



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년07월03일  
(11) 등록번호 10-2828375  
(24) 등록일자 2025년06월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/10 (2017.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)  
C40B 40/02 (2017.01) C40B 40/10 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 15/1037 (2013.01)  
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7024940
- (22) 출원일자(국제) 2019년02월02일  
심사청구일자 2022년01월13일
- (85) 번역문제출일자 2020년08월28일
- (65) 공개번호 10-2020-0128011
- (43) 공개일자 2020년11월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2019/074581
- (87) 국제공개번호 WO 2019/149282  
국제공개일자 2019년08월08일
- (30) 우선권주장  
PCT/CN2018/075065 2018년02월02일 중국(CN)
- (56) 선행기술조사문헌  
WO2010081173 A2\*  
WO2016014974 A2  
WO2016115275 A1  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
아다진 인크.  
케이만군도 케이와이1-1103 그랜드 케이만 피.오.  
박스 2582 사우스 처치 스트리트 103 하버 플레이스
- (72) 발명자  
루오, 피터 페이즈  
중국 215123 지양쑤 쑤저우 쑤저우 인더스트리얼  
파크 싱후 스트리트 218 빌딩 씨14 4에프  
두, 팡용  
중국 215123 지양쑤 쑤저우 쑤저우 인더스트리얼  
파크 싱후 스트리트 218 빌딩 씨14 4에프 아다진  
인크. 내
- (74) 대리인  
양영준, 이윤기

전체 청구항 수 : 총 42 항

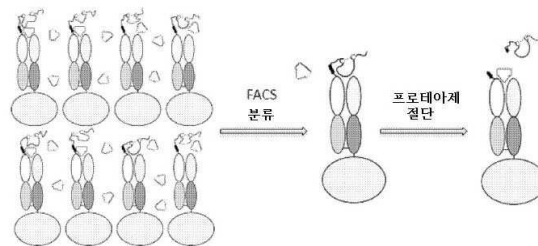
심사관 : 최지다

(54) 발명의 명칭 **활성화 가능한 항체 그리고 이의 제조 방법 및 사용 방법**

(57) 요약

본 명세서에는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드를 암호화하는 합성 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 라이브러리가 제공된다. 추가로 본 명세서에는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드 및 상기 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드를 함유하는 폴리펩타이드 라이브러리가 제공된다. 또한 본 명세서에는 벡터, 벡터 라이브러리, 세포, 키트, 및 활성화 가능한 폴리펩타이드 라이브러리의 제조 및 사용 방법이 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

*C07K 16/2818* (2013.01)

*C07K 16/2878* (2013.01)

*C40B 40/02* (2013.01)

*C40B 40/10* (2013.01)

*A61K 2039/505* (2013.01)

*C07K 2317/55* (2013.01)

*C07K 2317/622* (2013.01)

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

활성화 가능한 항체로서,

N-말단에서부터 C-말단으로, 차폐 모이어티(masking moiety: MM), 절단 가능한 모이어티(CM) 및 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는, 제1 폴리펩타이드를 포함하되,

상기 MM은 서열번호 79 내지 85로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;

상기 CM은 적어도 제1 절단 부위 및 제1 가요성 링커(L1)를 포함하고;

여기서:

a) 상기 TBM은 항체 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 활성화 가능한 항체는 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 더 포함하거나;

b) 상기 TBM은 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고, 상기 활성화 가능한 항체는 항체 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 더 포함하거나;

c) 상기 TBM은 N-말단에서부터 C-말단으로, 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하거나; 또는

d) 상기 TBM은 N-말단에서부터 C-말단으로, 항체 중쇄 가변 영역(VH) 및 항체 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고;

여기서:

(i) 상기 VH는 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고;

(ii) 상기 VL은 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열번호 70의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하고;

상기 활성화 가능한 항체는 상기 CM이 절단되는 경우 상기 VH 및 VL을 통해서 인간 CD137에 결합하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 TBM은 항체 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 활성화 가능한 항체는 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 더 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 하기 중 하나 이상을 특징으로 하는 활성화 가능한 항체:

a) 상기 MM은 이의 N-말단에, 추가적인 아미노산 서열을 더 포함함;

b) 상기 제1 절단 부위는 유로키나제-유형 플라스미노겐 활성화제(uPA), 매트릭스 메탈로프로테이나제-1(MMP-1), MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-14, 담배 식각 바이러스(TEV) 프로테아제, 플라스민, 트롬빈, 인자 X, PSA, PSMA, 카텡신 D, 카텡신 K, 카텡신 S, ADAM10, ADAM12, ADAMTS, 카스파제-1, 카스파제-2, 카스파제-3, 카스파제-4, 카스파제-5, 카스파제-6, 카스파제-7, 카스파제-8, 카스파제-9, 카스파제-10, 카스파제-11, 카스파제-12, 카스파제-13, 카스파제-14 및 TACE로 이루어진 군으로부터 선택된 프로테아제에 대한 프로테아제 절단 부위임;

c) 상기 L1은 서열번호 17 내지 24로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함함;

d) 상기 CM은 제2 절단 부위를 더 포함함; 및/또는

e) 상기 CM은 제2 링커(L2)를 더 포함함.

**청구항 4**

제3항에 있어서, 상기 MM은 이의 N-말단에, 추가적인 아미노산 서열을 더 포함하고, 상기 추가적인 아미노산 서열은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 5**

제3항에 있어서, 상기 CM은 L2를 더 포함하고, 상기 L2는 서열번호 17 내지 24로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 6**

제3항에 있어서, 상기 CM은 하기 중 하나 이상을 특징으로 하는 제2 절단 부위를 더 포함하는, 활성화 가능한 항체:

- a) 상기 제2 절단 부위는 유로키나제-유형 플라스미노겐 활성화제(uPA), 매트릭스 메탈로프로테이나제-1(MMP-1), MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-14, 담배 식각 바이러스(TEV) 프로테아제, 플라스민, 트롬빈, 인자 X, PSA, PSMA, 카텡신 D, 카텡신 K, 카텡신 S, ADAM10, ADAM12, ADAMTS, 카스파제-1, 카스파제-2, 카스파제-3, 카스파제-4, 카스파제-5, 카스파제-6, 카스파제-7, 카스파제-8, 카스파제-9, 카스파제-10, 카스파제-11, 카스파제-12, 카스파제-13, 카스파제-14 및 TACE로 이루어진 군으로부터 선택된 프로테아제에 대한 프로테아제 절단 부위임;
- b) 상기 제2 절단 부위는 상기 L1에 대한 C-말단에 존재함;
- c) 상기 제1 절단 부위 및 상기 제2 절단 부위는 상이함; 및/또는
- d) 상기 CM은 상기 제2 절단 부위에 대한 C-말단에 제2 링커(L2)를 포함함.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드는 N-말단에서부터 C-말단으로, 서열번호 40 내지 46으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 및 상기 TBM을 포함하고, 상기 서열번호 40 내지 46으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열은 상기 MM 및 상기 CM을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 8**

제1항에 있어서:

- (a) 상기 VH는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하고;
- (b) 상기 VL은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 상기 CM은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 10**

제1항에 있어서, 상기 MM은 서열번호 79의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 11**

제10항에 있어서:

- (a) 상기 VH는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하고;
- (b) 상기 VL은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 12**

제10항에 있어서, 상기 CM은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 13**

제1항에 있어서:

- (a) 상기 TBM은 항체 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 활성화 가능한 항체는 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 더 포함하고;
- (b) 상기 MM은 서열번호 79의 아미노산 서열을 포함하고;
- (c) 상기 CM은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 14**

제1항에 있어서:

- (a) 상기 TBM은 항체 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 활성화 가능한 항체는 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 더 포함하고;
- (b) 상기 MM은 서열번호 79의 아미노산 서열을 포함하고;
- (c) 상기 CM은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하고;
- (d) 상기 VH는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하고;
- (e) 상기 VL은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드는 N-말단에서부터 C-말단으로, 서열번호 40의 아미노산 서열 및 상기 TBM을 포함하고:

- (a) 상기 TBM은 항체 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 활성화 가능한 항체는 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 더 포함하고;
- (b) 상기 VH는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하고;
- (c) 상기 VL은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 16**

제1항에 있어서, 상기 MM은 서열번호 82의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 17**

제16항에 있어서:

- (a) 상기 VH는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하고;
- (b) 상기 VL은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 18**

제16항에 있어서, 상기 CM은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 19**

제1항에 있어서:

- (a) 상기 TBM은 항체 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 활성화 가능한 항체는 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 더 포함하고;
- (b) 상기 MM은 서열번호 82의 아미노산 서열을 포함하고;
- (c) 상기 CM은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 20**

제1항에 있어서:

- (a) 상기 TBM은 항체 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 활성화 가능한 항체는 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 더 포함하고;
- (b) 상기 MM은 서열번호 82의 아미노산 서열을 포함하고;
- (c) 상기 CM은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하고;
- (d) 상기 VH는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하고;
- (e) 상기 VL은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 21**

제1항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드는 N-말단에서부터 C-말단으로, 서열번호 43의 아미노산 서열 및 상기 TBM을 포함하고:

- (a) 상기 TBM은 항체 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 활성화 가능한 항체는 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 더 포함하고;
- (b) 상기 VH는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하고;
- (c) 상기 VL은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 22**

제1항에 있어서, 상기 MM은 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 23**

제22항에 있어서:

- (a) 상기 VH는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하고;
- (b) 상기 VL은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 24**

제22항에 있어서, 상기 CM은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 25**

제1항에 있어서:

- (a) 상기 TBM은 항체 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 활성화 가능한 항체는 항체 중쇄 가변 영역(VH)을

포함하는 제2 폴리펩타이드를 더 포함하고;

- (b) 상기 MM은 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하고;
- (c) 상기 CM은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 26**

제1항에 있어서:

- (a) 상기 TBM은 항체 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 활성화 가능한 항체는 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 더 포함하고;
- (b) 상기 MM은 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하고;
- (c) 상기 CM은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하고;
- (d) 상기 VH는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하고;
- (e) 상기 VL은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 27**

제1항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드는 N-말단에서부터 C-말단으로, 서열번호 46의 아미노산 서열 및 상기 TBM을 포함하고:

- (a) 상기 TBM은 항체 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 상기 활성화 가능한 항체는 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 더 포함하고;
- (b) 상기 VH는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하고;
- (c) 상기 VL은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 28**

활성화 가능한 항체로서,

N-말단에서부터 C-말단으로, 차폐 모이어티(MM), 절단 가능한 모이어티(CM) 및 항체 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는, 제1 폴리펩타이드, 및

항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하되;

상기 MM은 서열번호 79 내지 85로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;

상기 CM은 적어도 제1 절단 부위 및 제1 가요성 링커(L1)를 포함하고;

여기서:

(i) 상기 VH는 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고;

(ii) 상기 VL은 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열번호 70의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하고;

상기 활성화 가능한 항체는 상기 CM이 절단되는 경우 상기 VH 및 VL을 통해서 인간 CD137에 결합하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 29**

제28항에 있어서:

- (a) 상기 VH는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하고;
- (b) 상기 VL은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 30**

제28항에 있어서, 상기 MM은 서열번호 79의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 31**

제28항에 있어서:

- (a) 상기 MM은 서열번호 79의 아미노산 서열을 포함하고;
- (b) 상기 CM은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하고;
- (c) 상기 VH는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하고;
- (d) 상기 VL은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 32**

제28항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드는 N-말단에서부터 C-말단으로, 서열번호 40의 아미노산 서열 및 상기 VL을 포함하고:

- (a) 상기 VH는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하고;
- (b) 상기 VL은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 33**

제28항에 있어서, 상기 MM은 서열번호 82의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 34**

제28항에 있어서:

- (a) 상기 MM은 서열번호 82의 아미노산 서열을 포함하고;
- (b) 상기 CM은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하고;
- (c) 상기 VH는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하고;
- (d) 상기 VL은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 35**

제28항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드는 N-말단에서부터 C-말단으로, 서열번호 43의 아미노산 서열 및 상기 VL을 포함하고:

- (a) 상기 VH는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하고;
- (b) 상기 VL은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 36**

제28항에 있어서, 상기 MM은 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 37**

제28항에 있어서:

- (a) 상기 MM은 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하고;
- (b) 상기 CM은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하고;
- (c) 상기 VH는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하고;
- (d) 상기 VL은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 38**

제28항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드는 N-말단에서부터 C-말단으로, 서열번호 46의 아미노산 서열 및 상기 VL을 포함하고:

- (a) 상기 VH는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하고;
- (b) 상기 VL은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는, 활성화 가능한 항체.

**청구항 39**

암의 치료 또는 암의 진행 지연을 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하거나 또는 암의 진행을 지연시키는 방법에 사용하기 위한, 제1항 내지 제38항 중 어느 한 항의 활성화 가능한 항체를 포함하는 약제학적 조성물이며, 상기 방법은 상기 대상체에게 유효량의 상기 활성화 가능한 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 약제학적 조성물.

**청구항 40**

제39항에 있어서, 상기 방법은 상기 대상체에게 유효량의 적어도 하나의 추가적인 치료제를 투여하는 단계를 더 포함하는, 약제학적 조성물.

**청구항 41**

제40항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가적인 치료제는 바이러스성 유전자 요법, 면역 관문 저해제, 표적 요법, 방사선 요법 및 화학요법으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

**청구항 42**

제40항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가적인 치료제는 포말리스트(pomalyst), 레블리마이드(revlimid), 레날리도마이드(lenalidomide), 포말리도마이드(pomalidomide), 탈리도마이드(thalidomide), DNA-알킬화 백금-함유 유도체, 시스플라틴, 5-플루오로우라실, 사이클로포스파마이드, 항-CD137 항체, 항-CTLA4 항체, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CD20 항체, 항-CD40 항체, 항-DR5 항체, 항-CD1d 항체, 항-TIM3 항체, 항-SLAMF7 항체, 항-KIR 수용체 항체, 항-OX40 항체, 항-HER2 항체, 항-ErbB-2 항체, 항-EGFR 항체, 세특시맵(cetuximab), 리특시맵(rituximab), 트라스투주맵(trastuzumab), 펌브롤리주맵(pembrolizumab), 방사선 요법, 단일 선량 방사선(single dose radiation), 분할 방사선(fractionated radiation), 집중 방사선(focal radiation), 전체 장기 방사선(whole organ radiation), IL-12, IFN $\alpha$ , GM-CSF, 키메라 항원 수용체, 입양 전달된 T 세포(adoptively transferred T cell), 항암 백신, 및 암용해 바이러스(oncolytic virus)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

**청구항 43**

삭제

**청구항 44**

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

**청구항 61**

삭제

**청구항 62**

삭제

**청구항 63**

삭제

**청구항 64**

삭제

**청구항 65**

삭제

**청구항 66**

삭제

**청구항 67**

삭제

**청구항 68**

삭제

**청구항 69**

삭제

**청구항 70**

삭제

**청구항 71**

삭제

**청구항 72**

삭제

**청구항 73**

삭제

**청구항 74**

삭제

**청구항 75**

삭제

**청구항 76**

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92



[0009] 상기 요구 및 다른 요구를 충족시키기 위해서, 본 명세서에는 예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)의 스크리닝 및/또는 식별에 유용한 폴리뉴클레오타이드의 라이브러리가 개시된다. 본 개시 내용은 적어도 부분적으로, 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드가 활성화 이전에 상당히 개선된 차폐 효율(masking efficiency)을 나타냄으로써, 우수한 치료 지수 및 안전성 프로파일을 갖는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)의 더 양호한 설계, 스크리닝 및/또는 식별을 가능하게 한다는 발견에 기초한다. 본 개시내용은 추가로 적어도 부분적으로, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드 라이브러리가 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드를 식별하도록 성공적으로 작제되고, 스크리닝될 수 있다는 놀라운 발견에 기초한다(하기 실시예 1 및 2 참조). 본 명세서에는 불활성 형태가 아닌 활성 형태로 존재할 때 인간 CTLA4(실시예 3 참조) 또는 인간 CD137(실시예 5 참조)에 결합하는 정밀/컨텍스트-의존적 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드가 개시되며, 즉, 이것은 절단 가능한 모이어티(cleavable moiety: CM)를 절단하여 제1 펩타이드(first peptide: FP)(즉, 차폐 모이어티(masking moiety: MM) 또는 자가-차단 펩타이드(self-blocking peptide))를 제거한 후에만 표적(활성 형태로 존재할 때)에 결합한다. 본 명세서에 기재된 발견된 제1 펩타이드(FP)(예를 들어, 차폐 모이어티)는 일부 실시형태에서는 화학적으로 불안정한 잔기 메티오닌 및/또는 트립토판 없이, 항체 활성을 효율적으로 차폐할 수 있고/있거나 항원 결합을 감소시키거나 완전히 저해할 수 있다. 추가로, 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드 라이브러리를 사용하여 식별된 활성화 가능한 항체는 민감한 동물(NOD 마우스, 실시예 4 참조)에서도 세포독성을 상당히 감소시키면서, 모체 항체로서 다수의 암 유형을 치료하는데 효과적이다.

[0010] 따라서, 일 양상에서, 본 명세서에는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 라이브러리가 제공되며, 여기서 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 N-말단에서부터 C-말단으로, 제1 펩타이드(FP), 절단 가능한 모이어티(CM) 및 표적 결합 모이어티(target binding moiety: TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하고, 여기서 FP는 하기 구조식 (XIII)을 포함하며:  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86)(식 중, m은 2 내지 10(예를 들어, 3 내지 10)이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임); CM은 적어도 제1 절단 부위를 포함하고; TBM은 항체 경쇄 가변 영역 및/또는 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드는 적어도 two, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 500개, 적어도 1000개의 고유한 폴리펩타이드를 암호화하고, 각각의 고유한 폴리펩타이드는 N-말단에서부터 C-말단까지, 제1 펩타이드(FP), 절단 가능한 모이어티(CM) 및 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하고, 여기서 FP는 하기 구조식 (XIII)에 따른 아미노산 서열을 포함하며:  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86)(식 중, m은 2 내지 10(예를 들어, 3 내지 10)이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임); CM은 적어도 제1 절단 부위를 포함하고; TBM은 항체 경쇄 가변 영역 및/또는 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 각각은 N-말단에서부터 C-말단으로, 제1 펩타이드(FP), 절단 가능한 모이어티(CM) 및 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하고, 여기서 FP는 하기 구조식 (XIII)에 따른 아미노산 서열을 포함하며:  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86)(식 중, m은 2 내지 10(예를 들어, 3 내지 10)이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임); CM은 적어도 제1 절단 부위를 포함하고; TBM은 항체 경쇄 가변 영역 및/또는 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, FP는 하기 구조식 (XIV)에 따른 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해서 암호화된다:  $(NNK)_mTGY(NNK)_nTGY(NNK)_o$ (서열번호 87)(식 중, 각각의 N은 독립적으로 A, G, T 또는 C이고, 각각의 K는 독립적으로 T 또는 G이며, Y는 독립적으로 T 또는 C임).

[0011] 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 각각의 X는 M, W 또는 C가 아니다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 구조식 (XIII)의  $X_m$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 구조식 (XIII)의  $X_n$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 구조식 (XIII)의  $X_o$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, m은 6이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, m은 2 내지 5, 예를 들어, 2, 3, 4 또는 5이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, n은 6 내지 8이다. 상기 실시

형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, n은 6이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, o는 1 내지 2이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, o는 2이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, FP은 이의 N-말단에서, 추가적인 아미노산 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 추가적인 아미노산 서열은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함한다.

[0012] 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 제1 절단 부위는 유로키나제-유형 플라스미노겐 활성화제(urokinase-type plasminogen activator: uPA), 매트릭스 메탈로프로테이나제-1(matrix metalloproteinase-1: MMP-1), MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-14, 담배 식각 바이러스(Tobacco Etch Virus: TEV) 프로테아제, 플라스민, 트롬빈, 인자 X, PSA, PSMA, 카텡신(Cathepsin) D, 카텡신 K, 카텡신 S, ADAM10, ADAM12, ADAMTS, 카스파제(Caspase)-1, 카스파제-2, 카스파제-3, 카스파제-4, 카스파제-5, 카스파제-6, 카스파제-7, 카스파제-8, 카스파제-9, 카스파제-10, 카스파제-11, 카스파제-12, 카스파제-13, 카스파제-14 및 TACE로 이루어진 군으로부터 선택된 프로테아제에 대한 프로테아제 절단 부위이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, CM은 제1 절단 부위의 C-말단에 제1 링커(L<sub>1</sub>)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, L<sub>1</sub>는 서열번호 17 내지 24로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, CM은 제2 절단 부위를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 절단 부위는 L<sub>1</sub>에 대한 C-말단이다. 일부 실시형태에서, 제2 절단 부위는 유로키나제-유형 플라스미노겐 활성화제(uPA), 매트릭스 메탈로프로테이나제-1(MMP-1), MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-14, 담배 식각 바이러스(TEV) 프로테아제, 플라스민, 트롬빈, 인자 X, PSA, PSMA, 카텡신 D, 카텡신 K, 카텡신 S, ADAM10, ADAM12, ADAMTS, 카스파제-1, 카스파제-2, 카스파제-3, 카스파제-4, 카스파제-5, 카스파제-6, 카스파제-7, 카스파제-8, 카스파제-9, 카스파제-10, 카스파제-11, 카스파제-12, 카스파제-13, 카스파제-14 및 TACE로 이루어진 군으로부터 선택된 프로테아제에 대한 프로테아제 절단 부위이다. 일부 실시형태에서, 제1 절단 부위와 제2 절단 부위는 상이하다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, CM은 제2 절단 부위에 대한 C-말단에 제2 링커(L<sub>2</sub>)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, L<sub>2</sub>는 서열번호 17 내지 24로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, CM은 제1 절단 부위의 N-말단에 링커를 추가로 포함한다.

[0013] 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드에 의해서 암호화되는 폴리펩타이드는 하기 구조식 (III)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM) 및 제1 펩타이드(FP)를 포함한다: EVGSYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>CX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>CX<sub>13</sub>X<sub>14</sub>SGRSAGGGGTENLYFQSGGS(서열번호 3)(식 중, X<sub>1</sub>은 A, D, I, N, P 또는 Y이고, X<sub>2</sub>는 A, F, N, S 또는 V이며, X<sub>3</sub>은 A, H, L, P, S, V 또는 Y이고, X<sub>4</sub>는 A, H, S 또는 Y이며, X<sub>5</sub>는 A, D, P, S, V 또는 Y이고, X<sub>6</sub>은 A, D, L, S 또는 Y이며, X<sub>7</sub>은 D, P 또는 V이고, X<sub>8</sub>은 A, D, H, P, S 또는 T이며, X<sub>9</sub>는 A, D, F, H, P 또는 Y이고, X<sub>10</sub>은 L, P 또는 Y이며, X<sub>11</sub>은 F, P 또는 Y이고, X<sub>12</sub>는 A, P, S 또는 Y이며, X<sub>13</sub>은 A, D, N, S, T 또는 Y이고, X<sub>14</sub>는 A, S 또는 Y임). 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 각각은 구조식 (III)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화한다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 서열번호 25 내지 46으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0014] 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, TBM은 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, TBM은 경쇄 가변 영역에 대한 C-말단에 중쇄 가변 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리는 하나 이상의 항체 중쇄 가변 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 차폐 모이어티(MM)의 부재 하에서 표적에 결합할 수 있는 항원 결합 부위를 형성한다.

[0015] 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, TBM은 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, TBM은 중쇄 가변 영역에 대한 C-말단에 경쇄 가변 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리는 하나 이상의 항체 경쇄 가변 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 차폐 모이어티(MM)의 부재 하에서 표적에 결합할 수 있는 항원 결합 부위를 형성한다.

[0016] 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타

이드 중 적어도 하나는 벡터 내에 존재한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 발현 벡터 또는 디스플레이 벡터이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 세포 내에 존재한다. 일부 실시형태에서, 세포는 박테리아 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포이다.

[0017] 본 개시내용의 다른 양상은 활성화 가능한 항체의 생산 방법에 관한 것이며, 이 방법은 본 명세서에 기재된 세포 중 임의의 것을 활성화 가능한 항체를 생산하기에 적합한 조건 하에서 배양하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 세포에 의해 생산된 활성화 가능한 항체를 회수하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 가용성인 동안 활성화 가능한 표현형을 유지시키는 능력에 대해서 활성화 가능한 항체를 시험하는 단계를 추가로 포함한다.

[0018] 본 개시내용의 다른 양상은 본 명세서에 기재된 라이브러리 중 임의의 것을 사용하여 표적에 결합하는 활성화 가능한 항체를 스크리닝하는 방법에 관한 것이며, 이 방법은 a) CM이 절단되기 전에 라이브러리의 발현 생성물을 표적과 접촉시키는 단계, b) CM이 절단된 후 라이브러리의 발현 생성물을 표적과 접촉시키는 단계, 및 c) CM이 절단된 후 표적에 결합하지만, CM이 절단되기 전에는 표적에 결합하지 않는 발현 생성물 중 하나 이상을 단리시키는 단계를 포함한다. 또한 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 라이브러리 중 임의의 것을 사용하여 표적에 결합하는 활성화 가능한 항체를 스크리닝하는 방법에 관한 것이며, 이 방법은 a) CM이 절단되기 전에 라이브러리의 발현 생성물을 표적과 접촉시키는 단계, b) CM이 절단된 후 라이브러리의 발현 생성물을 표적과 접촉시키는 단계, 및 c) CM이 절단된 후에는 표적에 결합하지만, CM이 절단되기 전에는 CM이 절단된 후의 결합 친화도와 비교할 때 표적에 대해서 감소된 결합 친화도를 갖는 발현 생성물 중 하나 이상을 단리시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 발현 생성물은, CM가 절단되기 전에 발현 생성물의  $K_D$ 가 CM이 절단된 후 발현 생성물의  $K_D$ 의 적어도 2배(예를 들어, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 15배 또는 그 초과)인 경우, 단리된다. 일부 실시형태에서, CM은 유로키나제-유형 플라스미노겐 활성화제(uPA), 매트릭스 메탈로프로테이나제-1(MMP-1), MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-14, 담배 식각 바이러스(TEV) 프로테아제, 플라스민, 트롬빈, 인자 X, PSA, PSMA, 카텡신 D, 카텡신 K, 카텡신 S, ADAM10, ADAM12, ADAMTS, 카스파제-1, 카스파제-2, 카스파제-3, 카스파제-4, 카스파제-5, 카스파제-6, 카스파제-7, 카스파제-8, 카스파제-9, 카스파제-10, 카스파제-11, 카스파제-12, 카스파제-13, 카스파제-14 및 TACE로 이루어진 군으로부터 선택된 프로테아제에 대한 적어도 제1 프로테아제 절단 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적은 CTLA4, CD137, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, TIM3, B7-H3, OX40, CD3, CD19, CD20, CD40, CD95, CD120a, BTLA, VISTA, ICOS, BCMA, Her1, Her2, Her3 및/또는 B7-H4이다. 일부 실시형태에서, 표적은 CTLA4 또는 CD137이다.

[0019] 본 개시내용의 다른 양상은 본 명세서에 기재된 라이브러리 중 임의의 것의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드에 의해서 암호화된 폴리펩타이드 또는 본 명세서에 기재된 라이브러리 중 임의의 것의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드에 의해서 암호화된 폴리펩타이드의 라이브러리에 관한 것이다.

[0020] 본 개시내용의 다른 양상은 본 명세서에 기재된 라이브러리 중 임의의 것을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0021] 본 개시내용의 다른 양상은 항원 결합 도메인을 포함하는 라이브러리에 관한 것이며, 여기서 항원 결합 도메인 중 적어도 하나는 N-말단에서부터 C-말단으로, 제1 펩타이드(FP), 절단 가능한 모이어티(CM) 및 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 포함하고, FP는 하기 구조식 (XIII)에 따른 아미노산 서열을 포함한다:  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86)(식 중, m은 2 내지 10(예를 들어, 3 내지 10)이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임); CM은 적어도 제1 절단 부위를 포함하고; TBM은 항체 경쇄 가변 영역 및/또는 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인 중 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 1000개는 N-말단에서부터 C-말단으로, 제1 펩타이드(FP), 절단 가능한 모이어티(CM) 및 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 고유한 폴리펩타이드를 포함하며, 여기서 FP는 하기 구조식 (XIII)에 따른 아미노산 서열을 포함하고:  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86)(식 중, m은 2 내지 10(예를 들어, 3 내지 10)이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임); CM은 적어도 제1 절단 부위를 포함하고; TBM은 항체 경쇄 가변 영역 및/또는 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인 각각은 N-말단에서부터 C-말단으로, 제1 펩타이드(FP), a 절단 가능한 모이어티(CM) 및 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 고유한 폴리펩타이드를

포함하고, 여기서 FP는 하기 구조식 (XIII)에 따른 아미노산 서열을 포함하며:  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86)(식 중, m은 2 내지 10(예를 들어, 3 내지 10)이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임); CM은 적어도 제1 절단 부위를 포함하고; TBM은 항체 경쇄 가변 영역 및/또는 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, TBM은 항체 경쇄 가변 영역을 포함하고, 항원 결합 도메인은 항체 중쇄 가변 영역을 추가로 포함한다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, TBM은 항체 중쇄 가변 영역을 포함하고, 항원 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 영역을 추가로 포함한다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 각각의 X는 M, W 또는 C가 아니다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 구조식 (XIII)의  $X_m$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 구조식 (XIII)의  $X_n$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 구조식 (XIII)의  $X_o$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 일부 실시형태에서, 라이브리리 내의 항원 결합 도메인 각각은 파지 또는 세포(예를 들어, 효모 세포) 상에 디스플레이된다.

[0022] 본 개시내용의 다른 양상은, N-말단에서부터 C-말단으로, 제1 펩타이드(FP), 절단 가능한 모이어티(CM) 및 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 항체 경쇄에 관한 것이며, 여기서, FP은 구조식 (I)에 따른 아미노산 서열을 포함하되:  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)(식 중, m은 2 내지 10(예를 들어, 3 내지 10)이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이며, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임), CM은 적어도 제1 절단 부위를 포함하고; TBM은 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본 개시내용의 다른 양상은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체에 관한 것이며, 여기서 경쇄는 본 명세서에 기재된 항체 경쇄 중 임의의 것이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 각각의 X는 M, W 또는 C가 아니다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 구조식 (XIII)의  $X_m$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다.

[0023] 본 개시내용의 다른 양상은, N-말단에서부터 C-말단으로, 제1 펩타이드(FP), 절단 가능한 모이어티(CM) 및 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 항체 중쇄에 관한 것이며, 여기서, FP은 구조식 (I)에 따른 아미노산 서열을 포함하되:  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)(식 중, m은 2 내지 10(예를 들어, 3 내지 10)이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이며, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임), CM은 적어도 제1 절단 부위를 포함하고; TBM은 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다. 본 개시내용의 다른 양상은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체에 관한 것이며, 여기서 중쇄는 본 명세서에 기재된 항체 경쇄 중 임의의 것이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 각각의 X는 M, W 또는 C가 아니다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 구조식 (XIII)의  $X_m$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다.

[0024] 본 개시내용의 다른 양상은 표면 상에 디스플레이된 적어도 하나의 폴리펩타이드를 포함하는 세포에 관한 것이며, 여기서 적어도 폴리펩타이드는 N-말단에서부터 C-말단으로, 제1 펩타이드(FP), 절단 가능한 모이어티(CM) 및 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하고, FP는 하기 구조식 (I)에 따른 아미노산 서열을 포함하고:  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)(식 중, m은 2 내지 10(예를 들어, 3 내지 10)이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이며, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임), CM은 적어도 제1 절단 부위를 포함하고; TBM은 항체 경쇄 가변 영역 및/또는 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 박테리아 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 각각의 X는 M, W 또는 C가 아니다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 구조식 (I)의  $X_m$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S,

T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 구조식 (I)의  $X_n$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다.

[0025] 본 개시내용의 다른 양상은, N-말단에서부터 C-말단으로, 차폐 모이어티(MM), 절단 가능한 모이어티(CM) 및 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 활성화 가능한 항체에 관한 것이며, 여기서, MM은 구조식 (I)에 따른 아미노산 서열을 포함하되:  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)(식 중, m은 2 내지 10(예를 들어, 3 내지 10)이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이며, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임), MM은 CM이 절단되지 않은 경우 인간 CTLA4에 대한 활성화 가능한 항체의 결합을 저해하고, CM은 적어도 제1 절단 부위를 포함하고; TBM은 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및/또는 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고, 활성화 가능한 항체는 CM이 절단되는 경우 VH 및 VL을 통해서 인간 CTLA4에 결합한다. 일부 실시형태에서, TBM은 VL을 포함하고, 활성화 가능한 항체는 VH를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, TBM은 VH를 포함하고, 활성화 가능한 항체는 VL을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, TBM은 N-말단에서부터 C-말단으로, VH 및 VL 또는 VL 및 VH를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 적어도 제1 프로테아제 절단 부위를 포함하고, 유로키나제-유형 플라스미노겐 활성화제(uPA), 매트릭스 메탈로프로테이나제-1(MMP-1), MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-14, 담배 식각 바이러스(TEV) 프로테아제, 플라스민, 트롬빈, 인자 X, PSA, PSMA, 카텡신 D, 카텡신 K, 카텡신 S, ADAM10, ADAM12, ADAMTS, 카스파제-1, 카스파제-2, 카스파제-3, 카스파제-4, 카스파제-5, 카스파제-6, 카스파제-7, 카스파제-8, 카스파제-9, 카스파제-10, 카스파제-11, 카스파제-12, 카스파제-13, 카스파제-14 및 TACE로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프로테아제로 절단된다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 각각의 X는 M, W 또는 C가 아니다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 구조식 (I)의  $X_n$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 구조식 (I)의  $X_n$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, MM은 서열번호 72 내지 78로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, VL은 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열번호 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, VL은 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함한다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, VH는 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 및 서열번호 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, VH는 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다.

[0026] 본 개시내용의 다른 양상은, N-말단에서부터 C-말단으로, 차폐 모이어티(MM), 절단 가능한 모이어티(CM) 및 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 활성화 가능한 항체에 관한 것이며, 여기서, MM은 구조식 (I)에 따른 아미노산 서열을 포함하되:  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)(식 중, m은 2 내지 10(예를 들어, 3 내지 10)이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이며, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임); 여기서 MM은 CM이 절단되지 않은 경우 인간 CD137에 대한 상기 활성화 가능한 항체의 결합을 저해하고, CM은 적어도 제1 절단 부위를 포함하며; TBM은 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및/또는 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고; 활성화 가능한 항체는 CM이 절단되는 경우 VH 및 VL을 통해서 인간 CD137에 결합한다. 일부 실시형태에서, TBM은 VL을 포함하고, 활성화 가능한 항체는 VH를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, TBM은 VH를 포함하고, 활성화 가능한 항체는 VL을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, TBM은 N-말단에서부터 C-말단으로, VH 및 VL 또는 VL 및 VH를 포함한다. 일부 실시형태에서, CM은 적어도 제1 프로테아제 절단 부위를 포함하고, 유로키나제-유형 플라스미노겐 활성화제(uPA), 매트릭스 메탈로프로테이나제-1(MMP-1), MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-14, 담배 식각 바이러스(TEV) 프로테아제, 플라스민, 트롬빈, 인자 X, PSA, PSMA, 카텡신 D, 카텡신 K, 카텡신 S, ADAM10, ADAM12, ADAMTS, 카스파제-1, 카스파제-2, 카스파제-3, 카스파제-4, 카스파제-5, 카스파제-6, 카스파제-7, 카스파제-8, 카스파제-9, 카스파제-10, 카스파제-11, 카스파제-12, 카스파제-13, 카스파제-14 및 TACE로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프로테아제로 절단된다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 각각의 X

는 M, W 또는 C가 아니다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 구조식 (I)의  $X_m$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, 구조식 (I)의  $X_m$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, MM은 서열번호 79 내지 85 및 88 내지 94로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, VL은 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열번호 70의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, VL은 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함한다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, VH는 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다. 상기 실시형태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시형태에서, VH는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다.

[0027] 본 개시내용의 다른 양상은 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 항체 중 임의의 것을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 다른 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 활성화 가능한 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드) 중 임의의 것을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 발현 벡터 및/또는 디스플레이 벡터이다. 다른 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드 및/또는 벡터(예를 들어, 활성화 가능한 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 벡터) 중 임의의 것을 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 진핵생물 세포이다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 중국 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary: CHO) 세포이다. 다른 양상에서, 본 개시내용은 활성화 가능한 항체의 제조 방법에 관한 것이며, 이 방법은 본 명세서에 기재된 숙주 세포 중 임의의 것을 항체 또는 활성화 가능한 항체를 생산하기에 적합한 조건 하에서 배양하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 세포에 의해 생산된 항체 또는 활성화 가능한 항체를 회수하는 단계를 추가로 포함한다.

[0028] 본 개시내용의 다른 양상은 하기를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법 또는 암의 진행을 지연시키는 방법에 관한 것이며, 이 방법은 대상체에게 유효량의 본 명세서에 기재된 라이브러리 중 임의의 것 및/또는 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 항체(예를 들어, 인간 CTLA4에 대한 활성화 가능한 항체 또는 인간 CD137에 대한 활성화 가능한 항체) 중 임의의 것으로부터의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드에 의해서 암호화된 폴리펩타이드를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 대상체에 유효량의 적어도 하나의 추가적인 치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 추가적인 치료제는 바이러스성 유전자 요법, 면역 관문 저해제, 표적 요법, 방사선 요법 및 화학요법으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 추가적인 치료제는 포말리스트(pomalyst), 레블리마이드(revlimid), 레날리도마이드(lenalidomide), 포말리도마이드(pomalidomide), 탈리도마이드(thalidomide), DNA-알킬화 백금-함유 유도체, 시스플라틴, 5-플루오로우라실, 사이클로포스파마이드, 항-CD137 항체, 항-CTLA4 항체, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CD20 항체, 항-CD40 항체, 항-DR5 항체, 항-CD1d 항체, 항-TIM3 항체, 항-SLAMF7 항체, 항-KIR 수용체 항체, 항-OX40 항체, 항-HER2 항체, 항-ErbB-2 항체, 항-EGFR 항체, 세톡시맙(cetuximab), 리톡시맙(rituximab), 트라스투주맙(trastuzumab), 펌브롤리주맙(pembrolizumab), 방사선 요법, 단일 선량 방사선(single dose radiation), 분할 방사선(fractionated radiation), 집중 방사선(focal radiation), 전체 장기 방사선(whole organ radiation), IL-12, IFN  $\alpha$ , GM-CSF, 키메라 항원 수용체, 입양 전달된 T 세포(adoptively transferred T cell), 항암 백신, 및 암용해 바이러스(oncolytic virus)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0029] 상기 및 본 명세서에 기재된 다양한 실시형태의 특성 중 하나, 일부 또는 모두는 조합되어 본 개시내용의 다른 실시형태를 형성할 수 있음을 이해해야 한다. 본 개시내용의 이들 및 다른 양상은 당업자에게 자명할 것이다. 본 개시내용의 이들 및 다른 실시형태는 하기의 상세한 설명에 의해서 추가로 기재된다.

**도면의 간단한 설명**

[0030] **도 1**은 효모 표면 상에 디스플레이된 표적 항체의 Fab 단편을 사용한 자가-차단 펩타이드에 대한 예시적인 선택 과정의 개략도를 도시한 도면.

**도 2**는 효모 표면 상에 디스플레이된 표적 항체의 Fv 단편을 사용한 자가-차단 펩타이드에 대한 예시적인 선택 과정의 개략도를 도시한 도면.

**도 3A 및 도 3B**는 유세포 분석법에 의해서 결정된 바와 같은, 효모 상의 CTLA4를 표적으로 하는 Fab 및 scFv의 기능성 디스플레이를 도시한 도면. **도 3A**는 효모의 표면 상의 CTLA4를 표적으로 하는 Fab의 기능성 디스플레이를 도시한 도면. **도 3B**는 효모의 표면 상의 CTLA4를 표적으로 하는 scFv의 기능성 디스플레이를 도시한 도면.

**도 4**는 인간 CTLA4를 표적으로 하는 활성화 가능한 항체에 대한 예시적인 선택 과정을 도시한 도면. 융합 단백질 디스플레이하는 효모 라이브러리를 몇몇 라운드의 FACS-기반 스크리닝에 적용하였다.

**도 5A 및 도 5B**는 유세포 분석법에 의해서 결정된 바와 같은 예시적인 CTLA4 활성화 가능한 항체 클론의 CTLA4 결합 친화도를 도시한 도면. **도 5A**는 차폐 펩타이드를 갖지 않는 표적 항체의 scFv 단편과 비교한, 무손상 차폐 펩타이드 또는 TEV 프로테아제에 의해서 절단된 차폐 펩타이드를 갖는 CTLA4 활성화 가능한 항체 클론 B13287을 포함하는, scFv 포맷에서 CTLA4 활성화 가능한 항체 클론의 결합 친화도를 도시한 도면. **도 5B**는 차폐 펩타이드를 갖지 않는 표적 항체의 Fab 단편과 비교한, 무손상 차폐 펩타이드 또는 TEV 프로테아제에 의해서 절단된 차폐 펩타이드를 갖는 CTLA4 활성화 가능한 항체 클론 B13189을 포함하는, Fab 포맷에서 CTLA4 활성화 가능한 항체 클론의 CTLA4 결합 친화도를 도시한 도면.

**도 6A** 내지 **도 6B**는 모체 항체 TY21580과 비교한, 예시적인 CTLA4 활성화 가능한 항체 TY22401, TY22403, TY22402 및 TY22404의 차폐 효율을 도시한 도면. **도 6A**는 ForteBio 시스템에 의해서 결정된 바와 같은, 모체 항체 TY21580과 비교한, 제시된 활성화 가능한 항체의 회합 및 해리 곡선을 도시한 도면. **도 6B**는 모체 항체 TY21580과 비교한, 결합된 활성화 가능한 항체의 비교 비의 그래프.

**도 7A** 내지 **도 7C**는 ELISA에 의해서 결정된 바와 같은, 재조합 인간 CTLA4-Fc에 대한 예시적인 CTLA4 활성화 가능한 항체의 차폐 효율을 도시한 도면. **도 7A**는 모체 항체 TY21580과 비교한, 재조합 인간 CTLA4-Fc에 대한 CTLA4 활성화 가능한 항체 TY22401, TY22402, TY22403, TY22404의 결합을 나타낸 ELISA 데이터의 제1 배치(batch)를 도시한 도면. **도 7B**는 모체 항체 TY21580과 비교한, 재조합 인간 CTLA4-Fc에 대한 CTLA4 활성화 가능한 항체 TY22401, TY22402, TY22403, TY22404의 결합을 나타낸 ELISA 데이터의 제2 배치를 도시한 도면. **도 7C**는 모체 항체 TY21580과 비교한, 재조합 인간 CTLA4-Fc에 대한 CTLA4 활성화 가능한 항체 TY22563, TY22564, TY22565, TY22566의 결합을 도시한 도면.

**도 8A** 및 **도 8B**는 차폐 펩타이드의 제거에 대한 CTLA4 활성화 가능한 항체 TY22404의 활성도를 도시한 도면. **도 8A**는 미처리되거나, 프로테아제 uPA로 처리되거나, 또는 5 또는 10단위의 프로테아제 MMP-9로 처리된 활성화 가능한 항체 TY22404의 SDS-PAGE 결과를 도시한 도면. **도 8B**는 ELISA에 의해서 결정된, 모체 항체 TY21580과 비교한, 미처리되거나, 프로테아제 uPA로 처리되거나, 또는 프로테아제 MMP-9로 처리된 활성화 가능한 항체 TY22404의 결합을 도시한 도면.

**도 9A** 내지 **도 9C**는 가속 스트레스 조건 하에서 예시적인 활성화 가능한 항체의 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 프로파일을 도시한 도면. **도 9A**는 대조군 조건과 비교한, 6회의 동결 및 해동 주기 후 활성화 가능한 항체 TY22402의 SEC 프로파일을 도시한 도면. **도 9B**는 대조군 조건과 비교한, 50°C에서 7일 후 활성화 가능한 항체 TY22402의 SEC 프로파일을 도시한 도면. **도 9C**는 대조군 조건과 비교한, 50°C에서 7일 후, 40°C에서 최대 28일 동안 저장한 후 또는 6회의 동결 및 해동 주기 후 예시적인 활성화 가능한 항체의 SEC 주 피크 면적의 백분율을 도시한 도면.

**도 10**는 대략 8mg/ml 또는 150mg/ml 초과에서 저장 후 활성화 가능한 항체 TY22401 및 TY22402의 SEC 주 피크 면적의 백분율을 도시한 도면.

**도 11**는 ForteBio 시스템에 의해서 결정된 바와 같은, pH 3.7에서 30분 동안 인큐베이션되거나 또는 1시간 동안 pH 3.7에서 인큐베이션된 미처리된 활성화 가능한 항체 TY21580, TY22401, TY22402 및 TY22566의 차폐 효율을 도시한 도면.

**도 12A** 및 **도 12B**는 ELISA에 의해서 결정된 바와 같은 아이소타입 대조군 항체, 모체 항체 TY21580 또는 예시적인 CTLA4 활성화 가능한 항체 TY22401, TY22402 또는 TY22404에 의한 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 활성화를 도시한 도면. **도 12A**는 아이소타입 대조군 항체, 모체 항체 TY21580, 및 예시적인 CTLA4 활성화 가능한 항체 TY22401, TY22402 또는 TY22404로 자극된 CD3-프라이밍된 인간 PBMC로부터의 IL-2 분비에 대한 효과를 도시한 도면. **도 12B**는 아이소타입 대조군 항체, 모체 항체 TY21580, 및 예시적인 CTLA4 활성화 가능한 항체 TY22401, TY22402 또는 TY22404로 자극된 CD3-프라이밍된 인간 PBMC로부터의 IFN $\gamma$  분비에 대한 효과를 도시한 도면.

**도 13**는 ADCC 리포터 유전자 검정에 의해서 결정된, 인간 CTLA4를 일시적으로 과발현하는 HEK293F 세포에 대한

아이소타입 대조군 항체, 모체 항체 TY21580, 또는 예시적인 활성화 가능한 항체 TY22401, TY21580, 또는 TY22404의 항체-의존적 세포-매개된 세포독성(ADCC) 활성을 도기한 도면.

**도 14A** 및 **도 14B**는 MC38 동계 마우스 결장직장 종양 모델에서 모체 항체 TY21580, 아이소타입 대조군 항체, 또는 예시적인 CTLA4 활성화 가능한 항체 TY22401, TY22402 또는 TY22566의 생체내 항-종양 효능을 도기한 도면. **도 14A**는 MC38-확립된 종양을 보유하는 암컷 C57BL/6 마우스의 상이한 치료군의 종양 성장 곡선을 도기한 도면. 데이터 지점은 군 평균을 나타내고; 오차 막대는 SEM을 나타낸다. **도 14B**는 TY21580, TY22401, TY22402 및 TY22566으로 치료된 군에 대한 개별적인 종양 성장 곡선을 도기한 도면.

**도 15**는 CT26 동계 마우스 결장직장 종양 모델에서 아이소타입 대조군 항체, 모체 항체 TY21580, 또는 3종의 활성화 가능한 항체 중 하나의 생체내 항-종양 효능을 도기한 도면. CT26-확립된 종양을 보유하는 암컷 C57BL/6 마우스의 상이한 치료군의 종양 성장 곡선을 도기한 도면. 데이터 지점은 군 평균을 나타내고; 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

**도 16**은 H22 동계 마우스 간 종양 모델에서 아이소타입 대조군 항체, 모체 항체 TY21580, 또는 3종의 활성화 가능한 항체 중 하나의 생체내 항-종양 효능을 도기한 도면. H22-확립된 종양을 보유하는 암컷 C57BL/6 마우스의 상이한 치료군의 종양 성장 곡선을 도기한 도면. 데이터 지점은 군 평균을 나타내고; 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

**도 17A** 및 **도 17B**는 3LL 동계 마우스 폐 종양 모델에서 모체 항체 TY21580, 아이소타입 대조군 항체, 및 예시적인 활성화 가능한 항체 TY22401, TY22402 또는 TY22566의 생체내 항-종양 효능을 도기한 도면. **도 17A**는 3LL-확립된 종양을 보유하는 암컷 C57BL/6 마우스의 상이한 치료군의 종양 성장 곡선을 도기한 도면. 데이터 지점은 군 평균을 나타내고; 오차 막대는 SEM을 나타낸다. **도 17B**는 TY21580, TY22401, TY22402 및 TY22566으로 치료된 군에 대한 개별적인 종양 성장 곡선을 도기한 도면.

**도 18A** 내지 **도 18C**는 ELISA에 의해서 결정된 바와 같은, 암컷 BALB/c 마우스에게 10mg/kg의 농도로 정맥내로 투여된 시험품(TA)의 혈액 농도의 시간 경과를 도기한 도면. **도 18A**는 모체 항체 TY21580과 비교한, 암컷 BALB/c 마우스에게 10mg/kg의 농도로 정맥내로 투여된 활성화 가능한 항체 TY22401의 혈액 농도의 시간 경과를 도기한 도면. **도 18B**는 모체 항체 TY21580과 비교한, 암컷 BALB/c 마우스에게 10mg/kg의 농도로 정맥내로 투여된 활성화 가능한 항체 TY22402의 혈액 농도의 시간 경과를 도기한 도면. **도 18C**는 모체 항체 TY21580과 비교한, 암컷 BALB/c 마우스에게 10mg/kg의 농도로 정맥내로 투여된 활성화 가능한 항체 TY22404의 혈액 농도의 시간 경과를 도기한 도면.

**도 19**는 NOD 마우스 모델을 사용한 아이소타입 대조군 항체, 모체 항체 TY21580, 및 예시적인 활성화 가능한 항체 TY22566, TY22401 및 TY22402의 반복 투여 독성을 도기한 도면. 20일에 걸친 생존율 백분율을 각각의 치료군에 대해서 도기하였다.

**도 20A** 내지 **도 20B**는 유세포 분석법에 의해서 결정된 바와 같은, 효모 상의 인간 CD137를 표적으로 하는 Fab 및 scFv의 기능성 디스플레이를 도기한 도면. **도 20A**는 효모의 표면 상의 CD137를 표적으로 하는 scFv를 도기한 도면. **도 20B**는 효모의 표면 상의 CD137를 표적으로 하는 Fab를 도기한 도면.

**도 21**은 인간 CD137를 표적으로 하는 활성화 가능한 항체에 대한 예시적인 선택 과정을 도기한 도면. 융합 단백질 디스플레이하는 효모 라이브러리를 몇몇 라운드의 FACS-기반 스크리닝에 적용하였다.

**도 22A** 및 **도 22B**는 유세포 분석법에 의해서 결정된 바와 같은 예시적인 CD137 활성화 가능한 항체 클론의 CD137 결합 친화도를 도기한 도면. **도 22A**는 차폐 펩타이드를 갖지 않는 표적 항체의 scFv 단편과 비교한, 무손상 차폐 펩타이드 또는 TEV 프로테아제에 의해서 절단된 차폐 펩타이드를 갖는 CD137 활성화 가능한 항체 클론 B13428을 포함하는, scFv 포맷에서 CD137 활성화 가능한 항체 클론의 결합 친화도를 도기한 도면. **도 22B**는 차폐 펩타이드를 갖지 않는 표적 항체의 scFv 단편과 비교한, 무손상 차폐 펩타이드 또는 TEV 프로테아제에 의해서 절단된 차폐 펩타이드를 갖는 CD137 활성화 가능한 항체 클론 B13439를 포함하는, scFv 포맷에서 CD137 활성화 가능한 항체 클론의 CD137 결합 친화도를 도기한 도면.

**도 23**은 유세포 분석법에 의해서 결정된, 모체 항체 TY21242와 비교한, 인간 CD137에 대한 예시적인 활성화 가능한 항체의 차폐 효율을 도기한 도면.

**도 24A** 및 **도 24B**는 모체 항체 TY21580과 비교한, 가변 길이의 차폐 펩타이드를 함유한 예시적인 활성화 가능한 항체의 차폐 효율을 도기한 도면. 차폐 효율을 ELISA-기반 방법을 사용하여 결정하였다. **도 24A** 및 **도 24B**는 다양한 활성화 가능한 항-CTLA4 항체를 시험하기 위해서 동일한 실험 방법을 사용한 2가지 실험 설정을 나타낸 도

면.

도 25는 모체 항체 TY21580과 비교한, 다양한 길이의 절단 펩타이드를 함유한 예시적인 활성화 가능한 항체의 차폐 효율을 도시한 도면. 차폐 효율을 ELISA-기반 방법을 사용하여 결정하였다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

**I. 일반 기술**

본 명세서에 기재되거나 언급된 기술 및 절차는 일반적으로 당업자에 의해서 종래의 방법, 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); 및 *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993)]에 기재된 널리 사용되는 방법을 사용하여 양호하게 이해되고, 공통적으로 사용된다.

**II. 정의**

본 개시내용을 상세하게 기재하기 전에, 본 개시내용은 특정 조성물 또는 생물학적 시스템에 제한되지 않고, 물론 달라질 수 있음을 이해해야 한다. 또한 이러한 용어는 단지 특정 실시형태를 기재하는 목적을 위한 것이며, 제한을 의도하지 않음을 이해해야 한다.

본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 달리 명백하게 나타내지 않는 한 복수의 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "분자"에 대한 언급은 2개 이상의 그러한 분자의 조합물 등을 선택적으로 포함한다.

용어 "약"은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 관련 기술 분야의 당업자에게 용이하게 공지된 각각의 값에 대한 통상의 오차 범위를 지칭한다. 본 명세서에서 "약" 값 또는 파라미터에 대한 언급은 그 값 또는 파라미터 자체에 대한 실시형태를 포함한다(그리고 이를 기재한다).

본 명세서에 기재된 본 발명의 양상 및 실시형태는 양상 및 실시형태를 "포함하는 것", 이들로 "이루어진 것" 및 이들로 "본질적으로 이루어진 것"을 포함하는 것으로 이해된다.

본 명세서에서 사용되는 바와 같은 구, 예컨대, "A 및/또는 B"와 같은 용어 "및/또는"은 A 및 B 둘 다; A 또는 B; A(단독); 및 B(단독)를 포함하도록 의도된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 구, 예컨대, "A, B 및/또는 C"와 같은 용어 "및/또는"은 하기 실시형태 각각을 포함하도록 의도된다: A, B 및 C; A, B, 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독).

용어 "아미노산"은 천연 및 합성 아미노산, 뿐만 아니라, 천연 아미노산과 유사하게 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체(mimetic)를 지칭한다. 천연 아미노산에는 유전자 코드에 의해 암호화된 아미노산뿐만 아니라, 후에 변형된 그러한 아미노산, 예를 들어, 하이드록시프롤린, 감마-카복시글루타메이트, 및 O-포스포세린이 있다. 용어 "아미노산 유사체"는 천연 아미노산과 동일한 염기성 화학 구조를 갖지만, C-말단 카복시기, N-말단 아미노기, 또는 측쇄 작용기는 다른 작용기로 화학적으로 변형된, 화합물을 지칭한다. 용어 "아미노산 모방체"

는 아미노산의 일반 화학적 구조와는 다른 구조를 갖지만, 천연 아미노산과 유사하게 기능하는 화학적 화합물을 지칭한다.

[0040] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 20개의 통상적인 아미노산 및 이의 약어는 일반적인 사용법을 따른다(예를 들어, 문헌[Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)] 참조).

[0041] 용어 "폴리펩타이드", "단백질", 및 "펩타이드"는 본 명세서에서 상호 교환 가능하게 사용되고, 2개 이상의 아미노산의 중합체를 지칭할 수 있다.

[0042] "폴리뉴클레오타이드", 또는 "핵산"은 본 명세서에서 상호 교환 가능하게 사용되고, 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체를 지칭하고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드 또는 염기 및/또는 이의 유사체 또는 DNA 또는 RNA 중합효소에 의해서 또는 합성 반응에 의해서 중합체 내에 혼입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대, 메틸화된 뉴클레오타이드 및 이의 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 중합체의 조립 전 또는 후에 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형이 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비-뉴클레오타이드 성분에 의해서 개재될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 합성, 예컨대, 표지에 대한 접합 이후에 생성된 변형(들)을 포함할 수 있다. 다른 유형의 변형은 예를 들어, "캡", 자연 발생 뉴클레오타이드 중 하나 이상의 유사체로의 치환, 인터뉴클레오타이드 변형, 예를 들어, 비하전된 링키지를 갖는 것(예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포 트라이에스터, 포스포아미데이트, 카바메이트 등) 및 하전된 링키지를 갖는 것(예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로다이티오에이트 등), 펜던트 모이어티를 함유하는 것, 예를 들어, 단백질(예를 들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩타이드, ply-L-라이신 등), 인터칼레이터를 갖는 것(예를 들어, 아크리딘, 프소탈렌 등), 킬레이터를 함유하는 것(예를 들어, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화 금속 등), 알킬레이터를 함유하는 것, 변형된 링키지를 갖는 것(예를 들어, 알파 애노머성 핵산 등), 뿐만 아니라 폴리뉴클레오타이드(들)의 비변형된 형태를 포함한다. 추가로, 당에 보통 존재하는 하이드록실 기 중 임의의 것은, 예를 들어, 포스포네이트기, 포스포에이트기에 의해서 대체될 수 있거나, 표준 보호기에 의해서 보호될 수 있거나, 추가 뉴클레오타이드에 대한 추가 링키지를 제조하도록 활성화될 수 있거나, 고체 또는 반고체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH는 포스포릴화될 수 있거나 또는 아민 또는 1 내지 20개의 탄소 원자의 유기 캡핑기 모이어티로 치환될 수 있다. 다른 하이드록실은 또한 표준 보호기로 유도체화될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 또한 예를 들어, 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴-, 2'-플루오로- 또는 2'-아자이드-리보스, 탄소환식 당 유사체,  $\alpha$ -애노머 당, 에피머 당, 예컨대, 아라비노스, 자일로스 또는 라익소스, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헥톨로스, 비환식 유사체 및 염기성 뉴클레오사이드 유사체, 예컨대, 메틸 리보사이드를 비롯한 관련 기술 분야에 일반적으로 공지된 리보스 또는 데옥시리보스 당의 유사한 형태를 함유할 수 있다 하나 이상의 포스포다이에스터 링키지는 대안적인 연결기에 의해서 대체될 수 있다. 이러한 대안적인 연결기는 포스포에이트가 P(O)S("티오에이트"), P(S)S("다이티오에이트"), (O)NR<sub>2</sub>("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH<sub>2</sub>("폼아세탈")(식 중, 각각의 R 또는 R'는 독립적으로 H 또는 에터(-O-) 링키지를 선택적으로 함유하는 치환된 또는 비치환된 알킬(1-20 C), 아릴, 알켄일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일 또는 아르알릴임)인 실시형태를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 폴리뉴클레오타이드 내의 모든 링키지가 동일할 필요는 없다. 상기 설명은 RNA 및 DNA를 비롯한, 본 명세서에서 언급되는 모든 폴리뉴클레오타이드에 적용된다.

[0043] 용어 "단리된 핵산"은 핵산의 천연 소스에 존재하는 다른 핵산 분자로부터 분리된, 게놈, cDNA, 또는 합성 기원, 또는 이의 조합의 핵산 분자를 지칭한다. 예를 들어, 게놈 DNA와 관련하여, 용어 "단리된"은 게놈 DNA가 자연적으로 연관된 염색체로부터 분리된 핵산 분자를 포함한다. 바람직하게는, "단리된" 핵산에는 자연적으로 핵산 측면에 있는 서열(즉, 고려되는 핵산의 5' 및 3' 단부에 위치한 서열)이 존재하지 않는다.

[0044] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "라이브러리"는 공유된 클래스를 갖는 2개 이상의 엔티티의 세트를 지칭한다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 라이브러리는 2개 이상의 폴리뉴클레오타이드의 세트를 지칭할 수 있다. 용어 "라이브러리"는 가장 넓은 의미로 본 명세서에서 사용되며, 구체적으로 조합될 수 있거나 조합될 수 없는 하위라이브러리를 포괄한다.

[0045] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "고유한"은 그 세트의 다른 구성원과 상이한 세트의 구성원을 지칭한다. 예를 들어, 라이브러리 내의 고유한 활성화 가능한 항체는 라이브러리 내의 다른 활성화 가능한 항체에 의해서 공유되지 않는 특정 서열을 갖는 활성화 가능한 항체를 지칭한다. 실질적으로, 라이브러리의 물리학적 실현의 "고유한" 구성원은 하나를 초과하는 카피에 존재할 수 있음을 이해해야 한다. 예를 들어, 라이브러리는 복수의 "고유한" 구성원은 하나를 초과하는 카피에 존재할 수 있음을 이해해야 한다. 예를 들어, 라이브러리는 복수의 "고유한" 구성원은 하나를 초과하는 카피에 존재할 수 있음을 이해해야 한다.

유한" 활성화 가능한 항체를 함유할 수 있고, "고유한" 활성화 가능한 항체 분자 중 하나 이상은 하나를 초과하는 카피에서 발생할 수 있다.

[0046] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "다양성"은 다양성 및/또는 이종성을 지칭한다. 예를 들어, 라이브러리 내의 항체의 다양성은 라이브러리에 존재하는 고유한 서열을 갖는 다양한 항체를 지칭할 수 있다.

[0047] 용어 "항체"는 본 명세서에서, 가장 넓은 의미로 사용되고, 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 단클론성 항체(전장 단클론성 항체를 포함함), 다클론성 항체, 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이적 항체, 삼중특이적 항체), 및 항체 단편(예를 들어, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv 및/또는 단쇄 가변 단편 또는 scFv)을 특이적으로 포함한다.

[0048] 일부 실시형태에서, 용어 "항체"는 2개의 동일한 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)로 이루어진 기본 4-폴리펩타이드쇄 구조를 갖는 항원-결합 단백질(즉, 면역글로불린)을 지칭할 수 있다. 각각의 L쇄는 하나의 공유 다이설파이드 결합에 의해 H쇄에 연결되며, 2개의 H쇄는 H쇄 아이소타입에 따라 하나 이상의 다이설파이드 결합에 의해 서로 연결된다. 각각의 중쇄는 N-말단에서, 가변 영역(본 명세서에서 V<sub>H</sub>로서 약칭됨), 이후, 불변 영역을 갖는다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, 즉, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> 및 C<sub>H3</sub>으로 이루어진다. 각각의 경쇄는 N-말단에서, 가변 영역(본 명세서에서 V<sub>L</sub>로서 약칭됨), 이후에, 이의 다른 단부에서 불변 영역을 갖는다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, C<sub>L</sub>을 포함한다. V<sub>L</sub>은 V<sub>H</sub>와 정렬되며, C<sub>L</sub>은 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)과 정렬된다. V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub>을 함께 쌍을 형성하여 단일 항원-결합 부위를 형성한다. IgM 항체는 J쇄로 지칭되는 추가적인 폴리펩타이드와 함께 5개의 기본 이종사량체 단위로 이루어지고, 이에 따라, 10개의 항원 결합 부위를 함유하며, 분비된 IgA 항체는 J쇄와 함께 2 내지 5개의 기본 4-쇄 단위를 포함하는 다가 집합체를 형성하기 위해 중합할 수 있다.

[0049] V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 영역은 구조 및 서열 분석을 기초로 한 초가변 영역(HVR)을 지칭하는, 초가변성의 영역으로 추가로 세분화될 수 있다. HVR은 프레임워크 영역(FW)으로 지칭되는, 더욱 보존된 영역에 산재되어 있다(예를 들어, 문헌 [Chen *et al.* (1999) *J. Mol. Biol.* (1999) 293, 865-881] 참고). 각각의 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub>은 아미노-말단으로부터 카복시-말단으로 하기 순서대로 배열된, 3개의 HVR 및 4개의 FW로 이루어진다: FW-1\_HVR-1\_FW-2\_HVR-2\_FW-3\_HVR-3\_FW4. 본 개시내용 전체에서, 중쇄의 3개의 HVR은 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3으로 지칭된다. 유사하게, 경쇄의 3개의 HVR은 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3으로 지칭된다.

[0050] 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포(예를 들어, 효과기 세포) 및 전통적인 보체 시스템의 제1 성분(C1q)을 포함하는, 숙주 세포 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 경쇄 및 중쇄 내에서, 가변 영역 및 불변 영역은 약 10개 이상의 아미노산의 "D" 영역을 또한 포함하는 중쇄와 함께, 약 12개 이상의 아미노산의 "J" 영역에 의해 연결된다(문헌[Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))] 참조).

[0051] 척추동물 종으로부터의 L쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 한, 카파 및 람다로 지칭되는, 2개의 명백하게 구별되는 유형 중 하나로 지정될 수 있다. 이의 중쇄(CH)의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체는 상이한 부류 또는 아이소타입으로 지정될 수 있다. 5개 부류의 항체가 존재한다: 각각 α(알파), δ(델타), ε(엡실론), γ(감마), 및 μ(뮤)로 명시되는 중쇄를 갖는 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM. IgG 부류의 항체는 각각 감마 중쇄, Y1 내지 Y4에 의해 4가지의 하위부류 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 추가로 분류될 수 있다.

[0052] 용어 항체의 "항원-결합 단편" 또는 "항원 결합 부분"은 항체가 결합하는 항원에 결합하는 능력을 보유한 항체의 하나 이상의 부분을 지칭한다. 항체의 "항원-결합 단편"의 예는 (i) Fab 단편, V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> 및 C<sub>H1</sub> 도메인으로 이루어진 1가 단편; (ii) F(ab')<sub>2</sub> 단편, 힌지 영역에서 다이설파이드 브리지에 의해 결합된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; (iii) V<sub>H</sub> 및 C<sub>H1</sub> 도메인으로 이루어진 Fb 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 V<sub>L</sub> 및 V<sub>H</sub> 도메인으로 이루어진 Fv 단편, (v) V<sub>H</sub> 도메인으로 이루어진, dAb 단편[Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546 (1989)]; 및 (vi) 단리된 상보적 결정 영역(CDR)을 포함한다.

[0053] 용어 "CTLA4"가 본 출원에서 사용되고, 인간 CTLA4(예를 들어, 유니프로트 수탁 번호 P16410), 뿐만 이의 변이체, 아이소폼 및 중 동족체(예를 들어, 마우스 CTLA4(유니프로트 수탁 번호 P09793), 래트 CTLA4(유니프로트 수탁 번호 Q9Z1A7), 개 CTLA4(유니프로트 수탁 번호 Q9XSI1), 시노물거스 원숭이 CTLA4(유니프로트 수탁 번호 G7PL88) 등)를 포함한다. 따라서, 결합 분자(예를 들어, 활성화 가능한 항체)는 또한 인간이 아닌 종으로부터의

CTLA4에 결합할 수 있다. 다른 경우에서, 결합 분자는 인간 CTLA4에 대해 완전히 특이적일 수 있고, 종 또는 다른 타입의 교차-반응성을 나타내지 않을 수 있다.

[0054] 용어 "CD137"이 본 출원에서 사용되고, 인간 CD137(예를 들어, 젠뱅크 수탁 번호 NM\_001561; NP\_001552), 뿐만 아니라 이의 변이체, 아이소폼 및 종 동족체(예를 들어, 마우스 CD137(젠뱅크 유전자 ID 21942), 래트CD137(젠뱅크 유전자 ID 500590), 개 CD137(젠뱅크 유전자 ID 608274), 시노몰거스 원숭이(cynomolgus monkey) CTLA4(젠뱅크 유전자 ID 102127961) 등)를 포함한다. 따라서, 결합 분자(예를 들어, 활성화 가능한 항체)는 또한 인간이 아닌 종으로부터의 CD137에 결합할 수 있다. 다른 경우에서, 결합 분자는 인간 CD137에 대해 완전히 특이적일 수 있고, 종 또는 다른 타입의 교차반응성을 나타내지 않을 수 있다.

[0055] 용어 "키메라 항체"는 인간 항체로부터 유도된 가변 영역 및 뮤린 면역글로불린 불변 영역을 갖는 것과 같은 상이한 동물 종으로부터 유도된 아미노산 서열을 포함하는 항체를 지칭한다.

[0056] 용어 "결합에 대해 경쟁적이다(competes for binding)"는 결합 표적에 대한 이의 결합에서 2개의 항체의 상호작용을 지칭한다. 제1 항체는, 제1 항체와 이의 동족 에피토프의 결합이 제2 항체의 부재 하에서의 제1 항체의 결합과 비교하여 제2 항체의 존재 하에서 검출 가능하게 감소되는 경우에, 제2 항체와의 결합에 대해 경쟁적이다. 대안은, 제2 항체의 이의 에피토프에 대한 결합이 또한, 제1 항체의 존재 하에서 검출 가능하게 감소되는 경우에, 그러한 경우일 수 있지만, 반드시 그러한 필요는 없다. 즉, 제1 항체는 제1 항체의 이의 각각의 에피토프에 대한 결합을 저해하는 그러한 제2 항체 없이 제2 항체의 이의 에피토프에 대한 결합을 저해할 수 있다. 그러나, 각 항체가 다른 항체의 이의 동족 에피토프와의 결합을 검출 가능하게 저해하는 경우에, 동일하거나, 더 크거나, 더 작은 정도이든지 간에, 항체는 이의 개개 에피토프(들)에 대해 서로 "교차-경쟁적"이라고 한다.

[0057] 용어 "에피토프"는 항체(또는 이의 항원-결합 단편)가 결합하는 항원의 일부를 지칭한다. 에피토프는 단백질의 3차 폴딩(tertiary folding)에 의해 병치된 인접한 아미노산 또는 비인접한 아미노산 둘 모두로부터 형성될 수 있다. 인접한 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 통상적으로, 변성 용매에 노출 시에 유지되며, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 통상적으로, 변성 용매로의 처리 시에 손실된다. 에피토프는 고유한 공간 형태에서 다양한 수의 아미노산을 포함할 수 있다. 에피토프의 공간 형태를 결정하는 방법은 예를 들어, X선 크로마토그래피, 2차원 핵자기공명, 질량 분석법과 결합한 중수소 및 수소 교환, 또는 부위-유도 돌연변이 유발, 또는 결합 항체 및 이의 변이체를 갖는 항원 및 이의 복합물 구조의 계산 모델링과 조합하여 이용된 모든 방법을 포함한다(예를 들어, 문헌[Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)] 참조). 항원의 목적하는 에피토프가 결정된 직후에, 그러한 에피토프에 대한 항체는 예를 들어, 본 명세서에 기술된 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 항체의 생성 및 특징규명은 또한, 목적하는 에피토프에 대한 정보를 설명할 수 있다. 이러한 정보로부터, 동일한 에피토프에 대한 결합을 위해 항체를 경쟁적으로 스크리닝하는 것이 가능하다. 이를 달성하기 위한 방법은 서로 경쟁적으로 결합하는 항체, 즉, 항원에 결합하기 위해 경쟁적인 항체를 발견하기 위해 교차-경쟁 연구를 수행하는 것이다. 이의 교차-경쟁을 기초로 하여 항체를 "바이닝(binning)"하기 위한 고속대량처리(high throughput) 공정은 PCT 공개 WO 03/48731호에 기술되어 있다.

[0058] 용어 "생식계열"은 이러한 것이 생식 세포를 통해 부모로부터 자손에게 진행되기 때문에, 항체 유전자 및 유전자 분절의 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 생식계열 서열은 B 세포 성숙 과정 동안 재조합 및 초돌연변이 사건에 의해 변경될 수 있는 성숙 B 세포에서 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열과 구별된다.

[0059] 용어 "글리코실화 부위"는 당 잔기의 부착을 위한 위치로서 진핵 세포에 의해 인식되는 아미노산 잔기를 지칭한다. 탄수화물, 예를 들어, 올리고당이 부착된 아미노산에는 통상적으로, 아스파라긴(N-연결), 세린(O-연결), 및 트레오닌(O-연결) 잔기가 있다. 특정 부착 부위는 통상적으로, 본 명세서에서 "글리코실화 부위 서열"로서 지칭되는 아미노산의 서열에 의해 신호전달된다. N-연결된 글리코실화를 위한 글리코실화 부위 서열은 -Asn-X-Ser- 또는 -Asn-X-Thr-이며, 여기서, X는 프롤린 이외의 임의의 통상적인 아미노산일 수 있다. 용어 "N-연결된" 및 "O-연결된"은 당 분자와 아미노산 잔기 사이의 부착 부위로서 역할을 하는 화학적 기를 지칭한다. N-연결된 당은 아미노 기를 통해 부착된다. O-연결된 당은 하이드록실 기를 통해 부착된다. 용어 "글리칸 점유(glycan occupancy)"는 글리코실화 부위에 연결된 탄수화물 모이어티의 존재를 지칭한다(즉, 글리칸 부위는 점유된다). 폴리펩타이드 상에 적어도 2개의 잠재적인 글리코실화 부위가 존재하는 경우에, 탄수화물 모이어티에 의해 부위가 점유되지 않거나(O-글리칸 부위 점유), 하나(1-글리칸 부위 점유) 또는 둘 모두(2-글리칸 부위 점유)의 부위가 점유될 수 있다.

[0060] 용어 "숙주 세포"는 고려되는 단백질, 단백질 단편, 또는 펩타이드를 생성시키기 위해 조작될 수 있는 세포계를 지칭한다. 숙주 세포는 비제한적으로, 배양된 세포, 예를 들어, 설치류(래트, 마우스, 기니피그 또는 햄스터)로

부터 유도된 포유류 배양된 세포, 예를 들어, CHO, BHK, NSO, SP2/0, YB2/0; 인간 세포(예를 들어, HEK293F 세포, HEK293T 세포); 또는 인간 조직 또는 하이브리도마 세포, 효모 세포, 곤충 세포(예를 들어, S2 세포), 박테리아 세포(예를 들어, 이, 콜라이 세포) 및 트랜스제닉 동물 또는 배양된 조직 내에 포함된 세포를 포함한다. 이러한 용어는 특정 대상체 세포뿐만 아니라 이러한 세포의 자손을 포함한다. 특정 변경이 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 다음 세대에서 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 용어 "숙주 세포"의 범위 내에 여전히 포함되어 있다.

[0061] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해서 생산되거나 또는 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체-암호화 서열을 이용하는 비인간 기원으로부터 유래된 항체의 것에 상응하는 아미노산 서열을 보유하는 것이다. 인간 항체의 정의는 비인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화된 항체를 구체적으로 제외한다.

[0062] 용어 "인간화된 항체"는 인간 항체로부터 유도된 아미노산 잔기를 함유한 키메라 항체를 지칭한다. 인간화된 항체는 비-인간 동물 또는 합성 항체로부터의 CDR 또는 HVR 중 일부 또는 모두를 함유할 수 있으며, 항체의 프레임워크 및 불변 영역은 인간 항체 서열로부터 유도된 아미노산 잔기를 함유한다.

[0063] 용어 "예시적인 항체"는 본 명세서에 기재된 항체 중 임의의 하나를 지칭한다. 이러한 항체는 임의의 부류(예를 들어, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM)로 존재할 수 있다. 따라서, 상기에서 식별된 각각 항체는  $V_L$  및  $V_H$  영역에 대한 동일한 아미노산 서열을 갖는 모두 5개의 부류의 항체를 포함한다. 또한, IgG 부류의 항체는 임의의 하위 부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4)로 존재할 수 있다. 따라서, IgG 하위부류에서 상기에서 식별된 각각의 항체는  $V_L$  및  $V_H$  영역에 대한 동일한 아미노산 서열을 갖는 모두 4개의 하위부류의 항체를 포함한다. 5개 부류뿐만 아니라 4개의 IgG 하위부류에서 인간 항체의 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열은 당업계에서 공지되어 있다. 표 1b에 나타난 예시적인 항체 각각의 IgG4 하위부류에 대한 전장 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열은 본 개시 내용에 제공된다.

[0064] "단리된" 항체 또는 결합 분자는 자연 환경의 성분으로부터 분리된 것이다. 일부 실시형태에서, 항체는 예를 들어, 전기영동(예를 들어, SDS-PAGE, 등전점 전기영동(isoelectric focusing: IEF), 모세관 전기영동법) 또는 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해서 결정되는 경우 95% 또는 99% 초과로 순도로 정제된다. 항체 순도의 평가를 위한 방법의 검토를 위해서, 문헌[Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)]을 참고하기 바란다.

[0065] 용어 " $k_a$ "는 특정 항체-항원 상호작용의 결합속도 상수를 지칭하며, 용어 " $k_d$ "는 특정 항체-항원 상호작용의 해리속도 상수를 지칭한다.

[0066] 용어 " $K_D$ "는 특정 항체-항원 상호작용의 평형 해리 상수를 지칭한다. 이는  $k_a$ 에 대한  $k_d$ 의 비율(즉,  $k_d/k_a$ )로부터 얻어지고, 몰 농도(M)로서 표현된다.  $K_D$ 는 이의 결합 파트너에 대한 항체의 결합의 친화력에 대한 척도로서 사용된다.  $K_D$ 가 작을수록, 항체가 더욱 단단히 결합하거나, 항체와 항원 간의 친화력이 더욱 높다. 예를 들어, 나노몰(nM) 해리 상수를 갖는 항체는 마이크로몰( $\mu$ M) 해리 상수를 갖는 항체 보다 특정 항원에 더욱 단단히 결합한다. 항체에 대한  $K_D$  값은 당업계에서 널리 규명된 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 항체의  $K_D$ 를 결정하는 하나의 방법은 ELISA를 사용하는 것이다. 예를 들어, ELISA를 사용한 검정 절차가 본 개시내용의 적어도 실시예 3에 기술되어 있다.

[0067] 용어 "포유동물"은 포유류 부류의 임의의 동물 종을 지칭한다. 포유동물의 예는 인간; 실험실 동물, 예를 들어, 래트, 마우스, 햄스터, 토끼, 비인간 영장류 및 기니피그; 가축, 예를 들어, 고양이, 개, 소, 양, 염소, 말, 및 돼지; 및 야생 포획 동물, 예를 들어, 사자, 호랑이, 코끼리 등을 포함한다.

[0068] 포유동물에서 특정 질환 상태를 참조하여 용어 "예방하다" 또는 "예방하는"은 질환의 발병을 예방하거나 지연시키거나, 이의 임상적 또는 준임상적 증상의 징후를 예방하는 것을 지칭한다.

[0069] 본 명세서에서 사용되는 2개의 폴리펩타이드 서열 간의 "서열 동일성"은 서열 간에 동일한 아미노산의 백분율을 나타낸다. 폴리펩타이드의 아미노산 서열 동일성은 Bestfit, FASTA, 또는 BLAST와 같은 공지된 컴퓨터 프로그램을 이용하여 통상적으로 결정될 수 있다(예를 들어, 문헌[Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219 (2000); Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)] 참조). 특정 정렬이 예를 들어, 참조 아미노산 서열과 95% 일치하는 지를 결정하기 위해 Bestfit 또는 임의의 다른 서열 정렬 프로그램을 이용할 때,

파라미터는, 일치성의 백분율이 참조 아미노산 서열의 전장에 대해 계산되고 참조 서열에서 아미노산 잔기의 총수의 5% 이하의 상동성의 차이가 허용되도록 설정된다. 폴리펩타이드 간의 일치성의 백분율을 결정하는 이러한 상술된 방법은 본 명세서에 개시된 모든 단백질, 이의 단편, 또는 변이체에 적용 가능하다.

[0070] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "결합한다", "에 결합한다", "특이적으로 결합한다", "에 특이적으로 결합한다" 또는 "에 대해서 특이적인"은 생물학적 분자를 포함하는 분자의 이중 집단의 존재 하에서 표적의 존재를 결정하는, 측정 가능하고 재현 가능한 상호작용, 예컨대, 표적과 항체 간의 결합을 지칭한다. 예를 들어, 표적(에피토프일 수 있음)에 결합하거나 특이적으로 결합하는 항체는, 그것이 다른 표적에 결합하는 것보다 더 높은 친화도, 결합능, 보다 용이하게 그리고 또는 더 큰 지속 기간으로 표적에 결합하는 항체이다. 일 실시형태에서, 관련되지 않은 표적에 대한 항체의 결합 정도는 예를 들어, 방사선면역검정(radioimmunoassay: RIA)에 의해서 측정되는 경우, 표적에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시형태에서, 표적에 특이적으로 결합하는 항체는 1 $\mu$ M 이하, 100nM 이하, 10nM 이하, 1nM 이하, 또는 0.1nM 이하의 해리 상수(Kd)를 갖는다. 특정 실시형태에서, 항체는 상이한 종으로부터의 단백질 사이에서 보존된 단백질 상의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 또 다른 실시형태에서, 특이적 결합은 결합을 포함할 수 있지만, 배타적인 결합이 요구되는 것은 아니다.

[0071] 용어 "치료하다", "치료하는", 또는 "치료"는 포유동물에서 특정 질환 상태를 참조하여, 질환 상태를 갖는 포유동물에서 바람직하거나 유익한 효과를 야기시키는 것을 지칭한다. 바람직하거나 유익한 효과는 질환의 하나 이상의 증상의 빈도 또는 중증도(즉, 종양 성장 및/또는 전이, 또는 면역 세포의 수 및/또는 활성에 의해 매개된 다른 효과 등)의 감소, 또는 질환, 병태 또는 장애의 추가 발달의 정지 또는 저해를 포함할 수 있다. 포유동물에서 암을 치료하는 상황에서, 바람직하거나 유익한 효과는 암 세포의 추가 성장 또는 확산의 저해, 암 세포의 사멸, 암 재발의 저해, 암과 관련된 통증의 감소, 또는 포유동물의 생존 개선을 포함할 수 있다. 효과는 주관적 이거나 객관적일 수 있다. 예를 들어, 포유동물이 인간인 경우에, 인간은 개선된 기력 또는 활력 또는 요법에 대한 개선 또는 반응의 주관적 증상으로서의 통증 감소를 주목할 수 있다. 대안적으로, 임상적은 신체 검사, 실험실 파라미터, 종양 마커, 또는 방사선 소견을 기초로 하여 종양 크기 또는 종양 부담의 감소를 주목할 수 있다. 임상적은 치료에 대한 반응에 대해 관찰할 수 있는 일부 실험실 징후는 백혈구 카운트, 적혈구수 카운트, 혈소판 카운트, 적혈구 침강 속도, 및 다양한 효소 수준과 같은 시험의 정규화를 포함한다. 추가적으로, 임상적은 검출 가능한 종양 마커의 감소를 관찰할 수 있다. 대안적으로, 소노그램(sonogram), 핵자기공명 시험 또는 양전자 방출 시험과 같은, 다른 시험은 객관적인 개선을 평가하기 위해 사용될 수 있다.

[0072] 용어 "백터"는 외래 핵산 분자를 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 외래 핵산 분자는 재조합 기술, 예를 들어, 절찰 또는 재조합에 의해 백터 핵산 분자에 연결된다. 이는 외래 핵산 분자가 숙주 세포 또는 유기체에서 번식, 선택, 추가 조작 또는 발현될 수 있게 한다. 백터는 플라스미드, 파지, 트랜스포손, 코스미드, 염색체, 바이러스, 또는 비리온일 수 있다. 하나의 유형의 백터는 숙주 세포 내에 도입 시에 숙주 세포의 게놈 내에 통합될 수 있고, 이에 의해 숙주 게놈(예를 들어, 비-에피솜 포유류 백터)과 함께 복제된다. 또 다른 유형의 백터는 도입된 숙주 세포에서 자동 복제할 수 있다(예를 들어, 복제 및 에피솜 포유류 백터의 박테리아 기원을 갖는 박테리아 백터). 작동 가능하게 연결된 발현 가능한 외래 핵산의 발현을 유도할 수 있는 다른 특정 타입의 백터는 통상적으로 "발현 백터"로서 지칭된다. 발현 백터는 일반적으로, 발현 가능한 외래 핵산의 발현을 유도하는 제어 서열을 갖는다. "전사 백터"로서 공지된 더 단순한 백터는 번역되지 않고 단지 전사될 수 있으며, 이러한 것은 발현되지 않고 표적 세포에서 복제될 수 있다. 용어 "백터"는 이의 기능과는 무관하게 모든 타입의 백터를 포함한다. 이러한 것이 작동 가능하게 연결된 발현 가능한 핵산의 발현을 유도할 수 있는 백터는 통상적으로, "발현 백터"로서 지칭된다. "백터"의 다른 예는 디스플레이 백터(예를 들어, 바이러스 또는 세포(예컨대, 박테리아 세포, 효모 세포, 곤충 세포 및/또는 포유동물 세포)의 표면 상의 암호화된 폴리펩타이드의 발현 및 디스플레이를 지시하는 백터)를 포함할 수 있다.

[0073] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "대상체", "환자" 또는 "개체"는 인간 또는 비인간 동물을 지칭할 수 있다. "비인간 동물"은 인간으로서 분류되지 않은 임의의 동물, 예컨대, 가축, 농장 동물, 또는 동물원 동물, 스포츠 동물, 애완 동물(예컨대, 개, 말, 고양이, 소 등), 뿐만 아니라 연구에 사용되는 동물을 지칭할 수 있다. 연구 동물은 비계한적으로 선충, 절지동물, 척추동물, 포유동물, 개구리, 설치류(예를 들어, 마우스 또는 래트), 어류(예를 들어, 제브라피쉬 또는 복어), 조류(예를 들어, 닭), 개, 고양이 및 비인간 영장류(예를 들어, 레서스 원숭이, 시노몰거스 원숭이, 침팬지 등)를 지칭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상체, 환자 또는 개체는 인간이다.

[0074] "유효량"은 치료적 또는 예방적 결과를 비롯한, 하나 이상의 목적하거나 제시된 효과를 달성하기에 적어도 효과적인 양(투여량 및 필요한 시간 기간)을 지칭한다. 유효량은 1회 이상의 투여로 제공될 수 있다. 본 개시내용의

목적을 위해서, 항체, 약물, 화합물 또는 약제학적 조성물의 유효량은 예방적 또는 치료적 치료를 직접적으로 또는 간접적으로 달성하기에 충분한 양이다. 임상적 맥락에서, 약물, 화합물 또는 약제학적 조성물의 유효량은 또 다른 약물, 화합물 또는 약제학적 조성물과 함께(예를 들어, 단일요법 또는 병용 요법으로서 투여되는 유효량) 달성될 수 있거나 달성될 수 없다. 따라서, "유효량"은 1종 이상의 치료제의 투여와 관련하여 고려될 수 있고, 1종 이상의 다른 작용제와 함께, 목적하는 결과가 달성될 수 있거나 달성되는 경우 단일 작용제가 유효량으로 제공된다고 간주될 수 있다.

[0075] **III. 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드 라이브러리 및 라이브러리의 생성**

[0076] 본 개시내용의 특정 양상은 (예를 들어, 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드 중 임의의 것을 암호화하는) 폴리뉴클레오타이드 및/또는 예를 들어, 하나 이상의 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 하나 이상의 활성화 가능한 항체), 예컨대, 활성화 가능한 항체, 이의 활성화 가능한 항원 결합 단편 또는 활성화 가능한 항체의 유도체를 스크리닝 및/또는 식별하는 데 유용한 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 라이브러리에 관한 것이다.

[0077] 용어 "활성화 가능한 결합 폴리펩타이드", "ABP" 또는 "활성화 가능한 항체"는 표적 결합 모이어티(TBM), 절단 가능한 모이어티(CM) 및 차폐 모이어티(MM)를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, TBM은 표적에 결합하는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, TBM은 항체 또는 이의 항체 단편의 항원 결합 도메인(ABD)을 포함한다. 일부 실시형태에서, TBM은 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하며, 여기서 VH 및 VL은 MM의 부재 하에서 표적에 결합하는 결합 도메인을 형성한다. 일부 실시형태에서, VH 및 VL은 예를 들어, scFv에서 공유 연결된다. 일부 실시형태에서, VH 및 VL은 Fab 단편을 형성한다. 일부 실시형태에서, VH는 항체 중쇄 불변 영역에 연결되고, VL은 항체 경쇄 불변 영역에 연결된다.

[0078] 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 N-말단에서부터 C-말단으로, 차폐 모이어티(MM)-절단 가능한 모이어티(CM)-VL의 구조를 포함하는 폴리펩타이드를 포함하고, 활성화 가능한 항체는 VH(예를 들어, Fab 단편)를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 N-말단에서부터 C-말단으로, 차폐 모이어티(MM)-절단 가능한 모이어티(CM)-VL-VH(예를 들어, scFv)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 N-말단에서부터 C-말단으로, 차폐 모이어티(MM)-절단 가능한 모이어티(CM)-VH의 구조를 포함하는 폴리펩타이드를 포함하고, 활성화 가능한 항체는 VL(예를 들어, Fab 단편)를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 N-말단에서부터 C-말단으로, 차폐 모이어티(MM)-절단 가능한 모이어티(CM)-VH-VL(예를 들어, scFv)를 포함한다.

[0079] 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 N-말단에서부터 C-말단으로, 차폐 모이어티(MM)-L<sub>1</sub>-절단 가능한 모이어티(CM)-L<sub>2</sub>-VL의 구조를 포함하는 폴리펩타이드를 포함하고, 활성화 가능한 항체는 VH(예를 들어, Fab 단편)를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 N-말단에서부터 C-말단으로, 차폐 모이어티(MM)-L<sub>1</sub>-절단 가능한 모이어티(CM)-L<sub>2</sub>-VL-L<sub>3</sub>-VH(예를 들어, scFv)의 구조를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 N-말단에서부터 C-말단으로, 차폐 모이어티(MM)-절단 가능한 모이어티(CM)-L<sub>1</sub>-VH의 구조를 포함하는 폴리펩타이드를 포함하고, 활성화 가능한 항체는 VL(예를 들어, Fab 단편)를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 N-말단에서부터 C-말단으로, 차폐 모이어티(MM)-L<sub>1</sub>-절단 가능한 모이어티(CM)-L<sub>2</sub>-VH-L<sub>3</sub>-VL(예를 들어, scFv)의 구조를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, 및/또는 L<sub>3</sub>은 링커이다. 일부 실시형태에서, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> 및 L<sub>3</sub> 각각은 0개 아미노산 또는 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상 또는 10개 이상의 아미노산 중 하나인 독립적으로 선택된 길이를 가질 수 있는 링커이다.

[0080] CM은 일반적으로 절단 가능한, 예를 들어, 효소 및/또는 환원 가능한 다이설파이드 결합을 형성할 수 있는 시스템-시스템 쌍에 대한 기질로서 작용하는 아미노산 서열을 포함한다. 이와 같이, 용어 "절단", "절단 가능한", "절단된" 등이 CM과 관련하여 사용되는 경우, 그 용어는 예를 들어, 프로테아제, 뿐만 아니라 환원제에 대한 노출로부터 일어날 수 있는 다이설파이드 결합의 환원을 통한 시스템-시스템 쌍 간의 다이설파이드 결합의 파괴에 의한 효소 절단을 포함한다.

[0081] MM은, 활성화 가능한 항체의 CM이 무손상일 때(예를 들어, 상응하는 효소에 의해서 절단되지 않을 때 그리고/또는 비환원된 시스템-시스템 다이설파이드 결합을 함유할 때), MM이 표적에 대한 TBM의 결합을 방해하거나

저해하는, 아미노산 서열을 지칭한다. 일부 실시형태에서, MM은 표적에 대한 TBM의 결합 효율적으로 방해하거나 저해하여 표적에 대한 TBM의 결합은 상당히 낮고/낮거나 검출 한계보다 더 낮다(예를 들어, 결합은 ELISA 또는 유세포 분석법 검정으로 검출될 수 없음). CM의 아미노산 서열은 MM과 중첩될 수 있거나 MM 내에 포함될 수 있다. 편의상 "ABP" 또는 "활성화 가능한 항체"는 비절단된(또는 "네이티브") 상태, 뿐만 아니라 이의 절단된 상태 둘 다의 ABP 또는 활성화 가능한 항체를 지칭하는데 사용됨을 주목해야 한다. 당업자는 일부 실시형태에서 절단된 ABP가 예를 들어, 프로테아제에 의한, CM의 절단으로 인해서 MM이 결합되어, 적어도 MM(예를 들어, MM은 공유 결합(예를 들어, 시스테인 잔기 간의 다이설파이드 결합)에 의해서 ABP에 결합되지 않음))의 해방을 초래할 수 있음을 인식할 것이다. 예시적인 ABP는 하기에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0082] 본 개시내용의 라이브러리는 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드(예를 들어, 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드 중 하나 이상) 중 임의의 것을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 라이브러리의 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상(즉, 하나, 일부 또는 모두)은 전장 항체 경쇄 및/또는 중쇄(들)를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 라이브러리의 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상(즉, 하나, 일부 또는 모두)은 경쇄 및/또는 중쇄 Fab 단편을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 라이브러리의 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상(즉, 하나, 일부 또는 모두)은 단일-쇄 가변 단편(들)(scFv)을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화한다.

[0083] 본 개시내용의 다른 양상은 폴리펩타이드 (예를 들어, 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드 중 임의의 것) 및/또는 하나 이상의 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 하나 이상의 활성화 가능한 항체), 예컨대, 활성화 가능한 항체, 이의 활성화 가능한 항원 결합 단편 또는 활성화 가능한 항체의 유도체를 스크리닝 및/또는 식별하는 데 유용한 폴리펩타이드의 라이브러리에 관한 것이다. 본 개시내용의 라이브러리는 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드(예를 들어, 하나 이상의 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드) 중 하나 이상을 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 라이브러리의 폴리펩타이드 중 하나 이상(예를 들어, 하나, 일부 또는 모두)은 전장 항체 경쇄 및/또는 중쇄(들)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 라이브러리의 폴리펩타이드 중 하나 이상(예를 들어, 하나, 일부 또는 모두)은 경쇄 및/또는 중쇄 Fab 단편(들)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 라이브러리의 폴리펩타이드 중 하나 이상(예를 들어, 하나, 일부 또는 모두)은 단일-쇄 가변 단편(들)(scFv)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 세포 표면(예를 들어, 효모 또는 포유 동물 세포 디스플레이) 상에서 발현된다.

[0084] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 (a) 제1 펩타이드(FP); (b) 절단 가능한 모이어티(CM); 및 (c) 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함한다. 일부 실시형태에서, FP는 본 명세서에 기재된 제1 펩타이드 중 임의의 것이다(예를 들어, 하기 구조식 (XIII)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP):  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86)( $m$ 은 2 내지 10이고,  $n$ 은 3 내지 10이며,  $o$ 는 1 내지 10이고, 각각의  $X$ 는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택된 아미노산임)). 일부 실시형태에서,  $X$ 는 W, M 및/또는 C가 아니다. 일부 실시형태에서, 구조식 (XIII)의  $X_m$ 에서 각각의  $X$ 는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이고, 구조식 (XIII)의  $X_n$ 에서 각각의  $X$ 는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이고/이거나 구조식 (XIII)의  $X_o$ 에서 각각의  $X$ 는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 일부 실시형태에서,  $m$ 은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, FP는 본 명세서에 기재된 제1 펩타이드 중 임의의 것이다(예를 들어, 하기 구조식 (I)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP):  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)(식 중,  $m$ 은 2 내지 10이고,  $n$ 은 3 내지 10이며,  $o$ 는 1 내지 10이고, 각각의  $X$ 는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택된 아미노산이며, 각각의  $Z$ 는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임)). 일부 실시형태에서,  $m$ 은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서,  $X$ 는 W, M 및/또는 C가 아니다. 일부 실시형태에서, 구조식 (I)의  $X_m$ 에서 각각의  $X$ 는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이고/이거나 구조식 (I)의  $X_n$ 에서 각각의  $X$ 는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 일부 실시형태에서, FP는 본 명세서에 기재된 제1 펩타이드 중 임의의 것이다(예를 들어, 하기 구조식 (XII)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP):  $Z_mCZ_nCZ_o$ (서열번호 71)(식 중,  $m$ 은 2 내지 10이고,  $n$ 은 3 내지 10이며,  $o$ 는 1 내지 10이고, 각각의  $Z$ 는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로

이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임). 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, CM은 본 명세서에 기재된 절단 가능한 모이어티 중 임의의 것(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM))이다. 일부 실시형태에서, CM은 본 명세서에 기재된 절단 가능한 모이어티 중 임의의 것(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM))이다. 일부 실시형태에서, TBM은 본 명세서에 기재된 표적 결합 모이어티(예를 들어, 항체 경쇄 가변 영역 및/또는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)) 중 임의의 것이다.

[0085] 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는 표적(예를 들어, "불활성 활성화 가능한 항체)에 대한 결합에 대해서 표적 결합 모이어티를 간섭하거나, 방해하거나, 이의 능력을 감소시키거나, 방지하거나, 저해하거나, 이것과 경쟁한다. 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는 폴리펩타이드가 활성화(예를 들어, pH 변화(증가 또는 감소)에 의한 활성화, 온도 변화(증가 또는 감소)에 의한 활성화, 제2 분자(예컨대, 소분자 또는 단백질 리간드)와의 접촉 후의 활성화 등)되지 않았을 때만 표적에 대한 결합에 대해서 표적 결합 모이어티를 간섭하거나, 방해하거나, 감소시키거나, 방지하거나, 저해하거나, 이것과 경쟁한다. 일부 실시형태에서, 활성화는 절단 모이어티 내에서 폴리펩타이드의 절단을 유도한다. 일부 실시형태에서, 활성화는 폴리펩타이드에서 입체구조 변화(예를 들어, 제1 펩타이드(FP)의 이동)를 유도하여, 제1 펩타이드가, 활성화 가능한 항체가 표적에 결합하는 것을 더 이상 방지하지 않도록 한다. 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는, 절단 가능한 모이어티(CM)가 절단 가능한 모이어티(CM) 내를 절단하는 하나 이상의 프로테아제에 의해서 절단되지 않았을 때에만 표적(예를 들어, "불활성 활성화 가능한 항체)에 대한 결합에 대해서 표적 결합 모이어티를 간섭하거나, 방해하거나, 이의 능력을 감소시키거나, 방지하거나, 저해하거나, 이것과 경쟁한다. 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는 활성화 전에 적어도 약 2.0(예를 들어, 적어도 약 2.0, 적어도 약 3.0, 적어도 약 4.0, 적어도 약 5.0, 적어도 약 6.0, 적어도 약 7.0, 적어도 약 8.0, 적어도 약 9.0, 적어도 약 10, 적어도 약 25, 적어도 약 50, 적어도 약 75, 적어도 약 100, 적어도 약 150, 적어도 약 200, 적어도 약 300, 적어도 약 400, 적어도 약 500 등)의 차폐 효율을 갖는다. 일부 실시형태에서, 차폐 효율은, 표적에 결합하는 것에 대한 제1 펩타이드가 결핍된 폴리펩타이드의 친화도에 비해서, 표적에 결합하는 것에 대한 제1 펩타이드(FP)를 포함하는 활성화 가능한 항체의 친화도의 차이(활성화 전)(예를 들어, 제1 펩타이드(FP)가 결핍된 모체 항체와 비교한, 제1 펩타이드(FP)를 포함하는 활성화 가능한 항체의 표적 항원(예컨대, CTLA4)에 대한 친화도 차이(활성화 전), 또는 활성화 후 활성화 가능한 항체의 표적 항원에 대한 친화도와 비교한, (활성화 전) 제1 펩타이드(FP)를 포함하는 활성화 가능한 항체의 표적 항원(예컨대, CTLA4)에 대한 친화도의 차이)로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 차폐 효율은 제1 펩타이드(FP)를 포함하는(활성화 전) 활성화 가능한 항체의 결합에 대한 EC<sub>50</sub>을 모체 항체의 EC<sub>50</sub>으로 나눔으로써 측정된다(예를 들어, ELISA에 의해서 EC<sub>50</sub>을 측정함; 예를 들어, 실시예 3의 방법). 일부 실시형태에서, 차폐 효율은, 활성화 후 표적에 결합하는 것에 대한 제1 펩타이드(FP)를 포함하는 활성화 가능한 항체의 친화도에 비해서, 활성화 전 표적에 결합하는 것에 대한, 제1 펩타이드(FP)를 포함하는 활성화 가능한 항체의 친화도 차이(예를 들어, 활성화 후 활성화 가능한 항체에 비해서 활성화 전 활성화 가능한 항체의 표적 항원(예컨대, CTLA4)에 대한 친화도 차이)로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는 표적 결합 모이어티(TBM)에 결합하여, 활성화 가능한 항체가 표적에 결합하는 것을 방지한다(예를 들어, "불활성" 활성화 가능한 항체). 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는 표적에 대한 표적 결합 모이어티(TBM)의 해리 상수보다 더 높은 표적 결합 모이어티(TBM)에 대한 결합에 대한 해리 상수를 갖는다. 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는 차폐 모이어티(MM)이다. 해리 상수는 예를 들어, ELISA, 표면 플라즈몬 공명 또는 생물층 간섭계(Bio-Layer Interferometry: BLI) 또는 유세포 분석법과 같은 기술에 의해서 측정될 수 있다.

[0086] 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는, 폴리펩타이드가 활성화(예를 들어, 절단 가능한 모이어티(CM) 내를 절단하는 하나 이상의 프로테아제로의 처리에 의한 활성화, pH 변화(증가 또는 감소)에 의한 활성화, 온도 변화(증가 또는 감소)에 의한 활성화, 제2 분자(예컨대, 효소)와의 접촉 후의 활성화 등)된 후 표적에 결합하는 것에 대해서 표적 결합 모이어티(TBM)를 방해하거나, 방지하거나, 이의 능력을 감소시키거나, 예방하거나, 저해하거나, 경쟁하지 않는다. 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는, 절단 가능한 모이어티(CM)가 절단 가능한 모이어티(CM) 내를 절단하는 하나 이상의 프로테아제에 의해서 절단된 후에 표적(예를 들어, "불활성 활성화 가능한 항체)에 대한 결합에 대해서 표적 결합 모이어티를 간섭하거나, 방해하거나, 이의 능력을 감소시키거나, 방지하거나, 저해하거나, 경쟁하지 않는다. 일부 실시형태에서, 펩타이드(FP)는 활성화 후 최대 약 1.75(예를 들어, 최대 약 1.75, 최대 약 1.5, 최대 약 1.4, 최대 약 1.3, 최대 약 1.2, 최대 약 1.1, 최대 약 1.0, 최대 약 0.9, 최대 약 0.8, 최대 약 0.7, 최대 약 0.6 또는 최대 약 0.5 등)(예를 들어, 모체 항체의 친화도와 비교할 때 활성화 후 활성화 가능한 항체의 상대적인 친화도)의 차폐 효율을 갖는다.

- [0087] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 N-말단에서부터 C-말단으로, 하기의 구조를 포함한다: 제1펩타이드(FP)-절단 가능한 모이어티(CM)-표적 결합 모이어티(TBM). 본 개시내용의 라이브러리는 활성화 형태로 존재하는 경우, 예를 들어, CTLA4, CD137, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, TIM3, B7-H3, OX40, CD3, CD19, CD20, CD40, CD95, CD120a, BTLA, VISTA, ICOS, BCMA, Her1, Her2, Her3, 및/또는 B7-H4를 포함하는 관심대상의 임의의 표적에 결합하는 하나 이상의 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)를 스크리닝하는 데 사용될 수 있다.
- [0088] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 라이브러리는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 100, 적어도 250, 적어도 500, 적어도  $10^3$ , 적어도  $10^4$ , 적어도  $10^5$ , 적어도  $10^6$ , 적어도  $10^7$ , 적어도  $10^8$ , 적어도  $10^9$ , 적어도  $10^{10}$ , 적어도  $10^{11}$ , 적어도  $10^{12}$ , 적어도  $10^{13}$ , 적어도  $10^{14}$ , 적어도  $10^{15}$ , 적어도  $10^{16}$ , 적어도  $10^{17}$ , 적어도  $10^{18}$  또는 적어도  $10^{19}$  개의 고유한 폴리펩타이드를 암호화하는 복수의 폴리뉴클레오타이드를 함유한다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 (a) 제1 펩타이드(FP); (b) 절단 가능한 모이어티(CM); 및 (c) 표적 결합 모이어티(TBM)를 함유한다.
- [0089] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 라이브러리는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 100, 적어도 250, 적어도 500, 적어도  $10^3$ , 적어도  $10^4$ , 적어도  $10^5$ , 적어도  $10^6$ , 적어도  $10^7$ , 적어도  $10^8$ , 적어도  $10^9$ , 적어도  $10^{10}$ , 적어도  $10^{11}$ , 적어도  $10^{12}$ , 적어도  $10^{13}$ , 적어도  $10^{14}$ , 적어도  $10^{15}$ , 적어도  $10^{16}$ , 적어도  $10^{17}$ , 적어도  $10^{18}$ , 또는 적어도  $10^{19}$  개의 폴리펩타이드를 암호화하는 복수의 폴리뉴클레오타이드를 함유한다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 (a) 고유한 제1 펩타이드(FP); (b) 절단 가능한 모이어티(CM); 및 (c) 표적 결합 모이어티(TBM)를 함유한다.
- [0090] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 라이브러리는, 1) 전형적인 무작위 펩타이드 라이브러리에서 발견되는 것보다 더 적은 수의 고유한 펩타이드(예를 들어, 구조식 (XIII):  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86) 또는 구조식 (I):  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 FP)를 암호화하고/하거나 함유하고/하거나; 2) 디스플레이 펩타이드가 구속된 입체구조를 갖는 것을 보장하는 고정된 위치에 한 쌍의 시스테인 잔기를 포함하는 펩타이드(예를 들어, 예를 들어, 구조식 (XIII):  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86) 또는 구조식 (I):  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 FP)를 암호화하고/하거나 함유하고/하거나; 3) 화학적으로 불안정한 잔기(예컨대, 메티오닌 또는 트립토판)를 거의 또는 전혀 보유하지 않는 펩타이드(예를 들어, 구조식 (XIII):  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86) 또는 구조식 (I):  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 FP)를 암호화하고/하거나 함유한다. 이롭게는, 본 개시내용의 라이브러리는 무작위 펩타이드 라이브러리에 비해서 극적으로 감소된 라이브러리 크기를 가져서, 펩타이드(예를 들어, 구조식 (XIII):  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86) 또는 구조식 (I):  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 FP)의 훨씬 더 양호한 커버리지를 갖는 라이브러리의 작제를 가능하게 한다. 더욱이, 고정된 위치에 한 쌍의 시스테인 잔기를 포함하는 것은, 디스플레이 펩타이드가 구속된 입체구조를 가져서, 증가된 결합 친화도 및/또는 특이성을 나타내는 경향이 되는 것을 보장하였다. 추가로, 본 개시내용의 라이브러리는 제조 공정에 바람직하지 않은 잔기, 예컨대, 메티오닌 또는 트립토판을 거의 또는 전혀 포함하지 않는 펩타이드(예를 들어, 구조식 (XIII):  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86) 또는 구조식 (I):  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 FP)를 갖는다.
- [0091] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 라이브러리는 복수의 폴리뉴클레오타이드를 함유하는데, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 (a) 구조식 (XIII):  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택된 아미노산임)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 적어도 제1 절단 부위(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM); 및 (c) 항체 경쇄 가변 영역 및/또는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드는 벡터(예를 들어, 발현 벡터 또는 디스플레이 벡

터) 내에 존재한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 라이브러리는 복수의 폴리뉴클레오타이드를 함유하는데, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 (a) 구조식 (I):  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택된 아미노산이고, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로부터 선택된 아미노산임)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 적어도 제1 절단 부위(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM); 및 (c) 항체 경쇄 가변 영역 및/또는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드는 벡터(예를 들어, 발현 벡터 또는 디스플레이 벡터) 내에 존재한다.

[0092] 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 하기 구조식 (III)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화한다: EVGSYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>CX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>CX<sub>13</sub>X<sub>14</sub>SGRSAGGGGTENLYFQSGSGS(서열번호 3)(식 중, X<sub>1</sub>은 A, D, I, N, P 또는 Y이고, X<sub>2</sub>는 A, F, N, S 또는 V이며, X<sub>3</sub>은 A, H, L, P, S, V 또는 Y이고, X<sub>4</sub>는 A, H, S 또는 Y이며, X<sub>5</sub>는 A, D, P, S, V 또는 Y이고, X<sub>6</sub>은 A, D, L, S 또는 Y이며, X<sub>7</sub>은 D, P 또는 V이고, X<sub>8</sub>은 A, D, H, P, S 또는 T이며, X<sub>9</sub>는 A, D, F, H, P 또는 Y이고, X<sub>10</sub>은 L, P 또는 Y이며, X<sub>11</sub>은 F, P 또는 Y이고, X<sub>12</sub>는 A, P, S 또는 Y이며, X<sub>13</sub>은 A, D, N, S, T 또는 Y이고, X<sub>14</sub>는 A, S 또는 Y임). 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드는 벡터(예를 들어, 발현 벡터 또는 디스플레이 벡터) 내에 존재한다.

[0093] 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 서열번호 25 내지 46으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드는 벡터(예를 들어, 발현 벡터 또는 디스플레이 벡터) 내에 존재한다.

[0094] 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 55, 적어도 60, 적어도 65, 적어도 70, 적어도 75, 적어도 80, 적어도 85, 적어도 90, 적어도 95, 적어도 100, 적어도 250, 적어도 500, 적어도 10<sup>3</sup>, 적어도 10<sup>4</sup>, 적어도 10<sup>5</sup>, 적어도 10<sup>6</sup>, 적어도 10<sup>7</sup>, 적어도 10<sup>8</sup>, 적어도 10<sup>9</sup>, 적어도 10<sup>10</sup>, 적어도 10<sup>11</sup>, 적어도 10<sup>12</sup>, 적어도 10<sup>13</sup>, 적어도 10<sup>14</sup>, 적어도 10<sup>15</sup>, 적어도 10<sup>16</sup>, 적어도 10<sup>17</sup>, 적어도 10<sup>18</sup> 또는 적어도 10<sup>19</sup>개는 (a) 구조식 (XIII):  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택됨)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 적어도 제1 절단 부위(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM); 및 (c) 항체 경쇄 가변 영역 및/또는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 55, 적어도 60, 적어도 65, 적어도 70, 적어도 75, 적어도 80, 적어도 85, 적어도 90, 적어도 95, 적어도 100, 적어도 250, 적어도 500, 적어도 10<sup>3</sup>, 적어도 10<sup>4</sup>, 적어도 10<sup>5</sup>, 적어도 10<sup>6</sup>, 적어도 10<sup>7</sup>, 적어도 10<sup>8</sup>, 적어도 10<sup>9</sup>, 적어도 10<sup>10</sup>, 적어도 10<sup>11</sup>, 적어도 10<sup>12</sup>, 적어도 10<sup>13</sup>, 적어도 10<sup>14</sup>, 적어도 10<sup>15</sup>, 적어도 10<sup>16</sup>, 적어도 10<sup>17</sup>, 적어도 10<sup>18</sup> 또는 적어도 10<sup>19</sup>개는 (a) 구조식 (I):  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택된 아미노산이고, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로부터 선택된 아미노산임)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 적어도 제1 절단 부위(예를 들

어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM); 및 (c) 항체 경쇄 가변 영역 및/또는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드는 벡터(예를 들어, 발현 벡터 또는 디스플레이 벡터) 내에 존재한다.

[0095] 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 55, 적어도 60, 적어도 65, 적어도 70, 적어도 75, 적어도 80, 적어도 85, 적어도 90, 적어도 95, 적어도 100, 적어도 250, 적어도 500, 적어도  $10^3$ , 적어도  $10^4$ , 적어도  $10^5$ , 적어도  $10^6$ , 적어도  $10^7$ , 적어도  $10^8$ , 적어도  $10^9$ , 적어도  $10^{10}$ , 적어도  $10^{11}$ , 적어도  $10^{12}$ , 적어도  $10^{13}$ , 적어도  $10^{14}$ , 적어도  $10^{15}$ , 적어도  $10^{16}$ , 적어도  $10^{17}$ , 적어도  $10^{18}$  또는 적어도  $10^{19}$ 개는 하기 구조식 (III)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화한다: EVGSYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>CX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>CX<sub>13</sub>X<sub>14</sub>SGRSAGGGGTTENLYFQGS GGGS(서열번호 3)(식 중, X<sub>1</sub>은 A, D, I, N, P 또는 Y이고, X<sub>2</sub>는 A, F, N, S 또는 V이며, X<sub>3</sub>은 A, H, L, P, S, V 또는 Y이고, X<sub>4</sub>는 A, H, S 또는 Y이며, X<sub>5</sub>는 A, D, P, S, V 또는 Y이고, X<sub>6</sub>은 A, D, L, S 또는 Y이며, X<sub>7</sub>은 D, P 또는 V이고, X<sub>8</sub>은 A, D, H, P, S 또는 T이며, X<sub>9</sub>는 A, D, F, H, P 또는 Y이고, X<sub>10</sub>은 L, P 또는 Y이며, X<sub>11</sub>은 F, P 또는 Y이고, X<sub>12</sub>는 A, P, S 또는 Y이며, X<sub>13</sub>은 A, D, N, S, T 또는 Y이고, X<sub>14</sub>는 A, S 또는 Y임). 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드는 벡터(예를 들어, 발현 벡터 또는 디스플레이 벡터) 내에 존재한다.

[0096] 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 적어도 40, 적어도 45, 적어도 50, 적어도 55, 적어도 60, 적어도 65, 적어도 70, 적어도 75, 적어도 80, 적어도 85, 적어도 90, 적어도 95, 적어도 100, 적어도 250, 적어도 500, 적어도  $10^3$ , 적어도  $10^4$ , 적어도  $10^5$ , 적어도  $10^6$ , 적어도  $10^7$ , 적어도  $10^8$ , 적어도  $10^9$ , 적어도  $10^{10}$ , 적어도  $10^{11}$ , 적어도  $10^{12}$ , 적어도  $10^{13}$ , 적어도  $10^{14}$ , 적어도  $10^{15}$ , 적어도  $10^{16}$ , 적어도  $10^{17}$ , 적어도  $10^{18}$  또는 적어도  $10^{19}$ 개는 서열번호 25 내지 46으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드는 벡터(예를 들어, 발현 벡터 또는 디스플레이 벡터) 내에 존재한다.

[0097] 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 각각은 (a) 구조식 (XIII): X<sub>m</sub>CX<sub>n</sub>CX<sub>o</sub>(서열번호 86)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택된 아미노산임)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 적어도 제1 절단 부위(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM); 및 (c) 항체 경쇄 가변 영역 및/또는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 각각은 (a) 구조식 (I): X<sub>m</sub>CX<sub>n</sub>CZ<sub>o</sub>(서열번호 1)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택된 아미노산이고, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로부터 선택된 아미노산임)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 적어도 제1 절단 부위(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM); 및 (c) 항체 경쇄 가변 영역 및/또는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드는 벡터(예를 들어, 발현 벡터 또는 디스플레이 벡터) 내에 존재한다.

[0098] 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 각각은 하기 구조식 (III)에 따른 아미노산 서열을 포

합하는 폴리펩타이드를 암호화한다: EVGSYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>CX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>CX<sub>13</sub>X<sub>14</sub>SGRSAGGGGTENLYFGSGGS(서열번호 3)(식 중, X<sub>1</sub>은 A, D, I, N, P 또는 Y이고, x<sub>2</sub>는 A, F, N, S 또는 V이며, X<sub>3</sub>은 A, H, L, P, S, V 또는 Y이고, X<sub>4</sub>는 A, H, S 또는 Y이며, X<sub>5</sub>는 A, D, P, S, V 또는 Y이고, X<sub>6</sub>은 A, D, L, S 또는 Y이며, X<sub>7</sub>은 D, P 또는 V이고, X<sub>8</sub>은 A, D, H, P, S 또는 T이며, X<sub>9</sub>는 A, D, F, H, P 또는 Y이고, X<sub>10</sub>은 L, P 또는 Y이며, X<sub>11</sub>은 F, P 또는 Y이고, X<sub>12</sub>는 A, P, S 또는 Y이며, X<sub>13</sub>은 A, D, N, S, T 또는 Y이고, X<sub>14</sub>는 A, S 또는 Y임). 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드는 벡터(예를 들어, 발현 벡터 또는 디스플레이 벡터) 내에 존재한다.

[0099] 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 각각은 서열번호 25 내지 46으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드는 벡터(예를 들어, 발현 벡터 또는 디스플레이 벡터) 내에 존재한다.

[0100] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 라이브러리는 (a) 구조식 (XIII): X<sub>m</sub>CX<sub>n</sub>CX<sub>o</sub>(서열번호 86)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택됨)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 적어도 제1 절단 부위(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM); c) 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM) 및; d) 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 적어도 1개(예를 들어, 적어도 1, 적어도 2, 적어도 5, 적어도 10, 적어도 100, 적어도 10<sup>3</sup>, 적어도 10<sup>4</sup>, 적어도 10<sup>5</sup>, 적어도 10<sup>6</sup>, 적어도 10<sup>7</sup>, 적어도 10<sup>8</sup>, 적어도 10<sup>9</sup>, 적어도 10<sup>10</sup>, 적어도 10<sup>11</sup>, 적어도 10<sup>12</sup>, 적어도 10<sup>13</sup>, 적어도 10<sup>14</sup>, 적어도 10<sup>15</sup>, 적어도 10<sup>16</sup>, 적어도 10<sup>17</sup>, 적어도 10<sup>18</sup> 또는 적어도 10<sup>19</sup>개)의 폴리뉴클레오타이드를 함유한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 라이브러리는 (a) 구조식 (I): X<sub>m</sub>CX<sub>n</sub>CZ<sub>o</sub>(서열번호 1)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택되고, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로부터 선택된 아미노산임)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 적어도 제1 절단 부위(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM); c) 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM) 및; d) 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 적어도 1개(예를 들어, 적어도 1, 적어도 2, 적어도 5, 적어도 10, 적어도 100, 적어도 10<sup>3</sup>, 적어도 10<sup>4</sup>, 적어도 10<sup>5</sup>, 적어도 10<sup>6</sup>, 적어도 10<sup>7</sup>, 적어도 10<sup>8</sup>, 적어도 10<sup>9</sup>, 적어도 10<sup>10</sup>, 적어도 10<sup>11</sup>, 적어도 10<sup>12</sup>, 적어도 10<sup>13</sup>, 적어도 10<sup>14</sup>, 적어도 10<sup>15</sup>, 적어도 10<sup>16</sup>, 적어도 10<sup>17</sup>, 적어도 10<sup>18</sup> 또는 적어도 10<sup>19</sup>개)의 폴리뉴클레오타이드를 함유한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 N-말단에서부터 C-말단으로, 제1 펩타이드(FP)-절단 가능한 모이어티(CM)-VL-VH의 구조를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드 중 적어도 하나는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)이다. 일부 실시형태에서, 링커 서열은 VL과 VH(즉, 구조 VL-링커-VH)를 분리한다. 링커 서열은 당업계에 공지된 링커 서열, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 링커 서열 중 임의의 것일 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커 서열은 GGGGS(서열번호 17)의 임의의 카피 수(예를 들어, 2회 반복, 3회 반복 등)이다.

[0101] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 라이브러리는 (a) 구조식 (XIII): X<sub>m</sub>CX<sub>n</sub>CX<sub>o</sub>(서열번호 86)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택됨)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 적어도 제1 절단 부위(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM); c) 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 적어도 1개(예를 들어, 적어도 1, 적어도 2, 적어도 5, 적어도 10, 적어도 100, 적어도 10<sup>3</sup>, 적어도 10<sup>4</sup>, 적어도 10<sup>5</sup>, 적어도 10<sup>6</sup>, 적어도 10<sup>7</sup>, 적어도 10<sup>8</sup>, 적어도 10<sup>9</sup>, 적어도 10<sup>10</sup>, 적어도 10<sup>11</sup>, 적어도 10<sup>12</sup>, 적어도 10<sup>13</sup>, 적어도 10<sup>14</sup>, 적어도 10<sup>15</sup>, 적어도 10<sup>16</sup>, 적어도 10<sup>17</sup>, 적어도 10<sup>18</sup> 또는 적어도 10<sup>19</sup>개)의 폴리뉴클레오타이드를 함유하고, 라이브러리는 항체 중쇄 가변 영역을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 라이브러리는 (a) 구조식 (I): X<sub>m</sub>CX<sub>n</sub>CZ<sub>o</sub>(서열번호 1)(식 중,

m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택되고, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로부터 선택된 아미노산임)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 적어도 제1 절단 부위(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM); c) 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 적어도 1개(예를 들어, 적어도 1, 적어도 2, 적어도 5, 적어도 10, 적어도 100, 적어도  $10^3$ , 적어도  $10^4$ , 적어도  $10^5$ , 적어도  $10^6$ , 적어도  $10^7$ , 적어도  $10^8$ , 적어도  $10^9$ , 적어도  $10^{10}$ , 적어도  $10^{11}$ , 적어도  $10^{12}$ , 적어도  $10^{13}$ , 적어도  $10^{14}$ , 적어도  $10^{15}$ , 적어도  $10^{16}$ , 적어도  $10^{17}$ , 적어도  $10^{18}$  또는 적어도  $10^{19}$ 개)의 폴리뉴클레오타이드를 함유하며, 라이브러리는 항체 중쇄 가변 영역을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 항체 중쇄 가변 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 동일한 벡터(예를 들어, 그 자신의 프로모터로부터 발현됨) 또는 상이한 벡터 상에 존재한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드 중 적어도 하나는 항체 중쇄 가변 영역과 커플링되는 경우 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)를 형성한다.

[0102] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 라이브러리는 (a) 구조식 (XIII):  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택됨)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 적어도 제1 절단 부위(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM); c) 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM) 및; d) 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 적어도 1개(예를 들어, 적어도 1, 적어도 2, 적어도 5, 적어도 10, 적어도 100, 적어도  $10^3$ , 적어도  $10^4$ , 적어도  $10^5$ , 적어도  $10^6$ , 적어도  $10^7$ , 적어도  $10^8$ , 적어도  $10^9$ , 적어도  $10^{10}$ , 적어도  $10^{11}$ , 적어도  $10^{12}$ , 적어도  $10^{13}$ , 적어도  $10^{14}$ , 적어도  $10^{15}$ , 적어도  $10^{16}$ , 적어도  $10^{17}$ , 적어도  $10^{18}$  또는 적어도  $10^{19}$ 개)의 폴리뉴클레오타이드를 함유한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 N-말단에서부터 C-말단으로, 제1 펩타이드(FP)-절단 가능한 모이어티(CM)-VH-VL의 구조를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 라이브러리는 (a) 구조식 (I):  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택되고, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로부터 선택된 아미노산임)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 적어도 제1 절단 부위(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM); c) 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM) 및; d) 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 적어도 1개(예를 들어, 적어도 1, 적어도 2, 적어도 5, 적어도 10, 적어도 100, 적어도  $10^3$ , 적어도  $10^4$ , 적어도  $10^5$ , 적어도  $10^6$ , 적어도  $10^7$ , 적어도  $10^8$ , 적어도  $10^9$ , 적어도  $10^{10}$ , 적어도  $10^{11}$ , 적어도  $10^{12}$ , 적어도  $10^{13}$ , 적어도  $10^{14}$ , 적어도  $10^{15}$ , 적어도  $10^{16}$ , 적어도  $10^{17}$ , 적어도  $10^{18}$  또는 적어도  $10^{19}$ 개)의 폴리뉴클레오타이드를 함유한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 N-말단에서부터 C-말단으로, 제1 펩타이드(FP)-절단 가능한 모이어티(CM)-VH-VL의 구조를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드 중 적어도 하나는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)이다. 일부 실시형태에서, 링커 서열은 VH와 VL(즉, 구조 VH-링커-VL)을 분리한다. 링커 서열은 당업계에 공지된 링커 서열, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 링커 서열 중 임의의 것일 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커 서열은 GGGGS(서열번호 17)의 임의의 카피 수(예를 들어, 2회 반복, 3회 반복 등)이다.

[0103] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 라이브러리는 (a) 구조식 (XIII):  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택됨)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 적어도 제1 절단 부위(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM); c) 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 적어도 1개(예를 들어, 적어도 1, 적어도 2, 적어도 5, 적어도 10, 적어도 100, 적어도  $10^3$ , 적어도  $10^4$ , 적어도  $10^5$ , 적어도  $10^6$ , 적어도

도  $10^7$ , 적어도  $10^8$ , 적어도  $10^9$ , 적어도  $10^{10}$ , 적어도  $10^{11}$ , 적어도  $10^{12}$ , 적어도  $10^{13}$ , 적어도  $10^{14}$ , 적어도  $10^{15}$ , 적어도  $10^{16}$ , 적어도  $10^{17}$ , 적어도  $10^{18}$  또는 적어도  $10^{19}$ 개)의 폴리뉴클레오타이드를 함유하고, 라이브러리는 항체 경쇄 가변 영역을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 라이브러리는 (a) 구조식 (I):  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택되고, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로부터 선택된 아미노산임)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 적어도 제1 절단 부위(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM); c) 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 적어도 1개(예를 들어, 적어도 1, 적어도 2, 적어도 5, 적어도 10, 적어도 100, 적어도  $10^3$ , 적어도  $10^4$ , 적어도  $10^5$ , 적어도  $10^6$ , 적어도  $10^7$ , 적어도  $10^8$ , 적어도  $10^9$ , 적어도  $10^{10}$ , 적어도  $10^{11}$ , 적어도  $10^{12}$ , 적어도  $10^{13}$ , 적어도  $10^{14}$ , 적어도  $10^{15}$ , 적어도  $10^{16}$ , 적어도  $10^{17}$ , 적어도  $10^{18}$  또는 적어도  $10^{19}$ 개)의 폴리뉴클레오타이드를 함유하며, 라이브러리는 항체 경쇄 가변 영역을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 항체 경쇄 가변 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 동일한 벡터(예를 들어, 그 자신의 프로모터로부터 발현됨) 또는 상이한 벡터 상에 존재한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드 중 적어도 하나는 항체 경쇄 가변 영역과 커플링되는 경우 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)를 형성한다.

[0104] 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드 및/또는 폴리뉴클레오타이드 라이브러리는 HVR 서열 중 임의의 것(예를 들어, 중쇄 가변 영역 HVR 서열 중 1개, 2개 또는 3개 및/또는 경쇄 가변 영역 HVR 서열 중 1개, 2개, 3개), 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, 항-CTLA4 항체, 항-CD137 항체) 중 임의의 것의 경쇄 가변 영역 서열을 혼입할 수 있다. 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드 및/또는 폴리뉴클레오타이드 라이브러리는 또한 PCT 출원 번호 PCT/CN2017/098333(전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함됨), 및/또는 PCT 출원 번호 PCT/CN2017/098299(전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함됨)에 기재된 HVR 서열 중 임의의 것(예를 들어, 중쇄 가변 영역 HVR 서열 중 1개, 2개 또는 3개 및/또는 경쇄 가변 영역 HVR 서열 중 1개, 2개 또는 3개), 중쇄 가변 영역 서열, 경쇄 가변 영역 서열, 중쇄, 및/또는 경쇄를 혼입할 수 있다.

[0105] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 라이브러리는 본 개시내용의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 합성 폴리뉴클레오타이드)를 암호화하는 하나 이상의 벡터(예를 들어, 발현 벡터 및/또는 디스플레이 벡터)를 포함한다.

[0106] 추가로 본 명세서에는 예를 들어, 본 개시내용의 라이브러리의 폴리뉴클레오타이드 서열(예를 들어, 합성 폴리뉴클레오타이드(들))을 제공하고, 조립함으로써 라이브러리를 제조하는 방법이 제공된다. 또한 본 명세서에는, 예를 들어, 다수(예를 들어, 적어도 1, 적어도 2, 적어도 5, 적어도 10, 적어도 100, 적어도  $10^3$ , 적어도  $10^4$ , 적어도  $10^5$ , 적어도  $10^6$ , 적어도  $10^7$ , 적어도  $10^8$ , 적어도  $10^9$ , 적어도  $10^{10}$ , 적어도  $10^{11}$ , 적어도  $10^{12}$ , 적어도  $10^{13}$ , 적어도  $10^{14}$ , 적어도  $10^{15}$ , 적어도  $10^{16}$ , 적어도  $10^{17}$ , 적어도  $10^{18}$  또는 적어도  $10^{19}$ 개)의 제1 펩타이드(FP) 서열, 절단 가능한 모이어티(CM) 서열 및/또는 표적 결합 모이어티(TBM) 서열(예를 들어, 본 명세서에 기재된 FP, CM 및 TBM 서열 중 임의의 하나 이상)을 선택하는 단계, 및 이들 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 조립하여 복수의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 합성 폴리뉴클레오타이드)의 라이브러리를 생산하는 단계에 의해서 라이브러리를 제조하는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 조립된 라이브러리에 의해서 암호화된 폴리펩타이드 중 적어도 하나는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)이다.

[0107] 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 폴리펩타이드 서열의 일부 또는 전체의 발현에 적합한 임의의 벡터에 클로닝될 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 벡터 내에 클로닝되어 단백질(예를 들어, 바이러스 코트 단백질, 박테리아 표면 단백질, 효모 표면 단백질, 곤충 세포 표면 단백질, 포유동물 세포 표면 단백질)의 전체 또는 일부에 융합된 폴리펩타이드의 일부 또는 전체를 생산하는 것을 허용하고(즉, 융합 단백질을 생성함), 입자 또는 세포의 표면 상에 디스플레이된다. 벡터의 몇몇 유형은 입수 가능하고, 본 개시내용, 예를 들어, 파지미드 벡터를 실시하는 데 사용될 수 있다. 파지미드 벡터는 일

반적으로 당업자에게 공지된 바와 같은 프로모터, 신호 서열, 표현형결정 선택 유전자, 복제 기점 부위 및 다른 필수 성분을 비롯한 다양한 성분을 함유한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 박테리아 디스플레이용의 박테리아 세포에서 또는 효모 디스플레이용의 효모 세포에서의 발현을 위해서 벡터 내에 클로닝될 수 있다. 예시적인 벡터는 미국 특허 공개US20160145604호 기재되어 있다. 일부 실시형태에서, 벡터는 5'에서부터 3'로, 표면(예를 들어, 과지, 박테리아, 효모, 곤충 또는 포유동물 세포의 표면) 상에 디스플레이될 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제한 부위, 표면 상에 디스플레이될 수 있는 표면 펩타이드를 암호화하는 제2 폴리뉴클레오타이드 및 제2 제한 부위를 포함하는 디스플레이 벡터이다. 일부 실시형태에서, 제2 폴리뉴클레오타이드는 과지 코트 단백질, 효모 외벽 단백질(예컨대, Aga2), 박테리아 외부막 단백질, 세포 표면 테더 도메인(cell surface tether domain) 또는 어댑터(adapter) 또는 이들의 절두부 또는 유도체를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 표면 펩타이드는 과지 디스플레이, 효모 디스플레이, 박테리아 디스플레이, 곤충 디스플레이 또는 포유동물 디스플레이 또는 그 사이의 셔플링 디스플레이(shuttling display)용이다. 일부 실시형태에서, 발현되는 경우, 아미노산 서열 및 표면 펩타이드는 표면 상의 융합 단백질로서 디스플레이된다. 일부 실시형태에서, 벡터는 제1 제한 부위에 대해서 5' 또는 제2 제한 부위에 대해서 3'에 융합 태그를 추가로 포함한다.

[0108] 본 개시내용의 특정 양상은 본 명세서에 기재된 벡터(들)를 함유하는 세포의 집단에 관한 것이다. 본 명세서에 기재된 기술 또는 다른 적합한 기술에 의해서 생성된 폴리뉴클레오타이드에 의해서 암호화된 폴리펩타이드가 발현될 수 있고, 목적하는 구조 및/또는 활성을 갖는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드를 식별하도록 스크리닝될 수 있다. 폴리펩타이드의 발현은 예를 들어, 무세포 추출물(예를 들어, 리보솜 디스플레이), 과지 디스플레이, 원핵 세포(예를 들어, 박테리아 디스플레이) 또는 진핵 세포(예를 들어, 효모 디스플레이)를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포는 박테리아 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포(예컨대, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포)이다. 박테리아 세포, 효모 세포 또는 포유동물 세포의 형질주입 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있고, 본 명세서에 인용된 문헌에 기재되어 있다. 이들 세포 유형에서의 폴리펩타이드(예를 들어, 하나 이상의 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)의 (예를 들어, 본 개시내용의 라이브러리로부터) 발현뿐만 아니라 관심대상의 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드에 대한 스크리닝은 하기에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0109] 대안적으로, 폴리뉴클레오타이드는 예컨대, 문헌[Pluckthun and Skerra, (Meth. Enzymol., 1989, 178: 476; Biotechnology, 1991, 9: 273)]에 기재된 것과 같은 이. 콜라이(*E. coli*) 발현 시스템에서 발현될 수 있다. 돌연변이체 단백질은 문헌[Better and Horwitz, Meth. Enzymol., 1989, 178: 476]에 기재된 바와 같이 배지 및/또는 세포질에서의 분비를 위해서 발현될 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 신호 서열, 예컨대, ompA, phoA 또는 pelB 신호 서열을 암호화하는 서열의 3' 단부에 부착된다(Lei et al., J. Bacteriol., 1987, 169: 4379). 이러한 유전자 융합체는 디시스트론(dicistronic) 작체물로 조립되어, 이것은 단일 벡터로부터 발현되고, 이. 콜라이의 원형질막주위 공간으로 분비될 수 있는데, 여기서 이것은 다시 접힐 것이고, 활성화 형태로 회수될 수 있다(Skerra et al., Biotechnology, 1991, 9: 273). 예를 들어, 제1 펩타이드(FP), 절단 가능한 모이어티(CM) 및 항체 경쇄를 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자는 항체 중쇄 유전자와 함께 동시에 발현되어 관심대상 폴리펩타이드를 생산할 수 있다.

[0110] 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드 서열은 예를 들어, 미국 특허 제US20040072740호; 제US20030100023호; 및 제US20030036092호에 기재된 바와 같은 분비 신호 및 지질화 모이어티를 사용하여, 원핵생물, 예를 들어, 이. 콜라이의 막 표면 상에 발현된다.

[0111] 대안적으로, 본 개시내용의 폴리펩타이드 서열은 예를 들어, 문헌[Jeong et al., PNAS, 2007, 104: 8247]에 기재된 바와 같은 고정된 원형질막주위 발현(APEX 2-혼성 표면 디스플레이)에 의해서 또는 예를 들어, 문헌[Mazor et al., Nature Biotechnology, 2007, 25: 563]에 기재된 바와 같은 다른 고정 방법에 의해서 발현 및 스크리닝될 수 있다.

[0112] 고등 진핵 세포, 예컨대, 포유동물 세포, 예를 들어 골수종 세포(예를 들어, NS/O 세포), 하이브리도마 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 및 인간 배아 신장(HEK) 세포가 또한 본 개시내용의 폴리펩타이드의 발현을 위해서 사용될 수 있다. 포유동물에서 발현되는 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)는 배양 배지로 분비되거나 또는 세포의 표면 상에 발현되도록 설계될 수 있다.

[0113] 다른 실시형태에서, 펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)는 포유동물 세포 디스플레이를 사용하여 선택될 수 있다(Ho et al., PNAS, 2006, 103: 9637). 일부 실시형태에서, 상기에 기재되고 하기에 예시된 바와 같이, 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)는 바이러스 코트 단백질의 전부 또

는 일부에 융합되고, 예를 들어, 파지 디스플레이를 사용하여 입자 또는 세포의 표면 상에 디스플레이되는 폴리펩타이드 서열의 일부 또는 전체의 생산(즉, 융합 단백질을 생성함)을 가능하게 한다.

[0114] 본 개시내용의 특정 양상은 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 라이브러리를 포함하는 비인간 동물에 관한 것이다. 예를 들어, 본 개시내용의 비인간 동물은 본 개시내용의 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 트랜스제닉 동물(예를 들어, 마우스)은 폴리뉴클레오타이드에 의해서 암호화된 폴리펩타이드를 발현한다. 비인간 동물의 계놈을 변형시키기 위한 기술은 관련 기술 분야에 공지되어 있다(예를 들어, Xenomouse<sup>(상표명)</sup>를 생성시키기 위해서 사용되는 방법).

[0115] 본 개시내용의 라이브러리로부터 유래된 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드에 대한 스크리닝은 임의의 적절한 수단(예를 들어, 활성화(예컨대, 절단 가능한 모이어티(CM) 내의 서열을 절단하는 하나 이상의 프로테아제로 폴리펩타이드를 처리함) 전 및 후에 표적 결합을 결정함으로써)에 의해서 수행될 수 있다. 예를 들어, 결합 활성도는 표준 면역검정 및/또는 친화도 크로마토그래피에 의해서 평가될 수 있다. 촉매 기능, 예를 들어, 단백질 분해 기능에 대한 본 개시내용의 폴리펩타이드의 스크리닝은 표준 검정, 예를 들어, 헤모글로빈 혈소판 검정을 사용하여 달성될 수 있다. 표적에 대한 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)의 결합 친화도를 결정하는 방법은 다양한 널리 공지된 기술, 예를 들어, ELISA, 표면 플라즈몬 공명을 기초로 주어진 표적에 대한 단백질의 결합 속도를 측정하는 BIACORE<sup>(상표명)</sup> 장비 또는 ForteBio Octet(등록상표) RED96 플랫폼(폴 라이프 사이언시즈사(Pall Life Sciences))을 사용하는 하기에 예시된 바와 같은 생물층 간섭법(Bio-Layer Interferometry: BLI)을 사용하여 시험관내에서 검정될 수 있다. 생체내 검정은 다수의 동물 모델 중 임의의 것을 사용하고, 그 다음 적절한 경우 인간에서 시험하여 수행될 수 있다. 세포-기반의 생물학적 검정이 또한 고려된다. 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)는 기능성 활성도, 예를 들어, 길항제 또는 효능제 활성도를 위해서 추가로 선택될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, Fab 단편(들)을 포함하는 폴리펩타이드와 하나 이상의 표적(들) 간의 결합 친화도는 항원을 인간 IgG1-Fc 태그로 태그화하고, 항-hIgG-Fc 캡처(AHC) 바이오센서에 의해서 캡처함으로써 BLI에 의해서 측정된다(예를 들어, 활성화 전 및 후). 폴리펩타이드는 CH1 도메인의 이의 C-말단에서 His6 태그로 태그화되고, 숙주 세포, 예컨대, 이. 콜라이에서 과발현되고, 예를 들어, Ni-NTA 수지를 사용하여 정제될 수 있다. 친화도는 예를 들어, 동적 완충제를 사용하여, 예를 들어, 5 내지 10µg/ml로 희석된 Fab를 포함하는 정제된 폴리펩타이드를 함유하는 웰 내에 침지된 AHC 센서(항-인간 IgG-Fc 포획 칩 및 판독 바이오센서)를 사용하여 측정될 수 있다(예를 들어, 활성화 전 및 후).

[0116] 결합제가 (예를 들어, 폴리펩타이드가 "활성화"된 경우(예를 들어, 프로테아제로의 처리 후) 표적 또는 항원에 결합할 수 있지만, "불활성화"된 경우(예를 들어, 프로테아제로의 처리 전)에는 그렇지 않은지를 결정함으로써)가 식별된 후, 핵산이 추출될 수 있다. 이어서 추출된 DNA를 직접 사용하여 이. 콜라이 숙주 세포를 형질전환시키거나 또는 대안적으로 암호 서열을 예를 들어, 적합한 프라이머를 사용하여 PCR을 사용하여 증폭시키고, 임의의 전형적인 서열결정 방법을 사용하여 서열결정될 수 있다. 결합제의 DNA 서열은 소화된 제한 효소일 수 있고, 이어서 단백질 발현을 위해서 벡터에 삽입될 수 있다.

[0117] 제1 펩타이드(FP)

[0118] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 제1 펩타이드(FP)를 포함하는 하나 이상의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 폴리뉴클레오타이드 라이브러리에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 제1 펩타이드(FP)를 포함하는 폴리펩타이드 및/또는 적어도 하나의 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드 라이브러리에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는 하기 구조식 (XIII)에 따른 아미노산 서열을 포함한다:  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86)(식 중, m은 2 내지 10(예를 들어, 3 내지 10)이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임). 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, X는 W, M 및/또는 C가 아니다. 일부 실시형태에서, 구조식 (XIII)의  $X_m$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이고, 구조식 (XIII)의  $X_n$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이고/이거나 구조식 (XIII)의  $X_o$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 일부 실시형태에서, FP은 구조식 (XIV)에 따른 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해서 암호화된 폴리펩타이드를 포함한다:  $(NNK)_mTGY(NNK)_nTGY(NNK)_o$ (서열번호 87)(식 중, 각각의 N은 독립적으로 A, G, T 또는 C이고, 각각의 K는

독립적으로 T 또는 G이며, 각각의 Y는 독립적으로 T 또는 C이고, 각각의 H는 독립적으로 A, T 또는 C임).

- [0119] 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는 하기 구조식 (I)에 따른 아미노산 서열을 포함한다:  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)(식 중, m은 2 내지 10(예를 들어, 3 내지 10)이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이며, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임). 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, X는 W, M 및/또는 C가 아니다. 일부 실시형태에서, 구조식 (I)의  $X_m$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이고, 구조식 (I)의  $X_n$ 에서 각각의 X는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 일부 실시형태에서, FP는 구조식 (II)에 따른 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해서 암호화된 폴리펩타이드를 포함한다:  $(NNK)_mTGY(NNK)_nTGY(NHC)_o$ (서열번호 2)(식 중, 각각의 N은 독립적으로 A, G, T 또는 C이고, 각각의 K는 독립적으로 T 또는 G이며, 각각의 Y는 독립적으로 T 또는 C이고, 각각의 H는 독립적으로 A, T 또는 C임).
- [0120] 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는 하기 구조식 (XII)에 따른 아미노산 서열을 포함한다:  $Z_mCZ_nCZ_o$ (서열번호 71)(식 중, m은 2 내지 10(예를 들어, 3 내지 10)이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임)). 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다.
- [0121] 일부 실시형태에서, m은 2 내지 5, 3 내지 10, 3 내지 9, 3 내지 8, 3 내지 7, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 4 내지 10, 4 내지 9, 4 내지 8, 4 내지 7, 4 내지 6, 4 내지 5, 5 내지 10, 5 내지 9, 5 내지 8, 5 내지 7, 5 내지 6, 6 내지 10, 6 내지 9, 6 내지 8, 6 내지 7, 7 내지 10, 7 내지 9, 7 내지 8, 8 내지 10, 8 내지 9 또는 9 내지 10이다. 일부 실시형태에서, m은 6 내지 8이다. 일부 실시형태에서, m은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다. 일부 실시형태에서, m은 6이다.
- [0122] 일부 실시형태에서, n은 3 내지 10, 3 내지 9, 3 내지 8, 3 내지 7, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 4 내지 10, 4 내지 9, 4 내지 8, 4 내지 7, 4 내지 6, 4 내지 5, 5 내지 10, 5 내지 9, 5 내지 8, 5 내지 7, 5 내지 6, 6 내지 10, 6 내지 9, 6 내지 8, 6 내지 7, 7 내지 10, 7 내지 9, 7 내지 8, 8 내지 10, 8 내지 9 또는 9 내지 10이다. 일부 실시형태에서, n은 6 내지 8이다. 일부 실시형태에서, n은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다. 일부 실시형태에서, n은 6이다. 일부 실시형태에서, n은 8이다.
- [0123] 일부 실시형태에서, o는 1 내지 10, 1 내지 9, 1 내지 8, 1 내지 7, 1 내지 6, 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3, 1 내지 2, 2 내지 10, 2 내지 9, 2 내지 8, 2 내지 7, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 3, 3 내지 10, 3 내지 9, 3 내지 8, 3 내지 7, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 4 내지 10, 4 내지 9, 4 내지 8, 4 내지 7, 4 내지 6, 4 내지 5, 5 내지 10, 5 내지 9, 5 내지 8, 5 내지 7, 5 내지 6, 6 내지 10, 6 내지 9, 6 내지 8, 6 내지 7, 7 내지 10, 7 내지 9, 7 내지 8, 8 내지 10, 8 내지 9 또는 9 내지 10이다. 일부 실시형태에서, o는 1 내지 2이다. 일부 실시형태에서, o는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다. 일부 실시형태에서, o는 2이다.
- [0124] 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는 하기 구조식 (IV)에 따른 아미노산 서열을 포함한다:  $Z_6CX_6CZ_2$ (서열번호 55)(식 중, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이며, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임).
- [0125] 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는 하기 구조식 (V)에 따른 아미노산 서열을 포함한다:  $Z_6CX_8CZ_2$ (서열번호 56)(식 중, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이며, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임).
- [0126] 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는 하기 구조식 (VI)에 따른 아미노산 서열을 포함한다:  $(Z_6)C(Z_6)C(Z_2)$ (서열번호 57)(식 중, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임).
- [0127] 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는 하기 구조식 (VII)에 따른 아미노산 서열을 포함한다:  $(Z_6)C(Z_8)C(Z_2)$ (서열번호 58)(식 중, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터

선택된 아미노산임).

[0128] 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는  $X_m$ CADAPNHCXX(서열번호 88),  $X_m$ CHHSPANCXX(서열번호 89),  $X_m$ CPILRHRCXX(서열번호 90),  $X_m$ CKWRPSRCXX(서열번호 91),  $X_m$ CRVLP RRCCXX(서열번호 92),  $X_m$ CLWRHRSCXX(서열번호 93) 및  $X_m$ CPRLRRKCCXX(서열번호 94)(식 중,  $m$ 은 2 내지 10이고, 각각의  $X$ 는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 각각의  $X$ 는 M, W 또는 C가 아니다. 일부 실시형태에서, 각각의  $X$ 는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 일부 실시형태에서,  $m$ 은 2이다. 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는 아미노산 서열 EVGSYPTDLDACADAPNHCHF(서열번호 95), EVGSYSSTHAHCHHSPANCIS(서열번호 96), EVGSYD TDYDFCPILRHRCDS(서열번호 97), EVGSYNDYNYHCKWRPSRCHN(서열번호 98), EVGSYHYD YDCCRVLPRRCFN(서열번호 99), EVGSYSNNFASCLWRHRSCAD(서열번호 100) 또는 EVGSYTDNYDCPRLRRKCYH(서열번호 101)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 HVR, 가변 영역(VL, VH) 및/또는 경쇄(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG4)의 특정 아미노산 서열과 관련하여 기술된 항체를 포함하는 본 명세서에 기재된 항-CD137 항체 중 하나 이상의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 본 명세서에 기재된 항-CD137 항체 중 하나 이상의 전장 항체 경쇄를 포함한다.

[0129] 일부 실시형태에서 제1 펩타이드(FP)는  $X_m$ CPDHPYPCXX(서열번호 102),  $X_m$ CDAFYPCXX(서열번호 103),  $X_m$ CDSHPYPCXX(서열번호 104) 및  $X_m$ CVPYYACXX(서열번호 105)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하되,  $m$ 은 2 내지 10이고, 각각의  $X$ 는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다. 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는 아미노산 서열 EVGSYNFVADSCDPHPYPCSA(서열번호 110), EVGSYIVHHSDCDAFYPCDS(서열번호 111), EVGSYYSAYPACDSHPYPCNS(서열번호 112), EVGSYPNPSSDCVPPYYACAY(서열번호 113), EVGSYYSAYPACDSHPYPCQS(서열번호 114), EVGSYYSAYPACDSHPYPCNS(서열번호 115), EVGSYQPSSDCVPPYYACAY(서열번호 116) 또는 EVGSYNPASDCVPPYYACAY(서열번호 117)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 HVR, 가변 영역(VL, VH) 및/또는 경쇄(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG4)의 특정 아미노산 서열과 관련하여 기술된 항체를 포함하는 본 명세서에 기재된 항-CTLA4 항체 중 하나 이상의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 본 명세서에 기재된 항-CTLA4 항체 중 하나 이상의 전장 항체 경쇄를 포함한다.

[0130] 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는 서열번호 72 내지 85로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0131] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 제1 펩타이드(FP) 중 임의의 것은 하나 이상의 추가적인 아미노산 서열(예를 들어, 하나 이상의 폴리펩타이드 태그)을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 추가적인 아미노산 서열의 예는 비제한적으로 정제 태그(예컨대, his-태그, flag-태그, 말토스 결합 단백질 및 글루타티온-S-트랜스퍼라제 태그), 검출 태그(예컨대, 광도계에 의해서 검출될 수 있는 태그(예를 들어, 적색 또는 녹색 형광 단백질 등)), 검출 가능한 효소 활성을 갖는 태그(예를 들어, 알칼리성 포스포타제 등), 분비성 서열을 함유하는 태그, 리더 서열 및/또는 안정화 서열, 프로테아제 절단 부위(예를 들어, 푸린(furin) 절단 부위, TEV 절단 부위, 트롬빈 절단 부위) 등을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 추가적인 아미노산 서열은 제1 펩타이드(FP)의 N-말단에 존재한다. 일부 실시형태에서, 추가적인 아미노산 서열은 서열 EVGSY(서열번호 16)를 포함하거나 이로 이루어진다.

[0132] 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드는 활성화 전에(예를 들어, 절단 가능한 모이어티(CM) 내를 절단하는 하나 이상의 프로테아제로 처리하기 전에, pH의 (국지적인) 변화를 겪기 전에, 온도 이동(증가 또는 감소) 전에, 제2 분자(예컨대, 소분자 또는 단백질 리간드)와 접촉되기 전에 등) 표적 결합 모이어티(TBM)에 결합하여, 활성화 가능한 항체가 표적에 결합하는 것을 저해하지만, 활성화 후에(예를 들어, 절단 가능한 모이어티(CM) 내를 절단하는 하나 이상의 프로테아제로 처리한 후에, pH의 (국지적인) 변화를 겪은 후에, 온도 이동(증가 또는 감소) 후에, 제2 분자(예컨대, 소분자 또는 단백질 리간드와 접촉된 후에) 등) TBM에 결합하지 않고/않거나 폴리펩타이드가 표적에 결합하는 것을 저해하는 차폐 펩타이드이다. 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)(예를 들어, 차폐 모이어티)는 CM이 절단되지 않은 경우 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체))가 이의 표적에 결합하는 것을 저해하지만, CM이 절단되는 경우 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체))가 이의 표적에 결합하는 것을 저해하지 않는다. 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)(예를 들어, 차폐 모이어티)는 표적에 대한 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체))의 해리 상수보다 더 큰(예를 들어, 적어도 약 1.5배 더 큰, 적어도

약 2배 더 큰, 적어도 약 2.5배 더 큰, 적어도 약 3배 더 큰, 적어도 약 3.5배 더 큰, 적어도 약 4배 더 큰, 적어도 약 4.5배 더 큰, 적어도 약 5배 더 큰, 적어도 약 10배 더 큰, 적어도 약 100배 더 큰, 적어도 약 500배 더 큰 등) TBM에 대한 결합에 대한 해리 상수를 갖는다.

- [0133] 절단 가능한 모이어티(CM)
- [0134] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 절단 가능한 모이어티(CM)를 포함하는 하나 이상의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 폴리뉴클레오타이드 라이브러리에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 절단 가능한 모이어티(CM)를 포함하는 폴리펩타이드 및/또는 적어도 하나의 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드 라이브러리에 관한 것이다.
- [0135] 일부 실시형태에서, 절단 가능한 모이어티(CM)는 적어도 하나의 제1 절단 부위 (CS<sub>1</sub>)(예를 들어, 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 절단 부위는 제1 프로테아제 절단 부위이다. 예를 들어, 유로키나제-유형 플라스미노겐 활성화제(uPA); 매트릭스 메탈로프로테이나제(예를 들어, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-19, MMP-20, MMP-23, MMP-24, MMP-26 및/또는 MMP-27); 담배 식각 바이러스(TEV) 프로테아제; 플라스민; 트롬빈; PSA; PSMA; ADAMS/ADAMTS(예를 들어, ADAM 8, ADAM 9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAMDEC1, ADAMTS1, ADAMTS4 및/또는 ADAMTS5); 카스파제(예를 들어, 카스파제-1, 카스파제-2, 카스파제-3, 카스파제-4, 카스파제-5, 카스파제-6, 카스파제-7, 카스파제-8, 카스파제-9, 카스파제-10, 카스파제-11, 카스파제-12, 카스파제-13 및/또는 카스파제-14); 아스파테이트 프로테아제(예를 들어, RACE 및/또는 Renin); 아스파틱 카텡신(예를 들어, 카텡신 D 및/또는 카텡신 E); 시스테인 카텡신(예를 들어, 카텡신 B, 카텡신 C, 카텡신 K, 카텡신 L, 카텡신 S, 카텡신 V/L2 및/또는 카텡신 X/Z/P); 시스테인 프로테이나제(예를 들어, Cruzipain, Legumain 및/또는 Otubain-2); KLK(예를 들어, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK13 및/또는 KLK14); 메탈로 프로테이나제(예를 들어, Meprin, Neprilysin, PSMA 및/또는 BMP-1); 세린 프로테아제(예를 들어, 활성화된 단백질 C, 카텡신 A, 카텡신 G, Chymase 및/또는 응집 인자 프로테아제(예컨대, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa)); 엘라스타제; 그랜자임 B; 구아니디노벤조아타제; HtrA1; 인간 뉴트로필 엘라스타제; 락토펜; 마담신; NS3/4A; PACE4; tPA; 트립타제; 타입 II 막관통 세린 프로테아제(TTSP)(예를 들어, DESC1, DPP-4, FAP, Hepsin, Matriptase-2, MT-SP1/Matriptase, TMPRSS2, TMPRSS3 및/또는 TMPRSS4) 등에 의해서 인식 및/또는 절단되는 프로테아제 절단 부위를 비롯한, 당업계에 공지된 임의의 프로테아제(예를 들어, CM을 포함하는 폴리펩타이드의 표적과 공동 국지화된다고 공지된 프로테아제)에 의해서 인식 및/또는 절단되는 임의의 적합한 프로테아제 절단 부위가 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 프로테아제 절단 부위는 uPA, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-14, TEV 프로테아제, 플라스민, 트롬빈, 인자 X, PSA, PSMA, 카텡신 D, 카텡신 K, 카텡신 S, ADAM10, ADAM12, ADAMTS, 카스파제-1, 카스파제-2, 카스파제-3, 카스파제-4, 카스파제-5, 카스파제-6, 카스파제-7, 카스파제-8, 카스파제-9, 카스파제-10, 카스파제-11, 카스파제-12, 카스파제-13, 카스파제-14 및 TACE로부터 선택된 프로테아제에 대한 절단 부위이다. 일부 실시형태에서, 제1 프로테아제 절단 부위는 uPA, MMP-2, MMP-9 및/또는 TEV 프로테아제로부터 선택된 프로테아제에 대한 절단 부위이다. 일부 실시형태에서, 프로테아제 절단 부위는 SGRSA(서열번호 13), PLGLAG(서열번호 14) 및 ENLYFQG(서열번호 15)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0136] 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP) 및 절단 가능한 모이어티(CM)를 포함하는 폴리펩타이드는 하기 구조식 (VIII)에 따른 아미노산 서열을 포함한다: EVGSY(Z6)C(Z6)C(Z2)SGRSA(서열번호 4)(식 중, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로부터 선택된 아미노산임).
- [0137] 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP) 및 절단 가능한 모이어티(CM)를 포함하는 폴리펩타이드는 하기 구조식 (IX)에 따른 아미노산 서열을 포함한다: EVGSY(Z6)C(X6)C(Z2)SGRSA(서열번호 5)(식 중, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이며, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로부터 선택된 아미노산임).
- [0138] 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP) 및 절단 가능한 모이어티(CM)를 포함하는 폴리펩타이드는 하기 구조식 (X)에 따른 아미노산 서열을 포함한다: EVGSY(Z6)C(Z8)C(Z2)SGRSA(서열번호 6)(식 중, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로부터 선택된 아미노산임).
- [0139] 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP) 및 절단 가능한 모이어티(CM)를 포함하는 폴리펩타이드는 하기 구조식 (XI)에 따른 아미노산 서열을 포함한다: EVGSY(Z6)C(X8)C(Z2)SGRSA(서열번호 7)(식 중, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이며,

각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임).

[0140] 일부 실시형태에서, 절단 가능한 모이어티(CM)는 제1 링커(L<sub>1</sub>)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 링커(L<sub>1</sub>)는 제1 절단 부위 (CS<sub>1</sub>)(예를 들어, 제1 프로테아제 절단 부위)에 대한 C-말단이다. 일부 실시형태에서, 절단 가능한 모이어티(CM)는 N-말단에서부터 C-말단으로, (CS<sub>1</sub>)-L<sub>1</sub>의 구조를 포함한다.

[0141] 예를 들어, 글리신 중합체 (G)<sub>n</sub>(식 중, n은 적어도 1(예를 들어, 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10 등)의 정수임); 글리신-세린 중합체 (GS)<sub>n</sub>(식 중, n은 적어도 1(예를 들어, 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10 등)의 정수임) 예컨대, GGGGS(서열번호 17), SGGGS(서열번호 18), GGSG(서열번호 19), GGS GG(서열번호 20), GSGSG(서열번호 21), GSGGG(서열번호 22), GGS SG(서열번호 23), 및/또는 GSSSG(서열번호 24)); 글리신-알라닌 중합체; 알라닌-세린 중합체 등을 비롯한, 당업계에 공지된 임의의 적합한 링커(예를 들어, 가요성 링커)가 사용될 수 있다. 링커 서열은 임의의 길이, 예컨대, 약 1개 아미노산(예를 들어, 글리신 또는 세린) 내지 약 20개 아미노산(예를 들어, 20 아미노산 글리신 중합체 또는 글리신-세린 중합체), 약 1개 아미노산 내지 약 15개 아미노산, 약 3개 아미노산 내지 약 12개 아미노산, 약 4개 아미노산 내지 약 10개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 9개 아미노산, 약 6개 아미노산 내지 약 8개 아미노산 등일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 링커는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 아미노산 길이 중 임의의 것이다. 일부 실시형태에서, 링커는 서열번호 17 내지 24로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커는 서열번호 17 또는 18의 아미노산 서열을 포함한다.

[0142] 일부 실시형태에서, 절단 가능한 모이어티(CM)는 적어도 제2 절단 부위(예를 들어, 적어도 제2, 적어도 제3, 적어도 제4, 적어도 제5 등)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 절단 가능한 모이어티(CM)는 제2 절단 부위 (CS<sub>2</sub>)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 절단 부위는 제2 프로테아제 절단 부위이다. 제2 프로테아제 절단 부위는 상기에 기재된 프로테아제 중 임의의 것에 의해서 인식 및/또는 절단되는 임의의 적합한 프로테아제 절단 부위일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1(CS<sub>1</sub>) 절단 부위 및 제2 (CS<sub>2</sub>) 절단 부위는 동일한 프로테아제에 의해서 인식 및/또는 절단되는 프로테아제 절단 부위이다. 일부 실시형태에서, 제1(CS<sub>1</sub>) 절단 부위 및 제2(CS<sub>2</sub>) 절단 부위는 상이한 프로테아제에 의해서 인식 및/또는 절단되는 프로테아제 절단 부위이다(예를 들어, 제1 프로테아제 절단 부위는 uPA에 의해서 인식 및/또는 절단되고, 제2 프로테아제 절단 부위는 MMP-2에 의해서 인식 및/또는 절단되고; 제1 프로테아제 절단 부위는 uPA에 의해서 인식 및/또는 절단되고, 제2 프로테아제 절단 부위는 MMP-9에 의해서 인식 및/또는 절단되고; 제1 프로테아제 절단 부위는 uPA에 의해서 인식 및/또는 절단되고, 제2 프로테아제 절단 부위는 TEV 프로테아제에 의해서 인식 및/또는 절단되는 등이다). 일부 실시 형태에서, 적어도 제2 절단 부위(CS<sub>2</sub>)는 제1 링커(L<sub>1</sub>)에 대해서 C-말단이다. 일부 실시형태에서, 절단 가능한 모이어티(CM)는 N-말단에서부터 C-말단으로, (CS<sub>1</sub>)-L<sub>1</sub>-(CS<sub>2</sub>)의 구조를 포함한다.

[0143] 일부 실시형태에서, 절단 가능한 모이어티(CM)는 적어도 제2 링커(예를 들어, 적어도 제2, 적어도 제3, 적어도 제4, 적어도 제5 등)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 절단 가능한 모이어티(CM)는 제2 링커(L<sub>2</sub>)를 추가로 포함한다. 제2 링커(L<sub>2</sub>)는 상기에 기재된 임의의 적합한 링커일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 링커는 서열번호 17 내지 24로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1(L<sub>1</sub>) 링커와 제2(L<sub>2</sub>) 링커는 동일하다(예를 들어, 두 링커 모두 서열번호 17 또는 18의 서열을 포함한다). 일부 실시형태에서, 제1(L<sub>1</sub>) 링커와 제2(L<sub>2</sub>) 링커는 상이하다(예를 들어, 제1 링커(L<sub>1</sub>)는 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 링커(L<sub>2</sub>)는 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 등이다). 일부 실시형태에서, 적어도 제2 링커 (L<sub>2</sub>)는 제2 절단 부위(CS<sub>2</sub>)에 대해서 C-말단이다. 일부 실시형태에서, 절단 가능한 모이어티(CM)는 N-말단에서부터 C-말단으로, (CS<sub>1</sub>)-L<sub>1</sub>-(CS<sub>2</sub>)-L<sub>2</sub>의 구조를 포함한다.

[0144] 예시적인 FP-CM 서열

[0145] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 N-말단에서부터 C-말단으로, (FP)-(PCS<sub>1</sub>)-L<sub>1</sub>-(PCS<sub>2</sub>)-L<sub>2</sub>의 구조를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 하기의 아미노산 서열을 포함한다:

EVGSYDALHYACPPDYACYYSGRSAGGGGTENLYFQSGSGS (서열번호 25);  
 EVGSYNSYHAYCPHPLYCTASGRSAGGGGTENLYFQSGSGS (서열번호 26);  
 EVGSYASSAVLCVTAYFSCNSSGRSAGGGGTENLYFQSGSGS (서열번호 27);  
 EVGSYNFVADSCDPHPYPCASGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 28);  
 EVGSYNFVADSCDPHPYPCASGRSAGGGGTENLYFQSGSGS (서열번호 29);  
 EVGSYIVHHSDCDAFYPCDSSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 30);  
 EVGSYIVHHSDCDAFYPCDSSGRSAGGGGTENLYFQSGSGS (서열번호 31);  
 EVGSYYSAYPACDSHYPYCNSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 32);  
 EVGSYYSAYPACDSHYPYCNSGRSAGGGGTENLYFQSGSGS (서열번호 33);  
 EVGSYPNSSDCVPYYYACAYSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 34);  
 EVGSYPNSSDCVPYYYACAYSGRSAGGGGTENLYFQSGSGS (서열번호 35);  
 EVGSYYSAYPACDSHYPYCQSSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 36);  
 EVGSYYSAYPACDSHYPYCNSAGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 37);  
 EVGSYPQPSSDCVPYYYACAYSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 38);  
 EVGSYPNPASDCVPYYYACAYSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 39);  
 EVGSYPTDLDACADAPNHCHFSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 40);  
 EVGSYSSTHAHCHHSPANCISSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 41);  
 EVGSYDTDYDFCPILRHRCDSSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 42);  
 EVGSYNDYNYHCKWRPSRCHNSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 43);  
 EVGSYHYDYDDCVLPRRCFNSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 44);  
 EVGSYSNNFASCLWRHRSCADSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 45); 및/또는  
 EVGSYTDNYDYCPRLRRKCYHSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 46)

[0146] . 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 N-말단에서부터 C-말단으로, (FP)-(PCS<sub>1</sub>)-L<sub>1</sub>-(PCS<sub>2</sub>)-L<sub>2</sub>-(TBM)의 구조를 포함한다.

[0147] 표적 결합 모이어티(TBM)

[0148] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 하나 이상의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 폴리뉴클레오타이드 라이브러리에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드 및/또는 적어도 하나의 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드 라이브러리에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 항체 경쇄 가변 영역 및/또는 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 항체 경쇄 가변 영역 및 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체 중쇄 가변 영역은 항체 경쇄 가변 영역에 C-말단에 존재한다. 일부 실시형태에서, 항체 경쇄 가변 영역은 항체 중쇄 가변 영역에 C-말단에 존재한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 표적 결합 모이어티(TBM)는 예를 들어, CTLA4, CD137, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, TIM3, B7-H3, OX40, CD3, CD19, CD20, CD40, CD95, CD120a, BTLA, VISTA, ICOS, BCMA, Her1, Her2, Her3 및/또는 B7-H4를 포함하는 관심대상의 임의의 표적에 특이성을 갖는 항체 경쇄 가변 영역 및/또는 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0149] 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 전장 항체 경쇄 및/또는 전장 항체 중쇄를 포함한다. 항체 경쇄는 카파 또는 람다 경쇄일 수 있다. 항체 중쇄는 임의의 부류, 예를 들어, IgG, IgM, IgE, IgA, 또는 IgD에 속할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체 중쇄는 IgG 부류, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 하위부류에 속한다. 본 명세서에 기재된 An 항체 중쇄는 당업계에서 공지된 방법을 이용하여 하나의 부류 또는 하위부류에서 다른 부류 또는 하위부류로 전환될 수 있다.

[0150] 본 명세서에 기재된 표적 결합 모이어티(TBM) 중 임의의 하나 이상은 PCT 출원 번호 PCT/CN2017/098333(전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함됨), PCT 출원 번호 PCT/CN2017/098299(전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함됨), PCT 출원 번호 PCT/CN2017/098332 (전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함됨), 및/또는 발명의 명칭이

"Compositions Comprising Cross-reactive Anti-CTLA4 Antibodies, and Methods of Making and Using the Same"이고, 대리인 참조 번호 69540-2000540(전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함됨) 하에서 동시에 출원된 PCT 출원에 기재된 항체 중 임의의 것의 HVR 서열(예를 들어, 중쇄 가변 영역 HVR 서열 중 1개, 2개 또는 3개 및/또는 경쇄 가변 영역 HVR 서열 중 1개, 2개 또는 3개), 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열 중 임의의 것을 혼입할 수 있다.

[0151] 본 명세서에 기재된 표적 결합 모이어티(TBM)는 HVR 서열 중 임의의 것(예를 들어, 중쇄 가변 영역 HVR 서열 중 1개, 2개 또는 3개 및/또는 경쇄 가변 영역 HVR 서열 중 1개, 2개, 3개), 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, 항-CTLA4 항체, 항-CD137 항체) 중 임의의 것의 경쇄 가변 영역 서열을 혼입할 수 있다.

[0152] 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 HVR, 가변 영역(VL, VH) 및/또는 경쇄(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG4)의 특정 아미노산 서열과 관련하여 기술된 항체를 포함하는 본 명세서에 기재된 항-CTLA4 항체 중 하나 이상의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 아미노산 서열 RASQSVRGRFLA(서열번호 62)를 포함하는 HVR-L1, 아미노산 서열 DASNRATGI(서열번호 63)를 포함하는 HVR-L2 및/또는 아미노산 서열 YCQQSSWPPT(서열번호 64)를 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 아미노산 서열 YSISGGYHWSWI(서열번호 59)를 포함하는 HVR-H1, 아미노산 서열 LARIDWDDDKYYSTSLKSRL(서열번호 60)을 포함하는 HVR-H2 및/또는 아미노산 서열 ARSYVYFDY(서열번호 61)를 포함하는 HVR-H3을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 a) 아미노산 서열 RASQSVRGRFLA(서열번호 62)를 포함하는 HVR-L1, 아미노산 서열 DASNRATGI(서열번호 63)를 포함하는 HVR-L2 및/또는 아미노산 서열 YCQQSSWPPT(서열번호 64)를 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역; 및 b) 아미노산 서열 YSISGGYHWSWI(서열번호 59)를 포함하는 HVR-H1, 아미노산 서열 LARIDWDDDKYYSTSLKSRL(서열번호 60)을 포함하는 HVR-H2 및/또는 아미노산 서열 ARSYVYFDY(서열번호 61)를 포함하는 HVR-H3을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역 및 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0153] 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 HVR, 가변 영역(VL, VH) 및/또는 경쇄(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG4)의 특정 아미노산 서열과 관련하여 기술된 항체를 포함하는 본 명세서에 기재된 항-CD137 항체 중 하나 이상의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 아미노산 서열 RASQSIGSYLA(서열번호 68)를 포함하는 HVR-L1, 아미노산 서열: DASNLETGV(서열번호 69)를 포함하는 HVR-L2 및/또는 아미노산 서열: YCQQGYLWT(서열번호 70)를 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 아미노산 서열 FSLSTGGVGVGWI(서열번호 65)를 포함하는 HVR-H1, 아미노산 서열 LALIDWADDKYYSPLKSRL(서열번호 66)을 포함하는 HVR-H2 및/또는 아미노산 서열 ARGGSDTVIGDWFAY(서열번호 67)를 포함하는 HVR-H3을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 a) 아미노산 서열 RASQSIGSYLA(서열번호 68)를 포함하는 HVR-L1을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역, 아미노산 서열 DASNLETGV(서열번호 69)를 포함하는 HVR-L2 및/또는 아미노산 서열 YCQQGYLWT(서열번호 70)를 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역; 및 b) 아미노산 서열 FSLSTGGVGVGWI(서열번호 65)를 포함하는 HVR-H1, 아미노산 서열 LALIDWADDKYYSPLKSRL(서열번호 66)을 포함하는 HVR-H2 및/또는 아미노산 서열 ARGGSDTVIGDWFAY(서열번호 67)를 포함하는 HVR-H3을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티(TBM)는 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 항체 경쇄 가변 영역 및 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0154] **V. 폴리펩타이드 및 폴리펩타이드 라이브러리**

[0155] 본 개시내용의 다른 양상은 폴리펩타이드 (예를 들어, 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드 중 임의의 것) 및/또는 하나 이상의 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 하나 이상의 활성화 가능한 항체), 예컨대, 활성화 가능한 항체, 이의 활성화 가능한 항원 결합 단편 또는 활성화 가능한 항체의 유도체를 스크리닝, 식별 및/또는 선택하는 데 유용한 폴리펩타이드의 라이브러리에 관한 것이다. 본 개시내용의 라이브러리는 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드(예를 들어, 하나 이상의 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드) 중 하나 이상을 함유할 수 있다. 일부 실

시형태에서, 본 명세서에 기재된 라이브러리의 폴리펩타이드 중 하나 이상(예를 들어, 하나, 일부 또는 모두)은 항원 결합 도메인(들)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 라이브러리의 폴리펩타이드 중 하나 이상(예를 들어, 하나, 일부 또는 모두)은 전장 항체 경쇄 및/또는 중쇄(들)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 라이브러리의 폴리펩타이드 중 하나 이상(예를 들어, 하나, 일부 또는 모두)은 경쇄 및/또는 중쇄 Fab 단편(들)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 라이브러리의 폴리펩타이드 중 하나 이상(예를 들어, 하나, 일부 또는 모두)은 단일-쇄 가변 단편(들)(scFv)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 세포 표면(예를 들어, 효모 또는 포유동물 세포 디스플레이) 상에서 발현된다.

[0156] 일부 실시형태에서, (예를 들어, 라이브러리 내의) 본 개시내용의 폴리펩타이드는 (a) 제1 펩타이드(FP); (b) 절단 가능한 모이어티(CM); 및 (c) 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함한다. 일부 실시형태에서, FP는 본 명세서에 기재된 제1 펩타이드 중 임의의 것이다(예를 들어, 하기 구조식 (XIII)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP):  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86)( $m$ 은 2 내지 10이고,  $n$ 은 3 내지 10이며,  $o$ 는 1 내지 10이고, 각각의  $X$ 는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택된 아미노산임). 일부 실시형태에서, FP는 본 명세서에 기재된 제1 펩타이드 중 임의의 것이다(예를 들어, 하기 구조식 (I)에 따른 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP):  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)(식 중,  $m$ 은 2 내지 10이고,  $n$ 은 3 내지 10이며,  $o$ 는 1 내지 10이고, 각각의  $X$ 는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택된 아미노산이며, 각각의  $Z$ 는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임). 일부 실시형태에서,  $m$ 은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, CM은 본 명세서에 기재된 절단 가능한 모이어티 중 임의의 것(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM))이다. 일부 실시형태에서, TBM은 본 명세서에 기재된 표적 결합 모이어티(예를 들어, 항체 경쇄 가변 영역 및/또는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)) 중 임의의 것이다.

[0157] 일부 실시형태에서, 본 명세서에는 항원 결합 도메인을 포함하는 항원 결합 도메인 및/또는 라이브러리가 제공되며, 여기서 항원 결합 도메인 중 적어도 하나(예를 들어, 하나, 일부 또는 모두)는 본 개시내용의 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인 중 적어도 하나(예를 들어, 하나, 일부 또는 모두)는 N-말단에서부터 C-말단으로: (a) 제1 펩타이드(FP)(예를 들어, 구조식 (XIII):  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86)(식 중,  $m$ 은 2 내지 10이고,  $n$ 은 3 내지 10이며,  $o$ 는 1 내지 10이고, 각각의  $X$ 는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택된 아미노산임)의 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 절단 가능한 모이어티(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM)); 및 (c) 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서,  $m$ 은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인 중 적어도 하나(예를 들어, 하나, 일부 또는 모두)는 N-말단에서부터 C-말단으로: (a) 제1 펩타이드(FP)(예를 들어, 구조식 (I):  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)(식 중,  $m$ 은 2 내지 10이고,  $n$ 은 3 내지 10이며,  $o$ 는 1 내지 10이고, 각각의  $X$ 는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택된 아미노산이고, 각각의  $Z$ 는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임)의 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 절단 가능한 모이어티(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM)); 및 (c) 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 항체 중쇄 가변 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서,  $m$ 은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인 중 적어도 하나(예를 들어, 하나, 일부 또는 모두)는 N-말단에서부터 C-말단으로: (a) 제1 펩타이드(FP)(예를 들어, 구조식 (XIII):  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86)(식 중,  $m$ 은 2 내지 10이고,  $n$ 은 3 내지 10이며,  $o$ 는 1 내지 10이고, 각각의  $X$ 는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택된 아미노산임)의 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 절단 가능한 모이어티(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM)); 및 (c) 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서,  $m$ 은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인 중 적어도 하나(예를 들어, 하나, 일부 또는 모두)는 N-말단에서부터 C-말단으로: (a) 제1 펩타이드(FP)(예를 들어, 구조식 (I):  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)(식 중,  $m$ 은 2 내지 10이고,  $n$ 은 3 내지 10이며,  $o$ 는 1 내지 10이고, 각각의  $X$ 는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택된 아미노산이고, 각각의  $Z$ 는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임)의 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 절단 가능한 모이어티(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위를 포함

하는 절단 가능한 모이어티(CM)); 및 (c) 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 영역을 추가로 포함한다.

[0158] 일부 실시형태에서, 추가로 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드 중 임의의 것을 포함하는 항체 단편 또는 scFv가 제공된다. 일부 실시형태에서, 항체 단편 또는 scFv는 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체 단편 또는 scFv는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에는 항체 단편 또는 scFv의 라이브러리가 제공되며, 항체 단편 또는 scFv 중 적어도 하나는 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드 중 임의의 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 항체 단편 또는 scFv의 적어도 하나(예를 들어, 1개, 일부 또는 모두)는 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 내의 항체 단편 또는 scFv의 적어도 하나(예를 들어, 1개, 일부 또는 모두)는 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 추가로 본 명세서에는 이의 표면 상의 항체 단편 및/또는 scFv 중 하나 이상을 발현하는 세포 및/또는 세포의 라이브러리가 제공된다.

[0159] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 폴리펩타이드를 포함하는 항체 경쇄에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 항체 경쇄는 N-말단에서부터 C-말단으로: (a) 제1 펩타이드(FP)(예를 들어, 구조식 (XIII):  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택된 아미노산임)의 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 절단 가능한 모이어티(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM)); 및 (c) 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 항체 경쇄는 N-말단에서부터 C-말단으로: (a) 제1 펩타이드(FP)(예를 들어, 구조식 (I):  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택된 아미노산이고, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임)의 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 절단 가능한 모이어티(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM)); 및 (c) 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 항체 경쇄를 포함하는 라이브러리에 관한 것이고, 여기서 라이브러리 내의 항체 경쇄 중 적어도 하나(예를 들어, 하나, 일부 또는 모두)는 상기에 기재된 바와 같은 항체 경쇄이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 항체 경쇄 및 항체 중쇄를 포함하는 항체에 관한 것이며, 여기서 항체 경쇄는 상기에 기재된 바와 같은 항체 경쇄이다. 일부 실시형태에서, 항체 중쇄는 당업계에 공지된 항체 중쇄(본 명세서에 기재된 항체 중쇄 중 임의의 것 포함)이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 항체를 포함하는 라이브러리에 관한 것이고, 여기서 항체 중 적어도 하나(예를 들어, 하나, 일부 또는 모두)는 상기에 기재된 바와 같은 항체이다.

[0160] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 폴리펩타이드를 포함하는 항체 중쇄에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 항체 중쇄는 N-말단에서부터 C-말단으로: (a) 제1 펩타이드(FP)(예를 들어, 구조식 (XIII):  $X_mCX_nCX_o$ (서열번호 86)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택된 아미노산임)의 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 절단 가능한 모이어티(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM)); 및 (c) 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 항체 중쇄는 N-말단에서부터 C-말단으로: (a) 제1 펩타이드(FP)(예를 들어, 구조식 (I):  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로부터 선택된 아미노산이고, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임)의 아미노산 서열을 포함하는 제1 펩타이드(FP); (b) 절단 가능한 모이어티(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위를 포함하는 절단 가능한 모이어티(CM)); 및 (c) 항체 중쇄 가변 영역을 포함하는 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 항체 중쇄를 포함하는 라이브러리에 관한 것이고,

여기서 라이브러리 내의 항체 중쇄 중 적어도 하나(예를 들어, 하나, 일부 또는 모두)는 상기에 기재된 바와 같은 항체 중쇄이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 항체 중쇄 및 항체 경쇄를 포함하는 항체에 관한 것이며, 여기서 항체 중쇄는 상기에 기재된 바와 같은 항체 중쇄이다. 일부 실시형태에서, 항체 경쇄는 당업계에 공지된 항체 경쇄(본 명세서에 기재된 항체 경쇄 중 임의의 것 포함)이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 항체를 포함하는 라이브러리에 관한 것이고, 여기서 항체 중 적어도 하나(예를 들어, 하나, 일부 또는 모두)는 상기에 기재된 바와 같은 항체이다.

[0161] 본 개시내용의 폴리펩타이드(예를 들어, 상기에 기재된 항체 중 임의의 것)는 예를 들어, 미국 특허 제 4,816,567호 기재된 바와 같은 재조합 방법 및 조성물을 사용하여 생산될 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드 중 임의의 것(예를 들어, 상기에 기재된 항체 중 임의의 것)을 암호화하는 단리된 핵산이 제공된다. 이러한 핵산은 항체의  $V_L$ 을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 항체의  $V_H$ 를 포함하는 아미노산 서열(예를 들어, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)을 암호화할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터(예를 들어, 발현 벡터)가 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, 이러한 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 이러한 일 실시형태에서, 숙주 세포는 하기를 포함한다(예를 들어, 하기로 형질전환되었다): (1)  $V_L$ 을 포함하는 본 개시내용의 폴리펩타이드를 포함하는 아미노산 서열 및  $V_H$ 를 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체))을 포함하는 벡터, (2)  $V_H$ 를 포함하는 본 개시내용의 폴리펩타이드를 포함하는 아미노산 서열 및  $V_L$ 을 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체))을 포함하는 벡터, (3)  $V_L$ 을 포함하는 본 개시내용의 폴리펩타이드를 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함하는 제1 벡터 및  $V_H$ 를 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체))을 포함하는 제2 벡터, (4)  $V_H$ 를 포함하는 본 개시내용의 폴리펩타이드를 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함하는 제1 벡터 및  $V_L$ 을 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체))을 포함하는 제2 벡터. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 진핵, 예를 들어, 효모 세포, 곤충 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 림프구 세포(예를 들어, YO, NSO, Sp20 세포)이다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체))의 제조 방법이 제공되는데, 여기서 이 방법은 상기에 제공된 바와 같은 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체))를 암호화하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 폴리펩타이드의 발현에 적합한 조건 하에서 배양하는 단계, 및 선택적으로 숙주 세포(또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체))를 회수하는 단계를 포함한다.

[0162] 본 개시내용의 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체))의 재조합 생산을 위해서, 예를 들어, 상기에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체))를 암호화하는 핵산이 단리되고, 숙주 세포에서의 추가 클로닝 및/또는 발현을 위해서 하나 이상의 벡터 내에 삽입된다. 이러한 핵산은 (예를 들어, 폴리펩타이드(들)를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 통상적인 절차를 사용하여 쉽게 단리 및 서열결정될 수 있다.

[0163] 폴리펩타이드-암호화(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)-암호화) 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 원핵생물 또는 진핵생물 세포를 포함한다. 예를 들어, 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체))는 특히, 글리코실화 및 Fc 효과기 기능이 필요하지 않은 경우 박테리아에서 생산될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,648,237호, 제5,789,199호 및 제5,840,523호 참고, 또한 이. 콜라이에서의 항체 단편의 발현을 기술하는 문헌[Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254] 참고). 발현 이후에, 폴리펩타이드는 가용성 분획 중의 박테리아 세포 페이스트로부터 단리될 수 있고, 추가로 정제될 수 있다.

[0164] 원핵생물에 더하여, 진핵 미생물, 예컨대, 글리코실화 경로가 "인간화"되어, 부분적인 또는 완전 인간 글리코실화 패턴을 갖는 폴리펩타이드를 생산하는 진균 및 효모 균주를 비롯한, 사상성 진균 또는 효모가 폴리펩타이드-암호화(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)-암호화) 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다(문헌[Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), 및 Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)] 참고).

- [0165] 글리코실화된 폴리펩타이드의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체(무척추 동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 특히 스포도페타라 프루기퍼다(*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형질주입을 위해서, 곤충 세포와 함께 사용될 수 있는 다수의 바칼로바이러스 균주가 식별되어 있다.
- [0166] 식물 세포 배양물을 숙주로서 이용할 수도 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,959,177호, 제6,040,498호, 제6,420,548호, 제7,125,978호 및 제6,417,429호(트랜스제닉 식물에서 항체를 생산하기 위한 PLANTIBODIES<sup>(상표명)</sup> 기술을 기재함) 참고).
- [0167] 척추동물 세포가 또한 숙주로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 현탁물 중에서 성장하도록 개작된 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40(COS-7)에 의해서 형질전환된 원숭이 신장 CV1 주; 인간 배아 신장 주(예를 들어, 문헌[Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)]에 기재된 바와 같은 293 또는 293 세포); 아기 햄스터 신장 세포(BHK); 마우스 세르톨리 세포(예를 들어, 문헌[Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)]에 기재된 바와 같은 TM4 세포); 원숭이 신장 세포(CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76); 인간 자궁경부 암종 세포(HELA); 개 신장 세포(MDCK; 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A); 인간 폐 세포(W138); 인간 간 세포(Hep G2); 마우스 유선 종양(MMT 060562); 예를 들어, 문헌[Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)]에 기재된 바와 같은 TRI 세포; MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 예컨대, DHFR<sup>-</sup> CHO 세포(Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); 및 골수종 세포주, 예컨대, YO, NS0 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토에 대해서는 문헌[Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., 인강a Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)]을 참고하기 바란다.
- [0168] **VI. 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드 및 이의 생산**
- [0169] 일부 실시형태에서, 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드 및/또는 폴리펩타이드 라이브러리 중 임의의 것에 대해 스크리닝되고/되거나 식별되고/되거나 이로부터 선택되는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 항체)가 제공된다.
- [0170] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 활성화 가능한 항체는 특정 컨텍스트에서(예컨대, 프로테아제-풍부 미세환경에서) 컨텍스트-의존적이다(예를 들어, 표적에만 결합할 수 있다). 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 활성화 가능한 항체는 보다 전통적인 비-활성화 가능한 항체보다 개선된 안정성을 제공한다(예를 들어, 감소된 독성을 나타내고, 다수의 기관의 중량에 대한 상당한 변형을 유도하지 않고, 간 조직병리학, 혈액학 및/또는 혈액 생화학 등을 변경시키지 않는다). 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 활성화 가능한 항체는 보다 전통적인 비-활성화 가능한 항체와 비교할 때 개선된 약동학적 특성을 갖는다(예를 들어, 더 긴 생체내 반감기를 갖는다).
- [0171] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 (a) 제1 펩타이드(FP)(예를 들어, 차폐 모이어티), (b) 절단 가능한 모이어티 및 (c) 표적 결합 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는 활성화 가능한 결합 도메인의 표적 결합 모이어티(TBM)에 결합하여, 이의 표적(예를 들어, 인간 CTLA4 또는 인간 CD137)에 대한 차폐 모이어티가 결합된 상응하는 결합 폴리펩타이드의 결합과 비교할 때 그리고/또는 표적에 대한 모체 항체의 결합과 비교할 때, 표적에 대한 활성화 가능한 결합 모이어티의 결합을 감소시키거나 저해한다. 일부 실시형태에서, 차폐 모이어티(MM)는 활성화 전에 적어도 약 2.0(예를 들어, 적어도 약 2.0, 적어도 약 3.0, 적어도 약 4.0, 적어도 약 5.0, 적어도 약 6.0, 적어도 약 7.0, 적어도 약 8.0, 적어도 약 9.0, 적어도 약 10, 적어도 약 25, 적어도 약 50, 적어도 약 75, 적어도 약 100, 적어도 약 150, 적어도 약 200, 적어도 약 300, 적어도 약 400, 적어도 약 500 등)의 차폐 효율을 갖는다. 일부 실시형태에서, 차폐 효율은 표적에 결합하는 것에 대한, 차폐 모이어티가 결합된 폴리펩타이드의 친화도에 비해서, 표적에 결합하는 것에 대한, 차폐 모이어티(MM)를 포함하는 활성화 가능한 항체의 친화도의 차이(예를 들어, 차폐 모이어티(MM)가 결합된 모체 항체에 비해서, 차폐 모이어티(MM)를 포함하는(활성화 전) 활성화 가능한 항체의 표적 항원(예컨대, CTLA4 또는 CD137)에 대한 친화도 차이, 또는 활성화 후 활성화 가능한 항체의 표적 항원에 대한 친화도에 비해서, 차폐 모이어티(MM)를 포함하는(활성화 전) 활성화 가능한 항체의 표적 항원(예컨대, CTLA4 또는 CD137)에 대한 친화도의 차이)로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 차폐 효율은 차폐 모이어티(MM)를 포함하는(활성화 전) 활성화 가능한 항체의 결합에 대한 EC<sub>50</sub>을 모체 항체의 EC<sub>50</sub>으로 나눔으로써 측정된다(예를 들어, ELISA에 의해서 EC<sub>50</sub>을 측정함; 예를 들어, 실시예 3의 방법). 일부 실시형태에서, 차폐 효율은 활성화 후 표적에 결합하는 것에 대한, 차폐 모이어티(MM)를 포함하는 활성화 가능한 항체의 친화도에 비해서, 활성화 전 표적에 결합하는 것에 대한,

차폐 모이어티(MM)를 포함하는 활성화 가능한 항체의 친화도 차이(예를 들어, 활성화 후 활성화 가능한 항체에 비해서 활성화 전 활성화 가능한 항체의 표적 항원에 대한 친화도 차이)로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 차폐 모이어티(MM)는 표적 결합 모이어티(TBM)에 결합하여, 활성화 가능한 항체가 표적에 결합하는 것을 방지한다(예를 들어, "불활성" 활성화 가능한 항체).

[0172] 일부 실시형태에서, "활성화 가능한" 결합 폴리펩타이드는, 저해, 차폐 및/또는 비절단 상태로 존재할 때 표적에 대해서 제1 수준의 결합을 나타내고, 비저해, 비차폐 및/또는 절단 상태에서 표적에 대해서 제2 수준의 결합을 나타내는 결합 폴리펩타이드를 지칭하며, 여기서 표적 결합의 제2 수준은 표적 결합의 제1 수준보다 더 크다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드에 의한 표적에 대한 접근은(예를 들어, 하나 이상의 프로테아제에 의한) 절단 가능한 모이어티 내의 절단 후보보다 더 크다.

[0173] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 일반적으로 폴리펩타이드의 활성화 전과 비교할 때 폴리펩타이드의 활성화 후(예를 들어, 절단 가능한 모이어티(CM) 내를 절단하는 하나 이상의 프로테아제에 의한) 활성화 후, pH 변화(증가 또는 감소)에 의한 활성화 후, 온도 변화(증가 또는 감소)에 의한 활성화 후, 제2 분자(예컨대, 소분자 또는 단백질 리간드)와의 접촉에 의한 활성화 후 등) 이의 표적(예를 들어, 인간 CTLA4 또는 CD137)에 대한 폴리펩타이드의 결합 친화도가 적어도 약 2배(예를 들어, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3, 적어도 약 3.5배, 적어도 약 4배, 적어도 약 4.5배, 적어도 약 5배, 적어도 약 5.5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 6.5배, 적어도 약 7배, 적어도 약 7.5배, 적어도 약 8배, 적어도 약 8.5배, 적어도 약 9배, 적어도 약 9.5배, 적어도 약 10배, 적어도 약 25배, 적어도 약 50배, 적어도 약 75배, 적어도 약 100배, 적어도 약 250배, 적어도 약 500배, 적어도 약 750배, 또는 적어도 약 1000배 또는 그 초과)만큼 증가할 때 "활성화 가능한" 결합 폴리펩타이드인 것으로 간주된다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 일반적으로 폴리펩타이드의 EC<sub>50</sub>이 "활성화"(예를 들어, ELISA 또는 FACS 검정에 의해서 측정되는 경우; 하기 실시예 참조) 후 적어도 약 2배(예를 들어, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 3.5배, 적어도 약 4배, 적어도 약 4.5배, 적어도 약 5배, 적어도 약 5.5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 6.5배, 적어도 약 7배, 적어도 약 7.5배, 적어도 약 8배, 적어도 약 8.5배, 적어도 약 9배, 적어도 약 9.5배, 적어도 약 10배, 적어도 약 25배, 적어도 약 50배, 적어도 약 75배, 적어도 약 100배, 적어도 약 250배, 적어도 약 500배, 적어도 약 750배 또는 적어도 약 1000배 또는 그 초과)만큼 감소하는 경우 "활성화 가능한" 것으로 간주된다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 일반적으로 폴리펩타이드의 EC<sub>50</sub>이 절단 가능한 모이어티 내를 절단하는 프로테아제로 처리된 후 적어도 약 2배만큼 감소되는 경우(예를 들어, ELISA 또는 FACS 검정에 의해서 측정되는 경우; 하기 실시예 참조) "활성화 가능한" 것으로 간주된다.

[0174] 일부 실시형태에서, 차폐 모이어티가 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드의 표적 결합 모이어티에 결합된 경우, 표적에 대한 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드의 K<sub>D</sub>는, 차폐 모이어티가 표적 결합 모이어티에 결합되지 않은 경우(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드의 "활성화" 후(예컨대, 절단 가능한 모이어티 내를 절단하기 위한 프로테아제 처리 후))보다 그리고/또는 표적에 대한 모체 항체의 K<sub>D</sub>보다 약 2(예를 들어, 약 2, 약 2.5, 약 3, 약 3.5, 약 4, 약 4.5, 약 5, 약 5.5, 약 6, 약 6.5, 약 7, 약 7.5, 약 8, 약 8.5, 약 9, 약 9.5, 약 10, 약 25, 약 50, 약 75, 약 100, 약 250, 약 500, 약 750 또는 약 1000 또는 그 초과)배만큼 더 크다. 예를 들어, 하기 실시예 3에 기술되어 있는 방법에 의한 것을 비롯하여 친화도를 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0175] 일부 실시형태에서, 차폐 모이어티가 활성화 결합 폴리펩타이드의 표적 결합 모이어티에 결합된 경우, 표적에 대한 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드의 K<sub>D</sub>는, 차폐 모이어티가 표적 결합 모이어티에 결합되지 않은 경우(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드의 "활성화" 후(예컨대, 절단 가능한 모이어티 내를 절단하기 위한 프로테아제 처리 후))에 비해서 그리고/또는 표적에 대한 모체 항체의 K<sub>D</sub>에 비해서, 적어도 약 25%(예를 들어, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99%)만큼 감소된다. 예를 들어, 하기 실시예 3에 기술되어 있는 방법에 의한 것을 비롯하여 친화도를 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0176] 일부 실시형태에서, 차폐 모이어티는 표적에 대한 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드의 결합을 입체적으로 방해하고/하거나 표적에 대한 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드의 결합을 알로스테릭적으로 방해한다. 일부 실시형태에서, 차폐 모이어티는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드의 자연 결합 파트너의 아미노산 서열을 포함하지 않는다.

[0177] 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티에 대한 차폐 모이어티의 해리 상수는 (활성 형태로 존재하는 경우) 표적에 대한 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드에 대한 해리 상수보다 더 크다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티에 대한 차폐 모이어티의 해리 상수는 (활성 형태로 존재하는 경우) 표적에 대한 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드의 해리 상수보다 약 2(예를 들어, 약 2, 약 2.5, 약 3, 약 3.5, 약 4, 약 4.5, 약 5, 약 5.5, 약 6, 약 6.5, 약 7, 약 7.5, 약 8, 약 8.5, 약 9, 약 9.5, 약 10, 약 25, 약 50, 약 75, 약 100, 약 250, 약 500, 약 750 또는 약 1000 또는 그 초과)배 더 크다. 일부 실시형태에서, 표적 결합 모이어티에 대한 차폐 모이어티의 해리 상수는 (활성 형태로 존재하는 경우) 표적에 대한 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드에 대한 해리 상수와 거의 동일하다. 일부 실시형태에서, 제1 펩타이드(FP)는, 폴리펩타이드가 활성화(예를 들어, 절단 가능한 모이어티(CM) 내를 절단하는 1종 이상의 프로테아제에 의한 활성화, pH 변화(증가 또는 감소)에 의한 활성화, 온도 변화(증가 또는 감소)에 의한 활성화, 제2 분자(예컨대, 소분자 또는 단백질 리간드)와 접촉된 후의 활성화 등)되지 않은 경우에만 표적 결합 모이어티(TBM)에 결합하여, 폴리펩타이드가 표적에 결합하는 것을 방지한다. 일부 실시형태에서, 활성화는 절단 모이어티 내에서 폴리펩타이드의 절단을 유도한다. 일부 실시형태에서, 활성화는 폴리펩타이드에서 입체구조 변화(예를 들어, 제1 펩타이드(FP)의 이동)를 유도하여, 제1 펩타이드가, 폴리펩타이드가 표적에 결합하는 것을 더 이상 방지하지 않도록 한다.

[0178] 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)는 추가로 변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 추가적인 분자 엔티티에 연결된다. 추가적인 분자 독립체의 예는 약제학적 작용제, 펩타이드 또는 단백질, 검출제 또는 표지 및 항체를 포함한다.

[0179] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 약제학적 작용제에 연결된다. 약제학적 작용제의 예는 세포독성제 또는 다른 암 치료제, 및 방사성 동위원소를 포함한다. 세포독성제의 특정 예는 탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티뎀 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로파놀롤, 및 푸로마이신 및 이들의 유사체 또는 동족체를 포함한다. 치료제는 또한, 예를 들어, 항대사성 물질(예를 들어, 메토포렉세이트, 6-머캅토푸린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카바진), 알킬화제(예를 들어, 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 펠팔란, 카르무스틴(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 사이클로포스파마이드, 부셀판, 다이브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C 및 시스-다이클로로디아민 백금(II)(DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린(예를 들어, 다우노루비신(이전에 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예를 들어, 닥티노마이신(이전에 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신(AMC)), 및 유사분열방지제(예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)를 포함한다. 진단학적으로 또는 치료학적으로 사용하기 위한 항체에 컨쥬게이션될 수 있는 방사성 동위원소의 예는 아이오딘<sup>131</sup>, 인듐<sup>111</sup>, 이트륨<sup>90</sup> 및 루테튬<sup>177</sup>을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 다양한 링커 기술을 이용하는 것과 같은, 약제학적 작용제에 폴리펩타이드를 결합시키기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 링커 타입의 예는 하이드라존, 티오에테르, 에스터, 다이설파이드 및 펩타이드-함유 링커를 포함한다. 항체에 치료제를 결합하기 위한 링커 및 방법의 추가 논의를 위하여, 또한, 문헌 [Saito *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215 (2003); Trail, *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337 (2003); Payne, *Cancer Cell* 3:207-212 (2003); Allen, *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763 (2002); Pastan and Kreitman, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091 (2002); Senter and Springer (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264]을 참조하기 바란다.

[0180] CTLA4를 표적으로 하는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드

[0181] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 활성화 가능한 항-CTLA4 항체, 활성화 가능한 항-CTLA4 항체의 항원 결합 단편 및/또는 활성화 가능한 항-CTLA4 항체의 유도체를 비롯한, 인간 CTLA4에 결합하는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 (a) N-말단에서부터 C-말단으로, 차폐 모이어티(MM), 절단 가능한 모이어티(CM) 및 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드(여기서 MM은 하기 구조식 (I): X<sub>m</sub>CX<sub>n</sub>CZ<sub>o</sub>(서열번호 1)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이고, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임)에 따른 아미노산 서열을 포함하고; CM은 적어도 제1 절단 부위(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함하고; TBM은 항체 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함함); 및 (b) 항체 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다. 일부 실시형태에서, m은 3 내지 10이다. 일부 실시형태에서, MM은 CM이 절단되지 않

은 경우 인간 CTLA4에 대한 활성화 가능한 항체의 결합을 저해한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 CM이 절단될 때 인간 CTLA4에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, MM은 표 A에 열거된 바와 같은 서열번호 72 내지 78로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[표 A]

**활성화 가능한 항체를 위한 차폐 펩타이드 서열**

차폐 펩타이드 서열	서열번호
NFVADSCPDHPYPCSA	서열번호 72
IVHHSDCDAFYPCDS	서열번호 73
YSAYPACDSHYPCNS	서열번호 74
PNPSSDCVPYYYACAY	서열번호 75
YSAYPACDSHYPCQS	서열번호 76
PQPSSDCVPYYYACAY	서열번호 77
PNPASDCVPYYYACAY	서열번호 78

일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 HVR, 가변 영역(VL, VH) 및/또는 경쇄(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG4)의 특정 아미노산 서열과 관련하여 기술된 항체를 포함하는 본 명세서에 기재된 항-CTLA4 항체 중 임의의 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CTLA4 항체는 인간 항체이다. 일부 실시형태에서, 항-CTLA4 항체는 인간화된 항체 및/또는 키메라 항체이다.

일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 a) 아미노산 서열 YSISGGYHWSWI(서열번호 59)를 포함하는 HVR-H1, 아미노산 서열 LARIDWDDKYYSTSLKSR(서열번호 60)을 포함하는 HVR-H2 및 아미노산 서열 ARSYVFDY(서열번호 61)를 포함하는 HVR-H3; 및/또는 b) 아미노산 서열 RASQSVRGRFLA(서열번호 62)를 포함하는 HVR-L1, 아미노산 서열 DASNRATGI(서열번호 63)를 포함하는 HVR-L2 및 아미노산 서열 YCQQSSWPPT(서열번호 64)를 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 a) 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 b) 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

일부 실시형태에서, 본 개시내용은 활성 형태로 존재할 때 인간 CTLA4에 결합하지만, (예를 들어, 1종 이상의 프로테아제로) 절단 가능한 모이어티 내를 절단하기 전에는 불활성이고, 하기 기능성 특성 중 적어도 하나(예를 들어, 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개 또는 9개 모두)를 갖는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 (예를 들어, 1종 이상의 프로테아제로) 절단 가능한 모이어티 내의 절단 후에 활성임)에 관한 것이다: (a) 인간, 시노몰거스 원숭이, 마우스, 래트 및/또는 개 CTLA4에 500nM 이하의  $K_D$ 로 결합함; (b) 인간 CTLA4에 대해서 길항제 활성을 가짐; (c) 최대 100 nM 농도에서 인간 PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, TIM3, B7-H3, CD95, CD120a, OX40, CD40, BTLA, VISTA, ICOS 및/또는 B7-H4에 결합하지 않음; (d) 원숭이, 마우스, 래트 및/또는 개 CTLA4와 교차-반응성임; (e) (예를 들어, Treg에 대해서) ADCC 효과를 유도함; (f) 인간 PBMC를 활성화시킴(예를 들어, IL-2 및/또는 IFN  $\gamma$ 의 분비를 자극함); (g) 종양 세포 성장을 저해할 수 있음; (h) 암에 대한 치료 효과를 가짐; 및 (i) 인간 CD80 및/또는 인간 CD86에 대한 인간 CTLA4의 결합을 저해함. 또한 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 CTLA4-표적화 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드 및/또는 항-CTLA4 항체 중 하나 이상과 인간 CTLA4에 대한 결합에 대해서 교차-경쟁하는 하나 이상의 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드가 제공된다.

일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 불활성 형태로 존재할 때 약 500nM 이상의  $K_D$ 로 인간, 시노몰거스 원숭이, 마우스, 래트 및/또는 개 CTLA4에 결합한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 활성 형태로 존재할 때 약 500nM 이하(예를 들어, 약 500nM 이하, 약 450nM 이하, 약 400nM 이하, 약 350nM 이하, 약 300nM 이하, 약 250nM 이하, 약 200nM 이하, 약 150nM 이하, 약 100nM 이하, 약 90nM 이하, 약 80nM 이하, 약 70nM 이하, 약 60nM 이하, 약 50nM 이하, 약 40nM 이하, 약 30nM 이하, 약 25nM 이하, 약 20nM 이하, 약 10nM 이하, 약 1nM 이하, 약 0.1nM 이하 등)의  $K_D$ 로 인간, 시노몰거스 원숭이, 마우스, 래트 및/또는 개 CTLA4에 결합한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 활성 형태로 존재할 때 약 500nM 이하의  $K_D$ 로 인간, 시노몰거스 원숭이, 마우스, 래트 및/또는 개 CTLA4에 결합한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 활성 형태로 존재할 때 약 100nM 이하의  $K_D$ 로 인간 CTLA4에 결합한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 활성 형태로 존재할 때 약 50nM 이하의  $K_D$ 로 인간 CTLA4에 결합한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 활성 형태로 존재할 때 약 10nM 이하의  $K_D$ 로

인간 CTLA4에 결합한다. 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드의  $K_D$ 를 측정하는 방법은 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명, ELISA 등은 적정 열량측정법, 필터 결합 검정, EMSA 등을 포함하는, 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서,  $K_D$ 는 ELISA에 의해 측정된다(예를 들어, 하기 실시예 3 참조).

[0188] 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 불활성 형태로 존재할 때 인간 CTLA4에 대한 길항제 활성을 갖지 않는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 활성 형태로 존재할 때 인간 CTLA4에 대한 길항제 활성을 갖는다(예를 들어, (예컨대, Treg에 대한) ADCC 효과를 유도하고, (예컨대, IL-2 및/또는 IFN $\gamma$  분비의 활성화, 유도 및/또는 자극에 의해서) PBMC를 활성화시키고, 인간 CD80 및/또는 인간 CD86에 대한 인간 CTLA4의 결합을 차단한다 등). 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 활성 형태로 존재할 때 인간 CTLA4의 하나 이상의 활성을 억제한다(예를 들어, 인간 CTLA4를 발현하는 세포(예컨대, 인간 세포)가 활성화된 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드에 의해서 접촉될 때 인간 CTLA4의 하나 이상의 활성을 억제한다).

[0189] 일부 실시형태에서, 불활성 형태로 존재할 때, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 원숭이(예를 들어, 시노몰구스 원숭이), 마우스, 래트, 및/또는 개 CTLA4와 교차-반응성이 아니다. 일부 실시형태에서, 활성 형태로 존재할 때, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 원숭이(예를 들어, 시노몰구스 원숭이), 마우스, 래트, 및/또는 개 CTLA4와 교차-반응성이다. 일부 실시형태에서, 활성 형태로 존재할 때, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 원숭이 CTLA4와 교차-반응성이다. 일부 실시형태에서, 활성 형태로 존재할 때, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 래트 CTLA4와 교차-반응성이다. 일부 실시형태에서, 활성 형태로 존재할 때, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 개 CTLA4와 교차-반응성이다. 일부 실시형태에서, 활성 형태로 존재할 때, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 원숭이 및 마우스 CTLA4; 원숭이 및 래트 CTLA4; 원숭이 및 개 CTLA4; 마우스 및 래트 CTLA4; 마우스 및 개 CTLA4; 래트 및 개 CTLA4; 원숭이, 마우스, 및 래트 CTLA4; 원숭이, 마우스, 및 개 CTLA4; 원숭이, 래트 및 개 CTLA4; 마우스, 래트 및 개 CTLA4; 또는 원숭이, 마우스, 래트 및 개 CTLA4와 교차 반응성이다. 일부 실시형태에서, 활성 형태로 존재할 때, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 약 350 nM(예를 들어, 약 1nM, 약 10nM, 약 25nM, 약 50nM, 약 75nM, 약 100nM, 약 150 nM, 약 200 nM, 약 250 nM, 약 300 nM, 약 350 nM)에서 교차-반응성이다. 비제한적으로, 표면 플라즈몬 공명, ELISA 등은 적정 열량측정법, 필터 결합 검정, EMSA 등을 포함하는 교차-반응성을 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0190] 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 불활성 형태로 존재할 때 (예를 들어, 인간 세포, 예컨대, Treg에 대한) ADCC 효과를 유도하지 않는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 대조군 결합 폴리펩타이드(예를 들어, 제1 펩타이드(FP) 및 절단 가능한 모이어티(CM)가 결합된 모체 항체)와 비교하는 경우, 불활성 형태로 존재할 때 (예를 들어, 인간 세포, 예컨대, Treg에 대해서) 감소된 ADCC 효과를 갖는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 활성 형태로 존재할 때 (예를 들어, 인간 세포, 예컨대, Treg에 대한) ADCC 효과를 유도한다. 비제한적으로, 하기 실시예 4에 기술되어 있는 방법을 통한, ADCC 효과를 측정하는 방법(예를 들어, 시험관내 방법)은 당업계에 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 불활성 형태로 존재할 때, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 대조군(예를 들어, 제1 펩타이드(FP) 및 절단 가능한 모이어티(CM)가 결합된 모체 항체)에 비해서 약 10% 미만만큼 ADCC 효과를 유도한다(예를 들어, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 1% 미만 등만큼 ADCC를 유도한다). 일부 실시형태에서, 활성 형태로 존재할 때 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 대조군(예를 들어, 아이소타입 대조군)에 비해서 약 10% 초과만큼 ADCC 효과를 유도한다(예를 들어, 약 10% 초과, 약 15% 초과, 약 20% 초과, 약 25% 초과, 약 30% 초과, 약 35% 초과, 약 40% 초과 등만큼 ADCC를 유도한다).

[0191] 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 종양 세포 성장 및/또는 증식을 저해할 수 있다. 일부 실시형태에서, 종양 세포 성장 및/또는 증식은 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드와 접촉하지 않은 상응하는 종양 세포에 비해(또는 아이소타입 대조군 항체와 접촉한 상응하는 종양 세포에 비해), 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드와 접촉할 때 적어도 약 5%(예를 들어, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 99%) 저해된다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 대상체에 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드가 투여될 때 대상체에서 종양 부피를 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 대상체에서 초기 종양 부피(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드의 투여 전)에 비해; 아이소타입 대조군 항체가 투여된 대상체에서 상응하는 종양과 비교할 때 대상체에서 종양 부피를 적어도 약 5%(예를 들어, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약

60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 99%) 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 하기 실시예 4에 기술되어 있는 방법을 통한, 종양 세포 성장/증식, 종양 부피, 및/또는 종양 저해를 모니터링하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0192] 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 암에 대한 치료 효과를 갖는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 암의 하나 이상의 증후 또는 증상을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 암을 앓고 있는 대상체는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드가 투여될 때, 일부 또는 완전히 완화된다.

[0193] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 항체는 활성 형태로 존재할 때 a) 서열번호 59의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 서열번호 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및/또는 b) 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체와 인간 CTLA4에 대한 결합에 대해서 경쟁하거나 교차-경쟁하는 단리된 활성화 가능한 항체를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 활성 형태로 존재할 때 a) 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 b) 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 인간 CTLA4에 대한 결합에 대해서 경쟁하거나 교차-경쟁하는 단리된 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드를 제공한다. 다른 항체와 결합하기 위해 경쟁적이거나 교차-경쟁적인 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드의 능력은 당업계에 공지된 표준 결합 검정, 예를 들어, BIAcore 분석, ELISA 검정, 또는 유세포 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, (예를 들어, 상기에 기재된 바와 같은) 항체는 포화 조건 하에서 인간 CTLA4에 결합하고, 이후에, CTLA4에 결합하는 시험 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(활성 형태로 존재할 때)의 능력을 측정할 수 있다. 시험 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드가 항체와 동시에 CTLA4에 결합할 수 있는 경우에, 시험 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 항체와 상이한 에피토프에 결합한다. 그러나, 시험 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드가 동시에 CTLA4에 결합할 수 없는 경우에, 시험 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 동일한 에피토프, 중첩 에피토프, 또는 항체에 의해 결합된 에피토프에 매우 인접하여 있는 에피토프에 결합한다. 이러한 실험은 다양한 방법, 예를 들어, ELISA, RIA, FACS 또는 표면 플라즈몬 공명을 이용하여 수행될 수 있다.

[0194] 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 (불활성 형태로 존재할 때) CTLA4와 이의 결합 파트너 중 하나 이상(예를 들어, 인간 CTLA4 및 인간 CD80, 인간 CTLA4 및 인간 CD86) 간의 결합을 저해하지 않는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 (활성 형태로 존재할 때) CTLA4와 이의 결합 파트너 중 하나 이상(예를 들어, 인간 CTLA4 및 인간 CD80, 인간 CTLA4 및 인간 CD86) 간의 결합을 저해한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 시험관내에서 CTLA4과 이의 리간드 간의 결합을 저해한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 CD80 및/또는 CD86에 대한 CTLA4의 결합을 저해하기 위한 약 500nM 또는 그 미만(예를 들어, 약 500nM 또는 그 미만, 약 400nM 또는 그 미만, 약 300nM 또는 그 미만, 약 200nM 또는 그 미만, 약 100nM 또는 그 미만, 약 50nM 또는 그 미만, 약 25nM 또는 그 미만, 약 10nM 또는 그 미만, 약 1nM 또는 그 미만 등)의 반수 최대 저해 농도(IC<sub>50</sub>)를 갖는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 CD80 및/또는 CD86에 대한 CTLA4의 결합을 저해하기 위한 약 100nM 또는 그 미만의 반수 최대 저해 농도(IC<sub>50</sub>)를 갖는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 약 100nM 이상(예를 들어, 약 100nM 또는 그 초과, 약 500nM 또는 그 초과, 약 1μM 또는 그 초과, 약 10μM 또는 그 초과 등)의 농도로 제공될 때 CD80 및/또는 CD86에 대한 인간CTLA4의 결합을 완전히 저해한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "완전히 저해하는" 또는 "완전히 저해하다"는 제1 단백질과 제2 단백질 간의 결합을 적어도 약 80%(예를 들어, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99% 등) 감소시키는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드의 능력을 지칭한다. 비제한적으로, BIAcore 분석, ELISA 검정, 및 유세포 분석을 포함하는, 제1 단백질(예를 들어, 인간 CTLA4) 및 제2 단백질(예를 들어, 인간 CD80 또는 인간 CD86)의 결합을 저해하는 폴리펩타이드의 능력을 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0195] *CD137를 표적으로 하는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드*

[0196] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 활성화 가능한 항-CD137 항체, 활성화 가능한 항-CD137 항체의 항원 결합 단편 및/또는 활성화 가능한 항-CD137 항체의 유도체를 비롯한, 인간 CD137에 결합하는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(즉, 활성화 가능한 항체)에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 (a) N-말단에서부터 C-말단으로, 차폐 모이어티(MM), 절단 가능한 모이어티(CM) 및 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드(여기서 MM은 하기 구조식 (I): X<sub>m</sub>CX<sub>n</sub>CZ<sub>o</sub>(서열번호 1)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이

루어진 군으로부터 선택된 아미노산이고, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임)에 따른 아미노산 서열을 포함하고; CM은 적어도 제1 절단 부위(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함하고; TBM은 항체 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함함); 및 (b) 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 (a) N-말단에서부터 C-말단으로, 차폐 모이어티(MM), 절단 가능한 모이어티(CM) 및 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드(여기서 MM은 하기 구조식 (I):  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이고, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임); CM은 적어도 제1 절단 부위(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함하고; TBM은 항체 경쇄 가변 영역 (VH)을 포함함); 및 (b) 항체 중쇄 가변 영역(VL)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 (a) N-말단에서부터 C-말단으로, 차폐 모이어티(MM), 절단 가능한 모이어티(CM) 및 표적 결합 모이어티(TBM)를 포함하는 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 MM은 하기 구조식 (I):  $X_mCX_nCZ_o$ (서열번호 1)(식 중, m은 2 내지 10이고, n은 3 내지 10이며, o는 1 내지 10이고, 각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이고, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임)에 따른 아미노산 서열을 포함하고; CM은 적어도 제1 절단 부위(예를 들어, 적어도 제1 프로테아제 절단 부위)를 포함하고; TBM은 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다. 일부 실시형태에서, m은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다. 일부 실시형태에서, n은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다. 일부 실시형태에서, o는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

[0197] 일부 실시형태에서, MM은 CM이 절단되지 않은 경우 인간 CD137에 대한 활성화 가능한 항체의 결합을 저해한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 항체는 CM이 절단될 때 인간 CD137에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, MM은 표 B에 열거된 바와 같은 서열번호 79 내지 85 및 88 내지 94로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0198] [표 B]

활성화 가능한 항체를 위한 차폐 펩타이드 서열

차폐 펩타이드 서열	서열번호
PTDLDACADAPNHCHF	서열번호 79
SSTHAHCHHSPANCIS	서열번호 80
DTDYDFCPILRHRCDS	서열번호 81
NDYNYHCKWRPSRCHN	서열번호 82
YHDYDDCRVLP RR CFN	서열번호 83
NNFASCLWRHRSCAD	서열번호 84
TDNYDYCPRLRRKCYH	서열번호 85
X <sub>m</sub> CADAPNHCXX	서열번호 88
X <sub>m</sub> CHHSPANCXX	서열번호 89
X <sub>m</sub> CPILRHRCXX	서열번호 90
X <sub>m</sub> CKWRPSRCXX	서열번호 91
X <sub>m</sub> CRVLP RR CX	서열번호 92
X <sub>m</sub> CLWRHRSCXX	서열번호 93
X <sub>m</sub> CPRLRRKCXX	서열번호 94

m은 2 내지 10이고, 각각의 x는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산임.

[0199]

[0200]

일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 HVR, 가변 영역(VL, VH) 및/또는 경쇄(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG4)의 특정 아미노산 서열과 관련하여 기술된 항체를 포함하는 본 명세서에 기재된 항-CD137 항체 중 임의의 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD137 항체는 인간 항체이다. 일부 실시형태에서, 항-CD137 항체는 인간화된 항체 및/또는 키메라 항체이다.

[0201]

일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 a) 아미노산 서열 FSLSTGGVGVGI(서열번호 65)를 포함하는 HVR-H1, 아미노산 서열 LALIDWADDKYSPSLKSRL(서열번호 66)을 포함하는 HVR-H2 및 아미노산 서열 ARGSDTVIGDWFAY(서열번호 67)를 포함하는 HVR-H3; 및/또는 b) 아미노산 서열 RASQSIGSYLA(서열번호 68)를 포함하는 HVR-L1, 아미노산 서열 DASNLETGV(서열번호 69)를 포함하는 HVR-L2 및 아미노산 서열 YCQQGYLWT(서열번호 70)를 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 a) 서열번호 49의 아미노산 서열 또는 서열번호 49와 적어도 90%(예를 들어, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 b) 서열번호 50의 아미노산 서열 또는 서열번호 50과 적어도 90%(예를 들어, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%)의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0202]

일부 실시형태에서, 본 개시내용은 활성 형태로 존재할 때 인간 CD137에 결합하지만, (예를 들어, 1종 이상의 프로테아제로) 절단 가능한 모이어티 내를 절단하기 전에는 불활성이고, 하기 기능성 특성 중 적어도 하나(예를 들어, 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개 또는 8개 모두)를 갖는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 (예를 들어, 1종 이상의 프로테아제로) 절단 가능한 모이어티 내의 절단 후에 활성임)에 관한 것이다: (a) 500nM 이하의 K<sub>0</sub>로 인간 CD137에 결합함; (b) 인간 CD137에 대해서 길항제 활성을 가짐; (c) 최대 1000nM의 농도에서 인간 OX40, CD40, GITR 및/또는 CD27 수용체에 결합하지 않음; (d) 원숭이, 마우스, 래트 및/또는 개 CD137과 교차 반응성이 아님; (e) ADCC 효과를 유도하지 않음; (f) 종양 세포 성장을 저해할 수 있음; (g) 암에 대한 치료 효과를

가짐; 그리고 (h) CD137와 CD137L 간의 결합을 저해함. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 또한 CD137과 이의 리간드 CD137L 간의 결합을 저해할 수 있고, 예를 들어, 완전히 저해할 수 있다. 또한 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 CD137-표적화 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드 및/또는 항-CD137 항체 중 하나 이상과 인간 CD137에 대한 결합에 대해서 교차-경쟁하는 하나 이상의 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드 항-CD137 항체 또는 항원-결합 단편이 제공된다.

[0203] 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(불활성 형태로 존재할 때) 약 500nM 이상의  $K_D$ 로 인간 CD137에 결합한다. 일부 실시형태에서, (활성 형태로 존재할 때) 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 약 500nM 또는 그 미만(예를 들어, 약 500nM 또는 그 미만, 약 400nM 또는 그 미만, 약 300nM 또는 그 미만, 약 200nM 또는 그 미만, 약 150nM 또는 그 미만, 약 100nM 또는 그 미만, 약 90nM 또는 그 미만, 약 80nM 또는 그 미만, 약 75nM 또는 그 미만, 약 70nM 또는 그 미만, 약 60nM 또는 그 미만, 약 50nM 또는 그 미만, 약 40nM 또는 그 미만, 약 30nM 또는 그 미만, 약 25nM 또는 그 미만, 약 20nM 또는 그 미만, 약 10nM 또는 그 미만, 약 1nM 또는 그 미만, 약 0.1nM 또는 그 미만 등)의  $K_D$ 로 인간 CD137에 결합한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 약 100nM 이하의  $K_D$ 로 인간 CD137에 결합한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 약 50nM 이하의  $K_D$ 로 인간 CD137에 결합한다. 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드의  $K_D$ 를 측정하는 방법은 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명, ELISA 등은 적정 열량측정법, 필터 결합 검정, EMSA 등을 포함하는, 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서,  $K_D$ 는 ELISA에 의해 측정된다(예를 들어, 하기 실시예 5 참조).

[0204] 일부 실시형태에서, (활성 형태로 존재할 때) 본 명세서에 기재된 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 인간 CD137에 대한 효능제 활성을 갖는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 인간 CD137을 발현시키는 세포(예를 들어, 인간 세포)가 (활성) 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드에 의해 접촉될 때 인간 CD137의 하나 이상(예를 들어, 하나 이상, 둘 이상, 셋 이상 등)의 활성을 유도한다. 다양한 CD137 활성은 당업계에 공지되어 있고, 비제한적으로, NF- $\kappa$ B-의존 전사의 유도, T 세포 증식의 유도, T 세포 생존의 연장, 활성화된 T 세포의 동시-자극, 사이토카인 분비(예를 들어, IL-2)의 유도, 및 단핵구 활성의 유도를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 CD137 활성은 이의 리간드에 대한 CD137 결합이 아니다. CD137 활성(예를 들어, NF- $\kappa$ B-의존 전사 및/또는 T 세포 증식의 유도 등)을 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 인간 CD137을 발현시키는 세포(예를 들어, 인간 세포)에서 NF- $\kappa$ B 의존 전사를 증가시킨다. 일부 실시형태에서, NF- $\kappa$ B 의존적 전사는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드와 접촉하지 않거나 또는 불활성 형태로 존재할 때 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드와 접촉한 상응하는 세포(예를 들어, 아이소타입 대조군 항체와 접촉한 상응하는 세포)에 비해서, (활성) 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드와 접촉된 CD137을 발현시키는 세포(예를 들어, 인간 세포)에서 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 또는 약 99% 이상 증가된다. 일부 실시형태에서, NF- $\kappa$ B 의존적 전사는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드와 접촉하지 않거나 또는 불활성 형태로 존재할 때 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드와 접촉한 상응하는 세포(예를 들어, 아이소타입 대조군 항체와 접촉한 상응하는 세포)에 비해서, (비활성 형태로 존재할 때) 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드와 접촉된 CD137을 발현시키는 세포(예를 들어, 인간 세포)에서 약 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 100배, 1000배 또는 그 초과만큼 증가된다.

[0205] 일부 실시형태에서, (비활성 형태로 존재할 때) 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 원숭이(예를 들어, 시노몰거스 원숭이), 마우스, 래트, 및/또는 개 CD137과 교차-반응성이 아니다. 일부 실시형태에서, (활성 형태로 존재할 때) 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 원숭이(예를 들어, 시노몰거스 원숭이), 마우스, 래트, 및/또는 개 CD137과 교차-반응성이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 원숭이 CD137과 교차-반응성이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 마우스 CD137과 교차-반응성이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 래트 CD137과 교차-반응성이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 개 CD137과 교차-반응성이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 원숭이 및 마우스 CD137; 원숭이 및 래트 CD137; 원숭이 및 개 CD137; 마우스 및 래트 CD137; 마우스 및 개 CD137; 래트 및 개 CD137; 원숭이, 마우스, 및 래트 CD137; 원숭이, 마우스, 및 개 CD137; 원숭이, 래트 및 개 CD137; 마우스, 래트 및 개 CD137; 또는 원숭이, 마우스, 래트 및 개 CD137과 교차 반응성이다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 약 100nM(예를 들어, 약 1nM, 약 10nM, 약 25nM, 약 50nM, 약 75nM, 약 100nM)에서 교차-반응성이다. 비제한적으로, 표면 플라즈몬 공명, ELISA 등은 적정 열량측정법, 필터 결합

검정, EMSA 등을 포함하는 교차-반응성을 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

- [0206] 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 ADCC 효과를 유도하지 못한다. ADCC 효과의 측정 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, (활성 형태 또는 비활성 형태로 존재할 때) 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 대조군에 비해 ADCC 효과를 약 10%를 초과하게 유도하지 못한다(ADCC를 약 10%를 초과하게, 약 5%를 초과하게, 약 1%를 초과하게, 약 0.1%를 초과하게, 약 0.01%를 초과하게 유도하지 못한다).
- [0207] 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 종양 세포 성장 및/또는 증식을 저해할 수 있다. 일부 실시형태에서, 종양 세포 성장 및/또는 증식은 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드와 접촉하지 않은 상응하는 종양 세포에 비해(또는 아이소타입 대조군 항체와 접촉한 상응하는 종양 세포에 비해), 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드와 접촉할 때 적어도 약 5%(예를 들어, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 99%) 저해된다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 대상체에 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드가 투여될 때 대상체에서 종양 부피를 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 대상체에서 초기 종양 부피(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드의 투여 전)에 비해; 아이소타입 대조군 항체가 투여된 대상체에서 상응하는 종양과 비교할 때 대상체에서 종양 부피를 적어도 약 5%(예를 들어, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 99%) 감소시킬 수 있다. 종양 세포 성장/증식, 종양 부피, 및/또는 종양 저해를 모니터링하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.
- [0208] 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 암에 대한 치료 효과를 갖는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 암의 하나 이상의 증후 또는 증상을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 암을 앓고 있는 대상체는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드가 투여될 때, 일부 또는 완전히 완화된 다.
- [0209] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 항체는 활성 형태로 존재할 때 a) 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 서열번호 67의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및/또는 b) 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; 서열번호 69의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 서열번호 70의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체와 인간 CD137에 대한 결합에 대해서 경쟁하거나 교차-경쟁하는 단리된 활성화 가능한 항체를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 활성 형태로 존재할 때 a) 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 b) 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 인간 CD137에 대한 결합에 대해서 경쟁하거나 교차-경쟁하는 단리된 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드를 제공한다. 다른 항체와 결합하기 위해 경쟁적이거나 교차-경쟁적인 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드의 능력은 당업계에 공지된 표준 결합 검정, 예를 들어, BIAcore 분석, ELISA 검정, 또는 유세포 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, (예를 들어, 상기에 기재된 바와 같은) 항체는 포화 조건 하에서 인간 CD137에 결합하고, 이후에, CD137에 결합하는 시험 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(활성 형태로 존재할 때)의 능력을 측정할 수 있다. 시험 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드가 항체와 동시에 CD137에 결합할 수 있는 경우에, 시험 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 항체와 상이한 에피토프에 결합한다. 그러나, 시험 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드가 동시에 CD137에 결합할 수 없는 경우에, 시험 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 동일한 에피토프, 중첩 에피토프, 또는 항체에 의해 결합된 에피토프에 매우 인접하여 있는 에피토프에 결합한다. 이러한 실험은 다양한 방법, 예를 들어, ELISA, RIA, FACS 또는 표면 플라즈몬 공명을 이용하여 수행될 수 있다.
- [0210] 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(비활성 형태로 존재할 때)는 CD137과 이의 리간드(예를 들어, 인간 CD137과 인간 CD137L) 간의 결합을 저해하지 않는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드(활성 형태로 존재할 때)는 CD137과 이의 리간드(예를 들어, 인간 CD137과 인간 CD137L) 간의 결합을 저해한다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 시험관내에서 CD137과 이의 리간드 간의 결합을 저해한다. 일부 실시형태에서, (활성 형태로 존재할 때) 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 리간드에 대한 CD137의 결합을 저해하기 위한 약 500nM 또는 그 미만(예를 들어, 약 500nM 또는 그 미만, 약 400nM 또는 그 미만, 약 300nM 또는 그 미만, 약 200nM 또는 그 미만, 약 100nM 또는 그 미만, 약 50nM 또는 그 미만, 약 25nM 또는 그 미만, 약 10nM 또는 그 미만, 약 1nM 또는 그 미만 등)의 반수 최대 저해 농도(IC<sub>50</sub>)를 갖는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 리간드에 대한 CD137의 결합을 저해하는 것에 대해서 약 100nM 이하의 반수 최대 저해 농도(IC<sub>50</sub>)를 갖는다. 일부 실시형태에서, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드는 약 100nM 이상(예를 들어, 약 100nM 또는 그 초과, 약 500nM 또는 그 초과, 약 1 μM 또는 그 초과, 약 10 μM

또는 그 초과 등)의 농도로 제공될 때 리간드에 대한 인간 CD137의 결합을 완전히 저해한다. 비제한적으로, BIAcore 분석, ELISA 검정, 및 유세포 분석을 포함하는, 제1 단백질(예를 들어, 인간 CD137) 및 제2 단백질(예를 들어, CD137L)의 결합을 저해하는 폴리펩타이드의 능력을 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0211] 항체

[0212] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, 상기에 기재된 CTLA4 또는 CD137 항체)를 포함하는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드에 관한 것이다. 본 명세서에 기술된 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)는 임의의 부류, 예를 들어, IgG, IgM, IgE, IgA, 또는 IgD에 속할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)는 IgG 부류, 예컨대, gG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 하위부류에 속한다. 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 하나의 부류 또는 하위부류에서 다른 부류 또는 하위부류로 전환될 수 있다. 목적하는 부류 또는 하위부류의 항체를 생성하는 예시적인 방법은 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)의 중쇄를 암호화하는 핵산 및 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)의 경쇄를 암호화하는 핵산을 단리시키는 단계, V<sub>H</sub> 영역을 암호화하는 서열을 단리시키는 단계, V<sub>H</sub> 서열을 목적하는 부류 또는 하위부류의 중쇄 불변 영역을 암호화하는 서열에 결합시키는 단계, 세포에서 경쇄 유전자 및 중쇄 작제물을 발현시키는 단계, 및 항체를 수집하는 단계를 포함한다.

[0213] 항원 결합 단편

[0214] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 항원-결합 단편(예를 들어, 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)의 항원 결합 단편)을 포함하는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드에 관한 것이다.

[0215] 항원-결합 단편은 본 명세서에 기재된 항체 중 임의의 것의 임의의 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원-결합 단편은, (1) 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)의 경쇄; (2) 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)의 중쇄; (3) 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)의 경쇄로부터의 가변 영역; (4) 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)의 중쇄로부터의 가변 영역; (5) 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)의 하나 이상의 HVR(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR); 또는 (6) 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)의 경쇄로부터의 3개의 HVR 및 중쇄로부터의 3개의 HVR의 아미노산 서열을 포함한다.

[0216] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 아미노산 서열 YSISSGYHWSWI(서열번호 59)를 포함하는 HVR-H1, 아미노산 서열 LARLDWDDDKYYSTSLKSRSL(서열번호 60)을 포함하는 HVR-H2 및 아미노산 서열 ARSYVYFDY(서열번호 61)를 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 아미노산 서열 RASQSVRGRFLA(서열번호 62)를 포함하는 HVR-L1, 아미노산 서열 DASNRATGI(서열번호 63)를 포함하는 HVR-L2 및 아미노산 서열 YCQQSSWPPT(서열번호 64)를 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 (인간 CTLA4에 결합하는) 항체의 항원-결합 단편을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 a) 서열번호 47의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 b) 서열번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0217] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 아미노산 서열 FSLSTGGVGVGI(서열번호 65)를 포함하는 HVR-H1, 아미노산 서열 LALIDWADDKYYSPSLKSRSL(서열번호 66)을 포함하는 HVR-H2 및 아미노산 서열 ARGSDTVIGDWFAY(서열번호 67)를 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 아미노산 서열 RASQSIGSYLA(서열번호 68)를 포함하는 HVR-L1, 아미노산 서열 DASNLETGV(서열번호 69)를 포함하는 HVR-L2 및 아미노산 서열 YCQQGYLWT(서열번호 70)를 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 (인간 CD137에 결합하는) 항체의 항원-결합 단편을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 a) 서열번호 49의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 b) 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0218] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)의 항원-결합 단편은 (i) V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> 및 C<sub>H1</sub> 도메인으로 이루어진 1가 단편인, Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 다이설파이드 브리지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인, F(ab')<sub>2</sub> 단편; (iii) V<sub>H</sub> 및 C<sub>H1</sub> 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 V<sub>L</sub> 및 V<sub>H</sub> 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) V<sub>H</sub> 도메인으로 이루어진, dAb 단편[Ward et al., (1989) Nature 341:544-546]; (vi) 단리된 CDR, 및 (vii) 항체의 V<sub>H</sub> 영역에 연결된 항체의 V<sub>L</sub> 영역을 포함하는 폴리펩타이드인 단일 쇄 항체(scFv)를 포함한다(예를 들어, 문헌[Bird et al., (1988) Science

242:423-426; Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883] 참조).

- [0219] 항체 유도체
- [0220] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)의 유도체를 포함하는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0221] 일부 실시형태에서, 항체 유도체는 모체 항체 아미노산 서열의 전체 분자 구조를 보존하면서, "모체 항체"의 아미노산 서열의 변형으로부터 유도된다. 프레임워크 영역, HVR 영역, 또는 불변 영역과 같은, 모체 항체 쇄의 임의의 영역의 아미노산 서열이 변형될 수 있다. 변형 타입은 모체 항체의 하나 이상의 아미노산의 치환, 삽입, 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0222] 일부 실시형태에서, 항체 유도체는 서열번호 47 내지 50 중 임의의 것에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 65%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한  $V_L$  또는  $V_H$  영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체 유도체는 서열번호 59 또는 65 중 임의의 것에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 65%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 HVR-H1 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체 유도체는 서열번호 60 또는 66 중 임의의 것에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 65%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 HVR-H2 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체 유도체는 서열번호 61 또는 67 중 임의의 것에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 65%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 HVR-H3 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체 유도체는 서열번호 62 또는 68 중 임의의 것에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 65%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 HVR-L1 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체 유도체는 서열번호 63 또는 69 중 임의의 것에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 65%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 HVR-L2 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체 유도체는 서열번호 64 또는 70 중 임의의 것에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 65%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 HVR-L3 아미노산 서열을 포함한다.
- [0223] 일부 특정 실시형태에서, 유도체는 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)의 아미노산 서열에 대한 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 보존적 또는 비-보존적 치환, 및/또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 첨가 및/또는 결실을 포함한다.
- [0224] 아미노산 치환은 보존적 치환 및 비-치환적 치환 둘 모두를 포함한다. 용어 "보존적 아미노산 치환"은 하나의 아미노산을 다른 아미노산으로의 대체를 의미하며, 여기서, 2개의 아미노산은 특정 물리화학적 성질, 예를 들어, 포함된 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성, 및/또는 양쪽성 특성의 유사성을 갖는다. 예를 들어, 치환은 통상적으로, 하기 군 각각 내에서 이루어질 수 있다: (a) 비극성(소수성) 아미노산, 예를 들어, 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판, 및 메티오닌; (b) 극성 중성 아미노산, 예를 들어, 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 및 글루타민; (c) 양으로 하전된 (염기성) 아미노산, 예를 들어, 아르기닌, 라이신, 및 히스티딘; 및 (d) 음으로 하전된 (산성) 아미노산, 예를 들어, 아스파르트산 및 글루탐산.
- [0225] 변형은 HVR, 프레임워크 영역, 또는 불변 영역을 포함하는, 항체의 아미노산 서열의 임의의 위치에서 이루어질 수 있다. 일 실시형태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 예시적인 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)의 예시적인 항체의  $V_H$  및  $V_L$  HVR 서열을 함유하는 항체 유도체를 제공하고, 예시적인 항체와는 상이한 프레임워크 서열을 함유한다. 이러한 프레임워크 서열은 공개 DNA 데이터베이스 또는 생식계열 항체 유전자 서열을 포함하는 공개된 참고문헌으로부터 얻어질 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자에 대한 생식계열 DNA 서열은 유전자은행 데이터베이스에서 또는 "VBase" 인간 생식계열 서열 데이터베이스에서 확인될 수 있다(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of

Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991); Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol.* 227:776-798 (1992); 및 Cox *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:827-836 (1994)). 항체 유도체를 구성하는데 사용될 수 있는 프레임워크 서열은 본 개시내용의 예시적인 항체에 의해 사용된 프레임워크 서열과 구조적으로 유사한 것을 포함한다. 예를 들어, 예시적인 항체의 HVR-H1, HVR-H2 및 HVR-H3 서열 및 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3 서열은 프레임워크 서열이 유도하는 생식계열 면역글로불린 유전자에서 확인되는 것과 동일한 서열을 갖는 프레임워크 영역 상에 이식될 수 있거나, HVR 서열은 생식계열 서열과 비교하여 하나 이상의 돌연변이를 함유하는 프레임워크 영역 상에 이식될 수 있다.

[0226] 일부 실시형태에서, 항체 유도체는 본 명세서에 기재된 예시적인 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)의 아미노산 서열을 포함하는 키메라 항체이다. 일례에서, 하나 이상의 예시적인 항체로부터의 하나 이상의 HVR은 마우스 또는 래트와 같은, 비-인간 동물로부터의 항체로부터의 HVR과 조합된다. 다른 예에서, 키메라 항체의 모든 HVR은 하나 이상의 예시적인 항체로부터 유도된다. 일부 특정 실시형태에서, 키메라 항체는 예시적인 항체의 중쇄 가변 영역으로부터의 1, 2 또는 3개의 HVR 및/또는 경쇄 가변 영역으로부터의 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다. 키메라 항체는 당업계에 공지된 보편적인 방법을 이용하여 생산될 수 있다.

[0227] 다른 변형 유형은  $V_H$  및/또는  $V_L$  채의 HVR 영역 내에서 아미노산 잔기를 돌연변이시키는 것이다. 부위-유도 돌연변이유발 또는 PCR-매개 돌연변이유발은 돌연변이(들)를 도입하기 위해 수행될 수 있으며, 항체 결합, 또는 고려되는 다른 기능적 성질에 대한 효과는 당업계에 공지된 시험관내 또는 생체내 검정에서 평가될 수 있다. 통상적으로, 보존적 치환이 도입된다. 돌연변이는 아미노산 첨가 및/또는 결실일 수 있다. 또한, 통상적으로, HVR 영역 내에 1, 2, 3, 4 또는 5개 이하의 잔기가 변경된다. 일부 실시형태에서, 항체 유도체는 중쇄 HVR 및/또는 경쇄 HVR에서 1, 2, 3, 또는 4개의 아미노산 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, 아미노산 치환은 항체에서 하나의 시스테인을 비제한적으로, 알라닌 또는 세린과 같은 다른 잔기로 변경시키는 것이다. 시스테인은 표준 시스테인 또는 비-표준 시스테인일 수 있다. 일 실시형태에서, 항체 유도체는 예시적인 항체의 아미노산 서열에 대해 중쇄 HVR 영역에서 1, 2, 3 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 갖는다.

[0228] 변경은 또한,  $V_H$  및/또는  $V_L$  영역 내에서 프레임워크 잔기에 이루어질 수 있다. 통상적으로, 이러한 프레임워크 변이체는 항체의 면역원성을 감소시키기 위해 제조된다. 하나의 방법은 하나 이상의 프레임워크 잔기를 상응하는 생식계열 서열로 "역 돌연변이"하는 것이다. 체세포 돌연변이를 겪은 항체는 항체가 유도되는 생식계열 서열과는 다른 프레임워크 잔기를 함유할 수 있다. 이러한 잔기는 항체 프레임워크 서열을 항체가 유도되는 생식계열 서열과 비교함으로써 구조식별될 수 있다. 프레임워크 영역 서열을 이의 생식계열 구성으로 되돌리기 위하여, 체세포 돌연변이는 예를 들어, 부위-유도 돌연변이유발 또는 PCR-매개 돌연변이유발에 의해 생식계열에 "역 돌연변이"될 수 있다.

[0229] 또한, 변형은 또한, 통상적으로, 항체의 하나 이상의 기능적 성질, 예를 들어, 혈청 반감기, 보체 결합 (complement fixation), Fc 수용체 결합, 및/또는 항원-의존 세포 세포독성을 변경시키기 위해, 예시적인 항체의 Fc 영역 내에서 이루어질 수 있다. 일례에서, CH1의 힌지 영역은 힌지 영역에서 시스테인 잔기의 수가 변경되도록, 예를 들어, 증가 또는 감소되도록 변경된다. 이러한 방법은 미국특허 제5,677,425호에 추가로 기술되어 있다. CH1의 힌지 영역에서 시스테인 잔기의 수는 예를 들어, 경쇄 및 중쇄의 어셈블리를 촉진시키거나 항체의 안정성을 증가 또는 감소시키기 위해 변경된다. 다른 경우에, 항체의 Fc 힌지 영역은 항체의 생물학적 반감기를 감소시키기 위해 돌연변이된다.

[0230] 또한, 본 개시내용의 항체는 당업계에 공지된 일상적인 실험에 따라 이의 잠재적인 글리코실화 부위 또는 패턴을 변경시키기 위해 변형될 수 있다. 다른 양상에서, 본 개시내용은 가변 영역에서 글리코실화의 패턴을 변화시키는 경쇄 또는 중쇄의 가변 영역에서 적어도 하나의 돌연변이를 함유하는 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)의 유도체를 제공한다. 이러한 항체 유도체는 항원을 결합시키기 위한 증가된 친화력 및/또는 변형된 특이성을 가질 수 있다. 돌연변이는 V 영역에서 신규한 글리코실화 부위를 추가할 수 있거나, 하나 이상의 V 영역 글리코실화 부위(들)의 위치를 변화시킬 수 있거나, 기존의 V 영역 글리코실화 부위를 제거할 수 있다. 일 실시형태에서, 본 개시내용은 중쇄 가변 영역에서 아스파라긴에 잠재적인 N-연결된 글리코실화 부위를 갖는 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)의 유도체를 제공하는데, 여기서, 하나의 중쇄 가변 영역에서 잠재적인 N-결합된 글리코실화 부위가 제거되어 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 개시내용은 중쇄 가변 영역에서 아스파라긴에 잠재적인 N-결합된 글리코실화 부위를 갖는 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, CTLA4 또는 CD137 항체)의 유도체를 제공하는데, 여기서, 두 중쇄 가변 영역 모두에서 잠재적인 N-결합된 글리코실화 부위가 제거되어 있다. 항체의 글리코실화 패턴을 변경시키는 방법, 예를 들어, 미국특허 제

6,933,368호에 기술된 방법이 당업계에 공지되어 있으며, 이러한 문헌의 개시는 본 명세서에 참조에 의해 포함된다.

[0231] 본 개시내용에 의해 제공된 다른 항체 유도체의 예는 단일 쇠 항체, 다이아바디, 도메인 항체, 나노바디, 및 유니바디를 포함한다. "단일 쇠 항체"(scFv)는  $V_H$  도메인에 연결된  $V_L$  도메인을 포함하는 단일 폴리펩타이드 쇠로 이루어지며, 여기서,  $V_L$  도메인 및  $V_H$  도메인은 쌍을 이루어 1가 분자를 형성한다. 단일 쇠 항체는 당업계에 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다(예를 들어, 문헌[Bird et al., (1988) Science 242:423-426 및 Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883] 참조). "다이아바디"는 2개의 쇠로 이루어지며, 각각의 쇠는 짧은 펩타이드 링커에 의해 연결된 동일한 폴리펩타이드 쇠 상에 경쇄 가변 영역에 연결된 중쇄 가변 영역을 포함하며, 동일한 쇠 상의 2개의 영역은 서로 쌍을 이루지 않고, 다른 쇠 상의 상보적 도메인과 쌍을 이루어 이중특이적 분자를 형성한다. 다이아바디를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Holliger P. et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 및 Poljak R. J. et al., (1994) Structure 2:1121-1123] 참조). 도메인 항체(dAb)는 항체의 중쇄 또는 경쇄 중 어느 하나의 가변 영역에 상응하는, 항체의 작은 기능성 결합 단위이다. 도메인 항체는 박테리아, 효모, 및 포유류 세포계에서 양호하게 발현된다. 도메인 항체 및 이의 생산 방법의 추가 세부사항은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 미국 특허 제 6,291,158호; 제6,582,915호; 제6,593,081호; 제6,172,197호; 제6,696,245호; 유럽특허 제0368684호 및 제 0616640호; 국제 특허 공개 W005/035572, W004/101790, W004/081026, W004/058821, W004/003019 및 W003/002609 참조). 나노바디는 항체의 중쇄로부터 유도된다. 나노바디는 통상적으로, 단일의 가변 도메인 및 2개의 불변 도메인(CH2 및 CH3)을 포함하고, 본래 항체의 항원-결합 용량을 보유한다. 나노바디는 당업계에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다(예를 들어, 미국특허 제6,765,087호, 미국특허 제6,838,254호, 국제 특허 공개 WO 06/079372 참조). 유니바디는 IgG4 항체의 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄로 이루어진다. 유니바디는 IgG4 항체의 힌지 영역의 제거에 의해 이루어질 수 있다. 유니바디 및 이를 제조하는 방법의 추가 세부사항은 국제 특허 공개 W02007/059782에서 확인될 수 있다.

[0232] **VII. 조성물**

[0233] 다른 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드) 중 하나 이상을 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드) 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다. 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0234] 용어 "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)의 전달을 위한 제형에서 사용하기에 적합한 임의의 비활성 물질을 지칭한다. 담체는 접착방지제, 결합제, 코팅, 봉해제, 충전제 또는 희석제, 보존제(예를 들어, 항산화제, 항박테리아제, 또는 항진균제), 감미제, 흡수 지연제, 습윤제, 에멀션화제, 완충제 등일 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용 가능한 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 텍스트로오스, 식물성 오일(예를 들어, 올리브유), 염수, 완충제, 완충된 염수, 및 등장제, 예를 들어, 당, 폴리알코올, 솔비톨 및 나트륨 클로라이드를 포함한다.

[0235] 조성물은 임의의 적합한 형태, 예를 들어, 액체, 반-고체 및 고체 투여 형태로 존재할 수 있다. 액체 투여 형태의 예는 용액(예를 들어, 주사 가능한 및 주입 가능한 용액), 마이크로에멀션, 리포솜, 분산액 또는 현탁액을 포함한다. 고체 투여 형태의 예는 정제, 환제, 캡슐, 마이크로캡슐 및 분말을 포함한다. 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)를 전달하기에 적합한 미립자 형태의 조성물에는 주사 또는 주입을 위한, 멸균 액체, 예를 들어, 용액, 현탁액, 또는 분산액이 있다. 멸균 용액은 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)를 적절한 담체 중에 목적하는 양으로 도입하고, 이후에 멸균 미세여과함으로써 제조될 수 있다. 분산액은 기본 분산 매질 및 다른 담체를 함유한 멸균 비히클 내에 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)를 도입함으로써 제조될 수 있다. 멸균 액체의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 제조 방법은 활성 성분 및 이의 종래 멸균-여과된 용액으로부터의 임의의 추가적인 목적하는 성분의 분말을 수득하기 위한 진공 건조 및 냉동-건조(동결건조)를 포함한다. 조성물의 다양한 투여 형태는 당업계에 공지된 통상적인 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0236] 조성물에 포함되는 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)의 상대적인 양은 다수의 인자, 예를 들어, 사용되는 특정 폴리펩타이드 및 담체, 투약 형태, 및 목적하는 방출 및 약력학 특징에 따라 달라질 것이다. 단일 투약 형태에서 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)의 양은 일반적으로, 치료 효과를 형성시키는 양이지만, 또한, 더 적은 양일 수 있다. 일반적으로, 이러한 양은 투여 형태의 전체 중

량에 대해 약 0.01% 내지 약 99%, 약 0.1% 내지 약 70%, 또는 약 1% 내지 약 30%의 범위일 것이다.

[0237] 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드) 이외에, 하나 이상의 추가적인 치료제는 조성물에 포함될 수 있다. 추가적인 치료제의 예는 본 명세서의 하기에 기술되어 있다. 조성물에 포함되는 추가적인 치료제의 적합한 양은 당업자에 의해 용이하게 선택될 수 있고, 다수의 인자, 예를 들어, 사용되는 특정 작용제 및 담체, 투여 형태, 및 목적하는 방출 및 약력학 특징에 따라 달라질 것이다. 단일 투여 형태에 포함되는 추가적인 치료제의 양은 일반적으로, 치료 효과를 생성시키는 작용제의 양일 수 있지만, 또한, 더 적은 양일 수 있다.

[0238] 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드) 및/또는 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물) 중 임의의 것은 의약(예를 들어, 암의 치료 또는 진행 지연을 필요로 하는 대상체에서 암을 치료 또는 이의 진행을 지연시키는데 사용하기 위한 의약)의 제조에서 사용될 수 있다.

[0239] **VIII. 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드 및 약제학적 조성물의 용도**

[0240] 본 개시내용에 의해 제공된 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드) 및 이의 약제학적 조성물은 치료, 진단 또는 다른 목적을 위해, 예를 들어, 면역 반응을 조절하거나, 암을 치료하거나, 다른 암 요법의 효능을 향상시키거나, 백신 효능을 향상시키거나, 자가면역 질환을 치료하기 위해 유용하다. 이에 따라, 다른 양태에서, 본 개시내용은 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드) 또는 이의 약제학적 조성물을 사용하는 방법을 제공한다. 일 양상에서, 본 개시내용은 포유동물에서 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 치료를 필요로 하는 포유동물에 유효량의 본 개시내용에 의해 제공된 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드) 또는 이의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 활성 형태로 존재할 때 CTLA4(예를 들어, 인간 CTLA4) 또는 CD137(예를 들어, 인간 CD137)에 결합하는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드이다. 일부 실시형태에서, 포유동물은 인간이다.

[0241] 일부 실시형태에서, 장애는 암이다. 다양한 암이 본 개시내용에 의해서 제공된 방법, 용도 또는 의약으로 치료 또는 예방될 수 있다. 이러한 암의 예는 폐암, 예를 들어, 기관지원성 암종(예를 들어, 편평상피 세포 암종, 소세포 암종, 대세포 암종, 및 선암), 폐포 세포 암종, 기관지 선종, 연골종 과오종(chondromatous hamartoma)(비암성), 및 육종(암성); 심장암, 예를 들어, 점액종, 섬유종, 및 횡문근종; 골암, 예를 들어, 골연골종, 콘드로마(condroma), 연골 모세포종(chondroblastoma), 연골점액유사 섬유종, 유골골종, 거대 세포 종양, 연골육종, 다발성 골수종, 골육종, 섬유육종, 악성 섬유조직구종(malignant fibrous histiocytoma), 유잉 종양(Ewing's tumor)(유잉 육종), 및 세망 세포 육종; 뇌암, 예를 들어, 신경교종(예를 들어, 다형성교아종(glioblastoma multiforme)), 역형성별 아교세포종, 성상 세포종, 희소돌기 아교세포종, 수모세포종, 척색종, 슈반세포종, 뇌질피복 세포종, 수막종, 뇌하수체샘종, 송과체종, 골종, 혈관모세포종, 두개인두종, 척색종, 배세포종, 기형종, 유피포낭, 및 혈관종; 소화계에서의 암, 예를 들어, 평활근종, 표피모양 암종, 선암, 평활근육종, 위 선암, 장지방종, 장 신경 섬유종, 장 섬유종, 대장에서 폴립, 및 대장암; 간암, 예를 들어, 간세포 선종, 혈관종, 간세포 암종, 섬유층판 암종, 담관암종, 간모세포종, 및 혈관육종; 신장암, 예를 들어, 신장 선암, 신장 세포 암종, 부신종, 및 신우의 이행 세포 암종; 및 혈액암, 예를 들어, 급성 림프구성(림프모구) 백혈병, 급성 골수성(골수구성, 골수성, 골수모구, 골수단핵구) 백혈병, 만성 림프구성 백혈병(예를 들어, 세자리 증후군(Szary syndrome) 및 모발 세포 백혈병), 만성 골수구성(골수성, 골수구성, 과립구) 백혈병, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, B 세포 림프종, 균상 식육종, 및 골수증식성 장애(골수증식성 장애, 예를 들어, 진성다혈구증, 골수 섬유증, 혈소판혈증 장애, 예를 들어, 진성다혈구증, 골수 섬유증, 혈소판혈증, 및 만성 골수성 백혈병을 포함함); 피부암, 예를 들어, 기저 세포 암종, 편평상피 세포 암종, 흑색종, 카포시 육종, 및 파제트병(Paget's disease); 두경부암; 안구-관련 암, 예를 들어, 망막아종 및 안구내 흑색암종; 수컷 생식계 암, 예를 들어, 양성 전립선 비대증, 전립선암, 및 고환암(예를 들어, 정상피종, 기형종, 배아 암종, 및 용모막 암종); 유방암; 암컷 생식계 암, 예를 들어, 자궁암(자궁내막 암종), 자궁경부암(자궁경부암종), 난소의 암(난소 암종), 음문암종, 질의 암종, 나팔관암, 및 포상기태(hydatidiform mole); 갑상선암(유두, 여포성, 역형성, 또는 수질 암을 포함함); 갑상선암(부신); 부갑상선의 비암성 성장; 췌장암; 및 혈액암, 예를 들어, 백혈병, 골수종, 비-호지킨 림프종, 및 호지킨 림프종을 포함한다.

[0242] 일 양상에서, 본 개시내용은 포유동물에서 면역 반응을 향상시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 포유동물에게 유효량의 본 개시내용에 의해 제공된 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드) 또는 이의 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 CTLA4(예를 들어, 인간 CTLA4) 또는 CD137(예를 들어, 인간 CD137)에 결합하는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드이며, 포유동물은 인간이다. 용어 "면역 반응을 향상시키는" 또는 이의 문법적 변형에는, 포유동물의 면역계의 임의의 반응을 자극, 유발, 증가,

개선 또는 증대시키는 것을 의미한다. 면역 반응은 세포 반응(즉, 세포-매개, 예를 들어, 세포독성 T 림프구 매개) 또는 호르몬 반응(즉, 항체 매개)일 수 있고, 1차 또는 2차 면역 반응일 수 있다. 면역 반응의 향상의 예는 PBMC 및/또는 T 세포의 활성화(하나 이상의 사이토카인, 예컨대, IL-2 및/또는 IFN $\gamma$ 의 분비 증가 포함)를 포함한다. 면역 반응의 향상은 세포독성 T 림프구 검정, 사이토카인의 방출, 종양의 퇴행, 종양을 지닌 동물의 생존, 항체 생성, 면역 세포 증식, 세포 표면 마커의 발현, 및 세포독성을 포함하지만, 이로 제한되지 않는, 당업자에게 공지된 다수의 시험관내 또는 생체내 측정을 이용하여 평가될 수 있다. 통상적으로, 본 개시내용의 방법은 치료되지 않은 포유동물 또는 언급된 방법을 이용하여 치료되지 않은 포유동물에 의한 면역 반응과 비교할 때 포유동물에 의한 면역 반응을 향상시킨다.

[0243] 치료 방법을 실시함에 있어서, 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)는 단독요법으로서 단독으로 투여되거나 하나 이상의 추가적인 치료제 또는 요법과 병용하여 투여될 수 있다. 이에 따라, 다른 양태에서, 본 개시내용은 별도, 순차적 또는 동시 투여를 위한 하나 이상의 추가적인 요법 또는 치료제와 병용하여 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)를 포함하는, 병용 요법을 제공한다. 용어 "추가적인 치료제"는 본 명세서에 의해서 제공된 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드) 이외의 임의의 치료제를 지칭할 수 있다. 하나의 특정 양상에서, 본 개시내용은 포유동물에게, 1종 이상의 추가적인 치료제와 병용하여 유효량의 본 개시내용에 의해 제공된 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)를 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 암을 치료하는 병용 요법을 제공한다. 추가 실시형태에서, 포유동물은 인간이다.

[0244] 매우 다양한 암 치료제는 본 개시내용에 의해 제공된 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)와 병용하여 사용될 수 있다. 당업자는 본 개시내용의 방법 및 폴리펩타이드와 병용하여 사용될 수 있는 다른 암 요법의 존재 및 개발을 인식하고, 본 명세서에 기술된 요법의 형태로 제한되지 않을 것이다. 암을 치료하기 위해 병용 요법에서 사용될 수 있는 추가적인 치료제의 카테고리의 예는 (1) 화학치료제, (2) 면역치료제, 및 (3) 호르몬 치료제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 추가 치료제는 바이러스 유전자 요법, 면역 관문 저해제, 표적 요법, 방사선 요법, 백신 요법 및/또는 화학치료제이다.

[0245] 용어 "화학치료제"는 암 세포의 사망을 유발시키거나, 암 세포의 성장, 분열, 복구, 및/또는 기능을 방해할 수 있는 화학적 또는 생물학적 물질을 지칭한다. 화학치료제의 예는 국제 특허 공개 WO 2006/129163 및 미국 특허 US 20060153808에 개시된 것을 포함하며, 이러한 문헌의 개시는 본 명세서에 참조에 의해 포함된다. 특정 화학치료제의 예는 (1) 알킬화제, 예를 들어, 클로람부실(LEUKERAN), 엠사이클로포스파마이드(CYTOXAN), 이포스파마이드(IFEX), 메클로레타민 하이드로클로라이드(MUSTARGEN), 티오테파(THIOPLEX), 스트렙토토신(ZANOSAR), 카르무스틴(BICNU, GLIADEL WAFER), 로무스틴(CEENU), 및 다카르바진(DTIC-DOME); (2) 세포독성 항생제를 포함하는, 알칼로이드 및 식물 병카 알칼로이드, 예를 들어, 독소루비신(ADRIAMYCIN), 에피루비신(ELLENC, PHARMORUBICIN), 다우노루비신(CERUBIDINE, DAUNOXOME), 네모루비신, 이다루비신(IDAMYCIN PFS, ZAVEDOS), 미톡산트론(DHAD, NOVANTRONE), 닥티노마이신(악티노마이신 D, COSMEGEN), 플리카마이신(MITHRACIN), 미토마이신(MUTAMYCIN), 및 블레오마이신(BLENOXANE), 비노렐빈 타르트레이트(NAVELBINE), 빈블라스틴(VELBAN), 빈크리스틴(ONCOVIN), 및 빈데신(ELDISINE); (3) 항대사성 물질, 예를 들어, 카페시타빈(XELODA), 시타라빈(CYTOSAR-U), 플루다라빈(FLUDARA), 겐시타빈(GEMZAR), 하이드록시우레아(HYDRA), 메토트렉세이트(FOLEX, MEXATE, TREXALL), 넬라라빈(ARRANON), 트리메트렉세이트(NEUTREXIN), 및 페메트렉세드(ALIMTA); (4) 퍼리미딘 길항제, 예를 들어, 5-플루오로우라실(5-FU); 카페시타빈(XELODA), 랄티트렉세드(TOMUDEX), 테가푸르-우라실(UFTORAL), 및 겐시타빈(GEMZAR); (5) 타산, 예를 들어, 도세탁셀(TAXOTERE), 파클리탁셀(탁솔); (6) 백금 약물, 예를 들어, 시스플라틴(PLATINOL) 및 카보플라틴(PARAPLATIN), 및 옥살리플라틴(ELOXATIN); (7) 토포이소머라아제 저해제, 예를 들어, 이리노테칸(CAMPTOSAR), 토포테칸(HYCAMTIN), 에토포사이드(ETOPOPHOS, VEPESSID, TOPOSAR), 및 테니포사이드(VUMON); (8) 에피토포도필로톡신(포도필로톡신 유도체), 예를 들어, 에토포사이드(ETOPOPHOS, VEPESSID, TOPOSAR); (9) 엽산 유도체, 예를 들어, 류코보린(웰COVORIN); (10) 니트로소우레아, 예를 들어, 카르무스틴(BICNU), 로무스틴(CeeNU); (11) 상피 성장 인자 수용체(EGFR), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 인슐린 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 수용체(IGFR), 간세포 성장 인자 수용체(HGFR), 및 혈소판-유도 성장 인자 수용체(PDGFR)를 포함하는 수용체 티로신 키나제의 저해제, 예를 들어, 게피티닙(IRESSA), 에를로티닙(TARCEVA), 보르테조미프(VELCADE), 이마티닙 메실레이트(GLEEVEC), 게네피티닙, 라파티닙, 소라페닙, 탈리도마이드, 수니티닙(SUTENT), 악시티닙, 리툭시맵(RITUXAN, MABTHERA), 트라스투주맵(HERCEPTIN), 세툭시맵(ERBITUX), 베바시주맵(AVASTIN), 및 라니비주맵(LUCENTIS), lym-1(ONCOLYM), WO2002/053596호에 개시된 인슐린-유사 성장 인자-1 수용체(IGF-1R)에 대한 항체; (12) 혈관형성 저해제, 예를 들어, 베바시주맵(AVASTIN), 수라민(GERMANIN), 안지오스타틴, SU5416, 탈리도마이드, 및 기질 금속단백질분해효소 저해제(예를 들어, 바티마

스타트 및 마리마스타트) 및 W02002055106호에 개시된 것; 및 (13) 트로테아솜 저해제, 예를 들어, 보르테조밌 (VELCADE)을 포함한다.

[0246] 용어 "면역치료제"는 포유동물의 면역 반응을 향상시킬 수 있는 화학적 또는 생물학적 물질을 지칭한다. 면역치료제의 예는 바실러스 칼메트-게랑(bacillus Calmette-Guerin; BCG); 사이토카인, 예를 들어, 인터페론; 백신, 예를 들어, MyVax 개인화된 면역요법, Onyvax-P, Oncophage, GRNVAC1, FavId, Provenge, GVAX, Lovaxin C, BiovaxID, GMXX, 및 NeuVax; 및 항체, 예를 들어, 알렘투주맵(CAMPATH), 베바시주맵(AVASTIN), 세특시맵(ERBITUX), 겐투주맵 오조가마이신(MYLOTARG), 이브리투모맵 티옥세탄(ZEVALIN), 파니투무맵(VECTIBIX), 리특시맵(RITUXAN, MABTHERA), 트라스투주맵(HERCEPTIN), 토시투모맵(BEXXAR), 이필리무맵(YERVOY) 트레렐리무맵, CAT-3888, OX40 수용체에 대한 효능제 항체(예를 들어, 국제 특허 공개 W02009/079335에 개시된 것), CD40 수용체에 대한 효능제 항체(예를 들어, 국제 특허 공개 W02003/040170에 개시된 것), 및 TLR-9 효능제(예를 들어, 국제 특허 공개 W02003/015711, W02004/016805, 및 W02009/022215에 개시된 것)를 포함한다.

[0247] 용어 "호르몬 치료제"는 호르몬의 생성을 저해하거나 제거하거나 암성 세포의 성장 및/또는 생존에 대한 호르몬의 효과를 저해하거나 대응하는 화학적 또는 생물학적 물질을 지칭한다. 본 명세서의 방법을 위해 적합한 이러한 작용제의 예는 US20070117809호에 개시된 것을 포함한다. 특정 호르몬 치료제의 예는 타목시펜(NOLVADEX), 토레미펜(Fareston), 폴베스트란트(FASLODEX), 아나스트로졸(ARIMIDEX), 엑세메스탄(AROMASIN), 레트로졸(FEMARA), 메게스트롤 아세테이트(MEGACE), 고세렐린(ZOLADEX), 및 류프롤라이드(LUPRON)를 포함한다. 본 개시내용의 결합 분자는 또한, 비-약물 호르몬 요법, 예를 들어, (1) 호르몬의 생성에서 참여하는 모든 장기 또는 샘 또는 이의 일부, 예를 들어, 난소, 고환, 부신, 및 뇌하수체를 제거하는 수술 방법, 및 (2) 환자의 장기 또는 샘이 표적화된 호르몬의 생성을 저해하거나 제거하기에 충분한 양으로 조사되는 방사선 치료와 병용하여 사용될 수 있다.

[0248] 일부 실시형태에서, 추가적인 치료제는 포말리스트, 레블리마이드, 레날리도마이드, 포말리도마이드, 탈리도마이드, DNA-알킬화 백금-함유 유도제, 시스플라틴, 5-플루오로우라실, 사이클로포스파마이드, 항-CD137 항체, 항-CTLA4 항체, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CD20 항체, 항-CD40 항체, 항-DR5 항체, 항-CD1d 항체, 항-TIM3 항체, 항-SLAMF7 항체, 항-KIR 수용체 항체, 항-OX40 항체, 항-HER2 항체, 항-ErbB-2 항체, 항-EGFR 항체, 세특시맵, 리특시맵, 트라스투주맵, 펌블리주맵, 방사선 요법, 단일 선량 방사선, 분할 방사선, 집중 방사선, 전체 장기 방사선, IL-12, IFN  $\alpha$ , GM-CSF, 키메라 항원 수용체, 입양 전달된 T 세포, 항암 백신, 및 암 용해 바이러스 중 1종 이상이다.

[0249] 암을 치료하기 위한 병용 요법은 또한, 종양을 제거하기 위해 수술과 결합 분자의 병용을 포함한다. 결합 분자는 수술 전, 동안, 또는 후에 포유동물에 투여될 수 있다.

[0250] 암을 치료하기 위한 병용 요법은 또한, 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)와, 방사선 요법, 예를 들어, 이온화(전자기) 방사선 요법(예를 들어, X-선 또는 감마선) 및 입자 빔 방사선 요법(예를 들어, 고 선형 에너지 방사선의 조합을 포함한다. 방사선원은 포유동물에 대해 외부에 있거나 내부에 있을 수 있다. 폴리펩타이드는 방사선 요법 전, 동안, 또는 후에 포유동물에 투여될 수 있다.

[0251] 본 개시내용에 의해 제공된 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드) 및 이의 조성물은 임의의 적합한 장 경로 또는 비경구 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 용어 "장 경로(enteral route)"의 투여는 위 장관의 임의의 부분을 통한 투여를 지칭한다. 장 경로의 예는 경구, 점막, 협측, 및 직장 경로, 또는 위내 경로를 포함한다. "비경구 경로"의 투여는 장 경로 이외의 투여 경로를 지칭한다. 비경구 투여 경로의 예는 정맥내, 근육내, 피부내, 복강내, 종양내, 방광내, 동맥내, 척추강내, 낭내, 안와내, 심장내, 기관경유, 관절내, 낭밑, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내, 피하, 또는 국소 투여를 포함한다. 본 개시내용의 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드) 및 조성물은 임의의 적합한 방법을 이용하여, 예를 들어, 경구 섭취, 비위관, 위절개관, 주사, 주입, 이식 가능한 펌프, 및 삼투 펌프에 의해 투여될 수 있다. 적합한 투여 경로 및 투여 방법은 사용되는 특정 폴리펩타이드, 목적하는 흡수율, 사용되는 특정 제형 또는 투여 형태, 치료되는 장애의 타입 또는 중증도, 특정 작용 부위, 및 환자의 병태와 같은 다수의 인자에 따라 달라질 수 있고, 당업자에 의해 용이하게 선택될 수 있다.

[0252] 결합 분자의 용어 "유효량"은 의도된 치료 목적을 위해 효과적인 양을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 면역 반응을 향상시키는 상황에서, "유효량"은 포유동물의 면역계의 임의의 반응을 자극, 유발, 증가, 개선, 또는 증대시키는데 효과적인 임의의 양일 수 있다. 질환을 치료하는 상황에서, "유효량"은 치료될 포유동물에서 임의의 목적하는 또는 유익한 효과를 야기시키기에 충분한 임의의 양이다. 상세하게, 암의 치료에서, 목적하는 또는 유익한

효과의 예는 암 세포의 추가 성장 또는 확산의 저해, 암 세포의 사멸, 암의 재발 저해, 암과 관련된 통증 감소, 또는 포유동물의 개선된 생존을 포함한다. 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)의 유효량은 약 0.001 내지 약 500mg/kg 또는 약 0.01 내지 약 100mg/포유동물의 체중 kg의 범위일 수 있다. 예를 들어, 이러한 양은 포유동물의 체중의 약 0.3mg/kg, 1mg/kg, 3mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg, 50mg/kg, 또는 100mg/kg일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)의 유효량은 약 0.01 내지 30mg/포유동물의 체중 kg의 범위이다. 일부 다른 실시형태에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)의 유효량은 약 0.05 내지 15mg/포유동물의 체중 kg의 범위이다. 투여되는 정밀한 투여량 수준은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있고, 치료될 장애의 타입, 및 중증도, 사용되는 특정 폴리펩타이드, 투여 경로, 투여 시간, 치료 기간, 이용되는 특정 추가 요법, 치료되는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강 및 종래 의학적 가족력, 및 의학 분야에서 널리 알려진 유사한 인자와 같은 다수의 인자에 의존적일 것이다.

[0253] 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드) 또는 이의 조성물은 다수 상황으로 투여될 수 있다. 단일 투여 간의 간격은 예를 들어, 매일, 매주, 매월, 3개월, 또는 매년이 될 수 있다. 예시적인 치료 요법은 주당 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 1개월에 1회, 3개월마다 1회 또는 3 내지 6개월마다 1회를 수반한다. 본 개시내용의 폴리펩타이드(예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드)에 대한 투여 요법은, 하기 투여 스케줄 중 하나를 이용하여, 정맥내 투여를 통해 1mg/kg 체중 또는 3mg/kg 체중을 포함한다: (i) 6주 투여 동안 4주마다, 이후, 3개월마다; (ii) 3주마다; (iii) 1회 3mg/kg 체중, 이후, 3주마다 1mg/kg 체중.

[0254] IX. 키트

[0255] 또 다른 양상에서, 본 명세서에는 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드의 라이브러리를 포함하는 키트가 제공된다. 일부 실시형태에서, 키트는 발현, 변형, 스크리닝 또는 예를 들어, 관심대상 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드를 식별하기 위해서 라이브러리를 달리 사용하는 것에 대한 설명서를 포함하는 패키지 삽입물을 추가로 포함한다 일부 실시형태에서, 키트는 예를 들어, 저장, 전달, 형질주입 또는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 합성 폴리뉴클레오타이드) 중 하나 이상을 사용하는 다른 것을 위해서 1종 이상의 완충제를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상을 저장하기 위한 하나 이상의 용기를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 예를 들어, 숙주 세포에 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상을 형질주입하기 위한, 하나 이상의 벡터를 추가로 포함한다.

[0256] 또 다른 양상에서, 본 명세서에는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드 및/또는 본 명세서에 기재된 조성물을 포함하는 키트가 제공된다. 일부 실시형태에서, 키트는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드 및/또는 조성물의 사용을 위한 설명서를 포함하는 포장 삽입물을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 예를 들어, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드 및/또는 조성물을 저장, 전달, 투여 또는 달리 사용하기 위한 1종 이상의 완충제를 추가로 포함한다 일부 실시형태에서, 키트는 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드 및/또는 조성물을 저장 또는 투여(예를 들어, 주사 등)하기 위한 하나 이상의 용기를 추가로 포함한다

[0257] 상기에 기재된 설명은 당업자가 본 개시내용을 실시하기에 충분하다고 간주된다. 하기 실시예는 단지 예시의 목적을 위해서 제공되며, 본 개시내용의 범주를 어떠한 방식으로든 제한하도록 의도되지 않는다. 실제로, 본 개시내용에 도시되고 기재된 것에 더하여 본 개시내용의 다양한 변형이 당업자에게 상기 설명으로부터 자명할 것이며, 첨부된 청구범위의 범주 내에 속한다.

[0258] 실시예

[0259] 실시예 1: 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드에 대한 자가-차단 펩타이드를 식별하는 방법

[0260] 상기에 기재된 바와 같이, 활성화 가능한 결합 폴리펩타이드를 위한 자가-차단 펩타이드를 식별하는 데 유용한 개선된 방법 및 생성물이 필요하다. 따라서, 본 명세서에는 양호한 개발 가능성을 갖는 차폐 모이어티의 효율적인 발견을 위해서 설계 및 실행된 새로운 시스템이 기재된다. 이 시스템에서, 표적 항체 단편, Fab(도 1) 또는 scFv(도 2)를 효모 표면 상에 먼저 디스플레이하였고, 항원에 대한 결합에서 기능성임을 확인하였다. 이어서 개선된 펩타이드 라이브러리를 직접 경쇄의 N-말단에 융합시켰고, 효모 표면 상에 융합 단백질을 디스플레이하는 효모 라이브러리를 작제하였다. 이어서 효모 라이브러리를 수 라운드의 FACS-기반 스크리닝에 적용하였고: 먼저 항원에 대해서 낮은 결합을 갖는 효모 클론을 농축시키고, 이어서 농축된 효모 클론을 프로테아제로 절단하여 N-말단 펩타이드를 제거하였고, 항원에 대해서 높은 결합을 갖는 클론을 선택하였다(도 1 및 도 2). 4 내지 5

라운드의 분류 후, 플라스미드를 이들 클론으로부터 추출하였고, 차폐 펩타이드 서열을 DNA 서열결정을 통해서 확인하였다.

[0261] 양호한 개발 가능성을 갖는 표적 항체에 대한 차폐 펩타이드를 식별하는 것을 강력하게 만드는 이러한 새로운 시스템으로 구축되는 몇몇 고유한 특징이 존재한다:

[0262] 1) 펩타이드 라이브러리는 임의의 외부 스캐폴드 단백질 대신에 표적 항체 단편의 N-말단에 직접 융합되었고, 차폐 펩타이드는 최종 생성물과 동일한 컨텍스트에서 발견되었다. 이것은 위양성(false positive) 펩타이드 서열로의 오염을 제거하였고, 하류 특징구명을 위한 작업의 양을 극적으로 감소시켰다.

[0263] 2) 프로테아제 절단-매개된 활성화 기전이 스크리닝 공정에 통합되었다. 이것은 발견된 펩타이드가 활성화 전에 항원 결합을 차폐하였을 뿐만 아니라, 프로테아제 절단 후에 항원 결합을 더 이상 차폐하지 않았다는 것을 보장하는 것이다. 이것은 임의의 활성화 가능한 항체에 대한 양호한 차폐 펩타이드로서 자격이 있다고 간주되는 전제조건이었다.

[0264] 3) 펩타이드 라이브러리의 개선된 설계가 사용되었다. 일반적으로 사용되는 무작위 펩타이드 라이브러리에 반해서, 한 쌍의 시스테인 잔기를 펩타이드 라이브러리의 고정된 위치에 도입하여, 디스플레이된 펩타이드가 구축된 입체구조를 갖는 것을 보장하였다. 구축된 펩타이드는 증가된 결합 친화도 및 특이성을 나타내는 경향이 있다는 것이 밝혀져 있다(Uchiyama *et al.* (2005) 99(5):448-56). 화학적으로 불안정한 잔기, 예컨대, M 및 W를 비롯한 20개 모두의 잔기를 암호화하는 널리 사용되는 NNK(또는 NNS) 코돈과 상반되게, NHC 코돈을 펩타이드 라이브러리의 일부 또는 전부에서 사용하였다. NHC 코돈은 12개의 아미노산 잔기(D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P)를 암호화하고, 제조 공정에 바람직하지 않은 잔기, 예컨대, 메티오닌, 트립토판 또는 시스테인을 포함하지 않는다. 또한, NHC 코돈의 사용은 또한 NNK(또는 NNS) 코돈에 비해서 이론적인 펩타이드 라이브러리 크기를 극적으로 감소시켰고, 따라서 훨씬 더 양호한 커버리지를 갖는 라이브러리의 작제를 가능하게 하였다. 이들 라이브러리는 상이한 표적 항체에 대해서 시험될 때 양호하게 수행되었다.

[0265] 실시예 2: 구축된 펩타이드 라이브러리(CPL)의 설계

[0266] 4개의 예시적인 구축된 펩타이드 라이브러리(CPL)를 설계하였다(표 1).

표 1

설계된 CPL

CPL 명칭:	아미노산 서열:	핵산 서열:
CPL010	EVGSY(Z6)C(Z6)C(Z2)SGRSA (서열번호 4)	gaggttggatcctac(NHC)6tgt(NHC)6tgc(NHC)2tca ggtcgttccgct (서열번호 8)
CPL011	EVGSY(Z6)C(X6)C(Z2)SGRSA (서열번호 5)	gaggttggatcctac(NHC)6tgt(NNK)6tgc(NHC)2tca ggtcgttccgct (서열번호 9)
CPL012	EVGSY(Z6)C(Z8)C(Z2)SGRSA (서열번호 6)	gaggttggatcctac(NHC)6tgt(NHC)8tgc(NHC)2tca ggtcgttccgct (서열번호 10)
CPL013	EVGSY(Z6)C(X8)C(Z2)SGRSA (서열번호 7)	gaggttggatcctac(NHC)6tgt(NNK)8tgc(NHC)2tca ggtcgttccgct (서열번호 11)

각각의 X는 독립적으로 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 및 Y 로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이며, 각각의 Z는 독립적으로 D, A, Y, S, T, N, I, L, F, V, H 및 P 로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산이다.

[0267]

[0268] 이의 중심은 서열 Z<sub>6</sub>CX<sub>6</sub>CZ<sub>2</sub>(서열번호 55) 또는 Z<sub>6</sub>CX<sub>8</sub>CZ<sub>2</sub>(서열번호 56)였고, 2개의 고정된 시스테인 잔기는 다이설파이드 결합을 형성하여 펩타이드 입체구조를 구축하였다. 합성된 올리고뉴클레오타이드에서, 축퇴 코돈 NHC 는 루프 내부를 제외하고는 모든 곳에서 채택되었고, 여기서 NNK 코돈은 또한 CPL011 및 CPL013에서 사용되었다. NNK 또는 NNS 코돈과 대조적으로, NHC 코돈은 상당한 다양성을 포함하지만, 화학적으로 불안정한 잔기인 메티오닌, 트립토판 및 시스테인이 없는 12개의 잔기를 암호화한다(표 2). 또한, NNK 또는 NNS 코돈에

비해 감소된 이론적 다양성이 더 양호한 커버리지를 갖는 라이브러리의 작제를 가능하게 하였다.

**표 2**

**NHC 코돈**

NHC:	AA C	AC C	AT C	TA C	TC C	TT C	GA C	GC C	GT C	CA C	CC C	CT C
아미노산 :	N	T	I	Y	S	F	D	A	V	H	P	L

[0269]

[0270]

이들 차폐 펩타이드 서열 이후에 2개의 프로테아제 인식 부위를 함유하는 불변 절단 펩타이드 서열 (SGRSAGGGG SPLGLAGSGGS, 서열번호 12)이 존재하였다: 프로테아제 유로키나제-유형 플라스미노겐 활성화제(uPA)의 경우 SGRSA(서열번호 13) 및 프로테아제 매트릭스 메탈로프로테이나제-2(MMP-2) 및 매트릭스 메탈로프로테이나제-9(MMP-9)의 경우 PLGLAG(서열번호 14). 표적화제의 생체내 종양 세포-특이적 활성화에서의 다수의 군에 의해서 이러한 인식 부위를 사용하였다(예를 들어, 문헌[Ke *et al.* (1997) *J Biol Chem* 272(33):20456-62; Gerspach *et al.* (2006) *Cancer Immunol Immunother* 55(12):1590-600; 및 Jiang *et al.* (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101(51):17867-72] 참조). 효모-기반 스크리닝 동안, 담배 식각 바이러스 프로테아제의 사용 가능성 및 특이성으로 인해서 MMP-9 인식 서열을 TEV 프로테아제 인식 서열(ENLYFQG, 서열번호 15)로 대체하였다.

[0271]

CPL 및 불변 절단 펩타이드를 효모 표면 디스플레이된 Aga2 단백질에 연결된, scFv 또는 Fab의 형태로 표적 항체의 경쇄의 N-말단에 융합시켰다. 대용 TEV 프로테아제 인식 부위는 올바른 유형의 차폐 펩타이드 서열을 인식하는데 중요하였고, 즉, 항원 결합은 프로테아제 절단 이전에 차단되고, 항원 결합은 프로테아제 절단 이후에 가능하다. 하기에 기재된 실시예는, 효모에 먼저 제시된 활성화 가능한 항체의 절단-활성화 기전이 포유동물 세포에서 발현되는 전체 IgG 분자에서 복제되었다는 것을 입증하였다.

[0272]

**실시예 3: CTLA4를 표적으로 하는 활성화 가능한 항체의 작제 및 검증**

[0273]

*효모 표면 상의 기능성 표적 항체의 디스플레이*

[0274]

낮은 카피 수(copy number)의 CEN/ARS-기반 벡터를 사용하여 효모 에스. 세레비시아에(*S. cerevisiae*)에서 유도성 GAL1-10 프로모터의 제어 하에서 표적 항체(항체 TY21580, 인간 CTLA4를 표적으로 함)를 발현시켰다. 이전에 공개된 배열과 유사한, GAL1 프로모터의 제어 하에서 C-말단에 융합된 Aga2 단백질을 통해서 scFv의 표면 디스플레이를 달성하였다(Boder and Wittrup (1997) *Nat Biotechnol* 15(6):553-7). Fab의 경우, GAL1 프로모터의 제어 하에서 중쇄(VH 및 CH1의 융합)의 N-말단에 융합된 Aga2 단백질을 통해서 표면 디스플레이를 달성하였고, 경쇄(VL 및 CL의 융합)는 GAL10 프로모터의 제어 하에 있었다. Fab을 막 고정된 중쇄와의 회합을 통해서 효모 표면 상에 디스플레이하였다.

[0275]

융합된 친화도 태그를 인식하는 항체로의 염색에 의해서 Fab 또는 scFv의 표면 디스플레이를 검증하였고, 효모 상에 디스플레이된 Fab 또는 scFv의 기능성을 바이오티닐화된 인간 CTLA4를 사용하여 시험하였다. 간략하면, 갈락토스 배지 중에서의 48시간 유도 후, 효모 세포( $1 \times 10^6$ )를 수거하고, PBSA 완충제로 1회 세척하고, 이어서 10nM의 바이오티닐화된 항원과 함께 1시간 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. 이어서 효모 세포를 PBSA 완충제로 2회 세척하고, PE 접합된 스트렙타비딘(1:500 희석)(이바이오사이언스사 #2-4317-87)과 함께 30분 동안 4°C에서 인큐베이션시켰다. 이어서 효모 세포를 유세포 분석법에 의해서 분석하였다. 도 3A 및 도 3B에 도시된 바와 같이, CTLA4를 표적으로 하는 Fab(도 3A) 및 scFv(도 3B) 둘 다는 효모 표면 상에 성공적으로 디스플레이되었고, 둘 다 항원에 강하게 결합할 수 있었다.

[0276]

*CPL을 함유하는 효모 라이브러리의 작제*

[0277]

CPL을 암호화하는 합성된 올리고뉴클레오타이드를 5회 주기의 PCR을 통해서 절단 펩타이드를 암호화하는 올리고뉴클레오타이드와 융합시켰다. 사용된 프라이머(F-프라이머 및 R-프라이머)는 표 3에 열거되어 있다. PCR 반응의 조성은 다음과 같았다:  $1 \times$  PrimeSTAR 완충제, 2.5mM dNTP, 각각 100mM의 F-프라이머 및 R-프라이머, 및 100mM의 각각의 주형 1(CPL 올리고뉴클레오타이드) 및 주형 2(절단 펩타이드를 암호화하는 올리고뉴클레오타이드) 및 2.5U의 PrimeSTAR HS DNA 폴리머라제. 사용된 PCR 프로그램은 다음과 같았다: a) 96°C에서 5분 동안의 1회 주기; 2) 96°C(15초), 60°C(15초), 72°C(6초)의 5회 주기; 및 3) 72°C에서 3분 동안 1회 주기. 엑소뉴클레아제 I을 사용하여 단일 가닥 DNA를 소화시킨 후, 겔 전기영동을 통해서 PCR 생성물을 정제시켰다. 이어서 정제

된 PCR 생성물을 BamHI 및 KpnI으로 소화시키고, 동일한 2개의 제한 효소로 소화된 박테리아 필터 벡터 내에 클로닝시켰다. 필터 벡터에서, CPL 및 절단 펩타이드는 박테리아 분비 신호 펩타이드의 하류에 그리고 신호 서열이 없는 베타-락타마제의 상류에 위치되었다. 압피실린 플레이트에서 선택된 기능성 베타-락타마제는 CPL 및 절단 펩타이드의 인-프레임 융합을 나타냄으로써 합성된 축퇴 올리고뉴클레오타이드에 도입된 프레임의 오류(N-1 또는 N-2)를 제거하였다. 또한 일부 불량하게 접힌 서열을 또한 풀로부터 감소시켰다. 걸찰 생성물을 전기-적격(electro-competent) 박테리아 세포로 형질 전환시키고, CPL 라이브러리의 다양성은 일반적으로  $5 \times 10^9$  내지  $1 \times 10^{10}$ 였다. 개별 클론의 서열결정은 이러한 접근법을 통해 매우 높은 인-프레임 비율(대부분의 경우 거의 100%)이 달성되었음을 나타내었다.

**표 3**

**PCR 프라이머**

프라이머 명칭:	서열:	서열번호
F-프라이머	Tcgggtgaggttgatcctac	51
R-프라이머	gtacaggttctcggtaccacc	52
PL0009_F	tggagacacagacaggatcactggagactgggtcagcaggatcggatcctgaaccgctgaac	53
BL1024_R	cttcgctgttttcaatatttctgtattgcttcagttttagcaggatccgaggttgatcctac	54

[0278]

[0279]

CPL을 함유하는 효모 라이브러리를 제조하기 위해서, 플라스미드를 박테리아 라이브러리로부터 추출하고, CPL 및 절단 펩타이드를 암호화하는 DNA 단편의 PCR 증폭을 위한 주형으로 사용하였다. 사용된 프라이머(PL0009\_F 및 BL1024\_R)는 표 3에 열거되어 있다. 증폭된 PCR 단편을 겔-전기영동을 통해 정제시키고, Aga2에 융합된 표적 항체를 발현하는 선형화된 플라스미드와 함께 전기 적격 효모 세포로 형질전환시켰다. PCR 단편 및 플라스미드의 양 단부 상의 상동성 서열은 효모 세포 내에서 효율적인 상동 재조합을 보장하였다. 작제된 효모 라이브러리의 다양성은 일반적으로  $1 \times 10^9$  내지  $2 \times 10^9$ 였다.

[0280]

*CTLA4 항체에 대한 차폐 펩타이드의 FACS-기반 스크리닝*

[0281]

CPL 효모 라이브러리로부터의 총  $1 \times 10^8$ 개의 효모 세포를 사용하여 표적 항체에 대항하는 차폐 펩타이드에 대해서 스크리닝하였다. MoFlo XDP를 통한 각각의 라운드의 분류를 위해서, 갈락토스 배지 중에서 유도된 효모 세포를 수거하고, PBSA 완충제로 1회 세척하고, 이어서 10nM(추후 라운드에서 1nM까지 감소됨)의 바이오티닐화된 항원과 함께 1시간 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. 이어서 효모 세포를 PBSA 완충제로 2회 세척하고, PE 접합된 스트렙타비딘(1:500 희석)(이바이오사이언스사 #2-4317-87)과 함께 30분 동안 4°C에서 인큐베이션시켰다. PBSA 완충제로 2회 더 세척한 후, 효모 세포를 2 내지 30D/ml로 조정하고, 분류에 적용하였다. 도 4에 도시된 바와 같이, 라운드 1에서, 10nM의 바이오티닐화된 CTLA4-Fc를 사용하였고, 약한 결합기를 농축시켰다. 글루코스 배지에서의 성장 후, 라운드 1로부터의 효모 세포를 갈락토스 배지에서 유도하고, 30°C에서 2시간 동안 AcTEV 프로테아제(6U/OD 세포)(써모피셔 사이언티픽사 #12575015)로 처리하고, 강력한 결합기를 정제시켰다. 제3 라운드의 분류로부터, 바이오티닐화된 CTLA4-Fc의 농도를 1nM까지 감소시켰고, 약한 결합기를 수집하였다. 제4 라운드에서, 효모 세포의 분류를 병렬로 AcTEV로 처리하여, 표적 항체의 프로테아제 절단 매개 활성화를 검증하였다. 도 4에 도시된 바와 같이, AcTEV 절단은 항원에 강하게 결합한 세포 집단의 극적인 증가를 야기한 것이 자명하였는데, 이는 스크리닝 전략이 효과적이었음을 시사한다. 제5 라운드의 분류로부터의 단일 클론을 선택적 배지에 플레이팅하고, 절단 매개된 활성화된 항원 결합의 추가 확인을 위해 개별적으로 성장시켰다.

[0282]

도 5A 및 도 5B에 도시된 바와 같이, scFv(도 5A) 또는 Fab(도 5B) 포맷의 선택된 CTLA4 활성화 가능한 항체 클론은 차폐 펩타이드의 존재 하에 항원에 대한 결합을 거의 나타내지 않았다. 그러나 차폐 펩타이드를 제거하기 위해 효모 세포를 TEV 프로테아제로 처리하는 경우 항원에 대한 결합이 극적으로 증가하였다. 선택된 클론을 검증하기 위한 TEV 프로테아제의 적용과 조합된, 절단 펩타이드 내의 TEV 인식 부위의 혼입은 차폐 펩타이드 선택의 성공률을 상당히 증가시켰다.

[0283]

차폐 펩타이드 서열을 식별하기 위해, 서플 플라스미드를 선택된 효모 클론(Generay # GK2002-200)에서 추출하고 적격 이.콜라이 세포로 형질전환시켰다. 플라스미드를 준비하고, 차폐 펩타이드를 암호화하는 영역을 서열결정하고 정렬하였다. 예상된 바와 같이, 이러한 서열은 몇몇 군으로 분리될 수 있으며, 이는 수 라운드의 분류를 통한 명확한 농축을 나타낸다. 불변 절단 펩타이드 서열과 함께, 4개의 군의 차폐 펩타이드 서열을 표 4에 열거

한다.

**표 4**

차폐 펩타이드 서열

샘플 ID:	펩타이드 명칭:	차폐 + 절단 펩타이드 서열:
TY22401	B13189	EVGSYNFVADSCPDHPYPCASGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 28)
TY22402	B13180	EVGSYIVHHSDCDAFYPCDSSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 30)
TY22403	B13192	EVGSYYSAYPACDSHYPCNSSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 32)
TY22404	B13197	EVGSYPNPSSDCVPYYACAYSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 34)

[0284]

[0285] IgG 변환 및 발현

[0286] 표 4에 열거된 4개 군의 차폐 펩타이드뿐만 아니라 잠재적인 글리코실화 부위를 제거하기 위한 이들로부터 유래된 추가적인 4개의 차폐 펩타이드 서열(표 5)(B13192 및 B13197)을 IgG1로 변환시켰다.

**표 5**

추가적인 차폐 펩타이드 서열

샘플 ID:	차폐 + 절단 펩타이드 서열:
TY22563	EVGSYYSAYPACDSHYPCQSSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 36)
TY22564	EVGSYYSAYPACDSHYPCNSAGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 37)
TY22565	EVGSYPQPSSDCVPYYACAYSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 38)
TY22566	EVGSYPNPASDCVPYYACAYSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 39)

[0287]

[0288] 중쇄 및 경쇄를 별개로 포유동물 발현 벡터 pCDNA3.3(써모 피셔 사이언티픽사, cat# K830001)에 클로닝하고, 차폐 펩타이드 및 불변 절단 펩타이드를 효모 표면 상에 디스플레이된 것과 동일한 방식으로 경쇄의 N-말단에 융합시켰다. 모델 CTLA4 항체(TY21580)에 대한 VH 및 VL 서열을 하기에 열거한다(또한 대리인 참조 번호 69540-2000540 하에 동시에 출원된 발명의 명칭이 "Compositions Comprising Cross-reactive Anti-CTLA4 Antibodies, and Methods of Making and Using the Same"인 PCT 국제 출원 참조, 전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함됨):

[0289] 항-CTLA4 중쇄 가변 영역(서열번호 47):

[0290] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSISSGYHWSWIRQAPGKLEWLARIDWDDDKYYSTSLKSRLTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARSYVYFDYWGQGTLVTVSS

[0291] 항-CTLA4 경쇄 가변 영역(서열번호 48):

[0292] DIQLTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSVRGRFLAWYQQKPKAPKLLIYDASNRTGIPSRFSGSGSGTDFLTLSLQPEDFATYYCQQSSSWPPTFGGQTKVEIKR.

[0293] 플라즈미드의 쌍을 HEK293F 세포에 일시적으로 형질주입하였다. 6일 후, 상청액을 수거하고, 원심분리 및 여과에 의해 제거하고, IgG를 표준 단백질 A 친화도 크로마토그래피(MabSelect SuRe, 지이 헬쓰케어사)로 정제시켰다. IgG를 용리시키고, 중화시키고, PB 완충제(20mM 인산나트륨, 150mM NaCl, pH 7.0)로 완충제 교체하였다. 단백질 농도를 UV-분광광도법에 의해 결정하고, IgG 순도를 SDS-PAGE 또는 SEC-HPLC에 의해 변성, 환원 및 비-환원 조건 하에서 분석하였다. 중요하게는, HEK293 세포에서 활성화 가능한 항체의 발현 수준이 모체 항체와 유사했으며, 단백질 A 수지 이후의 정제 수율도 유사한데, 이는 차폐 펩타이드 및 절단 펩타이드의 존재가 포유동물 세포에서 항체 발현에 부정적인 영향을 미치지 않음을 시사한다.

[0294] 차폐 효율의 측정

[0295] ForteBio Octet RED96 시스템(폴사, 미국 소재)을 사용하여 차폐 펩타이드의 효율을 신속하게 평가하였다. 간략하면, 활성화 가능한 항체(및 모체 항체, TY21580)를 KB 완충제(0.02% Tween 20 및 0.1% BSA가 보충된 PBS 완충제)에서 30 $\mu$ g/ml로 희석시키고, 항-인간 IgG 캡처(AHC) 바이오 센서(폴사(Pa11), 미국 소재)로 병렬로 포집하였다. 이어서, 센서를 His-태그 처리된 CTLA4 단백질(25nM)과 300초 동안 회합시키고, 이어서 KB 완충제에서 추가로 300초 동안 해리시켰다. 회합 및 해리 곡선을 제조업체의 가이드라인에 따라 ForteBio Data Analysis 7.1(폴사, 미국 소재)를 이용하여 1:1 Langmuir 결합 모델에 피팅하였다. 도 6A 내지 도 6B에 도시된 바와 같이, 활성화 가능한 항체로 달성된 반응은 모체 항체에 대한 반응보다 현저히 낮았는데, 이는 차폐 펩타이드가 항체의 항원 결합을 효과적으로 차단했음을 시사한다. 그러나, 4개의 활성화 가능한 항체 중에서 TY22401은 덜 효과적이었는데, 이는 하기에 논의된 ELISA 검정 결과와 일치하였다.

[0296] 제조합 인간 CTLA4-Fc를 PBS에서 1 $\mu$ g/ml로 희석시키고, Maxisorp 플레이트 상에 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 코팅하였다. 플레이트를 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 3% 탈지유가 보충된 PBS로 차단시켰다. 세척 후, 항체의 3배 연속 희석물 100 m을 각각의 웰에 첨가하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 인큐베이션시킨 후, 플레이트를 4회 세척하고 100 $\mu$ l의 HRP 결합된 항-인간 IgG(Fab 특이적)(1:6000 희석)를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 인큐베이션시키고, 4회 세척하고, 이어서 50 $\mu$ l의 TMB 기질 용액을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 실온에서 인큐베이션시켰다. 450nm에서의 흡광도는 웰당 50 $\mu$ l H2SO4로 반응을 중단시킨 후 측정되었다. EC<sub>50</sub>은 GraphPad Prism 6 소프트웨어의 비대칭 S자형(5-파라미터 로지스틱 방정식) 모델을 사용하여 ELISA 데이터를 피팅시킴으로써 평가하였다. 활성화 가능한 항체 TY22401, TY22402 및 TY22404에 대한 실험을 두 번 수행하여 이러한 활성화 가능한 항체 각각에 대해 두 개의 계산된 차폐 효율성을 얻었다. 활성화 가능한 항체의 결합에 대한 EC<sub>50</sub>을 모체 항체(TY21580)의 EC<sub>50</sub>으로 나누어 각각의 활성화 가능한 항체에 대한 차폐 효율성을 계산하였다. 도 7A 내지 도 7C 및 표 6에 제시된 바와 같이, 모체 항체와 비교하여, 활성화 가능한 항체 모두는 항원에 대한 결합을 극적으로 감소시켰고, 계산된 차폐 효율은 48 내지 2213 범위였다. 차폐 효율의 차이는 EC<sub>50</sub> 값에 대한 측정 및 데이터 피팅의 변화로 인한 것 같고, 각각의 활성화 가능한 항체에 대한 차폐 효율은 계산된 범위 내에 있을 것이다(예를 들어, 활성화 가능한 항체 TY22402에 대한 차폐 효율은 377 내지 2213임). 이러한 결과는 CPL로부터 식별된 다중 차폐 펩타이드가 포유동물 세포에서 발현될 때 전체 IgG 분자의 부분으로서 차폐 효율을 유지하였다는 것을 나타내었다.

표 6

프로테아제 절단 이전의 활성화 가능한 항체 ELISA

샘플 ID:	LogEC <sub>50</sub> :	EC <sub>50</sub>			차폐 효율:
		M:	nM:	R <sup>2</sup> :	
데이터 배치 1					
TY21580	-9.665	2.161E-10	0.216	0.999	1.0
TY22401	-7.623	2.382E-08	23.82	0.997	110
TY22402	-6.321	4.779E-07	477.9	0.997	2213
TY22404	-6.749	178.4E-07	178.4	0.998	826
데이터 배치 2					
TY21580	-9.478	3.324E-10	0.3324	0.998	1.0
TY22401	-7.800	1.586E-08	15.86	0.994	48
TY22402	-6.902	1.254E-07	125.4	0.998	377
TY22404	-6.892	1.281E-07	128.1	0.998	385
TY21580	-9.48	3.3E-10	0.33		1.0
TY22563	-7.32	4.771E-08	47.71		143.5
TY22564	-7.41	3.898E-08	38.98		117.3
TY22565	-6.68	2.099E-07	209.9		631.5
TY22566	-6.79	1.6264E-07	162.6		489.2

[0297]

[0298] 차폐 펩타이드의 제거는 항체 활성을 회복시킨다.

[0299] 정제된 활성화 가능한 항체를 절단 서열을 인식하는 프로테아제로 처리한 다음, 이를 시험하여 차폐 펩타이드의 제거가 그의 활성을 회복시키는지의 여부를 결정하였다. 예를 들어, 20 $\mu$ g의 TY22404(0.5mg/ml)를 반응 완충제(50mM Tris-HCl, 0.01% Tween 20, pH 8.5) 중의 1 $\mu$ g의 재조합 인간 uPA(아크로바이오시스템즈사(Acrobiosystems), # PLU-H5229)로 처리하거나; 또는 TY22404를 반응 완충제(50mM Tris, 150mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 20  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, pH 7.5) 중의 5 또는 10단위의 재조합 인간 MMP-9(바이오비전사(BioVision), # 7867-500)로 처리하였다. 반응을 37 $^{\circ}$ C에서 21시간 동안 수행하였다. SDS-PAGE 분석에 의해서 차폐 펩타이드가 경쇄에서 제거되었음을 확인하였다(도 8A). 이어서, 차폐 효율을 상기에 기재된 바와 같이 ELISA로 측정하였다. 도 8B 및 표 7에 제시된 바와 같이, 차폐 펩타이드 제거 후, 활성화 가능한 항체는 항원에 대한 결합에서 모체 항체와 구별할 수 없게 되었다.

표 7

프로테아제 절단 후 활성화 가능한 항체 ELISA

샘플 ID:	LogEC <sub>50</sub> :	EC <sub>50</sub>	
		nM:	차폐 효율:
TY21580	-9.35	0.447	1.0
TY22404	-7.01	96.8	216
TY22404-uPA	-9.40	0.402	0.9
TY22404-MMP-9	-9.39	0.412	0.9

[0300]

[0301] 활성화 가능한 항체 개발 가능성 프로파일

[0302] 제조 목적을 위해, 발견된 활성화 가능한 항체가 우수한 개발성 프로파일을 갖는 것이 중요하다. 포유동물 세포에서 발현된 정제된 활성화 가능한 항체를 사용하여 몇몇 다른 시험을 수행하였다. 활성화 가능한 항체를 20mM 히스티딘, pH 5.5에서 1mg/ml로 조정하고, Waters 2996 UV 검출기 및 TSKgel g3000 SWXL 칼럼(300mm X 7.8mm)(토소 바이오사이언스사)이 장치된 Waters 2695를 사용하여 분석용 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 항체 품질 분석을 수행하였다. 각각의 검정의 경우, 10 $\mu$ g의 항체를 주입하고, 완충제(pH 7.0에서 200mM 인산나트륨)에서 0.5ml/분의 유량으로 분별을 수행하였다.

[0303] 3개의 가속 스트레스 시험을 수행하였다: 활성화 가능한 항체를 50 $^{\circ}$ C에서 7 일 동안 인큐베이션시킴, 활성화 가능한 항체를 40 $^{\circ}$ C에서 28일 동안 인큐베이션시킴, 6회 주기의 동결-해동을 수행함. 동결-해동 시험은 100 $\mu$ l의 샘플(20mM 히스티딘 중의 1mg/ml, pH 5.5)을 -80 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 동결시키고, 그 다음 실온에서 60분 동안 해동시킴으로써 수행하였다. 도 9A 내지 도 9C에 도시된 바와 같이, 모든 활성화 가능한 항체는 안정적으로 유지되었으며, 50 $^{\circ}$ C에서 7일 동안 또는 40 $^{\circ}$ C에서 28일 동안 저장한 후 거의 응집을 나타내지 않았다. 6회 주기의 동결-해동 후, 약간의 약화를 나타내었지만; 주 단량체 피크는 약 95%로 유지되었는데, 이는 이러한 활성화 가능한 항체가 이러한 가속 스트레스 시험에서 매우 안정적임을 나타낸다. 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, 활성화 가능한 항체가 아직 광범위한 완충제 최적화 과정을 경험하지 않았기 때문에, 활성화 가능한 항체의 안정성은 최적화된 완충제 및 부형제를 사용하여 추가로 개선될 수 있다는 점에 주목할 가치가 있다.

[0304] 다음으로, 활성화 가능한 항체를 20mM 히스티딘, pH 5.5에서 150mg/ml을 초과하게 농축시켰다(표 8). 활성화 가능한 항체 침전은 관찰되지 않았고, 샘플의 점도는 상당히 관리 가능하였다. 농축된 활성화 가능한 항체를 고분자량(HMW) 중의 분석을 위해 20mg/ml 또는 1mg/ml로 희석시켰다. 도 10 및 표 8에 제시된 바와 같이, HMW 중의 명백한 증가는 관찰되지 않았는데, 이는 이러한 활성화 가능한 항체가 시험된 완충제에서 매우 가용성이고, 높은 농도까지 안정적이라는 것을 시사한다.

표 8

활성화 가능한 항체의 농도 >150 mg/mL

샘플 ID:	출발 농도(mg/mL):	고 농도 (mg/mL):
TY22401	10.9	187.2
TY22402	8.4	160.0

[0305]

- [0306] 낮은 pH에서 활성화 가능한 항체의 안정성을 연구하기 위해, 정제된 활성화 가능한 항체(20mM 히스티딘 중의 10 mg/ml, pH 5.5)를 시트르산으로 1mg/ml로 적정하고, pH를 3.7로 조정하고, 실온에서 30분 및 60분 동안 유지시켰다. 그 후, 샘플을 1M Tris-염기로 pH 7.0까지 중화시켰다. 활성화 가능한 항체의 차폐 효율은 상기에 기재된 바와 같이 ForteBio로 측정하였다. 도 11에 도시된 바와 같이, 차폐 효율은 30분 또는 60분 동안 낮은 pH 인큐베이션 후에도 변하지 않고 유지되었는데, 이는 차폐 펩타이드가 낮은 pH 인큐베이션 후에도 차단 효능을 유지했음을 시사한다.
- [0307] 종합하면, 데이터는 발견된 활성화 가능한 항체가 다양한 스트레스 조건 하에서 안정적으로 유지되었고, 따라서 우수한 개발 가능성 프로파일을 가짐을 나타낸다.
- [0308] **실시예 4: CTLA4를 표적으로 하는 활성화 가능한 항체의 시험관내 및 생체내 특징규명**
- [0309] 이전에 모체 항체 TY21580 단독은 인간 T 세포 활성화 또는 인간 PBMC 세포의 활성화를 자극하지 않는다는 것이 밝혀져 있다(대리인 참조 번호 69540-2000540 하에 동시에 출원된 발명의 명칭이 "Compositions Comprising Cross-reactive Anti-CTLA4 Antibodies, and Methods of Making and Using the Same"인 PCT 국제 출원 참조, 전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함됨). T 세포에 대한 CTLA-4 활성화는 B7-CD28/CTLA-4를 포함하는 첫 번째 (TCR/CD3) 및 두 번째 신호와 관련이 있는 것으로 공지되어 있다. 일관되게, 낮은 농도의 항-CD3과 함께, 모체 항체 TY21580은 인간 PBMC 세포 활성화를 상당히 향상시켰다는 것을 발견하였다.
- [0310] *시험관내 기능성 특징규명*
- [0311] 여기서 CTLA4를 표적으로 하는 활성화 가능한 항체의 활성화는 인간 PMBC 활성화에 대한 낮은 농도의 항-CD3 항체의 존재 하에 평가하였다. 인간 PBMC를 Histopaque-1077(시그마사)을 사용하여 밀도 구배 원심분리에 의해서 건 강한 공여자(#44)의 혈액으로부터 새로 분리시켰다. 항-CD3(OKT-3) 항체를 밤새 4°C에서 96웰 플레이트 상에 코팅하였다. 세척 후,  $1 \times 10^5$ 개의 새로운 분리된 인간 PBMC를 각각의 웰에 첨가하고, 그 다음 상이한 농도로 시험품을 첨가하였다. 인간 IL-2 ELISA Ready-SET-Go(인비트로젠사) 키트를 사용한 자극 후에 48시간에 IL-2의 유도를 측정하였다. 인간 IFN  $\gamma$  ELISA Ready-SET-Go(인비트로젠사) 키트를 사용하여 상정액 중의 IFN  $\gamma$ 를 측정하였다. 도 12A 및 도 12B에서 입증된 바와 같이, 고농도에서 TY22404는 IL-2 생산을 유도하고, TY22401은 IFN- $\gamma$  생산을 유도하였다. 그럼에도 불구하고, 활성화 가능한 항체의 활성화는 모체 TY21580 항체의 활성화보다 현저히 낮았다.
- [0312] 다음으로, 활성화 가능한 항체의 항체 의존성 세포 독성 활성을 시험하여 모체 항체 TY21580과 비교하였다. 활성화 가능한 항체의 ADCC 활성을 평가하기 위해 ADCC 리포터 유전자 검정을 사용하였다. 인간 CTLA4를 과발현하는 HEK293F 세포(HEK293F/hCTLA-4 세포)를 표적 세포로 사용하였고; CD16a 및 NFAT-Luc(주카트(Jurkat)/CD16a 세포)을 과발현하는 주카트 세포주를 효과기 세포로 사용하였다.  $1 \times 10^5$  개의 주카트/CD16a 세포 및  $1 \times 10^4$ 개의 HEK293F/hCTLA-4 세포(E:T 비 10:1)를 상이한 농도의 항체와 혼합하였다. 6시간 동안 인큐베이션시킨 후 100  $\mu$ l의 One-Glo 시약을 세포에 첨가하고, 세포를 10분 동안 용해시켰다. SpectraMax i3x 플레이트 판독기를 사용한 발광 측정을 위해 상정액을 제거하였다. 도 13에 도시된 바와 같이, 활성화 가능한 항체는 모체 항체 TY21580보다 수 log 더 낮은 ADCC 활성을 나타냈다. TY22401의 ADCC 활성은 TY22402 및 TY22404보다 높았다. 종합하면, 시험관내 데이터는 더 양호하게 차폐된 활성화 가능한 항체가 더 낮은 ADCC 활성을 가짐을 나타낸다.
- [0313] 다음으로 활성화 가능한 항체의 항-종양 활성을 평가하였고, MC38 결장직장 종양 모델, CT26 결장직장 종양 모델, H22 간 종양 모델 및 3LL 폐 종양 모델을 비롯한, 다수의 동계 마우스 종양 모델에서 모체 항체 TY21580의 항-종양 활성과 비교하였다.
- [0314] *MC38 결장직장 종양 모델에서의 항-종양 효능*
- [0315] C57BL/6 마우스(군당 n=8개, 암컷, 6 내지 8주령)에게 MC38(NTCC-MC38) 무린 대장암 세포를 피하로 접종하였다. 종양이 확립되었을 때(70mm<sup>3</sup>), 주 2회, 복강내 주사에 의해 아이소타입 대조군 항체, 모체 항체 TY21580 또는 3개의 활성화 가능한 항체 중 하나로 치료를 시작하였다. 종양 성장을 주 2회 모니터링하고, 시간에 따른 평균 종양 부피  $\pm$  s.e.m.(도 14A) 및 개별 종양 성장 곡선(도 14B)을 평가하였다. 도 14A 및 도 14B에 도시된 바와 같이, 3개의 모든 활성화 가능한 항체는 MC38 동계 마우스 종양 모델에서 모체 항체 TY21580과 대등한 강력한 항-종양 활성을 나타내었다.
- [0316] *CT26 결장직장 종양 모델에서의 항-종양 효능*
- [0317] BALB/c 마우스(군당 n=8마리, 암컷, 7 내지 8주령)에게 CT26(상해 생물과학 연구소) 무린 대장암 세포를 피하로

접종하였다. 종양이 확립되었을 때(100mm<sup>3</sup>), 주 2회, 복강내 주사에 의해 5mg/kg의 아이소타입 대조군 항체, 모체 항체 TY21580 또는 3개의 활성화 가능한 항체 중 하나로 치료를 시작하였다. 종양 성장을 1주일에 2회 모니터링하고, 시간에 따른 평균 종양 부피±s.e.m.으로서 보고하였다. 도 15에 도시된 바와 같이, 3개의 모든 활성화 가능한 항체는 CT26 동계 마우스 종양 모델에서 모체 항체 TY21580과 대등한 강력한 항-종양 활성을 나타내었다.

[0318] H22 간 종양 모델에서의 항-종양 효능

[0319] BALB/c 마우스(군당 n=8마리, 암컷, 7 내지 8주령)에게 H22(중국 미생물 보존 센터) 무린 간 세포를 피하로 접종하였다. 종양이 확립되었을 때(100mm<sup>3</sup>), 주 2회, 복강내 주사에 의해 5mg/kg의 아이소타입 대조군 항체, 모체 항체 TY21580 또는 3개의 활성화 가능한 항체 중 하나로 치료를 시작하였다. 종양 성장을 1주일에 2회 모니터링하고, 시간에 따른 평균 종양 부피±s.e.m.으로서 보고하였다. 도 16에 도시된 바와 같이, 3개의 모든 활성화 가능한 항체는 H22 동계 마우스 종양 모델에서 모체 항체 TY21580과 대등한 강력한 항-종양 활성을 나타내었다.

[0320] 3LL 폐암 모델에서 항-종양 효능

[0321] C57BL/6 마우스(군당 n=10마리, 암컷, 6 내지 8주령)에 3LL(JCRB) 무린 폐암 세포를 피하로 접종하였다. 종양이 확립되었을 때(75mm<sup>3</sup>), 주 2회, 복강내 주사에 의해 아이소타입 대조군 항체, 모체 항체 TY21580 또는 3개의 활성화 가능한 항체 중 하나로 치료를 시작하였다. 종양 성장을 주 2회 모니터링하고, 시간에 따른 평균 종양 부피±s.e.m.(도 17A) 및 개별 종양 성장 곡선(도 17B)을 평가하였다. 도 17A 및 도 17B에 도시된 바와 같이, 3개의 모든 활성화 가능한 항체는 3LL 동계 마우스 종양 모델에서 모체 항체 TY21580과 대등한 강력한 항-종양 활성을 나타내었다.

[0322] 약동학 분석

[0323] 약동학 연구를 약 8주령의 BALB/c 암컷 마우스에서 수행하였다. 군당 3마리의 마우스에게 10mg/kg의 시험품을 복강내로 주사하였다. 혈액 샘플(샘플당 약 50ul)을 투여 후 3, 6, 24, 48, 96 및 168시간에 수집하였다. 블랭크 대조군 혈액을 항체가 투여되지 않은 3마리의 미경험 암컷 마우스로부터 수집하였다. 각각의 시험 항체의 혈청 농도를 ELISA에 의해 결정하였으며, 여기서, 항-인간 IgG Fc를 포집을 위해 사용하였으며, HRP-표지된 항-인간 IgG(Fab 특이적) 항체(시그마사)를 검출을 위해 사용하였다(도 18A 내지 도 18C). 모체 항체 TY21580에 대해서 수집된 이전 데이터와 비교할 때, 활성화 가능한 항체 TY22401(도 18A), TY22402(도 18B) 및 TY22404(도 18C)는 훨씬 더 느린 제거 시간 및 더 긴 반감기를 가졌다. TY22401은 196시간의 반감기를 가졌고, 168시간에서 약물 농도는 약 55µg/ml였다. TY22402는 134시간의 반감기를 가졌고, 168시간에서 약물 농도는 약 40µg/ml였다. TY22404는 254시간의 반감기를 가졌고, 168시간에서 약물 농도는 약 45µg/ml였다. 비교하면, 모체 항체 TY21580은 107시간의 반감기를 가졌고, 168시간에서 약물 농도는 약 17µg/ml였다.

[0324] 반복 투여 독성 연구

[0325] NOD 마우스에서 당뇨병 발병 연령에 대한 TY21580의 효과를 평가하는 동안, TY21580의 높은 투여량은 NOD의 동물 사멸을 초래할 수 있지만 정상적인 BALB/c 마우스에서는 그렇지 않음을 발견하였다. 여기서 NOD 마우스 모델을 사용하여 TY21580과 비교하여, 활성화 가능한 항체의 안전성을 평가하였다. NOD 마우스(군당 n=5, 암컷, 6주령)를 0, 3, 7 및 12일에 50mg/kg의 복강내 주사에 의해 아이소타입 대조군 항체, 모체 항체 TY21580 또는 3개의 활성화 가능한 항체 중 하나로 치료하였다. TY21580 치료군에서, 1마리의 동물은 3차 투여 후 사망하였고, 3마리는 4차 투여 후에 사망하였다. 도 19에 도시된 바와 같이, 아이소타입 대조군 또는 3개의 활성화 가능한 항체 중 임의의 것으로 치료된 모든 동물은 연구 종료 시 살아있고, 건강 상태가 양호하였다. 이러한 데이터는, 활성화 가능한 항체가 마우스에서 허용 가능한 안전성/독성 프로파일을 갖고, NOD 마우스에서 활성화 가능한 항체가 모체 항체 TY21580보다 훨씬 안전하다는 것을 나타낸다.

[0326] 실시예 5: CD137을 표적으로 하는 활성화 가능한 항체의 작제 및 검증

[0327] 상기 실시예 3에 기재된 항-CTLA4 활성화 가능한 항체의 개발을 위해서 사용된 방법과 유사하게 인간 CD137을 표적으로 하는 활성화 가능한 항체를 개발하였다. 모체 CD137 항체의 Fab 단편(도 20A) 또는 scFv(도 20B)는 Aga2 단백질에 대한 융합을 통해서 효모의 표면 상에 제시되었고, CD137에 결합하는 이의 능력을 유세포 분석법에 의해서 확인하였다. 모체 CD137 항체(TY21242)에 대한 VH 및 VL 서열을 하기에 열거한다(또한 PCT 국제 출원 PCT/CN2017/098332 참고, 전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함됨):

[0328] 항-CD137 중쇄 가변 영역(서열번호 49):

[0329] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSLSTGGVGVGWIQRAPGKGLEWLAIDWADDKYYSPSLKSRLTISRDNKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARGGS DTVIGDWFAYWGQGLTVTVSS

[0330] 항-CD137 경쇄 가변 영역(서열번호 50):

[0331] DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIGSYLAWYQQKPKGAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQGYLWTFGQGTK VEIK.

[0332] 효모 라이브러리를 경쇄의 N-말단에 융합된 CPL을 사용하여 작제하였고, FACS-기반 스크리닝 방법에 적용하였다. 제4 라운드 또는 제5 라운드의 분류(도 21)로부터의 단일 클론을 선택적 배지에 플레이팅하고, 절단 매개된 활성화된 항원 결합의 확인을 위해 개별적으로 성장시켰다. 도 22A 및 도 22B에 도시된 바와 같이, 선택된 CD137 활성화 가능한 항체 클론은 차폐 펩타이드의 존재 하에 항원에 대한 결합을 거의 나타내지 않았지만; 차폐 펩타이드를 제거하기 위해 효모 세포를 TEV 프로테아제로 처리하는 경우 항원에 대한 결합이 극적으로 증가하였다.

[0333] CTLA4 활성화 가능한 항체에서 관찰된 바와 같이, 식별된 차폐 서열은 몇몇 군으로 분리될 수 있는데, 이는 수 라운드의 분류를 통한 명확한 농축을 나타낸다. 불변 절단 펩타이드 서열과 함께, 7개의 군의 차폐 펩타이드 서열을 표 9에 열거한다. 이들 서열 군 중 몇몇(TY22594, TY22595, TY22596, TY22598, TY22599)은 CPL011 라이브러리로 부터 유래되었는데, 이것은 2개의 고정된 Cy 잔기들 사이의 루프에 NNK 코돈을 함유한다. 흥미롭게, 이들 서열군 모두에 대해서 루프 내에 2개 이상의 Arg 잔기가 존재하는데, 이는 차폐 펩타이드와 모체 항체의 CDR 사이에 전하-전하 상호작용이 관여될 수 있다는 것을 시사한다. 사실, VH CDR2 및 VH CDR3 내에 음으로 하전된 Asp 잔기가 존재한다.

표 9

차폐 펩타이드 서열

샘플 ID:	차폐 + 절단 펩타이드 서열:
TY22586	EVGSYPTDLDACADAPNHCHFSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 40)
TY22591	EVGSYSSTHAHCHHSPANCISSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 41)
TY22594	EVGSYDIDYDFCPILRHRCDSSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 42)
TY22595	EVGSYNDYNYHCKWRPSRCHNSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 43)
TY22596	EVGSYYHDYDDCRVLP RR CFNSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 44)
TY22598	EVGSYSNNFASCLWRHRSCADSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 45)
TY22599	EVGSYTDNYDYCPRLRRKCYHSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (서열번호 46)

[0334]

[0335] 이어서 차폐 서열 및 불변 절단 서열을 포유동물 세포에서 발현되는 전체 IgG4 분자에서 시험하였다. 이의 발현 수준은 모체 항체와 유사했으며, 단백질 A 수치 이후의 정제 수율도 유사한데, 이는 차폐 펩타이드 및 절단 펩타이드의 존재가 포유동물 세포에서 항체 발현에 어떠한 부정적인 영향도 미치지 않음을 시사한다.

[0336] 이어서, 차폐 효율을 유세포 분석법을 통해서 측정하였다. 간략하면, 표면 상에 인간 CD137을 디스플레이하는 효모 세포를 PBSA 완충제로 2회 세척하고, 50µl(1×10<sup>6</sup>)의 세포를 96웰 플레이트에 배분하였다. 이어서 세포를 얼음 상에서 1시간 동안 항체의 3배 연속 희석물과 함께 인큐베이션시키고, PBSA 완충제로 1회 세척하고, 이어서 100µl의 PE 접합된 마우스 항-인간 Fc(1µg/ml)과 함께 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 이어서 세포를 유세포 분석법(Beckman(등록상표) CytoFlex)에 의한 분석 전에 1회 세척하였다. 도 23 및 표 10에 제시된 바와 같이, 모체 항체 TY21242와 비교할 때, 모든 활성화 가능한 항체는 세포 표면 상의 인간 CD137에 대해서 극적으로 감소된 결합을 나타내었고, 계산된 차폐 효율은 TY22596의 경우 20배 내지 TY22586, TY22595 및 TY22599의 경우 300배 초과 범위였다. 이러한 결과는, 효모 상에 디스플레이된 CPL 라이브러리로 부터 식별된 차폐 펩타이드가 포유동물 세포에서 발현될 때 이의 차폐 효율을 유지하였음을 나타내었다.

표 10

CD137 활성화 가능한 항체의 차폐 효율

샘플 ID:	EC <sub>50</sub>	
	K <sub>D</sub> (nM):	차폐 효율:
TY21242	0.28	1.0
TY22586	너무 낮음 *	매우 높음
TY22591	10.8	38.3
TY22594	23.6	83.7
TY22595	106.8	378.7
TY22596	5.86	20.8
TY22598	8.61	30.5
TY22599	98.1	347.9

너무 낮음 = 결합이 너무 약해서 본 검정에서 검출 가능하지 않음.

[0337]

[0338]

종합하면, 이러한 데이터는, 다수의 강력한 차폐 펩타이드가 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 각각의 표적 항체에 대해서 성공적으로 발견되었음을 나타내었다.

[0339]

실시예 6: CTLA4를 표적으로 하는 활성화 가능한 항체의 차폐 효율에 대한 차폐 펩타이드 길이의 효과

[0340]

2개의 활성화 가능한 항체, TY22402 및 TY22404를 선택하여 특정 적용에 적합하도록 하는 차폐 펩타이드의 길이에 대한 차폐 효율의 의존성을 시험하였다. TY22402 및 TY22404의 차폐 펩타이드는 N-말단으로부터 잔기를 제거하여, 차폐 펩타이드의 첫 번째 시스테인 잔기 앞에 5개 또는 2개의 잔기만 남김으로써, 21개 잔기로부터 16개 또는 12개 잔기로 단축되었다(표 11). 이들 활성화 가능한 항체를 포유동물 세포로부터 발현 및 정제시키고, 이들의 차폐 효율을 실시예 3에 기재된 바와 같이 측정하고, 모체 항체 TY21580과 비교하였다. 두 실험으로부터의 결과는, 첫 번째 시스테인 잔기 이전에 2 내지 11개 잔기 범위의 길이를 갖는 상이한 차폐 펩타이드를 사용하여 이러한 활성화 가능한 항체를 제조하여 항체 차폐 효율을 조절할 수 있음을 나타내었다(도 24A 및 도 24B; 표 12 및 표 13). 이는, 코어 차폐 모터프가 시스테인 루프 및 이의 바로 인접한 잔기를 함유하고, 차폐 효율을 유지시키기에 충분함을 시사하는 것으로 보인다.

표 11

다양한 펩타이드 길이를 갖는 차폐 펩타이드

샘플 ID:	차폐 + 절단 펩타이드 서열(밑줄):
TY22402	EVGSYIVHHSDCDAFYPPYCDSSGRSAGGGGTPLGLAGSGGS (서열번호 118)
TY22775	EVGHSDCAFYPPYCDSSGRSAGGGGTPLGLAGSGGS (서열번호 119)
TY22864	EDCDAFYPPYCDSSGRSAGGGGTPLGLAGSGGS (서열번호 120)
TY22404	EVGSYPNPSSDCVPYYACAYSGRSAGGGGTPLGLAGSGGS (서열번호 121)
TY22776	EVGSSDCVPYYACAYSGRSAGGGGTPLGLAGSGGS (서열번호 122)
TY22871	EDCVPYYYACAYSGRSAGGGGTPLGLAGSGGS (서열번호 123)

[0341]

[0342]

표 12는 도 24A에서 항체의 차폐 효율을 나타낸다. 표 13은 도 24B에서 항체의 차폐 효율을 나타낸다.

표 12

다양한 차폐 펩타이드 길이를 갖는 항체의 차폐 효율

샘플 ID	EC50(nM)	차폐 효율
TY21580	0.2223	
TY22402	53.99	243
TY22775	37.31	168
TY22404	68.40	308
TY22776	65.90	296

[0343]

표 13

다양한 차폐 펩타이드 길이를 갖는 항체의 차폐 효율

샘플 ID	EC50(nM)	차폐 효율
TY21580	0.2125	
TY22402	115.6	554
TY22864	117	550
TY22404	121.5	572
TY22871	88.09	414

[0344]

[0345] 실시예 7: CTLA4를 표적으로 하는 활성화 가능한 항체의 차폐 효율에 대한 절단 펩타이드 길이의 효과

[0346] TY22404를 선택하여 특정 적용에 적합하도록 하는 절단 펩타이드의 길이에 대한 차폐 효율의 의존성을 시험하였다. TY22404의 절단 펩타이드를 다양한 길이로 단축시켰다(표 14). 이들 활성화 가능한 항체를 포유동물 세포로부터 발현 및 정제시키고, 이들의 차폐 효율을 실시예 3에 기재된 바와 같이 측정하고, 모체 항체 TY21580과 비교하였다. 도 25 및 표 15에 제시된 바와 같이, 이 결과는, 5 내지 20개 잔기 범위의 길이를 갖는 상이한 절단 펩타이드를 사용하여 이들 활성화 가능한 항체를 제조하여 항체 차폐 효율을 조절할 수 있음을 나타내었다. 차폐 모티프와 분열 모티프 사이의 강한 상관 관계는 놀라운 것이며; TY23291의 차폐 효율은 펩타이드 길이가 41 개에서 17개 아미노산으로 절두될 때 TY22404에 비해 적어도 30배 향상된다. 이러한 결과는 몇 가지 새로운 차폐 펩타이드를 설계하고 조작할 수 있음을 나타낸다. 또한 차폐 모티프와 분열 모티프 간의 결합에 대해 더 자세히 탐색할 수 있다.

**표 14**

다양한 절단 펩타이드 길이를 갖는 차폐 펩타이드

샘플 ID	펩타이드 명칭	차폐 + 절단 펩타이드 서열(밑줄):
TY22404		<u>EVGSYPNPSSDCVPYYYACAYSGRSAGGGG</u> <u>TPLGLA</u> GS GGS (서열번호 121)
TY23286		<u>EVGSYPNPSSDCVPYYYACAYSGRSAPLGLA</u> (서열번호 130)
TY23289		<u>EDCVPYYYACAYSGRSAPLGLA</u> (서열번호 131)
TY23280		<u>EDCVPYYYACAYSGRSA</u> (서열번호 132)
TY23291		<u>EDCVPYYYACAYPLGLA</u> (서열번호 133)

[0347]

[0348] 표 15는 도 25에서의 항체의 차폐 효율을 제시한다.

**표 15**

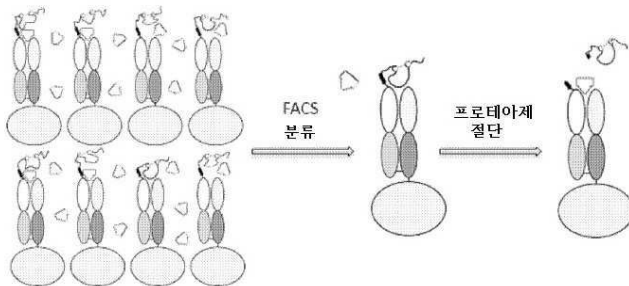
다양한 절단 펩타이드 길이를 갖는 항체의 차폐 효율

샘플 ID	EC50 (nM)	차폐 효율
TY21580	0.2505	
TY22404	117.4	469
TY23286	1496	5972
TY23289	133.2	532
TY23280	2952	11784
TY23291	3656	14595

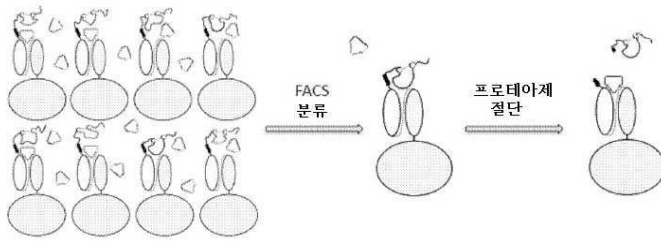
[0349]

**도면**

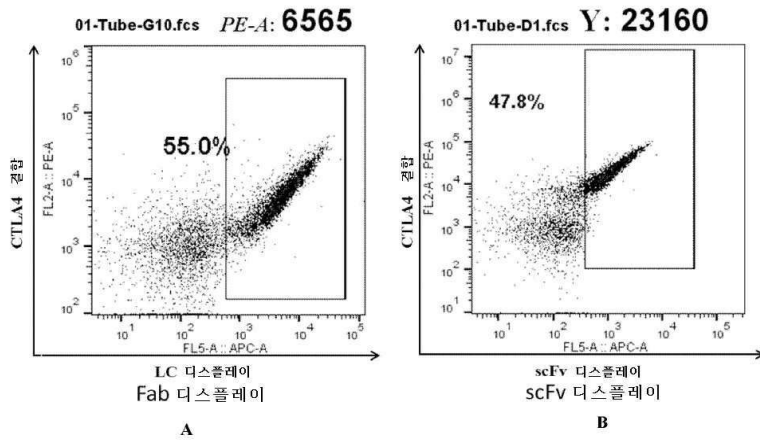
**도면1**



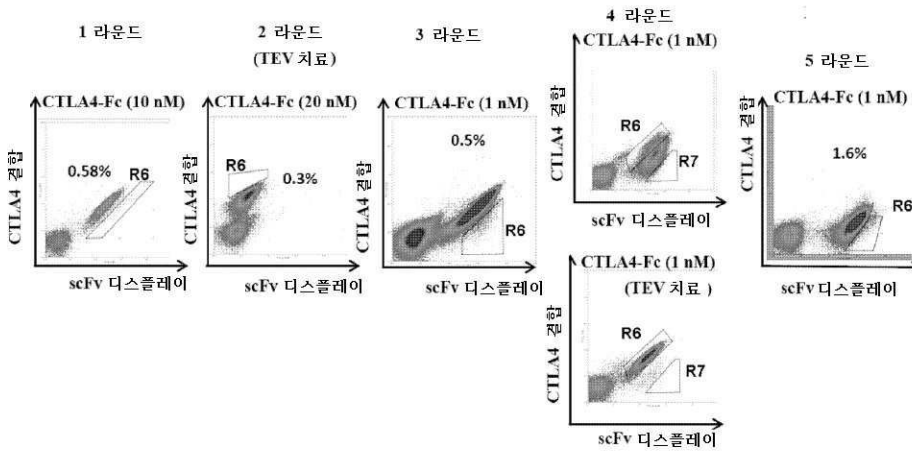
도면2



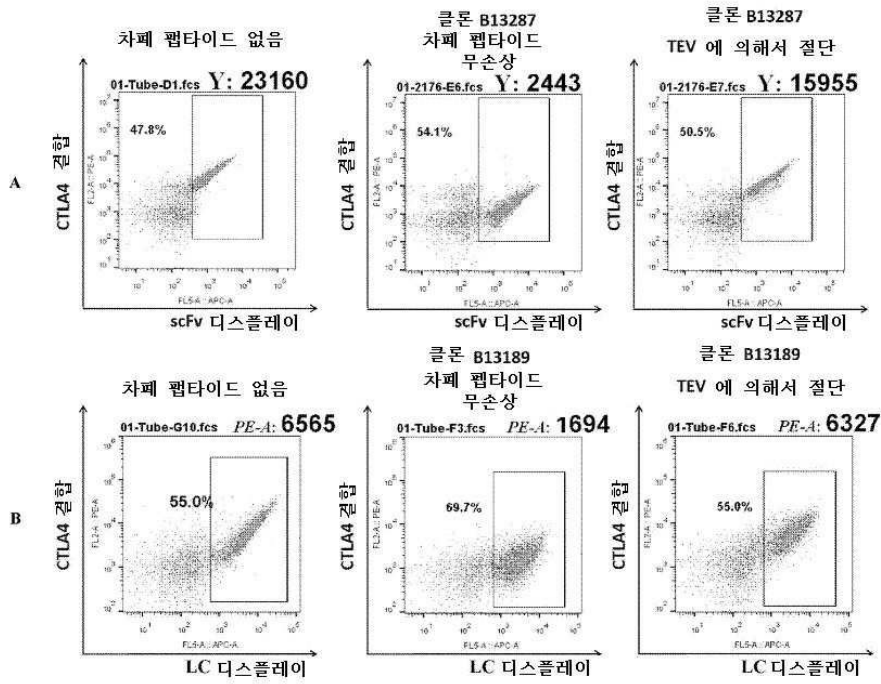
도면3



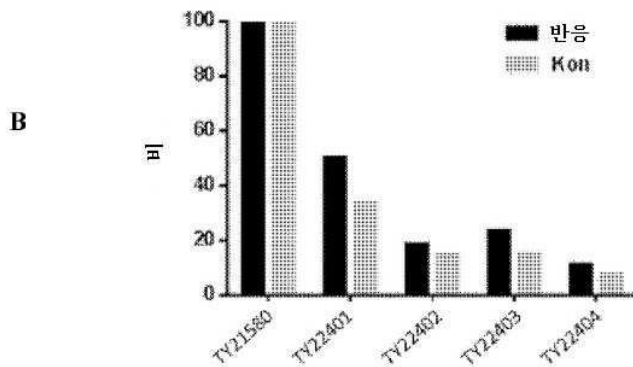
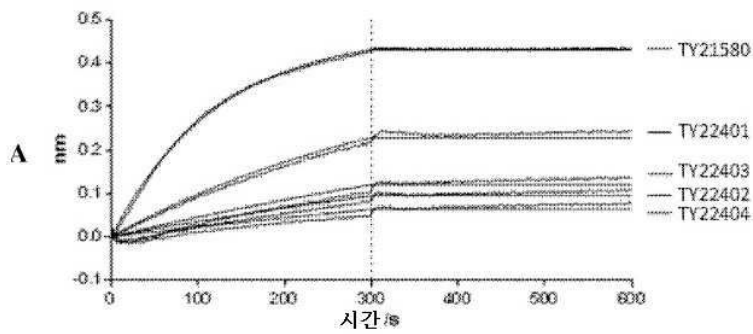
도면4



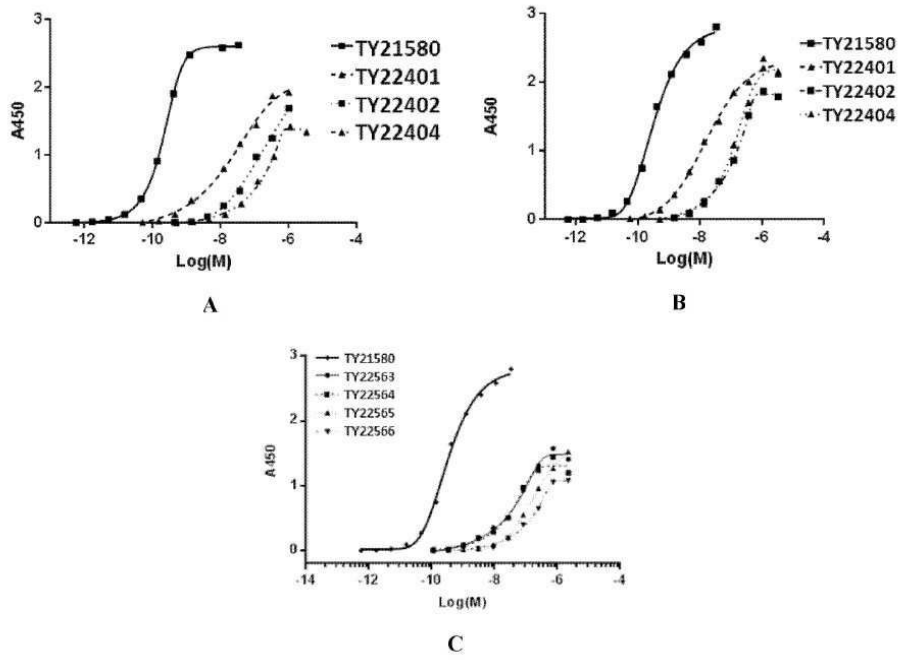
도면5



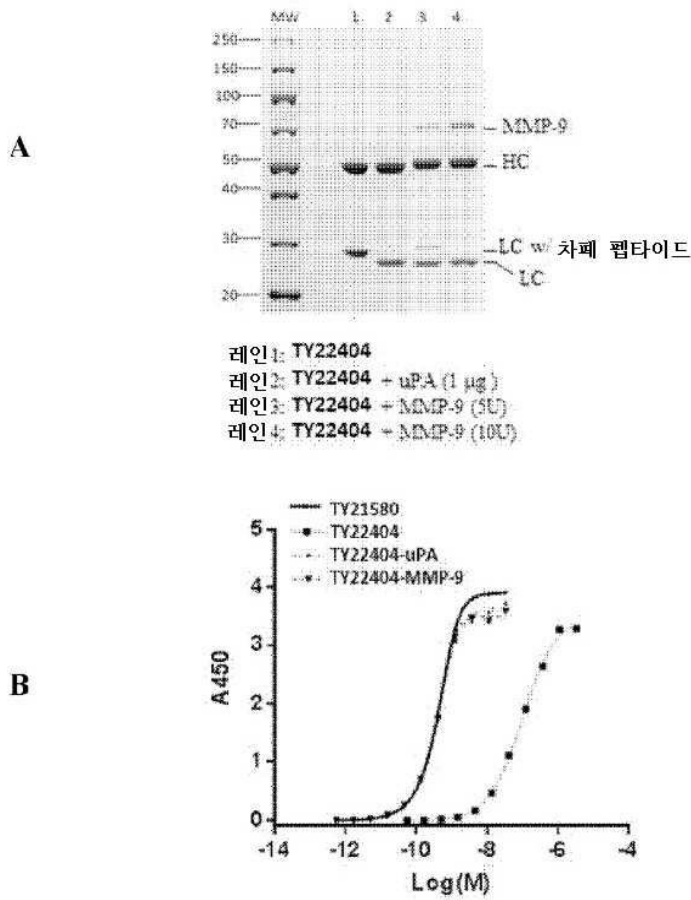
도면6



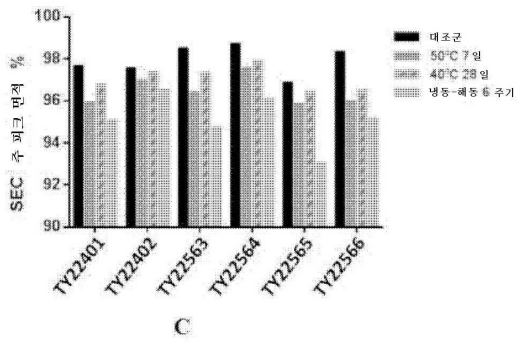
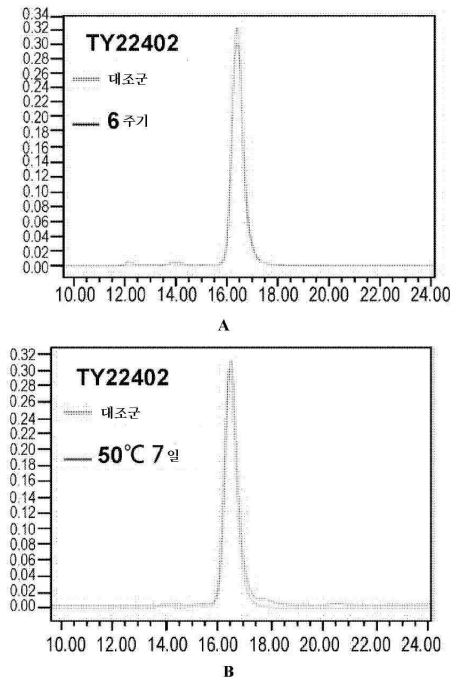
도면7



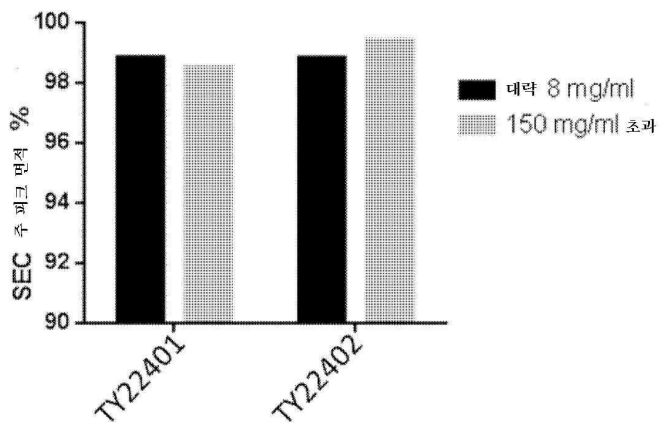
도면8



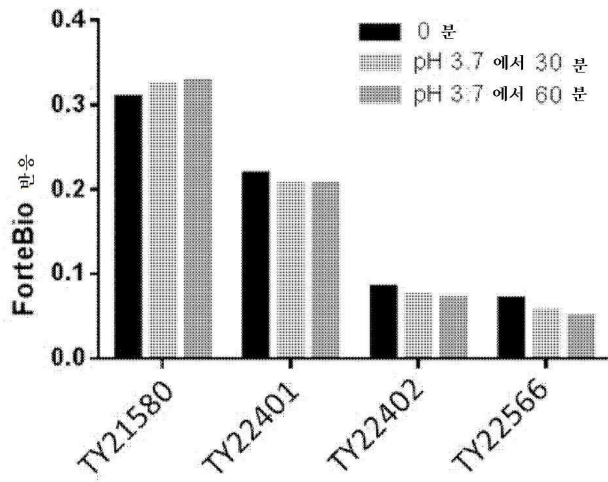
도면9



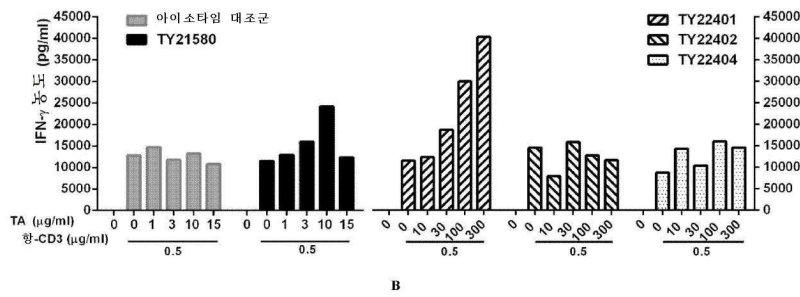
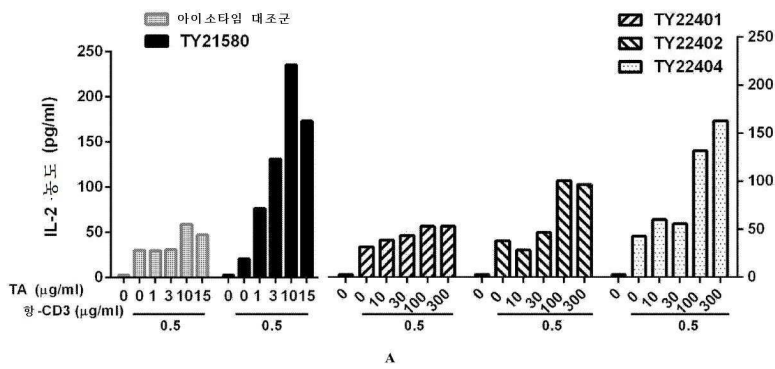
도면10



도면11

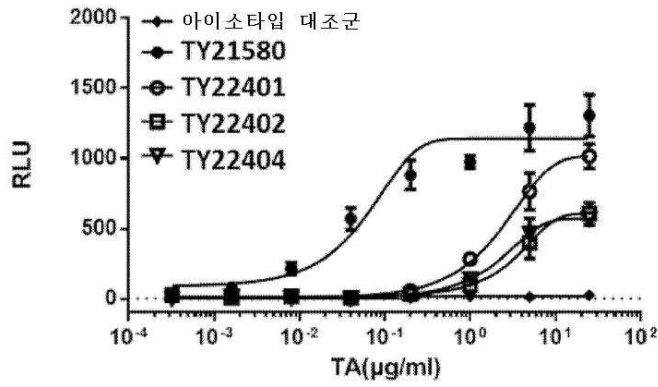


도면12

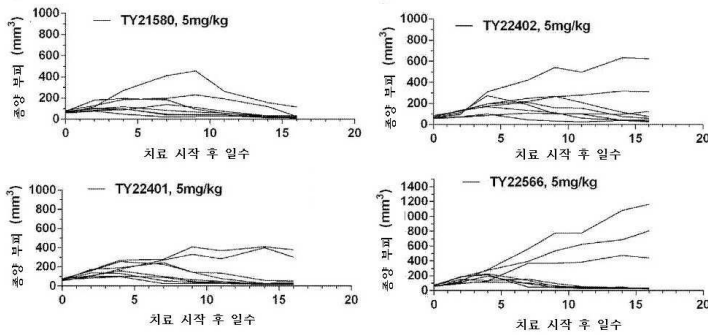
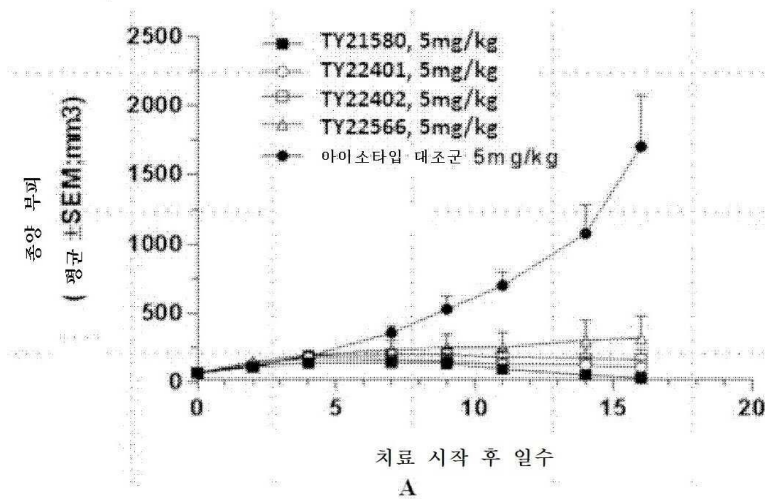


도면13

293F/BN2074 세포에 대한 ADCC 활성도  
(ADCC 리포터 유전자 검정)

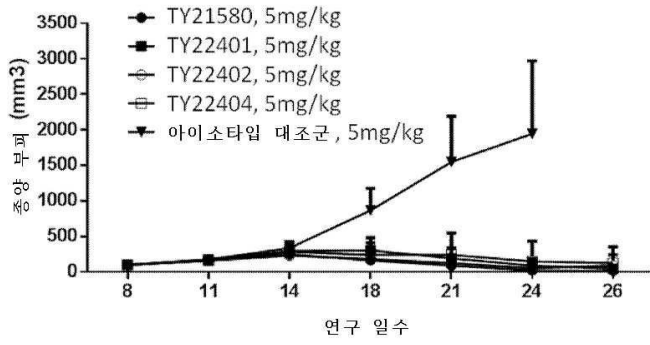


도면14

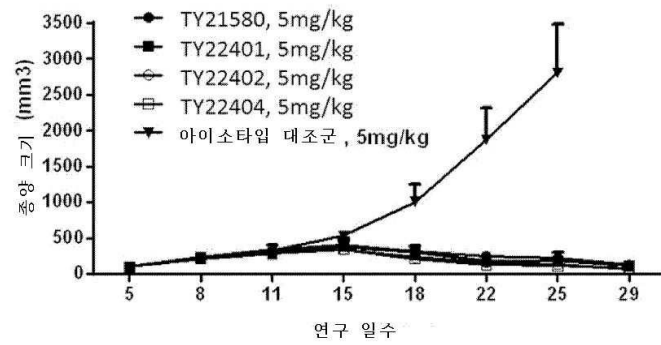


B

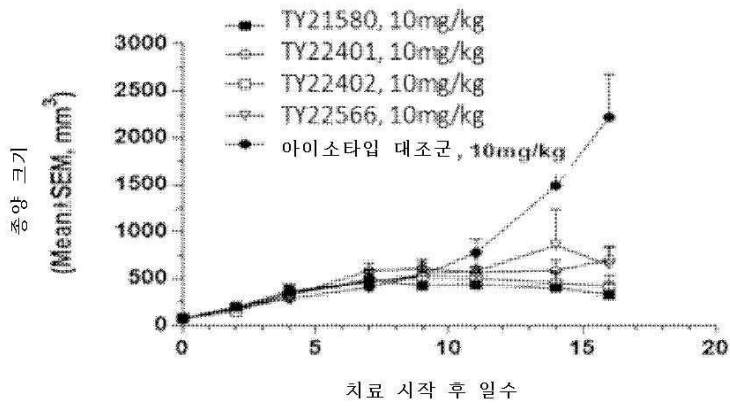
도면15



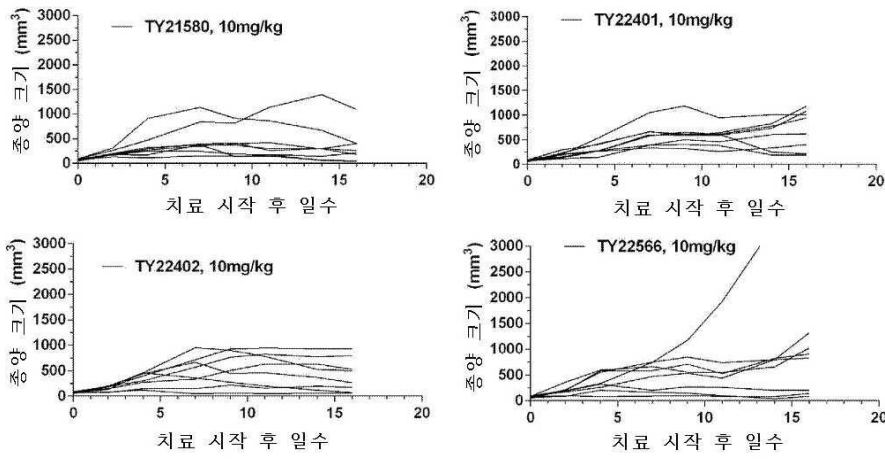
도면16



도면17

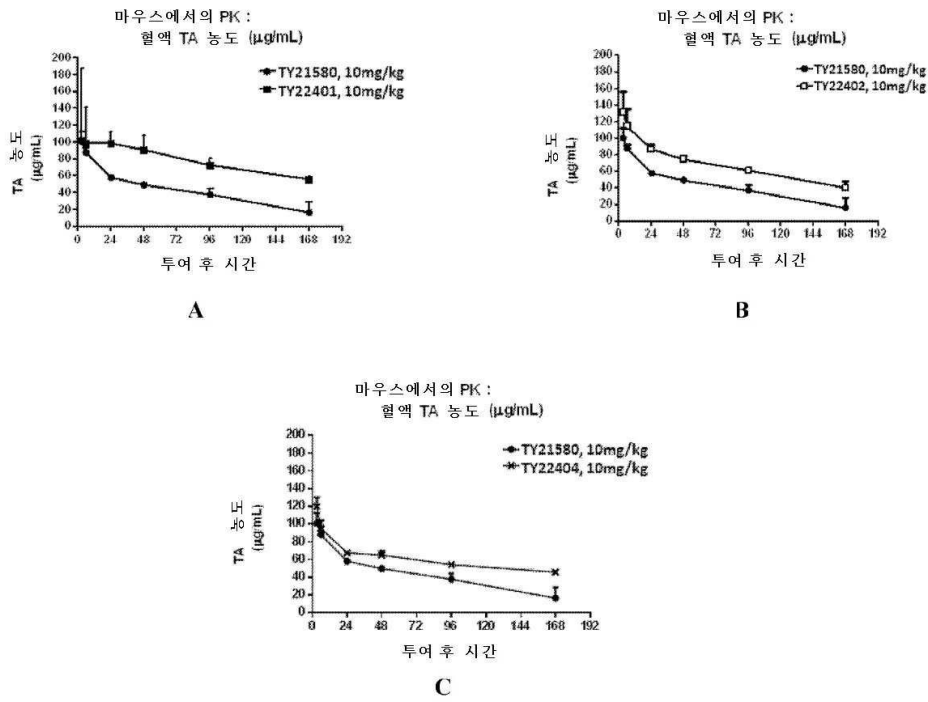


A

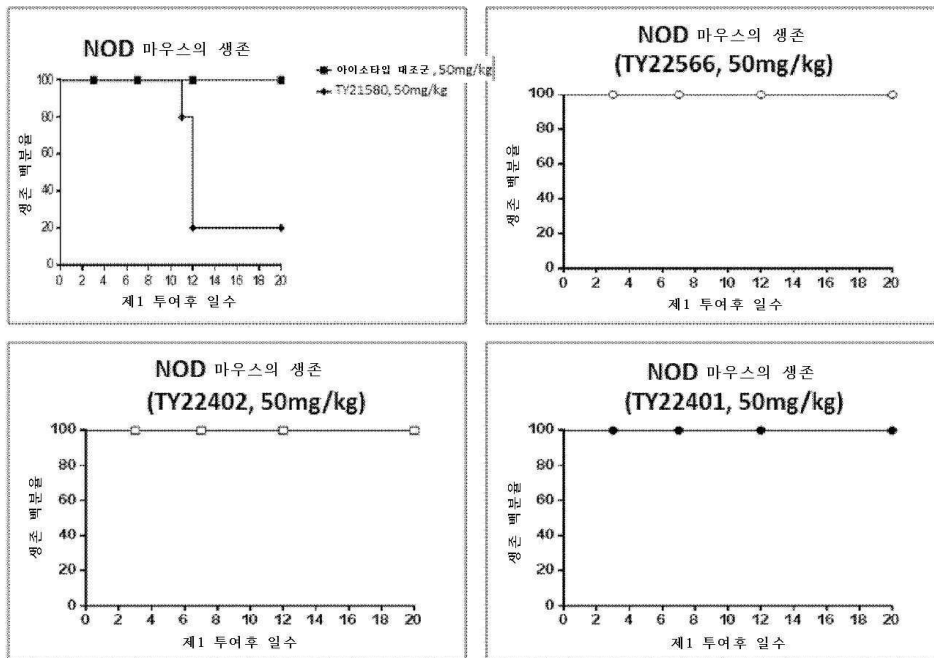


B

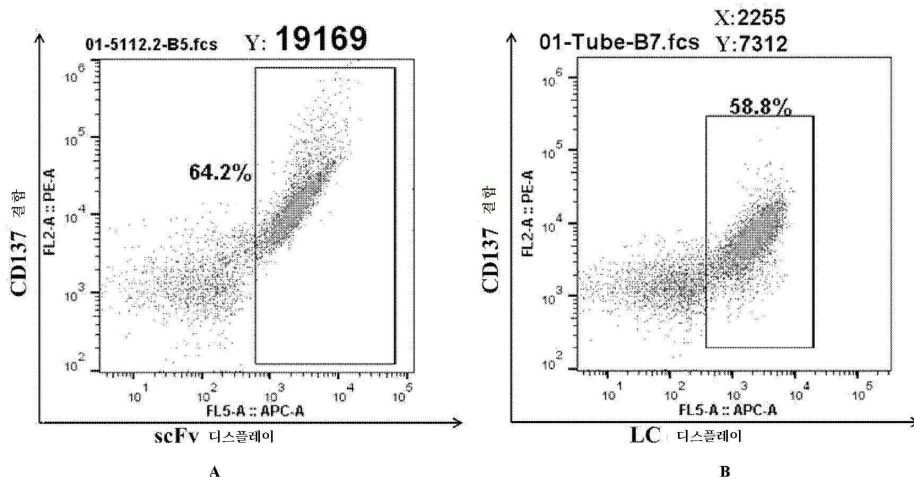
도면18



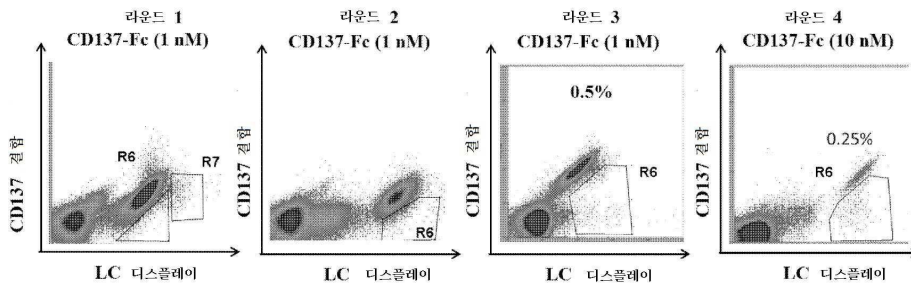
도면19



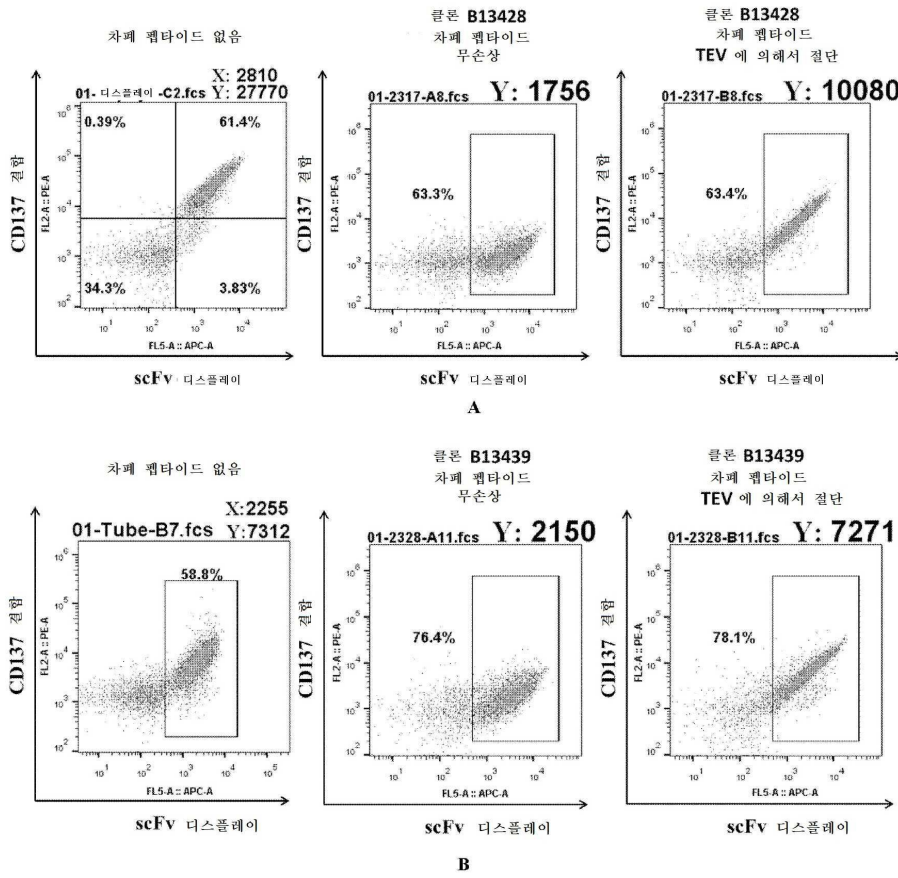
도면20



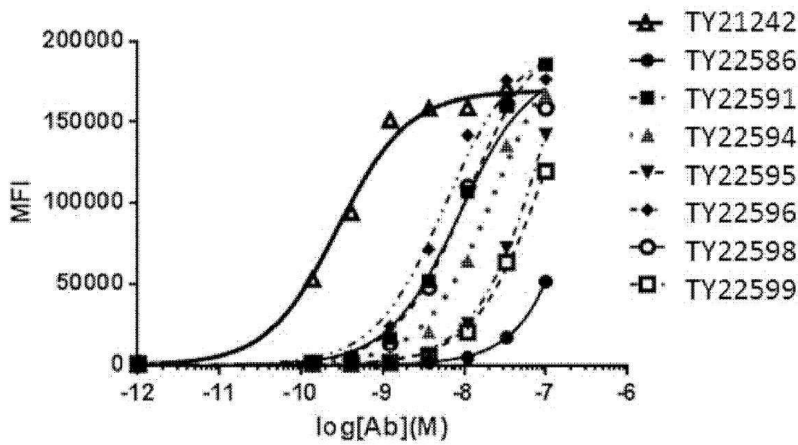
도면21



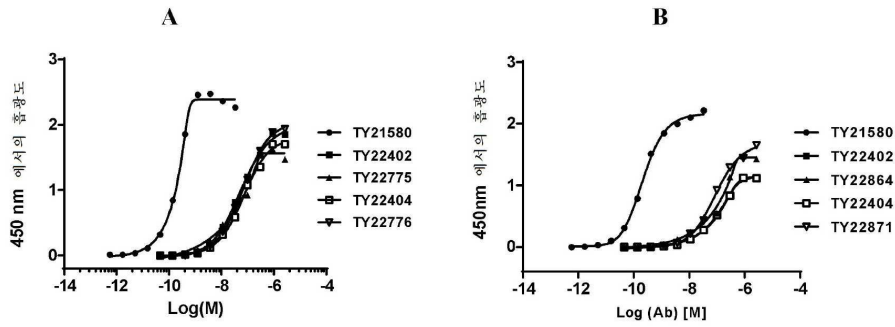
도면22



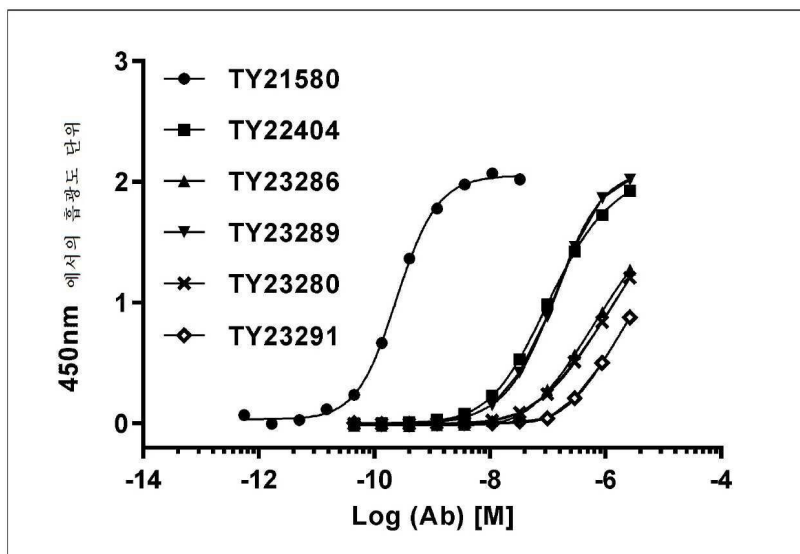
도면23



도면24



도면25



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Adagene Inc.

<120> ACTIVATABLE ANTIBODIES AND METHODS OF MAKING AND USING THEREOF

<130> 69540-20006.00

<140> Not Yet Assigned

<141> 2019-02-02

<150> PCT/CN2019/074581

<151> 2019-02-02

<150> PCT/CN2018/075065

<151> 2018-02-02

<160> 133

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 1, 3

<223> Xaa = Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu,

Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa = Asp, Ala, Tyr, Ser, Thr, Asn, Ile, Leu, Phe, Val,

His, or Pro

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Present in repeats of at least two and up to ten

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Present in repeats of at least three and up to ten

<220>

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Present in repeats of at least one and up to ten

<400> 1

Xaa Cys Xaa Cys Xaa

1

5

<210> 2

<211> 15

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 2, 7, 8, 13  
 <223> n = A,T,C or G  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 3, 9  
 <223> n = T or G  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 6, 12  
 <223> n = T or C  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 14  
 <223> n = A,T or C  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1, 2, 3  
 <223> Present in repeats of at least two and up to ten  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <  
 <222> 7, 8, 9  
 <223> Present in repeats of at least three and up to ten  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 13, 14, 15  
 <223> Present in repeats of at least one and up to ten  
 <400> 2  
 nnntgnnnt gnnnc

<210> 3

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = Ala, Asp, Ile, Asn, Pro, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> 7

<223> Xaa = Ala, Phe, Asn, Ser, or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> 8

<223> Xaa = Ala, His, Leu, Pro, Ser, Val, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa = Ala, His, Ser, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

<223> Xaa = Ala, Asp, Pro, Ser, Val, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> 11

<223> Xaa = Ala, Asp, Leu, Ser, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> 13

<223> Xaa = Asp, Pro, or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> 14

<223> Xaa = Ala, Asp, His, Pro, Ser, or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> 15

<223> Xaa = Ala, Asp, Phe, His, Pro, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> 16

<223> Xaa = Leu, Pro, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> 17

<223> Xaa = Phe, Pro, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> 18

<223> Xaa = Ala, Pro, Ser, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> 20

<223> Xaa = Ala, Asp, Asn, Ser, Thr, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> 21

<223> Xaa = Ala, Ser, or Tyr

<400> 3

Glu Val Gly Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa

1	5	10	15
Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Glu			
	20	25	30

Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Gly Gly Ser

35

40

<210> 4

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21

<223> Xaa = Asp, Ala, Tyr, Ser, Thr, Asn, Ile, Leu, Phe, Val,

His, or Pro

<400> 4

Glu Val Gly Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

10

15

Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Ser Gly Arg Ser Ala

20

25

<210> 5

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 6, 7, 8, 9, 10, 11, 20, 21

<223> Xaa = Asp, Ala, Tyr, Ser, Thr, Asn, Ile, Leu, Phe, Val,

His, or Pro

<220>

<221> VARIANT

<222> 13, 14, 15, 16, 17, 18

<223> Xaa = Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu,

Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, or Tyr

<400> 5

Glu Val Gly Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Ser Gly Arg Ser Ala

20 25

<210> 6

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222>

6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23

<223> Xaa = Asp, Ala, Tyr, Ser, Thr, Asn, Ile, Leu, Phe, Val,

His, or Pro

<400> 6

Glu Val Gly Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Ser Gly Arg Ser Ala

20 25

<210> 7

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 6, 7, 8, 9, 10, 11, 22, 23

<223> Xaa = Asp, Ala, Tyr, Ser, Thr, Asn, Ile, Leu, Phe, Val,

His, or Pro

<220>

<221> VARIANT

<222> 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20

<223> Xaa = Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, or Tyr

<400> 7

Glu Val Gly Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa

1                    5                    10                    15

Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Ser Gly Arg Ser Ala

20                    25

<210> 8

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> misc\_feature

<222> 16, 22, 28

<223> n = A,T,C or G

<220>

<221> misc\_feature

<222> 17, 23, 29

<223> n = A,T, or C

<220>

<221> misc\_feature

<222> 16, 17, 18

<223> Present in repeats of six

<220>

<221> misc\_feature

<222> 22, 23, 24

<223> Present in repeats of six

<220>

<221> misc\_feature

<222> 28, 29, 30

<223> Present in repeats of two

<400> 8

gaggttggat cctacnctg tnnctgcnc tcaggtcgtt ccgct

45

<210> 9

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> misc\_feature

<222> 16, 22, 23, 28

<223> n = A,T,C or G

<220>

<221> misc\_feature

<222> 17, 29

<223> n = A,T, or C

<220>

<221> misc\_feature

<222> 16, 17, 18

<223> Present in repeats of six

<220>

<221> misc\_feature

<222> 22, 23, 24

<223> Present in repeats of six

<220>

<221> misc\_feature

<222> 28, 29, 30

<223> Present in repeats of two

<400> 9

gaggttggat cctacnctg tnnctgcnc tcaggtcgtt ccgct

45

<210> 10

<211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 16, 22, 28  
 <223> n = A,T,C or G  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 17, 23, 29  
 <223> n = A,T, or C  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 16, 17, 18  
 <223> Present in repeats of six  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 22, 23, 24

<223> Present in repeats of eight  
 <220>

<221> misc\_feature  
 <222> 28, 29, 30  
 <223> Present in repeats of two

<400> 10

gaggttgat cctacnctg tnnctgcnc tcaggtcggt ccgct

45

<210> 11  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct  
 <220>

<221> misc\_feature

<222> 16, 22, 23, 28

<223> n = A,T,C or G

<220>

<221> misc\_feature

<222> 17, 29

<223> n = A,T, or C

<220>

<221> misc\_feature

<222> 16, 17, 18

<223> Present in repeats of six

<220>

<221> misc\_feature

<222> 22, 23, 24

<223> Present in repeats of eight

<220>

<221> misc\_feature

<222> 28, 29, 30

<223> Present in repeats of two

<400> 11

gaggttggat cctacnctg tnnmtgcnc tcaggtcggt ccgct 45

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 12

Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro Leu Gly Leu Ala Gly

1                    5                    10                    15

Ser Gly Gly Ser

20

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 13

Ser Gly Arg Ser Ala

1                    5

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 14

Pro Leu Gly Leu Ala Gly

1                    5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 15

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

1                    5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 16

Glu Val Gly Ser Tyr

1                    5  
<210> 17  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic Construct  
<400> 17  
Gly Gly Gly Gly Ser  
1                    5  
<210> 18  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic Construct  
<400> 18  
Ser Gly Gly Ser  
1  
<210> 19  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
  
<223> Synthetic Construct  
<400> 19  
Gly Gly Ser Gly  
1  
<210> 20  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 20

Gly Gly Ser Gly Gly

1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 21

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 22

Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 23

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 24

Gly Ser Ser Ser Gly

1                    5

<210> 25

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 25

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

1                    5                    10                    15

Tyr Ala Cys Tyr Tyr Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Glu

                  20                    25                    30

Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Gly Gly Ser

                  35                    40

<210> 26

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 26

Glu Val Gly Ser Tyr Asn Ser Tyr His Ala Tyr Cys Pro His Pro Leu

1                    5                    10                    15

Tyr Pro Cys Thr Ala Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Glu

                  20                    25                    30

Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Gly Gly Ser

                  35                    40

<210> 27

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 27

Glu Val Gly Ser Tyr Ala Ser Ser Ala Val Leu Cys Val Thr Ala Tyr

1                    5                    10                    15

Phe Ser Cys Asn Ser Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Glu

                  20                    25                    30

Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Gly Gly Ser

                  35                    40

<210> 28

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 28

Glu Val Gly Ser Tyr Asn Phe Val Ala Asp Ser Cys Pro Asp His Pro

1                    5                    10                    15

Tyr Pro Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro

                  20                    25                    30

Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser

                  35                    40

<210> 29

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 29

Glu Val Gly Ser Tyr Asn Phe Val Ala Asp Ser Cys Pro Asp His Pro

1                    5                    10                    15

Tyr Pro Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Glu  
                   20                  25                  30

Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Gly Gly Ser  
           35                  40

<210> 30

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 30

Glu Val Gly Ser Tyr Ile Val His His Ser Asp Cys Asp Ala Phe Tyr  
   1                  5                  10                  15

Pro Tyr Cys Asp Ser Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro  
                   20                  25                  30

Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser  
           35                  40

<210> 31

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 31

Glu Val Gly Ser Tyr Ile Val His His Ser Asp Cys Asp Ala Phe Tyr  
   1                  5                  10                  15

Pro Tyr Cys Asp Ser Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Glu  
                   20                  25                  30

Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Gly Gly Ser  
           35                  40

<210> 32

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 32

Glu Val Gly Ser Tyr Tyr Ser Ala Tyr Pro Ala Cys Asp Ser His Tyr

1 5 10 15

Pro Tyr Cys Asn Ser Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro

20 25 30

Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser

35 40

<210> 33

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 33

Glu Val Gly Ser Tyr Tyr Ser Ala Tyr Pro Ala Cys Asp Ser His Tyr

1 5 10 15

Pro Tyr Cys Asn Ser Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Glu

20 25 30

Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Gly Gly Ser

35 40

<210> 34

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 34

Glu Val Gly Ser Tyr Pro Asn Pro Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr

1 5 10 15

Tyr Ala Cys Ala Tyr Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro

20 25 30

Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser

35 40

<210> 35

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 35

Glu Val Gly Ser Tyr Pro Asn Pro Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr

1 5 10 15

Tyr Ala Cys Ala Tyr Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Glu

20 25 30

Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Gly Gly Ser

35 40

<210> 36

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 36

Glu Val Gly Ser Tyr Tyr Ser Ala Tyr Pro Ala Cys Asp Ser His Tyr

1 5 10 15

Pro Tyr Cys Gln Ser Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro

20 25 30

Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser

35 40

<210> 37

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 37

Glu Val Gly Ser Tyr Tyr Ser Ala Tyr Pro Ala Cys Asp Ser His Tyr

1 5 10 15

Pro Tyr Cys Asn Ser Ala Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro

20 25 30

Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser

35 40

<210> 38

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 38

Glu Val Gly Ser Tyr Pro Gln Pro Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr

1 5 10 15

Tyr Ala Cys Ala Tyr Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro

20 25 30

Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser

35 40

<210> 39

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 39

Glu Val Gly Ser Tyr Pro Asn Pro Ala Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr

1 5 10 15

Tyr Ala Cys Ala Tyr Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro  
 20 25 30

Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser  
 35 40

<210> 40

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 40

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

Asn His Cys His Phe Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro  
 20 25 30

Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser  
 35 40

<210> 41

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 41

Glu Val Gly Ser Tyr Ser Ser Thr His Ala His Cys His His Ser Pro  
 1 5 10 15

Ala Asn Cys Ile Ser Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro  
 20 25 30

Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser  
 35 40

<210> 42

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 42

Glu Val Gly Ser Tyr Asp Thr Asp Tyr Asp Phe Cys Pro Ile Leu Arg

1                    5                    10                    15

His Arg Cys Asp Ser Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro

                  20                    25                    30

Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser

                  35                    40

<210> 43

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 43

Glu Val Gly Ser Tyr Asn Asp Tyr Asn Tyr His Cys Lys Trp Arg Pro

1                    5                    10                    15

Ser Arg Cys His Asn Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro

                  20                    25                    30

Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser

                  35                    40

<210> 44

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 44

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

1                    5                    10                    15

Arg Arg Cys Phe Asn Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro

20 25 30  
 Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser  
 35 40  
 <210> 45  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct  
 <400> 45  
 Glu Val Gly Ser Tyr Ser Asn Asn Phe Ala Ser Cys Leu Trp Arg His

1 5 10 15  
 Arg Ser Cys Ala Asp Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro  
 20 25 30  
 Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser  
 35 40  
 <210> 46  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct  
 <400> 46  
 Glu Val Gly Ser Tyr Thr Asp Asn Tyr Asp Tyr Cys Pro Arg Leu Arg

1 5 10 15  
 Arg Lys Cys Tyr His Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro  
 20 25 30  
 Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser  
 35 40  
 <210> 47  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 47

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

<210> 48

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 48

Asp Ile Gln Leu 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 Ser Val Arg Gly Arg  
                   20                    25                    30  
 Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
                   35                    40                    45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Ser Trp Pro  
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 49

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 49

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 Ser Leu Ser Thr Gly  
 20 25 30

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

Trp Leu Ala Leu Ile Asp Trp Ala Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Pro Ser  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu  
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Arg Gly Gly Ser Asp Thr Val Ile Gly Asp Trp Phe Ala Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 50

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 50

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

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Tyr Leu Trp Thr

85                    90                    95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100                    105

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 51

tccgggtgagg ttggatccta c

21

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct  
 <400> 52  
 gtacaggttc tcgtaccac c 21

<210> 53  
 <211> 65  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct  
 <400> 53  
 tggagacaca gacaggatca ctggagactg ggtcagcagg atatcggatc ctgaaccgcc 60  
 tgaac 65

<210> 54  
 <211> 66  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct  
 <400> 54  
 ctctcgtgtt ttccaatatt ttctgttatt gcttcagttt tagcaggatc cgaggttggga 60  
 tcctac 66

<210> 55

<211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 15, 16  
 <223> Xaa = Asp, Ala, Tyr, Ser, Thr, Asn, Ile, Leu, Phe, Val,  
 His, or Pro  
 <220>

<221> VARIANT

<222> 8, 9, 10, 11, 12, 13

<223> Xaa = Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu,  
Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, or Tyr

<400> 55

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa  
1                    5                    10                    15

<210> 56

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 17, 18

<223> Xaa = Asp, Ala, Tyr, Ser, Thr, Asn, Ile, Leu, Phe, Val,  
His, or Pro

<220>

<221> VARIANT

<222> 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15

<223> Xaa = Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu,  
Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, or Tyr

<400> 56

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys  
1                    5                    10                    15

Xaa Xaa

<210> 57

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16

<223> Xaa = Asp, Ala, Tyr, Ser, Thr, Asn, Ile, Leu, Phe, Val, His, or Pro

<400> 57

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa

1                    5                    10                    15

<210> 58

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18

<223> Xaa = Asp, Ala, Tyr, Ser, Thr, Asn, Ile, Leu, Phe, Val, His, or Pro

<400> 58

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys

1                    5                    10                    15

Xaa Xaa

<210> 59

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 59

Tyr Ser Ile Ser Ser Gly Tyr His Trp Ser Trp Ile

1                    5                    10

<210> 60

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 60

Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser Leu

1                    5                    10                    15

Lys Ser Arg Leu

20

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 61

Ala Arg Ser Tyr Val Tyr Phe Asp Tyr

1                    5

<210> 62

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 62

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Gly Arg Phe Leu Ala

1                    5                    10

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 63

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile

1                    5

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 64

Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Ser Trp Pro Pro Thr

1                    5                    10

<210> 65

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 65

Phe Ser Leu Ser Thr Gly Gly Val Gly Val Gly Trp Ile

1                    5                    10

<210> 66

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 66

Leu Ala Leu Ile Asp Trp Ala Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Pro Ser Leu

1                    5                    10                    15

Lys Ser Arg Leu

20

<210> 67

<211

> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 67

Ala Arg Gly Gly Ser Asp Thr Val Ile Gly Asp Trp Phe Ala Tyr

1                    5                    10                    15

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 68

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala

1                    5                    10

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 69

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val

1                    5

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 70

Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Tyr Leu Trp Thr

1 5 10

<210> 71

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Present in repeats of at least two and up to ten

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Present in repeats of at least three and up to ten

<220>

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Present in repeats of at least one and up to ten

<220>

<221> VARIANT

<222> 1, 3, 5

<223> Xaa = Asp, Ala, Tyr, Ser, Thr, Asn, Ile, Leu, Phe, Val,

His, or Pro

<400> 71

Xaa Cys Xaa Cys Xaa

1 5

<210> 72

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 72

Asn Phe Val Ala Asp Ser Cys Pro Asp His Pro Tyr Pro Cys Ser Ala

1                    5                    10                    15

<210> 73

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 73

Ile Val His His Ser Asp Cys Asp Ala Phe Tyr Pro Tyr Cys Asp Ser

1                    5                    10                    15

<210> 74

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 74

Tyr Ser Ala Tyr Pro Ala Cys Asp Ser His Tyr Pro Tyr Cys Asn Ser

1                    5                    10                    15

<210> 75

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 75

Pro Asn Pro Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Ala Tyr

1                    5                    10                    15

<210> 76

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 76

Tyr Ser Ala Tyr Pro Ala Cys Asp Ser His Tyr Pro Tyr Cys Gln Ser

1                    5                    10                    15

<210> 77

<211> 16

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 77

Pro Gln Pro Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Ala Tyr

1                    5                    10                    15

<210> 78

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 78

Pro Asn Pro Ala Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Ala Tyr

1                    5                    10                    15

<210> 79

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 79

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

1                    5                    10                    15

<210> 80  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct  
 <400> 80  
 Ser Ser Thr His Ala His Cys His His Ser Pro Ala Asn Cys Ile Ser  
 1                    5                    10                    15

<210> 81  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct

<400> 81  
 Asp Thr Asp Tyr Asp Phe Cys Pro Ile Leu Arg His Arg Cys Asp Ser  
 1                    5                    10                    15

<210> 82  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct

<400> 82  
 Asn Asp Tyr Asn Tyr His Cys Lys Trp Arg Pro Ser Arg Cys His Asn  
 1                    5                    10                    15

<210> 83  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct

<400> 83

Tyr His Asp Tyr Asp Asp Cys Arg Val Leu Pro Arg Arg Cys Phe Asn

1 5 10 15

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 84

Asn Asn Phe Ala Ser Cys Leu Trp Arg His Arg Ser Cys Ala Asp

1 5 10 15

<210> 85

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 85

Thr Asp Asn Tyr Asp Tyr Cys Pro Arg Leu Arg Arg Lys Cys Tyr His

1 5 10 15

<210> 86

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Present in repeats of at least two and up to ten

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Present in repeats of at least three and up to ten  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 5  
 <223> Present in repeats of at least one and up to ten  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 1, 3, 5  
 <223> Xaa = Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu,

Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, or Tyr

<400> 86

Xaa Cys Xaa Cys Xaa

1                    5

<210> 87

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> misc\_feature

<222> 1, 2, 7, 8, 13, 14

<223> n = A,T,C or G

<220>

<221> misc\_feature

<222> 3, 9, 15

<223> n = T or G

<220>

<221> misc\_feature

<222> 6, 12

<223> n = T or C

<220>

<221> misc\_feature

<222> 1, 2, 3

<223> Present in repeats of at least two and up to ten

<220>

<221> misc\_feature

<222> 7, 8, 9

<223> Present in repeats of at least three and up to ten

<220>

<221> misc\_feature

<222> 13, 14, 15

<223> Present in repeats of at least one and up to ten

<400> 87

nnntgmnnt gnnnn

15

<210> 88

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 1, 10, 11

<223> Xaa = Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu,

Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Present in repeats of at least two and up to ten

<400> 88

Xaa Cys Ala Asp Ala Pro Asn His Cys Xaa Xaa

1                      5                      10

<210> 89

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 1, 10, 11

<223> Xaa = Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Present in repeats of at least two and up to ten

<400> 89

Xaa Cys His His Ser Pro Ala Asn Cys Xaa Xaa

1                      5                      10

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 1, 10, 11

<223> Xaa = Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Present in repeats of at least two and up to ten

<400> 90

Xaa Cys Pro Ile Leu Arg His Arg Cys Xaa Xaa

1                      5                      10

<210> 91

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 1, 10, 11  
 <223> Xaa = Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, or Tyr  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 1  
 <223> Present in repeats of at least two and up to ten

<400> 91  
 Xaa Cys Lys Trp Arg Pro Ser Arg Cys Xaa Xaa  
 1                    5                    10

<210> 92  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 1, 10, 11  
 <223> Xaa = Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, or Tyr  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 1  
 <223> Present in repeats of at least two and up to ten  
 <400> 92

Xaa Cys Arg Val Leu Pro Arg Arg Cys Xaa Xaa

1                    5                    10

<210> 93

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 1, 10, 11

<223> Xaa = Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Present in repeats of at least two and up to ten

<400> 93

Xaa Cys Leu Trp Arg His Arg Ser Cys Xaa Xaa

1                    5                    10

<210> 94

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 1, 10, 11

<223> Xaa = Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Present in repeats of at least two and up to ten

<400> 94

Xaa Cys Pro Arg Leu Arg Arg Lys Cys Xaa Xaa

1                    5                    10

<210> 95

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 95

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

1                    5                    10                    15

Asn His Cys His Phe

20

<210> 96

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 96

Glu Val Gly Ser Tyr Ser Ser Thr His Ala His Cys His His Ser Pro

1                    5                    10                    15

Ala Asn Cys Ile Ser

20

<210> 97

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 97

Glu Val Gly Ser Tyr Asp Thr Asp Tyr Asp Phe Cys Pro Ile Leu Arg

1 5 10 15

His Arg Cys Asp Ser

20

<210> 98

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 98

Glu Val Gly Ser Tyr Asn Asp Tyr Asn Tyr His Cys Lys Trp Arg Pro

1 5 10 15

Ser Arg Cys His Asn

20

<210> 99

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 99

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

1 5 10 15

Arg Arg Cys Phe Asn

20

<210> 100

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 100

Glu Val Gly Ser Tyr Ser Asn Asn Phe Ala Ser Cys Leu Trp Arg His  
 1 5 10 15

Arg Ser Cys Ala Asp  
 20

<210> 101

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 101

Glu Val Gly Ser Tyr Thr Asp Asn Tyr Asp Tyr Cys Pro Arg Leu Arg  
 1 5 10 15

Arg Lys Cys Tyr His  
 20

<210> 102

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 1, 10, 11

<223> Xaa = Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu,

Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Present in repeats of at least two and up to ten

<400> 102

Xaa Cys Pro Asp His Pro Tyr Pro Cys Xaa Xaa  
 1 5 10

<210> 103  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 1, 10, 11  
 <223> Xaa = Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu,  
 Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, or Tyr

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 1  
 <223> Present in repeats of at least two and up to ten  
 <400> 103

Xaa Cys Asp Ala Phe Tyr Pro Tyr Cys Xaa Xaa  
 1                    5                    10

<210> 104  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 1, 10, 11  
 <223> Xaa = Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu,  
 Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, or Tyr

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 1  
 <223> Present in repeats of at least two and up to ten

<400> 104

Xaa Cys Asp Ser His Tyr Pro Tyr Cys Xaa Xaa

1                    5                    10

<210> 105

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 1, 10, 11

<223> Xaa = Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu,

Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Present in repeats of at least two and up to ten

<400> 105

Xaa Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Xaa Xaa

1                    5                    10

<210> 106

<400> 106

000

<210> 107

<400> 107

000

<210> 108

<400> 108

000

<210> 109

<400> 109

000

<210> 110

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 110

Glu Val Gly Ser Tyr Asn Phe Val Ala Asp Ser Cys Pro Asp His Pro

1                    5                    10                    15

Tyr Pro Cys Ser Ala

20

<210> 111

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 111

Glu Val Gly Ser Tyr Ile Val His His Ser Asp Cys Asp Ala Phe Tyr

1                    5                    10                    15

Pro Tyr Cys Asp Ser

20

<210> 112

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 112

Glu Val Gly Ser Tyr Tyr Ser Ala Tyr Pro Ala Cys Asp Ser His Tyr

1                    5                    10                    15

Pro Tyr Cys Asn Ser

20

<210> 113

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 113

Glu Val Gly Ser Tyr Pro Asn Pro Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr

1                    5                    10                    15

Tyr Ala Cys Ala Tyr

20

<210> 114

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 114

Glu Val Gly Ser Tyr Tyr Ser Ala Tyr Pro Ala Cys Asp Ser His Tyr

1                    5                    10                    15

Pro Tyr Cys Gln Ser

20

<210> 115

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 115

Glu Val Gly Ser Tyr Tyr Ser Ala Tyr Pro Ala Cys Asp Ser His Tyr

1                    5                    10                    15

Pro Tyr Cys Asn Ser

20

<210> 116

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 116

Glu Val Gly Ser Tyr Pro Gln Pro Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr

1                    5                    10                    15

Tyr Ala Cys Ala Tyr

20

<210> 117

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 117

Glu Val Gly Ser Tyr Pro Asn Pro Ala Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr

1                    5                    10                    15

Tyr Ala Cys Ala Tyr

20

<210> 118

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 118

Glu Val Gly Ser Tyr Ile Val His His Ser Asp Cys Asp Ala Phe Tyr

1                    5                    10                    15

Pro Tyr Cys Asp Ser Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Pro

20                    25                    30

Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser

35                    40

<210> 119

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 119

Glu Val Gly His Ser Asp Cys Asp Ala Phe Tyr Pro Tyr Cys Asp Ser

1 5 10 15

Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Pro Leu Gly Leu Ala Gly

20 25 30

Ser Gly Gly Ser

35

<210> 120

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 120

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

1 5 10 15

Ala Gly Gly Gly Gly Thr Pro Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser

20 25 30

<210> 121

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 121

Glu Val Gly Ser Tyr Pro Asn Pro Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr

1 5 10 15

Tyr Ala Cys Ala Tyr Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Pro  
 20 25 30

Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser  
 35 40

<210> 122

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 122

Glu Val Gly Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Ala Tyr  
 1 5 10 15

Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Pro Leu Gly Leu Ala Gly  
 20 25 30

Ser Gly Gly Ser  
 35

<210> 123

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 123

Glu Asp Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Ala Tyr Ser Gly Arg Ser  
 1 5 10 15

Ala Gly Gly Gly Gly Thr Pro Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser  
 20 25 30

<210> 124

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 124

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile  
 1                    5                    10                    15

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

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys  
                   35                    40                    45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser  
                   50                    55                    60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln  
 65                    70                    75                    80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu  
                   85                    90                    95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Ala Gln Ile  
                   100                    105                    110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu  
                   115

<210> 125

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 125

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile  
 1                    5                    10                    15

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

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys  
                   35                    40                    45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60  
 Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln  
 65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu  
 85 90 95  
 Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile  
 100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu  
 115

<210> 126

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 126

Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg  
 1 5 10 15

Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr  
 20 25 30

Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu  
 35 40 45

Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Ile Cys  
 50 55 60

Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu  
 65 70 75 80

Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr  
 85 90 95

Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val  
 100 105 110

Ile Asp Pro  
 115

<210> 127

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 127

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val

35 40 45

Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Asp Ser Ile

50 55 60

Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly

65 70 75 80

Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met

85 90 95

Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr

100 105 110

Val Ile

<210> 128

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu  
                   35                                  40                                  45  
 Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp  
                   50                                  55                                  60  
 Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr  
 65                                  70                                  75                                  80  
 Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val  
   85                                  90                                  95  
 Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr  
                   100                                  105                                  110  
 Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu  
                   115                                  120  
 <210> 129  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 129  
 Glu Ala Ile Gln Val Thr Gln Pro Ser Val Val Leu Ala Ser Ser His  
   1                  5                                  10                                  15  
 Gly Val Ala Ser Phe Pro Cys Glu Tyr Ser Pro Ser His Asn Thr Asp  
   20                                  25                                  30  
 Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Thr Asn Asp Gln Met Thr Glu  
                   35                                  40                                  45  
 Val Cys Ala Thr Thr Phe Thr Glu Lys Asn Thr Val Gly Phe Leu Asp  
                   50                                  55                                  60  
 Tyr Pro Phe Cys Ser Gly Thr Phe Asn Glu Ser Arg Val Asn Leu Thr  
 65                                  70                                  75                                  80  
 Ile Gln Gly Leu Arg Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Leu Cys Lys Val  
   85                                  90                                  95  
 Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val Gly Met Gly Asn Gly Thr  
                   100                                  105                                  110  
 Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu

115 120

<210> 130

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 130

Glu Val Gly Ser Tyr Pro Asn Pro Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr

1 5 10 15

Tyr Ala Cys Ala Tyr Ser Gly Arg Ser Ala Pro Leu Gly Leu Ala

20 25 30

<210> 131

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 131

Glu Asp Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Ala Tyr Ser Gly Arg Ser

1 5 10 15

Ala Pro Leu Gly Leu Ala

20

<210> 132

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 132

Glu Asp Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Ala Tyr Ser Gly Arg Ser

1 5 10 15

Ala

<210> 133

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 133

Glu Asp Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Ala Tyr Pro Leu Gly Leu

1                    5                    10                    15

Ala