (예를 들어, 다른 세포는 죽지만, 선택가능한 마커 유전자를 포함하는 세포는 생존할 것이다).

[0176] 배양액 내의 본 발명의 숙주 세포, 예를 들어 원핵 또는 진핵 숙주 세포는 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7)를 생산 (즉, 발현)하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 추가로 본 발명의 숙주 세포를 사용하여 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7)를 생산하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 본 발명의 숙주 세포 (본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7)를 코딩하는 재조합 발현 벡터가 그 내부에 도입된)를 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7)가 생산되도록 적합한 배지에서 배양하는 것을 포함한다. 다른 실시양태에서, 방법은 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 도 2-7)를 배지 또는 숙주 세포로부터 단리하는 것을 추가로 포함한다.

[0177] 또한, 본 발명의 숙주 세포는 아래에서 설명되는 바와 같이 비-인간 트랜스제닉 동물의 생산을 위해 사용될 수 있다.

[0178] V. 복합 인간 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 항체를 생성하는 트랜스제닉 및 트랜스염색체 비인간 동물의 생산

[0179] 또 다른 측면에서, 본 발명은 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2에 특이적으로 결합하는 인간 모노클로날 항체를 발현할 수 있는 트랜스제닉 및 트랜스염색체 비-인간 동물, 예를 들어 트랜스제닉 또는 트랜스염색체 마우스를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 항원 및/또는 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2를 발현하는 세포로 면역화될 때 마우스가 인간 항-PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 항체를 생산하도록 인간 중쇄 도입유전자를 포함하는 게놈을 갖는 트랜스제닉 또는 트랜스염색체 마우스를 제공한다. 인간 중쇄 도입유전자는 당업계에 공지된 방법에 따라 트랜스제닉, 예를 들어 HuMAb 마우스에서처럼 마우스의 염색체 DNA 내로 통합될 수 있다. 별법으로, 인간 중쇄 도입유전자는 WO 02/43478에 설명된 바와 같이 트랜스염색체 (예를 들어, KM) 마우스에서처럼 염색체 외에서 유지될 수 있다. 상기 트랜스제닉 및 트랜스염색체 마우스는 V-D-J 재조합 및 이소형 스위칭을 거침으로써 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2에 대한 인간 모노클로날 항체의 여러 이소형 (예를 들어, IgG, IgA 및/또는 IgE)를 생산할 수 있다. 이소형 스위칭은 예를 들어 전통적인 또는 비-전통적인 이소형 스위칭에 의해 발

생할 수 있다.

[0180] 이종성 항체 레퍼토리를 사용한, 외래 항원 자극에 반응하는 트랜스제닉 또는 트랜스염색체 비-인간 동물의 설계는 트랜스제닉 동물 내에 포함된 이종성 면역글로불린 도입유전자가 B-세포 발생 경로 전체에 걸쳐서 정확하게 기능할 것으로 필요로 한다. 이것은 예를 들어 이종성 중쇄 도입유전자의 이소형 스위칭을 포함한다. 따라서, 이소형 스위칭 및 항체의 다음 중 하나 이상을 생성하도록 하기 위한 도입유전자가 제조된다: (1) 고수준 및 세포 종류 특이적 발현, (2) 기능적 유전자 재배열, (3) 대립유전자 배제 (allelic exclusion)의 활성화 및 이에 대한 반응, (4) 충분한 1차 레퍼토리의 발현, (5) 신호 전달, (6) 체세포 과다돌연변이, 및 (7) 면역 반응 동안 도입유전자 항체 로커스의 지배.

[0181] 상기 기준이 모두 충족될 필요는 없다. 예를 들어, 트랜스제닉 동물의 내인성 면역글로불린 로커스가 기능적으로 붕괴된 실시양태에서, 도입유전자가 대립유전자 배제를 활성화할 필요는 없다. 또한, 도입유전자가 기능적으로 재배열된 중쇄 및/또는 경쇄 면역글로불린 유전자를 포함하는 실시양태에서, 기능적 유전자 재배열의 제2 기준은 적어도 이미 재배열된 도입유전자의 경우에 불필요하다. 분자 면역학의 배경에 대해서는, 문헌 [Fundamental Immunology, 2nd edition (1989), Paul William E., ed. Raven Press, N. Y.]을 참조한다.

[0182] 특정 실시양태에서, 본 발명의 인간 모노클로날 항체를 생성하기 위해 사용되는 트랜스제닉 또는 트랜스염색체 비-인간 동물은 트랜스제닉 동물의 생식계열에 재배열된, 비재배열된 또는 재배열된 및 비재배열된 이종성 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 도입유전자의 조합을 포함한다. 각각의 중쇄 도입유전자는 적어도 하나의 CH 유전자를 포함한다. 또한, 중쇄 도입유전자는 트랜스제닉 동물의 B-세포에서 여러 CH 유전자를 코딩하는 이종성 도입유전자의 이소형 스위칭을 지지할 수 있는 기능성 이소형 스위치 서열을 포함할 수 있다. 상기 스위치 서열은 도입유전자 CH 유전자의 공급원으로서 기능하는 종으로부터의 생식계열 면역글로불린 로커스에서 천연 발생하는 것일 수 있거나, 또는 상기 스위치 서열은 도입유전자 구성체를 수용하는 종 (트랜스제닉 동물)에서 발생하는 것으로부터 유도될 수 있다. 예를 들어, 트랜스제닉 마우스를 생성하기 위해 사용되는 인간 도입유전자 구성체는 마우스 중쇄 로커스에서 천연 발생하는 것과 유사한 스위치 서열을 마우스가 포함한다면 고빈도의 이소형 스위칭 사건을 생성할 수 있고, 이것은 마우스 스위치 서열이 마우스 스위치 재조합효소 효소 시스템을 사용하여 기능하도록 최적화되는 반면에, 인간 스위치 서열은 그렇지 않기 때문이다. 스위치 서열은 통상적인 클로닝 방법에 의해 단리되고 클로닝될 수 있거나, 또는 면역글로불린 스위치 영역 서열에 관한 공개된 서열 정보를 기초로 하여 설계된 겹치는 합성 올리고뉴클레오티드로부터 드 노보 (de novo)로 합성될 수 있다 ([Mills et al., Nucl. Acids Res. 15:7305-7316 (1991)]; [Sideras et al., Intl. Immunol. 1:631-642 (1989)]). 각각의 상기 트랜스제닉 동물에 대해, 기능적으로 재배열된 이종성 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 도입유전자는 트랜스제닉 동물의 B-세포의 유의한 분획 (적어도 10%)에서 발견된다.

[0183] 본 발명의 트랜스제닉 동물의 생성에 사용되는 도입유전자는 적어도 하나의 가변 유전자 세그먼트, 하나의 다양성 유전자 세그먼트, 하나의 연결 유전자 세그먼트 및 적어도 하나의 불변 영역 유전자 세그먼트를 코딩하는 DNA를 포함하는 중쇄 도입유전자를 포함한다. 면역글로불린 경쇄 도입유전자는 적어도 하나의 가변 유전자 세그먼트, 하나의 연결 유전자 세그먼트 및 적어도 하나의 불변 영역 유전자 세그먼트를 코딩하는 DNA를 포함한다. 경쇄 및 중쇄 유전자 세그먼트를 코딩하는 유전자 세그먼트는 그가 유도되는 트랜스제닉 비-인간 동물에 이종성이거나, 또는 트랜스제닉 비-인간 동물로 구성되지 않는 종으로부터의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자 세그먼트를 코딩하는 DNA에 대응한다. 본 발명의 한 측면에서, 도입유전자는 개별적인 유전자 세그먼트가 비재배열되도록, 즉 기능성 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄를 코딩하기 위해 재배열되지 않도록 구성된다. 상기 비재배열된 도입유전자는 V, D, 및 J 유전자 세그먼트의 재조합 (기능적 재배열)을 지지하고, 바람직하게는 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 항원에 노출될 때 트랜스제닉 비-인간 동물 내에서 생성되는 재배열된 면역글로불린 중쇄에 D 영역 유전자 세그먼트의 전부 또는 일부의 도입을 지지한다.

[0184] 다른 실시양태에서, 도입유전자는 비재배열된 "미니-로커스"를 포함한다. 상기 도입유전자는 일반적으로 C, D, 및 J 세그먼트의 실질적인 부분 및 V 유전자 세그먼트의 하위세트를 포함한다. 상기 도입유전자 구성체에서, 다양한 조절 서열, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 클래스 스위치 영역, RNA 프로세싱을 위한 스플라이스-공여자 및 스플라이스-수용자 서열, 재조합 신호 등은 이종성 DNA로부터 유도된 대응하는 서열을 포함한다. 상기 조절 서열은 본 발명에서 사용되는 비-인간 동물의 동일한 또는 관련된 종으로부터의 도입유전자 내로 통합될 수 있다. 예를 들어, 인간 면역글로불린 유전자 세그먼트는 트랜스제닉 마우스에 사용하기 위해 설치류 면역글로불린 인핸서 서열과 함께 도입유전자에서 조합될 수 있다. 별법으로, 합성 조절 서열은 도입유전자 내로 통합될 수 있고, 여기서 상기 합성 조절 서열은 포유동물의 게놈에서 천연 생성되는 것으로 알려진 기능성 DNA 서열에 상동성이 아니다. 합성 조절 서열은 스플라이스-수용자 부위 또는 프로모터/인핸서 모티프의 허용되는 서열을

특정하는 것과 같이 합의된 규칙에 따라 설계된다. 예를 들어, 미니로커스는 천연 생성 생식계열 Ig 로커스에 비해 비-필수 DNA 부분 (예를 들어, 개재 서열; 인트론 또는 그의 일부)의 적어도 하나의 내부 (즉, 해당 부분의 말단이 아니라) 결실을 갖는 게놈 면역글로불린 로커스의 일부를 포함한다.

[0185] 본 발명에 사용되는 트랜스제닉 및 트랜스염색체 마우스는 이상적으로는 천연 마우스의 것에 실질적으로 유사한 유의한 레퍼토리를 사용하여 면역글로불린 생산을 보일 수 있다. 따라서, 예를 들어, 내인성 Ig 유전자가 불활성화된 실시양태에서, 총 면역글로불린 수준은 약 0.1 내지 10 mg/ml (혈청), 또는 약 0.5 내지 5 mg/ml, 또는 적어도 약 1.0 mg/ml일 수 있다. IgM으로부터 IgG로 스위치할 수 있는 도입유전자가 트랜스제닉 마우스 내로 도입된 경우, 혈청 IgG 대 IgM의 성체 마우스 비는 약 10:1일 수 있다. IgG 대 IgM 비는 미성숙 마우스에서 훨씬 더 낮을 것이다. 일반적으로, 약 10% 초과, 바람직하게는 40 내지 80%의 비장 및 림프절 B 세포가 인간 IgG 단백질만을 발현한다.

[0186] 레퍼토리는 이상적으로는 천연 마우스에서 보이는 것, 대체로 적어도 약 10%, 또는 25 내지 50% 이상에 비슷할 것이다. 일반적으로, 주로 마우스 게놈 내로 도입된 상이한 V, J 및 D 영역의 수에 따라 적어도 약 1000개의 상이한 면역글로불린 (이상적으로는 IgG), 예를 들어 바람직하게는 10^4 내지 10^6개 이상이 생산될 것이다. 이들 면역글로불린은 일반적으로 약 1/2 이상의 고항원성 단백질, 예를 들어, 스타필로코커스 단백질 A를 인식할 것이다. 일반적으로, 면역글로불린은 예비선택된 항원에 대해 10^{-7} M 미만, 예를 들어 10^{-8} M 미만, 10^{-9} M 미만 또는 10^{-10} M 미만 또는 이보다 낮은 친화도 (K_D)를 보일 것이다.

[0187] 일부 실시양태에서, 소정의 항원 종류에 대한 항체 반응에서 제시된 V 유전자의 선택을 제한하기 위해 소정의 레퍼토리를 사용하여 마우스를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 소정의 레퍼토리를 갖는 중쇄 도입유전자는 예를 들어 인간에서 소정의 항원 종류에 대한 항체 반응에 우선적으로 사용되는 인간 V_H 유전자를 포함할 수 있다. 별법으로, 일부 V_H 유전자는 다양한 이유 (예를 들어, 소정의 항원에 대한 고친화도 V 영역을 코딩할 가능성이 낮거나; 체세포 돌연변이 및 친화도 고도화 (sharpening) 경향이 낮거나; 특정 인간에 대해 면역원성임)로 규정된 레퍼토리로부터 배제될 수 있다. 따라서, 다양한 중쇄 또는 경쇄 유전자 세그먼트를 함유하는 도입유전자의 재배열 전에, 상기 유전자 세그먼트는 트랜스제닉 동물 이외의 다른 유기체의 종으로부터 유도된 것으로서, 예를 들어 혼성화 또는 DNA 서열결정에 의해 쉽게 확인될 수 있다.

[0188] 상기한 트랜스제닉 및 트랜스염색체 마우스는 예를 들어 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 항원의 정제된 또는 농축 제제 및/또는 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2를 발현하는 세포로 면역화될 수 있다. 별법으로, 트랜스제닉 마우스는 인간 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2를 코딩하는 DNA로 면역화될 수 있다. 이어서, 마우스는 도입유전자내 스위치 재조합 (시스-스위칭)을 통해 클래스-스위칭을 겪고 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2와 반응성인 면역글로불린을 발현하는 B 세포를 생산할 것이다. 면역글로불린은 인간 항체 ("인간 서열 항체"로도 언급됨)일 수 있고, 여기서 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드는 체세포 돌연변이 및 V 영역 재조합 연결에 의해 유도되는 서열, 및 생식계열-코딩 서열을 포함할 수 있는 인간 도입유전자 서열에 의해 코딩되고; 상기 인간 항체는 인간 V_L 또는 V_H 유전자 세그먼트 및 인간 J_L 또는 D_H 및 J_H 세그먼트에 의해 코딩되는 폴리펩티드 서열에 실질적으로 동일한 것으로 언급될 수 있지만, 다른 비-생식계열 서열이 체세포 돌연변이 및 차별적인 (differential) V-J 및 V-D-J 재조합 연결의 결과로 존재할 수 있다. 각각의 항체 사슬의 적어도 80%의 가변 영역은 일반적으로 인간 생식계열 V, J, 및 중쇄의 경우 D 유전자 세그먼트에 의해 코딩되고; 종종 적어도 85%의 가변 영역이 도입유전자 상에 존재하는 인간 생식계열 서열에 의해 코딩되고; 종종 90 또는 95% 이상의 가변 영역 서열이 도입유전자 상에 존재하는 인간 생식계열 서열에 의해 코딩된다. 그러나, 비-생식계열 서열은 체세포 돌연변이 및 VJ 및 VDJ 연결에 의해 도입되기 때문에, 인간 서열 항체는 종종 마우스의 생식계열 내의 인간 도입유전자(들)에서 발견되는 인간 V, D, 또는 J 유전자 세그먼트에 의해 코딩되지 않는 일부 가변 영역 서열 (및 드물게는 불변 영역 서열)을 가질 것이다. 일반적으로, 상기 비-생식계열 서열 (또는 개별적인 뉴클레오티드 위치)는 CDR에서 또는 CDR 부근에서, 또는 체세포 돌연변이가 밀집된다고 알려진 영역에 밀집될 것이다.

[0189] 소정의 항원에 결합하는 인간 항체는 인간 서열 γ 사슬 (예를 들어 γ1, γ2a, γ2B, 또는 γ3) 및 인간 서열 경쇄 (예를 들어 카파)를 포함하는 인간 항체가 생산되도록 하는 이소형 스위칭으로부터 생산될 수 있다. 상기 이소형-스위칭된 인간 항체는 종종 친화도 증진 및 특히 2차 (또는 후속적인) 항원 시험접종 후에 항원에 의한 B 세포의 선택의 결과로서 하나 이상의 체세포 돌연변이(들)을 일반적으로 가변 영역에 및 종종 CDR의 약 10개의 잔기에서 또는 그 내부에 포함한다. 상기 고친화도 인간 항체의 결합 친화도 (K_D)는 10^{-7} M 미만, 예를 들어

10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-10} M 미만 또는 이보다 더 낮을 수 있다.

[0190] 본 발명의 다른 측면은 본원에서 설명되는 트랜스제닉 또는 트랜스염색체 마우스로부터 유도된 B 세포를 포함한다. B 세포는 인간 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2에 고친화도 (예를 들어, 10^{-7} M 미만)로 결합하는 인간 모노클로날 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0191] PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2에 대한 고친화도 인간 모노클로날 항체의 개발은 통합된 인간 면역글로불린 도입유전자를 포함하는 게놈을 갖는 트랜스제닉 마우스에서 인간 가변 영역 유전자 세그먼트의 레퍼토리를 팽창시키는 방법에 의해 용이해질 수 있고, 상기 방법은 상기 통합된 인간 면역글로불린 도입유전자에 존재하지 않는 V 영역 유전자 세그먼트를 포함하는 V 유전자 도입유전자를 게놈 내로 도입하는 것을 포함한다. 종종, V 영역 도입유전자는 인간 게놈에서 천연에서 발생할 수 있거나 또는 재조합 방법에 의해 별개로 함께 스플라이싱될 수 있는, 인간 V_H 또는 V_L (V_K) 유전자 세그먼트 어레이의 일부를 포함하는 효모 인공 염색체이고, 기능 이상 또는 생략된 V 유전자 세그먼트를 포함할 수 있다. 종종 적어도 5개 이상의 기능성 V 유전자 세그먼트가 YAC 상에 함유된다. 상기 변이에서, V 레퍼토리 팽창 방법에 의해 트랜스제닉 마우스를 생산하는 것이 가능하고, 여기서 마우스는 V 영역 도입유전자 상에 존재하는 V 영역 유전자 세그먼트에 의해 코딩되는 가변 영역 서열 및 인간 Ig 도입유전자 상에 코딩되는 C 영역을 포함하는 면역글로불린 사슬을 발현한다. V 레퍼토리 팽창 방법에 의해, 적어도 5개의 별개의 V 유전자를 갖는 트랜스제닉 마우스가 생성될 수 있고; 예를 들어 적어도 약 24개 이상의 V 유전자를 포함하는 마우스가 생성될 수 있다. 일부 V 유전자 세그먼트는 비-기능성 (예를 들어, 위유전자 (pseudogene) 등)일 수 있고; 상기 세그먼트는 유지될 수 있거나 또는 필요한 경우 당업자에게 이용가능한 재조합 방법에 의해 선택적으로 결실될 수 있다.

[0192] 마우스 생식계열이, J 및 C 유전자 세그먼트를 포함하는 인간 Ig 도입유전자에 실질적으로 존재하지 않는 팽창된 V 세그먼트 레퍼토리를 갖는 기능성 YAC를 포함하도록 조작되면, 그 특징은 팽창된 V 세그먼트 레퍼토리를 갖는 기능성 YAC가 상이한 인간 Ig 도입유전자를 갖는 마우스 생식계열 내로 번식된 배경을 포함하여 다른 유전자 배경 내로 증식하고, 번식될 수 있다. 팽창된 V 세그먼트 레퍼토리를 갖는 다수의 기능성 YAC는 인간 Ig 도입유전자 (또는 다수의 인간 Ig 도입유전자)와 함께 생식계열 내로 번식될 수 있다. 본원에서 YAC 도입유전자로 언급되지만, 상기 도입유전자는 게놈 내로 통합될 때 실질적으로 효모 서열, 예를 들어 효모에서 자동 복제에 필요한 서열이 결여될 수 있고, 상기 서열은 효모에서의 복제가 더이상 필요하지 않게 된 후 (즉, 마우스 ES 세포 또는 마우스 프로자이고트 (prozygote) 내로 도입하기 전에), 유전공학 (예를 들어, 제한 소화 및 펄스장 (pulsed-field) 겔 전기영동 또는 다른 적합한 방법)에 의해 임의로 제거될 수 있다. 인간 서열 면역글로불린 발현의 특징을 증식시키는 방법은 인간 Ig 도입유전자(들)을 갖고, 또한 팽창된 V 세그먼트 레퍼토리를 갖는 기능성 YAC도 임의로 갖는 트랜스제닉 마우스의 번식을 포함한다. V_H 및 V_L 유전자 세그먼트 둘 모두는 YAC 상에 존재할 수 있다. 트랜스제닉 마우스는 다른 인간 도입유전자, 예를 들어 인간 Ig 도입유전자 및/또는 다른 인간 림프구 단백질을 코딩하는 도입유전자를 보유하는 배경을 포함하여 의사에 의해 요구되는 임의의 배경 내로 번식될 수 있다. 본 발명은 또한 팽창된 V 영역 레퍼토리 YAC 도입유전자를 갖는 트랜스제닉 마우스에 의해 생산되는 고친화도 인간 서열 면역글로불린을 제공한다. 상기 내용이 본 발명의 트랜스제닉 동물의 바람직한 실시양태를 설명하였지만, 다음과 같은 4개의 범주로 분류되는 다른 실시양태도 고려된다:

[0193] (1) 비재배열된 중쇄 및 재배열된 경쇄 면역글로불린 도입유전자를 포함하는 트랜스제닉 동물;

[0194] (2) 비재배열된 중쇄 및 비재배열된 경쇄 면역글로불린 도입유전자를 포함하는 트랜스제닉 동물;

[0195] (3) 재배열된 중쇄 및 비재배열된 경쇄 면역글로불린 도입유전자를 포함하는 트랜스제닉 동물; 및

[0196] (4) 재배열된 중쇄 및 재배열된 경쇄 면역글로불린 도입유전자를 포함하는 트랜스제닉 동물.

[0197] VI. 항체 접합체/면역독소

[0198] 다른 측면에서, 본 발명은 치료 모이어티, 예를 들어 세포독소, 약물 (예를 들어, 면역억제제) 또는 방사성 동위원소에 접합된 인간 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 항체를 특징으로 한다. 세포독소에 접합될 때, 상기 항체 접합체는 "면역독소"로서 언급된다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 유해한 (예를 들어, 세포를 죽이는) 임의의 물질을 포함한다. 그 예는 탁솔, 시토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티듐 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 푸로마이신 및 그의 유사체 또는 상동체를 포함한다. 치료제는 항대사

물질 (예를 들어, 메토트렉세이트, 6-머캅토퓨린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제 (예를 들어, 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU) 및 로무스틴 (CCNU), 시클로포스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 백금 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린 (예를 들어, 다우노루비신 (이전의 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제 (예를 들어, 닥티노마이신 (이전의 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신 (AMC)), 및 항-유사분열제 (예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 본 발명의 항체는 관련된 질환, 예를 들어 암의 치료를 위한 세포독성 방사성 의약품을 생성하기 위해 방사성 동위원소, 예를 들어 방사성 요오드에 접합될 수 있다.

[0199] 접합된 인간 PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2 항체는 예를 들어 제시된 치료 요법의 효능을 결정하기 위한 임상 시험 절차의 일부로서 조직 내의 폴리펩티드 수준을 모니터링하기 위해 진단 또는 예측 목적으로 사용될 수 있다. 검출은 항체를 검출가능한 물질에 커플링 (즉, 물리적 연결)시킴으로써 용이해질 수 있다. 검출가능한 물질의 예는 다양한 효소, 보결분자단, 형광 물질, 발광 물질, 생체발광 물질 및 방사성 물질을 포함한다. 적합한 효소의 예는 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타제, P-갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하고; 적합한 보결분자단 복합체의 예는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하고; 적합한 형광 물질의 예는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린을 포함하고; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하고; 생체발광 물질의 예는 루시퍼라제, 루시페린 및 아에쿠오린을 포함하고, 적합한 방사성 물질의 예는 ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S 또는 ^{3}H를 포함한다.

[0200] 본 발명의 항체 접합체는 제시된 생물학적 반응을 바꾸기 위해 사용될 수 있다. 치료 모이어티는 전통적인 화학적 치료제로 제한되는 것으로 간주되지 않아야 한다. 예를 들어, 약물 모이어티는 요구되는 생물학적 활성을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 상기 단백질은 예를 들어 효소 활성 독소, 또는 그의 활성 단편, 예를 들어 아브린, 리신 A, 슈도모나스 (pseudomonas) 외독소, 또는 디프테리아 독소; 단백질, 예를 들어 종양 괴사 인자 또는 인터페론-γ; 또는, 생물학적 반응 변경제, 예를 들어 림포킨, 인터류킨-1 ("IL-1"), 인터류킨-2 ("IL-2"), 인터류킨-6 ("IL-6"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 ("GM-CSF"), 과립구 콜로니 자극 인자 ("G-CSF"), 또는 다른 사이토킨 또는 성장 인자를 포함할 수 있다.

[0201] 그러한 치료 모이어티를 항체에 접합시키는 기술은 잘 알려져 있다 (예를 들어, 문헌 [Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)]; [Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)]; [Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985)]; ["Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)], 및 [Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)] 참조).

[0202] VII. 제약 조성물

[0203] 다른 측면에서, 본 발명은 제약상 허용되는 담체와 함께 제형화된 본 발명의 모노클로날 항체, 또는 그의 항원-결합 부분(들) (예를 들어, 항원-결합 단편)의 하나 또는 조합물을 포함하는 조성물, 예를 들어 제약 조성물을 제공한다. 한 실시양태에서, 조성물은 본 발명의 다수의 (예를 들어, 2개 이상의) 단리된 인간 항체의 조합물을 포함한다. 바람직하게는, 조성물의 각각의 항체는 PD-1, PD-L1, 및/또는 PD-L2의 별개의 예비-선택된 에피토프에 결합한다.

[0204] 또한, 본 발명의 제약 조성물은 조합 요법으로, 즉, 다른 물질과 조합되어 투여될 수 있다. 예를 들어, 조합 요법은 본 발명의 조성물을 적어도 하나 이상의 추가의 치료제, 예를 들어 소염제, DMARD (질병 변경 항류마티스 약물), 면역억제제, 화학치료제, 및 건선치료제와 함께 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 제약 조성물은 방사선 요법과 함께 투여될 수 있다. 다른 항체, 예를 들어 CD4 특이적 항체 및 IL-2 특이적 항체와의 동시투여가 또한 본 발명에 포함된다.

[0205] 본원에서 사용되는 바와 같이, "제약상 허용되는 담체"는 생리학상 상용성인 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코

팅, 항균 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척수 또는 상피 투여 (예를 들어, 주사 또는 주입에 의한)에 적합하다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물, 즉, 항체, 이중특이적 및 다중특이적 분자는 산의 작용 및 화합물을 불활성화시킬 수 있는 다른 천연 조건으로부터 화합물을 보호하는 물질로 코팅될 수 있다.

[0206] "제약상 허용되는 염"은 모 화합물의 요구되는 생물학적 활성을 보유하고 바람직하지 않은 임의의 독성 효과를 제시하지 않는 염을 의미한다 (예를 들어, 문헌 [Berge, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19] 참조). 그러한 염의 예는 산 부가염 및 염기 부가염을 포함한다. 산 부가염은 무독성 무기산, 예를 들어 염산, 질산, 인산, 황산, 브로화수소산, 요오드화수소산, 아인산 등으로부터 유도된 것, 및 무독성 유기산, 예를 들어 지방족 모노- 및 디카르복실산, 페닐-치환 알칼산, 히드록시 알칼산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 술폰산 등으로부터 유도된 것을 포함한다. 염기 부가염은 알칼리성 토금속, 예를 들어 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등으로부터 유도된 것, 및 무독성 유기 아민, 예를 들어 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등으로부터 유도된 것을 포함한다.

[0207] 본 발명의 조성물은 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 투여 방식은 요구되는 결과에 따라 상이할 것이다. 활성 화합물은 신속한 방출에 대해 화합물을 보호하는 담체와 함께 제조될 수 있다 (예를 들어, 제어 방출 제형, 예를 들어 임플란트, 경피 패치, 및 미세봉입된 전달 시스템). 생분해성, 생체적합성 중합체, 예를 들어 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안히드라이드 (polyanhydride), 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 상기 제형의 제조를 위한 많은 방법이 특허를 받았거나 일반적으로 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, 문헌 [Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]을 참조한다.

[0208] 본 발명의 화합물을 특정 투여 경로에 의해 투여하기 위해서, 화합물을 그의 불활성화를 방지하는 물질로 코팅하거나, 또는 화합물을 상기 물질과 함께 동시 투여하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들어, 화합물은 적절한 담체, 예를 들어, 리포좀, 또는 희석제 내에서 대상체에게 투여될 수 있다. 제약상 허용되는 희석제는 염수 및 버퍼 수용액을 포함한다. 리포좀은 수중유중수 CGF 에멀젼 및 통상적인 리포좀을 포함한다 (Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27).

[0209] 제약상 허용되는 담체는 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 주사가능 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 제약 활성 물질에 대한 상기 매질 및 물질은 당업계에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 물질이 활성 화합물과 비상용성인 경우를 제외하고, 본 발명의 제약 조성물에서 그의 사용이 고려된다. 보충 활성 화합물도 조성물 내로 혼입될 수 있다.

[0210] 치료 조성물은 일반적으로 멸균되어야 하고, 제조 및 보관 조건 하에서 안정하여야 한다. 조성물은 용액, 미세에멀젼, 리포좀, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 규칙적인 (ordered) 구조로 제형화될 수 있다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 포함하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 코팅, 예를 들어 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에, 조성물에 등장화제, 예를 들어, 당, 다가알콜, 예를 들어 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사가능한 조성물의 연장된 흡수는 조성물에 흡수를 지연하는 물질, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시킴으로써 달성될 수 있다.

[0211] 멸균 주사가능 용액은 요구되는 양의 활성 화합물을 적절한 용매 내에 상기 제시한 구성분의 하나 또는 조합물과 함께 혼입한 후, 멸균 미세여과에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 염기성 분산 매질 및 상기 제시한 요구되는 다른 구성분을 포함하는 멸균 비히클 내에 활성 화합물을 혼입함으로써 제조된다. 멸균 주사가능 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 그의 이전에 멸균 여과된 용액으로부터 활성 구성분 및 임의의 추가의 요구되는 구성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 동결건조 (lyophilization)이다.

[0212] 투여 용법은 요구되는 최적 반응 (예를 들어, 치료 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 볼러스 (bolus)가 투여될 수 있거나, 수회의 분할 용량이 시간에 걸쳐 투여될 수 있거나 또는 용량은 치료 상황의 긴급성에 의해 제시되는 바에 따라 감소 또는 증가될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 인간 항체는 피하 주사에 의해 매주 1 또는 2회 또는 피하 주사에 의해 매달 1 또는 2회 투여될 수 있다. 비경구 조성물을 투여 용이성 및 용량의 균일성을 위해 단위 투여 형태로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용되는 단위 투여 형태는 치료되는 대상체를 위한 단일 용량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 의미하고; 각각의 단위는 필요한 제

약 담체와 함께 요구되는 치료 효과를 생성하기 위해 계산된 소정량의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 단위 투여 형태에 대한 내역은 (a) 활성 화합물의 특유의 특징 및 달성되는 특정 치료 효과, 및 (b) 개체의 치료를 위한 상기 활성 화합물의 배합에 고유한 제한 사항에 의해 좌우되고, 이에 직접적으로 의존한다.

[0213] 한 실시양태에서, 본 발명의 물질은 항체이다. 본원에서 규정되는 바와 같이, 항체의 치료 유효량 (즉, 효과적인 용량)은 약 0.001 내지 30 mg/kg (체중), 또는 약 0.01 내지 25 mg/kg (체중), 또는 약 0.1 내지 20 mg/kg (체중), 또는 약 1 내지 10 mg/kg, 2 내지 9 mg/kg, 3 내지 8 mg/kg, 4 내지 7 mg/kg, 또는 5 내지 6 mg/kg (체중)이다. 당업자는 질병 또는 질환의 심도, 이전의 치료, 전반적인 건강 및/또는 대상체의 나이, 및 존재하는 다른 질병을 포함하고 이로 제한되지 않는 특정 요인이 대상체를 효과적으로 치료하기 위해 필요한 용량에 영향을 줄 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 치료 유효량의 항체를 사용한 대상체의 치료는 단일 치료를 포함할 수 있거나 또는 바람직하게는 일련의 치료를 포함할 수 있다. 또한, 치료를 위해 사용되는 항체의 효과적인 용량은 특정 치료 과정에 걸쳐 증가하거나 감소할 수 있음이 이해될 것이다. 용량의 변경은 진단 분석의 결과에 따라 이루어질 수 있다.

[0214] 제약상 허용되는 항산화제의 예는 다음을 포함한다: (1) 수용성 항산화제, 예를 들어 아스코르브산, 시스테인 히드로클로라이드, 중황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 아황산나트륨 등; (2) 지용성 항산화제, 예를 들어 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 (3) 금속 킬레이팅제, 예를 들어 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등.

[0215] 치료 조성물에 대해, 본 발명의 제형은 경구, 코, 국소 (구강 및 설하 포함), 직장, 질내 및/또는 비경구 투여에 적합한 것을 포함한다. 제형은 단위 투여 형태로 편리하게 제시될 수 있고, 제약업계에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 단일 투여 형태를 생산하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 구성분의 양은 치료되는 대상체 및 특정 투여 방식에 따라 상이할 것이다. 단일 투여 형태를 생산하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 구성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 생성하는 조성물의 양일 것이다. 일반적으로, 상기 양은 100% 중에서 약 0.001% 내지 약 90%, 별법으로 약 0.005% 내지 약 70%, 또는 별법으로 약 0.01% 내지 약 30%의 활성 구성분일 것이다.

[0216] 또한, 질내 투여에 적합한 본 발명의 제형은 적절한 것으로 당업계에 공지된 상기 담체를 함유하는 페사리, 탐폰, 크림, 겔, 페이스트, 포움 또는 스프레이 제형을 포함한다. 본 발명의 조성물의 국소 또는 경피 투여용 투여 형태는 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 겔, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 활성 화합물은 제약상 허용되는 담체, 및 임의의 보존제, 버퍼, 또는 필요할 수 있는 추진제와 함께 멸균 조건 하에서 혼합될 수 있다.

[0217] 본원에서 사용되는 구문 "비경구 투여" 및 "비경구 투여되는"은 장관내 및 국소 투여 이외의 다른 투여 방식, 대체로 주사에 의한 투여를 의미하고, 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 관절낭내, 안구내, 심장내, 피부내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0218] 본 발명의 제약 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 그의 적합한 혼합물, 식물유, 예를 들어 올리브 오일, 및 주사가능한 유기 에스테르, 예를 들어 에틸 올레에이트를 포함한다. 적절한 유동성은 예를 들어 코팅 물질, 예를 들어 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0219] 또한, 이들 조성물은 어쥬번트 (adjuvant), 예를 들어 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제를 함유할 수 있다. 미생물의 존재 예방은 상기 멸균 절차 및 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등의 혼입에 의해 달성될 수 있다. 또한, 등장화제, 예를 들어 당, 염화나트륨 등을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 주사가능한 제약 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 물질, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 혼입에 의해 유도될 수 있다.

[0220] 본 발명의 화합물은 인간 및 동물에게 제약으로서 투여될 때, 단독으로 또는 예를 들어 0.001 내지 90% (예를 들어, 0.005 내지 70%, 예를 들어 0.01 내지 30%)의 활성 구성분을 제약상 허용되는 담체와 함께 포함하는 제약 조성물로서 제공될 수 있다.

[0221] 선택된 투여 경로에 무관하게, 적합한 수화된 형태로 사용될 수 있는 본 발명의 화합물, 및/또는 본 발명의 제

약 조성물은 당업자에게 알려진 통상적인 방법에 의해 제약상 허용되는 투여 형태로 제형화된다.

[0222] 본 발명의 제약 조성물에서 활성 구성분의 실제 투여 수준은 환자에게 독성을 보이지 않으면서 특정 환자, 조성물, 및 투여 방식에 대해 요구되는 치료 반응을 달성하기 위해 효과적인 활성 구성분의 양을 얻기 위해서 상이할 수 있다. 선택된 투여 수준은 사용되는 본 발명의 특정 조성물, 또는 그의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배설 속도, 치료 지속기간, 사용되는 특정 조성물과 조합 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료되는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 전반적인 건강 및 이전의 의료력, 및 의료 분야에 공지된 다른 요인을 비롯한 다양한 약동학적 인자에 따라 결정될 것이다. 통상적인 기술 수준의 의사 또는 수의사는 요구되는 제약 조성물의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 제약 조성물에 사용되는 본 발명의 화합물의 용량을 목적하는 치료 효과 달성에 필요한 것보다 낮은 수준에서 시작하여, 목적하는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점차적으로 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 조성물의 적합한 1일 용량은 치료 효과를 나타내기 위해 효과적인 최저 용량인 화합물의 양일 것이다. 그러한 효과적인 용량은 일반적으로 상기 기재된 인자에 따라 결정될 것이다. 정맥내, 근육내, 복강내, 또는 피하 투여, 바람직하게는 표적 부위에 근접하여 투여되는 것이 바람직하다. 요구될 경우, 치료 조성물의 효과적인 1일 용량은 임의로 단위 투여 형태로 하루 동안 적절한 간격으로 별개로 2, 3, 4, 5, 6회 이상의 하위-용량으로 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물을 단독으로 투여할 수 있지만, 화합물을 제약 제형 (조성물)으로서 투여하는 것이 바람직하다.

[0223] 치료 조성물은 당업계에 공지된 의료 장치로 투여될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 본 발명의 치료 조성물은 무바늘 피하 주사 장치, 예를 들어 미국 특허 5,399,163, 5,383,851, 5,312,335, 5,064,413, 4,941,880, 4,790,824, 또는 4,596,556에 개시된 장치로 투여될 수 있다. 본 발명에서 유용한 공지의 임플란트 및 모듈의 예는 제어된 속도로 의약을 분배하기 위한 이식가능한 미세주입 펌프를 개시하고 있는 미국 특허 4,487,603; 피부를 통해 의약을 투여하기 위한 치료 장치를 개시하고 있는 미국 특허 4,486,194; 정밀한 주입 속도로 의약을 전달하기 위한 약물 주입 펌프를 개시하고 있는 미국 특허 4,447,233; 연속적인 약물 전달을 위한 가변 유동 이식가능 주입 장치를 개시하고 있는 미국 특허 4,447,224; 다중-챔버 구획을 갖는 삼투 약물 전달 시스템을 개시하고 있는 미국 특허 4,439,196; 및 삼투 약물 전달 시스템을 개시하고 있는 미국 특허 4,475,196을 포함한다. 많은 다른 상기 임플란트, 전달 시스템, 및 모듈은 당업자에게 알려져 있다.

[0224] 특정 실시양태에서, 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 생체 내에서 적합한 분포를 보장하도록 제형화될 수 있다. 예를 들어, 뇌-혈액 장벽 (BBB)은 많은 고친수성 화합물을 차단한다. 본 발명의 치료 화합물이 BBB를 가로지도록 보장하기 위해 (필요한 경우), 화합물은 예를 들어 리포좀 내에 제형화될 수 있다. 리포좀의 제조 방법에 대해서는 예를 들어, 미국 특허 4,522,811; 5,374,548; 및 5,399,331을 참조한다. 리포좀은 특이적 세포 또는 장기 내로 선택적으로 수송되어 표적화된 약물 전달을 향상시키는 하나 이상의 모이어티를 포함할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685] 참조). 예시적인 표적화 모이어티는 엽산 또는 비오틴 (예를 들어, 미국 특허 5,416,016 (Low et al.) 참조); 만노시드 (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); 항체 ([P. G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140]; [M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180]); 계면활성제 단백질 A 수용체 (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134) (그의 상이한 종은 본 발명의 제형, 및 본 발명의 분자의 성분을 포함할 수 있다); p120 (Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); 또한, 문헌 [K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123]; [J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273] 참조)을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 치료 화합물은 리포좀 내에 제형화되고; 다른 실시양태에서, 리포좀은 표적화 모이어티를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 리포좀 내의 치료 화합물은 볼러스 주사에 의해 종양 또는 감염에 근접한 부위에 전달된다. 조성물은 쉽게 주사가능한 정도로 유동성이어야 한다. 조성물은 제조 및 보관 조건 하에서 안정하여야 하고, 미생물, 예를 들어 세균 및 진균의 오염 작용에 대해 보호되어야 한다.

[0225] 조성물은 멸균되고, 주사기에 의해 조성물을 전달할 수 있는 정도로 유동성이어야 한다. 물 이외에, 담체는 등장성 완충 염수 용액, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 코팅, 예를 들어 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에, 조성물에 등장화제, 예를 들어, 당, 다가알콜, 예를 들어 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직하다. 주사가능한 조성물의 장기간 흡수는 조성물에 흡수를 지연하는 물질, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시킴으로써 달성될 수 있다.

[0226] 활성 화합물이 상기한 바와 같이 적절하게 보호될 경우, 화합물은 예를 들어 불활성 희석제 또는 동화가능한 식

용 담체와 함께 경구로 투여될 수 있다.

[0227] VIII. 본 발명의 용도 및 방법

[0228] 본원에 기재된 항체 (항체의 유도체 및 접합체 포함) 및 항체를 함유하는 조성물은 다양한 시험관내 및 생체내 진단 및 치료 용도에서 사용될 수 있다 (예를 들어, 면역 반응을 상향- 또는 하향-조정함으로써). 예를 들어, PD-1 또는 B7-1에 대한 PD-1 리간드 결합은 억제성 신호를 전달한다. 따라서, PD-1과 PD-1 리간드의, 또는 PD-1 리간드와 B7 폴리펩티드의 상호작용의 조정은 면역 반응을 조정할 수 있다. PD-1 리간드는 또한 T 세포를 동시자극할 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, PD-1 리간드와 PD-1 또는 B7의 상호작용을 차단하는 항체는 억제성 신호전달을 방지할 수 있다. 한 실시양태에서, PD-1 리간드의 동시자극 신호를 차단하는 항체는 면역 세포에 대한 동시자극 신호를 차단한다. 또한, PD-L2의 라이게이션은 수지상 세포의 사이토킨 분비 및 생존을 유도할 수 있다. 따라서, PD-L2 라이게이션을 차단하는 항체는 수지상 세포 생존을 억제하고 수지상 세포에 의한 사이토킨 발현을 감소시키고, 이들 메카니즘을 통해 면역 반응을 억제할 수 있다. 특히, 본원에서 설명되는 항체는 예를 들어 각각 그 전부가 본원에 참고로 포함된 문헌 [Keir et al. (2008) Annu. Rev. Immunol. 26:677]; [Sharpe et al., (2007) Nat. Immunol. 8:239]; [Freeman et al. (2007) J. Exp. Med. 10:2223]에 논의된 바와 같이 PD-1, PD-L1, 및/또는 PD-L2에 의해 매개된 특정 병태에 관련된 진단, 예측, 예방, 및 치료 용도에 유용하다.

[0229] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체 및 항원-결합 단편은 신경퇴행성 질병 (노인성 치매 (geriopsychosis), 알쯔하이머 (Alzheimer) 병, 다운증후군, 파킨슨 (Parkinson) 병, 크로이츠펠트-야콥 (Creutzfeldt-jakob) 병, 당뇨성 신경병증, 파킨슨 증후군, 헌팅턴 (Huntington) 병, 마카도-조셉 (Machado-Joseph) 병, 근위축성 측삭 경화증, 당뇨성 신경병증, 및 크로이츠펠트 크로이츠펠트-야콥병)에 대한 진단, 예측, 예방, 및 치료 용도에 유용하다.

[0230] 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 및 항원-결합 단편은 면역 반응을 촉진하는 질병, 예를 들어, 천식, 자가면역 질병 (사구체 신염, 관절염, 확장형 심근병증-유사 질병, 궤양성 대장염, 쇼그렌 (Sjogren) 증후군, 크론 (Crohn) 병, 전신성 홍반성, 만성 류마티스 관절염, 다발 경화증, 건선, 알레르기성 접촉 피부염, 다발성건염, 경피증, 결절 주변동맥염, 류마티스열, 보통 백반증, 인슐린 의존성 당뇨병, 베체트 (Behcet) 병, 하시모토 (Hashimoto) 병, 애디슨 (Addison) 병, 피부근염, 중증 근무력증, 라이터 (Reiter) 증후군, 그레이브스 (Graves) 병, 악성 빈혈, 굿파스쳐 (Goodpasture) 증후군, 불임병, 만성 활동형 간염, 천포창, 자가면역 혈소판 감소성 자반증, 및 자가면역 용혈성 빈혈, 활동형 만성 간염, 애디슨 병, 항-인지질 증후군, 아토피성 알레르기, 자가면역 위축 위염, 무위산증 자가면역, 셀리악병, 쿠싱 (Cushing) 증후군, 피부근염, 원판상 루푸스, 홍반, 굿파스쳐 증후군, 하시모토 (Hashimoto) 갑상선염, 특발성 부신 위축증, 특발성 혈소판감소증, 인슐린-의존성 당뇨, 램버트-이튼 (Lambert-Eaton) 증후군, 루푸스모양 간염, 일부 경우의 림프구감소증, 혼합형 결합 조직 질병, 유천포창, 보통 천포창, 악성 빈혈, 수정체성 포도막염, 결절 다발동맥염, 자가면역성 다선 증후군, 원발성 담즙성 간경화증, 원발 경화성 담관염, 레이노 (Raynaud) 증후군, 재발성 다발성 연골염, 슈미트 (Schmidt) 증후군, 제한성 공피증 (또는 크레스트 (crest) 증후군), 교감성 안염, 전신 홍반성 루푸스, 다까야스 (Takayasu) 동맥염, 관자 동맥염, 갑상선중독증, b형 인슐린 저항성, 궤양 대장염 및 베게너 (Wegener) 육아종증)의 진단, 예측, 예방, 및 치료 용도 (예를 들어, 질병의 발병 또는 진행의 치료 및 지연)에 유용하다.

[0231] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 및 항원-결합 단편은 지속 감염성 질병 (예를 들어, HPV, HBV, C형 간염 바이러스 (HCV), 레트로바이러스, 예를 들어 인간 면역결핍 바이러스 (HIV-1 및 HIV-2), 헤르페스 바이러스, 예를 들어 엡스타인 바르 (Epstein Barr) 바이러스 (EBV), 사이토메갈로바이러스 (CMV), HSV-1 및 HSV-2, 및 인플루엔자 바이러스를 비롯한 바이러스 감염성 질병)의 치료 및/또는 예방을 위해 진단, 예측, 예방, 및 치료 용도 (예를 들어, 질병의 발병 및 진행의 치료 및 지연)에 유용하다. 본원에서 설명된 바와 같이 이용될 수 있는 병원체와 관련된 다른 항원은 다양한 기생충의 항원이고, 말라리아, 바람직하게는 NANP의 반복체를 기초로 한 말라리아 펩티드를 포함한다. 또한, 아스페르길루스 (*Aspergillus*), 브루기아 (*Brugia*), 칸디다 (*Candida*), 클라미디아 (*Chlamydia*), 코시디아 (*Coccidia*), 크립토코커스 (*Cryptococcus*), 디로필라리아 (*Dirofilaria*), 고노코커스 (*Gonococcus*), 히스토플라스마 (*Histoplasma*), 리슈마니아 (*Leishmania*), 미코박테리움 (*Mycobacterium*), 미코플라스마 (*Mycoplasma*), 파라메슘 (*Paramecium*), 페르투시스 (*Pertussis*), 플라스모듐 (*Plasmodium*), 뉴모코커스 (*Pneumococcus*), 뉴모시스티스 (*Pneumocystis*), 리케챠 (*Rickettsia*), 살모넬라 (*Salmonella*), 시겔라 (*Shigella*), 스타필로코커스 (*Staphylococcus*), 스트렙토코커스 (*Streptococcus*), 톡소플라스마 (*Toxoplasma*) 및 비브리오콜레라에 (*Vibriocholerae*)와 같은 세균, 진균 및 다른 병원성 질병이 포함된다. 예시적인 종은 네이세리아 고노레아 (*Neisseria gonorrhea*), 미코박테리움 튜베르큘로시스

(*Mycobacterium tuberculosis*), 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*), 칸디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*), 트리코모나스 바기날리스 (*Trichomonas vaginalis*), 해모필루스 바기날리스 (*Haemophilus vaginalis*), 그룹 B 스트렙토코커스 (*Streptococcus*) 종, 미크로플라스마 호미니스 (*Microplasma hominis*), 헤모필루스 두크레이이 (*Hemophilus ducreyi*), 그라눌로마 인귀날레 (*Granuloma inguinale*), 림포파티아 베네레움 (*Lymphopathia venereum*), 트레포네마 팔리둠 (*Treponema pallidum*), 브루셀라 아보르투스 (*Brucella abortus*), 브루셀라 멜리텐시스 (*Brucella melitensis*), 브루셀라 수이스 (*Brucella suis*), 브루셀라 카니스 (*Brucella canis*), 캄필로박터 페투스 (*Campylobacter fetus*), 캄필로박터 페투스 인테스날리스 (*Campylobacter fetus intestinalis*), 렙토스피라 포모나 (*Leptospira pomona*), 리스테리아 모노시토게네스 (*Listeria monocytogenes*), 브루셀라 오비스 (*Brucella ovis*), 클라미디아 시타시 (*Chlamydia psittaci*), 트리코모나스 포에투스 (*Trichomonas foetus*), 톡소플라스마 곤디이 (*Toxoplasma gondii*), 에셔리키아 콜라이 (*Escherichia coli*), 악티노바실러스 에쿠울리 (*Actinobacillus equuli*), 살모넬라 아보르투스 오비스 (*Salmonella abortus ovis*), 살모넬라 아보르투스 에쿠이 (*Salmonella abortus equi*), 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*), 코리네박테리움 에쿠이 (*Corynebacterium equi*), 코리네박테리움 피오게네스 (*Corynebacterium pyogenes*), 악티노바실러스 세미니스 (*Actinobaccilus seminis*), 미코플라스마 보비게니탈리움 (*Mycoplasma bovigenitalium*), 아스페르길루스 푸미가투스 (*Aspergillus fumigatus*), 압시디아 라모사 (*Absidia ramosa*), 트리파노소마 에쿠이페르둠 (*Trypanosoma equiperdum*), 바베시아 카발리 (*Babesia caballi*), 클로스트리듐 테타니 (*Clostridium tetani*), 클로스트리듐 보툴리눔 (*Clostridium botulinum*); 또는 진균, 예를 들어 파라콕시디오이데스 브라실리엔시스 (*Paracoccidioides brasiliensis*); 또는 다른 병원체, 예를 들어, 플라스모듐 팔시파룸 (*Plasmodium falciparum*)을 포함한다. 또한, NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases) 우선순위 (priority) 병원체가 포함된다. 이들은 카테로기 A 물질, 예를 들어 대두창 (천연두), 바실러스 안트라시스 (*Bacillus anthracis*) (탄저병), 에르시니아 페스티스 (*Yersinia pestis*) (페스트), 클로스트리듐 보툴리눔 (*Clostridium botulinum*) 독소 (보툴리눔 독소증), 프란시셀라 툴라렌시스 (*Francisella tularensis*) (야생토끼병), 필로바이러스 (에볼라 출혈열, 마르부르크 (Marburg) 출혈열), 아레나바이러스 (라싸 (라싸열), 주닌 (아르헨티나 출혈열) 및 관련된 바이러스); 카테고리 B 물질, 예를 들어 콕시엘라 부르네티 (*Coxiella burnetii*) (Q 열), 브루셀라 종 (브루셀라증), 부르콜데리아 말레이 (*Burkholderia mallei*) (마비저), 알파바이러스 (베네주엘라 뇌척수염, 동부형 및 서부형 말 뇌척수염), 리시누스 코뮤니스 (*Ricinus communis*) (피마자)로부터의 리신 독소, 클로스트리듐 페르프린겐스 (*Clostridium perfringens*)로부터의 엡실론 독소; 스타필로코커스 장독소 B, 살모넬라 종, 시겔라 디센테리아에 (*Shigella dysenteriae*), 에셔리키아 콜라이 균주 0157:H7, 비브리오 콜레라에 (*Vibrio cholerae*), 크립토스포리듐 파르붐 (*Cryptosporidium parvum*); 카테고리 C 물질, 예를 들어 니파 바이러스, 한타바이러스, 진드기 매개 출혈열 바이러스, 진드기 매개 뇌염 바이러스, 황열병, 및 다약제-내성 결핵; 기생충, 예를 들어 주혈흡충 (*Schistosoma*) 및 촌충 (*Taenia*); 및 원충, 예를 들어 리슈마니아 (예를 들어, 엘. 멕시카나 (*L. mexicana*)) 및 플라스모듐을 포함한다.

[0232] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편은 장기 이식편 거부, 이식편-대-숙주 질병 (GVHD), 알레르기성 질병, 및 PD-1, PD-L1, 및/또는 PD-L2가 참여하는 면역 반응의 약화에 의해 유발되는 질병, 예를 들어 암 및 감염성 질병의 진단, 예측, 예방, 및 치료 용도에 유용하다.

[0233] 본원에서 설명되는 항체 또는 항원-결합 단편은 공지의 방법에 따라, 예를 들어 정맥내 (예를 들어, 볼러스로서 또는 일정 시간에 걸친 연속적인 주입에 의해), 피하, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 관절내, 활액내, 경막내, 또는 흡입 경로 투여에 의해 대상체에게 투여된다.

[0234] 대상체는 바람직한 임상 결과를 포함하여 하나 이상의 유익한 또는 원하는 결과가 얻어질 때 치료된다. 본 발명의 목적에서, 유익한 또는 원하는 임상 결과는 다음 중 하나 이상을 포함하고, 이로 제한되지 않는다: 질병에 따른 하나 이상의 증상 감소, 질병에 걸린 사람의 삶의 질 증가, 질병 치료에 필요한 다른 의약의 용량 감소, 질병의 진행 지연, 및/또는 개체의 생존 연장.

[0235] 1. 스크리닝 방법

[0236] 본 발명의 한 측면은 동시자극을 조정함으로써 면역 반응을 조정하기 위해 본 발명의 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다 (예를 들어, PD-1, PD-L1, 또는 PD-L2의 기능을 조정하는 항체). 상기 방법은 세포 기반 및 비-세포 기반 분석을 비롯하여 스크리닝 분석을 이용한다. 한 실시양태에서, 분석은 PD-1 리간드 및 PD-1의 상호작용을 조정하는 항체를 확인하는 방법을 제공한다. 다른 실시양태에서, 분석은 PD-1 리간드와 B7 폴리펩티드 사

이의 상호작용을 조정하는 항체를 확인하는 방법을 제공한다.

[0237] 한 실시양태에서, 본 발명은 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2에 결합하거나 그의 활성을 조정하는, 예를 들어, 그의 동족 결합 파트너와 상호작용하는 (예를 들어, 그에 결합하는) 폴리펩티드의 능력을 조정하는 후보 또는 시험 항체를 스크리닝하기 위한 분석에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 면역 반응을 조정하기 위해 항체를 확인하는 방법은 PD-1 및 PD-1 리간드 사이의 상호작용을 조정하는, 예를 들어 향상 또는 억제하는 항체의 능력을 결정하고, PD-1 리간드 및 B7 폴리펩티드 사이의 상호작용을 조정하는 항체의 능력을 추가로 결정하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, PD-1 리간드 및 PD-1 사이의 상호작용을 조정하는 항체 (예를 들어, PD-1 리간드 및 B7 폴리펩티드 사이의 상호작용을 조정하지 않으면서)가 선택된다. 다른 실시양태에서, PD-1 리간드 및 B7 폴리펩티드 사이의 상호작용을 조정하는 항체 (예를 들어, PD-1 리간드 및 PD-1 사이의 상호작용을 조정하지 않으면서)가 선택된다.

[0238] 다른 실시양태에서, 면역 반응을 감소시키기 위해 항체를 확인하는 방법은 PD-1 리간드 및 B7 폴리펩티드 사이의 상호작용을 향상시키는 후보 항체의 능력을 결정하고, PD-1 리간드 및 B7 폴리펩티드 사이의 상호작용을 억제하는 항체를 선택하는 것을 포함한다. 다른 실시양태에서, 면역 반응을 감소시키기 위해 항체를 확인하는 방법은 PD-1 리간드 및 PD-1 사이의 상호작용을 향상시키는 후보 항체의 능력을 결정하고, PD-1 리간드 및 PD-1 사이의 상호작용을 향상시키는 항체를 선택하는 것을 포함한다.

[0239] 한 실시양태에서, 분석은 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2를 발현하는 세포를 시험 항체와 접촉시키고, 그의 결합 파트너에 대한 PD-1 또는 PD-1 리간드 표적의 결합을 조정하는 (예를 들어 자극 또는 억제하는) 시험 항체의 능력을 결정하는 것을 포함하는 세포 기반 분석이다. 그의 결합 파트너에 결합하거나 상호작용하는 PD-1, PD-1 리간드 또는 B7 폴리펩티드의 능력을 결정하는 것은 예를 들어, 직접 결합을 측정함으로써 또는 면역 세포 활성화의 파라미터를 측정함으로써 달성할 수 있다.

[0240] 예를 들어, 직접 결합 분석에서, PD-1 또는 PD-1 리간드 단백질 (또는 그들의 각각의 표적 폴리펩티드)은 방사성 동위원소 또는 효소 표지와 결합될 수 있어서, PD-1에 대한 또는 B7 폴리펩티드에 대한 PD-1 리간드의 결합은 복합체 내의 표지된 단백질을 검출함으로써 결정할 수 있다. 예를 들어, PD-1 또는 PD-1 리간드는 ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C 또는 ^{3}H로 직접 또는 간접적으로 표지될 수 있고, 방사성 동위원소는 방사선방출의 직접 계수 또는 섬광 계수에 의해 검출할 수 있다. 별법으로, PD-1 또는 PD-1 리간드는 예를 들어, 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타제 또는 루시퍼라제를 사용하여 효소에 의해 표지될 수 있고, 효소 표지는 적절한 기질의 생성물로의 전환을 결정하여 검출할 수 있다.

[0241] 임의의 상호작용물을 표지하지 않으면서, PD-1과 PD-1 리간드 사이 또는 PD-1 리간드와 B7 폴리펩티드 사이의 상호작용을 조정하는 화합물의 능력을 결정하는 것이 또한 본 발명의 범위 내에 있다. 예를 들어, PD-1, PD-1 리간드, B7 폴리펩티드 또는 표적 폴리펩티드를 표지하지 않으면서, 그의 표적 폴리펩티드와 함께 PD-1 및 PD-1 리간드 또는 PD-1 리간드와 B7 폴리펩티드 사이의 상호작용을 검출하기 위해 마이크로피지오미터(microphysiometer)를 사용할 수 있다 (McConnell, H.M. et al. (1992) Science 257:1906-1912). 본원에서 사용될 때, "마이크로피지오미터" (예를 들어, 사이토센서 (Cytosensor))는 광감지 전위차측정 센서 (LAPS)를 사용하여 세포가 그의 환경을 산성화시키는 속도를 측정하는 분석 기기이다. 상기 산성화 속도의 변화는 화합물과 수용체 사이의 상호작용의 표시자로서 이용될 수 있다.

[0242] 다른 실시양태에서, 주어진 세트의 폴리펩티드들 사이의 상호작용에 길항하는 항체의 능력을 결정하는 것은 폴리펩티드 세트의 하나 이상의 구성원의 활성을 결정함으로써 달성할 수 있다. 예를 들어, PD-1 또는 PD-1 리간드의 활성은 세포성 제2 메신저의 유도 (예를 들어, 티로신 키나제 활성)를 검출하거나, 적절한 기질의 촉매/효소 활성을 검출하거나, 리포터 유전자의 유도 (검출가능한 마커, 예를 들어, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 표적-반응성 조절 요소 포함)를 검출하거나, PD-1 또는 PD-1 리간드에 의해 조절된 세포성 반응을 검출함으로써 결정될 수 있다. 상기 폴리펩티드에 결합하거나 상호작용하는 항체의 능력을 결정하는 것은 예를 들어, 증식 분석에서 면역 세포 동시자극 또는 억제를 조정하는 화합물의 능력을 측정함으로써, 또는 그의 일부를 인식하는 항체에 결합하는 상기 폴리펩티드의 능력을 저해함으로써 달성할 수 있다.

[0243] PD-1 리간드와 동시자극성 수용체와의 상호작용을 차단 또는 억제하는 항체, 및 PD-1 리간드-매개된 억제성 신호를 촉진하는 항체는 면역 세포 증식 및/또는 효과기 기능을 억제하거나, 시험관내 분석에 첨가될 때 무반응을 유도하는 그들의 능력에 의해 확인할 수 있다. 예를 들어, 세포는 활성화 수용체를 통해 신호 전달을 자극하는

물질의 존재 하에 배양될 수 있다. 활성화제의 존재 하에 세포 증식 또는 효과기 기능 (예를 들어, 항체 생산, 사이토킨 생산, 포식작용)을 측정하기 위해, 세포 활성화의 많은 인식된 판독이 사용될 수 있다. 상기 활성화를 차단하는 시험 항체의 능력은 당업계에 공지된 기술을 이용하여 측정되는 증식 또는 효과기 기능의 감소에 영향을 미치는 항체의 능력을 측정함으로써 쉽게 결정할 수 있다.

[0244] 예를 들어, 본 발명의 항체는 문헌 ([Freeman et al. (2000) J. Exp. Med. 192:1027] 및 [Latchman et al. (2001) Nat. Immunol. 2:261])에 설명된 바와 같이, T 세포 분석에서 동시자극을 억제 또는 향상시키는 능력에 대해 시험될 수 있다. CD4+ T 세포를 인간 PBMC로부터 단리하고 활성화 항-CD3 항체로 자극할 수 있다. T 세포의 증식은 ^{3}H 티미딘 혼입에 의해 측정할 수 있다. 분석은 분석에서 CD28 동시자극과 함께 또는 그 없이 수행할 수 있다. PBMC로부터 PHA-모세포 및 Jurkat T 세포를 사용하여 유사한 분석을 수행할 수 있다.

[0245] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 분석은 PD-1 또는 PD-1 리간드 또는 그의 생물학적 활성 부분이 시험 항체와 접촉되고 폴리펩티드 또는 그의 생물학적 활성 부분에 결합하는 시험 항체의 능력이 결정되는 무-세포 분석이다. PD-1 또는 PD-1 리간드 폴리펩티드에 대한 시험 항체의 결합은 상기 설명된 바와 같이 직접 또는 간접적으로 결정할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 분석은 폴리펩티드 또는 그의 생물학적 활성 부분을 그의 결합 파트너와 접촉시켜 분석 혼합물을 형성시키고, 분석 혼합물을 시험 항체와 접촉시키고, 분석 혼합물 내에서 폴리펩티드와 상호작용하는 시험 항체의 능력을 결정하는 것을 포함하고, 여기서 폴리펩티드와 상호작용하는 시험 항체의 능력을 결정하는 것은 결합 파트너에 비해 폴리펩티드 또는 그의 생물학적 활성 부분에 우선적으로 결합하는 시험 항체의 능력을 결정하는 것을 포함한다.

[0246] 예를 들어, PD-1 리간드 및 PD-1 폴리펩티드는 분석 혼합물을 형성하기 위해 사용될 수 있고, 상기 상호작용을 차단하는 시험 항체의 능력은 결합을 결정하는 데 대해 상기 설명된 방법 중 하나에 의해 PD-1 리간드에 결합하는 PD-1의 능력을 결정하고 PD-1 폴리펩티드에 결합하는 PD-1 리간드의 능력을 결정함으로써 시험할 수 있다. PD-1 리간드에 결합하는 PD-1 폴리펩티드의 능력을 결정하고 B7 폴리펩티드에 결합하는 PD-1 리간드의 능력을 결정하는 것은 또한 실시간 생체분자 상호작용 분석 (BIA)과 같은 기술을 이용하여 달성할 수 있다 ([Sjolander, S. and Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345] 및 [Szabo et al. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705]). 본원에서 사용될 때, "BIA"는 임의의 상호작용물을 표지하지 않으면서 생물특이적 상호작용을 실시간으로 연구하기 위한 기술이다 (예를 들어, BIAcore). 표면 플라스몬 공명 (SPR)의 광학 현상의 변화는 생물학적 폴리펩티드들 사이의 실시간 반응의 표시로서 사용될 수 있다. PD-1, PD-1 리간드 및 B7 폴리펩티드는 BIAcore 칩 상에 고정될 수 있고, 항체는 PD-1, PD-1 리간드 및 B7 폴리펩티드에 대한 결합에 대해 시험될 수 있다. BIA 기술을 사용하는 예가 문헌 [Fitz et al. (1997) Oncogene 15:613]에 기재되어 있다.

[0247] 본 발명의 무-세포 분석은 가용형 및/또는 막-결합형 단백질 (예를 들어, PD-1 리간드 또는 PD-1 단백질 또는 그의 생물학적 활성 부분, 또는 그에 PD-1 리간드 또는 PD-1이 결합하는 결합 파트너) 모두를 사용할 수 있다. 막-결합형 단백질 (예를 들어, 세포 표면 PD-1 리간드 또는 PD-1 수용체)이 사용되는 무-세포 분석의 경우에, 막-결합형 단백질이 용액 상태로 유지되도록 가용화제를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 그러한 가용화제의 예는 비-이온성 세제, 예를 들어 n-옥틸글루코시드, n-도데실글루코시드, n-도데실말토시드, 옥타노일-N-메틸글루카미드, 데카노일-N-메틸글루카미드, 트리톤 (Triton)® X-100, 트리톤® X-114, 테시트 (Thesit)®, 이소트리데시폴리(에틸렌 글리콜 에테르)$_n$, 3-[(3-콜라미도프로필)디메틸암미니오]-1-프로판 술포네이트 (CHAPS), 3-[(3-콜라미도프로필)디메틸암미니오]-2-히드록시-1-프로판 술포네이트 (CHAPSO) 또는 N-도데실=N,N-디메틸-3-암미니오-1-프로판 술포네이트를 포함한다.

[0248] 상기 기재된 분석 방법의 하나 이상의 실시양태에서, 하나의 또는 두 단백질의 비복합체 형태로부터 복합체 형태의 분리를 용이하게 하기 위해 및 분석의 자동화를 수용하기 위해, PD-1, PD-1 리간드 및 B7 폴리펩티드, 또는 적절한 표적 폴리펩티드를 고정하는 것이 바람직할 수 있다. PD-1 또는 PD-1 리간드에 대한 시험 항체의 결합은 반응물질을 담기 위해 적합한 임의의 용기 (vessel) 내에서 달성할 수 있다. 그러한 용기의 예는 미량역가 플레이트, 시험관 및 미세원심분리관을 포함한다. 한 실시양태에서, 하나의 또는 두 단백질이 매트릭스에 결합되도록 허용하는 도메인을 첨가하는 융합 단백질이 제공될 수 있다. 예를 들어, 글루타티온-S-트랜스퍼라제/ PD-1, PD-1 리간드 또는 B7 폴리펩티드 융합 단백질, 또는 글루타티온-S-트랜스퍼라제/표적 융합 단백질이 글루타티온 세파로스 비드 (시그마 케미칼 (Sigma Chemical, 미국 미주리주 세인트 루이스)) 또는 글루타티온 유도체화 미량역가 플레이트에 흡착될 수 있고, 그 후 시험 화합물과 합해지고, 혼합물은 복합체 형성에 도움이 되는 조건 하에 (예를 들어, 염 및 pH에 대해 생리학적 조건에서) 인큐베이팅한다. 인큐베이션 후에, 비드 또

는 미량역가 플레이트 웰을 세척하여 임의의 결합되지 않은 성분을 제거하고, 비드의 경우에 매트릭스를 고정시키고, 복합체를 예를 들어 상기 설명된 바와 같이 직접 또는 간접적으로 결정한다. 별법으로, 복합체는 매트릭스로부터 분리될 수 있고, PD-1, PD-1 리간드 또는 B7 폴리펩티드 결합 또는 활성의 수준은 표준 기술을 이용하여 결정될 수 있다.

[0249] 별도의 실시양태에서, PD-1 또는 PD-1 리간드의 활성을 조정하는 시험 화합물의 능력을 결정하는 것은 PD-1 또는 PD-1 리간드의 하류에서 기능하는 폴리펩티드, 예를 들어, PD-1 리간드와 상호작용하는 폴리펩티드, 또는 예를 들어, PD-1의 세포질 도메인과 상호작용함으로써 PD-1의 하류에서 기능하는 폴리펩티드의 활성을 조정하는 시험 항체의 능력을 결정함으로써 달성할 수 있다. 예를 들어, 제2 메신저의 수준이 결정될 수 있거나, 적절한 표적 상의 상호작용자 폴리펩티드의 활성이 결정될 수 있거나, 적절한 표적에 대한 상호작용자의 결합이 이전에 설명된 바와 같이 결정될 수 있다.

[0250] 본 발명은 추가로 상기 기재된 스크리닝 분석에 의해 확인되는 신규한 항체에 관한 것이다. 따라서, 적절한 동물 모델에서 본원에 기재된 바와 같이 확인된 항체를 추가로 사용하는 것은 본 발명의 범위 내에 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이 확인된 항체는 상기 항체를 사용한 치료의 효능, 독성 또는 부작용을 결정하기 위해 동물 모델에서 사용될 수 있다. 별법으로, 본원에 기재된 바와 같이 확인된 항체는 상기 항체의 작용 메카니즘을 결정하기 위해 동물 모델에서 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 본원에 기재된 치료를 위한 상기 기재된 스크리닝 분석에 의해 확인된 신규한 항체의 용도에 관한 것이다.

[0251] 2. 예방 방법

[0252] 하나의 측면에서, 본 발명은 대상체에서 원치않거나 바람직한 것보다 적은 면역 반응과 연관된 질병 또는 병태를 예방하기 위한 방법에 관한 것이다. 본 발명의 항체 또는 방법을 사용한 치료가 유익할 질병의 위험이 있는 대상체는 예를 들어, 당업계에 공지된 임의의 진단 또는 예측 분석 또는 그들의 조합에 의해 확인할 수 있다. 예방 항체의 투여는 원치않거나 바람직한 것보다 적은 면역 반응과 연관된 증상의 표현 전에 일어날 수 있다. 치료를 위해 사용된 적절한 항체는 임상 적응증을 기반으로 결정될 수 있고, 예를 들어, 본원에 기재된 스크리닝 분석을 이용하여 확인할 수 있다.

[0253] 3. 치료 방법

[0254] 본 발명의 다른 측면은 예를 들어, PD-1 및 PD-1 리간드 및/또는 PD-1 리간드 및 B7 폴리펩티드 사이의 상호작용을 조정함으로써 면역 반응을 조정하는 치료 방법에 관한 것이다. 예를 들어, PD-1 및 PD-1 리간드 사이, 또는 PD-1 리간드 및 B7 폴리펩티드 사이의 상호작용의 조정은 면역 반응의 조정을 일으킨다. 따라서, 한 실시양태에서, PD-1 및 PD-1 리간드 사이의 상호작용을 차단하는 항체는 억제성 신호전달을 방지할 수 있다. PD-1 리간드는 또한 T 세포에서 동시자극 신호를 향상시킬 수 있다. 따라서, 다른 실시양태에서, PD-1 리간드가 동시자극 신호를 제공하는 것을 방지하는 항체는 T 세포 동시자극을 억제할 수 있다.

[0255] 이들 조정 항체는 시험관 내에서 (예를 들어, 세포를 항체와 접촉시킴으로써) 또는 별법으로 생체 내에서 (예를 들어, 물질을 대상체에 투여함으로써) 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명은 예를 들어, PD-1 리간드 및 PD-1 사이의 상호작용, 또는 B7 폴리펩티드의 조정에 의한 면역 반응의 조정이 유익할 질병 또는 질환에 걸린 개체의 치료 방법에 관한 것이다.

[0256] 4. 면역 반응의 하향조절

[0257] PD-1 리간드의 억제 기능을 상향조절하거나 동시자극 기능을 하향조절하여, 면역 반응을 하향조절하기 위한 본 발명의 수많은 실시양태가 존재한다. 하향조절은 이미 진행하는 면역 반응을 억제 또는 차단하는 형태일 수 있거나, 면역 반응의 유도를 방지하는 것을 포함할 수 있다. 활성화된 면역 세포의 기능은 면역 세포 반응을 하향조절함으로써, 또는 면역 세포에서 특이적 무반응을 유도함으로써, 또는 둘 모두에 의해 억제될 수 있다.

[0258] 예를 들어, 면역 반응은 PD-1 리간드에 의한 동시자극을 차단하는 (예를 들어, PD-L1 및 PD-1 사이의 상호작용에 영향을 미치거나 증가시키지 않으면서) 또는 PD-1 리간드와 PD-1의 결합을 촉진하는 (예를 들어, PD-1 리간드에 의한 동시자극에 영향을 미치지 않으면서 또는 그를 억제함으로써) 항-PD-1 리간드 항체를 사용하여 하향조정될 수 있다.

[0259] 본 발명의 한 실시양태에서, 특이적 항원에 대한 내성은 항원을 PD-1 리간드 동시자극을 차단하는 항체와 동시 투여함으로써 유도된다. 예를 들어, 특이적 단백질에 대해 내성이 유도될 수 있다. 한 실시양태에서, 알레르기원에 대한, 또는 그에 대한 면역 반응이 바람직하지 않은 외래 단백질에 대한 면역 반응이 억제될 수 있다.

예를 들어, 인자 VIII을 투여받는 환자는 종종 상기 응고 인자에 대한 항체를 생성한다. PD-1 리간드-매개된 동시자극 신호를 차단하는 항체 또는 PD-1 매개된 억제 신호를 자극하는 항체를 재조합 인자 VIII와 조합으로 (또는 인자 VIII에 예를 들어, 가교결합에 의해 물리적으로 연결하여) 동시 투여하면 하향조정을 일으킬 수 있다.

[0260] 한 실시양태에서, 대상체에서 면역 세포 매개된 면역 반응을 보다 효과적으로 하향조절하기 위해, 면역 반응을 하향조정하는 2개의 별개의 물질을 단일 조성물로서 조합하거나 따로 (동시에 또는 순차적으로) 투여할 수 있다. 또한, 치료 활성량의 하나 이상의 대상 항체를 면역 반응에 영향을 미치는 다른 하향조정 시약과 함께 사용할 수 있다. 다른 면역조정 시약의 예는 비제한적으로, 동시자극 신호를 차단하는 항체 (예를 들어, CD28 또는 ICOS에 대한), CTLA4의 효능제로서 작용하는 항체, 및/또는 다른 면역 세포 마커 (예를 들어, CD40, CD40 리간드, 또는 사이토킨)에 대한 항체, 융합 단백질 (예를 들어, CTLA4-Fc), 및 면역억제 약물 (예를 들어, 라파마이신, 시클로스포린 A 또는 FK506)을 포함한다.

[0261] PD-1 리간드 동시자극을 하향조절 또는 방지하거나, PD-1 리간드 및 PD-1 사이의 상호작용을 촉진하는 것은 예를 들어, 조직, 피부 및 장기 이식의 상황에서, 이식편-대-숙주 질병 (GVHD)에서, 또는 염증성 질병, 예를 들어 전신 홍반성 루푸스, 및 다발 경화증에서 면역 반응을 하향조정하기 위해 유용하다. 예를 들어, 면역 세포 기능의 차단은 조직 이식에서 조직 파괴를 감소시킨다. 일반적으로, 조직 이식편에서, 이식편의 거부는 면역 세포에 의한 외래물로서의 인식을 통해 개시된 후, 이식편을 파괴하는 면역 반응이 일어난다. 이식 전에 또는 이식 시점에 PD-1 리간드 동시자극을 억제하는 항체의 단독 또는 또 다른 하향조정제와 함께의 투여는 억제성 신호 생성을 촉진할 수 있다. 또한, PD-1 리간드 동시자극 신호의 억제, 또는 PD-1 리간드 또는 PD-1 억제성 신호의 촉진은 또한 면역 세포를 무반응화하여, 대상체에서 내성을 유도하기에 충분할 수 있다. PD-1 리간드 매개된 동시자극 신호를 차단함에 의한 장기 내성의 유도는 이들 차단 시약의 반복 투여의 필요를 피할 수 있다.

[0262] 대상체에서 충분한 면역억제 또는 내성을 달성하기 위해, 다른 폴리펩티드의 동시자극 기능을 차단하는 것이 또한 바람직할 수 있다. 예를 들어, 이식 전에 또는 이식 시점에 각각의 이들 항원의 활성을 갖는 펩티드, 이들 항원에 대한 차단 항체 또는 차단 소분자의 조합물의 가용형 (따로 또는 단일 조성물 내에서 함께)을 투여함으로써 B7-1, B7-2, 또는 B7-1 및 B7-2의 기능을 차단하는 것이 바람직할 수 있다. 별법으로, PD-1 리간드 또는 PD-1의 억제 활성을 촉진하고 B7-1 및/또는 B7-2의 동시자극 활성을 억제하는 것이 바람직할 수 있다. 본 발명의 하향조정 방법과 함께 사용될 수 있는 다른 하향조정제는 예를 들어, CTLA4를 통해 억제성 신호를 전달하는 물질, 가용형의 CTLA4, CTLA4를 통해 억제성 신호를 활성화하는 항체, 다른 면역 세포 마커에 대한 차단 항체, 또는 가용형의 다른 수용체 리간드쌍 (예를 들어, CD40 및 CD40 리간드 사이의 상호작용을 파괴하는 물질 (예를 들어, 항CD40 리간드 항체)), 사이토킨에 대한 항체, 또는 면역억제 약물을 포함한다.

[0263] 면역 반응의 하향조정은 자가면역 질병을 치료하는데 또한 유용하다. 많은 자가면역 질환은 자가 조직에 대해 반응성이고 질병의 병인에 관여되는 사이토킨 및 자가항체의 생산을 촉진하는 면역 세포의 부적절한 활성화의 결과이다. 자가반응성 면역 세포의 활성화를 방지하는 것이 질병 증상을 감소 또는 제거할 수 있다. PD-1 리간드 및 B7 폴리펩티드 사이의 상호작용을 파괴함으로써, 또는 PD-1 리간드 및 B7 폴리펩티드 사이의 상호작용을 조정하지 않거나 하향조정하면서 PD-1 리간드 및 PD-1 사이의 상호작용을 촉진함으로써 면역 세포의 동시자극을 차단하는 시약의 투여는 면역 세포 활성화를 억제하기 위해 및 질병 과정에 관여할 수 있는 자가항체 또는 사이토킨의 생산을 방지하기 위해 유용하다. 추가로, PD-1 리간드 또는 PD-1의 억제 기능을 촉진하는 물질은 자가반응성 면역 세포의 항원-특이적 내성을 유도할 수 있고, 이것은 질병을 장기간 경감시킬 수 있다. 자가면역 질환을 예방 또는 완화하는데 있어서 시약의 효능은 인간 자가면역 질병의 많은 잘 특성화된 동물 모델을 이용하여 결정할 수 있다. 그 예는 쥐 실험적 자가면역 뇌염, MRL/lpr/lpr 마우스 또는 NZB 하이브리드 마우스에서 전신 홍반성 루푸스, 쥐 자가면역 콜라겐 관절염, NOD 마우스 및 BB 래트에서 당뇨병, 및 쥐 실험적 중증 근무력증을 포함한다 (예를 들어, [Paul ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, Third Edition 1993, chapter 30] 참조).

[0264] 면역 세포 활성화의 억제는 예를 들어, IgE 생산을 억제함으로써 알레르기 및 알레르기성 반응의 치료에서 치료상 유용하다. PD-1 리간드 또는 PD-1 억제 기능을 촉진하는 항체는 대상체에서 면역 세포 매개된 알레르기 반응을 억제하기 위해 알레르기 대상체에게 투여될 수 있다. 면역 세포의 PD-1 리간드 동시자극의 억제, 또는 PD-1 리간드 또는 PD-1 억제 경로의 자극은 적절한 MHC 폴리펩티드와 함께 알레르기원에 노출시킴으로써 동반될 수 있다. 알레르기 반응은 알레르기원의 도입 경로 및 비만 세포 또는 호염기구 상의 IgE의 침적 패턴에 따라 전신성 또는 국소성일 수 있다. 따라서, 면역 세포의 억제는 PD-1 리간드와 동시자극성 수용체의 상호작용을 억제하는 억제 형태의 물질, 또는 PD-1 리간드 또는 PD-1의 억제 기능을 촉진하는 항체의 투여에 의해 국소 또

는 전신적으로 알레르기 반응을 매개하였다.

[0265] PD-1 리간드 동시자극의 차단을 통한, 또는 PD-1 리간드 및 PD-1 사이의 상호작용의 촉진을 통한 면역 세포 활성화의 억제는 또한 면역 세포의 바이러스 감염에서 치료상 중요할 수 있다. 예를 들어, 후천성 면역 결핍 증후군 (AIDS)에서, 바이러스 복제는 면역 세포 활성화에 의해 자극된다. 이들 상호작용의 조정은 바이러스 복제를 억제시켜, AIDS의 경과를 개선할 수 있다. 이들 상호작용의 조정은 또한 임신의 유지를 촉진하는데 유용할 수 있다. PD-1 리간드는 정상적으로 태반 영양막 (모체와 태아 사이에 계면을 형성하는 세포의 층)에서 고도로 발현되고, 태아의 모체 거부를 방지하는데 일정 역할을 할 수 있다. 배아 또는 태아의 면역학적 거부 때문에 자연 유산의 위험이 있는 여성 (예를 들어, 이전에 자연 유산을 한 여성 또는 임신이 어려웠던 여성)을 이들 상호작용을 조정하는 물질로 치료할 수 있다.

[0266] PD-1 리간드 동시자극의 조정 또는 PD-1 리간드/PD-1 결합의 조정에 의한 면역 반응의 하향조절은 자가 조직의 자가면역 공격을 치료하는데 또한 유용할 수 있다. 예를 들어, PD-1 리간드는 정상적으로 심장에서 고도로 발현되고, 심장을 자가면역 공격으로부터 보호할 수 있다. 이것은 Balb/c PD-1 녹아웃 마우스가 혈전증이 있는 심장에 대해 대량의 자가면역 공격을 보인다는 사실에 의해 증명된다. 따라서, 자가면역 공격에 의해 유발되거나 악화되는 병태 (예를 들어, 본 예에서, 심장병, 심근경색 또는 죽상동맥경화증)는 이들 상호작용의 조정에 의해 개선되거나 개량될 수 있다. 따라서, 자가면역 공격에 의해 악화되는 병태, 예를 들어 자가면역 질환 (및 심장병, 심근경색, 및 죽상동맥경화증과 같은 병태)을 조정하는 것은 본 발명의 범위 내에 있다.

[0267] 5. 면역 반응의 상향조절

[0268] 면역 반응을 상향조절하는 수단으로서 PD-1 리간드와 PD-1 또는 B7-1의 상호작용의 차단이 또한 치료상 유용하다. 면역 반응의 상향조절은 존재하는 면역 반응을 향상시키거나 초기 면역 반응을 불러일으키는 형태일 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여 면역 반응을 향상시키는 것은 미생물 (예를 들어, 세균, 바이러스, 또는 기생충)로의 감염의 경우에 유용하다. 한 실시양태에서, PD-1 리간드와 PD-1의 상호작용을 차단하는 항체는 면역 반응을 향상시키기 위해 유용하다. 그러한 항체 (예를 들어, PD-1에 대한 PD-L1 결합을 차단하는 비-활성화 항체)는 항체 및 세포-매개 반응의 상향조절이 유익할 상황에서 치료상 유용하다. 예시적인 질환은 바이러스 피부 질병, 예를 들어 헤르페스 또는 대상포진을 포함하고, 이 경우에 상기 물질은 피부에 국소 전달될 수 있다. 또한, 전신 바이러스 질병, 예를 들어 인플루엔자, 감기, 및 뇌염이 상기 물질의 전신 투여에 의해 완화될 수 있다.

[0269] 별법으로, 예를 들어, 환자로부터 면역 세포를 제거하고, 시험관 내에서 면역 세포를 PD-1 리간드와 PD-1의 상호작용을 차단하는 항체와 접촉시키고, 시험관내 자극된 면역 세포를 환자에게 재도입함으로써 생체외 방안을 통해 감염된 환자에서 면역 반응을 향상시킬 수 있다.

[0270] 특정 예에서, 면역 반응을 상향조절하는 다른 물질, 예를 들어, 면역 반응을 더욱 증대시키기 위해 동시자극성 수용체를 통해 신호를 전달하는 다른 B7 패밀리 구성원의 형태를 추가로 투여하는 것이 바람직할 수 있다.

[0271] PD-1 리간드와 PD-1 또는 B7-1의 상호작용을 차단하는 항체는 다양한 폴리펩티드 (예를 들어, 병원체로부터 유래된 폴리펩티드)에 대한 백신 내에서 예방적으로 사용될 수 있다. 병원체 (예를 들어, 바이러스)에 대한 면역성은 바이러스 단백질을 PD-1 리간드와 PD-1 또는 B7-1의 상호작용을 차단하는 항체와 함께 적절한 어쥬번트 내에서 백신접종함으로써 유도될 수 있다.

[0272] 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 면역 반응 기능의 상향조절 또는 향상은 종양 면역성의 유도에 유용하다.

[0273] 다른 실시양태에서, 면역 반응은 기존의 내성이 극복되도록 본원에 기재된 방법에 의해 자극될 수 있다. 예를 들어, 그에 대해 대상체가 유의한 면역 반응을 시작할 수 없는 항원, 예를 들어, 자가 항원, 예를 들어 종양 특이적 항원에 대한 면역 반응은 PD-1 리간드와 PD-1의 상호작용을 차단하는 항체를 투여함으로써 유도될 수 있다. 한 실시양태에서, 자가 항원, 예를 들어 종양-특이적 항원이 동시투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, 면역 반응은 신경 질환을 치료하기 위해 항원 (예를 들어, 자가 항원)에 대해 자극될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 물질은 면역화 과정에서 외래 항원에 대한 반응을 상승시키기 위해 어쥬번트로서 사용될 수 있다.

[0274] 한 실시양태에서, 면역 세포는 대상체로부터 얻어지고, 면역 세포의 집단을 팽창시키기 위해 및/또는 면역 세포 활성화를 향상시키기 위해 본원에 기재된 바와 같이 항체의 존재 하에 생체 외에서 배양된다. 이어서, 추가의 실시양태에서, 면역 세포는 대상체에게 투여된다. 면역 세포는 당업계에 공지된 바와 같이, 예를 들어, 면역

세포에 1차 활성화 신호 및 동시자극 신호를 제공함으로써 시험관 내에서 자극될 수 있다. 면역 세포의 증식을 동시자극하기 위해 다양한 물질이 또한 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 면역 세포는 PCT 출원 WO 94/29436에 기재된 방법에 따라 생체 외에서 배양된다. 동시자극성 폴리펩티드는 가용형이거나, 세포막에 부착되거나, 고체 표면, 예를 들어 비드에 부착될 수 있다.

[0275] 본 발명의 다른 실시양태는 다음 실시예에 기재되어 있다. 본 발명은 다음 실시예에 의해 더욱 예시되고, 이들 실시예는 추가의 제한으로서 해석되어서는 안 된다. 서열 목록, 도면 및 본원 전체에서 인용된 모든 참조문, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 본원에 참조로 명백하게 포함된다.

[0276] 실시예

[0277] 아래 실시예는 인간 PD-1, PD-L1 및 PD-L2를 표적으로 하는 치료 목적에 적합한 모노클로날 항체의 생성을 설명한다. 복합 인간 항-인간 PD-1, PD-L1 및 PD-L2 항체를 각각 마우스 항-인간 EH12.2H7, 29E.2A3 및 24F.10C12 항체로부터 생성하였다. 인간 V 영역 서열의 세그먼트는 비관련 인간 항체 (생식계열 및 비-생식계열) 서열 데이타베이스로부터 공급되었다. 각각의 선택된 서열 세그먼트 (및 세그먼트들 사이의 연결부)를 결합 예측 알고리즘을 이용하여 MHC 클래스 II에 결합하는 가능성에 대해 시험하였다. 모든 최종 복합 인간 항체 서열 변이체는 T 세포 에피토프를 피하도록 설계되었다. 복합 인간 항체 V 영역 유전자는 인간 서열 세그먼트의 조합물을 코딩하는 합성 올리고뉴클레오티드를 사용하여 생성하였다. 이어서, 이들을 인간 불변 영역을 함유하는 벡터 내로 클로닝하고, 항체를 생산하고 경쟁적 ELISA에 의해 표적 항원에 대한 결합에 대해 시험하였다.

[0278] 실시예 1: 복합 인간 항체 가변 영역 서열의 설계

[0279] 마우스 EH12.2H7, 29E.2A3 및 24F.10C12V 영역의 구조적 모델을 Swiss Pdb를 사용하여 생산하고, 항체의 결합 특성을 위해 필수적일 수 있는 마우스 V 영역 내의 중요한 "구속 (constraining)" 아미노산을 확인하기 위해 분석하였다. 카바트 및 코티아 정의 하에 규정된 CDR 잔기를 포함한, CDR 내에 함유된 잔기만이 중요한 것으로 간주되었다.

[0280] 상기 분석으로부터, CDR 외부의 폭넓은 서열을 사용하여, 그러나 CDR 서열 내의 좁은 메뉴 (menu)의 가능한 대체적인 잔기를 사용하여, 복합 인간 형태의 EH12.2H7, 29E.2A3 및 24F.10C12가 생성될 수 있는 것으로 여겨졌다. 예비 분석은 몇몇 인간 항체로부터 상응하는 서열 세그먼트가 조합되어 마우스 서열의 것과 유사하거나 동일한 CDR을 생성할 수 있음을 나타냈다. CDR 외부의 측면이 접하는 영역에 대해, 인간 서열 세그먼트의 광범위한 선택이 신규한 복합 인간 항체 가변 영역의 가능한 성분으로서 확인되었다.

[0281] 상기 분석에 기초하여, EH12.2H7, 29E.2A3 및 24F.10C12 복합 인간 항체 변이체를 생성하기 위해 사용될 수 있는 큰 예비 세트의 서열 세그먼트를 선택하고 MHC 클래스 II 결합 예측 알고리즘을 통해 분석하고, T 세포 에피토프에 관련된 공지의 항체 서열의 독점 데이타베이스를 통해 BLAST 탐색하였다. 잠재적인 MHC 클래스 II 결합 펩티드가 확인되거나 공지의 T 세포 에피토프의 데이타베이스에 대해 유의한 히트를 스코어링한 서열 세그먼트를 폐기하였다. 이것은 세그먼트의 세트를 감소시켰고, 이들의 조합을 다시 위에서와 같이 분석하여, 세그먼트들 사이의 연결부가 잠재적인 T 세포 에피토프를 함유하지 않도록 보장하였다. 이어서, 선택된 세그먼트를 조합하여, 합성을 위한 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 생산하였다. 3개의 모든 항체에 대해, 다음과 같이 상세히 설명된 서열을 갖는 5개의 중쇄 및 4개의 경쇄가 제작되었다;

[0282]

항원	복합 VH 서열	복합 VK 서열
PD-1	도 2 (a-e)	도 3 (a-d)
PD-L1	도 4 (a-e)	도 5 (a-d)
PD-L2	도 6 (a-e)	도 7 (a-d)

[0283] 이들 복합 인간 항체 서열을 생산하기 위해 사용된 서열 세그먼트를 각각 PD-1, PD-L1 및 PD-L2에 대한 항체에 대해 표 1, 2, 및 3에 상세히 나열한다.

표 1

항-PD-1 복합 인간 항체를 포함하는 인간 서열 세그먼트의 유도체화

(a)

진뱅크 등록 번호	**VH3** 서열
BAA75018	QVQLVQSGHEVKQPGASVK (서열 82)
AAG00910	MSCKASGYSFTS (서열 83)
AAY18543	SGYSFTSSWI (서열 84)
AAY57105	WIHWV (서열 85)
AAG00910	KQ
AAD16517	QAPGQGLEWIG (서열 86)
AAD53797	GLEWIGYIYPS (서열 87)
CAA08742	STGF (서열 88)
CAC87219	TEYN (서열 89)
AAT96419	QKF
AAA17939	KDR
AAR02530	DRAT (서열 90)
AAA17939	TLT
AAM87977	TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (서열 91)
CAA78534	STAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRD (서열 92)
AAV40096	DSSGY (서열 93)
AAR38557	YHA
AAW29142	AMD
IGHJ4	DYWGQGTLVTVSS (서열 94)

(b)

진뱅크 등록 번호	**VH4** 서열
BAA75018	QVQLVQSGHEVKQPGASVK (서열 82)
AAG00910	MSCKASGYSFTS (서열 83)
AAY18543	SGYSFTSSWI (서열 84)
AAA02616	HWVRQAPGQGLEWIG (서열 95)
AAD53797	GLEWIGYIYPS (서열 87)
CAA08742	STGF (서열 88)
CAC87219	TEYN (서열 89)
AAT96419	QKF
AAA17939	KDR
AAR02530	DRAT (서열 90)
AAA17939	TLT
AAM87977	TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (서열 91)
CAA78534	STAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRD (서열 92)
AAV40096	DSSGY (서열 93)
AAR38557	YHA
AAW29142	AMD
IGHJ4	DYWGQGTLVTVSS (서열 94)

[0284]

(c)

진뱅크 등록 번호	**Vκ3** 서열
AAY16615	EIVLTQSPATLSLSPGQR (서열 96)
AAD09377	RLTISCRASQ (서열 97)
AAA99362	TISCRASQSVST (서열 98)
AAL04518	SVSTSGYSYMHW (서열 99)
AAA58912	WYQQKPDQSPKLLIK (서열 100)
AAD16648	FGS
AAD19478	SNLESG (서열 101)
AAL10884	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA (서열 102)
AAD16559	PEDFATYYCQHS (서열 103)
AAA99326	SW
AAC16811	EIP
인간 J2	YTFGQGTKLEIK (서열 104)

(d)

진뱅크 등록 번호	**Vκ4** 서열
AAB53267	DIVLTQSP (서열 105)
AAY16615	IVLTQSPATLSLSPGQR (서열 106)
AAD09377	RLTISCRASQ (서열 97)
AAA99362	TISCRASQSVST (서열 98)
AAL04518	SVSTSGYSYMHW (서열 99)
AAA58912	WYQQKPDQSPKLLIK (서열 100)
AAD16648	FGS
AAD19478	SNLESG (서열 101)
AAL10884	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA (서열 102)
AAD16559	PEDFATYYCQHS (서열 103)
AAA99326	SW
AAC16811	EIP
인간 J2	YTFGQGTKLEIK (서열 104)

[0285]

표 2

항-PD-L1 복합 인간 항체를 포함하는 인간 서열 세그먼트의 유도체화

(a)

진뱅크 등록 번호	**VH2** 서열
ABI50688	EVQLVQSGAEVKKPGASVK (서열 107)
AAG00910	MSCKASGY (서열 108)
ABI50688	SCKASGYTFTSY (서열 109)
AAC50839	SYVMHWV (서열 110)
CAC43594	WVKQ (서열 111)
AAA18267	QAPGQRLEWIG (서열 112)
ABF20472	GY
AAD30737	VNPF (서열 113)
CAL06274	NDGT (서열 114)
CAC43212	KYN
CAC87219	YNE
CAD31770	EM
AAR32413	FKGR (서열 115)
AAG30515	GRAT (서열 116)
ABA62048	TLT
ABI50549	TSD
AAR32572	DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA (서열 117)
AAC18225	AVYYCARQA (서열 118)
AAV39747	AWGY (서열 119)
IGHJ5*02	PWGQGTLVTVSS (서열 120)

(b)

진뱅크 등록 번호	**VH4** 서열
ABI50688	EVQLVQSGAEVKKPGASVK (서열 107)
AAG00910	MSCKASGY (서열 108)
ABI50688	SCKASGYTFTSY (서열 109)
AAC50839	SYVMHWV (서열 110)
AAA18267	WVRQAPGQRLEWIG (서열 121)
ABF20472	GY
AAD30737	VNPF (서열 113)
CAL06274	NDGT (서열 114)
CAC43212	KYN
CAC87219	YNE
CAD31770	EM
AAR32413	FKGR (서열 115)
AAG30515	GRAT (서열 116)
ABA62048	TLT
ABI50549	TSD
AAR32572	DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA (서열 117)
AAC18225	AVYYCARQA (서열 118)
AAV39747	AWGY (서열 119)
IGHJ5*02	PWGQGTLVTVSS (서열 120)

[0286]

(c)

진뱅크 등록 번호	**Vκ1** 서열
CAA31193	DIVLTQSPASLALS (서열 122)
ABA26115	LSPGERAT (서열 123)
AAQ21828	ESV
CAA51101	VE
AAA58691	YYGTSL (서열 124)
AAY33369	VQWYQQKPGQ (서열 125)
ABI74051	WYQQKPGQPPKLLIY (서열 126)
CAC39383	PKLLIYAASS (서열 127)
CAA38592	SVDS (서열 128)
AAK26833	DSGVPSRFSGSGSGT (서열 129)
AAM46660	RFSGSGSGTDFTLTINSLE (서열 130)
AAL04518	EEEDAA (서열 131)
AAK68016	AMYFCQQ (서열 132)
CAK50767	SR
AAP23227	RVPYTFG (서열 133)
인간 J2	YTFGQGTKLEIK (서열 104)

(d)

진뱅크 등록 번호	**Vκ2** 서열
CAA31193	DIVLTQSPASLALS (서열 122)
CAE54363	IVLTQSPATLSLSPGE (서열 134)
ABA26115	LSPGERAT (서열 123)
AAQ21828	ESV
CAA51101	VE
AAA58691	YYGTSL (서열 124)
AAY33369	VQWYQQKPGQ (서열 125)
ABI74051	WYQQKPGQPPKLLIY (서열 126)
CAC39383	PKLLIYAASS (서열 127)
CAA38592	SVDS (서열 128)
AAK26833	DSGVPSRFSGSGSGT (서열 129)
AAM46660	RFSGSGSGTDFTLTINSLE (서열 130)
AAA58912	TINSLEAEDAA (서열 135)
AAK68016	AMYFCQQ (서열 132)
CAK50767	SR
AAP23227	RVPYTFG (서열 133)
인간 J2	YTFGQGTKLEIK (서열 104)

[0287]

(e)

진뱅크 등록 번호	**Vκ4** 서열
CAA31193	DIVLTQSPASLALS (서열 122)
CAE54363	IVLTQSPATLSLSPGE (서열 134)
ABA26115	LSPGERAT (서열 123)
AAQ21828	ESV
CAA51101	VE
AAA58691	YYGTSL (서열 124)
AAY33369	VQWYQQKPGQ (서열 125)
ABI74051	WYQQKPGQPPKLLIY (서열 126)
CAC39383	PKLLIYAASS (서열 127)
CAA38592	SVDS (서열 128)
AAK26833	DSGVPSRFSGSGSGT (서열 129)
AAM46660	RFSGSGSGTDFTLTINSLE (서열 130)
AAA58912	TINSLEAEDAATYFC (서열 136)
AAK68016	AMYFCQQ (서열 132)
CAK50767	SR
AAP23227	RVPYTFG (서열 133)
인간 J2	YTFGQGTKLEIK (서열 104)

[0288]

표 3

항-PD-L2 복합 인간 항체를 포함하는 인간 서열 세그먼트의 유도체화

(a)

진뱅크 등록 번호	**VH2** 서열
ABF83419	QVQLVQSGAEVKKPGASVK (서열 137)
AAG00910	MSCKASGY (서열 108)
ABF83419	SCKASGYTFTGY (서열 138)
AAL17955	TMHWV (서열 139)
CAC43594	WVKQ (서열 111)
AAL17955	QAPG (서열 140)
AAF40162	GQGLEWIG (서열 141)
AAR02558	GYINP (서열 142)
AAR32283	INPRSG (서열 143)
AAR02553	GYT
CAC87219	TEYN (서열 89)
AAT96419	QKF
AAA17939	KDR
AAB06403	RTT
AAA17939	TLT
AAG30529	TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (서열 91)
ABE66740	DTAVYYCARPW (서열 144)
ABK81281	WFAYWGQGT (서열 145)
IGHJ4	YWGQGTLVTVSS (서열 146)

(b)

진뱅크 등록 번호	**VH4** 서열
ABF83419	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGY (서열 147)
AAL17955	TMHWVRQAPG (서열 148)
AAF40162	GQGLEWIG (서열 141)
AAR02558	GYINP (서열 142)
AAR32283	INPRSG (서열 143)
AAR02553	GYT
CAC87219	TEYN (서열 89)
AAT96419	QKF
AAA17939	KDR
AAB06403	RTT
AAA17939	TLT
AAG30529	TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (서열 91)
ABE66740	DTAVYYCARPW (서열 144)
ABK81281	WFAYWGQGT (서열 145)
IGHJ4	YWGQGTLVTVSS (서열 146)

[0289]

(c)

진뱅크 등록 번호	**Vκ2** 서열
AAD16249	DIVMTQSP (서열 149)
CAA31193	PASL (서열 150)
AAA58913	LSVTPGEKVTITC (서열 151)
AAQ99244	CKSSQSLL (서열 152)
ABA71421	LNS
AAD19451	GN
AAS86065	QK
AAD14073	KNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF (서열 153)
AAZ09126	RFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ (서열 154)
CAA31484	NDY
CAC87582	YSYPL (서열 155)
인간 J1	TFGQGTKLEIK (서열 156)

(d)

진뱅크 등록 번호	**Vκ3** 서열
AAD16249	DIVMTQSP (서열 149)
AAA58913	VMTQSPAFLSVTPGEKVTITC (서열 157)
AAQ99244	CKSSQSLL (서열 152)
ABA71421	LNS
AAD19451	GN
AAS86065	QK
AAD14073	KNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF (서열 153)
AAZ09126	RFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ (서열 154)
CAA31484	NDY
CAC87582	YSYPL (서열 155)
인간 J1	TFGQGTKLEIK (서열 156)

(e)

진뱅크 등록 번호	**Vκ4** 서열
AAD16249	DIVMTQSP (서열 149)
AAA58913	VMTQSPAFLSVTPGEKVTITC (서열 157)
AAQ99244	CKSSQSLL (서열 152)
ABA71421	LNS
AAD19451	GN
AAS86065	QK
AAD14073	KNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF (서열 153)
CAD44754	RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ (서열 158)
CAA31484	NDY
CAC87582	YSYPL (서열 155)
인간 J1	TFGQGTKLEIK (서열 156)

[0290]

[0291] 실시예 2: 복합 인간 항체의 생성 및 시험

[0292] 전장 합성 V-영역을 제공하기 위해 어닐링되고, 라이게이팅되고, PCR 증폭된 일련의 겹치는 올리고뉴클레오티드를 사용하여, EH12.2H7, 29E.2A3 및 24F.10C12에 대해 초기 변이체 1 복합 인간 항체 VH 및 VK 영역 유전자를 합성하였다 (도 2a, 도 3a, 도 4a, 도 5a, 도 6a 및 도 7a). 각각의 복합 인간 항체에 대해, 주형으로서 초기 변이체 1을 사용하여 긴 겹치는 올리고뉴클레오티드 및 PCR을 이용하여 후속적인 서열 변이체를 제작하였다. 이어서, 조립된 변이체를 발현 벡터 (도 1) 내로 직접 클로닝하고, 그들의 서열을 확인하였다.

[0293] 키메라 및 복합 중쇄 및 경쇄의 모든 조합물 (즉, 각각의 항체에 대해 총 20 페어링)을 전기천공에 의해 NS0 세포 내로 안정하게 형질감염시키고, 200 nM 메토트렉세이트를 함유하는 배지 (L-글루타민 및 Na 피루베이트, 5% 초저 IgG FCS, pen/strep를 함유하는 고 글루코스 DMEM - 모두 인비트로겐) 내에서 선택하였다. 각각의 구성체에 대한 몇몇 약물 내성 콜로니를 발현 수준에 대해 시험하고, 최상의 발현 세포주를 선택하고 액체 질소 하에 동결시켰다.

[0294] 각각의 조합에 대한 최상의 발현 세포주로부터의 상등액을 IgG1/카파 표준품에 비해 Fc 포획, 카파 경쇄 검출 ELISA를 이용하여 정량하였다. 이어서, 정량된 상등액을 경쟁 ELISA에서 그들의 표적 항원에 대한 결합에 대해 시험하였다. 96 웰 맥시소브™ 플레이트 (넝크 (Nunc))를 탄산염 버퍼 (pH 9.6) 중 1 ㎍/ml 인간 Fc-PD-1, Fc-PD-L1 또는 Fc-PD-L2 (알앤디 시스템즈 (R&D systems)) 50 ㎕/웰로 4℃에서 철야 코팅하였다. 마우스 참조 항체 및 복합 인간 항체 샘플의 2중의 적정을 생성하고 (0.0078 ㎍/ml 내지 8 ㎍/ml 범위), PBS pH 7.4/2% BSA 중의 불변 농도 (40 ng/ml)의 비오티닐화 마우스 참조 항체와 혼합하였다. 적정액 (100 ㎕/웰)을 첨가하여 분석 플레이트를 세척하고 (PBS pH 7.4/0.05% Tween 20으로 4x), 실온에서 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트를 위에서와 같이 세척하고, PBS pH 7.4/2% BSA 중 스트렙타비딘 HRP (시그마)의 1/1000 희석액 100 ㎕/웰을 첨가하고, 추가로 1시간 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 추가의 세척 후에, 결합된 비오티닐화 참조 항체를

100 ㎕/웰 OPD 기질을 사용하여 검출하였다. 490 nm에서 흡광도를 측정하고, 시험 항체의 결합 곡선을 마우스 참조 표준물질에 비교하였다. 흡광도를 샘플 농도에 대해 플로팅하고, 각각의 데이타 세트를 통해 직선을 피팅하였다. 선의 방정식을 이용하여 PD-1에 대한 비오틴-EH12.2H7 결합, PD-L1에 대한 비오틴-29E.2A3 결합, 및 인간 PD-L2에 대한 비오틴-24F.10C12 결합을 50% 억제하기 위해 요구되는 농도 (IC_{50})를 계산하였다.

[0295] 최상의 IC_{50}을 갖는 항체를 선택하고, EH12.2H7, 29E.2A3 및 24F.10C12 항체의 모든 이들 변이체에 대한 세포주를 100 ml까지 부피 증가시키고, 포화까지 성장시켰다. 항체를 단백질 A 친화도 크로마토그래피를 통해 각각의 배양액으로부터 정제하였다. 간단히 설명하면, 상등액을 0.1 부피의 10x PBS (pH 7.4)로 pH 조정하고, 1 ml Mab Select Sure 단백질 A 컬럼 (지이 헬쓰케어 (GE Healthcare)) 위로 통과시켰다. 컬럼을 10 부피의 PBS (pH 7.4)로 세척한 후, 50 mM 시트레이트 버퍼 (pH 3.0)으로 용출하였다. 1 ml 분획을 수집하고, 즉시 0.1 ml의 1 m Tris-HCl (pH 9.0)으로 중화시켰다. 단백질 함유 분획 (280 nm에서 흡광도에 의해 판단될 때)을 모으고, PBS (pH 7.4)로 버퍼 교환하고, 정제된 항체를 +4℃에서 저장하였다. 도 8A-C는 쿠마시 블루 (coomassie blue)로 염색한 1 ㎍의 각각의 항체의 SDS-PAGE 겔을 보여준다. 항체의 농도는 계산된 몰 소광 계수에 기초하여 UV 흡수에 의해 계산하였다: EH12.2H7에 대한 280 nm에서 $E_{0.1\%}$ = 1.61, 29E.2A3에 대한 280 nm에서 $E_{0.1\%}$ = 1.46, 및 24F.10C12에 대한 280 nm에서 $E_{0.1\%}$ = 1.57.

[0296] 정제된 항체를 상기 설명된 바와 같이 경쟁 ELISA를 통해 인간 Fc-PD-1, Fc-PD-L1 또는 Fc-PD-L2에 대한 결합에 대해 시험하였다. 시험 항체의 적정은 0.0625 ㎍/ml 내지 8.0 ㎍/ml로 2중으로 수행하였다. 490 nm에서 흡광도를 측정하고, 이를 시험 항체 농도에 대해 플로팅하였다 (도 9A-C, 10A-C).

[0297] 표 4는 항-PD-1, PD-L1 및 PD-L2 항체에 대한 복합 VH 및 VK 변이체 서열의 조합에 대한 결과를 요약한다. EH12.2H7에 대해, 모든 인간화된 항체는 마우스 참조물에 비해 개선된 IC50을 갖고, 특히 VH4/VK3은 결합이 2배 증가하였다. 29E.2A3의 경우에, 변이체 VH2/VK1 및 VH2/VK4는 마우스 참조물과 동등한 결합을 갖는 한편, 변이체 VH2/VK2 및 VH4/VK2는 각각 결합이 1.75 및 1.36배 감소하였다. 24F.10C12에 대해, 모든 선택된 변이체는 마우스 참조물에 비해 유사하지만 근소하게 감소된 결합을 가졌다 (1.13배).

표 4

PD-1, PD-L1 및 PD-L2 복합 인간 항체 서열 변이체에 대한 IC50 값

EH12.2H7		29E.2A3		24F.10C12	
항체	IC50 μg/ml	항체	IC50 μg/ml	항체	IC50 μg/ml
마우스	1.23	마우스	0.28	마우스	0.52
VH3/VK3	0.93	VH2/VK1	0.27	VH2/VK2	0.58
VH3/VK4	0.74	VH2/VK2	0.49	VH2/VK3	0.59
VH4/VK3	0.57	VH4/VK2	0.38	VH4/VK2	0.60
VH4/VK4	0.91	VH2/VK4	0.29	VH4/VK4	0.58

[0298]

[0299] 이들 실험의 결과로서, 인간 PD-1, PD-L1 및 PD-L2에 특이적인 복합 인간 항체가 전적으로 비관련 인간 항체 가변 영역으로부터 유래한 아미노산 서열 세그먼트로부터 제작되었다. 복합 인간 항체 변이체 내의 모든 CDR 및 프레임워크 영역은 하나 초과의 비관련 인간 서열 세그먼트 (인간 서열 데이타베이스로부터 공급됨)를 포함하였고, 모든 복합 인간 항체는 T 세포 에피토프를 피하도록 특이적으로 설계되었다. 4개의 선도 후보물을 인간 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2에 대한 결합을 위해 초기에 선택하고, 후속 분석 시에 쥐 항체의 2배 내의 결합을 갖는 것으로 입증되었다.

[0300] 실시예 5: PD-1:PD-리간드 상호작용의 억제에 의한 T 세포 활성화의 향상된 자극

[0301] PD-1 신호전달 경로는 중간 정도의 TCR/CD28 동시자극 신호를 억제하고, 여기서 T 세포 증식의 감소 없이 사이토킨 생산이 먼저 감소한다. TCR/CD28 동시자극 신호가 약화함에 따라, PD-1 경로가 지배하고, 여기서 사이토킨 생산의 큰 감소는 증식의 감소와 동반된다. 따라서, 본 발명의 복합 인간 항체를 사용하는 PD-L1 또는 PD-L2와의 상호작용의 억제를 통한 PD-1 경로의 억제가 T 세포 활성화를 향상시키는 것을 확인하기 위해, 혼합 림프구 반응 (MLR)을 수행하였다.

[0302] 미성숙 골수성 수지상 세포는 IL-4 및 GM-CSF 내에서 인간 말초 혈액 단핵구를 배양함으로써 단리하였다. 미성숙 수지상 세포를 IL-1β, TNF-α, IL-6, 및 PGE_2의 염증성 칵테일 (cocktail)에 노출시키면 APC로서 기능을 하는 성숙 수지상 세포를 발생시킨다. 그러나, 성숙기 동안 주어진 염증성 사이토킨에 IL-10을 첨가하면 또한 단지 1/6 내지 1/3의 기능만 하는 APC를 생성시킨다.

[0303] PD-1, PD-L1 및/또는 PD-L2에 대한 복합 인간 항체, 또는 대조 항체의 존재 하에, APC로서 IL-10 처리된 수지상 세포를 사용하여 T 세포 활성화 분석 (MLR)을 수행하였다. 항-PD-1, 항-PD-L1 및/또는 PD-L2 mAb를 IL-10 처리된 수지상 세포 + 동종이형 T 세포의 배양액에 첨가하면 대조 IgG 처리된 배양액에 비해 T 세포 증식 및 사이토킨 발현을 증가시키는 것으로 예측된다. 항-PD-1 항체와 항-PD-L1 항체, 항-PD-L2 항체의 조합물은 또한 항체를 단독으로 사용할 때보다 더 크게 자극을 증가시킬 수 있다.

[0304] 실시예 6: 만성 감염 상태의 마우스에서 PD-1 경로의 억제

[0305] 다양한 균주의 림프구성 맥락수막염 바이러스 (LCMV)로 감염된 마우스를 사용하여, CD8 T 세포 기능에 대한 만성 바이러스 감염의 효과를 연구하였다. LCMV 암스트롱 (Armstrong) 균주는 고도로 기능적인 휴지기 기억 CD8 T 세포의 장기 생존 집단을 남기는, 8일 이내에 사라지는 급성 감염을 일으킨다. 이와 반대로, LCMV C1-13 균주는 3개월까지 지속하는 바이러스혈증을 특징으로 하는, 숙주에서 지속 감염을 확립시킨다.

[0306] PD-1 신호전달을 차단하면 만성 LCMV 감염 동안 T 세포 기능을 복구하고 바이러스 제어를 향상시킴을 확인하기 위해, 본 발명의 복합 인간 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체 및/또는 항-PD-L2 항체를 사용하여 만성 LCMV 감염 동안 PD-1 신호전달을 파괴하였다. 항체를 감염후 제23일 내지 제37일에 LCMV C1-13으로 감염시킨 마우스에 3일마다 투여하였다. 제37일에, 비처리 대조군에 비해 처리된 마우스에서 수배 더 많은 LCMV 특이적 CD8 T 세포가 존재할 것으로 예상된다. 증식의 유도는 CD8 T 세포에 특이적일 것이고, 비장 내의 CD4 T 세포의 수는 처리된 마우스 및 비처리 마우스 모두에서 아마도 대략 동일할 것으로 또한 예상된다.

[0307] CD8 T 세포 증식의 증가에 추가로, PD-1 신호전달의 억제는 또한 바이러스-특이적 CD8 T 세포에서 항-바이러스 사이토킨의 생산을 증가시킬 것으로 예상된다. CD8 T 세포에 의한 IFN-감마 및 TNF-알파의 생산은 아마도 비처리 마우스에 비해 처리된 마우스에서 수배 더 높을 것이다. 바이러스 청소율은 또한 가속될 것이고, 처리된 마우스에서 감염 후 제37일에 폐 및 신장에서 감소된 바이러스 역가가 관찰된 한편, 비처리 마우스는 모든 이들 조직에서 아마도 유의한 수준의 바이러스를 보일 것이다.

[0308] CD4 T 세포는 CD8 T 세포 반응의 생성 및 유지에서 핵심 역할을 한다. 이와 관련하여, CD4 T 세포의 부재 하에 프라이밍 (priming)된 CD 8 T 세포는 정상적인 면역 반응을 시작할 수 없고, 따라서 종종 "무력한 (helpless) T 세포"로서 칭해진다. 또한, 만성 LCMV 감염은 CD4 T 세포의 부재 하에 보다 중증이다. 따라서, LCMV-C1-13 감염 동안 생성된 무력한 T 세포는 CD4 T 세포의 존재 하에 생성된 T 세포보다 훨씬 더 현저한 기능 손상을 보인다.

[0309] CD4 T 세포는 LCMV-C1-13 감염의 시간에 결핍되고, 마우스를 감염 후 제46일 내지 제60일에 본 발명의 복합 인간 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체 및/또는 항-PD-L1 항체로 처리하였다. 처리 후에, 처리된 마우스는 아마도 비처리된 대조 마우스보다 그들의 비장 내에 수배 더 많은 LCMV-특이적 CD8T 세포를 가질 것으로 예상된다. 처리된 마우스에서 바이러스-특이적 CD8 T 세포의 상기 증가는 아마도 BrdU 혼입에 의해 검출할 때 증식의 증가에 대한 결과일 것이다. BrdU 분석은 처리 동안 1 mg/ml BrdU를 음용수 내에 도입함으로써 수행하고, 염색은 제조자의 프로토콜에 따라 수행하였다 (비디 바이오사이언시즈 (BD Biosciences, 미국 캘리포니아주 샌 디에고)).

[0310] PD-1 신호의 억제가 무력한, 소모된, 바이러스-특이적 CD8 T 세포의 용해 활성을 증가시키는 것을 확인하기 위해, 바이러스-특이적 CD8 T 세포의 생체외 용해 활성을 ^{51}Cr 방출 분석을 이용하는 처리에 따라 검출하였다 (Wherry et al., 2003. J. Virol. 77:4911-27). 바이러스는 비처리 마우스에 비해 처리 2주 후에 비장, 간, 폐, 및 혈청 내에서 수배 감소되는 것으로 예상된다.

[0311] 실시예 7: PD-1 신호전달의 억제제와 함께 백신의 투여

[0312] 지속 감염 동안 T 세포 반응을 상승시키기 위한 하나의 방안은 치료 백신접종이다. 상기 방안에 대한 근거는 내인성 항원이 만성 바이러스 감염 동안 최적의 또는 면역원성 방식으로 제시될 수 없고, 항원을 백신 형태로 제공하면 바이러스-특이적 T 및 B 세포에 대한 보다 효과적인 자극원을 제공할 수 있다는 사실이다. 만성 LCMV 모델을 사용하여, 마우스에게 치료 백신으로서 LCMV GP33 에피토프를 발현하는 재조합 우두 바이러스 (VVGP33)를 투여하였고, 그 결과 일부 만성 감염 상태의 마우스에서 CD8 T 세포 반응이 적당히 향상하였다. 상기 치료

백신접종을 본 발명의 복합 인간 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체 및/또는 항-PD-L2 항체와 조합한다. LCMV 특이적 T 세포 반응이 두 처리에 비해 더 큰 수준으로 상승하고, 조합 처리의 효과는 아마도 상가적인 것보다 더 많을 것으로 예상된다.

[0313] 실시예 8: 지속 HCV 감염의 면역치료를 위한 모델로서 침팬지.

[0314] 침팬지는 인간에서 HCV 지속성의 모델을 제공한다. 일생 동안의 바이러스 지속성을 일으키는 T 세포 면역성의 결함은 모두 HCV-특이적 CD4 헬퍼 T 세포의 결핍 및 손상되거나 변경된 CD 8 효과기 T 세포 활성을 포함한다. 지속 감염 상태의 침팬지를 본 발명의 복합 인간 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체 및/또는 항-PD-L2 항체로 처리하였다. 재조합 구조적 및 비-구조적 HCV 단백질을 사용한 백신접종과 조합한 억제성 경로의 차단의 효능, 및 그러한 전략이 바이러스-특이적 기억 T 세포의 빈도 및 수명을 향상시킬 수 있는지 결정하였다. T 세포 면역성의 결함은 지속 감염 상태의 인간 및 침팬지에서 전적으로 HCV-특이적이다. 이어서, 침팬지에게 이들 분자를 통한 신호전달을 차단하는 인간화 모노클로날 항체를 전달함으로써 항바이러스 활성이 복구될 수 있다.

[0315] 지속 감염 상태의 침팬지를 본 발명의 복합 인간 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체 및/또는 항-PD-L2 항체로 처리하였다. 항체로 처리한 후, 체액성 및 세포성 면역 반응 및 HCV RNA 부하 (load)를 결정하였다. 샘플을 제1, 2, 3, 5 및 8주에, 이어서 매달 간격으로 수집하였다. 샘플은 1) 트랜스아미나제, 자가항체, HCV에 대한 중화 항체, 및 사이토킨 반응의 분석을 위한 혈청, 2) 바이러스 부하 및 게놈 진화를 위한 혈장, 3) 면역성, 동시자극성/억제 수용체 발현 및 기능의 시험관내 측정을 위한 PBMC, 4) 간내 림프구 및 RNA의 단리를 위한 신선한 (고정되지 않은) 간, 및 5) 조직학 및 면역조직화학 분석을 위한 고정된 (포르말린/파라핀 포매된) 간을 포함하였다. 면역조직화학 및 분자 기술에 의해 동시-억제성 분자 및 스플라이스 변이체의 발현을 평가하기 위해, 영역 림프절을 또한 2 또는 3개의 시점에 수집하였다.

[0316] HCV 항원을 사용한 백신접종이 항체의 치료 효과를 강화하는지 결정하기 위해서, 침팬지를 다음과 같이 처리하였다: 1) 제0, 4, 및 24주에 재조합 외피 (envelope) 당단백질 E1 및 E2 (MF59 어쥬번트 내의) 및 다른 단백질 (ISCOMS를 사용하여 제형화된 코어 + NS 3, 4, 및 5)를 사용한 근육내 면역화; 2) 본 발명의 복합 인간 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체 및/또는 항-PD-L2 항체 항체에서 사용되지만 그와 동시투여되는 백신을 사용한 근육내 면역화. HCV-특이적 T 및 B 세포 반응을 1년 동안의 면역화 후에 매달 간격으로 모니터링하였다.

[0317] 상기 분석에서 HCV-사량체 양성 및 총 T 세포에 대해 검사한 마커는 분화 (예를 들어 CD45RA/RO, CD62L, CCR7 및 CD27), 활성화 (예를 들어 CD25, CD69, CD38 및 HLA-DR), 생존/증식 (예를 들어 bcl-2 및 Ki67), 세포독성 잠재성 (예를 들어 그랜자임 (granzyme) 및 페르포린), 및 사이토킨 수용체 (CD122 및 CD127)의 마커를 포함한다. 케모킨 IP-10의 치료전 수준과 PEG IFN-γ/리바비린에 대한 반응 사이에 흥미로운 상관성이 존재한다. 음성 조절 경로 또는 HCV-특이적 T 세포 반응과 IP-10 수준 사이의 잠재적인 상관성을 조사하기 위해 IP-10 수준을 측정하였다. PBMC 상의 억제 수용체 및 리간드의 발현은 유동 세포측정법 (flow cytometry)에 의해 수행하였다.

[0318] 실시예 9: PD-1 차단에 의한 생체 내에서 SIV-특이적 면역성의 향상

[0319] 만성 원숭이 면역결핍 바이러스 (SIV) 감염 동안 PD-1의 차단의 면역 복구 가능성을 원숭이에서 시험하였다. SIV로 감염된 14마리의 인디언 (Indian) 붉은털 원숭이 (마카카 뮬라타 (Macaca mulatta))를 연구하였다. 초기 만성기에 대해 8마리의 원숭이를 사용하고, 200 50% 조직 배양 감염 용량 ($TCID_{50}$)의 SIV251로 정맥내로 감염시켰다. 후기 만성기에 대해 6마리의 원숭이를 사용하였고, 3마리를 SIV251로 직장 내로 감염시키고, 3마리를 SIV239로 정맥내로 감염시켰다. RDb11을 제외한 모든 원숭이는 Mamu B08 및 Mamu B17 대립유전자에 대해 음성이었다. RDb11은 Mamu B17 대립유전자에 대해 양성이었다.

[0320] 생체내 항체 처리: 원숭이에게 부분적으로 인간화된 마우스 항-인간 PD-1 항체 (클론 EH12-1540) (Dorfman et al., Am. J. Surg. Pathol. 30:802-810, 2006) 또는 대조 항체 (SYNAGIS)를 주입하였다. 항-PD-1 항체는 인간 IgG1 (FcR 및 보체 결합을 감소시키도록 돌연변이된)에 연결된 마우스 가변 중쇄 도메인 및 인간 κ에 연결된 마우스 가변 경쇄 도메인을 갖는다. 클론 EH12는 원숭이 PD-1에 결합하고, 시험관 내에서 PD-1과 그의 리간드 사이의 상호작용을 차단한다. SYNAGIS는 호흡기 세포융합 바이러스의 F 단백질에 특이적인 인간화된 마우스 모노클로날 항체 (IgG1κ)이다. 항체를 3 mg kg^{-1}의 체중으로 제0, 3, 7 및 10일에 정맥내 투여하였다.

[0321] 면역 반응: 혈액으로부터 말초 혈액 단핵 세포 및 직장 핀치 (pinch) 생검으로부터 림프구를 이전에 설명된 바와 같이 단리하였다 (Velu et al., J. Virol. 81:5819-5828, 2007). 사량체 염색, 세포내 사이토킨 생산, 및

항-SIV Env 결합 항체의 측정을 이전에 설명된 바와 같이 수행하였다 ([Amara et al., Science 292:69-74, 2001]; [Kannanganat et al., J. Virol. 81:8468-8476, 2007]; [Lai et al., Virology 369:153-167, 2007]).

[0322] 만성 SIV 감염의 초기 (10주) 및 후기 (약 90주)기에 PD-1 차단을 수행하였다. 9마리의 원숭이 (초기 단계 동안 5마리 및 후기 단계 동안 4마리)에게 항-PD-1 항체를 투여하고, 5마리의 원숭이 (초기 단계 동안 3마리 및 후기 단계 동안 2마리)에게 이소형 대조 항체 (Synagis, 항-호흡기 세포융합 바이러스 (RSV)-특이적)를 투여하였다.

[0323] 만성 SIV 감염 동안 PD-1 차단은 모든 원숭이의 혈액에서 SIV-특이적 CD8 T 세포의 신속한 팽창을 일으켰다. 2개의 면역우세 에피토프, 즉, Gag CM9 (Allen et al., J. Immunol. 160:6062-6071, 1998) 및 Tat SL8/TL8 (Allen et al., Nature 407:386-390, 2000)에 대한 CD8 T-세포 반응을, Mamu A*01 조직적합 분자를 발현한 7마리의 항-PD-1-항체-처리된 원숭이 및 3마리의 대조군-항체-처리된 원숭이에서 주요 조직적합 복합체 (MHC) I 사량체 복합체를 사용하여 연구하였다. 대부분 (>98%)의 Gag-CM9 사량체-특이적 CD8 T 세포는 차단 전에 PD-1을 발현하였다. PD-1 차단 후에, Gag-CM9 사량체-특이적 CD8 T 세포는 신속하게 팽창하여, 7-21일에 피크에 도달하였다. 피크 반응에서, 이들 수준은 제0일에 그들의 각각의 수준보다 약 2.5 내지 11배 더 높았고 (P= 0.007), 28-45일까지 상승된 상태로 유지되었다. 만성 SIV 감염의 초기 및 후기 단계 동안 차단에서도 유사한 결과가 관찰되었다. Gag-특이적 인터페론 (IFN)-y-양성 CD8 T 세포의 빈도의 3-4배 증가가 2마리의 Mamu A*01-음성 동물 (RTd11 및 RDb11)에서 차단 후 제14일에 또한 관찰되었고, 이는 PD-1 차단이 비-Mamu A*01 대립유전자에 의해 제한되는 바이러스-특이적 CD8 T 세포의 빈도를 향상시킬 수 있음을 입증한다. SIV-특이적 CD8 T 세포의 팽창은 대조군 항체 처리된 원숭이에서 관찰되지 않았다.

[0324] PD-1 차단은 또한 개선된 기능적 품질을 갖는 생체 내에서 활동적으로 세포 분할하는 바이러스-특이적 CD8 T 세포의 빈도의 유의한 증가와 연관되었다. SIV-특이적 CD8 T 세포의 신속한 팽창과 일치하게, Ki67 (증식하는 세포에 대한 마커)를 동시발현하는 Gag-CM9 사량체-특이적 CD8 세포의 빈도가 또한 차단 후 제7일 정도의 초기에 증가하였다 (P= 0.01). 이와 유사하게, 페르포린 및 그랜자임 B (세포용해 가능성; 각각 P= 0.001 및 P= 0.03), CD28 (동시자극 가능성; P= 0.001), CD127 (증식 가능성; P= 0.0003) 및 CCR7 (림프절 호밍 (homing) 가능성; 0.001)을 동시발현하는 Gag-CM9 사량체-특이적 CD8 T 세포의 빈도의 증가가 관찰되었다. 차단 후에 사량체-음성 및 Ki67-양성 CD8 T 세포의 빈도의 일시적인 1.5 내지 2배 증가가 관찰되었다. 이것은 Gag 내의 다른 에피토프에 특이적인 CD8 T 세포의 팽창뿐만 아니라 SIV의 다른 단백질, 및 이들 동물에서 다른 만성 바이러스 감염 때문일 수 있다. 3마리의 대조 항체-처리된 원숭이에서 이들 마커에 대한 유의한 향상은 관찰되지 않았다.

[0325] 차단 후에 Tat-TL8-특이적 CD8 T 세포에 대해 팽창이 관찰되지 않았다. 이것은 Tat-TL8-특이적 CD8 T 세포에 의한 인식으로부터 바이러스 회피 (escape) 때문일 수 있고, 이는 PD-1 차단이 이들이 T-세포 수용체를 통해 동시에 신호를 받을 때에만 T 세포의 팽창을 일으키는 것으로 알려져 있기 때문이다. 상기 가능성을 시험하기 위해, SIV251로 감염시키고 감염의 초기 단계 동안 차단 항체를 투여한 3마리의 모든 Mamu A*01-양성 원숭이로부터 차단의 개시 직전에 혈장 내에 존재하는 바이러스 게놈을 서열 결정하였다. 실제로, Tat TL8 에피토프 영역에 상응하는 바이러스 게놈 내의 돌연변이가 발견되었다. 모든 상기 돌연변이는 Mamu A*01 MHC 분자에 대한 Tat SL8/TL8 펩티드의 결합을 감소시키는 것으로 나타나거나 예측되었고, Tat-SL8/TL8-특이적 CD8 T 세포에 의한 인식으로부터 회피를 일으킨다. 이들 결과는 PD-1의 생체내 차단이 바이러스 에피토프의 회피 돌연변이체에 특이적인 T 세포의 팽창을 일으킬 수 없음을 제안한다.

[0326] PD-1 차단은 SIV/HIV 복제의 우선적인 부위인 결장직장 점막 조직 (창자)에서 또한 Gag-CM9-특이적 CD8 T 세포의 팽창을 일으켰다. 7마리 원숭이 중 2마리에 대해 팽창이 관찰되지 않았지만, 이들 중 1마리에 대해 혈액 내에서 팽창은 명백하였다. 혈액과 반대로, 창자 내의 팽창은 제42일에 훨씬 더 느리게 피크에 도달하였고, 그들의 각각의 제0일 수준에 비해 2배 내지 3배이었다 (P= 0.003). 혈액과 유사하게, Ki67 (P= 0.01), 페르포린 (P= 0.03), 그랜자임 B (P= 0.01) 및 CD28 (P= 0.01)을 동시발현하는 Gag-CM9 사량체-특이적 세포는 또한 차단 후에 창자에서 증가하였다.

[0327] 보다 중요하게는, PD-1 차단은 또한 항-바이러스 CD8 T 세포의 기능적 품질을 향상시키고, 사이토킨 IFN-y, 종양-괴사 인자 (TNF)-α 및 인터류킨 (IL)-2를 동시생산할 수 있는 다기능성 세포를 생성시켰다. 감염의 후기 만성기 동안 PD-1 차단의 개시일에, Gag-특이적 IFN-ɣ-양성 세포의 빈도는 낮고, TNF-a 및 IL-2를 동시발현하지 못하였다. 그러나, 차단 후에, IFN-ɣ-양성 세포의 빈도는 4마리의 모든 PD-1 항체-처리된 원숭이에서 증가하였고 (P= 0.03), 이들은 TNF-α 및 IL-2를 동시발현하는 능력을 획득하였다. IFN-ɣ 양성 세포의 팽창은 14-

21일에 피크에 도달하였고, 피크 수준은 각각의 제0일 수준 보다 2-10배 더 높았다. 제21일에, 총 Gag-특이적 세포의 약 16%가 3개의 모든 사이토킨을 동시발현하였고, 약 30%가 IFN-γ 및 TNF-α를 동시발현하였다. 이것은 제0일에 총 Gag-특이적 세포의 <1%가 3개의 모든 사이토킨을 동시-발현하고 (P= 0.01), 약 14%가 IFN-γ 및 TNF-α를 동시발현하는 것(P= 0.04)에 대조적이다. 감염의 초기 만성기 동안 차단 후에 유사한 결과가 또한 관찰되었다.

[0328] 만성 면역결핍 바이러스 감염 동안 B-세포 기능을 조절하는데 있어서 PD-1의 역할을 시험하기 위해, SIV-감염된 원숭이에서 PD-1 차단 후에 B-세포 반응을 특성 결정하였다. PD-1 차단 전에 상이한 B-세포 하위세트 상의 PD-1 발현의 분석은 나이브 (naive) B 세포 ($CD20^{+}CD27^{-}CD21^{+}$; P< 0.001)에 비해 기억 B 세포 ($CD20^{+}CD27^{+}CD21^{-}$)에 의한 PD-1의 우선적인 발현을 밝혔다. PD-1의 생체내 차단은 차단 후 제28일에 SIV-특이적 결합 항체의 역가의 2 내지 8배 증가를 일으켰다 (P< 0.001). 이를 추가로 이해하기 위해, 항-PD-1 항체 및 항-레트로바이러스 요법으로 동시에 처리한 SIV-감염된 원숭이에서 기억 B 세포의 증식에 대해 실험을 수행하였고, 제3일만큼 이르게 Ki67+ (증식) 기억 B 세포에서 유의한 증가가 관찰되었지만, 나이브 B 세포에서는 관찰되지 않았다. 이들 결과는 PD-1-PDL 경로가 만성 SIV 감염 동안 B-세포 기능장애를 조절하는데 일정 역할을 할 수 있음을 입증한다.

[0329] 중화 분석에 의해 쉽게 중화가능한 실험실-적응된 SIV251에 대한 역가의 2배 증가 및 중화하기 어려운 야생형 SIV251 또는 SIV239에 대해 역가의 증가 없음을 밝혔다. 항-PD-1 항체로 처리한 9마리의 동물 중 2마리에서, 차단 후 SIV-특이적 항체가 최소 (<2배) 팽창하였다. 특히, 이들 2마리 동물에서 총 기억 B 세포의 빈도는 차단 전에 나머지 7마리의 동물 (총 B 세포의 60-90%)에 비해 더 낮았고 (총 B 세포의 ~40%), 이는 차단 전에 SIV-특이적 기억 B 세포의 수준이 차단 후에 SIV-특이적 항체의 팽창 수준을 결정할 수 있음을 나타낸다.

[0330] PD-1 차단은 혈장 바이러스혈증 (P= 0.03)에서 유의한 감소를 일으켰고, 또한 SIV-감염된 원숭이의 생존을 연장시켰다 (P= 0.001). 초기 만성기 동안 항-PD-1 항체로 처리한 5마리의 원숭이 중 2마리에서, 바이러스 부하가 제10일에 감소하였고, 제90일까지 상기 수준 이하로 지속하였다. 1마리의 원숭이에서, 바이러스 부하는 일시적으로 감소하였고, 나머지 2마리의 원숭이에서 일시적으로 증가하여 차단전 수준으로 회복하였다. 초기 만성기와 대조적으로, 후기 만성기 동안 항-PD-1 항체로 처리한 4마리의 모든 원숭이가 제7일에 바이러스혈증의 일시적인 증가를 보였지만, 제21일에 바이러스 부하가 그들의 각각의 제0일 수준 미만의 수준으로 신속하게 감소하였다. 그러나, 바이러스 RNA 수준은 제43일에 차단전 수준으로 회복하였다. 예상되는 바와 같이, 대조 항체로 처리한 임의의 5마리의 원숭이에서 혈장 바이러스 부하의 유의한 감소는 관찰되지 않았다. 차단 후 제21-28일에, 항-PD-1-항체-처리된 동물에서 바이러스 RNA 수준은 그들의 각각의 제0일 수준에 비해 2-10배 더 낮았다 (P= 0.03). 차단 후 제150일에, 대조군 내의 5마리의 원숭이 중 4마리가 AIDS-관련 증상 (예를 들어, 식욕 상실, 설사, 체중 감소)로 인해 죽은 반면, 항-PD-1-항체-처리군 내의 9마리의 모든 동물은 생존하였다 (P= 0.001).

[0331] 모든 후기 단계-처리된 및 일부의 초기 단계-처리된 동물에서 혈장 바이러스혈증 수준의 관찰된 초기 상승은 활성화된 CD4 T 세포의 빈도의 증가 때문일 수 있다. 이를 결정하기 위해서, 차단 후 Ki67-양성 총 CD4 T 세포의 비율 및 SIV Gag-특이적 IFN-γ 생산 CD4 T 세포 (바이러스 복제에 대한 우선적인 표적)의 빈도를 측정하였다. 이들 분석에 의해 차단 후 제7-14일에 Ki67-양성 CD4 T 세포의 일시적인 증가 (P= 0.002)를 밝혔고, 상기 증가는 감염의 초기 단계보다 후기 단계 동안 처리된 동물에서 더 높았다 (P= 0.015). 이와 유사하게, Gag-특이적 CD4 T 세포의 빈도의 증가가 또한 관찰되었지만, 감염의 후기 단계 동안 처리된 동물에서만 관찰되었다. 대조-항체-처리된 원숭이에서 이들 활성화된 CD4 T 세포에 대한 유의한 증가는 관찰되지 않았다. 이들 결과는 활성화된 CD4 T 세포가 차단 후 혈장 바이러스혈증 수준의 관찰된 초기 상승에 기여할 수 있음을 제안한다.

[0332] PD-1 차단의 개시 전에, 혈장 내의 세트 포인트 (set point) 바이러스 부하 및 혈액 및 창자 내의 총 CD4 T 세포는 항-PD-1-항체-처리군 및 대조-항체 처리군 사이에 유사하였다. 그러나, Gag CM9+ 세포 및 페르포린, 그랜자임 B 또는 CD28을 동시발현하는 Gag CM9+ 세포의 빈도는 생체내 차단 전에 2개의 처리군 사이에서 유사하지 않았다. 이것은 이들 차이가 PD-1 차단 후에 Gag CM9+ 세포의 팽창에 기여할 수 있다는 가능성을 상승시킨다. 차단 후의 그들의 팽창에 대한 차단 전의 Gag CM9+ 세포의 빈도의 영향을 연구하기 위해, 항-PD-1-항체-처리군을 대조-항체-처리군에 비해 하나의 군은 유사한 수준을 갖고 다른 군은 더 높은 수준의 Gag CM9+ 세포를 갖도록, 차단 개시 전의 Gag CM9+ 세포의 빈도에 기초하여 2개의 하위군으로 나누었다. 이어서, 이들 하위군을 차단 후에 Gag CM9+ 세포의 팽창에 대해 분석하였다. Gag CM9+ 세포의 팽창은 그들이 차단 전에 낮은 수준이었든지 높은 수준이었든지 무관하게 PD-1의 차단 후에 두 하위군의 동물 모두에서 명백하였다. 보다 우수한 T-세포 기능과 연관된 분자, 예를 들어 페르포린, 그랜자임 B, CCR7, CD 127 또는 CD28을 동시발현하는 Gag CM9+ 세포

의 빈도에 기초한 하위군 분석에서 또한 유사한 결과가 관찰되었다. 그러나, 차단 전에 보다 높은 수준의 Gag CM9+CD28+ 세포를 갖는 동물에서 Gag CM9+CD28+ 세포의 보다 우수한 팽창을 향한 경향이 관찰되었고, 이것은 CD28 발현이 생체내 PD-1 차단의 결과를 예측하기 위한 생체마커로서 역할을 할 수 있음을 제안한다.

[0333] 상기 설명된 실험은 PD-1에 대한 항체를 사용한 PD-1 차단이 개선된 기능적 품질을 갖는 바이러스-특이적 CD8 T 세포의 신속한 팽창을 일으킴을 입증한다. 상기 향상된 T-세포 면역성은 혈액 내에서 및 또한 SIV 감염의 주요 저장기인 창자 내에서 보였다. PD-1 차단은 또한 기억 B 세포의 증식 및 SIV 외피-특이적 항체의 증가를 일으켰다. 이들 개선된 면역 반응은 혈장 바이러스 부하의 유의한 감소를 일으키고, 또한 SIV-감염된 원숭이의 생존을 연장시켰다. 차단은 중증 림프구감소증의 조건 하에 만성 감염의 초기 (제10주) 및 후기 (~제90주)기 동안 효과적이었다. 이들 결과는 단일 억제 경로를 억제함으로써 병원성 면역결핍 바이러스 감염 동안 세포성 및 체액성 면역 반응 모두의 향상을 입증하고, 인간 면역결핍 바이러스 감염의 제어를 위한 신규한 치료 방안을 확인한다.

[0334] 실시예 10: 인간화된 PD-1 항체 및 인간화된 PD-L1 항체에 의한 PD-1:PDL 경로의 시험관내 차단 후 SIV-특이적 CD8 T 세포의 향상된 증식.

[0335] SIV Gag-특이적 CD8 T 세포의 증식 능력에 대한 EH-12.2H7로부터 유래한 인간화된 항-PD-1 항체 및 29E.2A3으로부터 유래한 인간화된 항-PD-L1 항체의 효과를 시험관 내에서 시험하였다. 인간화된 항-PD-1 항체는 서열 28의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 32의 경쇄 가변 영역 서열을 갖는다. 인간화된 항-PD-L1 항체는 서열 35의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 42의 경쇄 가변 영역 서열을 갖는다. 인간화된 항체의 중쇄 불변 영역은 Ser 228에서 Pro 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 (CPSCP에서 CPPCP로)로부터의 것이고, 따라서 항체들은 이량체를 형성하고, 경쇄 불변 영역은 인간 카파 경쇄 불변 영역이다. Ser 228에 대한 아미노산 넘버링은 EU 넘버링 시스템을 따른다 (Aalberse et al., Immunology 105:9-19, 2002 참조). SIV-감염된 원숭이 (감염 후 3개월 내지 1.5년)로부터 얻은 PBMC를 카르복시플루오레세인 디아세테이트 숙신이미딜 에스테르 (CFSE)로 염색하고, SIV Gag 펩티드 풀 또는 배양 배지로 6일 동안 차단 항체의 존재 또는 부재 하에 자극하였다. 자극 끝에, 세포를 표면 CD3 및 CD8, 및 세포내 Ki-67에 대해 염색하였다. 이어서, 세포를 FACS Calibur 상에서 획득하고, Flowjo 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 림프구를 산란에 기초하여 확인한 후, CD8 T 세포 (CD3+, CD8+)을 Ki-67 및 CFSE에 대한 동시염색에 대해 분석하였다. Ki-67+, CFSE 저 (low) 세포가 증식하는 세포로서 확인되었다.

[0336] 도 14A에 도시된 바와 같이, 항-PD-1 Ab를 사용한 PD-1:PD-1 리간드 경로의 시험관내 차단은 SIV-특이적 CD8 T 세포 반응의 증식을 유의하게 증가시켰다. 항-PD-L1 Ab를 사용한 시험관내 차단은 SIV-특이적 CD 8 T 세포 반응의 증식을 적당하게 증가시켰다 (도 14B).

[0337] 실시예 11: 지속 감염 상태의 침팬지로부터 간내 단핵 세포에 의한 HCV-특이적 T 세포 증식의 복구

[0338] 10년 초과 동안 유전자형 1a H77 균주의 HCV로 만성 감염 상태인 침팬지 1564로부터 CFSE-표지된 간내 림프구 ($2x10^6$)를 단리하였다. 간내 림프구를, 조작하지 않거나 전체 HCV 폴리단백질 (유전자형 1a H77 균주)에 걸치는 겹치는 펩티드로 펄싱한 $4x10^6$개의 방사선 조사한 자가 CD8-결핍 PBMC와 6일 동안 동시-배양하였다. 세포를 항-PD-L1 차단 항체 (10 ㎍/ml, 제0일 및 제2일에 첨가됨)와 함께 또는 그 없이 L-글루타민 및 10% FCS를 보충한 RPMI 배지 내에서 배양하였다. 인간화된 항-PD-L1 항체는 서열 35의 중쇄 가변 영역 서열 및 서열 42의 경쇄 가변 영역 서열을 갖는다. 인간화된 항체의 중쇄 불변 영역은 Ser 228에서 Pro 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 (CPSCP에서 CPPCP로)로부터의 것이고, 따라서 항체들은 이량체를 형성하고, 경쇄 불변 영역은 인간 카파 경쇄 불변 영역이다. Ser 228에 대한 아미노산 넘버링은 EU 넘버링 시스템을 따른다 (Aalberse et al., Immunology 105:9-19, 2002 참조). 제6일에, 세포를 CD8-PerCP, A0701/P7(758)-PE 사량체, PD-1-Alexa 647, CD4-Alexa 700, CD14-Alexa 700, CD16-Alexa 700, CD19-Alexa 700, 및 Live/Dead Blue로 염색하였다. 샘플을 BD LSR II 유동 세포측정계 상에서 획득하고, 데이타를 FlowJo 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

[0339] 도 15에 도시된 바와 같이, 항-PD-L1 항체 처리는 지속 감염 상태의 침팬지로부터의 간내 단핵 세포에 의한 HCV-특이적 T 세포 증식을 복구하였다.

[0340] **참조에 의한 포함**

[0341] 본원에 언급된 모든 공개문, 특허, 및 특허 출원은 각각의 개별 공개문, 특허 또는 특허 출원이 참고로 포함되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 지시되는 것처럼 그 전체를 본원에 참고로 포함시킨다. 상충하는 경우에는, 본원의 임의의 정의 를 포함한 본 명세서가 우선할 것이다.

[0342] 공개 데이타베이스 내의 기탁에 상호관련하는 기탁 번호를 언급하는 임의의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열, 예를 들어 월드와이드웹 상에서 더 인스티튜트 포 제노믹 리써치 (The Institute for Genomic Research (TIGR)) 및/또는 월드와이드웹 상에서 내셔널 센터 포 바이오테크놀로지 인포메이션 (National Center for Biotechnology Information (NCBI))에 의해 유지되는 것은 그 전체가 또한 참고로 포함된다.

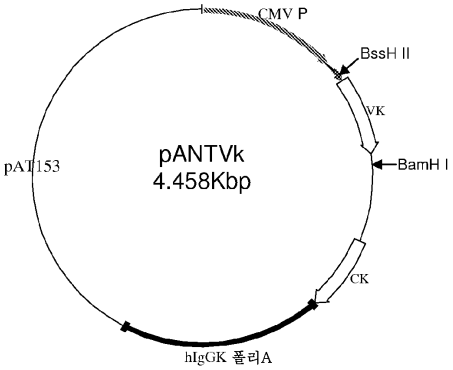
[0343] **균등물**

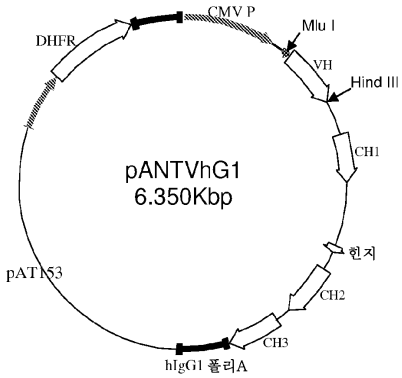
[0344] 당업자는 단지 통상적인 실험을 이용하여, 본원에 기재된 발명의 특정한 실시양태에 대한 많은 균등물을 확인할 수 있거나 알 것이다. 상기 균등물은 다음 특허청구범위에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

도면1

발현 벡터의 개략도





도면2a

항-PD-1 중쇄의 복합 인간 항체 서열 변이체

중쇄 VH1

```
        10        20        30        40        50
CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAACTGAAACAGCCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  L  K  Q  P  G  A  S

        60        70        80        90       100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  S  F  T  S  S  W
                                          CDR1

       110       120       130       140       150
TACACTGGGTGAAACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

      160       170       180       190       200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  Y  P  S  T  G  F  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                CDR2

       210       220       230       240       250
GGCCACATTGACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  A  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260       270       280       290       300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
S  S  L  R  S  E  D  S  A  V  Y  Y  C  A  R  W  R

       310       320       330       340       350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT
 D  S  S  G  Y  H  A  M  D  Y  W  G  Q  G  T  S  V
       CDR3

       360
CACCGTCTCCTCA (서열 1)
  T  V  S  S  (서열 25)
```

도면2b

중쇄 VH2

```
        10        20        30        40        50
CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAAACAGCCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  Q  P  G  A  S

        60        70        80        90       100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  S  F  T  S  S  W
                                          CDR1

       110       120       130       140       150
TACACTGGGTGAAACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

       160       170       180       190       200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  Y  P  S  T  G  F  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                CDR2

       210       220       230       240       250
GGCCACATTGACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  A  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260       270       280       290       300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  W  R

       310       320       330       340       350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT
 D  S  S  G  Y  H  A  M  D  Y  W  G  Q  G  T  S  V
            CDR3

       360
CACCGTCTCCTCA (서열 3)
  T  V  S  S  (서열 26)
```

도면2c

중쇄 VH3

```
        10         20         30         40         50
CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAACAGCCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  H  E  V  K  Q  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  S  F  T  S  S  W
                                              CDR1

       110        120        130        140        150
TACACTGGGTGAAACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  Y  P  S  T  G  F  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                  CDR2

       210        220        230        240        250
GGCCACATTGACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  A  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  W  R

       310        320        330        340        350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGT
 D  S  S  G  Y  H  A  M  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V
           CDR3

       360
CACCGTCTCCTCA (서열 5)
  T  V  S  S  (서열 27)
```

도면2d

중쇄 VH4

```
        10        20        30        40        50
CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGCATGAAGTGAAACAGCCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  H  E  V  K  Q  P  G  A  S

        60        70        80        90       100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  S  F  T  S  S  W
                                              CDR1

       110       120       130       140       150
TACACTGGGTGAGACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

       160       170       180       190       200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  Y  P  S  T  G  F  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                        CDR2

       210       220       230       240       250
GGCCACATTGACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  A  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260       270       280       290       300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  W  R

       310       320       330       340       350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGT
 D  S  S  G  Y  H  A  M  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V
           CDR3

       360
CACCGTCTCCTCA (서열 52)
  T  V  S  S  (서열 28)
```

도면2e

중쇄 VH5

```
        10         20         30         40         50
CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGCATGAAGTGAAACAGCCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  H  E  V  K  Q  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  S  F  T  S  S  W
                                                CDR1
       110        120        130        140        150
TACACTGGGTGAGACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  Y  P  S  T  G  F  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                  CDR2
       210        220        230        240        250
GGCCACAATCACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  A  T  I  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  W  R

       310        320        330        340        350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGT
 D  S  S  G  Y  H  A  M  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V
           CDR3

       360
CACCGTCTCCTCA (서열 53)
  T  V  S  S  (서열 29)
```

도면3a

항-PD-1 경쇄의 복합 인간 항체 서열 변이체

경쇄 VK1

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAACTCTGTCTCCAGGGCA
 D  I  V  L  T  Q  S  P  A  S  L  T  L  S  P  G  Q

        60         70         80         90        100
GAGGCTCACCATCTCATGCAGGGCCAGCCAAAGTGTCAGTACATCTGGCT
  R  L  T  I  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  T  S  G
                    CDR1

       110        120        130        140        150
ATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGACCAGTCCCCCAAACTC
Y  S  Y  M  H  W  Y  Q  Q  K  P  D  Q  S  P  K  L

       160        170        180        190        200
CTCATCAAGTTTGGCTCCAACCTAGAATCTGGCATCCCTGCCAGGTTCAG
 L  I  K  F  G  S  N  L  E  S  G  I  P  A  R  F  S
             CDR2

       210        220        230        240        250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCTCTTCTCTGGAGG
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  E

       260        270        280        290        300
AGGAGGATTTTGCAACATATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCGTAC
E  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  H  S  W  E  I  P  Y
                                CDR3

       310        320        330
ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (서열 54)
 T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (서열 30)
```

도면3b

경쇄 VK2

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTCTGTCTCCAGGGCA
 D  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  Q

        60         70         80         90        100
GAGGCTCACCATCTCATGCAGGGCCAGCCAAAGTGTCAGTACATCTGGCT
  R  L  T  I  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  T  S  G
                    CDR1

       110        120        130        140        150
ATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGACCAGTCCCCCAAACTC
Y  S  Y  M  H  W  Y  Q  Q  K  P  D  Q  S  P  K  L

       160        170        180        190        200
CTCATCAAGTTTGGCTCCAACCTAGAATCTGGCATCCCTGCCAGGTTCAG
 L  I  K  F  G  S  N  L  E  S  G  I  P  A  R  F  S
             CDR2

       210        220        230        240        250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCTCTTCTCTGGAGC
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  E

       260        270        280        290        300
CTGAGGATTTTGCAACATATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCGTAC
P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  H  S  W  E  I  P  Y
                                CDR3

       310        320        330
ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (서열 55)
 T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (서열 31)
```

도면3c

경쇄 VK3

```
        10        20        30        40        50
GAGATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTCTGTCTCCAGGGCA
 E  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  Q

        60        70        80        90       100
GAGGCTCACCATCTCATGCAGGGCCAGCCAAAGTGTCAGTACATCTGGCT
  R  L  T  I  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  T  S  G
                                              CDR1

       110       120       130       140       150
ATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGACCAGTCCCCCAAACTC
Y  S  Y  M  H  W  Y  Q  Q  K  P  D  Q  S  P  K  L

       160       170       180       190       200
CTCATCAAGTTTGGCTCCAACCTAGAATCTGGCATCCCTGCCAGGTTCAG
 L  I  K  F  G  S  N  L  E  S  G  I  P  A  R  F  S
             CDR2

       210       220       230       240       250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCTCTTCTCTGGAGC
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  E

       260       270       280       290       300
CTGAGGATTTTGCAACATATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCGTAC
P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  H  S  W  E  I  P  Y
                                              CDR3

       310       320       330
ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (서열 56)
 T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (서열 32)
```

도면3d

경쇄 VK4

```
        10        20        30        40        50
GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTCTGTCTCCAGGGCA
 D  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  Q

        60        70        80        90       100
GAGGCTCACCATCTCATGCAGGGCCAGCCAAAGTGTCAGTACATCTGGCT
  R  L  T  I  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  T  S  G
                                              CDR1

       110       120       130       140       150
ATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGACCAGTCCCCCAAACTC
Y  S  Y  M  H  W  Y  Q  Q  K  P  D  Q  S  P  K  L

       160       170       180       190       200
CTCATCAAGTTTGGCTCCAACCTAGAATCTGGCATCCCTGCCAGGTTCAG
 L  I  K  F  G  S  N  L  E  S  G  I  P  A  R  F  S
             CDR2

       210       220       230       240       250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCTCTTCTCTGGAGC
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  E

       260       270       280       290       300
CTGAGGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCGTAC
P  E  D  F  A  V  Y  Y  C  Q  H  S  W  E  I  P  Y
                                              CDR3

       310       320       330
ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (서열 57)
 T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (서열 33)
```

도면4a

항-PD-L1 중쇄의 복합 인간 항체 서열 변이체

중쇄 VH1

```
        10         20         30         40         50
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
 E  V  Q  L  V  Q  S  G  P  E  L  K  K  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y  V
                                       CDR1

       110        120        130        140        150
TGCACTGGGTGAAGCAGGCCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  R  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
 V  N  P  F  N  D  G  T  K  Y  N  E  M  F  K  G  R
                  CDR2

       210        220        230        240        250
GGCCACACTGACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
  A  T  L  T  S  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGGTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
S  S  L  R  S  E  D  S  A  V  Y  Y  C  A  R  Q  A

       310        320        330        340
TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (서열 58)
W  G  Y  P  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (서열 34)
CDR3
```

도면4b

중쇄 VH2

```
        10         20         30         40         50
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
 E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y  V
                                       CDR1

       110        120        130        140        150
TGCACTGGGTGAAGCAGGCCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  R  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
 V  N  P  F  N  D  G  T  K  Y  N  E  M  F  K  G  R
                  CDR2

       210        220        230        240        250
GGCCACACTGACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
  A  T  L  T  S  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGGTCTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  Q  A

       310        320        330        340
TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (서열 59)
W  G  Y  P  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (서열 35)
CDR3
```

도면4c

중쇄 VH3

```
        10         20         30         40         50
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
 E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y  V
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
TGCACTGGGTGAGGCAGGCCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  R  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
 V  N  P  F  N  D  G  T  K  Y  N  E  M  F  K  G  R
                  CDR2

       210        220        230        240        250
GGCCACACTGACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
  A  T  L  T  S  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGGTCTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  Q  A

       310        320        330        340
TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (서열 60)
 W  G  Y  P  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (서열 36)
 CDR3
```

도면4d

중쇄 VH4

```
        10         20         30         40         50
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
 E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTA
  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y  V
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
TGCACTGGGTGAGGCAGGCCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  R  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
 V  N  P  F  N  D  G  T  K  Y  N  E  M  F  K  G  R
                  CDR2

       210        220        230        240        250
GGCCACACTGACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
  A  T  L  T  S  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGGTCTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  Q  A

       310        320        330        340
TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (서열 61)
 W  G  Y  P  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (서열 37)
 CDR3
```

도면4e

중쇄 VH5

```
        10         20         30         40         50
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
 E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTA
  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y  V
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
TGCACTGGGTGAGGCAGGCCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  R  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
 V  N  P  F  N  D  G  T  K  Y  N  E  M  F  K  G  R
                CDR2

       210        220        230        240        250
GGCCACAATCACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
  A  T  I  T  S  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGGTCTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  Q  A

       310        320        330        340
TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (서열 62)
 W  G  Y  P  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (서열 38)
 CDR3
```

도면5a

항-PD-L1 경쇄의 복합 인간 항체 서열 변이체

경쇄 VK1

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTCTGTCTCCCGGGGA
 D  I  V  L  T  Q  S  P  A  S  L  A  L  S  P  G  E

        60         70         80         90        100
GAGAGCCACCCTCTCCTGCAGAGCCACTGAAAGTGTTGAATACTATGGCA
  R  A  T  L  S  C  R  A  T  E  S  V  E  Y  Y  G
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
CAAGTTTAGTGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTC
T  S  L  V  Q  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P  K  L

       160        170        180        190        200
CTCATCTATGCTGCATCCAGCGTAGATTCTGGGGTCCCTTCCAGGTTTAG
 L  I  Y  A  A  S  S  V  D  S  G  V  P  S  R  F  S
                CDR2

       210        220        230        240        250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAATTCTCTGGAGG
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  N  S  L  E

       260        270        280        290        300
AGGAGGATGCTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAGGAGGGTTCCGTAC
E  E  D  A  A  M  Y  F  C  Q  Q  S  R  R  V  P  Y
                                          CDR3

       310        320        330
ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAGATAAAA (서열 63)
 T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (서열 39)
```

도면5b

경쇄 VK2

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTACTTTGTCTCTGTCTCCCGGGGA
 D  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  E

        60         70         80         90        100
GAGAGCCACCCTCTCCTGCAGAGCCACTGAAAGTGTTGAATACTATGGCA
  R  A  T  L  S  C  R  A  T  E  S  V  E  Y  Y  G
                                 CDR1

       110        120        130        140        150
CAAGTTTAGTGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTC
T  S  L  V  Q  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P  K  L

       160        170        180        190        200
CTCATCTATGCTGCATCCAGCGTAGATTCTGGGGTCCCTTCCAGGTTTAG
 L  I  Y  A  A  S  S  V  D  S  G  V  P  S  R  F  S
             CDR2

       210        220        230        240        250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAATTCTCTGGAGG
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  N  S  L  E

       260        270        280        290        300
CCGAGGATGCTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAGGAGGGTTCCGTAC
A  E  D  A  A  M  Y  F  C  Q  Q  S  R  R  V  P  Y
                                 CDR3

       310        320        330
ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAGATAAAA (서열 64)
T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (서열 40)
```

도면5c

경쇄 VK3

```
        10         20         30         40         50
GAGATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTACTTTGTCTCTGTCTCCCGGGGA
 E  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  E

        60         70         80         90        100
GAGAGCCACCCTCTCCTGCAGAGCCACTGAAAGTGTTGAATACTATGGCA
  R  A  T  L  S  C  R  A  T  E  S  V  E  Y  Y  G
                                 CDR1

       110        120        130        140        150
CAAGTTTAGTGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTC
T  S  L  V  Q  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P  K  L

       160        170        180        190        200
CTCATCTATGCTGCATCCAGCGTAGATTCTGGGGTCCCTTCCAGGTTTAG
 L  I  Y  A  A  S  S  V  D  S  G  V  P  S  R  F  S
             CDR2

       210        220        230        240        250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAATTCTCTGGAGG
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  N  S  L  E

       260        270        280        290        300
CCGAGGATGCTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAGGAGGGTTCCGTAC
A  E  D  A  A  M  Y  F  C  Q  Q  S  R  R  V  P  Y
                                 CDR3

       310        320        330
ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAGATAAAA (서열 65)
T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (서열 41)
```

도면5d

경쇄 VK4

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTACTTTGTCTCTGTCTCCCGGGGA
 D  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  E

        60         70         80         90        100
GAGAGCCACCCTCTCCTGCAGAGCCACTGAAAGTGTTGAATACTATGGCA
  R  A  T  L  S  C  R  A  T  E  S  V  E  Y  Y  G
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
CAAGTTTAGTGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTC
T  S  L  V  Q  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P  K  L

       160        170        180        190        200
CTCATCTATGCTGCATCCAGCGTAGATTCTGGGGTCCCTTCCAGGTTTAG
 L  I  Y  A  A  S  S  V  D  S  G  V  P  S  R  F  S
             CDR2

       210        220        230        240        250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAATTCTCTGGAGG
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  N  S  L  E

       260        270        280        290        300
CCGAGGATGCTGCAACCTATTTCTGTCAGCAAAGTAGGAGGGTTCCGTAC
A  E  D  A  A  T  Y  F  C  Q  Q  S  R  R  V  P  Y
                                          CDR3

       310        320        330
ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAGATAAAA (서열 66)
T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (서열 42)
```

도면6a

항-PD-L2 중쇄의 복합 인간 항체 서열 변이체

중쇄 VH1

```
        10         20         30         40         50
CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAACTGAAGAAACCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  L  K  K  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  T
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
TGCACTGGGTAAAACAGGCCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
M  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
ATTAATCCTAGAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
             CDR2

       210        220        230        240        250
GACCACATTGACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  T  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
S  S  L  R  S  E  D  S  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

       310        320        330        340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (서열 67)
F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (서열 43)
CDR3
```

도면6b

중쇄 VH2

```
        10         20         30         40         50
CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  T
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
TGCACTGGGTAAAACAGGCCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
M  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
ATTAATCCTAGAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                   CDR2

       210        220        230        240        250
GACCACATTGACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  T  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

       310        320        330        340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (서열 68)
 F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (서열 44)
CDR3
```

도면6c

중쇄 VH3

```
        10         20         30         40         50
CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  T
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
TGCACTGGGTAAGACAGGCCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
ATTAATCCTAGAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                   CDR2

       210        220        230        240        250
GACCACATTGACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  T  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

       310        320        330        340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (서열 69)
 F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (서열 45)
CDR3
```

도면6d

중쇄 VH4

```
         10         20         30         40         50
CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

         60         70         80         90        100
AGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  T
                                          CDR1

        110        120        130        140        150
TGCACTGGGTAAGACAGGCCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

        160        170        180        190        200
ATTAATCCTAGAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                CDR2

        210        220        230        240        250
GACCACATTGACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  T  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

        260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

        310        320        330        340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (서열 70)
F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (서열 46)
CDR3
```

도면6e

중쇄 VH5

```
         10         20         30         40         50
CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

         60         70         80         90        100
AGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  T
                                          CDR1

        110        120        130        140        150
TGCACTGGGTAAGACAGGCCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

        160        170        180        190        200
ATTAATCCTAGAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                CDR2

        210        220        230        240        250
GACCACAATCACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  T  T  I  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

        260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

        310        320        330        340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (서열 71)
F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (서열 47)
CDR3
```

도면7a

항-PD-L2 경쇄의 복합 인간 항체 서열 변이체

경쇄 VK1

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCTCCCTGACTGTGACACCAGGAGA
 D  I  V  M  T  Q  S  P  A  S  L  T  V  T  P  G  E

        60         70         80         90        100
GAAGGTCACTATCACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAA
  K  V  T  I  T  C  K  S  S  Q  S  L  L  N  S  G
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
ATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT
N  Q  K  N  Y  L  T  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P

       160        170        180        190        200
AAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG
 K  L  L  I  Y  W  A  S  T  R  E  S  G  V  P  D  R
                CDR2

       210        220        230        240        250
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
  F  T  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S

       260        270        280        290        300
TGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTAT
L  Q  A  E  D  V  A  V  Y  Y  C  Q  N  D  Y  S  Y
                                          CDR3

       310        320        330
CCTCTCACGTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (서열 72)
P  L  T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (서열 48)
```

도면7b

경쇄 VK2

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCTCCCTGTCTGTGACACCAGGAGA
 D  I  V  M  T  Q  S  P  A  S  L  S  V  T  P  G  E

        60         70         80         90        100
GAAGGTCACTATCACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAA
  K  V  T  I  T  C  K  S  S  Q  S  L  L  N  S  G
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
ATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT
N  Q  K  N  Y  L  T  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P

       160        170        180        190        200
AAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG
 K  L  L  I  Y  W  A  S  T  R  E  S  G  V  P  D  R
                CDR2

       210        220        230        240        250
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
  F  T  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S

       260        270        280        290        300
TGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTAT
L  Q  A  E  D  V  A  V  Y  Y  C  Q  N  D  Y  S  Y
                                          CDR3

       310        320        330
CCTCTCACGTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (서열 73)
P  L  T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (서열 49)
```

도면7c

경쇄 VK3

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCTTCCTGTCTGTGACACCAGGAGA
 D  I  V  M  T  Q  S  P  A  F  L  S  V  T  P  G  E

        60         70         80         90        100
GAAGGTCACTATCACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAA
  K  V  T  I  T  C  K  S  S  Q  S  L  L  N  S  G
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
ATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT
N  Q  K  N  Y  L  T  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P

       160        170        180        190        200
AAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG
 K  L  L  I  Y  W  A  S  T  R  E  S  G  V  P  D  R
                CDR2

       210        220        230        240        250
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
  F  T  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S

       260        270        280        290        300
TGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTAT
L  Q  A  E  D  V  A  V  Y  Y  C  Q  N  D  Y  S  Y
                                          CDR3

       310        320        330
CCTCTCACGTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (서열 74)
 P  L  T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (서열 50)
```

도면7d

경쇄 VK4

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCTTCCTGTCTGTGACACCAGGAGA
 D  I  V  M  T  Q  S  P  A  F  L  S  V  T  P  G  E

        60         70         80         90        100
GAAGGTCACTATCACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAA
  K  V  T  I  T  C  K  S  S  Q  S  L  L  N  S  G
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
ATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT
N  Q  K  N  Y  L  T  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P

       160        170        180        190        200
AAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG
 K  L  L  I  Y  W  A  S  T  R  E  S  G  V  P  D  R
                CDR2

       210        220        230        240        250
CTTCTCCGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S

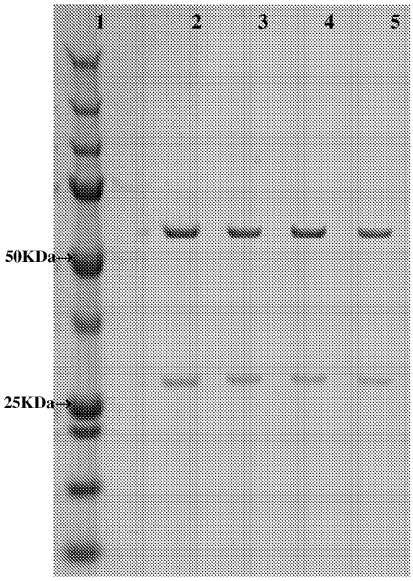
       260        270        280        290        300
TGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTAT
L  Q  A  E  D  V  A  V  Y  Y  C  Q  N  D  Y  S  Y
                                          CDR3

       310        320        330
CCTCTCACGTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (서열 75)
 P  L  T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (서열 51)
```

도면8a

EH12.2H7 복합 인간 항체의 정제

정제된 EH12.2H7 항체의 쿠마시 블루 염색 SDS-PAGE :

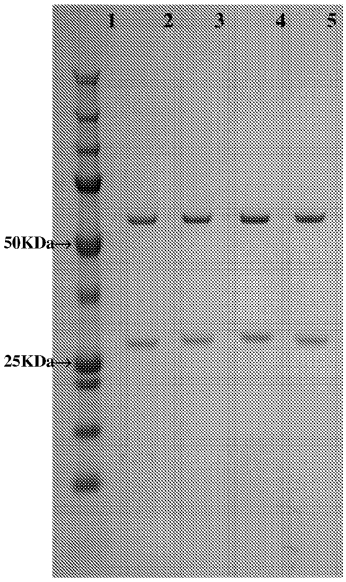


레인 1: Bio-Rad 정확도 마커
레인 2: VH4/Vκ4
레인 3: VH4/Vκ3
레인 4: VH3/Vκ4
레인 5: VH3/Vκ3

1μg의 각각의 항체를 로딩하였다

도면8b

정제된 29E.2A3 항체의 쿠마시 블루 염색 SDS-PAGE:

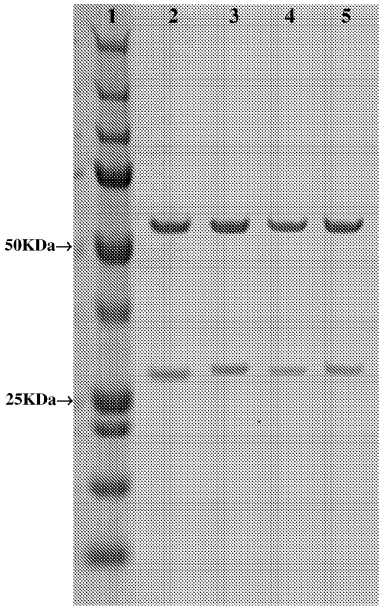


레인 1: Bio-Rad 정확도 마커
레인 2: VH4/Vκ2
레인 3: VH2/Vκ4
레인 4: VH2/Vκ1
레인 5: VH2/Vκ2

1μg의 각각의 항체를 로딩하였다

도면8c

정제된 24F.10C12 항체의 쿠마시 블루 염색 SDS-PAGE :

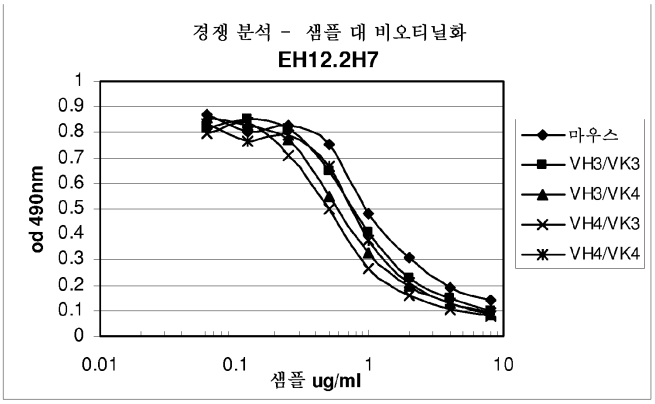


레인 1: Bio-Rad 정확도 마커
레인 2: VH4/Vκ4
레인 3: VH4/Vκ2
레인 4: VH2/Vκ3
레인 5: VH2/Vκ2

1μg의 각각의 항체를 로딩하였다

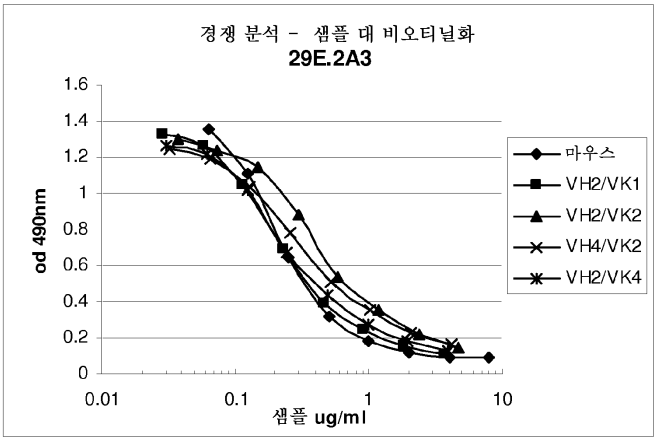
도면9a

마우스 참조 항체에 대한 복합 인간 항체 활성의 비교
인간 PD-1 경쟁 ELISA:



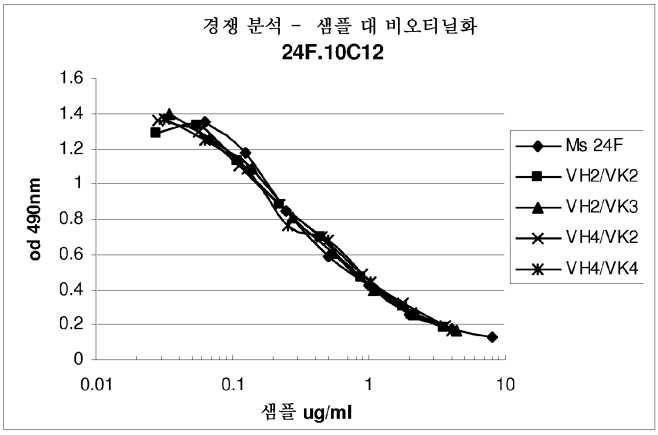
도면9b

인간 PD-L1 경쟁 ELISA:



도면9c

인간 PD-L2 경쟁 ELISA:



도면10

마우스 항-인간 항체를 복합 인간 항체와 비교하는 IC50 결합

(10A) PD-1에 대한 결합에 대해 EH12.2H7과의 경쟁

	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
VK1	0.82	0.78	0.82	0.77	ND
VK2	0.66	0.98	0.82	0.98	ND
VK3	0.82	0.98	0.76	0.46	ND
VK4	ND	0.90	0.60	0.74	ND

(10B) PD-L1에 대한 결합에 대해 29E.2A3과의 경쟁

	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
VK1	3.61	0.96	3.21	2.10	5.96
VK2	3.34	1.75	1.68	3.00	7.8
VK3	2.26	2.26	1.92	3.16	9.16
VK4	5.10	1.04	1.64	2.96	7.04

(10C) PD-L2에 대한 결합에 대해 24F.10C12와의 경쟁

	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
VK1	0.82	0.78	0.82	0.77	ND
VK2	0.66	0.98	0.82	0.98	ND
VK3	0.82	0.98	0.76	0.46	ND
VK4	ND	0.90	0.60	0.74	ND

도면11

PD-1, PD-L1 및 PD-L2의 아미노산 서열

PD-1 아미노산 서열 (서열 2)

```
MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA  50
TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL 100
PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE 150
VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI 200
GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT 250
IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL              288
```

PD-L1 아미노산 서열 (서열 4)

```
MRIFAVFIFM TYWHLLNAFT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL  50
AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ 100
ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPVTSE 150
HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVTSTLRIN 200
TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPELP LAHPPNERTH LVILGAILLC 250
LGVALTFIFR LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET            290
```

PD-L2 아미노산 서열 (서열 6)

```
MIFLLLMLSL ELQLHQIAAL FTVTVPKELY IIEHGSNVTL ECNFDTGSHV  50
NLGAITASLQ KVENDTSPHR ERATLLEEQL PLGKASFHIP QVQVRDEGQY 100
QCIIIYGVAW DYKYLTLKVK ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL 150
AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL RLKPPPGRNF SCVFWNTHVR 200
ELTLASIDLQ SQMEPRTHPT WLLHIFIPFC IIAFIFIATV IALRKQLCQK 250
LYSSKDTTKR PVTTTKREVN SAI                              273
```

도면12

복합 인간 항체에 대한 CDR 아미노산 서열

항체	사슬	CDR	서열	서열 번호
항-PD-1	중쇄	CDR1	SSWIH	7
		CDR2	YIYPSTGFTEYNQKFKD	8
		CDR3	WRDSSGYHAMDY	9
	경쇄	CDR1	RASQSVSTSGYSYMH	10
		CDR2	FGSNLES	11
		CDR3	QHSWEIPYT	12
항-PD-L1	중쇄	CDR1	SYVMH	13
		CDR2	YVNPFNDGTKYNEMFKG	14
		CDR3	QAWGYP	15
	경쇄	CDR1	RATESVEYYGTSLVQ	16
		CDR2	AASSVDS	17
		CDR3	QQSRRVPYT	18
항-PD-L2	중쇄	CDR1	GYTMH	19
		CDR2	YINPRSGYTEYNQKFKD	20
		CDR3	PWFAY	21
	경쇄	CDR1	KSSQSLLNSGNQKNYLT	22
		CDR2	WASTRES	23
		CDR3	QNDYSYPLT	24

도면13a

복합 인간 항체 가변 구역의 중쇄 및 경쇄에 대한 아미노산 서열

항-PD-1 중쇄 VH1 (서열 25)
QVQLVQSGAELKQPGASVKMSCKASGYSFTSSWIHWVKQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEYNQKFKDRA
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTSVTVSS

항-PD-1 중쇄 VH2 (서열 26)
QVQLVQSGAEVKQPGASVKMSCKASGYSFTSSWIHWVKQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEYNQKFKDRA
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTSVTVSS

항-PD-1 중쇄 VH3 (서열 27)
QVQLVQSGHEVKQPGASVKMSCKASGYSFTSSWIHWVKQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEYNQKFKDRA
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTLVTVSS

항-PD-1 중쇄 VH4 (서열 28)
QVQLVQSGHEVKQPGASVKMSCKASGYSFTSSWIHWVRQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEYNQKFKDRA
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTLVTVSS

항-PD-1 중쇄 VH5 (서열 29)
QVQLVQSGHEVKQPGASVKVSCKASGYSFTSSWIHWVRQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEYNQKFKDRA
TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTLVTVSS

항-PD-1 경쇄 VK1 (서열 30)
DIVLTQSPASLTLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPDQSPKLLIKFGSNLESGIPARFSG
SGSGTDFTLTISSLEEEDFATYYCQHSWEIPYTFGQGTKLEIK

항-PD-1 경쇄 VK2 (서열 31)
DIVLTQSPATLSLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPDQSPKLLIKFGSNLESGIPARFSG
SGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCQHSWEIPYTFGQGTKLEIK

항-PD-1 경쇄 VK3 (서열 32)
EIVLTQSPATLSLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPDQSPKLLIKFGSNLESGIPARFSG
SGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCQHSWEIPYTFGQGTKLEIK

항-PD-1 경쇄 VK4 (서열 33)
DIVLTQSPATLSLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPDQSPKLLIKFGSNLESGIPARFSG
SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSWEIPYTFGQGTKLEIK

항-PD-L1 중쇄 VH1 (서열 34)
EVQLVQSGPELKKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQAPGQRLEWIGYVNPFNDGTKYNEMFKGRA
TLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARQAWGYPWGQGTLVTVSS

항-PD-L1 중쇄 VH2 (서열 35)
EVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQAPGQRLEWIGYVNPFNDGTKYNEMFKGRA
TLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYPWGQGTLVTVSS

도면13b

항-PD-L1 중쇄 VH3 (서열 36)
EVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYVNPFNDGTKYNEMFKGRA
TLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYPWGQGTLVTVSS

항-PD-L1 중쇄 VH4 (서열 37)
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYVNPFNDGTKYNEMFKGRA
TLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYPWGQGTLVTVSS

항-PD-L1 중쇄 VH5 (서열 38)
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYVNPFNDGTKYNEMFKGRA
TITSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYPWGQGTLVTVSS

항-PD-L1 경쇄 VK1 (서열 39)
DIVLTQSPASLALSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTINSLEEEDAAMYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK

항-PD-L1 경쇄 VK2 (서열 40)
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTINSLEAEDAAMYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK

항-PD-L1 경쇄 VK3 (서열 41)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTINSLEAEDAAMYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK

항-PD-L1 경쇄 VK4 (서열 42)
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTINSLEAEDAATYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK

항-PD-L2 중쇄 VH1 (서열 43)
QVQLVQSGAELKKPGASVKMSCKASGYTFTGYTMHWVKQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARPWFAYWGQGTLVTVSS

항-PD-L2 중쇄 VH2 (서열 44)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTGYTMHWVKQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPWFAYWGQGTLVTVSS

항-PD-L2 중쇄 VH3 (서열 45)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTGYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPWFAYWGQGTLVTVSS

항-PD-L2 중쇄 VH4 (서열 46)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPWFAYWGQGTLVTVSS

도면13c

항-PD-L2 중쇄 VH5 (서열 47)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPWFAYWGQGTLVTVSS

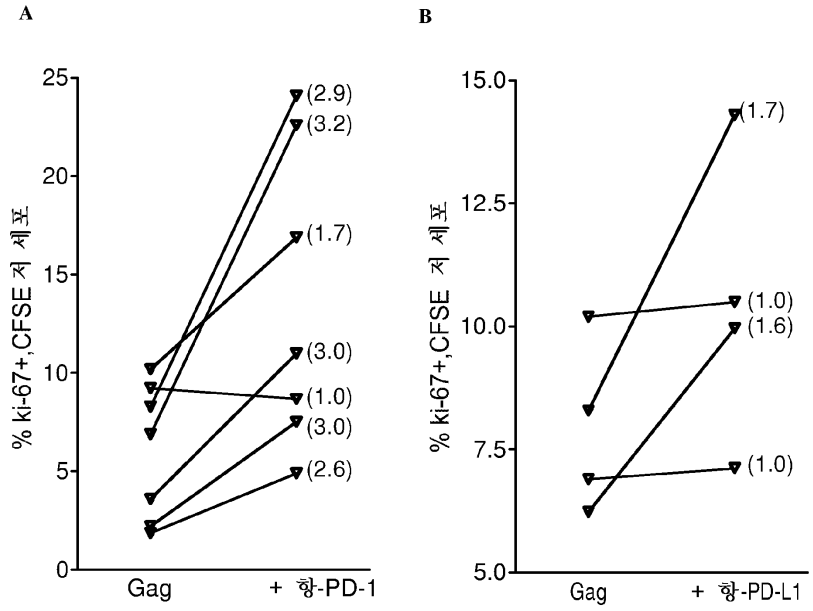
항-PD-L2 경쇄 VK1 (서열 48)
DIVMTQSPASLTVTPGEKVTITCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
TGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK

항-PD-L2 경쇄 VK2 (서열 49)
DIVMTQSPASLSVTPGEKVTITCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
TGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK

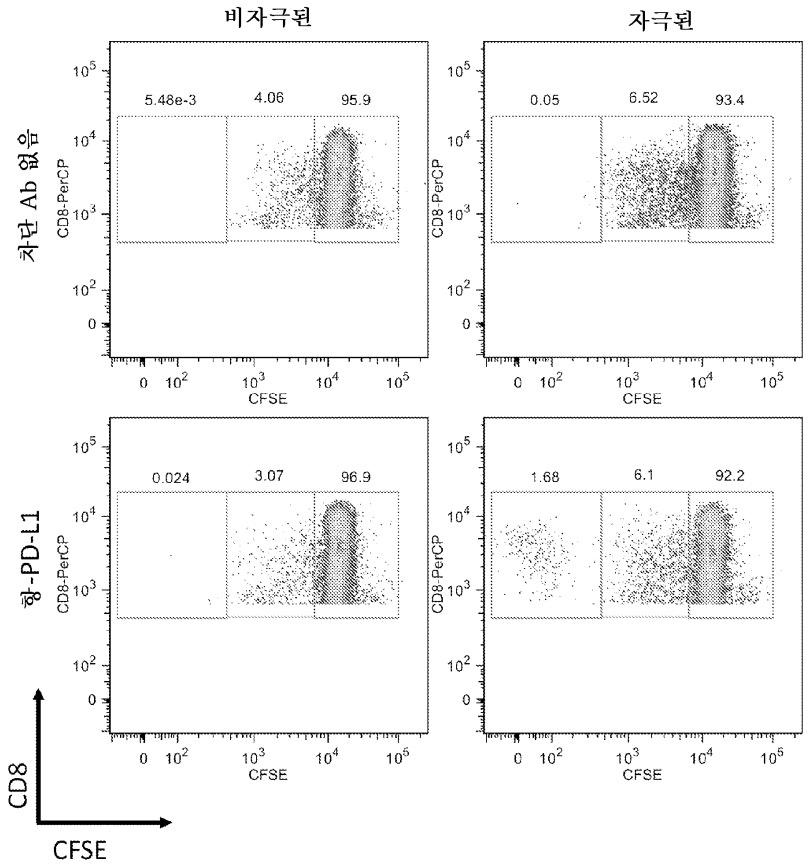
항-PD-L2 경쇄 VK3 (서열 50)
DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
TGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK

항-PD-L2 경쇄 VK4 (서열 51)
DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK

도면14



도면15



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Dana-Farber Cancer Institute

Emory University

FREEMAN, Gordon

AHMED, Rafi

JONES, Timothy D.

CARR, Francis J.

GREGSON, James P.

<120> HUMAN ANTI-PD-1, PD-L1, AND PD-L2
ANTIBODIES AND USES THEREFOR

<130> 677192000140

<140> PCT/US2009/058475

<141> 2009-09-25

<150> US 61/100,534

<151> 2008-09-26

<160> 158

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 1

caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgaa ctgaaacagc ctggggcctc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta cagttttact agctcctgga tacactgggt gaaacaggct 120

cctggacagg gtctggaatg gattggatac atttatccta gcactggttt tactgagtac 180

aatcagaagt tcaaggacag ggccacattg actgcagaca aatccaccag cacagcctac 240

atggaactga gcagcctgag atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatggagg 300

gacagctcgg gctaccatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 2

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

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

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val

50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100 105 110

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

115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys

180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro

225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly

245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg

260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu

275 280 285

<210> 3

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 3

caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgaa gtgaaacagc ctggggcctc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta cagttttact agctcctgga tacactgggt gaaacaggct 120

cctggacagg gtctggaatg gattggatac atttatccta gcactggttt tactgagtac 180

aatcagaagt tcaaggacag ggccacattg actgcagaca aatccaccag cacagcctac 240

atggaactga gcagcctgag atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagatggagg 300

gacagctcgg gctaccatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 4

<211> 290

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu

1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr

20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu

35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn

85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr

100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val

115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val

130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr

145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser

165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn

180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr

195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu

210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His

225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr

245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys

260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu

275 280 285

Glu Thr

290

<210> 5

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 5

caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgaa gtgaaacagc ctggggcctc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta cagttttact agctcctgga tacactgggt gaaacaggct 120

cctggacagg gtctggaatg gattggatac atttatccta gcactggttt tactgagtac 180

aatcagaagt tcaaggacag ggccacattg actgcagaca aatccaccag cacagcctac 240

atggaactga gcagcctgag atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagatggagg 300

gacagctcgg gctaccatgc tatggactac tggggtcaag gaaccctggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 6

<211> 273

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln

1 5 10 15

Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile

20 25 30

Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser

35 40 45

His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn

50 55 60

Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu

65 70 75 80

Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp

85 90 95

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

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

210 215 220
Ile Phe Ile Pro Phe Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val
225 230 235 240
Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp
245 250 255
Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala
260 265 270
Ile

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213
> Mus musculus
<400> 7
Ser Ser Trp Ile His
1 5
<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Tyr Ile Tyr Pro Ser Thr Gly Phe Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Trp Arg Asp Ser Ser Gly Tyr His Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Phe Gly Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Tyr Thr

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Ser Tyr Val Met His

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Tyr Val Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Gln Ala Trp Gly Tyr Pro

1 5

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

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

1 5 10 15

<210

> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Ala Ala Ser Ser Val Asp Ser

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Gln Gln Ser Arg Arg Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Gly Tyr Thr Met His

1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Pro Trp Phe Ala Tyr

1 5

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

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

1 5 10 15

Thr

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 25

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser Thr Gly Phe Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Arg Asp Ser Ser Gly Tyr His Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 26

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser Thr Gly Phe Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Arg Asp Ser Ser Gly Tyr His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 27
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly His Glu Val Lys Gln Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Ser

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

85 90 95
Ala Arg Trp Arg Asp Ser Ser Gly Tyr His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser Thr Gly Phe Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Arg Asp Ser Ser Gly Tyr His Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 29

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Trp Arg Asp Ser Ser Gly Tyr His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 30
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Construct
<400
> 30
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Thr Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Gln Arg Leu Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Lys Phe Gly Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Glu Glu Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
85 90 95
Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
<210> 31

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Phe Gly Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 32

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Phe Gly Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 33

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 33

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Phe Gly Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp

85 90 95

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

100 105 110

<210> 34

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 34

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Val Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Ala Trp Gly Tyr Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 35

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 35

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Arg Gln Ala Trp Gly Tyr Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 36
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 36

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

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

Ala Arg Gln Ala Trp Gly Tyr Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 37

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Val Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gln Ala Trp Gly Tyr Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 38

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 38

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

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

Ala Arg Gln Ala Trp Gly Tyr Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115
<210> 39
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 39
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Thr Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
20 25 30

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

65 70 75 80

Ser Leu Glu Glu Glu Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg

85 90 95

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

100 105 110

<210> 40

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Thr Ser Leu Val Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Val Asp Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg

85 90 95

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

100 105 110

<210> 41

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 41

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Thr Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Val Asp Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

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

Arg Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 42

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 42

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Thr Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Val Asp Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg

85 90 95

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

100 105 110

<210> 43

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser

<210> 44

<211> 114

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 44

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Ser Ser

<210> 45

<211> 114

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 45

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

<210> 46
<211> 114
<212
> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 46
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 Gly Tyr
20 25 30
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe

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

<210> 47

<211> 114

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 47

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 Gly Tyr
            20   25   30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe

    50   55   60

Lys Asp Arg Thr Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65   70   75   80

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

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

Ser Ser

<210> 48

<211> 113

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 48

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 49

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 49

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys

<210> 50
<211> 113
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 50
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

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

<210> 51
<211> 113
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 51

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

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

50 55 60

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

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

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 52

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 52

caggtccagc ttgtgcagtc tgggcatgaa gtgaaacagc ctggggcctc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta cagttttact agctcctgga tacactgggt gagacaggct 120

cctggacagg gtctggaatg gattggatac atttatccta gcactggttt tactgagtac 180

aatcagaagt tcaaggacag ggccacattg actgcagaca aatccaccag cacagcctac 240

atggaactga gcagcctgag atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagatggagg 300

gacagctcgg gctaccatgc tatggactac tggggtcaag gaaccctggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 53

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 53

caggtccagc ttgtgcagtc tgggcatgaa gtgaaacagc ctggggcctc agtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttctggcta cagttttact agctcctgga tacactgggt gagacaggct 120

cctggacagg gtctggaatg gattggatac atttatccta gcactggttt tactgagtac 180

aatcagaagt tcaaggacag ggccacaatc actgcagaca aatccaccag cacagcctac 240

atggaactga gcagcctgag atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagatggagg 300

gacagctcgg gctaccatgc tatggactac tggggtcaag gaaccctggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 54

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 54

gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttaactctgt ctccagggca gaggctcacc 60

atctcatgca gggccagcca aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcactggtac 120

caacagaaac cagaccagtc ccccaaactc ctcatcaagt ttggctccaa cctagaatct 180

ggcatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatctct 240

tctctggagg aggaggattt tgcaacatat tactgtcagc acagttggga gattccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 55

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 55

gacattgtgc tgacacagtc tcctgctacc ttatctctgt ctccagggca gaggctcacc 60

atctcatgca gggccagcca aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcactggtac 120

caacagaaac cagaccagtc ccccaaactc ctcatcaagt ttggctccaa cctagaatct 180

ggcatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatctct 240

tctctggagc ctgaggattt tgcaacatat tactgtcagc acagttggga gattccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 56

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 56

gagattgtgc tgacacagtc tcctgctacc ttatctctgt ctccagggca gaggctcacc 60

atctcatgca gggccagcca aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcactggtac 120

caacagaaac cagaccagtc ccccaaactc ctcatcaagt ttggctccaa cctagaatct 180

ggcatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatctct 240

tctctggagc ctgaggattt tgcaacatat tactgtcagc acagttggga gattccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 57

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 57

gacattgtgc tgacacagtc tcctgctacc ttatctctgt ctccagggca gaggctcacc 60

atctcatgca gggccagcca aagtgtcagt acatctggct gaggctcacc atctcatgca 120

gggccagcca aagtgtcagt acatctggct ctcatcaagt ttggctccaa cctagaatct 180

ggcatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatctct 240

tctctggagc ctgaggattt tgcagtgtat tactgtcagc acagttggga gattccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 58

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 58

gaggtccagc tggtgcagtc tggacctgag ctgaaaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtta tgcactgggt gaagcaggcc 120

cctgggcagc gccttgagtg gattggatat gttaatcctt tcaatgatgg tactaagtac 180

aatgagatgt tcaaaggcag ggccacactg acttcagaca aatccaccag cacagcctac 240

atggagctca gcagcctgag gtctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagacaggct 300

tggggttacc cctggggcca agggactctg gtcactgtct cttct 345

<210> 59

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 59

gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaaaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtta tgcactgggt gaagcaggcc 120

cctgggcagc gccttgagtg gattggatat gttaatcctt tcaatgatgg tactaagtac 180

aatgagatgt tcaaaggcag ggccacactg acttcagaca aatccaccag cacagcctac 240

atggagctca gcagcctgag gtctgaggac actgcggtct attactgtgc aagacaggct 300

tggggttacc cctggggcca agggactctg gtcactgtct cttct 345

<210> 60

<211> 344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 60

gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaaaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtta tgcactgggt gaggcaggcc 120

cctgggcagc gccttgagtg gattggatat gttaatcctt tcaatgatgg tactaagtac 180

aatgagatgt tcaaaggcag ggccacactg acttcagaca aatccaccag cacagcctac 240

atggagctca gcagcctgag gtctgaggac actgcggtct attactgtgc aagacaggct 300

ggggttaccc ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc ttct 344

<210> 61

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 61

gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaaaaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtta tgcactgggt gaggcaggcc 120

cctgggcagc gccttgagtg gattggatat gttaatcctt tcaatgatgg tactaagtac 180

aatgagatgt tcaaaggcag ggccacactg acttcagaca aatccaccag cacagcctac 240

atggagctca gcagcctgag gtctgaggac actgcggtct attactgtgc aagacaggct 300

tggggttacc cctggggcca agggactctg gtcactgtct cttct 345

<210> 62

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 62

gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaaaaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtta tgcactgggt gaggcaggcc 120

cctgggcagc gccttgagtg gattggatat gttaatcctt tcaatgatgg tactaagtac 180

aatgagatgt tcaaaggcag ggccacaatc acttcagaca aatccaccag cacagcctac 240

atggagctca gcagcctgag gtctgaggac actgcggtct attactgtgc aagacaggct 300

tggggttacc cctggggcca agggactctg gtcactgtct cttct 345

<210> 63

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 63

gacattgtgc tcacccaatc tccagcttct ttggctctgt ctcccgggga gagagccacc 60

ctctcctgca gagccactga aagtgttgaa tactatggca caagtttagt gcagtggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccag cgtagattct 180

ggggtccctt ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcaat 240

tctctggagg aggaggatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaggag ggttccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gctggagata aaa 333

<210> 64

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 64

gacattgtgc tcacccaatc tccagctact ttgtctctgt ctcccgggga gagagccacc 60

ctctcctgca gagccactga aagtgttgaa tactatggca caagtttagt gcagtggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccag cgtagattct 180

ggggtccctt ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcaat 240

tctctggagg ccgaggatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaggag ggttccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gctggagata aaa 333

<210> 65

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 65

gagattgtgc tcacccaatc tccagctact ttgtctctgt ctcccgggga gagagccacc 60

ctctcctgca gagccactga aagtgttgaa tactatggca caagtttagt gcagtggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccag cgtagattct 180

ggggtccctt ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcaat 240

tctctggagg ccgaggatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaggag ggttccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gctggagata aaa 333

<210> 66

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 66

gacattgtgc tcacccaatc tccagctact ttgtctctgt ctcccgggga gagagccacc 60

ctctcctgca gagccactga aagtgttgaa tactatggca caagtttagt gcagtggtac 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccag cgtagattct 180

ggggtccctt ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcaat 240

tctctggagg ccgaggatgc tgcaacctat ttctgtcagc aaagtaggag ggttccgtac 300

acgttcggac aggggaccaa gctggagata aaa 333

<210> 67

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 67

caggtccagc tggtgcagtc tggagctgaa ctgaagaaac ctggggcctc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta cacctttact ggctacacga tgcactgggt aaaacaggcc 120

cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gaagtggata tactgagtat 180

aatcagaagt tcaaggacag gaccacattg actgcagaca aatctaccag cacagcctac 240

atggaactga gcagcctgag atctgaggac tctgcggtct attattgtgc aagaccctgg 300

tttgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctt ca 342

<210> 68

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 68

caggtccagc tggtgcagtc tggagctgaa gtgaagaaac ctggggcctc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta cacctttact ggctacacga tgcactgggt aaaacaggcc 120

cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gaagtggata tactgagtat 180

aatcagaagt tcaaggacag gaccacattg actgcagaca aatctaccag cacagcctac 240

atggaactga gcagcctgag atctgaggac actgcggtct attattgtgc aagaccctgg 300

tttgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctt ca 342

<210> 69

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 69

caggtccagc tggtgcagtc tggagctgaa gtgaagaaac ctggggcctc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta cacctttact ggctacacga tgcactgggt aagacaggcc 120

cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gaagtggata tactgagtat 180

aatcagaagt tcaaggacag gaccacattg actgcagaca aatctaccag cacagcctac 240

atggaactga gcagcctgag atctgaggac actgcggtct attattgtgc aagaccctgg 300

tttgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctt ca 342

<210> 70

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 70

caggtccagc tggtgcagtc tggagctgaa gtgaagaaac ctggggcctc agtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttctggcta cacctttact ggctacacga tgcactgggt aagacaggcc 120

cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gaagtggata tactgagtat 180

aatcagaagt tcaaggacag gaccacattg actgcagaca aatctaccag cacagcctac 240

atggaactga gcagcctgag atctgaggac actgcggtct attattgtgc aagaccctgg 300

tttgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctt ca 342

<210> 71

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 71

caggtccagc tggtgcagtc tggagctgaa gtgaagaaac ctggggcctc agtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttctggcta cacctttact ggctacacga tgcactgggt aagacaggcc 120

cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gaagtggata tactgagtat 180

aatcagaagt tcaaggacag gaccacaatc actgcagaca aatctaccag cacagcctac 240

atggaactga gcagcctgag atctgaggac actgcggtct attattgtgc aagaccctgg 300

tttgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctt ca 342

<210> 72

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 72

gacattgtga tgacacagtc tccagcctcc ctgactgtga caccaggaga gaaggtcact 60

atcacctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 120

tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240

atcagcagtc tgcaggctga agacgtggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 300

cctctcacgt tcggtcaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

<210> 73

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 73

gacattgtga tgacacagtc tccagcctcc ctgtctgtga caccaggaga gaaggtcact 60

atcacctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 120

tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240

atcagcagtc tgcaggctga agacgtggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 300

cctctcacgt tcggtcaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

<210> 74

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 74

gacattgtga tgacacagtc tccagccttc ctgtctgtga caccaggaga gaaggtcact 60

atcacctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 120

tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240

atcagcagtc tgcaggctga agacgtggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 300

cctctcacgt tcggtcaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

<210> 75

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 75

gacattgtga tgacacagtc tccagccttc ctgtctgtga caccaggaga gaaggtcact 60

atcacctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 120

tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cttctccggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240

atcagcagtc tgcaggctga agacgtggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 300

cctctcacgt tcggtcaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

<210> 76

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 76

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

Ser Val Gln Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Ser
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser Thr Gly Phe Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Arg Asp Ser Ser Gly Tyr His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 77

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 77

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

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

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Phe Gly Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

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

Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 78

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 78

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Val Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Ala Trp Gly Tyr Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ala
115

<210> 79

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 79

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

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Val Asp Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Arg Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 80

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 80

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

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

<210> 81
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 81
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

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

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

<210> 82

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

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

1 5 10 15

Ser Val Lys

<210> 83

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

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

1 5 10

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Ser Trp Ile

1 5 10

<210> 85

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Trp Ile His Trp Val

1 5

<210> 86

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 87

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser

1 5 10

<210> 88

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Ser Thr Gly Phe

1

<210> 89

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Thr Glu Tyr Asn

1

<210> 90

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Asp Arg Ala Thr

1

<

210> 91

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 92

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

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

1 5 10 15

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Arg Asp

20 25

<210> 93

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Asp Ser Ser Gly Tyr

1 5

<210> 94

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

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

1 5 10

<210> 95

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1   5   10   15

<210> 96

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

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

Gln Arg

<210> 97

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Arg Leu Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 1   5   10

<210> 98

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr
 1   5   10

<210> 99

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp

1 5 10

<210> 100

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys

1 5 10 15

<210> 101

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Ser Asn Leu Glu Ser Gly

1 5

<210> 102

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 103

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

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

1 5 10

<210> 104

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

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

1 5 10

<210> 105

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro

1 5

<210> 106

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

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

1 5 10 15

Arg

<210> 107

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

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

1 5 10 15

Ser Val Lys

<210> 108

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

1 5

<210> 109

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

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

1 5 10

<210> 110

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Ser Tyr Val Met His Trp Val

1 5

<210> 111

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Trp Val Lys Gln

1

<210> 112

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 113

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Val Asn Pro Phe

1

<210> 114

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Asn Asp Gly Thr

1

<210> 115

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Phe Lys Gly Arg

1

<210> 116

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Gly Arg Ala Thr

1

<210> 117

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

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

1 5 10 15

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

20 25

<210> 118

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Ala

1 5

<210> 119

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Ala Trp Gly Tyr

1

<210> 120

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

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

1 5 10

<210> 121

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

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

1 5 10

<210> 122

<211

> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

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

1 5 10

<210> 123

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr

1 5

<210> 124

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu

1 5

<210> 125

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Val Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

1 5 10

<210> 126

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

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

1 5 10 15

<210> 127

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser

1 5 10

<210> 128

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Ser Val Asp Ser

1

<210> 129

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

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

1 5 10 15

<210> 130

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

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

1 5 10 15

Ser Leu Glu

<210> 131

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

Glu Glu Glu Asp Ala Ala

1 5

<210> 132

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln

1 5

<210> 133

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

Arg Val Pro Tyr Thr Phe Gly

1 5

<210> 134

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

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

1 5 10 15

<210> 135

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala

1 5 10

<210> 136

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys

1 5 10 15

<210> 137

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

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

1 5 10 15

Ser Val Lys

<210> 138

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

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

1 5 10

<210> 139

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

Thr Met His Trp Val

1 5

<210> 140

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Gln Ala Pro Gly

1

<210> 141

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5

<210> 142

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Gly Tyr Ile Asn Pro

1 5

<210> 143

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 143

Ile Asn Pro Arg Ser Gly

1 5

<210> 144

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Trp

1 5 10

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 145

Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

1 5

<210> 146

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 146

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 147

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

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 Gly Tyr
20 25 30

<210> 148

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 148

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 149

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro
1 5

<210> 150

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 150

Pro Ala Ser Leu

1

<210> 151

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 151

Leu Ser Val Thr Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys

1 5 10

<210> 152

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 152

Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu

1 5

<210> 153

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 153

Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe

<210> 154

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 154

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 155

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 155

Tyr Ser Tyr Pro Leu

1 5

<210> 156

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 156

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 157

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 157

Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly Glu Lys

1 5 10 15

Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 158

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 158

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

1 5 10 15

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

20 25