(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0057526
(43) 공개일자 2022년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C07K 16/28* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
*A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C07K 16/2827* (2013.01)
*A61P 35/00* (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7005068
(22) 출원일자(국제) 2020년07월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년02월15일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/070065
(87) 국제공개번호 WO 2021/009267
국제공개일자 2021년01월21일
(30) 우선권주장
1910138.5 2019년07월15일 영국(GB)

(71) 출원인
**카펠라 바이오사이언스 엘티디**
영국 런던 엔더블유1 2엔디 158-160 놀쓰 고워 스트리트
(72) 발명자
**홈즈 스티브**
영국 런던 엔더블유1 2엔디 158-160 놀쓰 고워 스트리트 카펠라 바이오사이언스 엘티디 내
(74) 대리인
**특허법인 플러스**

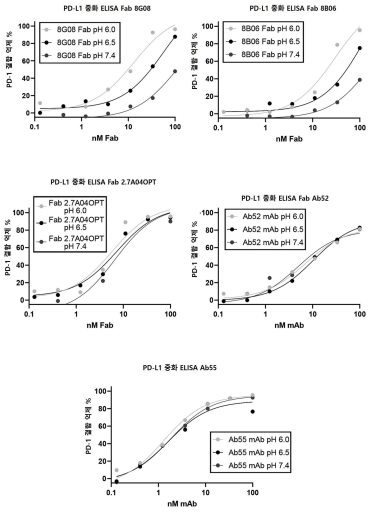
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 **항-PD-L1 항체**

## (57) 요 약

본 발명은 억제 수용체 프로그램화된 사멸 1 폴리펩티드 (PD-1) 및 공동-자극 분자 CD80에 대한 PD-L1 결합과 경쟁하는, pH-의존적 방식으로 프로그램화된 사멸-리간드 1 (PD-L1)에 결합하는 항원 결합 분자, 특히 항체, 이의 단편 및 변이체, 및 암과 같은 질환의 치료 및/또는 예방에 있어서 상기 항원 결합 분자의 용도에 관한 것이다.

*대 표 도* - 도9



(52) CPC특허분류
*A61K 2039/505* (2013.01)
*C07K 2317/31* (2013.01)
*C07K 2317/34* (2013.01)
*C07K 2317/76* (2013.01)
*C07K 2317/77* (2013.01)
*C07K 2317/92* (2013.01)

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

항-PD-L1 항원 결합 분자로서,

서열 번호 16, 12, 10, 14, 18, 또는 2 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 VLCDR1을 포함하는 항-PD-L1 항원 결합 분자.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 서열 번호 16, 12, 10, 14, 18, 또는 2 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 VLCDR1을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

서열 번호 6의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 VHCDR1

서열 번호 7의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 VHCDR2; 및

서열 번호 8의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 VHCDR3 및/또는

서열 번호 16, 12, 10, 14, 18, 또는 2 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 VLCDR1;

서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 VLCDR2; 및

서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 VLCDR3을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 VHCDR1

서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VHCDR2; 및

서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VHCDR3 및/또는

서열 번호 16, 12, 10, 14, 18, 또는 2 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 VLCDR1;

서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VLCDR2; 및

서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 VLCDR3을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

서열 번호 5의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역; 및/또는

서열 번호 15, 서열 번호 11, 서열 번호 9, 서열 번호 13, 서열 번호 17 및 서열 번호 1로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

서열 번호 15, 서열 번호 11, 서열 번호 9, 서열 번호 13, 서열 번호 17 및 서열 번호 1로 이루어진 그룹으로부

터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

**청구항 7**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 항-PD-L1 항원 결합 분자:

(a) 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

아미노산 서열 RETELSRRLHYVR (서열 번호 16)을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QNVLTTPWT (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

이의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VHCDR 및 VLCDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역

을 포함하는 항-PD-L1 항원 결합 분자;

(b) 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

아미노산 서열 VLSPRTHAGHYYR (서열 번호 12)을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QNVLTTPWT (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

이의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VHCDR 및 VLCDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역

을 포함하는 항-PD-L1 항원 결합 분자;

(c) 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

아미노산 서열 ISNDVPASGHYHR (서열 번호 10)을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QNVLTTPWT (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

이의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VHCDR 및 VLCDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역

을 포함하는 항-PD-L1 항원 결합 분자;

(d) 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

아미노산 서열 MRTGTGNKGHYTR (서열 번호 14)을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QNVLTTPWT (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

이의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VHCDR 및 VLCDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역

을 포함하는 항-PD-L1 항원 결합 분자;

(e) 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

아미노산 서열 RGTGSSFHHKUVR (서열 번호 18)을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QNVLTTPWT (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

이의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VHCDR 및 VLCDR을

포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역

을 포함하는 항-PD-L1 항원 결합 분자;

(f) 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

아미노산 서열 TRSSGSIASNYVQ (서열 번호 2)를 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QNVLTTPWT (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

이의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VHCDR 및 VLCDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역

을 포함하는 항-PD-L1 항원 결합 분자.

**청구항 8**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원-결합 분자가 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자:

(a) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 15의 아미노산을 포함하는 VL 또는 서열 번호 5 및 서열 번호 15와 각각 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VH 및 VL;

(b) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VL 또는 서열 번호 5 및 서열 번호 11과 각각 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VH 및 VL;

(c) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VL 또는 서열 번호 5 및 서열 번호 9와 각각 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VH 및 VL;

(d) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 13의 아미노산을 포함하는 VL 또는 서열 번호 5 및 서열 번호 13과 각각 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VH 및 VL;

(e) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 17의 아미노산을 포함하는 VL 또는 서열 번호 5 및 서열 번호 17과 각각 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VH 및 VL;

(f) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VL 또는 서열 번호 5 및 서열 번호 1과 각각 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VH 및 VL.

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-PD-L1 항원 결합 분자는 8B06, 8D06, 8G08, 8A04, 8D04, 2A09로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체인, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 상기 항체는 모든 6개 CDR 영역에 걸쳐 1 내지 10개, 1 내지 5개 또는 1 내지 2개의 보존적 아미노산 치환을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

**청구항 11**

PD-L1에 특이적으로 결합하고 PD-L1이 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항원-결합 분자에 결합하는 것을 억제하는 항-PD-L1 항원 결합 분자.

**청구항 12**

인간 PD-L1의 에피토프에 특이적으로 결합하고 8B06, 8D06, 8G08, 8A04, 8D04, 2A09로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체와 PD-L1에 대한 결합과 경쟁하는 항-PD-L1 항원-결합 분자.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 유도체이고, 임의로, 상기 항체 단편 또는 유도체는 Fab, F(ab')2, Fv, scFv, dAb, Fd, 또는 디아바디인, 항-PD-L1 항원-결합 분자.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 유도체는 1가인, 항-PD-L1 항원-결합 분자.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 유도체가 완전한 인간인, 항-PD-L1 항체.

**청구항 16**

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 유도체는 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM 또는 IgY 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 유도체이고, 임의로 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 유도체는 IgG 항체이고, 추가로 임의로 상기 IgG 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 유도체는 IgG1 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 유도체인, 항-PD-L1 항체 또는 항원 결합 단편 또는 유도체.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 상기 항체는 이중특이적 항체 또는 이중특이적 항원 결합 단편 또는 이의 유도체인, 항-PD-L1 항체 또는 항체 단편.

**청구항 18**

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 pH 의존적 방식으로 PD-L1에 특이적으로 결합하는, 항원 결합 분자.

**청구항 19**

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 pH 7.4에서보다 pH 6.0에서 PD-L1에 대해 더 높은 친화도를 갖는, 항원 결합 분자.

**청구항 20**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 pH 7.4에서보다 pH 6.0에서 PD-L1에 대해 적어도 약 5배 더 높은 친화도를 갖는, 항원 결합 분자.

**청구항 21**

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 적어도 5의 pH 6.0:7.4 결합 비를 갖는, 항원 결합 분자.

**청구항 22**

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, PD-1에 대한 PD-L1 결합의 IC50 억제 값은 pH 6.0에서보다 pH 7.4에서 더 높은, 항원 결합 분자.

**청구항 23**

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 분자가 생체내 또는 시험관내에 투여 시

a. 면역 억제를 역전시키고/시키거나

b. T 세포 면역을 강화하는, 항원 결합 분자.

**청구항 24**

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 항원 결합 분자 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 추가의 치료 활성제를 추가로 포함하거나, 또는 상기 약제학적 조성물은 또 다른 요법 또는 추가의 치료 활성제와 조합하여 사용하기 위한 것인, 약제학적 조성물.

**청구항 26**

의약에 사용하기 위한, 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 항원 결합 분자, 또는 제24항 내지 제25항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물.

**청구항 27**

암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 항원 결합 분자, 또는 제24항 내지 제25항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 상기 암은 흑색종, 전이 암, 비-소세포 폐암, 두경부암, 호지킨 림프종, 요로상피 암종, 위암, 자궁경부암, 간세포 암종 및 방광암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 항원 결합 분자 또는 약제학적 조성물.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 억제 수용체 프로그램화된 사멸 1 폴리펩티드 (PD-1) 및 공동-자극 분자 CD80에 대한 PD-L1 결합과 경쟁하는, pH-의존적 방식으로 프로그램화된 사멸-리간드 1 (PD-L1)에 결합하는 항원 결합 분자, 특히 항체, 이의 단편 및 변이체, 및 암과 같은 질환의 치료 및/또는 예방에 있어서 상기 항원 결합 분자의 용도에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0002] T-세포에 대한 2개의 별개의 신호와의 공동 자극은 항원-제시 세포에 의한 휴지기 T 림프구의 면역 반응 활성화를 조정하고 엄격하게 조절하기 위한 중요한 메커니즘이다 (Mondino and Jenkins, J Leukoc Biol. 1994;55:805-15). 초기 항원 특이적 신호는 MHC에 의해 제시되는 외래 펩티드 항원을 인식한 후 T-세포 수용체 (TCR)를 통해 전달된다. 제2 신호는 항원-제시 세포 (APC)에서 발현되는 공동-자극 분자에 의해 T-세포에 전달되고 T-세포가 클론 확장, 사이토카인 및 이펙터 기능을 분비하도록 유도한다 (Lenschow *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 1996;14:233). 공동-자극이 없으면, T-세포는 항원 자극에 대해 불응성이 될 수 있고 효과적인 면역 반응을 일으키지 않으며 고갈되거나 외부 항원에 대한 내성을 초래할 수 있다.

[0003] T-세포는 양성 및 음성 2차 공동-자극 신호 둘 모두를 수신하며 그러한 신호의 조절은 면역 관용을 유지하고 자가면역을 방지하면서 숙주의 보호 면역 반응을 최대화하는 데 중요하다. 음성 2차 신호는 T-세포 내성의 유도에 필요한 것으로 보이지만 양성 신호는 T-세포 활성화를 촉진한다. 단순한 2-신호 모델은 여전히 나이브 림프구에 대한 유효한 설명을 제공하지만, 숙주의 면역 반응은 동적 과정이고 공동-자극 신호는 항원에 노출된 T-세포에도 제공될 수 있다.

[0004] 공동-자극 신호의 조작과 같이 치료적으로 관련된 공동-자극의 메커니즘은 세포-기반 면역 반응을 향상시키거나 종료시키는 수단을 제공하는 것으로 나타났다. T 세포 기능장애 또는 아네르기는 억제 수용체인 프로그램화된 사멸 1 폴리펩티드 (PD-1)의 유도 및 지속 발현과 동시에 발생한다는 것을 발견하였다. 2개의 PD-1 리간드, PD-L1/B7H1/CD274 및 PD-L2/B7-DC/CD273이 설명되었다. PD-L1은 B 세포, 수지상 세포, 대식세포 및 T 세포와 같은 면역 세포에서 낮은 수준으로 발현되며 활성화 후 상향 조절된다. PD-L1은 또한 내피 세포, 심장, 폐, 췌장, 근육, 각질 세포 및 태반과 같은 비림프성 기관에서 발현된다. 비림프성 조직 내에서의 발현은 PD-L1이 말

초 조직의 골수성 세포 뿐만 아니라 자가-반응성 T 및 B 세포의 기능을 조절하거나 표적 기관의 염증 반응을 조절할 수 있음을 시사한다. PD-L1 발현은 주로 내피 및 상피 세포에서 PD-L1의 주요 조절자인 1형 및 2형 인터페론에 의해 조절된다. PD-L1은 종양 샘플에서 발현되며 불량한 예후와 관련이 있다 (Wang *et al*. Medicine 2017;96:e6369). PD-L2/B7-DC 세포 표면 발현은 주로 대식세포 및 수지상 세포로 제한된다. PD-L1은 다양한 인간 암에 풍부하며 (Dong *et al*. Nat. Med 2002;8:787) PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용은 종양 침윤 림프구의 감소, T-세포 수용체 매개된 증식의 감소 및 암세포에 의한 면역 회피를 초래한다 (Dong *et al*. J. Mol. Med. 2003;81:281; Blank *et al*. Cancer Immunol. Immunother. 2005;54:307; Konishi et. al. Clin. Cancer Res. 2004;10:5094). 면역 억제는 PD-1과 PD-L1의 국소 상호작용을 억제함으로써 역전될 수 있다 (Iwai *et al*. J Biomed. Sci. 2017;24: 26). PD-L1 신호전달의 억제는 암 치료를 위한 T 세포 면역성을 향상시키는 것으로 나타났다 (Alsaab *et al*. Front. Pharmacol. 2017;8:561).

[0005] 관문 억제제를 통한 면역요법은 이제 증가하는 수의 암 유형에 대한 표준 관행이다. 현재까지 1개의 항-CTLA-4 항체 (이플리무맙), 2개의 항-PD-1 항체 (펨브롤리주맙 및 니볼루맙) 및 3개의 항-PD-L1 항체 (아테졸리주맙, 아벨루맙 및 더발루맙)가 많은 임상 시험을 통해 명백한 이점을 보여주는 것으로 승인되었다. 이러한 제제와 관련된 면역성의 부작용은 종종 피부, 결장, 내분비선, 폐 및 간에 영향을 미친다. 이러한 면역 관련된 부작용 (AE)은 상이한 종양 유형에 걸쳐 발생한다: 임의의 등급의 사건은 항-CTLA-4 이필리무맙으로 치료받은 환자의 약 90%와 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체로 치료받은 환자의 대략 70%에서 발생한다 (Michot *et al*. Eur J Cancer 2016;54:139). 복합 관문 억제제 치료의 경우, 3-4등급 면역 관련된 AE의 비율이 유의하게 더 높다 (Wolchok *et al*. N Engl J Med 2017;377:1345).

[0006] Warburg는 암 세포가 산소가 존재하는 경우에도 이들의 에너지 대사를 주로 해당 작용으로 제한한다고 처음 보고하였다 (Warburg Science 1956;123:309). 증가된 해당작용은 해당과정 중간체를 뉴클레오사이드와 아미노산을 생성하는 경로를 포함하는 다양한 생합성 경로로 전환할 수 있도록 하며, 이는 새로운 세포를 조립하고 신생물성 질환에서 활성 세포 증식을 지원하는 데 필요한 거대분자 및 세포소기관의 생합성을 촉진한다 (Heiden *et al*. Science 2009;324:1029). 락트산의 증가된 세포내 생성의 결과는 세포외 종양 산증이다. 약알칼리성 (~pH 7.4)인 세포내 pH (pHi)를 유지하기 위해, 종양 세포는 Na+/H+ 교환체, HCO3- 수송체 및 탄산 탈수효소 IX와 같은 여러 양성자 압출 메커니즘을 상향 조절한다 (Gillies *et al*. J Magnetic Resonance Imaging 2002;16:430). 과잉 양성자는 세포외 기질로 방출되어 종양 미세환경의 세포외 pH (pHe)가 산성이 된다. 특정 종양 유형에서 pH는 pH 6 내지 6.5만큼 낮은 것으로 측정되었다 (Gatenby and Gillies Nature Rev. Cancer 2004;4:891; Muller-Klieser and Vaupel Adv. Physiol. Sci. 1981 25:253).

## *발명의 내용*

[0007] 발명의 요약

[0008] 종양 중화를 향상시키면서 상기 기재된 바와 같이 말초 관문 억제제 치료 독성을 감소시키기 위해, 본 발명자들은 생리학적 pH 7.4에서 감소된 활성을 갖고 종양의 산성 pH인 pH 6 내지 6.5에서 최대 활성을 갖는 항-PD-L1 Fab를 생성하였다. 본 발명은 폐 실질의 염증으로 광범위하게 정의되며 항PD-1 또는 PD-L1 요법을 단독으로 또는 조합하여 투여받는 환자에서 기술되었으며 폐암을 가진 환자에서 더 흔하게 발생하는 폐렴을 감소시키는데 특히 유용하다 (Brahmer J *et al*. N Engl J Med 2015; 373: 123-135; Rivzi NA *et al*. J Clin Oncol 2015; 33: 15s).

[0009] 본 발명의 항원 결합 분자는 생리학적 pH (pH 7.4)와 비교하여 산성 pH (pH 6.0)에서 PD-L1에 대해 유의하게 더 높은 친화도를 입증하였다. 이는 pH 특이적 결합을 나타내지 않고 많은 것이 실제로 pH 7.4와 비교하여 pH 6.0에서 더 낮은 친화도를 나타내는 당업계에 알려진 다른 PD-L1 결합 분자와 대조된다.

[0010] 따라서, 본 발명의 항원 결합 분자는 당업계에 알려진 PD-L1 항체보다 훨씬 더 낮은 말초 독성을 갖는다. 이것은 종양 세포 사멸 전략 (Fc 매개된 또는 독성 약물 접합체)이 건강한 세포의 파괴 없이 종양 양성 PD-L1 세포에만 사용될 수 있음을 의미한다. 이것은 상당한 부작용과 말초 관문 억제제 치료 독성을 감소시킨다.

[0011] 이러한 항-PD-L1 Fab는 단일 제제 또는 다른 관련 암 또는 면역-종양 표적과 함께 이중특이적 형식으로 형식화될 수 있다. 일부 구현예에서, 항원 결합 분자는 PD-L1 결합에 대해 1가이다.

[0012] PD-L1 항체 또는 조성물은 방사선 요법, 화학요법, 표적 요법, 면역요법, 호르몬 요법, 혈관신생 억제 및 암 치료를 위한 완화 치료로 이루어진 그룹으로부터 선택된 전통적인 요법을 추가로 포함하는 치료 용법과 조합될 수 있다. 화학요법 치료는 젬시타빈, 사이클로포스파미드, 독소루비신, 파클리탁셀, 시스플라틴으로 이루어진 그룹

으로부터 선택될 수 있다.

[0013] 본 발명자들 PD-L1에 특이적으로 결합하는 항원 결합 분자를 확인하였다.

[0014] 한 측면에서, 본 발명은 하기를 포함하는 항-PD-L1 항원 결합 분자를 제공한다:

[0015] 서열 번호 16, 12, 10, 14, 18, 또는 2 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 VLCDR1.

[0016] 추가의 측면에서, 본 발명은 PD-L1에 특이적으로 결합하고 PD-L1이 본 발명의 항원-결합 분자에 결합하는 것을 억제하는 항원-결합 분자를 제공한다.

[0017] 추가의 측면에서, 본 발명은 인간 PD-L1의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원-결합 분자를 제공하며, 여기서, 에피토프는 서열 19에 포함된다.

[0018] 추가의 측면에서, 본 발명은 시노몰구스 PD-L1의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원-결합 분자를 제공한다.

[0019] 추가의 측면에서, 본 발명은 항-PD-L1 항원 결합 분자를 제공하며, 여기서, 항-PD-L1 항원 결합 분자는 항체 2A09의 친화도 성숙된 돌연변이체이다.

[0020] 또 다른 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항원 결합 분자를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0021] 추가의 측면에서, 본 발명은 추가의 치료 활성제를 추가로 포함하는, 본 발명의 항원 결합 분자 또는 본 발명의 약제학적 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.

[0022] 추가의 측면에서, 본 발명은 암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 본 발명의 항원 결합 분자 또는 본 발명의 약제학적 조성물을 제공한다.

[0023] 또 다른 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항원 결합 분자 또는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 PD-L1 매개된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방 방법을 제공하며, 여기서, PD-L1 매개된 질환 또는 장애는 암이다.

[0024] 추가의 측면에서, 본 발명은 인간 PD-L1 또는 PD-L1 발현 세포를 본 발명의 항원-결합 분자와 접촉시키는 단계를 포함하여, PD-1 및/또는 CD80에 대한 인간 PD-L1의 결합 또는 PD-1 및/또는 CD80에 대한 PD-L1 발현 세포의 결합을 억제하는 방법을 제공한다.

[0025] 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항원 결합 분자를 암호화하는 핵산을 제공한다.

[0026] 본 발명의 추가의 측면에서, 본 발명의 항원 결합 분자를 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터 또는 플라스미드가 제공된다.

[0027] 본 발명의 추가의 측면에서, 본 발명의 항원 결합 분자를 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터 또는 플라스미드를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.

[0028] 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 플라스미드 또는 벡터로 상기 세포를 형질감염시키는 단계를 포함하여, 항-PD-L1 항원 결합 분자를 발현하는 세포를 생성하는 방법을 제공한다.

[0029] 추가의 측면에서, 본 발명은 세포 내부에서 플라스미드 또는 벡터의 암호화 핵산 서열을 발현하는 조건 하에 세포 배양 배지에서 본 발명에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하여, 항-PD-L1 항원 결합 분자의 생성 방법을 제공한다.,

## 도면의 간단한 설명

[0030] **도 1a**는 3개의 리드 mAb 1A06, 1E08 및 2A09의 PD-L1 중화 ELISA의 결과를 나타낸다. 항-HEL mAb를 음성 대조군으로 사용하였다.

**도 1b**는 3개의 리드 mAb 1A06, 1E08 및 2A09의 CD80 중화 ELISA의 결과를 나타낸다.

**도 2**는 항-PD-L1 mAb, PD-L1-Fc에 결합하는 pH 6.0 및 pH 7.4에서 mAb 2A09, 1A06 및 1E08의 Kd (1/s)의 BIAcore 분석 결과를 나타낸다.

**도 3**은 크렙스 (Krebs) 완충액에서 pH 7.4, 6.5 및 6.0에서 MDA-MB-231 세포에 대한 2A09 mAb 및 Fab의 결합을 나타낸다.

**도 4**는 KRB 완충액에서 pH 7.4 및 6.0에서 ELISA에 의해 PD-L1에 결합하는 친화도 성숙된 항-PD-L1 Fab를 나타

낸다.

**도 5**는 KRB 완충액에서 pH 7.4, 6.5 및 6.0에서 ELISA에 의한 PD-L1:PD-1 결합의 친화도 성숙된 항-PD-L1 Fab 억제를 나타낸다. OD는 음성 대조군 Fab 2A11 (항-HEL)에 대해 정규화되었다.

**도 6**은 크렙스 완충액에서 pH 7.4, 6.5 및 6.0에서 MDA-MB-231 세포에 결합하는 친화도 성숙된 항-PD-L1 Fab를 나타낸다. 항-PD-L1 Fab 2.7A04OPT를 양성 대조군으로 사용하였다.

**도 7**은 본 발명의 항원 결합 분자 중 일부의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 및 CDR을 제공한다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0031] 본원에 사용된 바와 같이, "항원 결합 분자"는 서로에 대해 결합 특이성을 갖는 분자 쌍의 구성원이다. 항원 결합 쌍의 구성원은 자연적으로 유래되거나 전체적으로 또는 부분적으로 합성적으로 생성될 수 있다. 분자 쌍의 하나의 구성원은 이의 표면에 돌출부 또는 공동일 수 있는 영역을 가지며, 이는 분자 쌍의 다른 구성원의 특정 공간 및 극성 조직에 특이적으로 결합하고 이에 따라 상보적이다. 따라서, 쌍의 구성원은 서로 구체적으로 결합하는 성질을 갖고 있다. 항원 결합 쌍의 유형의 예는 항원-항체, 비오틴-아비딘, 호르몬-호르몬 수용체, 수용체-리간드 및 효소-기질이다. 본 발명은 일반적으로 항원-항체 유형 상호작용에 관한 것이다. 본 발명에 사용된 항원 결합 분자는 다른 분자보다 PD-L1, 인간 PD-L1, 시노몰구스 PD-L1, PD-L1의 에피토프, hPD-L1의 에피토프 또는 시노몰구스 PD-L1의 에피토프에 더 큰 친화도로 결합하는데, 즉, PD-L1, hPD-L1, 시노몰구스 PD-L1, PD-L1의 에피토프, hPD-L1의 에피토프 및/또는 시노몰구스 PD-L1의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 항원 결합 분자 PD-L1, hPD-L1, 시노몰구스 PD-L1, PD-L1의 에피토프, hPD-L1의 에피토프 또는 시노몰구스 PD-L1의 에피토프의 결합 친화도는 해리 상수 ($K_D$)를 사용하여 측정할 수 있다. PD-L1, hPD-L1, 시노몰구스 PD-L1, PD-L1의 에피토프, hPD-L1의 에피토프 또는 시노몰구스 PD-L1의 에피토프에 대한 항원 결합 분자의 결합 친화도는 해리 상수 (Ka)를 사용하여 측정할 수도 있다.

[0032] 본원에 기재된 PD-L1에 대한 항원 결합 분자의 $K_D$ 값은 비-PD-L1에 대한 항원 결합 분자의 $K_D$ 값보다 낮을 것이다.

[0033] PD-L1 및/또는 hPD-L1에 결합하는 항원 결합 분자는 항-PD-L1 항체를 포함한다. 본 발명에서 사용되는 항원 결합 분자는 전형적으로 항체 (이의 단편 포함)이다.

[0034] 본원에 사용된 바와 같이, PD-L1은 인간 PD-L1 및/또는 시노몰구스 PD-L1을 지칭할 수 있다.

[0035] 본원에 사용된 용어 "항체"는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 즉 천연 또는 부분적으로 또는 전체적으로 합성 생산된 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 지칭한다. 상기 용어는 또한 항체 결합 도메인이거나 이에 상동인 결합 도메인을 갖는 임의의 폴리펩티드 또는 단백질을 포함한다. 항체는 다클론성 또는 단일클론성일 수 있다. 이들은 천연 공급원으로부터 유래되거나 부분적으로 또는 전체적으로 합성 생성될 수 있다. 항체는 중쇄보다 작은 2개의 동일한 중쇄와 2개의 동일한 경쇄를 포함하는 폴리펩티드이다. 포유류에는 람다 (λ)와 카파 (κ)로 불리는 두 가지 유형의 경쇄가 존재한다. 각각의 중쇄 및 각각의 경쇄는 가변 영역 및 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 가변 영역은 VH 영역으로 지칭되고 경쇄 가변 영역은 VL 영역으로 지칭된다. 카파 경쇄의 경우, VL 영역은 또한 VK 영역으로 지칭될 수 있다. 경쇄 및 중쇄의 각각의 가변 영역은 3개의 상보적 결정 영역 (CDR), CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 이들은 각각 VLCDR1, VLCDR2, VLCDR3, VHCDR1, VHCDR2 및 VHCDR3으로 명명된다. 항체의 예는 면역글로불린 이소형 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD 및 IgA) 및 이들의 이소형 하위부류이다; Fab, F(ab')2, Fv, scFv, dAb, Fd와 같은 항원 결합 도메인을 포함하는 단편; 및 디아바디 또한 본 발명에 고려된다.

[0036] 본 발명의 항원 결합 분자는 전형적으로 항체, 보다 전형적으로 단일클론 항체이다. 바람직한 구현예에서, 항체는 인간 불변 영역이 사용되는 완전한 인간 단일클론 항체이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 단일클론 항체는 인간화 항체이다.

[0037] 단일클론 항체의 생성 방법은, 예를 들어, 그 내용이 본원에 참조로 포함된 문헌 (Frenzel *et al*., "Expression of Recombinant Antibodies", *Front Immunol*, 2013, 4:217)에 기재된 바와 같이 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0038] 본 발명의 단일클론 항체는 항체의 아미노산 서열을 변형함으로써 인간화될 수 있다. 본 발명의 항원 결합 분자의 면역원성을 감소시키는 방법은, 예를 들어, 부위-지정된 돌연변이 유발 또는 기타 통상적으로 사용되는 분자 생물학적 기술에 의한 적합한 항체 프레임워크 스캐폴드에 대한 CDR 이식 또는 가변 표면 잔기 리모델링을

포함한다 (Roguska *et al* Protein Eng. 9 895-904 (1996)).

[0039] 적용 가능한 다른 방법은 분자 내 잠재적인 T-세포 에피토프의 식별 및 예를 들어, 부위-지정된 돌연변이 유발(탈면역화)에 의한 이들의 후속 제거를 포함할 수 있다. 항원 결합 분자의 인간화는 분자가 치료제로 사용될 경우 바람직할 수 있다. CDR 영역 또는 주변 프레임워크 서열의 인간화는 원하는 대로 수행될 수 있다.

[0040] 단일클론성 및 기타 항체를 취하고 재조합 DNA 기술의 기술을 사용하여 원래 항체의 특이성을 유지하는 다른 항체 또는 키메라 분자를 생성하는 것이 가능하다. 그러한 기술은 항체의 면역글로불린 가변 영역 또는 상보적 결정 영역 (CDR)을 암호화하는 DNA를 상이한 면역글로불린의 불변 영역, 또는 불변 영역과 프레임워크 영역에 도입하는 것을 포함할 수 있다. 항체를 생성하는 하이브리도마 또는 기타 세포는 생성된 항체의 결합 특이성을 변경하거나 변경하지 않을 수 있는 유전적 돌연변이 또는 기타 변화의 대상이 될 수 있다.

[0041] 한 구현예에서, 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역은 적어도 85% 인간화, 적어도 90% 인간화, 적어도 95% 인간화, 적어도 96% 인간화, 적어도 97% 인간화, 적어도 98% 인간화 또는 적어도 99% 인간화된다. 일부 구현예에서, 항체는, 예를 들어, 더 나은 항원 결합을 유지하기 위해 보존적으로 인간화된다. 그러한 보전적으로 인간화 항체에서, 인간화 항체와 비교하여 더 적은 수의 항체 치환이 이루어질 수 있다.

[0042] 일부 구현예에서, 항원 결합 분자는, 예를 들어, 그 내용이 본원에 참조로 포함된 문헌 (Jones *et al*., "Deimmunization of monoclonal antibodies", *Methods Mol Biol,* 2009, 525:405-23)에 기재된 방법을 사용하여 탈면역화된다. 탈면역화는 결합된 면역학 및 분자 생물학 기술을 사용하여 서열로부터 T-세포 에피토프를 제거한다.

[0043] 따라서, 본 발명의 일부 구현예에서, 탈면역화된 항-PD-L1 항원 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서, 항-PD-L1 항원 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편은 2A09, 8G08, 8D06, 8A04, 8B06 및 8D04로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체의 6개 CDR 영역의 탈면역화된 변이체를 포함한다. 본 발명의 추가 구현예에서, 탈면역화된 항-PD-L1 항원 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되고, 여기서, 항-PD-L1 항원 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편은 2A09, 8G08, 8D06, 8A04, 8B06 및 8D04로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체로부터의 VH 및/또는 VL 서열의 탈면역화된 변이체를 포함한다. 본 발명의 또 다른 추가 구현예에서, 탈면역화된 항-PD-L1 항체가 제공되고, 여기서, 항-PD-L1 항체는 2A09, 8G08, 8D06, 8A04, 8B06 및 8D04로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체의 탈면역화된 변이체이다.

[0044] 항원 결합 분자 및 이의 항원 결합 단편은 1개의 모 항체 2A09를 기반으로 한다. 모 항체 이외에, 본 발명은 특히 모 항체의 친화성 성숙된 변이체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 항체로부터의 하나 이상의 항원 결합 도메인 뿐만 아니라 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 함유하는 항원 결합 도메인을 갖는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 같은 추가 변이체를 포함하는 항체-단편에 기반한다. 한 구현예에서, 1 내지 10개의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 항원 결합 도메인을 갖는 항체 또는 이의 항원-결합 단편. 한 구현예에서, 1 내지 5개의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 항원 결합 도메인을 갖는 항체 또는 이의 항원-결합 단편. 한 구현예에서, 1 내지 2개의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 항원 결합 도메인을 갖는 항체 또는 이의 항원-결합 단편. 본 발명의 모든 항원 결합 분자는 PD-L1에 특이적으로 결합한다.

[0045] 본 발명의 항원 결합 분자, 특히 항체는 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM 및 IgY를 포함하는 임의의 적합한 유형일 수 있지만, IgG가 바람직할 수 있다. IgG1 백본이 가장 바람직할 수 있다. 관련 구현예에서, 본 발명의 항체의 불변 영역은 유리한 효과를 위해, 예를 들어, 안정성을 증가시키고 Fc 감마 수용체 상호작용을 감소시키기 위해 변형될 수 있다.

[0046] 그러한 유리한 변형은 Fc 영역에서의 변형 또는 치환, 예를 들어, 이펙터 세포 사멸 기능을 향상시키는 것을 포함한다. 이펙터 세포 사멸 기능은 항체 의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC), 항체 의존성 세포 식세포작용 (ADCP) 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 지칭한다.

[0047] 한 구현예에서, Fc 영역은 ADCC 및/또는 ADCP 및/또는 CDC 활성을 향상시키기 위해 변형된다. 증진은 변형 전의 항체와 비교하여 더 강한 ADCC 및/또는 ADCP 및/또는 CDC 활성을 지칭한다.

[0048] 한 구현예에서, Fc 영역은 ADCC 및/또는 ADCP 및/또는 CDC 활성을 향상시키기 위해 단백질 조작에 의해 변형된다. 한 구현예에서, Fc 수용체 친화도는 CDC를 향상시키는 C1q에 대한 친화도를 증가시키는 아미노산 돌연변이에 의해 증가될 수 있다.

[0049] 또 다른 구현예에서, Fc 수용체 친화도는 Fc 영역의 글리코실화 프로파일을 변화시킴으로써 증가될 수 있다.

한 구현예에서, Fc 영역은 ac푸코실화에 의해 또는 푸코실화 하에 변형되어 ADCC 활성을 증가시킨다.

[0050] 항체 및 항원 결합 분자의 단편

[0051] 본 발명의 항원 결합 분자는 항체의 단편, 구체적으로 항체의 항원-결합 단편일 수 있다. 항원 결합 단편은 하나 이상의 항원 결합 영역을 포함한다. 전체 항체의 단편이 결합 항원의 기능을 수행할 수 있는 것으로 나타났다. 결합 단편의 예는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편 (Ward, E.S. *et al.*, Nature 341:544-546 (1989)); (v) 단리된 CDR 영역; (vi) F(ab')2 단편, 2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; (vii) 단일 사슬 Fv 분자(scFv) (여기서, VH 도메인 및 VL 도메인은 2개의 도메인이 회합하여 항원 결합 부위를 형성하도록 하는 펩티드 링커에 의해 연결된다) (Bird *et al.*, Science 242:423-426 (1988); Huston *et al.*, PNAS USA 85:5879-5883 (1988)); (viii) 이중특이적 단일 사슬 Fv 이량체 (PCT/US92/09965) 및 (ix) "디아바디", 유전자 융합에 의해 작제된 다가 또는 다중-특이적 단편 (WO94/13804; P. Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993))이다. 전형적으로, 단편은 Fab, F(ab')2 또는 Fv 단편 또는 scFv 분자이다. 일부 구현예에서, 단편은 Fab 단편일 수 있다.

[0052] 이중특이적 항체는 2개의 항원 또는 2개의 에피토프와 같이 2개의 표적 분자에 동시에 결합할 수 있는 항체이다. 이중특이적 항체는 또한 이중 결합 항체로 지칭될 수 있다. 이중특이적 항체 형식의 예는 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다; (mAb)2, Fcab, F(mAb')2, 쿼드로마 (quadroma), scFv (단일 사슬 가변 단편), bsDb (이중특이적 디아바디), scBsDb (단일 사슬 이중특이적 디아바디), BiTE (이중특이적 T 세포 인게이저), DART (이중 친화성 재표적화 항체), 전하 쌍, 탠덤 항체, 탠덤 scFv-Fc, Fab-scFv-Fc, Fab-scFv, 미니바디, 자이바디, DNL-F(ab)3 (도크-앤-록 3가 Fab), bssdAb (이중특이적 단일 도메인 항체) 및 놉-인-홀 (knob-in-hole).

[0053] 디아바디는 폴리펩티드의 다량체이고, 각각의 폴리펩티드는 면역글로불린 경쇄의 결합 영역을 포함하는 제1 도메인 및 면역글로불린 중쇄의 결합 영역을 포함하는 제2 도메인을 포함하고, 상기 2개의 도메인은 (예를 들어, 펩티드 링커에 의해) 연결되지만, 서로 회합하여 항원 결합 부위를 형성할 수 없다: 항원 결합 부위는 다량체 내의 하나의 폴리펩티드의 제1 도메인과 다량체 내의 또 다른 폴리펩티드의 제2 도메인의 회합에 의해 형성된다 (WO94/13804).

[0054] 이중특이적 항체가 사용되어야 하는 경우, 이들은 다양한 방식 (Hollinger & Winter, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449 (1993))으로 제조될 수 있는, 예를 들어, 화학적으로 또는 하이브리드 하이브리도마로부터 제조될 수 있는 통상적인 이중특이성 항체일 수 있거나, 하기에 언급된 임의의 이중특이성 항체 단편일 수 있다. 전체 항체보다 scFv 이량체 또는 디아바디를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 디아바디 및 scFv는 가변 도메인만을 사용하여 Fc 영역 없이 작제될 수 있으며, 잠재적으로 항-이디오타입 반응 (anti-idiotypic reaction)의 효과를 감소시킬 수 있다. 이중특이성 항체의 다른 형태는 문헌 (Traunecker et al., EMBO Journal 10:3655-3659 (1991))에 기재된 단일 사슬 "야누신 (Janusin)"을 포함한다.

[0055] 이중특이적 전체 항체와 대조적으로 이중특이적 디아바디는 또한 이. 콜리 (*E. coli*)에서 쉽게 작제되고 발현될 수 있기 때문에 유용할 수 있다. 적절한 결합 특이성의 디아바디 (및 항체 단편과 같은 많은 다른 폴리펩티드)는 라이브러리로부터 파지 디스플레이 (WO94/13804)를 사용하여 쉽게 선택될 수 있다. 예를 들어, 디아바디의 아암이 항원 X에 대한 특이성으로 일정하게 유지되어야 하는 경우, 다른 아암이 변하고 적절한 특이성의 항체가 선택되는 라이브러리가 만들어질 수 있다.

[0056] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 PD-L1에 대해 1가, 예를 들어, 1가 항체 단편이다. 1가 항원 결합 분자 (단량체성 항원 결합 분자로도 알려져 있음)는 에피토프 또는 항원에 대한 하나의 결합 부위만을 갖는 항원 결합 분자이다. 예를 들어, Fab, 놉-인-홀, 1 아암 IgG, scFv는 1가 결합을 나타내는 반면, 2개의 Fab 영역을 갖는 완전한 단일클론 항체는 2가 결합을 나타낸다. 항원 결합 분자가 1가인 경우, 항원 결합 분자와 항원은 1:1 비율로 결합한다. 따라서, 본 발명은 pH-의존성 방식으로 PD-L1에 특이적으로 결합하는 1가 항체 또는 항체 단편을 제공한다.

[0057] 일부 구현예에서, 항원 결합 분자는 PD-L1에 대해 1가이다. 이것은 항원 결합 분자가 PD-L1에 대해 최대 1개의 결합 부위를 갖는다는 것을 의미한다. 따라서, 항원 결합 분자는 PD-L1 분자와 1:1의 비율로 결합한다. 1가 항원 결합 분자는 또한 일반적으로 단일특이적이다. 그러한 구현예에서, 1가 항원 결합 분자는 PD-L1에만 특이적으로 결합한다. 일부 구현예에서, 항체 결합 분자는 1:1의 비율로 PD-L1에 특이적으로 결합하는 1가 결합

부위, 및 PD-L1과 상이한 항원에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 추가 결합 부위를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 항원 결합 분자는 PD-L1에 대해 1가 (1:1의 비율로 PD-L1에 특이적으로 결합)인 제1 결합 부위 및 제2의 상이한 항원에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부위를 포함하는 이중특이적 항원 결합 분자이다. 또 다른 구현예에서, 항원 결합 분자는 PD-L1에 대해 1가 (1:1의 비율로 PD-L1에 특이적으로 결합)인 제1 결합 부위 및 상이한 제2의 항원에 대해 1가 (1:1의 비율로 제2의 상이한 항원에 특이적으로 결합)인 제2 결합 부위를 포함하는 이중특이적 항원 결합 분자일 수 있다. 그러한 구현예에서, 항원 결합 분자는 1개의 항원 결합 분자 대 2개의 항원 분자의 비율로 이의 항원에 결합하지만, 여전히 1개의 항원 결합 분자 대 1개의 PD-L1 분자의 비율로 결합한다. 다중- 및 이중특이성 구성은 다른 곳에서 논의되고, 본원에 개시된 다중- 및 이중특이성 항원 결합 분자가 PD-L1에 대해 1가 (즉, 1개의 이중특이적 항원 결합 분자 대 1개의 PD-L1 분자의 비율로 PD-L1에 결합)일 수 있다는 것이 직접적으로 고려된다.

[0058] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자 또는 항체는 PD-L1 및 또 다른 항원 또는 에피토프에 대해 이중특이적일 수 있다. 한 구현예에서, 다른 항원은 T 세포 공동자극 작용제 또는 T 세포 공동자극 길항제로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 한 구현예에서, 다른 항원은 CD47, SIRP 알파, CD25, TIGIT, ICOS, CD70, BTLA, GITR, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, CD137, OX40, EGFR, TGF, VEGF 및 CD40으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0059] 한 구현예에서, 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자 또는 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합하고 면역관문 억제제에 특이적으로 결합한다. 추가의 구현예에서, 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자 또는 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합하고 면역관문 억제제에 특이적으로 결합한다. 추가의 구현예에서, 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자 또는 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합하고 면역관문 억제제에 특이적으로 결합하고, 여기서, 면역관문 억제제는 PD-1, CTLA-4, TIM-3, CD137, CD40, LAG-3, VISTA, ICOS, BTLA, GITR 및 TIGIT로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0060] 한 구현예에서, 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자 또는 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합하고 면역 이펙터에 특이적으로 결합한다. 추가의 구현예에서, 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자 또는 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합하고 OX40, EGFR, TGF, VEGF, CD40, CD137, GITR, CXCR3, BTLA, CD3, CD70, CD25, CD47, SIRP 알파 및 CD27로 이루어진 그룹으로부터 선택된 면역 이펙터에 특이적으로 결합한다.

[0061] 한 구현예에서, 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자 또는 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합하고 또한 T 세포와 같은 다른 세포를 동원하고 결합시키는 작용을 한다. 이중특이적 항원 결합 분자 또는 항체의 이중-항원 특이성은 세포독성 T-세포 상에 존재하는 항원과 함께 PD-L1 특이적 항원에 대한 동시 결합을 가능하게 한다. 이것은 이중특이성 항원 결합 분자 또는 항체의 결합 활성을 통해 종양 세포에 대한 T 세포의 세포독성 활성을 지시한다. 추가의 구현예에서, 본 발명의 이중특이적 항원 결합 분자 또는 항체는 PD-L1에 특이적으로 결합하고 T 세포 동원자에 특이적으로 결합한다. T 세포 동원자 분자는 CD3 및 CD137을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0062] 항체 또는 본 발명의 항원 결합 분자는 또한 삼중특이적일 수 있다. 본 발명의 삼중특이적 항원 결합 분자 또는 항체는 PD-L1에 특이적인 결합 부위, 및 T 세포를 동원하기 위한 결합 부위를 포함한다. 한 구현예에서, 그러한 항원 결합 분자 또는 항체는 PD-L1에 특이적인 결합 부위, 및 CD3에 특이적인 결합 부위를 포함한다. 추가로, 이들 구현예에서, 삼중특이적 항원 결합 분자 또는 항체의 Fc 영역은 또한 부속 세포 상의 Fc 수용체에 결합할 수 있다.

[0063] 단핵구, 대식세포, NK 세포 및/또는 수지상 세포와 같은 추가 부속 세포의 동원은 삼중특이성 항체가 T 세포, 부속 세포 및 종양 세포의 연결을 가능하게 하기 때문에 삼중특이성 항원 결합 분자 또는 항체가 다른 항체보다 종양 세포를 파괴하는 데 더 강력하게 만든다. 한 구현예에서, 삼중특이적 항원 결합 분자 또는 항체는 PD-L1에 특이적인 하나의 결합 부위, CD3에 특이적인 하나의 결합 부위 및 단핵구, 대식세포, NK 세포 및 수지상 세포 상의 Fc 수용체와 상호작용할 수 있는 온전한 Fc 영역을 포함한다.

[0064] 항체 또는 본 발명의 항원 결합 분자는 또한 약물, 프로드럭 또는 독성 모이어티와 같은 다른 분자에 접합될 수 있다. 이것은 이들 분자를 종양 세포로 표적화하는 역할을 한다.

[0065] 본 발명의 항체 또는 항원 결합 분자는 다른 PD-L1 항체보다 말초 독성이 훨씬 낮기 때문에, 종양 세포 사멸 전략은 건강한 세포를 파괴하지 않고 종양 양성 PD-L1 세포에 대해서만 사용할 수 있다. 한 구현예에서, 본 발명의 PD-L1 특이적 항원 결합 분자는 세포독소 (예를 들어, 메이탄사노이드, 아우리스타틴, 돌라스타틴, 크립토피신, 칼리케아미신, 듀오카르마이신, 피로베노디아제핀), 단백질 독소 (예를 들어, *슈도모나스* (*Pseudomonas*) 외

독소, 디프테리아 독소, 리보솜-비활성화 단백질), 및 방사성 핵종 (예를 들어, $^{90}Y$, $^{111}In$)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 분자에 접합된다.

[0066] **동일성 및 상동성**

[0067] 당업계에 알려진 "동일성"은 서열을 비교함으로써 결정되는 2개 이상의 폴리펩티드 서열 또는 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 서열 간의 관계이다. 당업계에서, 동일성은 또한 경우에 따라 그러한 서열의 스트링 사이의 매치에 의해 결정되는 바와 같이 폴리펩티드 또는 폴린클레오티드 서열 사이의 서열 관련성의 정도를 의미한다. 2개의 폴리펩티드 또는 2개의 폴리뉴클레오티드 서열 사이의 동일성을 측정하는 많은 방법이 존재하지만, 동일성을 결정하기 위해 통상적으로 사용되는 방법은 컴퓨터 프로그램에 코드화되어 있다. 2개의 서열 사이의 동일성을 결정하기 위한 바람직한 컴퓨터 프로그램은 GCG 프로그램 패키지를 포함하지만 이에 제한되지 않는다 (Devereux, *et al*., Nucleic Acids Research, 12, 387 (1984), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Atschul *et al*., J. Molec. Biol. 215, 403 (1990)).

[0068] CLUSTAL 프로그램과 같은 프로그램을 사용하여 아미노산 서열을 비교할 수 있다. 이 프로그램은 아미노산 서열을 비교하고 적절하게 어느 한 서열에서든 공간을 삽입하여 최적의 정렬을 찾아낸다. 최적의 정렬을 위해 아미노산 동일성 또는 유사성 (동일성 + 아미노산 유형 보존)을 계산하는 것이 가능하다. BLASTx와 같은 프로그램은 유사한 서열의 가장 긴 스트레치를 정렬하고 맞춤에 값을 할당한다. 따라서 유사성이 있는 여러 영역이 발견되고 각각은 점수가 상이한 비교를 얻을 수 있다. 두 가지 유형의 동일성 분석이 본 발명에서 고려된다.

[0069] 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산 서열의 동일성 퍼센트는 최적의 비교 목적 (예를 들어, 서열과의 최상의 정렬을 위해 제1 서열에 갭을 도입할 수 있음)을 위해 서열을 정렬하고 상응하는 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 비교함으로써 결정된다. "최상의 정렬"은 가장 높은 동일성 퍼센트를 초래하는 두 서열의 정렬이다. 동일성 퍼센트는 비교되는 서열에서 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 수에 의해 결정된다 (즉, 동일성 % = 동일한 위치의 수/위치의 총 수 x 100). 일반적으로, 본원에서 동일성 %에 대한 언급은 문맥이 달리 명시하거나 암시하지 않는 한 분자의 전체 길이에 따른 동일성 %를 지칭한다.

[0070] 2개 서열 사이의 동일성 퍼센트의 결정은 당업자에게 알려진 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다. 2개 서열을 비교하기 위한 수학적 알고리즘의 예는 문헌 (Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877)에서 변형된 바와 같이 문헌 (Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268)의 알고리즘이다. 문헌 (Altschul, *et al*. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램은 그러한 알고리즘을 통합했다. BLAST 뉴클레오티드 검색은 NBLAST 프로그램, 점수 = 100, 단어 길이 = 12로 수행되어 본 발명의 핵산 분자와 상동성인 뉴클레오티드 서열을 얻을 수 있다. BLAST 단백질 검색은 XBLAST 프로그램, 점수 = 50, 단어 길이 = 3으로 수행되어 본 발명의 단백질 분자와 상동성인 아미노산 서열을 얻을 수 있다. 비교 목적으로 갭이 있는 정렬을 얻기 위해, 문헌 (Altschul *et al*. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)에 기재된 바와 같이 Gapped BLAST를 사용할 수 있다. 대안적으로, PSI-Blast를 사용하여 분자 (Id.) 간의 먼 관계를 감지하는 반복 검색을 수행할 수 있다.

[0071] BLAST, Gapped BLAST, 및 PSI-Blast 프로그램을 사용하는 경우, 각 프로그램의 기본 파라미터 (예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)를 사용할 수 있다. http://www.ncbi.nlm.nih.gov를 참조한다. 서열 비교에 사용되는 수학적 알고리즘의 또 다른 예는 문헌 (Myers and Miller, CABIOS (1989))의 알고리즘이다. CGC 서열 정렬 소프트웨어 패키지의 일부인 ALIGN 프로그램 (버전 2.0)은 그러한 알고리즘을 통합했다. 당업계에 알려진 서열 분석을 위한 다음 알고리즘은 문헌 (Torellis and Robotti (1994) Comput. Appl. Biosci., 10: 3-5)에 기재된 바와 같은 ADVANCE 및 ADAM; 및 문헌 (Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8)에 기재된 바와 같은 FASTA를 포함한다. FASTA 내에서, ktup은 검색 감도와 속도를 설정하는 제어 옵션이다.

[0072] 전형적으로, 본 발명에 제공된 항원 결합 분자의 CDR의 아미노산 서열은, 예를 들어, HGMP (인간 게놈 매핑 프로젝트)에 의해 제공되는 BLAST 컴퓨터 프로그램 (Atschul *et al*., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990))의 디폴트 파라미터를 사용하여 아미노산 수준에서 하기에 기재된 CDR의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 동일성을 갖는다. 보다 전형적으로, CDR 서열은 아미노산 수준에서 하기에 나타낸 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는다. 전형적으로, 본 발명에 사용된 항원 결합 분자의 각각의 CDR 서열은 하기에 제시된 CDR의 아미노산 서열에 대해 이러한 수준의 동일성을 갖는다. 대안적으로, 본 발명에 사용된 항원 결합 분자의 CDR 중 임의의 1, 2, 3, 4 또는 5개는 하기에 제시된 CDR의 아미노산 서열에 대해 이러한 수준의 동일성을 갖는다.

[0073] 본 발명에 제공된 항원 결합 분자의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은, 예를 들어, HGMP (인간 게놈 매핑 프로젝트)에 의해 제공되는 BLAST 컴퓨터 프로그램 (Atschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990))의 디폴트 파라미터를 사용하여 아미노산 수준에서 하기에 기재된 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 동일성을 갖는다. 보다 전형적으로, VH 및 VL 영역은 아미노산 수준에서 하기에 나타낸 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는다. 전형적으로, 본 발명에 사용된 항원 결합 분자의 VH 및 VL 영역 각각은 하기에 제시된 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열에 대해 이러한 수준의 동일성을 갖는다. 대안적으로, 본 발명에 사용된 항원 결합 분자의 VH 및 VL 영역 중 하나만이 하기에 제시된 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열에 대해 이러한 수준의 동일성을 갖는다.

[0074] 본원에 사용된 동일성은 "상동성" 및 "유사성"과 상호교환적으로 사용될 수 있다. 특정 동일성 %에 대한 참조는 상동성 % 및 유사성 %에 동일하게 적용된다. 상동성과 유사성은 FASTA, BLAST 및 Gapped BLAST와 같은 적절한 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다. 이러한 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 공개적으로 사용 가능하다.

[0075] **변이체**

[0076] 본 발명은 또한 하기에 언급된 펩티드 서열의 변이체로 확장된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "변이체"는 유사한 아미노산 서열을 갖고/있거나 동일한 기능을 유지하는 단백질에 관한 것이다. 예를 들어, 용어 "변이체"는 하나 이상의 아미노산 첨가, 결실, 치환 등을 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드를 포함한다. 본 발명의 변이체의 예는 하나 이상의 아미노산이 하나 이상의 다른 아미노산으로 치환되는 것을 제외하고, 하기에 정의된 바와 같은 펩티드를 포함하는 단백질이다. 아미노산 치환은, 예를 들어, 아미노산 서열의 경향성 (liability)을 감소 또는 제거하기 위해 이루어질 수 있다. 대안적으로, 아미노산 치환은 항원 친화도를 개선하기 위해 또는 필요한 경우 항체를 인간화 또는 탈면역화하기 위해 이루어질 수 있다. 항체의 서열에서 임의의 경향성을 감소 또는 제거하기 위한 아미노산 치환뿐만 아니라 특정 항체의 친화성 성숙된 변이체, 인간화 변이체 및 탈면역화된 변이체를 포함하는 변이체가 본원에 제공된다.

[0077] **치환**

[0078] 당업자는 다양한 아미노산이 유사한 특성을 갖는다는 것을 알고 있다. 물질의 하나 이상의 그러한 아미노산은 종종 그 물질의 원하는 활성을 제거하지 않고 하나 이상의 다른 그러한 아미노산으로 대체될 수 있다.

[0079] 따라서, 아미노산 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신은 종종 서로 대체될 수 있다 (지방족 측쇄를 갖는 아미노산).

[0080] 이러한 가능한 치환 중에서 글리신과 알라닌을 사용하여 서로를 대체하고 (이들이 상대적으로 짧은 측쇄를 갖기 때문에) 발린, 류신 및 이소류신을 사용하여 서로를 대체 (이들이 소수성인 더 큰 지방족 측쇄를 갖기 때문에)하는 것이 바람직하다. 종종 서로 치환될 수 있는 기타 아미노산은 다음을 포함한다: 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판 (방향족 측쇄를 갖는 아미노산); 라이신, 아르기닌 및 히스티딘 (염기성 측쇄를 갖는 아미노산); 아스파르테이트 및 글루타메이트 (산성 측쇄를 갖는 아미노산); 아스파라긴 및 글루타민 (아미드 측쇄를 갖는 아미노산); 및 시스테인 및 메티오닌 (황 함유 측쇄를 갖는 아미노산).

[0081] 이러한 성질의 치환은 종종 "보존적" 또는 "반보존적 보존적" 아미노산 치환으로 지칭된다.

[0082] 3개의 문자와 1개의 문자 코드를 사용하여 자연 발생 아미노산은 다음과 같이 지칭될 수 있다: 글리신 (G 또는 Gly), 알라닌 (A 또는 Ala), 발린 (V 또는 Val), 류신 (L 또는 Leu), 이소류신 (I 또는 Ile), 프롤린 (P 또는 Pro), 페닐알라닌 (F 또는 Phe), 티로신 (Y 또는 Tyr), 트립토판 (W 또는 Trp), 라이신 (K 또는 Lys), 아르기닌 (R 또는 Arg), 히스티딘 (H 또는 His), 아스파르트산 (D 또는 Asp), 글루탐산 (E 또는 Glu), 아스파라긴 (N 또는 Asn), 글루타민 (Q 또는 Gln), 시스테인 (C 또는 Cys), 메티오닌 (M 또는 Met), 세린 (S 또는 Ser) 및 트레오닌 (T 또는 Thr). 잔기가 아스파라긴산 또는 아스파라긴일 수 있는 경우, 기호 Asx 또는 B가 사용될 수 있다. 잔기가 글루탐산 또는 글루타민일 수 있는 경우, 기호 Glx 또는 Z가 사용될 수 있다. 아스파라긴산에 대한 언급은 아스파테이트를 포함하고, 글루탐산은 문맥에서 달리 지정하지 않는 한 글루타메이트를 포함한다.

[0083] 아미노산 결실 또는 삽입은 또한 하기에 언급된 융합 단백질에 대한 아미노산 서열에 대해 이루어질 수 있다. 따라서, 예를 들어, 폴리펩티드의 활성에 실질적인 영향을 미치지 않거나 적어도 그러한 활성을 제거하지 않는 아미노산이 결실될 수 있다. 그러한 결실은 활성을 여전히 유지하면서 폴리펩티드의 전체 길이 및 분자량이 감소될 수 있기 때문에 유리할 수 있다. 이것은 특정 목적에 필요한 폴리펩티드의 양을 감소시킬 수 있다 - 예를

들어, 투여량 수준이 감소될 수 있다.

[0084] 따라서, 아미노산 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신은 종종 서로 대체될 수 있다 (지방족 측쇄를 갖는 아미노산). 이러한 가능한 치환 중에서 글리신과 알라닌을 사용하여 서로를 대체하고 (이들이 상대적으로 짧은 측쇄를 갖기 때문에) 발린, 류신 및 이소류신을 사용하여 서로를 대체 (이들이 소수성인 더 큰 지방족 측쇄를 갖기 때문에) 하는 것이 바람직하다.

[0085] 종종 서로 치환될 수 있는 기타 아미노산은 다음을 포함한다: 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판 (방향족 측쇄를 갖는 아미노산); 라이신, 아르기닌 및 히스티딘 (염기성 측쇄를 갖는 아미노산); 아스파르테이트 및 글루타메이트 (산성 측쇄를 갖는 아미노산); 아스파라긴 및 글루타민 (아미노산 측쇄를 갖는 아미노산); 및 시스테인 및 메티오닌 (황 함유 측쇄를 갖는 아미노산).

[0086] 일부 구현예에서, 하기 아미노산은 보존적 아미노산 치환을 위해 서로 교환될 수 있다:

[0087]

| 부류 | 교환 가능한 아미노산 |
|---|---|
| 지방족 | 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신 |
| 하이드록실 또는 황/셀레늄-함유 | 세린, 시스테인, 트레오닌, 메티오닌 |
| 방향족 | 방향족 페닐알라닌, 티로신, 트립토판 |
| 염기성 | 히스티딘, 라이신, 아르기닌 |
| 산성 및 이들의 아미드 | 아스파테이트, 글루타메이트, 아스파라긴, 글루타민 |

[0088] 따라서, "보존적" 아미노산 치환에 대한 언급은 (예를 들어, CDR에서 또는 VH 또는 VL 서열에서) 항체의 서열에 있는 하나 이상의 아미노산이 상기 나타낸 바와 같은 동일한 부류의 또 다른 아미노산으로 치환된 아미노산 치환을 지칭한다. 항체의 기능에 대한 역효과를 최소화하기 위해 CDR 영역에서 보존적 아미노산 치환이 바람직할 수 있다. 그러나, 보존적 아미노산 치환은 프레임워크 영역에서도 발생할 수 있다.

[0089] 아래에 주어진 서열과 관련된 아미노산 변화는, 예를 들어, 부위-지정된 돌연변이 유발 또는 고체-상태 합성을 사용함으로써 임의의 적합한 기술을 사용하여 이루어질 수 있다.

[0090] 본 발명의 범위 내에서 아미노산 치환 또는 삽입은 자연 발생 또는 비자연 발생 아미노산을 사용하여 이루어질 수 있지만, 자연 발생 아미노산이 바람직할 수 있음을 이해해야 한다. 천연 또는 합성 아미노산이 사용되는지 여부에 관계없이 L-아미노산만이 존재하는 것이 바람직하다.

[0091] 본 발명의 한 구현예에서, 항체 결합 도메인 또는 항원 결합 도메인들에 1 내지 10개, 바람직하게는 1 내지 5개, 더욱 바람직하게는 1 내지 2개의 아미노산 치환을 포함하는 본 발명의 항원 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다. 예를 들어, 본 발명의 한 구현예에서, 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되며, 여기서, 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 2A09, 8G08, 8D06, 8A04, 8B06 및 8D04로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체의 6개의 CDR 영역을 포함하고, 임의로 항원 결합 분자는 이의 모든 CDR 영역에 걸쳐 1 내지 10개의 아미노산 치환, 바람직하게는 이의 모든 CDR 영역에 걸쳐 1 내지 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본 발명의 추가 구현예에서, 항-PD-L1 항원 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되며, 여기서, 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 2A09, 8G08, 8D06, 8A04, 8B06 및 8D04로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체의 VH 및 VL 서열을 포함하고, 임의로 항원 결합 분자는 이의 VH 및 VL 서열에 걸쳐 1 내지 10개의 아미노산 치환, 바람직하게는 이의 VH 및 VL 서열에 걸쳐 1 내지 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본 발명의 또 다른 추가의 구현예에서, 항-PD-L1 항체가 제공되며, 여기서, 항-PD-L1 항체는 2A09, 8G08, 8D06, 8A04, 8B06 및 8D04로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체이고, 상기 항체는 1 내지 10개의 아미노산 치환, 바람직하게는 1 내지 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 물론 치환은 출발 항체의 원래의 CDR 또는 가변 사슬 서열에 대한 치환이다.

[0092] 일부 구현예에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 CDR 영역 또는 영역들에 존재한다. 다른 구현예에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 가변 중쇄 및 경쇄의 골격 영역, 즉, CDR 영역 또는 영역들에 존재하지 않는다. 다른 구현예에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 가변 중쇄 및/또는 가변 경쇄 영역에서 임의의 위치에 있을 수 있다. 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 항체의 결합 특이성 및/또는 친화도에 부정적인 영향을 미치지 않는다. 따라서, 변이체 항체는 이것이 유래되는 항체와 동일하거나 더 우수한 기능적 프로파일을 가질 수 있다.

[0093] 예를 들어, 일부 구현예에서, 항-PD-L1 항체가 제공되며, 여기서, 항-PD-L1 항체는 2A09, 8G08, 8D06, 8A04,

8B06 및 8D04로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체이고, 항체는 이의 모든 프레임워크 영역에 걸쳐 1 내지 10개의 아미노산 치환, 바람직하게는 이의 모든 프레임워크 영역에 걸쳐 1 내지 5개의 아미노산 치환을 갖는다(즉, 치환은 참조 항체에 대해 프레임워크 영역에 나타나고, CDR 서열은 변경되지 않는다).

[0094] **친화도 성숙된 변이체**

[0095] 본 발명의 범위 내에 있는 다른 변이체는 PD-L1 또는 PD-L1의 에피토프에 대해 증가된 친화도를 갖도록 변형된 본 발명의 항원 결합 분자를 포함한다. 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 친화도-성숙된 항체이다. 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 완전한 인간 친화도 성숙된 항체이다.

[0096] 임의의 알려진 방법을 사용하여 PD-L1 또는 PD-L1의 에피토프에 대해 증가된 친화도를 갖는 친화도-성숙된 항체 또는 완전한 인간 친화도 성숙된 항체를 생성하기 위해 본 발명의 항원 결합 분자의 친화도를 증가시킬 수 있다.

[0097] 본 발명은 제공된 항원 결합제의 친화도 성숙된 변이체를 제공한다. 친화도 성숙된 변이체는 모 항체보다 더 큰 친화도로 PD-L1에 결합한다. 바람직하게는, 생성된 항체는 예를 들어, Kd에 의해 측정된 바와 같이 모 항체가 PD-L1에 결합하는 것보다 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 보다 바람직하게는 적어도 50% 더 큰 친화도로 PD-L1에 결합한다.

[0098] 일부 구현예에서, 본 발명은 본원에 기재된 항원 결합 분자 (예를 들어, 항-PD-L1 결합 분자 또는 항체 또는 항원 결합 단편 또는 이의 변이체)를 제공하는 단계, 및 항체를 친화도 성숙화시키는 단계를 포함하는 본 발명의 항원 결합 분자를 제조하는 방법을 제공하며, 여기서 생성된 항체는 모 항체보다 더 큰 친화도로 PD-L1에 결합한다. 바람직하게는, 생성된 항체는, 예를 들어, Kd에 의해 측정된 바와 같이 모 항체가 PD-L1에 결합하는 것보다 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 더욱 바람직하게는 50% 이상 더 큰 친화도로 PD-L1에 결합한다. 친화도를 측정하는 방법은 당업계에 알려져 있고 하기 실시예에 기재되어 있다. 그러한 방법에 의해 생성된 친화도 성숙된 항체는 다른 항-PD-L1 결합 분자에 대해 본원에 기재된 바와 같이 제형화되고 사용될 수 있다.

[0099] 친화도 성숙화는 당업자에게 알려진 임의의 적합한 방법에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어, 시험관내 항체 디스플레이 시스템은 친화도가 높은 특정 항체의 생성에 널리 사용된다. 이러한 시스템에서, 표현형 (즉, 항체 단편)은 유전자형(즉, 항체 유전자)에 결합되어 항체의 서열을 직접 결정할 수 있다. 항체 레퍼토리의 표시를 달성하기 위해 여러 시스템이 개발되어 바인더의 후속 선택을 허용하고 선택의 엄격성을 증가시켜 더욱 더 높은 친화도 변이체의 선택을 허용한다. 항체 단편은 효모, 리보솜, 파지 디스플레이 입자에서 또는 DNA에 직접 결합하여 발현될 수 있다.

[0100] 현재 항체 친화도 성숙화 방법은 확률적 및 비확률적이라는 두 가지 돌연변이 유발 범주에 속한다. 오류가 발생하기 쉬운 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR), 돌연변이 유발 유전자 (mutator) 박테리아 균주, 및 포화 돌연변이 유발은 확률론적 돌연변이 유발 방법의 전형적인 예이다. 비확률적 기술은 종종 알라닌-스캐닝 또는 부위-지정된 돌연변이 유발을 사용하여 특정 변이체의 제한된 컬렉션을 생성한다. 또한, 모 항체의 셔플링된 변이체를 얻기 위한 셔플링 접근법은 또한 항체 친화도를 추가로 개선하는 데 사용될 수 있다.

[0101] 따라서, 본 발명의 한 구현예에서, 친화도 성숙화 방법은 확률적 돌연변이 유발 (예를 들어 오류가 발생하기 쉬운 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR), 돌연변이 유발 유전자 박테리아 균주, 또는 포화 돌연변이 유발), 비확률적 돌연변이 유발 (예를 들어 알라닌-스캐닝 또는 부위-지정된 돌연변이 유발), 셔플링 (예를 들어 DNA 셔플링, 사슬 셔플링 또는 CDR 셔플링) 및 변형을 도입하기 위한 CRISPR-Cas9 시스템의 사용으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0102] 친화도 성숙화 방법은, 예를 들어, 문헌 (Rajpal *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(24):8466-71, Steinwand *et al.*, MAbs, 2014, 6(1):204-18) 뿐만 아니라 문헌 (Handbook of Therapeutic Antibodies, Wiley, 2014, Chapter 6, Antibody Affinity (pages 115-140))에 기재되어 있다.

[0103] 일부 구현예에서, 상기 방법에 따라 제조된 항체를 제공하고 (즉, 친화도 성숙에 의해 항체를 생산하기 위한) 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 부형제와 항체를 공동-제형화하는 것을 포함하는 약제학적 조성물의 제조 방법이 제공된다. 약제학적 조성물의 제조에 사용되는 항체는 2A09의 친화도 성숙된 변이체일 수 있다. 약제학적 조성물의 제조에 사용되는 항체는 8G08, 8D06, 8A04, 8B06 또는 8D04의 친화도 성숙된 변이체일 수 있다. 그러한 방법에 의해 생성된 약제학적 조성물은 다른 항-PD-L1 결합 분자에 대해 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 치료 방법에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 항원 결합 분자의 친화도 성숙된 돌연변이체 또는 변이체인 항원 결합 분자가 제공된다. 예를 들어, 한 구현예에서, 2A09, 8G08, 8D06, 8A04, 8B06 및 8D04로 이루

어진 그룹으로부터 선택된 항체의 친화도-성숙된 변이체가 제공된다. 일반적으로, 친화도 성숙된 돌연변이체는 모 항체 (돌연변이체가 유래된 항체)보다 PD-L1에 대해 더 높은 친화도를 갖는다. 또한, 본 발명의 항원 결합 분자 또는 항체의 친화도 성숙화에 의해 수득 가능하거나 수득한 항원 결합 분자 및 항체가 본 발명에 의해 제공된다.

[0104] **경향성 제조**

[0105] 항체와 같은 치료 단백질은 화학적 변형 및 해독 후 변형 (PTM)으로 인한 성질에 의해 본질적으로 이질적이고 복잡하다. 변형은 숙주 세포 시스템, 제조에 사용된 공정 또는 보관 또는 제조 동안 조건과 같은 다수의 인자에 의해 발생될 수 있다. 변형은 분자 자체의 화학적 안정성 또는 응집 가능성 및 이것이 항체의 고유한 물리적 안정성에 미치는 영향과 관련될 수 있다. 제조 또는 보관 동안 자발적인 변형을 겪을 수 있는 주어진 항체 서열의 아미노산 모티프 또는 잔기를 경향성으로 지칭한다. 따라서, 변형 및 분해에 대한 항체의 감수성을 감소시키는 경향성을 해결하기 위해 항체 서열에 돌연변이가 이루어질 수 있다.

[0106] 항체 서열의 경향성의 결과로서 그러한 변형은 글리코실화, 탈아미드화, 산화 및 C- 및 N-말단의 변형을 포함할 수 있다. 그러한 변형은 제조 동안 발생할 수 있다. 특정 잔기와 구조적 또는 서열 모티프는 특정 변형에 더 취약하다. 그러한 변형 경향성의 예는 Asn N-연결된 글리코실화, Ser/Thr O-연결된 글리코실화, Asn 탈아미드화, Asp 이성질체화/단편화, Lys 당화, Met/Trp 산화, 유리 티올 그룹, 피로-글루타메이트, C-말단 Lys를 포함한다.

[0107] 당업자는 잠재적으로 변형을 초래할 수 있는 구조적 및 서열 경향성을 예측하고 식별하기 위해 계산 도구를 사용할 수 있음을 알고 있다. 변형의 발생을 최소화하기 위해 제조 공정을 변경할 수 있다. 단백질 조작은 위험을 감소시키기 위해 고려될 수 있다. 예를 들어, 이러한 경향성의 선택적 돌연변이는 항체의 안정성을 위협하는 변형의 위험을 식별하고 감소시키는 데 도움이 될 수 있다.

[0108] 아스파르트산 잔기 (Asp)는 자발적인 변형을 겪을 수 있다. Asp-Gly 서열과 같은 Asp 함유 모티프는 자발적 이성질체화를 거쳐 이소아스파르트산을 형성할 수 있다. 이소아스파르테이트의 형성은 항체의 결합을 약화시키거나 완전히 없앨 수 있다. 이는 Asp 잔기가 항체의 CDR에 나타나는 경우 더욱 중요하다.

[0109] 따라서, 아스파르트산 잔기 (Asp)는 자연 발생 아미노산으로 대체되어 변형 경향성을 감소시킬 수 있다. 임의로, 아스파르트산 잔기 (Asp)는 알라닌 ((Ala), 글루타민 (Gln) 또는 글루탐산 (Glu)으로 치환되어 변형 경향성을 감소시킨다. 이성질체화를 감소시키기 위해 생산/제형 최적화를 조사할 수도 있다. 대안적으로, Asp-Gly 모티프는 Asp 잔기의 치환보다는 탈아미드화를 억제하기 위해 글리신 잔기를 또 다른 자연 발생 아미노산으로 대체함으로써 변형될 수 있다.

[0110] 메티오닌 잔기 (Met)는 자발적인 변형을 겪을 수 있다. CDR에 메티오닌 (Met)이 존재하면, 특히 용매에 노출될 경우, 메티오닌이 산화되어 결합을 방해한다면 문제가 발생할 수 있다. 따라서, 메티오닌 잔기는 임의의 다른 자연 발생 아미노산으로 치환되어 이러한 변형 경향성을 감소시킬 수 잇다. 메티오닌 잔기는 바람직하게는 Ala 또는 Leu로 치환될 수 있다. 산화를 감소시키기 위해 생산/제형의 최적화를 조사할 수도 있다.

[0111] [표 1]

[0112] 본 발명의 항원 결합 분자에서 서열 변형을 위한 잠재적 표적의 비제한적 목록:

[0113]

| | 8A04 | 8B06 | 8G08 | 8D06 | 2A09 | 8D04 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| VLCDR1 | Met 23 | - | - | - | - | - |
| VLCDR2 | - | - | - | - | - | - |
| VLCDR3 | Asp 95 | Asp 95 | Asp 95 | Asp 95 | Asp 95 | Asp 95 |
| VHCDR1 | - | - | - | - | - | - |
| VHCDR2 | Asp 54, Asp 62 | Asp 54, Asp 62 | Asp 54, Asp 62 | Asp 54, Asp 62 | Asp 54, Asp 62 | Asp 54, Asp 62 |
| VHCDR3 | Asp 110 | Asp 110 | Asp 110 | Asp 110 | Asp 110 | Asp 110 |
| VL (FR1) | Met 3 | Met 3 | Met 3 | Met 3 | Met 3 | Met 3 |

[0114] 따라서, 8A04, 8B06, 8G08, 8D06, 8D04 및 2A09 중 임의의 것에서 유래하지만 상기 요약된 하나 이상의 경향성을 다루기 위한 하나 이상의 아미노 치환을 포함하는 변이체 항체가 또한 본원에 제공된다.

[0115] 예를 들어, 본원에서 하나 이상의 아미노산 서열에 의해 정의된 임의의 항원 결합 분자에 대해, 하나 이상의 Met 잔기가 존재하는 경우, 하나 이상의 Met 잔기는 각각 독립적으로 Ala 잔기 또는 Leu 잔기로 치환될 수

있다. 하나 이상의 Asp 잔기가 존재하는 경우, 하나 이상의 Asp 잔기는 각각 독립적으로 Ala 잔기, Gln 잔기 또는 Glu 잔기로 치환될 수 있다.

[0116] **제공된 항원 결합 분자의 요약**

[0117] 본 발명에 의해 제공되는 항원 결합 분자의 요약은 첨부된 서열 목록에서 할당된 서열 번호의 식별과 함께 하기에 제공된다. 항원 결합 변이체, 이의 유도체 및 단편은 또한 본 발명의 일부로서 제공된다:

[0118] [표 2]

[0119] 모 완전 인간 항체 2A09_WT 및 이 항체의 완전한 인간 친화도 성숙된 버전의 요약

[0120]

| | 서열 번호 | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 항체 | VL | VLCDR1 | VLCDR2 | VLCDR3 | VH | VHCDR1 | VHCDR2 | VHCDR3 |
| 2A09_WT | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 8G08 | 9 | 10 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 8D06 | 11 | 12 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 8A04 | 13 | 14 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 8B06 | 15 | 16 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 8D04 | 17 | 18 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |

[0121] 최소한 다음과 같은 변이체를 포함한 변이체도 제공된다:

[0122] [표 3]

[0123] 아래에 요약된 하나 이상의 경향성을 다루기 위해 하나 이상의 아미노 치환을 포함하는 8A04, 8B06, 8G08, 8D06, 8D04 및 2A09_WT 중 임의의 것으로부터 유래된 변이체 항체의 요약.

[0124]

| 항체 | VL | VL_지원 1 | VL_지원 2 | VL_지원 3 | VLCDR1 | VLCDR1_지원 1 | VLCDR1_지원 2 | VLCDR1_지원 3 | VLCDR2 | VLCDR3 | VLCDR3_지원 1 | VLCDR3_지원 2 | VLCDR3_지원 3 | VH | VH_지원 1 | VH_지원 2 | VH_지원 3 | VHCDR1 | VHCDR2 | VHCDR2_지원 1 | VHCDR2_지원 2 | VHCDR2_지원 3 | VHCDR3 | VHCDR3_지원 1 | VHCDR3_지원 2 | VHCDR3_지원 2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 서열 번호 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2A09_WT | 1 | 20 | 21 | 22 | 2 | - | - | - | 3 | 4 | 23 | 24 | 25 | 5 | 26 | 27 | 28 | 6 | 7 | 29 | 30 | 31 | 8 | 32 | 33 | 34 |
| 8G08 | 9 | 35 | 36 | 37 | 10 | - | - | - | 3 | 4 | 23 | 24 | 25 | 5 | 26 | 27 | 28 | 6 | 7 | 29 | 30 | 31 | 8 | 32 | 33 | 34 |
| 8D06 | 11 | 38 | 39 | 40 | 12 | - | - | - | 3 | 4 | 23 | 24 | 25 | 5 | 26 | 27 | 28 | 6 | 7 | 29 | 30 | 31 | 8 | 32 | 33 | 34 |
| 8A04 | 13 | 41 | 42 | 43 | 14 | 44 | 45 | 46 | 3 | 4 | 23 | 24 | 25 | 5 | 26 | 27 | 28 | 6 | 7 | 29 | 30 | 31 | 8 | 32 | 33 | 34 |
| 8B06 | 15 | 47 | 48 | 49 | 16 | - | - | - | 3 | 4 | 23 | 24 | 25 | 5 | 26 | 27 | 28 | 6 | 7 | 29 | 30 | 31 | 8 | 32 | 33 | 34 |
| 8D04 | 17 | 50 | 51 | 52 | 18 | - | - | - | 3 | 4 | 23 | 24 | 25 | 5 | 26 | 27 | 28 | 6 | 7 | 29 | 30 | 31 | 8 | 32 | 33 | 34 |

[0125] 예를 들어, 본원에 제공된 8G08의 변이체는 서열 번호 35의 VL 및 서열 번호 26의 VH, 또는 서열 번호 36의 VL 및 서열 번호 27의 VH, 또는 서열 번호 37의 VL 및 서열 번호 28의 VH를 갖는 변이체를 포함한다. 본원에 제공된 8D06의 변이체는 서열 번호 38의 VL 및 서열 번호 26의 VH, 또는 서열 번호 39의 VL 및 서열 번호 27의 VH, 또는 서열 번호 40의 VL 및 서열 번호 28의 VH를 갖는 변이체를 포함한다. 본원에 제공된 8A04의 변이체는 서열 번호 41의 VL 및 서열 번호 26의 VH, 또는 서열 번호 42의 VL 및 서열 번호 27의 VH, 또는 서열 번호 43의 VL 및 서열 번호 28의 VH를 갖는 변이체를 포함한다. 본원에 제공된 8B06의 변이체는 서열 번호 47의 VL 및 서열 번호 26의 VH, 또는 서열 번호 48의 VL 및 서열 번호 27의 VH, 또는 서열 번호 49의 VL 및 서열 번호 28의 VH를 갖는 변이체를 포함한다. 본원에 제공된 8A04의 변이체는 서열 번호 50의 VL 및 서열 번호 26의 VH, 또는 서열 번호 51의 VL 및 서열 번호 27의 VH, 또는 서열 번호 52의 VL 및 서열 번호 28의 VH를 갖는 변이체를 포함한다. 본원에 제공된 2A09의 변이체는 서열 번호 20의 VL 및 서열 번호 26의 VH, 또는 서열 번호 21의 VL 및 서열 번호 27의 VH, 또는 서열 번호 22의 VL 및 서열 번호 28의 VH를 갖는 변이체를 포함한다.

[0126] 본원에 제공된 8G08의 다른 변이체는 다음을 갖는 변이체를 포함한다:

[0127] 서열 번호 10의 VLCDR1, 서열 번호 3의 VLCDR2, 서열 번호 23의 VLCDR3, 서열 번호 6의 VHCDR1, 서열 번호 29의 VHCDR2, 및 서열 번호 32의 VHCDR3;

[0128] 서열 번호 10의 VLCDR1, 서열 번호 3의 VLCDR2, 서열 번호 24의 VLCDR3, 서열 번호 6의 VHCDR1, 서열 번호 30의 VHCDR2, 및 서열 번호 33의 VHCDR3; 또는

[0129] 서열 번호 10의 VLCDR1, 서열 번호 3의 VLCDR2, 서열 번호 25의 VLCDR3, 서열 번호 6의 VHCDR1, 서열 번호 31의 VHCDR2, 및 서열 번호 34의 VHCDR3.

[0130] 본원에 제공된 8D06의 다른 변이체는 다음을 갖는 변이체를 포함한다:

[0131] 서열 번호 12의 VLCDR1, 서열 번호 3의 VLCDR2, 서열 번호 23의 VLCDR3, 서열 번호 6의 VHCDR1, 서열 번호 29의 VHCDR2, 및 서열 번호 32의 VHCDR3;

[0132] 서열 번호 12의 VLCDR1, 서열 번호 3의 VLCDR2, 서열 번호 24의 VLCDR3, 서열 번호 6의 VHCDR1, 서열 번호 30의 VHCDR2, 및 서열 번호 33의 VHCDR3; 또는

[0133] 서열 번호 12의 VLCDR1, 서열 번호 3의 VLCDR2, 서열 번호 25의 VLCDR3, 서열 번호 6의 VHCDR1, 서열 번호 31의 VHCDR2, 및 서열 번호 34의 VHCDR3.

[0134] 본원에 제공된 8A04의 다른 변이체는 다음을 갖는 변이체를 포함한다:

[0135] 서열 번호 44의 VLCDR1, 서열 번호 3의 VLCDR2, 서열 번호 23의 VLCDR3, 서열 번호 6의 VHCDR1, 서열 번호 29의 VHCDR2, 및 서열 번호 32의 VHCDR3;

[0136] 서열 번호 45의 VLCDR1, 서열 번호 3의 VLCDR2, 서열 번호 24의 VLCDR3, 서열 번호 6의 VHCDR1, 서열 번호 30의 VHCDR2, 및 서열 번호 33의 VHCDR3; 또는

[0137] 서열 번호 46의 VLCDR1, 서열 번호 3의 VLCDR2, 서열 번호 25의 VLCDR3, 서열 번호 6의 VHCDR1, 서열 번호 31의 VHCDR2, 및 서열 번호 34의 VHCDR3.

[0138] 본원에 제공된 8B06의 다른 변이체는 다음을 갖는 변이체를 포함한다:

[0139] 서열 번호 16의 VLCDR1, 서열 번호 3의 VLCDR2, 서열 번호 23의 VLCDR3, 서열 번호 6의 VHCDR1, 서열 번호 29의 VHCDR2, 및 서열 번호 32의 VHCDR3;

[0140] 서열 번호 16의 VLCDR1, 서열 번호 3의 VLCDR2, 서열 번호 24의 VLCDR3, 서열 번호 6의 VHCDR1, 서열 번호 30의 VHCDR2, 및 서열 번호 33의 VHCDR3; 또는

[0141] 서열 번호 16의 VLCDR1, 서열 번호 3의 VLCDR2, 서열 번호 25의 VLCDR3, 서열 번호 6의 VHCDR1, 서열 번호 31의 VHCDR2, 및 서열 번호 34의 VHCDR3.

[0142] 본원에 제공된 8D04의 다른 변이체는 다음을 갖는 변이체를 포함한다:

[0143] 서열 번호 16의 VLCDR1, 서열 번호 3의 VLCDR2, 서열 번호 23의 VLCDR3, 서열 번호 6의 VHCDR1, 서열 번호 29의 VHCDR2, 및 서열 번호 32의 VHCDR3;

[0144] 서열 번호 16의 VLCDR1, 서열 번호 3의 VLCDR2, 서열 번호 24의 VLCDR3, 서열 번호 6의 VHCDR1, 서열 번호 30의 VHCDR2, 및 서열 번호 33의 VHCDR3; 또는

[0145] 서열 번호 16의 VLCDR1, 서열 번호 3의 VLCDR2, 서열 번호 25의 VLCDR3, 서열 번호 6의 VHCDR1, 서열 번호 31의 VHCDR2, 및 서열 번호 34의 VHCDR3.

[0146] 본원에 제공된 2A09의 다른 변이체는 다음을 갖는 변이체를 포함한다:

[0147] 서열 번호 2의 VLCDR1, 서열 번호 3의 VLCDR2, 서열 번호 23의 VLCDR3, 서열 번호 6의 VHCDR1, 서열 번호 29의 VHCDR2, 및 서열 번호 32의 VHCDR3;

[0148] 서열 번호 2의 VLCDR1, 서열 번호 3의 VLCDR2, 서열 번호 24의 VLCDR3, 서열 번호 6의 VHCDR1, 서열 번호 30의 VHCDR2, 및 서열 번호 33의 VHCDR3; 또는

[0149] 서열 번호 2의 VLCDR1, 서열 번호 3의 VLCDR2, 서열 번호 25의 VLCDR3, 서열 번호 6의 VHCDR1, 서열 번호 31의 VHCDR2, 및 서열 번호 34의 VHCDR3.

[0150] 이제 본 발명의 다양한 구현예가 더 상세하게 논의된다.

[0151] **VLCDR1 영역을 포함하는 항원 결합 분자**

[0152] **8B06**

[0153] 한 구현예에서, 아미노산 서열 RETELSRRLHYVR (서열 번호 16)과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다. 한 구현예에서, 아미노산 서열 RETELSRRLHYVR (서열 번호 16)과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다.

[0154] 한 구현예에서, 아미노산 서열 RETELSRRLHYVR (서열 16)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다. 특정 구현예에서, 항원 결합 분자는 항체 또는 이의 단편 또는 변이체이고, 여기서, 상기 항체 또는 이의 단편 또는 변이체의 VLCDR1 영역은 RETELSRRLHYVR (서열 16)이다.

[0155] 일부 구현예에서, 적어도 30의 pH 6.0:7.4 EC50 비율을 가질 수 있는 8B06 항체, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체로부터 유래된 항원 결합 분자가 제공된다.

[0156] 아미노산 치환은, 예를 들어, 8B06 VLCDR1 영역에서 경향성을 감소시키거나 제거하기 위해 이루어질 수 있다.

[0157] 8D06

[0158] 한 구현예에서, 아미노산 서열 VLSPRTHAGHYYR (서열 번호 12)과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다. 한 구현예에서, 아미노산 서열 VLSPRTHAGHYYR (서열 번호 12)과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다.

[0159] 한 구현예에서, 아미노산 서열 VLSPRTHAGHYYR (서열 번호 12)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다. 특정 구현예에서, 항원 결합 분자는 항체 또는 이의 단편 또는 변이체이고, 여기서, 상기 항체 또는 이의 단편 또는 변이체의 VLCDR1 영역은 VLSPRTHAGHYYR (서열 번호 12)이다.

[0160] 일부 구현예에서, 적어도 약 5의 pH 6.0:7.4 EC50 비율을 가질 수 있는 8D06 항체, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체로부터 유래된 항원 결합 분자가 제공된다.

[0161] 아미노산 치환은, 예를 들어, 8D06 VLCDR1 영역에서 경향성을 감소시키거나 제거하기 위해 이루어질 수 있다.

[0162] 8G08

[0163] 한 구현예에서, 아미노산 서열 ISNDVPASGHYHR (서열 번호 10)과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다. 한 구현예에서, 아미노산 서열 ISNDVPASGHYHR (서열 번호 10)과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다.

[0164] 한 구현예에서, 아미노산 서열 ISNDVPASGHYHR (서열 번호 10)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다. 특정 구현예에서, 항원 결합 분자는 항체 또는 이의 단편 또는 변이체이고, 여기서, 상기 항체 또는 이의 단편 또는 변이체의 VLCDR1 영역은 ISNDVPASGHYHR (서열 번호 10)이다.

[0165] 일부 구현예에서, 적어도 약 5의 pH 6.0:7.4 EC50 비율을 가질 수 있는 8G08 항체, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체로부터 유래된 항원 결합 분자가 제공된다.

[0166] 아미노산 치환은, 예를 들어, 8G08 VLCDR1 영역에서 경향성을 감소시키거나 제거하기 위해 이루어질 수 있다.

[0167] 8A04

[0168] 한 구현예에서, 아미노산 서열 MRTGTGNKGHYTR (서열 번호 14)과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다. 한 구현예에서, 아미노산 서열 MRTGTGNKGHYTR (서열 번호 14)과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다.

[0169] 한 구현예에서, 아미노산 서열 MRTGTGNKGHYTR (서열 번호 14)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합

분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다.

[0170] 특정 구현예에서, 항원 결합 분자는 항체 또는 이의 단편 또는 변이체이고, 여기서, 상기 항체 또는 이의 단편 또는 변이체의 VLCDR1 영역은 MRTGTGNKGHYTR (서열 번호 14)이다.

[0171] 일부 구현예에서, 적어도 약 30의 pH 6.0:7.4 EC50 비율을 가질 수 있는 8A04 항체, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체로부터 유래된 항원 결합 분자가 제공된다.

[0172] 아미노산 치환은, 예를 들어, 8A04 VLCDR1 영역에서 경향성을 감소시키거나 제거하기 위해 이루어질 수 있다.

[0173] 예를 들어, 한 구현예에서, 아미노산 서열 XRTGTGNKGHYTR (서열 번호 44)을 포함하는 VLCDR1을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공되고, 여기서, X는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다.

[0174] 한 구현예에서, 아미노산 서열 XRTGTGNKGHYTR (서열 번호 45)을 포함하는 VLCDR1을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공되고, 여기서, X는 Met, Ala 또는 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0175] 한 구현예에서, 아미노산 서열 XRTGTGNKGHYTR (서열 번호 46)을 포함하는 VLCDR1을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공되고, 여기서, X는 Ala 또는 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0176] **8D04**

[0177] 한 구현예에서, 아미노산 서열 RGTGSSFHHKYVR (서열 번호 18)과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다. 한 구현예에서, 아미노산 서열 RGTGSSFHHKYVR (서열 번호 18)과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다.

[0178] 한 구현예에서, 아미노산 서열 RGTGSSFHHKYVR (서열 번호 18)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다. 특정 구현예에서, 항원 결합 분자는 항체 또는 이의 단편 또는 변이체이고, 여기서, 상기 항체 또는 이의 단편 또는 변이체의 VLCDR1 영역은 RGTGSSFHHKYVR (서열 번호 18)이다.

[0179] 아미노산 치환은, 예를 들어, 8D04 VLCDR1 영역에서 경향성을 감소시키거나 제거하기 위해 이루어질 수 있다.

[0180] 일부 구현예에서, 적어도 약 5의 pH 6.0:7.4 EC50 비율을 가질 수 있는 8D04 항체, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체로부터 유래된 항원 결합 분자가 제공된다.

[0181] **2A09_WT**

[0182] 한 구현예에서, 아미노산 서열 TRSSGSIASNYVQ (서열 번호 2)과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다. 한 구현예에서, 아미노산 서열 TRSSGSIASNYVQ (서열 번호 2)과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다.

[0183] 한 구현예에서, 아미노산 서열 TRSSGSIASNYVQ (서열 번호 2)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다. 특정 구현예에서, 항원 결합 분자는 항체 또는 이의 단편 또는 변이체이고, 여기서, 상기 항체 또는 이의 단편 또는 변이체의 VLCDR1 영역은 TRSSGSIASNYVQ (서열 번호 2)이다.

[0184] 아미노산 치환은, 예를 들어, 2A09_WT VLCDR1 영역에서 경향성을 감소시키거나 제거하기 위해 이루어질 수 있다.

[0185] **중쇄 및/또는 경쇄 CDR**

[0186] **8B06**

[0187] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0188] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0189] 아미노산 서열 RETELSRRLHYVR (서열 번호 16)과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0190] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0191] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0192] 아미노산 서열 RETELSRRLHYVR (서열 번호 16)과 적어도 90% 동일성을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)과 적어도 90% 동일성을 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0193] 일부 구현예에서, 적어도 약 30의 pH 6.0:7.4 EC50 비율을 가질 수 있는 8B06 항체, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체로부터 유래된 항원 결합 분자가 제공된다.

[0194] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0195] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0196] 아미노산 서열 RETELSRRLHYVR (서열 번호 16)을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0197] 아미노산 치환은, 예를 들어, 8B06 CDR에서 경향성을 감소시키거나 제거하기 위해 이루어질 수 있다.

[0198] 예를 들어, 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0199] 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0200] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1;

[0201] 아미노산 서열 VISY$X_1$GSNKYYA$X_2$SVKG (서열 번호 29)를 포함하는 VHCDR2 (여기서, $X_1$ 및 $X_2$는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다); 및

[0202] 아미노산 서열 GALTHWGVVIGXGMDV (서열 번호 32)를 포함하는 VHCDR3 (여기서, X는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다); 및/또는

[0203] 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0204] 아미노산 서열 RETELSRRLHYVR (서열 번호 16)을 포함하는 VLCDR1;

[0205] 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2; 및

[0206] 아미노산 서열 QSFXSTNPWV (서열 번호 23)를 포함하는 VLCDR3 (여기서, X는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다).

[0207] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0208] 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0209] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1;

[0210] 아미노산 서열 $VISYX_1GSNKYYAX_2SVKG$ (서열 번호 30)을 포함하는 VHCDR2 (여기서, $X_1$ 및 $X_2$는 각각 독립적으로 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및

[0211] 아미노산 서열 GALTHWGVVIGXGMDV (서열 번호 33)를 포함하는 VHCDR3 (여기서, X는 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및/또는

[0212] 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0213] 아미노산 서열 RETELSRRLHYVR (서열 번호 16)을 포함하는 VLCDR1;

[0214] 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2; 및

[0215] 아미노산 서열 QSFXSTNPWV (서열 번호 24)를 포함하는 VLCDR3 (여기서, X는 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다).

[0216] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0217] 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0218] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1;

[0219] 아미노산 서열 $VISYX_1GSNKYYAX_2SVKG$ (서열 번호 31)를 포함하는 VHCDR2 (여기서, $X_1$ 및 $X_2$는 각각 독립적으로 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및

[0220] 아미노산 서열 GALTHWGVVIGXGMDV (서열 번호 34)를 포함하는 VHCDR3 (여기서, X는 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및/또는

[0221] 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0222] 아미노산 서열 RETELSRRLHYVR (서열 번호 16)을 포함하는 VLCDR1;

[0223] 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2; 및

[0224] 아미노산 서열 QSFXSTNPWV (서열 번호 25)를 포함하는 VLCDR3 (여기서, X는 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다).

[0225] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공되고:

[0226] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0227] 아미노산 서열 RETELSRRLHYVR (서열 번호 16)을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

[0228] 임의로, Met 잔기는 각각 독립적으로 Ala 및 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산으로 치환되고, Asp 잔기는 각각 독립적으로 Ala, Gln 및 Glu로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산으로 치환된다.

[0229] **8D06**

[0230] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0231] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0232] 아미노산 서열 VLSPRTHAGHYYR (서열 번호 12)과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0233] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0234] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0235] 아미노산 서열 VLSPRTHAGHYYR (서열 번호 12)과 적어도 90% 동일성을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0236] 일부 구현예에서, 적어도 약 5의 pH 6.0:7.4 EC50 비율을 가질 수 있는 8D06 항체, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체로부터 유래된 항원 결합 분자가 제공된다.

[0237] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0238] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0239] 아미노산 서열 VLSPRTHAGHYYR (서열 번호 12)을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0240] 아미노산 치환은, 예를 들어, 8D06 CDR에서 경향성을 감소시키거나 제거하기 위해 이루어질 수 있다.

[0241] 예를 들어, 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0242] 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0243] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1;

[0244] 아미노산 서열 VISYX$_1$GSNKYYAX2SVKG (서열 번호 29)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 VHCDR2 (여기서, X$_1$ 및 X$_2$는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다); 및

[0245] 아미노산 서열 GALTHWGVVIGXGMDV (서열 번호 32)를 포함하는 VHCDR3 (여기서, X는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다); 및/또는

[0246] 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0247] 아미노산 서열 VLSPRTHAGHYYR (서열 번호 12)을 포함하는 VLCDR1;

[0248] 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2; 및

[0249] 아미노산 서열 QSFXSTNPWV (서열 번호 23)를 포함하는 VLCDR3 (여기서, X는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다).

[0250] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0251] 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0252] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1;

[0253] 아미노산 서열 VISYX$_1$GSNKYYAX2SVKG (서열 번호 30)를 포함하는 VHCDR2 (여기서, X$_1$ 및 X$_2$는 각각 독립적으로 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및

[0254] 아미노산 서열 GALTHWGVVIGXGMDV (서열 번호 33)를 포함하는 VHCDR3 (여기서, X는 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및/또는

[0255] 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0256] 아미노산 서열 VLSPRTHAGHYYR (서열 번호 12)을 포함하는 VLCDR1;

[0257] 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2; 및

[0258] 아미노산 서열 QSFXSTNPWV (서열 번호 24)를 포함하는 VLCDR3 (여기서, X는 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진

그룹으로부터 선택된다).

[0259] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0260] 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0261] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1;

[0262] 아미노산 서열 VISYX$_1$GSNKYYAX$_2$SVKG (서열 번호 31)를 포함하는 VHCDR2 (여기서, X$_1$ 및 X$_2$는 각각 독립적으로 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및

[0263] 아미노산 서열 GALTHWGVVIGXGMDV (서열 번호 34)를 포함하는 VHCDR3 (여기서, X는 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및/또는

[0264] 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0265] 아미노산 서열 VLSPRTHAGHYYR (서열 번호 12)을 포함하는 VLCDR1;

[0266] 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2; 및

[0267] 아미노산 서열 QSFXSTNPWV (서열 번호 25)를 포함하는 VLCDR3 (여기서, X는 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다).

[0268] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공되고:

[0269] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0270] 아미노산 서열 VLSPRTHAGHYYR (서열 번호 12)을 포함하는 VLCDR1, a 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

[0271] 임의로, Met 잔기는 각각 독립적으로 Ala 및 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산으로 치환되고, Asp 잔기는 각각 독립적으로 Ala, Gln 및 Glu로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산으로 치환된다.

[0272] **8G08**

[0273] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0274] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0275] 아미노산 서열 ISNDVPASGHYHR (서열 번호 10)과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0276] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0277] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0278] 아미노산 서열 ISNDVPASGHYHR (서열 번호 10)과 적어도 90% 동일성을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0279] 일부 구현예에서, 적어도 약 5의 pH 6.0:7.4 EC50 비율을 가질 수 있는 8G08 항체, 예를 들어, 항체, 이의 단편

또는 변이체로부터 유래된 항원 결합 분자가 제공된다.

[0280] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0281] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0282] 아미노산 서열 ISNDVPASGHYHR (서열 번호 10)을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0283] 아미노산 치환은, 예를 들어, 8G08 CDR에서 경향성을 감소시키거나 제거하기 위해 이루어질 수 있다.

[0284] 예를 들어, 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0285] 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0286] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1;

[0287] 아미노산 서열 VISYX$_1$GSNKYYAX$_2$SVKG (서열 번호 29)를 포함하는 VHCDR2 (여기서, X$_1$ 및 X$_2$는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다); 및

[0288] 아미노산 서열 GALTHWGVVIGXGMDV (서열 번호 32)를 포함하는 VHCDR3 (여기서, X는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다); 및/또는

[0289] 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0290] 아미노산 서열 ISNDVPASGHYHR (서열 번호 10)을 포함하는 VLCDR1;

[0291] 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2; 및

[0292] 아미노산 서열 QSFXSTNPWV (서열 번호 23)를 포함하는 VLCDR3 (여기서, X는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다).

[0293] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0294] 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0295] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1;

[0296] 아미노산 서열 VISYX$_1$GSNKYYAX$_2$SVKG (서열 번호 30)를 포함하는 VHCDR2 (여기서, X$_1$ 및 X$_2$는 각각 독립적으로 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및

[0297] 아미노산 서열 GALTHWGVVIGXGMDV (서열 번호 33)를 포함하는 VHCDR3 (여기서, X는 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및/또는

[0298] 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0299] 아미노산 서열 ISNDVPASGHYHR (서열 번호 10)을 포함하는 VLCDR1;

[0300] 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2; 및

[0301] 아미노산 서열 QSFXSTNPWV (서열 번호 24)를 포함하는 VLCDR3 (여기서, X는 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다).

[0302] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0303] 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0304] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1;

[0305] 아미노산 서열 VISYX$_1$GSNKYYAX$_2$SVKG (서열 번호 31)를 포함하는 VHCDR2 (여기서, X$_1$ 및 X$_2$는 각각 독립적으로 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및

[0306] 아미노산 서열 GALTHWGVVIGXGMDV (서열 번호 34)를 포함하는 VHCDR3 (여기서, X는 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진

그룹으로부터 선택된다); 및/또는

[0307] 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0308] 아미노산 서열 ISNDVPASGHYHR (서열 번호 10)을 포함하는 VLCDR1;

[0309] 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2; 및

[0310] 아미노산 서열 QSFXSTNPWV (서열 번호 25)를 포함하는 VLCDR3 (여기서, X는 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다).

[0311] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공되고:

[0312] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0313] 아미노산 서열 ISNDVPASGHYHR (서열 번호 10)을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

[0314] 임의로, Met 잔기는 각각 독립적으로 Ala 및 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산으로 치환되고, Asp 잔기는 각각 독립적으로 Ala, Gln 및 Glu로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산으로 치환된다.

[0315] **8A04**

[0316] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0317] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0318] 아미노산 서열 MRTGTGNKGHYTR (서열 번호 14)과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0319] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0320] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0321] 아미노산 서열 MRTGTGNKGHYTR (서열 번호 14)과 적어도 90% 동일성을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0322] 일부 구현예에서, 적어도 약 30의 pH 6.0:7.4 EC50 비율을 가질 수 있는 8A04 항체, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체로부터 유래된 항원 결합 분자가 제공된다.

[0323] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0324] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0325] 아미노산 서열 MRTGTGNKGHYTR (서열 번호 14)을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0326] 아미노산 치환은, 예를 들어, 8A04 CDR에서 경향성을 감소시키거나 제거하기 위해 이루어질 수 있다.

[0327] 예를 들어, 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0328] 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0329] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1;

[0330] 아미노산 서열 VISYX$_1$GSNKYYAX$_2$SVKG (서열 번호 29)를 포함하는 VHCDR2 (여기서, X$_1$ 및 X$_2$는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다); 및

[0331] 아미노산 서열 GALTHWGVVIGXGMDV (서열 번호 32)를 포함하는 VHCDR3 (여기서, X는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다); 및/또는

[0332] 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0333] 아미노산 서열 XRTGTGNKGHYTR (서열 번호 44)을 포함하는 VLCDR1 (여기서, X는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다);

[0334] 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2; 및

[0335] 아미노산 서열 QSFXSTNPWV (서열 번호 23)를 포함하는 VLCDR3 (여기서, X는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다).

[0336] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0337] 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0338] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1;

[0339] 아미노산 서열 VISYX$_1$GSNKYYAX$_2$SVKG (서열 번호 30)를 포함하는 VHCDR2 (여기서, X$_1$ 및 X$_2$는 각각 독립적으로 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및

[0340] 아미노산 서열 GALTHWGVVIGXGMDV (서열 번호 33)를 포함하는 VHCDR3 (여기서, X는 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및/또는

[0341] 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0342] 아미노산 서열 XRTGTGNKGHYTR (서열 번호 45)을 포함하는 VLCDR1 (여기서, X는 Met, Ala 또는 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택된다);

[0343] 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2; 및

[0344] 아미노산 서열 QSFXSTNPWV (서열 번호 24)를 포함하는 VLCDR3 (여기서, X는 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다).

[0345] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0346] 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0347] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1;

[0348] 아미노산 서열 VISYX$_1$GSNKYYAX$_2$SVKG (서열 번호 31)를 포함하는 VHCDR2 (여기서, X$_1$ 및 X$_2$는 각각 독립적으로 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및

[0349] 아미노산 서열 GALTHWGVVIGXGMDV (서열 번호 34)를 포함하는 VHCDR3 (여기서, X는 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및/또는

[0350] 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0351] 아미노산 서열 XRTGTGNKGHYTR (서열 번호 46)을 포함하는 VLCDR1 (여기서, X는 Ala 또는 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택된다);

[0352] 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2; 및

[0353] 아미노산 서열 QSFXSTNPWV (서열 번호 25)를 포함하는 VLCDR3 (여기서, X는 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다).

[0354] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공되고:

[0355] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0356] 아미노산 서열 MRTGTGNKGHYTR (서열 번호 14)을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

[0357] 임의로, Met 잔기는 각각 독립적으로 Ala 및 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산으로 치환되고, Asp 잔기는 각각 독립적으로 Ala, Gln 및 Glu로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산으로 치환된다.

[0358] **8D04**

[0359] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0360] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0361] 아미노산 서열 RGTGSSFHHKYVR (서열 번호 18)과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0362] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0363] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0364] 아미노산 서열 RGTGSSFHHKYVR (서열 번호 18)과 적어도 90% 동일성을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0365] 일부 구현예에서, 적어도 약 5의 pH 6.0:7.4 EC50 비율을 가질 수 있는 8D04 항체, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체로부터 유래된 항원 결합 분자가 제공된다.

[0366] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0367] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0368] 아미노산 서열 RGTGSSFHHKYVR (서열 번호 18)을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0369] 아미노산 치환은, 예를 들어, 8D04 CDR에서 경향성을 감소시키거나 제거하기 위해 이루어질 수 있다.

[0370] 예를 들어, 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0371] 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0372] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1;

[0373] 아미노산 서열 VISYX$_1$GSNKYYAX$_2$SVKG (서열 번호 29)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 VHCDR2 (여기서, X$_1$ 및 X$_2$는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다); 및

[0374] 아미노산 서열 GALTHWGVVIGXGMDV (서열 번호 32)를 포함하는 VHCDR3 (여기서, X는 임의의 자연 발생 아미노산일

수 있다); 및/또는

[0375] 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0376] 아미노산 서열 RGTGSSFHHKYVR (서열 번호 18)을 포함하는 VLCDR1;

[0377] 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2; 및

[0378] 아미노산 서열 QSFXSTNPWV (서열 번호 24)를 포함하는 VLCDR3 (여기서, X는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다).

[0379] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0380] 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0381] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1;

[0382] 아미노산 서열 VISYX$_1$GSNKYYAX$_2$SVKG (서열 번호 30)를 포함하는 VHCDR2 (여기서, X$_1$ 및 X$_2$는 각각 독립적으로 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및

[0383] 아미노산 서열 GALTHWGVVIGXGMDV (서열 번호 33)를 포함하는 VHCDR3 (여기서, X는 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및/또는

[0384] 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0385] 아미노산 서열 RGTGSSFHHKYVR (서열 번호 18)을 포함하는 VLCDR1;

[0386] 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2; 및

[0387] 아미노산 서열 QSFXSTNPWV (서열 번호 25)를 포함하는 VLCDR3 (여기서, X는 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다).

[0388] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0389] 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0390] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1;

[0391] 아미노산 서열 VISYX$_1$GSNKYYAX$_2$SVKG (서열 번호 31)를 포함하는 VHCDR2 (여기서, X$_1$ 및 X$_2$는 각각 독립적으로 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및

[0392] 아미노산 서열 GALTHWGVVIGXGMDV (서열 번호 34)를 포함하는 VHCDR3 (여기서, X는 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및/또는

[0393] 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0394] 아미노산 서열 RGTGSSFHHKYVR (서열 번호 18)을 포함하는 VLCDR1;

[0395] 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2; 및

[0396] 아미노산 서열 QSFXSTNPWV (서열 번호 26)를 포함하는 VLCDR3 (여기서, X는 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다).

[0397] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공되고:

[0398] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0399] 아미노산 서열 RGTGSSFHHKYVR (서열 번호 18)을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

[0400] 임의로, Met 잔기는 각각 독립적으로 Ala 및 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산으로 치환되고, Asp 잔기는 각각 독립적으로 Ala, Gln 및 Glu로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산으로 치환된다.

[0401] **2A09_WT**

[0402] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0403] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0404] 아미노산 서열 TRSSGSIASNYVQ (서열 번호 2)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0405] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0406] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0407] 아미노산 서열 TRSSGSIASNYVQ (서열 번호 2)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)와 적어도 90% 동일성을 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0408] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0409] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0410] 아미노산 서열 TRSSGSIASNYVQ (서열 번호 2)를 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0411] 아미노산 치환은, 예를 들어, 2A09_WT CDR에서 경향성을 감소시키거나 제거하기 위해 이루어질 수 있다.

[0412] 예를 들어, 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0413] 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0414] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1;

[0415] 아미노산 서열 VISYX$_1$GSNKYYAX$_2$SVKG (서열 번호 29)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 VHCDR2 (여기서, X$_1$ 및 X$_2$는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다); 및

[0416] 아미노산 서열 GALTHWGVVIGXGMDV (서열 번호 32)를 포함하는 VHCDR3 (여기서, X는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다); 및/또는

[0417] 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0418] 아미노산 서열 TRSSGSIASNYVQ (서열 번호 2)를 포함하는 VLCDR1;

[0419] 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2; 및

[0420] 아미노산 서열 QSFXSTNPWV (서열 번호 23)를 포함하는 VLCDR3 (여기서, X는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다).

[0421] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0422] 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0423] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1;

[0424] 아미노산 서열 VISYX$_1$GSNKYYAX$_2$SVKG (서열 번호 30)를 포함하는 VHCDR2 (여기서, X$_1$ 및 X$_2$는 각각 독립적으로

Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및

[0425] 아미노산 서열 GALTHWGVVIGXGMDV (서열 번호 33)를 포함하는 VHCDR3 (여기서, X는 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및/또는

[0426] 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0427] 아미노산 서열 TRSSGSIASNYVQ (서열 번호 2)를 포함하는 VLCDR1;

[0428] 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2; 및

[0429] 아미노산 서열 QSFXSTNPWV (서열 번호 24)를 포함하는 VLCDR3 (여기서, X는 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다).

[0430] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다:

[0431] 하기를 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0432] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1;

[0433] 아미노산 서열 VISYX$_1$GSNKYYAX$_2$SVKG (서열 번호 31)를 포함하는 VHCDR2 (여기서, X$_1$ 및 X$_2$는 각각 독립적으로 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및

[0434] 아미노산 서열 GALTHWGVVIGXGMDV (서열 번호 34)를 포함하는 VHCDR3 (여기서, X는 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및/또는

[0435] 하기를 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0436] 아미노산 서열 TRSSGSIASNYVQ (서열 번호 2)를 포함하는 VLCDR1;

[0437] 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2; 및

[0438] 아미노산 서열 QSFXSTNPWV (서열 번호 25)를 포함하는 VLCDR3 (여기서, X는 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다).

[0439] 한 구현예에서, 하기를 포함하는 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공되고:

[0440] 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0441] 아미노산 서열 TRSSGSIASNYVQ (서열 번호 2)를 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QSFDSTNPWV (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

[0442] 임의로, Met 잔기는 각각 독립적으로 Ala 및 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산으로 치환되고, Asp 잔기는 각각 독립적으로 Ala, Gln 및 Glu로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산으로 치환된다.

[0443] **중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역**

[0444] 한 구현예에서, 본 발명은 아미노산 서열 번호 5와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열 번호 15, 서열 번호 11, 서열 번호 9, 서열 번호 13, 서열 번호 17, 서열 번호 1로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항원-결합 분자, 특히 PD-L1에 결합하는 항체를 제공한다.

[0445] 그러한 구현예에서, 적어도 약 5의 pH 6.0:7.4 EC50 비율을 가질 수 있는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다.

[0446] 한 구현예에서, 항체는 PD-L1에 결합하고 아미노산 서열 번호 5를 갖는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열 번호 15, 서열 번호 11, 서열 번호 9, 서열 번호 13, 서열 번호 17, 서열 번호 1로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0447] 한 구현예에서, 항원-결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 변이체 또는 단편이 제공되며, 여기서, 항원-결합 분자는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다:

[0448] a) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 15의 아미노산을 포함하는 VL (또는 서열 번호 5 및 서열 번호 15와 각각 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 VH 및 VL);

[0449] b) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VL (또는 서열 번호 5 및 서열 번호 11과 각각 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 VH 및 VL);

[0450] c) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VL (또는 서열 번호 5 및 서열 번호 9와 각각 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 VH 및 VL 서열);

[0451] d) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 13의 아미노산을 포함하는 VL (또는 서열 번호 5 및 서열 번호 13과 각각 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 VH 및 VL);

[0452] e) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 17의 아미노산을 포함하는 VL (또는 서열 번호 5 및 서열 번호 17과 각각 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 VH 및 VL);

[0453] f) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VL (또는 서열 번호 5 및 서열 번호 1과 각각 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 VH 및 VL).

[0454] 한 구현예에서, 항원-결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 변이체 또는 단편이 제공되며, 여기서, 항원-결합 분자는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다:

[0455] a) 아미노산 서열 번호 5를 포함하는 VH 또는 서열 번호 5의 VH 서열과 비교하여 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 VH (또는 이의 변이체, 예컨대, 이의 친화도 성숙된 변이체); 및/또는 아미노산 서열 번호 15 또는 서열 번호 15의 VL과 비교하여 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 VL 서열을 포함하는 VL (또는 이의 변이체, 예컨대, 이의 친화도 성숙된 변이체).

[0456] b) 아미노산 서열 번호 5를 포함하는 VH 또는 서열 번호 5의 VH 서열과 비교하여 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 VH (또는 이의 변이체, 예컨대, 이의 친화도 성숙된 변이체); 및/또는 아미노산 서열 번호 11 또는 서열 번호 11의 VL과 비교하여 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 VL 서열을 포함하는 VL (또는 이의 변이체, 예컨대, 이의 친화도 성숙된 변이체).

[0457] c) 아미노산 서열 번호 5를 포함하는 VH 또는 서열 번호 5의 VH 서열과 비교하여 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 VH (또는 이의 변이체, 예컨대, 이의 친화도 성숙된 변이체); 및/또는 아미노산 서열 번호 9 또는 서열 번호 9의 VL과 비교하여 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 VL 서열을 포함하는 VL (또는 이의 변이체, 예컨대, 이의 친화도 성숙된 변이체).

[0458] d) 아미노산 서열 번호 5를 포함하는 VH 또는 서열 번호 5의 VH 서열과 비교하여 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 VH (또는 이의 변이체, 예컨대, 이의 친화도 성숙된 변이체); 및/또는 아미노산 서열 번호 13 또는 서열 번호 13의 VL과 비교하여 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 VL 서열을 포함하는 VL (또는 이의 변이체, 예컨대, 이의 친화도 성숙된 변이체).

[0459] e) 아미노산 서열 번호 5를 포함하는 VH 또는 서열 번호 5의 VH 서열과 비교하여 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 VH (또는 이의 변이체, 예컨대, 이의 친화도 성숙된 변이체); 및/또는 아미노산 서열 번호 17 또는 서열 번호 17의 VL과 비교하여 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 VL 서열을 포함하는 VL (또는 이의 변이체, 예컨대, 이의 친화도 성숙된 변이체).

[0460] f) 아미노산 서열 번호 5를 포함하는 VH 또는 서열 번호 5의 VH 서열과 비교하여 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 VH (또는 이의 변이체, 예컨대, 이의 친화도 성숙된 변이체); 및/또는 아미노산 서열 번호 1 또는 서열 번호 1의 VL과 비교하여 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 VL을 포함하는 VL (또는 이의 변이체, 예컨대, 이의 친화도 성숙된 변이체).

[0461] 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 모두 가변 영역의 CDR에서 발생한다. 일부 구현예에서, 모든 아미노산 치환은 가변 영역의 프레임워크 영역에서 발생한다.

[0462] 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환일 수 있다. 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 서열에서 하나 이상의 잠재적인 경향성을 다루기 위한 것일 수 있다. 일부 변이체 항체는 하나 이상의 경향성을 다루기 위해 하나 이상의 아미노산 치환을 가질 수 있고 보존적 아미노산 치환인 하나 이상의 추가 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0463] 한 구현예에서, 적어도 약 5의 pH 6.0:7.4 EC50 비율을 갖는 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공된다.

[0464] 따라서, 이의 인간화 및 친화도 성숙된 변이체, 및 명시된 서열(들)에 대해 더 작거나 더 큰 % 동일성 또는 상동성, 예를 들어, 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성 또는 상동성을 갖는 변이체를 포함하는, 상기 논의된 바와 같은 변이체가 또한 제공된다. 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 변이체가 또한 제공된다.

[0465] 본 발명의 한 구현예에서, 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 1과 적어도 89% 동일한 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-PD-L1 항원 결합 분자가 제공된다. 그러한 항원-결합 분자는 변이체 항원-결합 분자가 유래하는 항원-결합 분자의 기능적 활성 (예를 들면, 우선적인 pH 결합, EC50, IC50 및/또는 Kd)을 유지할 수 있다.

[0466] 일부 구현예에서, 서열 동일성 %는 명시된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 6개 CDR 모두의 서열 없이 계산된다. 그러한 구현예에서, 서열의 변이는 프레임워크 영역에서만 발생한다. 예를 들어, 항-PDL1 항원 결합 분자는 서열 번호 5의 가변 중쇄 영역과 적어도 95% 동일성을 갖는 가변 중쇄 영역 및/또는 서열 번호 15, 11, 9, 13, 17 또는 1의 가변 경쇄 영역과 적어도 95% 동일성을 갖는 가변 경쇄 영역을 포함할 수 있고, 여기서, 임의의 아미노산 변이는 가변 중쇄 및 경쇄 서열의 프레임워크 영역에서만 발생한다. 그러한 구현예에서, 명시된 서열 동일성을 갖는 항-PD-L1 항원 결합 분자는 서열 번호 5의 완전한 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열 및 서열 번호 15, 11, 9, 13, 17 또는 1의 완전한 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열 (즉, 변이체가 유래된 항체의 완전한 중쇄 및 경쇄 CDR 서열)을 포함한다.

[0467] 상기 언급된 바와 같이, 아미노산 치환은 본 발명의 항원-결합 분자의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역에서 경향성을 감소시키거나 제거하기 위해 이루어질 수 있다. 경향성을 감소시키거나 제거하기 위한 그러한 치환은 CDR에서 발생할 수 있다. 경향성을 감소시키거나 제거하기 위한 그러한 치환은 가변 영역의 프레임워크 영역에서 발생할 수 있다.

[0468] 예를 들어, 한 구현예에서, PD-L1에 결합하고 하기 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역:

[0469] QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMYWVRQAPGKGLEWVAVISYX$_1$GSNKYYAX$_2$SVKGRFTISRDNSKNTLNLQMNSLRAEDTAVYYCAKGAL THWGVVIGX$_3$GMDVWGQGTTVTVSS (서열 번호 26),

[0470] (여기서, $X_1$, $X_2$ 및 $X_3$은 각각 독립적으로 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다); 및/또는

[0471] 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;

[0472] a) NFX$_1$LTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFX$_2$STNPWV FGGGTKLTVL (서열 번호 20) (여기서, $X_1$ 및 $X_2$는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다);

[0473] b) NFX$_1$LTQPHSVSESPGKTVTISCISNDVPASGHYHRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFX$_2$STNPWV FGGGTKLTVL (서열 번호 35) (여기서, $X_1$ 및 $X_2$는 각각 독립적으로 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다);

[0474] c) NFX$_1$LTQPHSVSESPGKTVTISCVLSPRTHAGHYYRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFX$_2$STNPWV FGGGTKLTVL (서열 번호 38) (여기서, $X_1$ 및 $X_2$는 각각 독립적으로 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다);

[0475] d) NFX$_1$LTQPHSVSESPGKTVTISCX$_2$RTGTGNKGHYTRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFX$_3$STNPW VFGGGTKLTVL (서열 번호 41) (여기서, $X_1$, $X_2$ 및 $X_3$은 각각 독립적으로 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다);

[0476] e) NFX$_1$LTQPHSVSESPGKTVTISCRETELSRRLHYVRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFX$_2$STNPWV

FGGGTKLTVL (서열 번호 47) (여기서, $X_1$ 및 $X_2$는 각각 독립적으로 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다); 및

[0477] f) NFX$_1$LTQPHSVSESPGKTVTISCRGTGSSFHHKYVRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFX$_2$STNPWV FGGGTKLTVL (서열 번호 50) (여기서, $X_1$ 및 $X_2$는 각각 독립적으로 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다)

[0478] 을 포함하는 항원 결합 분자 (예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편)가 제공된다.

[0479] 한 구현예에서, PD-L1에 결합하고 하기 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역:

[0480] QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMYWVRQAPGKGLEWVAVISYX$_1$GSNKYYAX$_2$SVKGRFTISRDNSKNTLNLQMNSLRAEDTAVYYCAKGAL THWGVVIGX$_3$GMDVWGQGTTVTVSS (서열 번호 27),

[0481] (여기서, $X_1$, $X_2$ 및 $X_3$은 각각 독립적으로 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및/또는

[0482] 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역:

[0483] a) NFX$_1$LTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFX$_2$STNPWV FGGGTKLTVL (서열 번호 21) (여기서, $X_1$은 Met 또는 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, $X_2$는 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다);

[0484] b) NFX$_1$LTQPHSVSESPGKTVTISCISNDVPASGHYHRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFX$_2$STNPWV FGGGTKLTVL (서열 번호 36) (여기서, $X_1$은 Met 또는 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, $X_2$는 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다);

[0485] c) NFX$_1$LTQPHSVSESPGKTVTISCVLSPRTHAGHYYRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFX$_2$STNPWV FGGGTKLTVL (서열 번호 39) (여기서, $X_1$은 Met 또는 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, $X_2$는 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다);

[0486] d) NFX$_1$LTQPHSVSESPGKTVTISCX$_2$RTGTGNKGHYTRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFX$_3$STNPW VFGGGTKLTVL (서열 번호 42) (여기서, $X_1$은 Met 또는 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; $X_2$는 Met, Ala 및 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, $X_3$은 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다);

[0487] e) NFX$_1$LTQPHSVSESPGKTVTISCRETELSRRLHYVRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFX$_2$STNPWV FGGGTKLTVL (서열 번호 48) (여기서, $X_1$은 Met 또는 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, $X_2$는 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및

[0488] f) NFX$_1$LTQPHSVSESPGKTVTISCRGTGSSFHHKYVRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFX$_2$STNPWV FGGGTKLTVL (서열 번호 51) (여기서, $X_1$은 Met 또는 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, $X_2$는 Asp, Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다)

[0489] 을 포함하는 항원 결합 분자 (예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편)가 제공된다.

[0490] 한 구현예에서, PD-L1에 결합하고 하기 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역:

[0491] QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMYWVRQAPGKGLEWVAVISYX$_1$GSNKYYAX$_2$SVKGRFTISRDNSKNTLNLQMNSLRAEDTAVYYCAKGAL THWGVVIGX$_3$GMDVWGQGTTVTVSS (서열 번호 28),

[0492] (여기서, $X_1$, $X_2$ 및 $X_3$은 각각 독립적으로 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및/또는

[0493] 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역;

[0494] a) NF$X_1$LTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSF$X_2$STNPWV FGGGTKLTVL (서열 번호 22) (여기서, $X_1$은 Leu이고, $X_2$는 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다);

[0495] b) NF$X_1$LTQPHSVSESPGKTVTISCISNDVPASGHYHRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSF$X_2$STNPWV FGGGTKLTVL (서열 번호 37) (여기서, $X_1$은 Leu이고, $X_2$는 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다);

[0496] c) NF$X_1$LTQPHSVSESPGKTVTISCVLSPRTHAGHYYRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSF$X_2$STNPWV FGGGTKLTVL (서열 번호 40) (여기서, $X_1$은 Leu이고, $X_2$는 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다);

[0497] d) NF$X_1$LTQPHSVSESPGKTVTISC$X_2$RTGTGNKGHYTRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSF$X_3$STNPW VFGGGTKLTVL (서열 번호 43) (여기서, $X_1$은 Leu이고; $X_2$는 Ala 및 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, $X_3$은 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다);

[0498] e) NF$X_1$LTQPHSVSESPGKTVTISCRETELSRRLHYVRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSF$X_2$STNPWV FGGGTKLTVL (서열 번호 49) (여기서, $X_1$은 Leu이고, $X_2$는 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다); 및

[0499] f) NF$X_1$LTQPHSVSESPGKTVTISCRGTGSSFHHKYVRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSF$X_2$STNPWV FGGGTKLTVL (서열 번호 52) (여기서, $X_1$은 Leu이고, $X_2$는 Gln, Glu 및 Ala로 이루어진 그룹으로부터 선택된다)

[0500] 을 포함하는 항원 결합 분자 (예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편)가 제공된다.

[0501] 한 구현예에서, 항원-결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 변이체 또는 단편이 제공되며, 여기서, 항원-결합 분자는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고:

[0502] a) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 VL;

[0503] b) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VL;

[0504] c) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VL;

[0505] d) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 VL;

[0506] e) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 17의 아미노산을 포함하는 VL;

[0507] f) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VL;

[0508] 임의로, Met 잔기는 각각 독립적으로 Ala 및 Leu로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산으로 치환되고, Asp 잔기는 각각 독립적으로 Ala, Gln 및 Glu로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산으로 치환된다.

[0509] 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 변이체 항원-결합 분자는 변이체 항원-결합 분자가 유래하는 항원-결합 분자의 기능적 활성 (예를 들어, 우선적인 pH 결합 EC50, IC50 및/또는 Kd)을 유지할 수 있다. 본 발명의 변이체 항원-결합 분자는 이들이 유래하는 항원-결합 분자에 대해 기재된 것과 동일한 방식으로 사용되고 제형화될 수 있다.

[0510] **본 발명의 다른 항원 결합 분자**

[0511] 본 발명은 또한 하기 CDRH 및 CDRL 서열을 갖는 항-PD-L1 항원 결합 분자를 제공한다:

[0512]

| | | |
|---|---|---|
| 경쇄 | CDR1 | $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}YX_{11}X_{12}$ |
| | CDR2 | EDDQRPS |
| | CDR3 | QSFX$_{13}$STNPWV |
| 중쇄 | CDR1 | SYGMY |
| | CDR2 | VISYX$_{14}$GSNKYYAX$_{15}$SVKG |
| | CDR3 | GALTHWGVVIGX$_{16}$GMDV |

[0513] 여기서, 각각의 $X_1$ 내지 $X_{16}$은 임의의 아미노산, 바람직하게는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다.

[0514] 바람직한 구현예에서, 각각의 $X_1$ 내지 $X_{16}$은 T, I, V, M, R, S, L, E, G, N, D, P, A, H, F, K, Y, Q로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된다.

[0515] 한 구현예에서:

[0516] $X_1$은 A, L, T, I, V, M, R 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0517] $X_2$는 R, S, L, E, G 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0518] $X_3$은 S, N, T 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0519] $X_4$는 S, D, P, G, E 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0520] $X_5$는 G, V, R, T, L 및 S 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0521] $X_6$은 S, P, T, G 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0522] $X_7$은 I, A, H, N, R, F 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0523] $X_8$은 A, S, K, R, H 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0524] $X_9$는 S, G, L, H 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0525] $X_{10}$은 N, H, K 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0526] $X_{11}$은 V, H, Y, T 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0527] $X_{12}$는 Q, R 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0528] $X_{13}$은 D, Q, E, A 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0529] $X_{14}$는 D, Q, E, A 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0530] $X_{15}$는 D, Q, E, A 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0531] $X_{16}$은 D, Q, E, A 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0532] 한 구현예에서:

[0533] $X_1$은 A, L, T, I, V, M 및 R로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0534] $X_2$는 R, S, L, E 및 G로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0535] $X_3$은 S, N 및 T로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0536] $X_4$는 S, D, P, G 및 E로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0537] $X_5$는 G, V, R, T, L 및 S로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0538] $X_6$은 S, P, T 및 G로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0539] $X_7$은 I, A, H, N, R 및 F로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0540] $X_8$은 A, S, K, R 및 H로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0541] $X_9$는 S, G, L 및 H로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0542] $X_{10}$은 N, H 및 K로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0543] $X_{11}$은 V, H, Y 및 T로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0544] $X_{12}$는 Q 및 R로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0545] $X_{13}$은 D, Q, E 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0546] $X_{14}$는 D, Q, E 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0547] $X_{15}$는 D, Q, E 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0548] $X_{16}$은 D, Q, E 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0549] 한 구현예 (서열 번호 57)에서:

[0550] $X_1$은 A, L, T, I, V 및 R로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0551] $X_2$는 R, S, L, E 및 G로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0552] $X_3$은 S, N 및 T로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0553] $X_4$는 S, D, P, G 및 E로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0554] $X_5$는 G, V, R, T, L 및 S로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0555] $X_6$은 S, P, T 및 G로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0556] $X_7$은 I, A, H, N, R 및 F로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0557] $X_8$은 A, S, K, R 및 H로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0558] $X_9$는 S, G, L 및 H로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0559] $X_{10}$은 N, H 및 K로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0560] $X_{11}$은 V, H, Y 및 T로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0561] $X_{12}$는 Q 및 R로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0562] $X_{13}$은 Q, E 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0563] $X_{14}$는 Q, E 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0564] $X_{15}$는 Q, E 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0565] $X_{16}$은 Q, E 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0566] 그러한 항체는 바람직하게는 8B06, 8D06, 8G08, 8A04, 8D04 또는 2A09 중 하나 이상의 기능적 프로파일을 가질 수 있다.

[0567] 본 발명은 또한 하기 VH 및 VL 서열을 갖는 항-PD-L1 항원 결합 분자를 제공하고:

[0568] VH:

[0569] QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMYWVRQAPGKGLEWVAVISYX$_1$GSNKYYAX$_2$SVKGRFTISRDNSKNTLNLQMNSLRAEDTAVYYCAKGAL THWGVVIGX$_3$GMDVWGQGTTVTVSS

[0570] VL:
NFX$_4$LTQPHSVSESPGKTVTISCX$_5$X$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$X$_{14}$YX$_{15}$X$_{16}$WYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADY YCQSFX$_{17}$STNPWVFGGGTKLTVL

[0571] 여기서, 각각의 X$_1$ 내지 X$_{17}$은 임의의 아미노산, 바람직하게는 임의의 자연 발생 아미노산일 수 있다 (즉, VH 서열은 서열 번호 53을 포함하고, VL 서열은 서열 번호 58을 포함한다).

[0572] 바람직한 구현예에서, 각각의 X$_1$ 내지 X$_{17}$은 T, I, V, M, R, S, L, E, G, N, D, P, A, H, F, K, Y, Q로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된다 (즉, VH 서열은 서열 번호 54를 포함하고, VL 서열은 서열 번호 59를 포함한다).

[0573] 한 구현예에서:

[0574] X$_1$은 D, Q, E, A 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0575] X$_2$는 D, Q, E, A 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0576] X$_3$은 D, Q, E, A 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0577] X$_4$는 M, L, 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0578] X$_5$는 A, L, T, I, V, M, R 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0579] X$_6$은 R, S, L, E, G 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0580] X$_7$은 S, N, T 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0581] X$_8$은 S, D, P, G, E 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0582] X$_9$는 G, V, R, T, L 및 S 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0583] X$_{10}$은 S, P, T, G 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0584] X$_{11}$은 I, A, H, N, R, F 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0585] X$_{12}$는 A, S, K, R, H 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0586] X$_{13}$은 S, G, L, H 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0587] X$_{14}$는 N, H, K 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0588] X$_{15}$는 V, H, Y, T 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0589] X$_{16}$은 Q, R 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0590] X$_{17}$은 D, Q, E, A 또는 이의 보존적 아미노산 치환으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다

[0591] (즉, VH 서열은 서열 번호 55를 포함하고, VL 서열은 서열 번호 60을 포함한다).

[0592] 한 구현예에서:

[0593] X$_1$은 D, Q, E 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0594] X$_2$는 D, Q, E 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0595] $X_3$은 D, Q, E 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0596] $X_4$는 M 및 L로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0597] $X_5$는 A, L, T, I, V, M 및 R로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0598] $X_6$은 R, S, L, E 및 G로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0599] $X_7$은 S, N 및 T로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0600] $X_8$은 S, D, P, G 및 E로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0601] $X_9$는 G, V, R, T, L 및 S로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0602] $X_{10}$은 S, P, T 및 G로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0603] $X_{11}$은 I, A, H, N, R 및 F로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0604] $X_{12}$는 A, S, K, R 및 H로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0605] $X_{13}$은 S, G, L 및 H로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0606] $X_{14}$는 N, H 및 K로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0607] $X_{15}$는 V, H, Y 및 T로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0608] $X_{16}$은 Q 및 R로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0609] $X_{17}$은 D, Q, E 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택된다

[0610] (즉, VH 서열은 서열 번호 56을 포함하고, VL 서열은 서열 번호 61을 포함한다).

[0611] 한 구현예에서:

[0612] $X_1$은 Q, E 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0613] $X_2$는 Q, E 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0614] $X_3$은 Q, E 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0615] $X_4$는 L이고;

[0616] $X_5$는 L, T, I, V, M 및 R로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0617] $X_6$은 S, L, E 및 G로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0618] $X_7$은 N 및 T로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0619] $X_8$은 D, P, G 및 E로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0620] $X_9$는 V, R, T, L 및 S로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0621] $X_{10}$은 P, T 및 G로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0622] $X_{11}$은 A, H, N, R 및 F로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0623] $X_{12}$는 S, K, R 및 H로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0624] $X_{13}$은 G, L 및 H로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0625] $X_{14}$는 H 및 K로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0626] $X_{15}$는 H, Y 및 T로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0627] $X_{16}$은 R이고;

[0628] $X_{17}$은 E 및 A로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0629] (즉, VH 서열은 서열 번호 57을 포함하고, VL 서열은 서열 번호 62를 포함한다).

[0630] **항원-결합 분자를 암호화하는 핵산 서열**

[0631] 본 발명의 한 측면에서, 이의 단편 및 변이체를 포함하는, 본 발명의 항원 결합 분자를 암호화 핵산 서열이 제공된다.

[0632] 한 구현예에서, 아미노산 서열 번호 5와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 번호 15, 서열 번호 11, 서열 번호 9, 서열 번호 13, 서열 번호 17, 서열 번호 1로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 PD-L1에 결합하는 항원 결합 분자를 암호화하는 뉴클레오티드가 제공된다.

[0633] 한 구현예에서, 아미노산 서열 번호 5를 갖는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 번호 15, 서열 번호 11, 서열 번호 9, 서열 번호 13, 서열 번호 17, 서열 번호 1로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 PD-L1에 결합하는 항원 결합 분자를 암호화하는 뉴클레오티드가 제공된다.

[0634] 또한, 본 발명은 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 본원에 개시된 모든 변이체 항체 서열을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다.

[0635] 또한, 서열 1 내지 62 중 임의의 하나에 따른 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자가 제공된다.

[0636] 또한, 본 발명의 항원-결합 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 플라스미드 및 벡터가 제공된다. 핵산은 특히 진핵생물 발현 시스템, 보다 구체적으로 포유동물 세포주에서의 발현을 위해 플라스미드 또는 벡터에 혼입될 수 있다. 따라서, 또한, HEK 세포, NS0 뮤린 골수종 세포 또는 CHO 세포와 같은 본 발명의 플라스미드 또는 벡터로 형질감염된 숙주 세포가 제공된다.

[0637] 또한, 세포 내부에서 플라스미드 또는 벡터의 암호화 핵산 서열을 발현하는 조건 하에 세포 배양 배지에서 본 발명의 숙주를 배양하는 단계를 포함하여, 항-PD-L1 항원 결합 분자의 생성 방법이 제공된다. 상기 방법은 세포 배양 상청액으로부터 항-PD-L1 항원 결합 분자를 수득하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 플라스미드 또는 벡터로 세포를 형질감염시키는 단계를 포함하여, 항-PD-L1 항원 결합 분자를 발현하는 세포를 생성하는 방법이 제공된다. 이어서, 상기 세포는 항원-결합 분자의 생성을 위해 배양될 수 있다.

[0638] **항원**

[0639] 본 발명의 항원-결합 분자는 PD-L1, 특히 인간 PD-L1 또는 hPD-L1에 특이적으로 결합한다. 본 발명의 항원-결합 분자는 또한 시노몰구스 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 항원-결합 분자는 인간 PD-L1에 특이적으로 결합한다.

[0640] 본 발명의 항원 결합 분자는 일반적으로 마우스 PD-L1에 결합하지 않는다. PD-L1 (프로그램화된 사멸-리간드 1)은 억제 수용체 PD-1 (프로그램화된 사멸 1 폴리펩티드)에 대해 기술된 두 리간드 중 하나이다. PD-L1은 적응 면역 시스템을 억제하는 데 관여하는 1형 막관통 단백질이다. PD-L1의 상향 조절은 암이 면역 시스템을 피하게 할 수 있다.

[0641] PD-L1은 B 세포, 수지상 세포, 대식세포 및 T 세포와 같은 면역 세포에서 낮은 수준으로 발현되며 활성화 후 상향조절된다. PD-L1은 또한 내피 세포, 심장, 폐, 췌장, 근육, 각질세포 및 태반과 같은 비림프성 기관에서 발현된다. 비림프성 조직 내에서의 발현은 PD-L1이 말초 조직의 골수성 세포뿐만 아니라 자가-반응성 T 및 B 세포의 기능을 조절할 수 있거나 표적 기관의 염증 반응을 조절할 수 있음을 시사한다. PD-L1 발현은 주로 내피 및 상피 세포에서 PD-L1의 주요 조절자인 1형 및 2형 인터페론에 의해 조절된다. PD-L1은 다양한 인간 암에 풍부하며 PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용은 종양 침윤 림프구의 감소, T-세포 수용체 매개된 증식의 감소 및 암세포에 의한 면역 회피를 초래한다. PD-L1은 종양 샘플에서 발현되며 불량한 예후와 관련이 있다. 면역 억제는

PD-1과 PD-L1의 국소 상호작용을 억제함으로써 역전될 수 있다. PD-L1 신호전달의 억제는 암 치료를 위한 T 세포 면역을 향상시키는 것으로 나타났다.

[0642] 본 발명의 항원-결합 분자가 결합하는 인간 PD-L1의 아미노산 서열이 이하에 제공된다.

[0643] **인간 PD-L1 (NCBI 참조 서열: NP_054862.1)**

[0644] **아미노산 서열 (서열 번호 19)**

[0645] MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQIT
DVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTN
EIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET

[0646] 본 발명의 항-PD-L1 항원 결합 분자는 pH 의존적 방식으로 PD-L1에 특이적으로 결합한다.

[0647] 한 구현예에서, 본 발명의 항-PD-L1 항원 결합 분자는 pH 의존적 방식으로, 예를 들어, 1가 형식일 때 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 1가 형식은 Fab 단편과 같은 형식을 포함한다. 이것은 단일클론 항체보다 적은 (예를 들어, 대략 100배 미만) Fab의 친화성 및/또는 CDR 내로의 히스티딘 잔기의 존재로 인한 것일 수 있다고 가정된다.

[0648] 본 발명의 항원 결합 분자는 생리학적 pH (약 pH 7.4)와 비교하여 산성 pH (약 pH 6.0)에서 PD-L1에 대해 유의하게 더 높은 친화도를 입증하였다. 이는 pH 특이적 결합을 나타내지 않고 많은 것이 실제로 pH 7.4와 비교하여 pH 6.0에서 더 낮은 친화도를 나타내는 당업계에 알려진 다른 PD-L1 결합 분자와 대조된다.

[0649] 본 발명의 항원 결합 분자는 또한 억제의 명확한 pH 의존성을 입증하였다. 본 발명의 항원 결합 분자는 생리학적 pH (약 pH 7.4)와 비교하여 산성 pH (약 pH 6.0)에서 PD-L1에 대한 억제 활성이 유의하게 더 많다. pH 7.4에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 PD-L1에 대한 억제 활성이 거의 없다. 이것은 억제의 pH 의존성을 나타내지 않는 당업계에 알려진 다른 PD-L1 결합 분자와 대조된다.

[0650] 이러한 pH 특이적 결합은 종양 및 이들의 미세환경이 산성 (예를 들어, 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.5)이기 때문에 중요하다. 따라서, pH 6 내지 6.5 (종양의 산성 pH)에서 최대 활성을 갖고 생리학적 pH 7.4에서 감소된 활성을 갖는 항-PD-L1 결합 분자는 말초 관문 억제제 치료 독성 및 기타 부작용을 감소시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 항원-결합 분자는 잠재적 항암제로서 특히 유용하다.

[0651] 따라서, PD-L1에 결합하는 본 발명의 항원-결합 분자는 PD-L1을 발현하는 세포에도 결합할 것이다.

[0652] <u>EC50</u>

[0653] 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 pH 6.0에서 약 15 nM 미만의 PD-L1 또는 PD-L1 양성 세포에 대한 EC50 값을 갖는다. 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 pH 6.0에서 약 1.45 nM 내지 약 15 nM의 PD-L1에 대한 EC50 값을 갖는다.

[0654] 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 pH 7.4에서 적어도 약 10 nM의 PD-L1에 대한 EC50 값을 갖는다. 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 pH 7.4에서 약 13.2 nM 내지 약 100 nM의 PD-L1에 대한 EC50 값을 갖는다.

[0655] 본 발명의 항원 결합 분자는 생리학적 pH (pH 7.4)보다 산성 pH (pH 6.0)에서 PD-L1에 결합할 때 유의하게 더 높은 효능 (EC50)을 갖는다. 본 발명의 항원 결합 분자는 적어도 약 5의 pH 6.0:7.4 결합 비를 갖는데, 이는 pH 6.0에서 EC50이 pH 7.4에서보다 적어도 약 5배 낮고 항원 결합 분자가 pH 7.4에서보다 pH 6.0에서 적어도 약 5배 더 강력하다는 것을 의미한다.

[0656] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 pH 6.0에서 PD-L1에 대한 EC50 값이 약 15 nM 미만이고, pH 7.4에서 PD-L1에 대한 EC50 값이 적어도 약 10 nM이고, 여기서, 항원 결합 분자는 적어도 약 5의 pH 6.0:7.4 결합 비를 갖는다.

[0657] 용어 EC50은 당업자에게 잘 알려져 있으며 약물 또는 물질의 최대 유효 농도의 절반 또는 명시된 노출 시간 후 최대 반응과 기준선 사이의 중간 반응을 유도하는 물질의 농도를 나타낸다. EC50은 효능의 척도이다. EC50이 낮을수록 약물 또는 물질의 효능이 커진다. EC50은 당업자에게 알려진 임의의 적합한 수단에 따라 측정될 수 있다.

[0658] 세포 결합 검정에서, EC50은 약 4℃에서 약 60분 동안 0.60E05 MDA-MB-231 세포와 인큐베이션한 후 기준선과 최

대 사이의 약 중간 반응 (MFI)을 유도하는 Fab의 농도를 지칭할 수 있다. ELISA 검정에서, EC50은 실온 (예를 들어, 약 15℃ 내지 약 25℃)에서 약 2시간 동안 잘 코팅된 약 1 μg/ml의 인간 PD-L1-Fc 단백질로 인큐베이션한 후 기준선과 최대 사이의 약 중간 반응을 유도하는 Fab의 농도를 지칭할 수 있다.

[0659] IC50

[0660] 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 pH 6.0에서 약 50 nM 미만의 PD-L1:PD-1 결합을 억제하기 위한 IC50 값을 갖는다. 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 pH 6.0에서 약 12.1 nM 내지 약 42.3 nM의 PD-L1에 대한 EC50 값을 갖는다.

[0661] 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 pH 7.4에서 적어도 약 50 nM의 PD-L1:PD-1 결합을 억제하기 위한 IC50 값을 갖는다. 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 pH 7.4에서 약 81.2 nM 내지 약 100 nM의 PD-L1에 대한 IC50 값을 갖는다.

[0662] 본 발명의 항원 결합 분자는 생리학적 pH (pH 7.4)보다 산성 pH (pH 6.0)에서 PD-L1:PD-1 결합에 대해 유의하게 더 높은 억제 활성 (IC50)을 갖는다. 본 발명의 항원 결합 분자는 적어도 2의 pH 6.0:7.4 억제 비를 갖는데, 이는 pH 6.0에서 IC50이 pH 7.4에서보다 적어도 2배 낮고 항원 결합 분자가 pH 7.4에서보다 pH 6.0에서 억제에서 적어도 5배 더 강력하다는 것을 의미한다.

[0663] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 pH 6.0에서 PD-L1에 대한 IC50 값이 약 50 nM 미만이고, pH 7.4에서 PD-L1에 대한 IC50 값이 적어도 약 50 nM이고, 여기서, 항원 결합 분자는 적어도 약 2의 pH 6.0:7.4 억제 비를 갖는다.

[0664] 용어 IC50은 당업자에게 잘 알려져 있으며 약물 또는 물질의 최대 억제 농도의 절반 또는 50% 억제를 유도하는 물질의 농도를 지칭한다. IC50은 특정 생물학적 또는 생화학적 기능을 억제하는 물질의 효능을 측정한 것이다. IC50이 낮을수록 길항제 또는 억제제로서의 물질의 효능이 커진다. IC50은 당업자에게 알려진 임의의 적절한 수단에 따라 측정될 수 있다. 예를 들어, PD-L1-PD-1 억제 ELISA에서, IC50은 약 1 μg/ml의 PD-1-Fc 단백질로 코팅된 웰에 대한 약 1 μg/ml의 PD-L1 비오틴 결합을 억제하는 Fab의 최대 억제 농도의 절반일 수 있다.

[0665] 물론, 항체의 임의의 기능적 특징에 대해, 기능적 특징의 비교는 pH 변화의 영향이 측정되기 때문에 pH를 제외하고는 실질적으로 동일한 실험 조건 하에 수행된다. 기능적 특징 (예컨대 IC50, EC50 또는 $K_D$)을 측정하는 검정의 다른 특징은 이것이 가능한 한 동일하게 유지된다.

[0666] 본 발명의 일부 구현예에서, 본 발명자들은 항원 결합 분자가 억제 수용체 프로그램화된 사멸 1 폴리펩티드 (PD-1) 및 공동-자극 분자 CD80에 결합하는 PD-L1과 경쟁한다는 것을 발견하였다. PD-L1은 다양한 인간 암에 풍부하고 PD-1과 PD-L1 간의 상호작용은 종양 침윤 림프구의 감소, T-세포 수용체 매개된 증식의 감소 및 암 세포에 의한 면역 회피를 초래하기 때문에 이 메커니즘이 관련이 있다. 면역 억제는 PD-1과 PD-L1의 국소 상호작용을 억제함으로써 역전될 수 있다. PD-L1 신호전달의 억제는 암 치료를 위한 T 세포 면역을 향상시키는 것으로 나타났다. 본 발명의 항원 결합 분자는 PD-L1 및 이의 수용체의 결합을 적어도 40%, 적어도 50% 또는 적어도 80% 억제한다.

[0667] 본 발명자들은 또한 본 발명의 항원 결합 분자는 PD-L1 발현 세포가 PD-1 및/또는 CD80에 결합하는 것을 억제한다는 것을 발견하였다.

[0668] 본 발명의 항원 결합 분자의 pH-민감성 결합 성질은 생리학적 pH (예를 들어, 약 pH 7.4)에서보다 산성 pH에서 (예를 들어, pH 6에서) 적어도 5배 더 높은 친화도를 갖는 항원 결합 분자를 초래할 수 있다. 에피토프에 대한 본 발명의 항원 결합 분자의 친화도는 표면 플라즈몬 공명 (SPR)을 사용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, BIAcore SPR 시스템 (BIAcore 3000, GE Healthcare)이 사용될 수 있다. BIAcore 시스템은 분자 상호작용을 실시간으로 모니터링하는 데 사용되며 감지 원리는 센서 표면으로부터 약 150 nm 이내의 굴절률 변화에 민감한 표면 플라즈몬 공명 (SPR)을 기반으로 한다. 예를 들어, PD-L1-Fc는 표면에 부착될 수 있고 시험 항-PD-L1 항원 결합 분자는 샘플 용액의 연속적인 유동에서 표면을 통과할 수 있다. SPR 응답은 표면에 가까운 질량 농도의 변화에 정비례하고 동력학 파라미터는 센소그램의 회합 및 회합 단계로부터 평가된다.

[0669] 한 측면에서, 항-PD-L1 항원 결합 분자, 예를 들어, 항체, 이의 단편 또는 변이체가 제공되며, 여기서, 항원 결합 분자는 PD-L1에 대한 결합에 대해 상기 정의된 본 발명의 항원 결합 분자와 경쟁한다.

[0670] 예를 들어, 한 구현예에서, 본 발명은 항원 결합 분자가 PD-L1, 특히 인간 PD-L1에 특이적으로 결합하고, PD-L1

에 대한 결합에 대해 8B06, 8D06, 8G08, 8A04, 8D04 및 2A09로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체와 경쟁하는 항원 결합 분자 (바람직하게는 항체)를 제공한다. PD-L1에 대한 결합에 대해 단편 및 이의 변이체와 경쟁하는 항원 결합 분자가 또한 제공된다 (예를 들어, 상기 항체의 6개의 CDR 영역 또는 VH 및 VL 서열을 포함하는 항원-결합 분자, 및 기타 변이체).

[0671] 시험 항체가 본 발명의 항체에 의해 결합된 에피토프와 동일한 에피토프에 대한 결합에 대해 경쟁할 수 있는지를 결정하기 위해, 교차-차단 검정, 예를 들어, 경쟁적 ELISA 분석을 수행할 수 있다. 예시적인 경쟁적 ELISA 검정에서, 미세역가 플레이트의 PD-L1 코팅된 웰, 또는 PD-L1-코팅된 세파로스 비드를 후보 경쟁 항체와 함께 또는 없이 사전 인큐베이션한 다음, 본 발명의 비오틴-표지된 항-PD-L1 항체를 첨가한다. 웰 또는 비드 상의 PD-L1 항원에 결합된 표지된 항-PD-L1 항체의 양은 아비딘 퍼옥시다제 접합체 및 적절한 기질을 사용하여 측정할 수 있다.

[0672] 대안적으로, 항-PD-L1 항체는, 예를 들어, 방사성 또는 형광성 표지 또는 일부 다른 검출 가능하고 측정 가능한 표지로 표지될 수 있다. 항원에 결합하는 표지된 항-PD-L1 항체의 양은 항원 상의 동일한 에피토프에 대한 결합에 대해 경쟁하는 후보 경쟁 항체 (시험 항체)의 능력과 역 상관관계를 가질 것이며, 즉, 동일한 에피토프에 대한 시험 항체의 친화도가 클수록 덜 표지된 항-PD-L1 항체가 항원-코팅된 웰에 결합될 것이다. 후보 경쟁 항체는 후보 경쟁 항체가 후보 경쟁 항체의 부재하에 (그러나, 알려진 비경쟁 항체의 존재 하에 있을 수 있음) 병렬로 수행된 대조군과 비교하여 항-PD-L1 항체의 결합을 적어도 20%, 바람직하게는 적어도 20 내지 50%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 50% 차단할 수 있는 경우 동일한 에피토프에 실질적으로 결합하거나 본 발명의 항-PD-L1 항체와 동일한 에피토프에 대한 결합에 대해 경쟁하는 항체로 간주된다. 이 검정의 변형이 동일한 정량적 값에 도달하도록 수행될 수 있음을 이해해야 한다.

[0673] 또한, PD-L1에 특이적으로 결합하고 PD-L1이 본 발명의 항원-결합 분자에 결합하는 것을 억제하는 항원 결합 분자가 제공된다.

[0674] 예를 들어, 한 구현예에서, 항원-결합 분자 (바람직하게는 항체)는 PD-L1에 특이적으로 결합하고 8B06, 8D06, 8G08, 8A04, 8D04 및 2A09로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체에 대한 PD-L1의 결합을 억제한다. PD-L1에 특이적으로 결합하고 단편 및 이의 변이체에 대한 PD-L1의 결합을 억제하는 항원 결합 분자가 또한 제공된다 (예를 들어, 상기 항체의 6개의 CDR 영역 또는 VH 및 VL 서열을 포함하는 항원-결합 분자, 및 기타 변이체).

[0675] 또한, 본 발명의 항원-결합 분자에 의해 결합하는 PD-L1의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원-결합 분자가 제공된다.

[0676] 예를 들어, 한 구현예에서, 본 발명은 8B06, 8D06, 8G08, 8A04, 8D04 및 2A09로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체에 의해 결합되는 PD-L1의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원-결합 분자 (바람직하게는 항체)를 제공한다. 단편 및 이의 변이체에 의해 결합되는 PD-L1의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원 결합 분자가 또한 제공된다 (예를 들어, 상기 항체의 6개의 CDR 영역 또는 VH 및 VL 서열을 포함하는 항원-결합 분자, 및 기타 변이체)

[0677] **조성**

[0678] 본 발명의 한 측면에서, 본 발명의 항원 결합 분자를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0679] 본 발명의 이러한 측면에 따른 조성물은 임의의 편리한 경로에 의해 사용하기 위해 제형화될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 일반적으로 본 발명의 항원 결합 분자에 이외에, 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제, 보조제, 비히클, 완충제 또는 안정화제를 포함할 것이다. 그러한 담체는 염수, 완충 염수, 덱스트로스, 리포솜, 물, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜, 에탄올 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0680] 약제학적 조성물은 환자에게 이를 투여하는 원하는 방법에 따라 임의의 적합한 형태일 수 있다.

[0681] 본 발명의 약제학적 조성물은 용량당 각 활성 성분의 미리 결정된 양을 함유하는 단위 용량 형태로 제공될 수 있다. 그러한 단위는 0.5 내지 50 mg/kg의 화합물, 바람직하게는 1 내지 10 mg/kg, 1 내지 5 mg/kg, 5 내지 10 mg/kg 또는 10 내지 50 mg/kg을 제공하도록 조정될 수 있다. 그러한 용량은 단일 용량으로 또는 다수의 개별 용량으로 제공될 수 있다. 물론 최종 용량은 치료되는 병태, 투여 경로, 환자의 연령, 체중 및 병태에 따라 달라질 것이며 의사의 재량에 달라질 것이다.

[0682] 본 발명의 약제학적 조성물은 임의의 적절한 경로, 예를 들어 경구 (협측 또는 설하 포함), 직장, 비강, 국소

(협측, 설하 또는 경피 포함), 질 또는 비경구 (피하, 근육내, 정맥내 또는 피내 포함) 경로에 의한 투여에 적합할 수 있다. IV 투여가 바람직할 수 있다. 그러한 제형은 약학 분야에 알려진 임의의 방법, 예를 들어, 활성 성분을 담체(들) 또는 부형제(들)와 회합시킴으로써 제조될 수 있다.

[0683] 경구 투여에 적합한 약제학적 제형은 캡슐 또는 정제; 분말 또는 과립; 수성 또는 비수성 액체 중 용액 또는 현탁액; 식용 폼 또는 휘프 (whip); 또는 수중유 액체 에멀젼 또는 유중수 액체 에멀젼과 같은 개별 단위로 제시될 수 있다.

[0684] 경피 투여에 적합한 약제학적 제형은 장기간 동안 수용자의 표피와 긴밀한 접촉을 유지하도록 의도된 개별 패치로서 제공될 수 있다. 예를 들어, 활성 성분은 일반적으로 문헌 (Pharmaceutical Research, 3(6), 318 (1986))에 기재된 바와 같이 이온도입법 (iontophoresis)에 의해 패치로부터 전달될 수 있다.

[0685] 국소 투여에 적합한 약제학적 제형은 연고, 크림, 현탁액, 로션, 분말, 용액, 페이스트, 겔, 스프레이, 에어로졸 또는 오일로서 제형화될 수 있다

[0686] 눈 또는 기타 외부 조직, 예를 들어, 입 및 피부에 적용하기 위해, 제형은 바람직하게는 국소 연고 또는 크림으로서 적용된다. 연고로 제형화될 때, 활성 성분은 파라핀계 또는 수혼화성 연고 베이스와 함께 사용될 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 수중유 크림 베이스 또는 유중수 베이스와 함께 크림으로 제형화될 수 있다.

[0687] 눈에 국소 투여하기에 적합한 약제학적 제형은 활성 성분이 적합한 담체, 특히 수용매에 용해되거나 현탁된 점안액을 포함한다.

[0688] 구강 내 국소 투여에 적합한 약제학적 제형은 로젠지, 향정 및 구강 세척제를 포함한다.

[0689] 직장 투여에 적합한 약제학적 제형은 좌약 또는 관장제로 제공될 수 있다.

[0690] 담체가 고체인 비강 투여용 약제학적 제형은 코로 들어마시는 것 (snuff)을 취하는 방식으로, 즉, 코 가까이에 든 분말 용기로부터 비강을 통해 빠르게 흡입함으로써 투여되는, 예를 들어, 20 내지 500 미크론 범위의 입자 크기를 갖는 조악한 분말을 포함한다. 비강 스프레이 또는 비강 점적제로서 투여하기 위한 담체가 액체인 적합한 제형은 활성 성분의 수용액 또는 오일 용액을 포함한다.

[0691] 흡입에 의한 투여에 적합한 약제학적 제형은 다양한 유형의 계량 용량 가압 에어로졸, 분무기 또는 취입기에 의해 생성될 수 있는 미세 입자 먼지 또는 미스트를 포함한다.

[0692] 질 투여에 적합한 약제학적 제형은 페서리, 탐폰, 크림, 겔, 페이스트, 폼 또는 스프레이 제형으로서 제공될 수 있다.

[0693] 비경구 투여에 적합한 약제학적 제형은 항산화제, 완충제, 정균제 및 제형을 의도된 수용자의 혈액과 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 주사 용액; 및 현탁제 및 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 포함한다. 제형은 단위 용량 또는 다중 용량 용기, 예를 들어, 밀봉된 앰플 및 바이알로 제공될 수 있으며, 사용 직전에 멸균 액체 담체, 예를 들어, 주사용수의 첨가만을 필요로 하는 동결 건조된 (동결건조된) 상태로 보관할 수 있다. 즉석 주사 용액 및 현탁액은 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다.

[0694] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 본 발명의 분자 이외에 하나 이상의 다른 치료 활성제를 함유할 수 있다.

[0695] 일부 구현예에서, 활성 약물 농축물의 제형은 약제학적으로 허용되는 등장화제, 완충제, 및 약제학적으로 허용되는 계면활성제를 포함할 수 있다.

[0696] 대안적으로, 제형은 활성 성분 + 인산나트륨, 일염기성, 이염기성 인산나트륨, 염화나트륨, 폴리소르베이트 80 또는 폴리소르베이트 20 (진탕-유도된 응집의 위험을 최소화하기 위한 계면활성제) 및 물 (USP/Ph.Eur)을 포함할 수 있으며, 임의로 pH를 약 6.0 내지 7.0, 예를 들어, 약 6.5로 조정한다.

[0697] 바람직한 단위 투여 제형은 활성 성분의 상기 인용된 바와 같은 1일 용량 또는 하위 용량, 또는 이의 적절한 분획을 함유하는 것들이다.

[0698] 특히 상기 언급된 성분 이외에, 제형은 또한 해당 제형의 유형과 관련하여 당업계에서 통상적인 다른 제제를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 경구 투여에 적합한 제형은 향미제를 포함할 수 있음을 이해해야 한다.

[0699] **치료 방법**

[0700] 본 발명의 항원 결합 분자는 PD-L1-매개된 장애 또는 질환, 특히 암을 예방 및/또는 치료하는데 유용하다. 따라서, 본 발명의 이러한 측면은 또한 대상체에게 본 발명의 항원 결합 분자를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 PD-L1-매개된 장애 또는 질환 (예컨대 암)을 치료하는 방법을 포함한다. 따라서, 본 발명은 또한 PD-L1-매개된 장애 또는 질병 (예컨대 암)의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 약제의 제조에서 본 발명의 항원 결합 분자의 용도, 및 그러한 병태의 예방 및/또는 치료에 있어서의 본 발명의 항원-결합 분자의 용도로 확장된다.

[0701] 치료 방법은 인간 또는 동물 대상일 수 있으며 본 발명은 인간 및/또는 수의학 둘 모두에서의 용도로 동등하게 확장된다. 본 발명의 항원 결합 분자는 바람직하게는 "치료학적 유효량"으로 개체에게 투여되며, 이는 개체에게 이익을 나타내기에 충분하다. 본원에 사용된 바와 같이, "치료"는 인간 또는 인간이 아닌 동물, 바람직하게는 포유동물에게 도움이 될 수 있는 임의의 요법을 포함한다. 치료는 기존 병태와 관련되거나 예방적 (prophylactic) (예방적 (preventative) 치료)일 수 있다. 방법은 시험관내 방법일 수 있다. 방법은 생체내 방법일 수 있다.

[0702] 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 시험관내 또는 생체내 투여될 때 T 세포 면역성을 향상시킨다.

[0703] 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 시험관내 또는 생체내 투여될 때 면역 억제를 역전시킨다.

[0704] 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 면역관문 억제제이다.

[0705] 한 구현예에서, 본 발명의 항원 결합 분자는 암 예방의 치료에 사용하기 위한 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, "암"은 비정상 세포의 통제되지 않은 분열에 의해 야기되는 질환에 관한 것이다. 여기에는 심장, 육종 (혈관육종, 섬유육종, 횡문근육종, 지방육종), 점액종, 횡문근종, 섬유종, 지방종 및 기형종; 폐: 기관지 암종 (편평 세포, 미분화 소세포, 미분화 대세포, 선암종), 폐포 (세기관지) 암종, 기관지 선종, 육종, 림프종, 연골성 과오종, 중피중; 위장관: 식도 (편평 세포 암종, 선암종, 평활근육종, 림프종), 위 (암종, 림프종, 평활근육종), 췌장 (관 선암종, 인슐린종, 글루카곤종, 가스트린종, 카르시노이드 종양, 비포마), 소장 (선암종, 림프종, 카르시노이드 종양, 카포시 육종, 평활근종, 혈관종, 지방종, 신경섬유종, 섬유종), 대장 (선암종, 관상 선종, 융모 선종, 과오종, 평활근종) 결장직장; 비뇨생식관: 신장 (선암종, 빌름스 종양 [신모세포종], 림프종, 백혈병), 방광 및 요도 (편평 세포 암종, 이행 세포 암종, 선암종), 전립선 (선암종, 육종), 고환 (정상피종, 기형종, 배아 암종, 기형암종, 융모막암종, 육종, 간질 세포 암종, 섬유종, 섬유선종, 선종 종양, 지방종); 간: 간암 (간세포 암종), 담관암종 간모세포종, 혈관육종, 간세포 선종, 혈관종; 뼈; 골원성 육종 (골육종), 섬유육종, 악성 섬유성 조직구종, 연골육종, 유잉 육종, 악성 림프종 (세망 세포 육종), 다발성 골수종, 악성 거대 세포 종양 척색종, 골연골종 (골연골 외골증), 양성 연골종, 연골모세포종, 연골점액섬유종, 유골 골종 및 거대 세포 종양; 신경계: 두개골 (골종, 혈관종, 육아종, 황색종, 변형성 골염), 뇌수막 (수막종, 수막육종, 신경교종증), 뇌 (성상세포종, 수모세포종, 신경아교종, 뇌실막종, 배아세포종 [송과체종], 다형성 교모세포종, 희소돌기아교종, 신경초종, 망막모세포종, 선천성 종양), 척수 신경섬유종, 수막종, 신경아교종, 육종); 부인과: 자궁 (자궁내막 암종), 자궁 경관 (자궁경부 암종, 종양전 자궁경부 이형성증), 난소 (난소 암종 [장액성 낭선암종, 점액성 낭선암종, 비분류 암종], 과립막 수막 세포 종양, 세르톨리-라이디히 세포 종양, 이상색식세포종, 악성 기형종), 음문 (편평 세포 암종, 상피내 암종, 선암종, 섬유육종, 흑색종), 질 (투명 세포 암종, 편평 세포 암종, 포도상 육종 (배아 횡문근육종), 나팔관 (암종), 유방; 혈액학:혈액 (골수성 백혈병 [급성 및 만성], 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 골수증식성 질환, 다발성 골수종, 골수이형성증후군), 호지킨병, 비호지킨 림프종 [악성 림프종]; 피부: 악성 흑색종, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 카포시 육종, 두더지 이형성 모반, 지방종, 혈관종, 피부 섬유종, 켈로이드, 건선; 및 부신: 신경모세포종을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 암은 암종, 림프종, 백혈병, 모세포종, 및 육종이다. 그러한 암의 보다 구체적인 예는 편평 세포 암종, 골수종, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 신경아교종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 급성 골수성 백혈병 (AML), 다발성 골수종, 위장관 (관) 암, 신장암, 난소암, 간암, 림프구성 백혈병, 림프구성 백혈병, 결장직장 암, 자궁내막암, 신장암, 전립선암, 갑상선암, 흑색종, 연골육종, 신경모세포종, 췌장암, 다형성 교모세포종, 자궁경부암, 뇌암, 위암, 방광암, 간암, 유방암, 결장 암종, 및 두경부암을 포함한다. 암의 또 다른 특정 예는 신세포 암종을 포함한다. 암의 또 다른 특정 예는 비호지킨 림프종 또는 피부 T-세포 림프종이다.

[0706] 특히 관심 대상은 흑색종, 전이 암, 비-소세포 폐암, 두경부암, 호지킨 림프종, 요로상피 암종, 위암, 자궁경부암, 간세포 암종 및 방광암의 치료 또는 예방이다.

[0707] 한 구현예에서, 암은 흑색종, 전이 암, 비-소세포 폐암, 두경부암, 호지킨 림프종, 요로상피 암종, 위암, 자궁

경부암, 간세포 암종 및 방광암으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0708] 치료 중인 병태에 따라, 본 발명의 항원-결합 분자는 동시, 개별 또는 순차 사용을 위해 다른 약제학적 활성 성분과 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 암을 치료 또는 예방할 때, 본 발명의 항원-결합 분자는 다른 요법 또는 추가의 치료 활성제와 조합하여 사용될 수 있다. 적합한 요법 또는 추가의 치료 활성제는 방사선 요법, 화학요법 치료, 표적 요법, 면역요법, 단일클론 항체 요법, 호르몬 요법, 혈관신생 억제, 암 백신, 종양성 바이러스, 톨 유사 수용체 작용제, 후성유전학적 변형, 조작된 T 세포, T 세포 공동-자극 작용제, 티로신 키나제 억제제, 기타 항암 화학제, 암 치료를 위한 완화 치료, 면역관문 억제제, 면역억제제, 항염증제, 면역 조절제, 면역 활성화제 및/또는 억제제 예컨대, IDO 억제제, CSF-1R 억제제, TGFB 억제제, T 세포 공동-자극 길항제, Treg 억제제, 대식세포 조절제, 자연 살해 세포 조절제 및 케모카인 수용체 억제제를 포함한다.

[0709] 적합한 화학요법 치료는 젬시타빈, 사이클로포스파미드, 독소루비신, 파클리탁셀, 시스플라틴을 포함한다. 적합한 T 세포 공동-자극 작용제는 4-1BB, OX40, CD40, GITR, 및 ICOS를 포함한다. 면역관문 억제제는 PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, VISTA, BTLA, CD70 및 TIGIT로 이루어진 그룹의 구성원에 작용할 수 있다.

[0710] 다른 요법 또는 추가의 치료 활성제는 또 다른 항원 결합 분자일 수 있다. 추가의 항원 결합 분자는 항-PD-L1 항원 결합 분자, 항-PD-1 항원 결합 분자, 항-CTLA-4 항원 결합 분자, 항-OX40 항원 결합 분자, 항-ICOS 항원 결합 분자, 항-GITR 항원 결합 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0711] 본 발명의 약제학적 조성물은 하나 이상의 추가의 약제학적 활성 성분, 예컨대 상기 열거된 것을 포함하도록 제형화될 수 있다. 본 발명의 항원-결합 분자는 키트의 일부로서 제공될 수 있다. 그러한 키트는 사용 지침서 및/또는 추가 약제학적 활성 성분을 포함할 수 있다. 항원-결합 분자 및 추가 약제학적 활성 성분은 키트 내에 별도로 배치될 수 있거나, 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 추가의 약학적 활성 성분과 함께 제형화될 수 있다.

[0712] 본 발명의 한 구현예에서, PD-L1에 특이적으로 결합하는 항체, 특히 1가 항체, 예컨대 Fab 단편이 제공된다. 항체는 8B06, 8D06, 8G08, 8A04, 8D04 및 2A09로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 항체는 암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것이다.

[0713] 이제 본 발명은 예시 목적을 위해 제시되고 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 되는 다수의 특정 실시예를 참조하여 추가로 설명될 것이다.

[0714] **실시예**

[0715] **인간 나이브 라이브러리 작제물:**

[0716] RNA는 6명의 건강한 기증자 (0.5 L의 혈액/공여자)의 PBMC로부터 추출되었다. 240 μg의 RNA는 랜덤 프라이머를 사용한 cDNA 합성에 사용되었다. cDNA를 FR1 VH, Vκ 및 Vλ 및 힌지 CH1 영역에서 어닐링되는 태그가 없는 프라이머를 사용한 1차 PCR 증폭에 사용하고 이어 pCB3 파지미드 벡터에서 VH, Vλ 및 Vκ 유전자의 클로닝을 위한 제한 엔도뉴클레아제 부위를 도입하는 2차 PCR 증폭을 수행하였다. 라이브러리를 TG1 이. 콜리 (*E. coli*) 세포에 전기천공하고 인간 라이브러리의 박테리아 글리세롤 스톡을 -80℃에서 보관하였다 (Human Naive Fab Library Pool H002κ-H007κ and Human Naive Fab library pool H002λ-H007λ).

[0717] **선택: pH 선택적 항-PD-L1 Fab**

[0718] 인간 나이브 Fab 라이브러리 풀 H002κ-H007κ 및 인간 나이브 Fab 라이브러리 풀 H002λ-H007λ로부터의 파지 생산은 교차 반응성 클론의 가능성을 개선하기 위해 인간 PD-L1을 사용한 2회 연속 라운드의 패닝 파지 디스플레이 선택에 사용되었고 이어서 시노몰구스와 마우스 PD-L1 단백질을 사용한 제3 라운드 패닝 선택 및 마우스 PD-L1을 사용한 제4 라운드 패닝에 사용되었다 (인간 및 마우스 PD-L1 Fc는 R&D Systems에서 구입하고, 시노몰구스 PD-L1 Fc는 Sino biogical로부터 구입했다). 모든 선택 라운드는 pH 6.0 (CPA 완충액; 10 mN 시트르산나트륨, 10 mN 인산나트륨, 10 mN 아세트산나트륨, 115 mN 염화나트륨)에서 10 μg/ml의 재조합 PD-L1 단백질을 사용하여 수행되었으며 비특이적 파지를 세척하고 이어서 트립신으로 특정 파지를 용출했다 (전체 용출). 용출된 파지의 연속 희석을 수행하고 기하급수적으로 성장하는 TG1을 감염시키는 데 사용하였다. 감염된 TG1을 LBCarb100 Glu 2% 플레이트에 플레이팅하고 배경에 대해 농축 값을 계산하였다 (선택을 위한 항원 없음).

[0719] **ELISA 스크리닝:**

[0720] 패닝 선택 조건 출력의 제3 및 제4 라운드에서 개별 클론을 96웰 마스터 플레이트에 집어넣고 결합 ELISA를 통

해 pH 6.0 대 pH 7.4에서 인간, 시노몰구스 및 마우스 PD-L1에 대한 결합에 대해 파지 및 주변세포질 추출물(P.E.)로서 시험하였다.

[0721] 파지 결합 ELISA의 경우, MaxiSorp™ 고단백질-결합 용량 96웰 ELISA 플레이트를 4℃에서 밤새 PBS에 희석한 1 μg/ml의 PD-L1-Fc 단백질로 코팅하였다. 다음 날, 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0)로 3회 세척하고 250 μl/웰의 4% Marvel/CPA (pH 6.0)로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 차단 후, 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0)로 3회 세척하고 실온에서 1시간 동안 진탕하면서 90 μl의 1% Marvel/CPA (pH 6.0) 중 10 μl의 파지와 함께 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0)로 3회 세척하고 1시간 동안 실온에서 진탕하면서 1% Marvel/CPA (pH 6.0) 중 100 μl의 항-M13-HRP (GE 카탈로그 번호 27-9421-01)와 함께 웰당 인큐베이션하였다. 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0)로 3회 세척하고 기질 용액 (TMB, ThermoFisher)을 첨가하고 H2SO4 (ThermoFisher)로 반응을 중단하고 450 nm에서 흡광도를 판독하였다.

[0722] 주변세포질 추출물 (P.E.) 결합 ELISA의 경우, MaxiSorpTM 고단백질-결합 용량 96웰 ELISA 플레이트를 4℃에서 밤새 PBS에 희석한 1 μg/ml의 PD-L1-Fc 단백질로 코팅하였다. 다음 날, 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0) 또는 PBS Tween 0.05% pH 7.4로 3회 세척하고, 250 μl/웰의 4% Marvel/CPA (pH 6.0) 또는 4% Marvel/PBS pH 7.4로 실온에서 1시간 동안 차단하였다.

[0723] 차단 후, 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0) 또는 PBS Tween 0.05% (pH 7.4)로 3회 세척하고 실온에서 1시간 동안 진탕하면서 20 μl의 P.E + 80 μl의 1% Marvel/CPA (pH 6.0) 또는 1% Marvel/PBS (pH 7.4)와 함께 웰당 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0) 또는 PBS Tween 0.05% (pH 7.4)로 3회 세척하고 실온에서 1시간 동안 진탕하면서 1% Marvel/CPA (pH 6.0) 또는 1% Marvel/PBS (pH 7.4) 중 100 μl의 항-C-Myc-HRP (Bethyl 카탈로그 번호 A190-105P)와 함께 웰당 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0) 또는 PBS Tween 0.05% (pH 7.4)로 3회 세척하고 기질 용액 (TMB 용액)을 플레이트에 첨가하였다. 반응은 H2SO4로 중단되었고 흡광도는 450 nm에서 판독되었다. 대부분의 클론에 대해, 두 pH 모두에서 결합이 관찰되었다. 인간 PD-L1에 대한 양성 바인더를 서열분석하고 클론을 상이한 HCDR3 서열에 따라 패밀리로 분류하였다.

[0724] CDR3에서 히스티딘을 갖는 패밀리의 클론은 pH 7.4에서보다 pH 6.0에서 더 높은 OD 값을 제공했으며 ELISA에서 인간, 시노몰구스 및/또는 마우스 PD-L1에 결합하는 패밀리 대표적 클론의 패널을 인간, 시노몰구스 및 마우스 PD-L1 형질감염된 HEK293FF 세포에 대한 결합에 대한 스크리닝을 위해 선택하였다.

[0725] **세포에서 선택된 클론의 스크리닝:**

[0726] 인간, 시노몰구스 및 마우스 PD-L1을 사용한 HEK293FF 세포의 형질감염. HEK293FF 세포를 Freestyle™ 293 발현 배지에서 배양하고 형질감염 당일 0.8E+06 세포/ml로 시딩하였다. (리포펙타민 2000 + 70 μg의 인간, 시노몰구스 또는 마우스 플라스미드의 DNA)의 혼합물을 제조하고 세포에 첨가하였다 (포유류 발현 플라스미드는 Sino Biological에서 입수하였다). 세포를 37℃, 5% CO2에서 18시간 동안 인큐베이션하고 유세포 분석에 의해 인간, 사이노몰구스 및 마우스 PD-L1 발현에 대해 QC를 수행하였다. 간단히, 2.0E+05의 HEK293FF WT, 인간 PD-L1, 시노몰구스 PD-L1 및 마우스 PD-L1 세포를 2.5 μg/ml의 항-인간/마우스/시노몰구스(R&D Systems) PD-L1 (goat IgG)과 함께 50 μl/웰의 최종 부피로 4℃에서 30분 동안 온화하게 진탕하면서 인큐베이션하였다. 세포를 300 g에서 3분 동안 150 μl의 FACS 완충액 (PBS/0.5% FBS)으로 3회 세척하고 2차 항-염소 Alexa Fluor 647 (ThermoFisher)과 함께 웰당 50 μl의 최종 부피로 4ºC에서 30분 동안 어두운 곳에서 온화하게 진탕하면서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 150 μl/웰의 FACS 완충액으로 3회 세척하고 FL-4 채널 (APC 채널)의 FACS 기계 (Accuri C6)에서 측정하기 위해 75 μl/웰의 FACS 완충액에 재현탁하고 샘플당 총 10000개의 세포를 획득하였다.

[0727] **PD-L1 형질감염된 세포에 결합하는 주변세포질 추출물 (P.E):**

[0728] 선택된 클론의 주변세포질 추출물 (P.E)을 실온 (RT)에서 진탕하면서 30분 동안 가용성 Fab에 존재하는 c-myc 태그에 특이적인 항-c-myc 항체와 함께 인큐베이션하였다. 혼합물 (P.E + 항-C-myc 항체)을 WT 또는 인간, 사이노몰구스 및 마우스 PD-L1 HEK293FF 형질감염 세포에 첨가하고 온화하게 진탕하면서 4℃에서 60분 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 150 μl/웰의 FACS 완충액으로 3회 세척한 다음, 50 μl/웰의 2차 항체 염소 항-마우스-APC (ThermoFisher)와 함께 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고 빛을 차단하면서 진탕하였다. 세포를 다시 세척하고 150 μl/웰의 FACS 완충액으로 3회 원심분리한 다음, FL-4 채널 (APC 채널)의 FACS 기계 (Accuri C6)에서 측정하기 위해 75 μl/웰의 FACS 완충액에 재현탁하고 샘플당 총 10000개의 세포를 획득하였다. 인간

및 시노몰구스 PD-L1 세포에 결합된 여러 클론. 마우스 PD-L1 바인더는 발견되지 않았다.

[0729] **PD-1:PD-L1 억제에 대한 선택된 클론의 스크리닝:**

[0730] PD-L1 세포 결합 클론을 ELISA에 의해 pH 6.0에서 PD-1: PD-L1 억제에 대해 스크리닝하였다. MaxiSorp™ 고단백질-결합 용량 96웰 ELISA 플레이트를 4℃에서 밤새 PBS에 희석한 1 μg/ml의 인간 PD-1 Fc 단백질 (R&D Systems)로 코팅하였다. 다음 날, 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0)로 3회 세척하고 250 μl/웰의 1% 카제인/CPA (pH 6.0)로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 차단 후, 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0)로 3회 세척하고 실온에서 1시간 동안 진탕하면서 CPA/0.1% 카제인 중 50 μl의 비오틴화된 PD-L1 (2 μg/ml, R&D Systems) + 경쟁을 위한 CPA/0.1% 카제인 중 50 μl P.E (1:2.5)와 함께 최종 부피 100 μl로 인큐베이션하였다. 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0) 및 50 μl의 엑스트라비딘-HRP (Sigma-Aldrich)로 3회 세척하고 0.1% 카제인/CPA (pH 6.0)에 1:2000으로 희석하여 P.E.의 존재하에 코팅된 PD-1 Fc에 결합하는 비오틴화된 인간 PD-L1의 검출을 위해 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0)로 3회 세척하고 기질 용액 (TMB)을 플레이트에 첨가하고 반응을 H2SO4로 중단하고 플레이트를 450 nm에서 판독하였다. PD1:PD-L1 상호작용을 차단하는 클론의 능력은 관련 및 관련 없는 P.E의 존재 하에 비오틴화된-PD-L1을 갖는 웰의 OD 값을 비교하여 평가되었다. 대조군으로서 및 또한 PE 억제 효과의 비교를 위해, 중화 항 PD-L1 항체도 검정에 사용되었다. 4개의 클론; 1E08, 1A06, 2A09 및 2C11은 PD1:PD-L1 상호작용을 40% 내지 80% 억제할 수 있었다. 이 클론은 IgG 형식화 후 pH 6.0 및 pH 7.4에서 BIAcore 분석에 사용되었다.

[0731] **형식화 IgG, 생성 및 정제:**

[0732] VH, VH 및 Vκ 항체 가변 도메인을 암호화하는 합성 유전자는 Invitrogen에서 구입하였다. 각 DNA는 제조 지침에 따라 재구성되었다. 200 ng의 DNA를 이. 콜리 TOP10 화학적 적격 세포로 형질전환시켰다. DNA 정제는 QIAGEN으로부터의 QIAprep Spin Miniprep 키트를 사용하여 수행되었다. 각 DNA 작제물은 제한 효소 분해되었고, 삽입물은 겔 정제되었고, 각 가변 도메인 삽입물은 VH 삽입물에 대한 항체 중쇄 불변 도메인, 또는 VH 또는 Vκ 삽입물에 대한 경쇄 불변 도메인을 함유하는 포유동물 발현 벡터와 결찰되었다. ExpiCHO-S 세포는 제조업체 (ThermoFisher) 지침에 따라 클론으로 형질감염되었다; 40 μg의 VH 및 Vk 사슬을 포함하는 총 DNA 플라스미드 작제물을 50 mL 총 부피의 세포에서 4-10일 동안 단백질 생산 (32℃, 5% CO2) 동안 사용하였다. 비환원 조건에서 150 kDa에서 밴드의 존재를 분석하고 환원 조건에서 IgG 분자량에 해당하는 50 kDa 및 25 kDa에서 밴드의 존재를 분석하여 단백질 생성 4일 및 10일 후 SDS-Page에 의한 품질 관리를 수행하였다. AKTA Pure 25 시스템에서 Hitrap MabSelect Sure 컬럼을 사용하여 항체를 정제하였다. 이후, IgG를 pH 2.7에서 0.1 M 글리신을 사용하여 용리시키고, 중화를 위해 0.1 ml Tris-HCl pH 9.0을 함유하는 튜브에 1.0 ml 분획을 수집하였다. 항체 함유 분획을 풀링하고 AKTA Pure에서 HiTrap 탈염 컬럼을 사용하여 탈염을 수행하고 완충액을 1x PBS (인산염 완충 염수 pH 7.4) 용액으로 교환하였다. 예비 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 단백질 A 분획으로부터 응집체를 제거하였다. 단백질 농도는 280 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

[0733] **WT, 인간, 시노몰구스 및 마우스 PD-L1 형질감염된 HEK293FF에 대한 정제된 항체의 결합**

[0734] 인간, 시노몰구스 및 마우스 PD-L1을 사용한 HEK293FF 세포의 형질감염을 상기 기재된 바와 같이 수행하였다. 간단히, $2x10^5$ HEK293FF WT, 인간 PD-L1, 시노몰구스 PD-L1 및 마우스 PD-L1 세포를 FACS 완충액 (PBS/0.5% FBS)에서 정제된 항-PD-L1 IgG1 클론 (500 nM 내지 0.69 nM)과 함께 인큐베이션하고 4℃에서 1시간 동안 온화하게 진탕하면서 최종 부피 100 μl/웰로 $2x10^5$개의 WT 또는 인간, 시노몰구스 및 마우스 HEK293FF 형질감염된 세포와 함께 인큐베이션하였다. 특이성에 대한 대조군으로는 관련 없는 항체를 사용하였다. 인큐베이션 후, 세포를 150 μl의 FACS 완충액으로 3회 세척하고 50 μl/웰의 항-인간 IgG-Fc FITC 표지된 항체 (ThermoFisher)를 4℃에서 1시간 동안 온화하게 진탕하면서 세포에 첨가하였다. 세포를 세척한 후, 75 μl/웰의 FACS 완충액에 재현탁하고 FL-1 채널 (FITC 채널)의 FACS 기계 (Accuri C6)에서 측정하여 샘플당 총 10000개의 세포를 획득하였다.

[0735] **상이한 pH에서 PD-L1에 대한 ELISA 결합:**

[0736] 정제된 항-PD-L1 IgG1 클론을 결합 ELISA를 통해 pH 6.0 대 pH 7.4에서 인간 PD-L1에 대한 결합에 대해 시험하였다. MaxiSorp™ 고단백질-결합 용량 96웰 ELISA 플레이트를 PBS에 희석한 1 μg/ml의 인간 PD-L1-Fc 단백질로 4℃에서 밤새 코팅하였다. 다음 날, 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0) 또는 PBS Tween 0.05% (pH 7.4)

로 3회 세척하고 250 μl/웰의 4% Marvel/CPA (pH 6.0) 또는 PBS (pH 7.4)로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 차단 후, 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0) 또는 PBS Tween 0.05% (pH 7.4)로 3회 세척하고 1% Marvel CPA (pH 6.0) 또는 PBS (pH 7.4)에서 제조된 항체의 100 μl의 연속 희석액 (3배 희석액; 100 nM-0.137 nM)과 함께 인큐베이션하고 진탕하면서 실온(RT)에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0) 또는 PBS Tween 0.05% (pH 7.4)로 3회 세척하고 1% Marvel CPA (pH 6.0) 또는 PBS (pH 7.4)에서 제조된 100 μl/웰의 2차 항체, 항-인간-CH1 특이적-HRP (BD Pharmingen 카탈로그 번호 555788)를 첨가하고 진탕하면서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0) 또는 PBS Tween 0.05% (pH 7.4)로 3회 세척하고 기질 용액 (TMB)을 첨가하고 반응을 H2SO4로 중단하고 플레이트를 450 nm에서 판독하였다. 최종 스크리닝 검정에서, pH 7.4의 경우 1 mM 락트산 (Sigma 카탈로그 번호 252476-500G)을 갖는 Krebs 링거 중탄산염 완충액 (KRB, Amsbio 카탈로그 번호 KRB-1000); pH 6.5의 경우 KRB + 15 mM 락트산 및 pH 6.0의 경우 KRB + 20 mM 락트산)도 사용하였다.

[0737] **PD-1:PD-L1 억제에 대한 스크리닝 항체:**

[0738] 항체는 ELISA에 의해 pH 6.0에서 PD-1: PD-L1 억제에 대해 스크리닝하였다.

[0739] MaxiSorp™ 고단백질-결합 용량 96웰 ELISA 플레이트를 4℃에서 밤새 PBS에 희석한 1 μg/ml의 인간 PD-1 Fc 단백질로 코팅하였다. 다음 날, 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0)로 3회 세척하고 250 μl/웰의 1% 카제인/CPA (pH 6.0)로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 차단 후, 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0)로 3회 세척하고 100 nM에서 0.05 nM으로 시작하는 항-PD-L1 IgG1 클론의 3배 희석액을 1시간 (실온) 동안 0.1% 카제인/CPA (pH 6.0)에서 1 μg/ml 인간 PD-L1 비오틴과 함께 100 μg/웰의 총 부피로 인큐베이션하였다. 플레이트를 CPA Tween 0.05% (pH 6.0)로 3회 세척하고 항체의 존재 하에 코팅된 PD-1-Fc에 결합할 수 있는 비오틴화된 인간 PD-L1의 검출을 위해 0.1% 카제인/CPA (pH 6.0)에서 엑스트라비딘-HRP (1:2000 희석)를 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 다음, CPA Tween 0.05% (pH 6.0)로 3회 세척하고 기질 용액 (TMB)을 첨가하고 반응을 H2SO4로 중단하고 플레이트를 450 nm에서 판독하였다. PD1:PD-L1 상호작용을 차단하는 항체의 능력은 항-PD-L1 항체 대 관련 없는 항체의 존재 하에 비오틴화된-PD-L1을 갖는 웰의 OD 값을 비교하여 평가하였다. 이 검정은 또한 상기 완충액에서 CPA를 PBS로 대체하여 pH 6.5 및 pH 7.4에서 수행되었다. 최종 스크리닝 검정에서, pH 7.4의 경우 1 mM 락트산 (Sigma 카탈로그 번호 252476-500G)을 갖는 Krebs 링거 중탄산염 완충액 (KRB, Amsbio 카탈로그 번호 KRB-1000); pH 6.5의 경우 KRB + 15 mM 락트산 및 pH 6.0의 경우 KRB + 20 mM 락트산)도 사용하였다.

[0740] **CD80:PDL1 억제에 대한 스크리닝 항체**

[0741] ELISA 검정은 코팅 항원이 1 μg/ml 인간 B7-1-Fc (CD80) (R&D Systems cat. no. 140-B1)라는 것을 제외하고는 상기 "PD-1:PD-L1 억제에 대한 스크리닝 항체"와 동일하다.

[0742] **BIAcore 분석:**

[0743] pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 PD-L1에 대한 선택된 IgG 형식화된 정제된 클론의 친화도를 평가하기 위해, 인간 PD-L1-Fc 단백질을 아민 커플링으로 코팅하였다. 표면 플라즈몬 공명 (SPR) (BIAcore 3000, GE Healthcare)을 사용하여 pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 PD-L1에 대한 선택된 IgG 형식화된 정제된 클론의 결합 동역학을 결정하였다. 아세테이트 완충액 pH 5.0에서 50 μg/ml의 대략 3000 RU의 인간 PD-L1 Fc (R&D Systems)를 표준 아민 커플링 절차를 사용하여 CM5 칩에 고정화하였다. PD-L1 고정화의 QC는 2.0 μg/ml에서 항-PD-L1 상용 항체 (R&D systems 카탈로그 번호 AF156)를 사용하여 수행되었다. 1x HBS-EP pH 7.4 또는 HBS-EP pH 7.0 또는 HBS-EP 10 nM 시트레이트 완충액 pH 6.5 또는 HBS-EP 10 nM 시트레이트 완충액 pH 6.0을 결합 동역학 측정 동안 실행 완충액으로서 사용되었다. 항체 구배는 관련 pH 완충액에서 50 nM에서 0.13 nM으로 시작하여 3배 희석으로 구성되었으며 30 μl/분의 유속으로 120초 동안 주입되었다. 해리 후, PD-L1-Fc 표면의 재생은 1M NaCl 중 10 mM NaOH (20 μl/분에서 30초 주입)에 이어 10 mM 글리신 pH 1.5의 20μl/min에서 단일 30초 주입으로 달성되었다. 회합 속도 (ka), 해리 속도 (kd) 및 친화도 (KD)를 포함하는 항체-항원 상호작용의 동역학 상수를 계산하기 위해 BIAevaluation 소프트웨어를 사용하여 질량 전달을 사용한 1:1 결합을 곡선에 피팅하였다.

[0744] **친화도 성숙화 라이브러리 생성:**

[0745] 파지 디스플레이 라이브러리의 구성은 유전자 조립에 의해 생성되었다. 라이브러리 디자인에 정의된 특정 위치에서 특정 돌연변이를 포함하는 중첩 올리고뉴클레오티드 및/또는 삼량체를 사용하여 PCR을 통해 V-유전자를 합성적으로 생성하였다. 올리고뉴클레오티드는 상이한 변이체의 구성을 허용하는 모 뉴클레오티드 또는 축퇴 코

돈을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3 또는 LCDR1, LCDR2, LCDR3 영역에 특이적인 프라이머를 사용하여 완전한 VH 및 Vλ 서열을 조립하도록 디자인되었다. 클로닝 제한 부위는 파지미드 벡터에 추가로 삽입하기 위해 VH 및 Vλ 유전자에 도입되었다. 모든 유전자 어셈블리 PCR은 3가지 다른 어닐링 온도를 사용하여 수행되었으며, 상이한 어닐링 온도 PCR 산물 간에 차이가 관찰되지 않으면 PCR 산물을 풀링하였다. 겔-정제된 Vλ 유전자는 AFF2A09_LCDR1, AFF2A09_LCDR2 및 AFF2A09_LCDR3 친화성 성숙 라이브러리의 작제를 위해 불변 인간 중쇄 및 경쇄 유전자 (CH 및 CL) 및 모 VH 쇄 도메인을 함유하는 pCB13_2A09VH_WT 파지미드 벡터 내로 클로닝되었다. 겔-정제된 VH 무작위화된 유전자는 AFF2A09_HCDR1, AFF2A09_HCDR2 및 AFF2A09_HCDR3 친화도 성숙화 라이브러리의 작제를 위해 CH 및 CL 인간 불변 영역과 모 Vλ 도메인을 함유하는 pCB13_2A09Vλ_WT 파지미드 벡터에 클로닝되었다. 모든 Fab 파지 디스플레이 라이브러리에는 전체 Fab 삽입물을 포함하는 형질전환체가 80% 초과였으며 라이브러리당 48개의 형질전환체를 암호화를 위해 보내고 모 클론 2A09의 WT 서열과 비교하여 표적 중쇄 및 경쇄 CDR에서 아미노산 빈도 도입에 대해 분석하였다.

[0746] **친화도 성숙화 파지 디스플레이 선택:**

[0747] 라운드 I: 패닝 선택. pH 6.0에서 인간 PD-L1에 대한 Fab를 선택하기 위해 2A09 친화도 성숙화 하위-라이브러리를 사용한 패닝 선택의 제1 라운드를 수행하였다. 플레이트를 1x PBS, 100 μl/웰, O/N, 4℃에서 10 μg/ml 인간 PD-L1로 코팅한 다음, 실온에서 2시간 동안 PBS에서 250 μl/웰 4% 탈지유 (Marvel, 카탈로그 번호 928964)로 차단하였다. 2A09 친화도 성숙화 하위-라이브러리로부터의 파지를 선택 조건당 4% 탈지유/CPA pH 6.0에서 실온에서 30분 동안 회전하면서 차단하였다. 선택 조건당 4% 탈지유/1x PBS에서 친화성 성숙화 하위-라이브러리로부터 50 μl의 파지를 항원으로 코팅된 플레이트에서 실온에서 2시간 동안 100 μl/웰로 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 웰을 1x CPA-Tween 0.05%로 15회 세척하고 매 5번째 세척마다 5분 진탕 배양을 포함하여 1x CPA pH 6.0, 250 μl/웰로 5회 세척하였다. 1 mg/ml의 트립신 (Sigma, 카탈로그 번호 T1426-5G)을 사용하여 PD-L1에 결합된 파지의 전체 용출을 수행하였다. 웰당 트립신 150 μl를 첨가하고 실온에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 트립신 프로테아제 활성의 억제는 10 μl AEBSF (Sigma, 카탈로그 번호. A8456)로 수행하였다. 용출된 파지의 연속 희석을 수행하고 기하급수적으로 성장하는 TG1을 감염시키는 데 사용하였다. 감염된 TG1을 LBCarb100 Glu 2% 플레이트에 플레이팅하고 항원 선택이 없는 조건으로부터 용출된 파지의 수에 대한 항원 선택 조건으로부터 용출된 파지의 수 사이의 비로 농축을 계산하였다. 모든 하위 라이브러리에 대해 우수한 농축이 관찰되었으며 용액의 제2 라운드에서 출력을 수행했다.

[0748] 라운드 II: 용액 선택에서 친화도-기반. 용액 내 항원을 인식하는 PD-L1에 대한 친화도 성숙된 Fab의 선택을 위해 비오틴화된 PD-L1 및 스트렙타비딘-코팅된 자기 비드를 사용하여 제2 라운드를 수행하였다. 항원 차단: 10 nM 및 1 nM에서 비오틴화된 PD-L1을 2% Marvel CPA 완충액 pH 6.0으로 실온에서 30분 동안 회전하면서 차단하였다. 파지 차단: 제1 라운드로부터 나오는 산출물로부터 10 μl의 투입 파지는 4% Marvel CPA 완충액 (조건당)로 실온에서 30분 동안 회전하면서 차단하였다. 파지 + 항원 혼합물: 100 μl 차단된 항원 (bio-PD-L1) + 100 μl 차단된 파지 (조건당)를 실온에서 2시간 동안 회전하면서 인큐베이션하였다. 비드 세척/차단: 선택 조건당 30 μl Dynabeads™ MyOne™ 스트렙타비딘 T1 자기 비드 (Invitrogen, 카탈로그 번호 65601)를 CPA 완충액-Tween 0.05%로 3회 세척하고 2% Marvel CPA 완충액에서 30분 동안 실온에서 회전하면서 차단하였다. 혼합물 파지 + 항원 비드 포획: 200 μl의 혼합물 (파지 + 항원 bio-PD-L1)를 자기 비드에 실온에서 15분 동안 회전하면서 첨가하였다. 인큐베이션 후, 비드를 CPA 완충액-Tween 0.05%로 5회 세척하고 1 ml CPA 완충액으로 2회 세척하였다. 용출: PD-L1에 결합된 파지의 총 용출은 1 mg/ml의 트립신, 200 μl/조건을 사용하여 실온에서 20분 동안 회전하면서 수행되었다. 트립신 프로테아제 활성의 억제는 10 μl AEBSF로 수행되었다. 농축: 용출된 파지의 연속 희석을 수행하여 기하급수적으로 성장하는 TG1을 감염시키는 데 사용하였다. 감염된 TG1을 LBCarb100 Glu 2% 플레이트에 플레이팅하고 재조합 단백질 선택 동안 농축을 항원 선택이 없는 조건으로부터 용출된 파지의 수에 대한 항원 선택 조건으로부터 용출된 파지의 수 사이의 비로 계산하였다.

[0749] 라운드 3: 2시간 또는 20시간의 오프-레이트 세척으로 용액 선택에서 친화도 기반. 용액 내 항원을 인식하는 PD-L1에 대해 친화도 성숙된 Fab를 선택하기 위해, 고친화성 클론을 선택하기 위해 2시간 또는 20시간 동안 100배 과량의 비오틴화되지 않은 PD-L1을 사용하여 오프-레이트 세척과 함께 스트렙타비딘-코팅된 자기 비드를 사용하는 제3 라운드의 용액 내 선택을 사용하여 수행하였다. 항원 차단: 1 nM, 0,1 nM, 0,01 nM 및 0 nM에서 비오틴화된 PD-L1을 2% Marvel i CPA 완충액 pH 6.0으로 30분 동안 실온에서 회전하면서 차단하였다. 파지 차단: 제2 라운드로부터 나오는 산출물로부터의 10 μl의 투입 파지는 CPA 완충액에서 4% Marvel로 실온에서 30분 동안 회전하면서 차단되었다 (조건당). 파지 + 항원 혼합물: 100 μl 차단된 항원 (bio-PD-L1) + 100 μl 차단된 파지 (조건당)를 실온에서 2시간 동안 회전하면서 인큐베이션하였다. 비드 세척/차단: 선택 조건당 30 μl

Dynabeads™ MyOne™ 스트렙타비딘 T1 자기 비드 (Invitrogen, 카탈로그 번호 65601)를 CPA 완충액-Tween 0.05%로 3회 세척하고 2% Marvel CPA 완충액에서 30분 동안 실온에서 회전하면서 차단하였다. 혼합물 파지 + 항원 비드 포획: 200 μl의 혼합물 (파지 + 항원 bio-PD-L1)를 자기 비드에 실온에서 15분 동안 회전하면서 첨가하였다. 인큐베이션 후, 비드를 CPA 완충액-Tween 0.05%로 5회 세척하고 CPA 완충액으로 2회 세척하였다. 오프-레이트 세척: 100배 과량의 비오틴화되지 않은 PD-L1 (10 nM, 1 nM 및 0.1 nM) 또는 CPA 완충액을 선택 웰에 첨가하고 실온에서 2시간 또는 20시간 동안 회전하면서 인큐베이션하였다. 용출: PD-L1에 결합된 파지의 총 용출은 1 mg/ml의 트립신, 200 μl/조건을 사용하여 실온에서 20분 동안 회전하면서 수행되었다. 트립신 프로테아제 활성의 억제는 10 μl AEBSF로 수행되었다. 농축: 용출된 파지의 연속 희석을 수행하여 기하급수적으로 성장하는 TG1을 감염시키는 데 사용하였다. 감염된 TG1을 LBCarb100 Glu 2% 플레이트에 플레이팅하고 재조합 단백질 선택 동안 농축을 항원 선택이 없는 조건으로부터 용출된 파지의 수에 대한 항원 선택 조건으로부터 용출된 파지의 수 사이의 비로 계산하였다. 1 nM의 비오틴화된 PD-L1로 선택된 산출물 및 2시간 또는 20시간 동안 100 nM의 PD-L1을 사용한 오프-레이트 세척으로 세포에서 라운드 IV 선택을 위해 취하였다.

[0750] 라운드 4: 세포 선택. 세포 표면에 존재하는 천연 PD-L1에 대한 친화도 성숙된 Fab를 선택하기 위해 pH 6.0에서 MDA-MB-231 세포 (PD-L1을 발현하는 내인성 세포)를 사용한 선택 라운드를 사용하여 수행하였다. 세포: 하위 라이브러리 조건에 따라 10% FBS/PBS pH 6.0 (1M HCL로 산성화됨)에서 5.0E+06 MDA-MB-231 세포를 사용하였다. 세포는 또한 진탕하면서 검출을 위해 2차 항체 (Alexa Fluor® 488 AffiniPure Mouse Anti-Human IgG; Jackson ImmunoResearch Laboratories 카탈로그 번호. 209-545-098)를 사용하여 4℃에서 1시간 동안 pH 7.4 또는 pH 6.0에서 FACS 완충액에서 300 nM; 100 nM; 33,3 nM; 11,1 nM; 3,70 nM; 1,23 nM; 0 nM의 mAb 2A09 또는 mAb 12A4 (특허 US9856320으로부터)로 인큐베이션함으로써 PD-L1 발현에 대해 QC를 수행하였다. 파지 차단: 하위 라이브러리당, 라운드 3 선택 (오프-레이트 세척, 100 nM PD-L1, 2시간 또는 20시간 동안)으로부터 나오는 산출물 파지를 4℃에서 20분 동안 회전하면서 10% FBS/PBS pH 6.0으로 풀링하고 차단하였다. 파지 + 세포: 조건당 5E+06 MDA-MB-231 세포를 차단된 파지로 재현탁시키고 4℃에서 2시간 동안 회전하면서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포를 10% FBS/PBS pH 6.0으로 4회 세척하고 세척당 PBS pH 6.0; 1 ml로 1회 세척하였다. 용출: PD-L1에 결합된 파지의 전체 용출은 1 mg/ml의 트립신, 200 μl/조건을 사용하여 실온에서 20분 동안 10 μl AEBSF로 트립신 프로테아제 활성을 회전 및 억제하면서 수행하였다. 농축: 용출된 파지의 연속 희석을 수행하여 기하급수적으로 성장하는 TG1을 감염시키는 데 사용하였다. 감염된 TG1을 LBCarb100 Glu 2% 플레이트에 플레이팅하고 배경에 대해 농축 값을 계산하였다 (선택을 위한 항원 없이).

[0751] HCDR1 및 2 라이브러리 및 LCDR3 라이브러리는 2A09 WT와 비교하여 유의미한 히트를 생성하지 않았다. HCDR3 라이브러리는 2A09와 비교하여 개선된 결합으로 단리된 1개의 우세한 히트 및 3개의 상이한 고유한 서열을 생성한 반면, LCDR1 라이브러리는 36개의 고유한 히트를 생성하고 LCDR2 라이브러리는 개선된 결합으로 6개의 고유한 히트를 생성하였다. 이들 히트는 상기 기재된 바와 같이 pH 6 및 pH 7.4에서 세포 결합 검정, BIAcore 검정 및 PD-L1 중화 검정에 의해 추가로 분석되었다. 리드 Fab는 상기 설명한 대로 정제된 IgG로부터 Pierce™ Fab 준비 키트 (카탈로그 번호 44985)에 의해 준비되었다.

[0752] **종양 유사 완충액에서 MDA-MB-231 세포에 대한 항-PD-L1 mAb 또는 Fab의 결합**

[0753] PD-L1을 발현하는 종양 세포가 있는 산성 종양 환경을 모방하기 위해 (체내 종양의 대사, Warburg *et al*. J Gen Physiol. 1927;8:519-30), 하기 완충액이 사용되었다: pH 7.4의 경우 1 mM 락트산 (Sigma 카탈로그 번호 252476-500G)을 갖는 Krebs 링거 중탄산염 완충액 (KRB, Amsbio 카탈로그 번호 KRB-1000); pH 6.5의 경우 KRB + 15 mM 락트산 및 pH 6.0의 경우 KRB + 20 mM 락트산). Fab 또는 IgG의 3배 희석액 (100 nM 내지 0.0005 nM; 0)을 각각의 pH 완충액에서 제조하고 4℃에서 60분 동안 0.60E05 MDA-MB-231 세포와 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 각각의 pH 완충액으로 300 g에서 3분 동안 3회 세척하였다. 이어서, 세포를 각각의 pH 완충액에서 1:100 희석으로 50 μl의 항-인간 IgG (Fab 특이적)-FITC (Sigma, 카탈로그 번호 F5512-1ML)와 함께 인큐베이션하였다. PD-L1 발현 세포에 대한 IgG 또는 Fab의 결합은 FACS (Attune Nxt)에 의해 측정되었고 샘플당 총 10,000개의 세포가 획득되었다.

[0754] **통계 분석**

[0755] GraphPad Prism 7 소프트웨어 (GraphPad 50 Software, Inc., La Jolla, CA, USA)는 IC50, EC50 분석 및 통계 분석에 사용되었다.

[0756] **결과**

[0757] Fab 라이브러리의 초기 스크리닝 캐스케이드는 pH 6에서 인간 및 시노몰구스 PD-L1에 대한 파지 ELISA에 이어 PD-L1-PD-1 억제 ELISA 및 PD-L1 양성 세포 (MDA-MB-231)에 대한 결합이었다. 이들 검정으로부터 양성인 상이한 패밀리로부터 20개 클론은 인간 및 시노몰구스 PD-L1에 대한 ELISA에서 pH 6에서 P.E. Fab 제제로서 재스크리닝된 후 PD-L1-PD-1 억제 ELISA 및 MDA-MB-231 세포에서의 세포 결합 검정이 수행되었다. 이들 스크린으로부터, 인간 및 시노몰구스 세포에 파지 및 P.E로서 결합된 16개의 클론이 발견되었고; 7개는 약한 중화 활성을 갖고 4개는 높은 중화 활성을 갖는 Fab를 선택하였다. 이들 클론 중 2개는 동일한 CDR을 가져서 3개의 Fab는 추가 분석을 위해 IgG로 전환되었다. 3개의 mAb 모두는 2A09, 0.4 nM; 1A06, 0.9 nM 및 1E08, 1.1 nM에 대해 도 1a로부터 계산된 IC50 값으로 ELISA (도 1a)에 의해 PD-1에 대한 PD-L1 결합을 억제하였다. 3개의 mAb 모두는 또한 2A09, 1.2 nM; 1A06, 6.3 nM 및 1E08, 2.8 nM에 대해 도 1b로부터 계산된 IC50 값으로 도 1b에 나타낸 바와 같이 ELISA에 의해 CD80에 대한 PD-L1 결합을 억제하였다. mAb 2A09는 또한 인간 및 시노몰구스 PD-L1에 대해 동등한 결합을 나타냈다.

[0758] 2A09의 Fab 서열은 표 4에 나타낸다.

[0759] [표 4]

[0760] 리드 Fab 2A09의 VH 및 VL 서열. CDR은 밑줄이 그어져 있다.

| Fab | VH |
|---|---|
| 2A09 | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMYWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRF<br>TISRDNSKNTLNLQMNSLRAEDTAVYYCAKGALTHWGVVIGDGMDVWGQGTTVTVSS (서열 번호 5) |

| Fab | VL |
|---|---|
| 2A09 | NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNS<br>ASLTISGLKTEDEADYYCQSFDSTNPWVFGGGTKLTVL (서열 번호 1) |

[0761]

[0762] BIAcore에 의한 오프 레이트의 초기 분석 (도 2)은 2개의 mAb (1A06 및 1E08)가 pH 6과 비교하여 이 pH에서 더 낮은 Kd 값에 의해 나타난 바와 같이 pH 7.4에서 PD-L1에 우선적으로 결합하는 것으로 나타났다. 완전히 대조적으로, mAb 2A09는 대략 5배 더 나은 오프 레이트로 pH 6.0에서 PD-L1에 더 나은 결합을 가졌다. BIAcore 분석은 더 넓은 범위의 pH로 반복하였으며 항-PD-L1 mAb 12A4 (특허 US9856320으로부터) 및 표 5에 나타낸 결과와 비교하였다.

[0763] mAb 2A09는 pH 7.4와 비교하여 pH 6에서 대략 20배 더 높은 친화도를 나타냈고 이는 pH 특이적 결합에 대해 선택되지 않았고 실제로 pH 7.4와 비교하여 pH 6에서 더 낮은 친화도를 나타내는 mAb 12A4와 완전히 대조적이다.

[0764] [표 5]

[0765] PD-L1에 결합하는 mAb 2A09의 BIAcore 동역학 분석. 항-PD-L1 mAb, 2A09 및 12A4 (양성 대조군)를 고정된 PD-L1-Fc 상에 주사하고 동역학은 BIAevaluation 소프트웨어에 의해 결정되었다.

| mAb | pH | Ka (1/Ms) | Kd (1/s) | $K_D$ (nM) |
|---|---|---|---|---|
| 2A09 | 7.4 | $1.05 \times 10^{7}$ | $2.71 \times 10^{-2}$ | 2.6 |
| 2A09 | 7.0 | $1.25 \times 10^{7}$ | $7.11 \times 10^{-3}$ | 0.57 |
| 2A09 | 6.5 | $7.36 \times 10^{6}$ | $1.29 \times 10^{-3}$ | 0.18 |
| 2A09 | 6.0 | $6.77 \times 10^{6}$ | $8.65 \times 10^{-4}$ | 0.13 |
| 12A04 | 7.4 | $4.02 \times 10^{6}$ | $2.25 \times 10^{-5}$ | 0.006 |
| 12A04 | 7.0 | $3.72 \times 10^{6}$ | $2.39 \times 10^{-5}$ | 0.006 |
| 12A04 | 6.5 | $3.95 \times 10^{6}$ | $4.62 \times 10^{-5}$ | 0.01 |
| 12A04 | 6.0 | $4.76 \times 10^{6}$ | $1.21 \times 10^{-4}$ | 0.03 |

[0766]

[0767] 표 5에 나타낸 데이터는 결합의 pH 의존성을 반영하지만 BIAcore 표면에서 PD-L1에 대한 mAb의 결합의 친화력 (avidity) 성분이 있다. 이 문제를 회피하고 종양 미세환경과 유사한 완충액에서 세포에 대한 2A09의 결합을 분석하기 위해, MDA-MB-231 세포를 발현하는 PD-L1을 2A09 mAb 및 Fab와 함께 pH 6, 6.5 및 7.4에서 락테이트를 갖는 Krebs 완충액에서 인큐베이션하였다 (도 3). PD-L1에 대한 2A09 결합의 EC50은 도 3으로부터 계산하고 pH 7.4에서 16.3 nM이었고, pH 6.6에서 6.1 nM이었고 pH 6.0에서 2.4 nM이었다. 이러한 조건 하에 2A09의 Fab는 결합 활성이 매우 적었다 (도 3).

[0768] 2A09 Fab의 낮은 친화도의 결과로서, 이 클론의 친화도 성숙 운동이 수행되었다. 2A09에 대해 상기 요약된 스크리닝 운동을 수행하고 PD-L1에 결합하는 모 2A09 클론에 비해 결합의 pH 의존성 및 증가된 친화도를 나타내는

5개의 Fab 친화도 성숙된 리드를 선택하였다 (표 6). 경쇄의 CDR1에서 돌연변이를 포함하는 모든 5개의 리드를 선택하였다.

[0769] [표 6]

[0770] BIAcore 오프 레이트 분석에 의한 정제되지 않은 친화도 성숙된 항-PD-L1 Fab (주변세포질 추출물)의 분석.

[0771]

| 클론 | 라이브러리 | Kd (s-1) pH 7.4 | Kd (s-1) pH 6 | 비<br>pH 6 vs 7.4 |
|---|---|---|---|---|
| 8G08 | LCDR1 | 3.08E-03 | 8.23E-04 | 27 |
| 8D06 | LCDR1 | 3.45E-03 | 6.99E-04 | 20 |
| 8A04 | LCDR1 | 1.50E-02 | 1.31E-03 | 9 |
| 8D04 | LCDR1 | 2.75E-02 | 2.83E-03 | 10 |
| 8B06 | LCDR1 | 1.05E-02 | 1.35E-03 | 13 |
| 2A09 WT | | ND | ND | |

[0772] 5개의 선택된 Fab 모두를 정제하고 초기에 ELISA에 의해 조사하였다 (도 4). 모든 Fab는 pH 특이적 결합을 나타내었고 양성 대조군 항-PD-L1 Fab 또는 mAb 2.7A04OPT (특허 WO2011066389로부터)는 pH 의존성 결합을 나타내지 않았다. 음성 대조군 Fab (2A11, 항-HEL)는 특이적 결합을 나타내지 않았다. 이 초기 검정은 Fab가 pH 6에서 훨씬 더 큰 친화도를 갖고 (표 7) 조사된 농도에 걸쳐 pH 7.4에서 약한 비포화 결합을 갖는다는 것이 ELISA에 의해 입증되었다. EC50은 pH 7.4에서 이 방법론에 의해 정확하게 측정할 수 없었지만, 결합 비는 표 7에 나타내며, 이는 두 pH 곡선에 있는 OD 판독값을 비교할 때 Fab가 pH 6에서 9 내지 53배 더 잘 결합한다는 것을 입증한다. pH 6에서 모든 Fab는 4 nM에서 결합 포화에 도달하는 반면, 이 검정에서 5개 Fab 중 어느 것도 pH 7.4에서 포화에 도달하지 않았다 (도 4).

[0773] [표 7]

[0774] 도 4로부터의 ELISA에 의한 PD-L1에 결합하는 친화도 성숙된 Fab의 EC50 계산.

[0775] 결합 비는 pH 6 대 pH 7.4에서 Fab의 표준 곡선으로부터 OD 0.3을 외삽하여 계산하였다.

[0776]

| | 8D06 | 8A04 | 8G08 | 8D04 | 8B06 |
|---|---|---|---|---|---|
| pH 6, EC50, nM | 0.11 | 0.54 | 0.10 | 2.63 | 0.31 |
| pH 7.4, EC50, nM | >10 | >10 | >100 | >100 | >100 |
| 비 pH 6:7.4 | 39 | 11 | 53 | 9 | 38 |

[0777] 항-PD-L1 친화도 성숙된 Fab를 pH 6.0, 6.5 및 7.4에서 PD-L1 억제 ELISA에서 억제 활성에 대해 시험하였다 (도 5). 이 검정에서, 항-PD-L1 Fab2.7A04OPT는 양성 대조군으로 사용하였고 Fab 2A11은 음성 대조군으로 사용하였다. IC50은 곡선으로부터 계산되었고 표 8에 나타내었다. pH 6에서 항-PD-L1 Fab 8D06, 8A04, 8G08 및 8B06을 사용한 PD-1에 대한 PD-L1 결합 억제의 IC50은 대조군 Fab 2.7A04OPT보다 단지 대략 3배 적다. pH 6, 6.5 및 7.4에서, 항-PD-L1 Fab 2.7A04OPT는 억제에 대한 pH 선호도를 나타내지 않는다. 이것은 억제의 명확한 pH 의존성을 나타내는 본 발명의 Fab와 완전히 대조적이다 (도 5 및 표 8). Fab 8D06, 8A04, 8G08 및 8B06은 pH 6에 비해 pH 6.5에서 약 3배 더 적은 억제 활성을 갖고 pH 7.4에서 매우 작은 활성을 갖는다. 항-PD-L1 Fab 8D04는 이 검정에 의해 Fab 8D06, 8A04, 8G08 및 8B06보다 대략 3배 덜 강력하다. 100 nM에서 Fab 중 어느 것도 pH 7.4에서 PD-1에 대한 PD-L1 결합을 완전히 억제하지 않았으며, 최상은 대략 60% 억제를 갖는 Fab 8A04라는 점에 유의하는 것이 중요하다 (도 5).

[0778] [표 8]

[0779] 도 5로부터의 ELISA에 의한 PD-L1:PD-1 결합을 억제하는 친화도 성숙된 Fab의 IC50 계산.

[0780] 음성 대조군 Fab (2A11, 항-HEL)는 억제를 나타내지 않았으며 Fab 2.7A04OPT (특허 WO2011066389)는 양성 대조군으로서 사용하였다.

[0781]

| | 8D06 | 8A04 | 8G08 | 8D04 | 8B06 | 2.7A04OPT |
|---|---|---|---|---|---|---|
| pH 6, IC50 nM | 13.1 | 12.2 | 12.1 | 42.3 | 15.7 | 5.4 |
| pH 6.5, IC50 nM | 40.0 | 29.4 | 41.6 | >100 | 52.7 | 4.9 |
| pH 7.4, IC50 nM | >100 | 81.2 | >100 | >100 | >100 | 6.8 |
| 비 pH 6:7.4 | >7.63 | 6.66 | >8.26 | >2.36 | >6.37 | 1.26 |

[0782] 항-PD-L1 친화도 성숙된 Fab는 종양 미세환경 (Krebs-락테이트)과 유사한 완충액에서 세포주 (MDA-MB-231 세포)에서 천연 PD-L1에 결합하는 이들의 능력에 대해 시험하였다. 다시, 모든 5개 치환도 성숙된 Fab는 pH 의존적 결합을 나타내었다 (도 6 및 표 9A). 양성 대조군 항-PD-L1 Fab 2.7A04OPT는 pH 결합 선호도를 나타내지 않았다. pH 결합 선호도는 8배 (Fab 8G08) 및 11배 (Fab 8D06)에서 100배 초과 (Fabs 8A04, 8D04 및 8B06) 범위였다. 모든 Fab의 경우 pH 7.4 및 100 nM Fab에서의 총 결합 (MFI)은 pH 6에서보다 훨씬 낮았고 포화에 도달하지 않았다. Fab는 또한 IgG1로 형식화되었고 pH 7.4, 6.5 및 6.0에서 MDA-MB-231 세포에 대한 결합을 조사하였다 (표 9B). 놀랍게도, mAb는 결합의 pH 의존성을 나타내지 않았다 (표 9B). 결합의 pH 의존성은 형식 (Fab, 단량체 바인더)과 관련이 있다; Fab의 EC50 결합이 mAb 및 CDR 내로의 히스티딘 잔기 도입보다 대략 100배 더 작기 때문에 친화도가 있다 (표 10).

[0783] [표 9A]

[0784] Krebs 완충액에서 pH 7.4, 6.5 및 6.0에서 MDA-MB-231 세포에 결합하는 친화도 성숙된 항-PD-L1 Fab의 비교. 항-PD-L1 Fab 2.7A04OPT (특허 WO2011066389로부터)를 양성 대조군으로 사용하였고 음성 대조군 Fab (2A11, 항-HEL)에 대해 특이적 결합이 관찰되지 않았다. EC50은 모든 곡선을 비교하기 위해 pH 6에서 0 nM Fab MFI 판독값의 50%로 표시된다.

[0785]

| | 8D06 Fab | 8A04 Fab | 8G08 Fab | 8D04 Fab | 8B06 Fab | 2.7A040PT Fab |
|---|---|---|---|---|---|---|
| pH 6, EC50 nM | 1.45 | 2.16 | 1.58 | 13.5 | 2.0 | 0.82 |
| pH 6.5, EC50 nM | 2.92 | 6.62 | 2.95 | 56.4 | 6.4 | 0.86 |
| pH 7.4, EC50 nM | 16.0 | >100 | 13.2 | >100 | >100 | 0.60 |
| 비 pH 6:7.4 | 11.0 | >46.3 | 8.35 | >7.41 | >50.0 | 0.73 |

[0786] [표 9B]

[0787] pH 7.4, 6.5 및 6.0에서 MDA-MB-231 세포에 결합하는 친화도 성숙된 항-PD-L1 mAb의 비교. 항-PD-L1 mAb 2.7A04OPT (특허 WO2011066389로부터)를 양성 대조군으로 사용하였고 음성 대조군 mAb (2A11, 항-HEL)에 대해 특이적 결합이 관찰되지 않았다. EC50은 GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 계산되었다.

[0788]

| | 8D06 mAb | 8A04 mAb | 8G08 mAb | 8D04 mAb | 8B06 mAb | 2.7A04OPT mAb |
|---|---|---|---|---|---|---|
| pH 6, EC50 nM | 0.11 | 0.09 | 0.08 | 0.11 | 0.14 | 0.07 |
| pH 6.5, EC50 nM | 0.11 | 0.11 | 0.07 | 0.13 | 0.17 | 0.09 |
| pH 7.4, EC50 nM | 0.08 | 0.09 | 0.09 | 0.10 | 0.12 | 0.10 |

[0789] 양성자-연결된 결합 이벤트는, 예를 들어, 헤모글로빈에서 보어 효과 (Perutz MF *et al*. J Mol Biol. 1980;138:649-68); 세린 프로테아제 억제제의 pH-의존적 결합 (Ascenzi P. *et al*. J Mol Recognit. 1991, 4:113-9); pH 8에서 6.7로의 작은 pH 강하에 걸쳐 이의 수용체에 대한 결합 친화도의 큰 감소를 나타내는 것으로 보고된 인간 프로락틴 (Kulkarni MV *et al*. J Biol Chem. 2010;285:38524-33)을 포함하는 생물학적 조절에서 중요한 역할을 한다. 고도의 pH-의존적 결합 이벤트는 다수의 이온화 가능한 잔기 (예를 들어, 히스티딘)를 필요로 하고 이들은 본원에 기재된 방법론에 사용된 스크리닝 방법론에 의해 성공적으로 도입될 수 있다. 이미다졸은 히스티딘의 측쇄를 형성하고 이의 pK ($\approx$6.0)가 생리학적 pH 범위 내에 있을 뿐만 아니라 이미다졸의 양성자화된 형태와 비양성자화된 형태는 화학적으로 매우 상이하다. 비양성자화된 형태는 소수성 및 방향족 특성을 갖는 반면, 양성자화된 형태는 친수성 및 양전하를 띤다. 따라서, 화학적 상호작용은 pK보다 높거나 낮은 pH에서 크게 상이하다. pH 7.0에서 비양성자화된 형태가 우세하고 다른 소수성 그룹과의 상호작용을 선호하며 pH 5.0에서 이미다졸 그룹은 양성자화되어 친수성 환경을 선호한다.

[0790] 5개의 친화도 성숙된 항-PD-L1 Fab에서 HCDR1, 2 및 3 및 LCDR2 및 3 서열은 야생형 2A09 Fab와 동일하다. HCDR3에는 1개의 His 잔기만 있으며, 이는 이 클론의 불량한 pH 민감도를 설명할 수 있다. 5개의 친화도 성숙된 항-PD-L1 Fab는 CDR1 서열에 1 또는 2개의 추가 His 잔기를 갖고 (표 10), VL 및 VH 서열은 표 11에 도시되어 있다.

[0791] 추가 pH 특이성 및 친화도는 부분적으로 PD-L1 에피토프와 상호작용하고 "pH-스위치"를 생성할 수 있는 LCDR1에 추가 His 잔기가 있는 클론의 선택 때문일 수 있다.

[0792] [표 10]

[0793] WT 2A09 클론에 대한 친화도 성숙된 항-PD-L1 Fab의 LCDR1 서열의 비교.

| 라이브러리 | Fab 클론 | LCDR1 |
|---|---|---|
| | 2A09 WT | TRSSGSIASNYVQ (서열 번호 2) |
| LCDR1 | 8G08 | ISNDVPASGHYHR (서열 번호 10) |
| LCDR1 | 8D06 | VLSPRTHAGHYYR (서열 번호 12) |
| LCDR1 | 8A04 | MRTGTGNKGHYTR (서열 번호 14) |
| LCDR1 | 8B06 | RETELSRRLHYVR (서열 번호 16) |
| LCDR1 | 8D04 | RGTGSSFHHKYVR (서열 번호 18) |

[0794]

[0795] [표 11]

[0796] 친화도 성숙된 항-PD-L1 Fab의 VH 및 VL 서열의 비교. HCDR1, 2 및 3 및 LCDR 1, 2 및 3 영역에 밑줄이 그어져 있다.

| Fab 클론 | VH 서열 | VL 서열 |
|---|---|---|
| 8G08 | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMYWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNT LNLQMNSLRAEDTAVYYCAKGALTHWGVVIGDGMDVW GQGTTVTVSS (서열 번호 5) | NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCISNDVPASGHYHR WYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSS NSASLTISGLKTEDEADYYCQSFDSTNPWVFGGGTK LTVL (서열 번호 9) |
| 8D06 | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMYWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNT LNLQMNSLRAEDTAVYYCAKGALTHWGVVIGDGMDVW GQGTTVTVSS (서열 번호 5) | NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCVLSPRTHAGHYYR WYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSS NSASLTISGLKTEDEADYYCQSFDSTNPWVFGGGTK LTVL (서열 번호 11) |
| 8A04 | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMYWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNT LNLQMNSLRAEDTAVYYCAKGALTHWGVVIGDGMDVW GQGTTVTVSS (서열 번호 5) | NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCMRTGTGNKGHYTR WYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSS NSASLTISGLKTEDEADYYCQSFDSTNPWVFGGGTK LTVL (서열 번호 13) |
| 8B06 | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMYWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNT LNLQMNSLRAEDTAVYYCAKGALTHWGVVIGDGMDVW GQGTTVTVSS (서열 번호 5) | NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCRETELSRRLHYVRW YQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSN SASLTISGLKTEDEADYYCQSFDSTNPWVFGGGTKL TVL (서열 번호 15) |
| 8D04 | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMYWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNT LNLQMNSLRAEDTAVYYCAKGALTHWGVVIGDGMDVW GQGTTVTVSS (서열 번호 5) | NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCRGTGSSFHHKYVR WYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSS NSASLTISGLKTEDEADYYCQSFDSTNPWVFGGGTK LTVL (서열 번호 17) |

[0797]

[0798] **WO2014055897로부터 Ab-52 및 Ab-55의 평가**

[0799] WO2014055897 (DANA FARBER CANCER INST INC)은 PD-L1에 결합하는 인간 단일클론 항체를 개시하고 있다. WO2014055897에 개시된 Ab-52 및 Ab-55의 VL 서열은 서열 번호 2의 서열을 포함한다. pH 의존적 결합의 임의의 증거가 있는지를 알아보기 위해 이들 항체를 평가하였다

[0800] **방법**

[0801] Ab-52 및 Ab-55의 전장 항-PD-L1 항체를 WO2014055897 (WO2014055897의 16 페이지 참조)의 서열로부터 제조하였다. 양성 대조군 항-PD-L1 mAb, 2.7A04OPT는 WO2011066389 (WO2011066389의 페이지 71 참조)로부터이고 음성 대조군 mAb (2A11)는 항-HEL (난백 리소자임)이다.

[0802] 상업용 키트를 사용하여 온전한 mAb로부터 Fab를 제조하였다.

[0803] **PD-L1 중화 ELISA**

[0804] mAb 또는 Fab (100 내지 0.14 nM)를 1 μg/ml PD-1로 코팅된 96-웰 플레이트에 첨가하고 1 μg/ml PD-L1-비오

틴의 억제를 측정하여 각 mAb 또는 Fab의 중화 능력을 결정하였다. PD-L1-비오틴과의 PD-L1 상호작용은 엑스트라비딘-HRP로 검출되었다. 사용된 완충액은 pH 6.0 또는 pH 7.4에서 0.1% 카세인/크렙스/락테이트였다.

[0805] 수행된 검정의 전체 방법론은 "상이한 pH에서 PD-L1에 결합하는 ELISA" 및 "PD-1:PD-L1 억제에 대한 항체 스크리닝"이란 제목 하에 본 출원의 실시예 섹션에 제공된다.

[0806] **결과**

[0807] 제1 실험 (도 8)에서, Ab-52 및 Ab-55의 Fab를 pH 6 또는 pH 7.4에서 PD-L1을 중화시키는 이들의 능력을 본 발명의 5개 Fab (8B06, 8D06, 8G08, 8A04, 8D04) 각각과 비교하였다. WO2011066389로부터의 Fab 2.7A04OPT를 양성 대조군으로 사용하였다.

[0808] 양성 대조군 비교물질 mAb 2.7A04OPT는 pH 7.4와 비교하여 pH 6에서 PD-L1이 PD-1에 결합하는 것을 동등하게 억제하였다.

[0809] 본 발명의 5개 Fab (8D06, 8A04, 8G08, 8D04, 8B06)는 pH 6에서 PD-1에 대한 PD-L1 결합을 억제하였고 예상대로 pH 7.4에서는 억제가 거의 관찰되지 않았다. 대조적으로, Ab-52 및 Ab-55의 Fab에서는 어느 pH에서도 결합의 억제가 관찰되지 않았다. 이는 도 8에 사용된 다른 Fab와 비교하여 Fab Ab-52 및 Ab-55의 낮은 중화 친화도 때문일 수 있다.

[0810] 이러한 이유로, Ab-52 및 Ab-55 mAb는 두 번째 실험에서 pH 의존성 중화 활성이 있는지 결정하기 위해 사용되었다 (도 9).

[0811] 본 발명의 Fab 중 2개 (8G08 및 8B06)가 이 검정에 사용되었으며 pH 6 및 pH 6.5에서 pH 의존성 중화를 다시 나타내었고 pH 7.4에서는 활성이 거의 없었다. 완전히 대조적으로, mAbs Ab52 및 Ab55는 PD-1에 결합하는 PD-L1의 pH 의존성 중화를 나타내지 않았다. 데이터는 양성 대조군 Fab 2.7A04OPT에 필적한다.

[0812] 따라서, 서열의 작은 중첩에도 불구하고, Ab-52 및 Ab-55는 본 발명의 항-PD-L1 항원 결합 분자의 신규한 성질을 공유하지 않는다. 구체적으로, Ab-52 및 Ab-55는 pH 7.4보다 pH 6.0에서 PD-L1에 대해 더 높은 친화도를 공유하지 않으며, 이는 본 발명의 항-PD-L1 항원 결합 분자에 의해 입증된다.

[0813] **발명의 구현예**

[0814] 본 발명은 번호가 매겨진 조항으로 나열된 적어도 하기 구현예를 제공한다.

[0815] 1. 항-PD-L1 항원 결합 분자로서,

[0816] 서열 번호 16, 12, 10, 14, 18, 또는 2 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 VLCDR1을 포함하는 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0817] 2. 조항 1에 있어서, 서열 번호 16, 12, 10, 14, 18, 및 2 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VLCDR1을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0818] 3. 조항 1에 있어서, 서열 번호 16, 12, 10, 14, 18, 또는 2 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 VLCDR1을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0819] 4. 조항 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서,

[0820] 서열 번호 6의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 VHCDR1

[0821] 서열 번호 7의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 VHCDR2; 및

[0822] 서열 번호 8의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 VHCDR3 및/또는

[0823] 서열 번호 16, 12, 10, 14, 18, 및 2 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 VLCDR1;

[0824] 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 VLCDR2;

[0825] 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 VLCDR3을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0826] 5. 조항 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서,

[0827] 서열 번호 6의 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을

갖는 VHCDR1;

[0828] 서열 번호 7의 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VHCDR2; 및

[0829] 서열 번호 8의 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VHCDR3; 및/또는

[0830] 서열 번호 16, 12, 10, 14, 18, 및 2 중 임의의 하나의 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VLCDR1;

[0831] 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VLCDR2; 및

[0832] 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VLCDR3을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0833] 6. 조항 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서,

[0834] 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 VHCDR1

[0835] 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VHCDR2; 및

[0836] 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VHCDR3 및/또는

[0837] 서열 번호 16, 12, 10, 14, 18, 또는 2 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 VLCDR1;

[0838] 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 VLCDR2; 및

[0839] 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 VLCDR3을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0840] 7. 조항 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서,

[0841] 아미노산 서열 번호 5와 적어도 80% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0842] 서열 번호 15, 서열 번호 11, 서열 번호 9, 서열 번호 13, 서열 번호 17, 서열 번호 1로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0843] 8. 조항 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서,

[0844] 아미노산 서열 번호 5와 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0845] 서열 번호 15, 서열 번호 11, 서열 번호 9, 서열 번호 13, 서열 번호 17, 서열 번호 1로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0846] 9. 조항 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서,

[0847] 아미노산 서열 번호 5를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는

[0848] 서열 번호 15, 서열 번호 11, 서열 번호 9, 서열 번호 13, 서열 번호 17 및 서열 번호 1로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0849] 10. 조항 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는

[0850] (a) 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0851] 아미노산 서열 RETELSRRLHYVR (서열 번호 16)을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QNVLTTPWT (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

[0852] 이의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VHCDR 및 VLCDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역

[0853] 을 포함하는 항-PD-L1 항원 결합 분자;

[0854] (b) 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0855] 아미노산 서열 VLSPRTHAGHYYR (서열 번호 12)을 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QNVLTTPWT (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 VLCDR1을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

[0856] 이의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VHCDR 및 VLCDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역

[0857] 을 포함하는 항-PD-L1 항원 결합 분자;

[0858] (c) 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0859] 아미노산 서열 ISNDVPASGHYHR (서열 번호 10)을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QNVLTTPWT (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

[0860] 이의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VHCDR 및 VLCDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역

[0861] 을 포함하는 항-PD-L1 항원 결합 분자;

[0862] (d) 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0863] 아미노산 서열 MRTGTGNKGHYTR (서열 번호 14)을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QNVLTTPWT (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

[0864] 이의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VHCDR 및 VLCDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역

[0865] 을 포함하는 항-PD-L1 항원 결합 분자;

[0866] (e) 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0867] 아미노산 서열 RGTGSSFHHKYVR (서열 번호 18)을 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QNVLTTPWT (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

[0868] 이의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VHCDR 및 VLCDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역

[0869] 을 포함하는 항-PD-L1 항원 결합 분자;

[0870] (f) 아미노산 서열 SYGMY (서열 번호 6)를 포함하는 VHCDR1, 아미노산 서열 VISYDGSNKYYADSVKG (서열 번호 7)를 포함하는 VHCDR2, 아미노산 서열 GALTHWGVVIGDGMDV (서열 번호 8)를 포함하는 VHCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0871] 아미노산 서열 TRSSGSIASNYVQ (서열 번호 2)를 포함하는 VLCDR1, 아미노산 서열 EDDQRPS (서열 번호 3)를 포함하는 VLCDR2 및 아미노산 서열 QNVLTTPWT (서열 번호 4)를 포함하는 VLCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

[0872] 이의 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VHCDR 및 VLCDR을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역

[0873] 을 포함하는 항-PD-L1 항원 결합 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0874] 11. 조항 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원-결합 분자는

[0875] (a) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 15의 아미노산을 포함하는 VL 또는 서열 번호 5 및 서열 번호 15와 각각 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VH 및 VL;

[0876] (b) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VL 또는 서열 번호 5 및 서열 번호 11과 각각 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VH 및 VL;

[0877] (c) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VL 또는 서열 번호 5 및 서열 번호 9와 각각 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VH 및 VL;

[0878] (d) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 13의 아미노산을 포함하는 VL 또는 서열 번호 5 및 서열 번호 13과 각각 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VH 및 VL;

[0879] (e) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 17의 아미노산을 포함하는 VL 또는 서열 번호 5 및 서열 번호 17과 각각 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VH 및 VL;

[0880] (f) 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 VL 또는 서열 번호 5 및 서열 번호 1과 각각 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는 VH 및 VL로 이루어진 그룹으로부터 선택된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항-PDL1 항원 결합 분자.

[0881] 12. 조항 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 상기 항-PD-L1 항원 결합 분자는 8B06, 8D06, 8G08, 8A04, 8D04, 2A09로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체인, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0882] 13. 조항 12에 있어서, 상기 항체는 모든 6개 CDR 영역에 걸쳐 1 내지 10개, 1 내지 5개 또는 1 내지 2개의 보존적 아미노산 치환을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0883] 14. 조항 12에 있어서, 상기 항체는 가변 경쇄 및 중쇄 영역 중 하나 또는 둘 모두에 1 내지 10개, 1 내지 5개 또는 1 내지 2개의 보존적 아미노산 치환을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0884] 15. 조항 12에 있어서, 상기 항체는 프레임워크 영역에 1 내지 10개, 1 내지 5개 또는 1 내지 2개의 보존적 아미노산 치환을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0885] 16. PD-L1에 특이적으로 결합하고 조항 1 내지 15 중 어느 하나의 항원-결합 분자에 대한 PD-L1의 결합을 억제하는 항원-결합 분자.

[0886] 17. 조항 16에 있어서, 상기 항원-결합 분자는 PD-L1에 특이적으로 결합하고 8B06, 8D06, 8G08, 8A04, 8D04, 2A09로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체에 대한 PD-L1의 결합을 억제하는, 항원-결합 분자.

[0887] 18. 조항 1 내지 15 중 어느 하나의 항원-결합 분자에 의해 결합되는 PD-L1의 에피토프에 특이적으로 결합하는, 항원-결합 분자.

[0888] 19. 조항 18에 있어서, 상기 항원-결합 분자는 8B06, 8D06, 8G08, 8A04, 8D04, 2A09로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체에 의해 결합되는 PD-L1의 에피토프에 특이적으로 결합하는, 항원-결합 분자.

[0889] 20. 인간 PD-L1의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원-결합 분자로서, 상기 에피토프가 서열 번호 19에 포함되는 항원-결합 분자.

[0890] 21. 시노몰구스 PD-L1의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원-결합 분자.

[0891] 22. 조항 20에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 8B06, 8D06, 8G08, 8A04, 8D04, 2A09, 및 이의 단편 및 변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 항원-결합 분자.

[0892] 23. 조항 20에 있어서, 상기 항원-결합 분자는 8B06인, 항원-결합 분자.

[0893] 24. 조항 20에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 8A04인, 항원 결합 분자.

[0894] 25. PD-L1에 특이적으로 결합하고 조항 1 내지 15 중 어느 하나의 항원-결합 분자와 PD-L1에 대한 결합과 경쟁하는 항원 결합 분자.

[0895] 26. 조항 25에 있어서, 항원-결합 분자는 PD-L1에 특이적으로 결합하고 8B06, 8D06, 8G08, 8A04, 8D04, 2A09로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항체와 PD-L1에 대한 결합과 경쟁하는, 항원-결합 분자.

[0896] 27. 조항 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 특정된 서열 또는 서열들에서 1 내지 10개의 아미노산 치환을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0897] 28. 조항 27에 있어서, 특정된 서열 또는 서열들에서 1 내지 5개의 아미노산 치환을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0898] 29. 조항 27에 있어서, 특정된 서열 또는 서열들에서 1 내지 2개의 아미노산 치환을 포함하는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0899] 30. 조항 27 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 1 내지 10, 1 내지 5 또는 1 내지 2개의 아미노산 치환은 항원 결합 분자의 CDR 영역 또는 CDR 영역에 있는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0900] 31. 조항 27 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 상기 1 내지 10개, 1 내지 5개 또는 1 내지 2개의 아미노산 치환은 항원 결합 분자의 가변 영역 중 하나 또는 둘 모두에 있는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0901] 32. 조항 27 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 상기 1 내지 10개, 1 내지 5개 또는 1 내지 2개의 아미노산 치환은 항원 결합 분자의 프레임워크 영역에 있는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0902] 33. 조항 27 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원-결합 분자는 8B06, 8D06, 8G08, 8A04, 8D04, 2A09로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 항체로부터 유래된 변이체인, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0903] 34. 조항 13 내지 15 또는 27 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 상기 아미노산 치환이 보존적 아미노산 치환인, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0904] 35. 조항 1 내지 34에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 유도체인, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0905] 36. 조항 35에 있어서, 상기 항원-결합 항체 단편 또는 유도체는 Fab, F(ab')2, Fv, scFv, dAb, Fd, 또는 디아바디인, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0906] 37. 조항 35에 있어서, 상기 항원-결합 항체 단편은 Fab인, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0907] 38. 조항 35에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 유도체는 1가인, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0908] 39. 조항 35에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 유도체는 완전한 인간인, 항-PD-L1 항체.

[0909] 40. 조항 35 내지 39 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체 또는 항원-결합 항체 단편 또는 유도체는 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM 또는 IgY 항체 또는 항원-결합 항체 단편 또는 유도체인, 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원-결합 항체 단편 또는 유도체.

[0910] 41. 조항 35 내지 39 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 유도체는 IgG 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 유도체인, 항-PD-L1 항체 또는 항체 단편.

[0911] 42. 조항 41에 있어서, 상기 IgG 항체 또는 항원-결합 항체 단편 또는 유도체는 IgG1 항체 또는 이의 항원-결합 항체 단편 또는 유도체인, 항-PD-L1 항체 또는 항원-결합 항체 단편 또는 유도체.

[0912] 43. 항-PD-L1 항원 결합 분자로서, 상기 항-PD-L1 항원 결합 분자는 항체 2A09의 친화도 성숙된 돌연변이체인 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0913] 44. 조항 43에 있어서, 상기 친화도 성숙된 돌연변이체는 8B06, 8D06, 8G08, 8A04 및 8D04로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 항-PD-L1 항원 결합 분자.

[0914] 45. 조항 1 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 인간 또는 시노몰구스 PD-L1에 특이적으로 결합하는, 항원 결합 분자.

[0915] 46. 조항 1 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 pH 의존적 방식으로 PD-L1에 특이적으로 결합하는, 항원 결합 분자.

[0916] 47. 조항 1 내지 46 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 산성 pH에서 PD-L1에 특이적으로 결합하는, 항원 결합 분자.

[0917] 48. 조항 1 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 약 pH 6 내지 약 pH 6.5의 pH에서 PD-L1에 특이적으로 결합하는, 항원 결합 분자.

[0918] 49. 조항 1 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 생리학적 pH보다 산성 pH에서 PD-L1에 대해 더 높은 친화도를 갖는, 항원 결합 분자

[0919] 50. 조항 1 내지 49 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 약 pH 7.4에서보다 약 pH 6.0에서 PD-L1에 대해 더 높은 친화도를 갖는, 항원 결합 분자.

[0920] 51. 조항 49에 있어서, 상기 산성 pH는 약 pH 6.5 이하인, 항원 결합 분자.

[0921] 52. 조항 49에 있어서, 상기 생리학적 pH는 약 pH 7.4인, 항원 결합 분자.

[0922] 53. 조항 1 내지 52 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 약 pH 7.4에서보다 약 pH 6.0에서 PD-L1에 대해 적어도 약 5배 더 높은 친화도를 갖는, 항원 결합 분자.

[0923] 54. 조항 1 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 pH 6.0에서 PD-L1에 대한 EC50 값이 약 15 nM 미만인, 항원 결합 분자.

[0924] 55. 조항 1 내지 54 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 pH 6.0에서 PD-L1에 대한 EC50 값이 약 1.45 nM 내지 약 15 nM인, 항원 결합 분자.

[0925] 56. 조항 1 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 pH 7.4에서 PD-L1에 대한 EC50 값이 적어도 약 10 nM인, 항원 결합 분자.

[0926] 57. 조항 1 내지 56 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 pH 7.4에서 PD-L1에 대한 EC50 값이 약 13.2 nM 내지 약 100 nM인, 항원 결합 분자.

[0927] 58. 조항 1 내지 57 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 적어도 약 5의 pH 6.0:7.4 결합 비를 갖는, 항원 결합 분자.

[0928] 59. 조항 1 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 pH 6.0에서 PD-L1에 대한 EC50 값이 약 15 nM 미만이고 pH 7.4에서 PD-L1에 대한 EC50 값이 적어도 약 10 nM이고, 여기서, 항원 결합 분자는 적어도 5의 pH 6.0:7.4 결합 비를 갖는, 항원 결합 분자.

[0929] 60. 조항 1 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 PD-1 및/또는 CD80에 대한 PD-L1의 결합, 또는 PD-1 및/또는 CD80에 대한 PD-L1 발현 세포의 결합을 억제하는, 항원 결합 분자.

[0930] 61. 조항 60에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 적어도 약 40%, 적어도 약 50% 또는 적어도 약 80%까지 결합을 억제하는, 항원 결합 분자.

[0931] 62. 조항 1 내지 61 중 어느 하나에 있어서, PD-1에 결합하는 PD-L1의 IC50 억제 값은 약 pH 6.0에서 보다 약 pH 7.4에서 더 높은, 항원 결합 분자.

[0932] 63. 조항 1 내지 62 중 어느 하나에 있어서, 약 pH 6.0에서 PD-1에 결합하는 PD-L1의 IC50 억제 값은 약 12.1 nM 내지 약 42.3 nM인, 항원 결합 분자.

[0933] 64. 조항 1 내지 63 중 어느 하나에 있어서, 약 pH 6.0에서 PD-1에 결합하는 PD-L1의 IC50 억제 값은 약 50 nM 미만인, 항원 결합 분자.

[0934] 65. 조항 1 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 약 pH 7.4에서 PD-1에 결합하는 PD-L1의 IC50 억제 값은 약 81.2 nM 내지 약 100 nM인, 항원 결합 분자.

[0935] 66. 조항 1 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 약 pH 7.4에서 PD-1에 결합하는 PD-L1의 IC50 억제 값은 적어도 50 nM인, 항원 결합 분자.

[0936] 67. 조항 1 내지 66 중 어느 하나에 있어서, pH 7.4에서 PD-1에 결합하는 PD-L1의 IC50 억제 값은 적어도 80

nM인, 항원 결합 분자.

[0937] 68. 조항 1 내지 67 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 적어도 약 2의 pH 6.0:7.4 억제율을 갖는, 항원 결합 분자.

[0938] 69. 조항 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, pH 6.0에서 PD-1에 결합하는 PD-L1의 IC50 억제 값은 약 50 nM 미만이고 pH 7.4에서 PD-1에 결합하는 PD-L1의 IC50 억제 값은 적어도 약 80 nM이고, 여기서, 항원 결합은 분자는 적어도 약 2의 pH 6.0:7.4 억제율을 갖는, 항원 결합 분자.

[0939] 70. 조항 1 내지 69 중 어느 하나에 있어서, 상기 PD-L1은 인간 PD-L1 또는 시노몰구스 PD-L1인, 항원 결합 분자.

[0940] 71. 조항 1 내지 70 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 생체내 또는 시험관내에 투여될 때 면역 억제를 역전시키는, 항원 결합 분자.

[0941] 72. 조항 1 내지 71 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 생체내 또는 시험관내에 투여될 때 T 세포 면역을 향상시키는, 항원 결합 분자.

[0942] 73. 조항 1 내지 72 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자는 면역관문 억제제인, 항원 결합 분자.

[0943] 74. 조항 1 내지 73 중 어느 하나의 항원 결합 분자를 포함하고, 임의로 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

[0944] 75. 조항 74에 있어서, 추가의 치료 활성제를 추가로 포함하거나, 상기 약제학적 조성물은 또 다른 요법 또는 추가의 치료 활성제와 조합하여 사용하기 위한, 약제학적 조성물.

[0945] 76. 조항 75에 있어서, 상기 다른 요법 또는 추가의 치료 활성제는 방사선 요법, 화학요법 치료, 표적 요법, 면역요법, 단일클론 항체 요법, 호르몬 요법, 혈관신생 억제, 암 백신, 종양성 바이러스, 톨 유사 수용체 작용제, 후성유전학적 변형, 조작된 T 세포, T 세포 공동-자극 작용제, 티로신 키나제 억제제, 다른 항암 화학제, 암 치료를 위한 완화 치료, 면역관문 억제제, 면역억제제, 항염증제, 면역 조절제, 면역 활성화제 및/또는 억제제 예컨대, IDO 억제제, CSF-1R 억제제, TGFB 억제제, T 세포 공동-자극 길항제, Treg 억제제, 대식세포 조절제, 자연 살해 세포 조절제 또는 케모카인 수용체 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

[0946] 77. 조항 76에 있어서, 상기 화학요법 치료는 젬시타빈, 사이클로포스파미드, 독소루비신, 파클리탁셀, 시스플라틴으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

[0947] 78. 조항 76에 있어서, 상기 T 세포 공동-자극 작용제는 4-1BB, OX40, CD40, GITR, BTLA, CD70 및 ICOS로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

[0948] 79. 조항 76에 있어서, 상기 면역관문 억제제는 PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, VISTA, 및 TIGIT로 이루어진 그룹의 구성원에 작용하는, 약제학적 조성물.

[0949] 80. 조항 75에 있어서, 상기 다른 요법 또는 추가의 치료 활성제는 또 다른 항원 결합 분자인, 약제학적 조성물.

[0950] 81. 조항 80에 있어서, 상기 추가의 항원 결합 분자는 항-PD-L1 항원 결합 분자, 항-PD-1 항원 결합 분자, 항-CTLA-4 항원 결합 분자, 항-OX40 항원 결합 분자, 항-ICOS 항원 결합 분자, 항-GITR 항원 결합 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 임의로 상기 추가의 항원 결합 분자는 항체인, 약제학적 조성물.

[0951] 82. 추가의 치료 활성제를 추가로 포함하는, 조항 1 내지 73 중 어느 하나의 항원 결합 분자 또는 조항 74 내지 81 중 어느 하나에 따른 약제학적 조성물을 포함하는 키트.

[0952] 83. 조항 82에 있어서, 사용 지침서를 추가로 포함하는, 키트.

[0953] 84. 조항 82 또는 83에 있어서, 상기 약제학적 성분이 키트에 별도로 배치되는, 키트.

[0954] 85. 조항 82 내지 84 중 어느 하나에 있어서, 상기 추가의 치료 활성제는 면역관문 억제제, 면역억제제, 항염증제, 면역 조절제, 면역 활성화제 및/또는 억제제 예컨대, IDO 억제제, CSF-1R 억제제, TGFB 억제제, T 세포 공동-자극 길항제, Treg 억제제, 대식세포 조절제, 자연 살해 세포 조절제 또는 케모카인 수용체 억제제로 이루어진 목록으로부터 선택되는, 키트.

[0955] 86. 조항 82 내지 84 중 어느 하나에 있어서, 상기 추가의 치료 활성제는 면역관문 억제제인, 키트.

[0956] 87. 조항 82 내지 86 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 결합 분자 또는 약제학적 조성물 및 추가의 치료 활성제는 개별, 순차적 또는 동시 투여를 위한 것인, 키트.

[0957] 88. 의약에 사용하기 위한, 조항 1 내지 73 중 어느 하나의 항원 결합 분자, 또는 조항 74 내지 81 중 어느 하나의 약제학적 조성물.

[0958] 89. 암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 항목 1 내지 73 중 어느 하나의 항원 결합 분자, 또는 조항 78 내지 81 중 어느 하나의 약제학적 조성물.

[0959] 90. 조항 89에 있어서, 상기 암은 심장, 육종, 혈관육종, 섬유육종, 횡문근육종, 지방육종, 점액종, 전이성, 횡문근종, 섬유종, 지방종 및 기형종; 폐, 기관지 암종, 편평 세포, 미분화 소세포, 비-소세포 미분화 대세포, 선암종, 폐포 (세기관지) 암종, 기관지 선종, 육종, 림프종, 연골성 과오종, 중피중; 위장관: 식도, 편평 세포 암종, 선암종, 평활근육종, 림프종, 위, 암종, 림프종, 평활근육종, 두경부, 위, 췌장, 관 선암종, 인슐린종, 글루카곤종, 가스트린종, 카르시노이드 종양, 비포마, 소장, 선암종, 림프종, 카르시노이드 종양, 카포시 육종, 평활근종, 혈관종, 지방종, 신경섬유종, 섬유종, 대장, 선암종, 관상 선종, 융모 선종, 과오종, 평활근종, 결장직장; 비뇨생식관: 신장, 선암종, 빌름스 종양 [신모세포종], 림프종, 백혈병, 방광 및 요도, 편평 세포 암종, 이행 세포 암종, 선암종, 요로상피 암종, 전립선, 선암종, 육종), 고환 (정상피종, 기형종, 배아 암종, 기형암종, 융모막암종, 육종, 간질 세포 암종, 섬유종, 섬유선종, 선종 종양, 지방종; 간, 간암, 간세포 암종, 담관암종 간모세포종, 혈관육종, 간세포 선종, 혈관종; 뼈; 골원성 육종 (골육종), 섬유육종, 악성 섬유성 조직구종, 연골육종, 유잉 육종, 악성 림프종 (세망 세포 육종), 다발성 골수종, 악성 거대 세포 종양 척색종, 골연골종 (골연골 외골증), 양성 연골종, 연골모세포종, 연골점액섬유종, 유골 골종 및 거대 세포 종양; 신경계: 두개골, 골종, 혈관종, 육아종, 황색종, 변형성 골염, 수막, 수막종, 수막육종, 신경교종증, 뇌, 성상세포종, 수모세포종, 신경아교종, 뇌실막종, 배아세포종 [송과체종], 다형성 교모세포종, 희소돌기아교종, 신경초종, 망막모세포종, 선천성 종양, 척수 신경섬유종, 수막종, 신경아교종, 육종; 부인과: 자궁, 자궁내막 암종, 자궁경부, 자궁경부 암종, 종양전 자궁경부 이형성증, 난소, 난소 암종, 장액성 낭선암종, 점액성 낭선암종, 비분류 암종, 과립막 수막 세포 종양, 세르톨리-라이디히 세포 종양, 이상색식세포종, 악성 기형종, 외음부, 편평 세포 암종, 상피내 암종, 선암종, 섬유육종, 흑색종, 질, 투명 세포 암종, 편평 세포 암종, 포도상 육종 (배아 횡문근육종), 나팔관 암종, 유방; 혈액학: 혈액, 골수성 백혈병 [급성 및 만성], 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 골수증식성 질환, 다발성 골수종, 골수이형성 증후군), 호지킨 림프종, 호지킨병, 비호지킨 림프종 [악성 림프종]; 피부: 악성 흑색종, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 카포시 육종, 두더지 이형성 모반, 지방종, 혈관종, 피부 섬유종, 켈로이드, 건선; 및 부신: 신경모세포종으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 항원 결합 분자 또는 약제학적 조성물.

[0960] 91. 조항 89 또는 90에 있어서, 상기 암은 암종, 림프종, 백혈병, 모세포종 및 육종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항원 결합 분자, 친화도 성숙된 돌연변이체 또는 약제학적 조성물.

[0961] 92. 조항 89 내지 91 중 어느 하나에 있어서, 상기 암은 흑색종, 전이 암, 비-소세포 폐암, 두경부암, 호지킨 림프종, 요로상피 암종, 위암, 자궁경부암, 간세포 암종 및 방광암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 항원 결합 분자 또는 약제학적 조성물.

[0962] 93. 암 치료에 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서의 조항 1 내지 73 중 어느 하나의 항원 결합 분자의 용도.

[0963] 94. 조항 93에 있어서, 상기 암은 심장, 육종, 혈관육종, 섬유육종, 횡문근육종, 지방육종, 점액종, 전이성, 횡문근종, 섬유종, 지방종 및 기형종; 폐, 기관지 암종, 편평 세포, 미분화 소세포, 비-소세포 미분화 대세포, 선암종, 폐포 (세기관지) 암종, 기관지 선종, 육종, 림프종, 연골성 과오종, 중피중; 위장관: 식도, 편평 세포 암종, 선암종, 평활근육종, 림프종, 위, 암종, 림프종, 평활근육종, 두경부, 위, 췌장, 관 선암종, 인슐린종, 글루카곤종, 가스트린종, 카르시노이드 종양, 비포마, 소장, 선암종, 림프종, 카르시노이드 종양, 카포시 육종, 평활근종, 혈관종, 지방종, 신경섬유종, 섬유종, 대장, 선암종, 관상 선종, 융모 선종, 과오종, 평활근종, 결장직장; 비뇨생식관: 신장, 선암종, 빌름스 종양 [신모세포종], 림프종, 백혈병, 방광 및 요도, 편평 세포 암종, 이행 세포 암종, 선암종, 요로상피 암종, 전립선, 선암종, 육종), 고환 (정상피종, 기형종, 배아 암종, 기형암종, 융모막암종, 육종, 간질 세포 암종, 섬유종, 섬유선종, 선종 종양, 지방종; 간, 간암, 간세포 암종, 담관암종 간모세포종, 혈관육종, 간세포 선종, 혈관종; 뼈; 골원성 육종 (골육종), 섬유육종, 악성 섬유성 조직구종, 연골육종, 유잉 육종, 악성 림프종 (세망 세포 육종), 다발성 골수종, 악성 거대 세포 종양 척색종, 골연골종 (골연골 외골증), 양성 연골종, 연골모세포종, 연골점액섬유종, 유골 골종 및 거대 세포 종양; 신경계: 두개골, 골종, 혈관종, 육아종, 황색종, 변형성 골염, 수막, 수막종, 수막육종, 신경교종증, 뇌, 성상세포종, 수모세포

종, 신경아교종, 뇌실막종, 배아세포종 [송과체종], 다형성 교모세포종, 희소돌기아교종, 신경초종, 망막모세포종, 선천성 종양, 척수 신경섬유종, 수막종, 신경아교종, 육종; 부인과: 자궁, 자궁내막 암종, 자궁경부, 자궁경부 암종, 종양전 자궁경부 이형성증, 난소, 난소 암종, 장액성 낭선암종, 점액성 낭선암종, 비분류 암종, 과립막 수막 세포 종양, 세르톨리-라이디히 세포 종양, 이상색식세포종, 악성 기형종, 외음부, 편평 세포 암종, 상피내 암종, 선암종, 섬유육종, 흑색종, 질, 투명 세포 암종, 편평 세포 암종, 포도상 육종 (배아 횡문근육종), 나팔관 암종, 유방; 혈액학: 혈액, 골수성 백혈병 [급성 및 만성], 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 골수증식성 질환, 다발성 골수종, 골수이형성 증후군), 호지킨 림프종, 호지킨병, 비호지킨 림프종 [악성 림프종]; 피부: 악성 흑색종, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 카포시 육종, 두더지 이형성 모반, 지방종, 혈관종, 피부 섬유종, 켈로이드, 건선; 및 부신: 신경모세포종으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 항원 결합 분자의 용도.

[0964] 95. 조항 93에 있어서, 상기 암은 흑색종, 전이 암, 비-소세포 폐암, 두경부암, 호지킨 림프종, 요로상피 암종, 위암, 자궁경부암, 간세포 암종 및 방광암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 항원 결합 분자의 용도.

[0965] 96. 조항 1 내지 73 중 어느 하나의 항원 결합 분자 또는 조항 74 내지 81 중 어느 하나에 따른 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, PD-L1-매개된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방 방법.

[0966] 97. 조항 96에 있어서, 상기 PD-L1-매개된 질환 또는 장애는 암인, 방법.

[0967] 98. 조항 97에 있어서, 상기 암은 심장, 육종, 혈관육종, 섬유육종, 횡문근육종, 지방육종, 점액종, 전이성, 횡문근종, 섬유종, 지방종 및 기형종; 폐, 기관지 암종, 편평 세포, 미분화 소세포, 비-소세포 미분화 대세포, 선암종, 폐포 (세기관지) 암종, 기관지 선종, 육종, 림프종, 연골성 과오종, 중피종; 위장관: 식도, 편평 세포 암종, 선암종, 평활근육종, 림프종, 위, 암종, 림프종, 평활근육종, 두경부, 위, 췌장, 관 선암종, 인슐린종, 글루카곤종, 가스트린종, 카르시노이드 종양, 비포마, 소장, 선암종, 림프종, 카르시노이드 종양, 카포시 육종, 평활근종, 혈관종, 지방종, 신경섬유종, 섬유종, 대장, 선암종, 관상 선종, 융모 선종, 과오종, 평활근종, 결장직장; 비뇨생식관: 신장, 선암종, 빌름스 종양 [신모세포종], 림프종, 백혈병, 방광 및 요도, 편평 세포 암종, 이행 세포 암종, 선암종, 요로상피 암종, 전립선, 선암종, 육종), 고환 (정상피종, 기형종, 배아 암종, 기형암종, 융모막암종, 육종, 간질 세포 암종, 섬유종, 섬유선종, 선종 종양, 지방종; 간, 간암, 간세포 암종, 담관암종 간모세포종, 혈관육종, 간세포 선종, 혈관종; 뼈; 골원성 육종 (골육종), 섬유육종, 악성 섬유성 조직구종, 연골육종, 유잉 육종, 악성 림프종 (세망 세포 육종), 다발성 골수종, 악성 거대 세포 종양 척색종, 골연골종 (골연골 외골증), 양성 연골종, 연골모세포종, 연골점액섬유종, 유골 골종 및 거대 세포 종양; 신경계: 두개골, 골종, 혈관종, 육아종, 황색종, 변형성 골염, 수막, 수막종, 수막육종, 신경교종증, 뇌, 성상세포종, 수모세포종, 신경아교종, 뇌실막종, 배아세포종 [송과체종], 다형성 교모세포종, 희소돌기아교종, 신경초종, 망막모세포종, 선천성 종양, 척수 신경섬유종, 수막종, 신경아교종, 육종; 부인과: 자궁, 자궁내막 암종, 자궁경부, 자궁경부 암종, 종양전 자궁경부 이형성증, 난소, 난소 암종, 장액성 낭선암종, 점액성 낭선암종, 비분류 암종, 과립막 수막 세포 종양, 세르톨리-라이디히 세포 종양, 이상색식세포종, 악성 기형종, 외음부, 편평 세포 암종, 상피내 암종, 선암종, 섬유육종, 흑색종, 질, 투명 세포 암종, 편평 세포 암종, 포도상 육종 (배아 횡문근육종), 나팔관 암종, 유방; 혈액학: 혈액, 골수성 백혈병 [급성 및 만성], 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 골수증식성 질환, 다발성 골수종, 골수이형성 증후군), 호지킨 림프종, 호지킨병, 비호지킨 림프종 [악성 림프종]; 피부: 악성 흑색종, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 카포시 육종, 두더지 이형성 모반, 지방종, 혈관종, 피부 섬유종, 켈로이드, 건선; 및 부신: 신경모세포종인, 치료 방법.

[0968] 99. 조항 97에 있어서, 상기 암은 흑색종, 전이 암, 비-소세포 폐암, 두경부암, 호지킨 림프종, 요로상피 암종, 위암, 자궁경부암, 간세포 암종 및 방광암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 치료 방법

[0969] 100. 인간 PD-L1 또는 PD-L1 발현 세포를 조항 1 내지 73 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자와 접촉시키는 단계를 포함하여, PD-1 및/또는 CD80에 대한 인간 PD-L1의 결합 또는 PD-1 및/또는 CD80에 대한 PD-L1 발현 세포의 결합을 억제하는 방법,

[0970] 101. 조항 100에 있어서, 상기 방법은 시험관내 방법인, 방법.

[0971] 102. 조항 100에 있어서, 상기 방법은 생체내 방법인, 방법.

[0972] 103. 조항 1 내지 73 중 어느 하나의 항원 결합 분자를 암호화하는 핵산.

[0973] 104. 조항 103의 핵산을 포함하는 플라스미드.

[0974] 105. 조항 103의 핵산을 포함하는 벡터.

[0975] 106. 조항 104 또는 조항 105에 따른 플라스미드 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포.

[0976] 107. 항-PD-L1 항원 결합 분자를 발현하는 세포를 생성하는 방법으로서, 상기 세포를 조항 104 또는 105에 따른 플라스미드 또는 벡터로 형질감염시키는 단계를 포함하는 방법.

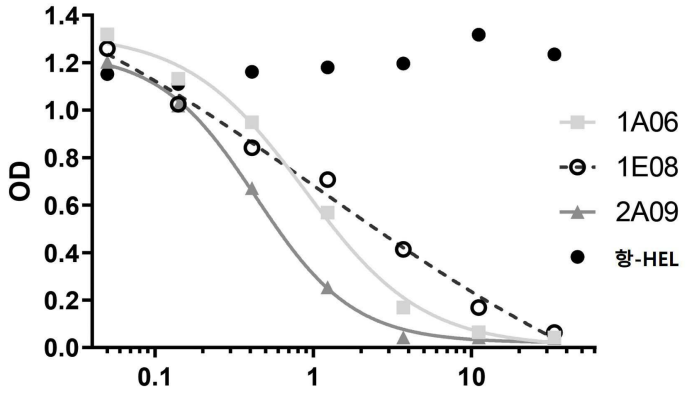
[0977] 108. 항-PD-L1 항원 결합 분자의 생성 방법으로서, 세포 내부에서 플라스미드 또는 벡터의 암호화 핵산 서열을 발현하는 조건 하에 세포 배양 배지에서 조항 106에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법.

[0978] 109. 조항 108에 있어서, 세포 배양 상청액으로부터 항-PD-L1 항원 결합 분자를 수득하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

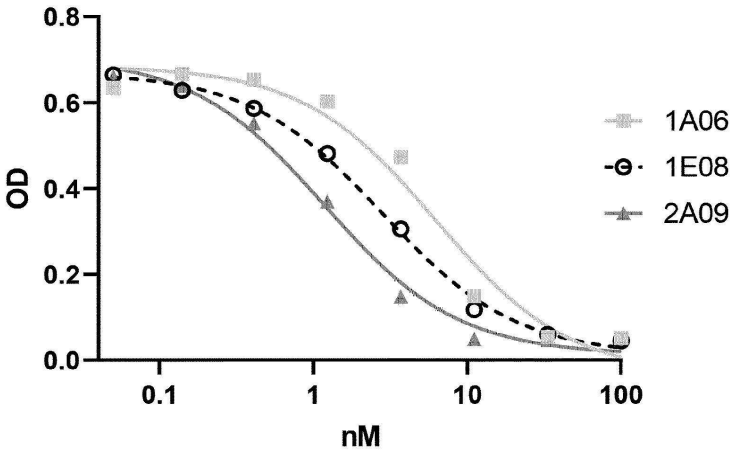
[0979] 110. 조항 109에 있어서, 수득된 항-PD-L1 항원 결합 분자를 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제와 함께 약제학적 조성물로 제형화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

## 도면

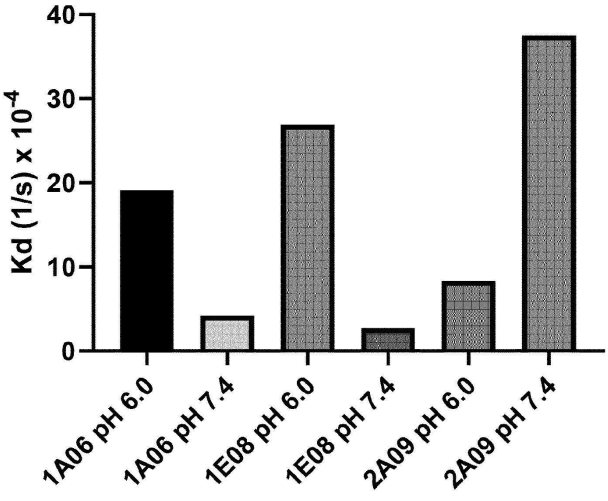
### 도면1a



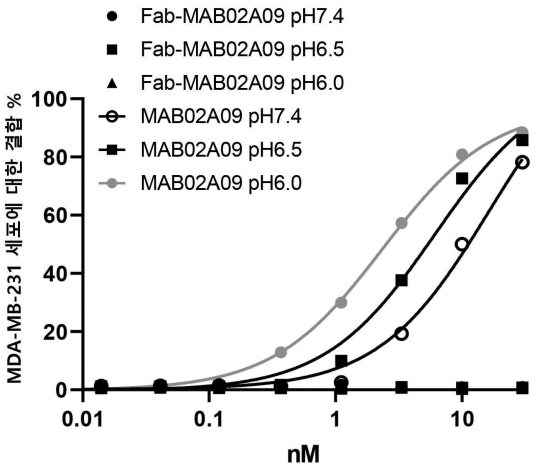

### 도면1b



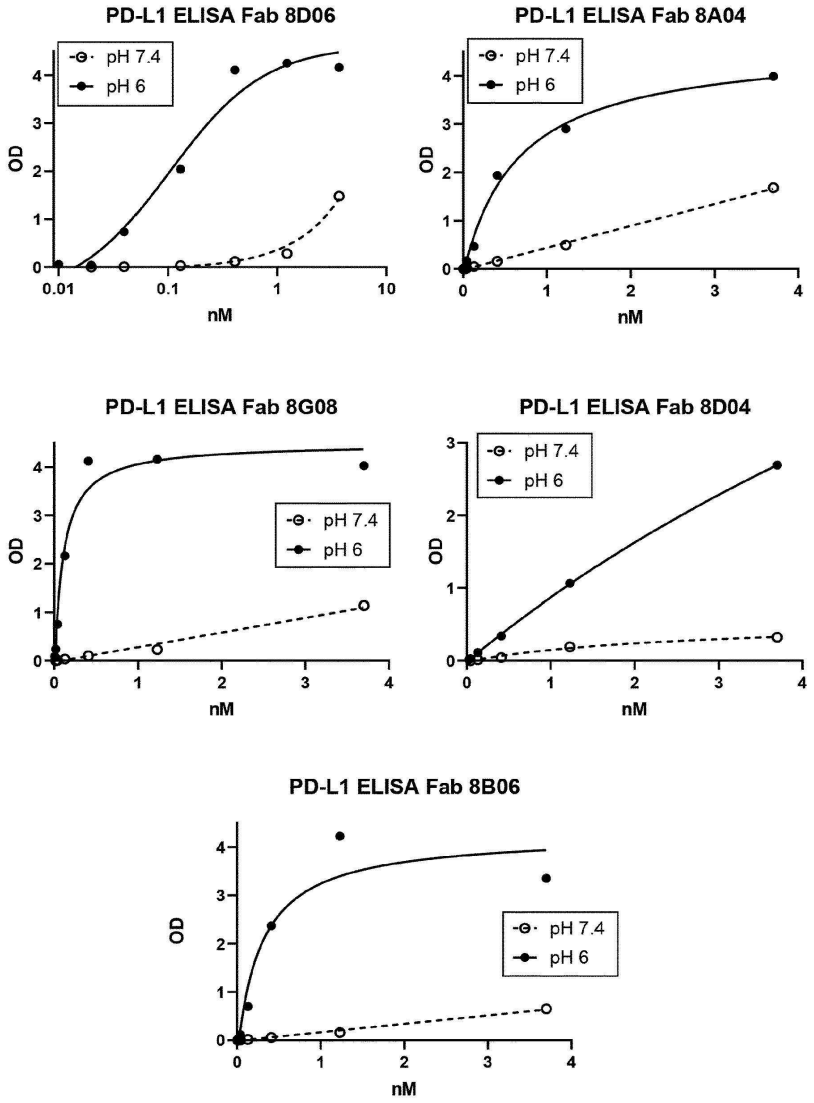
도면2


Kd (1/s) x 10-4
40
30
20
10
0
1A06 pH 6.0
1A06 pH 7.4
1E08 pH 6.0
1E08 pH 7.4
2A09 pH 6.0
2A09 pH 7.4

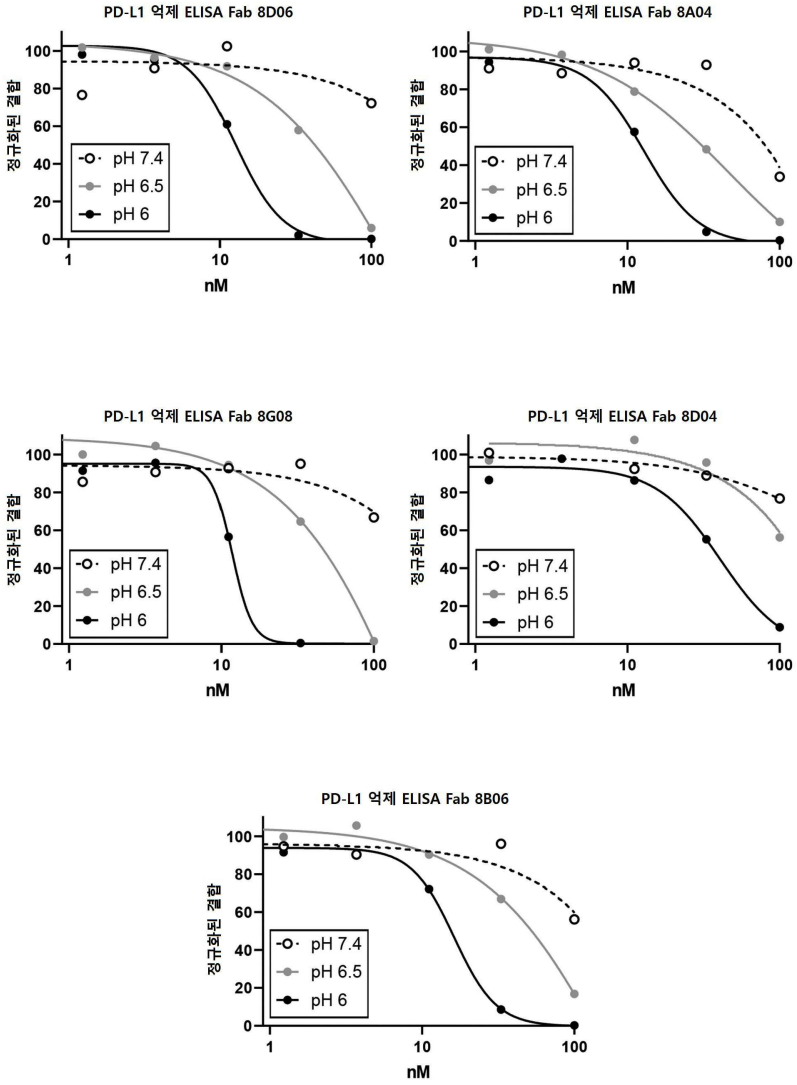
도면3


Fab-MAB02A09 pH7.4
Fab-MAB02A09 pH6.5
Fab-MAB02A09 pH6.0
MAB02A09 pH7.4
MAB02A09 pH6.5
MAB02A09 pH6.0
MDA-MB-231 세포에 대한 결합 %
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
nM

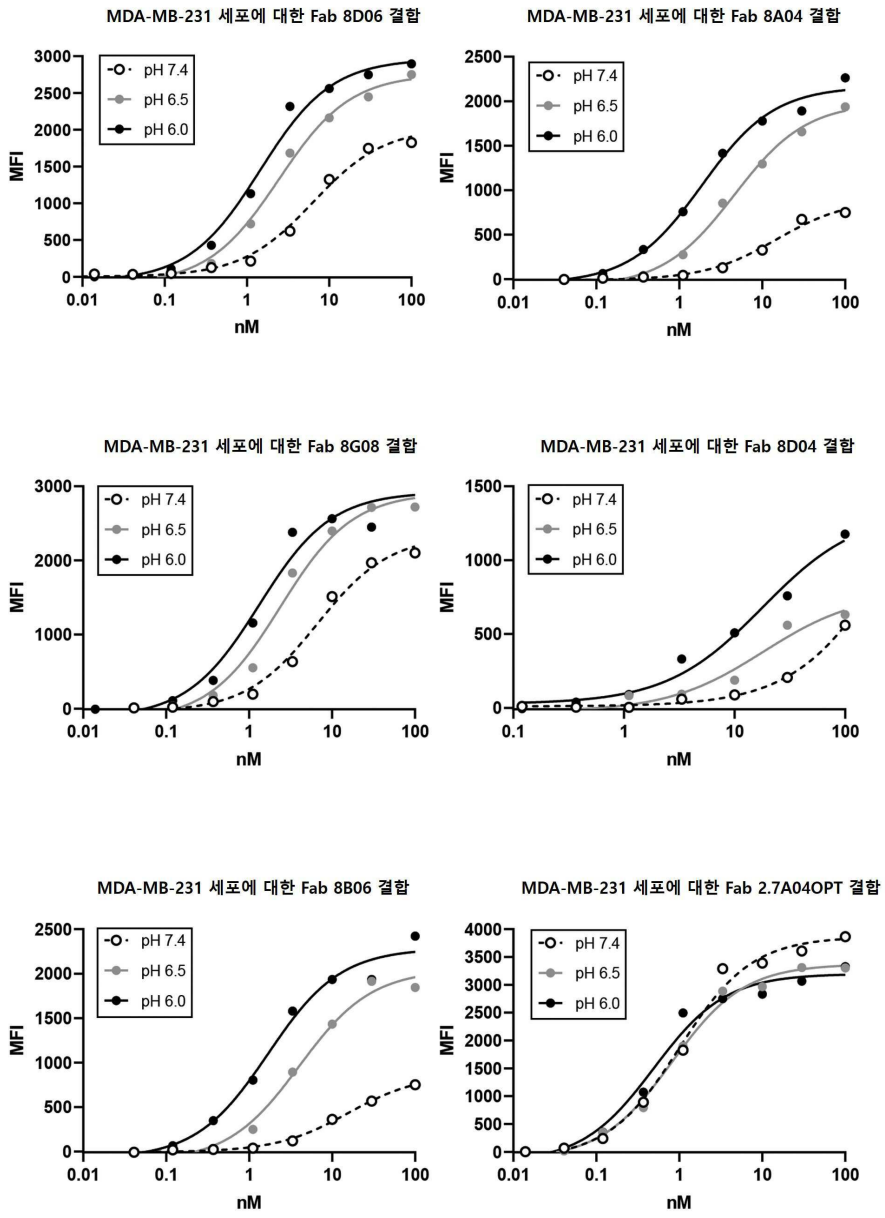
도면4


PD-L1 ELISA Fab 8D06
pH 7.4
pH 6
OD
nM
PD-L1 ELISA Fab 8A04
PD-L1 ELISA Fab 8G08
PD-L1 ELISA Fab 8D04
PD-L1 ELISA Fab 8B06

도면5


PD-L1 억제 ELISA Fab 8D06
PD-L1 억제 ELISA Fab 8A04
PD-L1 억제 ELISA Fab 8G08
PD-L1 억제 ELISA Fab 8D04
PD-L1 억제 ELISA Fab 8B06
정규화된 결합
nM
pH 7.4
pH 6.5
pH 6

도면6


MDA-MB-231 세포에 대한 Fab 8D06 결합
MDA-MB-231 세포에 대한 Fab 8A04 결합
MDA-MB-231 세포에 대한 Fab 8G08 결합
MDA-MB-231 세포에 대한 Fab 8D04 결합
MDA-MB-231 세포에 대한 Fab 8B06 결합
MDA-MB-231 세포에 대한 Fab 2.7A04OPT 결합
pH 7.4
pH 6.5
pH 6.0
MFI
nM

도면7a

| 클론 번호 | 클론 ID | 라이브러리 ID | 라이브러리명 | HCDR1 | HCDR1 번호 | HCDR2 | HCDR2 번호 | HCDR3 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 47 | FJ1424_P007MP05G06 | 2A09_WT clone | 2A09_WT clone | SYGMY | 1 | VISYDGSNKYYADSVKG | 1 | GALTHWGVVIGDGMDV |
| 351 | FJ1424_P007MP08G08 | FL0675 | AFF2A09_LCDR1 sub lib | SYGMY | 1 | VISYDGSNKYYADSVKG | 1 | GALTHWGVVIGDGMDV |
| 332 | FJ1424_P007MP08D06 | FL0675 | AFF2A09_LCDR1 sub lib | SYGMY | 1 | VISYDGSNKYYADSVKG | 1 | GALTHWGVVIGDGMDV |
| 313 | FJ1424_P007MP08A04 | FL0675 | AFF2A09_LCDR1 sub lib | SYGMY | 1 | VISYDGSNKYYADSVKG | 1 | GALTHWGVVIGDGMDV |
| 330 | FJ1424_P007MP08B06 | FL0675 | AFF2A09_LCDR1 sub lib | SYGMY | 1 | VISYDGSNKYYADSVKG | 1 | GALTHWGVVIGDGMDV |
| 316 | FJ1424_P007MP08D04 | FL0675 | AFF2A09_LCDR1 sub lib | SYGMY | 1 | VISYDGSNKYYADSVKG | 1 | GALTHWGVVIGDGMDV |

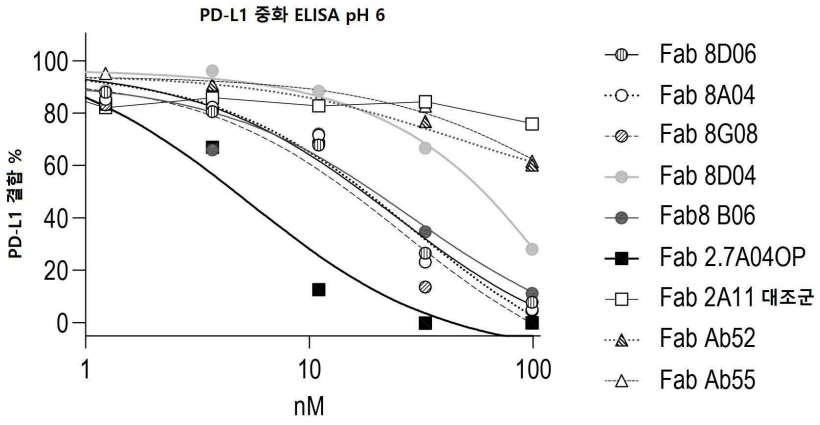
| 클론 번호 | VH 서열 |
|---|---|
| 47 | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMYWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLNLQMNSLRAEDTAVYYCAKGALTHWGVVIGDGMDVWGQGTTVTVSS |
| 351 | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMYWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLNLQMNSLRAEDTAVYYCAKGALTHWGVVIGDGMDVWGQGTTVTVSS |
| 332 | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMYWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLNLQMNSLRAEDTAVYYCAKGALTHWGVVIGDGMDVWGQGTTVTVSS |
| 313 | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMYWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLNLQMNSLRAEDTAVYYCAKGALTHWGVVIGDGMDVWGQGTTVTVSS |
| 330 | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMYWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLNLQMNSLRAEDTAVYYCAKGALTHWGVVIGDGMDVWGQGTTVTVSS |
| 316 | QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMYWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLNLQMNSLRAEDTAVYYCAKGALTHWGVVIGDGMDVWGQGTTVTVSS |

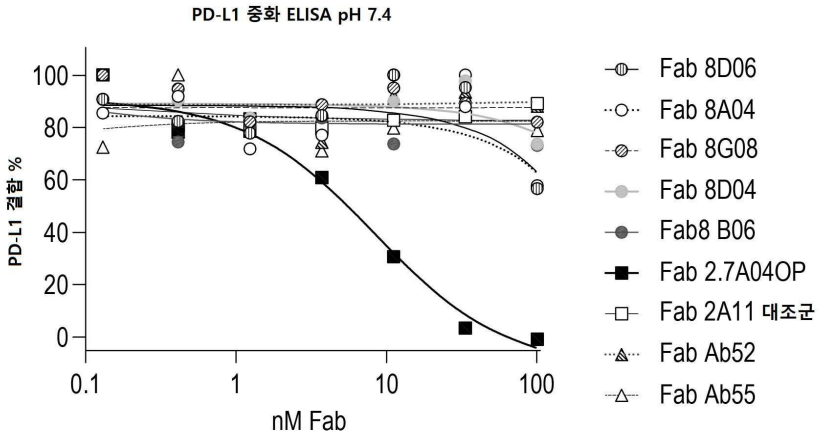
도면7b

| 클론 번호 | 클론 ID | 라이브러리 ID | 라이브러리명 | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 47 | FJ1424_P007MP05G06 | 2A09_WT clone | 2A09_WT clone | TRSSGSIASNYVQ | EDDQRPS | QSFDSTNPWV |
| 351 | FJ1424_P007MP08G08 | FL0675 | AFF2A09_LCDR1 sub lib | ISNDVPASGHYHR | EDDQRPS | QSFDSTNPWV |
| 332 | FJ1424_P007MP08D06 | FL0675 | AFF2A09_LCDR1 sub lib | VLSPRTHAGHYYR | EDDQRPS | QSFDSTNPWV |
| 313 | FJ1424_P007MP08A04 | FL0675 | AFF2A09_LCDR1 sub lib | MRTGTGNKGHYTR | EDDQRPS | QSFDSTNPWV |
| 330 | FJ1424_P007MP08B06 | FL0675 | AFF2A09_LCDR1 sub lib | RETELSRRLHYVR | EDDQRPS | QSFDSTNPWV |
| 316 | FJ1424_P007MP08D04 | FL0675 | AFF2A09_LCDR1 sub lib | RGTGSSFHHKYVR | EDDQRPS | QSFDSTNPWV |

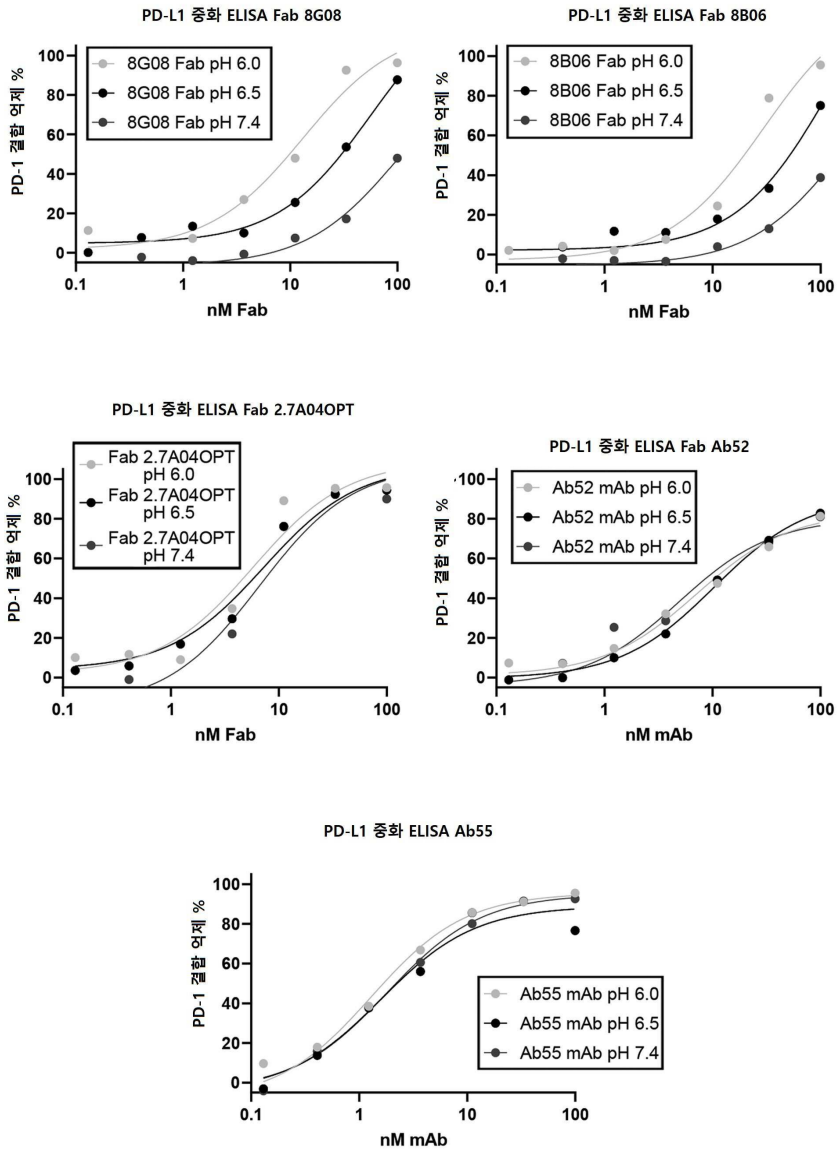
| 클론 번호 | VL 서열 |
|---|---|
| 47 | NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFDSTNPWVFGGGTKLTVL |
| 351 | NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCISNDVPASGHYHRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFDSTNPWVFGGGTKLTVL |
| 332 | NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCVLSPRTHAGHYYRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFDSTNPWVFGGGTKLTVL |
| 313 | NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCMRTGTGNKGHYTRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFDSTNPWVFGGGTKLTVL |
| 330 | NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCRETELSRRLHYVRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFDSTNPWVFGGGTKLTVL |
| 316 | NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCRGTGSSFHHKYVRWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSFDSTNPWVFGGGTKLTVL |

도면8


PD-L1 중화 ELISA pH 6
PD-L1 결합 %
100
80
60
40
20
0
1
10
100
nM
Fab 8D06
Fab 8A04
Fab 8G08
Fab 8D04
Fab8 B06
Fab 2.7A04OP
Fab 2A11 대조군
Fab Ab52
Fab Ab55


PD-L1 중화 ELISA pH 7.4
PD-L1 결합 %
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
nM Fab
Fab 8D06
Fab 8A04
Fab 8G08
Fab 8D04
Fab8 B06
Fab 2.7A04OP
Fab 2A11 대조군
Fab Ab52
Fab Ab55

도면9




## 서 열 목 록

<110> Capella Bioscience Ltd

<120> Anti-PD-L1 Antibodies

<130> P121311GB

<160> 62

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn
20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Asp Ser
85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln
1 5 10

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gln Ser Phe Asp Ser Thr Asn Pro Trp Val
1 5 10

<210> 5

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Ala Leu Thr His Trp Gly Val Val Ile Gly Asp Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser Tyr Gly Met Tyr
1 5

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Ala Leu Thr His Trp Gly Val Val Ile Gly Asp Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 9

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Ile Ser Asn Asp Val Pro Ala Ser Gly His
20 25 30

Tyr His Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Asp Ser
85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Ile Ser Asn Asp Val Pro Ala Ser Gly His Tyr His Arg

1 5 10

<210> 11

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Val Leu Ser Pro Arg Thr His Ala Gly His

20 25 30

Tyr Tyr Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val

35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Val Leu Ser Pro Arg Thr His Ala Gly His Tyr Tyr Arg

1 5 10

<210> 13

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Met Arg Thr Gly Thr Gly Asn Lys Gly His

20 25 30

Tyr Thr Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val

35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Arg Thr Gly Thr Gly Asn Lys Gly His Tyr Thr Arg

1 5 10

<210> 15

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Arg Glu Thr Glu Leu Ser Arg Arg Leu His
20 25 30

Tyr Val Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Asp Ser
85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Arg Glu Thr Glu Leu Ser Arg Arg Leu His Tyr Val Arg

1 5 10

<210> 17

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Arg Gly Thr Gly Ser Ser Phe His His Lys
20 25 30

Tyr Val Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Arg Gly Thr Gly Ser Ser Phe His His Lys Tyr Val Arg

1 5 10

<210> 19

<211> 290

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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> 20
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (3)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is any amino acid

<400> 20

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn
20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser
85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 21

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is Met or Leu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is Asp, Gln, Glu or Ala

<400> 21

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn

20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val

35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly

65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser

85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 22

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is Leu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is Gln, Glu or Ala

<400> 22

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn

20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val

35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly

65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser

85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> X is any amino acid

<400> 23

Gln Ser Phe Xaa Ser Thr Asn Pro Trp Val

1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> X is Asp, Gln, Glu or Ala

<400>

24

Gln Ser Phe Xaa Ser Thr Asn Pro Trp Val

1 5 10

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> X is Gln, Glu or Ala

<400> 25

Gln Ser Phe Xaa Ser Thr Asn Pro Trp Val

1 5 10

<210> 26

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (54)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (62)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (110)

<223> X is any amino acid

<400> 26

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Xaa Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Xaa Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Gly Ala Leu Thr His Trp Gly Val Val Ile Gly Xaa Gly Met

100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 27

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (54)

<223> X is Asp, Gln, Glu or Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (62)

<223> X is Asp, Gln, Glu or Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (110)

<223> X is Asp, Gln, Glu or Ala

<400> 27

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Xaa Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Xaa Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Ala Leu Thr His Trp Gly Val Val Ile Gly Xaa Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 28

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (54)

<223> X is Gln, Glu or Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (62)

<223> X is Gln, Glu or Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (110)

<223> X is Gln, Glu or Ala

<400> 28

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Xaa Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Xaa Ser Val
50 55 60

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

65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Ala Leu Thr His Trp Gly Val Val Ile Gly Xaa Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (13)

<223> X is any amino acid

<400> 29

Val Ile Ser Tyr Xaa Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Xaa Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> X is Asp, Gln, Glu or Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (13)

<223> X is Asp, Gln, Glu or Ala

<400>

30

Val Ile Ser Tyr Xaa Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Xaa Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> X is Gln, Glu or Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (13)

<223> X is Gln, Glu or Ala

<400> 31

Val Ile Ser Tyr Xaa Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Xaa Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)

<223> X is any amino acid

<400> 32

Gly Ala Leu Thr His Trp Gly Val Val Ile Gly Xaa Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)

<223> X is Asp, Gln, Glu or Ala

<400> 33

Gly Ala Leu Thr His Trp Gly Val Val Ile Gly Xaa Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (12)

<223> X is Gln, Glu or Ala

<400> 34

Gly Ala Leu Thr His Trp Gly Val Val Ile Gly Xaa Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 35

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is any amino acid

<400> 35

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Ile Ser Asn Asp Val Pro Ala Ser Gly His
20 25 30

Tyr His Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser
85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 36

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is Met or Leu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is Asp, Gln, Glu or Ala

<400> 36

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Ile Ser Asn Asp Val Pro Ala Ser Gly His
20 25 30

Tyr His Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser
85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 37

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is Leu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is Gln, Glu or Ala

<400> 37

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Ile Ser Asn Asp Val Pro Ala Ser Gly His

20 25 30

Tyr His Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val

35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly

65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser

85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 38

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is any amino acid

<400> 38

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Val Leu Ser Pro Arg Thr His Ala Gly His

20 25 30

Tyr Tyr Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val

35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

<210> 39
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)
<223> X is Met or Leu
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (95)
<223> X is Asp, Gln, Glu or Ala
<400> 39
Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Val Leu Ser Pro Arg Thr His Ala Gly His
20 25 30
Tyr Tyr Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45
Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

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

<210> 40
<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is Leu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is Gln, Glu or Ala

<400> 40

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Val Leu Ser Pro Arg Thr His Ala Gly His
20 25 30

Tyr Tyr Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser
85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 41

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is any amino acid

<400> 41

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Xaa Arg Thr Gly Thr Gly Asn Lys Gly His
20 25 30

Tyr Thr Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val

35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser
85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 42

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is Met or Leu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)

<223> X is Met, Ala or Leu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is Asp, Gln, Glu or Ala

<400> 42

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Xaa Arg Thr Gly Thr Gly Asn Lys Gly His
20 25 30

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

100 105 110

<210> 43
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (3)
<223> X is Leu
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (23)
<223> X is Ala or Leu
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (95)
<223> X is Gln, Glu or Ala
<400> 43
Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Xaa Arg Thr Gly Thr Gly Asn Lys Gly His

20 25 30

Tyr Thr Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser
85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> X is any amino acid

<400> 44

Xaa Arg Thr Gly Thr Gly Asn Lys Gly His Tyr Thr Arg
1 5 10

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> X is Met, Ala or Leu

<400> 45

Xaa Arg Thr Gly Thr Gly Asn Lys Gly His Tyr Thr Arg
1 5 10

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> X is Ala or Leu

<400> 46

Xaa Arg Thr Gly Thr Gly Asn Lys Gly His Tyr Thr Arg
1 5 10

<210> 47

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is any amino acid

<400> 47

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Arg Glu Thr Glu Leu Ser Arg Arg Leu His
20 25 30

Tyr Val Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser
85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 48

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is Met or Leu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is Asp, Gln, Glu or Ala

<400> 48

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Arg Glu Thr Glu Leu Ser Arg Arg Leu His
20 25 30

Tyr Val Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser
85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 49

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is Leu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is Gln, Glu or Ala

<400> 49

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Arg Glu Thr Glu Leu Ser Arg Arg Leu His
20 25 30

Tyr Val Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser
85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 50

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is any amino acid

<400> 50

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Arg Gly Thr Gly Ser Ser Phe His His Lys
20 25 30

Tyr Val Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val

35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser
85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 51

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is Met or Leu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is Asp, Gln, Glu or Ala

<400> 51

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Arg Gly Thr Gly Ser Ser Phe His His Lys
20 25 30

Tyr Val Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser
85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 52

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is Leu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is Gln, Glu or Ala

<400> 52

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Arg Gly Thr Gly Ser Ser Phe His His Lys

20 25 30

Tyr Val Arg Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val

35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly

65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser

85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 53

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (54)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (62)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (110)

<223> X is any amino acid

<400> 53

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Xaa Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Xaa Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Ala Leu Thr His Trp Gly Val Val Ile Gly Xaa Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 54

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (54)

<223> X is Thr, Ile, Val, Met, Arg, Ser, Leu, Glu, Gly, Asn, Asp, Phe,
Ala, His, Phe, Lys, Tyr or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (62)

<223> X is Thr, Ile, Val, Met, Arg, Ser, Leu, Glu, Gly, Asn, Asp, Phe,
Ala, His, Phe, Lys, Tyr or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (110)

<223> X is Thr, Ile, Val, Met, Arg, Ser, Leu, Glu, Gly, Asn, Asp, Phe,
Ala, His, Phe, Lys, Tyr or Gln

<400> 54

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Xaa Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Xaa Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Ala Leu Thr His Trp Gly Val Val Ile Gly Xaa Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 55

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (54)

<223> X is Asp, Gln, Glu, Ala or a conservative amino acid substitution

thereof

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (62)

<223> X is Asp, Gln, Glu, Ala or a conservative amino acid substitution thereof

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (110)

<223> X is Asp, Gln, Glu, Ala or a conservative amino acid substitution

thereof

<400> 55

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Xaa Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Xaa Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Ala Leu Thr His Trp Gly Val Val Ile Gly Xaa Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 56

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (54)

<223> X is Asp, Gln, Glu and Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (62)

<223> X is Asp, Gln, Glu and Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (110)

<223> X is Asp, Gln, Glu and Ala

<400> 56

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Xaa Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Xaa Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Ala Leu Thr His Trp Gly Val Val Ile Gly Xaa Gly Met

100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 57

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (54)

<223> X is Gln, Glu or Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (62)

<223> X is Gln, Glu or Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (110)

<223> X is Gln, Glu or Ala

<400> 57

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Xaa Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Xaa Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Gly Ala Leu Thr His Trp Gly Val Val Ile Gly Xaa Gly Met

100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 58

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is any amino acid

<220><221>

MISC_FEATURE

<222> (23)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (25)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (28)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (29)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (31)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (32)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (34)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (35)

<223> X is any amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is any amino acid

<400> 58

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20 25 30

Tyr Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val

35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly

65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser

85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 59

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is Thr, Ile, Val, Met, Arg, Ser, Leu, Glu, Gly, Asn, Asp, Pro,
Ala, His, Phe, Lys, Tyr or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)

<223> X is Thr, Ile, Val, Met, Arg, Ser, Leu, Glu, Gly, Asn, Asp, Pro,
Ala, His, Phe, Lys, Tyr or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)

<223> X is Thr, Ile, Val, Met, Arg, Ser, Leu, Glu, Gly, Asn, Asp, Pro,
Ala, His, Phe, Lys, Tyr or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (25)

<223> X is Thr, Ile, Val, Met, Arg, Ser, Leu, Glu, Gly, Asn, Asp, Pro,
Ala, His, Phe, Lys, Tyr or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)

<223> X is Thr, Ile, Val, Met, Arg, Ser, Leu, Glu, Gly, Asn, Asp, Pro,

Ala, His, Phe, Lys, Tyr or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)

<223> X is Thr, Ile, Val, Met, Arg, Ser, Leu, Glu, Gly, Asn, Asp, Pro,
Ala, His, Phe, Lys, Tyr or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (28)

<223> X is Thr, Ile, Val, Met, Arg, Ser, Leu, Glu, Gly, Asn, Asp, Pro,
Ala, His, Phe, Lys, Tyr or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (29)

<223> X is Thr, Ile, Val, Met, Arg, Ser, Leu, Glu, Gly, Asn, Asp, Pro,
Ala, His, Phe, Lys, Tyr or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)

<223> X is Thr, Ile, Val, Met, Arg, Ser, Leu, Glu, Gly, Asn, Asp, Pro,
Ala, His, Phe, Lys, Tyr or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (31)

<223> X is Thr, Ile, Val, Met, Arg, Ser, Leu, Glu, Gly, Asn, Asp, Pro,
Ala, His, Phe, Lys, Tyr or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (32)

<223> X is Thr, Ile, Val, Met, Arg, Ser, Leu, Glu, Gly, Asn, Asp, Pro,
Ala, His, Phe, Lys, Tyr or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (34)

<223> X is Thr, Ile, Val, Met, Arg, Ser, Leu, Glu, Gly, Asn, Asp, Pro, Ala, His, Phe, Lys, Tyr or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (35)

<223> X is Thr, Ile, Val, Met, Arg, Ser, Leu, Glu, Gly, Asn, Asp, Pro, Ala, His, Phe, Lys, Tyr or Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is Thr, Ile, Val, Met, Arg, Ser, Leu, Glu, Gly, Asn, Asp, Pro, Ala, His, Phe, Lys, Tyr or Gln

<400> 59

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20 25 30

Tyr Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val

35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly

65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser

85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 60

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is Met, Leu or a conservative amino acid substitution thereof

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)

<223> X is Ala, Leu, Thr, Ile, Val, Met, Arg or a conservative amino

acid substitution thereof

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)

<223> X is Arg, Ser, Leu, Glu, Gly or a conservative amino acid substitution thereof

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (25)

<223> X is Ser, Asn, Thr or a conservative amino acid substitution thereof

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)

<223> X is Ser, Asp, Pro, Gly, Glu or a conservative amino acid substitution thereof

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)

<223

> X is Gly, Val, Arg, Thr, Leu, Ser or a conservative amino acid substitution thereof

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (28)

<223> X is Ser, Pro, Thr, Gly or a conservative amino acid substitution thereof

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (29)

<223> X is Ile, Ala, His, Asn, Arg, Phe or a conservative amino acid substitution thereof

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)

<223> X is Ala, Ser, Lys, Arg, His or a conservative amino acid

substitution thereof

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (31)

<223> X is Ser, Gly, Leu, His or a conservative amino acid substitution thereof

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (32)

<223> X is Asn, His, Lys or a conservative amino acid substitution thereof

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (34)

<223> X is Val, His, Tyr, Thr or a conservative amino acid substitution thereof

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (35)

<223> X is Gln, Arg or a conservative amino acid substitution thereof

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is Asp, Gln, Glu, Ala or a conservative amino acid substitution thereof

<400> 60

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Tyr Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser

85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 61

<211

> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is Met or Leu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)

<223> X is Ala, Leu, Thr, Ile, Val, Met or Arg

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)

<223> X is Arg, Ser, Leu, Glu or Gly

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (25)

<223> X is Ser, Asn or Thr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)

<223> X is Ser, Asp, Pro, Gly or Glu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)

<223> X is Gly, Val, Arg, Thr, Leu or Ser

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (28)

<223> X is Ser, Pro, Thr or Gly

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (29)

<223> X is Ile, Ala, His, Asn, Arg or Phe

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)

<223> X is Ala, Ser, Lys, Arg or His

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (31)

<223> X is Ser, Gly, Leu or His

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (32)

<223> X is Asn, His or Lys

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (34)

<

223> X is Val, His, Tyr or Thr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (35)

<223> X is Gln or Arg

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is Asp, Gln, Glu or Ala

<400> 61

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Tyr Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val

35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser
85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 62

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> X is Leu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)

<223> X is Leu, Thr, Ile, Val, Met and Arg

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (24)

<223> X is Ser, Leu, Glu and Gly

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (25)

<223> X is Asn and Thr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)

<223> X is Asp, Pro, Gly and Glu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)

<223

> X is Val, Arg, Thr, Leu and Ser

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (28)

<223> X is Pro, Thr and Gly

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (29)

<223> X is Ala, His, Asn, Arg and Phe

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (30)

<223> X is Ser, Lys, Arg and His

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (31)

<223> X is Gly, Leu and His

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (32)

<223> X is His and Lys

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (34)

<223> X is His, Tyr and Thr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (35)

<223> X is Arg

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (95)

<223> X is Gln, Glu and Ala

<400> 62

Asn Phe Xaa Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Tyr Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Xaa Ser
85 90 95

Thr Asn Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110