



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월06일

(11) 등록번호 10-2761886

(24) 등록일자 2025년01월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) **G01N 33/68** (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7005653
- (22) 출원일자(국제) 2016년07월28일
 심사청구일자 2021년07월13일
- (85) 번역문제출일자 2018년02월26일
- (65) 공개번호 10-2018-0034588
- (43) 공개일자 2018년04월04일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/044430
- (87) 국제공개번호 WO 2017/019846
 국제공개일자 2017년02월02일
- (30) 우선권주장
 62/198,867 2015년07월30일 미국(US)
 (뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
 KR1020100054780 A

- (73) 특허권자
마크로제닉스, 인크.
 미국 메릴랜드주 20850 록빌 메디칼 센터 드라이브 9704
- (72) 발명자
샤아 칼파나
 미국 메릴랜드 20841 보이즈 에텔 로즈 웨이 13013
스미스 더글라스 에이치.
 미국 캘리포니아 94403 샌 마티오 더블유. 힐스테일 불리바드 429
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 80 항

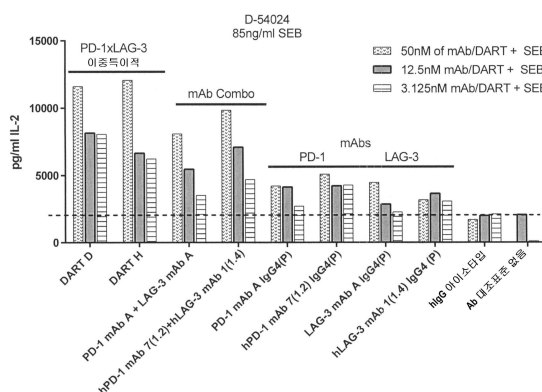
심사관 : 김윤선

(54) 발명의 명칭 PD-1-결합 분자 및 그것의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 두 가지, 시노물구스 원숭이 PD-1 및 인간 PD-1: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15항-PD-1 항체에 결합할 수 있는 선택된 항-PD-1 항체, 및 이러한 항체의 인간화된 및 키메라 버전에 관한 것이다. 발명은 추가적으로 이러한 항-PD-1 항체의 PD-1 결합 단편을 포함하는 PD-1-결합 분자, 면역컨쥬게이트, 및, 디아바디, BiTEs, 이중특이적 항체, 등을 포함하여 (i) 이러한 PD-1-결합 단편 및 (ii) 면역 세포의 표면 상에 존재하는 면역 체크포인트를 조절하는데 관여하는 분자의 에피토프에 결합할 수 있는 도메인을 포함하는 이중특이적 분자에 관한 것이다. 본 발명은 또한 면역 반응을 자극하기 위해 PD-1에 결합하는 분자를 사용하는 방법, 뿐만 아니라 PD-1을 검출하는 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

G01N 33/574 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
G01N 2333/70596 (2013.01)

(72) 발명자

라 모테-모스 로스

미국 메릴랜드 20841 보이즈 셰퍼 로드 16000

존슨 레슬리 에스.

미국 메릴랜드 20874 단스타운 포플라 힐 로드
 14411

무어 폴 에이.

미국 메릴랜드 20878 노스 포토맥 터얼리 코오트
 10

본비니 예지오

미국 메릴랜드 20854 포토맥 파우더 혼 드라이브
 11136

콰니그 스코트

미국 메릴랜드 20852 록빌 랄스톤 로드 10901

(30) 우선권주장

62/239,559	2015년10월09일	미국(US)
62/255,140	2015년11월13일	미국(US)
62/322,974	2016년04월15일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

가변 중쇄 도메인 및 가변 경쇄 도메인을 포함하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체로서,
상기 가변 중쇄 도메인은 CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인 및 CDR_{H3} 도메인을 포함하고, 상기 가변 경쇄 도메인은 CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인 및 CDR_{L3} 도메인을 포함하며,

(1) CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인 및 CDR_{H3} 도메인은 hPD-1 mAb 7(1.2)의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:140, 및 SEQ ID NO:141을 포함하며;

(2) CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인 및 CDR_{L3} 도메인은 hPD-1 mAb 7(1.2)의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:145, 및 SEQ ID NO:146을 포함하는,

항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는 키메라 항체 또는 인간화된 항체인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체는

SEQ ID NO:147의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및

SEQ ID NO:153의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인

을 포함하는 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체는 Fc 영역을 포함하고,

(a) 상기 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 아이소타입의 것이며;

(b) 상기 분자는 힌지 도메인을 추가적으로 포함하고; 및/또는

(c) 상기 Fc 영역은 IgG4 Fc 도메인이며 상기 항체는 안정화 돌연변이를 포함하는 IgG4 힌지 도메인을 추가적으로 포함하는

것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 항체는

SEQ ID NO:264 및 265를 포함하는 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 항체는 SEQ ID NO: 264 및 266을 포함하는 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 Fc 영역은:

- (a) Fc γ R에 대한 변종 Fc 영역의 친화성을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 변형; 및/또는
 - (b) 변종 Fc 영역의 혈청 반감기를 향상시키는 하나 이상의 아미노산 변형
- 을 포함하는 변종 Fc 영역인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 8

제7항에 있어서,

- (A) Fc γ R에 대한 변종 Fc 영역의 친화성을 감소시키는 상기 변형은 L234A; L235A; 또는 L234A 및 L235A의 치환을 포함하고, 상기 넘버링은 Kabat에서와 같이 EU 색인의 넘버링이며; 또는
- (B) 변종 Fc 영역의 혈청 반감기를 향상시키는 상기 변형은 M252Y; M252Y 및 S254T; M252Y 및 T256E; M252Y, S254T 및 T256E; 또는 K288D 및 H435K의 치환을 포함하고, 상기 넘버링은 Kabat에서와 같이 EU 색인의 넘버링인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 9

제1항 또는 제2항의 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 또는 감염의 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 10

제4항의 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 또는 감염의 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 11

제5항의 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 또는 감염의 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 12

제6항의 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 또는 감염의 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 13

제8항의 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 또는 감염의 치료에 사용하기 위한 조성물.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 분자는:

- (A) 그것을 필요로 하는 대상체의 T-세포 매개 면역 반응을 자극하기 위해; 또는
 - (B) 억제된 면역계와 관련된 질환 또는 상태의 치료에
- 사용되는 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 15

제4항에 있어서, 상기 분자는:

- (A) 그것을 필요로 하는 대상체의 T-세포 매개 면역 반응을 자극하기 위해; 또는
 - (B) 억제된 면역계와 관련된 질환 또는 상태의 치료에
- 사용되는 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 16

제5항에 있어서, 상기 분자는:

- (A) 그것을 필요로 하는 대상체의 T-세포 매개 면역 반응을 자극하기 위해; 또는
- (B) 억제된 면역계와 관련된 질환 또는 상태의 치료에

사용되는 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 17

제6항에 있어서, 상기 분자는:

- (A) 그것을 필요로 하는 대상체의 T-세포 매개 면역 반응을 자극하기 위해; 또는
- (B) 억제된 면역계와 관련된 질환 또는 상태의 치료에

사용되는 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 18

제8항에 있어서, 상기 분자는:

- (A) 그것을 필요로 하는 대상체의 T-세포 매개 면역 반응을 자극하기 위해; 또는
- (B) 억제된 면역계와 관련된 질환 또는 상태의 치료에

사용되는 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 19

제14항에 있어서, 질환 또는 상태는 암 또는 감염인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 20

제15항에 있어서, 질환 또는 상태는 암 또는 감염인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 21

제16항에 있어서, 질환 또는 상태는 암 또는 감염인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 22

제17항에 있어서, 질환 또는 상태는 암 또는 감염인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 23

제18항에 있어서, 질환 또는 상태는 암 또는 감염인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 24

제19항에 있어서, 상기 암은 부신 종양, AIDS-관련 암, 포상 연부 육종, 성상세포 종양, 방광암, 골암, 뇌척수암, 전이성 뇌 종양, 유방암, 경동맥체 종양, 자궁경부암, 연골 육종, 척색종, 난염성 신장 세포 암종, 투명 세포 암종, 결장암, 대장암, 피부 양성 섬유성 조직구종, 결체조직 작은 원형 세포 종양, 상의세포종, 유잉 종양, 골의 점액성 연골 육종, 골성 불완전 섬유원증, 섬유성 골 이형성증, 담낭암 또는 담관암, 위암, 임신성 용모성 질환, 생식세포종, 두경부암, 간세포 암종, 도세포 종양, 카포시 육종, 신장암, 백혈병, 지방종/양성 지방종성 종양, 지방육종/악성 지방종성 종양, 간암, 림프종, 폐암, 수모세포종, 흑색종, 뇌수막종, 다발성 내분비 종양증, 다발성 골수종, 골수 이형성 증후군, 신경아세포종, 신경 내분비 종양, 난소암, 췌장암, 유두 갑상선 암종, 부갑상선 종양, 소아 암, 말초 신경집 종양, 크롬 친화성 세포종, 뇌하수체 종양, 전립선암, 후부 포도막 흑색

중, 희귀성 혈액 질환, 전이성 신장암, 횡문근양 종양, 횡문근육종, 육종, 피부암, 연부 조직 육종, 편평세포암, 위암, 활막육종, 고환암, 흉선암, 흉선종, 전이성 갑상선암, 및 자궁암의 세포로 구성된 군으로부터 선택된 암 세포의 존재가 특징이고, 선택적으로 상기 암은 대장암, 간세포 암종, 신경교종, 신장암, 유방암, 다발성 골수종, 방광암, 신경아세포종; 육종, 비-호지킨 림프종, 비-소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 직장암, 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 B 림프아구성 백혈병 (B-ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 모세포 백혈병 (HCL), 출아형 형질세포양 수지상세포 신생물 (BPDCN), 맨틀 세포 백혈병 (MCL) 및 소림프구성 림프종 (SLL)을 포함하는 비-호지킨 림프종 (NHL), 호지킨 림프종, 전신성 비만세포증 또는 버킷 림프종인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 25

제20항에 있어서, 상기 암은 부신 종양, AIDS-관련 암, 포상 연부 육종, 성상세포 종양, 방광암, 골암, 뇌척수암, 전이성 뇌 종양, 유방암, 경동맥체 종양, 자궁경부암, 연골 육종, 척색종, 난염성 신장 세포 암종, 투명 세포 암종, 결장암, 대장암, 피부 양성 섬유성 조직구종, 결체조직 작은 원형 세포 종양, 상의세포종, 유잉 종양, 골외 점액성 연골 육종, 골성 불완전 섬유원증, 섬유성 골 이형성증, 담낭암 또는 담관암, 위암, 임신성 용모성 질환, 생식세포종, 두경부암, 간세포 암종, 도세포 종양, 카포시 육종, 신장암, 백혈병, 지방종/양성 지방종성 종양, 지방육종/악성 지방종성 종양, 간암, 림프종, 폐암, 수모세포종, 흑색종, 뇌수막종, 다발성 내분비 종양증, 다발성 골수종, 골수 이형성 증후군, 신경아세포종, 신경 내분비 종양, 난소암, 췌장암, 유두 갑상선 암종, 부갑상선 종양, 소아 암, 말초 신경집 종양, 크롬 친화성 세포종, 뇌하수체 종양, 전립선암, 후부 포도막 흑색종, 희귀성 혈액 질환, 전이성 신장암, 횡문근양 종양, 횡문근육종, 육종, 피부암, 연부 조직 육종, 편평세포암, 위암, 활막육종, 고환암, 흉선암, 흉선종, 전이성 갑상선암, 및 자궁암의 세포로 구성된 군으로부터 선택된 암 세포의 존재가 특징이고, 선택적으로 상기 암은 대장암, 간세포 암종, 신경교종, 신장암, 유방암, 다발성 골수종, 방광암, 신경아세포종; 육종, 비-호지킨 림프종, 비-소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 직장암, 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 B 림프아구성 백혈병 (B-ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 모세포 백혈병 (HCL), 출아형 형질세포양 수지상세포 신생물 (BPDCN), 맨틀 세포 백혈병 (MCL) 및 소림프구성 림프종 (SLL)을 포함하는 비-호지킨 림프종 (NHL), 호지킨 림프종, 전신성 비만세포증 또는 버킷 림프종인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 26

제21항에 있어서, 상기 암은 부신 종양, AIDS-관련 암, 포상 연부 육종, 성상세포 종양, 방광암, 골암, 뇌척수암, 전이성 뇌 종양, 유방암, 경동맥체 종양, 자궁경부암, 연골 육종, 척색종, 난염성 신장 세포 암종, 투명 세포 암종, 결장암, 대장암, 피부 양성 섬유성 조직구종, 결체조직 작은 원형 세포 종양, 상의세포종, 유잉 종양, 골외 점액성 연골 육종, 골성 불완전 섬유원증, 섬유성 골 이형성증, 담낭암 또는 담관암, 위암, 임신성 용모성 질환, 생식세포종, 두경부암, 간세포 암종, 도세포 종양, 카포시 육종, 신장암, 백혈병, 지방종/양성 지방종성 종양, 지방육종/악성 지방종성 종양, 간암, 림프종, 폐암, 수모세포종, 흑색종, 뇌수막종, 다발성 내분비 종양증, 다발성 골수종, 골수 이형성 증후군, 신경아세포종, 신경 내분비 종양, 난소암, 췌장암, 유두 갑상선 암종, 부갑상선 종양, 소아 암, 말초 신경집 종양, 크롬 친화성 세포종, 뇌하수체 종양, 전립선암, 후부 포도막 흑색종, 희귀성 혈액 질환, 전이성 신장암, 횡문근양 종양, 횡문근육종, 육종, 피부암, 연부 조직 육종, 편평세포암, 위암, 활막육종, 고환암, 흉선암, 흉선종, 전이성 갑상선암, 및 자궁암의 세포로 구성된 군으로부터 선택된 암 세포의 존재가 특징이고, 선택적으로 상기 암은 대장암, 간세포 암종, 신경교종, 신장암, 유방암, 다발성 골수종, 방광암, 신경아세포종;육종, 비-호지킨 림프종, 비-소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 직장암, 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 B 림프아구성 백혈병 (B-ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 모세포 백혈병 (HCL), 출아형 형질세포양 수지상세포 신생물 (BPDCN), 맨틀 세포 백혈병 (MCL) 및 소림프구성 림프종 (SLL)을 포함하는 비-호지킨 림프종 (NHL), 호지킨 림프종, 전신성 비만세포증 또는 버킷 림프종인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 27

제22항에 있어서, 상기 암은 부신 종양, AIDS-관련 암, 포상 연부 육종, 성상세포 종양, 방광암, 골암, 뇌척수암, 전이성 뇌 종양, 유방암, 경동맥체 종양, 자궁경부암, 연골 육종, 척색종, 난염성 신장 세포 암종, 투명 세포 암종, 결장암, 대장암, 피부 양성 섬유성 조직구종, 결체조직 작은 원형 세포 종양, 상의세포종, 유잉 종양, 골외 점액성 연골 육종, 골성 불완전 섬유원증, 섬유성 골 이형성증, 담낭암 또는 담관암, 위암, 임신성 용모성

질환, 생식세포종, 두경부암, 간세포 암종, 도세포 종양, 카포시 육종, 신장암, 백혈병, 지방종/양성 지방종성 종양, 지방육종/악성 지방종성 종양, 간암, 림프종, 폐암, 수모세포종, 흑색종, 뇌수막종, 다발성 내분비 종양 증, 다발성 골수종, 골수 이형성 증후군, 신경아세포종, 신경 내분비 종양, 난소암, 췌장암, 유두 갑상선 암종, 부갑상선 종양, 소아 암, 말초 신경집 종양, 크롬 친화성 세포종, 뇌하수체 종양, 전립선암, 후부 포도막 흑색 종, 희귀성 혈액 질환, 전이성 신장암, 횡문근양 종양, 횡문근육종, 육종, 피부암, 연부 조직 육종, 편평세포암, 위암, 활막육종, 고환암, 흉선암, 흉선종, 전이성 갑상선암, 및 자궁암의 세포로 구성된 군으로부터 선택된 암 세포의 존재가 특징이고, 선택적으로 상기 암은 대장암, 간세포 암종, 신경교종, 신장암, 유방암, 다발성 골수종, 방광암, 신경아세포종; 육종, 비-호지킨 림프종, 비-소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 직장암, 급 성 골수성 백혈병 (AML), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 B 림프아구성 백혈병 (B-ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 모세포 백혈병 (HCL), 출아형 형질세포양 수지상세포 신생물 (BPDCN), 맨틀 세포 백혈병 (MCL) 및 소림 프구성 림프종 (SLL)을 포함하는 비-호지킨 림프종 (NHL), 호지킨 림프종, 전신성 비만세포종 또는 버킷 림프종 인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 28

제23항에 있어서, 상기 암은 부신 종양, AIDS-관련 암, 포상 연부 육종, 성상세포 종양, 방광암, 골암, 뇌척수 암, 전이성 뇌 종양, 유방암, 경동맥체 종양, 자궁경부암, 연골 육종, 척색종, 단염성 신장 세포 암종, 투명 세 포 암종, 결장암, 대장암, 피부 양성 섬유성 조직구종, 결체조직 작은 원형 세포 종양, 상의세포종, 유잉 종양, 골외 점액성 연골 육종, 골성 불완전 섬유원증, 섬유성 골 이형성증, 담낭암 또는 담관암, 위암, 임신성 용모성 질환, 생식세포종, 두경부암, 간세포 암종, 도세포 종양, 카포시 육종, 신장암, 백혈병, 지방종/양성 지방종성 종양, 지방육종/악성 지방종성 종양, 간암, 림프종, 폐암, 수모세포종, 흑색종, 뇌수막종, 다발성 내분비 종양 증, 다발성 골수종, 골수 이형성 증후군, 신경아세포종, 신경 내분비 종양, 난소암, 췌장암, 유두 갑상선 암종, 부갑상선 종양, 소아 암, 말초 신경집 종양, 크롬 친화성 세포종, 뇌하수체 종양, 전립선암, 후부 포도막 흑색 종, 희귀성 혈액 질환, 전이성 신장암, 횡문근양 종양, 횡문근육종, 육종, 피부암, 연부 조직 육종, 편평세포암, 위암, 활막육종, 고환암, 흉선암, 흉선종, 전이성 갑상선암, 및 자궁암의 세포로 구성된 군으로부터 선택된 암 세포의 존재가 특징이고, 선택적으로 상기 암은 대장암, 간세포 암종, 신경교종, 신장암, 유방암, 다발성 골수종, 방광암, 신경아세포종;육종, 비-호지킨 림프종, 비-소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 직장암, 급 성 골수성 백혈병 (AML), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 B 림프아구성 백혈병 (B-ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 모세포 백혈병 (HCL), 출아형 형질세포양 수지상세포 신생물 (BPDCN), 맨틀 세포 백혈병 (MCL) 및 소림 프구성 림프종 (SLL)을 포함하는 비-호지킨 림프종 (NHL), 호지킨 림프종, 전신성 비만세포종 또는 버킷 림프종 인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 29

제19항에 있어서, 암은 자궁암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 30

제19항에 있어서, 암은 편평세포암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 31

제19항에 있어서, 암은 신경교종인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 32

제19항에 있어서, 암은 자궁경부암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 33

제19항에 있어서, 암은 신장암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 34

제19항에 있어서, 암은 폐암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 35

제19항에 있어서, 암은 비-소세포 폐암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 36

제19항에 있어서, 암은 두경부암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 37

제19항에 있어서, 암은 전이성 신장암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 38

제19항에 있어서, 암은 난염성 신장 세포 암종인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 39

제20항에 있어서, 암은 자궁암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 40

제20항에 있어서, 암은 편평세포암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 41

제20항에 있어서, 암은 신경교종인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 42

제20항에 있어서, 암은 자궁경부암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 43

제20항에 있어서, 암은 신장암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 44

제20항에 있어서, 암은 폐암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 45

제20항에 있어서, 암은 비-소세포 폐암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 46

제20항에 있어서, 암은 두경부암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 47

제20항에 있어서, 암은 전이성 신장암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 48

제20항에 있어서, 암은 난염성 신장 세포 암종인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 49

제21항에 있어서, 암은 자궁암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 50

제21항에 있어서, 암은 편평세포암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 51

제21항에 있어서, 암은 신경교종인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 52

제21항에 있어서, 암은 자궁경부암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 53

제21항에 있어서, 암은 신장암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 54

제21항에 있어서, 암은 폐암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 55

제21항에 있어서, 암은 비-소세포 폐암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 56

제21항에 있어서, 암은 두경부암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 57

제21항에 있어서, 암은 전이성 신장 세포 암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 58

제21항에 있어서, 암은 난염성 신장 세포 암종인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 59

제22항에 있어서, 암은 자궁암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 60

제22항에 있어서, 암은 편평세포암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 61

제22항에 있어서, 암은 신경교종인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 62

제22항에 있어서, 암은 자궁경부암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 63

제22항에 있어서, 암은 신장암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 64

제22항에 있어서, 암은 폐암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 65

제22항에 있어서, 암은 비-소세포 폐암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 66

제22항에 있어서, 암은 두경부암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 67

제22항에 있어서, 암은 전이성 신장 암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 68

제22항에 있어서, 암은 난염성 신장 세포 암종인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 69

제23항에 있어서, 암은 자궁암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 70

제23항에 있어서, 암은 편평세포암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 71

제23항에 있어서, 암은 신경교종인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 72

제23항에 있어서, 암은 자궁경부암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 73

제23항에 있어서, 암은 신장암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 74

제23항에 있어서, 암은 폐암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 75

제23항에 있어서, 암은 비-소세포 폐암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 76

제23항에 있어서, 암은 두경부암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 77

제23항에 있어서, 암은 전이성 신장 암인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 78

제23항에 있어서, 암은 난염성 신장 세포 암종인 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 79

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체는 검출가능하게 표시되어 PD-1의 검출에 사용되는 것을 특징으로 하는 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체.

청구항 80

제1항 또는 제2항의 항-인간 PD-1-결합 단일특이적 단클론성 항체를 암호화하는 핵산 발현 벡터.

발명의 설명

기술분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 미국 특허 출원 일련 번호 62/198,867 (2015년 7월 30일에 출원됨; 계류 중), 62/239,559 (2015년 10월 9일에 출원됨; 계류 중), 62/255,140 (2015년 11월 13일에 출원됨; 계류 중) 및 62/322,974 (2016년 4월 15일에 출원됨; 계류 중)의 우선권을 주장하며, 각 출원은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 서열목록에 대한 참조

[0004] 본 출원은 37 C.F.R. 1.821 et seq.에 의해 하나 이상의 서열 목록을 포함하고, 이것들은 컴퓨터로 판독 가능한 매체로 개시되며(파일명: 1301_0122PCT_Sequence_Listing_ST25.txt, 2016년 7월 1일 생성됨, 282,789 바이트의 크기를 가짐), 이 파일은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0005] 기술분야

[0006] 본 발명은 시노몰구스 원숭이(cynomolgus monkey) PD-1 및 인간 PD-1 둘 다에 결합할 수 있는 선택된 항-PD-1 항체: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15의 PD-1-결합 도메인을 포함하는 PD-1 결합 분자에 관한 것이다. 발명은 특히 이러한 항체의 인간화된 또는 키메라 버전이거나, 또는 이러한 항-PD-1 항체의 PD-1 결합-단편 (특히 면역조절제, 디아바디, BiTE, 이중특이적 항체, 등)을 포함하는 PD-1 결합 분자에 관한 것이다. 발명은 특히 면역 세포의 표면 상에 존재하는 면역 체크포인트(check point)를 조절하는데 관여하는 분자의 에피토프에 추가적으로 결합할 수 있는 이러한 PD-1-결합 분자에 관한 것이다. 본 발명은 또한 PD-1을 검출하거나 또는 면역 반응을 자극하기 위해 이러한 PD-1 결합 분자를 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 선택된 항-PD-1 항체의 하나 이상의 PD-1-결합 도메인(들)을 포함하는 PD-1-결합 분자가 면역 반응을 자극하는 데 효과적인 하나 이상의 추가적인 분자와 조합하여 및/또는 특이적으로 암 항원에 결합하는 하나 이상의 추가적인 분자와 조합하여 투여되는 조합 치료법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] I. 세포 매개 면역 반응

[0008] 인간 및 다른 포유동물의 면역계는 감염 및 질환에 대한 보호를 제공할 책임을 가진다. 이러한 보호는 체액 면역 반응 및 세포 매개 면역 반응 둘 다에 의해 제공된다. 체액 반응은 외래 표적 (항원)을 인식하고 중화시킬 수 있는 항체 및 다른 생체분자의 생산을 초래한다. 반대로, 세포 매개 면역 반응은 T 세포에 의한 대식세포, 자연 살해 세포 (NK), 및 항원-특이적 세포독성 T-림프구의 활성화, 및 항원의 인식에 반응하여 다양한 사이토카인의 방출을 포함한다 (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules," Immunolog. Res. 28(1):39-48).

[0009] 항원에 대한 면역 반응을 최적으로 매개하는 T 세포의 능력은 두 가지 별개의 신호전달 상호작용을 필요로 한다 (Viglietta, V. et al. (2007) "Modulating Co-Stimulation," Neurotherapeutics 4:666-675; Korman, A.J. et al. (2007) "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy," Adv. Immunol. 90:297-339). 첫 번째로, 항원 제공 세포 (APC)의 표면 상에 배열된 항원이 항원-특이적 나이브(naive) CD4⁺ T 세포에 제공되어야 한다. 이러한 제공은 T 세포가 제공된 항원에 특이적인 면역 반응을 시작하도록 지시하는 T 세포 수용체 (TCR)를 통해 신호를 전달한다. 두 번째로, APC와 별개의 T 세포 표면 분자 간의 상호작용을 통해 매개되는 일련의 동시자극 및 억제 신호는 T 세포의 활성화 및 증식을 촉발하여 궁극적으로는 그것들의 억제를 촉발한다. 따라서, 제1 신호는 면역 반응에 대한 특이성을 부여하는 반면 제2 신호는 반응의 성질, 규모 및 기간을 결정하는 역할을 한다.

[0010] 면역계는 동시자극 및 동시억제 리간드 및 수용체에 의해 엄격하게 제어된다. 이 분자들은 T 세포 활성화를 위해 제2 신호를 제공하고 양성 및 음성 신호의 균형 잡힌 네트워크를 제공하여 감염에 대한 면역 반응을 최대화하는 한편 스스로에 대한 면역력을 제한한다 (Wang, L. et al. (March 7, 2011) "VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T-Cell Responses," J. Exp. Med. 10.1084/jem.20100619:1-16; Lepenies, B. et al. (2008) "The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections," Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets 8:279-288). 항원 제공 세포의 B7.1 (CD80) 및 B7.2 (CD86) 리간드와 CD4⁺ T-림프구의 CD28 및 CTLA-4 수용체 간의 결합이 특히 중요하다 (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The

B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Dong, C. *et al.* (2003) "*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*," *Immunolog. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P.S. *et al.* (2009) "*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation*," *Immunol. Rev.* 229:307-321). CD28에 대한 B7.1 또는 B7.2의 결합은 T 세포 활성화를 자극하고; CTLA-4에 대한 B7.1 또는 B7.2의 결합은 이러한 활성화를 억제한다 (Dong, C. *et al.* (2003) "*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*," *Immunolog. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P.S. *et al.* (2009) "*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation*," *Immunol. Rev.* 229:307-321; Greenwald, R.J. *et al.* (2005) "*The B7 Family Revisited*," *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548). CD28은 구성적으로 T 세포의 표면 상에서 발현되는 반면 (Gross, J., *et al.* (1992) "*Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse*," *J. Immunol.* 149:380-388), CTLA-4 발현은 T 세포 활성화 이후 빠르게 상향조절된다 (Linsley, P. *et al.* (1996) "*Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement*," *Immunity* 4:535-543). CTLA-4가 더 높은 친화도의 수용체이기 때문에 (Sharpe, A.H. *et al.* (2002) "*The B7-CD28 Superfamily*," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126), 결합은 T 세포 증식을 먼저 시작한 다음 (CD28을 통해) 그것을 억제하고 (CTLA-4의 초기 발현을 통해), 그로써 증식이 더 이상 필요하지 않을 때 효과를 약화시킨다.

- [0011] CD28 수용체의 리간드에 대한 추가의 조사는 관련된 B7 분자의 세트 ("B7 슈퍼패밀리(Superfamily)")의 확인 및 특성화로 이어졌다 (Coyle, A.J. *et al.* (2001) "*The Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T-Cell Function*," *Nature Immunol.* 2(3):203-209; Sharpe, A.H. *et al.* (2002) "*The B7-CD28 Superfamily*," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Greenwald, R.J. *et al.* (2005) "*The B7 Family Revisited*," *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548; Collins, M. *et al.* (2005) "*The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands*," *Genome Biol.* 6:223.1-223.7; Loke, P. *et al.* (2004) "*Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T-Cells*," *Arthritis Res. Ther.* 6:208-214; Korman, A.J. *et al.* (2007) "*Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy*," *Adv. Immunol.* 90:297-339; Flies, D.B. *et al.* (2007) "*The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity*," *J. Immunother.* 30(3):251-260; Agarwal, A. *et al.* (2008) "*The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance*," *Curr. Opin. Organ Transplant.* 13:366-372; Lenschow, D.J. *et al.* (1996) "*CD28/B7 System of T-Cell Costimulation*," *Ann. Rev. Immunol.* 14:233-258; Wang, S. *et al.* (2004) "*Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses*," *Microbes Infect.* 6:759-766). 현재 패밀리의 여러 구성원들이 공지되어 있다: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), 유도성 동시자극자 리간드 (ICOS-L), 예정된 사멸-1 리간드 (PD-L1; B7-H1), 예정된 사멸-2 리간드 (PD-L2; B7-DC), B7-H3, B7-H4 및 B7-H6 (Collins, M. *et al.* (2005) "*The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands*," *Genome Biol.* 6:223.1-223.7; Flajnik, M.F. *et al.* (2012) "*Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC*," *Immunogenetics* epub doi.org/10.1007/s00251-012-0616-2).

[0012] **II. 예정된 사멸-1 ("PD-1")**

- [0013] 예정된 사멸-1 ("PD-1", 또한 "CD279"로도 알려짐)은 면역 반응을 광범위하게 부정적으로 조절하는 T 세포 조절자의 연장된 CD28/CTLA-4 패밀리의 대략 31 kD의 제1형 막 단백질 구성원이다 (Ishida, Y. *et al.* (1992) "*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death*," *EMBO J.* 11:3887-3895; 미국 특허 출원 공개 번호 2007/0202100; 2008/0311117; 2009/00110667; 미국 특허 번호 6,808,710; 7,101,550; 7,488,802; 7,635,757; 7,722,868; PCT 공개 번호 WO 01/14557).

- [0014] PD-1은 활성화된 T 세포, B 세포 및 단핵세포상에서 발현되고 (Agata, Y. *et al.* (1996) "*Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes*," *Int. Immunol.* 8(5):765-772; Yamazaki, T. *et al.* (2002) "*Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T-Cells And APC*," *J. Immunol.* 169:5538-5545) 자연 살해 (NK) T 세포에서 저수준으로 발현된다 (Nishimura, H. *et al.* (2000) "*Facilitation Of Beta Selection And Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice*," *J. Exp. Med.* 191:891-898; Martin-Orozco, N. *et al.* (2007) "*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*," *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298).

- [0015] PD-1의 세포외 영역은 CTLA-4의 등가 도메인에 대해 23%의 동일성을 가지는 단일 면역글로불린 (Ig)V 도메인으로 구성된다 (Martin-Orozco, N. *et al.* (2007) "*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*," *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298). 세포외 IgV 도메인에 이어 경막 영역 및 세포내 테일이 있다. 세포내 테일은 면

역수용체 타이로신-기반 억제 모티프 및 면역수용체 타이로신-기반 스위치 모티프에 위치한 두 인산화 부위를 함유하고, 그것은 PD-1이 TCR 신호를 부정적으로 조절하는 것을 시사한다 (Ishida, Y. *et al.* (1992) "*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death*," EMBO J. 11:3887-3895; Blank, C. *et al.* (2006) "*Contribution Of The PD-L1/PD-1 Pathway To T-Cell Exhaustion: An Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion Cancer*," Immunol. Immunother. 56(5):739-745).

[0016] PD-1은 B7-H1 및 B7-DC에 결합함으로써 면역 시스템의 억제를 매개한다 (Flies, D.B. *et al.* (2007) "*The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity*," J. Immunother. 30(3):251-260; 미국 특허 번호 6,803,192; 7,794,710; 미국 특허 출원 공개 번호 2005/0059051; 2009/0055944; 2009/0274666; 2009/0313687; PCT 공개 번호 WO 01/39722; WO 02/086083).

[0017] B7-H1 및 B7-DC는 인간 및 쥐과의 조직, 예컨대 심장, 태반, 근육, 태아 간, 비장, 림프절 및 흉선뿐 아니라 쥐과의 간, 폐, 신장, 췌장의 도세포(islet cell) 및 소장 표면에서 광범위하게 발현된다 (Martin-Orozco, N. *et al.* (2007) "*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*," Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298). 인간에서, B7-H1 단백질 발현은 인간 내피 세포에서 (Chen, Y. *et al.* (2005) "*Expression of B7-H1 in Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells*," Nephron. Exp. Nephrol. 102:e81-e92; de Haij, S. *et al.* (2005) "*Renal Tubular Epithelial Cells Modulate T-Cell Responses Via ICOS-L And B7-H1*" Kidney Int. 68:2091-2102; Mazanet, M.M. *et al.* (2002) "*B7-H1 Is Expressed By Human Endothelial Cells And Suppresses T-Cell Cytokine Synthesis*," J. Immunol. 169:3581-3588), 심근에서 (Brown, J.A. *et al.* (2003) "*Blockade Of Programmed Death-1 Ligands On Dendritic Cells Enhances T-Cell Activation And Cytokine Production*," J. Immunol. 170:1257-1266), 합포체영양세포에서 (Petroff, M.G. *et al.* (2002) "*B7 Family Molecules: Novel Immunomodulators At The Maternal-Fetal Interface*," Placenta 23:S95-S101) 발견되었다. 분자들은 또한 일부 조직의 상주 대식세포들(resident macrophages)에 의해, 인터페론 (IFN)- γ 또는 종양 괴사 인자 (TNF)- α 로 활성화된 대식세포들에 의해 (Latchman, Y. *et al.* (2001) "*PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation*," Nat. Immunol. 2:261-268), 및 종양에서 (Dong, H. (2003) "*B7-H1 Pathway And Its Role In The Evasion Of Tumor Immunity*," J. Mol. Med. 81:281-287) 발현된다.

[0018] B7-H1과 PD-1 사이의 상호작용은 T와 B 세포에 대한 중대한 네거티브 동시자극 신호를 제공하는 것으로 밝혀졌고 (Martin-Orozco, N. *et al.* (2007) "*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*," Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298) 세포 사멸 유도자로서 기능한다 (Ishida, Y. *et al.* (1992) "*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death*," EMBO J. 11:3887-3895; Subudhi, S.K. *et al.* (2005) "*The Balance Of Immune Responses: Costimulation Versus Coinhibition*," J. Molec. Med. 83:193-202). 보다 구체적으로, 저농도의 PD-1 수용체와 B7-H1 리간드 사이의 상호작용은 항원-특이적 CD8⁺ T-세포의 증식을 강력하게 억제하는 억제 신호의 전파를 초래하는 것으로 밝혀졌고; 고농도에서 PD-1과의 상호작용은 T-세포 증식을 억제하지는 않지만 다중 사이토카인의 생성을 현저하게 감소시킨다 (Sharpe, A.H. *et al.* (2002) "*The B7-CD28 Superfamily*," Nature Rev. Immunol. 2:116-126). 휴지기 및 전에 활성화된 CD4 및 CD8 T-세포 둘 다에 의한, 심지어 제대혈로부터의 나이브 T 세포에 의한 T-세포 증식 및 사이토카인 생성은 가용성 B7-H1-Fc 융합 단백질에 의해 억제되는 것으로 밝혀졌다 (Freeman, G.J. *et al.* (2000) "*Engagement Of The PD-1 Immunoinhibitory Receptor By A Novel B7 Family Member Leads To Negative Regulation Of Lymphocyte Activation*," J. Exp. Med. 192:1-9; Latchman, Y. *et al.* (2001) "*PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation*," Nature Immunol. 2:261-268; Carter, L. *et al.* (2002) "*PD-1:PD-L Inhibitory Pathway Affects Both CD4(+) and CD8(+) T-cells And Is Overcome By IL-2*," Eur. J. Immunol. 32(3):634-643; Sharpe, A.H. *et al.* (2002) "*The B7-CD28 Superfamily*," Nature Rev. Immunol. 2:116-126).

[0019] T 세포 활성화 및 증식을 억제하는 데 있어 B7-H1 및 PD-1의 역할은 이 분자들이 염증 및 암의 치료를 위한 치료제로서 작용할 것임을 시사한다. 그로써, 감염 및 종양을 치료하고 적응성 면역 반응을 상향-조절하기 위한 항-PD-1 항체들의 사용이 제안되었다 (미국 특허 출원 공개 번호 2010/0040614; 2010/0028330; 2004/0241745; 2008/0311117; 2009/0217401; 미국 특허 번호 7,521,051; 7,563,869; 7,595,048; PCT 공개 번호 WO 2004/056875; WO 2008/083174 참조). PD-1에 특이적으로 결합할 수 있는 항체들은 문헌에 보고되었다: Agata, T. *et al.* (1996) "*Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes*," Int. Immunol. 8(5):765-772; 및 Berger, R. *et al.* (2008) "*Phase I Safety And*

Pharmacokinetic Study Of CT-011, A 인간화된Antibody Interacting With PD-1, In Patients With Advanced Hematologic Malignancies," Clin. Cancer Res. 14(10):3044-3051 (또한 미국 특허 번호 8,008,449 및 8,552,154; 미국 특허 공개 번호 2007/0166281; 2012/0114648; 2012/0114649; 2013/0017199; 2013/0230514 및 2014/0044738; 및 PCT 특허 공개 번호 WO 2003/099196; WO 2004/004771; WO 2004/056875; WO 2004/072286; WO 2006/121168; WO 2007/005874; WO 2008/083174; WO 2009/014708; WO 2009/073533; WO 2012/135408, WO 2012/145549; 및 WO 2013/014668 참조).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0020] 그러나, 그러한 모든 선행 진보에도 불구하고, 암세포 또는 병원체-감염 세포를, 특히 낮은 치료적 농도에서 공격하기 위해 신체 면역계를 더욱 활발하게 지시할 수 있는 개선된 조성물에 대한 요구가 존재한다. 비록 적응성 면역계가 암 및 질환에 대한 강력한 방어 메커니즘일 수 있긴 하지만, 종종 종양 미세환경의 면역 억제 메커니즘, 예컨대 PD-1의 발현에 의해 방해받는다. 나아가, 종양 환경에서 종양 세포, 면역 세포 및 간질 세포 (stromal cells)에 의해 발현된 동시억제 분자들은 암세포에 대한 T 세포 반응을 우세하게 약화시킬 수 있다. 그러므로, 강력한 PD-1-결합 분자가 여전히 필요하다. 특히, 바람직한 결합 동역학 프로파일을 가지고 PD-1/PD-L1 상호작용을 차단함으로써 PD-1/PD-L1 축을 길항하고, 암 또는 다른 질환 및 상태로 고통받고 있는 환자들에게 개선된 치료 가치를 제공할 수 있을 강력한 PD-1 결합 분자에 대한 요구가 존재한다. 본 발명은 이들 목표 및 다른 목표에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0021] 본 발명은 시노물구스 원숭이 PD-1 및 인간 PD-1 둘 다에 결합할 수 있는 선택된 항-PD-1 항체: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15의 PD-1-결합 도메인을 포함하는 PD-1 결합 분자에 관한 것이다. 발명은 특히 이러한 항체의 인간화된 또는 키메라 버전이거나, 또는 이러한 항-PD-1 항체의 PD-1 결합-단편 (특히 면역억제제, 디아바디, BiTE, 이중특이적 항체, 등)을 포함하는 PD-1 결합 분자에 관한 것이다. 발명은 특히 면역 세포의 표면 상에 존재하는 면역 체크포인트를 조절하는데 관여하는 분자의 에피토프에 추가적으로 결합할 수 있는 이러한 PD-1-결합 분자에 관한 것이다. 본 발명은 또한 PD-1을 검출하거나 또는 면역 반응을 자극하기 위해 이러한 PD-1 결합 분자를 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 선택된 항-PD-1 항체의 하나 이상의 PD-1-결합 도메인(들)을 포함하는 PD-1-결합 분자가 면역 반응을 자극하는 데 효과적인 하나 이상의 추가적인 분자와 조합하여 및/또는 특이적으로 암 항원에 결합하는 하나 이상의 추가적인 분자와 조합하여 투여되는 조합 치료법에 관한 것이다.

[0022] 상세하게, 발명은 3개의 중쇄 CDR 도메인, CDR_H1, CDR_H2 및 CDR_H3 및 3개의 경쇄 CDR 도메인, CDR_L1, CDR_L2 및 CDR_L3을 포함하는 항-인간 PD-1 결합 분자를 제공하는데, 여기서

[0023] (A) (1) CDR_H1 도메인, CDR_H2 도메인 및 CDR_H3 도메인은 PD-1 mAb 1의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72 및 SEQ ID NO:73을 가지며;

[0024] (2) CDR_L1 도메인, CDR_L2 도메인 및 CDR_L3 도메인은 PD-1 mAb 1의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77 및 SEQ ID NO:78을 가지거나

[0025] 또는

[0026] (B) (1) CDR_H1 도메인, CDR_H2 도메인 및 CDR_H3 도메인은 PD-1 mAb 2의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86 및 SEQ ID NO:87을 가지며;

[0027] (2) CDR_L1 도메인, CDR_L2 도메인 및 CDR_L3 도메인은 PD-1 mAb 2의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:91 및 SEQ ID NO:92를 가지거나

[0028] 또는

[0029] (C) (1) CDR_H1 도메인, CDR_H2 도메인 및 CDR_H3 도메인은 PD-1 mAb 3의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ

ID NO:99, SEQ ID NO:100 및 SEQ ID NO:101을 가지며;

(2) CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인 및 CDR_{L3} 도메인은 PD-1 mAb 3의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105 및 SEQ ID NO:106을 가지거나

또는

(D) (1) CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인 및 CDR_{H3} 도메인은 PD-1 mAb 4의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:110 및 SEQ ID NO:111을 가지며;

(2) CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인 및 CDR_{L3} 도메인은 PD-1 mAb 4의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:115 및 SEQ ID NO:116을 가지거나

또는

(E) (1) CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인 및 CDR_{H3} 도메인은 PD-1 mAb 5의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:120 및 SEQ ID NO:121을 가지며;

(2) CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인 및 CDR_{L3} 도메인은 PD-1 mAb 5의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:125 및 SEQ ID NO:126을 가지거나

또는

(F) (1) CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인 및 CDR_{H3} 도메인은 PD-1 mAb 6의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:130 및 SEQ ID NO:131을 가지며;

(2) CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인 및 CDR_{L3} 도메인은 PD-1 mAb 6의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:135 및 SEQ ID NO:136을 가지거나

또는

(G) (1) CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인 및 CDR_{H3} 도메인은 PD-1 mAb 7의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:140 및 SEQ ID NO:141을 가지며;

(2) CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인 및 CDR_{L3} 도메인은 PD-1 mAb 7의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:145 및 SEQ ID NO:146을 가지거나

또는

(H) (1) CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인 및 CDR_{H3} 도메인은 PD-1 mAb 8의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:162 및 SEQ ID NO:163을 가지며;

(2) CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인 및 CDR_{L3} 도메인은 PD-1 mAb 8의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:167 및 SEQ ID NO:168을 가지거나

또는

(I) (1) CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인 및 CDR_{H3} 도메인은 PD-1 mAb 9의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:171, SEQ ID NO:172 및 SEQ ID NO:173을 가지며;

(2) CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인 및 CDR_{L3} 도메인은 PD-1 mAb 9의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:176, SEQ ID NO:177 및 SEQ ID NO:178을 가지거나

또는

(J) (1) CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인 및 CDR_{H3} 도메인은 PD-1 mAb 10의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:193 및 SEQ ID NO:194를 가지며;

(2) CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인 및 CDR_{L3} 도메인은 PD-1 mAb 10의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ

ID NO:197, SEQ ID NO:198 및 SEQ ID NO:199를 가지거나

또는

(K) (1) CDR_H1 도메인, CDR_H2 도메인 및 CDR_H3 도메인은 PD-1 mAb 11의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:203 및 SEQ ID NO:204를 가지며;

(2) CDR_L1 도메인, CDR_L2 도메인 및 CDR_L3 도메인은 PD-1 mAb 11의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:207, SEQ ID NO:208 및 SEQ ID NO:209를 가지거나

또는

(L) (1) CDR_H1 도메인, CDR_H2 도메인 및 CDR_H3 도메인은 PD-1 mAb 12의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:212, SEQ ID NO:213 및 SEQ ID NO:214를 가지며;

(2) CDR_L1 도메인, CDR_L2 도메인 및 CDR_L3 도메인은 PD-1 mAb 12의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:217, SEQ ID NO:218 및 SEQ ID NO:219를 가지거나

또는

(M) (1) CDR_H1 도메인, CDR_H2 도메인 및 CDR_H3 도메인은 PD-1 mAb 13의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:223 및 SEQ ID NO:224를 가지며;

(2) CDR_L1 도메인, CDR_L2 도메인 및 CDR_L3 도메인은 PD-1 mAb 13의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:228 및 SEQ ID NO:229를 가지거나

또는

(N) (1) CDR_H1 도메인, CDR_H2 도메인 및 CDR_H3 도메인은 PD-1 mAb 14의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233 및 SEQ ID NO:234를 가지며;

(2) CDR_L1 도메인, CDR_L2 도메인 및 CDR_L3 도메인은 PD-1 mAb 14의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238 및 SEQ ID NO:239를 가지거나

또는

(O) (1) CDR_H1 도메인, CDR_H2 도메인 및 CDR_H3 도메인은 PD-1 mAb 15의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243 및 SEQ ID NO:244를 가지며;

(2) CDR_L1 도메인, CDR_L2 도메인 및 CDR_L3 도메인은 PD-1 mAb 15의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248 및 SEQ ID NO:249를 가지거나

또는

(P) (1) CDR_H1 도메인, CDR_H2 도메인 및 CDR_H3 도메인은 hPD-1 mAb 7(1.2)의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:140 및 SEQ ID NO:141을 가지며;

(2) CDR_L1 도메인, CDR_L2 도메인 및 CDR_L3 도메인은 hPD-1 mAb 7(1.2)의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:145 및 SEQ ID NO:146을 가지거나

또는

(Q) (1) CDR_H1 도메인, CDR_H2 도메인 및 CDR_H3 도메인은 hPD-1 mAb 7(1.3)의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:140 및 SEQ ID NO:141을 가지며;

(2) CDR_L1 도메인, CDR_L2 도메인 및 CDR_L3 도메인은 hPD-1 mAb 7(1.3)의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:158 및 SEQ ID NO:146을 가지거나

또는

- [0074] (R) (1) CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인 및 CDR_{H3} 도메인은 hPD-1 mAb 9(2.2)의 중쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:183, SEQ ID NO:172 및 SEQ ID NO:173을 가지며;
- [0075] (2) CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인 및 CDR_{L3} 도메인은 hPD-1 mAb 9(2.2)의 경쇄 CDR이고, 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:189 및 SEQ ID NO:178을 가진다.
- [0076] 발명은 또한 분자가 항체인, 특히 분자가 키메라 항체 또는 인간화된 항체인 그런 모든 항-인간 PD-1-결합 분자의 구체예들에 관한 것이다.
- [0077] 발명은 또한 중쇄 가변 도메인이 SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:147, SEQ ID NO:149, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:181 또는 SEQ ID NO:250의 아미노산 서열을 가지는 그런 항-인간 PD-1-결합 분자의 구체예들에 관한 것이다.
- [0078] 발명은 또한 경쇄 가변 도메인이 SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:151, SEQ ID NO:153, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:186 또는 SEQ ID NO:251의 아미노산 서열을 가지는 그런 항-인간 PD-1-결합 분자의 구체예들에 관한 것이다.
- [0079] 본 발명은 또한 항-인간 PD-1-결합 분자가 인간 PD-1 및 제2 에피토프에 동시에 결합할 수 있는 이중특이적 결합 분자인 구체예에 관한 것이며, 특히 제2 에피토프가 면역 세포의 표면 상에 존재하는 면역 체크포인트를 조절하는데 관여하는 분자의 에피토프인 구체예에 관한 것이다 (특히 제2 에피토프는 B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, 갈렉틴(Galectin)-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC 클래스 I 또는 II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 또는 VISTA의 에피토프이고, 가장 구체적으로 제2 에피토프는 CD137, CTLA-4, LAG-3, OX40, TIGIT 또는 TIM-3의 에피토프이다).
- [0080] 발명은 또한 항-인간 PD-1-결합 분자가 LAG-3 에피토프-결합 부위를 포함하는 이중특이적 분자인 구체예들에 관한 것이고, 여기서 LAG-3 에피토프-결합 부위는
- [0081] (A) (1) 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43 및 SEQ ID NO:44를 가지는 LAG-3 mAb 1의 가변 중쇄의 CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인 및 CDR_{H3} 도메인; 및
- [0082] (2) 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47 및 SEQ ID NO:48을 가지는 LAG-3 mAb 1의 가변 경쇄의 CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인 및 CDR_{L3} 도메인;
- [0083] 또는
- [0084] (B) (1) 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43 및 SEQ ID NO:44를 가지는 hLAG-3 mAb 1 VH1의 가변 중쇄의 CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인 및 CDR_{H3} 도메인; 및
- [0085] (2) 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:47 및 SEQ ID NO:48을 가지는 hLAG-3 mAb 1 VL4의 가변 경쇄의 CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인 및 CDR_{L3} 도메인;
- [0086] 또는
- [0087] (C) (1) 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58 및 SEQ ID NO:59를 가지는 LAG-3 mAb 6의 가변 중쇄의 CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인 및 CDR_{H3} 도메인; 및
- [0088] (2) 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62 및 SEQ ID NO:63을 가지는 LAG-3 mAb 6의 가변 경쇄의 CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인 및 CDR_{L3} 도메인;
- [0089] 또는
- [0090] (D) (1) 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58 및 SEQ ID NO:59를 가지는 hLAG-3 mAb 6 VH1의 가변 중쇄의 CDR_{H1} 도메인, CDR_{H2} 도메인 및 CDR_{H3} 도메인; 및
- [0091] (2) 각각 아미노산 서열: SEQ ID NO:298, SEQ ID NO:62 및 SEQ ID NO:63을 가지는 LAG-3 mAb 6의 가변 경쇄의 CDR_{L1} 도메인, CDR_{L2} 도메인 및 CDR_{L3} 도메인을 포함한다.

- [0092] 발명은 또한 분자가 디아바디이고, 특히, 디아바디가 둘, 또는 셋, 또는 넷, 또는 다섯 개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 공유 결합된 복합체인 그러한 항-인간 PD-1-결합 분자의 구체예들에 관한 것이다. 발명은 또한 분자가 3가 결합 분자이고, 특히 3가 결합 분자는 셋, 넷, 다섯 개 또는 그 이상의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 공유 결합된 복합체인 그러한 항-인간 PD-1-결합 분자의 구체예들에 관한 것이다. 발명은 추가적으로 분자가 Fc 영역을 포함하는 그러한 항-인간 PD-1-결합 분자의 구체예에 관한 것이다. 발명은 추가적으로 분자가 알부민-결합 도메인, 특히 탈면역화 알부민-결합 도메인을 포함하는 그러한 항-인간 PD-1-결합 분자의 구체예에 관한 것이다.
- [0093] 발명은 또한 분자가 Fc 영역을 포함하고, Fc 영역은 Fc γ R에 대한 변종 Fc 영역의 친화도를 감소시키고 및/또는 혈청 반감기를 증가시키는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 변종 Fc 영역이며, 더 구체적으로, 변형은 다음으로 구성되는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는, 그러한 모든 항-인간 PD-1-결합 분자의 구체예들에 관한 것이다:
- [0094] (1) L234A; L235A;
- [0095] (2) L234A 및 L235A;
- [0096] (3) M252Y; M252Y 및 S254T;
- [0097] (4) M252Y 및 T256E;
- [0098] (5) M252Y, S254T 및 T256E; 또는
- [0099] (6) K288D 및 H435K;
- [0100] 여기서 넘버링은 Kabat에서와 같이 EU 색인의 넘버링이다.
- [0101] 발명은 또한 상기 기술된 PD-1-결합 분자 중 어느 것이 T 세포 매개 면역 반응을 자극하는데 사용되는 구체예들에 관한 것이다. 발명은 추가적으로 상기 기술된 PD-1-결합 분자가 억제된 면역계와 관련된 질환 또는 상태, 특히 암 또는 감염의 치료에 사용되는 구체예들에 관한 것이다.
- [0102] 발명은 특히 암의 치료 또는 진단 또는 예후에서의 이러한 사용에 관한 것이며, 암은 다음의 세포로 구성되는 군으로부터 선택된 암 세포의 존재를 특징으로 한다: 부신 종양, AIDS-관련 암, 포상 연부 육종, 성상세포 종양, 방광암, 골암, 뇌척수암, 전이성 뇌 종양, 유방암, 경동맥체 종양, 자궁경부암, 연골 육종, 척색종, 난임성 신장 세포 암종, 투명 세포 암종, 결장암, 대장암, 피부 양성 섬유성 조직구종, 결체조직 작은 원형 세포 종양, 상의세포종, 유잉 종양, 골외 점액성 연골 육종, 골성 불완전 섬유원종, 섬유성 골 이형성증, 담낭암 또는 담관암, 위암, 임신성 용모성 질환, 생식세포종, 두경부암, 간세포 암종, 도세포 종양, 카포시 육종, 신장암, 백혈병, 지방종/양성 지방종성 종양, 지방육종/악성 지방종성 종양, 간암, 림프종, 폐암, 수모세포종, 흑색종, 뇌수막종, 다발성 내분비종양증, 다발성 골수종, 골수 이형성 증후군, 신경아세포종, 신경 내분비 종양, 난소암, 췌장암, 유두 갑상선 암종, 부갑상선 종양, 소아 암, 말초 신경집 종양, 크롬 친화성 세포종, 뇌하수체 종양, 전립선암, 후부 포도막 흑색종, 희귀성 혈액 질환, 전이성 신장암, 간상소체 종양, 횡문근육종, 육종, 피부암, 연부 조직 육종, 편평세포암, 위암, 활막육종, 고환암, 흉선암, 흉선종, 전이성 갑상선암 및 자궁암.
- [0103] 발명은 특히 암의 치료 또는 진단 또는 예후에서의 이러한 사용에 관한 것이며, 암은 대장암, 간세포 암종, 신경교종, 신장암, 유방암, 다발성 골수종, 방광암, 신경아세포종; 육종, 비-호지킨 림프종, 비-소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 직장암, 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 B 림프아구성 백혈병 (B-ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 모세포 백혈병 (HCL), 출아형 형질세포양 수지상세포 신생물 (BPDCN), 맨틀 세포 백혈병 (MCL) 및 소림프구성 림프종 (SLL)을 포함한 비-호지킨 림프종 (NHL), 호지킨 림프종, 전신성 비만 세포종 또는 버킷 림프종이다.
- [0104] 발명은 또한 상기 기술된 PD-1-결합 분자 중 어느 것이 검출 가능하게 표지되어 PD-1의 검출에 사용되는 구체예들에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0105] 도 1은 각각 E-코일 또는 K-코일 헤테로다이어-촉진 도메인을 가진 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 구성된 두 개의 에피토프-결합 부위를 갖는 대표적인 공유 결합된 디아바디의 개략도를 제공한다. 시스템인 잔기는 도 3B에서 도시된 바와 같이 링커 및/또는 헤테로다이어-촉진 도메인에 존재할 수 있다. 동일한 에피토프를 인식하는

VL 및 VH 도메인은 동일한 음영(shading) 또는 채움(fill) 패턴을 사용하여 도시된다.

도 2는 회합된 사슬이 Fc 영역의 전부 또는 일부를 형성하도록, 각각 CH2 및 CH3 도메인을 가진 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 구성된 두 개의 에피토프-결합 부위를 갖는 대표적인 공유 결합된 디아바디 분자의 개략도를 제공한다. 동일한 에피토프를 인식하는 VL 및 VH 도메인은 동일한 음영 또는 채움 패턴을 사용하여 도시된다.

도 3A 내지 3C는 폴리펩타이드 사슬의 두 개의 쌍 (즉, 총 네 개의 폴리펩타이드 사슬)으로 구성된 네 개의 에피토프-결합 부위를 가진 대표적인 4가 디아바디를 도시하는 개략도를 제공한다. 각각의 쌍의 하나의 폴리펩타이드는, 회합된 사슬이 Fc 영역의 전부 또는 일부를 형성하도록, CH2 및 CH3 도메인을 가지고 있다. 동일한 에피토프를 인식하는 VL 및 VH 도메인은 동일한 음영 또는 채움 패턴을 사용하여 도시된다. 폴리펩타이드 사슬의 두 개의 쌍은 동일한 것일 수도 있다. VL 및 VH 도메인이 상이한 에피토프를 인식하는 이러한 구체예에서 (**도 3A 내지 3C**에서 도시된 바와 같음), 결과로 생긴 분자는 네 개의 에피토프-결합 부위를 가지고 있으며 각각의 결합된 에피토프에 대하여 이중특이적이고 2가이다. VL 및 VH 도메인이 동일한 에피토프를 인식하는 (예를 들어, 동일한 VL 도메인 CDR 및 동일한 VH 도메인 CDR이 두 사슬에서 사용된다) 이러한 구체예에서, 결과로 생긴 분자는 네 개의 에피토프-결합 부위를 가지고 있으며 단일 에피토프에 대하여 단일 특이적이고 4가이다. 대안으로, 폴리펩타이드의 두 개의 쌍은 다를 수도 있다. 폴리펩타이드 각각의 쌍의 VL 및 VH 도메인이 상이한 에피토프를 인식하는 이러한 구체예에서 (**도 3A 내지 3C**에서 도시된 바와 같음), 결과로 생긴 분자는 네 개의 에피토프-결합 부위를 가지고 있으며 각각의 결합된 에피토프에 대하여 사중특이적이고 1가이다. **도 3A**는 시스템인 잔기를 포함하는 펩타이드 헤테로다이어-촉진 도메인을 함유하는 Fc 디아바디를 나타낸다. **도 3B**는 시스템인 잔기 및 링커 (선택적으로 시스템인 잔기를 가짐)를 포함하는 E-코일 및 K-코일 헤테로다이어-촉진 도메인을 함유하는 Fc 영역-함유 디아바디를 도시한다. **도 3C**는 항체 CH1 및 CL 도메인을 함유하는 Fc 영역-함유 디아바디를 도시한다.

도 4A 및 4B는 세 개의 폴리펩타이드 사슬로 구성된 두 개의 에피토프-결합 부위를 갖는 대표적인 공유 결합된 디아바디 분자의 개략도를 제공한다. 폴리펩타이드 사슬 중 두 개는, 회합된 사슬이 Fc 영역의 전부 또는 일부를 형성하도록, CH2 및 CH3 도메인을 가지고 있다. VL 및 VH 도메인을 포함하는 폴리펩타이드 사슬은 헤테로다이어-촉진 도메인을 더 포함한다. 동일한 에피토프를 인식하는 VL 및 VH 도메인은 동일한 음영 또는 채움 패턴을 사용하여 도시된다.

도 5는 다섯 개의 폴리펩타이드 사슬로 구성된 네 개의 에피토프-결합 부위를 가진 대표적인 공유 결합된 디아바디 분자의 개략도를 제공한다. 폴리펩타이드 사슬 중 두 개는, 회합된 사슬이 Fc 영역의 전부 또는 일부를 포함한 Fc 영역을 형성하도록, CH2 및 CH3 도메인을 가지고 있다. 결합된 VL 및 VH 도메인을 포함하는 폴리펩타이드 사슬은 헤테로다이어-촉진 도메인을 더 포함한다. 동일한 에피토프를 인식하는 VL 및 VH 도메인은 동일한 음영 또는 채움 패턴을 사용하여 도시된다.

도 6A 내지 6F는 세 개의 에피토프-결합 부위를 가진 대표적인 Fc 영역-함유 3가 결합 분자의 개략도를 제공한다. **도 6A** 및 **6B**는 각각 두 개의 디아바디-형 결합 도메인 및 디아바디-형 결합 도메인이 Fc 영역에 대하여 N-말단 또는 C-말단인 상이한 도메인 방향을 갖는 Fab-형 결합 도메인을 포함하는 3가 결합 분자의 도메인을 개략적으로 도시한다. **도 6A** 및 **6B**에서 분자는 네 개의 사슬을 포함한다. **도 6C** 및 **6D**는 각각 Fc 영역에 대하여 N-말단인 두 개의 디아바디-형 결합 도메인, 및 경쇄 및 중쇄가 폴리펩타이드 링커 스페이서, 또는 scFv-형 결합 도메인을 통해 결합되는 Fab-형 결합 도메인을 포함하는 3가 결합 분자의 도메인을 개략적으로 도시한다. **도 6E** 및 **6F**의 3가 결합 분자는 각각 Fc 영역에 대하여 C-말단인 두 개의 디아바디-형 결합 도메인, 및 결합된 Fab-형 결합 도메인, 또는 디아바디-형 결합 도메인인 scFv-형 결합 도메인을 포함하는 3가 결합 분자의 도메인을 개략적으로 도시한다. **도 6C 내지 6F**의 3가 결합 분자는 세 개의 사슬을 포함한다. 동일한 에피토프를 인식하는 VL 및 VH 도메인은 동일한 음영 또는 채움 패턴을 사용하여 도시된다.

도 7A 내지 7D는 항-PD-1 항체 PD-1 mAb 1 내지 15가 인간 PD-1에 결합하는 것을 도시한다. shPD-1-His에의 결합에 대한 결합 곡선은 **도 7A**에 (PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 4 및 PD-1 mAb 9), **도 7B**에 (PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6 및 PD-1 mAb 7) 및 **도 7C**에 (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 및 PD-1 mAb 15) 도시된다. shPD-1-인간 Fc에의 결합에 대한 결합 곡선은 **도 7D**에 (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 및 PD-1 mAb 15) 도시된다.

도 8A 내지 8C는 항-PD-1 항체 PD-1 mAb 1 내지 15가 시노몰구스 원숭이 PD-1에 결합하는 것을 도시한다. scynoPD-1-hFc에의 결합에 대한 결합 곡선은 **도 8A**에 (PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1

mAb 6, PD-1 mAb 7), 도 8B에 (PD-1 mAb 9) 및 도 8C에 (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 및 PD-1 mAb 15) 도시된다.

도 9A 내지 9D는 항-PD-1 항체 PD-1 mAb 1 내지 15가 인간 PD-L1의 인간 PD-1에의 결합을 차단하는 능력을 도시한다. 억제 곡선은 도 9A에 (PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 15 및 PD-1 mAb A), 도 9B에 (PD-1 mAb 4), 도 9C에 (PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7 및 PD-1 mAb A) 및 도 9D에 (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, PD-1 mAb 15 및 PD-1 mAb A) 도시된다.

도 10A 내지 10B는 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 7의 조직 특이성을 도시한다. 도 10A는 정상 결장 (패널 i 및 vii), 간 (패널 ii 및 viii), 폐 (패널 iii 및 ix), 췌장 (패널 iv 및 x), 신장 (패널 v 및 xi) 및 심장 (패널 vi 및 xii) 조직의 조직학적 염색을 도시한다. 도 10A, 패널 i 내지 vi는 표지된 PD-1 mAb 7 (0.313 μ g/mL)과 함께 인큐베이션된 조직의 결과를 도시한다. 도 10A, 패널 vii 내지 xii는 표지된 동위원소 대조표준 mAb (0.314 μ g/mL)와 함께 인큐베이션된 조직의 결과를 도시한다. 도 10B는 PD-1을 발현하는 피부 (패널 i 및 iv), 편도선 (패널 ii 및 v) 및 NSO 세포 (패널 iii 및 vi)의 조직학적 염색을 도시한다. 도 10B, 패널 i 내지 iii는 표지된 PD-1 mAb 7 (0.313 μ g/mL)과 함께 인큐베이션된 조직의 결과를 도시한다.

도 11은 IgG1 (AA) 또는 IgG4 (P)를 가지는, 인간화된 항-인간 PD-1 항체 hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7(1.1), hPD-1 mAb 7(1.2), hPD-1 mAb 9(1.1), 및 참조 항-PD-1 항체 PD-1 mAb A 및 PD-1 mAb B의 세포 표면 PD-1에의 결합에 대한 결합 프로파일을 도시한다.

도 12A 내지 12B는 IgG1 (AA) 또는 IgG4 (P)를 가지는, 인간화된 항-PD 항체 hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7(1.1), hPD-1 mAb 7(1.2), hPD-1 mAb 9(1.1), 및 참조 항-PD-1 항체 PD-1 mAb A 및 PD-1 mAb B가 세포 표면 인간 PD-1에 대한 가용성 인간 PD-L1 (도 12A) 및 가용성 인간 PD-L2 (도 12B)의 결합을 차단하는 능력을 도시한다.

도 13은 IgG1 (AA) 또는 IgG4 (P)를 가지는, 인간화된 항-PD 항체 hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7(1.1), hPD-1 mAb 7(1.2), hPD-1 mAb 9(1.1), 및 참조 항-PD-1 항체 PD-1 mAb A 및 PD-1 mAb B가 Jurkat-luc-NFAT/CHO-PD-L1 루시페라제 리포터 분석에서 PD-1/PD-L1 상호작용을 차단하고 T-세포의 하향-조절을 방지함으로써 PD-1/PD-L1 축에 길항하는 능력을 도시한다.

도 14는 PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 및 PD-1 mAb 15가 참조된 항-PD-1 항체 (PD-1 mAb A 및 PD-1 mAb B)와 비교할만한 또는 그것보다 높은 수준으로 사이토카인 생성을 자극할 수 있고 LAG-3 mAb 1과 조합된 PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 및 PD-1 mAb 15로의 치료가 사이토카인 방출의 최대 증대를 제공하였음을 도시한다. 항-PD-1 및 항-LAG-3 항체들로 단독으로 및 조합하여 처리된 스타필로코쿠스 장독소 B (SEB) 자극된 PBMC로부터의 IFN γ 분비 프로파일.

도 15A 내지 15B는 IgG1 (AA) 또는 IgG4 (P)를 가지는, 인간화된 항-PD 항체 hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7(1.2), hPD-1 mAb 9(1.1), 및 참조 항-PD-1 항체 PD-1 mAb A 및 PD-1 mAb B가 사이토카인 생성을 자극하는 능력을 도시한다. 항-PD-1 항체로 처리된 SEB-자극된 PBMC로부터의 IFN γ (도 15A) 및 TNF α (도 15B) 분비 프로파일.

도 16A 내지 16B는 PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디 구성물 DART A, DART D, DART E, DART F, DART G 및 DART H가 항-PD-1 mAb + 항-LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A)의 조합의 투여시 관찰된 것과 비교할만한 또는 그것보다 높은 수준으로 사이토카인 생성을 자극할 수 있고, PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디 구성물 DART A, DART D, DART E, DART F 및 DART G가 사이토카인 방출의 최대 증대를 제공하였음을 도시한다. PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디로, 또는 항-PD-1 및 항-LAG-3 항체 단독으로 또는 조합하여 처리된 저농도의 SEB (0.2 ng/mL)로 자극된 PBMC의 IFN γ 분비 프로파일이 도표화된다. 두 대표적인 도너로부터의 PBMC를 사용한 결과가 도 16A 및 도 16B에 도시된다.

도 17A 내지 17B는 PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디 구성물 DART A, DART B 및 DART C가 항-PD-1 mAb + 항-LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A)의 조합의 투여시 관찰된 것보다 높은 수준으로 사이토카인 생성을 자극할 수 있음을 도시한다. PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디로, 또는 항-PD-1 및 항-LAG-3 항체 단독으로 및 조합하여 처리된 고농도의 SEB (85 ng/mL)로 자극된, 두 대표적인 도너로부터의 PBMC의 IFN γ 분비 프로파일이 도표화된다. 두 대표적인 도너로부터의 PBMC를 사용한 결과가 도 17A 및 도 17B에 도시된다.

도 18A 내지 18B는 PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디 구성물 DART A, DART B 및 DART C가 항-PD-1 mAb + 항-LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A)의 조합의 투여시 관찰된 것보다 높은 수준으로 사이토카인 생성을 자극할 수 있음을 도시한다. PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디로, 또는 항-PD-1 및 항-LAG-3 항체 단독으로 및 조

합하여 처리된 중간 농도의 SEB (0.5 ng/mL)로 자극된, 두 대표적인 도너로부터의 PBMC의 IFN γ 분비 프로파일 이 도표화된다. 두 대표적인 도너로부터의 PBMC를 사용한 결과가 도 18A 및 도 18B에 도시된다.

도 19는 PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디 구성물 DART D 및 DART H가 항-PD-1 mAb + 항-LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A)의 조합의 투여시 관찰된 것과 비교할만한 또는 그것보다 높은 수준으로 사이토카인 생성을 자극할 수 있고, DART D가 사이토카인 방출의 최대 증대를 제공하였음을 도시한다. PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디로, 또는 항-PD-1 및 항-LAG-3 항체 단독으로 및 조합하여 처리된 고농도의 SEB (85 ng/mL)로 자극된 대표적인 도너로부터의 PBMC의 IL-2 분비 프로파일이 도표화된다.

도 20은 PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디 구성물 DART B 및 DART I가 항-PD-1 mAb + 항-LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A, hPD-1 mAb 7(1.2) + hLAG-3 mAb 1(1.4), hPD-1 mAb 7(1.2) + hLAG-3 mAb 6(1.1))의 조합의 투여시 관찰된 것보다 높은 수준으로 사이토카인 생성을 자극할 수 있음을 도시한다. PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디로, 또는 항-PD-1 및 항-LAG-3 항체 단독으로 및 조합하여 처리된 중간 농도의 SEB (0.5 ng/mL)로 자극된, 두 대표적인 도너로부터의 PBMC의 IFN γ 분비 프로파일이 도표화된다.

도 21A 내지 21D는 PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디 DART I가 항-PD-1 mAb + 항-LAG-3 mAb (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A)의 조합의 투여시 관찰된 것보다 높은 수준으로 사이토카인 생성을 자극할 수 있음을 도시한다. PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디, 항-PD-1 및 항-LAG-3 항체를 조합하여, 또는 동위원소 대조표준으로 처리된 과산화물 변독소 (5 μ g/mL)로 자극된, 두 대표적인 도너로부터의 CD4 메모리 세포의 IFN γ (도 21A 및 21C) 및 IL-2 (도 21B 및 21D) 분비 프로파일이 도표화된다. 두 대표적 도너로부터의 CD4 메모리 T 세포를 사용한 7일째의 결과가 도 21A 내지 B 및 도 21C 내지 D에 도시된다.

도 22는 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자, DART I의 약물동역학이 시노물구스 원숭이에서 항-PD-1 항체, PD-1 mAb A IgG4 (P)의 그것과 비교할만한 것을 도시한다. 선은 DART I (실선) 및 PD-1 mAb A (점선)의 평균 혈청 농도를 도시한다. 수컷 (채워진) 및 암컷 (채워지지 않은) 원숭이에 대한 개별적인 값들이 DART I (삼각형) 및 PD-1 mAb A (원형)에 대해 도표화된다.

도 23A 내지 23C는 상이한 항-PD-1 항체로 처리한 후에 동물에서 시간의 경과에 따른 CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 표면에 결합된 PD-1의 혈청 항체 농도 및 백분율을 도시한다. 항-PD 1 mAb 처리 후에 CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 표면에 결합된 PD-1의 백분율은 우측 y-축에 도표화된다; 기호는 각 개별적인 동물에 대한 T 세포상의 % 결합된 PD 1을 나타내고 점선은 평균값을 도시한다. 혈청 mAb 농도가 좌측 Y-축에 도표화된다; 기호는 각 개별적인 동물에 대한 혈청 수준을 나타내고 실선은 데이터의 비선형 피트를 도시한다. 각 패널은 1일에 IV 주입에 의해 10 mg/kg hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) (도 23A), PD-1 mAb A IgG4 (P) (도 23B) 또는 PD-1 mAb B IgG4 (P) (도 23B)가 투여된 각 동물 (n=1/성별/그룹)에 대한 데이터를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0106] 본 발명은 시노물구스 원숭이 PD-1 및 인간 PD-1 둘 다에 결합할 수 있는 선택된 항-PD-1 항체: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15의 PD-1-결합 도메인을 포함하는 PD-1 결합 분자에 관한 것이다. 발명은 특히 이러한 항체의 인간화된 또는 키메라 버전이거나, 또는 이러한 항-PD-1 항체의 PD-1 결합-단편 (특히 면역조절제, 디아바디 (이들테면, 한정하는 것은 아니지만 DART-A, DART-B, DART-C, DART-D, DART-E, DART-F, DART-G, DART-H, DART-I 및 DART-J), BiTE, 이중특이적 항체, 등) 을 포함하는 PD-1 결합 분자에 관한 것이다. 발명은 특히 면역 세포의 표면 상에 존재하는 면역 체크포인트를 조절하는데 관여하는 분자의 에피토프에 추가적으로 결합할 수 있는 이러한 PD-1-결합 분자에 관한 것이다. 본 발명은 또한 PD-1을 검출하거나 또는 면역 반응을 자극하기 위해 이러한 PD-1 결합 분자를 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 선택된 항-PD-1 항체의 하나 이상의 PD-1-결합 도메인(들)을 포함하는 PD-1-결합 분자가 면역 반응을 자극하는 데 효과적인 하나 이상의 추가적인 분자와 조합하여 및/또는 특이적으로 암 항원에 결합하는 하나 이상의 추가적인 분자와 조합하여 투여되는 조합 치료법에 관한 것이다.

[0107] I. 항체 및 그것들의 결합 도메인

[0108] 본 발명의 항체는 면역글로불린 분자의 가변 도메인에 위치한 적어도 하나의 항원 인식 부위를 통해 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, 지질, 폴리펩타이드, 등과 동일한 표적에 면역특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 분자이다. 본원에서 사용된 용어 "항체" 및 "항체들"은 단클론성 항체, 다중특이적 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, 합성 항체, 키메라 항체, 다클론성 항체, 카멜화(camelized) 항체, 단일 사슬 Fv (scFv), 단일 사슬 항체,

Fab 단편, F(ab') 단편, 이황화물-결합 이중특이적 Fv (sdFv), 인트라바디 및 상기의 것들 중 어느 것의 에피토프-결합 단편을 나타낸다. 특히, 항체는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적으로 활성인 단편들, 즉 항원-결합 부위를 함유하는 분자들을 포함한다. 면역글로불린 분자들은 임의의 유형 (예컨대 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스 (예컨대 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂) 또는 하위클래스의 것일 수 있다. 진단에서의 공지된 사용에 더불어, 항체들은 치료제로서 유용한 것으로 밝혀졌다. 항체들은 그런 분자 상의 특정 도메인 또는 모이어티 또는 형태 ("**에피토프**")의 존재로 인해 폴리펩타이드 또는 단백질 또는 비-단백질 분자에 면역특이적으로 결합할 수 있다. 에피토프-함유 분자는 면역원성 활성을 가질 수 있어서, 동물에서 항체 생성 반응을 유도할 수 있고; 그런 분자는 "**항원**"으로 언급된다. 지난 수십년은 항체의 치료 가능성에 다시 관심이 모아졌고, 항체들이 생명공학-유도된 약물의 선두 클래스의 일원이 되었다 (Chan, C.E. *et al.* (2009) "*The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases*," Singapore Med. J. 50(7):663-666). 200 개가 넘는 항체-기반 약물이 사용할 수 있게 승인되었거나 개발 중이다.

[0109]

용어 "**단클론성 항체**"는 단클론성 항체가 항원의 선택적 결합에 관여하는 아미노산들 (자연적으로 발생하는 및 자연적으로 발생하지 않는)로 구성되는 균일한 항체 집단을 나타낸다. 단클론성 항체는 단일 에피토프 (또는 항원성 부위)에 대해 지시되는, 고도로 특이적이다. 용어 "단클론성 항체"는 온전한 단클론성 항체들 및 전체 길이 단클론성 항체들뿐만 아니라 그것들의 단편 (예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂ Fv), 단일-사슬 (scFv), 그것들의 돌연변이, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 인간화된 단클론성 항체, 키메라 단클론성 항체, 및 필요한 특이성 및 항원에 대한 결합 능력의 항원 인식 부위를 포함하는 면역글로불린 분자의 임의의 다른 변형된 구성을 포함한다. 항체의 공급원 또는 그것이 만들어지는 방식 (예컨대 하이브리도마, 파지 선택, 재조합체 발현, 형질전환 동물 등에 의한)과 관련하여 제한되게 하려는 의도는 없다. 용어는 전체 면역글로불린뿐 아니라 "항체"의 정의 하에서 상기 기술된 단편 등을 포함한다. 단클론성 항체의 제조 방법은 업계에 공지되어 있다. 이용될 수 있는 한 가지 방법은 Kohler, G. *et al.* (1975) "*Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predetermined Specificity*," Nature 256:495-497의 방법 또는 그 변형이다. 전형적으로, 단클론성 항체는 마우스, 래트 또는 토끼에서 개발된다. 항체는 원하는 에피토프를 함유한 세포, 세포 추출물, 또는 단백질 제제의 면역원성 양으로 동물을 면역화시킴으로써 생산된다. 면역원은 1차 세포, 배양 세포주, 암성 세포, 단백질, 펩타이드, 핵산, 또는 조직일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 면역화에 사용된 세포는 면역원으로서 사용 전에 일정 기간 (예를 들어, 적어도 24시간) 동안 배양될 수 있다. 세포는 그 자체로 또는 비-변성 보조제, 예컨대 Ribi와 조합하여 면역원으로서 사용될 수 있다 (예를 들어, Jennings, V.M. (1995) "*Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production*," ILAR J. 37(3):119-125 참조). 일반적으로, 세포는 면역원으로서 사용될 때 온전하게 유지되어야 하고 바람직하게는 살아있어야 한다. 온전한 세포는 파열된 세포보다 면역화된 동물에 의해 항원이 더 잘 검출되게 할 수 있다. 변성 또는 거친 보조제, 예를 들어, 프로인트 보조제 (Freud's adjuvant)의 사용은 세포를 파열시킬 수도 있으며 그러므로 권장되지 않는다. 면역원은 주기적인 간격으로, 예컨대 격주로, 또는 매주 여러 번 투여될 수도 있거나, 또는 동물에서 (예를 들어, 조직 재조합체에서) 생존력을 유지하는 방법으로 투여될 수도 있다. 대안으로, 기존의 단클론성 항체 및 원하는 병원성 에피토프에 대하여 면역특이적인 임의의 다른 동등한 항체가 서열분석되어 업계에 공지된 임의의 방법에 의해 재조합적으로 생산될 수 있다. 한 구체예에서, 이러한 항체가 서열분석된 다음 폴리뉴클레오타이드 서열이 발현 또는 증식을 위해 벡터로 클로닝된다. 관심있는 항체를 암호화하는 서열은 숙주 세포 내 벡터에서 유지될 수 있으며 그 다음에 숙주 세포는 미래의 사용을 위해 확장되어 냉동될 수 있다. 이러한 항체의 폴리뉴클레오타이드 서열은 항체의 친화도, 또는 다른 특징을 개선하기 위해 본 발명의 단일특이적 또는 다중특이적 (예를 들어, 이중특이적, 삼중특이적 및 사중특이적) 분자뿐 아니라 친화도 최적화된 키메라 항체, 인간화된 항체 및/또는 개화된 (caninized) 항체를 생성하기 위한 유전자 조작에 사용될 수 있다. 항체를 인간화하는 데 있어 일반적인 원리는 항체의 항원-결합 부분의 기본 서열을 유지하는 한편, 항체의 비-인간 나머지를 인간 항체 서열로 바꿔치기하는 것을 포함한다.

[0110]

천연 항체 (예컨대 IgG 항체)는 두 중쇄와 복합체를 형성한 두 경쇄로 구성된다. 각각의 경쇄는 가변 도메인 (VL) 및 불변 도메인 (CL)을 함유한다. 각각의 중쇄는 하나의 가변 도메인 (VH), 3개의 불변 도메인 (CH1, CH2 및 CH3), 및 CH1과 CH2 도메인 사이에 위치한 힌지 도메인을 함유한다. 천연 발생 면역글로불린 (예컨대 IgG)의 기본적인 구조 단위는 그러므로 두 경쇄 및 두 중쇄를 가진 테트라머이고, 보통 약 150,000 Da의 당단백질로서 표시된다. 각 사슬의 아미노-말단 ("N-말단") 부분은 주로 항원 인식에 기여하는 약 100 내지 110 또는 그 이상이 아미노산의 가변 도메인을 포함한다. 각 사슬의 카복시-말단 ("C-말단") 부분은 불변 영역을 규정하는데, 경쇄는 하나의 단일 불변 도메인을 가지고 중쇄는 보통 3개의 불변 도메인 및 힌지 도메인을 가진

다. 그러므로, IgG 분자의 경쇄의 구조는 n-VL-CL-c이고 IgG 중쇄의 구조는 n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c이다 (H는 힌지 도메인이고, n 및 c는 각각 폴리펩타이드의 N-말단 및 C-말단을 나타낸다). IgG 분자의 가변 도메인은 에피토프와 접촉하는 잔기를 함유하는 상보성 결정 영역 (CDR), 및 그런 접촉을 허용하기 위해 일반적으로 CDR 루프의 구조를 유지하고 위치를 결정하는, 프레임워크 분절 (FR)로 언급되는 비-CDR 분절로 구성된다 (비록 특정 프레임워크 잔기가 또한 항원과 접촉할 수 있긴 하다). 그러므로, VL 및 VH 도메인은 구조 n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c를 가진다. 항체 경쇄의 제1, 제2 및 제3 CDR인 (또는 그것들로서 작용할 수 있는) 폴리펩타이드는 본원에서 각각 **CDR_L1 도메인**, **CDR_L2 도메인** 및 **CDR_L3 도메인**으로 표시된다. 유사하게, 항체 중쇄의 제1, 제2 및 제3 CDR인 (또는 그것들로서 작용할 수 있는) 폴리펩타이드는 본원에서 각각 **CDR_H1 도메인**, **CDR_H2 도메인** 및 **CDR_H3 도메인**으로 표시된다. 그러므로, 용어 CDR_L1 도메인, CDR_L2 도메인, CDR_L3 도메인, CDR_H1 도메인, CDR_H2 도메인 및 CDR_H3 도메인은 단백질 안으로 통합될 때 단백질이 RMJS 단백질이 경쇄 및 중쇄를 가지는 항체이거나 디아바디이거나 또는 단일-사슬 결합 분자 (예컨대 scFv, BiTe, 등)거나, 또는 다른 유형의 단백질이거나에 관계없이 특이적 에피토프에 결합할 수 있게 되는 것을 유발하는 폴리펩타이드에 향해 있다. 따라서, 본원에서 사용되는 용어 "**에피토프-결합 단편**"은 에피토프에 면역특이적으로 결합할 수 있는 항체의 단편을 의미하고, 용어 "**에피토프-결합 부위**"는 에피토프 결합에 기여하는 에피토프-결합 단편을 포함하는 분자의 그 부분을 나타낸다. 에피토프-결합 부위는 그런 항체의 CDR 도메인을 1, 2, 3, 4, 5 또는 전부 6개 함유할 수 있고, 그런 에피토프에 면역특이적으로 결합할 수 있긴 하지만, 그런 항체와 상이한 그런 에피토프를 향한 면역특이성, 친화성 또는 선택성을 나타낼 수 있다. 그러나, 바람직하게, 에피토프-결합 단편은 그런 항체의 6개의 모든 CDR 도메인을 함유할 것이다. 항체의 에피토프-결합 단편은 단일 폴리펩타이드 사슬 (예컨대 scFv)이거나, 각각 아미노 말단 및 카르복시 말단을 가지는 둘 이상의 폴리펩타이드 사슬을 포함할 수 있다 (예컨대 디아바디, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, 등).

[0111] 발명은 특히 본 발명의 항-PD-1 항체들의 단일-사슬 가변 도메인 단편 ("**scFv**") 및 그것을 포함하는 다중특이적 결합 분자를 포함한다. 단일-사슬 가변 도메인 단편은 짧은 연결 펩타이드를 사용하여 경쇄 및/또는 중쇄 가변 도메인을 연결함으로써 만들어진다. Bird 등 (1988) ("*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*," Science 242:423-426)은 한 가변 도메인의 카르복시 말단과 다른 가변 도메인의 아미노 말단 사이의 대략 3.5 nm를 연결하는 결합 펩타이드의 예를 기술한다. 다른 서열의 링커들이 디자인되고 사용되었다 (Bird *et al.* (1988) "*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*," Science 242:423-426). 링커는 계속해서 추가적인 기능, 예컨대 약물의 부착 또는 고체 지지체로의 부착을 위해 변형될 수 있다. 단일 사슬 변종은 제조함으로써 또는 합성으로 제조될 수 있다. scFv의 합성에 의한 제조를 위해서, 자동화 합성기가 사용될 수 있다. scFv의 제조학적 제조를 위해서는, scFv를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 적합한 플라스미드가 적합한 숙주 세포, 진핵세포, 예컨대 효모, 식물 세포, 곤충 세포 또는 포유류 세포, 또는 원핵세포, 예컨대 대장균(*E. coli*)으로 도입될 수 있다. 관심있는 scFv를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드의 결합과 같은 일상적인 조작에 의해 제조될 수 있다. 결과로 생긴 scFv는 업계에 공지된 표준 단백질 정제 기법을 사용하여 분리될 수 있다.

[0112] 발명은 또한 특히 발명의 항-PD-1 항체의 인간화된 변종 및 그것을 포함한 다중특이적 결합 분자를 포함한다. 용어 "**인간화된**" 항체는 일반적으로 제조법 기법을 사용하여 제조되는, 비-인간 종으로부터의 면역글로불린의 항원-결합 부위 및 인간 면역글로불린의 구조 및/또는 서열에 기초한 분자의 나머지 면역글로불린 구조를 가진 키메라 분자를 나타낸다. 본 발명의 항-인간 PD-1 항체는 항체 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15의 인간화된, 키메라 또는 개화된 변종을 포함한다. 그런 항체들의 가변 도메인의 폴리뉴클레오타이드 서열은 그런 유도체를 생성하고 그런 항체들의 친화성 또는 다른 특징을 개선하기 위하여 유전자 조작에 사용될 수 있다. 항체를 인간화하는데 있어서 일반적인 원칙은 항체의 항원-결합 부분의 기본 서열을 유지하는 한편, 항체의 비-인간 나머지를 인간 항체 서열과 바꾸는 것을 포함한다. 단클론성 항체를 인간화하는데에는 일반적으로 네 개의 단계가 있다. 이것들은 다음과 같다: (1) 시작 항체 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 뉴클레오타이드 및 예상된 아미노산 서열을 결정하는 단계 (2) 인간화된 항체 또는 개화된 항체를 디자인하는 단계, 즉, 인간화 또는 개화 공정 중에 어떤 항체 프레임워크 영역을 사용할지를 결정하는 단계 (3) 실제 인간화 또는 개화 방법론/기법 및 (4) 인간화된 항체의 트랜스펙션 및 발현 단계. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; 및 6,331,415 참조.

[0113] 항원-결합 부위는 불변 도메인에 융합된 완전한 가변 도메인 또는 적절한 프레임워크 영역에 이식된 그런 가변

도메인의 상보성 결정 영역 (CDR)만을 포함할 수 있다. 항원-결합 부위는 야생형이거나 또는 하나 이상의 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있다. 이것은 인간 개체에서 면역원으로서 불변 영역을 제거하지만 외래 가변 도메인에 대한 면역 반응의 가능성은 남아있다 (LoBuglio, A.F. *et al.* (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). 다른 접근법은 인간-유래 불변 영역을 제공하는 것뿐만 아니라, 가능한 인간 형태에 가깝도록 가변 영역을 재형상화하기 위해 가변 도메인을 변형시키는 것에도 초점을 맞추고 있다. 중쇄 및 경쇄 둘 다의 가변 도메인은 주어진 종에서 상대적으로 보존되어 있고 추정상 CDR에 대한 스캐폴딩(scaffolding)을 제공하는 네 개의 프레임워크 영역 (FR)에 의해 플랭킹된, 문제의 항원에 반응하여 달라지고 결합 능력을 결정하는 세 개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 함유한 것으로 알려져 있다. 비-인간 항체가 특정 항원에 대하여 제조될 때, 가변 도메인은 변형될 인간 항체에 존재하는 FR 상에 비-인간 항체로부터 유래된 CDR을 이식함으로써 "재형상화" 또는 "인간화"될 수 있다. 다양한 항체에 대한 이 접근법의 적용은 문헌에서 보고되었다: Sato, K. *et al.* (1993) Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. *et al.* (1988) "Reshaping HumanAntibodies for Therapy," Nature 332:323-327; Verhoeven, M. *et al.* (1988) "Reshaping HumanAntibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. *et al.* (1991) "HumanizationOf A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation," Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. *et al.* (1991) "Construction Of Reshaped HumanAntibodies With HIV-Neutralizing Activity," HumanAntibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. *et al.* (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. *et al.* (1991) "Reshaping A HumanMonoclonal Antibody To Inhibit HumanRespiratory Syncytial Virus Infection in vivo," Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. *et al.* (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. *et al.* (1992) "HumanizationOf An Anti-p185her2 Antibody For HumanCancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; 및 Co, M.S. *et al.* (1992) "Chimeric And HumanizedAntibodies With Specificity For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148:1149-1154. 일부 구체예에서, 인간화된 항체는 모든 CDR 서열 (예를 들어, 마우스 항체의 6개의 CDR 모두를 함유한 인간화된 마우스 항체)을 보존하고 있다. 다른 구체예에서, 인간화된 항체는 원래의 항체와 비교하여 서열이 상이한 하나 이상의 CDR (하나, 둘, 셋, 넷, 다섯 또는 여섯 개)을 갖는다.

[0114] 설치류 또는 변형된 설치류 가변 도메인 및 인간 불변 도메인에 융합된 관련 상보성 결정 영역 (CDR)을 갖는 키메라 항체를 포함하여, 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 항원-결합 부위를 포함하는 많은 "인간화된" 항체 분자가 기술되어 있다 (예를 들어, Winter *et al.* (1991) "Man-made Antibodies," Nature 349:293-299; LoBuglio *et al.* (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989), Shaw *et al.* (1987) "Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-AssociatedAntigen," J. Immunol. 138:4534-4538, and Brown *et al.* (1987) "Tumor-SpecificGenetically Engineered Murine/HumanChimeric Monoclonal Antibody," Cancer Res. 47:3577-3583 참조). 다른 참고문헌은 적절한 인간 항체 불변 도메인과의 융합 전에 인간 지지 프레임워크 영역 (FR)으로 이식된 설치류 CDR을 기술한다 (예를 들어, Riechmann, L. *et al.* (1988) "Reshaping HumanAntibodies for Therapy," Nature 332:323-327; Verhoeven, M. *et al.* (1988) "Reshaping HumanAntibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," Science 239:1534-1536; and Jones *et al.* (1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A HumanAntibody With Those From A Mouse," Nature 321:522-525 참조). 또 다른 참고문헌은 재조합으로 덧붙여진 설치류 프레임워크 영역에 의해 지지되는 설치류 CDR을 기술한다. 예를 들어, 유럽 특허 공개 번호 519,596 참조. 이 "인간화된" 분자들은 인간 수령체에서 상기 모이어티의 치료적 적용의 기간 및 유효성을 제한하는, 설치류 항-인간 항체 분자에 대한 원치않는 면역학적 반응을 최소화하도록 디자인된다. 이용될 수 있는 다른 항체 인간화 방법은 Daugherty *et al.* (1991) "Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins," Nucl.Acids Res. 19:2471-2476 및 미국 특허 번호 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; 및 5,866,692에서 개시된다.

[0115] II. Fc γ 수용체 (Fc γ R)

[0116] 두 중쇄의 CH2 및 CH3 도메인은 그것에 한정되는 것은 아니지만, Fc 감마 수용체 (Fc γ R)를 포함하여, 세포의 Fc 수용체에 의해 인식된 도메인인 Fc 영역을 형성하기 위해 상호작용한다. 본원에서 사용되는, 용어 "Fc 영역"은 IgG 중쇄의 C-말단 영역을 규정하기 위해 사용된다. 예시의 인간 IgG1의 CH2-CH3 도메인의 아미노산 서열

은 (SEQ ID NO:1)이다:

[0117] 231 240 250 260 270 280
 [0118] APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 [0119] 290 300 310 320 330
 [0120] GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 [0121] 340 350 360 370 380
 [0122] PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 [0123] 390 400 410 420 430
 [0124] WESNGQPENN YKTPPVLD SGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
 [0125] 440 447
 [0126] ALHNHYTQKS LSLSPGX

[0127] Kabat 에 기재된 대로 EU 색인에 의해 넘버링되며, 여기에서, X는 리신 (K)이거나 또는 없다.

[0128] 예시의 인간 IgG2의 CH2-CH3 도메인의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:2)이다:

[0129] 231 240 250 260 270 280
 [0130] APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD
 [0131] 290 300 310 320 330
 [0132] GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA
 [0133] 340 350 360 370 380
 [0134] PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE
 [0135] 390 400 410 420 430
 [0136] WESNGQPENN YKTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
 [0137] 440 447
 [0138] ALHNHYTQKS LSLSPGX

[0139] Kabat 에 기재된 대로 EU 색인에 의해 넘버링되며, 여기에서, X는 리신 (K)이거나 또는 없다.

[0140] 예시의 인간 IgG3의 CH2-CH3 도메인의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:3)이다:

[0141] 231 240 250 260 270 280
 [0142] APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD
 [0143] 290 300 310 320 330
 [0144] GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 [0145] 340 350 360 370 380
 [0146] PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 [0147] 390 400 410 420 430
 [0148] WESSGQPENN YNTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVME
 [0149] 440 447
 [0150] ALHNRFTQKS LSLSPGX

[0151] Kabat 에 기재된 대로 EU 색인에 의해 넘버링되며, 여기에서, X는 리신 (K)이거나 또는 없다.

[0152] 예시의 인간 IgG4의 CH2-CH3 도메인의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:4)이다:

[0153] 231 240 250 260 270 280

[0154] APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD

[0155] 290 300 310 320 330

[0156] GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS

[0157] 340 350 360 370 380

[0158] SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

[0159] 390 400 410 420 430

[0160] WESNGQPENN YKTPPVLD SGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSV MHE

[0161] 440 447

[0162] ALHNHYTQKS LSLSLGX

[0163] Kabat에 기재된 대로 EU 색인에 의해 넘버링되며, 여기에서, X는 리신 (K)이거나 또는 없다.

[0164] 본 명세서 전반에 걸쳐, IgG 중쇄의 불변 영역에서 잔기의 넘버링은 Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. PublicHealth Service, NH1, MD (1991)에 따르는 EU 색인의 것이며 ("Kabat"), 본원에 참조로 포함된다. 용어 "Kabat에서와 같은 EU 색인"은 인간 IgG1 EU 항체의 넘버링을 말한다. 면역글로불린의 성숙한 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인으로부터의 아미노산은 사슬 내 아미노산의 위치에 의해 지정된다. Kabat은 항체에 대한 수많은 아미노산 서열을 기술하고, 각 하위그룹에 대한 아미노산 일치 서열을 확인하며, 잔기 번호를 각 아미노산에 배정하고, CDR은 Kabat에 의해 규정된 대로 확인된다 (Chothia, C. & Lesk, A. M. ((1987) "*Canonical structures for the hyper가변 regions of immunoglobulins*," J. Mol. Biol. 196:901-917)에 의해 규정된 CDR_{H1}은 5개의 잔기만큼 먼저 시작되는 것이 인지될 것이다). Kabat 넘버링 전략은 보존된 아미노산을 참조하여 Kabat의 일치 서열 중 하나와 문제의 항체를 배열함으로써 Kabat의 목록에 포함되지 않은 항체로 확장 가능하다. 잔기 번호를 배정하기 위한 이 방법은 분야의 표준이 되었고 키메라 또는 인간화된 변종을 포함하여 상이한 항체들의 동등한 위치에 있는 아미노산을 쉽게 식별한다. 예를 들어, 인간 항체 경쇄의 위치 50에 있는 아미노산은 마우스 항체 경쇄의 위치 50에 있는 아미노산과 동등한 위치를 차지한다.

[0165] 항체 불변 영역 내 많은 상이한 위치 (예를 들어, Kabat에 기재된 EU 색인에 의해 넘버링된 바와 같이, 제한되는 것은 아니지만, 위치 192, 193 및 214를 포함하는 CH1 위치; 위치 270, 272, 312, 315, 356 및 358를 포함하는 Fc 위치)에서 다형성이 관찰되었으며, 따라서 제공된 서열과 선행 기술의 서열 사이에는 약간의 차이가 존재할 수 있다. 인간 면역글로불린의 다형성 형태는 잘 특성화되어 있다. 현재는, 18개의 Gm 알로타입(allotype)이 공지되어 있다: G1m (1, 2, 3, 17) 또는 G1m (a, x, f, z), G2m (23) 또는 G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) 또는 G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, *et al.*, "*The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function And Regulation*," Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. *et al.*, 1979, Hum.Genet.: 50, 199-211). 구체적으로 본 발명의 항체는 임의의 면역글로불린 유전자의 임의의 알로타입, 아이소알로타입, 또는 하플로타입(haplotype)을 포함할 수 있고, 본원에서 제공된 서열의 알로타입, 아이소알로타입 또는 하플로타입에 제한되는 것은 아닌 것으로 생각된다. 게다가, 일부 발현 시스템에서 CH3 도메인의 C-말단 아미노산 잔기 (상기 볼드체)는 번역 후에 제거될 수 있다. 따라서, CH3 도메인의 C-말단 잔기는 발명의 PD-1-결합 분자에서 임의의 아미노산 잔기이다. 구체적으로 CH3 도메인의 C-말단 잔기가 없는 PD-1-결합 분자가 본 발명에 포함된다. 또한 CH3 도메인의 C-말단 리신 잔기를 포함하는 이러한 구성물이 본 발명에 구체적으로 포함된다.

[0166] 활성화 및 억제 신호는 세포의 Fc 감마 수용체 (FcγR)로의 Fc 영역의 결합을 통해 변환된다. 정반대의 기능을 초래하는 이러한 결합의 능력은 상이한 FcγR들 중에서도 구조적 차이로부터 발생한다. 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM) 및 면역수용체 티로신-기반 억제 모티프 (ITIM)라고 불리는, 수용체의 세포질 신호 전달 도메인 내 두 개의 별개의 도메인은 상이한 반응을 설명한다. 이 구성물들에 대한 상이한 세포질 효소의 충원은 FcγR-매개 세포 반응의 결과를 나타낸다. ITAM-함유 FcγR 복합체는 FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA를 포함하는 반면에, ITIM-함유 복합체는 FcγRIIB만을 포함한다. 인간 호중구는 FcγRIIA 유전자를 발현한다. 면역 복합체

또는 특이적 항체 교차결합을 통한 Fc γ RIIA 군집화(clustering)는 ITAM 인산화를 용이하게 하는 수용체-관련 키나제와 함께 ITAM을 응집시키는 역할을 한다. ITAM 인산화는 Syk 키나제에 대한 도킹(docking) 부위로서 작용하며, 이것의 활성화는 하류 기질 (예컨대, PI₃K)의 활성화를 초래한다. 세포 활성화는 전염증성 매개자의 방출로 이어진다. Fc γ RIIB 유전자는 B 림프구에서 발현되며; 그것의 세포외 도메인은 Fc γ RIIA와 96% 동일하고 구별 불가능한 방식으로 IgG 복합체에 결합한다. Fc γ RIIB의 세포외 도메인에서 ITIM의 존재는 Fc γ R의 이런 억제 하위클래스를 한정한다. 최근에 이 억제제의 분자적 기초가 확립되었다. Fc γ R의 활성화와 함께 동시-결찰될 때, Fc γ RIIB의 ITIM은 인산화되어 이노시톨 폴리포스페이트 5'-포스파타제의 SH2 도메인 (SHIP)을 끌어들이며, 이것은 ITAM-함유 Fc γ R-매개 티로신 키나제 활성화의 결과로서 방출된 포스포이노시톨 메신저(messenger)를 가수분해하여, 그 결과 세포 내 Ca⁺⁺의 유입을 방지한다. 그로써 Fc γ RIIB의 교차-결합은 Fc γ R 결찰에 대한 활성화 반응을 약화시키고 세포 반응성을 억제한다. 그로써 B-세포 활성화, B-세포 증식 및 항체 분비가 무산된다.

[0167] **III. 이중특이적 항체, 다중특이적 디아바디 및 DART® 디아바디**

[0168] 항체가 항원의 에피토프에 결합하는 능력은 항체의 VL 및 VH 도메인의 존재 및 아미노산 서열에 좌우된다. 항체 경쇄와 항체 중쇄의 상호작용 및, 특히 그것의 VL과 VH 도메인의 상호작용은 천연 항체의 두 에피토프-결합 부위들 중 하나를 형성한다. 천연 항체들은 단지 하나의 에피토프 중에 결합할 수 있지만 (즉 그것들은 단일 특이적이지만), 그것들은 그 중의 다중 복사물에 결합할 수 있다 (즉 이가 또는 다가를 나타냄).

[0169] 본 발명의 결합 도메인은 "**면역특이적**" 방식으로 에피토프에 결합한다. 본원에서 사용되는 바, 항체, 디아바디 또는 다른 에피토프-결합 분자는 만약 그것이 더 빈번하게, 더 빠르게, 더 긴 기간으로 및/또는 더 큰 친화성으로 대안 에피토프에 관하여 그 에피토프와 반응하거나 회합한다면 또 다른 분자 (즉 에피토프)의 영역에 "**면역특이적으로**" 결합한다고 말할 수 있다. 예를 들어, 바이러스 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항체는 그것이 다른 바이러스 에피토프 또는 비-바이러스 에피토프에 면역특이적으로 결합한 것보다 더 큰 친화성, 결합력으로, 더 빠르게 및/또는 더 큰 기간 동안 이 바이러스 에피토프에 결합하는 항체이다. 또한 이 정의를 관독함으로써, 예를 들어, 제1 표적에 면역특이적으로 결합하는 항체 (또는 모이어티 또는 에피토프)는 제2 표적에 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있거나 결합하지 않을 수 있는 것으로 인지된다. 그로써, "면역특이적 결합"은 반드시 (비록 그것이 포함할 수 있긴 하지만) 독점적인 결합을 필요로 하지 않는다. 일반적으로, 그러나 반드시는 아니지만, 결합에 대한 언급은 "특이적" 결합을 의미한다. 두 분자는 만약 그런 결합이 그것들의 각각의 리간드에 결합하는 수용체와의 특이성을 나타낸다면, 서로 "**물성특이적**" 방식으로 결합할 수 있다고 말할 수 있다.

[0170] 항체의 기능성은 두 개의 분리된 별개의 항원 (또는 동일한 항원의 상이한 에피토프)에 동시에 결합할 수 있는 다중특이적 항체-기반 분자를 생성함으로써 및/또는 동일한 에피토프 및/또는 항원에 대하여 더 높은 원자가 (즉, 두 개 이상의 결합 부위)를 가진 항체-기반 분자를 생성함으로써 향상될 수 있다.

[0171] 천연 항체보다 더 큰 능력을 가진 분자를 제공하기 위해서, 매우 다양한 재조합 이중특이적 항체 포맷이 개발되었으며 (예컨대, PCT 공개 번호 WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544, WO 2013/070565), 이것들 대부분은 추가의 에피토프-결합 단편 (예컨대, scFv, VL, VH, 등)을 항체 코어 (IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM)에, 또는 그 안에 융합시키거나 다수의 에피토프-결합 단편 (예컨대, 두 개의 Fab 단편 또는 scFv)을 융합시키기 위해 링커 펩타이드를 사용한다. 대안의 포맷은 에피토프-결합 단편 (예컨대, scFv, VL, VH, 등)을 다이머화 도메인, 예컨대 CH2-CH3 도메인 또는 대안의 폴리펩타이드에 융합시키기 위해 링커 펩타이드를 사용한다 (WO 2005/070966, WO 2006/107786A WO 2006/107617A, WO 2007/046893). 전형적으로, 이러한 접근법은 타협 및 절충을 포함한다. 예를 들어, PCT 공개 번호 WO 2013/174873, WO 2011/133886 및 WO 2010/136172는 링커의 사용이 치료 설정에서 문제를 유발할 수 있으며, CL 및 CH1 도메인이 각각의 천연 위치로부터 스위치되고 VL 및 VH 도메인이 다양화되어 (WO 2008/027236; WO 2010/108127) 그것들을 하나 이상의 항원에 결합시키는 삼중특이적 항체를 교시한다는 것을 개시한다. 그러므로, 이 문서들에서 개시된 분자는 결합 특이성을 추가적인 항원 중에 결합하는 능력으로 교환한다. PCT 공개 번호 WO 2013/163427 및 WO 2013/119903은 결합 도메인을 포함한 융합 단백질 부가물을 함유하도록 CH2 도메인을 변형시키는 것을 개시한다. 문서는 CH2 도메인이 이펙터 기능을 매개하는데 있어서 최소한의 역할만을 할 가능성이 크다는 것에 주목하고 있다. PCT 공개 번호 WO 2010/028797, WO2010028796 및 WO 2010/028795는 3가 결합 분자를 형성하기 위해 Fc 영역이 추가적인 VL 및 VH 도메인으로 대체된 재조합 항체를 개시한다. PCT 공개 번호 WO 2003/025018 및 WO2003012069는 개별적인 사슬이 scFv 도메인을 함유하는 재조합 디아바디를 개시한다. PCT 공개 번호 WO 2013/006544는 단일 폴리펩타이드 사슬로서 합성된 다음 헤테로다이머 구조를 얻기 위

해 단백질 가수분해된 다가 Fab 분자를 개시한다. 그러므로, 이 문서들에서 개시된 분자는 이펙터 기능을 매개하는 능력의 전부 또는 일부를 추가적인 항원 중에 결합하는 능력으로 교환하였다. PCT 공개 번호 WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2008/024188, WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 및 WO 1991/003493은 추가적인 결합 도메인 또는 작용기를 항체 또는 항체 일부에 추가하는 것 (예를 들어, 디아바디를 항체의 경쇄에 추가하는 것, 또는 추가적인 VL 및 VH 도메인을 항체의 경쇄 및 중쇄에 추가하는 것, 또는 이중기원 융합 단백질을 추가하거나 또는 다수의 Fab 도메인을 서로 연결하는 것)을 개시한다. 그러므로, 이 문서들에서 개시된 분자는 천연 항체 구조체를 추가적인 항원 중에 결합하는 능력으로 교환하다.

[0172] 업계에서는 추가적으로 둘 이상의 상이한 에피토프 중에 결합할 수 있다는 점에서 (즉, 2가 또는 다가에 더하여 이중특이성 또는 다중특이성을 나타냄) 이러한 천연 항체와 상이한 디아바디를 생성하는 능력에 주목하였다 (예컨대 Holliger *et al.* (1993) "'Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger *et al.*); US 2004/0220388 / WO 02/02781 (Mertens *et al.*); Alt *et al.* (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. *et al.* (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens *et al.*); Olafsen, T. *et al.* (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27; Wu, A. *et al.* (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Viable Domain Exchange," Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano *et al.* (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain," Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. *et al.* (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. *et al.* (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy," Cancer Res. 69(12):4941-4944 참조).

[0173] 디아바디의 디자인은 단일-사슬 가변 도메인 단편 (scFv)으로서 공지된 항체 유도체를 기반으로 한다. 이러한 분자는 짧은 결합 펩타이드를 사용하여 경쇄 및/또는 중쇄 가변 도메인을 결합시킴으로써 제조된다. Bird *et al.* (1988) ("Single-Chain Antigen-Binding Proteins," Science 242:423-426)는 한 가변 도메인의 카르복시 말단과 다른 가변 도메인의 아미노 말단 사이에서 대략 3.5 nm의 다리를 만드는 결합 펩타이드의 실례를 기술한다. 다른 서열의 링커들이 디자인되었고 사용되었다 (Bird *et al.* (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins," Science 242:423-426). 링커는 추가적인 기능, 예컨대 약물의 부착 또는 고체 지지체에의 부착을 위해 차례로 변형될 수 있다. 단일 사슬 변종은 재조합으로 또는 합성으로 제조될 수 있다. scFv의 합성에 의한 제조를 위해서, 자동화 합성기가 사용될 수 있다. scFv의 재조합 제조를 위해서는, scFv를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 적합한 플라스미드가 적합한 숙주 세포, 진핵세포, 예컨대 효모, 식물 세포, 곤충 세포 또는 포유류 세포, 또는 원핵세포, 예컨대 대장균으로 도입될 수 있다. 관심있는 scFv를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드의 결합과 같은 일상적인 조작에 의해 제조될 수 있다. 결과로 생긴 scFv는 업계에 공지된 표준 단백질 정제 기법을 사용하여 분리될 수 있다.

[0174] 비-단일특이적 디아바디의 제공은, 제한되는 것은 아니지만, 상이한 에피토프를 발현하는 세포를 동시-결찰 및 동시-국소화하는 능력을 포함하여, 항체들에 대하여 상당한 이점을 제공한다. 그러므로 이중특이적 디아바디는 치료법 및 면역진단을 포함한 광범위한 용도를 갖는다. 이중특이성은 다양한 용도에서 디아바디의 디자인 및 엔지니어링에 큰 유연성을 허용하여, 멀티머 항원에 대한 향상된 결합력, 상이한 항원의 교차-결합, 및 두 표적 항원의 존재에 따라 특이적 세포 유형에 대한 직접적 표적화를 제공한다. 증가된 원자가, 낮은 해리율 및 순환으로부터 빠른 클리어런스 (작은 크기, ~50 kDa 또는 그 이하의 디아바디에 대하여)로 인해, 업계에 공지된 디아바디 분자는 또한 종양 이미징 분야에서 특별한 용도를 나타냈다 (Fitzgerald *et al.* (1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*," Protein Eng. 10:1221).

[0175] 디아바디의 이중특이성은 상이한 세포들의 공동-결찰, 예를 들어, 종양 세포에 대한 세포독성 T 세포의 교차-결합에서의 사용으로 이어졌다 (Staerz *et al.* (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells," Nature 314:628-631, and Holliger *et al.* (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody," Protein Eng. 9:299-305; Marvin *et al.* (2005)

"*Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies*," *Acta Pharmacol. Sin.* 26:649-658).
 대안으로, 또는 추가적으로, 이중특이적 디아바디는 상이한 세포들의 표면 상에서 또는 단일 세포에서 수용체를 공동-결찰하는데 사용될 수 있다. 다른 세포들 및/또는 수용체의 공동-결찰은 조절 이펙터 기능 및/또는 면역 세포 신호 전달에 유용하다. 에피토프-결합 부위를 포함하는 다중특이적 분자 (예컨대, 이중특이적 디아바디)는 임의의 면역 세포의 표면 결정요인, 예컨대 B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), BTLA (CD272), CD3, CD8, CD16, CD27, CD32, CD40, CD40L, CD47, CD64, CD70 (CD27L), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD94 (KLRD1), CD137 (4-1BB), CD137L (4-1BBL), CD226, CTLA-4 (CD152), 갈렉틴-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS (CD278), ICOSL (CD275), 킬러 활성화 수용체 (KIR), LAG-3 (CD223), LIGHT (TNFSF14, CD258), MHC 클래스 I 또는 II, NKG2a, NKG2d, OX40 (CD134), OX40L (CD134L), PD1H, PD-1 (CD279), PD-L1 (B7-H1, CD274), PD-L2 (B7-CD, CD273), PVR (NECL5, CD155), SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 (HAVCR2) 및/또는 VISTA (PD-1H)에 대해 지시될 수 있으며, 이것들은 T 림프구, 자연 살해 (NK) 세포, 항원 제공 세포 또는 다른 단핵 세포 상에서 발현된다. 특히, 면역 체크포인트 (또는 그것의 리간드)를 조절하는데 관여하는 세포 표면 수용체에 대해 지시된 에피토프-결합 부위는 대상체에서 면역 체크포인트 분자의 억제 신호 전달에 반대로 작용하거나 이것을 차단함으로써 면역 반응을 자극하거나, 상향조절하거나 또는 향상시키는 이중특이적 또는 다중특이적 결합 분자의 생성에 유용하다. 면역 체크포인트를 조절하는데 관여하는 분자는 B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, 갈렉틴-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC 클래스 I 또는 II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 및/또는 VISTA를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0176] 그러나, 상기 이점은 상당한 비용이 든다. 이러한 비-단일특이적 디아바디의 형성은 둘 이상의 별개의 상이한 폴리펩타이드의 성공적인 조립을 필요로 한다 (즉, 이러한 형성은 디아바디가 상이한 폴리펩타이드 사슬 종의 헤테로다이머화를 통해 형성되는 것을 필요로 한다). 이 사실은 동일한 폴리펩타이드 사슬의 호모다이머화를 통해 형성되는 단일특이적 디아바디와는 대조적이다. 비-단일특이적 디아바디를 형성하기 위해서는 적어도 두 개의 같지 않은 폴리펩타이드 (즉, 두 개의 폴리펩타이드 중)가 제공되어야 하기 때문에, 그리고 이러한 폴리펩타이드의 호모다이머화가 비활성 분자로 이어지기 때문에 (Takemura, S. *et al.* (2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*," *Protein Eng.* 13(8):583-588), 이러한 폴리펩타이드의 생성은 동일한 종의 폴리펩타이드 간의 공유 결합을 방지하기 위한 방식으로 (즉, 호모다이머화를 방지하기 위해) 달성되어야 한다 (Takemura, S. *et al.* (2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*," *Protein Eng.* 13(8):583-588). 그러므로 업계에서는 이러한 폴리펩타이드의 비-공유 회합을 교시하였다 (예컨대 Olafsen *et al.* (2004) "*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications*," *Prot. Engr. Des. Sel.* 17:21-27; Asano *et al.* (2004) "*A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain*," *Abstract* 3P-683, *J. Biochem.* 76(8):992; Takemura, S. *et al.* (2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*," *Protein Eng.* 13(8):583-588; Lu, D. *et al.* (2005) "*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*," *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672 참조).

[0177] 그러나, 업계에서는 비-공유 회합된 폴리펩타이드로 구성된 이중특이적 디아바디가 불안정하고 비-기능적 모노머로 쉽게 회합된다는 것을 인식하였다 (예컨대, Lu, D. *et al.* (2005) "*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*," *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672 참조).

[0178] 이 도전에 직면하여, 업계에서는 **DART® (Dual Affinity Re-Targeting Reagent**; 이중친화성 재표적화 시약) 디아바디라고 불리는 안정하고, 공유 결합된 헤테로다이머 비-단일특이적 디아바디를 개발하는데 성공하였다; 예컨대, 미국 특허 공개 번호 2013-0295121; 2010-0174053 및 2009-0060910; 유럽 특허 공개 번호 EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 및 PCT 공개 번호 WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; 및 Sloan, D.D. *et al.* (2015) "*Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells*," *PLoS Pathog.* 11(11):e1005233. doi: 10.1371/journal.ppat.1005233; Al Hussaini, M. *et al.* (2015) "*Targeting CD123 In AML Using A T-Cell Directed Dual-Affinity Re-Targeting (DART®) Platform*," *Blood pii: blood-2014-05-575704*; Chichili, G.R. *et al.* (2015) "*A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To*

Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates," Sci. Transl. Med. 7(289):289ra82; Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma," Blood 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold," Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion," J. Mol. Biol. 399(3):436-449 참조). 이러한 디아바디는 공유 결합으로 복합체가 형성된 둘 이상의 폴리펩타이드를 포함하고, 이황화 결합이 형성되는 것을 허용하여 그로써 두 폴리펩타이드 사슬을 공유 결합시키는 사용된 폴리펩타이드 중의 각각으로 하나 이상의 시스테인 잔기를 엔지니어링하는 것을 포함한다. 예를 들어, 이러한 구성물의 C-말단에의 시스테인 잔기의 추가는 폴리펩타이드 사슬 간의 이황화 결합을 허용하여, 2가 분자의 결합 특징을 간섭하지 않으면서 결과로 생긴 헤테로다이머를 안정화시키는 것으로 나타났다.

[0179] 가장 단순한 이중특이적 DART® 디아바디의 두 폴리펩타이드 각각은 세 개의 도메인을 포함한다. 제1 폴리펩타이드는 (N-말단에서 C-말단 방향으로) (i) 제1 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인 (VL1)의 결합 영역을 포함하는 제1 도메인, (ii) 제2 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인 (VH2)의 결합 영역을 포함하는 제2 도메인, 및 (iii) 시스테인 잔기 (또는 시스테인-함유 도메인) 및 디아바디의 제2 폴리펩타이드와의 헤테로다이머화를 촉진하여 디아바디의 제1 및 제2 폴리펩타이드를 서로 공유 결합시키는 역할을 하는 헤테로다이머-촉진 도메인을 함유하는 제3 도메인을 포함한다. 제2 폴리펩타이드는 (N-말단에서 C-말단 방향으로) (i) 제2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인 (VL2)의 결합 영역을 포함하는 제1 도메인, (ii) 제1 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인 (VH1)의 결합 영역을 포함하는 제2 도메인, 및 (iii) 시스테인 잔기 (또는 시스테인-함유 도메인) 및 제1 폴리펩타이드 사슬과의 헤테로다이머화를 촉진하기 위해 제1 폴리펩타이드 사슬의 헤테로다이머-촉진 도메인과 복합체를 형성하는 상보적 헤테로다이머-촉진 도메인을 함유하는 제3 도메인을 함유한다. 제2 폴리펩타이드 사슬의 제3 도메인의 시스테인 잔기 (또는 시스테인-함유 도메인)는 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬에 대한 제2 폴리펩타이드 사슬의 공유 결합을 촉진하는 역할을 한다. 이러한 분자는 안정하고, 강력하며 둘 이상의 항원에 동시에 결합하는 능력을 갖는다. 한 구체예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드의 제3 도메인은 각각 시스테인 잔기를 함유하며, 이것은 이황화 결합을 통해 폴리펩타이드에 함께 결합하는 역할을 한다. 도 1은 이러한 디아바디의 개략도를 제공하는데, 이것은 공유 결합을 위해 E-코일/K-코일 헤테로다이머-촉진 도메인 및 시스테인 함유 링커를 이용한다. 도 2 및 도 3A 내지 3C에서 제공된 바와 같이, 폴리펩타이드 중 하나 또는 둘 다는 추가적으로 CH2-CH3 도메인의 서열을 가질 수 있어서, 두 개의 디아바디 폴리펩타이드 간의 복합체 형성은 세포 (예컨대 B 림프구, 수지상 세포, 자연 살해 세포, 대식세포, 호중구, 호산구, 호염기구 및 비만 세포)의 Fc 수용체에 결합 가능한 Fc 영역을 형성한다. 하기 더 상세히 제공된 바와 같이, 이러한 폴리펩타이드 사슬의 CH2 및/또는 CH3 도메인은 서열이 동일할 필요는 없으며, 유리하게는 두 개의 폴리펩타이드 사슬 간의 복합체 형성을 촉진하도록 변형된다.

[0180] 이러한 분자의 많은 변화가 기술되었다 (예컨대, 미국 특허 공개 번호 2015/0175697; 2014/0255407; 2014/0099318; 2013/0295121; 2010/0174053 및 2009/0060910; 유럽 특허 공개 번호 EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 및 PCT 공개 번호 WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538 참조). 이 Fc 영역-함유 DART® 디아바디들은 두 쌍의 폴리펩타이드 사슬을 포함할 수 있다. 제1 폴리펩타이드 사슬은 (N-말단에서 C-말단 방향으로) (i) 제1 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인 (VL1)의 결합 영역을 포함하는 제1 도메인, (ii) 제2 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인 (VH2)의 결합 영역을 포함하는 제2 도메인, (iii) 시스테인 잔기 (또는 시스테인-함유 도메인)를 함유하고 디아바디의 제2 폴리펩타이드와의 헤테로다이머화를 촉진하여 디아바디의 제1 및 제2 폴리펩타이드를 서로 공유 결합시키는 역할을 하는 제3 도메인, 및 (iv) CH2-CH3 도메인을 포함한다. 제2 폴리펩타이드는 (N-말단에서 C-말단 방향으로) (i) 제2 면역글로불린의 경쇄 가변 도메인 (VL2)의 결합 영역을 포함하는 제1 도메인, (ii) 제1 면역글로불린의 중쇄 가변 도메인 (VH1)의 결합 영역을 포함하는 제2 도메인, 및 (iii) 시스테인 잔기 (또는 시스테인-함유 도메인) 및 제1 폴리펩타이드 사슬과의 헤테로다이머화를 촉진하는 헤테로다이머-촉진 도메인을 함유하는 제3 도메인을 함유한다. 본원에서, 두 개의 제1 폴리펩타이드는 Fc 영역을 형성하기 위해 서로 복합체를 형성한다. 도 3A 내지 3C는 상이한 헤테로다이머-촉진 도메인을 이용하는 이러한 디아바디의 세 가지 변화의 개략도를 제공한다.

[0181] 다른 Fc-영역-함유 DART® 디아바디는 세 개의 폴리펩타이드 사슬을 포함할 수 있다. 이러한 DART® 디아바디의 제1 폴리펩타이드는 세 개의 도메인을 함유한다: (i) VL1-함유 도메인, (ii) VH2-함유 도메인 및 (iii) CH2-CH3 서열 함유 도메인. 이러한 DART® 디아바디의 제2 폴리펩타이드는 (i) VL2-함유 도메인, (ii) VH1-함유 도메인 및 (iii) 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬과의 헤테로다이머화 및 공유 결합을 촉진하는 도메인을 함유한다.

이러한 DART® 디아바디의 제3 폴리펩타이드는 CH2-CH3 서열을 포함한다. 그러므로, 이러한 DART® 디아바디의 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬은 함께 회합하여 에피토프에 결합할 수 있는 VL1/VH1 결합 부위뿐만 아니라 제2 에피토프에 결합할 수 있는 VL2/VH2 결합 부위를 형성한다. 이러한 더 복잡한 DART® 분자는 또한 공유 결합된 복합체를 형성하는 기능을 하는 시스테인-함유 도메인을 가지고 있다. 그러므로, 제1 및 제2 폴리펩타이드는 각각의 제3 도메인에서 시스테인 잔기를 포함하는 이황화 결합을 통해 서로 결합된다. 특히, 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬은 이황화 결합을 통해 안정화되는 Fc 영역을 형성하기 위해 서로 복합체를 형성한다. 도 4A 내지 4B는 세 개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 이러한 디아바디의 개략도를 제공한다.

[0182] 또 다른 Fc-영역-함유 DART® 디아바디는 다섯 개의 폴리펩타이드 사슬을 포함할 수 있으며, 이것들은 최대 세 개의 상이한 면역글로불린 (VL1/VH1, VL2/VH2 및 VL3/VH3으로 언급됨)의 경쇄 및 중쇄 가변 도메인으로부터의 결합 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬은 (i) VH1-함유 도메인, (ii) CH1-함유 도메인, 및 (iii) CH2-CH3 서열을 함유하는 도메인을 함유할 수 있다. 이러한 디아바디의 제2 및 제5 폴리펩타이드 사슬은 (i) VL1-함유 도메인, 및 (ii) CL-함유 도메인을 함유할 수 있다. 이러한 디아바디의 제3 폴리펩타이드 사슬은 (i) VH1-함유 도메인, (ii) CH1-함유 도메인, (iii) CH2-CH3 서열을 함유하는 도메인, (iv) VL2-함유 도메인, (v) VH3-함유 도메인 및 (vi) 제3 사슬과 제4 사슬의 다이머화를 촉진하는 헤테로다이머-촉진 도메인을 함유할 수 있다. 이러한 디아바디의 제4 폴리펩타이드는 (i) VL3-함유 도메인, (ii) VH2-함유 도메인 및 (iii) 디아바디의 제3 폴리펩타이드 사슬과의 헤테로다이머화 및 공유 결합을 촉진하는 도메인을 함유할 수 있다. 본원에서, 제1 및 제3 폴리펩타이드는 Fc 영역을 형성하기 위해 서로 복합체를 형성한다. 이러한 더 복잡한 DART® 분자는 또한 공유 결합된 복합체를 형성하는 기능을 하는 시스테인-함유 도메인을 가지고 있어서, 각각의 폴리펩타이드 사슬은 시스테인 잔기를 포함하는 이황화 결합을 통해 적어도 하나의 추가 폴리펩타이드 사슬에 결합된다. 바람직하게는, 이러한 도메인은 N-말단에서 C-말단 방향으로 정렬된다. 도 5는 다섯 개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 이러한 디아바디의 개략도를 제공한다.

[0183] 4가 분자가 바람직하지만 Fc는 필요하지 않은 대안의 구성물이 업계에 공지되어 있는데, "TandAb"로도 불리는 4가 탠덤(tandem) 항체를 포함하고, 이에 한정되는 것은 아니며 (예컨대, 미국 특허 공개 번호 2005-0079170, 2007-0031436, 2010-0099853, 2011-020667, 2013-0189263; 유럽 특허 공개 번호 EP 1078004, EP 2371866, EP 2361936 및 EP 1293514; PCT 공개 번호 WO 1999/057150, WO 2003/025018, 및 WO 2013/013700 참조), 이것들은 각각 VH1, VL2, VH2, 및 VL2 도메인을 가지고 있는 두 개의 동일한 사슬의 호모다이머화에 의해 형성된다.

[0184] 최근에, 두 개의 디아바디-형 결합 도메인 및 하나의 비-디아바디-형 도메인 및 Fc 영역을 통합하는 3가 구조가 기술되었다 (예컨대 2015년 5월 29일에 출원된 "Tri-Specific Binding Molecules and Methods of Use Thereof"라는 제목의 PCT 출원 번호 PCT/US15/33076; 및 2015년 5월 29일에 출원된 "Tri-Specific Binding Molecules That Specifically Bind to Multiple Cancer Antigens and Methods of Use Thereof"라는 제목의 PCT/US15/33081 참조). 이러한 3가 분자는 단일특이적, 이중특이적 또는 삼중특이적 분자를 생성하는데 이용될 수도 있다. 도 6A 내지 6F는 3 또는 4개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 이러한 3가 분자의 개략도를 제공한다.

[0185] IV. 본 발명의 항-인간 PD-1-결합 분자

[0186] 본 발명의 바람직한 PD-1-결합 분자는 항체, 디아바디, BiTE, 등을 포함하고 인간 PD-1 (CD279)의 연속적 또는 불연속적 (예를 들어, 형태적) 부분 (에피토프)에 결합할 수 있다. 본 발명의 PD-1-결합 분자는 바람직하게는 하나 이상의 비-인간 종, 특히, 영장류 종 (특히 영장류 종, 예컨대 시노몰구스 원숭이)의 PD-1 분자에 결합하는 능력을 또한 나타낼 것이다. 대표적인 인간 PD-1 폴리펩타이드 (NCBI 서열 NP_005009.2; 20개의 아미노산 잔기 신호 서열 (밑줄로 표시됨) 및 268개의 아미노산 잔기 성숙 단백질 포함)는 아미노산 서열 (SEQ ID NO:68)을 갖는다:

[0187] MQIQAPWPV VWAVLQLCWR PGWFLDSPDR PWNPTTFSPA LLVTEGDNA
 [0188] TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTVL
 [0189] PNGRDFHMSV VRARRNSGT YLCGAISLAP KAIKESLRA ELRVTERRAE
 [0190] VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLS LVLVWVLAV ICSRAARTI
 [0191] GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT
 [0192] IVFPGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL.

- [0193] 특정 구체예에서 본 발명의 항-인간 PD-1-결합 분자는 다음 기준들 중 어느 것 (하나 이상)을 특징으로 한다:
- [0194] (1) 자극된 인간 T-세포의 표면 상에서 내인성으로 발현된 인간 PD-1에 특이적으로 결합한다;
- [0195] (2) 40 nM 이하의 평형 결합 상수 (K_D)로 인간 PD-1에 특이적으로 결합한다;
- [0196] (3) 0.5 nM 이하의 평형 결합 상수 (K_D)로 인간 PD-1에 특이적으로 결합한다;
- [0197] (4) $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 이상의 온 속도(on rate)(k_a)로 인간 PD-1에 특이적으로 결합한다;
- [0198] (5) $90.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 이상의 온 속도(k_a)로 인간 PD-1에 특이적으로 결합한다;
- [0199] (6) $7 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ 이하의 오프 속도(off rate)(k_d)로 인간 PD-1에 특이적으로 결합한다;
- [0200] (7) $2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ 이하의 오프 속도(k_d)로 인간 PD-1에 특이적으로 결합한다;
- [0201] (8) 비-인간 영장류 PD-1 (예컨대 시노몰구스 원숭이의 PD-1)에 특이적으로 결합한다;
- [0202] (9) PD-1 리간드 (PD-L1/PD-L2)의 PD-1에 대한 결합/억제 활성을 억제한다 (즉 차단하거나 간섭한다);
- [0203] (10) 면역 반응을 자극한다; 및/또는
- [0204] (11) 항-인간 LAG-3 항체와 상승작용을 하여 항원 특이적 T-세포 반응을 자극한다.
- [0205] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "항원 특이적 T-세포 반응"은 그것에 대해 T-세포가 특이적인 항원으로 T-세포를 자극함으로써 유발되는 T-세포에 의한 반응을 나타낸다. 항원 특이적 자극시 T-세포에 의한 반응의 비-제한적 예는 증식 및 사이토카인 생성 (예를 들어, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ 생성)을 포함한다. 항원 특이적 T-세포 반응을 자극하는 분자의 능력은, 예를 들어, 본원에서 기술된 스타필로코쿠스 아우레우스 장독소 B형 항원 ("SEB")-자극된 PBMC 분석을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0206] 본 발명의 바람직한 항-인간 PD-1-결합 분자는 쥐 항-PD-1 단클론성 항체는 쥐과의 항-인간 PD-1 단클론성 항체 "PD-1 mAb 1", "PD-1 mAb 2", "PD-1 mAb 3", "PD-1 mAb 4", "PD-1 mAb 5", "PD-1 mAb 6", "PD-1 mAb 7", "PD-1 mAb 8", "PD-1 mAb 9", "PD-1 mAb 10", "PD-1 mAb 11", "PD-1 mAb 12", "PD-1 mAb 13", "PD-1 mAb 14" 또는 "PD-1 mAb 15"의 VH 및/또는 VL 도메인을 가지고 보다 바람직하게는 이러한 항-인간 PD-1 단클론성 항체들의 VL 도메인의 CDR_H 중 1, 2 또는 3개 모두 및/또는 VL 도메인의 CDR_L 중 1, 2 또는 3개 모두를 가진다. 이러한 바람직한 항-인간 PD-1-결합 분자는 이중특이적 (또는 다중특이적) 항체, 키메라 또는 인간화된 항체, BiTe, 디아바디, 등, 및 변종 Fc 영역을 가진 이러한 결합 분자를 포함한다.
- [0207] 발명은 특히
- [0208] (A) (1) PD-1 mAb 1의 VH 도메인의 세 개의 CDR_HS;
- [0209] (2) PD-1 mAb 1의 VL 도메인의 세 개의 CDR_LS;
- [0210] (3) PD-1 mAb 1의 VH 도메인의 세 개의 CDR_HS 및 PD-1 mAb 1의 VL 도메인의 세 개의 CDR_LS;
- [0211] (4) hPD-1 mAb 1 VH1의 VH 도메인;
- [0212] (5) hPD-1 mAb 1 VL1의 VL 도메인;
- [0213] (6) hPD-1 mAb 1 VL1의 VH 및 VL 도메인;
- [0214] (B) (1) PD-1 mAb 2의 VH 도메인의 세 개의 CDR_HS;
- [0215] (2) PD-1 mAb 2의 VL 도메인의 세 개의 CDR_LS;
- [0216] (3) PD-1 mAb 2의 VH 도메인의 세 개의 CDR_HS 및 PD-1 mAb 2의 VL 도메인의 세 개의 CDR_LS;
- [0217] (4) hPD-1 mAb 2 VH1의 VH 도메인;

- [0218] (5) hPD-1 mAb 2 VL1의 VL 도메인;
- [0219] (6) hPD-1 mAb 2 VL1의 VH 및 VL 도메인;
- [0220] (C) (1) PD-1 mAb 3의 VH 도메인의 세 개의 CDR_Hs;
- [0221] (2) PD-1 mAb 3의 VL 도메인의 세 개의 CDR_Ls;
- [0222] (3) PD-1 mAb 3의 VH 도메인의 세 개의 CDR_Hs 및 PD-1 mAb 3의 VL 도메인의 세 개의 CDR_Ls;
- [0223] (D) (1) PD-1 mAb 4의 VH 도메인의 세 개의 CDR_Hs;
- [0224] (2) PD-1 mAb 4의 VL 도메인의 세 개의 CDR_Ls;
- [0225] (3) PD-1 mAb 4의 VH 도메인의 세 개의 CDR_Hs 및 PD-1 mAb 4의 VL 도메인의 세 개의 CDR_Ls;
- [0226] (E) (1) PD-1 mAb 5의 VH 도메인의 세 개의 CDR_Hs;
- [0227] (2) PD-1 mAb 5의 VL 도메인의 세 개의 CDR_Ls;
- [0228] (3) PD-1 mAb 5의 VH 도메인의 세 개의 CDR_Hs 및 PD-1 mAb 5의 VL 도메인의 세 개의 CDR_Ls;
- [0229] (F) (1) PD-1 mAb 6의 VH 도메인의 세 개의 CDR_Hs;
- [0230] (2) PD-1 mAb 6의 VL 도메인의 세 개의 CDR_Ls;
- [0231] (3) PD-1 mAb 6의 VH 도메인의 세 개의 CDR_Hs 및 PD-1 mAb 6의 VL 도메인의 세 개의 CDR_Ls;
- [0232] (G) (1) PD-1 mAb 7의 VH 도메인의 세 개의 CDR_Hs;
- [0233] (2) PD-1 mAb 7의 VL 도메인, 또는 hPD-1 mAb 7 VL2, 또는 hPD-1 mAb 7 VL3의 세 개의 CDR_Ls;
- [0234] (3) PD-1 mAb 7의 VH 도메인의 세 개의 CDR_Hs 및 PD-1 mAb 7의 VL 도메인, 또는 hPD-1 mAb 7 VL2, hPD-1 mAb 7 VL3의 세 개의 CDR_Ls;
- [0235] (4) hPD-1 mAb 7 VH1, 또는 hPD-1 mAb 7 VH2의 VH 도메인;
- [0236] (5) hPD-1 mAb 7 VL1, 또는 hPD-1 mAb 7 VL2, 또는 hPD-1 mAb 7 VL3의 VL 도메인;
- [0237] (6) hPD-1 mAb 7(1.1), 또는 hPD-1 mAb 7(1.2), 또는 hPD-1 mAb 7(1.3), 또는 hPD-1 mAb 7(2.1), 또는 hPD-1 mAb 7(2.2), 또는 hPD-1 mAb 7(2.3)의 VH 및 VL 도메인;
- [0238] (H) (1) PD-1 mAb 8의 VH 도메인의 세 개의 CDR_Hs;
- [0239] (2) PD-1 mAb 8의 VL 도메인의 세 개의 CDR_Ls;
- [0240] (3) PD-1 mAb 8의 VH 도메인의 세 개의 CDR_Hs 및 PD-1 mAb 8의 VL 도메인의 세 개의 CDR_Ls;
- [0241] (I) (1) PD-1 mAb 9의 VH 도메인, 또는 hPD-1 mAb 9 VH2의 세 개의 CDR_Hs;
- [0242] (2) PD-1 mAb 9의 VL 도메인, 또는 hPD-1 mAb 9 VL2의 세 개의 CDR_Ls;
- [0243] (3) PD-1 mAb 9의 VH 도메인, 또는 hPD-1 mAb 9 VH2의 세 개의 CDR_Hs 및 PD-1 mAb 9의 VL 도메인, 또는 hPD-1 mAb 9 VL2의 세 개의 CDR_Ls;
- [0244] (4) hPD-1 mAb 9 VH1 또는 hPD-1 mAb 9 VH2의 VH 도메인;
- [0245] (5) hPD-1 mAb 9 VL1 또는 hPD-1 mAb 9 VL2의 VL 도메인;
- [0246] (6) hPD-1 mAb 9(1.1), 또는 hPD-1 mAb 9(1.2), 또는 hPD-1 mAb 9(2.1), 또는 hPD-1 mAb 9(2.2)의 VH 및

VL 도메인;

(J) (1) PD-1 mAb 10의 VH 도메인의 세 개의 CDR_{H1}s;

(2) PD-1 mAb 10의 VL 도메인의 세 개의 CDR_{L1}s;

(3) PD-1 mAb 10의 VH 도메인의 세 개의 CDR_{H1}s 및 PD-1 mAb 10의 VL 도메인의 세 개의 CDR_{L1}s;

(K) (1) PD-1 mAb 11의 VH 도메인의 세 개의 CDR_{H1}s;

(2) PD-1 mAb 11의 VL 도메인의 세 개의 CDR_{L1}s;

(3) PD-1 mAb 11의 VH 도메인의 세 개의 CDR_{H1}s 및 PD-1 mAb 11의 VL 도메인의 세 개의 CDR_{L1}s;

(L) (1) PD-1 mAb 12의 VH 도메인의 세 개의 CDR_{H1}s;

(2) PD-1 mAb 12의 VL 도메인의 세 개의 CDR_{L1}s;

(3) PD-1 mAb 12의 VH 도메인의 세 개의 CDR_{H1}s 및 PD-1 mAb 12의 VL 도메인의 세 개의 CDR_{L1}s;

(M) (1) PD-1 mAb 13의 VH 도메인의 세 개의 CDR_{H1}s;

(2) PD-1 mAb 13의 VL 도메인의 세 개의 CDR_{L1}s;

(3) PD-1 mAb 13의 VH 도메인의 세 개의 CDR_{H1}s 및 PD-1 mAb 13의 VL 도메인의 세 개의 CDR_{L1}s;

(N) (1) PD-1 mAb 14의 VH 도메인의 세 개의 CDR_{H1}s;

(2) PD-1 mAb 14의 VL 도메인의 세 개의 CDR_{L1}s;

(3) PD-1 mAb 14의 VH 도메인의 세 개의 CDR_{H1}s 및 PD-1 mAb 14의 VL 도메인의 세 개의 CDR_{L1}s;

(O) (1) PD-1 mAb 15의 VH 도메인의 세 개의 CDR_{H1}s;

(2) PD-1 mAb 15의 VL 도메인의 세 개의 CDR_{L1}s;

(3) PD-1 mAb 15의 VH 도메인의 세 개의 CDR_{H1}s 및 PD-1 mAb 15의 VL 도메인의 세 개의 CDR_{L1}s;

(4) hPD-1 mAb 15 VH1의 VH 도메인;

(5) hPD-1 mAb 15 VL1의 VL 도메인;

(6) hPD-1 mAb 15의 VH 도메인 및 VL 도메인을 가지거나

또는

PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15와 동일한 에피토프에 결합하거나, 또는 이것들과의 결합에 대해 경쟁하는 PD-1 결합 도메인을 포함하는 PD-1-결합 분자에 관한 것이다.

A. 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 1

1. 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 1

PD-1 mAb 1의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:69)이 하기에 제시된다 (CDR_{H1} 잔기는 밑줄로 표시됨):

DVQLQESGPG RVKPSQSLSL TCTVTGFSIT NDYAWNWIRQ FPGNKLEWMG

HITYSGSTSY NPSLKSRISI TRDTSKNHFF LQLSSVTPED TATYYCARDY

GSGYPYTLDY WGQGTSTVTS S.

- [0276] PD-1 mAb 1의 CDR_{H1} (SEQ ID NO:71): NDYAWN
- [0277] PD-1 mAb 1의 CDR_{H2} (SEQ ID NO:72): HITYSGSTSYNPSLKS
- [0278] PD-1 mAb 1의 CDR_{H3} (SEQ ID NO:73): DYGS GYPYTL DY
- [0279] PD-1 mAb 1의 VH 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:70이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0280] cagatccagtgatgtgcagcttcaggagctgggacctggc cgggtgaaac cttctcagtc
- [0281] tctgtccctc accctgcactg tcaactggctt ctcaatcacc aatgattatg cctggaactg
- [0282] gatccgacag tttccaggaa acaaaactgga gtggatgggc cacataacct acagtggcag
- [0283] cactagctac aacctatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgggaca catccaagaa
- [0284] ccactctctc ctgcagtga gttctgtgac tcttgaggac acagccacat attactgtgc
- [0285] aagaggattac ggtagtggct accctatac tttggactac tgggtcaag gtacctcagt
- [0286] caccgtctcc tcc.
- [0287] PD-1 mAb 1의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:74)이 하기에 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0288] QIVLTQSPAL MSASPGEKVT MTCSATSIVS YVYWYQQKPG SSPQPWIVLT
- [0289] SNLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYCQQW SDNPYTFGGG TKLEIK.
- [0290] PD-1 mAb 1의 CDR_{L1} (SEQ ID NO:76): SATSIVSYVY
- [0291] PD-1 mAb 1의 CDR_{L2} (SEQ ID NO:77): LTSNLAS
- [0292] PD-1 mAb 1의 CDR_{L3} (SEQ ID NO:78): QQWSDNPYT
- [0293] PD-1 mAb 1의 VL 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:75이다 (CDR_L 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0294] caaattgttc tcacccagtc tccagcactc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc
- [0295] atgacctgca gtgccacctc aattgtaagt tacgtttact ggtaccagca gaagcctgga
- [0296] tctctcccc aacctggat ttatctcaca tccaacctgg cttctggagt cctgtctgc
- [0297] ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaca tcagcagcat ggaggtgaa
- [0298] gatgtctgcca cttattactg ccagcagtgg agtgataacc cgtacacgtt cggagggggg
- [0299] accaagctgg aaataaaa.
- [0300] 2. "hPD-1 mAb 1"을 형성하기 위한 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 1의 인간화
- [0301] 상기 기술된 귀과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 1은 인간 수령체에 투여시 그것의 항원성을 감소시키기 위하여 항-인간 PD-1 항체를 인간화할 수 있는 능력을 입증하기 위하여 항원성 에피토프들이 확인되었을 때 인간화되었고 추가로 탈면역되었다. 인간화는 본원에서 "hPD-1 mAb 1 VH1"로 표시된 하나의 인간화된 VH 도메인 및 "hPD-1 mAb 1 VL1"로 표시된 하나의 인간화된 VL 도메인을 유발하였다. 따라서, 인간화된 VH 도메인과 쌍을 이룬 인간화된 VL 도메인을 포함하는 항체는 "hPD-1 mAb 1"로 언급된다.
- [0302] hPD-1 mAb 1 VH1의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:79)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0303] DVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGFSIS NDYAWNWIRQ PPGKLEWIG HITYSGSTSY
- [0304] NPSLKSRLTI TRDTSKNQFV LTMTNMDPVD TATYYCARDY GS GYPYTL DY WGQGTTVTVS S.

- [0305] hPD-1 mAb 1 VH1을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:80이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0306] gacgtacagc tccaggaaag tggcccaggt ctggtgaagc catcccagac actgagcctg
- [0307] acttgaccgc tgagtggctt ctccatctca aatgactacg cctggaattg gattaggcag
- [0308] cctcccggta aagggtcgga gtggatcggc cacatcacat acagcggctc cacatcatat
- [0309] aatcccagtc tgaagagccg tcttaccatt actcgcgaca ctagtaagaa ccagtttgtt
- [0310] ctgaccatga ccaacatgga ccctgtggat actgcaacat actattgtgc tcgagattat
- [0311] ggttctggtt acccttatac actcgactac tggggacagg gaaccactgt gaccgtgagc tcc.
- [0312] hPD-1 mAb 1 VL1의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:81)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0313] EIVLTQSPAT LSVSPGEKVT ITCSATSIVS YVYWYQKPG QAPQPLIYLT SNLASGIPAR
- [0314] FSGSGSGTDF LTISSEAE DAATYYCQQW SDNPYTFGGG TKVEIK.
- [0315] hPD-1 mAb 1 VH1을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:82이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0316] gaaatcgttc tgaccagag cccagcaacc ctgtctgtct cccccggaga aaaggtcacc
- [0317] attacttgct ctgctacttc tatctgtcc tacgtgtact ggtatcagca gaagcccggt
- [0318] caggctcccc agccattgat atatctgacc agcaacctgg ctctctggtat cccagctcgt
- [0319] ttttcggta ggggtccgg gactgatttc actttgacta tcagctctct ggaggcagaa
- [0320] gacgcgcga cctattattg tcaacagtgg tcagacaatc catacacttt tggcggtggc
- [0321] accaaagtcg aaataaag.
- [0322] **B. 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 2**
- [0323] **1. 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 2**
- [0324] PD-1 mAb 2의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:83)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0325] DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY ISSGMSISY
- [0326] ADTVKGRFTV TRDNAKNTLF LQMTSLRSED TAIYYCASLS DYFDYWGQGT TLTVSS.
- [0327] PD-1 mAb 2의 CDR_{H1} (SEQ ID NO:85): SFGMH
- [0328] PD-1 mAb 2의 CDR_{H2} (SEQ ID NO:86): YISSGMSISYADTVKG
- [0329] PD-1 mAb 2의 CDR_{H3} (SEQ ID NO:87): LSDYFDY
- [0330] PD-1 mAb 2의 VH 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:84이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0331] gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccgaaactc
- [0332] tcctgtgcag ccctcggatt cgttttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct
- [0333] ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac atcagtagtg gcagtatgag catttcctat
- [0334] gcagacacag tgaagggcg attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc
- [0335] ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgagt

- [0336] gactactttg actacttgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc.
- [0337] PD-1 mAb 2의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:88)이 하기에 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0338] DVVMSQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSTGNTYLHW YLQKPGQSPK LLTYRVSNRF
- [0339] SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV FFCSQTTHVP WTFGGGTKLE IK.
- [0340] PD-1 mAb 2의 CDR_{L1} (SEQ ID NO:90): RSSQSLVHSTGNTYLH
- [0341] PD-1 mAb 2의 CDR_{L2} (SEQ ID NO:91): RVSNRFS
- [0342] PD-1 mAb 2의 CDR_{L3} (SEQ ID NO:92): SQTTHVPWT
- [0343] PD-1 mAb 2의 VL 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:89이다 (CDR_L 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0344] gatgttgatga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc
- [0345] atctcttgca gatctagtc gagccttggt cacagtactg gaaacaccta ttacattgg
- [0346] tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acagggtttc taaccgattt
- [0347] tctggggccc ccgacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc
- [0348] agtagagtgg aggtgagga tctgggagtt tttttctgct ctcaactac acatgttccg
- [0349] tggacgtttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa.
- [0350] 2. "hPD-1 mAb 2"를 형성하기 위한 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 2의 인간화
- [0351] 상기 기술된 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 2는 인간 수령체에 투여시 그것의 항원성을 감소시키기 위하여 항-인간 PD-1 항체를 인간화할 수 있는 능력을 입증하기 위하여 항원성 에피토프들이 확인되었을 때 인간화되었고 추가로 탈면역되었다. 인간화는 본원에서 "hPD-1 mAb 2 VH1"로 표시된 하나의 인간화된 VH 도메인 및 "hPD-1 mAb 1 VL1"로 표시된 하나의 인간화된 VL 도메인을 유발하였다. 따라서, 인간화된 VH 도메인과 쌍을 이룬 인간화된 VL 도메인을 포함하는 임의의 항체는 "hPD-1 mAb 2"로 언급된다.
- [0352] hPD-1 mAb 2 VH1의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:93)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0353] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PGKLEWVAY ISSGMSISY
- [0354] ADTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRTE DYFDYWGQGT TVTVSS.
- [0355] hPD-1 mAb 2 VH1을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:94이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0356] gaagtgcaat tggttgagag tggtggtggc ctggtgcagc cagtggaag tctgcggttg
- [0357] tcctgtgcag caagcggatt tgtgttcagc tcttttggga tgcattggt gcgccaggt
- [0358] cccggcaagg gtctcgagtg ggtagcatac atctccagcg ggtccatgtc tattagttat
- [0359] gccgacacag tgaaggccag gtttactatc tcccgtaga atgcaaaaaa cacactgtac
- [0360] ctgcaaatga atagcctgcg caccaggac accgccttgt actactgcgc ttccctgtct
- [0361] gattacttcg actacttgggg tcagggcaca actgtgacag tttcttcc.
- [0362] hPD-1 mAb 2 VL1의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:95)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0363] DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HSTGNTYLHW YLQKPGQSPQ LLTYRVSNRF

- [0364] SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQTTHVP WTFGGGTKLE IK.
- [0365] hPD-1 mAb 2 VL1을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:96이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0366] gacgttggtga tgacacagtc accactgagt ctgccagtta ccctgggcca gccagccagt
- [0367] atttcttgtc ggagttcaca gagtctggta cattccacag gaaatacata tctccattgg
- [0368] tacctgcaaa aaccaggga gacccccag ctgctgattt atagagtgtc taatcgattt
- [0369] tctggcgtgc cagatcggtt cagcggcagc gggtctggca ctgatttcac actgaaaatc
- [0370] tctagggtgg aggcagagga cgtaggcgtt tactactgta a gtcagaccac ccatgtaccc
- [0371] tggacttttg gccaaaggtac taagctggaa atcaag.
- [0372] C. 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 3
- [0373] PD-1 mAb 3의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:97)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0374] QVQLQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFT DYVMHWVKQT PVHGLEWIGT IDPETGGTAY
- [0375] NQKFKGKAIL TADKSSNTAY MELRSLTSED SAVYYFTREK ITTIVEGTYW YFDVWGTGTT VTVSS
- [0376] PD-1 mAb 3의 CDR_{H1} (SEQ ID NO:99): DYVMH
- [0377] PD-1 mAb 3의 CDR_{H2} (SEQ ID NO:100): TIDPETGGTAYNQKFKG
- [0378] PD-1 mAb 3의 CDR_{H3} (SEQ ID NO:101): EKITTIVEGTYYFDV
- [0379] PD-1 mAb 3의 VH 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:98이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0380] caggttcaac tgcaacagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg
- [0381] tcctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgtaa tgcactgggt gaagcagaca
- [0382] cctgtgcatg gectggaatg gattggaact attgatcctg aaactgggtg tactgcctac
- [0383] aatcagaagt tcaaggccaa ggccatactg actgcagaca agtcctccaa cacagcctac
- [0384] atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactttac aagagagaag
- [0385] attactacga tagtagaggg gacatactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg
- [0386] gtcaccgtct cctca.
- [0387] PD-1 mAb 3의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:102)이 하기에 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0388] DVLLTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIV HSNGDTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF
- [0389] SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHP YTFGGGTKLE IK.
- [0390] PD-1 mAb 3의 CDR_{L1} (SEQ ID NO:104): RSSQNIVHSNGDTYLE
- [0391] PD-1 mAb 3의 CDR_{L2} (SEQ ID NO:105): KVSNRFS
- [0392] PD-1 mAb 3의 CDR_{L3} (SEQ ID NO:106): FQGSHPYT
- [0393] PD-1 mAb 3의 VL 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:103이다 (CDR_L 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0394] gatgttttgc tgacceaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc

- [0395] atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg gagacaccta ttgggaatgg
- [0396] tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct ataaagtttc caaccgattt
- [0397] tctgggggcc cagacaggtt cagtggcagt gggtcaggga cagattttac actcaaaatc
- [0398] agcagagtgg aggcctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatcttccg
- [0399] tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa.
- [0400] **D. 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 4**
- [0401] PD-1 mAb 4의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:107)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0402] DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY ISSGMSISY
- [0403] ADTVKGRFTV TRDNAKNTLF LQMTSLRSED TAIYYCASLT DYFDYWGQGT TLTVSS.
- [0404] PD-1 mAb 4의 CDR_{H1} (SEQ ID NO:109): SFGMH
- [0405] PD-1 mAb 4의 CDR_{H2} (SEQ ID NO:110): YISSGMSISYADTVKG
- [0406] PD-1 mAb 4의 CDR_{H3} (SEQ ID NO:111): LTDYFDY
- [0407] PD-1 mAb 4의 VH 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:108이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0408] gatgtgcagc tcttgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cggaaactc
- [0409] tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agcttttgaa tgcactgggt tcgtcaggct
- [0410] ccagagaagg ggctggagt ggctgcatat attagtagtg gcagtatgag tatttcctat
- [0411] gcagacacag tgaagggccgc attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc
- [0412] ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgact
- [0413] gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctctca.
- [0414] PD-1 mAb 4의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:112)이 하기에 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0415] DVVMSQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSTGNTYFHW YLQKPGQSPK LLTYRVSNRF
- [0416] SGVPDRFGSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQTHVP WTFGGGTKLE IK.
- [0417] PD-1 mAb 4의 CDR_{L1} (SEQ ID NO:114): RSSQSLVHSTGNTYFH
- [0418] PD-1 mAb 4의 CDR_{L2} (SEQ ID NO:115): RVSNRFS
- [0419] PD-1 mAb 4의 CDR_{L3} (SEQ ID NO:116): SQTHVPWT
- [0420] PD-1 mAb 4의 VL 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:113이다 (CDR_L 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0421] gatgttgta tgcceaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc
- [0422] atctctgca gatctagtca gacccttgtt cacagtactg gaaacaccta ttccattg
- [0423] tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acagggtttc taaccgattt
- [0424] tctgggggcc ccgacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc
- [0425] agcagagtgg aggcctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaaactac acatgttccg
- [0426] tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa.

- [0427] E. 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 5
- [0428] PD-1 mAb 5의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:117)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0429] QVQLQQPGVE LVRPGASVKL SCKASGYSFT AYWMNWMKQR PGQGLEWIGV IHPDSETWL
- [0430] NQKFKDKATL TVDKSSSTAY MQLISPTSED SAVYYCAREH YGSSPFAYWG QGTLTVTSA.
- [0431] PD-1 mAb 5의 CDR_{H1} (SEQ ID NO:119): AYWMN
- [0432] PD-1 mAb 5의 CDR_{H2} (SEQ ID NO:120): VIHPDSETWLNQKFKD
- [0433] PD-1 mAb 5의 CDR_{H3} (SEQ ID NO:121): EHYGSSPFAY
- [0434] PD-1 mAb 5의 VH 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:118이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0435] caggtccaac tgcagcagcc tggggttgaa ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg
- [0436] tcttgcgaagg ctcttggeta ctcttcacc gcctactgga tgaactggat gaaacagagg
- [0437] cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg attcatcctt ccgatatgta aacttggtta
- [0438] aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac
- [0439] atgcaactca tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagagcac
- [0440] tacggtagta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca.
- [0441] PD-1 mAb 5의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:122)이 하기에 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0442] DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRANESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL LIYAAASNQGS
- [0443] GVPARFSGSG SGTDFSLNIH PMEEDDTAMY FCQKSKEVPYTFGGGKLEI K.
- [0444] PD-1 mAb 5의 CDR_{L1} (SEQ ID NO:124): RANESVDNYGMSFMN
- [0445] PD-1 mAb 5의 CDR_{L2} (SEQ ID NO:125): AASNQGS
- [0446] PD-1 mAb 5의 CDR_{L3} (SEQ ID NO:126): QKSKEVPYT
- [0447] PD-1 mAb 5의 VL 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:123이다 (CDR_L 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0448] gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggtgtgt ctctagggca gagggccacc
- [0449] atctctctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca tgagttttat gaactggttc
- [0450] caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc
- [0451] ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag attcagcct caacatccat
- [0452] cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttttgtcagc aaagtaagga ggttccttac
- [0453] acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa.
- [0454] F. 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 6
- [0455] PD-1 mAb 6의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:127)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0456] EVKLVESGGG LVNPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PEKRELVAT ISGGGSDTTY
- [0457] PDSVKGRFTI SRDNAKNLY LQMSSLRSED TALYYCARQK ATTWFAYWG GTLTVTST.
- [0458] PD-1 mAb 6의 CDR_{H1} (SEQ ID NO:129): SYGMS

- [0459] PD-1 mAb 6의 CDR_H1 (SEQ ID NO:130): TISGGGSDTYYPDSVKG
- [0460] PD-1 mAb 6의 CDR_H1 (SEQ ID NO:131): QKATTWFAY
- [0461] PD-1 mAb 6의 VH 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:128이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0462] gaaatcgtac tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact
- [0463] ctcatctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcac gaactgggtt
- [0464] cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcatccacg ccgcctctaa ccgcggatct
- [0465] ggggtgcctt cagctttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc
- [0466] tctctggagc cagaggactt tgccgtctat tcttgc cagc aatctaaaga ggtgccctat
- [0467] acttttgggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa.
- [0468] PD-1 mAb 6의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:132)이 하기에 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0469] DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD NYGISFMNWF QQKPGQPPKL LIYPASNQGS
- [0470] GVPARFSGSG SGTDFSLNIH PMEEDDAAMY FC QQSKEVPW TFGGGTKLEI K.
- [0471] PD-1 mAb 6의 CDR_L1 (SEQ ID NO:134): RASESVDNYGISFMN
- [0472] PD-1 mAb 6의 CDR_L2 (SEQ ID NO:135): PASNQGS
- [0473] PD-1 mAb 6의 CDR_L3 (SEQ ID NO:136): QQSKEVPWT
- [0474] PD-1 mAb 6의 VL 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:133이다 (CDR_L 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0475] gacattgtgc tgacccaate tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc
- [0476] atctctctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaactgggtc
- [0477] caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ctgcatccaa ccaaggatcc
- [0478] ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat
- [0479] cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat tcttgc cagc aaagtaagga ggttcctgtg
- [0480] acgttcgggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa.
- [0481] G. 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 7
- [0482] 1. 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 7
- [0483] PD-1 mAb 7의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:137)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0484] QVQLQQGAE LVRPGASVKL SCKASGYSFT SYWMNWVKQR PGQGLEWIGV IHPDSETWL
- [0485] DQKFKDKATL TVDKSSTAY MQLISPTSED SAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLTVSS.
- [0486] PD-1 mAb 7의 CDR_H1 (SEQ ID NO:139): SYWMN
- [0487] PD-1 mAb 7의 CDR_H2 (SEQ ID NO:140): VIHPDSETWLDQKFKD
- [0488] PD-1 mAb 7의 CDR_H3 (SEQ ID NO:141): EHYGTSPFAY
- [0489] PD-1 mAb 7의 VH 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:138이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):

- [0490] gaggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg
- [0491] tcctgcaagg ctcttggtcta ctcttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg
- [0492] cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg attcatcctt ccgatagtga aacttggtta
- [0493] gatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccac cacagcctac
- [0494] atgcaactca tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagggagcac
- [0495] tacggtacta gcccgtttgc ttactggggc caagggaactc tggtcactgt gtcttcc.
- [0496] PD-1 mAb 6의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:132)이 하기에 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0497] DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRANESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL LIHAASNQGS
- [0498] GVPARFSGSG FGTFSLNIH PMEEDDAAMY FCQKSKEVPY TFGGGTKLEI K.
- [0499] PD-1 mAb 7의 CDR_{L1} (SEQ ID NO:144): RANESVDNYGMSFMN
- [0500] PD-1 mAb 7의 CDR_{L2} (SEQ ID NO:145): AASNQGS
- [0501] PD-1 mAb 7의 CDR_{L3} (SEQ ID NO:146): QKSKEVPYT
- [0502] PD-1 mAb 7의 VL 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:143이다 (CDR_L 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0503] gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc
- [0504] atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca tgagttttat gaactggttc
- [0505] caacagaaac caggacagcc acccaaaactc ctcatccatg ctgcatccaa ccaaggatcc
- [0506] ggggtccctg ccaggttttag tggcagtggg ttggggacag acttcagcct caacatccat
- [0507] cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac
- [0508] acgttcggag gggggaccaa gctggaata aaa.
- [0509] 2. "hPD-1 mAb 7"을 형성하기 위한 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 7의 인간화
- [0510] 상기 기술된 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 7은 인간 수령체에 투여시 그것의 항원성을 감소시키기 위하여 항-인간 PD-1 항체를 인간화할 수 있는 능력을 입증하기 위하여 항원성 에피토프들이 확인되었을 때 인간화되었고 추가로 탈면역되었다. 인간화는 본원에서 "hPD-1 mAb 7 VH1" 및 "hPD-1 mAb 7 VH2"로 표시된 두 개의 인간화된 VH 도메인 및 "hPD-1 mAb 7 VL1", "hPD-1 mAb 7 VL2" 및 "hPD-1 mAb 7 VL3"으로 표시된 세 개의 인간화된 VL 도메인을 유발하였다. 인간화된 VL 도메인 중 어느 것이든지 인간화된 VH 도메인 중 어느 하나와 쌍을 이룰 수 있다. 따라서, 인간화된 VH 도메인과 쌍을 이룬 인간화된 VL 도메인을 포함하는 임의의 항체는 "hPD-1 mAb 7"로 언급되고, 인간화된 VH/VL 도메인의 특정 조합은 특이적 VH/VL 도메인을 참조로 언급되며, 예를 들면 hPD-1 mAb 7 VH1 및 hPD-1 mAb 1 VL2를 포함하는 인간화된 항체는 "hPD-1 mAb 7(1.2)"로서 특이적으로 언급된다.
- [0511] hPD-1 mAb 7 VH1의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:147)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0512] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL
- [0513] DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTSS.
- [0514] PD-1 mAb 7의 VH1을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:148이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0515] caagttcaat tggtagacag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag tgttaaggtg
- [0516] tcctgcaaag ccagcgggta cagctttaca agctattgga tgaatgggt gcgtcaagca

- [0517] ccagggcagg gtctggaatg gattggg**gtg atacatcctt ctgacagcga aacatggttg**
- [0518] **gaccagaaat ttaaagat**cg tgtgacaatt acagtcgata agtcacaaag cactgcttac
- [0519] atggaactct ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc caga**gagcac**
- [0520] **tacggcacat caccttttgc atac**tggggc caggaactc tcgtaaccgt atcctcc.
- [0521] hPD-1 mAb 7 VH2의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:149)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0522] QQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT **SYWMN**WVRQA PGQGLEWAGV **IHP**SDSETWL
- [0523] **DQKFKD**RVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH **YGTSPFAY**WG QGTLTVSS.
- [0524] PD-1 mAb 7의 VH2를 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:150이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0525] caagttcaat tggtaacag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag tgttaaggtg
- [0526] tcctgcaaag ccagcgggta cagctttaca **agctattgga tgaat**tggt gcgtcaagca
- [0527] ccagggcagg gtctggaatg ggctggg**gtg atacatcctt ctgacagcga aacatggttg**
- [0528] **gaccagaaat ttaaagat**cg tgtgacaatt acagtcgata agtcacaaag cactgcttac
- [0529] atggaactct ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc caga**gagcac**
- [0530] **tacggcacat caccttttgc atac**tggggc caggaactc tcgtaaccgt atcctcc.
- [0531] hPD-1 mAb 7 VL1의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:151)이 하기에 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0532] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC**RANESVD NYGMSFMN**WF QKPGQPPKL LIH**AASNQGS**
- [0533] GVPSRFSGSG SGTDFLTIS SLEPEDFAVY FC**QKSKEVPY TF**GGGTKVEI K.
- [0534] PD-1 mAb 7의 VL1을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:152이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0535] gaaatcgta tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gcccgggtga acgtgccact
- [0536] ctacgtgca **gagcaaatga gagtgtggac aattacggca tgtccttc**at **gaact**ggttt
- [0537] cagcagaagc ctgggcagcc acctaaagctg ctcattccag **ccgcctctaa ccagggatct**
- [0538] ggggtgcctt cagctttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc
- [0539] tctctggagc cagaggactt tgccgtctat tctgc**cagc aatctaaaga ggtgccctat**
- [0540] **act**tttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa.
- [0541] hPD-1 mAb 7 VL2의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:153)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0542] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC**RASESVD NYGMSFMN**WF QKPGQPPKL LIH**AASNQGS**
- [0543] GVPSRFSGSG SGTDFLTIS SLEPEDFAVY FC**QKSKEVPY TF**GGGTKVEI K.
- [0544] PD-1 mAb 7의 VL2를 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:154이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0545] gaaatcgta tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gcccgggtga acgtgccact
- [0546] ctacgtgca **gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttc**at **gaact**ggttt

- [0547] cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcatccacg ccgcctctaa ccagggatct
- [0548] ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc
- [0549] tctctggagc cagaggactt tgccgtctat tcttgccagc aatctaaaga ggtgccctat
- [0550] acttttgggtg gcgggaccaa gggtgagatc aaa.
- [0551] hPD-1 mAb 7 VL3의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:155)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0552] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL LIHAASNRGS
- [0553] GVPSRFSGSG SGTDFLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI K.
- [0554] PD-1 mAb 7의 VL3을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:156이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0555] gaaatcgtag tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact
- [0556] ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt
- [0557] cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcatccacg ccgcctctaa ccggcgatct
- [0558] ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc
- [0559] tctctggagc cagaggactt tgccgtctat tcttgccagc aatctaaaga ggtgccctat
- [0560] acttttgggtg gcgggaccaa gggtgagatc aaa.
- [0561] 두 hPD-1 mAb 7 VL2 및 hPD-1 mAb 7 VL3의 VL 도메인의 CDR_L1은 아스파라긴 대 세린 아미노산 치환을 포함하고 아미노산 서열: RASESVDNYGMSFMN ((SEQ ID NO:157), 치환된 세린은 밑줄로 표시됨)을 가진다. 유사한 치환이 상기 기술된 PD-1 mAb 7 CDR_L1 도메인 중 임의의 것에 통합될 수 있는 것으로 여겨진다.
- [0562] 또한, hPD-1 mAb 7 VL3의 VL 도메인의 CDR_L2는 글루타민 대 아르기닌 아미노산 치환을 포함하고 아미노산 서열: AASNRGS ((SEQ ID NO:158), 치환된 아르기닌은 밑줄로 표시됨)를 가진다. 유사한 치환이 상기 기술된 PD-1 mAb 7 CDR_L2 도메인 중 임의의 것에 통합될 수 있는 것으로 여겨진다.
- [0563] **H. 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 8**
- [0564] PD-1 mAb 8의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:159)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0565] EGQLQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DYYMNWVKQN HGKSLEWIGD INPKNGDTHY
- [0566] NQKFKGEATL TVDKSSTAY MELRSLTSED SAVYYCASDF DYWGQTTLT VSS.
- [0567] PD-1 mAb 8의 CDR_H1 (SEQ ID NO:161): DYYMN
- [0568] PD-1 mAb 8의 CDR_H2 (SEQ ID NO:162): DINPKNGDTHYNQKFKG
- [0569] PD-1 mAb 8의 CDR_H3 (SEQ ID NO:163): DFDY
- [0570] PD-1 mAb 8의 VH 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:160이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0571] gagggccagc tgcaacaatc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata
- [0572] tcctgtaagg cttctggata cacgttcaact gactactaca tgaactgggt gaagcagaac
- [0573] catggaaaga gccttgagtg gattggagat attaatccta aaaatgggtga cactcactac
- [0574] aaccagaagt tcaagggcga ggccacattg actgtagaca agtcctccac cacagcctac
- [0575] atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc gagcgatttt

- [0576] **gactact**ggg gccaaagcac cactctcaca gtctctccc.
- [0577] PD-1 mAb 8의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:164)이 하기에 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0578] DVVMTQTPLS LPVGLGDQAS ISC**RSSQTLV YSNGNTYLNW** FLQKPGQSPK LLIIY**KVSNRF**
- [0579] **SGVPDR**FSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFC**SQSTHVP FT**FGSGTKLE IK.
- [0580] PD-1 mAb 8의 CDR_{L1} (SEQ ID NO:166): **RSSQTLVYSNGNTYLN**
- [0581] PD-1 mAb 8의 CDR_{L2} (SEQ ID NO:167): **KVSNRFS**
- [0582] PD-1 mAb 8의 CDR_{L3} (SEQ ID NO:168): **SQSTHVPFT**
- [0583] PD-1 mAb 8의 VL 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:165이다 (CDR_L 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0584] gatgttgatga tgacccaac tccactctcc ctgcctgtcg gtcttggaga tcaagcctcc
- [0585] atctcttgca **gatctagta gaccttgta tatagtaatg gaaacaccta tttaaattgg**
- [0586] ttctctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct ac**aaagt**ttc **caaccgattt**
- [0587] **tctggggtcc** cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc
- [0588] agcagagtgg agctgagga tctgggagtt tatctctgct **ctcaaagtac acatgttcca**
- [0589] **ttcacg**tttcg gctcggggac aaagtggaa ataaaa.
- [0590] I. 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 9
- [0591] 1. 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 9
- [0592] PD-1 mAb 9의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:169)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0593] EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS **SYLVS**WVRQT PEKRELVAT **ISGGGGNTYY**
- [0594] **SDSVKGRFTI** SRDNAKNTLY LQISSLRSED TALYYCARY**G FDGAWFAY**WG QGTLTVTVSS
- [0595] PD-1 mAb 9의 CDR_{H1} (SEQ ID NO:171): **SYLVS**
- [0596] PD-1 mAb 9의 CDR_{H2} (SEQ ID NO:172): **TISGGGGNTYYSDSVKG**
- [0597] PD-1 mAb 9의 CDR_{H3} (SEQ ID NO:173): **YGFDAWFAY**
- [0598] PD-1 mAb 9의 VH 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:170이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0599] gaagtgatgc tggatggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc
- [0600] tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt **agttatcttg tgtct**tggt tcgccagact
- [0601] ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc **attagtggtg gtggtggtaa cacctactat**
- [0602] **tcagacagtg tgaagggt**cg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac
- [0603] ctgcaaatca gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aag**gtatggt**
- [0604] **ttcgacggcg cctggtttgc ttact**ggggc caagggactc tggtcactgt ctcttcc.
- [0605] PD-1 mAb 9의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:174)이 하기에 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0606] DIQMTQSPAS LSASVGDIVT ITC**RASENIY SYLA**WYQQKQ EKSPQLLVYN **AKTLAA**GVPS
- [0607] RFGSGSGTQ FSLTINSLQP EDFGNYY**CQH HYAVPWT**FGG GTRLEIT

- [0608] PD-1 mAb 9의 CDR_L1 (SEQ ID NO:176): RASENIYSYLA
- [0609] PD-1 mAb 9의 CDR_L2 (SEQ ID NO:177): NAKTLAA
- [0610] PD-1 mAb 9의 CDR_L3 (SEQ ID NO:178): QHHYAVPWT
- [0611] PD-1 mAb 9의 VL 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:175이다 (CDR_L 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0612] gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga tattgtcacc
- [0613] atcacatgtc gagcaagta gaatatattac agttatttag catggtatca gcagaaacag
- [0614] gaaaaatctc ctcagctcct ggtctataaat gcaaaaacct tggcagcagg tgtgccatca
- [0615] aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga ccatcaacag cctgcagcct
- [0616] gaagattttg ggaattatta ctgtcagcat cattatgctg ttccgtggac gttcgggtgga
- [0617] ggcaccagac tggaaatcac a
- [0618] 2. "hPD-1 mAb 9"를 형성하기 위한 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 9의 인간화
- [0619] 상기 기술된 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 9는 인간 수령체에 투여시 그것의 항원성을 감소시키기 위하여 항-인간 PD-1 항체를 인간화할 수 있는 능력을 입증하기 위하여 항원성 에피토프들이 확인되었을 때 인간화되었고 추가로 탈면역되었다. 인간화는 본원에서 "hPD-1 mAb 9 VH1" 및 "hPD-1 mAb 9 VH2"로 표시된 두 개의 인간화된 VH 도메인 및 "hPD-1 mAb 9 VL1" 및 "hPD-1 mAb 9 VL2"로 표시된 두 개의 인간화된 VL 도메인을 유발하였다. 인간화된 VL 도메인 중 어느 것이든지 인간화된 VH 도메인 중 어느 하나와 쌍을 이룰 수 있다. 따라서, 인간화된 VH 도메인과 쌍을 이룬 인간화된 VL 도메인을 포함하는 임의의 항체는 "hPD-1 mAb 9"로 언급되고, 인간화된 VH/VL 도메인의 특정 조합은 특이적 VH/VL 도메인을 참조로 언급되며, 예를 들면 hPD-1 mAb 9 VH1 및 hPD-1 mAb 9 VL2를 포함하는 인간화된 항체는 "hPD-1 mAb 9(1.2)"로서 특이적으로 언급된다.
- [0620] hPD-1 mAb 9 VH1의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:179)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0621] EVQLVESGGG LVRPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVSWVRQA PGKGLEWVAT ISGGGGNTYY
- [0622] SDSVKGRFTI SRD~~NA~~KNSLY LQMNSLRAED TATYYCARYG FDGAWFAYWG QGTLTVTSS
- [0623] hPD-1 mAb 9 VH1을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:180이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0624] gaggtgcagc tgggtggaag tggggcggc ctggtgcgac cgggggaag tctgaaactg
- [0625] tcctgtgcag catcaggatt tactttttca tcttatctcg tgtcttgggt aagacaagca
- [0626] cccggaag gcttggaatg ggtggccact atctccggtg gaggtggcaa cacctactat
- [0627] agcgacagtg tcaagggaag atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac
- [0628] ctccagatga actccctgcg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgttatgga
- [0629] tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaaccgt tagctcc
- [0630] hPD-1 mAb 9 VH2의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:181)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0631] EVQLVESGGG LARPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVGWVRQA PGKLEWTAT ISGGGGNTYY
- [0632] SDSVKGRFTI SRD~~NA~~KNSLY LQMNSARAED TATYYCARYG FDGAWFAYWG QGTLTVTSS
- [0633] hPD-1 mAb 9 VH2를 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:182이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):

- [0634] gaggtgcagc tgggtgaaag tgggggcggc ctggcgcgac ccgggggaag tctgaaactg
- [0635] tcctgtgcag catcaggatt tactttttca tcttatctcg tgggctgggt aagacaagca
- [0636] cccggaaaag gcttggaaatg gacggccact atctccggtg gaggtggcaa cacctactat
- [0637] agcgacagtg tcaagggaag atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac
- [0638] ctccagatga actccgcacg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatatga
- [0639] tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaaccgt tagctcc
- [0640] hPD-1 mAb 9 VH2의 VH 도메인의 CDR_H1은 세린 대 글리신 아미노산 치환을 포함하고 아미노산 서열: SYLVG ((SEQ ID NO:183), 치환된 글리신은 밑줄로 표시됨)를 가진다. 유사한 치환이 상기 기술된 PD-1 mAb 9 CDR_H1 도메인 중 임의의 것에 통합될 수 있는 것으로 여겨진다.
- [0641] hPD-1 mAb 9 VL1의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:184)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0642] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY SYLAWYQKP GKAPKLLIYN AKTLAAGVPS
- [0643] RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYAVPWTFGQ GTKLEIK
- [0644] hPD-1 mAb 9 VL1을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:185이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0645] gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga tcgggtcacc
- [0646] atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat tcatacctcg cctggtatca acagaaacct
- [0647] ggtaaagccc caaaattgct catttacaac gccaaagaccc tcgcagctgg cgtgccaaagt
- [0648] aggtttctcag gcagcggctc agggacagat ttcacctca ccatatcctc actgcagccc
- [0649] gaggattttg ccacttacta ctgcccagcat cattacgcag tgccttggac cttcggacaa
- [0650] ggcaactaagc tcgagatcaa a
- [0651] hPD-1 mAb 9 VL2의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:186)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0652] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY NYLAWYQKP GKAPKLLIYD AKTLAAGVPS
- [0653] RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYAVPWTFGQ GTKLEIK
- [0654] hPD-1 mAb 9 VL2를 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:187이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0655] gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga tcgggtcacc
- [0656] atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat aactacctcg cctggtatca acagaaacct
- [0657] ggtaaagccc caaaattgct catttacgac gccaaagaccc tcgcagctgg cgtgccaaagt
- [0658] aggtttctcag gcagcggctc agggacagat ttcacctca ccatatcctc actgcagccc
- [0659] gaggattttg ccacttacta ctgcccagcat cattacgcag tgccttggac cttcggacaa
- [0660] ggcaactaagc tcgagatcaa a
- [0661] hPD-1 mAb 9 VL2의 VL 도메인의 CDR_L1은 세린 대 아스파라긴 아미노산 치환을 포함하고 아미노산 서열: RASENIYNYLA (SEQ ID NO:188), 치환된 아스파라긴은 밑줄로 표시됨)를 가진다. 유사한 치환이 상기 기술된 PD-1 mAb 9 CDR_L1 도메인 중 임의의 것에 통합될 수 있는 것으로 여겨진다.

- [0662] hPD-1 mAb 9 VL2의 VL 도메인의 CDR_L2는 아스파라긴 대 아스파테이트 아미노산 치환을 포함하고 아미노산 서열: **DAKTLAA** ((SEQ ID NO:189), 치환된 아스파테이트는 밑줄로 표시됨)를 가진다. 유사한 치환이 상기 기술된 PD-1 mAb 7 CDR_L2 도메인 중 임의의 것에 통합될 수 있는 것으로 여겨진다.
- [0663] **J. 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 10**
- [0664] PD-1 mAb 10의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:190)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0665] EVILVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS NYLMSWVRQT PEKRLEWVAS ISGGGSNIYY
- [0666] PDSVKGRFTI SRD~~NA~~KNTLY LQMNSLRSED TALYYCARQE LAFDYWGQGT TLTVSS
- [0667] PD-1 mAb 10의 CDR_H1 (SEQ ID NO:192): **NYLMS**
- [0668] PD-1 mAb 10의 CDR_H2 (SEQ ID NO:193): **SISGGGSNIYYPDSVKG**
- [0669] PD-1 mAb 10의 CDR_H3 (SEQ ID NO:194): **QELAFDY**
- [0670] PD-1 mAb 10의 VH 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:191이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0671] gaagt~~g~~at~~a~~c tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc
- [0672] tctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatctca tgtcttgggt tcgccagact
- [0673] ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaagt attagtggtg gtggtagtaa tatctactat
- [0674] ccagacagtg tgaagggtcgc attcaccata tccagggaca atgccaagaa caccctgtac
- [0675] ctgcaaatga acagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagaa
- [0676] ctggcttttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc
- [0677] PD-1 mAb 10의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:195)이 하기에 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0678] DIQMTQTSS LSASLGDRVT ISCRTSQDIS NFLNWYQKP DGTIKLLIYY TSRLHSGVPS
- [0679] RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GSTLPWTFGG GTKLEII
- [0680] PD-1 mAb 10의 CDR_L1 (SEQ ID NO:197): **RTSQDISNFLN**
- [0681] PD-1 mAb 10의 CDR_L2 (SEQ ID NO:198): **YTSRLHS**
- [0682] PD-1 mAb 10의 CDR_L3 (SEQ ID NO:199): **QQGSTLPWT**
- [0683] PD-1 mAb 10의 VL 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:196이다 (CDR_L 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0684] gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc
- [0685] atcagttgca a ggacaagtca ggacattagc aattttttaa actggtatca gcagaaacca
- [0686] gatggaacta ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca
- [0687] aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa
- [0688] gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtagtagcg ttccgtggac gttcggtgga
- [0689] ggcaccaagc tggaaatcat a
- [0690] **K. 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 11**
- [0691] PD-1 mAb 11의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:200)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):

- [0692] EVQLQQSGTV LARPGASVKM SCKTSGYTFT GYWMHWVKQR PGQGLKWMGA IYPGNSDTHY
- [0693] NQKFKGKAKL TAVTSASTAY MELSSLTNE SAIYYCTTGT YSYFDVWGTG TTVTVSS
- [0694] PD-1 mAb 11의 CDR_H1 (SEQ ID NO:202): GYWMH
- [0695] PD-1 mAb 11의 CDR_H2 (SEQ ID NO:203): AIYPGNSDTHYNQKFKG
- [0696] PD-1 mAb 11의 CDR_H3 (SEQ ID NO:204): GTYSYFDV
- [0697] PD-1 mAb 11의 VH 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:201이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0698] gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg
- [0699] tcctgcaaga ctcttggtta cacatttacc ggctactgga tgcactgggt aaacagagg
- [0700] cctggacagg gtctgaaatg gatgggggct atttatcctg gaaatagtga tactcactac
- [0701] aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtca catccgccag cactgcctac
- [0702] atggagctca gcagcctgac aaatgaggac tctgcgatct attactgtac tactgggacc
- [0703] tactcgtact tcatgtctg gggcacaggg accacggtca cgtctcttc a
- [0704] PD-1 mAb 11의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:205)이 하기에 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0705] DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSCRASQSIG TSIHWYQHRT NGSPRLLIK ASESISGIPS
- [0706] RFSGSGSGTD FTLINSVES EDIADYYCQQ SNSWLTFGAG TKLELK
- [0707] PD-1 mAb 11의 CDR_L1 (SEQ ID NO:207): RASQSIGTSIH
- [0708] PD-1 mAb 11의 CDR_L2 (SEQ ID NO:208): YASESIS
- [0709] PD-1 mAb 11의 CDR_L3 (SEQ ID NO:209): QQSNSWL
- [0710] PD-1 mAb 11의 VL 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:206이다 (CDR_L 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0711] gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt
- [0712] ttctctctgca gggccagtc gagcattggc acaagcatc actggtatca gcacagaaca
- [0713] aatggttctc caaggttctc cataaagtat gcttctgagt ctatctctgg gatcccttc
- [0714] aggttttagtg gcagtggatc agggactgat ttactctta gcatcaacag tgtggagtct
- [0715] gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa agtaatagct ggctcacgtt cgggtgctggg
- [0716] accaagctgg agctgaaa
- [0717] L. 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 12
- [0718] PD-1 mAb 12의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:210)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0719] QGHLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGFTFT DYEMHWVKQT PVHGLEWIGT IDPETGGTAY
- [0720] NQKFKGKAIL TVDKSSTTY MELRSLTSED SAVFYCSRER ITTVVEGAYW YFDVWGTGT VTVSS
- [0721] PD-1 mAb 12의 CDR_H1 (SEQ ID NO:212): DYEMH
- [0722] PD-1 mAb 12의 CDR_H2 (SEQ ID NO:213): TIDPETGGTAYNQKFKG
- [0723] PD-1 mAb 12의 CDR_H3 (SEQ ID NO:214): ERITTVVEGAYWYFDV

- [0724] PD-1 mAb 12의 VH 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:211이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0725] cagggtcacc tgcagcagtc tgggctgag ctggtgaggc ctgggcttc agtgacgctg
- [0726] tcctgcaagg cttcgggctt cacatttact gactatgaga tgcactgggt gaaacagaca
- [0727] cctgtgcatg gcctggaatg gattgggact attgatcctg aaactggtgg tactgcctac
- [0728] aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg acagtagaca aatcttcac tacaacctac
- [0729] atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct tttattgttc aagagagagg
- [0730] attactacgg ttgttgaggg ggccatactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg
- [0731] gtcaccgtct cctca
- [0732] PD-1 mAb 4의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:215)이 하기에 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0733] DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIV HSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLICKVSTRF
- [0734] SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLV YYCFQGSHPV YTFGGGTKLE IK
- [0735] PD-1 mAb 12의 CDR_L1 (SEQ ID NO:217): RSSQNIVHSNNGNTYLE
- [0736] PD-1 mAb 12의 CDR_L2 (SEQ ID NO:218): KVSTRFS
- [0737] PD-1 mAb 12의 CDR_L3 (SEQ ID NO:219): FQGSHPVYT
- [0738] PD-1 mAb 12의 VL 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:216이다 (CDR_L 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0739] gatgttttga tgacceagac tccactctcc ctgccgtgca gtcttggaga tcaagcctcc
- [0740] atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg gaaacaccta ttagaatgg
- [0741] tacttgcaaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct gcaagtttc caccgattt
- [0742] tctggggctcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc
- [0743] agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattattgct ttcaaggttc acatgttccg
- [0744] tacacgtttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa
- [0745] **M. 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 13**
- [0746] PD-1 mAb 13의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:220)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0747] EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SHTMSWVRQT PEKRLEWVAT ISGGGSNIYY
- [0748] PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRSED TALYYCARQA YYGNYWYFDV WGTGTTVTVS S
- [0749] PD-1 mAb 13의 CDR_H1 (SEQ ID NO:222): SHTMS
- [0750] PD-1 mAb 13의 CDR_H2 (SEQ ID NO:223): TISGGGSNIYYPDSVKG
- [0751] PD-1 mAb 13의 CDR_H3 (SEQ ID NO:224): QAYYGNWYFDV
- [0752] PD-1 mAb 13의 VH 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:221이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0753] gaagtgatgc tgggtgagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc
- [0754] tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agccatacca tgtcttgggt tcgccagact

- [0755] ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtggtg gtggttctaa tatctactat
- [0756] ccagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac
- [0757] ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagct
- [0758] tactacggta attactggta cticgatgtc tggggcacag ggaccacggt caccgtctcc
- [0759] tcc
- [0760] PD-1 mAb 13의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:225)이 하기에 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0761] DIQMTQSPAT QSASLGESVT ITCLASQTIG TWLAWYQKP GKSPQLLIYA ATSLADGVPS
- [0762] RFSGSGSGTK FSFKISLQA EDFVSYYCQQ LDSIPWTFGG GTKLEIK
- [0763] PD-1 mAb 13의 CDR_L1 (SEQ ID NO:227): LASQTIGTWLA
- [0764] PD-1 mAb 13의 CDR_L2 (SEQ ID NO:228): AATSLAD
- [0765] PD-1 mAb 13의 CDR_L3 (SEQ ID NO:229): QQLDSIPWT
- [0766] PD-1 mAb 13의 VL 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:226이다 (CDR_L 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0767] gacattcaga tgaccacgtc tctgccacc cagtctgcat ctctgggaga aagtgtcacc
- [0768] atcacgtgcc tggcaagtca gaccattggt acatggtag catggtatca gcagaaacca
- [0769] gggaaatctc ctgagctcct gatttatgct gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca
- [0770] aggttcagtg gtagtggatc tggcacaaaa tttcttttca agatcagcag cctacaggt
- [0771] gaagattttg taagttatta ctgtcaacaa ctigacagta ttccgtggac gttcggtgga
- [0772] ggcaccaagc tggaaatcaa a
- [0773] N. 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 14
- [0774] PD-1 mAb 14의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:230)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0775] QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKASGYNFI SYWITWVKQR PGQLQWIGN IYPGTDGTTY
- [0776] NEKFKSKATL TVDTSSSTAY MHLSRLTSED SAVYYCATGL HWYFDVWGTG TTVTVSS
- [0777] PD-1 mAb 14의 CDR_H1 (SEQ ID NO:232): SYWIT
- [0778] PD-1 mAb 14의 CDR_H2 (SEQ ID NO:233): NIYPGTDGTTYNEKFKS
- [0779] PD-1 mAb 14의 CDR_H3 (SEQ ID NO:234): GLHWYFDV
- [0780] PD-1 mAb 14의 VH 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:231이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0781] caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctgtgaagc ctggggcttc agtgaagatg
- [0782] tcttgaagg ctcttggtca caacttcac agctactgga taacctgggt gaaacagagg
- [0783] cctggacaag gccttcagtg gattggaaat atttatcctg gtactgatgg tactacctac
- [0784] aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac
- [0785] atgcacctca gtcgctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aactgggcta
- [0786] cactggtact tcgatgtctg gggcacaggg accacggtca ccgtctctc c

- [0787] PD-1 mAb 14의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:235)이 하기에 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0788] DIVMTQSQKF MSTSVGDRVS VTCKASQSVG TNVAWYQKP GQSPKALIYS ASSRFSGVDP
- [0789] RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLAEYFCQQ YNSYPYTFGG GTKLEIK
- [0790] PD-1 mAb 14의 CDR_L1 (SEQ ID NO:237): KASQSVGTNVA
- [0791] PD-1 mAb 14의 CDR_L2 (SEQ ID NO:238): SASSRFS
- [0792] PD-1 mAb 14의 CDR_L3 (SEQ ID NO:239): QQYNSYPYT
- [0793] PD-1 mAb 14의 VL 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:236이다 (CDR_L 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0794] gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagt
- [0795] gtcacctgca a aggccagtc a gagggtgggt actaatgtag cctgggtatca acagaagccc
- [0796] ggtcaatctc ctaaagcact gattttactcg gcatcctccc gattcagtgg cgteccatgat
- [0797] cgcttcacag gcagtggtatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtaa tgtgcagtct
- [0798] gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gttcggaggg
- [0799] gggaccaagc tggaaataaa a
- [0800] 0. 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 15
- [0801] 1. 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 15
- [0802] PD-1 mAb 15의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:240)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0803] EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFIFS SYLISWVRQT PEKRLWVA ISGGGADTY
- [0804] ADSVKGRFTI SRDIAKNTLY LQMSSLRSED TALYYCTRRG TYAMDYWGQG TSVTVSS
- [0805] PD-1 mAb 15의 CDR_H1 (SEQ ID NO:242): SYLIS
- [0806] PD-1 mAb 15의 CDR_H2 (SEQ ID NO:243): AISGGGADTYADSVKG
- [0807] PD-1 mAb 15의 CDR_H3 (SEQ ID NO:244): RGTYAMDY
- [0808] PD-1 mAb 15의 VH 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:241이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0809] gaagtgatgc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc
- [0810] tctctgtgcag cctctggatt cattttcagt agctatctca tctcttgggt tcgccagact
- [0811] ccggagaaga ggctggagtg ggtcgtcgcc attagtgggt gtggtgctga cacctactat
- [0812] gccgacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtat
- [0813] ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccttat attactgtac aagacgaggg
- [0814] acctatgcta tggactactg gggtaagga acctcagtea cctctctctc c
- [0815] PD-1 mAb 15의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:245)이 하기에 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0816] DIQMTQSPAS QSASLGESVT ITCLASQTIG TWLAWYQKP GKSPQLLIYA ATSLADGVPS
- [0817] RFSGSGSGTK FSFKISLQA EDFVNYCQQ LYSIPWTFGG GTKLEIK
- [0818] PD-1 mAb 15의 CDR_L1 (SEQ ID NO:247): LASQTIGTWLA

- [0819] PD-1 mAb 15의 CDR_L2 (SEQ ID NO:248): AATSLAD
- [0820] PD-1 mAb 15의 CDR_L3 (SEQ ID NO:249): QQLYSIPWT
- [0821] PD-1 mAb 15의 VL 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:246이다 (CDR_L 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0822] gacattcaga tgaccagtc tcccgcctcc cagtctgcat ctctgggaga aagtgtcacc
- [0823] atcacatgcc tgccaagtca gaccattggt acatggtag catggtatca gcagaaacca
- [0824] gggaaatctc ctcagctcct gatttatgct gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca
- [0825] aggttcagtg gtagtggatc tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct
- [0826] gaagattttg taaattatta ctgtcaacaa cttiacagta ttccgtggacgttcggtgga
- [0827] ggcaccaagc tggaaatcaa a
- [0828] 2. "hPD-1 mAb 15"를 형성하기 위한 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 15의 인간화
- [0829] 상기 기술된 쥐과의 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 15는 인간 수렴체에 투여시 그것의 항원성을 감소시키기 위하여 항-인간 PD-1 항체를 인간화할 수 있는 능력을 입증하기 위하여 항원성 에피토프들이 확인되었을 때 인간화되었고 추가로 탈면역되었다. 인간화는 본원에서 "hPD-1 mAb 2 VH1"로 표시된 한 인간화된 VH 도메인 및 "hPD-1 mAb 1 VL1"로 표시된 한 인간화된 VL 도메인을 유발하였다. 인간화된 VH 도메인과 쌍을 이룬 인간화된 VL 도메인을 포함하는 항체는 "hPD-1 mAb 15"로 언급된다.
- [0830] hPD-1 mAb 15의 VH1 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:250)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0831] EVQLVESGGG LVRPGGSLRL SCAASGFTFS SYLISWVRQA PGKGLEWVAA ISGGGADTTY
- [0832] ADSVKGRFTI SRD~~NA~~KNSLY LQMNSLRAED TATYYCARRG TYAMDYWGQG TLVTSS
- [0833] hPD-1 mAb 15의 VH1 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:251이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0834] gaagtgaac tggttgaaag tggcggcggg ctggtgcggc caggtgggtc actcagactg
- [0835] tcttgtgcag cttcaggtct tacattctcc tcttatctta tctcttgggt gcgccaagcc
- [0836] ccaggtgaagg gccttgaatg ggtcgccgcc attagtgggg gtggtgccga tacatattat
- [0837] gccgacagcg tcaagggacg ttccaccatc agcagggaca acgccaagaa tagcctttac
- [0838] ctgcagatga actcacttag agctgaagac accgtactt attactgtgc ccggcgcggg
- [0839] acttacgcta tggactattg gggccagggc accttggtea ctgtctcacc c
- [0840] hPD-1 mAb 15의 VL1의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:252)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [0841] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASQTIG TWLAWYQKP GKAPKLLIYA ATSLADGVPS
- [0842] RFGSGSGGTD FTFTISSLQP EDFATYYCQQ LYSIPWTFGQ GTKLEIK
- [0843] PD-1 mAb 15의 VL1 도메인을 암호화하는 예시의 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:253이다 (CDR_H 잔기를 암호화하는 뉴클레오타이드는 밑줄로 표시됨):
- [0844] gatattcaga tgaccagtc tccagctct ctcagtgaac gcgtaggcga ccgtgtgacc
- [0845] atcacctgtc tggccagtca gaccattgga acctggctcg cctggtatca gcagaaacct
- [0846] ggcaaggccc ctaagctgct gatttacgcc gccacctccc tgcagatgg agtgcctcc
- [0847] cgatttagcg ggtccgggtc cggcaccgac ttcacattca caatcagcag cctccagccc

[0848] gaggatttcg ctacatacta ctgtcaacag ctctactcca ttccatggac ctttggtcag

[0849] ggtactaaac tggagatcaa a

[0850] **V. 항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 1-15 및 엔지니어링된 Fc 영역을 가지는 그것들의 유도체**

[0851] 전통적인 면역 기능에서, 면역계의 세포와 항체-항원 복합체의 상호작용은 이펙터 기능, 예컨대 항체 의존성 세포독성, 비만 세포 탈과립화 및 식균작용(phagocytosis)에서 면역조절 신호, 예컨대 림프구 증식 및 항체 분비의 조절까지의 범위에 있는 다양한 반응을 초래한다. 이 상호작용들 모두는 조혈성 세포 상에서 특수(specialized) 세포 표면 수용체로의 항체 또는 면역 복합체의 Fc 영역의 결합을 통해 시작된다. 이 상호작용들은 모두 조혈성 세포 상의 특수화된 세포 표면 수용체에 대한 항체 또는 면역 복합체의 Fc 영역의 결합을 통해 시작된다. 항체 및 면역 복합체에 의해 촉발된 다양한 세포 반응은 세 개의 Fc 수용체, Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) 및 Fc γ RIII (CD16)의 구조적 이질성으로부터 유발된다. Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32A) 및 Fc γ RIII (CD16)은 활성화 (즉, 면역계 향상) 수용체이고; Fc γ RIIB (CD32B)는 억제 (즉, 면역계 약화) 수용체이다. 이에 더하여, 신생아 Fc 수용체 (FcRn)와의 상호작용은 엔도솜으로부터 세포 표면으로의 IgG 분자의 재순환 및 혈액으로의 방출을 매개한다. 예시의 야생형 IgG1 (SEQ ID NO:1), IgG2 (SEQ ID NO:2), IgG3 (SEQ ID NO:3), 및 IgG4 (SEQ ID NO:4)의 아미노산 서열은 상기 제시된다.

[0852] Fc 영역의 변형은 정상적으로 변화된 표현형, 예를 들어 변화된 혈청 반감기, 변화된 안정성, 세포 효소에 대한 변화된 민감성 또는 변화된 이펙터 기능으로 이어진다. 예를 들어, 암 치료에서 이러한 분자의 유효성을 향상시키기 위해서, 본 발명의 항체 또는 다른 결합 분자를 이펙터 기능에 관련하여 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 이펙터 기능의 감소 또는 제거는, 어떤 경우에, 예를 들어, 작용 메커니즘이 표적 항원을 함유한 세포의 차단 또는 길항작용을 포함하지만, 살해는 포함하지 않는 항체의 경우에 바람직하다. 증가된 이펙터 기능은 일반적으로 종양 및 외래 세포와 같이, Fc γ R이 낮은 수준으로 발현되는 바람직하지 않은 세포, 예를 들어, Fc γ RIIB의 수준이 낮은 종양-특이적 B 세포 (예를 들어, 비-호지킨 림프종, CLL 및 버킷 림프종)에 대해 지시될 때 바람직하다. 상기 구체예에서, 이펙터 기능 활성이 부여되거나 변화된 본 발명의 분자는 이펙터 기능 활성의 향상된 효능이 요구되는 질환, 장애 또는 감염의 치료 및/또는 예방에 유용하다.

[0853] 특정 구체예에서, 본 발명의 PD-1-결합 분자는 야생형 Fc 영역의 아미노산 서열 (예컨대, SEQ ID NO:1)에 대하여 하나 이상의 변형 (예를 들어, 치환, 결실 또는 삽입)을 가지고 있는 Fc 영역을 포함하며, 이것은 하나 이상의 Fc γ R 수용체에 대한 Fc 영역 및, 따라서 발명의 분자의 친화성 및 결합력을 감소시킨다. 다른 구체예에서, 발명의 분자는 야생형 Fc 영역의 아미노산에 대한 하나 이상의 변형을 가지고 있는 Fc 영역을 포함하며, 이것은 하나 이상의 Fc γ R 수용체에 대한 Fc 영역 및, 따라서, 발명의 분자의 친화성 및 결합력을 증가시킨다. 다른 구체예에서, 분자는 Fc 영역을 포함하지 않거나 야생형 Fc 영역을 포함하는 분자에 비해 항체 의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC) 활성의 증가 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 결합의 증가를 부여하거나 또는 매개하는 변종 Fc 영역을 포함한다. 대안의 구체예에서, 분자는 변종 Fc 영역을 포함하는데, 상기 변종은 Fc 영역을 포함하지 않거나 야생형 Fc 영역을 포함하는 분자에 비해 ADCC 활성 (또는 다른 이펙터 기능)의 감소 및/또는 Fc γ RIIB에 대한 결합의 증가를 부여하거나 또는 매개한다. 일부 구체예에서, 발명은 변종 Fc 영역을 포함하는 PD-1-결합 분자를 포함하며, 이 변종 Fc 영역은 야생형 Fc 영역을 포함하는 비슷한 분자에 비해 임의의 Fc γ R에 대한 검출 가능한 결합을 나타내지 않는다. 다른 구체예에서, 발명은 변종 Fc 영역을 포함하는 PD-1-결합 분자를 포함하며, 이 변종 Fc 영역은 단지 단일 Fc γ R, 바람직하게는 Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, 또는 Fc γ RIIA 중 하나에만 결합한다. 이러한 증가된 친화성 및/또는 결합력은 바람직하게는 시험관 내에서 모(parent) 분자의 결합 활성 (변형된 Fc 영역이 없음)이 세포에서 검출되지 않을 때 낮은 수준의 Fc γ R을 발현하는 세포에서, 또는 비-Fc γ R 수용체 표적 항원을 30,000 내지 20,000개 분자/세포의 밀도로, 20,000 내지 10,000개 분자/세포의 밀도로, 10,000 내지 5,000개 분자/세포의 밀도로, 5,000 내지 1,000개 분자/세포의 밀도로, 1,000 내지 200개 분자/세포의 밀도로 또는 200개 분자/세포 이하의 밀도로 (하지만 적어도 10, 50, 100 또는 150개 분자/세포) 발현하는 세포에서 Fc γ R에 대한 검출 가능한 결합의 정도 또는 Fc γ R-관련 활성을 측정하여 평가된다.

[0854] 본 발명의 PD-1-결합 분자는 활성화 및/또는 억제 Fc γ 수용체에 대하여 변화된 친화성을 갖는 변종 Fc 영역을 포함할 수 있다. 한 구체예에서, PD-1-결합 분자는 야생형 Fc 영역을 가진 비슷한 분자에 비해 Fc γ RIIB에 대한 친화성이 증가되고 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대한 친화성이 감소된 변종 Fc 영역을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 PD-1-결합 분자는 변종 Fc 영역을 포함하며, 이것은 야생형 Fc 영역을 가진 비슷한 분자에 비해 Fc γ RIIB에 대하여 감소된 친화성 및 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대하여 증가된 친화성을 갖는다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 PD-1-결합 분자는 야생형 Fc 영역을 가진 비슷한 분자에 비해 Fc γ RIIB에 대하여 감

소된 친화성 및 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대하여 감소된 친화성을 갖는 변종 Fc 영역을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 PD-1-결합 분자는 변종 Fc 영역을 포함하며, 이것은 야생형 Fc 영역을 가진 비슷한 분자에 비해 Fc γ RIIB에 대하여 변화되지 않은 친화성 및 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대하여 감소된 (또는 증가된) 친화성을 갖는다.

[0855] 특정 구체예에서, 본 발명의 PD-1-결합 분자는 면역글로불린이 향상된 이펙터 기능을 갖도록 Fc γ RIIA 및/또는 Fc γ RIIA에 대하여 변화된 친화성을 갖는 변종 Fc 영역을 포함한다. 이펙터 세포 기능의 비-제한적 예는 항체 의존성 세포 매개 세포독성, 항체 의존성 식균작용, 식균작용, 옵소닌화, 옵소닌 식균작용, 세포 결합, 로세팅, C1q 결합 및 보체 의존성 세포 매개 세포독성을 포함한다.

[0856] 바람직한 구체예에서, 친화성 또는 이펙터 기능의 변화는 야생형 Fc 영역을 포함하는 비슷한 분자에 비해 적어도 2배, 바람직하게는 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 50배, 또는 적어도 100배이다. 발명의 다른 구체예에서, 변종 Fc 영역은 야생형 Fc 영역을 포함하는 분자에 비해 적어도 65%, 바람직하게는 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 225% 또는 250% 더 큰 친화성으로 하나 이상의 FcR에 면역특이적으로 결합한다. 이러한 측정은 생체 내 또는 시험관 내 분석에서 이루어질 수 있고, 바람직한 구체예에서는 ELISA 또는 표면 플라스몬 공명 분석과 같은 시험관 내 분석에서 이루어진다.

[0857] 상이한 구체예에서, 본 발명의 PD-1-결합 분자는 Fc γ R 수용체의 적어도 하나의 활성을 작동시키거나, 또는 Fc γ R 수용체의 적어도 하나의 활성에 길항작용하는 변종 Fc 영역을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 분자는 Fc γ RIIB의 하나 이상의 활성, 예를 들어, B-세포 수용체-매개 신호 전달, B-세포의 활성화, B-세포 증식, 항체 생성, B 세포의 세포 내 칼슘 유입, 세포 주기 진행, Fc γ RI 신호 전달의 Fc γ RIIB-매개 억제, Fc γ RIIB의 인산화, SHIP 총원, SHIP 인산화 및 Shc와의 회합, 또는 Fc γ RIIB 신호 변환 경로에서 하나 이상의 하류 분자 (예컨대, MAP 키나아제, JNK, p38, 또는 Akt)의 활성에 길항작용하는 변종을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 PD-1-결합 분자는 Fc γ RI의 하나 이상의 활성, 예를 들어, 비만 세포 활성화, 칼슘 이동, 탈과립화, 사이토카인 생성 또는 세로토닌 방출을 작동시키는 변종을 포함한다.

[0858] 특정 구체예에서, 분자는 둘 이상의 IgG 아이소타입 (예컨대, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4)으로부터의 영역들을 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, Fc 영역은 특정 IgG 아이소타입의 아미노산 서열이 다른 IgG 아이소타입에 비해 상기 아이소타입에 대하여 가장 상동성인 경우 특정 IgG 아이소타입의 것이라고 한다. 다양한 IgG 아이소타입은, 예를 들어 Flesch and Neppert (1999) J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156; Chappel *et al.* (1993) J. Biol. Chem. 33:25124-25131; Chappel *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:9036-9040; 또는 Bruggemann *et al.* (1987) J. Exp. Med 166:1351-1361에 기술된 바와 같이, 힌지 및/또는 Fc 영역의 아미노산 서열의 차이로 인해 혈청 반감기, 보체 결합(complement fixation), Fc γ R 결합 친화성 및 이펙터 기능 활성 (예컨대, ADCC, CDC, 등)을 포함한 상이한 물리적 및 기능성 성질을 나타낸다. 이 유형의 변종 Fc 영역은 단독으로, 또는 아미노산 변형과 함께 사용되어 Fc-매개 이펙터 기능 및/또는 결합 활성에 영향을 줄 수 있다. 조합될 때, 아미노산 변형 및 IgG 힌지/Fc 영역은 야생형 Fc 영역을 포함하는 발명의 분자에 비하여 유사한 기능성 (예컨대 Fc γ RIIA에 대한 증가된 친화성)을 나타낼 수 있고 부가적으로 또는, 더 바람직하게는 발명의 분자에서 이펙터 기능성을 상승적으로 변형시킬 수 있다. 다른 구체예에서, 아미노산 변형 및 IgG Fc 영역은 Fc 영역을 포함하지 않거나 또는 동일한 아이소타입의 야생형 Fc 영역을 포함하는 발명의 분자에 비하여 반대의 기능성 (예컨대 Fc γ RIIA에 대하여 각각 증가된 및 감소된 친화성)을 나타낼 수도 있고 발명의 분자에서 특이적 기능성을 선택적으로 경감하거나 또는 감소시키는 작용을 할 수도 있다.

[0859] 바람직한 특이적 구체예에서, 본 발명의 PD-1-결합 분자는 변종 Fc 영역을 포함하는데, 상기 변종 Fc 영역은 상기 분자가 FcR에 대하여 변화된 친화성을 갖도록 야생형 Fc 영역에 비하여 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하며, 단 상기 변종 Fc 영역은 Sondermann *et al.* (2000) Nature 406:267-73에 의해 개시된 것들과 같이 Fc-FcR 상호작용의 결정학적 및 구조적 분석을 기반으로 Fc γ R과 직접적으로 접촉하게 되는 위치에서는 치환을 갖지 않는다. Fc γ R과 직접적으로 접촉하게 되는 Fc 영역 내 위치의 예는 아미노산 잔기 234 내지 239 (힌지 영역), 아미노산 잔기 265 내지 269 (B/C 루프), 아미노산 잔기 297 내지 299 (C'/E 루프) 및 아미노산 잔기 327 내지 332 (F/G 루프)이다. 일부 구체예에서, 발명의 분자는 구조적 및 결정학적 분석을 기반으로 Fc γ R과 직접적으로 접촉하지 않는, 예를 들어, Fc-Fc γ R 결합 부위 내에 있지 않은 적어도 하나의 잔기의 변형을 포함하는 변종 Fc 영역을 포함한다.

[0860] 변종 Fc 영역은 업계에 널리 공지되어 있으며, 임의의 공지된 변종 Fc 영역은 본 발명에서, 예를 들어, NK 의존

적 또는 대식세포 의존적 분석에서 기능적으로 분석된 바와 같이, Fc 영역 (또는 그 일부)를 포함하는 발명의 분자에 의해 나타난 이펙터 기능을 부여하거나 변형시키는데 사용될 수도 있다. 예를 들어, 이펙터 기능이 변화된 것으로 확인된 Fc 영역 변종은 PCT 공개 번호 WO 04/063351; WO 06/088494; WO 07/024249; WO 06/113665; WO 07/021841; WO 07/106707; 및 WO 2008/140603에서 개시되고, 그 문헌들에서 개시된 임의의 적합한 변종이 본 분자에서 사용될 수 있다.

[0861] 특정 구체예에서, 본 발명의 PD-1-결합 분자는 하나 이상의 영역에서 하나 이상의 아미노산 변형을 가진 변종 Fc 영역을 포함하며, 이 변형(들)은 (야생형 Fc 영역에 비하여) 억제 Fc γ R (예컨대 Fc γ RIIB)에 비하여 활성화 Fc γ R (예컨대 Fc γ RIIA 또는 Fc γ RIIIA)에 대한 변종 Fc 영역의 친화성의 비율을 변화시킨다:

$$\text{친화성 비율} = \frac{\text{Fc}\gamma\text{R}_{\text{활성화}} \text{에 대한 친화성에서 야생형 대 변종 변화}}{\text{Fc}\gamma\text{R}_{\text{억제}} \text{에 대한 친화성에서 야생형 대 변종 변화}}$$

[0862]

[0863] 변종 Fc 영역이 1보다 큰 친화성 비율을 갖는 변종 Fc 영역 (야생형 Fc 영역에 비하여)을 가지고 있는 본 발명의 PD-1-결합 분자가 특히 바람직하다. 이러한 분자는, Fc γ R에 의해 매개되는 이펙터 세포 기능 (예컨대 ADC C)의 향상된 효능이 요구되는 경우, 특히 질환, 장애, 또는 감염, 예컨대, 암 또는 감염성 질환의 치료적 또는 예방적 처치, 또는 그것들의 증상의 개선을 제공하는데 사용된다. 반대로, 1 미만의 친화성 비율을 갖는 변종 Fc 영역은 이펙터 세포 기능의 감소된 효능을 매개한다. 표 1에서는 친화성 비율이 1 초과 또는 1 미만인지에 따라 예시의 단일, 이중, 삼중, 사중 및 오중 돌연변이가 나열된다.

표 1

[0864]

친화도 비율에 의해 나열된 예시의 단일 및 다중 돌연변이				
단일	이중	삼중	사중	오중
친화도 비율 > 1				
F243L	F243L & R292P	F243L, P247L & N421K	L234F, F243L, R292P & Y300L	L235V, F243L, R292P, Y300L & P396L
D270E	F243L & Y300L	F243L, R292P & Y300L	L235I, F243L, R292P & Y300L	L235P, F243L, R292P, Y300L & P396L
R292G	F243L & P396L	F243L, R292P & V305I	L235Q, F243L, R292P & Y300L	F243L, R292P, V305I, Y300L & P396L
R292P	D270E & P396L	F243L, R292P & P396L	F243L, P247L, D270E & N421K	
	R292P & Y300L	F243L, Y300L & P396L	F243L, R255L, D270E & P396L	
	R292P & V305I	P247L, D270E & N421K	F243L, D270E, G316D & R416G	
	R292P & P396L	R255L, D270E & P396L	F243L, D270E, K392T & P396L	
	Y300L & P396L	D270E, G316D & R416G	F243L, D270E, P396L & Q419H	
	P396L & Q419H	D270E, K392T & P396L	F243L, R292P, Y300L, & P396L	
		D270E, P396L & Q419H	F243L, R292P, V305I & P396L	
		V284M, R292L & K370N	P247L, D270E, Y300L & N421K	
		R292P, Y300L & P396L	R255L, D270E, R292G & P396L	
			R255L, D270E, Y300L & P396L	
			D270E, G316D, P396L & R416G	
친화도 비율 < 1				
Y300L	F243L & P396L	F243L, R292P & V305I		
P396L	P247L & N421K			
	R255L & P396L			
	R292P & V305I			

	K392T & P396L			
	P396L & Q419H			

- [0865] 특이적 구체예에서, 변종 Fc 영역에서, 위치 235, 240, 241, 243, 244, 247, 262, 263, 269, 298, 328 또는 330 중 어느 것에서 및 바람직하게는 다음 잔기들 중 하나 이상: A240, I240, L241, L243, H244, N298, I328 또는 V330에서 임의의 아미노산 변형 (예컨대 치환). 상이한 특이적 구체예에서, 변종 Fc 영역에서, 위치 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 또는 439 중 어느 것에서 및 바람직하게는 다음 잔기들 중 하나 이상: H280, Q280, Y280, G290, S290, T290, Y290, N294, K295, P296, D298, N298, P298, V298, I300 또는 L300에서 임의의 아미노산 변형 (예컨대 치환).
- [0866] 바람직한 구체예에서, 변화된 친화성으로 Fc γ R에 결합하는 변종 Fc 영역에서, 위치 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 또는 439 중 어느 것에서 임의의 아미노산 변형 (예컨대 치환). 바람직하게는, 변종 Fc 영역은 다음 잔기들 중 임의의 것을 갖는다: A256, N268, Q272, D286, Q286, S286, A290, S290, A298, M301, A312, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, N326, S326, K330, T339, A333, A334, E334, H334, L334, M334, Q334, V334, K335, Q335, A359, A360 또는 A430.
- [0867] 상이한 구체예에서, 감소된 친화성으로 Fc γ R에 결합하는 (그것의 Fc 영역을 통해) 변종 Fc 영역에서, 위치 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 또는 439 중 임의의 위치에서 임의의 아미노산 변형 (예컨대 치환).
- [0868] 상이한 구체예에서, 향상된 친화성으로 Fc γ R에 결합하는 (그것의 Fc 영역을 통해) 변종 Fc 영역에서, 위치 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 또는 430 중 임의의 위치에서 임의의 아미노산 변형 (예컨대 치환). 상이한 구체예에서, 향상된 친화성으로 Fc γ RIIA에 결합하는 변종 Fc 영역에서, 다음 잔기들 중 어느 것: A255, A256, A258, A267, A268, N268, A272, Q272, A276, A280, A283, A285, A286, D286, Q286, S286, A290, S290, M301, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, S326, K330, A331, Q335, A337 또는 A430.
- [0869] 바람직한 변종은 위치 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 271, 273, 275, 281, 284, 291, 296, 297, 298, 299, 302, 304, 305, 313, 323, 325, 326, 328, 330 또는 332 중 어느 위치에서 하나 이상의 변형을 포함한다.

[0870] 특히 바람직한 변종은 군 A 내지 AI로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함한다:

A	228E, 228K, 228Y 또는 228G;
B	230A, 230E, 230Y 또는 230G;
C	231E, 231K, 231Y, 231P 또는 231G;
D	232E, 232K, 232Y, 232G;
E	233D;
F	234I 또는 234F;
G	235D, 235Q, 235P, 235I 또는 235V;
H	239D, 239E, 239N 또는 239Q;
I	240A, 240I, 240M 또는 240T;
J	243R, 243, 243Y, 243L, 243Q, 243W, 243H 또는 243I;
K	244H;
L	245A;
M	247G, 247V 또는 247L;
N	262A, 262E, 262I, 262T, 262E 또는 262F;
O	263A, 263I, 263M 또는 263T;
P	264F, 264E, 264R, 264I, 264A, 264T 또는 264W;
Q	265F, 265Y, 265H, 265I, 265L, 265T, 265V, 265N 또는 265Q;
R	266A, 266I, 266M 또는 266T;
S	271D, 271E, 271N, 271Q, 271K, 271R, 271S, 271T, 271H, 271A, 271V, 271L, 271I, 271F, 271M, 271Y, 271W 또는 271G;
T	273I;
U	275L 또는 275W;
V	281D, 281K, 281Y 또는 281P;
W	284E, 284N, 284T, 284L, 284Y 또는 284M;
X	291D, 291E, 291Q, 291T, 291H, 291I 또는 291G;
Y	299A, 299D, 299E, 299F, 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S, 299V, 299W 또는 299Y;
Z	302I;
AA	304D, 304N, 304T, 304H 또는 304L
AB	305I;
AC	313F;
AD	323I;
AE	325A, 325D, 325E, 325G, 325H, 325I, 325L, 325K, 325R, 325S, 325F, 325M, 325T, 325V, 325Y, 325W 또는 325P;
AF	328D, 328Q, 328K, 328R, 328S, 328T, 328V, 328I, 328Y, 328W, 328P, 328G, 328A, 328E, 328F, 328H, 328M 또는 328N;
AG	330L, 330Y, 330I 또는 330V;
AH	332A, 332D, 332E, 332H, 332N, 332Q, 332T, 332K, 332R, 332S, 332V, 332L, 332F, 332M, 332W, 332P, 332G 또는 332Y; 및
AI	336E, 336K 또는 336Y

[0871]

[0872] 더 특별하게는 바람직한 변종은 군 1 내지 105로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함한다:

군	변종	군	변종
1	A330L / I332E	54	S239D / D265L / N297D / I332E
2	D265F / N297E / I332E	55	S239D / D265T / N297D / I332E
3	D265Y / N297D / I332E	56	S239D / D265V / N297D / I332E
4	D265Y / N297D / T299L / I332E	57	S239D / D265Y / N297D / I332E
5	F241E / F243Q / V262T / V264F	58	S239D / I332D
6	F241E / F243Q / V262T / V264E / I332E	59	S239D / I332E
7	F241E / F243R / V262E / V264R	60	S239D / I332E / A330I
8	F241E / F243R / V262E / V264R / I332E	61	S239D / I332N
9	F241E / F243Y / V262T / V264R	62	S239D / I332Q
10	F241E / F243Y / V262T / V264R / I332E	63	S239D / N297D / I332E
11	F241L / F243L / V262I / V264I	64	S239D / N297D / I332E / A330Y
12	F241L / V262I	65	S239D / N297D / I332E / A330Y / F241S / F243H / V262T / V264T
13	F241R / F243Q / V262T / V264R	66	S239D / N297D / I332E / K326E
14	F241R / F243Q / V262T / V264R / I332E	67	S239D / N297D / I332E / L235D
15	F241W / F243W / V262A / V264A	68	S239D / S298A / I332E
16	F241Y / F243Y / V262T / V264T	69	S239D / V264I / A330L / I332E
17	F241Y / F243Y / V262T / V264T / N297D / I332E	70	S239D / V264I / I332E
18	F243L / V262I / V264W	71	S239D / V264I / S298A / I332E
19	P243L / V264I	72	S239E / D265N
20	L328D / I332E	73	S239E / D265Q
21	L328E / I332E	74	S239E / I332D
22	L328H / I332E	75	S239E / I332E
23	L328I / I332E	76	S239E / I332N
24	L328M / I332E	77	S239E / I332Q
25	L328N / I332E	78	S239E / N297D / I332E
26	L328Q / I332E	79	S239E / V264I / A330Y / I332 E
27	L328T / I332E	80	S239E / V264I / I332 E
28	L328V / I332E	81	S239E / V264I / S298A / A330Y / I332E
29	N297D / A330Y / I332E	82	S239N / A330L / I332E
30	N297D / I332E	83	S239N / A330Y / I332E
31	N297D / I332E / S239D / A330L	84	S239N / I332D
32	N297D / S298A / A330Y / I 332E	85	S239N / I332E
33	N297D / T299L / I332E	86	S239N / I332N
34	N297D / T299F / I332E / N297D / T299H / I332E	87	S239N / I332Q
35	N297D / T299I / I332E	88	S239N1S298A / I332E

[0873]

군	변종	군	변종
36	N297D / T299L / I332E	89	S239Q / I332D
37	N297D / T299V / I332E	90	S239Q / I332E
38	N297E / I332E	91	S239Q / I332N
39	N297S / I332E	92	S239Q / I332Q
40	P230A / E233D / I332E	93	S239Q / V264I / I332E
41	P244H / P245A / P247V	94	S298A / I332E
42	S239D / A330L / I332E	95	V264E / N297D / I332E
43	S239D / A330Y / I332E	96	V264I / A330L / I332E
44	S239D / A330Y / I332E / K326E	97	V264I / A330Y / I332E
45	S239D / A330Y / I332E / K326T	98	V264I / I332E
46	S239D / A330Y / I332E / L234I	99	V264I / S298A / I332E
47	S239D / A330Y / I332E / L235D	100	Y296D / N297D / I332E
48	S239D / A330Y / I332E / V240I	101	Y296E / N297D / I332 E
49	S239D / A330Y / I332E / V264T	102	Y296H / N297D / I332E
50	S239D / A330Y / I332E / V266I	103	Y296N / N297D / I332E
51	S239D / D265F / N297D / I332E	104	Y296Q / N297I / I332E
52	S239D / D265H / N297D / I332E	105	Y296T / N297D / I332E
53	S239D / D265I / N297D / I332E		

[0874]

[0875]

한 구체예에서, 발명의 PD-1 결합 분자는 Fc 영역에서 적어도 하나의 변형을 가진 변종 Fc 영역을 포함할 것이다. 특정 구체예에서, 변종 Fc 영역은 L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I 및 P396L로 구성되는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 치환을 포함한다.

[0876]

특이적 구체예에서, 변종 Fc 영역은 다음을 포함한다:

[0877]

(A) F243L, R292P, Y300L, V305I 및 P396L으로 구성되는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 치환;

[0878]

(B) 다음으로 구성되는 군으로부터 선택된 적어도 두 개의 치환:

[0879]

(1) F243L 및 P396L;

[0880]

(2) F243L 및 R292P; 및

[0881]

(3) R292P 및 V305I;

[0882]

(C) 다음으로 구성되는 군으로부터 선택된 적어도 세 개의 치환:

[0883]

(1) F243L, R292P 및 Y300L;

[0884]

(2) F243L, R292P 및 V305I;

[0885]

(3) F243L, R292P 및 P396L; 및

[0886]

(4) R292P, V305I 및 P396L;

[0887]

(D) 다음으로 구성되는 군으로부터 선택된 적어도 네 개의 치환:

[0888]

(1) F243L, R292P, Y300L 및 P396L; 및

[0889]

(2) F243L, R292P, V305I 및 P396L; 또는

[0890]

(E) 다음으로 구성되는 군으로부터 선택된 적어도 다섯 개의 치환:

[0891]

(1) F243L, R292P, Y300L, V305I 및 P396L; 및

[0892]

(2) L235V, F243L, R292P, Y300L 및 P396L.

[0893]

또 다른 특이적 구체예에서, 변종 Fc 영역은 다음의 치환을 포함한다:

[0894]

(A) F243L, R292P 및 Y300L;

[0895]

(B) L235V, F243L, R292P, Y300L 및 P396L; 또는

[0896]

(C) F243L, R292P, Y300L, V305I 및 P396L.

- [0897] 한 구체예에서, 발명의 PD-1-결합 분자는 (야생형 IgG1 Fc 영역 (SEQ ID NO:1)에 의해 나타난 결합에 비하여) Fc γ RIA (CD64), Fc γ RIIA (CD32A), Fc γ RIIB (CD32B), Fc γ RIIIA (CD16a) 또는 Fc γ RIIIB (CD16b)에 대한 감소된 결합 (또는 실질적으로 없음)을 나타내는 변종 Fc 영역을 포함한다. 한 구체예에서, 발명의 PD-1-결합 분자는 Fc γ R (예컨대 Fc γ RIIIA)에 대한 감소된 (또는 실질적으로 없음) 결합 및 ADCC 이펙터 기능의 감소 (또는 실질적으로 없음)를 나타내는 변종 Fc 영역을 포함할 것이다. 특정 구체예에서, 변종 Fc 영역은 L234A, L235A, D265A, N297Q 및 N297G로 구성되는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 치환을 포함한다. 특이적 구체예에서, 변종 Fc 영역은 L234A; L235A; L234A 및 L235A; D265A; N297Q, 또는 N297G의 치환을 포함한다.
- [0898] 발명의 PD-1-결합 분자의 CH2 및 CH3 도메인에 대한 바람직한 IgG1 서열은 L234A/L235A 치환 (SEQ ID NO:5)을 가질 것이다:
- [0899] APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
- [0900] PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
- [0901] LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL
- [0902] TVDKSRWQGG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGX
- [0903] 여기서, X는 리신 (K)이거나 없다.
- [0904] 상이한 구체예에서, 발명의 PD-1-결합 분자는 (야생형 IgG1 Fc 영역 (SEQ ID NO:1)에 의해 나타난 결합과 비교하여) 본질적으로 Fc γ RIIIA (CD16a)에 대한 감소된 (또는 실질적으로 없음) 결합 및/또는 감소된 이펙터 기능을 나타내는 Fc 영역을 포함한다. 특이적 구체예에서, 발명의 PD-1-결합 분자는 IgG2 Fc 영역 (SEQ ID NO:2) 또는 IgG4 Fc 영역 (SEQ ID NO:4)을 포함한다. IgG4 Fc 영역이 이용될 때, 발명은 또한 가닥 교환의 발생을 감소시키기 위하여 안정화 돌연변이, 예컨대 IgG4 힌지 영역 S228P 치환의 도입을 포함한다 (예컨대 SEQ ID NO:13: ESKYGPPCP~~PCP~~, (Lu *et al.*, (2008) "The Effect Of A Point Mutation On The Stability Of IgG4 As Monitored By Analytical Ultracentrifugation," J. Pharmaceutical Sciences 97:960-969 참조). 업계에 알려져 있는 다른 안정화 돌연변이가 IgG4 Fc 영역에 도입될 수 있다 (Peters, P *et al.*, (2012) "Engineering an Improved IgG4 Molecule with Reduced Disulfide Bond Heterogeneity and Increased Fab Domain Thermal Stability," J. Biol. Chem., 287:24525-24533; PCT 특허 공개 번호: WO 2008/145142).
- [0905] 다른 구체예에서, 발명은 업계에 공지된 임의의 변종 Fc 영역, 예컨대 Jefferis, B.J. *et al.* (2002) "Interaction Sites On Human IgG-Fc For Fc γ RI: Current Models," Immunol. Lett. 82:57-65; Presta, L.G. *et al.* (2002) "Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function," Biochem. Soc. Trans. 30:487-90; Idusogie, E.E. *et al.* (2001) "Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement," J. Immunol. 166:2571-75; Shields, R.L. *et al.* (2001) "High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, And Fc γ RIV And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc γ RI," J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Idusogie, E.E. *et al.* (2000) "Mapping Of The C1q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG Fc," J. Immunol. 164:4178-84; Reddy, M.P. *et al.* (2000) "Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4," J. Immunol. 164:1925-1933; Xu, D. *et al.* (2000) "In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies," Cell. Immunol. 200:16-26; Armour, K.L. *et al.* (1999) "Recombinant human IgG Molecules Lacking Fc γ RI Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities," Eur. J. Immunol. 29:2613-24; Jefferis, R. *et al.* (1996) "Modulation Of Fc(Gamma)R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions," Immunol. Lett. 54:101-04; Lund, J. *et al.* (1996) "Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc γ RI And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains," J. Immunol. 157:4963-4969; Hutchins *et al.* (1995) "Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-1H," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:11980-84; Jefferis, R. *et al.* (1995) "Recognition Sites On Human IgG For Fc γ Receptors: The Role Of Glycosylation," Immunol. Lett. 44:111-17; Lund, J. *et al.* (1995) "Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc γ Receptors," FASEB J. 9:115-19; Alegre, M.L. *et al.* (1994) "A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo,"

Transplantation 57:1537-1543; Lund *et al.* (1992) "*Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma R11*," Mol. Immunol. 29:53-59; Lund *et al.* (1991) "*Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG*," J. Immunol. 147:2657-2662; Duncan, A.R. *et al.* (1988) "*Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG*," Nature 332:563-564; 미국 특허 번호 5,624,821; 5,885,573; 6,194,551; 7,276,586; 및 7,317,091; 및 PCT 공보 WO 00/42072 및 PCT WO 99/58572에서 개시된 것들의 사용을 포함한다.

[0906] 일부 구체예에서, 발명의 분자는 추가로 하나 이상의 글리코실화 부위를 포함하여서, 하나 이상의 탄수화물 모이어티가 분자에 공유 결합에 의해 부착된다. 바람직하게는, 하나 이상의 글리코실화 부위 및/또는 Fc 영역에서 하나 이상의 변형을 가진 발명의 분자는 변형되지 않은 항체와 비교하여, 향상된 항체 매개 이펙터 기능, 예컨대, 향상된 ADCC 활성을 부여하거나 또는 가진다. 일부 구체예에서, 발명은 추가로, 제한되는 것은 아니지만, 위치 241, 243, 244, 245, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299 및 301에서 아미노산을 포함하는, Fc 영역의 탄수화물 모이어티와 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하는 것으로 알려져 있는 아미노산의 하나 이상의 변형을 포함하는 분자를 포함한다. Fc 영역의 탄수화물 모이어티와 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하는 아미노산은 업계에 공지되어 있으며, 예컨대, Jefferis *et al.*, 1995 *Immunology Letters*, 44:111-7을 참조하고, 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0907] 다른 구체예에서, 발명은, 바람직하게는 분자의 기능성, 예컨대, 표적 항원 또는 FcR γ 에 대한 결합 활성을 변화시키지 않으면서, 하나 이상의 글리코실화 부위를 하나 이상의 분자에 도입함으로써 변형된 분자를 포함한다. 글리코실화 부위는 발명의 분자의 가변 및/또는 불변 영역으로 도입될 수 있다. 본원에서 공지된 바와 같이, "글리코실화 부위"는 올리고당 (즉, 함께 결합된 둘 이상의 당을 함유하는 탄수화물)이 특이적으로 및 공유 결합에 의해 부착될 항체의 임의의 특이적 아미노산 서열을 포함한다. 올리고당 측쇄는 전형적으로 N- 또는 O- 결합을 통해 항체의 백본(backbone)에 결합된다. N-결합된 글리코실화는 아스파라긴 잔기의 측쇄에 올리고당 모이어티의 부착을 말한다. O-결합된 글리코실화는 하이드록시아미노산, 예컨대 세린, 트레오닌에 올리고당 모이어티의 부착을 말한다. 발명의 분자는 N-결합된 및 O-결합된 글리코실화 부위를 포함하여, 하나 이상의 글리코실화 부위를 포함할 수 있다. 업계에 공지된 N-결합된 또는 O-결합된 글리코실화를 위한 임의의 글리코실화 부위는 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에 따라서 유용한 예시의 N-결합된 글리코실화 부위는 아미노산 서열: Asn-X-Thr/Ser이며, X는 임의의 아미노산일 수 있고 Thr/Ser은 트레오닌 또는 세린을 나타낸다. 이러한 부위 또는 부위들은 본 발명이 속한 업계에 잘 알려져 있는 방법을 사용하여 발명의 분자로 도입될 수 있다 (예를 들어 *In vitro* Mutagenesis, Recombinant DNA: A Short Course, J. D. Watson, *et al.* W.H. Freeman and Company, New York, 1983, chapter 8, pp. 106-116 참조, 전문이 본원에 참조로 포함됨). 발명의 분자로 글리코실화 부위를 도입하기 위한 예시의 방법은 원하는 Asn-X-Thr/Ser 서열이 얻어지도록 분자의 아미노산 서열을 변형시키거나 또는 돌연변이를 생성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0908] 일부 구체예에서, 발명은 글리코실화 부위를 추가하거나 결실시킴으로써 발명의 분자의 탄수화물 함량을 변형시키는 방법을 포함한다. 항체 (및 항체 도메인, 예컨대, Fc 영역을 포함하는 분자)의 탄수화물 함량을 변형시키는 방법은 업계에 잘 알려져 있고 발명 내에 포함된다, 예컨대 미국 특허 번호 6,218,149; EP 0 359 096 B1; 미국 특허 출원 공개 번호 US 2002/0028486; WO 03/035835; 미국 특허출원 공개 번호 2003/0115614; 미국 특허 번호 6,218,149; 미국 특허 번호 6,472,511 (전문이 본원에 참조로 포함됨). 다른 구체예에서, 발명은 분자의 하나 이상의 내인성 탄수화물 모이어티를 결실시킴으로써 발명의 분자의 탄수화물 함량을 변형시키는 방법을 포함한다. 특이적 구체예에서, 발명은 297에 인접한 위치를 변형시킴으로써, 항체의 Fc 영역의 글리코실화 부위를 이동시키는 단계를 포함한다. 특이적 구체예에서, 발명은 위치 297이 아니라 위치 296이 글리코실화되도록 위치 296을 변형시키는 단계를 포함한다.

[0909] 이펙터 기능은 또한 Fc 영역으로 하나 이상의 시스테인 잔기를 도입하고, 그로써 이 영역에서 사슬간 이황화 결합 형성이 일어나는 것을 허용하여, 내재화 능력이 개선되고 및/또는 보체-매개 세포 살해 및 ADCC가 증가될 수 있는 호모다имер 항체의 생성을 초래하는 것과 같은 기법에 의해 변형될 수 있다 (Caron, P.C. *et al.* (1992) "*Engineered 인간화된 Dimeric Forms Of IgG Are More Effective Antibodies*," J. Exp. Med. 176:1191-1195; Shopes, B. (1992) "*A Genetically Engineered HumanIgG MutantWith Enhanced Cytolytic Activity*," J. Immunol. 148(9):2918-2922). 향상된 항종양 활성을 가진 호모다имер 항체는 또한 Wolff, E.A. *et al.* (1993) "*Monoclonal Antibody Homodimers: Enhanced Antitumor Activity In NudeMice*," Cancer Research 53:2560-2565에서 기술된 바와 같이 헤테로이기능성(heterobifunctional) 교차-링커를 사용하여 제조될 수 있다. 대안으로, 항체는 이중 Fc 영역을 갖도록 엔지니어링될 수 있고 그로써 보체 용해 및 ADCC 능력이 향상될 수 있다

(Stevenson, G.T. *et al.* (1989) "A Chimeric Antibody With DualFc Regions (bisFabFc) Prepared By Manipulations At The IgG Hinge," Anti-Cancer Drug Design 3:219-230).

[0910] Fc 영역을 포함하는 본 발명의 분자의 혈청 반감기는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합 친화성을 증가시킴으로써 증가될 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "반감기"는 투여 이후 분자의 평균 생존 시간의 측정값인 약물동역학적 특성을 의미한다. 반감기는, 예를 들어, 혈청에서, 즉, 순환 반감기, 또는 다른 조직에서 측정된 바와 같이 대상체의 신체 (예컨대 인간 환자 또는 다른 포유동물) 또는 이것들의 특정 구획으로부터의 분자의 공지된 양의 50 퍼센트 (50%)를 제거하는데 필요한 시간으로 표시될 수 있다. 일반적으로, 반감기의 증가는 투여된 분자에 대하여 순환 중 평균 체류 시간 (MRT)의 증가를 초래한다.

[0911] 일부 구체예에서, 본 발명의 PD-1-결합 분자는 변종 Fc 영역을 포함하며, 상기 변종 Fc 영역은 야생형 Fc 영역과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하여서, 상기 분자는 (야생형 Fc 영역과 비교하여) 증가된 반감기를 가진다.

[0912] 일부 구체예에서, 본 발명의 PD-1-결합 분자는 변종 Fc 영역을 포함하고, 상기 변종 Fc 영역은 238, 250, 252, 254, 256, 257, 258, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, 435 및 436으로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 위치에서 반감기-연장 아미노산 치환을 포함한다. Fc 영역-함유 분자의 반감기를 증가시킬 수 있는 많은 특이적 돌연변이가 업계에 공지되어 있고, 예를 들어 M252Y, S254T, T256E 및 이것들의 조합을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,277,375, 7,083,784; 7,217,797, 8,088,376; 미국 특허출원 공개 번호 2002/0147311; 2007/0148164; 및 국제 공개 번호 WO 98/23289 WO 2009/058492, 및 WO 2010/033279에서 기술된 돌연변이를 참고하고, 이것들은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 향상된 반감기를 가진 Fc 영역-함유 분자는 또한 Fc 영역 잔기 250, 252, 254, 256, 257, 288, 307, 308, 309, 311, 378, 428, 433, 434, 435 및 436 중 둘 이상에서 치환을 가진 것들을 포함한다. 특히, T250Q, M252Y, S254T, T256E, K288D, T307Q, V308P, A378V, M428L, N434A, H435K 및 Y436I로부터 선택된 둘 이상의 치환.

[0913] 특이적 구체예에서, 변종 Fc 영역은 다음의 치환을 포함한다:

[0914] (A) M252Y, S254T 및 T256E;

[0915] (B) M252Y 및 S254T;

[0916] (C) M252Y 및 T256E;

[0917] (D) T250Q 및 M428L;

[0918] (E) T307Q 및 N434A;

[0919] (F) A378V 및 N434A;

[0920] (G) N434A 및 Y436I;

[0921] (H) V308P 및 N434A; 또는

[0922] (I) K288D 및 H435K.

[0923] 본 발명은 다음을 포함하는 변종 Fc 영역을 더 포함한다:

[0924] (A) 이펙터 기능 및/또는 Fc γ R을 변화시키는 하나 이상의 돌연변이; 및

[0925] (B) 혈청 반감기를 연장시키는 하나 이상의 돌연변이.

[0926] VI. 이중특이적 항-인간 PD-1-결합 분자

[0927] 본 발명의 한 구체예는 "제1 에피토프" 및 "제2 에피토프"에 결합할 수 있는 이중특이적 결합 분자에 관한 것이며, 제1 에피토프는 인간 PD-1의 에피토프이고 제2 에피토프는 PD-1의 동일하거나 상이한 에피토프이거나, 또는 면역 세포 (예컨대 T 림프구)의 표면 상에 존재하는 또 다른 분자의 에피토프이고 면역 체크포인트의 조절에 관여한다. 한 구체예에서, 제2 에피토프는 B7-H3, B7-H4, BTLA, CD3, CD8, CD16, CD27, CD32, CD40, CD40L, CD47, CD64, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, 갈렉틴-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC 클래스 I 또는 II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 또는 VISTA의 에피토프이다. 한 구체예에서, 제2 에피토프는 PD-1의 에피토프

가 아니다. 특이적 구체예에서, 제2 에피토프는 CD137, PD-1, OX40, TIGIT 또는 TIM-3이다. 특정 구체예에서, 이중특이적 분자는 둘 이상의 에피토프-결합 부위를 포함한다. 이러한 이중특이적 분자는 LAG-3의 둘 이상의 상이한 에피토프 및 LAG-3이 아닌 분자의 적어도 하나의 에피토프에 결합할 수 있다.

[0928] 본 발명은 PD-1 및 제2 에피토프 (예컨대 B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC 클래스 I 또는 II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, 등)에 동시에 결합할 수 있는 이중특이적 항체를 포함한다. 일부 구체예에서, PD-1 및 제2 에피토프에 동시에 결합할 수 있는 이중특이적 항체는 PCT 공개 번호 WO 1998/002463, WO 2005/070966, WO 2006/107786 WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 2006/107617, WO 2007/046893, WO 2007/146968, WO 2008/003103, WO 2008/003116, WO 2008/027236, WO 2008/024188, WO 2009/132876, WO 2009/018386, WO 2010/028797, WO2010028796, WO 2010/028795, WO 2010/108127, WO 2010/136172, WO 2011/086091, WO 2011/133886, WO 2012/009544, WO 2013/003652, WO 2013/070565, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2013/174873 및 WO 2014/022540 (이것들은 각각 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 방법들 중 임의의 것을 사용하여 제조된다.

[0929] A. Fc 영역이 없는 이중특이적 디아바디

[0930] 본 발명의 한 구체예는 제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬을 포함하고, 가장 바람직하게는 이것들로 구성된 이중특이적 디아바디에 관한 것이며, 그것들의 서열은 폴리펩타이드 사슬이 서로 공유 결합되는 것을 허용하여, 서로 동일하지 않은 제1 에피토프 및 제2 에피토프에 동시에 결합할 수 있는, 공유 결합에 의해 회합된 디아바디를 형성한다. 그러므로 이러한 이중특이적 디아바디는 제1 에피토프에 결합할 수 있는 "VL1" / "VH1" 도메인 및 제2 에피토프에 결합할 수 있는 "VL2" / "VH2" 도메인을 포함한다. 표기법 "VL1" 및 "VH1"은 각각 이러한 이중특이적 디아바디의 "제1" 에피토프에 결합하는 가변 경쇄 도메인 및 가변 중쇄 도메인을 나타낸다. 유사하게, 표기법 "VL2" 및 "VH2"는 각각 이러한 이중특이적 디아바디의 "제2" 에피토프에 결합하는 가변 경쇄 도메인 및 가변 중쇄 도메인을 나타낸다. 특정 에피토프가 제1 대비 제2 에피토프로서 표시되는가 하는 것은 상관이 없고; 이러한 표기법은 단지 본 발명의 결합 분자의 폴리펩타이드 사슬의 도메인의 존재 및 방향과만 상관이 있다. 한 구체예에서, 이러한 에피토프 중 하나는 PD-1의 에피토프이고 이러한 에피토프들 중 다른 하나는 PD-1의 에피토프가 아니다 (예를 들어, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC 클래스 I 또는 II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, 등의 에피토프).

[0931] 제1 폴리펩타이드 사슬의 VL 도메인은 제2 폴리펩타이드 사슬의 VH 도메인과 상호작용하여 제1 항원 (즉, PD-1 또는 제2 에피토프를 함유하는 항원 중 어느 하나)에 특이적인 제1 기능성 항원-결합 부위를 형성한다. 유사하게, 제2 폴리펩타이드 사슬의 VL 도메인은 제1 폴리펩타이드 사슬의 VH 도메인과 상호작용하여 제2 항원 (즉, 제2 에피토프를 함유하는 항원 또는 PD-1 중 어느 하나)에 특이적인 제2 기능성 항원-결합 부위를 형성한다. 그러므로, 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬의 VL 및 VH 도메인의 선택은, 디아바디의 두 폴리펩타이드 사슬이 PD-1의 에피토프 및 제2 에피토프 둘 다에 결합할 수 있는 VL 및 VH 도메인을 전체적으로 포함하도록 조정된다 (즉 그것들은 VL_{PD-1}/VH_{PD-1} 및 VL2/VH2를 포함하고, PD-1은 "제1 에피토프" 또는 VL1/VH1 및 VL_{PD-1}/VH_{PD-1}이고, PD-1은 "제2 에피토프"이다).

[0932] 이러한 이중특이적 디아바디의 구체예의 제1 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로, N-말단, 제1 또는 제2 에피토프 중 어느 하나 (즉 VL_{PD-1} 또는 VL_{에피토프 2} 중 어느 하나)에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL1 도메인, 제1 개재 스페이스 펩티드 (링커 1), 제2 에피토프 (이러한 제1 폴리펩타이드 사슬이 VL_{PD-1}을 함유하는 경우) 또는 제1 에피토프 (이러한 제1 폴리펩타이드 사슬이 VL_{에피토프 2}를 함유하는 경우) 중 어느 하나에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH2 도메인, 선택적으로 시스테인 잔기를 함유하는 제2 개재 스페이스 펩타이드 (링커 2), 헤테로다이머-촉진 도메인 및 C-말단을 포함한다 (도 1).

[0933] 이중특이적 디아바디의 이 구체예의 제2 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로, N-말단, PD-1 또는 제2 에피토프 중 어느 하나 (즉 VL_{PD-1} 또는 VL_{에피토프 2} 중 어느 하나)이고, 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬에 포함되기 위해 선택되지 않는 VL 도메인임)에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL2 도메인, 개재 링커 펩타이드 (링커 1), 제2 에피토프 (이러한 제2 폴리펩타이드 사슬이 VL_{PD-1}을 함유하는 경우) 또는 PD-1 (이러한 제2 폴리펩타이드 사슬이 VL_{에피토프 2}를 함유하는 경우) 중 어느 하나에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH1 도메인, 선택적으로 시스테인 잔기를 함유하는 제2 개재 스페이스 펩타이드 (링커 2), 헤테로다이머-촉진 도메인 및 C-말단을 포함한다 (도 1).

- [0934] 가장 바람직하게는, 이러한 VL 및 VH 도메인을 분리하는 개재 링커 펩타이드 (예컨대, 링커 1)의 길이는 폴리펩타이드 사슬의 VL 및 VH 도메인이 서로 결합하는 것을 실질적으로 또는 완전히 방지하기 위해 선택된다. 그러므로 제1 폴리펩타이드 사슬의 VL 및 VH 도메인은 서로 실질적으로 또는 완전히 결합할 수 없다. 마찬가지로, 제2 폴리펩타이드 사슬의 VL 및 VH 도메인은 서로 실질적으로 또는 완전히 결합할 수 없다. 바람직한 개재 스페이스 펩타이드 (링커 1)는 서열 (SEQ ID NO:14): GGGSGGGG를 갖는다.
- [0935] 제2 개재 링커 펩타이드 (링커 2)의 길이 및 조성은 헤테로다имер-촉진 도메인의 선택을 기반으로 선택된다. 전형적으로, 제2 개재 링커 펩타이드 (링커 2)는 3 내지 20개의 아미노산 잔기를 포함할 것이다. 특히, 헤테로다имер-촉진 도메인이 시스테인 잔기를 포함하지 않는 경우 시스테인-함유 제2 개재 링커 펩타이드 (링커 2)가 활용된다. 시스테인-함유 제2 개재 스페이스 펩타이드 (링커 2)는 1, 2, 3개 또는 3개 이상의 시스테인 잔기(들)를 함유할 것이다. 바람직한 시스테인-함유 스페이스 펩타이드 (링커 2)는 서열 SEQ ID NO:15: GCGGGG를 가진다. 대안으로, 링커 2는 시스테인 (예컨대 GGG, GGS (SEQ ID NO:29), LGGSG (SEQ ID NO:261), GGGSGGGSGG (SEQ ID NO:262), ASTKG (SEQ ID NO:30), LEPKSS (SEQ ID NO:33), APSSS (SEQ ID NO:34), 등)을 포함하지 않고 하기 기술된 바와 같이 시스테인-함유 헤테로다имер-촉진 도메인이 사용된다. 선택적으로, 시스테인-함유 링커 2 및 시스테인-함유 헤테로다имер-촉진 도메인이 둘 다 사용된다.
- [0936] 헤테로다имер-촉진 도메인은 한 폴리펩타이드 사슬 상에서는 GVEPKSC (SEQ ID NO:16) 또는 VEKPKSC (SEQ ID NO:17) 또는 AEPKSC (SEQ ID NO:18)이고 다른 폴리펩타이드 사슬 상에서는 GFNRGEC (SEQ ID NO:19) 또는 FNRGEC (SEQ ID NO:20)일 수도 있다 (US2007/0004909).
- [0937] 그러나, 더 바람직하게는, 이러한 디아바디의 헤테로다имер-촉진 도메인은 헤테로다имер-촉진 도메인이 순전하 (net charge)를 갖도록 적어도 여섯 개, 적어도 일곱 개 또는 적어도 여덟 개의 아미노산 잔기의 서열을 포함하는 대향 전하의 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 나란히(tandemly) 반복되는 코일 도메인으로부터 형성된다 (Apostolovic, B. et al. (2008) "*pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil*," Biomacromolecules 9:3173-3180; Arndt, K.M. et al. (2001) "*Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody Fragments: Substituting the Constant Domain of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain*," J. Molec. Biol. 312:221-228; Arndt, K.M. et al. (2002) "*Comparison of In Vivo Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils*," Structure 10:1235-1248; Boucher, C. et al. (2010) "*Protein Detection By Western Blot Via Coiled-Coil Interactions*," Analytical Biochemistry 399:138-140; Cachia, P.J. et al. (2004) "*Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy*," J. Mol. Recognit. 17:540-557; De Crescenzo, G.D. et al. (2003) "*Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding*," Biochemistry 42:1754-1763; Fernandez-Rodriguez, J. et al. (2012) "*Induced Heterodimerization And Purification Of Two Target Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag*," Protein Science 21:511-519; Ghosh, T.S. et al. (2009) "*End-To-End And End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures*," Acta Crystallographica D65:1032-1041; Grigoryan, G. et al. (2008) "*Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions*," Curr. Opin. Struc. Biol. 18:477-483; Litowski, J.R. et al. (2002) "*Designing Heterodimeric Two-Stranded α -Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity And α -Helical Propensity On Protein Folding, Stability, And Specificity*," J. Biol. Chem. 277:37272-37279; Steinkruger, J.D. et al. (2012) "*The d'-d-d' Vertical Triad is Less Discriminating Than the a'-a-a' Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif*," J. Amer. Chem. Soc. 134(5):2626-2633; Straussman, R. et al. (2007) "*Kinking the Coiled Coil - Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface*," J. Molec. Biol. 366:1232-1242; Tripet, B. et al. (2002) "*Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance*," J. Molec. Biol. 323:345-362; Woolfson, D.N. (2005) "*The Design Of Coiled-Coil Structures And Assemblies*," Adv. Prot. Chem. 70:79-112; Zeng, Y. et al. (2008) "*A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism*," J. Gene Med. 10:355-367).
- [0938] 이러한 반복된 코일 도메인은 정확한 반복부이거나 치환을 가질 수 있다. 예를 들어, 제1 폴리펩타이드 사슬의 헤테로다имер-촉진 도메인의 코일 도메인은 이러한 헤테로다имер-촉진 도메인에게 음전하를 부여하도록 선택된

여덟 개의 아미노산 잔기의 서열을 포함할 수 있고, 제2 폴리펩타이드 사슬의 헤테로다이머-촉진 도메인의 코일 도메인은 이러한 헤테로다이머-촉진 도메인에게 양전하를 부여하도록 선택된 여덟 개의 아미노산 잔기의 서열을 포함할 수도 있다. 어떤 코일이 제1 또는 제2 폴리펩타이드 사슬에 제공되는지는 중요하지 않으며, 단 반대 전하의 코일이 다른 폴리펩타이드 사슬에 사용된다. 양전하를 띤 아미노산은 리신, 아르기닌, 히스티딘, 등일 수 있고 및/또는 음전하를 띤 아미노산은 글루탐산, 아스파르트산, 등일 수 있다. 양전하를 띤 아미노산은 바람직하게는 리신이고 및/또는 음전하를 띤 아미노산은 바람직하게는 글루탐산이다. 단지 단일 헤테로다이머-촉진 도메인만이 사용될 수 있지만 (이러한 도메인이 호모다이머화를 억제할 것이고 그로써 헤테로다이머화를 촉진하기 때문에), 본 발명의 디아바디의 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬 둘 다가 헤테로다이머-촉진 도메인을 함유하는 것이 바람직하다.

[0939] 바람직한 구체예에서, 헤테로다이머-촉진 도메인들 중 하나는 네 개의 탠덤 "E-코일" 나선형 도메인 (SEQ ID NO:21: **EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK**)을 포함할 것이며, 이것의 글루타메이트 잔기는 pH 7에서 음전하를 형성할 것인 한편, 헤테로다이머-촉진 도메인들 중 다른 것은 네 개의 탠덤 "K-코일" 나선형 도메인 (SEQ ID NO:22: **KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE**)을 포함할 것이며, 이것의 리신 잔기는 pH 7에서 양전하를 형성할 것이다. 이러한 전하를 띤 도메인의 존재는 제1 및 제2 폴리펩타이드 사이의 회합을 촉진하고, 그로써 헤테로다이머 형성을 촉진한다. SEQ ID NO:21의 네 개의 탠덤 "E-코일" 나선형 도메인 중 하나가 시스테인 잔기를 함유하도록 변형된 헤테로다이머-촉진 도메인이 특히 바람직하다: **EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK** (SEQ ID NO:23). 마찬가지로, SEQ ID NO:22의 네 개의 탠덤 "K-코일" 나선형 도메인 중 하나가 시스테인 잔기를 함유하도록 변형된 헤테로다이머-촉진 도메인이 특히 바람직하다: **KVAACEK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE** (SEQ ID NO:24).

[0940] WO 2012/018687에서 개시된 바와 같이, 디아바디의 생체 내 약물동역학적 특성을 개선하기 위해서, 디아바디는 디아바디의 말단 중 하나 이상에서 혈청-결합 단백질의 폴리펩타이드 부분을 함유하도록 변형될 수 있다. 가장 바람직하게는, 혈청-결합 단백질의 이러한 폴리펩타이드 부분은 디아바디의 C-말단에 설치될 것이다. 알부민은 혈장에서 가장 풍부한 단백질이고 인간에서 19일의 반감기를 갖는다. 알부민은 그것이 다른 단백질에 비-공유 결합되는 것을 허용함으로써 혈청 반감기를 연장시키는 여러 소분자 결합 부위를 가지고 있다. 스트렙토코쿠스 (Streptococcus) 스트레인 G148의 단백질 G의 알부민-결합 도메인 3 (ABD3)은 안정한 세 개의 나선 다발을 형성하는 46개의 아미노산 잔기로 구성되고 광범위한 알부민-결합 특이성을 갖는다 (Johansson, M.U. *et al.* (2002) "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules," J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120). 그러므로, 디아바디의 생체 내 약물동역학적 특성을 개선하기 위해, 혈청-결합 단백질의 특히 바람직한 폴리펩타이드 부분은 스트렙토코쿠스 단백질 G의 알부민-결합 도메인 (ABD)이고, 더 바람직하게는, 스트렙토코쿠스 디스갈락티에 (*Streptococcus dysgalactiae*) 스트레인 G148의 단백질 G의 알부민-결합 도메인 3 (ABD3)이다 (SEQ ID NO:25): LAEAKVLNLR ELDKYGVSDY YKNLID₆₆NAKS₇₀ A₇₁EGVKALIDE ILAALP.

[0941] WO 2012/162068 (본원에 참조로 포함됨)에서 개시된 바와 같이, SEQ ID NO:25의 "탈면역화" 변종은 MHC 클래스 II 결합을 약화시키거나 제거하는 능력을 갖는다. 조합 돌연변이 결과를 기반으로, 다음 치환의 조합들이 이러한 탈면역화 ABD를 형성하는데 바람직한 치환인 것으로 간주된다: 66D/70S +71A; 66S/70S +71A; 66S/70S +79A; 64A/65A/71A; 64A/65A/71A+66S; 64A/65A/71A+66D; 64A/65A/71A+66E; 64A/65A/79A+66S; 64A/65A/79A+66D; 64A/65A/79A+66E. 변종 ABD는 변형 L64A, I65A 및 D79A 또는 변형 N66S, T70S 및 D79A를 가진다. 아미노산 서열:

[0942] LAEAKVLNLR ELDKYGVSDY YKNLID₆₆NAKS₇₀ A₇₁EGVKALIDE ILAALP (SEQ ID NO:26),

[0943] 또는 아미노산 서열:

[0944] LAEAKVLNLR ELDKYGVSDY YKNA₆₄A₆₅NNAKT VEGVKALIA₇₉E ILAALP (SEQ ID NO:27),

[0945] 또는 아미노산 서열:

[0946] LAEAKVLNLR ELDKYGVSDY YKNLIS₆₆NAKS₇₀ VEGVKALIA₇₉E ILAALP (SEQ ID NO:28)을 가지는 변종 탈면역화 ABD가 이러한 탈면역화 ABD가 실질적으로 야생형 결합을 나타내는 한편 약화된 MHC 클래스 II 결합을 제공하기 때문에 특히 바람직하다. 그러므로, ABD를 가진 이러한 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬은 바람직하게는 E-코일 (또는 K-코일) 도메인과 ABD (바람직하게는 탈면역화 ABD) 사이를 개재하기 위해서 이러한 폴리펩타이드 사슬의 E-코일 (또는 K-코일) 도메인에 대하여 C-말단에 위치한 펩타이드 링커를 함유한다. 이러한 펩타이드 링커에 대하여 바람직한 서열은 SEQ ID NO:29:GGGS이다.

[0947] B. Fc 영역을 함유하는 이중특이적 디아바디

[0948] 본 발명의 한 구체예는 PD-1 및 제2 에피토프에 동시에 결합할 수 있는 Fc 영역을 포함하는 이중특이적 디아바디 (예컨대 B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC 클래스 I 또는 II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, 등)에 관한 것이다. 디아바디 사슬의 복합체 형성이 Fc 영역의 형성을 초래하도록, 디아바디 폴리펩타이드 사슬 중 하나 또는 둘 다에 IgG CH2-CH3 도메인의 추가는 디아바디의 생물학적 반감기를 증가시키고 및/또는 원자가를 변화시킨다. 디아바디 폴리펩타이드 둘 다로 IgG CH2-CH3 도메인의 포함은 2-사슬 이중특이적 Fc-영역-함유 디아바디가 형성되는 것을 허용할 것이다 (도 2).

[0949] 대안으로, 디아바디 폴리펩타이드 중 단 하나로의 IgG CH2-CH3 도메인의 포함은 더 복잡한 4-사슬 이중특이적 Fc 영역-함유 디아바디가 형성되는 것을 허용할 것이다 (도 3A 내지 3C). 도 3C는 불변 경쇄 (CL) 도메인 및 불변 중쇄 CH1 도메인을 가지고 있는 대표적인 4-사슬 디아바디를 도시하지만, 이러한 도메인의 단편, 뿐만 아니라 다른 폴리펩타이드가 대안으로 이용될 수도 있다 (예컨대 도 3A 및 3B, 미국 특허 공개 번호 2013-0295121; 2010-0174053 및 2009-0060910; 유럽 특허 공개 번호 EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 및 PCT 공개 번호 WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538 참조). 그러므로, 예를 들어, CH1 도메인 대신에, 인간 IgG의 힌지 도메인으로부터 유도된 아미노산 서열 GVEPKSC (SEQ ID NO:16), VEPKSC (SEQ ID NO:17) 또는 AEPKSC (SEQ ID NO:18)를 가진 펩타이드를 사용할 수 있고, CL 도메인 대신에, 인간 카파 경쇄의 C-말단 6개의 아미노산, GFNRGEC (SEQ ID NO:19) 또는 FNRGEC (SEQ ID NO:20)를 사용할 수 있다. 4-사슬 디아바디를 함유하는 대표적인 펩타이드가 도 3A에서 도시된다. 대안으로, 또는 이에 더하여, "E-코일" 나선형 도메인 (SEQ ID NO:21: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK 또는 SEQ ID NO:23: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK); 및 "K-코일" 도메인 (SEQ ID NO:22: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE 또는 SEQ ID NO:24: KVAACKK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE)과 같이 반대 전하의 탠덤 코일 도메인을 포함한 펩타이드를 사용할 수 있다. 4-사슬 디아바디를 함유하는 대표적인 코일 도메인은 도 3B에서 도시된다.

[0950] 본 발명의 Fc 영역-함유 디아바디 분자는 일반적으로 추가적인 개재 링커 펩타이드 (링커)를 포함한다. 전형적으로, 추가적인 링커는 3-20개의 아미노산 잔기를 포함할 것이다. 본 발명의 Fc 영역-함유 디아바디 분자에서 이용될 수 있는 추가적인 또는 대안의 링커는 GGG (SEQ ID NO:29), LGGSG (SEQ ID NO:261), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:262), ASTKG (SEQ ID NO:30), DKHTHTCPPCP (SEQ ID NO:31), EPKSCDKHTHTCPPCP (SEQ ID NO:32), LEPKSS (SEQ ID NO:33), APSSS (SEQ ID NO:34), 및 APSSSPME (SEQ ID NO:35), LEPKSADKHTHTCPPCP (SEQ ID NO:36), GGC, 및 GGG를 포함한다. 클로닝을 쉽게 하기 위해 GGG 또는 GGC 대신 SEQ ID NO:33이 사용될 수 있다. 추가적으로, 아미노산 GGG 또는 SEQ ID NO:33이 SEQ ID NO:31 바로 다음에 사용되어 대안 링커: GGGDKHTHTCPPCP (SEQ ID NO:263); 및 LEPKSSDKHTHTCPPCP (SEQ ID NO:37)가 형성될 수 있다. 본 발명의 Fc 영역-함유 디아바디 분자는 링커에 더불어 또는 링커 대신 IgG 힌지 영역을 통합할 수 있다. 예시의 힌지 영역은 IgG1로부터의 EPKSCDKHTHTCPPCP (SEQ ID NO:32), IgG2로부터의 ERKCCVECP (SEQ ID NO:11), IgG4로부터의 ESKYGPPCPSP (SEQ ID NO:12) 및 가닥 교환을 감소시키기 위해 안정화 치환체를 포함하는 IGG4 힌지 변종인 ESKYGPPCP (SEQ ID NO:13)를 포함한다.

[0951] 도 3A 내지 3C에서 제공된 바와 같이, 본 발명의 디아바디는 네 개의 상이한 사슬을 포함할 수 있다. 이러한 디아바디의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬은 세 개의 도메인 (i) VL1-함유 도메인, (ii) VH2-함유 도메인, (iii) 헤테로다이머-촉진 도메인 및 (iv) CH2-CH3 서열을 함유하는 도메인을 함유한다. 제2 및 제4 폴리펩타이드 사슬은 (i) VL2-함유 도메인, (ii) VH1-함유 도메인 및 (iii) 헤테로다이머-촉진 도메인을 함유하며, 헤테로다이머-촉진 도메인은 제1/제3 폴리펩타이드 사슬과 제2/제4 폴리펩타이드 사슬의 다이머화를 촉진한다. 제3 및 제4 폴리펩타이드 사슬의 VL 및/또는 VH 도메인, 및 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬의 VL 및/또는 VH 도메인은 단일특이적, 이중특이적 또는 사중특이적인 4가 결합을 허용하기 위해 동일하거나 상이할 수 있다. 제3 및 제4 폴리펩타이드 사슬의 VL 및/또는 VH 도메인, 및 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬의 VL 및/또는 VH 도메인은 단일특이적, 이중특이적 또는 사중특이적인 4가 결합을 허용하기 위해 동일하거나 상이할 수 있다. 표기법 "VL3" 및 "VH3"은 각각 이러한 디아바디의 "제3" 에피토프에 결합하는 가변 경쇄 도메인 및 가변 중쇄 도메인을 나타낸다. 유사하게, 표기법 "VL4" 및 "VH4"는 각각 이러한 디아바디의 "제4" 에피토프에 결합하는 가변 경쇄 도메인 및 가변 중쇄 도메인을 나타낸다. 발명의 대표적인 4-사슬 Fc 영역-함유 디아바디의 폴리펩타이드 사슬의 일반적인 구조는 표 2에서 제공된다:

표 2

이중특이적	제2 사슬	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	제1 사슬	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	제1 사슬	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	제2 사슬	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
사중특이적	제2 사슬	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	제1 사슬	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	제3 사슬	NH ₂ -VL3-VH4-HPD-CH2-CH3-COOH
	제4 사슬	NH ₂ -VL4-VH3-HPD-COOH

[0953] HPD = 헤테로다이어-촉진 도메인

[0954] 특이적 구체예에서, 본 발명의 디아바디는 이중특이적이고, 4가이며 (즉, 네 개의 에피토프-결합 부위를 가지고 있음), 총 네 개의 폴리펩타이드 사슬로 구성된 Fc-함유 디아바디이다 (도 3A 내지 3C). 본 발명의 이중특이적이고, 4가인 Fc-함유 디아바디는 PD-1에 대하여 면역특이적인 두 개의 에피토프-결합 부위 (PD-1의 동일한 에피토프 또는 PD-1의 상이한 에피토프에 결합할 수 있음), 제2 에피토프에 대하여 특이적인 두 개의 에피토프-결합 부위 (예를 들어, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC 클래스 I 또는 II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, 등)를 포함한다.

[0955] 추가의 구체예에서, 이중특이적 Fc 영역-함유 디아바디는 세 개의 폴리펩타이드 사슬을 포함할 수 있다. 이러한 디아바디의 제1 폴리펩타이드는 세 개의 도메인 (i) VL1-함유 도메인, (ii) VH2-함유 도메인 및 (iii) CH2-CH3 서열을 함유하는 도메인을 함유한다. 이러한 디아바디의 제2 폴리펩타이드는 (i) VL2-함유 도메인, (ii) VH1-함유 도메인 및 (iii) 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬과의 헤테로다이어머화 및 공유 결합을 촉진하는 도메인을 함유한다. 이러한 디아바디의 제3 폴리펩타이드는 CH2-CH3 서열을 포함한다. 그러므로, 이러한 디아바디의 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬은 함께 회합하여 제1 에피토프에 결합할 수 있는 VL1/VH1 결합 부위, 뿐만 아니라 제2 에피토프에 결합할 수 있는 VL2/VH2 결합 부위를 형성한다. 제1 및 제2 폴리펩타이드는 각각의 제3 도메인에서 시스테인 잔기를 포함하는 이황화 결합을 통해 서로 결합된다. 특히, 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬은 이황화 결합을 통해 안정화되는 Fc 영역을 형성하기 위해 서로 복합체를 형성한다. 이러한 디아바디는 향상된 효능을 갖는다. 도 4A 및 4B는 이러한 디아바디의 구조를 나타낸다. 이러한 Fc-영역-함유 이중특이적 디아바디는 두 방향 중 하나를 가질 수 있다 (표 3):

표 3

제1 방향	제3 사슬	NH ₂ -CH2-CH3-COOH
	제1 사슬	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	제2 사슬	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
제2 방향	제3 사슬	NH ₂ -CH2-CH3-COOH
	제1 사슬	NH ₂ -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	제2 사슬	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH

[0957] HPD = 헤테로다이어-촉진 도메인

[0958] 특이적 구체예에서, 본 발명의 디아바디는 이중특이적이고, 2가이며 (즉, 두 개의 에피토프-결합 부위를 가지고 있음), 총 세 개의 폴리펩타이드 사슬로 구성된 Fc-함유 디아바디이다 (도 4A 내지 4B). 본 발명의 이중특이적이고, 2가인 Fc-함유 디아바디는 PD-1에 대하여 면역특이적인 하나의 에피토프-결합 부위, 및 제2 에피토프 (예를 들어, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC 클래스 I 또는 II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, 등)에 대하여 특이적인 하나의 에피토프-결합 부위를 포함한다.

[0959] 추가의 구체예에서, 이중특이적 Fc 영역-함유 디아바디는 총 다섯 개의 폴리펩타이드 사슬을 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 상기 다섯 개의 폴리펩타이드 사슬 중 두 개는 동일한 아미노산 서열을 가진다. 이러한 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬은 (i) VH1-함유 도메인, (ii) CH1-함유 도메인 및 (iii) CH2-CH3 서열을 함유하

는 서열을 함유한다. 제1 폴리펩타이드 사슬은 VH1 및 중쇄 불변 영역을 함유하는 항체의 중쇄일 수 있다. 이러한 디아바디의 제2 및 제5 폴리펩타이드 사슬은 (i) VL1-함유 도메인 및 (ii) CL-함유 도메인을 함유한다. 이러한 디아바디의 제2 및/또는 제5 폴리펩타이드 사슬은 제1/제3 폴리펩타이드 사슬의 VH1에 대하여 상보적인 VL1을 함유하는 항체의 경쇄일 수 있다. 제1, 제2 및/또는 제5 폴리펩타이드 사슬은 자연 발생 항체로부터 분리될 수도 있다. 대안으로, 그것들은 재조합에 의해 구성될 수 있다. 이러한 디아바디의 제3 폴리펩타이드 사슬은 (i) VH1-함유 도메인, (ii) CH1-함유 도메인, (iii) CH2-CH3 서열을 함유하는 도메인, (iv) VL2-함유 도메인, (v) VH3-함유 도메인 및 (vi) 헤테로다이어머-촉진 도메인을 함유하며, 헤테로다이어머-촉진 도메인은 제3 사슬과 제4 사슬의 다이머화를 촉진한다. 이러한 디아바디의 제4 폴리펩타이드는 (i) VL3-함유 도메인, (ii) VH2-함유 도메인 및 (iii) 디아바디의 제3 폴리펩타이드 사슬과의 헤테로다이어머화 및 공유 결합을 촉진하는 도메인을 함유한다.

[0960] 그러므로, 이러한 디아바디의 제1 및 제2, 및 제3 및 제4 폴리펩타이드 사슬은 함께 회합하여 제1 에피토프에 결합할 수 있는 두 개의 VL1/VH1 결합 부위를 형성한다. 이러한 디아바디의 제3 및 제4 폴리펩타이드 사슬은 함께 회합하여 제2 에피토프에 결합할 수 있는 VL2/VH2 결합 부위, 뿐만 아니라 제3 에피토프에 결합할 수 있는 VL3/VH3 결합 부위를 형성한다. 제1 및 제3 폴리펩타이드는 각각의 불변 영역에서 시스테인 잔기를 포함하는 이황화 결합을 통해 서로 결합된다. 특히, 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬은 Fc 영역을 형성하기 위해 서로 복합체를 형성한다. 이러한 디아바디는 향상된 효능을 갖는다. 도 5는 이러한 디아바디의 구조를 나타낸다. VL1/VH1, VL2/VH2 및 VL3/VH3 도메인이 단일특이적, 이중특이적 또는 삼중특이적인 결합을 허용하기 위해 동일하거나 또는 상이할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 그러나, 본원에서 제공된 바와 같이, 이 도메인들은 바람직하게는 PD-1 및 제2 에피토프 (또는 제2 및 제3 에피토프 (예컨대, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC 클래스 I 또는 II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, 등)에 결합하도록 선택된다.

[0961] 폴리펩타이드 사슬의 VL 및 VH 도메인은 원하는 에피토프에 특이적인 VL/VH 결합 부위를 형성하기 위해 선택된다. 폴리펩타이드 사슬의 회합에 의해 형성된 VL/VH 결합 부위는 단일특이적, 이중특이적, 삼중특이적 또는 사중특이적인 4가 결합을 허용하기 위해 동일하거나 상이할 수 있다. 특히, VL 및 VH 도메인은 이중특이적 디아바디가 제1 에피토프에 대한 두 개의 결합 부위 및 제2 에피토프에 대한 두 개의 결합 부위, 또는 제1 에피토프에 대한 세 개의 결합 부위 및 제2 에피토프에 대한 하나의 결합 부위, 또는 제1 에피토프에 대한 두 개의 결합 부위, 제2 에피토프에 대한 하나의 결합 부위 및 제3 에피토프에 대한 하나의 결합 부위를 포함할 수 있도록 선택될 수도 있다 (도 5에서 도시됨). 발명의 대표적인 5-사슬 Fc 영역-함유 디아바디의 폴리펩타이드 사슬의 일반적인 구조가 표 4에서 제공된다:

표 4

[0962] 이중특이적 (2x2)	제2 사슬	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	제1 사슬	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	제3 사슬	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH2-HPD-COOH
	제5 사슬	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	제4 사슬	NH ₂ -VL2-VH2-HPD-COOH
이중특이적 (3x1)	제2 사슬	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	제1 사슬	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	제3 사슬	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	제5 사슬	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	제4 사슬	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
삼중특이적 (2x1x1)	제2 사슬	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	제1 사슬	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	제3 사슬	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH3-HPD-COOH
	제5 사슬	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	제4 사슬	NH ₂ -VL3-VH2-HPD-COOH

[0963] HPD = 헤테로다이어머-촉진 도메인

[0964] 특이적 구체예에서, 본 발명의 디아바디는 이중특이적이고, 4가이며 (즉, 네 개의 에피토프-결합 부위를 가지고

있음), 제1 에피토프에 대한 두 개의 결합 부위 및 제2 에피토프에 대한 두 개의 결합 부위를 갖는 총 5개의 폴리펩타이드 사슬로 구성된 Fc-함유 디아바디이다. 한 구체예에서, 발명의 이중특이적이고, 4가인, Fc-함유 디아바디는 PD-1에 대하여 면역특이적인 두 개의 에피토프-결합 부위 (이것은 PD-1의 동일한 에피토프 또는 PD-1의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다), 및 제2 에피토프 (예컨대, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC 클래스 I 또는 II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, 등)에 대하여 면역특이적인 두 개의 에피토프-결합 부위를 포함한다. 다른 구체예에서, 발명의 이중특이적이고, 4가인, Fc-함유 디아바디는 PD-1에 대하여 면역특이적인 세 개의 에피토프-결합 부위 (이것은 PD-1의 동일한 에피토프 또는 PD-1의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다), 및 제2 에피토프 (예컨대, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, PD-1 MHC 클래스 I 또는 II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, 등)에 대하여 특이적인 하나의 에피토프-결합 부위를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 발명의 이중특이적이고, 4가인, Fc-함유 디아바디는 PD-1에 대하여 면역특이적인 하나의 에피토프-결합 부위 및 제2 에피토프 (예컨대, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, PD-1 MHC 클래스 I 또는 II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, 등)에 대하여 특이적인 세 개의 에피토프-결합 부위를 포함한다.

[0965] **C. Fc 영역을 함유하는 이중특이적 3가 결합 분자**

[0966] 본 발명의 추가의 구체예는 Fc 영역을 포함하고, 제1 에피토프, 제2 에피토프 및 제3 에피토프에 동시에 결합할 수 있는 이중특이적 3가 결합 분자에 관한 것이며, 이러한 에피토프 중 적어도 하나는 다른 것에 대해 동일하지 않다. 그러므로 이러한 이중특이적 디아바디는 제1 에피토프에 결합할 수 있는 "VL1" / "VH1" 도메인, 제2 에피토프에 결합할 수 있는 "VL2" / "VH2" 도메인 및 제3 에피토프에 결합할 수 있는 "VL3" / "VH3" 도메인을 포함한다. 한 구체예에서, 이러한 에피토프 중 하나 또는 두 개는 PD-1의 에피토프이고 이러한 에피토프 중 다른 것 (또는 다른 하나)는 PD-1의 에피토프가 아니다 (예컨대, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC 클래스 I 또는 II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, 등의 에피토프). 이러한 이중특이적 3가 결합 분자는 세 개의 에피토프-결합 부위를 포함하는데, 그 중 두 개는 결합 부위 A 및 결합 부위 B를 제공하는 디아바디-형 결합 도메인이고, 그 중 하나는 결합 부위 C를 제공하는 비-디아바디-형 결합 도메인이다 (예컨대, 도 6A 내지 6F, 및 PCT 출원 번호 PCT/US15/33081; 및 PCT/US15/33076 참조).

[0967] 전형적으로, 본 발명의 3가 결합 분자는 네 개의 상이한 폴리펩타이드 사슬을 포함하겠지만 (도 6A 내지 6B 참조), 분자는, 예를 들어, 이러한 폴리펩타이드 사슬을 서로 융합시킴으로써 (예컨대, 펩타이드 결합을 통해) 또는 이러한 폴리펩타이드 사슬을 분할하여(divide) 추가적인 폴리펩타이드 사슬을 형성함으로써, 또는 소수의 또는 추가적인 폴리펩타이드 사슬을 이황화 결합을 통해 회합시킴으로써 더 적거나 더 많은 폴리펩타이드 사슬을 포함할 수 있다. 도 6B 내지 6F는 세 개의 폴리펩타이드 사슬을 가진 이러한 분자를 개략적으로 도시함으로써 본 발명의 이 측면을 예시한다. 도 6A 내지 6F에서 제공된 바와 같이, 본 발명의 3가 결합 분자는 디아바디-형 결합 도메인이 Fc 영역에 대하여 N-말단 (도 6A, 6C 및 6D)이거나 또는 C-말단 (도 6B, 6E 및 6F)인 대안의 방향을 가질 수 있다.

[0968] 특정 구체예에서, 본 발명의 이러한 3가 결합 분자의 제1 폴리펩타이드 사슬은 (i) VL1-함유 도메인, (ii) VH2-함유 도메인, (iii) 헤테로다이머-촉진 도메인 및 (iv) CH2-CH3 서열을 함유하는 도메인을 함유한다. VL1 및 VL2 도메인은 표 5에서 제공된 바와 같이 CH2-CH3-함유 도메인에 대하여 N-말단 또는 C-말단에 위치한다 (도 6A 및 6B). 이러한 구체예의 제2 폴리펩타이드 사슬은 (i) VL2-함유 도메인, (ii) VH1-함유 도메인 및 (iii) 헤테로다이머-촉진 도메인을 함유한다. 이러한 구체예의 제3 폴리펩타이드 사슬은 (i) VH3-함유 도메인, (ii) CH1-함유 도메인 및 (iii) CH2-CH3 서열을 함유하는 도메인을 함유한다. 제3 폴리펩타이드 사슬은 VH3 및 중쇄 불변 영역을 함유하는 항체의 중쇄일 수 있다. 이러한 구체예의 제4 폴리펩타이드는 (i) VL3-함유 도메인 및 (ii) CL-함유 도메인을 함유한다. 제4 폴리펩타이드 사슬은 제3 폴리펩타이드 사슬의 VH3에 대하여 상보적인 VL3을 함유하는 항체의 경쇄일 수도 있다. 제3 또는 제4 폴리펩타이드 사슬은 자연 발생 항체로부터 분리될 수 있다. 대안으로, 그것들은 재조합에 의해, 합성으로 또는 다른 수단에 의해 구성될 수 있다.

[0969] 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬의 가변 경쇄 도메인은 그것들의 VL1/VH2 (또는 그것들의 VL2/VH1) 도메인이 함께 회합되어 제1 또는 제2 에피토프에 결합할 수 있는 에피토프-결합 부위를 형성하는 것을 허용하기에는 너무 짧은 길이를 가진 개재 스페이스 링커에 의해 이러한 폴리펩타이드 사슬의 가변 중쇄 도메인으로부터 분리된다. 이 목적을 위해 바람직한 개재 스페이스 펩타이드 (링커 1)는 서열 (SEQ ID NO:14): GGGSGGGG를 가진다. 3가 결합 분자의 다른 도메인은 선택적으로 시스테인 잔기를 포함하는 하나 이상의 개재 스페이스 펩타이드에 의해 분리될 수 있다. 3가 결합 분자의 제조에 유용한 예시의 링커는 본원에서 제공되고 PCT 출원 번호 PCT/US15/33081; 및 PCT/US15/33076에서도 제공된다. 그러므로, 이러한 3가 결합 분자의 제1 및 제2 폴리펩타

이드 사슬은 함께 회합하여 제1 에피토프에 결합할 수 있는 VL1/VH1 결합 부위, 뿐만 아니라 제2 에피토프에 결합할 수 있는 VL2/VH2 결합 부위를 형성한다. 이러한 3가 결합 분자의 제3 및 제4 폴리펩타이드 사슬은 함께 회합하여 제3 에피토프에 결합할 수 있는 VL3/VH3 결합 부위를 형성한다. VL1/VH1, VL2/VH2 및 VL3/VH3 도메인은 단일특이적, 이중특이적 또는 삼중특이적인 결합을 허용하기 위하여 동일하거나 상이할 수 있다는 것이 인지될 것이다.

[0970] 상기 기술된 바와 같이, 본 발명의 3가 결합 분자는 세 개의 폴리펩타이드를 포함할 수도 있다. 세 개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 3가 결합 분자는 제3 폴리펩타이드의 VH3-함유 도메인에 대하여 N-말단에서 제4 폴리펩타이드의 도메인을 결합시킴으로써 얻어질 수 있다. 대안으로, 세 개의 도메인, (i) VL3-함유 도메인, (ii) VH3-함유 도메인 및 (iii) CH2-CH3 서열을 함유하는 도메인을 함유하는 발명의 3가 결합 분자의 제3 폴리펩타이드 사슬이 활용되는데, VL3 및 VH3은 이 도메인들의 회합이 에피토프-결합 부위를 형성하는 것을 허용하기 위해 충분히 긴 (적어도 9개 이상의 아미노산 잔기) 개재 스페이서 펩타이드만큼 서로 이격되어 있다.

[0971] VL1/VH1, VL2/VH2, 및 VL3/VH3 도메인은 단일특이적, 이중특이적 또는 삼중특이적인 결합을 허용하기 위해 동일하거나 또는 상이할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 그러나, 본원에서 제공된 바와 같이, 이 도메인들은 바람직하게는 PD-1 및 제2 에피토프 (또는 제2 및 제3 에피토프) (바람직하게는, 이러한 에피토프는 B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC 클래스 I 또는 II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, 등의 에피토프이다)에 결합하도록 선택된다.

[0972] 특히, VL 및 VH 도메인은 3가 결합 분자가 제1 에피토프에 대한 두 개의 결합 부위 및 제2 에피토프에 대한 하나의 결합 부위, 또는 제1 에피토프에 대한 하나의 결합 부위 및 제2 에피토프에 대한 두 개의 결합 부위, 또는 제1 에피토프에 대한 하나의 결합 부위, 제2 에피토프에 대한 하나의 결합 부위 및 제3 에피토프에 대한 하나의 결합 부위를 포함하도록 선택될 수 있다. 발명의 대표적인 3가 결합 분자의 폴리펩타이드 사슬의 일반적인 구조는 도 6A 내지 6F 및 표 5에서 제공된다:

표 5

[0973]

4개의 사슬 제1 방향	제2 사슬	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	제1 사슬	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	제3 사슬	NH ₂ -VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	제4 사슬	NH ₂ -VL3-CL-COOH
4개의 사슬 제2 방향	제2 사슬	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	제1 사슬	NH ₂ -CH2-CH3--VL1-VH2-HPD COOH
	제3 사슬	NH ₂ -VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	제4 사슬	NH ₂ -VL3-CL-COOH
3개의 사슬 제1 방향	제2 사슬	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	제1 사슬	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	제3 사슬	NH ₂ -VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH
3개의 사슬 제2 방향	제2 사슬	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	제1 사슬	NH ₂ -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD COOH
	제3 사슬	NH ₂ -VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH

[0974] HPD = 헤테로다이어-촉진 도메인

[0975] 본 발명의 한 구체예는 PD-1에 대한 두 개의 에피토프-결합 부위 및 PD-1 이외의 분자에 존재하는 제2 에피토프 (예컨대 B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC 클래스 I 또는 II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, 등)에 대한 하나의 에피토프-결합 부위를 포함하는 이중특이적 3가 결합 분자에 관한 것이다. PD-1에 대한 두 개의 에피토프-결합 부위는 동일한 에피토프 또는 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 본 발명의 다른 구체예는 PD-1에 대한 하나의 에피토프-결합 부위 및 PD-1 이외의 분자에 존재하는 제2 항원 (예컨대 B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC 클래스 I 또는 II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, 등)에 결합하는 두 개의 에피토프-결합 부위를 포함하는 이중특이적 3가 결합 분자에 관한 것이다. 제2 항원에 대한 두 개의 에피토프-결합 부위는 항원의 동일한 에피토프 또는 상이한 에피토프

(예컨대, LAG-3의 동일하거나 상이한 에피토프)에 결합할 수 있다. 상기 제공된 바와 같이, 이러한 이중특이적 3가 결합 분자는 세 개 또는 네 개의 폴리펩타이드 사슬을 포함할 수 있다.

[0976] **VII. 불변 도메인 및 Fc 영역**

[0977] 발명의 PD-1-결합 분자 (예컨대, 항체, 디아바디, 3가 결합 분자, 등)의 생성에 유용한 항체 불변 도메인이 본원에서 제공된다.

[0978] 바람직한 CL 도메인은 인간 IgG CL 카파 도메인이다. 예시의 인간 CL 카파 도메인의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:8)이다:

[0979] RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD

[0980] SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQLSSPVTK SFNRGEC.

[0981] 대안으로, 예시의 CL 도메인은 인간 IgG CL 람다 도메인이다. 예시의 인간 CL 카파 도메인의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:9)이다:

[0982] QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA GVETTPSKQS

[0983] NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS.

[0984] 본원에서 제공된 바와 같이, 발명의 PD-1-결합 분자는 Fc 영역을 포함할 수도 있다. 발명의 이러한 분자의 Fc 영역은 임의의 아이소타입 (예컨대, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)일 수 있다. 발명의 PD-1-결합 분자는 CH1 도메인 및/또는 힌지 영역을 더 포함할 수 있다. 존재할 때, CH1 도메인 및/또는 힌지 영역은 임의의 아이소타입 (예컨대, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)일 수 있고, 바람직하게는 원하는 Fc 영역과 동일한 아이소타입이다.

[0985] 예시의 CH1 도메인은 인간 IgG1 CH 도메인이다. 예시의 인간 IgG1 CH1 도메인의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:10)이다:

[0986] ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS

[0987] GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV.

[0988] 예시의 CH1 도메인은 인간 IgG2 CH 도메인이다. 예시의 인간 IgG2 CH1 도메인의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:257)이다:

[0989] ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS

[0990] GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV.

[0991] 예시의 CH1 도메인은 인간 IgG4 CH 도메인이다. 예시의 인간 IgG4 CH1 도메인의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:254)이다:

[0992] ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS

[0993] GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV.

[0994] 한 예시의 힌지 영역은 인간 IgG1 힌지 영역이다. 예시의 인간 IgG1 힌지 영역의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:32)이다: EPKSCDKTHTCPPCP.

[0995] 다른 예시의 힌지 영역은 인간 IgG2 힌지 영역이다. 예시의 인간 IgG2 힌지 영역의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:11)이다: ERKCCVECPPCP.

[0996] 또 다른 예시의 힌지 영역은 인간 IgG4 힌지 영역이다. 예시의 인간 IgG4 힌지 영역의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:12)이다: ESKYGPPCPSCP. 본원에서 기술된 바와 같이, IgG4 힌지 영역은 S228P 치환과 같은 안정화 돌연변이를 포함할 수 있다. 예시의 안정화된 IgG4 힌지 영역의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:13)이다: ESKYGPPCPSCP.

[0997] 본 발명의 Fc 영역-함유 분자 (예컨대, 항체, 디아바디, 및 3가 분자)의 Fc 영역은 완전한 Fc 영역 (예컨대, 완전한 IgG Fc 영역)이거나 또는 Fc 영역의 단지 단편일 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 Fc 영역-함유 분자의 Fc 영역은 C-말단 리신 아미노산 잔기가 없다. 특히, 본 발명의 Fc 영역-함유 분자의 Fc 영역은 엔지니어링된 변종 Fc 영역일 수 있다. 본 발명의 이중특이적 Fc 영역-함유 분자의 Fc 영역은 하나 이상의 Fc 수용체 (예컨대, Fc γ R(들))에 결합하는 능력을 가질 수 있지만, 더 바람직하게는 이러한 변종 Fc 영역은 Fc γ RIA (CD64), Fc γ RIIA (CD32A), Fc γ RIIB (CD32B), Fc γ RIIIA (CD16a) 또는 Fc γ RIIIB (CD16b)에 대하여 변화된 결합을 갖거나

(야생형 Fc 영역에 의해 나타난 결합과 비교하여) 또는 억제 수용체(들)에 결합하는 능력이 실질적으로 감소되거나 또는 없을 것이다. 그러므로, 본 발명의 Fc 영역-함유 분자의 Fc 영역은 완전한 Fc 영역의 CH2 도메인의 일부 또는 전부 및/또는 CH3 도메인의 일부 또는 전부를 포함할 수 있거나, 또는 변종 CH2 및/또는 변종 CH3 서열 (예를 들어, 완전한 Fc 영역의 CH2 또는 CH3 도메인에 관련하여 하나 이상의 삽입 및/또는 하나 이상의 결실을 포함할 수 있음)을 포함할 수 있다. 이러한 Fc 영역은 비-Fc 폴리펩타이드 부분을 포함할 수 있거나, 비-자연적으로 완전한 Fc 영역의 일부를 포함할 수 있거나, 또는 CH2 및/또는 CH3 도메인의 비-자연 발생 방향 (예컨대, 예를 들어, 두 개의 CH2 도메인 또는 두 개의 CH3 도메인, 또는 N-말단에서 C-말단 방향으로, CH2 도메인에 결합된 CH3 도메인, 등)을 포함할 수 있다.

[0998] 활성화 수용체에 대한 결합을 증가시키는 변형 (예컨대, Fc γ RIIA (CD16A)) 및 억제 수용체에 대한 결합을 감소시키는 변형 (예컨대, Fc γ RIIB (CD32B))을 포함하여, 이펙터 기능을 변화시키는 것으로 확인된 Fc 영역 변형은 업계에 공지되어 있다 (예컨대 Stavenhagen, J.B. *et al.* (2007) "Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fc γ Receptors," *Cancer Res.* 57(18):8882-8890 참조). CD32B에 대한 결합이 감소되고 및/또는 CD16A에 대한 결합이 증가된 인간 IgG1 Fc 영역의 예시의 변종은 F243L, R292P, Y300L, V305I 또는 P296L 치환을 함유한다. 이 아미노산 치환들은 임의의 조합으로 또는 부분조합(subcombination)으로 인간 IgG1 Fc 영역에 존재할 수 있다. 한 구체예에서, 인간 IgG1 Fc 영역 변종은 F243L, R292P 및 Y300L 치환을 함유한다. 다른 구체예에서, 인간 IgG1 Fc 영역 변종은 F243L, R292P, Y300L, V305I 및 P296L 치환을 함유한다.

[0999] 특히, 본 발명의 Fc 영역-함유 분자의 폴리펩타이드 사슬의 Fc 영역이 Fc γ RIA (CD64), Fc γ RIIA (CD32A), Fc γ RIIB (CD32B), Fc γ RIIA (CD16a) 또는 Fc γ RIIB (CD16b)에 대한 감소된 (또는 실질적으로 없음) 결합을 나타내는 것이 바람직하다 (야생형 IgG1 Fc 영역 (SEQ ID NO:1)에 의해 나타난 결합에 비하여). 이러한 변화된 결합을 매개할 수 있는 변종 Fc 영역 및 돌연변이 형태는 상기 기술되어 있다. 특이적 구체예에서, 본 발명의 Fc 영역-함유 분자는 감소된 ADCC 이펙터 기능을 나타내는 IgG Fc 영역을 포함한다. 바람직한 구체예에서 이러한 Fc 영역-함유 분자의 제1 및/또는 제3 폴리펩타이드 사슬의 CH2-CH3 도메인은 다음 치환 중 임의로 1, 2 또는 3 개를 포함한다: L234A, L235A, N297Q, 및 N297G. 다른 구체예에서, 인간 IgG Fc 영역 변종은 N297Q 치환, N297G 치환, L234A 및 L235A 치환 또는 D265A 치환을 함유하며, 이 돌연변이들은 FcR 결합을 없앤다. 대안으로, 고유하게 Fc γ RIIA (CD16a)에 대한 감소된 (또는 실질적으로 없음) 결합 및/또는 감소된 이펙터 기능 (야생형 IgG1 Fc 영역 (SEQ ID NO:1)에 의해 나타난 결합에 비하여)를 나타내는 Fc 영역의 CH2-CH3 도메인이 활용된다. 특이적 구체예에서, 본 발명의 Fc 영역-함유 분자는 IgG2 Fc 영역 (SEQ ID NO:2) 또는 IgG4 Fc 영역 (SEQ ID NO:4)을 포함한다. IgG4 Fc 영역이 활용될 때, 본 발명은 또한 상기 기술된 힌지 영역 S228P 치환 (예컨대, SEQ ID NO:13 참조)과 같은 안정화 돌연변이의 도입을 포함한다. 297G, N297Q, L234A, L235A 및 D265A 치환이 이펙터 기능을 없애기 때문에, 이펙터 기능이 필요한 상황에서는, 이 치환들은 바람직하게는 사용되지 않을 것이다.

[1000] 특히, 본 발명의 Fc 영역-함유 분자의 폴리펩타이드 사슬의 Fc 영역이 증가된 혈청 반감기를 나타내는 것이 바람직하다 (상응하는 야생형 Fc에 의해 나타난 반감기에 비하여). 연장된 혈청 반감기를 나타내는 변종 Fc 영역 및 돌연변이 형태는 상기 기술되어 있다. 바람직한 구체예에서 이러한 Fc 영역-함유 분자의 제1 및/또는 제3 폴리펩타이드 사슬의 CH2-CH3 도메인은 다음 치환 중 임의의 1, 2 또는 3 개를 포함한다: M252Y, S254T 및 T256E. 발명은 또한 다음을 포함하는 변종 Fc 영역을 포함하는 본 발명의 Fc 영역-함유 분자를 포함한다:

[1001] (A) 이펙터 기능 및/또는 Fc γ R을 변화시키는 하나 이상의 돌연변이; 및

[1002] (B) 혈청 반감기를 연장시키는 하나 이상의 돌연변이.

[1003] 본 발명의 Fc 영역-함유 분자의 CH2 및 CH3 도메인에 대하여 바람직한 IgG1 서열은 치환 L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E를 포함할 것이다 (SEQ ID NO:258):

[1004] APEAAGGPSV FLFPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK

[1005] PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT

[1006] LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL

[1007] TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGX,

[1008] 여기서, X는 리신 (K)이거나 또는 없다.

[1009] 본 발명의 Fc 영역-함유 분자의 CH2 및 CH3 도메인에 대하여 바람직한 IgG4 서열은 M252Y/S254T/T256E 치환을

포함할 것이다 (SEQ ID NO:259):

[1010] APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK
 [1011] PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
 [1012] LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL
 [1013] TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGX,

[1014] 여기서, X는 리신 (K)이거나 또는 없다.

[1015] 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬이 동일하지 않은 디아바디 및 3가 결합 분자에 대하여, 두 개의 제1 폴리펩타이드 사슬의 CH2-CH3 도메인 사이에서 또는 두 개의 제3 폴리펩타이드 사슬의 CH2-CH3 도메인 사이에서 호모다imer화가 일어나는 것을 감소시키거나 방지하는 것이 바람직하다. 이러한 폴리펩타이드 사슬의 CH2 및/또는 CH3 도메인은 서열이 동일할 필요가 없고, 유리하게는 두 개의 폴리펩타이드 사슬 사이에서의 복합체 형성을 촉진하도록 변형된다. 예를 들어, 아미노산 치환 (바람직하게는 "뿔(knob)"을 형성하는 부위가 큰 측면기를 포함하는 아미노산, 예컨대, 트립토판으로의 치환)은 입체적 간섭이 유사하게 돌연변이된 도메인과의 상호작용을 방지하게 되고 돌연변이된 도메인이 상보적, 또는 부응하는(accommodating) 돌연변이가 엔지니어링되는 도메인, 즉, "홀(hole)" (예컨대, 글리신으로의 치환)과 쌍을 형성하도록 CH2 또는 CH3 도메인으로 도입될 수 있다. 이러한 돌연변이의 세트는 Fc 영역을 형성하는 CH2-CH3 도메인을 포함하는 폴리펩타이드의 임의의 쌍으로 엔지니어링될 수 있다. 호모다imer화보다 헤테로다imer화를 선호하도록 단백질을 엔지니어링하는 방법은, 특히 면역글로불린-유사 분자의 조작과 관련하여, 업계에 널리 공지되어 있고, 본원에 포함된다 (예컨대, Ridgway *et al.* (1996) "'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization," Protein Engr. 9:617-621, Atwell *et al.* (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library," J. Mol. Biol. 270: 26-35, and Xie *et al.* (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis," J. Immunol. Methods 296:95-101 참조; 이 문헌들은 전문이 본원에 참조로 포함됨). 바람직하게는 "뿔"은 세 개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬의 CH2-CH3 도메인으로 엔지니어링되고 "홀"은 제3 폴리펩타이드 사슬의 CH2-CH3 도메인으로 엔지니어링된다. 그러므로, "뿔"은 제1 폴리펩타이드 사슬이 그것의 CH2 및/또는 CH3 도메인을 통해 호모다imer화하는 것을 방지하도록 도울 것이다. 제3 폴리펩타이드 사슬은 바람직하게는 "홀" 치환을 함유하기 때문에, 그것은 제1 폴리펩타이드 사슬과 헤테로다imer화될 뿐만 아니라 자체로 호모다imer화될 것이다. 이 전략은 "뿔"이 제1 폴리펩타이드 사슬의 CH2-CH3 도메인으로 엔지니어링되고 "홀"이 제3 폴리펩타이드 사슬의 CH2-CH3 도메인으로 엔지니어링되는 경우, 상기 기술된 바와 같이, 3, 4 또는 5개의 사슬을 포함하는 디아바디 및 3가 결합 분자에 활용될 수 있다.

[1016] 바람직한 뿔은 변형 T366W를 함유하도록 IgG Fc 영역을 변형시킴으로써 생성된다. 바람직한 홀은 변형 T366S, L368A 및 Y407V를 함유하도록 IgG Fc 영역을 변형시킴으로써 생성된다. 최종 이중특이적 헤테로다imer Fc 영역-함유 분자로부터 홀-함유 제3 폴리펩타이드 사슬 호모다imer를 정제하는 것을 돕기 위해서, 제3 폴리펩타이드 사슬의 홀-함유 CH2 및 CH3 도메인의 단백질 A 결합 부위는 바람직하게는 위치 435에서의 아미노산 치환 (H435R)에 의해 돌연변이된다. 그러므로, 홀-함유 제3 폴리펩타이드 사슬 호모다imer는 단백질 A에 결합하지 않는 반면, 이중특이적 헤테로다imer는 제1 폴리펩타이드 사슬 상의 단백질 A 결합 부위를 통해 단백질 A에 결합하는 능력을 보유했을 것이다. 대안의 구체예에서, 홀-함유 제3 폴리펩타이드 사슬은 위치 434 및 435에서의 아미노산 치환 (N434A/N435K)을 통합할 수 있다.

[1017] 본 발명의 Fc 영역-함유 분자의 제1 폴리펩타이드 사슬의 CH2 및 CH3 도메인에 대하여 바람직한 IgG1 아미노산 서열은 "뿔-함유" 서열 (SEQ ID NO:6)을 가질 것이다:

[1018] APEAAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 [1019] PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 [1020] LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL
 [1021] TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGX,

[1022] 여기서 X는 리신 (K)이거나 또는 없다.

[1023] 두 개의 폴리펩타이드 사슬을 가진 본 발명의 Fc 영역-함유 분자의 제2 폴리펩타이드 사슬 (또는 3, 4, 또는 5

개의 폴리펩타이드 사슬을 가진 Fc 영역-함유 분자의 제3 폴리펩타이드 사슬)의 CH2 및 CH3 도메인에 대하여 바람직한 IgG1 아미노산 서열은 "홀-함유" 서열 (SEQ ID NO:7)을 가질 것이다:

[1024] APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK

[1025] PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT

[1026] LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPDSIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKL

[1027] TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNRYTQKS LSLSPGX,

[1028] 여기서 X는 리신 (K)이거나 없다.

[1029] 언급되는 바와 같이, SEQ ID NO:6 및 SEQ ID NO:7의 CH2-CH3 도메인은 위치 234에서 알라닌으로 및 위치 235에서 알라닌으로의 치환을 포함하며, 따라서 Fc γ RIA (CD64), Fc γ RIIA (CD32A), Fc γ RIIB (CD32B), Fc γ RIIIA (CD16a) 또는 Fc γ RIIIB (CD16b)에 대한 감소된 (또는 실질적으로는 없음) 결합을 나타내는 Fc 영역을 형성한다 (야생형 Fc 영역 (SEQ ID NO:1)에 의해 나타난 결합에 비하여). 본 발명은 또한 이러한 CH2-CH3 도메인을 포함하는데, 이것은 위치 Fc 영역의 이펙터 기능 및/또는 F γ R 결합 활성을 변형시키는 대안의 및/또는 추가적인 치환을 포함한다. 발명은 또한 이러한 CH2-CH3 도메인을 포함하는데, 이것은 하나 이상의 반감기 연장 아미노산 치환을 더 포함한다. 특히, 발명은 M252Y/S254T/T256E를 더 포함하는 이러한 홀-함유 및 이러한 늑-함유 CH2-CH3 도메인을 포함한다.

[1030] 제1 폴리펩타이드 사슬은 SEQ ID NO:6의 것과 같은, "늑-함유" CH2-CH3 서열을 갖는 것이 바람직하다. 그러나, 인식되는 바와 같이, "홀-함유" CH2-CH3 도메인 (예컨대, SEQ ID NO:7)은 제1 폴리펩타이드 사슬에서 사용될 수 있으며, 이 경우에, "늑-함유" CH2-CH3 도메인 (예컨대, SEQ ID NO:6)은 두 개의 폴리펩타이드 사슬을 가진 본 발명의 Fc 영역-함유 분자의 제2 폴리펩타이드 사슬 (또는 3, 4, 또는 5개의 폴리펩타이드 사슬을 가진 Fc 영역-함유 분자의 제3 폴리펩타이드 사슬)에서 사용될 것이다.

[1031] 상기 상세히 설명된 바와 같이 발명은 야생형 CH2 및 CH3 도메인, 또는 상기 기술된 치환의 조합을 포함하는 CH2 및 CH3 도메인을 가진 Fc 영역-함유 분자 (예컨대, 항체 및 Fc 영역-함유 디아바디)를 포함한다. 이러한 변형을 포함하는 IgG1 CH2-CH3 도메인의 예시의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:260)이다:

[1032] APEX₁X₂GGPSV FLFPPKPKDT LX₃IX₄RX₅PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK

[1033] PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT

[1034] LPPSREEMTK NQVSLX₆CX₇VK GFYPDSIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLX₈SKL

[1035] TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHX₉X₁₀YTQKS LSLSPGX₁₁

[1036] 여기서:

[1037] (a) X₁ 및 X₂는 둘 다 L (야생형)이거나, 또는 둘 다 A (감소된 Fc γ R 결합)이고;

[1038] (b) X₃, X₄ 및 X₅는 각각 M, S 및 T (야생형)이거나, 또는 Y, T 및 E (연장된 반감기)이고,

[1039] (c) X₆, X₇ 및 X₈는 각각 T, L 및 Y (야생형)이거나, 또는 W, L 및 Y (늑), 또는 S, A 및 V (홀)이고;

[1040] (d) X₉ 및 X₁₀는 각각 N 및 H (야생형)이거나, 또는 N 및 R (단백질 A 결합 없음), 또는 A 및 K (단백질 A 결합 없음)이고;

[1041] (e) X₁₁은 K이거나 또는 없다.

[1042] 다른 구체예에서, 발명은 PCT 공개 번호 WO 2007/110205; WO 2011/143545; WO 2012/058768; WO 2013/06867 (이 것들은 모두 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에서 기술된 것들과 같이, 업계에 공지된 돌연변이를 사용하여 호모다имер화보다 헤테로다имер화를 선호하도록 엔지니어링된 CH2 및/또는 CH3 도메인을 포함하는 PD-1-결합 분자를 포함한다.

[1043] VIII. PD-1 x LAG-3 이중특이적 결합 분자

[1044] 본 발명은 특히 항-PD-1 항체, 바람직하게는 본원에 제공된 신규한 항-PD-1 항체들 중 하나의 에피토프-결합 단

편, 및 항-인간 LAG-3 항체, 바람직하게는 본원에 제공된 신규한 항-인간 LAG-3 항체들 중 하나의 에피토프-결합 단편을 포함하는 PD-1 x LAG-3 이중특이적 결합 분자 (예컨대, 이중특이적 항체, 이중특이적 디아바디, 등)에 관련된다. 본 발명의 바람직한 PD-1 x LAG-3 이중특이적 결합 분자는 이러한 분자들의 억제 활성을 약화시키기 위하여, 두 개의 상이한 에피토프: PD-1의 에피토프 및 LAG-3의 에피토프에 배위 결합할 수 있는 것을 가능하게 하는 항체들의 에피토프-결합 단편을 가진다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 이러한 약화는 검출 가능한 PD-1 및/또는 LAG-3 억제 활성의 적어도 20%의 감소, 적어도 50%의 감소, 적어도 80%의 감소 또는 적어도 90%의 감소, 또는 검출 가능한 PD-1 및/또는 LAG-3 억제 활성의 완전한 제거를 말한다. 항-인간 PD-1 항체 및 항-LAG-3 항체의 에피토프-결합 단편 (예컨대, VL 및 VH 도메인)의 선택은 이러한 PD-1 x LAG-3 이중특이적 결합 분자를 구성하는 폴리펩타이드 사슬들이 조립되어 제1 항원 (즉 PD-1 또는 LAG-3 중 어느 하나)에 특이적인 적어도 하나의 기능성 항원 결합 부위 및 제2 항원 (즉 제1 항원의 정체성에 따라 PD-1 또는 LAG-3 중 어느 하나)에 특이적인 적어도 하나의 기능성 항원 결합 부위를 형성하도록 조정될 수 있다.

[1045] 특정 구체예에서, 본 발명의 PD-1 x LAG-3 이중특이적 결합 분자는 본원에서 기술된 바와 같이 바람직하게 2, 3, 4 또는 5개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 이중특이적 디아바디이다. 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 PD-1 x LAG-3 이중특이적 결합 분자는 본원에서 기술된 바와 같이 바람직하게 2, 3 또는 4개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 이중특이적 항체이다 (또한 예컨대 WO 2007/024715; WO2007/110205; WO 2009/080251; WO 2009/080254; WO 2009/089004; WO 2011/069104; WO 2011/117329; WO 2011/131746; WO 2011/133886; WO 2011/143545; WO 2012/023053; WO 2013/060867 참조, 이것들은 모두 전문이 본원에 참조로 포함됨).

[1046] **A. 항-인간 LAG-3 항체**

[1047] 인간 LAG-3에 대하여 면역특이적인 예시의 항체들이 하기에 제공된다. 추가의 원하는 항체들은 LAG-3 또는 그것의 펩타이드 단편을 사용하여 유도된 항체-분비 하이브리도마를 분리함으로써, 또는 LAG-3 또는 그것의 펩타이드 단편에 대한 결합에 대해 재조합 항체 라이브러리를 스크리닝함으로써 제조될 수 있다. 인간 LAG-3 (28개의 아미노산 잔기 신호 서열 (하기에 밑줄로 표시됨) 및 497개의 아미노산 잔기 성숙 단백질을 포함함)은 아미노산 서열 (SEQ ID NO:38)을 가진다:

[1048] MWEAQLGLL FLQPLWVAPV KPLQPGAEV VVWAQEGAPA QLPCSPTIPL
 [1049] QDLSLLRRAG VTWQHQPDSG PPAAPGHPL APGPHPAAPS SWGPRPRRYT
 [1050] VLSVGPGLR SGRLPLQPRV QLDERGRQRG DFSLWLRPAR RADAGEYRAA
 [1051] VHLRDRALSC RLRLRLGQAS MTASPPGSLR ASDWVILNCS FSRPDRPASV
 [1052] HWFRNRGQGR VPVRESPIHH LAESFLFLPQ VSPMDSGPWG CILTYRDGFN
 [1053] VSIMYNLTVL GLEPPTPLTV YAGAGSRVGL PCRLPAGVGT RSFLTAKWTP
 [1054] PGGGPDLLVT GDNGDFTLRL EDVSAQAGT YTCHIHLQEQL NATVTLAI
 [1055] ITVTPKSFGS PGSLGKLLCE VTPVSGQERF VWSSLDTPSQ RSFSGPWLEA
 [1056] QEAQLLSQPW QCQLYQGERL LGAAYVFTTEL SSPGAQRSGR APGALPAGHL
 [1057] LLFLILGVLS LLLLVTAAGF FHLWRRQWRP RRFSALEQGI HPPQAQSKIE
 [1058] ELEQEPEPEP EPEPEPEPEP EPEQL.

[1059] **1. LAG-3 mAb A**

[1060] 본원에서 "LAG-3 mAb A"로 표시된 항-인간 LAG-3 항체 BMS-986016 (25F7; Medarex/BMS) 및 그것의 변종들이 기술되었다 (예컨대 WO 2014/008218 참조). LAG-3 mAb A의 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열은 아미노산 서열 (SEQ ID NO:39)을 가진다 (CDR은 밑줄로 표시됨):

[1061] QVQLQWAGG LLKPSETLSL TCAVYGGSF DYYWNWIRQP PGKGLEWIGE
 [1062] INHNGNTNSN PSLKSRVTLS LDTSKNQFSL KLRSVTAADT AVYYCAFGYS
 [1063] DYEYNWFDPW GQGTLVTVSS.

[1064] LAG-3 mAb A의 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열은 아미노산 서열 (SEQ ID NO:40)을 가진다 (CDR은 밑줄로 표

시됨):

- [1065] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIS SYLAWYQKP GQAPRLLIYD
- [1066] ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ
- [1067] GTNLEIK.
- [1068] 특유의 결합 특징을 가진 추가적인 쥐과의 항-인간 LAG-3 항체들이 최근에 확인되었다 (미국 특허 출원 번호 62/172,277 참조). 본 발명의 바람직한 PD-1 x LAG-3 이중특이적 결합 분자는 항-인간 LAG-3 항체 **LAG-3 mAb 1** 또는 **LAG-3 mAb 6** 항체를 포함하는데, 그것들은 신규한 에피토프에 결합하고 LAG-3 결합에 대해 BMS-986016과 경쟁하지 않는다. LAG-3 mAb 1 또는 LAG-3 mAb 6의 인간화된 VH 및/또는 VL 도메인을 가지는 본 발명의 PD-1 x LAG-3 이중특이적 결합 분자가 특히 바람직하다.
- [1069] **2. LAG-1 mAb 1**
- [1070] LAG-3 mAb 1의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:41)이 하기 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨).
- [1071] QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFR NYGMNWVKQA PGKVLKWMGW
- [1072] INTYTGESTY ADDFEGRFAF SLGTSASTAY LQINILKNED TATYFCARES
- [1073] LYDYYSMDYW GQGTSVTVSS
- [1074] LAG-3 mAb 1의 CDR_{H1} (SEQ ID NO:42): RNYGMN
- [1075] LAG-3 mAb 1의 CDR_{H2} (SEQ ID NO:43): WINTYTGESTYADDFEG
- [1076] LAG-3 mAb 1의 CDR_{H3} (SEQ ID NO:44): ESLDYYSMDY
- [1077] LAG-3 mAb 1의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:45)이 하기 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [1078] DVVVTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQRPGQSPE
- [1079] RLIYLVSELD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEADLGV YYCWQGTHFP
- [1080] YTFGGGTKLE IK
- [1081] LAG-3 mAb 1의 CDR_{L1} (SEQ ID NO:46): KSSQSLLHSDGKTYLN
- [1082] LAG-3 mAb 1의 CDR_{L2} (SEQ ID NO:47): LVSELDS
- [1083] LAG-3 mAb 1의 CDR_{L3} (SEQ ID NO:48): WQGTHTFPYT
- [1084] 본원에서 "hLAG-3 mAb 1 VH1" 및 "hLAG-3 mAb 1 VH2"로 표시된 LAG-3 mAb 1의 두 개의 예시의 인간화된 VH 도메인 및 LAG-3 mAb 1의 4개의 예시의 인간화된 VL 도메인, "hLAG-3 mAb 1 VL1", "hLAG-3 mAb 1 VL2", "hLAG-3 mAb 1 VL3" 및 "hLAG-3 mAb 1 VL4"가 하기에 제공된다. 인간화된 VL 도메인 중 어느 것이든지 인간화된 VH 도메인 중 어느 것과 쌍을 이루어 LAG-3 결합 도메인이 생성될 수 있다. 따라서, 인간화된 VH 도메인과 쌍을 이룬 인간화된 VL 도메인 중 하나를 포함하는 임의의 항체는 일반적으로 "hLAG-3 mAb 1"로 언급되고, 인간화된 VH/VL 도메인의 특정 조합은 특이적 VH/VL 도메인을 참조로 언급되며, 예를 들면 hLAG-3 mAb 1 VH1 및 hLAG-3 mAb 1 VL2를 포함하는 인간화된 항체는 "hLAG-3 mAb 1(1.2)"로 특이적으로 언급된다.
- [1085] LAG-3 mAb 1 VH1의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:49)이 하기 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [1086] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
- [1087] INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES
- [1088] LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS.
- [1089] LAG-3 mAb 1 VH2의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:50)이 하기 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [1090] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW

- [1091] INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYFCARES
- [1092] LYDYYSMDYW GQGTTTVTVSS.
- [1093] **LAG-3 mAb 1 VL1**의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:51)이 하기 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [1094] DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQSPE
- [1095] RLIYLVSELD SGVPDRFSGS SGTDFTLKI SRVEADVGV YYCWQGTTHP
- [1096] YTFGGGTKVE IK.
- [1097] **LAG-3 mAb 1 VL2**의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:52)이 하기 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [1098] DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQSPE
- [1099] RLIYLVSELD SGVPDRFSGS SGTDFTLKI SRVEADVGV YYCWQGTTHP
- [1100] YTFGGGTKVE IK.
- [1101] **LAG-3 mAb 1 VL3**의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:53)이 하기 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [1102] DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQPPE
- [1103] RLIYLVSELD SGVPDRFSGS SGTDFTLKI SRVEADVGV YYCWQGTTHP
- [1104] YTFGGGTKVE IK.
- [1105] **LAG-3 mAb 1 VL4**의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:54)이 하기 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [1106] DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
- [1107] RLIYLVSELD SGVPDRFSGS SGTDFTLKI SRVEADVGV YYCWQGTTHP
- [1108] YTFGGGTKVE IK.
- [1109] hLAG-3 mAb 1 VL4의 VL 도메인의 CDR_{L1}은 글리신 대 알라닌 아미노산 치환을 포함하고 아미노산 서열: **KSSQSLLHSDAKTYLN** (SEQ ID NO:55)을 가진다 (치환된 알라닌은 밑줄로 표시됨). 유사한 치환이 상기 기술된 LAG-3 mAb 1 CDR_{L1} 도메인들 중 임의의 것에 통합될 수 있는 것으로 여겨진다.
- [1110] **3. LAG-3 mAb 6**
- [1111] LAG-3 mAb 6의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:56)이 하기 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [1112] EVLLQQSGPE LVKPGASVKI PCKASGYTFT DYNMDWVKQS HGESLEWIGD
- [1113] INPDNGVTIY NQKFEGKATL TVDKSSSTAY MELRSLTSED TAVYYCAREA
- [1114] DYFYFDYWGQ GTTLTVSS
- [1115] LAG-3 mAb 6의 CDR_{H1} (SEQ ID NO:57): **DYNMD**
- [1116] LAG-3 mAb 6의 CDR_{H2} (SEQ ID NO:58): **DINPDNGVTIYNQKFEG**
- [1117] LAG-3 mAb 6의 CDR_{H3} (SEQ ID NO:59): **EADYFYFDY**
- [1118] LAG-3 mAb 6의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:60)이 하기 제시된다 (CDR 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [1119] DIVMTQSHRF MSTSVGDRVS ITCKASQDVS SVVAWYQKP GQSPKLLIFS
- [1120] ASYRYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA ADLAVYYCQQ HYSTPWTFGG
- [1121] GTKLEIK
- [1122] LAG-3 mAb 6의 CDR_{L1} (SEQ ID NO:61): **KASQDVSSVVA**

- [1123] LAG-3 mAb 6의 CDR_L2 (SEQ ID NO:62): SASRYRT
- [1124] LAG-3 mAb 6의 CDR_L3 (SEQ ID NO:63): HYSTPWT
- [1125] 본원에서 "hLAG-3 mAb 6 VH1" 및 "hLAG-3 mAb 6 VH2"로 표시된 LAG-3 mAb 6의 두 개의 예시의 인간화된 VH 도메인 및 LAG-3 mAb 6의 2개의 예시의 인간화된 VL 도메인, "hLAG-3 mAb 1 VL1" 및 "hLAG-3 mAb 1 VL2"가 하기에 제공된다. 인간화된 VL 도메인 중 어느 것이든지 인간화된 VH 도메인 중 어느 것과 쌍을 이루어 LAG-3 결합 도메인이 생성될 수 있다. 따라서, 인간화된 VH 도메인과 쌍을 이룬 인간화된 VL 도메인 중 하나를 포함하는 임의의 항체는 일반적으로 "hLAG-3 mAb 6"으로 언급되고, 인간화된 VH/VL 도메인의 특정 조합은 특이적 VH/VL 도메인을 참조로 언급되며, 예를 들면 hLAG-3 mAb 6 VH1 및 hLAG-3 mAb 6 VL2를 포함하는 인간화된 항체는 "hLAG-3 mAb 6(1.2)"로 특이적으로 언급된다.
- [1126] hLAG-3 mAb 6 VH1의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:294)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [1127] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYNMDWVRQA PGQGLEWMGD INPDNGVTIY
- [1128] NQKFEGRVTM TTDSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCAREA DYFYFDYWGQ GTTLTVSS.
- [1129] hLAG-3 mAb 6 VH2의 VH 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:295)이 하기에 제시된다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [1130] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYNMDWVRQA PGQGLEWVSD INPDNGVTIY
- [1131] NQKFEGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREA DYFYFDYWGQ GTTLTVSS.
- [1132] hLAG-3 mAb 6 VL1의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:296)이 하기에 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [1133] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS
- [1134] RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG GTKLEIK.
- [1135] hLAG-3 mAb 6 VL2의 VL 도메인의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:297)이 하기에 제시된다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [1136] DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPD
- [1137] RFGSGSGTD FTFTISSLQP EDIAVYYCQQ HYSTPWTFGG GTKLEIK.
- [1138] hLAG-3 mAb 6 VL1 및 VL2의 VL 도메인의 CDR_L1은 리신 대 아르기닌 아미노산 치환을 포함하고 아미노산 서열: RASQDVSSVVA (SEQ ID NO:298)을 가진다 (치환된 아르기닌은 밑줄로 표시됨). 유사한 치환이 상기 기술된 LAG-3 mAb 6 CDR_L1 도메인들 중 임의의 것에 통합될 수 있는 것으로 여겨진다.
- [1139] B. E/K 코일을 가지는 예시의 4 사슬 Fc 영역-함유 디아바디
- [1140] E/K-코일 헤테로다이머-촉진 도메인을 포함하는 4개의 예시적인 PD-1 X LAG-3 이중특이적, 4 사슬 Fc 영역-함유 디아바디 ("DART A", "DART B", "DART C" 및 "DART I"로 표시됨)가 생성되었다. 이 Fc 영역-함유 디아바디들의 구조는 하기에 상세하게 설명된다. 이 예시적인 PD-1 x LAG-3 디아바디들은 발명의 범주를, 어떤 방식으로든 제한하는 것이 아니라 예시하기 위해 의도된다.
- [1141] 1. DART A
- [1142] DART A는 PD-1에 특이적인 두 개의 결합 부위, LAG-3에 특이적인 두 개의 결합 부위, 연장된 반감기를 위해 엔지니어링된 변종 IgG4 Fc 영역 및 시스테인-함유 E/K-코일 헤테로다이머-촉진 도메인을 가지는, 이중특이적, 4 사슬, Fc 영역-함유 디아바디이다. DART A의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단, LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGG (SEQ ID NO:14)); PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); 시스테인-함유 개재 링커 펩타이드 (링커 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); 시

스테인-함유 헤테로다이머-촉진 (E-코일) 도메인 (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:23)); 안정화된 IgG4 힌지 영역 (SEQ ID NO:13); 치환 M252Y/S254T/T256E를 포함하고 C-말단 잔기가 없는 변종 IgG4 CH2-CH3 도메인 (SEQ ID NO:259); 및 C-말단을 포함한다.

[1143] DART A의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:267의 변종이다:

[1144] DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDX₁KTYLNW LLQKPGQPPE RLIYLVSELD

[1145] SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP YTFGGGTKVE IKGGSGGGG

[1146] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWRQA PGQGLEWIGV IHPDSEITWL

[1147] DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLTVTVSSG

[1148] GCGGGEVAAC EKEVAALEKE VAALKEVAA LEKESKYGPP CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP

[1149] KPKDTLX₂IX₃R X₄PEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV

[1150] LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL

[1151] TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGDSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC

[1152] SVMHEALHNH YTQKSLSLSL G,

[1153] 여기서 X₁, X₂, X₃ 및 X₄는 독립적으로 선택되고, X₁은 A 또는 G이며; X₂는 Y 또는 M이고; X₃은 T 또는 S이며; X₄는 E 또는 T이다.

[1154] DART A의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:267이고, 이때 X₁은 A이며; X₂는 Y이고; X₃은 T이며; X₄는 E이다.

[1155] DART A의 제2 및 제4 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단, PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 ((VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); 시스테인-함유 개재 링커 펩타이드 (링커 2: GCGGGG (SEQ ID NO:15)); 시스테인-함유 헤테로다이머-촉진 (K-코일) 도메인 (KVAACEK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:24)); 및 C-말단을 포함한다.

[1156] DART A의 제2 및 제4 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:268)이다:

[1157] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QKPGQPPKL LIHAASNQGS

[1158] GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KGGSGGGGG

[1159] VQLVQSGAEV KKPASGVKVS CKASGYFTN YGMNWRQAP GQGLEWMGIW NTYTGSTYA

[1160] DDFEGRFVFS MDTASTAYL QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTTVTVSSG

[1161] GCGGGKVAAC KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE.

[1162] 2. DART B

[1163] DART B는 DART A와 동일하되, DART B의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬은 CDR_L1에 아미노산 치환을 포함하는, hLAG-3 mAb 1 VL3의 VL 도메인 (SEQ ID NO:53)을 포함한다. 그러므로, DART B의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL3) (SEQ ID NO:53); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); 개재 링커 펩타이드 (링커 2: GCGGGG (SEQ ID NO:15)); 시스테인-함유 헤테로다이머-촉진 (E-코일) 도메인 (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:23)); 안정화된 IgG4 힌지 영역 (SEQ ID NO:13); 치환 M252Y/S254T/T256E를 포함하고 C-말단 잔기가 없는 변종 IgG4 CH2-CH3 도메인 (SEQ ID NO:259); 및 C-말단을 포함한다.

[1164] DART B의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:267이고, 이때 X₁은 G이며; X₂는 Y이고;

X₃은 T이며; X₄는 E이다.

[1165] DART B의 제2 및 제4 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:268이다.

[1166] 3. DART C

[1167] DART C는 DART B와 동일하되, DART B의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬은 C-말단 잔기가 없는 야생형 IgG4 CH2-CH3 도메인 (SEQ ID NO:4)을 포함한다. 그러므로, DART C의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL3) (SEQ ID NO:53); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); 개재 링커 펩타이드 (링커 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); 시스테인-함유 헤테로다이어-촉진 (E-코일) 도메인 (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:23)); 안정화된 IgG4 힌지 영역 (SEQ ID NO:13); C-말단 잔기가 없는 야생형 IgG4 CH2-CH3 도메인 (SEQ ID NO:4); 및 C-말단을 포함한다.

[1168] DART C의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:267이고, 이때 X₁은 G이며; X₂는 M이고; X₃은 S이며; X₄는 T이다.

[1169] DART C의 제2 및 제4 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:268이다.

[1170] 4. DART I

[1171] DART I는 PD-1에 특이적인 두 개의 결합 부위, LAG-3에 특이적인 두 개의 결합 부위, 연장된 반감기를 위해 엔지니어링된 변종 IgG4 Fc 영역 및 시스테인-함유 E/K-코일 헤테로다이어-촉진 도메인을 가지는, 이중특이적, 4 사슬, Fc 영역-함유 디아바디이다. DART I의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL1) (SEQ ID NO:296); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); 개재 링커 펩타이드 (링커 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); 시스테인-함유 헤테로다이어-촉진 (E-코일) 도메인 (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:23)); 안정화된 IgG4 힌지 영역 (SEQ ID NO:13); 치환 M252Y/S254T/T256E를 포함하고 C-말단 잔기가 없는 변종 IgG4 CH2-CH3 도메인 (SEQ ID NO:259); 및 C-말단을 포함한다.

[1172] DART I의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:290)이다:

[1173] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVP

[1174] RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV

[1175] QSGAEVKKPG ASVKVSKAS GYSFTSYWMN WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK

[1176] DRVTITVDKS TSTAYMELSS LRSEDTAVVY CAREHYGTSP FAYWGQGLV TVSSGGCGGG

[1177] EVAACEKEVA ALEKEVALE KEVAALEKES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT

[1178] LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH

[1179] QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK

[1180] GFYPDSIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE

[1181] ALHNHYTQKS LSLSLG.

[1182] DART I의 제2 및 제4 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단, PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 ((VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 6 VH1) (SEQ ID NO:294); 시스테인-함유 개재 링커 펩타이드 (링커 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); 시스테인-함유 헤테로다이어-촉진 (K-코일) 도메인 (KVAACEK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:24)); 및 C-말단을 포함한다.

[1183] DART I의 제2 및 제4 폴리펩타이드 사슬은 (SEQ ID NO:291)이다:

- [1184] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL LIHAASNQGS
- [1185] GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KGGSGGGGQ
- [1186] VQLVQSGAEV KKPASVKVS CKASGYTFTD YNMDWVRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN
- [1187] QKFEGRVTMT TDTSTSTAYM ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWGQG TTLTVSSGGC
- [1188] GGGKVAACKE KVAALKEKVA ALKEKVAALK E.
- [1189] **C. CL/CH1 도메인을 가지는 예시의 4 사슬 Fc 영역-함유 디아바디**
- [1190] "DART D", "DART E", "DART J" 및 "DART 1"로 표시된, CL/CH1 도메인을 포함하는 4개의 예시적인 PD-1 X LAG-3 이중특이적, 4 사슬 Fc 영역-함유 디아바디가 생성되었다. 이 Fc 영역-함유 디아바디들의 구조는 하기에 상세하게 설명된다. 이 예시적인 PD-1 x LAG-3 디아바디들은 발명의 범주를, 어떤 방식으로든 제한하는 것이 아니라 예시하기 위해 의도된다.
- [1191] **1. DART D**
- [1192] DART D는 PD-1에 특이적인 두 개의 결합 부위, LAG-3에 특이적인 두 개의 결합 부위, CL/CH1 도메인 및 연장된 반감기를 위해 엔지니어링된 변종 IgG4 Fc 영역을 가지는, 이중특이적, 4 사슬, Fc 영역-함유 디아바디이다. DART D의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); 개재 링커 펩타이드 (링커 2: LGGSGG (SEQ ID NO:261)); IgG4 CH1 도메인 (SEQ ID NO:254); 안정화된 IgG4 힌지 영역 (SEQ ID NO:13); 치환 M252Y/S254T/T256E를 포함하고 C-말단 잔기가 없는 IgG4 CH2-CH3 도메인의 변종 (SEQ ID NO:259); 및 C-말단을 포함한다.
- [1193] DART D의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:269)이다:
- [1194] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL LIHAASNQGS
- [1195] GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KGGSGGGGQ
- [1196] VQLVQSGAEV KKPASVKVS CKASGYTFTN YGMNWRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA
- [1197] DDFEGRFVFS MDTASTAYL QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSL
- [1198] GGGSGASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
- [1199] VLQSSGLYSL SSVVTPSSS LGTKYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP CPPCPAPEFL
- [1200] GGPSVFLFPP KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSQEDPEVQF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ
- [1201] FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT ISKAKQPRE PQVYTLPPSQ
- [1202] EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGSGFF LYSRLTVDKS
- [1203] RWQEGNVFSC SVMHEALHNH YTKSLSLSL G.
- [1204] DART D의 제2 및 제4 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 ((VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); 개재 링커 펩타이드 (링커 2: LGGSGG (SEQ ID NO:261)); 카파 CL 도메인 (SEQ ID NO:8); 및 C-말단을 포함한다.
- [1205] DART D의 제2 및 제4 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:270)이다:
- [1206] DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSL L HSDAKTYLW LLQKPGQPPE RLIIYLVSELD
- [1207] SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDGVV YYCWQGT HFP YTFGGGTKVE IKGGSGGGG
- [1208] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL

[1209] DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSL
 [1210] GGGSGRTVAA PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQES
 [1211] VTEQDSKDST YLSSTLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNRG EC.

[1212] **2. DART E**

[1213] DART E는 PD-1에 특이적인 두 개의 결합 부위, LAG-3에 특이적인 두 개의 결합 부위, CL/CH1 도메인 및 연장된 반감기를 위해 엔지니어링된 변종 IgG4 Fc 영역을 가지는, 또 다른 이중특이적, 4 사슬, Fc 영역-함유 디아바디이다. DART E의 PD-1 및 LAG-3 결합 부위들의 위치는 DART D에 비교하여 반전되었다.

[1214] DART E의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); 개재 링커 펩타이드 (링커 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); IgG4 CH1 도메인 (SEQ ID NO:254); 안정화된 IgG4 힌지 영역 (SEQ ID NO:13); 치환 M252Y/S254T/T256E를 포함하고 C-말단 잔기가 없는 IgG4 CH2-CH3 도메인의 변종 (SEQ ID NO:259); 및 C-말단을 포함한다.

[1215] DART E의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:271)이다:

[1216] DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLW LLQKPGQPPE RLIYLVSELD
 [1217] SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDGVV YYCWQGTTHFP YTFGGGTKVE IKGGSGGGG
 [1218] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWRQA PGQGLEWIGV IHPDSETWL
 [1219] DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSL
 [1220] GGGSGASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
 [1221] VLQSSGLYSL SSVVTVPSST LGTKTYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP CPPCPAPEFL
 [1222] GGPSVFLFPP KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
 [1223] FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ
 [1224] EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGSEFF LYSRLTVDKS
 [1225] RWQEGNVFSC SVMHEALHNH YTKSLSLSL G.

[1226] DART E의 제2 및 제4 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 ((VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); 개재 링커 펩타이드 (링커 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); 카파 CL 도메인 (SEQ ID NO:8); 및 C-말단을 포함한다.

[1227] DART E의 제2 및 제4 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:272)이다:

[1228] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QKPGQPPKL LIHAASNQGS
 [1229] GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEFAVY FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KGGSGGGGQ
 [1230] VQLVQSGAEV KKPASVKVS CKASGYFTN YGMNWRQAP GQGLEWMGI NTYTGSTYA
 [1231] DDFEGRFVFS MDTASASTAYL QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSL
 [1232] GGGSGRTVAA PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQES
 [1233] VTEQDSKDST YLSSTLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNRG EC.

[1234] **3. DART J**

[1235] DART J는 PD-1에 특이적인 두 개의 결합 부위, LAG-3에 특이적인 두 개의 결합 부위, CL/CH1 도메인 및 연장된 반감기를 위해 엔지니어링된 변종 IgG4 Fc 영역을 가지는, 이중특이적, 4 사슬, Fc 영역-함유 디아바디이다.

DART J의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 6 VL1) (SEQ ID NO:296); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); 개재 링커 펩타이드 (링커 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); IgG4 CH1 도메인 (SEQ ID NO:254); 안정화된 IgG4 힌지 영역 (SEQ ID NO:13); 치환 M252Y/S254T/T256E를 포함하고 C-말단 잔기가 없는 IgG4 CH2-CH3 도메인의 변종 (SEQ ID NO:259); 및 C-말단을 포함한다.

[1236] DART J의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:292)이다:

[1237] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVP

[1238] RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV

[1239] QSGAEVKKPG ASVKVCKAS GYSFTSYWMN WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK

[1240] DRVTITVDKS TSTAYMELSS LRSEDATVYY CAREHYGTSP FAYWGQGLV TVSSLGGGSG

[1241] ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS

[1242] GLYSLSSVVT VPSSSLGTTK YTCNVDPKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV

[1243] FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY

[1244] RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK

[1245] NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD SGSFFLYSRL TVDKSRWQEG

[1246] NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLG.

[1247] DART J의 제2 및 제4 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 ((VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 6 VH1) (SEQ ID NO:294); 개재 링커 펩타이드 (링커 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); 카파 CL 도메인 (SEQ ID NO:8); 및 C-말단을 포함한다.

[1248] DART J의 제2 및 제4 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:293)이다:

[1249] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL LIHAASNQGS

[1250] GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KGGSGGGGQ

[1251] VQLVQSGAEV KPGASVKVS CKASGYTFTD YNMDWVRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN

[1252] QKFEGRVTMT TDTSTSTAYM ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWGQG TTLTVSSLGG

[1253] GSGRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNMFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT

[1254] EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA DYKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC.

[1255] 4. DART 1

[1256] DART 1은 PD-1에 특이적인 두 개의 결합 부위, LAG-3에 특이적인 두 개의 결합 부위, CL/CH1 도메인 및 감소된 Fc γ R 결합을 위해 엔지니어링된 변종 IgG1 Fc 영역을 가지는, 이중특이적, 4 사슬, Fc 영역-함유 디아바이다. DART 1의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{PD-1} PD-1 mAb A VL) (SEQ ID NO:65); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{LAG-3} LAG-3 mAb A VH1) (SEQ ID NO:39); 개재 링커 펩타이드 (링커 2: LGGGSG (SEQ ID NO:261)); IgG1 CH1 도메인 (SEQ ID NO:10); IgG1 힌지 영역 (SEQ ID NO:32); 치환 L234A/L235A를 포함하고 C-말단 잔기가 없는 IgG1 CH2-CH3 도메인의 변종 (SEQ ID NO:5); 및 C-말단을 포함한다.

[1257] DART 1의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:284)이다:

- [1258] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG SYLAWYQKQP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA
- [1259] RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ GTNLEIKGGG SGGGGQVQLV
- [1260] ESGGGVVQPG RSLRLDCKAS GITFSNSGMH WVRQAPGKGL EWVAVIWDG SKRYADSVK
- [1261] GRFTISRDS KNTLFLQMS LRAEDTAVYY CATNDDYWGQ GTLVTVSSLG GGSGASTKGP
- [1262] SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS
- [1263] SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF
- [1264] PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
- [1265] SVLTVLHQDW LNGKEYCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV
- [1266] SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSLKTVL KSRWQQGNVF
- [1267] SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG.
- [1268] DART 1의 제2 및 제4 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{LAG-3} LAG-3 mAb A VL) (SEQ ID NO:40); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGG (SEQ ID NO:14)); PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{PD-1} PD-1 mAb A VH) (SEQ ID NO:64); 개재 링커 펩타이드 (링커 2: LGGSG (SEQ ID NO:261)); 카파 CL 도메인 (SEQ ID NO:8); 및 C-말단을 포함한다.
- [1269] DART 1의 제2 및 제4 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:285)이다:
- [1270] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQKQP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA
- [1271] RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKGGG SGGGGQVQLQ
- [1272] QWGAGLLKPS ETLTLCAVY GGSFSDYYWN WIRQPPGKGL EWIGEINHNG NTNSNPSLKS
- [1273] RVTLSLDTSK NQFSLKLSV TAADTAVYYC AFGYSDYEYN WFDPWGQGTI VTVSSLGGGS
- [1274] GRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREKQV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ
- [1275] DSKDSTYSLT STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC.
- [1276] **D. 예시의 5 사슬 Fc 영역-함유 디아바디**
- [1277] "DART F" 및 "DART G"로 표시된, CL/CH1 도메인 및 E/K-코일 헤테로다이머-촉진 도메인을 포함하는 두 개의 예시적인 PD-1 X LAG-3 이중특이적, 5 사슬 Fc 영역-함유 디아바디가 생성되었다. 이 Fc 영역-함유 디아바디들의 구조는 하기에 상세하게 설명된다. 이 예시적인 PD-1 x LAG-3 디아바디들은 발명의 범주를, 어떤 방식으로든 제한하는 것이 아니라 예시하기 위해 의도된다.
- [1278] **1. DART F**
- [1279] DART F는 PD-1에 특이적인 두 개의 결합 부위, LAG-3에 특이적인 두 개의 결합 부위, CL/CH1 도메인, 감소된 Fc γ R 결합 및 연장된 반감기를 위해 엔지니어링된 변종 높/홀-함유 IgG1 Fc 영역 및 E/K-코일 헤테로다이머-촉진 도메인을 가지는, 이중특이적, 5 사슬, Fc 영역-함유 디아바디이다. DART F의 제1 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); IgG1 CH1 도메인 (SEQ ID NO:10); IgG1 힌지 영역 (SEQ ID NO:32); 치환 L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/N434A/H435K를 포함하고 C-말단 잔기가 없는 홀-함유 IgG1 CH2-CH3 도메인 (SEQ ID NO:260, 여기서 X_1 은 A이고, X_2 는 A이며; X_3 은 Y이고, X_4 는 T이며, X_5 은 E이고, X_6 은 S이며, X_7 은 A이고, X_8 은 V이며, X_9 는 A이고, X_{10} 은 K이며, X_{11} 은 없음); 및 C-말단을 포함한다.
- [1280] DART F의 제1 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:273)이다:
- [1281] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL
- [1282] DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSFPAYWG QGTLVTSSA

- [1283] STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTWSW NSGALTSGVH TFPVLQSSG
- [1284] LYSLSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP
- [1285] SVFLFPPKPK DTLYITREPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
- [1286] TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM
- [1287] TKNQVSLSCA VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPV L DSDGSFFLV KLTVDKSRWQ
- [1288] QGNVFSCSVM HEALHAKYTQ KSLSLSPG.
- [1289] DART F의 제2 및 제5 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); 카파 CL 도메인 (SEQ ID NO:8); 및 C-말단을 포함한다.
- [1290] DART F의 제2 및 제5 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:274)이다:
- [1291] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL LIHAASNQGS
- [1292] GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF
- [1293] IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREKQV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL
- [1294] STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC.
- [1295] DART F의 제3 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); IgG1 CH1 도메인 (SEQ ID NO:10); IgG1 힌지 영역 (SEQ ID NO:32); 치환 L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E를 포함하고 C-말단 잔기가 없는 녹-함유 IgG1 CH2-CH3 도메인 (SEQ ID NO:260, 여기서 X₁은 A이고, X₂는 A이며; X₃은 Y이고, X₄는 T이며, X₅는 E이고, X₆은 W이며, X₇은 L이고, X₈은 Y이며, X₉는 N이고, X₁₀은 H이며, X₁₁은 없음); 개재 링커 펩타이드 (GGGSGGGSGG (SEQ ID NO:262)); LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGG (SEQ ID NO:14)); PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); 시스테인-함유 개재 링커 펩타이드 (링커 2: GCGGG (SEQ ID NO:15)); 헤테로다이어-촉진 (E-코일) 도메인 (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:21)); 및 C-말단을 포함한다.
- [1296] DART F의 제3 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 사슬은 (SEQ ID NO:275)이다:
- [1297] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL
- [1298] DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSFPAYWG QGTLVTVSSA
- [1299] STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTWSW NSGALTSGVH TFPVLQSSG
- [1300] LYSLSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP
- [1301] SVFLFPPKPK DTLYITREPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
- [1302] TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM
- [1303] TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPV L DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
- [1304] QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGGG GSGGGSGGGD IVMTQTPLSL SVTPGQPASI
- [1305] SCKSSQSLH SDAKTYLNWL LQKPGQPPER LIYLVSELD S GVPDRFSGSG SGTDFTLKIS
- [1306] RVEAEDGVY YCQWGTTHPY TFGGGTKVEI KGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVKVS
- [1307] CKASGYSFTS YWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWLD QKFKDRVTIT VDKSTSTAYM
- [1308] ELSSLRSED AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSG CGGGEVAAL KEVAALKEV
- [1309] AALEKEVAAL EK.

- [1310] DART F의 제4 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGG (SEQ ID NO:14)); LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 ((VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); 시스테인-함유 개재 링커 펩타이드 (링커 2: GCGGG (SEQ ID NO:15)); 헤테로다이머-촉진 (K-코일) 도메인 (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:22)); 및 C-말단을 포함한다.
- [1311] DART F의 제4 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:276)이다:
- [1312] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL LIHAASNQGS
- [1313] GVPSRFRSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KGGSGGGGQ
- [1314] VQLVQSGAEV KKPASGVKVS CKASGYFTN YGMNWRQAP GQGLEWMGI NTYTGSTYA
- [1315] DDFEGRFVFS MDTASASTAYL QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSG
- [1316] GCGGGKVAAL KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE.
- [1317] **2. DART G**
- [1318] DART G는 PD-1에 특이적인 두 개의 결합 부위, LAG-3에 특이적인 두 개의 결합 부위, CL/CH1 도메인, 감소된 Fc γR 결합 및 연장된 반감기를 위해 엔지니어링된 변종 높/홀-함유 IgG1 Fc 영역 및 E/K-코일 헤테로다이머-촉진 도메인을 가지는, 이중특이적, 5 사슬, Fc 영역-함유 디아바다이다. DART G의 제1 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); IgG1 CH1 도메인 (SEQ ID NO:10); IgG1 힌지 영역 (SEQ ID NO:32); 치환 L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/N434A/H435K를 포함하고 C-말단 잔기가 없는 홀-함유 IgG1 CH2-CH3 도메인 (SEQ ID NO:260, 여기서 X₁은 A이고, X₂는 A이며; X₃은 Y이고, X₄는 T이며, X₅는 E이고, X₆은 S이며, X₇은 A이고, X₈은 V이며, X₉는 A이고, X₁₀은 K이며, X₁₁은 없음); 및 C-말단을 포함한다.
- [1319] DART G의 제1 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:277)이다:
- [1320] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWRQA PGQGLEWMGW INTYTGSTY
- [1321] ADDFEGRFVFS SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES LYDYYSMDYWG QGTTVTVSSG
- [1322] ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
- [1323] GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVK KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG
- [1324] PSVFLFPPKP KDTLYITREP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
- [1325] STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
- [1326] MTKNQVSLSC AVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGSFFLV SKLTVDKSRW
- [1327] QQGNVFSCSV MHEALHAKYT QKSLSLSPG.
- [1328] DART G의 제2 및 제5 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54); 카파 CL 도메인 (SEQ ID NO:8) 및 C-말단을 포함한다.
- [1329] DART G의 제2 및 제5 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:278)이다:
- [1330] DIVMTQTPLS LSVTPGPAS ISCKSSQSL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE RLIYLVSELD
- [1331] SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDGVV YYCWQGTTHP YTFGGGTKVE IKRTVAAPSV
- [1332] FIFPPSDEQL KSGTASVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSSTYS
- [1333] SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGEC.
- [1334] DART G의 제3 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); IgG1 CH1 도메인 (SEQ ID NO:10); IgG1 힌지 영역

(SEQ ID NO:32); 치환 L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E를 포함하고 C-말단 잔기가 없는 낚-함유 IgG1 CH2-CH3 도메인 (SEQ ID NO:260, 여기서 X_1 은 A이고, X_2 는 A이며; X_3 은 Y이고, X_4 는 T이며, X_5 는 E이고, X_6 은 W이며, X_7 은 L이고, X_8 은 Y이며, X_9 는 N이고, X_{10} 은 H이며, X_{11} 은 없음); 개재 링커 펩타이드 (GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:262)); PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGG (SEQ ID NO:14)); PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); 시스테인-함유 개재 링커 펩타이드 (링커 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); 헤테로다이어머-축진 (E-코일) 도메인 (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:21)); 및 C-말단을 포함한다.

[1335] DART G의 제3 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 사슬은 (SEQ ID NO:279)이다:

[1336] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWRQA PGQGLEWMGW INTYTGESTY
[1337] ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISLKAED TAVYYCARES LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS
[1338] ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
[1339] GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG
[1340] PSVFLFPPKP KDTLYITREP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
[1341] STYRVSVLT VLHQDLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGPPEPQ VYTLPPSREE
[1342] MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSGSGFFLY SKLTVDKSRW
[1343] QQGNVFSQSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGG GSGGGSGGG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT
[1344] LSCRASEVD NYGMSFMNWF QKPGQPPKL LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFLTIS
[1345] SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KGGSGGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASGVKVS
[1346] CKASGYSFTS YWMNWRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVIT VDKSTSTAYM
[1347] ELSSLRSEDV AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGEVAAL KEVAALKEV
[1348] AALEKEVAAL EK.

[1349] DART G의 제4 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGG (SEQ ID NO:14)); PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); 시스테인-함유 개재 링커 펩타이드 (링커 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); 헤테로다이어머-축진 (K-코일) 도메인 (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:22)); 및 C-말단을 포함한다.

[1350] DART G의 제4 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:280)이다:

[1351] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASEVD NYGMSFMNWF QKPGQPPKL LIHAASNQGS
[1352] GVPSRFSGSG SGTDFLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KGGSGGGGGQ
[1353] VQLVQSGAEV KKPASGVKVS CKASGYSFTS YWMNWRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD
[1354] QKFKDRVIT VDKSTSTAYM ELSSLRSEDV AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG
[1355] CGGGKVAALK EKVAALKEV AALKEKVAAL KE.

[1356] E, E/K-코일을 가지는 예시의 3 사슬 Fc 영역-함유 디아바디

[1357] 본 발명은 추가적으로 E/K-코일 헤테로다이어머-축진 도메인을 포함하는, PD-1 X LAG-3 이중특이적, 3 사슬 Fc 영역-함유 디아바디를 제공한다. "DART H"로 표시된, E/K-코일 헤테로다이어머-축진 도메인을 포함하는, 예시의 PD-1 X LAG-3 이중특이적, 3 사슬 Fc 영역-함유 디아바디가 생성되었다. 이 Fc 영역-함유 디아바디들의 구조는 하기에 상세하게 설명된다. 이 예시적인 PD-1 x LAG-3 디아바디들은 발명의 범주를, 어떤 방식으로든 제한하는 것이 아니라 예시하기 위해 의도된다.

[1358] DART H는 PD-1에 특이적인 하나의 결합 부위, LAG-3에 특이적인 하나의 결합 부위, 감소된 Fc γ R 결합을 위해

엔지니어링된 변종 μ / δ -함유 IgG1 Fc 영역 및 E/K-코일 헤테로다이머-촉진 도메인을 포함하는 Fc 영역-함유 디아바디이다.

- [1359] DART H의 제1 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); 시스테인-함유 개재 링커 펩타이드 (링커 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); 헤테로다이머-촉진 (E-코일) 도메인 (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:21)); 개재 링커 (스페이스-링커 3: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:263)); 치환 L234A/L235A를 포함하고 C-말단 리신 잔기가 없는 μ -함유 IgG1 CH2-CH3 도메인 (SEQ ID NO:6); 및 C-말단을 포함한다.
- [1360] DART H의 제1 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:281)이다:
- [1361] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL LIHAASNQGS
- [1362] GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KGGSGGGGGQ
- [1363] VQLVQSGAEV KKPASGVKVS CKASGYFTN YGMNWRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA
- [1364] DDFEGRFVFS MDTASTAYL QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSG
- [1365] GCGGGEVAAL EKEVAALEKE VAALKEKVAAL LEKGGGDKTH TCPCPAPEA AGGPSVFLFP
- [1366] PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
- [1367] VLTVLHQDWL NGKEYCKKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS
- [1368] LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
- [1369] CSVMHEALHN HYTKSLSLSG PGK.
- [1370] DART H의 제2 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (SEQ ID NO:54); 개재 링커 펩타이드 (링커 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:14)); PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); 시스테인-함유 개재 링커 펩타이드 (링커 2: GGCGGG (SEQ ID NO:15)); 헤테로다이머-촉진 (K-코일) 도메인 (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:22)); 및 C-말단을 포함한다.
- [1371] DART H의 제2 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:282)이다:
- [1372] DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLH HSDAKTYLNV LLQKPGQPPE RLIYLVSELD
- [1373] SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDGVV YYCWQGHFPP YTFGGGKVEI KGGSGGGGGQ
- [1374] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWRQA PGQGLEWIGV IHPDSSETWL
- [1375] DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSFPAYWG QGTLVTVSSG
- [1376] GCGGKVAAL KEKVAALKEK VAALKEKVAAL LKE.
- [1377] DART G의 제3 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; 힌지 영역 (DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:31); 치환 L234A/L235A를 포함하고 C-말단 리신 잔기가 없는 δ -함유 IgG1 CH2-CH3 도메인 (SEQ ID NO:7); 및 C-말단을 포함한다.
- [1378] DART G의 제3 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:283)이다:
- [1379] DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
- [1380] GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
- [1381] GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPDSIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
- [1382] DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCVMHE ALHNRVTQKS LSLSPGK.
- [1383] F. 예시의 이중특이적 항체

- [1384] "BSAB A"로 표시된 예시의 PD-1 X LAG-3 4 사슬 이중특이적 항체가 생성되었다. 이 이중특이적 항체의 구조는 하기에 상세하게 설명된다. 이 예시의 PD-1 x LAG-3 이중특이적 항체는 발명의 범주를, 어떤 방식으로든 제한하는 것이 아니라 예시하기 위해 의도된다.
- [1385] BSAB A는 PD-1에 특이적인 하나의 결합 부위, LAG-3에 특이적인 하나의 결합 부위, Fc γ R 결합을 감소시키고 두 개의 상이한 중쇄 폴리펩타이드 사이의 복합체 형성을 촉진하기 위해 엔지니어링된 변종 IgG1 Fc 영역을 가지는 이중특이적 항체이다 (예컨대 WO 2011/143545 참조).
- [1386] BSAB A의 제1 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO:147); IgG1 CH1 도메인 (SEQ ID NO:10); 치환 D221E/P228E (Kabat에서와 같이 EU 색인에 의해 넘버링되고 하기 SEQ ID NO:286에 밑줄로 표시됨)를 포함하는 변종 IgG1 힌지 영역; 치환 L234A/L235A/L368E (하기 SEQ ID NO:286에 밑줄로 표시됨)를 포함하고 C-말단 잔기가 없는 변종 IgG1 CH2-CH3 도메인; 및 C-말단을 포함한다.
- [1387] BSAB A의 제1 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:286)이다:
- [1388] QQVLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYST SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPDSETWL
- [1389] DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA
- [1390] STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTWSW NSGALTSGVH TFPVLQSSG
- [1391] LYSLSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKRVKPE SCEKTHTCPE ECPAPEAAGGP
- [1392] SVFLFPPKPK DTLMISRTP ETCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
- [1393] TYRVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM
- [1394] TKNQVSLTCE VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPV L DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
- [1395] QGNVFSCSV M HEALHNHYTQ KSLSLSPG.
- [1396] BSAB A의 제2 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; PD-1에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (SEQ ID NO:153); 카파 CL 도메인 (SEQ ID NO:8) 및 C-말단을 포함한다.
- [1397] BSAB A의 제2 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:287)이다:
- [1398] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL LIHAASNQGS
- [1399] GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF
- [1400] IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
- [1401] STLTLKADY EKHVKYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC.
- [1402] BSAB A의 제3 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 ((VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (SEQ ID NO:49); IgG1 CH1 도메인 (SEQ ID NO:10); 치환 D221R/P228R (하기 SEQ ID NO:288에 밑줄로 표시됨)을 포함하는 변종 IgG1 힌지 영역; 치환 L234A/L235A/L409R (하기 SEQ ID NO:288에 밑줄로 표시됨)을 포함하고 C-말단 잔기가 없는 변종 IgG1 CH2-CH3 도메인; 및 C-말단을 포함한다.
- [1403] BSAB A의 제3 폴리펩타이드 사슬의 아미노산은 (SEQ ID NO:288)이다:
- [1404] QQVLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW INTYTGESTY
- [1405] ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS
- [1406] ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPVLQSS
- [1407] GLYLSVVTV VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVKPE KSCRKTHTCP RCPAPEAAG
- [1408] PSVFLFPPKP KDTLMISRTP ETCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN

- [1409] STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
- [1410] MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSGGSFFLY SRLTVDKSRW
- [1411] QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG.
- [1412] BSAB A의 제4 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단; LAG-3에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO:54**); 카파 CL 도메인 (**SEQ ID NO:8**) 및 C-말단을 포함한다.
- [1413] BSAB A의 제4 폴리펩타이드 사슬의 아미노산은 (**SEQ ID NO:289**)이다:
- [1414] DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE RLIYLVSELD
- [1415] SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDGVV YYCWQGFTHP YTFGGGTKVE IKRTVAAPSV
- [1416] FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTSL
- [1417] SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC.
- [1418] **IX. 참조 항체**
- [1419] **A. 참조 항-인간 PD-1 항체**
- [1420] 본 발명의 신규한 항-인간 PD-1-결합 분자를 평가하고 특성화하기 위하여, 다음의 참조 항체들이 사용되었다: 니볼루맵 (5C4, BMS-936558, ONO-4538, MDX-1106으로도 알려져 있고, Bristol-Myers Squibb에 의해 OPDIVO®로 시판됨), 본원에서 "PD-1 mAb A"로 표시된 인간 IgG4 항체; 및 펌브롤리주맵 (이전에 램브롤리주맵으로 알려지고, 또한 MK-3475, SCH-900475로서 알려지며, Merck에 의해 KEYTRUDA®로 시판됨).
- [1421] **1. 니볼루맵 ("PD-1 mAb A")**
- [1422] PD-1 mAb A의 중쇄 가변 도메인의 아미노산 사열은 아미노산 서열 (**SEQ ID NO:64**)을 가진다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [1423] QVQLVESGGG VVQPGRLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV
- [1424] IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND
- [1425] DYWGQGTLVT VSS
- [1426] PD-1 mAb A의 경쇄 가변 도메인의 아미노산 사열은 아미노산 서열 (**SEQ ID NO:65**)을 가진다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [1427] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQKPQ GQAPRLLIYD
- [1428] ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNPRTFGQ
- [1429] GTKVEIK
- [1430] **2. 펌브롤리주맵 ("PD-1 mAb B")**
- [1431] PD-1 mAb B의 중쇄 가변 도메인의 아미노산 사열은 아미노산 서열 (**SEQ ID NO:66**)을 가진다 (CDR_H 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [1432] QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG
- [1433] INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSITTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARD
- [1434] YRFDMGFDIW GQGTTVTSS
- [1435] PD-1 mAb B의 경쇄 가변 도메인의 아미노산 사열은 아미노산 서열 (**SEQ ID NO:67**)을 가진다 (CDR_L 잔기는 밑줄로 표시됨):
- [1436] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL

- [1437] LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL
- [1438] TFGGGTKVEIK
- [1439] **X. 제조 방법**
- [1440] 항-PD-1 폴리펩타이드, 및 다른 PD-1 작용물질 (agonist), 길항제 및 조절제는 업계에 공지된 방법에 의해, 예를 들어, 합성으로 또는 재조합에 의해 항-PD-1 항체 PD-1 mAb 1 내지 15의 폴리뉴클레오타이드 및/또는 서열로부터 생성될 수 있다. 이러한 펩타이드 작용물질, 길항제 및 조절제를 생산하는 한 방법은 폴리펩타이드의 화학적 합성과, 이어서 올바른 이황화 결합인 고유한 형태를 얻기에 적절한 산화 조건 하에서의 처리를 포함한다. 이것은 당업자에게 잘 알려져 있는 방법론을 사용하여 이루어질 수 있다 (예컨대, Kelley, R. F. *et al.* (1990) In: Genetic Engineering Principles and Methods, Setlow, J.K. Ed., Plenum Press, N.Y., vol. 12, pp 1-19; Stewart, J.M *et al.* (1984) Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; 또한 미국 특허 번호 4,105,603; 3,972,859; 3,842,067; 및 3,862,925 참조).
- [1441] 발명의 폴리펩타이드는 고체상 펩타이드 합성을 사용하여 편리하게 제조될 수 있다 (Merrifield, B. (1986) "Solid Phase Synthesis," Science 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) "General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) "Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century," Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10).
- [1442] 또 다른 대안으로, 인간 PD-1 또는 그것의 가용성 형태에 대한 결합을 위해, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15의 하나 이상의 CDR을 가지거나, 또는 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15와 경쟁하는 전체 인간 항체들이 특이적 인간 면역글로불린 단백질을 발현하기 위해 엔지니어링되어 있는 상업적으로 입수 가능한 마우스의 사용을 통해 얻어질 수 있다. 더 바람직한 (예컨대, 전체 인간 항체) 또는 더 왕성한 면역 반응을 생성하기 위해 디자인된 형질전환 동물들 또한 인간화된 또는 인간 항체의 생성을 위해 사용될 수 있다. 이러한 기술의 예는 XenomouseTM (Abgenix, Inc., Fremont, CA) 및 HuMAb-Mouse[®] 및 TC MouseTM (both from Medarex, Inc., Princeton, NJ)이다.
- [1443] 대안으로, 항체는 재조합으로 제조되고 업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 발현될 수 있다. 항체는 먼저 숙주 동물로부터 제조된 항체를 분리하고, 유전자 서열을 얻고, 유전자 서열을 사용하여 숙주 세포 (예컨대, CHO 세포)에서 재조합으로 항체를 발현시킴으로써 재조합으로 제조될 수 있다. 사용될 수 있는 다른 방법은 식물 (예컨대, 담배(tobacco)) 또는 형질전환 유충에서 항체 서열을 발현시키는 것이다. 식물 또는 유충에서 재조합으로 항체를 발현시키기에 적합한 방법이 개시되었다 (예를 들어, Peeters *et al.* (2001) "Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants," Vaccine 19:2756; Lonberg, N. *et al.* (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice," Int. Rev. Immunol 13:65-93; and Pollock *et al.* (1999) "Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies," J. Immunol Methods 231:147-157). 항체의 유도체, 예를 들어, 인간화된, 단일 사슬, 등을 제조하는데 적합한 방법을 업계에 공지되어 있다. 다른 대안으로, 항체는 파지 디스플레이 기술에 의해 재조합으로 제조될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; 6,265,150; 및 Winter, G. *et al.* (1994) "Making Antibodies By Phage Display Technology," Annu. Rev. Immunol. 12:433-455 참조).
- [1444] 관심있는 항체 또는 단백질은 당업자에게 잘 알려져 있는 에드먼 분해(Edman degradation)에 의해 서열분석이 수행될 수 있다. 질량 분석법 또는 에드먼 분해로부터 생성된 펩타이드 정보는 관심있는 단백질을 클로닝하는데 사용되는 프로브 또는 프라이머를 디자인하는데 사용될 수 있다.
- [1445] 관심있는 단백질을 클로닝하는 대안의 방법은 인간 PD-1에 대한 결합을 위하여, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15의 하나 이상의 CDR을 가지는 관심있는 항체 또는 단백질, 또는 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15와 경쟁하는 항체를 발현하는 세포에 대해 정제된 PD-1 또는 그 일부를 사용하여 "패닝(panning)"하는 것이

다. "패닝" 과정은 PD-1을 발현하는 조직 또는 세포로부터 cDNA 라이브러리를 얻고, 제2 세포 유형에서 cDNA를 과발현시키고, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15의 존재 또는 부재하에 PD-1에 대한 특이적 결합에 대하여 제2 세포 유형의 트랜스펙션된 세포를 스크리닝함으로써 실행될 수 있다. "패닝"에 의해 세포 표면 단백질을 암호화하는 포유류 유전자를 클로닝하는데 사용된 방법의 상세한 설명은 업계에서 찾아볼 수 있다 (예를 들어, Aruffo, A. et al. (1987) "*Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84:8573-8577 및 Stephan, J. et al. (1999) "*Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation*," Endocrinol. 140:5841-5854 참조).

[1446] 관심있는 폴리뉴클레오타이드를 함유한 벡터는 전기천공법, 칼슘 클로라이드, 루비듐 클로라이드, 칼슘 포스페이트, DEAE-텍스트란, 또는 다른 물질을 이용한 트랜스펙션; 미세사출법(microprojectile bombardment); 리포펙션; 및 감염 (예컨대, 벡터가 우두 바이러스(vaccinia virus)와 같은 감염원인 경우)을 포함한 많은 적절한 수단 중 임의의 것에 의해 숙주 세포로 도입될 수 있다. 도입 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드의 선택은 종종 숙주 세포의 특징에 따라 달라질 것이다.

[1447] 이중성 DNA를 과발현시킬 수 있는 임의의 숙주 세포는 관심있는 항체, 폴리펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 유전자를 분리할 목적으로 사용될 수 있다. 적합한 포유류 숙주 세포의 비-제한적 예는 COS, HeLa 및 CHO 세포를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 숙주 세포는, 숙주 세포에서, 존재하는 경우, 관심있는 상응하는 내인성 항체 또는 단백질보다 약 5배 더 높은 수준, 더 바람직하게는 10배 더 높은 수준, 더 바람직하게는 20배 더 높은 수준으로 cDNA를 발현한다. PD-1에 대한 특이적 결합에 대하여 숙주 세포를 스크리닝하는 것은 면역분석 또는 FACS에 의해 영향을 받는다. 관심있는 항체 또는 단백질을 과발현하는 세포가 식별될 수 있다.

[1448] 발명은 본 발명의 항체의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 본 발명의 폴리펩타이드는 업계에 공지된 과정에 의해 제조될 수 있다. 폴리펩타이드는 항체의 단백질 가수분해 또는 다른 분해에 의해, 상기 기술된 제조 방법 (즉, 단일 또는 융합 폴리펩타이드)에 의해 또는 화학적 합성에 의해 생산될 수 있다. 항체의 폴리펩타이드, 특히 약 50개 아미노산까지의 더 짧은 폴리펩타이드는 화학적 합성에 의해 편리하게 제조될 수 있다. 화학적 합성 방법은 업계에 공지되어 있으며 상업적으로 이용 가능하다. 예를 들어, 항-PD-1 폴리펩타이드는 고체상 방법을 이용하는 자동화 폴리펩타이드 합성기에 의해 제조될 수 있다.

[1449] 발명은 PD-1에 결합하는 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15 항체의 변종 및, 기능적으로 동등한 항체 및 이러한 분자의 특성에 유의미하게 영향을 미치지 않는 융합 폴리펩타이드, 뿐만 아니라 활성이 향상되거나 감소된 변종을 포함하는, 그것들의 폴리펩타이드 단편을 포함한다. 폴리펩타이드의 변형은 업계에서는 일상적인 관행이므로 본원에서 상세히 기술될 필요는 없다. 변형된 폴리펩타이드의 예는 아미노산 잔기의 보존적 치환, 기능적 활성을 유의미하게 유해하게 변화시키지 않는 아미노산의 하나 이상의 결실 또는 추가, 또는 화학적 유사체가 사용된 폴리펩타이드를 포함한다. 서로 보존적으로 치환될 수 있는 아미노산 잔기는 글리신/알라닌; 세린/트레오닌; 발린/아이소류신/류신; 아스파라긴/글루타민; 아스파르트산/글루탐산; 리신/아르기닌; 및 페닐알라닌/티로신을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 이 폴리펩타이드들은 또한 글리코실화된 및 글리코실화되지 않은 폴리펩타이드, 뿐만 아니라, 예를 들어, 상이한 당으로의 글리코실화, 아세틸화 및 인산화와 같이 다른 번역-후 변형을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 바람직하게는, 아미노산 치환은 보존적일 것이며, 즉, 치환된 아미노산은 원래의 아미노산과 유사한 화학적 특성을 가지고 있을 것이다. 이러한 보존적 치환은 업계에 공지되어 있으며, 그 예들은 상기 제공되어 있다. 아미노산 변형은 하나 이상의 아미노산의 변화 또는 변형에서부터 가변 도메인과 같은, 영역의 완전한 재디자인까지의 범위에 있을 수 있다. 가변 도메인의 변화는 결합 친화성 및/또는 특이성을 변화시킬 수 있다. 다른 변형 방법은 업계에 공지된 커플링(coupling) 기법의 사용을 포함하며, 효소적 수단, 산화적 치환 및 킬레이트화를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 변형은, 예를 들어, 면역분석을 위한 라벨의 부착, 예컨대 방사성 면역분석을 위한 방사성 모이어티의 부착에 사용될 수 있다. 변형된 폴리펩타이드는 업계에서 확립된 과정을 사용하여 제조되며 업계에 공지된 표준 분석을 사용하여 스크리닝될 수 있다.

[1450] 발명은 본 발명의 폴리펩타이드 또는 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14

또는 PD-1 mAb 15 항체 중 하나 이상을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 한 구체예에서, 경쇄, 중쇄 또는 경쇄 및 중쇄 둘 다를 포함하는 융합 폴리펩타이드가 제공된다. 다른 구체예에서, 융합 폴리펩타이드는 이중성 면역글로불린 불변 영역을 함유한다. 또 다른 구체예에서, 융합 폴리펩타이드는 공개적으로 기탁된 하이브리도마로부터 제조된 항체의 경쇄 가변 도메인 및 중쇄 가변 도메인을 함유한다. 본 발명의 목적을 위해서, 항체 융합 단백질은 PD-1에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 폴리펩타이드 도메인 및 고유한 분자에서 부착되지 않은 또 다른 아미노산 서열, 예를 들어, 이중성 서열 또는 다른 영역으로부터의 상동성 서열을 함유한다.

[1451] XI. 본 발명의 PD-1-결합 분자의 사용

[1452] 본 발명은 본 발명의 PD-1-결합 분자 (예컨대, 항-PD-1 항체, 항-PD-1 이중특이적 디아바디, 등), 이러한 분자로부터 유도된 폴리펩타이드, 이러한 분자 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 및 본원에서 기술된 다른 제제들을 포함하는, 약학적 조성물을 포함한 조성물을 포함한다.

A. 치료적 사용

[1454] 상기 논의된 바와 같이, PD-1은 T-세포 증식, 기능 및 항상성을 음성적으로 조절하는데 중요한 역할을 한다. 본 발명의 특정 PD-1-결합 분자는 PD-1 기능을 억제하는 능력을 가지며, 따라서 PD-1-매개 면역계 억제를 반전시킨다. 이와 같이, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, 및 PD-1 mAb 15, 그것들의 인간화된 유도체 및 그것들의 PD-1-결합 단편을 포함하는 분자 (예컨대, 이중특이적 항체, 이중특이적 디아바디 (한정하는 것은 아니지만, DART-A, DART-B, DART-C, DART-D, DART-E, DART-F, DART-G, DART-H, DART-I 및 DART-J를 포함함) 등) 또는 이러한 항체와의 결합에 대해 경쟁하는 분자는 PD-1-매개 면역계 억제를 차단하여, 면역계의 활성화를 촉진하는데 사용될 수 있다.

[1455] PD-1 및 세포 표면 상에 존재하는 면역 체크포인트의 조절에 관여된 또 다른 분자 (예컨대, LAG-3)에 결합하는 본 발명의 이러한 이중특이적 PD-1-결합 분자는 PD-1 및 이러한 면역 체크포인트 분자에 의해 매개된 면역계 억제를 차단함으로써 면역계를 증대시킨다. 그러므로, 발명의 PD-1-결합 분자는 대상체의 면역 반응 (예컨대, T-세포 매개 면역 반응)을 증대시키는데 유용하다. 특히, 발명의 이러한 PD-1-결합 분자는 암 및 병원체 (예컨대, 박테리아, 균류, 바이러스 또는 원생동물 감염)의 존재와 관련된 질환을 포함하는, 바람직하지 않게 억제된 면역계와 관련된 임의의 질환 또는 상태를 치료하는데 사용될 수 있다.

[1456] 본 발명의 이러한 PD-1-결합 분자에 의해 치료될 수 있는 암은 다음의 세포로 구성된 군으로부터 선택된 암 세포의 존재를 특징으로 하는 암을 포함한다: 부신 종양, AIDS-관련 암, 포상 연부 육종, 성상세포 종양, 방광암, 골암, 뇌척수암, 전이성 뇌 종양, 유방암, 경동맥체 종양, 자궁경부암, 연골 육종, 척색종, 난임성 신장 세포암종, 투명 세포 암종, 결장암, 대장암, 피부 양성 섬유성 조직구종, 결체조직 작은 원형 세포 종양, 상의세포종, 유잉 종양, 골외 점액성 연골 육종, 골성 불완전 섬유원종, 섬유성 골 이형성증, 담낭암 또는 담관암, 위암, 임신성 용모성 질환, 생식세포종, 두경부암, 간세포 암종, 도세포 종양, 카포시 육종, 신장암, 백혈병, 지방종/양성 지방종성 종양, 지방육종/악성 지방종성 종양, 간암, 림프종, 폐암, 수모세포종, 흑색종, 뇌수막종, 다발성 내분비종양증, 다발성 골수종, 골수 이형성 증후군, 신경아세포종, 신경 내분비 종양, 난소암, 췌장암, 유두 갑상선 암종, 부갑상선 종양, 소아 암, 말초 신경집 종양, 크롬 친화성 세포종, 뇌하수체 종양, 전립선암, 후부 포도막 흑색종, 희귀성 혈액 질환, 전이성 신장암, 간상소체 종양, 횡문근육종, 육종, 피부암, 연부 조직 육종, 편평세포암, 위암, 활막육종, 고환암, 흉선암, 흉선종, 전이성 갑상선암, 및 자궁암.

[1457] 특히, 본 발명의 이러한 PD-1-결합 분자는 대장암, 간세포 암종, 신경교종, 신장암, 유방암, 다발성 골수종, 방광암, 신경아세포종; 육종, 비-호지킨 림프종, 비-소세포 폐암, 난소암, 췌장암 및 직장암의 치료에 사용될 수 있다.

[1458] 본 발명의 이러한 PD-1-결합 분자에 의해 치료될 수 있는 병원체-관련 질환은 만성 바이러스, 박테리아, 균류 및 기생충 감염을 포함한다. 본 발명의 PD-1-결합 분자에 의해 치료될 수 있는 만성 감염은 엡스타인 바 바이러스, A형 간염 바이러스 (HAV); B형 간염 바이러스 (HBV); C형 간염 바이러스 (HCV); 헤르페스 바이러스 (예컨대 HSV-1, HSV-2, HHV-6, CMV), 인간 면역 결핍 바이러스 (HIV), 수포성 구내염 바이러스 (VSV), 바실루스 (*Bacilli*), 시트로박터(*Citrobacter*), 콜레라(*Cholera*), 디프테리아(*Diphtheria*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 임균(*Gonococci*), 헬리코박터 필로리(*Helicobacter pylori*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 레지오넬라(*Legionella*), 수막염균(*Meningococci*), 미코박테리아(*mycobacteria*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 뉴모노코쿠스(*Pneumococci*), 리케차 박테리아(*rickettsia bacteria*), 살모넬라(*Salmonella*), 세라티아(*Serratia*), 포도상

구균(*Staphylococci*), 연쇄상구균(*Streptococci*), 파상풍(*Tetanus*), 아스페르질루스(*Aspergillus*) (푸미가투스(*fumigatus*), 니게르(*niger*), 등), 블라스토미세스 더마티티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 칸디다(*Candida*) (알비칸스(*albicans*), 크루세이(*krusei*), 글라브라타(*glabrata*), 트로피칼리스(*tropicalis*), 등), 크립토코쿠스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 털곰팡이속(*Genus Mucorales*)(무코르(*mucor*), 아브시디아(*absidia*), 리조푸스(*rhizopus*)), 스포로트릭스 쉐нки이(*Sporothrix schenckii*), 파라코시디오이데스 브라질리엔시스(*Paracoccidioides brasiliensis*), 콕시디오이데스 이미티스(*Coccidioides immitis*), 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 랩토스피라증(*Leptospirosis*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 장내 기생충(helminth parasite) (십이지장충(hookworm), 조충류(tapeworms), 디스토마류(flukes), 편형동물류(flatworms) (예컨대, 주혈흡충병(*Schistosomia*)), 기아르디아 람비아(*Giardia lamblia*), 트리키넬라(*trichinella*), 이핵아메바(*Dientamoeba Fragilis*), 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*), 및 리슈마니아 도노바니(*Leishmania donovani*)를 포함한다.

[1459]

발명의 이러한 PD-1-결합 분자는 다른 항암제, 특히, 암 항원에 특이적으로 결합하는 분자들 (예컨대, antibodies, 디아바디)과 조합될 수 있다. 발명의 PD-1-결합 분자와 조합될 수 있는 항암 치료법은 다음을 포함하는 하나 이상의 암 항원에 특이적으로 결합하는 분자들을 포함한다: 결장암, 위암 뮤신에서 발견되는 **19.9; 4.2; A33** (대장 암종 항원; Almqvist, Y. 2006, *NuclMed Biol.* Nov;33(8):991-998); **ADAM-9** (미국 특허 공개 번호 2006/0172350; PCT 공개 번호 WO 06/084075); 위암에서 발견되는 **AH6; ALCAM** (PCT 공개 번호 WO 03/093443); **AP0-1** (악성 인간 림프구 항원) (Trauth *et al.* (1989) "Monoclonal Antibody-Mediated TumorRegression By Induction Of Apoptosis," *Science* 245:301-304); **B1** (Egloff, A.M. *et al.* 2006, *Cancer Res.* 66(1):6-9); **B7-H3** (Collins, M. *et al.* (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands," *Genome Biol.* 6:223.1-223.7). Chapoval, A. *et al.* (2001) "B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- γ Production," *Nature Immunol.* 2:269-274; Sun, M. *et al.* (2002) "Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes," *J. Immunol.* 168:6294-6297); **BAGE** (Bodey, B. 2002 *Expert Opin Biol Ther.* 2(6):577-84); **베타-카테닌** (Prange W. *et al.* 2003 *J Pathol.* 201(2):250-9); 결장 선암종에서 발견되는 **혈액군 Ale^b/Le^y**; 결장 선암종에서 발견되는 **버킷 림프종 항원-38.13, C14; CA125 (난소 암종 항원)**(Bast, R.C. Jr. *et al.* 2005 *Int J Gynecol Cancer* 15 Suppl3:274-81 ; Yuet *et al.* (1991) "Coexpression Of Different Antigenic Markers On Moieties That Bear CA 125 Determinants," *Cancer Res.* 51(2):468-475); **카르복시펩티다제 M** (미국 특허 공개 번호 2006/0166291); **CD5** (Calin, G.A. *et al.* 2006 *Semin Oncol.* 33(2):167-73; **CD19** (Ghetie *et al.* (1994) "Anti-CD19 Inhibits The Growth Of HumanB-Cell TumorLines In Vitro And Of Daudi Cells In SCID Mice By Inducing Cell Cycle Arrest," *Blood* 83:1329-1336; Troussard, X. *et al.* 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48); **CD20** (Reff *et al.* (1994) "Depletion Of B Cells In Vivo By A Chimeric Mouse HumanMonoclonal Antibody To CD20," *Blood* 83:435-445; Thomas, D.A. *et al.* 2006 *Hematol Oncol Clin North Am.* 20(5):1125-36); **CD22** (Kreitman, R.J. 2006 *AAPS J.* 18;8(3):E532-51); **CD23** (Rosati, S. *et al.* 2005 *CurrTop Microbiol Immunol.* 5;294:91-107); **CD25** (Troussard, X. *et al.* 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48); **CD27** (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40); **CD28** (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40); **CD33** (Sgouros *et al.* (1993) "Modeling And Dosimetry Of Monoclonal Antibody M195 (Anti-CD33) In Acute Myelogenous Leukemia," *J. Nucl.Med.* 34:422-430); **CD36** (Ge, Y. 2005 *Lab Hematol.* 11(1):31-7); **CD40/CD154** (Messmer, D. *et al.* 2005 *Ann N Y Acad Sci.* 1062:51-60); **CD45** (Jurcic, J.G. 2005 *CurrOncol Rep.* 7(5):339-46); **CD56** (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40); **CD46** (미국 특허 공개 번호 7,148,038; PCT 공개 번호 WO 03/032814); **CD52** (Eketorp, S.S. *et al.* (2014) "Alemtuzumab (Anti-CD52 Monoclonal Antibody) As Single-Agent Therapy In Patients With Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL)-A Single Region Experience On Consecutive Patients," *Ann Hematol.* 93(10):1725-1733; Suresh, T. *et al.* (2014) "New Antibody Approaches To Lymphoma Therapy," *J. Hematol. Oncol.* 7:58; Hoelzer, D. (2013) "Targeted Therapy With Monoclonal Antibodies In Acute Lymphoblastic Leukemia," *Curr.Opin. Oncol.* 25(6):701-706); **CD56** (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40); **CD79a/CD79b** (Troussard, X. *et al.* 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48; Chu, P.G. *et al.* 2001 *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 9(2):97-106); **CD103** (Troussard, X. *et al.* 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48); **CD317** (Kawai, S. *et al.* (2008) "Interferon- γ Enhances CD317 Expression And The Antitumor Activity Of Anti-CD317 Monoclonal Antibody In Renal Cell Carcinoma Xenograft Models," *Cancer Science* 99(12):2461-2466; Wang, W. *et al.* (2009) *HM1.24 (CD317) Is A Novel Target Against Lung Cancer For Immunotherapy Using Anti-HM1.24 Antibody*," *Cancer Immunology, Immunotherapy* 58(6):967-976; Wang,

W. et al. (2009) "Chimeric And Humanized Anti-HM1.24 Antibodies Mediate Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Against Lung Cancer Cells. *Lung Cancer*," 63(1):23-31; Sayeed, A. et al. (2013) "Aberrant Regulation Of The BST2 (Tetherin) Promoter Enhances Cell Proliferation And Apoptosis Evasion In High Grade Breast Cancer Cells," PLoS ONE 8(6):e67191, pp. 1-10); **CDK4** (Lee, Y.M. et al. 2006 *Cell Cycle* 5(18):2110-4); **CEA** (암배아 항원; Foon et al. (1995) "Immune Response To The Carcinoembryonic Antigen In Patients Treated With An Anti-Idiotypic Antibody Vaccine," *J. Clin. Invest.* 96(1):334-42); Mathelin, C. 2006 *Gynecol Obstet Fertil.* 34(7-8):638-46; Tellez-Avila, F.I. et al. 2005 *Rev Invest Clin.* 57(6):814-9); **CEACAM9/CEACAM6** (Zheng, C. et al. (2011) "A Novel Anti-CEACAM5 Monoclonal Antibody, CC4, Suppresses Colorectal Tumor Growth and Enhances NK Cells-Mediated Tumor Immunity," PLoS One 6(6):e21146, pp. 1-11); **CO17-1A** (Ragnhammar et al. (1993) "Effect Of Monoclonal Antibody 17-1A And GM-CSF In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma - Long-Lasting, Complete Remissions Can Be Induced," *Int. J. Cancer* 53:751-758); 선암종에서 발견되는 **CO-43** (혈액군 Le^b); **CO-514** (혈액군 Le^a); **CTA-1**; **CTLA-4** (Peggs, K.S. et al. 2006 *Curr Opin Immunol.* 18(2):206-13); **사이토케라틴 8** (PCT 공개 번호 WO 03/024191); **D1.1**; **D₁56-22**; **DR5** (Abdulghani, J. et al. (2010) "TRAIL Receptor Signaling And Therapeutics," *Expert Opin. Ther. Targets* 14(10):1091-1108; Andera, L. (2009) "Signaling Activated By The Death Receptors Of The TNFR Family," *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.* 153(3):173-180; Carlo-Stella, C. et al. (2007) "Targeting TRAIL Agonistic Receptors for Cancer Therapy," *Clin. Cancer* 13(8):2313-2317; Chaudhari, B.R. et al. (2006) "Following the TRAIL to Apoptosis," *Immunologic Res.* 35(3):249-262); 췌장암에서 발견되는 **E₁** 시리즈 (혈액군 B); **EGFR** (상피 성장 인자 수용체; Adenis, A. et al. 2003 *Bull Cancer.* 90 Spec No:S228-32); **에프린 수용체** (및 특히 **EphA2** (미국 특허 번호 7,569,672; PCT 공개 번호 WO 06/084226); **Erb** (ErbB1; ErbB3; ErbB4; Zhou, H. et al. 2002 *Oncogene* 21(57):8732-8740; Rimón, E. et al. 2004 *Int J Oncol.* 24(5):1325-1338); **GAGE** (GAGE-1; GAGE-2; Akcakanat, A. et al. 2006 *Int J Cancer.* 118(1):123-128); **GD2/GD3/GM2** (Livingston, P.O. et al. 2005 *Cancer Immunol Immunother.* 54(10):1018-1025); **강글리오시드 GD2** (G_{D2}; Saleh et al. (1993) "Generation Of A Human Anti-Idiotypic Antibody That Mimics The GD2 Antigen," *J. Immunol.*, 151, 3390-3398); **강글리오시드 GD3** (G_{D3}; Shitara et al. (1993) "A Mouse/Human Chimeric Anti-(Ganglioside GD3) Antibody With Enhanced Antitumor Activities," *Cancer Immunol. Immunother.* 36:373-380); **강글리오시드 GM2** (G_{M2}; Livingston et al. (1994) "Improved Survival In Stage III Melanoma Patients With GM2 Antibodies: A Randomized Trial Of Adjuvant Vaccination With GM2 Ganglioside," *J. Clin. Oncol.* 12:1036-1044); **강글리오시드 GM3** (G_{M3}; Hoon et al. (1993) "Molecular Cloning Of A Human Monoclonal Antibody Reactive To Ganglioside GM3 Antigen On Human Cancers," *Cancer Res.* 53:5244-5250); **GICA 19-9** (Herlyn et al. (1982) "Monoclonal Antibody Detection Of A Circulating Tumor-Associated Antigen. I. Presence Of Antigen In Sera Of Patients With Colorectal, Gastric, And Pancreatic Carcinoma," *J. Clin. Immunol.* 2:135-140); **gp100** (Lotem, M. et al. 2006 *J Immunother.* 29(6):616-27); **Gp37** (인간 백혈병 T 세포 항원; Bhattacharya-Chatterjee et al. (1988) "Idiotypic Vaccines Against Human T Cell Leukemia. II. Generation And Characterization Of A Monoclonal Idiotypic Cascade (Ab1, Ab2, and Ab3)," *J. Immunol.* 141:1398-1403); **gp75** (흑색종 항원; Vijayasardahl et al. (1990) "The Melanoma Antigen Gp75 Is The Human Homologue Of The Mouse B (Brown) Locus Gene Product," *J. Exp. Med.* 171(4):1375-1380); **gpA33** (Heath, J.K. et al. (1997) "The Human A33 Antigen Is A Transmembrane Glycoprotein And A Novel Member Of The Immunoglobulin Superfamily," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 94(2):469-474; Ritter, G. et al. (1997) "Characterization Of Posttranslational Modifications Of Human A33 Antigen, A Novel Palmitoylated Surface Glycoprotein Of Human Gastrointestinal Epithelium," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236(3):682-686; Wong, N.A. et al. (2006) "EpCAM and gpA33 Are Markers Of Barrett's Metaplasia," *J. Clin. Pathol.* 59(3):260-263); **HER2 항원** (HER2/neu, p185^{HER2}; Kumar, Pal S et al. 2006 *Semin Oncol.* 33(4):386-91); **HMFG** (인간 유지방 소구체 항원; WO1995015171); **인간 유두종 바이러스-E6/인간 유두종 바이러스-E7** (DiMaio, D. et al. 2006 *Adv Virus Res.* 66:125-59; **HMW-MAA** (고분자량 흑색종 항원; Natali et al. (1987) "Immunohistochemical Detection Of Antigen In Human Primary And Metastatic Melanomas By The Monoclonal Antibody 140.240 And Its Possible Prognostic Significance," *Cancer* 59:55-63; Mittelman et al. (1990)

"Active Specific Immunotherapy In Patients With Melanoma. A Clinical Trial With Mouse Antiidiotypic Monoclonal Antibodies Elicited With Syngeneic Anti-High-Molecular-Weight-Melanoma-Associated Antigen Monoclonal Antibodies," J. Clin. Invest. 86:2136-2144); **I 항원** (분화 항원; Feizi (1985) "Demonstration By Monoclonal Antibodies That Carbohydrate Structures Of Glycoproteins And Glycolipids Are Onco-Developmental Antigens," Nature 314:53-57); **IL13R α 2** (PCT 공개 번호 WO 2008/146911; Brown, C.E. et al. (2013) "Glioma IL13R α 2 Is Associated With Mesenchymal Signature Gene Expression And Poor Patient Prognosis," PLoS One. 18;8(10):e77769; Barderas, R. et al. (2012) "High Expression Of IL-13 Receptor A2 In Colorectal Cancer Is Associated With Invasion, Liver Metastasis, And Poor Prognosis," Cancer Res. 72(11):2780-2790; Kasaian, M.T. et al. (2011) "IL-13 Antibodies Influence IL-13 Clearance In Humans By Modulating Scavenger Activity Of IL-13R α 2," J. Immunol. 187(1):561-569; Bozinov, O. et al. (2010) "Decreasing Expression Of The Interleukin-13 Receptor IL-13R α 2 In Treated Recurrent Malignant Gliomas," Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 50(8):617-621; Fujisawa, T. et al. (2009) "A novel role of interleukin-13 receptor alpha2 in pancreatic cancer invasion and metastasis," Cancer Res. 69(22):8678-8685); **인테그린 β 6** (PCT 공개 번호 WO 03/087340); **JAM-3** (PCT 공개 번호 WO 06/084078); **KID3** (PCT 공개 번호 WO 05/028498); **KID31** (PCT 공개 번호 WO 06/076584); **KS 1/4 pan-암종 항원** (Perez et al. (1989) "Isolation And Characterization Of A cDNA Encoding The Ks1/4 Epithelial Carcinoma Marker," J. Immunol. 142:3662-3667; Moller et al. (1991) "Bi-specific-Monoclonal-Antibody-Directed Lysis Of Ovarian Carcinoma Cells By Activated Human T Lymphocytes," Cancer Immunol. Immunother. 33(4):210-216; Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res.* 123:157-80); **L6** 및 **L20** (인간 폐암종 항원; Hellstrom et al. (1986) "Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinoma," Cancer Res. 46:3917-3923); **LEA**; **LUCA-2** (미국 특허 공개 번호 2006/0172349; PCT 공개 번호 WO 06/083852); **M1:22:25:8**; **M18**; **M39**; **MAGE** (MAGE-1; MAGE-3; (Bodey, B. 2002 *Expert Opin Biol Ther.* 2(6):577-84); **MART** (Kounalakis, N. et al. 2005 *Curr Oncol Rep.* 7(5):377-82; **메조텔린** (Chang K, and Pastan I. 1996 "Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers," Proc Natl Acad Sci USA 93:136-40), **MUC-1** (Mathelin, C. 2006 *Gynecol Obstet Fertil.* 34(7-8):638-46); **MUM-1** (Castelli, C. et al. 2000 *J Cell Physiol.* 182(3):323-31); **My1**; **N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제** (Dennis, J.W. 1999 *Biochim Biophys Acta.* 6;1473(1):21-34); **네오당단백질**; 선암종에서 발견되는 **NS-10**; **OFA-1**; **OFA-2**; **온코스타틴 M** (온코스타틴 수용체 베타; 미국 특허 번호 7,572,896; PCT 공개 번호 WO 06/084092); **p15** (Gil, J. et al. 2006 *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(9):667-77); **p97** (흑색종-관련 항원; Estin et al. (1989) "Transfected Mouse Melanoma Lines That Express Various Levels Of Human Melanoma-Associated Antigen p97," J. Natl. Cancer Instit. 81(6):445-454); **PEM** (다형성 상피 뮤신; Hilkens et al. (1992) "Cell Membrane-Associated Mucins And Their Adhesion-Modulating Property," Trends in Biochem. Sci. 17:359-363); **PEMA** (다형성 상피 뮤신 항원); **PIPA** (미국 특허 번호 7,405,061; PCT 공개 번호 WO 04/043239); **PSA** (전립선-특이적 항원; Henttu et al. (1989) "cDNA Coding For The Entire Human Prostate Specific Antigen Shows High Homologies To The Human Tissue Kallikrein Genes," Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2):903-910; Israeli et al. (1993) "Molecular Cloning Of A Complementary DNA Encoding A Prostate-Specific Membrane Antigen," Cancer Res. 53:227-230; Cracco, C.M. et al. 2005 *Minerva Urol Nefrol.* 57(4):301-11); **PSMA** (전립선-특이적 막 항원; Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res.* 123:157-180); **전립선산 포스페이트** (Tailor et al. (1990) "Nucleotide Sequence Of Human Prostatic Acid Phosphatase Determined From A Full-Length cDNA Clone," Nucl. Acids Res. 18(16):4928); 흑색종에서 발견된 **R₂₄**; **ROR1** (미국 특허 번호 5,843,749); **스핑고지질**; **SSEA-1**; **SSEA-3**; **SSEA-4**; **sTn** (Holmberg, L.A. 2001 *Expert Opin Biol Ther.* 1(5):881-91); 피부 T 세포 림프종으로부터의 **T 세포 수용체 유도 펩타이드** (Edelson (1998) "Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Model For Selective Immunotherapy," Cancer J Sci Am. 4:62-71 참조); 골수 세포에서 발견된 **T_{5A7}**; **TAG-72** (Yokota et al. (1992) "Rapid Tumor Penetration Of A Single-Chain Fv And Comparison With Other Immunoglobulin Forms," Cancer Res. 52:3402-3408); **TL5** (혈액군 A); **TNF-수용체** (TNF- α 수용체, TNF- β 수용체; **TNF- γ 수용체** (van Horssen, R. et al. 2006 *Oncologist.* 11(4):397-408; Gardnerova, M. et al. 2000 *Curr Drug Targets.* 1(4):327-64); **TRA-1-85** (혈액군 H); **트랜스페린 수용체** (미국 특허 번호 7,572,895; PCT 공개 번호 WO 05/121179); **5T4** (TPBG, 영양세포 당단백질; Boghaert, E.R. et al. (2008) "The Oncofetal Protein, 5T4, Is A Suitable Target For Antibody-Guided Anti-Cancer Chemotherapy With Calicheamicin," Int. J. Oncol. 32(1):221-234; Eisen, T. et al. (2014) "Naptumomab Estafenatox: Targeted Immunotherapy with a Novel

Immunotoxin," Curr. Oncol. Rep. 16:370, pp. 1-6); **TSTA (종양-특이적 이식 항원)**, 예컨대 바이러스-유도된 종양 항원, 이를테면 T-항원 DNA 종양 바이러스 및 RNA 종양 바이러스의 엔벨로프 항원, 태아종양 항원-알파-태아단백질, 예컨대 결장의 CEA, 방광 종양 태아종양 항원 (Hellstrom et al. (1985) "*Monoclonal Antibodies To Cell Surface Antigens Shared By Chemically Induced Mouse Bladder Carcinomas*," Cancer. Res. 45:2210-2188); **VEGF** (Pietrantonio, F. et al. (2015) "*Bevacizumab-Based Neoadjuvant Chemotherapy For Colorectal Cancer Liver Metastases: Pitfalls And Helpful Tricks In A Review For Clinicians*," Crit. Rev. Oncol. Hematol. 95(3):272-281; Grabowski, J.P. (2015) "*Current Management Of Ovarian Cancer*," Minerva Med. 106(3):151-156; Field, K.M. (2015) "*Bevacizumab And Glioblastoma: Scientific Review, Newly Reported Updates, And Ongoing Controversies*," Cancer 121(7):997-1007; Suh, D.H. et al. (2015) "*Major Clinical Research Advances In Gynecologic Cancer In 2014*," J. Gynecol. Oncol. 26(2):156-167; Liu, K.J. et al. (2015) "*Bevacizumab In Combination With Anticancer Drugs For Previously Treated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer*," Tumour Biol. 36(3):1323-1327; Di Bartolomeo, M. et al. (2015) "*Bevacizumab treatment in the elderly patient with metastatic colorectal cancer*," Clin. Interv. Aging 10:127-133); **VEGF 수용체** (O'Dwyer, P.J. 2006 *Oncologist*. 11(9):992-998); **VEP8; VEP9; VIM-D5**; 및 배아 암종 세포에서 발견되는 **Y 합텐, Le^y**.

[1460] 특정 구체예에서, 발명의 이러한 항-PD-1-결합 분자는 5T4, B7H3, CD19, CD20, CD51, CD123, DR5, EGFR, EpCam, GD2, gpA33, HER2, ROR-1, TAG-72, VEGF-A 항체 및/또는 VEGFR2에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 분자와 조합하여 사용된다.

[1461] 발명의 이러한 PD-1-결합 분자는 면역원성 제제, 예컨대 종양 백신과 조합될 수 있다. 이러한 백신은 정제된 종양 항원 (재조합 단백질, 펩타이드 및 탄수화물 분자 포함), 자가조직 또는 동종이계 종양 세포를 포함할 수 있다. 많은 종양 백신 전략이 기술되었다 (예를 들어, Palena, C., et al., (2006) "*Cancer vaccines: preclinical studies and novel strategies*," Adv. Cancer Res. 95, 115-145; Mellman, I., et al. (2011) "*Cancer immunotherapy comes of age*," Nature 480, 480-489; Zhang, X. M. et al. (2008) "*The anti-tumor immune response induced by a combination of MAGE-3/MAGE-n-derived peptides*," Oncol. Rep. 20, 245-252; Disis, M. L. et al. (2002) "*Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines*," J. Clin. Oncol. 20, 2624-2632; Vermeij, R. et al. (2012) "*Potential of a p53-SLP vaccine by cyclophosphamide in ovarian cancer: a single-arm phase II study*," Int. J. Cancer 131, E670-E680 참조). 발명의 이러한 PD-1-결합 분자는 화학치료 처방과 조합될 수 있다. 이 경우에, 투여되는 화학치료제의 용량을 감소시키는 것이 가능할 수 있다 (Mokyr et al. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304).

[1462] 발명의 이러한 PD-1-결합 분자는 다른 면역자극성 분자, 예컨대 T-세포 활성화의 증가된 수준을 제공하도록 숙주 면역 반응성을 활성화시키는 항체와 조합될 수 있다. 특히, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체 및/또는 항-CTLA-4 항체는 면역계를 활성화시킨다는 것이 입증되었다 (예컨대 del Rio, M-L. et al. (2005) "*Antibody-Mediated Signaling Through PD-1 Costimulates T Cells And Enhances CD28-Dependent Proliferation*," Eur.J. Immunol 35:3545-3560; Barber, D. L. et al. (2006) "*Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection*," Nature 439, 682-687; Iwai, Y. et al. (2002) "*Involvement Of PD-L1 On Tumor Cells In The Escape From Host Immune System And Tumor Immunotherapy By PD-L1 Blockade*," Proc. Natl Acad. Sci. USA 99, 12293-12297; Leach, D. R., et al., (1996) "*Enhancement Of Antitumor Immunity By CTLA-4 Blockade*," Science 271, 1734-1736). 발명의 PD-1-결합 분자와 조합될 수 있는 추가적인 면역자극성 분자는 수지상세포 (DC) 기능 및 항원 제공을 활성화시키는, 수지상세포의 표면 상의 분자에 대한 항체, T 세포 헬퍼 활성을 대체할 수 있는 항-CD40 항체, 및 T 세포 동시자극 분자, 예컨대 PD-L1, CTLA-4, OX-40 4-1BB 및 ICOS 에 대한 활성화 항체 (예를 들어, Ito et al. (2000) "*Effective Priming Of Cytotoxic T Lymphocyte Precursors By Subcutaneous Administration Of Peptide Antigens In Liposomes Accompanied By Anti-CD40 And Anti-CTLA-4 Antibodies*," Immunobiology 201:527-40; U.S. Pat. No. 5,811,097; Weinberg et al. (2000) "*Engagement of the OX-40 Receptor In Vivo Enhances Antitumor Immunity*," Immunol 164:2160-2169; Melero et al. (1997) "*Monoclonal Antibodies Against The 4-1BB T-Cell Activation Molecule Eradicate Established Tumors*," Nature Medicine 3: 682-685; Hutloff et al. (1999) "*ICOS Is An Inducible T-Cell Co-Stimulator Structurally And Functionally Related To CD28*," Nature 397: 263-266; 및 Moran, A.E. et al. (2013) "*The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 As Targets For Cancer Immunotherapy*," Curr Opin Immunol.

2013 Apr; 25(2): 10.1016/j.coi.2013.01.004) 및/또는 항원 결합시 T-세포를 자극하는 역할을 하는 다양한 동시자극 단백질 수용체 (예컨대, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, 등)로부터의 하나 이상의 세포 내 신호 전달 도메인에 융합된 질환 항원에 대한 항원 결합 도메인을 포함하는 자극성 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함한다 (예를 들어, Tettamanti, S. et al. (2013) "Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor," Br. J. Haematol. 161:389-401; Gill, S. et al. (2014) "Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia And Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells," Blood 123(15): 2343-2354; Mardiros, A. et al. (2013) "T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions And Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia," Blood 122:3138-3148; Pizzitola, I. et al. (2014) "Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in vivo," Leukemia doi:10.1038/leu.2014.62).

[1463] 발명의 이러한 PD-1-결합 분자는 표적 면역치료 반응을 전환시키기 위해 억제 키메라 항원 수용체 (iCAR)와 조합될 수 있다. iCAR은 항원 결합시 T 세포 반응을 제한하는 역할을 하는 다양한 억제 단백질 수용체 (예컨대, CTLA-4, PD-1, 등)의 하나 이상의 세포 내 신호 전달 도메인에 융합된 질환 항원에 대해 지시된 항원 결합 도메인을 포함한다 (예를 들어 Fedorov V.D. (2013) "PD-1- and CTLA-4-Based Inhibitory Chimeric Antigen Receptors (iCARs) Divert Off-Target Immunotherapy Responses," Sci. Transl. Med. 5:215ra172 doi:10.1126/scitranslmed.3006597 참조).

[1464] 특히, 발명의 이러한 항-PD-1 결합 분자는 항-CD137 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-OX40 항체, 항-LAG-3 항체, 항-PD-L1 항체, 항-TIGIT 항체, 항-TIM-3 항체 및/또는 암 백신과 조합하여 사용된다.

[1465] B. 진단 및 치료진단 유용성

[1466] 본 발명의 특정 PD-1-결합 분자는 PD-1과 PD-L1 리간드 사이의 결합을 차단하는 능력이 거의 없는 것을 나타낸다. 이와 같이, 항체 PD-1 mAb 2 및 PD-1 mAb 4, 그것들의 인간화된 유도체, 및 그것들의 PD-1-결합 단편 (예컨대, 이중특이적 디아바디, 등)을 포함하거나 또는 이러한 항체들과의 결합에 대해 경쟁하는 분자들은 검출 가능하게 표지될 수 있고 (예컨대, 방사성, 효소적, 형광, 화학발광, 상자성, 반자성 또는 다른 표지화 모이어티로) 샘플 중의 PD-1의 검출에 또는 세포상의 PD-1의 영상화에 사용될 수 있다. 이러한 분자는 PD-1의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않기 때문에, 그것들은 특히 대상체에서 PD-1 발현의 정도, 위치 및 변화를 측정하는 방법에 유용하다 (예컨대 대상체는 PD-1의 발현 또는 표적화와 관련된 암에 대해 치료된다).

[1467] XII. 제약학적 조성물

[1468] 발명의 조성물은 제약학적 조성물의 제조에 유용한 대량의 약물 조성물 (예컨대, 불순하거나 또는 비-멸균 조성물) 및 단위 투약 형태의 제조에 사용될 수 있는 제약학적 조성물 (즉, 대상체 또는 환자에게 투여하기에 적합한 조성물)을 포함한다. 이러한 조성물은 본 발명의 PD-1-결합 분자, 또는 이러한 제제의 조합의 예방적 또는 치료적 유효량 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 바람직하게는, 발명의 조성물은 본 발명의 PD-1-결합 분자의 예방적 또는 치료적 유효량 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 발명은 특히 PD-1-결합 분자가 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15; a 인간화된 PD-1 mAb 1; PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15; 임의의 이러한 항체의 PD-1-결합 단편; 또는 PD-1-결합 분자가 이중특이적 PD-1 디아바디 (예컨대, PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디)인 이러한 제약학적 조성물을 포함한다. 특히 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15 항체; 인간화된 PD-1 mAb 1; PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15의 3개의 CDR₁s 및 3개의 CDR₄s를 포함하는 이러한 분자들이 포함된다.

[1469] 발명은 또한 추가적으로 특정 암 항원에 특이적인 제2 치료 항체 (예컨대 종양-특이적 단클론성 항체), 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 그런 제약학적 조성물을 포함한다.

[1470] 특이적 구체예에서, 용어 "제약학적으로 허용되는"은 미국 연방정부 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되지

나 미국 약전 또는 동물, 및 더 특별하게는 인간에서의 사용에 대하여 일반적으로 인정되는 다른 약전에 나열되어 있는 것을 의미한다. 용어 "담체"는 치료제와 함께 투여되는 희석제, 보조제 (예컨대, 프로인트 보조제 (완전 및 불완전), 부형제 또는 비히클을 말한다. 이러한 제약학적 담체는 멸균된 액체, 예컨대 물 및 오일일 수 있으며, 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 오일, 예컨대 땅콩 오일, 대두 오일, 미네랄 오일, 참깨 오일 등을 포함한다. 물은 제약학적 조성물이 정맥 내로 투여될 때 바람직한 담체이다. 식염수 용액 및 수성 텍스트로오스 및 글리세롤 용액은 또한, 특히, 주사 용액에 대하여, 액체 담체로서 사용될 수 있다. 적합한 제약학적 부형제는 전분, 글루코오스, 락토오스, 수크로오스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 클로라이드, 탈지 분유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 조성물은, 원하는 경우, 소량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 이 조성물들은 용액, 현탁액, 에멀전, 정제, 알약, 캡슐, 분말, 지효성 제형 등의 형태를 취할 수 있다.

[1471] 일반적으로, 발명의 조성물의 성분은, 예를 들어, 활성제의 양을 표시하는 앰플 또는 봉지(sachette)와 같은 용봉된(hermetically sealed) 용기 내 동결건조 분말 또는 무수 농축물로서, 별도로 공급되거나 단위 투약 형태로 함께 혼합된다. 조성물이 주입에 의해 투여되어야 하는 경우, 그것은 멸균된 제약학적 등급의 물 또는 식염수를 함유한 주입 병으로 분배될 수 있다. 조성물이 주사로 투여되는 경우, 투여 전에 성분들이 혼합될 수 있도록 멸균된 주사용수 또는 식염수의 앰플이 제공될 수 있다.

[1472] 발명의 조성물은 중성 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 제약학적으로 허용되는 염은 음이온으로 형성된 것들, 예컨대 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 등으로부터 유래된 것들, 및 양이온으로 형성된 것들, 예컨대 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘, 수산화 제2 철, 아이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인, 등을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[1473] 발명은 또한 본 발명의 PD-1-결합 분자 (및 더 바람직하게는, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15; 인간화된 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15 항체; 임의의 이러한 항체의 PD-1-결합 단편; 또는 PD-1-결합 분자가 이중특이적 PD-1 디아바디 (예컨대, PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디)인 것)가 채워진 하나 이상의 용기를 포함하는 제약학적 팩(pack) 또는 키트를 제공한다. 특히 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 또는 PD-1 mAb 15의 3개의 CDR_L 및 3개의 CDR_H를, 단독으로 또는 이러한 제약학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는 그런 분자가 포함된다. 추가적으로, 질환의 치료에 유용한 하나 이상의 다른 예방제 또는 치료제가 또한 제약학적 팩 또는 키트에 포함될 수 있다. 발명은 또한 발명의 제약학적 조성물의 성분들 중 하나 이상으로 채워진 하나 이상의 용기를 포함하는 제약학적 팩 또는 키트를 제공한다. 제약 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태의 통지가 이러한 용기(들)와 선택적으로 연관될 수 있으며, 이 통지는 인간 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매에 대한 기관의 승인을 반영한다.

[1474] 본 발명은 상기 방법에 사용될 수 있는 키트를 제공한다. 키트는 본 발명의 PD-1-결합 분자 중 어느 것도 포함할 수 있다. 키트는 본 발명의 PD-1-결합 분자 중 어느 것도 포함할 수 있다. 키트는 하나 이상의 용기에, 암 치료에 유용한 하나 이상의 다른 예방제 및/또는 치료제를 더 포함할 수 있고; 및/또는 키트는 암과 관련된 하나 이상의 암 항원에 결합하는 하나 이상의 세포독성 항체를 더 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 다른 예방제 또는 치료제는 화학치료제이다. 다른 구체예에서, 예방제 또는 치료제는 생물학적 또는 호르몬 치료제이다.

[1475] XIII. 투여 방법

[1476] 발명의 용합 단백질 또는 컨주게이션된 분자, 또는 발명의 용합 단백질 또는 컨주게이션된 분자를 포함하는 제약학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여함으로써 질환, 장애 또는 감염과 관련된 하나 이상의 증상의 치료, 예방 및 개선을 위한 본 발명의 조성물이 제공될 수 있다. 바람직한 측면으로, 이러한 조성물은 실질적으로 정제된다 (즉, 효과를 제한하거나 원치않는 부작용을 유발하는 물질이 실질적으로 없다). 특이적 구체예에서, 대상체는 동물, 바람직하게는 포유동물, 예컨대 비-영장류 (예컨대, 소, 말, 고양이, 개, 설치류, 등) 또는 영장류 (예컨대, 시노몰구스 원숭이와 같은 원숭이, 인간, 등)이다. 바람직한 구체예에서, 대상체는 인간이다.

[1477] 다양한 전달 시스템, 예컨대, 리포솜의 캡슐화, 미립자, 마이크로캡슐, 항체 또는 용합 단백질을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체-매개 세포 내 섭취(endocytosis) (예컨대, Wu et al. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System," J. Biol. Chem. 262:4429-4432 참조), 레트로

바이러스 또는 다른 벡터의 일부로서 핵산의 구성, 등이 공지되어 있으며 발명의 조성물을 투여하기 위해 사용될 수 있다.

[1478] 발명의 분자를 투여하는 방법은 비경구 투여 (예컨대, 피부 내, 근육 내, 복강 내, 정맥 내 및 피하), 경막 외, 및 점막 (예컨대, 비강 내 및 경구 경로)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 특이적 구체예에서, 본 발명의 PD-1-결합 분자는 근육 내로, 정맥 내로, 또는 피하로 투여된다. 조성물은 임의의 편리한 경로에 의해, 예를 들면, 주입 또는 볼루스 주사(bolus injection)에 의해, 상피 또는 점막피부 라이닝(lining) (예컨대, 구강 점막, 직장 및 장 점막, 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신성 또는 국소적일 수 있다. 이에 더하여, 예를 들어, 흡입기 또는 분무기, 및 연무제(aerosolizing agent)가 들어있는 제형의 사용에 의한 폐 투여가 또한 사용될 수 있다. 예컨대, 미국 특허 번호 6,019,968; 5,985,320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; 및 4,880,078; 및 PCT 공개 번호 WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; 및 WO 99/66903을 참조하고, 이것들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[1479] 발명은 또한 본 발명의 PD-1-결합 분자가 분자의 양을 표시하는 용봉된 용기, 예컨대 앰플 또는 봉지에 포장된다는 것을 제공한다. 한 구체예에서, 이러한 분자는 용봉된 용기 내에서 멸균된 동결건조 분말 또는 무수 농축물로서 공급되고, 예를 들어, 대상체에게 투여하기에 적절한 농도로 물 또는 식염수로 복원될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 PD-1-결합 분자는 용봉된 용기 내 건조한 멸균 동결건조 분말로서 공급된다.

[1480] 본 발명의 동결건조된 PD-1-결합 분자는 원래의 용기에서 2°C 내지 8°C에서 저장되어야 하고 분자는 복원된 후 12시간 내, 바람직하게는 6시간 내, 5시간 내, 3시간 내, 또는 1시간 내에 투여되어야 한다. 대안의 구체예에서, 이러한 분자는 분자, 용합 단백질, 또는 컨주게이션된 분자의 양 및 농도를 표시하는 용봉된 용기 내 액체 형태로 공급된다. 바람직하게는, 이러한 PD-1-결합 분자는 액체 형태로 제공될 때 용봉된 용기로 공급된다.

[1481] 장애와 관련된 하나 이상의 증상의 치료, 예방 또는 개선에 효과적인 발명의 조성물의 양은 표준 임상 기법으로 결정될 수 있다. 제형에서 사용될 정확한 용량은 또한 투여 경로, 및 상태의 심각도에 따라 달라질 것이며, 의사의 판단 및 각 환자의 상황에 따라 결정되어야 한다. 유효량은 시험관 내 또는 동물 모델 테스트 시스템으로부터 유도된 용량-반응 곡선으로부터 추정될 수 있다.

[1482] 본원에서 사용된 바와 같이, 제약학적 조성물의 "유효량"은, 한 구체예에서는, 제한 없이, 질환으로부터 유발되는 증상의 감소, 감염의 증상 (예컨대, 바이러스량, 열, 통증, 패혈증, 등) 또는 암의 증상 (예컨대, 암세포의 증식, 종양 존재, 종양 전이, 등)을 약화시켜서, 질환으로 고통받고 있는 것들의 삶의 질의 증가, 질환을 치료하는데 필요한 다른 약물의 용량 감소, 표적화 및/또는 내재화를 통해 또 다른 약물의 효과 향상, 질환의 진행의 지연 및/또는 개체의 생존 연장과 같은 임상 결과를 포함하는, 이로온 또는 원하는 결과를 얻기에 충분한 양이다.

[1483] 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 본 발명의 목적을 위해서, 약물, 화합물 또는 제약학적 조성물의 유효량은, 직접적으로 또는 간접적으로, 바이러스 존재의 증식 (또는 효과)를 감소시키고 바이러스 질환의 발달을 감소시키고 및/또는 지연시키기에 충분한 양이다. 일부 구체예에서, 약물, 화합물 또는 제약학적 조성물의 유효량은 또 다른 약물, 화합물 또는 제약학적 조성물과 함께 달성될 수 있거나 달성되지 않을 수 있다. 그러므로, "유효량"은 하나 이상의 화학치료제의 투여의 맥락에서 고려될 수 있으며, 하나 이상의 다른 제제와 함께, 원하는 결과가 달성될 수 있거나 달성된 경우, 단일 제제는 유효량으로 제공된 것으로 간주될 수 있다. 개개의 요구는 각기 다르지만, 각 구성성분의 유효량의 최적의 범위의 결정은 당업자의 기술 범위 내에 있다.

[1484] 발명에 포함된 PD-1-결합 분자에 대하여, 환자에게 투여되는 투약량은 바람직하게는 수령체 대상체의 체중 (kg)을 기준으로 결정된다. 발명에 포함된 PD-1-결합 분자에 대하여, 환자에게 투여되는 투약량은 전형적으로 대상체의 체중의 적어도 약 0.01 µg/kg, 적어도 약 0.05 µg/kg, 적어도 약 0.1 µg/kg, 적어도 약 0.2 µg/kg, 적어도 약 0.5 µg/kg, 적어도 약 1 µg/kg, 적어도 약 2 µg/kg, 적어도 약 5 µg/kg, 적어도 약 10 µg/kg, 적어도 약 20 µg/kg, 적어도 약 50 µg/kg, 적어도 약 0.1 mg/kg, 적어도 약 1 mg/kg, 적어도 약 3 mg/kg, 적어도 약 5 mg/kg, 또는 적어도 약 10 mg/kg, 적어도 약 30 mg/kg, 적어도 약 50 mg/kg, 적어도 약 75 mg/kg, 적어도 약 100 mg/kg, 적어도 약 125 mg/kg, 적어도 약 150 mg/kg 체중 이상이다.

[1485] 본 발명의 PD-1-결합 분자의 투약량 및 투여 빈도는 예를 들어, 지질화와 같은 변형에 의해 분자의 흡수 및 조직 침투를 향상시킴으로써 감소되거나 변화될 수 있다.

- [1486] 환자에게 투여되는 발명의 PD-1-결합 분자의 투약량은 단일 제제 치료법으로서의 사용에 대하여 계산될 수 있다. 대안으로, 분자는 다른 치료적 조성물과 조합하여 사용될 수 있으며 환자에게 투여되는 투약량은 상기 분자가 단일 제제 치료법으로서 사용될 때보다 더 적다.
- [1487] 발명의 제약학적 조성물은 치료가 필요한 지역에 국소적으로 투여될 수 있다; 이것은, 예를 들면, 그리고 제한이 아니라, 국소적 주입, 주사, 또는 이식물에 의해 달성될 수 있으며, 상기 이식물은 실라스틱 막, 또는 섬유와 같은 막을 포함하는 다공성, 비-다공성 또는 젤라틴 재료이다. 바람직하게는, 발명의 분자를 투여할 때, 분자를 흡수하지 않는 재료를 사용하기 위해 주의를 기울여야 한다.
- [1488] 발명의 조성물은 소포, 특히 리포솜으로 전달될 수 있다 (Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery," Science 249:1527-1533); Treat *et al.*, in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 3 17-327 참조).
- [1489] 발명의 조성물은 방출-제어 또는 지효성 시스템으로 전달될 수 있다. 발명의 PD-1-결합 분자(들) 중 하나 이상을 포함하는 지효성 제형을 제조하기 위해서 당업자에게 공지된 임의의 기법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,526,938; PCT 공보 WO 91/05548; PCT 공보 WO 96/20698; Ning *et al.* (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song *et al.* (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek *et al.* (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; 및 Lam *et al.* (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760 참조 (이것들은 각각 전문이 본원에 참조로 포함됨). 한 구체예에서, 방출-제어 시스템에서 펌프가 사용될 수 있다 (Langer, *supra*; Sefton, (1987) "Implantable Pumps," CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald *et al.* (1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis," Surgery 88:507-516; 및 Saudek *et al.* (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery," N. Engl. J. Med. 321:574-579 참조). 또 다른 구체예에서, 폴리머 재료가 분자의 방출-제어를 달성하기 위해 사용될 수 있다 (예컨대, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy *et al.* (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate," Science 228:190-192; During *et al.* (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization," Ann. Neurol. 25:351-356; Howard *et al.* (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits," J. Neurosurg. 7(1):105-112); 미국 특허 번호 5,679,377; 미국 특허 번호 5,916,597; 미국 특허 번호 5,912,015; 미국 특허 번호 5,989,463; 미국 특허 번호 5,128,326; PCT 공개 번호 WO 99/15154; 및 PCT 공개 번호 WO 99/20253 참조). 지효성 제형에 사용된 폴리머의 예는 폴리(2-하이드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜리드 (PLG), 폴리무수물, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알콜), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락티드 (PLA), 폴리(락티드-코-글리콜리드) (PLGA) 및 폴리오쏘에스터를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 방출-제어 시스템은 치료 표적 (예컨대, 폐)의 근처에 배치될 수 있으며, 따라서 전신 용량의 단지 일부만을 필요로 한다 (예컨대 Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984) 참조). 방출-제어 이식물로서 유용한 폴리머 조성물이 Dunnet *al.*에 따라 사용될 수 있다 (U.S. 5,945,155 참조). 이 특정한 방법은 폴리머 시스템으로부터 생체활성 재료의 제자리(in situ) 방출-제어의 치료적 효과를 기반으로 한다. 이식은 일반적으로 치료적 처치가 필요한 환자의 신체 내 어느 곳에서든 일어날 수 있다. 비-폴리머 지속성 전달 시스템이 사용될 수 있으며, 이에 의해 대상체의 신체에서 비-폴리머 이식물은 약물 전달 시스템으로서 사용된다. 신체에서 이식할 때, 이식물의 유기 용매는 조성물로부터 주위의 조직액으로 소멸되거나, 분산되거나 또는 침출될 것이며, 비-폴리머 재료는 서서히 응고되거나 침전되어 고체의 미소다공성 매트릭스를 형성한다 (U.S. 5,888,533 참조).
- [1490] 방출-제어 시스템은 Langer에 의한 리뷰 (1990, "New Methods Of Drug Delivery," Science 249:1527-1533)에서 논의된다. 발명의 하나 이상의 치료제를 포함하는 지효성 제형을 제조하기 위해서 당업자에게 공지된 임의의 기

법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,526,938; 국제 공개 번호 WO 91/05548 및 WO 96/20698; Ning *et al.* (1996) "*Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel*," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song *et al.* (1995) "*Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions*," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek *et al.* (1997) "*Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application*," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; 및 Lam *et al.* (1997) "*Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery*," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760 참조, 이것들은 각각 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[1491] 발명의 조성물이 본 발명의 PD-1-결합 분자를 암호화하는 핵산인 경우, 핵산은 핵산을 적절한 핵산 발현 벡터의 일부로서 구성하고 핵산이 세포 내에 있도록 핵산을 투여함으로써, 예컨대, 레트로바이러스 벡터의 사용에 의해 (미국 특허 번호 4,980,286 참조), 또는 직접적인 주사에 의해, 또는 미립자 충격 (예컨대, 유전자 총; Biolistic, Dupont)의 사용, 또는 지질 또는 세포 표면 수용체 또는 트랜스펙션제로의 코팅에 의해, 또는 핵산을 핵에 들어가는 것으로 알려져 있는 호메오박스(homeobox)-유사 펩타이드와 결합시켜 투여함으로써 (예컨대, Joliot *et al.* (1991) "*Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868 참조), 등에 의해 생체 내에 투여되어 암호화된 PD-1-결합 분자의 발현을 촉진할 수 있다. 대안으로, 핵산은 세포 내로 도입되고 상동성 재조합에 의해 발현을 위한 숙주 세포 DNA 내에 통합된다.

[1492] 본 발명의 PD-1-결합 분자의 치료적 또는 예방적 유효량으로 대상체의 치료는 1회 치료를 포함할 수 있거나, 또는 바람직하게는, 일련의 치료를 포함할 수 있다. 바람직한 예에서, 대상체는 약 1 내지 10주, 바람직하게는 2 내지 8주, 더 바람직하게는 약 3 내지 7주 동안, 및 더 바람직하게는 약 4, 5, 또는 6주 동안 주 1회 이러한 디아바디로 처리된다. 발명의 제약학적 조성물은 하루에 1회, 하루에 2회, 또는 하루에 3회 투여될 수 있다. 대안으로, 제약학적 조성물은 주 1회, 주 2회, 격주 1회, 월 1회, 6주마다 1회, 매 2개월에 1회, 연 2회 또는 연 1회 투여될 수 있다. 치료에 사용된 분자의 유효량은 특정 치료의 과정 동안에 증가하거나 감소할 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[1493] 실시예

[1494] 다음의 실시예는 발명의 진단 또는 치료 방법 중의 조성물에 대한 다양한 방법을 예시한다. 실시예들은 발명의 범주를, 어떤 방식으로든 제한하는 것이 아니라, 예시하기 위해 의도된다.

[1495] 실시예 1

[1496] 항-인간 PD-1 단클론성 항체의 특성화

[1497] 15개의 쥐과의 단클론성 항체를 인간 및 시노물구스 원숭이 PD-1 둘 다에 특이적으로 결합할 수 있는 것으로서 분리하고, 표시 "PD-1 mAb 1", "PD-1 mAb 2", "PD-1 mAb 3", "PD-1 mAb 4", "PD-1 mAb 5", "PD-1 mAb 6", "PD-1 mAb 7", "PD-1 mAb 8", "PD-1 mAb 9", "PD-1 mAb 10", "PD-1 mAb 11", "PD-1 mAb 12", "PD-1 mAb 13", "PD-1 mAb 14" 및 "PD-1 mAb 15"를 부여하였다. 이 항체들의 CDR은 상이한 것으로 나타났고 상기에서 제공된다. 인간 및 시노물구스 원숭이 PD-1의 세포외 도메인에 대한 결합을 다음과 같이 평가하였는데, 평평한 바닥 맥시솅(maxisorb) 96-웰 플레이트를 가용성 인간 또는 시노물구스 원숭이 PD-1 (His 태그에 융합된 인간 PD-1 (shPD-1 His) 또는 인간 Fc 영역에 융합된 인간 PD-1 (shPD-1 hFc)의 세포외 도메인), 또는 인간 Fc 영역에 융합된 시노물구스 원숭이 PD-1 (scyno-PD1 Fc)의 세포외 도메인)으로 각각 0.5 또는 1 $\mu\text{g/mL}$ 로 코팅하고, 플레이트를 세척 후 분리된 항-PD-1 항체 PD-1 mAb 1 내지 15 중 하나와 인큐베이션하였다. 이 연구를 위해 항-PD-1 항체를 3, 1.0, 0.3333, 0.1111, 0.0370, 0.0123 또는 0.0041 $\mu\text{g/mL}$ (3배 연속 희석)로 활용하였다. 고정된 PD-1 (인간 또는 시노물구스 원숭이에 결합하는 항체의 양을 염소 항-마우스 IgG-HRP 이차 항체를 사용하여 산정하였다. 모든 샘플을 플레이트 판독기 (Victor 2 Wallac, Perkin Elmers) 상에서 분석하였다. 가용성 인간 및 가용성 시노물구스 PD-1에 대한 대표적인 결합 곡선을 도 7A 내지 7D 및 도 8A 내지 8C에 각각 도시한다.

[1498] 이 결합 분석들의 결과 (도 7A 내지 7D 및 도 8A 내지 8C)는 모든 항-PD-1 항체 PD-1 mAb 1 내지 15가 가용성 인간 및 가용성 시노물구스 원숭이 PD-1 둘 다에 결합하는 것을 보여준다.

[1499] 쥐과의 항-PD-1 항체를 한층 더 특성화하기 위하여 가용성 인간 PD-L1의 가용성 인간 PD-1에 대한 결합을 차단하는 능력을 두 상이한 분석에서 평가하였다. 한 분석에서 표면상에 고정된 PD-L1에 대한 인간 PD-1의 결합을 항체가 차단하는 능력을 조사하였다. 이 분석을 위해 항-PD-1 항체 PD-1 mAb 1 내지 15의 각각, 또는 참조 항-

PD-1 항체 (PD-1 mAb A)를 shPD-1 His 융합 단백질과 (2.5 $\mu\text{g/mL}$ 에서) 혼합하고, 스트렙타비딘 코팅된 플레이트상에 고정된 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 비오티ن 표지된 가용성 인간 PD-L1 (인간 Fc (sPD-L1)에 융합된 PD-L1의 세포외 도메인)과 함께 별도로 인큐베이션하였다. 이 연구들에 대해 항-PD-1 항체를 10, 5.0, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 또는 0.1563 $\mu\text{g/mL}$ (2배 연속 희석)로 이용하였다. 고정된 sPD-L1에 대한 shPD-1 His 결합의 양을 항-His-Tag-HRP 이차 항체를 사용하여 His-태그를 통해 산정하였다. 모든 샘플을 플레이트 분석기 (Victor 2 Wallac, Perkin Elmers)상에서 분석하였다. 이 실험의 결과를 도 9A 내지 9D에 도시한다.

[1500] 이 억제 분석들의 결과 (도 9A-9D)는 항-PD-항체 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 및 PD-1 mAb 15가 가용성 인간 PD-1에 대한 가용성 인간 PD-L1의 결합을 달라지는 정도로 차단할 수 있었던 한편, PD-1 mAb 2 및 PD-1 mAb 4는 이 분석 포맷에서 차단 활성의 거의 내지는 전혀 나타내지 않았다.

[1501] 제2 분석에서 NSO 세포 표면에 발현된 PD-1에 대한 PD-1리간드 (즉 인간 PD-L1 또는 인간 PD-L2)의 결합을 차단하는 쥐과의 항-PD-1 항체 PD-1 mAb 1 내지 15의 능력을 조사하였다. 이 분석을 위해 항-PD-1 항체 PD-1 mAb 1 내지 15의 각각, 또는 참조 항-PD-1 항체 (PD-1 mAb A 또는 PD-1 mAb B)를 각각 0.1 $\mu\text{g/테스트}$ 의 비오티닐화된-가용성 인간 PD-L1 (shPD-L1 융합 단백질) 또는 비오티닐화된-가용성 인간 PD-L2-muIgFc 융합 단백질 (shPD-L2; Ancell Cat# 573-030)과 별도로 혼합하고, 인간 PD-1을 발현하는 NSO 세포와 함께 (~250,000 세포/웰) 차단 완충액 (FACS + 10% 인간 혈청 알부민)에서 인큐베이션하였다. 이 연구들에 대해 항-PD-1 항체를 4.0, 1.0, 2.5 $\times 10^{-1}$, 6.25 $\times 10^{-2}$, 1.56 $\times 10^{-2}$, 3.90 $\times 10^{-3}$, 9.76 $\times 10^{-4}$, 2.4 $\times 10^{-4}$, 0.6 $\times 10^{-4}$ $\mu\text{g/테스트}$ (4배 연속 희석)로 이용하였다. NSO 세포 표면에 대한 shPD-L1 (또는 shPD-L2) 결합의 양을 FACS 분석에 의해 PE-컨쥬게이트된 스트렙타비딘 이차 항체를 사용하여 측정하였다. PD-1/PD-L1 결합의 억제에 대한 IC50 값을 측정하고 적어도 두 실험의 샘플 평균 (\square)을 하기 표 6에 제시한다 (표시된 경우를 제외함).

표 6

[1502]

항-PD-1 항체	IC50 ($\mu\text{g/테스트}$)	항-PD-1 항체	IC50 ($\mu\text{g/테스트}$)
PD-1 mAb A	0.0044	PD-1 mAb 8	0.6611 \pm
PD-1 mAb B	0.0064	PD-1 mAb 9	0.0154
PD-1 mAb 1	0.0048	PD-1 mAb 10	0.0057
PD-1 mAb 2	0.0110	PD-1 mAb 11	0.0259 \pm
PD-1 mAb 3	0.0361 \pm	PD-1 mAb 12	0.0238 \pm
PD-1 mAb 4	0.0156 \pm	PD-1 mAb 13	0.0117
PD-1 mAb 5	0.0039	PD-1 mAb 14	0.0149 \pm
PD-1 mAb 6	0.0051	PD-1 mAb 15	0.0060
PD-1 mAb 7	0.0024		

[1503] \pm 단일 실험으로부터의 결과.

[1504] shPD-L1 억제 분석의 결과 (표 6)는 항-PD-1 항체 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 및 PD-1 mAb 15가 NSO 세포 표면에 발현된 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1의 결합을 차단할 수 있었음을 보여준다. 특히, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 10 및 PD-1 mAb 15는 shPD-L1 결합 역시 차단하였고 참조 PD-1 항체 (PD-1 mAb A, PD-1 mAb B)보다 더 낮게 차단한 한편, PD-1 mAb 8은 본질적으로 이 분석 포맷에서 차단하지 않았다. PD-1 mAb 2 및 PD-1 mAb 4는 둘 다 이 분석 포맷에서 PD-1/PD-L1 결합을 차단할 수 있었다.

[1505] 유사하게, 항-PD-1 항체 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2 및 PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14는 NSO 세포 표면에 발현된 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L2의 결합을 차단할 수 있었던 한편, 이 분석 포맷에서 PD-1 mAb 8은 본질적으로 차단하지 않았다. 특히, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7 및 PD-1 mAb 10은 shPD-L2 결합 역시 차단하였고, 또는 참조 PD-1 항체 (PD-1 mAb A, PD-1 mAb B)보다 더 낮게 차단하였다. PD-1 항체 PD-1 mAb 11 및 PD-1 mAb 15는 이 분석에서 테스트하지 않았다. hPD-1 mAb 15를 포함하여 여러 인간화된 항-PD-1 항체에 대한 결과를 하기에 제공한다.

- [1506] 실시예 2
- [1507] 인간화 및 추가의 특성화
- [1508] 항-PD-1 항체 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 및 PD-1 mAb 15의 가변 도메인을 인간화하였는데, 항원성 에피토프들을 확인하였고 항체들을 추가로 탈면역시켜서 최종 인간화된 가변 도메인을 생성하였다. PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2 및 PD-1 mAb 15의 인간화는 본원에서 "hPD-1 mAb 1 VH1" 및 "hPD-1 mAb 1 VL1"; "hPD-1 mAb 2 VH1" 및 "hPD-1 mAb 2 VL1"; 및 "hPD-1 mAb 15 VH1" 및 "hPD-1 mAb 15 VL1"로 표시된 각 항체에 대한 하나의 인간화된 VH 도메인 및 하나의 인간화된 VL 도메인을 산출하였다. PD-1 mAb 7의 인간화는 본원에서 "hPD-1 mAb 7 VH1" 및 "hPD-1 mAb 7 VH2"로 표시된 두 인간화된 VH 도메인 및 본원에서 "hPD-1 mAb 1 VL1" "hPD-1 mAb 7 VL2" 및 "hPD-1 mAb 7 VL3"으로 표시된 3개의 인간화된 VL 도메인을 산출하였다. PD-1 mAb 9의 인간화는 본원에서 "hPD-1 mAb 9 VH1" 및 "hPD-1 mAb 9 VH2"로 표시된 두 개의 인간화된 VH 도메인 및 본원에서 "hPD-1 mAb 9 VL1" 및 "hPD-1 mAb 1 VL2"로 표시된 두 개의 인간화된 VL 도메인을 산출하였다. 다중 인간화된 가변 도메인이 생성된 경우에 특정 항-PD-1 항체 (예컨대, PD-1 mAb 7)의 인간화된 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 임의의 조합으로 사용될 수 있고 인간화된 사슬들의 특정 조합은 특이적 VH/VL 도메인을 참조로 언급되는데, 예를 들면 hPD-1 mAb 7 VH1 및 hPD-1 mAb 7 VL2를 포함하는 인간화된 항체는 "hPD-1 mAb 7(1.2)"로 특이적으로 언급된다. 전체 길이 인간화된 항체는 L234A/L235A 치환을 포함하는 인간 IgG1 불변 영역 (IgG1 (AA)) 또는 S228P 치환을 포함하는 IgG4 불변 영역 (IgG4 (P)) 중 어느 하나로 생성되었다.
- [1509] 전체 길이 IgG1 인간화된 항체 중쇄를 다음과 같이 구성하였다: 인간화된 VH 도메인의 C-말단을 변종 CH2-CH3 도메인을 가지고 C-말단 리신 잔기가 없는 인간 IgG1 불변 영역의 N-말단에 융합시켰다 (SEQ ID NO:255):
- [1510] ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS
- [1511] GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVPE KSCDKTHTCP PCPAPEAAAGG
- [1512] PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
- [1513] STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
- [1514] MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSGSFFLY SKLTVDKSRW
- [1515] QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG.
- [1516] SEQ ID NO:255에서, 아미노산 잔기 1 내지 98은 IgG1 CH1 도메인 (SEQ ID NO:10)에 상응하였고, 아미노산 잔기 99 내지 113은 IgG1 힌지 영역 (SEQ ID NO:32)에 상응하였으며 아미노산 잔기 114 내지 329는 L234A/L235A 치환 (밑줄)을 포함하는 IgG1 CH2-CH3 도메인 (SEQ ID NO:5)에 상응하지만 C-말단 리신 잔기가 없다.
- [1517] L234A/L235A 돌연변이를 포함하고 C-말단 리신 잔기가 없는 IgG1 중쇄 불변 영역을 가지는 예시의 인간화된 항체 ((hPD-1 mAb 7(1.2))의 중쇄의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:265)이다:
- [1518] p158-[438]
- [1519] SEQ ID NO: 265에서, 아미노산 잔기 1 내지 119는 hPD-1 mAb 7 VH1의 VH 도메인 (SEQ ID NO: 147)에 상응하였고, 아미노산 잔기 120 내지 217은 IgG1 CH1 도메인 (SEQ ID NO: 10)에 상응하였으며, 잔기 218 내지 232는 IgG1 힌지 영역 (SEQ ID NO: 32)에 상응하였고 잔기 233 내지 448은 L234A/L235A 치환을 포함하는 IgG1 CH2-CH3 도메인 (SEQ ID NO:5)에 상응하지만 C-말단 리신 잔기가 없다.
- [1520] 전체 길이 IgG4 인간화된 항체 중쇄를 다음과 같이 구성하였다: 인간화된 VH 도메인의 C-말단을 안정화된 힌지 영역 (S228P 치환을 포함함)을 가지고 C-말단 리신 잔기가 없는 인간 IgG4 불변 영역의 N-말단에 융합시켰다 (SEQ ID NO:256):
- [1521] ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS
- [1522] GLYSLSSVVT VPSSSLGTTK YTCNVNHNKPS NTKVDKRVES KYGPPCP~~PCP~~ APEFLGGPSV
- [1523] FLFPPKPKDT LMISRTP~~PEVT~~ CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
- [1524] RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPSSQEEMTK
- [1525] NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG

- [1526] NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLG.
- [1527] SEQ ID NO:256에서, 아미노산 잔기 1 내지 98은 IgG4 CH1 도메인 (SEQ ID NO:254)에 상응하였고, 아미노산 잔기 99 내지 110은 S228P 치환 (밑줄)을 포함하는 안정화된 IgG4 힌지 영역 (SEQ ID NO:13)에 상응하였으며 아미노산 잔기 111 내지 326은 IgG4 CH2-CH3 도메인 (SEQ ID NO:4)에 상응하지만 C-말단 리신 잔기가 없다.
- [1528] S228P 돌연변이를 가지는 안정화된 힌지 영역을 포함하고 C-말단 리신 잔기가 없는 IgG4 중쇄 불변 영역을 가지는 예시의 인간화된 항체 ((hPD-1 mAb 7(1.2))의 중쇄의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:266)이다:
- [1529] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNVRQA PGQGLEWIGV IHPDSETWL
- [1530] DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLTVTSSA
- [1531] STKGPSVFP L APCSRTSES TAALGCLVKD YFPEPVTWSW NSGALTSGVH TTPAVLQSSG
- [1532] LYSLSVVTV PSSSLGTKTY TCNVDHKPSN TKVDKRVESK YGPPCP~~PC~~PA PEFLGGPSVF
- [1533] LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR
- [1534] VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSQEEMTKN
- [1535] QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQGPENNY KTTTPVLDSG GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN
- [1536] VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL SLSLG.
- [1537] SEQ ID NO:266에서, 아미노산 잔기 1 내지 119는 hPD-1 mAb 7 VH1의 VH 도메인 (SEQ ID NO:147)에 상응하였고, 아미노산 잔기 120 내지 217은 IgG4 CH1 도메인 (SEQ ID NO:254)에 상응하였으며, 아미노산 잔기 218 내지 229는 S228P 치환 (밑줄)을 포함하는 안정화된 IgG4 힌지 영역 (SEQ ID NO:13)에 상응하였고, 아미노산 잔기 230 내지 445는 IgG4 CH2-CH3 도메인 (SEQ ID NO:4)에 상응하지만 C-말단 리신 잔기가 없다.
- [1538] 전체 길이 인간화된 항체 경쇄는 다음과 같이 구성하였다: 인간화된 VL 도메인의 C-말단을 인간 경쇄 카파 영역 (SEQ ID NO:8)의 N-말단에 융합시켰다. 동일한 경쇄는 IgG1 (AA) 및 IgG4 (P) 중쇄와 쌍을 이룬다.
- [1539] 카파 불변 영역을 가지는 예시의 인간화된 PD-1 항체 (hPD-1 mAb 7(1.2))의 경쇄의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:264)이다:
- [1540] EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL LIHAASNQGS
- [1541] GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF
- [1542] IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
- [1543] STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC.
- [1544] SEQ ID NO:264에서, 아미노산 잔기 1 내지 111은 hPD-1 mAb 7 VL2 (SEQ ID NO:153)의 VL 도메인에 상응하였고, 아미노산 잔기 112 내지 218은 경쇄 카파 불변 영역 (SEQ ID NO: 8)에 상응하였다.
- [1545] 대안 불변 영역, 예를 들면 엔지니어링된 Fc 영역을 가지는 항-PD-1 항체는 상이한 불변 영역을 통합시킴으로써 및/또는 하나 이상의 아미노산 치환, 추가 또는 결실을 도입함으로써 쉽게 생성된다. 예를 들어, 이중특이적 항체가 바람직한 경우에 헤테로다имер화를 용이하게 하기 위해 노-함유 및 홀-함유 CH2-CH3 도메인이 사용된다. 쥐과의 가변 도메인 및 인간 불변 영역을 포함하는 키메라 항-PD-1 항체는 상기 기술된 바와 같이 생성된다.
- [1546] 인간화된 항체 (IgG1 (AA) 및/또는 IgG4 (P))를 상기에서 기술한 바와 같이 결합 및 차단 활성에 대하여 테스트하였다. 인간 PD-1 (shPD-1 His 및 shPD-1 hFc) 및 시노몰구스 원숭이 PD-1 (shPD-L1 hFc)에 대한 인간화된 항체의 결합은 상응하는 쥐과의 항체의 그것과 비슷하였다. 이에 더불어, 인간화된 항체는 ELISA 분석에서 인간 PD-L1의 인간 PD-1에 대한 결합을 차단하는 능력을 보유하였다.
- [1547] 쥐과의 항체 PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 15, 인간화된 항체 hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7(1.2), hPD-1 mAb 9(1.1), hPD-1 mAb 15 및 참조 항-PD-1 항체 PD-1 mAb A 및 PD-1 mAb B의 결합 동역학을 Biacore 분석을 사용하여 조사하였다. 항-PD-1 항체들을 고정된 단백질 A 상에 포획하였고 Fc 부분을 제거하기 위하여 절단된 His-태그된 가용성 인간 PD-1 (shPD-1-His) 또는 가용성 인간 시노몰구스 원숭이 PD-1 Fc 융합물 (scyno PD-1 hFc)과 인큐베이션하고, 결합의 동역학을 Biacore 분석을 통하여 측정하였다. 추가적인 연구에서 항-PD-1 항체 hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA), hPD-1

mAb 9(1.1) IgG4 (P), PD-1 mAb A IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG4 (P), PD-1 mAb B IgG1 (AA) 및 PD-1 mAb B IgG4 (P)를 고정된 F(ab)₂ 염소 항-인간 Fc 상에 포획하였고 결합 동역학을 상기 기술한 바와 같이 Biacore 분석에 의해 측정하였다. 이 연구들로부터 계산된 k_a , k_d 및 KD를 하기 표 7에 제시한다.

표 7

단백질 A 포획						
항-PD-1 항체	인간 ^a			시노몰구스 원숭이 ^b		
	k_a ($\times 10^4$)	k_d ($\times 10^{-4}$)	KD (nM)	k_a ($\times 10^4$)	k_d ($\times 10^{-4}$)	KD (nM)
PD-1 mAb A	60	18	3	14	9.6	6.9
PD-1 mAb B	140	35	2.5	37	12	3.2
PD-1 mAb 7	21	2.8	1.3	17	6	3.5
hPD-1 mAb 7(1.2)	110	4.3	0.39	37	6.4	1.7
PD-1 mAb 9	4.3	4.2	9.8	2.2	16	72.7
hPD-1 mAb 9(1.1)	1.8	6.5	36.1	1.5	11	73.3
PD-1 mAb 15	4.5	1.3	2.9	2.7	11	40.7
hPD-1 mAb 15	2.4	3.2	13.3	2.3	18	78.3
PD-1 mAb 2	5.5	5.6	10.2	4.2	6.0	14.3
hPD-1 mAb 2	3.2	1.6	5.0	2.3	3.9	17
F(ab) ₂ 염소 항-인간 Fc 포획						
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	13	8.4	6.5	8.1	4.5	5.6
PD-1 mAb A IgG4 (P)	13	7.9	6.1	8.4	5.0	6.0
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	25	28	11.2	20	6.4	3.2
PD-1 mAb B IgG4 (P)	26	25	9.6	20	7.9	4.0
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	25	3.8	1.5	16	7.8	4.9
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	27	4.1	1.5	17	7.8	4.6
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)	5.6	6.1	10.9	5.6	5.2	9.3
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)	6.1	5.8	9.5	4.9	7.4	15.1

^a His 태그된 가용성 인간 PD-1 (shPD-1 His)

^b 절단된 가용성 시노몰구스 원숭이 PD-1 (scyno PD-1 hFc)

결과는 PD-1 mAb 7 및 인간화된 hPD-1 mAb 7(1.2)이 참조 항-PD-1 항체 PD-1 mAb A 및 PD-1 mAb B에 비하여 더 나은 결합 동역학을 나타내는 것을 증명한다. PD-1 mAb 2 및 hPD-1 mAb 2는 참조 항-PD-1 항체의 약 2배 내에서 결합 동역학을 나타낸 한편, PD-1 mAb 9, hPD-1 mAb 9(1.1), PD-1 mAb 15 및 hPD-1 mAb 15는 참조 항-PD-1 항체의 약 2 내지 6배 내에서 결합 동역학을 나타낸다.

항-인간 PD-1 항체 PD-1 mAb 7의 조직 특이성을 조사하였다. 정상 조직을 PD-1 mAb 7 또는 아이소타입 대조표준 (0.313 μ g/mL)과 접촉시키고 염색 정도를 가시화하였다. 블록살(Bloxall)을 결장 조직에서 비-특이적인 무신 염색을 감소시키기 위한 내인성 효소 차단에 사용하였다. 도 10A, 패널 i 내지 xii에서 도시된 바와 같이, PD-1 mAb 7 또는 아이소타입 대조표준은 둘 다 정상 결장, 간, 폐, 췌장, 신장 및 심장 조직의 세포를 표지하지 못하였다. 이에 더불어, PD-1 mAb 7 또는 아이소타입 대조표준은 정상 피부를 염색하지 못하였다 (도 10B, 패널 i 내지 ii). 대조적으로, PD-1 mAb 7은 정상 편도선 조직 및 PD-1을 발현하는 PDCD1 트랜스펙션된 NSO 세포에 존재하는 림프구를 강하게 표지하는 것으로 발견된 한편 (도 10B, 패널 iii 및 v), 아이소타입 대조표준은 어느 것도 표지하지 못하였다 (도 10B, 패널 iv 및 vi). 그러므로 도 10A 내지 10B에 제시된 결과는 PD-1 mAb 7이 림프구 및 PD-1 발현 세포에 특이적으로 결합할 수 있었음을 나타낸다.

hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1, (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P), hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA) 및 참조 항-PD-1 항체 PD-1 mAb A 및 PD-1 mAb B의 결합 포화 프로파일을 조사하였다. 간단히 설명하면, 항-PD-1 항체, PD-1 mAb

1 내지 15의 각각 또는 참조 항-PD-1 항체 (PD-1 mAb A 및 PD-1 mAb B)를 인간 PD-1을 발현하는 NSO 세포와 (~250,000 세포/웰) 차단 완충액 (FACS + 10% 인간 혈청 알부민)에서 혼합하였다. 이 연구들을 위해 항-PD-1 항체를 50, 12.5, 3.13, 2.0 x 10⁻¹, 4.9 x 10⁻², 1.2 x 10⁻², 3.0 x 10⁻³, 1.9 x 10⁻⁴, 7.6 x 10⁻⁴, 4.75 x 10⁻⁵ 또는 1.19 x 10⁻⁵ µg/테스트 (4배 연속 희석)로 이용하였다. NSO 세포의 표면에 결합하는 항체의 양을 염소 항-인간-APC 이차 항체를 사용하여 FACS 분석에 의해 측정하였다. 대표적인 포화 곡선을 도 11에 나타낸다. EC50 및 EC90 값을 측정하고 별도의 4개의 실험으로부터의 샘플 평균 (SM) 및 표준 편차 (SD σ)를 하기 표 8에 제시한다.

표 8

[1554]

	포화 결합			
	EC50 (µg/테스트)		EC90 (µg/테스트)	
항-PD-1 항체	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	0.1991	0.1309	1.4528	0.8040
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0.1581	0.1161	1.5464	1.7690
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	0.1347	0.0681	1.3917	0.9573
PD-1 mAb B IgG4 (P)	0.1398	0.0951	1.1619	1.2681
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	0.4431	0.1997	2.4374	1.2637
hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)	0.1069	0.0500	0.9102	0.5476
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	0.1872	0.1553	0.6810	0.3226
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0.1376	0.0926	0.6609	0.3437
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)	0.3123	0.2291	1.6486	0.9117
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)	0.5128	0.2228	3.0563	0.9437
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	0.2927	0.1333	2.0640	0.6096

[1555]

결합 포화 연구들은 PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 및 PD-1 mAb 15의 인간화된 버전이 세포 표면 PD-1에 대한 결합에 대해 선호하는 프로파일을 가진 것을 입증한다. 특히, IgG1 (AA) 또는 IgG4 (P) Fc 영역 중 어느 하나를 가지는 인간화된 PD-1 mAb 7 (hPD-1 mAb 7(1.1) 및 hPD-1 mAb 7(1.2))는 조사된 모든 항체 중에서 가장 낮은 EC90 값을 가진다.

[1556]

인간화된 항-PD-1 항체 hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1, (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P) 및 hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)를 한층 더 특성화하기 위하여, NSO 세포의 표면에서 발현된 PD-1에 대한 인간 PD-L1 (shPD-L1) 및 인간 PD-L2 (shPD-L2)의 결합을 차단하는 능력을 조사하였다. 이 분석들은 본질적으로 상기에서 기술된 바와 같이 수행하였다. NSO 세포에서 발현된 PD-1에 대한 shPD-L1 및 shPD-L2 결합의 억제에 대한 대표적인 곡선을 각각 도 12A 및 12B에 도시한다. EC50 및 IC90 값을 측정하고 별도의 3개의 실험으로부터의 샘플 평균 (SM) 및 표준 편차 (SD σ)를 하기 표 9에 제시한다.

표 9

[1557]

	sPD-L1				sPD-L2			
	IC50 (µg/테스트)		IC90 (µg/테스트)		IC50 (µg/테스트)		IC90 (µg/테스트)	
항-PD-1 항체	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	0.0203	0.0089	0.2985	0.3279	0.0414	0.0124	0.1601	0.066
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0.0156	0.0096	0.0776	0.0208	0.0280	0.0070	0.1594	0.1153
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	0.0148	0.0008	0.1034	0.0100	0.0280	0.0059	0.1190	0.060
PD-1 mAb B IgG4 (P)	0.0143	0.0013	0.0798	0.0239	0.0280	0.0055	0.0924	0.0065
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	0.0578	0.0124	0.2480	0.050	0.1294	0.0143	0.3813	0.0656
hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)	0.0166	0.0032	0.0674	0.0041	0.0283	0.0147	0.0886	0.0166

hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	0.0118	0.0027	0.0678	0.0031	0.0212	0.0031	0.0672	0.0043
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0.0103	0.0023	0.0520	0.0033	0.0213	0.0019	0.0616	0.0063
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)	0.0593	0.0036	0.3238	0.0508	0.4002	0.5000	0.4573	0.1805
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)	0.0460	0.0118	0.2461	0.0513	0.1105	0.0146	0.2914	0.0526
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	0.0440	0.0092	0.2068	0.035	0.0945	0.0022	0.3093	0.0588

[1558] 리간드 결합 억제 연구는 PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 및 PD-1 mAb 15의 인간화된 버전이 세포 표면의 PD-1에 대한 sPD-L1 및 sPD-L2의 결합을 억제할 수 있음을 입증한다. 특히, 인간화된 PD-1 mAb 7 (hPD-1 mAb 7(1.1) 및 hPD-1 mAb 7(1.2))은 조사된 모든 항체의 가장 낮은 IC90 값을 가진다.

[1559] 실시예 3

[1560] 인간화된 항-인간 PD-1 항체에 의한 PD-1/PD-L1 체크포인트의 차단

[1561] hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1, (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P), hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA) 및 참조 항-PD-1 항체 PD-1 mAb A 및 PD-1 mAb B가 PD-1/PD-L1 축을 길항하는 (즉 PD-1/PD-L1 상호작용을 차단하고 T-세포 반응의 하향-조절을 방지하는) 능력을 Jurkat-luc-NFAT/ CHO-PD-L1 루시페라제 리포터 분석으로 조사하였다. 간단히 설명하면, PD-L1 (CHO/PD-L1)을 발현하는 CHO 세포를 100 μ L의 배양 배지 (RPMI + 10% FBS + 100 μ g/mL 하이그로마이신 B + 100 μ g/mL G418)에 40,000/웰로 플레이팅하고 밤새 인큐베이션하였다. 다음날 배지를 제거하고 MNFAT-luc2/PD-1 Jurkat 세포 (Promega)를 50,000 세포/웰로 40 μ L의 분석 완충액 (RPMI + 2% FBS)에 넣고 항-PD-1 항체 PD-1 mAb 1 내지 15 또는 참조 항-PD-1 항체 (PD-1 mAb A 및 PD-1 mAb B) (0 내지 25 μ g/mL; 분석 완충액에 8회의 2.5배 연속 희석)를 각 웰에 추가하고 6시간 동안 37°C에서 인큐베이션한 후 5 내지 10분 동안 주변 온도에서 인큐베이션하였다. 다음에 80 μ L의 BioGlo 기질 (Promega)을 각 웰에 추가하고 플레이트를 추가의 5 내지 10분 동안 주변 온도에서 인큐베이션한 후, 발광을 Victor 플레이트 판독기에서 측정하였다. 대표적인 포화 곡선을 도 13에 도시한다. EC50 및 EC90 값을 측정하고 별도의 4개의 실험으로부터의 샘플 평균 (SM) 및 표준 편차 (SD σ)를 하기 표 10에 제시한다.

표 10

[1562]

항-PD-1 항체	리포터 신호전달			
	EC50 (μ g/테스트)		EC90 (μ g/테스트)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	0.2549	0.0480	2.4474	1.2228
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0.2049	0.0719	2.5535	1.2139
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	0.2119	0.1781	2.2036	2.0118
PD-1 mAb B IgG4 (P)	0.1142	0.0323	0.9418	0.2863
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	0.3539	0.0983	3.8975	2.0054
hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)	0.1080	0.0386	1.1992	0.5103
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	0.0944	0.0153	0.6452	0.2615
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0.0965	0.0169	0.6885	.01858
hPD-1 mAb 9 IgG1 (AA)	0.2835	0.0530	2.9968	0.8866
hPD-1 mAb 9 IgG4 (P)	0.3154	0.0872	5.0940	4.0496
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	0.2585	0.0592	3.3138	1.0532

[1563] 리포터 신호전달 연구는 PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 및 PD-1 mAb 15의 인간화된 버전이 PD-1/PD-L1 축을 차단하고 T-세포 반응의 하향-조절을 방지할 것임을 입증한다. 특히, IgG1 (AA) 또는 IgG4 (P) Fc 영역 중 어느 하나를 가지는 인간화된 PD-1 mAb 7 (hPD-1 mAb 7(1.1) 및 hPD-1 mAb 7(1.2))가 가장 낮은 EC50/EC90 값을 가진다.

[1564] 실시예 4

[1565] 항-인간 PD-1 항체의 기능적 활성

[1566] 스타필로코쿠스 아우레우스 장독소 B형 (SEB)은 SEB-반응성 도너에서 T-세포의 큰 집단 (5 내지 30%)을 활성화 할 수 있는 미생물의 수퍼항원이다. SEB는 펩타이드 결합 그로브 밖에서 MHC II에 결합하고, 그러므로 MHC II 의존적이지만, 제한받지 않으며 TCR 매개된다. T-세포의 SEB-자극은 올리고클론성 T-세포 증식 및 사이토카인 생성을 초래한다 (비록 도너의 가변성이 관찰되고 일부 도너는 반응하지 않을 것이지만). SEB-자극 후 48시간 이내에 PMBC는 PD-1과 LAG-3을 상향 조절하고 이때 96-웰 플레이트에서 SEB-자극으로 이차 배양 후 5일 제에 추가의 향상이 보인다. PMBC의 SEB-자극 후 면역 체크 포인트 단백질 PD-1 및 LAG-3의 상향조절은 제자극시 사이토카인 방출을 제한한다. 항-PD-1 항체 단독 및 항-LAG-3 항체와 조합되었을 때의 체크포인트 억제를 통한 사이토카인 방출을 향상시키는 능력을 조사하였다.

[1567] 간단히 설명하면, PMBC를 Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) 밀도 구배 원심분리 방법을 사용하여 제조자의 설명서를 따라 건강한 도너 (Biological Specialty Corporation)로부터의 서면 동의하에 얻어진 전혈로부터 정제한 다음 T 세포를 Dynabeads® Untouched T 세포 키트 (Life Technologies)를 사용하여 제조자의 설명서를 따라 정제하였다. 정제된 PMBC를 T-25 벌크 플라스크 중의 RPMI-배지 + 10% 열 비활성화 FBS + 1% 페니실린/스트렙토마이신에서 2 내지 3일 동안 단독으로 또는 0.1 ng/mL의 SEB (Sigma-Aldrich)와 함께 (일차 자극) 배양하였다. 제1 라운드의 SEB-자극이 끝났을 때 PMBC를 PBS로 2회 세척하고 즉시 96-웰 조직 배양 플레이트에 1 내지 5×10^5 세포/웰의 농도로 배지 단독에, 대조표준 또는 항-PD-1 항체가 들어있는 배지에, 0.1 ng/mL의 SEB (이차 자극)이 있으며 항체가 없는 배지에, 또는 SEB와 대조 IgG 또는 항-PD-1 항체 +/- an 항-LAG-3 mAb가 들어있는 배지에 플레이팅한 후, 추가의 2 내지 3일 동안 배양하였다. 이차 자극이 끝났을 때, 상층액을 수득하여 IFN γ , TNF α , IL-10 및 IL-4 (R&D Systems)에 대한 인간 DuoSet ELISA 키트를 사용하여 제조자의 지시를 따라 사이토카인 분비를 측정하였다.

[1568] PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 및 PD-1 mAb 15가 단독으로, 또는 특유한 항-LAG-3 항체 LAG-3 mAb 1과 함께 체크포인트 억제를 통해 사이토카인 방출을 향상시키는 능력을 조사하였다. 이 연구들은 또한 다음 참조 항-PD-1 항체 중 하나 이상을 단독으로 또는 조합하여 포함하였다: PD-1 mAb A; PD-1 mAb B; 및 LAG-3 mAb A. **도 14**는 다음으로 처리된, 대표적으로 반응하는 도너 (D:38941)로부터의 SEB-자극된 (0.1 ng/mL) PMBC로부터의 IFN γ 분비 프로파일을 나타낸다: 항체 없음; 아이소타입 대조표준 항체; PD-1 mAb 7 및/또는 LAG-3 mAb 7; PD-1 mAb 9 및/또는 LAG-3 mAb 1; PD-1 mAb 15 및/또는 LAG-3 mAb 1; PD-1 mAb 2 및/또는 LAG-3 mAb 1; 또는 참조 항-PD-1 항체 PD-1 mAb B 및/또는 LAG-3 mAb A (항체들은 10 μ g/mL로 사용하였다).

[1569] 추가의 연구에서 인간화된 버전의 PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 및 PD-1 mAb 15 (인간 IgG1 (AA) 또는 인간 IgG4 (P) Fc 영역을 포함함)와, 뿐만 아니라 참조 항-PD-1 항체 PD-1 mAb A 및 PD-1 mAb B의 체크포인트 억제를 통해 사이토카인 방출을 향상시키는 능력을 조사하였다. 이 연구들에 대해 항체를 0.625, 2.5, 및 10 μ g/mL로 이용하였다. **도 15A 내지 15B**는 항체로 처리되지 않았거나 다음 항체들 중 하나로 처리된, 대표적인 반응 도너 (D:57709)로부터의 SEB-자극된 (0.2 ng/mL) PMBC로부터의 IFN γ (**도 15A**) 및 TNF α (**도 15B**) 분비 프로파일을 나타낸다: 아이소타입 대조표준; hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA); hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA); hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P); hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA); hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P); hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA); 또는 참조 항-PD-1 항체 PD-1 mAb A IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG4 (P), PD-1 mAb B IgG1 (AA), PD-1 mAb B IgG4 (P). SEB+Ab로 처리된 샘플의 IFN γ 의 총 pg/mg을 0.625, 2.5 및 10 μ g/mL의 항-PD-1 항체로 처리한 샘플에 대해 측정하였고, 3개의 상이한 반응 도너로부터의 샘플 평균 (SM) 및 표준 편차 (SD σ) (표시된 경우 제외함)를 **표 11**에 제시한다. 참조 항-PD-1 항체 PD-1 mAb A 및 PD-1 mAb B (즉 인간화된 항-PD-1/PD-1 mAb A 및 인간화된 항-PD-1/PD-1 mAb B)를 능가하는, 인간화된 버전의 PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 및 PD-1 mAb 15 (인간 IgG1 (AA) 또는 인간 IgG4 (P) Fc 영역을 포함함)로 처리된 샘플에서 분비된 IFN γ 의 비율을 각각 **표 12** 및 **표 13**에 제시한다.

표 11

[1570]

μ g/mL 항-PD1 항체	IFN γ 분비 (pg/mL)					
	0.625 μ g/mL		2.5 μ g/mL		10 μ g/mL	
항-PD-1 항체	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	221.18	110.89	341.13	247.93	347.46	144.72
PD-1 mAb A IgG4 (P)	281.36	132.65	495.15	190.57	399.41	117.56
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	366.69	196.64	387.682	215.51	387.32	282.81

PD-1 mAb B IgG4 (P)	348.40	185.96	433.382	163.23	551.68	125.08
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	302.05	185.71	610.70	209.77	414.63	272.65
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	384.57 ‡	323.79 ‡	411.40	398.59	370.06	108.12
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)	340.81	207.76	442.598	303.70	655.29	567.91
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)	309.82	130.30	468.62	350.15	424.35	288.95
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	360.00	274.28	373.32	160.25	541.83	444.22
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	275.88	135.23	372.73	53.53	496.70	235.37
대조표준 IgG	137.14	76.61	100.65	48.67	138.10	120.81
항체 없음	120.05	73.90	120.05	73.90	109.46	85.18

[1571] ‡ 반응하는 두 도너로부터의 결과

표 12

[1572]

	IFN γ 분비 비율 (새로운 항-PD-1/PD-1 mAb A)					
μ g/mL 항-PD1 항체	0.625 μ g/mL		2.5 μ g/mL		10 μ g/mL	
항-PD-1 항체	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00
PD-1 mAb A IgG4 (P)	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	1.77	0.92	1.28	0.36	1.07	0.42
PD-1 mAb B IgG4 (P)	1.23	0.16	0.92	0.27	1.40	0.12
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	1.36	0.37	2.46	1.85	1.17	0.41
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	1.20 ‡	0.35 ‡	0.79	0.54	0.95	0.22
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)	1.48	0.19	1.46	0.71	1.70	0.84
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)	1.13	0.13	0.91	0.42	1.02	0.46
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	1.50	0.39	1.51	1.23	1.48	0.71
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	1.32	0.53	1.48	0.86	1.42	0.12
대조표준 IgG	0.63	0.2	0.33	0.08	0.39	0.24
항체 없음	0.54	0.12	0.39	0.14	0.31	0.17

[1573] ‡ 반응하는 두 도너로부터의 결과

표 13

[1574]

	IFN γ 분비 비율 (새로운 항-PD-1/PD-1 mAb B)					
μ g/mL 항-PD1 항체	0.625 μ g/mL		2.5 μ g/mL		10 μ g/mL	
항-PD-1 항체	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	0.37	0.37	0.82	0.20	1.06	0.48
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0.82	0.12	1.16	0.38	0.72	0.07
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	1.0	0.00	1.0	0.00	1.0	0.00
PD-1 mAb B IgG4 (P)	1.0	0.00	1.0	0.00	1.0	0.00
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	0.84	0.22	1.77	0.81	1.11	0.07
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0.91 ‡	0.26 ‡	0.83	0.50	0.68	0.17
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA)	1.04	0.59	1.12	0.29	1.60	0.42
hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P)	0.92	0.09	0.99	0.36	0.75	0.39
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	1.01	0.48	1.07	0.57	1.34	0.15
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	0.78	0.12	1.10	0.38	1.46	0.53
대조표준 IgG	0.39	0.08	0.27	0.08	0.34	0.13
항체 없음	0.34	0.11	0.31	0.03	0.28	0.08

[1575] ‡ 반응하는 두 도너로부터의 결과

[1576] 이 연구들의 결과는 PD-1 항체 PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 및 PD-1 mAb 15가 제자극시 SEB-자극된 PBMC로부터 IFN γ (도 14 및 15A 및 표 11 내지 13) 및 TNF α (도 15B)를 극적으로 향상시켰음을 입증한다. 이에 더불어, 항-PD-1 항체와 항-LAG-3 항체의 조합은 제자극시 SEB-자극된 PBMC로부터의 사이토카인 방출의 추가

의 향상을 초래하였다 (도 14). 특히, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 또는 PD-1 mAb 15와 특유한 항-LAG-3 항체 LAG-3 mAb 1과의 조합이 가장 큰 향상을 제공하였다.

[1577] 실시예 5

[1578] PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자 결합 연구

[1579] 3, 4 및 5개의 사슬 및 이중특이적 항체를 포함하는 Fc 영역-함유 디아바드를 포함하여, 여러 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자를 생성하였다. 4개의 사슬을 가지며 E/K-코일 헤테로다이머-촉진 도메인을 포함하는 4개의 디아바드를 생성하고 표시 "DART A" "DART B" "DART C" 및 "DART I"를 부여하였다. 4개의 사슬을 가지며 CH1/CL 도메인을 포함하는 4개의 디아바드를 생성하였고 표시 "DART D" "DART E" "DART J" 및 "DART 1"을 부여하였다. 5개의 사슬을 가지며 E/K-코일 헤테로다이머-촉진 도메인 및 CH1/CL 도메인을 포함하는 2개의 디아바드를 생성하고 표시 "DART F" 및 "DART G"를 부여하였다. 3개의 사슬을 가지며 E/K-코일 헤테로다이머-촉진 도메인을 포함하는 한 디아바드를 생성하였고 표시 "DART H"를 부여하였다. 4개의 사슬을 가지는 하나의 이중특이적 항체를 생성하였고 표시 "BSAB A"를 부여하였다. 이 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들의 구조 및 아미노산 서열을 상기에서 제공하였고 하기 표 14에서 요약한다.

표 14

명칭	모 mAbs	Fc γ	사슬	SEQ ID NO:	다른 성분
DART A	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG4 (YTE)	4	267 (X ₁ =A; X ₂ =Y; X ₃ =T; X ₄ =E) 및 268	E/K-코일; 도 3B 참조
DART B	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.3)	IgG4 (YTE)	4	267 (X ₁ =G; X ₂ =Y; X ₃ =T; X ₄ =E) 및 268	E/K-코일; 도 3B 참조
DART C	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.3)	IgG4	4	267 (X ₁ =G; X ₂ =M; X ₃ =S; X ₄ =T) 및 268	E/K-코일; 도 3B 참조
DART D	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG4 (YTE)	4	269 및 270	CL/CH1; 도 3C 참조
DART E	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG4 (YTE)	4	271 및 272	CL/CH1; 도 3C 참조
DART F	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG1 (AA/ YTE)	5	273, 274, 275 및 276	CL/CH1 및 E/K-코일; 도 5 참조
DART G	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG1 (AA/ YTE)	5	277, 278, 279 및 280	CL/CH1 및 E/K-코일; 도 5 참조
DART H	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG1 (AA)	3	281, 282 및 283	E/K 코일; 도 4A 참조
DART I	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 6(1.1)	IgG4 (YTE)	4	290 및 291	E/K-코일; 도 3B 참조
DART J	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 6(1.1)	IgG4 (YTE)	4	292 및 293	CL/CH1; 도 3C 참조
DART 1	PD-1 mAb A LAG-3 mAb A	IgG1 (AA)	4	284 및 285	CL/CH1; 도 3C 참조
BSAB A	hPD-1 mAb 7(1.2) hLAG-3 mAb 1(1.4)	IgG1 (AA)	4	286, 287, 288 및 289	전하 엔지니어링된 Fc 영역을 가지는 mAb

[1581] ‡ IgG4 Fc 영역을 통합시키는 분자들은 또한 안정화된 IgG4 힌지 영역을 통합시킨다.

[1582] 대안 PD-1 및/또는 LAG-3 에피토프-결합 부위를 포함하는 추가의 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들은 상이한 VH 및 VL 도메인을 통합시킴으로써 쉽게 생성될 수 있다. 유사하게, LAG-3 이외의 항원을 결합하는 분자들은 원하는 특이성을 가지는 VH 및 VL을 통합시킴으로써 생성될 수 있다.

[1583] PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바드 구성물: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I 및 DART 1; 항-PD-1 항체: hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG1 (AA) 및 PD-1 mAb A IgG4 (P); 및 항-LAG-3 항체: hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4 (P), LAG-3 mAb A IgG4 (P), hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG1 (AA) 및 LAG-3 mAb A IgG1 (AA)의 결합 포화 프로파일을 본질적으로 상기에서 기술한 바와 같이 조사하였다. PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바드 구성물을 PD-1 및 LAG-3 결합 둘 다에 대해 테스트하는 한편,

항-PD-1 및 항-LAG-3 항체는 단지 그것들의 각각의 항원에 대한 결합에 대해서만 테스트하였다. 이 연구들에 대해 PD-1 또는 LAG-3을 발현하는 NS0 세포를 이용하였다. 디아바디 및 항체를 170.0 내지 0.013 μM 또는 85.0 내지 0.0021 μM (4배 연속 희석)로 이용하였다. EC50 및 EC90 값을 측정하고 하기 표 15 및 표 16에 제시한다. 둘 이상의 별도의 실험을 수행한 경우에 샘플 평균 (SM) 및 표준 편차 (SD σ)를 제시한다.

표 15

분자	포화 결합 PD-1			
	EC50 (μM)		EC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	1.9297	0.4324	9.6027	0.4801
DART B	1.7640 §		12.2700 §	
DART D	2.2267	0.4140	10.9313	2.6351
DART E	3.2180	0.5742	23.840	3.2385
DART F	1.4320 §		14.5800 §	
DART G	1.1488	0.6227	3.4220	2.4600
DART H	4.5310 §		22.6600 §	
DART I	1.3232	0.4890	7.8135	4.0821
DART 1	2.1329	1.4850	13.8113	9.0256
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	1.2083	0.8112	3.9340	1.8746
PD-1 mAb A IgG4 (P)	2.3470	1.2362	22.7770	15.0690
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)	1.0879	0.3958	7.4153	3.0794
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1.6733	0.5464	9.9543	6.6569

§ 단일 실험으로부터의 결과

표 16

분자	포화 결합 LAG-3			
	EC50 (μM)		EC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	0.8402	0.2231	4.4448	2.4770
DART B	1.0750 §		9.8580 §	
DART D	0.8985	0.5326	5.7967	4.7329
DART E	0.9250	0.8075	5.6450	5.6809
DART F	5.0090	0.5770	19.3350	4.7447
DART G	0.9396	0.3045	8.5507	4.7448
DART H	2.3840 §		9.7810	4.2412
DART I	0.5321	0.0547	4.198	3.2188
DART 1	20.0233	2.1454	115.97	15.2425
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4 (P)	1.0057	0.1969	5.1360	4.7904
LAG-3 mAb A IgG4 (P)	0.5968	0.1376	2.0833	0.3244
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG1 (AA)	0.6069	0.3430	3.6373	2.4762
LAG-3 mAb A IgG1 (AA)	0.4523	0.1660	2.0187	0.7035

§ 단일 실험으로부터의 결과

결합 포화 연구는 PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디 구성물이 PD-1에 대한 결합을 보유하고 모 항-PD-1 항체의 결합 프로파일에 유사한 결합 프로파일을 가지는 것을 입증한다. 유사하게, PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디 구성물은 LAG-3에 대한 결합을 보유하며, 이때 DART 1은 예외이고, 모 항-LAG-3 항체의 결합 프로파일에 유사한 결합 프로파일을 가진다.

실시예 6

PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자 억제 연구

PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, DART 1

및 BSAB A; 및 항-PD-1 항체: hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG1 (AA) 및 PD-1 mAb A IgG4 (P)가 NSO 세포 표면에 발현된 PD-1에 대한 인간 PD-L1 (shPD-L1) 및 인간 PD-L2 (shPD-L2)의 결합을 차단하는 능력을 본질적으로 상기에서 기술한 바와 같이 조사하였다. 디아바디 및 항체를 33.75 내지 0.002 μM 또는 107.5 내지 0.0001 μM (4배 연속 희석)로 이용하였다.

[1592] IC50 및 IC90 값을 측정하고 하기 표 17에 제시한다. 둘 이상의 별도의 실험을 수행한 경우에 샘플 평균 (SM) 및 표준 편차 (SD σ)를 제시한다.

표 17

[1593]

분자	차단 sPD-L1/PD-1 결합				차단 sPD-L2/PD-1 결합			
	IC50 (μM)		IC90 (μM)		IC50 (μM)		IC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	0.9645	0.1485	5.6312	1.5247	1.6273	0.4285	6.9335	3.9849
DART B	1.1515	0.0007	4.8615	0.2199	2.1150	0.3154	7.9550	0.0933
DART D	1.5548	0.1692	7.8950	2.5135	3.1255	0.5869	9.2973	5.5426
DART E	1.6533	0.3307	7.8470	1.1642	2.9460	0.7736	6.6135	0.0177
DART F	0.5697	0.1729	2.0360	0.1174	0.8389	0.0846	1.7995	0.2171
DART G	1.6013	0.3581	8.1953	1.5708	2.5540	0.7891	7.4810	0.2333
DART H	3.3950	0.1018	18.640	9.5742	6.2065	3.6847	29.395	3.8679
DART I	0.8363	0.1302	5.3115	0.3125	1.286	0.3125	6.2485	1.3951
DART 1	1.7467	0.3097	5.4533	1.0214	2.8355	1.8250	7.2735	3.9831
BSAB A	2.1590	0.3097	11.075	0.8132	4.8775	0.5438	15.580	1.3294
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0.5186	0.1668	3.8050	1.2227	1.0425	0.2563	3.4880	0.5459
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0.9209	0.3256	4.3023	0.7069	1.3859	0.3882	5.1675	0.2943
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1(AA)	0.7320	0.2337	3.2048	1.1479	0.9769	0.2893	2.8437	1.4801
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1.0765	0.2393	5.2775	0.9933	1.9510	0.8814	5.0880	1.3831

[1594] 리간드 결합 억제 연구는 PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디 구성물이 세포 표면에서 PD-1에 대한 sPD-L1 및 sPD-L2의 결합을 억제하는 능력을 보유한 것을 입증한다.

[1595] 이에 더불어, PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, DART 1 및 BSAB A; 및 항-LAG-3 항체: hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4 (P), LAG-3 mAb A IgG4 (P), hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG1 (AA) 및 LAG-3 mAb A IgG1 (AA)가 Daudi 세포 표면 상에서 천연 MHC 클래스 II에 대한 인간 LAG-3의 결합을 차단하는 능력을 조사하였다. 간단히 설명하면, PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자 및 대조표준 항-LAG-3 항체를 각각 비오틴화된-가용성 인간 LAG-3-Fc 융합 단백질 (shLAG-3), (0.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서)과 혼합하고, 별도로 MHC II-포지티브 Daudi 세포 (2.5×10^6 세포)와 함께 인큐베이션하였다. Daudi 세포의 표면에 대한 LAG-3 결합의 양을 PE-컨쥬게이트된 스트렙타아비딘 이차 항체를 사용하여 FACS 분석에 의해 측정하였다. 디아바디 및 항체를 27.5 내지 0.026 μM (2배 연속 희석) 또는 107.5 내지 0.0001 μM (4배 연속 희석) 또는 35 내지 0.002 μM (4배 연속 희석)로 이용하였다.

[1596] IC50 및 IC90 값을 측정하고 하기 표 18에 제시한다. 둘 이상의 별도의 실험을 수행한 경우에 샘플 평균 (SM) 및 표준 편차 (SD σ)를 제시한다.

표 18

[1597]

분자	차단 shLAG-3/MHC 클래스 II 결합			
	EC50 (μM)		EC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	1.3835	1.6465	8.396102	8.3962
DART B	0.4081	0.1104	3.0645	0.3924
DART D	1.1843	1.1398	8.0041	7.3317
DART E	3.2706	2.9177	28.9683	24.1694

DART F	1.5347	1.2674	10.3920	11.2555
DART G	2.0618	3.3552	11.4422	12.4964
DART H	2.8967	4.9817	17.2533	21.1420
DART I	0.4864	0.1549	2.339	1.1780
DART 1	15.9610	14.0883	87.1486	109.533
BSAB A	0.7101	0.0571	7.2470	1.0706
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4 (P)	0.4815	0.2176	3.4837	1.7564
LAG-3 mAb A IgG4 (P)	0.7011	0.1900	2.4232	0.3481
hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG1 (AA)	0.3637	0.1409	9.4422	7.9319
LAG-3 mAb A IgG1 (AA)	0.5923	0.3407	2.1451	1.1139

[1598] 리간드 결합 억제 연구는 PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디 구성물이 세포 표면에서 MHC 클래스 II에 대한 shLAG-3-Fc 융합 단백질의 결합을 억제하는 능력을 보유한 것을 입증한다. DART 1의 예외로, PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자가 모 항-LAG-3 항체와 유사한 억제 프로파일을 가진다.

[1599] 실시예 7

[1600] PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자에 의한 PD-1/PD-L1 체크포인트의 차단

[1601] PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, DART 1 및 BSAB A; 및 항-PD-1 항체: hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG1 (AA) 및 PD-1 mAb A IgG4 (P)가 PD-1/PD-L1 축을 길항하는 (즉 PD-1/PD-L1 상호작용을 차단하고 T-세포 반응의 하향-조절을 방지하는) 능력을 본질적으로 상기에서 기술된 바와 같이 Jurkat-luc2-NFAT/CHO-PD-L1 루시페라제 리포터 분석으로 (CHO/PD-L1 세포 및 MNFAT-luc2/PD-1 Jurkat 세포를 사용하여) 조사하였다. 디아바디 및 항체를 100 내지 0.0065 μ M (4배 연속 희석) 또는 100 내지 0.0013 μ M (5배 연속 희석)로 이용하였다.

[1602] IC50 및 IC90 값을 측정하고 하기 표 19에 제시한다. 둘 이상의 별도의 실험을 수행한 경우에 샘플 평균 (SM) 및 표준 편차 (SD σ)를 제시한다.

표 19

[1603]

분자	리포터 신호전달			
	IC50 (μ M)		IC90 (μ M)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	0.8804	0.1949	7.9115	1.3232
DART B	1.079	0.1535	7.5413	3.1483
DART D	1.4044	0.2584	12.0786	3.6616
DART E	1.4060	0.1222	13.7867	1.4981
DART F	0.3404	0.0103	1.8710	0.481
DART G	0.6914	0.0206	4.2090	0.7331
DART H	36.6167	20.8078	968.300	811.8471
DART I	1.3335	0.3641	12.146	6.8787
DART 1	11.8807	3.4905	1048.2000	1508.9992
BSAB A	9.7825	1.0288	113.3350	22.2951
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0.6460	0.3035	6.0736	2.5513
PD-1 mAb A IgG4 (P)	1.328	0.7439	16.5138	9.7149
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1(AA)	0.5214	0.1541	4.7592	2.1044
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1.4514	1.0049	35.7382	40.9858

[1604] 리포터 신호전달 연구는 대부분의 PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디 구성물이 세포 표면에서 PD-1에 대한 sPD-L1의 결합을 억제하는 능력을 보유한 것을 입증한다. 사가(tetravalent) PD-1 x LAG-3 이중특이적 디아바디 구성물, DART A, DART B, DART D, DART-E, DART F, DART G 및 DART I는 이 분석에서 가장 강력한 억제제였다. PD-L2 리포터 분석으로 조사한 이 이중특이적 구성물 중 여럿에 대해 유사한 결과를 얻었다.

[1605] 실시예 8

[1606] PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들의 기능적 활성

- [1607] PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들이 체크포인트 억제제를 통해 사이토카인 방출을 향상시키는 능력을, 표기된 것을 제외하고 본질적으로 상기에서 기술된 바와 같이 재자극시 SEB-자극된 PBMC에서 조사하였다.
- [1608] 초기 연구에서 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들: DART A, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H; 및 항-PD-1 및 항-LAG 항체: PD-1 mAb A IgG4 (P) 및 LAG-3 mAb A IgG4 (P)가 단독으로 또는 조합하여, 체크포인트 억제제를 통해 사이토카인 방출을 향상시키는 능력을 조사하였다. 이 분석에서 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들 및 항체를 3.125, 12.5 또는 50 nM의 총 농도로 사용하였고 PBMC를 0.2 ng/mL의 SEB (이전 연구에서는 0.1 ng/mL로 사용함)로 자극하였다. 이 연구들에 대해, 항체 조합을 사용한 경우에 각 항체는 총 농도의 절반으로 제공하였다 (즉 1.563, 6.25 또는 25 nM). **도 16A 및 16B**는 두 대표적인 반응하는 도너, D: 35644 및 D: 59697로부터의 각각의 SEB-자극된 PBMC로부터의 IFN γ 분비 프로파일을 나타낸다.
- [1609] 주지한 바와 같이, 모든 도너가 0.1 또는 0.2 ng/mL에서 SEB에 반응하지는 않았다. 더 많은 수의 도너로부터의 PBMC의 SEB 자극을 향상시키기 위하여 SEB를 추가의 연구에서는 85 ng/mL의 고농도 또는 0.5 ng/mL의 중간 농도에서 사용하였다. 이 농도들에서 도너 대 도너 가변성이 여전히 나타날 수 있지만, SEB 자극은 더 많은 도너에 걸쳐 더 왕성하다.
- [1610] 한 연구에서 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들: DART A, DART B; 항-PD-1 항체: hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P); 항-LAG-3 항체: LAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P); 및 PD-1 mAb A IgG4 (P)와 LAG-3 mAb A IgG4 (P)의 조합이 체크포인트 억제제를 통해 사이토카인 방출을 향상시키는 능력을 조사하였다. 이 분석들에서 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들 및 항체를 0.019, 0.078, 0.3125, 1.25, 5 또는 20 nM의 총 농도로 사용하였고 PBMC를 85 ng/mL의 SEB로 자극하였다. 이 분석을 위해 항체의 조합을 사용하는 경우 각 항체를 표시된 농도로 제공하였고 그로써 총 항체 농도는 각 항체에 대해 사용된 농도의 2배이다 (즉 0.038, 0.156, 0.625, 2.5, 10 또는 40 nM). **도 17A 및 17B**는 두 대표적인 도너, D: 55515 및 D: 54024로부터의 SEB 자극된 PBMC로부터의 IFN γ 분비 프로파일을 나타낸다.
- [1611] 또 다른 연구에서 체크포인트 억제제를 통해 사이토카인 방출을 향상시키기 위하여 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들: DART A, DART B, DART C; 항-PD-1 항체: hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P); 항-LAG-3 항체: LAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P); PD-1 mAb A IgG4 (P)와 LAG-3 mAb A IgG4 (P)의 조합을 조사하였다. 이 분석들에서 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들 및 항체들은 0.048, 0.195, 0.78, 3.125, 12.5 또는 50 nM의 총 농도로 사용하였고 PBMC를 0.5 ng/mL의 SEB로 자극하였다. 이 연구들을 위해, 항체 조합이 사용되는 경우에 각 항체는 총 농도의 절반으로 제공된다 (즉 0.024, 0.098, 0.39, 1.563, 6.25 또는 25 nM). **도 18A 및 18B**는 두 대표적인 도너, D: 20990 및 D: 54947로부터의 SEB-자극된 PBMC로부터의 IFN γ 분비 프로파일을 나타낸다.
- [1612] 추가의 연구로, 사이토카인 IL-2의 방출을 조사하였다. 구체적으로, 체크포인트 억제제를 통해 사이토카인 방출을 향상시키기 위하여 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들: DART D, DART H; 항-PD-1 항체: PD-1 mAb A IgG4 (P), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P); 항-LAG-3 항체: LAG-3 mAb A IgG4 (P) 및 LAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P); 및 PD-1 mAb A IgG4 (P) 및 LAG-3 mAb A IgG4 (P), 그리고 hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P) 및 LAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P)의 조합을 조사하였다. 이 분석들에서 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들 및 항체들은 3.125, 12.5 또는 50 nM의 총 농도로 사용하였고 PBMC를 85 ng/mL의 고농도의 SEB로 자극하였다. 이 연구들을 위해, 항체 조합이 사용되는 경우에 각 항체는 총 농도의 절반으로 제공된다 (즉 1.563, 6.25 또는 25 nM). **도 19**는 대표적인 도너 (D: 54024)로부터의 SEB-자극된 PBMC로부터의 IL-2 분비 프로파일을 나타낸다.
- [1613] 추가의 연구에서 체크포인트 억제제를 통해 사이토카인 방출을 향상시키기 위하여 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들: DART B 및 DART I; 항-PD-1 항체: PD-1 mAb A IgG4 (P) 및 hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P); 항-LAG-3 항체: LAG-3 mAb A IgG4 (P), hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P) 및 hLAG-3 mAb 6(1.1) IgG4 (P); 및 thPD-1 mAb A IgG4 (P)와 LAG-3 mAb A IgG4 (P)의 조합, hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)와 hLAG-3 mAb 1(1.4) IgG4(P)의 조합 및 hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4(P)와 hLAG-3 mAb 6(1.1) IgG4 (P)의 조합을 조사하였다. 이 분석들에서 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들 및 항체들을 0.0061, 0.024, 0.09, 0.39, 1.56, 6.25 또는 25 nM의 농도로 사용하였고 PBMC를 0.5 ng/mL의 SEB로 자극하였다. 이 연구들을 위해, 항체 조합이 사용되는 경우에 각 항체는 표시된 농도로 제공하고 그로써 총 항체 농도는 각 항체에 대해 사용된 농도의 2배이다 (즉 0.0122, 0.048, 0.18, 0.78, 3.12, 12.5 또는 50 nM). **도 20**는 대표적인 도너 D: 56041로부터의 SEB-자극된 PBMC로부터의 IFN γ 분비 프로파일을 나타낸다.
- [1614] PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자 DART I; 항-PD-1 항체 PD-1 mAb A IgG4와 항-LAG-3 항체 LAG-3 mAb A IgG4 (P)의 조합; 및 네거티브 대조표준 항체가 항원-특이적 T 세포 반응을 향상시키는 능력을 과사풍-변독소 리콜 분석을 사용하여 조사하였다. 특히, 사이토카인의 항원-특이적 향상된 분비의 반응을 리콜 항원으로서 공동배양 분

석 시스템에서 과상풍 변독소를 사용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, CD4 메모리 T 세포 (0.5 내지 1.0×10^5 세포/웰)를 네거티브 선택 분리 키트 (Miltenyi Biotec, San Diego, CA 및 Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 인간 말초혈로부터 분리하고 동일한 도너로부터의 방사선 조사된 단핵세포 (0.01 내지 0.05×10^5 세포/웰, 3500 rads)와 함께 $5 \mu\text{g/mL}$ 의 리콜 항원 과상풍 변독소 (TTd) 및 회석된 (25 nM에서 시작함) DART I, PD-1 mAb A IgG4 + LAG-3 mAb A IgG4(P) 또는 아이소타입 대조표준의 존재 또는 부재하에 5 내지 7 일 동안 배양하였다. 병렬 플레이트에서, 삼중수산화된 티미딘의 통합을 통해 증식을 측정하고 IL-2 및 IFN γ 를 ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN)를 사용하여 5 내지 7 일에 측정하였다. **도 21A 내지 21D**는 두 대표적인 도너 (D50702 및 D54267)로부터의, 7일째의 IFN γ (**도 21A, 21C**) 및 IL-2 (**도 21B, 21D**) 분비 프로파일을 나타낸다.

[1615] 이 연구들의 결과는 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들이 재자극시 SEB-자극된 PBMC로부터의 IFN γ (**도 16A 내지 16B, 17A 내지 17B, 18A 내지 18B, 20**) 및 IL-2 (**도 19**) 생성을 극적으로 향상시켰음을 증명한다. 이에 더불어, PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들은 과상풍 변독소로 자극된 CD4 메모리 T 세포로부터 IFN γ 생성을 극적으로 향상시켰다 (**도 21A 및 21C**). 특히, 사가 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들은 항-PD-1 항체와 항-LAG-3 항체의 조합보다 큰 향상을 제공하였다.

[1616] 실시예 9

[1617] PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들의 약물동역학

[1618] 대표적인 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자, DART I 및 대표적인 항-PD-1 항체, PD-1 mAb A의 약물동역학을 시노물구스 원숭이에서 조사하였다. 간단하게 설명하면, 두 시노물구스 원숭이 (수컷 한 마리와 암컷 한 마리)를 단일 용량의 DART I (5 mg/kg) 또는 PD-1 mAb A (10 mg/kg) 및 혈청 농도의 분자들을 시간 경과에 따라 샌드위치 ELISA 분석을 사용하여 모니터링하였다. 간단하게 설명하면, 맥시소브 96-웰 분석 플레이트를 가용성 인간 PD-1 (shPD-1)로 코팅하고, 소 혈청 알부민으로 차단한 후, 세척하고 교정 표준, 품질 대조표준 및 회석된 혈청 샘플과 함께 인큐베이션하였다. 포획된 DART I 및 PD-1 mAb A의 양을 염소 항-인간 IgG Fc-비오틴 이차 및 스트렙트아비딘-양고추냉이 과산화효소 (SA-HRP)의 연속적인 추가에 의해 산정하였다. HRP 활성을 TMB 기질을 사용하여 검출하였다. 모든 샘플을 마이크로플레이트 판독기 (SpectraMax M2e, Molecular Device, Sunnyvale, CA)를 사용하여 분석하고 표준 캘리브레이터에 의해 생성된 OD 신호를 SoftMax Pro 소프트웨어 (버전 5.4, Molecular Devices)를 사용하는 4-매개변수 로지스틱 모델에 사용하였다. PD-1 mAb A 또는 DART I의 농도를 표준 곡선을 설명하는 방정식으로 샘플의 OD 신호 데이터의 내삽으로부터 측정하였다. 이 분석에 대한 정량의 하한 (LLOQ)을 9.775 ng/mL로 추정하였다.

[1619] **도 22**는 시간 경과에 따른 혈청 농도를 나타내고, 선은 DART I (실선, 삼각형) 또는 PD-1 mAb A (점선, 원형)로 주입된 두 수컷 (검은색 기호) 및 암컷 (흰색 기호) 원숭이의 평균을 나타낸다. 이 데이터들은 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자의 약물동역학이 시노물구스 원숭이에서 항-PD-1 항체의 그것과 비교할만한 것을 입증한다.

[1620] 실시예 10

[1621] PD-1 항체 및 PD-1 x LAG-3 이중특이적 분자들의 독물학 연구

[1622] 대표적인 항-PD1 항체, hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) 및 대표적인 PD1 x LAG3 이중특이적 분자, DART I의 안전성 프로파일을 시노물구스 원숭이에서 비-GLP (Good Laboratory Practice)에서 평가하였다.

[1623] 이 연구에서 항-PD-1 항체 (hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P))의 잠재적 독성 및 독성동태학을, 다중 정맥 내 주입에 의해 투여될 때 평가하였다. 이에 더불어, PD-1 x LAG-3 DART 분자 (DART I)의 잠재적 독성 및 독성동태학을, 단일 정맥 내 주입에 의해 투여될 때 평가하였다. 연구 디자인을 하기 **표 20**에 제시한다.

표 20

그룹 번호	테스트 물질	용량 수준 (mg/kg)	투약일	투약 부피	용량 (mg/mL)	동물의 수	
						수컷	암컷
1	대조표준	0	1, 8, 15	5	0	1 ^a	1 ^a
2A	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	1	1, 8, 15	5	0.2	1 ^a	1 ^a
2B	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	1	1, 8, 15	5	0.2	1 ^b	1 ^b

3A	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	100	1, 8, 15	5	20	1 ^a	1 ^a
3B	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	100	1, 8, 15	5	20	1 ^b	1 ^b
4	DART I	5	1	5	1	1 ^c	1 ^c
^a 그룹 1, 2A 및 3A에 1일에 투약을 시작하였고 18일에 마지막 (제3) 용량 후 72시간 후에 부검하였다. ^b 그룹 2B 및 3B에 1일에 투약을 시작하였고 22일에 마지막 (제3) 용량 후 7일 후에 부검하였다. ^c 그룹 4에 1일에 투약을 시작하였고 단일 용량 투여 후 28일 동안 계속하였다 (29일까지); 다음에 동물들을 군집으로 복귀시켰다.							

[1625] 다음의 매개변수 및 중점을 이 연구에서 평가하였다: 임상 신호, 체중, 식품 소비, 체온, 임상적 병리학 매개변수들 (혈액학, 응고 및 임상 화학), 생체 분석 및 독성 역학 매개변수들, 항-약물 항체 분석, 유동 세포 분석, 사이토카인, 총 부검 결과, 기관 중량 및 조직병리학적 조사(examination).

[1626] 모든 동물은 18일 또는 22일에 안락사 스케줄이 있을 때까지 또는 29일에 연구로부터 방출될 때까지 생존하였다. hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)에 대해 임상 신호, 식품 소비, 체중, 체온, 혈액학, 응고 또는 임상 화학 매개변수들, 또는 총 부검 결과에 테스트 물품-관련 변화는 없었다. 18일 및 22일에, 1 또는 100 mg/kg의 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)를 받은 동물에서 비장 무게 및 적색 비수 (red pulp)의 용량-의존성 경미에서 중간까지의 림프조직구 침윤물의 증가가 분명하였다. 주변의 림프구와 비교하여, 림프조직구성 세포는 창백한 세포질 및 불규칙적인 핵을 가졌다. 드문 유사분열상(Rare mitotic figure)이 분명하였다. 침윤물은 현미경으로 볼 때 증가된 비장 중량에 상관이 있었다.

[1627] hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)를 제공한 동물에 대한 혈청 농도-시간 프로파일은 이 종에서, 소수의 예외는 있지만, 항체에 대해 예상된 프로파일을 보인다. 제3 용량 후 곡선의 기울기는 1 mg/kg 용량 그룹에서 두 동물 및 100 mg/kg 용량 그룹에서 두 동물에 대한 제1 용량 후보다 더 날카롭게 떨어졌고, 그것은 후기 사이클에서 항-약물 항체 (ADA)의 가능한 출현을 가리킨다. 분석은 1 mg/kg 그룹에서 4마리중 2마리 동물이 ADA를 발생시켰고 100 mg/kg 그룹에서 4마리 중 1마리 동물이 ADA를 발생시켰다.

[1628] 결론적으로, 3주 동안 (1, 8 및 15일) 주 1회 정맥 내 주입에 의한 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)의 투여는 시노물구스 원숭이에서 1 및 100 mg/kg의 수준에서 잘 용인되었다. 비장의 적색 비수의 용량-의존성 경미에서 중간까지의 림프조직구성 세포 침윤물은 1 및 100 mg/kg의 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)에서 존재하였다.

[1629] DART I에 대해, 임상 신호, 식품 소비, 체중, 체온, 혈액학 또는 응고 매개변수에서 테스트 물품-관련 변화는 없었다. 임상 화학 매개변수들의 DART I-관련 변화는 2일에 아스파테이트 아미노트란스페라제 (AST) 및 락테이트 데하이드로게나제 (LDH)의 비-역기능적, 일시적 상승을 포함하였다. 평균 AST 변화는 3.2x 비히클-처리된 대조표준 동물 및 7.8x 사전연구 수준이었고, 이때 수준은 대조표준 참조 범위2보다 위였다. 평균 LDH 변화는 2.5x 비히클-처리된 대조표준 동물 및 7.8x 사전연구 수준이었다. 두 매개변수는 8일에 거의 기준선 수준으로 복귀하였다. 결론적으로, 정맥 내 주입에 의한 DART-I의 단일 투여는 5 mg/kg의 수준에서 시노물구스 원숭이에서 잘 용인되었다.

[1630] 실시예 11

[1631] 항-PD-1 항체를 사용한 단일 용량 PK

[1632] 선택된 독물학적 중점을 사용한 단일-용량 PK 연구를 시노물구스 원숭이에서 수행하였다. 이 연구에서, hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)를 두 개의 다른 항-PD1 IgG4 (P), κ mAbs: PD-1 mAb A IgG4 (P) 및 PD-1 mAb B IgG4 (P)와 비교하였다. 각 항체를 10 mg/kg으로 1-시간 정맥 내 주입에 의해 2마리 원숭이 (1마리 수컷, 1마리 암컷)에게 투여하고 동물들을 65일 동안 모니터링하였다.

[1633] hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) 또는 PD-1 mAb A IgG4 (P)의 투여와 관련된 테스트 물품-관련 임상 신호, 체중, 식품 소비, 사이토카인 또는 면역표현형의 변화는 없었다. 데이터는 PD-1 mAb B IgG4 (P)에 대해 유사하였는데, 예외는 PD-1 mAb B IgG4 (P) 투여 후에 IL-5의 상승이 관찰된 것이었다.

[1634] T 세포의 표면에서 PD-1에 결합하는 항-PD-1 항체를, hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), PD-1 mAb A IgG4 (P) 또는 PD-1 mAb B IgG4 (P)로 처리된 시노물구스 원숭이로부터 수집한 혈액 샘플의 전시간 과정에 대해 파인 경쟁자

(미표지 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P))의 부재 (PBS 대조표준) 또는 존재하에 T 세포에 결합하는 형광 표지된 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)의 평균 형광 세기 (MFI)가 있는 경쟁 방법을 사용하여 유동 세포분석에 의해 측정 하였다. 도 23A-23C에 도시된 바와 같이, hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) 및 PD-1 mAb B IgG4 (P)는 PD-1 mAb A IgG4 (P)에 비교하여 (PD-1 결합은 21일 이하의 날 동안 $\geq 80\%$ 에서 유지됨)(도 23B) CD4+ 및 CD8+ T 세포 표면에서 PD-1에 대한 연장된 결합 (PD-1 결합은 28일 또는 그 이상의 날 동안 $\geq 80\%$ 에서 유지됨)(각각 도 23A 및 23C)을 입증하였다. 각각의 항-PD-1 항체에 대하여, T-세포 PD-1 결합 데이터는 그것들의 혈청 농도와 상관성이 있었다.

[1635] 실시예 12

[1636] 반복 용량 독물학 연구

[1637] 본 발명의 치료 분자들의 안전성, 독성 역학 및 약물동역학 프로파일을 평가하기 위하여, 예시의 분자 (hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P))를 시노물구스 원숭이에 투여하고 GLP (Good Laboratory Practice) 투약 연구를 수행하였다. 이 연구에서, 4 그룹의 동물 (그룹당 10마리, 5마리 수컷 및 5마리 암컷)을 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) 또는 대조표준 물품으로, 3가지 용량 수준에서의 주입에 의해 주 1회 처리하였다. 동물을 4-주의 약물 투약 기간 중에 임의의 잠재적인 독성에 대해 평가하고 이어서 추가의 10-주의 약물이 없는 기간 중에 모니터링하였다. 이 연구의 실험 디자인을 하기 표 21에 제시한다. 동물들에게 연구일 1, 8, 15 및 22일에, 주 1회 1-시간 정맥 내 주입을 통해 눈금이 표시된 주입 펌프를 사용하여 투약하였다. 각 그룹으로부터 1마리 수컷 및 1마리 암컷을 25일에 희생시키고, 나머지 동물들을 연구일 95일에 희생시켰다. T-림프구 상의 PD-1 수용체의 선점(occupancy)을 포함하여, 순환 중의 백혈구 하위집단에 미치는 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) 투여의 효과를 평가하였다. 이에 더불어, 항-약물 항체 (ADA) 프로파일을 측정하였다.

표 21

그룹 번호	테스트 재료 ^a	용량 수준 (mg/kg)	용량 부피 (mL/kg)	용량 (mg/mL)	동물의 수 ^b			
					메인 연구		회복 연구	
					M	F	M	F
1	대조표준	0	5.88	0	3	3	2	2
2	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	10	5.88	1.7	3	3	2	2
3	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	40	5.88	6.8	3	3	2	2
4	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	150	5.88	25.5	3	3	2	2

[1638]

[1639] ^a 대조표준 및 hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)를 주마다 정맥 내 주입에 의해 투여하였다.

[1640] ^b 그룹당 6마리의 원숭이 (수컷 3마리/암컷 3마리)를 25일에 부검한 한편, 나머지 회복 그룹 원숭이 (수컷 2마리/암컷 2마리)는 95일에 부검하였다.

[1641] 시노물구스 원숭이에서 0, 10, 40 및 150 mg/kg에서 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)의 주마다 1회 정맥 내 (IV) 주입은 잘 용인되었고 모든 동물은 그것들의 안락사 스케줄이 있는 25일 또는 95일까지 생존하였다. 임상 신호, 식품 소비, 체중, 신체적, 안과적 및 신경학적 검사, 심전도, 체온, 호흡률, 혈압 및 심박수, 응고, 임상 화학 및 소변 검사 매개변수들, 장기 무게 또는 총 해부 결과에서 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)-관련 변화는 없었다.

[1642] 혈액학적 매개변수들의 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)-관련 변화들은 림프구 역가의 일시적인 감소를 포함하였다. 림프구 역가는 2일 (주입 후 23시간 후)에 ≥ 10 mg/kg에서, 대조표준에 비교하여 10 및 40 mg/kg에서 수컷에 대해 및 40 및 150 mg/kg에서 암컷에 대해 통계학적으로 유의미한, 수컷 및 암컷에서 사전-연구 (1일 사전용량)에 비교하여 적당히 감소하였다. 림프구 역가는 8일 사전용량시 거의 사전연구 수준으로 복귀하였지만 9일 (주입 후 23시간)에 모든 용량 수준에서 일부 개별적인 수컷 및 암컷에 대해 약하게 감소하였다 (0.47x 내지 0.68x 사전연구). 림프구 역가는 15일 및 22일에 투약 전에 증가하였지만, 16일 및 23일 (주입 후 23시간)에 일

부 개별적인 수컷 및 암컷에 대해 감소하였다.

- [1643] 총 백혈구, T 세포, B 세포 및 NK 세포를 포함하여, 순환하는 면역 세포 집단에서 용량-의존성, 일시적인 감소가 대조표준 그룹과 비교하여 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)-처리된 동물에서 주입 종점 후 23시간 후에 관찰되었다. 변화의 가장 큰 크기는 1일에 제1 용량 투여 후에 관찰되었다; 더 작은 크기의 변화는 8, 15 또는 22일에 후속적인 용량 후에 일시적으로 관찰되었다. 면역 세포 집단은 일반적으로 EOI-후 27시간 후에 및 회복 단계 내내 기준선 값으로 또는 거의 기준선 값으로 회복되었다. 대조표준 그룹과 비교하여 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)-처리된 동물에서 순환하는 단핵세포의 변화는 관찰되지 않았다.
- [1644] PD-1+/CD4+ 및 PD-1+/CD8+ 세포에 결합하는 최대 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)를 시험된 모든 용량 (10, 40 또는 150 mg/kg)에서 연구의 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) 단계 동안 관찰하였다. 항-약물 항체 (ADA) 반응을 발달시키지 않았던 회복되는 동물에서, 혈청 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) 농도는 29 $\mu\text{g/mL}$ 이상으로 유지되었고 PD-1+/CD4+ 및 PD-1+/CD8+ 세포에 결합하는 최대 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)는 전체 1-주 회복 기간 동안 유지되었다. 이 동물들에서, T 세포 상의 PD-1 조절의 증거는 없었다. ADA 반응을 발달시킨 회복되는 동물에서, MGD012-결합된 PD-1+ T 세포의 빈도는 기준선 수준으로 감소하였다. ADA-포지티브 동물의 PD-1+/CD4+ 및 PD-1+/CD8+ 세포에 대한 최대 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) 결합으로부터의 감쇠는 일반적으로 외관상의 혈청 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) 농도가 대략 25 $\mu\text{g/mL}$ 아래로 떨어질 때 발생하였다. 그러나, ADA-포지티브 동물에서의 ADA의 존재가 PD-1에 대한 PD-1 항체의 결합을 차단하기 위해 기여할 수 있기 때문에, 이런 외관상의 한계값 관계가 ADA-네거티브 동물에도 적용되는지는 알 수 없다.
- [1645] hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)의 약물동역학적 반응에는 최소한의 성-관련 차이가 있었고, 그것은 평가된 용량 범위 (10 내지 150 mg/kg)에 걸쳐 선형이었다. 10, 40 및 150 mg/kg에서 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)에 대해, 성 조합된 평균 C_{max} 는 각각 240 $\mu\text{g/mL}$ (0.240 mg/mL), 1078 $\mu\text{g/mL}$ (1.08 mg/mL) 및 3938 $\mu\text{g/mL}$ (3.94 mg/mL)이었고, AUC는 각각 47310 h $\cdot \mu\text{g/mL}$ (47.3 h $\cdot \text{mg/mL}$), 205723 h $\cdot \mu\text{g/mL}$ (206 h $\cdot \text{mg/mL}$) 및 745681 h $\cdot \mu\text{g/mL}$ (746 h $\cdot \text{mg/mL}$)이었다. ADA가 출현하기 전 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)의 제1 사이클의 비-구획성 분석 (NCA)에 의한 평균 클리어런스는 0.21 mL/h/kg으로, 큰 분자량 단백질에 대해 예상되는 바와 같이, 시노물구스 원숭이의 사구체 여과율보다 실질적으로 더 낮았다. hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)의 제1 사이클의 NCA에 의한 분포의 평균 정상 상태 부피는 68 mL/kg으로, 혈청 부피의 대략 1.5배지만, 세포의 물 공간보다는 적다. 이것은 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)가 맥관 구획으로부터 조직 세포의 공간으로 흘러나오는 것을 시사하지만, 언제나 모든 세포외 공간이 이 분자에 접근할 수 있지 않다는 것을 시사한다. hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)의 제1 사이클의 NCA에 의한 평균 체류 시간 (MRT)의 평균 값은 335시간 또는 대략 14일이었다. ADA의 출현은 사이클 2 내지 4에서 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)의 농도를 감소시켰다. hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)의 반복된 용량 후에 감소된 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) 혈청 농도의 증거는 10, 40 및 150 mg/kg 용량 그룹에서 각각 10마리 중 7마리, 10마리 중 4마리 및 10마리 중 3마리 동물에서 관찰되었다. hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)에 대한 ADA의 존재는 10, 40 및 150 mg/kg 용량 그룹에서 각각 이들 동물 중 4, 2 및 1마리에서 확인되었고; ADA가 확인되지 않은 모든 동물은 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) 혈청 농도가 ADA를 검출하는 능력으로 간섭되는 말기 해부 그룹에 있었다. 따라서, 후속되는 TK 분석에서, 트로프 농도 (trough concentration)가 기존의 트로프 농도보다 낮을 때 이 시간 전으로부터의 데이터는 검열될 수 있다. 3개의 용량 그룹에 대한 모든 사이클 전체에서 데이터의 2-구획 모델링으로부터 ADA에 의해 영향을 받은 지점들을 배제하는 것은 2-구획 모델에 대한 일차 TK 매개변수들에 대한 평균 값이 클리어런스에 대해 0.22 mL/h/kg이었고, 분포의 초기 부피 (V_1)에 대해서는 38.5 mL/kg이었으며 V_2 에 대해서는 33.8 mL/kg이었음을 의미하고, 72.3 mL/kg의 분포의 평균 정상-상태 부피 (V_{ss}) 및 329 시간의 MRT를 유발하였다. 이 값들은 제1 용량의 NCA로부터 얻어진 매개변수들과 일치하였다. ADA의 부재시에, 시뮬레이션으로, 약하게 투약함으로써, 시노물구스 원숭이에서 정상 상태는 제5 용량 후에 이루어질 수 있을 것이고 추적 지수는 2.4일 것임을 예측할 수 있다.
- [1646] 25일에, hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)-관련된 최소 다초점 혈관주위 단핵 세포 침윤물은 수컷에서 ≥ 40 mg/kg로 및 암컷에서 ≥ 10 mg/kg로 IV 주사한 부위의 가장 바깥쪽의 진피에 존재하였고, 외래 단백질 (단클론성 항체)의 반복된 주입에 대해 예상된 반응이었다. 95일에, hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)-관련된 미시적 변화는 주지되지 않았고, 그것은 25일에 존재한 테스트 물품-관련 변화의 회복을 나타낸다.
- [1647] 요약하면, 이 연구의 결과는 주 1회 (1, 8, 15 및 22일에) 정맥 내 주입을 통한 hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)의 투여가 10, 40 또는 150 mg/kg의 수준에서 시노물구스 원숭이에서 임상적으로 잘 용인되었음을 나타낸다. 관찰된 효과는 순환하는 림프구 및 외래 단백질의 주입에 관련된 최소 주사-부위 변화의 일시적인 감소에 국한되었

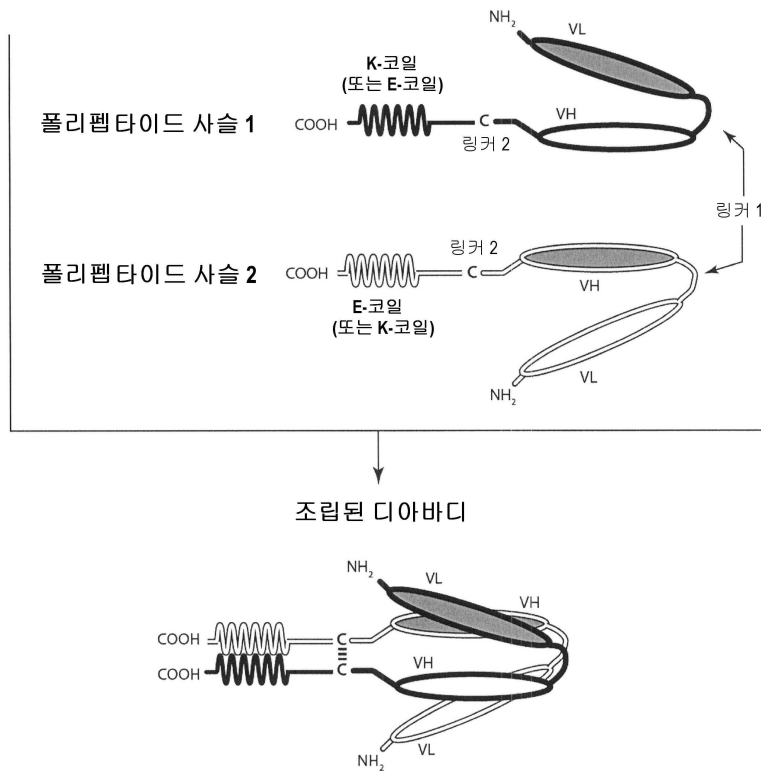
다. 이 결과들을 기반으로, 비관측 역효과 수준 (NOAEL)이 150 mg/kg인 것 (3.94 mg/mL의 성 조합된 평균 C_{max} 및 746 h · mg/mL의 AUC)으로 여겨졌다.

[1648]

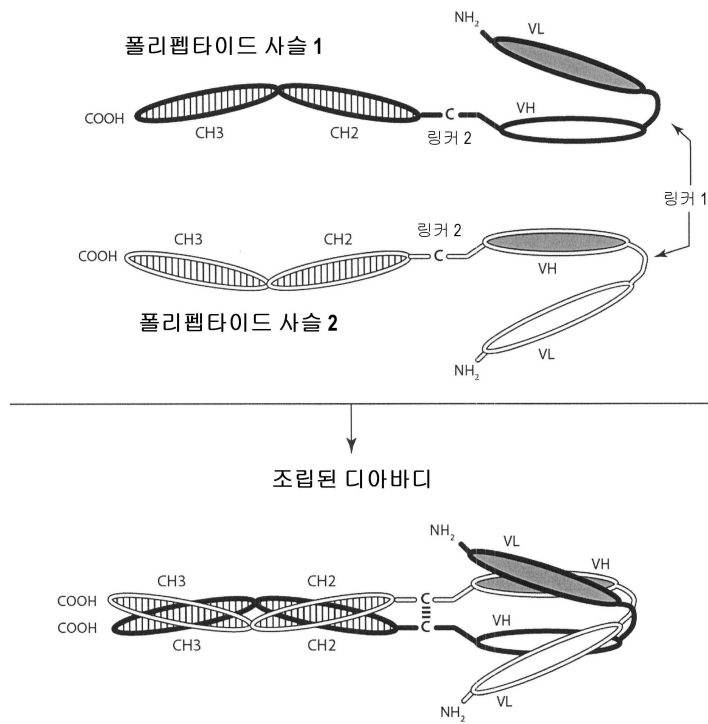
본 명세서에서 언급된 모든 공보 및 특허는 각각의 개별적인 공보 또는 특허 출원이 그 전문이 참조로 포함되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 참조로 본원에 포함된다. 발명이 그것의 특정 구체예들과 관련하여 기술되었지만, 추가로 변형될 수 있고 일반적으로, 발명의 원리를 따르는 본 출원이 임의의 변화, 사용 또는 적응을 다 포함하고 본 개시로부터의 그런 일탈을 발명이 속하는 기술분야 내에서 공지된 또는 관례적인 실시예에 포함되는 것으로서 및 지금까지 설명된 필수 특징에 적용될 수 있는 것으로서 포함하는 것으로 의도된 것이 인지될 것이다.

도면

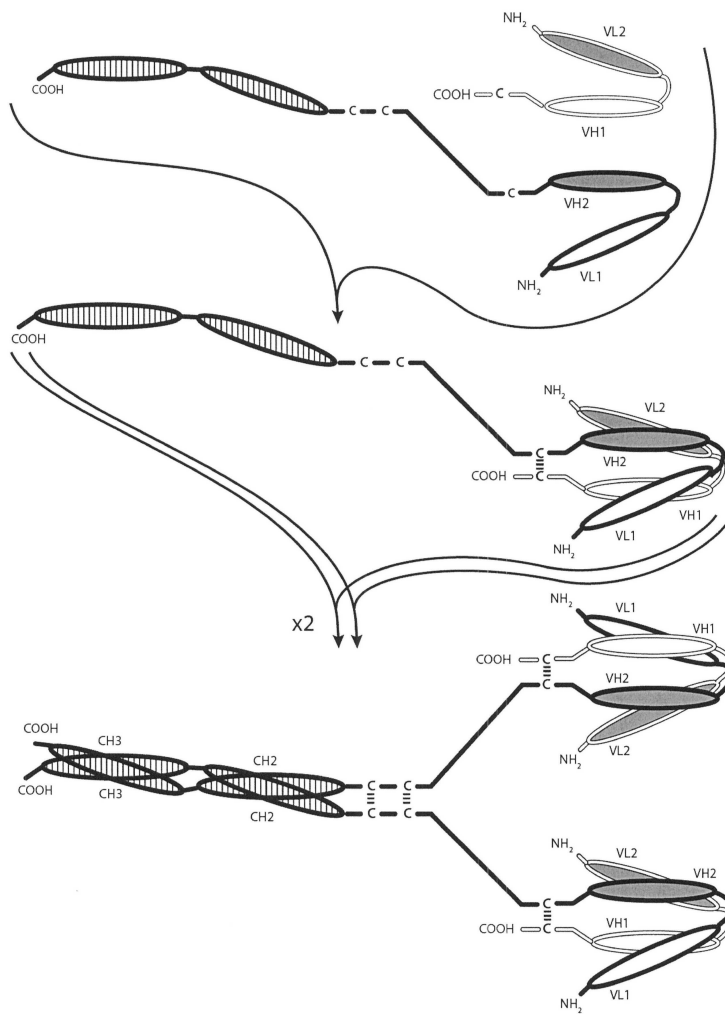
도면1



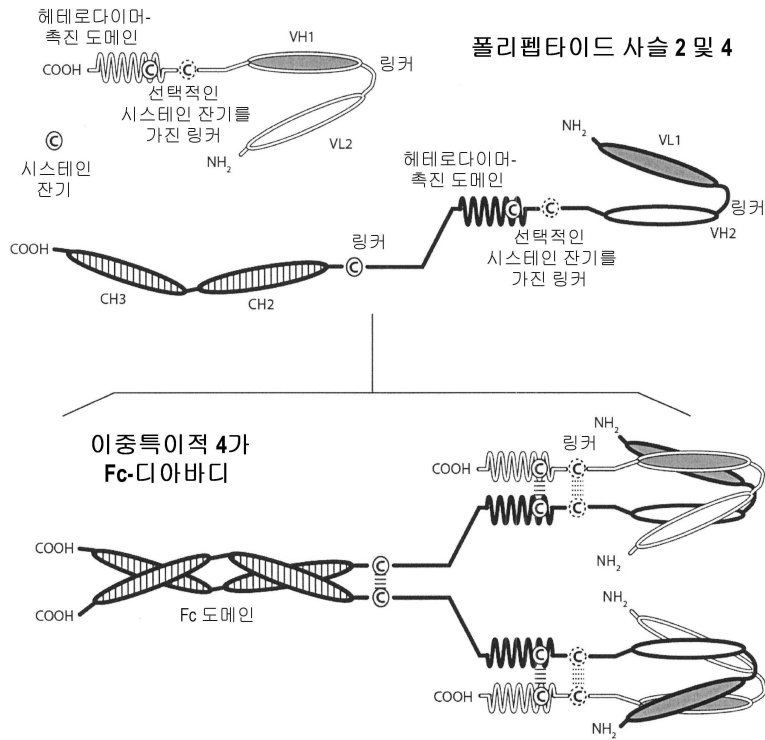
도면2



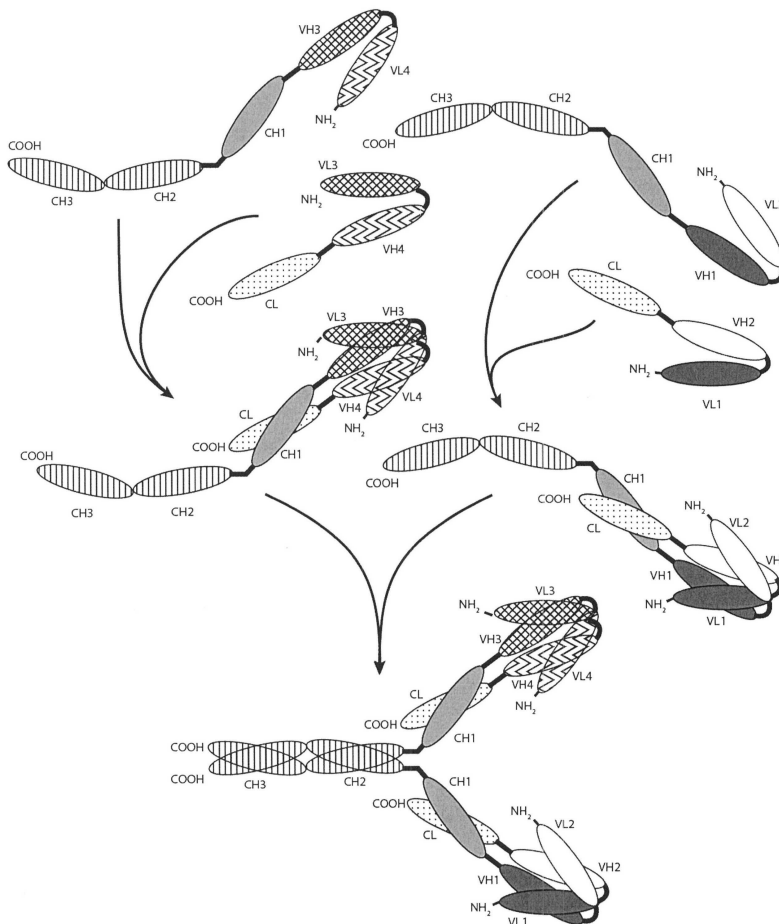
도면3a



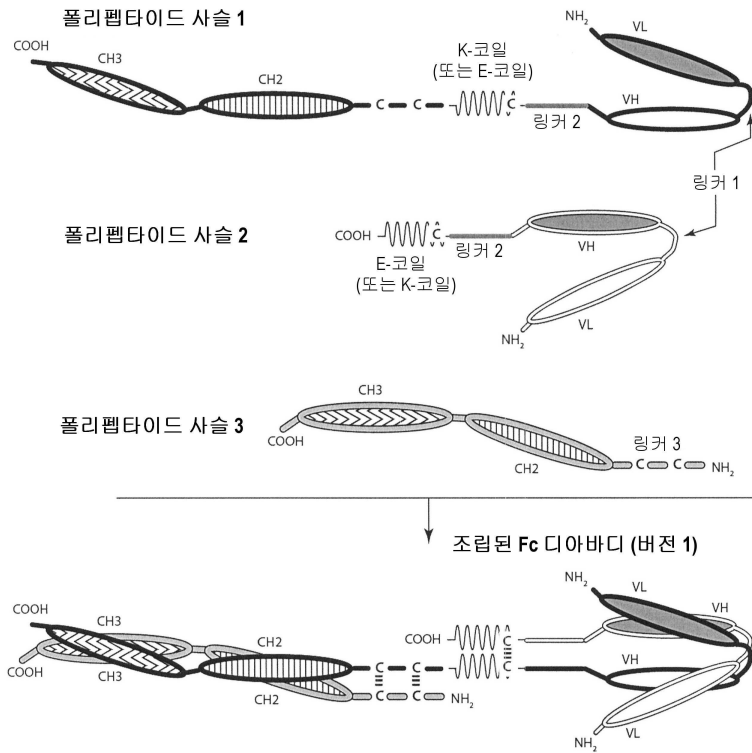
도면3b



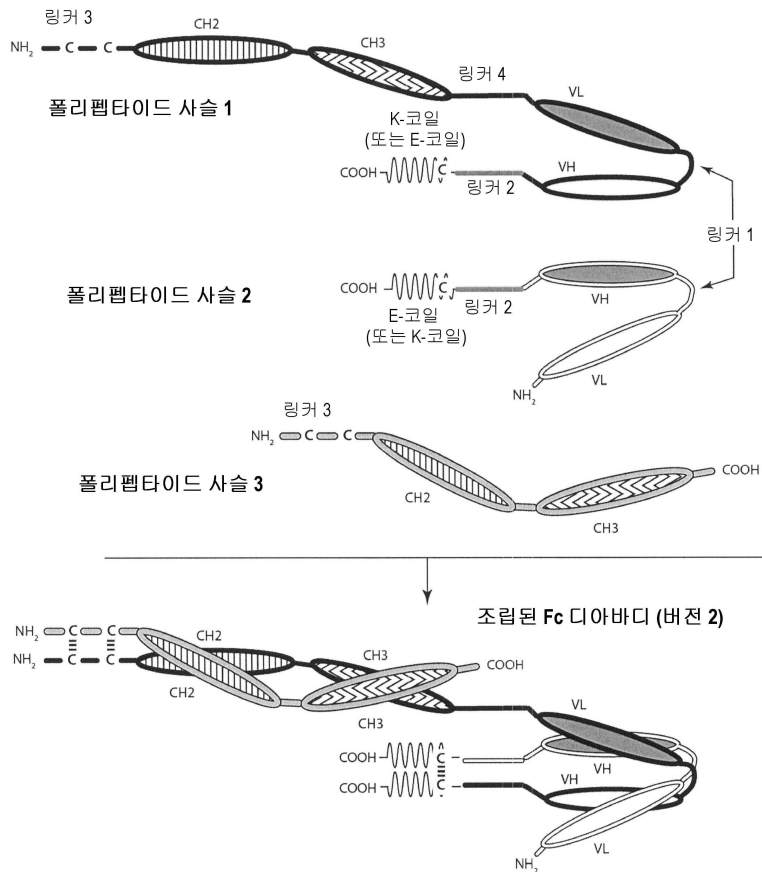
도면3c



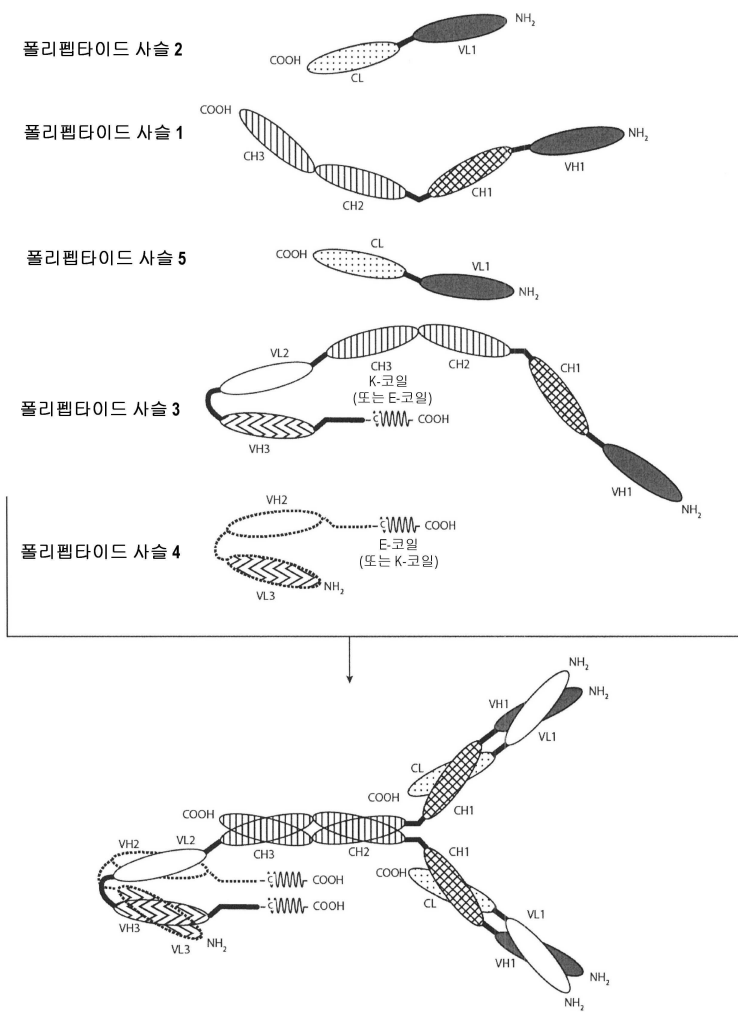
도면4a



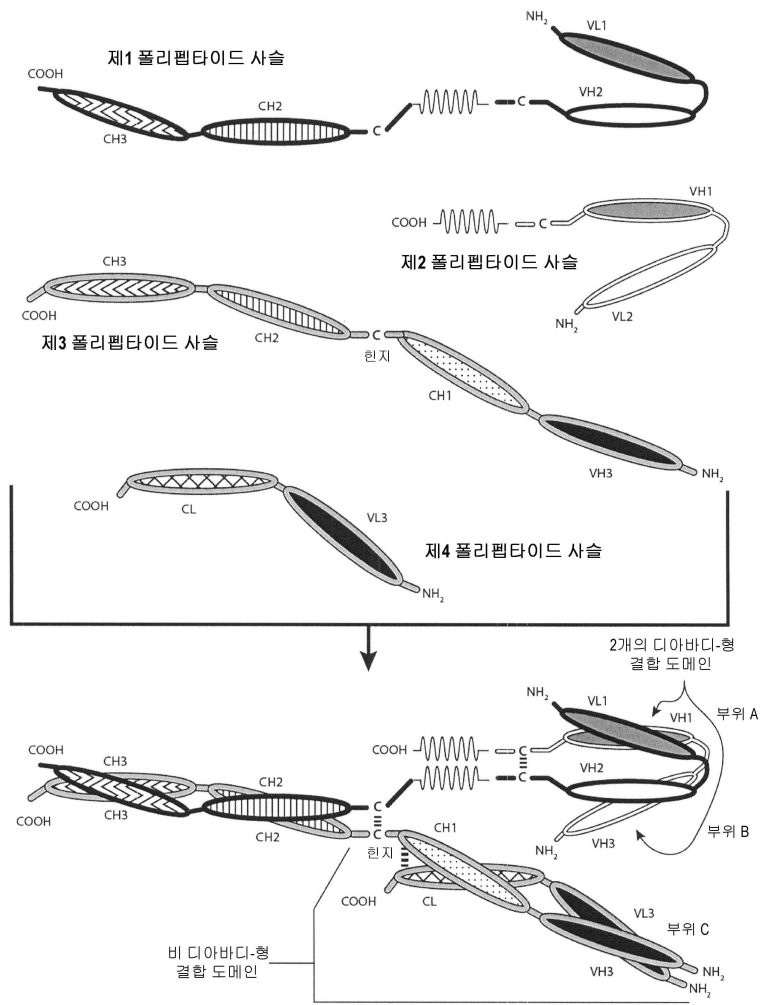
도면4b



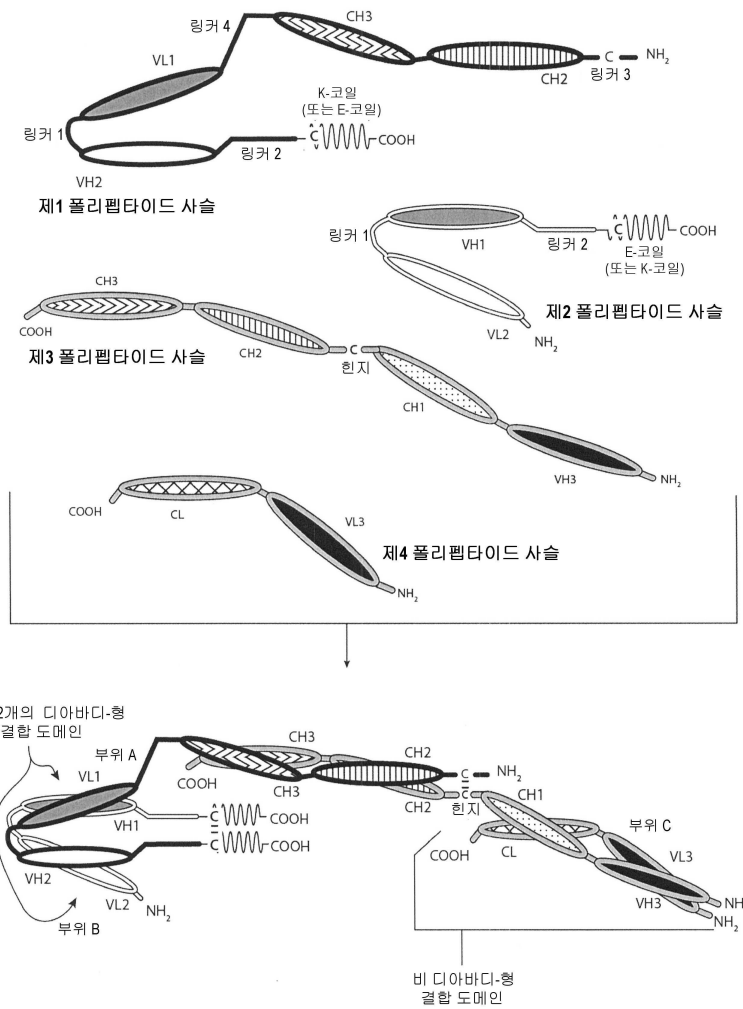
도면5



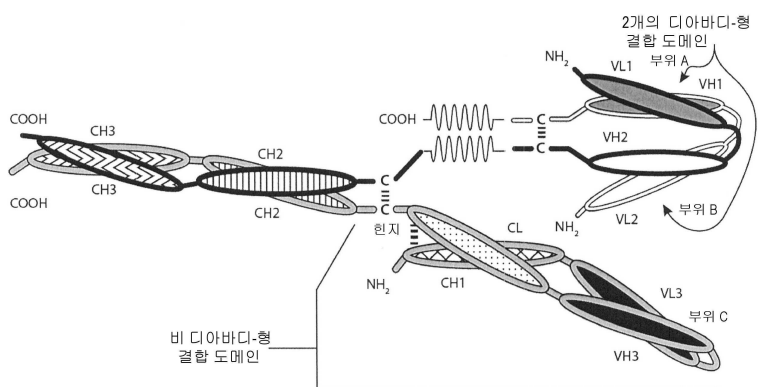
도면6a



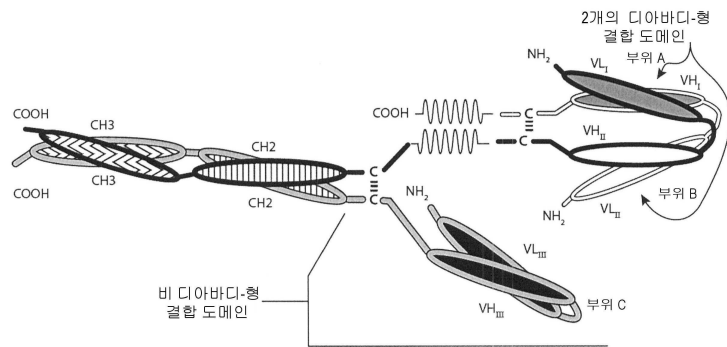
도면6b



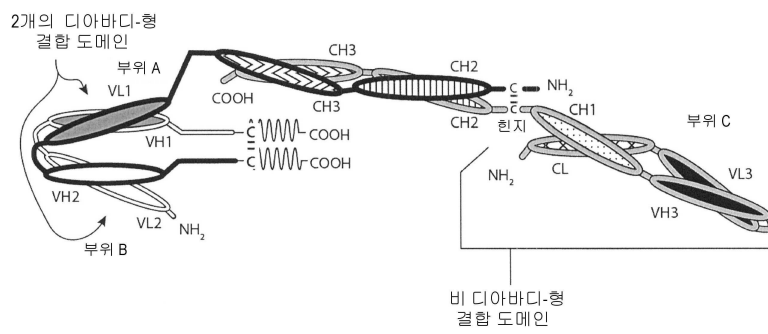
도면6c



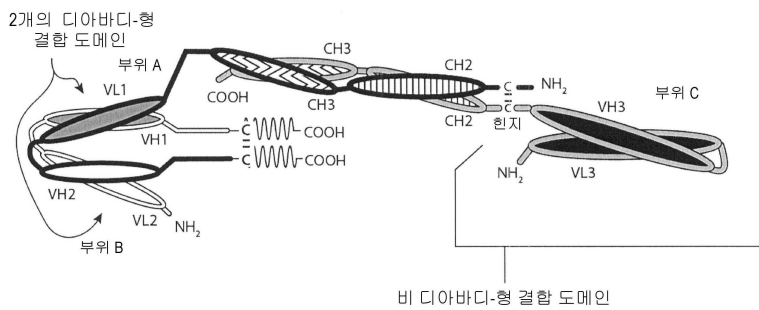
도면6d



도면6e

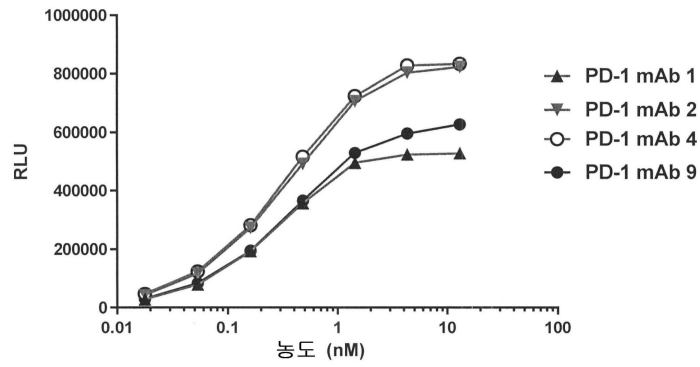


도면6f



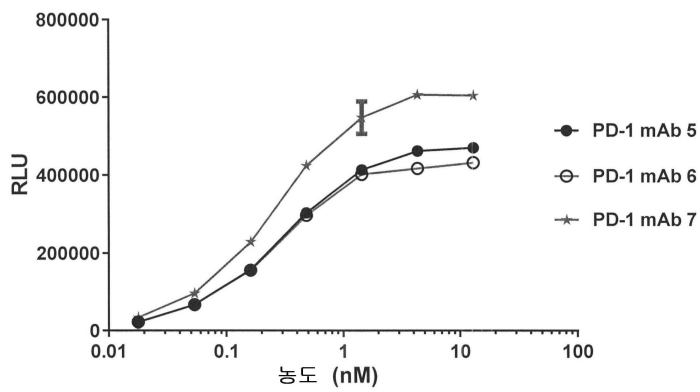
도면7ab

shPD-1 His (1ug/ml) 코팅 및 G 항 M H+L HRP 검출

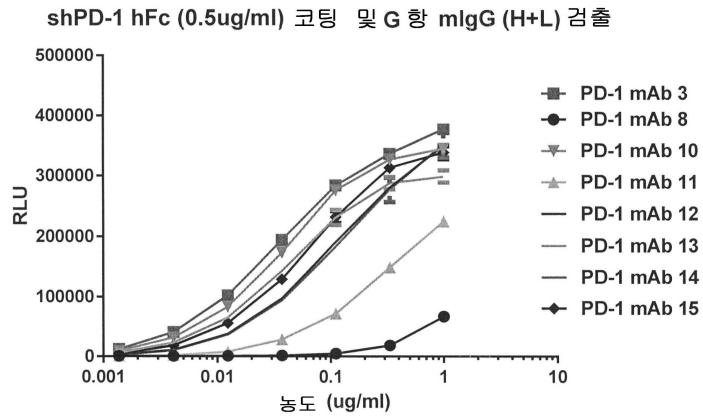
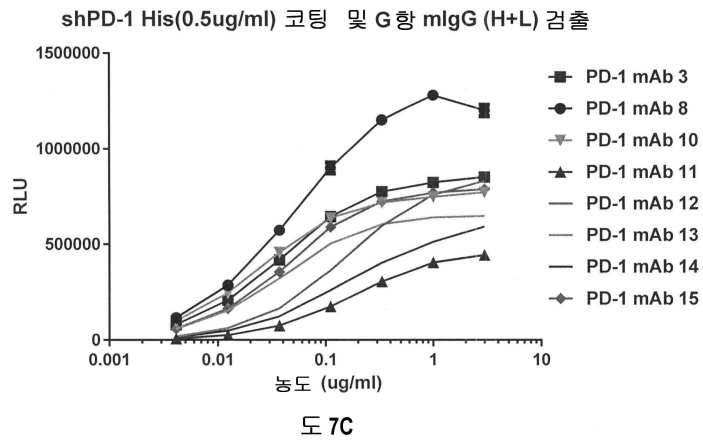


도 7A

shPD-1 His (0.5ug/ml) 코팅 및 G 항 M H+L HRP 검출

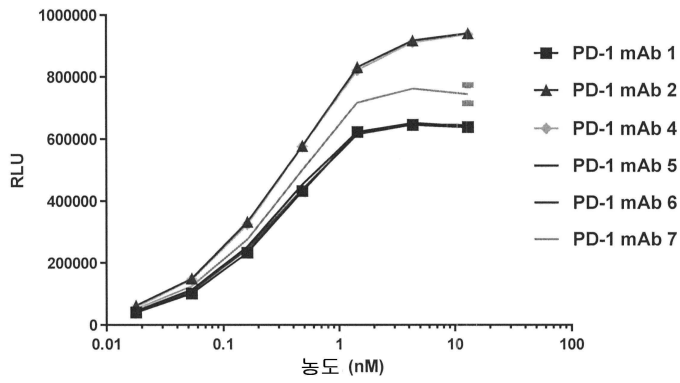


도면7cd



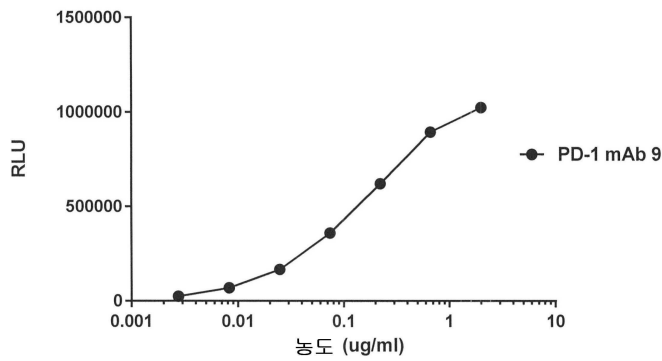
도면8ab

scyno-PD-1-TEV-Fc (0.5ug/ml) 코팅 및 G 항 M H+L HRP 검출



도 8A

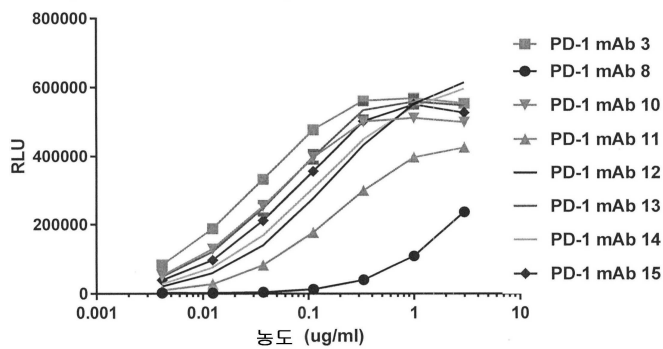
scyno-PD-1-TEV-hFc(1ug/ml) 코팅 및 G 항 M (H+L) 검출



도 8B

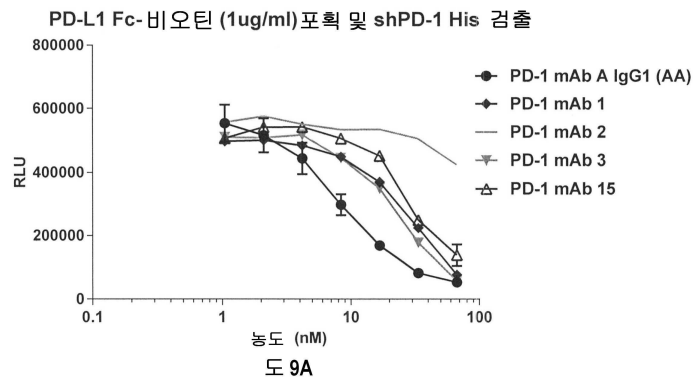
도면8c

scyno-PD-1-TEV-Fc (1ug/ml) 코팅 및 G 항 mIgG (H+L) 검출

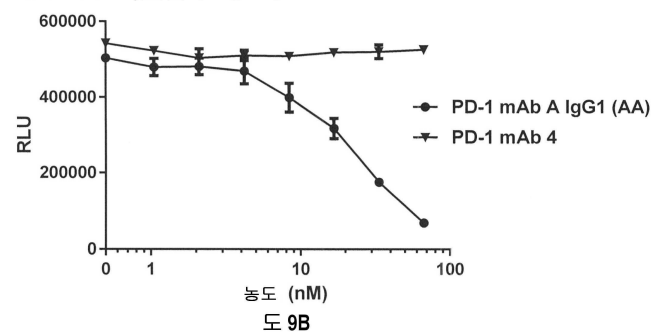


도 8C

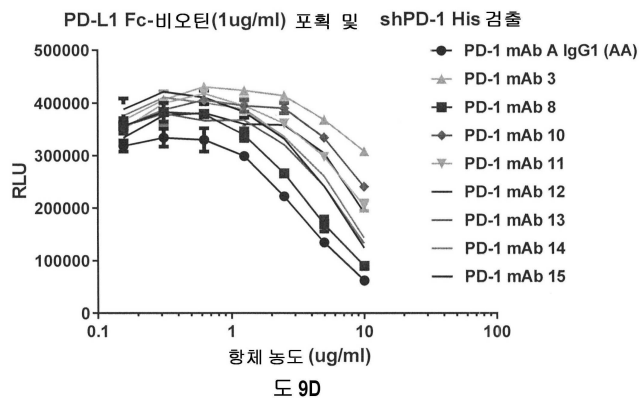
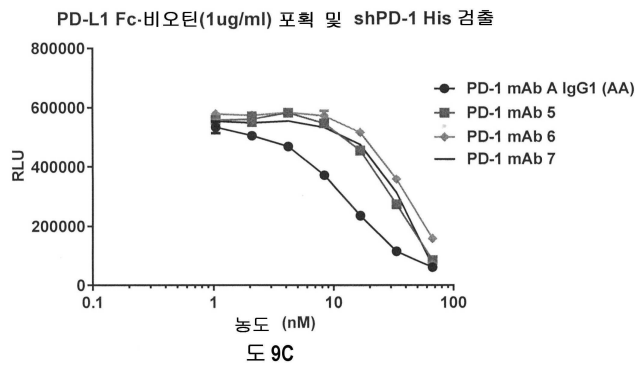
도면9ab



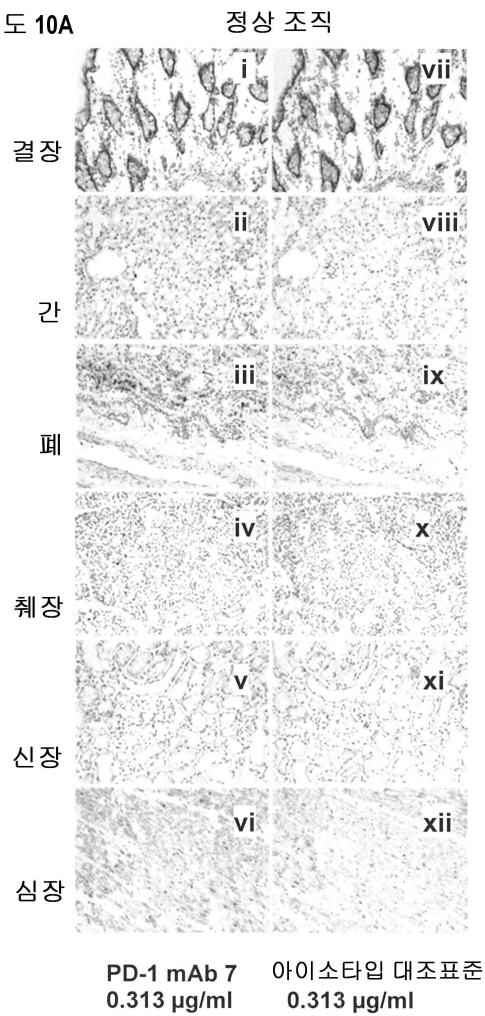
PD-L1 Fc-비오틴 (1ug/ml) 포획 및 shPD-1 His 검출



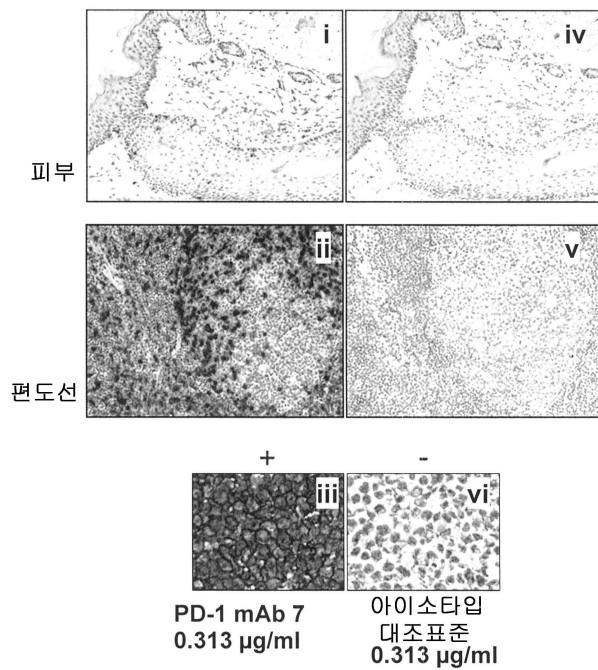
도면9cd



도면10a

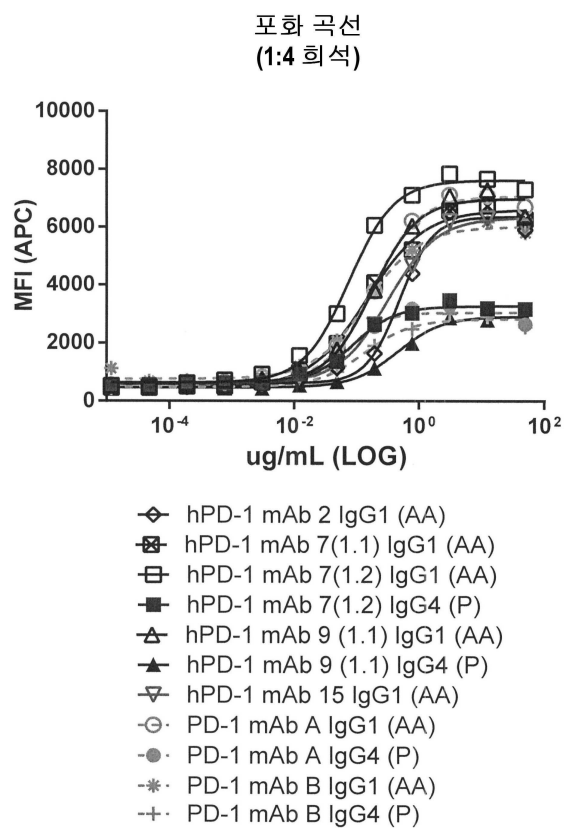


도면10b

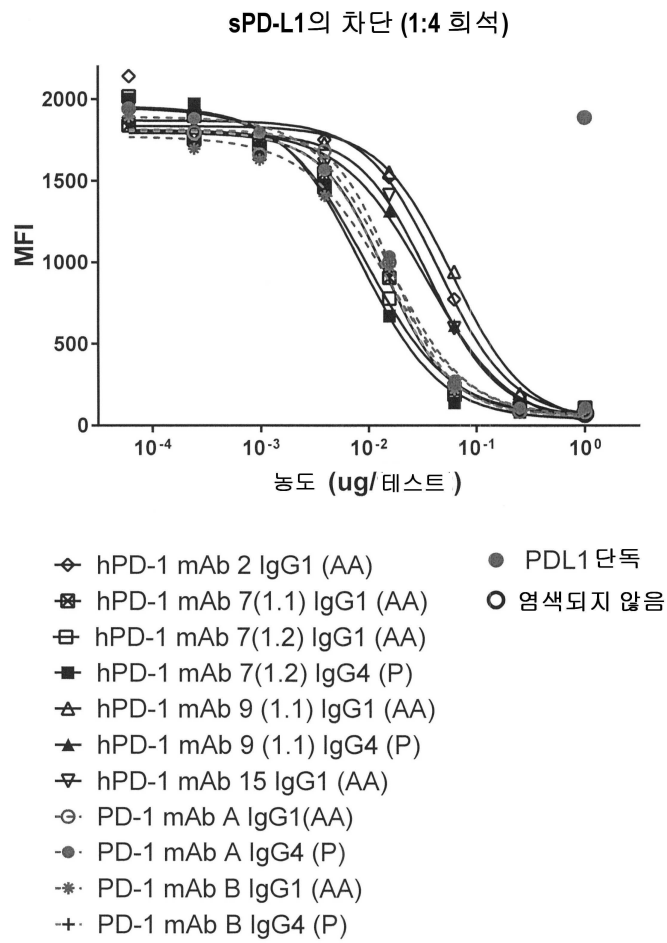


도 10B

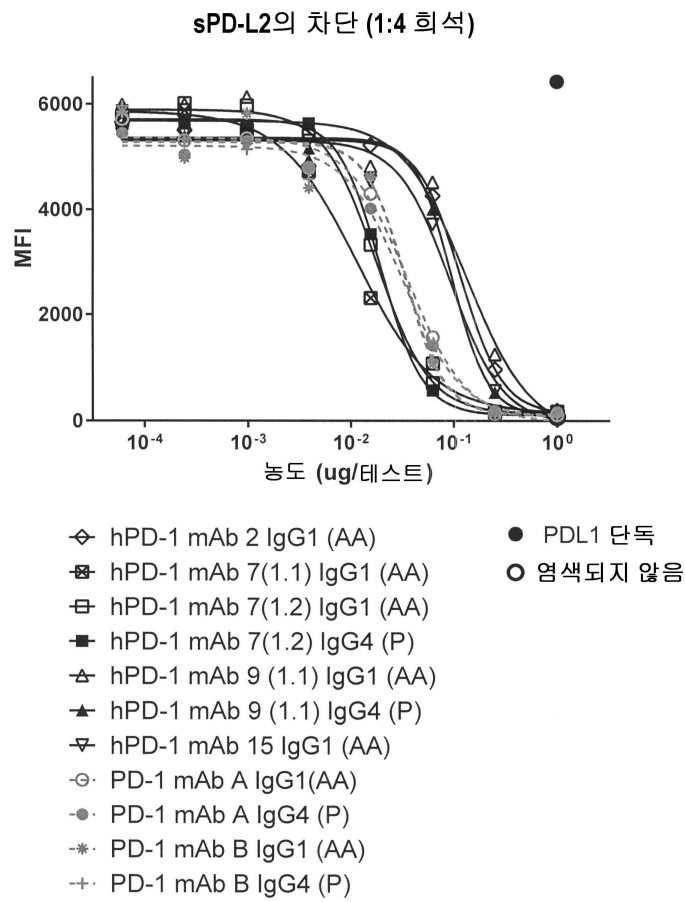
도면11



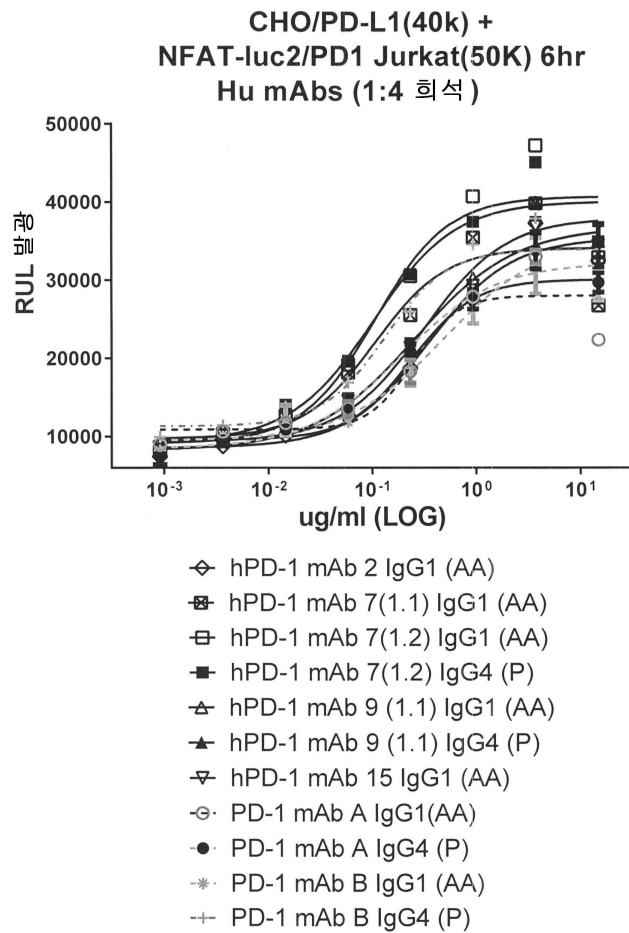
도면12a



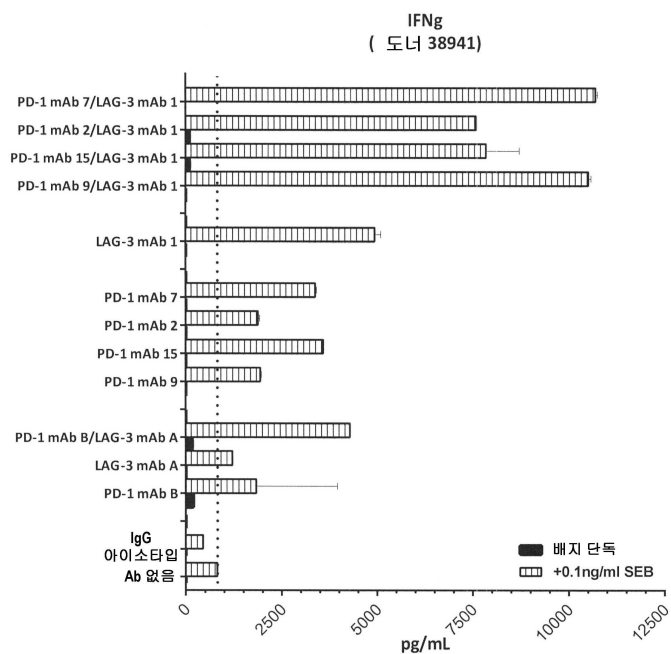
도면12b



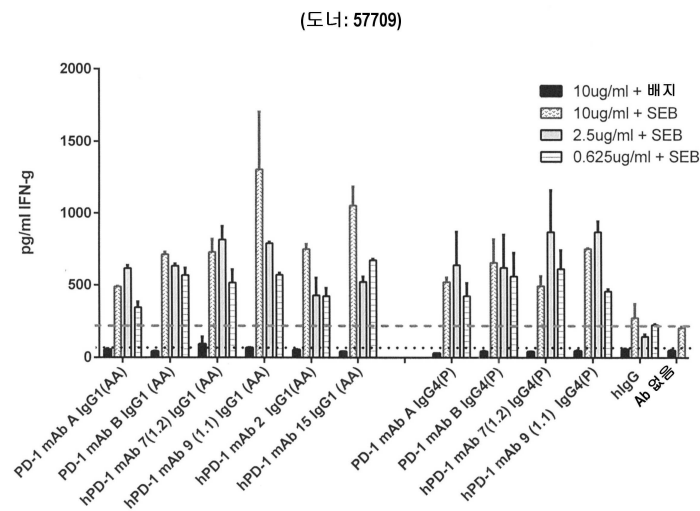
도면13



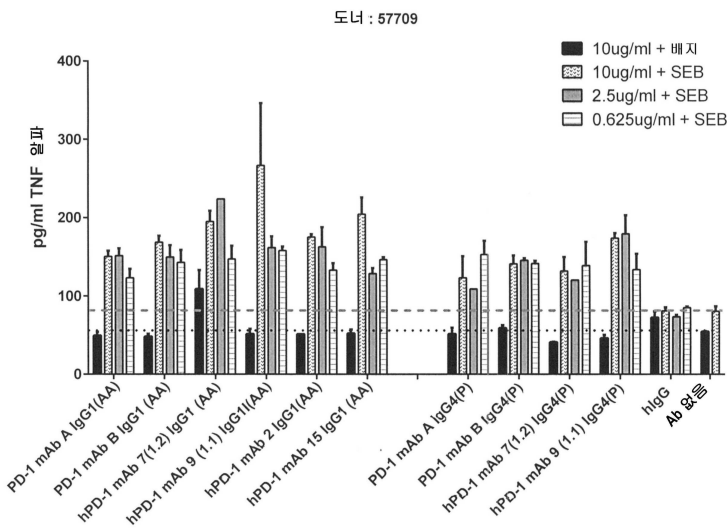
도면14



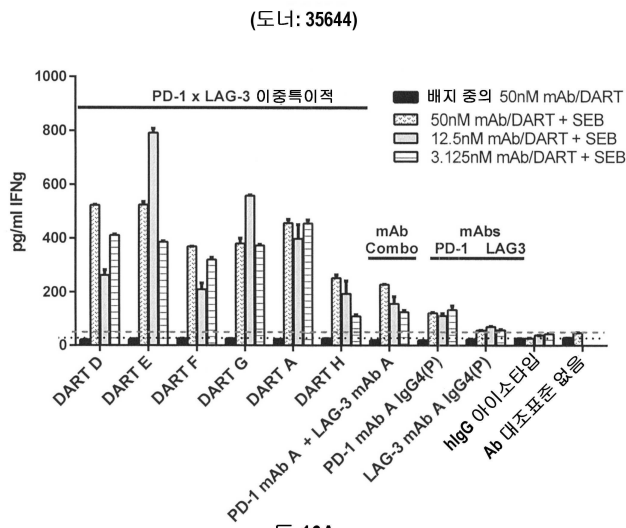
도면15a



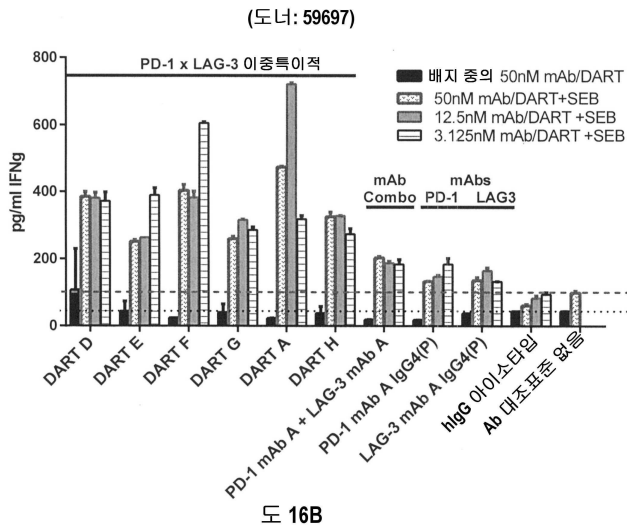
도면15b



도면16

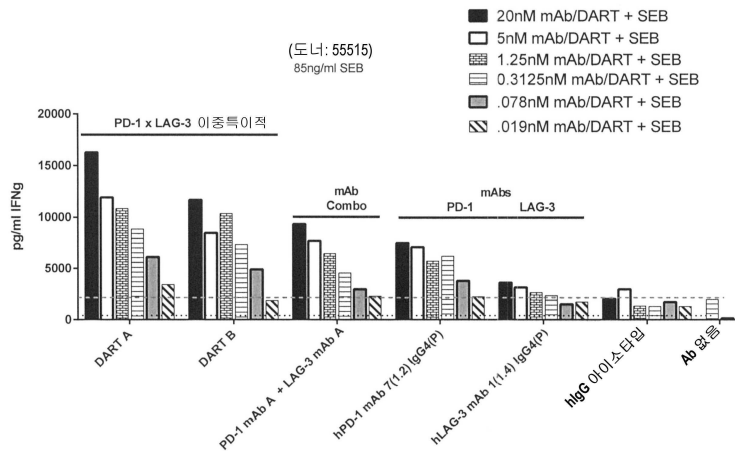


도 16A

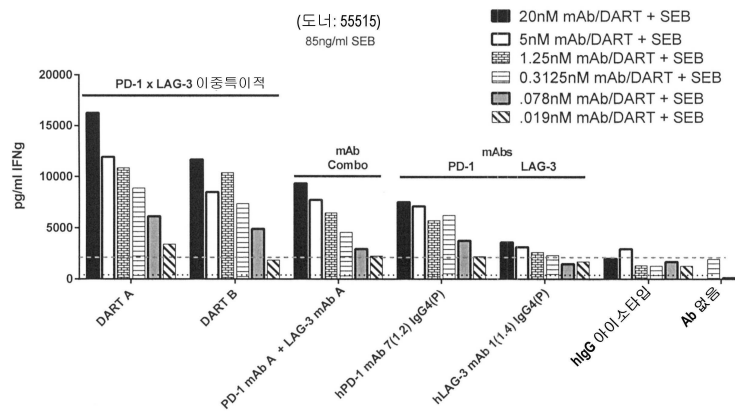


도 16B

도면17

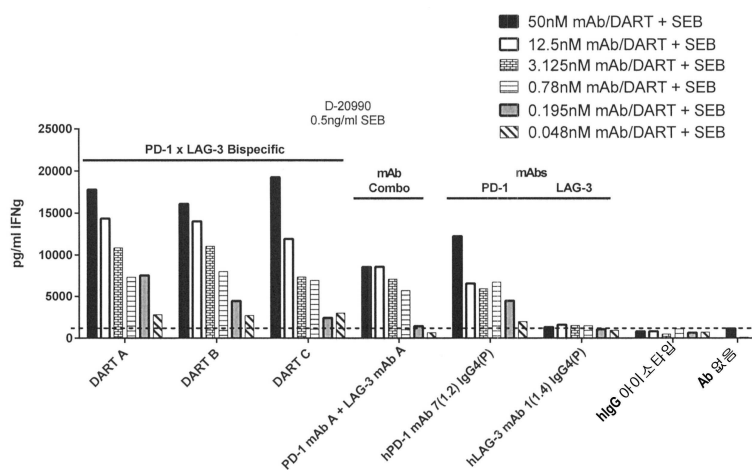


도 17A

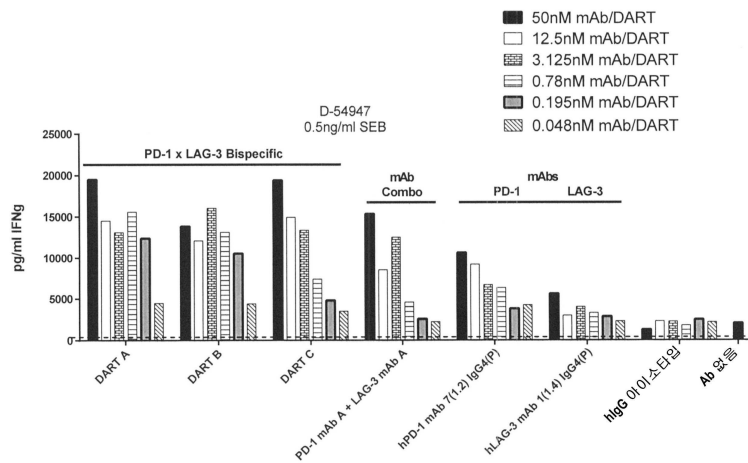


도 17B

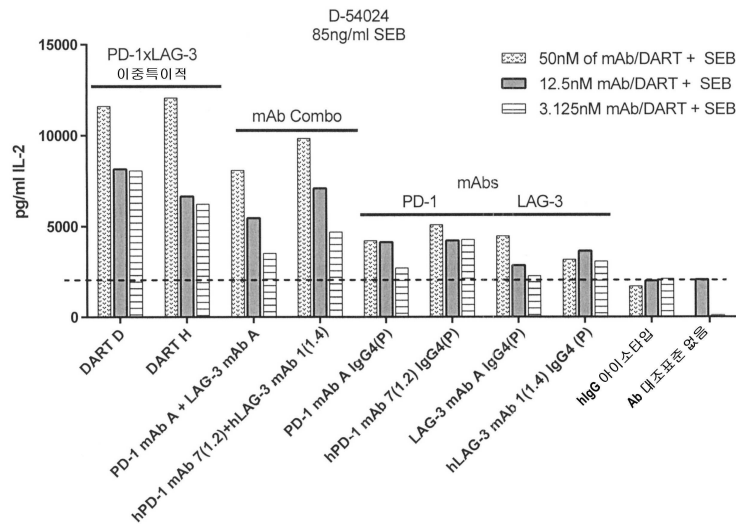
도면18a



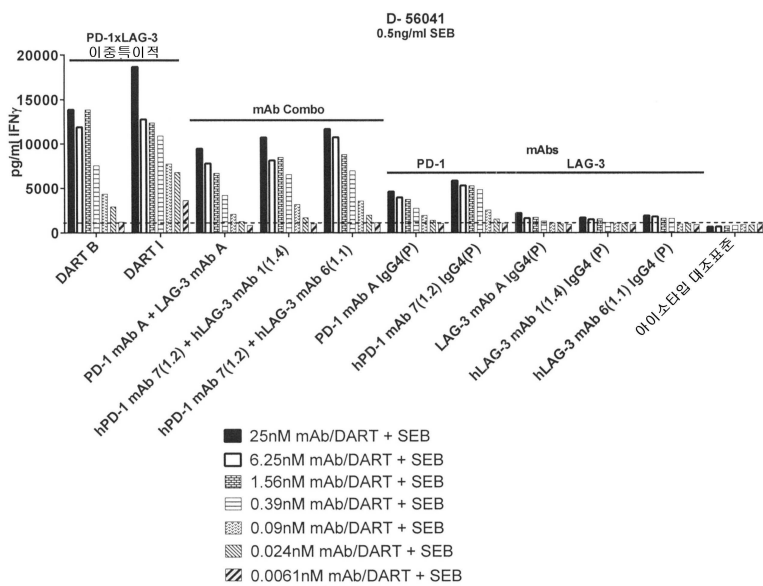
도면18b



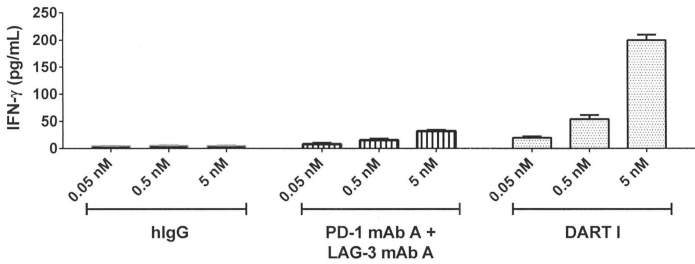
도면19



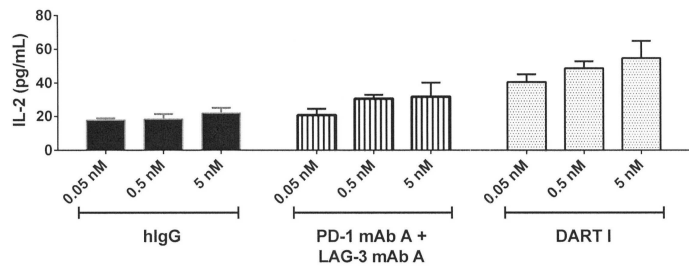
도면20



도면21ab

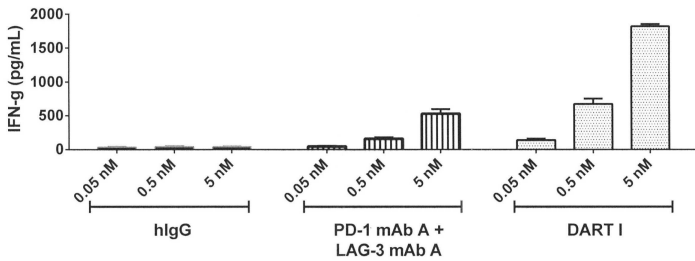


도 21A

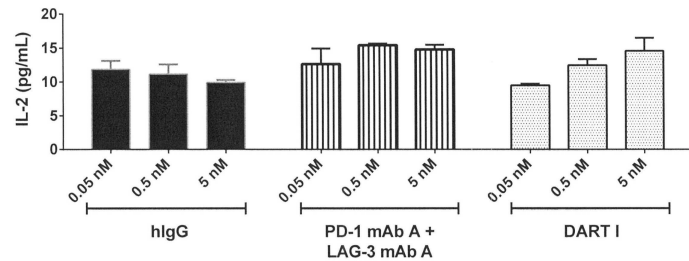


도 21B

도면21cd

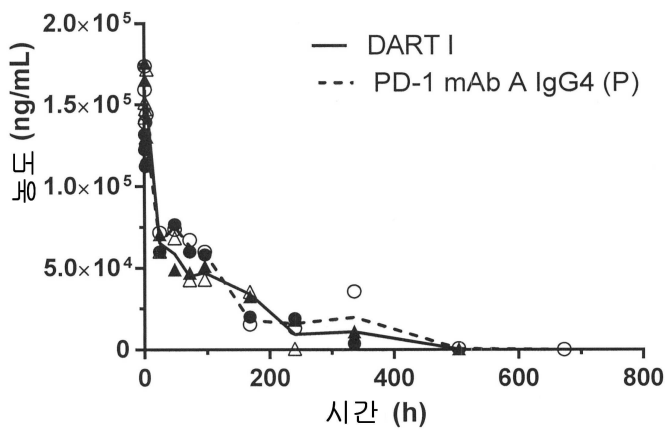


도 21C

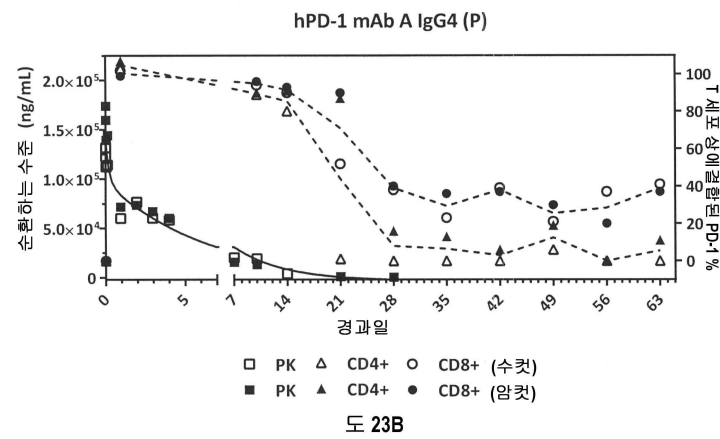
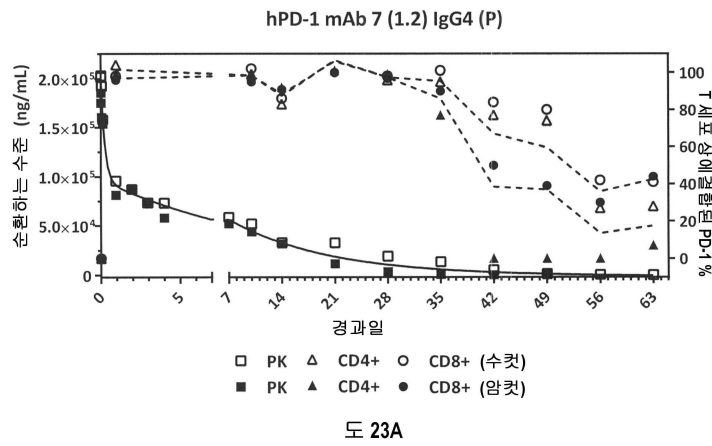


도 21D

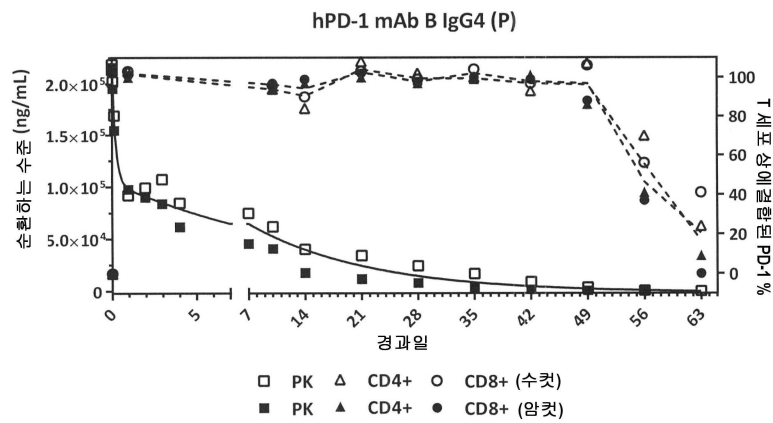
도면22



도면23ab



도면23c



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> MacroGenic, Inc.

Shah, Kalpana

Smith, Douglas

La Motte-Mohs, Ross

Johnson, Leslie

Moore, Paul

Bonvini, Ezio

Koenig, Scott

<120> PD-1-Binding Molecules and Methods of Use Thereof

<130> 1301.0122PCT

<150> US 62/198,867

<151> 2015-07-30

<150> US 62/239,559

<151> 2015-10-09

<150> US 62/255,140

<151> 2015-11-13

<150> US 62/322,974

<151> 2016-04-15

<160> 298

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(217)

<223> Human IgG1 CH2-CH3 Domain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Xaa is a lysine (K) or is absent

<400> 1

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

1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

85 90 95

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

100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
 210 215
 <210> 2
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(216)

 <223> Human IgG2 CH2-CH3 Domain
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (216)..(216)
 <223> Xaa is a lysine (K) or is absent
 <400> 2
 Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45

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

 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
180 185 190
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 3

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(217)

<223> Human IgG3 CH2-CH3 Domain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Xaa is a lysine (K) or is absent

<400> 3

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

50

55

60

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

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

180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa

210 215

<210> 4

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(217)

<223> Human IgG4 CH2-CH3 Domain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Xaa is a lysine (K) or is absent

<400

> 4

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

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

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

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

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa
210 215

<210> 5

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human IgG1 CH2-CH3 Domain Having L234A/L235A Substitutions

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Xaa is a lysine (K) or is absent

<400> 5

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

1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

85 90 95

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

100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa

210 215

<210> 6

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> "Knob-Bearing" Human IgG1 CH2-CH3 Domain

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Xaa is a lysine (K) or is absent

<400> 6

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

1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

85 90 95

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

100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 7
<211> 217
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> "Hole-Bearing" Human IgG1 CH2-CH3 Domain
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa is a lysine (K) or is absent
<400> 7

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

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

100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro

130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

165 170 175
Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln

195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa

210 215

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(107)

<223> Human IgG CL Kappa Domain

<400> 8

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> 9

<211> 104

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(104)

<223> Human IgG CL Lambda Domain

<400> 9

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu

1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe

20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val

35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr

50 55 60

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His

65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys

85 90 95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100

<210> 10

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(98)

<223> Human IgG1 CH1 Domain

<400> 10

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

Arg Val

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(12)

<223> Human IgG2 Hinge Region

<400> 11

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(12)

<223>

> Human IgG4 Hinge Region

<400> 12

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1 5 10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Stabilized IgG4 Hinge Region

<400> 13

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker 1

<400> 14

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cysteine-containing Linker 2

<400> 15

Gly Gly Cys Gly Gly Gly

1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heterodimer-Promoting Domain

<400> 16

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys

1 5

<210> 17

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Heterodimer-Promoting Domain
 <400> 17
 Val Glu Pro Lys Ser Cys
 1 5

<210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Heterodimer-Promoting Domain
 <400> 18
 Ala Glu Pro Lys Ser Cys
 1 5

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Heterodimer-Promoting Domain
 <400> 19
 Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 1 5

<210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Heterodimer-Promoting Domain
 <400> 20
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 1 5

<210> 21
 <211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heterodimer-Promoting (E-coil) Domain

<400> 21

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val

1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys

20 25

<210> 22

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heterodimer-Promoting "K-coil" Domain

<400> 22

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val

1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu

20 25

<210> 23

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cysteine-Containing Heterodimer-Promoting "E-coil" Domain

<400> 23

Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val

1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys

20 25

<210> 24

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cysteine-Containing Heterodimer-Promoting "K-coil" Domain

<400> 24

Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val

1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu

20 25

<210> 25

<211> 46

<212> PRT

<213> Streptococcus dysgalactiae

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(46)

<223> Albumin-Binding Domain 3 of Protein G of Streptococcus Strain

G148

<400> 25

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly

1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu

20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro

35 40 45

<210> 26

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant deimmunized Albumin Binding Domain

<400> 26

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly

1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu

20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro

35 40 45

<210> 27

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant Deimmunized Albumin Binding Domain

<400> 27

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly

1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ala Ala Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu

20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro

35 40 45

<210> 28

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant deimmunized Albumin Binding Domain

<400> 28

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly

1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Ser Asn Ala Lys Ser Val Glu

20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro

35 40 45

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alternative Linker 2

<400> 29

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alternative Linker 2

<400> 30

Ala Ser Thr Lys Gly

1 5

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 31

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 32

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alternative Linker 2

<400> 33

Leu Glu Pro Lys Ser Ser

1 5

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alternative Linker 2

<400> 34

Ala Pro Ser Ser Ser

1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 35

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu

1 5

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 36

Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

1 5 10 15

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 37

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 38

<211> 525

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(525)

<223> Human LAG-3 (Signaling Sequence and Mature Protein)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(28)

<223> Signaling Sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(525)

<223> Mature Protein

<400> 38

Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile

35 40 45

Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln

50 55 60

His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu

65 70 75 80

Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro

85 90 95

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

100 105 110

Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln

115 120 125

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

130 135 140

Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
180 185 190

Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
195 200 205

Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
210 215 220

Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
225 230 235 240

Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
245 250 255

Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala
260 265 270

Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val
275 280 285

Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu
305 310 315 320

Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His
325 330 335

Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr
340 345 350

Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu
355 360 365

Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser
370 375 380

Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala
385 390 395 400

Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln
405 410 415

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

420 425 430
Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly
435 440 445
His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu
450 455 460
Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro
465 470 475 480

Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln
485 490 495
Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
500 505 510
Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu
515 520 525

<210> 39

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(120)

<223> Heavy Chain Variable Domain of LAG-3 mAb A

<400> 39

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

Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95
Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(107)

<223> Light Chain Variable Domain of LAG-3 mAb A

<400> 40

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

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

<210> 41

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(107)

<223> Heavy Chain Variable Domain of LAG-3 mAb 1

<400> 41

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Val Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Ile Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 42

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(6)

<223> CDRH1 of LAG-3 mAb 1

<400> 42

Arg Asn Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 of LAG-3 mAb 1

<400> 43

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu

1 5 10 15

Gly

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(11)

<223> CDRH3 of LAG-3 mAb 1

<400> 44

Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 45

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(112)

<223> VL Domain of LAG-3 mAb 1

<400> 45

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro

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

85 90 95
 Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 46

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(16)

<223> CDRL1 of LAG-3 mAb 1

<400> 46

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 of LAG-3 mAb 1

<400> 47

Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser

1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 of LAG-3 mAb 1

<400> 48

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 49

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Domain of hLAG-3 mAb 1 VH1

<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 Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 50

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Domain of hLAG-3 mAb 1 VH2

<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 Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60
Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Domain of hLAG-3 mAb 1 VL1

<400> 51

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95
Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 52

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Domain of hLAG-3 mAb 1 VL2

<400> 52

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

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

<210> 53

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Domain of hLAG-3 mAb 1 VL3

<400> 53

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

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

<210> 54

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Domain of hLAG-3 mAb 1 VL4

<400> 54

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

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

100 105 110

<210> 55

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL1 of the VL Domain of hLAG-3 mAb 1 VL4

<400> 55

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 56

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(118)

<223> VH Domain of LAG-3 mAb 6

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 of LAG-3 mAb 6

<400> 57

Asp Tyr Asn Met Asp

1 5

<210

> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 of LAG-3 mAb 6

<400> 58

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

1 5 10 15

Gly

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> CDRH3 of LAG-3 mAb 6

<400> 59

Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210

> 60

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(107)

<223> VL Domain of LAG-3 mAb 6

<400> 60

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

65 70 75 80

Ala Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(11)

<223> CDRL1 of LAG-3 mAb 6

<400> 61

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val Val Ala

1 5 10

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 of LAG-3 mAb 6

<400> 62

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRL3 of LAG-3 mAb 6

<400> 63

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 64

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(113)

<223> Heavy Chain Variable Domain of PD-1 mAb A

<400> 64

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 65

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(107)

<223> Light Chain Variable Domain of PD-1 mAb A

<400> 65

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

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

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 66

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(120)

<223> Heavy Chain Variable Domain of PD-1 mAb B

<400> 66

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val 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 Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 67

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(111)

<223> Light Chain Variable Domain of PD-1 mAb B

<400> 67

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 68

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(288)

<223> Human PD-1 Polypeptide (NCI Sequence NP 005009.2)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> Human PD-1 Signal Sequence

<400> 68

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50	55	60	
Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala			
65	70	75	80
Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg			
	85	90	95
Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg			
	100	105	110
Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu			
	115	120	125
Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val			
	130	135	140
Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro			
145	150	155	160
Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly			
	165	170	175
Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys			
	180	185	190
Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro			
	195	200	205
Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly			
	210	215	220
Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro			
225	230	235	240
Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly			
	245	250	255
Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg			
	260	265	270
Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu			
	275	280	285
<210> 69			
<211> 121			

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(121)

<223> VH Domain of PD-1 mAb 1

<400> 69

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Arg Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Phe Ser Ile Thr Asn Asp

20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp

35 40 45

Met Gly His Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn His Phe Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 70

<211> 373

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(373)

<223> Polynucleotide Encoding VH Domain of PD-1 mAb 1

<400> 70

cagatccagt gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc cgggtgaaac cttctcagtc 60

tctgtccctc acctgcactg tcaactggctt ctcaatcacc aatgattatg cctggaactg 120

gatccgacag tticcaggaa acaaactgga gtggatgggc cacataacct acagtggcag 180
 cactagctac aaccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgggaca catccaagaa 240
 ccacttcttc ctgcagttga gttctgtgac tcctgaggac acagccacat attactgtgc 300
 aagagattac ggiagtggct acccctatac ttggactac tggggtcaag gtacctcagt 360
 caccgtctcc tcc 373

<210> 71

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(6)

<400> 71

Asn Asp Tyr Ala Trp Asn

1 5

<210> 72

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(16)

<223> CDRH2 of PD-1 mAb 1

<400> 72

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

1 5 10 15

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221>

> MISC_FEATURE

<222> (1)..(12)

<223> CDRH3 of PD-1 mAb 1

<400> 73

Asp Tyr Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr

```

1             5             10
<210> 74
<211> 106
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(106)
<223> VL Domain of PD-1 mAb 1
<400> 74
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
1             5             10             15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val

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

                85                90                95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
                100                105
<210> 75
<211> 318
<212> DNA
<213> Mus musculus
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(318)
<223> Polynucleotide Encoding VL Domain of PD-1 mAb 1
<400> 75
caaattgttc tcaccagtc tccagcactc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc        60
atgacctgca gtgccacctc aattgtaagt tacgtttact ggtaccagca gaagcctgga        120

```


tcctccccc aaccctggat ttatctcaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctgc 180

ttcagtgga gtgggtctgg gacctcttac tctctcaca tcagcagcat ggaggctgaa 240

gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtgataacc cgtacacgtt cggagggggg 300

accaagctgg aaataaaa 318

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(10)

<223> CDRL1 of PD-1 mAb 1

<400> 76

Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val Tyr

1 5 10

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 of PD-1 mAb 1

<400> 77

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 of PD-1 mAb 1

<400> 78

Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Tyr Thr

1 5
 <210> 79
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VH Domain of hPD-1 mAb 1 VH1
 <400> 79
 Asp 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 Thr Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser Asn Asp
 20 25 30
 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly His Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Val

65 70 75 80
 Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 80
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Polynucleotide Encoding hPD-1 mAb 1 VH1

<400> 80
 gacgtacagc tccaggaaag tggcccaggt ctggtgaagc catcccagac actgagcctg 60
 acttgaccg tgagtggctt ctccatctca aatgactacg cctggaattg gattaggcag 120
 cctcccggt aagggtgga gtggatcggc cacatcacat acagcggctc cacatcatat 180

aatcccagtc tgaagagccg tcttaccatt actcgcgaca ctagtaagaa ccagtttgtt 240
ctgaccatga ccaacatgga ccctgtggat actgcaacat actattgtgc tcgagattat 300
ggttctggtt acccttatac actcgactac tggggacagg gaaccactgt gaccgtgagc 360
tcc 363

<210> 81

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Domain of hPD-1 mAb 1 VL1

<400> 81

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val

20 25 30

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

35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Tyr Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 82

<211> 318

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide Encoding hPD-1 mAb 1 VL1

<400> 82

gaaatcggtc tgacccagag cccagcaacc ctgtctgtct ccccgaggaga aaaggtcacc 60

attacttgct ctgctacttc tategtgtcc tacgtgtact ggtatcagca gaagcccggt 120

caggctcccc agccattgat atatctgacc agcaacctgg cttctggtat cccagctcgt 180
 ttttccggta gcgggtccgg gactgatttc actttgacta tcagctctct ggaggcagaa 240
 gagcccgcca cctattattg tcaacagtgg tcagacaatc catacacttt tggcgggtggc 300
 accaaagtcg aaataaag 318

<210> 83

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(116)

<223> VH Domain of PD-1 mAb 2

<400> 83

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

1 5 10 15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Phe

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Thr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe

65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 84

<211> 348

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(348)

<223> Polynucleotide Encoding the VH Domain of PD-1 mAb 2

<400> 84

gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa tgcaactgggt tcgtcaggct 120

ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatat atcagtagtg gcagtatgag catttcctat 180

gcagacacag tgaagggccg attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc 240

ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgagt 300

gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc 348

<210> 85

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 of PD-1 mAb 2

<400> 85

Ser Phe Gly Met His

1 5

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 of PD-1 mAb 2

<400> 86

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

1 5 10 15

Gly

<210> 87

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRH3 of PD-1 mAb 2

<400> 87

Leu Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 88

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(112)

<223> VL Domain of PD-1 mAb 2

<400> 88

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 89

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(336)

<223> Polynucleotide Encoding the VL Domain of PD-1 mAb 2

<400> 89

gatgttgtga tgcctcaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtc gagccttggt cacagtactg gaaacaccta ttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acagggtttc taaccgattt 180

tctgggggcc ccgacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agtagagtgg aggctgagga tctgggagtt tttttctgct ctcaaactac acatgttccg 300

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 90

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(16)

<223> CDRL1 of PD-1 mAb 2

<400> 90

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 of PD-1 mAb 2

<400> 91

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 of PD-1 mAb 2

<400> 92

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 93

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Domain of hPD-1 mAb 2 VH1

<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 Val Phe Ser Ser Phe

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 94

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide Encoding hPD-1 mAb 2 VH1

<400> 94

```
gaagtgaat tggttgagag tggtaggtggc ctggtgcagc caggtggaag tctgcggttg      60
tcctgtgcag caagcggatt tgtgttcagc tcttttggga tgcattgggt gcgccaggct      120
cccggaagg gtctcgagtg ggtagcatat atctccagcg ggtccatgtc tattagttat      180
gccgacacag tgaaggcag gtttactatc tcccgtagaca atgcaaaaaa cacactgtac      240
ctgcaaatga atagcctgcg caccgaggac accgccttgt actactgcgc ttcctgtct      300

gattacttcg actactgggg tcagggcaca actgtgacag tttcttcc      348
```

<210> 95

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Domain of hPD-1 mAb 2 VL1

<400> 95

```
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1           5           10           15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
           20           25           30
Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
           85           90           95
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105          110
```

<210> 96

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide Encoding hPD-1 mAb 2 VL1

<400> 96

```
gacgttgatga tgacacagtc accactgagt ctgccagtta ccctgggcca gccagccagt      60
atttcttgtc ggagttcaca gagtctggta cattccacag gaaatacata tctccattgg      120
tacctgcaaa aaccaggcca gagccccag ctgctgattt atagagtgtc taatcgattt      180
tctggcgtgc cagatcggtt cagcggcagc gggctctggca ctgatttcac actgaaaatc      240
tctagggtgg aggcagagga cgtaggcgtt tactactgta gtcagaccac ccatgtaccc      300
```

```
tggacttttg gccaaggtac taagctggaa atcaag      336
```

<210> 97

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(125)

<223> VH Domain of PD-1 mAb 3

<400> 97

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Glu Lys Ile Thr Thr Ile Val Glu Gly Thr Tyr Trp Tyr Phe

	100	105	110	
Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser				
	115	120	125	
<210>	98			
<211>	375			
<212>	DNA			
<213>	Mus musculus			
<220><221>	misc_feature			
<222>	(1)..(375)			
<223>	Polynucleotide Encoding the VH Domain of PD-1 mAb 3			
<400>	98			
caggttcaac tgcaacagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg			60	
tcctgcaagg cticgggcta cacatttact gactatgtaa tgcaactgggt gaagcagaca			120	
cctgtgcatg gcctggaatg gattggaact attgatcctg aaactggtgg tactgcctac			180	
aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg actgcagaca agtcctccaa cacagcctac			240	
atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactttac aagagagaag			300	
attactacga tagtagaggg gacatactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg			360	
gtcacctgtc cctca			375	
<210>	99			
<211>	5			
<212>	PRT			
<213>	Mus musculus			
<220><221>	MISC_FEATURE			
<222>	(1)..(5)			
<223>	CDRH1 of PD-1 mAb 3			
<400>	99			
Asp Tyr Val Met His				
1	5			
<210>	100			
<211>				
>	17			
<212>	PRT			
<213>	Mus musculus			
<220><221>	MISC_FEATURE			

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 of PD-1 mAb 3

<400> 100

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

1 5 10 15

Gly

<210> 101

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(16)

<223> CDRH3 of PD-1 mAb 3

<400> 101

Glu Lys Ile Thr Thr Ile Val Glu Gly Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10 15

<210> 102

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(112)

<223> VL Domain of PD-1 mAb 3

<400> 102

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser

20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

<210> 103

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(336)

<223> Polynucleotide Encoding the VL Domain of PD-1 mAb 3

<400> 103

gatgttttgc tgacccaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc	60
atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg gagacaccta tttggaatgg	120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct ataaagtttc caaccgattt	180
tctggggctc cagacaggtt cagtggcagt gggtcagga cagattttac actcaaaatc	240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatcttcgc	300

tacacgttcg gagggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 104

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(16)

<223> CDRL1 of PD-1 mAb 3

<400> 104

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

1 5 10 15

<210> 105

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 of PD-1 mAb 3

<400> 105

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 106

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 of PD-1 mAb 3

<400> 106

Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 107

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(116)

<223> VH Domain of PD-1 mAb 4

<400> 107

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

1 5 10 15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Phe

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Thr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

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

Ala Ser Leu Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 108

<211> 348

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(348)

<223> Polynucleotide Encoding the VH Domain of PD-1 mAb 4

<400> 108

gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120

ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatat attagtagtg gcagtatgag tatttcctat 180

gcagacacag tgaagggccg attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc 240

ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgact 300

gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca 348

<210> 109

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 of PD-1 mAb 4

<400> 109

Ser Phe Gly Met His

1 5

<210> 110

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 of PD-1 mAb 4

<400> 110

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

1 5 10 15

Gly

<210> 111

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRH3 of PD-1 mAb 4

<400> 111

Leu Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 112

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(112)

<223> VL Domain of PD-1 mAb 4

<400> 112

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Phe His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

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

100 105 110
<210> 113
<211> 336
<212> DNA
<213> Mus musculus
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(336)
<223> Polynucleotide Encoding the VL Domain of PD-1 mAb
<400> 113

gatgttgatg tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcctgca gatctagtca gagccttggt cacagtactg gaaacaccta ttccattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acagggtttc taaccgattt 180
tctgggggtcc ccgacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaactac acatgttccg 300
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 114
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(16)
<223> CDRL1 of PD-1 mAb 4
<400> 114

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Phe His

1 5 10 15

<210> 115

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 of PD-1 mAb 4

<400> 115

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 of PD-1 mAb 4

<400> 116

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 117

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(119)

<223> VH Domain of PD-1 mAb 5

<400> 117

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

1 5 10 15

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

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

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

115

<210> 118

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(357)

<223> Polynucleotide Encoding the VH Domain of PD-1 mAb 5

<400> 118

cagggtccaac tgcagcagcc tggggttgaa ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg 60
 tcctgcaagg ctcttgacta ctccttcacc gcctactgga tgaactggat gaaacagagg 120
 cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg attcatcctt ccgatagtga aacttggtta 180
 aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcaactca tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagagcac 300
 tacggtagta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca 357

<210> 119

<211> 5

<212> PRT

<

213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 of PD-1 mAb 5

<400> 119

Ala Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 120

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 of PD-1 mAb 5

<400> 120

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

1 5 10 15

Asp

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><

221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(10)

<223> CDRH3 of PD-1 mAb 5

<400> 121

Glu His Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 122

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(111)

<223> VL Domain of PD-1 mAb 5

<400> 122

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys

85 90 95

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

100 105 110

<210> 123

<211> 333

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(333)

<223> Polynucleotide Encoding the VL Domain of PD-1 mAb 5

<400> 123

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggga gaggccacc 60

atctcctgca gagccaacga aagtgtgat aattatggca tgagtttat gaactggttc 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatcaa ccaaggatcc 180

ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag atttcagcct caacatccat 240

cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat tttctgcagc aaagtaagga ggttccttac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 124

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(15)

<223> CDRL1 of PD-1 mAb 5

<400> 124

Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn

1 5 10 15

<210> 125

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 of PD-1 mAb 5

<400> 125

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser

1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 of PD-1 mAb 5

<400> 126

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 127

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(118)

<223> VH Domain of PD-1 mAb 6

<400> 127

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Asn Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gln Lys Ala Thr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Thr

115

<210> 128

<211> 333

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(333)

<223> Polynucleotide Encoding the VH Domain of PD-1 mAb 6

<400> 128

gaaatcgtac tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60

ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcac gaactggttt 120

cagcagaagc ctgggcagcc acctaaagctg ctcatccacg ccgcctctaa ccgcggatct 180

ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240

tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccttat 300

acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 129

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 of PD-1 mAb 6

<400> 129

Ser Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 130

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 of PD-1 mAb 6

<400> 130

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> CDRH3 of PD-1 mAb 6

<400> 131

Gln Lys Ala Thr Thr Trp Phe Ala Tyr

1 5

<210> 132

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(111)

<223> VL Domain of PD-1 mAb 6

<400> 132

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

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

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

<210> 133

<211> 333

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(333)

<223> Polynucleotide Encoding the VL Domain of PD-1 mAb 6

<400> 133

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggga gagggccacc 60

atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaactggttc 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcattctatc ctgcatccaa ccaaggatcc 180

ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat 240

cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttcctggg 300

acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333

<210> 134

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(15)

<223> CDRL1 of PD-1 mAb 6

<400> 134

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn

1 5 10 15

<210> 135

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 of PD-1 mAb 6

<400> 135

Pro Ala Ser Asn Gln Gly Ser

1 5

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 of PD-1 mAb 6

<400> 136

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 137

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(119)

<223> VH Domain of PD-1 mAb 7

<400> 137

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 138

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(357)

<223> Polynucleotide Encoding the VH Domain of PD-1 mAb 7

<400> 138

gaggtccaac tgcagcagcc tggggtgaa ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta ctccttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120

cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg attcatcctt ccgatagtga aacttggtta 180

gatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccac cacagcctac 240

atgcaactca tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaggagcac 300

tacggtacta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt gtcttcc 357

<210> 139

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 of PD-1 mAb 7

<400> 139

Ser Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 140

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222>

> (1)..(17)

<223> CDRH2 of PD-1 mAb 7

<400> 140

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

1 5 10 15

Asp

<210> 141

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(10)

<223> CDRH3 of PD-1 mAb 7

<400> 141

Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 142

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(111)

<223> VL Domain of PD-1 mAb 7

<400> 142

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Met Glu Glu Asp Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys

85 90 95

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

100 105 110

<210> 143

<211> 333

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(333)

<223> Polynucleotide Encoding the VL Domain of PD-1 mAb 7

<400> 143
gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggtgtgt ctctaggga gagggccacc 60
atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca tgagttttat gaactggttc 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcattcatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180
ggggtccctg ccaggttttag tggcagtggg ttggggacag acttcagcct caacatccat 240
cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttcgtgcagc aaagtaagga ggttccttac 300
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 144
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(15)
<223> CDRL1 of PD-1 mAb 7
<400> 144

Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 145
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 of PD-1 mAb 7
<400> 145

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5

<210> 146
<211> 9
<212> PRT

<213> Mus musculus
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 of PD-1 mAb 7

<400> 146

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 147

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Domain of hPD-1 mAb 7 VH1

<400> 147

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 148

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide Encoding hPD-1 mAb 7 VH1

<400> 148

caagttcaat tggtagacag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag tgtaaggtg 60

tcctgcaaag ccagcgggta cagctttaca agctattgga tgaattgggt gcgtcaagca 120
ccagggcagg gtctggaatg gattgggggtg atacatcctt ctgacagcga aacatgggtg 180

gaccagaaat ttaaagatcg tgtgacaatt acagtcgata agtcacacaag cactgcttac 240
atggaactct ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac 300
tacggcacat caccttttgc atactggggc cagggaactc tcgtaaccgt atcctcc 357

<210> 149

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Domain of hPD-1 mAb 7 VH2

<400> 149

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 Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 150

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide Encoding hPD-1 mAb 7 VH2

<400> 150

caagttcaat tggtaacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag tgtaaggtg 60
tcctgcaaag ccagcgggta cagctttaca agctattgga tgaattgggt gcgtcaagca 120

ccagggcagg gtctggaatg ggctgggggtg atacatcctt ctgacagcga aacatggttg 180
gaccagaaat ttaaagatcg tgtgacaatt acagtcgata agtcacaaag cactgcttac 240
atggaactct ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac 300
tacggcacat caccttttgc atactggggc cagggaactc tcgtaaccgt atcctcc 357

<210> 151

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Domain of hPD-1 mAb 7 VL1

<400> 151

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

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

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

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

<210> 152

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide Encoding hPD-1 mAb 7 VL1

<400> 152

gaaatcgtag tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60
ctcagctgca gagcaaatga gagtgtggac aattacggca tgtccttcac gaactgggtt 120

cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcacccagc ccgcctctaa ccagggatct 180
ggggtgcctt cagctttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240
tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgcctat 300
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 153

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Domain of hPD-1 mAb 7 VL2

<400> 153

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

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

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

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

<210> 154

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide Encoding hPD-1 mAb 7 VL2

<400> 154

gaaatcgtag tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60
ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120

cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcattccag cgcctctaa ccagggatct 180
ggggtgcctt cagctttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240
tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgcctat 300
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 155

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Domain of hPD-1 mAb 7 VL3

<400> 155

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

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

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

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

<210> 156

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide Encoding hPD-1 mAb 7 VL3

<400> 156
gaaatcgtac tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60
ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120

cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcattccacg ccgcctctaa ccgcggatct 180
gggggtgcctt cagctttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240
tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccttat 300
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 157
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CDRL1 of the VL Domain of hPD-1 mAb 7 VL2 and hPD-1 mAb 7 VL3
<400> 157
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn

1 5 10 15
<210> 158
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CDRL2 of the VL Domain of hPD-1 mAb 7 VL3
<400> 158
Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser
1 5
<210> 159
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(113)
<223> VH Domain of PD-1 mAb 8
<400> 159
Glu Gly 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 Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Glu Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser

<210> 160

<211> 339

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(339)

<223> Polynucleotide Encoding the VH Domain of PD-1 mAb 8

<400> 160

gagggccagc tgcaacaatc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgtaagg cttctggata cacgttcact gactactaca tgaactgggt gaagcagaac 120

catggaaaga gccttgagtg gattggagat attaatccta aaaatggtga cactcactac 180

aaccagaagt tcaagggcga ggccacattg actgtagaca agtcctccac cacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc gagcgatttt 300

gactactggg gccaaaggcac cactctcaca gtctcctcc 339

<210> 161

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 of PD-1 mAb 8

<400> 161

Asp Tyr Tyr Met Asn

1 5

<210> 162

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 of PD-1 mAb 8

<400> 162

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

1 5 10 15

Gly

<210> 163

<211> 4

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(4)

<223> CDRH3 of PD-1 mAb 8

<400> 163

Asp Phe Asp Tyr

1

<210> 164

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(112)

<223> VL Domain of PD-1 mAb 8

<400> 164

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

85 90 95

Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 165

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(336)

<223> Polynucleotide Encoding the VL Domain of PD-1 mAb 8

<400> 165

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtcg gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtea gaccttgta tatagtaatg gaaacaccta tttaaattgg 120

ttcctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcca 300

ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa 336

<210> 166

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(16)

<223> CDRL1 of PD-1 mAb 8

<400> 166

Arg Ser Ser Gln Thr Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 167

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 of PD-1 mAb 8

<400> 167

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 168

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 of PD-1 mAb 8

<400> 168

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr

1 5

<210> 169

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(119)

<223> VH Domain of PD-1 mAb 9

<400> 169

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Val Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 170

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(357)

<223> Polynucleotide Encoding the VH Domain of PD-1 mAb 9

<400> 170

gaagtgatgc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttatcttg tgtcttgggt tcgccagact 120

ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgggtg gtggtggtaa cacctactat 180

tcagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatca gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aaggtatggt 300

ttcgacggcg cctggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctcttcc 357

<210> 171

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 of PD-1 mAb 9

<400> 171

Ser Tyr Leu Val Ser

1 5

<210> 172

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 of PD-1 mAb 9

<400> 172

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 173

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(10)

<223> CDRH3 of PD-1 mAb 9

<400> 173

Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 174

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(107)

<223> VL Domain of PD-1 mAb 9

<400> 174

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Glu Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Thr

100 105

<210> 175

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(321)

<223> Polynucleotide Encoding the VL Domain of PD-1 mAb 9

<400> 175

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga tattgtcacc 60

atcacatgtc gagcaagtga gaatatattac agttatttag catggtatca gcagaaacag 120

gaaaaatctc ctgagctcct ggtctataat gcaaaaacct tggcagcagg tgtgccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga ccatcaacag cctgcagcct 240
 gaagattttg ggaattatta ctgtcagcat cattatgctg ttccgtggac gttcggtgga 300

ggcaccagac tggaaatcac a 321

<210> 176

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(11)

<223> CDRL1 of PD-1 mAb 9

<400> 176

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 177

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 of PD-1 mAb 9

<400> 177

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Ala

1 5

<210> 178

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 of PD-1 mAb 9

<400> 178

Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 179

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Domain of hPD-1 mAb 9 VH1

<400> 179

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 180

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide Encoding hPD-1 mAb 9 VH1

<400> 180

gaggtgcagc tgggtggaaag tgggggcggc ctggtgacgac ccgggggaag tctgaaactg 60

tcctgtgcag catcaggatt tactttttca tcttatctcg tgtcttgggt aagacaagca 120

cccggaaaag gcttgaatg ggtggccact atctccggtg gaggtggcaa cacctactat 180

agcgacagtg tcaagggaag atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac 240
ctccagatga actccctgcg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga 300
tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaacgt tagctcc 357

<210> 181

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Domain of hPD-1 mAb 9 VH2

<400> 181

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 182

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide Encoding hPD-1 mAb 9 VH2

<400> 182

gaggtgcagc tggtggaaag tgggggcggc ctggcgcgac cgggggaag tctgaaactg 60

tcctgtgcag catcaggatt tactttttca tcttatctcg tgggctgggt aagacaagca 120
cccggaaaag gcttggaatg gacggccact atctccgtg gaggtggcaa cacctactat 180
agcgacagtg tcaagggaag atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac 240
ctccagatga actccgcacg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga 300
tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaacctg tagctcc 357

<210> 183

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH1 of the VH Domain of hPD-1 mAb 9 VH2 Having a Serine to

Glycine Amino Acid Substitution

<400> 183

Ser Tyr Leu Val Gly

1 5

<210> 184

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Domain of hPD-1 mAb 9 VL1

<400> 184

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 Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Ala 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 His His Tyr Ala Val Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 185

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide Encoding hPD-1 mAb 9 VL1

<400> 185

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga tcgggtcacc 60
atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat tcatacctcg cctggtatca acagaaacct 120
ggtaaagccc caaaattgct catttacaac gccaagaccc tcgcagctgg cgtgccaagt 180
aggttctcag gcagcggctc agggacagat ttaccctca ccatatcctc actgcagccc 240
gaggattttg ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgccttgac cttcggacaa 300

ggcactaagc tcgagatcaa a 321

<210> 186

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Domain of hPD-1 mAb 9 VL2

<400> 186

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 Glu Asn Ile Tyr Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Lys Thr Leu Ala Ala 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 His His Tyr Ala Val Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 187

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide Encoding hPD-1 mAb 9 VL2

<400> 187

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga tcgggtcacc	60
atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat aactacctcg cctggtatca acagaaacct	120
ggtaaagccc caaaattgct catttacgac gccaagaccc tcgcagctgg cgtgccaagt	180
aggttctcag gcagcggctc agggacagat ttaccctca ccatatcctc actgcagccc	240
gaggattttg ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgcctggac cttcggacaa	300

ggcactaagc tcgagatcaa a	321
-------------------------	-----

<210> 188

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL1 of the VL Domain of hPD-1 mAb 9 VL2

<400> 188

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Asn Tyr Leu Ala

1	5	10
---	---	----

<210> 189

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL2 of the VL Domain of hPD-1 mAb 9 VL2

<400> 189

Asp Ala Lys Thr Leu Ala Ala

1	5
---	---

<210> 190

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(116)

<223> VH Domain of PD-1 mAb 10

<400> 190

Glu Val Ile Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ser Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 191

<211> 348

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(348)

<223> Polynucleotide Encoding the VH Domain of PD-1 mAb 10

<400> 191

gaagtgatac tggatggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatctca tgtcttgggt tcgccagact 120

cgggagaaga ggctggagtg ggtcgcaagt attagtgggt gtggtagtaa tatctactat 180

ccagacagtg tgaagggtcg attcaccata tccagggaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga acagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagaa 300

ctggcttttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc 348

<210> 192

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 of PD-1 mAb 10

<400> 192

Asn Tyr Leu Met Ser

1 5

<210> 193

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 of PD-1 mAb 10

<400> 193

Ser Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 194

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRH3 of PD-1 mAb 10

<400> 194

Gln Glu Leu Ala Phe Asp Tyr

1 5

<210> 195

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(107)

<223> VL Domain of PD-1 mAb 10

<400> 195

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ile

100 105

<210> 196

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(321)

<223> Polynucleotide Encoding the VL Domain of PD-1 mAb 10

<400> 196

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca ggacaagtca ggacattagc aattttttaa actggtatca gcagaaacca 120

gatggaacta ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240

gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtagtacgc ticcgtggac gttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcat a 321

<210> 197

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(11)

<223> CDRL1 of PD-1 mAb 10

<400> 197

Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe Leu Asn

1 5 10

<210> 198

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 of PD-1 mAb 10

<400> 198

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 199

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (19)..()

<223> CDRL3 of PD-1 mAb 10

<400> 199

Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 200

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(117)

<223> VH Domain of PD-1 mAb 11

<400> 200

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Thr Gly Thr Tyr Ser Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210>

> 201

<211> 351

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(351)

<223> Polynucleotide Encoding the VH Domain of PD-1 mAb 11

<400> 201

gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcctgcaaga ctcttggtta cacatttacc ggctactgga tgcactgggt aaaacagagg 120
cctggacagg gtctgaaatg gatgggggct atttatcttg gaaatagtga tactcactac 180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtca catccgccag cactgcctac 240
atggagctca gcagcctgac aaatgaggac tctgcgatct attactgtac tactgggacc 300

tactcgtact tcgatgtctg gggcacaggg accacggtca ccgtctcttc a 351

<210> 202

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 of PD-1 mAb 11

<400> 202

Gly Tyr Trp Met His

1 5

<210> 203

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 of PD-1 mAb 11

<400> 203

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

1 5 10 15

Gly

<210> 204

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(8)

<223> CDRH3 of PD-1 mAb 11

<400> 204

Gly Thr Tyr Ser Tyr Phe Asp Val

1 5

<210> 205

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(106)

<223> VL Domain of PD-1 mAb 11

<400> 205

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser

20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln His Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 206

<211> 318

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(318)

<223> Polynucleotide Encoding the VL Domain of PD-1 mAb 11

<400> 206

gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 60

ttctctctgca gggccagtc gagcattggc acaagcatac actggtatca gcacagaaca 120

aatggttctc caaggcttct cataaagtat gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc 180

aggtttagtg gcagtggatc agggactgat ttactcttta gcatcaacag tgtggagtct 240

gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa agtaatagct ggctcacgtt cggctgctggg 300

accaagctgg agctgaaa 318

<210> 207

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(11)

<223> CDRL1 of PD-1 mAb 11

<400> 207

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His

1 5 10

<210> 208

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 of PD-1 mAb 11

<400> 208

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser

1 5

<210> 209

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(8)

<223> CDRL3 of PD-1 mAb 11

<400> 209

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Leu Thr

1 5

<210> 210

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<

222> (1)..(125)

<223> VH Domain of PD-1 mAb 12

<400> 210

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Arg Glu Arg Ile Thr Thr Val Val Glu Gly Ala Tyr Trp Tyr Phe

100 105 110

Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 211

<211> 375
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(375)
 <223> Polynucleotide Encoding the VH Domain of PD-1 mAb 12
 <400> 211
 cagggtcacc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60
 tcctgcaagg ctctgggctt cacatttact gactatgaga tgcaactgggt gaaacagaca 120
 cctgtgcatg gcctggaatg gattgggact attgatcctg aaactggtgg tactgcctac 180
 aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg acagtagaca aatcttcac tacaacctac 240

 atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct tttattgttc aagagagagg 300
 attactacgg ttgttgaggg ggcatactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg 360
 gtcaccgtct cctca 375
 <210> 212
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(5)
 <223> CDRH1 of PD-1 mAb 12
 <400> 212
 Asp Tyr Glu Met His
 1 5
 <210> 213
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222>
 > (1)..(17)
 <223> CDRH2 of PD-1 mAb 12
 <400> 213
 Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 214

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(16)

<223> CDRH3 of PD-1 mAb 12

<400> 214

Glu Arg Ile Thr Thr Val Val Glu Gly Ala Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10 15

<210> 215

<211> 112

<

212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(112)

<223> VL Domain of PD-1 mAb 4

<400> 215

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Cys Lys Val Ser Thr Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 216

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(336)

<223> Polynucleotide Encoding the VL Domain of PD-1 mAb 12

<400> 216

gatgttttga tgaccagac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct gcaaagtttc cacccgattt 180

tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattattgct ttcaaggttc acatgttccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 217

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(16)

<223> CDRL1 of PD-1 mAb 12

<400> 217

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1

5

10

15

<210> 218

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 of PD-1 mAb 12

<400> 218

Lys Val Ser Thr Arg Phe Ser

1 5

<210> 219

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 of PD-1 mAb 12

<400> 219

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 220

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(121)

<223> VH Domain of PD-1 mAb 13

<400> 220

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His

20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95
Ala Arg Gln Ala Tyr Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 221

<211> 363

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(363)

<223> Polynucleotide Encoding the VH Domain of PD-1 mAb 13

<400> 221

gaagtgatgc tggtaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agccatacca tgtcttgggt tcgccagact	120
ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgggtg gtggttctaa tatctactat	180
ccagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac	240
ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagct	300
tactacggta attactggta cttcgatgtc tggggcacag ggaccacggt caccgtctcc	360
tcc	363

<210> 222

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 of PD-1 mAb 13

<400> 222

Ser His Thr Met Ser

1 5

<210> 223

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(17)
 <223> CDRH2 of PD-1 mAb 13
 <400> 223
 Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 224

<211> 12

<

212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(12)

<223> CDRH3 of PD-1 mAb 13

<400> 224

Gln Ala Tyr Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 225

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(107)

<223> VL Domain of PD-1 mAb 13

<400> 225

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

1 5 10 15

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 226

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(321)

<223> Polynucleotide Encoding the VL Domain of PD-1 mAb 13

<400> 226

gacattcaga tgaccagtc tctgccacc cagtctgcat ctctgggaga aagtgtcacc 60
 atcacgtgcc tggcaagtca gaccattggt acatgggttag catggtatca gcagaaacca 120
 gggaaatctc ctcagctcct gatttatgct gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gtagtggatc tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct 240
 gaagattttg taagttatta ctgtcaacaa cttgacagta ttccgtggac gttcgggtgga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 227

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(11)

<223> CDRL1 of PD-1 mAb 13

<400> 227

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 228

```

<211> 7
<212> PRT
<213>
> Mus musculus
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 of PD-1 mAb 13
<400> 228
Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp
1          5
<210> 229
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 of PD-1 mAb 13
<400> 229
Gln Gln Leu Asp Ser Ile Pro Trp Thr
1          5
<210> 230
<211> 117
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(117)
<223> VH Domain of PD-1 mAb 14

<400> 230
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Ile Ser Tyr
          20          25          30
Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
          35          40          45

```

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

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

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

Ala Thr Gly Leu His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 231

<211> 351

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221

> misc_feature

<222> (1)..(351)

<223> Polynucleotide Encoding the VH Domain of PD-1 mAb 14

<400> 231

caggtccaac tgcagcagcc tgggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgaagatg	60
tcctgcaagg ctctggcta caacttcac agctactgga taacctgggt gaaacagagg	120
cctggacaag gccttcagtg gattggaaat attatcctg gtactgatgg tactacctac	180
aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac	240
atgcacctca gtcgcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aactgggcta	300
cactgttact tcgatgtctg gggcacaggg accacggtca ccgtctctc c	351

<210> 232

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> CDRH1 of PD-1 mAb 14

<400> 232

Ser Tyr Trp Ile Thr

1 5

<210> 233

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 of PD-1 mAb 14

<400> 233

Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Asp Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 234

<211> 8

<212>

> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(8)

<223> CDRH3 of PD-1 mAb 14

<400> 234

Gly Leu His Trp Tyr Phe Asp Val

1 5

<210> 235

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(107)

<223> VL Domain of PD-1 mAb 14

<400> 235

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

1 5 10 15

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

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

85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 236

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(321)

<223> Polynucleotide Encoding the VL Domain of PD-1 mAb 14

<400> 236

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagt 60

gtcacctgca aggccagtc gagtgtgggt actaatgtag cctggatatca acagaagccc 120

ggtcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcacccctccc gattcagtgg cgtccctgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagtaa tgtgcagtct 240

gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gtccggaggg 300

gggaccaagc tggaaataaa a 321

<210> 237

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(11)

<223> CDRL1 of PD-1 mAb 14

<400> 237

Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Asn Val Ala

1 5 10

<210> 238

<211> 7

<212> PRT

<213>

> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 of PD-1 mAb 14

<400> 238

Ser Ala Ser Ser Arg Phe Ser

1 5

<210> 239

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 of PD-1 mAb 14

<400> 239

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 240

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(117)

<223> VH Domain of PD-1 mAb 15

<400> 240

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

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

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

115

<210> 241

<211> 351

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221

> misc_feature

<222> (1)..(351)

<223> Polynucleotide Encoding the VH Domain of PD-1 mAb 15

<400> 241

gaagtgatgc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cattttcagt agctatctca tctcttgggt tcgccagact	120
ccggagaaga ggctggagtg ggtcgtgcc attagtgggtg gtggtgctga cacctactat	180
gccgacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtat	240
ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccttat attactgtac aagacgaggg	300
acctatgcta tggactactg gggtaagga acctcagtca ccgtctcctc c	351

<210> 242

<211> 5

<212> PRT


```

<213> Mus musculus
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> CDRH1 of PD-1 mAb 15
<400> 242
Ser Tyr Leu Ile Ser
1          5
<210> 243
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> CDRH2 of PD-1 mAb 15
<400> 243
Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1          5          10          15
Gly

<210> 244
<211> 8
<212>
> PRT
<213> Mus musculus
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(8)
<223> CDRH3 of PD-1 mAb 15
<400> 244
Arg Gly Thr Tyr Ala Met Asp Tyr
1          5
<210> 245
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220><221> MISC_FEATURE

```

<222> (1)..(107)

<223> VL Domain of PD-1 mAb 15

<400> 245

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

1 5 10 15

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Ile Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 246

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(321)

<223> Polynucleotide Encoding the VL Domain of PD-1 mAb 15

<400> 246

gacattcaga tgaccagtc tccgcctcc cagtctgcat ctctgggaga aagtgtcacc 60

atcacatgcc tggcaagtc gaccattggt acatggttag catggtatca gcagaaacca 120

gggaaatctc ctcaagctct gatttatgct gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gtagtggatc tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct 240

gaagattttg taaattatta ctgtcaacaa ctttacagta ttccgtggac gttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 247

```

<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> CDRL1 of PD-1 mAb 15
<400> 247
Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala
1          5          10
<210> 248
<211> 7
<212> PRT
<213>
> Mus musculus
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 of PD-1 mAb 15
<400> 248
Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp
1          5
<210> 249
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 of PD-1 mAb 15
<400> 249
Gln Gln Leu Tyr Ser Ile Pro Trp Thr
1          5
<210> 250
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> VH Domain of hPD-1 mAb 15 VH1

```

<400> 250

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Thr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 251

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<

220><223> Polynucleotide Encoding hPD-1 mAb 15 VH1

<400> 251

gaagtgaac tggttgaaag tggcggcggg ctggtgcggc caggtgggtc actcagactg 60
 tcttgtgcag cttcaggett tacattctcc tcttatctta tctcttgggt gcgccaagcc 120
 ccaggtaagg gccttgaatg ggtcgccgcc attagtgggg gtggtgccga tacatattat 180
 gccgacagcg tcaagggacg ttccaccatc agcagggaca acgccaagaa tagcctttac 240
 ctgcagatga actcacttag agctgaagac accgtactt attactgtgc cggcgcgggg 300
 acttacgcta tggactattg gggccagggc accttgggtca ctgtctcatc c 351

<210> 252

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Domain of hPD-1 mAb 15 VL1

<400> 252

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 Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 253

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide encoding hPD-1 mAb 15 VL1

<400> 253

gatatccaga tgaccagtc tccagctct ctcaagtcaa gcgtaggcga ccgtgtgacc 60

atcacctgtc tggccagtc gaccattgga acctggctcg cctggatatca gcagaaacct 120

ggcaaggccc ctaagctgct gatttacgcc gccacctccc tcgcagatgg agtgcctcc 180

cgatttagcg ggtccgggtc cggcaccgac ttcacattca caatcagcag cctccagccc 240

gaggatttcg ctacatacta ctgtcaacag ctctactcca ttccatggac ctttggtcag 300

ggtactaaac tggagatcaa a 321

<210> 254

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(98)

<223> Human IgG4 CH1 Domain

<400> 254

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

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val

<210> 255

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1 Humanized Antibody Heavy Chain

<400> 255

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
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		80
	85	90
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		95
	100	105
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		110
	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
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		160
	165	170
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		175
	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
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		240
	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
325

<210> 256

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG4 Humanized Antibody Heavy Chain with Stabilized Hinge Region

<400> 256

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

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys

225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser

290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 325

<210> 257

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(98)

<223> Human IgG2 CH1 Domain

<400> 257

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Thr Val

<210> 258

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1 Sequence for the CH2 and CH3 Domains

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Xaa is a lysine (K) or is absent

<400> 258

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

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

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 259

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG4 Sequence for the CH2 and CH3 Domains

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Xaa is a lysine (K) or is absent

<400> 259

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

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa
 210 215

<210> 260

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Wild-type and Variant Human IgG1 CH2 and CH3 Domains

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Xaa4 and Xaa5 are both L (wild type), or are both A (decreased
FcγR binding)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(26)

<223> Xaa22, Xaa24 and Xaa26 respectively are M, S and T (wild type),
or are Y, T and E (extended half-life)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (136)..(177)

<223> Xaa136, Xaa138, and Xaa177 respectively are: T, L and Y (wild

type), or are W, L and Y (knob), or S, A and V (hole)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (204)..(205)

<223> Xaa204 and Xaa205 respectively are N and H (wild type), or are N
and R (no protein A binding), or A and K (no protein A binding)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Xaa217 is K or is absent

<400> 260

Ala Pro Glu Xaa Xaa Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Xaa Ile Xaa Arg Xaa Pro Glu Val Thr Cys Val

20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

85 90 95

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

100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Xaa Cys Xaa Val Lys Gly Phe Tyr Pro

130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

165 170 175

Xaa Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Xaa Xaa Tyr Thr Gln

195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa

210 215

<210> 261

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Alternative Linker 2

<400> 261

Leu Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 262

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker 3

<400> 262

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 263

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker 3

<400> 263

Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 264

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light Chain of a Humanized PD-1 Antibody (hPD-1 mAb 7(1.2))

<400> 264

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115 120 125

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

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 265
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Heavy Chain of a Humanized Antibody ((hPD-1 mAb 7(1.2))

 <400> 265
 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 Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
 50 55 60

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

 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165										170					175									
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser									
180										185					190									
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro									
195										200					205									
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys									
210										215					220									
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro									
225										230					235					240				
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser									
245										250					255									
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp									
260										265					270									
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn									
275										280					285									
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val									
290										295					300									
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu									
305										310					315					320				
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys									
325										330					335									
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr									
340										345					350									
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr									
355										360					365									
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu									
370										375					380									
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu									
385										390					395					400				
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys									
405										410					415									

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445

<210> 266

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain of a Humanized Antibody ((hPD-1 mAb 7(1.2))

<400> 266

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 Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro		
210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe		
225	230	235
		240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
245	250	255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val		
260	265	270
Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
275	280	285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
305	310	315
Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
325	330	335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
340	345	350
Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
355	360	365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
370	375	380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
385	390	395
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
405	410	415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420

425

430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly

435

440

445

<210> 267

<211> 501

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First and Third Polypeptide Chains of DART A

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (34)..(34)

<223> Xaa34 is A or G

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (307)..(307)

<223> Xaa307 is Y or M

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (309)..(309)

<223> Xaa309 is T or S

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (311)..(311)

<223> Xaa311 is E or T

<400> 267

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

1

5

10

15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20

25

30

Asp Xaa Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro

35

40

45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro

50

55

60

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

65

70

75

80

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

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

 Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 195 200 205
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser
 210 215 220
 Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
 225 230 235 240
 Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala
 245 250 255

 Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
 260 265 270
 Lys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 275 280 285
 Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 290 295 300
 Thr Leu Xaa Ile Xaa Arg Xaa Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 305 310 315 320

 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

325 330 335
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 340 345 350
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 355 360 365
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 370 375 380

 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 385 390 395 400
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 405 410 415
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 420 425 430
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 435 440 445

 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 450 455 460
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 465 470 475 480
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 485 490 495
 Ser Leu Ser Leu Gly
 500

 <210> 268
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220

 ><223> Second and Fourth Polypeptide Chains of DART A
 <400> 268
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr

20 25 30
 Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser

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

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

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

 245 250 255
 Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
 260 265 270

Glu

<210> 269

<211> 571

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First and Third Polypeptide Chains of DART D

<400> 269

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala

115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro

145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu

165 170 175

Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp

180 185 190

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr
210 215 220

Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
245 250 255

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
260 265 270

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
275 280 285

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
290 295 300

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
305 310 315 320

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
325 330 335

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
340 345 350

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
355 360 365

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val
370 375 380

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
385 390 395 400

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
405 410 415

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

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

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

465 470 475 480
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
485 490 495
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
500 505 510
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
515 520 525
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu

530 535 540
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
545 550 555 560
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
565 570

<210> 270

<211> 352

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Second and Fourth Polypeptide Chains of DART D

<400> 270

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

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

65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly			
	85	90	95
Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	110
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly			
	115	120	125
Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala			
	130	135	140
Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala			
145	150	155	160
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser			
	165	170	175
Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val			
	180	185	190
Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser			
	195	200	205
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser			
	210	215	220
Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu			
225	230	235	240
Gly Gly Gly Ser Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe			
	245	250	255
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys			
	260	265	270
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val			
	275	280	285
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln			
	290	295	300
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser			
305	310	315	320

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
325 330 335

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
340 345 350

<210> 271

<211> 571

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First and Third Polypeptide Chains of DART E

<400> 271

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro

35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly

115 120 125

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala

130 135 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala

145 150 155 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser

165	170	175
Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val		
180	185	190
Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser		
195	200	205
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser		
210	215	220
Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu		
225	230	235
Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu		
245	250	255
Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys		
260	265	270
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser		
275	280	285
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser		
290	295	300
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		
305	310	315
Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn		
325	330	335
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro		
340	345	350
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
355	360	365
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val		
370	375	380
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe		
385	390	395
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
405	410	415

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
420 425 430
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
435 440 445
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
450 455 460
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
465 470 475 480

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
485 490 495
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
500 505 510
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
515 520 525
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
530 535 540

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
545 550 555 560
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
565 570

<210> 272

<211> 352

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Second and Fourth Polypeptide Chains of DART E

<400> 272

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

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 100 105 110
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
 115 120 125
 Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 130 135 140
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp
 180 185 190
 Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu
 195 200 205
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr
 210 215 220
 Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Ser Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 245 250 255
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 260 265 270
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 275 280 285
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln

290 295 300
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 305 310 315 320
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 325 330 335
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

 340 345 350
 <210> 273
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> First Polypeptide Chain of DART F
 <400> 273
 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 Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

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

 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro

 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr
 245 250 255
 Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Ala Lys Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
<210> 274
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Second and Fifth Polypeptide Chains of DART F
<400> 274
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95
Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 275

<211> 732

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Third Polypeptide Chain of DART F

<400> 275

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 Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130	135	140	
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
	165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
	180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro			
	195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys			
	210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro			
225	230	235	240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr			
	245	250	255
Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
	260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
	275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
	290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
305	310	315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
	325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
	340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp			
	355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
	370	375	380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asp Ile Val Met Thr
450 455 460
Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile
465 470 475 480
Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Ala Lys Thr Tyr
485 490 495
Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Glu Arg Leu Ile
500 505 510
Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
515 520 525
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
530 535 540
Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr
545 550 555 560
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
565 570 575
Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
580 585 590
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
595 600 605
Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
610 615 620
Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp

625 630 635 640
 Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 645 650 655
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 660 665 670
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp
 675 680 685

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly
 690 695 700
 Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
 705 710 715 720
 Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
 725 730

<210> 276

<211> 273

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fourth Polypeptide Chain of DART F

<400> 276

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

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

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

100 105 110
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125
Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

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

195 200 205
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr
210 215 220
Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
225 230 235 240
Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala
245 250 255
Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys

260 265 270
Glu

<210> 277

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First Polypeptide Chain of DART G

<400> 277

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 Asn Tyr

20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

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

 100 105 110
 Gly Thr Thr 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 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly

 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile
 245 250 255
 Thr Arg Glu 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 Pro 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 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Ser Cys Ala 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 Val 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 Ala Lys Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly
 <210> 278
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Second and Fifth Polypeptide Chain of DART G
 <400> 278
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro

35 40 45

Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 279

<211> 732

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Third Polypeptide Chain of DART G

<400> 279

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 Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr 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 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile
 245 250 255
 Thr Arg Glu 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 Pro 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 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

 Trp 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 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ile Val Leu
 450 455 460
 Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
 465 470 475 480
 Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe

485 490 495

Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr

545 550 555 560

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp

625 630 635 640

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser

645 650 655

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

660 665 670

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp

675 680 685

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly

690 695 700

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val

705 710 715 720

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys

725 730

<210> 280

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fourth Polypeptide Chain of DART G

<400> 280

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

1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr

20 25 30
Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45
Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys

85 90 95
Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

100 105 110
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala

115 120 125
Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

130 135 140
Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro

145 150 155 160
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu

165 170 175
Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp

180 185 190
Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu

195 200 205
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro
 210 215 220
 Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 225 230 235 240
 Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
 245 250 255
 Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu

260 265 270
 <210> 281
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> First Polypeptide Chain of DART H
 <400> 281
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

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

100 105 110
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
 115 120 125
 Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

130	135	140	
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro			
145	150	155	160
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu			
	165	170	175
Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp			
	180	185	190
Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu			
	195	200	205
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr			
	210	215	220
Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly			
225	230	235	240
Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala			
	245	250	255
Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu			
	260	265	270
Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
	275	280	285
Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
290	295	300	
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
305	310	315	320
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
	325	330	335
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr			
	340	345	350
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
355	360	365	
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu			
370	375	380	

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
385 390 395 400
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
405 410 415
Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
420 425 430
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
435 440 445
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
450 455 460
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
465 470 475 480
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
485 490 495
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500
<210> 282
<211> 273
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Second Polypeptide Chain of DART H
<400> 282
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45
Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
115 120 125

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
130 135 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser
165 170 175

Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser
210 215 220

Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala
245 250 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
260 265 270

Glu

<210> 283

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Third Polypeptide Chain of DART H

<400> 283

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

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

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 284

<211> 563

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First and Third Polypeptide Chains of DART 1

<400> 284

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ser Asn Ser Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

145 150 155 160

Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 275 280 285
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 290 295 300
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 305 310 315 320
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 325 330 335

 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 340 345 350
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 355 360 365
 Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 370 375 380
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 385 390 395 400

 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 405 410 415
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 420 425 430
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 435 440 445
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
465							470				475						480
	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
					485					490						495	
	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
				500					505						510		
	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	
		515					520						525				

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
530 535 540
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
545 550 555 560
Ser Pro Gly

<210> 285

<211> 348

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Second and Fourth Polypeptide Chains of DART 1

<400> 285

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

1 5 10 15

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
 115 120 125
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
 130 135 140

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

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

 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 275 280 285
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 305 310 315 320
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

325 330 335

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

340 345

<210> 286

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First Polypeptide Chain of BSAB A

<400> 286

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 Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Glu Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Glu Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro

225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

355 360 365

Cys Glu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 <210> 287
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Second Polypeptide Chain of BSAB A
 <400> 287
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 288

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Third Polypeptide Chain of BSAB A

<400> 288

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 Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gly Thr Thr 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 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Arg		
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro 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 Glu Glu Met 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
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg 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

<210> 289

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fourth Polypeptide Chain of BSAB A

<400> 289

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

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

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

145						150						155						160	
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser				
					165					170					175				
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu				
					180					185					190				
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser				
					195					200					205				
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
210					215														
<210>	290																		
<211>	496																		
<212>	PRT																		
<213>	Artificial Sequence																		
<220><223>	First and Third Polypeptide Chains of DART I																		
<400>	290																		
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	Ser	Val				
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	Tyr	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	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp				
85					90						95								
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly				
100					105						110								
Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys				
115				120						125									

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp
165 170 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
180 185 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp
210 215 220

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly
225 230 235 240

Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
245 250 255

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Ser Lys Tyr
260 265 270

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
275 280 285

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr
290 295 300

Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
305 310 315 320

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
325 330 335

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
340 345 350

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
355 360 365

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

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

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

 <210> 291
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Second and Fourth Polypeptide Chains of DART I
 <400> 291
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

85 90 95
 Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
 115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro
 145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val
 165 170 175

Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp
 180 185 190

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
 195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe
 210 215 220

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
 245 250 255

Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 260 265 270

<210> 292

<211> 566

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First and Third Polypeptide Chains of DART J

<400> 292

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 Ser Val
 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 Tyr 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 115 120 125
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 130 135 140

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

 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp
 210 215 220
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ser Gly
 225 230 235 240
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 245 250 255
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

260	265	270
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
275	280	285
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
290	295	300
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr		
305	310	315
320		
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
325	330	335
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
340	345	350
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
355	360	365
Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
370	375	380
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
385	390	395
400		
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe		
405	410	415
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
420	425	430
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu		
435	440	445
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
450	455	460
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys		
465	470	475
480		
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
485	490	495
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
500	505	510

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
515 520 525

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
530 535 540

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
545 550 555 560

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
565

<210> 293
<211> 350
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Second and Fourth Polypeptide Chains of DART J
<400> 293

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

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

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

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

195 200 205
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe
 210 215 220
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Ser Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 245 250 255
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu

260 265 270
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 275 280 285
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 290 295 300
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 305 310 315 320
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly

325 330 335
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 340 345 350

<210> 294

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Domain of hLAG-3 mAb 6 VH1

<400> 294

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

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

Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 295

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH Domain of hLAG-3 mAb 6 VH2

<400> 295

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu 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 Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 296

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Domain of hLAG-3 mAb 6 VL1

<400> 296

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 Ser Val
 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 Tyr 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 297

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL Domain of hLAG-3 mAb 6 VL2

<400> 297

Asp Ile Val 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 Ser Val

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 Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp 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 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 298

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL1 of the VL Domain of hLAG-3 mAb 6 VL1 and VL2

<400> 298

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val Val Ala

1 5 10