



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0069615
(43) 공개일자 2019년06월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
A61K 39/3955 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7016653(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2009년12월08일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2018-7022311
원출원일자(국제) 2009년12월08일
심사청구일자 2018년08월31일
- (85) 번역문제출일자 2019년06월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2009/067104
- (87) 국제공개번호 WO 2010/077634
국제공개일자 2010년07월08일
- (30) 우선권주장
61/121,092 2008년12월09일 미국(US)

- (71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자
어빙, 브라이언
미국 94107 캘리포니아 샌프란시스코 아칸소 스트
리트 587
청, 잔느
미국 94158 캘리포니아 샌프란시스코 베리 스트리
트 300 유닛 807
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장덕순, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 1 항

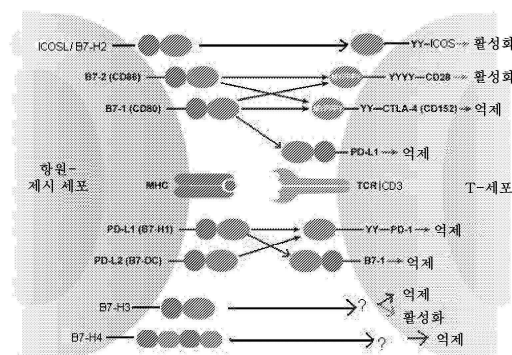
(54) 발명의 명칭 항-PD-L1 항체 및 T 세포 기능을 향상시키기 위한 그의 용도

(57) 요약

본 출원은 항-PD-L1 항체, 이를 코딩하는 핵산, 이의 치료 조성물, 및 T 세포 기능을 향상시켜 세포 매개 면역 반응을 상향조절하고 감염 (예를 들어, 급성 및 만성) 및 종양 면역을 비롯한 T 세포 기능이상 장애를 치료하기 위한 이의 용도에 관한 것이다.

대표도

B7 패밀리 공동자극



(52) CPC특허분류

C07K 16/2827 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/507 (2013.01)

(72) 발명자

치우, 헨리

미국 94116 캘리포니아 샌프란시스코 20번 애비뉴
2334

레하르, 소피, 엠.

미국 94037 캘리포니아 몬타라 어빙 스트리트 945

맥커, 헤더

미국 94303 캘리포니아 팔로 알토 로마 베르데 애
비뉴 733 씨

마리아타산, 산지브

미국 94030 캘리포니아 밀브레 엔시나 드라이브
1291

유, 얀

미국 94404 캘리포니아 포스터 시티 블라이드 스트
리트 1160

명세서

청구범위

청구항 1

T 세포 기능을 향상시켜 세포 매개 면역 반응을 상향조절하고, 감염 및 종양 면역을 비롯한 T 세포 기능이상 장애를 치료하기 위한 항-PD-L1 항체의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본원은 35 USC 119(e)하에서 2008년 12월 9일자로 출원된 미국 가출원 제61/121092호에 대한 우선권의 이익을 주장하며, 상기 문헌의 개시내용은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 면역 기능 및 세포 매개 면역 반응을 상향조절하는 것을 비롯하여 T 세포 기능을 향상시키는 것, 및 T 세포 기능이상 장애를 치료하는 것에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] T 세포에 대한 공동자극 또는 그에 대해 2 개의 구분되는 신호를 제공하는 것은 항원 제시 세포 (APC)에 의한 휴면 T 림프구의 림프구 활성화의 널리 허용되는 모델이다. 문헌 [Lafferty et al., Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 53: 27-42 (1975)]. 이 모델은 추가로 비-자기 및 면역 내성으로부터 자기를 구별하는 것을 제공한다. 문헌 [Bretscher et al., Science 169: 1042-1049 (1970)]; [Bretscher, P.A., P.N.A.S. USA 96: 185-190 (1999)]; [Jenkins et al., J. Exp. Med. 165: 302-319 (1987)]. 최초 신호, 또는 항원 특이적 신호는, 주요 조직적합성 복합체 (MHC)에 의해 제시된 외래 항원 펩티드의 인식 이후에 T 세포 수용체 (TCR)를 통해 변환된다. 제2 또는 공동자극 신호는 항원 제시 세포 (APC) 상에서 발현된 공동자극 분자에 의해 T 세포로 전달되고, T 세포가 클론 증식, 시토카인 분비 및 이펙터 기능을 촉진하도록 유도한다. 문헌 [Lenschow et al., Ann. Rev. Immunol. 14:233 (1996)]. 공동자극이 없으면, T 세포는 항원 자극에 대해 불응성이 될 수 있고, 효과적인 면역 반응을 시작하지 않을 수 있으며, 추가로 외래 항원에 대해 탈진상태가 되거나 내성을 가질 수 있다.

[0006] TCR 신호의 강도는 T 세포 활성화 및 분화에 대해 실제로 정량적인 영향을 갖기 때문에 단순한 2 신호 모델은 지나친 단순화일 수 있다. 문헌 [Viola et al., Science 273: 104-106 (1996)]; [Sloan-Lancaster, Nature 363: 156-159 (1993)]. 게다가, T 세포 활성화는 TCR 신호 강도가 높다면 심지어 공동자극 신호가 존재하지 않는 경우에도 일어날 수 있다. 보다 중요하게는, T 세포는 양성 및 음성 2차 공동자극 신호를 둘 모두 받는다. 그러한 양성 및 음성 신호의 조절은 면역 내성을 유지하고 자가면역을 방지하면서 숙주의 보호 면역 반응을 최대화하는데 중요하다. 음성 2차 신호는 T 세포 내성을 유도하는데 필요한 것으로 보이는 반면, 양성 신호는 T 세포 활성화를 촉진한다. 단순한 2 신호 모델이 나이브 림프구에 대해서는 여전히 유효한 설명을 제공하지만, 숙주의 면역 반응은 동적 과정이고, 공동자극 신호는 또한 항원-노출된 T 세포에도 제공될 수 있다.

[0007] 공동자극 신호를 조작하는 것은 세포 기초 면역 반응을 향상시키거나 종결시키는 수단을 제공하는 것으로 보이기 때문에, 공동자극 메커니즘은 치료상 관심대상이다. 최근, T 세포 기능이상 또는 무반응이 억제 수용체, 프로그래밍된 사멸 1 폴리펩티드 (PD-1)의 유도 발현 및 지속 발현과 함께 일어나는 것으로 밝혀졌다. 그 결과, PD-1 및 PD-1과의 상호작용을 통해 신호를 전달하는 다른 분자, 예컨대 프로그래밍된 사멸 리간드 1 (PD-L1) 및 프로그래밍된 사멸 리간드 2 (PD-L2)를 치료상 표적으로 하는 것이 집중 관심 영역이다. PD-L1 신호전달의 억제는 암 (예를 들어 종양 면역) 및 감염 (급성 및 만성 (예를 들어 지속) 감염 둘 모두를 포함함)을 치료하기 위해 T 세포 면역을 향상시키기 위한 수단으로서 제안되어 왔다. 그러나, 이러한 경로에서 표적에 대해 지시된 최적의 요법이 아직 상업화되지 않았기 때문에, 상당히 충족되지 않은 의학적 필요가 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 항-PD-L1 항체 (그러한 항체를 코딩하는 핵산 및 그러한 항체를 함유하는 조성물을 포함함), 및 T 세포 기능을 향상시켜 세포 매개 면역 반응을 상향조절하고, 감염 (예를 들어 급성 및 만성) 및 종양 면역을 비롯한 T 세포 기능이상 장애를 치료하기 위한 그의 용도를 제공한다.

과제의 해결 수단

[0009] 한 실시양태에서, 본 발명은 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 서열을 포함하는 단리된 중쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공하며, 여기서:

[0010] (a) HVR-H1 서열은 GFTFSX₁SWIH (서열1) 이고;

[0011] (b) HVR-H2 서열은 AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (서열2) 이고;

[0012] (c) HVR-H3 서열은 RHWPGGFDY (서열3) 이며;

[0013] 추가로 X₁은 D 또는 G이고; X₂는 S 또는 L이고; X₃은 T 또는 S이다.

[0014] 한 특정 측면에서, X₁이 D이고; X₂가 S이고; X₃이 T이다. 또 다른 측면에서, 폴리펩티드는 식: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)에 따라 HVR 사이에 병렬된 가변 영역 중쇄 프레임워크 서열을 추가로 포함한다. 또 다른 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 프레임워크 서열은 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크이다. 또 다른 추가 측면에서, 프레임워크 서열 중 적어도 하나는 다음과 같다:

[0015] HC-FR1은 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열4) 이고,

[0016] HC-FR2는 WVRQAPGKGLEWV (서열5) 이고,

[0017] HC-FR3은 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열6) 이고,

[0018] HC-FR4는 WGQGTLLTVSA (서열7) 이다.

[0019] 또 다른 추가 측면에서, 중쇄 폴리펩티드는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3을 포함하는 가변 영역 경쇄와 추가로 조합되고, 여기서:

[0020] (a) HVR-L1 서열은 RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (서열8) 이고;

[0021] (b) HVR-L2 서열은 SASX₉LX₁₀S (서열9) 이고;

[0022] (c) HVR-L3 서열은 QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (서열10) 이며;

[0023] 추가로 X₄는 D 또는 V이고; X₅는 V 또는 I이고; X₆은 S 또는 N이고; X₇은 A 또는 F이고; X₈은 V 또는 L이고; X₉는 F 또는 T이고; X₁₀은 Y 또는 A이고; X₁₁은 Y, G, F 또는 S이고; X₁₂는 L, Y, F 또는 W이고; X₁₃은 Y, N, A, T, G, F 또는 I이고; X₁₄는 H, V, P, T 또는 I이고; X₁₅는 A, W, R, P 또는 T이다.

[0024] 또 다른 추가 측면에서, X₄는 D이고; X₅는 V이고; X₆은 S이고; X₇은 A이고; X₈은 V이고; X₉는 F이고; X₁₀은 Y이고; X₁₁은 Y이고; X₁₂는 L이고; X₁₃은 Y이고; X₁₄는 H이고; X₁₅는 A이다. 또 다른 추가 측면에서, 경쇄는 식: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)에 따라 HVR 사이에 병렬된 가변 영역 경쇄 프레임워크 서열을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 또 다른 추가 측면에서, 프레임워크 서열은 VL 카파 I 컨센서스 프레임워크이다. 또 다른 추가 측면에서, 프레임워크 서열 중 적어도 하나는 다음과 같다:

- [0025] LC-FR1은 DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC (서열11) 이고,
- [0026] LC-FR2는 WYQQKPGKAPKLLIY (서열12) 이고,
- [0027] LC-FR3은 GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC (서열13) 이고,
- [0028] LC-FR4는 FGQGTKVEIKR (서열14) 이다.
- [0029] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 단리된 항-PD-L1 항체 또는 항원 결합 단편을 제공하고, 여기서:
- [0030] (a) 중쇄는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3을 포함하며, 추가로:
- [0031] (i) HVR-H1 서열은 GFTFSX₁SWIH (서열1) 이고,
- [0032] (ii) HVR-H2 서열은 AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (서열2) 이고,
- [0033] (iii) HVR-H3 서열은 RHWPGGFDY (서열3) 이며,
- [0034] (b) 경쇄는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3을 포함하고, 추가로:
- [0035] (i) HVR-L1 서열은 RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (서열8) 이고,
- [0036] (ii) HVR-L2 서열은 SASX₉LX₁₀S (서열9) 이고,
- [0037] (iii) HVR-L3 서열은 QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (서열10) 이다.
- [0038] 여기서 추가로 X₁은 D 또는 G이고; X₂는 S 또는 L이고; X₃은 T 또는 S이고; X₄는 D 또는 V이고; X₅는 V 또는 I이고; X₆은 S 또는 N이고; X₇은 A 또는 F이고; X₈은 V 또는 L이고; X₉는 F 또는 T이고; X₁₀은 Y 또는 A이고; X₁₁은 Y, G, F 또는 S이고; X₁₂는 L, Y, F 또는 W이고; X₁₃은 Y, N, A, T, G, F 또는 I이고; X₁₄는 H, V, P, T 또는 I이고; X₁₅는 A, W, R, P 또는 T이다.
- [0039] 특정 측면에서, X₁은 D이고; X₂는 S이고; X₃은 T이다. 또 다른 측면에서, X₄는 D이고; X₅는 V이고; X₆은 S이고; X₇은 A이고; X₈은 V이고; X₉는 F이고; X₁₀은 Y이고; X₁₁은 Y이고; X₁₂는 L이고; X₁₃은 Y이고; X₁₄는 H이고; X₁₅는 A이다. 또 다른 측면에서, X₁은 D이고; X₂는 S이고; X₃은 T이고, X₄는 D이고; X₅는 V이고; X₆은 S이고; X₇은 A이고; X₈은 V이고; X₉는 F이고; X₁₀은 Y이고; X₁₁은 Y이고; X₁₂는 L이고; X₁₃은 Y이고; X₁₄는 H이고 X₁₅는 A이다.
- [0040] 추가 측면에서, 중쇄 가변 영역은 (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)로서 HVR 사이에 병렬된 하나 이상의 프레임워크 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)로서 HVR 사이에 병렬된 하나 이상의 프레임워크 서열을 포함한다. 또 다른 추가 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 또 다른 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카바트 하위군 I, II, 또는 III 서열로부터 유래된다. 또 다른 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크이다. 또 다른 추가 측면에서, 하나 이상의 중쇄 프레임워크 서열은 다음과 같다:
- [0041] HC-FR1은 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열4) 이고,
- [0042] HC-FR2는 WVRQAPGKGLEWV (서열5) 이고,
- [0043] HC-FR3은 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열6) 이고,
- [0044] HC-FR4는 WGQGTTLVTVSA (서열7) 이다.
- [0045] 또 다른 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카바트 카파 I, II, II 또는 IV 하위군 서열로부터 유래된다. 또 다른 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카파 I 컨센서스 프레임워크이다. 또 다른 추가 측면에서,

하나 이상의 경쇄 프레임워크 서열은 다음과 같다:

[0046] LC-FR1은 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열11) 이고,

[0047] LC-FR2는 WYQQKPGKAPKLLIY (서열12) 이고,

[0048] LC-FR3은 GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (서열13) 이고,

[0049] LC-FR4는 FGQGTKVEIKR (서열14) 이다.

[0050] 추가의 특정 측면에서, 항체는 인간 또는 무린 불변 영역을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 특정 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 또 다른 추가 측면에서, 무린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 추가 측면에서, 무린 불변 영역은 IgG2A이다. 추가의 특정 측면에서, 항체는 감소되거나 또는 최소한의 이펙터 기능을 갖는다. 추가의 특정 측면에서, 최소한의 이펙터 기능은 "비-이펙터 Fc 돌연변이" 또는 비글리코실화로부터 유래된다. 또 다른 추가 실시양태에서, 비-이펙터 Fc 돌연변이는 불변 영역에서의 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.

[0051] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-PD-L1 항체를 제공하고, 여기서:

[0052] (a) 중쇄는 GFTFSDSWIH (서열15), AWISPYGGSTYYADSVKG (서열16) 및 RHWPGGFDY (서열3) 에 대해 각각 85% 이상의 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 서열을 추가로 포함하거나, 또는

[0053] (b) 경쇄는 RASQDVSTAVA (서열17), SASFLYS (서열18) 및 QQYLYHPAT (서열19)에 대해 각각 85% 이상의 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 서열을 추가로 포함한다.

[0054] 특정 측면에서, 서열 동일성은 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다. 또 다른 측면에서, 중쇄 가변 영역은 (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)로서 HVR 사이에 병렬된 하나 이상의 프레임워크 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)로서 HVR 사이에 병렬된 하나 이상의 프레임워크 서열을 포함한다. 또 다른 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 또 다른 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카바트 하위군 I, II 또는 III 서열로부터 유래된다. 또 다른 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크이다. 또 다른 추가 측면에서, 하나 이상의 중쇄 프레임워크 서열은 다음과 같다:

[0055] HC-FR1은 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열4) 이고,

[0056] HC-FR2는 WVRQAPGKGLEWV (서열5) 이고,

[0057] HC-FR3은 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열6) 이고,

[0058] HC-FR4는 WGQGTLLVTVSA (서열7) 이다.

[0059] 또 다른 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카바트 카파 I, II, II 또는 IV 하위군 서열로부터 유래된다. 또 다른 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카파 I 컨센서스 프레임워크이다. 또 다른 추가 측면에서, 하나 이상의 경쇄 프레임워크 서열은 다음과 같다:

[0060] LC-FR1은 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열11) 이고,

[0061] LC-FR2는 WYQQKPGKAPKLLIY (서열12) 이고,

[0062] LC-FR3은 GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (서열13) 이고,

[0063] LC-FR4는 FGQGTKVEIKR (서열14) 이다.

[0064] 추가의 특정 측면에서, 항체는 인간 또는 무린 불변 영역을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 특정 측면에서, 인간 불변

영역은 IgG1이다. 또 다른 추가 측면에서, 무린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 추가 측면에서, 무린 불변 영역은 IgG2A이다. 추가의 특정 측면에서, 항체는 감소되거나 또는 최소한의 이펙터 기능을 갖는다. 추가의 특정 측면에서, 최소한의 이펙터 기능은 "비-이펙터 Fc 돌연변이" 또는 비글리코실화로부터 유래된다. 또 다른 추가 실시양태에서, 비-이펙터 Fc 돌연변이는 불변 영역에서의 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.

[0065] 또 다른 추가 실시양태에서, 본 발명은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 단리된 항-PD-L1 항체를 제공하고, 여기서:

[0066] (a) 중쇄 서열은 중쇄 서열:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWIS
PYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWG
QGTLVTVSA (서열20)

[0067] 에 대해 85% 이상의 서열 동일성을 갖거나, 또는

[0068] (b) 경쇄 서열은 경쇄 서열:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASF
LYSGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (서열21)

[0070] 에 대해 85% 이상의 서열 동일성을 갖는다.

[0071] 특정 측면에서, 서열 동일성은 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다. 또 다른 측면에서, 중쇄 가변 영역은 (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)로서 HVR 사이에 병렬된 하나 이상의 프레임워크 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)로서 HVR 사이에 병렬된 하나 이상의 프레임워크 서열을 포함한다. 또 다른 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카바트 하위군 I, II 또는 III 서열로부터 유래된다. 또 다른 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크이다. 또 다른 추가 측면에서, 하나 이상의 중쇄 프레임워크 서열은 다음과 같다:

[0072] HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열4)

[0073] HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (서열5)

[0074] HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열6)

[0075] HC-FR4 WGQGTTLTVSA (서열7)

[0076] 또 다른 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카바트 카파 I, II, II 또는 IV 하위군 서열로부터 유래된다. 또 다른 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카파 I 컨센서스 프레임워크이다. 또 다른 추가 측면에서, 하나 이상의 경쇄 프레임워크 서열은 다음과 같다:

[0077] LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열11)

[0078] LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (서열12)

[0079] LC-FR3 GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYC (서열13)

[0080] LC-FR4 FGQGTKVEIKR (서열14)

[0081] 추가의 특정 측면에서, 항체는 인간 또는 무린 불변 영역을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 특정 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 또 다른 추가 측면에서, 무린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 추가 측면에서, 무린 불변 영역은 IgG2A이다. 추가의 특정 측면에서, 항체는 감소되거나 또는 최소한의 이펙터 기능을 갖는다. 추가의 특정 측면에서, 최소한의 이펙터 기능은 원핵 세포에서의 생

산으로부터 야기된다. 추가의 특정 측면에서, 최소한의 이펙터 기능은 "비-이펙터 Fc 돌연변이" 또는 비글리코실화로부터 야기된다. 또 다른 추가 실시양태에서, 비-이펙터 Fc 돌연변이는 불변 영역에서의 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.

[0082] 또 다른 추가 실시양태에서, 본 발명은 상기 기재된 임의의 항-PD-L1 항체를 하나 이상의 제약상 허용되는 담체와 함께 포함하는 조성물을 제공한다.

[0083] 또 다른 추가 실시양태에서, 본 발명은 항-PD-L1 항체의 경쇄 또는 중쇄 가변 영역 서열을 코딩하는 단리된 핵산을 제공하며, 여기서:

[0084] (a) 중쇄는 GFTFSDSWIH (서열15), AWISPYGGSTYYADSVKG (서열16) 및 RHWPGGFDY (서열3) 과 각각 85% 이상의 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 서열을 추가로 포함하고,

[0085] (b) 경쇄는 RASQDVSTAVA (서열17), SASFLYS (서열18) 및 QQYLYHPAT (서열19) 와 각각 85% 이상의 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 서열을 추가로 포함한다.

[0086] 특정 측면에서, 서열 동일성은 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다. 측면에서, 중쇄 가변 영역은 (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)로서 HVR 사이에 병렬된 하나 이상의 프레임워크 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)로서 HVR 사이에 병렬된 하나 이상의 프레임워크 서열을 포함한다. 또 다른 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터 유래된다. 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 카바트 하위군 I, II 또는 III 서열로부터 유래된다. 또 다른 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열은 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크이다. 또 다른 추가 측면에서, 하나 이상의 중쇄 프레임워크 서열은 다음과 같다:

[0087] HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열4)

[0088] HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (서열5)

[0089] HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열6)

[0090] HC-FR4 WGQGTLLVTVSA (서열7)

[0091] 또 다른 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 카바트 카파 I, II, II 또는 IV 하위군 서열로부터 유래된다. 또 다른 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 VL 카파 I 컨센서스 프레임워크이다. 또 다른 추가 측면에서, 하나 이상의 경쇄 프레임워크 서열은 다음과 같다:

[0092] LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVSGDRVTITC (서열11)

[0093] LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (서열12)

[0094] LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (서열13)

[0095] LC-FR4 FGQGTKVEIKR (서열14)

[0096] 추가의 특정 측면에서, 항체는 인간 또는 무린 불변 영역을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 특정 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 또 다른 추가 측면에서, 무린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 추가 측면에서, 무린 불변 영역은 IgG2A이다. 추가의 특정 측면에서, 항체는 감소되거나 또는 최소한의 이펙터 기능을 갖는다. 추가의 특정 측면에서, 최소한의 이펙터 기능은 원핵 세포에서의 생산으로부터 야기된다. 추가의 특정 측면에서 최소한의 이펙터 기능은 "비-이펙터 Fc 돌연변이" 또는 비글리코실화로부터 야기된다. 또 다른 추가 측면에서, 비-이펙터 Fc 돌연변이는 불변 영역에서의 N297A 또는 D265A/N297A 치환이다.

[0097] 또 다른 추가 측면에서, 핵산은 앞서 기재한 임의의 항-PD-L1 항체를 코딩하는 핵산의 발현에 적합한 벡터를 추가로 포함한다. 또 다른 추가의 특정 측면에서, 벡터는 핵산의 발현에 적합한 숙주 세포를 추가로 포함한다.

또 다른 추가의 특정 측면에서, 숙주 세포는 진핵 세포 또는 원핵 세포이다. 또 다른 추가의 특정 측면에서, 진핵 세포는 포유동물 세포, 예컨대 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO)이다.

- [0098] 또 다른 추가 실시양태에서, 본 발명은 앞서 기재한 임의의 항-PD-L1 항체 또는 항원 결합 단편을 코딩하는 핵산을 발현에 적합한 형태로 함유하는 숙주 세포를 상기 항체 또는 단편이 생산되는데 적합한 조건하에서 배양하는 단계, 및 항체 또는 단편을 회수하는 단계를 포함하는, 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0099] 또 다른 추가 실시양태에서, 본 발명은 본원에서 제공하는 바와 같은 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 하나 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0100] 또 다른 추가 실시양태에서, 본 발명은 본원에서 개시하는 조성물의 치료 유효량을 담은 용기 및 T 세포 기능이 상 장애의 치료를 위한 용도를 나타낸 포장 삽입물을 포함하는 제조품을 제공한다.
- [0101] 또 다른 추가 실시양태에서, 본 발명은 상기 기재한 임의의 항-PD-L1 조성물을 하나 이상의 BNCA 분자와 함께 포함하는 제조품을 제공한다. 한 측면에서, BNCA 분자는 항체, 항원 결합 항체 단편, BNCA 올리고펩티드, BNCA RNAi 또는 BNCA 소분자이다. 또 다른 측면에서, B7 음성 공동자극 분자는 CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7.1, B7-H3 및 B7-H4로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0102] 또 다른 추가 실시양태에서, 제조품은 상기 기재한 임의의 항-PD-L1 조성물과 함께 화학요법제를 포함한다. 한 측면에서, 화학요법제는 겐시타빈이다.
- [0103] 또 다른 추가 실시양태에서, 본 발명은 상기 기재한 임의의 항-PD-L1 항체와 함께 하나 이상의 양성 공동자극 분자인 효능제를 포함하는 제조품을 제공한다. 한 측면에서, 양성 공동자극 분자는 B7 패밀리 공동자극 분자이다. 또 다른 측면에서, 양성 공동자극 분자는 CD28, CD80, CD86, ICOS/ICOSL로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 측면에서, 양성 공동자극 분자는 TNFR 패밀리 공동자극 분자이다. 추가 측면에서, TNFR 공동자극 분자는 OX40/OX40L, 4-1BB/4-1BBL, CD27/CD27L, CD30/CD30L 및 HVEM/LIGHT 및 그의 가용성 단편, 구축물 및 효능제 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 형태이다.
- [0104] 또 다른 추가 실시양태에서, 본 발명은 상기 기재한 임의의 항-PD-L1 항체와 함께 하나 이상의 항생제를 포함하는 제조품을 제공한다. 한 측면에서, 항생제는 항바이러스제, 항박테리아제, 항진균제, 항-원생동물 작용제로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0105] 또 다른 측면에서, 항바이러스제는 역전사효소 억제제, 프로테아제 억제제, 인테그라제 억제제, 진입 또는 융합 억제제, 성숙 억제제, 바이러스 방출 억제제, 면역 반응 향상제, 항바이러스성 상승작용 향상제, 백신, 간 효능제 및 약초제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 측면에서, 조합물은 하나 이상의 항바이러스제 카테고리를 포함한다.
- [0106] 또 다른 추가 실시양태에서, 본 발명은 상기 기재한 임의의 항-PD-L1 항체와 함께 하나 이상의 백신을 포함하는 제조품을 제공한다.
- [0107] 또 다른 추가 실시양태에서, 본 발명은 상기 기재한 임의의 항-PD-L1 항체 또는 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, T 세포 기능을 향상시키는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 항-PD-L1 항체 또는 조성물은 기능이상 T 세포를 비-기능이상으로 만든다.
- [0108] 또 다른 추가 실시양태에서, 본 발명은 상기 기재한 임의의 항-PD-L1 항체 또는 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, T 세포 기능이상 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 한 특정 측면에서, T 세포 기능이상 장애는 감염 또는 종양 면역이다. 또 다른 측면에서, 감염은 급성 또는 만성이다. 또 다른 측면에서, 만성 감염은 지속적이거나, 잠재적이거나 또는 느리다. 또 다른 측면에서, 만성 감염은 박테리아, 바이러스, 진균 및 원생동물로 이루어진 군으로부터 선택된 병원체로부터 야기된다. 추가 측면에서, 숙주 내의 병원체 수준은 감소된다. 또 다른 추가 측면에서, 상기 방법은 백신으로 치료하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 측면에서, 상기 방법은 항생제로 치료하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 측면에서, 병원체는 박테리아이고, 상기 방법은 항박테리아제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 측면에서, 박테리아는 미코박테리움 종(*Mycobacterium spp.*), 살모넬라 종(*Salmonella spp.*), 리스테리아 종(*Listeria spp.*), 스트렙토코쿠스 종(*Streptococcus spp.*), 헤모필루스 종(*Haemophilus spp.*), 네이세리아 종(*Neisseria spp.*), 클레브시엘라 종(*Klebsiella spp.*), 보렐리아 종(*Borrelia spp.*), 박테로이데스 프라길리스(*Bacterioides fragilis*), 트레포네마 종(*Treponema spp.*), 및 헬리코박터 피로리(*Helicobacter pylori*)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

또 다른 추가 측면에서, 병원체는 바이러스이고, 상기 방법은 항바이러스제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 측면에서, 바이러스는 간염 -B, -C, 단순 포진 바이러스 -I, -II, 인간 면역결핍 바이러스 -I, -II, 시토메갈로바이러스, 엡스타인 바르 바이러스, 인간 파필로마바이러스, 인간 T 림프구 친화성 바이러스, -I, -II, 바리셀라 조스터로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 추가 측면에서, 병원체는 진균이고, 상기 방법은 항진균제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 측면에서, 장에는 아스페르길루스증, 블라스 토미세스증, 칸디다증 알비칸스, 콕시디오이데스진균증 이미티스, 히스토플라스마증, 파라콕시디오이데스진균증, 미포자충증으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 추가 측면에서, 병원체는 원생동물이고, 상기 방법은 항-원생동물 작용제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 측면에서, 장에는 리슈마니아증, 플라스모디오시스(plasmodiosis) (즉, 말라리아), 크립토스포리디아증, 톡소플라스마증, 트리파노소마증, 및 흡충류 (예를 들어, 주혈흡충증), 촌충류 (예를 들어, 포충증) 및 선충류 (예를 들어, 선모충 증, 회충증, 사상충증 및 분선충증)로부터 야기된 감염을 비롯한 연충 감염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0109]

또 다른 추가 측면에서, T 세포 기능이상 장애는 종양 면역이다. 또 다른 추가 측면에서, PD-L1 항체 또는 조성물은 방사선 요법, 화학요법, 표적화 요법, 면역요법, 호르몬 요법, 혈관신생 억제 및 완화 치료로 이루어진 군으로부터 선택된 전통 요법을 추가로 포함하는 치료 섭생과 조합된다. 추가의 특정 측면에서, 화학요법 치료는 겐시타빈, 시클로포스파미드, 독소루비신, 파클리탁셀, 시스플라틴으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 특정 측면에서, 종양 면역은 유방암, 폐암, 결장암, 난소암, 흑색종, 방광암, 신장암, 간암, 침샘암, 위장 암, 신경교종, 갑상선암, 흉선암, 상피암, 두경부암, 위암 및 췌장암으로 이루어진 군으로부터 선택된 암으로부터 야기된다.

도면의 간단한 설명

[0110]

도 1은 세포 표면 분자인 B7 패밀리에 의한 T 세포의 공동자극을 도시한 그래프적 설명이다.

도 2는 PMEL/B16 T 세포 자극 검정의 실험 설계를 나타낸 개략도이다.

도 3은 멜라닌세포 펩티드 gp100에 반응하여 PMEL CD8+ T 세포에서의 IFN- γ 생산이 향상되는 것을 통한, 항원 특이적 T 세포 기능에의 항-PD-L1 Ab의 효과를 보여주는 막대 그래프이다. IFN- γ 를 생산하는 CD8+ T 세포 및 IFN- γ 생산 수준 백분율은 둘 모두 항-PD-L1 항체의 존재하에서 자극하는 동안 증가되었다.

도 4는 Ova-펄스된 A20 B 세포/mPD-L1 APC에 의한 2차 자극에 있어서 항-PD-L1 Ab YW243.55.S1에 의해 Ova-특 이적 CD4+ T 세포의 증식이 향상되는 것을 통한, 항원 특이적 T 세포 기능에 대한 항-PD-L1 Ab의 효과를 보여주는 막대 그래프이다.

도 5는 혼합 림프구 반응에서 항-PD-L1 항체 YW243.55S1에 의해 인간 CD8 T 세포의 증식이 향상되는 것을 보여주는 일련의 FACS 플롯이다. CFSE의 강도를 희석시켜 측정된 증식 세포의 퍼센트를 또한 보고한다.

도 6은 만성 LCMV를 키메라 형태의 항-PD-L1 Ab YW243.55S70으로 치료하는 것에 대한 실험 설계의 개략도이다. 화살표는 2×10^6 pfu 클론 13 LCMV에 의한 감염 14일 후에 시작된 항-PD-L1의 6 투약 시점을 나타낸다.

도 7A 및 7B는 항-PD-L1 Ab, YW243.55.S70에 의한 만성 LCMV 감염의 생체내 치료 이후에 생체의 세포에서 향상된 CD8 이펙터 기능을 보여주는 그래프이다. YW243.55.S70에 의한 PD-L1의 차단은 CD8⁺ T 세포의 탈과립화를 증가시켰고 (표면 CD107A의 증가로 판단함) (도 7A), LCMV 펩티드 gp33에 반응하여 IFN-감마 생산 세포 %를 증가시켰다 (도 7B). gp33-특이적 세포의 빈도는 H2-Db gp33 오랑체로 염색하여 밝혀내었다.

도 8A 및 8B는 만성 LCMV 감염에 있어서 항-PD-L1 항체로 생체내 치료한 이후에 혈액 및 조직 LCMV 역가가 감소된 것을 보여준다. 도 8A에서, 다양하게 나타난 조직으로부터의 바이러스 역가를 제 21 일 및 제 28 일, Ab 치료 후 1 주 및 2 주 후에 각각 분석하였다. 도 8B에서는, 제 0 일에 LCMV를 접종하고 제 14 일에 치료를 시작하여 제 0 일, 제 7 일, 제 14 일, 제 21 일 및 제 28 일에 혈청 바이러스 역가를 분석하였다.

도 9A는 확립된 종양을 요법상 치료한 이후에 (종양이 250 mm^3 일 때, 제 14 일에 치료를 시작함) 항-PD-L1 항체를 적용한 결과로서 MC38.Ova 결장 암종 종양 성장에 있어서의 현저한 감소를 보여준다. 도 9B는 유동세포계수법으로 측정된, 조직 배양물 중 MC38.Ova 세포 상에서의 PD-L1 발현의 표면 수준을 보여주는 히스토그램이다. PD-L2는 MC38.Ova 세포에 의해 발현되지 않았다.

도 10은 C57BL/6 마우스에서의 MC38.Ova 종양의 성장에 대한 PD-L1 차단 치료의 단독 효과 및 항-VEGF 또는 겐

시타빈과의 조합 치료의 효과를 보여주는 그래프이다.

도 11A-B는 각각 파지 디스플레이에 의해 확인된 11 항-PD-L1 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열이다. 음영 처리된 막대는 다양한 정의를 갖는 CDR을 나타내고, 박스처리된 영역은 HVR의 범위를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

바람직한 실시양태의 상세한 설명

본원에 언급된 모든 참조문헌은 구체적으로 참고로 포함된다.

일반적 기술

달리 언급하지 않는 한, 본 발명의 실시는 당업계 기술에 속하는 분자 생물학 (재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기술을 이용할 것이다. 그러한 기술은 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989)]; [Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984)]; [Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987)]; [Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.)]; [Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds 1987, 및 주기적인 업데이트)]; [PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., ed., 1994)]; [A Practical Guide to Molecular Cloning (Perbal Bernard V., 1988)]; [Phage Display: A Laboratory Manual (Barbas et al., 2001)]과 같은 문헌에 충분히 설명되어 있다.

I. 숙주 면역

A. 림프구 발생 및 활성화

인간에서 2가지 주요 유형의 림프구는 T (흉선 유래) 및 B (골수 유래)이다. 이들 세포는 림프구양 발생 경로에 관련된 골수 및 태아 간의 조혈 줄기 세포로부터 유래한다. 이들 줄기 세포의 자손은 B 또는 T 림프구로 성숙하기 위해 분기하는 경로를 따른다. 인간 B 림프구 발생은 전적으로 골수 내에서 일어난다. 반면에, T 세포는 골수를 벗어난 미성숙 전구체로부터 발생하고 혈류를 통해 흉선으로 이동하여, 여기서 성숙 T 림프구로 증식하고 분화한다.

흉선 또는 골수에서 빠져나오는 성숙 림프구는 정지 또는 "휴지" 상태이고, 즉, 유사분열상 불활성이다. 혈류 내로 분산될 때, 이들 "나이프" 또는 "버진(virgin)" 림프구는 다양한 2차 또는 말초 림프 장기, 예를 들어 비장, 림프절 또는 톨실로 이동한다. 대부분의 버진 림프구는 수명이 본래 짧고, 골수 또는 흉선을 떠난 후 수일 내에 사멸한다. 그러나, 그러한 세포가 항원의 존재를 가리키는 신호를 받으면, 이들은 활성화되고 연속적인 라운드의 세포 분열을 겪을 수 있다. 이어서, 생성되는 자손 세포 중 일부는 휴지 상태로 되돌아가 기억 림프구 (본질적으로 자극 알레르겐과의 다음 마주침을 위해 제조된 B 및 T 세포)로 된다. 활성화된 버진 림프구의 다른 자손은 이펙터 세포이고, 이들은 수일 동안만 생존하지만, 특이적인 방어 활동을 수행한다.

림프구 활성화는 휴지 림프구가 자극될 때 통과하여 분할하고 자손을 생산하고, 이들 중 일부는 이펙터 세포로 되는 질서 정연한 일련의 사건을 나타낸다. 완전한 반응은 세포 증식 (유사분열)의 유도 및 면역학적 기능의 발현을 모두 포함한다. 림프구는 특이적 리간드가 그의 표면 상의 수용체에 결합할 때 활성화된다. 리간드는 T 세포 및 B 세포에 대해 상이하지만, 생성되는 세포내 생리학적 메카니즘은 유사하다.

일부 외래 항원 자체는 림프구 활성화를 유도할 수 있고, 특히 큰 중합체 항원은 B 세포 상에서 표면 이뮤노글로불린, 또는 T 세포 상에서 다른 당단백질과 가교결합한다. 그러나, 대부분의 항원은 중합체가 아니고, 심지어 B 세포에 직접 결합한 다수의 경우에도 활성화를 일으키지 못한다. 이러한 보다 흔한 항원들은 이들이 거의 활성화된 헬퍼 T 림프구와 공동자극될 때 B 세포를 활성화한다. 그러한 자극은 T 세포에 의해 분비된 림포킨으로부터 일어날 수 있지만, B 세포와 특정 B 세포 표면 수용체와 상호작용하여 2차 신호를 생성하는 T 세포 표면 단백질과의 직접 접촉에 의해 가장 효율적으로 전달된다.

B. T 세포

T 림프구는 이뮤노글로불린을 발현하지 않지만, 대신 T 세포 수용체 (TCR)로 불리는 표면 단백질에 의해 외래 물질의 존재를 검출한다. 이들 수용체는 직접 접촉에 의해 또는 다른 면역 세포의 활성화에 영향을 미침으로써

항원을 인식한다. 대식세포와 함께, T 세포는 세포 매개 면역에 관여하는 주요 세포형이다.

[0125] B 세포와는 달리, T 세포는 특이적인 맥락에서만 외래 물질을 검출할 수 있다. 특히, T-림프구는 먼저 작은 펩티드로 절단된 후, 항원 제시 세포 (APC)로 불리는 제2 숙주 세포의 표면 상에 나타나는 경우에만 외래 단백질 을 인식할 것이다. 많은 유형의 숙주 세포가 일부 조건 하에서 항원을 제시할 수 있지만, 특정 유형은 그러한 목적을 위해 보다 특이적으로 개작되고, 이는 대식세포 및 다른 B 세포를 비롯해서 T 세포 활성을 제어하는데 특히 중요하다. 항원 제시는 제시 세포의 표면 상의 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 단백질로 불리는 특정 단백질에 부분적으로 의존한다. 따라서, 세포 매개 면역을 자극하기 위해, 외래 펩티드는 MHC 펩티드와 조합되어 T 세포에 제시되어야 하고, 상기 조합은 T 세포 수용체에 의해 인식되어야 한다.

[0126] 2가지 중요한 T 세포 하위세트: 세포독성 T 림프구 (T_c 세포 또는 CTL) 및 헬퍼 T 세포 (T_H) 세포가 존재하고, 이들은 마커 CD8 및 CD4의 세포 표면 발현에 기초하여 대략 확인될 수 있다. T_c 세포는 바이러스성 방어에 중요하고, 특정 세포 표면 발현된 바이러스성 펩티드를 인식함으로써 바이러스를 직접 치사시킬 수 있다. T_H 세포는 다른 세포형의 증식, 성숙 및 면역 기능을 촉진하고, 예를 들어 B 세포, 대식세포 및 세포독성 T 세포의 활성을 제어하도록 림프킨 분비를 촉진한다. 버진 및 기억 T-림프구는 통상 휴지 상태로 남아있고, 이 상태에서 유의한 헬퍼 또는 세포독성 활성을 나타내지 않는다. 활성화되면, 이들 세포는 수 라운드의 유사분열을 겪어 딸 세포를 생산한다. 이들 딸 세포의 일부는 기억 세포로서 휴지 상태로 되돌아가지만, 다른 것은 헬퍼 또는 세포독성 활성을 활발하게 나타내는 이펙터 세포가 된다. 이들 딸 세포는 그의 모 세포를 닮는다: CD4+ 세포는 단지 CD4+ 자손만을 생산하는 한편, CD8+ 세포는 단지 CD8+ 자손만을 생산할 수 있다. 이펙터 T 세포는 휴지 T 세포 상에서 발현되지 않는 세포 표면 마커, 예컨대 CD25, CD28, CD29, CD40L, 트랜스페린 수용체 및 클래스 II MHC 단백질을 발현한다. 활성화 자극이 없으면, 이펙터 세포는 사멸하거나 휴지 상태로 되돌아가므로 세포독성 또는 헬퍼 활성은 수일의 기간에 걸쳐 점차 감퇴한다.

[0127] B 세포 활성화와 유사하게, 대부분의 항원에 대한 T-림프구 반응은 또한 2가지 유형의 동시 자극을 필요로 한다. 첫 번째 자극은 항원이고, 이는 항원 제시 세포 상의 MHC 단백질에 의해 적절하게 표시되면 T 세포 수용체가 이를 인식하고 결합할 수 있다. 상기 항원-MHC 복합체가 세포 내부로 신호를 보내지만, 이는 보통 T 세포 활성화를 일으키기에는 불충분하다. 헬퍼 T 세포에서 발생하는 것과 같은 완전한 활성화에는 항원 제시 세포의 표면 상에 발현되는 공동자극자로 불리는 다른 특이적 리간드에 의한 공동자극이 필요하다. 그 반면에, 세포독성 T 세포의 활성화는 일반적으로 활성화된 헬퍼 T 세포에 의해 분비된 시토카인 IL-2를 필요로 한다.

[0128] C. 면역 반응

[0129] 다른 신체 방어와 구분되는 포유동물 면역계의 3가지 주요 기능적 특성은 다음을 포함한다: (1) 특이성 - 막대한 수의 표적 분자들 사이에서 개별적으로 인식하고 반응하거나 반응하지 않는 능력, (2) 식별 - 모든 무수한 단백질 및 다른 유기 물질과 평화롭게 공존하지만, 신체로 도입되는 외래 물질에 대해 여전히 격렬하게 반응하도록 비-자기로부터 자기를 결정하는 능력, 및 (3) 기억 - 특정 외래 병원체와 후속적인 마주침이 최초 마주침에서 발생한 것보다 더 신속하고 격렬한 반응을 유발시킬, 경험에 의해 형성된 능력. 하나 이상의 이러한 기능에 문제가 생기면, 병리학적 상태가 야기된다.

[0130] 버진 림프구는 1차 림프 장기로부터 말초 내로 계속 방출되고, 각각은 항원 결합을 가능하게 하는 표면 수용체를 보유한다. B 세포에서 항원 결합은 표면 결합된 이뮤노글로불린을 통해 매개되는 반면, T 세포에서는 T 세포 수용체에 의해 매개된다. 버진 림프구가 활성화될 경우, 이들은 증식하여 딸 세포를 생성하고, 이들은 이어서 추가의 활성화 및 증식 사이클을 겪을 수 있다. 주어진 항원에 대한 반응의 속도 및 강도는 주로 클론 선택에 의해 결정되고: 특정 항원에 특이적인 딸 세포 또는 클론 집단이 클수록, 면역 반응에서 인식 및 참여할 수 있는 세포의 수가 더 많다. 모든 면역 반응은 복잡적이고, 몇몇 세포형을 포함한 복잡하게 조절되는 사건의 연속이다. 이는 면역원이 신체에 들어와서 항원 제시 세포 (APC)로 불리는 특수한 클래스의 세포와 마주칠 때 촉발된다. 이들 APC는 소량의 면역원을 포획하여, 이를 항원 특이적 헬퍼 T-림프구가 인식할 수 있는 형태로 표시한다. 이어서, 헬퍼 T 세포는 활성화되고, 다시 다른 클래스의 림프구, 예컨대 B 세포 또는 세포독성 T 세포의 활성화를 촉진한다. 이어서, 활성화된 림프구는 증식하고 그의 특이적인 이펙터 기능을 수행한다. 상기 과정의 각 단계에서, 림프구 및 APC는 직접 접촉을 통해 또는 조절 시토카인을 분비함으로써 서로 소통한다.

[0131] APC에 의해 포획된 외인성 항원은 항원 프로세싱이라 불리는 일련의 변경을 겪는다. 특히 단백질성 면역원의 그러한 프로세싱은 변성 및 부분 단백질분해적 소화를 포함하여, 면역원은 짧은 펩티드로 절단된다. 이어서, 제한된 수의 생성된 펩티드는 클래스 II MHC 단백질과 비공유적으로 회합되고, APC 표면으로 운반된다 (항원 제

시로서 공지된 과정). APC와 직접 접촉하는 CD4⁺ 헬퍼 T 림프구는 활성화될 수 있지만, APC가 제시하는 특정 펩티드-MHC 복합체를 인식하고 결합할 수 있는 T 세포 수용체 단백질을 발현하는 경우에만 활성화될 것이다.

[0132] 헬퍼 T (T_H) 세포는 2개의 다른 림프 이펙터 세포: 세포독성 T (T_C) 세포 및 항체 분비 형질 세포의 활성화를 위해 필요하기 때문에 면역 반응의 주요 조정자(orchestrator)이다. T_H 활성화는 면역 반응에서 초기에 일어나고, 적어도 2개의 신호를 필요로 한다. 하나의 신호는 CD3 단백질을 통해 전달되는 APC 표면 상의 항원성 펩티드-MHC 복합체에 대한 T 세포 항원 수용체의 결합에 의해 제공되는 한편, APC를 통한 제2의 공동 자극 신호는 APC 상에 특이적 리간드를 갖는 T 세포 표면 상의 별개의 신호-전달 단백질의 결합으로부터 생성되는 것으로 생각된다. 하나의 공지된 그러한 상호작용은 T 세포 단백질 CD28 및 B7로서 공지된 APC 표면 단백질의 패밀리 사이의 상호작용이다. 다른 표면 단백질 쌍들이 또한 공동자극을 매개할 수 있다. 공동자극 과정을 이하에서 보다 상세하게 기재한다. 본 발명의 항-PD-L1 항체는 PD-L1을 통한 신호전달에 의해 제공되는 음성 공동자극 신호의 길항작용을 통해 공동자극을 향상시키는 것으로 여겨진다.

[0133] 2개의 신호는 함께 헬퍼 T 세포가 시토카인 인터류킨-2 (IL-2)를 분비하기 시작하도록 유도하고, 또한 그의 표면 상에 특이적인 높은 친화성 IL-2 수용체를 발현하기 시작하도록 유도한다. IL-2는 T-림프구에 대한 매우 강력한 분열촉진 인자이고, 활성화된 T 세포의 증식 반응에 필수적이다. IL-2는 그가 분비된 세포에 대해 작용한다 (자가분비 효과로 공지된 현상). T 세포가 두 신호를 모두 받더라도, 그 자신의 표면 IL-2 수용체가 차단되면 증식하지 않을 것으로 추가로 밝혀졌다. IL-2는 또한 바로 근접한 세포에 대해 작용할 수 있다 (소위 측분비 (paracrine) 효과). 상기 효과는 T_C 세포를 활성화하기 위해 특히 중요하고, 이는 일반적으로 그 자신의 증식을 자극하기 위해 충분한 IL-2를 생산하지 않는다. IL-2에 추가로, 활성화된 T_H 세포는 다른 시토카인을 분비하고, B 세포, 대식세포 및 다른 세포형의 성장, 분화 및 기능을 촉진한다.

[0134] APC와 항원 특이적 T_H 세포 사이의 접촉은 또한 APC에 대해 효과를 가지며 - 가장 중요한 것 중 하나는 IL-1의 방출이다. 이 시토카인은 자가분비 방식으로 클래스 II MHC 단백질 및 다양한 부착 분자의 표면 발현이 증가되도록 작용하여, T_H 세포의 결합을 강화하고 항원 제시를 향상시키는 것으로 여겨진다. 동시에, IL-1은 측분비 방식으로 T_H 세포에 대해 기능하여 IL-2 분비 및 IL-2 수용체 발현을 촉진한다.

[0135] 앞서 설명된 방식으로 T_H 세포의 활성화 동안, 일부 B 세포는 또한 그의 항원 수용체를 통해 면역원에 부착될 수 있고, 이는 그들이 나중에 분비할 막-결합형의 항체이다. T 세포와는 달리, B 세포는 면역원을 그의 유리 비프로세싱 형태로 인식한다. 특이적 항원 결합은 B 세포 활성화를 일으킬 수 있는 하나의 유형의 신호를 제공한다. 두 번째 유형은 활성화된 T_H 세포에 의해 제공되고, 이는 그의 표면 상의 비-이뮤노글로불린 수용체에 결합함으로써 B 세포를 활성화시키는 것을 돕는 단백질을 발현한다. 그의 항원 특이성에 무관하게 임의의 B 세포에 대해 작용하는 이들 T_H-유래된 신호는 헬퍼 인자로서 공지되어 있다. 이들 헬퍼 인자는 IL-2, IL-4 및 IL-6을 포함한다. 그러나, 도움은 세포-세포 접촉을 통해 보다 효율적으로 달성되고, 이는 T 세포 표면 상의 단백질이 B 세포상의 단백질에 직접 접촉하도록 허용한다. 가장 효과적인 형태의 접촉 매개된 도움은 T_H 세포가 활성화된 후에만 T_H 세포 상에서 발현되는 CD40 리간드 (CD40L)로 불리는 단백질이 B 세포 상의 CD40으로 불리는 단백질에 결합할 때 발생한다. 방관자(by-stander) 활성화로서 공지된 과정에서, 활성화된 B 세포와의 접촉은 그의 표면 이뮤노글로불린이 항원 내에 연결되지 않더라도 휴지 B 세포를 활성화시키기에 충분할 수 있다.

[0136] T_C 림프구는 그의 표면 상에 외래 항원을 발현하는 세포, 예컨대 바이러스 감염된 숙주 세포를 근절시키는 기능을 한다. 대부분의 T_C 세포는 CD4보다는 CD8을 발현하고, 따라서 클래스 II MHC 단백질보다는 클래스 I과 회합된 항원을 인식한다. 체세포가 바이러스로 감염될 때, 일부 면역원성 바이러스성 단백질은 세포 내에서 프로세싱을 겪을 수 있고, 이어서 생성되는 펩티드는 클래스 I MHC 분자와 표면 복합체로서 보일 수 있다. 이어서, 이들 펩티드-MHC 복합체는 항원 특이적 클론의 T 세포 수용체에 의해 인식될 수 있어서, T_C 세포 활성화를 위해 필요한 2개의 신호 중 하나를 제공한다. 상기 제1 신호는 단독으로 T_C 세포 상에 고-친화성 IL-2 수용체를 유도한다. 제2 신호는 근처의 활성화된 T_H 림프구로부터 분비된 IL-2에 의해 제공된다. 두 신호를 받으면, 활성화된 T_C 세포는 세포독성 활성을 획득하여, 그가 결합하는 세포 뿐만 아니라 동일한 펩티드-MHC 클래스 I 복합체를 보유하는 임의의 다른 세포를 치사시킬 수 있다. 일부 경우에, T_C가 표적 세포 상으로 특이적 독소를 방출하므로 치사가 일어나고; 다른 경우에, T_C는 표적 세포가 아포토시스에 의해 자멸하도록 유도한다. 활성화된 T_C

세포는 또한 증식하여, 동일한 항원 특이성을 갖는 추가의 T_c 세포를 생성시킨다.

[0137] D. 이뮤노글로불린 슈퍼패밀리에 의한 공동자극:

[0138] 1. B7.1/B7.2 - CD28/CTLA-4

[0139] 아마도 그 특징이 가장 잘 규명된 T 세포 공동자극 경로는 B7.1(CD80)/B7.2(CD86) - CD28/CTLA-4(CD152)를 통한 신호 중 하나일 것이다. 이 신호전달 경로는 T 세포 활성화 및 내성에 중요하다. 문헌 [Karandikar et al., J. Neuroimmunol. 89: 10-18 (1998)]; [Oosterwegal et al., Curr. Opin. Immunol. 11: 294-300 (1999)]; [Salomon et al., Annu. Rev. Immunol. 19: 225-252 (2001)]; [Sansom, D.M., Immunol. 101: 169-177 (2000)]; [Chambers et al., Annu. Rev. Immunol. 19: 565-592 (2001)].

[0140] B7.1 (문헌 [Freeman et al., J. Exp. Med. 174: 625-631 (1991)]; [Freedman et al., J. Immunol. 137: 3260-3267 (1987)]; [Yokochi et al., J. Immunol. 128: 823-827 (1982)]) 및 B7.2 (문헌 [Freeman et al., Science 262: 909-911 (1993)]; [Freeman et al., J. Exp. Med. 178: 2185-2192 (1993)]; [Azuma et al., Nature 366: 76-79 (1993)])는 2종의 자극 수용체 CD-28 및 CTLA-4에 대해 이중 특이성을 갖는다. 문헌 [Aruffo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 8573-8577 (1987)]; [Gross et al., J. Immunol. 144: 3201-3210 (1990)]. CD28은 T 세포의 표면에서 구성적으로 발현되는 반면에 (문헌 [Gross et al., J. Immunol. 149: 380-388 (1992)]), 더 높은 친화성 수용체인 CTLA-4는 T 세포 활성화 이후에 신속하게 상향조절되는 발현을 갖는다. 문헌 [Peach et al., J. Exp. Med. 180: 2049-2058 (1994)]; [Linsley et al., J. Exp. Med. 176: 1595-1604 (1992)]; [Kinsley et al., Immunity 1: 793-801 (1994)]; [Linsley et al., Immunity 4: 535-543 (1996)]. 대부분의 APC 집단은 B7.2를 구성적으로 낮은 수준으로 발현하며, 이는 신속하게 상향조절되고, 한편 B7.1은 활성화 이후에 더 늦게 유도적으로 발현된다. 문헌 [Freeman et al., Science 262: 909-911 (1993)]; [Hathcock et al., J. Exp. Med. 180: 631-640 (1994)]. B7.2의 이전 발현 및 마우스 넉아웃 테이터는 B7.2가 면역 반응을 개시하기 위한 보다 중요한 공동자극 분자이지만, 한편으로는 2 분자는 그 기능이 매우 중복됨을 시사한다. 문헌 [McAdam et al., Immuno. Rev. 165: 631-640 (1994)].

[0141] CD28는 B7.1 및 B7.2와 상호작용하여 신호를 전달하고, 이는 TCR 신호와 상승작용하여 T 세포 활성화를 촉진한다. 문헌 [Lenschow et al., Annu. Rev. Immunol. 165: 233-258 (1996)]; [Lanzavecchia et al., Cell 96: 1-4 (1999)]. TCR 신호의 부재하에서, CD28 신호전달은 생리학적 중요성을 갖지 않는다. CD28 신호전달은 T 세포 활성화를 위한 역할을 조절하고, T 세포 활성화에 요구되는 TCR 부착 개수를 현저하게 감소시킨다. 문헌 [Viola et al., Science 273: 104-106 (1996)]. CD28 활성화는 T 세포 생존을 촉진하여 시토카인이 T 세포 클론 확장 및 분화를 개시할 수 있게 함으로써 T 세포 반응을 지속시킨다. 문헌 [Thompson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1333-1337 (1989)]; [Lucas et al., J. Immunol. 154: 5757-5768 (1995)]; [Shahinian et al., Science 261: 609-612 (1993)]; [Sperling et al., J. Immunol. 157: 3909-3917 (1996)]; [Boise et al., Immunity 3: 87-98 (1995)]. CD28은 또한 이전에 활성화된 T 세포의 반응을 최적화하여, 인터류킨 2 (IL-2) 생산 및 T 세포 생존을 촉진한다. 몇몇 반응은 CD28 비의존적인데, 이것이 강력한 항원 자극으로 인한 공동자극 비의존적인지 또는 다른, 공지되지 않은 공동자극 경로에 의존한 결과인지는 아직 분명하지 않다.

[0142] CTLA-4 활성화는 음성 신호를 유발하여, TCR- 및 CD-28 매개 신호 전달을 억제한다. CTLA-4 부착은 IL-2 합성의 억제, 세포 주기를 통한 진행 및 T 세포 반응의 종결을 야기한다. 문헌 [Walunas et al., Immunity 1: 405-413 (1994)]; [Walunas et al., J. Exp. Med. 183: 2541-2550 (1996)]; [Krummel et al., J. Exp. Med. 182: 459-466 (1995)]; [Brunner et al., J. Immunol. 162: 5813-5820 (1999)]; [Greenwald et al., Immunity 14: 145-155 (2001)]. CTLA-4는 말초 T 세포 내성을 비롯하여 T 세포 반응을 조절하는데 중요한 역할을 한다. 신호전달이 어떻게 CTLA-4 및 CD28을 통해 조정되는지 분명하지 않지만, 몇몇 가능성에는 면역억제 시토카인의 유도, CD28 신호전달의 직접적인 길항작용 및/또는 TCR-매개 신호전달에 의해 CD28이 B7에의 결합에 대한 경쟁에서 제외되는 것이 포함된다.

[0143] 그 결과, CTLA-4의 길항작용 (예를 들어, 길항제 항-CTLA 항체) 및 또는 B7.1/B7.2/CD28 효능작용은 감염 (예를 들어, 급성 및 만성) 및 종양 면역을 치료하는데 있어서 면역 반응을 향상시키는데 유용할 수 있다.

[0144] 2. ICOS/ICOSL 신호전달:

[0145] APC 및 T 세포 사이의 상호작용의 또 다른 경로는 ICOS (CD278) 및 ICOSL (B7-H2, CD275)을 통해 일어난다. ICOS/ICOSL 신호전달은 T 헬퍼 세포 분화 및 이펙터 기능을 촉진하고, 인터류킨-10 (IL-10) 생산을 위해 특히 중요하지만, T 세포, T 세포 내성 및 자가면역을 조절하는 것을 비롯해서 T 세포 확장 및 IL-2 생산을 조절하는

데 보다 적절한 역할을 한다.

- [0146] CD28과 대조적으로, ICOS는 나이브 T 세포에서 구성적으로 발현되지 않지만, TCR 부착 이후에 T 세포 상에서 신속하게 유도된다. 문헌 [Hutloff et al., Nature 397: 263-266 (1999)]; [Yoshinaga et al., Nature 402: 827-832 (1999)]; [Beier et al., Eur. J. Immunol. 30: 3707-3717 (2000)]; [Coyle et al., Immunity 13: 95-105 (2000)]; [Mages et al., Eur. J. Immunol. 30: 1040-1047 (2000)]; [McAdam et al., J. Immunol. 165: 5035-5040 (2000)]. 이는 ICOS가 활성화된 T 세포에 공동자극 신호를 제공함을 시사한다. CD28에 의한 공동자극이 ICOS 발현을 향상시키고, ICOS 발현은 B7.1 및 B7.2의 부재하에서 감소되므로, ICOS는 CD28 신호에 전적으로 의존하지 않는다. 문헌 [McAdam et al., J. Immunol. 165: 5035-5040 (2000)]; [Aicher et al., J. Immunol. 164: 4689-4696 (2000)]; [Kopf et al., J. Exp. Med. 192: 53-61 (2000)]. ICOS는 초기 단계의 분화 동안 T 헬퍼 유형 1 및 2 (T_H1 및 T_H2) 세포 둘 모두에서 상향조절되지만, T_H2 세포 상에서는 높은 수준을 유지하고 T_H1 세포 상에서는 낮은 수준을 유지한다. T 세포 상에서의 ICOS의 발현 패턴은 배 중심이다. 문헌 [Beier et al., Eur. J. Immunol. 30: 3707-3717 (2000)]; [Mages et al., Eur. J. Immunol. 30: 1040-1047 (2000)]은 B 세포에 대한 T 세포 도우에 있어서의 ICOS의 역할을 나타낸다. 기능 연구를 통해 이를 확인하였고, 심지어 ICOS의 발현은 래트 B 세포에서도 확인되었지만, 다른 종에서는 그렇지 않았다. 문헌 [Tezuka et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 276: 335-345 (2000); McAdam et al., Nature 409: 102-105 (2001)]; [Dong et al., Nature 409: 97-101 (2001)]; [Dong et al., J. Immunol. 166: 3659-3662 (2001)]; [Tafuri et al., Nature 409: 105-109 (2001)].
- [0147] ICOS/ICOSL 신호전달의 한가지 역할은 직전에 활성화되었을 뿐만 아니라 이펙터인 T 세포에 의해 시토카인 생산 (예를 들어, IL-4, IL-13)을 조절하는 것으로 보인다. 문헌 [Hutloff et al., Nature 397: 263-266 (1999)]; [Coyle et al., Immunity 13: 95-105 (2000)]; [Dong et al., Nature 409: 97-101 (2001)]. 알레르기성 기도 질환 연구에서, T_H2 이펙터 기능은 ICOS 차단에 의해 제공되지만 T_H2 분화는 그렇지 않았다. 문헌 [Tesciuba et al., J. Immunol. 167: 1996-2003 (2001)]. ICOS가 또한 T_H1 이펙터 기능을 조절할 수 있다는 것은, 시험관내에서의 재활성화시에 T_H1 및 T_H2 시토카인 둘 모두의 생산이 ICOS-Ig 융합 단백질에 의해 억제될 수 있음을 나타낸다. 문헌 [Kopf et al., J. Exp. Med. 192: 53-61 (2000)].
- [0148] ICOS의 또 다른 잠재적인 역할은 T_H1 반응을 지속시키는 것과 관련이 있다. 다발성 경화증에 대한 자가면역성 뇌척수염 (EAE) 실험 모델에서, 미엘린 특이적 CD4⁺ T 세포에 의해 매개되는 T_H1 질환은 ICOS 차단의 결과가 T 세포 초회감작에 이은 EAE의 이펙터 기 동안 공동자극이 차단될 때 분명해질 수 있음을 보여준다. 문헌 [Dong et al., Nature 409: 97-101 (2001)]; [Rottman et al., Nature Immunol. 2: 605-611 (2001)]; [Sporici et al., Clin. Immunol. 100: 277-288 (2001)]. 미엘린 회소돌기아교세포 당단백질 (MOG)에 의해 유도된 EAE는 ICOS^{-/-} 녀아웃 마우스에서 매우 악화되고 IFN- γ 의 생산이 야생형에 비해 증가된다. 유사하게, EAE 유도 동안의 ICOS 차단은 또한 IFN- γ 생산을 증가시켜 질환을 악화시킨다. 따라서, 초회감작 동안의 ICOS 차단은 반응의 T_H1 분극화를 야기한다. 흥미롭게도, 시험관내 ICOS-Ig의 존재하에서의 미엘린-특이적 TCR 트랜스제닉 T 세포의 초회감작은 생체내에서 관찰된 ICOS-Ig 차단 결과와는 극명하게 대조적으로 EAE를 유도하는 그의 능력을 억제하였다. 문헌 [Sporici et al., 상기 문헌]. 시험관내 및 생체내에서의 반대되는 결과의 차이는 아직 분명하지 않지만, 생체내 ICOS 차단 동안의 IL-10 생산 조절 T 세포, 뿐만 아니라 이펙터 T 세포에 대한 ICOS의 역할을 반영할 수 있다. IL-10을 통한 공동자극은 IL-10 생산을 향상시키는데 매우 효과적이며, CD28을 통한 공동자극에 비해 더 효과적이다. 문헌 [Hutloff et al., 상기 문헌]. IL-10^{-/-} 마우스가 악화된 EAE를 발생하기 때문에 (그러나 IL4^{-/-} 마우스는 그러하지 않음) IL-10, IL-12 조절 루프는 EAE를 조절하는데 있어서 중요하다. 문헌 [Segal et al., J. Exp. Med. 187: 537-546 (1998)].
- [0149] ICOS의 또 다른 잠재적인 역할은 T 세포 의존성 B 세포 체액 반응을 향상시키는 것이다. ICOS^{-/-} 및 ICOSL^{-/-} 마우스는 ICOS가 T 세포 의존성 B 세포 반응에 요구됨을 나타내었다. 문헌 [Hutloff et al., Nature 397:263-66 (1999)]; [Chapoval et al., Nat. Immunol. 2:269-74 (2001)]; [Coyle et al., Immunity 13: 95-105 (2000)]; [McAdam et al., Nature 409: 102-5 (2001)]; [Tafuri et al., Nature 409: 105-9 (2001)]; [Suh et al., Nat. Immunol. 4:899-906 (2003)]. ICOS^{-/-} 마우스는 또한 1차 면역화에 반응하여 감소된 배중심, 2차 접종에 반응하여 배중심 형성의 엄청난 결손, 및 IgG 클래스 전환에 있어서의 결손을 나타낸다. T:B 세포 상호작용에 있어서의 ICOS의 역할은 성인 발병성 공통 가변성 면역결핍 질환 환자에서 T 세포에서의 ICOS의 동질접합체 손

실을 확인한 것에 의해 추가로 밝혀졌다. 문헌 [Grimbacher et al., Nat. Immunol. 4: 261-68 (2003)].

[0150] 그 결과, ICOS/ICOSL의 효능작용 (예를 들어, 효능제 항-ICOS 항체, 가용성 ICOS/ICOSL 리간드)은 감염 (예를 들어, 급성 및 만성) 및/또는 종양 면역을 치료하는데 있어서 면역 반응을 향상시키는데 유용할 수 있다.

[0151] 3. PD-1 경로:

[0152] T 세포 활성화를 조절하는 중요한 음성 공동자극 신호는 프로그램화된 사멸 - 1 수용체 (PD-1)(CD279), 및 그의 리간드 결합 파트너 PD-L1 (B7-H1, CD274) 및 PD-L2 (B7-DC, CD273)에 의해 제공된다. PD-1의 음성 조절 역할은 자가면역되기 쉬운 PD-1 녹아웃 (Pdcd1^{-/-})에 의해 밝혀졌다. 문헌 [Nishimura et al., Immunity 11: 141-51 (1999)]; [Nishimura et al., Science 291: 319-22 (2001)]. PD-1은 CD28 및 CTLA-4와 관련이 있지만, 동종이량체화를 가능하게 하는 막 인접 시스템이 결여되어 있다. PD-1의 세포질 도메인은 면역수용체 티로신-기재 억제 모티프 (ITIM, V/IxYxxL/V)를 함유한다. PD-1은 PD-L1 및 PD-L2와만 결합한다. 문헌 [Freeman et al., J. Exp. Med. 192: 1-9 (2000)]; [Dong et al., Nature Med. 5: 1365-1369 (1999)]; [Latchman et al., Nature Immunol. 2: 261-268 (2001)]; [Tseng et al., J. Exp. Med. 193: 839-846 (2001)].

[0153] PD-1은 T 세포, B 세포, 자연 살해 T 세포, 활성화된 단핵구 및 수지상 세포 (DC)에서 발현될 수 있다. PD-1은 활성화된 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포, B 세포 및 골수 세포에 의해서는 발현되지만, 비자극된 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포, B 세포 및 골수 세포에 의해서는 그렇지 않다. 이는 보다 제한된 CD28 및 CTLA-4 발현과 대조적이다. 문헌 [Nishimura et al., Int. Immunol. 8: 773-80 (1996)]; [Boettler et al., J. Virol. 80: 3532-40 (2006)]. (i) 엑손 2, (ii) 엑손 3, (iii) 엑손 2 및 3 또는 (iv) 엑손 2 내지 4가 결여된 전사체를 비롯하여, 활성화된 인간 T 세포로부터 클로닝된 적어도 4 종의 PD-1 변이체가 존재한다. 문헌 [Nielsen et al., Cell. Immunol. 235: 109-16 (2005)]. PD-1Δex3을 제외하고, 휴지 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)에서 모든 변이체는 전장 PD-1과 유사한 수준으로 발현된다. 모든 변이체의 발현은 항-CD3 및 항-CD28에 의한 인간 T 세포의 활성화시에 상당히 유도된다. PD-1Δex3 변이체는 막횡단 도메인이 결여되어 있고, 자가면역에서 중요한 역할을 하는 가용성 CTLA-4와 유사하다. 문헌 [Ueda et al., Nature 423: 506-11 (2003)]. 이 변이체는 류마티스 관절염 환자의 활액 및 혈청에서 풍부해진다. 문헌 [Wan et al., J. Immunol. 177: 8844-50 (2006)].

[0154] 2 종의 PD-1 리간드는 그의 발현 패턴에 있어서 상이하다. PD-L1은 마우스 T 및 B 세포, CD, 대식세포, 중간엽 줄기 세포 및 골수-유래 비만 세포에서 구성적으로 발현된다. 문헌 [Yamazaki et al., J. Immunol. 169: 5538-45 (2002)]. PD-L1은 넓은 범위의 비조혈 세포 (예를 들어, 각막, 폐, 혈관 상피, 간 비실질 세포, 중간엽 줄기 세포, 체장 도세포, 태반 융합세포영양막, 각질세포 등)에서 발현되고 (문헌 [Keir et al., Annu. Rev. Immunol. 26: 677-704 (2008)]), 활성화 이후에 다수의 세포형에서 상향조절된다. 유형 I 및 유형 II 인터페론 (IFN)은 둘 모두 PD-L1을 상향조절한다. 문헌 [Eppihimer et al., Microcirculation 9: 133-45 (2002)]; [Schreiner et al., J. Neuroimmunol. 155: 172-82 (2004)]. 세포주에서의 PD-L1 발현은 MyD88, TRAF6 및 MEK가 억제될 경우 감소된다. 문헌 [Liu et al., Blood 110: 296-304 (2007)]. JAK2도 또한 PD-L1 유도와 관련이 있다. 문헌 [Lee et al., FEBS Lett. 580: 755-62 (2006)]; [Liu et al., Blood 110: 296-304 (2007)]. 포스포타티로시놀 3-키나제 (PI3K) 및 Akt 신호전달을 변형시키는 세포성 포스포타제인 포스포타제 및 텐신 상동체 (PTEN)의 손실 또는 억제는 암에서 전사후 PD-L1 발현을 증가시킨다. 문헌 [Parsa et al., Nat. Med. 13: 84-88 (2007)].

[0155] PD-L2 발현은 PD-L1 보다 제한적이다. PD-L2는 DC, 대식세포, 및 골수 유래 비만 세포에서 유도적으로 발현된다. PD-L2는 또한 2/3의 휴지 복막 B1 세포의 약 절반에서 발현되지만, 통상의 B2 B 세포에서는 발현되지 않는다. 문헌 [Zhong et al., Eur. J. Immunol. 37: 2405-10 (2007)]. PD-L2+ B1 세포는 포스포타티로시놀에 결합하고, 박테리아 항원에 대한 선천적인 면역 반응에 중요할 수 있다. IFN-γ에 의한 PD-L2의 유도는 NF-κB에 부분적으로 의존적이다. 문헌 [Liang et al., Eur. J. Immunol. 33: 2706-16 (2003)]. PD-L2는 또한 GM-CSF, IL-4 및 IFN-γ에 의해 단핵구 및 대식세포에서 유도될 수 있다. 문헌 [Yamazaki et al., J. Immunol. 169: 5538-45 (2002)]; [Loke et al., PNAS 100:5336-41 (2003)].

[0156] PD-1 신호전달은 전형적으로 세포 증식보다 시토킨 생산에 더 큰 효과를 가지며, IFN-γ, TNF-α 및 IL-2 생산에 대해 현저한 효과를 갖는다. PD-1 매개 억제성 신호전달은 또한 TCR 신호전달의 강도에 의존적이며, 낮은 수준의 TCR 자극에서 큰 억제가 전달된다. 이러한 감소는 CD28을 통한 공동자극에 의해 (문헌 [Freeman et al., J. Exp. Med. 192: 1027-34 (2000)]) 또는 IL-2의 존재에 의해 (문헌 [Carter et al., Eur. J. Immunol.

32: 634-43 (2002)] 극복될 수 있다.

- [0157] PD-L1 및 PD-L2를 통한 신호전달이 양방향성일 수 있다는 증거가 갖춰지고 있다. 즉, TCR 또는 BCR 신호전달을 변형하는 것에 더하여, 신호전달은 또한 PD-L1 및 PD-L2를 발현하는 세포로 되돌려질 수 있다. 수지상 세포를 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 환자로부터 단리한 천연 인간 항-PD-L2 항체로 처리하는 것에 의해 MHC II 또는 B7 공동자극 분자가 상향조절되는 것은 발견되지 않은 반면, 그러한 세포는 전염증성 시토카인, 특히 TNF- α 및 IL-6을 대량으로 생산하고, T 세포 증식을 자극한다. 문헌 [Nguyen et al., J. Exp. Med. 196: 1393-98 (2002)]. 마우스를 이러한 항체로 처리하는 것은 또한 (1) 이식된 b16 흑색종에 대한 내성을 향상시키고, 종양 특이적 CTL을 급속하게 유도하였고 (문헌 [Radhakrishnan et al., J. Immunol. 170: 1830-38 (2003)]; [Radhakrishnan et al., Cancer Res. 64: 4965-72 (2004)]; [Heckman et al., Eur. J. Immunol. 37: 1827-35 (2007)]); (2) 알레르기성 천식 마우스 모델에서 기도 염증성 질환의 발생을 차단하였다. 문헌 [Radhakrishnan et al., J. Immunol. 173: 1360-65 (2004)]; [Radhakrishnan et al., J. Allergy Clin. Immunol. 116: 668-74 (2005)].
- [0158] 수지상 세포 ("DC")로의 역 신호전달의 추가의 증거는 가용성 PD-1 (Ig 불변 영역에 융합된 PD-1 EC 도메인 - "s-PD-1")와 함께 배양한 골수 유래 DC의 연구로부터 나왔다. 문헌 [Kuipers et al., Eur. J. Immunol. 36: 2472-82 (2006)]. 상기 sPD-1은 항-PD-1의 투여를 통해 가역적인 방식으로 DC 활성화를 억제하였고, IL-10 생산을 증가시켰다.
- [0159] 또한, 여러 연구는 PD-L1 또는 PD-L2 수용체가 PD-1에 독립적임을 보여준다. B7.1은 PD-L1 결합 파트너로서 이미 확인되었다. 문헌 [Butte et al., Immunity 27: 111-22 (2007)]. 화학적 가교 연구는 PD-L1 및 B7.1이 그들의 IgV-유사 도메인을 통해 상호작용할 수 있음을 시사한다. B7.1:PD-L1 상호작용은 T 세포에 대해 억제 신호를 유도할 수 있다. B7.1에 의한 CD4+ T 세포 상의 PD-L1의 라이게이션 또는 PD-L1에 의한 CD4+ T 세포 상의 B7.1의 라이게이션은 억제 신호를 전달한다. CD28 및 CTLA-4가 결합된 T 세포는 항-CD3 플러스 B7.1 코팅 비드에 의한 자극시 감소된 증식 및 시토카인 생산을 보인다. B7.1에 대한 모든 수용체 (즉, CD28, CTLA-4 및 PD-L1)가 결합된 T 세포에서, T 세포 증식 및 시토카인 생산은 항-CD3 플러스 B7.1 코팅 비드에 의해 더 이상 억제되지 않는다. 이는 B7.1이 CD28 및 CTLA-4의 부재하에 T 세포 상의 PD-L1을 통해 특이적으로 작용함을 나타낸다. 유사하게, PD-1이 결합된 T 세포는 항-CD3 플러스 PD-L1 코팅 비드의 존재하에서의 자극시에 감소된 증식 및 시토카인 생산을 나타내었는데, 이는 T 세포 상의 B7.1에 대한 PD-L1 라이게이션의 억제 효과를 보여준다. T 세포에서 PD-L1에 대한 공지된 모든 수용체가 결합된 경우 (즉, PD-1 및 B7.1이 없음), T 세포 증식은 더 이상 항-CD3 플러스 PD-L1 코팅 비드에 의해 악화되지 않는다. 즉, PD-L1은 B7.1 또는 PD-1을 통해 T 세포에 대해 억제 효과를 발휘할 수 있다.
- [0160] B7.1 및 PD-L1 사이의 직접 상호작용은 공동자극에 대한 현재의 이해가 불완전함을 시사하며, T 세포 상에서의 이러한 분자의 발현에 대한 중요성을 강조한다. PD-L1^{-/-} T 세포의 연구는 T 세포 상의 PD-L1이 T 세포 시토카인 생산을 하향조절할 수 있음을 보여준다. 문헌 [Latchman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 10691-96 (2004)]. PD-L1 및 B7.1이 둘 모두 T 세포, B 세포, DC 및 대식세포에서 발현되기 때문에, 이들 세포형에서 B7.1 및 PD-L1 사이의 지향성 상호작용에 대한 가능성이 존재한다. 또한, 비조혈 세포 상의 PD-L1은 T 세포 상의 B7.1 뿐만 아니라 PD-1과도 상호작용할 수 있는데, 따라서 PD-L1이 이들의 조절에 관련이 있는지 여부가 의문시된다. B7.1:PD-L1 상호작용의 억제 효과에 대한 한가지 가능한 설명은 T 세포 PD-L1이 APC B7.1을 CD28과의 상호작용으로부터 가두거나 분리할 수 있다는 것이다.
- [0161] 그 결과, PD-L1을 PD-1, B7.1 또는 둘 모두와의 상호작용으로부터 차단하여 PD-L1이 T 세포 및 다른 항원 제시 세포에 음성 공동자극 신호를 전달하는 것을 막는 것을 비롯한 PD-L1을 통한 신호전달의 길항작용은 감염 (예를 들어, 급성 및 만성) 및 종양 면역에 대한 면역을 향상시킬 것이다. 또한, 본 발명의 항-PD-L1 항체는 PD-1:PD-L1 신호전달의 다른 성분의 길항제, 예를 들어 길항제 항-PD-1 및 항-PD-L2 항체와 조합될 수 있다.
- [0162] 4. B7-H3
- [0163] 공동자극 신호는 또한 림프양 및 비림프양 조직에서 널리 발현되는 B7-H3 (B7RP-2, CD276, PRO352)을 통해 제공된다. 문헌 [Chapoval et al., Nat. Immunol. 2: 269-74 (2001)]. 인간에서, B7-H3은 4Ig 및 2Ig 변이체를 둘 모두 갖고 4Ig 형태가 우세한 반면, 마우스에서는 2Ig 변이체가 우세하다. 문헌 [Sun et al., J. Immunol. 168: 6294-97 (2002)]; [Steinberger et al., J. Immunol. 172: 2352-59 (2004)]; [Ling et al., Genomics 82: 365-77 (2003)].

[0164] 최근의 연구는 B7-H3이 T 세포 반응의 자극제이면서 억제제임을 보여준다. 자극 활성화의 증거는 다음과 같이 제공된다: (1) 항-CD3과 조합되어, B7-H3/Ig 융합체는 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 증식을 공동자극하고, IFN- γ 및 CD8 용해 활성을 자극하였고 (문헌 [Chapoval et al., Nat. Immunol. 2: 269-74 (2001)]); (2) EL-4 림프종 모델의 종양에 B7-H3 발현 플라스미드를 주사한 결과 50%의 종양이 완전히 퇴화되었다 (CD8⁺ T 세포 및 NK 세포에 의존적임). 그러나, 몇몇 최근 연구는 이러한 분자의 억제 역할을 보여준다. B7-H3^{-/-} APC 녹아웃은 MLR 반응에서 이형반응성 T 세포 증식을 2배 증가시키는 것으로 나타났다. 항-CD3 및 항-CD28에 의한 CD4 T 세포의 활성화는 B7-H3 형태에 의해 형질감염된 HLA-DR2에서 억제되었다. 문헌 [Ling et al., Genomics 82: 365-77 (2003)]. 그 결과 IFN- γ , TNF- α , IL-10 및 GM-CSF의 증식 및 생산이 감소되었다. 이러한 연구를 조화시키는 것은, CD28 및 CTLA-4가 B7.1 및 B7.2를 통해 어떻게 신호전달을 조절하는지와 유사하게, 반대되는 기능을 갖는 B7-H3에 대한 2종의 수용체의 존재하에서 이루어질 수 있다.

[0165] 그 결과, B7-H3 신호전달의 차단은 본 발명의 항-PD-L1 항체와 조합할 경우 감염 및 종양 면역에 대한 면역 반응을 향상시키는데 기여할 수 있다.

[0166] 5. B7-H4

[0167] 가장 최근에 B7 패밀리에 포함된 것은 B7-H4 (B7x, B7-S1, B7-H.5, VTCN1, PR01291)로서, 이것은 T 세포 반응의 음성 조절자이다. 문헌 [Zang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (18), 10388-10392 (2003)]; [Watanabe et al., Nat. Immunol. 4 (7), 670-679 (2003)]; [Prasad, et al., Immunity 18(6), 863-873 (2003)]; [Sica et al., Immunity 18 (6), 849-861 (2003)]. 인간 및 마우스 B7-H4는 둘 모두 림프양 (비장 및 흉선) 및 비림프양 장기 (폐, 간, 고환, 난소, 태반, 골격근, 췌장 및 소장 포함) 둘 모두에서 널리 발현된다. B7-H4는 IHC 또는 면역 수준에서의 B7-H4의 조절에 의해서는 정상 인간 조직에서 검출되지 않는다. IHC는 B7-H4가 폐 및 난소 종양에서 고도로 발현됨을 나타내었고, 실시간 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 분석은 마우스 B7-H4도 역시 전립선, 폐 및 결장 암종 세포주에서 고도로 발현됨을 보여주었다. B7-H4는 CTLA-4, ICOS, PD-1 및 B7-H3에 대한 수용체와 달리, 활성화되었지만 나이브 T 세포가 아닌, 아직 알려지지 않은 수용체에 결합한다. BTLA가 B7-H4에 대한 리간드인 것으로 처음에 보고되었지만, 야생형 (그러나 BTLA^{-/-} 세포는 아님)에 대한 B7-H4/Ig 융합체의 결합에 대한 보고는 HVEM이 B7-H4에 대한 특유한 리간드이고 BTLA는 그렇지 않다는 결론을 내리게 한다. 문헌 [Sedy et al., Nat. Immunol. 6: 90-98 (2004)].

[0168] B7-H4 형질감염체 및 고정된 B7-H4/Ig 융합체에 의한 연구는 B7-H4가 TCR-매개 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 증식, G0/G1 상에서의 세포 주기 진행, 및 IL-2 생산을 억제하는 신호를 전달하는 것으로 밝혀내었다. 문헌 [Sica et al., Immunity 18: 849-61 (2003)]; [Zang et al., PNAS 100: 10388-92 (2003)]; [Prasad et al., Immunity 18: 863-73 (2003)]. B7.1 공동자극은 B7-H4/Ig 유도된 억제를 극복할 수 없다. 항-B7-H4 항체를 차단하면 시험관내 T 세포 증식 및 IL-2 생산이 증가된다. 완전 프로인트 아주반트 (CFA) 중의 키폴 림프 헤모시아닌 (KLH)의 투여와 상응하는 생체내 항-B7-H4 항체의 투여는 항-KLH 항체 IgM의 생산을 약간 증가시켰고, 시험관내에서 KLH로 재자극하면 T 세포 증식 및 IL-2 생산을 2배 내지 3배 증가시켰는데, 이는 항-B7-H4의 존재하에서 생체내 T 세포 초회감작이 더 높아짐을 시사한다. 항-B7-H4 차단 항체는 항-B7-H4 처리된 자가면역 마우스 모델의 뇌에서 증가된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 및 CD11b⁺ 대식세포에서 EAE의 개시 및 중증도를 현저하게 가속화시켰다. B7-H4에 대해 이용가능한 실험 데이터를 조합한 것은 이것이 말초 조직에서 면역 반응을 하향조절할 수 있으며, T 세포 내성을 조절하는데 소정의 역할을 한다는 것을 시사한다. B7-H4의 발현은 또한 종양 면역에 있어서 숙주 면역 반응의 회피에 소정의 역할을 할 수 있다. 문헌 [Choi et al., J. Immunol. 171: 4650-54 (2003)]. 그 결과, B7-H4의 길항작용은 본 발명의 항-PD-L1 항체와 조합될 경우 감염 및 종양 면역에 대한 면역 반응을 향상시키는데 유용할 수 있다.

[0169] 6. BTLA:

[0170] B7 패밀리 구성원 BTLA (CD272, BTLA-1)는 PD-1 및 CTLA와 기능적으로 유사하다. Th1 세포에 대한 선별 마커로서 초기에 확인된 BTLA는 림프구에서만 발현된다. CTLA-4, ICOS 및 PD-1와 유사하게, BTLA는 활성화 동안에 T 세포에서 유도된다. 그러나, Th2-세포 상에서 상승된 채로 존재하지만 Th1 세포에서는 하향조절되는 ICOS와 대조적으로, BTLA는 Th1-세포에서 발현된 채로 존재하지만 Th2-세포에서는 그렇지 않다. PD-1과 유사하게, BTLA는 또한 B 세포에서 발현된다. 문헌 [Gavrieli et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 312: 1236-43 (2003)]. 그러나, BTLA는 휴지 및 활성화 B 세포 둘 모두에서 발현되지만, PD-1은 활성화된 B 세포에서 상향조

절된다. BTLA는 2개의 ITIM 모티프를 갖는다.

[0171] BTLA는 B 및 T 림프구 둘 모두에 대해 억제 효과를 발휘한다. 문헌 [Watanabe et al., Nat. Immunol. 4: 670-79 (2003)]. BTLA^{-/-} B 세포는 항-IgM에 대해 미진한 반응을 나타내지만, 시험관내에서 항-CD3에 대해 증가된 반응을 나타낸다. 극성 BTLA^{-/-} Th1 세포는 시험관 내에서 항원 노출에 반응하여 증식이 약 2배 증가되는 것으로 나타났다. 생체내에서, BTLA^{-/-} 마우스는 합텐 특이적 항체 반응에서 3배 증가를 나타내었고, EAE에 대해 향상된 감수성을 나타내었다. BTLA^{-/-} 마우스의 표현형은 자가면역에 대해 증가된 감수성을 나타내는 PD-1^{-/-} 마우스의 표현형과 유사하였지만, CTLA-4^{-/-} 마우스에 비해 더 감지하기 어려운 표현형이었다. 그러나, 음성 조절자로서의 그의 역할을 고려할 때, BTLA의 차단은 본 발명의 항-PD-L1 항체와 조합될 경우 감염 및 항종양 면역에서의 면역 반응을 향상시키는 데 유용한 것으로 판명될 수 있다.

[0172] 흥미롭게도, Ig 슈퍼패밀리 구성원 BTLA가 또한 TNFR 패밀리 구성원 HVEM와도 상호작용하는 것이 최근에 밝혀졌다. 문헌 [Sedy et al., Nat. Immunol. 6: 90-98 (2005)]; [Gonzalez et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 1116-1121 (2005)]. HVEM은 이하의 TNFR 패밀리 공동자극제 하에서 고찰한다.

[0173] E. TNFR 패밀리 공동자극제

[0174] **1.OX40/OX40L (CD134)**

[0175] OX40 (CD134, TXPG1L, TNFRSF4) 및 OX40L (CD134L, CD252, GP34, TNFSF4, TXGP1) 결핍 마우스는 바이러스성 및 공통 단백질 항원 둘 모두에 대해 그리고 접촉 과민 반응에서 감소된 1차 CD4+ T 세포 반응을 갖는다. 문헌 [Chen et al., Immunity 11: 689-698 (1999)]; [Kopf et al., Immunity 11: 699-708 (1999)]; [Murata et al., J. Exp. Med. 191: 365-374 (2000)]; [Gramaglia et al., J. Immunol. 165: 3043-3050 (2000)]. 1차 반응에서 낮은 빈도의 항원 특이적 이펙터 T 세포가 나중에 생성되고, 더 적은 개수의 기억 T 세포가 발생한다. 문헌 [Gramaglia et al., 상기 문헌]. CD27 결핍 T 세포와 대조적으로, OX40이 결핍된 나이브 CD4+ T 세포 증식에서 초기 증식은 손상되지 않는다. 그러나, 활성화 4-5일 후에 감소된 증식 및 뚜렷한 아포토시스성 세포 사멸이 발생하며, T 세포가 거의 장기간 생존하지 못한다. 문헌 [Rogers et al., Immunity 15: 445-455 (2001)]. OX40-결핍 CD8+ T 세포에 의해, 초기 세포 분열은 영향을 받지 않지만, 1차 이펙터 세포의 축적은 항원과 접촉하고 3-6일 이후에 현저하게 감소된다. 문헌 [Croft et al., Nat. Immunol. 3: 609-620 (2003)].

[0176] 수지상 세포 또는 T 세포에 의한 OX40L의 트랜스제닉 발현은 항원-반응 CD4+ T 세포의 개수를 증가시키고, 이상 T 세포 활성화와 관련이 있는 자가면역-유사 증상을 야기한다. 문헌 [Brockner et al., Eur.J. Immunol. 29:1610-1616 (1999)]; [Murata et al., J. Immunol. 169: 4628-4636 (2002)]. 면역화 이후에, 효능제 항-OX40 항체를 주사하면 1차 반응의 정점에서 보다 많은 개수의 항원-반응성 CD4+ T 세포가 축적되고, 생성되는 기억 T 세포의 개수가 함께 향상된다. 문헌 [Gramaglia et al., 상기 문헌], [Bansai-Pakala et al., Nature Med. 7: 907-912 (2001)], [Maxwell et al., J. Immunol. 164: 107-112 (2000)]; [Weatherill et al., Cell. Immunol. 209: 63-75 (2001)]. 1차 이펙터 CTL의 향상된 축적은 항원-초회감작 마우스를 OX40에 대해 특이적인 효능제 항체로 처리한 경우에 발생한다. 문헌 [De Smedt et al., J. Immunol. 168: 661-670 (2002)].

[0177] OX40은 1차 면역 반응의 정점에서 새롭게 생성된 이펙터 세포의 생존을 가능하게 하는 후기 작용 신호를 제공하는 것으로 보인다. 또한, OX40이 CD28로부터 하류에서 기능한다는 타당한 증거가 존재하며 - OX40의 증가된 발현이 CD28 신호에 의해 매개되는 것에 더하여, CD28 결핍 대 OX40 결핍의 기능 분석으로 초기 1차 T 세포 반응이 CD28 신호의 부재하에서 현저하게 손상되지만, 후기 반응만은 OX40 신호의 부재하에서 손상되는 것으로 밝혀졌다. 문헌 [Rogers et al., Immunity 15: 445-455 (2001)]; [Bertram et al., J. Immunol. 168: 3777-3785 (2002)].

[0178] 그 결과, 예컨대 효능제 항체를 적용하는 것을 통한 OX40/OX40L의 활성화는 본 발명의 항-PD-L1 항체와 조합될 경우 T 세포 기능이상 장애를 치료하는데 유용할 수 있을 것으로 보인다.

[0179] **2.4-1BB (CD137)/4-1BBL**

[0180] OX40/OX40L과 유사하게, 4-1BB (CD137, TNFRSF9) 및 4-1BBL (TNFSF9)이 결핍된 T 세포는 4-1BBL의 부재시에 1차 반응에서 더 적은 항원-반응성 CD8+ T 세포 축적 및 더 적은 기억 T 세포 발생을 나타낸다. 문헌 [DeBenedette et al., J. Immunol. 163: 4833-4841 (1999)]; [Tan et al., J. Immunol. 163: 4859-4868 (1999)]; [Tan et al., J. Immunol. 164: 2320-2325 (2000)]. 또한, 4-1BBL의 차단은 CD8+ T 세포의 초기 증

식 반응을 변경시키지 않지만, 3-6 일 후의 1차 반응의 정점에서 이펙터 CTL의 축적을 억제하는데, 이는 수회 분열된 세포의 아포토시스로 인한 것이다. 문헌 [Cooper et al., Eur. J. Immunol. 32: 521-529 (2002)]. 효능제 항-4-1BB 항체 및 항-4-1BBL-형질감염된 APC는 또한 유사한 결과로 생성되고: CTL 및 CD4+ T 세포 반응은 생체내에서 현저하게 증가된다. 문헌 [Melero et al., Nature Med. 3: 682-685 (1997)]; [Melero et al., Eur. J. Immunol. 28: 1116-1121 (1998)]; [Takahashi et al., J. Immunol. 162: 5037-5040 (1999)]; [Guinn et al., J. Immunol. 162: 5003-5010 (1999)]; [Halstead et al., Nature Immunol. 3: 536-541 (2002)]; [Takahashi et al., Immunol. Lett. 76: 183-191 (2001)]; [Bansal-Pakala et al., J. Immunol. 169: 5005-5009 (2002)]. 4-1BB-특이적 항체는 초기 증식 반응을 변경시키지 않는데, 이는 4-1BBL 차단 실험으로부터의 결론을 지지하며, 세포 생존 신호를 공급하는데 있어서 4-1BB의 후기 활성을 나타낸다.

[0181] OX40과 같이, 4-1BB도 1차 면역 반응의 정점에서 새롭게 생성된 이펙터 세포의 생존을 가능하게 하는 후기 작용 신호를 제공하는 것으로 여겨진다. 또한, 4-1BB이 CD28 보다 나중에 기능한다는 타당한 증거가 존재하며 - OX40 및 4-1BB의 증가된 발현이 CD28 신호에 의해 매개되는 것에 더하여, CD28 결핍 대 4-1BB 결핍의 기능 분석으로 초기 1차 T 세포 반응이 CD28 신호의 부재하에서 현저하게 손상되지만, 후기 반응만은 OX40 신호의 부재하에서 손상을 받는 것으로 밝혀졌다. 문헌 [Rogers et al., Immunity 15: 445-455 (2001)]; [Bertram et al., J. Immunol. 168: 3777-3785 (2002)].

[0182] 효능제 항-CD137 항체는 CD8+ CTL이 중추적인 역할을 하는 암에서 종양 퇴화를 유도할 수 있다. 문헌 [Melero et al., Nat. Med. 3: 682-5 (1997)]; [Hirano et al., Cancer Res. 65(3): 1089-96 (2005)]. PD-L1의 구성적 및 유도적 발현은 PD-L1의 차단에 대해 가역적인 그러한 종양에 내성을 부여한다. 문헌 [Hirano et al.].

[0183] 그 결과, 예컨대 효능제 항체를 적용하는 것을 통한 4-1BB/4-BBL의 활성화는, 특히 PD-L1 길항제 (예를 들어, 항-PD-L1 항체)와 조합되어 T 세포 기능이상 장애를 치료하는데 유용할 수 있을 것으로 보인다.

[0184] 3.CD27/CD27L (CD70)

[0185] T 세포 반응의 초기 단계에서의 CD27 (TNFRSF7, S152) 및 CD27L (CD70, TNFSF7) 신호전달의 중요성은 CD27/CD70 상호작용을 방해한 시험관내 차단 연구에서 밝혀졌다. 문헌 [Oshima et al., Int. Immunol. 10: 517-526 (1998)]; [Agematsu et al., J. Immunol. 153: 1421-1429 (1994)]; [Hintzen et al., J. Immunol. 154: 2612-2623 (1995)]. CD27이 결여된 T 세포는 초기에는 정상적으로 분열되지만, 활성화되고 3일 이상이 지나면 저조하게 증식된다. 문헌 [Hendriks et al., Nature Immunol. 1: 433-440 (2000)]. 이는 CD27이 T 세포 사멸을 초기에 억제하는 것에 의해 또는 활성화 2-3일 이후에 분열이 지속되도록 세포 주기에 작용하는 것에 의해 나이브 T 세포 집단의 초기 확장을 촉진하는데 관여함을 나타낸다. 이는 CD27-결핍 마우스의 생체내 연구에 의해 보강되며, 상기 연구에서 더 적은 수의 항원 특이적 반응 (4-8 일) 및 더 적은 기억 T 세포가 3 주 이상에 걸쳐 발생한다. 문헌 [Hendriks et al., 상기 문헌]. CD27의 발현은 T 세포 활성화 직후에 상향조절되는데, 이는 그것이 주로 이펙터 반응의 정점 이전에 초기 증식을 유지시키는 신호를 전달함을 시사한다.

[0186] 그 결과, 예컨대 효능제 항체를 적용하는 것을 통한 CD27/CD27L의 활성화는, 특히 본원에 기재된 항-PD-L1 항체와 조합되어 T 세포 기능이상 장애를 치료하는데 유용할 수 있을 것으로 보인다.

[0187] 4.CD30/CD30L (CD153)

[0188] CD30 (TNFRSF8, Ki-1) 및 CD30L (CD153, TNFSF8) 신호전달은 시험관내에서 몇몇 T 세포 기능에 대해 공동자극을 제공한다. 문헌 [Del Prete et al., J. Exp. Med. 182: 1655-1661 (1995)], [Bowen et al., J. Immunol. 156: 442-449 (1995)]. CD30L에 대한 차단 시약은 시험관내에서 Th2 세포의 발생을 억제하고, Th1 세포의 발생을 향상시킨다. 이러한 활성화는 CD30이 Th2 세포 및 유형 2 세포독성 Tc2 세포에 의해 우선적으로 발현되는 것을 보여주는 데이터와 일치한다. 문헌 [Del Prete et al., 상기 문헌], [Nakamura et al., J. Immunol. 158: 2090-2098 (1996)]. CD30은 비극성 1차 반응에서 나이브 T 세포의 활성화 3-4 일 후에 발현된다. 문헌 [Nakamura et al., 상기 문헌]은 그 역할이 유형 2 시토카인-우세 반응에 국한되지 않음을 보여준다.

[0189] CD30/CD30L 신호전달의 정확한 메커니즘은 분명하지 않지만, OX40 및 4-1BB와 유사할 수 있는 것으로 제안되고 있다. 입양 전달된 항원 특이적 CD8+ T 세포를 CD30L-결핍 마우스에 전달한 경우, 이들은 1차 반응의 정점에서 많은 수로 축적되지 않고, 더 적은 기억 T 세포가 발생한다. 그 결과, CD30도 또한 1차 반응의 정점에서 많은 수의 항원 특이적 T 세포의 생성을 가능하게 하는 증식 및/또는 생존 신호를 제공할 수 있다.

[0190] 그 결과, 예컨대 효능제 항체를 적용하는 것을 통한 CD27/CD27L의 활성화는, 특히 본원에 기재된 항-PD-L1 항체

와 조합되어 T 세포 기능이상 장애를 치료하는데 유용할 수 있을 것으로 보인다.

[0191] **5.HVEM/LIGHT**

[0192] T 세포 공동자극에 대한 HVEM (HVEA, ATAR, LIGHTR, TNFRSF14, PRO509) 및 LIGHT (CD258, HVEM, TR2, TNFSF14, PRO726)의 효과는 1) LIGHT가 또한 림프독소- β 수용체 (LT β R)에 결합할 수 있고, 2) HVEM이 가용성 LT α 3에 결합하므로 이에 의해 복잡하다. 이에 따라, HVEM/LIGHT의 효과의 임의의 연구는 이러한 신호전달 시스템에 대한 다른 결합 파트너의 효과를 또한 고려해야 한다. LIGHT의 차단은 동종이형 혼합-림프구 반응 (MLR)에서 초기 T 세포 증식 및 시토카인 분비를 억제할 수 있다. 문헌 [Tamada et al., J. Immunol. 164: 4105-4110 (2000)], [Kwon et al., J. Biol. Chem. 272: 14272-14276 (1997)]; [Harrop et al., J. Immunol. 161: 1786-1794 (1998)]; [Tamada et al., Nature Med. 6: 283-289 (2000)]. 전염증성 시토카인의 생산은 MHC-미스매칭된 심장 동종이식편에서 LIGHT가 차단될 경우에 억제된다. 문헌 [Ye et al., J. Exp. Med. 195: 795-800 (2002)]. 게다가, 동종이형 피부 이식편은 LIGHT 및 CD28이 둘 모두 결합된 수용자에서 지연된 역동학으로 인해 거부된다. 문헌 [Scheu et al., J. Exp. Med. 195: 1613-1624 (2002)]. 이식편 거부를 지연시킨다는 것은 T 세포 클론 확장 또는 시토카인 생산의 초기 억제를 나타낼 수 있다. 이러한 결론은 (i) LIGHT-결합 비장세포가 동종항원에 반응하여 TH1 및 TH2 시토카인 둘 모두의 생산을 감소시키고, 세포독성 T 림프구 (CTL) 활성의 생성을 약화시킴을 보여주는 시험관내 연구 (문헌 [Sheu et al., 상기 문헌]), 및 (ii) LIGHT 차단이 동종반응성 CTL의 생성을 감소시킴을 보여주는 생체내 연구에 의해 강화된다. 문헌 [Tamada et al., Nature Med. 6: 283-289 (2000)].

[0193] 그 결과, HVEM/LIGHT는 예컨대 효능제 항체를 적용하는 것을 통해, 특히 본원에 기재된 항-PD-L1 항체와 조합되어 T 세포 기능이상 장애를 치료하는데 유용할 수 있을 것으로 보인다.

[0194] **II.정의**

[0195] "알레르겐" 또는 "면역원"은 면역 반응을 일으킬 수 있는 임의의 분자이다. 본원에서 사용되는 용어는, 항원 분자 그 자체, 또는 그의 공급원, 예컨대 꽃가루, 동물 비듬, 곤충 독 또는 식료품을 포괄한다. 이는 이뮤노글로불린 또는 T 세포 수용체에 의해 특이적으로 인식될 수 있는 분자를 지칭하는 용어 항원과 대조된다. 면역 반응을 유도할 수 있는 임의의 외래 물질은 잠재적인 알레르겐이다. 천연 및 합성 둘 모두로부터 기원된 많은 다양한 화학물질들이 알레르겐인 것으로 알려져 있다. 복합 천연 유기 화학물질, 특히 단백질은 항체-매개 알레르기를 유발하는 것으로 보이는 한편, 단순 유기 화합물, 무기 화학물질, 및 금속은 T 세포 매개 알레르기를 보다 우세하게 유발한다. 일부 경우에서, 동일한 알레르겐이 한 유형을 초과하는 알레르기의 원인이 될 수 있다. 알레르겐에의 노출은 흡입, 주사, 주사, 또는 피부 접촉을 통해 일어날 수 있다.

[0196] 면역 기능장애와 관련하여 "기능장애"란, 항원 자극에 대한 반응성이 감소된 면역 상태를 지칭한다. 상기 용어는 항원 인식이 일어날 수 있지만 후속 면역 반응이 감염 또는 종양 성장을 제어하는데 효과적이지 않은 탈진 및/또는 무반응 둘 모두의 공통 요소를 포함한다.

[0197] "내성" 또는 "면역 내성"은 면역계가 특정 항원에 대한 방어적 면역 반응을 개시하는데 실패한 것이다. 내성은 자연적이거나 자기일 수 있거나 (이때 신체는 그 자신의 단백질 및 항원을 공격하지 못함), 또는 면역계를 조작하는 것으로부터 유도될 수 있다. 중심 내성은 림프구 발생 동안에 생기고, 흉선 및 골수에서 작동된다. 이 과정 동안, 자기 항원을 인식하는 T 및 B 림프구는 그것이 완전한 면역적격 세포로 발생되기 이전에 제거된다. 이 과정은 태아 발생 동안에 가장 활발하지만, 미성숙 림프구가 생성됨에 따라 생애에 걸쳐 계속된다. 말초 T 세포 내성은 말초 조직에 존재하는 자기 항원에 대한 기능적 무반응을 지칭하며, T 및 B 세포 성숙 및 말초 진입 이후에 생긴다. 이러한 과정은 "조절" T 세포에 의해 자가반응 세포가 억제되고, 염증에 수반되는 공동자극 신호의 부재하에서 항원과 맞닥뜨린 림프구에서 저반응 (무반응)이 생성되는 것을 포함한다. "후천적" 또는 "유도된 내성"은 다른 환경에서는 아마도 세포 매개 또는 체액성 면역을 유도할 주어진 항원에 대한 림프양 조직의 특이적 비반응성을 특징으로 하는, 외부 항원에 대해 면역계가 적응한 것을 지칭한다. 성체에서, 내성은 매우 많은 용량의 항원, 또는 면역 반응을 자극하는데 요구되는 역치 미만의 작은 용량을 예컨대 정맥내 또는 가용성 항원의 설하 투여를 통해 반복 투여하여 임상적으로 유도할 수 있다. 면역억제는 또한 내성 유도를 용이하게 한다. 자기 내성의 파괴는 자가면역을 야기할 수 있다.

[0198] "T 세포 기능을 향상시키는 것"은 T 세포가 지속적이거나 증폭된 생물학적 기능을 갖도록 유도하거나, 유발하거나, 또는 자극하는 것, 또는 탈진되거나 불활성인 T 세포를 재생시키거나 재활성화시키는 것을 의미한다. T 세포 기능을 향상시키는 것의 예에는: CD8⁺ T 세포로부터 γ -인터페론의 분비를 증가시키는 것, 증식을 증가시키는

것, 항원 반응성 (예를 들어, 바이러스 또는 병원체 제거)을 개입 이전의 수준에 비해 증가시키는 것이 포함된다. 한 실시양태에서, 향상 수준은 적어도 50%, 별법적으로 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150%, 200%이다. 이러한 향상을 측정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

[0199] "T 세포 기능이상 장애"는 항원 자극에 대한 반응성이 감소된 것을 특징으로 하는 T 세포의 장애 또는 상태이다. 특정 실시양태에서, T 세포 기능이상 장애는 PD-1을 통한 부적절한 신호전달의 증가와 특이적으로 관련된 장애이다. 또 다른 실시양태에서, T 세포 기능이상 장애는 T 세포가 무반응이거나 또는 시토크인 분비, 증식, 또는 세포용해 활성을 수행하는데 있어서의 능력이 감소된 장애이다. 특정 측면에서, 감소된 반응성은 면역원을 발현하는 병원체 또는 종양을 비효과적으로 제어한다. T 세포 기능장애를 특징으로 하는 T 세포 기능이상 장애의 예에는 미해결 급성 감염, 만성 감염 및 종양 면역이 포함된다.

[0200] "만성 감염"은 감염된 숙주에서 감염원 (예를 들어, 병원체, 예컨대 바이러스, 박테리아, 원생동물성 기생충, 진균 등)이 면역 반응을 유도하지만, 급성 감염 동안에서와 같이 숙주에서 소멸되거나 제거되지 않은 감염을 지칭한다. 만성 감염은 지속적이거나, 잠재적이거나 또는 느릴 수 있다. 급성 감염이 면역계에 의해 전형적으로 수 일 또는 수 주 이내에 해소되는 반면 (예를 들어, 인플루엔자), 지속 감염은 비교적 낮은 수준에서 수 개월, 수 년, 수십 년, 또는 평생 지속될 수 있다 (예를 들어, B형 간염). 대조적으로, 잠재적인 감염은 급속하게 증가하는 고 등급의 감염 기간에 의해 단절되고 병원체 수준이 상승되는 장기간의 무증상 활성을 특징으로 한다 (예를 들어, 단순 포진). 마지막으로, 느린 감염은 질환 증상이 점진적이고 계속적으로 증가되는 것을 특징으로 하는 것으로, 예컨대 장기간 인큐베이션된 후 임상적 증상이 개시된 이후에 장기적이고 점진적인 임상 경과가 시작된다. 잠재적 및 지속적 감염과 달리, 느린 감염은 급성 바이러스 증식 기간과 함께 시작될 수 없다 (예를 들어, 피코르나바이러스 감염, 비스나바이러스, 스크래피, 크로이츠펔트 야콥 질환). 만성 감염을 유도할 수 있는 예시적인 감염원으로는 바이러스 (예를 들어, 시토크갈로바이러스, 엡스타인 바르 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 단순 포진 바이러스, 1형 및 2형, 인간 면역결핍 바이러스, 1형 및 2형, 인간 파필로마바이러스, 인간 T 림프구 친화성 바이러스, 1형 및 2형, 바리셀라 조스터 바이러스 등), 박테리아 (예를 들어, 미코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 리스테리아 종, 클레브시엘라 뉴모니아에(*Klebsiella pneumoniae*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 보렐리아 종, 헬리코박터 피롤리 등), 원생동물성 기생충 (예를 들어, 리슈마니아 종(*Leishmania spp.*), 플라시모뎀 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 쉬스토소마 종(*Schistosoma spp.*), 톡소플라즈마 종(*Toxoplasma spp.*), 트리파노소마 종(*Trypanosoma spp.*), 타에니아 카르시셉스(*Taenia carssiceps*) 등), 및 진균 (예를 들어, 아스페르길루스 종(*Aspergillus spp.*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 콕시디 오이테스 이미티스(*Coccidioides immitis*), 히스토플라스마 카프슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 뉴모시스티스 카리니(*Pneumocystis carinii*) 등)이 포함된다. 추가의 감염원으로는 프리온 또는 미스폴딩된 단백질이 포함되며, 뇌 또는 뉴런 구조에서 단백질 미스폴딩이 추가로 계속되는 것에 의해 이들 조직에 영향을 미치고, 아밀로이드 플라크가 형성되게 하여 세포 사멸, 조직 손상 및 궁극적으로는 사망을 유발한다. 프리온 감염에 의해 유발되는 질환의 예로는 크로이츠펔트 야콥 질환 및 그의 변종, 게르스트만 슈투로이슬러 샤잉커 증후군(GSS), 치사성 가족 불면증(sFI), 쿠루, 스크래피, 소에서의 소 해면상 뇌병증(BSE) ("광우" 병으로도 알려짐), 및 그밖의 다양한 동물의 뇌병증 형태 [예를 들어, 전염성 멍크 뇌병증(TME), 흰꼬리 사슴, 엘크 및 물 사슴에서의 만성 소모성 질환(CWD), 고양이 해면상 뇌병증, 니알라, 오리кс 및 그레이터 쿠두에서의 외래성 유제류 뇌병증(EUE), 타조의 해면상 뇌병증]이 포함된다.

[0201] "종양 면역"은 종양이 면역 인식 및 제거를 회피하는 과정을 지칭한다. 이에 따라, 치료 개념으로서 종양 면역은 그러한 회피가 약화될 때 "치료"되고, 종양은 면역계에 의해 인식되어 공격받는다. 종양 인식의 예에는 종양 결합, 종양 수축 및 종양 제거가 포함된다.

[0202] "B7-음성 공동자극 길항제" ("BNCA")는 B7 패밀리의 구성원에 의해 매개되는 T 림프구에서 발현된 세포 표면 단백질에 의하거나 또는 그를 통해 매개되는 음성 공동자극 신호를 감소시키거나, 차단하거나, 억제하거나, 없애거나, 방해하는 작용제이다. 한 측면에서, BNCA는 단독으로 또는 본 발명의 항-PD-1 항체와 조합되어 기능이상 T 세포를 비-기능이상으로 만들 수 있다. 또 다른 측면에서, BNCA는 B7-음성 공동자극 분자의 핵산 또는 단백질 합성, 발현, 신호전달 및/또는 발현 후 프로세싱을 억제하는 작용제일 수 있다. 또 다른 측면에서, BNCA는 B7-음성 공동자극 분자에 의한 신호 전달을 감소시키거나, 차단하거나, 억제하거나, 없애거나, 또는 방해하는 항체, 항원 결합 항체 단편, BNCA 올리고펩티드, BNCA RNAi 또는 BNCA 소분자이다. B7 음성 공동자극 분자의 예에는 CTLA-4, PD-L1, PD-1, B7.1 (T 세포 상에서 발현됨), PD-L2, B7-H3 및 B7-H4가 포함된다.

[0203] 양성 공동자극 효능제는 T 림프구 상에서 발현되는 세포 표면 단백질에 의하거나 또는 그를 통해 매개되는 공동

자극 신호를 증가시키거나, 향상시키거나, 늘리거나, 또는 용이하게 하는 분자이다. 한 측면에서, 양성 공동자극 분자는 양성 공동자극 경로를 활성화하는 세포외 도메인, 가용성 구축물 또는 효능제 항체일 수 있다. 양성 공동자극 분자의 예에는 B7 슈퍼패밀리 분자, 예를 들어, B7.1, B7.2, CD28 및 ICOS/ICOSL이 포함된다. 추가의 예에는 TNFR 패밀리 공동자극 분자, 예를 들어, OX40/OX40L, 41-BB/41-BBL, CD27/CD27L, CD30/CD30L 및 HVEM/LIGHT가 포함된다.

[0204] "소분자" 또는 "유기 소분자"는 분자량이 약 500 달톤 미만인 것이다.

[0205] "간섭 RNA" "RNAi"는 표적 유전자의 발현을 감소시키는, 길이가 10 내지 50 뉴클레오티드인 RNA로, 이때 가닥의 일부는 충분히 상보적이다 (예를 들어, 표적 유전자에 대해 적어도 80% 동일성을 가짐). RNA 간섭 방법은 전사후 수준 (예를 들어, 번역)에서 일어나는 유전자 발현의 표적 특이적 억제 (즉 "유전자 침묵")를 지칭하며, 유전자 발현의 RNA 매개 억제의 모든 전사후 및 전사 메카니즘을 포함한다 (예컨대 문헌 [P.D. Zamore, Science 296: 1265 (2002)] 및 [Hannan and Rossi, Nature 431: 371-378 (2004)]에 기재되어 있음). 본원에서 사용되는 RNAi는 소형 간섭 RNA (siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 및/또는 마이크로 RNA (miRNA)의 형태일 수 있다. 그러한 RNAi 분자는 종종, 별개의 상보적인 또는 부분적으로 상보적인 RNA 가닥의 형태로 발현될 수 있는 이중 가닥 RNA 복합체이다. 이중 가닥 RNA 복합체를 설계하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 적합한 shRNA 및 siRNA의 설계 및 합성은 문헌 [Sandy et al., BioTechniques 39: 215-224 (2005)]에서 찾아볼 수 있다.

[0206] "소형 간섭 RNA" 또는 siRNA는 표적 유전자의 발현을 감소시키는, 길이가 10 내지 50 뉴클레오티드인 이중 가닥 RNA (dsRNA) 이중체로, 이때 첫번째 가닥의 일부는 충분히 상보적이다 (예를 들어, 표적 유전자에 대해 적어도 80% 동일성을 가짐). siRNA는 종종 포유동물 세포에서 RNAi의 사용과 관련된 세포 자살 또는 사멸을 야기하는 상승된 인터페론 합성, 비특이적 단백질 합성 억제 및 RNA 열화를 특징으로 하는 항바이러스 반응을 회피하도록 특이적으로 설계된다. 문헌 [Paddison et al., Proc Natl Acad Sci USA 99(3):1443-8. (2002)].

[0207] 용어 "헤어핀"은 7-20 뉴클레오티드의 루프 RNA 구조를 지칭한다. "짧은 헤어핀 RNA" 또는 shRNA는 표적 유전자의 발현을 감소시키는 헤어핀 턴을 특징으로 하는, 길이가 10 내지 50 뉴클레오티드인 단일 가닥 RNA로, 이때 RNA 가닥의 일부는 충분히 상보적이다 (예를 들어, 표적 유전자에 대해 적어도 80% 동일성을 가짐). 용어 "줄기 루프"는 짧은 홀 루프로 끝나서 이중 헬릭스를 형성하여 막대 사탕 구조를 제공하는, 동일한 분자 염기쌍의 두 영역 사이에서의 쌍형성을 지칭한다.

[0208] "마이크로 RNA" 또는 "miRNA" (종전에 stRNA로 공지됨)는 초기에 "줄기 루프" 구조를 특징으로 하는 프리-miRNA로서 전사되는, 길이가 약 10 내지 70 뉴클레오티드인 단일 가닥 RNA로, 이는 RNA-유도된 침묵 복합체 (RISC)를 통해 추가로 프로세싱된 후 성숙한 miRNA로 후속 프로세싱된다.

[0209] "BNCA 간섭 RNA" 또는 "BNCA RNAi"는 바람직하게는 BNCA 핵산에 특이적으로 결합하고, 그의 발현을 감소시킨다. 이는 BNCA RNAi가 존재하지 않는 대조군에서의 B7 음성 공동자극 분자의 발현과 비교하여 BNCA RNAi가 존재할 때 B7 음성 공동자극 분자의 발현이 더 낮아짐을 의미한다. BNCA RNAi는 공지된 방법을 이용하여 확인 및 합성할 수 있다 (문헌 [Shi Y., Trends in Genetics 19(1): 9-12 (2003)], WO2003056012, WO2003064621, WO2001/075164, WO2002/044321).

[0210] "BNCA 올리고펩티드"는 바람직하게는 본원에서 기재하는 바와 같은 B7 음성 공동자극 펩티드, 예컨대 수용체, 리간드 또는 신호전달 성분에 각각 특이적으로 결합하는 올리고펩티드이다. 이같은 올리고펩티드는 공지된 올리고펩티드 합성 방법을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있거나, 또는 재조합 기술을 사용하여 제조 및 정제될 수 있다. 상기 올리고펩티드의 길이는 대체로 적어도 약 5개 아미노산, 별법적으로 길이가 적어도 약 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100개 아미노산이다. 이같은 올리고펩티드는 주지된 기술을 사용하여 과도한 실험없이 확인할 수 있다. 이와 관련하여, 폴리펩티드 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고펩티드에 대해 올리고펩티드 라이브러리를 스크리닝하는 기술이 당업계에 주지되어 있는 것으로 인지된다 (예를 들어, 미국 특허 제5,556,762호, 동 제5,750,373호, 동 제4,708,871호, 동 제4,833,092호, 동 제5,223,409호, 동 제5,403,484호, 동 제5,571,689호, 동 제5,663,143호; PCT 출원 번호 WO 84/03506 및 WO84/03564; 문헌 [Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984)]; [Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985)]; [Geysen et al., in Synthetic Peptides as

Antigens, 130-149 (1986)]; [Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987)]; [Schoofs et al., J. Immunol., 140:611-616 (1988)], [Cwirlla, S. E. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378 (1990)]; [Lowman, H.B. et al. Biochemistry, 30:10832 (1991)]; [Clackson, T. et al. Nature, 352: 624 (1991)]; [Marks, J. D. et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]; [Kang, A.S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363 (1991)], 및 [Smith, G. P., Current Opin. Biotechnol., 2:668 (1991)] 참조.

[0211] "BNCA 소분자 길항제" 또는 "BNCA 소분자"는 바람직하게는 B7 음성 공동자극 폴리펩티드를 특이적으로 억제하는, 본원에서 정의하는 올리고펩티드 또는 항체 이외의 유기 분자이다. 그러한 B7 음성 공동자극 신호전달 억제는 바람직하게는 기능이상 T 세포가 항원 자극에 반응성 있게 한다. 예시적인 BNCA 소분자는 공지된 방법을 이용하여 확인가능하고, 화학적으로 합성할 수 있다 (예를 들어, PCT 출원 번호 W02000/00823 및 W02000/39585 참조). 그러한 BNCA 소분자는 통상적으로 크기가 약 2000 달톤 미만이고, 별법적으로 크기가 약 1500, 750, 500, 250 또는 200 달톤 미만이며, 바람직하게는 본원에서 기재하는 바와 같은 B7 음성 자극 폴리펩티드에 특이적으로 결합할 수 있고, 널리 공지되어 있는 기술을 이용하여 과도한 실험없이 확인가능하다. 이와 관련하여, 폴리펩티드 표적에 결합할 수 있는 분자에 대해 유기 분자 라이브러리를 스크리닝하는 기술이 당업계에 주지되어 있는 것으로 인지된다 (예를 들어, PCT 공개 번호 W000/00823 및 W000/39585 참조).

[0212] 용어 "항생제"는 미생물, 예컨대 바이러스, 박테리아, 진균 또는 원생동물의 성장을 특이적으로 억제하거나 막지만, 투여되는 농도 및 투약 간격에서 숙주에게 치명적이지 않은 임의의 분자를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 항생제에는 항박테리아제, 항바이러스제, 항진균제 및 항-원생동물 작용제가 포함된다. 특정 측면에서, 항생제는 투여 농도 및 투약 간격에서 숙주에게 비독성이다. 항박테리아 항생제 또는 항박테리아제는 살균성 (즉 직접 사멸) 또는 정균성 (즉 분열 방지)으로 넓게 분류될 수 있다. 항-살균 항생제는 추가로 혐범위 (즉, 단지 작은 부류의 박테리아 하위세트, 예를 들어 그람-음성 등에만 영향을 미치는 것) 또는 광범위 (즉, 넓은 부류에 영향을 미치는 것)로 세분될 수 있다. 항생제의 예에는 (i) 아미노글리코시드, 예를 들어 아미카신, 겐타미신, 카나마이신, 네오마이신, 네틸미신, 스트렙토마이신, 토브라마이신, 파로마이신, (ii) 안사마이신, 예를 들어 겐다나마이신, 헤르비마이신, (iii) 카르바세뎀, 예를 들어 로라카르베프, (iv) 카르바페뎀, 예를 들어 어터피뎀, 도리페뎀, 이미페뎀/실라스타틴, 메로페뎀, (v) 세팔로스포린 (제1 세대), 예를 들어 세파드록실, 세파졸린, 세팔로틴, 세팔렉신, (vi) 세팔로스포린 (제2 세대), 예를 들어 세파클러, 세파만돌, 세폭시틴, 세프프로질, 세푸록심, (vii) 세팔로스포린 (제3 세대), 예를 들어 세픽심, 세프디니르, 세프디토렌, 세포페라존, 세프트락심, 세프포독심, 세프타지딤, 세프티부텐, 세프티독심, 세프트리악손, (viii) 세팔로스포린 (제4 세대), 예를 들어 세페팜, (ix) 세팔로스포린 (제5 세대), 예를 들어 세프토비프롤, (x) 글리코펩티드, 예를 들어 테이코플라닌, 반코마이신, (xi) 매크롤리드, 예를 들어 아지트로마이신, 클라리트로마이신, 디리트로마이신, 에리트로마이신, 록시트로마이신, 트롤레안도마이신, 텔리트로마이신, 스펙티노마이신, (xii) 모노박탐, 예를 들어 액스 트리오뎀, (xiii) 페니실린, 예를 들어 아목시실린, 암피실린, 아즐로실린, 카르베니실린, 클록사실린, 디클록사실린, 플루클록사실린, 메즐로실린, 메치실린, 나프실린, 옥사실린, 페니실린, 피페라실린, 티카르실린, (xiv) 항생제 폴리펩티드, 예를 들어 바시트라신, 콜리스틴, 폴리믹신 B, (xv) 퀴놀론, 예를 들어 시프로플록사신, 에녹사신, 가티플록사신, 레보플록사신, 레메플록사신, 목시플록사신, 노르플록사신, 오르플록사신, 트로바플록사신, (xvi) 술폰아미드, 예를 들어 마페나이드, 프론토실, 술폰아세트아미드, 술폰메티졸, 술폰닐아미드, 술폰살라진, 술폰속사졸, 트리메토프림, 트리메토프림-술폰메톡사졸 (TMP-SMX), (xvii) 테트라시클린, 예를 들어 데메클로시클린, 독시시클린, 미노시클린, 옥시테트라시클린, 테트라시클린 및 (xviii) 기타, 예컨대 아르스페나민, 클로람페니콜, 클린다마이신, 린코마이신, 에탐부톨, 포스포마이신, 푸시드산, 푸라졸리돈, 이소니아지드, 리네졸리드, 메트로니다졸, 무피로신, 니트로푸란토인, 플라텐시마이신, 피라진아미드, 퀴누프리스트린/달포프리스트린, 리팜핀/리팜피신 또는 티니다졸이 포함된다.

[0213] 용어 "항바이러스제"는 바이러스의 성장, 이환 및/또는 생존을 억제하거나 막는 임의의 분자를 포함한다. 그러한 것으로는 항레트로바이러스 약물, 예컨대 (1) 역전사효소 억제제, 예를 들어: (a) 뉴클레오시드 유사체 역전사효소 억제제 (NRTI) (예를 들어, 아시클로비르/아시클로비르 (조비락스[®], 조비르[®]), 시도포비르, 아지도티미딘/지도부딘 (AZT, 레트로비어[®]), 디다노신 (ddI, 비텍스[®]; 잘시타빈 (ddC, HIVID[®]); 스타부딘 (d4T, 제리트[®]); 라미부딘 (3TC, 에피비르[®]); 아바카비르 (지아젠[®]); 엠트리시타빈 (엠트리바[®]); 브리부딘 (헬핀[®]); 엔테카비르 (바라클루드[®]); 이독수리딘; 비라미딘 (발린트 파마슈티칼스(Valeant Pharmaceuticals)의 타리바비린), 시티딘 뉴클레오시드 유사체 폴리머라제 억제제 PCI-6130, 및 파마셋(Pharmasset)/로슈(Roche)의 전구약물 변이체 (예를 들어, R7128); 머크(Merck)/이시스 파마슈티칼스(Isis Pharmaceuticals)의 뉴클레오시드 유사체 억제

제 - MK-0608, (b) 뉴클레오타이드 유사체 역전사효소 억제제 (NtRTI) (예를 들어, 테노포비르 (바이리드[®]); 아테노비르 (프레메온[®], 헵세라[®]); 포미비르센 (비트라벤[®]); (c) 비-뉴클레오타이드 역전사효소 억제제 (NNRTI), 에파비렌즈 (수스티바[®], 스토크린[®]); 네비라핀 (비라문[®]), 텔라비르딘 (리스크립터[®]), 에트라바이린 (인텔렌스[®]), 로비리드; 비로캄 파마(ViroChem Pharma)의 HCV RNA-의존성 RNA 폴리머라제의 비-뉴클레오타이드 억제제 - VCH-759, 화이자(Pfizer)의 HCV 폴리머라제 억제제의 비-뉴클레오타이드 억제제 - PF-868554; 및 (d) 폴리머라제 억제제, 예를 들어: 베링거 잉겔하임(Boehringer Ingelheim)의 C형 간염 바이러스의 RNA-의존성 RNA 폴리머라제 - BILB-1941, 로슈의 RNA 폴리머라제 억제제 - R1626; ACH-0137171 아킬리온 파마슈티칼스(Achillion Pharmaceuticals)의 레플리카제 억제제, R7128 - 로슈/파마셋의 폴리머라제 억제제, ABT-333, 및 ABT-072 - 애보트(Abbott)의 폴리머라제 억제제, BI 207127 - 베링거 잉겔하임의 폴리머라제 억제제, PSI-7851 - 파마셋의 폴리머라제 억제제, ANA598 - 아나디스 파마슈티칼스(Anadys Pharmaceuticals)의 폴리머라제 억제제, MK-3281 - 머크의 폴리머라제 억제제, IDX184 - 이데닉스(Idenix)의 폴리머라제 억제제, GSK 625433 - 글락소 스미스 클라인(Glaxo Smith Kline)의 폴리머라제 억제제, INX-189 - 인히비텍스(Inhibitex)의 폴리머라제 억제제, NM283 - 이데닉스의 폴리머라제 억제제, HCV796 - 와이어쓰(Wyeth)의 폴리머라제 억제제, GL60667 및 GS9190 - 길리아드(Gilead)의 폴리머라제 억제제, PF-00868554 0 화자의 폴리머라제 억제제, VCH759, VCH916, VX222 및 VX759 - 비로캄(Virochem)의 폴리머라제 억제제, IDX184 및 IDX375 - 이데닉스의 폴리머라제 억제제, BMS650032 - 브리스톨 마이어스 스쿼브(Bristol Myers Squibb)의 폴리머라제 억제제; (2) 프로테아제 억제제, 예를 들어: 사퀴나비르 (포로바세[®]/인비라세[®]), 리토나비르 (노르비르[®]), 인디나비르 (크릭시반[®]), 넬피나비르 (비라셉트[®]), 암프레나비르 (아제너라제[®]), 로피나비르 (칼레트라[®]), 아타자나비르 (레야타즈[®]), 포삼프레나비르 (렉시바[®]), 티프라나비르 (아프티부스[®]), 다루나비르 (프레지스타[®]), 텔라프라비르 (VX-950); 베르텍스 파마슈티칼스(Vertex Pharmaceuticals)의 제2 세대 HCV 프로테아제 억제제 - VX-500 및 VX-813; 인터뮴(Intermune)/로슈의 NS3/4A 프로테아제 억제제 - ITMN-191/R-7227, 보세프레비르, 셰링 플라우(Schering-Plough)의 프로테아제 억제제 - SCH 503034, 메디비르(Medivir)/티보텍(Tibotec)의 HCV NS3/4A 프로테아제 억제제 - TMC435/TMC435350, ACH-1625 아킬리온 파마슈티칼스의 프로테아제 억제제, ACH-806 - 아킬리온/길리아드의 프로테아제 억제제, BI201335 및 BILN 2061 - 베링거 잉겔하임의 프로테아제 억제제, SCH 900518/SP900518 (나를라프레비르) - 셰링 플라우의 프로테아제 억제제, MK-7009 - 머크의 프로테아제 억제제, BMS-650032, BMS-790052 및 BMS-791325 - 브리스톨 마이어스 스쿼브의 프로테아제 억제제, R7227 - 로슈의 프로테아제 억제제, PHX1766 - 페노믹스(Phenomix)의 프로테아제 억제제, AVL-181 - 아빌라 테라퓨틱스(Avila Therapeutics)의 프로테아제 억제제, 담녹소, CTS-1027 로슈 바이오사이언시즈의 프로테아제 억제제, VX985 - 베르텍스의 프로테아제 억제제, VCH-759 및 VCH-917 - 비로캄/베르텍스의 프로테아제 억제제, IDX-136 및 316 - 이데닉스의 프로테아제 억제제, ABT-450 - 애보트의 프로테아제 억제제, VBY 376 - 비로베이(Virobay)의 프로테아제 억제제; (3) 인테그라제 억제제, 예를 들어: 칼테그라비르 (이센트레스[®]), 엘비테그라비르; (4) 뉴클레오타이드 유사체/뉴클레오타이드 유사체 억제제의 혼합 요법, 아트리플라 (테노포비르 + 엠브리시타빈 + 에파비렌즈), 콤비버 (라미부데인 + 지도부딘), (5) 진입 또는 융합 억제제, 예를 들어: 마라비록, 엔푸비르티드, 도코사놀, 항-CD4 항체, 항-gp120 항체, 항-CCR5 항체, HCV NS5a 길항제: (a) 애로우 테라퓨틱스(Arrow Therapeutics)의 A-831, A-689 및 AZD 2836, (b) 브리스톨 마이어스 스쿼브의 BMS-790052 및 BMS-824393, (c) 글락소 스미스 클라인의 GSK-625433, (d) NS4a 길항제 ACH-1095; (5) 성숙 억제제, 예를 들어: 베비리마트 및 비베콘; (6) 바이러스 방출 억제제, 예를 들어: 자나미비르 (릴렌자[®]), 오셀타미비르 (타미플루[®]), 알비돌; (7) 면역 반응 향상제, 예를 들어 인터페론- α (예를 들어, 바이오렉스 테라퓨틱스(Biolex Therapeutics)의 BLX-883 및 BLX 883 CR, 노틸러스 바이오테크(Nautilus Biotech)의 벨레로폰, LG 라이프 사이언시즈(LG Life Sciences)의 지속 작용 IFN- α , IFN- α SR, 플라멜 테크놀로지스(Flamel Technologies)의 지속 작용 IFN- α 2b CR 및 IFN- α 2b XL, PEG화 IFN- α (예를 들어, PEG-IFN- α -2a, 페가시스[®]; PEG-IFN- α -2b, 페그인트론[®]), IFN- α 2b-인간 혈청 알부민 융합 단백질 (알부페론[®]); 인터페론- β , 예를 들어 IFN- β -1b (베타세론[®]), 인터페론- γ , 인터페론- λ , PEG화 인터페론- λ (예를 들어, 지모게네틱스/노보 노르디스크(ZymoGenetics/Novo Nordisk)의 PEG-rIL-29), 인터페론- ω /백혈구 II 인터페론 (예를 들어, 인타르시아 테라퓨틱스(Intarcia Therapeutics)), 아나디스 파마슈티칼스의 톨 유사 수용체 7 효능제, 예를 들어 이미퀴모드, 이사토리빈 및 그의 전구약물 변이체 (예를 들어, ANA-975 및 ANA-971), 임플리시트 바이오사이언스(Implicit Bioscience)의 오글루파니드 (IM862, L-Glu-L-Trp-

OH) 및 그의 지질- 또는 -글리코실접합 변이체, NOV-205 (예를 들어, 몰릭산[®] - 노벨로스 테라퓨틱스, 인크.(Novelos Therapeutics, Inc.)의 펩티드성 항바이러스), 엔조 바이오켄(Enzo Biochem)의 항바이러스 EHC18, 감마-D-글루탐일-L-트립토판 (예를 들어, SCV-07, 사이클론 파마슈티칼스/베르타(SciClone Pharmaceuticals/Verta)), 알로페론 (예를 들어, 알로페론-1-HGVSGHGQHGHHG, 알로페론-2-GVSGHGQHGHHG), CPG 10101 - 콜리 파마슈티칼스/액틸론(Coley Pharmaceuticals/Actilon)의 TLR-9 효능제; (8) 항바이러스성 상승작용 향상제, 즉 단독으로는 항바이러스 특성이 거의 또는 전혀 없지만, 다른 항바이러스제의 효과를 향상시키는 것 - 예를 들어, 클로로퀸, 자몽 주스, 히드록시우레아, 레플루노미드, 미코페놀산, 레스베라트롤, 리토나비; 뿐만 아니라 그 밖의 항바이러스성 약물, 예컨대 아만타딘, 에독스딘, 팜시클로비르 (팜비르[®]), 펜시클로비르, 파스카르넷, 포스포넛, 간시클로비르 (시토벤[®], 시메벤[®], 비트라세르트[®]), 갈다실, 이바시타빈, 이뮤노비르, 몰옥시딘, 넥사비르, 페라미비르, 플레코나틸, 포도필로톡신, 리바비린, 리만타딘, 트리플루리딘, 트리지비르, 트로만타딘, 트루바다, 발라시클로비르, 발간시클로비르, 비다라빈, 및 인터페론 향상제, 예컨대 트랜지션 테라퓨틱스(Transition Therapeutics)의 EMZ702, 히스타민 디히드로클로라이드 (예를 들어, 세플렌[®] + IFN-α); 및 (9) 그 밖의 또는 분류되지 않은 항바이러스제, 예컨대: 케민 파마슈티칼스(Kemin Pharmaceuticals)의 KPE-02003002 (알테니몰), 미토퀴논 - 안티포딘 파마슈티칼스(Antipodean Pharmaceuticals)의 조효소 Q10 항-산화제 효능제, 알파-글루코시다제 I 억제제 (예를 들어, MX-3253 - 미제닉스 파마슈티칼스(Migenix Pharmaceuticals)의 셀고시비르, 카스타노스퍼민, 글루코코르티코이드 길항제 (예를 들어, HCV IRES 억제제, 미페프리스톤, VGX 파마슈티칼스의 VGX-410C), 간 효능제 (예를 들어, 피노바 파마슈티칼스(Phynova Pharmaceuticals)의 PYN17), 종래 약초제로부터 유래된 항바이러스제, 예를 들어 피노바 파마슈티칼스의 PYN18, 카스파제 억제제 (예를 들어, LB-84451 - LG 라이프 사이언스, 엠리카산 - 화이자의 PF-03491390/IDN-6556), 시클로필린 A에의 결합을 막아 바이러스 복제를 억제하는 시클로스포린 유사체 (예를 들어, 노바르티스(Novartis)의 SDZ NIM 911, 데바이오팜(Debiopharm)의 Debio-025)가 포함된다.

[0214] 용어 "항진균제"는 진균의 성장, 이환 및/또는 생존을 억제하거나 막는 임의의 분자를 포함한다. 그러한 것으로는 예를 들어 (1) 폴리엔 항진균제, 예컨대 나타마이신, 리모시딘, 필리핀, 니스타틴, 암포테리신 B, 칸디신; (2) 이미다졸, 예컨대 미코나졸, 케토코나졸 (로트리민[®]), 에코나졸, 비포나졸, 부타코나졸, 펜티코나졸, 이소코나졸, 옥시코나졸, 세르타코나졸 (에르탁조[®]), 실코나졸, 티오코나졸, (3) 트리아졸, 예컨대 플루코나졸, 이트라코나졸, 이사부코나졸, 라부코나졸 포사코나졸, 보리코나졸, 테르코나졸; (4) 알릴아민, 예컨대 테르비나핀 (라미실[®]), 아모로핀, 나프티핀 (나프틴[®]), 부테나핀 (로트리민 울트라[®]); (5) 에키노칸딘스, 예컨대 아니둘라핀진, 카스포핀진, 미카핀진, 및 기타 항진균 특성을 갖는 물질, 예컨대 벤조산, 시클로프스, 플루시토신, 그리세오폴린, 젠티안 바이올렛, 할로프로진, 톨나프테이트 (티낙틴[®], 데세넥스[®], 아프타데[®]), 운데실렌산, 티트리오일 -- ISO 4730 (멜라류카(Melaleuca)의 오일, 테르펜렌-4-올 유형) 시트로넬라 오일, 레몬 그라스, 오렌지 오일, 팔마로사 오일, 파출리, 레몬 머틀, 니임 종자 오일, 코코넛 오일이 포함된다.

[0215] 용어 "항-원생동물 작용제" 또는 "항-원생동물성 작용제"는 원생동물 유기체의 성장, 이환 및/또는 생존을 억제하거나 막는 임의의 분자를 포함한다. 항-원생동물 작용제의 예에는, (1) 항-말라리아 작용제, 예를 들어, 퀴닌, 퀴니엑스, 퀴니딘, 퀴니엑스, 클로로퀸 (아랄렌[®]), 히드록시클로로퀸 (플라켈[®]), 아모디아킨, 피리메타민 (다라프림[®]), 술파독신, 프로구아닐, 메플로퀸 (라리암[®]), 할로판트린, 프리마퀸, 아르테미시닌 및 그의 유도체 (예를 들어, 아르테메테르, 아르텐수네이트, 디히드로아르테미시닌, 아르테에테르), 클린다마이신 및 그의 조합물; (2) 프로테아제 억제제, 및 약물, 벤즈니다졸, 부파르바쿰, 카바르손, 클리오퀴놀, 디술포람, 에플로르니틴, 에메틴, 푸라졸리돈, 메글루민 안티모니에이트, 멜라르소프롤, 메트로니다졸 (플라질[®]), 밀테포신, 니푸르티목스, 니타족사나이드, 오르니다졸, 파로모마이신 술페이트, 펜타미딘, 피리메타민 (다라프림[®]), 세크니다졸, 티니다졸이 포함된다.

[0216] 본원에서 사용되는 용어 "백신"은 숙주에 접종하였을 때 특정 병원체에 대해 보호적 면역을 유도하는 임의의 비병원성 면역원을 포함한다. 백신은 많은 형태를 취할 수 있다. 백신은 병원체와 중요한 항원을 공유하지만, 병원체 그 자체는 아닌 전체 유기체일 수 있다 (예를 들어, 우두). 또한 백신은 사멸된 것 (예를 들어, 소크 소아마비 백신) 또는 약독화된 것 (질화 생성능을 잃은 것 - 예를 들어, 사빈 소아마비 백신)으로부터 제조될 수 있다. 백신은 또한 병원성 유기체로부터 단리된 정제된 거대분자로부터 제조될 수 있다. 예를 들어, 불활

성 형태의 가용성 박테리아 독소를 함유하는 독소이드 백신 (예를 들어, 파상풍 및 디프테리아) - 항-독소 항체를 생성하지만, 무손상 박테리아에 대해서는 면역을 생성하지 않는다. 서브유닛 백신 (예를 들어, B형 간염)은 관심 병원체로부터 단리된 단일의 면역원성 단백질 만을 함유한다. 합텐 접합체 백신은 관심 병원체로부터 단리된 특정 탄수화물 또는 폴리펩티드 에피토프를 면역원성 운반체, 예컨대 파상풍 독소이드에 부착시킨 것이다. 이러한 전략은 본질적으로 항체 생산을 유도하기 위한 합텐으로서 에피토프를 사용하며, 이어서 항체는 천연 병원체에서 동일한 에피토프를 인식한다. 그러나, 최대한 효과적이기 위해서는, 그러한 백신에는 B 및 T 세포 에피토프가 둘 모두 혼입되어야 하고, T 세포 에피토프는 그것이 숙주 개체의 면역계에 의해 인식되고, 제시되고, 반응될 수 있는 것이 보장되도록 선택해야 한다.

[0217] DNA 백신은 숙주 세포가 근육내로 주사되는 병원성 단백질을 코딩하는 DNA를 받아들여 발현하는 능력을 이용한다.

[0218] 본원에서 기재하는 방법을 위해 항-PD-L1 항체와 조합하여 사용할 수 있는 항바이러스 백신의 예에는 페비온 바이오테크.(Pevion Biotech.)의 HCV 백신 (비라섬), NS3, NS4 및 NS5B에 대한 세포성 (세포독성 T 림프구 CD4+ 및 CD8+) 면역 반응을 향상시키도록 설계된 TG4040 (트랜스진 비리온(Transgene viron)의 MVA-HCV), 크론백® - 이노비오 바이오메디칼(Inovio Biomedical)의 코돈 최적화된 NS3/4a DNA 백신, 노파르티스의 HCV/CpG 백신, GI-5005 - 글로베이툼(Globeimmune)의 HCV 백신, IC41 인터셀(Intercell)의 폴리-L-아르기닌과 함께 HCV CD4 및 CD8 T 에피토프를 갖는 합성 펩티드의 혼합물이 포함된다.

[0219] 면역원에 대한 숙주 반응은 아주반트와의 혼합물로 투여할 경우 향상될 수 있다. 면역 아주반트는 하나 이상의 다음과 같은 방식으로 기능한다: (1) 면역원의 잔류를 연장시키거나, (2) 효과적인 면역원 크기를 증가시키거나 (그래서 식세포작용 및 대식세포에의 제시를 촉진하거나), (3) 주사 부위로 대식세포 또는 다른 면역 세포의 유입을 자극하거나, 또는 (4) 국소 시토카인 생산 및 다른 면역학적 활성을 촉진시키는 방식. 아주반트의 예에는 완전 프로인트 아주반트 (CFA), 알루미늄 염, 및 마이코박테리아 유래 단백질, 예컨대 뮤라밀 디- 또는 트리-펩티드가 포함된다.

[0220] 용어 "항체"는 모노클로날 항체 (예를 들어, 이뮤노글로불린 Fc 영역을 갖는 전장 항체), 다중에피토프 특이성을 갖는 항체 조성물, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 디아바디 및 단일쇄 분자 뿐만 아니라 항체 단편 (예를 들어, Fab, F(ab')₂ 및 Fv)를 포함한다. 용어 "이뮤노글로불린" (Ig)은 본원에서 "항체"와 상호교환적으로 사용된다.

[0221] 기본 4쇄 항체 단위는 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 이루어진 이중4량체 당단백질이다. IgM 항체는 J 사슬로 불리는 추가의 폴리펩티드와 함께 5개의 기본 이중4량체 단위로 이루어지고 10개의 항원 결합 부위를 함유하는 한편, IgA 항체는 중합화하여 J 사슬과의 조합으로 다가 어셈블리를 형성할 수 있는 2-5개의 기본 4쇄 단위를 포함한다. IgG의 경우, 4쇄 단위는 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각각의 L 쇠는 1개의 공유 디설피드 결합에 의해 H 쇠에 연결되지만, 2개의 H 쇠는 H 쇠 이소형에 따라 1개 이상의 디설피드 결합에 의해 서로 연결된다. 또한, 각 H 쇠 및 L 쇠에는 일정한 간격을 두고 이격된 쇠내 디설피드 브릿지가 존재한다. 각각의 H 쇠는 N-말단에 가변 도메인 (V_H)을 갖고, 그 뒤에 α 및 γ 쇠 각각의 경우에는 3개의 불변 도메인 (C_H), μ 및 ε 이소형의 경우에는 4개의 C_H 도메인을 갖는다. 각각의 L 사슬은 N-말단에서 가변 도메인 (V_L)을 갖고, 이어서, 그의 다른 말단에서 불변 도메인을 갖는다. V_L은 V_H와 정렬되고, C_L은 중쇄의 제1 불변 도메인 (C_{H1})과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기가 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성한다고 여겨진다. V_H 및 V_L의 쌍형성은 함께 단일 항원-결합 부위를 형성한다. 상이한 클래스의 항체의 구조 및 특성에 대해서는 예를 들어 문헌 [Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6]을 참조한다. 임의의 척추동물 종의 L 쇠는 이들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여 카파 및 람다라고 불리는 명백히 상이한 2가지 유형 중 하나에 배정될 수 있다. 이뮤노글로불린은 중쇄의 불변 도메인 (CH)의 아미노산 서열에 따라 상이한 클래스 또는 이소형으로 배정될 수 있다. 5가지 클래스의 이뮤노글로불린: 각각 α, δ, ε, γ 및 μ로 표기되는 중쇄를 갖는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재한다. γ 및 α 클래스는 CH 서열 및 기능에서 비교적 작은 차이에 기초하여 서브클래스로 추가로 분류되고, 예를 들어 인간은 다음 서브클래스: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2를 발현한다.

[0222] "단리된" 항체는 그의 생산 환경 (예를 들어, 천연 또는 재조합)의 성분으로부터 확인, 분리 및/또는 회수된 항

체이다. 바람직하게는, 단리된 폴리펩티드에는 그의 생산 환경의 다른 모든 성분과의 회합이 존재하지 않는다. 그의 생산 환경의 오염 성분, 예를 들어 제조합 형질감염된 세포로부터 생성되는 것은 대개 항체에 대한 연구, 진단 또는 치료 용도를 저해할 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 폴리펩티드는 (1) 예를 들어 로우리 방법으로 측정시에 항체의 95 중량%를 초과하는 정도로, 일부 실시양태에서는 99 중량%를 초과하는 정도로; (2) 스피닝 컵 서열 분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 이용한 환원 또는 비-환원 조건하에서의 SDS-PAGE에 의해 균일한 정도로 정제될 것이다. 단리된 항체는 제조합 세포 내의 계내 항체를 포함하는데, 이는 항체 천연 환경의 1종 이상의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0223] 항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 "VH" 및 "VL"로서 칭할 수 있다. 이들 도메인은 일반적으로 항체의 최대 가변 부분이고 (동일한 클래스의 다른 항체에 비해), 항원 결합 부위를 함유한다.

[0224] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 분절의 서열이 항체마다 크게 상이하다는 사실을 지칭한다. V 도메인은 항원 결합을 매개하고, 그의 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 규정한다. 그러나, 가변성은 가변 도메인의 전체 범위에 걸쳐 균등하게 분포되지 않는다. 대신에, 가변성은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에서 초가변 영역 (HVR)으로 불리는 3개의 세그먼트에 농축된다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)이라 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 주로 베타-시트 형태의 4개의 FR 영역을 포함하는데, 이것은 상기 베타-시트 구조를 연결하고 일부 경우에는 베타-시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성하는 3개의 HVR에 의해 연결된다. 각 사슬 내의 HVR은 FR 영역에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 사슬의 HVR과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)] 참조). 불변 도메인은 항원에 대한 항체의 결합에 직접 관여하지 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체 의존성 세포독성에서 항체의 참여를 나타낸다.

[0225] 본원에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득한 항체를 지칭하고, 즉, 이러한 집단을 구성하는 개개의 항체는 소량으로 존재할 수도 있는, 가능한 자연 발생 돌연변이 및/또는 번역후 변형 (예를 들어, 이성질체화, 아미드화)을 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 지시되며 고도로 특이적이다. 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 작용하는 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 작용한다. 이러한 특이성 이외에도, 모노클로날 항체는 하이브리도마 배양에 의해 합성되고, 다른 이뮤노글로불린에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다. 수식은 "모노클로날"은 항체의 특징을 실질적으로 균일한 항체들의 집단으로부터 수득된 것으로 나타내고, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 요구하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라서 사용될 모노클로날 항체는 다양한 기술, 예를 들어 하이브리도마 방법 (예를 들어, [Kohler and Milstein, Nature, 256:495-97 (1975)]; [Hongo et al., Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995)], [Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)]; [Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)]), 제조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조), 파지-디스플레이 기술 (예를 들어, 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]; [Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992)]; [Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004)]; [Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004)]; [Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004)]; 및 [Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)] 참조) 및 인간 이뮤노글로불린 유전자좌 또는 인간 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 유전자의 일부 또는 전부를 갖는 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체를 생성하는 기술 (예를 들어, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature 362: 255-258 (1993)]; [Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993)]; 미국 특허 제5,545,807호; 동 제5,545,806호; 동 제5,569,825호; 동 제5,625,126호; 동 제5,633,425호; 및 동 제5,661,016호; [Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992)]; [Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994)]; [Morrison, Nature 368: 812-813 (1994)]; [Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996)]; [Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996)]; 및 [Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)]로 제조될 수 있다.

- [0226] 용어 "네이키드 (naked) 항체"는 세포독성 모이어티 또는 방사성 표지에 접합되지 않은 항체를 지칭한다.
- [0227] 용어 "전장 항체", "무손상 항체" 또는 "전체 항체"는 항체 단편에 반대되는, 그의 실질적으로 무손상 형태의 항체를 지칭하는 것으로 상호 교환가능하게 사용된다. 구체적으로, 전체 항체는 Fc 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 갖는 것을 포함한다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 일부 경우에, 무손상 항체는 하나 이상의 이펙터 기능을 가질 수 있다.
- [0228] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부, 바람직하게는 무손상 항체의 항원 결합 및/또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체 (미국 특허 제5,641,870호의 실시예 2; 문헌 [Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]] 참조); 단일쇄 항체 분자 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 항체를 파파인 소화시키면 "Fab" 단편이라 불리는 2개의 동일한 항원 결합 단편, 및 나머지 "Fc" 단편 (이 명칭은 쉽게 결정되는 능력을 반영함)을 생성시킨다. Fab 단편은 H 쇠의 가변 영역 도메인 (V_H) 및 1개 중쇄의 제1 불변 도메인 (C_H1) 및 L 쇠 전체로 이루어진다. 각 Fab 단편은 항원 결합에 대해 1가이고, 즉, 단일 항원-결합 부위를 갖는다. 항체를 펩신 처리하면 상이한 항원 결합 활성을 갖는 2개의 디설피드 연결된 Fab 단편에 대략 상응하는 단일의 큰 F(ab')₂ 단편을 생성시키고, 여전히 항원에 가교결합할 수 있다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 C_H1 도메인의 카르복시 말단에서 몇 개의 잔기가 추가된 점에서 Fab 단편과 상이하다. 본원에서, Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 보유하는 Fab'에 대한 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 원래 Fab' 단편들 사이에 힌지 시스테인을 갖는, Fab' 단편들의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 공지되어 있다.
- [0229] Fc 단편은 디설피드에 의해 함께 결합되어 있는 H 쇠 2개 모두의 카르복시-말단 부분을 포함한다. 항체의 이펙터 기능은 Fc 영역 내의 서열에 의해 결정되고, 이 영역은 또한 특정 유형의 세포 상에서 발견되는 Fc 수용체 (FcR)에 의해 인식된다.
- [0230] "Fv"는 완전한 항원-인식 부위 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 단편은 1개의 중쇄 가변 영역 도메인 및 1개의 경쇄 가변 영역 도메인이 단단하게 비-공유적으로 회합된 이량체로 이루어진다. 이들 2개 도메인이 폴딩되어 6개의 추가변 루프 (H 쇠 및 L 쇠로부터 각각 3개의 루프)가 형성되는데, 상기 루프는 항원 결합을 위한 아미노산 잔기를 제공하고 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 HVR만을 포함하는 Fv의 절반)일지라도 전체 결합 부위보다 친화성이 낮긴 하지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.
- [0231] "sFv" 또는 "scFv"로도 약칭되는 "단일쇄 Fv"는 단일 폴리펩티드 쇠로 연결되어 있는 V_H 및 V_L 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 바람직하게는, sFv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합을 위한 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 하는, V_H 및 V_L 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. sFv에 관해서는 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.
- [0232] 본 발명의 항체의 "기능적 단편"은 무손상 항체의 일부, 예를 들어 일반적으로 무손상 항체의 항원 결합 또는 가변 영역, 또는 변형된 FcR 결합 능력을 보유하거나 갖는 항체의 Fc 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 선형 항체, 단일쇄 항체 분자 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.
- [0233] 용어 "디아바디"는 V 도메인의 사슬간이 아닌 사슬내 쌍형성이 달성되어 2가 단편, 즉, 2개의 항원 결합 부위를 갖는 단편을 생성하도록, V_H 및 V_L 도메인 사이에 짧은 링커 (약 5-10개 잔기)를 사용하여 sFv 단편 (상기 단락 참조)을 구성함으로써 제조된 작은 항체 단편을 지칭한다. 이중특이적 디아바디는 2개 항체의 V_H 도메인 및 V_L 도메인이 상이한 폴리펩티드 쇠에 존재하는 2개의 "가교" sFv 단편으로 이루어진 이중이량체이다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]에 보다 상세하게 기재되어 있다.
- [0234] 구체적으로, 본원에서의 모노클로날 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 하위클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고, 쇠(들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 클래스 또는 하위클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나

나 상동성인 "키메라" 항체 (이뮤노글로불린), 및 또한 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한은 이러한 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 제4,816,567호; 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)]). 본원에서의 관심 키메라 항체는 프리마티즈® 항체를 포함하고, 여기서 항체의 항원 결합 영역은 예를 들어 마카쿠 원숭이를 관심 항원으로 면역화하는 것에 의해 생산된 항체로부터 유래한다. 본원에서 사용되는, "인간화 항체"는 "키메라 항체"의 하위세트로 사용된다.

[0235] 비-인간 (예를 들어, 무린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린에서 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 한 실시양태에서, 인간화 항체는 수용자의 HVR (이하 정의됨)로부터의 잔기가 비인간종 (공여자 항체), 예를 들어 목적하는 특이성, 친화성 및/또는 능력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 HVR로부터의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 예에서, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 ("FR") 잔기를 상응하는 비-인간 잔기로 대체한다. 추가로, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서는 발견되지 않는 잔기를 포함할 수도 있다. 상기 변형은 항체 성능, 예를 들어 결합 친화성을 보다 개량하기 위해 이루어질 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 하나의, 일반적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비인간 이뮤노글로불린 서열의 그것에 대응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이지만, FR 영역은 항체 성능, 예를 들어 결합 친화성, 이성질체화, 면역원성 등을 개선시키는 하나 이상의 개별적인 FR 잔기 치환을 포함할 수 있다. FR 중 이들 아미노산 치환의 수는 전형적으로 H 쇄에서 6 이하, L 쇄에서는 3 이하이다. 또한, 인간화 항체는 임의로 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc) 중 적어도 일부, 전형적으로는 인간 이뮤노글로불린 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 추가의 세부사항에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다. 또한, 예를 들어 문헌 [Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)]; [Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)]; [Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)]; 및 미국 특허 제6,982,321호 및 동 제7,087,409호도 참조한다.

[0236] "인간 항체"는 인간에 의해 생산되고/되거나 본원에 개시되는 임의의 인간 항체 제조 기술을 사용하여 제조된 항체에 대응하는 아미노산 서열을 갖는 항체이다. 인간 항체의 이러한 정의는 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 명확하게 제외한다. 인간 항체는 파지-디스플레이 라이브러리를 포함한 당해 분야에 공지된 각종 기술을 사용하여 생성할 수 있다. 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)]; [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]. 또한, 문헌 [Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)]; [Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]에 기재된 방법도 인간 모노클로날 항체의 제조에 이용가능하다. 또한, 문헌 [van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001)]을 참조한다. 인간 항체는 항원 시험접종에 반응하여 이러한 항체를 생성하도록 변형되었으나 내인성 유전자좌는 무력화시킨 트랜스제닉 동물, 예를 들어 면역화된 제노마우스 (xenomice)에게 항원을 투여하여 제조될 수 있다 (예를 들어, 제노마우스(XENOMOUSE)™ 기술에 관한 미국 특허 제6,075,181호 및 동 제6,150,584호 참조). 또한, 예를 들어 인간 B 세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체에 관한 문헌 [Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)]도 참조한다.

[0237] 용어 "초가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는 본원에서 사용될 때 서열에서 초가변이고/이거나 구조상 규정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR - VH 내에 3개 (H1, H2, H3) 및 VL 내에 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. 천연 항체에서, H3 및 L3은 6개의 HVR 중에서 가장 높은 다양성을 나타내고, 특히 H3은 항체에 정밀한 특이성을 부여하는데 특유의 역할을 수행한다고 여겨진다. 예를 들어, 문헌 [Xu et al., Immunity 13:37-45 (2000)]; [Johnson and Wu, in Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)]을 참조한다. 실제로, 중쇄만으로 이루어진 자연 발생 카멜리드 (camelid) 항체는 경쇄의 부재하에 기능적이고 안정적이다. 예를 들어, 문헌 [Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993)]; [Sheriff et al., Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996)]을 참조한다.

[0238] 많은 HVR 설명이 사용되고 있고 본원에 포함된다. 카바트 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 가변성에 기초한 것이며, 가장 흔히 사용되고 있다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]). 대신, 코티아 (Chothia)는 구조적 루프의 위치를 지칭한다 (문헌 [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). AbM HVR은 카바트 HVR과 코티아 구조적 루프 사이의 절충안을 나타내고, 옥스포드 몰레큘라(Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다. "접촉" HVR은 이용가능한 복합 결정 구조의 분석을 기초로

한다. 이들 HVR 각각으로부터의 잔기가 다음에 제시된다.

루프	카바트	AbM	코티아	접촉
----	-----	----	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	(카바트 넘버링)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(코티아 넘버링)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0239]

[0240]

HVR은 다음과 같이 "연장된 HVR"을 포함할 수 있다: VL에서 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 또는 89-96 (L3), 및 VH에서 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기는 각각의 상기 정의에 대해 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.

[0241]

표현 "카바트에서와 같은 가변 도메인 잔기 넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산 위치 넘버링" 및 이것의 변형 형태는 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서 항체 편집(compilation)의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 사용된 넘버링 시스템을 지칭한다. 이러한 넘버링 시스템을 이용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축 또는 이것으로의 삽입에 상응하는 보다 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 후에 단일 아미노산 삽입 (카바트에 따른 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 후에 삽입된 잔기 (예를 들어, 카바트에 따른 잔기 82a, 82b 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 항체 서열의 상동성 영역에서 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 정렬함으로써 주어진 항체에 대하여 결정할 수 있다.

[0242]

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

[0243]

"인간 컨센서스 프레임워크" 또는 "수용자 인간 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택시에 가장 흔하게 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 행한다. 일반적으로, 서열의 하위군은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에서와 같은 하위군이다. 예에는, VL의 경우 하위군이 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같이 하위군 카파 I, 카파 II, 카파 III 또는 카파 IV일 수 있는 것이 포함된다. 추가로, VH의 경우 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같이 하위군 I, 하위군 II, 또는 하위군 III일 수 있다. 별법적으로, 인간 컨센서스 프레임워크는 공여자 프레임워크 서열을 다양한 인간 프레임워크 서열의 집합과 정렬하여 인간 프레임워크 잔기를 공여자 프레임워크에 대한 상동성에 기초하여 선택하는 경우에서와 같이 상기 특정 잔기로부터 유래될 수 있다. 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크"로부터 유래된" 수용자 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 이미 존재하는 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이미 존재하는 아미노산 변화의 수는 10 이하, 9 이하, 8 이하, 7 이하, 6 이하, 5 이하, 4 이하, 3 이하, 또는 2 이하이다.

[0244]

"VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]의 가변 중쇄 하위군 III 내의 아미노산 서열로부터 취득된 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 각각의 하기 서열의 적어도 일부 또는 전부를 포함한다:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (HC-FR1) (서열4), WVRQAPGKGLEWV (HC-FR2), (서열5),
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (HC-FR3, 서열6), WGQGLTVTVSA (HC-FR4), (서열7).

[0245]

"VL 카파 I 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]의 가변 경쇄 카파 하위군 I 내의 아미노산 서열로부터 취득된 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 각각의 다음 서열의 적어도 일부 또는 전부를 포함한다: DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC (LC-FR1)(서열11),

WYQQKPGKAPKLLIY (LC-FR2) (서열12), GVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYC (LC-FR3)(서열13),
FGQGTKVEIKR (LC-FR4)(서열14).

- [0246] 예를 들어 Fc 영역의 특정 위치에서 "아미노산 변형"은 특정 잔기의 치환 또는 결실 또는 특정 잔기에 인접한 적어도 하나의 아미노산 잔기의 삽입을 지칭한다. 특정 잔기에 "인접한" 삽입은 그의 1 또는 2개의 잔기 내의 삽입을 의미한다. 삽입은 특정 잔기에 대해 N-말단 또는 C-말단일 수 있다. 본원에서 바람직한 아미노산 변형은 치환이다.
- [0247] "친화성 성숙" 항체는 변경(들)을 갖지 않는 모 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화성을 개선시키는, 그의 하나 이상의 HVR에 하나 이상의 변경을 갖는 항체이다. 한 실시양태에서, 친화성 성숙 항체는 표적 항원에 대한 나노물 또는 심지어 피코물의 친화성을 갖는다. 친화성 성숙 항체는 당업계에 공지된 절차에 의해 생성된다. 예를 들어, 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)]에서는 VH 및 VL 도메인 셔플링(shuffling)에 의한 친화성 성숙을 기재하고 있다. HVR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이유발에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Barbas et al., Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994)]; [Schier et al., Gene 169:147-155 (1995)]; [Yelton et al., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)]; [Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)]; 및 [Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)]에 기재되어 있다.
- [0248] 본원에서 사용되는 용어 "~에 특이적으로 결합한다" 또는 "~에 특이적인"은 생물 분자를 포함하는 이중 분자 집단의 존재하에서 표적의 존재를 결정할 수 있는 것으로, 측정가능하고 재생가능한 상호작용, 예컨대 표적 및 항체 사이의 결합을 지칭한다. 예를 들어, 표적 (에피토프일 수 있음)에 특이적으로 결합하는 항체는 다른 표적에 결합하는 것에 비해 이 표적에 더 높은 친화성, 결합성, 더 큰 용이성, 및/또는 더 긴 기간 동안 결합하는 항체이다. 한 실시양태에서, 비관련 표적에 항체가 결합하는 정도는, 예를 들어 방사선면역검정 (RIA)으로 측정시, 표적에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시양태에서, 표적에 특이적으로 결합하는 항체의 해리 상수 (Kd)는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, 또는 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 이다. 특정 실시양태에서, 항체는 상이한 종으로부터의 단백질 사이에 보존된 단백질 상의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 특이적 결합에는 배타적인 결합이 포함될 수 있지만, 배타적인 결합이 요구되는 것은 아니다.
- [0249] "차단" 항체 또는 "길항제" 항체는 그가 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 항체이다. 일부 실시양태에서, 차단 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다. 본 발명의 항-PD-L1 항체는 T 세포에 의한 기능적 반응이 항원 자극에 대해 기능이상 상태에서부터 회복되도록 PD-1을 통한 신호전달을 차단한다.
- [0250] "효능제" 또는 활성화 항체는 그것이 결합하는 항원에 의한 신호전달을 향상시키거나 개시하는 것이다. 일부 실시양태에서, 효능제 항체는 천연 리간드 없이 신호전달을 유발하거나 활성화한다.
- [0251] 용어 "고체상"은 본 발명의 항체가 부착될 수 있는 비수성 매트릭스를 의미한다. 본원에 포함되는 고체상의 예는 부분적으로 또는 전적으로 유리 (예를 들어, 공극이 제어된 유리), 폴리사카라이드 (예를 들어, 아가로스), 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌, 폴리비닐 알콜 및 실리콘으로 형성된 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 문맥에 따라 고체상은 검정 플레이트의 웰을 포함할 수 있으며; 다른 실시양태에서 고체상은 정제 칼럼 (예를 들어, 친화성 크로마토그래피 칼럼)이다. 상기 용어는 또한 미국 특허 제4,275,149호에 기재된 것과 같은 별개 입자의 불연속 고체상도 포함한다.
- [0252] "항체 이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에서 기인한 생물학적 활성을 지칭하며, 항체 이소형에 따라 다양하다. 항체 이펙터 기능의 예에는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체 - 의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체)의 하향조절; 및 B 세포 활성화가 포함된다. "감소되거나 최소화된" 항체 이펙터 기능이란 야생형 또는 비변형 항체로부터 적어도 50% (별법적으로 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 만큼 감소된 것을 의미한다. 항체 이펙터 기능의 판단은 당업자가 용이하게 판단 및 측정가능하다. 바람직한 실시양태에서, 보체 결합, 보체 의존성 세포독성 및 항체 의존성 세포독성의 항체 이펙터 기능이 영향을 받는다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 이펙터 기능은 글리코실화를 제거하는 불변 영역에서의 돌연변이, 예를 들어 "비-이펙터 돌연변이"를 통해 제거된다. 한 측면에서, 비-이펙터 돌연변이는 CH2 영역에서의 N297A 또는 DANA 돌연변이 (D265A + N297A)이다. 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 276 (9): 6591-6604 (2001)]. 별법적으로, 감소되거나 제거된 이펙터 기능을 야기하는 추가의 돌연변이에는 K322A 및 L234A/L235A (LALA)가 포함된다. 별법적으로, 이펙터 기능은 생산 기술, 예컨대 글리코실화되지 않거나 (예를 들어, 이. 콜라이) 또는 이펙터 기능을 촉진하는데 효과가 없거나 덜 효과적인 변경된 글리코실화 패턴을 야기하는 숙주 세포에서의 발현을 통해 감소시키거나 제거할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Shinkawa et al., J. Biol. Chem. 278(5): 3466-3473 (2003)]).

- [0253] "항체 의존성 세포 매개 세포독성" 또는 ADCC는 특정 세포독성의 세포 (예를 들어 자연 살해 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합된 분비된 Ig가, 상기 세포독성의 이펙터 세포가 항원 보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후, 표적 세포를 세포독소로 사멸시키도록 만드는 세포독성의 한 형태를 지칭한다. 항체는 세포독성 세포를 "무장"시키고, 상기 메카니즘으로 표적 세포를 치사시키는데 필요하다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈세포 상의 Fc 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991)]의 464 페이지 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 시험관내 ADCC 검정, 예를 들어 미국 특허 제5,500,362호 또는 동 제5,821,337호에 기재된 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 살해 (NK) 세포를 포함한다. 별법적으로, 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체 내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al., PNAS USA 95:652-656 (1998)]에 개시된 동물 모델에서 평가할 수 있다.
- [0254] 본원에서 달리 나타내지 않는 한, 이뮤노글로불린 중쇄 내 잔기의 넘버링은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 EU 색인의 넘버링이다. "카바트에서와 같은 EU 색인"은 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다.
- [0255] 본원에서의 용어 "Fc 영역"은 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역, 예를 들어 천연 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역을 정의하기 위하여 사용된다. 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 달라질 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 위치 Cys226 또는 Pro230의 아미노산 잔기로부터 이것의 카르복실 말단까지의 스트레치인 것으로 정의된다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은 예를 들어 항체의 생성 또는 정제 동안 또는 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산의 재조합 조작에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 무손상 항체의 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 항체 집단, K447 잔기가 제거되지 않는 항체 집단, 및 K447 잔기가 존재하거나 존재하지 않는 항체들의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다. 본 발명의 항체에 사용하기 적합한 천연 서열 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 및 IgG4를 포함한다.
- [0256] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 또한, 바람직한 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하는 것이고, Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII 하위클래스의 수용체의 대립유전자 변이체 및 선택적 스플라이싱된 형태를 비롯한 상기 수용체를 포함하며, Fc γ RII 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 포함하고, 이들은 그의 세포질 도메인에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기계의 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기계의 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다. (문헌 [M. Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)]; [Capel et al., Immunomethods 4: 25-34 (1994)]; 및 [de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995)]에서 고찰된다. 추후에 확인될 것을 포함하는 기타 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다.
- [0257] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 또한 모체 IgG의 태아로의 전달을 담당하는 신생아의 수용체인 FcRn을 포함한다. 문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]. FcRn에 대한 결합을 측정하는 방법은 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Ghetie and Ward, Immunol. Today 18:(12):592-8 (1997)]; [Ghetie et al., Nature Biotechnology 15(7):637-40 (1997)]; [Hinton et al., J. Biol. Chem. 279(8):6213-6 (2004)]; WO 2004/92219 (Hinton et al.) 참조). 생체 내에서 FcRn에 대한 결합 및 인간 FcRn 높은 친화성 결합 폴리펩티드의 혈청 반감기는 예를 들어 인간 FcRn을 발현하는 트랜스제닉 마우스 또는 형질감염된 인간 세포주에서, 또는 Fc 변이체 영역을 갖는 폴리펩티드가 투여된 영양류에서 검정될 수 있다. WO 2004/42072 (Presta)에는 FcR에 대한 결합이 개선 또는 감소된 항체 변이체가 기재되어 있다. 또한, 예를 들어 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)]을 참조한다.
- [0258] "이펙터 세포"는 1종 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 한 측면에서, 이펙터 세포는 적어도 Fc γ RIII를 발현하고 ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 자연 살해 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함한다. 이펙터 세포는 천연 공급원, 예를 들어 혈액으로부터 분리할 수 있다. 이펙터 세포는 일반적으로 이펙터 기와 관련된 림프구이고, 시토킨을 생산하거나 (헬퍼 T 세포), 병원체에 의해 감염된 세포를 사멸하거나 (세포독성 T 세포), 항체를 분비하는 (분화된 B 세포) 기능을 한다.
- [0259] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체 존재하에의 표적 세포의 용해를 지칭한다. 고전적 보체 경로의 활

성화는 동족 항원에 결합된 항체 (적절한 하위클래스의 항체)에 대한 보체 시스템 제1 성분 (C1q)의 결합으로 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위하여, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다. Fc 영역 아미노산 서열이 변경되고 C1q 결합능이 증가 또는 감소된 항체 변이체가 미국 특허 제6,194,551B1호 및 W099/51642에 기재되어 있다. 이러한 특허 공보의 내용은 본원에 참고로 명확하게 포함된다. 문헌 [Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]을 또한 참조한다.

[0260] IgG의 N-글리코실화 부위는 CH2 도메인에서 Asn297이다. 본 발명은 또한, 이펙터 기능이 감소되거나 없는 Fc 영역을 갖는 항원-결합, 인간화 항체 조성물을 제공한다. 이것을 달성할 수 있는 한 가지 방법은 A297N 치환으로, 이것은 종전에 항-CD20 항체에서 보체 결합 및 이펙터 기능을 없애는 것 ("비-이펙터 Fc 돌연변이체")으로 밝혀졌다. 문헌 [Idusogie et al., 상기 문헌]. 이러한 돌연변이 결과, CHO와 같은 포유동물 세포에서 이러한 Fc 돌연변이를 함유하는 본 발명의 항-PD-L1 항체의 생산은 어떤 글리코실화도 갖지 않을 것이고, 그 결과 이펙터 기능은 감소되거나 또는 최소화될 것이다. 별법적으로, 항체 이펙터 기능은 CH2 치환 없이, 이. 콜라이와 같은 비 포유동물 세포에서 발현시키는 것에 의해 제거될 수 있다.

[0261] "결합 친화성"은 일반적으로 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총 합의 강도를 지칭한다. 달리 지시되지 않는 한, 본원에서 사용된 "결합 친화성"은 결합 쌍의 구성원들 (예를 들어, 항체 및 항원) 간의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화성을 지칭한다. 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화성은 일반적으로 해리 상수 (K_d)로 표시될 수 있다. 친화성은 본원에 기재된 방법을 포함하는 당업계 공지의 통상의 방법으로 측정할 수 있다. 낮은 친화성 항체는 일반적으로 항원과 서서히 결합하고 쉽게 해리되는 경향이 있는 반면, 높은 친화성 항체는 일반적으로 항원과 보다 신속하게 결합하고 보다 오랫동안 결합된 상태를 유지하는 경향이 있다. 결합 친화성을 측정하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있고, 본 발명의 목적상, 이들 중 임의의 방법이 사용될 수 있다. 결합 친화성 측정을 위한 구체적인 예시적인 실시양태를 아래에 기재한다.

[0262] 본 발명에 따른 " K_d " 또는 " K_d 값"은 한 실시양태에서 표지되지 않은 항원의 적정 시리즈의 존재 하에 (^{125} I)-표지된 항원의 최소 농도로 Fab를 평형화시킨 후, 항-Fab 항체-코팅된 플레이트를 사용하여 결합된 항원을 포획함으로써 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화성을 측정하는 하기 검정에서 설명되는 바와 같이, 항체의 Fab 버전 및 항원 분자를 사용하여 수행된 방사성 표지된 항원 결합 검정 (RIA)에 의해 측정된다 (문헌 [Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881]). 이러한 검정에 대한 조건을 확립시키기 위해, 마이크로타이터 플레이트 (다이넥스(Dynex))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중의 5 μ g/ml의 포획성 항-Fab 항체 (카펠 랩스(Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후, 실온 (대략 23°C) 하에 2 내지 5 시간 동안 PBS 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 차단시킨다. 비흡착 플레이트 (눈크 #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [^{125} I]-항원을 관심 Fab의 연속 희석물과 혼합한다 (문헌 [Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599])의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함). 이어서, 관심 Fab를 밤새 인큐베이션하되; 그러나, 평형이 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 시간 (예를 들어, 65 시간) 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 그 후, 혼합물을 포획 플레이트로 옮겨 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션한다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% 트윈-20으로 8회 세척하였다. 플레이트를 건조시킬 때, 150 μ l/웰의 섬광제 (마이크로싯트-20; 팩카드)를 첨가하고, 플레이트를 탐카운트 감마 계수기 (팩카드) 상에서 10 분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의 농도를 선택하여 경쟁적 결합 검정에 사용한다.

[0263] 또 다른 실시양태에 따르면, K_d 는 약 10의 반응 단위 (RU)로 고정된 항원 CM5 칩을 사용하여 25°C에서 비아코어[®]-2000 또는 비아코어[®]-3000 기기 (비아코어, 인크., 뉴저지주 피스카타웨이 소재)를 사용하는 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용하여 측정한다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어, 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 μ g/ml (약 0.2 μ M)로 희석한 후, 커플링된 단백질의 약 10 반응 단위 (RU)를 달성하도록 5 μ l/분의 유속으로 주입한다. 항원 주입 후, 미반응 기를 차단하기 위해 1 M 에탄올아민을 주입한다. 역학 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석물 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 μ l/분의 유속으로 25°C에서 0.05% 트윈 20[™] 계면활성제를 함유하는 PBS (PBST) 중에 주입한다. 단순한 일대일 랭뮤어 결합 모델 (비아코어[®] 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 회합 및 해리 센서그램을 동시에 피팅시킴으로써 회합율 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})을 계산한다. 평형 해리 상수 (K

d)는 k_{off}/k_{on} 의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)]을 참조한다. 온-레이트 (on-rate)가 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 을 초과하면, 온-레이트는 분광계, 예를 들어 정지 유동 설치 분광광도계 (아비브 인스트루먼트(Aviv Instruments)) 또는 교반 큐벳이 구비된 8000-시리즈 SLM-AMINCO™ 분광광도계 (써모스펙트로닉(ThermoSpectronic))에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재 하에, PBS (pH 7.2) 중 20 nM의 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25℃에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 밴드 통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용하여 결정할 수 있다.

[0264] 본 발명에 따른 "온-레이트", "회합 속도", "회합율", 또는 " k_{on} "은 또한 25℃에서 약 10 반응 단위 (RU)로 고정된 항원 CM5 칩과 함께 비아코어®-2000 또는 비아코어®-3000 시스템 (비아코어, 인크., 뉴저지주 피스카타웨이 소재)을 사용하여 상기한 바와 같이 측정할 수 있다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (ECD) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 mg/ml (약 0.2 mM)로 희석한 후, 커플링된 단백질의 약 10 반응 단위 (RU)를 달성하도록 5 ml/분의 유속으로 주입한다. 항원 주입 후에, 미반응기를 차단하기 위해 1 M 에탄올아민을 첨가한다. 역학 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석물 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 μ l/분의 유속으로 25℃에서 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS (PBST) 중에 주입한다. 단순한 일대일 랭뮤어 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 회합 및 해리 센서그램을 동시에 피팅시킴으로써 회합율 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})을 계산한다. 평형 해리 상수 (K_d)는 k_{off}/k_{on} 의 비로 계산하였다. 예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293: 865-881]을 참조한다. 그러나, 온-레이트가 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 을 초과하면, 온-레이트는 바람직하게는 분광계, 예를 들어 정지 유동 설치 분광광도계 (아비브 인스트루먼트) 또는 교반 큐벳이 구비된 8000-시리즈 SLM-Aminco 분광광도계 (써모스펙트로닉)에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재 하에, PBS (pH 7.2) 중 20 nM의 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25℃에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 밴드 통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용하여 결정할 수 있다.

[0265] 본원에서 사용되는 어구 "실질적으로 감소된" 또는 "실질적으로 상이한"은 당업자가 2개의 수치값 (일반적으로, 하나는 분자와 관련이 있고, 다른 하나는 참조/비교 분자와 관련이 있음) (예를 들어, K_d 값)에 의해 측정된 생물학적 특징과 관련하여 이들 2개 값 사이의 차이를 통계적 유의성이 있는 것으로 간주할 정도의, 상기 값 사이의 충분히 높은 정도의 차이를 나타낸다. 상기 2개 값 사이의 차이는 참조/비교 분자에 대한 값의 함수로서 예를 들어 약 10% 초과, 약 20% 초과, 약 30% 초과, 약 40% 초과 및/또는 약 50% 초과이다.

[0266] 본원에서 사용되는 용어 "실질적으로 유사한" 또는 "실질적으로 동일한"은 당업자가 2개의 수치값 (예를 들어, 하나는 본 발명의 항체와 관련이 있고, 다른 하나는 참조/비교 항체와 관련이 있음) (예를 들어, K_d 값)에 의해 측정된 생물학적 특징과 관련하여 이들 2개 값 사이의 차이를 생물학적 및/또는 통계적 유의성이 거의 또는 전혀 없는 것으로 간주할 정도의, 상기 값 사이의 충분히 높은 정도의 유사성을 나타낸다. 상기 2개 값 사이의 차이는 참조/비교 값의 함수로서 예를 들어 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만 및/또는 약 10% 미만이다.

[0267] 펩티드, 폴리펩티드 또는 항체 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 퍼센트 (%)" 및 "상동성"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우 최대 서열 동일성 퍼센트를 달성하도록 갭 (gap)을 도입한 후, 특정 펩티드 또는 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 본원에서 정의되고, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로 간주하지 않는다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은 당업자에게 공지된 다양한 방법, 예를 들어 공개적으로 입수가 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN, 또는 MEGALIGN™ (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. 당업자는 비교될 전장 서열에 대한 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여 정렬 결정에 적절한 파라미터를 정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적상, 핵산 서열 동일성 % 값은 제네테크, 인크.가 저작권자인 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 이용하여 생성한다. ALIGN-2의 소스 코드는 미국 저작권청 (미국 20559 워싱턴 디.씨.)에 사용자 문서로 제출되어 있고, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제네테크, 인크. (캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코 소재)로부터 공개적으로 입수가 가능하다. ALIGN-2 프로그램은 유닉스 운영 체제, 바람직하게는 디지털 유닉스 V4.0D에서 사용되도록 컴파일해야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되어 있으며 변하지 않는다.

- [0268] 아미노산 서열 비교를 위해 ALIGN-2가 사용되는 상황에서, 주어진 아미노산 서열 B에, 또는 주어진 아미노산 서열 B와, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대한 주어진 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성 (별법적으로, 주어진 아미노산 서열 B에, 또는 주어진 아미노산 서열 B와, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대해 특정 % 아미노산 서열 동일성을 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A라는 어구로 표현될 수 있음)은 다음과 같이 계산된다:
- [0269] $100 \times X/Y$ 의 분수값
- [0270] 여기서, X는 A와 B의 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일한 매치(match)로 스코어링되는 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B에 있는 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우에는 B에 대한 A의 % 아미노산 서열 동일성이 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 동일성과 동일하지 않을 것임을 이해할 것이다.
- [0271] 달리 구체적으로 언급하지 않는다면, 본원에서 사용되는 모든 % 아미노산 서열 동일성 값은 바로 앞 단락에서 기재한 바와 같이 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 구한다.
- [0272] 본원의 항체를 코딩하는 "단리된" 핵산 분자는 예를 들어 그것이 생산되는 환경에서 그와 통상적으로 회합되는 적어도 하나의 오염 핵산 분자로부터 확인되고 분리된 핵산 분자이다. 바람직하게는, 단리된 핵산은 생산 환경과 관련된 모든 성분과의 회합이 존재하지 않는다. 본 발명의 폴리펩티드 및 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 자연에서 발견되는 형태 또는 세팅이 아닌 형태이다. 따라서, 단리된 핵산 분자는 세포에서 천연으로 존재하는 본원의 폴리펩티드 및 항체를 코딩하는 핵산과는 구별된다.
- [0273] 용어 "제어 서열"은 특정 숙주 유기체에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 지칭한다. 원핵세포에 적합한 제어 서열은, 예를 들어 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서를 이용하는 것으로 공지되어 있다.
- [0274] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들어, 예비 서열 또는 분비 리더용 DNA는 폴리펩티드의 분비에 참여하는 예비 단백질로서 발현되는 경우에 폴리펩티드용 DNA에 작동가능하게 연결되거나; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 주는 경우에 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 배치되는 경우에 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결되는 DNA 서열이 인접함을 의미하고, 분비 리더의 경우 인접하고 리딩 상으로 존재한다. 그러나, 인핸서는 반드시 인접하여 위치할 필요가 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서의 라이게이션을 통해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우에는 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 관행에 따라 사용한다.
- [0275] 본원에서 사용되는 용어 "에피토프 태그가 부착된 (tagged)"은 "태그 폴리펩티드"에 융합된 본원에 설명된 폴리펩티드 또는 항체를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 지칭한다. 태그 폴리펩티드는 항체가 생성될 수 있는 에피토프를 제공할 만큼 충분한 잔기를 갖지만 그와 융합될 폴리펩티드의 활성을 방해하지 않을 정도로 충분히 짧다. 또한, 태그 폴리펩티드는 항체가 다른 에피토프와는 실질적으로 교차반응하지 않도록 아주 독특한 것이 바람직하다. 일반적으로, 적합한 태그 폴리펩티드는 적어도 6개의 아미노산 잔기, 통상적으로는 약 8개 내지 50개의 아미노산 잔기 (바람직하게는, 약 10개 내지 20개의 아미노산 잔기)를 갖는다.
- [0276] 본원에서 사용되는 용어 "이뮤노어드헤신"은 이뮤노글로불린 불변 도메인의 이펙터 기능과 이종 단백질 ("어드헤신")의 결합 특이성을 겸비한 항체 유사 분자를 지칭한다. 구조적으로, 이뮤노어드헤신은 항체의 항원 인식 및 결합 부위 이외 (즉, "이종")의 원하는 결합 특이성을 갖는 아미노산 서열과 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열의 융합체를 포함한다. 이뮤노어드헤신 분자의 어드헤신 부분은 전형적으로 수용체 또는 리간드의 적어도 결합 부위를 포함하는 인접한 아미노산 서열이다. 이뮤노어드헤신 내의 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열은 임의의 이뮤노글로불린, 예컨대 IgG-1, IgG-2 (예를 들어 IgG2A 및 IgG2B), IgG-3 또는 IgG-4 하위유형, IgA (예를 들어, IgA-1 및 IgA-2), IgE, IgD 또는 IgM으로부터 취득될 수 있다. Ig 융합체는 바람직하게는 Ig 분자 내의 하나 이상의 가변 영역 대신 본원에 기술된 폴리펩티드 또는 항체 도메인의 치환을 포함한다. 특히 바람직한 실시양태에서, 이뮤노글로불린 융합체는 힌지, CH2 및 CH3, 또는 힌지, IgG1 분자의 CH1, CH2 및 CH3 영역을 포함한다. 이뮤노글로불린 융합체의 생산에 대해서는 또한 미국 특허 제5,428,130호 (1995년 6월 27일 허여됨)를 참조한다. 예를 들어, 본원에서 조합 요법에 유용한 제2 의약으로서 유용한 이뮤노어드헤신은 이뮤노글로불린 서열의 불변 도메인에 융합된, PD-L1 또는 PD-L2 또는 그 반대의 세포외 또는 PD-1 결합 부분을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

- [0277] "융합 단백질" 및 "융합 폴리펩티드"는 함께 공유 연결된 2개의 부분을 갖는 폴리펩티드이고, 여기서 각각의 부분은 상이한 특성을 갖는 폴리펩티드이다. 성질은 생물학적 성질, 예컨대 시험관내 또는 생체내 활성일 수 있다. 또한, 특성은 간단한 화학적 또는 물리적 특성, 예를 들어 표적 분자에 대한 결합, 반응의 촉매 작용 등일 수 있다. 2개의 부분은 단일 펩티드 결합에 의해 직접 연결될 수 있거나 또는 펩티드 링커를 통해 서로 리딩 프레임으로 연결될 수 있다.
- [0278] "안정한" 제제는 보관시 그 안의 단백질이 그의 물리적 및 화학적 안정성, 및 일체성을 본질적으로 유지하는 것이다. 단백질 안정성을 측정하기 위한 다양한 분석 기술들이 당업계에서 사용될 수 있고, 문헌 [Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs.(1991)] 및 [Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90(1993)]에 검토되어 있다. 안정성은 선택된 시간 동안 선택된 온도에서 측정될 수 있다. 신속한 스크리닝을 위해 제제를 40℃에서 2주 내지 1개월 동안 보관할 수 있고, 이때 안정성을 측정한다. 제제를 2-8℃에서 보관할 경우에는, 통상적으로 제제는 30℃ 또는 40℃에서 1개월 이상 보관시 안정해야 하고/하거나, 2-8℃에서 2년 이상 보관시 안정해야 한다. 제제를 30℃에서 보관할 경우에는, 통상적으로 제제는 30℃에서 2년 이상 안정해야 하고/하거나 40℃에서 6개월 이상 안정해야 한다. 예를 들어, 보관 동안의 응집 정도는 단백질 안정성의 지표로서 사용될 수 있다. 따라서, "안정한" 제제는 제제에서 약 10% 미만, 바람직하게는 약 5% 미만의 단백질이 제제 내에 응집체로서 존재하는 것일 수 있다. 기타 실시양태에서, 제제를 보관하는 동안 응집체 형성이 증가하는지를 측정할 수 있다.
- [0279] "재구성된" 제제는 단백질이 전체적으로 분산되도록 동결건조된 단백질 또는 항체 제제를 희석제에 용해시켜 제조된 것이다. 재구성된 제제는 관심 단백질로 치료될 환자에게 투여 (예를 들어, 피하 투여)하기에 적합하고, 본 발명의 특정 실시양태에서는 비경구 또는 정맥내 투여에 적합한 것일 수 있다.
- [0280] "등장성" 제제는 본질적으로 인간 혈액과 동일한 삼투압을 갖는 것이다. 등장성 제제는 일반적으로 약 250 내지 350 mOsm의 삼투압을 가질 것이다. 용어 "저장성 (hypotonic)"이란 인간 혈액의 삼투압 미만의 삼투압을 갖는 제제를 나타낸다. 따라서, 용어 "고장성 (hypertonic)"은 인간 혈액의 삼투압을 초과하는 삼투압을 갖는 제제를 기술하는데 사용된다. 예를 들어, 증기압 또는 빙냉 유형 삼투압측정기를 사용하여 등장성을 측정할 수 있다. 본 발명의 제제는 염 및/또는 완충액을 첨가한 결과로서 고장성이다.
- [0281] 본원에서 사용된 "담체"는 사용되는 투여량 및 농도에서 이에 노출되는 세포 또는 포유동물에 비독성인 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함한다. 종종, 생리적으로 허용되는 담체는 수성 pH 완충 용액이다. 생리적으로 허용되는 담체의 예는 완충액, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 기타 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산; 저분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 기타 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당 알콜, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 트윈™, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 플루로닉스™를 포함한다.
- [0282] 용어 "포장 삽입물"은 적응증, 사용, 용량, 투여에 대한 정보, 금기사항, 포장 제품과 함께 조합되는 다른 의약 및/또는 상기 의약의 사용에 대한 경고 등을 포함하는, 의약의 상업적 포장에 통상적으로 포함되는 사용 지시서를 지칭한다.
- [0283] "제약상 허용되는 산"은 제제화된 농도 및 방식에서 비독성인 무기산 및 유기산을 포함한다. 예를 들어, 적합한 무기산은 염산, 과염소산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 질산, 황산, 술폰산, 술펜산, 술파닐산, 인산, 탄산 등을 포함한다. 적합한 유기산은 직쇄 및 분지쇄 알킬, 방향족, 시클릭, 지환족, 아릴지방족, 헤테로시클릭, 포화, 불포화, 모노, 디- 및 트리-카르복실산을 포함하고, 예를 들어 포름산, 아세트산, 2-히드록시아세트산, 트리플루오로아세트산, 페닐아세트산, 트리메틸아세트산, t-부틸 아세트산, 안트라닐산, 프로판산, 2-히드록시프로판산, 2-옥소프로판산, 프로판디온산, 시클로펜탄프로피온산, 시클로펜탄 프로피온산, 3-페닐프로피온산, 부탄산, 부탄디온산, 벤조산, 3-(4-히드록시벤조일)벤조산, 2-아세톡시-벤조산, 아스코르브산, 신남산, 라우릴 황산, 스테아르산, myristic acid, 숙신산, 엠본산, 푸마르산, 말산, 말레산, 히드록시말레산, 말론산, 락트산, 시트르산, 타르타르산, 글리콜산, 글리콘산, 글루콘산, 피루브산, 글리옥살산, 옥살산, 메실산, 숙신산, 살리실산, 프탈산, 팔모산, 팔메산, 티오시안산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 1,2-에탄디술폰산, 2-히드록시에탄술폰산, 벤젠술폰산, 4-클로로벤젠술폰산, 나프탈렌-2-술폰산, p-톨루엔술폰산, 캄포르술폰산, 4-메틸비시클로[2.2.2]-옥트-2-엔-1-카르복실산, 글루코헵톤산, 4,4'-메틸렌비스-3-(히드록시-2-엔-1-카르복실산), 히드록시나프토산이 포함된다.

- [0284] "제약상 허용되는 염기"는 제제화된 농도 및 방식에서 비독성인 무기 염기 및 유기 염기를 포함한다. 예를 들어, 적합한 염기는 무기 염기 형성 금속, 예를 들어 리튬, 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘, 암모늄, 철, 아연, 구리, 망간, 알루미늄, N-메틸글루카민, 모르폴린, 피페리딘, 및 1급, 2급 및 3급 아민, 치환된 아민, 시클릭 아민 및 염기성 이온 교환 수지 [예를 들어, $N(R')_4^+$ (여기서, R'는 독립적으로 H 또는 C_{1-4} 알킬, 예를 들어 암모늄, 트리스임)]를 비롯한 유기 비독성 염기, 예를 들어 이소프로필아민, 트리메틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 트리프로필아민, 에탄올아민, 2-디에틸아미노에탄올, 트리메타민, 디시클로헥실아민, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 카페인, 프로카인, 히드라바민, 콜린, 베타인, 에틸렌디아민, 글루코사민, 메틸글루카민, 테오브로민, 퓨린, 피페라진, 피페리딘, N-에틸피페리딘, 폴리아민 수지 등으로부터 형성된 것을 포함한다. 특히 바람직한 유기 비독성 염기는 이소프로필아민, 디에틸아민, 에탄올아민, 트리메틸아민, 디시클로헥실아민, 콜린, 및 카페인이다. 본 발명에서 사용할 수 있는 추가의 제약상 허용되는 산 및 염기는 아미노산, 예를 들어 히스티딘, 글리신, 페닐알라닌, 아스파르트산, 글루탐산, 리신 및 아스파라긴으로부터 유래된 것을 포함한다.
- [0285] "제약상 허용되는" 완충액 및 염은 상기 기재한 산 및 염기의 산 및 염기 부가염으로부터 유래된 것을 포함한다. 구체적인 완충액 및/또는 염은 히스티딘, 숙시네이트 및 아세테이트를 포함한다.
- [0286] "제약상 허용되는 당"은 관심있는 단백질과 조합될 경우, 보관시 단백질의 화학적 및/또는 물리적 불안정성을 현저하게 억제하거나 감소시키는 분자이다. 제제가 동결건조된 다음 재구성되는 경우에는, "제약상 허용되는 당"을 "동결건조보호제"로 이해할 수도 있다. 예시적인 당 및 그의 상응하는 당 알콜은 아미노산, 예를 들어 모노나트륨 글루타메이트 또는 히스티딘; 메틸아민, 예를 들어 베타인; 친액성 염, 예를 들어 황산마그네슘; 폴리올, 예를 들어 3가 또는 보다 고분자량의 당 알콜, 예를 들어 글리세린, 텍스트란, 에리트리톨, 글리세롤, 아라비톨, 크실리톨, 소르비톨 및 만니톨; 프로필렌 글리콜; 폴리에틸렌 글리콜; 플루로닉스®; 및 그의 조합을 포함한다. 추가의 예시적인 동결건조보호제는 글리세린 및 젤라틴, 및 당 펄리비오스, 펠레지토스, 라피노스, 만노트리오스 및 스타키오스를 포함한다. 환원 당의 예는 글루코스, 말토스, 락토스, 말톨로스, 이소-말톨로스 및 락톨로스를 포함한다. 비-환원 당의 예는 당 알콜 및 기타 직쇄 폴리알콜로부터 선택된 폴리히드록시 화합물의 비-환원 글리코시드를 포함한다. 바람직한 당 알콜은 모노글리코시드, 특히 락토스, 말토스, 락톨로스 및 말톨로스와 같은 디사카라이드의 환원에 의해 수득되는 화합물이다. 글리코시드 측기는 글루코시드 또는 갈락토시드일 수 있다. 당 알콜의 추가적인 예는 글루시톨, 말티톨, 락티톨 및 이소-말톨로스이다. 바람직한 제약상 허용되는 당은 비-환원 당 트레할로스 또는 수크로스이다. 제약상 허용되는 당은 단백질이 보관 동안 (예를 들어, 재구성 및 보관 후) 본질적으로 그의 물리적 및 화학적 안정성 및 일체성을 유지하는 양을 의미하는 "보호량"으로 (예를 들어, 동결건조 전에) 제제에 첨가된다.
- [0287] 본원에서 관심 "희석제"는 제약상 허용되고 (인간 투여에 안전하고 비독성임) 액체 제제, 예를 들어 동결건조 후 재구성된 제제의 제조에 유용한 것이다. 예시적인 희석제에는 무균수, 주사용 정균수 (BWF1), pH 완충 용액 (예를 들어 포스페이트-완충 염수), 무균성 염수 용액, 링거(Ringer) 용액 또는 텍스트로스 용액이 포함된다. 별도의 실시양태에서, 희석제는 염 및/또는 완충액의 수용액을 포함할 수 있다.
- [0288] "보존제"는 세균 활성을 감소시키기 위해 본원의 제제에 첨가될 수 있는 화합물이다. 보존제의 첨가는 예를 들어, 다용도 (다용량) 제제의 생산을 촉진할 수 있다. 가능한 보존제의 예로는 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 헥사메토늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드 (알킬기들이 장쇄 화합물인 알킬벤질디메틸암모늄 클로라이드들의 혼합물), 및 벤즈에토늄 클로라이드가 포함된다. 또 다른 유형의 보존제에는 방향족 알콜 예컨대 페놀, 부틸 및 벤질 알콜, 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤, 카테콜, 레조르시놀, 시클로헥사놀, 3-펜타놀, 및 m-크레졸이 포함된다. 본원에서 가장 바람직한 보존제는 벤질 알콜이다.
- [0289] "치료"는 치료되는 개체 또는 세포의 자연적 과정을 변경시키려는 임상 기술을 나타내고, 임상 질병의 예방을 위해 또는 질병 과정 동안 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질병의 발생 또는 재발 억제, 전이 억제, 질병 진행 속도의 감소, 질병 상태의 개선 또는 호전, 및 완화 또는 개선된 예후를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 질병 또는 질환의 발생을 지연시키기 위해 사용된다. 대상체는 예를 들어 T 세포 기능이상 장애와 연관된 하나 이상의 증상이 완화되면 본 발명의 아포토시스성 항-PD-L1 항체에 의해 성공적으로 "치료된" 것이다.
- [0290] "유효량"은 적어도 필요한 용량에서 필요한 기간 동안 치료 또는 예방 결과를 포함하여 목적하는 또는 지시된 효과를 달성하기 위해 효과적인 양을 지칭한다. 예를 들어, 본 발명의 항-PD-L1 항체의 유효량은 T 세포 상의 PD-1 또는 다른 APC 상의 B7.1을 통해 또는 그 둘 모두를 통해 PD-L1으로부터의 신호전달을 억제하는 적어도 최

소한의 농도이다.

- [0291] "치료 유효량"은 적어도 특정 질환의 측정가능한 개선 또는 예방에 필요한 최대 농도이다. 치료 유효량은 본원에서 환자의 질병 상태, 연령, 성별, 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 유도하는 항체의 능력과 같은 요인에 따라 변할 수 있다. 또한, 치료 유효량은 항체의 임의의 독성 또는 유해한 효과를 치료상 유용한 효과가 능가하는 양이다. 예를 들어, 본 발명의 항-PD-L1 항체의 치료 유효량은 T 세포 기능이상 장애의 하나 이상의 증상을 억제하는 적어도 최소한의 농도이다.
- [0292] "예방 유효량"은 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 목적하는 예방 결과를 달성하기 위해 효과적인 양을 나타낸다. 예를 들어, 본 발명의 항-PD-L1 항체의 예방 유효량은 T 세포 기능이상 장애의 하나 이상의 증상의 발생을 방지하거나 약화시키는 적어도 최소한의 농도이다.
- [0293] "만성" 투여는 장기간 동안 초기의 치료 효과 (활성)를 유지하기 위해 의약(들)을 급성 방식과 달리 연속적으로 투여하는 것을 의미한다. "간헐적" 투여는 중단없이 연속적으로 행해지지 않는지만 특성상 주기적인 치료법이다.
- [0294] 치료를 위한 "포유동물"은 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠, 또는 애완 동물, 예를 들어 개, 말, 토끼, 소, 돼지, 햄스터, 게르빌루스쥐, 마우스, 흰족제비, 래트, 고양이 등을 포함하여 포유동물로서 분류된 임의의 동물을 의미한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.
- [0295] 용어 "제약 제제"는 활성 성분의 생물학적 활성이 효과를 보이도록 하는 형태이고 제제가 투여되는 대상에게 허용되지 않은 독성을 보이는 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 의미한다. 상기 제제는 멸균 상태이다.
- [0296] "멸균" 제제는 무균 상태이거나 또는 모든 살아있는 미생물 및 이들의 포자가 존재하지 않는 것이다.
- [0297] 본원에서 사용된 용어 "약"은 이러한 기술 분야의 당업자에게 용이하게 공지된 각각의 값에 대한 일반적인 오차 범위를 지칭한다.
- [0298] "자가면역 질환"은 개체 자신의 조직 또는 장기 또는 그의 공동-분리 또는 징후 또는 그로부터 생성된 상태로 인한, 그에 대한 질환 또는 장애이다. "자가면역 질환"은 장기-특이적 질환 (즉, 면역 반응은 내분비계, 조혈계, 피부, 심폐계, 위장관계 및 간계, 신장계, 갑상선, 귀, 신경근육계, 중추신경계 등과 같은 장기계에 대해 특이적으로 작용함) 또는 다수의 장기계에 영향을 줄 수 있는 전신 질환 (예를 들어, 전신 홍반 루푸스 (SLE), 류마티스성 관절염 (RA), 다발성 근육염 등)일 수 있다. 바람직한 상기 질환은 자가면역 류마티스 장애 (예를 들어, RA, 쇼그렌 증후군, 골다공증, 루푸스, 예를 들어 SLE 및 루푸스 신장염, 다발성 근육염-피부근육염, 한랭글로불린혈증, 항-인지질 항체 증후군, 및 건선성 관절염), 자가면역 위장 및 간 장애 (예를 들어, 염증성 장 질환 (예를 들어, 궤양 대장염 및 크론 질환), 자가면역 위염 및 악성 빈혈, 자가면역 간염, 원발성 담즙성 간경화, 원발성 경화성 담관염, 및 셀리악 질환), 혈관염 (예를 들어, ANCA-음성 혈관염 및 ANCA-연관 혈관염, 예를 들어 처그-스트라우스 혈관염, 베게너 육아종증, 및 현미경적 다발성 혈관염), 자가면역 신경 장애 (예를 들어, 다발성 경화증, 눈간대경련 근육간대경련 증후군, 중증 근무력증, 시신경 척수염, 파킨슨병, 알츠하이머병, 및 자가면역 다발성 신경병증), 신장 장애 (예를 들어, 사구체신염, 굿패스처 증후군, 및 버거병), 자가면역 피부 장애 (예를 들어, 건선, 두드러기, 심상성 천포창, 수포성 유천포창, 및 피부 홍반성 루푸스), 혈액 장애 (예를 들어, 혈소판 감소성 자색반증, 혈전성 혈소판 감소성 자색반증, 수혈후 자색반증, 및 자가면역 용혈 빈혈), 즉 상경화증, 포도막염, 자가면역 청력 질환 (예를 들어, 내이 질환 및 난청), 베체트병, 레이노드 증후군, 장기 이식, 및 자가면역 내분비 장애 (예를 들어, 당뇨병-관련 자가면역 질환, 예를 들어 인슐린-의존성 당뇨병 (IDDM), 애디슨병, 및 자가면역 갑상선 질환 (예를 들어, 그레이브스 질환 및 갑상선염))을 포함한다. 보다 바람직한 상기 질환은 예를 들어 RA, 궤양 대장염, ANCA-연관 혈관염, 루푸스, 다발성 경화증, 쇼그렌 증후군, 그레이브스 질환, IDDM, 악성 빈혈, 갑상선염, 및 사구체신염을 포함한다.
- [0299] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 저해하고/하거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을 지칭한다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어 ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P 및 ^{177}Lu 의 방사성 동위원소), 및 독소, 예를 들어 소분자 독소 또는 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 및 그의 단편을 포함한다.
- [0300] "화학요법제"는 암 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 시클로포스파미드 (시톡산®); 알킬 술포네이트, 예컨대 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예컨대 알트레타민, 트리메틸라멜라민,

트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 델타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀®); 베타-라파콘; 라파콜; 콜히친; 베툴린산; 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 (하이캄틴®), CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사르®), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄프토테신 포함); 브리오스타틴; 페메트렉세드; 칼리스트아틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; TLK-286; CDP323, 경구 알파-4 인테그린 억제제; 사르코덕티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대 에비디인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가 II (예를 들어, 문헌 [Nicolaou et al., Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33 : 183-186 (1994)] 참조); 다이네미신, 예컨대 다이네미신 A; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색소단백질 에네디인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (아드리아마이신®, 모르폴리노-독소루비신, 사이아노모폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리조폼 주사 (독실®) 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물, 예컨대 메토크세이트, 겐시타빈 (겐자르®), 테가푸르 (유프토랄®), 카페시타빈 (젤로다®), 에포틸론 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴산 유사체, 예컨대 테노프테린, 메토크세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘 및 이마티닙 (2-페닐아미노피리미딘 유도체), 뿐만 아니라 다른 c-키트 억제제; 항-부신, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충물, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 폴리사카라이드 복합체 (JHS 내츄럴 프로덕츠, 오리곤주 유진 소재); 라죽산; 리죽신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리메틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신®, 필데신®); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("아라-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 (탁솔®), 파클리탁셀의 알부민 조작된 나노입자 제제 (아브락산™) 및 도세탁셀 (탁소테레®); 클로란부실; 6-티오구아닌; 메르캅토피린; 메토크세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (벨반®); 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴 (온코빈®); 옥살리플라틴; 류코보빈; 비노렐빈 (나벨빈®); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산; 임의의 상기한 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기한 것 중 2종 이상의 조합물, 예컨대 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법에 대한 약어 CHOP, 및 5-FU 및 류코보빈과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴™)에 의한 치료 섭생에 대한 약어 FOLFOX가 포함된다. 특히 중앙면역의 치료에 있어서 본 발명의 항-PD-L1 항체와 조합하는데 유용한 특히 바람직한 화학요법제는 겐시타빈이다.

[0301]

또한, 상기 정의에는 암의 성장을 촉진할 수 있는 호르몬의 효과를 조절하거나 감소시키거나 차단하거나 억제하는 작용을 하고, 종종 전신(systemic 또는 whole-body) 치료의 형태인 항-호르몬제도 포함된다. 이들은 그 자체가 호르몬일 수 있다. 예로는 타목시펜 (놀바텍스® 타목시펜 포함), 탈록시펜 (에비스타®), 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 토레미펜 (파레스톤®)이 예를 들어 포함되는 항-에스트로젠 및 선택적인 에스트로젠 수용체 조절자 (SERM); 항-프로게스테론; 에스트로젠 수용체 하향-조절제 (ERD); 에스트로젠 수용체 길항제 예컨대 폴베스트란트 (파슬로텍스®); 난소를 저해하거나 정지시키는 기능을 하는 작용제, 예를 들어, 황체형성 호르몬-방출 호르몬 (LHRH) 효능제, 예컨대 류프롤리드 아세테이트

트 (루프론® 및 엘리가드®), 고세렐린 아세테이트, 부세렐린 아세테이트 및 트리프테렐린; 항-안드로겐제 예컨대 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 및 부신에서의 에스트로겐 생산을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어, 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메게스트롤 아세테이트 (메가세®), 엑세메스탄 (아로마신®), 포르메스타나에, 파드로졸, 보로졸 (리비졸®), 레트로졸 (페마라®), 및 아나스트로졸 (아리멕스®)이 포함된다. 또한, 상기 화학요법제의 정의에는 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스® 또는 오스탁®), 에티드로네이트 (디드로칼®), NE-58095, 졸레드론산/졸레드로네이트 (조메타®), 알렌드로네이트 (포사맥스®), 팔미드로네이트 (아레디아®), 틸루드로네이트(스켈리드®), 또는 리세드로네이트 (악토넬®); 및 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 부착성 세포 증식에 연관되는 신호 전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것, 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신, 예를 들어 테라토프® 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어, 알로백틴® 백신, 류백틴® 백신, 및 백시드® 백신; 토포이소머라제 1 억제제 (예를 들어, 루르토테칸®); 항-에스트로겐, 예를 들어 풀베스트란트; 키트 억제제, 예를 들어 이마티닙 또는 EXEL-0862 (티로신 키나제 억제제); EGFR 억제제, 예를 들어 에를로니닙 또는 세툽시맙; 항-VEGF 억제제, 예를 들어 베바시주맙; 아리노테칸; rmRH (예를 들어, 아바렐릭스®); 라파티닙 및 라파티닙 디토실레이트 (ErbB-2 및 GW572016으로도 공지된 EGFR 이중 티로신 키나제 소분자 억제제); 17AAG (열 쇼크 단백질 (Hsp) 90 독인 겔다나마이신 유도제), 및 상기 임의의 물질의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[0302] "성장 억제제"는 시험관 내 또는 생체 내에서 성장이 수용체 활성화에 의존하는 세포의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 따라서, 성장 억제제는 S기에서 수용체 의존성 세포의 비율을 유의하게 감소시키는 것을 포함한다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 다른 시기에) 차단하는 물질, 예를 들어 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 물질을 포함한다. 전통적인 M기 차단제는 빈카 및 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산 및 토포이소머라제 II 억제제, 예를 들어 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 작용제, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예를 들어 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C는 S기 정지로까지 이어질 수도 있다. 추가의 정보는 문헌 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al., (WB Saunders: Philadelphia, 1995), 특히 p. 13]에서 찾을 수 있다. 탁산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 둘 다 주목에서 유래된 항암 약물이다. 유럽형 주목에서 유래된 도세탁셀 (탁소테레®, 론-프랑 로러(Rhone-Poulenc Rorer))은 파클리탁셀 (탁술®, 브리스톨-마이어스 스쿼브)의 반합성 유사체이다.

[0303] 용어 "시토카인"은 세포간 매개자로서 또 다른 세포에 대해 작용하는, 한 세포 집단에 의해 방출되는 단백질에 대한 일반 용어이다. 상기 시토카인의 예는 림포킨, 모노킨; 인터류킨 (IL), 예를 들어 IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15...IL-35, 예를 들어 프로류킨® rIL-2; 종양 괴사 인자, 예를 들어 TNF- α 또는 TNF- β ; 및 다른 폴리펩티드 인자, 예를 들어 LIF 및 키트 리간드 (KL)이고, 용어 "인터류킨"은 현재 본질적으로 시토카인과 동의어가 되었다. 본원에서 사용되는 용어 시토카인은 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 시토카인의 생물학적 활성 등가물, 예를 들어 이것의 합성 생성된 소분자 및 제약상 허용되는 유도제 및 염을 포함한다. 시토카인은 의도된 표적의 근접 위치로 분류될 수 있으며, 여기서 자가분비는 그것이 분비된 동일한 세포에 작용하는 것을 지칭하고, 측분비는 시토카인이 분비되는 곳과 가까운 부근에 한정되어 작용하는 것을 지칭하며, 내분비는 신체의 먼 영역에서 작용하는 것을 지칭한다. 면역 시토카인은 또한 그것이 유형 I 반응을 향상시키는지 (예를 들어, IFN- γ , TGF- β 등) (세포 면역을 지지함) 또는 유형 II 반응을 향상시키는지 (IL-4, IL-10, IL-13 등) (항체 또는 체액성 면역을 지지함)에 따라 분류될 수 있다. 면역 시토카인은 공동자극, 성숙, 증식, 활성화, 염증, 성장, 분화, 시토카인 생산 및 분비, 다양한 면역 세포의 생존에서 조정의 역할을 한다.

[0304] 용어 "호르몬"은 일반적으로 관이 있는 선의 장기에 의해 분비되는 폴리펩티드 호르몬을 의미한다. 호르몬 중 예에서, 예를 들어, 성장 호르몬 예컨대 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 릴랙신; 에스트라디올; 호르몬-대체 요법; 안드로겐 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 또는 테스토락톤; 프로릴랙신; 당단백질 호르몬 예컨대 난포 자극 호르몬 (FSH), 갑상선 자극 호르몬 (TSH), 및 황체형성 호르몬 (LH); 프로락틴, 태반 락토젠, 마우스 성선자극호르몬-관련 펩티드, 성선자극호르몬-방출 호르몬; 인히빈; 액티빈; 물러관-억제 물질; 및 트롬보포이에틴이 포함된다. 본원에서 사용되는 용어 호르몬에는 천연 공급원으로부터 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 호르몬의 생물학적으로 활성인 등가물 (이의 합성 생산된 소형-분자 본

체 및 제약상 허용되는 유도체 및 염 포함)이 포함된다.

[0305] III.본 발명을 수행하는 방식

[0306] A. 파지 디스플레이를 이용한 인간화

[0307] 본원에서 기재하는 추가변 영역-이식된 변이체는 각각의 추가변 영역에 대한 별개의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여, 인간 수용체 서열을 코딩하는 핵산을 쿤켈(Kunkel) 돌연변이 유발시킴으로써 생성하였다. 문헌 [Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987)]. 적당한 추가변 영역-항원 상호 작용을 교정하고 재정립하기 위한 통상적인 기술을 사용하여, 적당한 변화를 프레임워크 및/또는 추가변 영역 내에 도입시킬 수 있다.

[0308] 파지(미드) 디스플레이 (본원에서 또한 파지 디스플레이로 지칭됨)가 서열 무작위화에 의해 생성된 라이브러리에서 다수의 상이한 잠재적인 변이체 항체를 생성시키고 스크리닝하기 위한 편리하고 신속한 방법으로 사용될 수 있다. 그러나, 변경된 항체를 제조하고 스크리닝하기 위한 또 다른 방법들이 당업자에게 이용가능하다.

[0309] 파지(미드) 디스플레이 (본원에서 일부 정황에서는 파지 디스플레이로 또한 지칭됨)가 서열 무작위화에 의해 생성된 라이브러리에서 다수의 상이한 잠재적인 변이체 항체를 생성시키고 스크리닝하기 위한 편리하고 신속한 방법으로 사용될 수 있다. 그러나, 변경된 항체를 제조하고 스크리닝하기 위한 또 다른 방법들이 당업자에게 이용가능하다.

[0310] 파지(미드) 디스플레이 기술은 리간드, 예를 들어 항원에 결합하는 신규한 단백질을 생성하고 선택하기 위한 강력한 도구를 제공하였다. 파지(미드) 디스플레이 기술을 사용함으로써, 표적 분자에 높은 친화성으로 결합하는 서열에 대해 신속하게 분류될 수 있는 단백질 변이체의 큰 라이브러리를 생성할 수 있다. 변이체 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 바이러스 코트 단백질, 예컨대 유전자 III 단백질 또는 유전자 VIII 단백질을 코딩하는 핵산 서열에 일반적으로 융합된다. 단백질 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열이 유전자 III 단백질의 일부를 코딩하는 핵산 서열에 융합된 1가 파지미드 디스플레이 시스템이 개발되었다. (문헌 [Bass, S., Proteins, 8:309 (1990)]; [Lowman and Wells, Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 3:205 (1991)]). 1가 파지미드 디스플레이 시스템에서는, 유전자 융합체가 저 수준으로 발현되고, 야생형 유전자 III 단백질이 또한 발현되어 입자의 감염성이 유지된다. 펩티드 라이브러리의 생성 방법 및 이들 라이브러리의 스크리닝 방법이 많은 특허에 개시되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 제5,723,286호, 미국 특허 제5,432,018호, 미국 특허 제5,580,717호, 미국 특허 제5,427,908호 및 미국 특허 제5,498,530호).

[0311] 항체 또는 항원 결합 폴리펩티드의 라이브러리를 수 많은 방식으로 제조하였는데, 이에는 무작위 DNA 서열을 삽입함으로써 단일 유전자를 변경시키는 방법 또는 관련 유전자 패밀리를 클로닝하는 방법이 포함된다. 파지(미드) 디스플레이를 이용하여 항체 또는 항원 결합 단편을 디스플레이하는 방법이 미국 특허 제5,750,373호, 동 제5,733,743호, 동 제5,837,242호, 동 제5,969,108호, 동 제6,172,197호, 동 제5,580,717호 및 동 제5,658,727호에 기재되어 있다. 이어서, 상기 라이브러리를 대상으로 하여 목적하는 특징을 지닌 항체 또는 항원 결합성 단백질의 발현에 관하여 스크리닝한다.

[0312] 선택된 아미노산을 주형 핵산으로 치환시키는 방법은 당해 분야에 널리 정립되어 있는데, 이들 중의 몇 가지가 본원에 기재되어 있다. 예를 들어, 쿤켈 방법을 사용하여 추가변 영역 잔기를 치환시킬 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987)]을 참조한다.

[0313] 올리고뉴클레오타이드의 서열에는 변경시키고자 하는 추가변 영역 잔기에 대해 설계된 코돈 세트 중의 하나 이상이 포함된다. 코돈 세트는 원하는 변이체 아미노산을 코딩하는데 사용된 여러 뉴클레오타이드 트리플렛(triplet) 서열들의 세트이다. 코돈 세트는 IUB 코드에 따라 아래 나타낸 바와 같이 특정 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드의 등물 혼합물을 지정하기 위해 기호를 사용하여 나타낼 수 있다.

IUB 코드

G (구아닌)	Y (C 또는 T)	H (A 또는 C 또는 T)
A (아데닌)	M (A 또는 C)	B (C 또는 G 또는 T)
T (티민)	K (G 또는 T)	V (A 또는 C 또는 G)
C (시토신)	S (C 또는 G)	D (A 또는 G 또는 T)
R (A 또는 G)	W (A 또는 T)	N (A 또는 C 또는 G 또는 T)
예를 들면, 코돈 세트 DVK에서, D는 뉴클레오타이드 A 또는 G 또는 T 일 수 있고; V는 A 또는 G 또는 C 일 수 있고; K는 G 또는 T 일 수 있다. 이 코돈 세트는 18 종의 다양한 코돈을 제공할 수 있고, 아미노산 Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly 및 Cys를 코딩할 수 있다.		

[0314]

[0315]

표준 방법을 사용하여 올리고뉴클레오타이드 또는 프라이머 세트를 합성할 수 있다. 코돈 세트에 의해 제공되는 뉴클레오타이드 트리플렛의 모든 가능한 조합을 나타내고, 목적하는 군의 아미노산을 코딩하는 서열을 함유하는 올리고뉴클레오타이드의 세트는 예를 들어 고체상 합성에 의해 합성할 수 있다. 특정 위치에 선택된 뉴클레오타이드 "퇴보"가 있는 올리고뉴클레오타이드의 합성은 당업계에서 주지되어 있다. 특정 코돈 세트를 갖는 뉴클레오타이드들의 이같은 세트는 시판되는 핵산 합성기 (예를 들어, 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems), 캘리포니아주 포스터 시티 소재로부터 입수가가능)를 사용하여 합성될 수 있거나, 또는 상업적으로 수득될 수 있다 (예를 들어, 라이프 테크놀로지스(Life Technologies), 메릴랜드주 록빌 소재로부터 수득). 따라서, 특정 코돈 세트를 갖는 합성된 올리고뉴클레오타이드 세트는 전형적으로, 상이한 서열을 갖는 다수의 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 그 차이는 전체 서열내 코돈 세트에 의해 확립된다. 본 발명에 따라 사용될 때 올리고뉴클레오타이드는 가변 도메인 핵산 주형에 혼성화를 허용하는 서열을 갖고, 또한 클로닝 목적을 위한 제한 효소 부위를 포함할 수 있다.

[0316]

한 방법에서, 변이체 아미노산을 코딩하는 핵산 서열이 올리고뉴클레오타이드-매개 돌연변이유발에 의해 생성될 수 있다. 상기 기술은 문헌 [Zoller et al., Nucleic Acids Res. 10:6487-6504 (1987)]에 기재된 바와 같이 당업계에 잘 공지되어 있다. 간략하게, 변이체 아미노산을 코딩하는 핵산 서열은 목적하는 코돈 세트를 코딩하는 올리고뉴클레오타이드 세트를 DNA 주형에 혼성화함으로써 생성되고, 여기서 주형은 가변 영역 핵산 주형 서열을 함유하는 단일 가닥 형태의 플라스미드이다. 혼성화 후, DNA 폴리머라제를 사용하여 주형의 전체적인 제2 상보적 가닥이 합성되고, 상기 가닥에는 따라서 올리고뉴클레오타이드 프라이머가 혼입될 것이고, 올리고뉴클레오타이드 세트에 의해 제공된 코돈 세트를 함유할 것이다.

[0317]

일반적으로, 길이가 적어도 25 뉴클레오타이드인 올리고뉴클레오타이드가 사용된다. 최적의 올리고뉴클레오타이드에는 돌연변이(들)를 코딩하는 뉴클레오타이드(들)의 어느 한쪽 측면 상의 주형에 대해 완전히 상보적인 12개 내지 15개의 뉴클레오타이드가 있을 것이다. 이는 올리고뉴클레오타이드가 단일 가닥 DNA 주형 분자에 정확하게 혼성화될 것을 확실하게 한다. 올리고뉴클레오타이드는 당업계에 공지된 기술, 예컨대 문헌 [Crea et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 75:5765 (1978)]에 기재된 바와 같은 기술을 사용하여 용이하게 합성한다.

[0318]

DNA 주형은 박테리오파지 M13 벡터 (시판용 M13mp18 및 M13mp19 벡터가 적합함)로부터 유래된 벡터 또는 문헌 [Viera et al., Meth. Enzymol., 153:3 (1987)]에 의해 기재된 바와 같은 단일 가닥 파지 복제 기점을 함유하는 벡터에 의해 생성된다. 따라서, 돌연변이될 DNA가 단일 가닥 주형을 생성시키기 위해 이러한 벡터들 중 하나 내로 삽입될 수 있다. 단일 가닥 주형의 생산은 상기 문헌 [Sambrook et al.]의 섹션 4.21-4.41에 기재되어 있다.

[0319]

천연 DNA 서열을 변경시키기 위해, 올리고뉴클레오타이드를 적절한 혼성화 조건 하에 단일 가닥 주형에 혼성화시킨다. 이어서, DNA 폴리머라제, 보통 T7 DNA 폴리머라제 또는 DNA 폴리머라제 I의 클레나우(Klenow) 단편을 첨가하여, 합성을 위한 프라이머로서 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 주형의 상보적 가닥을 합성한다. 1개의 DNA의 가닥은 유전자 1의 돌연변이된 형태를 코딩하고, 다른 가닥 (원래의 주형)은 유전자 1의 천연의 변경되지 않은 서열을 코딩하도록 헤테로듀플렉스(heteroduplex) 분자가 이렇게 하여 형성된다. 그후, 이러한 헤테로듀플렉스 분자를 적절한 숙주 세포, 일반적으로는 원핵세포, 예컨대 이. 콜라이 JM101 내로 형질전환시킨다. 세포를 성장시킨 후 아가로스 플레이트 상에 플레이팅하고, 돌연변이된 DNA를 함유하는 박테리아 콜로니를 확인하기 위해 ³²-포스페이트로 방사성 표지된 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 스크리닝한다.

- [0320] 플라스미드의 양쪽 가닥 모두가 돌연변이(들)를 함유하는 호모듀플렉스(homoduplex) 분자가 생성되도록 바로 위에서 기술된 방법이 변형될 수 있다. 변형은 하기와 같다: 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 상기 기재된 바와 같이 단일 가닥 주형에 어닐링시킨다. 데옥시리보아데노신 (dATP), 데옥시리보구아노신 (dGTP), 및 데옥시리보티미딘 (dTTP)의 3가지 데옥시리보뉴클레오타이드의 혼합물을 dCTP-(aS)로 불리는 변형된 티오데옥시리보사이토신 (아머섬(Amersham)으로부터 수득될 수 있음)과 조합한다. 이러한 혼합물을 주형-올리고뉴클레오타이드 복합체에 첨가한다. 이러한 혼합물에 DNA 폴리머라제를 첨가하면, 돌연변이된 염기를 제외하고 주형과 동일한 DNA의 가닥이 생성된다. 또한, DNA의 이러한 새로운 가닥은 dCTP 대신 dCTP-(aS)를 함유할 것이고, 이는 제한 효소 소화로부터 DNA를 보호하는 작용을 한다. 이중 가닥 헤테로듀플렉스의 주형 가닥을 적절한 제한 효소로 니킹(nicking)시킨 후, 돌연변이유발될 부위(들)를 함유하는 영역이 아닌 곳에서 주형 가닥을 ExoIII 뉴클레아제 또는 또 다른 적합한 뉴클레아제로 소화시켜 절단할 수 있다. 그후, 반응을 정지시켜, 부분적으로만 단일 가닥인 분자를 남긴다. 그후, 4가지 모두의 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트, ATP, 및 DNA 리가제의 존재 하에 DNA 폴리머라제를 사용하여 완전한 이중 가닥 DNA 호모듀플렉스가 형성된다. 그후, 이러한 호모듀플렉스 분자를 적절한 숙주 세포 내로 형질전환시킨다.
- [0321] 앞서 나타난 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드 세트의 서열은 주형 핵산에 혼성화하기에 충분한 길이이고, 반드시 그럴 필요는 없지만, 제한 부위를 또한 함유할 수 있다. 문헌 [Viera et al., Meth. Enzymol., 153:3 (1987)]에 기술된 바와 같이 단일 가닥 파지 복제 기원을 함유하는 벡터 또는 박테리오파지 M13 벡터로부터 유래된 벡터에 의해 DNA 주형이 생성될 수 있다. 따라서, 돌연변이될 DNA가 단일 가닥 주형을 생성시키기 위해 이러한 벡터들 중 하나 내로 삽입되어야 한다. 단일 가닥 주형의 생산이 [Sambrook et al., 상기 문헌]의 섹션 4.21-4.41에 기술되어 있다.
- [0322] 다른 방법에 따르면, 각각의 세트가 상이한 서열을 갖는 다수의 올리고뉴클레오타이드를 갖는 상류 및 하류 올리고뉴클레오타이드 세트를 제공함으로써 라이브러리를 생성시킬 수 있고, 상기 상이한 서열은 올리고뉴클레오타이드의 서열 내에 제공된 코돈 세트에 의해 확립된다. 상류 및 하류 올리고뉴클레오타이드 세트를 가변 도메인 주형 핵산 서열과 함께 폴리머라제 연쇄 반응에 사용하여 PCR 생성물의 "라이브러리"를 생성시킬 수 있다. 확립된 분자 생물학 기술을 사용하여 다른 관련된 또는 관련되지 않은 핵산 서열, 예를 들어, 바이러스 코트 단백질 및 이량체화 도메인과 융합될 수 있기 때문에, PCR 생성물은 "핵산 카세트"로 지칭될 수 있다.
- [0323] PCR 프라이머의 서열에는 추가된 영역 내의 용매 접근 가능하고 고도로 다양한 위치에 대해 설계된 코돈 세트 중의 하나 이상이 포함된다. 상기 기술된 바와 같이, 코돈 세트는 원하는 변이체 아미노산을 코딩하는데 사용된 여러 뉴클레오타이드 트리플렛 서열들의 세트이다. 적당한 스크리닝/선별 단계를 통하여 선별된 바와 같은, 목적하는 기준을 충족시켜 주는 항체 선별제는 표준 재조합 기술을 사용하여 단리 및 클로닝할 수 있다.
- [0324] B. 재조합 제제
- [0325] 본 발명은 또한 항-PD-L1 항체를 코딩하는 단리된 핵산, 상기 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주 세포, 및 항체의 생산을 위한 재조합 기술을 제공한다.
- [0326] 항체의 재조합 생성을 위해, 이것을 코딩하는 핵산을 단리하여 추가의 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제가능한 벡터에 삽입한다. 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상의 절차를 이용 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함)하여 쉽게 단리되고 서열분석된다. 다수의 벡터가 이용가능하다. 벡터의 선택은 부분적으로는 사용되는 숙주 세포에 따른다. 일반적으로, 바람직한 숙주 세포는 원핵세포 또는 진핵세포 (일반적으로, 포유동물) 기원 중 하나이다.
- [0327] 1. 원핵 세포에서의 항체 생산
- [0328] a) 벡터 구축
- [0329] 본 발명의 항체의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 표준 재조합 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 목적하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 항체 생성 세포, 예컨대 하이브리도마 세포로부터 단리되어 서열 결정될 수 있다. 별법적으로, 폴리뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 합성기 또는 PCR 기술을 사용하여 합성할 수 있다. 일단 얻은 후에, 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 원핵세포 숙주에서 이중 폴리뉴클레오타이드를 복제 및 발현할 수 있는 재조합 벡터 내로 삽입된다. 입수가 가능하고 당업계에 공지된 많은 벡터를 본 발명의 목적에 사용할 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 주로 벡터에 삽입되는 핵산의 크기 및 벡터로 형질전환되는 특정 숙주 세포에 따를 것이다. 각각의 벡터는 그의 기능 (이중 폴리뉴클레오타이드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 모두) 및 벡터가 존재하게 되는 특정 숙주 세포와의 상용성에 따라 다양한 성분을 포함한다. 벡터 성분은 일반적으로 복제

기점, 선별 마커 유전자, 프로모터, 리보솜 결합 부위 (RBS), 신호 서열, 이중 핵산 삽입물 및 전사 종결 서열을 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0330] 일반적으로, 숙주 세포와 상용성인 종으로부터 유래된 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 플라스미드 벡터가 상기 숙주와 함께 사용된다. 벡터는 통상적으로 복제 부위, 및 형질전환된 세포에서 표현형 선별을 제공할 수 있는 마킹(marking) 서열을 포함한다. 예를 들어, 이. 콜라이는 전형적으로 이. 콜라이 종으로부터 유래된 플라스미드인 pBR322를 사용하여 형질전환시킨다. pBR322는 암피실린 (Amp) 및 테트라시클린 (Tet) 내성을 코딩하는 유전자를 함유하고, 따라서 형질전환된 세포를 확인하기 위한 용이한 수단을 제공한다. pBR322, 그의 유도체, 또는 다른 미생물 플라스미드 또는 박테리오파지 또한 내인성 단백질의 발현을 위해 미생물 유기체에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 함유하거나 상기 프로모터를 함유하도록 변형될 수 있다. 특정 항체의 발현을 위해 사용되는 pBR322 유도체의 예는 카터(Carter) 등의 미국 특허 제5,648,237호에 상세하게 기재되어 있다.

[0331] 또한, 숙주 미생물과 상용성인 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 파지 벡터를 상기 숙주에 대한 형질전환 벡터로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 박테리오파지, 예컨대 GEM.TM.-11이 이. 콜라이 LE392와 같은 감수성 숙주 세포의 형질전환에 사용될 수 있는 제조법 벡터의 제조에 이용될 수 있다.

[0332] 본 발명의 발현 벡터는 각각의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 2종 이상의 프로모터-시스트론 쌍을 포함할 수 있다. 프로모터는 시스트론의 발현을 조정하는, 시스트론의 상류 (5')에 위치하는 번역되지 않는 제어 서열이다. 원핵세포 프로모터는 전형적으로 두 유형의 프로모터, 즉 유도가능 및 구성적 프로모터로 분류된다. 유도성 프로모터는 배양 조건에서의 변화, 예를 들어 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도에서의 변화에 응답하여 이의 제어 하에 있는 시스트론의 전사 수준 증가를 개시시키는 프로모터이다.

[0333] 다양한 가능한 숙주 세포에 의해 인식되는 수많은 프로모터가 공지되어 있다. 선택된 프로모터는, 제한 효소 소화를 통해 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고 단리된 프로모터 서열을 본 발명의 벡터 내로 삽입함으로써 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 시스트론 DNA에 작동가능하게 연결될 수 있다. 천연 프로모터 서열 및 많은 이중 프로모터를 둘다 사용하여 표적 유전자의 증폭 및/또는 발현을 지시할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중 프로모터는 일반적으로 천연 표적 폴리펩티드 프로모터에 비해 발현된 표적 유전자의 보다 큰 전사 및 보다 높은 수율을 가능하게 하기 때문에 이것이 이용된다.

[0334] 원핵세포 숙주에 사용하기 적합한 프로모터에는 PhoA 프로모터, 갈락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템 및 하이브리드 프로모터, 예컨대 tac 또는 trc 프로모터가 포함된다. 그러나, 박테리아에서 기능적인 다른 프로모터 (예컨대, 다른 공지의 박테리아 또는 파지 프로모터)도 적합하다. 그의 뉴클레오타이드 서열은 공개되어 있고, 당업자는 임의의 요구되는 제한 부위를 공급하도록 링커 또는 어댑터를 사용하여 이들 서열을 표적 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 시스트론에 작동가능하게 라이게이션할 수 있다 (문헌 [Siebenlist et al., (1980) Cell 20: 269]).

[0335] 한 측면에서, 제조법 벡터 내의 각각의 시스트론은 발현된 폴리펩티드의 막을 가로지른 전위를 지시하는 분비 신호 서열 성분을 포함한다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 한 성분일 수 있거나, 또는 벡터 내에 삽입되는 표적 폴리펩티드 DNA의 일부일 수 있다. 본 발명의 목적을 위해 선별된 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단)되는 것이어야 한다. 이중성 폴리펩티드에 천연인 신호 서열을 인식 및 프로세싱하지 않는 원핵생물 숙주 세포에 대해서, 신호 서열이 알칼리성 포스포타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열-안정성 장독소 II (STII) 리더, LamB, PhoE, PelB, OmpA 및 MBP로 이루어진 군으로부터 예를 들어 선택된 원핵생물 신호 서열로 치환된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 발현 시스템의 시스트론 모두에 사용되는 신호 서열은 STII 신호 서열 또는 그의 변이체이다.

[0336] 또 다른 측면에서, 본 발명에 따른 이뮤노글로불린의 생성은 숙주 세포의 세포질에서 일어날 수 있으며, 따라서 각 시스트론 내의 분비 신호 서열의 존재를 요구하지 않는다. 이와 관련하여, 이뮤노글로불린 경쇄 및 중쇄가 발현되고, 폴딩되고, 어셈블리되어, 세포질 내에서 기능적 이뮤노글로불린을 형성한다. 특정 숙주 균주 (예를 들어, 이. 콜라이 trxB⁻ 균주)는 디설피드 결합 형성에 유리한 세포질 조건을 제공함으로써, 발현된 단백질 서브유닛의 정확한 폴딩 및 어셈블리를 허용한다. 문헌 [Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995)].

[0337] 본 발명은 발현된 폴리펩티드 성분의 정량적 비율이 분비되고 적절하게 어셈블리된 항체의 수율을 최대화하도록 조정될 수 있는 발현 시스템을 제공한다. 이러한 조절은 폴리펩티드 성분에 대한 번역 강도의 동시 조절에 의해 적어도 부분적으로 달성된다. 번역 강도의 조절을 위한 한 가지 기술은 시몬스 (Simmons) 등의 미국 특허 제5,840,523호에 개시되어 있다. 이는 시스트론 내의 번역 개시 영역 (TIR)의 변이체를 이용한다. 소정의 TIR

에 대해, 일련의 아미노산 또는 핵산 서열 변이체는 일정 범위의 번역 강도로 생성됨으로써, 상기 인자를 특정 사슬의 목적하는 발현 수준을 위해 조정하는 편리한 수단을 제공할 수 있다. TIR 변이체는 아미노산 서열을 변경할 수 있는 코돈 변화를 초래하는 통상적인 돌연변이 유발 기술에 의해 생성될 수 있지만, 뉴클레오타이드 서열의 침묵 변경이 바람직하다. TIR의 변경은 예를 들어 신호 서열의 변경과 함께 샤인-달가노 (Shine-Dalgarno) 서열의 수 또는 간격의 변경을 포함할 수 있다. 돌연변이체 신호 서열을 생성하는 한 가지 방법은 신호 서열의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 (즉, 변화가 침묵된) 코딩 서열의 시작점에서의 "코돈 뱅크 (codon bank)"의 생성이다. 이는 각각의 코돈의 제3 뉴클레오타이드 위치의 변화에 의해 달성될 수 있으며; 또한 류신, 세린 및 아르기닌과 같은 일부 아미노산은 상기 뱅크를 제조하는데 있어서 복잡성을 추가할 수 있는 다수의 제1 및 제2 위치를 갖는다. 상기 돌연변이 유발의 방법은 문헌 [Yansura et al., (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158]에 상세히 기재되어 있다.

[0338] 바람직하게는, 그 안의 각각의 시스템에 대한 일정 범위의 TIR 강도를 갖는 벡터의 세트가 생성된다. 상기 제한된 세트는 각각의 사슬의 발현 수준뿐만 아니라 다양한 TIR 강도 조합 하에서 목적하는 항체 생성물의 수율의 비교를 제공한다. TIR 강도는 시몬스 등의 미국 특허 제5,840,523호에 상세히 기재된 바와 같이 리포터 유전자의 발현 수준을 정량화함으로써 측정될 수 있다. 번역 강도 비교를 기초로 하여, 본 발명의 발현 벡터 구조물에 조합되도록 목적하는 개별 TIR을 선택한다.

[0339] b)원핵 숙주 세포.

[0340] 본 발명의 항체의 발현에 적합한 원핵 숙주 세포에는 원시세균 및 유박테리아, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체가 포함된다. 유용한 박테리아의 예에는 에스케리키아(*Escherichia*) (예를 들어, 이. 콜라이), 바실러스(*Bacilli*) (예를 들어, 비. 섭틸리스(*B. subtilis*)), 엔테로박테리아), 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종 (예를 들어, 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*)), 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 시겔라(*Shigella*), 리조비아(*Rhizobia*), 비트레오실라(*Vitreoscilla*) 또는 파라코쿠스(*Paracoccus*)가 포함된다. 한 실시양태에서, 그람-음성 세포가 사용된다. 한 실시양태에서, 이. 콜라이 세포가 본 발명에서 숙주로서 사용된다. 이. 콜라이 균주의 예로는 유전자형 W3110 *yfhua (ytonA) ptr3 lac Iq lacL8 yompTȳ(nmpc-fepE) degP41 kan^R* (미국 특허 제5,639,635호)을 갖는 균주 33D3을 비롯한, 균주 W3110 (문헌 [Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219]; ATCC 기탁 번호 27,325) 및 그의 유도체가 포함된다. 다른 균주 및 그의 유도체, 예컨대 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446), 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 1776 (ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 RV308 (ATCC 31,608)이 또한 적합하다. 이러한 예는 제한적인 것이 아니라 예시적인 것이다. 특정 유전자형을 갖는 언급된 박테리아의 유도체 중 어느 하나를 제작하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990)]에 기재되어 있다. 박테리아 세포 내의 레플리콘의 복제능을 고려하여 적절한 박테리아를 선택하는 것이 일반적으로 필요하다. 예를 들어, pBR322, pBR325, pACYC177, 또는 pKN410과 같은 널리 공지된 플라스미드를 사용하여 레플리콘을 공급하는 경우에는, 이. 콜라이, 세라티아, 또는 살모넬라 종이 숙주로서 적합하게 사용될 수 있다.

[0341] 전형적으로, 숙주 세포는 최소량의 단백질 분해 효소를 분비해야 하며, 추가의 프로테아제 억제제는 바람직하게는 세포 배양물에 혼입될 수 있다.

[0342] c)항체 생산

[0343] 숙주 세포를 상기 기재된 발현 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 필요에 따라 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양시킨다. 형질전환은 DNA가 염색체의 요소로서 또는 염색체 통합체에 의해 복제가능하도록 DNA를 원핵세포 숙주 내로 도입하는 것을 의미한다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 그 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행된다. 염화칼슘을 사용한 칼슘 처리는 실질적인 세포벽 장벽을 함유하는 박테리아 세포에 일반적으로 사용된다. 또 다른 형질전환 방법은 폴리에틸렌 글리콜/DMSO를 사용한다. 사용되는 또 다른 기술은 전기천공이다.

[0344] 본 발명의 항체를 생성하는데 사용되는 원핵세포를 당업계에 공지되고 선택된 숙주 세포의 배양에 적합한 배지에서 성장시킨다. 적합한 배지의 예에는 필수 영양 보충물이 부가된 루리아 브로쓰(luria broth; LB)가 포함된다. 일부 실시양태에서, 배지는 또한 발현 벡터를 함유하는 원핵세포의 성장을 선택적으로 허용하는, 발현 벡터의 구조를 기초로 하여 선택된 선별제를 함유한다. 예를 들어, 암피실린은 암피실린 내성 유전자를 발현하는 세포를 성장시키기 위한 배지에 첨가된다.

- [0345] 또한, 탄소, 질소 및 무기 포스페이트 공급원 이외의 임의의 필요한 보충물이, 단독으로, 또는 복합 질소 공급원과 같은 또 다른 보충물 또는 배지와와의 혼합물로서 도입되어 적절한 농도로 포함될 수 있다. 임의로, 배양 배지는 글루타티온, 시스테인, 시스타민, 티오글리콜레이트, 디티오에리트리트 및 디티오트레이톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 환원제를 함유할 수 있다.
- [0346] 원핵 숙주 세포를 적합한 온도에서 배양한다. 이. 콜라이 성장에 대하여, 바람직한 온도는 예를 들어 약 20℃ 내지 약 39℃, 보다 바람직하게는 약 25℃ 내지 약 37℃, 보다 더 바람직하게는 약 30℃이다. 배지의 pH는 주로 숙주 유기체에 따라 약 5 내지 약 9 범위의 임의의 pH일 수 있다. 이. 콜라이의 경우, pH는 바람직하게는 약 6.8 내지 약 7.4, 보다 바람직하게는 약 7.0이다.
- [0347] 유도가능 프로모터가 본 발명의 발현 벡터에 사용되는 경우에, 단백질 발현은 프로모터의 활성화에 적합한 조건 하에서 유도된다. 본 발명의 한 측면에서, PhoA 프로모터가 폴리펩티드의 전사의 제어에 사용된다. 따라서, 형질전환된 숙주 세포는 유도용의 포스페이트-제한 배지에서 배양된다. 바람직하게는, 포스페이트-제한 배지는 C.R.A.P 배지이다 (예를 들어, 문헌 [Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147] 참조). 당업계에 공지된 바와 같이, 사용되는 벡터 구조물에 따라 다양한 다른 유도제가 사용될 수 있다.
- [0348] 본 발명의 발현된 항체 단백질은 숙주 세포의 주변 세포질로 분비되고 그로부터 회수된다. 전형적으로, 단백질 회수는 일반적으로 삼투성 쇼크, 초음파 처리 또는 용해와 같은 수단에 의해 미생물을 분쇄하는 것을 포함한다. 세포가 분쇄되면, 세포 잔해 또는 전체 세포를 원심분리 또는 여과에 의해 제거할 수 있다. 단백질은 예를 들어 친화성 수지 크로마토그래피에 의해 추가로 정제할 수 있다. 별법적으로, 단백질을 배양 배지 내로 옮기고, 그 안에서 단리할 수 있다. 세포를 배양물로부터 제거하고, 배양 상청액을 여과하고 농축하여 생성된 단백질을 추가로 정제할 수 있다. 발현된 폴리펩티드를 추가로 단리하고, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (PAGE) 및 웨스턴 블롯 검정과 같은 통상적으로 공지된 방법을 이용하여 확인할 수 있다.
- [0349] 별법적으로, 항체 생성은 발효 공정에 의해 대량으로 수행된다. 다양한 대규모 유가식(fed-batch) 발효 절차가 재조합 단백질의 생성에 이용가능하다. 대규모 발효는 적어도 1000 리터의 용량, 바람직하게는 약 1,000 내지 100,000 리터의 용량을 갖는다. 상기 발효기는 산소 및 영양소, 특히 글루코스 (바람직한 탄소/에너지 공급원)를 분배시키는 교반기 추진기를 사용한다. 소규모 발효는 일반적으로, 용적이 대략 100 리터 이하인 발효기 내에서의 발효를 지칭하는데, 이는 약 1 리터 내지 약 100 리터 범위일 수 있다.
- [0350] 발효 공정에서, 단백질 발현의 유도는 전형적으로 세포를 적합한 조건 하에서 목적하는 밀도, 예를 들어 약 180-220의 OD₅₅₀으로 성장시킨 후에 개시되며, 이 단계에서 세포는 초기 정제기이다. 당업계에 공지되고 상기 기재된 바와 같이, 사용되는 벡터 구조물에 따라 다양한 유도제를 사용할 수 있다. 세포를 유도 전에 보다 짧은 기간 동안 성장시킬 수 있다. 세포를 통상적으로 약 12 내지 50시간 동안 유도하지만, 보다 길거나 보다 짧은 유도 시간이 사용될 수도 있다.
- [0351] 본 발명의 항체의 생성 수율 및 품질을 향상시키기 위해, 다양한 발효 조건을 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 분비된 항체 폴리펩티드의 적당한 어셈블리와 폴딩을 개선시키기 위해, 샤페론(chaperone) 단백질, 예를 들어 Dsb 단백질 (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD 및/또는 DsbG) 또는 FkpA (샤페론 활성을 지니고 있는 펩티딜프롤릴 시스,트랜스-이소머라제)를 과발현하는 부가의 벡터를 사용하여 숙주 원핵 세포를 공동-형질전환시킬 수 있다. 샤페론 단백질은 박테리아 숙주 세포에서 생성된 이종 단백질의 적절한 폴딩 및 가용성을 용이하게 하는 것으로 입증되었다. 문헌 [Chen et al., (1999) J Bio Chem 274:19601-19605]; 미국 특허 제6,083,715호 (Georgiou et al.); 미국 특허 제6,027,888호 (Georgiou et al.); [Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105]; [Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113]; [Arie et al., (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210].
- [0352] 발현된 이종 단백질 (특히, 단백질 분해에 감수성인 단백질)의 단백질 분해를 최소화하기 위해, 단백질 분해 효소가 결핍된 특정 숙주 균주를 본 발명에 사용할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포 균주를 변형시켜, 공지된 세균성 프로테아제, 예를 들어 프로테아제 III, OmpT, DegP, Tsp, 프로테아제 I, 프로테아제 Mi, 프로테아제 V, 프로테아제 VI 및 그의 조합물을 코딩하는 유전자에서 유전적 돌연변이(들)를 수행할 수 있다. 몇몇 이. 콜라이 프로테아제-결핍 균주가 이용가능하며, 예를 들어, 문헌 [Joly et al., (1998), 상기 문헌]; 미국 특허 제5,264,365호 (Georgiou et al.); 미국 특허 제5,508,192호 (Georgiou et al.); [Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)]에 기재되어 있다.
- [0353] 단백질분해 효소가 결핍되고 1종 이상의 샤페론 단백질을 과발현하는 플라스미드로 형질전환된 이. 콜라이 균

주가 본 발명의 항체를 코딩하는 발현 시스템에 있어서 숙주 세포로서 이용될 수 있다.

[0354] d) 항체 정제

[0355] 추가적인 검정 및 사용을 위한 실질적으로 균질한 제제를 수득하기 위해 본원에서 생산된 항체 단백질을 추가로 정제하였다. 당업계에 공지된 표준 단백질 정제 방법이 이용될 수 있다. 하기 절차는 적합한 정제 절차의 예이다: 면역친화성 또는 이온-교환 칼럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상 또는 DEAE와 같은 양이온-교환 수지 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱(chromatofocusing), SDS-PAGE, 황산암모늄 침전, 및 예를 들어 세파덱스(Sephadex) G-75를 이용한 겔 여과.

[0357] 한 측면에서, 고체상에 고정된 단백질 A가 본 발명의 전장 항체 생성물의 면역친화성 정제에 사용된다. 단백질 A는 높은 친화성으로 항체의 Fc 영역에 결합하는 스태필로코쿠스 아우레아스(*Staphylococcus aureas*)로부터의 41 kD 세포벽 단백질이다. 문헌 [Lindmark et al., (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13]. 단백질 A가 고정되는 고체상은 바람직하게는 유리 또는 실리카 표면을 포함하는 칼럼, 보다 바람직하게는 제어된 공극 유리 칼럼 또는 규산 칼럼일 수 있다. 일부 용도에서, 칼럼을 글리세롤과 같은 시약으로 코팅하여 가능하게는 오염물의 비특이적 부착을 방지한다. 그 후, 고체상을 세척하여 고체상에 비-특이적으로 결합된 오염물을 제거하였다. 최종적으로, 목적하는 항체를 용출에 의해 고체상으로부터 회수한다.

[0358] 2. 진핵 세포에서의 항체 생산

[0359] 진핵세포 발현을 위해, 벡터 성분은 일반적으로 하나 이상의 다음과 같은 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 성분, 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0360] a) 신호 서열 성분

[0361] 진핵 숙주에 사용하기 위한 벡터는 또한 신호 서열, 또는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드를 코딩하는 삽입물을 함유할 수 있다. 바람직하게 선택된 이중 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식 및 프로세싱 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단)되는 것이다. 포유동물 세포 발현시에는, 포유동물 신호 서열 및 또한 바이러스성 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호가 이용가능하다.

[0362] 이러한 전구체 영역을 위한 DNA는 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA에 리딩 프레임으로 라이게이션된다.

[0363] b) 복제 기점

[0364] 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에서는 필요하지 않다 (전형적으로, SV40 기점은 단지 초기 프로모터를 함유하기 때문에 사용될 수 있음).

[0365] c) 선별 유전자 성분

[0366] 발현 및 클로닝 벡터는 선별가능한 마커라고도 불리는 선별 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선별 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토틱세이트 또는 테트라시클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 영양요구성 결핍을 보완하거나, (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않는 중요 영양분을 공급하는 단백질을 코딩하고, 예를 들어 바실러스의 경우에는 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자이다.

[0367] 선별 계획의 한 예는 숙주 세포의 성장을 정지시키는 약물을 이용한다. 이중 유전자로 성공적으로 형질전환된 세포들은 약물 내성을 부여하는 단백질을 생성하고, 따라서 선별 계획에서 생존한다. 이러한 우성 선별의 예는 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 히드로마이신을 사용한다.

[0368] 포유동물 세포에 적합한 선별가능 마커의 또 다른 예는 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산을 능숙하게 취하는 세포의 확인을 가능하게 하는 것, 예컨대 DHFR, 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영양류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카르복실라제 등이다.

[0369] 예를 들어, DHFR 선별 유전자로 형질전환된 세포는 우선 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토틱세이트 (Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 모든 형질전환체를 배양함으로써 확인한다. 야생형 DHFR을 사용할 때의 적절한 숙주 세포는 DHFR 활성이 결여된 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포주 (예를 들어, ATCC CRL-9096)이다.

[0370] 또 다른 한편, 항체 코딩 DNA 서열, 야생형 DHFR 단백질 및 또 다른 선별가능 마커, 예를 들어 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스퍼라제 (APH)로 형질전환시켰거나 공동-형질전환시킨 숙주 세포 (특히, 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)는, 선별가능 마커, 예를 들어 아미노글리코시드성 항생제 (예를 들어, 카나마이신, 네오마이

신 또는 G418)에 대한 선별제를 함유하는 배지에서 세포 성장시킴으로써 선별할 수 있다. 미국 특허 제 4,965,199호를 참조한다.

[0371] *d)프로모터 성분*

[0372] 발현 및 클로닝 벡터는 통상적으로 숙주 유기체에 의해 인지되고 목적하는 항체 서열을 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 실질적으로 모든 진핵 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25개 내지 30개 염기 상류에 위치하는 AT-풍부 영역을 갖는다. 많은 유전자의 전사 출발점으로부터 70개 내지 80개 염기 상류에서 확인되는 또 다른 서열은 CNCAAT 영역 (여기서, N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있음)이다. 대부분의 진핵세포의 3' 말단에는 코딩 서열의 3' 말단에 폴리 A 테일의 부가를 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 존재한다. 이러한 모든 서열들이 진핵 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다.

[0373] 원핵 숙주에 사용하기 적합한 그 밖의 프로모터는 *phoA* 프로모터, -락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 알칼리성 포스파타제 프로모터, 트립토판 (*trp*) 프로모터 시스템, 및 하이브리드 프로모터, 예를 들어 *tac* 프로모터를 포함한다. 그러나, 다른 공지의 박테리아 프로모터도 적합하다. 박테리아 시스템에 사용하기 위한 프로모터는 또한 항체 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 샤인-달가노(S.D.)서열도 함유할 것이다.

[0374] 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터의 항체 폴리펩티드 전사는, 예를 들어 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스 (예컨대 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 시토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스, 및 가장 바람직하게는 원숭이 바이러스 40 (SV40) 등의 바이러스 계놈으로부터 수득한 프로모터, 이중 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터, 및 열-쇼크 프로모터에 의해 제어될 수 있는데, 단 이들 프로모터는 숙주 세포 시스템과 상용가능하여야 한다.

[0375] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스성 복제 기점을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득하였다. 인간 시토메갈로바이러스의 극초기 프로모터가 HindIII E 제한 단편으로 편리하게 수득하였다. 소 유두종 바이러스를 벡터로 사용하여 포유동물 숙주에서 DNA를 발현시키기 위한 시스템이 미국 특허 제4,419,446호에 개시되어 있다. 이러한 시스템의 변형은 미국 특허 제4,601,978호에 기재되어 있다. 또한, 단순 포진 바이러스로부터의 티미딘 키나제 프로모터의 조절 하에 마우스 세포에서 인간 -인터페론 cDNA의 발현에 대해서는 또한 문헌 [Reyes et al., Nature 297: 598-601 (1982)]을 참조한다. 별법적으로, 라우스 육종 바이러스의 긴 말단 반복체를 프로모터로 사용할 수 있다.

[0376] *e)인헨서 요소 성분*

[0377] 고등 진핵생물에 의해 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA를 전사하는 것은 종종, 인헨서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가된다. 많은 인헨서 서열이 현재 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α -태아단백질 및 인슐린)로부터 공지되어 있다. 그러나, 전형적으로는 진핵 세포 바이러스로부터의 인헨서를 사용할 것이다. 이것의 예는 복제 기점의 하류 쪽 (bp 100 내지 270)의 SV40 인헨서, 시토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 복제 기점 하류 쪽의 폴리오마 인헨서 및 아데노바이러스 인헨서를 포함한다. 또한, 진핵 프로모터의 활성화를 위한 인헨서 요소에 대한 문헌 [Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)]을 참조한다. 인헨서는 항체 코딩 서열에 대한 5' 또는 3' 위치에서 벡터 내로 분할될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 5' 부위에 위치한다.

[0378] *f)전사 종결 성분*

[0379] 진핵 숙주 세포 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다세포 유기체로부터의 유핵 세포)에 사용되는 발현 벡터 역시 전사의 종결 및 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 함유할 것이다. 이러한 서열은 진핵생물 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 영역으로부터 통상적으로 이용가능하다. 이들 영역은 항체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사된 뉴클레오티드 절편을 함유한다. 유용한 전사 종결 성분 중 하나는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다. WO 94/11026 및 이에 개시된 발현 벡터를 참조한다.

[0380] *g)숙주 세포의 선별 및 형질전환*

[0381] 본원의 벡터에서 DNA의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포에는 척추동물 숙주 세포를 비롯하여 본원에 기재된 보다 고등한 진핵세포가 포함된다. 배양 (조직 배양)시 척추동물 세포의 증식은 일상적인 방법이 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40으로 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651), 인간 배아 신장 세포주 (293 세포 또는 현탁 배양으로 성장시키기 위해 서브클로닝된 293 세포, 문헌 [Graham et

al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이나이즈 햄스터 난소 세포 /-DHFR (CHO, 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간종양 세포주 (Hep G2)이다.

[0382] 숙주 세포를 상기 기재된 항체 생산을 위한 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선별하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형시킨 통상의 영양 배지에서 배양한다.

[0383] *h) 숙주 세포의 배양*

[0384] 본 발명의 항체를 생성하는데 사용되는 숙주 세포는 다양한 배지 중에서 배양될 수 있다. 시판 배지, 예컨대 햄 F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM) (시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 돌베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (DMEM) (시그마)가 숙주 세포의 배양에 적합하다. 또한, 문헌 [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)], [Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)], 미국 특허 제4,767,704호; 동 제4,657,866호; 동 제4,927,762호; 동 제4,560,655호; 또는 동 제5,122,469호; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985에 기재되어 있는 임의의 배지를 숙주 세포용 배양 배지로 사용할 수 있다. 임의의 이들 배지에는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린 또는 포피 성장 인자), 염 (예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충액 (예컨대 HEPES), 뉴클레오타이드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대 젠타마이신TM 약물), 미량 원소 (통상적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨) 및 글루코스 또는 등가의 에너지원이 보충될 수 있다. 또한, 임의의 다른 필요한 보충물을 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함시킬 수도 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것이고, 당업자에게 명백할 것이다.

[0385] *i) 항체의 정제*

[0386] 제조법 기술을 이용하는 경우, 항체는 세포 내에서 또는 주변세포질 공간 내에서 생성될 수도 있고, 또는 배지로 직접 분리될 수도 있다. 항체가 세포 내에서 생성되는 경우, 제1 단계로서 입자형 잔해인 숙주 세포 또는 용해된 단편을 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거하였다. 문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]에는 이. 콜라이의 주변세포질 공간에 분리된 항체를 분리하는 절차가 기재되어 있다. 간략하게, 세포 페이스트를 아세트산나트륨 (pH 3.5), EDTA 및 페닐메틸설포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재하에 약 30분에 걸쳐 해동시킨다. 세포 잔해는 원심분리로 제거할 수 있다. 항체가 배지로 분리되는 경우, 일반적으로는 우선 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 장치를 사용하여 농축시킨다. 단백질분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제, 예를 들어 PMSF를 임의의 이전 단계에 포함시킬 수 있고, 우발적인 오염물의 성장을 저해하기 위해 항생제를 포함시킬 수 있다.

[0387] 세포로부터 제조된 항체 조성물은 예를 들어 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있고, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소형에 따라 달라진다. 단백질 A가 1, 2 또는 4 중쇄를 함유하는 인간 이뮤노글로불린을 기초로 한 항체를 정제하기 위해 사용될 수 있다 (문헌 [Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 3에 대해 추천된다 (문헌 [Guss et al., EMBO J. 5: 15671575 (1986)]). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예를 들어 제어된 공극 유리 또는 폴리(스티렌-디비닐)벤젠이 아가르스를 사용하여 달성될 수 있는 것보다 더 빠른 유동 속도와 더 짧은 처리 시간을 허용한다. 항체가 C_H3 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABXTM 수지 (제이. 티. 베이커(J. T. Baker), 뉴저지주 필립스버그 소재)가 정제에 유용하다. 회수할 항체에 따라, 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예컨대 이온-교환 칼럼에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카에서의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스TM에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예를 들어 폴리아스파르트산 칼럼)에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전이 이용될 수도 있다.

- [0388] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 관심 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물로 pH 약 2.5 내지 4.5의 용출 완충액을 사용하는, 바람직하게는 낮은 염 농도 (예를 들어 약 0 내지 0.25 M 염)에서 수행되는 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피를 실시할 수 있다.
- [0389] C. 항체 제조
- [0390] 1) 폴리클로날 항체
- [0391] 폴리클로날 항체는 일반적으로 관련 항원 및 아주반트의 다수회의 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 생성시킬 수 있다. 2기능성 작용제 또는 유도체화제, 예를 들어, 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통한), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOCl_2 , 또는 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (여기서, R 및 R^1 은 독립적으로 저급 알킬기임)을 사용하여, 면역화되는 중에 면역원성인 단백질, 예를 들어 키홀 림펫 (keyhole limpet) 헤모시아닌 (KLH), 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제제에 관련 항원을 접합시키는 것이 유용할 수 있다. 사용될 수 있는 아주반트의 예는 프로인트 완전 아주반트 및 MPL-TDM 아주반트 (모노포스포릴 지질 A, 합성 트레할로스 디코리노미콜레이트)를 포함한다. 면역화 프로토콜은 과도한 실험 없이 당업자가 선택할 수 있다.
- [0392] 동물은 예를 들어 100 μg 또는 5 μg 의 단백질 또는 접합체 (각각 토끼 또는 마우스에 대해)를 3 부피의 프로인트 완전 아주반트와 혼합 후 용액을 다중 부위에 피내 주사함으로써 항원, 면역원성 접합체, 또는 유도체에 대해 면역화된다. 1개월 후에, 프로인트 완전 아주반트 중 상기 펩티드 또는 접합체의 원래 양의 1/5 내지 1/10으로 여러 부위에 피하 주사함으로써 상기 동물을 부스팅한다. 7일 내지 14일 후에, 동물에서 채혈하여 혈청의 항체 역가를 분석한다. 역가가 안정화될 때까지 동물을 부스팅한다. 접합체는 또한 재조합 세포 배양물에서 단백질 융합체로서 제조될 수도 있다. 또한, 면역 반응을 증강시키기 위해 응집제, 예를 들어 명반을 적절하게 사용한다.
- [0394] 2) 모노클로날 항체
- [0395] 모노클로날 항체는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 획득하였다. 즉, 이러한 집단을 구성하는 개개의 항체는 소량으로 존재할 수도 있는, 가능한 자연 발생 돌연변이 및/또는 번역후 변형 (예를 들어, 이성질체화, 아미드화)을 제외하고는 동일하다. 따라서, 수식어구 "모노클로날"은 항체의 특징을 별개의 항체의 혼합물이 아니라는 것으로서 표시하는 것이다.
- [0396] 예를 들어, 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조할 수도 있고, 또는 재조합 DNA 방법 (미국 특허 제4,816,567호)으로 제조할 수도 있다.
- [0397] 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예를 들어 햄스터는 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하거나 생성할 수 있는 림프구를 유발하기 위해 상기 기재된 바와 같이 면역화된다. 별법적으로, 림프구는 시험관내 면역화될 수 있다. 이어서, 림프구는 하이브리도마 세포를 형성하기 위해 적합한 융합제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포와 융합된다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]).
- [0398] 면역화제는 전형적으로 항원성 단백질 또는 그의 융합체 변이체를 포함할 것이다. 일반적으로, 인간 기원의 세포가 요구될 경우 말초 혈액 림프구 ("PBL")가 사용되거나, 비-인간 포유동물 공급원이 요구될 경우 비장 세포 또는 림프절 세포가 사용된다. 이어서, 림프구를 적합한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 불멸화 세포주와 융합시켜, 하이브리도마 세포를 형성한다. 문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986), pp. 59-103].
- [0399] 불멸화 세포주는 일반적으로 형질전환된 포유동물 세포, 특히 설치류, 소 및 인간 기원의 골수종 세포이다. 통상적으로, 래트 또는 마우스 골수종 세포주가 사용된다. 이와 같이 제조된 하이브리도마 세포는 바람직하게는 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 1종 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에 접종하여 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 효소 히포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결핍된 경우, 하이브리도마의 배양 배지는 일반적으로 히포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘 (HAT 배지)을 포함할 것이고, 이들 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 억제한다.
- [0400] 바람직한 무한증식 골수종 세포는 효율적으로 융합하고, 선택된 항체 생산 세포에 의한 항체의 안정적인 고수준

생성을 지지하고, 배지, 예를 들어 HAT 배지에 민감한 세포이다. 이 중에서, 바람직한 무한증식 세포주는 예를 들어 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터 (Salk Institute Cell Distribution Center, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)로부터 얻을 수 있는 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양 및 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (American Type Culture Collection, 미국 버지니아주 매나사스 소재)으로부터 얻을 수 있는 SP-2 세포 (및 그의 유도체, 예를 들어 X63-Ag8-653)와 같은 쥐 골수종 라인이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주 역시 인간 모노클로날 항체 생성과 관련하여 기재된 바 있다 (문헌 [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)], [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).

[0401] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 항원에 대한 모노클로날 항체의 생성에 대해 검정한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생성된 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침전법으로 결정하거나, 또는 시험관내 결합 검정법, 예를 들어 방사성면역검정 (RIA) 또는 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA)으로 결정한다.

[0402] 하이브리도마 세포가 성장하는 배지는 목적하는 항원에 대해 작용하는 모노클로날 항체의 존재에 대해 분석될 수 있다. 바람직하게는, 모노클로날 항체의 결합 친화성 및 특이성은 면역침전 또는 시험관내 결합 분석, 예를 들어 방사성 면역 검정 (RIA) 또는 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 결정할 수 있다. 상기 기술 및 검정은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 결합 친화성은 문헌 [Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)]의 스캐차드 (Scatchard) 분석에 의해 결정할 수 있다.

[0403] 목적하는 특이성, 친화성 및/또는 활성의 항체를 생성하는 하이브리도마 세포가 확인된 후에, 클론은 제한 회석 과정에 의해 서브클로닝하고 표준 방법 [Goding, 상기 문헌]으로 성장시킬 수 있다. 이러한 목적에 적합한 배양 배지는 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포는 포유동물에서 종양으로서 생체 내에서 성장시킬 수 있다.

[0404] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 통상적인 이뮤노글로불린 정제 절차, 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적합하게 분리된다.

[0405] 또한, 모노클로날 항체는 제조할 DNA 방법, 예컨대 미국 특허 제4,816,567호에 기재되어 있는 방법, 및 상기에서 기재한 것과 같은 방법으로 제조할 수도 있다. 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차 (예를 들어, 유린 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브 사용)를 이용하여 쉽게 분리 및 서열분석된다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로 작용한다. 일단 분리된 DNA는 발현 벡터에 삽입되고, 이 벡터는 제조할 숙주 세포에서 모노클로날 항체를 합성하기 위해 본래 이뮤노글로불린 단백질을 생성하지 않는 숙주 세포, 예를 들어 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포를 형질감염시킨다. 항체를 코딩하는 DNA의 박테리아에서의 제조할 발현에 대한 검토 문헌으로는 문헌 [Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993)] 및 [Plueckthun, Immunol. Revs. 130:151-188 (1992)]이 포함된다.

[0406] 추가의 실시양태에서, 항체는 문헌 [McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990)]에 기재된 기술을 이용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 분리될 수 있다. 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]은 파지 라이브러리를 사용한 유린 및 인간 항체 각각의 분리를 기재한다. 후속 간행물들에는 사슬 서플링에 의한 높은 친화성 (nM 범위) 인간 항체의 생산 (문헌 [Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)]), 뿐만 아니라 매우 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서의 조합형 감염 및 생체내 제조할 (문헌 [Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21:2265-2266 (1993)])이 기술되어 있다. 따라서, 이러한 기술은 모노클로날 항체 분리를 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술의 실행가능한 대안이다.

[0407] DNA는 또한 예를 들어 상동성 유린 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환시키거나 (미국 특허 제4,816,567호, 문헌 [Morrison, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)]), 또는 이뮤노글로불린 코딩 서열에 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 공유 연결함으로써 변형시킬 수 있다. 전형적으로, 이러한 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드는 항체의 불변 도메인 대신 사용되거나 항체의 한 항원-결합 부위의 가변 도메인 대신 사용되어, 항원에 대한 특이성을 갖는 하나의 항원-결합 부위 및 상이한 항원에 대한 특이성을 갖는 또 다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 2가 항체를 생성시킨다.

[0408] 본원에 기재된 모노클로날 항체는 1가 항체일 수 있고, 그의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어,

한 방법은 이뮤노글로불린 경쇄 및 변형 중쇄의 제조합 발현을 수반하였다. 중쇄는 중쇄 가교를 방지하도록 일반적으로 Fc 영역 내의 임의의 지점에서 절단된다. 별법적으로, 관련 시스템인 잔기는 다른 아미노산 잔기로 대체되거나 결실되어 가교결합을 방지한다. 1가 항체를 제조하기 위해 시험관내 방법도 적합하다. 그의 단편, 특히 Fab 단편을 생산하기 위한 항체의 소화는 당업계에 공지된 통상적인 기술을 사용하여 달성할 수 있다.

[0409] 또한, 키메라 또는 하이브리드 항체는 가교제의 사용을 포함하는 합성 단백질 화학에 공지된 방법을 이용하여 시험관내 제조될 수도 있다. 예를 들어, 면역독소는 디설피드-교환 반응을 사용하여 또는 티오에테르 결합을 형성하여 제조할 수 있다. 상기 목적에 적합한 시약의 예로는 이미노티올레이트 및 메틸-4-메르캅토부티르이미데이트를 들 수 있다.

[0410] 3)인간화 항체.

[0411] 본 발명의 항체는 인간화 또는 인간 항체를 추가로 포함할 수 있다. 비인간 (예를 들어, 무린) 항체의 인간화 형태는 비인간 이뮤노글로불린에서 유래한 최소 서열을 포함하는 키메라 이뮤노글로불린, 이뮤노글로불린 사슬, 또는 그의 단편 (예를 들어 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 다른 항원 결합 하위서열)이다. 인간화 항체는 수용자의 상보성 결정 영역 (CDR)의 잔기 (본원에서 HVR로 사용됨)가 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 비인간중 (공여자 항체), 예를 들어 마우스, 래트 또는 토끼의 CDR의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)을 포함한다. 일부 예에서, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 도입된 CDR 또는 프레임워크 서열 어느 것에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수도 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 하나, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비인간 이뮤노글로불린의 CDR 영역에 대응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 컨센서스 서열의 FR 영역에 대응한다. 또한, 인간화 항체는 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 일부를 최적으로 포함할 것이다. 문헌 [Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature 332: 323-329 (1988)] 및 [Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)].

[0412] 비-인간 항체를 인간화하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간 공급원 으로부터 도입된 1개 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "유입(import)" 잔기로서 지칭되는데, 이는 전형적으로 "유입" 가변 도메인으로부터 취한다. 인간화는 본질적으로 윈터 (Winter) 및 동업자의 방법, 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988)]; [Verhoeven et al., Science 239:1534-1536 (1988)]을 따라 또는 인간 항체의 대응하는 서열을 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 대체함으로써 수행할 수 있다. 따라서, 이같은 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 적은 서열이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체 (미국 특허 제4,816,567호)이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

[0413] 인간화 항체의 제조에 사용되는 인간 가변 도메인 경쇄 및 중쇄 둘다의 선택은 항원성 감소에 매우 중요하다. 소위 "베스트-핏(best-fit)" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 설치류와 가장 근접한 인간 서열은 이어서 인간화 항체의 인간 프레임워크 (FR)로서 허용된다. 문헌 [Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993)]; [Chothia et al., J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)]. 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 프레임워크를 사용한다. 여러 다양한 인간화 항체에 대해 동일한 프레임워크가 사용될 수 있다. 문헌 [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)]; [Presta et al., J. Immunol., 151: 2623 (1993)].

[0414] 추가로, 항체가 항원에 대해 높은 친화성을 보유하고 기타 유리한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화하는 것이 중요하다. 이를 달성하기 위해서, 바람직한 방법에 따라, 인간화 항체는 모 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하는 모 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석 과정에 의해 제조된다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 이용가능하고, 당업자에게 공지되어 있다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원 형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 디스플레이를 조사하면 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 이뮤노글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석이 가능하다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 수용자 서열 및 유입 서열로부터 선택 및 조합되어 원하는 항체 특징, 예를 들어 표적 항원(들)에 대한 친화성 증가를 달성할 수 있다. 일반적으로, 항원 결합에 대한 영향에는 CDR 잔기가 직접적이고 가장 실질적으로 관여한다.

- [0415] 인간화 항체의 다양한 형태가 고려된다. 예를 들어, 인간화 항체는 면역접합체를 생성시키기 위해서 하나 이상의 세포독성제(들)과 임의로 접합된 항체 단편, 예를 들어 Fab일 수 있다. 별법적으로, 인간화 항체는 무손상 항체, 예를 들어 무손상 IgG1 항체일 수 있다.
- [0416] 4)인간 항체
- [0417] 인간화에 대한 대안책으로서 인간 항체를 생성할 수 있다. 예를 들어, 면역화시에 내인성 이뮤노글로불린의 생성 없이 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생성할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)을 생성하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 배선(germ-line) 돌연변이체 마우스 내 항체 중쇄 연결 영역 (J_H) 유전자의 동형접합성 결실이 내인성 항체 생성을 완전히 억제시킨다고 기재된 바 있다. 인간 배선 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 이러한 배선 돌연변이체 마우스에게 전달하면, 항원 접촉시에 인간 항체가 생성될 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)]; [Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993)]; 미국 특허 제5,591,669호 및 WO 97/17852를 참조한다.
- [0418] 다르게는, 파지 디스플레이 기술을 이용하여 면역화되지 않은 공여자로부터의 이뮤노글로불린 가변 (V) 도메인 유전자 레퍼토리로부터 인간 항체 및 항체 단편을 시험관내 생산할 수 있다. 문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)]; [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991)]. 이러한 기술에 따라, 항체 V 도메인 유전자를 섬유상 박테리오파지, 예컨대 M13 또는 fd의 주요 또는 소수의 외피 단백질 유전자로 인 프레임 클로닝하고, 파지 입자의 표면에 기능성 항체 단편으로서 디스플레이한다. 섬유상 입자는 파지 계통의 단일 가닥 DNA 카피를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 특성에 기초한 선별에 의해 이러한 특성을 나타내는 항체를 코딩하는 유전자도 선별된다. 따라서, 파지는 B 세포의 특성 중 일부를 모방한다. 파지 디스플레이는 예를 들어 문헌 [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Curr. Opin Struct. Biol. 3:564-571 (1993)]에서 고찰된 다양한 포맷으로 수행할 수 있다. V-유전자 절편의 여러 공급원이 파지 디스플레이에 사용될 수 있다. 문헌 [Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991)]은 면역화된 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 소규모 무작위 조합 라이브러리로부터의 항-옥사졸론 항체의 다양한 어레이를 단리하였다. 면역화하지 않은 인간 공여자로부터의 V 유전자 레퍼토리를 구축할 수 있고, 다양한 항원 (자기 항원 포함) 어레이에 대한 항체는 본질적으로, 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)], 또는 [Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)]에 기재된 기술에 따라서 단리시킬 수 있다. 또한 미국 특허 제5,565,332호 및 동 제 5,573,905호를 참조한다.
- [0419] 콜(Cole) 등 및 보에르너(Boerner) 등의 기술도 인간 모노클로날 항체의 제조에 이용될 수 있다 (문헌 [Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)] 및 [Boerner et al., J. Immunol. 147(1): 86-95 (1991)]). 유사하게, 인간 항체는 트랜스제닉 동물, 예를 들어 내인성 이뮤노글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 마우스에 인간 이뮤노글로불린 로커스를 도입하여 제조할 수 있다. 시험 접종 시에, 인간 항체 생산이 관찰되고, 이것은 유전자 재배열, 회합 및 항체 레파토리를 포함하여 모든 면에서 인간에서 관찰되는 것과 매우 유사하다. 이러한 접근법은, 예를 들어 미국 특허 제5,545,807호; 동 제5,545,806호, 동 제5,569,825호, 동 제5,625,126호, 동 제5,633,425호, 동 제5,661,016호 및 다음과 같은 과학 간행물: 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992)]; [Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994)]; [Morrison, Nature 368: 812-13 (1994)], [Fishwild et al., Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996)], [Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996)] 및 [Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)]에 기재되어 있다.
- [0420] 마지막으로, 인간 항체는 또한 시험관 내에서 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다 (미국 특허 제5,567,610호 및 제5,229,275호 참조).
- [0421] 5)항체 단편
- [0422] 특정 상황에서는, 전체 항체보다 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 보다 작은 단편 크기는 신속한 제거를 가능하게, 충실성 종양에 대한 접근성을 개선시킬 수 있다.
- [0423] 항체 단편 생성을 위한 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백질분해적 소화를 통해 유도되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., J Biochem Biophys. Method. 24:107-117 (1992)]; 및 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 이러한 단편은 이제 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생성될 수 있다. Fab, Fv 및 scFv 항체 단편은 모두가 이. 콜라이에서 발현되어 분비될 수 있고, 이에 의해

다량의 이들 단편을 쉽게 생성할 수 있다. 항체 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 별법적으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]). 또 다른 접근법에 따라, F(ab')₂ 단편을 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접적으로 단리할 수 있다. 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 F(ab')₂는 미국 특허 제5,869,046호에 기재되어 있다. 다른 실시양태에서, 선택된 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 제5,571,894호 및 미국 특허 제5,587,458호를 참조한다. 항체 단편은 또한 예를 들어 미국 특허 제5,641,870호에 기재된 바와 같이 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0424] 6) 항체 의존성 효소-매개 전구약물 요법 (ADEPT)

[0425] 본 발명의 항체는 또한 전구약물 (예를 들어 펩티딜 화학요법제, WO 81/01145 참조)을 활성 항암 약물로 전환시키는 전구약물-활성화 효소에 항체를 접합시켜서 ADEPT에서 사용할 수도 있다. 예를 들어 WO 88/07378 및 미국 특허 제4,975,278호를 참조한다.

[0426] ADEPT에 유용한 면역접합체의 효소 성분은 전구약물을 그의 보다 활성인 세포독성 형태로 전환시키는 방식으로 전구약물에 작용할 수 있는 임의의 효소를 포함한다.

[0427] 본 발명의 방법에 유용한 효소는 글리코시다제, 글루코스 옥시다제, 인간 리소자임, 인간 글루쿠로니다제, 포스페이트 함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 알칼리성 포스파타제; 술페이트 함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 아릴술포타제; 비독성 5-플루오로시토신을 항암 약물인 5-플루오로우라실로 전환시키는데 유용한 시토신 데아미나제; 펩티드 함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 프로테아제, 예를 들어 세라티아(serratia) 프로테아제, 테르몰리신, 셉틸리신, 카르복시펩티다제 (예를 들어, 카르복시펩티다제 G2 및 카르복시펩티다제 A) 및 카텝신 (예를 들어, 카텝신 B 및 L); D-아미노산 치환체를 함유하는 전구약물을 전환시키는데 유용한 D-알라닐카르복시펩티다제; 글리코실화된 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 탄수화물-절단 효소, 예를 들어 β-갈락토시다제 및 뉴라미니다제; β-락탐으로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 β-락타마제; 및 아민 질소에서 각각 페녹시아세틸기 또는 페닐아세틸기로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 페닐실린 아마이드제, 예를 들어 페닐실린 V 아마이드제 또는 페닐실린 G 아마이드제를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 별법적으로, 효소 활성을 갖는 항체 (당업계에서 "아브자임 (abzyme)"으로도 알려짐)가 본 발명의 전구약물을 유리 활성 약물로 전환시키기 위해 사용될 수 있다 (예를 들어 문헌 [Massey, Nature 328: 457-458 (1987)] 참조). 항체-아브자임 접합체는 종양 세포 집단에 아브자임을 전달하기 위해 본원에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0428] 상기 효소는 당업계에 잘 공지된 기술에 의해, 예를 들어 상기 논의된 이중 2관능성 가교결합제를 사용하여 본원에 기재된 폴리펩티드 또는 항체에 공유 결합될 수 있다. 별법적으로, 적어도 본 발명의 효소의 기능적 활성 부분에 연결된 본 발명의 항체의 항원 결합 영역을 적어도 포함하는 융합 단백질은 당업계에 잘 공지된 재조합 DNA 기술을 이용하여 제작할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Neuberger et al., Nature, 312: 604-608 (1984)] 참조).

[0429] 7) 이중특이적 및 다중특이적 항체

[0430] 이중특이적 항체 (BsAb)는 동일한 또는 다른 단백질 상의 에피토프를 포함하는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 항체이다. 별법적으로, 한 아암은 표적 항원에 결합할 수 있고, 다른 아암은 세포 방어 메커니즘을 표적 항원 발현 세포에 집중시키고 국한시키도록 백혈구 상의 촉발 분자, 예컨대 T 세포 수용체 분자 (예를 들어, CD3), 또는 IgG에 대한 Fc 수용체 (FcγR), 예컨대 FcγR1 (CD64), FcγRII (CD32) 및 FcγRIII (CD16)에 결합하는 아암과 조합될 수 있다. 상기 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, F(ab')₂ 이중특이적 항체)으로부터 유도될 수 있다.

[0431] 이중특이적 항체는 또한 세포독성제를 표적 항원 발현 세포에 편재하도록 사용될 수 있다. 이들 항체는 목적하는 항원에 결합하는 하나의 아암 및 세포독성제 (예를 들어, 사포린, 항-인터페론-α, 빈카 알칼로이드, 리신 (ricin) A 사슬, 메토크세이트 또는 방사성 동위원소 합텐)에 결합하는 다른 아암을 갖는다. 공지된 이중특이적 항체의 예는 항-ErbB2/항-FcγRIII (WO 96/16673), 항-ErbB2/항-FcγRI (U.S.P. 5,837,234), 항-ErbB2/항-CD3 (U.S.P. 5,821,337)을 포함한다.

[0432] 이중특이적 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 전통적인 제조는 2개의 이뮤

노글로불린 중쇄/경쇄 쌍의 동시발현에 기초하고, 여기서 2개의 사슬은 상이한 특이성을 갖는다. 문헌 [Millstein et al., Nature, 305: 537-539 (1983)]. 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류로 인해, 이들 하이브리도마 (콰드로마(quadroma))는 10종의 상이한 항체 분자들의 잠재적인 혼합물을 생성하며, 이 중에서 오직 1종만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 통상적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 상기 정확한 분자의 정제는 다소 성가시고 생성 수율이 낮다. 유사한 절차가 W093/08829 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0433] 상이한 접근법에 따라, 원하는 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)을 갖는 항체 가변 도메인을 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합시킨다. 바람직하게는, 융합은 힌지의 적어도 일부, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인에 의한다. 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)이 융합체의 적어도 하나에 존재하는 것이 바람직하다. 이뮤노글로불린 중쇄 융합체 및 원하는 경우 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터 내로 삽입하고, 적합한 숙주 유기체 내로 동시형질감염시킨다. 이는 구축에 사용된 3종의 폴리펩티드 쌍의 불균일한 비율이 최적의 수율을 제공하는 실시양태에서 3종의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조정하는데 있어서 높은 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 2종 이상의 폴리펩티드 쌍의 발현이 고수율을 유도하거나 상기 비율이 특별한 유의성을 갖지 않는 경우에는 하나의 발현 벡터 내에 2종 또는 3종 모두의 폴리펩티드 쌍의 코딩 서열을 삽입하는 것이 가능하다.

[0434] 이러한 접근법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한쪽 아암에 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄, 및 다른 쪽 아암에 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공함)으로 이루어진다. 이중특이적 분자의 반쪽에만 이뮤노글로불린 경쇄가 존재하는 것이 손쉬운 분리 방법을 제공하므로, 상기 비대칭 구조는 원치 않는 이뮤노글로불린 사슬 조합물로부터 목적하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 접근법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체의 생성에 대한 추가의 상세한 내용에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0435] WO 96/27011 또는 U.S.P. 5,731,168에 기재된 다른 방법에 따라, 한쌍의 항체 분자들 사이의 계면은 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이중이량체의 비율을 최대화하도록 공학적으로 처리될 수 있다. 바람직한 계면은 항체 불변 도메인의 CH3 영역의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 경계면으로부터의 1개 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 큰 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 교체함으로써 큰 측쇄(들)에 동일하거나 유사한 크기의 보상적 "캐비티 (cavity)"가 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이는 다른 원치않는 최종 생성물, 예를 들어 동종이량체에 비해 이중이량체의 수율을 증가시키는 메카니즘을 제공한다.

[0436] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하는 기술은 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 화학적 연결을 이용하여 제조될 수 있다. 문헌 [Brennan et al., Science 229: 81 (1985)]은 무손상 항체를 단백질가수분해로 절단하여 F(ab')₂ 단편을 생성하는 절차를 기재한다. 이들 단편은 인접 디티올을 안정화시키고 분자간 디설피드 형성을 방지하기 위해 디티올 착화제인 아비산나트륨의 존재하에 환원시킨다. 이어서, 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 이어서 Fab'-TNB 유도체 중 하나는 Fab'-TNB 유도체로 재전환되어 이중특이적 항체를 형성한다. 생성된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 작용제로서 사용될 수 있다.

[0437] Fab' 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수하고, 화학적으로 커플링시켜 이중특이적 항체를 형성할 수 있다. 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992)]은 완전히 인간화된 이중특이적 항체 F(ab')₂ 분자의 생성을 기재한다. 각각의 Fab' 단편을 이. 콜라이로부터 따로 분리시키고, 이중특이적 항체를 형성하도록 시험관내 유도 화학 커플링 반응을 실시하였다. 이로써 형성된 이중특이적 항체는 ErbB2 수용체를 과다발현하는 세포 및 정상 인간 T 세포에 결합할 수 있을 뿐만 아니라, 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 촉발할 수도 있었다.

[0438] 2가 항체 단편을 재조합 세포 배양액으로부터 직접 제조하고 단리하기 위한 다양한 기술이 또한 설명되었다. 예를 들어, 2가 이중이량체는 류신 지퍼를 사용하여 생산되었다. 문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드를 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결시켰다. 항체 동종이량체를 힌지 영역에서 환원시켜 단량체를 형성한 후에 재산화시켜서 항체 이중이량체를 형성하였다. 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적/2가 항체 단편 제조를 위한 다른 메카니즘을 제공하였다. 상

기 단편은 동일 쇠의 2개의 도메인 사이에 쌍을 형성하기에는 지나치게 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함한다. 따라서, 1개 단편의 V_H 및 V_L 도메인은 또 다른 단편의 상보적 V_L 및 V_H 도메인과 쌍을 형성하게 되어 2개의 항원-결합 부위가 형성된다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용한 이중특이적/2가 항체 단편의 다른 제조 전략도 보고된 바 있다. 문헌 [Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)]을 참조한다.

[0439] 2가 초과 항체가 고려된다. 예를 들어 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991)].

[0440] 예시적인 이중특이적 항체는 제시된 분자 상의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 별법적으로, 항-단백질 아암은 세포 방어 메커니즘을 특정 단백질을 발현하는 세포에 집중시키도록 백혈구 상의 촉발 분자, 예를 들어 T 세포 수용체 분자 (예를 들어, CD2, CD3, CD28 또는 B7), 또는 IgG에 대한 Fc 수용체 ($Fc\gamma R$), 예를 들어 $Fc\gamma RI$ (CD64), $Fc\gamma RII$ (CD32) 및 $Fc\gamma RIII$ (CD16)에 결합하는 아암과 조합될 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 세포독성제를 특정 단백질을 발현하는 세포에 편재하도록 사용될 수 있다. 이들 항체는 단백질 결합 아암 및 세포독성제 또는 방사성핵종 킬레이터, 예를 들어 EOTUBE, DPTA, DOTA 또는 TETA에 결합하는 아암을 갖는다. 관심있는 다른 이중특이적 항체는 관심있는 단백질에 결합하고, 조직 인자 (TF)에 추가로 결합한다.

[0441] 8) 다가 항체

[0442] 다가 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 2가 항체보다 신속하게 내재화 (및/또는 이화)될 수 있다. 본 발명의 항체는 3개 이상의 항원 결합 부위가 있는 다가 항체 (IgM 클래스 이외의 것)일 수 있고 (예를 들어 4가 항체), 이는 항체의 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 핵산의 재조합 발현에 의해 쉽게 생산될 수 있다. 다가 항체는 이량체화 도메인 및 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 바람직한 이량체화 도메인은 Fc 영역 또는 힌지 영역을 포함한다 (또는 이것으로 이루어진다). 이러한 시나리오에서, 항체는 Fc 영역, 및 Fc 영역의 아미노 말단에 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 것이다. 본원에서의 바람직한 다가 항체는 3개 내지 약 8개, 그러나 바람직하게는 4개의 항원 결합 부위를 포함한다 (또는 이것으로 이루어진다). 다가 항체는 적어도 1개의 폴리펩티드 쇠 (바람직하게는 2개의 폴리펩티드 쇠)를 포함하고, 여기서의 상기 폴리펩티드 쇠(들)은 2개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 예를 들어 폴리펩티드 쇠(들)은 $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$ (여기서, $VD1$ 은 제1 가변 도메인이고, $VD2$ 는 제2 가변 도메인이고, Fc 는 Fc 영역의 1개의 폴리펩티드 쇠이고, $X1$ 및 $X2$ 는 아미노산 또는 폴리펩티드를 나타내고, n 은 0 또는 1임)를 포함할 수 있다. 예를 들어 폴리펩티드 쇠(들)은 $VH-CH1$ -가교성 링커- $VH-CH1-Fc$ 영역 쇠; 또는 $VH-CH1-VH-CH1-Fc$ 영역 쇠를 포함할 수 있다. 본원에서의 다가 항체는 바람직하게는 적어도 2개 (바람직하게는 4개)의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 본원에서의 다가 항체는 예를 들어 약 2개 내지 약 8개의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본원에서 고려되는 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 임의로 CL 도메인을 추가로 포함한다.

[0443] 9) 이중접합체 항체

[0444] 이중접합체 항체도 또한 본 발명의 범주에 속한다. 이중접합체 항체는 2개의 공유 결합된 항체로 구성된다. 예를 들어, 이중접합체 항체 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 하나는 비오틴에 커플링될 수 있다. 그러한 항체는, 예를 들어 면역계 세포를 원치 않는 세포에 표적화시키기 위해 (U.S.P. 4,676,980), 및 HIV 감염의 치료를 위해 제안되었다. WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP 0308936. 항체는 가교제를 사용하는 것을 포함하는, 합성 단백질 화학에 공지된 방법을 이용하여 시험관내 제조될 수 있는 것으로 고려된다. 예를 들어, 디설피드 교환 반응을 이용하거나 티오에테르 결합을 형성하여 면역독소를 구축할 수 있다. 이러한 목적에 적합한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-4-메르캅토부티르이미데이트 및, 예를 들어 미국 특허 제4,676,980호에 개시된 것을 포함한다. 이중접합체 항체는 임의의 편리한 가교 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 다수의 가교 기술과 함께 적합한 가교제가 당업계에 공지되어 있고, 미국 특허 제4,676,980호에 개시되어 있다.

[0445] 10) 이펙터 기능 조작

[0446] 본 발명의 항체를 예를 들어 항체의 항원-의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체-의존성 세포독성 (CDC)이 변형 (예를 들어, 향상 또는 제거)되도록 Fc 이펙터 기능에 대해 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항-PD-L1 항체의 Fc 이펙터 기능은 감소되거나 제거된다. 이것은 항체의 Fc 영역에 1개 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 달성될 수 있다. 별법적으로 또는 추가로, 시스테인 잔기(들)이 Fc 영역 내에 도입될 수 있어서, 상기 영역 내에 사슬간 디설피드 결합 형성이 가능하다. 이로써 생성된 동종이량

체 항체는 개선된 내재화 능력 및/또는 증가된 보체-매개 세포 사멸 및 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 가질 수 있다. 문헌 [Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)] 및 [Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)]을 참조한다. 항종양 활성이 증강된 동종-이량체성 항체는 문헌 [Wolff et al., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)]에 기재된 바와 같이 이중-이관능성 가교 결합제를 사용하여 제조할 수도 있다. 별법적으로, 이중 Fc 영역을 갖는 항체를 조작할 수 있고, 이에 의해 항체의 보체 용해 및 ADCC 능력이 증진될 수 있다. 문헌 [Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989)]을 참조한다.

[0447] 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어 미국 특허 제5,739,277호에 기재된 바와 같이 셀비지 (salvage) 수용체 결합 에피토프를 항체 (특히, 항체 단편)에 혼입시킬 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "셀비지 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기 증가를 담당하는 IgG 분자 (예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃ 또는 IgG₄)의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다.

[0448] 11) 다른 아미노산 서열 변형

[0449] 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화성 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체들은 적절한 뉴클레오타이드 변화를 항체 핵산 내에 도입함으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 제조된다. 이같은 변형에는, 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환이 포함된다. 최종 구조물이 원하는 특징을 갖는다면, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 최종 구조물에 가해진다. 아미노산 변화는 또한 항체의 번역-후 과정을 변경시킬 수 있으며, 예컨대 글리코실화 부위의 개수 또는 위치를 변화시킬 수 있다.

[0450] 돌연변이 유발의 바람직한 위치인 항체의 특정 잔기 또는 영역의 확인에 유용한 방법은 문헌 [Cunningham and Wells in Science, 244:1081-1085 (1989)]에 기재된 바와 같은 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발"이다. 여기서, 표적 잔기 또는 잔기의 집단이 확인되고 (예를 들어, 하전된 잔기, 예를 들어 arg, asp, his, lys, 및 glu), 아미노산과 항원의 상호작용에 영향을 주기 위해 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 치환된다. 이후, 치환에 대한 기능적 감수성을 나타내는 아미노산 위치를 치환 부위에서 또는 치환 부위에 대하여 추가적인 또는 다른 변이체를 도입함으로써 정련시킨다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 미리 결정되지만, 돌연변이 자체의 성질은 미리 결정할 필요가 없다. 예를 들어, 소정의 부위에서 돌연변이의 성능을 분석하기 위해, ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발이 표적 코돈 또는 영역에서 수행되고, 발현된 변이체가 원하는 활성에 대하여 스크리닝된다.

[0451] 아미노산 서열 삽입은 길이가 1개 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드까지의 범위인 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합체 및 또한 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기가 있는 항체 또는 세포독성 폴리펩티드에 융합된 항체가 포함된다. 항체 분자의 또 다른 삽입 변이체에는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드 또는 효소 (예를 들어 ADEPT용)가 항체의 N- 또는 C-말단에 융합된 것이 포함된다.

[0452] 또 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이러한 변이체에서는 항체 분자 내의 1개 이상의 아미노산 잔기가 상이한 잔기로 대체된다. 치환적 돌연변이유발에 대하여 가장 관심을 갖는 부위는 초가변 영역을 포함하지만, FR 변경 또한 고려된다. 보존적 치환은 "바람직한 치환"의 표제 하에 표 A에 나타난다. 이같은 치환으로 생물학적 활성이 변하게 되면, 표 A에서 "예시적 치환"으로 명명된 또는 아미노산 부류와 관련하여 하기에 추가로 기술되는 바와 같은 더욱 실질적인 변화가 도입될 수 있고, 생성물을 스크리닝하게 된다.

[0453] <표 A>

아미노산 치환

본래 잔기	예시적 치환	바람직한 치환
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe;노르류신	leu
Leu (L)	노르류신 ; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 노르류신	leu

[0454]

[0455] 항체의 생물학적 특성의 실질적인 변형은, (a) 치환 영역에서 폴리펩티드 주쇄의 구조가 예를 들어 시트 또는 나선 형태로서 유지되거나, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성이 유지되거나, 또는 (c) 측쇄의 크기가 유지되는데 미치는 효과가 유의하게 상이한 치환을 선택함으로써 수행된다. 자연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성에 따라 하기 군으로 나뉜다:

[0456]

(1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

[0457]

(2) 중성 친수성: cys, ser, thr;

[0458]

(3) 산성: asp, glu;

[0459]

(4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;

[0460]

(5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro, 및

[0461]

(6) 방향족 : trp, tyr, phe.

[0462]

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

[0463]

항체의 적절한 입체 형태를 유지하는데 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기가 또한 분자의 산화적 안정성을 개선시키고 비정상적 가교결합을 방지하기 위해 일반적으로 세린으로 치환될 수 있다. 반대로, 그의 안정성을 개선시키기 위해 시스테인 결함(들)이 항체에 첨가될 수 있다 (특히 항체가 항체 단편, 예를 들어 Fv 단편인 경우).

[0464]

특히 바람직한 유형의 치환 변이체는 모 항체 (예를 들어 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 초가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가의 개발을 위해 선택된 생성되는 변이체(들)은 이들이 생성된 모 항체에 비해 개선된 생물학적 특성을 가질 것이다. 이러한 치환 변이체를 생성하는 편리한 방법은 파지 디스플레이를 사용한 친화성 성숙을 수반하였다. 간략하게, 몇몇 초가변 영역 부위 (예를 들어 6-7개의 부위)가 각 부위에서 모든 가능한 아미노 치환을 생성하도록 돌연변이된다. 이로써 생성된 항체 변이체를 섬유상 파지 입자로부터 각 입자 내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합체로서 1가 방식으로 디스플레이시

킨다. 이어서, 파지-디스플레이된 변이체를 본원에 개시된 바와 같이 이들의 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화성)에 대해 스크리닝한다. 변형시킬 후보 추가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알려진 스캐닝 돌연변이유발을 수행하여 항원 결합에 유의하게 기여하는 추가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 별법적으로 또는 추가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하여 항체와 그의 표적 (예를 들어, PD-L1, B7.1) 사이의 접촉 지점을 확인하는 것이 유익할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃 잔기가 본원에서 상술된 기술에 따라 치환시킬 후보이다. 일단 이러한 변이체가 생성되면, 변이체의 패널을 본원에 기재한 바와 같이 스크리닝하고, 하나 이상의 관련 검정에서 우수한 특성을 갖는 항체를 추가 개발을 위해 선택할 수 있다.

[0465] 항체의 또 다른 유형의 아미노산 변이체는, 항체의 원래의 글리코실화 패턴을 변경한 것이다. 변경이란, 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티의 결실 및/또는 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위의 첨가를 의미한다.

[0466] 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결되거나 O-연결된다. N-연결된이란 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 지칭한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 외한 임의의 아미노산임)이 아스파라긴 측쇄로 탄수화물 모이어티를 효소적 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩티드 내 이들 트리펩티드 서열 중 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. O-연결된 글리코실화는 히드록시아미노산, 가장 일반적으로는 세린 또는 트레오닌으로의 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중 하나의 부착을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신이 사용될 수도 있다.

[0467] 항체에의 글리코실화 부위의 첨가는 아미노산 서열이 상기 기재한 하나 이상의 트리펩티드 서열을 함유하도록 변경시키는 것에 의해 편리하게 달성된다 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우). 변경은 또한 본래 항체의 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 첨가하거나 또는 그것으로 치환하여 행할 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).

[0468] 본 발명의 항체에 대한 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에서 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이러한 방법에는 천연 공급원으로부터의 단리 (자연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우), 또는 앞서 제조된 변이체 또는 비-변이체 버전의 올리고뉴클레오타이드-매개 (또는 부위-지정) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발 및 카세트 돌연변이유발에 의한 제조가 포함되지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0469] 12) 기타 항체 변형

[0470] 본 발명의 항체는 당업계에 공지되고 용이하게 입수가 가능한 추가적인 비단백질성 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 바람직하게는, 항체의 유도체화에 적절한 모이어티는 수용성 중합체이다. 수용성 중합체의 비-제한적인 예로는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 무작위 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어 글리세롤), 폴리비닐 알콜 및 이들의 혼합물을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데하이드는 물에서의 안정성으로 인해 제작에서의 장점이 있을 수 있다. 중합체는 임의의 분자량일 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 변할 수 있고, 1개를 초과하는 중합체가 부착될 경우, 중합체들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선될 항체의 특정 성질 또는 기능, 항체 유도체가 한정된 조건 하에 치료법에서 사용될 것인지 여부 등이 포함되지만 이에 제한되지 않는 고려사항을 기초로 결정될 수 있다. 상기 기술 및 다른 적합한 제제는 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000)]에 개시되어 있다.

[0471] D. 제약 제제

[0472] 치료 제제는 목적하는 정도의 순도를 갖는 활성 성분을 선택적인 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Pub., Gennaro Ed., Philadelphia, PA 2000])와 혼합함으로써 보관을 위해 제조한다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 용량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충액, 항산화제, 예를 들어 아스코르브산, 메티오닌, 비타민 E, 메타중아황산나트륨; 보존제, 등장화제, 안정화제, 금속 착체 (예를 들어 Zn-단백질 착체); 킬레이트화제, 예를 들어 EDTA 및/또는 비-이온성 계면활성제를 포함한다.

- [0473] 치료제가 항체 단편일 때, 표적 단백질의 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 최소 억제 단편이 바람직하다. 예를 들어, 항체의 가변 영역 서열을 기초로 하여, 표적 단백질 서열에 결합하는 능력을 보유한 항체 단편 또는 심지어 펩티드 분자를 설계할 수 있다. 그러한 펩티드는 화학적으로 합성할 수 있고/거나 재조합 DNA 기술에 의해 생산할 수 있다 (예를 들어 문헌 [Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7889-7893] 참조).
- [0474] 완충액을 이용하여, 특히 안정성이 pH 의존적인 경우 치료 유효성을 최적화하는 범위로 pH를 조절한다. 완충액은 바람직하게는 약 50 mM 내지 약 250 mM 범위의 농도로 존재한다. 본 발명에 사용하기 위한 적당한 완충액은 유기산 및 무기산 모두 및 그의 염을 포함한다. 예를 들어, 시트레이트, 포스페이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 옥살레이트, 락테이트, 아세테이트가 있다. 추가로, 완충액은 히스티딘 및 트리메틸아민염, 예를 들어 트리스를 포함할 수 있다.
- [0475] 보존제는 미생물 성장을 지연시키기 위하여 첨가되고, 통상적으로 0.2%-1.0% (w/v) 범위로 존재한다. 본 발명에 사용하기 위한 적당한 보존제는 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 할라이드 (예를 들어 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드), 벤제토늄 클로라이드; 티메로살, 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥사놀, 3-펜타놀 및 m-크레졸을 포함한다.
- [0476] 때로 "안정화제"로 공지된 등장화제는 액체 조성물의 등장성을 조정하거나 유지하기 위해 존재한다. 단백질 및 항체와 같은 크고 대전된 생체분자를 이용하는 경우, 이들은 아미노산 측쇄의 대전된 기와 상호작용하여 분자간 및 분자내 상호작용 가능성을 줄일 수 있기 때문에 종종 "안정화제"로 지칭된다. 등장화제는 다른 성분의 상대량을 고려하여, 0.1 내지 25 중량%, 바람직하게는 1 내지 5 중량%의 양으로 존재할 수 있다. 바람직한 등장화제는 다가 당 알콜, 바람직하게는 3가 이상의 당 알콜, 예를 들어 글리세린, 에리트리톨, 아라비톨, 크실리톨, 소르비톨 및 만니톨을 포함한다.
- [0477] 추가의 부형제는 다음 중 하나 이상으로 작용할 수 있는 작용제를 포함한다: (1) 벌킹제, (2) 용해도 향상제, (3) 안정화제 및 (4) 변성 또는 용기 벽에 대한 부착을 방지하는 작용제. 그러한 부형제에는 다가 당 알콜 (상기 열거한 것들); 아미노산, 예를 들어 알라닌, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 리신, 오르니틴, 류신, 2-페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌 등; 유기 당 또는 당 알콜, 예를 들어 수크로스, 락토스, 락티톨, 트레할로스, 스타키오스, 만노스, 소르보스, 크실로스, 리보스, 리비톨, 미오이니시토스, 미오이니시톨, 갈락토스, 갈락티톨, 글리세롤, 시클리톨 (예를 들어 이노시톨), 폴리에틸렌 글리콜; 황 함유 환원제, 예를 들어 우레아, 글루타티온, 티옥트산, 나트륨 티오글리콜레이트, 티오글리세롤, α -모노티오글리세롤 및 나트륨 티오 술페이트; 저분자량 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 젤라틴 또는 다른 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 모노사카라이드 (예를 들어, 크실로스, 만노스, 프룩토스, 글루코스); 디사카라이드 (예를 들어, 락토스, 말토스, 수크로스); 트리스카라이드, 예를 들어 라피노스; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린 또는 텍스트란이 포함된다.
- [0478] 비이온성 계면활성제 또는 세제 (또한 "습윤제"로 공지됨)는 치료제의 가용화를 돕고, 치료 단백질을 교반에 의해 유도되는 응집에 대해 보호하기 위해 존재한다 (이는 또한 활성 치료 단백질 또는 항체의 변성을 유발하지 않으면서 제제가 전단 표면 스트레스에 노출되는 것을 허용한다). 비이온성 계면활성제는 약 0.05 mg/ml 내지 약 1.0 mg/ml, 바람직하게는 약 0.07 mg/ml 내지 약 0.2 mg/ml의 범위로 존재한다.
- [0479] 적합한 비이온성 계면활성제는 폴리소르베이트 (20, 40, 60, 65, 80 등), 폴리옥사머 (184, 188 등), 플루로닉® 폴리올, 트리톤®, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노에테르 (트윈®-20, 트윈®-80 등), 라우로마크로콜 400, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 수소화 피마자 오일 10, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아레이트, 수크로스 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로스 및 카르복시메틸 셀룰로스를 포함한다. 사용될 수 있는 음이온성 세제는 나트륨 라우릴 술페이트, 디옥틸 나트륨 술포숙시네이트 및 디옥틸 나트륨 술포네이트를 포함한다. 양이온성 세제는 벤즈알코늄 클로라이드 또는 벤제토늄 클로라이드를 포함한다.
- [0480] 제제를 생체내 투여용으로 사용하기 위하여서는, 제제는 멸균 상태이어야 한다. 제제는 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 멸균될 수 있다. 본원의 치료 조성물은 일반적으로 멸균 접근 포트를 갖는 용기, 예를 들어 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알에 둔다.
- [0481] 투여 경로는 공지되고 허용되는 방법에 따르고, 예를 들어 단일 또는 다회 볼루스 또는 장시간에 걸친 주입으로 적당한 방식, 예를 들어 피하, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 병변내 또는 관절내 경로에 의한 주사 또는 주입, 국소 투여, 흡입에 의해서 또는 지속방출 또는 연장방출 방식이다.

- [0482] 본원의 제제는 또한 치료할 특정 적응증에 필요한 경우에는 1종 초과와 활성 화합물, 바람직하게는 서로 유해한 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 화합물을 함유할 수 있다. 별법적으로 또는 추가로, 조성물은 세포독성제, 시토카인 또는 성장억제제를 포함할 수 있다. 이러한 분자는 적합하게는 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합되어 존재한다.
- [0483] 또한, 활성 성분은 예를 들어 코아세르베이션 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어 리포솜, 알부민 미세구, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐)에, 또는 마크로에멀전 중에 봉입될 수 있다. 상기 기술은 상기한 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition]에 개시되어 있다.
- [0484] 본원에 기술된 단백질 및 항체의 안정성은 비독성 "수용성 다가 금속염"의 사용을 통하여 증가될 수 있다. 예로는 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , Sn^{4+} , Al^{3+} 및 Al^{3+} 를 포함한다. 상기한 다가 금속 양이온과 수용성 염을 형성할 수 있는 음이온의 예로는 무기산 및/또는 유기산으로부터 형성된 것을 들 수 있다. 상기 수용성 염은 물 (20°C) 중에서 적어도 약 20 mg/ml, 별법적으로 적어도 약 100 mg/ml, 별법적으로 적어도 약 200 mg/ml의 용해도를 갖는다.
- [0485] "수용성 다가 금속염"을 형성하는데 사용될 수 있는 적당한 무기산은 염산, 아세트산, 황산, 질산, 티오시안산 및 인산을 포함한다. 사용될 수 있는 적합한 유기산은 지방족 카르복실산 및 방향족 산을 포함한다. 이러한 정의 내의 지방족 산은 포화 또는 불포화 C_{2-9} 카르복실산 (예를 들어 지방족 모노-, 디- 및 트리-카르복실산)으로 정의될 수 있다. 예를 들어, 이러한 정의 내의 예시적인 모노카르복실산은 포화 C_{2-9} 모노카르복실산, 아세트산, 프로피온산, 부티르산, 발레르산, 카프로산, 에난트산, 카프릴산, 펠라르곤산 및 카프리콘산, 및 불포화 C_{2-9} 모노카르복실산, 아크릴산, 프로프리오산, 메타크릴산, 크로톤산 및 이소크로톤산을 포함한다. 예시적인 디카르복실산은 포화 C_{2-9} 디카르복실산, 말론산, 숙신산, 글루타르산, 아디프산 및 피멜산을 포함하고, 불포화 C_{2-9} 디카르복실산은 말레산, 푸마르산, 시트라콘산 및 메사콘산을 포함한다. 예시적인 트리카르복실산은 포화 C_{2-9} 트리카르복실산, 트리카르발릴산 및 1,2,3-부탄트리카르복실산을 포함한다. 추가로, 이러한 정의의 카르복실산은 또한 1 또는 2개의 히드록실기를 포함하여 히드록시 카르복실산을 형성할 수 있다. 예시적인 히드록시 카르복실산은 글리콜산, 락트산, 글리세르산, 타르트론산, 말산, 타르타르산 및 시트르산을 포함한다. 이러한 정의 내의 방향족 산은 벤조산 및 살리실산을 포함한다.
- [0486] 본 발명의 캡슐화된 폴리펩티드를 안정화시키는 것을 돕는데 사용될 수 있는 흔히 채용되는 수용성 다가 금속염으로는, 예를 들어 (1) 할라이드 (예를 들어, 염화아연, 염화칼슘), 술페이트, 니트레이트, 포스페이트 및 티오시아네이트의 무기 산 금속 염; (2) 지방족 카르복실산 금속 염 (예를 들어, 칼슘 아세테이트, 아연 아세테이트, 칼슘 프로프리오네이트, 아연 글리콜레이트, 칼슘 락테이트, 아연 락테이트 및 아연 타르트레이트); 및 (3) 벤조에이트 (예를 들어, 아연 벤조에이트)과 살리실레이트의 방향족 카르복실산 금속 염이 포함된다.
- [0487] E. 치료 방법:
- [0488] 질환의 예방 또는 치료를 위하여, 활성 물질의 적합한 용량은 상기 정의한 바와 같은 치료되는 질병의 유형, 질환의 심각도 및 경과, 상기 물질이 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상력 및 물질에 대한 반응, 및 주치의의 판단에 의존할 수 있다. 상기 물질은 적합하게는 환자에게 1회 이상의 일련의 치료로서 투여될 수 있다.
- [0489] 특정 실시양태에서, 본 발명은 특히 PD-1 및/또는 B7.1에의 결합을 방지하는 PD-L1 항체를 적용하는 것에 의해 PD-1을 통한 신호전달을 약화시키는 것으로부터 야기되는 공동자극에 관한 것일 뿐만 아니라 T 세포 기능이상 장애의 치유적 치료에 관한 것이다.
- [0490] 1. 감염
- [0491] PD-1 및 그의 리간드 ("PD-1:PD-L")는 급성 및 만성 감염을 야기하는 병원체에 대해 면역 방어를 조절하는데 중요한 역할을 한다. PD-1:PD-L 신호전달은 효과적인 항균성 면역 방어 및 면역 매개 조직 손상 사이의 균형을 조절하는데 있어서 핵심 역할을 한다. 예를 들어, PD-1 녹아웃 마우스는 그의 야생형 대응체에 비해 더 신속하게 아데노바이러스 감염을 제거하는 반면, 보다 심각한 간세포 손상을 발생시킨다. 문헌 [Iwai et al., J. Exp. Med. 198: 39-50 (2003)]. 헤르페스 기질 각막염 마우스 모델에서, 항-PD-L1 항체를 차단하는 것은 각막

염, HSV-1 특이적 이펙터 CD4 T 세포 확장 및 IFN- γ 생산 및 생존의 증가를 악화시켰다. 문헌 [Jun et al., FEBS Lett. 579: 6259-64 (2005)].

[0492] 만성 감염을 유발하는 미생물은 숙주 면역 반응을 회피하는 PD-1:PD-L 신호전달 경로를 이용하여 만성 감염을 일으킨다. 만성 감염을 유발하는 바이러스는 바이러스-특이적 T 세포가 비기능적이도록 할 수 있고, 이에 의해 항바이러스 T 세포 반응이 침묵하게 된다. 문헌 [Barber et al., Nature 439: 682-87 (2006)]; [Wherry et al., J. Virol. 78: 5535-45 (2004)]. T 세포의 탈진 또는 CD8⁺ T 세포의 무반응은 만성 감염 동안의 비효과적인 바이러스 조절의 중요한 원인이고, 마우스에서의 만성 LCMV 감염, 뿐만 아니라 인간에서의 HIV, HBV, HCV 및 HTLV 감염 및 영장류에서의 SIV 감염의 특징이다. 탈진된 바이러스-특이적 CD8⁺ T 세포의 표현형에서, 먼저 세포독성 및 IL-2 생산이 손실되고 이어서 이펙터 시토카인이 생산되는, 계층적이고 점진적인 기능의 손실이 있는 것으로 보인다.

[0494] PD-1은 활성화시에 상향조절되고, 발현은 LCMV 만성 감염된 마우스에서 탈진된 CD8⁺ T 세포에 의해 높은 수준으로 유지된다. 문헌 [Barber et al., 상기 문헌]. PD-1:PD-L1 결합을 차단하는 항체의 투여는 T 세포 반응을 향상시키고, 바이러스 양을 실질적으로 감소시킨다. 비효과적인 CD4⁺ T_H 반응을 갖는 지속적으로 감염된 마우스에서, PD-1:PD-L1의 차단은 CD8⁺ T 세포를 기능이상 상태로부터 회복시켜, 증식, 시토카인의 분비, 감염된 세포의 사멸, 및 바이러스 개수의 감소를 야기하는데, 이는 이것이 만성 바이러스성 감염의 치료를 위한 치유적 접근법임을 강력하게 시사한다.

[0495] LCMV에서 PD-1:PD-L의 역할의 결과로서, 인간에서 만성 감염을 치료하기 위해 이러한 경로를 표적화하는 것에 대한 강한 관심이 나타났다. PD-1 발현은 HIV-특이적 (문헌 [Petrovas et al., J. Exp. Med. 203: 2281-92 (2006)]; [Day et al., Nature 443: 350-54 (2006)]; [Trautmann et al., Nat. Med. 12: 1198-202 (2006)]), HBV-특이적 (문헌 [Boettler et al., J. Virol. 80: 3532-40 (2006)]; [Boni et al., J. Virol. 81: 4215-25 (2007)], 및 HCV-특이적 T 세포 (문헌 [Urbani et al., J. Virol. 80: 11398-403 (2006)])에서 높다. PD-L1은 또한 만성 HBV 감염 환자의 말초 혈액 CD14⁺ 단핵구 및 골수성 DC (문헌 [Chen et al., J. Immunol. 178: 6634-41 (2007)]; [Geng et al., J. Viral Hepat. 13: 725-33 (2006)], 및 HIV 환자의 CD14⁺ 세포 및 T 세포 (문헌 [Trabattoni et al., Blood 101: 2514-20 (2003)])에서 상향조절된다. 시험관내에서 PD-1:PD-L1 상호작용의 차단은 HIV-특이적, HBV-특이적, HCV-특이적 및 SIV-특이적 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포의 탈진을 역전시키고, 증식 및 시토카인 생산을 회복시킨다. 문헌 [Petrovas et al., J. Exp. Med. 203: 2281-92 (2006)]; [Day et al., 상기 문헌]; [Trautmann et al., 상기 문헌]; [Boni et al., 상기 문헌]; [Urbani et al., 상기 문헌]; [Velu et al., J. Virol. 81: 5819-28 (2007)].

[0496] PD-1 발현의 정도는 또한 T 세포 탈진의 정도 및 질환 중증도를 나타내는 바이러스-특이적 CD8⁺ T 세포에 대한 유용한 진단상 마커일 수 있다. HIV-특이적 CD8⁺ T 세포에서의 PD-1 발현 수준은 바이러스 수, CD4⁺ 계수 감소, 및 CD8⁺ T 세포가 시험관내에서 HIV 항원에 반응하여 증식하는 능력의 감소와 관련이 있다. 생체내 관찰도 마찬가지로, HIV-특이적 CD4⁺ T 세포에서의 PD-1 발현 및 바이러스 수 사이에 직접적인 상관관계가 존재한다. 문헌 [D'Souza et al., J. Immunol. 179: 1979-87 (2007)]. 장기간 비진행자는 현저하게 상향조절된 PD-1을 발현하는 전형적인 진행자와 대조적으로, 기능적 HIV-특이적 기억 CD8⁺ T 세포를 가지며 PD-1 발현이 현저하게 낮고, 이는 감소된 CD4⁺ T 세포 개수, 감소된 CD4⁺ T 세포 개수, 감소된 HIV-특이적 이펙터 기억 CD8⁺ T 세포 기능, 및 상승된 혈장 바이러스 수와 관련이 있다. 문헌 [Zhang et al., Blood 109: 4671-78 (2007)].

[0497] PD-1:PD-L 경로는 또한 박테리아 감염의 만성화와 관련이 있다. 헬리코박터 피롤리는 만성 위염 및 위십이지장 궤양을 유발하고, 위암 발생의 위험 인자이다. H. 피롤리 감염 동안, T 세포 반응은 감염을 제거하는데 불충분하여, 감염을 지속시킨다. 시험관내 또는 생체내에서 H. 피롤리에 노출된 이후, PD-L1은 위 상피세포에서 상향조절된다. 위 상피세포는 MHC 클래스 II 분자를 발현하고, H. 피롤리 감염 동안 APC 기능에서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. PD-1이 PD-L1과 상호작용하는 것을 차단하는 항-PD-L1 항체는 H. 피롤리 및 CD4 T 세포에 노출된 위 상피세포 배양물에서 T 세포 증식 및 IL-2 생산을 향상시킨다. 항체 또는 siRNA에 의한 PD-L1의 차단은 조절 T 세포의 생산을 방지하였는데, 이는 H. 피롤리 감염 동안 조절 및 이펙터 T 세포 사이의 역학을 조

절하는 것에 의해 PD-L1이 T 세포 억제 및 감염의 지속을 촉진할 수 있음을 시사한다. 문헌 [Beswick et al., Infect. Immun. 75: 4334-41 (2007)].

- [0498] 또한, 기생충도 면역 반응을 억제하는 대식세포를 유도하기 위해 PD-1:PD-L1 경로를 이용한다. 마우스에서의 타에니아 크래시셉스(*Taenia crassiceps*) (즉, 촌충) 감염 동안, PD-1 및 PD-L2는 활성화된 대식세포에서 상향 조절되며, CD4+ T 세포는 PD-1을 발현한다. PD-1, PD-L1 또는 PD-L2의 차단은 촌충 감염 마우스로부터 대식세포에 의한 시험관내 T 세포 증식의 억제를 상당히 감소시킨다. 문헌 [Terrazas et al., Int. J. Parasitol. 35: 1349-58 (2005)]. 마우스에서의 쉬스토소마 만소니(*Shistosoma mansoni*) 감염 동안, 대식세포는 높은 수준의 PD-L1 및 보다 미진한 수준의 PD-L2를 발현한다. 항-PD-L1은 이들 대식세포가 시험관내에서 T 세포 증식을 억제하는 능력을 제거하는 반면, 항-PD-L2는 어떤 효과도 없었다. 감염된 마우스로부터의 대식세포에서의 PD-L1 발현은 감염 12 주 후에 감소되었는데, 이는 T 세포 무반응의 중단과 관련이 있다. 문헌 [Smith et al., J. Immunol. 173: 1240-48 (2004)].

[0499] 2. 종양 면역

- [0500] 종양 면역에 대한 경험적 증거에는 (i) 자연 완화의 관찰, (ii) 검출가능하지만 비효과적인 종양에 대한 숙주 면역 반응의 존재, (iii) 면역결핍 환자에서의 1차 및 2차 악성종양의 보급 증가, (iv) 종양 환자에서 증가된 항체 및 T-림프구 수준의 검출, 및 (v) 시험 동물이 다양한 유형의 종양에 대해 면역화될 수 있다는 관찰이 포함된다.

- [0501] 연구들은 대부분의 인간 종양이 T 세포에 의해 인식될 수 있는 종양 관련 항원 (TAA)을 발현하고, 이에 따라 잠재적으로 면역 반응을 유도할 수 있음을 보여준다. 문헌 [Boon et al., Immunol. Today 16:334-336 (1995)]. 암 환자를 TAA 또는 TAA로 펄스된 전문 항원 제시 세포로 백신화하여 초기 상 임상 시험을 개시하였다. 문헌 [Dudley et al., Science 298: 850-854 (2002)]; [Gajewski et al., Clin. Cancer Res. 7: 895s-901s (2001)]; [Marincola et al., Adv. Immunol. 74: 181-273 (2000)]; [Peterson et al., J. Clin. Oncol. 21: 2342-2348 (2003)]. 종양 항원 특이적 CD8+ T 세포의 유도는 많은 시험에서 달성되었다. 문헌 [Mackensen et al., Eur. Cytokine Netw 10: 329-336 (1999)]; [Peterson et al., 상기 문헌]. 또한, 종양 항원 특이적 T 세포를 환자로 입양 전달하였고, 확장된 세포독성 T 림프구 (CTL)가 종양 부위로 귀소하는 것으로 밝혀졌다. 문헌 [Meidenbauer et al., J. Immunol. 170: 2161-2169 (2003)]. 그러나, 면역 이펙터 세포의 종양 침투에도 불구하고, 종양 성장은 좀처럼 제어되지 않았다.

- [0502] 종양 미세환경이 종양 세포를 면역 파괴로부터 보호할 수 있음이 널리 확립되어 있다. 문헌 [Ganss et al., Cancer Res. 58: 4673-4681 (1998)]; [Singh et al., J. Exp. Med. 175: 139-146 (1992)]. 가용성 인자, 뿐만 아니라 형질전환 성장 인자 β (TGF- β), 인터류킨 (IL)-10, 프로스타글란딘 E₂, FASL, CTLA-4 리간드, 종양 괴사 인자-관련 아포토시스-유도 리간드 (TRAIL), 및 프로그램화된 사멸 수용체 리간드 1 (PD-L1, 일명 B7-H1)을 비롯한 막-결합 분자가 종양에 의해 발현되는 것으로 밝혀졌고, 면역 회피를 매개하는 것으로 여겨진다. 이에 따라, 종양 세포에서 이러한 음성 면역 조절 신호를 차단하는 것은 생체내에서 종양-특이적 CD8+ T 세포 면역을 향상시키는 유망한 접근법이다.

- [0503] 많은 종양에서의 PD-L1 발현은 이러한 억제에 대한 성분이며, 다른 면역억제 신호와 협력하여 작용할 수 있다. PD-L1은 T 세포 수용체 신호전달을 음성적으로 조절한다. PD-L1 발현은 광범위한 충실성 종양, 예컨대 유방암, 폐암, 결장암, 난소암, 흑색종, 방광암, 간암, 침샘암, 위장암, 신경교종, 갑상선암, 흉선암, 상피암, 두경부암에서 계내에서 보여진다. 문헌 [Brown et al., J. Immunol. 170: 1257-66 (2003)]; [Dong et al., Nat. Med. 8: 793-800 (2002)]; [Hamanishi et al., PNAS 104: 3360-65 (2007)]; [Strome et al., Cancer Res. 63: 6501-5 (2003)]; [Inman et al., Cancer 109: 1499-505 (2007)]; [Konishi et al., Clin. Cancer Res. 10: 5094-100 (2004)]; [Nakanishi et al., Cancer Immunol. Immunother. 56: 1173-82 (2007)]; [Nomi et al., Clin. Cancer Res. 13: 2151-57 (2004)]; [Thompson et al., PNAS 101: 17174-79 (2004)]; [Wu et al., Acta Histochem. 108: 19-24 (2006)].

- [0504] 또한, 면역학적 염색도 다양한 암에서의 PD-1:PD-L 발현을 보여준다.

- [0505] 흥미롭게도, 암은 또한 만성 염증성 질환으로 특징지어진다. 문헌 [Coussens et al., Nature 420: 860-867 (2002)]. 전세계적으로 최대 15%의 암이 직접적인 감염성 기원을 갖는 한편 (문헌 [Kuper et al., J. Intern. Med. 248: 171-183 (2000)]), 많은 인간 종양은 만성 자극 및 염증과 관련이 있다. 문헌 [Zou et al., Ntu. Rev. Cancer 5: 263-274 (2005)].

- [0506] 종양에서의 PD-L1 발현과 질환 결과의 관련성 연구는 PD-L1 발현이 신장암, 난소암, 방광암, 유방암, 위암 및 췌장암에서의 바람직하지 않은 예후와 강력한 연관성이 있음 (그러나 아마도 소세포 폐암에서는 그렇지 않음)을 보여준다. 문헌 [Hamanishi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 3360-65 (2007)], [Inman et al., Cancer 109: 1499-505 (2007)], [Konishi et al., Clin. Cancer Res. 10:5094-100 (2004)]; [Nakanishi et al., Cancer Immunol. Immunother. 56: 1173-82 (2007)]; [Nomi et al., Clin. Cancer Res. 13: 2151-57 (2007)]; [Thompson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 17174-79 (2004)]; [Wu et al., Acta Histochem. 108: 19-24 (2006)]. 또한, 이러한 연구는 종양에서의 보다 높은 수준의 PD-L1 발현이 종양 병기의 진행 및 보다 깊은 조직 구조로의 침투를 용이하게 할 수 있음을 시사한다.
- [0507] PD-1:PD-L 경로는 또한 혈액 악성종양에서 소정의 역할을 할 수 있다. PD-1 또는 PD-L1은 B 세포 악성종양에서는 거의 발현되지 않지만, PD-L2는 외투 세포 악성종양에서 과다발현된다. 문헌 [Brown et al., 상기 문헌]; [Rosenwald et al., J. Exp. Med. 198: 851-62 (2003)]. PD-L1은 다발성 골수종 세포에서 발현되지만, 정상 형질 세포에서는 발현되지 않는다. 골수종 세포에 반응한 T 세포 확장은 PD-L1 차단에 의해 시험관내에서 향상된다. 문헌 [Liu et al., Blood 110: 296-304 (2007)]. PD-L1은 몇몇 주요 T 세포 림프종, 특히 역형성 대세포 T 림프종에서 발현되고, PD-L1은 회합된 여포성 수지상 세포 네트워크에서 발현된다. 문헌 [Dorfman et al., Am. J. Surg. Pathol. 30: 802-10 (2006)]. 마이크로어레이 분석은 호지킨 림프종에서 종양 관련 T 세포가 계내에서 PD-1 신호에 반응함을 추가로 시사한다. 문헌 [Chemnitz et al., Blood 110: 3226-33 (2007)]. PD-1 및 PD-L1은 HTLV-1 매개 성인 T 세포 백혈병 및 림프종에서 CD4⁺ T 세포에서 발현된다. 문헌 [Shimauchi et al., Int. J. Cancer 121: 2585-90 (2007)]. 이들 종양 세포는 TCR 신호에 대해 저반응성이고, PD-1 차단은 TNF- α 의 발현을 증가시키지만, IFN- γ 은 그렇지 않다. 동물 모델에서의 연구는 종양에서의 PD-L1 발현이 T 세포 활성화 및 종양 세포의 용해를 억제하고, 일부 경우에는 종양 특이적 T 세포 사멸을 증가시키는 밝혀내었다. 문헌 [Dong et al., Nat. Med. 8: 793-800 (2006)]; [Hirano et al., Cancer Res. 65: 1089-96 (2005)].
- [0508] 이에 따라, 본 발명의 항-PD-L1 항체로 PD-L1을 통한 신호전달을 억제하여 T 세포 기능을 향상시키는 것은 종양 면역 약화에 대한 가능성을 보여주며, 그 결과, 암을 효과적으로 치료할 수 있다.
- [0509] F.조합 요법
- [0510] 본 발명의 방법은 조합되거나 부가된 치료 단계로서 또는 치료 제제의 추가의 성분으로서 공지의 만성 감염 또는 암 치료 방법과 조합될 수 있다.
- [0511] 1. 앞:
- [0512] 종양을 퇴치하기 위해 숙주의 면역 기능을 향상시키는 것은 최대 관심 대상이다. 종래의 방법으로는 (i) APC 향상, 예컨대 (a) 종양에 외래 MHC 동종항원을 코딩하는 DNA를 주사하는 것, 또는 (b) 생검 종양 세포를 종양의 면역 항원 인식 확률을 증가시키는 유전자 (예를 들어, 면역 자극 시토카인, GM-CSF, 공동자극 분자 B7.1, B7.2)로 형질감염시키는 것, (iii) 입양 세포 면역요법, 또는 활성화된 종양 특이적 T 세포에 의한 치료가 포함된다. 입양 세포 면역요법은 종양 침윤성 숙주 T-림프구를 단리하는 것, 예컨대 IL-2 또는 종양 또는 둘 모두에 의해 자극하는 것을 통해 시험관내에서 집단을 확장시키는 것을 포함한다. 추가로, 단리된 기능이상 T 세포는 또한 본 발명의 항-PD-L1 항체를 시험관내 적용하는 것에 의해 활성화될 수 있다. 그렇게 활성화된 T 세포를 이어서 숙주에 재투여할 수 있다.
- [0513] 전통적인 암 요법에는 다음과 같은 것이 포함된다: (i) 방사선 요법 (예를 들어, 방사선요법, X선 요법, 조사) 또는 암 세포를 사멸시키고 종양을 수축시키기 위한 이온화 방사선의 사용. 방사선 요법은 외래 빔 방사선요법 (EBRT)을 통해 외부적으로 또는 근접요법을 통해 내부적으로 투여될 수 있다; (ii) 화학요법, 또는 일반적으로 신속하게 분열하는 세포에 영향을 미치는 세포독성 약물의 적용; (iii) 표적화 요법, 또는 제어되지 않은 암 세포의 단백질에 특이적으로 영향을 미치는 작용제 (예를 들어, 티로신 키나제 억제제 이마티닙, 게피티닙; 모노클로날 항체, 광역학 요법); (iv) 면역요법, 또는 숙주 면역 반응의 향상 (예를 들어, 백신); (v) 호르몬 요법, 또는 호르몬의 차단 (예를 들어, 종양이 호르몬 민감성인 경우), (vi) 혈관신생 억제제, 또는 혈관 형성 및 성장의 차단, 및 (vii) 완화 치료, 또는 통증, 메스꺼움, 구토, 설사 및 출혈을 감소시키도록 치료의 질을 개선시키는 치료. 통증 약제, 예컨대 모르핀 및 옥시코돈, 항-구토제, 예컨대 온단세트론 및 아프레피탄트는 보다 적극적인 치료 섭생을 가능하게 할 수 있다.
- [0514] 암을 치료하는데 있어서, 암 면역의 치료를 위한 종전에 기재된 임의의 종래의 치료법을 본 발명의 항-PD-L1 항

체의 투여 이전에, 또는 그에 후속하여, 또는 동시에 수행할 수 있다. 또한, 본 발명의 항-PD-L1 항체를 종래의 암 치료법, 예컨대 중앙 결합 항체 (예를 들어, 모노클로날 항체, 독소 접합된 모노클로날 항체)의 투여 및/또는 화학요법제의 투여 이전에, 또는 그에 후속하여, 또는 동시에 투여할 수 있다.

[0515] 2. 감염:

[0516] 감염 (예를 들어, 급성 및/또는 만성)을 치료하는데 있어서, 본 발명의 항-PD-L1 항체를 투여하는 것은 감염에 대한 천연 숙주 면역 방어를 자극하는 것에 더하여 또는 그를 대신하여 종래의 치료법과 조합될 수 있다. 감염에 대한 천연 숙주 면역 방어로는 염증, 열, 항체-매개 숙주 방어, T-림프구-매개 숙주 방어, 예컨대 림포킨 분비 및 세포독성 T 세포 (특히 바이러스 감염 동안), 보체 매개 용해 및 옹소닌화 (식세포작용을 용이하게 함), 및 식세포작용이 포함되지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 항-PD-L1 항체가 기능이상 T 세포를 재활성화하는 능력은 만성 감염, 특히 완전한 회복을 위해 세포 매개 면역이 중요한 감염을 치료하는데 특히 유용할 것이다.

[0517] a. 박테리아

[0518] 박테리아 감염으로 인한 감염의 경우, 본 발명의 항-PD-L1 항체는 박테리아 감염을 치료하는 표준 요법과 동시에, 또는 그 이전, 또는 그에 후속하여 투여하는 것과 조합될 수 있다. 오늘날 박테리아 감염은 항박테리아 항생제에 의해 가장 흔하게 치료되지만, 또한 면역화된 숙주로부터의 병원체-특이적 항체를 함유하는 혈청이 효과적일 수 있다.

[0519] 독소를 분비하는 결과 병원성인 박테리아 (독소생성 박테리아)의 경우, 불활성 독소에 의한 백신화 및/또는 독소의 독성을 차단하는 치료제를 투여하는 것이 통상적으로 효과적이다 (예를 들어, 폴리클로날 혈청, 항체, 항생제 등). 그러한 유기체로는, 클로스트리디움 종(*Clostridium spp.*), 바실러스 종, 코리네박테륨 종(*Corynebacterium spp.*), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 보르테텔라 페르투스시스(*Bordetella pertussis*), 스탕필로코쿠스 종, 스트렙토코쿠스 종이 포함된다. 또한 그러한 종래의 요법에 전형적으로 반응하는 그람 음성 박테리아로는 엔테로박테리아 (예를 들어, 에스케리키아, 클레브시엘라, 프로테우스, 예르시니아(*Yersinia*), 에르위나(*Erwinia*)), 살모넬라, 및 슈도모나스 아에루기노사가 포함된다. 식세포작용 및 옹소닌화에 내성이 있어서 종종 면역 제거에 더 상당한 시험감염을 방지하는 캡슐화된 박테리아로는 스트렙토코쿠스 종, 헤모필루스 종, 네이세리아 종, 클레브시엘라 종 및 박테로이데스 프라길리스가 포함된다.

[0520] 박테리아는 특정 시험 감염 이후에 혈청 항체 및 보체를 회피하도록 세포에 침투하는 것에 의해 숙주 방어를 회피한다. 이러한 감염의 제거는 거의 전적으로 T-림프구 매개 면역에 의존적이고, 특히 만성 감염화되기 쉽다. 구체적인 예로는 살모넬라 (*S. 티피*, *S. 콜레라수이스*(*S. choleraesuis*), *S. 엔테리티디스*(*S. enteritidis*)), 레지오넬라 종(*Legionella spp.*), 리스테리아 종(*Listeria spp.*), 브루셀라 종(*Brucella spp.*) 및 *M. 튜베르쿨로시스*(*M. tuberculosis*), *M. 아비움*(*M. avium*) 및 *M. 레프래*(*M. leprae*)를 비롯한 미코박테리움이 포함된다.

[0521] 트레포네마 종(*Treponema spp.*), 보렐리아 종(*Borrelia spp.*) 및 렙토스피라 종(*Leptospira spp.*)을 비롯한 스피로헤타는 지속적이고 잠재적인 감염을 유발하는 박테리아이다. 질환 매독의 원인이 되는 병원체인 트레포네마 팔라듐(*Treponema palladium*)은 치료하지 않고 방치할 경우 심각한 병리학적 결과를 가져올 수 있는 성병이다. 이 질환은 특징적 단계를 통해 진행된다. 초기 임상 단계는 매독 점종 부위에서의 궤양 또는 경성 하감이다. 그 이후는 2차 매독으로 알려진 상태에서의, 감염 및 해소 주기가 반복되는 것을 포함하여 스피로헤타 혈증 및 지속적인 미생물 전이 분포 기간이다. 2차 매독의 해소 이후에, 질환은 무증상 잠재기에 진입하며, 이는 심각하고 종종 치명적인 상태인 3차 매독에 이를 수 있다. 3차 매독은 (i) 동맥류가 형성된 대동맥염 및 2차 대동맥관 폐쇄부전으로서의 심장, (ii) 중추신경계 (척수 매독, 진행 마비), (iii) 눈 (간질성 각막염) 또는 (iv) 귀 (신경 난청)를 나타낼 수 있다. 비-성병형은 성병형의 임상 소견과 유사하지만, 주로 직접 접촉 및 불량한 위생에 의해 전파된다. 그러한 것으로 매종 (*T. 팔리둠* subsp. 페르테누에(*T. pallidum* subsp. *pertenue*)), 핀타 (*T. 카라툼*(*T. carateum*)) 및 베젤 (*T. 팔리둠* subsp. 엔데미쿰)이 포함된다.

[0522] 매독의 치료법에는 페니실린 (예를 들어, 페니실린 G.), 테트라시클린, 독시시클린, 세프트리악손 및 아지트로마이신이 포함된다. 본 발명의 항-PD-L1 항체는 잠재적 감염기를 치료하기 위해 가장 유익하게 투여될 것이다.

[0523] 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*)에 의해 유발되는 라임병은 진드기에 물리는 것을 통해 인간에게 전파된다. 이 질환은 처음에 국소적 발진으로 나타났다가, 불쾌감, 열, 두통, 경부 경직 및 관절통을 비롯해서 플루-유사 증상을 나타낸다. 그 이후의 소견으로는 이주성 및 다관절 관절염, 뇌신경 마비 및 신경근병증을 수반한 신경 및 심장 침범, 심근염 및 부정맥이 포함될 수 있다. 라임병의 일부 케이스는 지속화되어, 3차

매독과 유사한 회복 불가능한 손상을 야기한다.

- [0524] 라임병에 대한 현재 요법은 항생제를 투여하는 것을 주로 포함한다. 항생제-내성 균주는 히드록시클로로퀸 또는 메토트렉세이트로 치료할 수 있다. 신경병증성 통증이 있는 항생제 난치성 환자는 가바펜틴으로 치료할 수 있다. 미노시클린은 신경학적 또는 다른 염증 소견을 갖는 후기/만성 라임병에 도움이 될 수 있다. 항-PD-L1 항체는 잠재적 감염기를 치료하기 위해 가장 유익하게 투여될 것이다.
- [0525] 그 밖의 형태의 보렐리아증, 예컨대 B. 레쿠렌티스(*B. recurrentis*), B. 헤름시(*B. hermsii*), B. 튜리카타에(*B. turicatae*), B. 파리카리(*B. parikeri*), B. 히스파니카(*B. hispanica*), B. 듀토니(*B. duttonii*) 및 B. 페르시카(*B. persica*)로 인한 보렐리아증, 뿐만 아니라 렘토스피라병 (예를 들어, L. 인테로간스(*L. interrogans*))은 전형적으로 혈액 역가가 간대성 폐쇄를 유발하는 농도에 이르지 않았다면 자연 해소된다.
- [0526] b. 바이러스
- [0527] 바이러스 원인으로 인한 감염의 경우, 본 발명의 항-PD-L1 항체는 바이러스 감염을 치료하는 표준 요법과 동시에, 또는 그 이전, 또는 그에 후속하여 적용하는 것과 조합될 수 있다. 그러한 표준 요법은 바이러스 유형에 따라 달라지지만, 거의 모든 경우에서 바이러스에 특이적인 항체 (예를 들어, IgA, IgG)를 함유하는 인간 혈청을 투여하는 것이 효과적일 수 있다.
- [0528] 1) 인플루엔자
- [0529] 인플루엔자 감염은 열, 기침, 근육통, 두통 및 불쾌감을 야기하며, 종종 계절 유행성으로 발생한다. 또한 인플루엔자는 수많은 감염후 장애, 예컨대 뇌염, 심근심낭염, 콧속스쉴러 증후군 및 라이에 증후군과 관련이 있다. 인플루엔자 감염은 또한 정상적인 폐의 항박테리아 방어를 억제하여, 인플루엔자로부터 회복된 환자의 박테리아성 폐렴 발생 위험을 증가시킨다.
- [0530] 인플루엔자 바이러스 표면 단백질은 뚜렷한 항원 변이를 나타내는데, 이는 돌연변이 및 재조합으로 인한 것이다. 따라서, 세포용해성 T 림프구는 감염 이후에 바이러스 제거를 위한 숙주의 중요한 비히클이다. 인플루엔자는 3가지 주요 유형: A, B 및 C로 분류된다. 인플루엔자 A는 인간 및 많은 다른 동물 (예를 들어, 돼지, 말, 새 및 물개)을 모두 감염시키고, 유행성 인플루엔자의 주요 원인이라는 점에서 특유하다. 또한, 세포가 2종의 다른 인플루엔자 A 균주에 의해 감염되었을 때, 2종의 모 바이러스 유형의 분절된 RNA 게놈이 복제 동안 혼합되어 하이브리드 복제품을 만들고, 이는 새로운 유행성 균주의 원인이 된다. 인플루엔자 B는 동물에서 복제되지 않아 유전적으로 덜 변이되고, 인플루엔자 C는 오직 단일 혈청형만을 갖는다.
- [0531] 대부분의 종래 요법은 감염으로 인해 야기되는 증상에 대한 일시적인 처방이었고, 실제로 숙주의 면역 반응을 질환을 제거하였다. 그러나, 특정 균주 (예를 들어, 인플루엔자 A)는 보다 심각한 질병 및 사망을 야기할 수 있다. 인플루엔자 A는 바이러스 복제를 억제하는 시클릭 아민 억제제 아다만틴 및 리만타딘을 투여하는 것에 의해 임상적으로 및 예방적으로 모두 치료될 수 있다. 그러나, 이들 약물의 임상적 유용성은 상대적으로 높은 부작용의 발생빈도, 이들의 좁은 항바이러스 범위 (인플루엔자 A 단독), 및 내성을 만드는 바이러스의 경향으로 인해 제한된다. 주요 인플루엔자 표면 단백질, 헤마글루티닌 및 뉴라미니다아제에 혈청 IgG 항체를 투여하는 것은 폐 감염을 방지할 수 있고, 점막 IgA는 상기도 및 기관의 감염을 방지하는데 요구된다. 가장 효과적인 최근의 인플루엔자 치료법은 포르말린 또는 β -프로피올락톤에 의해 불활성화된 바이러스를 투여하여 백신화하는 것이다.
- [0532] 2) 홍역 바이러스
- [0533] 9-11 일의 인큐베이션 이후에, 홍역 바이러스에 의해 감염된 숙주에서는 열, 기침, 코감기 및 결막염이 발생한다. 1-2 일 내에, 홍반, 반점구진성 발진이 발생하며, 이는 전신으로 신속하게 퍼져나간다. 감염은 또한 세포 면역을 억제하기 때문에, 숙주는 중이염, 폐렴 및 감염후 뇌척수염을 비롯하여 박테리아성 중복감염이 발생할 위험이 더 커진다. 급성 감염은 특히 영양이 부족한 청소년에서 현저한 이환률 및 사망률과 관련이 있다.
- [0534] 홍역의 치료법에는 폴링된 인간 IgG를 수동적으로 투여하는 것이 포함되며, 이는 노출 후 최대 한 주가 되었어도 비-면역 대상체에서 감염을 예방할 수 있다. 그러나, 살아있는 약독화 바이러스로 사전 면역화하는 것이 가장 효과적인 치료법이고, 95%를 초과한 면역화 사례에서 질환이 예방된다. 이러한 바이러스는 한가지 혈청형이 존재하므로, 단일 면역화 또는 감염은 전형적으로 평생동안 후속 감염으로부터 보호한다.
- [0535] 감염된 숙주의 적은 비율에서, 홍역이 중추 신경계의 지속적인 감염으로 인한 만성 진행성 신경학적 장애인 SSPE로 발전될 수 있다. SSPE는 비리온 어셈블리 및 출아가 방해된 결함을 갖는 홍역 바이러스의 클론 변이체

에 의해 유발된다. 이러한 환자의 경우, 바이러스 제거를 용이하게 하기 위해 본 발명의 항-PD-L1 항체로 T 세포를 재활성화하는 것이 바람직할 것이다.

[0536] 3) B형 간염 바이러스

[0537] B형 간염 바이러스 (HB-V)는 가장 감염성인 공지된 혈행성 병원체이다. 이는 급성 및 만성 간염 및 간 암종, 뿐만 아니라 일생 동안의 만성 감염의 주요 원인이다. 감염된 이후에 바이러스는 간세포에서 복제하고, 이것은 또한 이어서 표면 항원 HBsAg을 발산한다. 혈청에서 과도한 수준의 HBsAg를 검출하는 것은 B형 간염 감염을 진단하는 표준 방법으로 사용된다. 급성 감염은 해소될 수 있거나, 또는 만성 지속적 감염으로 발전될 수 있다.

[0538] 최근의 만성 HBV 치료법으로는 간세포의 표면에서 클래스 I 인간 백혈구 항원 (HLA)의 발현을 증가시켜 세포독성 T 림프구에 의한 그의 인식을 용이하게 하는 α -인터페론이 포함된다. 추가로, 뉴클레오시드 유사체 간시클로비르, 팜시클로비르 및 라미부딘도 또한 임상 시험에서 HBV 감염을 치료하는데 있어서 일부 효능을 나타내었다. HBV의 추가의 치료법으로는 PEG화된 α -인터페론, 아데포비르, 엔테카비르 및 텔바이부딘이 포함된다. 항-HBsAg 혈청 항체의 모 투여를 통해 수동 면역이 부여될 수 있고, 불활성화되거나 재조합 HBsAg에 의한 백신화도 또한 감염에 대한 내성을 부여한다. 본 발명의 항-PD-L1 항체는 치료상 이점을 위해 B형 간염 감염의 종래 치료법과 조합될 수 있다.

[0539] 4) C형 간염 바이러스

[0540] C형 간염 바이러스 (HC-V) 감염은 만성 형태의 감염으로 이어져 간경변증을 야기할 수 있다. 증상은 B형 간염으로 인한 감염과 유사하지만, HB-V와 뚜렷하게 대조적으로, 감염된 숙주는 10-20 년간 증상이 없을 수 있다. HC-V 감염의 치료법으로는 α -인터페론 및 리바비린의 조합 투여가 포함된다. HC-V 감염의 가능한 잠재적인 요법은 프로테아제 억제제 텔라프레비르 (VX-960)이다. 추가의 치료법으로는 항-PD-1 항체 (MDX-1106, 메다렉스 (Medarex)), 바비투시맵 (B2-당단백질 I 의존적 방식으로 음이온 인지질 포스파티딜세린에 결합하는 항체, 페레그린 파마슈티칼스(Peregrine Pharmaceuticals)), 항-HPV 바이러스 코트 단백질 E2 항체(들) (예를 들어, ATL 6865 - Ab68 + Ab65, XTL 파마슈티칼스) 및 시바시르[®] (폴리클로날 항-HCV 인간 면역 글로불린)이 포함된다. 본 발명의 항-PD-L1 항체는 치료상 이점을 위해 이러한 하나 이상의 C형 간염 감염 치료법과 조합될 수 있다.

[0541] C형 간염 감염을 특이적으로 치료하기 위해 본 발명의 항-PD-L1 항체와 함께 사용될 수 있는 프로테아제, 폴리머라제 및 NS5A 억제제에는 이하의 표 B에서 확인되는 것들이 포함된다.

[0542] <표 B>

C형 간염 프로테아제 및 폴리머라제 억제제

억제제의 유형	억제제 명칭	제조사(들)
프로테아제	R7227/ITMN 191	로슈/인터문
	CTS-1027	로슈 바이오사이언시즈
	VX500, VX813, VX985	베르텍스
	텔라프레비르 (VX950)	베르텍스/티보텍
	TMC435350/TMC 435	메디버/티보텍
	보세프레비르(SCH503034), 나트라프레비르 (SCH900518/SP900518)	쉐링-플라우
	BI201335, BILN 2061	베링거 잉겔하임
	MK7009	머크
	IDX-136, IDX-316	이테닉스
	BMS-790052, BMS-791325	브리스톨 마이어스 스쿼브
	PHX-1766	페노믹스
	ACH-806	아킬리온/길리아드
	ACH-1625	아킬리온
	ABT-450	애보트 랩스
	VBV 376	비로베이
폴리머라제 억제제	R1626	로슈
	R7128	로슈/파마셋
	NM283	이테닉스
	HCV796	와이어쓰
	BILB 1941, BI-207127	베링거 잉겔하임
	GL60667, GS9190	길리아드
	PF-00868554	화이자
	VCH757, VCH916	비로켄
	VX222, VX759	베르텍스
	MK-3281	머크
	ANA598	아나디스
	IDX184, IDX375	이테닉스
	PSI-7851	파마셋
	ABT-072, ABT-333	애보트 랩스
	BMS650032	브리스톨 마이어스 스쿼브
NS5A 억제제	BMS790052, BMX824393	브리스톨 마이어스 스쿼브
	AZD 2836, AZD 7295	애로우 테라퓨틱스
	GSK 625433	글락소 스미스 클라인

[0543]

[0544] 5)인간 면역결핍 바이러스 (HIV)

[0545] HIV는 T-림프구, 단핵구-대식세포, 여포성 수지상 세포 및 랑게르한스 세포를 비롯하여 CD4+ 세포를 공격하고, CD4+ 헬퍼/유도 세포를 고갈시킨다. 그 결과, 숙주는 세포 매개 면역에 있어서 심각한 결함을 갖게 된다. HIV에 의한 감염은 적어도 50%의 개체에서 AIDS를 야기하며, 성적 접촉, 감염된 혈액 또는 혈액 제제의 투여, 감염된 정액에 의한 인공 수정, 혈액 함유 바늘 또는 시린지에의 노출 및 분만 동안 감염된 모체로부터 신생아로의 전파를 통해 전파된다.

[0546] HIV에 감염된 숙주는 증상이 없을 수 있거나, 또는 단핵구증과 유사한 급성 질병 - 열, 두통, 인후통, 불쾌감 및 발진으로 발전할 수 있다. 증상은 지속적인 열, 야간 발한, 체중 감소, 설명이 어려운 설사, 습진, 건선, 지루성 피부염, 대상 포진, 경구 칸디다증 및 구강모 백반증을 비롯한 진행성 면역 기능장애로 진행될 수 있다. 감염이 AIDS로 발전된 환자에서 다수의 기생충에 의한 기회 감염이 흔하다.

[0547] HIV의 치료법으로는 항바이러스 요법, 예컨대 뉴클레오시드 유사체, 지도부딘 (AST) (단독 또는 디다노신 또는 잘시타빈과 조합된 것), 디데옥시시노신, 디데옥시시티딘, 라미부딘, 스타부딘; 역 전사 억제제, 예컨대 텔라비르딘, 네비라핀, 로비리드 및 프로테아제 억제제, 예컨대 사퀴나비르, 리토나비르, 인디나비르 및 넬피나비르가 포함된다. 본 발명의 항-PD-L1 항체는 치료상 이점을 위해 종래의 HIV 감염 치료법과 조합될 수 있다.

[0548] 6)시토메갈로바이러스

[0549] 시토메갈로바이러스 (CMV) 감염은 종종 지속적이고, 잠재적이고, 재발하는 감염과 관련이 있다. CMV는 단핵구

및 과립구-단핵구 전구 세포를 감염시켜 그 안에 잠재해 있다. CMV의 임상 증상으로는 단핵구증-유사 증상(즉 열, 선의 비대, 불쾌감) 및 항생제에 대해 알레르기성 피부 발진으로 발전되는 경향이 포함된다. 바이러스는 직접 접촉에 의해 전파된다. 바이러스는 소변, 타액, 정액 및 보다 낮은 정도로 다른 체액에 존재한다. 전파는 또한 감염된 모체로부터 그녀의 태아 또는 신생아에게 일어날 수 있고, 수혈 및 장기 이식에 의해 일어날 수 있다. CMV 감염은 비특이적 미토겐 및 특이적 CMV 항원에 대해 손상된 배자발생 반응, 감소된 세포독성 능력 및 CD4+ 림프구의 CD8 림프구 개수의 증가를 특징으로 하는, 일반적인 세포 면역 손상을 야기한다.

[0550] CMV 감염의 치료법으로는 항바이러스 간시클로비르, 포스카르넛 및 시도비르가 포함되지만, 이들 약물은 전형적으로 면역손상 환자에게만 처방된다. 본 발명의 항-PD-L1 항체는 치료상 이점을 위해 종래의 시토메갈로바이러스 감염 치료법과 조합될 수 있다.

[0551] 7)엡스타인-바르 바이러스

[0552] 엡스타인-바르 바이러스 (EBV)는 지속적이고 잠재적인 감염을 확립할 수 있고, 주로 B 세포를 공격한다. EBV에 의한 감염은 감염성 단핵구증의 임상 상태를 야기하며, 그러한 것으로 열, 인후증(종종 삼출물이 포함됨), 전신 림프절염 및 비장 비대증이 포함된다. 또한 간염이 있을 수 있으며, 이는 황달로 발전할 수 있다.

[0553] EBV 감염의 전형적인 치료법은 증상의 완화이지만, EBV는 특정 암, 예컨대 버킷의 림프종 및 비인두 암의 발생과 관련이 있다. 따라서, 이러한 합병증 결과 이전에 바이러스 감염을 제거하는 것이 더 유익할 것이다. 본 발명의 항-PD-L1 항체는 치료상 이점을 위해 종래의 엡스타인-바르 바이러스 감염 치료법과 조합될 수 있다.

[0554] 8)헤르페스 바이러스

[0555] 단순 포진 바이러스 (HSV)는 감염된 숙주와의 직접 접촉에 의해 전파된다. 직접 감염은 증상이 없을 수 있지만, 전형적으로 감염된 입자를 함유하는 수포를 야기한다. 질환은 질환의 활성기의 주기로서 나타나고, 바이러스가 잠재적으로 신경절을 감염시키고 후속 발병함에 따라 병변이 생겼다가 사라진다. 병변은 얼굴, 생식기, 눈 및/또는 손에 생길 수 있다. 일부 경우에서, 감염은 또한 뇌염의 원인이 될 수 있다.

[0556] 헤르페스 감염의 치료법은 주로 증상 발생을 해소하는 것에 관한 것이고, 전신 항바이러스성 의약, 예컨대: 아시클로비르(예를 들어, 조비락스®), 발라시클로비르, 팜시클로비르, 펜시클로비르 및 국소 약제, 예컨대 도코사놀(아브레바®), 트로만타딘 및 질락틴이 포함된다. 헤르페스의 잠재적인 감염의 제거는 임상적 이점이 클 것이다. 본 발명의 항-PD-L1 항체는 치료상 이점을 위해 종래의 헤르페스 바이러스 감염 치료법과 조합될 수 있다.

[0557] 9)HTLV

[0558] 인간 T-림프구 친화성 바이러스 (HTLV-1, HTLV-2)는 성적 접촉, 모유 수유 또는 오염된 혈액에의 노출을 통해 전파된다. 바이러스는 Th1 세포라 불리는 Th 세포의 하위 세트를 활성화하여, 과다증식하고 Th1 관련 시토카인(예를 들어, IFN- γ 및 TNF- α)을 과다생산한다. 이는 결과적으로 Th2 림프구의 억제 및 Th2 시토카인 생산(예를 들어, IL-4, IL-5, IL-10 및 IL-13)의 감소를 야기하여, 제거를 위해 Th2-의존성 반응을 필요로 하는 유기체의 침입에 대해 감염된 숙주가 적절한 면역 반응을 개시하는 능력을 감소시킨다(예를 들어, 기생충 감염, 점막성 및 체액성 항체의 생산).

[0559] HTLV 감염은 기회 감염을 유발하여 스타필로코쿠스 종 및 스트렙토코커스 종(*Strongyloides spp.*)에 의한 기관지확장증, 피부염 및 중복감염을 야기하고, 다균성 패혈증으로 인해 사망에 이르게 한다. HTLV 감염은 또한 성인 T 세포 백혈병/림프종 및 HAM/TSP로 알려진 점진적 탈수성 상위 운동 신경 질환을 직접적으로 유발할 수 있다. HTLV 잠재적 감염을 제거하는 것은 임상적 이점이 클 것이다. 본 발명의 항-PD-L1 항체는 치료상 이점을 위해 종래의 HTLV 감염 치료법과 조합될 수 있다.

[0560] 10)HPV

[0561] 인간 파필로마 바이러스 (HPV)는 주로 각질세포에 영향을 미치고, 두 가지 형태로 피부 및 생식기에서 발생한다. 이는 직접 접촉 및/또는 성활동을 통해 전파되는 것으로 여겨진다. 피부 및 생식기 HPV 감염은 둘 모두, 사마귀 및 잠재적인 감염 및 때때로 재발하는 감염을 야기할 수 있으며, 이는 증상을 조절하고 사마귀의 외관을 차단하는 숙주 면역에 의해 조절되지만, 숙주가 타인에게 감염을 전파할 수 있는 능력은 남는다.

[0562] HPV에 의한 감염은 또한 특정 암, 예컨대 자궁경부암, 항문암, 외음부암, 음경암 및 구인두암을 유발할 수

있다. HPV 감염에 대한 치유법은 공지되어 있지 않지만, 최근의 치료법은 이미퀴모드를 국소적으로 적용하는 것으로, 이는 침범된 영역을 공격하도록 면역계를 자극한다. HPV 잠재적 감염을 제거하는 것은 임상적 이점이 클 것이다. 본 발명의 항-PD-L1 항체는 치료상 이점을 위해 종래의 HPV 감염 치료법과 조합될 수 있다.

[0563] c. 진균

[0564] 진균 감염, 또는 진균증은 1차적 감염으로서 또는 내인성 균무리에 의해 손상된 면역계를 가진 숙주의 기회적 콜로니화로서 발생할 수 있다. 진균증에 대한 면역은 주로 호중구, 대식세포, 림프구 및 아마도 자연 살해(NK) 세포를 포함해서 세포성이다. 진균증은 전형적으로 항체 및 보체에 의한 직접 사멸에 대해 영향을 받지 않는다. 1차 감염으로 인해 야기되는 전신 침습적 진균증에는 블라스토미세스증, 콕시디오이데스진균증, 히스토플라스마증, 및 파라콕시디오이데스진균증이 포함된다. 진균 감염으로 인한 만성 감염의 경우, 본 발명의 항-PD-L1 항체는 이러한 진균증에 대한 종래의 공지된 임의의 치료법 이전에, 또는 그와 동시에, 또는 그 이후에 투여될 수 있다.

[0565] 블라스토미세스 데르마티티스(*Blastomyces dermatitis*)에 의해 유발되는 블라스토미세스증은 흡입에 의해 발생하고, 1차 폐 감염 또는 대개 피부, 골 및 남성 비뇨생식관을 포함한 혈행성 파종 질환을 야기한다. 1차 노출은 증상이 없을 수 있거나, 또는 인플루엔자와 유사한 증후군을 야기할 수 있다. 이러한 질환은 만성 무통성 형태로 나타날 수 있다. 이 질환은 또한 AIDS 환자에서와 같이 손상된 면역과 관련이 있다. 종래의 B. 데르마티티스 감염 요법으로는 이트라코나졸, 케토코나졸 또는 암포테리신 B의 정맥내 주사가 포함된다.

[0566] 콕시디오이데스 이미티스(*Coccidioides immitis*)에 의해 유발되는 콕시디오이데스진균증은 흡입에 의해 발생하고, 1차 폐 감염, 진행성 폐 질환, 또는 대개 피부, 피하 조직, 골, 관절, 및 뇌막을 포함한 혈행성 파종 질환을 야기할 수 있다. 1차 노출은 증상이 없을 수 있거나 (60%) 또는 인플루엔자와 유사한 증후군과 관련이 있을 수 있다. 폐렴, 흉막염 및 폐 공동화가 발생할 수 있다. 전이성 소견에는 피부 병변, 예컨대 결절, 궤양, 보다 깊은 부위에서의 배농루 및 사마귀형 육아종, 골, 관절, 건초 및 수막, 예컨대 수막염이 포함된다. 상기 질환은 또한 AIDS 환자에서와 같이 손상된 면역과 관련이 있다. 콕시디오이데스진균증의 치료법은 케토코나졸, 이트라코나졸 및 플루코나졸, 특히 비수막 질환의 장기간 유지 요법을 포함한다. 수막 형태는 통상적으로 암포테리신 B의 정맥내 투여에 의해 치료된다.

[0567] 히스토플라스마 카프슐라툼(*Histoplasma capsulatum*)에 의해 유발되는 히스토플라스마증은 작은 효모가 대식세포에 존재하는, 흡입에 의해 발생하는 세망내피계 질환이다. 이는 1차 폐 감염, 진행성 폐 질환 또는 대개 세망내피계, 점막 표면 및 부신을 포함한 혈행성 파종 질환을 유발할 수 있다. 잠재적인 감염의 재활성화는 종종 손상된 면역을 갖는 환자, 예컨대 AIDS 환자에서 발생한다. 1차 노출은 증상이 없을 수 있거나, 또는 폐렴, 흉막염, 폐 공동화 및 종격동 림프절증을 비롯한 플루-유사 증후군과 관련이 있을 수 있다. 전위 부위로는 세망내피계 (간비종대, 림프절증, 빈혈, 백혈구감소증 및 혈소판감소증), 점막 (구비강인두 궤양), 위장관 (흡수불량) 및 부신 부전이 포함된다. 대부분의 1차 감염이 자연적으로 해소되지만, AIDS 환자에서와 같이 손상된 면역계와 관련된 경우 계속 재발되며, 종종 혈행성 폐렴, ARDS, 파종성 혈관내 응고 (DIC), 혈행성 분포 구진농포 및 수막염과 관련된다. 히스토플라스마증은 암포테리신 B (특히 급성 혈행성 파종으로 인해 병든 면역손상 환자의 경우), 이트라코나졸 및 케토코나졸에 의해 치료된다.

[0568] 파라콕시디오이데스 브라질리엔시스(*Paracoccidioides brasiliensis*)에 의해 유발되는 파라콕시디오이데스진균증은 1차 폐 감염 또는 대개 피부, 점막, 세망내피계 및 부신을 포함한 혈행성 파종 질환을 생성할 수 있는, 흡입에 의해 발생하는 진균증이다. 감염은 초기에 증상이 없을 수 있지만, 휴면기에 이어 부활할 수 있다. 이러한 감염의 치료법은 케토코나졸, 이트라코나졸 및 술폰아미드를 이용한다.

[0569] 면역손상된 숙주에서 발생하는 기회 병원체로 인한 전신 침습적 진균증으로는 칸디다증, 크립토코쿠스증, 아스페르길루스증, 모균증 및 폐포자충증이 포함된다. 손상된 면역계에서 면역 반응을 강화시키는 것에 의해, 본 발명의 항-PD-L1 항체는 또한 특히 종래의 요법과 조합된 경우에 이들 상태를 치료하는데 치료상 가치를 가질 수 있다.

[0570] 칸디다증 (칸디다 알비칸스, *C. 트로피칼리스*(*C. tropicalis*), *C. 글라브라타*(*C. glabrata*)에 의한 것), 크립토코쿠스증 (크립토코쿠스 네오포만스(*Cryptococcus neoformans*)에 의한 것), 아스페르길루스증 (아스페르길루스 플라부스(*Aspergillus flavus*), *A. 퍼미가터스*(*A. fumigatus*), *A. 테레우스*(*A. terreus*) 및 *A. 니게르*(*A. niger*)에 의한 것) 및 모균증 (리조푸스 아르히주스(*Rhizopus arrhizus*), 리조뮤코(*Rhizomuco*), 아브시디아(*Absidia*), 쿠닝하멜라(*Cunninghamella*), 모르티에렐라(*Mortierella*), 사케세나에아 종(*Saksenaea spp.*)에 의

한 것)의 치료는 하나 이상의 다음과 같은 이미다졸, 케토코나졸, 인트라코나졸, 플루코나졸, 암포테리신 B (플루시토신을 함유하거나 함유하지 않음)로 치료할 수 있다. 최근 원생동물에서 진균으로 재분류된 폐포자충증 (뉴모시스티스 카르니(*pneumocystis carinii*)에 의한 것)은 트리메토프림-술파메복사졸 (TMP-SMZ) 및 정맥내 펜다미딘 이세티오네이트, 뿐만 아니라 답손, TMP-답손, 트리메트렉세이트, 클린다마이신-프리마퀸 및 아토바그논으로 치료한다.

[0571] 미포자충류 기생충에 의해 유발되는 미포자충증이 최근에 원생동물로부터 진균으로 재분류되었다. 이는 미토콘드리아 대신 미토솜을 갖는 단세포 유기체이다. 인간에서 질환을 유발할 수 있는 유기체로는 엔테로시토존 비에뉴시(*Enterocytozoon bieneusi*), 엔세팔리토존 헬렘(*Encephalitozoon hellem*), 엔세팔리토존 인테스티날리스(*Encephalitozoon intestinalis*), 엔세팔리토존 쿠니쿨리(*Encephalitozoon cuniculi*), 플리스토포라속 종(*Pleistophora spp.*), 트라키플레이스토포라 호미니스(*Trachipleistophora hominis*), 트라키플레이스토포라 안트로포프테라(*Trachipleistophora anthropophthera*), 노세마 콘노리(*Nosema connori*), 노세마 오쿨라룸(*Nosema ocularum*), 브라키올라 베시쿨라룸(*Brachiola vesicularum*), 비타포르마 코르니아에(*Vittaforma corneae*), 마이크로스포리둠 세일로넨시스(*Microsporidium ceylonensis*), 마이크로스포리둠 아프리카눔(*Microsporidium africanum*), 브라키올라 알게라에(*Brachiola algerae*)가 포함된다.

[0572] 감염은 동물, 오염된 물, 또는 다른 감염된 숙주와 직접 접촉하는 것으로부터 인간에게 전파되는 것으로 생각된다. 숙주 세포를 감염시킨 후, 포자 원형질이 성장하여 다핵 플라스포둠으로 분열되거나 그것을 형성하여, 무성 생식 및 유성 생식을 둘 모두 포함한 복잡한 수명 주기를 가질 수 있다. 연속 생식에 의한 자체 감염 및 만성, 소모성 질환은 종종 미포자충 감염의 특징이 된다.

[0573] 상기 질환의 임상 소견은 종 및 숙주의 면역 상태에 따라 다양할 수 있으며, 결막염 (예를 들어, V. 코르니아에), 만성 설사, 흡수불량 및 소모 (예를 들어, E. 비에뉴시, E. 인테스티날리스)가 포함된다.

[0574] 안구, 장 및 과중성 소포자균증의 치료법으로는 알벤다졸의 투여가 포함된다. 푸마질린의 국소 적용은 미포자충 각결막염을 치료하는데 효과적으로 사용될 수 있다. 그 밖의 약물로는 구충제 (예를 들어, 알벤다졸), 항생제 (예를 들어, 푸마질린), 면역조절제 (예를 들어, 탈리도미드), 항원생동물제 (예를 들어, 메트로니다졸)가 포함된다.

[0575] d. 원생동물

[0576] 기생충 장애로 인한 질환, 예컨대 말라리아, 주혈흡충증 및 리슈마니아증은 개발 도상국에서 가장 보편적이고 중요한 보건 문제 중 하나이다. 이러한 질환은 이들이 1) 숙주 세포 안에서 생존하고 (예를 들어, 리슈마니아증), 2) 표면 항원을 신속하게 변화시키고 (예를 들어, 과동편모충증) 및 3) 숙주 항원을 내보이는 것에 의해 그 자신을 숙주 세포로 "위장하는" 것 (예를 들어, 주혈흡충증)을 비롯한 다양한 방법으로 숙주 면역을 피할 수 있기 때문에 특정한 도전을 제시한다. 장기 이식과 함께, 암 뿐만 아니라 세계적으로 유행하는 AIDS의 치료를 위해 면역억제 약물을 사용하는 것은 플라스포둠 종(*Plasmodium spp.*), 톡소플라즈마 종(*Toxoplasma spp.*), 리슈마니아 종(*Leishmania spp.*), 크립토스포리디움 종(*Cryptosporidium spp.*), 트립노소마 종(*Trypanosoma spp.*) 및 연충류로 인한 잠재적이거나 무증상인 감염을 재활성화시킬 수 있다.

[0577] 원생동물성 기생충에 의한 감염으로 인해 야기된 만성 감염의 경우, 본 발명의 항-PD-L1 항체를 표준 항-원생동물 요법과 함께, 또는 그 이전에 또는 그에 후속하여 투여하는 것에 의해 조합할 수 있다.

[0578] 속 플라스포둠 (예를 들어, P. 오발레(*P. ovale*), P. 말라리아에(*P. malariae*), P. 팔시파룸(*P. falciparum*), P. 비박스(*P. vivax*))의 기생충에 의해 유발되는 말라리아는 암컷 열록날개모기속 모기의 소화관에서 발생된 포자소체로서 감염 주기를 시작한다. 인간에게 전파되면, 이들 포자소체는 염증 반응을 유도하지 않고 간 세포 내에 침투하여 증식한다. 분열소체라 불리는 이러한 유기체의 자손은 이어서 적혈구 세포에 침투하고, 전형적으로 열 및 한기를 특징으로 하는 질환의 임상학적 단계를 개시한다. 감염이 풍토성인 세계의 지역에서, 거의 모든 거주자들은 낮은 범위에서 중간 범위의 병원성을 갖는 계속적으로 낮은 수준의 만성 감염을 보유하며, 증가되는 IgG 항체의 수준은 분열소체가 적혈구로 진입하는 것으로부터 보호한다.

[0579] 임상 질환의 치료 및 예방 둘 모두를 위한 최근의 이용가능한 항-말라리아 약물로는 아르테메테르-루메판트린 (요법, 예를 들어, 코아르템[®] 및 리아메트[®]), 아르테수네이트-아모디아킨 (요법), 아르테수네이트-메플로퀸 (요법), 아르테수네이트-술파독신/피리메타민 (요법), 아토바쿠온-프루구아닐 (요법 및 예방, 예를 들어, 말라론[®]), 퀴닌 (요법), 클로로퀸 (요법 및 예방), 코트리파지드 (요법 및 예방), 독시시클린 (요법 및 예방), 메플로

퀸, (요법 및 예방, 예를 들어, 라리암[®]), 프리마퀸 (P. 비박스 및 P. 오발레에 대한 요법만; 예방은 안됨), 프 로구아닐 (예방), 술파독신-피리메타민 (요법 및 예방), 히드록시클로로퀸 (요법 및 예방, 예를 들어, 플라켈닐[®])이 포함된다.

[0580] 무반응성 T 세포를 재활성화하는 것을 통해, 본 발명의 항-PD-L1 항체는 말라리아 기생충을 제거하는데 도움이 되는 특정 치료제일 수 있다.

[0581] 숙 톡소플라스마 기생충에 의해 유발되는 톡소플라스마증은 종종 증상이 없지만, 작은 분획이 임상 질환으로 발 전할 수 있고, 그 범위는 양성 급성 림프절증에서 중추 신경계의 치명적 감염에 이를 수 있다. 감염의 공급원 으로는 날것인 또는 부분적으로 요리된 돼지 또는 양고기 내의 포낭 및 감염된 고양이 배설물을 통과한 충란 이 포함된다. 감염은 인간에서 통상적으로 위장관을 통해 일어나고, 원생동물은 실질적으로 모든 체내 세포에 침입하여 (타키조이트로서) 증식할 수 있다. 이러한 타키조이트는 매우 천천히 성장하는 감염체 (브라디조이트)로 채워진 낭포를 생성할 수 있고, 이것은 장기간 생존한 채로 남아 잠재적인 만성 감염을 야기 할 수 있다. 면역계가 손상된 숙주, 예컨대 면역억제 약물을 처방받았거나 HIV에 걸린 숙주는 특히 톡소플라스 마증에 걸리기 쉽다.

[0582] 1차 톡소플라스마증을 치료하는데 사용되는 약제로는 다음과 같은 것들이 포함된다: 항생제 (예를 들어, 술파디 아진, 클린다마이신, 스피라마이신 및 미노시클린)를 수반할 수도, 수반하지 않을 수도 있는 피리메타민. 잠재 적인 톡소플라스마증은 클린다마이신을 함유할 수도, 그렇지 않을 수도 있는 항생제 아토바쿠온에 의해 치료될 수 있다.

[0583] 숙 리슈마니아의 기생충에 의해 유발되는 리슈마니아증은 피부와 내장의 대식세포를 감염시키고, 모래파리를 통 해 인간에게 전파된다. 특이적인 혈청 항체가 거의 또는 전혀 존재하지 않기 때문에, 활성화된 T 세포를 통한 세포 매개 면역이 감염을 제거하는 중요한 경로인 것으로 보인다. 열대성 궤양으로도 알려져 있는 구세계 리슈 마니아증은 몇몇 리슈마니아 종에 의해 유발된다: L. 트로피카(*L. tropica*), L. 메이저(*L. major*) 및 L. 아에티 오피카(*L. aethiopica*). 신세계 리슈마니아증은 L. 멕시코나(*L. Mexicana*) 및 L. 브라질리엔시스(*L. braziliensis*)의 다양한 아종에 의해 유발된다. 이러한 기생충들은 강력한 세포 매개 면역 반응을 유도하지만, 임상 질환의 결과도 또한 숙주 반응을 일부 야기한다. 숙주가 억제되거나 부적당한 세포 매개 반응을 시작하면, 자연 치유를 거의 바랄 수 없는 미만성 만성 피부 리슈마니아증으로 된다 (예를 들어, L. 아에티오피 카, L. 멕시코나). 숙주가 과잉의 세포 매개 반응을 시작하면, 그 반응은 1차 병변의 가장자리에서 나타나는 비궤양성 림프소절이 지속되는 낭창양 또는 재발성 리슈마니아증이다 (예를 들어, L. 트로피카). 재발성 리슈 마니아증은 초기 병변 이후 1 내지 10년 간 나타날 수 있다. 피부형 및 내장형의 2 형태의 질환이 존재하며, 세포 매개 면역에 의해 피부 병변을 나타내는 피부형이 제거에 있어서 중요하다. 내장형에서 세포 매개 면역은 불충분하거나 존재하지 않고, 상기 질환은 임상적으로 폴리클로날 B 세포 고감마글로불린혈증, 백혈구감소증, 비장비대증 및 TNF- α 의 상승된 생산을 보인다.

[0584] 밀테포신 (예를 들어, 임파비도[®]) 및 파라미오신은 피부 및 내장 리슈마니아증 둘 모두에 대해 최근 이용가능한 치료법이다.

[0585] 숙 크립토스포리디아의 원생동물로부터의 감염에 의해 유발되는 크립토스포리디움증은 감염된 숙주의 대변 배설 물과 인간의 직접 접촉으로 인해 야기된다. 장 점막 조직의 감염은 설사를 유발할 수 있다. 상기 질환은 전형 적으로 급성 감염으로 나타나지만, 특히 면역손상된 개체에서는 만성화될 수 있다. 치료는 전형적으로 임시방 편인 것으로 특히 수화작용이지만, 파로모마이신, 아지트로마이신 및 혈청 Ig (예를 들어, 락토빈-R[®])가 성공적 으로 감염을 제거하였다.

[0586] 기생충 트리파노소마 (예를 들어, T. 부루세이, subsp. 감비엔스, 로데시엔스)에 의해 유발되는 트리파노소마증 은 체체파리가 무는 것을 통해 인간 및 소를 감염시킨다. 이러한 병원체가 제시하는 도전은 다양한 표면 항원 을 나타내는 집단의 연속 생성으로 인한 것이다. 감염은 비특이적이고 비보호적인 혈청 이뮤노글로불린의 상승 된 수준을 특징으로 한다.

[0587] 트리파노소마증의 치료법으로는 다음과 같은 펜다미딘 (T.b. 감비엔스용), 정맥내 수라민 (T.b. 로데시엔스용), 에플로르니틴, 펠라르소프롤 (니푸르티목스와 함께 할 수도, 함께 하지 않을 수도 있음)의 정맥내 투여를 포함 한다.

[0588] 흡충류 (예를 들어, 스키토소마 종(*Schistomsoma spp.*), 촌충류 및 선충류로 인한 연충 감염은 T 세포 의존적

반응인 호산구증가증 및 감각 항체의 공통 면역 반응을 공유한다.

- [0589] 스킴스토소마 만소니(*Shistosoma mansoni*), S. 자포니쿰(*S. japonicum*), S. 해마토비움(*S. haematobium*) 및 S. 메콩기(*S. mekongi*)에 의해 유발되는 주혈흡충증 (일명 주혈흡충병)은 그 수명 주기를 물 속 알로서 시작했다고 미라시디아로 부화되고, 이것이 달팽이를 통과하여 포자낭을 다중 생성한다. 이어서, 이는 두 갈래 꼬리의 세르카리아를 생성하며, 스킴스토소플라로서 인간 숙주의 혈류를 감염시킬 수 있고, 이는 처음에 폐로 이동했다가 간으로 이동한다. 이들 흡충은 종내에는 쌍을 형성하고, 짝짓기를 하고, 장간막 세정맥에 알을 낳는다. 이러한 많은 알들이 장을 경유하여 배설되는 동안, 일부는 점막하층, 간의 문 세정맥, 및 그 밖의 신체 장기에 포획된다. 포획된 알과 관련된 육아종성 염증은 만성 주혈흡충증의 결정적인 증상이다.
- [0590] 주혈흡충증의 치료법으로는 프라지판텔®, 안티몬, 옥삼니퀸 (S. 만소니) 및 미라지드®의 투여가 포함된다.
- [0591] 촌충류 감염은 2개의 군으로 분류될 수 있고, 그 하나는 장 거주 성충, 예컨대 광절열두조충 및 무구조충으로, 제한된 비-체액성 면역 효과를 갖는다. 두번째 그룹은 이동성 조직 포낭형 애벌레 촌충, 예컨대 왜소조충, 단방조충 및 유구조충으로, 이들은 강력한 비경구 숙주 반응 및 보호적 혈청 항체를 유도한다. 인간에서 가장 심각한 촌충류 감염은 포충증으로, 이것이 간, 폐, 뇌, 신장 또는 다른 신체 일부에 이식될 경우, 포충낭을 형성할 수 있다.
- [0592] 포충증의 치료법으로는 메트로니다졸, 알벤다졸의 투여 및 수술적 개입, 예컨대 제거, 흡인, 조대술 또는 그물막고정술이 포함된다.
- [0593] 선충류는 인간을 감염시키는 가장 흔하고 널리 분포된 연충으로, 선모충증, 회충증, 사상충증 및 분선충증과 같은 장애를 유발한다. 선모충에 의해 유발되는 선모충증은 날고기 또는 부분적으로 요리된 고기, 예컨대 돼지에서 *T. 스피랄리스*(*T. spiralis*)의 애벌레를 섭취하는 것으로 인해 야기될 수 있다. 인간에서, 감염은 상승된 IgM 생산에 이어 IgG를 생산하게 한 후, 이어서 T 림프구에 의해 항체-손상된 유충이 신속하게 배출되게 하는 강력한 체액 반응을 유도한다.
- [0594] 장내에서 성충을 사멸시키는 것으로 공지된 유일한 치료법은 티아벤다졸이고, 애벌레를 사멸시키는 치료법은 공지되어 있지 않다.
- [0595] 회충으로도 알려져 있는 아스카리스 (아스카리스 룬브리코이데스(*Ascaris lumbricoides*))는 배설물에 의해 오염된 물질의 섭취로 인해 생기는 인간에서 흔한 기생충이다. 환자가 매우 오랜 기간 동안 증상이 없는 채로 있을 수 있지만, 유생 단계가 신체를 통과함에 따라 이는 내장 손상, 복막염 및 염증, 간 또는 비장의 비대, 독성 및 폐렴을 유발할 수 있다.
- [0596] 회충증의 치료법으로는 메벤다졸 (예를 들어, 벌목스®), 피페라진, 피란텔 파모에이트 (예를 들어, 안티민스®, 핀-리드®, 핀-X®), 알벤다졸, 티아벤다졸 (피페라진과 함께 또는 따로), 핵실레소르시놀, 산토닌 및 케노포디움 오일을 투여하는 것이 포함된다. 본 발명의 항-PD-L1 항체는 회충증을 치료하기 위한 상기 요법을 투여하는 것과 함께, 또는 그 이전에 또는 그에 후속하여 투여될 수 있다.
- [0597] 사상충속 선충에 의해 유발되는 사상충증은 곤충 벡터에 의해 인간에 도입된다. 온코세리아시스 또는 하천 실명증을 유발하는 회선 사상충은 먹파리에 물려 전파된다. 감염성 애벌레는 피하에 그 자신을 숨기고 성체로 발생하여 섬유조직발생 숙주 반응을 유도하며, 다량의 미세사상충을 발산시켜 이것이 피하 및 눈을 통해 확산되면 추가로 각막염 또는 망막염이 유도되고 이어서 각막이 뿌옇게 된다. 림프 사상충증은 브루기아 종(*Brugia spp.*) 및 우체레리아 종(*Wuchereria spp.*)에 의한 감염으로 인해 야기된다. 시간이 지나면서, 림프 조직 특히 서혜부에서의 상흔은 유출을 막아 기형 상태의 코끼리피부병을 야기할 수 있다.
- [0598] 사상충증의 주요 치료법은 항생제 이버멕틴, 알벤다졸 및 디에틸카르바마진 시트레이트 (DEC, 헤트라잔®) (이버멕틴 또는 알벤다졸과 함께 또는 따로)를 투여하는 것이다. 그 밖의 치료 전망에는 공생 박테리아, 월바키아를 사멸시키는 독시시클린이 포함된다.
- [0599] 속 스트론길로이데스 (예를 들어, S. 스테르코칼리스(*S. stercoralis*), S. 폴레보르니(*S. fuelleborni*))의 기생충에 의해 유발되는 분선충증은 배설물에 의해 오염된 토양을 통해 인간에게 전파되는 질환이다. 이는 자유생활 주기 (간상유충이 성충으로 성숙됨) 뿐만 아니라 기생 주기 (사상유충이 성충으로 성장함) 둘 모두로 존재할 수 있고, 이는 피부에 침투하여 폐에 이어 인두를 거친 후 궁극적으로 장 내에서 거주한다. 스트론길로이데스에 의해 또한 자기감염이 발생하는 것으로 알려져 있고, 이는 본질적으로 사상유충의 연속 생성으로 인한 반

복 감염이다.

[0600] 감염은 증상이 없을 수 있거나, 또는 위장관에서의 통증 및 설사, 폐에서의 피플러 증후군 (즉 호산구증가증) 및 두드러기를 특징으로 할 수 있다. 혈액 호산구증가증이 또한 있을 수 있다. 스트론길로이데스의 지속적인 감염이 소화성 궤양, 당뇨병 질환 및 크론병을 모방할 수 있어 오진이 흔하다. 이는 특히 면역손상 숙주에서 문제가 된다.

[0601] 분선충증에 대한 공지의 치료법은 이버멕틴, 알벤다졸 또는 티아벤다졸이지만, 이러한 약제는 단지 성충만 사멸시키기 때문에, 반복적인 투여가 필요하다.

[0602] e. 백신화

[0603] 질환에 대한 면역을 유도하기 위한 백신화 또는 항원성 물질의 투여는 병원체에 의한 감염 효과를 예방하거나 개선시키기 위해 일상적으로 사용된다. 숙주 면역을 향상시키는 것은 감염성 병원체에서 뿐만 아니라 질환화되기 시작한 (예를 들어 암성) 숙주 조직에서 발견된 바람직하지 않은 항원에 대해 사용될 수 있다. 전통적으로 백신은 약화되거나 사멸된 전체 병원체로부터 유래되지만, 또한 인간 클래스 I 또는 클래스 II 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자에 의해 특이적으로 인식되는 무손상 병원체 상의 에피토프를 대표하는 펩티드일 수 있다. 특정 관심 펩티드 항원은 T 세포에 의해 특이적으로 인식되는 것이다.

[0604] 최근, 요법상 백신화를 탈진된 CD8+ T 세포에 PD-L1 차단제를 투여하는 것과 함께 조합하는 것이 만성 감염 마우스 모델에서 기능 및 바이러스 제어를 향상시키는 것으로 밝혀졌다. 문헌 [Ha et al., J.Exp.Med. 205(3): 543-555 (2008)]. 그 결과, 본원에서 기재하는 항-PD-L1 항체는 또한 항원 백신과 조합되어 (예를 들어, 이전, 동시 또는 이후 투여), 바이러스, 박테리아, 진균 또는 원생동물 침입 뿐만 아니라 종양 면역으로 인한 감염 (예를 들어, 급성 및 만성)을 치료할 수 있다.

[0605] G. 제약학적 투여량:

[0606] 본 발명의 제약 조성물의 투여량 및 목적하는 약물 농도는 고려되는 특정 용도에 따라 다를 수 있다. 적합한 투여량 및 투여 경로의 결정은 당업자의 기술 범위 내에 있다. 동물 실험은 인간 치료법에 대한 효과적인 용량의 결정을 위한 신뢰할 수 있는 지침을 제공한다. 유효량에 대한 중간 스케일링은 문헌 [Mordenti, J. and Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics." In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al., Eds, Pergamon Press, New York 1989, pp.42-46]에 제시된 원칙에 따라 수행될 수 있다.

[0607] 본원에 기술된 폴리펩티드 또는 항체의 생체내 투여가 이용되는 경우, 정상 투여량은 투여 경로에 따라서 하루에 포유동물 체중을 기준으로 약 10 ng/kg 내지 약 100 mg/kg 또는 그 이상, 바람직하게는 약 1 mg/kg/일 내지 10 mg/kg/일로 다양할 수 있다. 특정 투여량 및 전달 방법에 관한 지침은 문헌에 제공되어 있고; 예를 들어, 미국 특허 제4,657,760호; 동 제5,206,344호; 또는 동 제5,225,212호를 참조한다. 상이한 제제가 상이한 치료법 및 상이한 장애에 효과적일 수 있으며, 특정 장기 또는 조직을 치료하기 위한 투여가 다른 장기 또는 조직에 대한 것과 상이한 양식으로서의 전달을 필요로 할 수 있다는 것은 본 발명의 범위 내에 있다. 나아가, 투여량은 1회 이상의 별개 투여에 의해서, 또는 연속 주입에 의해 투여될 수 있다. 수일 또는 그보다 오랜 기간에 걸친 반복 투여의 경우, 상태에 따라서 치료는 질환 증상이 목적하는 수준으로 저해될 때까지 지속된다. 그러나, 다른 투여법이 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상의 기술 및 검정에 의해 쉽게 모니터링된다.

[0608] H. 제제의 투여

[0609] 재구성된 제제 및 액체 제제를 포함하나 이로 제한되지 않는 본 발명의 항-PD-L1 항체에 의한 치료를 필요로 하는 포유동물, 바람직하게는 인간에게, 공지된 방법에 따라서, 예를 들어 볼러스와 같은 정맥내 투여, 또는 일정 기간에 걸친 연속 주입에 의해서, 근육내, 복강내, 뇌척수액내, 피하, 관절내, 활막액내, 경막내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의해서 투여된다.

[0610] 바람직한 실시양태에서, 상기 제제는 포유동물에게 피하 (즉, 피부 아래) 투여에 의해 투여된다. 상기 목적을 위하여, 제제는 시린지를 이용하여 주사될 수 있다. 그러나, 주사 장치 (예를 들어, INJECT-EASE™ 및 GENJECT™ 장치); 주사기 펜 (예를 들어, GENPEN™); 자동-주사기 장치, 무바늘 장치 (예를 들어, MEDIJECTOR™ 및 BIOJECTOR™) 및 피하 패치 전달 시스템과 같은 상기 제제의 투여를 위한 다른 장치를 이용할 수 있다.

[0611] 특정 실시양태에서, 본 발명은 단일 용량 투여 단위용 키트에 관한 것이다. 이러한 키트는 단일 또는 복수 챔버의 예비 충전된 시린지를 비롯한, 치료 단백질 또는 항체의 수성 제제의 용기를 포함한다. 예시적인 예비 충

전된 시린지는 베티 게엠베하 (Vetter GmbH, 독일 라벤스버그 소재)로부터 입수가 가능하다.

[0612] 단백질의 적절한 투여량 ("치료 유효량")은 예를 들어 치료할 상태, 상태의 중증도 및 경과, 단백질이 치료 또는 예방 목적으로 투여되는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 항-PD-L1 항체에 대한 반응, 사용되는 제제의 포맷, 및 주치의의 판단에 의존할 것이다. 항-PD-L1 항체는 적합하게는 환자에게 1회 또는 일련의 치료에 걸쳐서 투여되고, 환자에게 진단 이후 임의의 시점에 투여될 수 있다. 항-PD-L1 항체는 단독 치료로서, 또는 문제되는 상태의 치료에 유용한 다른 약물 또는 요법과 함께 투여될 수 있다.

[0613] 항-PD-L1 항체의 경우, 초기 후보 투여량은 환자에게 투여될 경우 약 0.1-20 mg/kg 범위일 수 있고, 이는 1 이상의 개별 투여형을 취할 수 있다. 그러나, 다른 투약법도 유용할 수 있다. 그러한 요법의 진행상황은 종래의 기술을 이용하여 쉽게 모니터링된다.

[0614] I. 제조품

[0615] 본 발명의 다른 실시양태에서, 상기 제제를 함유하는 제조품이 제공되는데, 이는 그의 사용 설명서를 바람직하게 제공한다. 제조품은 용기를 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알 (예를 들어, 이중 챔버 바이알), 시린지 (예를 들어, 단일 또는 이중 챔버 시린지) 및 시험관을 포함한다. 상기 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로 형성될 수 있다. 용기는 제제를 보유한다. 용기 상의 또는 용기에 부착된 라벨은 재구성 및/또는 사용을 위한 지침을 나타낼 수 있다. 라벨은 추가로 제제가 피하 투여 및/또는 T 세포 기능 이상 장애의 치료에 유용하거나 피하 투여 및/또는 T 세포 기능 이상 장애의 치료를 의도함을 나타낼 수 있다. 제제를 보유하는 용기는 재구성 제제의 반복 투여 (예를 들어, 2-6회 투여)를 가능하게 하는 다회 사용 바이알일 수 있다. 제조품은 추가로 적합한 희석물 (예를 들어, BWF1)을 포함하는 제2 용기를 포함할 수 있다. 희석물 및 동결건조 제제를 혼합할 때, 재구성된 제제 중 최종 단백질 농도는 일반적으로 적어도 50 mg/ml일 것이다. 제조품은 상업적 및 사용자 입장에서 바람직한 다른 물질, 예를 들어 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘, 시린지 및 사용을 위한 지침이 적힌 포장삽입물을 추가로 포함할 수 있다.

[0616] 하기 실시예를 참조하여 보다 충분하게 본 발명을 이해할 수 있을 것이다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 명세서 전체에서 모든 인용문은 본원에 명백하게 참고로 포함된다.

[0617] 다른 실시양태에서, 본 발명은 자동-주사기 장치로 투여하기 위한 본원에 기재된 제제를 포함하는 제조품을 제공한다. 자동-주사기는 활성화시에 환자 또는 투여자로부터 추가로 필요한 작용없이 그의 내용물을 전달할 수 있는 주사 장치로 설명될 수 있다. 이들은 특히, 전달 속도가 일정하여야 하고 전달 시간이 수 분 보다 긴 경우 치료 제제의 자동-투약에 적합하다.

[0618] 실시예 1

[0619] 파지 라이브러리에서의 항-PD-L1 항체의 확인

[0620] 항-PD-L1 항체를 확인하기 위한 라이브러리 분류 및 스크리닝

[0621] 인간 (R&D 시스템즈(R&D Systems), cat# 156-B7) 및 무린 (R&D 시스템즈, cat# 1019-B7) PD-L1-Fc 융합체를 교대 라이브러리 분류를 위한 항원으로 사용하였다. 구체적으로, 파지 라이브러리를 먼저 인간 항원에 대해, 이어서 무린, 인간, 및 무린 항원에 대해 후속 3 라운드로 분류하였다. 눈크 96 웰 맥시소르프(Maxisorp)[®] 면역플레이트를 표적 항원 (10 µg/ml) 으로 밤새 4°C에서 코팅하고, 파지 차단 완충액 PBST (포스페이트 완충 염수 (PBS) 및 1% (w/v) 소 혈청 알부민 (BSA) 및 0.05% (v/v) 트윈-20)으로 1 시간 동안 실온에서 차단하였다. 항체 파지 라이브러리 VH (예를 들어, 문헌 [Lee et al., J. Immunol. Meth. 284:119-132, 2004] 참조) 및 VH/VL (문헌 [Liang et al., J. Mol. Biol. 366: 815-829, 2007] 참조)을 항원 플레이트에 개별적으로 첨가하고, 밤새 실온에서 인큐베이션하였다. 다음날, 항원 코팅된 플레이트를 PBT (0.05% 트윈-20을 함유하는 PBS)로 10회 세척하고, 결합된 파지를 50 mM HCl 및 500 mM NaCl로 30 분 동안 용출시키고, 동 부피의 1 M 트리스 염기 (pH 7.5)로 중화시켰다. 회수된 파지를 이. 콜라이 XL-1 블루 세포 중에서 증폭시켰다. 후속 선별 라운드 동안, 항원 코팅된 플레이트와 항체 파지의 인큐베이션은 2 내지 3시간으로 줄이고, 플레이트 세척의 엄격도는 점차 증가시켰다.

[0622] 4 라운드의 패닝 이후에, 현저하게 풍부해진 것이 관찰되었다. VH 및 VH/VL 라이브러리 분류로부터 각각 96 클론을 골라내어 이들이 인간 및 무린 PD-L1-Fc 둘 모두에 특이적으로 결합하는지 여부를 측정하였다. 이들 클론의 가변 영역을 PCR 서열분석하여 특유한 서열 클론을 확인하였다.

- [0623] 개별 클론의 V_L 및 V_H 영역을 LPG3 및 LPG4 벡터 (문헌 [Lee et al., 상기 문헌])에 각각 클로닝하고, 포유동물 CHO 세포에서 일시적으로 발현시키고, 단백질을 칼럼에 의해 정제하여, 관심 클론을 IgG로 재포맷시켰다. 13 가지 항체가 가용성 PD-1-Fc 융합 단백질 및 293 세포에서 발현된 인간 또는 마우스 PD-L1 사이의 상호작용을 차단하는 능력을 평가하였다 (IC_{50} 값을 표 1 - 상반부에 표기함). PD-1에 대한 인간 PD-L1 결합을 차단하는데 IC_{50} 이 가장 낮은 항체인 YW243.55를 후속 친화성 성숙을 위해 선별하여 인간 및 마우스 PD-L1 둘 모두에 대한 그의 친화성을 개선시켰다. (표 1). 영장류 및 무린 종 둘 모두에 대해 비슷한 교차 반응성을 갖는 (뿐만 아니라 인간에 대한 친화성을 보유하는) 항체는 향상된 치료상 가치를 제공할 것이고, 실험 모델에서 그 특징이 잘 규명된 동일한 항체가 인간 임상 시험에 사용될 수 있다. 이로서 모델 특이적 대용물을 사용하는 것으로 인한 불확실성을 회피한다.
- [0624] V_H 라이브러리 유래의 클론의 친화성 개선을 위한 라이브러리의 구축
- [0625] 파지미드 pW0703 (파지미드 pV0350-2b (문헌 [Lee et al., J. Mol. Biol 340: 1073-1093 (2004)])에서 유래되었고, 모든 CDR-L3 위치에 정지 코돈 (TAA)을 함유하고, M13 박테리오파지의 표면상에 1가 Fab를 나타냄)은, 친화성 성숙을 위해 V_H 라이브러리로부터의 관심 클론의 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 이식하기 위한 라이브러리 주형으로 작용하였다. 친화성 성숙을 위해 완전(hard) 및 부분(soft) 무작위화 전략을 둘 모두 이용하였다. 완전 무작위화의 경우, 천연 인간 항체를 모방하도록 설계된 아미노산을 이용하여 3개의 경쇄 CDR의 선택된 위치를 갖는 1개의 경쇄 라이브러리를 무작위화하였으며, 설계된 DNA 퇴보는 문헌 [Lee et al., (J. Mol. Biol 340, 1073-1093 (2004))]에 기재된 바와 같다. 부분 무작위화의 경우, CDR-L3의 위치 91-94 및 96, CDR-H1의 위치 28-31 및 34-35, CDR-H2의 위치 50, 52 및 53-58, CDR-H3의 위치 95-99 및 100A의 잔기를 표적화하고; CDR 루프, L3/H1/H2 및 L3/H3의 2개의 상이한 조합을 무작위화를 위해 선택하였다. 부분 무작위화 조건을 달성하기 위해 (선택된 위치에서 약 50%의 돌연변이율 도입), 돌연변이유발 DNA를 야생형 뉴클레오타이드에 유리한 염기의 70-10-10-10 혼합물로 합성하였다 (문헌 [Gallop et al., Journal of Medicinal Chemistry 37:1233-1251 (1994)]).
- [0626] 친화성을 개선하기 위한 파지 분류
- [0627] 종전에 확인된 파지 클론을 첫번째 라운드에서 플레이트 분류하고, 이어서 5회 또는 6회 라운드로 용액 분류하였다. 라이브러리를 개별적으로 인간 및 무린 PD-L1-Fc에 대해 분류하였다 (R&D 시스템즈, 각각 cat. # 156-B7, cat # 1019-B7). 인간 PD-L1-Fc 표적의 경우, 제1 라운드 플레이트 분류에서, 3개의 라이브러리를 1% BSA 및 0.05% 트윈 20 중의 약 3 O.D./ml의 파지 주입을 이용하여 실온에서 2 시간 동안 표적 코팅된 플레이트 (뉴크 맥시소프® 플레이트)에 대해 개별 분류하였다. 제1 라운드의 플레이트 분류 후에, 용액 분류를 수행하여 선별의 엄격도를 증가시켰다. 용액 분류의 경우, 제1 라운드의 플레이트 분류로부터 증식된 1 O.D./mL 파지를 1% 슈퍼블록(Superblock) (피어스 바이오테크놀로지(Pierce Biotechnology)) 및 0.05% 트윈-20을 함유하는 완충액 100 μ l 중 20 nM 비오틴화된 표적 단백질 (농도는 모 클론 파지 IC_{50} 값을 기초로 함)과 함께 30분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 상기 혼합물을 1% 슈퍼블록으로 10배 추가 희석하고, 웰 당 100 μ l를 뉴트라비딘-코팅된 웰 (5 μ g/mL)에 15분 동안 실온에서 적용하며 부드럽게 진탕시켜서, 비오틴화된 표적과 파지가 결합하도록 하였다. 웰을 PBS-0.05% 트윈-20으로 10회 세척하였다. 배경 결합을 측정하기 위해, 비오틴화되지 않은 표적과 함께 파지를 함유하는 대조군 웰을 뉴트라비딘-코팅된 플레이트 상에 포획시켰다. 결합된 파지를 0.1 N HCl에 의해 20 분 동안 용출시키고, 1/10 부피의 1 M 트리스 (pH 11)로 중화시키고, 적정하고, 다음 라운드를 위해 전달하였다. 다음으로, 선별 엄격도를 증가시키는 두가지 방법과 함께, 용액 분류를 5 라운드 더 수행하였다. 첫번째 방법은 비오틴화된 표적 단백질 농도를 4 nM에서 0.5 nM으로 감소시키는 것에 의한 온-레이트 선별에 대한 것이고, 두번째 방법은 과량의 비-비오틴화된 표적 단백질 (100 내지 2000 배 더)을 첨가하여 실온 또는 37°C에서 더 약한 결합자를 경쟁에서 탈락시키는 것에 의한 오프-레이트 선별에 대한 것이다. 또한, 파지 주입을 감소시켜 (0.1 내지 0.5 O.D./ml) 배경 파지 결합을 낮췄다. 무린 PD-L1-Fc 표적의 경우, 파지 분류 방법은 인간 PD-L1 Fc 항원에 대해 상기에서 기재한 것과 유사하며 약간 변형된다. 구체적으로, 제1 라운드의 플레이트 패닝 직후에 용액 패닝을 위해 100 nM 비오틴화된 무린 PD-L1-Fc를 사용하였다. 제4 후속 라운드의 용액 패닝에서, 비오틴화된 표적을 10 nM에서 1 nM로 감소시키고, 200-500배 과량의 비-비오틴화된 표적을 실온에서 첨가하였다.
- [0628] 이어서, 이하의 실시예에서 기재하는 고처리량 친화성 스크리닝 ELISA 절차에 의해 친화성 성숙된 클론을 추가

로 스크리닝하였다.

[0629] 고처리량 친화성 스크리닝 ELISA (단일 스팟 경쟁)

[0630] 인간 및 뮤린 PD-L1 표적 각각에 대한 7번째 및 6번째 라운드 스크린으로부터 콜로니를 가려내었다. 콜로니를 96-웰 플레이트 (팔콘(Falcon))에서 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 카르베니실린 및 1E10/ml K07을 함유하는 2YT 배지의 웰당 150 μl 로 37°C에서 밤새 성장시켰다. 동일한 플레이트로부터, XL-1 감염된 모 파지의 콜로니를 대조군으로서 골라 내었다. 96-웰 눈크 맥시소프[®] 플레이트를 PBS 중의 웰당 100 μl 의 인간 및 뮤린 PD-L1-Fc 단백질 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 4°C에서 밤새 또는 실온에서 2 시간 동안 개별 코팅하였다. 플레이트를 65 μl 의 1% BSA로 30 분 동안, 그리고 40 μl 의 1% 트윈 20으로 추가 30 분 동안 차단시켰다.

[0631] 파지 상청액을 10 nM 표적 단백질을 함유하거나 함유하지 않는 ELISA (효소 연결 면역흡착 검정) 완충액 (0.5% BSA, 0.05% 트윈-20 함유 PBS) 중에서 100 μl 의 총 부피로 1:10으로 희석하고, F 플레이트 (눈크)에서 실온에서 적어도 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 표적 단백질을 함유하거나 함유하지 않는 75 μl 의 혼합물을 나란히 표적 단백질 코팅된 플레이트로 옮겼다. 플레이트를 15 분 동안 부드럽게 진탕시켜 미결합 파지가 표적 단백질 코팅된 플레이트에 포획되게 하였다. 플레이트를 PBS-0.05% 트윈 20으로 적어도 5회 세척하였다. ELISA 완충액 (1:5000) 중의 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)-접합된 항-M13 항체를 첨가함으로써 결합을 정량화하고, 30 분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS-0.05% 트윈 20으로 적어도 5회 세척하였다. 다음에, 웰 당 1:1 비율의 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB) 퍼옥시다제 기질 및 퍼옥시다제 용액 B (H_2O_2) (키르케가르트-페리 래버러토리스(Kirkegaard - Perry Laboratories), 메릴랜드주 게이터스버그 소재)를 100 μl 웰에 첨가하고, 실온에서 5 분 동안 인큐베이션하였다. 각 웰에 1 M 인산 (H_3PO_4) 100 μl 를 첨가하여 반응을 정지시키고, 실온에서 5 분 동안 인큐베이션하였다. 표준 ELISA 플레이트 판독기를 이용하여 450 nm에서 각 웰의 황색의 OD (광학 밀도)를 측정하였다. OD 감소율 (%)을 다음의 공식에 의해 계산하였다.

[0632] $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 감소율 (%) = [(경쟁자 존재 웰의 $\text{OD}_{450\text{nm}}$) / (경쟁자 부재 웰의 $\text{OD}_{450\text{nm}}$)] x 100

[0633] 모 파지 웰 (100%)에 대한 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 감소율 (%) 비교시, 인간 및 뮤린 표적 둘 모두에 대한 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 감소율 (%) 이 50%보다 낮은 클론을 서열 분석을 위해 가려내었다. 파지 제조를 위해 특유의 클론을 선별하여 모 클론과 비교하는 것에 의해 인간 및 뮤린 PD-L-Fc 둘 모두에 대한 결합 친화성 (파지 IC_{50})을 측정하였다.

[0634] 재료

[0635] hPD-1-Fc, hPD-L1-Fc, hB7.1-Fc, mPD-1-Fc, mPD-L1-Fc, 및 mB7.1은 R&D 시스템즈에서 구입하였다. 종래의 기술을 이용하여 hPD-L1 발현 293 세포는 제넨테크에서 생성시켰다. F(ab')_2 염소 항-인간 IgG Fc는 잭슨 이뮤노리서치 래버러토리스(Jackson ImmunoResearch Laboratories)에서 구입하였다.

[0636] 단백질의 접합

[0637] PD-1-Fc, 및 B7.1-Fc 단백질을 EZ-연결 술포-NHS-LC-LC-비오틴 (피어스)으로 30 분 동안 실온에서 제조자의 설명에 따라 비오틴화하였다. 과량의 비-반응 비오틴은 퀵 스피ن 고용량 칼럼, G50-세파텍스 (로슈)로 제조자의 설명에 따라 제거하였다.

[0638] F(ab')_2 염소 항-인간 IgG Fc는 MSD 술포-태그 NHS-에스테르 (메조 스케일 디스커버리(Meso Scale Discovery))로 제조자의 설명에 따라 루테늄 표지하였고, 과량의 비-반응 술포-태그는 퀵 스피ن 고용량 칼럼, G50-세파텍스로 제거하였다.

[0639] 파지 항체의 시험을 위한 ECL 세포 결합 검정

[0640] hPD-L1 발현 293 세포에의 hPD-1-Fc 결합을 50% 억제시키는 항체 농도 (IC_{50})를 전기화학발광 (ECL) 세포 결합 검정에 의해 측정하였다. hPD-L1 발현 293 세포를 인산염 완충 염수 (PBS)로 세척하고, 96 웰 고결합 플레이트 (메조 스케일 디스커버리) 상에서 25 μl PBS 중에 웰당 25,000 세포로 시딩하였다. 플레이트를 실온에서 인큐베이션하여 세포가 플레이트의 탄소 표면에 부착되도록 하였다. 25 μl 의 30% FBS를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 가볍게 진탕하면서 30 분 동안 인큐베이션하여 비특이적인 결합 부위를 차단시켰다. 플레이트를 부드러운 분배 및 흡인 조건하에서 ELISA 마이크로플레이트 세척기 (ELx405 셀렉트, 바이오-테크 인스트루먼트즈(Bio-Tek Instruments)) 상에서 PBS로 3회 세척하였다. 플레이트를 페이퍼 타올 상에 블롯팅하여 웰에서 과량의 PBS를

제거하였다. 12.5 μ l의 2배 농도의 항체를 PBS 중의 3% FBS (검정 완충액) 중의 각 웰에 첨가한 후 12.5 μ l의 4 μ g/mL (2배 농도)의 검정 완충액 중의 hPD-1-비오틴을 첨가하고, 플레이트를 가볍게 교반하면서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 마이크로플레이트 세척기 상에서 PBS로 3회 세척하고, 플레이트를 페이퍼 타올 상에 블롯팅하였다. 25 μ l의 2 μ g/mL의 스트렙타비딘-루테늄 (메조 스케일 디스커버리)을 첨가하고, 검정 완충액 중 실온에서 30 분 동안 부드럽게 교반하면서 인큐베이션하였다. 마이크로플레이트 세척기 상에서 PBS로 3회 세척하고, 플레이트를 페이퍼 타올 상에 블롯팅하였다. 계면활성제를 함유하지 않는 150 μ l의 1X MSD 판독 완충액 (메조 스케일 디스커버리)을 첨가하였다. 방출된 발광을 섹터 화상기 6000 판독기 (메조 스케일 디스커버리) 상에서 620 nm에서 판독하였다. ECL 값을 4개 파라미터 비선형 최소 제곱 적합을 이용하여 검정에 사용된 시험 항체의 농도에 의해 분석하여, 검정에서 각 경쟁자에 대한 IC₅₀ 값을 획득하였다.

[0641] 결과 및 논의:

[0642] 인간 및 무린 PD-L1 둘 모두에 결합하는 YW243.55 유래의 15개의 독특한 파지 항체를 선별하고, 추가의 평가를 위해 전장 IgG1 항체로 재포맷하였다. 이들 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역 서열을 도 11A 및 B에 나타낸다.

[0643] 전기화학발광 (ECL) 세포 결합 검정을 통해 15개의 재포맷된 Ab가 인간 또는 마우스 PD-L1을 발현하는 293 세포에 대한 PD-1의 결합을 차단하는 능력을 시험하였다. (표 1 - 하반부: 표 1에서 "포맷 1"은 가용성 인간 PD-1-Fc의 인간 PD-L1-형질감염된 293 세포에의 결합을 나타내고; "포맷 2"는 무린 PD-1-Fc의 무린 PD-L1 형질감염된 293 세포에의 결합을 나타내고, "포맷 3"은 인간 PD-1의 무린 PD-L1-형질감염된 293 세포에의 결합을 나타낸다.) 15종의 모든 친화성 개선된 Ab가 마우스 PD-L1에 대해 상당한 교차 반응성을 획득하였지만, PD-1에의 인간 및 마우스 PD-L1 둘 모두의 결합을 차단하는 능력에 기초하여 YW243.55S70이 후속 1차 후보로 선별되었다 (표 1: 49 pM 및 22 pM 각각의 IC₅₀ 값).

[0644] <표 1>

클론	포맷 1	포맷 2	포맷 3
	hPD1-Fc-비오틴/ hPDL1-293 IC ₅₀ (nM)	mPD1-Fc-비오틴/ mPDL1-293 IC ₅₀ (nM)	hPD1-Fc-비오틴/ mPDL1-293 IC ₅₀ (nM)
YW251.11	8.6		
YW 243.1	0.234		
YW243.55	0.099		>100
YW254.1	>100	0.795	
YW254.2	>100	3.76	
YW254.3	>100	>100	
YW254.4	1.73	15.6	
YW254.9	>100	0.224	
YW254.33	2.2	>100	
YW262.4	50	1.42	
YW262.5	90	25	
YW262.16	7.5	0.626	
YW262.64	0.256	100	
YW243.55.5	0.104		0.141
YW243.55.8	0.061		0.063
YW243.55.30	0.108		0.100
YW243.55.34	0.084		0.049
YW243.55.49	0.08		0.032
YW243.55.51	0.078		0.031
YW243.55.62	0.096		0.066
YW243.55.84	0.124		0.051
YW243.55.89	0.066		0.13
YW243.55.H12	0.103		0.156
YW243.55.H37	0.109		0.163
YW243.55.H70	0.084		0.042
YW243.55.S1	0.114		0.074
YW243.55.S37	0.100		0.024
YW243.55.S70	0.049		0.022

[0645] 실시예 2

[0646] 항-PD-L1 항체 (비아코어)의 특징규명

[0649] 비아코어™-3000 기기를 이용한 표면 플라즈몬 공명 (SRP)에 의해 제조한 인간 및 마우스 PD-L1에 대한 항-PD-L1 파지 항체 YW243.55 및 YW243.55S70의 결합 친화성을 측정하였다. 제조한 인간 PD-L1-Fc (R&D 시스템즈,

cat # 156-B7) 및 재조합 마우스 PD-L1-Fc (R&D 시스템즈, cat# 1019-B7)를 CM5 바이오센서 칩 상에 직접 코팅하여 대략 500 반응 단위 (RU)를 달성하였다. 역학 측정을 위해, 2배 연속 희석물 (3.9 nm 내지 500 nm)을 25 °C에서 30 μ l/분의 유속으로 PBT 완충액 (0.05% 트윈-20을 함유하는 PBS) 중에 주입하였다. 단순한 일대일 랭뮤어 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 회합율 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})을 계산하였다. 평형 해리 상수 (kD)는 k_{off}/k_{on} 의 비로 계산하였다.

측정된 항-PD-L1 파지 항체 클론 YW243.55 및 YW243.55.S70의 결합 친화성을 하기 표 2에 나타내었다.

<표 2>

비아코어 결합 친화성

클론	고정된 rhPD-L1 Fc			고정된 rmPD-L1 Fc		
	$k_{on}/(1/Ms)$	$k_{off}/(1/s)$	kD(M)	$k_{on}/(1/Ms)$	$k_{off}/(1/s)$	kD(M)
YW243.55 (Fab)	5.80×10^5	7.30×10^{-3}	1.26×10^{-8}	--	--	$> 1 \times 10^{-6}$
YW243.55 (IgG)	2.70×10^5	2.60×10^{-4}	9.63×10^{-10}	5.80×10^4	9.20×10^{-3}	1.59×10^{-7}
YW243.55.S70 (Fab)	5.30×10^5	1.00×10^{-4}	1.89×10^{-10}	4.80×10^5	1.40×10^{-3}	2.92×10^{-9}
YW243.55.S70 (IgG)	3.90×10^5	6.30×10^{-5}	1.62×10^{-10}	2.80×10^5	1.80×10^{-4}	6.43×10^{-10}

실시예 3A

인간, 레서스 및 마우스 PD-L1에 대한 항-PD-L1 Ab의 특이성 - FACS 및 방사성리간드 세포 결합 검정

본 실시예는 본 발명의 항-PD-L1 항체의 인간, 레서스 및 마우스 PD-L1에 대한 특이성을 보여준다. 또한, 293-형질감염된 세포 상의 세포막에서 발현된 마우스 및 인간 PD-L1에 대한 Ab의 친화성을 보여준다.

인간 및 마우스 PD-L1로 293 세포를 안정적으로 형질감염시켰다. 세포를 수거하고, 결합 연구를 위해 96 웰 플레이트에 웰당 150,000 세포로 플레이팅하였다.

레서스 혈액을 바이오메디칼 리서치(Biomedical Research; 텍사스주 샌 안토니오 소재)의 사우스웨스트 재단으로부터 획득하였다. 혈액을 동 부피의 PBS로 희석하고, 단핵 세포가 분리되도록 96% 피콜-파크(Ficoll-Paque) (GE 헬스케어) 상에 덮어씌웠다. 적혈구 용해 완충액 (퀴아젠)을 이용하여 적혈구의 단핵 세포를 용해시키고, 6-웰 플레이트에서 5 ng/ml PMA 플러스 1 μ M 이오노마이신과 함께 1.5×10^6 세포/ml로 밤새 배양하였다. 배양 배지는 10% 태아 소 혈청, 20 μ M HEPES, 및 키포(Gibco)사의 다음과 같은 보충물의 1:100 희석물: 글루타-맥스, 나트륨 피루베이트, 페니실린/스트렙토마이신, 및 비필수 아미노산을 함유하는 RPMI 1640이었다. 다음 날 세포를 수거하고, 결합 연구를 위해 96 웰 플레이트에 분취하였다 (대략 웰당 120,000 세포).

PD-L1 항체 YW243.55.S70 또는 헤르셉틴[®] 항체 대조군은 10 μ g/ml에서 시작하여 3배 연속 희석물 중에서 적정하고, 빙상에서 25 분 동안 50 μ l 부피의 세포에 결합시켰다. 세포를 세척한 다음 20 μ g/ml의 항-인간 IgG PE (칼태그(Caltag))와 빙상에서 25 분 동안 결합시켰다. 레서스 세포를 또한 CD3 FITC 및 CD4 APC (BD 바이오사이언시즈(BD Biosciences))로 공동 염색하여 CD4+ T 세포를 구분하였다.

모든 샘플을 베크만 딕킨슨 FACS칼리버(Beckman Dickinson FACSCalibur) 상에서 구동시키고, 항-PD-L1 항체 농도의 함수로서 PD-L1 결합 데이터의 평균 형광 강도를 트리 스타, 인크. 플로우조[®] 소프트웨어(Tree Star, Inc. FlowJo[®] software)를 사용하여 분석하였고; 칼레이다그래프를 이용하여 EC₅₀ 값 (최대 결합의 절반과 관련된 Ab 농도)을 계산하였다. 또한, 평형 결합 연구를 수행하여 293 세포 상에서 발현된 인간 및 마우스 PD-L1에 대한 YW24355S70 결합의 정확한 친화성 (Kd)을 규정하였다 (실시예 3B). 이들 값을 하기 표 3에 요약한다:

<표 3>

EC ₅₀ 요약		
종	EC ₅₀ (nM) FACS	Kd (nM) 평형 방사성리간드 결합
인간	0.4	0.4
레저스	0.3	
마우스	0.3	0.13
랫	0.8	

실시예 3B

인간 및 마우스 PD-L1에 대한 항-PD-L1 Ab의 친화성 측정 - 평형 결합 방사성리간드 세포 결합 검정

인간 또는 마우스 PD-L1에 의해 형질감염된 293 세포를 10% 태아 소 혈청 (FBS), 2 mM L-글루타민, 1X 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640 배지로 이루어진 성장 배지에서 5% CO₂ 중 37°C에서 배양하였다. 세포를 결합 완충액 (2% FBS 및 50 mM Hepes를 함유하는 50:50 DMEM/F12, pH 7.2)으로 세척하고, 0.2 mL의 결합 완충액 중의 대략 230,000 세포로 96 웰 플레이트에 배치하였다. 요오도겐 방법을 이용하여 항-PD-L1 항체, YW243.55.S70.hIgG를 요오드화하였다. 방사성표지된 항-PD-L1 항체를 NAP-5 칼럼을 이용한 겔 여과에 의해 유리 ¹²⁵I-NA로부터 정제하였고; 정제된 Ab는 17.41 µCi/µg의 특이적 활성을 가졌다. 고정된 농도의 요오드화 항체 및 감소하는 농도의 연속 희석된 비표지 항체를 함유하는 50 µl 부피의 경쟁 반응 혼합물을 96 웰 플레이트에 배치하였다. 인간 PD-L1 및 무린 PD-L1을 발현하는 293 안정한 형질감염 세포주를 10% 태아 소 혈청 (FBS), 2 mM L-글루타민, 1X 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 50:50 DMEM/F12 배지로 이루어진 성장 배지에서 5% CO₂ 중 37°C에서 배양하였다. 세포를 결합 완충액 (2% FBS, 50 mM HEPES, pH 7.2, 및 2 mM 나트륨 아지드를 함유하는 50:50 DMEM/F12)으로 세척하였고, 0.2 mL의 결합 완충액 중의 대략 200,000 세포 밀도로 50 µl의 경쟁 반응 혼합물에 첨가하였다. 세포와의 각 경쟁 반응에서 요오드화된 항체의 최종 농도는 약 150 pM (0.25 mL 당 약 120,000 cps)이었고, 세포와의 경쟁 반응에서 비표지된 항체의 최종 농도는 500 nM에서 출발하여 이어서 10 농도에 대해 2배씩 감소하는 것으로 달리하였다. 세포와의 경쟁 반응물을 실온에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 비표지된 항체의 각 농도에 대한 세포와의 경쟁 반응을 3중으로 검정하였다. 인큐베이션 2 시간 후에, 경쟁 반응물을 밀리포어 멀티스크린 필터 플레이트로 옮기고, 결합 완충액으로 4회 세척하여, 유리물을 결합된 요오드화 항체로부터 분리시켰다. 필터를 왈락 위자드(Wallac Wizard) 1470 감마 계수기 (퍼킨엘머 라이프 앤드 어널리티칼 사이언시즈 인크.(PerkinElmer Life and Analytical Sciences Inc.) 메사추세츠주 웰즐리 소재) 상에서 계수하였다. 결합 데이터를 먼슨(Munson) 및 로바드(Robard)의 적합 알고리즘을 이용하는 뉴리간드 소프트웨어 (제넨테크)를 이용하여 평가하여, 항체의 결합 친화성을 판단하였다. 문헌 [Musson et al., Anal. Biochem. 107: 220-39 (1980)].

스캐차드 분석에 의해 판단된 Kd 값은 표 3에 나타낸 바와 같은 인간 및 마우스 PD-L1에 대한 항-PD-L1 항체 결합의 EC₅₀ 값을 제공하였다.

실시예 4

항-PD-L1 Ab의 선택성 및 친화성 (IC₅₀)

본 실시예는 본 발명의 전장 항-PD-L1 항체의 PD-1 및 B7.1 둘 모두에 대한 PD-L1의 결합을 차단하는 능력을 평가하는데 사용된 결합 선택성 및 친화성 (IC₅₀으로서) 검정을 보여준다.

방법:

hPD-L1-Fc ELISA에 대한 hB7.1-Fc-비오틴 및 hPD-L1-Fc-비오틴 결합 (포맷 4):

뉴크 맥시소프 384 웰 플레이트를 PBS 중의 25 µl의 250 ng/mL hPD-L1-Fc로 밤새 코팅하였다. 웰을 마이크로 플레이트 세척기 상에서 PBS 중의 0.05% 트윈 (세척 완충액)으로 3회 세척하고, PBS 중의 0.5% BSA로 웰을 차단하였다. 2배 농도의 12.5 µl의 항체를 PBS 중의 0.05% 트윈, 0.5% BSA (검정 희석물) 중의 각 웰에 첨가한 다음, 검정 희석물 중의 12.5 µl의 250 ng/mL (2배 농도)의 hB7.1-Fc-비오틴을 첨가하고, 플레이트를 1 시간 30 분 동안 교반하면서 인큐베이션하였다. 웰을 세척 완충액으로 6회 세척하고, 25 µl의 스트렙타비딘-HRP (검정

희석물 중 1:40,000, GE 헬스케어)를 첨가하였다. 플레이트를 교반하면서 30 분 동안 인큐베이션하고, 웰을 세척 완충액으로 6회 세척하였다. 25 μ l의 TMB 기질 (키르케가아드 앤드 페리 래버러터리즈)을 1 시간 동안 첨가하고, 25 μ l의 1 M 인산으로 반응을 중지시켰다. 450 nm에서 흡광도를 판독하고, 실시예 1의 ECL 세포 결합 검정 이하에서 기재한 바와 같이 IC₅₀ 값을 분석하였다.

[0673] 포맷 5, 6, 7:

[0674] hPD-L1-Fc에 대한 hPD-1-Fc-비오틴 결합 (포맷 5)의 경우, 결합에 hB7.1-Fc-비오틴 대신 hPD-1-Fc-비오틴을 사용한 것을 제외하고 포맷은 상기 검정과 유사하였다. TMB 기질 반응 시간은 17 분이였다.

[0675] mPD-L1-Fc에 대한 mB7.1-Fc-비오틴 결합 (포맷 6)의 경우, hPD-L1-Fc 대신 mPD-L1-Fc를 사용하여 플레이트를 코팅하고, 결합에 hB7.1-Fc-비오틴 대신 mB7.1-Fc-비오틴을 사용한 것을 제외하고 포맷은 포맷 5와 유사하였다. TMB 기질 반응 시간은 7 분이였다.

[0676] mPD-L1-Fc에 대한 mPD-1-Fc-비오틴 결합 (포맷 7)의 경우, 결합에 mB7.1-Fc-비오틴 대신 mPD-1-Fc-비오틴을 사용한 것을 제외하고 포맷은 상기 언급한 마우스 ELISA와 유사하였다. TMB 기질 반응 시간은 5 분이였다.

[0677] 결과:

[0678] 지정된 결합 쌍 사이의 상호작용을 차단하는 것에 대한 친화성 성숙된 파지 항-PD-L1 항체 YW243.55.S70의 IC₅₀ 평가치를 표 4에 나타낸다. YW243.55S70은 PD-L1/PD-1 상호작용을 차단하는 그의 IC₅₀ 값 (42 pM)과 비교적 비슷한 농도인 38 pM의 최대 억제 농도의 절반으로 인간 PD-L1이 hB7.1 Fc에 결합하는 것을 차단할 수 있었다. PD-L1의 PD-1 및 B7.1와의 상호작용을 둘 모두 차단하는 YW243.55S70의 능력을 측정된 비아코어 연구는 이러한 ELISA 결과와 일치하였다 (데이터는 나타내지 않음).

[0679] <표 4>

항체	포맷 4 hB7.1-비오틴/hPD-L1 IC ₅₀ (pM)	포맷 5 hPD-1-비오틴/hPD-L1 IC ₅₀ (pM)	포맷 6 mB7.1-비오틴/mPD-L1 IC ₅₀ (pM)	포맷 7 mPD-1-비오틴/mPD-L1 IC ₅₀ (pM)
YW243.55.S70	38	42	29	48

[0680]

[0681] 실시예 5

[0682] 항-PD-L1 항체 YW243.55.S70에 의한 시험관내 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 활성의 향상

[0683] PMEL/B16 시험관내 검정

[0684] 본 실시예는 멜라닌세포 펩티드, gp100에 반응한 γ -IFN 생산의 향상에 의해 측정되는, PMEL T 세포 수용체 트랜스제닉 CD8⁺ T 세포의 활성화에 대한 본 발명의 항-PD-L1 항체의 효과를 보여준다. 이 절차에서, CD8⁺ T 세포는 CD8⁺ T 세포가 gp100 펩티드에 대해 특이적인 TCR을 발현하는 PMEL TCR 트랜스제닉 마우스에서 수득하였다. CD8⁺ T 세포를 정제한 후에, 여러 라운드의 자극을 주어 활성화된 CD8⁺ T 세포를 생성 및 확장시켰고, 이는 이어서 PD-1 발현을 상향조절할 것이다. 동시에, B16 흑색종 세포를 IFN- γ 로 처리하여 그의 PD-L1 발현을 상향조절하였다. 이어서, 세포를 항-PD-L1 항체의 존재하에서 공동 배양하고, IFN- γ 생산에 대한 효과를 평가하였다. B16 세포가 낮은 수준의 gp100 펩티드를 내생적으로 발현하므로 (펩티드의 외인성 적용과 대조됨) 3차 자극을 위해 B16 세포를 선택하였다. 또한, 이들 세포는 PD-L2, B7.1 또는 B7.2를 발현하지 않으므로, PD-L1과 관련이 없는 부가적인 신호전달 (예를 들어 CD28 또는 CTLA-4를 통한 신호전달 또는 PD-1을 통해 PD-L2 유도된 신호전달)의 효과가 최소화되었다.

[0685] PMEL 검정:

[0686] 도 3에 나타난 바와 같이, 항-PD-L1 항체는 IFN- γ -생산 PMEL CD8⁺ T 세포의 백분율 및 지정된 양의 gp100 펩티드에 반응하여 생산되는 IFN- γ 의 평균 수준을 둘 모두 향상시켰다.

[0687] D.011.10 시험관내 검정:

[0688] Ova-특이적 TCR Tg CD4⁺ T 세포를 이용한 유사한 검정은 PD-1의 발현을 유도하기 위한 Ova 펩티드에 의한 이전

자극에 따라 항-PD-L1 Ab의 존재하에서 향상된 T 세포 증식을 보여주었다 (도 4). 마지막 자극에서, PD-L1을 발현하는 조사된 A20 B 세포를 사용하여 DO.11.10 T 세포에 지정된 농도의 Ova 펩티드를 제공하였다. 특히, PD-1/PD-L1 축의 기여는 생리학적으로 적절한 크기의 자극을 보다 근접하게 반영한 수준인 보다 낮은 정도의 항원 수용체 자극에서 더욱 두드러졌다.

재료 및 방법:

PMEL 검정

최초 자극 (제 0 일 - 제 4 일)

PMEL 트랜스제닉 T 세포 수용체 마우스로부터 비장 및 장간막 림프절을 수거하였다. 장기를 단세포 현탁액으로 분쇄하고, 적혈구를 용해시켰다. $CD8^+$ T 세포 분리 키트 및 AutoMACS 세포 분리기 (밀테니 바이오테크(Miltenyi Biotec))를 이용하여 제조사의 지침에 따라 $CD8^+$ T 세포를 분리하였다.

비-트랜스제닉 성-매칭된 마우스로부터 비장을 분리하고, 이를 단세포 현탁액으로 분쇄하고 적혈구를 용해시켰다. 세포를 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 의 gp100-펩티드로 37°C 에서 2 시간 동안 펄싱하고 세척하였다.

세포를 96 웰 편평 바닥 플레이트에서 200,000 PMEL $CD8^+$ T 세포 및 75,000 gp100-펄싱된 비장세포와 함께 4 일 동안 공동배양하였다. 배양 배지는 이소코브의 변형된 돌베코 배지 + 10% 태아 소 혈청 + $20 \mu\text{M}$ HEPES, 및 김코의 다음과 같은 보충물의 1:100 희석물이었다: 글루타-맥스, 나트륨 피루베이트, 페니실린/스트렙토마이신, 및 비필수 아미노산.

2차 자극 (제 4 일 - 제 7 일)

PMEL 배양을 스핀 다운시키고, 다중 채널 피펫을 이용하여 배지를 흡출하였다. 새로운 배지를 첨가 및 혼합하여 세포를 세척한 후, 또 다시 스핀시켰다. 대부분의 배지를 제거하고, 항체 (헤르셉틴®, YW243.55.S70, 또는 아무것도 없음)를 $10 \mu\text{g/ml}$ 의 최종 농도로 첨가하였다. 종점에 평균 IFN- γ 생산을 평가할 수 있도록 조건을 2 중 웰에서 설정하였다.

DC-1 세포를 $0.1 \mu\text{g/ml}$ gp100 펩티드로 2 시간 동안 37°C 에서 펄싱하고 세척하였다. Gp100-펄싱된 DC-1 세포를 세척된 PMEL 배양물에 40,000 세포/웰로 첨가하였다. PMEL 및 DC-1 + 항체를 3 일 동안 공동배양하였다.

3차 자극 (제 7 일 - 제 8 일)

3차 자극 하루 전인 제 6 일에, B16 흑색종 세포를 20 ng/ml 마우스 IFN- γ (R&D 시스템즈)와 밤새 인큐베이션하여 그의 PD-L1 발현을 상향조절시켰다.

제 7 일에, PMEL 배양을 스핀 다운시키고, 다중 채널 피펫을 이용하여 배지를 흡출하였다. 새로운 배지를 첨가하고 혼합한 후, 다시 스핀시켰다. 대부분의 배지를 제거하고, 항체를 $10 \mu\text{g/ml}$ 의 최종 농도로 첨가하였다.

IFN- γ 로 밤새 자극한 후, B16 세포를 세척하고, 3 그룹으로 나누어, gp100 없이, 1 ng/ml 의 gp100와 함께 (저 gp100), 및 10 ng/ml 의 gp100와 함께 (고 gp100) 2 시간 인큐베이션하였다. 세포를 세척한 다음 세척된 PMEL + Ab 배양물에 웰당 40,000 세포로 첨가하고, 밤새 함께 인큐베이션하였다.

제 8 일 IFN- γ 세포내 염색

제조사의 지침에 따라 배양의 마지막 5 시간 동안 골지-플러그(Golgi-Plug) (BD 바이오사이언시즈)를 첨가하였다. IFN- γ 세포내 염색은 BD 바이오사이언시즈 시토폭스/시토펜(Cytofix/Cytoperm) 고정/투과 용액 키트를 제조사의 지침에 따라 사용하여 행하였고, 모든 염색 항체는 또한 BD 바이오사이언시즈로부터의 것이다. 세포를 CD8a PE 및 Thy1.1 FITC로 표면 염색하고, 포화 농도의 IFN- γ APC로 세포내 염색하였다.

모든 샘플을 베크만 덕킨슨 FACS칼리버 상에서 구동시켰고, 데이터는 트리 스타, 인크. 플로우조™ 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

DO11.10 시험관내 검정

DO11.10 트랜스제닉 마우스로부터 비장 및 장간막 림프절을 수거하고, 단세포 현탁액으로 분쇄하고, 적혈구를 용해하였다. 세포를 Ova 펩티드를 $0.3 \mu\text{M}$ 함유하는 6 웰 플레이트에서 ml 당 1×10^6 의 세포 밀도로 72 시간

동안 배양하였다. 배양 배지는 RPMI 1640 + 10% 태아 소 혈청 + 20 μ M HEPES, 및 김코의 다음과 같은 보충물의 1:100 희석물이었다: 글루타-맥스, 나트륨 피루베이트, 페니실린/스트렙토마이신, 및 비필수 아미노산.

[0707] 최초 자극 후에, 세포를 수거하고 마우스 CD4 T 세포 정제 키트를 사용하여 제조사의 지침 (밀테니 바이오텍)에 따라 CD4⁺ T 세포를 정제하였다. 이어서, 정제된 CD4⁺ T 세포는 밤새 휴지 상태로 있었다.

[0708] 다음날, 세포를 수거하고, 세척하고, 조사된 (10,000 라드) A20 세포와 공동 배양하였다. 공동 배양은 20 μ g/ml의 최종 농도로 Ova 펩티드 및 항체로 적정한 50,000 CD4⁺ T 세포 대 40,000 A20 세포를 함유하는 96 웰 U자 바닥 플레이트에서 3중 웰로 설정하였다. 48 시간 후에, 배양물을 3H-티미딘 1 μ Ci/웰로 밤새 펠싱하고, 다음 날 동결시켰다. 이후에 플레이트를 해동시키고, 세포 수거기 상에서 수거하고, 베타-계수기 상에서 판독하였다.

[0709] **실시예 6**

[0710] **항-PD-L1에 의한 혼합 림프구 반응에서의 인간 CD8+ T 세포의 향상된 증식**

[0711] 도 5는 항-PD-L1 (예를 들어, YW243.55.S1)이 MHC-미스매칭된 공여자로부터의 세포에 반응하여 인간 CD8 T 세포의 증식을 향상시키는 능력을 보여준다. CD8+ T 세포 반응은 CD8+ T 세포 로세테셉(RosetteSep)[®] (스텝셀 테크놀로지스(StemCell Technologies))을 제조사의 지침에 따라 처음 사용하는 것에 의해 공여자 A의 전혈로부터 강화되었다. 이어서, 세포를 동 부피의 인산염 완충 염수 (PBS)로 희석시키고, 구배 원심분리에 의해 피콜-파큐 플러스 (GE 헬스케어) 상에 덮어씌워 분리하였다. 분리 이후에, 세포를 CD8 APC (BD 바이오사이언시즈)로 염색하고, 78% CD8+ T 세포임을 확인하였다. 세포를 2.5 μ M CFSE 트래이서 염료 (몰레큘라 프로브스)로 형광 표지하였다.

[0712] 동종이형 항원 제시 세포 (APC)로서 제공하기 위해, 먼저 공여자 B의 전혈로부터 단핵 세포를 단리해낸 후, CD3+T 세포를 고갈시켰다. 혈액을 동 부피의 PBS로 희석시키고, 피콜 상에서의 구배 원심분리 이후에 단핵 세포를 단리하였다. 세포를 CD3 FITC (BD 바이오사이언시즈)로 염색하고, 세척하고, 이어서 항-FITC 마이크로비드 (밀테니 바이오텍)와 함께 인큐베이션하였다. 이어서 CD3 FITC 양성 세포를 AutoMACS 세포 분리기 (밀테니 바이오텍) 상에서 고갈시켰다. 이어서 세습 조사기 내에서 세포를 2500 라드로 조사하였다.

[0713] 세포를 96 웰 편평 바닥 플레이트 내에서 150,000 CD8+ T 세포 및 150,000 APC와 5 일 동안 10 μ g/ml의 항체와 함께 공동 배양하였다. 배양 배지는 RPMI 1640 + 10% 태아 소 혈청 + 20 μ M HEPES, 및 김코의 다음과 같은 보충물의 1:100 희석물이었다: 글루타-맥스, 나트륨 피루베이트, 페니실린/스트렙토마이신, 및 비필수 아미노산.

[0714] 제 5 일에, 세포를 수거하고, 세척하고, CD8-비오틴에 이어 스트렙타비딘-PerCp (BD 바이오사이언시즈)로 염색하였다. 샘플을 베크만 덕킨슨 FACS칼리버 상에 구동시키고, 데이터를 트리 스타, 인크. 플로우조 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0715] 항-PD-L1의 존재하에서, MHC-미스매칭된 공여자로부터의 세포에 반응하여 CD8 T 세포의 증식이 대략 45% 향상된 것으로 관찰되었다.

[0716] **실시예 7**

[0717] **생체내 모델에서 LCMV에 대한 PD-L1 차단 효과**

[0718] 만성 자극 조건하에서의 T 세포는 억제 수용체 PD-1의 발현을 상향조절하고 지속시키는 것으로 나타났다. 2종의 리간드 PD-L1 및 PD-L2 중 어느 하나에 의한 PD-1의 라이게이션은 만성적으로 활성화된 T 세포를 불응 상태로 만들어, 그의 동족 항원에 대한 반응을 약화시킨다. 림프구성 맥락수막염 바이러스 (LCMV)에 의해 지속적인 감염된 마우스에서, PD-1 또는 그의 리간드 PD-L1의 차단은 만성적 불응성 T 세포를 소생시켜 항바이러스 T 세포 반응의 크기 및 기능 품질을 향상시키는데 충분하다. 유사하게, HIV 또는 HCV에 의해 만성적으로 감염된 인간은 PD-1 또는 PD-L1의 차단에 의해 시험관내에서 활성이 향상될 수 있는 자극에 대해 T 세포 불응성을 나타낸다. 따라서, LCMV 모델에서의 PD-L1 차단의 활성화는 항바이러스 및 항종양 면역을 향상시키는데 대한 치료적 잠재력을 시사한다.

[0719] 마우스에서의 LCMV 생체내 실험을 위해, 본 발명자들은 마우스 IgG2a 중쇄 및 마우스 카파 경쇄 불변 도메인 상류의 파지 유래 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 클로닝하여 인간화 항-PD-L1 항체 (YW243.55S70)를 재포맷하였

다. Fc γ 수용체 결합을 억제하는 것에 의해 PD-L1 발현 세포의 항체-매개 세포독성을 방지하기 위해, 위치 265 (아스파르트산) 및 297 (아스파라긴)을 알라닌 (DANA)으로 변화시켰다. 문헌 [Shields, RL et al., J. Biol Chem 2001 276 (9): 6591-6604]. 항-PD-L1 항체가 만성 감염에서 항바이러스성 면역을 향상시키는 능력을 시험하기 위해, 마우스를 제 0 일에 참조 대조군으로서 클론 13 LCMV 또는 LCMV의 암스트롱 균주의 2×10^6 플라크 형성 단위 (pfu)로 감염시켰다. 실험 설계의 개략도는 도 6에 나타내었다. 클론 13에 의한 감염은 확장되지만 바이러스를 효과적으로 제거할 수 없는 T 세포를 특징으로 하는 만성 감염을 야기한 반면, 암스트롱 LCMV는 감염 8-10 일 이내에 제거되었다. 제 14 일에, 마우스에 항-PD-L1 또는 대조군 mIgG를 10 mg/kg 용량으로 주 3회 전달하여 치료를 개시하였다. 제 21 일 및 제 28 일에, CD8 T 세포 기능 및 혈액 및 조직 중의 바이러스 역가를 분석하였다.

[0720] 문헌 [Barber et al., Nature 439:682-7 (2006)]에서 공개된 데이터와 일치하게, 본 실시예는 만성 LCMV 감염에서의 2 주 치료 섭생에 따라 LCMV에 대한 세포독성 림프구 반응을 향상시키는 항-PD-L1 Ab 능력을 보여준다. 도 7A는 gp33 LCMV-특이적 펩티드에 반응하여 세포 표면에 CD107a를 발현하는 CD8 T 세포의 %를 보여준다. 정상적으로는 세포내에서 발현되는 CD107a의 원형질막 발현은 탈과립화 과정에 따른 것으로, 따라서 탈과립화에 대한 대응물 마커의 역할을 한다. 급성 암스트롱 LCMV 감염으로부터의 세포의 반응과 관련하여, 만성 균주, 클론 13에 의해 감염된 동물로부터의 세포는 탈과립화가 손상된 반면 (대조군 Ig 그룹), PD-L1 차단은 CD8+ 탈과립화를 암스트롱 감염에서 관찰되는 것과 비교가능한 수준으로 회복시킬 수 있었다. 유사하게, 7B는 대조군 Ig와 비교하여, 항-PD-L1-처리된 그룹에서 LCMV gp33에 반응하여 IFN- γ -생산 CD8 T 세포가 증가된 %를 보여준다.

[0721] 다음으로, 혈액 및 조직에서 LCMV 바이러스를 감소시키거나 근절하는 것에 대한 항-PD-L1 Ab의 영향을 시험하였다. 도 8A에서, 그래프는 클론 13 LCMV에 의해 감염된 후 제 21 일 및 제 28 일에 대조군 Ig 및 PD-L1 처리된 마우스의 표시된 조직에서의 로그 바이러스 역가를 보여준다. 항체 처리는 감염 후 제 14 일에 시작하였다. PD-L1의 차단은 혈액, 간, 뇌, 폐 및 신장에서 바이러스 역가를 매우 현저하게 감소시켰다. 인상적으로, 5 마리의 마우스 중 3 마리에서 α -PD-L1 Ab는 혈액 LCMV 역가를 검출 수준 미만 ($< 1 \times 10^{-5}$)으로 감소시켰다. 비교 설계의 후속 실험에서는, 항-PD-L1로 10 mg/kg 또는 2 mg/kg의 용량으로 주 3회 2 주 동안 처리된 5/5 마우스의 혈액 및 간에서 바이러스의 근절이 관찰되었다 (데이터는 나타내지 않음). 하단 그래프는 혈액에서의 바이러스 역가의 감소 역학을 나타낸 것으로, 대조군에 비해 항-PD-L1 처리된 그룹에서 제 28 일에 평균 감소율이 96.8%임을 보여준다. 이러한 데이터는 만성 감염에서 T 세포 반응을 억제하는데 있어서 PD-1/PD-L1 경로의 중요성을 지지하며, 만성 감염, 예컨대 C형 간염 및 HIV 인간으로부터 수득한 T 세포에 대한 시험관내 PD-L1 차단 효과와 일치한다.

[0722] 재료 및 방법:

[0723] **LCMV gp33 펩티드에 반응하여 CD8 T 세포에 의한 IFN-감마 생산 % 측정**

[0724] 감염된 마우스로부터 비장을 단리하고, 완전 배지: 10% 열 불활성화된 태아 소 혈청, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린/스트렙토마이신 및 10 mM 2-메르캅토에탄올을 함유하는 IMDM (인비트로젠 인크., 캘리포니아주 칼스배드 소재)에서 장기를 분쇄하여 단세포 현탁액을 생성하였다. ACK 용해 완충액 (0.15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA)을 이용하여 적혈구를 용해시켰다. 항원 특이적 CD8 T 세포 반응을 측정하기 위해, 비장세포를 완전 배지에서 세척하고, 시험관 내에서 LCMV 펩티드 GP33 (KAVYNFATC, 프로이문 인크., 플로리다주 브라덴튼 소재)으로 4 시간 동안 재자극하였다. 1×10^6 비장세포를 96 웰 편평 바닥 플레이트에서 100 ng/ml의 GP33 펩티드와 함께 100 단위/ml의 인간 인터류킨-2 (시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스 소재), 1 μ l/ml의 브레펠딘 A 및 1 μ l/ml (1:1000 희석물)의 모넨신 (BD 파밍겐) 및 항-CD107a FITC (클론 ID4B, BD 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산 호세 소재)의 존재하에 배양하였다. 인큐베이션 후에, 세포를 2% 태아 소 혈청을 함유하는 PBS에서 1회 세척하고, 세포 표면 마커를 형광색소 접합된 항체: 항-CD8 APC (클론 53.67, BD 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산 호세 소재) 항-CD4 PerCp-Cy5.5 (클론 RM4-5, BD 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산 호세 소재) 및 항-PD-1 PE (클론 J43, BD 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산 호세 소재)를 이용하여 염색하였다. 세포내 IFN- γ 의 염색은 항-IFN- γ PE-Cy7 (클론 XMGI.2, 이바이오사이언스 인크., 캘리포니아주 산 호세 소재)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 시토픽스 시토픽 플러스 키트 (BD 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산 호세 소재)를 이용하여 행하였다. GP33 특이적인 CD8 T 세포의 개수를 검출하기 위해, 새로운 비장세포를 제조사의 지침에 따라 GP33 오랑체 (APC에 연결된 H2-Db, 프로이문 인크., 플로리다주 브라덴튼 소재)를 이용하여

여 염색하였다. BD FACS아리아 (BD 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산 호세 소재)를 이용하여 데이터를 수집하고, 플로우조 소프트웨어 (트리 스타, 인크., 오리건주 애쉬랜드 소재)를 이용하여 분석하였다.

LCMV 바이러스 역가의 측정:

MC57 섬유육종 세포를 완전 IMDM 중의 LCMV-함유 혈액 또는 조직 균질물의 10배 연속 희석물로 감염시켰다. 이어서, 반응물을 조직 배양 인큐베이터 내에서 37°C에서 2-6 시간 동안 인큐베이션한 다음, 1% 메틸셀룰로스를 함유하는 DMEM로 덮어씌웠다. 이어서 3-5 일 동안 인큐베이션한 다음, 메틸셀룰로스 층을 흡인하여 제거하였다. 세포를 PBS/4% 파라포름알데히드로 고정시킨 다음, 0.5% 트리톤-x로 20 분 동안 투과성으로 만들고, PBS 중에서 세척한 후, 10% FCS 중에서 1 시간 동안 가법제 진동시키면서 차단하였다. LCMV에 대한 염색은 VL4 항체 (1 시간)로 행하고, 2회 세척한 다음, 차단 완충액 중에서 항-라트 HRP (1:400)로 발색시켰다. 이어서, 3회 세척한 다음, o-페닐렌디아민 기질 (시그마 P8806-50TAB 3 mg/정제)을 웰에 첨가하여 발색시켰다.

실시예 8

암에서의 PD-L1 차단

현재 많은 종양들이 항종양 T 세포 반응을 약화시키기 위한 수단으로서 PD-1 리간드의 발현을 이용한다는 것은 분명하다. 몇몇 인간 암은 종양 및 종양-침윤 백혈구 둘 모두에서 상승된 수준의 PD-L1을 발현하는 것을 특징으로 하며, 이렇게 상승된 PD-L1 발현은 종종 더 나쁜 예후와 관련이 있다. 마우스 종양 모델은 종양 내에서 유사한 PD-L1 발현의 증가를 보였고, 이는 종양 면역을 억제하는데 있어서 PD-1/PD-L1 경로의 역할을 보여준다.

본 발명자들은 본원에서, 동계 C57B6 마우스에서 MC38.0va 무린 결장직장 암종 세포의 정위적 종양 성장에 대한 PD-L1 차단의 영향을 보여주는 실험을 제시한다 (도 9A). 이들 세포는 레트로바이러스 형질도입을 통해 오브알 부민을 발현하고, PD-L1을 발현하지만, 유동세포계수법에 의한 측정시 그의 세포 표면에서 PD-L2는 발현하지 않는다 (히스토그램 - 도 10A). 마우스에 50 만개의 MC38.0va 세포를 제 0 일에 피하 접종하였다. 제 1 일 또는 제 14 일 마우스 (종양의 평균 크기가 250 mm³에 달한 경우)에 10 마우스/그룹으로 10 mg/kg 항-PD-L1 (YW243.55S70-마우스 IgG2a-DANA), 대조군 Ig, 또는 차단 항-CTLA4 Ab, (UC10-4F10-11)를 연구 기간 동안 주 3 회 처리하였다. 개입 초기 또는 이후의 PD-L1의 차단은 종양 성장을 방지하는 단일 작용제 요법으로서 매우 효과적이었다. 대조적으로, T 세포 상에서 발현되는 또 다른 억제 분자인 CTLA4의 차단은 종양 성장 억제에 대한 어떤 증거도 보이지 않았다. 이러한 결과는 항종양 면역 반응을 억제하는데 있어서 CTLA4/B7에 비해 PD-1/PD-L1 축의 특유한 역할을 보여주며, PD-1 및 B7.1과의 PD-L1 상호작용을 차단하는 항체에 의해 인간 암을 치료하는 잠재력을 지지한다.

MC38.0va 동계 종양 모델: 방법. 제 0 일에, 70 마리의 동물에 100 µl HBSS+마트리젤 중의 50 만개의 MC38.0va 세포를 피하 접종하였다. D1 착수시점에, 20 마리의 마우스를 2 처리 그룹 (하기 참조: 그룹 1 또는 그룹 2) 중 하나로 구성하였다. 남아있는 40 마리의 마우스는 제 14 일까지 종양이 성장하도록 두었다. 이들 40 마리 중, 종양 크기가 유사한 30 마리의 마우스를 3 처리 그룹 (그룹 3-5) 중 하나로 구성하였다. 종양을 측정하고, 주 2회 마우스의 체중을 재었다. 종양 부피가 달라 하기 처리 그룹에 속하지 못한 마우스는 안락사 시켰다:

그룹 1: 항-gp120 항체, 10 mg/kg IP, 100 µl, D1, 3x/주

그룹 2: 항-PD-L1 항체, 10 mg/kg IP, 100 µl, D1, 3x/주

그룹 3: 항-gp120 항체, 10 mg/kg IP, 100 µl, D14, 3x/주

그룹 4: 항-PD-L1 항체, 10 mg/kg IP, 100 µl, D14, 3x/주

그룹 5: 항-CTLA-4 항체, 10 mg/kg IP, 100 µl, D14, 3x/주

*** 그룹 1 및 2는 D1에 투약하기 시작했고; 그룹 3, 4, 및 5는 D14에 투약하기 시작했다.

실시예 9

항-PD-L1과 항종양 효과를 제공하는 다른 작용제 또는 면역 향상 요법과의 조합 - MC38.0va 모델

제 0 일에, 150 마리의 동물에 100 µl HBSS + 매트릭스 젤 중의 50 만개의 MC38.0va 세포를 피하 접종하였다. 마우스를 종양이 성장하도록 두었다. 마우스의 체중을 재고, 제 11 일 (종양 부피가 100-200 mm³인 때)까지 주 2

회 측정하였다. 제 11 일에, 종양을 측정한 후, 마우스를 하기 12 처리 그룹 중 하나로 구성하였다. 종양 부피가 달라 하기 처리 그룹에 속하지 못한 마우스는 안락사시켰다. 겐시타빈 (그룹 4) 처리는 제 12 일에 시작하였고, 그 밖의 항체 그룹으로의 처리는 제 14 일에 시작하였다. 모든 부피는 불활성 비히클 중 100 μl 였고, 부가적인 상세사항은 하기에 나타낸 바와 같다:

[0741] 그룹 1: 항-gp120 항체, 10 mg/kg IP, 100 μl , 3x/주 x 5, n=10

[0742] 그룹 2: 항-PD-L1 항체, 10 mg/kg IP, 100 μl , 3x/주 x 5, n=10

[0743] 그룹 3: 항-VEGF 항체, 5 mg/kg IP, 100 μl , 2x/주 x 5, n=10

[0744] 그룹 4: 겐시타빈, 40 mg/kg IP, 100 μl , 12, 16, 20 일, n=10

[0745] 그룹 5: 항-PD-L1 항체 + 항-gp120 항체, n=10

[0746] 그룹 6: 항-PD-L1 항체 + 항-VEGF 항체, n=10

[0747] 그룹 7: 항-PD-L1 항체 + 겐시타빈, n=10

[0748] 그룹 8: 항-gp120 항체 + 겐시타빈, n=10

[0749] 그룹 9: 항-gp120 항체 + 항-VEGF, n=10

[0751] 제 12 일: CBC 분석을 위해 그룹 1의 마우스를 마취상태 하에서 안와후방으로 채혈하였다 (100 μl).

[0752] 제 14 일 및 제 22 일: CBC 분석을 위해 그룹 4의 마우스를 마취상태 하에서 안와후방으로 채혈하였다 (100 μl).

[0753] 제 19 일: CBC 분석을 위해 그룹 4를 제외한 모든 마우스를 마취상태 하에서 안와후방으로 채혈하였다 (100 μl).

[0754] 제 26 일: PK 분석을 위해 그룹 4를 제외한 모든 마우스를 마취상태 하에서 안와후방으로 채혈하였다 (100 μl).

[0755] 종양을 측정하고, 주 2회 마우스의 체중을 재었다. 15% 초과와 체중 감소를 보이는 동물은 매일 체중을 재고, 체중이 20%를 초과하여 감소되면 안락사시킬 것이다. 종양 부피가 3,000 mm^3 을 초과하거나, 또는 종양이 형성되지 않을 경우에는 3 개월 후에 마우스를 안락사시킬 것이다.

[0756] 본 연구는 PD-L1 차단이 α -VEGF 및 겐시타빈 단독의 유도 섭생에 비해 더 효과적임을 보여주었다 (도 10).

[0757] 실시예 10

[0758] 포유동물 세포에서 항-PD-L1 항체의 발현

[0759] 본 실시예는 포유동물 세포에서 재조합 발현에 의해 잠재적으로 글리코실화된 형태의 항-PD-L1 항체를 제조하는 것을 설명한다.

[0760] 벡터 pRK5 (1989년 3월 15일자로 공개된 EP 307,247 참조)를 발현 벡터로 사용하였다. 임의로, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄를 코딩하는 DNA를, 문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]에 기재된 바와 같은 라이게이션 방법을 이용하여 상기 DNA의 삽입을 허용하도록 선택된 제한 효소가 존재하는 pRK5 내로 라이게이션하였다.

[0761] 한 실시양태에서, 선택된 숙주 세포는 293 세포일 수 있다. 인간 293 세포 (ATCC CCL 1573)를 조직 배양 플레이트에서 태아 송아지 혈청이 보충되고 임의로는 영양소 성분 및/또는 항생제가 보충된 DMEM과 같은 배지 중에서 전면성장시까지 성장시켰다. pRK5-항체를 코딩하는 DNA 약 10 μg 을 VA RNA 유전자를 코딩하는 DNA 약 1 μg 과 혼합하고 (문헌 [Thimmappaya et al., Cell, 31:543 (1982)]), 500 μl 의 1 mM 트리스-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.227 M CaCl_2 에 용해시켰다. 상기 혼합물에 50 mM HEPES (pH 7.35), 280 mM NaCl, 1.5 mM NaPO_4 500 μl 를 첨가하고, 25°C에서 10 분 동안 침전물이 형성되게 하였다. 상기 침전물을 현탁시키고 293 세포에 첨가하여 약 4 시간 동안 37°C에서 침강되게 하였다. 배양 배지를 흡출하고, PBS 중 20% 글리세롤 2 mL를 30 초 동안 첨가하였다. 이어서, 293 세포를 혈청-무함유 배지로 세척하고, 신선한 배지를 첨가하고, 세포를 약 5 일 동안 인큐베이션하였다.

- [0762] 형질감염 후 대략 24시간이 지난 후에 상기 배양 배지를 제거하고, 배양 배지 (단독) 또는 200 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ^{35}S -시스테인 및 200 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ^{35}S -메티오닌을 함유하는 배양 배지로 교체하였다. 12시간 동안 인큐베이션한 후, 조건화 배지를 수집하여 회전 필터에서 농축시키고 15% SDS 겔에 로딩하였다. 처리된 겔을 건조시키고, 항체의 존재를 밝히기 위해 선택된 시간 동안 필름에 노출시킬 수 있다. 형질감염된 세포를 함유하는 배양물을 추가로 인큐베이션할 수 있었고 (형질-무함유 배지 중에서), 상기 배지를 선택된 생물검정으로 시험하였다.
- [0763] 별법적인 기술로, 문헌 [Somparyrac et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)]에 기재되어 있는 텍스트란 술페이트 방법을 이용하여 항체를 293 세포 내에 일시적으로 도입할 수 있다. 293 세포를 스피너 플라스크 내에서 최대 밀도로 성장시키고, pRK5-항체를 코딩하는 700 μg DNA를 첨가하였다. 세포를 원심분리에 의해 스피너 플라스크로부터 우선 농축하고 PBS로 세척하였다. DNA-텍스트란 침전물을 4시간 동안 세포 펠렛상에서 인큐베이션하였다. 세포를 20% 글리세롤로 90초 동안 처리하고, 조직 배양 배지로 세척하고, 조직 배양 배지, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 소 인슐린 및 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 소 트랜스페린을 함유하는 스피너 플라스크에 다시 도입하였다. 약 4일 후, 조건화 배지를 원심분리하고 여과하여 세포 및 잔해를 제거하였다. 이어서, 발현된 항체를 함유하는 샘플을 농축하고 투석 및/또는 칼럼 크로마토그래피와 같은 임의의 선택된 방법으로 정제할 수 있다.
- [0764] 또 다른 실시양태에서, 항체는 CHO 세포에서 발현될 수 있다. pRK5 내로 라이게이션된 항체를 코딩하는 DNA는 CaPO_4 또는 DEAE-텍스트란과 같은 공지의 시약을 사용하여 CHO 세포를 형질감염시킬 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, 세포 배양물을 인큐베이션하고, 배지를 배양 배지 (단독) 또는 ^{35}S -메티오닌과 같은 방사능표지를 함유하는 배지로 교체할 수 있었다. 항체의 존재를 결정한 후에, 배양 배지를 무혈청 배지로 교체할 수 있다. 바람직하게는, 상기 배양물을 약 6일 동안 인큐베이션한 후에 조건화 배지를 수거하였다. 이어서, 발현된 항체를 함유하는 배지를 임의의 선택된 방법으로 농축하고 정제할 수 있었다.
- [0765] 항체의 에피토프-태그가 부착된 변이체도 숙주 CHO 세포에서 발현될 수 있다. pRK5 내로 라이게이션된 항체를 코딩하는 DNA는 pRK5 벡터로부터 서브클로닝될 수 있다. 상기 서브클론 삽입물로 PCR을 수행하여 바큘로바이러스 발현 벡터에 선택된 에피토프 태그, 예컨대 폴리-his 태그와 인-프레임으로 융합시킬 수 있었다. 이어서, 항체 삽입물을 코딩하는 폴리-his 태그가 부착된 DNA는 안정한 클론의 선택을 위해 선별 마커, 예를 들어 DHFR을 함유하는 SV40 유도 벡터 내로 서브클로닝될 수 있다. 마지막으로, CHO 세포를 (상기 기재된 바와 같이) SV40 구동 벡터로 형질감염시킬 수 있었다. 상기 기재된 바와 같이 표지하여 발현을 입증할 수 있었다. 이어서, 발현된 폴리-His 태그가 부착된 항체를 함유하는 배양 배지를 임의의 선택된 방법, 예를 들어 Ni^{2+} -킬레이트 친화성 크로마토그래피에 의해 농축하고 정제할 수 있었다.
- [0766] 항체는 또한 일시적 발현 절차에 의해 CHO 및/또는 COS 세포 내에서 또는 다른 안정한 발현 절차에 의해 CHO 세포 내에서 발현될 수 있다.
- [0767] 하기 절차를 이용하여 CHO 세포에서의 안정적인 발현을 수행하였다. 단백질은 IgG 구조물 (이뮤노어드헤신)로 발현되었고, 이때 각 단백질의 가용 형태 (예를 들어, 세포외 도메인)에 대한 코딩 서열은 힌지, CH2 및 CH2 도메인을 함유하는 IgG1 불변 영역에 융합되었고/거나 폴리-His 태그가 부착된 형태였다.
- [0768] PCR 증폭 후, 문헌 [Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997)]에 기재된 바와 같은 표준 기술을 이용하여 각각의 DNA를 CHO 발현 벡터에 서브클로닝하였다. 관심 DNA의 5' 및 3'에 상용성 제한 부위가 있도록 CHO 발현 벡터를 구축하여, cDNA가 간편하게 서투링되도록 하였다. CHO 세포에서의 발현에 사용된 벡터는 문헌 [Lucas et al., Nucl. Acids Res. 24:9 (1996)]에 기술된 바와 같고, SV40 초기 프로모터/인핸서를 사용하여 관심 cDNA 및 디히드로폴레이트 환원효소 (DHFR)의 발현을 구동시켰다. DHFR 발현은 형질감염 후 안정적으로 유지되는 플라스미드의 선별을 허용한다.
- [0769] 목적하는 플라스미드 DNA 12 μg 을 시판되는 형질감염 시약 슈퍼펙트(SUPERFECT)[®] (퀴아젠), 도스퍼(DOSPER)[®] 또는 퓨진(FUGENE)[®] (베링거 만하임(Boehringer Mannheim))을 사용하여 대략 1000 만개의 CHO 세포에 도입하였다. 문헌 [Lucas et al., 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 세포를 성장시켰다. 약 3×10^{-7} 세포를 아래에서 설명되는 바와 같은 추가의 성장 및 생산을 위해 앰플 내에 동결시켰다.
- [0770] 플라스미드 DNA를 함유하는 앰플을 수조에 넣어 해동시키고, 볼텍싱시켜 혼합하였다. 내용물을 배지 10 mL를 함유하는 원심분리 튜브에 피펫팅하고, 1000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 상청액을 흡출하고, 세포를 10

mL의 선별 배지 (0.2 μ m 정용여과된 5% 소 태아 혈청을 함유하는 0.2 μ m 여과된 PS20)에 재현탁시켰다. 이어서, 상기 세포를 선별 배지 90 mL를 함유하는 100 mL 스피너에 분취하였다. 1일 내지 2일이 지난 후, 상기 세포를 선별 성장 배지 150 mL를 충전한 250 mL 스피너로 옮기고 37℃에서 인큐베이션하였다. 2-3 일이 더 지난 후, 250 mL, 500 mL 및 2000 mL 스피너에 3×10^5 개 세포/mL를 시딩하였다. 원심분리 및 생성 배지 중의 재현탁에 의해 세포 배지를 신선한 배지로 교환하였다. 임의의 적합한 CHO 배지를 사용할 수 있지만, 실제로는 1992년 6월 16일자로 허여된 미국 특허 제5,122,469호에 기재된 생성 배지를 사용할 수 있다. 3L 생성 스피너에 1.2×10^6 개 세포/mL를 시딩하였다. 제 0 일에, 세포수 및 pH를 측정하였다. 제 1 일에, 스피너를 샘플링하고, 여과된 공기를 살포하기 시작하였다. 제 2 일에 스피너로부터 샘플링하고, 온도를 33℃로 변화시키고, 500 g/L 글루코스 30 mL 및 10% 소포제 (예를 들어, 35% 폴리디메틸실록산 에멀전, 다우 코닝(Dow Corning) 365 의료 등급 에멀전) 0.6 mL를 첨가하였다. 생성 전반에 걸쳐, 필요에 따라 pH를 조정하여 pH가 약 7.2로 유지되도록 하였다. 10일 후, 또는 생존률이 70% 아래로 떨어졌을 때, 세포 배양물을 원심분리 및 0.22 μ m 필터를 통한 여과에 의해 수거하였다. 여과물을 4℃에서 저장하거나, 정제를 위한 칼럼 상에 즉시 로딩하였다.

[0771] 폴리-His 태그가 부착된 구축물의 경우, Ni-NTA 칼럼 (퀴아겐)을 사용하여 단백질을 정제하였다. 정제 전에, 이미다졸을 5 mM 농도로 조건화 배지에 첨가하였다. 조건화 배지를 4℃에서 0.3 M NaCl 및 5 mM 이미다졸을 함유하는 20 mM Hepes (pH 7.4) 완충액 내에 평형화시킨 6 mL Ni-NTA 칼럼 상으로 4-5 mL/분의 유속으로 펌핑하였다. 로딩 후, 상기 칼럼을 추가의 평형화 완충액으로 세척하고, 0.25 M 이미다졸을 함유하는 평형화 완충액으로 단백질을 용출시켰다. 이어서, 고도로 정제된 단백질을 25 mL G25 수퍼파인 (파마시아) 칼럼을 사용하여 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl 및 4% 만니톨을 함유하는 저장 완충액 (pH 6.8) 중에 탈염시키고 -80℃에서 저장하였다.

[0772] 이뮤노어드헤신 (Fc 함유) 구축물을 하기와 같이 조건화 배지로부터 정제하였다. 조건화 배지를 20 mM 인산나트륨 완충액 (pH 6.8)로 평형화시킨 5 mL 단백질 A 칼럼 (파마시아)에 펌핑하였다. 로딩 후, 상기 칼럼을 평형화 완충액으로 철저하게 세척한 후에 100 mM 시트르산 (pH 3.5)으로 용출시켰다. 1 mL 분획을 1 M 트리스 완충액 (pH 9) 275 μ L를 함유하는 튜브에 수집함으로써, 용출된 단백질을 즉시 중화시켰다. 이어서, 고도로 정제된 단백질을 폴리-His 태그가 부착된 단백질에 대해 상기 기재된 바와 같은 저장 완충액 중에 탈염시켰다. SDS 폴리아크릴 아미드 겔 및 에드만(Edman) 분해법에 의한 N-말단 아미노산 서열분석에 의해 균질성을 평가하였다.

[0773] **실시예 11**

[0774] **이. 콜라이에서의 항-PD-L1 항체의 발현**

[0775] 본 실시예는 이. 콜라이 내에서의 재조합 발현에 의해 글리코실화되지 않은 형태의 항-PD-L1 항체를 제조하는 것을 설명한다.

[0776] 먼저, 항-PD-L1 항체를 코딩하는 DNA 서열을 선택된 PCR 프라이머를 사용하여 증폭시켰다. 상기 프라이머는 선택된 발현 벡터상의 제한 효소 부위에 상응하는 제한 효소 부위를 함유해야 한다. 다양한 발현 벡터를 사용할 수 있다. 적절한 벡터의 예는 앰피실린 및 테트라시클린 저항성에 대한 유전자를 함유하는 pBR322 (이. 콜라이에서 유래됨; 문헌 [Bolivar et al., Gene, 2:95 (1977)] 참조)이다. 벡터를 제한 효소로 소화시키고 탈인산화시켰다. 이어서, PCR 증폭된 서열을 상기 벡터에 라이게이션시켰다. 바람직하게는, 벡터는 항생제 내성 유전자, trp 프로모터, 폴리his 리더 (처음 6개의 STII 코돈, 폴리his 서열 및 엔테로키나제 절단 부위를 포함함), NPOR 코딩 영역, 람다 전사 종결자 및 argU 유전자를 코딩하는 서열을 포함할 것이다.

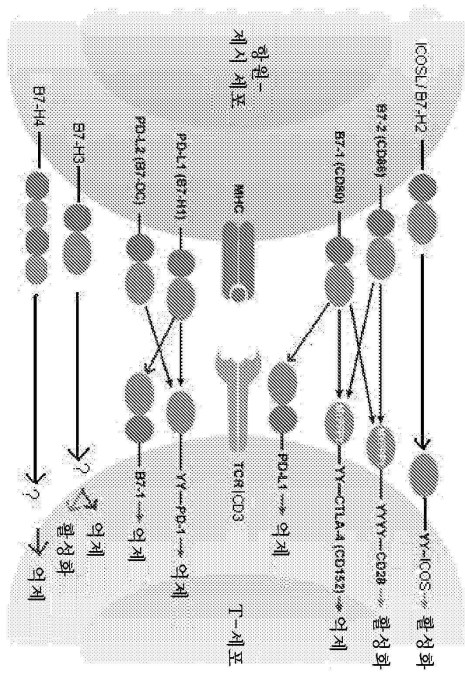
[0777] 이어서, 라이게이션 혼합물을 사용하여, 선택된 이. 콜라이 균주를 문헌 [Sambrook et al., (상기 문헌)]에 기재된 방법을 이용하여 형질전환시켰다. LB 플레이트에서 성장하는 능력에 의해 형질전환체를 확인한 후, 항생제 내성 콜로니를 선별하였다. 제한 분석 및 DNA 서열분석에 의해 플라스미드 DNA를 단리 및 확인할 수 있었다.

[0778] 선별된 클론을 항생제가 보충된 LB 브로쓰와 같은 액체 배양 배지 중에서 밤새 성장시킬 수 있었다. 이어서, 상기 철야 배양물을 사용하여, 더 큰 규모의 배양물에 접종할 수 있었다. 이어서, 세포를 원하는 광학 밀도까지 성장시켰고, 이 동안에 발현 프로모터가 작동되었다.

[0779] 추가로 수시간 동안 세포를 배양한 후, 원심분리에 의해 세포를 수거할 수 있었다. 원심분리에 의해 수득된 세포 펠렛을 당업계에 공지된 다양한 작용제를 사용하여 가용화할 수 있었고, 이후에는 가용화된 항체를 항체의 강력한 결합을 허용하는 조건하에서 금속 킬레이팅 칼럼을 사용하여 정제할 수 있었다.

- [0780] 하기 절차를 이용하여 항-PD-L1 항체를 이. 콜라이 내에서 폴리-His 태그가 부착된 형태로 발현시킬 수 있었다. 먼저, 항체를 코딩하는 DNA를 선택된 PCR 프라이머를 사용하여 증폭시켰다. 프라이머는 선택된 발현 벡터상의 제한 효소 부위에 상응하는 제한 효소 부위, 및 효율적이고 신뢰할 수 있는 번역 개시, 금속 킬레이트 칼럼 상에서의 신속한 정제, 및 엔테로키나제에 의한 단백질분해 제거를 제공하는 기타 유용한 서열들을 함유한다. 이어서, PCR 증폭된, 폴리-His 태그가 부착된 서열을 발현 벡터에 라이게이션시키고, 이것을 사용하여 균주 52를 기초로 하는 이. 콜라이 숙주를 형질전환시켰다 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). 먼저, 형질전환체를 50 mg/ml의 카르베니실린을 함유하는 LB에서 O.D.600이 3-5에 도달할 때까지 30℃에서 진탕하며 성장시켰다. 이어서, 배양물을 CRAP 배지 (물 500 mL 중 (NH₄)₂SO₄ 3.57 g, 시트르산나트륨 · 2H₂O 0.71 g, KCl 1.07 g, 디프코(Difco) 효모 추출물 5.36 g, 셰필드(Sheffield) 하이카제 SF 5.36 g 및 또한 110 mM MPOS (pH 7.3), 0.55% (w/v) 글루코스 및 7 mM MgSO₄를 혼합하여 제조한 것) 중에 50-100배 희석하고, 대략 20-30 시간 동안 30℃에서 진탕하며 성장시켰다. 샘플을 제거하여 SDS-PAGE 분석을 통해 발현을 입증하고, 벌크 배양물을 원심분리하여 세포를 펠렛화하였다. 정제 및 리폴딩시킬 때까지 세포 펠렛을 동결시켰다.
- [0781] 발효물 0.5 내지 1 L로부터의 이. 콜라이 페이스트 (펠렛 6-10 g)를 7 M 구아니딘, 20 mM 트리스 (pH 8) 완충액 중에 10 부피 (w/v)로 재현탁시켰다. 고체 아황산나트륨 및 나트륨 테트라티오네이트를 각각 0.1 M 및 0.02 M 의 최종 농도로 첨가하고, 용액을 4℃에서 밤새 교반하였다. 이 단계에서, 모든 시스테인 잔기가 아황산염화에 의해 차단된 변성 단백질이 생성되었다. 상기 용액을 베크만 초원심분리기에서 40,000 rpm으로 30분 동안 원심 분리하였다. 상청액을 3-5 부피의 금속 킬레이트 칼럼 완충액 (6 M 구아니딘, 20 mM 트리스 (pH 7.4))로 희석하고, 0.22 μm 필터를 통해 여과하여 정화하였다. 조건에 따라, 정화된 추출물을 금속 킬레이트 칼럼 완충액으로 평형화시킨 5 mL 쿼겐 Ni-NTA 금속 킬레이트 칼럼에 로딩하였다. 50 mM 이미다졸 (칼바이오캡, 우트룰 (Utrol) 등급)을 함유하는 추가의 완충액 (pH 7.4)로 칼럼을 세척하였다. 250 mM 이미다졸을 함유하는 완충액으로 단백질을 용출시켰다. 목적하는 단백질을 함유하는 분획을 폴링하고, 4℃에서 저장하였다. 아미노산 서열을 기초로 계산된 흡광 계수를 사용하여 280 nm에서의 흡광도에 의해 단백질 농도를 추정하였다.
- [0782] 샘플을 새로 제조된 리폴딩 완충액 (20 mM 트리스 (pH 8.6), 0.3 M NaCl, 2.5 M 우레아, 5 mM 시스테인, 20 mM 글리신 및 1 mM EDTA로 이루어짐)으로 천천히 희석하여 단백질을 리폴딩시켰다. 최종 단백질 농도가 50 내지 100 μg/mL가 되도록 리폴딩 부피를 선택하였다. 리폴딩 용액을 4℃에서 12시간 내지 36시간 동안 부드럽게 교반하였다. TFA를 0.4%의 최종 농도 (대략 pH 3)로 첨가하여 리폴딩 반응을 켜쳤다. 추가의 단백질 정제 이전에, 상기 용액을 0.22 μm 필터를 통해 여과하고, 아세트오니트릴을 2-10%의 최종 농도로 첨가하였다. 리폴딩된 단백질로 0.1% TFA의 이동상 완충액을 사용한 포로스(Poros) R1/H 역상 칼럼에서의 크로마토그래피를 실시하였고, 이때 10%→80%의 아세트오니트릴 구배로 용출시켰다. A280 흡광도를 갖는 분획의 분취액을 SDS 폴리 아크릴아미드 겔에서 분석하고, 균질한 리폴딩된 단백질을 함유하는 분획을 모았다. 일반적으로, 대부분의 단백질의 적당하게 리폴딩된 종은 가장 낮은 농도의 아세트오니트릴에서 용출되는데, 이는 이러한 종들이 소수성 내부가 상기 역상 수지와와의 상호작용으로부터 차폐되면서 가장 조밀하기 때문이다. 응집된 종은 일반적으로 더 높은 아세트오니트릴 농도에서 용출된다. 잘못 폴딩된 단백질을 형태를 목적하는 형태로부터 제거하는 것에 더하여, 역상 단계는 또한 샘플로부터 내독소를 제거하였다.
- [0783] 목적하는 바와 같이 폴딩된 항-PD-L1 항체를 함유하는 분획을 폴링하고, 상기 용액에 질소를 부드럽게 흐르게 하여 아세트오니트릴을 제거하였다. 투석에 의해 또는 제제 완충액으로 평형화되고 멸균 여과된 G25 수퍼파인 (파마시아) 수지를 사용한 겔 여과에 의해, 단백질을 0.14 M 염화나트륨 및 4% 만니톨을 함유하는 20 mM Hepes (pH 6.8)로 제제화하였다.

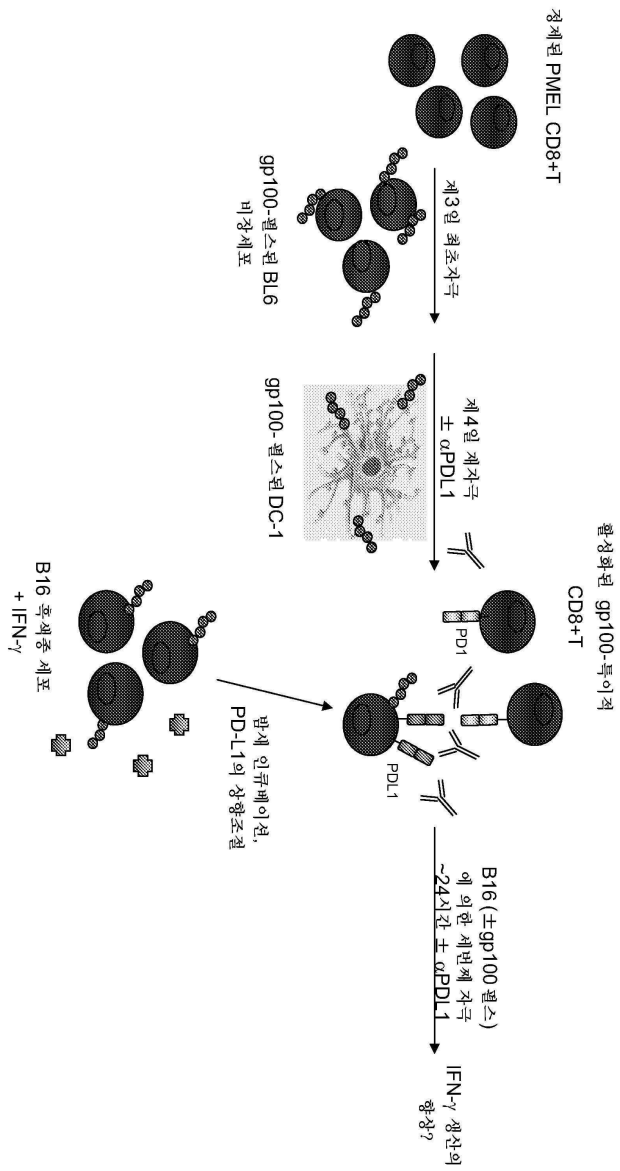
B7 패밀리 공동자극



도면

도면1

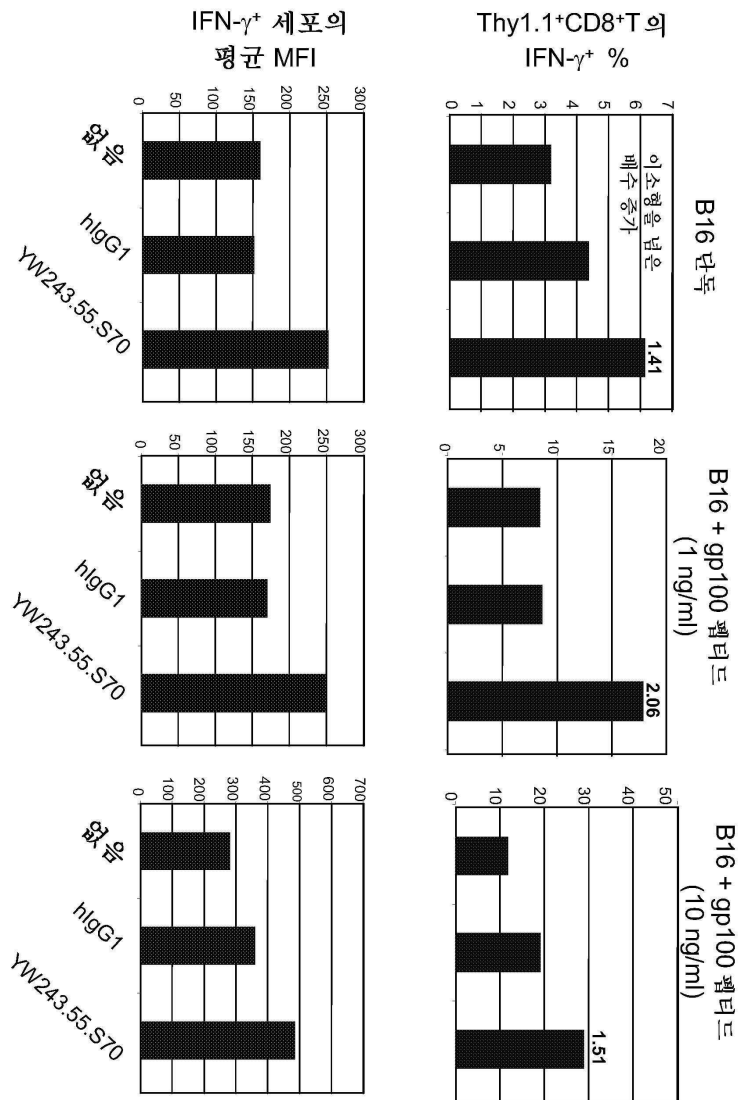
PMEL/B16 시험관내 검증



도면2

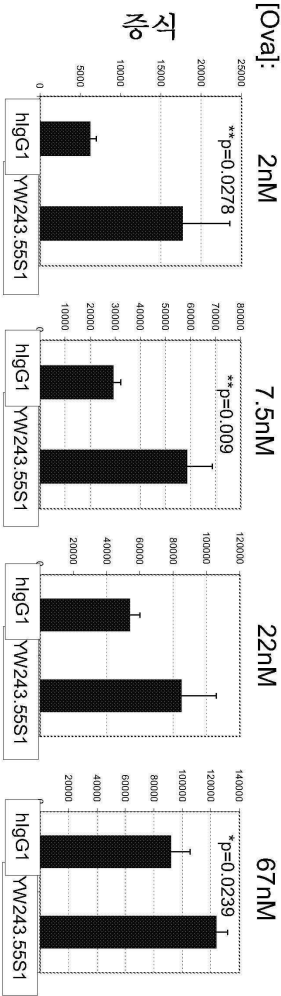
도면3

PMEL CD8+T 세포에 의한 IFN- γ 생산에 대한 항-PDL1 항체의 효과



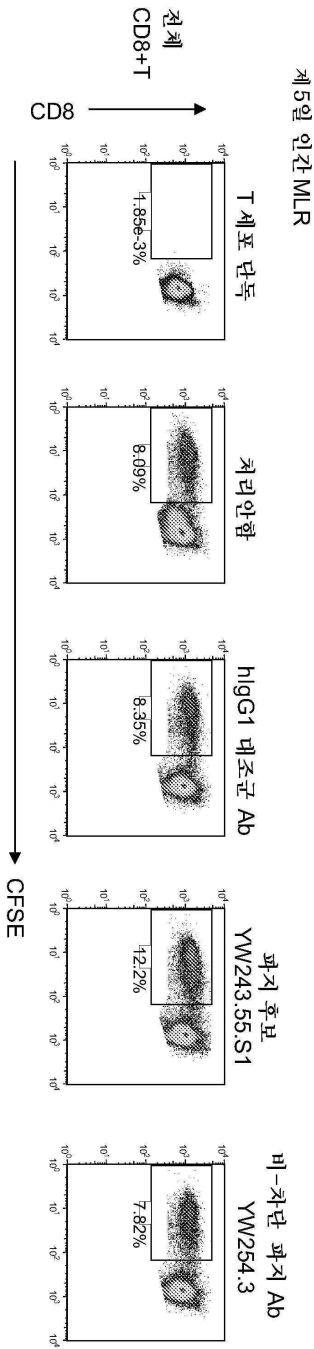
2차 자극을 거친 CD4-T 세포 증식에 대한
항-PD-L1 항체의 효과

도면4



혼합 림프구 반응에서 인간 CD8 T 세포의 증식에 대한
항-PD-L1 Ab의 효과

도면5



만성 림프구 백혈수막염 바이러스(LCMV) 감염에서의 항-PDL1(클론 13)

그룹:

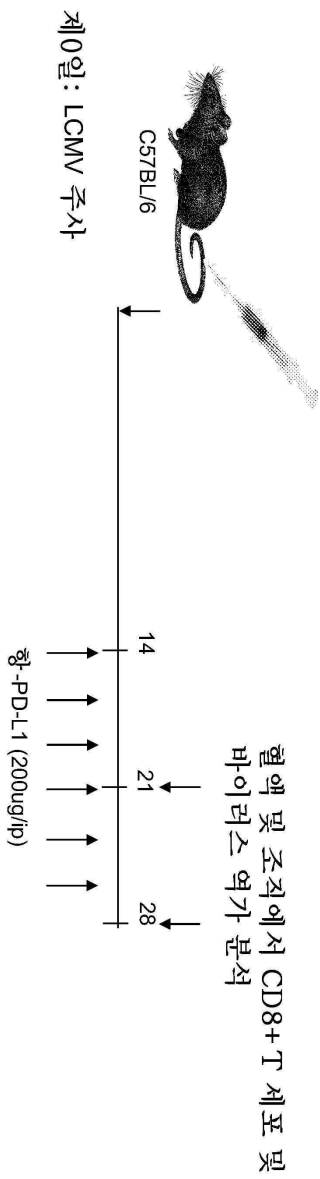
-클론 13 LCMV 만성 균주 (2E6/마우스)

1. IgG1 대조군: n=5 마우스

2. 항-PD-L1 YW243.55.S70 H/m: n=5 마우스

-암스트롱 급성 균주 LCMV (2E6/마우스)

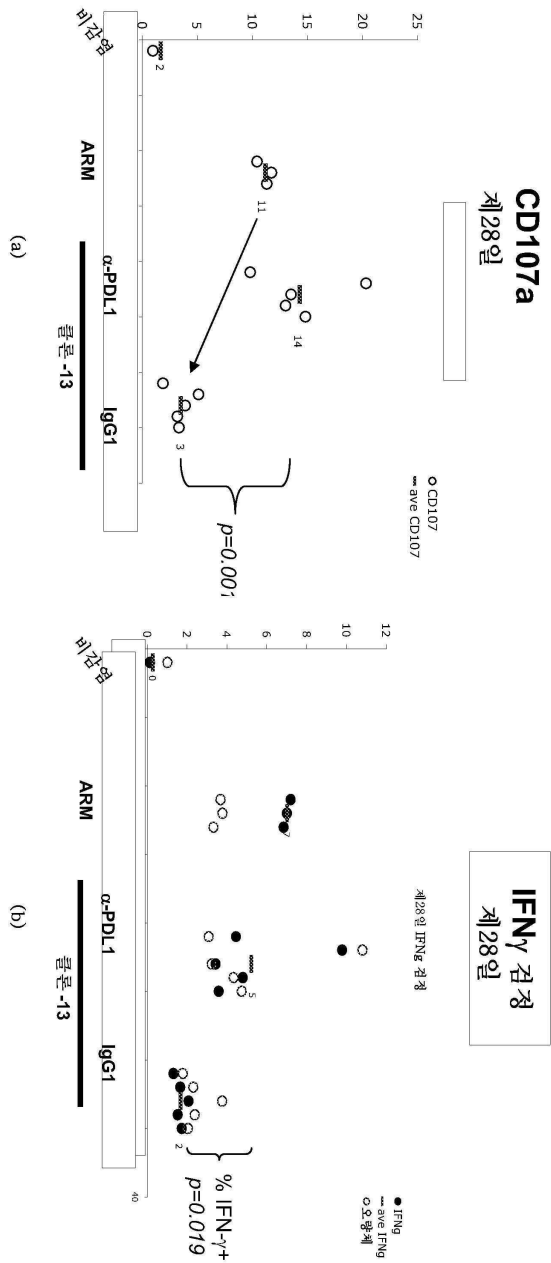
-비감염



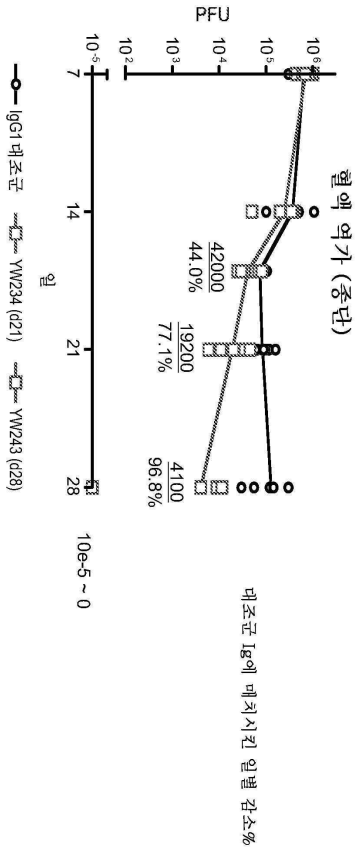
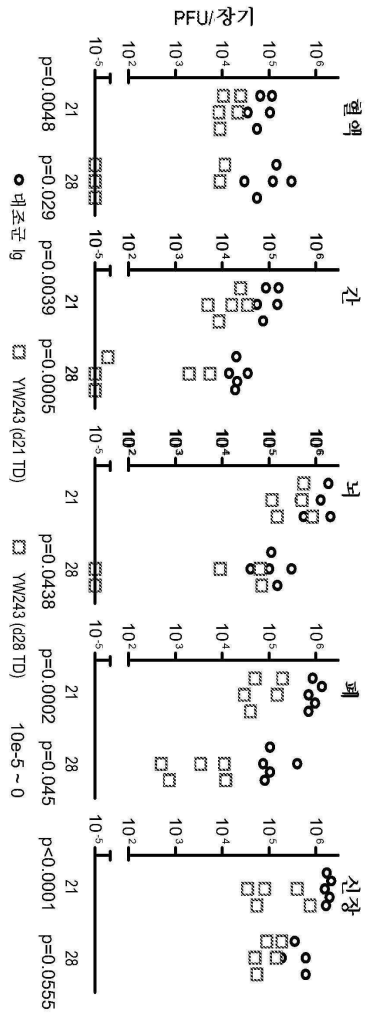
도면6

항-PDL1 처리된 마우스에서 CD8 이펙터 기능에 대한 항-PD-L1 Ab의 효과

도면7

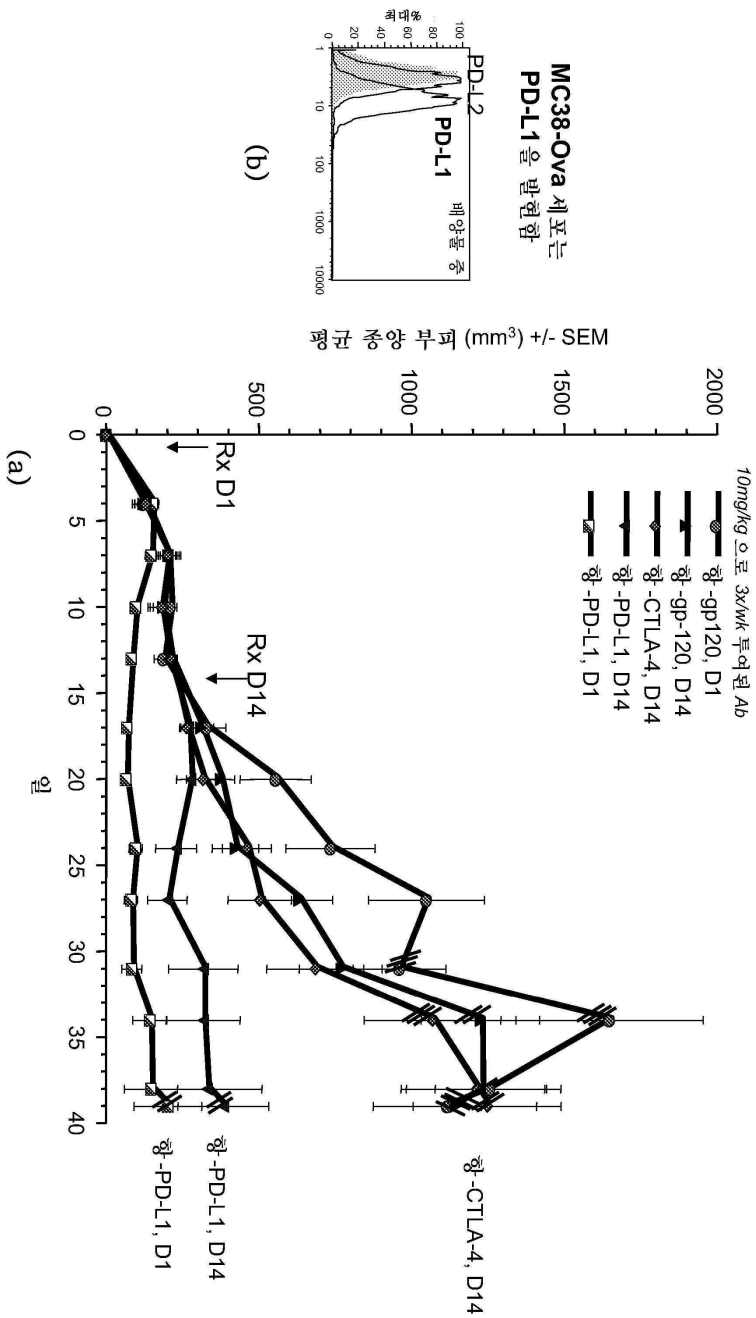


α -PD-L1 처리된 마우스에서 혈청 및 조직에서의 바이러스 역가의 감소

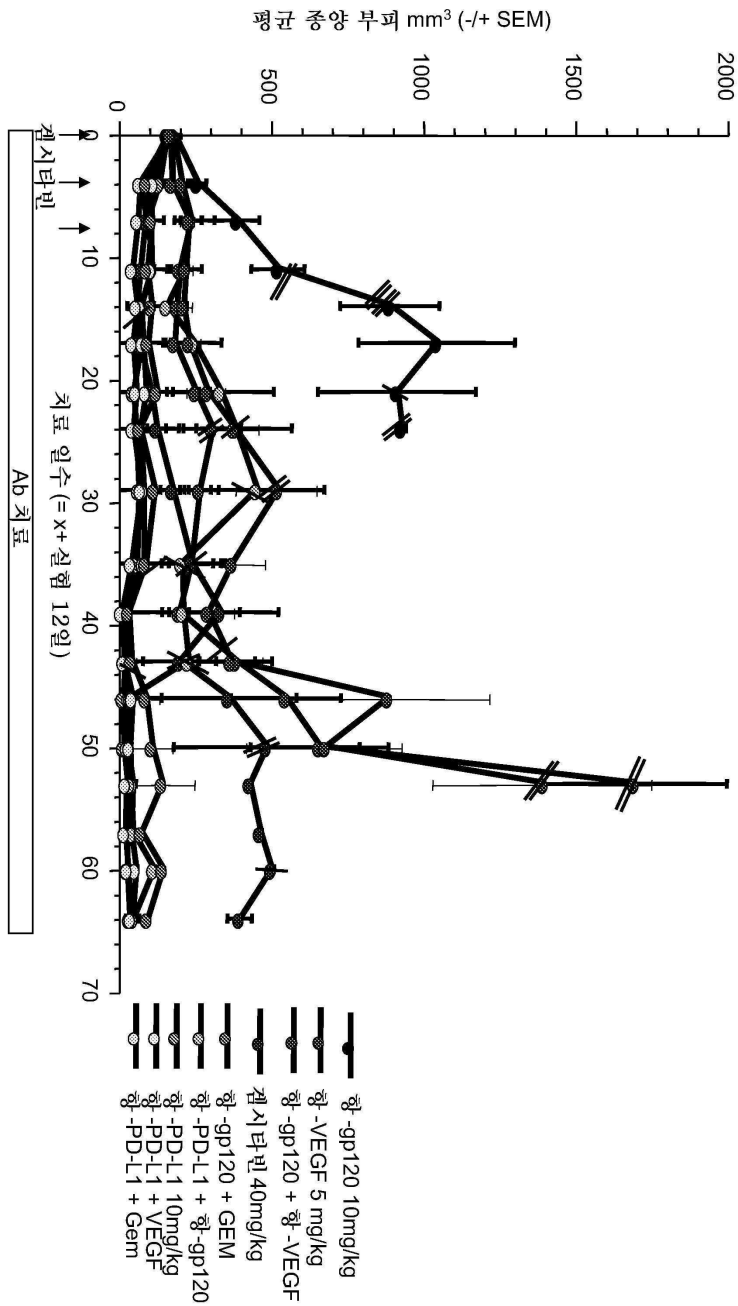


도면8

MC38.Ova 결장직장 모델에서 항-PDL1 치료에 의한 후속 개입의 효과



도면10



도면11a

중쇄

카바트# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 35A 35B 36 37 38 39 40 41 42 43

		한글-치환식										한글-치환식										한글-치환식									
		한글-치환식										한글-치환식										한글-치환식									
WY211 랜선스프	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S D S Y A M S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	W V R Q A P G K	서	제22																	
H34315.570	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S D S W I H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	W V R Q A P G K	서	제22																	
2435.01 H	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S D S W I H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	W V R Q A P G K	서	제23																	
2435.012 H	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S D S W I H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	W V R Q A P G K	서	제23																	
2435.017 H	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S D S W I H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	W V R Q A P G K	서	제23																	
2435.070 H	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S D S W I H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	W V R Q A P G K	서	제23																	
2435.088 H	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S D S W I H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	W V R Q A P G K	서	제23																	
2435.01 E	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S D S W I H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	W V R Q A P G K	서	제23																	
2435.05 E	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S D S W I H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	W V R Q A P G K	서	제23																	
2435.08 E	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S D S W I H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	W V R Q A P G K	서	제23																	
2435.030 E	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S D S W I H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	W V R Q A P G K	서	제23																	
2435.034 E	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S D S W I H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	W V R Q A P G K	서	제23																	
2435.037 E	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S D S W I H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	W V R Q A P G K	서	제23																	
2435.040 E	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S D S W I H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	W V R Q A P G K	서	제23																	
2435.051 E	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S D S W I H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	W V R Q A P G K	서	제23																	
2435.052 E	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S D S W I H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	W V R Q A P G K	서	제23																	
2435.064 E	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S D S W I H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	W V R Q A P G K	서	제24																	

카바트# 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A B C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 72 74 75 76 77 79 80 81 82 A

		키보드 : CDR H2		출력 : 2015.07.24	
		파일명 : 20150724		파일크기 : 1000000000	
HDD1 파티션 50		G L E W V W	S A V I S G	-- D G G S T Y Y A	D S V K V K G R F T T I S A D T S K N T A Y L Q M N
2435.05 H12		G L E W V W	A W I S P	-- Y G G S T Y Y A	D S V K V K G R F T T I S A D T S K N T A Y L Q M N
2435.05 H12		G L E W V W	A W I S P	-- Y G G S T Y Y A	D S V K V K G R F T T I S A D T S K N T A Y L Q M N
2435.05 H37		G L E W V W	A W I S P	-- Y G G S T Y Y A	D S V K V K G R F T T I S A D T S K N T A Y L Q M N
2435.05 H40		G L E W V W	A W I S P	-- Y G G S T Y Y A	D S V K V K G R F T T I S A D T S K N T A Y L Q M N
2435.05 H89		G L E W V W	A W I S P	-- Y G G S T Y Y A	D S V K V K G R F T T I S A D T S K N T A Y L Q M N
2435.05 S1		G L E W V W	A W I S P	-- Y G G S T Y Y A	D S V K V K G R F T T I S A D T S K N T A Y L Q M N
2435.05 S		G L E W V W	A W I S P	-- Y G G S T Y Y A	D S V K V K G R F T T I S A D T S K N T A Y L Q M N
2435.05 S10		G L E W V W	A W I S P	-- Y G G S T Y Y A	D S V K V K G R F T T I S A D T S K N T A Y L Q M N
2435.05 S30		G L E W V W	A W I S P	-- Y G G S T Y Y A	D S V K V K G R F T T I S A D T S K N T A Y L Q M N
2435.05 S34		G L E W V W	A W I S P	-- Y G G S T Y Y A	D S V K V K G R F T T I S A D T S K N T A Y L Q M N
2435.05 S37		G L E W V W	A W I S P	-- Y G G S T Y Y A	D S V K V K G R F T T I S A D T S K N T A Y L Q M N
2435.05 S40		G L E W V W	A W I S P	-- Y G G S T Y Y A	D S V K V K G R F T T I S A D T S K N T A Y L Q M N
2435.05 S51		G L E W V W	A W I S P	-- Y G G S T Y Y A	D S V K V K G R F T T I S A D T S K N T A Y L Q M N
2435.05 S62		G L E W V W	A W I S P	-- Y G G S T Y Y A	D S V K V K G R F T T I S A D T S K N T A Y L Q M N
2435.05 S84		G L E W V W	A W I S P	-- Y G G S T Y Y A	D S V K V K G R F T T I S A D T S K N T A Y L Q M N

카바트# B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H I J K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

		카바보 (CMB H3)																											
		코비트 (CMB H3)																											
		코비트 (CMB H3)																											
He II 램프스프	S L R A E D T A V Y Y C A R R	G	H	W	P	G	G	---	---	---	---	---	---	---	---	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
W243.55 H70	S L R A E D T A V Y Y C A R R	R	H	W	P	G	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
243.55 H1	S L R A E D T A V Y Y C A R R	R	H	W	P	G	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
243.55 H12	S L R A E D T A V Y Y C A R R	R	H	W	P	G	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
243.55 H37	S L R A E D T A V Y Y C A R R	R	H	W	P	G	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
243.55 H70	S L R A E D T A V Y Y C A R R	R	H	W	P	G	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
243.55 H89	S L R A E D T A V Y Y C A R R	R	H	W	P	G	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
243.55 S1	S L R A E D T A V Y Y C A R R	R	H	W	P	G	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
243.55 S	S L R A E D T A V Y Y C A R R	R	H	W	P	G	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
243.55 S	S L R A E D T A V Y Y C A R R	R	H	W	P	G	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
243.55 S10	S L R A E D T A V Y Y C A R R	R	H	W	P	G	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
243.55 S36	S L R A E D T A V Y Y C A R R	R	H	W	P	G	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
243.55 S37	S L R A E D T A V Y Y C A R R	R	H	W	P	G	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
243.55 S48	S L R A E D T A V Y Y C A R R	R	H	W	P	G	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
243.55 S51	S L R A E D T A V Y Y C A R R	R	H	W	P	G	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
243.55 S62	S L R A E D T A V Y Y C A R R	R	H	W	P	G	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
243.55 S84	S L R A E D T A V Y Y C A R R	R	H	W	P	G	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> variant

<222> 6

<223> residue is D or G

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Ser Trp Ile His

5

10

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> variant

<222> 4

<223> residue is S or L

<220><221> variant

<222> 10

<223> residue is T or S

<400> 2

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

1

5

10

15

Val Lys Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 3

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr

5

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 4

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

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223>

> sequence is synthesized

<400> 5

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

5 10

<210> 6

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Arg

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 7

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

5

10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> variant

<222> 5

<223> residue is D or V

<220><221> variant

<222> 6

<223> residue is V or I

<220><221> variant

<222> 7

<223> residue is S or N

<220><221> variant

<222> 9

<223> residue is A or F

<220><221> variant

<222> 10

<223> residue is V or L

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Ala

5

10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> variant

<222> 4

<223> residue is F or T

<220><221> variant

<222> 6

<223> residue is Y or A

<400> 9

Ser Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser

5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> variant

<222> 3

<223> residue is Y, G, F or S

<220><221> variant

<222> 4

<223> residue is L, Y, F, or W

<220><221> variant

<222> 5

<223> residue is Y, N, A, T, G, F or I

<220><221> variant

<222> 6

<223> residue is H, V, P, T or I

<220><221> variant

<222> 8

<223> residue is A, W, R, P or T

<400> 10

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr

5

<210> 11

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 11

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

1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 12

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

1 5 10 15

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Cys

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 14

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

5

10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 15

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His

5

10

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 16

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

1

5

10

15

Val Lys Gly

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 17

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

5

10

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 18

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 19

Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr

5

<210> 20

<211

> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser

65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe

95 100 105

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

110

115

<210> 21

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 21

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5						10				15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser
				20						25				30
Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35						40				45
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
				50						55				60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				65						70				75
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80						85				90
Tyr	Leu	Tyr	His	Pro	Ala	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95						100				105
Ile	Lys	Arg												

<210> 22

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

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

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 110

<210> 23

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220

><223> sequence is synthesized

<400> 23

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

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe
 95 100 105

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

110

115

<210> 24

<211> 118

<212>

> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 24

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

Glu Trp Val Ala Trp Ile Leu Pro Tyr Gly Gly Ser Ser Tyr Tyr

50

55

60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser

65

70

75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80

85

90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe

95

100

105

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

110

115

<210> 25

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

1

5

10

15

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

20	25	30
Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys		
35	40	45
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser		
50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile		
65	70	75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln		
80	85	90
Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu		
95	100	105
Ile Lys Arg		

<210> 26

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400>

26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val		
1	5	10
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser		
20	25	30
Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys		
35	40	45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser		
50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile		
65	70	75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln		
80	85	90
Tyr Tyr Asn Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu		

95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75

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

80 85 90

Tyr Tyr Ala Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 28

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 28

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

1	5	10	15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser			
	20	25	30
Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys			
	35	40	45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser			
	50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile			
	65	70	75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln			
	80	85	90
Tyr Tyr Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu			
	95	100	105
Ile Lys Arg			

<210> 29

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val			
1	5	10	15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Asn			
	20	25	30
Thr Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys			
	35	40	45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser			
	50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile			
	65	70	75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln			

80 85 90

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

95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 30

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75

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

80 85 90

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

95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 31

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 31

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5						10				15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser
				20						25				30
Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35						40				45
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
				50						55				60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				65						70				75
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80						85				90
Tyr	Leu	Phe	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95						100				105

Ile Lys Arg

<210> 32

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 32

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

	65	70	75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln			
	80	85	90
Tyr Phe Ile Thr Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu			
	95	100	105
Ile Lys Arg			

<210> 33

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 33

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

	50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile			
	65	70	75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln			
	80	85	90
Tyr Tyr Tyr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu			
	95	100	105
Ile Lys Arg			

<210> 34

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 34

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5						10				15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser
				20						25				30
Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35						40				45
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
				50						55				60
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
				65						70				75
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80						85				90
Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95						100				105
Ile	Lys	Arg												

<210> 35

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400>

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

50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Ser Leu Phe Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg

<210> 36

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 36

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

1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Ser Leu Tyr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg

<210> 37

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 37

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

Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser
				20						25				30

Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35						40				45

Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
				50						55				60

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

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

				80						85				90
--	--	--	--	----	--	--	--	--	--	----	--	--	--	----

Ser	Trp	Tyr	His	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95						100				105

Ile	Lys	Arg
-----	-----	-----

<210> 38

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 38

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

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

				20						25				30
--	--	--	--	----	--	--	--	--	--	----	--	--	--	----

Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

35	40	45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser		
50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile		
65	70	75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln		
80	85	90
Tyr Phe Tyr Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu		
95	100	105
Ile Lys Arg		

<210> 39

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser
20 25 30

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys		
35	40	45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser		
50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile		
65	70	75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln		
80	85	90
Tyr Trp Tyr Thr Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu		
95	100	105
Ile Lys Arg		

<210> 40

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75

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

80 85 90

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

95 100 105

Ile Lys Arg