



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월14일
 (11) 등록번호 10-1947702
 (24) 등록일자 2019년02월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
 C07K 16/46 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
 C07K 16/2896 (2013.01)
 A61K 39/39533 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2015-7008757
 (22) 출원일자(국제) 2013년10월04일
 심사청구일자 2018년09월28일
 (85) 번역문제출일자 2015년04월06일
 (65) 공개번호 10-2015-0060750
 (43) 공개일자 2015년06월03일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2013/063509
 (87) 국제공개번호 WO 2014/055897
 국제공개일자 2014년04월10일
 (30) 우선권주장
 61/709,731 2012년10월04일 미국(US)
 61/779,969 2013년03월13일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 W02010036959 A2
 (뒷면에 계속)
 전체 청구항 수 : 총 11 항

(73) 특허권자
 다나-파머 캔서 인스티튜트 인크.
 미국 메사추세츠 02215 보스턴 브룩클린 예비뉴 450
 (72) 발명자
 마라스코 웨인 에이.
 미국 02481 매사추세츠주 웰즐리 라이스 스트리트 43
 수이 지안후아
 미국 02451 매사추세츠주 월섬 칼리지 팜 로드 184
 (74) 대리인
 김진희, 김태홍

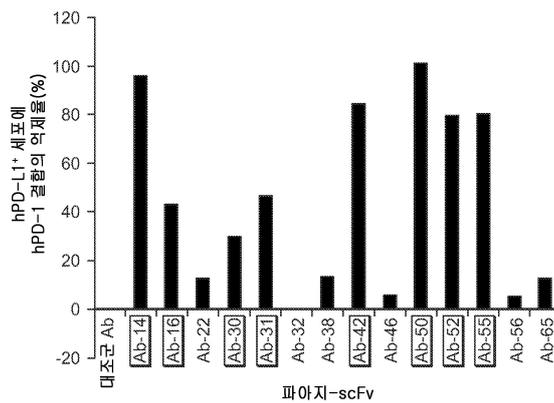
심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 **인간 단클론 항-PD-L1 항체 및 사용 방법**

(57) 요약

본 발명은 PD-L1(예정세포사 1 리간드 1 또는 B7H1로도 알려짐)에 결합하는 인간 단클론 항체를 포함한다. PD-L1에 본 발명 항체의 결합은 그의 수용체 PD1(예정사 1)에 결합 및 리간드-매개된 활성을 억제하고, 암 및 만성 바이러스 감염을 치료하는 데 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C07K 16/464 (2013.01)

C07K 2317/75 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

US20110209230 A1

US20090055944 A1

The New England Journal of Medicine, 2012,
제366권, 페이지 2455-2465

The New England Journal of Medicine, 2012,
제366권, 페이지 2443-2454

명세서

청구범위

청구항 1

단리된 인간화 단클론 항체로서,

아미노산 서열 SYAIS(서열 번호 57), GIIPIFGTANYAQKFQG(서열 번호 78) 및 GRQMFAGAGIDF(서열 번호 93)를 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 중쇄, 및 아미노산 서열 TRSSGSIDSNYVQ(서열 번호 108), EDNQRPS(서열 번호 115) 및 QSYSINNRHVI(서열 번호 134)를 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 경쇄

를 갖고, 상기 항체가 인간 예정사 리간드-1에 결합하는 것인 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체가 1가 또는 2가인 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체가 단쇄 항체인 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항체가 종양 연관 항원, 사이토카인 또는 세포 표면 수용체에 또한 결합하는 이중 특이적 항체인 항체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 종양 연관 항원이 CAIX인 항체.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 사이토카인이 IL-10인 항체.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 세포 표면 수용체가 CCR4, IL21R, BTLA, HVEM 또는 TIM3인 항체.

청구항 8

서열 번호 29를 포함하는 V_H 뉴클레오티드 서열 및 서열 번호 31을 포함하는 V_L 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단쇄 항체로서, 항체가 인간 예정사 리간드-1에 결합하는 것인 단쇄 항체.

청구항 9

서열 번호 30을 포함하는 V_H 아미노산 서열 및 서열 번호 32를 포함하는 V_L 아미노산 서열을 포함하는 단쇄 항체로서, 항체가 인간 예정사 리간드-1에 결합하는 것인 단쇄 항체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 치료제에 결합하는 것인 항체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 치료제가 독소, 방사성 표지, siRNA, 소분자, 또는 사이토카인을 포함하는 것인 항체.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 2012년 10월 4일에 출원된 미국 가출원 제61/709,731호 및 2013년 3월 13일에 출원된 미국 가출원 제 61/779,969호의 우선권을 주장하며, 이로써 그 내용은 전문으로 참고에 각각 포함된다.

[0003] **본 발명의 분야**

[0004] 본 발명은 전반적으로 항-PD-L1(예정세포사-1 리간드 1 또는 B7H1로도 알려짐) 항체 및 그의 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 면역계는 병원성 독립체를 제거하는 유효 반응과 자가면역 질환을 예방하는 관용(tolerance)을 유지하는 것 사이에 균형을 이루어야만 한다. T 세포는 상기 균형을 유지하는 데 중요하며, 이들의 적합한 조절은 B7-CD28 패밀리의 분자에 의해 주로 조절된다. 리간드로서 기능을 하는 B7 패밀리의 구성원과 수용체로서 기능을 CD28 패밀리의 구성원 사이의 상호작용은 T 세포 반응을 개시하고, 증가시키고, 유지하는 중요한 양성 신호를 제공할 뿐 아니라, 적절한 경우 T 세포 반응을 제한하고, 종결하고/거나 약화시키는 중요한 음성 신호를 제공한다. PD-1(예정세포사-1로도 알려짐)로 불리는 CD28 패밀리의 구성원은 활성화된 T 세포, B 세포, 및 단핵구에서 상승 조절된다. PD-1은 B7 패밀리에서 확인된 두 개의 리간드, PD-L1(BH71 또는 예정세포사-1 리간드 1로도 알려짐) 및 PD-L2를 갖는다. 활성화된 항원 제시 세포(APC)에서 주로 발견되는 PD-L2 발현은 보다 제한적인 경향을 보이지만, PD-L1 발현은 조혈계 세포(활성화된 T 세포, B 세포, 단핵구, 수지상 세포 및 대식세포 포함) 및 말초 비림프 조직(심장, 골격, 근육, 태반, 폐, 신장 및 간 조직 포함)을 포함하여 광범위하다. PD-L1의 광범위한 발현은 PD-1/PD-L1-매개된 말초 관용을 조절하는 데 중요한 역할을 나타낸다.

[0006] PD-L1과 PD-1 사이의 결합은 T 세포 반응을 조절하는 데 큰 영향을 준다. 특히, PD-L1/PD-1 상호작용은 T 세포

증식, 및 T 세포 활성화 및 면역 반응을 매개하는 이펙터(effector) 사이토카인, 예를 들어 IL-2 및 IFN- γ 의 생산을 억제한다. 이러한 음성 조절 기능은 T 세포-매개된 자가면역 및 면역병리를 예방하는 데 중요하다. 그러나, PD-1/PD-L1 축은 또한 T 세포 고갈(exhaustion)에 역할을 하여, 음성 조절 기능이 숙주의 손상에 대한 T 세포 반응을 억제한다는 것을 보여 주었다. T 세포의 오래 지속되는 또는 만성 항원 자극은 항원-특이적 반응을 억제하는 음성의 면역학적 피드백 기전을 유도할 수 있으며 병원체의 면역 회피를 일으킨다. T 세포 고갈은 또한 항원 특이적 T 세포 자체를 점차 물리적으로 제거한다. T 세포의 PD-1 발현은 만성 항원 자극 시 상승조절되고, PD-L1과의 결합은 CD4+(T 보조 세포) 및 CD8+(세포독성 T 림프구 또는 CTL) T 세포 모두에서 이펙터 기능을 차단하는데, 이는 PD-1/PD-L1 상호작용이 T 세포 고갈의 유도에 관련됨을 나타낸다.

[0007] 보다 최근에는, 일부 만성 바이러스 감염 및 암이 PD-1/PD-L1-매개된 T 세포 고갈을 유발함으로써 PD-1/PD-L1 축을 특이적으로 이용하는 면역 회피 전략을 발달시킨다는 것을 보였다. 많은 인간 종양 세포 및 종양 연관 항원 제시 세포가 PD-L1을 높은 수준으로 발현하는데, 이는 종양이 항-종양 면역 반응을 회피하는 T 세포 고갈을 유도한다는 것을 나타낸다. 만성 HIV 감염시, HIV-특이적 CD8+ T 세포는 기능적으로 손상되어, 사이토카인 및 이펙터 분자를 생산하는 능력의 감소 및 증식하는 능력의 감소를 나타낸다. 연구에서, PD-1은 HIV 감염된 개체의 HIV-특이적 CD8+ T 세포에서 높이 발현된다는 것을 보였는데, 이는 PD-1/PD-L1 경로 차단이 HIV 감염 및 AIDS 환자의 치료를 위한 치료 가능성을 가질 수 있다는 것을 나타낸다. 종합해 보면, PD-1/PD-L1 경로를 차단하는 제제는 여러 가지 암, HIV 감염, 및/또는 T 세포 고갈과 연관된 다른 질환 및 병태를 위한 새로운 치료 접근법을 제공할 것이다. 따라서, PD-1/PD-L1 상호작용을 차단 또는 방지할 수 있는 제제가 시급하게 요구되고 있다.

발명의 내용

[0008] 본 발명은 PD-L1에 결합하는 단클론 항체의 발견에 기초한다. 단클론 항체는 완전 인간 항체이다. 항체는 PD-L1에 결합한다. 항체는 본원에서 huPD-L1 항체로 나타낸다.

[0009] PD-L1은 또한 예정세포사 1 리간드 1, 예정사 리간드 1, PDCD1 리간드 1, PDCD1L1, PDL1, B7 상동체 1, B7H1, B7-H, CD274 및 CD274 항원으로도 알려져 있다.

[0010] 본 발명은 인간 PD-L1에 결합하는 단리된 인간화 단클론 항체로서, 아미노산 서열 SYGIS (서열 번호 57), WISAYNGNTNYAQKLED (서열 번호 70), 및 ALPSGTILVGGWFDP (서열 번호 86)을 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 중쇄 및 아미노산 서열 TRSSGNIASNYVQ (서열 번호 101), EDNQRPS (서열 번호 115), 및 QSYDSSNLWV (서열 번호 127)을 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 경쇄; 아미노산 서열 SYALS (서열 번호 58), AISGGGGSTYYADSVKD (서열 번호 71), 및 DVFPETFSMNYGMDV (서열 번호 87)을 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 중쇄 및 아미노산 서열 QGDSLRSYYAS (서열 번호 102), GKNNRPS (서열 번호 116), 및 NSRDSSGNHYV (서열 번호 128)을 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 경쇄; 아미노산 서열 DYAMH (서열 번호 60), LISGGGGSTYYADSVKD (서열 번호 73), 및 VLLPCSSTSCYSGVGFADI (서열 번호 88)을 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 중쇄 및 아미노산 서열 GGSDIGRKS VH (서열 번호 103), SDRDRPS (서열 번호 117), 및 QVWDNNSDHVY (서열 번호 129)를 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 경쇄; 아미노산 서열 NYDMS (서열 번호 61), RVNWNNGSSTYADAVKD (서열 번호 74), 및 EFGVAYDL (서열 번호 89)를 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 중쇄 및 아미노산 서열 TGTSSDVGNYVVS (서열 번호 104), DVSNRPS (서열 번호 118), 및 SSYTSSTLP (서열 번호 130)을 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 경쇄; 아미노산 서열 GLYIH (서열 번호 62), WIIPFGTANYAQKFED (서열 번호 75), 및 GLRWGIWGWDFP (서열 번호 90)을 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 중쇄 및 아미노산 서열 RASQSIGNSLA (서열 번호 105), GASSRAT (서열 번호 119), 및 QQHTIPTFS (서열 번호 131)을 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 경쇄; 아미노산 서열 DNAIS (서열 번호 63), WIIPFGKPNYAQKFED (서열 번호 76), 및 TMVRGFLGVMDV (서열 번호 91)을 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 중쇄 및 아미노산 서열 RASQGIGSYLA (서열 번호 106), AASTLQS (서열 번호 120), 및 QQLNNYPIT (서열 번호 132)를 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 경쇄; 아미노산 서열 SYAMS (서열 번호 64), AISGSGGSTYYADSVKD (서열 번호 77), 및 DQFVTIFGVPRYGMVDV (서열 번호 92)를 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 중쇄 및 아미노산 서열 SGDKLGNKYAY (서열 번호 107), QDIKRPS (서열 번호 121), 및 QTWDNSV (서열 번호 133)을 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 경쇄; 아미노산 서열 SYAIS (서열 번호 57), WIIPFGTANYAQKFED (서열 번호 78), 및 GRQMFAGIDF (서열 번호 93)을 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 중쇄 및 아미노산 서열 TRSSGIDSNYVQ (서열 번호 108), EDNQRPS (서열 번호 115), 및 QSYDSSNNRHYV (서열 번호 134)를 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 경쇄; 아미노산 서열 TYALN (서열 번호 65), RIVPLIGLVNYAHNFED (서열 번호 79), 및 EVYGGNSDY (서열 번호 94)를 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 중쇄 및 아미노산 서열 TRSSGNIGTNYVQ (서열 번호 109), EDYRRPS (서

열 번호 122), 및 QSYHSSGWE (서열 번호 135)를 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 경쇄; 아미노산 서열 SHGIT (서열 번호 66), WISAHNGHASNAQKVED (서열 번호 80), 및 VHAALYYGMDV (서열 번호 95)를 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 중쇄 및 아미노산 서열 GGNNIGSKGVH (서열 번호 110), DDSDRPS (서열 번호 123), 및 QVWDSSSDHWV (서열 번호 136)을 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 경쇄; 아미노산 서열 RHGMH (서열 번호 67), VISHDGSVKYYADSMKD (서열 번호 81), 및 GLSYQVSGWFDP (서열 번호 96)을 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 중쇄 및 아미노산 서열 TRSSGSIASNYVQ (서열 번호 111), EDNQRPS (서열 번호 115), 및 QSYDSTTPSV (서열 번호 137)을 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 경쇄; 아미노산 서열 SYGIS (서열 번호 58), WTSPhnGLTafaQIleD (서열 번호 82), 및 VHPVFSYALDV (서열 번호 97)을 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 중쇄 및 아미노산 서열 TRSSGSIASNYVQ (서열 번호 112), EDNQRPS (서열 번호 115), 및 QSYDGITVI (서열 번호 138)을 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 경쇄; 아미노산 서열 TYAFS (서열 번호 68), RIIPILGIANYAQKFED (서열 번호 83), 및 DGYGSDPVL (서열 번호 98)을 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 중쇄 및 아미노산 서열 TRSSGSIASHYVQ (서열 번호 113), EDNKRPS (서열 번호 124), 및 QSYDSSNRWV (서열 번호 139)를 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 경쇄; 또는 아미노산 서열 NYGIS (서열 번호 69), WISAYNGNTNYAQKVED (서열 번호 84), 및 GDFRKPFDY (서열 번호 99)를 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 중쇄 및 아미노산 서열 TLRSGLVNGSYRIY (서열 번호 114), YKSDSNKQQAS (서열 번호 125), 및 MIWYSSAVV (서열 번호 140)을 각각 포함하는 세 개의 CDR을 갖는 경쇄를 갖는 항체를 제공한다.

[0011] 한 측면에서, 항체는 1가 또는 2가이다. 또 다른 측면에서, 항체는 단쇄 항체이다.

[0012] 본 발명은 서열 번호 1을 포함하는 V_H 뉴클레오티드 서열 및 서열 번호 3을 포함하는 V_L 뉴클레오티드 서열; 서열 번호 5를 포함하는 V_H 뉴클레오티드 서열 및 서열 번호 7을 포함하는 V_L 뉴클레오티드 서열; 서열 번호 9를 포함하는 V_H 뉴클레오티드 서열 및 서열 번호 11을 포함하는 V_L 뉴클레오티드 서열; 서열 번호 13을 포함하는 V_H 뉴클레오티드 서열 및 서열 번호 15를 포함하는 V_L 뉴클레오티드 서열; 서열 번호 17을 포함하는 V_H 뉴클레오티드 서열 및 서열 번호 19를 포함하는 V_L 뉴클레오티드 서열; 서열 번호 21을 포함하는 V_H 뉴클레오티드 서열 및 서열 번호 23을 포함하는 V_L 뉴클레오티드 서열; 서열 번호 25를 포함하는 V_H 뉴클레오티드 서열 및 서열 번호 27을 포함하는 V_L 뉴클레오티드 서열; 서열 번호 29를 포함하는 V_H 뉴클레오티드 서열 및 서열 번호 31을 포함하는 V_L 뉴클레오티드 서열; 서열 번호 33을 포함하는 V_H 뉴클레오티드 서열 및 서열 번호 35를 포함하는 V_L 뉴클레오티드 서열; 서열 번호 37을 포함하는 V_H 뉴클레오티드 서열 및 서열 번호 39를 포함하는 V_L 뉴클레오티드 서열; 서열 번호 41을 포함하는 V_H 뉴클레오티드 서열 및 서열 번호 43을 포함하는 V_L 뉴클레오티드 서열; 서열 번호 45를 포함하는 V_H 뉴클레오티드 서열 및 서열 번호 47을 포함하는 V_L 뉴클레오티드 서열; 서열 번호 49를 포함하는 V_H 뉴클레오티드 서열 및 서열 번호 51을 포함하는 V_L 뉴클레오티드 서열; 또는 서열 번호 53을 포함하는 V_H 뉴클레오티드 서열 및 서열 번호 55를 포함하는 V_L 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단쇄 항체를 제공한다.

[0013] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 번호 2를 포함하는 V_H 아미노산 서열 및 서열 번호 4를 포함하는 V_L 아미노산 서열; 서열 번호 6을 포함하는 V_H 아미노산 서열 및 서열 번호 8을 포함하는 V_L 아미노산 서열; 서열 번호 10을 포함하는 V_H 아미노산 서열 및 서열 번호 12를 포함하는 V_L 아미노산 서열; 서열 번호 14를 포함하는 V_H 아미노산 서열 및 서열 번호 16을 포함하는 V_L 아미노산 서열; 서열 번호 18을 포함하는 V_H 아미노산 서열 및 서열 번호 20을 포함하는 V_L 아미노산 서열; 서열 번호 22를 포함하는 V_H 아미노산 서열 및 서열 번호 24를 포함하는 V_L 아미노산 서열; 서열 번호 26을 포함하는 V_H 아미노산 서열 및 서열 번호 28을 포함하는 V_L 아미노산 서열; 서열 번호 30을 포함하는 V_H 아미노산 서열 및 서열 번호 32를 포함하는 V_L 아미노산 서열; 서열 번호 34를 포함하는 V_H 아미노산 서열 및 서열 번호 36을 포함하는 V_L 아미노산 서열; 서열 번호 38을 포함하는 V_H 아미노산 서열 및 서열 번호 40을 포함하는 V_L 아미노산 서열; 서열 번호 42를 포함하는 V_H 아미노산 서열 및 서열 번호 44를 포함하는 V_L 아미노산 서열; 서열 번호 46을 포함하는 V_H 아미노산 서열 및 서열 번호 48을 포함하는 V_L 아미노산 서열; 서열 번호 50을 포함하는 V_H 아미노산 서열 및 서열 번호 52를 포함하는 V_L 아미노산 서열; 또는 서열 번호 54를 포함하는 V_H 아미노산 서열 및 서열 번호 56을 포함하는 V_L 아미노산 서열을 포함하는 단쇄 항체를 제공한다.

- [0014] 일부 측면에서, 항체는 10^{-5} M 내지 10^{-12} M 범위 내의 결합 친화성을 갖는다.
- [0015] 또 다른 측면에서, 항체는 또한 종양 연관 항원, 사이토카인 또는 세포 표면 수용체에 결합하는 이중 특이적 항체이다. 예를 들어, 종양 연관 항원은 CAIX이다. 예를 들어, 사이토카인은 IL-10이다. 예를 들어, 세포 표면 수용체는 CCR4, IL21R, BTLA, HVEM 또는 TIM3이다.
- [0016] 본 발명은 치료제에 결합된 항체를 제공한다. 예를 들어, 치료제는 독소, 방사성 표지, siRNA, 소분자, 또는 사이토카인이다.
- [0017] 본 발명은 임의의 상기 항체를 생산하는 세포를 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 종양 세포를 선택적으로 사멸시키는 방법으로서, 상기 세포를 임의의 상기 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 선택적 사멸은 항체 의존성 세포독성(ADCC), 보체 의존성 세포독성(CDC), 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP)에 의해 일어난다. 또 다른 측면에서, 종양 세포는 PD-L1을 발현한다.
- [0019] 본 발명은 또한 T 세포 고갈을 예방하거나 역전시키는 방법으로서, 이를 필요로 하는 피험체에게 임의의 상기 항체를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한 항원에 대한 면역 반응을 증대시키는 방법으로서, 이를 필요로 하는 피험체에게 임의의 상기 항체를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 항원은 바이러스 항원, 세균 항원 또는 종양 연관 항원이다. 또 다른 측면에서, 바이러스 항원은 HIV이다. 또 다른 측면에서, 종양 연관 항원은 CAIX이다. 또 다른 측면에서, 항체는 항원에 노출되기 전 또는 후에 투여된다. 또 다른 측면에서, 상기 항체의 투여는 항원 특이적 T 세포 활성을 증가시킨다. 또 다른 측면에서, T 세포는 이펙터 T 세포이다.
- [0021] 또한, 본 발명은 암 증상을 치료하거나 완화시키기 위한 방법으로서, 이를 필요로 하는 피험체에게 임의의 상기 항체를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 암은 신세포암 또는 유방암이다. 예를 들어, 암은 PD-L1이 과발현되는 암이다. 또 다른 실시예에서, 암은 T 세포 고갈을 유도하는 암이다.
- [0022] 본 발명은 또한, 만성 바이러스 감염 증상을 치료하거나 완화시키기 위한 방법으로서, 이를 필요로 하는 피험체에게 임의의 상기 항체를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 만성 바이러스 감염은 HIV 감염이다. 예를 들어, 만성 바이러스 감염은 T 세포 고갈을 유도하는 바이러스 감염이다.
- [0023] 본 발명은 서열 번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 또는 55의 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열을 제공한다.
- [0024] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 또는 56의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 제공한다.
- [0025] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 또는 56의 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.
- [0026] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 또는 55의 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 본 발명은 서열 번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 또는 56의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 본 발명은 또한 임의의 상기 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.
- [0027] 상기 개시의 임의의 방법에서 투여 경로는 비경구(예를 들어, 정맥내), 피내, 피하, 경구(예를 들어, 흡입), 경피(즉, 국소), 경점막, 및 직장 투여를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0028] 상기 개시의 임의의 방법에서 피험체는 예를 들어, 포유동물이다. 포유동물은 예를 들어, 인간이다.
- [0029] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 하기의 상세한 설명 및 청구항에서 명백할 것이며 그에 의해 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0030] **[도 1]** 항-PD-L1 scFv-파아지 클론(14개 클론)의 아미노산 서열. 프레임워크 영역 1-4(FW1-4), 상보성 결정 영역 1-3(CDR1-3) 및 패밀리 명칭으로 IGHV 및 IGLV/IGKV가 표시되어 있다. 카뎃(Kabat) 번호가 사용된다. 기호

설명: "." AA는 공통 서열, "X"는 비공통 AA에 일치하고, "-"는 공백(즉, AA 없음)이다.

[도 2] 인간 PD-L1(hPD-L1) 발현 세포와 huPD-L1 항체의 FACS에 의한 결합 분석. 부모 세포주 300.9, 및 hPD-L1, hPD-L2 또는 인간 C-형 렉틴 도메인 패밀리 2 구성원(hCLEC2D)으로 형질감염된 300.9 세포를 포함한 네 가지 유형의 세포가 시험되었다. GF1538은 hPD-L1에 대한 인간화 Ab이다. GF1757은 hPD-L2에 대한 인간화 Ab이다. 2차 항체는 PE-염소 항-인간 IgG이다.

[도 3] 경쟁 FACS 분석에서 항-PD-L1 파아지-항체에 의한 hPD-L1에 hPD-1 결합의 억제. 파아지-scFv 형태의 모든 항-hPD-L1 Ab는 hPD-L1 발현 293T 세포와 hPD1-hFc 융합 단백질의 결합의 억제에 대해 시험되었다. 10^{12} pfu의 파아지-scFv는 $\sim 0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 가용성 hPD1-hFc과 혼합하고, hPD-L1 발현 플라스미드로 형질감염된 293T 세포에 첨가하였다. 세척 후, 세포를 FITC-항-인간 IgG 항체와 인큐베이션하여 세포 표면 상 hPD-L1에 hPD1-hFc의 결합을 측정하였다.

[도 4] 경쟁 FACS 분석에서 항-PD-L1 가용성 항체에 의한 hPD-L1에 hPD-1 결합의 억제. 모든 항-hPD-L1 Ab는 hPD-L1 발현 플라스미드로 형질감염된 300.9 세포와 지시된 농도로 30분간 미리 인큐베이션한 후, $0.125 \mu\text{g}$ 의 hPD-1-마우스 IgG2 α 를 각 반응에 첨가하고, 추가로 30분간 인큐베이션하였다. 세척 후, PE-염소-항-마우스 IgG2 α Ab를 첨가한 후, 세척하고 FACS 분석하였다. GF1538은 hPD-L1에 대한 인간화 Ab이다. GF1757은 hPD-L2에 대한 인간화 Ab이다.

[도 5] 이중 특이적 항체의 설계 및 형성.

[도 6] 이중 특이적 항체(bsAb) 구조물 결정. A) CAIX 및 PD-L1을 인식하는 이중 특이적 항체 및 CH3 도메인을 결합하는 "구멍에 손잡이" 접근법을 나타내는 개략도. B) ADCC 활성을 변경시키는 CH2 도메인 내 상이한 돌연변이를 갖는 세 가지 유형의 bsAb 구조물을 나타내는 개략도.

[도 7] 이중 특이적 항체의 생성 및 그의 기능. A) 접합된(비환원된) 대조군 IgG, 부모 G37 (WT), 및 이중 특이적 (G37 KIHA + PD-L1 KIHB) 항체와 비교하여 환원 조건하에서 조작된 (G37 KIHA) 항체의 해리를 나타내는 단백질 겔. B) 대조군 IgG, 부모 PDL-1 (WT), 및 이중 특이적 (G37 KIHA + PD-L1 KIHB) 항체와 비교하여 환원 조건하에서 조작된 (PD-L1 KIHB) 항체의 해리를 나타내는 단백질 겔. C) 유세포 분석에 의한 CAIX⁺PDL-1⁻ SKRC-52 세포에 이중 특이적 항체 결합의 분석.

[도 8] PD-L1 특이적 mAb42의 기능적 특징 조사. 4명의 건강한 공여자(D1-D4)의 PBMC는 α PDL1 (mAb42) 또는 대조군 동종형 항체의 존재하에서 배양하고, $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ SEB로 48시간 동안 자극하고, TNF α 생산은 MSD 단위로 측정하였다. 자료는 3회 반복 실험의 평균*, $p < 0.0005$ 로 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명은 B7H1로도 알려진 PD-L1에 특이적인 인간화 단클론 항체를 제공한다. 항체는 라이브러리 선별 표적으로서 단백질리포솜-결합된-PD-L1을 이용하여 파아지 디스플레이 항체 라이브러리 선별법으로 확인되었다. 상기 항체는 PD-L1에 대한 인간 단클론 항체의 새로운 클래스를 나타낸다.

[0032] 상기 항-PD-L1 인간 단클론 항체는 본원에서 "huPD-L1 항체"로 나타낸다.

[0033] PD-1에 PD-L1의 결합은 자가면역 및 면역병리의 관용 및 예방에 중요한 T 세포 항원 특이적 반응을 음성적으로 조절한다. 그러나, 만성 항원 자극에 의해 유발될 수 있는 과도한 PD-L1/PD-1 상호작용은 T 세포 고갈의 특징이 되는, T 세포 항원 특이적 반응의 억제 및 T 세포의 소실을 가져올 수 있다. T 세포 고갈은 만성 감염 및 암에서 일어날 수 있는 T 세포 기능 장애의 상태이다. 이는 불량한 이펙터 기능, 억제성 수용체의 지속적 발현, 및 기능적 이펙터 또는 기억 T 세포와는 다른 전사 상태로서 정의된다. 고갈은 감염 및 종양 진행의 관리를 방해한다.

[0034] PD-L1 과발현은 다양한 암에서 검출되었다. 예를 들어, 유방암에서, PD-L1은 과발현되고 고위험도의 예후 인자와 연관되어 있다. 신세포암에서, PD-L1이 상승조절되고, PD-1의 증가된 발현이 종양 침윤성 백혈구에서 또한 확인되었다. 항-PD-L1 및 항-PD-1 항체는 신세포암의 1단계 시험에서 약간의 임상적 효능을 증명하였다. PD-1 또는 PD-L1에 결합할 수 있는 치료제는 종양 세포를 특이적으로 표적화하는 데 유용할 수 있다. PD-1/PD-L1 상호작용을 차단할 수 있는 제제는 항-종양 T 세포 활성을 회피하는 T 세포 고갈을 유도하는 암을 치료하는 데 더욱더 유용할 수 있다. 상기 제제의 단독 또는 다른 항암 치료제와 함께 사용은 PD-L1을 과발현하는 종양 세포

를 효과적으로 표적화하고, 항-중양 T 세포 활성을 증가시켜, 중양 세포를 표적화하는 면역 반응을 증대시킬 수 있다.

- [0035] PD-1 및 PD-L1은 또한 만성 항원 자극 후 T 세포, 예를 들어 만성 감염에 의해 상승조절될 수 있다. 만성 HIV 감염시, HIV-특이적 CD8+ T 세포는 기능적으로 손상되어, 사이토카인 및 이펙터 분자의 생산능의 감소 및 증식능의 감소를 나타낸다. PD-1은 HIV 감염된 개체의 HIV-특이적 CD8+ T 세포에서 높이 발현된다. 따라서, 상기 경로의 차단은 HIV 펩티드 자극에 반응하여 HIV-특이적 세포가 증식하고 사이토카인을 생산하는 능력을 상승시켜 HIV에 대한 면역 반응을 증대시킬 수 있다. 그 밖의 만성 감염, 예를 들어 만성 바이러스, 세균 또는 기생충 감염은 또한 PD-1/PD-L1 차단제의 사용으로 유익할 수 있다.
- [0036] 본 발명은 PD-L1 단백질에 특이적으로 결합하는 인간 단클론 항체를 제공한다. PD-L1에 본 발명의 항체 결합은 리간드가 그의 수용체 PD1에 결합하는 능력을 방해한다. 다양한 기전에 의해, huPD-L1 항체는 T 세포 반응을 억제하는 음성적인 피드백 기전을 방지한다. 일부 경우에는, huPD-L1 항체는 T 세포 고갈을 예방하고, 억제하거나 역전시킨다. huPD-L1 항체 투여는 T 세포 증식의 증가, 항원-특이적 T 세포 활성의 증가, 및 이펙터 사이토카인의 생산의 증가를 가져올 수 있다. 일부 경우에는, huPD-L1 항체는 항원 특이적 면역 반응을 촉진하거나 증대시킨다. 상기 면역 반응은 이펙터 T 세포에 의해 매개될 수 있다.
- [0037] huPD-L1 항체는 1가 또는 2가이고, 단쇄 또는 이중 쇄를 포함한다. 기능적으로, huPD-L1 항체의 결합 친화성은 10^{-5} M 내지 10^{-12} M 범위 내에 있다. 예를 들어, huPD-L1 항체의 결합 친화성은 10^{-6} M 내지 10^{-12} M, 10^{-7} M 내지 10^{-12} M, 10^{-8} M 내지 10^{-12} M, 10^{-9} M 내지 10^{-12} M, 10^{-5} M 내지 10^{-11} M, 10^{-6} M 내지 10^{-11} M, 10^{-7} M 내지 10^{-11} M, 10^{-8} M 내지 10^{-11} M, 10^{-9} M 내지 10^{-11} M, 10^{-10} M 내지 10^{-11} M, 10^{-5} M 내지 10^{-10} M, 10^{-6} M 내지 10^{-10} M, 10^{-7} M 내지 10^{-10} M, 10^{-8} M 내지 10^{-10} M, 10^{-9} M 내지 10^{-10} M, 10^{-5} M 내지 10^{-9} M, 10^{-6} M 내지 10^{-9} M, 10^{-7} M 내지 10^{-9} M, 10^{-8} M 내지 10^{-9} M, 10^{-5} M 내지 10^{-8} M, 10^{-6} M 내지 10^{-8} M, 10^{-7} M 내지 10^{-8} M, 10^{-5} M 내지 10^{-7} M, 10^{-6} M 내지 10^{-7} M 또는 10^{-5} M 내지 10^{-6} M이다.
- [0038] 또한, 본 발명의 항체는 독소, 방사성 표지, siRNA 또는 사이토카인을 포함한 치료제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0039] huPD-L1 항체는 세포 사멸을 유도할 수 있다. 세포 사멸은 직접적 또는 간접적 기전에 의해 유도된다. 예를 들어, huPD-L1 항체에 의한 PD-L1 결합은 보체 의존성 세포독성(CDC)을 일으킬 수 있다. 대안적으로, huPD-L1 항체는 PD-L1에 결합하고, PD-L1-발현 표적 세포를 사멸시킬 2차 세포 유형의 동원을 일으킨다. huPD-L1 항체가 2차 세포 유형의 동원에 의해 세포 사멸을 매개하는 대표적인 기전은 항체 의존성 세포독성(ADCC) 및 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 표적 PD-L1-발현 세포 유형은 중양 및 T 세포, 예를 들어 활성화된 T 세포를 포함한다.
- [0040] 14가지 고유한 단클론 huPD-L1 항체가 확인되었다. 여기에는 Ab-14, Ab-16, Ab-22, Ab-30, Ab-31, Ab-32, Ab-38, Ab-42, Ab-46, Ab-50, Ab-52, Ab-55, Ab-56 및 Ab-65가 포함된다.
- [0041] 단클론 huPD-L1 항체의 핵산 및 아미노산 서열은 하기에 제공된다.

표 1

표 1A. Ab-14 가변 영역 핵산 서열
Ab-14의 V _H 사슬 (서열 번호 1)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTC TGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAT GGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACA TCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGC TCTACTAGTGGGACTATACTGGTCGGAGTTGGTTCGACCCTGGGGCCAGGGAAACCCTGGTCACCGTCTCCT CA
Ab-14의 V _L 사슬 (서열 번호 3)
AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAAGACGGTAACCATCTCCTGCAACCCGACG CAGTGGCAACATTTGCCAGCAATATGTGCAGTGGTACCAACAGCGCCCGGGCAGTGCCCCACCACCTGTGATCT ATGAGGATAACCAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTTGCC TCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGTCAGTCTTATGATAGCAGCAATCT TTGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTTA
표 1B. Ab-14 가변 영역 아미노산 서열
Ab-14의 V _H 사슬 (서열 번호 2)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSTYSYGISWVRQAPGQGLEWMGWI SAYNGNTNYAQLQGRVTMTTDT STSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARALPSGTLVGGWFDPWGQGLVTVSS
Ab-14의 V _L 사슬 (서열 번호 4)
NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGNIASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRPSPGVPDRFSGSIDSSNSA SLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNLWVFGGGTKLTVL

[0042]

표 2

표 2A. Ab-16 가변 영역 핵산 서열
Ab-16의 V _H 사슬 (서열 번호 5)
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTACACCTTTAGCAGCTATGCCCTGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAG CTATTAGTGGTGGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAAT TCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTAAGTGTGGAAAGA CGTGTTCAGAGACTTTTTCGATGAACACTACGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCT CA
Ab-16의 V _L 사슬 (서열 번호 7)
TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCCTGCTGTGCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGA CAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTGTGCATCTATGGTA AAAACAAACGGCCCTCAGGGATCCCAAGCCGATTCCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCCTTGACCATC ACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTCCGGGACAGCAGTGGTAACCATTAATGTCCTT CGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCTTA
표 2B. Ab-16 가변 영역 아미노산 서열
Ab-16의 V _H 사슬 (서열 번호 6)
EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYALSWVRQAPGKLEWVSAISGGGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKDVFPETFSMNYGMDVWGQGLVTVSS
Ab-16의 V _L 사슬 (서열 번호 8)
SSELTQDPAVSVVALGQTVRITCGDLSLSYASWYQQKPGQAPVLIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTI TGAQAEDADYYCNSRDSSGNHYVFGTGTKTVL

[0043]

표 3

표 3A. Ab-22 가변 영역 핵산 서열
Ab-22의 V _H 사슬 (서열 번호 9)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGGCGTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTCACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGTC AAGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCTC TTATATAGTGGGGATGGTGGTAGCACATACTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAAC AGCAAAAACCTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGTCTGAGAACTGAGGACACCGCCTGTATTTACTGTGCAAAAGT GCTCCTCCCCTGTAGTAGTACCAGCTGTATGGAAGCGTCCGGTGTCTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACCACGG TCACCGTCTCCTCA
Ab-22의 V _L 사슬 (서열 번호 11)
TAGGACGATGAGCTCGGTCCAGCTCCGAAGACATAATGATCACTATTATTATCCACACCTGACAGTAATAAT CGGCCTCATCACCGGCTTCGACCCCTGCTGATGGTCAGGGTGGCCGTGTCCAGAGTTGGAGCCAGAGAATCGC TCAGAGATCCCTGAGGGCCGGTCCCTATCAGAGTAGATGACCAACGCAAGGGCC TGGCCTGGCTTCTCTGGTA CCAGTGCACACTCTTCCTTCCAATGTGCTTCCCCACAGGTAATCTGGCCGTCTTCTGGGGCCACTGACA CTGAGGGTGCCTGAGTCAGCACAGGCAG
표 3B. Ab-22 가변 영역 아미노산 서열
Ab-22의 V _H 사슬 (서열 번호 10)
QVQLVQSGGQVVPFGSSRLRSCAASGFTFDYAMHWVRQAPGKLEWVSLISGDGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNSLYLQMNLRLEDALYCAKVLPLCSSTSCYGSVGAFDIWGQGTITVTVSS
Ab-22의 V _L 사슬 (서열 번호 12)
LPVLTQAPSVSVAPGKTRITCGGSDIGRKSVMHWYQQKPGQAPALVIYSRDRPFGISERFSGSNSGNTATLTII SRVEAGDEADYVYQVVDNNSDHYVFGAGTELIVL

[0044]

표 4

표 4A. Ab-30 가변 영역 핵산 서열
Ab-30의 V _H 사슬 (서열 번호 13)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAAGTGTGGTACGGCCTGGGGAATCCCTCAGACTCTCCTGTGTAGCCTC TGGATTCATCTTTGATAATTATGACATGAGTTGGGTCCGCCAAGTTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTC GTGTTAATGGAAATGGTGGTAGCACAACCTTATGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAAC ACCAAGAACTCCCTGTATCTACAAATGAACAACCTGAGAGCCGAAGACACGGCCGTGTATTTACTGTGTGCGCGA GTTTGTCTGGTGTATGATCTCTGGGGCCAGGGGACCACGGTCAACCGTCTCCTCA
Ab-30의 V _L 사슬 (서열 번호 15)
CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAAC CAGCAGTACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCCTGGTACCAACAACCCAGGCAAGGCCCAAACTCATGA TTTATGATGTCAGTAATCGGCCCTCAGGGGTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCC CTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTAATTAAGTCAAGTCAATATAAGCAACTCTGCC GTTCCGGCGGAGGACCAAGCTGACCGTCCCTA
표 4B. Ab-30 가변 영역 아미노산 서열
Ab-30의 V _H 사슬 (서열 번호 14)
QVQLVQSGGQVVRPGEISRLRSCVASGFI FDNYDMSWVRQVPGKLEWVSRVNWNGGSTYYADAVKGRFTISRDN TKNSLYLQMNLRRAEDTAVYYCVREYVGAIDLWGQGTITVTVSS
Ab-30의 V _L 사슬 (서열 번호 16)
QSALTQAPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKPLMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTAS LTISGLQAEDADYVCSSTSLPFGGGTKLTVL

[0045]

표 5

표 5A. Ab-31 가변 영역 핵산 서열
Ab-31의 V _H 사슬 (서열 번호 17)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGGGCCACAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGTTT TGGAGACACCTCCCGGGCTCTATATACACTGGGTGCACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAATGGATGGGAG GGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACACGCACAGAAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCACGGACGAA TCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGCGG ACTACGTTGGGGATCTGGGGCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCA
Ab-31의 V _L 사슬 (서열 번호 19)
GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGCAGGGC CAGTCAGAGTATTGGCAACAGCTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCCTCCAGGCTCCTCATGTATG GTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGGCTGGGACAGACTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTGCAACGTATTACTGTGACAGCATACTATCCCAACATCTCTTTTCGG CCCTGGGACCAAAGTGGAGTCAA
표 5B. Ab-31 가변 영역 아미노산 서열
Ab-31의 V _H 사슬 (서열 번호 18)
QVQLVQSGAEVKKPGATVKVSKVFGDTFRGLYIHWRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITTTDE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASGLRWGIWGFDPWGQGLTVVSS
Ab-31의 V _L 사슬 (서열 번호 20)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIGNSLAWYQQKPGQAPRLLMYGASSRATGIPDRFSGSGAGTDFTLT ISSLEPEDFATYYCQQHTIPTFSPGPKVEVK

[0046]

표 6

표 6A. Ab-32 가변 영역 핵산 서열
Ab-32의 V _H 사슬 (서열 번호 21)
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTT TGGAGGCACCTTCAGTGACAATGCTATCAGCTGGGTGCACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAATGGATGGGGG GCATCATTCCTATCTTTGGAAAACCAAACACGCACAGAAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAA TCCACGAGCACTGCCTACATGGTCCGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAGAAC TATGGTTCCGGGCTTTCTTGGGTTATGGACGCTCGGGCCAAAGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
Ab-32의 V _L 사슬 (서열 번호 23)
GATATTGTGATGACCCAGACTCCATCCTTCTGTCGATCCATAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCTGGC CAGTCAGGGCATTGGCAGTTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAGACCAGGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATG CTGCATCGACTTTGCAAAGTGGAGTCCATCAAGGTTTCAAGGTCAGCGGAGTGGATCTGGGACGGACTTCACTCTCACA ATCAGCAACCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCAACAGCTTAATAATTACCCGATCACCTTCGG CAAAGGGACACGACTGGAGATTAAA
표 6B. Ab-32 가변 영역 아미노산 서열
Ab-32의 V _H 사슬 (서열 번호 22)
EVQLVQSGAELKPKGSSVKVSKAFGGTFSDNAISWVRQAPGQGPWMGGIIPIFGKPNYAQKFQGRVTITADE STSTAYMVLSSLRSEDTAVYYCARTMVRGFLGVMVWGQGLTVVSS
Ab-32의 V _L 사슬 (서열 번호 24)
DIVMTQTPSFSLASIGDRVTTTCRASQGIISYLAWYQQRFGEAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISNLQPEDFATYYCQQLNNYPITFGQGLRLEIK

[0047]

표 7

표 7A. Ab-38 가변 영역 핵산 서열
Ab-38의 V _H 사슬 (서열 번호 25) CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCACAG CTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAAT TCCAAGAACCAGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGA TCAGTTCTGTACGATTTTGGAGTGCCAAGATACGGTATGGACGCTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCCACCGTCT CCTCA
Ab-38의 V _L 사슬 (서열 번호 27) CAGTCTGCCCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCAACATCCCTGCTCTGGAGA TAAATTGGGGAATAAATATGCTTACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCTGTACTGCTCATCTATCAAG ATATCAAGCGGCCCTCAAGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGCGGACACAGCCACTCTGACCATC AGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGACGTGGGACAACAGCGTGGTCTTCGCGCGCGG GACCAAGCTGACCGTCCCTC
표 7B. Ab-38 가변 영역 아미노산 서열
Ab-38의 V _H 사슬 (서열 번호 26) QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSLRSEDVAVYYCAKDDQFVTFVGVPRYGMDFWVGGTFTVTVSS
Ab-38의 V _L 사슬 (서열 번호 28) QSALTQPPSVSVSPGQTANIPCSGDKLGNKYAYWYQQKPGQSPVLLIYQDIKRPSRIPERFSGSNSADTATLTI SGTQAMDEADYYCQTDWNSVVFEGGKLTIVL

[0048]

표 8

표 8A. Ab-42 가변 영역 핵산 서열
Ab-42의 V _H 사슬 (서열 번호 29) CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTCCTCTGCAAGGCTTC TGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGGATGGATGGGAG GGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTACAGTACCGCGGACAAA TCCACGAGCAGCCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCGAGAGG GCGTCAAATGTTCCGGTGCGGGAATTGATTTCTGGGGCCCGGGCACCCCTGGTCCACCGTCTCCTCA
Ab-42의 V _L 사슬 42 (서열 번호 31) AATTTTATGCTGACTCAGCCCACTCTGTGTCCGGAGTCTCCGGGAAGACGGTAACCATCTCCTGCACCCGCAG CAGTGGCAGCATTGACAGCAACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCAGCGCCCCACCCTGTGATCT ATGAGGATAACCAAGACCCCTGGGGTCCCTGATCGGTCTCTGGCTCCAATCGACAGCTCCTCCAACCTGCG TCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGTCAGTCTTATGATAGCAACAATCG TCATGTGATATTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCCTA
표 8B. Ab-42 가변 영역 아미노산 서열
Ab-42의 V _H 사슬 (서열 번호 30) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGLEWMGGIIFIFGTANYAQKFKGRVTTITADK STSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGRQMFAGIDFWGPGTLVTVSS
Ab-42의 V _L 사슬 (서열 번호 32) NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSDSNVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSNSA SLTISGLKTEDEADYYCQSYDSNNRHVIFGGKLTIVL

[0049]

표 9

표 9A. Ab-46 가변 영역 핵산 서열
Ab-46의 V _H 사슬 (서열 번호 33)
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAAGTAAAGAAGCCTGGGTCCCGGTGAAAGTCTCCTGCAAGGTTTC AGGAGGCACATTCGGCACCTATGCTCTCAACTGGGTGCCAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAA GGATCGTCCCTCTCATTGGTCTAGTAAACTACGCACATAACTTTGAGGGCAGAACTCGATTACCGGGACAAG TCCACGGGCACAGCCTACATGGAACAGCAACCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGA GGTCTACGGTGGTAACTCCGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA
Ab-46의 V _L 사슬 (서열 번호 35)
AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCAGTGTGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACCATCTCCTGCACTCGCAG TAGTGGCAACATTGGCACCACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCAGTGCCCCGTCGCTTTGATCT ACGAGGATTATCGAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCC TCCCTCATCATCTCTGGACTGAAGCCTGAGGACAGGGTGACTACTACTGTCAGTCTTATCATAGCAGCGGTTG GGAATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCCTC
표 9B. Ab-46 가변 영역 아미노산 서열
Ab-46의 V _H 사슬 (서열 번호 34)
EVQLVDSGAEVKKPKGSSVKVSKVSGGTFTGYALNWVRQAPGQGLEWMGRIVPLIGLVNYAHNFEGRISITADK STGTAYMELSNLRSDDTAVYYCAREVYGGNSDYWQQGTLTVTVSS
Ab-46의 V _L 사슬 (서열 번호 36)
NEMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGNIIGNYVQWYQQRPGSAPVALIYEDYRRPSGVPDRFSGSIDSSNSA SLIISGLKPEDEADYYCQSYHSSGWEFGGGTKLTVL

[0050]

표 10

표 10A. Ab-50 가변 영역 핵산 서열
Ab-50의 V _H 사슬 (서열 번호 37)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGGTGAGGTGAAGAAGCCGGGGCCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTC TGGTTACACCTTGAGCAGTCTATGGTATAAOCCTGGGTGCCAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAT GGATCAGCGCTCACAATGGTCACGCTAGCAATGCACAGAAGGTGGAGGACAGAGTCACTATGACTACTGACACA TCCACGAACACAGCCTACATGGAACAGGAGCCTGACAGCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGT ACATGCTGCCCTCTACTATGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA
Ab-50의 V _L 사슬 (서열 번호 39)
CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAA CAACATTGGAAGTAAAGGTGTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTACTGGTCGCTATGATG ATAGTGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATC AGCAGGGTCCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGGATAGTAGTAGTGATCATTTGGGTGTT CGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCCTA
표 10B. Ab-50 가변 영역 아미노산 서열
Ab-50의 V _H 사슬 (서열 번호 38)
QVQLVQSGGEVKKPGASVKVSKCASGYTLSSHGITWVRQAPGQGLEWMGWI SAHNGHASNAQKVEDRVTMTTDT STNTAYMELRSLTADDTAVYYCARVHAALYYGMDVWVWQGTLLVTVSS
Ab-50의 V _L 사슬 (서열 번호 40)
QSVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKGVHWYQQKPGQAPVLYVYDSDRPSGIPERFSGSNSGNATLTI SRVEAGDEADYYCQVWVDSSTHWFVGGTKLTVL

[0051]

표 11

표 11A. Ab-52 가변 영역 핵산 서열
Ab-52의 V _H 사슬 (서열 번호 41)
CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGAGGCGTGGTGCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTCAGCCTC TGGATTACCTTCAGCAGACATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAG TGATAACACATGATGGAAGTGTAATACTATGCAGACTCCATGAAGGGCCGATTTCAGCATCTCCAGAGACAAT TCCAACACACACTGTATCTCCAAATGGACAGCCTGAGAGCTGACGACACGCGCTTTATCTACTGTGCGAGAGG ACTGTCGTACACAGGTGTCGGGGTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA
Ab-52의 V _L 사슬 (서열 번호 43)
AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTGCGGAGTCTCCGGGAAGACGGTAACCATCTCCTGCACCCGCAG CAGTGGCAGCATTGCCAGCAACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCAGTCCCCCACCCTGTGATCT ATGAGGATAACCAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCC TCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGTGAGTCTTATGATAGCACACCC TTCGGTGTTCGGCGGGGGACCAAGCTGACCGTCTCA
표 11B. Ab-52 가변 영역 아미노산 서열
Ab-52의 V _H 사슬 (서열 번호 42)
QVQLQESGGGVVQPRSLRLSCSASGFTFSRHGMHWVRQAPGKLEWVAVISHDGSVKYYADSMKGRFSISRDN SNNTLYLQMDSLRADDTAVYYCARGLSYQVSGWFDWFGQGLVTVSS
Ab-52의 V _L 사슬 (서열 번호 44)
NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQRPGSAPTTVIYEDNQRPSPGVPDRFSGSIDSSNSA SLTISGLKTEADYYCQSYDSTTPSVFGGGKLTVL

[0052]

표 12

표 12A. Ab-55 가변 영역 핵산 서열
Ab-55의 V _H 사슬 (서열 번호 45)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTC TGGTTACACCTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCAGAGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAT GGACCAGCCCTCATAATGGTCTCACAGCATTTGCACAGATCCTAGAGGGCCGAGTCACCATGACCACAGACACA TCCACGAACACAGCCTACATGGAATGAGGAACCTGACATTTGATGACACGCGCTTTATTTCTGTGCGAAAGT ACATCCTGTCTTCTCTTATGCGTTGGACGCTCTGGGGCCAAGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA
Ab-55의 V _L 사슬 (서열 번호 47)
AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTGCGGAGTCCCCGGGAAGACGGTAACCATCTCCTGCACCCGCAG CAGTGGCAGCATTGCCAGCAACTATGTACAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCAGTCCCCCACCCTGTGATCT ATGAAGATAACCAAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACACCTCCTCCAACCTCTGCC TCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGACTAAGGACGAGCGGACTACTACTGTGAGTCTTATGATGGCATCACTGT GATTTTCGGCGGAGGGACCAAGTTGACCGTCTCA
표 12B. Ab-55 가변 영역 아미노산 서열
Ab-55의 V _H 사슬 (서열 번호 46)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWTSFHNGLTAFQAQILEGRVTMTTDT STNTAYMELRNLTFDDTAVYFCAKVHPVFSYALDVWVGQGLVTVSS
Ab-55의 V _L 사슬 (서열 번호 48)
NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQRPGSPTTVIYEDNQRPSPGVPDRFSGSIDSSNSA SLTISGLKTKDEADYYCQSYDGTIVIFGGGKLTVL

[0053]

표 13

표 13A. Ab-56 가변 영역 핵산 서열
Ab-56의 V _H 사슬 (서열 번호 49)
GAGGTGCAGCTGGTGGAGCTGGAGCTGAGGTGATGAACCTGGGTCCGCTCGGTGAGGGTCTCCTGCAGGGGTTCTGGAGGCGACTTCAGTACCTATGCTTTCAGCTGGGTGCACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAA GGATCATCCCTATCCTTGGTATAGCAAACCTACGCACAGAAGTCCAGGGCAGGGTCACGATTACCGCGGACAAA TCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGACGATACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGA TGGCTATGGTTCGGACCCGGTGTATGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA
Ab-56의 V _L 사슬 (서열 번호 51)
AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGGGTCTCCGGGAAGACGGTAACCCCTCCCTGCACCCGCAG CAGTGGCAGCATTGCCAGCCACTATGTCCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCAGTCCCCCACCCTGTGATCT ATGAGGATAACAAGAGACCCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCC TCCCTCAGCATCTCTGGACTGAAGACTGAGGACAGGCTGACTACTACTGTCTAGTCTTATGATAGCAGCAATCG TTGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
표 13B. Ab-56 가변 영역 아미노산 서열
Ab-56의 V _H 사슬 (서열 번호 50)
EVQLVESGAEVMNPGSSVRVSCRSGSGGDFSTYAFSWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVITADK STSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARDGYGSDPVLWGQGLTLTVSS
Ab-56의 V _L 사슬 (서열 번호 52)
NFMLTQPHSVSGSFGKTVTLPCSTRSGSIASHYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNKRPSGVPDRFSGSIDSSNSA SLISISGLKTEDEADYYCQSYDSSNRWVFGGGTKLTVL

[0054]

표 14

표 14A. Ab-65 가변 영역 핵산 서열
Ab-65의 V _H 사슬 (서열 번호 53)
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTC TGGTTACACCTTTACCAACTATGGTATCAGCTGGGTGCACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAT GGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACA TCCACGAGCACAGGCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGG AGATTTTCGGAAACCCCTTACTACTGGGGCCAGGAAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA
Ab-65의 V _L 사슬 (서열 번호 55)
CTGCTGTGCTGACTCAGCCGGCTTCCCTCTCTGCATCCCCGGAGCATCAGCCAGTCTCACCTGCACCTTACG CAGTGGCCCTCAATGTTGGTTCCTACAGGATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAGTCTCCCCAGTATCTCC TGAATAACAAATCAGACTCAAATAAACAGCAGGCTCTGGAGTCCCCAGCCGCTTCTCTGGATCCAAGGATGCT TCGGCCAATGCAGGGATTTTACTCATCTCCGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTATGATTTG GTACAGCAGCGCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
표 14B. Ab-65 가변 영역 아미노산 서열
Ab-65의 V _H 사슬 (서열 번호 54)
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKVQGRVMTTDT STSTGYMELRSLRSDDTAVYYCARGDFRKPFDYWGQGLTLTVSS
Ab-65의 V _L 사슬 (서열 번호 56)
LPVLTQPASLSASFASASLTCTLRSLNVGSYRIYWYQQKPSRPQYLLNYKSDSNKQQASGVPSRFSGSKDA SANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWYSSAVVFGGGTKLTVL

[0055]

[0056] huPD-L1 항체의 중쇄 및 경쇄의 상보성 결정 영역의 아미노산 서열은 하기 표 15 및 15B에 나타낸다.

표 15

표 15A. 중쇄의 상보성 결정 영역의 아미노산 서열

항체	CDR1	서열 번호	CDR2	서열 번호	CDR3	서열 번호
공통	SYAIS	57	WISPIGGSTNYAQKVG	70	GLXXXXXXXXXXXXXXXXXDV	85
Ab-14	SYGIS	58	WISAYNGNTNYAQKLED	71	ALPSGTILVGGWFDP	86
Ab-16	SYALS	59	AISGGGGSTYYADSVKD	72	DVFPETFSMNYGMDV	87
Ab-22	DYAMH	60	LISGDGGSTYYADSVKD	73	VLLPCSSTSCYGSVGFADI	88
Ab-30	NYDMS	61	RVNWNGGSTYYADAVKD	74	EFVGAYDL	89
Ab-31	GLYIH	62	WIIPIFGTANYAQKFED	75	GLRWGIWGFDP	90
Ab-32	DNAIS	63	WIIPIFGKPNYAQKFED	76	TMVRGFLGVMDV	91
Ab-38	SYAMS	64	AISGGGGSTYYADSVKD	77	DQFVTIFGVPRYGMDV	92
Ab-42	SYAIS	57	WIIPIFGTANYAQKFED	78	GRQMFAGIDF	93
Ab-46	TYALN	65	RIVPLIGLVNVAHNFD	79	EVYGGNSDY	94
Ab-50	SHGIT	66	WISAHNGHASNAQKVED	80	VHAALYYGMDV	95
Ab-52	RHGMH	67	VISHDGSVKYYADSMKD	81	GLSYQVSGWFDP	96
Ab-55	SYGIS	58	WTSFHNGLTAFQAILED	82	VHPVFSYALDV	97
Ab-56	TYAFS	68	RIIPILGIANYAQKFED	83	DGYGSDPVL	98
Ab-65	NYGIS	69	WISAYNGNTNYAQKVED	84	GDFRKFVDY	99

표 15B. 경쇄의 상보성 결정 영역의 아미노산 서열

항체	CDR1	서열 번호	CDR2	서열 번호	CDR3	서열 번호
공통	TRSSGSIGSNVYQ	100	EDNQRP	115	QSYDSSSTWV	126
Ab-14	TRSSGNIASNVYQ	101	EDNQRP	115	QSYDSSNLWV	127
Ab-16	QGDSLRSYYAS	102	GKNNRP	116	NSRDSSGNHYV	128
Ab-22	GGSDIGRKSVD	103	SDRDRP	117	QVWDNNSDHYV	129
Ab-30	TGTSSDVGGYNYVS	104	DVSNRP	118	SSYTSSTLP	130
Ab-31	RASQSIGNSLA	105	GASSRAT	119	QQHTIPTFS	131
Ab-32	RASQIGSYLA	106	AASTLQS	120	QQLNNYPIT	132
Ab-38	SGDKLGNKYAY	107	QDIKRP	121	QTDWNSVV	133
Ab-42	TRSSGSIDSNVYQ	108	EDNQRP	115	QSYDSNNRHVI	134
Ab-46	TRSSGNIGTNVYQ	109	EDYRRP	122	QSYHSSGWE	135
Ab-50	GGNNIGSKGVH	110	DDSDRP	123	QVWDSSSDHWV	136
Ab-52	TRSSGSIASNVYQ	111	EDNQRP	115	QSYDSTTPSV	137
Ab-55	TRSSGSIASNVYQ	112	EDNQRP	115	QSYDGITVI	138
Ab-56	TRSSGSIASHYVQ	113	EDNKRPS	124	QSYDSSNRWV	139
Ab-65	TLRSGLVGSYRIY	114	YKSDSNKQAS	125	MIWYSSAVV	140

[0057]

[0058]

본원에서 기재된 huPD-L1 항체는 PD-L1에 결합한다. 한 측면에서, huPD-L1 항체는 PD-L1에 대해 높은 친화성 및 높은 특이성을 갖는다. 또 다른 측면에서, huPD-L1 항체는 PD-1 수용체에 결합하고, 리간드 PD-L1이 그의 수용체 PD-1에 결합하는 것을 방지하고, 억제하거나 차단할 수 있다. 일부 경우에는, huPD-L1 항체는 PD-L2와 약간의 교차 반응성을 가질 수 있다. 일부 경우에는, huPD-L1 항체는 PD-L2와 교차 반응성을 전혀 나타내지 않는다. 일부 경우에는, huPD-L1 항체는 PD-L2보다 PD-L1에 더 높은 친화성 및/또는 더 높은 특이성으로 결합한다.

[0059]

또한, 본 발명은 본원에서 기재된 huPD-L1 항체의 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열에 대해 명시된 비율의 동일성 또는 유사성을 갖는 항체를 특징으로 한다. 예를 들어, 항체는 본원에서 기재된 임의의 huPD-L1 항체의 명시된 영역 또는 전장과 비교할 때 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 더 높은 동일성을 가질 수 있다. 본 발명의 핵산 및 단백질에 대한 서열 동일성 또는 유사성은 당업계에 공지된 방법에 의한 서열 비교 및/또는 정렬에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 서열 비교 알고리즘(즉,

BLAST 또는 BLAST 2.0), 수동 정렬, 육안 검사를 이용하여 본 발명의 핵산 또는 단백질의 퍼센트 서열 동일성 또는 유사성을 결정할 수 있다.

[0060] 아미노산 서열과 관련하여, 당업자는 코딩되는 서열 내의 단일 아미노산 또는 낮은 비율의 아미노산을 변경, 첨가, 제거 또는 치환하는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 서열로의 각각의 치환물, 결실물 또는 첨가물이 본원에서 총체적으로 "보존적으로 변형된 변이체"로 언급된다는 것을 쉽게 인지할 것이다. 일부 실시양태에서, 변경은 아미노산을 화학적으로 유사한 아미노산으로 치환을 가져올 수 있다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당 업계에 공지되어 있다. huPD-L1 항체의 이같이 보존적으로 변형된 변이체는 변형되지 않은 huPD-L1 항체와 비교하여 PD-L2에 대해 증가된 교차 반응성을 나타낼 수 있다.

[0061] 항체

[0062] 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린(Ig) 분자의 면역적으로 활성인 영역, 즉, 항원에 특이적으로 결합하는(면역 반응하는) 항원 결합 부위를 포함하는 분자를 나타낸다. "특이적으로 결합하다" 또는 "면역반응하다"는 항체가 원하는 항원의 하나 이상의 항원 결정인자와 반응하고 다른 폴리펩티드와는 반응하지 않는다는 것을 의미한다. 항체는 다클론, 단클론, 키메라, dAb(도메인 항체), 단쇄, F_{ab}, F_{ab'} 및 F_{(ab')₂} 단편, scFv, 및 F_{ab} 발현 라이브러리를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0063] 단쇄 Fv("scFv") 폴리펩티드 분자는 공유 결합된 V_H:V_L 헤테로 이합체이며, 이것은 펩티드 코딩 링커에 의해 연결된 V_H- 및 V_L-코딩 유전자를 포함하는 유전자 융합체로부터 발현될 수 있다(문헌(Huston et al. (1988) Proc Nat Acad Sci USA 85(16):5879-5883) 참조). 항체 V 영역의 자연적으로 응집되지만 화학적으로 분리된 경쇄 및 중쇄 폴리펩티드를, 항원-결합 부위의 구조와 실질적으로 유사한 3차원 구조로 접힐 수 있는 scFv 분자로 전환시키기 위한 화학 구조를 식별하는 수많은 방법이 개시되어 왔다. 예를 들어, 미국 특허 제5,091,513호, 제 5,132,405호, 제4,946,778호를 참조한다.

[0064] 과다한 표적 분자에 대해 다양한 공급원의 재배열된 항체 유전자를 제공하기 위해 매우 큰 미접촉 인간 scFv 라이브러리가 생성되어졌고, 생성되어질 수 있다. 질환 특이적 항체를 단리하기 위하여 감염 질환을 갖는 개체로부터 더 작은 라이브러리가 제작될 수 있다.(문헌(Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9339-43 (1992));(Zebedee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3175-79 (1992)) 참조).

[0065] 일반적으로 인간으로부터 얻어진 항체 분자는 분자 내에 존재하는 중쇄의 특성으로 서로 구분되는 임의의 클래스 IgG, IgM, IgA, IgE 및 IgD와 관련된다. 어떤 클래스는 또한 서브클래스, 예를 들어 IgG₁, IgG₂ 등을 갖는다. 또한, 인간에서 경쇄는 카파 사슬 또는 람다 사슬일 수 있다. 용어 "항원-결합 부위," 또는 "결합 영역"은 항원 결합에 관여하는 면역글로불린 분자의 일부분을 나타낸다. 항원 결합 부위는 중쇄("H") 및 경쇄("L")의 N-말단 가변("V") 영역의 아미노산 잔기에 의해 형성된다. "초가변 영역"으로 나타내는 중쇄 및 경쇄의 V 영역 내의 매우 다른 세 개의 스트레치는 "프레임워크 영역," 또는 "FR"로 알려진 보다 보존된 측면 스트레치 사이에 삽입되어 있다. 따라서, 용어 "FR"은 면역글로불린 내 초가변 영역 사이 및 인접하게 자연적으로 발견되는 아미노산 서열을 나타낸다. 항체 분자에서, 경쇄의 세 개의 초가변 영역 및 중쇄의 세 개의 초가변 영역은 항원 결합 표면을 형성하는 3차원 공간에서 서로 상대적으로 배치된다. 항원 결합 표면은 결합된 항원의 3차원 표면에 상보적이고, 중쇄 및 경쇄 각각의 세 개의 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로 나타낸다. scFv 항체의 VH 및 VL 영역의 CDR은 [도 2]에 나타낸다.

[0066] 본원에서 사용되는 용어 "에피토프"는 면역글로불린, scFv, 또는 T 세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 단백질 결정인자를 포함한다. 에피토프 결정인자는 대개 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 분자 집단으로 이루어지며, 보통 특이한 3차원 구조적 특징, 및 특이한 전하 특징을 갖는다. 예를 들어, 항체는 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 펩티드에 대해 생성될 수 있다.

[0067] 본원에서 사용되는 용어 "면역적 결합," 및 "면역적 결합 특성"은 면역글로불린 분자와 면역글로불린이 특이성을 갖는 항원 사이에 발생할 수 유형의 비공유적 상호작용을 나타낸다. 면역적 결합 상호작용의 세기 또는 친화성은 상호작용의 해리 상수(K_d)로 표현될 수 있으며, K_d가 작을 수록 더 큰 친화성을 나타낸다. 선택된 폴리펩티드의 면역적 결합 특성은 당 업계에 공지된 방법을 이용하여 정량될 수 있다. 이러한 한 가지 방법은 항원-결합 부위/항원 복합체 형성 및 해리의 속도를 측정하는 단계를 수반하며, 이들 속도는 복합체 파트너의 농도, 상호작용의 친화성, 및 양 방향 속도에 동등하게 영향을 주는 기하학적 요인에 의존한다. 따라서, "온 레이트(on rate) 상수" (K_{on}) 및 "오프 레이트(off rate) 상수" (K_{off})는 농도, 및 결합 및 해리의 실제 속도를 계산하여

결정될 수 있다(문헌(Nature 361:186-87 (1993)) 참조). K_{off}/K_{on} 비는 친화성과 관련되지 않은 모든 요인을 무효화시킬 수 있으며, 해리 상수 K_d 와 같다(일반적으로, 문헌(Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473) 참조). 평균 결합 상수 (K_d)가 당업자에게 공지된 방사능 리간드 결합 분석 또는 유사한 분석과 같은 분석에 의해 측정된 바 $\leq 10 \mu M$, 바람직하게는 $\leq 10nM$, 보다 바람직하게는 $\leq 10nM$, 가장 바람직하게는 $\leq 100 pM$ 내지 약 $1 pM$ 일 때 본 발명의 항체는 PD-L1 에피토프에 특이적으로 결합한다고 말한다.

[0068] 본 발명의 PD-L1 단백질 또는 그의 유도체, 단편, 유사체, 상동체 또는 오솔로그(ortholog)는 이들 단백질 구성성분에 면역특이적으로 결합하는 항체의 생성에 있어 면역원으로 이용될 수 있다. 단백질 리포솜에 결합된 본 발명의 PD-L1 단백질 또는 그의 유도체, 단편, 유사체, 상동체 또는 오솔로그는 이들 단백질 구성성분에 면역특이적으로 결합하는 항체의 생성에 있어 면역원으로 이용될 수 있다.

[0069] 당업자는 과도한 실험 없이도 인간 단클론 항체가 본 발명의 인간 단클론 항체가 PD-L1에 결합을 방지하는지의 여부를 알아냄으로써, 전자가 후자와 동일한 특이성을 갖는 지를 결정할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 본 발명의 인간 단클론 항체에 의한 결합 감소로 나타난 바와 같이, 시험되는 인간 단클론 항체가 본 발명의 인간 단클론 항체와 경쟁을 한다면, 두 가지 단클론 항체는 동일한 또는 매우 연관된 에피토프에 결합할 것이다.

[0070] 인간 단클론 항체가 본 발명의 인간 단클론 항체의 특이성을 갖는 지를 결정하는 또 다른 방법은, 본 발명의 인간 단클론 항체를 그것이 정상적으로 반응성을 갖는 PD-L1 단백질과 미리 인큐베이션한 후 시험되는 인간 단클론 항체를 첨가하여 시험되는 인간 단클론 항체가 그의 PD-L1에 결합하는 능력이 억제되는 지를 결정하는 것이다. 시험되는 인간 단클론 항체가 억제되는 경우, 아마도 본 발명의 단클론 항체와 동일한 또는 기능적으로 등가인 에피토프 특이성을 갖는다. 본 발명의 인간 단클론 항체의 스크리닝은 PD-L1을 이용하여 시험 단클론 항체가 PD-L1을 중화시킬 수 있는 지를 결정하여 수행될 수 있다.

[0071] 당 업계에 공지된 여러 가지 방법이 본 발명의 단백질에 대해, 또는 그의 유도체, 단편, 유사체, 상동체 또는 오솔로그에 대해 지정된 단클론 또는 단클론 항체 생산에 이용될 수 있다.(예를 들어, 본원에 참고로 포함된 문헌(Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) 참고).

[0072] 항체는 공지된 방법, 예를 들어 면역 혈청의 IgG 분획을 주로 제공하는 단백질 A 또는 단백질 G를 이용한 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제될 수 있다. 이어서 또는 대안적으로, 원하는 면역글로불린의 표적 또는 그의 에피토프인 특이적 항원은 컬럼에 고정되어 면역친화성 크로마토그래피에 의해 면역 특이적 항체를 정제할 수 있다. 면역글로불린의 정제는 예를 들어 문헌(D. Wilkinson, The Scientist, published by The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28)에 논의되어 있다.

[0073] 본원에서 사용되는 용어 "단클론 항체" 또는 "MAb" 또는 "단클론 항체 조성물"은 고유한 경쇄 유전자 산물 및 고유한 중쇄 유전자 산물로 이루어진 항체 분자의 단일 분자 종만을 포함하는 항체 분자 집단을 나타낸다. 특히, 단클론 항체의 상보성 결정 영역(CDR)은 집단의 모든 분자에서 동일하다. MAb는 그에 대한 고유한 결합 친화성의 특징을 갖는 항원의 특정 에피토프와 면역반응을 할 수 있는 항원 결합 부위를 포함한다.

[0074] 단클론 항체는 하이브리도마 방법, 예를 들어 문헌(Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975))에 기재된 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 하이브리도마 방법에서, 마우스, 햄스터, 또는 그 외 적합한 숙주 동물은 전형적으로 면역화제로 면역되어, 면역화제에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도한다. 대안적으로, 림프구는 시험관 내에서 면역될 수 있다.

[0075] 면역화제는 전형적으로 단백질 항원, 그의 단편 또는 그의 융합 단백질을 포함할 것이다. 일반적으로, 인간 기원의 세포가 바람직한 경우에는 말초 혈액 림프구가 사용되거나, 비인간 포유동물 공급원이 바람직한 경우에는 비장 세포 또는 림프절 세포가 사용된다. 이어서, 림프구는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 용제를 사용하여 무한증식 세포주와 융합되어 하이브리도마 세포를 형성한다(문헌(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103)). 무한증식 세포주는 통상적으로 형질전환된 포유동물 세포, 특히 쥐, 소 및 인간 유래의 골수종 세포이다. 통상적으로 랫트 또는 마우스는 골수종 세포주가 이용된다. 하이브리도마 세포는 바람직하게는 융합되지 않은 무한증식 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 포함하는 적합한 배양 배지에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 부모 세포에 효소 하이포잔틴 구아닌 포스포 리보실 트랜스퍼라제(HGPRT 또는 HPRT)가 결여된 경우, 하이브리도마 배양 배지는 전형적으로 HGPRT 결핍 세포의 성장을 방지하는 물질인 하이포잔틴, 아미노프테린, 및 티미딘("HAT 배지")을 포함할 것이다.

- [0076] 바람직한 무한증식 세포주는 효율적으로 융합하고, 선택된 항체 생산 세포에 의한 안정되고 높은 수준으로 항체 발현을 지원하고, 배지, 예를 들어 HAT 배지에 민감한 것이다. 보다 바람직한 무한증식 세포주는 마우스 골수종 세포주이며, 이들은 예를 들어, 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California) 및 어메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection, Manassas, Virginia)으로부터 얻을 수 있다. 또한, 인간 골수종 및 마우스-인간 헤테로 골수종 세포주는 인간 단클론 항체의 생산에 대해 기재되어 있다(문헌(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibodies Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63)).
- [0077] 이어서, 하이브리도마 세포가 배양되는 배양 세포는 항원에 대해 지정된 단클론 항체의 존재에 대해 분석될 수 있다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 단클론 항체의 결합 특이성은 면역 침전법 또는 시험관 내 결합 분석, 예를 들어 방사성 면역분석법(RIA) 또는 효소 결합 면역흡착 측정법(ELISA)에 의해 결정될 수 있다. 상기 기술 및 분석법은 당 업계에 공지되어 있다. 단클론 항체의 결합 친화성은 예를 들어, 문헌(Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980))의 스캐차드 분석에 의해 결정될 수 있다. 또한, 단클론 항체의 치료 적용에 있어, 표적 항원에 대한 높은 정도의 특이성 및 높은 결합 친화성을 갖는 항체를 확인하는 것이 중요하다.
- [0078] 원하는 하이브리도마 세포가 확인되면, 클론은 한계 희석법에 의해 서브클로닝되고 표준 방법으로 배양될 수 있다(문헌(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103) 참고). 상기 목적에 적합한 배양 배지는 예를 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 및 RPMI-1640 배지를 포함한다. 대안적으로, 하이브리도마 세포는 포유동물의 복수와 같은 생체 내에서 배양될 수 있다.
- [0079] 서브클론에 의해 분비된 단클론 항체는 예를 들어 단백질 A-세파로스 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 통상적인 면역글로불린 정제 방법에 의해 배양 배지 또는 복수액으로부터 단리되거나 정제될 수 있다.
- [0080] 또한, 단클론 항체는 재조합 DNA 방법, 예를 들어 미국 특허 제4,816,567호에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 단클론 항체를 코딩하는 DNA는 통상의 방법(예를 들어, 마우스 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 이용하여)을 이용하여 쉽게 단리되고 서열분석될 수 있다. 본 발명의 하이브리도마 세포는 상기 DNA의 바람직한 공급원으로서 역할을 한다. 일단 단리되면, DNA는 발현 벡터에 배치될 수 있고, 이어서 숙주 세포, 예를 들어 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 세포(CHO) 세포, 또는 원래 면역글로불린 단백질을 생산하지 못하는 골수종 세포에 형질감염되어 재조합 숙주세포에서 단클론 항체를 합성할 수 있다. 또한, DNA는 상동의 마우스 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인의 코딩 서열로 치환하거나(미국 특허 제4,816,567호 및 문헌(Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)) 참조), 면역글로불린 코딩 서열에 비-면역글로불린 폴리펩티드의 코딩 서열의 전체 또는 일부분을 공유적으로 연결함으로써 변형될 수 있다. 상기 비-면역글로불린 폴리펩티드는 키메라 2가 항체를 생성하기 위해 본 발명의 항체 불변 도메인에 치환될 수 있거나, 본 발명의 항체의 한 항원 결합 부위의 가변 도메인에 치환될 수 있다.
- [0081] 완전 인간 항체는 CDR을 포함하는 경쇄 및 중쇄의 모든 서열이 인간 유전자에서 유래된 항체 분자이다. 상기 항체를 본원에서 "인간화 항체", "인간 항체", 또는 "완전 인간 항체"라고 부른다. 인간 단클론 항체는 인간 단클론 항체를 생산하기 위한 트리오마 기술, 인간 B 세포 하이브리도마 기술(문헌(Kozbor, et al., 1983 Immunol Today 4: 72) 참조), 및 EBV 하이브리도마 기술(문헌(Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) 참조)를 이용하여 제조될 수 있다. 인간 단클론 항체는 인간 하이브리도마를 이용함으로써(문헌(Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) 참조), 또는 인간 B 세포를 엡스타인 바(Epstein Barr) 바이러스로 시험관 내에서 형질전환시킴으로써(문헌(Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) 참조) 이용될 수 있거나 생산될 수 있다.
- [0082] 게다가, 인간 항체는 또한 파아지 디스플레이 라이브러리를 포함한 또 다른 기술을 이용하여 생산될 수 있다(문헌(Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991));(Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)) 참조). 유사하게, 인간 항체는 인간 면역글로불린 유전자위를 형질전환 동물, 예를 들어 내인성 면역글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 마우스로 도입하여 만들어질 수 있다. 공격시 유전자 재배열, 어셈블리, 및 항체 레퍼토리를 포함한 모든 측면에서 인간에서 나타난 것과 매우 유사한 인간 항체 생산이 관찰된다. 상기 접근법은 예를 들어, 미국 특허 제5,545,807호, 제5,545,806호, 제569,825호, 제5,625,126호, 제5,633,425호, 제5,661,016호 및 문헌((Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992));(Lonberg et al.,

Nature 368 856-859 (1994));(Morrison, Nature 368, 812-13 (1994));(Fishwild et al, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996));(Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996)); 및 (Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995))에 기재되어 있다.

- [0083] 인간 항체는 또한 항원에 의한 공격에 반응하여 동물의 내인성 항체보다는 완전 인간 항체를 생산하도록 변형된 형질전환된 비인간 동물을 이용하여 생산될 수 있다(PCT 공보 W094/02602호 참조). 비인간 숙주에서 중쇄 및 경쇄 면역글로불린을 코딩하는 내인성 유전자는 무능력해지고, 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린을 코딩하는 활성 유전좌위는 숙주의 게놈으로 삽입된다. 인간 유전자는 예를 들어, 필요한 인간 DNA 세그먼트를 포함하는 효모 인공 게놈을 이용하여 편입된다. 이어서, 원하는 모든 변형을 제공하는 동물은 완전 상보체보다 더 적은 변형 포함하는 중간 형질전환 동물들을 이중교배하여 자손으로 얻어진다. 상기 비인간 동물의 바람직한 실시양태는 마우스이고, PCT 공보 WO 96/33735호 및 WO 96/34096호에 개시된 바와 같이 제노마우스(Xenomouse™)로 불린다. 상기 동물은 완전 인간 면역글로불린을 분비하는 B 세포를 생산한다. 항체는 예를 들어, 다클론 항체의 제조물로서 관심의 면역원으로 면역 후 동물로부터 직접적으로 얻거나, 대안적으로 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마와 같은 동물로부터 유래된 무한증식 B 세포로부터 얻을 수 있다. 또한, 인간 가변 영역을 갖는 면역글로불린을 코딩하는 유전자는 회수되고 발현되어 직접적으로 항체를 얻을 수 있거나, 추가로 변형되어 예를 들어, 단쇄 Fv (scFv) 분자와 같은 항체 유사체를 얻을 수 있다.
- [0084] 내인성 면역글로불린 중쇄의 발현이 결여된, 마우스로 대표가 되는 비인간 숙주를 생산하는 방법의 예는 미국 특허 제5,939,598호에 개시되어 있다. 이것은 유전좌위의 재배열을 방지하고 재배열된 면역글로불린 중쇄 유전좌위의 전사체의 형성을 방지하기 위해, 배아 줄기 세포에서 하나 이상의 내인성 중쇄 유전좌위로부터 J 세그먼트 유전자를 선택 마커 코딩 유전자를 포함하는 표적화 벡터에 의해 제거하는 단계; 및 배아 줄기 세포로부터 체세포 및 생식 세포가 선택 마커 코딩 유전자를 포함하는 형질전환 마우스를 생산하는 단계를 포함하는 방법에 의해 얻어질 수 있다.
- [0085] 인간 항체와 같은 관심의 항체를 생산하는 한 가지 방법은 미국 특허 제5,916,771호에 개시되어 있다. 상기 방법은 중쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 배양물 내의 한 포유동물 숙주세포에 도입하는 단계, 경쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 또 다른 포유동물 숙주세포에 도입하는 단계, 및 두 세포를 융합하여 잡종 세포를 형성하는 단계를 포함한다. 잡종 세포는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체를 발현한다.
- [0086] 상기 방법에 더 개선된 방법이 있어, 면역원 상의 임상적으로 관련된 에피토프를 확인하는 방법, 및 높은 친화성을 갖는 관련 에피토프에 면역 특이적으로 결합하는 항체를 선별하는 연관된 방법은 PCT 공보 WO 99/53049호에 개시되어 있다.
- [0087] 항체는 상기에 기재된 단쇄 항체를 코딩하는 DNA 세그먼트를 포함하는 벡터에 의해 발현될 수 있다.
- [0088] 이들은 벡터, 리포솜, 네이키드 DNA, 애쥬번트 보조된 DNA, 유전자총, 카테타 등을 포함할 수 있다. 벡터는 WO 93/64701호에 기재된 것과 같이 표적화 부분(예를 들어, 세포 표면 수용체에 대한 리간드), 및 핵산 결합 부분(예를 들어, 폴리리신)을 갖는 화학 접합체, 바이러스 벡터(예를 들어, DNA 또는 RNA 바이러스 벡터), 표적 부분(예를 들어, 표적 세포에 특이적인 항체) 및 핵산 결합 부분(예를 들어, 프로타민)을 포함하는 융합 단백질인 PCT/US95/02140(WO 95/22618)에 기재된 것과 같은 융합 단백질, 플라스미드, 파아지 등을 포함한다. 벡터는 염색체, 비염색체, 합성 벡터일 수 있다.
- [0089] 바람직한 벡터에는 바이러스 벡터, 융합 단백질, 및 화학 접합체를 포함된다. 레트로바이러스 벡터에는 몰로니 설치류 백혈병 바이러스가 포함된다. DNA 바이러스 벡터가 바람직하다. 이러한 벡터에는 오르토폭스 또는 조류 포크스 벡터와 같은 포크스 벡터, 단순포진 바이러스(herpes simplex I Virus; HSV) 벡터와 같은 헤르페스바이러스 벡터(문헌(Geller, A. I. et al., J. Neurochem, 64:487 (1995));(Lim, F., et al., in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995));(Geller, A. I. et al., Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A. 90:7603 (1993));(Geller, A. I., et al., Proc Natl. Acad. Sci USA 87:1149 (1990)) 참조), 아데노바이러스 벡터(문헌(LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993));(Davidson, et al., Nat. Genet 3:219 (1993));(Yang, et al., J. Virol. 69:2004 (1995)) 참조) 및 아데노 연관 바이러스 벡터(문헌(Kaplitt, M. G. et al., Nat. Genet. 8:148 (1994)) 참조)가 포함된다.
- [0090] 포크스 바이러스 벡터는 유전자를 세포의 세포질로 도입한다. 조류포크스 바이러스 벡터는 핵산을 단지 짧은 기간만 발현한다. 아데노바이러스 벡터, 아데노 연관 바이러스 벡터 및 단순 포진 바이러스(HSV) 벡터는 핵산을 중성

세포로 도입하기에 바람직하다. 아데노바이러스 벡터는 아데노 연관 바이러스(약 4개월)보다 더 짧은 기간 발현(약 2개월)하며, 이것은 HSV 벡터보다 더 짧다. 선택된 특정 벡터는 표적 세포 및 치료될 병태에 따라 결정될 것이다. 도입은 표준 기술, 예를 들어, 감염, 형질감염, 형질도입, 또는 형질전환에 의해 이루어질 수 있다. 유전자 전달 방식의 예는 예를 들어, 네이키드 DNA, CaPO₄ 침전, DEAE 텍스트란, 전기천공, 원형질체 융합, 리포펙틴, 세포 미세주입법 및 바이러스 벡터를 포함한다.

[0091] 벡터는 기본적으로 원하는 임의의 표적 세포를 표적화하는 데 이용될 수 있다. 예를 들어, 정위 주입법이 벡터(예를 들어, 아데노바이러스, HSV)를 원하는 위치에 보낼 때 사용될 수 있다. 또한, 입자는 싱크로메드 인퓨전 시스템(SynchroMed Infusion System)과 같은 미니펌프 주입 시스템을 이용하여 뇌실 내(icv) 주입에 의해 전달될 수 있다. 또한, 대류로 명명되는 부피 유동에 기초한 방법은 대분자를 뇌의 확장된 영역에 전달하는 데 효과적이라는 것이 입증되었고, 벡터를 표적 세포에 전달하는 데 유용할 수 있다(문헌(Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080 (1994));(Morrison et al., Am. J. Physiol. 266:292-305 (1994))참조). 이용될 수 있는 다른 방법에는 카테타, 정맥내, 비경구, 복강내 및 피하 주사 및 경구 또는 그 밖의 공지된 투여 경로가 포함된다.

[0092] 상기 벡터들은 다양한 방법으로 사용될 수 있는 다량의 항체를 발현하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 시료 내에 PD-L1의 존재를 검출하는 데 사용될 수 있다. 항체는 또한 PD-L1에 결합하거나 PD-L1 활성을 파괴하려고 하는 데 사용될 수 있다.

[0093] 기술은 본 발명의 항원 단백질에 특이적인 단쇄 항체 생산에 맞게 조정될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제 4,946,778호 참조). 또한, 방법은 F_{ab} 발현 라이브러리 제작에 맞게 조정되어(예를 들어 문헌(Huse, et al., 1989 Science 246: 1275-1281) 참조) 단백질 또는 그의 유도체, 단편, 유사체 또는 상동체에 대해 원하는 특이성을 갖는 단클론 F_{ab} 단편을 신속하고 효과적으로 확인할 수 있다. 단백질 항원에 대한 이디오타입을 포함하는 항체 단편은 당 업계에 공지된 기술에 의해 생산될 수 있다. 여기에는 (i) 항체 분자의 펩신 분해에 의해 생성된 F_{(ab')₂}; (ii) F_{(ab')₂} 단편의 이황화 결합을 환원시켜 생성된 F_{ab} 단편; (iii) 항체 분자에 과과인 및 환원제를 처리하여 생성된 F_{ab} 단편 및 (iv) F_v 단편이 포함되나 이에 제한되지 않는다.

[0094] 또한, 헤테로 접합 항체가 본 발명의 범위 내에 있다. 헤테로 접합 항체는 공유적으로 결합된 두 개의 항체로 이루어진다. 상기 항체는 예를 들어 원하지 않는 세포에 면역계 세포를 표적화하도록(미국 특허 제4,676,980호), 그리고 HIV 감염 치료(WO 91/00360호, WO 92/200373호, EP 03089호 참조)를 위해 제안되었다. 항체는 가교제를 수반하는 방법을 포함한 합성 단백질 화학에 공지된 방법을 이용하여 시험관 내에서 제조될 수 있는 것으로 생각된다. 예를 들어, 이황화 교환 반응을 이용하거나 티오에테르 결합을 형성하여 면역독소가 제작될 수 있다. 상기 목적에 적합한 시약의 예로는 이미노티올레이트 및 메틸-4-머캅토부티리미데이트 및 예를 들어, 미국 특허 제4,676,980호에 개시된 것이 포함된다.

[0095] 이펙터 기능과 관련하여, 예를 들어 암을 치료하는 데 있어 항체의 효과를 향상시키도록 본 발명의 항체를 변형하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어 시스템인 잔기는 Fc 영역에 도입되어 이 영역에 쇄간 이황화 결합을 형성하도록 할 수 있다. 따라서, 생성된 호모 이황체 항체는 내재화 능력을 향상시키고/거나 보체 매개된 세포 사멸 및 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 증가시켰다(문헌(Caron et al., J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992)) 및 (Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)) 참조). 대안적으로, 항체는 이중 Fc 영역을 갖도록 조작될 수 있으며, 이로써 보체 용해 및 ADCC 능력이 향상되었다(문헌(Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)) 참조).

[0096] 본 발명은 또한 독소(예를 들어, 세균, 진균, 식물, 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소(즉, 방사성 접합체)와 같은 세포독성체에 접합된 항체를 포함하는 면역접합체에 관한 것이다.

[0097] 사용될 수 있는 효소 활성 독소, 또는 그의 단편에는 디프테리아 A쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A쇄(슈도모나스 에루기노사(Pseudomonas aeruginosa) 유래), 리신 A쇄, 아브린 A쇄, 모데신 A쇄, 알파-사르신, 알레우라이트 포르디이(Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나(Phytolaca americana) 단백질(PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(momordica charantia) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(sapaonaria officinalis) 억제제, 켈로닌, 미토켈린, 레스티릭토신, 페노마이신, 예노마이신, 및 트리코테센이 포함된다. 여러 가지 방사성 핵종이 방사성 접합된 항체 생산에 이용 가능하다. 예로는 ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y, 및 ¹⁸⁶Re가 포함된다.

- [0098] 항체와 세포독성제의 접합체는 여러 가지 양기능 단백질-커플링제, 예를 들어, N-숙시니미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트(SPDP), 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 양기능성 유도체 (예를 들어 디메틸 아디피미데이트 HCL), 활성 에스테르(예를 들어, 디숙시니미딜 수베레이트), 알데히드(예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물(예를 들어, 비스 (p-아지도벤조일) 헥사디아민), 비스-디아조늄 유도체(예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예를 들어, 톨리엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오르 화합물(예를 들어, 1,5-디플루오르-2,4-디니트로벤젠)을 이용하여 제조된다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌(Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987))에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 방사성 핵종을 항체에 접합시키기 위한 대표적인 킬레이트제이다(WO94/11026호 참조).
- [0099] 당업자는 매우 다양하게 가능한 부분이 생성 항체 또는 본 발명의 다른 분자에 결합될 수 있다는 것을 인지할 것이다(예를 들어, 전체 내용이 본원의 참고에 포함된 문헌("Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J.M. Cruse and R. E. Lewis, Jr(eds), Carger Press, New York, (1989)) 참조).
- [0100] 항체 및 다른 부분이 자신의 각각의 활성을 보유하기만 한다면, 두 분자를 결합시킬 어떤 화학 반응에 의해서든 결합이 수행될 수 있다. 상기 결합은 많은 화학 기전, 예를 들어 공유 결합, 친화성 결합, 인터칼레이션, 배위 결합 및 복합체 형성을 포함할 수 있다. 그러나, 바람직한 결합은 공유 결합이다. 공유 결합은 존재하는 측쇄의 직접적인 측합에 의해, 또는 외부 가교 분자의 편입에 의해 이루어질 수 있다. 많은 2가 또는 다가 결합제 (linking agent)는 본 발명의 항체와 같은 단백질 분자를 다른 분자에 결합하는 데 유용하다. 예를 들어, 대표적인 커플링제는 티오에스테르, 카보디이미드, 숙시니미드 에스테르, 디이소시아네이트, 글루타르알데히드, 디아조벤젠 및 헥사메틸렌 디아민과 같은 유기 화합물을 포함할 수 있다. 상기에 당 업계에 공지된 다양한 부류의 커플링제를 완벽하게 열거하고자 한 것이 아니라, 보다 일반적인 커플링제의 좋은 예를 나타낸 것이다(문헌 (Killen and Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984));(Jansen et al., Immunological Reviews 62:185-216 (1982)); 및 (Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)) 참조). 바람직한 링커는 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, MBS (M-말레이미도벤조일-N-히드록시숙시니미드 에스테르의 사용을 기재하는 문헌 (Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984))을 참조한다. 또한, 올리고 펩티드 링커에 의해 항체에 결합된 할로겐화된 아세틸 히드라지드 유도체의 사용을 기재하는 미국 특허 제5,030,719호를 참조한다. 특히 바람직한 링커는 (i) EDC (1-에틸-3-(3-디메틸아미노-프로필) 카보디이미드 히드록로라이드; (ii) SMPT (4-숙시니미딜옥사카보닐-알파-메틸-알파-(2-피리딜-디티오)-톨루엔(Pierce Chem. Co., Cat. #21558G); (iii) SPDP (숙시니미딜-6 [3-(2-피리딜디티오) 프로피온아미도]헥사노에이트(Pierce Chem. Co., Cat. #21651G); (iv) 설포-LC-SPDP(설포숙시니미딜 6 [3-(2-피리딜디티오)-프로피아나미드] 헥사노에이트(Pierce Chem. Co., Cat. #2165-G); 및 (v) EDC에 접합된 설포-NHS (N-히드록시설포-숙시니미드(Pierce Chem. Co., Cat. #24510G)를 포함한다.
- [0101] 상기에 기재된 링커는 상이한 속성을 갖는 구성성분을 포함하기 때문에, 상이한 물리화학적 특성을 갖는 접합체를 유도한다. 예를 들어, 알킬 카복실레이트의 설포-NHS 에스테르는 방향족 카복실레이트의 설포-NHS 에스테르보다 더 안정적이다. NHS-에스테르 함유 링커는 설포-NHS 에스테르보다 낮은 용해성을 갖는다. 또한, 링커 SMPT는 입체적으로 방해받은 이황화 결합을 포함하고 있고 안정성이 증가된 접합체를 형성할 수 있다. 이황화 결합은 일반적으로 다른 결합에 비해 덜 안정적이다. 왜냐하면, 이황화 결합은 시험관 내에서 절단되어 더 낮은 이용 가능성을 갖는 접합체를 형성하기 때문이다. 특히, 설포-NHS는 카보디미드 결합의 안정성을 상승시킬 수 있다. 설포-NHS와 함께 사용될 때, 카보디미드 결합(예를 들어 EDC)은 카보디미드 결합 단독 반응보다 가수분해에 더 높은 내성을 갖는 에스테르를 형성한다.
- [0102] 본원에 개시된 항체는 면역리포솜으로 제제화될 수 있다. 항체를 포함하는 리포솜은 당 업계에 공지된 방법, 예를 들어 문헌(Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985));(Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980)) 및 미국 특허 제4,485,045호 및 제4,544,545호에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 향상된 순환 시간을 갖는 리포솜이 미국 특허 제5,013,556호에 개시되어 있다.
- [0103] 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤, 및 PEG-유도체화된 포스파티딜에타놀아민(PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 이용한 역상 증발법에 의해 생성될 수 있다. 리포솜은 정해진 공극 크기의 필터를 통해 압출되어 원하는 지름을 갖는 리포솜을 생산한다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 문헌(Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982))에 기재된 바와 같이 이황화물 교환 반응을 통해 리포솜에 접합될 수 있다.

- [0104] PD-L1에 대한 항체의 용도
- [0105] PD-L1 단백질에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 암 또는 다른 증식 장애의 치료를 위해 투여될 수 있다. 많은 암들은 PD-L1을 과발현하고, PD-L1의 상승 조절은 고위험성의 예후 인자와 연관되어 있다. 또한, 종양 세포에서 PD-L1의 과발현은 종양 세포가 예를 들어, T 세포 고갈을 유도함으로써 항-종양 면역을 회피하는 기전을 나타낼 수 있다. 상기 암에는 신세포암 및 유방암이 포함된다. 다른 전형적인 암은 항-종양 T 세포 활성을 회피하기 위해 T 세포 고갈과 관련되거나 이를 이용하는 암이다. 본 발명의 항체의 사용은 종양 항원 펩티드의 자극에 반응하여 종양 항원 특이적 T 세포가 증식하고 사이토카인을 분비하는 능력을 상승시킴으로써, T 세포 활성을 또는 항 종양 면역 반응을 증대시킬 수 있다.
- [0106] PD-L1 단백질에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 만성 감염 치료를 위해 투여될 수 있다. 상기 감염에는 예를 들어, 바이러스, 세균 및 기생충 감염이 포함된다. 전형적인 만성 바이러스 감염은 HIV이다. 만성 HIV 감염시, HIV-특이적 CD8+ T 세포는 기능적으로 손상되고, 사이토카인 및 이펙터 분자를 생산하는 능력의 감소 및 증식하는 능력의 감소를 나타낸다. PD-1는 HIV 감염된 개체의 HIV 특이적 CD8+ T 세포에서 높이 발현된다. 본 발명의 항체의 사용은 HIV 펩티드 자극에 반응하여 HIV 특이적 T 세포가 증식하고 사이토카인을 생산하는 능력을 향상시킴으로, T 세포 활성 또는 항 바이러스 면역 반응을 증대시킬 수 있다.
- [0107] 이중 특이적, 다클론, 단클론, 인간화 및 완전 인간 항체를 포함한 본 발명의 항체는 치료제로서 사용될 수 있다. 상기 제제는 피험체에서 암을 치료 또는 예방하고, 백신 효율을 증가시키거나 자연 면역 반응을 증대시키는 데 이용될 수 있다. 항체 제제, 바람직하게는 그의 표적 항원에 대해 높은 특이성 및 높은 친화성을 갖는 항원 제제는 피험체에게 투여되어, 일반적으로 표적과 그의 결합으로 인해 효과를 가질 것이다. 항체의 투여는 PD-L1 단백질의 활성을 방지 또는 억제 또는 방해할 수 있다.
- [0108] 본 발명의 항체는 세포 사멸을 유도할 수 있다. 세포 사멸은 직접적 또는 간접적 기전에 의해 유도된다. 예를 들어, huPD-L1 항체에 의한 PD-L1 결합은 보체 의존성 세포독성(CDC)을 유도할 수 있다. 대안적으로, huPD-L1 항체는 PD-L1에 결합하고 PD-L1-발현 표적 세포를 사멸시키는 2차 세포 유형의 동원을 유도한다. huPD-L1 항체가 2차 세포 유형의 동원에 의해 세포 사멸을 매개하는 전형적인 기전은 항체 의존성 세포독성(ADCC) 및 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 표적 PD-L1-발현 세포 유형은 종양 및 T 세포, 예를 들어, 활성화된 T 세포를 포함한다.
- [0109] PD-L1 단백질에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 암 또는 만성 감염의 치료를 위해 약학 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 항체를 포함하는 치료 조성물을 제조하는 데 관련된 원리 및 고려사항 및 구성성분의 선택에 있어 안내는 예를 들어 문헌((Remington: The Science and Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa., 1995);(Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, and Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994)); 및 (Petite And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.))에 제공된다.
- [0110] 본 발명의 치료 유효량은 일반적으로 치료 목적을 달성하는 데 필요한 양에 관한 것이다. 상기에 언급한 바와 같이, 이는 일부 경우에는 표적의 기능을 방해하는 항체와 그의 표적 항원 사이의 결합 상호작용일 수 있다. 또한, 투여에 필요한 양은 항체의 그의 특이적 항원에 대한 결합 친화성에 의존할 것이며, 또한 투여된 항체가 투여받은 개체로부터 소모되는 속도에 의존할 것이다. 본 발명의 항체 또는 항체 단편의 치료 유효 투여량의 보편적인 범위는 비제한적인 예로서, 약 0.1 mg/kg 체중 내지 약 50 mg/kg 체중일 수 있다. 보편적인 투여 빈도는 예를 들어 1일 2회 내지 1주에 1회의 범위일 수 있다.
- [0111] 항체 단편이 사용되는 경우, 표적 단백질의 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 최소한의 억제 단편이 바람직하다. 예를 들어, 항체의 가변 영역 서열을 기본으로 하여, 펩티드 분자는 표적 단백질 서열에 결합하는 능력을 보유하도록 설계될 수 있다. 이러한 펩티드는 화학적으로 합성되거나 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 수 있다 (예를 들어, 문헌(Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)) 참조). 또한, 제제는 치료될 특정 증상에 필요한 경우 하나 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로 유해한 영향을 주지 않는 서로 보완적인 활성을 갖는 것을 포함할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 조성물은 그의 기능을 향상시키는 제제, 예를 들어 세포독성제, 사이토카인, 화학치료제 또는 성장 억제제를 포함할 수 있다. 상기 분자는 원하는 목적에 효과적인 양으로 적합하게 존재한다.
- [0112] 활성 성분은 또한 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히

트록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐, 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에, 콜로이드 약물 전달 시스템(예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 나노입자 및 나노캡슐)에, 또는 매크로에멀전에 인트랩될 수 있다.

[0113] 생체 내 투여에 사용되는 제제는 멸균되어야만 한다. 이는 멸균 여과막을 통해 여과시킴으로써 이루어진다.

[0114] 서방형 제제가 제조될 수 있다. 서방형 제제의 적합한 예는 항체를 포함하는 고상의 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되며, 상기 매트릭스는 성형체, 예를 들어, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 서방형 매트릭스의 예로는 폴리에스테르, 히드로겔(예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알콜), 폴리락티드(미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산과 γ -에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 루프론 데포(LUPRON DEPOT™)(락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능한 마이크로스피어), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산이 포함된다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일에 걸쳐 분자를 방출할 수 있는 반면, 어떤 히드로겔은 더 짧은 기간동안 단백질을 방출한다.

[0115] 본 발명에 따른 항체는 시료 내에 PD-L1(또는 단백질 또는 그의 단백질 단편)의 존재를 검출하는 제제로서 사용될 수 있다. 바람직하게는, 항체는 검출가능한 표지를 포함한다. 항체는 다클론, 또는 보다 바람직하게는 단클론일 수 있다. 완전한 항체, 또는 그의 단편(예를 들어, F_{ab}, scFv, 또는 F_{(ab)2})이 사용될 수 있다. 프로브 또는 항체와 관련하여 용어 "표지된"은 검출가능한 물질을 프로브 또는 항체에 결합(즉, 물리적 결합)에 의한 프로브 또는 항체의 직접적인 표지, 및 간접적으로 표지된 또 다른 시약과의 반응성에 의한 프로브 또는 항체의 간접적 표지를 포함하는 것을 의미한다. 간접적 표지의 예는 형광 표지된 2차 항체 및 비오틴으로 DNA 프로브의 말단 표지를 이용하여 형광 표지된 스트렙타비딘으로 검출될 수 있는 1차 항체의 검출이 포함된다. 용어 "생물학적 시료"는 피험체로부터 단리된 조직, 세포 및 생물학적 체액 및 피험체 내에 존재하는 조직, 세포 및 체액을 포함하는 것을 의미한다. 따라서, 용어 "생물학적 시료"의 사용 내에는 혈청, 혈장 또는 림프를 포함한 혈액의 분획 또는 구성성분이 포함된다. 즉, 본 발명의 검출 방법은 시험관 내 및 생체 내 생물학적 시료 내의 분석물 mRNA, 단백질, 또는 게놈 DNA를 검출하는 데 이용될 수 있다. 예를 들어, 분석물 mRNA 검출을 위한 시험관 내 기술은 노던 혼성화 및 제자리 혼성화가 포함된다. 분석물 단백질 검출을 위한 시험관 내 기술은 효소 결합 면역흡착 측정법(ELISA), 웨스턴 블롯, 면역침전법 및 면역형광법을 포함한다. 분석물 게놈 DNA 검출을 위한 시험관 내 기술은 서던 혼성화를 포함한다. 면역분석을 실시하는 방법은 예를 들어 문헌(("ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology" Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995);("Immunoassay", E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996); 및 ("Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985))에 기재되어 있다. 또한, 분석물 단백질의 검출을 위한 생체 내 기술은 표지된 항-분석물 단백질 항체를 피험체에게 도입하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 항체는 피험체 내의 존재 및 위치가 표준 이미징 기술에 의해 검출될 수 있는 방사성 마커로 표지될 수 있다.

[0116] PD-L1 단백질 (또는 그의 단편)에 대해 지정된 항체는 PD-L1 단백질의 국소화 및/또는 정량과 관련된 기술(예를 들어, 적당한 생리학적 시료 내의 PD-L1 단백질 수준을 측정하는 용도, 진단법에 있어서의 용도, 단백질을 이미징하는 용도 등)내에 공지된 방법에 사용될 수 있다. 주어진 실시양태에서, PD-L1 단백질에 특이적 항체, 또는 항체 유래 항원 결합 도메인을 포함하는 그의 유도체, 단편, 유사체 또는 상동체는 약학적 활성 화합물(이후로 "치료제"로 나타냄)로서 이용된다.

[0117] 본 발명의 PD-L1 단백질에 특이적 항체는 표준 기술, 예를 들어 면역친화성 크로마토그래피 또는 면역침전법에 의해 PD-L1 폴리펩티드를 단리하는 데 이용될 수 있다. PD-L1 단백질 (또는 그의 단편)에 대해 지정된 항체는 임상 시험 방법의 일부분으로서 조직 내의 단백질 수준을 진단적으로 모니터링하기 위해, 예를 들어 주어진 치료요법의 효능을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 검출은 항체에 검출가능한 물질을 결합(즉, 물리적으로 결합)함으로써 용이해질 수 있다. 검출가능한 물질의 예에는 여러 가지 효소, 보결분자단, 형광 물질, 발광성 물질, 생물 발광성 물질 및 방사성 물질이 포함된다. 적합한 효소의 예는 겨자무 과산화 효소, 알칼리 포스파타제, β -갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제; 적합한 보결분자단 복합체의 예에는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴; 적합한 형광 물질의 예에는 움벨리페론, 플루오레신, 플루오레신 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레신, 단실 염화물 또는 피코에리트린; 발광성 물질의 예에는 루미놀; 생물 발광성 물질의 예에는 루시페라제, 루시페린 및 에쿠오린; 및 적합한 방사성 물질의 예에는 ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S 또는 ³H가 포함

된다.

[0118] 약학 조성물

[0119] 본 발명의 항체 또는 제제(본원에서 "활성 화합물"로 나타냄), 및 그의 유도체, 단편, 유사체 및 상동체는 투여에 적합한 약학 조성물에 포함될 수 있다. 상기 조성물은 전형적으로 항체 또는 제제 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 약학 투여에 적합한 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항세균제 및 항진균제, 및 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함하는 것을 의미한다. 적합한 담체는 본원에 참고로 포함된, 본 분야의 표준 참고 문헌인 레밍턴스 파마슈티컬 사이언스(Remington's Pharmaceutical Sciences)의 최신판에 기재되어 있다. 상기 담체 또는 희석제의 바람직한 예는 물, 식염수, 링거액, 텍스트로스 용액, 및 5% 인간 혈청 알부민이 포함되나 이에 제한되지는 않는다. 리포솜 및 고정유와 같은 비수성 비히클이 또한 사용될 수 있다. 약학적 활성 물질에 상기 매질 및 제제의 사용은 당 업계에 잘 알려져 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 활성화합물과 적합하지 않은 경우를 제외하고는, 조성물에 그들의 사용이 고려된다. 또한, 보조 활성 화합물이 조성물에 포함될 수 있다.

[0120] 본 발명의 약학 조성물은 그의 원하는 투여 경로에 적합하게 제제화될 수 있다. 투여 경로의 예는 비경구, 예를 들어 정맥내, 피내, 피하, 경구(예를 들어, 흡입), 경피(즉, 국소), 경점막, 및 직장 투여를 포함한다. 비경구, 피내 또는 피하 적용에 사용되는 용액 또는 현탁액은 다음과 같은 구성성분을 포함할 수 있다; 희석액, 예를 들어 주사용 물, 생리식염수, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 그 밖의 합성 용매; 항세균제, 예를 들어 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 또는 아황산 수소나트륨; 킬레이트제, 예를 들어 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA); 완충액, 예를 들어 아세트산염, 시트르산염 또는 인산염, 및 염화나트륨 또는 텍스트로스와 같은 긴장성 조절을 위한 제제. pH는 산 또는 염기, 예를 들어 염산 또는 수산화나트륨으로 조절될 수 있다. 비경구 제제는 앰플, 일회용 주사기 또는 유리 또는 플라스틱으로 만들어진 다회 투여 바이알에 포장될 수 있다.

[0121] 주사용으로 적합한 수용액(수용성) 또는 현탁액 및 멸균의 주사가능 용액 또는 현탁액의 즉석 제제를 위한 멸균 분말을 포함한다. 정맥 내 투여의 경우, 적합한 담체는 생리 식염수, 정균수, 크레모포 이엘(Cremophor EL™)(BASF, Parsippany, N.J.) 또는 인산염 완충 식염수(PBS)를 포함한다. 모든 경우에, 조성물은 멸균 상태여야만 하고 용이하게 주사될 수 있을 정도로 유동적이어야 한다. 조성물은 제조 및 저장 조건 하에서 안정해야만 하고 세균 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대해서도 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액상 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 그의 적합한 혼합물을 포함하는 용매 또는 현탁 매질일 수 있다. 적당한 유동성은 레시틴과 같은 코팅제의 사용에 의해, 현탁액의 경우 원하는 입자의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용은 다양한 항세균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티머osal 등에 의해 방지될 수 있다. 많은 경우에, 조성물 내에 등장제, 예를 들어 당, 만니톨, 소르비톨과 같은 다가알콜, 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물은 조성물에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함함으로써 흡수가 오래 지속될 수 있다.

[0122] 멸균 주사액은 적절한 용매에 원하는 양의 활성 화합물을 상기에 열거한 구성 요소 중 하나 또는 조합물과 함께 포함시켜 제조될 수 있다. 필요한 경우, 이어서 여과 살균될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산매 및 상기에 열거된 것 중 원하는 다른 구성 요소를 포함하는 멸균 비히클에 활성 화합물을 포함시켜 제조될 수 있다. 멸균 주사액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조하여 미리 멸균 여과된 용액으로부터 활성 구성 요소 및 임의의 추가의 원하는 구성 요소의 분말을 생산한다.

[0123] 경구 조성물은 일반적으로 비활성 희석제 또는 식용 담체를 포함한다. 이들은 젤라틴 캡슐에 싸여지거나 정제로 압축될 수 있다. 경구 치료 투여를 위해서, 활성 화합물은 부형제와 결합되거나 정제, 트로키제, 또는 캡슐 형태로 이용될 수 있다. 또한, 경구 조성물은 액체 담체 내의 화합물은 경구로 적용하고, 획 소리 내고(swished), 맹거나 삼키는 구강 청결제로서 사용되는 액체 담체를 사용하여 제조될 수 있다. 약학적으로 적합한 결합제 및/또는 애썬먼트 물질이 조성물의 일부로서 포함될 수 있다. 정제, 환제, 캡슐, 트로키제 등은 하기의 임의의 구성 요소 또는 유사한 특성의 화합물을 포함할 수 있다: 결합제, 예를 들어 미정질의 셀룰로스, 트라가칸트 고무 또는 젤라틴; 부형제, 예를 들어 전분 또는 락토오스; 붕괴제, 예를 들어, 알긴산, 프리모겔 또는 옥수수 전분; 윤활제, 예를 들어, 마그네슘 스테아레이트 또는 스테로트(Sterotes); 글라이던트(glidant), 예를 들어 콜로이드성 실리콘 다이옥사이드; 감미제, 예를 들어 슈크로스 또는 사카린; 향미제, 예를 들어 페퍼민트, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지향.

- [0124] 흡입에 의한 투여를 위해, 화합물은 적합한 분사제, 예를 들어 이산화탄소 와 같은 기체를 포함하는 압력 용기 또는 디스펜서, 또는 분무기로부터 에어로졸 형태로 전달된다.
- [0125] 또한, 경점막 또는 경피 수단에 의해 전신 투여될 수 있다. 경점막 또는 경피 투여의 경우, 침투될 장벽에 적합한 침투제가 제제에 사용된다. 상기 침투제는 일반적으로 당 업계에 공지되어 있고, 예를 들어 경점막 투여의 경우 계면 활성제, 담즙산염, 및 푸시딘산 유도체를 포함한다. 경점막 투여는 코 스프레이 또는 좌약의 사용을 통해 수행될 수 있다. 경피 투여의 경우, 활성 화합물은 당 업계에 일반적으로 공지된 연고(salve, ointment), 겔, 또는 크림으로 제제화될 수 있다.
- [0126] 화합물은 또한 직장 전달을 위한 좌약(예를 들어, 코코아 버터 및 다른 글리세라이드와 같은 통상의 좌약 기재와 함께) 또는 정체 관장의 형태로 제조될 수 있다.
- [0127] 한 실시양태에서, 활성 화합물은 몸에서 빠르게 제거되지 않도록 화합물을 보호할 담체와 함께, 예를 들어 이식 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함한 제어 방출 제형으로 제조될 수 있다. 생분해성, 생적합성 중합체, 예를 들어 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리산무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 상기 제제의 제조 방법은 당 업자에게는 명백할 것이다. 재료는 알자 코포레이션(Alza Corporation) 및 노바 파마슈티칼(Nova Pharmaceuticals, Inc)로부터 구입할 수 있다. 리포솜 현탁액(바이러스 항원에 대한 단클론 항체로 형질감염된 세포에 표적화되는 리포솜 포함)이 또한 약학적으로 허용가능한 담체로 사용될 수 있다. 이들은 당업자에게 공지된 방법에 따라, 예를 들어 미국 특허 제4,522,811호에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.
- [0128] 경구 또는 비경구 조성물은 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용되는 투여 단위 형태는 투여받는 피험체를 위해 단일 투여량으로 맞춰진 물리적 개별 단위를 나타낸다. 각 단위는 원하는 약학적 담체와 함께 원하는 치료 효과를 얻을 수 있도록 계산된 미리 정해진 양의 활성 화합물을 포함한다. 본 발명의 투여 단위 형태를 위한 설명서는 활성 화합물의 고유한 특징 및 달성될 구체적인 치료 효과, 및 개체 치료를 위한 상기 활성 화합물을 구성하는 기술에 내재하는 제약에 의해 그리고 이들에 따라 지시된다.
- [0129] 약학 조성물은 투여를 위한 설명서와 함께 용기 또는 팩 또는 디스펜서에 포함될 수 있다.
- [0130] 진단 분석법
- [0131] 본 발명의 huPD-L1 항체는 검출 가능한 부분에 결합될 때 "암 조직" 또는 이상 세포 증식되기 쉬워 암의 위험이 있는 조직을 검출하는 방법을 제공한다. 제자리 신생물로 인해 암이 되는 조직 외에도, 예를 들어, 항체 검출 가능한 부분 접합체가 또한 말단 기관 및/또는 조직에 존재하는 암 전이성 조직을 검출하는 방법을 제공한다. 따라서, 상기 조직은 암으로 의심되는 조직을 항체 검출가능한 부분과 검출가능한 부분이 암 조직에서 검출될 수 있는 적합한 조건하에서 접촉시켜, 암 조직의 존재를 검출함으로써 검출될 수 있다.
- [0132] 본 발명의 huPD-L1 항체는 검출가능한 부분에 결합될 때 암 또는 만성 감염에 걸린 피험체에서 T 세포 고갈을 검출하는 방법을 제공한다. 예를 들어, huPD-L1 항체는 피험체에서 PD-L1의 수준을 검출하는 데 사용될 수 있으며, 상기 수준을 기준 수준과 비교하여 피험체가 T 세포 고갈을 겪고 있는지 여부를 나타낼 수 있다. 따라서, 본 방법은 또한 T 세포 고갈을 역전시키거나 억제시킴으로써 면역 반응을 증대시키는 huPD-L1 항체를 이용한 치료에 피험체에게 유익한 지 여부를 결정하는 데 이용될 수 있다.
- [0133] 검출 가능한 부분은 직접적으로, 또는 간접적으로 예를 들어 형광의 2차 항체를 이용하여 항체 또는 단편에 결합될 수 있다. 직접적인 접합은 예를 들어, 형광단을 항체 또는 항체 단편을 표준 화학적 결합에 의해, 또는 유전공학을 통해 수행될 수 있다. 키메라 또는 융합 단백질은 형광 또는 생물 발광성 단백질에 결합된 항체 또는 항체 단편을 포함하도록 제작될 수 있다. 예를 들어, 카사데이 등(Casadei, et al.)은 포유동물 세포에서 에쿠오린과 항체 유전자의 융합 단백질을 발현할 수 있는 벡터 구조물을 제조하는 방법을 개시하고 있다.
- [0134] 프로브 또는 항체와 관련하여 용어 "표지된"은 검출가능한 물질을 프로브 또는 항체에 결합(즉, 물리적 결합)하여 프로브 또는 항체를 직접적으로 표지하고, 및 간접적으로 표지된 또 다른 시약과의 반응성에 의해 프로브 또는 항체를 간접적으로 표지하는 것을 포함하는 것을 의미한다. 간접적 표지의 예는 형광 표지된 2차 항체 및 비오틴으로 DNA 프로브의 말단 표지를 이용하여 형광 표지된 스트렙타비딘으로 검출될 수 있는 1차 항체의 검출이 포함된다. 용어 "생물학적 시료"는 피험체(예를 들어, 생검)로부터 단리된 조직, 세포 및 생물학적 체액 및 피험체 내에 존재하는 조직, 세포 및 체액을 포함하는 것을 의미한다. 즉, 본 발명의 검출 방법은 시험관 내 및

생체 내 생물학적 시료 내의 암, 암 세포 또는 암 연관 세포(예를 들어, 종양 또는 암세포와 연관된 간질 세포)를 검출하는 데 이용될 수 있다. 예를 들어, PD-L1 검출을 위한 시험관 내 기술은 효소 결합 면역흡착 측정법(ELISA), 웨스턴 블롯, 면역침전법 및 면역형광법을 포함한다. 또한, PD-L1의 검출을 위한 생체 내 기술은 표지된 항-PD-L1 항체를 피험체에게 도입하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 항체는 피험체 내의 존재 및 위치가 표준 이미징 기술에 의해 검출될 수 있는 방사성 마커로 표지될 수 있다. 실시양태에서, 본 발명은 피험체에서 종양 또는 암 세포를 검출하는 비침습적 방법을 제공한다. 피험체는 본 발명의 항체 또는 scFv 항체를 투여받고, 상기 항체는 검출 가능한 부분(즉, 예를 들어 형광, 화학, 화학발광성, 방사성 또는 당 업계에 공지된 다른 방법에 의해 검출될 수 있는 임의의 부분)에 결합되고, 항체는 종양에 국소화되도록 한 후 검출 가능한 부분의 관찰에 의해 검출된다.

[0135] "표적화된" 집합체, 즉 표적화 부분- 피험체 또는 동물 내에 특정 부위 또는 부위들에서 집합체를 국소화하도록 설계된 분자 또는 특징을 포함하는 집합체의 경우, 국소화는 피험체내에서 결합된, "국소화된" 및 결합되지 않은, "유리된" 독립체 사이에 평형이 반드시 도달되었을 때의 상태를 나타낸다. 상기 평형이 도달되는 속도는 투여 경로에 따라 결정된다. 예를 들어, 혈전에 국소화되도록 정맥 내 주사에 의해 투여된 집합체는 주사 후 몇 분내에 혈전에 배치 또는 축적될 수 있다. 반면에, 장 내 감염에 국소화되도록 경구 투여된 집합체는 배치될 때까지 몇 시간이 걸릴 수 있다. 대안적으로, 국소화는 독립체가 투여된 후 선택된 시간에 피험체 또는 동물 내에 독립체의 국소화를 간단하게 나타낼 수 있다. 또 다른 예로, 부분이 투여 후 분배될 때 국소화가 이루어진다.

[0136] 상기 모든 경우에, 국소화가 달성되는 적정 예상 시간은 당 업자 의해 결정될 수 있다. 또한, 시간의 함수로서 국소화 상태는 본 발명의 방법에 따라 검출 가능한 부분(예를 들어, 발광 집합체)을 예를 들어 광검출 장치를 이용하여 이미징하여 추적될 수 있다. 사용된 "광검출 장치"는 적정 시간 내에 포유동물 내로부터의 희미한 빛의 이미징을 가능하게 하고 이미지를 만드는 장치로부터의 신호를 이용하기에 충분할 정도로 높은 민감도를 가져야만 한다.

[0137] 너무 밝은 빛 생성 부분을 사용할 수 있고/거나 이미지가 될 피험체 또는 동물의 표면 가까이에서 국소화된 빛 생성 용합 단백질 검출할 수 있는 경우에, "나이트-비전" 보안경 또는 실리콘 증폭관(Silicon Intensified Tube)(SIT) 카메라(예를 들어, 하마마쯔(Hammamatsu Photonic Systems, Bridgewater, N.J.)로부터 구입)와 같은 표준 고감도 비디오 카메라가 사용될 수 있다. 그러나, 보다 전형적으로, 보다 민감한 광검출 방법이 요구된다.

[0138] 광도가 너무 낮은 경우, 단위 면적당 광자 속(flux)이 너무 낮아 이미지가 될 장면이 더 이상 연속적으로 보이지 않는다. 대신에, 일시적으로 공간적으로 서로 다른 형태인 각각의 광자로 나타난다. 모니터에 보여지면, 상기 이미지는 각각이 단일 검출된 광자를 나타내는 빛의 점광점으로 나타난다. 시간에 걸쳐 디지털 이미지 프로세서에서 상기에 검출된 광자를 누적하여, 이미지를 얻고 제작할 수 있다. 각 이미지 포인트에 있는 신호를 강도 값으로 지정하는 통상의 카메라에 비해, 광자 카운팅 이미징에서는 신호의 진폭은 유의성을 가지지 않는다. 목적은 신호(광자)의 존재를 단순히 검출하는 것과 시간에 걸쳐 그의 위치에 관한 신호의 발생을 계수하는 것이다.

[0139] 하기에 기재된 두 가지 이상의 유형의 광검출 장치는 개별 광자를 검출하고 이미지 프로세서에 의해 분석될 수 있는 신호를 생성할 수 있다. 노이즈 감소 광검출 장치는 광자 검출기 내 기본 노이즈를 감소시키는 반면 광자 신호는 증폭시켜 감도를 얻는다. 노이즈는 주로 검출기 배열을 냉각시킴으로 감소된다. 장치는 "백신티드(backthinned)" 냉각된 CCD 카메라라고 불리는 전하 결합 장치(CCD) 카메라를 포함한다. 보다 민감한 기기에서는, 냉각은 예를 들어 CCD 배열의 온도를 대략 -120°C로 만들어 주는 액체 질소를 이용하여 달성된다. "백신티드"는 광자가 검출되기 위해 따라가는 경로 길이를 감소시켜 양자 효율을 증가시키는 초박막 뒤판을 나타낸다. 특히 민감한 백신티드 극저온 CCD 카메라는 포토메트릭(Photometrics, Ltd. (Tucson, Ariz.))에서 구입할 수 있는 시리즈 200 카메라 "TECH512"이다.

[0140] "광자 증폭 장치"는 광자가 검출 스크린을 치기 전에 광자를 증폭시킨다. 이러한 종류는 마이크로채널 증폭기와 같은 증폭기를 갖는 카메라이다. 마이크로채널 증폭기는 통상 카메라의 검출 스크린에 수직이거나 동일한 폭을 갖는 금속 배열의 채널을 포함한다. 마이크로채널 배열은 이미지가 될 시료, 피험체, 또는 동물과 카메라 사이에 배치된다. 배열의 채널에 들어가는 대부분의 광자는 나오기 전에 채널의 측면에 접촉한다. 배열을 통해 적용되는 전압은 각 광자 충돌로부터 많은 전자가 방출되게 한다. 상기 충돌로부터의 전자는 "샷건" 패턴으로 원래의 자신의 채널을 떠나고 카메라에 의해 검출된다.

[0141] 첫 번째 단계에서 생성된 전자를 차례로 두 번째 단계에서 증폭된 신호의 전자로 만들어 주기 위해서, 시리즈

내에 증폭 마이크로채널 배열을 배치시켜 훨씬 큰 감도를 얻을 수 있다. 그러나, 감도는 증폭의 각 추가 단계를 감소시켜 주는 공간 해상도의 비용으로 증가되며, 이는 대표적인 마이크로채널 증폭기 기재 단일 광자 검출 장치는 하마마쓰로부터 구입 가능한 C2400 시리즈이다.

[0142] 이미지 프로세서는 예를 들어 모니터에 보여지거나 비디오 프린터 상에 인쇄될 수 있는 이미지를 제작하기 위해서 광자를 계수하는 광검출 장치에 의해 생성된 신호를 처리한다. 상기 이미지 프로세서는 통상 상기에 기재된 민감한 광자 계수 카메라를 포함하는 시스템의 일부로 판매되거나 동일한 공급원에서 구입 가능하다. 이미지 프로세서는 보통 IBM-호환 PC 또는 애플 매킨토시(Apple Macintosh)(Apple Computer, Cupertino, Calif.)와 같은 개인용 컴퓨터에 연결되며, 상기 컴퓨터는 구입한 이미징 시스템의 일부로 포함될 수 있거나 포함되지 않을 수 있다. 이미지가 디지털 화일 형태가 되면, 다양한 이미지 프로세싱 프로그램(예를 들어, "ADOBE PHOTOSHOP", Adobe Systems, Adobe Systems, Mt. View, Calif.)에 의해 조작되고 인쇄될 수 있다.

[0143] 한 실시양태에서, 생물학적 시료는 시험 피험체의 단백질 분자를 포함한다. 바라직한 생물학적 시료 중 하나는 피험체로부터 통상의 방법에 의해 단리된 말초 혈액 림프구 시료이다.

[0144] 본 발명은 또한 생물학적 시료 내에 PD-L1 또는 PD-L1-발현 세포의 존재를 검출하기 위한 키트를 포함한다. 예를 들어, 키트는 생물학적 시료 내에서 암 또는 종양 세포를 검출할 수 있는 표지된 화합물 또는 제제(예를 들어, 항-PD-L1 scFv 또는 단클론 항체), 시료 내에 PD-L1의 양을 결정할 수 있는 수단, 및 시료 내의 PD-L1 양을 표준과 비교하기 위한 수단을 포함할 수 있다. 표준은, 일부 실시양태에서, 비-암 세포 또는 그의 추출물이다. 화합물 또는 제제는 적당한 용기에 포장될 수 있다. 키트는 또한 시료 내 암을 검출하는 데 키트를 사용하기 위한 설명서를 포함할 수 있다.

[0145] 이중 특이적 항체

[0146] 이중 특이적 항체(bsAb)는 두 개의 가변 도메인 또는 scFv 유닛을 포함하는 항체로, 생성된 항체는 두 가지 상이한 항원을 인식한다. 본 발명은 PD-L1 및 제2 항원을 인식하는 이중 특이적 항체를 제공한다. 전형적인 제2 항원은 종양 연관 항원, 사이토카인 및 세포 표면 수용체이다. 일부 실시양태에서, 제2 항원은 CAIX(탄산 무수화 효소IX, 또는 G250), IL-10 또는 CCR4 일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 항원은 세포 표면 수용체일 수 있고, 여기서 세포 표면 수용체는 CCR4, IL21R, BTLA, HVEM 또는 TIM3이다.

[0147] 본 발명의 이중 특이적 항체는 본원에 개시된 huPD-L1 항체의 중쇄와 경쇄 조합 또는 scFv를 포함한다.

[0148] 이중 특이적 항체의 제작

[0149] 본 발명의 이중 특이적 항체는 당 업계에 공지된 방법을 이용하여 제작될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 항체를 형성하는 두 개의 scFv 유닛 사이에 분자 내 회합(association)을 가능하게 할 정도의 충분한 길이의 긴 링커 폴리펩티드에 의해 두 개의 scFv 유닛이 연결된 단일 폴리펩티드이다. 다른 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 공유 또는 비공유 결합에 의해 결합된 하나 이상의 폴리펩티드이다.

[0150] 또 다른 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 "구멍에 손잡이" 방법을 이용하여 제작된다(문헌(Ridgway et al., Protein Eng 7:617-621 (1996))). 상기 방법에서, 두 개의 상이한 가변 도메인의 Ig 중쇄는 중쇄-경쇄 페어링(pairing)을 유지하면서 중쇄 페어링을 선택적으로 파괴하도록 환원된다. 두 가지 상이한 항원을 인식하는 두 개의 중쇄-경쇄 헤테로 이합체는 혼합되어 [도 5 및 6A]에 나타낸 바와 같이 CH3 도메인의 조작된 "구멍에 손잡이"를 통해 매개되는 헤테로 결합 페어링을 촉진한다.

[0151] 또 다른 실시양태에서, 이중 특이적 항체는 제1 중쇄-경쇄 이합체는 PD-L1을 인식하고 제2 중쇄-경쇄 이합체는 제2 항원을 인식하는 혼성 항체를 형성하도록 두 개 이상의 상이한 항체로부터 중쇄-경쇄 이합체의 교환을 통해 제작될 수 있다. 중쇄-경쇄 이합체에 대한 기전은 이중 특이적 분자로서 또한 기능을 하는 인간 IG4의 형성과 유사하다. IgG 중쇄의 이합 반응은 분자 내 힘, 예를 들어 각 중쇄의 CH3 도메인과 이황화 가교의 페어링에 의해 유도된다. 도메인 내에 특정 아미노산(R409)의 존재는 IgG4 분자의 이합체 교환 및 제작을 촉진하는 것으로 보여졌다. 중쇄 페어링은 또한 항체의 힌지 영역 내의 중쇄 사이의 이황화 가교에 의해서도 안정화된다. 특히, IgG4에서, 힌지 영역은 아미노산 226-230에 아미노산 서열 Cys-Pro-Ser-Cys(서열 Cys-Pro-Pro-Cys을 포함하는 안정한 G1 힌지 영역과 비교하여)을 포함한다. 위치229에서 세린의 상기 서열의 차이는 IgG4가 힌지 영역 내에 새로운 쇠내 이황화 결합을 형성하는 경향과 연관되어 있다(문헌(Van der Neut Kolfshoten, M. et al., 2007, Science 317:1554-1557) 및 (Labrijn, A.F. et al, 2011, Journal of immunol 187:3238-3246)).

[0152] 따라서, 본 발명의 이중 특이적 항체는 CH3 도메인 내 R409 잔기 및 PD-L1 또는 제2 항원을 인식하는 항체의 힌

지 영역 내 Cys-Pro-Ser-Cys 서열의 도입에 의해 생성될 수 있으며, 그 결과 중쇄-경쇄 이합체가 교환하여 PD-L1을 인식하는 한 중쇄-경쇄 이합체 및 제2 항원을 인식하는 제2 중쇄-경쇄 이합체를 갖는 항원 분자를 생산하며, 상기 제2 항원은 본원에서 개시된 임의의 항원이다. 바람직하게는, 이중 특이적 항체는 실시예 5 및 6에서 논의되는 한 항-CAIX(탄산 무수화 효소IX, 또는 250) 중쇄-경쇄 이합체에 접합된 한 항-PD-L1 중쇄-경쇄 이합체를 포함한다. 중쇄-경쇄 이합체 교환은 또한 교환을 촉진하는 환원제, 예를 들어 환원된 글루타티온의 첨가로 상승될 수 있다. 공지된 IgG4 분자는 또한 중쇄 및 경쇄가 본원에서 개시된 바와 같이 PD-L1 또는 제2 항원을 인식하도록 변경될 수 있다. 본 발명의 이중 특이적 항체를 제작하는 상기 방법의 사용은 면역 반응의 이펙터 시스템, 예를 들어, 특정 백혈구에서 발현되는 보체 및 Fc 수용체와 거의 상호작용을 하지 않는다는 점에서 Fc 영역이 다른 IgG 서브형과 상이한 IgG4 분자의 고유한 특성으로 인해 유익할 수 있다. 상기 특이한 특성으로 인해 상기 IgG4-기재 이중 특이적 항체는, 항체가 표적에 결합하고 표적과 연관 신호전달 경로를 기능적으로 변경하지만 이펙터 활성을 유발하지 않는 치료적 적용에 매력적이게 된다.

[0153] 일부 실시양태에서, 돌연변이가 bsAb의 불변 영역에 도입되어 bsAb의 항체 의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC) 활성이 변경된다. 상기 실시예는 [도 6B]에 도시되어 있다. 예를 들어, 돌연변이는 CH2 도메인 내 LALA 돌연변이이다. 한 측면에서, bsAb는 헤테로 이합체 bsAb의 한 scFv 유닛 상에 돌연변이를 포함하며, 이것은 ADCC 활성을 감소시킨다. 또 다른 측면에서, bsAb는 헤테로 이합체 bsAb의 두 사슬 모두에 돌연변이를 포함하며, 이것은 ADCC 활성을 완전히 제거한다. 예를 들어, bsAb의 scFv 유닛의 하나 또는 둘 모두에 도입된 돌연변이는 CH2 도메인의 LALA 돌연변이이다. 가변적인 ADCC 활성을 갖는 상기 bsAb는 bsAb에 의해 인식되는 한 항원을 발현하는 세포에 대해 최대의 선택적인 사멸을 나타내지만, bsAb에 의해 인식되는 제2 항원에 대해서는 최소의 사멸을 나타내도록 최적화될 수 있다.

[0154] 전형적인 제2 항원

[0155] 본 발명은 PD-L1 및 제2 항원을 인식하는 이중 특이적 항체를 제공한다.

[0156] 일부 실시양태에서, 제2 항원은 종양 연관 항원이다. 일부 실시양태에서, 종양 연관 항원은 탄산 무수화 효소 IX(CAIX)이다. 예를 들어, CAIX/PD-L1 이중 특이적 항체는 본원에서 기재된 huPD-L1 항체의 한 중쇄와 한 경쇄 조합 및 CAIX를 인식하는 한 중쇄와 한 경쇄의 조합을 포함하도록 제작될 수 있다(도 5A). CAIX는 질환 진행의 예후 마커 및 IL-2를 이용한 면역치료법의 표적으로 개시되었다. CAIX는 신세포암과 같은 암에서 높이 발현되는 종양 연관 항원이다. 일부 경우에는, 종양 세포에 의한 PD1/PD-L1 축의 활성화는 CAIX와 같은 특정 종양-특이적 항원에 대한 T 세포 고갈을 유도할 수 있고, 이로써 CAIX를 발현하는 종양세포는 면역계에 의한 인식을 회피한다. CAIX 및 PD-L1 모두를 표적화하는 bsAb는 새로운 암 치료제로서 역할을 한다. CAIX/PD-L1 bsAb를 이용한 치료는 CAIX에 대한 PD-1/PD-L1-매개된 T 세포 고갈을 억제하거나 역전시키고, CAIX-발현 종양 세포에 대한 종양 감시(surveillance) 및 면역 반응을 촉진할 것이다. 예를 들어, 표적화된 항원이 CAIX인 종양 세포에 대한 항원 특이적 면역 반응을 촉진할 것이다.

[0157] 일부 경우에는, 돌연변이가 CAIX 또는 PD-L1 사슬로 불변 영역(예를 들어, CH2 도메인)에 도입되어 ADCC 활성을 감소시킬 수 있다(도 5B). 일부 경우에는, 돌연변이가 CAIX 또는 PD-L1 사슬로 불변 영역(예를 들어, CH2 도메인)에 도입되어 ADCC 활성을 제거시킬 수 있다. 가변적 ADCC 활성을 갖는 변이된 bsAb는 종양 세포를 사멸시키는 특이성에 대해 당 업계에 공지된 방법에 의해 분석될 수 있다. 바람직하게는, CAIX/PD-L1 bsAb는 CAIX-발현 종양 세포의 최대의 선택적 사멸을 나타낼 것이지만 PD-L1-발현 내인성 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 최소의 사멸을 나타낸다.

[0158] 일부 실시양태에서, 제2 항원은 세포 표면 수용체로서, 인터류킨 21(IL21R)이다. 예를 들어, IL21R/PD-L1 이중 특이적 항체는 본원에서 기재된 huPD-L1 항체의 한 중쇄와 한 경쇄 조합 및 IL21에 아고니스트 방식으로 결합하는 한 중쇄와 한 경쇄의 조합을 포함하도록 제작될 수 있다. 사이토카인 IL21은 CD4+ T 보조 세포에 의해 분비되고 IL21R에 결합하여 몇몇 면역 활성화 경로를 촉진하며, 특히, CTL의 항원특이적 세포독성 및 NK 세포의 성숙, 증식 및 세포독성을 촉진한다(문헌(Sondergaard, H et al., 2009 *Tissue antigens* 74:467-479);(Kasaian, M. T. et al, 2002 *Immunity* 16:559-569)); 및 (Coquet, J. M. et al, 2008 *J Immunol* 178:2827-2834)). 특히, IL21은 흑색종 항원의 활성화 및 그에 대한 세포독성능을 촉진한다는 것을 보였다(문헌(Li, Y. et al, 2005, *J Immunol* 175:2261-2269)). IL21의 전신 투여는 암 치료 용도에 대해 연구되었고, 약간의 효능을 보였으나(문헌(Schmidt, H. et al, 2010 *Clinical cancer research*, 16: 5312-5319)), 일부 자료는 유해하고 바람직하지 않은 부작용을 보였다(문헌(Grunwald, V. et al, 2011, *Acta Oncol* 50:121-126)).

[0159] 본 발명의 IL21R/PD-L1 bsAb는 아고니스트 방식으로 IL21R에 결합하여 사이토카인 IL21의 모방체 또는 대리체로

작용한다. IL21R/PD-L1 bsAb에 의한 결합은 IL21R-매개된 경로의 활성화 및 후속적인 PD-L1-매개된 T 세포 고갈을 유도하는 종양 세포에 대한 항원 특이적 세포독성 면역 반응의 촉진을 일으킨다. 본 발명의 이중 특이적 항체를 이용한 치료의 특별한 이점은 PD-1/PD-L1-매개된 T 세포 고갈이 일어난 영역, 예를 들어, 항-종양 면역 반응을 회피하기 위해 T 세포 고갈을 유도한 종양의 미세 환경, 예를 들어 종양 근처 또는 종양 내에서 IL21R 활성화를 국소화시킨다는 것이다. 이러한 방법으로, IL21R/PD-L1 bsAb는 다음 두 갈래 기전으로 1) PD-1/PD-L1-매개된 T 세포 고갈을 역전시키거나 억제함으로써, 그리고 2) 세포독성 면역 반응의 IL21/IL21R-매개된 활성화를 촉진시켜 항원-특이적 또는 항-종양 면역 반응 및 세포독성을 유도함으로써 종양 면역 반응을 촉진한다.

[0160] 또한, IL21R/PD-L1 이중 특이적 항체는 피험체의 백신접종을 위한 백신 또는 백신 애주번트로서 용도를 가질 수 있다. 지속된 면역 보호 및 이전에 만났던 외래 항원에 대한 신속한 리콜 반응을 보장하는 높은 친화성의 항체-분비 혈장 세포 및 기억 B 세포가 생산되는 배중심 반응(GCR)에서, PDL1이 배중심 B 세포에서 발현되는 동안 PD1은 난포 T 보조 세포(TFH)에서 발현된다(문헌(Crotty, S. et al, 2011, *Annual review of Immunology*, 29:621-623)). PD1 또는 PD-L1의 과발현은 항체-생산 B 세포의 확장을 억제한다. 항체의 PD-L1 부분이 PD1/PD-L1 축을 억제하는 IL21R/PD-L1 이중 특이적 항체의 사용은 높은 친화성 항체만을 우선적으로 확장시킬 것이다. IL-21은 항원-특이적 B 세포의 항체-분비 혈장 세포로의 전이, 및 TFH 활성화의 형성 및 지속을 강하게 촉진하기 때문에(문헌(Crotty, S. et al, 2011, *Annual review of Immunology*, 29:621-623)), IL21 대리체 또는 아고니스트 활성을 갖는 PDL1에 대한 bsAb는 특정 항원, 예를 들어 백신을 통해 투여되는 항원 또는 감염원의 항원에 대한 높은 친화성 항체 생산의 촉진에 대해 GCR 특이적 애주번트로서 작용할 수 있다.

[0161] 일부 실시양태에서, 제2 항원은 BTLA(B 및 T 림프구 감쇠기 단백질) 또는 HVEM(TNFRSF14로도 알려진 헤르페스 바이러스 유입 매개체(entry mediator))이다. 예를 들어, BTLA/PD-L1 이중 특이적 항체는 본원에서 기재된 huPD-L1 항체의 한 중쇄와 한 경쇄 조합 및 BTLA에 결합하는 한 중쇄와 한 경쇄의 조합을 포함하도록 제작될 수 있다. 예를 들어, HVEM/PD-L1 이중 특이적 항체는 본원에서 기재된 huPD-L1 항체의 한 중쇄와 한 경쇄 조합, 및 HVEM에, 바람직하게는 BTLA와 결합을 매개하는 HVEM의 영역에 결합하는 한 중쇄와 한 경쇄의 조합을 포함하도록 제작될 수 있다. HVEM에 BTLA 결합은 PD1/PD-L1 상호작용과 유사하게 T 세포 억제를 일으킨다. 본 발명의 BTLA/PD-L1 또는 HVEM/PD-L1 이중 특이적 항체는 BTLA와 HVEM 사이의 회합을 억제하거나 방지하고, BTLA/HVEM-매개된 T 세포 억제를 방지한다. BTLA 억제는 종양-특이적 T 세포 반응을 촉진한다. 따라서, 본 발명의 이중 특이적 항체를 이용한 치료는 T 세포 활성을 제한하는 두 가지 상이한 억제 경로를 동시에 차단한다.

[0162] 일부 경우에는, HVEM/PD-L1 bsAb 항체는 또한 HVEM과 또 다른 HVEM 리간드, CD160 사이의 회합을 방지할 것이다. CD160은 B 세포 만성 림프구 백혈병(BCLL) 세포의 생존에 대한 아고니스트이고, CD4+ T 세포 활성화 및 기능을 강하게 억제하는 것을 보였다. 본 발명의 HVEM/CD160 결합을 또한 방지하는 HVEM/PD-L1 이중 특이적 항체를 이용한 치료는 T 세포 활성화 및 CD160-매개된 종양 생존 경로의 억제를 제한하는 두 가지 억제 경로를 동시에 차단한다.

[0163] 일부 실시양태에서, 제2 항원은 TIM3(T 세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인 3)이다. 예를 들어, TIM3/PD-L1 이중 특이적 항체는 본원에서 기재된 huPD-L1 항체의 한 중쇄와 한 경쇄 조합, 및 TIM3에 결합하는 한 중쇄와 한 경쇄의 조합을 포함하도록 제작될 수 있다. 한 측면에서, 본 발명의 항체는 갈락틴-9(GAL9)와 TIM3 결합을 방지 또는 억제한다. TIM3과 GAL9 사이의 상호작용은 T 세포 기능의 억제 및 대식세포의 활성화를 가져온다(문헌(Sakuishi, K. et al, 2010, *The Journal of experimental medicine*, 207:2187-2194) 및 (Zhang, Y. et al, 2012, *Journal of leukocyte biology*, 91: 189-196)). TIM3은 또한 골수 유래 억제 세포(MDSC)의 활성을 촉진하는 것을 보였다(문헌(Dardalhon, V. et al., 2012 *Journal of leukocyte biology*, 185:1383-1392)). 따라서, TIM3/PD-L1 bsAb와 같은 본 발명의 이중 특이적 항체를 이용한 치료는 T 세포 고갈을 역전시키고 방지하고, 종양 감시를 촉진하고 MDSC의 생성을 억제할 것이다. TIM3/PD-L1 bsAb의 이용은 TIM3에 다형성을 갖는 암, 예를 들어 신세포암 및 전이성 신세포암에 걸린 피험체의 치료에 특히 유리할 수 있다.

[0164] 본원에 개시된 이중 특이적 항체는 질환 또는 질병, 예를 들어, 암의 치료에 유용할 수 있다. 특히, 본 발명의 이중 특이적 항체는 T 세포 고갈과 연관된 질환 또는 질병에 유용할 수 있다. 일부 경우에는, 본원에 개시된 이중 특이적 항체는 항원-특이적 면역 반응을 촉진하기 위한 백신으로 사용될 수 있다. 본 발명의 이중 특이적 항체는 T 세포 고갈을 유도하는 종양을 표적화할 것이다.

[0165] 치료 방법

[0166] 본 발명은 암 또는 다른 세포 증식 관련 질환 또는 장애에 위험이 있는(걸리기 쉬운) 피험체를 치료하는 예방법 및 치료법 모두를 제공한다. 상기 질환 또는 장애는 예를 들어 PD-L1의 비정상적인 발현과 연관된 질병 또는 장

애를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 방법은 신세포암 또는 유방암의 증상을 치료하고, 예방하거나 완화시키는 데 이용될 수 있다. 대안적으로, 방법은 PD-L1가 T 세포 반응에서 음성적 조절 역할을 하는 암의 증상을 치료하고, 예방하거나, 완화시키는 데 이용될 수 있다. 대안적으로, 방법은 고형암, 예를 들어 유방암, 폐암, 난소암, 전립선암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 간암, 췌장암, 또는 위암의 증상을 치료하고, 예방하거나, 완화시키는 데 이용될 수 있다. 대안적으로, 방법은 전이 된 암의 증상을 치료하고, 예방하거나, 완화시키는 데 이용될 수 있다

[0167] 본 발명은 만성 바이러스, 세균 또는 기생충 감염에 위험이 있는(걸리기 쉬운) 피험체를 치료하는 예방법 및 치료법 모두를 제공한다. 특히, 본 발명은 HIV 감염 또는 AIDS에 위험이 있는(걸리기 쉬운) 피험체를 치료하는 예방법 및 치료법 모두를 제공한다.

[0168] 본 발명은 또한 T 세포 고갈과 연관된 질환 또는 장애 또는 병태의 위험에 있거나 또는 T 세포 고갈을 발전시킬 위험에 있는 피험체를 치료하기 위한 예방법 및 치료법 모두를 제공한다. 상기 질환 또는 장애는 HIV, AIDS, 및 만성 세균, 바이러스 또는 기생충 감염을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 다른 상기 만성 감염은 예를 들어, 간염 B 바이러스(HBV), 감염 C 바이러스(HCV), 단순 포진 바이러스 1(HSV-1), 에이치. 필로리(*H. pylori*), 또는 톡소플라스마 곤디아(*Toxoplasma gondii*)에 의해 유발되는 것을 포함한다.

[0169] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 단클론 항체 또는 scFv 항체를 피험체에게 투여함으로써 피험체에서 암 또는 세포 증식 질환 또는 장애의 증상을 예방하고, 치료하거나, 완화시키는 방법을 제공한다. 예를 들어, huPD-L1 항체는 치료 유효량으로 투여될 수 있다.

[0170] 암 또는 세포 증식 관련 질환 또는 장애의 위험에 있는 피험체는 암의 가족력을 갖는 환자 또는 공지되거나 의심되는 암 유발체에 노출된 피험체를 포함한다. 암의 징후가 있기 전에 예방 제제를 투여하여 질환은 예방되거나, 대안적으로 그 진행에 있어 지연될 수 있다.

[0171] 또 다른 측면에서, 본 발명의 PD-L1 항체와 접촉시킴으로써 종양 세포 성장이 억제되거나, 억제 T 세포 활성이 감소된다. 세포는 PD-L1을 발현하는 임의의 세포이다. 예를 들어, 세포는 T 세포이다.

[0172] 본 발명은 또한 항원에 대한 면역 반응을 증가시키거나 상승시키는 방법을 포함한다. 면역 반응은 본 발명의 단클론 항체 또는 scFv 항체를 피험체에게 투여함으로써 증가되거나 상승된다. 면역 반응은 예를 들어 항원 특이적 T 이펙터 기능을 증대시킴으로써 증대된다. 항원은 바이러스(예를 들어, HIV), 세균, 기생충 또는 종양 항원이다. 면역 반응은 자연 면역 반응이다. 자연 면역 반응은 감염의 결과인 면역 반응을 의미한다. 감염은 만성 감염이다. 항원에 대한 면역 반응의 증가 또는 상승은 당 업계에 공지된 수많은 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 면역 반응은 다음 중 어느 하나를 측정함으로써 측정될 수 있다: T 세포 활성, T 세포 증식, T 세포 활성화, 이펙터 사이토카인의 생산, 및 T 세포 전사 프로파일.

[0173] 대안적으로, 면역 반응은 백신접종으로 인해 유도된 반응이다. 따라서, 또 다른 측면에서 본 발명은 본 발명의 단클론 항체 또는 scFv 항체 및 백신을 피험체에게 투여함으로써 백신의 효율을 증가시키는 방법을 제공한다. 항체 및 백신은 순차적으로 또는 동시에 투여된다. 백신은 종양 백신, 세균 백신 또는 바이러스 백신이다.

[0174] 조합 방법

[0175] 본 발명은 PD-L1 단백질의 동일한 에피토프 또는, 대안적으로, PD-L1 단백질의 두 개의 상이한 에피토프에 결합하는 두 가지 항체를 투여함으로써 환자에서 암을 치료하는 것을 제공한다. 대안적으로, 암은 PD-L1에 결합하는 제1 항체 및 PD-L1 이외에 단백질 결합하는 제2 항체를 투여함으로써 치료된다. 예를 들어, PD-L1 이외에 다른 단백질은 CAIX, CCR4 및 IL-10을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, PD-L1 이외에 다른 단백질은 종양 연관 항원이다.

[0176] 일부 실시양태에서, 본 발명은 단독 또는 PD-L1 이외의 또 다른 단백질을 인식하는 추가의 항체와 함께 면역 반응을 일으키거나 증대시킬 수 있는 세포와 함께 huPD-L1 항체 투여를 제공한다. 예를 들어, 상기 세포는 말초 혈관 단핵 세포(PBMC), 또는 PBMC에서 발견되는 임의의 세포 유형, 예를 들어 세포독성 T 세포, 대식세포, 및 자연 살해 세포(NK) 세포일 수 있다.

[0177] 또한, 본 발명은 PD-L1 단백질에 결합하는 항체 및 항-신생물 제제, 예를 들어 소분자, 성장 인자, 사이토카인 또는 펩티드, 펩티드모방체, 펩토이드, 폴리뉴클레오티드, 지질 유래 매개체, 작은 생원성 아민, 호르몬, 뉴로 펩티드 및 프로테아제과 같은 생분자를 포함한 그 밖의 치료제의 투여를 제공한다. 소분자는 무기 분자 및 유기 소분자를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 성장 인자 또는 사이토카인은 IL-2, GM-CSF, IL-12, 및 TNF-

알파를 포함한다. 소분자 라이브러리는 당 업계에 공지되어 있다(문헌(Lam, Anticancer Drug Des., 12:145, 1997.) 참조)

[0178] 본 발명은 또한 하기 실시예에 기재될 것이며, 이는 청구항에 기재된 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0179] 실시예

[0180] 실시예 1: PD-L1에 대한 인간 mAb의 생성

[0181] 270억 개 구성원의 인간 scFv 파아지 디스플레이 라이브러리를 선별하여, 인간 PD-L1에 대한 mAb를 생성하였다. 라이브러리에 제시하기 위한 PD-L1 세포의 도메인의 적합한 방향을 보장해주는 초자성 단백질 리포솜(PMPL)형태의 전장 PD-L1을 이용하여, 14개의 고유한 scFv-파아지가 PD-L1에 결합하는 것으로 확인되었다. 인간 IgG 구조물은 상기 14가지 고유한 scFv-파아지: Ab-14, Ab-16, Ab-22, Ab-30, Ab-31, Ab-32, Ab-38, Ab-42, Ab-46, Ab-50, Ab-52, Ab-55, Ab-56 및 Ab-65에 대해 제작되었다.

[0182] 실시예 2: PD-L1에 대한 huPD-L1 mAb 결합의 특성 조사

[0183] huPD-L1 항체의 결합 분석은 PD-L1-발현 세포를 이용하여 실시하였다. 부모 세포주 300.19, 및 인간 PD-L1(hPD-L1), 인간 PD-L2(hPD-L2), 및 인간 C-형 렉틴 도메인 패밀리 2 구성원(hCLEC2D)을 발현하는 형질감염된 세포주를 포함한 4가지 유형의 세포를 시험하였다. 결합 분석은 2회 반복 실시하였으며, 결과는 아래 표 16-19 및 [도 2]에 요약하였다. 항체 친화성은 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0.1 µg/ml 및 0.01 µg/ml의 4가지 항체 농도를 이용하여 시험하였다. GF1538 및 GF1757을 대조군으로 사용하였다. GF1538은 hPD-L1에 대한 인간화 Ab이고, GF1757은 hPD-L2에 대한 인간화 Ab이다. 이용된 2차 항체는 PE-염소 항-인간 IgG였다. 모든 값은 FACS 분석에 의해 검출된 평균 형광 강도(GMFI)로 나타낸다.

[0184] 결합 분석 결과는 시험된 huPD-L1 항체가 결합 PD-L1에 대해 높은 친화성 및 특이성을 보인다는 것을 나타낸다. 대조군으로 인간 PD-L1을 발현하지 않는 부모 세포주 300.19를 사용하여, 기저 또는 비특이적 형광도를 확인하였다(표 16 및 [도 2] 왼쪽 위). huPD-L1 항체로 형질감염에 의해 인간 PD-L1을 발현하는 300.19 세포의 염색은 유의하게 더 높은 평균 형광 강도(MFI)를 나타내었으며, 이는 항체가 PD-L1에 결합한다는 것을 증명해준다. 가장 낮은 희석률인 0.01 µg/ml 항체에서도 유의한 MFI 값은 PD-L1 단백질 결합에 대한 huPD-L1 항체의 높은 친화성을 증명하였다(표 17A, 17B 및 [도 2] 오른쪽 위). 표 18A, 18B, 19A, 19B 및 [도 2](아래 두 그래프)에 증명된 바와 같이, huPD-L1 항체는 300.19 세포에서 발현될 때 인간 PD-L2 또는 CLEC2D에 약간 결합할 수 있다는 것을 증명하였다. 그러나, PD-L2 및 CLEC2D의 염색에서 얻어진 MFI 값은 PD-L1에서 얻어진 값만큼 높지 않았다. 또한, 더 낮은 희석률에서, MFI값은 기저 수준보다 유의하게 더 높지 않았는데, 이것은 huPD-L1 항체가 PD-L2 또는 CLEC2D에 대해 높은 친화성 또는 특이성을 갖지 않는다는 것을 나타낸다. 일부 huPD-L1 항체, 예를 들어 Ab-42는 PD-L2와 약간의 교차 반응성을 증명하였지만, 항체는 PD-L1에 대해 유의하게 더 높은 친화성과 특이성을 갖는다.

표 16

형질감염 되지 않은 300.19 세포상 huPD-L1 을 이용한 염색

웰	huPD-L1 Ab #		세포 PE-A 평균			
			대략 10 ug/ml	1 ug/ml	0.1 ug/ml	0.01 ug/ml
A1	14		358	186	91	73
A2	16		269	105	79	67
A3	30		75	78	74	66
A4	31		324	137	82	73
A5	42		771	315	119	82
A6	50		145	95	70	71
A7	52		324	124	85	72
A8	55		110	75	74	69
A9	1538	GF 항-hPD-L1	79	72	75	71
A10	1757	GF 항-hPD-L2	108	74	70	71
A11	대조군 hIgG		260	87	74	73
A12	세척		81	73	73	73

[0185]

표 17

표 17A. hPD-L1-형질감염된 300.19 세포상 huPD-L1 을 이용한 염색, 분석 1 결과

웰	huPD-L1 Ab #		세포 PE-A 평균			
			대략 10 ug/ml	1 ug/ml	0.1 ug/ml	0.01 ug/ml
E1	14		41500	23277	8095	1653
E2	16		31837	8277	1866	386
E3	30		47645	37503	17479	3509
E4	31		53790	44199	12498	2826
E5	42		53583	40923	14869	2084
E6	50		49437	42087	15083	2690
E7	52		28372	21430	5614	1073
E8	55		24422	9653	2298	543
E9	1538	GF 항-hPD-L1	64961	60765	27366	5091
E10	1757	GF 항-hPD-L2	154	60	56	54
E11	대조군 hIgG		195	64	52	51
E12	세척		52	51	49	51

표 17B. hPD-L1-형질감염된 300.19 세포상 huPD-L1 을 이용한 염색, 분석 2 결과.

웰	huPD-L1 Ab #		세포 PE-A 평균			
			대략 10 ug/ml	1 ug/ml	0.1 ug/ml	0.01 ug/ml
E1	14		77893	53207	17715	3700
E2	16		60182	46561	14101	4218
E3	30		67252	61219	39104	7722
E4	31		76388	70951	37698	6830
E5	42	최대	76824	72143	49449	11559
E6	50		69598	63446	28694	5198
E7	52		37203	34863	14718	2689
E8	55		42433	26528	8911	1758
E9	1538 hPD-L1		83021	85450	47677	8164
E11	1757 hPD-L2		122	72	63	57
E10	대조군 hIgG		283	88	71	81

[0186]

표 18

표 18A. hPD-L2-형질감염된 300.19 세포상 huPD-L1 을 이용한 염색, 분석 1 결과

웰	huPD-L1 Ab #		세포 PE-A 평균			
			대략 10 ug/ml	1 ug/ml	0.1 ug/ml	0.01 ug/ml
A1	14		137	464	173	67
A2	16		678	224	80	53
A3	30		60	52	49	50
A4	31		795	239	91	82
A5	42		1417	668	254	72
A6	50		444	149	88	51
A7	52		813	190	79	55
A8	55		132	69	55	51
A9	1538	GF 항-hPD-L1	60	50	62	51
A10	1757	GF 항-hPD-L2	104849	105994	36970	4810
A11	대조군 hIgG		481	176	60	92
A12	세척		69	51	52	60

표 18B. hPD-L2-형질감염된 300.19 세포상 huPD-L1 을 이용한 염색, 분석 2 결과

huPD-L1 Ab #		세포 PE-A 평균			
		대략 10 ug/ml	1 ug/ml	0.1 ug/ml	0.01 ug/ml
14		1394	847	295	133
16		1502	858	317	129
30		112	78	74	67
31		1573	834	182	87
42		2310	1496	761	213
50		680	386	220	79
52		1467	656	182	85
55		440	200	82	69
1538 hPD-L1		78	70	97	74
1757 hPD-L2		132613	117381	66269	11160
대조군 hIgG		443	118	77	71

[0187]

표 19

표 19A. hCLEC2D-형질감염된 300.19 세포상 huPD-L1 을 이용한 염색, 분석 1

웰	huPD-L1 Ab #		세포 PE-A 평균			
			대략 10 ug/ml	1 ug/ml	0.1 ug/ml	0.01 ug/ml
E1	14		3629	1924	793	245
E2	16		2371	898	294	154
E3	30		283	161	153	144
E4	31		2954	870	360	153
E5	42		4669	2318	748	234
E6	50		1957	869	327	167
E7	52		3138	1105	298	166
E8	55		944	297	171	139
E9	1538	GF 항-hPD-L1	199	143	141	137
E10	1757	GF 항-hPD-L2	343	163	141	137
E11	대조군 hIgG		1541	351	175	146
E12	세척		139	141	142	136

표 19B hCLEC2-형질감염된 300.19 세포상 huPD-L1 을 이용한 염색, 분석 2

웰	huPD-L1 Ab #		세포 PE-A 평균			
			대략 10 ug/ml	1 ug/ml	0.1 ug/ml	0.01 ug/ml
E1	14		3629	1924	793	245
E2	16		2371	898	294	154
E3	30		283	161	153	144
E4	31		2954	870	360	153
E5	42		4669	2318	748	234
E6	50		1957	869	327	167
E7	52		3138	1105	298	166
E8	55		944	297	171	139
E9	1538	GF 항-hPD-L1	199	143	141	137
E10	1757	GF 항-hPD-L2	343	163	141	137
E11	대조군 hIgG		1541	351	175	146
E12	세척		139	141	142	136

[0188]

[0189] 실시예 3: PD/PD-L1 결합을 차단하는 항-PD-L1 파아지-항체의 특성 조사

[0190] 항-PD-L1 파아지 항체에 의한 hPD-L1에 hPD1 결합 억제체의 특성을 조사하기 위해 FACS 경쟁 분석을 수행하였다. 모든 항-hPD-L1 항체는 파아지-scFv 형태였다. 293T 세포는 hPD-L1-Fc 발현을 위해 인간 Fc 영역에 융합된 인간 PD-L1을 코딩하는 벡터로 형질감염되었다. 본 분석에서, 10¹² 플라크 형성 유닛(pfu)의 파아지-scFv는 약 0.25 mg/ml의 가용성 hPD-1-hFc 융합 단백질과 혼합한 후 hPD-L1-발현 293T 세포에 첨가하였다. 세척 후, 세포는 FITC-항-인간 IgG 항체와 인큐베이션하고 세포 상 hPD-L1에 hPD1-hFc 결합을 측정하기 위해 FACS로 분석하였다.

[0191] 형광값을 FACS 분석에 의해 얻었고, hPD-L1+ 세포에 hPD-1 결합의 억제율을 얻는 데 이용하였다. 상기 값은 [도 3]에 나타내었다. 거의 모든 항-PD-L1 파아지 scFv가 hPD-L1에 hPD-1 결합을 약간 억제할 수 있다는 것을 증명하였다. 특히, Ab-14, Ab-16, Ab-30, Ab-31, Ab-42, Ab-50, Ab-52, 및 Ab-55 파아지-scFv는 hPD-1/hPD-L1 결합을 유의하게 억제한다는 것을 증명하였다.

[0192] 실시예 4: PD/PD-L1 결합을 차단하는 huPD-L1 가용성 mAb의 특성 조사

[0193] 본 발명의 가용성 huPD-L1 항체에 의한 hPD-L1에 hPD1 결합의 억제를 특성 조사하기 위해 FACS 경쟁 분석을 실시하였다. 모든 huPD-L1 항체는 hPD-L1-발현 300.19 세포와 hPD1-IgG 융합 단백질의 결합을 억제하는 능력에 대해 시험하였다. 본 분석에서, hPD-L1을 발현하는 50,000개 세포는 다음 농도, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0.1 µg/ml 및 0.01 µg/ml의 huPD-L1 또는 대조군 항체와 30분간 미리 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 0.125 µg의 마우스

IgG2a에 융합된 인간 PD1을 세포에 첨가하고 추가로 30분간 인큐베이션하였다. 세포를 2회 세척한 후, 0.125 μg의 염소 항-마우스 IgG2a-PE 항체를 세포에 첨가하였다. 30분간 인큐베이션한 후, 세포를 2회 세척한 후 FACS로 분석하였다. FACS에서 얻어진 값은 평균 형광 강도 단위(MFI)로 나타내고 표 20에 요약하였다. 표 20의 MFI 값을 사용하여 [도 4]의 hPD-L1+ 세포와 hPD1 결합의 억제율을 얻었다. 본원에서 나타낸 바와 같이, 시험된 모든 huPD-L1 가용성 항체는 10 μg/ml에서 hPD-L1과 hPD1 결합을 거의 완전하게 억제한다는 것을 증명하였다. 연속하여 더 낮은 농도에서, 대부분의 가용성 항체, 특히 Ab-42 및 Ab-50은 여전히 PD1/PD-L1 결합을 매우 우수하게 억제한다는 것을 증명하였다.

표 20

표 20. huPD-L1 를 이용한 PD-1 결합 차단 결과

웰	huPD-L1 Ab #		세포 PE-A 평균			
			10 ug/ml	1 ug/ml	0.1 ug/ml	0.01 ug/ml
A1	14		696	11991	14859	15840
A2	16		1092	6660	11080	14783
A3	30		244	661	4775	11585
A4	31		157	623	7934	11908
A5	42		139	142	3137	11797
A6	50		207	156	2795	12517
A7	52		380	2070	6746	11856
A8	55		150	3625	9137	12926
A9	1538	GF 항-hPD-L1	143	148	198	10145
A10	1757	GF 항-hPD-L2	10922	11447	11197	13167
A11	대조군 hIgG		11355	11664	11571	12274
A12	세척		10339	10274	9842	12305
E1	세척					
	음성 대조군		155	137	130	
E4	mIgG2a					
	음성 대조군		128	207	131	
평균 양성 대조군			11363			
평균 양성 대조군			155			

[0194]

[0195] 실시예 5: 이중 특이적 항체의 형성

[0196] IgG₄ 분자의 반(half) 단위체를 생성하는데 있어서 힌지의 역할을 기초로 하여, 인간 IgG₁의 힌지 영역 내 하전된 돌연변이의 도입은 반 단위체 교환을 용이하게 할 뿐만 아니라 이중 특이적 분자를 잠재적으로 안정화시킬 수 있다는 가설을 세웠다. 본 실시예는 힌지와 CH3 돌연변이의 조합이 이중 특이적 항체 형성을 증가시킨다는 것을 증명한다.

[0197] 헤테로 이합체 형성을 더 안정화시키기 위하여, 반대로 하전된 돌연변이를 또한 "구멍에 손잡이" 개념이 되는 CH3 도메인에 대체시켰다. 이중 특이적 항체는 하기 단계를 거쳐 형성될 수 있다. 첫째, 이중 특이적 돌연변이를 포함하는 두 부모 항체를 발현시키고 각각 정제하였다. 이어서, 항체를 약한 환원제의 존재하에서 혼합한다. 항체의 약한 환원은 가변의 중쇄 및 가변의 경쇄를 각각 갖는 두 개의 단위체로의 해리를 유발하였다. 이어서, 단위체를 서로 혼합한 후 이중 특이적 항체 분자의 형성을 일으키는 산화 단계를 거쳤다.

[0198] PD-L1 및 G250(탄산 무수화 효소 IX)를 인식하는 이중 특이적 항체를 생성하였다. 항-G250 부모(G37 야생형, G37WT) 및 조작된 (G37 KIHA) 항체를 생성하고 두 개의 독립적인 벡터로 정제하였다. "구멍에 손잡이" 개념에 따르면 이중 특이적 돌연변이를 포함하는 G37 KIHA는 면역글로불린 힌지 영역 내 서열이 변경되었다.

[0199] G37 KIHA의 해리 활성을 이해하기 위해, 항체를 약한 환원제 존재하에서 혼합하여 상이한 농도의 글루타티온(GSH)에 의해 항체 단위체 형성을 방해하였다(도 7A). [도 7A]에 저분자량 종의 수준 증가로 나타난 바와 같이,

증가하는 농도로 환원제(GSH)의 첨가는 항체의 단위체로의 해리를 유발하였다.

[0200] 유사하게, 항-PD-L1 부모(PD-L1 야생형, PDL-1WT) 및 조작된 (PD-L1 KIHB) 항체를 생성하고 두 개의 독립된 벡터로 정제하였다. GSH의 다양한 농도를 이용하여 항-PD-L1 단위체를 얻기 위한 적합한 조건을 확인하였다(도 7B). GSH 농도의 최상의 조건을 선택하고, 생성된 항-PD-L1 단위체를 G37 KIHA 단위체와 인큐베이션하였다. 이중 특이적 항체가 야생형 IgG와 동일한 크기에서 형성된 것이 확인되었으며, 이것은 두 개의 중쇄-경쇄 단위체, 하나는 PD-L1-특이적 단위체 및 다른 하나는 G250-특이적 단위체를 포함하는 항체가 생성되었음을 나타낸다.

[0201] **실시예 6: 이중 특이적 항체 기능**

[0202] 실시예 5에서 생성된 이중 특이적 항체를 다음에 두 개의 항원, 예를 들어, PD-L1 및 G250 모두를 인식하는 능력에 대해 시험하였다. PD-L1 및 G250 이중 특이적 항체의 기능은 유세포분석을 이용하여 시험하였다. CAIX⁺PD-L1⁻ SKRC-52는 CAIX (250)을 발현하였으나 PD-L1을 발현하지 않는다. 따라서, 세포는 단지 항-CAIX G37에 의해서만 인식될 수 있으며, PD-L1에 의해서는 인식될 수 없었다. 항체 결합의 포화를 피하기 위해서, 항체 농도는 낮고 감소된 용량 방식으로 만들었다. 실제로, 부모 항-G37은 SKRC-52 세포를 인식한 반면, 부모 항-PD-L1은 인식하지 못하였다(대조군과 동일한 수준). 접합된 항-G37 및 항-PD-L1 단위체를 포함하는 이중 특이적 항체는 부모 G37 항체와 비교하여 절반으로 감소된 농도에서 SKRC-52 세포를 인식하였으며, 이로써 본원에 기재된 방법 및 항체를 이용하여 생성된 이중 특이적 항체의 기능성을 증명하였다.

[0203] **실시예 7: mAb42의 기능적 특성 조사**

[0204] 또한, PD-L1에 대한 단클론 항체(mAb42)의 기능적 특성 조사를 실시하였다. 4명의 상이한 건강한 공여자(D1-D4)의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 배양하였다. mAb42의 존재하에서 또는 대조군 동종형 IgG 항체의 존재하에서 PBMC는 배양하였다. PMBC는 0.1 μ g/ml SEB(포도상 구균의 내독소 B)로 자극하였고, TNF α 생산은 MSD(Meso Scale Delivery)를 이용하여 측정하였다. 시료 분석은 3회 반복 실시하였다.

[0205] [도 8]에 나타난 바와 같이, 4명의 공여자 시료 모두에서 대조군 항체에 비해 항-PD-L1 항체(mAb42)의 존재하에서 배양되었을 때, mAb42의 존재하에서 PBMC 배양은 SEB에 반응하여 TNF α 생산을 증가시켰다. 또한, TNF α 생산의 증가는 p<0.0005로 통계학적으로 유의하였다. 따라서, 항-PD-L1 항체를 이용한 치료는 인간에서 항원 또는 감염에 반응하여 면역 반응을 증대시킨다.

[0206] **그 밖의 실시양태**

[0207] 본 발명은 그의 상세한 설명과 함께 기재되었지만, 앞선 설명은 첨부된 청구항의 범위에 의해 정의되는 본 발명의 범위를 예시하고자 하는 것이며 이를 제한 하려는 것은 아니다. 다른 측면, 이점 및 변형은 하기의 청구항의 범위 내에 있다.

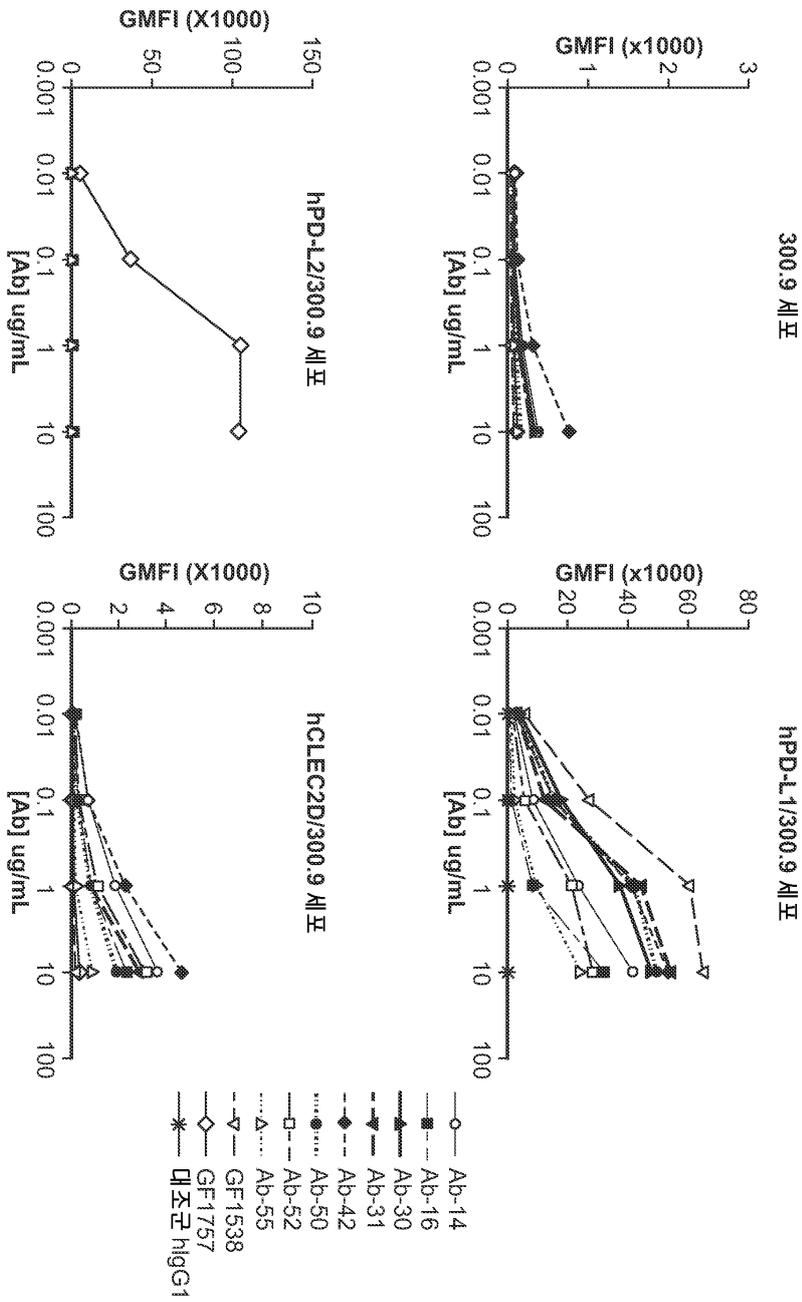
도면1b

공통	1	24	ABC	35	50	ABCD57	AB	FW3	89	AB	98	CDR3	FW4	패밀리																																							
공통	1	24	ABC	35	50	ABCD57	AB	FW3	89	AB	98	CDR3	FW4	패밀리																																							
50	QSV	P	VA	QAR	T	GGM	--	KG	H	K	Q	V	V	D	SD	I	E	N	G	T	R	VERK	W	SDH	IGW3-21*02																												
55					G	A		S	T					K										GI	VI	IGW6-57*01																											
14					G	A		T																	NI	IGW6-57*01																											
65	LPV	Q	A	L	A	ASASLT		IR	GINV	YRIY		K	R	Q	ILN	YKSDNKQA		S		K	A	AG	L	Q	S	WNY	A	V	IGW5-45*01																								
46					G	A		T																		H	G	E	IGW6-57*01																								
31	EIV	QS	ATL	IS	ERA	L		RI	Q	--	SIG	SIA		K	Q	R	IM	GASS		AT						G	AG	DT	S	EP	E	T	QHTP	FS	P	VE	K	IGW3-20*01															
32	DIV	QT	SFL	A	IR			TR	Q	--	GIGS	LA		E	K	I		ASTH		Q							S		G	DT	N	Q	P	F	T	QAMP	IT	Q	R	EIK	IGW1-9*01												
36					G	A		H																			S												NR	IGW6-57*01													
42					G	A		D																																NRHY	IGW6-57*01												
52					G	A																																				T	P	S	IGW6-57*01								
30	QSA	Q	A	G	QST			GT	SWG	Y	S		H	K	K	M	DYGN		SN		K	G	T		QA		S	T		LP														IGW2-14*01									
22	LPV	Q	AP	YA				GG	D	--	RKS	H		K	Q	A		S	RD									N	G	T		R	YAG											W	MNSDY	A	E	I	IGW3-12*01				
16	SSE	Q	DA	VAL	Q	R	T	QGD	--	IR	Y	AS		K	Q	V		GK	N									S	G	T		T	AGA													N	R	GMY	T	V	IGW3-19*01		
38	QSA	Q	P	V	Q	AM	P	SDX	--	L	MK	AV		K	Q	S	V	L		Q	IK							R	E	N	--	AD	T		TQM														TW	N	--	V	IGW3-1*01

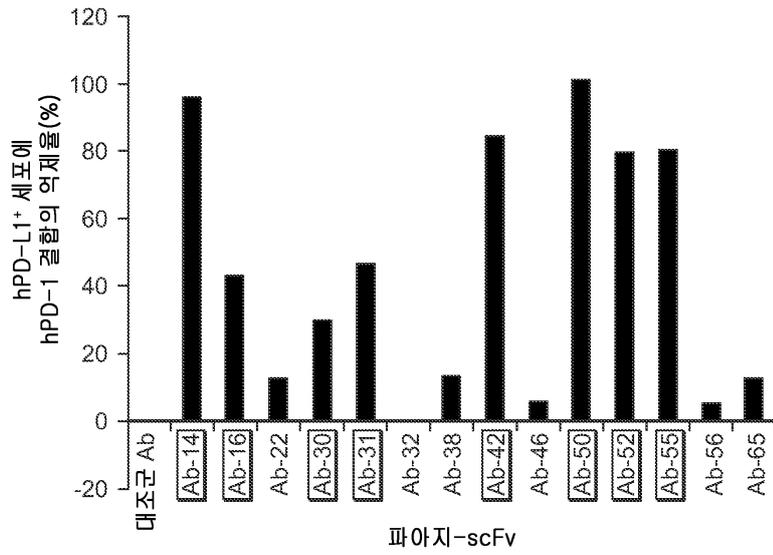
기호 설명: " AA는 공통 서열, "X"는 비공통 AA에 일치하고, "--"는 공백(즉, AA 없음)이다.

VL:

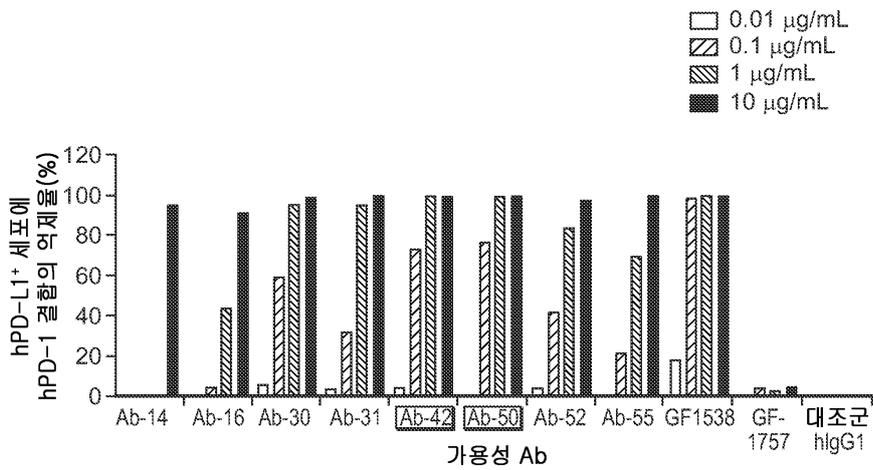
도면2



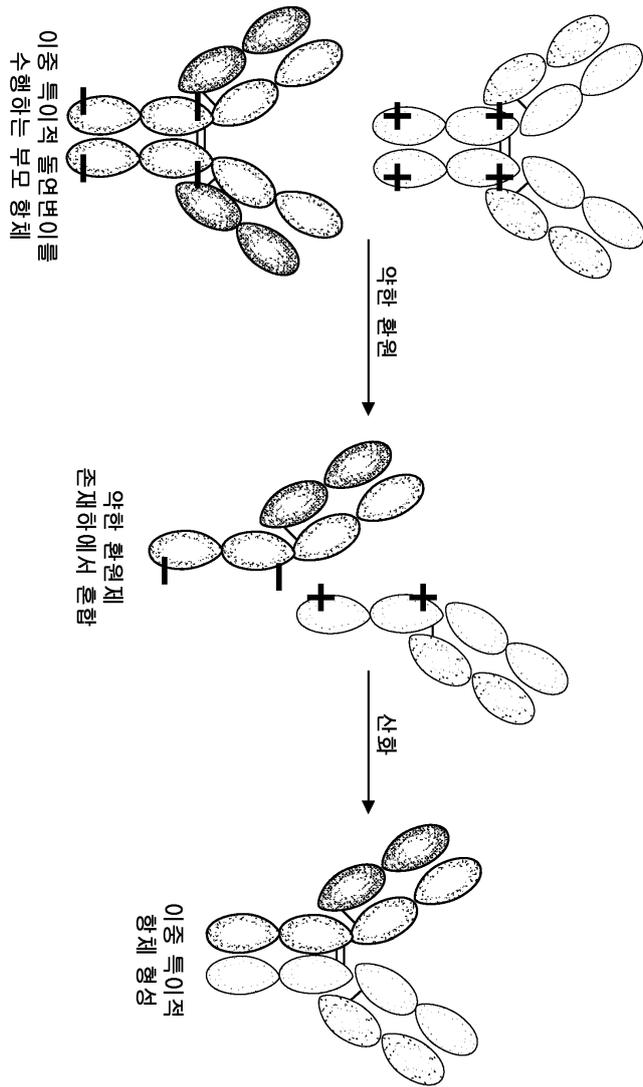
도면3



도면4

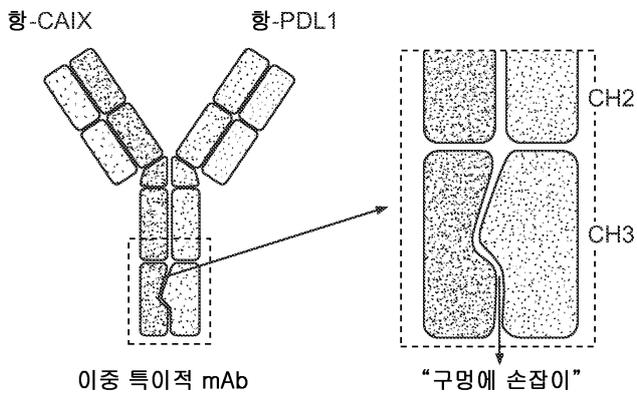


도면5

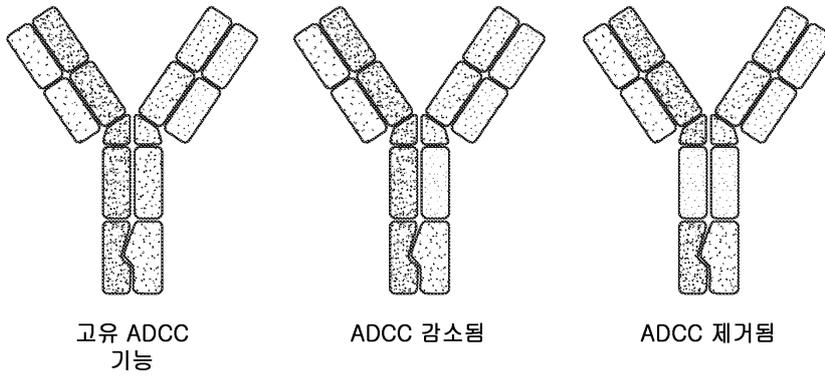


이중 특이적 항체의 설계 및 형성

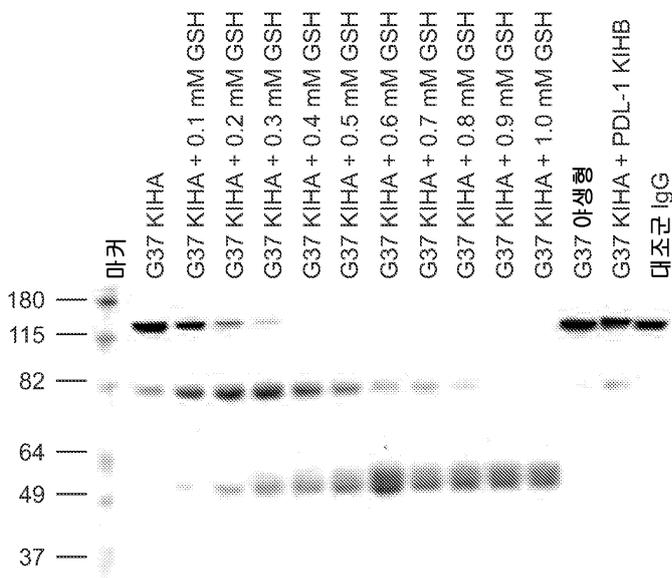
도면6a



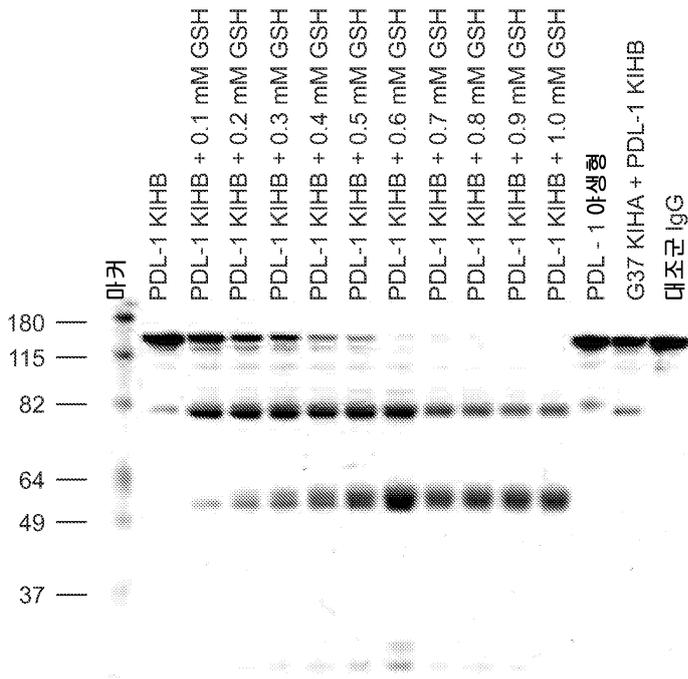
도면6b



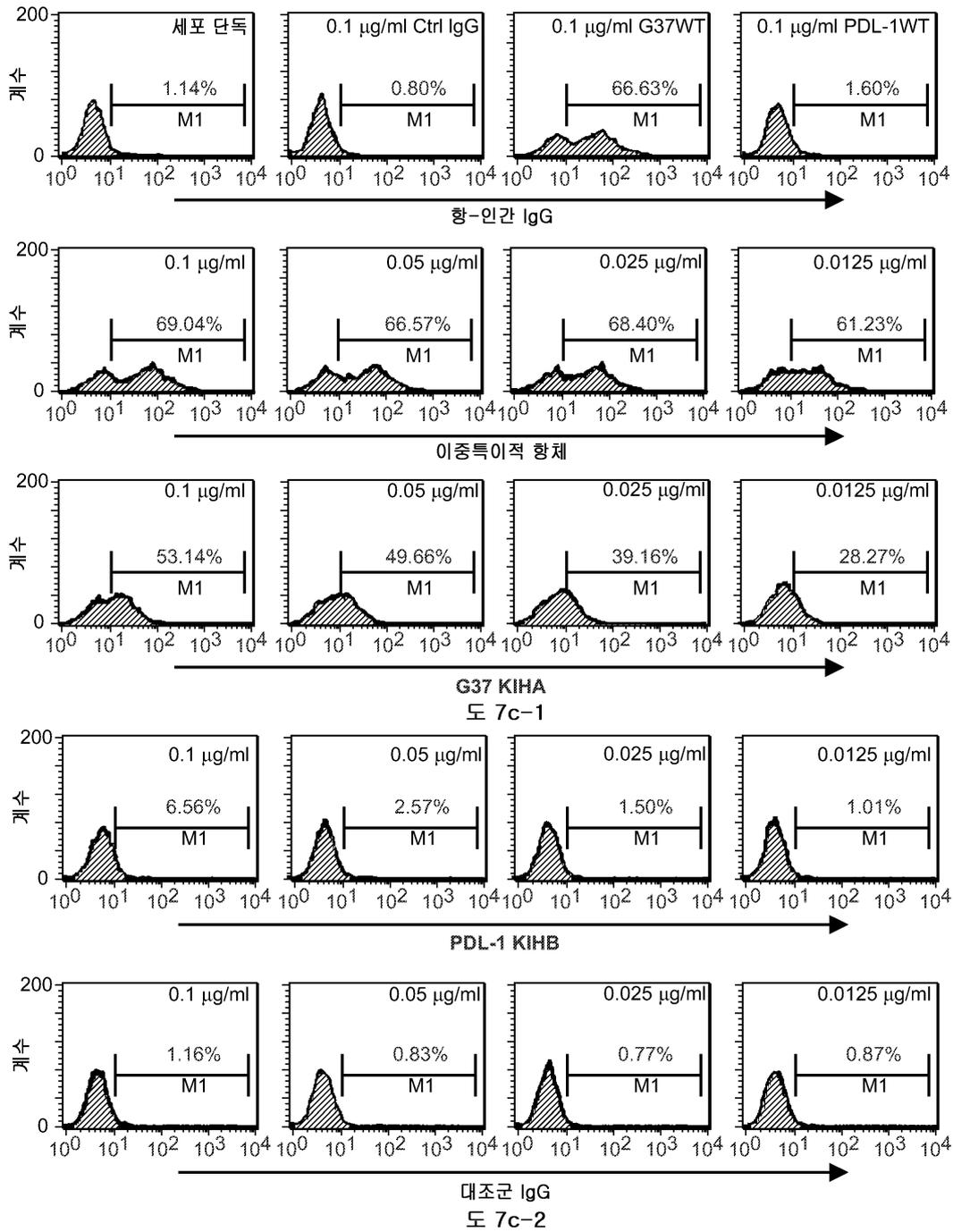
도면7a



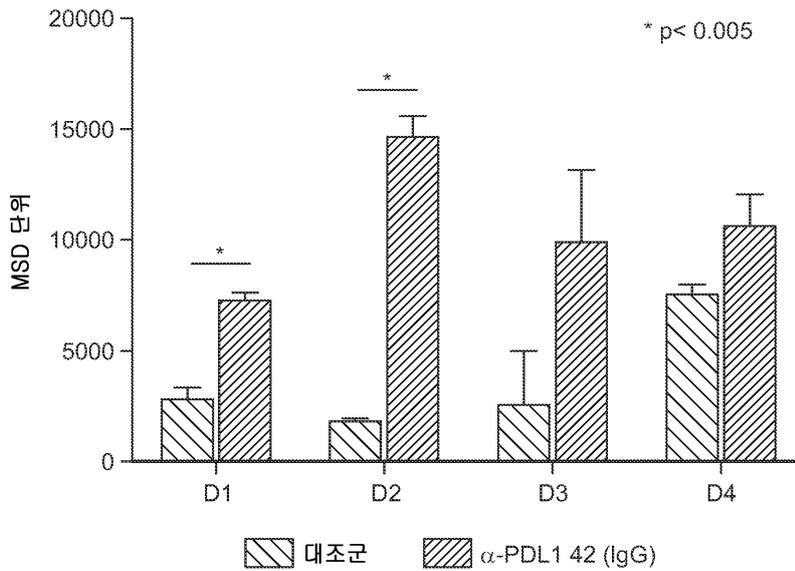
도면7b



도면7c



도면8



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Dana-Farber Cancer Institute, Inc.

Marasco, Wayne A.

Sui, Jianhua

<120> Human Monoclonal Anti-PD-L1 Antibodies and Methods of Use

<130> 20363-068001W0

<140> PCT/US13/63509

<141> 2013-10-04

<150> US 61/709,731

<151> 2012-10-04

<150> US 61/779,969

<151> 2013-03-13

<160> 140

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-14

<400> 1
 caggtgcagc tggatgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ctcttggtta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180
 gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagctcta 300
 cctagtggga ctatactggt cggaggttgg ttcgaccctt ggggccaggg aaccctggtc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-14

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ala Leu Pro Ser Gly Thr Ile Leu Val Gly Gly Trp Phe Asp

100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 3

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-14

<400> 3

```

aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc      60
tcttgcaccc gcagcagtgg caacattgcc agcaattatg tgcagtggta ccaacagcgc      120
ccgggcagtg cccccaccac tgtgatctat gaggataacc aaagaccctc tggggtcctc      180
gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga      240

ctgaagactg aggacgagge tgactactac tgcagctctt atgatagcag caatctttgg      300
gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta                                    333
    
```

<210> 4

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-14

<400> 4

```

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

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

Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
           100          105          110
    
```

<210> 5

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-16

<400> 5

```

gaggtgcagc tggcgcagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttage agctatgccc tgagctgggt cgcaggct      120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtgggt gtggtgtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcacatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat      240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagacgtg      300
ttccagaga cttttcgat gaactacggg atggacgtct gggccaagg aaccctggtc      360
accgtctcct ca                                                              372
    
```

<210> 6

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain Ab-16

<400> 6

```

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

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

           85           90           95
Ala Lys Asp Val Phe Pro Glu Thr Phe Ser Met Asn Tyr Gly Met Asp
           100          105          110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    
```

115 120

<210> 7

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-16

<400> 7

tcttctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaggatc 60

acatgccaaag gagacagcct cagaagctat tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga 120

caggcccctg tacttgtcat ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga 180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcaactggggc tcaggcgga 240

gatgaggctg actattactg taactcccgg gacagcagtg gtaaccatta tgtcttcgga 300

actgggacca aggtcacctg ccta 324

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-16

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His

85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 9

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-22

<400> 9

caggtgcagc tggcgcagtc tgggggaggc gtggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcaactgggt ccgtcaagct 120

ccaggaagg gtctggagtg ggtctctctt attagtgggg atggtggtag cacatactat 180

gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acagcaaaaa ctcctgtat 240

ctgcaaatga acagtctgag aactgaggac accgccttgt attactgtgc aaaagtgctc 300

ctcccctgta gtagtaccag ctgctatgga agcgtcggtg cttttgatat ctggggccaa 360

gggaccacgg tcaccgtctc ctca 384

<210> 10

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-22

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Leu Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Val Leu Leu Pro Cys Ser Ser Thr Ser Cys Tyr Gly Ser Val
 100 105 110

Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 11

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain Ab-22

<400> 11

taggacgatg agctcgggcc cagctccgaa gacataatga tcactattat tatcccacac 60
 ctgacagtaa taatcggcct catcaccggc ttcgaccctg ctgatgggtca gggcggccgt 120
 gttcccagag ttggagccag agaatcgctc agagatccct gagggccggt ccctatcaga 180
 gtagatgacc aacgcagggg cctggcctgg cttctgctgg taccagtgea cactcttct 240
 tccaatgtcg cttccccac aggtaatcct ggccgtcttt cctggggcca ctgacactga 300
 gggcgcctga gtcagcacag gcag 324

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-22

<400> 12

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asn Asn Ser Asp His
 85 90 95

Tyr Val Phe Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ile Val Leu
 100 105

<210> 13

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-30

<400> 13

caggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaagt gtggtacggc ctggggaatc cctcagactc 60
 tcctgtgtag ccctcggatt catctttgat aattatgaca tgagttgggt cgcceaagtt 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctctcgt gtaattgga atggtgtag cacaacttat 180
 gcagacgctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acaccaagaa ctccctgtat 240
 ctacaaatga acaacctgag agccgaagac acggccgtgt attactgtgt gcgagagttt 300
 gtcggtgctt atgatctctg gggccagggg accacgtca ccgtctctc a 351

<210> 14

<211> 117

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-30

<400> 14

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

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

Ser Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Val Lys
 100 105

<210> 21

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-32

<400> 21

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag ctgaagaagc ctgggtcctc ggtgaagtc 60
 tcttgcaagg cttttggagg caccttcagt gacaatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggctgagtg gatggggggc atcattccta tctttgaaa accaaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cactgcctac 240

atggtcctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtat attactgtgc gagaactatg 300
 gttcggggct ttcttggggg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 22

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-32

<400> 22

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

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

85 90 95
 Ala Arg Thr Met Val Arg Gly Phe Leu Gly Val Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-32

<400> 23

gatattgtga tgaccagac tccatcctc ctgtccgat ccataggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtc gggcattggc agttatttag cctggtatca gcaaagacca 120

ggggaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatcgactt tgcaaagtgg agtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacggac ttcactctca caatcagcaa cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag ctttaataatt acccgatcac cttcggccaa 300
 gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-32

<400> 24

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

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

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

<210> 25

<211> 375

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-38

<400> 25

caggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcag 300
 ttcgttacga tttttggagt gccaaagatac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360
 gtcaccgtct cctca 375

<210> 26

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-38

<400> 26

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Lys Asp Gln Phe Val Thr Ile Phe Gly Val Pro Arg Tyr Gly Met

 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

 115 120 125

<210> 27

<211> 315

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-38

<400> 27

cagtctgccc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agccaacatc 60

cctgtctctg gagataaatt ggggaataaa tatgcttact ggtatcagca gaagccaggc 120

cagtcacctg tactgtcat ctatcaagat atcaagcggc cctcaaggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccaactctgc ggacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggetatg 240

gatgaggctg actattactg tcagacgtgg gacaacagcg tggctctcgg cggcgggacc 300

aagctgaccg tctc 315

<210> 28

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-38

<400> 28

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

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

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

<210> 29

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-42

<400> 29

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcttgcaagg ctctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120

 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttgttac agcaaactac 180
 gcacagaagt tcagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtct attactgtgc gagagggcgt 300
 caaatgttcg gtgcgggaat tgatttctgg ggccccggca ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 30

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-42

<400> 30

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Arg Gln Met Phe Gly Ala Gly Ile Asp Phe Trp Gly Pro
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 31

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-42

<400> 31

aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60

tcctgcacce gcagcagtgg cagcattgac agcaactatg tgcagtggta ccagcagcgc 120

ccgggcagcg cccccaccac tgtgatctat gaggataacc aaagaccctc tggggtcctt 180

gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga 240

ctgaagactg aggacgagge tgactactac tgcagctctt atgatagcaa caatcgtcat 300

gtgatattcg gcggaggac caagctgacc gtcccta 336

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-42

<400> 32

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys

1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Asp Ser Asn

 20 25 30
 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val

 35 40 45
 Ile Tyr Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

 50 55 60
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly

65 70 75 80
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser

 85 90 95
 Asn Asn Arg His Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

 100 105 110

<210> 33

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-46

<400> 33

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggctgaa gtaaagaagc ctgggtcctc ggtgaaagtc 60

tcttcaagg tttcaggagg cacattcggc acctatgctc tcaactgggt ggcaccagcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagg atcgtccctc tcattggtct agtaaacctac 180

gcacataact ttgagggcag aatctcgatt accgcggaca agtccacggg cacagcctac 240

atggaactga gcaacctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagaggtc 300

tacggtggtg actccgacta ctggggccag ggaacctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 34

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-46

<400> 34

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

1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Thr Phe Gly Thr Tyr

 20 25 30
Ala Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

 35 40 45
Gly Arg Ile Val Pro Leu Ile Gly Leu Val Asn Tyr Ala His Asn Phe

 50 55 60
Glu Gly Arg Ile Ser Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Gly Thr Ala Tyr

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

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

 100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 35

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-46

<400> 35

aattttatgc tgactcagcc ccactcagtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60

tctgcactc gcagtagtgg caacattggc accaactatg tgcagtggta ccagcagcgc 120

ccgggcagtg cccccgtcgc tttgatctac gaggattatc gaagaccctc tggggtcctc 180

gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcat catctctgga 240

ctgaagcctg aggacgagge tgactactac tgtcagcttt atcatagcag cggttgggaa 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctc 330

<210> 36

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-46

<400> 36

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys

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

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

<210> 37

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-50

<400> 37

caggtgcagc tgggtgcagtc tggaggtgag gtgaagaagc cgggggcctc agtgaaggtc	60
tcttgcaagg cttctgggta caccttgagc agtcatggta taacctgggt ggcacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctc acaatgggtca cgctagcaat	180
gcacagaagg tggaggacag agtcactatg actactgaca catccacgaa cacagcctac	240
atggaactga ggagcctgac agctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagtacat	300
gctgcctct actatggat ggacgtctgg ggccaaggaa ccctgggtcac cgtctcctca	360

<210> 38

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-50

<400> 38

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

1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Ser Ser His

 20 25 30
Gly Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

 35 40 45
Gly Trp Ile Ser Ala His Asn Gly His Ala Ser Asn Ala Gln Lys Val

 50 55 60
Glu Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

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

 85 90 95
Ala Arg Val His Ala Ala Leu Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln

 100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 39

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-50

<

400> 39

cagtcctgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtggtccc caggacagac ggccaggatt 60
acctgtgggg gaaacaacat tggaagtaa ggtgtgcact ggtatcagca gaagccaggc 120
caggcccctg tactggtcgt ctatgatgat agtgaccggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240
gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatagtagta gtgatcattg ggtgttcggc 300

ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 40

<211> 108

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-50

<400> 40

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

<210> 41

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-52

<400> 41

caggtgcagc tgcaggagtc ggggggaggc gtggtgcagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgttcag cctctggatt caccttcagc agacatggca tgcactgggt cgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtg atatcacatg atggaagtgt aaaatactat 180
 gcagactcca tgaagggccg attcagcatc tccagagaca attccaacaa cacactgtat 240
 ctccaatgg acagcctgag agctgacgac acggccgttt attactgtgc gagaggactg 300

tcgtaccagg tgcgggggtg gttcgacccc tggggccagg gcaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 42

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-52

<400> 42

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 43

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-52

<400> 43

aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60
 tcctgcaccc gcagcagtg ggcagcattgcc agcaactatg tgcagtggta ccagcagcgc 120

ccgggcagtg cccccaccac tgtgatctat gaggataacc aaagaccctc tggggtcctt 180
 gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga 240
 ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgtcagtctt atgatagcac cacccttcg 300

gtgttcggcg gcgggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 44

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-52

<400> 44

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn

20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 45

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-55

<400> 45

caggtgcagc tgggtcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg accagccctc ataatggtct cacagcattt 180
 gcacagatcc tagagggccg agtcaccatg accacagaca catccacgaa cacagcctac 240
 atggaattga ggaacctgac atttgatgac acggccgttt atttctgtgc gaaagtacat 300

cctgtcttct cttatgctgtt ggacgtctgg ggccaaggca ccttggtcac cgtctctca 360

<210> 46

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-55

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Thr Ser Pro His Asn Gly Leu Thr Ala Phe Ala Gln Ile Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Asn Leu Thr Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Lys Val His Pro Val Phe Ser Tyr Ala Leu Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 47

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-55

<400> 47

aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtccc cggggaagac ggtaaccatc 60
 tcctgcaccc gcagcagtg cagcattgcc agcaactatg tacagtggta ccagcagcgc 120
 ccgggcagtt cccccaccac tgtgatctat gaagataacc aaagaccctc tggggtcctt 180
 gatcggttct ctggctccat cgacacctcc tccaactctg cctcctcac catctctgga 240

ctgaagacta aggacgagc ggactactac tgtcagtctt atgatggcat cactgtgatt 300
 ttcggcggag ggaccaagtt gaccgtccta 330

<210> 48

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-55

<400> 48

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn

20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Thr Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly

65 70 75 80

Leu Lys Thr Lys Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Gly

85 90 95

Ile Thr Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 49

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-56

<400> 49

gaggtgcagc tggtaggagtc tggagctgag gtgatgaacc ctgggtcctc ggtgagggtc 60
 tcctgcaggg gttctggagg cgacttcagt acctatgctt tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagg atcatcccta tccttggtat agcaaaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag ggtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgacgat acggccgtgt attactgtgc gagagatggc 300
 tatggttcgg acccgggtct atggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 50

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-56

<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Met Asn Pro Gly Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 51

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-56
 <400> 51
 aatTTTatgc tgactcagcc ccactctgtg tcgggggtctc cggggaagac ggtaaccctc 60
 ccctgcaccc gcagcagtgG cagcattgcc agccactatg tccagtggta ccagcagcgc 120
 ccgggcagtG cccccaccac tgtgatctat gaggataaca agagaccctc tggggtcctt 180

 gatcggTtct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcag catctctgga 240
 ctgaagactg aggacgagGc tgactactac tgcagctctt atgatagcag caatcgttgg 300
 gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 52

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-56

<400> 52

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

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

 85 90 95
 Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 53

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-65

<400> 53

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcttcaagg ctcttggtta cacctttacc aactatggta tcagctgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat      180

gcacagaagg tccagggcag agtcacatg accacagaca catccacgag cacaggctac      240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaggagat      300
tttcgaaaac cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca          354

```

<210> 54

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain of Ab-65

<400> 54

```

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

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

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

```

115

<210> 55

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-65

<400> 55

```

ctgcctgtgc tgactcagcc ggcttcctc tctgcatccc cggagcatc agccagtctc      60
acctgcacct tacgcagtgg cctcaatggt ggttctctaca ggatatactg gtaccagcag    120

aagccagggg gtcgtcccca gtatctcctg aactacaaat cagactcaa taaacagcag      180
gcctctggag tcccagccg cttctctgga tccaaggatg cttcggccaa tgcagggatt     240
ttactcatct cgggctcca gtctgaggat gaggctgact attactgtat gatttggtac     300
agcagcgctg tggattcgg cggagggacc aagctgaccg tccta                       345

```

<210> 56

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain of Ab-65

<400> 56

```

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

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Leu Asn Val Gly Ser
          20           25           30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Arg Pro Gln Tyr
          35           40           45

Leu Leu Asn Tyr Lys Ser Asp Ser Asn Lys Gln Gln Ala Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65           70           75           80

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
          85           90           95

Met Ile Trp Tyr Ser Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
          100          105          110

Thr Val Leu
          115

```

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR1 consensus, Ab-42

<400> 57

Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR1 of Ab-14, Ab-55

<400> 58

Ser Tyr Gly Ile Ser

1 5

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR1 of Ab-16

<400> 59

Ser Tyr Ala Leu Ser

1 5

<210> 60

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR1 of Ab-22

<400> 60

Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 61

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR1 of Ab-30

<400> 61

Asn Tyr Asp Met Ser

1 5

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR1 of Ab-31

<400> 62

Gly Leu Tyr Ile His

1 5

<210> 63

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR1 of Ab-32

<400> 63

Asp Asn Ala Ile Ser

1 5

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR1 of Ab-38

<400> 64

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> Heavy chain CDR1 of Ab-46
<400> 65

Thr Tyr Ala Leu Asn
1 5

<210> 66

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> Heavy chain CDR1 of Ab-50
<400> 66

Ser His Gly Ile Thr
1 5

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> Heavy chain CDR1 Ab-52
<400> 67

Arg His Gly Met His
1 5

<210> 68

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> Heavy chain CDR1 of Ab-56
<400> 68

Thr Tyr Ala Phe Ser
1 5

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> Heavy chain CDR1 of Ab-65

<400> 69

Asn Tyr Gly Ile Ser

1 5

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR2 consensus

<400> 70

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

1 5 10 15

Gly

<210> 71

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR2 of Ab-14

<400> 71

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

1 5 10 15

Asp

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR2 of Ab-16

<400> 72

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

1 5 10 15

Asp

<210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR2 of Ab-22

<400> 73

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

1 5 10 15

Asp

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR2 of Ab-30

<400> 74

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

1 5 10 15

Asp

<210> 75

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR2 of Ab-31

<400> 75

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

1 5 10 15

Asp

<210> 76

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR2 of Ab-32

<400> 76

Trp Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Pro Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Glu

1 5 10 15

Asp

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR2 of Ab-38

<400> 77

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

1 5 10 15

Asp

<210> 78

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR2 of Ab-42

<400> 78

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

1 5 10 15

Asp

<210> 79

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR2 of Ab-46

<400> 79

Arg Ile Val Pro Leu Ile Gly Leu Val Asn Tyr Ala His Asn Phe Glu

1 5 10 15

Asp

<210> 80

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR2 of Ab-50

<400> 80

Trp Ile Ser Ala His Asn Gly His Ala Ser Asn Ala Gln Lys Val Glu

1 5 10 15

Asp

<210> 81

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR2 of Ab-52

<400> 81

Val Ile Ser His Asp Gly Ser Val Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Met Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 82

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR2 of Ab-55

<400> 82

Trp Thr Ser Pro His Asn Gly Leu Thr Ala Phe Ala Gln Ile Leu Glu

1 5 10 15

Asp

<210> 83

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR2 of Ab-56

<400> 83

Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Glu

1 5 10 15

Asp

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR2 of Ab-65

<400> 84

Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Val Glu

1 5 10 15

Asp

<210> 85

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR3 consensus

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(17)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 85

Gly Leu Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Asp Val

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR3 of Ab-14

<400> 86

Ala Leu Pro Ser Gly Thr Ile Leu Val Gly Gly Trp Phe Asp Pro

1 5 10 15

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR3 of Ab-16

<400> 87

Asp Val Phe Pro Glu Thr Phe Ser Met Asn Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 88

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR3 of Ab-22

<400> 88

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

1 5 10 15

Phe Asp Ile

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR3 of Ab-30

<400> 89

Glu Phe Val Gly Ala Tyr Asp Leu

1 5

<210> 90

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR3 of Ab-31

<400> 90

Gly Leu Arg Trp Gly Ile Trp Gly Trp Phe Asp Pro

1 5 10

<210> 91

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR3 of Ab-32

<400> 91

Thr Met Val Arg Gly Phe Leu Gly Val Met Asp Val

1 5 10

<210> 92

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR3 of Ab-38

<400> 92

Asp Gln Phe Val Thr Ile Phe Gly Val Pro Arg Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 93

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR3 of Ab-42

<400> 93

Gly Arg Gln Met Phe Gly Ala Gly Ile Asp Phe

1 5 10

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR3 of Ab-46

<400> 94

Glu Val Tyr Gly Gly Asn Ser Asp Tyr

1 5

<210> 95

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR3 of Ab-50

<400> 95

Val His Ala Ala Leu Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 96

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR3 of Ab-52

<400> 96

Gly Leu Ser Tyr Gln Val Ser Gly Trp Phe Asp Pro

1 5 10

<210> 97

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR3 of Ab-55

<400> 97

Val His Pro Val Phe Ser Tyr Ala Leu Asp Val

1 5 10

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR3 of Ab-56

<400> 98

Asp Gly Tyr Gly Ser Asp Pro Val Leu

1 5

<210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain CDR3 of Ab-65

<400> 99

Gly Asp Phe Arg Lys Pro Phe Asp Tyr

1 5

<210> 100

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR1 consensus

<400> 100

Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Gly Ser Asn Tyr Val Gln

1 5 10

<210> 101

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR1 of Ab-14

<400> 101

Thr Arg Ser Ser Gly Asn Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln

1 5 10

<210> 102

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR1 of Ab-16
 <400> 102
 Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
 1 5 10

<210> 103

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Light chain CDR1 of Ab-22

<400> 103

Gly Gly Ser Asp Ile Gly Arg Lys Ser Val His
 1 5 10

<210> 104

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR1 of Ab-30

<400> 104

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 105

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR1 of Ab-31

<400> 105

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 106

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR1 of Ab-32

<400> 106

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR1 of Ab-38

<400> 107

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Tyr Ala Tyr

1 5 10

<210> 108

<211> 13

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR1 of Ab-42

<400> 108

Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Asp Ser Asn Tyr Val Gln

1 5 10

<210> 109

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR1 of Ab-46

<400> 109

Thr Arg Ser Ser Gly Asn Ile Gly Thr Asn Tyr Val Gln

1 5 10

<210> 110

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR1 of Ab-50

<400> 110

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Gly Val His

1 5 10

<210> 111

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR1 of Ab-52

<400> 111

Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln

1 5 10

<210> 112

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR1 of Ab-55

<400> 112

Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln

1 5 10

<210> 113

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR1 of Ab-56

<400> 113

Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser His Tyr Val Gln

1 5 10

<210> 114

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR1 of Ab-65

<400> 114

Thr Leu Arg Ser Gly Leu Asn Val Gly Ser Tyr Arg Ile Tyr

1 5 10

<210> 115

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR2 of consensus, Ab-14, Ab-42, Ab-52, Ab-55

<400> 115

Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 116

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR2 of Ab-16

<400> 116

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 117

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR2 of Ab-22

<400> 117

Ser Asp Arg Asp Arg Pro Ser

1 5

<210> 118

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR2 of Ab-30

<400> 118

Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 119

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR2 of Ab-31

<400> 119

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR2 of Ab-32

<400> 120

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 121

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR2 of Ab-38

<400> 121

Gln Asp Ile Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 122

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR2 of Ab-46

<400> 122

Glu Asp Tyr Arg Arg Pro Ser

1 5

<210> 123

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR2 of Ab-50

<400> 123

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser

1 5

<210> 124

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR2 of Ab-56

<400> 124

Glu Asp Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 125

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR2 of Ab-65

<400> 125

Tyr Lys Ser Asp Ser Asn Lys Gln Gln Ala Ser

1 5 10

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR3 consensus

<400> 126

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Thr Trp Val

1 5

<210> 127

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR3 of Ab-14

<400> 127

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Asn Leu Trp Val

1 5 10

<210> 128

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR3 of Ab-16

<400> 128

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Tyr Val

1 5 10

<210> 129

<211>

11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR3 of Ab-22

<400> 129

Gln Val Trp Asp Asn Asn Ser Asp His Tyr Val

1 5 10

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR3 of Ab-30

<400> 130

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Thr Leu Pro

1 5

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR3 of Ab-31

<400> 131

Gln Gln His Thr Ile Pro Thr Phe Ser

1 5

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR3 of Ab-32

<400> 132

Gln Gln Leu Asn Asn Tyr Pro Ile Thr

1 5

<210> 133

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR3 of Ab-38

<400> 133

Gln Thr Trp Asp Asn Ser Val Val

1 5

<210> 134

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR3 of Ab-42

<400> 134

Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Arg His Val Ile

1 5 10

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR3 of Ab-46

<400> 135

Gln Ser Tyr His Ser Ser Gly Trp Glu

1 5
 <210> 136
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light chain CDR3 of Ab-50
 <400> 136
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val
 1 5 10

<210> 137
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light chain CDR3 of Ab-52
 <400> 137
 Gln Ser Tyr Asp Ser Thr Thr Pro Ser Val
 1 5 10

<210> 138
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light chain CDR3 of Ab-55
 <400> 138
 Gln Ser Tyr Asp Gly Ile Thr Val Ile
 1 5

<210> 139
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light chain CDR3 of Ab-56
 <400>
 139
 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Asn Arg Trp Val
 1 5 10

<210> 140

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain CDR3 of Ab-65

<400> 140

Met Ile Trp Tyr Ser Ser Ala Val Val

1

5