(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월12일
(11) 등록번호 10-2778941
(24) 등록일자 2025년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C07K 16/28* (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
*G01N 33/533* (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C07K 16/2827* (2013.01)
*C07K 16/3015* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7005614(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년03월24일
심사청구일자 2023년03월20일
(85) 번역문제출일자 2023년02월16일
(65) 공개번호 10-2023-0031373
(43) 공개일자 2023년03월07일
(62) 원출원 특허 10-2018-7031149
원출원일자(국제) 2017년03월24일
심사청구일자 2020년03월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/024024
(87) 국제공개번호 WO 2017/172517
국제공개일자 2017년10월05일
(30) 우선권주장
62/314,940 2016년03월29일 미국(US)
62/361,298 2016년07월12일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
Antje Danielczyk et al., 'PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody', Cancer Immunology Immunotherapy, Vol.55, pp.1337-1347, 2006.02.17.*
Janis M. Taube et al., 'Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1 Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape', Sci transl med.*
Pharmacology Review. Application Number: 125554Orig1s000(OPDIVO(nivolumab)), Center for Drug Evaluation and Research, 2014.12.04.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
**주식회사 에스티큐브앤컴퍼니**
서울특별시 강남구 삼성로96길 12 ,7층(삼성동,정석빌딩)
**더 보드 오브 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템**
미국, 텍사스 78701, 오스틴, 210 웨스트 7 스트리트
(72) 발명자
**유, 스테판 에스.**
미국 버지니아주 20120 센터빌 쥴 스타 드라이브 5233
**홍, 미엔-치에**
미국 텍사스주 77096 휴스턴 버드우드 로드 5762
(74) 대리인
**특허법인 광장리앤고**

전체 청구항 수 : 총 17 항 심사관 : 문영준

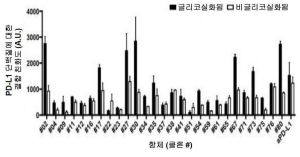
(54) 발명의 명칭 **글리코실화된 면역체크포인트 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 선택하는 방법**

## (57) 요 약

비글리코실화된 ICP에 비해 글리코실화된 면역 체크포인트 단백질(ICP)에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하고 이에 대해 스크리닝하기 위한 방법이 제공된다. 상기 항체는 글리코실화된 ICP의 특정 에피토프를 인식하고, 글리코실화된 ICP와 이의 리간드, 예컨대 다른 ICP의 결합을 예방하거나 차단할 수 있으며, 인간 PD-L1/PD-1 상호

(뒷면에 계속)

## 대 표 도



작용에 의해 예시된 바와 같이 면역억제를 야기할 수 있는 2 개의 단백질 사이의 상호작용을 억제할 수 있다. 구체적 예로서, PD-L1 또는 PD-1에 각각 특이적으로 결합하고, PD-L1/PD-1 상호작용을 억제하는 항-글리코실화된 PD-L1 또는 항-글리코실화된 PD-1 항체를 생성하기 위해, 세포외 도메인 내에 글리코실화된 아미노산 잔기를 포함하는 인간 PD-L1 및 PD-1 폴리펩티드가 제공된다. 본 방법에 의해 생성되고 선택된 항체는 ICP 시스템 및 이의 특정 ICP 상호작용을 방해, 차단, 또는 중화하기 위한 암 치료제로서 특히 유용하다.

(52) CPC특허분류

***G01N 33/533*** (2013.01)
***G01N 33/6845*** (2013.01)
*C07K 2317/30* (2013.01)
*C07K 2317/73* (2013.01)
*C07K 2317/76* (2013.01)
*C07K 2317/77* (2013.01)
*C07K 2317/92* (2013.01)

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

글리코실화된 면역 체크포인트 단백질(immune checkpoint protein)(ICP) 항원에 우선적으로 결합하는 항체를 확인하고 단리시키는 방법으로서,

a) 글리코실화된 ICP 항원에 대한 특이적 결합을 위한 항체 집단을 스크리닝하는 단계;

b) 글리코실화된 ICP 항원에 비해 ICP 항원의 비글리코실화된 형태에 대한 약한 결합으로 글리코실화된 ICP 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 스크리닝하는 단계;

c) ICP의 비글리코실화된 형태에 비해 더 큰 친화도로 글리코실화된 ICP에 결합하는 항체를 단리시키는 단계를 포함하고,

ICP가 인간 ICP이며,

i) 인간 글리코실화된 ICP 항원이 전장 인간 PD-L1 또는 인간 PD-L1의 단편을 포함하는 단리된 폴리펩티드이고, 상기 폴리펩티드가 인간 PD-L1의 위치 N35, N192, N200, 및 N219에 상응하는 아미노산을 포함하되, PD-L1의 위치 N35, N192, N200 및 N219에 상응하는 아미노산이 글리코실화되거나, 또는

ii) 인간 글리코실화된 ICP 항원이 전장 인간 PD-1 또는 인간 PD-1의 단편을 포함하는 단리된 폴리펩티드이고, 상기 폴리펩티드가 인간 PD-1의 위치 N49, N58, N74 및 N116에 상응하는 아미노산을 포함하되, PD-1의 위치 N49, N58, N74 및 N116에 상응하는 아미노산이 글리코실화되는 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

항체 집단이 파지 디스플레이 항체 라이브러리인 방법.

### 청구항 3

제2항에 있어서,

파지 항체 라이브러리가 인간 항체 레퍼토리 라이브러리인 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항체가 ICP 항원의 비글리코실화된 형태에 대한 항체의 결합에 의해 나타나는 $K_d$의 2분의 1 미만의 $K_d$로 글리코실화된 ICP 항원에 결합하는지에 대해 시험되는 방법.

### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 항체가 ICP 항원의 비글리코실화된 형태에 대한 항체의 결합에 의해 나타나는 $K_d$에 비해 적어도 5 배 작은 $K_d$로 글리코실화된 ICP 항원에 결합하는지에 대해 시험되는 방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 항체가 ICP 항원의 비글리코실화된 형태를 발현하는 세포에 대한 항체의 결합에 의해 나타나는 측정 형광 강도(measured fluorescence intensity)(MFI) 값에 비해 적어도 2 배 내지 20 배 큰 글리코실화된 ICP 항원을 발현하는 세포에 결합하기 위한 MFI 값으로 글리코실화된 ICP 항원에 결합하는지에 대해 시험되고, 항체가 형광

표지로 직접적으로 또는 간접적으로 표지되는 방법.

**청구항 7**

제6항에 있어서,

상기 항체가 ICP 항원의 비글리코실화된 형태에 대한 항체의 결합에 의해 나타나는 MFI 값에 비해 적어도 3 배 내지 적어도 5 배 큰 글리코실화된 ICP 항원에 결합하기 위한 MFI 값으로 글리코실화된 ICP 항원에 결합하는지에 대해 시험되는 방법.

**청구항 8**

제1항에 있어서,

글리코실화된 ICP가 PD-L1인 방법.

**청구항 9**

제1항에 있어서,

글리코실화된 ICP가 PD-1인 방법.

**청구항 10**

제1항에 있어서,

단계 (a) 및/또는 단계 (b)에서의 스크리닝이 유세포분석에 의한 것인 방법.

**청구항 11**

제1항에 있어서,

항체가 동족 ICP 결합 파트너에 대한 ICP의 결합을 억제하는지 시험하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 12**

제1항에 있어서,

항체의 상보성 결정 영역(complementarity determining region)(CDR)을 포함하는 아미노산을 확인하는 단계 및 CDR 주위의 아미노산 서열을 인간화하여 인간화 항체를 생성하는 단계를 단계 (c) 이후에 추가로 포함하는 방법.

**청구항 13**

제12항에 있어서,

인간화 항체를 재조합적으로 발현하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 14**

제1항에 있어서,

단리된 폴리펩티드가 인간 PD-L1의 적어도 8-20 개의 연속 아미노산을 포함하는 방법.

**청구항 15**

제1항에 있어서,

단리된 폴리펩티드가 이의 아미노 또는 카복시 말단에서 면역원성 폴리펩티드에 융합되거나 콘쥬게이트되는 방법.

**청구항 16**

제1항에 있어서,

단리된 폴리펩티드가 인간 PD-1의 적어도 8-20 개의 연속 아미노산을 포함하는 방법.

**청구항 17**

제1항에 있어서,

상기 항체의 에피토프와 중첩되지 않는 인간 글리코실화된 ICP의 에피토프에 결합하는 2 차 항체의 항원 결합 도메인을 함유하는 scFv를 상기 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 N-말단에 연결하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] **서열 목록**

[0002] 본 출원은 ASCII 형태로 전자적으로 제출된 서열 목록을 함유하며, 그 전체는 본원에 참고로 포함된다. 2017년 3월 23일에 생성된 상기 ASCII 사본은 명칭이 24258_105006PCT_SL.txt이고, 31,652 바이트의 크기이다.

[0003] **관련 분야**

[0004] 본 발명에 제시된 방법은 일반적으로 분자 생물학, 의약 및 종양학 분야에 관한 것이다. 보다 특히, 글리코실화된 면역 체크포인트 단백질(immune checkpoint protein)에 특이적으로 및 우선적으로 결합하는 항체를 제조하고, 선택하고 스크리닝하기 위한 방법이 제공된다.

### *배 경 기 술*

[0005] **배경**

[0006] 면역 체크포인트 경로는 면역 체크포인트 분자(폴리펩티드 및 펩티드)를 보유하는 면역 세포들 사이의 상호작용을 포함하며, 정상 조건 하에서, 자기면역 관용(self-tolerence)을 유지하고, 항균 면역 반응 동안 부수적 조직 손상을 제한한다. 이들 경로는 면역 파괴를 회피하기 위해 암 및 종양 세포에 의해 사용될 수 있다. 항-CTLA-4, 항-PD-1, 항-PD-L1 항체와 같은 면역 체크포인트를 방해하여, 종양 세포와 면역 T 세포의 상호작용을 차단하고, 항-종양 면역력을 제공하며, 지속적인 암 퇴축 요법을 매개하기 위한 노력으로 약물이 개발 및 시험 중에 있다. 면역 체크포인트 경로의 생물학은 복합적이며, 단독으로 또는 조합적으로 사용되는 체크포인트-차단성 약물의 전체 활성 스펙트럼은 현재 집중적으로 연구되는 주제이다. (S. Topalian et al., 2015, *Cancer Cell*, 27(4): 450-461).

[0007] 암 질환 병인에서 교란 사례는 종양이 특히, 종양 항원에 특이적인 T 세포에 대한 면역 저항성의 주요 메커니즘으로서 특정 면역-체크포인트 경로를 공동-선택할 수 있다는 것이다. 많은 면역 체크포인트가 리간드-수용체 상호작용에 의해 개시되기 때문에, 이들은 항체에 의해 용이하게 차단되거나 리간드 또는 수용체의 재조합 형태에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, 세포독성 T-림프구 연관 항원 4(cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4)(CTLA4) 항체는 미국 식품의약국(Food and Drug Administration)(FDA)에 의해 승인된 1 차 면역치료제 중 하나이다. 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(programmed cell death protein 1)(PD-1)과 같은 추가 면역-체크포인트 단백질의 차단제에 의한 조사결과는 지속적 임상 반응을 생성할 가능성이 있는 항종양 면역력을 향상시키는 광범위하고 다양한 기회를 나타낸다. (D. Pardoll, 2012, *Nature Reviews Cancer*, 12:252-264). PD-1에 대한 치료 항체인 KEYTRUDA® 펨브롤리주맙 및 OPDIVO® 니볼루맙이 미국 FDA에 의해 승인되었다.

[0008] 면역 체크포인트 분자, 특히 종양 세포 상에서 안정적으로 발현되고, 면역 T 세포 상의 리간드에 결합하여, 종양 세포에 대한 T 세포 활성의 면역억제를 촉진하는 면역 체크포인트 분자를 특이적으로 인식하고 결합하는 항체를 생성하고 선택하는 방법이 의약 현장에서 필요하다. 또한, 종양 세포 상의 면역 체크포인트 분자와 이펙터 T 세포 상의 동족 리간드의 상호작용을 차단하고 억제하여, 종양 세포를 파괴하고, 궁극적으로 암을 치료하는데 필요한 T 세포 반응의 면역억제를 예방하거나 억제하기 위해, 상기 방법에 의해 생성된 새롭고 특이적인 항체가 필요하다.

## *발명의 내용*

[0009] **요약**

[0010] 본 발명자들은 본원에서 "ICP"로 축약되는 면역 체크포인트 단백질, 예를 들어 종양 세포 상에 발현된 PD-L1의 글리코실화가 면역 이펙터 세포 상의 동족 리간드, 예를 들어 PD-1에 대한 결합을 촉진하거나 향상시키므로, 종양 세포에 대한 T 세포 활성의 억제를 증가시키고, PD-L1과 같은 ICP의 글리코실화는 또한, 세포 표면 상에서 상기 면역 체크포인트 단백질의 발현을 안정화시킬 수 있음을 발견하였다. 본 발명자들은 비글리코실화된 인간 ICP에 비해 PD-L1 폴리펩티드(CD274, PDCD1L1, 또는 B7-H1로도 알려짐) 또는 PD-1 폴리펩티드(CD279로도 알려짐)와 같은 글리코실화된 인간 ICP에 우선적으로 결합(즉, 비글리코실화된 형태에 비해 ICP의 글리코실화된 형태에 더 높은 친화도로 결합)하고, 상기 특이적 결합에 의해, 예를 들어 종양 세포 상의 ICP와, 예를 들어 T 세포, 또는 천연 킬러(natural killer) 세포(NK 세포)와 같은 면역 이펙터 세포 상의 이의 동족 리간드 또는 그 반대의 상호작용을 예방하거나 억제하는 항체를 생성하고 확인하는 방법을 개발하였다. 본원의 방법은 글리코실화된 ICP에 대해 선택적이고 이에 우선적으로 결합하며, 효과적인 ICP 억제제로서 제공되어, ICP 상호작용 경로를 통한 상기 종양 세포와 T 세포 상호작용으로부터 야기되는 면역억제 효과를 예방, 감소, 차단, 또는 억제하는 항체를 제공한다. 용어 "면역 체크포인트 단백질" 및 "면역 체크포인트 폴리펩티드"("면역 체크포인트 분자"로도 지칭됨)는 본원에서 "ICP"로 축약된다는 것을 이해해야 한다. 용어 "글리코실화된 ICP"는 본원에서 "glycICP"로 축약된다.

[0011] 본원은 면역계의 세포 및/또는 종양 세포 상에 존재할 수 있는, ICP 표적 항원의 비글리코실화된 형태 또는 글리코실화 변이체 형태에 비해 글리코실화된 ICP 표적 항원을 선택적으로 인식하고 이에 우선적으로 결합하는 단리된 항체(본원의 항-glycICP 항체)를 생성하고 스크리닝하거나 선택하는 방법을 제공한다. 일부 경우에, 글리코실화된 ICP는 ICP의 야생형 또는 천연 발생 형태(즉, ICP WT)일 수 있으며; 따라서, ICP WT는 항체 생성 및 스크리닝을 위한 표적 항원으로서 제공된다. 실시양태에서, 당업계에 알려진 방법, 예를 들어 하이브리도마 기술, 항체 레퍼토리, 친화도 성숙 항체의 파지 디스플레이 라이브러리 등에 의해 생성된 클론 항체 집단이 ICP 표적 항원의 비글리코실화된 형태에 비해 ICP 표적 항원의 글리코실화된 형태에 결합하는 항체에 대해 스크리닝되고 선택될 수 있다.

[0012] 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 인간 글리코실화된 PD-L1 폴리펩티드(CD274, PDCD1L1, 또는 B7-H1로도 알려짐)이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 단백질 항원은 인간 글리코실화된 PD-1 폴리펩티드(CD279로도 알려짐)이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 인간 글리코실화된 PD-L2 폴리펩티드이다. 본원에 사용되는 정도에 대해, "PD-L1"은 PD-L1 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드, 특히 인간 PD-L1(서열번호 1의 아미노산 서열)을 지칭하며; "PD-1"은 PD-1 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드, 특히 인간 PD-1(서열번호 2의 아미노산 서열)을 지칭한다.

[0013] 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 CD366, FLJ14428, TIMD3 및 HAVCR2로도 알려진 인간 글리코실화된 "T 세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인(T-cell Immunoglobulin and Mucin domain) 3"(TIM-3)(아미노산 서열은 서열번호 4임)이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 CD223로도 알려진 인간 글리코실화된 "림프구 활성화 유전자(Lymphocyte Activation Gene)-3"(LAG-3)(아미노산 서열은 서열번호 5임)이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 CD272로도 알려진 인간 글리코실화된 "B 및 T 림프구 어테뉴에이터(B and T Lymphocyte Attenuator)"(BTLA)(아미노산 서열은 서열번호 3임)이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 IAP, MER6, 및 OA3로도 알려진 인간 글리코실화된 CD47이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 CD96 분자 또는 CD96 항원으로도 알려진 인간 글리코실화된 CD96이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 BGP 또는 BGP1으로도 알려진 인간 글리코실화된 "암배아 항원-관련 세포 접착 분자(Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule) 1(담즙성 당단백질)"(CEACAM1)(아미노산 서열은 서열번호 7임)이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 BTN 또는 BTN1으로도 알려진 인간 글리코실화된 "부티로필린 서브패밀리 1 멤버(Butyrophilin subfamily 1 member) A1"(BTN1A1)(아미노산 서열은 서열번호 6임)이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 SEMAJ, CD100, coll-4 및 FLJ39737으로도 알려진 인간 글리코실화된 세마포린 4D(아미노산 서열은 서열번호 8임)이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 BTL-II, BTN7, HSBLMHCI 및 SS2로도 알려진 인간 글리코실화된 "부티로필린-유사(Butyrophilin-like) 2"(BTNL2)이다. 본원에 사용되는 정도에 대해, 실시양태의 ICP 항원은 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드, 특히 인간 ICP 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드를 지칭한다. 양태에서, 본원에 기재된 방법의 실시에 의해, 항체가 생성되고 하기 표 1에 기재된 글리코실화된 아미노산을 포함하는, 상기 ICP 중 임의의 것에 우선적으로 결합하는지에 대해 스크리닝될 수 있다. 간략하게는, 글리코실화된 ICP 폴리펩티드, 또는 이의 글리코실화된 부분은 면역원으로서 사용되어, 각각의 글리코실화된 ICP 단백질 또는 이의 부분에 우선적으로 결합하는 항-glycICP 항체를 생성할 수 있다.

[0014] 비글리코실화된 ICP 항원에 비해 글리코실화된 ICP에 결합하는 특이성에 대해 생성 및 선택되는 항체는 글리코실화된 ICP 항원에 특이적으로 결합하고, ICP와 일반적으로 다른 세포, 예를 들어 면역 세포 또는 종양 세포 상에서 발현되는 단백질 수용체인 이의 동족 리간드의 상호작용을 차단하는 ICP 억제제로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체는 ICP 항원의 비글리코실화된 형태에 비해 2 배, 3 배, 4 배, 5 배, 6 배, 8 배 또는 10 배 크지만, 특정 실시양태에서, ICP 항원의 비글리코실화된 형태에 비해 20 배, 50 배, 100 배, 1000 배, 또는 10000 배 이하로 큰 결합 친화도로 ICP 항원의 글리코실화된 형태에 결합할 수 있다.

[0015] 대안적으로, 항체는 상응하는 비글리코실화된 ICP에 대한 항체의 결합에 의해 나타나는 $K_d$의 2분의 1 미만의 $K_d$로 글리코실화된 ICP에 결합할 수 있다. 다른 실시양태에서, 항체는 비글리코실화된 ICP에 비해 나타나는 $K_d$의 85% 미만, 80% 미만, 75% 미만, 70% 미만, 65% 미만, 60% 미만, 55% 미만, 50% 미만, 45% 미만, 30% 미만, 20% 미만 또는 10% 미만의 $K_d$로 글리코실화된 ICP에 결합한다. 추가 실시양태에서, 항체는 비글리코실화된 ICP에 비해 나타나는 $K_d$의 10 배, 100 배, 또는 1000 배 이하로 작은 $K_d$로 글리코실화된 ICP에 결합한다.

[0016] 글리코실화된 ICP 항원을 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 1 이상의 항체에 대한 클론 항체 집단(예컨대, 비제한적으로, 하이브리도마, 항체의 레퍼토리를 발현하는 파지 디스플레이 라이브러리 등)을 스크리닝하는 단계, 및 이어서, 항체가 글리코실화된 형태에 결합하는 것에 비해 낮은 친화도로 ICP 항원의 비글리코실화된 형태에 결합하는지에 대해, 글리코실화된 ICP 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 추가로 스크리닝하는 단계를 포함하는, 글리코실화된 ICP 항원에 특이적으로 및 우선적으로 결합하는 항체를 스크리닝하고 확인하는 방법이 제공된다. 대안적으로, 항체 집단은 비글리코실화된 ICP와 비교하여 글리코실화된 ICP에 대한 특이적 결합 및 글리코실화된 ICP에 대한 항체의 우선적 결합에 대하여 하나의 단계에서 스크리닝된다.

[0017] 스크리닝은 당업계에 알려진 임의의 방법을 사용하여, 예를 들어 표지된 글리코실화된 ICP 항원을 이용한 패닝(panning) 또는 글리코실화된 ICP 항원 또는 고체 지지체 상의 항원으로 글리코실화된 ICP를 발현하는 배양된 세포에 결합하기 위한 하이브리도마 배지 또는 라이브러리 멤버의 시험을 사용하여, 웨스턴 블롯팅에 의해, 또는 FACS 또는 항원에 대한 항체의 특이적 결합을 검출하기 위해 알려진 임의의 다른 방법에 의해 수행될 수 있다. ICP의 비글리코실화된 형태와 비교하여 ICP의 글리코실화된 형태에 대한 우선적 결합을 평가하는 단계는 고체 표면 상에 코팅된 글리코실화된 ICP 항원 및 비글리코실화된 ICP 각각에 대한 항체의 결합을 비교함으로써 또는 FACS 또는 유세포분석을 통해 수행될 수 있다.

[0018] 바람직한 실시양태에서, 우선적 결합에 대한 스크리닝은 유세포분석을 사용하여 ICP의 글리코실화된 형태 및 비글리코실화된 형태를 발현하는 세포 상에서 수행된다. 예를 들어, WT ICP(글리코실화됨)를 재조합적으로 발현하는 세포는 배양액에서 글리코실화되지 않은(예를 들어, 글리코실화 부위 내의 아스프라긴은 글루타민으로 치환됨) 돌연변이 ICP를 재조합적으로 발현하는 동일한 숙주 세포와 혼합될 수 있으며, 하나 또는 둘 다의 세포 세트는 검출 가능하거나 선택 가능하게 표지된다. 예를 들어, 하나의 세포 세트는 검출 가능하거나 선택 가능한 마커에 연결된 스트렙타비딘에 대한 결합을 통해 검출되고/되거나 분류될 수 있는 비오틴으로 표지될 수 있다. 세포의 혼합물은 시험될 항체와 접촉(직접적이거나 간접적일 수 있으며, 예컨대 검출 가능하거나 선택 가능한 마커로 표지된, 시험될 항체를 인식하는 2 차 항체를 이용할 수 있음)된 다음에, 양측 유형의 세포에 대한 결합이, 예를 들어 실시예 2에 기재된 바와 같이 FACS 또는 다른 항체 결합 에세이를 통해 에세이될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 유세포분석 에세이에서 비글리코실화된 ICP를 발현하는 세포에 비해 적어도 1.5 배, 2 배, 3 배, 4 배, 5 배, 6 배, 7 배, 8 배, 9 배, 또는 10 배 큰 빈도로 글리코실화된 ICP를 발현하는 세포에 우선적으로 결합하는 항체가 확인되며, 결합은 예를 들어, 항체가 형광 마커로 직접적으로 또는 간접적으로(예를 들어 표지된 2 차 항체로) 표지될 때, 2 개의 세포 집단에 대한 측정 형광 강도(measured fluorescence intensity)(MFI)에 의해 측정된다.

[0019] 글리코실화된 형태는 일반적으로 야생형 ICP 또는 이의 펩티드이다. ICP의 비글리코실화된 형태는 단백질로부터 글리코실화, 특히 N-연결된 글리코실화, 예를 들어, 비제한적으로, PNGase F를 이용한 분해를 제거하는 효소로 ICP를 처리함으로써 생성될 수 있다. 대안적으로, ICP는 글리코실화 부위 또는 단백질 내의 부위를 제거하도록 돌연변이화될 수 있다. N-연결된 글리코실화는 일반적으로 아스파라긴에 대한 다른 아미노산, 바람직하게는 글루타민의 치환이 상기 부위에서 글리코실화되지 않는 단백질을 야기하도록, 콘센서스 서열(consensus sequence) Asn-X-Ser/Thr(X는 프롤린 이외의 임의의 아미노산임)의 아스파라긴에서 발생한다.

[0020] 실시양태에서, 본 방법은 항-glycICP 항체를 스크리닝하여, 글리코실화된 ICP 항원과 이의 동족 ICP 결합 파트너(예를 들어, PD-1과 같은 리간드 또는 수용체는 PD-L1의 동족 ICP 결합 파트너임) 사이의 상호작용 또는 결합

을 특이적으로 차단하는 항-glycICP 항체를 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원 또는 이의 펩티드는 종양 또는 암 세포 상에서 발현되고, ICP 리간드는 면역 세포 상에서 발현된다. 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원 또는 이의 펩티드는 면역 세포 상에서 발현되고, ICP 리간드는 종양 또는 암 세포 상에서 발현된다. 실시양태에서, 면역 세포는 이펙터 T 세포 또는 천연 킬러 세포(NK 세포)이다. 항체는 ICP 결합 파트너의 세포외 도메인에 대한 Fc 융합물과 같은 결합 파트너의 변형된 가용성 형태를 포함하여, 표지된 ICP 결합 파트너와 항체의 ICP에 대한 결합을 위한 경쟁에 대해 에세이함으로써, 이의 ICP 결합 파트너에 대하여 ICP의 결합을 억제하거나 차단하는지에 대해 스크리닝된다. 대안적으로, 항체는 ICP-ICP 결합 파트너 결합의 생물학적 결과(예를 들어, 면역억제, 특정 사이토카인 생성 수준에서의 변경 등)가 검출되는 세포 에세이에서 ICP-ICP 결합 파트너 결합을 차단하는 이의 능력에 대해 에세이될 수 있다.

[0021] 글리칸 모이어티(moiety)에 대한 부착에 의해 변형된 적어도 하나의 글리코실화된 아스파라긴(N) 아미노산을 포함하는 인간 ICP의 적어도 7 개의 연속 아미노산의 단편을 포함하는 인간 글리코실화된 ICP 또는 이의 펩티드를 동물에서 항-글리코실화된 ICP 면역 반응을 유도하기에 효과적인 양으로 수용체 동물에게 투여하는 단계; 및 이어서, 스크리닝을 위해 동물로부터 하이브리도마를 제조하는 단계를 포함하는, 항체, 바람직하게는 글리코실화된 ICP를 향해 지향된 항체를 발현하는 클론 집단을 생성하는 방법이 제공된다. 실시양태에서, 동물은 마우스, 래트, 또는 토끼, 염소, 당나귀, 또는 비인간 영장류이다. 대안적으로, 항체의 라이브러리, 예를 들어 항체의 파지 라이브러리는 면역화된 동물로부터 생성될 수 있거나 항체의 나이브( naïve ) 라이브러리가 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 동물은 인간 면역글로불린에 대해 유전자도입(transgenic)된다. 다른 실시양태에서, 라이브러리는 인간 항체 레퍼토리를 대표하는 합성 라이브러리이다. 항체 라이브러리는 사합체 면역글로불린, F(ab) 단편, scFv, 또는 단일 도메인 항체를 포함하는, 임의의 형태로 항체를 발현하는 클론일 수 있다.

[0022] 실시양태에서, 항체를 제조 및 선택하는 방법에서 사용하기 위한 글리코실화된 ICP 항원은 PD-L1, PD-L2, PD-1, TIM-3, LAG-3, BTLA, CEACAM1, BTN1A1, BTNL2, SEMA4D, CD47, CD96, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, VISTA, 또는 KIR로부터 선택된다. 바람직하게는, ICP는 인간 ICP이다. 다른 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 다음 중 하나이다: AGER, ALCAM, AMIGO1, AMIGO2, AMIGO3, AXL, B2M, BCAM, BCAN, BOC, BSG, BTN2A1, BTN2A2, BTN3A3, BTNL1, BTNL6, BTNL7, BTNL9, CADM1, CADM2, CADM3, CADM4, CD101, CD160, CD19, CD1D2, CD2, CD200, CD22, CD226, CD244, CD274, CD276, CD28, CD300A, CD300E, CD300LB, CD300LD, CD300LF, CD300LG, CD33, CD3E, CD3G, CD4, CD48, CD7, CD79A, CD79B, CD80, CD83, CD84, CD86, CD8A, CD8B, CD8B1, CDON, CEACAM3, CEACAM5, CHL1, CILP, CNTFR, CNTN1, CNTN2, CNTN6, CRL, CRTAM, CSF1R, CSF3R, CXADR, EMBF, ERMAP, ESAM , F11R, FAIM3, FCER1A, FCGR2B, FCGRT, FCRL1, FCRL5, FCRLA, FCRLB, FGFR1, FGFR2, FGFR4, FLT1, FLT3, GP6, GPA33, HAPLN1, HAPLN2, HAPLN3, HAVCR1, HEPACAM, HEPACAM2, ICAM1, ICAM2, ICAM4, ICAM5, ICOS, IFNGR1, KIT, L1CAM, LAIR1, LEPR, LILRA5, LILRB4, LINGO1, LINGO2, LINGO4, LRFN1, LRFN2, LRFN3, LRFN4, LRFN5, LRIG1, LRIG2, LRIG3, LRIT1, LRRC4, LRRN1, LRRN2, LRRN3, LSAMP, LSR, LY6G6F, LY9, MADCAM1, MAG, MALT1, MCAM, MERTK, MFAP3, MOG, MPZ, MPZL1, MPZL2, MPZL3, MR1, MUSK, MXRA8, NCAM1, NCAM2, NCR1, NEGR1, NEO1, NFAM1, NPTN, NRCAM, NRG1, NTM, NTRK1, NTRK2, NTRK3, OPCML, OSCAR, PAPLN, PDCD1, PDCD1LG2, PDGFRA, PDGFRB, PECAM1, PIGR, PRTG, PTGFRN, PTK7, PTPRD, PTPRK, PTPRS, PTPRT, PTPRU, PVR, PVRL1, PVRL2, PVRL3, PVRL4, PXDN, ROBO1, ROBO2, ROBO3, ROBO4, ROR1, ROR2, SCN1B, SCN2B, SCN3B, SEMA3A, SEMA3B, SEMA3C, SEMA3F, SEMA4A, SEMA4B, SEMA4C, SEMA4F, SEMA4G, SEMA7A, SIGGIR, SIGLEC1, SIGLEC5, SIRPA, SIRPB1, SLAMF1, SLAMF6, SLAMF7, SLAMF8, SLAMF9, TAPBP, TAPBPL, TEK, THY1, TIE1, TIGIT, TIMD4, TMEM25, TMEM81, TMIGD1, TREM1, TREM2, TREML1, TREML2, TREML4, TYRO3, UNC5A, UNC5B, UNC5C, VCAM1, VPREB1, VPREB3, VSIG1, VSIG2, VSIG4, VSIG8, VTCN1, WFIKKN2.

[0023] 실시양태에서, 인간 글리코실화된 ICP 항원은 인간 PD-L1의 적어도 7 개의 연속 아미노산의 단편을 포함하는 단리된 폴리펩티드이되, 상기 폴리펩티드는 인간 PD-L1의 위치 N35, N192, N200, 또는 N219에 상응하는 적어도 하나의 아미노산(서열번호 1로 넘버링됨)을 포함하고, PD-L1의 위치 N35, N192, N200 또는 N219에 상응하는 아미노산 중 적어도 하나는 글리코실화된다. 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드는 인간 PD-L1의 적어도 8-20 개의 연속 아미노산을 포함한다. 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드는 인간 PD-L1의 위치 N35, N192, N200, 및/또는 N219에 상응하는 글리코실화된 아미노산을 포함한다. 다른 실시양태에서, 인간 글리코실화된 ICP 항원은 인간 PD-1의 적어도 7 개의 연속 아미노산의 단편을 포함하는 단리된 폴리펩티드이고, 상기 폴리펩티드는 인간 PD-1의 위치 N49, N58, N74 및/또는 N116에 상응하는 적어도 하나의 아미노산(서열번호 2로 넘버링됨)을 포함하되, PD-1의 위치 N49, N58, N74 및/또는 N116에 상응하는 아미노산 중 적어도 하나는 글리코실화된다. 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드는 인간 PD-1의 적어도 8-20 개의 연속 아미노산을 포함한다. 실시양태에서,

단리된 폴리펩티드는 인간 PD-1의 위치 N49, N58, N74 및/또는 N116에 상응하는 글리코실화된 아미노산을 포함한다. 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드는 그것의 아미노 또는 카복시 말단에서 ICP 폴리펩티드가 아닌 면역원성 폴리펩티드에 융합되거나 콘쥬게이트된다.

[0024] 단리된 항체가 인간 항체가 아닌(예를 들어, 뮤린(murine) 단클론 항체인) 다른 실시양태에서, 방법은 항체의 상보성 결정 영역(complementarity determining region)(CDR)을 포함하는 아미노산을 확인하는 단계 및 CDR 주위의 아미노산 서열을 인간화하여, 재조합적으로 발현되는 인간화 항체를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 실시양태에서, 방법은 인간화 항체를 재조합적으로 발현하는 단계를 포함한다. 대안적으로, 항체의 비인간 불변 도메인은 인간 불변 도메인으로 치환되어, 키메라 항체를 생성할 수 있다.

[0025] 다른 양태에서, 상기 기재된 방법에 의해 생성된 단리된 항체가 제공되며, 항체는 비글리코실화된 ICP에 비해 글리코실화된 ICP 항원에 선택적으로 및 우선적으로 결합한다. 실시양태에서, 단리된 항체는 항-글리코실화된 PD-L1 항체이다. 실시양태에서, 단리된 항체는 항-글리코실화된 PD-1 항체이다. 실시양태에서, 항체는 단클론 인간화, 키메라, 또는 인간 항체이다. 다른 실시양태에서, 항체는 이소형(isotype) IgM, IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, 또는 이의 항원 결합 단편의 것이다. 실시양태에서, 항체는 Fab', $F(ab')_2$, $F(ab')_3$, 1가 scFv, 2가 scFv, 또는 단일 도메인 항체로부터 선택된다. 다른 실시양태에서, 항체는 이미징제, 화학치료제, 독소, 또는 방사성핵종에 콘쥬게이트된다.

[0026] 특별한 양태에서, 본원에 기재된 방법은 비글리코실화된 PD-L1 단백질에 비해 글리코실화된 PD-L1 단백질에 특이적으로 및 우선적으로 결합하는 항-글리코실화된 PD-L1 항체(본원에서 항-glycPD-L1 항체로 지칭됨)를 스크리닝하고 선택하는데 적합하다. 실시양태에서, 항-glycPD-L1 항체는 비글리코실화된 PD-L1 단백질에 비해, 예를 들어 서열번호 1에 기재된 바와 같은 PD-L1 단백질의 아미노산 위치 N35, N192, N200 및/또는 N219, 특히 PD-L1 단백질의 세포외 도메인(extracellular domain)(ECD)에서 글리코실화되는 PD-L1 단백질에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-glycPD-L1 항체는 PD-L1 글리코폴리펩티드 또는 이의 펩티드에서의 1 이상의 글리코실화 모티프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-glycPD-L1 항체는 글리코실화 모티프 및 인접 펩티드를 포함하는 PD-L1 글리코펩티드에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-glycPD-L1 항체는 3 차원으로 1 이상의 글리코실화 모티프에 인접하여 위치한 펩티드 서열에 결합한다. 따라서, 실시양태에서, 항-glycPD-L1 항체는 글리코실화된 PD-L1의 입체구조 에피토프를 인식하고 이에 선택적으로 결합한다. 예로서, 특정 실시양태에서, 항-glycPD-L1 항체는 비글리코실화된 PD-L1에 대한 항체의 결합에 의해 나타나는 $K_d$의 2분의 1 미만의 $K_d$로 글리코실화된 PD-L1에 결합한다. 실시양태에서, 항-glycPD-L1 항체는 비글리코실화된 PD-L1에 대한 항체의 결합에 의해 나타나는 $K_d$에 비해 적어도 5 배 작은 $K_d$로 글리코실화된 PD-L1 단백질에 결합한다. 실시양태에서, 항-glycPD-L1 항체는 비글리코실화된 PD-L1 단백질에 관해 나타난 $K_d$ 보다 적어도 10 배 작은 $K_d$로 글리코실화된 PD-L1 단백질에 결합한다. 실시양태에서, 실시예 2에 기재된 유세포분석 결합 에세이에서, 항-glycPD-L1 항체는 비글리코실화된 PD-L1을 발현하는 세포에 결합하기 위한 MFI에 비해 1.5 배, 2 배, 3 배, 4 배, 5 배, 6 배, 7 배, 8 배, 9 배 또는 10 배 큰 WT PD-L1을 발현하는 세포에 대한 MFI 만큼 발현된 결합을 나타낸다. 실시양태에서, 항-glycPD-L1 항체는 5-20 nM, 5-10 nM, 또는 10-20 nM의 친화도로 글리코실화된 PD-L1 단백질에 선택적으로 결합한다. 실시양태에서, 항체는 인간, 인간화, 또는 재조합 항체이다.

[0027] 다른 구체적 양태에서, 비글리코실화된 PD-1 단백질에 비해 글리코실화된 PD-1 단백질에 특이적으로 및 우선적으로 결합하는 항-글리코실화된 PD-1 항체(본원에서 항-glycPD-1 항체로 지칭됨), 또는 이의 결합 단편을 스크리닝하고 선택하는 방법이 제공된다. 실시양태에서, 항-glycPD-1 항체는 비글리코실화된 PD-1 단백질에 비해, 예를 들어 서열번호 2에 기재된 바와 같은 인간 PD-1 단백질의 아미노산 위치 N49, N58, N74 및/또는 N116, 특히 PD-1 단백질 세포외 도메인(ECD)에서 글리코실화되는 PD-1 단백질에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-glycPD-1 항체는 PD-1 글리코폴리펩티드 또는 이의 펩티드에서의 1 이상의 글리코실화 모티프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-glycPD-1 항체는 글리코실화 모티프 및 인접 펩티드를 포함하는 PD-1 글리코펩티드에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-glycPD-1 항체는 3 차원으로 1 이상의 글리코실화 모티프에 인접하여 위치한 펩티드 서열에 결합한다. 따라서, 실시양태에서, 항-glycPD-1 항체는 글리코실화된 PD-1의 비선형, 입체구조 에피토프를 인식하고 이에 선택적으로 결합한다. 예로서, 특정 실시양태에서, 항-glycPD-1 항체는 비글리코실화된 PD-1에 대한 항체의 결합에 의해 나타나는 $K_d$의 2분의 1 미만의 $K_d$로 글리코실화된 PD-1에 결합한다. 실시양태에서, 항-glycPD-1 항체는 비글리코실화된 PD-1에 대한 항체의 결합에 의해 나타나는 $K_d$에 비해 적어도 5 배 작은 $K_d$로 글리코실화된 PD-1 단백질에 결합한다. 실시양태에서, 항-glycPD-1 항체는 비글리코실화

된 PD-1 단백질에 관해 나타난 $K_d$ 보다 적어도 10 배 작은 $K_d$로 글리코실화된 PD-1 단백질에 결합한다. 실시양태에서, 실시예 2에 기재된 유세포분석 결합 에세이에서, 항-glycPD-1 항체는 비글리코실화된 PD-L1을 발현하는 세포에 결합하기 위한 MFI에 비해 1.5 배, 2 배, 3 배, 4 배, 5 배, 6 배, 7 배, 8 배, 9 배 또는 10 배 큰 WT PD-L1을 발현하는 세포에 대한 MFI 만큼 발현된 결합을 나타낸다. 실시양태에서, 항-glycPD-1 항체는 5-20 nM, 5-10 nM, 또는 10-20 nM의 친화도로 글리코실화된 PD-1 단백질에 선택적으로 결합한다. 실시양태에서, 항체는 단클론 항체이다. 실시양태에서, 항체는 인간, 인간화, 또는 재조합 항체이다.

[0028] 또 다른 양태에서, 생물학적 샘플에서 ICP의 글리코실화, N-연결된 글리코실화, 또는 N-글리코실화를 평가하는 방법이 제공되며, 방법은 ICP-함유 샘플을 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 항체(예를 들어, 비글리코실화된 ICP에 비해 글리코실화된 ICP에 선택적으로 결합하는 항체)와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 방법은 *시험관내(in vitro)* 방법 또는 에세이이다. 특정 양태에서, 생물학적 샘플은 세포 샘플, 조직 샘플, 체액(예를 들어, 혈장, 혈청, 혈액, 소변, 가래, 림프, 복수액, 복강내 유체, 뇌 척수액 등)이다. 특별한 실시양태에서, 샘플은 세포 샘플 또는 암 또는 종양을 갖는 대상체로부터 얻어진 종양 또는 암으로부터의 세포 샘플이다. 상기 암 또는 종양 세포 샘플은 항-글리코실화된 단백질 항체를 사용하여 암 또는 종양 세포 표면 상의 글리코실화된 ICP에 대해, 특히 글리코실화된 ICP가 대상체의 암 또는 종양 세포 상에 존재하는지, 상기 세포가 1 이상의 항-글리코실화된 ICP 항체를 이용한 치료를 위한 적절한 표적일 수 있는지를 결정하기 위해 에세이될 수 있다. 예로서, 글리코실화된 단백질에 특이적으로 결합하고 이의 동족 결합 파트너와의 상호작용을 예방하거나 차단하는 단리된 항체에 의해 검출 가능한 글리코실화된 ICP는 PD-L1, PD-L2, PD-1, TIM-3, LAG-3, BTLA, CEACAM1, BTN1A1, BTNL2, SEMA4D, CD47, CD96, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, VISTA, 또는 KIR 등을 포함한다.

[0029] 다른 실시양태에서, 항체는 다음과 이의 동족 결합 파트너의 상호작용을 차단한다: AGER, ALCAM, AMIGO1, AMIGO2, AMIGO3, AXL, B2M, BCAM, BCAN, BOC, BSG, BTN2A1, BTN2A2, BTN3A3, BTNL1, BTNL6, BTNL7, BTNL9, CADM1, CADM2, CADM3, CADM4, CD101, CD160, CD19, CD1D2, CD2, CD200, CD22, CD226, CD244, CD274, CD276, CD28, CD300A, CD300E, CD300LB, CD300LD, CD300LF, CD300LG, CD33, CD3E, CD3G, CD4, CD48, CD7, CD79A, CD79B, CD80, CD83, CD84, CD86, CD8A, CD8B, CD8B1, CDON, CEACAM3, CEACAM5, CHL1, CILP, CNTFR, CNTN1, CNTN2, CNTN6, CRL, CRTAM, CSF1R, CSF3R, CXADR, EMBF, ERMAP, ESAM, F11R, FAIM3, FCER1A, FCGR2B, FCGRT, FCRL1, FCRL5, FCRLA, FCRLB, FGFR1, FGFR2, FGFR4, FLT1, FLT3, GP6, GPA33, HAPLN1, HAPLN2, HAPLN3, HAVCR1, HEPACAM, HEPACAM2, ICAM1, ICAM2, ICAM4, ICAM5, ICOS, IFNGR1, KIT, L1CAM, LAIR1, LEPR, LILRA5, LILRB4, LINGO1, LINGO2, LINGO4, LRFN1, LRFN2, LRFN3, LRFN4, LRFN5, LRIG1, LRIG2, LRIG3, LRIT1, LRRC4, LRRN1, LRRN2, LRRN3, LSAMP, LSR, LY6G6F, LY9, MADCAM1, MAG, MALT1, MCAM, MERTK, MFAP3, MOG, MPZ, MPZL1, MPZL2, MPZL3, MR1, MUSK, MXRA8, NCAM1, NCAM2, NCR1, NEGR1, NEO1, NFAM1, NPTN, NRCAM, NRG1, NTM, NTRK1, NTRK2, NTRK3, OPCML, OSCAR, PAPLN, PDCD1, PDCD1LG2, PDGFRA, PDGFRB, PECAM1, PIGR, PRTG, PTGFRN, PTK7, PTPRD, PTPRK, PTPRS, PTPRT, PTPRU, PVR, PVRL1, PVRL2, PVRL3, PVRL4, PXDN, ROBO1, ROBO2, ROBO3, ROBO4, ROR1, ROR2, SCN1B, SCN2B, SCN3B, SEMA3A, SEMA3B, SEMA3C, SEMA3F, SEMA4A, SEMA4B, SEMA4C, SEMA4F, SEMA4G, SEMA7A, SIGGIR, SIGLEC1, SIGLEC5, SIRPA, SIRPB1, SLAMF1, SLAMF6, SLAMF7, SLAMF8, SLAMF9, TAPBP, TAPBPL, TEK, THY1, TIE1, TIGIT, TIMD4, TMEM25, TMEM81, TMIGD1, TREM1, TREM2, TREML1, TREML2, TREML4, TYRO3, UNC5A, UNC5B, UNC5C, VCAM1, VPREB1, VPREB3, VSIG1, VSIG2, VSIG4, VSIG8, VTCN1, 또는 WFIKKN2.

[0030] 양태에서, 본원에 개시된 방법의 실시에 의해, 폴리펩티드의 비글리코실화된 형태에 비해 적어도 하나의 글리코실화된 아미노산(예를 들어, 글리칸 모이어티에 대한 부착에 의해 변형된 아미노산(N 또는 아스파라긴))을 갖는 적어도 7 개의 연속 아미노산의 단편을 포함하는 글리코실화된 ICP의 입체구조 에피토프와 같은 에피토프에 선택적으로 결합하는 단리된 항체가 제공된다. 특별한 실시양태에서, 인간 PD-L1의 위치 N35, N192, N200 또는 N219에 상응하는 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 PD-L1의 입체구조 에피토프와 같은 에피토프에 선택적으로 결합하고, PD-L1의 위치 N35, N192, N200 또는 N219에 상응하는 아미노산 중 적어도 하나가 글리코실화되는 단리된 항체가 제공된다. 특별한 실시양태에서, 인간 PD-1의 위치 N49, N58, N74 또는 N116에 상응하는 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 PD-1의 입체구조 에피토프와 같은 에피토프에 선택적으로 결합하고, PD-1의 위치 N49, N58, N74 또는 N116에 상응하는 아미노산 중 적어도 하나가 글리코실화되는 단리된 항체가 제공된다.

[0031] 구체적 실시양태에서, 본 발명은 각각 글리코실화된 ICP의 다른 항원 결합 도메인의 에피토프와 중첩되지 않는 에피토프에 결합하고, 적어도 하나의 결합 도메인(및 특정 실시양태에서, 결합 도메인 둘 다)이, 예를 들어 본원에 열거된 글리코실화 부위 중 1 이상을 함유한 에피토프에 결합함으로써 ICP의 글리코실화된 형태에 우선적으로 결합하는 2 개의 상이한 항원 결합 도메인을 갖는 비파라토프(biparatopic) 항체를 제조하는 방법을 제공

한다. 이들 항체는 내부화, 리소좀 수송 및 분해를 촉진하는 세포 표면 단백질을 교차결합시킬 수 있다. 상기 비파라토프 항체는 본원에 기재된 스크리닝 방법을 사용하여 ICP의 비글리코실화된 형태에 비해 글리코실화된 ICP에 우선적으로 결합하는 항체에 대해 스크리닝하고, 글리코실화된 ICP의 비중첩 에피토프에 결합하고, 바람직하게는 하나 또는 둘 다 비글리코실화된 형태와 비교하여 ICP의 글리코실화된 형태에 우선적으로 결합하는 2개의 항체를 확인함으로써 생성될 수 있다. 글리코실화 함유 에피토프 또는 항체가 글리코실화된 ICP에 우선적으로 결합하는 본원에 기재된 에피토프 중 임의의 것에 대한 항체가 사용될 수 있다. 2 개의 항원 결합 도메인은, 예를 들어 Dimasi et al., *J. Mol. Biol.*, 393:672-692 (2009)에 기재된 바와 같이 항체 분자 내에 배열될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 항원 결합 도메인 중 하나는 단일쇄 Fv의 형식이 된 다음에, 예를 들어 펩티드 링커를 통해 다른 항원 결합 도메인을 갖는 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 N 말단 또는 CH3 도메인의 C-말단에 연결되도록 조작된다.

[0032] 특별한 양태에서, 항-glycICP 항체는 세포 표면 상의 표적 항원에 결합한 후에, 이의 표적 glycICP 항원의 내부화 및 분해를 촉진한다. 표적 glycICP 항원이 종양 세포 상에서 발현되거나, 높게 발현되는 경우, 본원에 제공된 항-glycICP 항체에 결합한 다음에, 종양 세포 상에서 발현되는 글리코실화된 표적 항원의 내부화는 T 세포와 같은 면역 세포 상의 동족 결합 분자와의 상호작용을 위해 종양 세포 상에서 이용 가능한 덜 글리코실화된 ICP를 야기하여, 예를 들어 종양 세포에 대한 T 세포 세포독성 이펙터 기능을 증가시키고, glycICP/동족 결합 분자 상호작용으로부터 야기된 T 세포 아네르기(anergy)를 감소시킨다. 구체적 실시양태에서, 항체는 PD-1과 PD-L1의 상호작용을 억제하고, 이펙터 T 세포에 의해 발현된 PD-1과 종양 세포에 의해 발현된 PD-L1, 특히 글리코실화된 PD-L1의 상호작용을 특히 억제하며, 특히 PD-L1의 내부화 및 세포내 분해를 증가시킴으로써 종양 세포의 표면 상의 PD-L1, 특히 글리코실화된 PD-L1의 수준을 또한 감소시키는 항-glycPD-L1 항체이다. 본원에 제공된 항-글리코실화된 PD-L1 항체에 결합한 다음에, 종양 세포 상에서 발현되는 PD-L1의 내부화는 항-glycPD-L1 항체의 유익한 특징이며, 이는 덜 글리코실화된 PD-L1이 T 세포 상의 PD-1과의 상호작용을 위해 종양 세포 상에서 이용 가능하여, 종양 세포에 대한 T 세포 세포독성 이펙터 기능을 증가시키고, PD-L1/PD-1 상호작용으로부터 야기된 T 세포 아네르기를 감소시키기 때문이다.

[0033] 다른 양태에서, 본원에 기재된, 특히 글리코실화된 표적 항원에 결합한 다음에, 내부화 활성을 나타내는 항-glycICP 항체가 항신생물 약물 및 약제에 화학적으로 연결되어 본원에 기재되고 예시된 바와 같은 항-glycICP 항체-약물 콘쥬게이트(antibody-drug conjugate)(항-glycICP 항체 또는 MAb ADC)를 생성하는 항체-약물 콘쥬게이트(ADC)가 제공된다. 특정 실시양태에서, 항-glycICP 항체-ADC는 종양 또는 암 세포를 사멸시키고 암을 갖는 대상체를 치료하기 위한 항신생물 요법에 매우 효과적이다. 실시양태에서, ADC의 항-glycICP 항체 성분은 이중특이적, 다중특이적, 비파라토프, 또는 멀티파라토프 항체, 또는 이의 항원 결합 부분이다. 다른 실시양태에서, 항-glycICP 항체는 항유사분열제, 예컨대 마이탄신(maytansine) 유도체, 예를 들어 DM1 또는 DM4와 같은 마이탄시노이드, 또는 튜불린-중합성 아우리스타틴, 예를 들어 본원에 추가로 기재된 바와 같은 모노메틸 아우리스타틴(monomethyl auristatin) E(MMAE) 또는 모노메틸 아우리스타틴 F(MMAF)에 화학적으로 연결된다. 실시양태에서, 항-glycICP 항체에 대한 링커는 세포외 유체에서는 안정적이지만, ADC가 종양 또는 암 세포로 들어가면 카텝신에 의해 절단되어, MMAE 또는 다른 독성 약물의 항유사분열 메커니즘을 활성화시킨다. 구체적 실시양태에서, ADC의 항체 성분은 본원에 기재된 바와 같은 STM073 MAb 또는 STM108 MAb이다. 실시양태에서, 항-glycICP 항체-함유 ADC(항-glycICP 항체-ADC), 예를 들어 STM108 MAb-함유 ADC(STM108-ADC)는 절단성 링커를 통해 MMAE에 화학적으로 연결된다. 특별한 실시양태에서, 항-glycICP 항체-ADC(예를 들어, STM108-ADC)는 항-glycICP 항체(예를 들어, STM108 MAb)가 이의 C-영역 내의 시스테인 잔기를 통해 말레이미드 및 카프로산(maleimide and caproic acid)(MC) 부착기에 화학적으로 연결되고, 이는 발린(Val) 및 시트룰린(Cit)으로 구성된 "vc"와 같은 카텝신 절단성 링커에 화학적으로 연결되며, 이는 스페이서 "PAB", 즉 파라아미노벤조산(paraminobenzoic acid)에 화학적으로 부착되고, 이는 MMAE 세포독소에 화학적으로 연결되어, 성분 구조에 의해 항-glycICP 항체-MC-vc-PAB-MMAE, 예를 들어 STM108-MC-vc-PAB-MMAE로 표시되는 ADC를 생성한다.

## *도면의 간단한 설명*

[0034] **도면의 간단한 설명**

다음 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고, 본원에 기재된 방법 및 항체의 특정 양태를 추가로 나타내기 위해 포함된다. 이들은 본원에 제시된 실시양태의 상세한 설명과 조합되어 이들 도면 중 1 이상을 참고하여 더욱 이해될 수 있으나, 이들이 제한되는 것으로 의도되지는 않는다. 특허 또는 출원 파일은 컬러로 도시된 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면(들)이 있는 이 특허 또는 특허 출원 공개의 사본은 요청 및 필요 수수료의 지

불시 관청에 의해 제공될 것이다.

**도 1. PNGase F 처치를 이용하거나 이용하지 않은 *시험관내* 인간 PD-L1 및 항-인간 PD-L1 항체 결합.** His-태그된 PD-L1을 자연 조건에서 PNGase F를 이용하거나 이용하지 않고 처치한 다음에, Ni-NTA 코팅된 플레이트 상에 고정화시켰다. 형광 표지된 항-PD-L1 항체를 고정화된 리간드로 항온처리하였으며, 리간드에 대한 항체의 결합 친화도를 정량화하였다.

**도 2. PD-L1 및 PD-1 결합에 대한 항-인간 PD-L1 항체의 차단.** BT549 세포를 발현하는 PD-L1을 항-인간 PD-L1 항체 및 형광 표지된 PD-1-Fc-융합 단백질로 항온처리하였다. 리간드 및 수용체 결합을 매시간 IncuCyte™Zoom에 의해 정량화하였다. 적색 표시는 항체가 PD-L1/PD-1 결합의 완전 차단을 나타낸다는 것을 나타낸다.

**도 3a-3c. 항-글리코실화된 PD-L1 단클론 항체의 특징화.** **a.** PD-L1 아미노산 서열(아스파라긴(N)을 4 개의 글루타민(Q)으로 치환한 PD-L1 4NQ) 내의 글리코실화 부위를 돌연변이화함으로써 생성된 PD-L1 WT 및 비글리코실화된 PD-L1의 도식적 도면. **b.** 5 개의 항-glycPD-L1 항체의 웨스턴 블롯 분석. 좌측 패널은 항-Flag 항체를 사용한 동등한 양의 PD-L1 WT 및 4NQ 발현을 나타낸다. **c.** 5 개의 항-glycPD-L1 항체의 유세포분석.

**도 4a-4d. 항-글리코실화된 PD-L1 항체의 특징화. a.** PD-L1 WT 및 비글리코실화된 PD-L1 변이체의 도식적 도면. **b.** WT, N35/3NQ, N192/3NQ, N200/3NQ, 및 N219/3NQ PD-L1을 발현하는 BT 549의 안정적 클론의 웨스턴 블롯 분석. **c.** 6 개의 항-glycPD-L1 항체의 웨스턴 블롯 분석. **d.** 간암 세포주에서 5 개의 항-glycPD-L1 항체의 웨스턴 블롯 분석.

**도 5. 면역조직화학(Immunohistochemistry)(IHC)에 의한 항-글리코실화된 PD-L1 단클론 항체의 특징화.** 사이토스핀(cytospin) 분석을 위해, PD-L1 WT 또는 PD-L1 4NQ 단백질을 발현하는 BT-549 세포를 도말하고, 5 개의 항-glycPD-L1 항체로 염색하였다. IHC 염색을 위해, 유방암 환자 샘플을 항-glycPD-L1 항체로 염색하였다.

**도 6a-6d. 결합 에세이. 도 6a-6c**는 실시예 5에 기재된 바와 같은 결합 에세이의 결과를 나타낸다. 항-glycPD-L1 항체는 에세이 대조군 PD-1/Fc 없음; Ab 없음; mIgG Ab(**도 6d**)에 비교하여 WT PD-L1을 발현하는 BT549 표적 세포에 대한 PD-1의 결합을 용량 의존 방식으로 차단한다(**도 6a**는 STM004 결합을 나타내고, **도 6b**는 STM073 결합을 나타내며, **도 6c**는 STM108 결합을 나타냄).

**도 7a 및 7b. 항-glycPD-L1 항체는 T 세포에 의한 종양 세포 사멸을 향상시킨다.** 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 2 개의 상이한 항-글리코실화된 PD-L1 항체를 실시예 6에 기재된 바와 같은 세포 세포독성 에세이에서 시험하여, 종양 세포(BT 549)에 대한 PBMC-유래 T 세포의 세포독성을 평가하였다. **도 7a**(STM004) 및 **7b**(STM073)는 실시간으로 각각 2 개의 상이한 항체로 처치된 PD-L1 WT 발현 BT549 세포의 사멸(아폽토시스(apoptosis))을 나타낸다. **도 7a** 및 **7b**에서, 하부 그래프(순청색 사각형)는 대조군(PBMC로부터의 T 세포 없음)을 나타내고; 순적색 원은 항체가 없는 대조군을 나타내며; 순흑색 사각형은 에세이에서 사용된 20 ㎍/mL의 항-글리코실화된 PD-L1 항체를 나타내고; 순갈색 원은 에세이에서 사용된 40 ㎍/mL의 항-글리코실화된 PD-L1 항체를 나타낸다. **도 7a** 및 **7b**에 나타낸 바와 같이, 시간에 걸친 PD-L1 보유 종양 세포의 사멸은 용량-의존성이다.

**도 8a-8c. 항-glycPD-L1 항체에 의한 결합 후의 PD-L1의 내부화 및 분해. 도 8a-8c**는 이중 기능 항-glycPD-L1 항체와 함께 항온처리된 PD-L1-발현 세포의 생세포 영상화의 결과를 나타낸다. **도 8a-8c**에서, 항-PD-L1 항체는 적색 형광 염료 pHrodo™ Red(석신이미딜에스터(pHrodo™ Red, SE), (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)에 콘쥬게이트된 STM108 MAb이다. pHrodo™ Red 염료 콘쥬게이트는 세포 외부에서는 비-형광성이지만, 식포 내에서는 밝은 적색으로 형광을 내며, 이는 이들이 바이오입자의 식세포작용 내지 수용체 내부화 범위의 연구에 유용한 시약이 되게 한다. 녹색 염색은 생세포 영상화를 통해 영상화된 생세포에서 산성 구획(리소좀)을 염색하는 세포 침투성 녹색 염료인 LysoTracker® Green DND-26으로 염색된 세포를 나타낸다. **도 8a**는 제1 시점(0 시)에, 화살표로 나타낸 세포의 강한 적색 세포내 염색으로 도시된 바와 같이 STM108이 세포 내로 내부화된다는 것을 나타낸다. **도 8b**는 **도 8a**의 시점의 2 분 후에 **도 8a**에 도시된 동일한 세포에서 약화된 세포내 적색 염색을 나타낸다. **도 8c**는 **도 8a**의 시점의 4 분 후에 적색 세포내 염색의 결여를 나타내며, 이는 세포 내부의 STM108 항체 및/또는 항체-항원 복합체의 분해를 나타낸다.

**도 9a-9l. 총 T 세포에 비해 종양 세포에서 항-PD-L1 항체에 의해 결합된 PD-L1의 내부화. 도 9a-9l**은 PD-L1 양성 종양 세포 내로는 내부화하지만, 활성화된 또는 비활성화된 T 세포 내로는 그렇지 않은 이중 기능 항-glycPD-L1 항체의 능력을 나타내는 세포의 영상을 나타낸다. **도 9a-9d**는 다음 항체와 함께 항온처리된 후에 말초 혈액으로부터의 비활성화된 총 T 세포의 영상을 나타낸다: 마우스 IgG 항체 대조군(**도 9a**); 비-내부화 항-

glycPD-L1 MAb STM004(**도 9b**); 이중 기능 항-glycPD-L1 MAb STM073(**도 9c**); 및 이중 기능 항-glycPD-L1 항체 STM108(**도 9d**). **도 9a-9d**는 시험된 항체 중 어느것도 비활성화된 총 T 세포 내로 내부화되지 않았다는 것을 나타낸다. **도 9e-9h**는 다음 항체와 함께 항온처리된 후에 말초 혈액으로부터의 활성화된 총 T 세포의 영상을 나타낸다: 마우스 IgG 항체 대조군(**도 9e**); 비-내부화 STM004(**도 9f**); 이중 기능 STM073(**도 9g**); 및 이중 기능 STM108(**도 9h**). T 세포 활성화를 위해 총 T 세포를 비드, 예를 들어 1:1의 비의 항-CD3 및 항-CD28 항체와 공유 결합된 불활성 초상자성 비드(예를 들어, ThermoFisher Scientific, Rochester, NY)와 혼합하였다. **도 9e-9h**는 시험된 임의의 항체에 관하여 활성화된 총 T 세포 내로의 내부화가 사실상 관찰되지 않았다는 것을 나타낸다. **도 9i-9l**은 다음 항체와 함께 항온처리 후의 NCI-H226 세포(인간 폐암 세포주, 편평세포 중피종)의 영상을 나타낸다: 마우스 IgG 항체 대조군(**도 9i**); 비-내부화 항-glycPD-L1 항체 STM004(**도 9j**); 이중 기능 항-glycPD-L1 MAb STM073(**도 9k**); 및 이중 기능 항-glycPD-L1 MAb STM108(**도 9l**). **도 9i-9l**은 적색 세포내 염색에 의해 입증된 바와 같이 대조군 항체 mIgG(**도 9i**) 및 비-내부화 STM004 MAb와 비교하여 이중 기능 내부화 STM073 및 STM108이 이들 세포와의 항온처리 후에 NCI-H226 세포 내로 내부화되었다는 것을 나타낸다.

**도 10a-10d. 항-glycPD-L1 항체-ADC의 항-종양 효능. 도 10a-10d**는 대조군(IgG 및 STM108 MAb 단독)으로 주사된 종양화된 동물과 비교해, STM108 ADC로 종양화된 동물의 주사 후에 종양-이식된 마우스에서 PD-L1-발현 및 비-PD-L1-발현 종양 세포를 살해하고, 종양의 부피를 감소시키는데 있어서, MMAE에 결합되어, 본원에 기재된 바와 같은 항체-약물 콘쥬게이트(STM108-ADC)를 생성하는 이중 기능 항-glycPD-L1 MAb STM108을 포함하는 ADC의 효능을 평가하는 실험의 결과를 나타낸다. **도 10a**는 상이한 농도의 STM108-ADC, 즉 "ADC108"에 노출된 후에 PD-L1의 발현("MB231 PDL1 KO")을 녹아웃(knock out)시키도록 분자 조작된 MB231 세포의 % 생존도(채워진 흑색 사각형)와 비교하여, 상이한 농도(nM)의 STM108-ADC에 노출된 후의 PD-L1-발현 MDA-MB231(인간 유방암종 세포주) 종양 세포("MB231")의 % 생존도(채워진 흑색 원)를 나타낸다. **도 10b**에서, **도 10b**의 그래프 상에 나타낸 바와 같이, MB231 세포로부터 유래된 종양이 이식된 동물을 IgG-MMAE 대조군(100 ㎍); 또는 50 ㎍, 100 ㎍, 또는 150 ㎍의 STM108 ADC("ADC"); 또는 100 ㎍의 STM108 MAb로 처치한 유방암의 MDA-MB231 마우스 모델을 사용하였다. 100 ㎍ STM108-ADC가 투여된 5 마리 마우스 중 3 마리 및 150 ㎍ STM108-ADC가 투여된 5 마리 마우스 중 4 마리에서 완전 반응(Complete response)("CR")이 관찰되었다. **도 10c**는 상이한 농도의 STM108-ADC, 즉 "ADC108"에 노출된 후에 PD-L1을 자연적으로 발현하지 않는 4T1 세포("4T1")의 % 생존도(채워지지 않은 적색 사각형)와 비교하여, 상이한 농도(nM)의 STM108-ADC에 노출된 후에 세포 표면 상에 인간 PD-L1을 발현하도록 분자 조작된 4T1 유방 암종 세포("4T1 hPDL1")의 % 생존도(채워지지 않은 적색 원)를 나타낸다. **도 10d**에서, 세포 표면에서 PD-L1을 발현하도록 분자 조작된 4T1 유방 암종 세포로부터의 종양이 동물(Balb/c 마우스)에 이식되거나("4T1 hPD-L1"), 세포 표면 상에 PD-L1을 자연적으로 발현하지 않는 비형질감염된 4T1 유방 암종 세포로부터 유래된 종양이 Balb/c 마우스에 이식된("4T1") 유방암의 4T1 동계(syngeneic) 마우스 모델을 사용하였다. 2 개 유형의 4T1 세포로부터 유래된 종양 보유 동물을 **도 10d**의 그래프 상에 나타낸 바와 같이, IgG-MMAE 대조군(100 ㎍); 또는 STM108 MAb(100 ㎍), 또는 STM108 ADC(100 ㎍)로 처치하였다. 실시예 8을 참고한다.

기재된 실시양태의 다른 양태, 특징 및 이점은 다음 상세한 설명 및 예시적 실시예로부터 명확해질 것이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0035] **실시양태의 상세한 설명**

[0036] 본원은 비글리코실화된 ICP, 또는 이의 비글리코실화된 펩티드에 비해 글리코실화된 면역 체크포인트 단백질(ICP), 또는 이의 글리코실화된 펩티드를 특이적으로 및 우선적으로 인식하고 결합하는 단클론 항체(MAb)와 같은 항체를 생성하고, 스크리닝하고 선택하는 방법을 제공한다. ICP의 비제한적인 예는 PD-L1, PD-L2, PD-1, TIM-3, LAG-3, BTLA, CEACAM1, BTN1A1, BTNL2, SEMA4D, CD47, CD96, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, VISTA, 또는 KIR 등을 포함하고, 이들 중 일부 또는 전부는 1 이상의 글리칸 구조를 포함하는 당단백질이다. 두문자어 "MAb"는 본원에서 "단클론 항체"를 표시하기 위해 사용된다.

[0037] 당업자에 의해 인식될 바와 같이, 종양 세포 상에 발현된 프로그래밍된 사멸 리간드-1 단백질(programmed death ligand-1 protein)(PD-L1)과 면역 이펙터 세포, 예를 들어 T 세포 상에 발현된 프로그래밍된 사멸-1 단백질(PD-1)과 같은 ICP 사이의 세포외 상호작용은 종양-관련 면역 회피에 대해 명확한 영향을 갖는다. (예를 들어, Pardoll, D. M., 2012, *Nature Reviews*, 12:252-264 참고). 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체를 사용한 면역 체크포인트 차단의 임상 성공에도 불구하고, PD-L1 및 PD-1 상호작용의 기본이 되는 조절 메커니즘 및 구조적 특징은 많이 알려지지 않은 채로 남아있다. PD-L1의 N-연결된 글리코실화는 PD-L1 단백질 리간드를 안정시키고, PD-1에 대한 이의 결합을 또한 가능하게 하고 향상시키며, 이는 T 세포-매개된 면역 반응의 억제를 촉진한다는 것이 발

견되었다. 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 항-glycPD-L1 항체는 PD-L1/PD-1 상호작용을 예방, 차단, 또는 억제하기 위해 제공되므로, 암 치료를 위한 효과적인 ICP 억제제로서 유용하다.

[0038] 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 인간 글리코실화된 PD-L1 폴리펩티드(CD274, PDCD1L1, 또는 B7-H1로도 알려짐)이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 인간 글리코실화된 PD-1 폴리펩티드(CD279로도 알려짐)이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 인간 글리코실화된 PD-L2 폴리펩티드이다. 본원에 사용되는 정도에 대해, "PD-L1"은 PD-L1 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드, 특히 인간 PD-L1(서열번호 1의 아미노산 서열)을 지칭하며; "PD-1"은 PD-1 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드, 특히 인간 PD-1(서열번호 2의 아미노산 서열)을 지칭한다.

[0039] 특별한 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에서 사용되는 글리코실화된 ICP 항원은, 예를 들어 서열번호 1에 기재된 바와 같은 PD-L1 단백질의 위치 N35, N192, N200 및/또는 N219의 글리코실화 부위 중 1 이상을 함유하는 PD-L1 단백질의 적어도 7 개의 아미노산 폴리펩티드이다. 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에서 사용되는 글리코실화된 ICP 항원은, 예를 들어 서열번호 2에 기재된 바와 같은 인간 PD-1 단백질의 아미노산 위치 N49, N58, N74 및/또는 N116의 글리코실화 부위 중 1 이상을 함유하는 PD-1 단백질의 적어도 7 개의 아미노산 폴리펩티드이다.

[0040] 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 CD366, FLJ14428, TIMD3 및 HAVCR2로도 알려진 인간 글리코실화된 "T 세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인 3"(TIM-3)(서열번호 4)이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 CD223로도 알려진 인간 글리코실화된 "림프구 활성화 유전자-3"(LAG-3)(서열번호 5)이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 CD272로도 알려진 인간 글리코실화된 "B 및 T 림프구 어테뉴에이터"(BTLA)(서열번호 3)이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 IAP, MER6, 및 OA3로도 알려진 인간 글리코실화된 CD47이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 CD96 분자 또는 CD96 항원으로도 알려진 인간 글리코실화된 CD96이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 BGP 또는 BGP1으로도 알려진 인간 글리코실화된 "암배아 항원-관련 세포 접착 분자 1(담즙성 당단백질)"(CEACAM1)(서열번호 7)이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 BTN 또는 BTN1으로도 알려진 인간 글리코실화된 "부티로필린 서브패밀리 1 멤버 A1"(BTN1A1)(서열번호 6)이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 SEMAJ, CD100, coll-4 및 FLJ39737로도 알려진 인간 글리코실화된 세마포린 4D(서열번호 8)이다. 다른 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 BTL-II, BTN7, HSBLMHCI 및 SS2로도 알려진 인간 글리코실화된 "부티로필린-유사 2"(BTNL2)이다. 본원에 사용되는 정도에 대해, 실시양태의 ICP 항원은 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드, 특히 인간 ICP 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드를 지칭한다.

표 1

표 1. ICP 아미노산 서열의 글리코실화 부위

| ICP | N-연결된 글리코실화 부위를 나타내는 아미노산 서열 |
|---|---|
| BTLA | MKTLP AMLGT GKLFW VFFLI PYLDI WNIHG KESCD VQLYI KRQSE HSILA GDPFE LECPV KYCAN RPHVT WCKLN GTTCV KYLER QTSWK EEKNI SFFIL HFEPV LPNDN GSYRC SANFQ SNLIE SHSTT LYVTD VKSAS ERPSK DEMAS RPWLL YRLLP LGGLP LLITT CFCLF CCLRR HQGKQ NELSD TAGRE INLVDAHLKS EQTEA STRQN SQVLL SETGI YDNDP DLCFR MQEGS EVYSN PCLEE NKPGI VYASL NHSVI GPNSR LARNV KEAPT EYASI CVRS ( 서열번호 3) |
| TIM-3 | SEVEY RAEVG QNAYL PCFYT PAAPG NLVPV CWGKG ACPVF ECGNV VLRTD ERDVN YWTSR YWLNG DFRKG DVSLT IENVT LADSG IYCCR IQIPG IMNDE KFNLK LVIKP AKVTP APTLQ RDFTA AFPRM LTTRG HGPAE TQTLG SLPDI NLTQI STLAN ELRDS RLAND LRDSG ATIRV DHHHH HH ( 서열번호 4) |
| LAG-3 | LQPGA EVPVV WAQEG APAQL PCSPT IPLQD LSLLR RAGVT WQHQP DSGPP AAAPG HPLAP GPHPA APSSW GPRPR RYTVL SVGPG GLRSG RLPLQ PRVQL DERGR QRGDF SLWLR PARRA DAGEY RAAVH LRDRA LSCRL RLRLG QASMT ASPPG SLRAS DWVIL NCSFS RPDRP ASVHW FRNRG QGRVP VRESP HHHLA ESFLF LPQVS PMDSG PWGCI LTYRD GFNVS IMYNL TVLGL EPPTP LTVYA GAGSR VGLPC RLPAG VGTRS FLTAK WTPPG GGPDL LVTGD NGDFT LRLED VSQAQ AGTYT CHIHL QEQQL NATVT LAIIT VTPKS FGSPG SLGKL LCEVT PVSGQ ERFVW SSLDT PSQRS FSGPW LEAQE AQLLS QPWQC QLYQG ERLLG AAVYF TELSS PG ( 서열번호 5) |
| BTN1A1 | MAVFP SSGLP RCLLT LILLQ LPKLD SAPFD VIGPP EPILA VVGED AKLPC RLSPN ASAEH LELRW FRKKV SPAVL VHRDG REQEA EQMPE YRGRA TLVQD GIAKG RVALR IRGVR VSDDG EYTCF FREDG SYEEA LVHLK VAALG SDPHI SMQVQ ENGEI CLECT SVGWY PEPQV QWRTS KGEKF PSTSE SRNPD EEGLF TVAAS VIIRD TSAKN VSCYI QNLLL GQEKK VEISI PASSL PRLTP WIVAV AVILM VLGLL TIGSI FFTWR LYNER PRERR NEFSS KERLL EELKW KKATL HAVDV TLDPD TAHPH LFLYE DSKSV RLEDS RQKLP EKTER FDSWP CVLGR ETFTS GRHYW EVEVG DRTDW AIGVC RENVM KKGFD PMTPE NGFWA VELYG NGYWA LTPLR TPLPL AGPPR RVGIF LDYES GDISF YNMND GSDIY TFSNV TFSGP LRPFF CLWSS GKKPL TICPI ADGPE RVTVI ANAQD LSKEI PLSPM GEDSA PRDAD TLHSK LIPTQ PSQGA P ( 서열번호 6) |

[0041]

| ICP | N-연결된 글리코실화 부위를 나타내는 아미노산 서열 |
|---|---|
| CEACAM1 | MGHLS APLHR VRVPW QGLLL TASLL TFWNP PTTAQ LTTES MPFNV AEGKE VLLLV HNLPQ QLFGY SWYKG ERVDG NRQIV GYAIG TQQAT PGPAN SGRET IYPNA SLLIQ NVTQN DTGFY TLQVI KSDLV NEEAT GQFHV YPELP KPSIS SNNSN PVEDK DAVAF TCEPE TQDTT YLWWI NNQSL PVSPR LQLSN GNRTL TLLSV TRNDT GPYEC EIQNP VSANR SDPVT LNVTY GPDTP TISPS DTYYR PGANL SLSCY AASNP PAQYS WLING TFQQS TQELF IPNIT VNNSG SYTCH ANNSV TGCNR TTVKT IIVTE LSPVV AKPQI KASKT TVTGD KDSVN LTCST NDTGI SIRWF FKNQS LPSSE RMKLS QGNTT LSINP VKRED AGTYW CEVFN PISKN QSDPI MLNVN YNALP QENGL SPGAI AGIVI GVVAL VALIA VALAC FLHFG KTGRT TPMTH LTR ( 서열번호 7) |
| 세마포린 4D | MRMCT PIRGL LMALA VMFGT AMAFA PIPRI TWEHR EVHLV QFHEP DIYNY SALLL SEDKD TLYIG AREAV FAVNA LNISE KQHEV YWKVS EDKKA KCAEK GKSKQ TECLN YIRVL QPLSA TSLYV CGTNA FQPAC DHLNL TSFKF LGKNE DGKGR CPFDP AHSYT SVMVD GELYS GTSYN FLGSE PIISR NSSHS PLRTE RAANY TSSLN LPDKT LQFVK DHPLM SHTKW VRYNG PVPKP RPGAC IDSEA CAYNL STAEE VFSHG KYMQS TTVEQ SPGLK VPVFY ALFTP QLNNV GLSAV KARLI CSRPD SGLVF NVLRD VFVLR PRIAR VCKGD QGGLR TLQKK WTSFL GEDDR VYFFF TEVSV EYEFV FRVLI YAIPW LNEPS FVFAD VIRKS PDSPD DDSVT PIDNR PRLIK KDVNY TQIVV DRTQA LDGTV YDVMF VSTDR GALHK AISLE HAVHI IEETQ LFQDF EPVQT LLLSS KKGNR FVYAG SNSGV VQAPL AFCGK HGTCE DCVLA RDPYC AWSPP TATCV ALHQT ESPSR GLIQE MSGDA SVCPD KSKGS YRQHF FKHGG TAELK CSQKS NLARV FWKFQ NDVLK AESPK YGLMG RKNLL IFNLS EGDSG VYQCL SEERV KNKTV FQVVA KHVLE VKVVP KPVVA PTLSV VQTEG SRIAT KVLVA STQGS SPPTP AVQAT SSGAI TLPPK PAPTG TSCEP KIVIN TVPQL HSEKT MYLKS SDNRL LMSLF LFFFV LFLCL FFYNC YKGYL PRQCL KFRSA LLIGK KKPKS DFCDR EQSLK ETLVE PGSFS QQNGE HPKPA LDTGY ETEQD TITSK VPTDR EDSQR IDDLS ARDKP FDVKC ELKFA DSDAD GD ( 서열번호 8) |

[0042]

[0043] 표 1에서, 글리코실화된 아미노산(N)은 볼드체 및 밑줄로 나타낸다. 구체적으로, BTLA에 대해, 3 개의 글리코실화 부위가 서열번호 3의 BTLA ICP 단백질 서열의 아미노산 위치 N75, N94 및 N110에 나타난다. TIM-3에 대해, 2 개의 글리코실화 부위가 서열번호 4의 TIM-3 ICP 단백질 서열의 아미노산 위치 N78 및 N151에 나타난다. LAG-3에 대해, 4 개의 글리코실화 부위가 서열번호 5의 LAG-3 ICP 단백질 서열의 아미노산 위치 N166, N228, N234 및 N321에 나타난다. BTN1A1에 대해, 3 개의 글리코실화 부위가 서열번호 6의 BTN1A1 ICP 단백질 서열의 아미노산 위치 N55, N215 및 N449에 나타난다. CEACAM1에 대해, 3 개의 글리코실화 부위가 서열번호 7의 BTLA ICP 단백질 서열의 아미노산 위치 N104, N111 및 N115에 나타난다. 세마포린 4D에 대해, 6 개의 글리코실화 부위가 서열번호 8의 세마포린 4D 아미노산 서열의 아미노산 위치 N139, N191, N204, N254, N613, 및 N632에 나타난다.

[0044] 특정 실시양태에서, 기재된 방법에서 사용되는 글리코실화된 ICP 항원은 서열번호 3의 BTLA ICP 단백질 서열의 아미노산 위치 N75, N94 및 N110에 1 이상의 글리코실화 부위를 함유한 인간 BTLA의 적어도 7 개의 아미노산 폴리펩티드일 수 있다. 특정 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 서열번호 4의 TIM-3 ICP 단백질 서열의 아미노산 위치 N78 및 N151에 하나 또는 둘 다의 글리코실화 부위를 함유한 인간 TIM-3의 적어도 7 개의 아미노산 폴리펩티드이다. 특정 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 서열번호 5의 LAG-3 ICP 단백질 서열의 아미노산 위치 N166, N228, N234 및 N321에 1 이상의 글리코실화 부위를 함유한 인간 LAG-3의 적어도 7 개의 아미노산 폴리펩티드이다. 특정 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 서열번호 6의 BTN1A1 ICP 단백질 서열의 아미노산 위치 N55, N215 및 N449에 1 이상의 글리코실화 부위를 함유한 인간 BTN1A1의 적어도 7 개의 아미노산 폴리펩티드이다. 특정 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 서열번호 7의 BTLA ICP 단백질 서열의 아미노산 위치 N104, N111 및 N115에 1 이상의 글리코실화 부위를 함유한 인간 CEACAM1의 적어도 7 개의 아미노산 폴리펩티드이다. 특정 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원은 서열번호 8의 세마포린 4D 아미노산 서열의 아미노산 위치 N139, N191, N204, N254, N613, 및 N632에 6 개의 글리코실화 부위 중 1 이상을 함유한 인간 세마포린 4D의 적

어도 7 개의 아미노산 폴리펩티드이다. 항-glycICP 항체는 이러한 글리코실화 부위 중 1 이상을 함유한 에피토프에 결합될 수 있다.

[0045] 다른 실시양태에서, 항체를 제조하고 선택하는 방법에서 사용하기 위한 글리코실화된 인간 ICP 항원은 PD-L2, BTNL2, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, VISTA, 또는 KIR로부터 선택된다. 바람직하게는, ICP는 인간 ICP이다. 다른 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 항원(바람직하게는 인간)은 다음 중 하나이다: AGER, ALCAM, AMIGO1, AMIGO2, AMIGO3, AXL, B2M, BCAM, BCAN, BOC, BSG, BTN2A1, BTN2A2, BTN3A3, BTNL1, BTNL6, BTNL7, BTNL9, CADM1, CADM2, CADM3, CADM4, CD101, CD160, CD19, CD1D2, CD2, CD200, CD22, CD226, CD244, CD274, CD276, CD28, CD300A, CD300E, CD300LB, CD300LD, CD300LF, CD300LG, CD33, CD3E, CD3G, CD4, CD48, CD7, CD79A, CD79B, CD80, CD83, CD84, CD86, CD8A, CD8B, CD8B1, CDON, CEACAM3, CEACAM5, CHL1, CILP, CNTFR, CNTN1, CNTN2, CNTN6, CRL, CRTAM, CSF1R, CSF3R, CXADR, EMBF, ERMAP, ESAM, F11R, FAIM3, FCER1A, FCGR2B, FCGRT, FCRL1, FCRL5, FCRLA, FCRLB, FGFR1, FGFR2, FGFR4, FLT1, FLT3, GP6, GPA33, HAPLN1, HAPLN2, HAPLN3, HAVCR1, HEPACAM, HEPACAM2, ICAM1, ICAM2, ICAM4, ICAM5, ICOS, IFNGR1, KIT, L1CAM, LAIR1, LEPR, LILRA5, LILRB4, LINGO1, LINGO2, LINGO4, LRFN1, LRFN2, LRFN3, LRFN4, LRFN5, LRIG1, LRIG2, LRIG3, LRIT1, LRRC4, LRRN1, LRRN2, LRRN3, LSAMP, LSR, LY6G6F, LY9, MADCAM1, MAG, MALT1, MCAM, MERTK, MFAP3, MOG, MPZ, MPZL1, MPZL2, MPZL3, MR1, MUSK, MXRA8, NCAM1, NCAM2, NCR1, NEGR1, NEO1, NFAM1, NPTN, NRCAM, NRG1, NTM, NTRK1, NTRK2, NTRK3, OPCML, OSCAR, PAPLN, PDCD1, PDCD1LG2, PDGFRA, PDGFRB, PECAM1, PIGR, PRTG, PTGFRN, PTK7, PTPRD, PTPRK, PTPRS, PTPRT, PTPRU, PVR, PVRL1, PVRL2, PVRL3, PVRL4, PXDN, ROBO1, ROBO2, ROBO3, ROBO4, ROR1, ROR2, SCN1B, SCN2B, SCN3B, SEMA3A, SEMA3B, SEMA3C, SEMA3F, SEMA4A, SEMA4B, SEMA4C, SEMA4F, SEMA4G, SEMA7A, SIGGIR, SIGLEC1, SIGLEC5, SIRPA, SIRPB1, SLAMF1, SLAMF6, SLAMF7, SLAMF8, SLAMF9, TAPBP, TAPBPL, TEK, THY1, TIE1, TIGIT, TIMD4, TMEM25, TMEM81, TMIGD1, TREM1, TREM2, TREML1, TREML2, TREML4, TYRO3, UNC5A, UNC5B, UNC5C, VCAM1, VPREB1, VPREB3, VSIG1, VSIG2, VSIG4, VSIG8, VTCN1, 또는 WFIKKN2.

[0046] 비글리코실화된 ICP에 비해 글리코실화된 ICP에 선택적으로 및 우선적으로 결합하는지에 대해 스크리닝되는 항-glycICP 항체를 생성하는 방법은 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 또는 이의 글리코실화된 펩티드에 대한 특이적 결합에 대해 스크리닝되는, 글리코실화된 ICP 항원에 대한 단클론 항체(MAb)를 생성하기 위해 하이브리도마 방법론이 사용된다. 본 방법에 따라, 글리코실화된 ICP 또는 이의 글리코실화된 펩티드는 비인간 동물을 면역시키기 위한 항원 또는 면역원으로서 사용되어, 면역 반응을 유도하고 글리코실화된 ICP에 대해 항체를 생성하는 B 세포를 생성한다. 이어서, 항체는 ICP의 비글리코실화된 형태와 비교하여, 글리코실화된 ICP에 대한 특이적 결합 및 글리코실화된 ICP에 대한 우선적 결합에 대해 스크리닝된다. 항체는 또한, ICP 결합 파트너에 대한 글리코실화된 ICP의 결합을 차단하거나 억제하는지에 대해 스크리닝될 수 있다. 예에서, 항체는 글리코실화된 PD-L1에 선택적으로 및 우선적으로 결합하고, PD-1에 대한 PD-L1의 결합을 차단하거나 억제한다. 대안적으로, 항체는 글리코실화된 PD-1에 선택적으로 및 우선적으로 결합하고, PD-L1 또는 PD-L2를 포함한 PD-1의 결합 파트너에 대한 PD-1의 결합을 차단하거나 억제한다. 본원에 제공된 방법에 의해 선택되고 확인된 항체는 ICP에 의해 매개된 면역 억제 활성을 조절할 수 있는 치료제 또는 생물학적 샘플에서 글리코실화된 ICP를 검출하고 특징화하는데 유용한 시약으로서의 용도를 갖는다.

[0047] 단클론 항체는 소정 표적 항원에 대해 단일특이적이다. MAb는 표적 항원을 향해 지향되나, 상이한 B 세포에 의해 생성되는 다클론 항체와 반대로, 모두 고유한 모 B 세포의 클론인 동일한 면역 B 세포에 의해 합성되고 생성된다. 단클론 항체는 1가 친화도를 가지며, 동일한 에피토프에 결합한다. 일반적으로, 항체를 생성하기 위해 면역원으로서 사용되는 표적 항원에 특이적으로 결합하는 단클론 항체가 생성될 수 있다. 이어서, 상기 MAb는 표적 항원을 검출하거나 정제하거나 표적 항원의 생물학적 활성을 조절하기 위해 제공될 수 있다. 또한, 소정 표적 항원에 대한 특이성을 갖는 MAb, 특히 단리되고 정제된 MAb는 암, 종양 등과 같은 질환 및 병리학적 병태에 대한 치료에서 사용될 수 있다. 실시양태에서, 표적 항원은 글리코실화된 ICP 또는 이의 글리코실화된 펩티드 부분이다. 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 또는 이의 글리코실화된 펩티드 부분에 대해 생성된 MAb는 비글리코실화된 ICP에 비해 글리코실화된 ICP를 특이적으로 및 선택적으로 인식하고 이에 결합한다.

[0048] **정의**

[0049] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "하나" 또는 "한"은 하나 이상을 의미할 수 있다.

[0050] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "또는"은 본 발명이 대체물 및 "및/또는"만을 지칭하는 정의를 지지하더라도, 대체물만을 지칭하는 것으로 명확하게 나타내지지 않거나, 대체물이 서로 배제하지 않는 경우, "및/또는"을 의

미한다.

[0051] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "다른"은 적어도 제2 이상을 의미한다.

[0052] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 값이 상기 값을 결정하기 위해 사용되는 장치, 방법에 대한 오차의 고유 변동, 또는 연구 대상 사이에 존재하는 변동을 포함한다는 것을 나타내기 위해 사용된다.

[0053] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "프로그래밍된 사멸 리간드-1" 또는 "PD-L1"은 달리 나타내지 않는 경우, 영장류(예를 들어, 인간, 시노몰거스 원숭이(cynomolgus monkey)(cyno)), 개, 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 포함한 임의의 척추동물 공급원으로부터의 폴리펩티드(용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 본원에서 상호교환적으로 사용됨) 또는 임의의 천연 PD-L1을 지칭하며, 특정 실시양태에서, 다양한 PD-L1 이소형, 관련 PD-L1 폴리펩티드, 및 이의 SNP 변이체를 포함한다. 유사하게는, 용어 "프로그래밍된 사멸-1" 또는 "PD-1"은 영장류(예를 들어, 인간, 시노몰거스 원숭이(cyno)), 개, 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 포함한 임의의 척추동물 공급원으로부터의 PD-1을 지칭한다. 달리 명시되지 않는 경우, PD-1은 또한 다양한 PD-1 이소형, 관련 PD-1 폴리펩티드, 및 이의 SNP 변이체뿐 아니라, 비제한적으로, 인산화된 PD-1, 글리코실화된 PD-1, 및 유비퀴틴화된 PD-1을 포함한 PD-1의 상이한 변형 형태를 포함한다.

[0054] 인간 PD-L1의 예시적 아미노산 서열(UniProtKB/Swiss-Prot: Q9NZQ7.1; GI:83287884)이 하기에 제공된다:

MRIFAVFIFM TYWHLLNAFT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL
AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ
ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPVTSE
HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVTSTLRIN
TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPELP LAHPPNERTH LVILGAILLC LGVALTFIFR
LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET ( 서열번호 1).

[0055]

[0056] 서열번호 1에서, 아미노 말단 아미노산 1-18은 인간 PD-L1 단백질의 시그널 서열을 구성한다. 따라서, 성숙 인간 PD-L1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 19-290으로 구성된다.

[0057] 인간 PD-1의 예시적 아미노산 서열(UniProtKB:; Q15116.3 GI:145559515)이 하기에 제공된다:

MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA
TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL
PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE
VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI
GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT
IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL ( 서열번호 2).

[0058]

[0059] 서열번호 2에서, 글리코실화된 아미노산 잔기는 밑줄쳐 있으며 볼드체로 나타내었다. 또한, 서열번호 2에서, 아미노 말단 아미노산 1-20은 인간 PD-1 단백질의 시그널 서열을 구성한다. 따라서, 성숙 인간 PD-1 단백질은 서열번호 2의 아미노산 21-288로 구성된다.

[0060] 본원에 기재된 폴리펩티드 및 펩티드를 포함하는 아미노산 잔기, 및 이들 아미노산 잔기에 대한 보존적 치환에 대한 약자를 하기 표 2에 나타내었다. 본원에 기재된 폴리펩티드의 1 이상의 보존적 아미노산 치환 또는 보존적으로 변형된 변이체를 함유한 폴리펩티드는 원래의 또는 천연적으로 발생하는 아미노산이 유사한 특징, 예를 들어 유사한 전하, 소수성/친수성, 측쇄 크기, 백본(backbone) 입체구조, 구조 및 강도 등을 갖는 다른 아미노산으로 치환된 폴리펩티드를 지칭한다. 따라서, 이들 아미노산 변경은 전형적으로 폴리펩티드의 생물학적 활성, 기능, 또는 다른 소망하는 특성, 예컨대 항원에 대한 이의 친화도 또는 이의 특이성이 변화되지 않으면서 이루어질 수 있다. 일반적으로, 폴리펩티드의 비본질적 영역에서의 단일 아미노산 치환은 실질적으로 생물학적 활성을 변화시키지 않는다. 또한, 구조 또는 기능이 유사한 아미노산의 치환은 폴리펩티드의 생물학적 활성을 덜 방해할 수 있다.

표 2

표 2. 아미노산 잔기 및 보존적 아미노산 치환의 예

[0061]

| 원래의 잔기<br>3 개의 문자 코드 및<br>단일 문자 코드 | 보존적 치환(들) |
|---|---|
| 알라닌 (Ala) (A) | Gly; Ser |
| 아르기닌 (Arg) (R) | Lys; His |
| 아스파라긴 (Asn) (N) | Gln; His |
| 아스파르트산 (Asp) (D) | Glu; Asn |
| 시스테인 (Cys) (C) | Ser; Ala |
| 글루타민 (Gln) (Q) | Asn |
| 글루탐산 (Glu) (E) | Asp; Gln |
| 글리신 (Gly) (G) | Ala |
| 히스티딘 (His) (H) | Asn; Gln |
| 이소류신 (Ile) (I) | Leu; Val |
| 류신 (Leu) (L) | Ile; Val |
| 라이신 (Lys) (K) | Arg; His |
| 메티오닌 (Met) (M) | Leu; Ile; Tyr |

[0062]

| 원래의 잔기<br>3 개의 문자 코드 및<br>단일 문자 코드 | 보존적 치환(들) |
|---|---|
| 페닐알라닌 (Phe) (F) | Tyr; Met; Leu |
| 프롤린 (Pro) (P) | Ala |
| 세린 (Ser) (S) | Thr |
| 트레오닌 (Thr) (T) | Ser |
| 트립토판 (Trp) (W) | Tyr; Phe |
| 티로신 (Tyr) (Y) | Trp; Phe |
| 발린 (Val) (V) | Ile; Leu |

[0063] 용어 "항체", "면역글로불린", 및 "Ig"는 본원에서 넓은 의미에서 상호교환적으로 사용되며, 구체적으로 예를 들어, 하기에 기재된 바와 같은 개별 항-글리코실화된 ICP 항체, 예컨대 본원에 기재된 단클론 항체(항원 결합 활성을 유지하는 항체의 작용제, 길항제, 중화 항체, 전장 또는 온전한(intact) 단클론 항체, 펩티드 단편을 포함함), 항-비글리코실화된 ICP 항체 및 항-글리코실화된 ICP 항체; 폴리에피토프 또는 모노에피토프 특이성을 갖는 항-ICP 항체 조성물, 다클론 또는 1가 항체, 다가 항체, 적어도 2 개의 온전한 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체(예를 들어, 소망하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이중특이적 항체 또는 비파라토프 항체), 단일쇄 항-ICP 항체, 및 항-ICP 항체의 단편을 포괄한다. 항체는 인간, 인간화, 키메라, 및/또는 친화도 성숙일 수 있다. 항체는 다른 종, 예를 들어 마우스, 래트, 토끼 등으로부터의 것일 수 있다. 용어 "항체"는 특정 분자 항원에 결합할 수 있는 폴리펩티드의 면역글로불린 클래스 내의 B 세포의 폴리펩티드 생성물을 포함하는 것으로 의도된다. 항체는 전형적으로 2 개의 동일한 쌍의 폴리펩티드 사슬로 구성되며, 각각의 쌍은 하나의 중쇄(약 50-70 kDa) 및 하나의 경쇄(약 25 kDa)를 갖고; 중쇄 및 경쇄의 아미노-말단 부분은 약 100 내지 약 130 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함하며, 각각의 사슬의 카복시-말단 부분은 불변 영역을 포함한다(Borrebaeck (ed.), 1995, *Antibody Engineering*, Second Ed., Oxford University Press.; Kuby, 1997, *Immunology*, Third Ed., W.H. Freeman and Company, New York 참고). 구체적 실시양태에서, 본원에 제공된 항체에 의해 결합된 특정 분자 항원은 ICP 항원 폴리펩티드, ICP 펩티드 단편, 또는 ICP 에피토프를 포함한다. ICP 폴리펩티드, ICP 펩티드 단편, 또는 ICP 에피토프는 비글리코실화되거나 글리코실화될 수 있다. 특별한 실시양태에서, ICP 폴리펩티드, ICP 펩티드 단편, 또는 ICP 에피토프는 글리코실화된다. ICP 항원에 결합하는 항체 또는 이의 펩티드 단편은 예를 들어, 면역에세이, BIAcore, 또는 당업자에게 알려지고 본원의 실시예에 기재된 다른 기법에 의해 확인될 수 있다. 항체 또는 이의 단편은 방사면역에세이(radioimmunoassay)(RIA) 및 효소

연결 면역흡착 에세이(enzyme linked immunosorbent assay)(ELISA)와 같은 실험 기법을 사용하여 결정된 바와 같이, 그것이 임의의 교차-반응성 항원에 비해 높은 친화도로 ICP 항원에 결합할 때, ICP 항원에 특이적으로 결합한다. 전형적으로, 특이적 또는 선택적 결합 반응은 적어도 2 배 백그라운드 신호 또는 노이즈(noise), 및 더욱 전형적으로 5-10 배 이상의 백그라운드 신호 또는 노이즈일 것이다. 예를 들어, 항체 특이성에 관한 논의에 대해 Paul, ed., 1989, *Fundamental Immunology Second Edition*, Raven Press, New York at pages 332-336을 참고한다.

[0064] 본원에 제공된 항체는, 비제한적으로, 합성 항체, 단클론 항체, 재조합적으로 생성된 항체, 다중특이적 항체(이중특이적 항체를 포함함), 인간 항체, 인간화 항체, 낙타화 항체, 키메라 항체, 인트라바디(intrabody), 항-유전자형(anti-idiotypic)(항-Id) 항체, 및 상기 중 임의의 하나의 기능적 단편(예를 들어, 글리코실화된 ICP 결합 단편과 같은 항원-결합 단편)을 포함한다. 결합 단편은 단편이 유래되는 항체의 결합 활성의 일부 또는 전부를 보유하는 펩티드 부분과 같은 항체 중쇄 또는 경쇄 폴리펩티드의 부분을 지칭한다. 기능적 단편(예를 들어, ICP 결합 단편과 같은 항원-결합 단편)의 비제한적인 예는 단일쇄 Fv(scFv)(예를 들어, 단일특이적, 이중특이적, 비파라토프, 1가(예를 들어, 단일 $V_H$ 또는 $V_L$ 도메인을 가짐) 또는 2가 등을 포함함), Fab 단편, F(ab') 단편, $F(ab)_2$ 단편, $F(ab')_2$ 단편, 다이설파이드-연결된 Fv(sdFv), Fd 단편, Fv 단편, 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody), 테트라바디(tetrabody) 및 미니바디(minibody)를 포함한다. 특히, 본원에 제공된 항체는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적으로 활성인 부분, 예를 들어 항원 결합 도메인 또는 ICP 항원, 특히 글리코실화된 ICP 항원에 결합하는 항원-결합 부위를 함유하는 분자(예를 들어, 항-글리코실화된 ICP 항체의 1 이상의 상보성 결정 영역(CDR))를 포함한다. 상기 항체 단편의 설명은, 예를 들어 Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); Myers (ed.), *Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, New York: VCH Publisher, Inc.; Huston *et al.*, *Cell Biophysics*, 22:189-224 (1993); Plückthun and Skerra, *Meth. Enzymol.*, 178:497-515 (1989) 및 Day, E.D., *Advanced Immunochemistry,* Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, NY (1990)에서 찾아볼 수 있다. 본원에 제공된 항체는 면역글로불린 분자의 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 임의의 클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2), 또는 임의의 서브클래스(예를 들어, IgG2a 및 IgG2b)의 것일 수 있다. 항-PD-L1 항체는 작용성 항체 또는 길항성 항체일 수 있다. 특정 실시양태에서, 항-ICP 항체는 완전 인간, 예컨대 완전 인간 단클론 항-ICP 항체이다. 특정 실시양태에서, 항-ICP 항체는 인간화, 예컨대 인간화 단클론 항-glycICP 항체이다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 IgG 항체, 또는 클래스(예를 들어, 인간 IgG1 또는 IgG4) 또는 이의 서브클래스, 특히 IgG1 서브클래스 항체이다.

[0065] 4-쇄 항체 단위는 2 개의 동일한 경(L)쇄 및 2 개의 동일한 중(H)쇄로 구성된 이종4량체 당단백질이다. IgG의 경우에, 4-쇄(비환원된) 항체 단위의 분자량은 일반적으로 약 150,000 달톤(dalton)이다. 각각의 L 사슬은 하나의 공유 다이설파이드 결합에 의해 H 사슬에 연결되는 한편, 2 개의 H 사슬은 H 사슬의 이소형에 따라 1 이상의 다이설파이드 결합에 의해 서로 연결된다. 각각의 H 및 L 사슬은 또한, 규칙적으로 이격된 사슬내 다이설파이드 가교를 갖는다. N-말단에서, 각각의 H 사슬은 가변 도메인($V_H$) 이후 각각의 α 및 γ 사슬에 대한 3 개의 불변 도메인($C_H$) 및 μ 및 ε 이소형에 대한 4 개의 $C_H$ 도메인을 갖는다. 각각의 L 사슬은 N-말단에서 가변 도메인($V_L$) 이후 이의 카복시 말단에서 불변 도메인($C_L$)을 갖는다. $V_L$ 도메인은 $V_H$ 도메인과 정렬되고, $C_L$ 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인($C_{H1}$)과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄 도메인과 중쇄 도메인 사이에 계면을 형성하는 것으로 여겨진다. $V_H$ 및 $V_L$의 쌍 형성은 함께 단일 항원-결합 부위를 형성한다. 면역글로불린 분자의 기본 구조는 당업자에 의해 이해된다. 예를 들어, 상이한 클래스의 항체의 구조 및 특성은 Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6에서 찾아볼 수 있다.

[0066] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항원" 또는 "표적 항원"은 항체가 선택적으로 결합할 수 있도록 예정된 분자이다. 표적 항원은 폴리펩티드, 펩티드, 탄수화물, 핵산, 지질, 합텐, 또는 천연 발생 또는 합성 화합물일 수 있다. 실시양태에서, 표적 항원은 소분자이다. 특정 실시양태에서, 표적 항원은 폴리펩티드 또는 펩티드, 바람직하게는 글리코실화된 ICP이다.

[0067] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항원 결합 단편", "항원 결합 도메인", "항원 결합 영역", 및 유사한 용어는 항원과 상호작용하고 항원에 대한 결합제로서 이의 특이성 및 친화도를 항체 상에 부여하는 아미노산 잔기를 포

함하는 항체의 부분을 지칭한다(예를 들어, 항체의 CDR은 항원 결합 영역임). 항원 결합 영역은 설치류(예를 들어, 토끼, 래트, 또는 햄스터) 및 인간과 같은 임의의 동물 종으로부터 유래될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 항원 결합 영역은 인간 기원의 것일 수 있다.

[0068] "단리된" 항체는 세포 물질 또는 세포 또는 조직 공급원으로부터의 다른 오염 단백질 및/또는 항체가 유래되는 다른 오염 성분이 실질적으로 없거나, 화학적으로 합성될 때 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없다. 표현 "세포 물질이 실질적으로 없는"은 항체가 그것이 단리되거나 재조합적으로 생성되는 세포의 세포 성분으로부터 분리되는 항체의 제제를 포함한다. 따라서, 세포 물질이 실질적으로 없는 항체는 약 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 또는 1%(건조 중량으로) 미만의 이종 단백질(본원에서는 "오염 단백질"로도 지칭됨)을 갖는 항체의 제제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체가 재조합적으로 생성될 때, 이는 배양 배지가 실질적으로 없으며, 예를 들어 배양 배지는 단백질 제제 부피의 약 20%, 15%, 10%, 5%, 또는 1% 미만을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 항체가 화학적 합성에 의해 생성될 때, 이는 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없으며, 예를 들어, 그것은 단백질의 합성에 관여하는 화학적 전구체 또는 다른 화학물질로부터 분리된다. 따라서, 상기 항체의 제제는 관심 항체 외에 약 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 또는 1%(건조 중량으로) 미만의 화학적 전구체 또는 화합물을 갖는다. 오염 성분은 또한, 비제한적으로, 항체에 대한 치료적 용도에 간섭할 물질을 포함할 수 있으며, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리법(Lowry method)(Lowry *et al.* J. Bio. Chem. 193: 265-275, 1951)에 의해 결정된 바와 같이 항체의 95 중량% 이상, 예컨대 95 중량%, 96 중량%, 97 중량%, 98 중량%, 또는 99 중량%까지, (2) 스피닝 컵 배열결정장치(spinning cup sequenator)의 사용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15 개 잔기를 얻기 충분한 정도 까지, 또는 (3) 쿠마씨 블루(Coomassie blue) 또는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건 하에서 SDS-PAGE에 의한 동종성까지 정제된다. 단리된 항체는 또한, 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에, 재조합 세포 내의 *원위치*(*in situ*)에서의 항체를 포함한다. 단리된 항체는 전형적으로 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 단리된다.

[0069] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "결합하다" 또는 "결합하는"은, 예를 들어 복합체를 형성하는 것을 포함하여 분자 사이의 상호작용을 지칭한다. 예시적으로, 상기 상호작용은 수소 결합, 이온 결합, 소수성 상호작용, 및/또는 반 데르 발스(van der Waals) 상호작용을 포함한 비공유 상호작용을 포괄한다. 복합체는 또한, 공유 또는 비공유 결합, 상호작용, 또는 힘에 의해 함께 유지되는 2 이상의 분자의 결합을 포함한다. 항체의 단일 항원-결합 부위와 PD-L1 또는 PD-1과 같은 표적(항원) 분자 상의 이의 에피토프 사이의 총 비공유 상호작용의 강도는 상기 에피토프에 대한 항체 또는 기능적 단편의 친화도이다. 1가 항원에 대한 항체의 결합($k_{on}$) 대 해리($k_{off}$)의 비($k_{on}$ / $k_{off}$)는 친화도의 측정치인 결합 상수 K이다. K의 값은 항체와 항원의 상이한 복합체에 대해 달라지며, $k_{on}$ 및 $k_{off}$ 둘 다에 의존한다. 본원에 제공된 항체에 대한 결합 상수 K는 본원에 제공된 임의의 방법 또는 당업자에게 알려진 임의의 다른 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 하나의 결합 부위에서의 친화도는 항체와 항원 사이의 상호작용의 실제 강도를 항상 반영하지는 않는다. 다중, 반복 항원성 결정인자를 함유한 복합체 항원이 다중 결합 부위를 함유한 항체와 접촉하게 될 때, 하나의 부위에서 항체와 항원의 상호작용은 제2 결합 부위에서의 상호작용 가능성을 증가시킬 것이다. 다가 항체와 항원 사이의 상기 다중 상호작용의 강도는 결합활성(avidity)으로 지칭된다. 항체의 결합활성은 이의 개별 결합 부위의 친화도에 비해 이의 결합 능력의 우수한 측정치일 수 있다. 예를 들어, 높은 결합활성은 때때로 IgG에 비해 낮은 친화도를 갖지만, 이의 다가로부터 야기된 IgM의 높은 결합활성이 이를 항원에 효과적으로 결합시킬 수 있는 5량체 IgM 항체에 대해 발견되는 바와 같이 낮은 친화도에 대해 보상할 수 있다.

[0070] "결합 친화도"는 일반적으로 분자(예를 들어, 항체와 같은 결합 단백질)의 단일 결합 부위와 이의 결합 파트너(예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총합의 강도를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 경우, 본원에 사용되는 바와 같이, "결합 친화도"는 결합 쌍(예를 들어, 항체 및 항원)의 멤버 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 본질적인 결합 친화도를 지칭한다. 결합 파트너 Y에 대한 결합 분자 X의 친화도는 일반적으로 해리 상수($K_d$)에 의해 나타낼 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 것들을 포함하여, 당업계에 알려진 일반적인 방법에 의해 측정될 수 있다. 저친화도 항체는 일반적으로 항원에 느리게 결합하고, 용이하게 해리되는 경향이 있는 반면에, 고친화도 항체는 일반적으로 항원에 신속하게 결합하고, 항원에 오래 결합된 채로 유지되는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하기 위한 다양한 방법이 당업계에 알려져 있으며, 이들 중 임의의 것이 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. 구체적인 예시적 실시양태는 다음을 포함한다: 일 실시양태에서, "$K_d$" 또는 "$K_d$ 값"은 당업계에 알려진 방법에 의해, 예를 들어 결합 에세이에 의해 측정된다. $K_d$는 예를 들어, 관심 항체의 Fab 부분과 이의 항원을

이용해 수행되는 방사성표지된 항원 결합 에세이(radiolabeled antigen binding assay)(RIA)에서 측정될 수 있다(Chen, *et al.*, (1999) J. Mol Biol 293:865-881). $K_d$ 또는 $K_d$ 값은 또한, 예를 들어 BIAcoreTM-2000 또는 BIAcoreTM-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)을 사용한 표면 플라스몬 공명 에세이(surface plasmon resonance assay)(BIAcore에 의함)를 사용함으로써, 또는 예를 들어, OctetQK384 시스템(ForteBio, Menlo Park, CA)을 사용한 바이오레이어 간섭계법(biolayer interferometry)에 의해 측정될 수 있다. "온-레이트(on-rate)" 또는 "결합의 비율" 또는 "결합 비율" 또는 "$k_{on}$"은 또한, 예를 들어 BIAcoreTM-2000 또는 BIAcoreTM-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ), 또는 OctetQK384 시스템(ForteBio, Menlo Park, CA)을 사용한 상기 기재된 동일한 표면 플라스몬 공명 또는 바이오레이어 간섭계법 기술로 결정될 수 있다.

[0071] 용어 "항-glycICP 항체", "글리코실화된 ICP에 특이적으로 결합하는 항체", 또는 "글리코실화된 ICP에 대해 특이적인 항체", "글리코실화된 ICP 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체" "글리코실화된 ICP에 선택적으로 결합하는 항체", "글리코실화된 ICP 에피토프에 선택적으로 결합하는 항체", "글리코실화된 ICP 에피토프에 우선적으로 결합하는 항체" 및 유사 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 충분한 친화도 및 특이성으로 ICP, 즉 글리코실화된 또는 WT ICP에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 항-글리코실화된 ICP 항체는 글리코실화된 ICP 폴리펩티드, 예컨대 글리코실화된 ICP 항원, 펩티드 단편, 또는 에피토프(예를 들어, 인간 PD-L1, 예컨대 인간 PD-L1 폴리펩티드, 항원 또는 에피토프)에 특이적으로 결합한다. 본원에 제공된 바와 같은 항-glycICP 항체의 "우선적 결합"은, 예를 들어 글리코실화된 PD-L1에 우선적으로 결합하는 항체에 대해 본원의 실시예 2에 기재된 바와 같은 ICP의 비글리코실화된 형태를 발현하는 세포에 대한 결합과 같이, 적절한 대조군에 비교하여 세포 상에 발현된 글리코실화된 ICP에 대한 항체 결합의 형광 강도의 정량화를 기본으로 하여 결정될 수 있다. 글리코실화된 ICP 폴리펩티드 또는 글리코실화된 ICP-발현 세포에 대해 기재된 바와 같은 항-ICP 항체의 우선적 결합은 비글리코실화된 ICP 폴리펩티드 또는 비글리코실화된 ICP-발현 세포에 대한 항체의 결합과 비교하여, 적어도 1.5 배, 적어도 2 배, 적어도 3 배, 적어도 4 배, 적어도 5 배, 적어도 6 배, 적어도 7 배, 적어도 8 배, 적어도 10 배, 적어도 15 배, 적어도 20 배 또는 그 이상인 실시예 2에 기재된 바와 같은 에세이를 사용한 측정 형광 결합 강도(measured fluorescent binding intensity)(MFI) 값으로 나타내어진다. 실시양태에서, 글리코실화된 ICP에 우선적으로 또는 선택적으로 결합하는 항-glycICP 항체는, 예를 들어 실시예 2의 유세포분석 에세이에 따라 결정된 바와 같이, ICP의 비글리코실화된 형태를 발현하는 결합 세포 또는 완전히 글리코실화되지 않은 ICP 글리코실화 변이체에 대한 동일한 항체의 MFI 값에 비해, ICP의 글리코실화된 형태를 발현하는 결합 세포에 대해 1.5 배 내지 25 배, 또는 2 배 내지 20 배, 또는 3 배 내지 15 배, 또는 4 배 내지 8 배, 또는 2 배 내지 10 배, 또는 2 배 내지 5 배 큰 MFI 값을 나타낸다. 상기 모두의 사이이며 동일한 배수-형광 강도 값이 포함되는 것으로 의도된다.

[0072] 실시양태에서, 인간 글리코실화된 ICP(예를 들어, 인간 PD-L1)에 특이적으로 결합하는 항체는 적어도 하나의 N-연결된 글리코실화된 아미노산을 포함하는 세포외 도메인(ECD), 또는 글리코실화된 ICP의 ECD로부터 유래된 펩티드에 결합할 수 있다. 인간 글리코실화된 ICP 항원(예를 들어, 인간 PD-L1)에 특이적으로 결합하는 항체는 관련 항원(예를 들어, 시노몰거스(cyno) ICP 항원)과 교차-반응성일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 인간 글리코실화된 ICP 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 다른 ICP 항원과 교차-반응성이 아니다. 인간 글리코실화된 ICP 항원에 특이적으로 결합하는 항체는, 예를 들어 면역에세이 방법, 비아코어(Biacore), 또는 당업자에게 알려진 다른 기법에 의해 확인될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 인간 글리코실화된 ICP에 결합하는 항체는 20 nM, 19 nM, 18 nM, 17 nM, 16 nM, 15 nM, 14 nM, 13 nM, 12 nM, 11 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 0.9 nM, 0.8 nM, 0.7 nM, 0.6 nM, 0.5 nM, 0.4 nM, 0.3 nM, 0.2 nM, 또는 0.1 nM 이하, 및/또는 0.1 nM 이상의 해리 상수($K_d$)를 갖는다. 특정 실시양태에서, 글리코실화된 ICP에 결합하는 항체는 상이한 종으로부터의 ICP 사이(예를 들어, 인간과 cyno PD-L1 사이)에 보존된 단백질의 에피토프에 결합한다. 항체는 방사면역에세이(RIA) 및 효소 연결 면역흡착 에세이(ELISA)와 같은 실험 기법을 사용하여 결정된 바와 같이, 그것이 임의의 교차 반응성 항원에 비해 높은 친화도로 글리코실화된 ICP에 결합할 때, 글리코실화된 ICP 항원에 특이적으로 결합한다. 전형적으로, 특이적 또는 선택적 결합 반응은 적어도 2 회 백그라운드 신호 또는 노이즈일 것이며, 10 회를 초과하는 백그라운드일 수 있다. 예를 들어, 항체 특이성에 관한 논의에 대한 Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, New York at pages 332 336을 참고한다. 상기 실시양태에서, "비-표적" 단백질에 대한 항체의 결합 정도는, 예를 들어 형광 활성화된 세포 분류(fluorescence activated cell sorting)(FACS) 분석 또는 방사면역침강법(radioimmunoprecipitation)(RIA)에 의해 결정된 바와 같이, 이의 특정 표적 단백질에 대한 항체 결합의 약 10% 미만일 것이다.

[0073] 실시양태에서, 항-글리코실화된 ICP 항체는 글리코실화된 ICP에 대해 특이적인 항체, 예를 들어 항-글리코실화

된 ICP 항체 또는 항-야생형 ICP(ICP WT) 항체를 포함하되, 야생형 ICP 단백질은 글리코실화되고, 글리코실화된 ICP에 대해 특이적인 항체를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 항-글리코실화된 ICP 항체는 비글리코실화된 ICP에 비해 글리코실화된 ICP에 특이적으로 및 우선적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-글리코실화된 ICP 항체는 ICP의 선형 글리코실화 모티프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-글리코실화된 ICP 항체는 3 차원으로 글리코실화 모티프 중 1 이상에 인접하여 위치한 펩티드 서열에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-글리코실화된 ICP 항체는 비글리코실화된 ICP에 비해 글리코실화 모티프를 갖는 ICP 또는 이의 펩티드의 1 이상의 글리코실화 모티프에 선택적으로 결합한다. 다른 실시양태에서, 항-글리코실화된 ICP 항체는 ICP 아미노산 서열의 연속 아미노산을 포함하는 선형 에피토프에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항-글리코실화된 ICP 항체는 글리코실화된 ICP의 비연속 아미노산을 포함하는 입체구조(비선형) 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-글리코실화된 ICP 항체, 또는 이의 결합 부분은 비글리코실화된 ICP에 관해 나타난 $K_d$의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 미만의 $K_d$로 글리코실화된 ICP에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항-글리코실화된 ICP 항체, 또는 이의 결합 부분은 비글리코실화된 ICP에 관해 나타난 $K_d$의 50% 미만의 $K_d$로 글리코실화된 ICP에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-글리코실화된 ICP 항체, 또는 이의 결합 부분은 비글리코실화된 ICP에 관해 나타난 $K_d$의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50% 미만의 $K_d$로 글리코실화된 ICP에 결합한다. 추가 양태에서, 항-글리코실화된 ICP 항체, 또는 이의 결합 부분은 비글리코실화된 ICP에 관해 나타난 $K_d$에 비해 적어도 5-10 배 작은 $K_d$로 글리코실화된 ICP에 결합한다. 실시양태에서, 항-ICP 항체, 또는 이의 결합 부분은 비글리코실화된 ICP에 관해 나타난 $K_d$에 비해 적어도 10 배 작은 $K_d$로 글리코실화된 ICP에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 ICP의 비글리코실화된 형태에 대한 결합에 의해 나타나는 $K_d$의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 또는 20% 이하의 $K_d$로 글리코실화된 ICP에 결합한다. 실시양태에서, 항-ICP 항체, 또는 이의 결합 부분은 5-20 nM 또는 10-20 nM(하부값 및 상부값 포함)의 친화도와 같은 나노몰농도 친화도로 글리코실화된 ICP에 결합한다.

[0074] 항체와 관련하여 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "중(H)쇄"는 약 50-70 kDa의 폴리펩티드 사슬을 지칭하되, 아미노-말단 부분은 약 115 내지 130 이상의 아미노산의 가변(V) 영역(V 도메인으로도 지칭됨) 및 불변(C) 영역을 포함하는 카복시-말단 부분을 포함한다. 불변 영역(또는 불변 도메인)은 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열을 기본으로 하여, 알파(α), 델타(δ), 엡실론(ε), 감마(ɣ) 및 뮤(μ)로 지칭되는 5 개의 별개 유형(예를 들어, 이소형) 중 하나일 수 있다. 별개의 중쇄는 크기가 상이하다: α, δ 및 ɣ는 대략 450 아미노산을 함유하는 한편, μ 및 ε은 대략 550 아미노산을 함유한다. 경쇄와 조합될 때, 이들 별개 유형의 중쇄는 잘 알려진 클래스(예를 들어, 이소형)의 항체, 4 개의 서브클래스의 IgG, 소위 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하여, 소위 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM을 각각 발생시킨다. 항체 중쇄는 인간 항체 중쇄일 수 있다.

[0075] 항체와 관련하여 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "경(L)쇄"는 약 25 kDa의 폴리펩티드 사슬을 지칭하되, 아미노-말단 부분은 약 100 내지 약 110 이상의 아미노산의 가변 도메인 및 불변 영역을 포함하는 카복시-말단 부분을 포함한다. 경쇄(V 및 C 도메인 둘 다)의 대략적인 길이는 211 내지 217 아미노산이다. 불변 영역의 아미노산 서열을 기본으로 하여, 카파(κ) 및 람다(λ)로 지칭되는 2 개의 별개 유형의 경쇄가 있다. 경쇄 아미노산 서열은 당업계에 잘 알려져 있다. 항체 경쇄는 인간 항체 경쇄일 수 있다.

[0076] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "가변(V) 영역" 또는 "가변(V) 도메인"은 일반적으로 L 또는 H 사슬의 아미노-말단에 위치한 항체 폴리펩티드의 경(L)쇄 또는 중(H)쇄의 부분을 지칭한다. H 사슬 V 도메인은 약 115 내지 130 아미노산 길이를 갖는 한편, L 사슬 V 도메인은 100 내지 110 아미노산 길이이다. H 및 L 사슬 V 도메인은 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다. H 사슬의 V 도메인은 "$V_H$"로 지칭될 수 있다. L 사슬의 V 영역은 "$V_L$"로 지칭될 수 있다. 용어 "가변"은 V 도메인의 특정 절편이 상이한 항체 사이의 서열에서 광범위하게 상이하다는 점을 지칭한다. V 도메인은 항원 결합을 매개하고 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 정의하는 한편, 가변성은 항체 V 도메인의 110-아미노산 구간에 걸쳐 고르게 분포되어 있지 않다. 대신에, V 도메인은 각각 약 9-12 아미노산 길이인 "초가변 영역" 또는 "상보성 결정 영역"(CDR)으로 지칭되는 큰 가변성(예를 들어, 극단적 가변성)의 짧은 영역에 의해 분리된 약 15-30 아미노산의 프레임워크 영역(framework region)(FR)으로 지칭되는 덜 가변적인(비교적 비가변성인) 구간으로 구성된다. 항체 H 및 L 사슬의 V 도메인은 각각, β 시트 구조의 일부를 형성하는 일부 경우에, 루프 연결을 형성하는, β 시트 구조로 지칭되는, 3 개의 초가변 영역에 의해 연결된 β 시트 구성을 광범위하게 채택하는 4 개의 FR을 포함한다. 각각의 사

슬에서 초가변 영역은 FR에 의해 함께 근접하여 유지되며, 다른 사슬로부터의 초가변 영역과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다(예를 들어, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991) 참고). C 도메인은 항원에 항체를 결합하는 데에 직접 관여하지는 않지만, 항체 의존성 세포 세포독성(antibody dependent cellular cytotoxicity)(ADCC) 및 보체 의존성 세포독성(complement dependent cytotoxicity)(CDC)과 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다. V 도메인은 상이한 항체 클래스 또는 유형 사이에서 서열이 광범위하게 상이하다. 서열에서의 가변성은 항체와 항원의 상호작용의 주요 원인이 되는 CDR에 집중된다. 구체적 실시양태에서, 항체의 가변 도메인은 인간 또는 인간화 가변 도메인이다.

[0077] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "상보성 결정 영역", "CDR", "초가변 영역", "HVR", 및 "HV"는 상호교환적으로 사용된다. "CDR"은 항체 $V_H$ β-시트 프레임워크의 비-프레임워크 영역 내의 3 개의 초가변 영역(H1, H2 또는 H3) 중 하나, 또는 항체 $V_L$ β-시트 프레임워크의 비-프레임워크 영역 내의 3 개의 초가변 영역(L1, L2 또는 L3) 중 하나를 지칭한다. 본원에 사용될 때, 상기 용어는 서열에서 초가변성이고/이거나 구조적으로 정의된 루프를 형성하는 항체 V 도메인의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6 개의 초가변 영역을 포함한다: $V_H$ 도메인의 3 개(H1, H2, H3) 및 $V_L$ 도메인의 3 개(L1, L2, L3). 따라서, CDR은 전형적으로 V 도메인의 프레임워크 영역 서열 내에 배치된 매우 가변적인 서열이다. "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 CDR의 측면 배치된 가변 영역 잔기이다. FR 잔기는, 예를 들어 키메라, 인간화, 인간, 도메인 항체, 디아바디, 선형 항체, 이중특이적, 또는 비파라토프 항체 내에 존재한다.

[0078] 다수의 초가변 영역 설명이 본원에 사용되고 포함된다. CDR 영역은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어 카밧(Kabat)에 의해 항체 V 도메인 내의 대부분의 초가변성의 영역으로서 정의되어 왔다(Kabat *et al.*, J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat, Adv. Prot. Chem. 32:1-75 (1978)). 카밧 CDR은 서열 가변성을 기본으로 하며, 가장 일반적으로 사용된다(예를 들어, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) 참고). CDR 영역 서열은 또한, 코티아(Chothia)에 의해 보존적 β-시트 프레임워크의 일부가 아니므로, 상이한 입체구조를 채택할 수 있는 잔기로서 구조적으로 정의되어 왔다(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). 코티아는 대신 구조적 루프의 위치를 지칭한다. 코티아 CDR-H1 루프의 말단은 카밧 넘버링 협약을 사용하여 넘버링될 때, 루프의 길이에 따라 H32와 H34 사이에서 달라진다(이는 카밧 넘버링 계획이 H35A 및 H35B에 삽입을 배치하기 때문이며; 35A 및 35B 둘 다 존재하지 않는 경우, 루프는 32에서 종결되고; 35A만 존재하는 경우, 루프는 33에서 종결되며; 35A 및 35B 둘 다 존재하는 경우, 루프는 34에서 종결됨). 양측 넘버링 시스템 및 용어는 당업계에 잘 인식되어 있다.

[0079] 최근, 범용 넘버링 시스템인 ImMunoGeneTics (IMGT) Information System®(Lafranc *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* 27(1):55-77 (2003))이 개발되어 왔으며, 광범위하게 채택되어 왔다. IMGT는 인간 및 다른 척추동물의 면역글로불린(Ig), T 세포 수용체(TR) 및 주조직적합복합체(MHC)에 특화된 통합 정보 시스템이다. 본원에서, CDR은 경쇄 또는 중쇄 내의 아미노산 서열 및 위치 둘 다와 관련하여 지칭된다. 면역글로불린 V 도메인의 구조 내의 CDR의 "위치"는 종들 사이에서 보존되며, 루프로 지칭되는 구조 내에 존재하기 때문에, 구조적 특징, CDR 및 프레임워크 잔기에 따라 가변 도메인 서열을 정렬하는 넘버링 시스템을 사용함으로써 용이하게 확인된다. 이 정보는 하나의 종의 면역글로불린으로부터의 CDR 잔기를 전형적으로, 인간 항체로부터의 억셉터(acceptor) 프레임워크 내로 이식하고 치환하는데 사용될 수 있다. 추가의 넘버링 시스템(AHon)이 Honegger and Plückthun *J. Mol. Biol.* 309: 657-670 (2001)에 의해 개발되어 왔다. 예를 들어, 카밧 넘버링과 IMGT 고유 넘버링 시스템을 포함하여, 넘버링 시스템 사이의 상응은 당업자에게 잘 알려져 있다(예를 들어, Kabat, *supra*; Chothia and Lesk, *supra*; Martin, *supra*; and Lefranc et al., 1999, *Nuc. Acids Res.*, 27:209-212 참고).

[0080] CDR 영역 서열은 또한 AbM, 콘택트(Contact) 및 IMGT에 의해서도 정의되어 왔다. AbM 초가변 영역은 카밧 CDR과 코티아 구조적 루프 사이의 절충을 나타내며, Oxford Molecular의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다(예를 들어, Martin, in Antibody Engineering, Vol. 2, Chapter 3, Springer Verlag 참고). "콘택트" 초가변 영역은 이용 가능한 복합 결정 구조의 분석을 기본으로 한다. 이들 초가변 영역 또는 CDR 각각으로부터의 잔기를 하기에 기재하였다.

[0081] CDR 영역 서열의 예시적 설명을 하기 표 3에 나타내었다. 표준 항체 가변 영역 내의 CDR의 위치는 많은 구조의 비교에 의해 결정되어 왔다(Al-Lazikani *et al.*, J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); Morea *et al.*, Methods

20:267-279 (2000)). 초가변 영역 내의 잔기의 수는 상이한 항체에서 달라지기 때문에, 표준 위치에 관한 추가 잔기는 전통적으로 표준 가변 영역 넘버링 계획에서 잔기 번호 다음에 a, b, c 등으로 넘버링된다(상기 Al-Lazikani *et al.* (1997)). 이러한 명명법은 당업자에게 유사하게 잘 알려져 있다.

*표 3*

**표 3. CDR 영역 서열의 예시적 개략설명**

[0082]

| | IMGT | 카밧 | AbM | 코티아 | 콘택트 |
|---|---|---|---|---|---|
| $V_H$ CDR1 | 27-38 | 31-35 | 26-35 | 26-32 | 30-35 |
| $V_H$ CDR2 | 56-65 | 50-65 | 50-58 | 53-55 | 47-58 |
| $V_H$ CDR3 | 105-117 | 95-102 | 95-102 | 96-101 | 93-101 |
| $V_L$ CDR1 | 27-38 | 24-34 | 24-34 | 26-32 | 30-36 |
| $V_L$ CDR2 | 56-65 | 50-56 | 50-56 | 50-52 | 46-55 |
| $V_L$ CDR3 | 105-117 | 89-97 | 89-97 | 91-96 | 89-96 |

[0083] "친화도 성숙" 항체는 이의 1 이상의 HVR 내에 1 이상의 변화(예를 들어, 변경, 추가 및/또는 결실을 포함한 아미노산 서열 변이)를 가져, 상기 변화(들)를 포함하지 않는 모 항체와 비교하여, 항원에 대한 항체의 친화도에서의 개선을 야기하는 항체를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 친화도 성숙 항체는 글리코실화된 PD-L1과 같은 표적 항원에 대해 나노몰농도 또는 피코몰농도 친화도를 가질 것이다. 친화도 성숙 항체는 당업계에 알려진 절차에 의해 생성된다. 검토를 위해, Hudson and Souriau, *Nature Medicine* 9:129-134 (2003); Hoogenboom, *Nature Biotechnol.* 23 : 1105-1116 (2005); Quiroz and Sinclair, *Revista Ingeneria Biomedia* 4 : 39-51 (2010)을 참고한다.

[0084] "키메라" 항체는 H 및/또는 L 사슬의 부분, 예를 들어, V 도메인이 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체에서의 상응하는 아미노산 서열과 동일하거나 상동성인 반면에, 사슬(들)의 나머지, 예를 들어 C 도메인은 다른 종으로부터 유래되거나 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체에서의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 항체뿐 아니라, 소망하는 생물학적 활성을 발휘하는 한, 상기 항체의 단편이다(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호; 및 Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984) 참고).

[0085] "인간화" 비인간(예를 들어, 뮤린) 항체는 천연 CDR 잔기가 소망하는 특이성, 친화도, 및 항원 결합과 상호작용을 위한 능력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비인간 종(예를 들어, 도너(donor) 항체)의 상응하는 CDR로부터의 잔기에 의해 치환된 인간 면역글로불린 서열을 지칭하는 항체(예를 들어, 수용체 항체)의 키메라 형태이다. 일부 사례에서, 인간 면역글로불린의 1 이상의 FR 영역 잔기는 또한 상응하는 비인간 잔기에 의해 치환될 수 있다. 또한, 인간화 항체는 수용체 항체 또는 도너 항체에서 발견되지 않은 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 인간화 항체의 성능을 추가로 개선하기 위해 이루어진다. 인간화 항체 H 또는 L 사슬은 CDR의 전부 또는 실질적으로 전부가 비인간 면역글로불린의 CDR에 상응하고, FR의 전부 또는 실질적으로 전부가 인간 면역글로불린 서열의 FR인, 적어도 1 이상의 가변 영역의 실질적으로 전부를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 인간화 항체는 전형적으로, 인간 면역글로불린의 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부를 포함할 것이다. 당업자에게 알려져 있는 한편, 소망하는 경우, 추가 상세내용은 예를 들어, 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); Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acd. Sci. USA*, 89:4285-4289 (1992); 및 미국 특허 제6,800,738호(2004년 10월 5일 등록), 제6,719,971호(2005년 9월 27일 등록), 제6,639,055호(2003년 10월 28일 등록), 제6,407,213호(2002년 6월 18일 등록), 및 제6,054,297호(2000년 4월 25일 등록)에서 찾아볼 수 있다.

[0086] 용어 "인간 항체" 및 "완전 인간 항체"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 인간에 의해 생성된 항체의 것에 상응하는 아미노산 서열을 포함하고/하거나 당업자에 의해 실시되는 바와 같이 인간 항체를 제조하기 위한 기법 중 임의의 것을 사용하여 제조된 항체를 지칭한다. 인간 항체의 이 정의는 특히 비인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 배제한다. 인간 항체는 파지-디스플레이 라이브러리를 포함하여, 당업계에 알려진 다양한 기법(Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991) 및 효모 디스플레이 라이브러리(Chao *et al.*, Nature Protocols 1: 755-768 (2006))을 사용하여 생성될 수 있다. 또한, 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 방법이 인간 단클론 항체의 제조를 위해 이용 가능하다.

또한, van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001)를 참고한다. 인간 항체는 내생 Ig 좌위가 불능이 된 유전자도입 동물, 예를 들어 마우스, 및 인간 항체가 항원성 도전에 반응하여 생성되도록, 인간 항체를 코딩하는 인간 면역글로불린 유전자를 보유하도록 유전적으로 변형된 유전자도입 동물에게 항원을 투여함으로써 제조될 수 있다(예를 들어, XENOMOUSE™ 기술에 관한 Jakobovits, A., *Curr. Opin. Biotechnol.* 1995, 6(5):561-6; Brüggemann and Taussing, *Curr. Opin. Biotechnol.* 1997, 8(4):455-8; 및 미국 특허 제6,075,181호 및 제6,150,584호 참고). 또한, 예를 들어 인간 B 세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체에 관한 Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)를 참고한다. 구체적 실시양태에서, 인간 항체는 인간 기원의 가변 영역 및 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, "완전 인간" 항-글리코실화된 ICP 항체는 또한 면역체크포인트 폴리펩티드에 결합하고 인간 생식세포 면역글로불린 핵산 서열의 천연 산출 신체적 변이체인 핵산 서열에 의해 코딩되는 항체를 포함할 수 있다. 구체적 실시양태에서, 본원에 제공된 항-글리코실화된 ICP 항체는 완전 인간 항체이다. 용어 "완전 인간 항체"는 Kabat *et al.* (See Kabat, et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)에 의해 기재된 바와 같은 인간 생식세포 면역글로불린 서열에 상응하는 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함한다. 어구 "재조합 인간 항체"는 숙주 세포 내로 형질주입된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체; 재조합, 조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체; 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자도입되고/되거나 염색체도입(transchromosomal)된 동물(예를 들어, 마우스 또는 소)로부터 단리된 항체(예를 들어, Taylor, L. D., et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295 참고); 또는 다른 DNA 서열에 대한 인간 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체와 같은 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성, 또는 단리된 인간 항체를 포함한다. 상기 재조합 인간 항체는 인간 생식세포 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 가질 수 있다(Kabat, E. A., et al., 1991, *Id* 참고). 그러나, 특정 실시양태에서, 상기 재조합 인간 항체는 *시험관내(in vitro)* 돌연변이유발(또는, 인간 Ig 서열에 대해 동물 유전자도입이 사용될 때, *생체내(in vivo)* 신체적 돌연변이유발)을 거치므로, 재조합 항체의 $V_H$ 및 $V_L$ 영역의 아미노산 서열은 인간 생식세포 $V_H$ 및 $V_L$ 서열로부터 유래되고 이와 관련되는 한편, 인간 항체 생식세포 레퍼토리 내의 *생체내에서* 천연적으로 존재할 수 없는 서열이다.

[0087] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "에피토프"는 항원의 표면 상의 국소화된 영역과 같이, 단일 항체 분자가 결합하는 항원 분자, 예를 들어 항-ICP 또는 항-glycICP 항체의 1 이상의 항원 결합 영역에 의해 결합될 수 있는 ICP 폴리펩티드 또는 글리코실화된 ICP 폴리펩티드의 표면 상의 부위(들) 또는 영역(들)이다. 에피토프는 면역원성일 수 있으며, 동물에서 면역 반응을 유도할 수 있다. 에피토프는 반드시 면역원성일 필요는 없다. 에피토프는 보통 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 그룹화로 구성되며, 특정한 3 차원 구조 특징뿐 아니라, 특정한 전하 특징을 갖는다. 에피토프는 선형 에피토프 및 입체구조 에피토프일 수 있다. 에피토프에 기여하는 폴리펩티드의 영역은 선형 에피토프를 형성하는 폴리펩티드의 연속 아미노산일 수 있거나, 전형적으로, 입체구조 에피토프로 지칭되는 에피토프는 폴리펩티드의 2 이상의 비연속 아미노산 또는 영역으로부터 형성될 수 있다. 에피토프는 항원의 3 차원 표면 구조이거나, 항원의 3 차원 표면 구조가 아닐 수 있다. 특정 실시양태에서, 글리코실화된 면역 체크포인트 폴리펩티드 에피토프는 글리코실화된 면역 체크포인트 폴리펩티드의 3 차원 표면 구조이다. 다른 실시양태에서, 글리코실화된 면역 체크포인트 폴리펩티드 에피토프는 글리코실화된 면역 체크포인트 폴리펩티드의 선형 표면 구조이다. 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 폴리펩티드 에피토프는 비글리코실화된 면역 체크포인트 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 글리코실화된 면역 체크포인트 폴리펩티드 에피토프는 1 이상의 부위에서 글리코실화된다. 일반적으로, 항원은 몇몇의 또는 많은 상이한 에피토프를 가지며, 많은 상이한 항체와 반응할 수 있다. 특별한 실시양태에서, 항-글리코실화된 면역 체크포인트 폴리펩티드 항체는 입체구조 에피토프인 글리코실화된 면역 체크포인트 폴리펩티드, 예를 들어 글리코실화된 PD-L1의 에피토프에 결합한다.

[0088] 항체는 2 개의 항체가 3 차원 공간에서 동일하거나, 중첩되거나, 또는 인접한 에피토프를 인식할 때, 기준 항체로서 "에피토프" 또는 "필수적으로 동일한 에피토프" 또는 "동일한 에피토프"에 결합한다. 2 개의 항체가 3 차원 공간에서 동일하거나, 중첩되거나, 또는 인접한 에피토프에 결합하는지 여부를 결정하기 위해 가장 광범위하게 사용되고, 신속한 방법은 예를 들어, 표지된 항원 또는 표지된 항체를 사용하여 다수의 상이한 형식으로 구성될 수 있는 경쟁 에세이이다. 일부 에세이에서, 항원은 96-웰 플레이트 상에 고정화되거나, 세포 표면 상에 발현되며, 항원에 대한 표지된 항체의 결합을 차단하는 비표지된 항체의 능력은 검출 가능한 신호, 예를 들어 방사성, 형광 또는 효소 표지를 사용하여 측정된다.

[0089] 글리코실화된 면역 체크포인트 폴리펩티드 표적 단백질 또는 이의 펩티드 상의 동일한 에피토프 또는 결합 부위에 대해 경쟁하는 항-글리코실화된 체크포인트 폴리펩티드 항체의 맥락에서 사용될 때, 용어 "경쟁하다"는 연구 중인 항체, 또는 이의 결합 단편이 일반 항원(예를 들어, ICP 또는 이의 단편)에 대한 기준 분자(예를 들어, 기준 리간드, 또는 기준 항체와 같은 기준 항원 결합 단백질)의 특이적 결합을 예방, 차단, 또는 억제하는 에세이에 의해 결정되는 바와 같은 경쟁을 의미한다. 시험 항체가 글리코실화된 면역 체크포인트 폴리펩티드 또는 이의 에피토프(예를 들어, 인간 PD-L1 또는 인간 글리코실화된 PD-L1)에 결합하기 위해 기준 항체와 경쟁하는지를 결정하기 위해 많은 유형의 경쟁적 결합 에세이가 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 에세이의 예는 고상 직접 또는 간접 방사면역에세이(RIA); 고상 직접 또는 간접 효소 면역에세이(enzyme immunoassay)(EIA); 샌드위치 경쟁 에세이(예를 들어, Stahli *et al.*, (1983) *Methods in Enzymology* 9:242-253 참고); 고상 직접 비오틴-아비딘 EIA(예를 들어, Kirkland *et al.*, (1986) *J. Immunol.* 137:3614-3619 참고); 고상 직접 표지된 에세이; 고상 직접 표지된 샌드위치 에세이(예를 들어, Harlow and Lane, (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press 참고); 표지된 아이오딘($1^{125}$ 표지)을 사용하는 고상 직접 표지 RIA(예를 들어, Morel *et al.*, (1988) *Molec. Immunol.* 25:7-15 참고); 고상 직접 비오틴-아비딘 EIA(예를 들어, Cheung, *et al.*, (1990) *Virology* 176:546-552 참고); 및 직접 표지된 RIA(Moldenhauer *et al.*, (1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77-82)를 포함한다. 전형적으로, 이러한 에세이는 비표지된 시험 항원 결합 단백질(예를 들어, 시험 항-PD-L1 항체) 또는 표지된 기준 항원 결합 단백질(예를 들어, 기준 항-PD-L1 항체)을 보유한 고체 표면, 또는 세포에 결합되는 정제된, 글리코실화된 ICP 항원(예를 들어, 인간 PD-L1 또는 글리코실화된 PD-L1)의 사용을 포함한다. 경쟁적 억제는 시험 항원 결합 단백질의 알려진 양의 존재 하에, 고체 표면 또는 세포에 결합된 표지의 양을 결정함으로써 측정될 수 있다. 보통, 시험 항원 결합 단백질은 과량으로 존재한다. 경쟁 에세이에 의해 확인된 항체(경쟁 항체)는 기준 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체 및/또는 기준 항체에 의해 결합되어 입체적 방해가 발생하도록 야기하기에 충분히 근접한 인접 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다. 경쟁적 결합을 결정하기 위한 방법에 관한 추가 상세내용은 본원에 기재되어 있다. 보통, 경쟁 항체 단백질이 과량으로 존재할 때, 적어도 15%, 또는 적어도 23%, 예를 들어, 비제한적으로, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75% 이상뿐 아니라, 기재된 양들 사이의 퍼센트 양으로 일반 항원에 대한 기준 항체의 특이적 결합을 억제할 것이다. 일반 사례에서, 결합은 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96% 또는 97%, 98%, 99% 이상 억제된다.

[0090] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "차단성" 항체 또는 "길항제" 항체는 그것이 결합하는 항원의 생물학적 또는 기능적 활성을 예방, 억제, 차단, 또는 감소시키는 항체를 지칭한다. 차단성 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성 또는 기능을 실질적으로 또는 완전히 예방, 억제, 차단, 또는 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 차단성 항-글리코실화된 면역 체크포인트 폴리펩티드 항체는 상호작용하는 2 개의 ICP, 예를 들어 PD-L1과 PD-1 사이의 결합 상호작용을 예방, 억제, 차단, 또는 감소시킬 수 있으므로, 상호작용과 연관된 면역억제 기능을 예방, 차단, 억제, 또는 감소시킬 수 있다. 용어 차단, 억제, 및 중화는 본원에서 상호 교환적으로 사용되며, ICP-ICP 상호작용을 예방하거나, 이와 달리 방해하는 항-글리코실화된 면역 체크포인트 폴리펩티드 항체의 능력을 지칭한다.

[0091] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리펩티드" 또는 "펩티드"는 펩티드 결합을 통해 연결된 연속 배열에서 3 이상의 아미노산의 아미노산 중합체를 지칭한다. "폴리펩티드"는 단백질, 단백질 단편, 단백질 유사체, 올리고펩티드 등일 수 있다. 폴리펩티드를 포함하는 아미노산은 자연적으로 유래되거나 합성일 수 있다. 폴리펩티드는 생물학적 샘플로부터 정제될 수 있다. 예를 들어, ICP 폴리펩티드 또는 펩티드는 ICP의 아미노산 서열의 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25 개의 연속 아미노산으로 구성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 인간 면역 체크포인트 폴리펩티드 또는 글리코실화된 면역 체크포인트 폴리펩티드의 적어도 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 또는 285 개의 연속 아미노산을 갖는다. 특정 실시양태에서, 글리코실화된 면역 체크포인트 폴리펩티드 또는 비글리코실화된 면역 체크포인트 폴리펩티드는 면역 체크포인트 폴리펩티드 또는 글리코실화된 면역 체크포인트의 아미노산 서열의 적어도 5 개의 연속 아미노산 잔기, 적어도 10 개의 연속 아미노산 잔기, 적어도 15 개의 연속 아미노산 잔기, 적어도 20 개의 연속 아미노산 잔기, 적어도 25 개의 연속 아미노산 잔기, 적어도 40 개의 연속 아미노산 잔기, 적어도 50 개의 연속 아미노산 잔기, 적어도 60 개의 연속 아미노산 잔기, 적어도 70 개의 연속 아미노산 잔기, 적어도 80 개의 연속 아미노산 잔기, 적어도 90 개의 연속 아미노산 잔기, 적어도 연속 100 개의 아미노산 잔기, 적어도 125 개의 연속 아미노산 잔기, 적어도 150 개의 연속 아미노산 잔기, 적어도 175 개의 연속 아미노산 잔기, 적어도 200 개의 연속 아미노산 잔기, 적어도 250 개의 연속

아미노산 잔기를 포함한다.

[0092] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유사체"는 기준 폴리펩티드와 유사하거나 동일한 기능을 포함하지만, 기준 폴리펩티드의 유사하거나 동일한 아미노산 서열을 반드시 포함하지는 않거나, 기준 폴리펩티드의 유사하거나 동일한 구조를 반드시 포함하지는 않는 폴리펩티드를 지칭한다. 기준 폴리펩티드는 ICP, 예를 들어 PD-L1 폴리펩티드, ICP의 단편, 항-ICP 항체, 또는 항-글리코실화된 ICP 항체일 수 있다. 기준 폴리펩티드와 유사한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는 본원에 기재된 ICP 또는 항-글리코실화된 ICP 항체일 수 있는 기준 폴리펩티드의 아미노산 서열과 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. 기준 폴리펩티드와 유사한 구조를 갖는 폴리펩티드는 ICP 또는 항-글리코실화된 ICP 항체일 수 있는 기준 폴리펩티드의 구조와 유사한 2 차, 3 차 또는 4 차 구조를 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. 폴리펩티드의 구조는, 비제한적으로, X선 결정학, 핵 자기 공명(nuclear magnetic resonance)(NMR), 및 결정학 전자 현미경을 포함하여, 당업자에게 알려진 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0093] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "변이체"는 ICP 또는 항-글리코실화된 ICP 항체와 관련하여 사용될 때, 천연 또는 비변형된 ICP 서열 또는 항-ICP 항체 서열과 비교하여, 1 이상(예컨대, 약 1 내지 약 25, 약 1 내지 약 20, 약 1 내지 약 15, 약 1 내지 약 10, 또는 약 1 내지 약 5)의 아미노산 서열 치환, 결실, 및/또는 추가를 갖는 폴리펩티드 또는 항-글리코실화된 ICP 항체를 지칭한다. 예를 들어, ICP 변이체는 천연 ICP의 아미노산 서열에 대한 1 이상(예컨대, 약 1 내지 약 25, 약 1 내지 약 20, 약 1 내지 약 15, 약 1 내지 약 10, 또는 약 1 내지 약 5)의 변경으로부터 야기될 수 있다. 또한, 예로서, 항-ICP 항체의 변이체는 천연 또는 이전에 비변형된 항-ICP 항체의 아미노산 서열에 대한 1 이상(예컨대, 약 1 내지 약 25, 약 1 내지 약 20, 약 1 내지 약 15, 약 1 내지 약 10, 또는 약 1 내지 약 5)의 변경으로부터 야기될 수 있다. 변이체는 대립형질 또는 스플라이스 변이체와 같이 천연적으로 발생할 수 있거나, 합성적으로 구축될 수 있다. 폴리펩티드 변이체는 변이체를 코딩하는 상응하는 핵산 분자로부터 제조될 수 있다.

[0094] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유도체"는 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 추가의 도입에 의해 변화된 기준 폴리펩티드의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 기준 폴리펩티드는 ICP 또는 항-글리코실화된 ICP 항체일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "유도체"는 또한, 예를 들어 폴리펩티드에 대한 임의의 유형의 분자의 공유 부착에 의해 화학적으로 변형된 ICP 또는 항-글리코실화된 ICP 항체를 지칭한다. 예를 들어, ICP 또는 항-글리코실화된 ICP 항체는, 예를 들어 알려진 보호/차단기, 단백분해 절단(proteolytic cleavage), 세포 리간드에 대한 연결, 펩티드 또는 단백질 태그 분자, 또는 다른 단백질 등에 대한 연결에 의한 글리코실화, 아세틸화, 페길화, 인산화, 아마이드화, 유도체화에 의해 화학적으로 변형될 수 있다. 유도체는 부착된 분자의 유형 또는 위치에서 천연적으로 발생하거나 출발하는 펩티드 또는 폴리펩티드와 상이한 방식으로 변형된다. 유도체는 펩티드 또는 폴리펩티드 상에 천연적으로 존재하는 1 이상의 화학기의 결실을 추가로 포함한다. ICP 또는 항-글리코실화된 ICP 항체의 유도체는, 비제한적으로, 튜니카마이신의 특정 화학 절단, 아세틸화, 제형화, 대사 합성 등을 포함하여, 당업자에게 알려진 기법을 사용한 화학적 변형에 의해 화학적으로 변형될 수 있다. 또한, ICP 또는 항-글리코실화된 ICP 항체의 유도체는 1 이상의 비고전적 아미노산을 함유할 수 있다. 폴리펩티드 유도체는 본원에 기재된 ICP 또는 항-글리코실화된 ICP 항체일 수 있는 기준 폴리펩티드와 유사하거나 동일한 기능을 포함한다.

[0095] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "조성물"은, 선택적으로 특정 양 또는 유효량의 특정 구성요소 성분(예를 들어, 본원에 제공된 폴리펩티드 또는 항체)을 함유하는 생성물뿐 아니라, 선택적으로 특정 양 또는 유효량의 특정 구성요소 성분의 조합 또는 상호작용으로부터 직접적으로 또는 간접적으로 야기되는 임의의 소망하는 생성물을 지칭한다.

[0096] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료", 또는 "치료하는"은 치료를 필요로 하는 대상체에 대한 치료제의 투여 또는 적용, 또는 질환 또는 건강 관련 병태를 치료하는 것과 같은 적어도 하나의 양성적 치료 효과 또는 이득을 얻을 목적을 위한 대상체에 대한 절차 또는 양상의 수행을 지칭한다. 예를 들어, 치료는 다양한 유형의 암을 치료할 목적으로 글리코실화된 ICP에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 조성물 또는 이의 제형의 약학적 유효량의 투여를 포함한다. 용어 "치료 계획", "투약 계획", 또는 "투약 프로토콜"은 상호교환적으로 사용되며, 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 항-글리코실화된 ICP 항체와 같은 치료제의 시기 및 용량을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 암을 갖거나 암으로 진단받은 영장류, 포유동물, 및 척추동물과 같은 인간 또는 비인간 동물을 지칭한다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 암 환자이다. 실시양태에서, 치료를 필요로 하는 대상체는 항-글리코실화된 ICP 항체, 예를 들어 항-glycPD-

L1 항체, 치료로부터 이득을 볼 것이거나 이득을 볼 것으로 예상된다.

[0097] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료적으로 유익한" 또는 "치료적으로 유효한"은, 특히 항-글리코실화된 ICP 항체의 사용의 결과로서 병태의 의료적 치료, 요법, 투여량 투여 및 이들 항체를 사용한 방법의 수행에 관하여 치료를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 암을 갖거나 암으로 진단받은 대상체)의 웰-빙(well-being)의 촉진 또는 향상을 지칭한다. 이는, 비제한적으로, 질환의 신호 또는 증상의 빈도 또는 중증도에서의 감소를 포함한다. 예를 들어, 암의 치료는 예를 들어, 종양 크기에서의 감소, 종양의 침투성 또는 중증도에서의 감소, 말초 조직 또는 장기 내로의 암 세포 침투 감소; 종양 또는 암의 성장률에서의 감소, 또는 전이의 예방 또는 감소를 포함할 수 있다. 암의 치료는 또한 대상체에서 지속된 반응을 달성하는 것 또는 암을 갖는 대상체의 생존을 연장하는 것을 포함할 수 있다.

[0098] **글리코실화된 면역 체크포인트 단백질에 우선적으로 결합하는 항체를 생성하는 방법**

[0099] 항체 생성을 위해, 수용체 동물은 글리코실화된 ICP 또는 펩티드와 같은 항원으로 접종되어, 면역 반응을 생성하고 글리코실화된 ICP 또는 펩티드에 대해 특이적인 항체, 예를 들어 PD-L1을 생성한다. 자주, 항원은 다른 분자에 결합되거나 콘쥬게이트되어, 면역 반응을 향상시킨다. 본원에 사용된 바와 같이, 콘쥬게이트는 동물에서 면역 반응을 유도하기 위해 사용되는 항원에 결합되는 임의의 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 또는 비단백질성 물질이다. 항원 접종에 반응하여 동물에서 생성된 항체는 B 림프구를 생성하는 다양한 개별 항체로부터 제조된 다양한 비-동일성 분자(다클론 항체)를 포함한다. 다클론 항체는 항체 종들의 혼합된 집단이며, 이들 각각은 동일한 항원 상의 상이한 에피토프를 인식할 수 있다. 동물에서 다클론 항체 생성을 위한 올바른 조건이 주어지면, 동물의 혈청에서 대부분의 항체는 동물이 면역화된 항원성 화합물 상의 집단 에피토프를 인식할 것이다. 이 특이성은 관심 항원 또는 에피토프를 인식하는 항체만을 선택하기 위해 친화도 정제에 의해 추가로 향상된다.

[0100] 단클론 항체(MAb)를 생성하기 위한 방법은 일반적으로 다클론 항체를 제조하기 위한 방법과 동일한 선을 따라 시작한다. 일부 실시양태에서, 마우스 및 래트와 같은 설치류가 단클론 항체를 생성하는데 사용된다. 일부 실시양태에서, 토끼, 양, 또는 개구리 세포가 단클론 항체를 생성하는데 사용된다. 래트의 사용은 잘 알려져 있으며, 특정 이점을 제공할 수 있다. 마우스(예를 들어, BALB/c 마우스)는 일상적으로 사용되고, 일반적으로 높은 비율의 안정된 융합을 제공한다. 단클론 항체 생성에서 사용되는 바와 같은 하이브리도마 기술은 글리코실화된 ICP 항원과 고정화된 골수종 세포, 예를 들어 마우스 골수종 세포주를 이용하여 이전에 면역화된 마우스로부터 단리된 단일, 항체-생성 B 림프구의 융합을 포함한다. 이 기술은 무기한 세대 동안 단일 항체-생성 세포를 번식시켜, 동일한 항원 또는 에피토프 특이성을 갖는 비제한적 양의 구조적으로 동일한 항체, 즉 단클론 항체가 생성될 수 있는 방법을 제공한다. 면역화된 동물로부터 유래된 단클론 항체 집단을 발현하는 하이브리도마 또는 다른 세포의 집단은 본원에 기재된 바와 같은 항-글리코실화된 ICP 항체에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0101] 특별한 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 글리코실화된 ICP, 또는 이의 글리코실화된 펩티드 부분, 예를 들어 글리코실화된 PD-L1 또는 이의 펩티드는 투약 계획에 따른 주사 경로를 통해 수용체 동물, 예를 들어 마우스 또는 래트에게 투여된다. 전형적으로, 초기 면역화가 주어지고; 동물을 일정 기간, 예를 들어 비제한적으로, 7-15 일 동안 휴식시키며; 부스터(booster) 면역화가 예정된 기간, 예컨대 2-3 주, 또는 개월 동안 주어진다. 부스터 면역화 기간 동안, 동물은 당업계에서 전통적으로 사용되는 방법에 의해 혈장 또는 혈청에서의 항체 역가에 대해 시험될 수 있다. 이를 위해, 혈액 샘플이 수주의 면역화 후에 혈청 항체의 측정을 위해 동물로부터 얻어진다. *Clinical Chemistry of Laboratory Animals*, Eds. W.F. Loeb and F.W. Quimby, Taylor & Francis, 1999에 기재된 바와 같이, 마우스로부터 작은 부피의 혈액의 수집을 위해 몇몇 인도적인 기법이 개발되어 왔다. 혈청 항체 역가는 효소 연결 면역흡착 에세이(ELISA) 및 유세포분석과 같은 다양한 기법을 사용하여 결정된다. 항체 역가가 높을 경우, 세포 융합이 수행될 수 있다. 역가가 지나치게 낮을 경우, 마우스는 반복된 혈액 샘플링에 의해 결정된 바와 같이 충분한 반응이 달성될 때까지 부스트될 수 있다. 항체 역가가 충분히 높을 때, 마우스는 일반적으로, 예를 들어 융합 3 일 전, 그러나 사전 면역화 2 주 후에 아쥬반트(adjuvant) 없이 복강내로 또는 정맥내로(꼬리 정맥을 통해) 항원을 주사함으로써 부스트된다.

[0102] 항체 역가가 당업자에 의해 결정된 바와 같이 충분할 때, 마우스는 안락사되고, 이의 비장이 제거된다. 비장 세포는 단일 세포 현탁액 내로 분산되고, *시험관내* 세포 융합 및 하이브리도마 생성을 위해 적당한 조건 하에서 불멸화된 골수종 세포주(예를 들어, 비제한적으로, Sp/02)와 혼합된다. 제한된 수명을 갖는 항체-생성 비장 세포를 불멸화된 골수종 세포로부터 유래된 세포와 융합하는 것은 비제한적 성장이 가능한 하이브리도마를 야기한다. 골수종 세포는 세포 융합 이후 사용된 하이포크산틴-아미노프테린-티미딘(hypoxanthine-aminopterin-thymidine)(HAT) 선택 배지에 대한 이들의 민감도를 보장하기 위해 8-아자구아닌과 함께 배양되는 불멸화된 세

포이다. 세포 융합 약 1 주 전에, 골수종 세포는 8-아자구아닌에서 성장하며; 세포는 높은 생존도 및 신속한 성장을 가져야 한다. HAT 선택 배지는 융합된 세포만이 배양액에서 생존하게 한다. HAT 선택 기법에서, 선택 성장 배지는 뉴클레오티드가 제조되는 합성 경로를 차단하는 억제제 아미노프테린을 함유한다. 따라서, 세포는 핵산을 합성하기 위한 우회 경로를 사용해야 하며 - 이 경로는 정상 항체-생성 세포가 융합되는 골수종 세포주에서 결여되어 있다. 골수종 세포도 항체-생성 세포도 그 자체로 성장할 수 없기 때문에, 하이브리드 세포인 "하이브리도마"만이 배지에서 세포 분열을 겪고 지속되며 증식한다. (*Monoclonal Antibody Production*, 1999, Inst. For Laboratory Animal Research and National Research Council, National Academy Press).

[0103] 세포 융합은 폴리에틸렌 글리콜, 세포막 융합 포텐시에이터(potentiator) 중에서 신선하게 수집된 비장 세포 및 골수종 세포를 공동-원심분리함으로써 수행된다. 이어서, 세포는 마우스의 염류 복막 세척으로부터 유래될 수 있는 피더 세포(feeder cell)가 있거나 없이, 다중-웰 플레이트 내로 분산된다. 피더 세포는 하이브리도마 세포의 성장을 촉진하는 성장 인자를 지지하는 것으로 여겨지지만; 배양된 세포의 성장을 지지하고 성장 인자를 함유하는 배지의 수집물로부터 유래된 상업용 제제가 마우스-유래 피더 세포 대신에 사용될 수 있다. 뮤린 골수-유래 대식세포가 또한 피더 세포로서 사용될 수 있다. 다중-웰 플레이트로부터의 하이브리도마 세포의 소집단은 조직 배양액에서 성장한 다음에, 본원에 기재된 방법에 의한 항원 결합을 위해 선택될 수 있다. 하이브리도마는 또한 후기에 클로닝으로 마우스 복수에서 성장할 수 있다. 하이브리도마 세포의 제한 희석 '클로닝'은 다수의 웰 각각이 최대 단일 클론을 함유하도록 보장한다. 당업자는 증식 및 추가 성장이 가능한 하이브리도마를 선택할 수 있다. 하이브리도마는 적합한 결합 특이성을 갖는 단클론 항체의 생성을 위해 스크리닝된다.

[0104] 단클론 항체에 대한 스크리닝은 당업계에 알려진 다양한 절차를 통해, 예를 들어 항체가 박테리오파지의 표면 상에 제시되는 세균 시스템("파지 디스플레이" 절차)에서 달성될 수 있으며, 다른 스크리닝 기법이 또한 구상된다. 인간 항체는 인간 조합 항체 라이브러리로부터 확인 및 단리될 수 있다. 예를 들어, 박테리오파지 항체 발현 기술은 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 제6,946,546호에 기재된 바와 같이, 특정 항체가 동물 면역화의 부재 하에서 생성되게 한다. 이들 기법은 Marks et al., 1992, Bio/Technol., 10:779-783; Stemmer, 1994, Nature, 370:389-391; Gram et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:3576-3580; Barbas et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3809-3813; 및 Schier et al., 1996, Gene, 169(2):147-155에 추가로 기재되어 있다.

[0105] 예를 들어, 하이브리도마 라이브러리 기법은 글리코실화된 ICP 또는 이의 펩티드에 특이적으로 및 우선적으로 결합하는 단클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주가 선택되고 확인되는 데에 사용될 수 있다. 하이브리도마 라이브러리는 클로닝 전에 항체 결합 활성에 대해 조사될 수 있다. 이러한 과정은 실제 클론의 분석을 가능하게 하고 다중 라운드의 서브-클로닝(예를 들어, Antibody Solutions, Sunnyvale, CA)을 요구하지 않는 유세포분석에 의한 단일 세포의 클로닝을 포함한다. 표면 상에 특히 많은 항-글리코실화된 ICP 항체를 디스플레이하는 하이브리도마 세포 변이체를 선택하기 위해 FACS 분류가 반복적으로 사용될 수 있다. 하이브리도마 라이브러리는 매우 민감하고 특이적인 유도성 시스템을 가질 수 있으며, 이는 다수의 종에서의 *생체내* 친화도 성숙; 자가-항원 결합을 위한 음성 선택; 중쇄 및 경쇄의 천연 쌍 형성; 하이브리도마에 의한 직접 항체 분비; 발현을 위한 무클로닝; 및 항체의 포유동물 번역후 변형과 함께 사용될 수 있다. (Antibody Solutions, Sunnyvale, CA). 소망하는 항-글리코실화된 ICP 항체를 생성하는 하이브리도마가 본원에 기재된 방법을 사용하여 스크리닝되고 확인되면, 추가 사용을 위해 클론이 증식될 수 있으며, 항체가 단리될 수 있다.

[0106] 하이브리도마 기술 또는 항체 발현 세포의 다른 집단, 예컨대 파지 디스플레이 라이브러리에 의해 생성된 단클론 항체는 특정 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 선택 및 확인을 위해 알려진 프로토콜 및 기법을 사용하여 결합 특이성에 대해 선택될 수 있다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 다양한 직접, 간접 및 경쟁적 결합 에세이가 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항체에 대해 에세이하기 위해 사용될 수 있다. 예시적으로, 및 비제한적으로, 글리코실화된 ICP 항원은 고체 기재에 부착될 수 있으며, 적절한 검출 가능하게 표지된 리포터 분자, 예를 들어 표지된 2 차 항체가 고체 기재 상의 글리코실화된 ICP 항원에 결합된 항-glycICP 항체의 특이적 결합을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 또한, 항체가 세포 표면 상에 디스플레이되는 항체의 라이브러리, 예를 들어 파지 디스플레이 라이브러리가 스크리닝될 때, 상기 라이브러리는 글리코실화된 ICP 항원에 결합하는 항체에 대해 "패닝될(panned)" 수 있다. 항체가 선택되어야 하는 항원 또는 리간드는 검출 가능하거나 선택 가능한 표지로 표지될 수 있으며, 항체 발현 세포 집단이 검출 가능하거나 선택 가능한 표지와 접촉된 다음에, 표지된 항원에 결합하는 항체를 발현하는 세포가 선택된다. 예를 들어, 표지가 비오틴인 경우, 비오틴 표지된 항원에 결합되는 항체를 발현하는 세포는 고체 지지체, 비드 등에 있을 수 있는 스트렙타비딘에 대한 비오틴의 결합을 사용하여 단리될 수 있다.

[0107] 특별한 실시양태에서, 스크리닝될 항체 집단은 ICP의 비글리코실화된 형태에 비해 ICP의 글리코실화된 형태에 우선적으로 결합하는 항체에 대해 에세이될 수 있다. 예를 들어, 글리코실화된 ICP를 발현하거나 우선적으로 재조합적으로 발현하는 세포는 예를 들어, 비오틴으로 표지되고, ICP의 비글리코실화된 형태를 발현하지만, 표지되지 않거나 상이한 표지를 갖는 세포와 혼합된다. 예를 들어, 글리코실화 부위 또는 ICP 상의 부위는 돌연변이화되어(예를 들어, 글리코실화 콘센서스 부위에서 글루타민을 아스파라긴으로 치환함), ICP가 글루코실화될 수 있다. 세포 혼합물은 시험될 항체뿐 아니라, 표지된 세포(글리코실화된 형태를 발현하는 세포)에 결합하지만, 비표지된 세포에는 그렇지 않는 분자와 함께 항온처리된다. 예를 들어, 표지가 비오틴인 경우, 세포 혼합물은 시험될 항체 및 표지된 스트렙타비딘과 함께 항온처리된다. 이어서, 세포는 표지된 2 차 항체와 함께 항온처리되어, 세포에 결합된 임의의 항체를 검출한다. 글리코실화된 ICP를 발현하는 세포 및 비글리코실화된 ICP를 발현하는 세포에 대한 항체의 결합을 비교하기 위해 당업계에 알려진 임의의 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 글리코실화된 ICP를 발현하는 세포 및 비글리코실화된 ICP를 발현하는 세포는 분리될 수 있으며, 2 차 항체 결합 수준은 FACS/유세포분석에 의해 측정되어, 글리코실화된 ICP 및 비글리코실화된 ICP에 대한 항체의 상대적 결합을 평가할 수 있다. 예시적 방법이 실시예 2에 기재되어 있으며, 비글리코실화된 ICP와 비교하여 글리코실화된 ICP에 대해 2 배, 3 배, 4 배, 5 배, 6 배, 7 배, 8 배, 9 배 또는 10 배 큰 결합을 갖는 항체가 글리코실화된 ICP에 우선적으로 결합하는 것으로 선택될 수 있다.

[0108] 글리코실화된 ICP에 특이적으로 결합하는 항체가 첫번째로 확인된 경우, 상기 항체는 비글리코실화된 형태에 대한 결합을 비교하기 위해 당업계에 알려진 임의의 다른 방법에 의해 추가로 스크리닝되고 분석될 수 있다. 예를 들어, 항체는 항원 결합에 대해 ELISA, 방사면역에세이, BIACORE 등과 같은 임의의 결합 에세이에 있을 수 있다. 특별한 실시양태에서, 글리코실화된 ICP 및 비글리코실화된 ICP는 고체 표면(예를 들어, 에세이 플레이트의 웰) 상에 코팅된다. 비글리코실화된 ICP는 글리코실화를 제거하기 위한 효소, 예를 들어 N-연결된 글리코실화를 제거하는 PNGase를 이용한 글리코실화된 ICP의 처리에 의해, 또는 발현 세포에 의해 글리코실화되지 않도록 돌연변이 글리코실화 부위를 갖는 ICP를 재조합적으로 발현함으로써 생성될 수 있다. 이어서, 항체는 항체의 다양한 농도에서 글리코실화된 형태 및 비글리코실화된 형태에 대한 결합에 대해 에세이되어, 비글리코실화된 ICP와 비교하여 글리코실화된 ICP에 대한 결합 친화도에서의 차이를 검출한다.

[0109] 또한, 우선적 결합은 웨스턴 블롯 또는 FACS 유세포분석에 의해 시험될 수도 있다. 당업자에 의해 잘 알려진 바와 같이, 웨스턴 블롯은 항체에 의해 특이적으로 결합되는 에피토프를 함유하는 단백질을 분리하고 확인하기 위해 사용되는 실험실 연구 기법이다. 일반적으로, 상기 기법은 겔 전기영동을 통해 크기/분자량에 의해 단백질 항원을 분리하는(보통 세포 용해액에서) 단계를 포함한다. 겔 상에 분리된 단백질은 나일론, 폴리비닐리덴 플루오라이드(polyvinylidene fluoride)(PVDF), 또는 니트로셀룰로오스와 같은 고체 막 지지체로 이동되고, 검출 가능하게 표지된 항체는 항체에 의해 특이적으로 인식되는 에피토프를 함유하는 고체 지지체 상의 단백질에 항체가 결합할 수 있는 조건 하에서 항온처리된다. 이어서, 결합된 단백질은 시각화되고 정량화될 수 있다. 결합 검출을 위해, 1 차 항원-특이적 항체에 결합하는 표지된 2 차 항체를 사용하는 것 또한 가능하다. 비제한적 예로서, Mahmood and Yang, 2012, NAM J Med Sci, 4(9):429-434를 참고한다. 또한, 당업자에게 알려진 바와 같이, 유세포분석은 자동화된 유세포분석기 기구(flow cytometer instrument)(FC 또는 FCM)를 사용하여 수행되어, 세포가 레이저 빔을 통과하여 흐르는 시점에 단일 세포, 하나의 세포의 다수의 특징 및 특성을 신속하게 정량화한다. FC는 세포 크기, 세포 입도, 특정 표면 수용체 단백질의 양, 세포내 단백질의 양, 세포 성분의 양, 예컨대 총 DNA, 새롭게 합성된 DNA, 특정 유전자에 대한 메신저 RNA의 양으로서의 유전자 발현, 또는 생세포에서의 일시적 시그널링 사례를 측정할 수 있다. 양은 보통 상대적이지만, 절대값이 필요할 때, 세포 당 분자의 수일 수 있다. 전형적으로, 단일 샘플에서, 셀 바이 셀(cell by cell)로, 1 분 미만에 약 $1x10^4$-$1x10^5$ 세포에 대해 3 내지 6 개의 특성 또는 성분이 정량화될 수 있다. (Brown, M. and Wittwer, C., 2000, Clin. Chem., 46(8):1221-1229; and Martz, E., 2003, Microbiology 542, U. Massachusetts, Amherst, MA).

[0110] 또한, 항체는 항체가 지향되는 글리코실화된 표적 리간드, 예를 들어, 글리코실화된 PD-L1과 이의 동족 (ICP) 결합 분자, 예를 들어 PD-1 사이의 상호작용을 특이적으로 차단하는 능력에 대해 에세이될 수 있다. 예를 들어, 글리코실화된 ICP는 세포의 표면 상에 발현되거나 고체 지지체 상에 부착된 다음에, 시험될 항체 및 검출 가능한 표지를 갖는 동족 ICP 결합 파트너와 함께 항온처리될 수 있다. 이어서, ICP에 대한 표지된 ICP 결합 파트너의 결합 수준이 시험될 항체의 부재 하에 대조군과 비교하여 정량화될 수 있다. ICP 결합 파트너의 결합의 감소는 항체가 ICP와 ICP 결합 파트너의 상호작용을 억제하거나 차단할 수 있다는 것을 나타낸다. ICP 결합 분자의 결합의 부재는 항체가 ICP 결합 파트너에 대한 ICP의 결합을 차단하였다는 것을 나타낸다. 예시적 방법이 실시예 2 및 5에 기재되어 있다.

[0111] **ICP 억제제로서 사용하기에 적합한 항체의 형태**

[0112] 글리코실화된 ICP에 우선적으로 및 특이적으로 결합하는 항체가 확인되고 단리되면, 이들은 예를 들어, 치료제로서 이들을 더욱 적절하게 제조하기 위해 추가로 조작될 수 있다. 비인간 단클론 항체의 경우에, 항체는 "키메라" 또는 "인간화"로 제조되어야 한다. 외래 항체의 가변 영역은 온전하게 남겨두면서, 단클론 항체의 경쇄 및 중쇄 불변 도메인을 인간 기원의 유사 도메인으로 치환하기 위한 방법이 개발되어 왔다. 설치류 및 인간 아미노산 서열 둘 다를 갖는 항체 가변 도메인을 재조합적으로 구축함으로써 단클론 항체의 가변 도메인을 더욱 인간 형태로 전환하기 위한 방법이 또한 개발되어 왔다. "인간화" 단클론 항체에서는, 초가변 CDR만이 비인간(예를 들어, 마우스, 래트, 닭, 라마 등) 단클론 항체로부터 유래되며, 프레임워크 영역은 인간 항체 아미노산 서열로부터 유래된다. 설치류의 특징인 항체에서의 아미노산 서열을 인간 항체의 상응하는 위치에서 발견되는 아미노산 서열로 치환하는 것은 인간에서의 치료적 사용 동안 외래 단백질에 대한 부정적 면역 반응의 가능성을 감소시킨다. 하이브리도마 또는 항체를 생성하는 다른 세포는 또한 하이브리도마에 의해 생성된 항체의 결합 특이성을 변화시키거나 변화시키지 않을 수 있는 유전적 돌연변이 또는 다른 변경을 위한 대상체일 수 있다.

[0113] 조작된 항체는 단클론 항체 및 다른 항체 및 원래 항체의 항원 또는 에피토프 결합 특이성을 보유하는 다른 항체 또는 키메라 분자(즉, 분자는 특이적 결합 도메인을 가짐)를 생성하기 위한 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 상기 기법은 항체의 면역글로불린 가변 영역 또는 CDR을 코딩하는 DNA를 상이한 항체의 프레임워크 영역, 불변 영역, 또는 불변 영역 및 프레임워크 영역에 대한 유전자 물질 내로 도입하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 제5,091,513호 및 제6,881,557호를 참고한다.

[0114] 본원에 기재된 바와 같이 알려진 수단에 의해, 글리코실화된 ICP, 이의 각각의 에피토프 중 1 이상, 또는 상술한 것 중 임의의 것의 콘쥬게이트에 특이적으로 결합하는, 결합 활성, 결합 도메인 및 CDR을 갖는 다클론 또는 단클론 항체, 항체 단편(상술한 것 중 임의의 것의 조작된 형태를 포함함)이 생성될 수 있으며, 상기 항원 또는 에피토프는 천연 공급원으로부터 단리되거나 천연 화합물의 합성 유도체 또는 변이체이다.

[0115] 특정 동물 종은 치료 항체를 생성하기에 덜 바람직할 수 있으며, 이는 이들이 항체의 "Fc" 부분을 통한 보체계의 활성화로 인해 면역 또는 알레르기 반응을 더욱 야기할 수 있기 때문이다. 그러나, 전체 항체는 "Fc"(보체 결합) 항체, 및 결합 도메인 또는 CDR을 갖는 펩티드 단편으로 효소로 분해될 수 있다. Fc 부분의 제거는 이 항체 단편이 소망하지 않는 면역학적 반응을 유도할 가능성을 감소시키므로, Fc 부분이 없는 항체는 예방적 또는 치료적 치료를 위해 바람직할 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, 항체는 또한 키메라, 인간화, 또는 부분적 또는 완전 인간이 되도록 구축되어, 다른 종에서 생성되거나 다른 종으로부터의 아미노산 서열을 갖는 항체를 동물에게 투여하는 것으로부터 야기되는 잠재적인 부정적 면역학적 효과를 감소시키거나 제거할 수 있다.

[0116] 치환 변이체는 전형적으로 단백질 내의 1 이상의 부위에서 하나의 아미노산의 다른 것으로의 치환을 함유하며, 다른 기능 또는 특성의 손실이 있거나 없이 폴리펩티드의 1 이상의 특성을 조절하도록 설계될 수 있다. 치환은 보존적일 수 있으며, 즉 하나의 아미노산은 유사한 형태 및 전하의 아미노산으로 치환된다. 보존적 치환은 상기 표 1에 기재된 바와 같다. 대안적으로, 치환은 폴리펩티드의 기능 또는 활성이 영향을 받도록 비-보존적일 수 있다. 비-보존적 치환은 전형적으로 잔기를 화학적으로 상이한 잔기로 치환하는 것, 예컨대 극성 또는 하전된 아미노산을 비극성 또는 비하전된 아미노산으로 치환하는 것, 및 그 반대를 포함한다.

[0117] 항체 단백질은 재조합체이거나, *시험관내* 합성될 수 있다. 대안적으로, 비-재조합 또는 재조합 항체 단백질은 세균으로부터 단리될 수 있다. 또한, 항체 단백질 변이체를 함유하는 세균이 본원의 조성물 및 방법에서 수행되어, 개선된 결합 또는 다른 파라미터를 갖는 항체를 단리시킬 수 있다는 것이 고려된다. 본원에 기재된 조성물에서는, mL 당 약 0.001 mg 내지 약 10 mg의 총 항체 폴리펩티드가 있는 것으로 고려된다. 따라서, 조성물 중 항체 단백질의 농도는 약, 적어도 약 또는 최대 약 또는 0.001, 0.010, 0.050, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 mg/mL 이상(또는 이의 유도 가능한 임의의 범위)일 수 있다. 이 중, 약, 적어도 약, 최대 약, 또는 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, 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 100%가 글리코실화된 ICP에 결합하는 항체일 수 있다.

[0118] ICP에 대한 결합 활성을 보유하는 항체 또는 항체의 면역학적 부분은 다른 단백질을 갖는 융합 단백질에 화학적으로 콘쥬게이트되거나, 다른 단백질을 갖는 융합 단백질로서 재조합적으로 발현될 수 있다. 모든 상기 융합 단

백질은 항체 또는 항체의 면역학적 부분의 정의에 포함된다. 일부 실시양태에서, 항체 콘쥬게이트 또는 페이로드(payload)를 형성하기 위해 적어도 하나의 약제에 연결되는 글리코실화된 면역 체크포인트 폴리펩티드 또는 이의 펩티드에 대해 생성되는 항체 및 항체-유사 분자가 포함된다. 진단제 또는 치료제로서 항체 분자의 효능을 증가시키기 위해, 적어도 하나의 소망하는 분자 또는 모이어티를 항체에 연결시키거나 공유 결합시키거나 복합체화시키는 것이 전통적이다. 상기 연결된 분자 또는 모이어티는, 비제한적으로, 적어도 하나의 이펙터 또는 리포터 분자일 수 있다. 이펙터 분자는 소망하는 활성, 예를 들어 세포독성 활성을 갖는 분자를 포함한다. 항체에 부착될 수 있는 이펙터 분자의 비제한적인 예는 독소, 치료 효소, 항생제, 방사성-표지된 뉴클레오티드 등을 포함한다. 반대로, 리포터 분자는 에세이를 사용하여 검출될 수 있는 임의의 모이어티로서 정의된다. 항체에 콘쥬게이트될 수 있는 리포터 분자의 비제한적인 예는 효소, 방사성표지, 합텐, 형광 표지, 인광성 분자, 화학발광성 분자, 발색단, 발광성 분자, 광친화성 분자, 유색 입자 또는 리간드, 예컨대 비오틴 등을 포함한다. 항체를 콘쥬게이트 분자 또는 모이어티에 부착하거나 콘쥬게이트시키기 위한 몇몇 방법이 당업계에 알려져 있다. 일부 부착 방법은 금속 킬레이트 복합체의 사용을 포함하며, 비제한적 예로서, 유기 킬레이트제, 예컨대 디에틸렌트리아민펜타아세트산 무수물(diethylenetriaminepentaacetic acid anhydride)(DTPA); 에틸렌트리아민테트라아세트산; N-클로로-p-톨루엔술폰아마이드; 및/또는 항체에 부착된 테트라클로로-3-6α-디페닐글리코우릴-3을 사용한다. 항체는 또한 글루타르알데하이드 또는 퍼아이오데이트(periodate)와 같은 커플링제의 존재 하에 효소와 반응할 수 있다. 형광 마커와의 콘쥬게이트는 전통적으로 이들 커플링제의 존재 하에서 또는 이소티오시아네이트와의 반응에 의해 제조된다. 다른 실시양태에서, 항-글리코실화된 ICP 항체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 화합물 또는 물질에 결합되거나 연결되어, 투여 후 혈장, 혈청, 또는 혈액에서 이의 *생체내* 반감기를 증가시킬 수 있다.

[0119] 실시양태에서, 항체는 키메라 항체, 예를 들어 이종 비인간, 인간 또는 인간화 서열(예를 들어, 프레임워크 및/또는 불변 도메인 서열)에 이식된 비인간 도너로부터의 항원 결합 서열(예를 들어, V 도메인 및/또는 CDR)을 포함하는 항체이다. 일 실시양태에서, 비인간 도너 서열은 마우스 또는 래트로부터의 것이다. 일 실시양태에서, 항원 결합 서열은 예를 들어, 돌연변이유발(예를 들어, 인간 파지 라이브러리 등의 파지 디스플레이 스크리닝)에 의해 얻어진 합성이다. 일 실시양태에서, 키메라 항체는 뮤린 V 영역 및 인간 C 영역을 갖는다. 일 실시양태에서, 뮤린 경쇄 V 영역은 인간 카파 경쇄 C 영역에 융합된다. 일 실시양태에서, 뮤린 중쇄 V 영역은 인간 IgG1 C 영역에 융합된다.

[0120] 실시양태에서, 항체는 낙타과 항체로부터, 바람직하게는 $V_HH$ 도메인 서열 또는 Nanobody™로 알려진 경쇄가 없는 중쇄 낙타과 항체로부터 유래된 면역글로불린 단일 가변 도메인이다. Nanobody™(Nb)는 천연적으로 발생하는 단일쇄 항체의 최소 기능적 단편 또는 단일 가변 도메인($V_HH$)이며, 당업자에게 알려져 있다. 이들은 낙타과에서 나타나는 중쇄 유일 항체로부터 유래된다(Hamers-Casterman et al., 1993, *Nature*, 363:446-448; 및 Desmyter et al., 1996, *Nat. Struct. Biol.*, pp. 803-811). "낙타과"의 패밀리에서, 경쇄 폴리펩티드가 없는 면역글로불린이 발견된다. "낙타과"는 구세계 낙타과(*카멜루스 박트리아누스*(*Camelus bactrianus*) 및 *카멜루스 드로메다리우스*(*Camelus dromedarius*)) 및 신세계 낙타과(예를 들어, *라마 파코스*(*Lama paccos*), *라마 글라마*(*Lama glama*), *라마 가우니코에*(*Lama guanicoe*) 및 *라마 비쿠그나*(*Lama vicugna*))를 포함한다. 단일 가변 도메인 중쇄 항체는 본원에서 Nanobody™ 또는 $V_HH$ 항체로서 표시된다. Nb의 작은 크기 및 고유한 생물물리학적 특성은 드물거나 숨겨진 에피토프의 인식 및 단백질 표적의 구멍 또는 활성 부위로의 결합에 대해 종래의 항체 단편보다 뛰어나다. 또한, Nb는 리포터 분자에 부착되거나 인간화된 다중-특이적 및 다가 항체로서 설계될 수 있다. Nb는 안정적이고, 위장계에 생존하며 용이하게 제조될 수 있다.

[0121] 다른 실시양태에서, 항체는 이중특이적 항체이다. 상이한 특이성의 2 개의 항원 결합 부위를 단일 구축물로 결합함으로써, 이중특이적 항체는 예민한 특이성을 갖는 2 개의 신중한 항원을 결합시키는 능력을 가지므로, 치료제로서 큰 가능성을 갖는다. 이중특이적 항체는 본래 각각 상이한 면역글로불린을 생성할 수 있는 2 개의 하이브리도마를 융합함으로써 제조되었다. 이중특이적 항체는 또한 2 개의 scFv 항체 단편을 결합시키는 한편, 완전 면역글로불린에 존재하는 Fc 부분을 생략함으로써 생성된다. 상기 구축물에서 각각의 scFv 단위는 합성 폴리펩티드 링커를 통해 서로 결합된 중($V_H$) 및 경($V_L$) 항체 사슬 각각으로부터의 하나의 가변 도메인을 함유할 수 있으며, 후자는 보통 유전적으로 조작되어 최소로 면역원성인 반면에, 단백분해에 대해 최대로 저항성인 채로 유지된다. 각각의 scFv 단위는 2 개의 scFv 단위를 가교하여 이중특이적 단일쇄 항체를 생성하는 짧은(보통 10 아미노산 미만) 폴리펩티드 스페이서의 결합을 포함하여, 다수의 알려진 기법에 의해 결합될 수 있다. 따라서, 얻

어진 이중특이적 단일쇄 항체는 단일 폴리펩티드 사슬 상에 상이한 특이성의 2 개의 $V_H/V_L$ 쌍을 함유하는 종이며, 각각의 scFv 단위에서 상기 $V_H$ 및 $V_L$ 도메인은 이들 2 개의 도메인 사이의 분자내 연합을 허용하여, 그렇게 형성된 scFv 단위가 예를 들어, 하나의 scFv 단위의 $V_H$ 도메인과 다른 scFv 단위의 $V_L$ 사이의 소망하지 않는 연합을 예방하도록 충분히 짧게 유지되는 폴리펩티드 스페이서를 통해 서로 연속하여 묶이기에 충분한 길이의 폴리펩티드에 의해 분리된다.

[0122] 다른 실시양태에서, 항체는 비파라토프 항체이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "비파라토프 항체"는 동일한 단백질 표적, 예를 들어 종양 관련 ICP 표적 항원, 또는 본원에 기재된 바와 같은 글리코실화된 ICP 표적 항원 상의 2 개의 상이한 비중첩 에피토프, 항원성 결정인자, 또는 도메인을 인식하고 이에 결합하는 2 개의 항원 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 결합 분자를 지칭한다. 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 glycICP 또는 이의 1 이상의 펩티드 부분에 대해 지향된 비파라토프 항체는 제1 면역글로불린 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 가변 도메인을 포함하되, 2 개의 결합 도메인은 동일한 표적 glycICP 단백질의 2 개의 상이한 비중첩 에피토프에 결합한다. 제1 및 제2 면역글로불린 결합 도메인에 의해 인식된 에피토프 중 하나 또는 둘 다는 글리코실화되거나 글리코실화된 잔기를 함유할 수 있다. 바람직하게는, 적어도 하나의 면역글로불린은 비글리코실화된 형태에 비해 glycICP 단백질의 글리코실화된 형태에 우선적으로 결합한다.

[0123] 다른 실시양태에서, 비파라토프 항체는 glycICP 표적 분자 상의 에피토프에 결합하는 면역글로불린(바람직하게는, 3가 IgG) 및 동일한 glycICP 표적 분자 상의 상이한 비중첩 에피토프에 결합하는 scFv를 포함하며, 상기 면역글로불린 및 scFv는 링커에 의해 연결되어, glycICP 표적 분자 상의 상이한 비중첩 에피토프에 대한 면역글로불린 및 scFv의 결합을 허용한다. 따라서, 비파라토프 항체는 동일한 glycICP 표적 상의 상이한 에피토프(또는 도메인)에 결합하는(즉, 비파라토프 결합) 본원에 기재된 방법에 의해 확인된 2 개의 항-glycICP 항체로부터 생성되어, 결합 친화도/결합활성을 향상시키고/시키거나; 항체 의존성 세포 세포독성(ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC)과 같은 향상된 이펙터 기능을 위해 종양 세포 상의 항체 로드를 증가시키고/시키거나; 종양 체류 시간을 개선 또는 증가시킨다. 또한, 종양 관련 glycICP 항원 상의 2 개의 비중첩 에피토프를 표적화하는 2가 비파라토프 항체는 세포막에서 glycICP 표적 분자의 클러스터링(clustering)을 유도하여, 결국 내부화, 리소좀 수송 및 분해 증가를 촉진할 수 있는 가능성을 갖는다. 표적 단백질/항원 상의 2 개의 상이한 비중첩 에피토프에 대해 지향된 비파라토프 항체는 당업계에 알려진 기법을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, B. Roberts et al., 1999, *Int. J. Cancer*, Vol. 81:285-291 (carcinoembryonic antigen, CEA); D. Lu et al., 1999, *J. Immunol. Methods*, Vol. 230:159-71 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGF2); 2009년 6월 4일 공개된 WO 2009/068627, Ablynx NV; 2010년 12월 16일 공개된 WO 2010/142534, 및 Ablynx NV를 참고한다.

[0124] 실시양태에서, 2가 비파라토프 항체는 소정의 glycICP 표적 단백질 상의 상이한 비중첩 에피토프를 인식하고 이에 결합하는 것으로 본원에 기재된 바와 같이 확인된 2 개의 상이한 항-glycICP 항체로부터의 가변 도메인 서열을 사용함으로써 생성될 수 있으며, 상기 항체는 glycICP 상의 상이한 비중첩 에피토프를 인식하는 제2 항-ICP 항체의 H 사슬 및/또는 L 사슬의 N-말단, 또는 대안적으로, $C_H3$ 도메인의 C-말단에 부착된 항-glycICP 항체 중 하나의 단일쇄 가변 단편(scFv)을 함유한다. scFv는 예를 들어, scFv에서 결합 도메인을 연결하기 위해 사용되는 링커와 같은 펩티드 링커를 통해 제2 항-ICP 항체에 연결될 수 있다. 예를 들어, Dimasi et al., *J. Mol. Biol.*, 393:672-692 (2009)를 참고한다. 얻어진 결합 분자 생성물, 또는 비파라토프 항체는 glycICP 상의 2 개의 상이한 에피토프와 상호작용하고 이에 결합할 수 있는, 4 개의 항-glycICP 결합 단위, 또는 분자의 각각의 암(arm) 상의 2 개의 결합 단위를 함유한다. 이 실시양태에 따라, 종양 세포의 표면 상에 발현된 glycICP 상의 2 개의 비중첩 에피토프를 표적화하는 2가 비파라토프 항체는 에피토프 결합을 통해 glycICP를 효과적으로 교차결합하여, 세포 표면 상의 glycICP의 클러스터링을 유도해, 향상된 내부화 및 리소좀 분해를 유도하고 촉진하는 큰 복합체의 형성을 야기할 수 있었다. 실시양태에서, 비파라토프 항체는 독소 또는 항암 약물에 연결되어, 본원에 추가로 기재된 바와 같은 항체-약물 콘쥬게이트(ADC)를 생성한다. 상기 항-ICP 비파라토프 항체의 향상된 내부화 및 내포작용 및 리소좀 수송은 궁극적으로 표적 세포 내로의 많은 양의 독소의 전달 및 큰 종양 세포 사멸 또는 퇴축을 야기한다. 상기 효과는 비파라토프 항-HER2 ADC에 대해 기재된 바와 같이 *시험관내* 및 *생체내* 둘 다에서 관찰되었다(J.Y. Li et al., 2016, *Cancer Cell*, Vol. 29:117-129). 예시적으로, 본원에 기재된 바와 같은 다음 글리코실화된 ICP: PD-L1, PD-L2, PD-1, TIM-3, LAG-3, BTLA, CEACAM1, BTN1A1, BTNL2, SEMA4D, CD47, CD96, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, VISTA, 또는 KIR 등 중 하나의 2 개의 비중첩 에피토프에 특이적으로 결합하여, 이의 동족 결합 파트너와의 상호작용을 예방하거나 차단하고, 이의 내부화 및 분해뿐 아니라, 항-glycICP ADC가 사용되는 경우, 종양 세포의 사멸을 촉진하는 비파라토프 항-glycICP 항체 또는 항-glycICP ADC가 생성될

수 있다.

[0125] 다른 실시양태에서, 본 발명에 의해 포함되는 항-glycICP 결합 분자 또는 항체는 멀티파라토프일 수 있으며 즉, 동일한 glycICP 표적 분자 상의 3 개, 4 개, 또는 그 이상의 상이한, 바람직하게는 비중첩 에피토프 또는 항원성 결정인자를 인식하고 이에 결합하는 항원 결합 도메인을 함유한다. 또 다른 양태에서, 항-glycICP 항체는 비파라토프 또는 멀티파라토프 및 다가 둘 다이며, 즉 상이한 표적 glycICP 분자 상의 1 이상의 상이한 에피토프 또는 항원성 결정인자를 인식하고 이에 결합하는 항원 결합 부위 또는 "파라토프(paratope)"를 또한 포함한다.

[0126] 항체 단편의 예는, 비제한적으로, (i) $V_L$, $V_H$, $C_L$, 및 $C_{H1}$ 도메인으로 구성된 Fab 단편; (ii) $V_H$ 및 $C_{H1}$ 도메인으로 구성된 "Fd" 단편; (iii) 단일 항체의 $V_L$ 및 $V_H$ 도메인으로 구성된 "Fv" 단편; (iv) $V_H$ 도메인으로 구성된 "dAb" 단편; (v) 단리된 CDR 영역; (vi) 2 개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')2 단편; (vii) $V_H$ 도메인과 $V_L$ 도메인이 2 개의 도메인이 연합하여 결합 도메인을 형성하게 하는 펩티드 링커에 의해 연결된 단일쇄 Fv 분자("scFv"); (viii) 이중특이적 단일쇄 Fv 이량체(미국 특허 제5,091,513호 참고); 및 (ix) 유전자 융합에 의해 구축되는 디아바디, 다가, 또는 다중특이적 단편(미국 특허 출원 제20050214860호)을 포함한다. Fv, scFv, 또는 디아바디 분자는 $V_H$ 및 $V_L$ 도메인을 연결하는 이황화물 다리의 결합에 의해 안정화될 수 있다. $C_{H3}$ 도메인에 결합된 scFv를 포함하는 미니바디(Hu et al., 1996, *Cancer Res.*, 56:3055-3061)가 또한 유용할 수 있다. 또한, 항체-유사 결합 펩티도미메틱(peptidomimetic)이 또한 실시양태에서 고려된다. 감소된(pared-down) 항체로서 작용하고 긴 혈청 반감기뿐 아니라, 덜 번거로운 합성 방법의 특정 이점을 갖는 펩티드인 "항체 유사 결합 펩티도미메틱"(ABiP)이 Liu et al.,, 2003, *Cell Mol. Biol.*, 49:209-216)에 의해 보고되어 왔다.

[0127] **항-글리코실화된 PD-L1 항체(항-glycPD-L1 항체)**

[0128] 특별한 실시양태에서, 비글리코실화된 PD-L1에 비해 글리코실화된 ICP 단백질, PD-L1(예를 들어, PD-L1의 특정 N-글리칸 구조; 특정 글리코펩티드를 갖는 PD-L1 단백질) 또는 글리코실화된 PD-L1 펩티드에 특이적으로 결합하고 글리코실화된 PD-L1/PD-1 상호작용의 면역 억제 기능을 억제하는 항체(항-glycPD-L1 항체)를 단리시키고 확인하는 방법이 제공된다. 상기 항-glycPD-L1 항체는 질환, 특히 암의 치료에 유용하다. 항-glycPD-L1 항체는 IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE Ig 클래스뿐 아니라, 항원 결합 활성을 보유하는 항체 CDR 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 것일 수 있다. 예시적으로, 항-glycPD-L1 항체는 키메라, 친화도 성숙, 인간화, 또는 인간 항체일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항-glycPD-L1 항체는 단클론 항체이다. 다른 바람직한 실시양태에서, 단클론 항-glycPD-L1 항체는 인간화 또는 인간 항체이다. 본원에 기재된 바와 같은 알려진 수단에 의해, 다클론 또는 단클론 항체, 항체 단편, 결합 도메인 및 CDR(상술한 것 중 임의의 것의 조작된 형태를 포함함)은 글리코실화된 PD-L1 항원, 이의 각각의 에피토프 중 1 이상, 또는 상술한 것 중 임의의 것의 콘쥬게이트에 대해 특이적이도록 생성될 수 있으며, 상기 항원 또는 에피토프는 천연 공급원으로부터 단리되거나 합성 유도체이거나 천연 화합물의 변이체이다. 항체는 이중특이적이거나 비파라토프일 수 있다.

[0129] **상기 방법에 의해 얻어진 특이적 항-glycICP 항체에 의한 질환의 치료**

[0130] 특정 양태에서, 기재된 방법에 의해 얻어진 항체, 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, PD-L1과 같이 글리코실화된 ICP에 특이적으로 결합하는 항체)이 치료 방법에 사용될 수 있으며, 암을 치료하기 위해 투여될 수 있다. 따라서, 본원은 암을 치료하기 위해 적어도 하나의 항-글리코실화된 ICP 항체, 또는 이의 결합 단편, 예를 들어 항-glycPD-L1 항체의 치료적 유효량을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여함으로써 암을 치료하는 방법을 제공한다. 본원에 기재된 바와 같이, 치료 또는 치료적 치료는 암 세포의 성장, 증식, 전이 등을 감소, 예방, 억제, 또는 차단하는 것을 포함한다. 방법은 대상체, 특히, 예를 들어 T 세포, 특히 킬러 또는 세포독성 T 세포와 같은 면역 이펙터 세포의 세포 표면 상에 발현된 ICP 동족 리간드와 결합/상호작용 할 수 있는 ICP 세포 표면 단백질을 발현하는 대상체의 종양 세포에 관하여 치료 중인 인간 환자에게 이점을 제공한다. 항-글리코실화된 ICP 항체 중 적어도 하나의 유효량을 이용한 이들 대상체의 치료는 종양 세포 상의 글리코실화된 ICP에 대한 항체(들)의 결합을 야기하고 ICP-발현 종양 세포와 동족 ICP 리간드를 발현하는 T 세포의 상호작용을 예방, 차단, 또는 억제하여, T 세포 활성의 면역억제를 예방하거나 회피하고, T 세포가 PD-L1과 같이 ICP를 발현하는 종양 세포를 사멸시키도록 활성화되게 야기할 것으로 예상된다. 따라서, 기재된 방법에 의해 생성되고 얻어진 항-글리코실화된 ICP 항체를 사용하는 방법은 본 방법의 실시에 의해 달성되는 항암 결과가 필요하거나, 이로부터 이득을 얻을 수 있거나, 이의 이득을 얻기를 소망하는 대상체에게 유리하다. 적어도 하나의 항-글리코실화된 ICP 항체, 또는 이의 결합 단편, 예를 들어 항-glycPD-L1 항체 또는 이의 결합 단편의 치료적 유효량의 투여를 포함하는 방법의 치료적 이득 및 상기 치료 이득을 받는 것에 대한 대상체의 추구는 당업계에 이점을 제공한다. 또

한, 본 방법은 부작용, 부정적 결과, 금기 등을 제거하거나 회피하거나, 다른 치료 및 치료 방법과 비교하여 발생할 상기 사례에 대한 위험 또는 가능성을 감소시키는 추가 이점을 제공한다.

[0131] 본 치료 방법이 유용한 암은 임의의 악성 세포 유형, 예컨대 고형 종양 또는 혈액학적 종양, 특히 이들의 표면상에 글리코실화된 PD-L1과 같은 글리코실화된 ICP를 발현하는 세포를 갖는 종양에서 발견되는 것과 같은 악성 세포 유형을 포함한다. 일반적으로, 종양은 악성 또는 잠재적 악성 신생물 또는 임의의 크기의 조직 덩어리를 지칭하며, 원발성 종양 및 2 차 종양을 포함한다. 고형 종양은 보통 낭포 또는 액체를 함유하지 않는 비정상적 조직 덩어리 또는 성장이다. 예시적 고형 종양은, 비제한적으로, 췌장, 쓸개, 결장, 맹장, 위, 뇌, 머리, 목, 난소, 고환, 신장, 후두, 육종, 폐, 방광, 흑색종, 전립선, 및 유방으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 장기의 종양을 포함할 수 있다. 예시적 혈액학적 종양은 골수의 종양, 악성 T 또는 B 세포, 백혈병, 림프종, 아세포종, 골수종 등을 포함한다. 본원에 제공된 방법을 사용하여 치료될 수 있는 암의 추가적 예는, 비제한적으로, 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 백혈병, 편평세포암종, 폐암(소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암, 및 폐의 편평상피암을 포함함), 복막의 암, 간세포암, 위 또는 위선암(위장암 및 위장관기질암을 포함함), 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 다양한 유형의 두경부암, 흑색종, 표재 확산 흑색종, 흑색점 악성 흑색종, 말단 흑색점 흑색종, 결절성 흑색종뿐 아니라, B-세포 림프종(저급/난포 비-호지킨 림프종(NHL); 소형 림프구성(SL) NHL; 중급/난포 NHL; 중급 미만성 NHL; 고급 면역모세포 NHL; 고급 림프모구 NHL; 고급 소형 비-절개 세포 NHL; 대량 질환 NHL; 외투 세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증을 포함함), 만성 림프성 백혈병(CLL), 급성 림프모구 백혈병(ALL), 모양 세포 백혈병, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병(AML) 및 만성 골수모구 백혈병을을 포함한다.

[0132] 상기 암은 구체적으로 다음 조직학적 유형의 것일 수 있으나, 이들로 제한될 필요는 없다: 악성 신생물; 암종; 미분화된 암종; 거대 및 방추형 세포 암종; 소세포 암종; 유두상암; 편평세포 암종; 림프상피 암종; 기저세포암; 섬모기질암; 이행상피암; 유두상 이행상피암; 선암; 악성 가스트린종; 담관암; 간세포 암종; 조합된 간세포 암종 및 담관암; 섬유주 선암; 샘낭 암종; 샘종성 폴립에서의 선암; 가족성 대장 폴립증 선암; 고형 암종; 악성 유암종; 세기관지-폐포 선암; 유두상 선암종; 색소혐성 암종; 호산성 암종; 호산성 선암; 호염기성 암종; 투명세포 선암종; 과립세포 암종; 여포 선암종; 유두상 및 여포 선암종; 비피막 경화성 암종; 부신피질 암종; 자궁내막 암종; 피부부속물 암종; 아포크린 선암종; 피지선암; 귀지선암; 점액표피양 암종; 낭선암종; 유두상 낭선암종; 유두상 장액성 낭선암종; 점액성 낭선암종; 점액성 선암; 반지 세포 암종; 침윤성 관 암종; 수질암종; 소엽암; 염증성 암종; 유방 파제트병(paget's disease); 선방세포 암종; 선편평세포 암종; 선암 w/편평상피화생; 악성 흉선종; 악성 난소 기질 종양; 악성 난포막종; 악성 과립막 세포종; 악성 남성모세포종; 세르톨리세포 암종; 악성 간질세포종; 악성 지질세포종; 악성 부신경절종; 악성 유방외 부신경절종; 갈색세포종; 글로만지오사르코마(glomangiosarcoma); 악성 흑색종; 멜라닌결핍 흑색종; 표재 확산 흑색종; 거대색소 모반에서의 악성 흑색종; 유상피세포 흑색종; 악성 청색모반; 육종; 섬유육종; 악성 섬유조직구종; 점액육종; 지방육종; 평활근육종; 횡문근육종; 배아형 횡문근육종; 포상 횡문근육종; 기질육종; 악성 혼합 종양; 뮐로(mullerian) 혼합 종양; 신아세포종; 간모세포종; 암육종; 악성 간엽종; 악성 브레너 종양(brenner tumor); 악성 엽상종; 활막육종; 악성 중피종; 미분화배세포종; 태생기암; 악성 기형종; 악성 난소갑상선종; 융모막암종; 악성 중신종; 혈관육종; 악성 혈관내피종; 카포시 육종(kaposi's sarcoma); 악성 혈관주위세포종; 림프관육종; 골육종; 골막 골육종; 연골육종; 악성 연골모세포종; 간엽 연골육종; 뼈의 거대 세포 종양; 유잉 육종(ewing's sarcoma); 악성 치성 종양; 사기질모세포 치육종(ameloblastic odontosarcoma); 악성 법랑모세포종; 사기질모세포 섬유육종; 악성 송과체종; 척삭종; 악성 신경교종; 상의세포종; 성상세포종; 원형질 성상세포종; 원섬유성 성상세포종; 성상아세포종; 교모세포종; 핍지교종; 핍지모세포종; 원시신경외배엽; 소뇌 육종; 신경절아세포종; 신경모세포종; 망막모세포종; 후각 신경성 종양; 악성 뇌수막종; 신경섬유육종; 악성 신경초종; 악성 과립 세포 종양; 악성 림프종; 호지킨병; 파라육아종; 소형 림프구성 악성 림프종; 광범위 큰 세포 악성 림프종; 난포 악성 림프종; 균상식육종; 다른 명시된 비-호지킨 림프종; 악성 조직구증; 다발성 골수종; 비만세포 육종; 면역증식 소장 질환; 백혈병; 림프성 백혈병; 형질세포성 백혈병; 적백혈병; 림프육종 세포 백혈병; 골수성 백혈병; 호염기성 백혈병; 호산구성 백혈병; 단구성 백혈병; 비만세포성 백혈병; 거핵아구 백혈병(megakaryoblastic leukemia); 골수성 육종; 및 모양 세포 백혈병.

[0133] 상기 기재된 방법에 의해 얻어진 항-glycICP 항체로 치료될 암은 바람직하게는 종양 또는 암 세포 상에 발현된 ICP, 예를 들어 PD-L1, 특히 글리코실화된 PD-L1에 대해 양성이다. 구체적으로, 치료될 암은 항-glycICP 항체가 결합하는 ICP에 대해 양성이다. 특정 실시양태에서, 종양 세포는 또한 예를 들어, 유방암 세포 상에 발현되는 바와 같은 EGFR 또는 HER2/neu 발현과 같은 종양 세포 마커에 대해 양성이다. 이들 마커의 존재 또는 부재는 항

-glycICP 항체와 조합된 표적화된 치료제, 예컨대 티로신 키나아제 억제제, 예를 들어 EGFR-양성 암에 대한 제피티닙, 또는 HER2/neu-양성 암에 대한 헤르셉틴을 이용한 병용 요법이 치료를 필요로 하는 대상체에 대한 치료 이득을 제공할 것이라는 점을 나타날 수 있다. 특정 실시양태에서, 암은 BLBC이다.

[0134] 암을 특징지어 항-glycICP 항체로 요법 또는 모니터링 요법의 선택을 안내하기 위해 사용될 수 있는 다른 마커는 비소세포 폐암 및 역형성 대세포 림프종에서 ALK 유전자 재배열 및 과잉발현; 간암 및 생식세포 종양에 대한 알파-태아단백질(alpha-fetoprotein)(AFP); 다발성 골수종, 만성 림프성 백혈병, 및 일부 림프종에 대한 베타-2-마이크로글로불린(beta-2-microglobulin)(B2M); 융모암 및 생식세포 종양에 대한 베타-인간 융모성 생식선 자극호르몬(beta-human chorionic gonadotropin)(Beta-hCG); 난소암 및 유방암에 대한 BRCA1 및 BRCA2 유전자 돌연변이; 만성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 및 급성 골수성 백혈병에 대한 BCR-ABL 융합 유전자(필라델피아 염색체); 피부 흑색종 및 대장암에 대한 BRAF V600 돌연변이; 위장관 기질 종양 및 점막 흑색종에 대한 C-키트/CD117; 유방암에 대한 CA15-3/CA27.29; 췌장암, 담낭암, 담도암, 및 위암에 대한 CA19-9; 난소암에 대한 CA-125; 갑상선 수질암에 대한 칼시토닌; 대장암 및 일부 다른 암에 대한 암배아 항원(CEA); 비-호지킨 림프종에 대한 CD20; 신경내분비 종양에 대한 크로모그라닌(Chromogranin) A(CgA); 방광암에 대한 염색체 3, 7, 17, 및 9p21; 폐암에 대한 사이토케라틴 단편 21-1; 비소세포 폐암에 대한 EGFR 유전자 돌연변이 분석; 유방암에 대한 에스트로겐 수용체(estrogen receptor)(ER)/프로게스테론 수용체(progesterone receptor)(PR); 방광암에 대한 피브린/피브리노겐; 난소암에 대한 HE4; 유방암, 위암, 및 위식도접합부 선암종에 대한 HER2/neu 유전자 증폭 또는 단백질 과잉발현; 다발성 골수종 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증에 대한 면역글로불린; 대장암 및 비소세포 폐암에 대한 KRAS 유전자 돌연변이 분석; 생식세포 종양, 림프종, 백혈병, 흑색종, 및 신경모세포종에 대한 락테이트 데하이드로게나아제; 소세포 폐암 및 신경모세포종에 대한 뉴런-특이 에놀라아제(neuron-specific enolase)(NSE); 방광암에 대한 핵기질 단백질 22; 전립선암에 대한 전립선-특이 항원(prostate-specific antigen)(PSA); 갑상선암에 대한 티로글로불린; 및 유방암에 대한 우로키나아제 플라스미노겐 활성제(urokinase plasminogen activator)(uPA) 및 플라스미노겐 활성제 억제제(plasminogen activator inhibitor)(PAI-1)를 포함한다.

[0135] 항-글리코실화된 ICP 항체, 예를 들어 항-glycPD-L1 항체는 다양한 양식의 항종양제로서 사용될 수 있다. 특별한 실시양태에서, 항종양제로서 항체를 사용하는 방법이 고려되므로, 종양 세포 성장을 차단하거나 억제하기에 충분한 기간 동안 종양 세포 집단을 치료적 유효량의 항체, 또는 항체를 함유하는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 실시양태에서, *생체내에서* 종양 세포를 접촉시키는 단계는 항-글리코실화된 ICP 항체, 또는 이의 결합 단편, 예를 들어 본원에 기재된 항-glycPD-L1 항체 또는 이의 결합 단편을 포함하는 생리학적 용인성 조성물의 치료적 유효량을 예를 들어, 정맥내, 피하, 복강내, 또는 종양내 주사에 의해, 치료를 필요로 하는 환자에게 투여함으로써 수행된다. 항체는 주사에 의하거나 시간에 걸친 점진적 주입에 의해 비경구적으로 투여될 수 있다. 유용한 투여 및 전달 요법은 정맥내, 복강내, 경구, 근육내, 피하, 공동내, 경피, 피부, 연동 수단, 또는 종양 세포를 함유하는 조직 내로의 직접 주사를 포함한다.

[0136] 항체를 포함하는 치료 조성물은 전통적으로, 예를 들어 단위 용량의 주사에 의한 바와 같이 정맥내로 투여된다. 용어 "단위 용량"은 치료 조성물에 관하여 사용될 때, 각각의 단위가 필요한 희석제, 즉 담체, 또는 비히클과 연합하여 소망하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 소정양의 활성 물질을 함유하는, 대상체에 대한 단일 투여량에 적합한 물리적 별개 단위를 지칭한다. 조성물을 함유하는 항-글리코실화된 ICP 항체, 예를 들어 항-glycPD-L1 항체는 투약 제형과 양립 가능한 방식 및 치료적 유효량으로 투여된다. 투여될 양은 치료될 대상체, 활성 성분을 이용하는 대상체의 시스템의 능력, 및 소망하는 치료 효과의 정도에 의존한다. 투여에 요구되는 활성 성분의 정밀한 양은 의사의 판단에 의존하며 각각의 개체에 대해 고유하다. 그러나, 전신 적용을 위해 적합한 투여량 범위는 본원에 개시되어 있으며, 투여 경로에 의존한다. 초기 및 부스터 투여에 적합한 요법이 또한 고려되며, 전형적으로 초기 투여 이후 연속 주사 또는 다른 투여에 의한 1 이상의 간격(시간)으로 반복된 투약을 포함할 수 있다. 예시적 다중 투여는 항체의 연속적으로 높은 혈청 및 조직 수준을 유지하기에 적합하다. 대안적으로, *생체내* 요법에 특화된 범위로 혈액내 농도를 유지하기에 충분한 연속 정맥내 주입이 고려된다.

[0137] 상기 기재된 방법에 의해 생성된 항-glycICP 항체는 질환을 치료하기 위해, 예컨대 국소 진행 또는 전이성 암을 앓는 암 환자에서 종양 세포 성장을 억제하거나 암 세포를 사멸시키기 위해 전신으로 또는 국소로 투여될 수 있는 것으로 고려된다. 항체는 단독으로 투여되거나 항-증식 약물 또는 항암 약물과 조합되어 투여될 수 있다. 실시양태에서, 항-글리코실화된 ICP 항체는 수술 또는 다른 절차 전에 환자에서 암 부담을 감소시키기 위해 투여된다. 대안적으로, 이들은 수술 후에 주기적 간격으로 투여되어, 임의의 나머지 암(예를 들어, 수술이 제거에 실패한 암)의 크기 또는 성장 능력이 감소되고/되거나 생존하지 않도록 보장할 수 있다. 상기 본원에 기재된 바

와 같이, 항체의 치료적 유효량은 소망하는 효과를 달성하기 위해 계산된 소정의 양이다. 따라서, 항-glycICP 항체의 투여를 위한 투여량 범위는 종양 세포 분열의 증상 및 세포 주기가 감소되는 소망하는 효과를 생성하기에 충분히 큰 범위이다. 최적으로는, 투여량은 과점도 증후군, 폐부종, 울혈성 심부전, 신경학적 영향 등과 같은 부작용을 야기할 만큼 크면 안된다. 일반적으로, 투여량은 환자의 연령, 병태, 크기 및 성별, 및 질환의 정도에 따라 달라질 것이며, 의사 또는 임상의와 같은 당업자에 의해 결정될 수 있다. 물론, 투여량은 임의의 합병증 사례에서 개별 의사에 의해 조정될 수 있다.

[0138] **치료 방법**

[0139] 특정 실시양태에서, 조성물 및 방법은 항-글리코실화된 ICP 항체, 또는 이의 결합 부분, 예를 들어 글리코실화된 ICP 단백질, 예를 들어 PD-L1에 특이적으로 및 우선적으로 결합하는 항-glycPD-L1 항체 단독, 또는 제 2 또는 부가 약물 또는 요법과의 조합으로의 투여를 포함한다. 상기 약물 또는 요법은 인간 글리코실화된 ICP와 이의 리간드의 상호작용, 예를 들어 인간 PD-L1 또는 글리코실화된 인간 PD-L1과 인간 PD-1의 상호작용과 연관된 임의의 질환의 치료에 적용될 수 있다. 예를 들어, 상기 질환은 암일 수 있다. 특별한 예시적 실시양태에서, 글리코실화된 PD-L1 단백질에 결합하는 적어도 하나의 항-PD-L1 항체, 또는 이의 결합 부분을 포함하는 조성물 및 방법은 PD-1/PD-L1 상호작용을 예방, 감소, 차단, 또는 억제시켜, 치료 효과 및 치료를 제공함으로써, 암 또는 다른 질환의 치료에서 치료 또는 예방 효과를 갖는다.

[0140] 병용 요법을 포함한 조성물 및 방법은 치료 또는 예방 효과를 가지며, 치료 또는 예방 효과를 향상시키고/시키거나 다른 항암 또는 항-과증식성 요법의 치료 효과를 증가시킬 수 있다. 치료 및 예방 방법 및 조성물은 암 세포의 사멸 및/또는 세포 과증식성의 억제와 같은 소망하는 효과를 달성하기에 효과적인 조합된 양으로 제공될 수 있다. 이 과정은 항-글리코실화된 ICP 항체 또는 이의 결합 단편 및 제2 요법을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 제2 요법은 직접적인 세포독성 효과를 갖거나 갖지 않을 수 있다. 예를 들어, 제2 요법은 직접적인 세포독성 효과를 갖지 않으면서 면역계를 상향조절하는 약제일 수 있다. 조직, 종양, 및/또는 세포는 1 이상의 약제(예를 들어, 항체 또는 항암제)를 포함하는 1 이상의 조성물 또는 약학 제형(들)에 노출되거나, 하나의 조성물이, 예를 들어 1) 항체, 2) 항암제, 3) 항체 및 항암제 둘 다, 또는 4) 2 이상의 항체를 제공하는 2 이상의 별개의 조성물 또는 제형으로 조직, 종양, 및/또는 세포를 노출시킴으로써 노출될 수 있다. 또한, 상기 병용 요법은 화학요법, 방사선요법, 수술요법, 또는 면역요법과 콘쥬게이트되어 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0141] 예로서, 용어 "접촉되다" 및 "노출되다"는 세포에 적용될 때, 본원에서 치료 폴리펩티드, 바람직하게는 항-glycPD-L1 항체가 표적 세포에게 전달되거나 표적 세포와 직접 병치되어, 특히 종양 또는 암 세포의 표면 상의 표적 항원, 예를 들어 PD-L1, 특히 글리코실화된 PD-L1에 특이적으로 결합하는 과정을 기재하기 위해 사용된다. 치료적 항-glycPD-L1 항체에 의한 상기 결합은 종양 또는 암 세포-발현된 PD-L1과 이펙터 T 세포 상의 PD-1의 상호작용을 예방, 차단, 억제, 또는 감소시켜, PD-L1/PD-1 상호작용과 연관된 면역억제를 예방한다. 실시양태에서, 화학치료제 또는 방사선치료제가 또한 항-glycPD-L1 항체 또는 이의 결합 단편과 함께 대상체에게 투여되거나 전달된다. 예를 들어, 세포 사멸을 달성하기 위해, 1 이상의 약제가 세포를 사멸시키거나 이의 분열을 예방하기에 효과적인 조합된 양으로 세포에게 전달된다.

[0142] 본원에 기재된 바와 같은 항-글리코실화된 ICP 항체, 예를 들어 항-glycPD-L1 항체는 다른 항암 치료 전에, 그 동안에, 그 이후에, 또는 그에 비해 다양한 조합으로 투여될 수 있다. 상기 투여는 서로 동시 내지 수분 내지 수일 내지 수주 전 또는 후의 범위의 간격을 둘 수 있다. 항체가 항암제와 별도로 환자에게 제공되는 실시양태에서, 일반적으로 각각의 전달 시점 사이에 상당한 기간이 만료되지 않아, 투여된 화합물이 환자에 대해 유리하게 조합된 효과를 여전히 발휘할 수 있을 것이라는 점이 보장될 것이다. 예시적으로, 상기 사례에서, 당업자는 서로 약 12 내지 24 또는 72 시간 이내에, 더욱 상세하게는, 서로 약 6-12 시간 이내에 항체 및 항암 요법을 대상체에게 투여할 수 있는 것으로 고려된다. 일부 상황에서, 치료 기간을 각각의 투여 사이에 수일(2, 3, 4, 5, 6, 또는 7 일) 내지 수주(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8 주)가 경과하도록 상당히 연장하는 것이 바람직할 수 있다.

[0143] 특정 실시양태에서, 치료의 과정 또는 치료 사이클은 1-90 일 이상(이 범위는 개입일 및 최종일을 포함함) 지속될 것이다. 하나의 약제는 1 일차 내지 90 일차(이러한 범위는 개입일 및 최종일을 포함함) 중 임의의 날짜 또는 이의 임의의 조합에 제공될 수 있으며, 다른 약제는 1 일차 내지 90 일차(이러한 범위는 개입일 및 최종일을 포함함) 중 임의의 날짜 또는 이의 임의의 조합에 제공되는 것으로 고려된다. 1 일(24 시간의 기간) 이내에, 환자는 약제(들)의 1 회 또는 다수 투여를 제공받을 수 있다. 또한, 치료 과정 후에, 항암 치료가 투여되지 않는 기간이 있을 수 있다는 점이 고려된다. 이 기간은, 예를 들어 예후, 강도, 건강 등과 같은 환자의 병태에 따라

1-7 일, 및/또는 1-5 주, 및/또는 1-12 개월 이상(이러한 범위는 개입일 및 최고 시점을 포함함) 지속될 수 있다. 치료 사이클은 필요시 반복될 것이다. 다양한 조합의 치료가 사용될 수 있다. 하기에 나타낸 조합 치료 요법의 대표적인 예에서, 항-글리코실화된 ICP 항체, 예를 들어 항-glycPD-L1 항체, 또는 이의 결합 단편과 같은 항체는 "A"로 표현되고, 항암 요법은 "B"로 표현된다:

[0144] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B
B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A.

[0145] 환자에 대한 본 실시양태의 임의의 항체 또는 요법의 투여는, 존재하는 경우, 약제의 독성을 고려하여, 상기 화합물의 투여를 위한 일반 프로토콜에 따를 것이다. 따라서, 일부 실시양태에서, 부작용 및 독성, 특히 병용 요법에 기인할 수 있는 부작용 및 독성을 모니터링하는 단계가 있다.

[0146] 실시양태에서, 치료제 또는 치료 방법은 치료를 필요로 하는 환자, 즉 암 또는 종양이 있는 환자에 대한 항-글리코실화된 ICP 항체 단독 또는 다른 항암제와의 조합의 투여를 포함한다. 항-글리코실화된 ICP 항체의 투여 전에, 환자의 종양 또는 암의 샘플이 ICP의 존재에 대해 평가될 수 있다. 상기 평가의 결과가 환자의 종양 또는 암이 글리코실화된 ICP에 양성인 것으로 드러내는 경우, 환자는 환자의 글리코실화된-ICP+ 종양 또는 암이 항-글리코실화된 ICP 항체를 이용한 치료에 더욱 잘 들을 가능성을 기본으로 하여 치료가 선택될 것이며, 치료는 더욱 유익한 결과를 지속할 수 있다. 전문 의료진 또는 의사는 환자에게 항-글리코실화된 ICP 항체 치료 방법을 지속할 것을 권고할 수 있으며, 환자는 전문 의료진 또는 의사의 권고를 기본으로 하여 치료를 지속할 것을 결정할 수 있다. 또한, 치료 과정 동안, 환자의 종양 또는 암 세포는 치료의 과정 또는 효과를 모니터링하기 위한 방식으로서, 글리코실화된 ICP의 존재에 대해 평가될 수 있다. 상기 에세이가 예를 들어, 환자의 종양 또는 암 세포 상의 글리코실화된 ICP에서의 변경, 손실, 또는 감소를 나타내는 경우, 환자와 함께 전문 의료진에 의해, 치료를 지속해야 하거나 일부 방식, 예를 들어 고 투여량, 다른 항암제 또는 요법의 추가 등으로 변경되어야 할지에 대한 결정이 이루어질 수 있다.

[0147] **면역요법**

[0148] 본 방법의 일부 실시양태에서, 면역요법은 항-glycICP 항체의 투여와 조합되거나 이와 함께 사용될 수 있다. 암 치료의 맥락에서, 면역치료제는 일반적으로 암 세포를 표적화하고 파괴하는 면역 이펙터 세포 및 분자의 사용에 의존한다. 리툭시맙(RITUXAN®)이 이러한 예이다. 예를 들어, 이필루미맙(ipilumimab)과 같은 체크포인트 억제제는 이러한 다른 예이다. 면역 이펙터는 예를 들어, 종양 세포의 표면 상의 마커(세포 표면 단백질 또는 수용체)에 대해 특이적인 항체일 수 있다. 항체 단독은 요법의 이펙터로서 제공될 수 있거나 이는 실제로 세포 사멸에 영향을 미치는 다른 세포를 모집할 수 있다. 항체는 또한 약물 또는 독소(화학치료제, 방사성핵종, 리신(ricin) A 사슬, 콜레라 독소, 백일해 독소 등)와 콘쥬게이트될 수 있으며, 드물게는 표적화제로서 제공될 수 있다. 대안적으로, 이펙터는 종양 세포 표적와 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하는 표면 분자, 예를 들어 종양 세포 상호작용시 T 세포/PD-L1에 대하여 PD-1을 수반하는 림프구일 수 있다. 다양한 이펙터 세포는 세포독성 T 세포 및 NK 세포를 포함한다.

[0149] 면역요법의 일 양태에서, 종양 세포는 표적화에 잘 듣는 일부 마커(단백질/수용체)를 보유해야 한다. 최적으로는, 종양 마커 단백질/수용체는 비-암세포 또는 정상 세포와 같은 대부분의 다른 세포 상에 존재하지 않는다. 많은 종양 마커가 존재하며, 이들 중 임의의 것이 본 실시양태의 맥락에서 항-glycICP 항체와 함께 투여되는 다른 약물 또는 요법에 의해 표적화하기 위해 적합할 수 있다. 일반적인 종양 마커는, 예를 들어 CD20, 암배아 항원(CEA), 티로시나아제(p97), gp68, TAG-72, HMFG, 시알릴 루이스 항원(Sialyl Lewis Antigen), MucA, MucB, PLAP, 라미닌 수용체, erbB, 및 p155를 포함한다. 면역요법의 대안적 양태는 항암 효과를 면역 자극 효과와 조합하는 것이다. 면역 자극 분자가 또한 존재하며, IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, 감마-IFN과 같은 사이토카인; MIP-1, MCP-1, IL-8과 같은 케모카인; 및 FLT3 리간드와 같은 성장 인자를 포함한다.

[0150] 현재 조사 중이거나 사용 중인 면역요법의 예는 면역 아쥬반트, 예를 들어 *미코박테리움 보비스*(*Mycobacterium bovis*), *플라스모듐 팔시파룸*(*Plasmodium falciparum*), 디니트로클로로벤젠, 및 방향족 화합물(미국 특허 제5,801,005호 및 제5,739,169호; Hui and Hashimoto, 1998, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336; Christodoulides et al., 1998, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037); 사이토카인 요법, 예를 들어 α, β 및 γ 인터페론; IL-1, GM-CSF, 및 TNF(Bukowski et al., 1998, *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347;

Davidson et al., 1998, J. *Immunother.*, 21(5):389-398; Hellstrand et al., 1998, *Acta Oncologica*, 37(4):347-353); 유전자 요법, 예를 들어 TNF, IL-1, IL-2, 및 p53(Qin et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416; Austin-Ward et al., 1998, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845; 미국 특허 제5,830,880호 및 제5,846,945호); 및 단클론 항체, 예를 들어 항-CD20, 항-강글리오시드 GM2, 및 항-p185(Hollander, 2012, *Front. Immun.*, 3:3; Hanibuchi et al., 1998, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485; 미국 특허 제5,824,311호)이다. 1 이상의 항암 요법이 본원에 기재된 항체 요법과 함께 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0151] **단백질 정제**

[0152] 항-글리코실화된 ICP 항체를 포함한 단백질 정제 기법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 이들 기법은 적어도 하나의 단계에서, 세포, 조직, 또는 장기를 폴리펩티드 및 비-폴리펩티드 분획으로 균질화 및 조제물 분별(crude fractionation)하는 것을 포함한다. 관심 단백질 또는 폴리펩티드는 달리 명시되지 않는 경우, 크로마토그래피 및 전기영동 기법을 사용하여 추가로 정제되어, 부분 또는 완전 정제(또는 균질성까지의 정제)를 달성할 수 있다. 순수 단백질 또는 펩티드의 제조에 특히 적합한 분석적 방법은 이온-교환 크로마토그래피, 크기-배제 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 수산화인회석 크로마토그래피, 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동, 친화성 크로마토그래피, 면역친화성 크로마토그래피, 및 등전점 전기영동이다. 펩티드를 정제하는 특히 효율적인 방법은 고속 액체 크로마토그래피(fast-performance liquid chromatography)(FPLC) 또는 고성능 액체 크로마토그래피(high-performance liquid chromatography)(HPLC)이다. 당업계에 일반적으로 알려진 바와 같이, 다양한 정제 단계를 수행하는 순서는 변경되고/되거나, 특정 단계가 생략되어, 실질적으로 정제된 폴리펩티드의 제조에 적합한 방법을 여전히 야기할 수 있다.

[0153] 항-글리코실화된 ICP, 예를 들어 항-glycPD-L1 항체와 같은 정제된 폴리펩티드는 다른 성분으로부터 단리 가능하거나 단리되고, 이의 천연적으로 얻을 수 있는 상태와 비교하여 임의의 정도로 정제된 폴리펩티드를 지칭한다. 따라서, 단리되거나 정제된 폴리펩티드는 또한 천연적으로 발생할 수 있는 환경, 예를 들어 세포, 조직, 장기, 생물학적 샘플 등으로부터 유리된 폴리펩티드를 지칭한다. 일반적으로, "정제된"은 분별을 거쳐 다양한 다른 성분이 제거된 폴리펩티드 조성물을 지칭할 것이며, 상기 조성물은 이의 발현된 생물학적 활성을 실질적으로 보유한다. "실질적으로 정제된" 조성물은 폴리펩티드가 조성물 내의 단백질 성분의 약 50 %, 약 60 %, 약 70 %, 약 80 %, 약 90 %, 약 95 %, 또는 그 이상을 구성하는 바와 같이, 조성물의 주요 성분을 형성하는 조성물을 지칭한다.

[0154] 항체 단백질과 같은 폴리펩티드의 정제의 정도를 정량화하기 위한 다양한 방법이 본 발명에 비추어 당업자에게 알려져 있다. 이들은 예를 들어, 활성 분획의 특이적 활성을 결정하는 단계, 또는 SDS/PAGE 분석에 의해 분획 내의 폴리펩티드의 양을 평가하는 단계를 포함한다. 분획의 순도를 평가하기 위한 바람직한 방법은 분획의 특이적 활성을 계산하고, 그것을 최초 추출물의 특이적 활성과 비교하여, "정제 배수"로 평가된 이의 순도의 정도를 계산하는 것이다. 활성의 양을 나타내기 위해 사용되는 실제 단위는, 물론 정제를 따르기 위해 선택된 특별한 에세이 기법, 및 발현된 폴리펩티드가 검출 가능한 활성을 나타내는지 여부에 의존할 것이다.

[0155] 폴리펩티드가 항상 그것의 가장 정제된 상태로 제공될 일반적 필요성은 없다. 실제로, 특정 실시양태에서는 실질적으로 덜 정제된 생성물이 유용성을 가질 수 있는 것으로 고려된다. 부분적 정제는 조합적으로 더 적은 정제 단계를 사용하거나, 동일한 일반 정제 계획의 상이한 형태를 이용함으로써 수행될 수 있다. 예를 들어, HPLC 기구를 이용하여 수행된 양이온-교환 칼럼 크로마토그래피는 일반적으로 저압 크로마토그래피 시스템을 이용한 동일한 기법에 비해 더 큰 "배수" 정제를 야기할 것으로 인식된다. 낮은 정도의 상대 정제를 나타내는 방법은 단백질 생성물의 총 회수에서, 또는 발현된 단백질의 활성을 유지하는데 유리할 수 있다.

[0156] 친화성 크로마토그래피는 단리될 물질(단백질)과 그것이 특이적으로 결합할 수 있는 분자 사이의 특이적 친화성, 예를 들어 수용체-리간드 유형의 상호작용에 의지하는 크로마토그래피 절차이다. 칼럼 물질(수지)은 결합 파트너 중 하나를 불용성 매트릭스에 공유결합으로 결합함으로써 합성된다. 이어서, 칼럼 물질은 칼럼 수지에 걸쳐 통과하는 용액으로부터 상기 물질을 특이적으로 흡착할 수 있다. 용출은 결합이 방해되는/발생하지 않는 조건으로 조건을 변경(pH, 이온 강도, 온도 변경 등)시킴으로써 발생한다. 매트릭스는 분자를 임의의 상당한 정도로 흡착하지 않고, 넓은 범위의 화학적, 물리적, 및 열적 안정성을 갖는 물질이어야 한다. 리간드는 그것의 결합 특성에 영향을 미치지 않는 방식으로 결합되어야 한다. 리간드는 또한 비교적 단단한 결합을 제공해야 하지만; 결합된 물질의 용출이 소망하는 샘플 단백질 또는 리간드를 파괴하지 않으면서 발생해야 한다.

[0157] 크기-배제 크로마토그래피(SEC)는 용액 내의 분자가 그것들의 크기, 또는 보다 기술적 관점에서 그것들의 유체

역학적 부피를 기본으로 하여 분리되는 크로마토그래피 방법이다. 이는 보통 큰 분자 또는 거대분자 복합체, 예컨대 단백질 또는 산업 중합체에 적용된다. 전형적으로, 상기 기법은 유기 용매가 이동상으로서 사용될 때 사용되는 명칭인 겔 투과 크로마토그래피에 비해, 수용액이 칼럼을 통해 샘플을 이동시키기 위해 사용될 때, 겔 여과 크로마토그래피로 알려져 있다. SEC의 근본적인 원리는 상이한 크기의 입자가 고정상을 통해 상이한 비율로 용출(여과)되어, 크기를 기본으로 한 입자 용액의 분리를 야기하는 것이다. 모든 입자가 동시에 또는 거의 동시에 로딩된다면, 동일한 크기의 입자는 함께 용출되어야 한다.

[0158] 고성능(고압으로도 알려짐) 액체 크로마토그래피(HPLC)는 화합물을 분리, 확인, 및 정량화하기 위해 생화학 및 분석 화학에서 자주 사용되는 칼럼 크로마토그래피의 형태이다. HPLC는 크로마토그래피 충전재(고정상)를 유지하는 칼럼, 칼럼을 통해 이동상(들)을 이동시키는 펌프, 및 분자의 체류 시간을 나타내는 검출기를 이용한다. 체류 시간은 고정상, 분석되는 분자, 및 사용된 용매(들)에 따라 달라진다.

[0159] **항-글리코실화된 ICP 항체 치료로부터의 환자 이득의 바이오마커로서의 글리코실화된 ICP**

[0160] 실시양태에서, 기재된 바와 같은 적어도 하나의 항-글리코실화된 ICP 항체의 사용을 포함하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 암 또는 종양을 갖는 환자로부터 얻은 종양 또는 암 세포의 바이오마커 평가에 유용할 수 있다. 암을 갖는 대상체가 또한 ICP-보유 종양 또는 암 세포의 바이오마커로서, 글리코실화된 PD-L1, 특히 상기 세포의 세포 표면 상의 검출 가능한 수준의 글리코실화된 PD-L1과 같은 글리코실화된 ICP를 발현하는 암 또는 종양을 갖는지 여부를 결정하는 방법이 제공된다. 예를 들어, 대상체의 암 또는 종양 세포가 시험되고, 세포 표면 상에 글리코실화된 ICP, 예를 들어 PD-L1을 발현하는 것으로 결정되는 경우, 항-글리코실화된 ICP 항체, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 항-glycPD-L1 항체 단독, 또는 다른 항암제와의 조합으로 치료된 대상체는, 예를 들어 상기 치료로부터 이득을 얻을 가능성이 더 있다. 상기 방법은 암 또는 종양을 갖는 대상체로부터 샘플을 얻는 단계, 당업계에 알려지고 사용되거나 상기 기재된 바와 같은 결합 방법을 사용하여, 대상체의 암 또는 종양으로부터 유래된 세포 상의 글리코실화된 ICP, 예를 들어 PD-L1의 존재에 대해 샘플을 시험하는 단계, 및 대상체의 암 또는 종양이 글리코실화된 ICP, 예를 들어 PD-L1 단백질의 세포 표면 발현에 대해 양성인 것으로 밝혀진 경우, 유효량의 항-글리코실화된 ICP 항체, 예를 들어 항-glycPD-L1 항체 단독, 또는 다른 항암제와의 조합을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 대상체가 치료 전에 글리코실화된 ICP, 예를 들어 PD-L1을 발현하는 암 또는 종양을 갖는 것으로 진단하는 것은 대상체에게 더욱 효과적인 치료 및 이득을 허용하며, 이는 투여된 항-글리코실화된 ICP 항체, 예를 들어 항-glycPD-L1 항체가 대상체의 글리코실화된 ICP, 예를 들어 glycPD-L1-발현 암 또는 종양 세포와 대상체의 ICP-발현 T 세포, 예를 들어 PD-1-발현 T 세포의 상호작용을 차단하거나 억제하여, T 세포 활성의 면역억제를 예방하고 활성화된 T 세포 사멸에 의해 종양 또는 암세포의 사멸을 촉진할 가능성이 있기 때문이다. 실시양태에서, 상기 방법은 암 또는 종양이 발현된 글리코실화된 ICP, 예를 들어 글리코실화된 PD-L1 단백질의 존재에 대한 시험에 잘 들을 수 있는 대상체를 우선 선택하는 단계를 포함할 수 있다.

[0161] 시간에 걸친 항-글리코실화된 ICP 항체, 예를 들어 항-glycPD-L1 항체, 및 다른 항암 약물 또는 치료와의 조합 치료를 포함한 암 치료 또는 요법의 과정 동안뿐 아니라, 치료가 중단된 후에, 환자의 종양 세포 상의 글리코실화된 ICP, 예를 들어 글리코실화된 PD-L1의 존재를 모니터링하기 위해 유사한 방법이 사용될 수 있다. 상기 방법은 또한 항암 치료 요법, 또는 조합 치료가 치료 전에 및 치료 과정, 예를 들어 모니터링 동안 환자의 종양 또는 암 샘플을 글리코실화된 ICP-발현 종양 또는 암 세포, 예를 들어 글리코실화된 PD-L1-발현 종양 또는 암 세포에 대하여 시험하거나 평가하여, 성공적 결과 또는 이의 가능성을 결정하는 단계를 포함하는 동반 진단 방법에서 사용될 수 있다.

[0162] **다른 약제**

[0163] 치료의 치료 효능을 개선하기 위해 다른 약제가 본 실시양태의 특정 양태와 조합되어 사용될 수 있다는 점이 고려된다. 이들 추가 약제는 세포 표면 수용체와 갭 연결부(GAP junction)의 상향조절에 영향을 미치는 약제, 세포증식억제제 및 분화제, 세포 부착 억제제, 세포사멸 유도물질에 대한 과증식성 세포의 민감도를 증가시키는 약제, 또는 다른 생물학적 약제를 포함한다. 갭 연결부의 수의 증가에 의한 세포내 시그널링의 증가는 인접한 과증식성 세포 집단에 대한 항-과증식성 효과를 증가시킬 수 있다. 다른 실시양태에서, 치료의 항-과증식성 효능을 개선하기 위해 세포증식억제제 또는 분화제가 본 실시양태의 특정 양태와 조합되어 사용될 수 있다. 세포 부착 억제제는 본 실시양태의 효능을 개선하는 것으로 고려된다. 세포 부착 억제제의 예는 초점 접착 키나아제(focal adhesion kinase)(FAK) 억제제 및 로바스타틴이다. 항체 c225와 같이 아폽토시스에 대한 과증식성 세포의 민감도를 증가시키는 다른 약제가 치료 효능을 개선하기 위해 본 실시양태의 특정 양태와 조합되어 사용될 수 있음이 추가로 고려된다.

[0164] **융합 및 콘쥬게이트**

[0165] 본원에서 제공된 항-글리코실화된 ICP 항체는 또한 다른 단백질을 갖거나 다른 모이어티에 화학적으로 콘쥬게이트된 융합 단백질로서 발현될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 폴리펩티드는 이소형 또는 서브클래스에 의해 달라질 수 있으며, 키메라 또는 하이브리드일 수 있고/있거나, 예를 들어 이펙터 기능을 개선하며, 반감기, 또는 조직 접근성을 조절하고, 안정성과 같은 생물물리학적 특징을 증가시키며, 비용 감소와 연관될 수 있는 생산 효율성을 개선하기 위해 변형될 수 있는 Fc 부위를 갖는다. 융합 단백질 및 이를 제조하기 위한 방법의 구축에 유용한 많은 변형이, 예를 들어 Mueller, J.P. et al., 1997, *Mol. Immun.* 34(6):441-452; Swann, P.G., 2008, *Curr. Opin. Immunol.*, 20:493-499; 및 Presta, L.G., 2008, *Curr. Opin. Immunol.*, 20:460-470에 의해 보고된 바와 같이 당업계에 알려져 있다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 항체의 천연 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 Fc 영역이다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 하이브리드, 예를 들어 IgG2/IgG4 Fc 불변 영역을 함유하는 키메라이다. Fc 영역에 대한 변형은, 비제한적으로, Fc 감마 수용체 및 보체에 대한 결합을 예방하기 위해 변형된 IgG4; 1 이상의 Fc 감마 수용체에 대한 결합을 개선하기 위해 변형된 IgG1; 이펙터 기능을 최소화하기 위해 변형(아미노산 변경)된 IgG1; 변화된 글리칸을 갖는/글리칸이 없는(전형적으로 발현 숙주를 변경시킴으로써) IgG1; 및 FcRn에 대한 변경된 pH-의존성 결합을 갖는 IgG1을 포함한다. Fc 영역은 항체의 전체 힌지 영역, 또는 전체 미만의 힌지 영역을 포함할 수 있다.

[0166] 다른 실시양태는 반감기를 증가시키는 FcR에 대한 결합 감소를 갖는 IgG2-4 하이브리드 및 IgG4 돌연변이를 포함한다. 대표적인 IG2-4 하이브리드 및 IgG4 돌연변이체는 예를 들어, Angal et al., 1993, *Molec. Immunol.*, 30(1):105-108; Mueller et al., 1997, *Mol. Immun.*, 34(6):441-452; 및 미국 특허 제6,982,323호에 기재되어 있으며; 이들 모두는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 일부 실시양태에서, IgG1 및/또는 IgG2 도메인은 결실된다. 예를 들어, Angal *et al., Id.*는 IgG1 및 IgG2 도메인의 세린 241이 프롤린으로 치환된 단백질을 기재하고 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90 또는 적어도 100 개의 아미노산을 갖는 융합 단백질 또는 폴리펩티드가 고려된다.

[0167] 일부 실시양태에서, 항-글리코실화된 ICP 항체는 적어도 하나의 모이어티와 연결되거나, 모이어티와 공유결합되거나, 모이어티와 복합체를 형성한다. 상기 모이어티는, 비제한적으로, 진단제 또는 치료제로서 항체의 효능을 증가시키는 모이어티일 수 있다. 일부 실시양태에서, 모이어티는 이미징제, 독소, 치료 효소, 항생제, 방사성-표지된 뉴클레오티드, 화학치료제 등일 수 있다.

[0168] 일부 실시양태에서, 항-glycICP 항체에 콘쥬게이트되거나 융합되는 모이어티는 효소, 호르몬, 세포 표면 수용체, 독소, 예컨대, 비제한적으로, 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소(즉, PE-40), 디프테리아 독소, 리신, 젤로닌, 또는 포크위드(pokeweed) 항바이러스 단백질), 단백질(예컨대, 종양 괴사 인자, 인터페론(예를 들어, α-인터페론, β-인터페론), 신경 성장 인자(nerve growth factor)(NGF), 혈소판 유래 성장 인자(platelet derived growth factor)(PDGF), 조직 플라스미노겐 활성제(tissue plasminogen activator)(TPA), 또는 세포사멸제(예를 들어, 종양 괴사 인자-α, 종양 괴사 인자-β)), 생체 반응 조절인자(예컨대, 림포카인(예를 들어, 인터류킨-1("IL-1"), 인터류킨-2("IL-2"), 인터류킨-6("IL-6")), 과립구 대식세포 집락 자극 인자(granulocyte macrophage colony stimulating factor)("GM-CSF"), 과립구 집락 자극 인자("G-CSF"), 또는 대식세포 집락 자극 인자("M-CSF")), 또는 성장 인자(예를 들어, 성장 호르몬(growth hormone)("GH")), 세포독소(예를 들어, 세포증식억제제 또는 세포파괴제, 예컨대 파클리탁셀, 시토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티듐 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드(tenoposide), 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온(dihydroxy anthracin dione), 미톡산트론, 미스라마이신, 악티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀올, 튜불리신계 미세소관 억제제, 예를 들어 마이탄시노이드, 예컨대 마이탄시노이드 DM1(N2'-데아세틸-N2'-(3-머캅토-1-옥소프로필)-마이탄신; 사용된 링커에 따라 메르탄신(mertansine) 또는 엠탄신(emtansine); 및 마이탄시노이드 DM4(N2'-데아세틸-n2'-(4-머캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-6-메틸마이탄신; 라브탄신(ravtansine)), ImmunoGen, Inc., Waltham, MA), 및 퓨로마이신 및 이의 유사체 또는 동족체), 대사길항제(예를 들어, 메토트렉세이트, 6-머캅토퓨린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카바진), 알킬화제(예를 들어, 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, BiCNU®(카무스틴; BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조신, 미토마이신 C, 및 시스디클로로디아민 플라티늄 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라시클린(예를 들어, 다우노루비신(이전의 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예를 들어, 닥티노마이신(이전의 악티노마이신), 블레오마이신, 미스라마이신, 및 안트라마이신(AMC)), 항유사분열제 및/또는 튜불린 억제제, 예를 들어 빈크리스틴 및 빈블라스틴, 모노메틸 아우리스타틴 F(MMAF), 모노메틸 아우리스타

틴 E(또는, 데스메틸-아우라스타틴 E)(MMAE), 예를 들어, 베도틴; 또는 이의 조합일 수 있다.

[0169] **항체-약물 콘쥬게이트(Antibody-Drug Conjugate)(ADC)**

[0170] 항체 약물 콘쥬게이트(ADC)는 항체, 전형적으로 특정 표적 항원, 특히 종양 또는 암 세포의 표면 상에 발현되거나 과잉발현된 표적 항원에 지향된 단클론 항체에 강한 세포독성 약물이 화학적 링커 또는 커필링제를 통해 공유적으로 연결된 생물학적 치료제이다. 상기 "로딩된" 항체는 종양 또는 암 세포에게 치명적 세포독성 화물을 전달하도록 설계된다. ADC는 페이로드 약물을 신생물 세포에 표적화하는 한편, 부작용을 감소시키고 전신성 독성을 최소화하기 위한 수단을 제공한다. ADC는 ADC의 항체 성분과 이의 표적 항원의 특이적 상호작용 때문에 세포 표면-발현된 표적 항원에 결합한다. 표적 항원에 대한 결합 후에, ADC는 특히, 항체가 내부화 활성을 고조시켰을 경우, 세포 내로 내부화될 수 있다. 내부화 융합을 갖는 항-glycICP 항체의 예는 STM108 및 STM073과 같은 본원에 기재된 실시양태의 항-glycPD-L1 항체이다. 따라서, 상기 ADC가 세포 내로 내부화될 때, 이들은 세포를 사멸시키거나 아폽토시스 또는 세포 사멸을 야기하는 세포 내부의 분자를 표적화하기 위해 직접적으로 작용한다. 본원에 기재된 항-glycICP 항체, 예를 들어 항-glycPD-L1 항체(예를 들어, STM108 및 STM073), 특히 단클론, 인간화, 키메라, 또는 인간 항체를 포함하는 상기 ADC는 종양 및 암 세포 상의 글리코실화된 ICP에 대한 항체의 특이적 표적화를 세포독성 약물 또는 화합물의 암-사멸 능력과 조합하여, 항-glycICP 항체를 이용한 치료 및 요법에 대한 추가 이점을 제공한다. ADC를 제조하고 사용하기 위한 기법은 당업계에 알려져 있으며, 본원에 기재된 항-glycPD-L1 항체에 대하여 제한되지 않는다. (예를 들어, Valliere Douglass, J.F., et al., 2015, *Mol. Pharm.*, 12(6):1774-1783; Leal, M. et al., 2014, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1321:41-54; Panowski, S. et al., 2014, *mAbs*, 6(1):34-45; Beck, A. 2014, *mAbs*, 6(1):30-33; Behrens, C.R. et al., 2014, *mAbs*, 6(1):46-53; 및 Flygare, J.A. et al., 2013, *Chem. Biol. Drug Des.*, 81(1):113-121 참고). 실시양태에서, 상기 기재된 모이어티, 특히 독소 및 세포독소의 일부 또는 전부는 항-glycPD-L1 항체에 콘쥬게이트되어 암을 치료하기 위해 효과적인 ADC를 생성할 수 있다. 실시양태에서, ACD의 항-glycICP 항체 성분은 이중특이적, 다중특이적, 비파라토프, 또는 멀티파라토프 항체일 수 있다.

[0171] 치료 또는 세포독성 모이어티를 항체에 콘쥬게이트시키기 위한 기법은 잘 알려져 있으며; 예를 들어 Amon *et al.*, "*Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy*", in MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Reisfeld *et al.* (eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom *et al.*, "*Antibodies For Drug Delivery*", in CONTROLLED DRUG DELIVERY (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "*Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review*", in MONOCLONAL ANTIBODIES '84: BIOLOGICAL AND CLINICAL APPLICATIONS, Pinchera *et al.* (eds.), 1985, pp. 475-506); "*Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy*", in MONOCLONAL ANTIBODIES FOR CANCER DETECTION AND THERAPY, Baldwin *et al.* (eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; Thorpe *et al.*, *Immunol. Rev.* 62:119-158 (1982); Carter *et al.*, *Cancer J.* 14(3):154-169 (2008); Alley *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14(4):529-537 (2010); Carter *et al.*, *Amer. Assoc. Cancer Res. Educ. Book.* 2005(1):147-154 (2005); Carter *et al.*, *Cancer J.* 14(3):154-169(2008); Chari, *Acc. Chem Res.* 41(1):98-107 (2008); Doronina *et al.*, Nat. Biotechnol. 21(7):778-784(2003); Ducry *et al.*, *Bioconjug Chem.* 21(1):5-13(2010); Senter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13(3):235-244 (2009); 및 Teicher, *Curr Cancer Drug Targets.* 9(8):982-1004 (2009)를 참고한다. ADC 및 ADC 종양학 생성물의 검토는 Lambert, British J. Clin. Pharmacol., 76(2):248-262 (2013) 및 Bouchard et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 24:5357-5363 (2014)에서 발견된다.

[0172] 구체적 실시양태에서, 종양 세포 내로 glycICP, 예를 들어 PD-L1의 내부화를 가능하게 하는 항-glycICP 항체, 예를 들어 항-glycPD-L1 항체는 전형적으로 불안정한 결합을 갖는 화학적 링커에 의해 매우 강한 생물학적으로 활성인 약물 또는 약제, 예컨대 세포독소 및/또는 화학치료제, 상기 기재된 바와 같은 독소 또는 세포독소, 또는 방사성핵종에 콘쥬게이트되어, 본원에서 항-glycICP 항체-ADC로 지칭되는 항-glycICP 항체-약물 콘쥬게이트(ADC)를 생성한다. 생물학적으로 활성인 약물 또는 세포독성제는 예를 들어, 세포, 특히 항-glycICP 항체-ADC에 의해 결합되는 세포-표면 표적 수용체 또는 분자를 발현하는 종양 또는 암 세포 내로 전달되는 "세포독성 페이로드"로서 제공된다. 표적 분자에 결합된 상기 항-glycICP 항체-ADC는 세포독성 약물 페이로드가 방출되는 세포 내로 내부화된다. 매우 강한 세포독성 페이로드에 대한 콘쥬게이트를 통해 본원에 기재된 항-glycPD-L1 항체와 같은 항-glycICP 항체를 내부화시키는 암 세포-사멸 활성의 강화는 높은 항-종양 활성 및 일반적으로 잘 용인되는 가벼운 부작용을 갖는 항암 ADC 생물의약품을 제공한다.

[0173] 본원의 실시양태에 기재된 항-glycICP 항체는 당업계에 알려지고 사용되는 바와 같은, 또는 아직 상용화되지 않

은 다양한 유형의 세포독성 또는 DNA-작용 페이로드에 연결될 수 있다. 예를 들어, 마이탄신은 에티오피아 관목 *마이테누스 오바투스*(*Maytenus ovatus*)의 수피로부터 첫번째로 단리되는 벤조안사마크롤라이드(benzoansamacrolide)이다. 이 세포독성제 및 이의 유도체(예를 들어, 마이탄시노이드)는 빈카 알칼로이드 결합 부위에 인접한 튜불린에 결합한다. 이들은 미세소관의 단부에 위치한 튜불린에 대해 강한 친화도를 갖고 미세소관에 걸쳐 분포된 부위에 대해 낮은 친화도를 갖는 것으로 여겨진다. 미세소관 동역학의 억제는 세포가 세포 주기의 G2/M 단계에서 정지되도록 야기하여, 궁극적으로 아폽토시스에 의한 세포 사멸을 야기한다. (Oroudjev *et al., Mol. Cancer Ther.*, 10L2700-2713 (2010)). 2 종의 메이탄신 유도체(티올-함유 마이탄시노이드)는 비가역적 및 가역적 링커와 조합되어 광범위하게 사용되어온 DM1 및 DM4(ImmunoGen, Inc., Waltham, MA)를 포함한다. 특히, 티오에터 링커를 이용해 항체에 부착된 DM1은 "엠탄신"으로 지칭되고; SPP 링커를 이용해 항체에 부착된 DM1은 "메르탄신"으로 지칭된다. SPDB 링커를 이용해 부착된 DM4는 "라브탄신(ravtansine)"으로 지칭되고; sSPDB 링커를 이용해 부착된 DM4는 "소라브탄신(soravtansine)"으로 지칭된다. (ImmunoGen, Inc., Waltham, MA). 실시양태에서, 항-glycICP 항체-ADC는 튜불린-작용 마이탄시노이드 페이로드 DM1을 포함한다. 특별한 실시양태에서, 항-glycICP 항체-ADC는 항-glycPD-L1 항체-DM1이다. 실시양태에서, 항-glycICP 항체-ADC는 튜불린-작용 마이탄시노이드 페이로드 DM4를 포함한다. 특별한 실시양태에서, 항-glycICP 항체-ADC는 항-glycPD-L1 항체-DM4이다. 실시양태에서, 항-glycICP 항체-ADC는 DNA-작용 페이로드, 예를 들어 DGN462(ImmunoGen, Inc., Waltham, MA)를 포함한다. 특별한 실시양태에서, 항-glycICP 항체-ADC는 항-glycPD-L1 항체-DGN462이다. 실시양태에서, 항-glycPD-L1 항체-ADC의 항-glycPD-L1 항체 성분은 STM073, 또는 이의 결합 부분이다. 실시양태에서, 항-glycPD-L1 항체-ADC의 항-glycPD-L1 항체 성분은 STM108, 또는 이의 결합 부분이다.

[0174] 특별한 실시양태에서, 항-glycICP 항체에 콘쥬게이트된 세포독성제는 MMAE(모노메틸 아우리스타틴 E(또는 데스메틸-아우리스타틴 E)), 항유사분열 활성이 튜불린의 중합을 차단함으로써 세포 분열을 억제하는 것을 포함하는 높은 독성의 항신생물제이다. 국제 일반명 베도틴은 MMAE-항체 콘쥬게이트에서 MMAE와 항체에 대한 이의 연결 구조를 지칭한다. 더욱 특별한 실시양태에서, ADC는 항-glycPD-L1 항체-MMAE, 예를 들어 STM073-MMAE 또는 STM108-MMAE이다.

[0175] 다수의 화학적 링커가 알려져 있으며, 세포독성 또는 DNA-작용 약물 페이로드를 항체에 콘쥬게이트시켜 ADC를 생성하기 위해 사용된다. 항-glycICP 항체를 포함하는 ADC, 특히 본원에 기재된 바와 같은 이들의 표적에 결합한 이후 내부화하는 ADC를 생성하기 위해, 단독으로 또는 조합적으로 사용하기 위해 수용되는 특정 링커는 SMCC(4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산카복시산 N-하이드록시석신이미드 에스터); SPDB(N-석신이미딜 3-(2-피리딜디티오)부티레이트); SPP(N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트); 설포-SPDB 또는 sSPDB(N-석신이미딜-4-(2-피리딜디티오)-2-설포부타노에이트); 티오에터 링커 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카복실레이트(MCC); 및 vc(발린-시트룰린 디펩티드 링커)를 포함한다. 예로서, 조작된 링커(예를 들어, SMCC, SPDB, S-SPDB), (Immunogen, Inc.)는 종양에 대한 ADC의 결합 이전에 안정되고, 이어서 ACD가 암 세포 내부로 내부화되면 페이로드 효능을 최적화하도록 설계되었다. 다른 링커, 예컨대 카텝신 절단성 링커인 디펩티드 vc 링커는 세포독성제, 예컨대 돌라스타틴 10으로부터 유래된 유사분열 억제제인 아우리스타틴, 예를 들어 모노메틸아우리스타틴 E(MMAE), 예를 들어 베도틴에 항체를 콘쥬게이트시키기 위해 사용될 수 있다. 세포독소는 항체에 콘쥬게이트되어, 1 이상의 독소 분자가 각각의 항체 분자에 부착될 수 있으며, 예를 들어 항체 당 평균 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 개의 독소 분자가 있을 수 있다.

[0176] 특별한 실시양태에서, MMAE는 발린-시트룰린-*p*-아미노벤질옥시카보닐-MMAE(MC-vc-PAB-MMAE)에 결합된 말레이미도카프로일(MC) 부착기에 의해 항체 시스테인에 간접적으로 연결된다. "MC-vc-PAB-MMAE" 선형 구조에서, "MC"는 말레이미드 및 카프로산으로 구성되며, 전형적으로 H 사슬 상의 시스테인기를 통해 항체에 부착되는 모이어티이다. 결국, "MC"는 발린(Val) 및 시트룰린(Cit)으로 구성되고, 종양 또는 암 세포 내부의 카텝신에 의해 절단되는 카텝신 절단성 링커인 "vc" 링커에 부착된다. "vc"는 스페이서 "PAB", 즉 MMAE 세포독소가 연결되는 파라미노벤조산에 부착된다. MC-vc-PAB-MMAE ADC는 카텝신 B와 같은 프로테아제에 의해 절단될 때, 유리, 막-투과성 MMAE를 방출한다. 실시양태에서, 항체에 대한 링커는 세포외액에서 안정적이지만, ADC가 종양 또는 암 세포로 유입되면 카텝신에 의해 절단되어, MMAE 또는 다른 독소 약물의 항유사분열 메커니즘을 활성화한다. 다른 실시양태에서, 모노메틸아우리스타틴 F, (MMAF)는 말레이미도카프로일에 의해 항체 시스테인에 연결된다(MC-MMAF). MC-vc-PAB-MMAE ADC와 반대로, MC-MMAF ADC는 MCC-DM1 ADC와 같이 절단 불가능하며, 세포 내로 내부화 및 분해되어, 세포 내의 활성 약물로서 시스테인-MC-MMAF를 방출해야 한다.

[0177] 실시양태에서, 세포독성 페이로드는 ADC를 세포 내로 내부화한 다음, 리소좀 내로 방출된다. 리소좀에서, 리소좀 효소는 ADC의 항체 성분을 분해시킨다. 리소좀 분해 이후, 약물(및 약물-링커) 페이로드가 세포질 내로 방출

되며, 약물은 세포내 표적에 결합하여, 궁극적으로 세포 사멸을 야기한다. 최적으로는, 방출된 페이로드는 링커가 여전히 부착된 완전 활성이다. ADC에 결합된 표적이 리소좀으로의 열악한 수송을 야기하는 다른 실시양태에서, 표적 세포 외부에서 안정적이나, 세포 내에서는 항체 성분으로부터 페이로드를 절단하는 링커는 세포 내에서 페이로드 방출을 위한 대안적 방식을 제공하지만, 리소좀 외부에서는 그렇지 않다. 다른 실시양태에서, 링커는 세포외액에서 안정적이지만, ADC가 종양 또는 암 세포로 유입되면 카텝신에 의해 절단되어, 독소 약물의 항유사분열 또는 다른 세포독성 메커니즘을 활성화한다. 다른 실시양태에서, 절단성 링커의 작용에 의해 방출된 페이로드는 이웃한 암 세포에 유입되고, 방관자 효과를 통해 이들을 사멸시켜, ADC의 표적화 및 종양 사멸 활성을 증가시킬 수 있다.

[0178] 특별한 예로서, 세포 표면 PD-L1의 내부화를 촉진하는 항-PD-L1 MAb STM073 또는 STM108로 표현되는 바와 같은 항-glycICP 항체는 링커 SMCC(석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카복실레이트)를 통해 DM1에 결합된다. 다른 특별한 예에서, STM073 또는 STM108로 표현되는 바와 같은 항-glycICP 항체는 링커 SPDB(N-석신이미딜 3-(2-피리딜디티오)부티레이트) 또는 sSPDB(N-석신이미딜-4-(2-피리딜디티오)-2-설포부타노에이트)를 통해 DM4에 결합된다. 다른 특별한 예에서, 아우리스타틴 모노메틸아우리스타틴 E는 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-*p*-아미노벤질옥시카보닐(MC-vc-PAB-MMAE)에 의해 항-glycICP 항체, 예를 들어 STM073 또는 STM108의 시스테인 잔기에 연결된다. 특별한 실시양태에서, ADC는 STM108-MC-vc-PAB-MMAE 또는 STM073-MC-vc-PAB-MMAE이다.

[0179] 실시양태에서, 항-glycICP 항체-ADC는 분자 당 다중 단위의 MMAE와 같은 약물, 예컨대 분자 당 1-10, 1-5, 2-5, 3-5, 또는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 단위뿐 아니라, 이들 사이의 값의 MMAE와 같은 약물을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항체-약물 비는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 그 이상뿐 아니라, 2-10의 범위 및 이들 사이의 값일 수 있다. 실시양태에서, 항-glycICP 항체, 예를 들어 STM108 또는 STM073은 이중특이적, 다중특이적, 비파라토프, 또는 멀티파라토프 항체, 또는 이의 항원 결합 부분이다. 본원에 기재된 바와 같은 내부화 기능을 갖는 항-glycICP 항체를 포함하는 상기 ADC, 예를 들어 상술한 STM108-MC-vc-PAB-MMAE는 암 치료를 위한 종양 및 암 세포의 사멸에서 강화되고 다면적인 항신생물 효과를 제공한다. 약간의 예시적 이점으로서, 항-인간 glycICP MAb-ADC, 예를 들어 STM108-ADC는 PD-1/PD-L1 상호작용을 차단하여, 종양 세포에 대한 T 세포 면역력 및 이펙터 기능을 향상시킬 수 있고; 이는 종양 및 암 세포 상에 발현된 글리코실화된 PD-L1을 선택적으로 표적화할 수 있으며; 이는 결합 후에 종양 또는 암 세포 상에 PD-L1을 내부화하여, 종양 또는 암 세포 상에 표면-발현된 PD-L1을 감소시키고 PD-L1의 종양발생 가능성을 추가로 감소시킬 수 있으며; 이는 항체가 내부화되고 독성 약물이 방출되는 종양 또는 암 세포의 아폽토시스를 야기하여, 세포를 손상시키고 궁극적으로 사멸시킬 수 있으며; 이는 세포사멸된(apoptosed) 종양 또는 세포로부터의 독성 약물 방출을 통해 인근의 또는 이웃한 종양 또는 암 세포를 사멸시킴으로써 방관자 효과를 용이하게 할 수 있다.

[0180] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항체는 펩티드와 같은 마커에 콘쥬게이트 되어, 정제를 용이하게 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 마커는 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질로부터 유래된 에피토프에 상응하는 헥사-히스티딘 펩티드, 즉 헤마글루티닌 "HA" 태그(Wilson, I. A. *et al.*, *Cell*, 37:767-778 (1984)), 또는 "플래그(flag)" 태그(Knappik, A. *et al.*, *Biotechniques* 17(4):754-761 (1994))이다.

[0181] 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 항-glycICP 항체에 콘쥬게이트된 모이어티는 에세이에서 검출될 수 있는 이미징제일 수 있다. 상기 이미징제는 효소, 보결분자단, 방사성표지, 비방사성 상자성 금속 이온, 합텐, 형광 표지, 인광성 분자, 화학발광성 분자, 발색단, 발광성 분자, 생물발광성 분자, 광친화성 분자, 또는 유색 입자 또는 리간드, 예컨대 비오틴일수 있다. 실시양태에서, 적합한 효소는, 비제한적으로, 꽃양배추 퍼옥시다아제, 알칼리 포스파타제, 베타-갈락토시다아제, 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하고; 보결분자단 복합체는, 비제한적으로, 스트렙타비틴/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하며; 형광 물질은, 비제한적으로, 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아진일아민 플루오레세인, 댄실 클로라이드 또는 피코에리트린을 포함하고; 발광 물질은, 비제한적으로, 루미놀을 포함하며; 생물발광 물질은, 비제한적으로, 루시페라아제, 루시페린, 및 에쿼린을 포함하고; 방사성 물질은, 비제한적으로, 비스무트($^{213}$Bi), 탄소($^{14}$C), 크롬($^{51}$Cr), 코발트($^{57}$Co), 불소($^{18}$F), 가돌리늄($^{153}$Gd, $^{159}$Gd), 갈륨($^{68}$Ga, $^{67}$Ga), 게르마늄($^{68}$Ge), 홀뮴($^{166}$Ho), 인듐($^{115}$In, $^{113}$In, $^{112}$In, $^{111}$In), 요오드($^{131}$I, $^{125}$I, $^{123}$I, $^{121}$I), 란타늄($^{140}$La), 루테튬($^{177}$Lu), 망간($^{54}$Mn), 몰리브덴($^{99}$Mo), 팔라듐($^{103}$Pd), 인($^{32}$P), 프라세오디뮴($^{142}$Pr), 프로메튬($^{149}$Pm), 레늄($^{186}$Re, $^{188}$Re), 로듐($^{105}$Rh), 루테뮴($^{97}$Ru), 사마륨($^{153}$Sm), 스칸듐($^{47}$Sc), 셀레늄($^{75}$Se), 스트론튬($^{85}$Sr), 황($^{35}$S), 테크네튬($^{99}$Tc), 탈륨($^{201}$Ti), 주석($^{113}$Sn, $^{117}$Sn), 삼중수소($^{3}$H), 제논($^{133}$Xe), 이테르븀($^{169}$Yb, $^{175}$Yb), 이트륨($^{90}$Y), 아연($^{65}$Zn)을 포함하며; 다양

한 양전자 방출 단층촬영을 사용한 양전자 방출 금속, 및 비방사성 상자성 금속 이온을 포함한다.

[0182] 이미징제는 당업계에 알려진 기법을 사용하여 본원에 기재된 항체 또는 폴리펩티드에 직접적으로 또는 중간물(예컨대, 당업계에 알려진 링커)을 통해 간접적으로 콘쥬게이트될 수 있다. 예를 들어, 진단제로서 사용하기 위해 본원에 기재된 항체 및 다른 분자에 콘쥬게이트 될 수 있는 금속 이온에 대하여 보고된 미국 특허 제4,741,900호를 참고한다. 일부 콘쥬게이션 방법은, 예를 들어 항체에 부착되는 유기 킬레이트제, 예컨대 디에틸렌트리아민펜타아세트산 무수물(DTPA); 에틸렌트리아민테트라아세트산; N-클로로-p-톨루엔술폰아마이드; 및/또는 테트라클로로-3-6α-디페닐글리코우릴-3을 이용하는 금속 킬레이트 복합체의 사용을 포함한다. 단클론 항체는 또한 글루타르알데하이드 또는 과요오드산염과 같은 커플링제의 존재 하에 효소와 반응할 수 있다. 형광 마커와의 콘쥬게이트는 이들 커플링제의 존재 하에 또는 이소티오시아네이트와의 반응에 의해 제조될 수 있다.

[0183] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-glycICP 항체는 2 차 항체에 콘쥬게이트되어, 예를 들어 미국 특허 제4,676,980호에 기재된 바와 같은 항체 이종콘쥬게이트를 형성할 수 있다. 상기 이종콘쥬게이트 항체는 합텐(예를 들어, 플루오레세인), 또는 세포 마커, 또는 사이토카인, 또는 케모카인에 추가로 결합할 수 있다.

[0184] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-글리코실화된 ICP 항체는 또한 고체 지지체에 부착될 수 있으며, 이는 표적 항원, 또는 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편에 대한 결합을 통해 지지체에 고정화된 표적 항원에 결합할 수 있는 다른 분자의 면역에세이 또는 정제를 수행하는데 유용할 수 있다. 상기 고체 지지체는, 비제한적으로, 유리, 셀루로오스, 폴리아크릴아마이드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리프로필렌을 포함한다.

[0185] **실시예**

[0186] 본원의 실시예는 종양 또는 암 세포 상의 글리코실화된 형태로 안정적으로 발현되는, 본 발명자들에 의해 발견된 구체적이고 대표적인 ICP, 소위 PD-L1, 및 PD-L1의 글리코실화된 형태 및 이의 펩티드에 대해 생성된 항체에 관한 것이다. 상기 기재되고 본원에 예시된 방법에 의해 단리된 대표적인 항-glycPD-L1 항체는 STM004, STM115, STM073 및 STM108을 포함한다. 항체 STM004 및 STM115는 2016년 10월 6일 공개된 PCT 공보 WO2016/160792호에 개시되어 있으며; 항체 STM073 및 STM108은 2016년 7월 12일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/361,312호에 개시되어 있다. 당업자는 실시예가 PD-L1과 함께 종양 세포 상에 발현된 다른 글리코실화된 ICP, 및 이펙터 T 세포와 같은 면역 세포 상에 발현된 이의 리간드 ICP를 포괄할 수 있다는 점을 인식할 것이다.

[0187] **실시예 1 물질 및 방법**

[0188] *세포 배양, 안정된 형질감염체, 및 형질감염.* 모든 세포를 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(American Type Culture Collection)(ATCC)으로부터 얻었다. 이들 세포를 10 % 소태아혈청(fetal bovine serum)(FBS)이 보충된 DMEM/F12 또는 RPMI 1640 배지에서 성장시켰다. 퓨로마이신(InvivoGen, San Diego, CA, USA)을 사용하여 MDA-MB-468, BT549 및 293T 세포 내의 PD-L1 안정된 형질감염체를 선택하였다. 일시적 형질감염을 위해, SN 리포좀(Hu, M. C. et al., 2004, *Cell*, 117:225-237) 및 lipofectamine™ 2000(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 DNA, 예컨대 PD-L1을 코딩하는 DNA로 세포를 일시적으로 형질감염시켰다.

[0189] *렌티바이러스 감염을 사용한 안정된 세포의 생성.* 세포에서 PD-L1의 녹다운(knockdown) 발현(Shen, J. et al., 2013, *Nature*, 497:383-387)에 사용된 렌티바이러스계 shRNA(pGIPZ 플라스미드)를 shRNA/ORF 코어 퍼실리티(Core Facility)(UT MD Anderson Cancer Center)로부터 구매하였다. MDA-MB-231 또는 A431 세포에서 PD-L1 단백질 발현의 녹-다운 효능을 기본으로 하여, 본 발명자들은 본 연구를 위해 2 개의 shPD-L1 클론을 선택하였다. 성숙 안티센스 서열은 다음과 같다: TCAATTGTCATATTGCTAC(shPD-L1 #1, 서열번호 9), TTGACTCCATCTTTCTTCA(shPD-L1 #5, 서열번호 10). 내생 PD-L1을 녹다운시키고, 동시에 Flag-PD-L1을 재구성하기 위해 pGIPZ-shPD-L1/Flag-PD-L1 이중 발현 구축물을 사용하여, 본 발명자들은 내생 PD-L1 녹-다운 및 Flag-PD-L1 WT 또는 4NQ 돌연변이 발현 세포주를 수립하였다. PD-L1 및 Flag-PD-L1에 대한 렌티바이러스-발현 shRNA를 생성하기 위해, 본 발명자들은 293T 세포를 FuGENE 6 형질감염 시약과 함께 pGIPZ-비-침묵(벡터 대조군 바이러스에 대해), pGIPZ-shPD-L1, 또는 pGIPZ-shPD-L1/ PD-L1 WT, 또는 pGIPZ-shPD-L1/ PD-L1 4NQ 돌연변이로 형질감염시켰다. 형질감염 24 시간 후에 배지를 교환한 다음에, 상기 배지를 24 시간 간격으로 수집하였다. 렌티바이러스를 함유하는 수집된 배지를 원심분리하여 세포 잔해를 제거하고, 0.45-μm 필터를 통해 여과하였다. 세포를 감염 12 시간 전에 50% 콘플루언스(confluence)로 접종하고, 배지를 렌티바이러스를 함유한 배지로 교체하였다. 24 시간 동안의 감염 후, 배지를 신선한 배지로 교체하였으며, 감염된 세포를 1 μg/mL 퓨로마이신(InvivoGen)으로 선택하였다.

[0190] *플라스미드*. shRNA/ORF 코어 퍼실리티(UT MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA)로부터 인간 PD-L1 클론을 얻었으며, 알려진 분자 생물학 기법을 사용하여 pCDH 렌티바이러스 발현 벡터 내로 클로닝하여, PD-L1-Flag 또는 PD-L1-Myc 발현 세포주를 수립하였다. 또한, 인간 PD-L1 핵산 또한 일시적 형질감염을 위해 pEGFP-N1 및 pCMV-HA 포유동물 세포 발현 벡터 내로 클로닝하였다. pCDH / PD-L1-Flag 발현 벡터를 주형으로 사용하여, 하기 표 4에 나타낸 프라이머를 사용하는 부위 지향된 돌연변이유발을 수행함으로써 PD-L1-Flag NQ 돌연변이 N35Q, N192Q, N200Q, N219Q, 및 4NQ(N35Q/N192Q/N200Q/N219Q)를 생성하였다. 내생 PD-L1을 녹다운시키고, 동시에 Flag-PD-L1을 재구성하기 위한 pGIPZ-shPD-L1/Flag-PD-L1 이중 발현 구축물을 생성하기 위해, PD-L1 mRNA의 3'-UTR 영역을 표적화하는 shPD-L1 구축물(shPD-L1 #5)을 선택하였다. 내생 PD-L1에 대해 특이적인 shRNA를 발현하는 pGIPZ-shPD-L1(Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, USA) 내로 Flag-PD-L1 야생형(WT) 또는 4NQ 돌연변이 DNA를 클로닝하였다. 효소 분해 및 DNA 서열결정을 사용하여 모든 구축물을 확인하였다.

*표 4*

[0191] 표 4. 부위 지향된 돌연변이유발을 위한 프라이머

| 프라이머 | | 서열 (5'에서 3') |
|---|---|---|
| N35Q | 정방향 ( 서열번호 11) | gtggtagagtatggtagccaaatgacaattgaatgcaaa |
| | 역방향 ( 서열번호 12) | tttgcattcaattgtcatttggctaccatactctaccac |
| N192Q | 정방향 ( 서열번호 13) | gagaggagaagcttttccaggtgaccagcacactgag |
| | 역방향 ( 서열번호 14) | ctcagtgtgctggtcacctggaaaagcttctcctctc |
| N200Q | 정방향 ( 서열번호 15) | gaccagcacactgagaatccagacaacaactaatgagat |
| | 역방향 ( 서열번호 16) | atctcattagttgttgtctggattctcagtgtgctggtc |
| N219Q | 정방향 ( 서열번호 17) | gagagaggagaagcttttccaagtgaccagcacactgaga |
| | 역방향 ( 서열번호 18) | tctcagtgtgctggtcacttggaaaagcttctcctctctc |

[0192] *항체 및 화학물질*. 실시예에 기재된 실험에서는 다음 항체를 사용하였다: Flag(F3165; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); PD-L1(13684; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); PD-L1(329702; BioLegend, San Diego, CA, USA,); PD-L1(GTX117446; GeneTex, Irvine, CA, USA); PD-L1(AF156; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); PD-1(ab52587; Abcam, Cambridge, MA, USA).

[0193] *면역블롯 분석 및 면역세포화학*. 면역블롯 분석을 이전에 기재된 바(Lim et al., 2008, *Gastroenterology*, 135:2128-2140; and Lee et al., 2007, *Cell*, 130:440-455)와 같이 수행하였다. Odyssey® 적외선 영상화 시스템(LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA)을 사용하여 이미지 획득 및 밴드 강도의 정량화를 수행하였다. 면역세포화학을 위해, 세포를 실온에서 15 분 동안 4 % 파라포름알데하이드에서 고정시키고, 5 % 트리톤(Triton) X-100에서 5 분 동안 투과시킨 다음에, 1 차 항체를 사용하여 염색하였다. 사용된 2 차 항체는 항-마우스 Alexa Fluor 488 또는 594 염료 콘쥬게이트 및/또는 항-토끼 Alexa Fluor 488 또는 594 염료 콘쥬게이트(Life Technologies)였다. 4', 6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI 블루)(Life Technologies)을 사용하여 핵을 염색하였다. 장착 후에, 다광자 공초점 레이저-주사 현미경(Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)을 사용하여 세포를 시각화하였다.

[0194] *PD-L1 및 PD-1 상호작용 에세이*. PD-1 단백질과 PD-L1 단백질의 상호작용을 측정하기 위해, 세포를 실온에서 15 분 동안 4 % 파라포름알데하이드에서 고정시킨 다음에, 재조합 인간 PD-1 Fc 키메라 단백질(R&D Systems)과 함께 1 시간 동안 항온처리하였다. 사용된 2 차 항체는 항-인간 Alexa Fluor 488 염료 콘쥬게이트(Life Technologies)였다. 4', 6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI 블루)(Life Technologies)을 사용하여 핵을 염색하였다. 이어서, 마이크로플레이트 판독기 Synergy Neo(BioTeK, Winooski, VT, USA)를 사용하여 Alexa Fluor 488 염료의 형광 강도를 측정하고, 총 단백질 양에 의한 강도로 정규화하였다. 영상을 얻기 위해, 장착 후에, 공초점 레이저-주사 현미경(Carl Zeiss)을 사용하여 세포를 시각화하였다.

[0195] *통계 분석*. 막대 그래프에서의 데이터는 3 개의 독립 실험의 표준 편차를 이용하여 미처치 그룹 또는 대조군 그룹에 비교한 평균 배수 변화를 나타낸다. SPSS(Ver. 20, SPSS, Chicago, IL)를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 스피어만 상관관계(Spearman's correlation) 및 만-위트니 검정(Mann - Whitney test)을 사용하여 단백질 발현과 BLBC 서브세트(subset) 사이의 상관관계를 분석하였다. 실험 데이터에 대하여 스튜던트 t 테스트(Student's t test)를 수행하였다. $P$ 값 < 0.05는 통계적으로 유의미한 것으로 고려되었다.

[0196] **실시예 2 글리코실화된 PD-L1-결합 항체의 생성 및 스크리닝**

[0197] 이 대표적 실시예는 글리코실화된 ICP, 소위 글리코실화된 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 얻는 단계의 설명을 제공하지만; 본원에 기재된 방법은 다른 글리코실화된 면역 체크포인트 분자에 특이적으로 결합하여, 글리코실화된 ICP와 이의 상호작용 리간드의 연합을 예방함으로써 면역억제를 억제하는 항체를 생성하기 위해 적용 가능하다.

[0198] 표준화된 프로토콜에 따라, SP2/0 뮤린 골수종 세포와 인간 PD-L1-면역화된 BALB/c 마우스(n=6)(Antibody Solution, Inc.)로부터 단리된 비장 세포의 융합에 의해, 글리코실화된 인간 PD-L1에 대해 생성된 단클론 항체를 생성하는 하이브리도마를 얻었다. 융합 전에, 면역화된 마우스로부터의 혈청은 FACS 분석을 이용하여 PD-L1 면역원에 대한 결합에 대하여 확인되었다. 단클론 항체(MAb)-생성 하이브리도마를 생성하였다. 모든 MAb의 이소형은 IgG1이었다. 항체를 생성했던 하이브리도마를 글리코실화된 PD-L1에 대한 특이성에 대해 다시 시험하였다. 이를 위하여, 42 개의 후보 MAb-생성 하이브리도마를 선택하고, ADCF 배지에서 성장시켰으며, 이들의 단클론 항체-함유 상청액을 농축 및 정제하였다.

[0199] 비글리코실화된 PD-L1에 비해 글리코실화된 PD-L1 항원에 특이적이고, 비글리코실화된 PD-L1에 비해 글리코실화된 PD-L1 항원에 우선적으로 결합하는 항-glycPD-L1 MAb를 확인하기 위해, 상이한 유형의 에세이를 수행하였다. 글리코실화된 PD-L1에 대한 MAb의 우선적 결합을 검출하기 위한 스크리닝 에세이에서, FACS 분석(막 결합된 단백질을 사용함)을 통해 시험되는 항체를 인식하는 2 차 항체의 형광 강도 측정을 기본으로 하여 항체 결합을 결정하였다. 예로서, 상기 에세이는 BT549 인간 유방암 세포주를 사용하여 수행하였다. 예시적으로, 종래 절차에 따라 PD-L1 WT(완전 글리코실화됨)를 과잉발현하는 BT549 세포를 비오틴으로 표지한 다음에, 비오틴으로 표지되지 않은 PD-L1 4NQ(완전 비글리코실화된 PD-L1 변이체)를 과잉발현하는 BT549 세포와 혼합하였다. 혼합된 세포를 시험될 항체 및 PE와 콘쥬게이트된 재조합 스트렙타비딘(rSA-PE)과 함께 항온처리하였다. 세포를 FITC와 콘쥬게이트된 2 차 항체(SA-FITC)와 함께 추가로 항온처리하였다. 세척 후에, 세포를 게이팅(gate)하여, 비오틴-rSA-PE 표지된 세포(글리코실화된 PD-L1)와 비오틴-rSA-PE로 표지되지 않은 세포(비글리코실화된 PD-L1 4NQ 세포)를 분리하였다. 평균 형광 강도(MFI)를 측정하여, FITC 콘쥬게이트된 2 차 항체(SA-FITC)를 통해 막 결합된 WT 또는 4NQ PD-L1에 대한 항-PD-L1 항체의 상대적 결합을 평가하였다. 4NQ PD-L1에 비해 WT PD-L1에 대해 상당히 높은 MFI를 나타낸 항체를 추가 평가를 위해 선택하였다. STM004, STM073, STM108, 및 STM115 항-glycPD-L1 MAb의 형광 결합 분석에 대한 결과를 하기 표 5에 나타내었며, 이는 변이체(비글리코실화된 4NQ) PD-L1을 발현하는 BT549 세포(BT549PD-L1 4NQ 세포)에 결합하는 항체와 비교하여 야생형(글리코실화된) PD-L1을 발현하는 BT549 세포(BT549PD-L1WT 세포)에 결합하는 항체에 대한 MFI 값을 나타낸다.

*표 5*

**표 5. 항-glycPD-L1 MAb 에 대한 평균 형광 강도 값**

[0200]

| MAb | MFI (BT549PD-L1WT 세포) | MFI (BT549PD-L1 4NQ 세포) |
|---|---|---|
| STM004 | 42.53 | 8.70 |
| STM073 | 63.90 | 12.21 |
| STM108 | 117.42 | 27.57 |
| STM115 | 51.14 | 21.31 |

[0201] 다른 에세이에서, 글리코실화된 인간 PD-L1 단백질 및 비글리코실화된 PD-L1, 즉 PNGase F로 처치된 PD-L1 단백질 둘 다를 고상(solid phase)에 코팅하고, PD-L1 항원에 대한 MAb의 결합 친화도에 대해 시험하였다. "PD-L1 항원"은 "PD-L1 단백질"과 동의어임을 이해할 것이다. 12 개의 MAb가 비글리코실화된 PD-L1 단백질(PNGase F 처치된 단백질)과 비교하여 글리코실화된 PD-L1 단백질과 더 높은 친화도 상호작용을 나타내었다. 추가 특이성 분석을 위해, 선택된 MAb를 웨스턴 블롯 및 FACS 유세포분석에 의해 분석하였다. 다양한 분석으로부터, STM004, STM073, STM108, 및 STM115와 같은 MAb가 PD-L1의 비글리코실화된 형태와 비교하여 PD-L1의 글리코실화된 형태에 특이적으로 결합하는 것이 발견되었으며, 이는 글리코실화된 PD-L1 항원에 대한 이들 MAb의 특이성을 추가로 입증하였다. **도 1**을 참고한다.

[0202] 일부 경우에, 정제된 MAb를 생세포 영상화 에세이인 IncuCyte™, (Essen Bioscience)를 사용하여 PD-L1과 PD-1 사이의 상호작용(PD-L1/PD-1 상호작용)을 중화하거나 억제하는 이들의 능력에 대해 추가로 시험하였다. 이 에세

이를 위해, PD-L1을 발현하는 BT-549 세포를 항-인간 PD-L1 항체 및 형광-표지된 PD-1-Fc 융합 단백질과 함께 항온처리하였다. 리간드 및 수용체 결합을 IncyCyte™Zoom에 의해 매시간마다, 제조사의 지시에 따라 정량화하였다. 시험된 42 개 MAb의 이 에세이를 기본으로 하여 **도 2**에 나타낸 바와 같이, 15 개 MAb는 PD-1에 대한 PD-L1의 결합을 완전히 차단하였다.

[0203] 웨스턴 블롯 및 유세포분석에 의해 글리코실화된 PD-L1에 대한 우선적 결합을 입증하였다. **도 3b**는 본원에 기재된 스크리닝 방법에 의해 확인된 항-glycPD-L1 항체 중 5 개가 글리코실화된 PD-L1("WT")에 결합하지만, 비글리코실화된 PD-L1 4NQ에는 그렇지 않음을 입증한다. 또한, **도 3c**는 유세포분석에 의해 비글리코실화된 PD-L1 4NQ 돌연변이에 비교한 글리코실화된 또는 WT PD-L1에 대한 이들 5 개 항체의 우선적 결합을 입증한다.

[0204] **실시예 3 특이적 글리코실화된 PD-L1-결합 항체의 결합 영역의 확인**

[0205] 글리코실화된 PD-L1에 결합되는 단클론 항-glycPD-L1 항체의 영역을 확인하기 위해, 야생형(글리코실화된) PD-L1(PD-L1 WT) 및 글리코실화 변이체 단백질 N35/3NQ, N192/3NQ, N200/3NQ, 및 N219/3NQ(**도 4a-4c**)를 PD-L1 녹다운 BT549 세포에서 과잉발현시켰다. **도 4c**에서 웨스턴 블롯에 의해 결정된 바와 같이, 일부 MAb는 다른 PD-L1 돌연변이와 비교하여 더 높은 수준의 결합으로 특정 PD-L1 돌연변이를 인식하였으며, 이는 상기 MAb가 인식된 글리코실화에 대해 부위-특이적이라는 것을 입증하였다. 또한, 간암 세포 용해액을 사용한 웨스턴 블롯 분석 또한 상이한 항-glycPD-L1 항체가 상이한 패턴의 PD-L1 글리코실화를 인식한다는 것을 밝혀내었다(**도 4d**).

[0206] **실시예 4 항-glycPD-L1 항체를 사용한 면역조직화학 염색**

[0207] 이들 MAb의 병리조직학적 타당성을 면역조직화학(IHC) 염색에 의해 **도 5**에 나타낸 바와 같이 추가로 입증하였다. 사이토스핀 염색 분석에서, 항-glycPD-L1 단클론 항체는 글리코실화된 PD-L1 단백질을 지속적으로 인식하고 이에 결합하였으나, 비글리코실화된 PD-L1 단백질은 그렇지 않았다. 인간 삼중 음성 유방암 환자 샘플에서, 항-glycPD-L1 단클론 항체는 또한 1:30 비로 막 및 세포질 염색을 나타내었다. 이들 데이터는 항-glycPD-L1 단클론 항체가 글리코실화된 PD-L1의 검출을 위한 바이오마커 분석에서 바이오마커로서 사용될 수 있음을 입증하였다.

[0208] **실시예 5 결합 에세이**

[0209] 본원에 기재된 바와 같은 항-glycPD-L1 단클론 항체가 PD-1과 PD-L1의 상호작용을 특이적으로 억제하는지 여부를 결정하기 위해, 다음 결합 에세이를 수행하였다. 에세이 0 일차에, PD-L1-발현 BT549 표적 세포 배양액으로부터 혈청-함유 배지를 제거하고, D-PBS로 부드럽게 2 회 세정(rinse)하였다. 세포를 수집하고 계수하였다. 세포 현탁액을 원심분리(1000 RPM, 5 분)하고, 세포 펠릿을 50,000 세포/mL로 배양 배지에서 재현탁하였다. 수동 멀티채널 피펫을 사용하여, 평평한 바닥 마이크로플레이트의 모든 웰에 세포를 접종(100 µL/웰, 즉 5000 세포/웰)하였다. 상기 플레이트를 주위 온도에서 30 분 동안 방치하였다. 그 후에, 세포를 함유한 상기 플레이트를 5% $CO_2$ 항온처리기에서 밤새 항온처리하였다.

[0210] 에세이 1 일차(즉, 다음 아침)에, 1 ㎍/mL PD-1/Fc 및 1:400 희석액의 Alex Fluor 488-염소 항-인간 IgG를 함유한 배양 배지를 제조하고, 항온처리기에서 37℃까지 승온하였다. 세포 플레이트를 항온처리기에서 제거하고, 세포 층을 손상시키지 않도록 주의하면서, 배지를 흡입하였다. 50 µL의 시험 항체를 각각의 웰에 용량-의존 방식으로 첨가하였다. PD-1/Fc 및 Alex Fluor 488-염소 항-인간 IgG를 함유한 50 µL의 배양 배지를 모든 웰에 첨가하였다. 세포 플레이트를 IncuCyte ZOOM® 기구 내에 위치시키고, 1 차 스캔 전에 20 분 동안 평형화시켰다. 24 시간 자동 반복 스캐닝(10x)이 최대 24 시간 동안 1-2 시간마다 예정되었다. 대물렌즈: 10x; 용기 유형: Corning 3596; 스캔 방식: 표준; 스캔 패턴: 웰 당 4 개 영상; 채널: 위상(Phase) + "녹색". 상이한 농도의 대표적인 단클론 항-glycPD-L1 항체의 결합을 대조군(**도 6d**)과 비교하여 **도 6a-6c**에 나타낸다. **도 6a**는 STM004에 대한 결과를 나타내고, **도 6b**는 STM073에 대한 결과를 나타내며, **도 6c**는 STM108에 대한 결과를 나타낸다. 항-glycPD-L1 항체의 농도 증가에 따른 PD-1에 대한 결합 감소는 항-glycPD-L1 항체가 PD-1에 대한 PD-L1 결합을 억제한다는 것을 입증한다.

[0211] **실시예 6 T 세포 사멸 에세이**

[0212] 종양 세포에 대한 항-glycPD-L1 단클론 항체의 세포독성 활성을 결정하기 위해 T 세포 사멸 에세이를 이용하였다. 따른 프로토콜은 다음과 같다: 0 일차에, 글리코실화된 야생형 PD-L1- (PD-L1 WT) 발현 BT549 RFP 표적 세포 배양액으로부터 혈청-함유 배지를 제거하고, PBS로 부드럽게 2 회 세정하였다. 세포를 수집하고 계수하였다. 세포 현탁액을 원심분리(1000 RPM, 4 분)하고, 세포 펠릿을 50,000 세포/mL로 배양 배지에서 재현탁하였다. 수

동 멀티채널 피펫을 사용하여, 평평한 바닥 마이크로플레이트의 모든 웰에 세포를 접종(100 μL/웰, 즉 5000 세포/웰)하였다. 상기 플레이트를 주위 온도에서 30 분 동안 방치한 다음에, IncuCyte ZOOM® 생세포 영상기 내에 위치시켰으며, 이를 1 차 스캔이 예정되기 전에 20 분 동안 방치하여 평형화시켰다. 24 시간 반복 스캐닝(10x 대물렌즈)이 1 차 스캐닝 개시 직후 3 시간마다 예정되었다. 소망하는 콘플루언스(예를 들어, 20%)가 달성될 때까지 다음 18 시간 동안(밤새) 세포 콘플루언스를 모니터링하였다.

[0213] 다음 아침, 에세이 당일(즉, 1 일차)에, IncuCyte™ 카스파아제 3/7 아폽토시스 녹색 형광 검출 시약(Essen BioScience 4440)의 10 μM 용액을 에세이 배지(4x 2.5 μM의 최종 에세이 농도)에서 제조하고, 항온처리기에서 37℃까지 승온하였다. 에세이 배지에서 4x 최종 에세이 농도의 항-CD3 항체(100 ng/mL) + IL-2(10 ng/mL) T 세포 활성제 치료제를 제조하고 37℃까지 승온하였다. 시험 MAb을 또한 제조하였다. 표적 세포 플레이트를 항온처리기에서 제거하고, 세포 층을 손상시키지 않도록 주의하면서, 배지를 흡입하였다. 멀티채널 피펫을 사용하여, 25 μL의 승온된 카스파아제 3/7 용액을 각각의 웰로 옮겼다. 그 후에, 25 μL의 승온된 항-CD3 항체 + IL-2, 및 항체를 세포 플레이트의 적절한 웰 내로 위치시켰다. 이펙터 세포(PBMC 또는 총 T 세포)를 함유한 추가의 50 μL 배지를 첨가하여 100 μL의 총 에세이 부피를 형성하였다. 거품 제거된 세포 플레이트를 IncuCyte ZOOM® 기구 내에 위치시키고, 1 차 스캔 전에 20 분 동안 평형화시켰다. 24 시간 반복 스캐닝이 최대 5 일 동안 2-3 시간마다 예정되었다. (대물렌즈 10x; 용기 유형: Corning 3596; 스캔 방식: 표준; 스캔 패턴: 웰 당 2 개 영상; 채널: 위상 + "녹색"(NucLight™ Red 표적 세포가 사용된 경우, + "적색").

[0214] 분석을 위해, 시간에 걸쳐 시야에서 "큰" 녹색-형광 물체(핵)의 총 수를 계수함으로써, IncuCyte™ 소프트웨어로 표적-세포 아폽토시스를 정량화하였다. 적색 세포 핵의 수에 상응하는 적색 물체 수로부터 표적 세포의 증식을 측정하였다. 데이터를 $mm^2$ 당 형광 물체의 수로서 나타내었다. 데이터는 시험된 항체의 첨가를 통한 종양 세포 사멸의 향상을 나타내었다. **도 7a**는 STM004에 대한 결과를 나타내고, **도 7b**는 STM073에 대한 결과를 나타낸다.

[0215] **실시예 7 항-glycPD-L1 항체에 의한 PD-L1의 결합은 PD-L1 내부화 및 분해를 촉진한다**

[0216] 항-glycICP 항체가 이의 동족 ICP 결합 분자에 대한 결합 후에 내부화 및 분해를 촉진하는지 여부를 결정하기 위해, 세포 염색 에세이를 수행하였다. 이 실시예에서, 사용된 항-glycICP 항체는 항-PD-L1 MAb, STM108이었다. 에세이를 위해, A431 세포를 무혈청 배지에서 밤새 항온처리한 다음에, 10 ㎍의 항-glycPD-L1 항체와 함께 2 일 동안 항온처리하였다. 이어서, 세포를 수집하고, 세포 내의 PD-L1을 웨스턴 블롯에 의해 평가하였다. 항-glycPD-L1 MAb를 이용한 세포의 항온처리는 대조군(IgG)과 비교하여 세포에서 PD-L1의 수준 감소를 나타내었다.

[0217] pHrodo™ Red 마이크로스케일 표지 키트(ThermoFischer Scientific, Rochester, NY)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 pHrodo™ Red 염료로 항체를 표지함으로써 STM108 MAb의 세포 내부화를 시각화하였다. 간략하게는, 분석을 위해, 세포를 0 시에 접종하고; 접종 24 시간 후에, 세포를 표지된 STM108 MAb(5 ㎍/mL)와 함께 항온처리하였다. 1 시간 후에, IncuCyte ZOOM® 기구를 사용하여 1 시간마다 예정된 24 시간 반복 스캐닝(10x)으로 세포의 영상 스캔을 시작하였다. 대물렌즈: 10x; 용기 유형: Corning 356407; 스캔 방식: 표준; 스캔 패턴; 웰 당 3 개 영상; 채널: 위상 + "적색".

[0218] **도 8a-8c**는 BT549-PD-L1 세포 상에 발현된 PD-L1에 대한 항-glycPD-L1 MAb STM108의 결합 후에 생세포 영상화 분석을 통한 PD-L1 내부화 및 분해의 예를 제공한다. **도 8a-8c**에서, STM108은 상기 기재된 바와 같이 pHrodo™ Red 마이크로스케일 표지 키트(ThermoFisher Scientific, Rochester, NY)를 사용하여 적색 형광 염료인 pHrodo™ Red(석신이미딜 에스터(pHrodo™ Red, SE)에 콘쥬게이트 된다. 녹색 염색은 생세포 영상화를 통해 영상화된 생세포에서 산성 구획(리소좀)을 염색시키는 세포 침투성 녹색 염료인 LysoTracker® Green DND-26으로 염색된 세포를 나타낸다. **도 8a**는 제1 시점(0 시)에, 화살표로 나타낸 세포의 강한 적색 세포내 염색에 의해 관찰된 바와 같이 STM108 항체가 세포 내로 내부화된다는 것을 나타낸다. **도 8b**는 **도 8a**의 0 시의 2 분 후 시점에 **도 8a**에 도시된 동일한 세포에서 약화된 세포내 적색 염색을 나타낸다. **도 8c**는 **도 8a**의 0 시의 4 분 후에 적색 세포내 염색의 결여를 나타내며, 이는 세포 내부의 STM108 항체 및/또는 항체-항원 복합체의 분해를 나타낸다. 이들 영상은 항-glycICP 항체, 소위 STM108 MAb와 같은 항-glycPD-L1 항체가 세포 표면 상에 발현된 PD-L1에 대한 결합 후에 PD-L1의 내부화 및 분해를 유발하였다는 것을 나타낸다.

[0219] **실시예 8 총 T 세포에 비교하여 종양 세포에서 항-glycPD-L1 항체에 의해 결합된 PD-L1의 내부화**

[0220] 항-glycPD-L1 항체를 활성화되거나 비활성화된 T 세포와 비교하여, 세포-표면 발현된 PD-L1 결합 후에 PD-L1 양성 종양 세포 내로 내부화하는 능력에 대해 시험하였다. 항-glycPD-L1 항체 STM004, STM073 및 STM108, 및 대조군으로서의 마우스 IgG를 PD-L1을 발현하는 말초 혈액으로부터의 비활성화된 총 T 세포, 말초 혈액으로부터의 활성화된 총 T 세포 및 NCI-H226 세포와 함께 항온처리하였다. T 세포 활성화를 위해, 총 T 세포를 비드, 예를 들어 항-CD3 및 항-CD28 항체(예를 들어, ThermoFisher Scientific, Rochester, NY)와 1:1 비로 공유 결합된 불활성 초상자성 비드와 혼합하여, 항원-제시 세포에 의한 자극(예를 들어, A. Trickett et al., 2003, *J. Immunol. Methods*, 275, Issues 1-2:251-255 참고)을 모방한 방식으로 T 세포를 자극하였다. 모든 항체를 pHrodo™ Red로 표지하고, 내부화를 상기 기재된 바와 같이 시각화하였다. **도 9a-9d** 및 **도 9e-9h**는 시험된 어떠한 항체도 비활성화된 총 T 세포 또는 활성화된 총 T 세포 내로 내부화되지 않았음을 나타낸다. **도 9i-9l**은 적색 세포내 염색을 나타내지 않는 표지된 대조군 항체인 mIgG(**도 9i**) 및 표지된 비-내부화 STM004 MAb(**도 9j**)와 비교하여, 적색 세포내 염색에 의해 입증된 바와 같이, STM073 및 STM108 MAb가 이들 세포를 이용한 항온처리 후에 NCI-H226 세포 내로 내부화되었음을 나타낸다. 이 실시예는 항-glycPD-L1 항체 STM073 및 STM108이 PD-L1-발현 종양 세포 내로 선택적으로 내부화되지만, 활성화되거나 비활성화된 T 세포 내로 내부화되지 않는 항-glycICP 항체의 예라는 것을 입증한다.

[0221] **실시예 9 종양 세포 사멸 및 종양 부피의 감소에서 PD-L1 ADC의 효능**

[0222] 종양 사멸 및 종양 부피 감소에서 세포독성 MMAE에 결합된 항-인간 ICP 항체, 특히 항-인간 glycPD-L1 MAb, 즉 STM108 MAb를 포함하는 ADC의 효능을 평가하기 위해 *시험관내* 및 *생체내* 실험 둘 다를 수행하였다. STM108-ADC는 PD-L1-발현 종양 또는 암 세포에 대한 MMAE 세포독성 페이로드의 특이적 전달을 위해, 상기 본원에 기재된 바와 같이 시스테인을 통해 MC-vc-PAB-MMAE에 화학적으로 연결된 STM108 MAb를 포함한다. STM108-ADC(STM108-MC-vc-PAB-MMAE)의 측정된 물리적 특성은 다음과 같다:

[0223]

| | |
|---|---|
| ADC의 $A_{248nm}$ | 2.548 |
| ADC의 $A_{280nm}$ | 3.635 |
| 비 $A_{248nm}/A_{280nm}$ | 0.70 |
| 약물 항체 비 | 4.13 |

[0224] 이 실시예와 관련하여, **도 10a-10d**는 대조군(IgG 및 STM108 MAb 단독)과 비교하여 종양-이식된 마우스에서 PD-L1-발현 및 비-PD-L1-발현 종양 세포 사멸 및 종양의 부피 감소에서 STM108-ADC의 효능을 평가하기 위해 수행된 실험의 결과를 나타낸다. **도 10a**는 상이한 농도의 STM108-ADC, 즉 "ADC108"에 노출된 후에 PD-L1의 MB231의 발현을 녹아웃시키도록 분자 조작된 MB231 세포("MB231 PDL1 KO")의 % 생존도(채워진 흑색 사각형)와 비교하여, 상이한 농도(nM)의 STM108-ADC에 노출된 후에 PD-L1-발현 MDA-MB231(인간 유방암종 세포주) 종양 세포("MB231")의 % 생존도(채워진 흑색 원)를 나타낸다. 관찰된 바와 같이, 표면 상에 PD-L1을 발현하지 않은 MB231 세포의 생존도는 최고 농도의 STM108-ADC에 의해 상당한 영향을 받지 않은 반면에, PD-L1-발현 MB231 세포의 생존도는, 특히 1 nM 내지 100 nM의 STM108-ADC 농도에서 상당히 감소되었다. **도 10b**에서, MB231 세포로부터 유래된 종양이 이식된 동물을 IgG-MMAE 대조군(100 μg); 50 μg, 100 μg, 또는 150 μg의 STM108 ADC; 또는 STM108 MAb 단독(100 μg)으로 처치한 유방암의 MDA-MB231 마우스 모델을 사용하였다. 상기 결과는 IgG-MMAE 대조군으로 처치된 동물과 비교하여, 모든 농도 수준의 STM108-ADC뿐 아니라, 일부 정도의 STM108 MAb (100 μg)로 처치된 종양-보유 동물에서 종양 부피가 효과적으로 감소되었음을 입증하였다. 또한, 놀랍게도 약 18 일 차에 STM108-ADC(100 μg)로 처치된 5 마리 동물 중 3 마리(3/5) 및 STM108-ADC(150 μg)로 처치된 5 마리 동물 중 4 마리(4/5)에서 완전 완화(complete remission)("CR")가 발생한 것으로 밝혀졌다.

[0225] **도 10c**는 상이한 농도의 STM108-ADC, 즉 "ADC108"에 노출된 후에 PD-L1을 자연적으로 발현하지 않는 4T1 세포("4T1")의 % 생존도(채워지지 않은 적색 사각형)와 비교하여, 상이한 농도(nM)의 STM108-ADC에 노출된 후에 세포 표면 상에 인간 PD-L1을 발현하도록 분자 조작된 4T1 유방 암종 세포("4T1 hPDL1")의 % 생존도(채워지지 않은 적색 원)를 나타낸다. 관찰된 바와 같이, 표면 상에 PD-L1을 발현하지 않는 4T1 세포의 생존도는 최고 농도의 STM108-ADC에 의해 상당한 영향을 받지 않은 반면에, PD-L1-발현 4T1 세포의 생존도는 10 nM 내지 100 nM을 초과하는 STM108-ADC 농도에서 감소되었다.

[0226] 동물(Balb/c 마우스)이 PD-L1 또는 세포 표면을 발현하도록 분자 조작된 4T1 유방 암종 세포로부터 유래된 종양

을 이식받거나("4T1 hPD-L1"), Balb/c 마우스가 세포 표면 상에 PD-L1을 자연적으로 발현하지 않는 비형질감염된 4T1 유방 암종 세포로부터 유래된 종양을 이식받은("4T1") 유방암의 4T1 동계 마우스 모델을 사용하였다. BALB/c 마우스(6- 내지 8-주령 암컷; Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA)에 관한 모든 절차는 MD Anderson의 실험 동물 운영 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 승인된 지침 하에서 수행하였다. 마우스를 평균 종양 부피에 따라 각각의 그룹으로 나누었다. 4T1 세포(25 μL의 매트릭스겔 베이스먼트 멤브레인 매트릭스(Matrixgel Basement Membrane Matrix)[BD Biosciences, San Jose, CA, USA]와 혼합된 25 μL의 배지 중 1 x $10^5$ 세포)를 유방 지방체(mammary fat pad) 내로 주사하였다. 마우스의 종양 세포 접종 3, 5, 7, 9, 11, 및 13 일 후에 IgG-MMAE 대조군(100 ㎍), STM108 MAb(100 ㎍), 또는 STM108-ADC(150 ㎍)를 복강내로 주사하였다. 종양을 3 일마다 캘리퍼로 측정하고, 다음 식을 사용하여 종양 부피를 계산하였다: π/6 x 길이 x $폭^2$.

[0227] **도 10d**에서 관찰된 바와 같이, 세포-표면 PD-L1 발현을 거의 갖지 않거나, 전혀 갖지 않는 4T1-유래 종양을 보유하는 동물(채워지지 않은 원/점선)에서는, 종양 부피가 모든 처치 유형, 즉 IgG-MMAE 대조군, STM108 MAb, 또는 STM108-ADC에 대해 시간에 걸쳐 증가하는 결과가 나타났다. PD-L1-발현 4T1 세포로부터 유래된 종양을 보유하고 IgG-MMAE 대조군으로 처치된 동물에서, 처치된 종물의 종양 부피가 또한 시간에 걸쳐 증가하였다(순흑색 원). 반대로, PD-L1-발현 4T1 세포로부터 유래된 종양을 보유하고 STM108 MAb(순청색 원) 또는 STM108-ADC(순적색 원)로 치료된 동물에서는, 종양 부피가 효과적으로 감소하였다. 또한, 놀랍게도 약 21 일 차에 STM108-ADC로 처치된 7 마리 동물 중 5 마리(5/7)에서 완전 완화("CR")가 발생한 것으로 밝혀졌다.

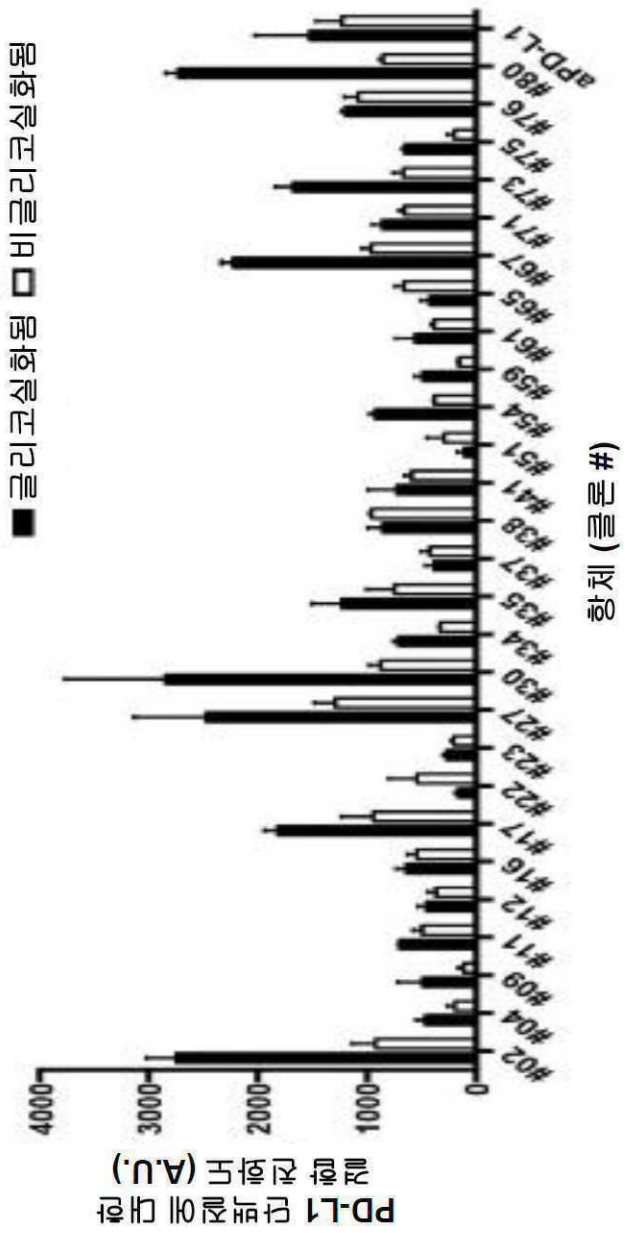
[0228] 암, 예를 들어 2 개 유형의 유방암을 치료시, 항-glycICP 항체, 예를 들어 상기 본원에 기재된 STM108와 같은 항-glycPD-L1 MAb를 포함하는 ADC의 사용과 관련된 유익하고 효과적인 항신생물 및 치료 양태는 처치 후 25 일 이내에, 예를 들어 약 15-23일에 항-glycPD-L1 MAb ADC로 처치된 동물에서 종양 부피의 상당한 감소 및 종양의 완전 완화를 나타내는 *생체내* 결과에 의해 강조된다.

[0229] 본원에 개시되고 청구된 모든 방법은 본 발명의 측면에서 과도한 실험 없이 이루어지고 실행될 수 있다. 조성물 및 방법은 바람직한 실시양태의 측면에서 기재된 한편, 다양한 변형이 본원에 기재된 방법의 단계 또는 단계의 순서에서 이의 개념, 의의 및 범위를 벗어나지 않으면서, 상기 방법에 적용될 수 있다는 것은 당업자에게 명확할 것이다. 더욱 구체적으로, 화학적 및 생리학적 둘 다로 관련된 특정 약제는 본원에 기재된 약제로 치환될 수 있는 반면에, 동일하거나 유사한 결과가 달성될 것이라는 점은 명확할 것이다. 당업자에게 명확한 모든 상기 유사한 치환 및 변형은 첨부된 청구범위에 의해 정의된 바와 같이 기재된 실시양태의 의의, 범위 및 개념 내에 있는 것으로 여겨진다.

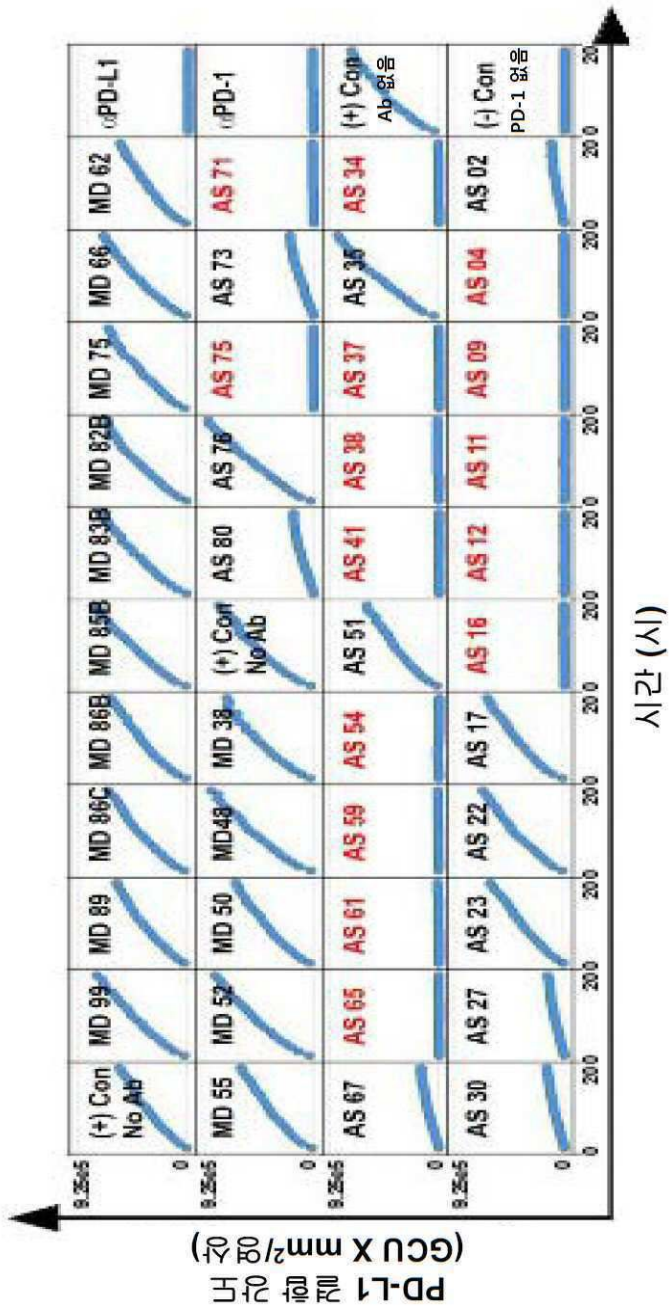
[0230] 본원에 인용된 모든 특허, 공개된 특허 출원, 및 다른 간행물은 본 출원에서 참고로 본원에 포함된다.

도면

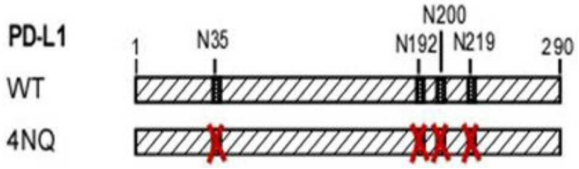
도면1


■ 글리코실화됨 □ 비글리코실화됨
PD-L1 단백질에 대한 결합 친화도 (A.U.)
4000
3000
2000
1000
0
항체 (클론 #)
#02
#04
#09
#11
#12
#16
#17
#22
#23
#27
#30
#34
#35
#37
#38
#41
#51
#54
#59
#61
#65
#67
#71
#73
#75
#76
#80
aPD-L1

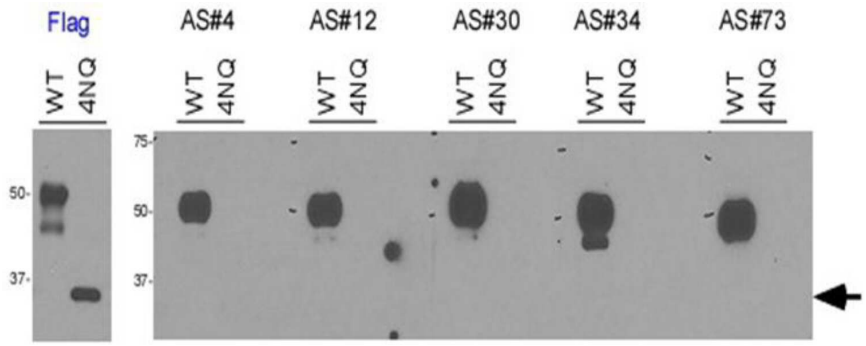
도면2


PD-L1 발현 강도
(GCU x mm²/영상)
시간 (시)
(+) Con No Ab
MD 99
MD 89
MD 86C
MD 86B
MD 85B
MD 83B
MD 82B
MD 75
MD 66
MD 62
αPD-L1
MD 55
MD 52
MD 50
MD48
MD 38
(+) Con No Ab
AS 80
AS 76
AS 75
AS 73
AS 71
αPD-1
AS 67
AS 65
AS 61
AS 59
AS 54
AS 51
AS 41
AS 38
AS 37
AS 35
AS 34
(+) Con Ab 없음
AS 30
AS 27
AS 23
AS 22
AS 17
AS 16
AS 12
AS 11
AS 09
AS 04
AS 02
(-) Con PD-1 없음
0
200
9.2e+5

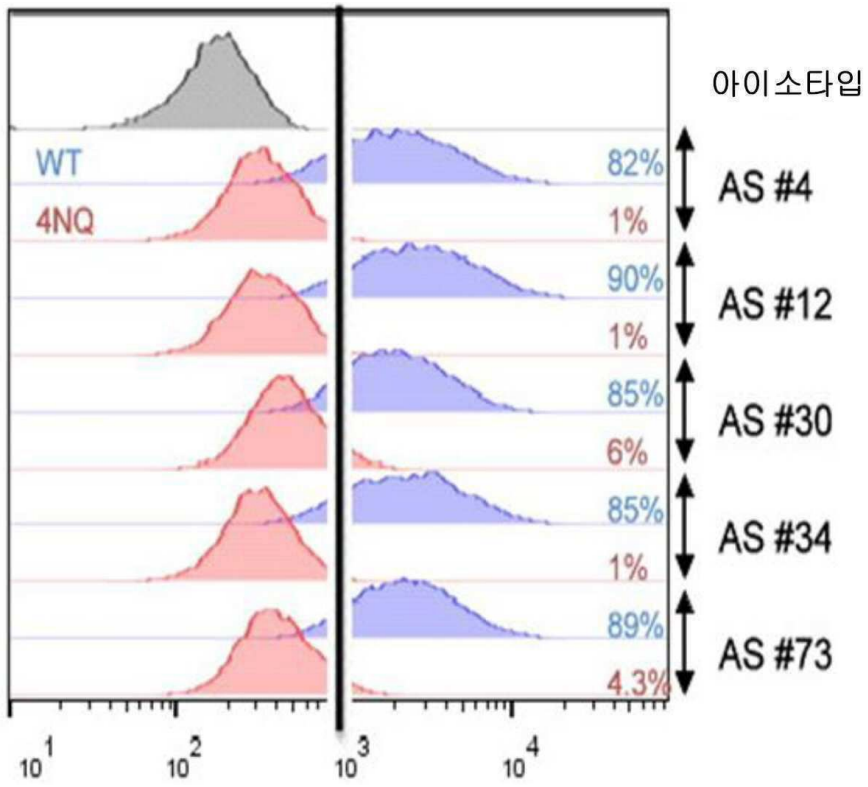
도면3a


PD-L1
WT
4NQ
1
N35
N192
N200
N219
290

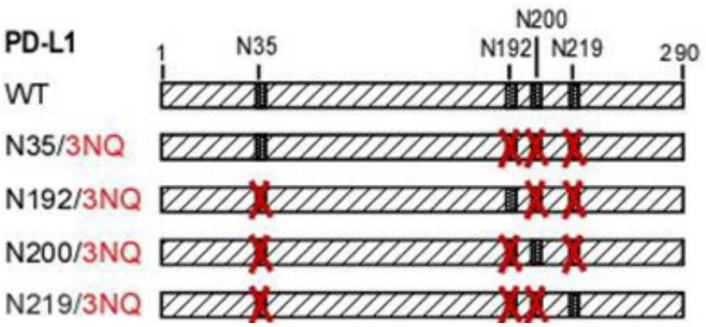
도면3b



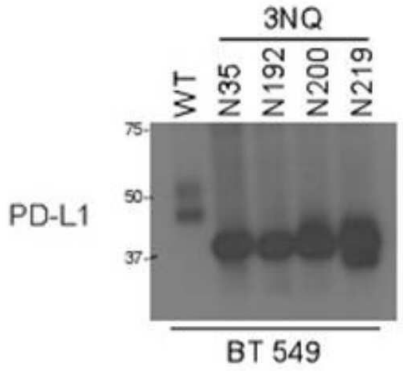

도면3c



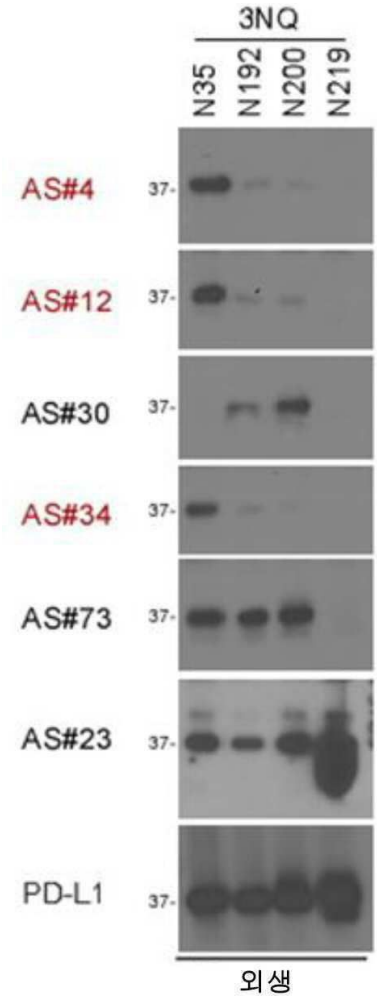

도면4a



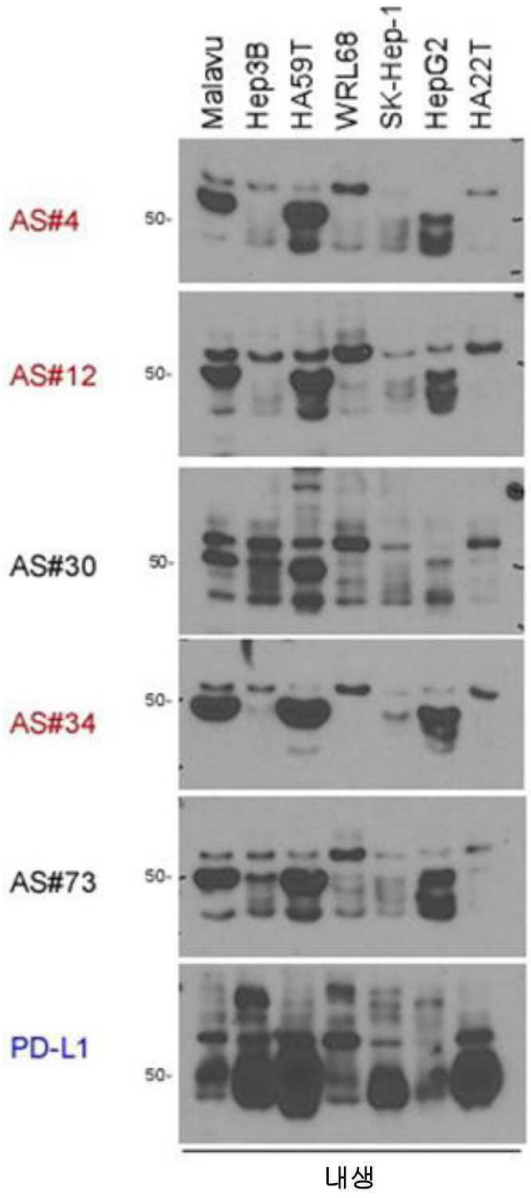
도면4b


3NQ
WT
N35
N192
N200
N219
75
50
37
PD-L1
BT 549

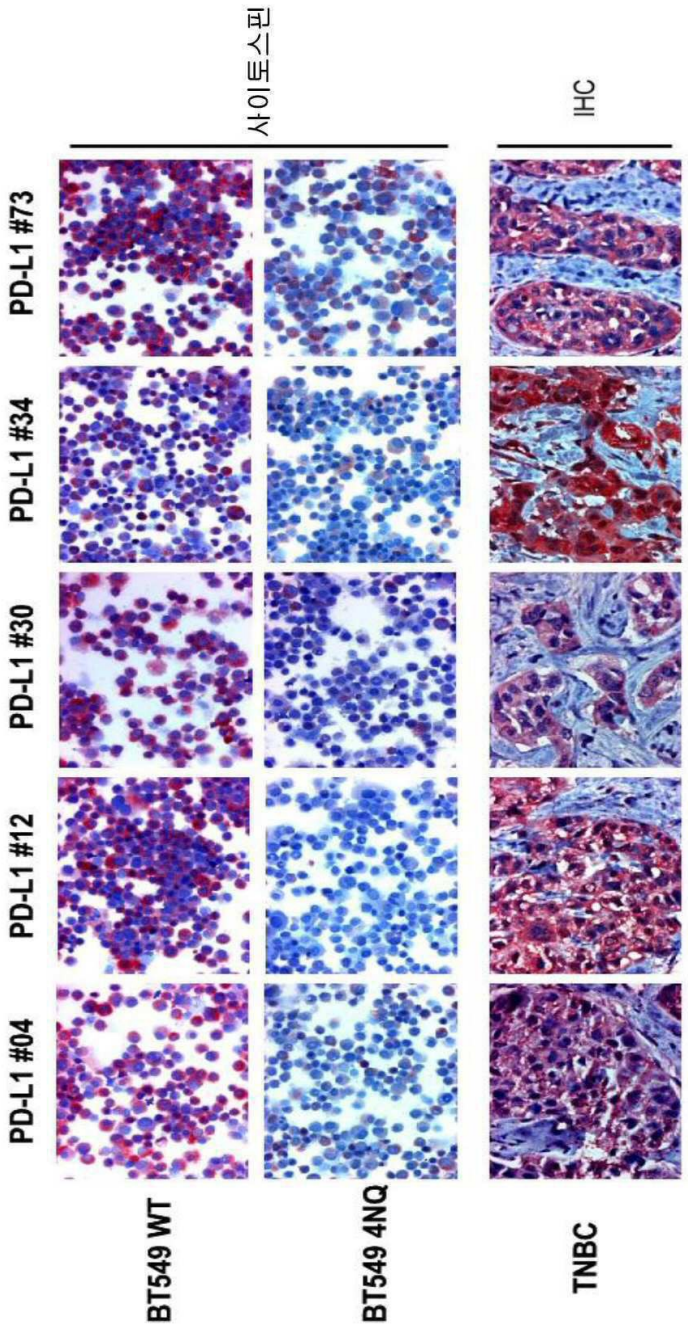
도면4c


3NQ
N35
N192
N200
N219
AS#4
AS#12
AS#30
AS#34
AS#73
AS#23
PD-L1
37
외생

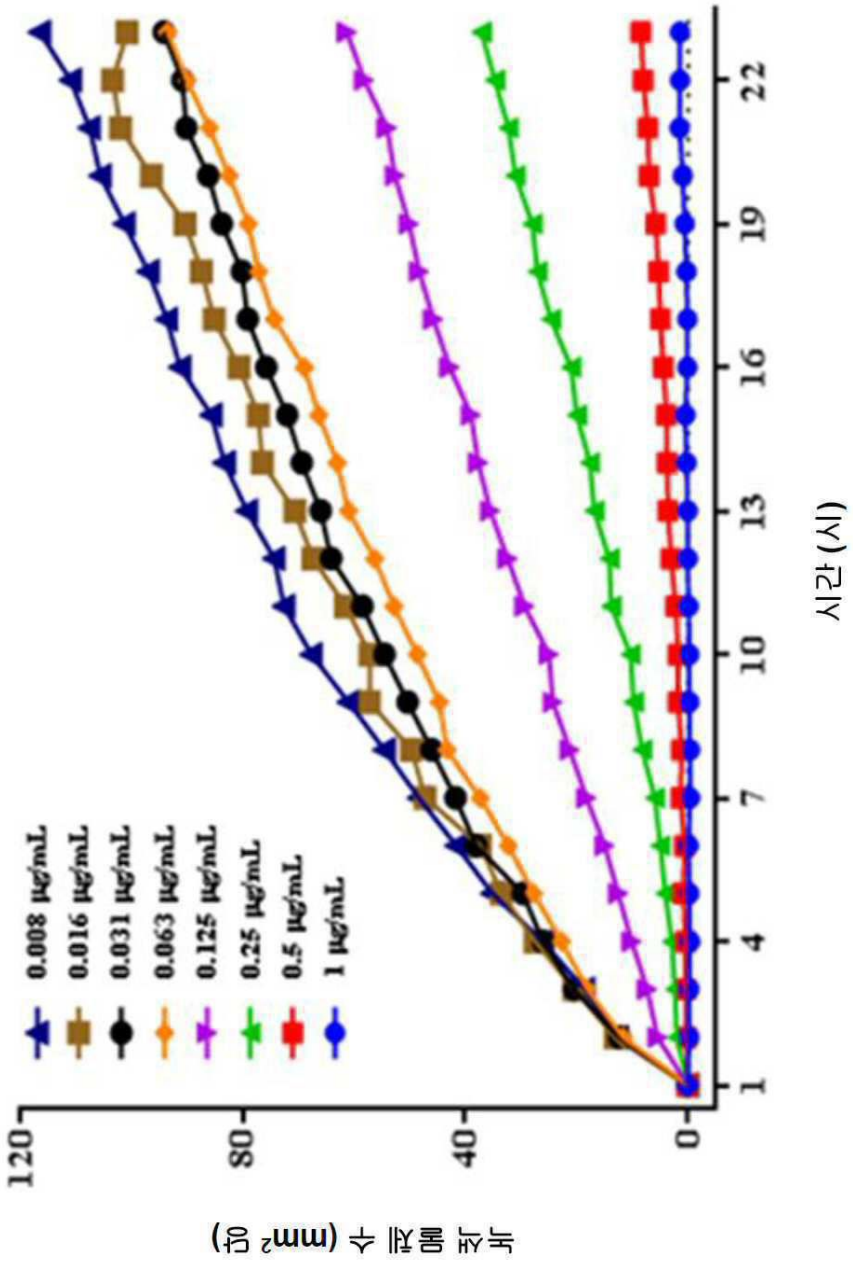
도면4d


Malavu
Hep3B
HA59T
WRL68
SK-Hep-1
HepG2
HA22T
AS#4
AS#12
AS#30
AS#34
AS#73
PD-L1
50-
내생

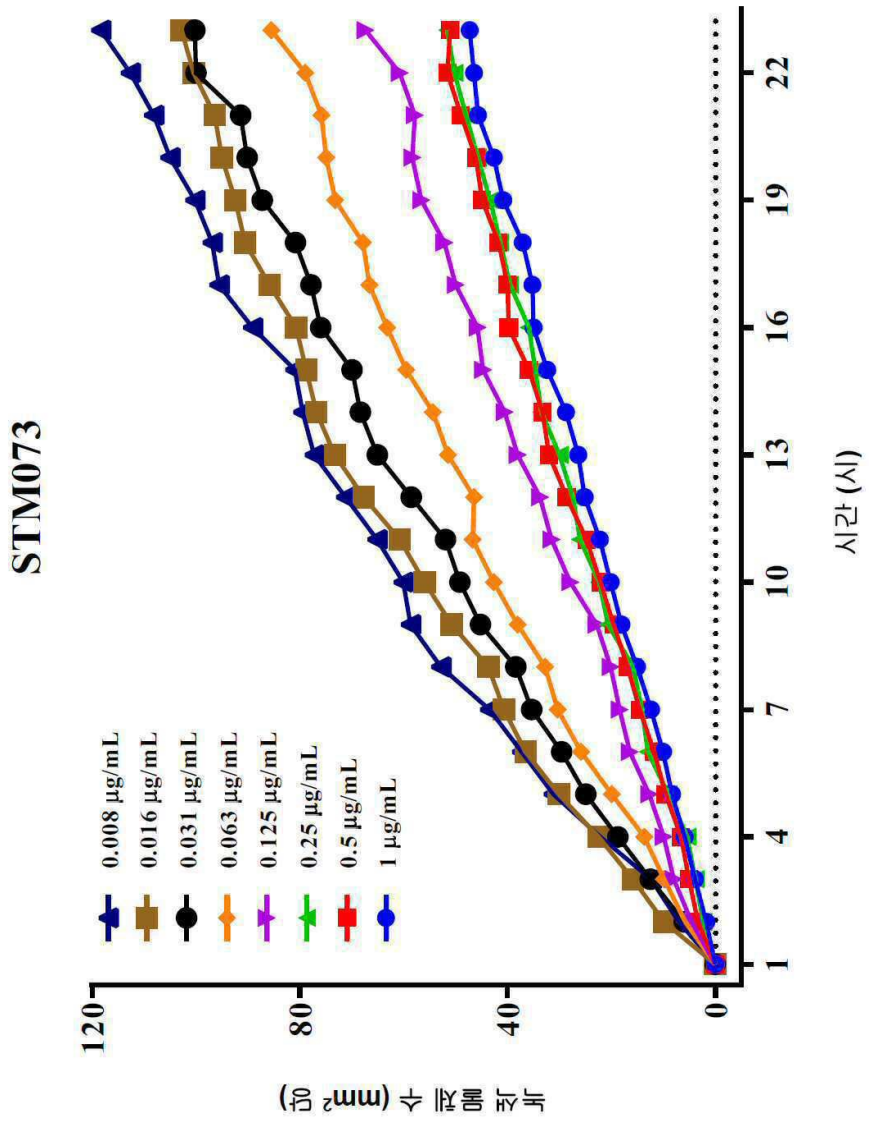
도면5


사이토스핀
IHC
PD-L1 #73
PD-L1 #34
PD-L1 #30
PD-L1 #12
PD-L1 #04
BT549 WT
BT549 4NQ
TNBC

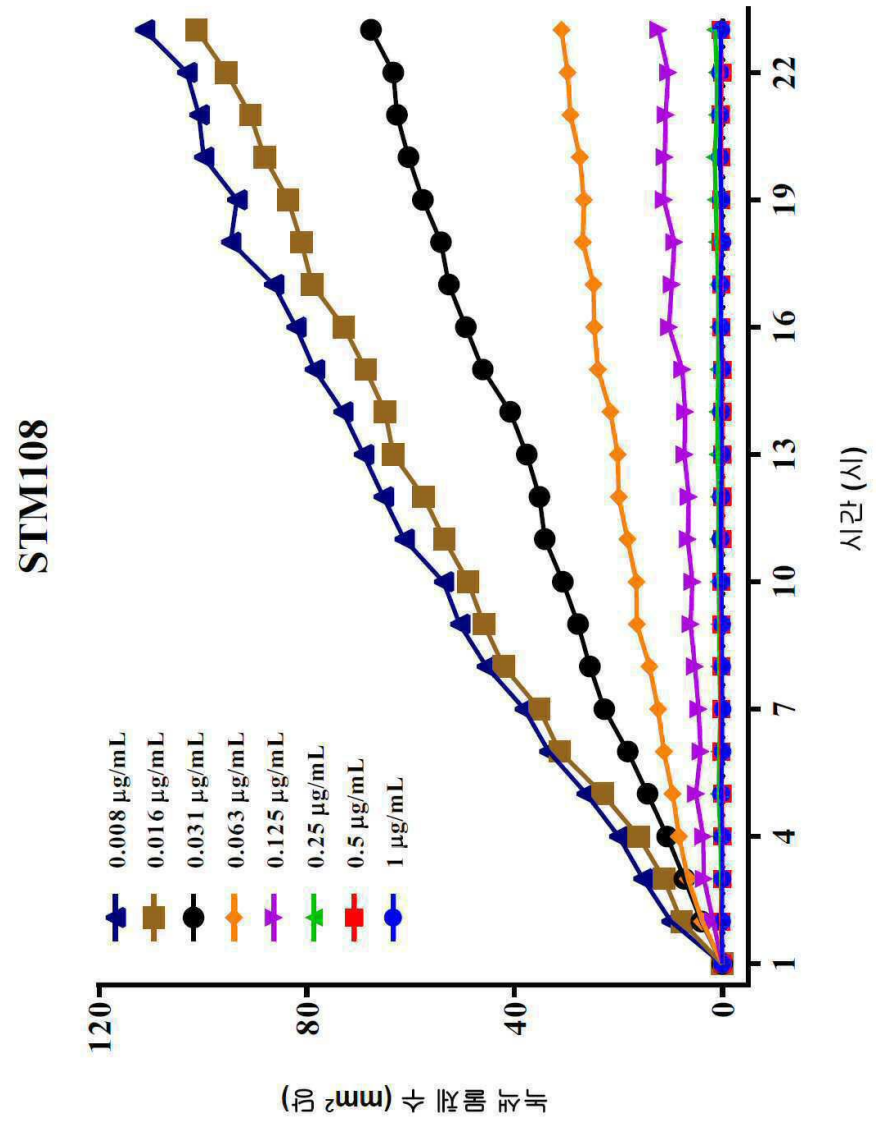
도면6a


0.008 μg/mL
0.016 μg/mL
0.031 μg/mL
0.063 μg/mL
0.125 μg/mL
0.25 μg/mL
0.5 μg/mL
1 μg/mL
120
80
40
0
1
4
7
10
13
16
19
22
부착 물체 수 (mm² 당)
시간 (시)

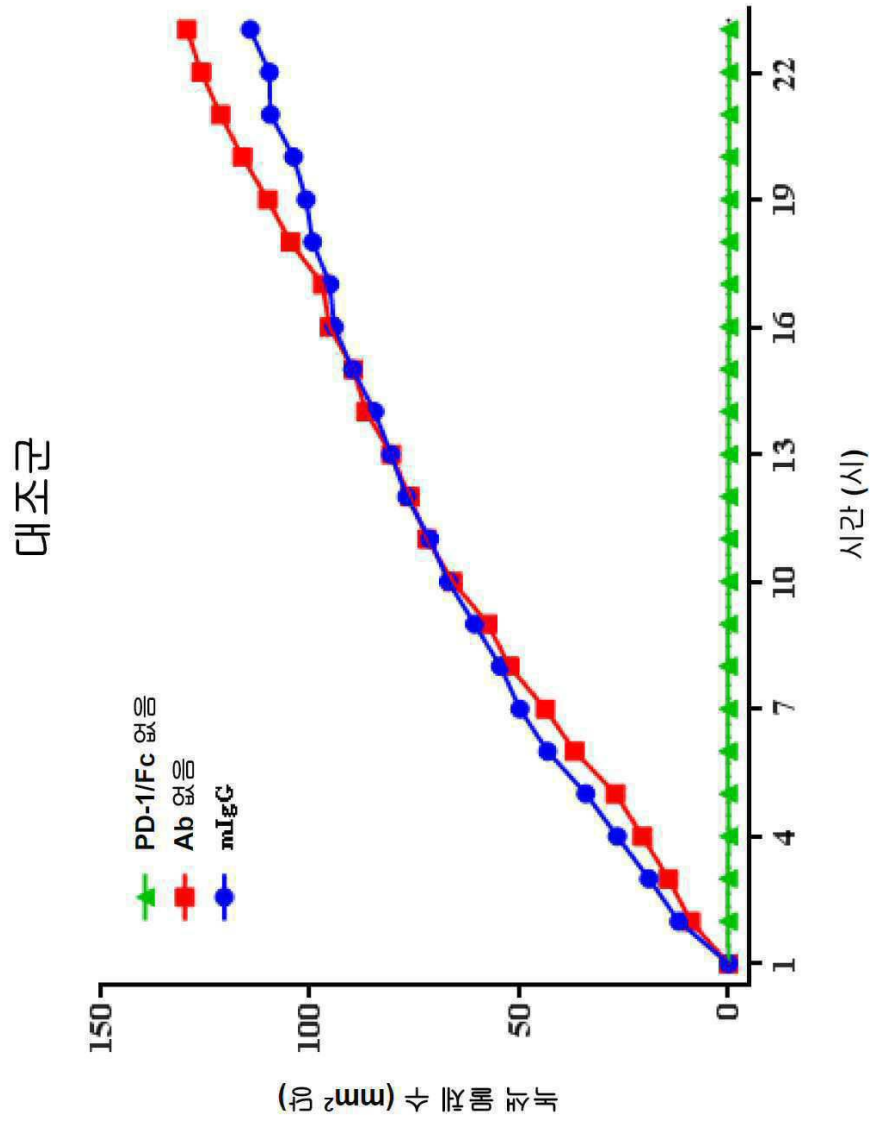
도면6b


STM073
0.008 μg/mL
0.016 μg/mL
0.031 μg/mL
0.063 μg/mL
0.125 μg/mL
0.25 μg/mL
0.5 μg/mL
1 μg/mL
120
80
40
0
1
4
7
10
13
16
19
22
시간 (시)
녹색 물체 수 (mm² 당)

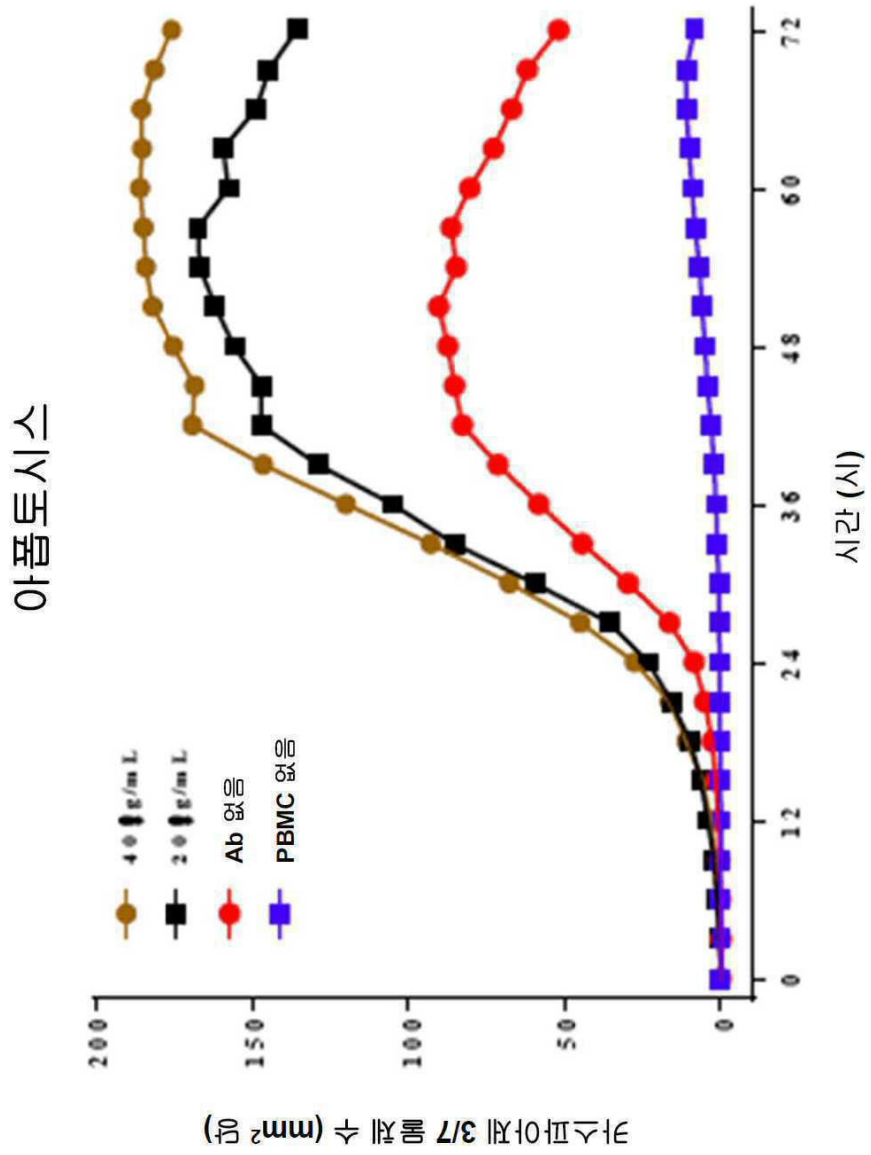
도면6c


STM108
0.008 μg/mL
0.016 μg/mL
0.031 μg/mL
0.063 μg/mL
0.125 μg/mL
0.25 μg/mL
0.5 μg/mL
1 μg/mL
120
80
40
0
1
4
7
10
13
16
19
22
시간 (시)
녹색 물체 수 (mm² 당)

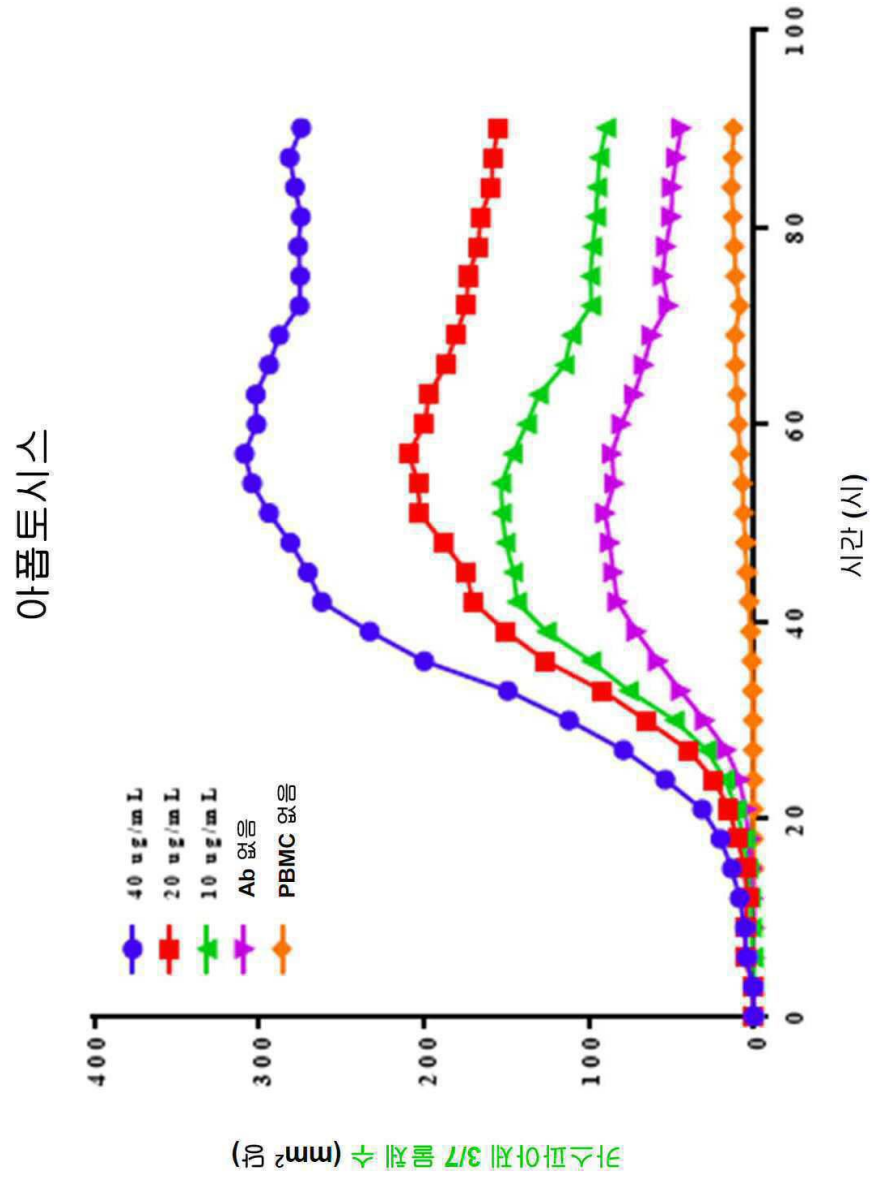
도면6d


대조군
PD-1/Fc 없음
Ab 없음
mIgG
150
100
50
0
1
4
7
10
13
16
19
22
시간 (시)
녹색 물체 수 (mm² 당)

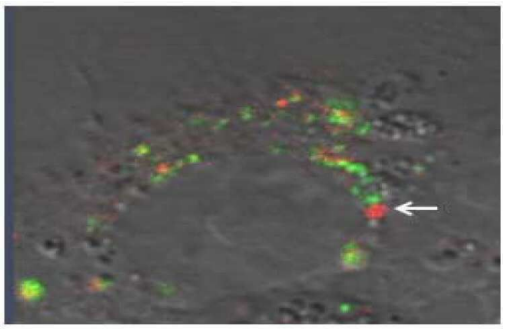
도면7a


아폽토시스
혈관신생 3/7 물체 수 (mm² 당)
200
150
100
50
0
0
12
24
36
48
60
72
시간 (시)
40 μg/mL
20 μg/mL
Ab 없음
PBMC 없음

도면7b

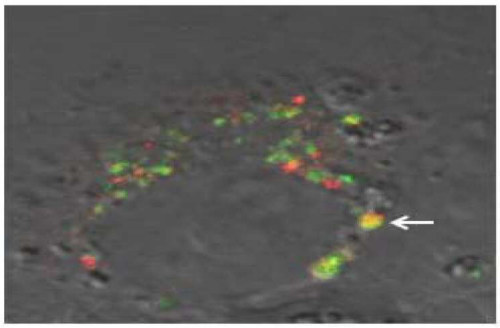

아폽토시스
시간 (시)
0
20
40
60
80
100
100
200
300
400
PBMC 없음
Ab 없음
10 ug/mL
20 ug/mL
40 ug/mL
카스파아제 3/7 물질 수 (mm² 당)

도면8a



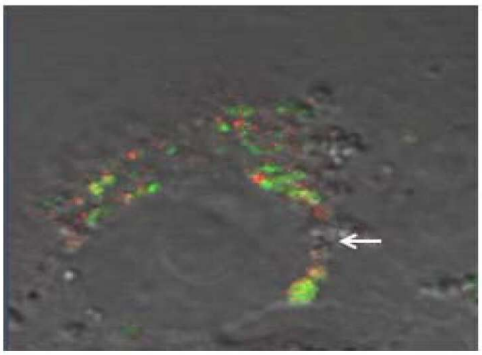
0 시

도면8b



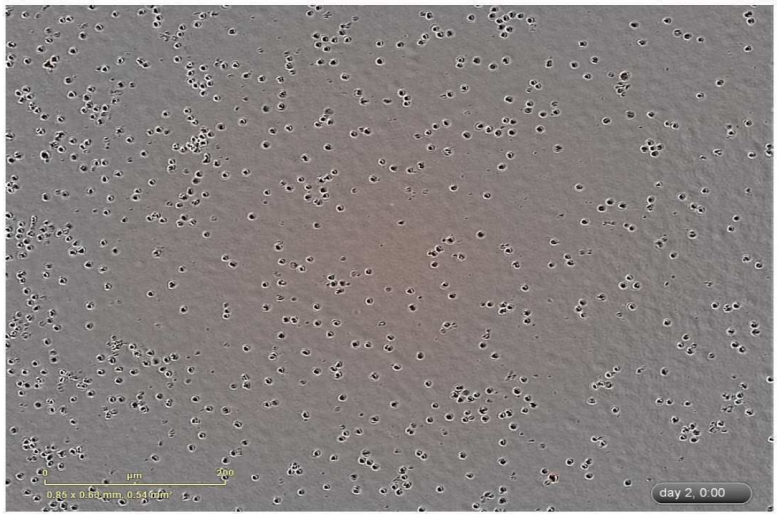
2 분

도면8c



4 분

도면9a



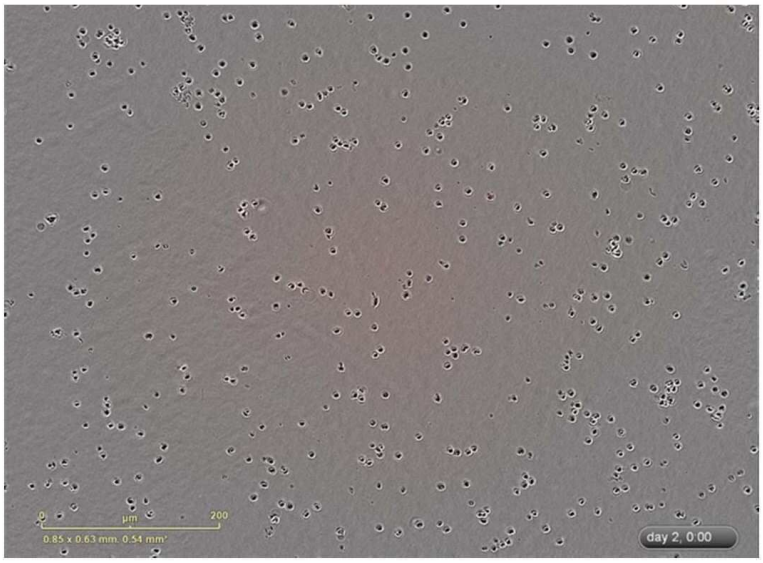

mIgG 대조군

도면9b



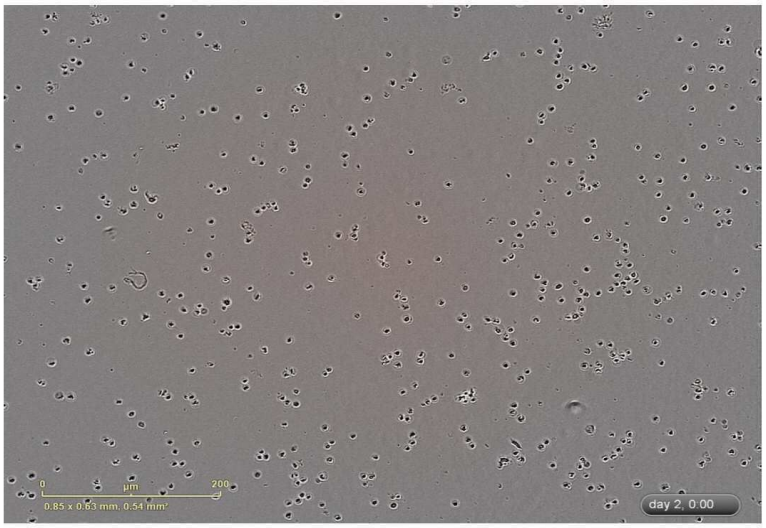

**STM004** 항체

도면9c



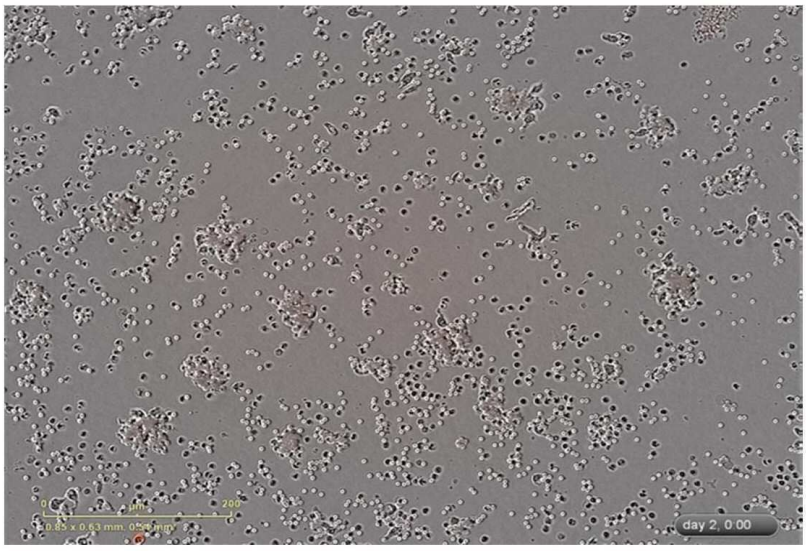

**STM073** 항체

도면9d



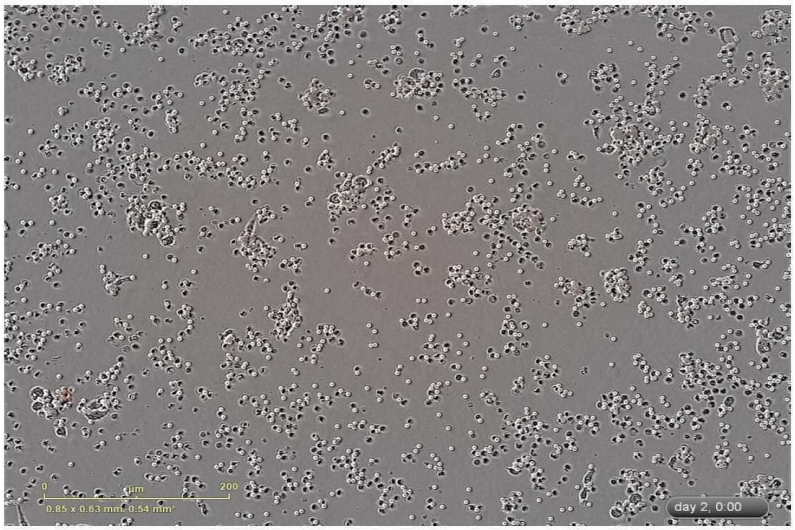

**STM108** 항체

도면9e



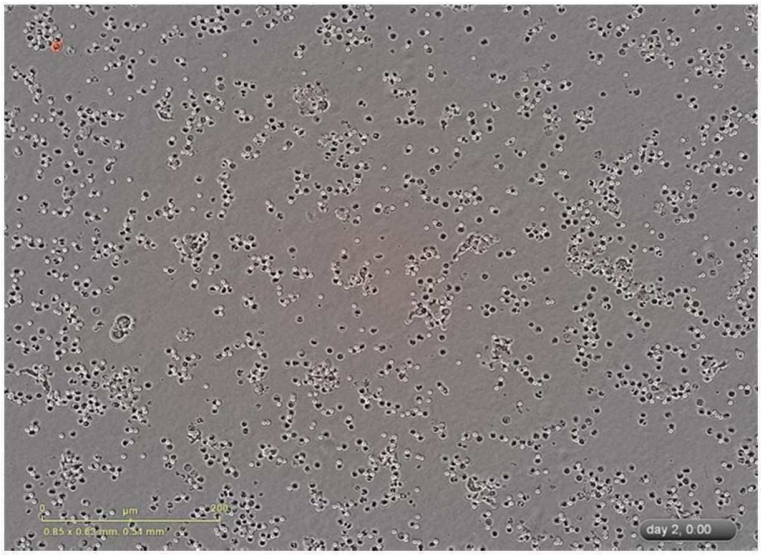

**mIgG** 대조군

도면9f



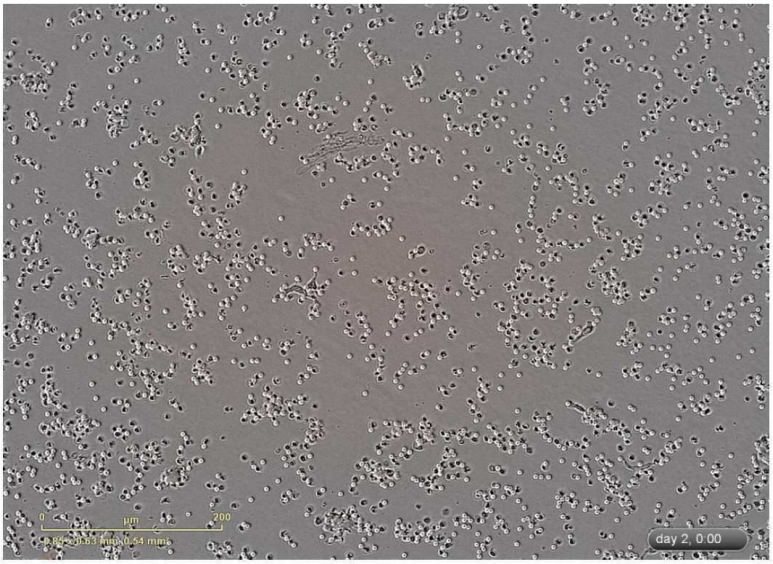

**STM004** 항체

도면9g



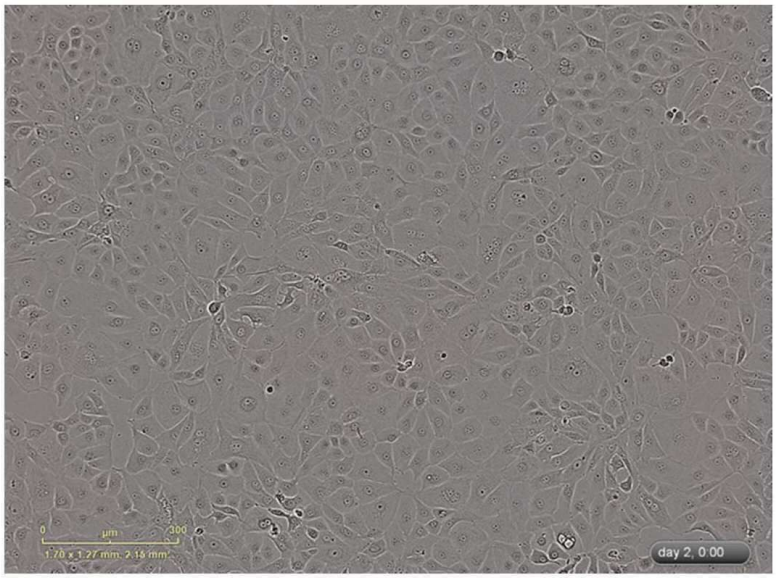

**STM073** 항체

도면9h



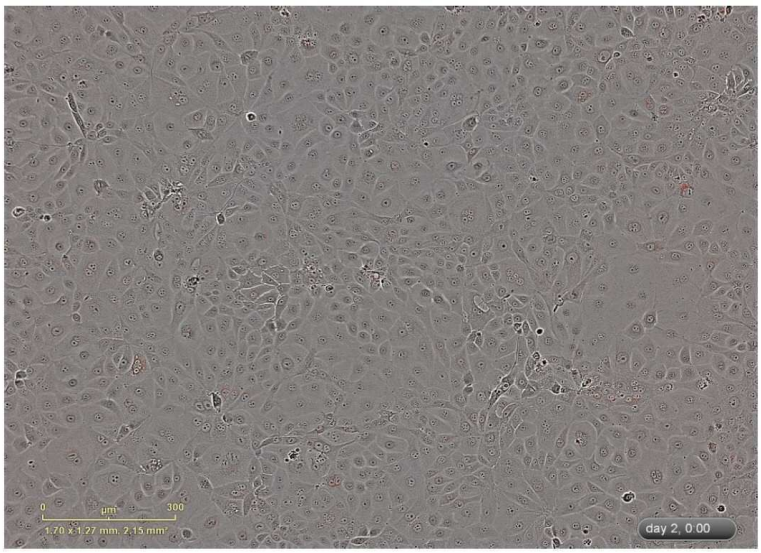

**STM108** 항체

도면9i



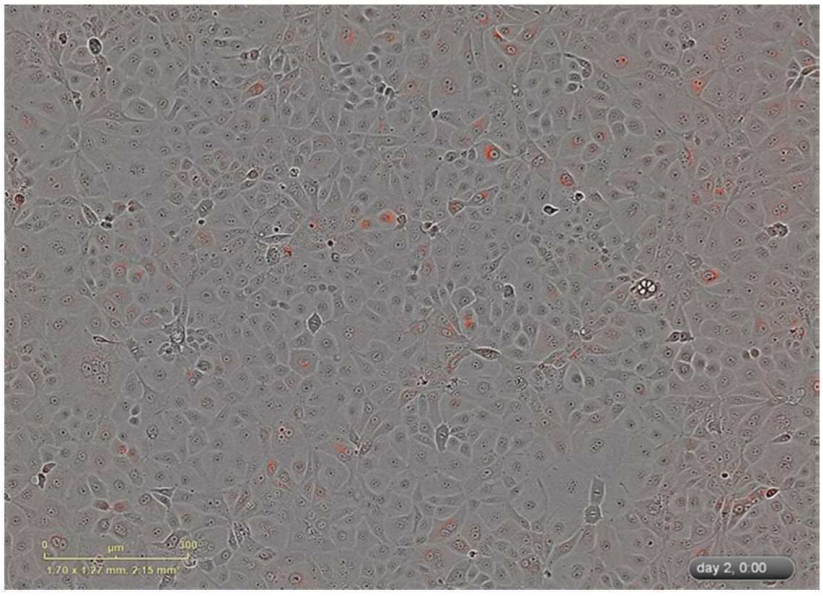

**mIgG** 대조군

도면9j



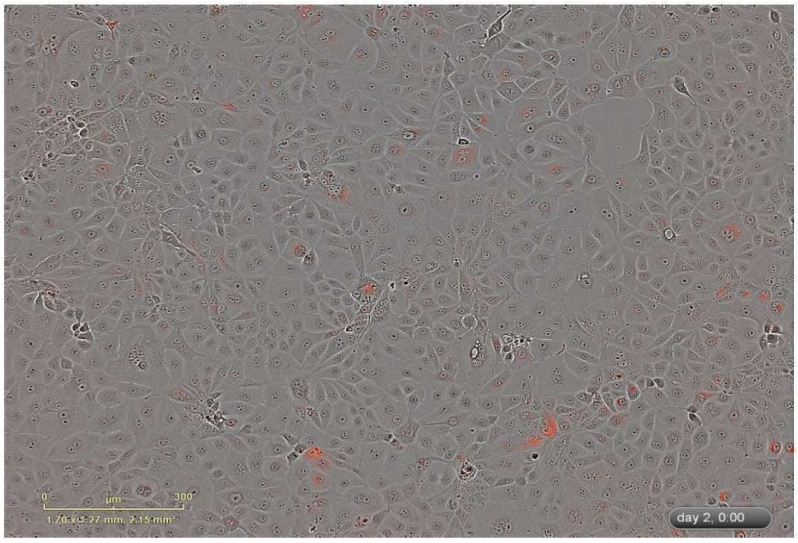

**STM004** 항체

도면9k



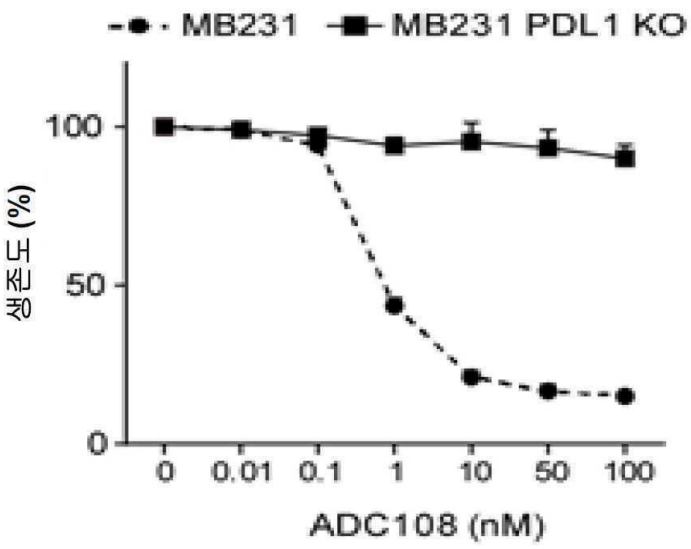

**STM073** 항체

도면91

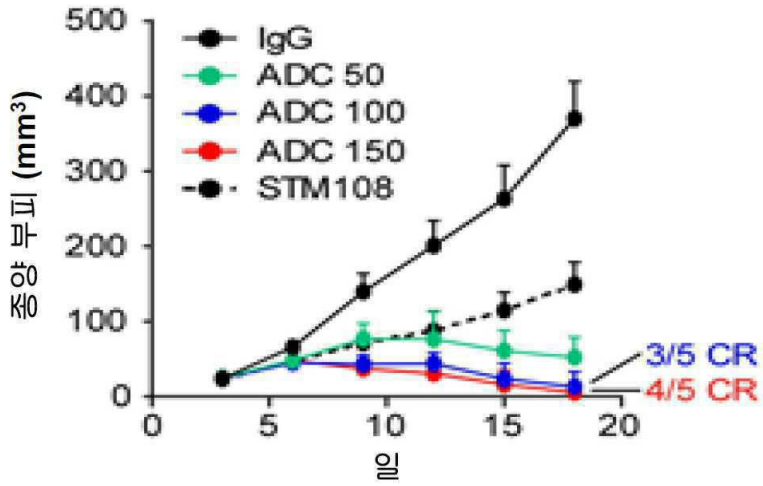



STM108 항체

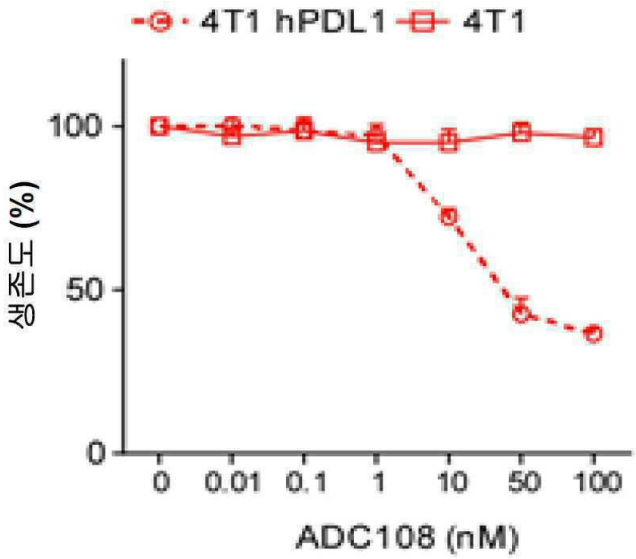
도면10a



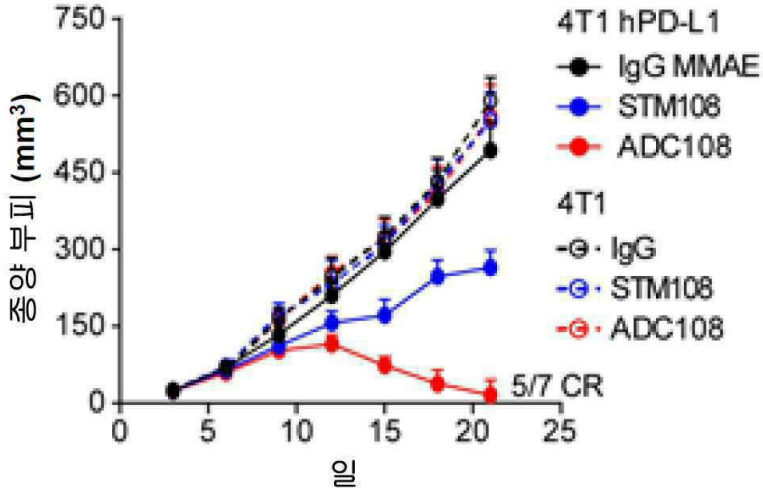
도면10b




도면10c




도면10d




서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> STCUBE & CO., INC.
BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

<120> METHODS FOR SELECTING ANTIBODIES THAT SPECIFICALLY BIND GLYCOSYLATED IMMUNE CHECKPOINT PROTEINS

<130> 24258.105006PCT

<140><141><150> 62/361,298

<151> 2016-07-12

<150> 62/314,940

<151> 2016-03-29

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 290

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Glu Thr

290

<210> 2

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp

20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp

35 40 45

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

50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala

65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val

130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro

195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

<210> 3

<211> 289

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys Leu Asn Gly Thr Thr Cys Val
65 70 75 80
Lys Tyr Leu Glu Arg Gln Thr Ser Trp Lys Glu Glu Lys Asn Ile Ser
85 90 95
Phe Phe Ile Leu His Phe Glu Pro Val Leu Pro Asn Asp Asn Gly Ser
100 105 110
Tyr Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser His Ser
115 120 125

Thr Thr Leu Tyr Val Thr Asp Val Lys Ser Ala Ser Glu Arg Pro Ser
130 135 140
Lys Asp Glu Met Ala Ser Arg Pro Trp Leu Leu Tyr Arg Leu Leu Pro
145 150 155 160
Leu Gly Gly Leu Pro Leu Leu Ile Thr Thr Cys Phe Cys Leu Phe Cys
165 170 175
Cys Leu Arg Arg His Gln Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr Ala
180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly Ser

225 230 235 240

Glu Val Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile Val

245 250 255

Tyr Ala Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Pro Asn Ser Arg Leu Ala

260 265 270

Arg Asn Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val Arg

275 280 285

Ser

<210> 4

<211> 187

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Glu Val Glu Tyr Arg Ala Glu Val Gly Gln Asn Ala Tyr Leu Pro

1 5 10 15

Cys Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Pro Gly Asn Leu Val Pro Val Cys Trp

20 25 30

Gly Lys Gly Ala Cys Pro Val Phe Glu Cys Gly Asn Val Val Leu Arg

35 40 45

Thr Asp Glu Arg Asp Val Asn Tyr Trp Thr Ser Arg Tyr Trp Leu Asn

50 55 60

Gly Asp Phe Arg Lys Gly Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Val Thr

65 70 75 80

Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile Gln Ile Pro Gly Ile

85 90 95

Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val Ile Lys Pro Ala Lys

100 105 110

Val Thr Pro Ala Pro Thr Leu Gln Arg Asp Phe Thr Ala Ala Phe Pro
115 120 125
Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala Glu Thr Gln Thr Leu
130 135 140
Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile Ser Thr Leu Ala Asn

145 150 155 160
Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu Arg Asp Ser Gly Ala
165 170 175
Thr Ile Arg Val Asp His His His His His His
180 185

<210> 5
<211> 412
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5
Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala
1 5 10 15
Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser

20 25 30
Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly
35 40 45
Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro
50 55 60
Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu
65 70 75 80
Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro

85 90 95
Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu
100 105 110
Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala
115 120 125
Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu

130 135 140

Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala Ser

145 150 155 160

Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala

165 170 175

Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Arg

180 185 190

Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro Gln

195 200 205

Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg

210 215 220

Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly Leu

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Leu Val Thr

275 280 285

Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu Glu Asp Val Ser Gln Ala

290 295 300

Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His Leu Gln Glu Gln Gln Leu

305 310 315 320

Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr Val Thr Pro Lys Ser Phe

325 330 335

Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Val

340 345 350

Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser Leu Asp Thr Pro Ser Gln

355 360 365

Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala Gln Glu Ala Gln Leu Leu

370 375 380

Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln Gly Glu Arg Leu Leu Gly
385 390 395 400
Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser Pro Gly

405 410

<210> 6
<211> 526
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6
Met Ala Val Phe Pro Ser Ser Gly Leu Pro Arg Cys Leu Leu Thr Leu
1 5 10 15
Ile Leu Leu Gln Leu Pro Lys Leu Asp Ser Ala Pro Phe Asp Val Ile
20 25 30
Gly Pro Pro Glu Pro Ile Leu Ala Val Val Gly Glu Asp Ala Lys Leu
35 40 45

Pro Cys Arg Leu Ser Pro Asn Ala Ser Ala Glu His Leu Glu Leu Arg
50 55 60
Trp Phe Arg Lys Lys Val Ser Pro Ala Val Leu Val His Arg Asp Gly
65 70 75 80
Arg Glu Gln Glu Ala Glu Gln Met Pro Glu Tyr Arg Gly Arg Ala Thr
85 90 95
Leu Val Gln Asp Gly Ile Ala Lys Gly Arg Val Ala Leu Arg Ile Arg
100 105 110

Gly Val Arg Val Ser Asp Asp Gly Glu Tyr Thr Cys Phe Phe Arg Glu
115 120 125
Asp Gly Ser Tyr Glu Glu Ala Leu Val His Leu Lys Val Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Ser Asp Pro His Ile Ser Met Gln Val Gln Glu Asn Gly Glu Ile
145 150 155 160
Cys Leu Glu Cys Thr Ser Val Gly Trp Tyr Pro Glu Pro Gln Val Gln
165 170 175

Trp Arg Thr Ser Lys Gly Glu Lys Phe Pro Ser Thr Ser Glu Ser Arg
180 185 190
Asn Pro Asp Glu Glu Gly Leu Phe Thr Val Ala Ala Ser Val Ile Ile
195 200 205
Arg Asp Thr Ser Ala Lys Asn Val Ser Cys Tyr Ile Gln Asn Leu Leu
210 215 220
Leu Gly Gln Glu Lys Lys Val Glu Ile Ser Ile Pro Ala Ser Ser Leu
225 230 235 240

Pro Arg Leu Thr Pro Trp Ile Val Ala Val Ala Val Ile Leu Met Val
245 250 255
Leu Gly Leu Leu Thr Ile Gly Ser Ile Phe Phe Thr Trp Arg Leu Tyr
260 265 270
Asn Glu Arg Pro Arg Glu Arg Arg Asn Glu Phe Ser Ser Lys Glu Arg
275 280 285
Leu Leu Glu Glu Leu Lys Trp Lys Lys Ala Thr Leu His Ala Val Asp
290 295 300

Val Thr Leu Asp Pro Asp Thr Ala His Pro His Leu Phe Leu Tyr Glu
305 310 315 320
Asp Ser Lys Ser Val Arg Leu Glu Asp Ser Arg Gln Lys Leu Pro Glu
325 330 335
Lys Thr Glu Arg Phe Asp Ser Trp Pro Cys Val Leu Gly Arg Glu Thr
340 345 350
Phe Thr Ser Gly Arg His Tyr Trp Glu Val Glu Val Gly Asp Arg Thr
355 360 365

Asp Trp Ala Ile Gly Val Cys Arg Glu Asn Val Met Lys Lys Gly Phe
370 375 380
Asp Pro Met Thr Pro Glu Asn Gly Phe Trp Ala Val Glu Leu Tyr Gly
385 390 395 400
Asn Gly Tyr Trp Ala Leu Thr Pro Leu Arg Thr Pro Leu Pro Leu Ala
405 410 415
Gly Pro Pro Arg Arg Val Gly Ile Phe Leu Asp Tyr Glu Ser Gly Asp

420 425 430

Ile Ser Phe Tyr Asn Met Asn Asp Gly Ser Asp Ile Tyr Thr Phe Ser
435 440 445
Asn Val Thr Phe Ser Gly Pro Leu Arg Pro Phe Phe Cys Leu Trp Ser
450 455 460
Ser Gly Lys Lys Pro Leu Thr Ile Cys Pro Ile Ala Asp Gly Pro Glu
465 470 475 480
Arg Val Thr Val Ile Ala Asn Ala Gln Asp Leu Ser Lys Glu Ile Pro
485 490 495

Leu Ser Pro Met Gly Glu Asp Ser Ala Pro Arg Asp Ala Asp Thr Leu
500 505 510
His Ser Lys Leu Ile Pro Thr Gln Pro Ser Gln Gly Ala Pro
515 520 525

<210> 7
<211> 468
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7

Met Gly His Leu Ser Ala Pro Leu His Arg Val Arg Val Pro Trp Gln
1 5 10 15
Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr

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

85 90 95
Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val

100 105 110

Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp

115 120 125

Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu

130 135 140

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys

145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr

165 170 175

Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln

180 185 190

Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn

195 200 205

Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn

210 215 220

Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro

225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Ser Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu

260 265 270

Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn

275 280 285

Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser

290 295 300

Val Thr Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu

305 310 315 320

Leu Ser Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr

325 330 335

Val Thr Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp

340 345 350

Thr Gly Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser
355 360 365
Ser Glu Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn
370 375 380
Pro Val Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn
385 390 395 400
Pro Ile Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr

405 410 415
Asn Ala Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly
420 425 430
Ile Val Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu
435 440 445
Ala Cys Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Arg Thr Thr Pro Met Thr
450 455 460
His Leu Thr Arg
465

<210> 8

<211> 862
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8
Met Arg Met Cys Thr Pro Ile Arg Gly Leu Leu Met Ala Leu Ala Val
1 5 10 15
Met Phe Gly Thr Ala Met Ala Phe Ala Pro Ile Pro Arg Ile Thr Trp
20 25 30
Glu His Arg Glu Val His Leu Val Gln Phe His Glu Pro Asp Ile Tyr
35 40 45
Asn Tyr Ser Ala Leu Leu Leu Ser Glu Asp Lys Asp Thr Leu Tyr Ile

50 55 60
Gly Ala Arg Glu Ala Val Phe Ala Val Asn Ala Leu Asn Ile Ser Glu
65 70 75 80
Lys Gln His Glu Val Tyr Trp Lys Val Ser Glu Asp Lys Lys Ala Lys

85 90 95

Cys Ala Glu Lys Gly Lys Ser Lys Gln Thr Glu Cys Leu Asn Tyr Ile

100 105 110

Arg Val Leu Gln Pro Leu Ser Ala Thr Ser Leu Tyr Val Cys Gly Thr

115 120 125

Asn Ala Phe Gln Pro Ala Cys Asp His Leu Asn Leu Thr Ser Phe Lys

130 135 140

Phe Leu Gly Lys Asn Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro

145 150 155 160

Ala His Ser Tyr Thr Ser Val Met Val Asp Gly Glu Leu Tyr Ser Gly

165 170 175

Thr Ser Tyr Asn Phe Leu Gly Ser Glu Pro Ile Ile Ser Arg Asn Ser

180 185 190

Ser His Ser Pro Leu Arg Thr Glu Arg Ala Ala Asn Tyr Thr Ser Ser

195 200 205

Leu Asn Leu Pro Asp Lys Thr Leu Gln Phe Val Lys Asp His Pro Leu

210 215 220

Met Ser His Thr Lys Trp Val Arg Tyr Asn Gly Pro Val Pro Lys Pro

225 230 235 240

Arg Pro Gly Ala Cys Ile Asp Ser Glu Ala Cys Ala Tyr Asn Leu Ser

245 250 255

Thr Ala Glu Glu Val Phe Ser His Gly Lys Tyr Met Gln Ser Thr Thr

260 265 270

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

275 280 285

Thr Pro Gln Leu Asn Asn Val Gly Leu Ser Ala Val Lys Ala Arg Leu

290 295 300

Ile Cys Ser Arg Pro Asp Ser Gly Leu Val Phe Asn Val Leu Arg Asp

305 310 315 320

Val Phe Val Leu Arg Pro Arg Ile Ala Arg Val Cys Lys Gly Asp Gln

325 330 335

Gly Gly Leu Arg Thr Leu Gln Lys Lys Trp Thr Ser Phe Leu Gly Glu
340 345 350
Asp Asp Arg Val Tyr Phe Phe Phe Thr Glu Val Ser Val Glu Tyr Glu
355 360 365
Phe Val Phe Arg Val Leu Ile Tyr Ala Ile Pro Trp Leu Asn Glu Pro

370 375 380
Ser Phe Val Phe Ala Asp Val Ile Arg Lys Ser Pro Asp Ser Pro Asp
385 390 395 400
Asp Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Asn Arg Pro Arg Leu Ile Lys Lys
405 410 415
Asp Val Asn Tyr Thr Gln Ile Val Val Asp Arg Thr Gln Ala Leu Asp
420 425 430
Gly Thr Val Tyr Asp Val Met Phe Val Ser Thr Asp Arg Gly Ala Leu

435 440 445
His Lys Ala Ile Ser Leu Glu His Ala Val His Ile Ile Glu Glu Thr
450 455 460
Gln Leu Phe Gln Asp Phe Glu Pro Val Gln Thr Leu Leu Leu Ser Ser
465 470 475 480
Lys Lys Gly Asn Arg Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val
485 490 495
Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Gly Lys His Gly Thr Cys Glu Asp Cys

500 505 510
Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Pro Thr Ala Thr
515 520 525
Cys Val Ala Leu His Gln Thr Glu Ser Pro Ser Arg Gly Leu Ile Gln
530 535 540
Glu Met Ser Gly Asp Ala Ser Val Cys Pro Asp Lys Ser Lys Gly Ser
545 550 555 560
Tyr Arg Gln His Phe Phe Lys His Gly Gly Thr Ala Glu Leu Lys Cys

565 570 575
Ser Gln Lys Ser Asn Leu Ala Arg Val Phe Trp Lys Phe Gln Asn Asp

580 585 590

Val Leu Lys Ala Glu Ser Pro Lys Tyr Gly Leu Met Gly Arg Lys Asn

595 600 605

Leu Leu Ile Phe Asn Leu Ser Glu Gly Asp Ser Gly Val Tyr Gln Cys

610 615 620

Leu Ser Glu Glu Arg Val Lys Asn Lys Thr Val Phe Gln Val Val Ala

625 630 635 640

Lys His Val Leu Glu Val Lys Val Val Pro Lys Pro Val Val Ala Pro

645 650 655

Thr Leu Ser Val Val Gln Thr Glu Gly Ser Arg Ile Ala Thr Lys Val

660 665 670

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

675 680 685

Ala Thr Ser Ser Gly Ala Ile Thr Leu Pro Pro Lys Pro Ala Pro Thr

690 695 700

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

705 710 715 720

His Ser Glu Lys Thr Met Tyr Leu Lys Ser Ser Asp Asn Arg Leu Leu

725 730 735

Met Ser Leu Phe Leu Phe Phe Phe Val Leu Phe Leu Cys Leu Phe Phe

740 745 750

Tyr Asn Cys Tyr Lys Gly Tyr Leu Pro Arg Gln Cys Leu Lys Phe Arg

755 760 765

Ser Ala Leu Leu Ile Gly Lys Lys Lys Pro Lys Ser Asp Phe Cys Asp

770 775 780

Arg Glu Gln Ser Leu Lys Glu Thr Leu Val Glu Pro Gly Ser Phe Ser

785 790 795 800

Gln Gln Asn Gly Glu His Pro Lys Pro Ala Leu Asp Thr Gly Tyr Glu

805 810 815

Thr Glu Gln Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Pro Thr Asp Arg Glu Asp

820 825 830

Ser Gln Arg Ile Asp Asp Leu Ser Ala Arg Asp Lys Pro Phe Asp Val
835 840 845

Lys Cys Glu Leu Lys Phe Ala Asp Ser Asp Ala Asp Gly Asp
850 855 860

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 9

tcaattgtca tattgctac 19

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 10

ttgactccat ctttcttca 19

<210> 11

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 11

gtggtagagt atggtagcca aatgacaatt gaatgcaaa 39

<210> 12

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 12

tttgcattca attgtcattt ggctaccata ctctaccac 39

<210> 13

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 13

gagaggagaa gcttttccag gtgaccagca cactgag 37

<210> 14

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 14

ctcagtgtgc tggtcacctg gaaaagcttc tcctctc 37

<210> 15

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 15

gaccagcaca ctgagaatcc agacaacaac taatgagat 39

<210> 16

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 16

atctcattag ttgttgtctg gattctcagt gtgctggtc 39

<210> 17

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 17

gagagaggag aagcttttcc aagtgaccag cacactgaga 40

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 18

tctcagtgtg ctggtcactt ggaaaagctt ctcctctctc 40

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic 6xHis tag

<400> 19

His His His His His His

1 5