

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0110546
(43) 공개일자 2023년07월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/495 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01) C07K 16/24 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/2827 (2013.01)
A61P 31/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2023-7020099

(22) 출원일자(국제) 2021년11월18일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2023년06월14일

(86) 국제출원번호 PCT/CN2021/131389

(87) 국제공개번호 WO 2022/105817

국제공개일자 2022년05월27일

(30) 우선권주장

PCT/CN2020/129918 2020년11월18일 중국(CN)

PCT/CN2021/073341 2021년01월22일 중국(CN)

(71) 출원인

쑤저우 트랜스젠타 테라퓨틱스 컴퍼니 리미티드

중국 215123 장쑤 쑤저우 싱후 스트리트 218
비6-501

(72) 발명자

치옌 쉬에밍

중국 215123 장쑤 쑤저우 싱후 스트리트 218
비6-501

리 홍준

중국 215123 장쑤 쑤저우 싱후 스트리트 218
비6-501

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김진희, 김태홍

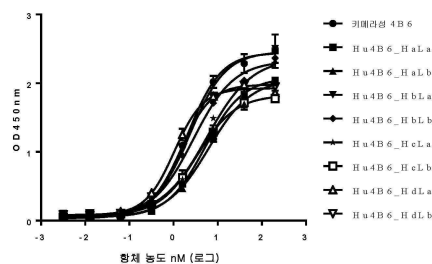
전체 청구항 수 : 총 116 항

(54) 발명의 명칭 이작용성 분자

(57) 요약

TGFβ 결합 모이어티, IL-1 결합 모이어티, 면역자극성 폴리펩타이드(예컨대, 가용성 LAG3 또는 가용성 CD4) 또는 CD47 결합 모이어티에 연결된 PD-L1 결합 모이어티를 포함하는 단백질, 이를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드, 이를 포함하는 약학 조성물 및 이의 용도가 제공된다.

대표도 - 도1



	키메라성 4B6	Hu4B6_HaLa	Hu4B6_HaLb	Hu4B6_HbLa	Hu4B6_HbLb
EC50	2.047	5.158	6.263	2.375	2.805

	Hu4B6_HcLa	Hu4B6_HcLb	Hu4B6_HdLa	Hu4B6_HdLb
	5.738	3.437	1.042	1.465

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/00 (2018.01)

C07K 14/4702 (2013.01)

C07K 14/495 (2013.01)

C07K 14/70596 (2013.01)

C07K 14/7155 (2013.01)

C07K 16/245 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

(72) 발명자

팅 페이

중국 215123 장쑤 쑤저우 싱후 스트리트 218
비6-501

구오 후안후안

중국 215123 장쑤 쑤저우 싱후 스트리트 218
비6-501

구 이

중국 215123 장쑤 쑤저우 싱후 스트리트 218
비6-501

명세서

청구범위

청구항 1

면역 체크포인트 분자에 결합하는 제1 모이어티, 및 인터루킨-1(IL-1)의 활성을 차단하는 제2 모이어티를 포함하는 이작용성(bi-functional) 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 모이어티는 CD27, CD70, CD28, CD80(B7-1), CD86(B7-2), CD40, CD40L(CD154), CD122, CD137, CD137L, OX40(CD134), OX40L(CD252), GITR, ICOS(CD278), 및 ICOSLG(CD275), CD2, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), CD30, BAFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, Nkp80, CD160, 및 CD83으로 이루어진 군으로부터 선택적으로 선택되는 면역자극성 체크포인트 분자의 작용제를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 3

제1항에 있어서, 제1 모이어티는 A2AR, B7-H3(CD276), B7-H4(VTCN1), BTLA(CD272), CTLA-4(CD152), IDO1, IDO2, TDO, KIR, LAG3, NOX2, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, VISTA, SIGLEC7(CD328), TIGIT, PVR(CD155), SIGLEC9(CD329), CD160, LAIR1, 2B4(CD244), CD47, 및 B7-H5로 이루어진 군으로부터 선택적으로 선택되는 면역억제성 체크포인트 분자의 길항제를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 4

제3항에 있어서, 면역 체크포인트 분자는 PD-L1인 이작용성 분자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 모이어티는 PD-L1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고, 제2 모이어티는 IL-1 결합 모이어티 또는 IL-1 수용체(IL-1R) 결합 모이어티를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 6

제5항에 있어서, IL-1 결합 모이어티는 IL-1R 또는 이의 단편 또는 변이체, 또는 IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 7

제6항에 있어서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 XB2001, 루티키주맵, LY2189102 및 베르메키맵으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항-IL-1 α 항체로부터의, 또는 SSGJ-613, CDP484, 카나키누맵 및 게보키주맵으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항-IL-1 β 항체로부터의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 8

제6항에 있어서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 104 또는 서열번호: 112의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 105 또는 서열번호: 113의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 106 또는 서열번호: 114의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 107 또는 서열번호: 115의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 108 또는 서열번호: 116의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 109 또는 서열번호: 117의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 9

제6항에 있어서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 104의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 105의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 106의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역,

및/또는 서열번호: 107의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 108의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 109의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 10

제6항에 있어서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 112의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 113의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 114의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 115의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 116의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 117의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 11

제6항에 있어서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 102, 서열번호: 110, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 103, 서열번호: 111, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 12

제6항에 있어서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 102, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 103, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 13

제6항에 있어서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 110, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 111, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 14

제5항에 있어서, IL-1R 결합 모이어티는 인터루킨-1 수용체 길항제 또는 이의 단편 또는 변이체, 또는 IL-1R에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 15

제14항에 있어서, IL-1R에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 스페슬리맵, 아스테글리맵, 임시돌리맵, AMG 108, 멜릴리맵, 니다닐리맵, MEDI8968, REGN6490, HB0034 및 CSC012로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체로부터의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 16

PD-L1에 결합하는 제1 모이어티, 및 a) 면역억제 사이토카인의 활성을 차단하거나 b) 면역을 자극하는 제2 모이어티를 포함하는 이작용성 분자로서, 여기서 제1 모이어티는 중쇄 가변(VH) 영역 및/또는 경쇄 가변(VL) 영역을 포함하는 PD-L1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은

a) **DYYMN**(서열번호: 1) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하는 HCDR1,

b) **DINPNNX₁X₂TX₃YNHKFKG**(서열번호: 19) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하는 HCDR2, 및

c) **WGDGPFAY**(서열번호: 3) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고/거나,

여기서, 경쇄 가변 영역은

d) **KASQNVX₁X₂X₃VA**(서열번호: 20) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 LCDR1,

e) **SX₁SX₂RYT**(서열번호: 21) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 LCDR2, 및

f) **QQYSNYPT**(서열번호: 6) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하고;

여기서, X₁은 G 또는 A이고, X₂는 G 또는 D 또는 Q 또는 E 또는 L이며, X₃은 S 또는 M 또는 Q 또는 L 또는 V이고, X₄는 G 또는 P 또는 K이며, X₅는 A 또는 G이고, X₆은 A 또는 I이며, X₇은 A 또는 N 또는 R 또는 V이고, X₈은 N 또는 H 또는 V 또는 D인 이작용성 분자.

청구항 17

제16항에 있어서, 중쇄 가변 영역은

a) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1,

b) 서열번호: 2, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 17 및 서열번호: 18로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 HCDR2, 및

c) 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고/거나,

경쇄 가변 영역은

d) 서열번호: 4, 서열번호: 7, 서열번호: 8 및 서열번호: 9로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 LCDR1,

e) 서열번호: 5, 서열번호: 10, 서열번호: 11 및 서열번호: 12로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 LCDR2, 및

f) 서열번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 18

제17항에 있어서, 중쇄 가변 영역은

a) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 2의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;

b) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 13의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;

c) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 14의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;

d) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 15의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

e) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 17의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 이작용성 분자.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 경쇄 가변 영역은

a) 서열번호: 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

b) 서열번호: 9의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 6의 서열을 포

함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

c) 서열번호: 8의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

d) 서열번호: 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 12의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및

e) 서열번호: 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 11의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 이작용성 분자.

청구항 20

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, PD-L1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 하나 이상, 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 하나 이상을 추가로 포함하고, 여기서:

a) HFR1은 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX₉FT(서열번호: 40) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하고,

b) HFR2는 WVRQAPGQX₁₀LEWVG(서열번호: 41) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하며,

c) HFR3 서열은 RVTX₁₆TVDX₁₁SISTAYMELSRLSDDTAVYYCX₁₂X₁₃(서열번호: 42) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하고,

d) HFR4는 WGQGTILVTYSS(서열번호: 25) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하며,

e) LFR1은 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC(서열번호: 26) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하고,

f) LFR2는 WYQQKPGKX₁₄PKLLIY(서열번호: 43) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하며,

g) LFR3은 GVPX₁₅RFSGSGSGTDFTX₁₇TISSLQPEDIATYYC(서열번호: 44) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하고,

h) LFR4는 FGQGTIKLEIK(서열번호: 29) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하며,

여기서, X₉는 T 또는 V이고, X₁₀은 G 또는 S이며, X₁₁은 T 또는 K이고, X₁₂는 A 또는 V이며, X₁₃은 R 또는 K이고, X₁₄는 A 또는 S이며, X₁₅는 S 또는 D이고, X₁₆은 M 또는 V이며, X₁₇은 F 또는 L인 이작용성 분자.

청구항 21

제20항에 있어서,

HFR1은 서열번호: 22 및 30으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하고,

HFR2는 서열번호: 23 및 31로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하며,

HFR3은 서열번호: 24 및 서열번호: 32-35로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하고,

HFR4는 서열번호: 25의 서열을 포함하며,

LFR1은 서열번호: 26으로 이루어진 군으로부터의 서열을 포함하고,

LFR2는 서열번호: 27 및 36으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하며,

LFR3은 서열번호: 28, 및 37-38, 39, 45로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하고,

LFR4는 서열번호: 29의 서열을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 22

제16항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 가변 영역은 서열번호: 46, 서열번호: 49, 서열번호: 50, 서열번호: 51, 서열번호: 52, 서열번호: 56, 서열번호: 57, 서열번호: 58, 서열번호: 59, 서열번호: 60, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 23

제16항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 경쇄 가변 영역은 서열번호: 47, 서열번호: 54, 서열번호: 55, 서열번호: 61, 서열번호: 62, 서열번호: 63, 서열번호: 64, 서열번호: 65, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 24

제16항에 있어서, PD-L1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 49/54, 50/54, 51/54, 52/54, 49/55, 50/55, 51/55, 52/55, 58/62, 58/63, 58/64, 58/65, 59/62, 59/63, 59/64, 59/65, 60/62, 60/63, 60/64, 및 60/65로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 서열의 쌍을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 25

제16항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, PD-L1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하지만 PD-L1에 대한 특이적 결합 특이성 및/또는 친화도를 보유하는 것인 이작용성 분자.

청구항 26

제25항에 있어서, 치환 또는 변형 중 적어도 하나는 CDR 서열 중 하나 이상, 및/또는 VH 또는 VL 서열의 비-CDR 영역 중 하나 이상에 존재하는 것인 이작용성 분자.

청구항 27

제16항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, PD-L1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 면역글로불린 불변 영역, 선택적으로 인간 Ig의 불변 영역, 또는 선택적으로 인간 IgG의 불변 영역을 추가로 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 28

제27항에 있어서, 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4의 Fc 영역을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 29

제28항에 있어서, 불변 영역은 상응하는 야생형 Fc 영역에 비해 감소된 효과기 기능을 갖는 Fc 변이체를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 30

제29항에 있어서, Fc 변이체는 220S, 226S, 228P, 229S, 233P, 234V, 234G, 234A, 234F, 234A, 235A, 235G, 235E, 236E, 236R, 237A, 237K, 238S, 267R, 268A, 268Q, 269R, 297A, 297Q, 297G, 309L, 318A, 322A, 325L, 328R, 330S, 331S 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함하며, 여기서 Fc 영역 내의 잔기의 넘버링은 카바트(Kabat)에서와 같은 EU 지수의 넘버링인 이작용성 분자.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, Fc 변이체는 a) K322A, L234A, 및 L235A; b) P331S, L234F 및 L235E; c) L234A 및 L235A; d) N297A; e) N297Q; f) N297G; g) L235E; h) L234A 및 L235A(IgG1); i) F234A 및 L235A(IgG4); j) H268Q, V309L, A330S 및 P331S(IgG2); k) V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S 및 P331S(IgG2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 돌연변이의 조합을 포함하며, 여기서 Fc 영역 내의 잔기의 넘버링은 카바트에서와 같은 EU 지수의 넘버링인 이작용성 분자.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 변이체는 서열번호: 81의 아미노산 서열을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 33

제16항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, PD-L1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화되는 것인 이작용성 분자.

청구항 34

제16항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단편은 디아바디, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv 단편, 디설파이드 안정화된 Fv 단편(dsFv), (dsFv)₂, 이중특이적 dsFv(dsFv-dsFv'), 디설파이드 안정화된 디아바디(ds 디아바디), 단쇄 항체 분자(scFv), scFv 이량체(2가 디아바디), 다중특이적 항체, 낙타화된 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 및 2가 도메인 항체인 이작용성 분자.

청구항 35

제16항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 PD-L1 및 시노(cyno) PD-L1 모두에 결합할 수 있는 것인 이작용성 분자.

청구항 36

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 모이어티는 PD-L1에 대한 결합에 대해 제16항 내지 제35항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 37

제16항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제 사이토카인은 형질전환 성장 인자 베타(TGF-β) 수퍼패밀리, IL-1, 또는 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 내의 사이토카인을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 38

제37항에 있어서, TGF-β 수퍼패밀리 내의 면역억제 사이토카인은 TGF-β, 골형성 단백질(BMP), 액티빈, NODAL, 및 성장 및 분화 인자(GDF)를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 39

제16항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제 사이토카인은 TGF-β 인 이작용성 분자.

청구항 40

제16항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 모이어티는 TGFβ 결합 모이어티를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 41

제40항에 있어서, TGFβ 결합 모이어티는 가용성 TGFβ 수용체(TGFβR) 또는 이의 TGFβ 결합 단편 또는 변이체, 또는 TGFβ에 대한 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 42

제41항에 있어서, 가용성 TGFβR은 TGFβR의 세포외 도메인(ECD), 또는 TGFβ 결합 단편, 또는 이의 변이체를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 43

제42항에 있어서, TGFβR은 TGFβ 수용체 I(TGFβRI), TGFβ 수용체 II(TGFβRII), TGFβ 수용체 III(TGFβ

RIII), 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 이작용성 분자.

청구항 44

제42항에 있어서, TGF β R은 TGF β RII인 이작용성 분자.

청구항 45

제44항에 있어서, TGF β RII는 TGF β 2 및 TGF β 3에 비해 TGF β 1에 선택적으로 결합하는 것인 이작용성 분자.

청구항 46

제45항에 있어서, TGF β 1은 인간 TGF β 1 또는 마우스 TGF β 1인 이작용성 분자.

청구항 47

제42항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, TGF β R의 ECD는 서열번호: 66, 79, 78, 77의 아미노산 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하지만 TGF- β 에 대한 특이적 결합 특이성 및/또는 친화도를 보유하는 것인 이작용성 분자.

청구항 48

제36항에 있어서, 제2 모이어티는 IL-1 결합 모이어티 또는 IL-1 수용체(IL-1R) 결합 모이어티를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 49

제48항에 있어서, IL-1 결합 모이어티는 가용성 IL-1R, IL-1R의 IL-1 결합 단편 또는 변이체, 또는 IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 50

제49항에 있어서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 XB2001, 루티키주맵, LY2189102 및 베르메키맵으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항-IL-1 α 항체로부터의, 또는 SSGJ-613, CDP484, 카나키주맵 및 게보키주맵으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항-IL-1 β 항체로부터의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 51

제49항에 있어서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 104 또는 서열번호: 112의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 105 또는 서열번호: 113의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 106 또는 서열번호: 114의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 107 또는 서열번호: 115의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 108 또는 서열번호: 116의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 109 또는 서열번호: 117의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 52

제49항에 있어서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 104의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 105의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 106의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 107의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 108의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 109의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 53

제49항에 있어서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 112의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 113의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 114의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 115의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 116의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 117의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 54

제49항에 있어서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 102, 서열번호: 110, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 103, 서열번호: 111, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 55

제49항에 있어서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 102, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 103, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 56

제49항에 있어서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 110, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 111, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 57

제49항에 있어서, 이작용성 분자는 서열번호: 118 또는 서열번호: 120의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및/또는 서열번호: 119 또는 서열번호: 121의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 58

제49항에 있어서, IL-1 결합 모이어티는 IL-1RI의 세포외 도메인(ECD), 임의의 IL-1RI의 IL-1 결합 단편 또는 변이체, IL-1RI의 ECD, IL-1RII, 또는 IL-1RII의 ECD, 또는 IL-1RAP, 또는 IL-1RAP의 ECD, IL-1sRI 또는 IL-1sRII를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 59

제48항에 있어서, IL-1R 결합 모이어티는 IL-1Ra 또는 이의 IL-1 결합 단편 또는 변이체, 또는 IL-1R에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 60

제59항에 있어서, IL-1R에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 스페슬리맵, 아스테콜리맵, 임시돌리맵, AMG 108, 멜릴리맵, 니다닐리맵, MEDI8968, REGN6490, HB0034 및 CSC012로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체로부터의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 61

제60항에 있어서, IL-1R 결합 모이어티는 서열번호: 67 또는 76의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 67 또는 76에 대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 이의 IL-1 결합 단편 또는 변이체를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 62

제48항 또는 제49항에 있어서, IL-1은 IL-1 α 또는 IL-1 β 인 이작용성 분자.

청구항 63

제62항에 있어서, IL-1 β 는 인간 IL-1 β 인 이작용성 분자.

청구항 64

제16항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 모이어티는 항종양 면역을 자극하고, 면역자극성 폴리펩타이드를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 65

제64항에 있어서, 면역자극성 폴리펩타이드는 인터루킨(IL)-2(IL-2), IL-15, IL-21, IL-10, IL-12, IL-23, IL-27, IL-35, 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 가용성 CD4, 가용성 LAG-3, IFN- α , 또는 이의 기능적 등가물을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 66

제65항에 있어서, 가용성 LAG-3은 LAG-3의 세포외 도메인(ECD) 또는 이의 MHCII 결합 변이체를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 67

제16항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 모이어티는 항종양 면역을 자극하고, 면역억제성 수용체 신호 전달의 길항제를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 68

제67항에 있어서, 면역억제성 수용체는 신호-조절 단백질 알파(SIRP α)인 이작용성 분자.

청구항 69

제68항에 있어서, 제2 모이어티는 CD47과 SIRP α 사이의 상호작용을 차단하는 것인 이작용성 분자.

청구항 70

제69항에 있어서, 제2 모이어티는 CD47 결합 도메인 또는 SIRP α 결합 도메인을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 71

제70항에 있어서, CD47 결합 도메인은 가용성 SIRP α 또는 이의 CD47 결합 단편 또는 변이체, 또는 항-CD47 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 72

제71항에 있어서, 가용성 SIRP α 는 SIRP α 의 세포외 도메인(ECD), 또는 이의 CD47 결합 변이체를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 73

제70항에 있어서, CD47 결합 도메인은 서열번호: 84의 아미노산 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖지만 CD47에 대한 결합 특이성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 74

제70항에 있어서, SIRP α 결합 도메인은 가용성 CD47 또는 이의 SIRP α 결합 단편 또는 변이체, 또는 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 75

제74항에 있어서, 가용성 CD47은 CD47의 세포외 도메인(ECD) 또는 이의 SIRP α 결합 단편 또는 변이체, 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 76

제1항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 모이어티와 제2 모이어티를 연결하는 링커를 추가로 포함하는 이작용성 분자.

청구항 77

제76항에 있어서, 링커는 절단가능한 링커, 절단불가능한 링커, 펩타이드 링커, 가요성 링커, 강성 링커, 나선

형 링커, 및 비나선 링커로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 이작용성 분자.

청구항 78

제77항에 있어서, 링커는 $((G)_nS)_m$ 의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 m 및 n 은 독립적으로 0 내지 30으로부터 선택되는 정수인 이작용성 분자.

청구항 79

제16항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 이작용성 분자는 제2 모이어티 중 하나 이상을 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 80

제79항에 있어서, 제2 모이어티 중 적어도 하나는 제1 모이어티의 폴리펩타이드 사슬의 N 말단 또는 C 말단에 연결되는 것인 이작용성 분자.

청구항 81

제79항에 있어서, 제2 모이어티 중 적어도 하나는 a) 제1 모이어티의 중쇄의 N 말단 또는 C 말단, 또는 b) 제1 모이어티의 경쇄의 N 말단 또는 C 말단에 연결되는 것인 이작용성 분자.

청구항 82

제79항에 있어서, 제2 모이어티 중 적어도 하나는 제1 모이어티의 중쇄 불변 영역의 C 말단에 연결되는 것인 이작용성 분자.

청구항 83

제79항에 있어서, 각각의 제2 모이어티는 제1 모이어티의 각 중쇄 불변 영역의 C 말단에 각각 연결되는 것인 이작용성 분자.

청구항 84

제79항에 있어서, 이작용성 분자는 제1 모이어티의 중쇄의 N 말단, 제1 모이어티의 중쇄의 C 말단, 제1 모이어티의 경쇄의 N 말단, 제1 모이어티의 경쇄의 C 말단, 또는 이의 임의의 조합에 각각 연결되는 하나 초과 제2 모이어티를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 85

제79항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 이작용성 분자는 동종이량체 또는 이종이량체 중쇄를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 86

제79항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄는 제2 모이어티의 존재 또는 위치에 대하여 이종이량체성인 이작용성 분자.

청구항 87

제86항에 있어서, 이종이량체성 중쇄는 제2 모이어티를 갖는 하나의 중쇄 및 제2 모이어티를 갖지 않는 다른 중쇄를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 88

제86항에 있어서, 이종이량체성 중쇄는 동종이량체화를 억제하고/거나 이종이량체화를 선호하는 방식으로 결합하는 이종이량체성 Fc 영역을 추가로 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 89

제86항에 있어서, 이종이량체성 Fc 영역은 노브-인투-홀(knobs-into-holes), 소수성 상호작용, 정전기적 상호작용

용, 친수성 상호작용, 또는 증가된 가요성을 통해 이중이량체로 결합할 수 있는 것인 이작용성 분자.

청구항 90

제88항 또는 제89항에 있어서, 이중이량체성 Fc 영역은 하나의 Fc 폴리펩타이드 사슬 내에 Y349C, T366S, L368A 또는 Y407V 또는 이의 임의의 조합을 포함하고, 또 다른 Fc 폴리펩타이드 사슬 내에 S354C, 또는 T366W 또는 이의 조합을 포함하며, 여기서 Fc 폴리펩타이드 사슬 내의 잔기의 넘버링은 카바트에서와 같은 EU 지수의 넘버링인 이작용성 분자.

청구항 91

제1항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 접합체 모이어티에 추가로 연결되는 이작용성 분자.

청구항 92

제91항에 있어서, 접합체 모이어티는 제거 변형제(clearance-modifying agent), 화학치료제, 독소, 방사성 동위원소, 란탄족(lanthanide), 발광 표지, 형광 표지, 효소-기질 표지, DNA-알킬화제(DNA-alkylator), 토포이소머라제 억제제, 튜블린 결합제, 또는 다른 항암 약물, 예컨대 안드로겐 수용체 억제제를 포함하는 것인 이작용성 분자.

청구항 93

제1항 내지 제92항 중 어느 한 항의 이작용성 분자, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물 또는 키트.

청구항 94

제16항 내지 제92항 중 어느 한 항의 이작용성 분자를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 95

제94항의 단리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

청구항 96

제95항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 97

제95항의 벡터가 발현되는 조건 하에서 제96항의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 제16항 내지 제92항 중 어느 한 항의 이작용성 분자를 발현시키는 방법.

청구항 98

치료적 유효량의 제16항 내지 제92항 중 어느 한 항의 이작용성 분자 및/또는 제93항의 약학 조성물 또는 키트를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 PD-L1 관련 질환을 치료, 예방 또는 완화하는 방법.

청구항 99

제98항에 있어서, 질환은 면역 관련 질환 또는 장애, 암, 또는 감염성 질환인 방법.

청구항 100

제99항에 있어서, 암은 폐암(예컨대, 비소세포 폐암), 간암, 췌장암, 유방암, 기관지암, 골암, 간 및 담관 암, 난소암, 고환암, 신장암, 방광암, 두경부암, 척추암, 뇌암, 자궁경부암, 자궁암, 자궁내막암, 결장암, 결장직장암, 전립선암, 위식도암, 직장암, 항문암, 위장암, 피부암, 뇌하수체암, 위암, 질암, 갑상선암, 교모세포종, 성상세포종, 흑색종, 골수이형성 증후군, 육종, 기형종, 신경교종, 및 선암종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 101

제98항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 PD-L1 발현 암 세포를 갖는 것으로 확인된 것인 방법.

청구항 102

제98항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, PD-L1 관련 질환은 PD-L1/PD-1 단일요법에 내성인 방법.

청구항 103

제98항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 인간인 방법.

청구항 104

제98항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 치료적 유효량의 제2 치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 105

제104항에 있어서, 제2 치료제는 화학치료제, 항암 약물, 방사선 요법, 면역요법제, 항혈관신생제, 표적요법제, 세포 요법제, 유전자 요법제, 호르몬 요법제, 또는 사이토카인으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 106

대상체에서 PD-L1 관련 질환 또는 병태를 치료하기 위한 약제의 제조에서의 제16항 내지 제92항 중 어느 한 항의 이작용성 분자의 용도.

청구항 107

제16항 내지 제92항 중 어느 한 항의 이작용성 분자의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 면역억제 사이토카인의 억제, 지속적인 면역 반응의 유도, 또는 항종양 면역의 자극으로부터 이익을 얻는 질환 또는 병태를 대상체에서 치료, 예방 또는 완화시키는 방법.

청구항 108

제107항에 있어서, 면역억제 사이토카인은 TGF β 인 방법.

청구항 109

제108항에 있어서, 질환 또는 병태는 TGF β 관련 질환 또는 병태인 방법.

청구항 110

제109항에 있어서, TGF β 관련 질환은 암, 섬유성 질환, 또는 신장 질환인 방법.

청구항 111

제107항에 있어서, 면역억제 사이토카인은 IL-1인 방법.

청구항 112

제111항에 있어서, 질환 또는 병태는 IL-1 관련 질환 또는 병태인 방법.

청구항 113

제107항에 있어서, 질환 또는 병태는 면역자극성 폴리펩타이드로 MHCII 신호전달을 자극함으로써 지속적인 면역 반응의 유도로부터 이익을 얻는 것인 방법.

청구항 114

제113항에 있어서, 면역자극성 폴리펩타이드는 가용성 LAG-3인 방법.

청구항 115

제107항에 있어서, 질환 또는 병태는 면역억제성 수용체 신호전달을 억제함으로써 항종양 면역의 자극으로부터

이익을 얻는 것인 방법.

청구항 116

제115항에 있어서, 면역억제성 수용체는 SIRP α 인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 일반적으로 면역 체크포인트 분자(예컨대, PD-L1)를 표적화하고 항종양 면역 억제(ATIS) 사이토카인(예컨대, IL-1 또는 TGFβ)의 활성을 차단하거나 또는 면역을 자극하는 신규한 이작용성 분자에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 프로그램된 사멸 1(PD-1) 및 그의 리간드 PD-L1 및 PD-L2는 T 세포 매개 면역 반응의 조절에서 핵심적인 공동억제 분자이다. PD-1은 말초 조직 내의 활성화된 T 세포의 표면 상에서 발현되는 단일 세포의 면역글로불린 수퍼패밀리(IgSF) V-세트 도메인을 갖는 유형 I 막 단백질이다(Zhang X, et al, Immunity, 2004, 20(3): 337-347). PD-L1 및 PD-L2는 일반적으로 수지상 세포 및 대식세포 상에서 발현되고, 이들의 엑토도메인은 막 원위 IgSF V-세트 및 막 근위 IgSF C-세트 도메인으로 구성된다(Latchman Y, et al, Nature immunology, 2001, 2(3): 261-268). PD-1과 그의 2개의 리간드의 라이게이션은 면역수용체 티로신 기반 억제 모티프 및 면역수용체 티로신 기반 스위치 모티프를 함유하는 PD-1의 세포질 도메인을 통해 공동억제성 신호전달을 개시하여, 신호전달에 관여하는 효과기 분자를 탈인산화시킴으로써 TCR 신호전달을 하향조절하는 SHP 포스포타제의 활성화를 유도한다(Chemnitz J M, et al, J. Immunol., 2004, 173(2): 945-954). 그 결과, PD-1 신호전달은 과도하거나 유해한 염증을 방지하고 정상 조건 하에서 자가항원에 대한 면역 내성을 유지한다(Collins A V, et al, Immunity, 2002, 17(2): 201-210).

[0003] PD-L1은 또 다른 수용체인 B7.1(B7-1 또는 CD80으로도 알려짐)과의 상호작용을 통해서도 T 세포 기능을 부정적으로 조절한다. PD-L1/PD-1 및 PD-L1/B7.1 복합체의 형성은 T 세포 수용체 신호전달을 부정적으로 조절하여, T 세포 활성화의 후속적인 하향조절 및 항종양 면역 활성의 억제를 초래한다(Butte M J, et al, Immunity, 2007, 27(1): 111-122).

[0004] PD-L1은 종종 상이한 종양에서 과발현되며, T 세포 상의 PD-1과 그의 상호작용은 암세포가 T 세포 매개 면역 반응을 회피할 수 있게 한다(Okazaki T, et al, Nature immunology, 2013, 14(12): 1212-1218). 따라서, PD-1/PD-L1 상호작용의 차단은 T 세포 활성화 및 항종양 반응을 회복시킬 수 있다(Callahan M K, et al, Immunity, 2016, 44(5): 1069-1078). 아테졸리주맵(Tecentriq®)(Rittmeyer A, et al, The Lancet, 2017, 389(10066): 255-265), 아벨루맵(Bavencio®)(Hamilton G, et al, Expert Opinion on Biological Therapy, 2017, 17(4): 515-523) 및 두르발루맵(Imfinzi®)(Brower V, The Lancet Oncology, 2016, 17(7): e275)과 같은 항체 기반 PD-1/PD-L1 차단 요법의 성공은 인간 암에 대한 싸움에서, 특히 고형 종양에 대한 돌파구를 제공하였다. 종양 세포 및/또는 침윤 면역 세포에 의한 PD-L1 발현과 PD-1/PD-L1 표적 요법에 대한 임상 반응 사이에 연관성이 나타났음에도 불구하고, 이 연관성은 완벽한 것은 아니다(Herbst, R., et al, Nature 515, 563-567 (2014); Taube J M, et al, Clinical cancer research, 2014, 20(19): 5064-5074). 소수의 PD-L1-양성 종양만이 이러한 치료에 반응하고, 특정 PD-L1-음성 종양은 그럼에도 불구하고 치료에 반응한다. 이는 추가적인 요인이 PD-1/PD-L1 표적 요법에 대한 환자 반응을 좌우하고 이러한 제제의 임상적 사용을 개선하기 위해 추가적인 예측 바이오마커가 확인되어야 할 가능성을 제기한다.

[0005] Mariathasan S 등은 반응 부족이 섬유아세포 내의 형질전환 성장 인자 β(TGF-β) 신호전달의 특징과 관련이 있음을 확인하였다(Mariathasan S, et al, Nature, 2018, 554(7693): 544-548). David JM 등은 또한 상피 중간엽 전이(EMT)를 유도하고 항종양 면역을 억제하는 것으로 알려진 다면발현(pleiotropic) 사이토카인으로서 TGF-β가 여러 상피 NSCLC 세포주에서 종양 PD-L1 발현을 상향조절할 수 있고 상향조절이 TGF-β 신호전달의 핵심적인 다운스트림 효과기인 Smad2의 인산화와 관련이 있음을 확인하였다(David J M, et al, Oncoimmunology, 2017, 6(10): e1349589). 마우스에서, 항-PD-L1과 함께 TGF-β 차단 항체의 치료적 투여는 기질 세포에서 TGF-β 신호전달을 감소시켰고, 종양의 중심 내로의 T 세포 침투를 촉진하였으며, 강력한 항종양 면역 및 종양 퇴행을 유발하였다(Mariathasan S, et al, Nature, 2018, 554(7693): 544-548).

- [0006] 그러나, 항-PD-L1 항체의 낮은 친화도는 여전히 높은 치료 효능 및 낮은 독성 부작용을 달성하는 데 어려움이 있다.
- [0007] 따라서, PD-L1에 대한 높은 결합 친화도, 개선된 치료 효능 및 감소된 독성 부작용을 갖는 치료 분자가 필요하다.

발명의 내용

- [0008] 본 개시내용 전반에 걸쳐, 관사 "a", "an," 및 "the"는 관사의 문법적 대상 중 하나 또는 둘 이상(즉, 적어도 하나)을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 예로서, "항체"는 하나의 항체 또는 둘 이상의 항체를 의미한다.
- [0009] 일 양태에서, 본 개시내용은 면역 체크포인트 분자에 결합하는 제1 모이어티, 및 인터루킨-1(IL-1)의 활성을 차단하는 제2 모이어티를 포함하는 이작용성(bi-functional) 분자를 제공한다.
- [0010] 특정 구현예에서, 제1 모이어티는 CD27, CD70, CD28, CD80(B7-1), CD86(B7-2), CD40, CD40L(CD154), CD122, CD137, CD137L, OX40(CD134), OX40L(CD252), GITR, ICOS(CD278), 및 ICOSLG(CD275), CD2, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), CD30, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, Nkp80, CD160, 및 CD83으로 이루어진 군으로부터 선택적으로 선택되는 면역자극성 체크포인트 분자의 작용제를 포함한다.
- [0011] 특정 구현예에서, 제1 모이어티는 A2AR, B7-H3(CD276), B7-H4(VTCN1), BTLA(CD272), CTLA-4(CD152), IDO1, IDO2, TDO, KIR, LAG3, NOX2, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, VISTA, SIGLEC7(CD328), TIGIT, PVR(CD155), SIGLEC9(CD329), CD160, LAIR1, 2B4(CD244), CD47, 및 B7-H5로 이루어진 군으로부터 선택적으로 선택되는 면역 억제성 체크포인트 분자의 길항제를 포함한다.
- [0012] 특정 구현예에서, 면역 체크포인트 분자는 PD-L1이다.
- [0013] 특정 구현예에서, 제1 모이어티는 PD-L1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고, 제2 모이어티는 IL-1 결합 모이어티 또는 IL-1 수용체(IL-1R) 결합 모이어티를 포함한다.
- [0014] 특정 구현예에서, IL-1 결합 모이어티는 IL-1R 또는 이의 IL-1 결합 단편 또는 변이체, 또는 IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0015] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 XB2001, 루티키주맵, LY2189102 및 베르메키맵으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항-IL-1 α 항체로부터의, 또는 SSGJ-613, CDP484, 카나키주맵 및 게보키주맵으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항-IL-1 β 항체로부터의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0016] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 104 또는 서열번호: 112의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 105 또는 서열번호: 113의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 106 또는 서열번호: 114를 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 107 또는 서열번호: 115의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 108 또는 서열번호: 116의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 109 또는 서열번호: 117의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0017] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 104의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 105의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 106의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 107의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 108의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 109의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0018] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 112의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 113의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 114의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 115의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 116의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 117의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0019] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 102, 서열번호: 110, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 103, 서열번호: 111, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0020] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 102, 및 이의 적어도 80% 서열 동일

성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 103, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

- [0021] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 110, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 111, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0022] 특정 구현예에서, IL-1R 결합 모이어티는 인터루킨-1 수용체 길항제 또는 이의 단편 또는 변이체, 또는 IL-1R에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0023] 특정 구현예에서, IL-1R에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 스페슬리맵, 아스테콜리맵, 임시돌리맵, AMG 108, 멜릴리맵, 니다닐리맵, MEDI8968, REGN6490, HB0034 및 CSC012로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체로부터의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0024] 또 다른 양태에서, 이작용성 분자는 PD-L1에 결합하는 제1 모이어티, 및 a) 면역억제 사이토카인의 활성을 차단하거나 b) 면역을 자극하는 제2 모이어티를 포함하고, 여기서 제1 모이어티는 중쇄 가변(VH) 영역 및/또는 경쇄 가변(VL) 영역을 포함하는 PD-L1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은
- [0025] a) **DYYMN**(서열번호: 1) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0026] b) **DINPNXX₁X₂TX₃YNHKFKG**(서열번호: 19) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하는 HCDR2, 및
- [0027] c) **WGDGPFAY**(서열번호: 3) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고/거나
- [0028] 여기서, 경쇄 가변 영역은
- [0029] d) **KASQNVX₁X₂X₃VA**(서열번호: 20) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0030] e) **SX₁SX₂RYT**(서열번호: 21) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 LCDR2, 및
- [0031] f) **QQYSNYPT**(서열번호: 6) 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하고;
- [0032] 여기서, X₁은 G 또는 A이고, X₂는 G 또는 D 또는 Q 또는 E 또는 L이며, X₃은 S 또는 M 또는 Q 또는 L 또는 V이고, X₄는 G 또는 P 또는 K이며, X₅는 A 또는 G이고, X₆은 A 또는 I이며, X₇은 A 또는 N 또는 R 또는 V이고, X₈은 N 또는 H 또는 V 또는 D이다.
- [0033] 특정 구현예에서, 중쇄 가변 영역은
- [0034] a) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0035] b) 서열번호: 2, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 17 및 서열번호: 18로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 HCDR2,
- [0036] c) 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고/거나,
- [0037] 경쇄 가변 영역은
- [0038] d) 서열번호: 4, 서열번호: 7, 서열번호: 8 및 서열번호: 9로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0039] e) 서열번호: 5, 서열번호: 10, 서열번호: 11 및 서열번호: 12로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 LCDR2,
- [0040] f) 서열번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0041] 특정 구현예에서, 중쇄 가변 영역은

- [0042] a) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 2의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0043] b) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 13의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0044] c) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 14의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0045] d) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 15의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0046] e) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 17의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0047] f) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 18의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역
- [0048] 으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0049] 특정 구현예에서, 경쇄 가변 영역은
- [0050] a) 서열번호: 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0051] b) 서열번호: 9의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0052] c) 서열번호: 8의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0053] d) 서열번호: 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 12의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및
- [0054] e) 서열번호: 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 11의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역
- [0055] 으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0056] 특정 구현예에서, PD-L1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 하나 이상, 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 하나 이상을 추가로 포함하고, 여기서:
- [0057] a) HFR1은 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY₅FT(서열번호: 40)의 아미노산 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하고,
- [0058] b) HFR2는 WVRQAPGQX₁₀LEWMG(서열번호: 41)의 아미노산 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하며,
- [0059] c) HFR3 서열은 RVTX₁₆TVDX₁₁SISTAYMELSR₁₂SDTAVVYCX₁₂X₁₃(서열번호: 42)의 아미노산 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하고,
- [0060] d) HFR4는 WQQGLVTVSS(서열번호: 25)의 아미노산 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하며,
- [0061] e) LFR1은 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC(서열번호: 26)의 아미노산 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하고,
- [0062] f) LFR2는 WYQQKPGKX₁₄PKLLIY(서열번호: 43)의 아미노산 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하며,
- [0063] g) LFR3은 GVPX₁₅RFSGSGSGTDFTX₁₇TISSLQPEDIATYYC(서열번호: 44)의 아미노산 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동

일성의 상동성 서열을 포함하고,

- [0064] h) LFR4는 **FGQGTKLEIK**(서열번호: 29)의 아미노산 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하며,
- [0065] 여기서, X_9 는 T 또는 V이고, X_{10} 은 G 또는 S이며, X_{11} 은 T 또는 K이고, X_{12} 는 A 또는 V이며, X_{13} 은 R 또는 K이고, X_{14} 는 A 또는 S이며, X_{15} 는 S 또는 D이고, X_{16} 은 M 또는 V이며, X_{17} 은 F 또는 L이다.
- [0066] 특정 구현예에서,
- [0067] HFR1은 서열번호: 22 및 30으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하고,
- [0068] HFR2는 서열번호: 23 및 31로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하며,
- [0069] HFR3은 서열번호: 24 및 서열번호: 32-35로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하고,
- [0070] HFR4는 서열번호: 25의 서열을 포함하며,
- [0071] LFR1은 서열번호: 26으로 이루어진 군으로부터의 서열을 포함하고,
- [0072] LFR2는 서열번호: 27 및 36으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하며,
- [0073] LFR3은 서열번호: 28, 및 37-38, 39, 45로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하고,
- [0074] LFR4는 서열번호: 29의 서열을 포함한다.
- [0075] 특정 구현예에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호: 46, 서열번호: 49, 서열번호: 50, 서열번호: 51, 서열번호: 52, 서열번호: 56, 서열번호: 57, 서열번호: 58, 서열번호: 59, 서열번호: 60, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0076] 특정 구현예에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호: 47, 서열번호: 54, 서열번호: 55, 서열번호: 61, 서열번호: 62, 서열번호: 63, 서열번호: 64, 서열번호: 65, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.
- [0077] 특정 구현예에서, PD-L1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 49/54, 50/54, 51/54, 52/54, 49/55, 50/55, 51/55, 52/55, 58/62, 58/63, 58/64, 58/65, 59/62, 59/63, 59/64, 59/65, 60/62, 60/63, 60/64, 및 60/65로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 서열의 쌍을 포함한다.
- [0078] 특정 구현예에서, PD-L1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하지만 PD-L1에 대한 특이적 결합 특이성 및/또는 친화도를 보유한다.
- [0079] 특정 구현예에서, 치환 또는 변형 중 적어도 하나는 CDR 서열 중 하나 이상, 및/또는 VH 또는 VL 서열의 비-CDR 영역 중 하나 이상에 존재한다.
- [0080] 특정 구현예에서, PD-L1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 면역글로불린 불변 영역, 선택적으로 인간 Ig의 불변 영역, 또는 선택적으로 인간 IgG의 불변 영역을 추가로 포함한다.
- [0081] 특정 구현예에서, 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4의 Fc 영역을 포함한다.
- [0082] 특정 구현예에서, 인간 IgG1의 Fc 영역은 서열번호: 80, 또는 이의 적어도 80%(예컨대, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함한다.
- [0083] 특정 구현예에서, 불변 영역은 상응하는 야생형 Fc 영역에 비해 감소된 효과기 기능을 갖는 Fc 변이체를 포함한다. 특정 구현예에서, Fc 영역은 서열번호: 80에 비해 감소된 효과기 기능을 초래하는 하나 이상의 아미노산 잔기 변형 또는 치환을 포함한다.
- [0084] 특정 구현예에서, Fc 영역은 220S, 226S, 228P, 229S, 233P, 234V, 234G, 234A, 234F, 234A, 235A, 235G, 235E, 236E, 236R, 237A, 237K, 238S, 267R, 268A, 268Q, 269R, 297A, 297Q, 297G, 309L, 318A, 322A, 325L, 328R, 330S, 331S 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함하며, 여기서 Fc 영역 내의 잔기의 넘버링은 카바트(Kabat)에서와 같은 EU 지수의 넘버링이다.
- [0085] 특정 구현예에서, Fc 영역은 a) K322A, L234A, 및 L235A; b) P331S, L234F 및 L235E; c) L234A 및 L235A; c) N297A; d) N297Q; e) N297G; f) L235E; g) L234A 및 L235A(IgG1); h) F234A 및 L235A(IgG4); i) H268Q,

V309L, A330S 및 P331S(IgG2); j) V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S 및 P331S(IgG2)로 이루어진 군 으로부터 선택되는 돌연변이의 조합을 포함하며, 여기서 Fc 영역 내의 잔기의 넘버링은 카바트에서와 같은 EU 지수의 넘버링이다.

- [0086] 특정 구현예에서, Fc 변이체는 서열번호: 81의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0087] 특정 구현예에서, PD-L1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화된다.
- [0088] 특정 구현예에서, 항원 결합 단편은 디아바디, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv 단편, 디설파이드 안정화된 Fv 단편 (dsFv), (dsFv)₂, 이중특이적 dsFv(dsFv-dsFv'), 디설파이드 안정화된 디아바디(ds 디아바디), 단쇄 항체 분자 (scFv), scFv 이량체(2가 디아바디), 다중특이적 항체, 낙타화된 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 및 2가 도메인 항체이다.
- [0089] 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 PD-L1 및 시노(cyno) PD-L1 모두에 결합할 수 있다.
- [0090] 특정 구현예에서, 제1 모이어티는 PD-L1에 대한 결합에 대해 본원에 제공된 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0091] 특정 구현예에서, 면역억제 사이토카인은 형질전환 성장 인자 β (TGF- β) 슈퍼패밀리, IL-1, 또는 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 내의 사이토카인을 포함한다.
- [0092] 특정 구현예에서, TGF- β 슈퍼패밀리 내의 면역억제 사이토카인은 TGF- β , 골형성 단백질(BMP), 액티빈, NODAL, 및 성장 및 분화 인자(GDF)를 포함한다.
- [0093] 특정 구현예에서, 면역억제 사이토카인은 TGF- β 이다.
- [0094] 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 TGF β 결합 모이어티를 포함한다.
- [0095] 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 가용성 TGF β 수용체(TGF β R) 또는 이의 TGF β 결합 단편 또는 변이체, 또는 TGF β 에 대한 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0096] 특정 구현예에서, 가용성 TGF β R은 TGF β R의 세포외 도메인(ECD), 또는 TGF β 결합 단편, 또는 이의 변이체를 포함한다.
- [0097] 특정 구현예에서, TGF β R은 TGF β 수용체 I(TGF β RI), TGF β 수용체 II(TGF β RII), TGF β 수용체 III(TGF β RIII), 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0098] 특정 구현예에서, TGF β R은 TGF β RII이다.
- [0099] 특정 구현예에서, TGF β RII는 TGF β 2 및 TGF β 3에 비해 TGF β 1에 선택적으로 결합한다.
- [0100] 특정 구현예에서, TGF β 1은 인간 TGF β 1 또는 마우스 TGF β 1이다.
- [0101] 특정 구현예에서, TGF β R의 ECD는 서열번호: 66, 79, 78, 77의 아미노산 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일 성을 갖는 서열을 포함하지만 TGF- β 에 대한 특이적 결합 특이성 및/또는 친화도를 보유한다.
- [0102] 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 IL-1 결합 모이어티 또는 IL-1 수용체(IL-1R) 결합 모이어티를 포함한다.
- [0103] 특정 구현예에서, IL-1 결합 모이어티는 가용성 IL-1R, IL-1R의 IL-1 결합 단편 또는 변이체, 또는 IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0104] 특정 구현예에서, IL-1 결합 모이어티는 IL-1RI의 세포외 도메인(ECD), 임의의 IL-1RI의 IL-1 결합 단편 또는 변이체, IL-1RI의 ECD, IL-1RII, 또는 IL-1RII의 ECD, 또는 IL-1RAP, 또는 IL-1RAP의 ECD, IL-1sRI 또는 IL-1sRII를 포함한다.
- [0105] 특정 구현예에서, IL-1R 결합 모이어티는 IL-1Ra 또는 이의 IL-1 결합 단편 또는 변이체, 또는 IL-1R에 대한 항 체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0106] 특정 구현예에서, IL-1R에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 스페슬리맵, 아스테콜리맵, 임시돌리맵, AMG 108, 멜릴리맵, 니다닐리맵, MEDI8968, REGN6490, HB0034 및 CSC012로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체로부터 의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0107] 특정 구현예에서, IL-1R 결합 모이어티는 서열번호: 67 또는 76의 아미노산 서열, 또는 서열번호: 67 또는 76에

대해 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 이의 IL-1 결합 단편 또는 변이체를 포함한다.

- [0108] 특정 구현예에서, IL-1은 IL-1 α 또는 IL-1 β 이다.
- [0109] 특정 구현예에서, IL-1 β 는 인간 IL-1 β 이다.
- [0110] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 XB2001, 루티키주맵, LY2189102 및 베르메키맵으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항-IL-1 α 항체로부터의, 또는 SSGJ-613, CDP484, 카나키누맵 및 게보키주맵으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항-IL-1 β 항체로부터의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0111] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 104 또는 서열번호: 112의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 105 또는 서열번호: 113의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 106 또는 서열번호: 114의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 107 또는 서열번호: 115의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 108 또는 서열번호: 116의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 109 또는 서열번호: 117의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0112] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 104의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 105의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 106의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 107의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 108의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 109의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0113] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 112의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 113의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 114의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 115의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 116의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 117의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0114] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 102, 서열번호: 110, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 103, 서열번호: 111, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0115] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 102, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 103, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0116] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 110, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 111, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0117] 특정 구현예에서, 이작용성 분자는 서열번호: 118 또는 서열번호: 120의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및/또는 서열번호: 119 또는 서열번호: 121의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0118] 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 항종양 면역을 자극하고, 면역자극성 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0119] 특정 구현예에서, 면역자극성 폴리펩타이드는 인터루킨(IL)-2(IL-2), IL-15, IL-21, IL-10, IL-12, IL-23, IL-27, IL-35, 파괴구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 가용성 CD4, 가용성 LAG-3, 또는 IFN- α , 또는 이의 기능적 등가물을 포함한다.
- [0120] 특정 구현예에서, 가용성 LAG-3은 LAG-3의 세포외 도메인(ECD) 또는 이의 MHCII 결합 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0121] 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 항종양 면역을 자극하고, 면역억제성 수용체 신호전달의 길항제를 포함한다.
- [0122] 특정 구현예에서, 면역억제성 수용체는 신호-조절 단백질 알파(SIRP α)이다.
- [0123] 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 CD47과 SIRP α 사이의 상호작용을 차단한다.

- [0124] 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 CD47 결합 도메인 또는 SIRP α 결합 도메인을 포함한다.
- [0125] 특정 구현예에서, CD47 결합 도메인은 가용성 SIRP α 또는 이의 CD47 결합 단편 또는 변이체, 또는 항-CD47 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0126] 특정 구현예에서, 가용성 SIRP α 는 SIRP α 의 세포외 도메인(ECD), 또는 이의 CD47 결합 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0127] 특정 구현예에서, 가용성 SIRP α 는 서열번호: 84의 아미노산 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖지만 CD47에 대한 결합 특이성을 보유하는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0128] 특정 구현예에서, SIRP α 결합 도메인은 가용성 CD47 또는 이의 SIRP α 결합 단편 또는 변이체, 또는 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0129] 특정 구현예에서, 가용성 CD47은 CD47의 세포외 도메인(ECD) 또는 이의 SIRP α 결합 단편 또는 변이체, 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0130] 특정 구현예에서, 이작용성 분자는 제1 모이어티와 제2 모이어티를 연결하는 링커를 추가로 포함한다.
- [0131] 특정 구현예에서, 링커는 절단가능한 링커, 절단불가능한 링커, 펩타이드 링커, 가요성 링커, 강성 링커, 나선형 링커, 및 비나선 링커로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0132] 특정 구현예에서, 링커는 ((G)nS)m의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 m 및 n은 독립적으로 0 내지 30(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10)으로부터 선택되는 정수이다. 특정 구현예에서, n은 2, 3, 4 또는 5이고, m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10이다. 특정 구현예에서, 링커는 서열번호: 68의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0133] 특정 구현예에서, 이작용성 분자는 하나 이상의 제2 모이어티를 포함한다.
- [0134] 특정 구현예에서, 제2 모이어티 중 적어도 하나는 제1 모이어티의 폴리펩타이드 사슬의 N 말단 또는 C 말단에 연결된다.
- [0135] 특정 구현예에서, 제2 모이어티 중 적어도 하나는 a) 제1 모이어티의 중쇄의 N 말단 또는 C 말단, 또는 b) 제1 모이어티의 경쇄의 N 말단 또는 C 말단에 연결된다.
- [0136] 특정 구현예에서, 제2 모이어티 중 적어도 하나는 제1 모이어티의 중쇄 불변 영역의 C 말단에 연결된다.
- [0137] 특정 구현예에서, 제2 모이어티 각각은 제1 모이어티의 각 중쇄 불변 영역의 C 말단에 각각 연결된다.
- [0138] 특정 구현예에서, 이작용성 분자는 제1 모이어티의 중쇄의 N 말단, 제1 모이어티의 중쇄의 C 말단, 제1 모이어티의 경쇄의 N 말단, 제1 모이어티의 경쇄의 C 말단, 또는 이의 임의의 조합에 각각 연결되는 둘 이상의 제2 모이어티를 포함한다.
- [0139] 특정 구현예에서, 이작용성 분자는 동종이량체 또는 이종이량체 중쇄를 포함한다.
- [0140] 특정 구현예에서, 중쇄는 제2 모이어티의 존재 또는 위치에 대하여 이종이량체성이다.
- [0141] 특정 구현예에서, 이종이량체성 중쇄는 제2 모이어티를 갖는 하나의 중쇄 및 제2 모이어티를 갖지 않는 다른 중쇄를 포함한다.
- [0142] 특정 구현예에서, 이종이량체성 중쇄는 동종이량체화를 억제하고/거나 이종이량체화를 선호하는 방식으로 결합하는 이종이량체성 Fc 영역을 추가로 포함한다.
- [0143] 특정 구현예에서, 제1 및 이종이량체성 Fc 영역은 노브-인투-홀(knobs-into-holes), 소수성 상호작용, 정전기적 상호작용, 친수성 상호작용, 또는 증가된 가요성을 통해 이종이량체로 결합할 수 있다.
- [0144] 특정 구현예에서, 이종이량체성 Fc 영역은 하나의 Fc 영역 내에 Y349C, T366S, L368A 또는 Y407V 또는 이의 임의의 조합을 포함하고, 또 다른 Fc 영역 내에 S354C, 또는 T366W 또는 이의 조합을 포함하며, 여기서 Fc 영역 내의 잔기의 넘버링은 카바트에서와 같은 EU 지수의 넘버링이다.
- [0145] 특정 구현예에서, 이작용성 분자는 하나 이상의 접합체 모이어티에 추가로 연결된다.
- [0146] 특정 구현예에서, 접합체 모이어티는 제거 변형제(clearance-modifying agent), 화학치료제, 독소, 방사성 동위

원소, 란탄족(lanthanide), 발광 표지, 형광 표지, 효소-기질 표지, DNA-알킬화제(DNA-alkylator), 토포이소머라제 억제제, 튜블린 결합제, 또는 다른 항암 약물, 예컨대 안드로겐 수용체 억제제를 포함한다.

- [0147] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 이작용성 분자 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물 또는 키트를 추가로 제공한다.
- [0148] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 이작용성 분자를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드를 추가로 제공한다.
- [0149] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 단리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 추가로 제공한다.
- [0150] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 벡터를 포함하는 숙주 세포를 추가로 제공한다.
- [0151] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 벡터가 발현되는 조건 하에서 본원에 제공된 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 본원에 제공된 이작용성 분자를 발현시키는 방법을 추가로 제공한다.
- [0152] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 이작용성 분자의 치료적 유효량 및/또는 본원에 제공된 약학 조성물 또는 키트를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 PD-L1 관련 질환을 치료, 예방 또는 완화하는 방법을 추가로 제공한다.
- [0153] 특정 구현예에서, 질환은 면역 관련 질환 또는 장애, 암, 자가면역 질환, 또는 감염성 질환이다.
- [0154] 특정 구현예에서, 암은 폐암(예컨대, 비소세포 폐암), 간암, 췌장암, 유방암, 기관지암, 골암, 간 및 담관 암, 난소암, 고환암, 신장암, 방광암, 두경부암, 척추암, 뇌암, 자궁경부암, 자궁암, 자궁내막암, 결장암, 결장직장암, 전립선암, 위식도암, 직장암, 항문암, 위장암, 피부암, 뇌하수체암, 위암, 질암, 갑상선암, 교모세포종, 성상세포종, 흑색종, 골수이형성 증후군, 육종, 기형종, 신경교종, 및 선암종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0155] 특정 구현예에서, 대상체는 PD-L1 발현 암 세포를 갖는 것으로 확인되었다.
- [0156] 특정 구현예에서, 대상체는 인간이다.
- [0157] 특정 구현예에서, 방법은 제2 치료제의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0158] 특정 구현예에서, 제2 치료제는 화학치료제, 항암 약물, 방사선 요법, 면역요법제, 항혈관신생제, 표적 요법제, 세포 요법제, 유전자 요법제, 호르몬 요법제, 또는 사이토카인으로부터 선택된다.
- [0159] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 PD-L1 관련 질환 또는 병태를 치료하기 위한 약제의 제조에서의 본원에 제공된 이작용성 분자의 용도를 제공한다.
- [0160] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 이작용성 분자의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 면역억제 사이토카인의 억제, 지속적인 면역 반응의 유도, 또는 항종양 면역의 자극으로부터 이익을 얻을 질환 또는 병태를 대상체에서 치료, 예방 또는 완화시키는 방법을 제공한다.
- [0161] 특정 구현예에서, 면역억제 사이토카인은 TGF β 이다.
- [0162] 특정 구현예에서, 질환 또는 병태는 TGF β 관련 질환 또는 병태이다.
- [0163] 특정 구현예에서, TGF β 관련 질환은 암, 섬유성 질환, 또는 신장 질환이다.
- [0164] 특정 구현예에서, 면역억제 사이토카인은 IL-1이다.
- [0165] 특정 구현예에서, 질환 또는 병태는 IL-1 관련 질환 또는 병태이다.
- [0166] 특정 구현예에서, 질환 또는 병태는 면역억제성 수용체 신호전달, 예컨대, SIRP α 신호전달을 억제함으로써 항종양 면역의 자극으로부터 이익을 얻을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0167] 도 1은 ELISA에 의해 인간 PD-L1에 대한 인간화 4B6 항체 결합을 보여준다.
- 도 2는 ELISA에 의해 인간 PD-L1에 대한 Hu4B6_HgLa 결합을 보여준다.
- 도 3a - 도 3c는 ELISA에 의해 PD-L1에 대한 AM-4B6-IgG1-TGF β RII 변이체 결합을 보여준다.

- 도 4는 유세포 분석을 사용하여 AM-4B6-IgG1-TGF β RII 변이체의 친화도 순위를 보여준다.
- 도 5a 및 5b는 AM-4B6-IgG1-TGF β RII 변이체에 의한 PD-L1/PD-1 또는 PD-L1/B7-1의 차단을 보여준다.
- 도 6은 세포 기반 분석을 사용하여 AM-4B6-IgG1-TGF β RII 변이체에 의한 PD-L1/PD-1의 차단을 보여준다.
- 도 7은 안정한 세포주를 이용하여 발현된 AM4B6_hIgG1_TBRII(20-136)의 SDS-PAGE를 보여준다.
- 도 8a 및 도 8b는 ELISA 분석에 의해 인간 PD-L1 또는 시노 PD-L1에 대한 결합을 보여준다.
- 도 9a - 도 9c는 ELISA 분석에 의해 인간 PD-L1 및 B7 패밀리의 다른 구성원 및 TGF β 수퍼패밀리의 다른 구성원에 대한 결합을 보여준다.
- 도 10a - 도 10f는 FACS 분석에 의해 PD-L1 발현 세포에 대한 결합을 보여준다.
- 도 11은 FACS 분석에 의해 활성화된 인간 T 세포 상의 인간 PD-L1에 대한 결합을 보여준다.
- 도 12a - 도 12b는 ELISA 분석에 의해 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1 결합 또는 시노 PD-1에 대한 시노 PD-L1 결합의 차단을 보여준다.
- 도 13은 ELISA 분석에 의해 hPD-L1 및 TGF β 1에 대한 동시 결합을 보여준다.
- 도 14는 리포터 분석을 사용하여 hPD-L1/hPD-1을 차단하는 것을 보여준다.
- 도 15는 TGF- β 리포터 HEK-293 세포주를 사용하여 TGF β 1 신호전달을 차단하는 것을 보여준다.
- 도 16은 투베르쿨린(TB)에 의해 자극된 PBMC의 IFN γ 방출에 대한 AM4B6-hIgG1-TGF β RII'의 효과를 보여준다.
- 도 17a - 도 17b는 MC38-hPD-L1 종양 모델에서의 항종양 활성을 보여준다.
- 도 18a - 도 18b는 H460 종양 모델에서의 항종양 활성을 보여준다.
- 도 19a - 도 19b는 EMT6-hPD-L1 종양 모델에서의 항종양 활성을 보여준다.
- 도 20a - 도 20c는 생체 내에서 AM4B6-hIgG1-TGF β RII의 약동학 및 약리학 연구를 보여준다.
- 도 21은 ELISA에 의해 인간 PD-L1에 대한 AM4B6-hIgG1-IL-1RA의 결합 활성을 보여준다.
- 도 22는 FACS 분석에 의해 인간 PD-L1에 대한 AM4B6-hIgG1-IL-1RA의 결합 활성을 보여준다.
- 도 23은 세포 기반 분석을 사용하여 AM4B6-hIgG1-IL-1RA에 의한 PD-L1/PD-1의 차단을 보여준다.
- 도 24는 ELISA에 의해 인간 IL-1 β 에 대한 AM4B6-IgG1-IL-1RA의 차단 활성을 보여준다.
- 도 25는 리포터 세포 상의 인간 IL-1 β 에 대한 AM4B6-hIgG1-IL-1RA의 차단 활성을 보여준다.
- 도 26은 비대칭 이작용성 항체의 SEC-HPLC 순도를 보여준다.
- 도 27은 ELISA에 의해 측정된 바와 같이 인간 PD-L1에 대한 이작용성 분자의 결합을 보여준다.
- 도 28은 ELISA에 의해 측정된 바와 같이 인간 CD47에 대한 이작용성 분자의 결합을 보여준다.
- 도 29는 hIL-1 β 단백질에 대한 IgG-scFv-ACZ885-AM4B6 및 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 bsAb의 ELISA 결합 활성을 보여준다.
- 도 30은 hPD-L1 단백질에 대한 IgG-scFv-ACZ885-AM4B6 및 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 bsAb의 ELISA 결합 활성을 보여준다.
- 도 31은 FACS 방법에 의해 PD-L1 발현 293T 세포에 대한 IgG-scFv-ACZ885-AM4B6 및 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6의 결합을 보여준다.
- 도 32는 IgG-scFv-ACZ885-AM4B6 및 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6의 세포 기반 PD1/PD-L1 차단 활성을 보여준다.
- 도 33은 HDF 세포 상의 인간 IL-1 β 에 대한 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6의 차단 활성을 보여준다.
- 도 34는 리포터 세포 상의 hIL-1 β 에 대한 IgG-scFv-ACZ885-AM4B6의 차단 활성을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0168] 본 개시내용의 하기 설명은 단지 본 개시내용의 다양한 구현예를 예시하기 위한 것이다. 이와 같이, 논의된 특정 변형은 본 개시내용의 범위에 대한 제한으로 해석되지 않아야 한다. 본 개시내용의 범위를 벗어나지 않으면서 다양한 균등물, 변경, 및 변형이 이루어질 수 있음이 당업자에게 명백할 것이며, 이러한 균등한 구현예가 본원에 포함되어야 하는 것으로 이해된다. 간행물, 특허 및 특허 출원을 포함하여 본원에 인용된 모든 참고문헌은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.
- [0169] **정의**
- [0170] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 특정 항원에 결합하는 임의의 면역글로불린, 단일클론 항체, 다클론 항체, 다가 항체, 2가 항체, 1가 항체, 다중특이적 항체, 또는 이중특이적 항체를 포함한다. 천연 온전한 항체는 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함한다. 포유동물 중쇄는 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 분류되며, 각각의 중쇄는 가변 영역(VH) 및 제1, 제2, 제3, 및 선택적으로 제4 불변 영역(각각 CH1, CH2, CH3, CH4)으로 구성되고; 포유동물 경쇄는 λ 또는 κ 로 분류되는 반면, 각 경쇄는 가변 도메인(VL) 및 불변 도메인으로 구성된다. 항체는 "Y" 모양을 가지며, Y의 줄기는 디설파이드 결합을 통해 함께 결합된 2개의 중쇄의 제2 및 제3 불변 영역으로 구성된다. Y의 각각의 팔은 단일 경쇄의 가변 및 불변 영역에 결합된 단일 중쇄의 가변 영역 및 제1 불변 영역을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 항원 결합을 담당한다. 두 쇠에서의 가변 영역은 일반적으로 상보성 결정 영역(CDR)(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 CDR, HCDR1, HCDR2, HCDR3을 포함하는 중쇄 CDR)으로 불리는 3개의 매우 가변적인 루프를 함유한다. 본원에 개시된 항체 및 항원 결합 단편에 대한 CDR 경계는 카바트(Kabat), IMGT, 초티아(Chothia), 또는 알-라지카니(Al-Lazikani)의 규정에 의해 정의되거나 확인될 수 있다(Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., *J. Mol. Biol.*, 273(4), 927 (1997); Chothia, C. *et al.*, *J Mol Biol.* Dec 5;186(3):651-63 (1985); Chothia, C. and Lesk, A.M., *J.Mol.Biol.*, 196,901 (1987); Chothia, C. *et al.*, *Nature*. Dec 21-28;342(6252):877-83 (1989); Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Marie-Paule Lefranc *et al.*, *Developmental and Comparative Immunology*, 27: 55-77 (2003); Marie-Paule Lefranc *et al.*, *Immunome Research*, 1(3), (2005); Marie-Paule Lefranc, Molecular Biology of B cells (second edition), chapter 26, 481-514, (2015)). 3개의 CDR은 프레임워크 영역(FR)(LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4를 포함하는 경쇄 FR, HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4를 포함하는 중쇄 FR)으로 알려진 측접하는 스트레치 사이에 개재되며, 이들은 CDR보다 더 고도로 보존되고 스캐폴드를 형성하여 매우 가변적인 루프를 지원한다. 중쇄 및 경쇄의 불변 영역은 항원 결합에 관여하지 않지만 다양한 효과기 기능을 나타낸다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "효과기 기능"은 항체의 Fc 영역과 면역 세포 상의 C1q 보체 단백질 또는 Fc 수용체(FcRs) 사이의 상호작용에 의해 야기되는 세포 매개 또는 보체 매개 세포독성 효과를 지칭한다. 예시적인 효과기 기능은, 비제한적으로 항체 의존적 세포성 세포독성(ADCC), 항체 의존적 세포 매개 식세포작용(ADCP) 및 보체 의존적 세포독성(CDC) 효과를 포함한다. 항체는 그들의 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에 기초하여 부류에 할당된다. 항체의 5개의 주요 부류 또는 이소타입은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤 중쇄의 존재를 특징으로 하는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이다. 몇 가지 주요 항체 부류는 하위부류, 예컨대 IgG1(감마1 중쇄), IgG2(감마2 중쇄), IgG3(감마3 중쇄), IgG4(감마4 중쇄), IgA1(알파1 중쇄), 또는 IgA2(알파2 중쇄)로 나뉜다.
- [0171] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항체는 이의 임의의 항원 결합 단편을 포괄한다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "항원 결합 단편"은 하나 이상의 CDR을 포함하는 항체의 일부로부터 형성된 항체 단편, 또는 항원에 결합하지만 온전한 천연 항체 구조를 포함하지 않는 임의의 다른 항체 단편을 지칭한다. 항원 결합 단편의 예는, 비제한적으로, 디아바디, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 단편, 디설파이드 안정화된 Fv 단편(dsFv), (dsFv)₂, 이중특이적 dsFv(dsFv-dsFv'), 디설파이드 안정화된 디아바디(ds 디아바디), 단쇄 항체 분자(scFv), scFv 이량체(2가 디아바디), 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 낙타화된 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 및 2가 도메인 항체를 포함한다. 항원 결합 단편은 모 항체가 결합하는 동일한 항원에 결합할 수 있다.
- [0172] 항체와 관련하여 "Fab"는 디설파이드 결합에 의해 단일 중쇄의 가변 영역 및 제1 불변 영역에 결합된 단일 경쇄(가변 및 불변 영역 모두)로 구성된 항체의 부분을 지칭한다.
- [0173] "Fab'"는 힌지 영역의 일부를 포함하는 Fab 단편을 지칭한다.
- [0174] "F(ab')₂"는 Fab'의 이량체를 지칭한다.
- [0175] 항체(예컨대 IgG, IgA, 또는 IgD 이소타입)와 관련하여 "Fc"는 디설파이드 결합을 통해 제2 중쇄의 제2 및 제3

불변 도메인에 결합된 제1 중쇄의 제2 및 제3 불변 도메인으로 구성된 항체의 부분을 지칭한다. IgM 및 IgE 이소타입의 항체와 관련하여 Fc는 제4 불변 도메인을 추가로 포함한다. 항체의 Fc 영역은 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC), 및 보체 의존적 세포독성(CDC)과 같은 다양한 효과기 기능을 담당하지만 항원 결합에서 기능하지 않는다.

- [0176] 항체와 관련하여 "Fv"는 완전한 항원 결합 부위를 갖는 항체의 가장 작은 단편을 지칭한다. Fv 단편은 단일 중쇄의 가변 영역에 결합된 단일 경쇄의 가변 영역으로 구성된다.
- [0177] "단일쇄 Fv 항체" 또는 "scFv"는 직접 또는 펩타이드 링커 서열을 통해 서로 연결된 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역으로 구성된 조각된 항체를 지칭한다(Huston JS *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:5879(1988)).
- [0178] "단일쇄 Fv-Fc 항체" 또는 "scFv-Fc"는 항체의 Fc 영역에 연결된 scFv로 구성된 조각된 항체를 지칭한다.
- [0179] "낙타화된 단일 도메인 항체", "중쇄 항체" 또는 "HCAb"는 2개의 V_H 도메인을 함유하고 경쇄를 함유하지 않는 항체를 지칭한다(Riechmann L. and Muyldermans S., *J Immunol Methods*. Dec 10; 231(1-2):25-38 (1999); Muyldermans S., *J Biotechnol*. Jun; 74(4):277-302 (2001); WO제94/04678호; WO제94/25591호; 미국 특허 제 6,005,079호). 중쇄 항체는 원래 낙타과(Camelidae)(낙타, 단봉낙타, 및 라마)로부터 유래되었다. 경쇄가 없지만, 낙타화된 항체는 진정한 항원 결합 레퍼토리를 갖는다(Hamers-Casterman C. *et al.*, *Nature*. Jun 3; 363(6428):446-8 (1993); Nguyen VK. *et al.* *Immunogenetics*. Apr; 54(1):39-47 (2002); Nguyen VK. *et al.* *Immunology*. May; 109(1): 93-101 (2003)). 중쇄 항체의 가변 도메인(VHH 도메인)은 적응 면역 반응에 의해 생성된 가장 작은 공지된 항원 결합 단위를 나타낸다(Koch-Nolte F. *et al.*, *FASEB J*. Nov; 21(13): 3490-8. Epub 2007 Jun 15 (2007)).
- [0180] "나노바디"는 중쇄 항체로부터의 VHH 도메인 및 2개의 불변 도메인인 CH2 및 CH3으로 구성되는 항체 단편을 지칭한다.
- [0181] "디아바디" 또는 "dAb"는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 포함하며, 여기서 단편은 동일한 폴리펩타이드 사슬 내의 VL 도메인에 연결된 VH 도메인(VH-VL 또는 VL-VH)을 포함한다(예컨대, Holliger P. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*. Jul 15;90(14):6444-8 (1993); EP제404097호; WO제93/1116호 참조). 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이에 쌍 형성을 허용하기에 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 또 다른 사슬의 상보적 도메인과 쌍을 형성하게 되어, 2개의 항원 결합 부위를 생성한다. 항원 결합 부위는 동일하거나 상이한 항원(또는 에피토프)을 표적화할 수 있다. 특정 구현예에서, "이중특이적 ds 디아바디"는 2개의 상이한 항원(또는 에피토프)을 표적화하는 디아바디이다.
- [0182] "도메인 항체"는 중쇄의 가변 영역 또는 경쇄의 가변 영역만을 함유하는 항체 단편을 지칭한다. 특정 경우, 2개 이상의 VH 도메인은 펩타이드 링커와 공유적으로 연결되어 2가 또는 다가 도메인 항체를 생성한다. 2가 도메인 항체의 2개의 VH 도메인은 동일하거나 상이한 항원을 표적화할 수 있다.
- [0183] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "가(valent)"는 주어진 분자 내의 항원 결합 부위의 특정 수의 존재를 지칭한다. 용어 "1가"는 하나의 단일 항원 결합 부위만을 갖는 항체 또는 항원 결합 단편을 지칭하고; 용어 "다가"는 다중 항원 결합 부위를 갖는 항체 또는 항원 결합 단편을 지칭한다. 이와 같이, 용어 "2가", "4가", 및 "6가"는 항원 결합 분자 내에 각각 2개의 결합 부위, 4개의 결합 부위, 및 6개의 결합 부위의 존재를 나타낸다. 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 2가이다.
- [0184] 본원에 사용된 바와 같이, "이중특이적" 항체는 2개의 상이한 단일클론 항체로부터 유래된 단편을 가지며 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 인공 항체를 지칭한다. 2개의 에피토프는 동일한 항원 상에 존재할 수 있거나, 또는 이들은 2개의 상이한 항원 상에 존재할 수 있다.
- [0185] 특정 구현예에서, "scFv 이량체"는 하나의 모이어티의 VH가 다른 모이어티의 VL과 배위하고 동일한 항원(또는 에피토프) 또는 상이한 항원(또는 에피토프)을 표적화할 수 있는 2개의 결합 부위를 형성하도록 또 다른 VH-VL 모이어티와 이량체화된 VH-VL(펩타이드 링커에 의해 연결됨)을 포함하는 2가 디아바디 또는 이중특이적 scFv(BsFv)이다. 다른 구현예에서, "scFv 이량체"는 VH1 및 VL1이 배위하고 VH2 및 VL2가 배위하며 각각의 배위된 쌍이 상이한 항원 특이성을 갖도록 VL1-VH2(또한 펩타이드 링커에 의해 연결됨)와 결합된 VH1-VL2(펩타이드 링커에 의해 연결됨)를 포함하는 이중특이적 디아바디이다.
- [0186] "dsFv"는 단일 경쇄의 가변 도메인과 단일 중쇄의 가변 도메인 사이의 결합이 디설파이드 결합인 디설파이드 안정화된 Fv 단편을 지칭한다. 일부 구현예에서, "(dsFv)2" 또는 "(dsFv-dsFv)"는 3개의 펩타이드 사슬, 즉 펩타

이드 링커(예컨대, 긴 가요성 링커)에 의해 연결되고 디선파이드 다리를 통해 각각 2개의 VL 모이어티에 결합된 2개의 VH 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, dsFv-dsFv'는 이중특이적이며, 여기서 각각의 디선파이드 쌍을 형성한 중쇄 및 경쇄는 상이한 항원 특이성을 갖는다.

[0187] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "키메라"는 하나의 종으로부터 유래된 중쇄 및/또는 경쇄의 일부, 및 상이한 종으로부터 유래된 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지를 갖는, 항체 또는 항원 결합 단편을 의미한다. 예시적인 예에서, 키메라 항체는 인간으로부터 유래된 불변 영역 및 비인간 동물, 예컨대 마우스로부터 유래된 가변 영역을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 비인간 동물은 포유동물, 예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 염소, 양, 기니아 피그, 또는 햄스터이다.

[0188] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "인간화된"은 항체 또는 항원 결합 단편이 비인간 동물로부터 유래된 CDR, 인간으로부터 유래된 FR 영역, 및 적용가능한 경우, 인간으로부터 유래된 불변 영역을 포함하는 것을 의미한다.

[0189] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "친화도"는 면역글로불린 분자(즉, 항체) 또는 이의 단편과 항원 사이의 비공유 상호작용의 강도를 지칭한다.

[0190] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합한다"는, 예를 들어 항체와 항원 사이와 같이, 2개의 분자 사이의 비무작위 결합 반응을 지칭한다. 특이적 결합은, 예를 들어 K_D 값으로 표시되는 결합 친화도, 즉 항원과 항원 결합 분자 사이의 결합이 평형에 도달할 때의 해리 속도 대 결합 속도의 비율(k_{off}/k_{on})을 특징으로 할 수 있다. K_D 는, 비제한적으로 표면 플라즈몬 공명 방법, 옥텟(Octet) 방법, 마이크로스케일 열영동 방법, HPLC-MS 방법 및 FACS 분석 방법을 포함하는 당업계에 공지된 임의의 통상적인 방법을 사용하여 결정될 수 있다. $\leq 10^{-6}$ M(예컨대 $\leq 5 \times 10^{-7}$ M, $\leq 2 \times 10^{-7}$ M, $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 5 \times 10^{-8}$ M, $\leq 2 \times 10^{-8}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 5 \times 10^{-9}$ M, $\leq 4 \times 10^{-9}$ M, $\leq 3 \times 10^{-9}$ M, $\leq 2 \times 10^{-9}$ M, 또는 $\leq 10^{-9}$ M)의 K_D 값은 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 PD-L1(예컨대, 인간 PD-L1 또는 시노몰구스 PD-L1) 사이의 특이적 결합을 나타낼 수 있다.

[0191] 본원에 사용된 바와 같이 "PD-L1에 대한 결합에 대해 경쟁하는" 능력은 PD-L1과 제2 항-PD-L1 항체 사이의 결합 상호작용을 임의의 검출가능한 정도까지 억제하는 제1 항체 또는 항원 결합 단편의 능력을 지칭한다. 특정 구현예에서, PD-L1에 대한 결합에 대해 경쟁하는 항체 또는 항원 결합 단편은 PD-L1 및 제2 항-PD-L1 항체 사이의 결합 상호작용을 적어도 85%, 또는 적어도 90% 억제한다. 특정 구현예에서, 이러한 억제는 95% 초과, 또는 99% 초과일 수 있다.

[0192] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "아미노산"은 각 아미노산에 특이적인 측쇄와 함께, 아민($-NH_2$) 및 카복실($-COOH$) 작용기를 함유하는 유기 화합물을 지칭한다. 아미노산의 명칭은 또한 본 개시내용에서 표준 단문자 또는 3 문자 코드로서 표시되며, 이는 하기와 같이 요약된다.

이름	3 문자 코드	단문자 코드
알라닌	Ala	A
아르기닌	Arg	R
아스파라긴	Asn	N
아스파르트산	Asp	D
시스테인	Cys	C
글루탐산	Glu	E
글루타민	Gln	Q
글리신	Gly	G
히스티딘	His	H
이소류신	Ile	I
류신	Leu	L
리신	Lys	K
메티오닌	Met	M
페닐알라닌	Phe	F
프롤린	Pro	P
세린	Ser	S
트레오닌	Thr	T
트립토판	Trp	W
티로신	Tyr	Y
발린	Val	V

[0193]

[0194]

용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 또한 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연 발생 아미노산의 인공 화학적 모방체인 아미노산 중합체뿐만 아니라, 자연 발생 아미노산 중합체 및 비자연 발생 아미노산 중합체에도 적용된다.

[0195]

아미노산 서열과 관련된 "보존적 치환"은 아미노산 잔기를 유사한 물리화학적 특성을 갖는 측쇄를 갖는 상이한 아미노산 잔기로 대체하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 보존적 치환은 소수성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기(예컨대, Met, Ala, Val, Leu 및 Ile) 사이에서, 중성 친수성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기(예컨대, Cys, Ser, Thr, Asn 및 Gln) 사이에서, 산성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기(예컨대, Asp, Glu) 사이에서, 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기(예컨대, His, Lys, 및 Arg) 사이에서, 또는 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 잔기(예컨대, Trp, Tyr 및 Phe) 사이에서 이뤄질 수 있다. 당업계에 공지된 바와 같이, 보존적 치환은 일반적으로 단백질 입체 구조에 유의한 변화를 유발하지 않으며, 따라서 단백질의 생물학적 활성을 보유할 수 있다.

[0196]

아미노산 서열(또는 핵산 서열)과 관련하여 "백분율(%) 서열 동일성"은 서열을 정렬하고, 필요한 경우 갭을 도입하여 최대 일치치를 달성한 후, 참조 서열 내의 아미노산(또는 핵산) 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산(또는 핵산) 잔기의 백분율로서 정의된다. 백분율 아미노산(또는 핵산) 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬은 예를 들어, 공개적으로 이용가능한 도구, 예컨대 BLASTN, BLASTp(미국 국립 생물 정보 센터(NCBI)의 웹사이트에서 이용가능함, 또한 Altschul S.F. et al, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990); Stephen F. et al, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997) 참고), ClustalW2(유럽 생물정보학 연구소의 웹사이트에서 이용가능함, 또한 Higgins D.G. et al, Methods in Enzymology, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. et al, Bioinformatics (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007) 참고), 및 ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 당업자는 상기 도구에 의해 제공되는 기본 파라미터를 사용할 수 있거나, 또는 예를 들어, 적합한 알고리즘을 선택함으로써 정렬에 대해 적절하게 파라미터를 바꿀 수 있다. 특정 구현예에서, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환에 의해 상이할 수 있다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사

한 화학적 특성(예컨대, 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄(R 기)를 갖는 또 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 것이다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 기능적 특성을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 2개 이상의 아미노산 서열이 보존적 치환에 의해 서로 상이한 경우, 유사성의 백분율 또는 정도는 치환의 보존적 성질을 보정하기 위해 상향 조정될 수 있다. 이러한 조정을 하기 위한 수단은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예컨대, 문헌[Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331]을 참고하며, 이는 참조로 본원에 포함된다.

[0197] 본원에 사용된 바와 같이, "상동성 서열"은 선택적으로 정렬될 때 또 다른 서열에 대해 적어도 80%(예컨대, 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%)의 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오타이드 서열(또는 그의 상보적 가닥) 또는 아미노산 서열을 지칭한다.

[0198] "단리된" 물질은 자연 상태에서부터 인간의 손에 의해 변경되었다. "단리된" 조성물 또는 물질이 자연에 존재하는 경우, 그것은 변화되었거나 그의 원래의 환경으로부터 제거되었거나, 또는 둘 모두이다. 예를 들어, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 "단리된" 것이 아니지만, 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 실질적으로 순수한 상태로 존재하도록 그의 자연 상태의 공존하는 물질로부터 충분히 분리되었다면 "단리된" 것이다. 단리된 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 상호교환적으로 사용되고, 단리된 핵산 분자의 서열을 지칭한다. 특정 구현예에서, "단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편"은 전기영동 방법(예컨대, SDS-PAGE, 등전 포커싱, 모세관 전기영동), 또는 크로마토그래피 방법(예컨대, 이온 교환 크로마토그래피 또는 역상 HPLC)에 의해 결정된 바와 같이 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 순도를 갖는 항체 또는 항원 결합 단편을 지칭한다.

[0199] 용어 "대상체"는 인간 및 비인간 동물을 포함한다. 비인간 동물은 모든 척추동물, 예컨대, 포유동물 및 비포유동물, 예컨대 비인간 영장류, 마우스, 래트, 고양이, 토끼, 양, 개, 소, 닭, 양서류 및 파충류를 포함한다. 언급된 경우를 제외하고, 용어 "환자" 또는 "대상체"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0200] 본원에 사용된 바와 같이 병태를 "치료하는 것" 또는 "치료"는 병태를 예방 또는 완화시키는 것, 병태의 발병 또는 발달 속도를 늦추는 것, 병태를 발병할 위험을 감소시키는 것, 병태와 관련된 증상의 발달을 예방 또는 지연시키는 것, 병태와 관련된 증상을 감소 또는 종료시키는 것, 병태의 완전한 또는 부분적 퇴행을 생성시키는 것, 병태를 치유하는 것, 또는 이의 일부 조합을 포함한다.

[0201] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "백터"는 유전적 요소를 발현시키기 위해, 예컨대 유전적 요소에 의해 코딩된 단백질, RNA 또는 DNA를 생산하거나 유전적 요소를 복제하기 위해, 유전적 요소가 작동가능하게 삽입될 수 있는 비히클을 지칭한다. 백터는 숙주 세포 내에서 그것이 운반하는 유전적 요소를 발현시키기 위해, 숙주 세포를 형질전환, 형질도입 또는 형질감염시키는 데 사용될 수 있다. 백터의 예는 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 인공 염색체, 예컨대 효모 인공 염색체(YAC), 박테리아 인공 염색체(BAC), 또는 P1 유래 인공 염색체(PAC), 박테리오파지, 예컨대 람다 파지 또는 M13 파지, 및 동물 바이러스를 포함한다. 백터는 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 선택가능한 요소, 및 리포터 유전자를 포함하는, 발현을 제어하기 위한 다양한 요소를 함유할 수 있다. 추가로, 백터는 복제 원점을 함유할 수 있다. 백터는 또한 비제한적으로 바이러스 입자, 리포솜, 또는 단백질 코팅을 포함하는, 세포 내로의 그의 진입을 보조하는 물질을 포함할 수 있다. 백터는 발현 백터 또는 클로닝 백터일 수 있다. 본 개시내용은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 본원에 제공된 핵산 서열, 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터(예컨대, SV40, CMV, EF-1 α), 및 적어도 하나의 선택 마커를 함유하는 백터(예컨대, 발현 백터)를 제공한다.

[0202] 본원에 사용된 바와 같이 "숙주 세포"는 외인성 폴리뉴클레오타이드 및/또는 백터가 도입된 세포를 지칭한다.

[0203] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "가용성"은 액체 및 수성 환경과 같은 용매에 용해되는 분자(예컨대, 단백질)의 능력을 지칭한다.

[0204] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "형질전환 성장 인자 베타" 및 "TGF β "는 전구체 및 성숙 TGF β 의 잠복성 형태 및 결합 또는 비결합된 복합체("잠복성 TGF β ")를 포함하여, 대상체(예컨대, 인간)로부터의 임의의 TGF 베타의 전장, 천연 아미노산 서열을 갖는 임의의 TGF β 패밀리 단백질을 지칭한다. 본원에서 이러한 TGF β 에 대한 언급은 TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3 이소형, 및 이의 잠복성 형태를 포함하여, 현재 확인된 형태 중 어느 하나에 대한 언급뿐만 아니라 임의의 공지된 TGF β 의 서열로부터 유래되고 상기 서열과 적어도 약 75%, 바람직하게는 적어도 약 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 85%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 90%, 및 더욱더 바람직하게는 적어도 약 95% 상동성인 폴리펩타이드를 포함하여, 미래에 확인되는 인간 TGF β 종에 대한 언급인 것으로 이해될 것

이다. 구체적 용어 "TGF β 1", "TGF β 2" 및 "TGF β 3"은 문헌, 예컨대, Derynck *et al.*, *Nature, Cancer Res.*, 47: 707 (1987); Seyedin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 261: 5693-5695 (1986); deMartin *et al.*, *EMBO J.*, 6: 3673 (1987); Kuppner *et al.*, *Int. J. Cancer*, 42: 562 (1988)에 정의된 TGF-베타를 지칭한다. 용어 "형질전환 성장 인자 베타", "TGF β ", "TGF 베타", "TGF- β ", 및 "TGF-베타"는 본 개시내용에서 상호교환적으로 사용된다.

[0205] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인간 TGF β 1"은 인간 TGFB1 유전자(예컨대, 야생형 인간 TGFB1 유전자)에 의해 코딩되는 TGF β 1 단백질을 지칭한다. 예시적인 야생형 인간 TGF β 1 단백질은 GenBank 등록번호 NP_000651.3에 의해 제공된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인간 TGF β 2"는 인간 TGFB2 유전자(예컨대, 야생형 인간 TGFB2 유전자)에 의해 코딩되는 TGF β 2 단백질을 지칭한다. 예시적인 야생형 인간 TGF β 2 단백질은 GenBank 등록번호 NP_001129071.1 및 NP_003229.1에 의해 제공된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인간 TGF β 3"은 인간 TGFB3 유전자(예컨대, 야생형 인간 TGFB3 유전자)에 의해 코딩되는 TGF β 3 단백질을 지칭한다. 예시적인 야생형 인간 TGF β 3 단백질은 GenBank 등록번호 NP_003230.1, NP_001316868.1 및 NP_001316867.1에 의해 제공된다.

[0206] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "마우스 TGF β 1", "마우스 TGF β 2", 및 "마우스 TGF β 3"은 각각 마우스 TGFB1 유전자(예컨대, 야생형 마우스 TGFB1 유전자), 마우스 TGFB2 유전자(예컨대, 야생형 마우스 TGFB2 유전자), 및 마우스 TGFB3 유전자(예컨대, 야생형 마우스 TGFB3 유전자)에 의해 코딩되는 TGF β 1 단백질, TGF β 2 단백질, 및 TGF β 3 단백질을 지칭한다. 예시적인 야생형 마우스(*Mus musculus*) TGF β 1 단백질은 GenBank 등록번호 NP_035707.1 및 CAA08900.1에 의해 제공된다. 예시적인 야생형 마우스 TGF β 2 단백질은 GenBank 등록번호 NP_033393.2에 의해 제공된다. 예시적인 야생형 마우스 TGF β 3 단백질은 GenBank 등록번호 AAA40422.1에 의해 제공된다.

[0207] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "TGF β 수용체"는 적어도 하나의 TGF β 이소형에 결합하는 임의의 수용체를 지칭한다. 일반적으로, TGF β 수용체는 TGF β 수용체 I(TGF β RI), TGF β 수용체 II(TGF β RII), 또는 TGF β 수용체 III(TGF β RIII)을 포함한다.

[0208] 인간과 관련하여, 용어 "TGF β 수용체 I" 또는 "TGF β RI"은 인간 TGF β 수용체 유형 1 서열을 지칭하며, 야생형 TGF β RI뿐만 아니라 적어도 하나의 TGF β 이소형에 결합할 수 있는 것으로 알려진 이의 모든 이소형 및 변이체를 포함한다. 야생형 TGF β RI의 예시적인 아미노산 서열은 GenBank 등록번호 ABD46753.1 하에 또는 UniProtKB-P36897 하에 이용가능하며, 또한 서열번호: 69로서 본원에 포함된다. 변이체 TGF β RI는 서열번호: 69의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 서열 동일성의 서열을 가질 수 있고, 야생형 서열(예컨대, 서열번호: 69)의 TGF β 결합 활성의 적어도 25%, 35%, 50%, 75%, 90%, 95%, 또는 99%를 보유한다.

[0209] 인간과 관련하여, 용어 "TGF β 수용체 II" 또는 "TGF β RII"는 인간 TGF β 수용체 유형 2 이소형 A 서열을 지칭하며, 야생형 TGF β RII뿐만 아니라 적어도 하나의 TGF β 이소형에 결합할 수 있는 것으로 알려진 이의 모든 이소형 및 변이체를 포함한다. 야생형 TGF β RII 이소형 A 또는 이소형 1의 예시적인 아미노산 서열은 GenBank 등록번호 NP_001020018.1 하에 또는 UniProtKB - P37173-1 하에 이용가능하고, 또한 본원에서 서열번호: 70로서 포함되며, 야생형 TGF β RII 이소형 B는 GenBank 등록번호 NP_003233.4 또는 UniProtKB - P37173-2 하에 이용가능하고, 또한 본원에서 서열번호: 71로서 포함된다. 변이체 TGF β RII는 서열번호: 70 또는 71에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성의 서열을 가질 수 있고, 야생형 서열(예컨대, 서열번호: 70 또는 71)의 TGF β 결합 활성의 적어도 25%, 35%, 50%, 75%, 90%, 95%, 또는 99%를 보유한다.

[0210] 인간과 관련하여, 용어 "TGF β 수용체 III" 또는 "TGF β RIII"은 인간 TGF β 수용체 유형 3 서열을 지칭하며, 야생형 TGF β RIII뿐만 아니라 모든 이소형 및 변이체를 포함한다. 야생형 TGF β RIII의 예시적인 아미노산 서열은 GenBank 등록번호 NP_003234.2 하에 또는 UniProtKB - Q03167 하에 이용가능하고, 또한 본원에서 서열번호: 72로서 포함된다.

[0211] 본원에 사용된 바와 같이, 특정 참조 단백질 또는 펩타이드와 관련하여 용어 "변이체"는 참조 서열에 대해 적어도 70%(예컨대, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성의 아미노산 서열을 갖고 참조 서열(예컨대, 야생형 서열)의 생물학적 활성 또는 결합 활성의 적어도 25%(예컨대, 35%, 50%, 75%, 90%, 95%, 또는 99%)를 보유하는, 참조 단백질 또는 펩타이드의 변형된 형태, 예컨대, 기능적 균등물, 단편, 융합체, 유도체, 모방체, 또는 이의 임의의 조합을 의미한다. 변이체는 참조 단백질 또는 펩타이드의 단편, 돌연변이체, 융합체, 절단, 또는 이의 임의의 조합일 수 있다.

- [0212] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "인터루킨-1" 또는 "IL-1"은 IL-1 α 및 IL-1 β , 이들의 전구체(예컨대, 프로-IL-1 α 및 프로-IL-1 β), 이소형, 및 변이체를 포함한다.
- [0213] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인간 IL-1 α "는 인간 IL1A 유전자(예컨대, 야생형 인간 IL1A 유전자)에 의해 코딩되는 IL-1 α 단백질, 및 이소형, 및 변이체를 지칭한다. 예시적인 야생형 인간 IL1 α 단백질은 UniProtKB - P01583에 의해 제공된다.
- [0214] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인간 IL-1 β "는 인간 IL1B 유전자(예컨대, 야생형 인간 IL1B 유전자)에 의해 코딩되는 IL-1 β 단백질을 지칭한다. 예시적인 야생형 인간 IL1 β 단백질은 GenBank 등록번호 NP_000567.1에 의해, 또는 UniProtKB - C9JVK0 하에 제공된다.
- [0215] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "IL-1 수용체" 또는 "IL-1R"은 IL-1에 결합할 수 있는 수용체를 지칭하며, IL-1에 결합할 수 있는 이의 모든 야생형 수용체, 이소형 및 변이체를 포함한다. 일반적으로, 두 가지 유형의 IL-1 수용체, 즉 IL-1 수용체 I(IL-1RI), 및 IL-1 수용체 II(IL-1RII)가 있다. IL-1RII는 신호를 전달하지 않고 리간드에 결합하는 미끼(decoy) 수용체로 작용한다. IL-1RII의 단백질분해 절단은 가용성 수용체, 예컨대, IL-1sRI 및 IL-1sRII의 형성을 초래하며, 이는 신호를 전달하지 않고 리간드에 결합한다(문헌[Thomas G. Kennedy, Chapter V.B.2., in Encyclopedia of Hormones, 2003]의 세부사항 참조). IL-1sRI 및 IL-1sRII는 IL-1RII의 단백질분해 절단 산물이며, IL-1RII의 세포외 도메인 단편의 그룹일 수 있다. 용어 IL-1R은 또한 보조수용체 IL-1RAP를 포괄하기 위한 것이며, 이는 IL-1 β 에 결합된 IL-1RI가 회합하여, NF- κ B의 인터루킨-1 의존적 활성화 및 다른 경로를 매개하는 고친화도 인터루킨-1 수용체 복합체를 형성할 수 있다.
- [0216] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "IL-1RI"는 야생형 IL-1RI뿐만 아니라 IL-1 α 및/또는 IL-1 β 에 결합할 수 있는 이의 모든 이소형 및 변이체를 포함한다. 야생형 IL-1RI의 예시적인 아미노산 서열은 UniProtKB - P14778 하에 이용가능하며, 또한 본원에서 서열번호: 73으로서 포함된다.
- [0217] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "IL-1RII"는 야생형 IL-1RII뿐만 아니라 IL-1 α 및/또는 IL-1 β 에 결합할 수 있는 이의 모든 이소형 및 변이체를 포함한다. 야생형 IL-1RII의 예시적인 아미노산 서열은 UniProtKB - P27930 하에 이용가능하고, 또한 본원에서 서열번호: 75로서 포함된다.
- [0218] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "IL-1RAP"는 야생형 IL-1RAP뿐만 아니라 IL-1 β 에 결합된 IL-1R에 결합할 수 있는 이의 모든 이소형 및 변이체를 포함한다. 야생형 IL-1RAP의 예시적인 아미노산 서열은 UniProtKB - Q9NPH3 하에 이용가능하며, 또한 본원에서 서열번호: 74로서 포함된다.
- [0219] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "IL-1sRI"는 메탈로프로테이나제를 수반하는 단백질분해 절단에 의해 생성될 수 있는 IL-1RI의 모든 가용성 형태를 포함한다. 자연 발생 IL-1sRI는 약 45 kDa 내지 60 Kda 범위의 분자량을 가질 수 있다. 이 용어는 또한 IL-1 α 및/또는 IL-1 β 에 결합할 수 있는, IL-1sRI의 모든 이소형 및 변이체를 포함한다.
- [0220] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "IL-1sRII"는 메탈로프로테이나제를 수반하는 단백질분해 절단에 의해 생성될 수 있는 IL-1RII의 모든 가용성 형태를 포함한다. 자연 발생 IL-1sRII는 약 45 kDa 내지 60 Kda 범위의 분자량을 가질 수 있다. 이 용어는 또한 IL-1 α 및/또는 IL-1 β 에 결합할 수 있는, IL-1sRII의 모든 이소형 및 변이체를 포함한다.
- [0221] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "IL-1 수용체 길항제"는 일반적으로 IL-1 수용체에의 결합에 대해 IL-1 α 또는 IL-1 β 와 경쟁할 수 있고, IL-1 α 또는 IL-1 β 의 활성을 억제하는 임의의 단백질을 포함한다. IL-1 수용체 길항제는 IL-1Ra, IL-1sRI 및 IL-1sRII와 같은 자연 발생 길항제뿐만 아니라 IL-1 수용체, 특히 IL-1RI에 대한 결합을 위해 IL-1 α 또는 IL-1 β 의 결합을 차단할 수 있는 기타 인공 길항제를 포함할 수 있다.
- [0222] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "IL-1Ra"는 야생형 IL-1Ra뿐만 아니라 IL-1 α 및/또는 IL-1 β 에 결합할 수 있는 이의 모든 이소형 및 변이체를 포함한다. 야생형 IL-1Ra의 예시적인 아미노산 서열은 UniProtKB - P18510 하에 이용가능하고, 또한 본원에서 서열번호: 76으로서 포함된다.
- [0223] 본원에 사용된 바와 같이, "암"은 악성 세포 성장 또는 신생물, 비정상적인 증식, 침윤 또는 전이를 특징으로 하는 임의의 의학적 병태를 지칭하며, 양성 또는 악성일 수 있으며, 고형 종양 및 비고형암(예컨대, 혈액학적 악성종양), 예컨대 백혈병 모두를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "고형 종양"은 신생물성 및/또는 악성 세포의 고체 덩어리를 지칭한다.
- [0224] 용어 "약학적으로 허용가능한"은 지정된 담체, 비히클, 희석제, 부형제(들), 및/또는 염이 일반적으로 제제를

포함하는 다른 성분과 화학적 및/또는 물리적으로 양립가능하고, 이의 수용자와 생리학적으로 양립가능하다는 것을 나타낸다.

[0225] 본원에서 "약" 값 또는 파라미터에 대한 언급은 그 값 또는 파라미터 자체에 관한 구현예를 포함(그리고 설명)한다. 예를 들어, "약 X"를 언급하는 설명은 "X"의 설명을 포함한다. 수치 범위는 범위를 정의하는 숫자들을 포함한다. 일반적으로, 용어 "약"은 변수의 표시된 값 및 표시된 값의 실험 오차 내(예컨대, 평균에 대한 95% 신뢰 구간 내) 또는 표시된 값의 10퍼센트 내에 있는 변수의 모든 값 중 더 큰 값을 지칭한다.

[0226] 용어 "융합" 또는 "융합된"은 아미노산 서열(예컨대, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질)과 관련하여 사용될 때, 예를 들어 화학적 결합 또는 재조합 수단에 의해 자연적으로 존재하지 않는 단일 아미노산 서열로의 2개 이상의 아미노산 서열의 조합을 지칭한다. 융합 아미노산 서열은 2개의 코딩 폴리뉴클레오타이드 서열의 유전적 재조합에 의해 생성될 수 있으며, 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 작제물을 숙주 세포 내로 도입하는 방법에 의해 발현될 수 있다.

[0227] 용어 "약학적으로 허용가능한"은 지정된 담체, 비히클, 희석제, 부형제(들), 및/또는 염이 일반적으로 제제를 포함하는 다른 성분과 화학적 및/또는 물리적으로 양립가능하고, 이의 수용자와 생리학적으로 양립가능하다는 것을 나타낸다.

[0228] **I. 면역 체크포인트 분자를 표적화하고 IL-1 활성을 차단하는 이작용성 분자**

[0229] 본 개시내용은 면역 체크포인트 분자에 결합하는 제1 모이어티 및 인터루킨-1(IL-1)의 활성을 차단하는 제2 모이어티를 포함하는 이작용성 분자를 제공한다. 본원에 제공된 이작용성 분자는 IL-1 결합 모이어티 또는 IL-1 수용체(IL-1R) 결합 모이어티(즉, 이작용성 분자의 제2 모이어티)를 이용하여 IL-1 및 IL-1 수용체 사이의 상호작용을 차단함으로써 종양 미세환경에서 IL-1 활성의 차단 및/또는 감소를 허용한다. IL-1 결합 모이어티 및/또는 IL-1R 결합 모이어티는 특정 종양 세포 또는 면역 세포의 표면 상에서 발견될 수 있는 면역 체크포인트 분자를 표적화하는 모이어티(즉, 이작용성 분자의 제1 모이어티)에 연결될 수 있다.

[0230] IL-1은 염증성 사이토카인이다. 염증은 종양 미세 환경의 중요한 구성요소이며, IL-1은 발암 및 종양 진행에서 중요한 역할을 한다(A. Mantovani et al, Immunol Rev. 2018 Jan; 281(1): 57-61.). IL-1은 만성 비용해성 염증(non-resolving inflammation), 종양 혈관신생, IL-17 경로의 활성화, 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 유도 및 대식세포 모집, 침윤 및 전이를 포함하여, 종양 개시 및 진행에서 상이한 수준으로 작용한다(상기 문헌).

[0231] 면역 체크포인트 분자는 T 세포, 자연 살해 세포 등과 같은 특정 면역 세포 상에서 발현된다. 일부 암세포는 또한 특정 면역 체크포인트 분자를 발현할 수 있으며, 이는 면역 체크포인트의 활성화를 차단하여 암세포가 면역 체계의 감시를 회피하게 할 수 있다.

[0232] 종양 미세환경에서 IL-1을 감소시키고 체크포인트 차단을 감소시킴으로써, 본 개시내용은 암, 자가면역 질환, 감염성 질환 등과 같은 면역 체크포인트 관련 질환을 치료하는데 유용할 수 있는 신규한 이작용성 분자를 제공한다.

[0233] 특정 구현예에서, 제1 모이어티는 면역자극성 또는 공동자극성 활성을 갖는 체크포인트 분자의 작용제를 포함한다. 이러한 면역자극성 체크포인트 분자는, 비제한적으로 CD27, CD70, CD28, CD80(B7-1), CD86(B7-2), CD40, CD40L(CD154), CD122, CD137, CD137L, OX40(CD134), OX40L(CD252), GITR, ICOS(CD278), 및 ICOSLG(CD275), CD2, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), CD30, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, 및 CD83을 포함할 수 있다.

[0234] 특정 구현예에서, 제1 모이어티는 면역억제성 또는 동시억제성 활성을 갖는 체크포인트 분자의 억제제를 포함한다. 이러한 면역 억제성 체크포인트 분자는, 비제한적으로 A2AR, B7-H3(CD276), B7-H4(VTCN1), BTLA(CD272), CTLA-4(CD152), IDO1, IDO2, TDO, KIR, LAG3, NOX2, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, VISTA, SIGLEC7(CD328), TIGIT, PVR(CD155), SIGLEC9(CD329), CD160, LAIR1, 2B4(CD244), CD47, 및 B7-H5를 포함할 수 있다.

[0235] 특정 구현예에서, 면역 체크포인트 분자는 PD-L1이다. 특정 구현예에서, 제1 모이어티는 PD-L1에 대한 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 특정 구현예에서, 제1 모이어티는 PD-L1에 대한 길항제 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0236] 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 IL-1 결합 모이어티 또는 IL-1 수용체(IL-1R) 결합 모이어티를 포함한다.

[0237] IL-1 α 및 IL-1 β 모두는 전염증성(proinflammatory)이고, IL-1R에 결합한다. IL-1 α 또는 IL-1 β 에 결합시,

IL-1R은 IL-1R 부속 단백질과 어댑터 단백질 MyD88 모두를 수용체 복합체로 모집하여, 다운스트림 신호전달 캐스케이드를 활성화하고 궁극적으로 무수한 면역 및 염증 유전자를 활성화시킬 수 있다. 본 발명자들은 IL-1의 활성 또는 IL-1R에 대한 그의 결합을 차단하는 것이 면역 체크포인트 분자의 조절과 조합하여 유용할 것임을 발견한다.

- [0238] 특정 구현예에서, IL-1은 IL-1 α 또는 IL-1 β 이다. 특정 구현예에서, IL-1 β 는 인간 IL-1 β 이다
- [0239] 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 IL-1 결합 모이어티를 포함한다. 특정 구현예에서, IL-1 결합 모이어티는 IL-1 α 또는 IL-1 β 에 특이적으로 결합한다. 특정 구현예에서, IL-1 결합 모이어티는 가용성 IL-1R, IL-1R의 IL-1 결합 단편 또는 변이체, 또는 IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0240] 가용성 IL-1R은 IL-1R의 도메인 또는 단편, 예를 들어 IL-1R의 세포외 도메인(ECD)일 수 있다. 대안적으로, 가용성 IL-1R은 또한 IL-1sRI 또는 IL-1sRII일 수 있으며, 이는 자연적으로 가용성이고 IL-1에 결합할 수 있는 이소형이다.
- [0241] 당업자는 이러한 단편이 IL-1 결합 도메인을 함유하는 한, IL-1RI의 단축된 단편, 또는 IL-1RI의 ECD, 또는 IL-1RII, 또는 IL-1RII의 ECD, 또는 IL-1RAP의 ECD, 또는 IL-1sRI 또는 IL-1sRII가 IL-1(예컨대, IL-1 α 또는 IL-1 β)에 결합하는 데 충분할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 본 개시내용은 또한 IL-1RI, IL-1RI의 ECD, 또는 IL-1RII, 또는 IL-1RII의 ECD, 또는 IL-1RAP, 또는 IL-1RAP의 ECD, IL-1sRI 및 IL-1sRII 중 어느 것의 모든 IL-1 결합 단편 및 변이체를 포함한다. 특정 구현예에서, IL-1 결합 모이어티는 서열번호: 73, 74, 또는 75의 아미노산 서열, 또는 이의 IL-1 결합 단편 또는 변이체를 포함한다. 특정 구현예에서, IL-1 결합 모이어티는 서열번호: 73, 74 및 75 중 어느 것에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 이의 IL-1 결합 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0242] 특정 구현예에서, IL-1 결합 모이어티는 IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. IL-1에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 또한 이러한 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 IL-1R에 대한 IL-1(예컨대, IL-1 α 또는 IL-1 β)의 결합을 방해할 수 있는 한 사용될 수 있다.
- [0243] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 XB2001, 루티키주맵, LY2189102 및 베르메키맵으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항-IL-1 α 항체로부터의, 또는 SSGJ-613, CDP484, 카나키주맵 및 게보키주맵으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항-IL-1 β 항체로부터의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0244] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 104 또는 서열번호: 112의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 105 또는 서열번호: 113의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 106 또는 서열번호: 114의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 107 또는 서열번호: 115의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 108 또는 서열번호: 116의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 109 또는 서열번호: 117의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0245] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 104의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 105의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 106의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 107의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 108의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 109의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0246] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 112의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 113의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 114의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 115의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 116의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 117의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0247] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 102, 서열번호: 110, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 103, 서열번호: 111, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0248] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 102, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 103, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포

합하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

- [0249] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 110, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 111, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 IL-1R 결합 모이어티를 포함한다.
- [0250] 특정 구현예에서, IL-1R 결합 모이어티는 IL-1Ra 또는 이의 IL-1R 결합 단편 또는 변이체를 포함한다. IL-1Ra는 IL-1R의 길항제이며 IL-1R에 대한 결합에 대해 IL-1 α 또는 IL-1 β 와 경쟁할 수 있다. 유사하게, 당업자는 IL-1Ra의 단축된 단편이 IL-1R에 결합하는데 유용하고/하거나 IL-1 α 또는 IL-1 β 와 경쟁하는 데 충분할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 특정 구현예에서, IL-1R 결합 모이어티는 IL-1Ra의 절단된 형태를 포함한다. 특정 구현예에서, IL-1R 결합 모이어티는 서열번호: 67 또는 76의 아미노산 서열, 또는 이의 임의의 IL-1 결합 단편 또는 변이체를 포함한다. 특정 구현예에서, IL-1R 결합 모이어티는 서열번호: 67 또는 76에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 이의 임의의 IL-1 결합 단편 또는 변이체를 포함한다. 당업자는 야생형 IL-1Ra의 변이체가 또한 IL-1R과의 결합에 대해 IL-1 α 또는 IL-1 β 와 경쟁할 수 있는 한 본 개시내용에서 유용할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0251] 특정 구현예에서, IL-1R 결합 모이어티는 IL-1R에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. IL-1R에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 또한 이러한 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 IL-1R과의 결합에 대해 IL-1 α 또는 IL-1 β 와 경쟁할 수 있는 한 사용될 수 있다.
- [0252] 특정 구현예에서, IL-1R에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 스페슬리맵, 아스테콜리맵, 임시돌리맵, AMG 108, 멜릴리맵, 니다닐리맵, MEDI8968, REGN6490, HB0034 및 CSC012로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체로부터의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0253] **II. PD-L1 및 제2 모이어티를 표적화하는 이작용성 분자**
- [0254] PD-1/PD-L1 축 체크포인트 억제제(예컨대, PD-L1 항체)의 치료 효능은 종양 미세환경("TME")에 면역억제 사이토카인이 풍부할 때 제한될 수 있다. 국소 미세환경에서 이러한 면역억제 사이토카인의 신호전달은 종양 침윤 T 세포를 감소시키고, 이들을 Treg 쪽으로 왜곡시키고, 면역 효과기 세포의 활성화를 약화시킬 수 있다.
- [0255] 일 양태에서, 본 개시내용은 PD-L1에 결합하는 제1 모이어티 및 a) 면역억제 사이토카인의 활성을 차단하거나 b) 항종양 면역을 자극하는 제2 모이어티를 포함하는, 신규한 이작용성 분자를 제공한다. 상기 분자는 화합물, 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, 또는 이의 임의의 조합일 수 있다. 제2 모이어티는 면역억제성 활성 또는 사이토카인을 차단하거나, 또는 면역을 증가시키거나 자극함으로써 종양 미세환경에서 면역 반응을 회복시킬 수 있다.
- [0256] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 이작용성 분자는 PD-L1에 결합하는 제1 모이어티(즉, PD-L1 결합 모이어티), 및 면역억제 사이토카인의 활성을 차단하는 제2 모이어티를 포함한다.
- [0257] 특정 구현예에서, 면역억제 사이토카인은 형질전환 성장 인자 베타(TGF- β) 수퍼패밀리, IL-1, 또는 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 내의 사이토카인을 포함한다. 특정 구현예에서, TGF- β 수퍼패밀리 내의 면역억제 사이토카인은 골형성 단백질(BMP), 액티빈, NODAL, 및 성장 및 분화 인자(GDF)를 포함한다.
- [0258] 특정 구현예에서, 면역억제 사이토카인은 TGF- β 이다. 특정 구현예에서, 면역억제 사이토카인은 IL-1이다.
- [0259] 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 TGF β 결합 모이어티를 포함한다. 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 IL-1 결합 모이어티를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "결합 모이어티", "결합 단편"은 표적 분자 또는 복합체에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 모이어티 또는 단편을 지칭한다. 용어 "TGF β 결합 모이어티"는 TGF β 패밀리(예컨대, TGF β 1, TGF β 2, 또는 TGF β 3)의 하나 이상의 패밀리 구성원 또는 이소형에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 모이어티를 지칭한다. 유사하게, 용어 "IL-1 결합 모이어티"는 IL-1 패밀리(예컨대, IL-1 α , IL-1 β)의 하나 이상의 패밀리 구성원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 모이어티를 지칭한다.
- [0260] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 이작용성 분자는 PD-L1에 결합하는 제1 모이어티(즉, PD-L1 결합 모이어티) 및 항종양 면역을 자극하는 제2 모이어티를 포함한다. 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 면역자극성 폴리펩타이드 또는 이의 기능적 등가물 또는 이의 변이체를 포함한다. 특정 구현예에서, 면역자극성 폴리펩타이드는 인터루킨(IL)-2(IL-2), IL-15, IL-21, IL-10, IL-12, IL-23, IL-27, IL-35, 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-

CSF), 가용성 CD4, 가용성 LAG-3, 또는 IFN- α , 또는 그의 기능적 등가물이다.

- [0261] 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 면역억제성 수용체 신호전달의 길항제를 포함한다. 특정 구현예에서, 면역억제성 수용체는 SIRP α 이다.
- [0262] 특정 구현예에서, 이작용성 분자는 하나 이상의 제2 모이어티를 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 제2 모이어티는 동일한 유형일 수 있으며, 예를 들어, 이들 각각은 면역억제 사이토카인의 활성을 차단할 수 있거나, 또는 이들 각각은 항종양 면역을 자극할 수 있다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 제2 모이어티는 상이한 유형일 수 있다. 특정 구현예에서, 제2 모이어티 각각은 동일한 서열을 가질 수 있거나, 또는 상이한 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0263] **i. TGF β 결합 모이어티**
- [0264] 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 가용성 TGF β 수용체(TGF β R) 또는 이의 TGF β 결합 단편 또는 변이체, 또는 TGF β 에 대한 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0265] "TGF β 결합 모이어티"는 본 개시내용에서 "TGF β 트랩"으로도 지칭될 수 있다. 따라서, PD-L1 및 TGF β 둘 모두를 표적화하는 단백질은 본 개시내용에서 "항-PD-L1/TGF β 트랩"으로도 지칭될 수 있다.
- [0266] 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 인간 및/또는 마우스 TGF β 에 결합한다. 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 TGF β 신호전달 경로를 길항하고/거나 억제할 수 있다. 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 TGF β 를 길항하고/거나 억제할 수 있다.
- [0267] 본 개시내용에서, TGF β 결합 모이어티는 TGF β 패밀리의 하나 이상의 패밀리 구성원 또는 이소형에 특이적으로 결합하는 임의의 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 TGF β 1(예컨대, 인간 TGF β 1), TGF β 2(예컨대, 인간 TGF β 2), 및/또는 TGF β 3(예컨대, 인간 TGF β 3)에 결합하는 모이어티, 또는 유사하거나 개선된 TGF β 결합 친화도를 갖는 이의 변이체를 포함한다. 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 TGF β 1(예컨대, 인간 TGF β 1)에 결합하는 모이어티를 포함한다. 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 TGF β 2(예컨대, 인간 TGF β 2)에 결합하는 모이어티를 포함한다. 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 TGF β 3(예컨대, 인간 TGF β 3)에 결합하는 모이어티를 포함한다. 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 TGF β 1(예컨대, 인간 TGF β 1) 및 TGF β 2(예컨대, 인간 TGF β 2) 둘 모두에 특이적으로 결합하는 모이어티를 포함한다. 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 TGF β 1(예컨대, 인간 TGF β 1) 및 TGF β 3(예컨대, 인간 TGF β 3) 둘 모두에 특이적으로 결합하는 모이어티를 포함한다. 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 TGF β 2(예컨대, 인간 TGF β 2) 및 TGF β 3(예컨대, 인간 TGF β 3) 둘 모두에 특이적으로 결합하는 모이어티를 포함한다. 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 TGF β 1(예컨대, 인간 TGF β 1), TGF β 2(예컨대, 인간 TGF β 2), 및 TGF β 3(예컨대, 인간 TGF β 3) 각각에 특이적으로 결합하는 모이어티를 포함한다. 당업자는 TGF β 패밀리의 하나의 패밀리 구성원 또는 이소형에 결합하는 TGF β 결합 모이어티가 유사하거나 더 높은 친화도로 TGF β 패밀리의 하나 이상의 다른 패밀리 구성원 또는 이소형에 결합할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0268] 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 TGF β 2보다 및/또는 TGF β 3보다 TGF β 1에 선택적으로 결합하는 모이어티를 포함한다.
- [0269] 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 유사한 친화도로 인간 TGF β 1 및 마우스 TGF β 1에 특이적으로 결합하는 모이어티를 포함한다.
- [0270] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 TGF β 결합 모이어티는 가용성 TGF β 수용체(TGF β R) 또는 TGF β 결합 단편 또는 이의 변이체를 포함한다.
- [0271] 예시적인 TGF β 수용체는 TGF β RI, TGF β RII 및 TGF β RIII를 포함한다. 특정 구현예에서, TGF β 수용체는 TGF β 수용체 I(TGF β RI), TGF β 수용체 II(TGF β RII), TGF β 수용체 III(TGF β RIII), 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, TGF β 수용체는 TGF β RI(예컨대, 인간 TGF β RI)이다. 특정 구현예에서, TGF β 수용체는 TGF β RII(예컨대, 인간 TGF β RII)이다. 특정 구현예에서, TGF β 수용체는 TGF β RIII(예컨대, 인간 TGF β RIII)이다.
- [0272] 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 TGF β 수용체(예컨대, 인간 TGF β 수용체)의 세포외 도메인(ECD), 또는 이의 TGF β 결합 단편 또는 변이체를 포함한다. 특정 구현예에서, TGF β 수용체의 ECD는 TGF β RI(예컨대, 인간 TGF β RI)의 ECD, TGF β RII(예컨대, 인간 TGF β RII)의 ECD, TGF β RIII(예컨대, 인간 TGF β RIII)의 ECD, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, TGF β RII의 ECD는 서열번호: 66, 79의 아미노산 서열, 또는 이

의 적어도 80%(예컨대, 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖지만 TGF β 에 대한 결합 특이성을 보유하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, TGF β RI의 ECD는 서열번호: 77의 아미노산 서열, 또는 이의 적어도 80%(예컨대, 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖지만 TGF β 에 대한 결합 특이성을 보유하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, TGF β RIII의 ECD는 서열번호: 78의 아미노산 서열, 또는 이의 적어도 80%(예컨대, 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖지만 TGF β 에 대한 결합 특이성을 보유하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0273] 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 TGF β 에 대한 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 예시적인 항-TGF β 항체는 프레줄리무맙 및 메텔리무맙뿐만 아니라, 예를 들어 각각이 참조로 본원에 포함된 US7494651B2, US8383780B2, US8012482B2, W02017141208A1에 기재된 항-TGF β 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0274] 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 하나 이상의 TGF β 수용체의 하나 이상의 ECD 및/또는 하나 이상의 항-TGF β 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 조합을 포함한다.

[0275] 하나 이상의 ECD는 동일하거나 상이할 수 있다. 예를 들어, TGF β 결합 모이어티는 TGF β 수용체의 ECD의 동일한 반복을 포함할 수 있거나, 대안적으로 동일한 TGF β 수용체의 상이한 ECD 서열의 조합을 포함할 수 있거나, 또는 대안적으로 상이한 TGF β 수용체로부터의 상이한 ECD의 조합을 포함할 수 있다. 유사하게, 하나 이상의 항-TGF β 항체는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0276] 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 TGF β RI(예컨대, 인간 TGF β RI)의 ECD, TGF β RII(예컨대, 인간 TGF β RII)의 ECD, TGF β RIII(예컨대, 인간 TGF β RIII)의 ECD, 또는 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 ECD의 조합(또는 융합)을 포함한다.

[0277] 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 하나 이상의 항-TGF β 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 조합(또는 융합)을 포함한다.

[0278] 특정 구현예에서, TGF β 결합 모이어티는 TGF β RI(예컨대, 인간 TGF β RI)의 ECD, TGF β RII(예컨대, 인간 TGF β RII)의 ECD, TGF β RIII(예컨대, 인간 TGF β RIII)의 ECD, 하나 이상의 항-TGF β 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 이의 임의의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 ECD의 조합(또는 융합)을 포함한다.

[0279] ii. IL-1 결합 모이어티

[0280] 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 IL-1 결합 모이어티를 포함한다. 특정 구현예에서, IL-1은 IL-1 α 또는 IL-1 β 이다. 특정 구현예에서, IL-1 β 는 인간 IL-1 β 이다.

[0281] 특정 구현예에서, IL-1 결합 모이어티는 IL-1 α 또는 IL-1 β 에 특이적으로 결합한다. 특정 구현예에서, IL-1 결합 모이어티는 IL-1 α 보다 IL-1 β 에 선택적으로 결합하거나, IL-1 β 보다 IL-1 α 에 선택적으로 결합하는 모이어티를 포함한다.

[0282] 특정 구현예에서, IL-1 결합 모이어티는 가용성 IL-1R, IL-1R의 IL-1 결합 단편 또는 변이체, 또는 IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0283] 가용성 IL-1R은 IL-1R의 도메인 또는 단편 또는 변이체, 예를 들어 IL-1R의 세포외 도메인(ECD)을 포함할 수 있다. 대안적으로, 가용성 IL-1R은 또한 IL-1sRI 또는 IL-1sRII를 포함할 수 있으며, 이는 자연적으로 가용성이고 IL-1에 결합할 수 있는 이소형이다.

[0284] 당업자는 IL-1R의 단축된 단편, 또는 IL-1R의 ECD, 또는 IL-1sRI 또는 IL-1sRII가 IL-1 결합 도메인을 함유하는 한 IL-1(예컨대, IL-1 α 또는 IL-1 β)에 결합하는 데 충분할 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본원에 제공된 IL-1 결합 모이어티는 또한 IL-1R, IL-1R의 ECD, IL-1sRI 및 IL-1sRII 중 어느 것의 IL-1 결합 단편을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, IL-1 결합 모이어티는 서열번호: 73, 74, 또는 75의 아미노산 서열, 또는 이의 IL-1 결합 단편 또는 변이체를 포함한다. 특정 구현예에서, IL-1 결합 모이어티는 서열번호: 73, 74 및 75 중 어느 것에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 이의 IL-1 결합 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0285] 특정 구현예에서, IL-1 결합 모이어티는 IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. IL-1에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 또한 이러한 항체 또는 항원 결합 단편이 IL-1R에 대한 IL-1(예컨대, IL-1 α 또는 IL-1 β)의 결합을 방해할 수 있는 한 사용될 수 있다.

- [0286] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 XB2001, 루티키주맵, LY2189102 및 베르메키맵으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항-IL-1 α 항체로부터의, 또는 SSGJ-613, CDP484, 카나키주맵 및 게보키주맵으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항-IL-1 β 항체로부터의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0287] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 104 또는 서열번호: 112의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 105 또는 서열번호: 113의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 106 또는 서열번호: 114의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 107 또는 서열번호: 115의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 108 또는 서열번호: 116의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 109 또는 서열번호: 117의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0288] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 104의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 105의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 106의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 107의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 108의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 109의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0289] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 112의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 113의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 114의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 115의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 116의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 117의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0290] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 102, 서열번호: 110, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 103, 서열번호: 111, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0291] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 102, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 103, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0292] 특정 구현예에서, IL-1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 110, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호: 111, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0293] 특정 구현예에서, IL-1 결합 모이어티는 IL-1R, IL-1R의 ECD, IL-1sRI, IL-1sRII, IL-1에 대한 항체, 이의 임의의 IL-1 결합 단편, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 모이어티의 조합을 포함한다. 이러한 하나 이상의 모이어티는 직접 결합에 의해 연결될 수 있거나 또는 적합한 링커에 의해 연결될 수 있다.
- [0294] 특정 구현예에서, IL-1R 결합 모이어티는 IL-1Ra 또는 이의 IL-1R 결합 단편 또는 변이체를 포함한다. IL-1Ra는 IL-1R의 길항제이며 IL-1R에 대한 결합에 대해 IL-1 α 또는 IL-1 β 와 경쟁할 수 있다. 유사하게, 당업자는 IL-1Ra의 단축된 단편이 IL-1R에 결합하는데 유용하고/하거나 IL-1 α 또는 IL-1 β 와 경쟁하는 데 충분할 수 있음을 이해할 것이다. 특정 구현예에서, IL-1R 결합 모이어티는 IL-1Ra의 절단된 형태를 포함한다. 특정 구현예에서, IL-1R 결합 모이어티는 서열번호: 67의 아미노산 서열, 또는 이의 임의의 IL-1 결합 단편 또는 변이체를 포함한다. 특정 구현예에서, IL-1R 결합 모이어티는 서열번호: 67에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 이의 임의의 IL-1 결합 단편 또는 변이체를 포함한다. 당업자는 이러한 변이체가 IL-1R과의 결합에 대해 IL-1 α 또는 IL-1 β 와 경쟁할 수 있는 한, 야생형 IL-1Ra의 변이체가 또한 본 개시내용에서 유용할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0295] 특정 구현예에서, IL-1R 결합 모이어티는 IL-1R에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. IL-1R에 대한 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 또한 이러한 항체 또는 항원 결합 단편이 IL-1R과의 결합에 대해 IL-1 α 또는 IL-1 β 와 경쟁할 수 있는 한 사용될 수 있다.
- [0296] 특정 구현예에서, IL-1R 결합 모이어티는 IL-1Ra, IL-1R에 대한 항체, 이의 임의의 IL-1R 결합 단편 또는 변이

체 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 모이어티의 조합을 포함한다. 이러한 하나 이상의 모이어티는 직접 결합에 의해 연결될 수 있거나 또는 적합한 링커에 의해 연결될 수 있다.

[0297] 특정 구현예에서, IL-1R에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 스페슬리맵, 아스테글리맵, 임시돌리맵, AMG 108, 멜릴리맵, 니다닐리맵, MEDI8968, REGN6490, HB0034 및 CSC012로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체로부터의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0298] **iii. 면역자극성 폴리펩타이드**

[0299] 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 면역자극성 폴리펩타이드 또는 이의 기능적 등가물 또는 이의 변이체를 포함한다. 특정 구현예에서, 면역자극성 폴리펩타이드는 가용성 CD4, 가용성 LAG-3, 또는 그의 기능적 등가물이다.

[0300] 특정 구현예에서, 가용성 LAG-3는 LAG-3의 세포외 도메인(ECD) 또는 이의 MHC 클래스 II(MHCII) 결합 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0301] LAG-3(Uniprot 번호: Q61790)은 면역글로불린(Ig) 슈퍼패밀리에 속하며, 이는 503개의 아미노산을 포함하는 I형 막횡단 단백질이다. Lag-3는 세포내 도메인(ICD), 막횡단 도메인(TMD), 및 세포외 도메인(ECD)을 포함한다. ECD는 4개의 Ig-유사 도메인, 즉 D1 내지 D4를 포함하고, 여기서 D1은 9β-사슬: A, B, C, C', C'', D, E, F 및 G 사슬을 포함한다. C 및 C' 사슬 사이에는, "엑스트라 루프"를 형성하는 약 30개의 아미노산을 갖는 추가 서열이 있다. 이러한 "엑스트라 루프"는 LAG-3과 MHCII 사이의 상호작용에 관여하는 것으로 보고되었다. 특정 구현예에서, 가용성 LAG-3는 엑스트라 루프의 아미노산 서열, D1 도메인, D1 플러스 D2 도메인, 또는 이의 임의의 MHC II 결합 단편 또는 변이체를 포함한다. 특정 구현예에서, 가용성 LAG-3는 서열번호: 99, 서열번호: 100, 서열번호: 101의 아미노산 서열, 또는 이의 임의의 MHC II 결합 단편 또는 변이체를 포함한다.

[0302] LAG-3는 활성화된 T 세포, 자연 살해 세포, B 세포 및 형질세포양 수지상 세포 상에서 발현된다. 그의 주요 리간드는 CD4보다 높은 친화도로 결합하는 MHC 클래스 II이다. 연결 펩타이드(CP)가 LAG-3의 D4와 TMD 사이에 존재하며, 여기서 메탈로프로티나아제 ADAM10 및/또는 ADAM17의 존재 하에서 절단이 발생하여 절단된 가용성 LAG-3을 생성한다. 예컨대, 본원에 참고로 포함된 문헌[Huard et al., Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:5744-9.; Workman et al., J Immunol 2002;169:5392-5.doi:10.4049/jimmunol.169.10.5392; 및 Lawrence et al., J Immunother Cancer. 2015; 3(Suppl 2): P216]을 참조한다.

[0303] LAG-3는 또한 LAG-3의 가용성 형태로 번역되는 선택적 스플라이스 변이체(alternative splice variant)를 코딩한다. 가용성 LAG-3는 MHCII 신호전달을 통해 항원 제시 세포(APC)를 활성화시켜, 생체내에서 증가된 항원 특이적 T-세포 반응을 야기한다. 예를 들어, 가용성 LAG-3는 수지상 세포(DC)를 활성화시키고, 사이토카인 활성화된(예컨대, TNF-α 및/또는 IL-12 활성화된) 방관자 T 세포의 전염증성 활성화에 관여하는 것으로 보고되었으며, 그것은 DC를 직접 활성화시킬 수 있다. 예컨대, 본원에 참조로 포함된 문헌[Triebel, Trends Immunol., 2003, 24: 619-622]을 참조한다.

[0304] 특정 구현예에서, 가용성 LAG-3는 에프틸라지모드 알파(IMP321) 또는 이의 MHC II 결합 단편 또는 변이체를 포함한다. IMP321은 LAG-3의 가용성 이량체성 재조합 형태이다. IMP321은 MHCII 분자를 통해 수지상 세포를 자극함으로써 지속적인 면역 반응을 유도한다. MP321 및 항-PD-1 항체 또는 항-PD-L1 항체의 조합 요법은 T 세포(특히, CD8+ T 세포)를 상승적으로 활성화시키는 것으로 나타났다. 예컨대, 본원에 참조로 포함된 문헌[Luc et al., Future Oncol Actions Search in PubMed Search in NLM Catalog Add to Search. 2019 Jun;15(17):1963-1973. doi: 10.2217/fon-2018-0807. Epub 2019 Apr 12.; Julio et al., Journal of Clinical Oncology, Volume 37, Issue 15; 및 US10874713 B]을 참조한다.

[0305] **iv. 면역억제성 수용체 신호전달의 길항제**

[0306] 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 면역억제성 수용체 신호전달의 길항제를 포함한다. 특정 구현예에서, 면역억제성 수용체는 SIRP α이다.

[0307] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "SIRP α"는 용어 "신호 조절성 단백질 알파"와 상호교환적으로, 골수 세포 및 수지상 세포 상에서 주로 발현되는 억제성 수용체를 지칭한다. SIRP α는 SIRP β 및 SIRP γ를 포함하는 몇 가지 다른 막횡단 당단백질을 또한 포함하는 SIRP 패밀리에 속한다. SIRP 패밀리의 각 구성원은 구별되는 막횡단 및 세포질 도메인을 갖는 3개의 유사한 세포외 Ig 유사 도메인을 함유한다.

[0308] SIRP α는 식균작용(phagocytosis)을 억제하기 위해 "나를 먹지 마세요(don't eat me)" 신호를 전달하는 CD47에 결합할 수 있으며, 식세포 상의 SIRP α의 CD47 매개 결합을 차단하는 것은 "나를 먹으세요(eat me)" 신호를 가

진 살아있는 세포의 제거를 유발할 수 있다. CD47은 세포의 N-말단 IgV 도메인, 5개의 막횡단 도메인, 및 짧은 C-말단 세포내 꼬리를 갖는 광범위하게 발현되는 막횡단 당단백질이다. CD47은 SIRP α 에 대한 세포 리간드로서 기능한다. 종양 세포는 종종 대식세포 매개 파괴를 피하기 위해 CD47을 과발현한다. CD47과 SIRP α 의 상호작용은 대식세포 매개 식균작용의 조절에 관여하는 것으로 나타났다(Takenaka *et al.*, *Nature Immunol.*, 8(12): 1313-1323, 2007).

- [0309] 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 CD47과 SIRP α 사이의 상호작용을 차단한다. 다양한 범위의 전임상 모델에서, CD47 및 SIRP α 의 상호작용을 차단하는 요법은 시험관내에서 암세포의 식균작용 및 생체내에서 항종양 면역 반응을 자극한다.
- [0310] 제2 모이어티는 CD47 결합 도메인 또는 SIRP α 결합 도메인을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 면역억제성 수용체는 신호 조절성 단백질 알파(SIRP α)이다. 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 CD47과 SIRP α 사이의 상호작용을 차단한다. 특정 구현예에서, 제2 모이어티는 CD47 결합 도메인 또는 SIRP α 결합 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, CD47 결합 도메인은 가용성 SIRP α 또는 이의 CD47 결합 단편, 또는 항-CD47 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0311] 특정 구현예에서, 가용성 SIRP α 는 SIRP α 의 세포외 도메인(ECD), 또는 이의 CD47 결합 단편 또는 변이체를 포함한다. 특정 구현예에서, 가용성 SIRP α 는 서열번호: 84의 아미노산 서열 또는 이의 적어도 80%(예컨대, 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖지만 CD47에 대한 결합 특이성을 보유하는 아미노산 서열을 포함한다. 선택적으로, 가용성 SIRP α 는 조작된 고친화도 SIRP α 변이체이며, 이는 암세포 상에서 CD47을 강력하게 길항하지만 자체적으로 대식세포 식균작용을 유도하지는 않는다. 특정 구현예에서, SIRP α 변이체는 서열번호: 98에 대해 L4V, L4I, V6I, V6L, A21V, V27I, V27L, I31T, I31S, I31F, E47V, E47L, K53R, E54Q, H56P, H56R, V63I, S66T, S66G, K68R, V92I, F94L, F94V 및 F103V로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 특정 구현예에서, SIRP α 변이체는 1) V27I, K53R, S66T, K68R, F103V; 2) L4V, V27L, E47V, K53R, E54Q, S66G, K68R, V92I; 3) L4V, V6I, A21V, V27I, I31T, E47L, K53R, H56P, S66T, K68R, F94L; 4) V6I, V27I, I31S, E47V, K53R, E54Q, H56P, S66G, V92I, F94L; 5) L4I, A21V, V27I, I31F, E47V, K53R, E54Q, H56R, S66G, F94V, F103V; 6) L4V, V6I, V27I, I31F, E47V, K53R, H56R, S66G, K68R, V92I, F94L; 7) L4V, V6L, I31F, E47V, K53R, H56P, S66G, V92I, F103V; 8) V6I, V27I, I31F, E47L, K53R, E54Q, H56P, S66T; 9) L4V, V6I, V27I, I31F, E47V, K53R, E54Q, H56P, V63, S66T, K68R, V92I; 10) V6I, V27I, I31T, E47V, K53R, E54Q, H56P, S66G, K68R, V92I, F103V; 및 11) V6I, V27I, I31F, E47V, K53R, E54Q, H56P, S66T, V92I로 이루어진 군으로부터 선택되는 돌연변이의 조합을 포함한다. 예컨대, 본원에 참조로 포함된 문헌[Kipp Weiskopf *et al.* *Science* 341, 88 (2013)]을 참조한다.
- [0312] 특정 구현예에서, SIRP α 결합 도메인은 가용성 CD47 또는 이의 SIRP α 결합 단편, 또는 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 특정 구현예에서, 가용성 CD47은 CD47의 세포외 도메인(ECD) 또는 이의 SIRP α 결합 단편, 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.
- [0313] 특정 구현예에서, CD47 결합 도메인은 항-CD47 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 예시적인 항-CD47 항체는, 비제한적으로 인간화된 5F9 항체, B6H12 항체 및 ZF1 항체를 포함한다. 본원에 참조로 포함된 문헌[Lu *et al.*, *OncoTargets and Therapy*, Volume 13, DOI <https://doi.org/10.2147/OTT.S249822>]을 참조한다. 특정 구현예에서, SIRP α 결합 도메인은 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 예시적인 항-SIRP α 항체는, 비제한적으로 BI765064 및 AL008을 포함한다. 예컨대, 본원에 참조로 포함된 W02019073080A1, W02019175218A1 및 W02018107058A1을 참조한다.
- [0314] 특정 구현예에서, CD47 결합 도메인은 하나 이상의 SIRP α , SIRP β 또는 SIRP γ 의 하나 이상의 ECD, 및/또는 하나 이상의 항-CD47 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 조합을 포함한다.
- [0315] 하나 이상의 ECD는 동일하거나 상이할 수 있다. 예를 들어, CD47 결합 도메인은 SIRP α , SIRP β 또는 SIRP γ 의 ECD의 동일한 반복을 포함할 수 있거나, 또는 대안적으로 동일한 SIRP α , SIRP β 또는 SIRP γ 의 상이한 ECD 서열의 조합을 포함할 수 있거나, 또는 대안적으로 상이한 SIRP α , SIRP β 또는 SIRP γ 로부터의 상이한 ECD의 조합을 포함할 수 있다. 유사하게, 하나 이상의 항-CD47 항체는 상이하거나 동일할 수 있다.
- [0316] 특정 구현예에서, CD47 결합 도메인은 SIRP α 의 ECD, SIRP β 의 ECD, SIRP γ 의 ECD 또는 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 ECD의 조합(또는 융합)을 포함한다.
- [0317] 특정 구현예에서, CD47 결합 도메인은 하나 이상의 항-CD47 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 조합(또는 융합)

을 포함한다.

[0318] 특정 구현예에서, CD47 결합 도메인은 SIRP α 의 ECD, SIRP β 의 ECD, SIRP γ 의 ECD, 하나 이상의 항-CD47 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 ECD의 조합(또는 융합)을 포함한다.

[0319] v. PD-L1 결합 모이어티

[0320] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 이작용성 분자는 PD-L1 결합 모이어티인 제1 모이어티를 포함한다.

[0321] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 PD-L1 결합 모이어티는 PD-L1(예컨대, 인간 PD-L1, 또는 시노몰구스 PD-L1)에 결합한다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 PD-L1 결합 모이어티는 인간 PD-L1에 결합한다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 PD-L1 결합 모이어티는 시노몰구스 PD-L1에 결합한다.

[0322] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 PD-L1 결합 모이어티는 항-PD-L1 항체 모이어티를 포함한다. 특정 구현예에서, 예시적인 항-PD-L1 항체는 본 개시내용의 섹션 항-PD-L1 항체 및 섹션 예시적인 항-PD-L1 항체에 개시되어 있다.

[0323] 특정 구현예에서, 항-PD-L1 항체 모이어티는 하나 이상의 CDR을 포함한다. 특정 구현예에서, 항-PD-L1 항체 모이어티는 본 개시내용의 섹션 예시적인 항-PD-L1 항체에 기재된 하나 이상의 CDR을 포함한다. 특정 구현예에서, 항-PD-L1 항체 모이어티는 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다. 특정 구현예에서, 항-PD-L1 항체 모이어티는 본 개시내용의 섹션 예시적인 항-PD-L1 항체에 개시된 바와 같은 항-PD-L1 항체의 VH 및 VL을 포함한다.

[0324] 특정 구현예에서, 항-PD-L1 항체 모이어티는 중쇄 가변 영역의 카르복실 말단에 부가된 중쇄 불변 도메인을 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 중쇄 불변 영역은 IgA, IgG, 및 IgM으로 이루어진 군으로부터 유래된다. 특정 구현예에서, 중쇄 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 또는 IgM으로부터 유래된다. 특정 구현예에서, 항-PD-L1 항체 모이어티는 경쇄 가변 영역의 카르복실 말단에 부가된 경쇄 불변 도메인을 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 경쇄 불변 영역은 카파 경쇄 또는 람다 경쇄로부터 유래된다. 특정 구현예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호: 80 또는 81의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 경쇄 불변 영역은 서열번호: 82의 아미노산 서열을 포함한다.

[0325] vi. 제1 모이어티와 제2 모이어티 사이의 연결

[0326] 본 개시내용에서, 제2 모이어티는 제1 모이어티의 임의의 부분에 연결될 수 있다. 예를 들어, 제2 모이어티, 예컨대 TGF β 결합 모이어티 또는 IL-1 결합 모이어티는 제1 모이어티의 임의의 적합한 부분, 예컨대 PD-L1 결합 모이어티(예컨대, 항-PD-L1 항체 모이어티)에 연결될 수 있다.

[0327] 특정 구현예에서, PD-L1 결합 모이어티는 하나 이상의 폴리펩타이드 사슬, 예컨대 항체 중쇄 및 경쇄를 포함한다.

[0328] 특정 구현예에서, 이작용성 분자는 하나 이상의 제2 모이어티를 포함한다. 특정 구현예에서, 제2 모이어티 중 적어도 하나는 제1 모이어티의 폴리펩타이드 사슬의 아미노 말단(N 말단) 또는 카르복실(C 말단)에 연결된다. 특정 구현예에서, 제2 모이어티 중 적어도 하나는 제1 모이어티의 중쇄의 N 말단 또는 C 말단에 연결되거나, 또는 제1 모이어티의 경쇄의 N 말단 또는 C 말단에 연결된다.

[0329] 특정 구현예에서, 제2 모이어티 중 적어도 하나는 제1 모이어티의 중쇄 불변 영역의 C 말단에 연결된다. 특정 구현예에서, 제2 모이어티 각각은 제1 모이어티의 각 중쇄 불변 영역의 C 말단에 각각 연결된다.

[0330] 특정 구현예에서, 이작용성 분자는 적어도 2개의 제2 모이어티를 포함하고, 이들 각각은 제1 모이어티의 각 중쇄의 C 말단에 각각 연결되거나, 또는 이들 각각은 제1 모이어티의 각 경쇄의 C 말단에 각각 연결된다. 특정 구현예에서, 이작용성 분자는 적어도 2개의 제2 모이어티를 포함하고, 이들 각각은 제1 모이어티의 각 중쇄의 N 말단에 각각 연결되거나, 또는 이들 각각은 제1 모이어티의 각 경쇄의 N 말단에 각각 연결된다.

[0331] 특정 구현예에서, 이작용성 분자는 제1 모이어티의 중쇄의 N 말단, 제1 모이어티의 중쇄의 C 말단, 제1 모이어티의 경쇄의 N 말단, 제1 모이어티의 경쇄의 C 말단, 또는 이의 임의의 조합에 각각 연결되는 둘 이상의 제2 모이어티를 포함한다. 예를 들어, 이작용성 분자는 적어도 2개의 제2 모이어티를 포함할 수 있으며, 이들 중 하나는 제1 모이어티의 중쇄의 C 말단에 연결되고, 다른 하나는 제1 모이어티의 경쇄의 C 말단에 연결된다. 예를 들어, 이작용성 분자는 적어도 2개의 제2 모이어티를 포함할 수 있으며, 이들 중 하나는 제1 모이어티의 중쇄의 N

말단에 연결되고, 다른 하나는 제1 모이어티의 경쇄의 N 말단에 연결된다.

[0332] 특정 구현예에서, 하나 이상의 TGF β 결합 모이어티, 하나 이상의 IL-1 결합 모이어티, 하나 이상의 면역자극성 폴리펩타이드(예컨대, 가용성 LAG3 또는 가용성 CD4) 또는 하나 이상의 CD47 결합 모이어티는 항-PD-L1 항체 모이어티의 1) 중쇄 가변 영역의 N 말단, 2) 경쇄 가변 영역의 N 말단, 3) 중쇄 가변 영역의 C 말단; 4) 경쇄 가변 영역의 C 말단; 5) 중쇄 불변 영역의 C 말단; 6) 경쇄 불변 영역의 C 말단, 및 7) 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 항-PD-L1 항체 잔기에 연결된다.

[0333] 특정 구현예에서, 이작용성 분자는 동종이량체성 중쇄를 포함한다. 특정 구현예에서, 이작용성 분자는 이종이량체성 중쇄를 포함한다. 중쇄는 제2 모이어티의 존재 또는 위치에 대하여 이종이량체성이다. 특정 구현예에서, 이종이량체성 중쇄는 제2 모이어티를 갖는 하나의 중쇄 및 제2 모이어티를 갖지 않는 다른 중쇄를 포함한다.

[0334] vii. 링커

[0335] 제2 모이어티는 직접 또는 링커를 통해 제1 모이어티에 연결될 수 있다. 직접 연결은 화학적 연결(예컨대, 공유 결합)일 수 있다.

[0336] 특정 구현예에서, 이작용성 분자는 제1 모이어티와 제2 모이어티를 연결하는 링커를 추가로 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "링커"는 연결될 적어도 2개의 엔티티와 반응하여, 엔티티에 결합하여 하나의 분자를 형성하거나 충분히 근접하여 엔티티의 회합을 유지할 수 있는 임의의 적합한 이작용성 모이어티일 수 있다. 링커는 그의 반응된 작용기를 갖거나 갖지 않고 생성된 연결된 분자 또는 구조에 통합될 수 있다.

[0337] 특정 구현예에서, 링커는 절단가능한 링커, 절단불가능한 링커, 펩타이드 링커, 가요성 링커, 강성 링커, 나선형 링커, 및비나선 링커로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0338] 특정 구현예에서, 링커는 펩타이드 링커를 포함한다. 펩타이드 링커는 펩타이드 결합에 의해 함께 연결된 아미노산 잔기로 구성될 수 있다. 특정 구현예에서, 펩타이드 링커는 하나 이상의 비천원 아미노산을 추가로 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 펩타이드 링커는 펩타이드 결합에 의해 결합되고 2개 이상의 폴리펩타이드를 연결할 수 있는, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15, 20, 30, 50개 이상의 아미노산 잔기를 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 펩타이드 링커는 2차 구조를 갖거나 갖지 않을 수 있다.

[0339] 임의의 적합한 펩타이드 링커가 사용될 수 있다. 많은 펩타이드 링커 서열은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌[Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993); Poljak *et al.*, *Structure* 2:1121-1123 (1994)]에 기재되어 있다. 특정 구현예에서, 펩타이드 링커는 아미노산 글리신, 세린, 알라닌, 메티오닌, 아스파라긴, 및 글루타민으로부터 선택된 아미노산 잔기를 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드 링커는 입체적으로 방해받지 않는 대다수의 아미노산, 예컨대 글리신 및 알라닌으로 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 폴리글리신, 폴리알라닌, 글리신과 알라닌의 조합(예컨대, 폴리(Gly-Ala)), 또는 글리신과 세린의 조합(예컨대 폴리(Gly-Ser))이다.

[0340] 특정 구현예에서, 링커는 ((G)nS)_m의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 m 및 n은 독립적으로 0 내지 30, 1 내지 29, 2 내지 28, 3 내지 27, 4 내지 26, 5 내지 25, 6 내지 24, 7 내지 23, 8 내지 22, 9 내지 21, 10 내지 20, 11 내지 19, 12 내지 18, 13 내지 17, 14 내지 16 또는 5로부터 선택된 정수이다. 특정 구현예에서, m은 4 이고 n은 4이다.

[0341] 특정 구현예에서, 링커는 서열번호: 68의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 링커는 서열번호: 68에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0342] viii. 항-PD-L1 항체 및 이의 항원 결합 단편

[0343] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 이작용성 분자의 PD-L1 결합 모이어티는 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 모이어티를 포함한다. 특정 구현예에서, 항-PD-L1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 PD-L1에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0344] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 Biacore 분석에 의해 측정된 바와 같이 0.8 nM 이하, 0.7 nM 이하, 0.6 nM 이하, 0.5 nM 이하, 또는 0.4 nM 이하의 K_D 값으로 인간 PD-L1에 특이적으로 결합한다. Biacore 분석은 표면 플라즈몬 공명 기술에 기초하며, 예를 들어, 문헌[Murphy, M. *et al.*, *Current protocols in protein science*, Chapter 19, unit 19.14, 2006]을 참조한다. 특정 구현예에서, K_D 값

은 본 개시내용의 실시예 6에 기재된 바와 같은 방법에 의해 측정된다.

- [0345] 인간 PD-L1에 대한 본원에 제공된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합은 또한 "절반 최대 유효 농도"(EC₅₀) 값으로 나타낼 수 있으며, 이는 그의 최대 결합의 50%가 관찰되는 항체의 농도를 지칭한다. EC₅₀ 값은 당업계에 공지된 결합 분석, 예를 들어 직접 또는 간접 결합 분석, 예컨대 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA), 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석, 및 기타 결합 분석에 의해 측정될 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항체 및 이의 항원 결합 단편은 ELISA에 의해 측정된 바와 같이 0.3 nM 이하, 0.2 nM 이하, 0.1 nM 이하, 또는 0.09 nM 이하의 EC₅₀(즉, 50% 결합 농도)에서 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항체 및 이의 항원 결합 단편은 FACS 분석에 의해 측정된 바와 같이 1.4 nM 이하, 1.3 nM 이하, 1.2 nM 이하, 1.1 nM 이하, 1.0 nM 이하, 0.3 nM 이하, 0.25 nM 이하, 또 0.21 nM의 EC₅₀(즉, 50% 결합 농도)에서 PD-L1에 특이적으로 결합한다.
- [0346] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 B7 패밀리의 다른 구성원에 결합하지 않는다.
- [0347] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 ELISA에 의해 측정된 바와 같이 2.2, 2.1, 2.0, 1.9, 1.8 또는 1.2 ug/ml 이하의 IC₅₀을 갖는 PD-L1과 그의 결합 파트너(예컨대, PD-1 및 B7-1) 사이의 상호작용을 차단할 수 있다.
- [0348] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 세포 기반 분석에 의해 측정된 바와 같이 1.3, 1.2, 1.1, 1.0, 0.9 또는 0.8 nM 이하의 EC₅₀을 갖는 PD-L1과 그의 결합 파트너(예컨대, PD-1) 사이의 상호작용을 차단할 수 있다.
- [0349] **ix. 예시적인 항-PD-L1 항체 및 이의 항원 결합 단편**
- [0350] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항-PD-L1 항체(즉, PD-L1에 대한 항체) 및 이의 항원 결합 단편은 **DYYMN**(서열번호: 1), **DINPNNX₁X₂TX₃YNHKFKG**(서열번호: 19), **WGDGPFAY**(서열번호: 3), **KASQNVX₄X₅X₆VA**(서열번호: 20), **SX₇SX₈RYT**(서열번호: 21), **QQYSNYPT**(서열번호: 6)로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 하나 이상(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6)의 CDR을 포함하며, 여기서 X₁은 G 또는 A이고, X₂는 G 또는 D 또는 Q 또는 E 또는 L이며, X₃은 S 또는 M 또는 Q 또는 L 또는 V이고, X₄는 G 또는 P 또는 K이며, X₅는 A 또는 G이고, X₆는 A 또는 I이며, X₇은 A 또는 N 또는 R 또는 V이고, X₈은 N 또는 H 또는 V 또는 D이다.
- [0351] 특정 구현예에서, 중쇄 가변 영역은
- [0352] a) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0353] b) 서열번호: 2, 서열번호: 13, 서열번호: 14, 서열번호: 15, 서열번호: 17, 및 서열번호: 18로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 HCDR2 및
- [0354] c) 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3
- [0355] 을 포함하고/하거나,
- [0356] 경쇄 가변 영역은
- [0357] d) 서열번호: 4, 서열번호: 7, 서열번호: 8 및 서열번호: 9로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0358] e) 서열번호: 5, 서열번호: 10, 서열번호: 11 및 서열번호: 12로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 LCDR2, 및
- [0359] f) 서열번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3
- [0360] 을 포함한다.
- [0361] 특정 구현예에서, 중쇄 가변 영역은
- [0362] g) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 2의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 3의 서열을 포

합하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;

- [0363] h) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 13의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0364] i) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 14의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0365] j) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 15의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0366] k) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 17의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0367] l) 서열번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 18의 서열을 포함하는 HCDR2 및 서열번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역
- [0368] 으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0369] 특정 구현예에서, 경쇄 가변 영역은
- [0370] a) 서열번호: 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0371] b) 서열번호: 9의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0372] c) 서열번호: 8의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0373] d) 서열번호: 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 12의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및
- [0374] e) 서열번호: 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 11의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역
- [0375] 으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0376] 본원에 사용된 바와 같이 항체 "4B6"은 서열번호: 46의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 47의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단일클론 항체를 지칭한다.
- [0377] 특정 구현예에서, 본 개시내용은 항체 4B6, 또는 항체 4B6의 변이체의 하나 이상(예컨대 1, 2, 3, 4, 5 또는 6)의 CDR 서열을 포함하는 항-PD-L1 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. CDR 경계는 카바트(Kabat)의 규정에 의해 정의되거나 확인되었다.
- [0378] 특정 구현예에서, 본 개시내용은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호: 2, 13, 14, 15, 17, 및 18로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 및/또는 서열번호: 4, 7, 8-9로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호: 5, 10, 11-12로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 항-PD-L1 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

표 1. 항체 4B6의 CDR 아미노산 서열.

항체	영역	CDR1	CDR2	CDR3
4B6	HCDR	서열번호: 1 DYVMN	서열번호: 2 DINPNNGGTSYNHKF KG	서열번호: 3 WGDGPFAY
	LCDR	서열번호: 4 KASQNVGAAVA	서열번호: 5 SASNRYT	서열번호: 6 QQYSNYPT

표 2. 항체 4B6의 가변 영역 아미노산 서열.

항체	VH	VL
4B6	서열번호: 46 EVQLQQSGPELVKPGASVKISC KASGYVFTDYIMNWVKQSHG KSLEWIGDINPNNGGTSYNHKF KGKATVTVDKSSRTAYMELLSL TSEDSAVYYCVKWGDGPFAYW GQGTLVTVSA	서열번호: 47 DIVMTQSQKFMSTSVGDRVS ITCKASQNVGA AVAWYQQK PGQSPKLLIYSASNRYTGVP DRFTGSGSGTDFLTISNMQS EDLADYFCQQYSNYPTFGSG TKLGIK

CDR은 항원 결합을 담당하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 6개의 CDR 모두가 필수불가결하거나 변경할 수 없는 것은 아님이 밝혀졌다. 다시 말하면, 항-PD-L1 항체 4B6에서 하나 이상의 CDR을 대체하거나 변경 또는 변형시키지만 PD-L1에 대한 특이적 결합 친화도를 실질적으로 보유할 수 있다.

특정 구현예에서, 본원에 제공된 항체 및 이의 항원 결합 단편은 항체 및 이의 항원 결합 단편이 PD-L1에 특이적으로 결합할 수 있는 한, 적합한 프레임워크 영역(FR) 서열을 포함한다. 표 1에 제공된 CDR 서열은 마우스 항체로부터 유래되지만, 이들은 재조합 기술과 같은 당업계에 공지된 적합한 방법을 사용하여 임의의 적합한 종, 예컨대 그 중에서도 마우스, 인간, 래트, 토끼의 임의의 적합한 FR 서열에 이식될 수 있다.

특정 구현예에서, 본원에 제공된 항체 및 이의 항원 결합 단편은 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간에서의 그의 감소된 면역원성에서 바람직하다. 인간화 항체는 비인간 CDR 서열이 인간 또는 실질적으로 인간 FR 서열에 이식되는 바와 같이 그의 가변 영역에서 키메라성이다. 항체 또는 항원 결합 단편의 인간화는 비인간(예컨대, 쥐) CDR 유전자를 인간 면역글로불린 유전자 내의 상응하는 인간 CDR 유전자로 치환함으로써 본질적으로 수행될 수 있다(예를 들어, Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536 참조).

적합한 인간 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 이러한 목적을 달성하기 위해 선택될 수 있다. 예시적인 예에서, "최적 적합(best-fit)" 접근법이 사용될 수 있고, 여기서 비인간(예컨대, 설치류) 항체 가변 도메인 서열이 공지된 인간 가변 도메인 서열의 데이터베이스에 대해 스크리닝되거나 BLAST되고, 비인간 쿼리 서열에 가장 가까운 인간 서열이 확인되고 비인간 CDR 서열을 이식하기 위한 인간 스캐폴드로서 사용된다(예를 들어, Sims *et al.*, (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901 참조). 대안적으로, 모든 인간 항체의 공통 서열로부터 유래된 프레임워크가 비인간 CDR의 이식에 사용될 수 있다(예를 들어, Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151:2623 참조).

일부 구현예에서, 본 개시내용은 각각 Hu4B6_Hg.2La.1, Hu4B6_Hg.2La.2, Hu4B6_Hg.2La.4, Hu4B6_Hg.2La.6, Hu4B6_Hg.3La.1, Hu4B6_Hg.3La.2, Hu4B6_Hg.3La.4, Hu4B6_Hg.3La.6, Hu4B6_Hg.5La.1, Hu4B6_Hg.5La.2, Hu4B6_Hg.5La.4 및 Hu4B6_Hg.5La.6으로 지정되는, 4B6의 12개의 인간화 항체를 제공한다. 4B6의 각 인간화 항

체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 서열번호가 표 5에 나타나 있다. 4B6의 12개의 인간화 항체 각각의 CDR이 표 5 (밑줄 친 서열)에 나타나 있다. CDR 경계는 카바트 규정에 의해 정의되거나 확인되었다.

[0388] 하기 표 3a는 인간화 4B6에 대한 변이체 CDR의 아미노산 서열을 보여주며, 하기 표 3b는 인간화 4B6 중쇄 및 경쇄 가변 영역에 대한 FR을 보여준다. 하기 표 4는 각각 Hu4B6_Hg.2La.1, Hu4B6_Hg.2La.2, Hu4B6_Hg.2La.4, Hu4B6_Hg.2La.6, Hu4B6_Hg.3La.1, Hu4B6_Hg.3La.2, Hu4B6_Hg.3La.4, Hu4B6_Hg.3La.6, Hu4B6_Hg.5La.1, Hu4B6_Hg.5La.2, Hu4B6_Hg.5La.4 및 Hu4B6_Hg.5La.6으로 지정되는 키메라 항체 4B6에 대한 12개의 인간화 항체의 각각의 중쇄 및 경쇄에 대한 FR 아미노산 서열을 보여준다. 이들 12개의 인간화 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역이 표 5에 나타나 있다.

[0389] 표 3a. 4B6의 인간화 항체에 대한 CDR 변이체의 아미노산 서열.

서열번호	서열	주석
7	KASQNVGAIVA	4B6-L-CDR1-1
8	KASQNVPAAVA	4B6-L-CDR1-2
9	KASQNVKGAVA	4B6-L-CDR1-3
10	SNSHRYT	4B6-L-CDR2-1
11	SRSVRYT	4B6-L-CDR2-2
12	SVSDRYT	4B6-L-CDR2-3
13	DINPNNADTMYNHKFKG	4B6-H-CDR2-1
14	DINPNNAQTYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-2
15	DINPNNATLYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-3
16	DINPNNGLTSYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-4
17	DINPNNAQTVYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-5
18	DINPNNAGTSYNHNKFKG	H-CDR2-WT (G55A)

[0390]

[0391] 표 3b. 4B6 및 4B6의 인간화 항체에 대한 FR 서열의 아미노산 서열.

서열번호	서열	주석
22	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT	인간 생식계열 서열의 HFR1
23	WVRQAPGQGLEWMG	인간 생식계열 서열의 HFR2
24	RVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCAR	인간 생식계열 서열의 HFR3
25	WGQGTLVTVSS	인간 생식계열 서열의 HFR4
26	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	인간 생식계열 서열의 LFR1
27	WYQQKPGKAPKLLIY	인간 생식계열 서열의 LFR2
28	GVPSRFGSGSGTDFITISLQPEDATYYC	인간 생식계열 서열의 LFR3
29	FGQGTKLEIK	인간 생식계열 서열의 LFR4
30	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYVFT	HFR1 변이체
31	WVRQAPGQSLEWMG	HFR2 변이체
32	RVTVTVDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCAR	HFR3 변이체 1
33	RVTVTVDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCVK	HFR3 변이체 2
34	RVTVTVDKSISTAYMELSRLSDDTAVYYCAR	HFR3 변이체 3
35	RVTVTVDKSISTAYMELSRLSDDTAVYYCVK	HFR3 변이체 4
36	WYQQKPGKSPKLLIY	LFR2 변이체
37	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDATYYC	LFR3 변이체 1
38	GVPDRFGSGSGTDFLTISLQPEDATYYC	LFR3 변이체 2
39	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDATYYC	변이체 1-FR3 에 대한 F73L 돌연변이
45	GVPDRFGSGSGTDFLTISLQPEDATYYC	LC 변이체 2- FR3 에 대한 F73L, A43S, S60D

[0392]

[0393] 표 4. 4B6의 인간화 항체에 대한 각각의 인간화 중쇄 및 경쇄 가변 영역에 대한 FR 아미노산 서열.

VH 또는 VL 이름	FR1 (서열번호)	FR2 (서열번호)	FR3 (서열번호)	FR4 (서열번호)
Hu4B6_Hg.2	30	31	35	25
AM4B6_Hg.3	30	31	35	25
AM4B6_Hg.5	30	31	35	25
AM4B6_La.1	26	27	37	29
AM4B6_La.2	26	27	37	29
AM4B6_La.4	26	27	37	29
AM4B6_La.6	30	31	35	25

[0394]

[0395] 하기 표 5는 인간화 4B6 중쇄 가변 영역의 3개의 변이체(즉, Hu4B6_Hg.2, Hu4B6_Hg.3 및 Hu4B6_Hg.5) 및 인간화 4B6 경쇄 가변 영역의 4개의 변이체(즉, AM4B6_La.1, AM4B6_La.2, AM4B6_La.4, AM4B6_La.6)를 보여준다.

[0396] 표 5. 4B6의 인간화 항체에 대한 가변 영역의 아미노산 서열.

항체	VH	VL
AM4B6_Hg.2La.1	Hu4B6_Hg.2, 서열번호: 58 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDIN PNN AQTQ YNHKKFKGRVT VTVDKS IST AYMELSRRLRSDDTAVYYC VKW GDGPF AYWGQGTTLTVSS	AM4B6_La.1, 서열번호: 62 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQNV KG AVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASNRYTGVPSRFGSGSGTDFT LTI SSLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQG TKLEIK
AM4B6_Hg.2La.2	Hu4B6_Hg.2, 서열번호: 58 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDIN PNN AQTQ YNHKKFKGRVT VTVDKS IST AYMELSRRLRSDDTAVYYC VKW GDGPF AYWGQGTTLTVSS	AM4B6_La.2, 서열번호: 63 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQNV PA AVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASNRYTGVPSRFGSGSGTDFT LTI SSLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQG TKLEIK

[0397]

AM4B6_Hg. 2La.4	Hu4B6_Hg.2, 서열번호: 58 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGDIN PNN AQ TQYNHKEFKGRVT V TV D K S IST AYMELSRLRSDDTAVYYC V KWGDGPF AYWGQGTILVTVSS	AM4B6_La.4, 서열번호: 64 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQNVGA AA VAWYQQKPGKAPKLLIYS V S D RYTGVPSRFSGSGSGTDFT L TI SSLQPED IA TYYCQQYSNYPTFGQG TKLEIK
AM4B6_Hg. 2La.6	Hu4B6_Hg.2, 서열번호: 58 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGDIN PNN AQ TQYNHKEFKGRVT V TV D K S IST AYMELSRLRSDDTAVYYC V KWGDGPF AYWGQGTILVTVSS	AM4B6_La.6, 서열번호: 65 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQNVGA AA VAWYQQKPGKAPKLLIYS R S V RYTGVPSRFSGSGSGTDFT L TI SSLQPED IA TYYCQQYSNYPTFGQG TKLEIK
AM4B6_Hg. 3La.1	AM4B6_Hg.3, 서열번호: 59 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGDIN PNN AE TLYNHKEFKGRVT V TV D K S IST AYMELSRLRSDDTAVYYC V KWGDGPF AYWGQGTILVTVSS	AM4B6_La.1, 서열번호: 62 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQNV K G AA VAWYQQKPGKAPKLLIYS ASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFT L TI SSLQPED IA TYYCQQYSNYPTFGQG TKLEIK
AM4B6_Hg. 3La.2	AM4B6_Hg.3, 서열번호: 59 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGDIN PNN AE TLYNHKEFKGRVT V TV D K S IST AYMELSRLRSDDTAVYYC V KWGDGPF AYWGQGTILVTVSS	AM4B6_La.2, 서열번호: 63 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQNV P AAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFT L TI SSLQPED IA TYYCQQYSNYPTFGQG TKLEIK
AM4B6_Hg. 3La.4	AM4B6_Hg.3, 서열번호: 59 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGDIN PNN AE TLYNHKEFKGRVT V TV D K S IST AYMELSRLRSDDTAVYYC V KWGDGPF AYWGQGTILVTVSS	AM4B6_La.4, 서열번호: 64 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQNVGA AA VAWYQQKPGKAPKLLIYS V S D RYTGVPSRFSGSGSGTDFT L TI SSLQPED IA TYYCQQYSNYPTFGQG TKLEIK
AM4B6_Hg. 3La.6	AM4B6_Hg.3, 서열번호: 59 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGDIN PNN AE TLYNHKEFKGRVT V TV D K S IST AYMELSRLRSDDTAVYYC V KWGDGPF AYWGQGTILVTVSS	AM4B6_La.6, 서열번호: 65 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYVFTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGD INPNN A GTSYNHKEFKGRVT V TV D K S ISTAYMELSRLRSDDTAVYYC V KW DGPFA Y WGQGTILVTVSS
AM4B6_Hg. 5La.1	AM4B6_Hg.5, 서열번호: 60 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGDIN PNN AQ T V YNHKEFKGRVT V TV D K S IST AYMELSRLRSDDTAVYYC V KWGDGPF AYWGQGTILVTVSS	AM4B6_La.1, 서열번호: 62 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQNV K G AA VAWYQQKPGKAPKLLIYS ASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFT L TI SSLQPED IA TYYCQQYSNYPTFGQG TKLEIK

[0398]

AM4B6_Hg.5La.2	AM4B6_Hg.5, 서열번호: 60 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGDIN PNN AQ TVYNHKKFKGRVT TV VDKSIST AYMELSRRLRSDDTAVYYC VK WGDGPF AYWGQGTILVTVSS	AM4B6_La.2, 서열번호: 63 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKA SQNV P AAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFT L TI SSLQPEDIAITYYC QQ YSNYPTFGQG TKLEIK
AM4B6_Hg.5La.4	AM4B6_Hg.5, 서열번호: 60 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGDIN PNN AQ TVYNHKKFKGRVT TV VDKSIST AYMELSRRLRSDDTAVYYC VK WGDGPF AYWGQGTILVTVSS	AM4B6_La.4, 서열번호: 64 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKA SQNVGA A VAWYQQKPGKAPKLLIYS V SDRYTGVPSRFSGSGSGTDFT L TI SSLQPEDIAITYYC QQ YSNYPTFGQG TKLEIK
AM4B6_Hg.5La.6	AM4B6_Hg.5, 서열번호: 60 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGDIN PNN AQ TVYNHKKFKGRVT TV VDKSIST AYMELSRRLRSDDTAVYYC VK WGDGPF AYWGQGTILVTVSS	AM4B6_La.6, 서열번호: 65 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GY V FTDYIMNWVRQAPGQ S LEWMGD INPN N AGTSYNHKKFKGRVT TV VDKS ISTAYMELSRRLRSDDTAVYYC VK W DGPFA Y WGQGTILVTVSS

[0399]

[0400]

특정 구현예에서, 본원에 제공된 인간화 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 비인간인 CDR 서열을 제외하고 실질적으로 모든 인간 서열로 구성된다. 일부 구현예에서, 가변 영역 FR, 및 불변 영역은, 존재하는 경우, 전적으로 또는 실질적으로 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된다. 인간 FR 서열 및 인간 불변 영역 서열은 상이한 인간 면역글로불린 유전자, 예를 들어, 하나의 인간 항체로부터 유래된 FR 서열 및 또 다른 인간 항체로부터 유래된 불변 영역일 수 있다. 일부 구현예에서, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 중쇄 HFR1-4, 및/또는 경쇄 LFR1-4를 포함한다.

[0401]

일부 구현예에서, 인간으로부터 유래된 FR 영역은 그것이 유래되는 인간 면역글로불린과 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 인간 FR의 하나 이상의 아미노산 잔기는 모 비인간 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환된다. 이것은 특정 구현예에서 결합 특성을 최적화하기 위해(예를 들어, 결합 친화도를 증가시키기 위해) 인간화 항체 또는 그의 단편을 비인간 모 항체 구조에 매우 근사하게 만드는 것이 바람직할 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 각각의 인간 FR 서열에서 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 잔기 치환, 또는 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 모든 FR 서열에서 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 아미노산 잔기에서의 이러한 변화는 중쇄 FR 영역에만, 경쇄 FR 영역에만, 또는 양쪽 사슬에 존재할 수 있다. 특정 구현예에서, 인간 FR 서열의 하나 이상의 아미노산은 결합 친화도를 증가시키기 위해 무작위로 돌연변이된다. 특정 구현예에서, 인간 FR 서열의 하나 이상의 아미노산은 결합 친화도를 증가시키기 위해 모 비인간 항체의 상응하는 아미노산(들)으로 다시 돌연변이된다.

[0402]

특정 구현예에서, 본 개시내용의 인간화 항-PD-L1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX₉FT(서열번호: 40)의 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하는 중쇄 HFR1, WVRQAPGQX₁₀LEWMG(서열번호: 41)의 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하는 중쇄 HFR2, RVTX₁₆TVDX₁₁SISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCX₁₂X₁₃(서열번호: 42)의 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하는 중쇄 HFR3, 및 WGQGTILVTVSS(서열번호: 25)의 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하는 중쇄 HFR4를 포함하며, 여기서 X₉는 T 또는 V이고, X₁₀은 G 또는 S이며, X₁₁은 T 또는 K이고, X₁₂는 A 또는 V이며, X₁₃은 R 또는 K이다.

[0403]

특정 구현예에서, 본 개시내용의 인간화 항-PD-L1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC(서열번호: 26)의 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하는 경쇄 LFR1, WYQQKPGKX₁₄PKLLIY(서열번호: 43)의 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하는 경쇄 LFR2, GVPX₁₅RFSGSGSGTDFTX₁₇TISSLQPEDIAITYYC(서열번호: 44)의 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성 서열을 포함하는 경쇄 LFR3, 및 FGQGTKLEIK(서열번호: 29)의 서열 또는 이의 적어도 80% 서열 동일성의 상동성

서열을 포함하는 경쇄 LFR4를 포함하며, 여기서 X_{14} 는 A 또는 S이고, X_{15} 는 S 또는 D이며, X_{16} 은 M 또는 V이고, X_{17} 은 F 또는 L이다.

- [0404] 특정 구현예에서, HFR1은 서열번호: 22 및 30으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하고, HFR2는 서열번호: 23 및 31로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하며, HFR3은 서열번호: 24 및 32-35로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하고, HFR4는 서열번호: 25의 서열을 포함하며, LFR1은 서열번호: 26으로 이루어진 군으로부터의 서열을 포함하고, LFR2는 서열번호: 27 및 36으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하며, LFR3는 서열번호: 28, 및 37-38, 39, 45로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하고, LFR4는 서열번호: 29의 서열을 포함한다.
- [0405] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 인간화 항-PD-L1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 Hu4B6_Hg.2(서열번호: 58), AM4B6_Hg.3(서열번호: 59), AM4B6_Hg.5(서열번호: 60)로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역에 함유된 HFR1, HFR2, HFR3, 및/또는 HFR4 서열을 포함한다.
- [0406] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 인간화 항-PD-L1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 AM4B6_La.1(서열번호: 62), AM4B6_La.2(서열번호: 63), AM4B6_La.4(서열번호: 64), 및 AM4B6_La.6(서열번호: 65)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 경쇄 가변 영역에 함유된 LFR1, LFR2, LFR3, 및/또는 LFR4 서열을 포함한다.
- [0407] 특정 구현예에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호: 46, 서열번호: 49, 서열번호: 50, 서열번호: 51, 서열번호: 52, 서열번호: 56, 서열번호: 57, 서열번호: 58, 서열번호: 59, 서열번호: 60, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 이의 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호: 47, 서열번호: 54, 서열번호: 55, 서열번호: 61, 서열번호: 62, 서열번호: 63, 서열번호: 64, 서열번호: 65, 및 이의 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 상동성 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, PD-L1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호: 49/54, 50/54, 51/54, 52/54, 49/55, 50/55, 51/55, 52/55, 58/62, 58/63, 58/64, 58/65, 59/62, 59/63, 59/64, 59/65, 60/62, 60/63, 60/64, 및 60/65로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 서열의 쌍을 포함한다.
- [0408] 이들 예시적인 인간화 항-PD-L1 항체는 PD-L1에 대한 특이적 결합 능력 또는 친화도를 보유하고, 그 측면에서, 모 마우스 항체 4B6보다 우수하다.
- [0409] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 및 항원 결합 단편은 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 및/또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 본원에 제공된 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부로 구성되는 단일 도메인 항체이다. 이러한 단일 도메인 항체의 더 많은 정보는 당업계에서 이용가능하다(예컨대, 미국 특허 제6,248,516호 참조).
- [0410] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 면역글로불린(Ig) 불변 영역을 추가로 포함하고, 이는 선택적으로 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 중쇄 불변 영역은 CH1, 힌지, 및/또는 CH2-CH3 영역(또는 선택적으로 CH2-CH3-CH4 영역)을 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 또는 IgM의 중쇄 불변 영역을 포함한다. 특정 구현예에서, 경쇄 불변 영역은 C κ 또는 C λ 를 포함한다. 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 불변 영역은 야생형 불변 영역 서열과 동일하거나 하나 이상의 돌연변이에서 상이할 수 있다.
- [0411] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 진단 및/또는 치료 용도를 제공하기에 충분한 인간 PD-L1에 대한 특이적 결합 친화도를 갖는다.
- [0412] 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단일클론 항체, 다클론 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 재조합 항체, 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 표지된 항체, 2가 항체, 항-이디오타입 항체, 또는 융합 단백질일 수 있다. 재조합 항체는 동물에서가 아닌 재조합 방법을 사용하여 시험관내에서 제조된 항체이다.
- [0413] 특정 구현예에서, PD-L1 결합 모이어티는 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고, 이는 PD-L1에 대한 결합에 대해 서열번호: 49/54, 50/54, 51/54, 52/54, 49/55, 50/55, 51/55, 52/55, 58/62, 58/63, 58/64, 58/65, 59/62, 59/63, 59/64, 59/65, 60/62, 60/63, 60/64, 및 60/65로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 서열의 쌍을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁한다.

[0414] **x. 항체 변이체**

[0415] 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 또한 본원에 제공된 항체 서열의 다양한 변이체를 포괄한다.

[0416] 특정 구현예에서, 항체 변이체는 상기 표 1에 제공된 CDR 서열 중 하나 이상, 상기 표 3a, 3b 및 5에 제공된 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역의 비-CDR 서열 중 하나 이상, 및/또는 불변 영역(예컨대, Fc 영역)에서 하나 이상의 변형 또는 치환을 포함한다. 이러한 변이체는 그들의 모 항체의 PD-L1에 대한 결합 친화도를 보유하지만, 변형(들) 또는 치환(들)에 의해 부여되는 하나 이상의 바람직한 특성을 갖는다. 예를 들어, 항체 변이체는 개선된 항원 결합 친화도, 개선된 글리코실화 패턴, 감소된 글리코실화의 위험, 감소된 탈아민화, 감소되거나 고갈된 효과기 기능(들), 개선된 FcRn 수용체 결합, 증가된 약동학적 반감기, pH 민감도, 및/또는 접합에 대한 양립가능성(예컨대, 하나 이상의 도입된 시스테인 잔기)을 가질 수 있다.

[0417] 모 항체 서열은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발"을 사용하여 변형 또는 치환되기에 적합하거나 바람직한 잔기를 확인하기 위해 스크리닝될 수 있다(예를 들어, Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085 참조). 간략하게, 표적 잔기(예컨대, 하전된 잔기, 예컨대 Arg, Asp, His, Lys, 및 Glu)는 확인되고 중성 또는 음전하를 띤 아미노산(예컨대, 알라닌 또는 폴리알라닌)에 의해 대체될 수 있으며, 변형된 항체가 생성되고 관심있는 특성에 대해 스크리닝된다. 특정 아미노산 위치에서의 치환이 관심있는 기능적 변화를 나타내면, 상기 위치는 변형 또는 치환을 위한 잠재적인 잔기로서 확인될 수 있다. 잠재적인 잔기는 상이한 유형의 잔기(예컨대, 시스테인 잔기, 양전하를 띤 잔기 등)로 치환함으로써 추가로 평가될 수 있다.

[0418] **xi. 친화도 변이체**

[0419] 항체의 친화도 변이체는 상기 표 1에 제공된 하나 이상의 CDR 서열, 상기 표 3b 및 4에 제공된 하나 이상의 FR 서열, 또는 상기 표 5에 제공된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열에서 변형 또는 치환을 함유할 수 있다. FR 서열은 상기 표 1에서의 CDR 서열 및 상기 표 5에서의 가변 영역 서열에 기초하여 당업자에 의해 쉽게 확인될 수 있는데, CDR 영역이 가변 영역 내의 2개의 FR 영역에 의해 측정된다는 것이 당업계에 잘 알려져 있기 때문이다. 친화도 변이체는 모 항체의 PD-L1에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하거나, 심지어 모 항체에 비해 개선된 PD-L1 특이적 결합 친화도를 갖는다. 특정 구현예에서, CDR 서열, FR 서열, 또는 가변 영역 서열 내의 치환(들) 중 적어도 하나(또는 모두)는 보존적 치환을 포함한다.

[0420] 당업자는 상기 표 1 및 3a에 제공된 CDR 서열, 및 상기 표 5에 제공된 가변 영역 서열에서, 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환될 수 있지만 생성된 항체 또는 항원 결합 단편은 PD-L1에 대한 결합 친화도 또는 결합 능력을 여전히 보유하거나, 또는 심지어 개선된 결합 친화도 또는 능력을 갖는다는 것을 이해할 것이다. 이러한 목적을 달성하기 위해 당업계에 공지된 다양한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 변이체(예컨대, Fab 또는 scFv 변이체)의 라이브러리나 파지 디스플레이 기술을 이용하여 생성 및 발현된 다음, PD-L1에 대한 결합 친화도에 대해 스크리닝될 수 있다. 또 다른 예를 들어, 컴퓨터 소프트웨어가 PD-L1에 대한 항체의 결합을 가상으로 시뮬레이션하고, 결합 인터페이스를 형성하는 항체 상의 아미노산 잔기를 확인하는 데 사용될 수 있다. 이러한 잔기는 결합 친화도의 감소를 방지하기 위해 치환에서 회피되거나, 또는 더 강한 결합을 제공하기 위해 치환을 위해 표적화될 수 있다.

[0421] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 CDR 서열, 및/또는 하나 이상의 FR 서열에서 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 특정 구현예에서, 친화도 변이체는 CDR 서열 및/또는 FR 서열에서 전체적으로 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 치환을 포함한다.

[0422] 특정 구현예에서, 항-PD-L1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 상기 표 1 및 3a에 열거된 것(또는 것들)에 대해 적어도 80%(예컨대, 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 갖지만 그의 모 항체와 유사하거나 심지어 더 높은 수준으로 PD-L1에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하는 1, 2, 또는 3개의 CDR 서열을 포함한다.

[0423] 특정 구현예에서, 항-PD-L1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 상기 표 5에 열거된 것(또는 것들)에 대해 적어도 80%(예컨대, 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 갖지만 그의 모 항체와 유사하거나 심지어 더 높은 수준으로 PD-L1에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하는 하나 이상의 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 상기 표 5에 열거된 가변 영역 서열에서 치환, 삽입 또는 결실되었다. 일부 구현예에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 CDR 외부의 영역(예컨대, FR)에서 발생한다.

[0424] **xii. 글리코실화 변이체**

[0425] 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 또한 글리코실화 변이체를 포괄하며, 이는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 글리코실화 정도를 증가 또는 감소시키기 위해 수득될 수 있다.

[0426] 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 글리코실화 부위를 도입하거나 제거하는 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 글리코실화 부위는 탄수화물 모이어티(예컨대, 올리고당 구조)가 부착될 수 있는 측쇄를 갖는 아미노산 잔기이다. 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 아스파라긴 잔기, 예를 들어, 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌과 같은 트리펩타이드 서열에서의 아스파라긴 잔기의 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 부착을 지칭하며, 여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다. O-연결된 글리코실화는 하이드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌에 대한 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스, 또는 자일로스 중 하나의 부착을 지칭한다. 천연 글리코실화 부위의 제거는, 예를 들어, 서열 내에 존재하는 상기 기재된 트리펩타이드 서열 중 하나(N-연결된 글리코실화 부위의 경우) 또는 세린 또는 트레오닌 잔기(O-연결된 글리코실화 부위의 경우)가 치환되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성될 수 있다. 새로운 글리코실화 부위는 이러한 트리펩타이드 서열 또는 세린 또는 트레오닌 잔기를 도입함으로써 유사한 방식으로 생성될 수 있다.

[0427] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 및 항원 결합 단편은 하나 이상의 탈아미드화 부위를 제거하기 위한 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 및 항원 결합 단편은 중쇄 내의 G55에서의 돌연변이(예를 들어, G55A)를 포함한다. 이들 돌연변이는 시험되고, 본원에 제공된 항체의 결합 친화도에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 여겨진다.

[0428] **xiii.시스테인 조작된 변이체**

[0429] 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 또한 하나 이상의 도입된 유리 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 시스테인 조작된 변이체를 포괄한다.

[0430] 유리 시스테인 잔기는 디설파이드 다리의 일부가 아닌 잔기이다. 시스테인 조작된 변이체는, 예를 들어 말레이미드 또는 할로아세틸을 통해, 조작된 시스테인 부위에서, 예를 들어 그 중에서도 세포독성 및/또는 이미징 화합물, 표지, 또는 방사성동위원소와의 접합에 유용하다. 유리 시스테인 잔기를 도입하기 위해 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 조작하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 WO제2006/034488호를 참고한다.

[0431] **xiv. Fc 변이체**

[0432] 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 또한 Fc 변이체를 포괄하며, 이는 예를 들어 ADCC 및 CDC와 같은 변경된 효과기 기능을 제공하기 위해 Fc 영역 및/또는 힌지 영역에 하나 이상의 아미노산 잔기 변형 또는 치환을 포함한다. 항체 조작에 의해 ADCC 활성을 변경시키는 방법은 당업계에 기재되어 있으며, 예를 들어 문헌[Shields RL. et al., J Biol Chem. 2001, 276(9): 6591-604; Idusogie EE. et al., J Immunol. 2000, 164(8):4178-84; Steurer W. et al., J Immunol. 1995, 155(3): 1165- 74; Idusogie EE. et al., J Immunol. 2001, 166(4): 2571-5; Lazar GA. et al., PNAS, 2006, 103(11): 4005-4010; Ryan MC. et al., Mol. Cancer Ther., 2007, 6: 3009-3018; Richards JO., et al., Mol Cancer Ther. 2008, 7(8): 2517-27; Shields R. L. et al., J. Biol. Chem, 2002, 277: 26733-26740; Shinkawa T. et al., J. Biol. Chem, 2003, 278: 3466-3473]을 참고한다.

[0433] 본원에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편의 CDC 활성은 또한 예를 들어 C1q 결합 및/또는 CDC를 개선하거나 감소시킴으로써 변경될 수 있다(예를 들어, WO제99/51642호; Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); 미국 특허 제5,648,260호; 미국 특허 제5,624,821호; 및 Fc 영역 변이체의 다른 예에 관한 WO제94/29351호 참조). Fc 영역의 아미노산 잔기 329, 331 및 322로부터 선택된 하나 이상의 아미노산은 C1q 결합 및/또는 감소되거나 폐지된 보체 의존적 세포독성(CDC)을 변경하기 위해 상이한 아미노산 잔기로 대체될 수 있다(미국 특허 제 6,194,551호(Idusogie et al.) 참조). 하나 이상의 아미노산 치환(들)은 또한 보체를 고정하는 항체의 능력을 변경시키기 위해 도입될 수 있다(Bodmer et al.의 PCT 공개 WO 제94/29351호 참조).

[0434] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 Fc 변이체는 야생형 Fc(예컨대, IgG1의 Fc)에 비해 감소된 효과기 기능을 가지며, Fc 영역의 220, 226, 228, 229, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 267, 268, 269, 270, 297, 309, 318, 320, 322, 325, 328, 329, 330, 331 및 332로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에 하나 이상의 아미노산 치환(들)을 포함하고(WO제2016/196228호; Richards et al. (2008) Mol. Cancer Therap. 7:2517; Moore et al. (

2010) *mAbs* 2:181; and Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691 참조), 여기서 Fc 영역 내의 잔기의 넘버링은 카바트에서와 같은 EU 지수의 넘버링이다. 감소된 효과기 기능에 대한 예시적인 치환은, 비제한적으로 220S, 226S, 228P, 229S, 233P, 234V, 234G, 234A, 234F, 234A, 235A, 235G, 235E, 236E, 236R, 237A, 237K, 238S, 267R, 268A, 268Q, 269R, 297A, 297Q, 297G, 309L, 318A, 322A, 325L, 328R, 330S, 331S, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다(WO제2016/196228호; 및 Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691 참조).

[0435] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 감소된 효과기 기능을 갖고, 234, 235, 237, 238, 268, 297, 309, 330 및 331로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에 IgG1 내의 하나 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG1 이소타입이고, N297A, N297Q, N297G, L235E, L234A, L235A, L234F, L235E, P331S 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다.

[0436] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG1 이소타입이고, L234A 및 L235A 돌연변이를 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG1 이소타입이고, L234F, L235E, 및 P331S를 포함한다. Fc 도메인의 CH2 영역에 위치한 L234F, L235E, 및 P331S 치환 세트(FES 삼중 돌연변이로도 지칭됨)는 FCγR 및 C1q 결합을 폐지하여 ADCC 또는 CDC를 유도할 수 없는 항체를 생성할 수 있다(Oganesyan et al., *Acta Crystallogr. D* 64:700-704 (2008) 참조). 제PCT/US2013/36872호는 변이체 Fc 도메인, 예컨대 항체 내의 변이체 Fc 도메인에서의 이들 돌연변이를 조합하는 것이 야생형 모 분자, 예컨대 야생형 IgG1 Fc와 비교하여 감소된 열 안정성을 갖는 Fc 도메인을 생성한다는 것을 보여주었다. 특정 구현예에서, Fc 변이체는 서열번호: 81의 아미노산 서열을 포함한다.

[0437] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG2 이소타입이고, H268Q, V309L, A330S, P331S, V234A, G237A, P238S, H268A, 및 이의 임의의 조합(예컨대, H268Q/V309L/A330S/P331S, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG4 이소타입이고, S228P, N297A, N297Q, N297G, L235E, F234A, L235A, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IgG2/IgG4 교차 이소타입이다. IgG2/IgG4 교차 이소타입의 예는 문헌[Rother R.P. R., *Nat Biotechnol* 25:1256-1264 (2007)]에 기재되어 있다.

[0438] 특정 구현예에서, 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 pH 의존적 결합을 개선하는 하나 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 이러한 변이체는 산성 pH에서 FcRn에 결합하여 그것을 리소좀에서의 분해로부터 탈출시킨 다음 전좌되고 세포 밖으로 방출되게 하기 때문에, 연장된 약동학적 반감기를 가질 수 있다. FcRn과의 결합 친화도를 개선하기 위해 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 조작하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌[Vaughn, D. et al., *Structure*, 6(1): 63-73, 1998; Kontermann, R. et al., *Antibody Engineering*, Volume 1, Chapter 27: Engineering of the Fc region for improved PK, published by Springer, 2010; Yeung, Y. et al., *Cancer Research*, 70: 3269-3277 (2010); 및 Hinton, P. et al., *J. Immunology*, 176:346-356 (2006)]을 참조한다.

[0439] 특정 구현예에서, 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 이중이량체화를 용이하게 하고/하거나 촉진하기 위해 Fc 영역의 계면 내에 하나 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 이들 변형은 제1 Fc 폴리펩타이드 내로 융기(protuberance)의 도입 및 제2 Fc 폴리펩타이드 내로 공동(cavity)의 도입을 포함하며, 여기서 융기는 제1 및 제2 Fc 폴리펩타이드의 상호작용을 촉진하여 이중이량체 또는 복합체를 형성하기 위해 공동 내에 위치될 수 있다. 이러한 변형을 갖는 항체를 생성하는 방법은, 예컨대, 미국 특허 제5,731,168호에 기재된 바와 같이, 당업계에 공지되어 있다.

[0440] xv. 항원 결합 단편

[0441] 본원에 제공된 이작용성 분자 내의 PD-L1 결합 모이어티는 또한 항-PD-L1 항원 결합 단편을 포괄한다. 다양한 유형의 항원 결합 단편은 당업계에 공지되어 있고, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체에 기초하여 개발될 수 있으며, 예를 들어 CDR이 상기 표 1 및 3a에 나타나 있고 가변 서열이 표 2 및 5에 나타나 있는 예시적인 항체, 및 이들의 상이한 변이체(예컨대, 친화도 변이체, 글리코실화 변이체, Fc 변이체, 시스테인 조작된 변이체 등)를 포함한다.

- [0442] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항원 결합 단편은 디아바디, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv 단편, 이황화 안정화 Fv 단편(dsFv), (dsFv)₂, 이중특이적 dsFv(dsFv-dsFv'), 이황화 안정화 디아바디(ds 디아바디), 단일쇄 항체 분자(scFv), scFv 이량체(2가 디아바디), 다중특이적 항체, 낙타화된 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 및 2가 도메인 항체이다.
- [0443] 이러한 항원 결합 단편의 생산을 위해 다양한 기술이 사용될 수 있다. 예시적인 방법은, 온전한 항체의 효소적 소화(예컨대, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); 및 Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985) 참조), *E. Coli*와 같은 숙주 세포에 의한 재조합 발현(예컨대, Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편의 경우), 상기 논의된 바와 같은 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 스크리닝(예컨대, ScFv의 경우), 및 F(ab')₂ 단편을 형성하기 위한 2개의 Fab'-SH 단편의 화학적 결합(Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992))을 포함한다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다.
- [0444] 특정 구현예에서, 항원 결합 단편은 scFv이다. scFv의 생성은, 예를 들어 WO 제93/16185호; 미국 특허 제 5,571,894호; 및 제5,587,458호에 기재되어 있다. ScFv는 융합 단백질을 제공하기 위해 아미노 또는 카르복실 말단 중 어느 하나에서 효과기 단백질에 융합될 수 있다(예를 들어, 문헌[Antibody Engineering, ed. Borrebaeck] 참조).
- [0445] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 2가, 4가, 6가, 또는 다가이다. 2가 초과인 임의의 분자는, 예를 들어 3가, 4가, 6가 등을 포함하는 다가인 것으로 간주된다.
- [0446] 2가 분자는 2개의 결합 부위가 모두 동일한 항원 또는 동일한 에피토프에의 결합에 특이적인 경우 단일특이적일 수 있다. 이는, 특정 구현예에서, 1가 대응물보다 항원 또는 에피토프에 대해 더 강한 결합을 제공한다. 유사하게, 다가 분자는 또한 단일특이적일 수 있다. 특정 구현예에서, 2가 또는 다가 항원 결합 모이어티에서, 결합 부위의 1가 및 결합 부위의 2가는 구조적으로 동일하거나(즉, 동일한 서열을 가짐), 구조적으로 상이하다(즉, 동일한 특이성을 갖지만 상이한 서열을 가짐).
- [0447] 2가는 또한 2개의 결합 부위가 상이한 항원 또는 에피토프에 대해 특이적인 경우 이중특이적일 수 있다. 이것은 또한 다가 분자에 적용된다. 예를 들어, 2개의 결합 부위가 제1 항원(또는 에피토프)에 대해 단일특이적이고, 제3 결합 부위가 제2 항원(또는 에피토프)에 대해 특이적일 때 3가 분자는 이중특이적일 수 있다.
- [0448] **xvi. 이중특이적 항체**
- [0449] 특정 구현예에서, 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 이중특이적이다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 제2 모이어티와는 별도로, PD-L1 결합 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 상기 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편과는 상이한 결합 특이성을 갖는 추가의 기능적 도메인에 추가로 연결된다.
- [0450] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 PD-L1 이외(및 제2 모이어티에 의해 결합된 표적 이외)의 제2 항원, 또는 PD-L1 상의 제2 에피토프(또는 제2 모이어티에 의해 결합된 표적 상의 제2 에피토프)에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0451] **xvii. 이작용성 분자**
- [0452] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 이작용성 분자는 PD-L1 및 제2 모이어티에 의해 결합된 표적 모두에 결합할 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 이작용성 분자는 PD-L1 및 TGFβ 모두에 결합할 수 있거나, PD-L1 및 IL-1 모두에 결합할 수 있거나, PD-L1 및 IL-1R 모두에 결합할 수 있거나, PD-L1 및 MHCII 모두에 결합할 수 있거나, PD-L1 및 CD47 모두에 결합할 수 있거나, 또는 PD-L1 및 SIRPα 모두에 결합할 수 있다.
- [0453] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 PD-L1 및 TGFβ를 표적화하는 이작용성 분자는 ELISA 분석에 의해 측정된 바와 같이 2.0 nM 이하(예컨대, 2.0 nM 이하, 1.2 nM 이하, 1.1 nM 이하, 1.0 nM 이하, 0.9 nM 이하, 0.8 nM 이하)의 EC₅₀에서 인간 TGFβ 1에 특이적으로 결합한다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 PD-L1 및 TGFβ를 표적화하는 단백질은 ELISA 분석에 의해 측정된 바와 같이 PD-L1 및 TGFβ에 동시에 결합할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 PD-L1 및 TGFβ를 표적화하는 이작용성 분자는 Biacore 분석에 의해 측정된 바와 같이 0.8 nM 이하, 0.7 nM 이하, 0.6 nM 이하, 0.5 nM 이하, 또는 0.4 nM 이하의 K_D 값에서 인간 PD-L1에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 PD-L1 및 TGFβ를 표적화하는 이작용성 분자는 ELISA 분석에 의해 측정된 바와 같이 2.0 nM 이하(예컨대, 2.0 nM 이하, 1.2 nM 이하, 1.1 nM 이하, 1.0 nM 이하, 0.9 nM 이하, 0.8 nM

이하)의 K_D 값에서 인간 TGF β 1에 특이적으로 결합할 수 있다.

- [0454] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 PD-L1 및 TGF β 를 표적화하는 이작용성 분자는 용량 의존적 방식으로 종양 성장 억제에 대해 상승 효과를 나타낼 수 있다.
- [0455] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 PD-L1 및 TGF β 를 표적화하는 이작용성 분자는 면역 체크포인트 분자만을 포함하는 분자와 비교하여 종양 미세환경 내로의 항종양 면역 세포의 향상된 침윤을 나타낼 수 있다.
- [0456] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 PD-L1 및 TGF β 를 표적화하는 이작용성 분자는 혈장에서 TGF β 1의 적어도 90% (예컨대, 적어도 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 또는 20%)를 선택적으로 감소시킬 수 있고, 이러한 감소는 적어도 10, 14 또는 21일 동안 유지될 수 있다.
- [0457] 특정 구현예에서, 이작용성 분자는 이중이량체성 중쇄를 포함한다. 중쇄는 제2 모이어티의 존재 또는 위치에 대하여 이중이량체성이다. 특정 구현예에서, 이중이량체성 중쇄는 제2 모이어티를 갖는 하나의 중쇄 및 제2 모이어티를 갖지 않는 다른 중쇄를 포함하고, 여기서 제2 모이어티는 CD47 결합 도메인(예컨대, 가용성 SIRP α) 또는 SIRP α 결합 도메인을 포함한다.
- [0458] 이작용성 분자에서, 이중이량체성 중쇄는 제2 모이어티를 갖는 하나의 중쇄 및 제2 모이어티를 갖지 않는 다른 중쇄를 포함한다. 이중이량체성 중쇄는 동중이량체화를 억제하고/거나 이중이량체화를 선호하는 방식으로 회합하는 이중이량체성 Fc 영역을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 이중이량체성 Fc 영역은 이들이 동일하지 않고, 이들이 그 자체 내에서 동중이량체를 형성하기보다는 서로 간에 우선적으로 이중이량체를 형성하도록 선택될 수 있다. 특정 구현예에서, 이중이량체성 Fc 영역은 노브-인투-홀(knob-into-hole)의 형성, 소수성 상호작용, 정전기적 상호작용, 친수성 상호작용, 또는 증가된 가요성을 통해 이중이량체로 결합될 수 있다. 특정 구현예에서, 이중이량체성 Fc 영역은 CH2 및/또는 CH3 도메인을 포함하며, 이들은 각각 돌연변이되어 노브-인투-홀을 형성할 수 있다. 노브는 첫 번째 CH2/CH3 폴리펩타이드에서 작은 아미노산 잔기를 더 큰 아미노산 잔기로 대체하여 얻을 수 있고, 홀은 큰 잔기를 더 작은 잔기로 대체하여 얻을 수 있다. 특정 구현예에서, 이중이량체성 Fc 영역은 S354C 및 T366W 치환을 함유하는 IgG1 이소타입의 제1 CH3 도메인(서열번호: 96, 노브) 및 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 치환을 포함하는 IgG1 이소타입의 제2 CH3 도메인(서열번호: 97, 홀)을 포함한다.
- [0459] 특정 구현예에서, 이작용성 분자는 서열번호: 118 또는 서열번호: 120의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및/또는 서열번호: 119 또는 서열번호: 121의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0460] **xviii. 접합체**
- [0461] 일부 구현예에서, 이작용성 분자는 하나 이상의 접합체 모이어티를 추가로 포함한다. 접합체 모이어티는 이작용성 분자에 연결될 수 있다. 접합체 모이어티는 이작용성 분자에 부착될 수 있는 모이어티이다. 다양한 접합체 모이어티가 본원에 제공된 이작용성 분자에 연결될 수 있는 것으로 고려된다(예를 들어, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger Press, New York, (1989) 참조). 이들 접합체 모이어티는 다른 방법들 중에서 공유 결합, 친화도 결합, 인터칼레이션, 배위 결합, 착물화, 결합, 블렌딩, 또는 첨가에 의해 이작용성 분자에 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 이작용성 분자는 링커를 통해 하나 이상의 접합체에 연결될 수 있다.
- [0462] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 이작용성 분자는 하나 이상의 접합체 모이어티에 결합하기 위해 이용될 수 있는 에피토프 결합 부분의 외부에 특정 부위를 함유하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 이러한 부위는 접합체 모이어티에 대한 공유 결합을 촉진하기 위해, 하나 이상의 반응성 아미노산 잔기, 예컨대 시스테인 또는 히스티딘 잔기를 포함할 수 있다.
- [0463] 특정 구현예에서, 이작용성 분자는 간접적으로, 또는 또 다른 접합체 모이어티를 통해 접합체 모이어티에 연결될 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 이작용성 분자는 바이오틴에 접합된 다음, 아비딘에 접합된 제2 접합체에 간접적으로 접합될 수 있다. 일부 구현예에서, 접합체 모이어티는 제거 변형체(예컨대, 반감기를 연장시키는 PEG와 같은 중합체), 화학치료제, 독소, 방사성 동위원소, 란탄족, 검출가능한 표지(예컨대, 발광 표지, 형광 표지, 효소-기질 표지), DNA-알킬화제, 토포이소머라제 억제제, 튜블린 결합체, 정제 모이어티 또는 다른 항암 약물을 포함한다.
- [0464] "독소"는 세포에 해롭거나 세포를 손상시키거나 사멸시킬 수 있는 임의의 제제일 수 있다. 독소의 예는, 비제한적으로, 탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티뎀 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시

드, 빈크리스틴, MMAE, MMAF, DM1, 빈블라스틴, 콜치신, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신 및 이의 유사체, 항대사산물(예컨대, 메토틱세이트, 6-메르캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제(예컨대, 메클로레타민, 티오테파, 클로람부실, 펠팔란, 카르무스틴(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 사이클로포스파미드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 백금(II)(DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린(예컨대, 다우노루비신(이전에 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예컨대, 닥티노마이신(이전에 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신(AMC)), 항유사분열제(예컨대, 빈크리스틴 및 빈블라스틴), 토포이소머라제 억제제, 및 튜블린 결합제를 포함한다.

[0465] 검출가능한 표지의 예는 형광 표지(예컨대, 플루오레세인, 로다민, 단실, 피코에리트린, 또는 텍사스 레드), 효소-기질 표지(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 루시퍼라제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제 또는 β -D-갈락토시다제), 방사성동위원소(예컨대, ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H , ^{111}In , ^{112}In , ^{14}C , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{211}At , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , 및 ^{32}P , 다른 란탄족), 발광 표지, 발색단 모이어티, 디콕시게닌, 바이오틴/아비딘, DNA 분자 또는 검출용 금속을 포함할 수 있다.

[0466] 특정 구현예에서, 접합체 모이어티는 이작용성 분자의 반감기를 증가시키는 것을 돕는 제거 변형체일 수 있다. 예시적인 예는 수용성 중합체, 예컨대 PEG, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체 등을 포함한다. 중합체는 임의의 분자량일 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 다양할 수 있으며, 2개 이상의 중합체가 부착된 경우, 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다.

[0467] 특정 구현예에서, 접합체 모이어티는 자성 비드와 같은 정제 모이어티일 수 있다.

[0468] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 이작용성 분자는 접합체에 대한 기재로서 사용된다.

[0469] III. 폴리뉴클레오타이드 및 재조합 방법

[0470] 본 개시내용은 본원에 제공된 이작용성 분자를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 단일 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA) 및 이의 중합체를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 특정 폴리뉴클레오타이드 서열은 또한 명시적으로 나타낸 서열뿐만 아니라 이의 보존적으로 변형된 변이체(예컨대, 축퇴성 코돈 치환), 대립유전자, 오르토로그, SNP 및 상보적 서열을 암시적으로 포괄한다. 구체적으로, 축퇴성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다 (Batzner *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); and Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994) 참조).

[0471] 단일클론 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여(예컨대, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여) 쉽게 단리되고 시퀀싱된다. 코딩 DNA는 또한 합성 방법에 의해 획득될 수 있다.

[0472] 이작용성 분자를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드는 당업계에서 공지된 재조합 기술을 사용하여 추가의 클로닝(DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 벡터 내로 삽입될 수 있다. 많은 벡터가 이용가능하다. 벡터 구성요소는 일반적으로 비제한적으로 신호 서열, 복제 원점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터(예컨대, SV40, CMV, EF-1 α), 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함한다.

[0473] 본 개시내용은 본원에 제공된 단리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 폴리뉴클레오타이드는 이작용성 분자, 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터(예컨대, SV40, CMV, EF-1 α), 및 적어도 하나의 선택 마커를 코딩한다. 벡터의 예는, 비제한적으로, 레트로바이러스(렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 헤르페스바이러스(예컨대, 헤르페스 심플렉스 바이러스), 폭스바이러스, 바콜로바이러스, 파필로마바이러스, 파포마바이러스(예컨대, SV40), 람다 파지, 및 M13 파지, 플라스미드 pcDNA3.3, pMD18-T, pOptivec, pCMV, pEGFP, pIRES, pQD-Hyg-GSeu, pALTER, pBAD, pcDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS10, pLexA, pACT2.2, pCMV-SCRIPT.RTM., pCDM8, pCDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, PCR 2.1, pEF-1, pFB, pSG5, pXT1, pCDEF3, pSVSPORT, pEF-Bos 등

을 포함한다.

[0474] 이작용성 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터는 클로닝 또는 유전자 발현을 위해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 본원의 벡터에서 DNA를 클로닝 또는 발현시키기에 적합한 숙주 세포는 상기 기재된 원핵생물, 효모, 또는 고등 진핵 세포이다. 이러한 목적에 적합한 원핵생물은 진정세균, 예컨대 그람 음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어, 장내세균(*Enterobacteriaceae*), 예컨대 에스케리치아, 예컨대, *E. coli*, 엔테로박터, 에르위니아, 클렙시엘라, 프로테우스, 살모넬라, 예컨대, 살모넬라 티피무리움, 세라티아, 예컨대, 세라티아 마르세스칸스, 및 시겔라뿐만 아니라 바실리, 예컨대 *B. 서브틸리스* 및 *B. 리케니포르미스*, 슈도모나스, 예컨대 *P. 에루지노사*, 및 스트렙토마이세스를 포함한다.

[0475] 원핵생물 이외에, 진핵 미생물, 예컨대 사상성 진균 또는 효모는 이작용성 분자를 코딩하는 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세레비지에, 또는 일반적인 빵 효모는 하등 진핵 숙주 미생물 중에서 가장 일반적으로 사용된다. 그러나, 다수의 다른 유전자, 종, 및 균주, 예컨대 쉬조사카로마이세스 폼베; 클루이베로마이세스 숙주, 예컨대, *K. 락티스*, *K. 프라질리스*(ATCC 12,424), *K. 불가리쿠스*(ATCC 16,045), *K. 위커라미이*(ATCC 24,178), *K. 왈티이*(ATCC 56,500), *K. 드로소필라룸*(ATCC 36,906), *K. 썬모톨레란스*, 및 *K. 막시아누스*; 야로위아(EP 402,226); 피키아 파스토리스(EP 183,070); 칸디다; 트리코더마 레시아(EP 244,234); 뉴로스포라 크라사; 쉬반니오마이세스, 예컨대 쉬반니오마이세스 오시덴탈리스; 및 사상성 진균, 예컨대, 뉴로스포라, 페니실리움, 툴리코플라둠, 및 아스퍼질러스 숙주, 예컨대 *A. 니들란스* 및 *A. 나이거*가 일반적으로 이용 가능하고 본원에 유용하다.

[0476] 본원에 제공된 글리코실화된 이작용성 분자의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 수많은 바칼로바이러스 균주 및 변이체 및 스포돔테라 프루지페르다(애벌레), 아에테스 아에집티(모기), 아에테스 알보픽투스(모기), 드로소필라 멜라노가스터(초파리), 및 봄빅스 모리와 같은 숙주로부터의 상응하는 허용되는 곤충 숙주 세포가 확인되었다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주, 예컨대, 오토그라파 칼리포르니카 NPV(*Autographa californica* NPV)의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 이용가능하며, 이러한 바이러스는 특히 스포돔테라 프루지페르다 세포의 형질감염을 위해 본 발명에 따른 본원의 바이러스로서 사용될 수 있다. 목화, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양물이 또한 숙주로서 활용될 수 있다.

[0477] 그러나, 관심은 척추동물 세포에서 가장 컸고, 배양(조직 배양)에서 척추동물 세포의 증식은 일상적인 절차가 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 계통(현탁 배양물에서 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); 베이비 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR(CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); 마우스 세르톨리 세포(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부암 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포(Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 계통(Hep G2)이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 포유동물 배양 세포주, 예컨대 CHO, BHK, NS0, 293 및 그의 유도체이다.

[0478] 숙주 세포는 이작용성 분자의 생산을 위한 상기 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환되고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 원하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적합하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양된다. 또 다른 구현예에서, 이작용성 분자는 당업계에 공지된 상동 재조합에 의해 생산될 수 있다. 특정 구현예에서, 숙주 세포는 본원에 제공된 이작용성 분자를 생산할 수 있다.

[0479] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 벡터가 발현되는 조건 하에서 본원에 제공된 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 본원에 제공된 이작용성 분자를 발현시키는 방법을 제공한다. 본원에 제공된 이작용성 분자를 생산하기 위해 사용되는 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. Ham's F10(Sigma), 최소 필수 배지(MEM)(Sigma), RPMI-1640(Sigma), 및 둘베코 변형 이글 배지(DMEM, Sigma)와 같은 상업적으로 이용가능한 배지가 숙주 세포를 배양하는 데 적합하다. 또한, 문헌[Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), 미국 특허 제4,767,704호; 제4,657,866호; 제4,927,762호; 제4,560,655호; 또는 제5,122,469호; WO 제90/03430호; WO 제87/00195호; 또는 미국 특허 Re. 제30,985호]에 기재된 임의의 배지가 숙주 세포를 위한 배양 배지로서 사용될 수 있다. 이러한 임의의 배지는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른

성장 인자(예컨대, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염(예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제(예컨대, HEPES), 뉴클레오타이드(예컨대, 아데노신 및 티미딘), 항생제(예컨대, 젠타마이신TM 약물), 미량 원소(일반적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로 정의됨), 및 글루코스 또는 동등한 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필요한 보충제가 또한 당업자에게 공지될 적절한 농도로 포함될 수 있다. 온도, pH 등과 같은 배양 조건은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것이며, 이는 당업자에게 명백할 것이다.

[0480] 재조합 기술을 사용하는 경우, 이작용성 분자는 세포내에서, 주변세포질 공간에서 생성될 수 있거나, 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 이작용성 분자가 세포내에서 생산되는 경우, 첫 번째 단계로서, 숙주 세포 또는 용해된 단편 중 하나인 미립자 파편이, 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다. 문헌[Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)]은 *E. coli*의 주변세포질 공간으로 분비되는 항체를 분리하기 위한 절차를 기술한다. 간략하게, 세포 페이스트는 약 30분에 걸쳐 아세트산나트륨(pH 3.5), EDTA, 및 페닐메틸설포닐플루오라이드(PMSF)의 존재 하에 해동된다. 세포 파편은 원심분리에 의해 제거될 수 있다. 이작용성 분자가 배지 내로 분비되는 경우, 이러한 발현 시스템으로부터의 상층액은 일반적으로 먼저 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 유닛을 사용하여 농축된다. PMSF와 같은 프로테아제 억제제는 단백질분해를 억제하기 위해 전술한 단계 중 어느 단계에 포함될 수 있으며, 항생제는 우발적인 오염물의 성장을 방지하기 위해 포함될 수 있다.

[0481] 세포로부터 제조된 이작용성 분자는, 예를 들어 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, DEAE-셀룰로오스 이온 교환 크로마토그래피, 황산암모늄 침전, 염석, 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있으며, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다.

[0482] 특정 구현예에서, 고체상에 고정화된 단백질 A는 항체 및 이의 항원 결합 단편의 면역친화성 정제에 사용된다. 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 이작용성 분자에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소타입에 의존한다. 단백질 A는 인간 감마1, 감마2, 또는 감마4 중쇄에 기반한 항체를 정제하는 데 사용될 수 있다(Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). 단백질 G는 모든 마우스 이소타입과 인간 감마3에 권장된다(Guss *et al.*, *EMBO J.* (1986)5:1567-75). 5:1567 1575 (1986)). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로스이지만, 다른 매트릭스가 이용가능하다. 제어된 기공 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠과 같은 기계적으로 안정한 매트릭스는 아가로스보다 달성될 수 있는 것보다 더 빠른 유속과 더 짧은 처리 시간을 허용한다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우, Bakerbond ABXTM 수지(J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.)가 정제에 유용하다. 이온 교환 컬럼 상의 분별, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지(예컨대, 폴리아스파르트산 컬럼) 상의 헤파린 세파로스TM 크로마토그래피 상의 크로마토그래피, 크로마토포싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전과 같은 단백질 정제를 위한 다른 기술이 또한 회수될 항체에 따라 이용가능하다.

[0483] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 관심있는 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물은 약 2.5-4.5 사이의 pH에서 용출 완충액을 사용하여 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피에 적용될 수 있고, 바람직하게는 낮은 염 농도(예컨대, 약 0-0.25 M 염)에서 수행될 수 있다.

[0484] IV. 약학 조성물

[0485] 본 개시내용은 이작용성 분자 및 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 추가로 제공한다.

[0486] 본원에 개시된 약학 조성물에 사용하기 위한 약학적으로 허용가능한 담체는, 예를 들어, 약학적으로 허용가능한 액체, 겔, 또는 고체 담체, 수성 비히클, 비수성 비히클, 향미생물제, 등장화제, 완충제, 항산화제, 마취제, 현탁/분산제, 금속이온봉쇄제 또는 킬레이트화제, 희석제, 보조제, 부형제, 또는 비독성 보조 물질, 당업계에 공지된 다른 성분, 또는 이의 다양한 조합을 포함할 수 있다.

[0487] 적합한 구성요소는, 예를 들어, 항산화제, 충진제, 결합제, 봉해제, 완충제, 보존제, 윤활제, 방향제, 증점제, 착색제, 유화제 또는 안정화제, 예컨대 당 및 사이클로덱스트린을 포함할 수 있다. 적합한 항산화제는, 예를 들어, 메티오닌, 아스코르브산, EDTA, 나트륨 티오설파이트, 백금, 카탈라제, 시트르산, 시스테인, 티오글리세롤, 티오글리콜산, 티오소르비톨, 부틸화된 하이드록시아니솔, 부틸화된 하이드록시톨루엔, 및/또는 프로필 갈레이트를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 바와 같이, 본원에 제공된 이작용성 분자 및 접합체를 포함하는 조성물에 메티오닌과 같은 하나 이상의 항산화제를 포함시키는 것은 이작용성 분자의 산화를 감소시킨다. 이러한 산화의

감소는 결합 친화도의 손실을 방지하거나 감소시켜, 항체 안정성을 개선하고 저장 수명을 극대화시킨다. 그러므로, 특정 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 이작용성 분자 및 하나 이상의 항산화제, 예컨대 메티오닌을 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 이작용성 분자를 하나 이상의 항산화제, 예컨대 메티오닌과 혼합함으로써 본원에 제공된 이작용성 분자의 산화를 방지하고, 저장 수명을 연장하고/거나 효능을 개선하기 위한 방법이 추가로 제공된다.

[0488] 추가로 예시하기 위해, 약학적 허용가능한 담체는 예를 들어, 수성 비히클, 예컨대 염화나트륨 주사, 링거 주사, 등장성 텍스트로스 주사, 멸균수 주사, 또는 텍스트로스 및 락테이트 링거 주사, 비수성 비히클, 예컨대 식물성 기원의 고정유, 면실유, 옥수수유, 참깨유, 또는 땅콩유, 정균 또는 진균 농도의 항미생물제, 등장화제, 예컨대 염화나트륨 또는 텍스트로스, 완충제, 예컨대 포스페이트 또는 시트레이트 완충제, 항산화제, 예컨대 나트륨 바이설페이트, 국소 마취제, 예컨대 프로카인 하이드로클로라이드, 현탁 및 분산제, 예컨대 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 또는 폴리비닐피롤리돈, 유화제, 예컨대 폴리소르베이트 80(TWEEN-80), 금속이온봉쇄제 또는 킬레이트화제, 예컨대 EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산) 또는 EGTA(에틸렌 글리콜 테트라아세트산), 에틸 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 수산화 나트륨, 염산, 시트르산 또는 락트산을 포함할 수 있다. 페놀 또는 크레졸, 수은, 벤질 알코올, 클로로부탄올, 메틸 및 프로필 p-하이드록시벤조산 에스테르, 티메로살, 벤즈알코늄 클로라이드 및 벤제토늄 클로라이드를 포함하는 담체로서 이용되는 항미생물제가 다중 용량 용기 내의 약학 조성물에 첨가될 수 있다. 적합한 부형제는 예를 들어, 물, 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 또는 에탄올을 포함할 수 있다. 적합한 비독성 보조 물질은 예를 들어, 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 안정화제, 용해도 향상제, 또는 제제, 예컨대 아세트산 나트륨, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트, 또는 사이클로텍스트린을 포함할 수 있다.

[0489] 약학 조성물은 액체 용액, 현탁액, 유화액, 환제, 캡슐, 정제, 지속 방출 제제, 또는 분말일 수 있다. 경구 제제는 표준 담체, 예컨대 약학적 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 폴리비닐 피롤리돈, 나트륨 사카린, 셀룰로오스, 마그네슘 카보네이트 등을 포함할 수 있다.

[0490] 특정 구현예에서, 약학 조성물은 주사용 조성물로 제제화된다. 주사용 약학 조성물은 임의의 통상적인 형태, 예를 들어 액체 용액, 현탁액, 유화액, 또는 액체 용액, 현탁액, 또는 유화액을 생성하기에 적합한 고체 형태로 제조될 수 있다. 주사용 제제는 주사를 위한 준비가 된 멸균 및/또는 비발열성 용액, 피하 정제를 포함하여 사용 직전에 용매와 조합될 준비가 되어 있는 동결건조된 분말과 같은 멸균 건조 가용성 제품, 사용 직전에 비히클과 조합될 준비가 된 멸균 건조 불용성 제품, 및 멸균 및/또는 비발열성 유화액을 포함할 수 있다. 용액은 수성 또는 비수성일 수 있다.

[0491] 특정 구현예에서, 단위 용량 비경구 제제는 앰플, 바이알 또는 바늘이 있는 주사기에 포장된다. 비경구 투여를 위한 모든 제제는 당업계에 공지되어 있고 실행되는 바와 같이 멸균이고 비발열성이어야 한다.

[0492] 특정 구현예에서, 멸균, 동결건조된 분말은 본원에 개시된 이작용성 분자를 적합한 용매에 용해시킴으로써 제조된다. 용매는 분말 또는 분말로부터 제조된 재구성된 용액의 안정성 또는 다른 약리학적 구성요소를 개선하는 부형제를 함유할 수 있다. 사용될 수 있는 부형제는 비제한적으로, 물, 텍스트로스, 솔비톨, 프럭토스, 옥수수 시럽, 자일리톨, 글리세린, 글루코스, 수크로스 또는 다른 적합한 제제를 포함한다. 용매는 완충제, 예컨대 시트레이트, 나트륨 또는 칼륨 포스페이트 또는 일 구현예에서, 약 중성 pH의 당업자에게 공지된 다른 이러한 완충제를 함유할 수 있다. 용액의 후속 멸균 여과 후 당업자에게 공지된 표준 조건 하에서의 동결건조는 바람직한 제제를 제공한다. 일 구현예에서, 생성된 용액은 동결건조를 위해 바이알에 분배될 것이다. 각각의 바이알은 이작용성 분자 또는 이의 조성물의 단일 투여량 또는 다중 투여량을 함유할 수 있다. 용량 또는 용량 세트에 필요한 것을 초과하는 소량(예컨대, 약 10%)으로 바이알을 과충전하는 것은 정확한 샘플 인출 및 정확한 투약을 용이하게 하기 위해 허용가능하다. 동결건조된 분말은 약 4°C 내지 실온과 같은 적절한 조건 하에서 저장될 수 있다.

[0493] 동결건조된 분말을 주사용수로 재구성하는 것은 비경구 투여에 사용하기 위한 제제를 제공한다. 일 구현예에서, 재구성을 위해 멸균 및/또는 비발열성 물 또는 다른 액체 적합한 담체가 동결건조된 분말에 첨가된다. 정확한 양은 주어지는 선택된 요법에 의존하며, 경험적으로 결정될 수 있다.

[0494] V. 키트

[0495] 특정 구현예에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 이작용성 분자 및/또는 본원에 제공된 약학 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 특정 구현예에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 이작용성 분자 및 제2 치료제를 포함하는 키

트를 제공한다. 특정 구현예에서, 제2 치료제는 화학치료제, 항암 약물, 방사선 요법, 면역요법제, 항혈관신생제, 표적 요법, 세포 요법, 유전자 요법, 호르몬 요법, 항바이러스제, 항생제, 진통제, 항산화제, 금속 킬레이터, 및 사이토카인으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0496] 이러한 키트는 당업자에게 쉽게 명백한 바와 같이, 원하는 경우, 다양한 통상적인 약학적 키트 구성요소 중 하나 이상, 예를 들어, 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체가 있는 용기, 추가의 용기 등을 추가로 포함할 수 있다. 투여될 구성요소의 양을 나타내는 삽입물 또는 라벨과 같은 지침, 투여 지침, 및/또는 구성요소를 혼합하기 위한 지침이 또한 키트에 포함될 수 있다.

[0497] VI. 사용 방법

[0498] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 이작용성 분자의 치료적 유효량, 또는 본원에 제공된 약학 조성물 또는 키트를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 PD-L1 관련 질환을 치료, 예방 또는 완화하는 방법을 제공한다.

[0499] 특정 구현예에서, 대상체는 인간이다.

[0500] PD-1 관련 병태 및 장애는 면역 관련 질환 또는 장애, 암, 자가면역 질환, 또는 감염성 질환일 수 있다.

[0501] 특정 구현예에서, PD-1 관련 병태 및 장애는 암, 예를 들어, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신장 세포암, 결장직장암, 난소암, 유방암, 췌장암, 위암종, 방광암, 식도암, 중피종, 흑색종, 두경부암, 갑상선암, 육종, 전립선암, 교모세포종, 자궁경부암, 흉선 암종, 백혈병, 림프종, 골수종, 진균성 식육종, 메르켈 세포암, 및 다른 혈액학적 악성종양, 예컨대 고전적 호지킨 림프종(CHL), 원발성 종격동 거대 B 세포 림프종, T 세포/조각구가 풍부한 B 세포 림프종, EBV 양성 및 음성 PTLD, 및 EBV 관련 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 형질모세포 림프종, 림프절외 NK/T 세포 림프종, 비인두 암종, 및 HHV8 관련 원발성 삼출 림프종, 호지킨 림프종, 중추신경계(CNS)의 신생물, 예컨대 원발성 CNS 림프종, 척수 축 종양, 뇌간 신경교종을 포함한다. 특정 구현예에서, 종양 및 암은 전이성, 특히 PD-L1을 발현하는 전이성 종양이다.

[0502] 특정 구현예에서, PD-1 관련 병태 및 장애는 자가면역 질환을 포함한다. 자가면역 질환은, 비제한적으로 후천성 면역결핍 증후군(AIDS, 자가면역 성분을 갖는 바이러스 질환), 탈모증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 에디슨병, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 내이 질환(AIED), 자가면역 림프증식성 증후군(ALPS), 자가면역 혈소판감소성 자반병(ATP), 베체트병, 심근병증, 셀리악 스프루-포진상 피부염; 만성 피로 면역 기능장애 증후군(CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 다발성신경병증(CIPD), 반흔성 유전포창, 한랭 응집소병, 크레스트 증후군, 크론병, 데고스병, 피부근염-소아, 원반형 루푸스, 필수 혼합 냉동글로불린혈증, 섬유근육통-섬유근육염, 그레이브스병, 길랑-바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐 섬유증, 특발성 혈소판 감소증 자반병(ITP), IgA 신증, 인슐린 의존성 당뇨병, 소아 만성 관절염(스틸병), 소아 류마티스 관절염, 메니에르병, 혼합 결합 조직 질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 악성 빈혈, 결절성 다발성 동맥염, 다발성연골염, 다선 증후군, 류마티스성 다발근통, 다발성근육염 및 피부근염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경변증, 건선, 건선성 관절염, 레이노 현상, 라이터 증후군, 류마티스 열, 류마티스 관절염, 유육종증, 경피증(전신성 경피증(SS)으로도 알려진 진행성 전신 경화증(PSS)), 쇼그렌 증후군, 스티프맨 증후군, 전신성 홍반성 루푸스(SLE), 다카야수 동맥염, 측두 동맥염/거대 세포 동맥염, 켈양성 대장염, 포도막염, 백반증 및 베게너 육아종증을 포함한다.

[0503] 특정 구현예에서, PD-1 관련 병태 및 장애는 감염성 질환을 포함한다. 감염성 질환은, 예를 들어, 만성 바이러스 감염, 예를 들어, 진균 감염, 기생충/원생동물 감염 또는 만성 바이러스 감염, 예를 들어, 말라리아, 콕시디오이테스 진균증(coccidioidomycosis immitis), 히스토플라스마증(histoplasmosis), 손발톱진균증(onychomycosis), 아스페르길로증(aspergilosis), 배반진균증(blastomycosis), 칸디다증 알비칸스(candidiasis albicans), 파라코시디오테스 진균증(paracoccidioiomyosis), 미세포자충증(microsporidiosis), 각시아메바 각막염(Acanthamoeba keratitis), 아메바증(amoebiasis), 회충증(Ascariasis), 바베시아증(Babesiosis), 발란티듐증(Balantidiasis), 아프리카너구리회충증(Baylisascariasis), 샤가스병Chagas disease), 간흡충증(Clonorchiasis), 코클리미아속(Cochliomyia), 크립토스트리듐증(Cryptosporidiosis), 열두조충증(Diphyllobothriasis), 용선충증(Dracunculiasis), 포충증(Echinococcosis), 상피병(Elephantiasis), 요충증(Enterobiasis), 간질병(Fascioliasis), 비대흡충증(Fasciolopsiasis), 필라리아증(Filariasis), 편모충증(Giardiasis), 악구충증(Gnathostomiasis), 왜소조충증(Hymenolepiasis), 포자충증(Isosporiasis), 카타야마열(Katayama fever), 리슈만편모충증(Leishmaniasis), 라임병(Lyme disease), 요코가와흡충증(Metagonimiasis),

승저증(Myiasis), 사상충증(Onchocerciasis), 이 기생증(Pediculosis), 옴(Scabies), 주혈흡충증(Schistosomiasis), 수면병(Sleeping sickness), 간충증(Strongyloidiasis), 조충증(Taeniasis), 톡소카라증(Toxocariasis), 톡소플라스마증(Toxoplasmosis), 선모충증(Trichinosis), 편충증(Trichuriasis), 트리파노소마증(Trypanosomiasis), 기생충 감염, B형 간염(HBV), C형 간염(HCV), 헤르페스 바이러스, 엡스타인-바 바이러스, HIV-1, HIV-2, 사이토메갈로바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 I형, 헤르페스 심플렉스 바이러스 II형, 인간 유두종 바이러스, 아데노바이러스, 카포시 웨스트 육종(Kaposi West sarcoma) 관련 헤르페스 바이러스 유행, 얇은 고리 바이러스(Torquetenovirus), 인간 T 림프성 바이러스 I, 인간 T 림프성 바이러스 II, 수두 대상 포진, JC 바이러스 또는 BK 바이러스의 감염을 포함한다.

[0504] 특정 구현예에서, PD-L1 관련 질환은 PD-L1 발현 암, 또는 PD-L1 과발현 암이다. "PD-L1-발현 암"은 그의 세포 표면에 존재하는 PD-L1 단백질을 갖는 암 세포 또는 종양 세포를 포함하는 것이다. "PD-L1 과발현 암"은 동일한 조직 유형의 비암성 세포와 비교하여, 암 또는 종양 세포의 세포 표면에서 유의하게 높은 수준의 PD-L1을 갖는 것이다.

[0505] PD-L1 발현 또는 과발현은 세포의 표면 상에 존재하는 PD-L1의 증가된 수준을 평가함으로써(예컨대, 면역조직화학 분석; IHC를 통해) 진단 또는 예후 분석에서 결정될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 예컨대 형광 계내 혼성화(FISH; 1998년 10월에 공개된 WO제98/45479호 참조), 서던 블로팅, 또는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 기술, 예컨대 실시간 정량적 PCR(RT-PCR)을 통해, 세포 내의 PD-L1 코딩 핵산의 수준을 측정할 수 있다. 또한 혈청과 같은 생물학적 유체 내의 shed된(shed) 항원(예컨대, PD-L1 엑토도메인 또는 가용성 PD-L1)을 측정함으로써 PD-L1 과발현을 연구할 수 있다. 상기 분석 외에도, 다양한 생체내 분석이 당업자에게 이용가능하다. 예를 들어, 환자의 체내의 세포를 선택적으로 검출가능한 표지, 예컨대 방사성 동위원소로 표지된 항-PD-L1 항체에 노출시킬 수 있고, 환자에서 세포에 대한 항체의 결합은, 예컨대 방사능에 대한 외부 스캐닝에 의해 또는 이전에 항체에 노출된 환자로부터 채취한 생검을 분석함으로써 평가될 수 있다.

[0506] 일부 구현예에서, 대상체는 PD-1 길항체에 반응할 가능성이 높은 것으로 확인되었다. 관심있는 생물학적 샘플 상의 PD-L1의 존재 또는 수준은 생물학적 샘플이 유래된 대상체가 PD-1 길항체에 반응할 가능성이 높은지 여부를 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, 시험 샘플은 암 세포 또는 조직, 또는 종양 침윤성 면역 세포로부터 유래된다. 특정 구현예에서, 시험 생물학적 샘플 내의 PD-L1의 존재 또는 상향조절된 수준은 반응 가능성을 나타낸다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "상향조절된"은 동일한 항체를 사용하여 검출된 바와 같은 참조 샘플 내의 PD-L1 단백질 수준과 비교하여, 시험 샘플 내의 PD-L1의 단백질 수준에서, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 초과 이상의 전반적인 증가를 지칭한다. 참조 샘플은 건강하거나 병에 걸리지 않은 개체로부터 얻은 대조군 샘플, 또는 시험 샘플이 얻어진 동일한 개체로부터 얻은 건강하거나 병에 걸리지 않은 샘플일 수 있다. 예를 들어, 참조 샘플은 시험 샘플(예컨대, 종양)에 인접하거나 그 근처에 있는 병에 걸리지 않은 샘플일 수 있다.

[0507] 특정 구현예에서, PD-L1 관련 질환은 PD-L1/PD-1 단일요법에 내성이다. 본원에 사용된 바와 같이, "PD-L1/PD-1 단일요법"은 PD-L1 및 PD-1 상호작용 또는 신호전달을 억제 또는 감소시킴으로써 작용하는 단일요법을 지칭한다. 예시적인 PD-L1/PD-1 단일요법은 항-PD-L1 항체 요법, 항-PD-1 항체 요법, 또는 PD-1 또는 PD-L1에 대한 소분자 억제제를 수반하는 단일요법을 포함할 수 있다. "내성"은 질환이 PD-L1/PD-1 단일요법에 대한 반응성 또는 민감성이 없거나 감소된 반응성 또는 민감성을 갖는다는 것을 의미한다. 감소된 반응성은, 예를 들어 주어진 효능을 달성하기 위해 증가된 용량의 요법에 의해 표시될 수 있다. 특정 구현예에서, 질환은 PD-L1/PD-1 단일요법에 대해 비반응성일 수 있다. 예를 들어, 암세포 또는 종양 크기는 PD-L1/PD-1 단일요법 치료에도 불구하고 증가하거나, 또는 질환이 그의 이전 상태로의 퇴행, 예를 들어 부분적인 회복 후 이전 증상의 복귀를 나타내었다. PD-L1/PD-1 단일요법에 대한 내성은 새로운 것이거나 후천적일 수 있다.

[0508] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 이작용성 분자의 유효량, 또는 본원에 제공된 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 면역억제 사이토카인의 억제로부터, 지속적인 면역 반응의 유도로부터, 또는 항종양 면역의 자극으로부터 이익을 얻을 질환 또는 병태를 대상체에서 치료, 예방 또는 완화하는 방법을 제공한다.

[0509] 일부 구현예에서, 면역억제 사이토카인은 TGF β 또는 IL-1이다. 일부 구현예에서, 면역억제 사이토카인은 TGF β 1 또는 IL-1 β 이다.

[0510] 일부 구현예에서, 질환 또는 병태는 TGF β 관련 질환 또는 병태이다. 일부 구현예에서, TGF β 관련 질환은 암, 섬유성 질환, 또는 신장 질환이다.

- [0511] 특정 구현예에서, TGF β 관련 질환은 암이다. 특정 구현예에서, 암은 결장직장, 유방, 난소, 췌장, 위, 전립선, 신장, 자궁경부, 골수종, 림프종, 백혈병, 갑상선, 자궁내막, 자궁, 방광, 신경내분비, 두정부, 간, 비인두, 고환, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 흑색종, 기저 세포, 피부암, 편평 세포 피부암, 용기성 피부섬유육종(dermatofibrosarcoma protuberans), 메르켈 세포 암종, 교모세포종, 신경교종, 육종, 중피종 및 골수이형성 증후군으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0512] 특정 구현예에서, TGF β 관련 질환은 섬유성 질환이다. 섬유성 질환은 섬유증을 수반하는 질환 또는 병태이다. 섬유증은, 예를 들어 폐, 간, 신장, 피부, 심장, 내장 또는 근육에서의 만성 장기 손상의 일반적인 특징인 반흔화 과정(scarring process)이다. 섬유증은 세포의 기질 및 다른 섬유증 관련 단백질의 증가되고 변경된 침착을 초래하는, 형질전환 성장 인자-베타(TGF- β)의 증가된 활성을 특징으로 한다.
- [0513] 섬유성 질환은 폐, 간, 신장, 눈, 피부, 심장, 내장 또는 근육에서의 섬유성 질환을 포함할 수 있다. 폐에서의 섬유성 질환의 예는 폐 섬유증, 낭포성 섬유증, 폐 고혈압, 진행성 거대 섬유증, 폐쇄성 세기관지염(bronchiolitis obliterans), 특발성 폐와 관련된 기도 리모델링 또는 만성 천식을 포함한다. 간에서의 섬유성 질환의 예는 간경변 또는 비알코올성 지방간염을 포함한다. 신장에서의 섬유성 질환의 예는, 예컨대 신장 섬유증, 허혈성 신장 손상, 세뇨관간질성 섬유증, 당뇨병성 신증, 신장경화증, 또는 신독성을 포함한다. 눈에서의 섬유성 질환의 예는, 예컨대 각막 섬유증, 망막하 섬유증을 포함한다. 피부에서의 섬유성 질환의 예는, 예컨대 신성 전신 섬유증, 켈로이드 또는 경피증을 포함한다. 심장에서의 섬유성 질환의 예는 심내막 섬유증 또는 오래된 심근 경색을 포함한다.
- [0514] 일부 구현예에서, 질환 또는 병태는 IL-1 관련 질환 또는 병태이다. 일부 구현예에서, IL-1 관련 질환은 자가염증성 질환, 대사 증후군, 급성 염증, 만성 염증 또는 악성종양이다.
- [0515] 일부 구현예에서, 질환 또는 병태는 MHCII 신호전달을 면역자극성 폴리펩타이드, 예컨대 가용성 LAG-3으로 자극함으로써 지속적인 면역 반응의 유도로부터 이익을 얻을 것이다. 일부 구현예에서, 질환 또는 병태는 암, 바이러스 감염, 기생충 감염, 또는 이의 조합이다.
- [0516] 일부 구현예에서, 질환 또는 병태는 면역억제성 수용체 신호전달을 억제함으로써 항종양 면역의 자극으로부터 이익을 얻을 것이다. 일부 구현예에서, 면역억제성 수용체는 SIRP α 이다. 특정 구현예에서, 질환, 장애 또는 병태는 암, 고형 종양, 만성 감염, 염증성 질환, 다발성 경화증, 자가면역 질환, 신경계 질환, 뇌 손상, 신경 손상, 적혈구증가증(polycythemia), 혈색소침착증(hemochromatosis), 외상, 패혈성 쇼크, 섬유증, 죽상동맥경화증, 비만, II형 당뇨병, 이식 기능장애, 또는 관절염과 같이 SIRP α 와 관련된다. 일부 구현예에서, 암은 항문암, 맹장암, 성상세포종, 기저 세포 암종, 담낭암, 위암, 폐암, 기관지암, 골암, 간 및 담관 암, 췌장암, 유방암, 간암, 난소암, 고환암, 신장암, 신우 및 요관암, 침샘암, 소장암, 요도암, 방광암, 두정부암, 척추암, 뇌암, 자궁경부암, 자궁암, 자궁내막암, 결장암, 결장직장암, 직장암, 항문암, 식도암, 위장암, 피부암, 전립선암, 뇌하수체암, 질암, 갑상선암, 인후암, 교모세포종, 흑색종, 골수이형성 증후군, 육종, 기형종, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 다발성 골수종, T 또는 B 세포 림프종, GI 장기 간질종, 연조직 종양, 간세포 암종 및 선암종이다. 일부 구현예에서, 암은 CD47 발현 암, 또는 CD47 과발현 암이다.
- [0517] 본원에 제공된 이작용성 분자의 치료적 유효량은, 예를 들어 대상체의 체중, 연령, 과거 병력, 현재 약물 치료, 건강 상태 및 교차 반응의 가능성, 알레르기, 민감성 및 부작용뿐만 아니라 투여 경로 및 질환 발병 정도와 같은 당업계에 공지된 다양한 인자에 따라 달라질 것이다. 투여량은 이들 및 다른 상황 또는 요건에 의해 표시된 바와 같이 당업자(예컨대, 의사 또는 수의사)에 의해 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다.
- [0518] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 이작용성 분자는 약 0.01 mg/kg 내지 약 100 mg/kg의 치료적 유효량으로 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 투여량은 치료 과정 동안 변할 수 있다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 초기 투여량은 후속 투여량보다 높을 수 있다. 특정 구현예에서, 투여량은 대상체의 반응에 따라 치료 과정 동안 달라질 수 있다.
- [0519] 투여 요법은 최적의 원하는 반응(예컨대, 치료 반응)을 제공하기 위해 조절될 수 있다. 예를 들어, 단일 용량이 투여될 수 있거나, 또는 몇 개의 분할 용량이 시간 경과에 따라 투여될 수 있다.
- [0520] 본원에 제공된 이작용성 분자는, 예를 들어 비경구(예컨대, 피하, 복강내, 정맥내, 예컨대 정맥내 주입, 근육내, 또는 피내 주사) 또는 비경구(예컨대, 경구, 비강내, 안구내, 설하, 직장 또는 국소) 경로와 같은 당업계에 공지된 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다.

- [0521] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 이작용성 분자는 단독으로 또는 제2 치료제의 치료적 유효량과 조합하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 이작용성 분자는 제2 치료제, 예를 들어, 화학치료제, 항암 약물, 방사선 요법, 면역요법제, 항혈관신생제, 표적 요법, 세포 요법, 유전자 요법, 호르몬 요법, 항바이러스제, 항생제, 진통제, 항산화제, 금속 킬레이터, 또는 사이토카인과 조합하여 투여될 수 있다.
- [0522] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "면역요법"은 암과 같은 질환에 대항하기 위해 면역 체계를 자극하거나 일반적인 방식으로 면역 체계를 강화하는 요법의 유형을 지칭한다. 면역요법의 예는, 비제한적으로 체크포인트 조절제, 입양 세포 전달, 사이토카인, 종양 용해성 바이러스 및 치료 백신을 포함한다.
- [0523] "표적 요법"은 암세포에는 존재하지만 정상 세포에는 존재하지 않거나 암 세포에 더 풍부한 특정 단백질, 또는 암 성장 및 생존에 기여하는 암 미세환경 내의 표적 분자와 같이 암과 관련된 특정 분자에 작용하는 요법의 유형이다. 표적 요법은 치료제를 종양에 표적화하여, 치료제의 효과로부터 정상 조직을 보호한다.
- [0524] 이들 특정 구현예에서, 하나 이상의 추가 치료제와 조합하여 투여되는 본원에 제공된 이작용성 분자는 하나 이상의 추가 치료제와 동시에 투여될 수 있고, 이들 특정 구현예에서, 이작용성 분자 및 추가 치료제(들)는 동일한 약학 조성물의 일부로서 투여될 수 있다. 그러나, 또 다른 치료제와 "조합하여" 투여된 이작용성 분자는 제제와 동시에 또는 동일한 조성물로 투여될 필요는 없다. 또 다른 제제의 전후에 투여된 이작용성 분자는, 항체 또는 항원 결합 단편 및 제2 제제가 상이한 경로를 통해 투여되는 경우에도, 문구가 본원에 사용될 때 그 제제와 "조합하여" 투여되는 것으로 간주된다. 가능한 경우, 본원에 개시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 조합하여 투여되는 추가 치료제는 추가 치료제의 제품 정보 시트에 열거된 스케줄에 따라, 또는 의사용 탁상 편람(Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002))) 또는 당업계에 잘 알려진 프로토콜에 따라 투여된다.
- [0525] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 PD-L1 관련 질환, 및/또는 TGF- β 관련 질환 및/또는 IL-1 관련 질환 및/또는 CD47 관련 질환을 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서 본원에 제공된 이작용성 분자 및/또는 본원에 제공된 약학 조성물의 용도를 제공한다.
- [0526] 하기 실시예는 청구된 발명을 더 잘 예시하기 위해 제공되며, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 하기 기재된 모든 특정 조성물, 물질, 및 방법은 전체적으로 또는 부분적으로 본 발명의 범위에 속한다. 이들 특정 조성물, 물질, 및 방법은 본 발명을 한정하는 것이 아니라 단지 본 발명의 범위 내에 속하는 특정 구현예를 예시하기 위한 것이다. 당업자는 발명 능력을 행사하지 않고 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 동등한 조성물, 물질 및 방법을 개발할 수 있다. 많은 변형이 여전히 본 발명의 범위에 있으면서 본원에 기술된 절차에서 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 이러한 변형은 본 발명의 범위 내에 포함된다는 것이 발명자의 의도이다.
- [0527] 실시예
- [0528] 실시예 1: 인간화 4B6 항체의 생성, 발현 및 정제
- [0529] 하기에 나타난 서열번호: 46의 VH 서열 및 서열번호: 47의 VL 서열을 포함하는 특허 WO제2017161976호A1에서 유래된 항-PD-L1 mAb 4B6은 강력한 PD-1/PD-L1 차단제였다. 이 항체는 마우스 하이브리도마 항체로부터 생성되었고, 따라서 적절한 인간화가 필요하였다. 마우스 항체 4B6의 가변 도메인의 서열을 사용하여 이들의 각각의 첫과 프레임워크에 대해 가장 높은 상동성을 갖는 생식계열 서열을 확인하였다. 컴퓨터 모델링을 상보성 결정 영역(CDR) 이식 및 역 돌연변이를 갖는 인간화 변이체를 설계하는 데 사용하였다.
- [0530] 마우스/키메라성 중쇄 가변 영역(서열번호: 46):
- [0531] EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYVFTDYDMNWVKQSHGKSLEWICDINPNNGGTS
YNHKFKGKATVTVDKSSRTAYMELLSLTSEDSAVYYCVKWGDGPFAYWGQGLTVTVSA
- [0532] 마우스/키메라성 경쇄 가변 영역(서열번호: 47):
- [0533] DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGAAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVP
DRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYSNYPTFGSGTKLGIK
- [0534] 참고: 이탤릭체 부분은 프레임워크(FR)를 나타내고, 밑줄 친 부분은 CDR 서열을 나타낸다. 순서는 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4이다.

- [0535] 경쇄에 대한 인간 생식계열 프레임워크 서열 VK/1-33 및 중쇄에 대한 VH/1-2를 각각 CDR 이식에 사용하였다.
- [0536] 3개의 CDR을 VH 생식계열 서열(서열번호: 48)에 직접 이식하고, 추가로 VH 변이체 1(서열번호: 49)에 대해 M69V, R71V, VH 변이체 2(서열번호: 50)에 대해 M69V, R71V, A93V, R94K, VH 변이체 3(서열번호: 51)에 대해 M69V, R71V, T73K, T28V 및 VH 변이체 4(서열번호: 52)에 대해 M69V, R71V, A93V, R94K, T73K, T28V, G44S를 각각 역 돌연변이시켜, 중쇄 변이체 1, 2, 3 및 4(즉, VH 변이체 1, 2, 3 및 4)를 수득하였다.
- [0537] 4B6 VH에 대한 생식계열 서열:
- [0538] VH/1-2(4B6-VH 생식계열, 서열번호: 48):
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYIMHWVRQAPGQGLEWMG
- [0539] WINPNSSGGTNYAQKFQGRVTMTDRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR
- [0540] VH/1-2 변이체 1(4B6_Ha, 서열번호: 49):
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMNWVRQAPGQGLEWMG
- DINPNNGGTSYNHKFKGRVTVTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWG
- [0541] DGPFAIYWGQGTLVTVSS
- [0542] VH/1-2 변이체 2(4B6_Hb, 서열번호: 50):
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMNWVRQAPGQGLEWMG
- DINPNNGGTSYNHKFKGRVTVTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKVG
- [0543] DGPFAIYWGQGTLVTVSS
- [0544] VH/1-2 변이체 3(Hu4B6_Hc, 서열번호: 51):
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYIMNWVRQAPGQGLEWMG
- DINPNNGGTSYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARWG
- [0545] DGPFAIYWGQGTLVTVSS
- [0546] VH/1-2 변이체 4(Hu4B6_Hd, 서열번호: 52):
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYIMNWVRQAPGQSLEWMG
- DINPNNGGTSYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKVG
- [0547] DGPFAIYWGQGTLVTVSS
- [0548] 3개의 CDR을 생식계열 서열(서열번호: 53)에 직접 이식하고, 추가로 VL 변이체 1(서열번호: 54)에 대해 F73L 돌연변이 및 VL 변이체 2(서열번호: 55)에 대해 F73L, A43S, S60D를 각각 역 돌연변이시켜 경쇄 변이체 1 및 2(VL 변이체 1 및 2)를 수득하였다.
- [0549] 4B6 VL에 대한 생식계열 서열:
- [0550] VK/1-33(4B6-VL-생식계열, 서열번호: 53):
- DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASN
- [0551] LETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQYDNLP
- [0552] VK/1-33 변이체 1(Hu4B6_La, 서열번호: 54):
- DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGA AVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS
- [0553] NRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDATYYCQYSNYPTFGQGTKLEIK

[0554] VK/1-33 변이체 2(Hu4B6_Lb, 서열번호: 55):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVGA AVAWYQQKPGKSPKLLIYSAS
NRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGTKLEIK

[0555]

[0556] 상기 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 cDNA를 합성한 다음, 인간 IgG1 및 인간 카파의 불변 영역의 서열과 융합시켰다. 생성된 항체 유전자 서열을 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 표 6에 나타난 바와 같이, 인간화 4B6 변이체 발현을 위해 쿼아젠(Qiagen)의 플라스미드 맥시프렙 시스템(Plasmid Maxiprep System)을 사용하여 대규모 DNA를 제조하고, 제조자의 프로토콜에 따라 인비트로젠(Invitrogen)의 ExpiFectamine™ CHO 시약을 사용하여 세포 형질감염을 수행하였다. 세포 생존율이 60% 초과일 때 상층액을 채취하고 0.22 µm 여과 캡슐을 통해 여과하여 세포 파편을 제거하였다. 이후, 여과된 상층액을 미리 평형화된 단백질-A 친화성 컬럼 상에 로딩하였다. 단백질 A 수지를 평형 완충액(PBS)으로 세척한 다음, 25 mM 시트레이트(pH 3.5)를 사용하여 항체를 용출시켰다. 정제된 항체 용액을 1 M Tris-염기(pH 9.0)를 사용하여 pH 6.0-7.0으로 조정하였다. 내독소를 1 EU/mg 미만으로 제어하였다. 마지막으로, 정제된 항체를 SDS-PAGE에 의해 특성화하였다.

[0557]

표 6. 인간화 4B6 변이체의 발현

첫과 항체 4B6 에 대한 인간화 서열 조합			
	Hu4B6_L0	Hu4B6_La (서열번호 : 54)	Hu4B6_Lb (서열번호 : 55)
Hu4B6_H0			
Hu4B6_Ha (서열번호 : 49)		Hu4B6_HaLa	Hu4B6_HaLb
Hu4B6_Hb (서열번호 : 50)		Hu4B6_HbLa	Hu4B6_HbLb
Hu4B6_Hc (서열번호 : 51)		Hu4B6_HcLa	Hu4B6_HcLb
Hu4B6_Hd (서열번호 : 52)		Hu4B6_HdLa	Hu4B6_HdLb

[0558]

[0559] 참고: 이 표는 상이한 돌연변이의 다양한 서열 조합을 보여준다. 예를 들어, Hu4B6_HaLa는 2 종류의 돌연변이(중쇄 Hu4B6_Ha 및 경쇄 Hu4B6_La)가 인간화 첫과 항체 Hu4B6_HaLa 상에 존재한다는 것 등을 나타낸다. Hu4B6_L0 및 Hu4B6_H0은 핵심적인 역 돌연변이가 없는 CDR 이식에 의해 수득되므로, 이들은 발현에 사용되지 않는다.

[0560]

실시예 2: ELISA 분석에 의한 인간 PD-L1에 대한 결합

[0561]

인간화 항체의 결합을 ELISA 방법에 의해 평가하였다. 간단히 말해서, 인간 PD-L1-His를 플레이트 상에 고정시켰다. 표 6에 제시된 인간화 4B6 항체를 PBS에 연속 희석하고, 1시간 인큐베이션 동안 첨가하였다. 다음으로, OD450 nm에서의 결합의 검출을 위해 염소 pAb를 인간 IgG-HRP 및 TMB에 첨가하였다.

[0562]

도 1에 나타난 바와 같이, 모든 인간화 변이체를 시험하여 최상의 변이체를 스크리닝하였다. 모든 변이체는 그 결합 활성을 유지하였고, Hu4B6_HdLa는 다른 변이체보다 더 우수한 결합 활성을 나타내었다.

[0563]

본 발명자들은 이 항체의 CDR 서열을 분석하였고, 중쇄의 CDR2 내에 NG 모티프가 있다는 것을 발견하였다. 발현 및 정제에서 탈아미노화의 위험이 있을 수 있다. 탈아미드화 핫스팟을 제거하기 위해, 본 발명자들은 Hu4B6_Hd 내로 G55A의 돌연변이(하기에 볼드체로 표시되고 확대됨)를 도입하였다. 그 다음, Hu4B6_Hg(서열번호: 56)를 수득하였고, 인간 PD-L1에 대한 친화도는 도 2에 나타난 바와 같이 영향을 받지 않았다.

- [0564] Hu4B6-Hg(서열번호: 56) :
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYVFTDYYMNWVRQAPGQSLEWMG
 DINPNN^AAGTSYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLSDDTAVYYCVKWG
 DGPFAIYWGQGLTVTVSS
- [0565]
- [0566] **실시예 3: 단일클론 파지 ELISA 및 서열 분석**
- [0567] Hu4B6-HgLa는 길항제 약물로서 키메라 4B6으로부터의 활성을 유지하지만, 더 높은 친화도가 바람직하다. Hu4B6-HgLa 서열에 기초하여, CDR 내의 부위 지향 돌연변이유발 및 시험관내에서 오프-레이트(off-rate) 의존적 선택을 위한 패닝의 여러 사이클을 친화성 성숙을 위해 추가로 사용하였다. 우선, 4B6-HgLa의 VL 및 VH 도메인을 증폭하고 펩타이드 링커 (G₄S)₃에 의해 부착하여 오버랩 PCR에 의해 scFv를 형성한 다음, SfiI 절단 부위를 통한 친화성 성숙을 위한 야생형 서열로서 파지미드 벡터 pComb3x(Wuhan MiaoLingBio, P0862) 내로 서브클로닝하였다.
- [0568] 4B6 친화성 성숙에 대한 중쇄 및 경쇄 모두의 CDR1 및 CDR2의 개별적인 기여를 조사하기 위해, 상기 각 CDR에 대해 하나의 SPM(small perturbation mutagenesis) 파지 라이브러리가 제작될 것인데, 두 사슬의 항체 CDR3이 일반적으로 항원 결합에 중요한 역할을 하기 때문이다. 두 사슬의 CDR1 및 CDR2 서열을 생식계열 서열과 정렬하였고, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 생식계열은 각각 IGHV1-2 및 IGHV1-33이었다. 생식계열 CDR 서열의 생물정보학 분석 결과를 라이브러리의 설계를 안내하는 데 사용한다.
- [0569] 아미노산 돌연변이 부위 및 치환 서열을 결정한 후, 돌연변이 라이브러리의 다양성을 증가시키기 위해 축퇴성 프라이머를 설계하였다. 다양한 CDR 단편을 증폭시켜 4B6 scFv 유전자 돌연변이체 라이브러리를 제작하였다. scFv 유전자를 pComb3XSS 파지 디스플레이 벡터와 라이게이션하여 scFv 라이브러리를 생성하였다. 각 CDR(표 2에 열거된, HCDR1, HCDR2, LCDR1 및 LCDR2 포함)의 코돈 기반 프라이머를 독립적인 라이브러리로서 확립하였고, 4B6 친화성 성숙 라이브러리를 4개의 라이브러리로 나누었다. 능력은 HCDR1의 경우 1.76×10^8 CFM, HCDR2의 경우 1.81×10^8 CFM, LCDR1의 경우 2.34×10^8 CFM, LCDR2의 경우 2.00×10^8 CFM이었다. 콜로니의 시퀀싱을 위해 각 라이브러리의 5개 또는 6개의 클론을 무작위로 선택하였다. 결과는 제작된 라이브러리의 삽입률이 100%임을 보여주었다.
- [0570] 10 µg/ml hPD-L1(Acro Biosystems, PD1-H5229) 항원을 ELISA 플레이트에 코팅하고 200 µL의 파지(1×10^{10} pfu/ml)의 파지 디스플레이 라이브러리와 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 후, 약 0.5의 OD600을 갖는 TG1(Lucigen, 60502-2)을 감염을 위해 직접 웰에 첨가하고 파지와 함께 15분 동안 인큐베이션하였다. 라이브러리 파지미드 레스큐(rescue)를 위한 중간 로그 단계 배양에 충분한 부피의 M13K07 헬퍼 파지(NEB, N0315S), 및 파지를 생성하고 다음 라운드의 스크리닝을 위해 정제하였다. 스크리닝 과정을 3 라운드 반복하였고, 항원의 농도를 2번째 라운드를 위해 2.5 µg/ml 및 3번째 라운드를 위해 1 µg/ml로 감소시켰다.
- [0571] 이들 다중클론 파지 변이체의 역가를 검출하기 위해 ELISA 결합 분석을 수행하였다. 3 라운드의 패닝 후, 4B6-H-CDR2, 4B6-L-CDR1 및 4B6-L-CDR2를 포함하는 3개의 라이브러리가 분명히 농축된다.
- [0572] 이들 3개의 라이브러리에 대해, 각 라이브러리의 96개의 클론을 선택하고 파지 ELISA에 적용하여 이들의 결합 활성을 검출하였다. 간단히 말해서, 1 µg/ml hPD-L1(Acro Biosystems, PD1-H5229) 항원을 ELISA 플레이트에 코팅하고 4°C에서 밤새 두었다. 그 다음, 실온에서 1시간 동안 차단하기 위해 300 µL의 3%(w/v) 탈지유를 첨가하였다. 1시간 후, 단일클론 항체 단편 파지를 함유하는 100 µl의 상층액을 음성 대조군으로서 PBS와 함께 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 0.5% PBS+트윈-20을 3회 세척에 사용하고, 100 µl HRP 결합된 항-M13 mAb(1:20000, Sino Biological, 11973-MM05T-H)를 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 혼합된 TMB(InnoReagents, TMB-S-003) 기질 시약을 첨가하고, 플레이트에 실온에서 5분간 인큐베이션하였다. 반응을 정지시키기 위해 0.1 M H₂SO₄를 첨가한 다음, OD450 nm를 기록하였다. 양성 클론을 Genewiz(Suzhou, China)에 의한 DNA 시퀀싱을 위해 선택하였다. 서열을 표 7에 나타내었다.

[0573] 표 7. 4B6 scFv 파지 라이브러리의 양성 클론의 서열

AM4B6_ Hg		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQSL EWMGDINPNNAGTSYNHKFKGRVTITVDKSISTAYMELSRLSDD TAVYYCVKWDGPFAYWGQGLTVTVSS(서열번호: 56)
Hu4B6_ Hg.2	G57Q, S59Q	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQSL EWMGDINPNNAQTYNHKFKGRVTITVDKSISTAYMELSRLSDD TAVYYCVKWDGPFAYWGQGLTVTVSS(서열번호: 58)
AM4B6_ Hg.3	G57E, S59L	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQSL EWMGDINPNNAETLYNHKFKGRVTITVDKSISTAYMELSRLSDD TAVYYCVKWDGPFAYWGQGLTVTVSS(서열번호: 59)
AM4B6_ Hg.5	G57Q, S59V	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQSL EWMGDINPNNAQTVYNHKFKGRVTITVDKSISTAYMELSRLSDD TAVYYCVKWDGPFAYWGQGLTVTVSS(서열번호: 60)
Hu4B6_ La		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGA AA VAWYQQKPGKAPK LLIYSASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED IA TY YC QQ YSNYPTFGQGTKLEIK(서열번호: 61)
AM4B6_ La.1	G30K, A31G	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVKG AA VAWYQQKPGKAPK LLIYSASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED IA TY YC QQ YSNYPTFGQGTKLEIK(서열번호: 62)
AM4B6_ La.2	G30P	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNV PA AAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED IA TY YC QQ YSNYPTFGQGTKLEIK(서열번호: 63)
AM4B6_ La.4	A51V, N53D	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGA AA VAWYQQKPGKAPK LLIYSVSDRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED IA TY YC QQ YSNYPTFGQGTKLEIK(서열번호: 64)
참고: 밑줄 친 서열은 CDR 서열을 지칭하고, 볼드체로 표시된 아미노산은 돌연변이된 아미노산을 지칭한다.		

[0574]

[0575] 실시예 4: 결합 친화도의 검출을 위한 생물층 간섭계(BLI)

[0576]

생물층 간섭계(BLI)를 인간 PD-L1-Fc(Sino Biological, 70110-D02H) 항원에 대한 4B6 scFv 변이체의 결합 친화도를 시험하기 위해 사용하였다. 물질 및 절차를 각각 표 8 및 표 9에 나타내었다. 결과를 표 10-12에 나타내었다. 결합 친화도 결과에 따라, 4개의 경쇄 변이체(L-CDR1-2, L-CDR1-3, L-CDR2-2, L-CDR2-3) 및 3개의 중쇄 변이체(H-CDR2-2, H-CDR2-3, H-CDR2-5)를 향후 제작을 선택하였다.

[0577]

표 8 BLI 분석에 사용된 샘플 및 물질

웰 유형	샘플 ID
기저선	KD 완충액
로드	PD-L1-FC (3.25 µg/ml)
기저선 2	KD 완충액
샘플	4B6 scFvs (5.2 µg/ml)
참조 웰	KD 완충액
재생	재생 완충액
중화	KD 완충액

[0578]

[0579] 표 9 BLI 분석 절차

단계 유형	분석 시간
기저선	60s
로딩	180s
기저선 2	120s
결합	180s
해리	240s
재생	5s

[0580]

[0581] 표 10. 4B6-L-CDR1 돌연변이 변이체의 결합 친화도 순위

샘플 번호	서열	$K_{on}(\times 10^5 M^{-1} s^{-1})$	$K_{off}(\times 10^{-3} M^{-1} s^{-1})$	$K_d(\times 10^{-9} M)$	배수 증가
L-CDR1-WT	KASQNVGAAVA (서열번호: 4)	0.358	1.01	28.2	----
L-CDR1-1	KASQNVGAIVA (서열번호: 7)	0.412	0.285	6.91	4.08
L-CDR1-2	KASQNVPAAVA (서열번호: 8)	2.71	1.54	5.68	4.96
L-CDR1-3	KASQNVKGAVA (서열번호: 9)	0.911	0.253	2.78	10.14

[0582]

[0583] 표 11. 4B6-L-CDR2 돌연변이 변이체의 결합 친화도 순위

샘플 번호	서열	$K_{on}(\times 10^5 M^{-1} s^{-1})$	$K_{off}(\times 10^{-3} M^{-1} s^{-1})$	$K_d(\times 10^{-9} M)$	배수 증가
L-CDR2-WT	SASNRYT (서열번호: 5)	0.381	1.05	27.6	----
L-CDR2-1	SNSHRYT (서열번호: 10)	0.468	0.377	8.06	3.42
L-CDR2-2	SRSVRYT (서열번호: 11)	1.62	0.540	3.34	8.26
L-CDR2-3	SVSDRYT (서열번호: 12)	1.24	0.543	4.37	6.32

[0584]

[0585] 표 12. 4B6-H-CDR2 돌연변이 변이체의 결합 친화도 순위

샘플 번호	서열	$K_{on}(\times 10^5 M^{-1} s^{-1})$	$K_{off}(\times 10^{-3} M^{-1} s^{-1})$	$K_d(\times 10^{-9} M)$	배수 증가
H-CDR2-WT (G55A)	DINPNNAGTSYNHKFKG (서열번호: 18)	0.463	1.24	26.7	----
H-CDR2-1	DINPNNADTMYNHKFKG (서열번호: 13)	1.41	0.495	3.52	7.6
H-CDR2-2	DINPNNAQTYNHNKFKG (서열번호: 14)	1.01	0.244	2.42	11.03
H-CDR2-3	DINPNNAEITYNHNKFKG (서열번호: 15)	1.16	0.283	2.43	10.99
H-CDR2-4	DINPNNGLTSYNHKFKG (서열번호: 16)	1.17	0.517	4.43	6.03
H-CDR2-5	DINPNNAQTVYNHNKFKG (서열번호: 17)	1.02	0.245	2.40	11.13

[0586]

[0587]

실시예 5: AM-4B6-hIgG1-TGF β RII(1-136) 융합 단백질의 제작 및 발현

[0588]

선택된 중쇄 및 경쇄 변이체를 교차 조합하고, hIgG1-TGF β RII(1-136) 융합 단백질과 함께 발현시켰다. TGF β RII(1-136)는 서열번호: 79에 제시된 아미노산 서열을 갖는다:

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITS
ICEKPQEVCAVVRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKK
KPGETFFMCSDECDNDNIIFSEEYNTSNPD

[0589]

[0590]

hIgG1의 아미노산 서열은 다음과 같다(서열번호: 80):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

[0591]

[0592]

TGF β RII(1-136)를 펩타이드 링커 (G4S)₄G(서열번호: 68)를 통해 hIgG1의 카르복실 말단에 연결하였다.

[0593]

hKappa의 아미노산 서열은 다음과 같다(서열번호: 82):

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNR

[0594]

GEC

[0595]

온전한 항체 변이체를 AM(친화성 성숙)에 의해 미리 고정시켰다. 중쇄 및 경쇄의 서열 작제물을 표 13에 나타내었고, 온전한 항체의 설계를 표 14에 나타내었다. 예를 들어, 표 13 및 표 14에 나타낸 바와 같이, 이작용성 분

자 "AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 1"은 중쇄 및 경쇄를 가지며, 여기서 중쇄는 N 말단부터 C 말단까지 Hu4B6_Hg.2 -hIgG1 -(G4S)4G- TGFβRII(1-136)를 포함하고; 경쇄는 N 말단에서 C 말단까지 Hu4B6_La.1 -hKappa를 포함한다. 동일한 명명법이 표 14의 다른 변이체에 적용된다.

[0596] 중쇄 및 경쇄의 공동형질감염을 제조사의 프로토콜에 따라 인비트로젠(Invitrogen)의 ExpiFectamine™ CHO 시약 (Thermo, A29129)을 사용하여 수행하였다. 상층액을 10일에 채취하고, 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0597] 표 13: AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 중쇄 및 경쇄 변이체의 목록

이름	돌연변이 부위	영역	서열
Hu4B6_Hg.2_hIgG1 -(G4S)4G- TGFβRII	G57Q, S59Q	H-CDR2-2	DINPNNAQTQYNHKFKG
Hu4B6_Hg.3_hIgG1 -(G4S)4G- TGFβRII	G57E, S59L	H-CDR2-3	DINPNNAETLYNHNKFKG
Hu4B6_Hg.5_hIgG1 -(G4S)4G- TGFβRII	G57Q, S59V	H-CDR2-5	DINPNNAQTVYNHNKFKG
Hu4B6_La.1_hKappa	G30K, A31G	L-CDR1-3	KASQNVKGAVA
Hu4B6_La.2_hKappa	G30P	L-CDR1-2	KASQNVPAAVA
Hu4B6_La.4_hKappa	A51V, N53D	L-CDR2-2	SRSVRYT
Hu4B6_La.6_hKappa	A51R, N53V	L-CDR2-3	SVSDRYT

[0598]

[0599] 표 14. AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 항체 변이체의 목록

샘플 번호	중쇄	경쇄
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 1	Hu4B6_Hg.2 (서열번호: 58)	Hu4B6_La.1 (서열번호: 62)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 2		Hu4B6_La.2 (서열번호: 63)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 3		Hu4B6_La.4 (서열번호: 64)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 4		Hu4B6_La.6 (서열번호: 66)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 5	Hu4B6_Hg.3 (서열번호: 59)	Hu4B6_La.1 (서열번호: 62)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 6		Hu4B6_La.2 (서열번호: 63)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 7		Hu4B6_La.4 (서열번호: 64)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 8		Hu4B6_La.6 (서열번호: 65)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 9	Hu4B6_Hg.5 (서열번호: 60)	Hu4B6_La.1 (서열번호: 62)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 10		Hu4B6_La.2 (서열번호: 63)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 11		Hu4B6_La.4 (서열번호: 64)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 12		Hu4B6_La.6 (서열번호: 65)

[0600]

[0601] 실시예 6: hPD-L1에 대한 AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체의 결합 친화도

[0602] ELISA 분석에 의한 hPD-L1에의 결합

[0603] 1 μg/ml hPD-L1(Acro Biosystems, PD1-H5229) 항원을 ELISA 플레이트에 코팅하고 4℃에서 밤새 두었다. 그 다음, 실온에서 1시간 동안 차단하기 위해 300 μl의 3%(w/v) 탈지유를 첨가하였다. 1시간 후, 100 nM 내지 0.006 nM 범위(4배 연속 희석)의 농도에서 100 μl의 AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 또는 원래의 4B6-hIgG1-TGFβRII를 음성 대조군으로서 PBS와 함께 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 0.5% PBS+트윈-20을 3회 세척에 사용하였고, 100 μl HRP 접합된 항-인간 Fc 항체(1:20000, Abcam, ab98624)를 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션 후, 혼합 TMB 기질 시약(InnoReagents, TMB-S-003)을 첨가하고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션한 다음, 0.1 M H₂SO₄를 첨가하여 정지시켰다. OD450 nm를 마이크로플레이트 리더에 의해 기록하였다.

[0604] 도 3a - 도 3c에 나타낸 바와 같이, 원래의 4B6-hIgG1-TGFβRII와 비교하였을 때, 모든 변이체는 향상된 결합 신호 및 친화도를 가지고 있었다. 이러한 변이체 사이의 제한된 차이를 고려하여, 이들의 결합 친화도의 추가

평가를 위해 표면 플라즈몬 공명 기술을 사용하였다.

[0605] **Biacore에 의한 hPD-L1에의 결합**

[0606] 4 µg/ml AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 또는 원래의 4B6-hIgG1-TGFβRII를 S 시리즈 단백질 A 칩의 표면 상에 고정시켰다. 인간 PD-L1을 적절한 농도 구배(0 nM, 1.875 nM, 3.75 nM, 7.5 nM, 15 nM, 30 nM, 60 nM)로 희석하고 Biacore 2000의 샘플 채널 내로 주입하였다. 결과가 표 15에 나타나 있다. 인간 PD-L1에 대한 AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 7의 결합 친화도는 원래의 4B6-hIgG1-TGFβRII보다 약 15배 개선되었다.

[0607] **표 15. Biacore에 의한 hPD-L1에 대한 AM-4B6-hIgG1-TGFβRII의 결합 친화도**

분석물	샘플 번호	샘플 이름	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
PD-L1 his	1	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 5	2.060E+5	1.487E-4	7.218E-10
	2	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 7	3.815E+5	1.479E-4	3.876E-10
	3	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 2	3.231E+5	1.676E-4	5.189E-10
	4	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 10	2.444E+5	1.476E-4	6.039E-10
	5	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 11	2.688E+5	1.366E-4	5.083E-10
	6	4B6-hIgG1-TGFβRII	2.107E+5	0.001156	5.489E-9

[0608]

[0609] **FACS 분석에 의한 세포 표면 상에서 발현되는 PD-L1에의 결합**

[0610] PD-L1 항체의 특성화를 위해 293T-PD-L1-CD3L 세포를 MabSpace Bioscience에 의해 생성하였다. 세포를 인간 PD-L1 및 항-CD3 scFv 둘 모두로 형질감염시켰다. AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 또는 원래의 4B6-hIgG1-TGFβRII를 연속 희석(5배 희석)하여 희석 완충액(2% BSA를 갖는 PBS)에서 8개의 농도를 수득하였다. 293T-PD-L1-CD3L 세포를 채취하고 원심분리하였다. 이들을 PBS에서 2×10^6 세포/ml의 밀도로 재현탁시킨 후 웰당 100 µl로 플레이트에 첨가하였다. 원심분리 및 상층액 제거 후, 희석된 항체를 플레이트에 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 희석 완충액으로 2회 세척한 후, PE 접합된 당나귀 항인간 IgG(H+L)(Jacksonimmuno, 709-116-149)를 플레이트에 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 세포를 200 µl PBS에 재현탁시키고, 유세포 분석에 의해 분석하였다.

[0611] 도 4에 나타낸 바와 같이, PD-L1에 결합된 이들 5개의 변이체는 유사한 EC50으로 293T-PD-L1-CD3L 세포의 표면 상에서 발현되었다. 변이체 7은 다른 것보다 약간 더 낮은 EC50을 가지고 있었고, 이는 Biacore에서 측정된 결합 친화도 결과와 일치하였다.

[0612] **실시예 7: AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체의 PD-1/PD-L1 차단 활성**

[0613] **ELISA 분석에 의한 PD-1/PD-L1 및 B7-1/PD-L1 차단**

[0614] 리간드/수용체 차단 활성을 시험하기 위해, 0.5 µg/ml hPD-L1-Fc 항원을 ELISA 플레이트에 코팅하고 4°C에서 밤새 두었다. 실온에서 1시간 동안 차단하기 위해, 300 µL 차단 완충액을 첨가하였다. 1시간 후, 농도가 1 µg/ml인 50 µl PD-L1-his를 갖는 100 nM 내지 0.024 nM(4배 연속 희석) 범위의 농도의 50 µl의 AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 7 또는 원래의 4B6-hIgG1-TGFβRII를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 0.5% PBS+트윈-20을 3회 세척에 사용하고, 100 µl HRP 접합된 스트렙타비딘(1:5000, Abcam, cat#ab7403)을 첨가하였다. 실온에서 1.5시간 동안 인큐베이션한 후, 혼합 TMB 기질 시약을 첨가하고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션한 다음, 0.1 M H₂SO₄를 첨가하여 정지시켰다. OD450 nm를 마이크로플레이트 리더에 의해 기록하였다. 도 5a - 도 5b에 나타낸 바와 같이, 두 샘플은 PD-L1/PD-1 또는 PD-L1/B7-1을 차단할 수 있는 반면, AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 7은 IC50이 더 낮았으며, 이는 변이체 7이 개선된 활성을 가진다는 것을 나타낸다.

[0615] **세포 기반 분석에 의한 PD-1/PD-L1 차단**

[0616] 이 분석에서, 293T-PD-L1-CD3L 세포는 PD-L1 및 항-CD3 scFv를 발현하고, Jurkat-NFAT-Luc-PD1 세포는 PD-1을 발현하며, CD3 자극으로 활성화될 수 있는 NFAT 신호를 운반한다. NFAT 활성화는 그의 기질에 의해 검출될 수 있는 다운스트림 루시퍼라제 유전자 전사 및 발현을 유도한다. 2개의 세포를 MabSpace Bioscience에 의해 생성하였다.

[0617] 간단히 말해서, 293T-PD-L1-CD3L 세포를 채취하고 2×10^6 세포/ml의 밀도로 재현탁시켰다. 웰당 20 µl 세포를 절반 웰 플레이트에 첨가하였다. AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 변이체 또는 원래의 4B6-hIgG1-TGFβRII를 연속 희석

(3배 희석)하여 2% FBS를 갖는 RPMI 배지에서 8개의 농도를 수득하였다. 웰당 20 μ l의 항체를 절반 웰 플레이트에 첨가하고, 플레이트를 37°C, 5% CO₂에서 30분 동안 인큐베이션하였다. Jurkat-NFAT-Luc-PD1 세포를 채취하고, 2% FBS를 갖는 RPMI 배지에서 4×10^6 세포/ml의 밀도로 재현탁시켰다. 마지막으로, 5 ng/ml TGF-베타(R&D, 240-B-010)와 함께 웰당 20 μ l 세포를 절반 웰 플레이트에 첨가하고 37°C, 5% CO₂에서 5시간 동안 인큐베이션하였다. 60 μ l OneGlo 검출 시약(Promega, E6120)을 각 웰에 첨가하고 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 발광 신호를 마이크로플레이트 리더에 의해 판독하였다. 데이터를 GraphPad Prism에 의해 분석하였다.

[0618] 도 6에 나타난 바와 같이, 이전 ELISA 결과와 일치하게도, 변이체 7은 다른 변이체와 비교하여 이 세포 기반 분석에서 가장 강력한 차단 활성을 가지고 있었다. 따라서, AM4B6-hIgG1-TGF β RII 변이체 7의 4B6 Fab 부분을 AM4B6으로 약칭하고, AM4B6-hIgG1-TGF β RII 융합 단백질을 다음 실험에서 추가로 평가하였다.

[0619] **실시예 8: 시험관내에서 AM4B6-hIgG1-TGF β RII'의 생성 및 특성화**

[0620] **AM4B6-hIgG1-TGF β RII 클로닝 및 발현**

[0621] 절단된 TGF β RII ECD₂₀₋₁₃₆은 가용성이고 TGF β 1에 결합하는 능력을 보유하는 것으로 보고되었다(Kim-Ming Lo, et al, US9676863 B2, 2017; Christian C., et al, Protein Expression and Purification, 2000, 20: 98-104)). 다음으로, TGF β RII₁₋₁₃₆의 세포외 도메인의 전장을 절단된 도메인으로 대체하고 개발가능성과 안정성을 평가하였다. 안정한 세포주로부터의 SDS-PAGE 결과는 단백질 발현이 절단된 TGF β RII ECD 및 전장 TGF β RII ECD 모두에 대해 양호하지만, 단백질 안정성이 전장 TGF β RII ECD보다 절단된 TGF β RII ECD₂₀₋₁₃₆에 대해 훨씬 더 우수하다는 것을 보여주었다(도 7). 절단된 TGF β RII ECD₂₀₋₁₃₆의 서열은 다음과 같다:

[0622] 안정한 TGF- β 트랩, TGF- β RII 세포외 도메인(20-136)의 서열

GAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCH
DPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSSECDNDNIIFSEYNTSNPD

(서열번호: 66)

[0623] 절단된 TGF- β RII(즉, TGF- β RII(20-136), 서열번호: 66)를 포함하는 이작용성 분자를 본 실시예 및 또한 실시예 9-11에서 사용하였다. 이러한 이작용성 분자의 이름을 TGF- β RII(1-136)와 구별하기 위해 TGF β RII'로 표시하였다. 예를 들어, AM4B6-hIgG1-TGF β RII'는 TGF- β RII(20-136)를 갖는 분자를 나타낸다.

[0625] **ELISA 분석에 의한 다양한 종으로부터의 PD-L1과의 결합**

[0626] 1 μ g/ml 인간 PD-L1(Acro Biosystems, PD1-H5229) 또는 시노 PD-L1 항원을 ELISA 플레이트에 코팅하고 4°C에서 밤새 두었다. 그 다음, 실온에서 1시간 동안 차단하기 위해, 300 μ l의 3%(w/v) 탈지유를 첨가하였다. 1시간 후, 100 nM 내지 0.02 nM(4배 연속 희석) 범위의 농도의 100 μ l의 AM4B6-hIgG1-TGF β RII' 또는 대조군 hIgG1-TGF β RII'를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 0.5% PBS+트윈-20을 3회 세척에 사용하였고, 100 μ l HRP 접합된 항-인간 Fc 항체(1:20000, Abcam, ab98624)를 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 혼합 TMB 기질 시약(InnoReagents, TMB-S-003)을 첨가하고 실온에서 5분 동안 인큐베이션하고, 0.1M H₂SO₄를 첨가하여 정지시켰다. OD450 nm를 마이크로플레이트 리더에 의해 기록하였다.

[0627] 도 8a 및 도 8b에 나타난 바와 같이, AM4B6-hIgG1-TGF β RII'는 인간 PD-L1과 유사한 EC50으로 시노 PD-L1과 교차 반응하였다.

[0628] **ELISA에 의한 다양한 종으로부터의 TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3와의 결합**

[0629] Uniport 웹사이트(<https://www.uniprot.org/>)에 공개된, 4개의 일반적인 종인 인간, 시노물구스, 마우스, 래트로부터의 TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3의 서열에 따르면, TGF β 구성원들은 상당히 보존적이다. 인간 TGF β 1 및 시노물구스 TGF β 1의 서열은 동일하고, 마우스 TGF β 1 및 래트 TGF β 1은 동일하며, 인간 TGF β 2 및 시노물구스 TGF β 2는 동일하고, 마우스 TGF β 2 및 래트 TGF β 2는 동일하며, 인간 TGF β 3, 시노물구스 TGF β 3 및 마우스 TGF β 3는 동일하다.

[0630] TGF β 1 및 TGF β 3의 경우, 절차는 다음과 같다. 0.5 μ g/ml 인간 TGF β 1(Sino Biological, 10804-HNAC) 또는 마우스 TGF β 1(Novoprotein, CK33) 또는 인간 TGF β 3(Genscript, Z03430) 또는 래트 TGF β 3(Novoprotein, CJ44) 항원을 ELISA 플레이트에 코팅하고, 4°C에서 밤새 두었다. 그 다음, 실온에서 1시간 동안 차단하기 위해, 300 μ l의 3%(w/v) 탈지유를 첨가하였다. 1시간 후, 100 nM 내지 0.006 nM(4배 연속 희석) 범위의 농도의 100

μl의 AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 또는 대조군 hIgG1-TGFβRII'를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 0.5% PBS+트윈-20을 3회 세척에 사용하였고, 100 μl HRP 접합된 항-인간 Fc 항체(1:20000, Abcam, ab98624)를 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 혼합 TMB 기질 시약(InnoReagents, TMB-S-003)을 첨가하고 실온에서 5분 동안 인큐베이션하고, 0.1 M H₂SO₄를 첨가하여 정지시켰다. OD450 nm를 마이크로플레이트 리더에 의해 기록하였다.

[0631] TGFβ2의 경우, 시험 절차가 상이하다: 2 μg/ml AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 또는 대조군 hIgG1-TGFβRII'를 ELISA 플레이트에 코팅하고 4℃에서 밤새 두었다. 그 다음, 실온에서 1시간 동안 차단하기 위해, 300 μl의 3%(w/v) 탈지유를 첨가하였다. 1시간 후, 39.4 nM 내지 0.3 nM(2배 연속 희석) 범위의 농도의 100 μl의 인간 TGFβ2 또는 마우스 TGFβ2를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 0.5% PBS+트윈-20을 3회 세척에 사용하였고, 100 μl TGFβ2 바이오티닐화된 항체(1:10000, R&D, BAF302)를 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 세척한 후, 100 μl HRP-스트렙타비딘(1:5000, Abcam, ab7403)을 첨가하고, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 혼합 TMB 기질 시약(InnoReagents, TMB-S-003)을 첨가하고 실온에서 5분 동안 인큐베이션하고, 0.1 M H₂SO₄를 첨가하여 정지시켰다. OD450 nm를 마이크로플레이트 리더에 의해 기록하였다.

[0632] 결과가 표 16에 요약되었다. TGFβ1에 대한 결합 친화도의 경우, EC₅₀ 값은 상이한 종 사이에서 매우 유사하였다. 또한, TGFβ1 및 TGFβ3에 대한 결합 친화도는 TGFβ2보다 유의하게 높았으며, 이는 TGFβ1 및 TGFβ3에 대한 차단 활성이 TGFβ2보다 더 강력할 수 있음을 나타낸다.

[0633] 표 16. TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3에 대한 AM4B6-hIgG1-TGFβRII'의 결합

ELISA 에 의한 다양한 종으로부터의 TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3 에의 결합 (EC ₅₀ , nM)					
TGFβ1		TGFβ2		TGFβ3	
인간	마우스	인간	마우스	인간	랫
0.748	0.800	8.459	8.884	5.257	3.733

[0634] ELISA 분석에 의한 B7 패밀리 또는 TGFβ 슈퍼패밀리 내의 다른 구성원과의 결합

[0636] B7 패밀리의 경우, 0.5 μg/ml hPD-L1(Acro Biosystems, PD1-H5229) 또는 hPD-L2 또는 B7-2 또는 B7-1 또는 B7-H2 또는 B7-H3 또는 B7-H4 또는 VISTA를 ELISA 플레이트에 코팅하고 4℃에서 밤새 두었다. TGFβ 슈퍼패밀리의 경우, 0.5 μg/ml 인간 액티빈 A, BMP-2, LAP 또는 TGFβ1을 4℃에서 밤새 코팅하였다. 그 다음, 실온에서 1시간 동안 차단하기 위해, 300 μl의 3%(w/v) 탈지유를 첨가하였다. 1시간 후, 100 nM 내지 0.006 nM(연속 희석됨) 범위의 농도의 100 μl의 AM4B6-hIgG1-TGFβRII'를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 0.5% PBS+트윈-20을 3회 세척에 사용하였고, 100 μl HRP 접합된 항-인간 Fc 항체(1:20000, Abcam, ab98624)를 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 혼합 TMB 기질 시약(InnoReagents, TMB-S-003)을 첨가하고 실온에서 5분 동안 인큐베이션하고, 0.1 M H₂SO₄를 첨가하여 정지시켰다. OD450 nm를 마이크로플레이트 리더에 의해 기록하였다.

[0637] 도 9a - 도 9b에 나타난 바와 같이, AM4B6-hIgG1-TGFβRII'는 B7 패밀리에 속하는 다른 항원보다 PD-L1에 특이적으로 결합하였다. 도 9c에 나타난 바와 같이, AM4B6-hIgG1-TGFβRII'는 TGFβ 슈퍼패밀리에 속하는 다른 항원보다 TGF-β1에 특이적으로 결합하였다.

[0638] AM4B6-hIgG1-TGFβRII'의 PD-L1 발현 세포와의 결합

[0639] CRISPR-Cas9 시스템을 통해 mPD-L1을 결실시킨 후 렌티바이러스를 사용하여 hPD-L1을 형질도입하여 MC38/hPD-L1을 생성하였다. 이 세포주는 중국 의학 아카데미 쑤저우 시스템 의학 연구소, 시스템 의학 센터의 Qin Xiaofeng 교수 실험실에 의해 제공되었다(Huang, Anfei, et al. Scientific Reports 7 (2017): 42687.). MC-38/hPD-L1 세포를 RPMI1640+10%FBS에서 배양하였다. EMT-6/hPD-L1은 형질감염된 인간 PD-L1 유전자를 안정적으로 발현하는 마우스 유방암 세포주이다. EMT-6/hPD-L1 세포를 웨이머스(Waymouth)의 (1 x) MB752/1 +15% FBS에서 배양하였다. NCI-H460 세포를 COBIOER사로부터 구입하였다. 그것은 PD-L1 발현을 가진 인간 폐 상피 종양 세포주이다. NCI-H460 세포를 RPMI1640+10%FBS에서 배양하였다. NCI-H292 세포를 COBIOER사로부터 구입하였다. 그것은 PD-L1 발현을 가진 인간 폐 상피 종양 세포주이다. NCI-H292 세포를 RPMI1640+10%FBS+1 nM 피루브산나트륨 용액에

서 배양하였다. FACS 분석의 프로토콜은 실시예 6 섹션 3과 동일하였다.

[0640] 인간 또는 시노물구스 PBMC(TPCS, Cat#PB025C)를 액체 질소로부터 회수하고 10% FBS를 갖는 RPMI1640에 재현탁시켰다. 5 μ g/ml PHA(Sigma, Cat# L8902)를 첨가하여 PBMC 활성화를 자극하고, 세포를 3일 동안 배양하였다. 활성화된 PBMC를 채취하고 원심분리하고 2×10^6 세포/ml의 밀도로 PBS에 재현탁하고 웰당 100 μ l로 플레이트에 첨가하였다. AM4B6-hIgG1-TGF β RII' 또는 AM4B6 또는 대조군 hIgG1-TGF β RII'를 연속 희석(5배 희석)하여 희석 완충액(2% BSA를 갖는 PBS)에서 10개의 농도를 수득하였다. 플레이트에서 원심분리 및 상층액의 제거 후, 희석된 항체를 활성화된 PBMC를 갖는 플레이트에 첨가하고 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 희석 완충액으로 2회 세척한 후, Alexa488 표지된 마우스 항인간 CD3(Biolegend, Cat#300320) 및 APC 표지된 항인간 IgG 2차 항체(BD, Cat#550931)를 첨가하고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 세포를 150 μ l PBS에 재현탁시키고, 유세포 분석에 의해 분석하였다.

[0641] 도 10a - 도 10f에 나타난 바와 같이, AM4B6-hIgG1-TGF β RII'는 AM4B6 mAb 단독과 유사한 친화도로 이들 암 세포주 및 활성화된 인간 또는 시노물구스 T 세포 상에서 발현된 PD-L1에 결합할 수 있었다.

[0642] 활성화된 인간 T 세포와의 결합

[0643] 인간 PBMC(TPCS, Cat#PB025C)를 액체 질소로부터 회수하고 10% FBS를 갖는 RPMI1640에 재현탁시켰다. 5 μ g/ml PHA(Sigma, Cat# L8902)를 첨가하여 PBMC 활성화를 자극하고 세포를 3일 동안 배양하였다. 활성화된 PBMC를 채취하고 원심분리하고 2×10^6 세포/ml의 밀도로 PBS에 재현탁시키고 웰당 100 μ l로 플레이트에 첨가하였다. AM4B6-hIgG1-TGF β RII' 또는 AM4B6 또는 대조군 hIgG1-TGF β RII'를 연속 희석(5배 희석)하여 희석 완충액(2% BSA를 갖는 PBS)에서 10개의 농도를 수득하였다. 플레이트에서 원심분리 및 상층액의 제거 후, 희석된 항체를 활성화된 PBMC를 갖는 플레이트에 첨가하고 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 희석 완충액으로 2회 세척한 후, Alexa488 표지된 마우스 항-인간 CD3(Biolegend, Cat#300320) 및 APC 표지된 항-인간 IgG 2차 항체(BD, Cat#550931)를 첨가하고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 세포를 150 μ l PBS에 재현탁시키고, 유세포 분석에 의해 분석하였다.

[0644] 도 11에 나타난 바와 같이, AM4B6-hIgG1-TGF β RII'는 활성화된 인간 T 세포 상에서 발현된 PD-L1에 결합할 수 있었다.

[0645] ELISA 분석에 의한 hPD-L1/hPD-1 및 시노PD-L1/시노PD-1의 차단

[0646] 0.5 μ g/ml hPD-L1-Fc 또는 0.5 μ g/ml 시노PD-L1-Fc를 ELISA 플레이트에 코팅하고 4°C에서 밤새 두었다. 실온에서 1시간 동안 차단하기 위해, 300 μ l의 3%(w/v) 탈지유를 첨가하였다. 1시간 후, 0.5 μ g/ml hPD-1-Fc-바이오틴 또는 시노 PD-1-Fc-바이오틴과 함께 100 nM 내지 0.02 nM(4배 연속 희석) 범위의 농도의 100 μ l의 AM4B6-hIgG1-TGF β RII' 또는 AM4B6를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 0.5% PBS+트윈-20을 3회 세척에 사용하고, 100 μ l HRP 접합된 스트렙타비딘(1:5000)을 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 혼합 TMB 기질 시약을 첨가하고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션한 다음, 0.1 M H₂SO₄를 첨가하여 정지시켰다. OD450 nm를 마이크로플레이트 리더에 의해 기록하였다.

[0647] 도 12a - 도 12b에 나타난 바와 같이, AM4B6-hIgG1-TGF β RII'는 또한 인간 PD-L1/인간 PD-1을 차단하는 것과 유사한 IC50으로 시노 PD-L1/시노 PD-1을 완전히 차단할 수 있었다.

[0648] hPD-L1 및 hTGF β 1에의 동시 결합

[0649] 0.5 μ g/ml hTGF β 1을 ELISA 플레이트에 코팅하고 4°C에서 밤새 두었다. 그 다음, 실온에서 1시간 동안 차단하기 위해, 300 μ l의 차단 완충액을 첨가하였다. 1시간 후, 100 nM 내지 0.02 nM(4배 연속 희석) 범위의 농도의 100 μ l의 AM4B6-hIgG1-TGF β RII' 또는 AM4B6 또는 대조군 hIgG1-TGF β RII'를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 0.5% PBS+트윈-20을 3회 세척에 사용한 다음, 0.5 μ g/ml hPD-L1-바이오틴을 각 웰에 첨가하였다. 1시간 후, 100 μ l HRP 접합된 스트렙타비딘(1:5000)을 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 혼합 TMB 기질 시약(InnoReagents, TMB-S-003)을 첨가하고 실온에서 5분 동안 인큐베이션하고, 0.1 M H₂SO₄를 첨가하여 정지시켰다. OD450 nm를 마이크로플레이트 리더에 의해 기록하였다.

[0650] 도 13에 나타난 바와 같이, 항-PD-L1 항체 AM4B6 및 TGF β RII'로 구성된 AM4B6-hIgG1-TGF β RII'는 2개의 표적에 동시에 결합할 수 있었으며, 이는 그의 이중특이적 또는 이작용성 특성을 나타낸다.

- [0651] **리포터 세포 분석에 의한 hPD-L1/hPD-1의 차단**
- [0652] 프로토콜은 실시예 15 섹션 2와 동일하였다. 도 14에 나타난 바와 같이, AM4B6-hIgG1-TGF β RII는 AM4B6 mAb 단독과 동일하게 PD-L1/PD-1의 억제 효과를 차단하고 이후에 신호전달 활성화를 역전시킬 수 있었다.
- [0653] **리포터 세포 분석에 의한 TGF β 1 신호전달의 차단**
- [0654] TGF β 리포터 HEK-293 세포주를 Genomeditech(Cat: GM-C05346)으로부터 구입하고, 5% 이산화탄소를 갖는 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 10% FBS, 4 μ g/ml 블라스티시딘, 400 μ g/ml 네오마이신, 125 μ g/ml 하이그로마이신, 0.75 μ g/ml 퓨로마이신, 및 1% Pen/Strep을 함유하는 DMEM 배지에서 배양하였다.
- [0655] 세포를 로그 성장 단계에서 수집하고 DMEM 배지에 재현탁시키고 웰당 2×10^4 세포/100 μ l의 밀도로 96-웰 플레이트에 심었다. 세포를 밤새 배양한 후, 배지를 10 ng/ml의 인간 TGF β 1을 함유하는 75 μ l의 배양 배지로 교체하였다. 75 μ l의 AM4B6-hIgG1-TGF β RII' 또는 AM4B6을 100 nM 내지 0.02 nM(3배 연속 희석) 범위의 최종 농도로 첨가하였다. 플레이트를 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. ONE-GloTM 루시퍼라제 분석 시스템을 150 μ l/웰로 첨가하고 실온에서 10분 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 마이크로플레이트 리더로 판독하였다.
- [0656] 도 15에 나타난 바와 같이, AM4B6-hIgG1-TGF β RII'는 0.35 nM의 IC50으로 TGF β 1 신호전달에 대해 강력한 차단 활성을 나타낸 반면, AM4B6 mAb 단독은 차단 활성이 없었으며, 이는 차단 활성이 TGF β 1 특이적임을 나타낸다.
- [0657] **투베르쿨린(TB)에 의해 자극된 PBMC의 IFN- γ 방출에 대한 AM4B6-hIgG1-TGF β RII'의 효과**
- [0658] 인간 PBMC를 액체 질소로부터 회수하고, 2×10^6 /mL의 밀도로 세포를 재현탁시켰다. TB를 1.33 μ g/mL의 최종 농도로 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 5일 동안 배양하였다. 6일째에, 유도된 PBMC를 수집 및 원심분리하고, PBS로 1회 세척하고, 새로운 배지에 재현탁하고, 1×10^6 /mL의 밀도로 조정하고, 96-웰 세포 플레이트 내로 180 μ L/웰로 시딩하였다. 희석된 항체를 96-웰 세포 배양 플레이트에 20 μ L/웰로 첨가하였다. 대조군 및 블랭크 군에 PBS 20 μ L를 첨가하였다. 세포 배양 플레이트를 5% CO₂ 인큐베이터에서 37 $^{\circ}$ C에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 말기에, 세포 상층액을 10배 희석하고, IFN γ 의 분비 수준을 IFN- γ ELISA 검출 키트(R&D, DY285B)로 검출하였다.
- [0659] 도 16에 나타난 바와 같이, AM4B6-hIgG1-TGF β RII'는 AM4B6 mAb 단독보다 유의하게 더 높은 수준의 IFN- γ 방출을 유도하였고, 이는 그의 활성화 활성이 그의 이중특이적 결합 및 차단 활성으로 인해 더 강력하다는 것을 나타낸다.
- [0660] **AM4B6-hIgG1-TGF β RII'의 ADCC/CDC 활성**
- [0661] ADCC 분석을 위해, 효과기 세포: Jurkat-NFAT Luc-Fc γ RIIIa-158V 세포주를 Mabspace Biosciences(Suzhou) Co., Limited에 의해 제작하였다. 표적 세포: HEK-293T-hPD-L1 세포를 Crown Biosciences Inc.(Cat: 2005)로부터 구입하였다.
- [0662] HEK-293T-hPD-L1 세포를 웰당 10,000개 세포/12.5 μ l로 세포 배양 플레이트에 첨가하였다. 그 다음, 200 nM 내지 0.003 nM 범위의 최종 농도의 AM4B6-hIgG1-TGF β RII' 희석액을 12.5 μ l/웰로 첨가하였다. 그 다음, 플레이트를 37 $^{\circ}$ C의 인큐베이터에 넣어 항체 및 세포를 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, Jurkat-NFAT Luc-Fc γ RIIIa-158V 세포를 웰당 60,000 세포/25 μ l로 웰에 첨가하였다. 그 다음, 플레이트를 37 $^{\circ}$ C의 인큐베이터에 6시간 동안 두었다. ONE-GloTM 루시퍼라제 분석 시스템을 50 μ l/웰로 첨가하고 실온에서 10분 동안 인큐베이션 후, 플레이트를 마이크로플레이트 리더로 판독하였다.
- [0663] CDC 분석의 경우, 표적 세포는 또한 HEK-293T-hPD-L1 세포이다. HEK-293T-hPD-L1 세포를 웰당 10,000개 세포/25로 세포 배양 플레이트에 첨가하였다. 그 다음, 200 nM 내지 0.3 nM 범위의 최종 농도의 AM4B6-hIgG1-TGF β RII' 희석액을 12.5 μ l/웰로 첨가하였다. 그 다음, 플레이트를 37 $^{\circ}$ C의 인큐베이터에 넣어 항체 및 세포를 30분 동안 인큐베이션하였다. HEK-293T-hPD-L1 세포에 50 μ l/웰(최종 농도는 20%임)의 40% 보체를 처리한 다음, 37 $^{\circ}$ C에서 80분 동안 인큐베이션하였다. ONE-GloTM 루시퍼라제 분석 시스템을 100 μ l/웰로 첨가하고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션 후, 플레이트를 마이크로플레이트 리더로 판독하였다.
- [0664] 결과는 AM4B6-hIgG1-TGF β RII'가 HEK-293T-hPD-L1 세포에서 ADCC 또는 CDC 활성을 갖지 않았음을 시사하였다(데이터는 나타내지 않음).

[0665] 실시예 9: 생체내에서 AM4B6-hIgG1-TGFβRII'의 효능

[0666] C57BL/6 마우스 상의 MC38-hPD-L1 종양 모델

[0667] 마우스 종양 세포주 MC38(ATCC) 내의 내인성 마우스 PD-L1을 최근 개발한 고효율 CRISPR/Cas9 시스템을 사용하여 녹아웃시켰다. 간단히 말해서, 마우스 PD-L1 유전자의 첫 번째 코딩 엑손을 표적화하는 sgRNA를 설계하고, 세포를 히트 앤 런(hit-and-run) CRISPR/Cas9+sgRNA 작제물에 의해 형질감염시키고 녹아웃 세포를 선택하였다. 내인성 마우스 PD-L1의 완전한 녹아웃을 갖는 세포를 정상 상태이거나 인터페론 감마에 의해 자극된 PD-L1의 세포 표면 발현에 대한 FACS 분석에 의해 확인한 후, 표적화된 게놈 영역의 TA 클로닝 및 시퀀싱에 의해 검증하였다. 인간 PD-L1 대체 세포주를 생성하기 위해, 인간 PD-L1 cDNA의 코딩 서열을 FG12 유래 렌티바이러스 벡터 내로 클로닝하였다. 그 다음, 마우스 PD-L1 녹아웃 세포를 인간 PD-L1 발현 렌티바이러스로 감염시키고, 확립된 세포주에서 인간 PD-L1의 높은 수준 및 안정한 발현을 FACS 분석에 의해 확인하였다. 이러한 MC38의 조작된 세포를 MC38-hPD-L1로 명명하였다.

[0668] MC38-hPD-L1 세포를 공기 중 5% CO₂를 갖는 분위기에서 37℃에서 10% 열 비활성화된 우태아 혈청이 보충된 RPMI1640 배지에서 단층 배양물로서 시험관 내에서 유지시켰다. 지수 성장 단계에서 성장하는 종양 세포를 채취하고 종양 접종을 위해 계수하였다. 각각의 암컷 SPF 등급 C57BL/6 마우스에 50% 마트리젤을 갖는 혼합된 2×10⁶ MC38-hPD-L1 세포를 접종하였다. 종양 크기가 약 90mm³일 때, 종양을 갖는 마우스를 선택하고 5개의 그룹(n=8)으로 무작위 배정하였다. 동물에 2.5 mg/kg 이소타입 대조군, 3 mg/kg 이소타입 대조군-TGFβRII', 2.5 mg/kg AM4B6, 0.3 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII', 1 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 및 3 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'를 처리하였다. 모든 항체를 i.p. 주사에 의해 4주 동안 매주 2회 투여하였다. 종양 크기를 캘리퍼스(INSIZE)를 사용하여 2차원으로 매주 2회 또는 3회 측정하였고, 부피를 다음 공식을 사용하여 mm³으로 표시하였다: V=0.5 a×b², 상기 식에서 a와 b는 각각 종양의 긴 직경 및 짧은 직경이다. 결과를 Prism GraphPad를 사용하여 분석하였고, 평균±S.E.M.으로 표시하였다. 두 그룹 간의 비교는 T-검정에 의해 이루어졌으며, p가 *<0.05 및 ***<0.01인 경우 차이는 유의한 것으로 간주된다.

[0669] 도 17a - 도 17b에 나타난 바와 같이, 3 mg/kg 이소타입 대조군-TGFβRII'는 종양 성장을 전혀 억제하지 않았으며, 이는 TGFβRII' 단독이 거의 효능이 없음을 나타낸다. 2.5 mg/kg AM4B6은 0.3 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'와 유사하게 부분적인 억제 효과만을 가지고 있었으며, 이는 종양 성장을 제어하는 데 충분하지 않은 것으로 보였다. 복용량이 증가함에 따라 종양 부피는 점점 작아졌다. 3 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII'는 84% TGI로 종양 성장을 거의 완전히 정지시켰다(표 17).

[0670] 표 17. 32일에 MC38-hPD-L1 종양 모델에서 항체의 종양 성장 억제(TGI)(평균±S.E.M., n=8)

처리	종양 크기 (±SEM, mm ³)	TGI (%)	p 값 대 이소타입 대조군
이소타입 대조군 2.5 mg/kg	3877.77±712.67		
이소타입 대조군-TGFβRII' 3 mg/kg	3489.60±880.53	10.01	0.6713
AM4B6 2.5 mg/kg	2105.51±443.56	45.70	0.0183
AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 0.3 mg/kg	2411.61±742.60	37.81	0.0931
AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 1 mg/kg	1646.12±517.06	57.55	0.0063
AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 3 mg/kg	601.31±197.10	84.49	0.00006

[0671]

[0672] NOD-SCID 마우스 상의 H460 종양 및 인간 PBMC 공동접종된 모델

[0673] H460 세포를 COBIOER사로부터 구입하였다. H460 세포를 공기 중 5% CO₂가 있는 분위기에서 37℃에서 10% 열 비활성화된 우태아 혈청이 보충된 RPMI1640 배지에서 단층 배양물로서 시험관 내에서 유지시켰다. 지수 성장 단계에서 성장하는 종양 세포를 채취하고 종양 접종을 위해 계수하였다. 각 암컷 SPF 등급 NOD-SCID 마우스에게 혼합된 3×10⁶ H460 세포(모델 그룹) 또는 1.5×10⁶ 인간 PBMC와 혼합된 3×10⁶ H460 세포를 접종하였다. 모든 세포 현탁액을 접종 전에 1:1 비율로 마트리젤과 잘 혼합하였다. 접종 약 4시간 후, 동물을 7개의 그룹(n=10)으로 나누고 상이하게 투여하였다. 동물에게 16.7 mg/kg 대조군 hIgG1, 또는 20 mg/kg 대조군 hIgG1-TGF

β RII', 또는 16.7 mg/kg AM4B6, 또는 5 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII', 또는 10 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII', 또는 20 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII'를 처리하였다. 모델 그룹에는 아무것도 처리하지 않았다. 모든 항체를 i.p. 주사에 의해 5주 동안 매주 2회 투여하였다. 종양 크기를 캘리퍼스(INSIZE)를 사용하여 2차원으로 매주 2회 또는 3회 측정하였고, 부피를 다음 공식을 사용하여 mm³으로 표시하였다: $V=0.5 a \times b^2$, 상기 식에서 a와 b는 각각 종양의 긴 직경과 짧은 직경이다. 결과를 GraphPad Prism을 사용하여 분석하였고, 평균 $\pm$ S.E.M.으로 표시하였다. 두 그룹 간의 비교는 T-검정에 의해 이루어졌으며 p가 * <0.05 및 ** <0.01 인 경우 차이는 유의한 것으로 간주된다.

[0674] 도 18a - 도 18b에 나타난 바와 같이, 20 mg/kg 이소타입 대조군-TGF β RII'는 종양 성장을 전혀 억제하지 않았다. 16.7 mg/kg AM4B6은 부분적인 억제 효과만 갖는 반면, 5 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII'는 이미 유의하게 더 나은 종양 억제를 가지고 있었으며, 이는 TGF β RII 융합이 AM4B6 mAb 단독의 항종양 효능을 증가시켰음을 나타낸다. 또한, 이 모델에서 AM4B6-hIgG1-TGF β RII'의 명백한 용량-반응이 관찰되었으며, 이는 효능이 AM4B6-hIgG1-TGF β RII'에 의존하고 있음을 다시 시사한다.

[0675] **C57BL/6 마우스 상의 EMT6-hPD-L1 종양 모델**

[0676] 마우스 종양 세포주 EMT6(ATCC) 내의 내인성 마우스 PD-L1을 녹아웃시키고, 인간 PD-L1을 세포에서 녹아웃시키고, EMT6의 조작된 세포를 EMT6-hPD-L1로 명명하였다.

[0677] 마우스에게 EMT6/hPD-L1 종양 세포를 피하 접종하고, 그룹당 10마리의 마우스로 종양 부피에 따라 이후에 7개의 그룹으로 무작위로 나누었다. 그룹핑 후, 그룹 1 내지 그룹 7의 동물에게 각각 24.9 mg/kg 대조군 hIgG1, 30 mg/kg 대조군 hIgG1-TGF β RII', 24.9 mg/kg AM4B6, 3 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII', 10 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII' 또는 30 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII'를 4주 동안 매주 2회 복강내 주사에 의해 투여하였다. 종양 보유 마우스의 종양 부피 및 체중을 매주 2회 관찰하였다. 도 19a - 도 19b에 나타난 바와 같이, AM4B6-hIgG1-TGF β RII'는 투여 후 29일에 각각 3, 10 및 30 mg/kg에서 21.43%, 46.83% 및 79.39%의 TGI로 종양 성장을 용량 의존적으로 억제하였다. 동일한 몰량에서, 30 mg/kg의 AM4B6-hIgG1-TGF β RII'의 항종양 활성은 24.9 mg/kg의 AM4B6보다 더 두드러졌으며, 상기 그룹에서, TGI는 29일에 29.67%였다.

[0678] **실시예 10: MC38-hPD-L1 종양 모델에서 종양 침윤성 림프구(TIL)에 대한 AM4B6-hIgG1-TGF β RII' 처리의 영향**

[0679] MC38-hPD-L1 종양 세포를 실시예 9의 동일한 과정에 따라 배양 및 접종하였다. 종양 크기가 250-300mm³일 때, 종양을 갖는 마우스를 선택하고 4개의 그룹(n=6)으로 무작위 배정하였다. 동물에게 PBS, 또는 3 mg/kg 이소타입 대조군-TGF β RII', 또는 2.5 mg/kg AM4B6, 또는 3 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGF β RII'를 처리하였다. 모든 항체를 i.v. 주사에 의해 1 또는 2주 동안 매주 2회 투여하였다. 종양을 각각 2차 투여 후 24시간 및 4차 투여 후 24시간에 채취한 후, 부드러운 MACS 해리제(Miltenyi Biotec, 130-093-235)로 해리하고 마우스 종양 해리 키트(Miltenyi Biotec, 130-096-730)로 37°C에서 40분 동안 소화시켰다. 각 그룹의 단리된 단일 종양 세포 현탁액을 표 18 및 표 19에 나타난, PE 항-마우스 CD45(BD bioscience, Cat#553081), APC 항-마우스 CD8a(Biolegend, Cat#100712), APC 항-마우스 NK1.1(Biolegend, Cat#108710), FITC 항-마우스 그랜자임 B(Biolegend, Cat#515403) 및 FITC 항-마우스 IFN 감마(Invitrogen, Cat#11-7311-82)에 의해 염색한 후 FACS를 사용하여 TIL 하위집단 백분율에 대해 분석하였다.

[0680] 표 18. 2차 투여 후 24시간에 MC38-hPD-L1 종양 모델에 대한 TIL 분석.

TIL의 하위 집단 (%) 그룹(n=3)	CD8+/CD45+	CD8+GZMB +/CD45+	NK1.1+/CD45+	NK1.1+GZM B+/CD45+	CD8+IFNg+ /CD45+	NK1.1+IFNg+ /CD45+
PBS	11.77%±0.95%	1.18%±0.00%	1.78%±0.57%	0.40%±0.07%	0.31%±0.03%	0.32%±0.03%
이소타입 대조군- TGFβRII' 3mpk	13.53%±3.64%	0.91%±0.36%	2.02%±0.48%	0.44%±0.14%	0.22%±0.02%	0.21%±0.02%
AM4B6 2.5mpk	13.80%±4.88%	1.26%±0.49%	2.70%±0.35%	0.63%±0.06%	0.30%±0.06%	0.27%±0.06%
AM4B6- hIgG1- TGFβRII' 3mpk	11.32%±2.97%	1.11%±0.31%	2.59%±0.39%	0.72%±0.21%	0.26%±0.06%	0.27%±0.05%

[0681]

[0682] 표 19. 4차 투여 후 24시간에 MC38-hPD-L1 종양 모델에 대한 TIL 분석.

TIL의 하위 집단 (%) 그룹(n=3)	CD8+/CD45+	CD8+GZMB +/CD45+	NK1.1+/CD45+	NK1.1+GZM B+/CD45+	CD8+IFNg+ /CD45+	NK1.1+IFNg+ /CD45+
PBS	9.36%±3.79%	0.72% ± 0.07%	1.54%±0.21%	0.31% ± 0.05%	0.30% ± 0.07%	0.31%±0.05%
이소타입 대조군- TGFβRII' 3mpk	10.53%±1.86%	0.66% ± 0.10%	1.90%±0.14%	0.27% ± 0.05%	0.21% ± 0.05%	0.20%±0.06%
AM4B6 2.5mpk	17.36%±3.16%	1.03% ± 0.24%	2.73%±0.46%	0.33% ± 0.02%	0.26% ± 0.04%	0.21%±0.03%
AM4B6- hIgG1- TGFβRII' 3mpk	17.77%±0.88%	1.37% ± 0.15%	4.19%±1.12%	0.62% ± 0.16%	0.24% ± 0.04%	0.30%±0.04%

[0683]

[0684] 2차 투여 후, 상이한 처리 그룹 사이에서 TIL의 하위집단의 백분율에는 유의한 변화가 없었다(표 18). 그러나 4차 투여 후, AM4B6 그룹 및 AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 그룹의 CD8+/CD45+는 이소타입 대조군-TGFβRII' 그룹과 비교하여 유의하게 증가하였다(표 19). CD8+GZMB+ 및 NK1.1+는 또한 이소타입 대조군-TGFβRII' 그룹과 비교하여 많이 증가하였다. 이러한 발견은 CD8+T 세포와 NK1.1 T 세포가 AM4B6 또는 AM4B6-hIgG1-TGFβRII'에 의해 자극되어 활성화하고 증식할 수 있으며, 또한 종양 미세환경에서 풍부해져 종양 세포 사멸을 촉진할 수 있음을 나타낸다. AM4B6과 비교했을 때, AM4B6-hIgG1-TGFβRII'는 훨씬 더 높은 CD8+GZMB+ 및 NK1.1+를 가지고 있었

으며, 이는 상기 TGI에 의해 측정된 바와 같이 그의 더 강력한 항종양 활성과 상관관계가 있었다.

[0685] **실시예 11: 생체내에서 AM4B6-hIgG1-TGFβRII'의 약동학 및 약력학 연구**

[0686] C57BL/6 암컷 마우스를 6개의 그룹(n=3)으로 무작위 배정하였다. 동물에게 3 mg/kg 이소타입 대조군-TGFβRII', 또는 2.5 mg/kg AM4B6, 또는 0.3 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII', 또는 1 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII', 또는 3 mg/kg AM4B6-hIgG1-TGFβRII', 또는 3 mg/kg M7824-유사체를 처리하였다. M7824-유사체를 US9676863에 개시된 서열에 따라 MabSpace Biosciences에 의해 생성하였다. 모든 항체를 i.v. 단일 주사에 의해 투여하였다. 주사 후, 각 마우스의 200 μl 혈액을 상이한 시점, 즉 투여 전, 주사 후 30분, 2시간, 8시간, 24시간, 48시간, D4, D7, D10, D14, D21에 수집하였다. 각 마우스의 80 μl의 혈장을 수집하고 항체 농도를 시험하였다.

[0687] 혈장 내 항체 농도를 측정하기 위해, 두 가지 방법을 사용하였다. 첫 번째 방법은 AM4B6 및 TGFβRII' 팔 모두를 포함하는 전체 이작용성 분자를 검출하는 것이다. 일반적으로, 1 μg/ml의 인간 PD-L1-his를 실온에서 2시간 동안 96-웰 ELISA 플레이트 상에 코팅하였다. 차단 후, 연속 희석된 표준 및 혈장 샘플을 첨가하고, 1.5시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 0.1 μg/ml 바이오티닐화된 항인간 TGFβRII'를 첨가한 다음, 세척 후, 스트렙타비딘-HRP를 첨가하였다. 마지막으로, TMB를 첨가하여 발색시키고, 이를 희석된 황산에 의해 정지시켰다. 플레이트를 마이크로플레이트 판독기에 의해 OD450 nm 및 OD620 nm로 판독하였다. 데이터를 OD450 nm-OD620 nm에 의해 분석하였다.

[0688] 두 번째 방법은 AM4B6 항체 팔만 검출하는 것이다. 상기 절차와 유사하게, 1 μg/ml의 인간 PD-L1-his를 코팅하고, 연속 희석된 표준 및 혈장 샘플을 첨가하고, 1.5시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 희석된 염소 HRP 접합된 항인간 IgG Fc 항체를 첨가하였다. 마지막으로, TMB를 첨가하여 발색시키고, 이를 희석된 황산에 의해 정지시켰다. 플레이트를 마이크로플레이트 판독기에 의해 OD450 nm 및 OD620 nm로 판독하였다. 데이터를 OD450 nm-OD620 nm에 의해 분석하였다.

[0689] 혈장에서의 항체 농도와 TGFβ의 변화 사이의 상관관계를 평가하기 위해, 혈장 내 TGFβ1 및 TGFβ2의 농도 변화를 시험하였다. 간략히 설명하면, 4 μg/ml의 마우스 TGF-β1 포획 항체 또는 2 μg/ml의 마우스 TGF-β2 포획 항체를 실온에서 2시간 동안 96-웰 ELISA 플레이트 상에 코팅하였다. 10 μl의 1 N HCl를 50 μl의 각 혈장 샘플에 첨가하고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 산성화된 샘플을 10 μl의 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES를 첨가하여 중화시켜 최종 pH가 7.2-7.6 이내가 되게 하였다. 차단 후, 연속 희석된 표준 및 혈장 샘플을 첨가하고, 1.5시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, TGF-β1 또는 TGF-β2 검출 항체를 첨가한 다음, 세척 후, 스트렙타비딘-HRP를 첨가하였다. 마지막으로, TMB를 첨가하여 발색시키고, 이를 희석된 황산에 의해 정지시켰다. 플레이트를 마이크로플레이트 판독기에 의해 OD450 nm 및 OD620 nm로 판독하였다. 데이터를 OD450 nm-OD620 nm에 의해 분석하였다.

[0690] 도 20a는 혈장 내의 항체 농도 변화를 나타내었다. 두 가지 방법을 사용한 PK 프로파일에는 유의한 차이가 없었으며, 이는 전체 이작용성 분자 AM4B6-hIgG1-TGFβRII'가 AM4B6 mAb와 마찬가지로 생체 내에서 비정상적인 절단 및 제거 없이 상당히 안정적이었음을 나타낸다. 그리고, 동시에 AM4B6-hIgG1-TGFβRII'는 도 20b에 나타낸 바와 같이 0.3 mg/kg의 최저 용량에서도 i.v. 주사 후 30분 이내에 TGF-β1을 고갈시켰다. M7824-유사체 및 이소타입 대조군-TGFβRII'는 또한 TGF-β1을 고갈시켰지만, M7824-유사체는 2일부터 그 효과를 유지할 수 없는 반면 AM4B6-hIgG1-TGFβRII'는 21일까지 낮은 수준의 TGF-β1을 유지할 수 있었다. 이 결과는 또한 이들의 PK 노출에 상응하였고(도 20c), 이는 TGF-β1이 혈장에서 AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 표적 결합에 대한 양호한 약력학적 마커로서 역할을 할 수 있음을 나타낸다. 마우스 혈장에서 TGF-β2의 명백한 고갈이 검출되지 않았다(데이터가 이제 나타남).

[0691] **실시예 12: AM4B6-hIgG1-IL-1RA 융합 단백질의 제작 및 발현**

[0692] 선택된 중쇄 및 경쇄 변이체를 교차 조합하고, hIgG1-IL-1RA(34-177)(UniProtKB, P18510) 융합 단백질로 발현시켰다. 중쇄 및 경쇄의 서열을 표 20에 나타내었다.

[0693] 표 20. AM4B6-hIgG1-IL-1RA 중쇄 및 경쇄 변이체의 목록

이름	돌연변이 부위	영역	서열
AM4B6_Hg.3_hIgG1-(G4S)4G-IL-1RA	G57E, S59L	H-CDR2-3	DINPNAETLYNHHKFKG
AM4B6_La.4_hKappa	A51V, N53D	L-CDR2-2	SRSVRYT

[0694]

- [0695] AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 이작용성 분자와 유사하게, 절단된 인간 IL-1RA₃₄₋₁₇₇를 AM4B6과 융합하여 더 나은 활성 및 안정성을 얻었다. AM4B6-hIgG1-IL-1RA는 AM4B6-hIgG1-IL-1RA(34-177)의 약어이다. 절단된 인간 IL-1RA₃₄₋₁₇₇의 서열은 다음과 같다: (서열번호: 67)
- KMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNVNLEEKIDVVPIEPHALFLGI
HGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSENRRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFES
AACPGWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDE
- [0696]
- [0697] 중쇄 및 경쇄의 공동형질감염을 제조사의 프로토콜에 따라 인비트로젠(Invitrogen)의 ExpiFectamine™ CHO 시약(Thermo, A29129)을 사용하여 수행하였다. 상층액을 10일에 수확하고, 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였다.
- [0698] **실시예 13: hPD-L1에 대한 AM4B6-hIgG1-IL-1RA 이작용성 분자의 친화도**
- [0699] **ELISA 분석에 기초한 인간 PD-L1에의 결합**
- [0700] 1 μg/ml hPD-L1(Acro Biosystems, PD1-H5229) 항원을 ELISA 플레이트에 코팅하고 4℃에서 밤새 코팅하였다. 그 다음, 실온에서 1시간 동안 차단하기 위해, 300 μl의 2%(w/v) BSA를 첨가하였다. 1시간 인큐베이션 후, 100 μl의 AM4B6-hIgG1-IL-1RA 이작용성 분자 또는 10 nM 내지 0.00017 nM(3배 연속 희석) 범위의 농도의 AM4B6-hIgG1 단일클론 항체를 음성 대조군으로서 PBST와 함께 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 0.5% 트윈-20을 갖는 PBS를 3회 세척에 사용하였으며, 100 μl HRP 접합된 항-인간 Fc 항체(1:20000, Abcam, ab98624)를 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 혼합 TMB 기질 시약(InnoReagents, TMB-S-003)을 첨가하고 실온에서 5분간 인큐베이션한 후, 0.1 M H₂SO₄를 첨가하여 정지시켰다. OD450 nm를 마이크로플레이트 리더에 의해 기록하였다. 데이터를 그래프패드 프리즘에 의해 분석하였다.
- [0701] 도 21에 나타난 바와 같이, AM4B6 단일클론 항체와 비교하여, AM4B6-hIgG1-IL-1RA 이작용성 분자는 유사한 결합 신호 및 친화도를 갖는다.
- [0702] **FACS 분석에 의한 AM4B6-hIgG1-IL-1RA의 세포 표면 상에서 발현되는 PD-L1에의 결합**
- [0703] 293T-PD-L1-CD3L 세포를 PD-L1 항체의 특성화를 위해 MabSpace Biosciences에 의해 생성하였다. 세포를 인간 PD-L1 및 항-CD3 scFv 모두로 형질감염시켰다. AM4B6-hIgG1-IL-1RA 이작용성 분자 또는 AM4B6 단일클론 항체를 3배 희석액으로 연속 희석하여 희석 완충액(2% BSA를 갖는 PBS)에서 11개의 농도를 얻었다. 293T-PD-L1-CD3L 세포를 채취하고 원심분리하였다. 그 다음, 이들을 2×10⁶ 세포/ml의 밀도로 PBS에 재현탁시키고 웰당 100 μl로 플레이트에 첨가하였다. 원심분리 및 상층액의 제거 후, 희석된 항체를 플레이트에 첨가하고 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 희석 완충액으로 2회 세척한 후, PE 접합된 당나귀 항인간 IgG(HL)(Jacksonimmuno, 709-116-149)를 플레이트에 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 세포를 200 μl PBS에 재현탁시키고, 유세포 분석에 의해 분석하였다. 데이터를 그래프패드 프리즘에 의해 분석하였다.
- [0704] 도 22에 나타난 바와 같이, AM4B6-hIgG1-IL-1RA 이작용성 분자 및 AM4B6-hIgG1은 유사한 EC50으로 세포 표면 상에서 발현된 PD-L1에 결합할 수 있었으며, 이는 ELISA에 의해 측정된 친화도 결과와 일치하였다.
- [0705] **실시예 14: AM4B6-hIgG1-IL-1RA의 PD1/PD-L1 차단 활성**
- [0706] 이 분석에서, 293T-PD-L1-CD3L 세포는 PD-L1 및 항-CD3 scFv를 발현하고 있었고, Jurkat-NFAT-Luc-PD1 세포는 PD-1을 발현하고 CD3 자극에 의해 활성화될 수 있는 NFAT 신호를 가지고 있었다. NFAT 활성화는 루시페라아제 유전자 전사 및 발현으로 이어질 것이며, 이는 그의 기질에 의해 검출될 수 있다. 두 세포 모두를 MabSpace Biosciences에 의해 생성하였다.
- [0707] 간단히 말해서, 293T-PD-L1-CD3L 세포를 채취하고 2×10⁶ 세포/ml의 밀도로 재현탁시켰다. 웰당 20 μl 세포를 절반 웰 플레이트에 첨가하였다. AM4B6-hIgG1-IL-1RA 이작용성 분자 및 AM4B6-hIgG1을 연속 희석(3배 희석)하여 2% FBS를 갖는 RPMI 배지에서 8개의 농도를 얻었다. 웰당 20 μl의 항체를 절반 웰 플레이트에 첨가하고, 플레이트를 37℃, 5% CO₂에서 30분 동안 인큐베이션하였다. Jurkat-NFAT-Luc-PD1 세포를 채취하고, 2% FBS를 갖는 RPMI 배지에서 4×10⁶ 세포/ml의 밀도로 재현탁시켰다. 마지막으로, 웰당 20 μl 세포를 절반 웰 플레이트에 첨가하고 37℃, 5% CO₂에서 5시간 동안 인큐베이션하였다. 60 μl OneGlo 검출 시약(Promega, E6120)을 각 웰에

첨가하고 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 발광 신호를 마이크로플레이트 리더에 의해 판독하였다. 데이터를 그래프패드 프리즘에 의해 분석하였다.

[0708] 도 23에 나타난 바와 같이, AM4B6-hIgG1-IL-1RA 이작용성 분자 및 AM4B6-hIgG1은 이러한 세포 기반 분석에서 PD-L1과 유사한 차단 활성을 가지고 있었다.

[0709] **실시예 15: 인간 IL-1 β 에 대한 AM4B6-hIgG1-IL-1RA의 차단 활성**

[0710] ELISA에 기초한 hIL-1 β 에 대한 AM4B6-hIgG1-IL-1RA BsAb의 차단 활성

[0711] 리간드/수용체 차단 활성을 시험하기 위해, 5 μ g/ml 인간 IL-1 β 단백질(Sino Biological, Cat#10139)을 ELISA 플레이트에 코팅하고 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 실온에서 1시간 동안 차단하기 위해, 300 μ l 차단 완충액을 첨가하였다. 1시간 후, 50 μ l 10 nM 인간 IL-1RI-his(Sino Biological, Cat#10126-H08H)와 함께 200 nM 내지 0.03 nM 범위의 연속 농도에서 50 μ l의 AM4B6-hIgG1-IL-1RA BsAb 또는 IL-1RA 단백질(Sino Biological, Cat#10123-HNAE)을 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 0.5% 트윈-20을 갖는 PBS를 3회 세척에 사용하였고, 100 μ l HRP 접합된 his-태그 항체(1:2000 희석, Genscript, Cat#A00612)를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 혼합 TMB 기질 시약(InnoReagents, Cat#: TMB-S-003)를 첨가하고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션한 다음, 0.1 M H₂SO₄를 첨가하여 정지시켰다. OD450 nm를 마이크로플레이트 리더에 의해 기록하였다. 데이터를 Graphpad prism에 의해 분석하였다.

[0712] 도 24에 나타난 바와 같이, AM4B6-hIgG1-IL-1RA는 IL-1 β 를 용량 의존적으로 차단할 수 있으며, IL-1RI에 대한 AM4B6-hIgG1-IL-1RA의 차단 활성은 IL-1RA 단백질보다 우수하였다.

[0713] **리포터 세포 상의 hIL-1 β 에 대한 AM4B6-hIgG1-IL-1RA 이작용성 분자의 차단 활성**

[0714] 이 분석에서, HEK-BlueTM CD40L 세포를 인비보젠(Invivogen)(Cat# hkb-cd40)으로부터 구입하였다. HEK293 세포를 인간 CD40 유전자 및 NF- κ B 유도성 SEAP 작제물로 안정적으로 형질감염시켜 이들 세포를 생성하였다. CD40L과 그의 수용체 CD40의 결합은 캐스케이드를 촉발하여 NF- κ B의 활성화와 QUANTI-Blue에 의해 모니터링될 수 있는 SEAP의 후속 생성을 유도한다. HEK293 세포는 CD40L과 공통 신호전달 경로를 공유하는 사이토카인 IL-1 β 에 대한 수용체를 내인성으로 발현한다. 따라서, IL-1b 매개된 SEAP 생산은 중화 항체를 사용하여 차단될 수 있다.

[0715] 간단히 말해서, 로그 단계 세포에 있는 HEK293-CD40L 세포를 수집하고, 세포를 5 $\times$ 10⁴/웰(100 μ l/웰)의 밀도로 96-웰 플레이트에 시딩하여 밤새 부착시킨다. AM4B6-hIgG1-IL-1RA 이중특이적 항체 및 IL-1RA 단백질을 연속 희석(5배 희석)하여 완전 배양 배지에서 10개의 농도를 얻었다. 50 μ l/웰 희석된 항체(또는 IL-1RA 단백질)와 50 μ l/웰 인간 IL-1 β 를 세포에 첨가하고, 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션한다. 다음날, 160 μ l의 QUANTI-BlueTM 용액(Invivogen, Cat#rep-qbs)을 새로운 플레이트에 첨가하고, 40 μ l의 세포 배양 상층액을 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 2시간 동안 배양한다. 620 nm에서 분광 광도계를 사용하여 SEAP 수준을 결정한다. 데이터를 Graphpad prism에 의해 분석하였다.

[0716] 도 25에 나타난 바와 같이, AM4B6-hIgG1-IL-1RA는 IL-1 β 를 용량 의존적 방식으로 차단할 수 있고, IL-1 β 에 대한 AM4B6-hIgG1-IL-1RA의 차단 활성은 IL-1RA 단백질보다 더 강했으며, 이는 ELISA에 의해 측정된 차단 결과와 일치하였다.

[0717] **실시예 16: AM4B6-SIRP α 이작용성 항체의 제작, 발현, 정제**

[0718] SIRP α _CV1은 조작된 고친화성 SIRP α 변이체이며, 이는 암세포 상에서 CD47을 강력하게 길항하였지만 자체적으로 대식세포 식균작용을 유도하지 않았다(Kipp Weiskopf et al. Science 341, 88 (2013)). 본 발명자들은 대칭 항체(AM4B6-hIgG1-SIRP α 및 3280A-hIgG1-SIRP α) 및 비대칭 항체(AM4B6-hIgG1-SIRP α (KIH) 및 3280A-hIgG1-SIRP α (KIH))를 포함하여, PD-L1 및 CD47 모두를 표적화하는 이작용성 항체를 발명하였고, 여기서 KIH는 노브 인투 홀의 약어이다. 이들 분자의 제작은 표 21에 기재되어 있으며, 시퀀싱된 SIRP α _CV1이 또한 하기에 열거되어 있다.

[0719] SIRP α _CV1 서열(서열번호: 84):

EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQ
GPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSPDDVEFKSGA
GTELSVRAKPS

[0720]

[0721] 표 21 항-PD-L1-SIRP α 이작용성 항체의 제작

ID	경쇄 서열	중쇄 서열 1	중쇄 서열 2	참고
AM4B6-hIgG1-SIRP α	AM4B6-La.4-hKappa 서열번호: 90	AM4B6_Hg.3_hIgG1_L234F_L235E_P331S - (G4S)4G - SIRP α _CV1 서열번호: 91	NA	SIRP α _CV1 서열은 Kipp Weiskopf et al. Science 341, 88 (2013) 유래이다
3280A-hIgG1-SIRP α	3280A-L-hKappa 서열번호: 92	3280A-H-hIgG1(N297A)-(G4S)4G-SIRP α _CV1 서열번호: 93	NA	3280A 는 Roche 의 항-PD-L1 항체인 아테졸리주맵에 대한 약어이다
AM4B6-hIgG1-SIRP α (KI H)	AM4B6-La.4-hKappa 서열번호: 90	AM4B6_Hg.3_hIgG1_L234F_L235E_P331S (노브) - SIRP α _CV1 서열번호: 94	AM4B6_Hg.3_hIgG1_L234F_L235E_P331S (홀) 서열번호: 95	노브: S354C, T366W 홀: Y349C, T366S, L368A, Y407V
3280A-hIgG1-SIRP α (KI H)	3280A-L-hKappa 3280A-L-hKappa 서열번호: 92	3280A_H_hIgG1_L234F_L235E_P331S (노브) - SIRP α _CV1 서열번호: 96	3280A_H_hIgG1_L234F_L235E_P331S (홀) 서열번호: 97	3280A 는 Roche 의 항-PD-L1 항체인 아테졸리주맵에 대한 약어이다

[0722]

[0723] 4개의 이작용성 항체 모두를 제조사 프로토콜에 따라 Expi-CHO 세포를 이용하여 발현시켰다. 2개의 대칭 이작용성 항체의 경우, 1단계 Mabselect SuRe 정제를 이용하여 고순도 항체를 얻었지만, 비대칭 이작용성 항체의 경우, 종래의 1단계 Mabselect SuRe 정제에 의해 고순도 항체를 얻을 수 없었다. 고순도 비대칭 항체를 얻기 위해, HiTrap PrismA 수지를 사용하여 항체를 연마 정제하였고, 비대칭 항체의 순도는 95%보다 더 우수하였다. 연마 정제 절차는 다음과 같이 설명된다.

[0724] 사용된 완충액:

[0725] 평형 완충액: 50 mM Tris-HAc, 150 mM NaCl, pH7.4.

[0726] 세척 완충액: 50 mM NaAc/HAc, 500 mM NaCl, 5% PEG, pH5.5.

[0727] 용출 완충액: 50 mM HAc, 500 mM NaCl, 5% PEG, pH 3.0.

[0728] UV 기저선, 용리액 pH 및 전도도가 변하지 않을 때까지, HiTrap PrismA 컬럼을 적어도 5 컬럼 부피(CV)에 대해 평형 완충액으로 평형화한다.

[0729] 사전 평형화된 HiTrap PrismA 컬럼 상에 샘플을 로딩한다.

- [0730] UV 트레이스(trace)가 기저선으로 돌아올 때까지, 5 내지 10 CV 세척 완충액으로 세척한다.
- [0731] 10-20 CV에서 0-100% 용출 완충액으로 용리하고 여러 개의 튜브로 5-10개의 분획을 별도로 수집한다. pH를 1 M Tris-염기(pH 9.0)로 약 6.0-7.0으로 조절하였다
- [0732] 그 다음, 분획을 SEC-HPLC에 의해 특성화한다. 도 26은 3280A-hIgG1-SIRP α (KIH) 및 AM4B6-hIgG1-SIRP α (KIH)의 순도가 각각 95.33% 및 96.5%임을 보여준다.
- [0733] 인간 PD-L1 또는 인간 CD47에 대한 친화도를 ELISA로 시험하였다. 도 27 및 28은 이작용성 항체의 항원에 대한 친화도가 모 단일클론 항체(4B6 mAb 대조군) 또는 융합 단백질(SIRP α-Fc(FES))의 친화도와 대등하다는 것을 보여준다.
- [0734] **실시예 17: IgG-scFv-ACZ885-AM4B6 및 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 이중특이적 항체(bsAb)의 제작 및 발현**
- [0735] 단일 사슬 단편(scFv) AM4B6의 서열이 하기 표에 나타나 있다. 항-IL-1β 항체 게보키주맵(XOMA052) 및 카나키 누맵(ACZ885)을 노바티스(Novartis)로부터 구입하였다. AM4B6의 scFv를 항-IL-1β 항체 중쇄 C-말단에 연결하여 더 나은 활성과 안정성을 얻었다. scFv는 VH를 VL에 연결한 GS 링커(GGGSGGGSGGGSGGS)를 가지며, 잔기 H44C와 L100C(카바트 넘버링) 사이에 도메인간 이황화 결합을 함유한다. 항-IL-1β 항체(XOMA052 및 ACZ885)의 서열이 표 22에 나타나 있다. 제작된 이중특이적 항체를 각각 IgG-scFv-ACZ885-AM4B6 및 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6으로 명명하였다.
- [0736] bsAb의 중쇄 및 경쇄의 공동형질감염을 제조사의 프로토콜에 따라 인비트로젠의 ExpiFectamine™ CHO 시약(Thermo, A29129)을 사용하여 수행하였다. 상층액을 10일에 수확하고, 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였다.
- [0737] **실시예 18: hIL-1β에 대한 IgG-scFv-ACZ885-AM4B6 및 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 bsAb의 결합 활성**
- [0738] **ELISA 분석에 기초한 인간 IL-1β 단백질에의 결합**
- [0739] 100 μL 1 μg/ml hIL-1β 단백질(SinoBiological, Cat# 10139 -HNAE)을 ELISA 플레이트에 코팅하고 4℃에서 밤새 코팅하였다. 그 다음, 실온에서 2시간 동안 차단하기 위해, 200 μl의 2%(w/v) BSA를 첨가하였다. 인큐베이션한 후, 20 nM 내지 0.000339 nM(3배 연속 희석) 범위의 농도의 100 μl의 IgG-scFv-ACZ885-AM4B6, IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 bsAb, ACZ885, 및 XOMA052를 음성 대조군으로서 PBST에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 0.5% 트윈-20을 갖는 PBS를 3회 세척에 사용하였고, 100 μl HRP 접합된 항인간 Fc 항체(1:20000, Abcam, ab98624)를 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 혼합 TMB 기질 시약(InnoReagents, TMB-S-003)을 첨가하고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션하고, 0.1M H₂SO₄를 첨가하여 정지시켰다. OD450 nm를 마이크로플레이트 리더에 의해 기록하였다. 데이터를 Graphpad prism에 의해 분석하였다.
- [0740] 도 29에 나타난 바와 같이, ACZ885 및 XOMA052 단일클론 항체와 비교하여, IgG-scFv-ACZ885-AM4B6 및 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 bsAb는 각각 hIL-1β 단백질과 유사한 결합 활성을 갖는다.
- [0741] **실시예 19: hPD-L1에 대한 IgG-scFv-ACZ885-AM4B6 및 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 bsAb의 결합 활성**
- [0742] **ELISA 분석에 기초한 인간 PD-L1에의 결합**
- [0743] 100 μL 1 μg/ml hPD-L1(Acro Biosystems, PD1-H5229) 항원을 ELISA 플레이트에 코팅하고, 4℃에서 밤새 코팅하였다. 그 다음, 실온에서 1시간 동안 차단하기 위해, 300 μl의 2%(w/v) BSA를 첨가하였다. 1시간 인큐베이션한 후, 20 nM 내지 0.000339 nM(3배 연속 희석) 범위의 농도의 100 μl의 IgG-scFv-ACZ885-AM4B6, IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 bsAb 또는 AM4B6-hIgG1 단일클론 항체(AM4B6 mAb)를 음성 대조군으로서 PBST에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 0.5% 트윈-20을 갖는 PBS를 3회 세척에 사용하였고, 100 μl HRP 접합된 항인간 Fc 항체(1:20000, Abcam, ab98624)를 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 혼합 TMB 기질 시약(InnoReagents, TMB-S-003)을 첨가하고 실온에서 5분 동안 인큐베이션하고, 0.1M H₂SO₄를 첨가하여 정지시켰다. OD450 nm를 마이크로플레이트 리더에 의해 기록하였다. 데이터를 Graphpad prism에 의해 분석하였다.
- [0744] 도 30에 나타난 바와 같이, AM4B6 단일클론 항체와 비교하여, IgG-scFv-ACZ885-AM4B6, IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 bsAb는 hPD-L1 단백질과 유사한 결합 활성을 갖는다.
- [0745] **FACS 방법에 의한 PD-L1 발현 293T 세포에 대한 IgG-scFv-ACZ885-AM4B6 및 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6의 결합**

- [0746] 293T-PD-L1-CD3L 세포를 PD-L1 항체의 특성화를 위해 MabSpace Biosciences에 의해 생성하였다. 세포를 인간 PD-L1 및 항-CD3 scFv 모두로 형질감염시켰다. IgG-scFv-ACZ885-AM4B6, IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 또는 AM4B6 mAb를 4배 희석액으로 연속 희석하여 희석 완충액(2% BSA를 갖는 PBS)에서 9개의 농도를 얻었다. 293T-PD-L1-CD3L 세포를 채취하고 원심분리하였다. 그 다음, 이들을 2×10^6 세포/ml의 밀도로 PBS에 재현탁시키고, 웰당 100 μ l로 플레이트에 첨가하였다. 원심분리 및 상층액의 제거 후, 희석된 항체를 플레이트에 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 희석 완충액으로 2회 세척한 후, PE 접합된 당나귀 항인간 IgG(H+L)(Jacksonimmuno, 709-116-149)를 플레이트에 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 세포를 200 μ l PBS에 재현탁시키고, 유세포 분석에 의해 분석하였다. 데이터를 Graphpad prism에 의해 분석하였다.
- [0747] 도 31에 나타낸 바와 같이, IgG-scFv-ACZ885-AM4B6 및 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6은 유사한 EC50으로 세포 표면 상에서 발현된 PD-L1에 결합할 수 있었고, 이는 ELISA에 의해 측정된 친화도 결과와 일치하였다.
- [0748] **실시예 20: IgG-scFv-ACZ885-AM4B6 및 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6의 PD1/PD-L1 차단 활성**
- [0749] 이 분석에서, 293T-PD-L1-CD3L 세포는 PD-L1 및 항-CD3 scFv를 발현하고 있었고, Jurkat-NFAT-Luc-PD1 세포는 PD-1을 발현하고 CD3 자극에 의해 활성화될 수 있는 NFAT 신호를 가지고 있었다. NFAT 활성화는 루시페라아제 유전자 전사 및 발현으로 이어질 것이며, 이는 그의 기질에 의해 검출될 수 있다. 두 세포주를 MabSpace Biosciences에 의해 생성하였다.
- [0750] 간단히 말해서, 293T-PD-L1-CD3L 세포를 채취하고 2×10^6 세포/ml의 밀도로 재현탁시켰다. 웰당 20 μ l 세포를 절반 웰 플레이트에 첨가하였다. IgG-scFv-ACZ885-AM4B6, IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 및 AM4B6-hIgG1을 연속 희석(3배 희석)하여 2% FBS를 갖는 RPMI 배지에서 9개의 농도를 얻었다. 웰당 20 μ l의 항체를 절반 웰 플레이트에 첨가하고, 플레이트를 37℃, 5% CO₂에서 30분 동안 인큐베이션하였다. Jurkat-NFAT-Luc-PD1 세포를 채취하고, 2% FBS를 갖는 RPMI 배지에서 4×10^6 세포/ml의 밀도로 재현탁시켰다. 마지막으로, 웰당 20 μ l 세포를 절반 웰 플레이트에 첨가하고, 37℃, 5% CO₂에서 5시간 동안 인큐베이션하였다. 60 μ l OneGlo 검출 시약(Promega, E6120)을 각 웰에 첨가하고 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 발광 신호를 마이크로플레이트 리더에 의해 판독하였다. 데이터를 Graphpad prism에 의해 분석하였다.
- [0751] 도 32에 나타낸 바와 같이, IgG-scFv-ACZ885-AM4B6, IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 및 AM4B6-hIgG1은 이 세포 기반 분석에서 PD-L1과 유사한 차단 활성을 가지고 있었다.
- [0752] **실시예 21: 인간 진피 섬유아세포(HDF) 세포 상의 인간 IL-1 β 에 대한 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6의 차단 활성**
- [0753] HDF 세포 상의 인간 IL-1 β 에 대한 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6의 차단 활성
- [0754] 리간드/수용체 차단 활성을 시험하기 위해, 100 μ l/웰을 갖는 4×10^4 /mL HDF 세포를 50 pg/mL의 재조합 인간 IL-1 β (Sino Biological, Cat#10139)로 자극하고, IL-1 β 자극이 없는 세포를 음성 대조군으로 사용하였다. 그 다음, 100 nM 내지 0.00038 nM(4배 연속 희석) 범위의 연속 농도에서 100 μ l/웰 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 및 XOMA052를 배양물에 첨가하고, 실온에서 밤새(16-17시간) 인큐베이션하였다. 자극 후, 세포 배양 상층액에서의 IL-6 방출을 키트 지침에 의해 가이드된 IL-6 ELISA 키트(R&D, DY206, P209026)를 사용하여 검출하였다.
- [0755] 도 33에 나타낸 바와 같이, IgG-scFv-XOMA052-AM4B6 및 XOMA052는 IL-1 β 를 용량 의존적으로 차단할 수 있고, IL-1 β 에 대한 IgG-scFv-XOMA052-AM4B6의 차단 활성은 HDF 세포 상의 XOMA052와 유사하였다.
- [0756] **리포터 세포 상의 hIL-1 β 에 대한 IgG-scFv-ACZ885-AM4B6의 차단 활성**
- [0757] 이 분석에서, HEK-Blue™ CD40L 세포를 인비보젠(Cat# hkb-cd40)으로부터 구입하였다. HEK293 세포를 인간 CD40 유전자 및 NF- κ B 유도성 SEAP 작제물로 안정적으로 형질감염시켜 이들 세포를 생성하였다. CD40과 그의 수용체 CD40의 결합은 캐스케이드를 촉발하여 NF- κ B의 활성화와 QUANTI-Blue에 의해 모니터링될 수 있는 SEAP의 후속 생성을 유도한다. HEK293 세포는 CD40과 공통 신호전달 경로를 공유하는 사이토카인 IL-1 β 에 대한 수용체를 내인성으로 발현한다. 따라서, IL-1 β 매개된 SEAP 생산은 중화 항체를 사용하여 차단될 수 있다.
- [0758] 간단히 말해서, 로그 단계 세포에 있는 HEK293-CD40L 세포를 수집하고, 세포를 5×10^4 /웰(100 μ l/웰) 밀도로 96-웰 플레이트 내로 시딩하여 밤새 부착시킨다. IgG-scFv-ACZ885-AM4B6 및 ACZ885를 100 nM부터 연속 희석(4

배 희석)하여 완전 배양 배지에서 9개의 농도를 얻었다. 50 μ l/웰 희석된 항체와 50 μ l/웰 인간 IL-1 β (1 ng/mL)를 세포에 첨가하고, 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션한다. 다음날, 160 μ l의 QUANTI-Blue™ 용액 (Invivogen, Cat#rep-qbs)을 새로운 플레이트에 첨가하고, 40 μ l의 세포 배양 상층액을 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션한다. 620 nm에서 분광 광도계를 사용하여 SEAP 수준을 결정한다. 데이터를 Graphpad prism에 의해 분석하였다.

[0759] 도 34에 나타난 바와 같이, IgG-scFv-ACZ885-AM4B6 및 ACZ885(카나키누맵)는 IL-1 β 를 용량 의존적으로 차단할 수 있으며, IgG-scFv-ACZ885-AM4B6의 차단 활성은 HEK293-CD40L 리포터 세포 상의 ACZ885(카나키누맵)와 유사하였다.

[0760] 표 22. 본 개시내용에서 언급된 아미노산 서열

서열 번호	서열	영역
1	DYYMN	4B6_HCDR1
2	DINPNNGGTSYNHKFKG	4B6_HCDR2
3	WGDGPFAY	4B6_HCDR3
4	KASQNVGAAVA	4B6_LCDR1
5	SASNRYT	4B6_LCDR2
6	QQYSNYPT	4B6_LCDR3
7	KASQNVGAIVA	4B6-L-CDR1-1
8	KASQNVPAAVA	4B6-L-CDR1-2
9	KASQNVKGAVA	4B6-L-CDR1-3
10	SNSHRYT	4B6-L-CDR2-1
11	SRSVRYT	4B6-L-CDR2-2
12	SVSDRYT	4B6-L-CDR2-3
13	DINPNNADTMYNHKFKG	4B6-H-CDR2-1
14	DINPNNAQTYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-2
15	DINPNNAETLYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-3
16	DINPNNGLTSYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-4
17	DINPNNAQTVYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-5
18	DINPNNAGTSYNHNKFKG	H-CDR2-WT (G55A)
19	DINPNNX ₁ X ₂ TX ₃ YNHNKFKG	HCDR2
20	KASQNVX ₄ X ₅ X ₆ VA	LCDR1
21	SX ₇ SX ₈ RYT	LCDR2
22	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF T	HFR1
23	WVRQAPGQGLEWMG	HFR2
24	RVTMTSDTSISTAYMELSLRSDDTAVYY CAR	HFR3
25	WGQGTLVTVSS	HFR4
26	DIQMTQSPSSLASVGDRTITC	LFR1
27	WYQQKPGKAPKLLIY	LFR2
28	GVPSRFGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYC	LFR3
29	FGQGTKLEIK	LFR4
30	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF T	HFR1 변이체
31	WVRQAPGQSLEWMG	HFR2 변이체
32	RVTVTVDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYC AR	HFR3 변이체 1
33	RVTVTVDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYC	HFR3 변이체 2

[0761]

	VK	
34	RVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYY CAR	HFR3 변이체 3
35	RVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYY CVK	HFR3 변이체 4
36	WYQQKPGKSPKLLIY	LFR2 변이체
37	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDIATYY C	LFR3 변이체 1
38	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDIATYY C	LFR3 변이체 2
39	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDIATYY C	변이체 1-FR3 에 대한 F73L 돌연변이
40	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX ₉ FT	HFR1
41	WVRQAPGQX ₁₀ LEWMG	HFR2
42	RVTX ₁₆ TVDX ₁₁ SISTAYMELSRLRSDDTAVY YCX ₁₂ X ₁₃	HFR3
43	WYQQKPGKX ₁₄ PKLLIY	LFR2
44	GVPX ₁₅ RFSGSGSGTDFTX ₁₇ TISSLQPEDIAT YYC	LFR3
45	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDIATYY C	LC 변이체 2- FR3 에 대한 F73L, A43S, S60D
46	EVQLQQSGPELVKPGASVKISKASGYVFT DYYMNWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGT SYNHKFKGKATVTVDKSSRTAYMELLSLT SEDSAVYYCVKWGDGPFAYWGQGLVTV SA	4B6 VH
47	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNV GAAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYTG PDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFC QQYSNYPTFGSGTKLGIK	4B6 VL
48	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSG GTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAR	인간화 4B6, VH 생식계열
49	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TDYYMNWVRQAPGQGLEWMGDINPNN GTSYNHKFKGRVTVTVDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWGDGPFAYWGQGLVTV VSS	인간화 4B6, VH 변이체 1
50	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TDYYMNWVRQAPGQGLEWMGDINPNN GTSYNHKFKGRVTVTVDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGLVTV	인간화 4B6, VH 변이체 2

[0762]

	VSS	
51	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQGLEWMGDINPNNG GTSYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWGDGPFAYWGQGLVT VSS	인간화 4B6, VH 변이체 3
52	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNGG TSYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGLVT SS	인간화 4B6, VH 변이체 4
53	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISN YLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVP RFSGSGSGTDFTTISLQPEDATYYCQQY DNLP	인간화 4B6, VL 생식계열
54	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVG AAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDATYYCQQ YSNYPTFGQGKLEIK	인간화 4B6, VL 변이체 1
55	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVG AAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVP DRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDATYYCQQ YSNYPTFGQGKLEIK	인간화 4B6, VL 변이체 2
56	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNAG TSYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGLVT SS	Hu4B6_Hg
57	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNAG TSYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGLVT SS	AM4B6_Hg
58	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNAQ TQYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGLVT VSS	Hu4B6_Hg.2
59	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNAE TLYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGLVT TV	AM4B6_Hg.3

[0763]

	SS	
60	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNAQ TVYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGLVT VSS	AM4B6_Hg.5
61	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVG AAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQ YSNYPTFGQGKLEIK	Hu4B6_La
62	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVK GAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQ YSNYPTFGQGKLEIK	AM4B6_La.1
63	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVK AAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQ YSNYPTFGQGKLEIK	AM4B6_La.2
64	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVG AAVAWYQQKPGKAPKLLIYSVSDRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQ YSNYPTFGQGKLEIK	AM4B6_La.4
65	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVG AAVAWYQQKPGKAPKLLIYSRSVRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQ YSNYPTFGQGKLEIK	AM4B6_La.6
66	GAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNC SITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVC HDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGE TFFMCSCSSDECNDNIIFSEYNTSNPD	절단된 TGF-베타 수용체 II 서열 20- 136
67	KMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ GPNVNLEEKIDVVPPIEPHALFLGIHGGKMC LSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSNRKQDK RFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAME ADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDE	절단된 IL-1 R-34- 177
68	(G4S)4G	링커

[0764]

69	LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTD KVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVCPASSKTGS VTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPV ELAAVIAGPVCFVCISLMLMVYICHNRTVI HHRVPNEEDPSLDRPFISEGTTLKDLIYDMT TSGSGSGLPLLQRTIARTIVLQESIGKGRF GEVWRGKWRGEEVAVKIFSSREERSWFRE AEIYQTVMLRHENILGFIAADNKDNGTWT QLWLVS DYHEHGS LFDYLNRYTVTVEGMI KLALSTASGLAHLHMEIVGTQGKPAIAHRD LKSKNILVKKNGTCCIADLGLAVRHDSATD TIDIAPNHRVGT KRYMAPEVLDD SINMKHF ESFKRADIYAMGLVFWEIARRCSIGGIHED YQLPYYDLVPSDPSVEEMRKVVCEQKLRP NIPNRWQSCEALRVM AKIMREC WYANGA ARLTALRIKKTLSQLSQEGIKM	TGFβRI
70	TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLC KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQE VCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDF ILED AASP KCIMKEKKKPGETFFMCSCSSD ECNDNIIFSEEYNTSNPDLLL VIFQVTGISLL PPLGVAISVIII FYCYRVNRQQKLSSTWETG KTRKLMEFSEHCAIILED RSDISSTCANNI NHNT ELLPIELDTLVGKGRFAEVYKAKLK QNTSEQFETVAVKIFPYEEYASWKTEKDIF SDINLKHENILQFLTAEERKTEL GKQYWLIT AFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKL GSSL ARGIAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSN ILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLA NSGQVGTARYMAPEVLES RMNLENVESFK QTDVYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYE PPFGSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIP SFWLNHQGIQMV CETLTECWDHDPEARLT AQCVAERFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDG SLNTTK	TGFβRII 이소형 A

[0765]

71	TIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHP LRHINNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVR FSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAV WRKNDENITLETVC HDPKLPYHDFILEDAA SPK CIMKEKKKPGETFFMCS CSSDECNDNII FSEEYNTSNPDLLL VIFQVTGISLLPPLGVAI SVIIIFYCYRVNRQQKLSSTWETGKTRKLM EFSEHCAIILED RSDISSTCANNINHNTLL PIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFE TVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFSDINLKHE NILQFLTAEERKTEL GKQYWLITAFHAKGN LQEYLTRHVISWEDLRKL GSSLARGIAHLH SDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNILVKNDLT CCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSQQVGT RYMAPEVLES RMNLENVESFKQTDVYSMA LVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPFGSKVRE HPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSWLNHQGI QMV CETLTECWDHDP EARLTAQCVAERFS ELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK	TGFβRII 이소형 B
72	GPEPGALCELS PVSASHPVQALMESFTVLS GCASRGTTGLPQEVHVLNLR TAGQGPGQL QREVT LHLNPISSVHHHKS VVFLNSPHPL VWHLKTERLATGVSRFLVSEGSVVQFSSA NFSLTAE TEERNFPHGNEHLLNWARKEYG AVTSFTELKIARNIYIKVGEDQVFPPKCNIG KNFLSLNYLAEYLQPKAAEGCVMSSQPQN EEVHHIELITPNSNPYSAFQVDITIDIRPSQED LEVVKNLILILKCKKSVNWVIKSFVKGSL KIIAPNSIGFGKESERSMTMTKSIRDDIPSTQ GNLVKWALDNGYSPITSYTMAPVANRFHL RLENNAEEMGDEEVHTIPPELRILLDPGALP ALQNPPIRGGEGQNGGLPFPFPDISRRVWN EEGEDGLPRPKDPVPSIQLFPGLREPEEVQ GSVDIALSVKCDNEKMIVAVEKDSFQASG YSGMDVTLLDPTCKAKMNGTHFVLESPLN GCGTRPRWSALDGVVYYNSIVIQVPALGD SSGWPDGYEDLES GDNGFPGDMDEGDASL FTRPEIVVFNC SLQQVRNPSSFQE QPHGNIT FNMELYNTD LFLVPSQGVFSVPENGHVYV EVSVTKAEQELGFAIQT CFISPYSNPDRMSH YTIENICPKDES VKFYSPKRVHFPIQADM DKKRFSFVFKPVFNTSLLFLQCELT LCTKM EKHPQKL PKCVPPDEACTSLDASHWAMM QNKKTF TKPLAVIHHEAESKEKGPSMKEPN	TGFβRIII

[0766]

	PISPPIFHGLDTLTVMGIAFAAFVIGALLTG ALWYIYSHTGETAGRQQVPTSPPASENSSA AHSIGSTQSTPCSSSSTA	
73	LEADKCKEREKIIILVSSANEIDVRPCPLNP NEHKGTITWYKDDSKTPVSTEQASRIHQHK EKLWFVPAKVEDSGHYVCVVRNSSYCLRI KISAKFVENEPNLCYNAQAIFKQKLPVAGD GGLVCPYMEFFKNENNELPKLQWYKDCKP LLLDNIHFSGVKDRLIVMNVAEKHRGNYT CHASYTYLGKQYPITRVIEFITLEENKPTRP VIVSPANETMEVDLGSQIQLICNVTGQLSDI AYWKWNGSVIDEDDPVLGEDYYSVENPA NKRRSTLITVLNISEIESRFYKHPFTCFAKNT HGIDAAYIQLIYPVTNFKHMGICVTLTVII VCSVFIYKIFKIDIVLWYRDSCYDFLPIKAS DGKTYDAYILYPKTVGEGSTSDCDIFVKV LPEVLEKQCGYKLFYGRDDYVGEDIVEVI NENVKKSRRLLIILVRETSGFSWLGGSSSEEQI AMYNALVQDGIKVVLELEKIQDYEKMP SIKFIKQKHGAIRWSGDFTQGPQSAKTRFW KNVRYHMPVQRRSPSSKHQLLSPATKEKL QREAHVPLG	IL-1RI
74	SERCCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLF EHFLKFNYSTAHSAGLTLIYWTRQDRDL EEPINFRLPENRISKEKDVLFWRPTLLNDTG NYTCMLRNTTYCSKVAFFLEVQKDSFCN SPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVDGYFPSS VKPTITWYMGYKIQNFNNVIPEGMNL SFL IALISNNGNYTCVVTPENGRTFHLTRILT VKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHVVEKEPG EELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKP DDITIDVTINESISHSRTEDETRTQILSIKKVT SEDLKRSYVCHARSAKGEVAKAAKVKQK VPAPRYTVELACGFGATVLLVVILIVVYHV YWLEMVLFYRAHFGTDETILDGKEYDIYV SYARNAEEEEFVLLTLRGVLENEFGYKLCI FDRDSLPGGIVTDETL SFIQKSRRLLVVLSP NYVLQGTQALLELKAGLENMASRGNINVI LVQYKAVKETKVKELKRAKTVLTVIKWK GEKSKYPQGRFWKQLQVAMPVKKSPRRSS SDEQGLSYSSLKNV	IL-1RAP

[0767]

75	FTLQPAHTGAARSCRFRGRHYKREFRLE GEPVALRCPQVPYWLWASVSPRINTWHK NDSARTVPGEETRMWAQDGALWLLPAL QEDSGTYVCTTRNASYCDKMSIELRVFENT DAFLPFISYPQILTLSTSGVLVCPDLSEFTRD KTDVKIQWYKDSLLLDKDNEKFLSVRGTT HLLVHDVALEDAGYYRCVLTFHEGQQY NITRSIELRIKKKKEETIPVIISPLKTISASLGS RLTIPCKVFLGTGTPLTTMLWWTANDTHIE SAYPGGRVTEGPRQEYSENNENYIEVPLIFD PVTREDLHMDFKCVVHNTLSFQTLRTTVK EASSTFSWGIVLAPLSLAFLVLGGIWMHRR CKHRTGKADGLTVLWPHHQDFQSYPK	IL-1RII
76	RPSGRKSSKMQAfriwDvNqkTFYLRNNQ LVAGYLQGPVNLEEKIDVVPiEPHALFLGI HGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLS ENRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGW FLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYF QEDE	IL-1RA
77	LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTD KVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVCAPSSKTGS VTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPV EL	인간 TGFβRI 34-126 의 ECD
78	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCK FCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFIL EDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDEC NDNIIFSEEYNTSNPD	인간 TGFβRII 24-159 의 ECD

[0768]

79	GPEPGALCELSPPVSASHPVQALMESFTVLS GCASRGTTGLPQEVHVLNLRTAGQGPGQL QREVTLHLNPISSVHIHHKSVVFLNNSPHPL VWHLKTERLATGVSRLFLVSEGSVVQFSSA NFSLTAETEERNFPHGNEHLLNWARKEYG AVTSFTELKIARNIYIKVGEDQVFPPKCNIG KNFLSLNYLAEYLQPKAAEGCVMSSQPQN EEVHIIELITPNSNPYSAFQVDITIDIRPSQED LEVVKNLILILKCKKSVNWVIKSFQVKGSL KIIAPNSIGFGKESERSMTMTKSIRDDIPSTQ GNLVKWALDNGYSPITSYTMAPVANRFHL RLENNAEEMGDDEEVHTIPPELRILLDPGALP ALQNPPIRGGEGQNGGLPFPFDPISRRVWN EEGEDGLPRPKDPVPSIQLFPGLREPEEVQ GSVDIALSVKCDNEKMIVAVEKDSFQASG YSGMDVTLLDPTCKAKMNGTHFVLESPLN GCGTRPRWSALDGVVYYNSIVIQVPALGD SSGWPDPGYEDLESGDNGFPGDMDEGDASL FTRPEIVVFNCSLQQVRNPSSFQEQPHGNIT FNMELYNTDLFLVPSQGVFSVPENGHVYV EVSVTKAEQELGFAIQTCFISPYSNPDRMSH YTIENICPKDES VKFYSPKRVHFPIPADM DKKRFSFVFKPVFNTSLFLQCELTLCTKM EKHPQKLKCVPPDEACTSLDASIIWAMM QNKKTFTKPLAVIHHEAESKEKGPSMKEPN PISPPIFHGLDTLTV	인간 TGFβRIII 21- 787 의 ECD
80	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK	hIgG1 aa 서열:

[0769]

81	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGA	hIgG1_FES (L234F/L235E/P331 S)
82	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	hKappa aa 서열
83	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG A	hIgG1_FES (L234F/L235E/P331 S)
84	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFP VGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFPVTT VSDTTKRNNMDFSIIRIGNITPADAGTYCYIK FRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS	SIRPa_CV1
85	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVST AWAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR FSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYL YHPATFGGGTKVEIK	3280A 경쇄 가변 영역
86	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DSWIHWVRQAPGKLEWVAWISPYGGSTY YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVS S	3280A 중쇄 가변 영역
87	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN	hIgG1(N297A)

[0770]

	TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG A	
88	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG A	hIgG1_L234F_L235 E_P331S (노브)S354C/ T366W
89	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDE LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	hIgG1_L234F_L235 E_P331S(홀) T366S/ L368A/Y407V
90	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVG AAVAWYQQKPGKAPKLLIYSVSDRYTGVP RFGSGSGTDFLTITSLQPEDIATYYCQQYS NYPTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	AM4B6-L.a.4-hKappa
91	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQSLEWMDINPNAE TLYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGLVTVS	AM4B6_Hg.3 hIgG1 _L234F_L235E_P33 1S-(G4S)4G- SIRPa_CV1

[0771]

	SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTIVLHQLDNLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGEEELQII QPDKSVLVAAAGETATLRCTITSLFPVGPIQW FRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTK RNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSP DDVEFKSGAGTELSVRAKPS	
92	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVST AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYL YHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRG EC	3280A-L-hKappa
93	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTY YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTIVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTIVLHQLDNLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGEEELQII QPDKSVLVAAAGETATLRCTITSLFPVGPIQW FRGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTK RNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSP DDVEFKSGAGTELSVRAKPS	3280A-H- hIgG1(N297A)- (G4S)4G- SIRP α _CV1

[0772]

94	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNAE TLYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGEEELQII QPDKSVLVAAGETATLRCITISLFPVGPIQW FRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTK RNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSP DDVEFKSGAGTELSVRAKPS	AM4B6_Hg.3_hIgG1 _L234F_L235E_P33 1S(노브) - SIRPa_CV1
95	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNAE TLYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDE LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	AM4B6_Hg.3_hIgG1 _L234F_L235E_P33 1S(홀)
96	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DSWIHWVRQAPGKGLEWVAVISPYGGSTY YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE	3280A_H_hIgG1_L2 34F_L235E_P331S(노브) - SIRPa_CV1

[0773]

	DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGSGEEELQII QPKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPQW FRGAGPGRVLIYNQRQGPFPVTTVSDTTK RNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSP DDVEFKSGAGTELSVRKPS	
97	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DSWIHWVRQAPGKLEWVAWISPYGGSTY YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWNSGALTSGLVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDE LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	3280A_H_hIgG1_L2 34F_L235E_P331S(홀)
98	EEELQVIQPKSVLVAAGETATLRCTVTSLI PVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVT TVSDSTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCY VKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRKPS	SIRPa_WT 대립유전자 1
99	LQPGAEPVVWAQEGAPALPCSTIPLQD LSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLA PGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVGPGLRS GRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARR ADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQAS MT	LAG3 D1
100	LQPGAEPVVWAQEGAPALPCSTIPLQD LSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLA PGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVGPGLRS GRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARR ADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQAS MTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASV HWFRNRGQGRVPVRESPHHHLAESFLFPQ VSPMDSGPWGCLTYRDGFNVSIMYNLTVL	LAG3 D1+D2

[0774]

	GLEPPTPLTVYAGAGSRVGLPC	
101	GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRR	LAG3 엑스트라-루프
102	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCSFSGFSLST SGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDE SYNPSLKSRLTISKDTSKNQVSLKITSVTAA DTAVYFCARNRYDPPWFVDWGQGTLVTVS S	XOMA052 VH
103	DIQMTQSTSSLSASVGDRVTITCRASQDISN YLSWYQQKPGKAVKLLIYYTSKLHSGVPSR FSGSGSGTDYTLTISLQQEDFATYFCLQGK MLPWTFGQGTKLEIK	XOMA052 VL
104	TSGMGVG	XOMA052 HCDR1
105	HIWWDGDESYNPSLKS	XOMA052 HCDR2
106	NRYDPPWFVD	XOMA052 HCDR3
107	RASQDISNYLS	XOMA052 LCDR1
108	YTSKLHS	XOMA052 LCDR2
109	LQ GKMLPWT	XOMA052 LCDR3
110	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS VYGMNWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGDN QYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNGL RAEDTAVYYCARDLRTGPFDYWGQGT LV TVSS	ACZ885 VH
111	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSS LHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRF SGSGSGTDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSS SLPFTFGPGTKVDIK	ACZ885 VL
112	VYGMN	ACZ885 HCDR1

[0775]

113	IIWYDGDNQYYADSVKG	ACZ885 HCDR2
114	DLRTGPFDY	ACZ885 HCDR3
115	RASQSIGSSLH	ACZ885 LCDR1
116	YASQSFS	ACZ885 LCDR2
117	HQSSSLPFT	ACZ885 LCDR3
118	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSFSGFSLST SGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDE SYNPSLKSRLTISKDTSKNQVSLKITSVTAA DTAVYFCARNRYDPPWFVDWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGSSFLYSLKTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNAETLYNHK FKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAV YYCVKWGDGPFAYWGQGLTVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSAS VGDRVITITCKASQNVGAATAWYQKPKGA PKLLIYVSDRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDVATYYCQYYSNYPTFGQGTKLT V L	IgG-scFv- XOMA052-AM4B6 HC
119	DIQMTQSTSSLSASVGDRVITITCRASQDISN YLSWYQKPKGKAVKLLIYYTSKLHSGVPSR FSGSGSGTDYTLTISSLQEDFATYFCLQGK MLPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN	IgG-scFv- XOMA052-AM4B6 LC

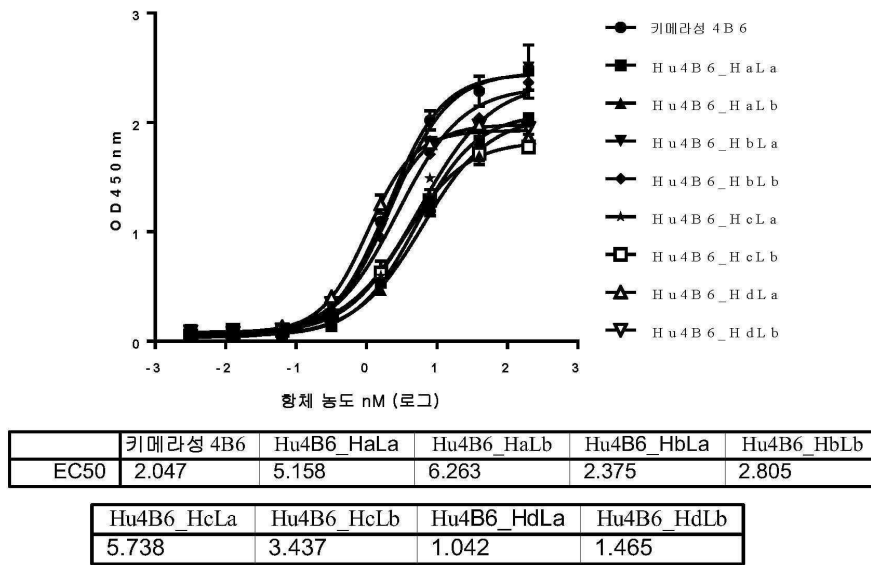
[0776]

	ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC	
120	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS VYGMNWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGDNQ YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNGLR AEDTAVYYCARDLRTGPFDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQ SGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYIM NWVRQAPGQCLEWMGDINPNAETLYNH KFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTA VYYCVKWGDGPFAYWGQGLTVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVITITCKASQNVGA AVAWYQQKPGK APKLLIYSVSDRYTGVP SRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDATYYCQQYSNYPTFGCGTKLT VL	IgG-scFv-ACZ885- AM4B6 HC
121	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSS LHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRF SGSGSGTDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSSS LPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	IgG-scFv-ACZ885- AM4B6 LC
122	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	G4S

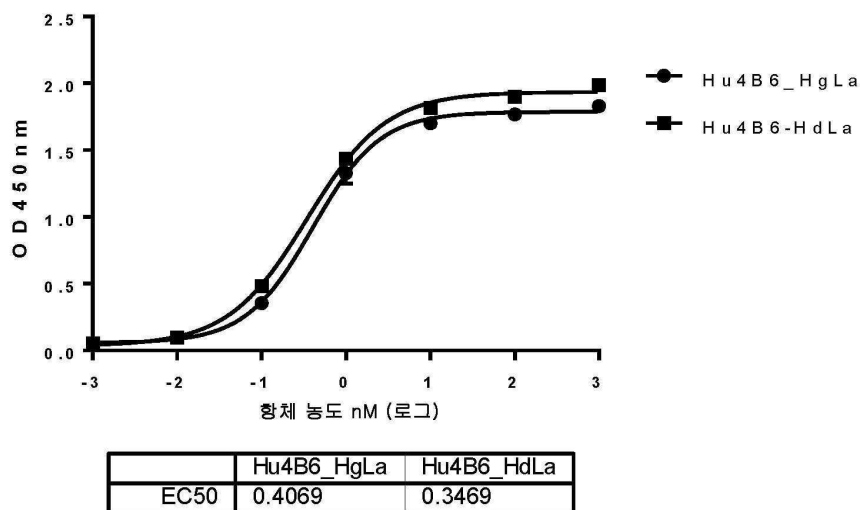
[0777]

도면

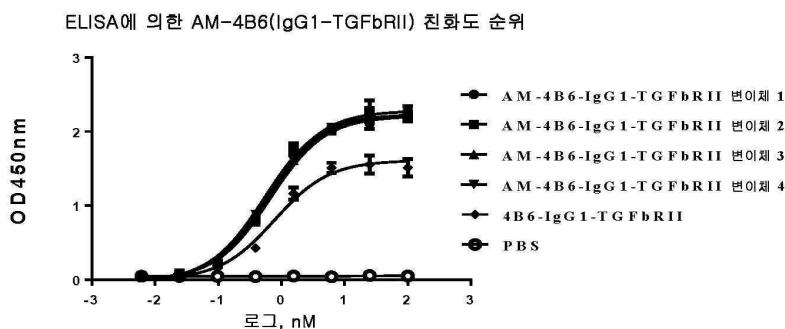
도면1



도면2

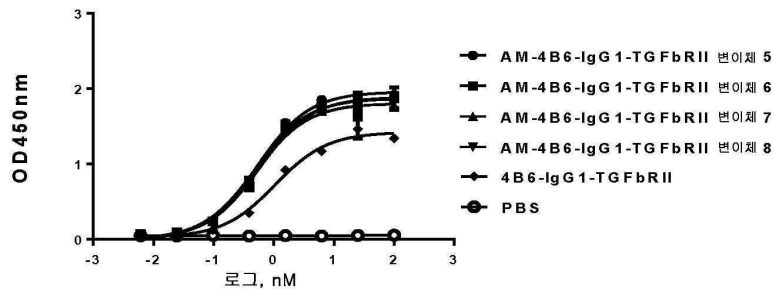


도면3a



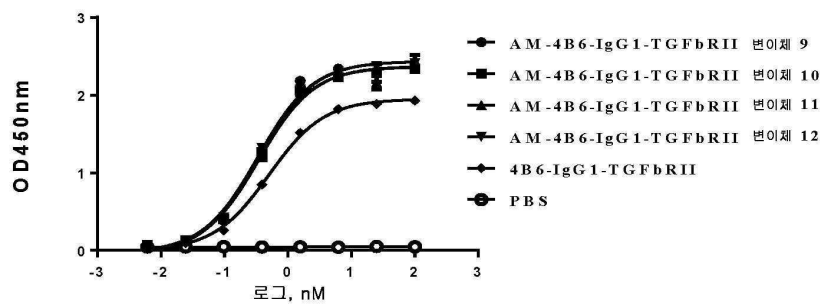
도면3b

ELISA에 의한 AM-4B6(IgG1-TGFbRII) 친화도 순위



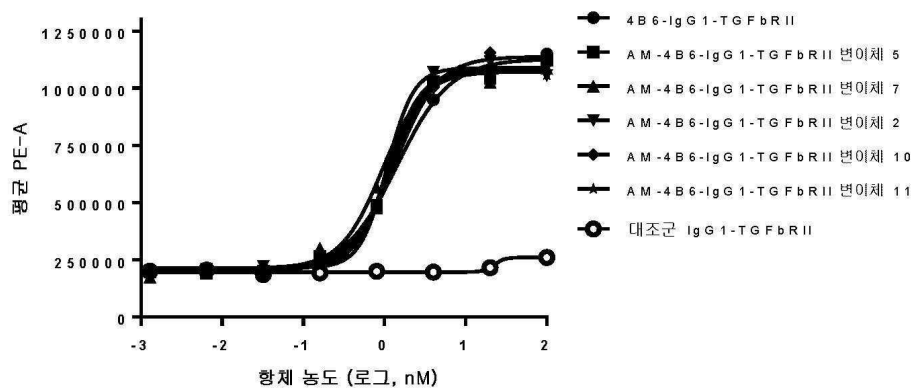
도면3c

ELISA에 의한 AM-4B6(IgG1-TGFbRII) 친화도 순위



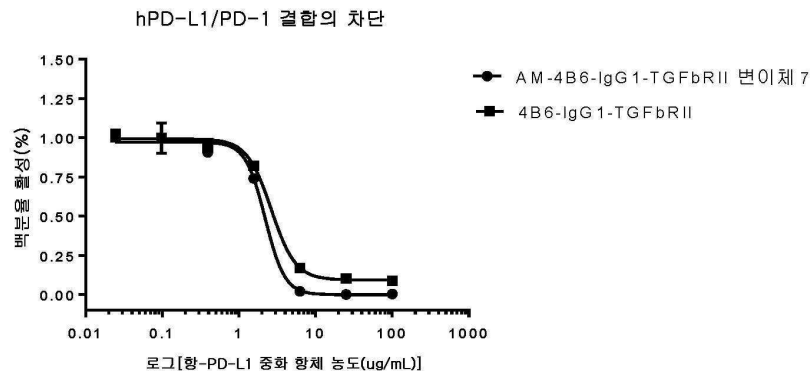
도면4

FACS 분석에 의한 AM-4B6-IgG1-TGFbRII 변이체의 친화도 순위

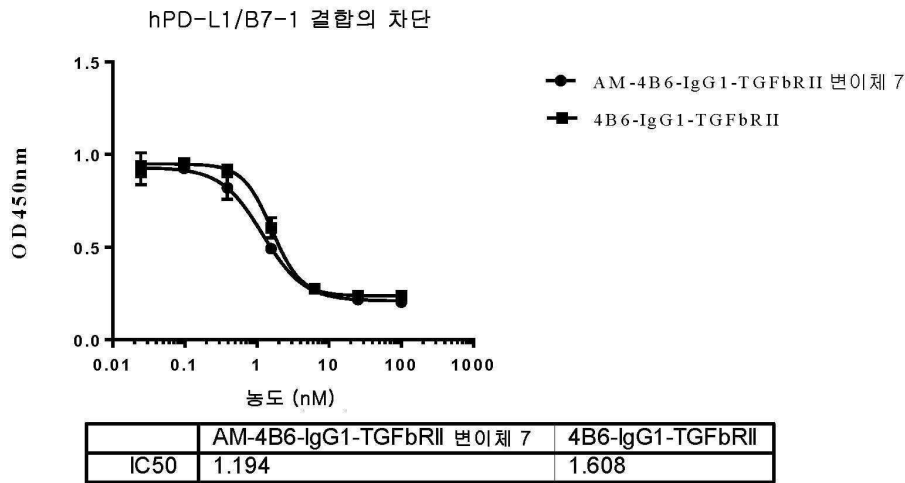


	4B6-IgG1-TGFbRII	AM-4B6-IgG1-TGFbRII 변이체 5	AM-4B6-IgG1-TGFbRII 변이체 7
EC50	1.436	1.196	0.9404
	AM-4B6-IgG1-TGFbRII 변이체 2	AM-4B6-IgG1-TGFbRII 변이체 10	AM-4B6-IgG1-TGFbRII 변이체 11
	1.074	1.363	1.11

도면5a

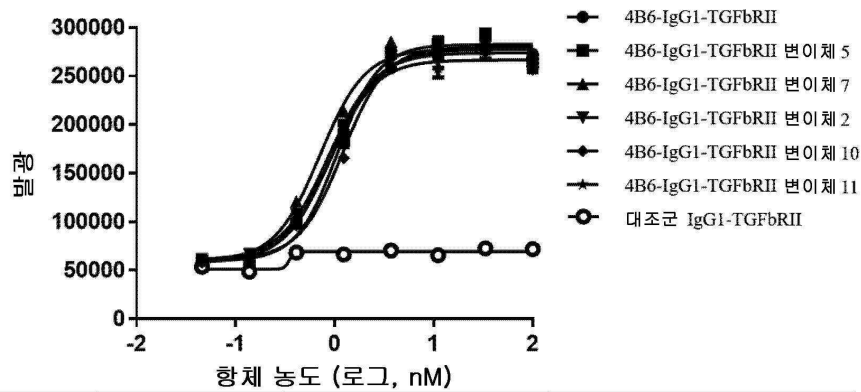


도면5b



도면6

AM-4B6-IgG1-TGFbRII 변이체에 의한 PD-L1/PD-1의 차단

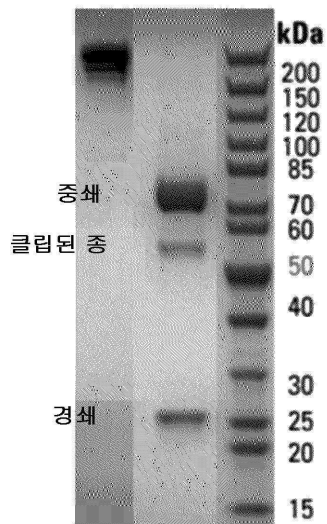


	4B6-IgG1-TGFbRII	4B6-IgG1-TGFbRII 변이체5	4B6-IgG1-TGFbRII 변이체7
EC50	0.9333	1.073	0.7112

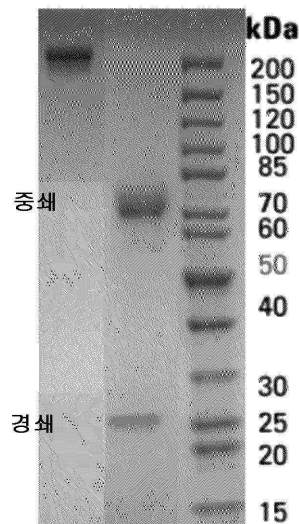
4B6-IgG1-TGFbRII 변이체2	4B6-IgG1-TGFbRII 변이체10	4B6-IgG1-TGFbRII 변이체11
0.8679	1.203	0.8934

도면7

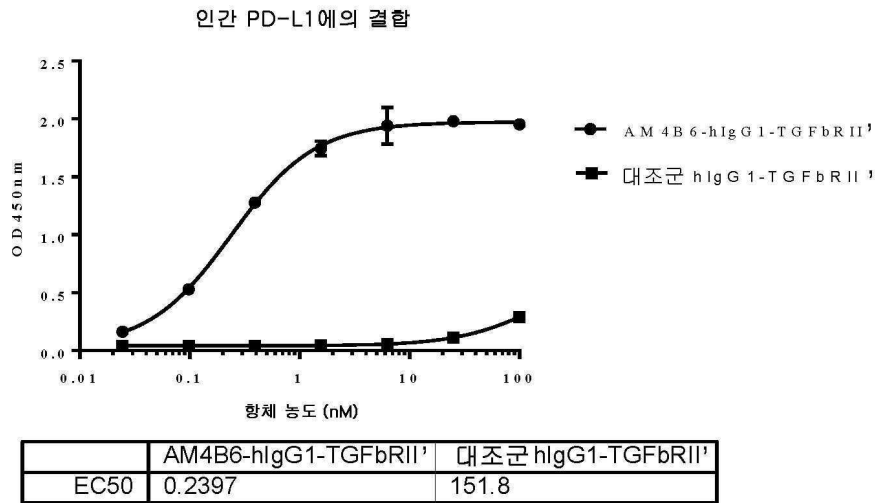
안정한 세포주로 발현된 Hu4B6_
HgLa_hIgG1_TGFbRII (1-136)



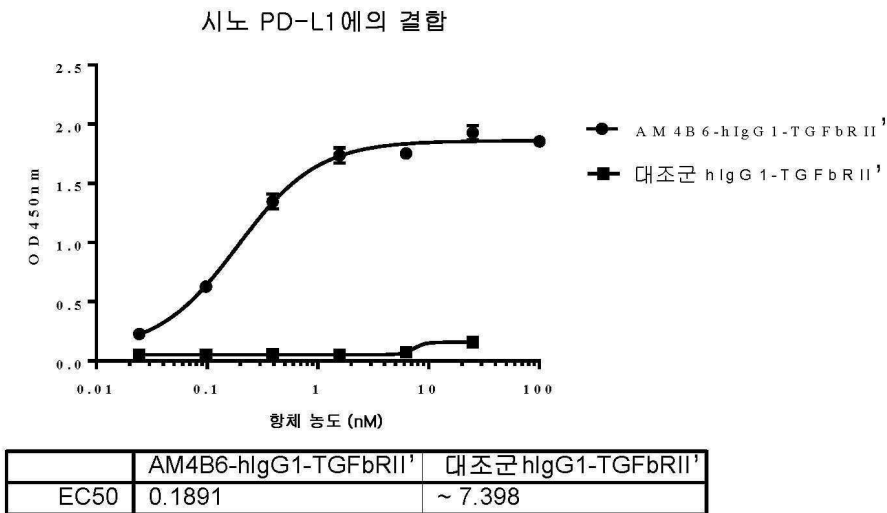
안정한 세포주로 발현된
AM4B6_hIgG1_TGFbRII (20-136)



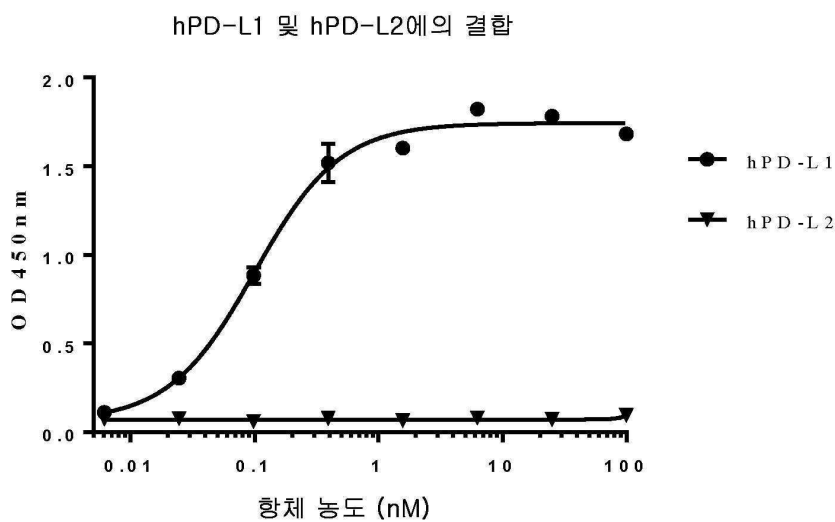
도면8a



도면8b

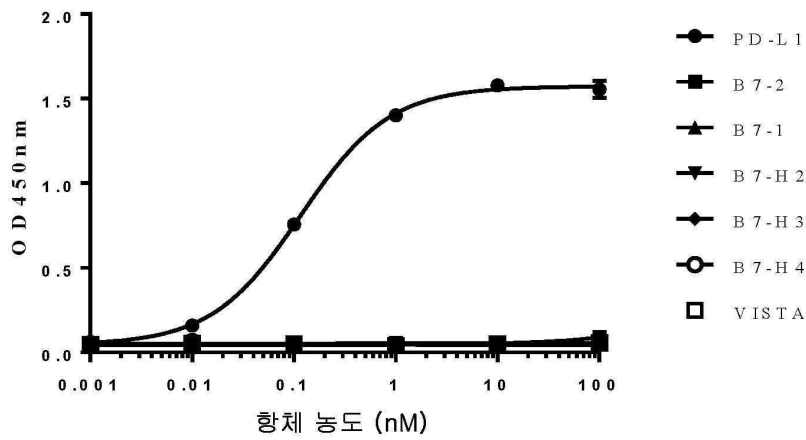


도면9a



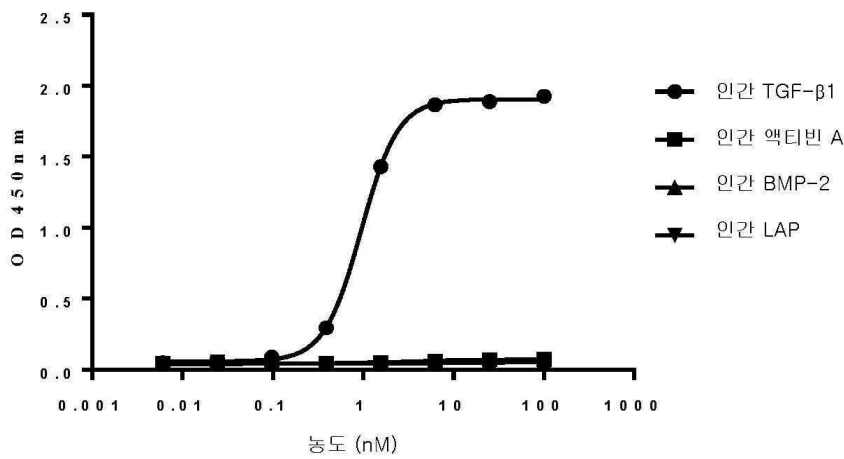
도면9b

hPD-L1 및 B7 패밀리 기타 구성원과의 결합



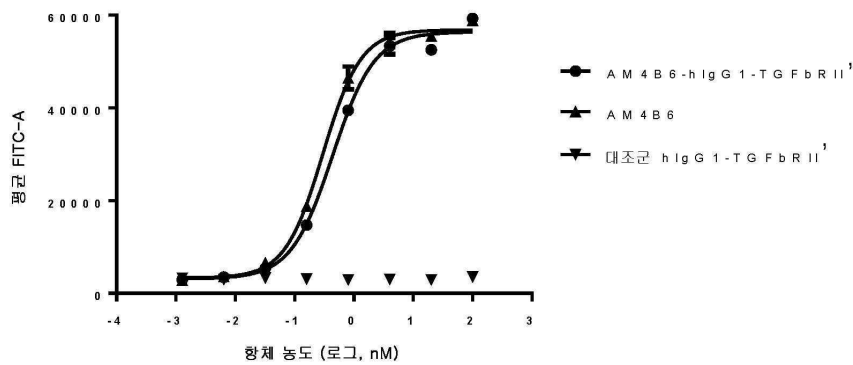
도면9c

TGFβ 수퍼패밀리의 기타 구성원과의 결합



도면10a

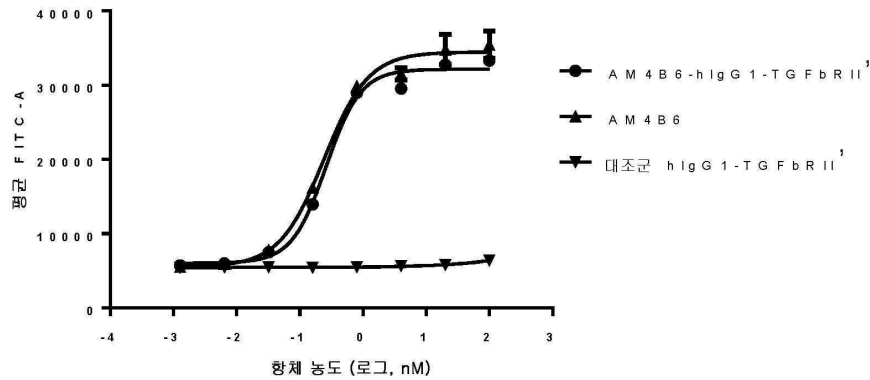
MC38/hPD-L1 세포와의 결합



	AM4B6-hIgG1-TGFβRII*	AM4B6
EC50	0.4373	0.299

도면10b

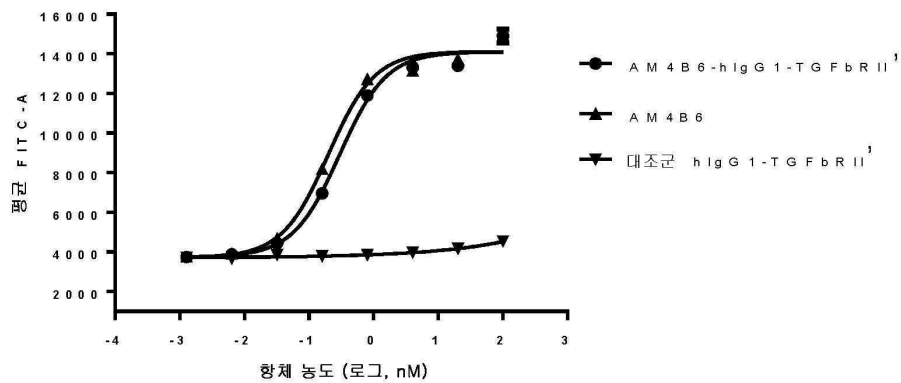
EMT6/hPD-L1 세포에의 결합



	AM4B6-hIgG1-TGFbRII ¹	AM4B6
EC50	0.2614	0.2403

도면10c

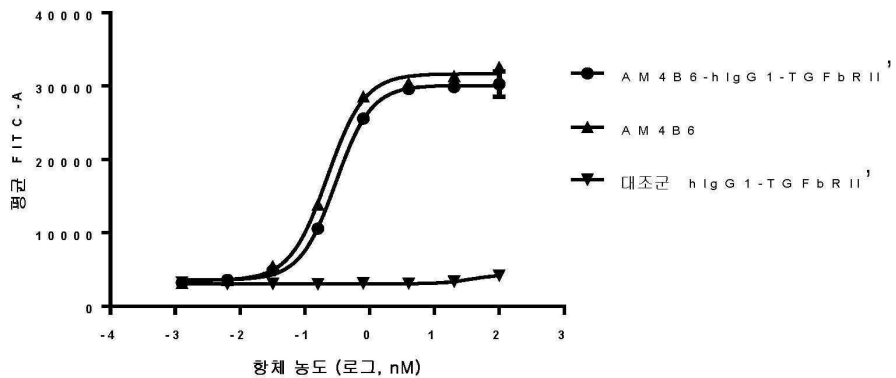
NCI-H292 세포에의 결합



	AM4B6-hIgG1-TGFbRII ¹	AM4B6
EC50	0.2982	0.199

도면10d

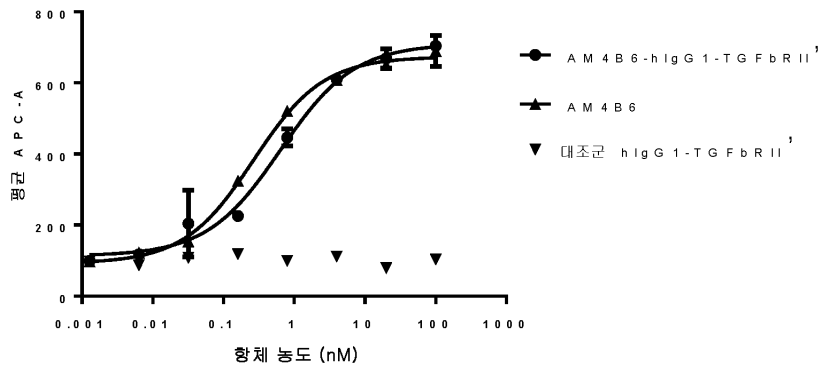
NCI-H460 세포에의 결합



	AM4B6-hIgG1-TGFbRII ¹	AM4B6
EC50	0.2997	0.2224

도면10e

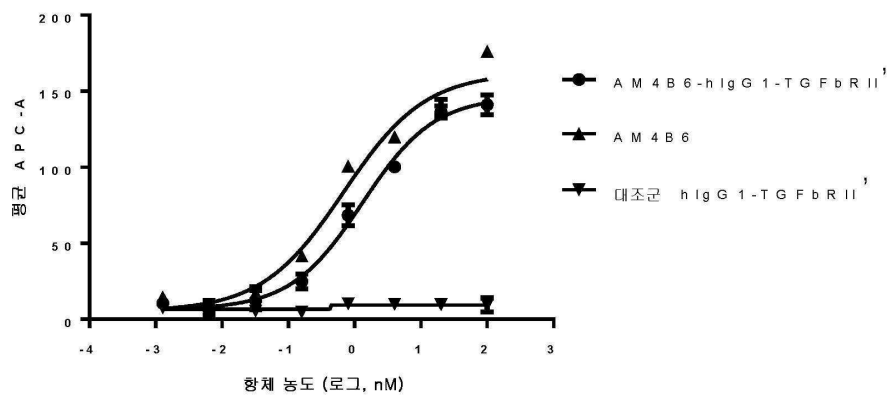
활성화된 인간 PBMC에의 결합



	AM4B6-hlgG1-TGFbRII ¹	AM4B6
EC50	0.6437	0.267

도면10f

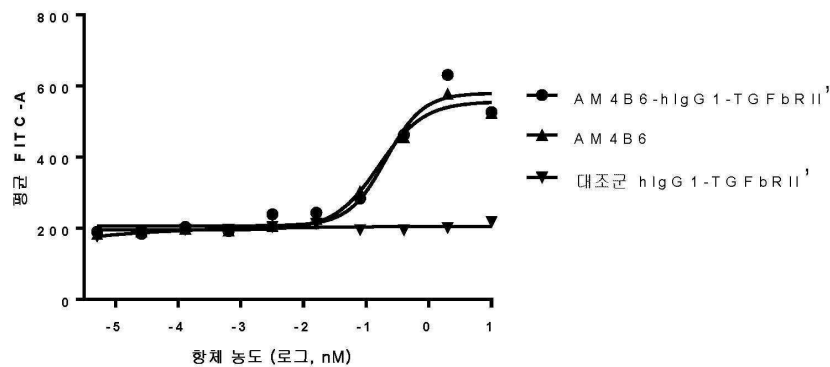
활성화된 시노몰구스 PBMC에의 결합



	AM4B6-hlgG1-TGFbRII ¹	AM4B6
EC50	1.306	0.684

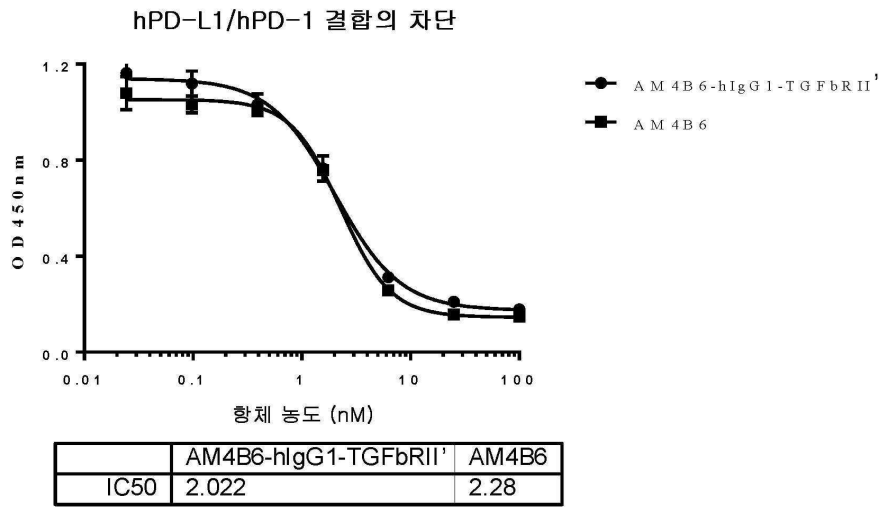
도면11

활성화된 인간 T 세포 상에서 발현된 hPD-L1에의 결합

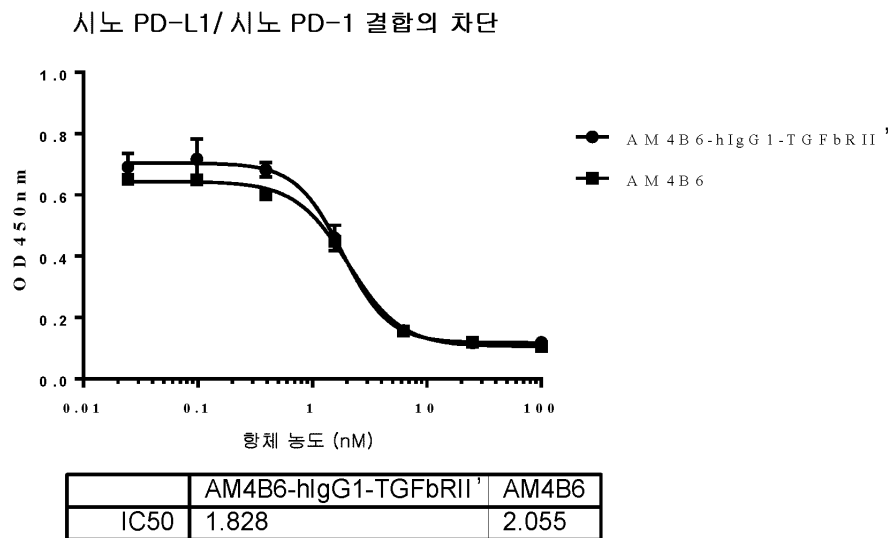


	AM4B6-hlgG1-TGFbRII ¹	AM4B6	대조군 hlgG1-TGFbRII ¹
EC50	0.2064	0.1604	~ 7.407e-013

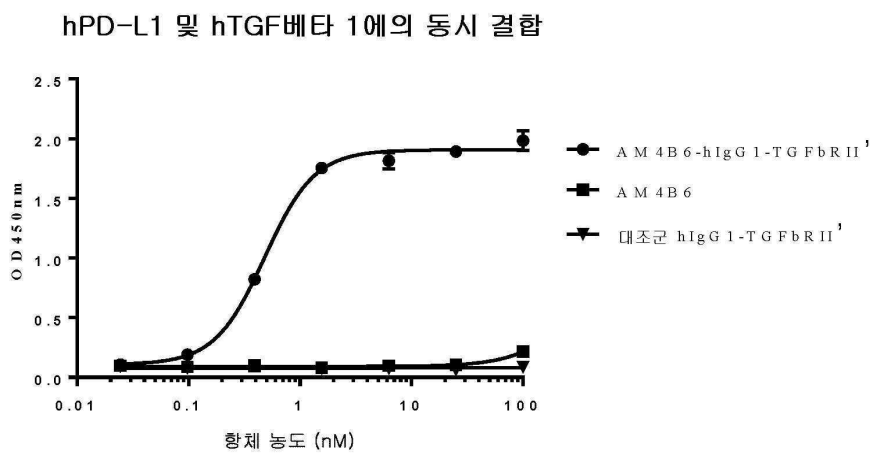
도면12a



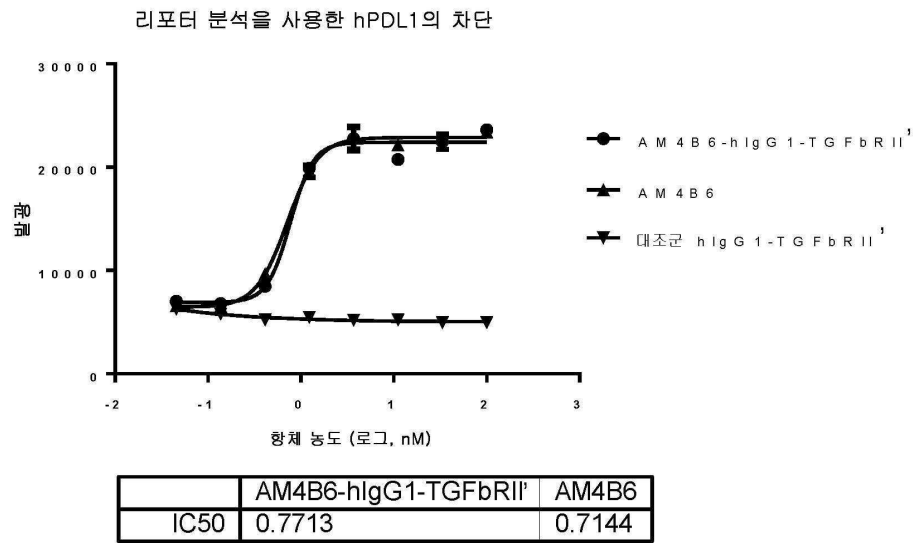
도면12b



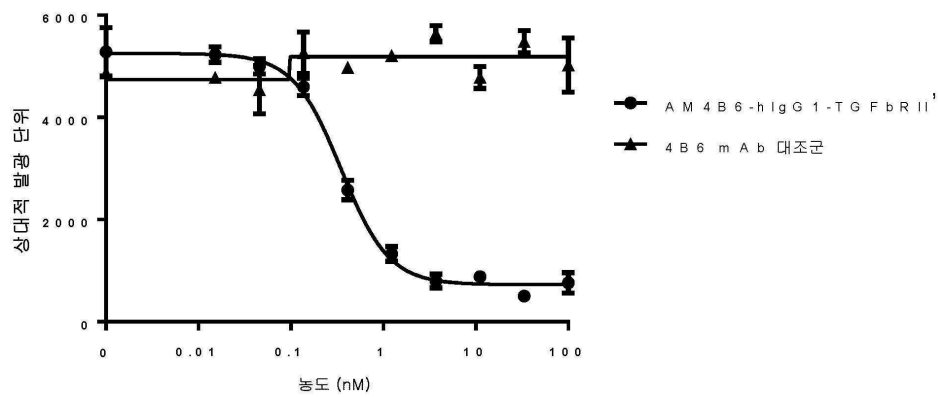
도면13



도면14

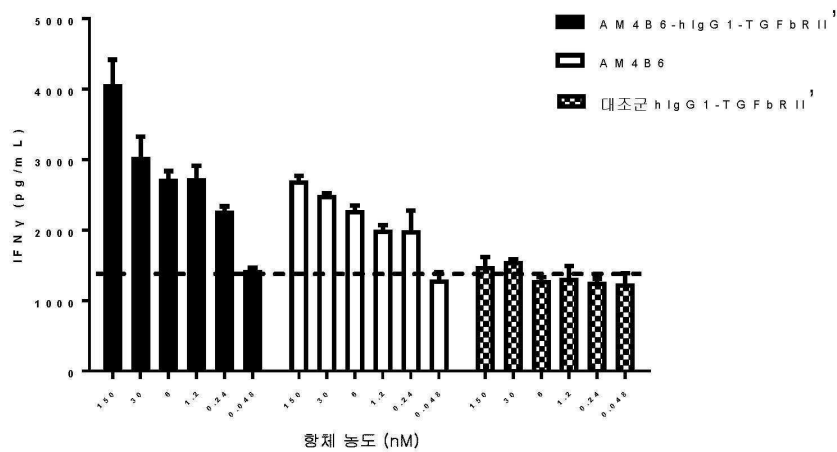


도면15

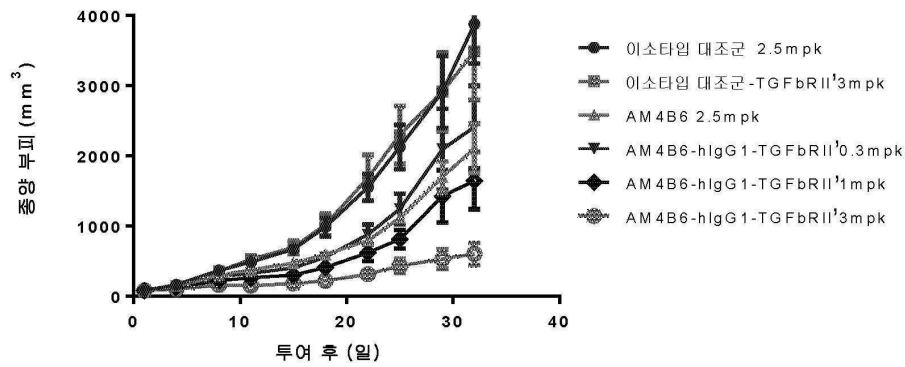


도면16

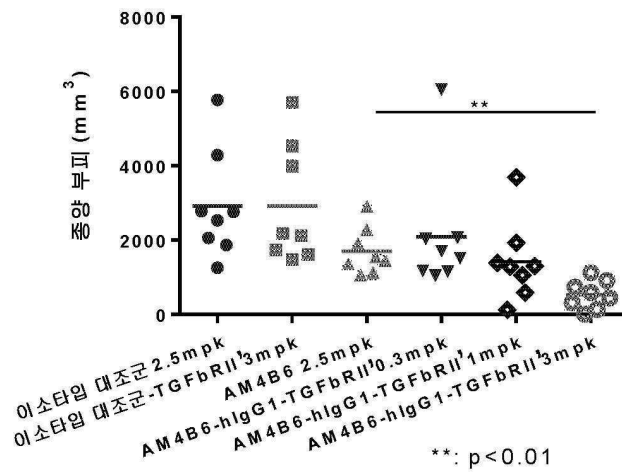
투베르쿨린(TB) 자극된 PBMC에 대한 AM4B6-hlgG1-TGFbRII'의 효과
(DC 공여자 : T P C S , P B 0 2 5 C , A 1 0 K 5 4 6 0 0 6)



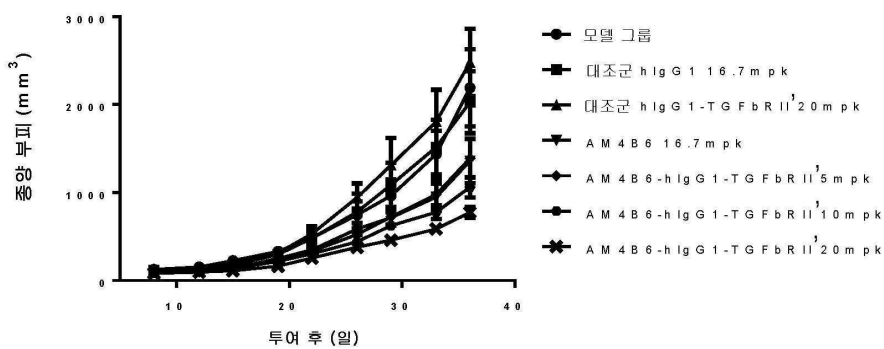
도면17a



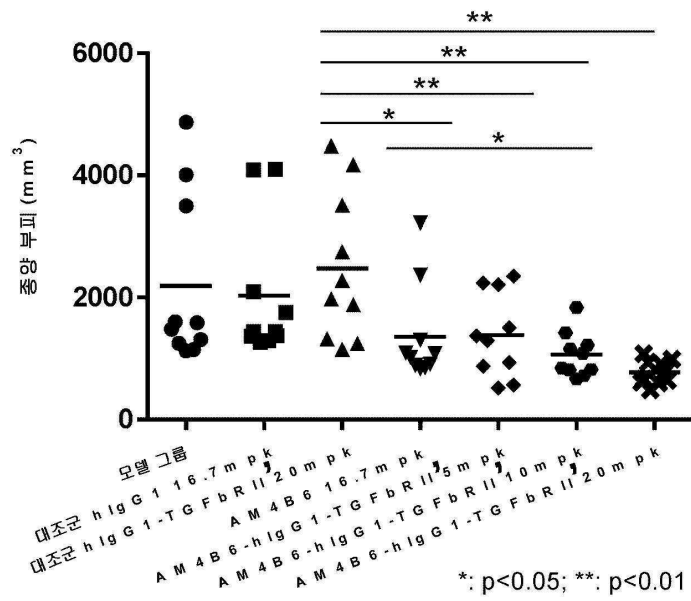
도면17b



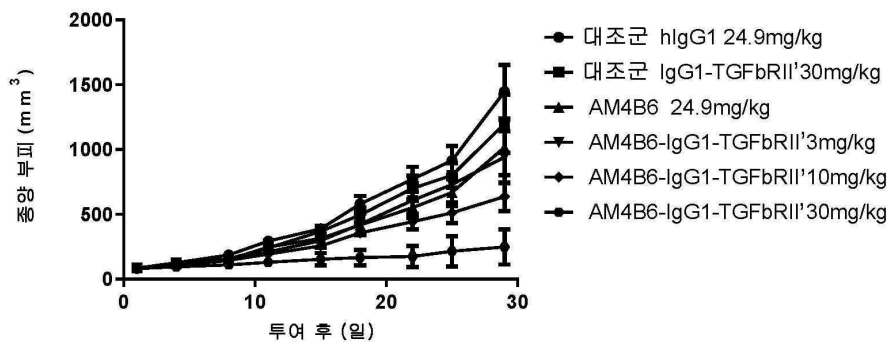
도면18a



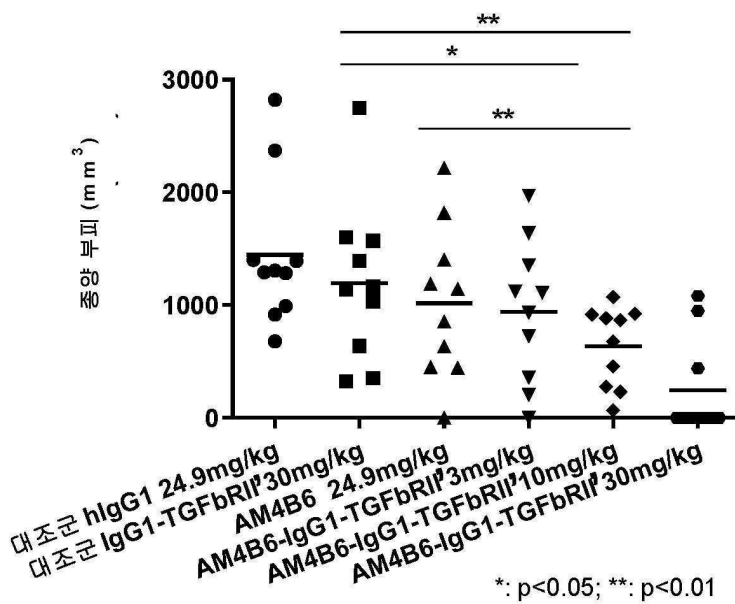
도면18b



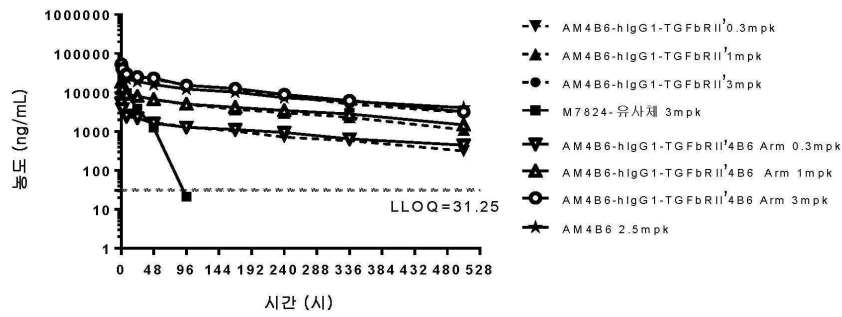
도면19a



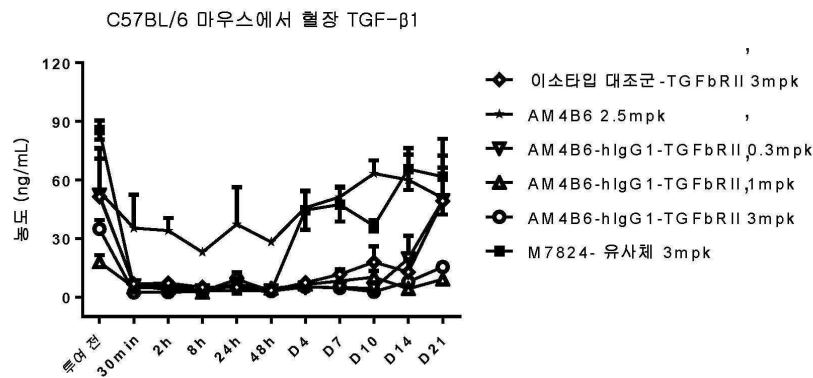
도면19b



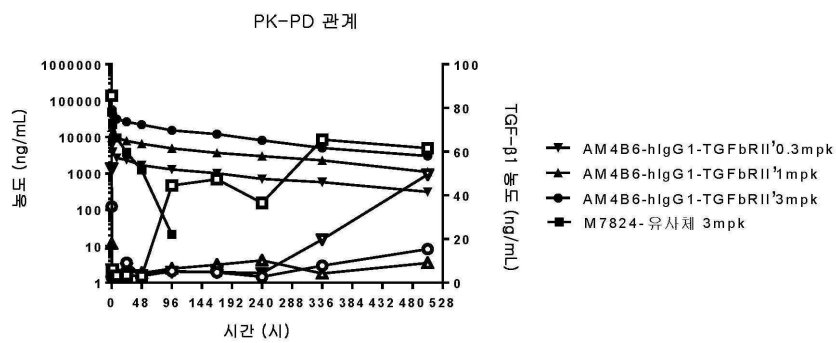
도면20a



도면20b

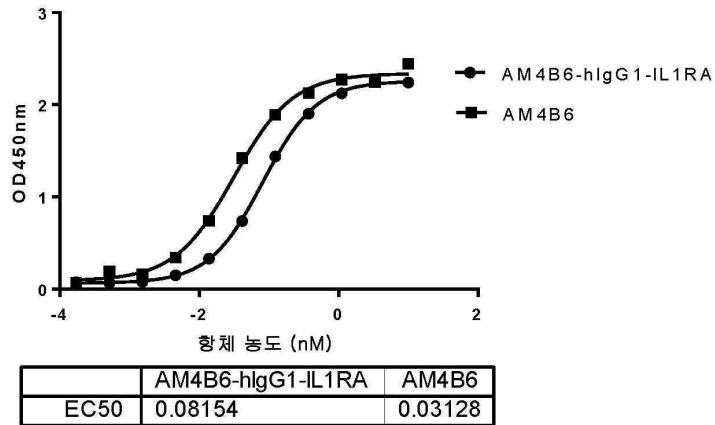


도면20c



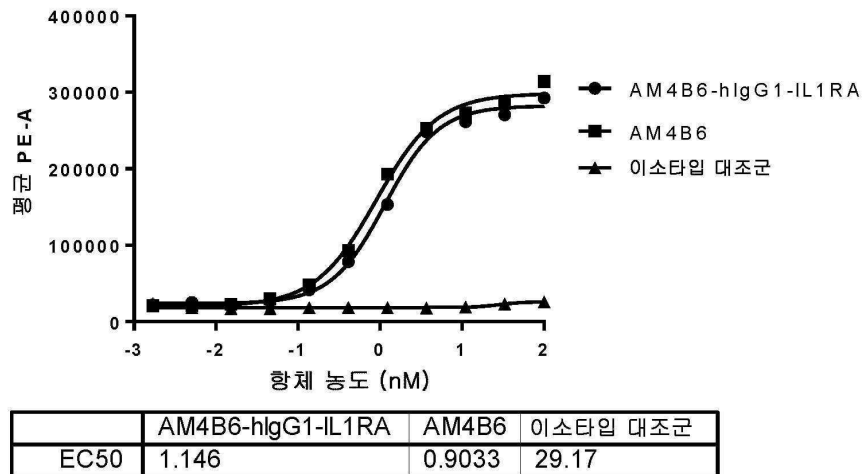
도면21

hPDL1에 대한 AM4B6-hlgG1-IL-1RA BsAb의 결합 활성



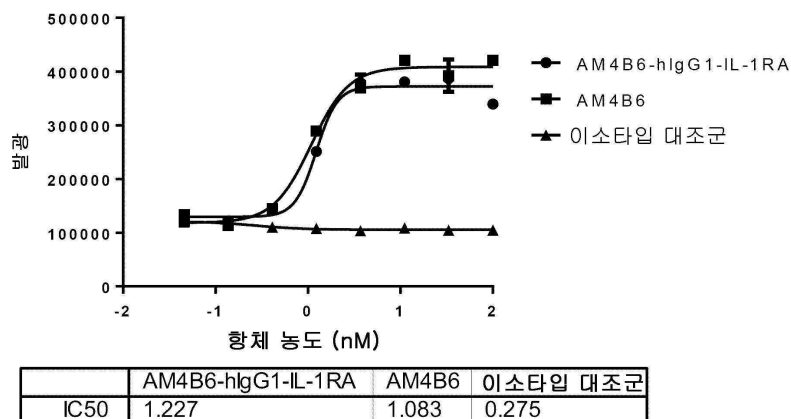
도면22

hPDL1에 대한 AM4B6-hlgG1-IL1RA의 결합 활성 (FACS)



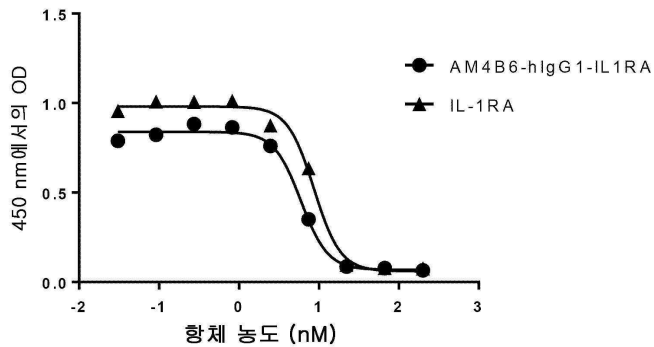
도면23

AM4B6-hlgG1-IL-1RA의 PD-L1/PD-1 차단 활성



도면24

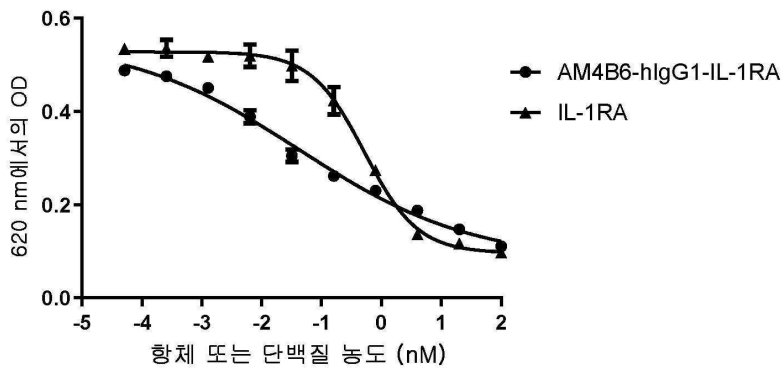
AM4B6-hlgG1-IL-1RA의 IL-1 베타/IL-1R1 차단 활성



	IL-1RA	AM4B6-hlgG1-IL1RA
IC50	8.681	5.947

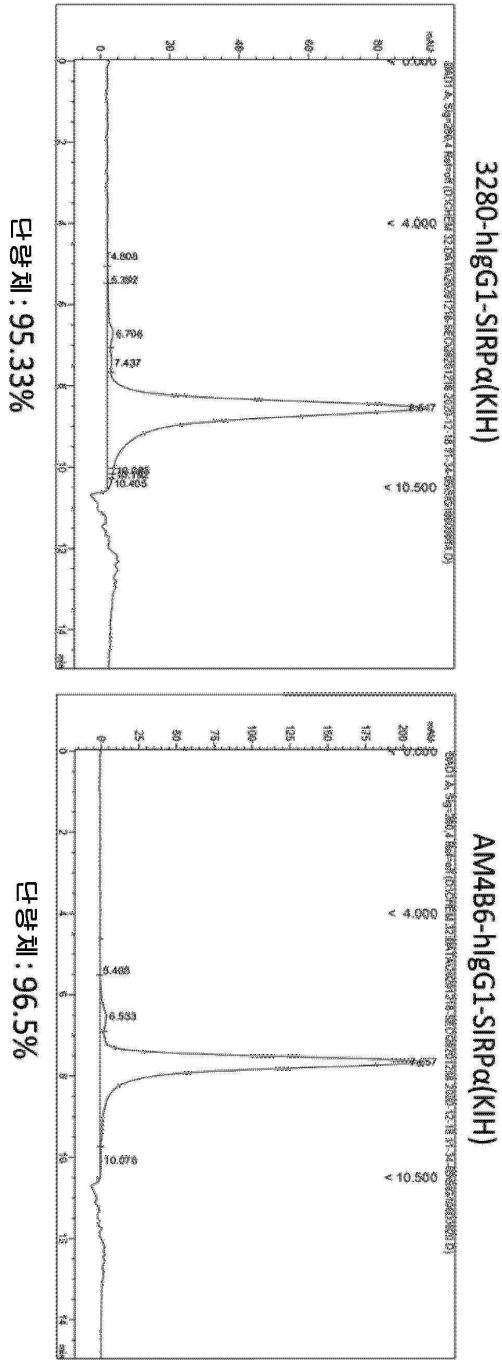
도면25

리포터 세포에 대한 AM4B6-hlgG1-IL-1RA의 IL-1베타 차단 활성

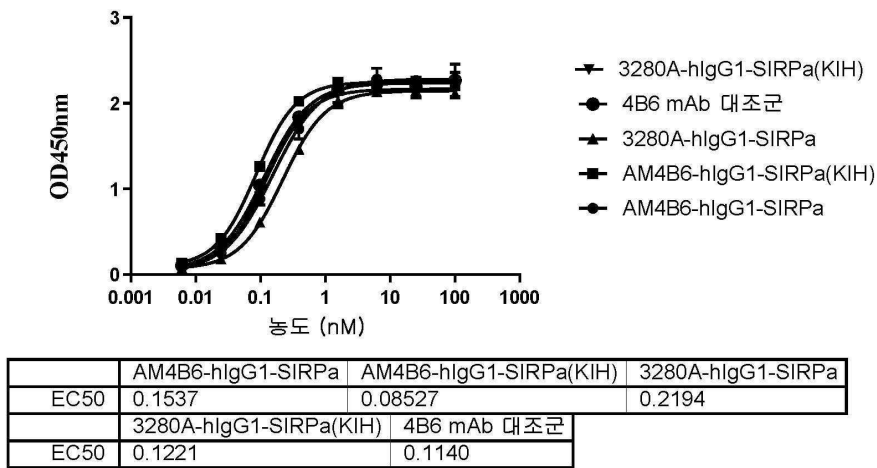


	IL-1RA	AM4B6-hlgG1-IL-1RA
IC50	0.5238	0.04344

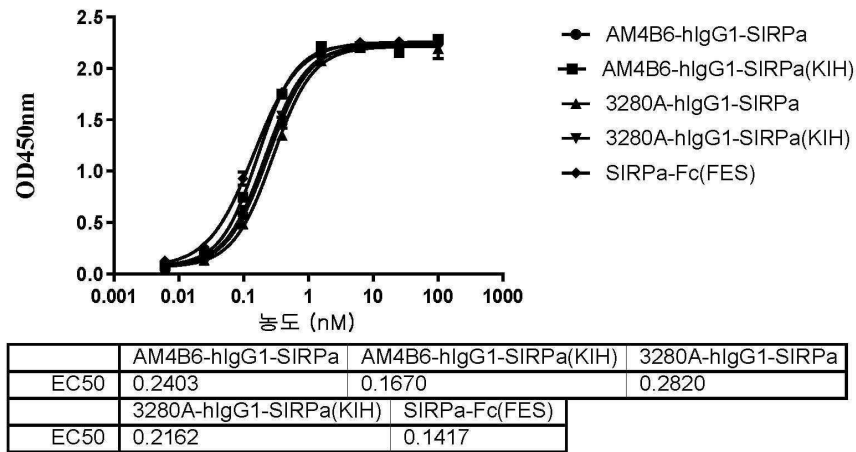
도면26



도면27

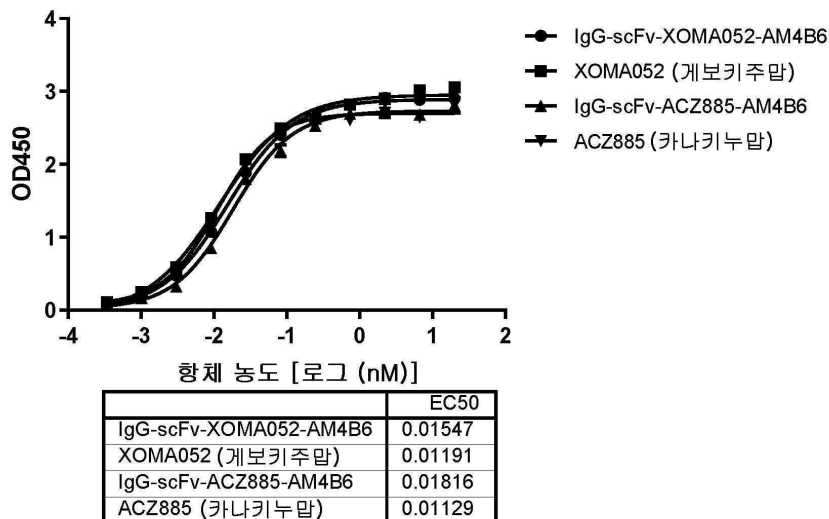


도면28



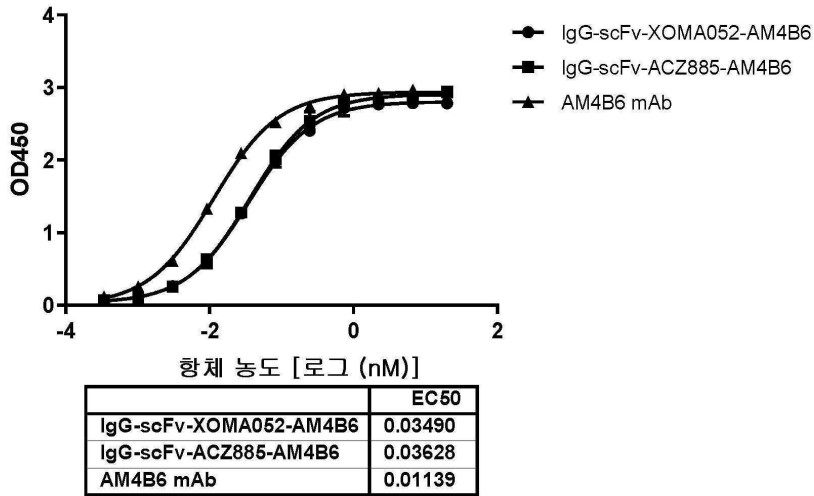
도면29

인간 IL-1 β 단백질에 대한 ELISA 결합



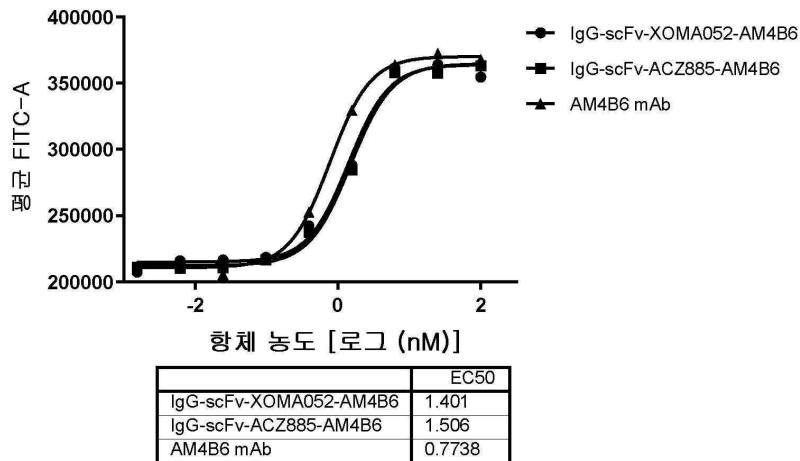
도면30

인간 PD-L1 단백질에 대한 ELISA 결합



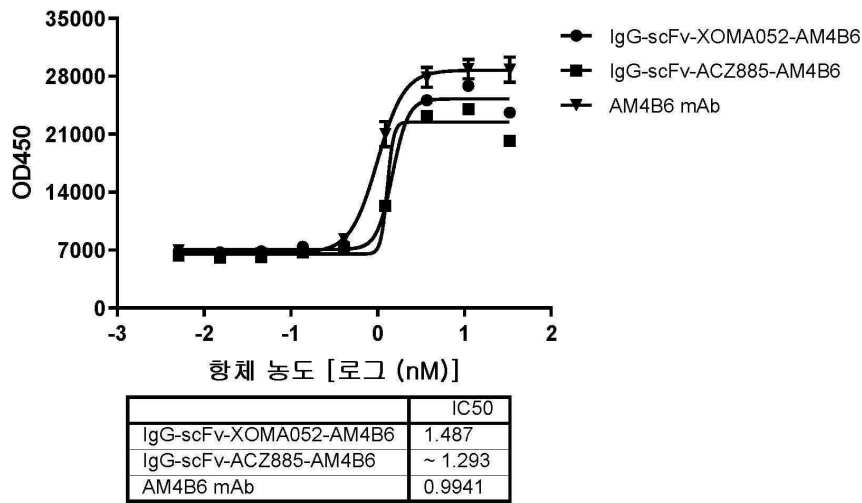
도면31

인간 PD-L1을 발현하는 293T 안정한 세포에 대한 세포 기반 결합



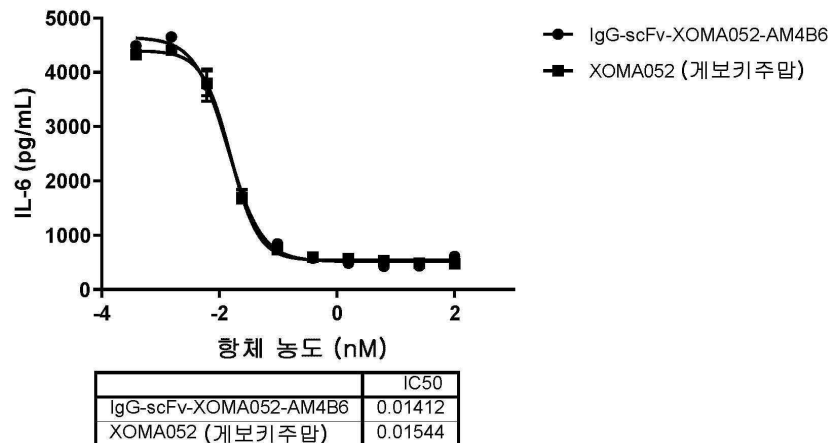
도면32

PD-1/PD-L1 상호작용에 대한 세포 기반 차단



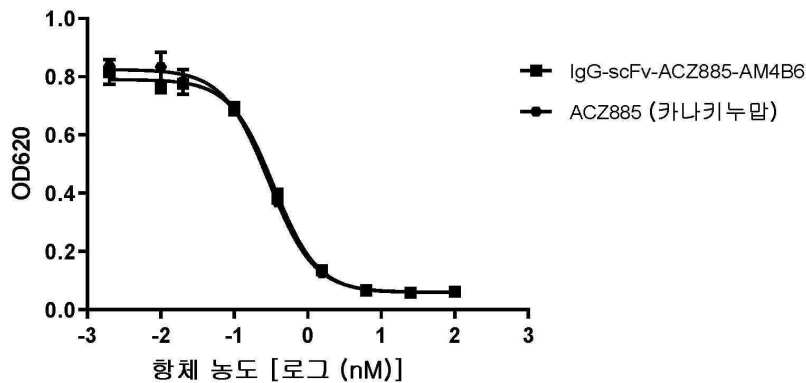
도면33

인간 IL-1R을 발현하는 HDF 세포 상의 세포 기반 차단



도면34

인간 IL-1R을 발현하는 HEK293-CD40L
리포터 세포 상의 세포 기반 차단



	IC50
IgG-scFv-ACZ885-AM4B6	0.3459
ACZ885 (카나키누맙)	0.2941

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MABSPACE BIOSCIENCES (SUZHOU) CO., LTD.

<120> BI-FUNCTIONAL MOLECULES

<130> 063694-8005W003

<150> PCT/CN2020/129918

<151> 2020-11-18

<150> PCT/CN2021/073341

<151> 2021-01-22

<160> 122

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

Asp Tyr Tyr Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala Val Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr

1 5

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ile Val Ala

1 5 10

<210

> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

Lys Ala Ser Gln Asn Val Pro Ala Ala Val Ala

1 5 10

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

Lys Ala Ser Gln Asn Val Lys Gly Ala Val Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 10

Ser Asn Ser His Arg Tyr Thr

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 11

Ser Arg Ser Val Arg Tyr Thr

1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 12

Ser Val Ser Asp Arg Tyr Thr

1 5

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 13

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Asp Thr Met Tyr Asn His Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Gln Thr Gln Tyr Asn His Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Glu Thr Leu Tyr Asn His Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 16

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Leu Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 17

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Gln Thr Val Tyr Asn His Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210

> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 19

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Asn His Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(9)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 20

Lys Ala Ser Gln Asn Val Xaa Xaa Xaa Val Ala

1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic
 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 21

Ser Xaa Ser Xaa Arg Tyr Thr

1 5

<210> 22

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 23

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

1 5 10

<210> 24

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 24

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 25

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 26

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 26

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 27

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

1 5 10 15

<210> 28

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 30

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 31

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Met Gly

1 5 10

<210> 32

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 32

Arg Val Thr Val Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 33

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 33

Arg Val Thr Val Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 34

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 34

Arg Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 35

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 35

Arg Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 36

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

1 5 10 15

<210> 37

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 38

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 39

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 39

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 40

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 41

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Xaa Leu Glu Trp Met Gly

1 5 10

<210> 42

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(32)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 42

Arg Val Thr Xaa Thr Val Asp Xaa Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa Xaa

20 25 30

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 43

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

1 5 10 15

<210> 44

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 44

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

1 5 10 15

Xaa Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 45

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 46

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ala

115

<210>

> 47

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 47

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Gly Ile Lys

100 105

<210> 48

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95
Ala Arg

<210> 49

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

$\langle 220 \rangle \langle 223 \rangle$ Synthetic

<400> 49

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Val Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 50

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

$\langle 220 \rangle \langle 223 \rangle$ Synthetic

<400> 50

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

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

 85 90 95
 Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 51

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 51

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

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

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 52

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 52

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 53

<211> 95

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 53

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro

85 90 95

<210> 54

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 55

<211> 106

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 55

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

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

85

90

95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 56

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400>

> 56

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

1

5

10

15

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

20

25

30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe
50 55 60

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

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

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 57

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic

<400> 57

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Gly Thr Ser Tyr Asn His Lys Phe
50 55 60

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

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

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 58

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic

<400> 58

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Gln Thr Gln Tyr Asn His Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 59

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic

<400> 59

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

1 5 10 15

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 60

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic

<400> 60

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

Lys Gly Arg Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 61

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic

<400> 61

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 62

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 62

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

1 5 10 15

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

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

<210> 63

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 63

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

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

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

<210> 64

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 64

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 65

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 65

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 66

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 66

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

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

100 105 110
Thr Ser Asn Pro Asp

115

<210> 67

<211> 144

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 67

Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu

35 40 45

Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser

50 55 60

Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu

65 70 75 80

Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp

85 90 95

Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe

100 105 110

Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met

115 120 125

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

130 135 140

<210> 68

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 68

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly

20

<210> 69

<211> 470

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

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

1 5 10 15

Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val

20 25 30

Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp

35 40 45

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

50 55 60

Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Ala Gly Pro Val Cys Phe Val Cys Ile Ser Leu Met Leu Met Val

100 105 110

Tyr Ile Cys His Asn Arg Thr Val Ile His His Arg Val Pro Asn Glu

115 120 125

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

130 135 140

Lys Asp Leu Ile Tyr Asp Met Thr Thr Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu

145 150 155 160

Pro Leu Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala Arg Thr Ile Val Leu Gln Glu

165 170 175

Ser Ile Gly Lys Gly Arg Phe Gly Glu Val Trp Arg Gly Lys Trp Arg

180 185 190

Gly Glu Glu Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Glu Glu Arg Ser

195 200 205

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

210 215 220
 Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Asn Lys Asp Asn Gly Thr Trp
 225 230 235 240

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

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

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

 Val Met Ala Lys Ile Met Arg Glu Cys Trp Tyr Ala Asn Gly Ala Ala
 435 440 445
 Arg Leu Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ser Gln Leu Ser Gln
 450 455 460

Gln Glu Gly Ile Lys Met

465 470

<210> 70

<211> 545

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val

1 5 10 15

Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys

20 25 30

Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn

35 40 45

Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala

50 55 60

Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His

65 70 75 80

Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser

85 90 95

Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe

100 105 110

Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser

115 120 125

Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu Leu Leu Val Ile Phe Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Ile Ile Ile Phe Tyr Cys Tyr Arg Val Asn Arg Gln Gln Lys Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Trp Glu Thr Gly Lys Thr Arg Lys Leu Met Glu Phe Ser Glu

180 185 190

His Cys Ala Ile Ile Leu Glu Asp Asp Arg Ser Asp Ile Ser Ser Thr

195	200	205
Cys Ala Asn Asn Ile Asn His Asn Thr Glu Leu Leu Pro Ile Glu Leu		
210	215	220
Asp Thr Leu Val Gly Lys Gly Arg Phe Ala Glu Val Tyr Lys Ala Lys		
225	230	235
240		
Leu Lys Gln Asn Thr Ser Glu Gln Phe Glu Thr Val Ala Val Lys Ile		
245	250	255
Phe Pro Tyr Glu Glu Tyr Ala Ser Trp Lys Thr Glu Lys Asp Ile Phe		
260	265	270
Ser Asp Ile Asn Leu Lys His Glu Asn Ile Leu Gln Phe Leu Thr Ala		
275	280	285
Glu Glu Arg Lys Thr Glu Leu Gly Lys Gln Tyr Trp Leu Ile Thr Ala		
290	295	300
Phe His Ala Lys Gly Asn Leu Gln Glu Tyr Leu Thr Arg His Val Ile		
305	310	315
320		
Ser Trp Glu Asp Leu Arg Lys Leu Gly Ser Ser Leu Ala Arg Gly Ile		
325	330	335
Ala His Leu His Ser Asp His Thr Pro Cys Gly Arg Pro Lys Met Pro		
340	345	350
Ile Val His Arg Asp Leu Lys Ser Ser Asn Ile Leu Val Lys Asn Asp		
355	360	365
Leu Thr Cys Cys Leu Cys Asp Phe Gly Leu Ser Leu Arg Leu Asp Pro		
370	375	380
Thr Leu Ser Val Asp Asp Leu Ala Asn Ser Gly Gln Val Gly Thr Ala		
385	390	395
400		
Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Glu Ser Arg Met Asn Leu Glu Asn		
405	410	415
Val Glu Ser Phe Lys Gln Thr Asp Val Tyr Ser Met Ala Leu Val Leu		
420	425	430
Trp Glu Met Thr Ser Arg Cys Asn Ala Val Gly Glu Val Lys Asp Tyr		
435	440	445

Glu Pro Pro Phe Gly Ser Lys Val Arg Glu His Pro Cys Val Glu Ser
450 455 460

Met Lys Asp Asn Val Leu Arg Asp Arg Gly Arg Pro Glu Ile Pro Ser
465 470 475 480

Phe Trp Leu Asn His Gln Gly Ile Gln Met Val Cys Glu Thr Leu Thr
485 490 495

Glu Cys Trp Asp His Asp Pro Glu Ala Arg Leu Thr Ala Gln Cys Val
500 505 510

Ala Glu Arg Phe Ser Glu Leu Glu His Leu Asp Arg Leu Ser Gly Arg
515 520 525

Ser Cys Ser Glu Glu Lys Ile Pro Glu Asp Gly Ser Leu Asn Thr Thr
530 535 540

Lys

545

<210> 71

<211> 570

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Asp Val Glu Met Glu Ala Gln
1 5 10 15

Lys Asp Glu Ile Ile Cys Pro Ser Cys Asn Arg Thr Ala His Pro Leu
20 25 30

Arg His Ile Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val

35 40 45

Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys
50 55 60

Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys
65 70 75 80

Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu
85 90 95

Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His

100 105 110

Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu

115 120 125

Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp

130 135 140

Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Arg Val Asn Arg Gln Gln Lys Leu Ser Ser Thr Trp Glu Thr Gly Lys

195 200 205

Thr Arg Lys Leu Met Glu Phe Ser Glu His Cys Ala Ile Ile Leu Glu

210 215 220

Asp Asp Arg Ser Asp Ile Ser Ser Thr Cys Ala Asn Asn Ile Asn His

225 230 235 240

Asn Thr Glu Leu Leu Pro Ile Glu Leu Asp Thr Leu Val Gly Lys Gly

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ser Trp Lys Thr Glu Lys Asp Ile Phe Ser Asp Ile Asn Leu Lys His

290 295 300

Glu Asn Ile Leu Gln Phe Leu Thr Ala Glu Glu Arg Lys Thr Glu Leu

305 310 315 320

Gly Lys Gln Tyr Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Ala Lys Gly Asn Leu

325 330 335

Gln Glu Tyr Leu Thr Arg His Val Ile Ser Trp Glu Asp Leu Arg Lys

340 345 350
Leu Gly Ser Ser Leu Ala Arg Gly Ile Ala His Leu His Ser Asp His

355 360 365
Thr Pro Cys Gly Arg Pro Lys Met Pro Ile Val His Arg Asp Leu Lys

370 375 380
Ser Ser Asn Ile Leu Val Lys Asn Asp Leu Thr Cys Cys Leu Cys Asp

385 390 395 400
Phe Gly Leu Ser Leu Arg Leu Asp Pro Thr Leu Ser Val Asp Asp Leu

405 410 415
Ala Asn Ser Gly Gln Val Gly Thr Ala Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val

420 425 430
Leu Glu Ser Arg Met Asn Leu Glu Asn Val Glu Ser Phe Lys Gln Thr

435 440 445
Asp Val Tyr Ser Met Ala Leu Val Leu Trp Glu Met Thr Ser Arg Cys

450 455 460
Asn Ala Val Gly Glu Val Lys Asp Tyr Glu Pro Pro Phe Gly Ser Lys

465 470 475 480
Val Arg Glu His Pro Cys Val Glu Ser Met Lys Asp Asn Val Leu Arg

485 490 495
Asp Arg Gly Arg Pro Glu Ile Pro Ser Phe Trp Leu Asn His Gln Gly

500 505 510
Ile Gln Met Val Cys Glu Thr Leu Thr Glu Cys Trp Asp His Asp Pro

515 520 525
Glu Ala Arg Leu Thr Ala Gln Cys Val Ala Glu Arg Phe Ser Glu Leu

530 535 540
Glu His Leu Asp Arg Leu Ser Gly Arg Ser Cys Ser Glu Glu Lys Ile

545 550 555 560
Pro Glu Asp Gly Ser Leu Asn Thr Thr Lys

565 570

<210> 72

<211> 831

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Gly Pro Glu Pro Gly Ala Leu Cys Glu Leu Ser Pro Val Ser Ala Ser

1 5 10 15

His Pro Val Gln Ala Leu Met Glu Ser Phe Thr Val Leu Ser Gly Cys

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu His Leu Asn Pro Ile Ser Ser Val His Ile His His Lys Ser Val

65 70 75 80

Val Phe Leu Leu Asn Ser Pro His Pro Leu Val Trp His Leu Lys Thr

85 90 95

Glu Arg Leu Ala Thr Gly Val Ser Arg Leu Phe Leu Val Ser Glu Gly

100 105 110

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

115 120 125

Glu Glu Arg Asn Phe Pro His Gly Asn Glu His Leu Leu Asn Trp Ala

130 135 140

Arg Lys Glu Tyr Gly Ala Val Thr Ser Phe Thr Glu Leu Lys Ile Ala

145 150 155 160

Arg Asn Ile Tyr Ile Lys Val Gly Glu Asp Gln Val Phe Pro Pro Lys

165 170 175

Cys Asn Ile Gly Lys Asn Phe Leu Ser Leu Asn Tyr Leu Ala Glu Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Asn Glu Glu Val His Ile Ile Glu Leu Ile Thr Pro Asn Ser Asn Pro

210 215 220

Tyr Ser Ala Phe Gln Val Asp Ile Thr Ile Asp Ile Arg Pro Ser Gln

225 230 235 240

Glu Asp Leu Glu Val Val Lys Asn Leu Ile Leu Ile Leu Lys Cys Lys

245 250 255

Lys Ser Val Asn Trp Val Ile Lys Ser Phe Asp Val Lys Gly Ser Leu

260 265 270

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

275 280 285

Ser Met Thr Met Thr Lys Ser Ile Arg Asp Asp Ile Pro Ser Thr Gln

290 295 300

Gly Asn Leu Val Lys Trp Ala Leu Asp Asn Gly Tyr Ser Pro Ile Thr

305 310 315 320

Ser Tyr Thr Met Ala Pro Val Ala Asn Arg Phe His Leu Arg Leu Glu

325 330 335

Asn Asn Ala Glu Glu Met Gly Asp Glu Glu Val His Thr Ile Pro Pro

340 345 350

Glu Leu Arg Ile Leu Leu Asp Pro Gly Ala Leu Pro Ala Leu Gln Asn

355 360 365

Pro Pro Ile Arg Gly Gly Glu Gly Gln Asn Gly Gly Leu Pro Phe Pro

370 375 380

Phe Pro Asp Ile Ser Arg Arg Val Trp Asn Glu Glu Gly Glu Asp Gly

385 390 395 400

Leu Pro Arg Pro Lys Asp Pro Val Ile Pro Ser Ile Gln Leu Phe Pro

405 410 415

Gly Leu Arg Glu Pro Glu Glu Val Gln Gly Ser Val Asp Ile Ala Leu

420 425 430

Ser Val Lys Cys Asp Asn Glu Lys Met Ile Val Ala Val Glu Lys Asp

435 440 445

Ser Phe Gln Ala Ser Gly Tyr Ser Gly Met Asp Val Thr Leu Leu Asp

450 455 460

Pro Thr Cys Lys Ala Lys Met Asn Gly Thr His Phe Val Leu Glu Ser

465 470 475 480
 Pro Leu Asn Gly Cys Gly Thr Arg Pro Arg Trp Ser Ala Leu Asp Gly

 485 490 495
 Val Val Tyr Tyr Asn Ser Ile Val Ile Gln Val Pro Ala Leu Gly Asp
 500 505 510
 Ser Ser Gly Trp Pro Asp Gly Tyr Glu Asp Leu Glu Ser Gly Asp Asn
 515 520 525
 Gly Phe Pro Gly Asp Met Asp Glu Gly Asp Ala Ser Leu Phe Thr Arg
 530 535 540
 Pro Glu Ile Val Val Phe Asn Cys Ser Leu Gln Gln Val Arg Asn Pro

 545 550 555 560
 Ser Ser Phe Gln Glu Gln Pro His Gly Asn Ile Thr Phe Asn Met Glu
 565 570 575
 Leu Tyr Asn Thr Asp Leu Phe Leu Val Pro Ser Gln Gly Val Phe Ser
 580 585 590
 Val Pro Glu Asn Gly His Val Tyr Val Glu Val Ser Val Thr Lys Ala
 595 600 605
 Glu Gln Glu Leu Gly Phe Ala Ile Gln Thr Cys Phe Ile Ser Pro Tyr

 610 615 620
 Ser Asn Pro Asp Arg Met Ser His Tyr Thr Ile Ile Glu Asn Ile Cys
 625 630 635 640
 Pro Lys Asp Glu Ser Val Lys Phe Tyr Ser Pro Lys Arg Val His Phe
 645 650 655
 Pro Ile Pro Gln Ala Asp Met Asp Lys Lys Arg Phe Ser Phe Val Phe
 660 665 670
 Lys Pro Val Phe Asn Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Cys Glu Leu Thr

 675 680 685
 Leu Cys Thr Lys Met Glu Lys His Pro Gln Lys Leu Pro Lys Cys Val
 690 695 700
 Pro Pro Asp Glu Ala Cys Thr Ser Leu Asp Ala Ser Ile Ile Trp Ala
 705 710 715 720

Met Met Gln Asn Lys Lys Thr Phe Thr Lys Pro Leu Ala Val Ile His
725 730 735
His Glu Ala Glu Ser Lys Glu Lys Gly Pro Ser Met Lys Glu Pro Asn
740 745 750
Pro Ile Ser Pro Pro Ile Phe His Gly Leu Asp Thr Leu Thr Val Met
755 760 765
Gly Ile Ala Phe Ala Ala Phe Val Ile Gly Ala Leu Leu Thr Gly Ala
770 775 780
Leu Trp Tyr Ile Tyr Ser His Thr Gly Glu Thr Ala Gly Arg Gln Gln
785 790 795 800
Val Pro Thr Ser Pro Pro Ala Ser Glu Asn Ser Ser Ala Ala His Ser
805 810 815
Ile Gly Ser Thr Gln Ser Thr Pro Cys Ser Ser Ser Ser Thr Ala
820 825 830
<210> 73
<211> 552
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 73
Leu Glu Ala Asp Lys Cys Lys Glu Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu Val
1 5 10 15
Ser Ser Ala Asn Glu Ile Asp Val Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro Asn
20 25 30
Glu His Lys Gly Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Asp Asp Ser Lys Thr Pro
35 40 45
Val Ser Thr Glu Gln Ala Ser Arg Ile His Gln His Lys Glu Lys Leu
50 55 60
Trp Phe Val Pro Ala Lys Val Glu Asp Ser Gly His Tyr Tyr Cys Val
65 70 75 80
Val Arg Asn Ser Ser Tyr Cys Leu Arg Ile Lys Ile Ser Ala Lys Phe
85 90 95

Val Glu Asn Glu Pro Asn Leu Cys Tyr Asn Ala Gln Ala Ile Phe Lys
100 105 110

Gln Lys Leu Pro Val Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val Cys Pro Tyr Met
115 120 125

Glu Phe Phe Lys Asn Glu Asn Asn Glu Leu Pro Lys Leu Gln Trp Tyr
130 135 140

Lys Asp Cys Lys Pro Leu Leu Leu Asp Asn Ile His Phe Ser Gly Val
145 150 155 160

Lys Asp Arg Leu Ile Val Met Asn Val Ala Glu Lys His Arg Gly Asn
165 170 175

Tyr Thr Cys His Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro Ile
180 185 190

Thr Arg Val Ile Glu Phe Ile Thr Leu Glu Glu Asn Lys Pro Thr Arg
195 200 205

Pro Val Ile Val Ser Pro Ala Asn Glu Thr Met Glu Val Asp Leu Gly
210 215 220

Ser Gln Ile Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp Ile
225 230 235 240

Ala Tyr Trp Lys Trp Asn Gly Ser Val Ile Asp Glu Asp Asp Pro Val
245 250 255

Leu Gly Glu Asp Tyr Tyr Ser Val Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg Arg
260 265 270

Ser Thr Leu Ile Thr Val Leu Asn Ile Ser Glu Ile Glu Ser Arg Phe
275 280 285

Tyr Lys His Pro Phe Thr Cys Phe Ala Lys Asn Thr His Gly Ile Asp
290 295 300

Ala Ala Tyr Ile Gln Leu Ile Tyr Pro Val Thr Asn Phe Gln Lys His
305 310 315 320

Met Ile Gly Ile Cys Val Thr Leu Thr Val Ile Ile Val Cys Ser Val
325 330 335

Phe Ile Tyr Lys Ile Phe Lys Ile Asp Ile Val Leu Trp Tyr Arg Asp

[illegible]

<400> 74

Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met Arg Gln Ile Gln

1 5 10 15

Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro Leu Phe Glu His

20 25 30

Phe Leu Lys Phe Asn Tyr Ser Thr Ala His Ser Ala Gly Leu Thr Leu

35 40 45

Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp Leu Glu Glu Pro Ile Asn

50 55 60

Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys Glu Lys Asp Val Leu Trp

65 70 75 80

Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Cys Met Leu

85 90 95

Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala Phe Pro Leu Glu Val Val

100 105 110

Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Pro Met Lys Leu Pro Val His Lys

115 120 125

Leu Tyr Ile Glu Tyr Gly Ile Gln Arg Ile Thr Cys Pro Asn Val Asp

130 135 140

Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Thr Ile Thr Trp Tyr Met Gly

145 150 155 160

Cys Tyr Lys Ile Gln Asn Phe Asn Asn Val Ile Pro Glu Gly Met Asn

165 170 175

Leu Ser Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ser Asn Asn Gly Asn Tyr Thr Cys

180 185 190

Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Thr Phe His Leu Thr Arg Thr

195 200 205

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

210 215 220

Ile His Ser Pro Asn Asp His Val Val Tyr Glu Lys Glu Pro Gly Glu

225 230 235 240

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

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

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

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

485 490 495
 Ala Lys Thr Val Leu Thr Val Ile Lys Trp Lys Gly Glu Lys Ser Lys
 500 505 510
 Tyr Pro Gln Gly Arg Phe Trp Lys Gln Leu Gln Val Ala Met Pro Val
 515 520 525
 Lys Lys Ser Pro Arg Arg Ser Ser Ser Asp Glu Gln Gly Leu Ser Tyr
 530 535 540
 Ser Ser Leu Lys Asn Val
 545 550
 <210> 75
 <211> 385
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400
 > 75
 Phe Thr Leu Gln Pro Ala Ala His Thr Gly Ala Ala Arg Ser Cys Arg
 1 5 10 15
 Phe Arg Gly Arg His Tyr Lys Arg Glu Phe Arg Leu Glu Gly Glu Pro
 20 25 30
 Val Ala Leu Arg Cys Pro Gln Val Pro Tyr Trp Leu Trp Ala Ser Val
 35 40 45
 Ser Pro Arg Ile Asn Leu Thr Trp His Lys Asn Asp Ser Ala Arg Thr
 50 55 60

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

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

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

 Arg Cys Val Leu Thr Phe Ala His Glu Gly Gln Gln Tyr Asn Ile Thr
 195 200 205
 Arg Ser Ile Glu Leu Arg Ile Lys Lys Lys Lys Glu Glu Thr Ile Pro
 210 215 220
 Val Ile Ile Ser Pro Leu Lys Thr Ile Ser Ala Ser Leu Gly Ser Arg
 225 230 235 240
 Leu Thr Ile Pro Cys Lys Val Phe Leu Gly Thr Gly Thr Pro Leu Thr
 245 250 255

 Thr Met Leu Trp Trp Thr Ala Asn Asp Thr His Ile Glu Ser Ala Tyr
 260 265 270
 Pro Gly Gly Arg Val Thr Glu Gly Pro Arg Gln Glu Tyr Ser Glu Asn
 275 280 285
 Asn Glu Asn Tyr Ile Glu Val Pro Leu Ile Phe Asp Pro Val Thr Arg
 290 295 300
 Glu Asp Leu His Met Asp Phe Lys Cys Val Val His Asn Thr Leu Ser
 305 310 315 320

 Phe Gln Thr Leu Arg Thr Thr Val Lys Glu Ala Ser Ser Thr Phe Ser
 325 330 335
 Trp Gly Ile Val Leu Ala Pro Leu Ser Leu Ala Phe Leu Val Leu Gly
 340 345 350
 Gly Ile Trp Met His Arg Arg Cys Lys His Arg Thr Gly Lys Ala Asp
 355 360 365
 Gly Leu Thr Val Leu Trp Pro His His Gln Asp Phe Gln Ser Tyr Pro
 370 375 380

Lys

385

<210> 76

<211> 152

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp

1 5 10 15

Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala

20 25 30

Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val

35 40 45

Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys

50 55 60

Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu

100 105 110

Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp

115 120 125

Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr

130 135 140

Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu

145 150

<210> 77

<211> 93

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 77

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

1 5 10 15

Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val

20 25 30

Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp

35 40 45

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

50 55 60

Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro Thr

65 70 75 80

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

85 90

<210> 78

<211> 136

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 78

Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr

1 5 10 15

Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp

20 25 30

Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys

35 40 45

Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val

50 55 60

Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp

65 70 75 80

Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro

85 90 95

Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met

100 105 110
 Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu
 115 120 125
 Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
 130 135
 <210> 79
 <211> 767
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 79
 Gly Pro Glu Pro Gly Ala Leu Cys Glu Leu Ser Pro Val Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 His Pro Val Gln Ala Leu Met Glu Ser Phe Thr Val Leu Ser Gly Cys
 20 25 30

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

 Glu Arg Leu Ala Thr Gly Val Ser Arg Leu Phe Leu Val Ser Glu Gly
 100 105 110
 Ser Val Val Gln Phe Ser Ser Ala Asn Phe Ser Leu Thr Ala Glu Thr
 115 120 125
 Glu Glu Arg Asn Phe Pro His Gly Asn Glu His Leu Leu Asn Trp Ala
 130 135 140
 Arg Lys Glu Tyr Gly Ala Val Thr Ser Phe Thr Glu Leu Lys Ile Ala
 145 150 155 160

Arg Asn Ile Tyr Ile Lys Val Gly Glu Asp Gln Val Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Cys Asn Ile Gly Lys Asn Phe Leu Ser Leu Asn Tyr Leu Ala Glu Tyr
180 185 190

Leu Gln Pro Lys Ala Ala Glu Gly Cys Val Met Ser Ser Gln Pro Gln
195 200 205

Asn Glu Glu Val His Ile Ile Glu Leu Ile Thr Pro Asn Ser Asn Pro
210 215 220

Tyr Ser Ala Phe Gln Val Asp Ile Thr Ile Asp Ile Arg Pro Ser Gln
225 230 235 240

Glu Asp Leu Glu Val Val Lys Asn Leu Ile Leu Ile Leu Lys Cys Lys
245 250 255

Lys Ser Val Asn Trp Val Ile Lys Ser Phe Asp Val Lys Gly Ser Leu
260 265 270

Lys Ile Ile Ala Pro Asn Ser Ile Gly Phe Gly Lys Glu Ser Glu Arg
275 280 285

Ser Met Thr Met Thr Lys Ser Ile Arg Asp Asp Ile Pro Ser Thr Gln
290 295 300

Gly Asn Leu Val Lys Trp Ala Leu Asp Asn Gly Tyr Ser Pro Ile Thr
305 310 315 320

Ser Tyr Thr Met Ala Pro Val Ala Asn Arg Phe His Leu Arg Leu Glu
325 330 335

Asn Asn Ala Glu Glu Met Gly Asp Glu Glu Val His Thr Ile Pro Pro
340 345 350

Glu Leu Arg Ile Leu Leu Asp Pro Gly Ala Leu Pro Ala Leu Gln Asn
355 360 365

Pro Pro Ile Arg Gly Gly Glu Gly Gln Asn Gly Gly Leu Pro Phe Pro
370 375 380

Phe Pro Asp Ile Ser Arg Arg Val Trp Asn Glu Glu Gly Glu Asp Gly
385 390 395 400

Leu Pro Arg Pro Lys Asp Pro Val Ile Pro Ser Ile Gln Leu Phe Pro

405					410					415						
Gly	Leu	Arg	Glu	Pro	Glu	Glu	Val	Gln	Gly	Ser	Val	Asp	Ile	Ala	Leu	
420					425					430						
Ser	Val	Lys	Cys	Asp	Asn	Glu	Lys	Met	Ile	Val	Ala	Val	Glu	Lys	Asp	
435					440					445						
Ser	Phe	Gln	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Gly	Met	Asp	Val	Thr	Leu	Leu	Asp	
450					455					460						
Pro	Thr	Cys	Lys	Ala	Lys	Met	Asn	Gly	Thr	His	Phe	Val	Leu	Glu	Ser	
465					470					475					480	
Pro	Leu	Asn	Gly	Cys	Gly	Thr	Arg	Pro	Arg	Trp	Ser	Ala	Leu	Asp	Gly	
485					490					495						
Val	Val	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ile	Val	Ile	Gln	Val	Pro	Ala	Leu	Gly	Asp	
500					505					510						
Ser	Ser	Gly	Trp	Pro	Asp	Gly	Tyr	Glu	Asp	Leu	Glu	Ser	Gly	Asp	Asn	
515					520					525						
Gly	Phe	Pro	Gly	Asp	Met	Asp	Glu	Gly	Asp	Ala	Ser	Leu	Phe	Thr	Arg	
530					535					540						
Pro	Glu	Ile	Val	Val	Phe	Asn	Cys	Ser	Leu	Gln	Gln	Val	Arg	Asn	Pro	
545					550					555					560	
Ser	Ser	Phe	Gln	Glu	Gln	Pro	His	Gly	Asn	Ile	Thr	Phe	Asn	Met	Glu	
565					570					575						
Leu	Tyr	Asn	Thr	Asp	Leu	Phe	Leu	Val	Pro	Ser	Gln	Gly	Val	Phe	Ser	
580					585					590						
Val	Pro	Glu	Asn	Gly	His	Val	Tyr	Val	Glu	Val	Ser	Val	Thr	Lys	Ala	
595					600					605						
Glu	Gln	Glu	Leu	Gly	Phe	Ala	Ile	Gln	Thr	Cys	Phe	Ile	Ser	Pro	Tyr	
610					615					620						
Ser	Asn	Pro	Asp	Arg	Met	Ser	His	Tyr	Thr	Ile	Ile	Glu	Asn	Ile	Cys	
625					630					635					640	
Pro	Lys	Asp	Glu	Ser	Val	Lys	Phe	Tyr	Ser	Pro	Lys	Arg	Val	His	Phe	
645					650					655						

Pro Ile Pro Gln Ala Asp Met Asp Lys Lys Arg Phe Ser Phe Val Phe
660 665 670

Lys Pro Val Phe Asn Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Cys Glu Leu Thr
675 680 685

Leu Cys Thr Lys Met Glu Lys His Pro Gln Lys Leu Pro Lys Cys Val
690 695 700

Pro Pro Asp Glu Ala Cys Thr Ser Leu Asp Ala Ser Ile Ile Trp Ala
705 710 715 720

Met Met Gln Asn Lys Lys Thr Phe Thr Lys Pro Leu Ala Val Ile His
725 730 735

His Glu Ala Glu Ser Lys Glu Lys Gly Pro Ser Met Lys Glu Pro Asn
740 745 750

Pro Ile Ser Pro Pro Ile Phe His Gly Leu Asp Thr Leu Thr Val
755 760 765

<210> 80

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 80

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

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

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

 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 81

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 81

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala
325 330

<210> 82
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 82

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 83

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 83

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

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

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

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

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

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala

325 330

<210> 84

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 84

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

1 5 10 15

Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Thr Ser Leu Phe Pro

20 25 30

Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Val Leu

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

Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
 100 105 110
 Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser
 115

<210> 85

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 85

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 86

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 86

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

100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 87

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 87

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

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

 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

 165 170 175
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290

295

300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305

310

315

320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala

325

330

<210> 88

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 88

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1

5

10

15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20

25

30

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

35

40

45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50

55

60

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

65

70

75

80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85

90

95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100

105

110

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115

120

125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130

135

140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

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

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

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala
 325 330

<210> 89

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 89

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

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

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

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

 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 90
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 90

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Val Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr
85 90 95

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 91

<211> 587

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic

<400> 91

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Glu Thr Leu Tyr Asn His Lys Phe
50 55 60

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

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

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115	120	125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys		
130	135	140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser		
145	150	155
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser		
165	170	175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		
180	185	190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn		
195	200	205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His		
210	215	220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val		
225	230	235
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
260	265	270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
305	310	315
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
340	345	350
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
355	360	365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Gly
435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
450 455 460

Gly Gly Ser Gly Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys Ser
465 470 475 480

Val Leu Val Ala Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile Thr
485 490 495

Ser Leu Phe Pro Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro
500 505 510

Gly Arg Val Leu Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg Val
515 520 525

Thr Thr Val Ser Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile
530 535 540

Arg Ile Gly Asn Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Ile
545 550 555 560

Lys Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala
565 570 575

Gly Thr Glu Leu Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser
580 585

<210> 92

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 92

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 93

<211> 588

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 93

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

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

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

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

195	200	205
-----	-----	-----

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala
 435 440 445
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

450 455 460
 Gly Gly Gly Ser Gly Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys
 465 470 475 480
 Ser Val Leu Val Ala Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile
 485 490 495
 Thr Ser Leu Phe Pro Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly
 500 505 510
 Pro Gly Arg Val Leu Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg

515 520 525
 Val Thr Thr Val Ser Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser
 530 535 540
 Ile Arg Ile Gly Asn Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys
 545 550 555 560
 Ile Lys Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly
 565 570 575
 Ala Gly Thr Glu Leu Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser

580 585

<210> 94

<211> 587

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 94

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

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

65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
	100	105	110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu			
	115	120	125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys			
	130	135	140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
145	150	155	160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
	165	170	175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
	180	185	190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn			
	195	200	205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His			
	210	215	220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val			
225	230	235	240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
	245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			
	260	265	270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
	275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
	290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
305	310	315	320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
 355 360 365

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

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

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

 Lys Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala

565 570 575
 Gly Thr Glu Leu Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser
 580 585
 <210> 95
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 95
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Glu Thr Leu Tyr Asn His Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

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

275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro

340 345 350
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405 410 415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 96

<211> 588

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 96

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115 120 125

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

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala

435 440 445
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Glu Glu Glu Leu Gln Ile Ile Gln Pro Asp Lys
 465 470 475 480
 Ser Val Leu Val Ala Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ile
 485 490 495
 Thr Ser Leu Phe Pro Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly
 500 505 510
 Pro Gly Arg Val Leu Ile Tyr Asn Gln Arg Gln Gly Pro Phe Pro Arg
 515 520 525

Val Thr Thr Val Ser Asp Thr Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser
 530 535 540
 Ile Arg Ile Gly Asn Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys
 545 550 555 560
 Ile Lys Phe Arg Lys Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly
 565 570 575
 Ala Gly Thr Glu Leu Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser
 580 585

<210> 97

<211

> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 97

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

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115

120

125

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

130

135

140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145

150

155

160

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

165

170

175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180

185

190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195

200

205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210

215

220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser

225

230

235

240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245

250

255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

260

265

270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275

280

285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

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

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

 435 440 445
 <210> 98
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 98
 Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala
 1 5 10 15
 Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Val Thr Ser Leu Ile Pro
 20 25 30
 Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu
 35 40 45

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

Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser
115

<210> 99

<211> 150

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 99

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
145 150

<210> 100
<211> 260
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 100

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
260

<210> 101

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 101

Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His
1 5 10 15

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg
20 25

<210> 102

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 102

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe
85 90 95

Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 103
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 103

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Gln
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 104

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 104

Thr Ser Gly Met Gly Val Gly

1 5

<210> 105

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 105

His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 106

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 106

Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp

1 5 10

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 107

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 108

Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser

1 5

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 109

Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 110

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 110

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 111

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 111

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys

1

5

10

15

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

20

25

30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

65

70

75

80

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

85

90

95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100

105

<210> 112

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 112

Val Tyr Gly Met Asn

1

5

<210> 113

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 113

Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 114

Asp Leu Arg Thr Gly Pro Phe Asp Tyr

1 5

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 115

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His

1 5 10

<210> 116

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 116

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser

1 5

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 117

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 118

<211> 713

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 118

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Gly Asp Glu Ser Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val

65 70 75 80

Ser Leu Lys Ile Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe

85 90 95

Cys Ala Arg Asn Arg Tyr Asp Pro Pro Trp Phe Val Asp Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp

 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly

 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu

 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

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

 465 470 475 480
 Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 485 490 495
 Tyr Val Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 500 505 510
 Gln Ser Leu Glu Trp Met Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Glu Thr
 515 520 525
 Leu Tyr Asn His Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Val Thr Val Asp Lys

 530 535 540
 Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp
 545 550 555 560
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr
 565 570 575
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 580 585 590
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp

 595 600 605
 Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 610 615 620
 Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala Val
 625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr Phe

690 695 700

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

705 710

<210> 119

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 119

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Gln

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 120
 <211> 711
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 120
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
 20 25 30

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

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

				340				345				350			
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
355				360				365							
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
370				375				380							
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385				390				395				400			
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
405				410				415							
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
420				425				430							
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Ala
435				440				445							
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
450				455				460							
Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys
465				470				475				480			
Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Val
485				490				495							
Phe	Thr	Asp	Tyr	Tyr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Cys
500				505				510							
Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Asp	Ile	Asn	Pro	Asn	Asn	Ala	Glu	Thr	Leu	Tyr
515				520				525							
Asn	His	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Val	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ile
530				535				540							
Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala
545				550				555				560			
Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Lys	Trp	Gly	Asp	Gly	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly
565				570				575							
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
580				585				590							

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
595 600 605

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
610 615 620

Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ala Ala Val Ala Trp
625 630 635 640

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Val
645 650 655

Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
660 665 670

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile
675 680 685

Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Thr Phe Gly Cys
690 695 700

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
705 710

<210> 121

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 121

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

65					70					75					80
Glu	Asp	Ala	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Phe
85					90					95					
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
100					105					110					
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
115					120					125					
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
130					135					140					
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145					150					155					160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
165					170					175					
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
180					185					190					
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
195					200					205					
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
210															
<210>	122														
<211>	20														
<212>	PRT														
<213>	Artificial Sequence														
<220><223>	synthetic														
<400>	122														
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
1					5					10					15
Gly	Gly	Gly	Ser												
20															