



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2022-0087488  
(43) 공개일자 2022년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
C07K 16/2827 (2013.01)  
A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2022-7016606  
(22) 출원일자(국제) 2020년10월30일  
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년05월17일  
(86) 국제출원번호 PCT/CN2020/125301  
(87) 국제공개번호 WO 2021/083335  
국제공개일자 2021년05월06일

(30) 우선권주장  
201911044297.0 2019년10월30일 중국(CN)  
202010765530.0 2020년07월31일 중국(CN)

(71) 출원인  
산유 바이오파마슈티컬스 씨오., 엘티디.  
중국 상하이 200233 쉬후이 디스트릭트 구이핑 로드 333빌딩 7 룸 103

(72) 발명자  
콩 차오  
중국, 상하이 200233, 쉬후이 디스트릭트, 333 구이핑 로드, 빌딩 7, 룸 103

량 구오준  
중국, 상하이 200233, 쉬후이 디스트릭트, 333 구이핑 로드, 빌딩 7, 룸 103  
(뒷면에 계속)

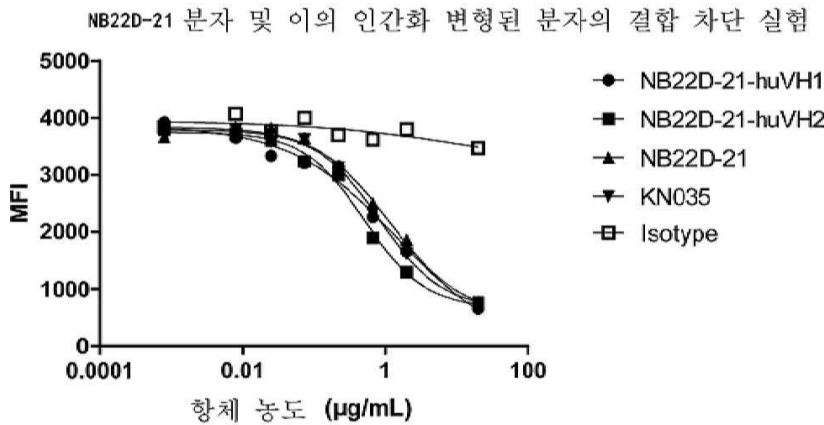
(74) 대리인  
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 PD-L1 결합 분자

(57) 요약

본원 발명은 분리된 PD-L1 결합 분자, 구체적으로 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트를 제공한다. 본 발명은 상기 분리된 PD-L1 결합 분자를 코딩하는 핵산 및 상기 핵산을 포함하는 발현 벡터 또는 숙주 세포, 및 상기 PD-L1 결합 분자를 포함하는 약물 조성물 또는 키트를 제공한다.



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/569 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

**우 치**

중국, 상하이 200233, 쉬후이 디스트릭트, 333 구  
이핑 로드, 빌딩 7, 룸 103

**리우 찬주안**

중국, 상하이 200233, 쉬후이 디스트릭트, 333 구  
이핑 로드, 빌딩 7, 룸 103

**안 룬**

중국, 상하이 200233, 쉬후이 디스트릭트, 333 구  
이핑 로드, 빌딩 7, 룸 103

**양 신티안**

중국, 상하이 200233, 쉬후이 디스트릭트, 333 구  
이핑 로드, 빌딩 7, 룸 103

**탄 룬메이**

중국, 상하이 200233, 쉬후이 디스트릭트, 333 구  
이핑 로드, 빌딩 7, 룸 103

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

(i) SEQ ID NO: 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1로서,

● SEQ ID NO: 1과 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 또는

● SEQ ID NO: 1에 비해 2개 이하(예를 들어, 0개, 1개 및 2개)의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1,

(ii) SEQ ID NO: 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2로서,

● SEQ ID NO: 2와 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 또는

● SEQ ID NO: 2에 비해 2개 이하(예를 들어, 0개, 1개 및 2개)의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및

(iii) SEQ ID NO: 3 또는 12로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3으로서,

● SEQ ID NO: 3 또는 12와 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3, 또는

● SEQ ID NO: 3 또는 12에 비해 2개 이하(예를 들어, 0개, 1개 및 2개)의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3,

을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인, PD-L1에 특이적으로 결합하는 단리된 PD-L1 결합 분자.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,

(i) 식 RTDSNIX<sub>1</sub>GMH로 표시되는, X<sub>1</sub>은 H, F 또는 N인 CDR1,

(ii) 식 TIFIDX<sub>2</sub>NTX<sub>3</sub>으로 표시되는, X<sub>2</sub>는 G, L 또는 A이고, X<sub>3</sub>은 I 또는 L인 CDR2, 및

(iii) 식 DVSGYGRX<sub>4</sub>로 표시되는, X<sub>4</sub>는 A 또는 Y인 CDR3,

을 포함하는 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,

(i) SEQ ID NO: 1을 포함하거나 SEQ ID NO: 1로 구성된 CDR1,

(ii) SEQ ID NO: 2를 포함하거나 SEQ ID NO: 2로 구성된 CDR2, 및

(iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3,

을 포함하는 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,

(i) SEQ ID NO: 4를 포함하거나 SEQ ID NO: 4로 구성된 CDR1,

(ii) SEQ ID NO: 5를 포함하거나 SEQ ID NO: 5로 구성된 CDR2, 및

(iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3,

을 포함하는 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 5**

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,

- (i) SEQ ID NO: 6을 포함하거나 SEQ ID NO: 6으로 구성된 CDR1,
  - (ii) SEQ ID NO: 7을 포함하거나 SEQ ID NO: 7로 구성된 CDR2, 및
  - (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3,
- 을 포함하는 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 6**

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,

- (i) SEQ ID NO: 1을 포함하거나 SEQ ID NO: 1로 구성된 CDR1,
  - (ii) SEQ ID NO: 8을 포함하거나 SEQ ID NO: 8로 구성된 CDR2, 및
  - (iii) SEQ ID NO: 9를 포함하거나 SEQ ID NO: 9로 구성된 CDR3,
- 을 포함하는 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 7**

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,

- (i) SEQ ID NO: 10을 포함하거나 SEQ ID NO: 10으로 구성된 CDR1,
  - (ii) SEQ ID NO: 11을 포함하거나 SEQ ID NO: 11로 구성된 CDR2, 및
  - (iii) SEQ ID NO: 12를 포함하거나 SEQ ID NO: 12로 구성된 CDR3,
- 을 포함하는 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 8**

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,

- (i) SEQ ID NO: 13을 포함하거나 SEQ ID NO: 13으로 구성된 CDR1,
  - (ii) SEQ ID NO: 5를 포함하거나 SEQ ID NO: 5로 구성된 CDR2, 및
  - (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3,
- 을 포함하는 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 9**

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,

- (i) SEQ ID NO: 14를 포함하거나 SEQ ID NO: 14로 구성된 CDR1,
  - (ii) SEQ ID NO: 15를 포함하거나 SEQ ID NO: 15로 구성된 CDR2, 및
  - (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3,
- 을 포함하는 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 10**

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,

- (i) SEQ ID NO: 16을 포함하거나 SEQ ID NO: 16으로 구성된 CDR1,
- (ii) SEQ ID NO: 17을 포함하거나 SEQ ID NO: 17로 구성된 CDR2, 및

(iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3, 을 포함하는 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 11**

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,

- (i) SEQ ID NO: 18을 포함하거나 SEQ ID NO: 18로 구성된 CDR1,
- (ii) SEQ ID NO: 19를 포함하거나 SEQ ID NO: 19로 구성된 CDR2, 및
- (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3, 을 포함하는 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 12**

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,

- (i) SEQ ID NO: 20을 포함하거나 SEQ ID NO: 20으로 구성된 CDR1,
- (ii) SEQ ID NO: 5를 포함하거나 SEQ ID NO: 5로 구성된 CDR2, 및
- (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3, 을 포함하는 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 13**

- (i) SEQ ID NO: 21을 포함하거나 SEQ ID NO: 21로 구성된 CDR1,
- (ii) SEQ ID NO: 22를 포함하거나 SEQ ID NO: 22로 구성된 CDR2, 및
- (iii) SEQ ID NO: 23을 포함하거나 SEQ ID NO: 23으로 구성된 CDR3, 을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인, PD-L1에 특이적으로 결합하는 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 14**

- (i) SEQ ID NO: 24를 포함하거나 SEQ ID NO: 24로 구성된 CDR1,
- (ii) SEQ ID NO: 25를 포함하거나 SEQ ID NO: 25로 구성된 CDR2, 및
- (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3, 을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인, PD-L1에 특이적으로 결합하는 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 15**

- (i) SEQ ID NO: 26을 포함하거나 SEQ ID NO: 26으로 구성된 CDR1,
- (ii) SEQ ID NO: 27을 포함하거나 SEQ ID NO: 27로 구성된 CDR2, 및
- (iii) SEQ ID NO: 23을 포함하거나 SEQ ID NO: 23으로 구성된 CDR3, 을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인, PD-L1에 특이적으로 결합하는 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 16**

- (i) SEQ ID NO: 28을 포함하거나 SEQ ID NO: 28로 구성된 CDR1,
- (ii) SEQ ID NO: 29를 포함하거나 SEQ ID NO: 29로 구성된 CDR2, 및
- (iii) SEQ ID NO: 23을 포함하거나 SEQ ID NO: 23으로 구성된 CDR3, 을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인, PD-L1에 특이적으로 결합하는 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 17**

- (i) SEQ ID NO: 30을 포함하거나 SEQ ID NO: 30으로 구성된 CDR1,
  - (ii) SEQ ID NO: 31을 포함하거나 SEQ ID NO: 31로 구성된 CDR2, 및
  - (iii) SEQ ID NO: 23을 포함하거나 SEQ ID NO: 23으로 구성된 CDR3,
- 을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인, PD-L1에 특이적으로 결합하는 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 18**

제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서,  
 상기 중쇄 가변 영역은 FR1, FR2, FR3 및 FR4를 포함하는 FR 영역을 더 포함하고,  
 상기 FR1, FR2, FR3 및 FR4와 CDR1, CDR2 및 CDR3은, 상기 중쇄 가변 영역에서 엇갈아 배열되어, N 말단으로부터 C 말단까지 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4의 구조를 형성하는,  
 것인 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 19**

- 제 18 항에 있어서, 상기 FR 영역은,
- (a) SEQ ID NO: 53에 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 FR1로서,
    - SEQ ID NO: 53과 90%, 95% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR1, 또는
    - SEQ ID NO: 53에 비해 2개 이하(예를 들어, 0개, 1개 및 2개)의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR1,
  - (b) SEQ ID NO: 54에 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 FR2로서,
    - SEQ ID NO: 54와 90%, 95% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR2, 또는
    - SEQ ID NO: 54에 비해 2개 이하(예를 들어, 0개, 1개 및 2개)의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR2;
  - (c) SEQ ID NO: 55에 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 FR3으로서,
    - SEQ ID NO: 55와 90%, 95% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR3, 또는
    - SEQ ID NO: 55에 비해 2개 이하(예를 들어, 0개, 1개 및 2개)의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR3, 및
  - (d) SEQ ID NO: 56에 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 FR4로서,
    - SEQ ID NO: 56과 90%, 95% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR4, 또는
    - SEQ ID NO: 56에 비해 2개 이하(예를 들어, 0개, 1개 및 2개)의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR4,
- 를 포함하는 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 20**

- 제 18 항에 있어서, 상기 FR 영역은,
- (a) SEQ ID NO: 57에 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 FR1로서,
    - SEQ ID NO: 57과 90%, 95% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR1, 또는
    - SEQ ID NO: 57에 비해 2개 이하(예를 들어, 0개, 1개 및 2개)의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR1,
  - (b) SEQ ID NO: 58에 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 FR2로서,

- SEQ ID NO: 58과 90%, 95% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR2, 또는
  - SEQ ID NO: 58에 비해 2개 이하(예를 들어, 0개, 1개 및 2개)의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR2,
- (c) SEQ ID NO: 59에 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 FR3으로서,
- SEQ ID NO: 59와 90%, 95% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR3, 또는
  - SEQ ID NO: 59에 비해 2개 이하(예를 들어, 0개, 1개 및 2개)의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR3, 및
- (d) SEQ ID NO: 60에 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 FR4로서,
- SEQ ID NO: 60과 90%, 95% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR4, 또는
  - SEQ ID NO: 60에 비해 2개 이하(예를 들어, 0개, 1개 및 2개)의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR4,
- 를 포함하는 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

#### 청구항 21

제 18 항에 있어서, 상기 FR 영역은,

- (a) SEQ ID NO: 61에 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 FR1로서,
- SEQ ID NO: 61과 90%, 95% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR1, 또는
  - SEQ ID NO: 61에 비해 2개 이하(예를 들어, 0개, 1개 및 2개)의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR1,
- (b) SEQ ID NO: 58에 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 FR2로서,
- SEQ ID NO: 58과 90%, 95% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR2, 또는
  - SEQ ID NO: 58에 비해 2개 이하(예를 들어, 0개, 1개 및 2개)의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR2,
- (c) SEQ ID NO: 59에 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 FR3으로서,
- SEQ ID NO: 59와 90%, 95% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR3, 또는
  - SEQ ID NO: 59에 비해 2개 이하(예를 들어, 0개, 1개 및 2개)의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR3, 및
- (d) SEQ ID NO: 60에 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 FR4로서,
- SEQ ID NO: 60과 90%, 95% 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR4, 또는
  - SEQ ID NO: 60에 비해 2개 이하(예를 들어, 0개, 1개 및 2개)의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR4,
- 를 포함하는 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

#### 청구항 22

제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,

- SEQ ID NO: 36 내지 52 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나,
  - SEQ ID NO: 36 내지 52 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열로 구성되는
- 것인 단리된 PD-L1 결합 분자.

#### 청구항 23

제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 중쇄 가변 영역은,

- SEQ ID NO: 36 내지 52 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 이상의 동일성을 갖고,

- PD-L1에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하고 있는

아미노산 서열을 포함하는 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 24**

제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서,

- 상기 중쇄 가변 영역은,

- SEQ ID NO: 36 내지 52 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열에 비해 하나 이상의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환(예를 들어, 보존적 치환)을 갖고,

- PD-L1에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하고 있는

아미노산 서열을 포함하고,

- 상기 1개 이상의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환(예를 들어, 보존적 치환)은 5개 이하, 바람직하게는 3개 이하인

것인 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 25**

제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서, PD-L1 결합 분자가 낙타 유래 항체, 인간화 항체, 친화력 성숙 항체 또는 약물 가능성 변형 분자 인 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 26**

제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서, PD-L1 결합 분자가 단일 도메인 항체 또는 그의 항원 결합 세그먼트 인 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 27**

제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 가변 영역은 면역 글로불린(예를 들어, IgG)의 Fc 도메인, 항체, 항체의 항원 결합 세그먼트, 항체-약물 접합체, 항체-유사 분자, 항체-유사 분자의 항원 결합 세그먼트 또는 형광 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 다른 분자에 융합 되어 있는 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 28**

제 27 항에 있어서, 중쇄 가변 영역이 인간 IgG(예를 들어, 인간 IgG1 또는 인간 IgG4)의 Fc 도메인에 융합되어 있는 것인, 단리된 PD-L1 결합 분자.

**청구항 29**

제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 따른 단리된 PD-L1 결합 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인, 단리된 핵산 분자.

**청구항 30**

제 29 항에 따른 핵산 분자를 포함하는 것인, 벡터.

**청구항 31**

제 30 항에 따른 벡터를 포함하는 것인, 숙주 세포.



**청구항 32**

유효량의 제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 따른 PD-L1 결합 분자 및 약학 적으로 허용되는 담체를 포함하는 것인, 약물 조성물.

**청구항 33**

- 숙주 세포에서, 제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 따른 PD-L1 결합 분자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현시켜 PD-L1 결합 분자를 생성하는 단계와,
- 상기 숙주 세포로부터 상기 PD-L1 결합 분자를 단리시키는 단계를 포함하는 것인, 제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 따른 PD-L1 결합 분자의 제조 방법.

**청구항 34**

치료 유효량의 제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 따른 PD-L1 결합 분자를 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 것인, 피험자에서 PD-L1과 관련된 질환의 예방 또는 치료용 방법.

**청구항 35**

제 34 항에 있어서, 상기 피험자가 마우스 또는 인간, 바람직하게는 인간 인 것인, 방법.

**청구항 36**

제 34 항에 있어서, 상기 PD-L1과 관련된 질환은 신장세포암, 비소세포폐암, 방광암, 요로상피암 및 현미세부수채 불안정형 고형 종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환인 것인, 방법.

**청구항 37**

1종 이상의 제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항에 따른 PD-L1 결합 분자를 포함하는 용기를 포함하는 것인, 피험자에서 PD-L1과 관련된 질환의 예방 또는 치료용 키트.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] [우선권 정보]

[0002] 본원 발명은 2019년 10월 30일에 제출된 중국 발명 특허 출원 번호 201911044297.0 및 2020년 7월 31일에 제출된 중국 발명 특허 출원 번호 202010765530.0의 권리와 이익을 주장하고, 상기 발명의 내용은 인용을 통해 본문에 완전히 포함된다.

[0003] 본원 발명은 생물 기술 분야에 속하고, 일반적으로 항체에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본원 발명은 PD-L1을 특이적으로 인식하는 결합 분자(예를 들어, 단일 도메인 항체), 이의 제조 방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0004] 면역 체크포인트(Immune checkpoint)는 면역계에서 억제 역할을 하는 CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3을 포함하는 조절 분자로서, 현재 CTLA-4와 PD-1 두 개의 면역 체크포인트를 기반으로 다수의 항체 약물이 출시되고 있다. PD-1(programmed death 1, 프로그래밍된 사멸 수용체1)은 중요한 면역 억제 분자로서, 최초 사멸된 마우스 T세포 하이브리도마(T cell hybridoma) 2B4.11에서 클로닝되었다. PD-1을 표적으로 하는 면역 조절은 항종양, 항감염, 자가면역 질환 및 장기 이식 생존 등에 대해 모두 중요한 의미를 갖는다.

[0005] PD-1의 주요 리간드는 PD-L1 및 PD-L2이고, 여기서 PD-L1은 종양 세포 회피(tumor escape)를 매개하는 과정에서 중요한 역할을 하며, 종양 세포 및 일부 항원 제시 세포에서 고도로 발현되고, 발현량은 IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 와 같은 다양한 사이토카인에 의해 유도될 수 있다. 종양 미세 환경에서, PD-L1의 발현의 상향 조절은 PD-1 신호

경로를 통해 T세포의 항종양 반응을 직접적으로 억제하여, 종양 세포의 면역 회피를 매개할 수 있다.

- [0006] 단일 도메인 항체는 단일 도메인 항체(single domain antibody, sdAb)로 약칭되고, 단일 항체 중쇄 가변 영역 도메인을 포함하는 항체이다. IgG 항체와 유사하게, 특정 항원에 선택적으로 결합할 수 있지만, 단일 도메인 항체의 분자량은 IgG 항체보다 훨씬 작다. 현재 첫번째 단일 도메인 항체는 낙타과 동물에서 발견된 중쇄 항체를 변형시킨 것이고(Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature 363(6428):446-448.); 이러한 낙타과 동물에서 발견된 중쇄 항체도 VHH 세그먼트로 지칭된다. 현재, 단일 도메인 항체에 대한 대부분의 연구는 중쇄 가변 도메인을 기반으로 한다.
- [0007] 단일 도메인 항체는 많은 장점을 갖고 있다. 예를 들어, 높은 용해도, 우수한 열 안정성 및 조직 투과성을 갖고, 일부 단일 도메인 항체는 분자 내 이황화 결합의 존재로 인해 파파인 등의 분해 작용에 내성이 있을 수도 있으며; 이 외에, 단일 도메인 항체는 효모, 식물 및 포유 동물 세포와 같은 다양한 발현 숙주에서 생성될 수 있고, 발현량이 높아 매우 비용 효율적이다(Harmsen MM, De Haard HJ (2007) Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. Appl Microbiol Biotechnol 77(1):13-22.). 단일 도메인 항체는 많은 장점으로 인해 다양한 생물 기술 및 의료 분야에서 우수한 응용 전망을 갖는다. 현재 Ablynx 회사의 첫번째 단일 도메인 항체 약물은 승인을 받아 출시되었다.
- [0008] 현재 PD-L1 표적에 관하여 출시된 항체 약물은 많지 않으므로, 암의 면역 치료에 사용되는, PD-L1을 특이적으로 인식하는 새로운 결합 분자(예를 들어, 단일 도메인 항체)의 연구 개발이 여전히 필요하여 보다 낮은 독성 부작용 및 보다 우수한 임상 효능을 갖도록 한다.

**발명의 내용**

- [0009] 본 발명의 목적은 새로운 PD-L1 결합 분자를 제공하는 것이고, 구체적으로, PD-L1을 특이적으로 인식하는 새로운 단일 도메인 항체를 제공하는 것이다. 기존의 PD-L1 결합 분자에 비해, 본 발명의 PD-L1 결합 분자는 보다 낮은 독성 부작용 및 보다 우수한 임상 효능을 갖고, 암을 보다 효과적으로 치료할 수 있다.
- [0010] 요약하면, 본 발명은 PD-L1을 특이적으로 인식하는 결합 분자를 제공하고, 구체적으로 PD-L1을 특이적으로 인식하는 단일 도메인 항체를 제공한다. 상기 단일 도메인 항체는 이하에서 PD-L1 단일 도메인 항체, 나노 항체 형태의 PD-L1 항체, PD-L1 나노 항체 또는 PD-L1의 VHH 항체로도 지칭되고, 상기 용어는 상호 교환하여 사용할 수 있다. 본원 발명은 상기 PD-L1 결합 분자를 구축하고 스크리닝하는 방법, 상기 PD-L1 결합 분자를 코딩하는 핵산 분자, PD-L1 결합 분자를 발현하기 위한 벡터 및 숙주 세포, 및 상기 PD-L1 결합 분자를 포함하는 조성물 또는 키트를 더 제공한다. 본원 발명의 PD-L1 결합 분자는 면역계를 조절하여 다양한 암을 치료하므로, 암을 치료하는 약제 제조에 사용될 수 있다.
- [0011] 구체적으로, 본 발명은 나노 항체 형태의 PD-L1 항체 및 인간화 변형 또는 친화력이 성숙된 유도체 분자를 제공하고, 높은 친화력, 낮은 분자량 등 장점을 유지하면서, 면역 원성 변형을 수행하여 약물 가능성을 개선하며 큰 치료 장점을 갖는다.
- [0012] 일부 양태에서, 본 발명은 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 PD-L1 결합 분자를 제공하되, 여기서 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0013] (i) SEQ ID NO: 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1;
- [0014] SEQ ID NO: 1과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1; 또는
- [0015] SEQ ID NO: 1 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1;
- [0016] (ii) SEQ ID NO: 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2;
- [0017] SEQ ID NO: 2와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2; 또는
- [0018] SEQ ID NO: 2 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2;
- [0019] 및

- [0020] (iii) SEQ ID NO: 3 또는 12로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3;
- [0021] SEQ ID NO: 3 또는 12와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3; 또는
- [0022] SEQ ID NO: 3 또는 12 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함한다.
- [0023] 일부 실시형태에서, 상기 PD-L1 결합 분자는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0024] (i)  $X_1$ 은 H, F 또는 N인 식 RTDSNIX<sub>1</sub>GMH로 표시되는 CDR1;
- [0025] (ii)  $X_2$ 는 G, L 또는 A이고,  $X_3$ 은 I 또는 L인 식 TIFIDX<sub>2</sub>NTX<sub>3</sub>으로 표시되는 CDR2; 및
- [0026] (iii)  $X_4$ 는 A 또는 Y인 식 DVSGYGRX<sub>4</sub>로 표시되는 CDR3을 포함한다.
- [0027] 일부 실시형태에서, 상기 PD-L1 결합 분자는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0028] (i) SEQ ID NO: 1을 포함하거나 SEQ ID NO: 1로 구성된 CDR1;
- [0029] (ii) SEQ ID NO: 2를 포함하거나 SEQ ID NO: 2로 구성된 CDR2; 및
- [0030] (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0031] 일부 실시형태에서, 상기 PD-L1 결합 분자는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0032] (i) SEQ ID NO: 4를 포함하거나 SEQ ID NO: 4로 구성된 CDR1;
- [0033] (ii) SEQ ID NO: 5를 포함하거나 SEQ ID NO: 5로 구성된 CDR2; 및
- [0034] (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0035] 일부 실시형태에서, 상기 PD-L1 결합 분자는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0036] (i) SEQ ID NO: 6을 포함하거나 SEQ ID NO: 6으로 구성된 CDR1;
- [0037] (ii) SEQ ID NO: 7을 포함하거나 SEQ ID NO: 7로 구성된 CDR2; 및
- [0038] (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0039] 일부 실시형태에서, 상기 PD-L1 결합 분자는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0040] (i) SEQ ID NO: 1을 포함하거나 SEQ ID NO: 1로 구성된 CDR1;
- [0041] (ii) SEQ ID NO: 8을 포함하거나 SEQ ID NO: 8로 구성된 CDR2; 및
- [0042] (iii) SEQ ID NO: 9를 포함하거나 SEQ ID NO: 9로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0043] 일부 실시형태에서, 상기 PD-L1 결합 분자는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0044] (i) SEQ ID NO: 10을 포함하거나 SEQ ID NO: 10으로 구성된 CDR1;
- [0045] (ii) SEQ ID NO: 11을 포함하거나 SEQ ID NO: 11로 구성된 CDR2; 및
- [0046] (iii) SEQ ID NO: 12를 포함하거나 SEQ ID NO: 12로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0047] 일부 실시형태에서, 상기 PD-L1 결합 분자는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0048] (i) SEQ ID NO: 13을 포함하거나 SEQ ID NO: 13으로 구성된 CDR1;
- [0049] (ii) SEQ ID NO: 5를 포함하거나 SEQ ID NO: 5로 구성된 CDR2; 및
- [0050] (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0051] 일부 실시형태에서, 상기 PD-L1 결합 분자는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0052] (i) SEQ ID NO: 14를 포함하거나 SEQ ID NO: 14로 구성된 CDR1;
- [0053] (ii) SEQ ID NO: 15를 포함하거나 SEQ ID NO: 15로 구성된 CDR2; 및

- [0054] (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0055] 일부 실시형태에서, 상기 PD-L1 결합 분자는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0056] (i) SEQ ID NO: 16을 포함하거나 SEQ ID NO: 16으로 구성된 CDR1;
- [0057] (ii) SEQ ID NO: 17을 포함하거나 SEQ ID NO: 17로 구성된 CDR2; 및
- [0058] (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0059] 일부 실시형태에서, 상기 PD-L1 결합 분자는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0060] (i) SEQ ID NO: 18을 포함하거나 SEQ ID NO: 18로 구성된 CDR1;
- [0061] (ii) SEQ ID NO: 19를 포함하거나 SEQ ID NO: 19로 구성된 CDR2; 및
- [0062] (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0063] 일부 실시형태에서, 상기 PD-L1 결합 분자는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0064] (i) SEQ ID NO: 20을 포함하거나 SEQ ID NO: 20으로 구성된 CDR1;
- [0065] (ii) SEQ ID NO: 5를 포함하거나 SEQ ID NO: 5로 구성된 CDR2; 및
- [0066] (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0067] 일부 양태에서, 본 발명은 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 PD-L1 결합 분자를 제공하되, 여기서 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0068] (i) SEQ ID NO: 21을 포함하거나 SEQ ID NO: 21로 구성된 CDR1;
- [0069] (ii) SEQ ID NO: 22를 포함하거나 SEQ ID NO: 22로 구성된 CDR2; 및
- [0070] (iii) SEQ ID NO: 23을 포함하거나 SEQ ID NO: 23으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0071] 일부 양태에서, 본 발명은 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 PD-L1 결합 분자를 제공하되, 여기서 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0072] (i) SEQ ID NO: 24를 포함하거나 SEQ ID NO: 24로 구성된 CDR1;
- [0073] (ii) SEQ ID NO: 25를 포함하거나 SEQ ID NO: 25로 구성된 CDR2; 및
- [0074] (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0075] 일부 양태에서, 본 발명은 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 PD-L1 결합 분자를 제공하되, 여기서 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0076] (i) SEQ ID NO: 26을 포함하거나 SEQ ID NO: 26으로 구성된 CDR1;
- [0077] (ii) SEQ ID NO: 27을 포함하거나 SEQ ID NO: 27로 구성된 CDR2; 및
- [0078] (iii) SEQ ID NO: 23을 포함하거나 SEQ ID NO: 23으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0079] 일부 양태에서, 본 발명은 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 PD-L1 결합 분자를 제공하되, 여기서 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0080] (i) SEQ ID NO: 28을 포함하거나 SEQ ID NO: 28로 구성된 CDR1;
- [0081] (ii) SEQ ID NO: 29를 포함하거나 SEQ ID NO: 29로 구성된 CDR2; 및
- [0082] (iii) SEQ ID NO: 23을 포함하거나 SEQ ID NO: 23으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0083] 일부 양태에서, 본 발명은 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 PD-L1 결합 분자를 제공하되, 여기서 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0084] (i) SEQ ID NO: 30을 포함하거나 SEQ ID NO: 30으로 구성된 CDR1;
- [0085] (ii) SEQ ID NO: 31을 포함하거나 SEQ ID NO: 31로 구성된 CDR2; 및

- [0086] (iii) SEQ ID NO: 23을 포함하거나 SEQ ID NO: 23으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0087] 일부 양태에서, 본 발명은 PD-L1에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 PD-L1 결합 분자를 제공하되, 여기서 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 36-52 중 어느 하나로 표시되는 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열 중 3개의 CDR을 포함한다.
- [0088] 일부 실시형태에서, 본 발명의 분리된 PD-L1 결합 분자에서, 상기 중쇄 가변 영역은 FR 영역을 더 포함하고, 상기 FR 영역은 FR1, FR2, FR3 및 FR4를 포함하며, 상기 중쇄 가변 영역에서 CDR1, CDR2 및 CDR3과 함께 이격 배치되어 N단에서 C단으로 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4인 구조를 형성한다.
- [0089] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 분리된 PD-L1 결합 분자에서, 상기 FR 영역은,
- [0090] (a) SEQ ID NO: 53으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR1;
- [0091] SEQ ID NO: 53과 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR1; 또는
- [0092] SEQ ID NO: 53 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR1;
- [0093] (b) SEQ ID NO: 54로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 FR2;
- [0094] SEQ ID NO: 54와 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR2; 또는
- [0095] SEQ ID NO: 54 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR2;
- [0096] (c) SEQ ID NO: 55로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR3;
- [0097] SEQ ID NO: 55와 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR3; 또는
- [0098] SEQ ID NO: 55 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR3;
- [0099] 및
- [0100] (d) SEQ ID NO: 56으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR4;
- [0101] SEQ ID NO: 56과 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR4; 또는
- [0102] SEQ ID NO: 56 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR4를 포함한다.
- [0103] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 분리된 PD-L1 결합 분자에서, 상기 FR 영역은,
- [0104] (a) SEQ ID NO: 57로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR1;
- [0105] SEQ ID NO: 57과 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR1; 또는
- [0106] SEQ ID NO: 57 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR1;
- [0107] (b) SEQ ID NO: 58로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR2;
- [0108] SEQ ID NO: 58과 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR2; 또는
- [0109] SEQ ID NO: 58 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR2;
- [0110] (c) SEQ ID NO: 59로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR3;
- [0111] SEQ ID NO: 59와 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR3; 또는
- [0112] SEQ ID NO: 59 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR3;
- [0113] 및



- [0114] (d) SEQ ID NO: 60으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR4;
- [0115] SEQ ID NO: 60과 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR4; 또는
- [0116] SEQ ID NO: 60 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR4를 포함한다.
- [0117] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 분리된 PD-L1 결합 분자에서, 상기 FR 영역은,
- [0118] (a) SEQ ID NO: 61로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR1;
- [0119] SEQ ID NO: 61과 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR1; 또는
- [0120] SEQ ID NO: 61 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR1;
- [0121] (b) SEQ ID NO: 58로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR2;
- [0122] SEQ ID NO: 58과 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR2; 또는
- [0123] SEQ ID NO: 58 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR2;
- [0124] (c) SEQ ID NO: 59로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR3;
- [0125] SEQ ID NO: 59와 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR3; 또는
- [0126] SEQ ID NO: 59 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR3;
- [0127] 및
- [0128] (d) SEQ ID NO: 60으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR4;
- [0129] SEQ ID NO: 60과 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR4; 또는
- [0130] SEQ ID NO: 60 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR4를 포함한다.
- [0131] 일부 실시형태에서, 본 발명의 분리된 PD-L1 결합 분자에서, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 36-52 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 SEQ ID NO: 36-52 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열로 구성된다.
- [0132] 일부 실시형태에서, 본 발명의 분리된 PD-L1 결합 분자에서, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 36-52 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖고 PD-L1에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0133] 일부 실시형태에서, 본 발명의 분리된 PD-L1 결합 분자에서, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 36-52 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열 대비 하나 이상의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환(예를 들어, 보존적 치환)을 갖고 PD-L1에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0134] 바람직한 실시형태에서, 상기 하나 이상의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환(예를 들어, 보존적 치환)은 5개 이하이고, 바람직하게는 3개 이하이다.
- [0135] 일부 양태에서, 본 발명의 분리된 PD-L1 결합 분자는 낙타 유래 항체, 인간화 항체, 친화력 성숙 항체 또는 약물 가능성 변형 분자이다.
- [0136] 일부 양태에서, 본 발명의 분리된 PD-L1 결합 분자는 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트이다. 따라서, 본 발명은 분리된 나노 항체 형태의 PD-L1 단일 도메인 항체를 제공한다.
- [0137] 일부 양태에서, 본 발명의 분리된 PD-L1 결합 분자의 중쇄 가변 영역은 다른 분자에 융합될 수 있고, 상기 다른 분자는 면역 글로불린(예를 들어 IgG)의 Fc 도메인, 항체, 항체의 항원 결합 세그먼트, 항체-약물 접합체, 항체-유사 분자, 항체-유사 분자의 항원 결합 세그먼트 또는 형광 단백질로부터 선택된다.
- [0138] 일부 실시형태에서, 상기 PD-L1 결합 분자는 인간IgG(예를 들어 인간 IgG1 또는 인간 IgG4)의 Fc 도메인에 융합

된다.

- [0139] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 분리된 PD-L1 결합 분자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자를 제공한다.
- [0140] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 분리된 PD-L1 결합 분자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0141] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 분리된 PD-L1 결합 분자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 핵산 분자를 포함하거나 본 발명의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0142] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 PD-L1 결합 분자 및 약학적으로 허용 가능한 벡터를 포함하는 약물 조성물을 제공한다.
- [0143] 일부 실시형태에서, 상기 약물 조성물은 본 발명의 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트 및 약학적으로 허용 가능한 벡터를 포함한다.
- [0144] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 PD-L1 결합 분자를 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은,
- [0145] (1) 적절한 숙주 세포에서 본 발명의 분리된 PD-L1 결합 분자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 발현하여 상기 PD-L1 결합 분자를 생성하는 단계;
- [0146] (2) 상기 숙주 세포로부터 상기 PD-L1 결합 분자를 분리시키는 단계를 포함한다.
- [0147] 일부 양태에서, 본 발명은 피험자의 면역 응답을 조절하는 방법에 관한 것으로, 피험자의 면역 응답을 조절되도록 피험자에게 본문에 개시된 PD-L1 결합 분자를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0148] 일부 실시형태에서, 상기 피험자는 PD-L1과 관련된 질환이 있는 인간 또는 포유 동물이다. 구체적으로, 상기 피험자는 신장세포암, 비소세포폐암, 방광암, 요로상피암, 현미세부수체 불안정형 고형 종양과 같은 질환이 있을 수 있지만 이에 한정되지 않는다.
- [0149] 일부 양태에서, 본 발명은 PD-L1과 관련된 질환을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것으로, PD-L1과 관련된 상기 질환이 있는 환자 또는 PD-L1과 관련된 상기 질환을 갖는 경향이 있는 피험자에게 유효량의 본문에 개시된 PD-L1 결합 분자를 투여하거나, 본문에 개시된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트를 투여하거나, 유효량의 본문에 개시된 PD-L1 결합 분자를 포함하는 약물 조성물을 투여하거나, 유효량의 본문에 개시된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트를 포함하는 약물 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0150] 일부 측면에서, 본 발명은 PD-L1 활성을 제거, 억제 또는 저하시켜 개선, 완화, 억제 또는 예방할 수 있는 임의의 질환 또는 병증을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0151] 다른 측면에서, 본 발명의 방법은 또한 병용 요법을 통해 종양을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 피험자에게 유효량의 본문에 기재된 PD-L1 결합 분자, PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트 및 한가지 또는 여러 가지 다른 약물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0152] 일부 실시형태에서, 본문에 개시된 방법은 피험자에게 유효량의 제2 약물을 병용 투여하는 단계를 더 포함하되, 여기서 본문에 개시된 PD-L1 결합 분자 또는 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트는 제1 약물이다. 일 실시형태에서, 제2 약물은 PD-L1과 관련된 질환을 치료하기 위한 화학 요법제, 방사선 요법제 또는 생체 대분자 약물이다. 일 실시형태에서, 상기 생체 대분자 약물은 예를 들어 리톡시맙, 세톡시맙 및 트라스투주맙과 같은 T세포 인식을 통해 종양 세포를 공격하는 다양한 단일 클론 항체 약물이다. 본문에 사용된 표현 “제2 약물”은 제1 약물 외의 유일한 약물을 의미하는 것은 아니다. 따라서, 제2 약물은 한가지 약물일 필요가 없고, 한가지 이상의 이러한 약물을 구성하거나 포함할 수 있다.
- [0153] 일부 실시형태에서, 피험자, 환자 또는 개체는 포유 동물이고, 예를 들어, 마우스 또는 인간이며, 바람직하게는 인간이다.
- [0154] 일부 측면에서, 본 발명은 PD-L1과 관련된 질환을 치료 또는 예방하기 위한 약물을 제조하는 본문에 개시된 PD-L1 결합 분자의 용도에 관한 것이다.
- [0155] 일부 측면에서, 본 발명은 PD-L1과 관련된 질환을 치료 또는 예방하기 위한 약물을 제조하는 본문에 개시된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트의 용도에 관한 것이다.

- [0156] 일부 실시형태에서, 상기 PD-L1과 관련된 질환은 신장세포암, 비소세포폐암, 방광암, 요로상피암, 현미세부수체 불안정형 고형 종양으로부터 선택되지만 이에 한정되지 않는다.
- [0157] 일부 측면에서, 본 발명은 본문에 개시된 PD-L1 결합 분자, PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트를 사용하는 키트 또는 장치 및 관련 방법, 및 본문에 개시된 약물 조성물에 관한 것으로, 암과 같은 PD-L1과 관련된 질환의 치료에 사용될 수 있다. 이를 위해, 본 발명은 바람직하게 이러한 병증 치료에 사용될 수 있는 제품을 제공하되, 본문에 개시된 PD-L1 결합 분자, PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트를 함유하는 용기 및 본문에 개시된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트를 사용하여 PD-L1과 관련된 질환 또는 이의 진행 또는 재발을 치료, 개선 또는 예방하기 위한 설명 자료를 포함한다.
- [0158] 본 발명은 본문에 기재된 임의의 실시형태의 임의의 조합을 더 포함한다. 본문에 기재된 임의의 실시형태 또는 이의 임의의 조합은 본문에 기재된 발명의 임의의 및 모든 PD-L1 결합 분자, PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트, 방법 및 용도에 적용된다.

**도면의 간단한 설명**

- [0159] 도 1은 PD-L1에 결합하는 VHH 항체 용해액 샘플의 결합 친화력 스크리닝 결과를 나타낸다.
- 도 2는 항PD-L1 후보 항체 분자의 차단 실험 스크리닝 결과를 나타낸다.
- 도 3은 후보 항체 분자 세포 결합 실험 검증 결과를 나타내고, (A)동종 대조, (B)NB22D-21, (C)NB22gb-10, (D)양성 대조 KN035이다.
- 도 4는 NB22D-21 분자의 특이적 결합 반응 실험 검증 결과를 나타낸다.
- 도 5는 NB22D-21 분자의 혼합 림프구 반응 실험 검증 결과를 나타낸다.
- 도 6은 NB22D-21 분자 및 이의 인간화 변형된 유도체 분자의 결합 실험 검증 결과를 나타낸다.
- 도 7은 NB22D-21 분자 및 이의 인간화 변형된 유도체 분자의 인간-뮤린 교차 반응 실험 결과를 나타낸다.
- 도 8은 인간화 변형된 유도체 분자 NB22D-21-huVH1의 인간-뮤린 교차 반응 실험의 피크 흐름도 결과를 나타내고, (A)대조 분자 KN035, (B)NB22D-21-huVH1이다.
- 도 9는 NB22D-21 분자 및 이의 인간화 변형 분자의 결합 차단 실험 결과를 나타낸다.
- 도 10은 PD-L1-CHO에서의 친화력 성숙된 분자의 친화력 검출 결과를 나타낸다.
- 도 11은 친화력 성숙된 분자가 PD-L1-CHO 세포에 대한 PD-1 결합을 차단하는 것을 나타낸다.
- 도 12는 인간PD-L1-CHO 세포에 결합하는 제2차 친화력 성숙 분자의 친화력 검출을 나타낸다.
- 도 13은 제2차 친화력 성숙 분자가 인간PD-L1-CHO 세포에 대한 PD-1 결합을 차단하는 활성 검출을 나타낸다.
- 도 14 는 뮤린PD-L1 세포에 결합하는 제2차 친화력 성숙 분자의 활성 검출을 나타낸다.
- 도 15는 PD-L1-CHO에서의 약물 가능성이 변형된 분자의 차단 활성을 나타내고, 여기서 동종 대조(isotype)는 인간 IgG1이다.
- 도 16은 혼합 림프구 반응에서 IFN- $\gamma$  (A) 및 IL-2(B) 분비에 대한 약물 가능성이 형질전환된 분자의 영향을 나타낸다.
- 도 17은 후보 항체 분자의 서열 비교를 나타내고, 여기서 블록으로 CDR 서열을 표시한다.

[서열 목록 개요]

본원 발명에는 많은 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 포함하는 서열 목록이 첨부되어 있다. 아래 표 A, B 및 C는 포함된 서열의 개요를 제공한다.



[표 A]

표 A. 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR 서열

설명	클론 명칭	SEQ ID NO	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3
양성 대조	KN035	32	GFTFSRRCKA	33	KILTTSGSTY	34	DSFEDPTCLVTSSGAFQY
알파카 스크리닝	NB22D-21	1	R.TDSNINGMH	2	TIFIDGNTI	3	DVSGYGRA
인간화	NB22D-21-hmVH2	1	R.TDSNINGMH	2	TIFIDGNTI	3	DVSGYGRA
인간화	NB22D-21-hmVH1	1	R.TDSNINGMH	2	TIFIDGNTI	3	DVSGYGRA
친화력 성숙	SY01-201	4	R.TDSNIHGMH	5	TIFIDLNTI	3	DVSGYGRA
친화력 성숙	SY01-208	6	R.TDSNIFGMH	7	TIFIDANTI	3	DVSGYGRA
친화력 성숙	SY01-NB-004	1	R.TDSNINGMH	8	TIFIDGNTI	9	DVSGYGRY
친화력 성숙	SY01-NB-027-M	10	R.TDSNINSMH	11	TWFIDGNTI	12	DEWMYGRA
약물 가능성 변형	NB22D-21-4	13	R.TDRNINTMH	5	TIFIDLNTI	3	DVSGYGRA
약물 가능성 변형	NB22D-21-8	14	R.TYSNIYGMH	15	TIFIGSNTI	3	DVSGYGRA
약물 가능성 변형	NB22D-21-17	16	R.TGSNIYGMH	17	TIFIDWNTI	3	DVSGYGRA
약물 가능성 변형	NB22D-21-24	18	R.TFSNIFGMH	19	TIFITGNTI	3	DVSGYGRA
약물 가능성 변형	NB22D-21-47	20	R.TLSNIRGMH	5	TIFIDLNTI	3	DVSGYGRA
친화력 성숙	NB22D-21-45-106	21	R.RWSNIHGMH	22	SRFITGNTI	23	DVRGYGRA
친화력 성숙	NB22D-21-123	24	P.TASNIGHMH	25	MIFITGLTI	3	DVSGYGRA
친화력 성숙	NB22D-21-154	26	R.TASNAMGMH	27	MIFRDGNTI	23	DVRGYGRA
친화력 성숙	NB22D-21-94	28	R.TAGNIHGMH	29	SIFITGNTI	23	DVRGYGRA
친화력 성숙	NB22D-21-109	30	R.TAGYIHGMH	31	MIFGWGNTI	23	DVRGYGRA

[표 B]

표 B. 항체의 VH 서열, CDR은 블록으로 표시

설명	클론	SEQ ID NO	VH 영역
양성 대조	KN035	35	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRRCKAWFRQAPGKERERVAKILTTSGSTYLDASVVKGRFTISRDNKNTLVY LQMNILRAEDTAVYYCAADSFEDPTCLVTSSGAFQYWGQGITVTVSS
알파카 스크리닝	NB22D-21	36	EVQLVQESGGGLVQAGGSLRLSCAHSR.TDSNINGMHWYRQAPGKQRDWWVGTIFIDGNTIVTDSVKGRFTISRDNKNTLVY LQMNILKPEDTAVYYCAADVSGYGRAWGGGTTVTVSS
인간화	NB22D-21-hmVH2	37	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASR.TDSNINGMHWYRQAPGKGREWVGTIFIDGNTIVTDSVKGRFTISRDNKNTLVY LQMNILRAEDTAVYYCAADVSGYGRAWGGGTTVTVSS
인간화	NB22D-21-hmVH1	38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAHSR.TDSNINGMHWYRQAPGKGREWVGTIFIDGNTIVTDSVKGRFTISRDNKNTLVY LQMNILRAEDTAVYYCAADVSGYGRAWGGGTTVTVSS
친화력 성숙	SY01-201	39	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAHSR.TDSNIHGMHWYRQAPGKGREWVGTIFIDLNTIVTDSVKGRFTISRDNKNTLVY LQMNILRAEDTAVYYCAADVSGYGRAWGGGTTVTVSS
친화력 성숙	SY01-208	40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAHSR.TDSNIFGMHWYRQAPGKGREWVGTIFIDANTIIVTDSVKGRFTISRDNKNTLVY LQMNILRAEDTAVYYCAADVSGYGRAWGGGTTVTVSS
친화력 성숙	SY01-NB-004	41	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAHSR.TDSNINGMHWYRQAPGKGREWVGTIFIDGNTIVTDSVKGRFTISRDNKNTLVY LQMNILRAEDTAVYYCAADVSGYGRYWGGGTTVTVSS
친화력 성숙	SY01-NB-027-M	42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAHSR.TDSNINSMHWYRQAPGKGREWVGTWFIDGNTIVTDSVKGRFTISRDNKNTLVY LQMNILRAEDTAVYYCAADDEWMYGRAWGGGTTVTVSS
약물 가능성 변형	SY01-D21-4	43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASR.TDRNINTMHWYRQAPGKGREWVGTIFIDLNTIVTDSVKGRFTISRDNKNTLVY LQMNILRAEDTAVYYCAADVSGYGRAWGGGTTVTVSS
약물 가능성 변형	SY01-D21-8	44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRTYSNIYGMHWYRQAPGKGREWVGTIFIGSNTIVTDSVKGRFTISRDNKNTLVY LQMNILRAEDTAVYYCAADVSGYGRAWGGGTTVTVSS
약물 가능성 변형	SY01-D21-17	45	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRTGSNIYGMHWYRQAPGKGREWVGTIFIDWNTIVTDSVKGRFTISRDNKNTLVY LQMNILRAEDTAVYYCAADVSGYGRAWGGGTTVTVSS
약물 가능성 변형	SY01-D21-24	46	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASR.TFSNIFGMHWYRQAPGKGREWVGTIFITGNTIVTDSVKGRFTISRDNKNTLVY LQMNILRAEDTAVYYCAADVSGYGRAWGGGTTVTVSS
약물 가능성 변형	SY01-D21-47	47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASR.TLSNIRGMHWYRQAPGKGREWVGTIFIDLNTIVTDSVKGRFTISRDNKNTLVY LQMNILRAEDTAVYYCAADVSGYGRAWGGGTTVTVSS
친화력 성숙	NB22D-21-45-106	48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASR.RWSNIHGMHWYRQAPGKGREWVGSRFITGNTIVTDSVKGRFTISRDNKNTLVY LQMNILRAEDTAVYYCAADVSGYGRAWGGGTTVTVSS
친화력 성숙	NB22D-21-123	49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASPTASNIGHMHWYRQAPGKGREWVGMIFITGLTIVTDSVKGRFTISRDNKNTLVY LQMNILRAEDTAVYYCAADVSGYGRAWGGGTTVTVSS
친화력 성숙	NB22D-21-154	50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRTASNAMGMHWYRQAPGKGREWVGMIFRDGNTIVTDSVKGRFTISRDNKNTLVY LQMNILRAEDTAVYYCAADVSGYGRAWGGGTTVTVSS
친화력 성숙	NB22D-21-94	51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRTAGNIHGMHWYRQAPGKGREWVSIFITGNTIVTDSVKGRFTISRDNKNTLVY LQMNILRAEDTAVYYCAADVSGYGRAWGGGTTVTVSS
친화력 성숙	NB22D-21-109	52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRTAGYIHGMHWYRQAPGKGREWVGMIFGWGNTIVTDSVKGRFTISRDNKNTLVY LQMNILRAEDTAVYYCAADVSGYGRAWGGGTTVTVSS

참고: CDR1-3 서열은 블록으로 표시함.

[표 C]

표 C. 항체의 FR 서열

설명	클론 명칭	SEQ ID NO.	FR1	SEQ ID NO.	FR2	SEQ ID NO.	FR3	SEQ ID NO.	FR4
양성대조	KN035	62	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	63	WYRQAPGKERERVA	64	LADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNILRAEDTAVYYCAA	65	WGQGLTVT VSS
일회카 스크리닝	NB22D-21	53	EVQVQESGGGLVQA	54	WYRQAPGKQRD WVG	55	VTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNTLKPEDTAVYFCAA	56	WGQGTQVT VSS
인간화	NB22D-21-huVH2	57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	58	WYRQAPGKGRE WVG	59	VTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNTLRAEDTAVYYCAA	60	WGQGITVT VSS
인간화	NB22D-21-huVH1	61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	58	WYRQAPGKGRE WVG	59	VTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNTLRAEDTAVYYCAA	60	WGQGITVT VSS
친화력 경속	SY01-201	61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	58	WYRQAPGKGRE WVG	59	VTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNTLRAEDTAVYYCAA	60	WGQGITVT VSS
친화력 경속	SY01-208	61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	58	WYRQAPGKGRE WVG	59	VTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNTLRAEDTAVYYCAA	60	WGQGITVT VSS
친화력 경속	SY01-NB-004	61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	58	WYRQAPGKGRE WVG	59	VTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNTLRAEDTAVYYCAA	60	WGQGITVT VSS
친화력 경속	SY01-NB-027-M	61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	58	WYRQAPGKGRE WVG	59	VTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNTLRAEDTAVYYCAA	60	WGQGITVT VSS
약물 기능성 변형	NB22D-21-4	57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	58	WYRQAPGKGRE WVG	59	VTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNTLRAEDTAVYYCAA	60	WGQGITVT VSS
약물 기능성 변형	NB22D-21-8	57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	58	WYRQAPGKGRE WVG	59	VTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNTLRAEDTAVYYCAA	60	WGQGITVT VSS
약물 기능성 변형	NB22D-21-17	57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	58	WYRQAPGKGRE WVG	59	VTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNTLRAEDTAVYYCAA	60	WGQGITVT VSS
약물 기능성 변형	NB22D-21-24	57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	58	WYRQAPGKGRE WVG	59	VTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNTLRAEDTAVYYCAA	60	WGQGITVT VSS
약물 기능성 변형	NB22D-21-47	57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	58	WYRQAPGKGRE WVG	59	VTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNTLRAEDTAVYYCAA	60	WGQGITVT VSS

29

변형	클론 명칭	SEQ ID NO.	FR1	SEQ ID NO.	FR2	SEQ ID NO.	FR3	SEQ ID NO.	FR4
친화력 경속	NB22D-21-45-106	57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	58	WYRQAPGKGRE WVG	59	VTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNTLRAEDTAVYYCAA	60	WGQGITVT VSS
친화력 경속	NB22D-21-123	57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	58	WYRQAPGKGRE WVG	59	VTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNTLRAEDTAVYYCAA	60	WGQGITVT VSS
친화력 경속	NB22D-21-154	57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	58	WYRQAPGKGRE WVG	59	VTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNTLRAEDTAVYYCAA	60	WGQGITVT VSS
친화력 경속	NB22D-21-94	57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	58	WYRQAPGKGRE WVG	59	VTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNTLRAEDTAVYYCAA	60	WGQGITVT VSS
친화력 경속	NB22D-21-109	57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	58	WYRQAPGKGRE WVG	59	VTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNTLRAEDTAVYYCAA	60	WGQGITVT VSS

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0160] 본 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명은 예시적인 설명이기에 본문에 설명된 특정 방법학, 실시형태 및 시약에 한정되지 않음을 이해해야 한다. 또한 본문에서 사용된 용어는 단지 구체적인 실시형태를 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하려는 의도는 아니고, 본 발명의 범위는 단지 첨부된 특허청구범위에 의해 한정됨을 이해해야 한다.
- [0161] 달리 정의되지 않는 한, 본문에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자의 통상적인 이해와 동일한 의미를 갖는다.
- [0162] 이 외에, 문맥에서 달리 요구하지 않는 한, 단수 형태의 용어는 복수 형태를 포함하고, 복수 형태의 용어는 단수 형태를 포함한다. 보다 구체적으로, 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에 사용된 바와 같이, 문맥에서 달리 명확하게 지시하지 않는 한, 단수 형태 “한가지” 및 “이러한”은 복수 지시물을 포함한다. 따라서, 예를 들어, “항체”는 다양한 항체를 포함한다.
- [0163] I. 정의
- [0164] 본 발명을 보다 잘 이해하기 위하여, 관련 용어의 정의 및 해석은 다음과 같이 제공된다.
- [0165] 용어 “약”은 숫자 및 수치와 함께 사용될 때 지정된 숫자 및 수치보다 5% 작은 하한 및 지정된 숫자 및 수치보다 5% 큰 상한을 갖는 범위 내의 숫자 및 수치를 포함하는 것을 의미한다.
- [0166] 용어 “항체”는 본문에서 가장 넓은 의미로 사용되고 다양한 항체 구조물을 포함하며, 단일 클론 항체, 다중 클론 항체, 다중 특이적 항체(예를 들어, 이중 특이적 항체) 및 항체 세그먼트를 포함하지만 이에 한정되지 않고, 이들이 원하는 항원 결합 활성을 나타내는 것이면 된다. 완전한 항체는 일반적으로 적어도 두 가닥의 전장 중쇄 및 두 가닥의 전장 경쇄를 포함하지만, 일부 경우에는 더 적은 수의 사슬을 포함할 수 있고, 예를 들어 낙타과 동물에서 천연적으로 존재하는 항체는 중쇄만 포함할 수 있다.
- [0167] 본문에서 사용된 용어 “항원 결합 부분”은 표적 항원에 특이적으로 결합하는 부분을 지칭한다. 상기 용어는 표적 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 및 다른 천연 분자(예를 들어 수용체, 리간드) 또는 합성 분자(예를 들어, DARPin)를 포함한다. 하나의 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 항체의 항원 결합 부분은 항체 세그먼트이다.

- [0168] 용어 “전장 항체”, “온전한 항체” 및 “완전한 항체”는 본문에서 교환적으로 사용되어 항체를 지칭할 수 있고, 상기 항체는 천연 항체 구조와 기본적으로 유사한 구조를 갖거나 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는다.
- [0169] 본문에서 사용된 바와 같이, 용어 “단일 클론 항체” 또는 “단일 클론 항체 조성물”은 생산 방법이 아닌 단일 아미노산 구성을 갖는 항체 분자의 제조물을 지칭한다. 단일 클론 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트는 예를 들어 하이브리도마 기술, 재조합 기술, 파지 디스플레이 기술, CDR 접목과 같은 합성 기술, 또는 이러한 또는 본 분야에 공지된 다른 기술의 조합에 의해 생성될 수 있다.
- [0170] 본문에서 사용된 바와 같이, 용어 “PD-1”은 프로그램화된 세포 사멸 단백질 지칭하고, 번역 글로불린 슈퍼패밀리에 속하며 공동 억제 수용체로서 작용하여 면역계를 음성적으로 조절한다. PD-1은 CD28/CTLA-4 패밀리의 구성원이고, PD-L1 및 PD-L2를 포함하는 두 가지 공지된 리간드를 갖는다. PD-1의 대체 명칭 또는 동의어는 PDCD1, PD1, CD279 및 SLEB2 등을 포함한다. 인간PD-1의 대표적인 아미노산 서열은 NCBI 수탁번호: NP\_005009.2에 개시되고, 인간PD-1을 코딩하는 대표적인 핵산 서열은 NCBI 수탁번호 NM\_005018.3에 나타냈다.
- [0171] 본문에서 사용된 바와 같이, 용어 “PD-L1”은 프로그램화된 세포 사멸 리간드1(PD-L1, 예를 들어 Freeman 등, (2000) J. Exp. Med. 192: 1027을 참조)을 지칭한다. PD-L1의 대체 명칭 또는 동의어는 PDCD1L1, PDL1, B7H1, CD274 및 B7-H를 포함한다. 인간PD-L1의 대표적인 아미노산 서열은 NCBI 수탁번호 NP\_054862.1에 개시되고, 인간PD-L1을 코딩하는 대표적인 핵산 서열은 NCBI 수탁번호: NM\_014143.4에 나타낸다. PD-L1은 태반, 비장, 림프절, 흉선, 심장, 태아 간에서 발현되고, 많은 종양 또는 암 세포에서도 발견된다. PD-L1은 활성화된 T세포, B세포 및 골수 세포에서 발현되는 수용체 PD-1 또는 B7-1에 결합한다. PD-L1과 그 수용체의 결합은 신호 전달을 유도하여 TCR에 의해 매개된 사이토카인의 생성 및 T세포 증식의 활성화를 억제한다. 따라서, PD-L1은 특정 사건(예를 들어 임신, 자가면역 질환, 조직 동종이식) 동안 면역계를 억제하는데 주요한 역할을 하고, 종양 또는 암 세포가 면역 체크포인트를 회피하여 면역 응답을 회피하도록 허용하는 것으로 간주된다.
- [0172] 본문에서 사용된 바와 같이, 용어 “결합” 및 “특이적으로 결합”은 항체 또는 항원 결합 부분이 체외 측정법에서, 바람직하게는 정제된 야생형 항원을 사용하는 생물발광 간섭 측정(ForteBio)에서 항원 에피토프에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원 결합 부분이 바람직하게는 단백질 및/또는 대분자의 복합 혼합물에서 그 표적 항원을 인식할 경우, 항체 또는 항원 결합 부분을 특이적 결합 항원이라고 지칭한다.
- [0173] 중쇄 불변 영역에 의해 결정되는 아미노산 서열은, 항체를 “클래스”로 구분하고, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이며, 이러한 클래스 중 일부를 서브클래스(subclass), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3과 IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가로 구분할 수 있다. 상이한 항체 클래스에 해당되는 중쇄 불변 영역을 각각  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$ 라고 지칭한다. 5가지 항체 클래스 전체에서 찾을 수 있는 경쇄 불변 영역(CL)을  $\kappa$  및  $\lambda$ 라고 지칭한다. 전장 경쇄 및 중쇄에서, 일반적으로 가변 영역 및 불변 영역은 약 12개 또는 더 많은 아미노산의 “J” 영역에 의해 연결되고, 중쇄는 약 10개 이상의 아미노산의 “D” 영역을 더 포함한다. 예를 들어 Fundamental Immunology, Ch.7을 참조할 수 있다(Paul, W. 편집, 제2 버전, Raven Press, N.Y.(1989))(이는 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로 여기에 포함된다). 각 경쇄/중쇄 쌍의 가변 영역은 일반적으로 항원 결합 사이트를 형성한다.
- [0174] 용어 “가변 영역” 또는 “가변 도메인”은 항체와 항원 결합에 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 일반적으로 유사한 구조를 갖고, 여기서 각 도메인은 네 개의 보존적 프레임워크(FR) 및 세 개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다(예를 들어, Kindt 등 Kuby Immunology, 6<sup>th</sup> ed., W.H. Freeman and Co. 91페이지(2007)). 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원 결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 이 외에, 특정 항원에 결합하는 항체로부터의 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 상기 항원에 결합하는 항체를 분리하여 상보성 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 각각 스크리닝할 수 있다. 예를 들어, Portolano 등, J. Immunol. 150: 880-887(1993); Clarkson 등, Nature 352: 624-628(1991)을 참조한다. 본문에 개시된 FR 및 CDR은 AbM의 표준에 따라 구분된 것이지만, 본 개시의 CDR은 AbM의 구분 방식에 한정되지 않고, 본 분야에서 통상적인 다른 임의의 하나의 구분 방식일 수도 있으며, 예를 들어 또한 Chothia, Martin, Kabat, Aho 및 IMGT 등 방식으로 구분할 수 있음을 반드시 지적하여야 한다.
- [0175] 가변 영역은 일반적으로 세 개의 초가변 영역에 의해 연결된 상대적으로 보존적인 프레임워크 영역(FR)의 동일한 일반 구조를 나타내고, 상기 초가변 영역은 또한 상보성 결정 영역 또는 CDR이라고도 지칭된다. 일반적으로 프레임워크 영역을 통해 항체가 특정 에피토프에 결합하도록 각 쌍의 두 가닥의 사슬로부터의 CDR을 얼라인(align) 한다. 두 가닥의 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 N-말단으로부터 C-말단으로 일반적으로 도메인FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다.

- [0176] “항체 세그먼트”는 완전한 항체와 상이한 분자를 지칭하고, 이는 완전한 항체의 부분을 포함하며, 상기 부분은 완전한 항체가 결합하는 항원에 결합한다.
- [0177] “친화력”은 분자(예를 들어 항체)의 단일 결합 사이트와 이의 결합 파트너(예를 들어 항원) 사이의 모든 비공유 상호작용의 총 합을 지칭한다. 달리 설명되지 않는 한, 본문에 사용될 경우, “결합 친화력”은 결합 쌍의 구성원(예를 들어 항체와 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화력을 지칭한다. 파트너Y에 대한 분자X의 친화력은 일반적으로 해리 상수(Kd)로 표현될 수 있다. 친화력은 선행기술에 공지되고 본문에 설명된 것을 포함하는 본 분야에 공지된 통상적인 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0178] 본문에서 사용된 “반수효과농도”로도 지칭되는 용어 “EC<sub>50</sub>”은, 특정된 노출 시간 후 기준선과 최대치 사이의 50%의 응답을 유도하는 약물, 항체 또는 독성제의 농도를 지칭한다. 본원 발명의 본문에서, EC<sub>50</sub>의 단위는 “nM”이다.
- [0179] “인간 항체”는 인간 또는 인간 세포에 의해 생성되거나 인간 항체 라이브러리 또는 다른 인간 항체 코딩 서열을 사용하는 비인간 공급원으로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 대응되는 아미노산 서열을 갖는 항체를 지칭한다. 인간 항체의 이러한 정의는 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 명확하게 배제한다.
- [0180] “인간 공동 프레임워크”는 인간 면역 글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열에서, 가장 빈번하게 나타나는 아미노산 잔기를 대표하는 프레임워크를 지칭한다. 일반적으로, 인간 면역 글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 아형으로부터 선택된다. 일반적으로, 상기 서열의 아형은 예를 들어 Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 제5 버전, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD(1991), 1-3권의 아형이다. 일 실시형태에서, VL에 있어서, 상기 아형은 예를 들어 Kabat 등(상기 참조)에서의 아형 κ I이다. 일 실시형태에서, VH에 있어서, 상기 아형은 예를 들어 Kabat 등(상기 참조)에서의 아형III이다.
- [0181] “인간화” 항체는 비인간 HVR의 아미노산 잔기 및 인간 FR의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 인간화 항체는 기본적으로 모든 적어도 하나, 통상적으로 두 개의 가변 도메인을 포함하고, 여기서 모든 또는 기본적으로 모든 HVR(예를 들어, CDR)은 비인간 항체의 HVR에 해당되며, 모든 또는 기본적으로 모든 FR은 인간 항체의 FR에 해당된다. 인간화 항체는 임의로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체(예를 들어 비인간 항체)의 “인간화 형태”는 인간화된 항체를 지칭한다.
- [0182] 용어 “보존적 치환”은 하나의 아미노산이 동일한 클래스의 다른 아미노산에 의해 치환되는 것을 지칭하고, 예를 들어 하나의 산성 아미노산이 다른 산성 아미노산에 의해 치환되며, 하나의 염기성 아미노산이 다른 염기성 아미노산에 의해 치환되거나, 하나의 중성 아미노산이 다른 중성 아미노산에 의해 치환되는 것을 지칭한다. 예시적인 치환은 하기 표 D에 나타낸 바와 같다.
- [0183] [표 D]

[0184] 표 D. 예시적인 치환

원래 잔기	예시적인 치환	보존적 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르로이신 (norleucine)	Leu
Leu (L)	노르로이신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala

[0185]

원래 잔기	예시적인 치환	보존적 치환
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르로이신	Leu

[0186]

[0187] 아미노산은 일반적인 측쇄의 특성에 따라 그룹화될 수 있다. (1) 소수성: 노르로이신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0188] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0189] (3) 산성: Asp, Glu;

[0190] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0191] (5) 사슬 방향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0192] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.



- [0193] 비보존적 치환은 이러한 클래스 중 하나의 구성원을 다른 클래스로 교체해야 한다.
- [0194] 한 유형의 치환 변이체는 모 항체(예를 들어 인간화 항체)의 하나 이상의 추가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가 연구를 위해 선택된 한가지 또는 여러 가지 변이체는 모체 항체에 비해 일부 생물학적 특성이 개선(예를 들어, 개선)(예를 들어, 증가된 친화력, 감소된 면역 원성)되고, 및/또는 모체 항체가 기본적으로 유지하는 특정 생물학적 특성을 갖는다. 예시적인 치환 변이체는 친화력 성숙 항체로서, 예를 들어, 본문에 기재된 기술과 같은 파지 기반 친화력 성숙 기술을 사용하여 편리하게 생성될 수 있다. 간단히 말해서, 하나 또는 복수개의 HVR 잔기를 돌연변이시키고, 변이체 항체를 파지에 표시하며, 특정된 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화력)에 대해 스크리닝한다.
- [0195] 참조 폴리펩티드 서열에 대한 “백분율(%) 아미노산 서열 동일성”은 상기 서열 정렬을 수행하여(필요 시 갭을 도입함) 최대 백분율 서열 동일성을 획득하고, 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 부분으로 간주하지 않은 후, 후보 서열의 아미노산 잔기와 참조 폴리펩티드 서열의 동일한 아미노산 잔기의 백분율로 정의된다. 본 분야의 다양한 방법을 사용하여 서열 정렬을 수행하여 백분율 아미노산 서열 동일성을 측정하고, BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 MEGALIGN(DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 얻을 수 있는 컴퓨터 소프트웨어를 사용한다. 본 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 정렬을 측정하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있고, 비교되는 서열의 전체 길이에 대한 최대 정렬을 얻는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함한다. 본원 발명에서 서열 동일성의 백분율이 언급될 경우, 달리 명시되지 않는 한, 이러한 백분율은 더 긴 서열에 대하여 전체 길이를 계산한다. 긴 서열에 대한 전체 길이 계산은 핵산 서열 및 폴리펩티드 서열 양자에 적용된다.
- [0196] 용어 “유효량”, “치료 유효량”은 본 발명의 항체 또는 항원 결합 세그먼트의 양 또는 투여량을 지칭하고, 단일 또는 다중 투여량으로 환자에게 투여된 후, 치료하는 피험자에서 피험자 병증의 개선(예를 들어, 하나 또는 복수개의 증상의 개선) 및/또는 증상 진행의 지연을 포함하는 예기하는 효과를 생성한다. “유효량”, “치료 유효량”은 또한 PD-L1 신호 전달을 감소시키기 위해 충분한 양을 지칭할 수 있다.
- [0197] 유효량은 본 분야에서 통상의 지식을 가진 자인 담당 의사가 포유 동물의 종; 크기, 연령 및 일반적인 건강; 관련된 구체적인 질환; 질환의 정도 또는 심각도; 개체 환자의 응답; 투여되는 구체적인 항체; 투여 방식; 투여되는 제제의 생체이용률 특징; 선택된 투여 방법; 및 임의의 병용 요법의 사용과 같은 다양한 요인을 고려하여 쉽게 결정할 수 있다.
- [0198] 본문에서 사용된 용어 “차단”은 본 발명의 항체 존재시 PD-L1의 신호 전달을 감소시키는 것을 나타낸다. PD-L1에 의해 매개된 신호 전달 차단은 본 발명의 PD-L1 단일 도메인 항체 존재시 PD-L1 신호 전달 수준이 PD-L1의 대조 수준(즉 항체가 존재하지 않는 경우의 PD-L1 신호 전달 수준)보다 낮은 것을 지칭하고, 감소된 폭은 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%보다 크거나 같다. 다양한 표준 기술을 사용하여 PD-L1 신호 전달 수준을 측정할 수 있고, 예를 들어 비제한적인 실시예로서, 다운스트림 유전자 활성화 측정 및/또는 PD-L1 활성화에 응답하는 루시페라아제 리포트 시험이다. 본 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 예를 들어 상업적으로 구입 가능한 키트를 포함하는 다양한 시험으로 PD-L1 신호 전달 수준을 측정할 수 있음을 이해해야 한다.
- [0199] 용어 “숙주 세포”, “숙주 세포계” 및 “숙주 세포 배양물”은 교환적으로 사용될 수 있고 여기에 외인성 핵산이 도입된 세포를 지칭하며, 이러한 세포의 후대를 포함한다. 숙주 세포는 “형질전환체” 및 “형질전환된 세포”를 포함하고, 계대 수에 관계없이 1차 형질전환된 세포 및 이로부터 유래된 후대를 포함한다. 후대는 모 세포와 핵산 함량이 완전히 동일하지 않을 수 있으며, 돌연변이를 포함할 수 있다. 본문에서 최초 형질전환된 세포에서 스크리닝되거나 선택된 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 후대를 포함한다.
- [0200] 용어 “백터”는 본문에 사용될 경우 이에 연결된 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 상기 용어는 자가 복제 핵산 구조인 백터 및 이를 인입한 숙주 세포의 계통에 결합된 백터를 포함한다. 일부 백터는 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현을 가이드할 수 있다. 이러한 백터는 본문에서 “발현 백터”라고 지칭된다.
- [0201] “개체” 또는 “피험자”는 포유 동물을 포함한다. 포유 동물은 가축 동물(예를 들어, 소, 양, 고양이, 개와 말), 영장류 동물(예를 들어, 인간 및 원숭이와 같은 비인간 영장류 동물), 토끼, 알파카, 및 설치류 동물(예를 들어, 마우스 및 랫트)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시형태에서, 개체 또는 피험자는 인간이다.
- [0202] II. PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트
- [0203] 본 발명의 분리된 PD-L1 결합 분자는 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트일 수 있다. 다시 말해서,

본 발명은 PD-L1에 특이적으로 결합할 수 있는 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트를 제공한다.

- [0204] 따라서, 본 발명은 이하 실시형태를 더 제공한다.
- [0205] 1. PD-L1에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0206] (i) SEQ ID NO: 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1;
- [0207] SEQ ID NO: 1과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1; 또는
- [0208] SEQ ID NO: 1 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1;
- [0209] (ii) SEQ ID NO: 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2;
- [0210] SEQ ID NO: 2와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2; 또는
- [0211] SEQ ID NO: 2 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDR2;
- [0212] 및
- [0213] (iii) SEQ ID NO: 3 또는 12로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3;
- [0214] SEQ ID NO: 3 또는 12와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3; 또는
- [0215] SEQ ID NO: 3 또는 12 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함한다.
- [0216] 2. 실시형태1에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0217] (i)  $X_1$ 은 H, F 또는 N인 식RTDSNIX<sub>1</sub>GMH로 표시되는 CDR1;
- [0218] (ii)  $X_2$ 는 G, L 또는 A이고,  $X_3$ 은 I 또는 L인 식TIFIDX<sub>2</sub>NTX<sub>3</sub>으로 표시되는 CDR2; 및
- [0219] (iii)  $X_4$ 는 A 또는 Y인 식DVSGYGRX<sub>4</sub>로 표시되는 CDR3을 포함한다.
- [0220] 3. 실시형태1에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0221] (i) SEQ ID NO: 1을 포함하거나 SEQ ID NO: 1로 구성된 CDR1;
- [0222] (ii) SEQ ID NO: 2를 포함하거나 SEQ ID NO: 2로 구성된 CDR2; 및
- [0223] (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0224] 4. 실시형태1에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0225] (i) SEQ ID NO: 4를 포함하거나 SEQ ID NO: 4로 구성된 CDR1;
- [0226] (ii) SEQ ID NO: 5를 포함하거나 SEQ ID NO: 5로 구성된 CDR2; 및
- [0227] (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0228] 5. 실시형태1에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0229] (i) SEQ ID NO: 6을 포함하거나 SEQ ID NO: 6으로 구성된 CDR1;
- [0230] (ii) SEQ ID NO: 7을 포함하거나 SEQ ID NO: 7로 구성된 CDR2; 및

- [0231] (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0232] 6. 실시형태1에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0233] (i) SEQ ID NO: 1을 포함하거나 SEQ ID NO: 1로 구성된 CDR1;
- [0234] (ii) SEQ ID NO: 8을 포함하거나 SEQ ID NO: 8로 구성된 CDR2; 및
- [0235] (iii) SEQ ID NO: 9를 포함하거나 SEQ ID NO: 9로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0236] 7. 실시형태1에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0237] (i) SEQ ID NO: 10을 포함하거나 SEQ ID NO: 10으로 구성된 CDR1;
- [0238] (ii) SEQ ID NO: 11을 포함하거나 SEQ ID NO: 11로 구성된 CDR2; 및
- [0239] (iii) SEQ ID NO: 12를 포함하거나 SEQ ID NO: 12로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0240] 8. 실시형태1에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0241] (i) SEQ ID NO: 13을 포함하거나 SEQ ID NO: 13으로 구성된 CDR1;
- [0242] (ii) SEQ ID NO: 5를 포함하거나 SEQ ID NO: 5로 구성된 CDR2; 및
- [0243] (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0244] 9. 실시형태1에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0245] (i) SEQ ID NO: 14를 포함하거나 SEQ ID NO: 14로 구성된 CDR1;
- [0246] (ii) SEQ ID NO: 15를 포함하거나 SEQ ID NO: 15로 구성된 CDR2; 및
- [0247] (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0248] 10. 실시형태1에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0249] (i) SEQ ID NO: 16을 포함하거나 SEQ ID NO: 16으로 구성된 CDR1;
- [0250] (ii) SEQ ID NO: 17을 포함하거나 SEQ ID NO: 17로 구성된 CDR2; 및
- [0251] (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0252] 11. 실시형태1에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0253] (i) SEQ ID NO: 18을 포함하거나 SEQ ID NO: 18로 구성된 CDR1;
- [0254] (ii) SEQ ID NO: 19를 포함하거나 SEQ ID NO: 19로 구성된 CDR2; 및
- [0255] (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0256] 12. 실시형태1에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0257] (i) SEQ ID NO: 20을 포함하거나 SEQ ID NO: 20으로 구성된 CDR1;
- [0258] (ii) SEQ ID NO: 5를 포함하거나 SEQ ID NO: 5로 구성된 CDR2; 및
- [0259] (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0260] 13. PD-L1에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,



- [0261] (i) SEQ ID NO: 21을 포함하거나 SEQ ID NO: 21로 구성된 CDR1;
- [0262] (ii) SEQ ID NO: 22를 포함하거나 SEQ ID NO: 22로 구성된 CDR2; 및
- [0263] (iii) SEQ ID NO: 23을 포함하거나 SEQ ID NO: 23으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0264] 14. PD-L1에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0265] (i) SEQ ID NO: 24를 포함하거나 SEQ ID NO: 24로 구성된 CDR1;
- [0266] (ii) SEQ ID NO: 25를 포함하거나 SEQ ID NO: 25로 구성된 CDR2; 및
- [0267] (iii) SEQ ID NO: 3을 포함하거나 SEQ ID NO: 3으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0268] 15. PD-L1에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0269] (i) SEQ ID NO: 26을 포함하거나 SEQ ID NO: 26으로 구성된 CDR1;
- [0270] (ii) SEQ ID NO: 27을 포함하거나 SEQ ID NO: 27로 구성된 CDR2; 및
- [0271] (iii) SEQ ID NO: 23을 포함하거나 SEQ ID NO: 23으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0272] 16. PD-L1에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0273] (i) SEQ ID NO: 28을 포함하거나 SEQ ID NO: 28로 구성된 CDR1;
- [0274] (ii) SEQ ID NO: 29를 포함하거나 SEQ ID NO: 29로 구성된 CDR2; 및
- [0275] (iii) SEQ ID NO: 23을 포함하거나 SEQ ID NO: 23으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0276] 17. PD-L1에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은,
- [0277] (i) SEQ ID NO: 30을 포함하거나 SEQ ID NO: 30으로 구성된 CDR1;
- [0278] (ii) SEQ ID NO: 31을 포함하거나 SEQ ID NO: 31로 구성된 CDR2; 및
- [0279] (iii) SEQ ID NO: 23을 포함하거나 SEQ ID NO: 23으로 구성된 CDR3을 포함한다.
- [0280] 18. PD-L1에 특이적으로 결합하고, 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 36-52 중 어느 하나로 표시되는 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열 중 3개의 CDR을 포함한다.
- [0281] 19. 실시형태1-18 중 어느 하나에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 FR 영역을 더 포함하고, 상기 FR 영역은 FR1, FR2, FR3 및 FR4를 포함하며, 상기 중쇄 가변 영역에서 CDR1, CDR2 및 CDR3과 함께 이격 배치되어 N단에서 C단으로 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4인 구조를 형성한다.
- [0282] 20. 실시형태19에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 FR 영역은,
- [0283] (a) SEQ ID NO: 53으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR1;
- [0284] SEQ ID NO: 53과 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR1; 또는
- [0285] SEQ ID NO: 53 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR1;
- [0286] (b) SEQ ID NO: 54로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 FR2;
- [0287] SEQ ID NO: 54와 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR2; 또는
- [0288] SEQ ID NO: 54 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는

아미노산 서열을 포함하는 FR2;

- [0289] (c) SEQ ID NO: 55로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR3;
- [0290] SEQ ID NO: 55와 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR3; 또는
- [0291] SEQ ID NO: 55 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR3;
- [0292] 및
- [0293] (d) SEQ ID NO: 56으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR4;
- [0294] SEQ ID NO: 56과 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR4; 또는
- [0295] SEQ ID NO: 56 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR4를 포함한다.
- [0296] 21. 실시형태19에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 FR 영역은,
- [0297] (a) SEQ ID NO: 57로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR1;
- [0298] SEQ ID NO: 57과 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR1; 또는
- [0299] SEQ ID NO: 57 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR1;
- [0300] (b) SEQ ID NO: 58로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR2;
- [0301] SEQ ID NO: 58과 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR2; 또는
- [0302] SEQ ID NO: 58 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR2;
- [0303] (c) SEQ ID NO: 59로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR3;
- [0304] SEQ ID NO: 59와 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR3; 또는
- [0305] SEQ ID NO: 59 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR3;
- [0306] 및
- [0307] (d) SEQ ID NO: 60으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR4;
- [0308] SEQ ID NO: 60과 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR4; 또는
- [0309] SEQ ID NO: 60 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR4를 포함한다.
- [0310] 22. 실시형태19에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 FR 영역은,
- [0311] (a) SEQ ID NO: 61로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR1;
- [0312] SEQ ID NO: 61과 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR1; 또는
- [0313] SEQ ID NO: 61 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR1;
- [0314] (b) SEQ ID NO: 58로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR2;
- [0315] SEQ ID NO: 58과 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR2; 또는
- [0316] SEQ ID NO: 58 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR2;

- [0317] (c) SEQ ID NO: 59로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR3;
- [0318] SEQ ID NO: 59와 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR3; 또는
- [0319] SEQ ID NO: 59 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR3;
- [0320] 및
- [0321] (d) SEQ ID NO: 60으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 FR4;
- [0322] SEQ ID NO: 60과 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR4; 또는
- [0323] SEQ ID NO: 60 대비 2개(예를 들어 0개, 1개, 2개) 이하의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환의 차이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 FR4를 포함한다.
- [0324] 23. 실시형태1-22 중 어느 하나에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 36-52 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함하거나 SEQ ID NO: 36-52 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열로 구성된다.
- [0325] 24. 실시형태1-22 중 어느 하나에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 36-52 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖고 PD-L1에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0326] 25. 실시형태1-22 중 어느 하나에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 36-52 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열 대비 하나 이상의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환(예를 들어, 보존적 치환)을 갖고 PD-L1에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 상기 하나 또는 복수개의 아미노산의 첨가, 결실 및/또는 치환(예를 들어, 보존적 치환)은 5개 이하이고, 바람직하게는 3개 이하이다.
- [0327] 26. 실시형태1-25 중 어느 하나에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 PD-L1 결합 분자는 낙타 유래 항체, 인간화 항체, 친화력 성숙 항체 또는 약물 가능성이 변형된 분자이다.
- [0328] 27. 실시형태1-26 중 어느 하나에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 다른 분자에 융합될 수 있고, 상기 다른 분자는 면역 글로불린(예를 들어 IgG)의 Fc 도메인, 항체, 항체의 항원 결합 세그먼트, 항체-약물 접합체, 항체-유사 분자, 항체-유사 분자의 항원 결합 세그먼트 또는 형광 단백질로부터 선택된다.
- [0329] 28. 실시형태27에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 인간 IgG(예를 들어 인간 IgG1 또는 인간 IgG4)의 Fc 도메인에 융합된다.
- [0330] 29. 분리된 핵산 분자에 있어서, 실시형태1-28 중 어느 하나에 따른 분리된 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0331] 30. 벡터에 있어서, 실시형태29에 따른 핵산 분자를 포함한다.
- [0332] 31. 숙주 세포에 있어서, 실시형태30에 따른 벡터를 포함한다.
- [0333] 32. 약물 조성물에 있어서, 유효량의 실시형태1-28 중 어느 하나에 따른 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트 및 약학적으로 허용 가능한 벡터를 포함한다.
- [0334] 33. 실시형태1-28 중 어느 하나에 따른 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트를 제조하는 방법에 있어서, 상기 방법은,
- [0335] - 숙주 세포에서 실시형태1-28 중 어느 하나에 따른 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 발현하여 상기 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트를 생성하는 단계; 및
- [0336] - 상기 숙주 세포로부터 상기 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트를 분리시키는 단계를 포함한다.

- [0337] 34. 피험자에서 PD-L1과 관련된 질환을 예방 또는 치료하는 방법에 있어서, 상기 방법은 상기 피험자에게 치료 유효량의 실시형태1-28 중 어느 하나에 따른 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트를 투여하거나 유효량의 실시형태1-27 중 어느 하나에 따른 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트를 포함하는 약물 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0338] 35. 피험자의 면역 응답을 조절하는 방법에 있어서, 피험자의 면역 응답을 조절되도록 피험자에게 치료 유효량의 실시형태1-28 중 어느 하나에 따른 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트를 투여하거나 유효량의 실시형태1-28 중 어느 하나에 따른 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트를 포함하는 약물 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0339] 36. 실시형태34 또는 35에 따른 방법에 있어서, 상기 피험자는 포유 동물이고, 바람직하게는 마우스 또는 인간이며, 보다 바람직하게는 인간이다.
- [0340] 37. 실시형태36에 따른 방법에 있어서, 상기 PD-L1과 관련된 질환은 신장세포암, 비소세포폐암, 방광암, 요로상피암, 현미세부수체 불안정형 고형 종양으로부터 선택된다.
- [0341] 38. 실시형태34 또는 35에 따른 방법에 있어서, 상기 방법은 피험자에게 유효량의 제2 약물을 병용 투여하는 단계를 더 포함하되, 여기서 상기 제2 약물은 PD-L1과 관련된 질환을 치료하기 위한 화학 요법제, 방사선 요법제 또는 생체 대분자 약물이다.
- [0342] 39. 실시형태38에 따른 방법에 있어서, 상기 생체 대분자 약물은 예를 들어 리투시맵(rituximab), 세특시맵(cetuximab) 및 트라스투주맵(trastuzumab)과 같은 T세포 인식을 통해 종양 세포를 공격하는 다양한 단일 클론 항체 약물이다.
- [0343] 40. 피험자에서 PD-L1과 관련된 질환을 예방 또는 치료하기 위한 키트에 있어서, 용기를 포함하되, 상기 용기는 적어도 하나의 실시형태1-29 중 어느 하나에 따른 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트를 포함한다.
- [0344] 41. 실시형태1-29 중 어느 하나에 따른 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 피험자에서 PD-L1과 관련된 질환을 예방 또는 치료한다.
- [0345] 42. 실시형태1-29 중 어느 하나에 따른 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트에 있어서, 피험자의 면역 응답을 조절한다.
- [0346] 43. 피험자의 면역 응답을 조절하기 위한 약물 조성물을 제조하는 실시형태1-29 중 어느 하나에 따른 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트의 용도이다.
- [0347] 44. 피험자에서 PD-L1과 관련된 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약물 조성물을 제조하는 실시형태1-29 중 어느 하나에 따른 PD-L1 단일 도메인 항체 또는 이의 항원 결합 세그먼트의 용도이다.
- [0348] 45. 실시형태43 또는 44에 따른 용도에 있어서, 상기 피험자는 포유 동물이고, 바람직하게는 마우스 또는 인간이며, 보다 바람직하게는 인간이다.
- [0349] 46. 실시형태45에 따른 용도에 있어서, 상기 PD-L1과 관련된 질환은 신장세포암, 비소세포폐암, 방광암, 요로상피암, 현미세부수체 불안정형 고형 종양으로부터 선택된다.
- [0350] 실시예
- [0351] 이하 실시예를 참조하여 본문에 일반적으로 설명된 본 발명을 보다 용이하게 이해하고, 이러한 실시예는 예시적인 설명 방식으로 제공된 것으로, 본 발명을 제한하려는 의도는 아니다.
- [0352] 달리 명시되지 않는 한, 본 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 이하 실시예에서 사용된 시약, 플라스미드, 세포 등은 모두 상업적으로 얻을 수 있는 제품임을 이해해야 한다.
- [0353] 실시예1 PD-L1을 안정적으로 발현하는 세포주의 구축
- [0354] 본 실시예에서 본 발명자는 인간PD-L1, 원숭이PD-L1, 무린PD-L1을 발현하는 CHO-s세포를 각각 구축하였고, 로슈(Roche) 회사의 대조 항체를 제조하였다.
- [0355] 1.1 대조 항체 제조
- [0356] 대조 항체-Atezolizumab(로슈(Roche))의 경쇄 및 중쇄 유전자 서열(유전자 합성 공급업체: GENERAL BIOL)을 전

체 유전자 합성하고, 대조 항체 발현은 ExpiCHO 일시적 발현 시스템(써모피셔(Thermo Fisher)에서 구입함)을 사용하며, 배지는 ExpiCHO™ Expression Medium(Gibco, A29100-01)이고, 형질감염 키트는 ExpiFectamine™ CHO Transfection Kit(Gibco, A29129)이다.

- [0357] 구체적 방법은 다음과 같다. 분자 클로닝을 통해 Atezolizumab 항체의 경쇄 및 중쇄 유전자의 ExpiCHO 발현 플라스미드를 구축하고, 형질감염 1일 전에 ExpiCHO 세포(Gibco A29127에서 구입함)를 계대하며, 25 ml의 세포 배양물 시스템에서, 구축된 플라스미드 25 µg(질량비가 2:1인 경쇄 코딩 유전자, 중쇄 코딩 유전자의 플라스미드 혼합물)을 형질감염 시약과 혼합한 후 25 ml의 ExpiCHO 세포 배양물에 적가하고, 충분히 혼합하며, 37°C에서 18-22시간 동안 발현한 후, 키트의 설명에 따라 피드 배지를 첨가하고, 피드 후, 세포를 32°C에서 배양하며, 형질감염 후 제5일에, 제2차 피드를 첨가하고, 세포를 32°C에서 배양하며, 10-12일 후, 발현된 세포 현탁액을 고속 원심분리하여 상등액을 취하고, 얻은 상등액을 0.22 µm의 여과막으로 여과한 후 Protein A/G 친화성 크로마토그래피 컬럼 친화성 정제 방법으로 정제하며, 100 mM의 글리시네이트(glycinate)(pH3.0)로 목적 단백질을 용출하고, 다음 1M의 Tris-HCl을 사용하여 pH7.0으로 중화시켰다. 소량을 샘플링한 후 SDS-PAGE로 감정한 후 포장하여 동결보존하였다.
- [0358] 대조 항체KN035(아미노산 서열은 서열 목록 SEQ ID NO:35를 참조)의 제조 방법은 다음과 같다.
- [0359] 대조 항체 KN035 전체 유전자 서열을 전체 유전자 합성하고, 분자 클로닝을 통해 KN035 항체 유전자의 ExpiCHO 발현 플라스미드를 구축하며, 형질감염 1일 전에 ExpiCHO 세포(Gibco A29127에서 구입함)를 계대하고, 25 ml의 세포 배양물 시스템에서, 구축된 플라스미드 25 µg을 형질감염 시약과 혼합한 후, 상기 대조 항체-Atezolizumab 제조 방법에 근거하여 형질감염시키며, 항체를 발현시켰다.
- [0360] 1.2 안정한 세포주의 구축
- [0361] 인간PD-L1(gi번호: NP\_054862.1), 무린PD-L1(gi번호: NP\_068693) 및 히말라야 원숭이PD-L1(gi번호: ABO33163.1)의 전장 단백질을 발현하는 재조합 박터 플라스미드를 각각 구축하고, 전기-형질전환(electrotransformation)으로 구축된 플라스미드를 CHO-s 세포(써모피셔에서 구입함) 및 A375 흑색종 세포주(ATCC, CRL-1619)에 도입하였다. 스크리닝을 통해 이상 세 가지 중의 PD-L1 단백질의 고발현 CHO-s세포주 및 고발현 인간PD-L1의 A375 세포주(PD-L1-A375)를 각각 획득하였다.
- [0362] 1.2.1 인간PD-1 및 PD-L1 세포 외 도메인 단백질을 발현하는 플라스미드의 구축
- [0363] 유전자 합성 기술을 통해 인간PD-L1, 무린PD-L1 및 히말라야 원숭이PD-L1의 전장 단백질 유전자 서열을 포함하는 발현 박터를 각각 합성하고, 연결 후 대장균에 도입하여, 대장균 단일 클론을 선택한 후 시퀀싱하여 정확한 플라스미드 클론을 얻고, 플라스미드를 추출하여 다시 시퀀싱하였다.
- [0364] 1.2.2 PD-1 및 PD-L1 단백질을 발현하는 CHO-s 세포주의 구축
- [0365] 1.2.2.1 전기-형질전환
- [0366] CD-CHO 무혈청 배지(Gibco, 10743029)를 사용하여 CHO-s 세포를 배양 및 유지하고, 전기-형질전환 1일 전에 세포를  $5 \times 10^6$ /mL로 계대하며, 다음날 전기-형질전환 키트(Invitrogen, Neon™ Kit, MPK10096) 및 전기-형질전환기(Invitrogen, Neon™ Transfection System, MP922947)를 사용하여 구축된 플라스미드를 CHO-s 세포에 각각 도입하였다. 전기-형질전환된 세포를 3 mL의 CD-CHO 배지에 넣고, 37°C 및 이산화탄소 조건의 인큐베이터에서 48시간 동안 배양하였다.
- [0367] 1.2.2.2 세포 플레이팅 및 배양
- [0368] 전기-형질전환된 CHO-s 세포를 2000개 세포/웰에 따라 96웰 세포 배양 플레이트에 플레이팅하고, L-메티오닌설펍시민(L-Methionine sulfoximine, MSX)(Millipore, GSS-1015-F)을 30 µM/mL의 최종 농도로 넣으며, 부피를 세포 배양 부피가 100 µL/웰 및 1 × GS 보충물(Sigma, 58672C)로 유지하고, 37°C 및 이산화탄소 조건의 인큐베이터에서 배양하며, 10일 후 30 µM의 MSX 및 1 × GS의 보충물을 함유하는 배지 50 µL를 보충하여 넣었다.
- [0369] 1.2.2.3 클론 감정 및 세포 확장
- [0370] 성장한 클론을 선택하고, 24웰 세포 배양 플레이트로 옮겨 배양하였다. FACS 방법을 이용하여 세포주를 감정하고, 발현량이 높은 클론을 선택하여 확장 및 동결보존하였다. 관련 FACS 감정 방법은 다음과 같다.
- [0371] 1) 먼저 빈 CHO-s 세포 및 각각의 클로닝된 CHO-s 세포  $2 \times 10^5$ 개를 수집하고, 300 g로 원심분리하여 상등액을



제거하며, 세포를 조제된 200 μL의 FACS 완충액(1 × PBS + 2% FBS)으로 96-웰 둥근 바닥 플레이트에 재현탁시키고;

- [0372] 2) 96웰 둥근 바닥 플레이트에서 300 g로 5분 동안 원심분리하여, 상등액을 제거하며;
- [0373] 3) 대응웰에 항PD-L1 항체 희석액 또는 음성 대조 항체 희석액을 넣고, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불며 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고;
- [0374] 4) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g에서 원심분리하여 상등액을 제거하며, 대응웰에 200 μL FACS 완충액을 넣고 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키며;
- [0375] 5) 단계4)를 2회 중복하고, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며;
- [0376] 6) PE 표지된 항-인간IgG Fc 흐름 항체(Abcam, ab98596)를 넣고, 피펫으로 세포를 균일하게 불며 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고;
- [0377] 7) 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, FACS 완충액을 넣어 세포를 재현탁시키고;
- [0378] 8) 단계7)을 2회 중복하며, 웰에 FACS 완충액을 넣고, 각 웰은 200 μL이며, 세포를 재현탁시키고, 유세포 분석기(Beckman, CytoFLEX A00-1-1102)로 검출하였다.

1.2.3 PD-L1을 발현하는 A375세포주의 제조

[0380] 1.2.2.1에서 CHO-s 세포를 전기-형질전환하는 방법과 동일한 방법으로 A375 세포주의 PD-L1 고발현 세포주(PD-L1-A375)를 제조하고, A375 세포주의 동물 모델 구축에 사용하였다.

실시예2 동물 면역 및 혈청 역가 검출

2.1 동물 면역

[0383] PD-L1(NP\_054862.1) 세포 외 도메인 단백질(이초선저우(Sino Biological), 10084-H05H)을 구입하여 2마리 알파카(난창대지아기술(Nanobody-Nanchang Dajia technology co., Ltd))를 면역시켰다. 각 알파카는 2주에 한 번 1회당 500 μg씩 총 4회 면역시켰다.

2.2 혈청 역가 검출

[0385] 알파카 면역가 종료된 후 알파카 혈청을 취하여 면역 역가 검출을 수행하였다.

[0386] 면역 역가 측정은 ELISA 방법을 통해 재조합 단백질PD-L1(이초선저우, 10084-H05H)에 대한 면역 혈청의 결합 능력을 측정하고, 결합 항체의 역가에 근거하여 면역 효과를 판정하였다.

[0387] 구체적인 방법은 다음과 같다.

[0388] 2.2.1 항원 코팅: 면역 역가 측정 1일 전에, 항원 재조합 단백질PD-L1을 PBS로 최종 농도 2 μg/mL로 희석하여, 희석액을 수득하였다. 30 μl의 수득한 희석액을 ELISA 플레이트에 넣고, 4℃에서 하룻밤 코팅하였다. 면역 역가 측정일에 PBS로 3회 세척한 후, 5%의 탈지유를 함유하는 PBST로 실온에서 2시간 동안 차단하고, PBS로 다시 3회 세척하였다.

[0389] 2.2.2 혈청 희석: 다른 희석 플레이트에서 면역 접종되지 않은 음성 혈청과 면역된 혈청을 PBS로 희석하고, 첫 번째 웰을 200배 희석한 후, 다음 7개 웰을 3배 구배로 희석하였다.

[0390] 2.2.3 항체 반응: 희석된 혈청을 첫 번째 ELISA 플레이트에 넣고, 37℃에서 1h 동안 인큐베이션하며, PBS로 2회 세척한 후 1:5000로 2차 항체 염소 항낙타과 IgG 항체(난징진스루이(Nanjing GenScript)에서 구입함)를 넣었다.

[0391] 2.2.4 발색 리딩: PBS로 상기 2차 항체를 3회 세척한 후, 발색액을 넣어 5분 동안 발색시키고, 정지액을 넣은 후, 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices, SpecterMax 190)를 통해 OD450에서 플레이트를 리딩하며, 결과는 표 1과 같다.

**표 1**

**표 1. 상이한 희석 비율의 ELISA 발색 실험 결과**

희석 비율	음성 혈청	NSY004	NSY005
1 : 2000	0.209	2.582	2.163

1 : 4000	0.133	2.286	2.216
1 : 8000	0.093	1.923	2.131
1 : 16000	0.052	1.817	1.868
1 : 32000	0.054	1.337	1.218
1 : 64000	0.048	1.048	0.792
1 : 128000	0.042	0.761	0.587
1 : 256000	0.048	0.404	0.473

[0393] 여기서, NSY004 및 NSY005 두 개의 열은 각각 2마리 알파카의 면역된 혈청을 상이한 배수로 희석한 후의 ELISA 발색 실험 결과이고, 음성 혈청은 면역되지 않은 알파카 혈청 ELISA 실험 결과이다. 표 1의 결과에 따르면, 2마리 알파카의 면역 역가 IgG 역가가 모두 256000에 도달하였고, 면역 효과는 우수하며, 다음 단계의 말초혈액 면역 항체 라이브러리 구축에 사용될 수 있다.

[0394] 실시예3 알파카 면역 라이브러리 구축 및 예비 스크리닝

[0395] 동물 면역 종료 후, 알파카의 신선한 혈액 50 mL를 취하고, Ficoll-Paque 밀도 구배 분리액(GE, 17144003S)으로 말초혈액 단핵구(Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC)를 분리하여, 항인간PD-L1 항체 과지 알파카 면역 라이브러리를 구축하였다.

[0396] 구체적인 방법은 다음과 같다.

[0397] 수집한 알파카 혈액을 PBS로 1:1(v/v)의 비율로 희석하고, Ficoll-Paque 밀도 구배 분리액 15 ml를 50 ml의 원심분리관에 천천히 넣으며, 두 가지 액체가 명확한 분리 계면을 유지하도록 원심분리관을 기울여 관벽을 따라 희석된 알파카 혈액 30 mL를 천천히 넣었다. 4°C에서 20분 동안 원심분리하고, 가속도를 3 증가 0 감소로 유지하였다. 원심분리 후, 전체 액면은 4개의 층으로 분리되고, 상층은 혈장 혼합물이며, 하층은 적혈구 및 과립구이고, 중층은 Ficoll-Paque PLUS이며, 상층, 중층의 접합부에는 PBMC 주로 하는 백색 좁은 밴드, 즉 PBMC 세포층이 있다. 피펫을 조심스럽게 사용하여 중간 PBMC 세포를 흡입하여 새로운 50 mL의 원심분리관에 옮긴다. PBS로 2회 세척하고, 4°C, 1500 rpm 조건으로 10분 동안 수평으로 원심분리하며, 마지막으로 1.5 ml의 PBS으로 재현탁시키고, 현미경으로 계수하였다.

[0398] 분리된 PBMC 세포에서 RNA를 추출하고, 역전사 키트(TaKaRa, 6210A)로 추출된 RNA를 cDNA로 역전사시켰다. 알파카 항체의 분자 형태는 일반 항체와 상이한 것으로, 경쇄를 포함하지 않고 중쇄는 CH1을 포함하지 않기에, 먼저 VH전단 및 CH2에서 일반 프라이머를 설계하여, PCR을 통해 두 개의 상이한 크기의 세그먼트를 얻으며, 탭핑(tapping)을 통해 더 작은 목적 세그먼트를 회수하였다. 다음 통상적인 VHH 모든 생식계열(Germline)의 아미노산 서열을 정렬하여, 양단에 각각 NcoI 및 NotI 제한 효소 절단 사이트를 포함하는 Germline 특이적 축퇴 프라이머를 설계함으로써, 회수된 생성물을 주형으로 모든 VHH 유전자를 증폭하고, 마지막으로 이중 효소 절단 및 연결을 통해 목적 항체 유전자 세그먼트를 과지 디스플레이용 벡터에 삽입하며, 상기 발현 벡터의 VHH 유전자의 C단은 과지 발현 벡터의 GIII 유전자에 융합된다는 점에 유의하여야 한다. 연결 생성물은 회수 키트(Omega, D6492-02)를 통해 회수되고, 마지막으로 전기-형질전환기(Bio-Rad, MicroPulser)를 통해 감수성 대장균SS320으로 형질전환시키며, 압피실린 내성의 2-YT 고체 플레이트에 도포하였다. 라이브러리 용량을 계산하기 위하여, 10 µl의 라이브러리의 균액을 취하여 10배 구배 희석하고, 각 희석 구배에서 2 µl를 취하여 플레이트에 스포팅하며, 플레이트에 형성된 클론을 계산하여 모든 전기-형질전환에 의해 형성된 총 클론 수, 즉 라이브러리 용량을 계산하였다. 이 면역 라이브러리의 라이브러리 용량은  $1 \times 10^9$ 이었다.

[0399] 이 라이브러리 용량에 기반하여, 10배의 라이브러리 용량의 균의 양(약 20 OD)을 취하여 신선한 2-YT 액체 배지에 넣고, 균액 희석액의 초기 OD값이 0.05가 되도록 배지의 첨가량을 조정하였다. 37°C에서, 220 rpm으로 대수 성장기까지 배양하고, 이때 VSCM13 보조 파지를 세균수 50배로 넣어, 충분히 혼합하고, 30분 동안 방치한 후, 220 rpm 조건 하에서 1 시간 동안 배양하며, 10000 rpm으로 5분 동안 원심분리한 후 카르베니실린/카나마이신 이중 내성 2-YT배지로 교체하고, 30°C, 220 rpm 조건으로 하룻밤 배양하였다. 다음날, 13000g로 10분 동안 원심분리하고, 그 상등액에 20%의 PEG/NaCl 용액을 넣으며, 침전시켜 알파카 면역 항체 라이브러리에 대응되는 파지를 얻고, PBS로 1회 세척한 후, 표적 PD-L1 항체 스크리닝에 사용하였다.

[0400] 과지 스크리닝에 재조합 PD-L1 단백질을 사용하고, 자성비드 스크리닝 및 면역관 스크리닝 두 가지 방법을 사용하였으며, 구체적인 방법은 다음과 같다.

- [0401] 3.1 자성비드 스크리닝
- [0402] 비오틴 표지된 재조합 PD-L1 단백질을 아비딘 커플링된 자성비드(써모피셔에서 구입함, 제품 번호: 11205D)에 결합하여 스크리닝하는 것을 기반으로, 먼저 비오틴으로 재조합 인간PD-L1 단백질(비오틴 표지 방법은 Roche 회사의 비오틴 단백질 표지 키트 설명서를 참조, 제품 번호: 11418165001)을 표지하고, PD-L1 단백질이 자성비드에 결합되도록 비오틴 표지된 PD-L1 단백질과 자성비드를 인큐베이션하였다. PD-L1 항원이 결합된 자성비드 및 나노 항체 디스플레이를 갖는 파지 라이브러리를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하고, PBST로 6-8회 세척한 후, 비특이적으로 흡착된 파지를 제거하며, 트립신(Gibco)를 넣어 20분 동안 부드럽게 혼합하고, 인간PD-L1 단백질에 특이적으로 결합하는 나노 항체로 파지를 디스플레이하였다. 다음 용출된 파지를 대수기의 SS320 균체(Lucigen, MC1061 F)로 감염시키고, 파지가 감염된 SS320 균체를 카르베니실린 내성 플레이트에 도포하며, 37°C에서 하룻밤 배양하고, 다음날 균체를 수집하였다. SS320 균체를 사용하여 파지를 제조하고, 제조 방법은 상술한 라이브러리 파지 제조 방법을 상세히 설명되어 있다. 최종적으로 얻은 파지는 계속하여 2차 스크리닝에 사용되고, 2차 스크리닝이 종료될 때 트립신 방식을 사용하여 용출하였다. 2차 스크리닝에서 얻은 파지는 3차 스크리닝에 사용되고, 3차 스크리닝이 종료될 때 트립신을 사용하여 용출하였다. 이와 같이 반복하되, 각 라운드에서 무작위로 선택한 10개의 클론을 통해 서열 분석하였다. 결과는, 3라운드의 스크리닝 후 얻은 단일 클론 파지, 시퀀싱 후의 단일 클론, 상이한 클론의 유전자 서열이 중복되고, 서열 농축이 명백함을 입증한다.
- [0403] 3.2 면역관 스크리닝
- [0404] 면역관 스크리닝은 항원을 면역관 표면에 코팅하여, 표적 항원에 결합하는 항체를 스크리닝하여 파지를 디스플레이하는 것을 기반으로 한다. 스크리닝 1일 전에 재조합 인간PD-L1 단백질을 사용하여 면역관을 미리 코팅하고, PD-L1 항원이 결합된 면역관 및 나노 항체 디스플레이를 갖는 파지 라이브러리를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하여, PBST로 6-8회 세척한 후, 비특이적으로 흡착된 파지를 제거하며, 트립신(Gibco)를 넣어 20분 동안 부드럽게 혼합하고, 인간PD-L1 단백질에 특이적으로 결합하는 나노 항체로 파지를 디스플레이하였다. 다음 용출된 파지를 대수기의 SS320균체(Lucigen, MC1061 F)로 감염시키고, 파지가 감염된 SS320 균체를 카르베니실린 내성 플레이트에 도포하며, 37°C에서 하룻밤 배양하고, 다음날 균체를 수집하였다. SS320 균체를 사용하여 파지를 제조하고, 제조 방법은 상술한 라이브러리 파지 제조 방법에 상세히 설명되어 있다. 최종적으로 얻은 파지를 계속하여 2차 스크리닝에 사용된다. 2차 스크리닝이 종료될 때 Trypsin 방식을 사용하여 용출하였다. 2차 스크리닝에서 얻은 파지를 3차 스크리닝에 사용하되, 3차 스크리닝이 종료될 때 Trypsin 방식을 사용하여 용출하였다. 이와 같이 반복하고, 각 라운드에서 무작위로 선택한 10개의 클론을 통해 서열 분석하였다. 결과는, 3라운드의 스크리닝 후의 단일 클론, 클론의 유전자 서열이 중복되고, 서열 농축이 명백함을 입증한다.
- [0405] 두 가지 상이한 스크리닝 방법으로 수득한 파지 라이브러리를 단일 클론 스크리닝하고, 자성비드 스크리닝 및 면역관 스크리닝한 3차 생성물의 양성 클로닝을 각각 선택하였다. 구체적인 방법은 다음과 같다.
- [0406] 스크리닝 1일 전에 재조합 인간PD-L1 단백질을 96웰 ELISA 플레이트에 코팅하고, 다음날 96웰 플레이트에 유도 파지 상등액을 제조하며, 파지 ELISA로 인간PD-L1 재조합 단백질에 대한 양성 클론을 스크리닝한 후, 모든 양성 클론을 선택하여 시퀀싱 분석하고, 서열이 유일한 클론으로 용해액을 제조하며, 제조 방법은 다음과 같다. 1일 전에 상기 클로닝된 균액을 1:100으로 50 mL 접종하고, 37°C에서 항온 셰이커에서 14시간 동안 진탕 배양하며, 10000 g로 5분 동안 상온 원심분리하고, 1 mL의 PH 9.0인, benzonase 뉴클레아제가 함유된 Tris-HCl 완충액을 사용하여 세균을 재현탁시키며, 얼음에서 30분 동안 분해하고, 4°C 10000 g로 10분 동안 원심분리하며, 상등액을 수집하여 양성 클론 용해액을 얻었다.
- [0407] 제조된 양성 클론 용해액을 흐름 수준에서 추가로 검증하고, 인간PD-L1을 특이적으로 인식하는 후보 항체를 스크리닝하였다. 흐름 수준 검증 방법은 다음과 같다.
- [0408] 1) 먼저 배양된 인간PD-L1-CHO 세포를 수집하고, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, 세포를 조제된 FACS 완충액으로 재현탁시키고, 계수하며 세포 현탁액의 밀도를  $2 \times 10^6$  개/mL로 조정하고;
- [0409] 2) PD-L1-CHO 세포를 각 웰당 100  $\mu$ L씩 96웰 둥근 바닥 플레이트에 넣어, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0410] 3) 대응웰에 구매 희석된 후보 항체 용해액 및 대조 항체 희석액을 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0411] 4) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 대응웰에 200  $\mu$ L의 FACS 완충액을



넣으며 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키고;

- [0412] 5) 단계4)를 2회 중복하며, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0413] 6) PE 표지된 흐름 항체(진스루이)를 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0414] 7) 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, FACS 완충액을 넣어 세포를 재현탁시키며;
- [0415] 8) 단계7)을 2회 중복하고, 웰에 FACS 완충액을 200 μL씩 넣어, 세포를 재현탁시키며, 유세포 분석기(Beckman, CytoFLEX A00-1-1102)로 검출하였다.
- [0416] 항PD-L1 VHH 용해액 샘플의 결합 친화력 스크리닝 결과는 도 1에 나타난 바와 같다.
- [0417] 도 1로부터 알 수 있다 시피, 도시된 클론 번호의 VHH 분자가 PD-L1을 발현하는 CHO 세포에 대해 모두 일정한 친화력을 갖는다. 본 검출 실험은 정성적 및 반정량적이기에, 어느 클론 번호의 VHH 항체 분자의 친화력이 우수한 지를 확인할 수 없고, 추가적인 실험적 확인이 필요하다.
- [0418] 제조된 양성 클론 용해액을 흐름 수준에서 추가로 차단 스크리닝하고, 인간PD-L1을 특이적으로 인식하고 PD-1단백질에 결합하는 것을 차단하는 후보 항체를 스크리닝하였다. 흐름 수준 검증 방법은 다음과 같다.
- [0419] 1) 먼저 배양된 인간PD-L1-CHO 세포를 수집하고, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, 세포를 조제된 FACS 완충액으로 재현탁시키고, 계수하며 세포 현탁액의 밀도를  $2 \times 10^6$ /mL로 조정하고;
- [0420] 2) PD-L1-CHO 세포를 각 웰당100 μL씩 96웰 둥근 바닥 플레이트에 넣어, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0421] 3) 대응웰에 구배 희석으로 수득한 농도 구배가 각각 1 : 1, 1 : 5 및 1 : 25인 후보 항체 용해액 및 대조 항체 희석액을 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0422] 4) 인큐베이션된 세포혼합액300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 대응웰에 200 μL를 넣으며 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키고;
- [0423] 5) 단계4)를 2회 중복하며, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0424] 6) 대응웰에 PD-1-Fc 단백질 희석액(1 μg/mL) 100 μL를 넣으며, 세포를 재현탁시키고 세포를 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0425] 7) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 대응웰에 200 μL를 넣으며 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키고;
- [0426] 8)단계7)을 2회 중복하며, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0427] 9)PE 표지된 항-인간IgG Fc 흐름 항체(Abcam)를 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0428] 10)300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, FACS 완충액을 넣어 세포를 재현탁시키며;
- [0429] 11)단계10)을 2회 중복하고, 웰에 FACS 완충액을 200 μL씩넣어, 세포를 재현탁시키며, 유세포 분석기(Beckman, CytoFLEX A00-1-1102)로 검출하였다.
- [0430] 항PD-L1 항체 후보 분자의 차단 실험 스크리닝 결과는 도 2에 도시된 바와 같고, ELISA 및 FACS 등 방법에 의한 예비 스크리닝을 통해, 스크리닝된 항체 서열로부터 제조한 항체 용해액에는 PD-L1이 PD1에 결합하는 반응에 차단 효과를 갖는 항체가 함유됨을 알 수 있고, 본 발명자는 10개의 우수한 친화력 및 차단 활성을 갖는 후보 분자를 스크리닝하였다.
- [0431] 실시예4 키메라 VHH-Fc 항체의 생성 및 발현
- [0432] 스크리닝으로 수득한 양성 VHH 후보 항체를 인간IgG1 Fc 세그먼트와 융합시키고, 양성 VHH 유전자 서열의 C단에 인간IgG1 Fc 세그먼트 유전자 서열의 N단에 연결시키는 방식으로 융합 발현 벡터를 구축하며, 상기 융합 발현 벡터 플라스미드를 ExpCHO 세포로 형질전환시키고, 발현을 유도하여 Fc 세그먼트에 융합된 VHH-Fc 키메라 항체 단백질을 얻었다.

- [0433] 항체 발현은 ExpiCHO 일시적 발현 시스템을 사용하고, 배지는 (Gibco, A29100-01)이며, 형질감염 키트는 (Gibco, A29129)이다. 구체적인 방법은 다음과 같다. 형질감염 1일 전에 ExpiCHO 세포를 계대하고, 25 ml의 시스템에서, 구축된 플라스미드 25 µg을 형질감염 시약과 혼합한 후 25 ml의 ExpiCHO 세포 배양물에 적가하며, 충분히 혼합하고, 37°C에서 18-22시간 동안 발현한 후, 키트의 설명에 따라 피드 배지를 첨가하며, 피드 후, 세포를 32°C에서 배양하고, 형질감염 후 5일째에, 제2차 피드를 첨가하며, 세포를 32°C에서 배양하고, 10-12일 후, 발현된 세포 현탁액을 고속 원심분리하여 상등액을 취하며, 얻은 상등액을 0.22 µm으로 여과한 후 Protein A/G 친화성 정제 방법으로 정제하고, 100 mM의 글리시네이트(pH3.0)로 목적 단백질을 용출하며, 다음 1M의 Tris-HCl으로 중화하였다.
- [0434] 실시예5 키메라 VHH-Fc 항체 세포 수준의 친화 활성 검증
- [0435] 수득한 VHH-Fc 후보 항체를 평가하고, FACS 방법으로 세포의 PD-L1 단백질에 대한 결합 활성을 검출하며, 구체적인 방법은 다음과 같다.
- [0436] 1) 배양된 인간PD-L1-CHO 세포를 수집하고, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, 세포를 조제된 FACS 완충액으로 재현탁시키고, 계수하며 세포 현탁액의 밀도를  $2 \times 10^6$  개/mL로 조정하고;
- [0437] 2) PD-L1-CHO 세포를 각 웰당 100 µL씩 96웰 둥근 바닥 플레이트에 넣어, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0438] 3) 대응웰에 구배 희석된 후보 항체 희석액 및 대조 항체 희석액을 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0439] 4) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 대응웰에 200 µL를 넣으며 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키고;
- [0440] 5) 단계4)를 2회 중복하며, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0441] 6) PE 표지된 항-인간IgG Fc 흐름 항체(Abcam, ab98596)를 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0442] 7) 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, FACS 완충액을 넣어 세포를 재현탁시키며;
- [0443] 8) 단계10)을 2회 중복하고, 웰에 FACS 완충액을 200 µL씩 넣어, 세포를 재현탁시키며, 유세포 분석기(Beckman, CytoFLEX A00-1-1102)로 검출하였다.
- [0444] 표 2에 나타낸 바와 같이, FACS 실험을 통해, 본 발명자는 높은 친화력이 있는 2개의 나노 항체 후보 분자(NB22D-21 및 NB22gb-10)를 스크리닝하였고, 친화력은 모두 대조 항체보다 높거나 유사하였다.

**표 2**

**표 2.** 항체의 EC50

클론 번호	EC50( µg/mL)
NB22D-21	0.39
NB22gb-10	0.39
KN035(대조)	0.39
Atezolizumab(대조)	0.83

- [0445] 실시예6 PD-1을 차단하는 키메라 VHH-Fc 항체의 활성 검증
- [0446] 수득한 VHH-Fc 후보 항체를 평가하고, FACS 방법으로 PD-1/PD-L1에 대한 차단 활성을 검출하며, 구체적인 방법은 다음과 같다.
- [0447] 1) 배양된 인간PD-L1-CHO 세포를 수집하고, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, 세포를 조제된 FACS 완충액으로 재현탁시키고, 계수하며 세포 현탁액의 밀도를  $2 \times 10^6$  /mL로 조정하고;
- [0448] 2) PD-L1-CHO 세포를 각 웰당 100 µL씩 96웰 둥근 바닥 플레이트에 넣어, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;

- [0450] 3) 대응웰에 구배 희석된 후보 항체 희석액 및 대조 항체 희석액을 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0451] 4) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 대응웰에 200 μL를 넣으며 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키고;
- [0452] 5) 단계4)를 2회 중복하며, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0453] 6) 대응웰에 비오틴 표지된 PD-1-Fc 단백질 희석액(1 μg/mL) 100 μL를 넣으며, 세포를 재현탁시키고 세포를 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0454] 7) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 대응웰에 200 μL의 FACS를 넣으며 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키고;
- [0455] 8) 단계7)을 2회 중복하며, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0456] 9) PE 표지된 스트렙타비딘(streptavidin, eBioscience, 12-4317-87)을 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0457] 10) 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, FACS 완충액을 넣어 세포를 재현탁시키며;
- [0458] 11) 단계10)을 2회 중복하고, 웰에 FACS 완충액을 200 μL씩 넣어, 세포를 재현탁시키며, 유세포 분석기(Beckman, CytoFLEX A00-1-1102)로 검출하였다.
- [0459] 표 3에 나타난 바와 같이, FACS 실험을 통해, 본 발명자는 실시예5에서 클론 번호가 NB22D-21 및 NB22gb-10인 2개의 나노 항체 후보 분자가 동시에 높은 차단 활성을 갖고, 그 차단 활성은 모두 대조 항체보다 높거나 대조 항체와 유사함을 검증하였다.

**표 3**

**표 3.** 항체의 IC50

클론 번호	IC50( μg/mL)
NB22D-21	0.41
NB22gb-10	0.54
KN035(대조)	0.39
Atezolizumab(대조)	0.86

- [0460] 실시예7 CD80을 차단하는 키메라 VHH-Fc 항체의 활성 검증
- [0461] 실시예7 CD80을 차단하는 키메라 VHH-Fc 항체의 활성 검증
- [0462] 수득한 VHH-Fc 후보 항체를 평가하고, FACS 방법으로 CD80/PD-L1에 대한 차단 활성을 검출하며, 구체적인 방법은 다음과 같다.
- [0463] 1) 배양된 인간PD-L1-CHO 세포를 수집하고, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, 세포를 조제된 FACS 완충액으로 재현탁시키고, 계수하며 세포 현탁액의 밀도를  $2 \times 10^6$  /mL로 조정하고;
- [0464] 2) PD-L1-CHO 세포를 각 웰당 100 μL씩 96웰 둥근 바닥 플레이트에 넣어, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0465] 3) 대응웰에 구배 희석된 후보 항체 희석액 및 대조 항체 희석액을 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0466] 4) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 대응웰에 200 μL를 넣으며 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키고;
- [0467] 5) 단계4)를 2회 중복하며, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0468] 6) 대응웰에 비오틴 표지된 CD80단백질 희석액(1 μg/mL) 100 μL를 넣으며, 세포를 재현탁시키고 세포를 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0469] 7) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 대응웰에 200 μL를 넣으며 드레인

건을 사용하여 세포를 재현탁시키고;

- [0470] 8) 단계7)을 2회 중복하며, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
  - [0471] 9) PE 표지된 스트렙트아비딘(eBioscience, 12-4317-87)을 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하며;
  - [0472] 10) 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, FACS 완충액을 넣어 세포를 재현탁시키며;
  - [0473] 11) 단계10)을 2회 중복하고, 웰에 FACS 완충액을 200 μL씩 넣으며, 세포를 재현탁시키며, 유세포 분석기(Beckman, CytoFLEX A00-1-1102)로 검출하였다.
- [0474] 표 4에 나타난 바와 같이, FACS 실험을 통해, 본 발명자는 실시예5에서 클론 번호가 NB22D-21 및 NB22gb-10인 2개의 나노 항체 후보 분자가 동시에 높은 차단 활성을 갖고, 그 차단 활성은 모두 대조 항체보다 높거나 대조 항체와 유사함을 검증하였다.

**표 4**

**표 4.** 항체의 IC50

클론 번호	IC50 ( μg/mL)
NB22D-21	0.7081
NB22gb-10	0.7651
KN035(대조)	0.6307
Atezolizumab(대조)	0.9077

- [0475] 실시예8 종양 세포에서의 키메라 VHH-Fc 항체의 결합 활성
- [0476] 인간 흑색종 세포계 A375세포(ATCC, CRL-1619)에서의 VHH-Fc 후보 항체의 결합 활성을 평가하기 위하여, FACS 방법으로 세포의 PD-L1 단백질에 대한 결합 활성을 검출하고, 구체적인 방법은 다음과 같다.
  - [0477] 1) 0.25% EDTA를 함유하는 Trypsin으로 A375세포를 소화시키고, 세포를 수집하며 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 세포를 조제된 FACS 완충액으로 재현탁시키며, 계수하고 세포 현탁액의 밀도를  $2 \times 10^6$  개/mL로 조정하며;
  - [0479] 2) A375세포를 각 웰당 100 μL씩 96웰 둥근 바닥 플레이트에 넣고, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며;
  - [0480] 3) 대응웰에 구배 희석된 후보 항체 희석액 및 대조 항체 희석액을 넣고, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불며 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고;
  - [0481] 4) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, 대응웰에 200 μL를 넣고 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키며;
  - [0482] 5) 단계4)를 2회 중복하고, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며;
  - [0483] 6) 대응웰에 각 후보 항체 및 대조 항체 희석액(1 μg/mL) 100 μL를 넣고, 세포를 재현탁시키며 세포를 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고;
  - [0484] 7) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, 대응웰에 200 μL를 넣고 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키며;
  - [0485] 8) 단계7)을 2회 중복하고, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며;
  - [0486] 9) PE 표지된 항-비오틴(anti-biotin) 흐름 항체(Abcam)를 넣고, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불며 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고;
  - [0487] 10) 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, FACS 완충액을 넣어 세포를 재현탁시키고;
  - [0488] 11) 단계10)을 2회 중복하며, 웰에 FACS 완충액을 200 μL씩 넣어, 세포를 재현탁시키고, 유세포 분석기(Beckman, CytoFLEX A00-1-1102)로 검출하며, 검출 결과는 도 3에 도시된 바와 같다.
  - [0489] 도 3으로부터 알 수 있다시피, 클론 번호가 NB22D-21 및 NB22gb-10인 2개의 나노 항체 후보 분자가 인간 흑색

중 세포계A375세포에서의 결합 활성은 대조 항체와 상당하다.

- [0490] 실시예9 뮤린, 원숭이PD-L1에 결합하는 키메라 VHH-Fc 항체의 활성 검증
- [0491] VHH-Fc 후보 항체와 원숭이, 뮤린PD-L1의 교차 결합 활성을 평가하기 위하여, FACS 방법으로 세포의 PD-L1 단백질에 대한 결합 활성을 검출하고, 구체적인 방법은 다음과 같다.
- [0492] 1) 배양된 마우스PD-L1-CHO 세포 및 원숭이 PD-L1-CHO 세포를 수집하고, 300 g로 원심분리하여 배지를 제거하며, 세포를 조제된 FACS 완충액으로 재현탁시키고, 계수하며 세포 현탁액의 밀도를  $2 \times 10^6$ /mL로 조정하고;
- [0493] 2) 마우스PD-L1-CHO 세포 및 원숭이 PD-L1-CHO 세포를 각 웰당 100  $\mu$ L씩 96웰 둥근 바닥 플레이트에 각각 넣으며, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0494] 3) 대응웰에 구배 희석된 후보 항체 희석액 및 대조 항체 희석액을 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0495] 4) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 대응웰에 200  $\mu$ L를 넣으며 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키고;
- [0496] 5) 단계4)를 2회 중복하며, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0497] 6) 대응웰에 비오틴 표지된 PD-1-Fc단백질 희석액(1  $\mu$ g/mL) 100  $\mu$ L를 넣으며, 세포를 재현탁시키고 세포를 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0498] 7) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 대응웰에 200  $\mu$ L를 넣으며 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키고;
- [0499] 8) 단계7)을 2회 중복하며, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0500] 9) PE 표지된 항-비오틴(anti-biotin) 흐름 항체(Abcam)를 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0501] 10) 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, FACS 완충액을 넣어 세포를 재현탁시키며;
- [0502] 11) 단계10)을 2회 중복하고, 웰에 FACS 완충액을 200  $\mu$ L씩 넣어, 세포를 재현탁시키며, 유세포 분석기(Beckman, CytoFLEX A00-1-1102)로 검출하였다.
- [0503] 인간-뮤린 교차 반응 검출 결과, 클론 번호가 NB22D-21인 나노 항체 후보 분자는 일정한 뮤린PD-L1 결합 활성을 갖는 것을 나타낸다.
- [0504] 인간-원숭이 교차 반응의 검출 결과는 표 5를 참조하고, 이로부터 알 수 있다 시피, 클론 번호가 NB22D-21 및 NB22gb-10인 2개의 나노 항체 후보 분자는 모두 원숭이 PD-L1을 인식하는 우수한 활성을 갖는다.

**표 5**

**표 5. EC50값**

클론 번호	EC50( $\mu$ g/mL)
NB22D-21	0.25
NB22gb-10	0.20
KN035(대조)	0.21
Atezolizumab(대조)	0.33

- [0505] 실시예10 PD-L1에 결합하는 키메라 VHH-Fc 항체의 특이성 검출
- [0507] PD-L1 단백질에 결합하는 후보 분자의 특이성을 확인하기 위하여, ELISA법을 사용하여 후보 분자가 B7 패밀리의 다른 단백질에 결합하는 활성을 검출하고, 구체적인 방법은 다음과 같다.
- [0508] 실험 1일 전에 ELISA 플레이트에 30  $\mu$ L의 최종 농도가 2  $\mu$ g/mL인 B7-H1(즉, PDL1), B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-DC(이상 단백질은 모두 이요선저우 회사에서 구입하고, 제품 번호는 각각 10084-HNAH, 11559-H08H, 11188-H08H, 10738-H08H, 10292-H08H-B임) 등 단백질 희석액을 넣고, 4°C에서 하룻밤 인큐베이션하며; 다음날 PBST를



사용하여 ELISA 플레이트를 3회 세척한 후, 150 μL의 5% PBSM을 넣어 ELISA 플레이트를 차단하고, 상온에서 2 시간 동안 인큐베이션하며; 다시 PBST로 플레이트를 3회 세척하고, 다음 30 μL의 후보 항체와 대조 항체의 희석액을 ELISA 플레이트에 넣으며, 상온에서 1시간 동안 인큐베이션하고; PBST로 플레이트를 3회 세척하며, 각 웰당 30 μL씩 1:7000으로 희석된 항-인간IgG Fc-HRP 2차 항체를 넣어, 상온에서 30분 동안 인큐베이션하고; PBST로 플레이트를 6회 세척한 후 TMB를 넣어 발색시키며, 마지막으로 2M의 HCl를 넣어 반응을 정지시키고, 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices, SpecterMax 190)로 450 nM의 파장에서 값을 리딩하며, 그 결과를 표 6 및 도 4에 나타낸바와 같다.

[0509] 항체 분자의 특이적 결합 반응 실험 검증 결과는 표 6 및 도 4에 도시된 바와 같다.

**표 6**

[0510] 표 6. PD-L1 단백질에 결합하는 후보 분자의 특이성

클론/단백질	B7-H1	B7-H2	B7-H3	B7-H4	B7-DC
NB22D-21	+	N/A	N/A	N/A	N/A
NB22-gb-10	+	N/A	N/A	N/A	N/A
KN035	+	N/A	N/A	N/A	N/A
Atezolizumab	+	N/A	N/A	N/A	N/A

[0511] +: 결합 활성이 검출되었음을 나타내고;

[0512] N/A: 결합 활성이 검출되지 않았음을 나타낸다.

[0513] 표 6 및 도 4의 결과로부터 알 수 있다시피, 클론 번호가 NB22D-21 및 NB22gb-10인 2개의 나노 항체 후보 분자는 B7-H1 외의 B7 패밀리 분자에 결합 활성이 없고, B7-H1에만 결합 활성이 있으며, 이 결합 특이성은 대조 항체와 일치하였다.

[0514] 실시예11 키메라 VHH-Fc 항체의 체외 생물학적 활성 검증

[0515] 후보 분자가 체외에서 T세포 활성화를 자극하는 능력을 확인하기 위하여, 본 발명자는 체외에서 혼합 림프구 반응 시스템을 구축하였고, 구체적인 방법은 다음과 같다.

[0516] 밀테니 분류 키트(Miltenyibiotec, 130-050-201)를 사용하여 체외에서 CD14 양성 단핵구 및 CD4 양성 T세포를 분류하고, 체외에서 100 ng/mL의 IL-4 및 100 ng/mL의 GM-CSF를 사용하여 7일 동안 유도 배양하여 단핵구를 수지상 세포(Dendritic cell, DC)가 되도록 유도하며, 다음 CD4 양성 T세포와 DC를 10 : 1의 세포수 비율로 혼합하고, 세포에 구배 희석된 후보 항체 및 대조 항체를 넣으며, 37°C 세포 인큐베이터에서 5일 동안 배양하고, 72 시간 동안 배양한 후 세포 상등액을 취하며, PBS 희석 후 IL-2 ELISA 키트를 사용하여 배양 상등액에서의 IL-2 분비량을 검출하고; 5일 동안 배양한 후 세포 상등액을 취하며, PBS 희석 후 IFN-γ ELISA 키트를 사용하여 배양 상등액에서의 IFN-γ 분비량을 검출하였다.

[0517] IL-2의 분비량을 검출하여, 본 발명자는 항체 분자의 혼합 림프구 반응 테스트의 검증 결과를 얻었고, 도 5에 도시된 바와 같다. 도 5로부터 알 수 있다시피, 본 발명의 나노 항체 후보 분자는 면역 반응을 활성화시킬 수 있다.

[0518] 실시예12 항체 인간화 변형

[0519] 체내에서 분자의 면역 원성을 감소시키기 위해, 본 발명자는 후보 분자를 인간화 설계하였다. Discovery Studio 및 Schrödinger Antibody Modeling을 각각 사용하고, 상동성 모델링 방법을 사용하여 모델링하며, 5-10개의 최적의 구조적 솔루션을 선택하고, Loop 영역은 일반적으로 상동성 모델링 방법을 사용하여 모델링하며, CDR 아미노산 서열 정렬 결과가 50% 미만의 동일성을 보이면, 새로운 모델링 방법을 사용하여 CDR3 구조 모델을 구축하였다. PDB BLAST를 사용하여 서열이 가장 가까운 10개의 항체 결정 구조 모델(구조 분해능은 2.5Å보다 높음)을 검색하고, 자동 모델링 모델을 비교하여, 최적의 구조 모델을 선택하였다. 본 발명자는 NB22D-21 분자에 대하여 항체 인간화 변형을 수행하여, 두 개의 인간화된 분자를 얻었고, 이 두 개의 인간화 변형된 분자 번호는 NB22D-21-huVH1 및 NB22D-21-huVH2이다.

[0520] 실시예13 인간PD-L1-CHO 세포에 결합하는 인간화 변형된 유도체 분자

- [0521] 인간PD-L1 항원에 결합하는 분자의 활성에 대한 인간화의 영향을 검출하기 위하여, 본 발명자는 FACS를 사용하여 후보 분자 및 인간화 변형된 유도체 분자를 검출하였다.
- [0522] 1) 배양된 인간PD-L1-CHO 세포를 수집하고, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, 세포를 조제된 FACS 완충액으로 재현탁시키고, 계수하며 세포 현탁액의 밀도를  $2 \times 10^6$  개/mL로 조정하고;
- [0523] 2) PD-L1-CHO 세포를 각 웰당 100  $\mu$ L씩 96웰 둥근 바닥 플레이트에 넣어, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0524] 3) 대응웰에 구매 희석된 후보 항체 희석액 및 대조 항체 희석액을 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0525] 4) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 대응웰에 200  $\mu$ L를 넣으며 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키고;
- [0526] 5) 단계4)를 2회 중복하며, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0527] 6) PE 표지된 항-인간IgG Fc 흐름 항체(Abcam, ab98596)를 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0528] 7) 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, FACS 완충액을 넣어 세포를 재현탁시키며;
- [0529] 8) 단계7)을 2회 중복하고, 웰에 FACS 완충액을 200  $\mu$ L씩 넣어, 세포를 재현탁시키며, 유세포 분석기(Beckman, CytoFLEX A00-1-1102)로 검출하였고, 결과는 도 6에 도시된 바와 같다.
- [0530] 도 6으로부터 알 수 있다시피, 인간화 후 얻은 유도체 분자(즉, NB22D-21-huVH1 및 NB22D-21-huVH2)는 인간PD-L1에 결합하는 친화력 및 이의 모본 분자(즉, NB22D-21)와 유사하였다.
- [0531] 실시예14 뮤린PD-L1-CHO 세포에 결합하는 인간화 변형된 유도체 분자
- [0532] 뮤린PD-L1 항원에 결합하는 분자의 교차 활성에 대한 인간화의 영향을 검출하기 위하여, 본 발명자는 FACS를 사용하여 후보 분자를 검출하였다.
- [0533] 1) 배양된 뮤린PD-L1-CHO 세포를 수집하고, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, 세포를 조제된 FACS 완충액으로 재현탁시키고, 계수하며 세포 현탁액의 밀도를  $2 \times 10^6$  개/mL로 조정하고;
- [0534] 2) 뮤린PD-L1-CHO 세포를 각 웰당 100  $\mu$ L씩 96웰 둥근 바닥 플레이트에 넣어, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0535] 3) 대응웰에 구매 희석된 후보 항체 희석액 및 대조 항체 희석액을 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0536] 4) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 대응웰에 200  $\mu$ L를 넣으며 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키고;
- [0537] 5) 단계4)를 2회 중복하며, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0538] 6) PE 표지된 항-인간IgG Fc 흐름 항체(Abcam, ab98596)를 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0539] 7) 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, FACS 완충액을 넣어 세포를 재현탁시키며;
- [0540] 8) 단계7)을 2회 중복하고, 웰에 FACS 완충액을 200  $\mu$ L씩 넣어, 세포를 재현탁시키며, 유세포 분석기(Beckman, CytoFLEX A00-1-1102)로 검출하고, 결과는 도 7 및 도 8에 도시된 바와 같다.
- [0541] 도 7로부터 알 수 있다시피, 인간화 변형 후 얻은 유도체 분자에서, NB22D-21-huVH1이 뮤린PD-L1에 결합하는 친화력은 모본 분자(즉, NB22D-21)보다 우수하였다.
- [0542] 구체적으로, 도 7로부터 알 수 있다시피, 모본 분자NB22D-21 및 대조 분자KN035에 있어서, 인간화 변형 후 얻은 유도체 분자NB22D-21-huVH1은 뮤린PD-L1 단백질에 결합하는 매우 우수한 활성을 갖고; 그 중 KN035 및 NB22D-21-huVH1의 피크 흐름도(도 8에 도시된 바와 같이)를 선택하며, 이로부터 각각 20  $\mu$ g/mL의 KN035 및 NB22D-21-huVH1을 사용하여 뮤린PD-L1 과발현 세포에 결합하고, FACS 검출 데이터는 KN035가 CHO 세포 표면의

뮤린PD-L1(도 8A)을 인식할 수 없지만, NB22D-21-huVH1은 CHO 세포 표면의 뮤린PD-L1(도 8B)(참고: 각 도면의 중간의 구분선은 설정된 형광 강도 임계값 위치임)을 잘 인식할 수 있음을 명확하게 알 수 있다.

- [0543] 실시예15 인간화 변형된 유도체 분자의 PD-1 차단 활성 검증
- [0544] 인간화 후 수득한 유도체 분자를 평가하고, FACS 방법으로 PD-1/PD-L1에 대한 차단 활성을 검출하며, 구체적인 방법은 다음과 같다.
- [0545] 1) 배양된 인간PD-L1-CHO 세포를 수집하고, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, 세포를 조제된 FACS 완충액으로 재현탁시키고, 계수하며 세포 현탁액의 밀도를  $2 \times 10^6$ /mL로 조정하였다.
- [0546] 2) PD-L1-CHO 세포를 각 웰당 100  $\mu$ L씩 96웰 둥근 바닥 플레이트에 넣어, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며;
- [0547] 3) 대응웰에 구배 희석된 후보 항체 희석액 및 대조 항체 희석액을 넣고, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불며 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하고;
- [0548] 4) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, 대응웰에 200  $\mu$ L를 넣고 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키며;
- [0549] 5) 단계4)를 2회 중복하고, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며;
- [0550] 6) 대응웰에 비오틴 표지된 PD-1-Fc 단백질 희석액(1  $\mu$ g/mL) 100  $\mu$ L를 넣고, 세포를 재현탁시키며 세포를 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하고;
- [0551] 7) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, 대응웰에 200  $\mu$ L를 넣고 FACS드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키며;
- [0552] 8) 단계7)을 2회 중복하고, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며;
- [0553] 9) PE 표지된 스트렙타비딘(streptavidin, eBioscience, 12-4317-87)을 넣고, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불며 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하고;
- [0554] 10) 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, FACS 완충액을 넣어 세포를 재현탁시키고;
- [0555] 11) 단계10)을 2회 중복하며, 웰에 FACS 완충액을 200  $\mu$ L씩 넣어, 세포를 재현탁시키고, 유세포 분석기(Beckman, CytoFLEX A00-1-1102)로 검출하였으며, 결과는 도 9에 도시된 바와 같다.
- [0556] 도 9로부터 알 수 있다시피, 인간화 변형 후 얻은 유도체 분자(즉, NB22D-21-huVH1 및 NB22D-21-huVH2)가 PD-1단백질이 PD-L1에 결합하는 것을 차단하는 활성은 이의 모본 분자(즉, NB22D-21) 및 양성 대조KN035와 비슷하였다.
- [0557] 실시예16 인간화 분자의 친화력 성숙
- [0558] 인간PD-L1 항원에 결합하는 항체 분자의 친화력 및 차단 활성을 향상시키기 위하여, 본 발명자는 인간화 변형 후 수득한 항체 유래 분자에 대하여 친화력 성숙 설계를 수행하였다.
- [0559] 친화력 성숙은 싱글-포인트(single-point) 포화 돌연변이, 멀티-포인트(multi-point) 조합 돌연변이, 사슬 치환과 같은 방법을 사용하고, Trim 프라이머 기술을 사용하여 CDR 영역에 대한 프라이머를 정향 설계하며, 친화력 성숙 항체 라이브러리를 구축하고, 파지 디스플레이 기술을 이용하여 친화력 성숙된 분자를 스크리닝한다. 단일 클론을 수득한 후 VHH 용해액을 제조하고, FACS를 사용하여 클론의 친화성 및 차단 활성을 검출하였다. 스크리닝을 통해 모본보다 우수할 수 있는 4개의 클론을 수득하였고, 각각 SY01-201, SY01-208, SY01-NB-004 및 SY01-NB-027-M이다.
- [0560] 구체적인 실험 결과는 도 10 및 도 11에 도시된 바와 같고, 세포 용해액의 정성/반정량적 결과로부터 대체적으로 알 수 있다시피, SY01-201, SY01-208, SY01-NB-004 및 SY01-NB-027-M 네 개의 분자의 결합 활성 및 차단 활성은 모두 모본 NB22D-21 분자와 유사하였다.
- [0561] 실시예17 인간화 분자의 약물 가능성 변형
- [0562] 분자의 약물 가능성을 최적화하고, 단백질 폴딩, 활성 및 기능에 대한 잠재적인 번역 후 변형 사이트의 영향을 피하기 위하여, 본 발명자는 인간화 변형 후 수득한 항체 유래 분자NB22D-21-huVH2에 대하여 약물 가능성 변형



설계를 수행하였다.

- [0563] 약물 가능성 변형은 점 돌연변이를 사용하여 잠재적인 번역 후 변형 사이트를 무작위로 돌연변이시키고, 약물 가능성 변형 항체 라이브러리를 구축하며, 파지 디스플레이 기술을 이용하여 약물 가능성이 변형된 분자를 스크리닝하였다. 단일 클론을 수득한 후 VHH 용해액을 제조하고, FACS를 사용하여 PD-L1-CHO에 대한 클론의 차단 활성을 검출하였다.
- [0564] 예비 스크리닝을 통해, 본 발명자는 10개의 약물 가능성이 변형된 변이체 분자: SY01-D21-3, SY01-D21-4, SY01-D21-5, SY01-D21-6, SY01-D21-8, SY01-D21-17, SY01-D21-21, SY01-D21-24, SY01-D21-38 및 SY01-D21-47(도 15에서 각각 3, 4, 5, 6, 8, 17, 21, 24, 38 및 47로 약칭되고, 모본 분자는 NB22D-21-huVH2로서, D21-Vh2로 약칭되며, 동종 대조(isotype)는 인간IgG1임)을 얻었고, 추가로 스크리닝하여, 본 발명자는 모본보다 우수할 수 있는 5개의 클론을 수득하였으며, 각각 SY01-D21-4, SY01-D21-8, SY01-D21-17, SY01-D21-24 및 SY01-D21-47이다.
- [0565] 실험 결과는 도 15에 도시된 바와 같고, 세포 용해액의 정성/반정량적 결과로부터 알 수 있다시피, SY01-D21-4, SY01-D21-8, SY01-D21-17 및 SY01-D21-24 이 4개의 약물 가능성이 변형된 후보 분자의 차단 활성은 모두 모본 분자 NB22D-21-huVH2와 유사하였다. 이 밖에, SY01-D21-47의 세포 발현량이 높지 않기에, 상기 클론을 후속 검출에 사용하지 않았다.
- [0566] 실시예18 약물 가능성 후보 클론의 전장 구축 및 샘플 생산
- [0567] 스크리닝으로 수득한 양성 VHH 후보 항체SY01-D21-4, SY01-D21-8, SY01-D21-17 및 SY01-D21-24를 인간IgG1 Fc 세그먼트에 융합시키고, 양성 VHH 유전자 서열의 C단을 인간IgG1 Fc 세그먼트 유전자 서열의 N단에 연결시키는 방식으로 융합 발현 벡터를 구축하며, 상기 융합 발현 벡터 플라스미드를 ExpiCHO 세포로 형질전환시키고, 발현을 유도하여 Fc 세그먼트를 융합한 4가지 VHH-Fc 키메라 항체 단백질을 얻었으며, 각각 NB22D-21-4, NB22D-21-8, NB22D-21-17 및 NB22D-21-24라고 지칭하였다.
- [0568] 항체 발현은 ExpiCHO 일시적 발현 시스템을 사용하고, 배지는 (Gibco, A29100-01)이며, 형질감염 키트는 (Gibco, A29129)이다. 구체적인 방법은 다음과 같다. 형질감염 1일 전에 ExpiCHO 세포를 계대하고, 25 ml의 시스템에서, 구축된 플라스미드 25 µg을 형질감염 시약과 혼합한 후 25 ml의 ExpiCHO 세포 배양물에 적가하며, 충분히 혼합하고, 37°C에서 18-22시간 동안 발현한 후, 키트의 설명에 따라 피드 배지를 첨가하며, 피드 후, 세포를 32°C에서 배양하고, 형질감염 후 5일째에, 제2차 피드를 첨가하며, 세포를 32°C에서 배양하고, 10-12일 후, 발현된 세포 현탁액을 고속 원심분리하여 상등액을 취하며, 얻은 상등액을 0.22 µm으로 여과한 후 Protein A/G 친화성 정제 방법으로 정제하고, 100 mM의 글리시네이트(pH3.0)로 목적 단백질을 용출하며, 다음 1M의 Tris-HCl으로 중화하였다.
- [0569] 실시예19 약물 가능성이 형질전환된 후보 항체가 인간 및 원숭이PD-L1에 결합하는 활성 검증
- [0570] 약물 가능성 변형 후 수득한 4개의 VHH-Fc후보 항체를 평가하고, FACS 방법을 사용하여 세포의 인간 및 원숭이 PD-L1 단백질에 대한 결합 활성을 검출하며, 구체적인 방법은 다음과 같다.
- [0571] 1) 배양된 인간 및 원숭이PD-L1-CHO 세포를 수집하고, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, 세포를 조제된 FACS 완충액으로 재현탁시키고, 계수하며 세포 현탁액의 밀도를  $2 \times 10^6$  개/mL로 조정하고;
- [0572] 2) 인간 및 원숭이PD-L1-CHO 세포를 각 웰당 100 µL씩 96웰 둥근 바닥 플레이트에 각각 넣어, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0573] 3) 대응웰에 구배 희석된 후보 항체 희석액 및 대조 항체 희석액을 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0574] 4) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 대응웰에 200 µL를 넣으며 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키고;
- [0575] 5) 단계4)를 2회 중복하며, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0576] 6) PE 표지된 항-인간IgG Fc 흐름 항체(Abcam, ab98596)을 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0577] 7) 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, FACS 완충액을 넣어 세포를 재현탁시키며;

[0578] 8) 단계10)을 2회 중복하고, 웰에 FACS 완충액을 200  $\mu$ L씩넣어, 세포를 재현탁시키며, 유세포 분석기(Beckman, CytoFLEX A00-1-1102)로 검출하였다.

[0579] 표 7에 나타낸 바와 같이, 인간 및 원숭이PD-L1-CHO에 대한 4개의 후보 분자의 결합 활성을 비교하고, 본 발명자는 인간 및 원숭이PD-L1에 대하여 높은 친화력을 갖는 2개의 나노 항체 후보 분자 NB22D-21-4 및 NB22D-21-24를 스크리닝하였다.

**표 7**

**표 7. 항체의 EC50**

[0580]

클론 번호	인간PD-L1-CHO에 결합하는 EC50( $\mu$ g/mL)	원숭이PD-L1-CHO에 결합하는 EC50( $\mu$ g/mL)
NB22D-21-huVH2	0.72	1.82
NB22D-21-4	0.21	0.30
NB22D-21-8	0.26	0.70
NB22D-21-17	1.73	3.25
NB22D-21-24	0.14	0.39

[0581] 실시예20 약물 가능성이 형질전환된 후보 항체의 PD-1 차단 활성 검증

[0582] 수득한 VHH-Fc 후보 항체를 평가하고, FACS 방법으로 PD-1/PD-L1에 대한 차단 활성을 검출하며, 구체적인 방법은 다음과 같다.

[0583] 1) 배양된 인간PD-L1-CHO 세포를 수집하고, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, 세포를 조제된 FACS 완충액으로 재현탁시키고, 계수하며 세포 현탁액의 밀도를  $2 \times 10^6$ /mL로 조정하고;

[0584] 2) PD-L1-CHO 세포를 각 웰당 100  $\mu$ L씩 96웰 둥근 바닥 플레이트에 넣어, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;

[0585] 3) 대응웰에 구배 희석된 후보 항체 희석액 및 대조 항체 희석액을 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;

[0586] 4) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 대응웰에 200  $\mu$ L를 넣으며 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키고;

[0587] 5) 단계4)를 2회 중복하며, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;

[0588] 6) 대응웰에 비오틴 표지된 PD-1-Fc 단백질 희석액(1  $\mu$ g/mL) 100  $\mu$ L를 넣으며, 세포를 재현탁시키고 세포를 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;

[0589] 7) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 대응웰에 200  $\mu$ L의 FACS를 넣으며 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키고;

[0590] 8) 단계7)을 2회 중복하며, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;

[0591] 9) PE 표지된 스트렙타비딘(streptavidin, eBioscience, 12-4317-87)을 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;

[0592] 10) 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, FACS 완충액을 넣어 세포를 재현탁시키며;

[0593] 11) 단계10)을 2회 중복하고, 웰에 FACS 완충액을 200  $\mu$ L씩넣어, 세포를 재현탁시키며, 유세포 분석기(Beckman, CytoFLEX A00-1-1102)로 검출하였다.

[0594] 표 8에 나타낸 바와 같이, FACS 실험을 통해, 본 발명자는 실시예19에서 클론 번호가 NB22D-21-4 및 NB22D-21-24인 2개의 나노 항체 후보 분자가 동시에 높은 차단 활성을 갖고, 그 차단 활성이 모두 NB22D-21-huVH2 항체보다 높음을 검증하였다.

**표 8**

[0595]

표 8. 항체의 IC50

클론 번호	IC50(μg/mL)
NB22D-21-huVH2	1.00
NB22D-21-4	0.30
NB22D-21-24	0.20

[0596]

실시에21 PD-L1에 결합하는 약물 가능성이 변형된 후보 항체의 특이성 검출PD-L1 단백질에 결합하는 약물 가능성이 형질전환된 후보 분자의 특이성을 확인하기 위하여, FACS법을 사용하여 세포에 결합하는 후보 분자의 특이성을 검출하고, 구체적으로 두 부분으로 구분되며, 제1 부분의 구체적인 방법은 다음과 같다.

[0597]

1) 배양된 Jurkat 및 Raji 세포를 수집하고, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, 세포를 조제된 FACS 완충액(완충액 성분: 1\*PBS + 5%FBS + 2%BSA)으로 재현탁시키고, 계수하며 세포 현탁액의 밀도를  $2 \times 10^6$  개/mL로 조정하고;

[0598]

2) Jurkat 및 Raji 세포를 각 웰당 100 μL씩 96웰 둥근 바닥 플레이트에 각각 넣어, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;

[0599]

3) 대응웰에 구매 희석된 후보 항체 희석액 및 대조 항체 희석액을 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;

[0600]

4) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 대응웰에 200 μL를 넣으며 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키고;

[0601]

5) 단계4)를 4회 중복하며, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;

[0602]

6) PE 표지된 항-인간IgG Fc 흐름 항체(Abcam, ab98596)를 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;

[0603]

7) 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, FACS 완충액을 넣어 세포를 재현탁시키며;

[0604]

8) 단계10)을 2회 중복하고, 웰에 FACS 완충액을 200 μL씩 넣어, 세포를 재현탁시키며, 유세포 분석기(Beckman, CytoFLEX A00-1-1102)로 검출하였다.

[0605]

하기 표 9와 같이, FACS 검출 결과에 따르면, 본 발명자는 양성 및 음성을 각각 “+” (결합이 있음을 나타냄) 및 “-” (결합이 없음을 나타냄)으로 나타내고, 표 9에 따라 알 수 있다 시피, NB22D-21-4 및 NB22D-21-24 클로닝에서, 전자는 두 가지 세포에서 모두 비특이적 결합이 없지만, 후자는 모두 높은 비특이적 결합이 있으며, 대조 항체는 비특이적 결합을 나타내지 않는다.

표 9

[0606]

표 9. 항체의 비특이적 결합

클론/세포	Jurkat	Raji
NB22D-21-huVH2	-	-
NB22D-21-4	-	-
NB22D-21-24	+	+
KNO35(대조)	-	-
Atezolizumab(대조)	-	-

[0607]

제2 부분의 실험에서, 본 발명자는 FACS 방법을 이용하여 NB22D-21-4 클론이 B7 패밀리 단백질에 결합하는 특이성을 검출하였고, 구체적인 방법은 다음과 같다.1) 배양된 B7-H2, B7-H4, B7-H5세포를 수집하고, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하며, 세포를 조제된 FACS 완충액(완충액 성분: 1\*PBS + 5%FBS + 2%BSA)으로 재현탁시키고, 계수하며 세포 현탁액의 밀도를  $2 \times 10^6$  개/mL로 조정하고;

[0608]

2) B7-H2, B7-H4, B7-H5 세포를 각 웰당 100 μL씩 96웰 둥근 바닥 플레이트에 각각 넣어, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;

- [0609] 3) 대응웰에 구배 희석된 후보 항체 희석액 및 대조 항체 희석액을 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0610] 4) 인큐베이션된 세포 혼합액을 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고, 대응웰에 200 μL를 넣으며 드레인 건을 사용하여 세포를 재현탁시키고;
- [0611] 5) 단계4)를 4회 중복하며, 300 g로 원심분리하여 상등액을 제거하고;
- [0612] 6) PE 표지된 항-인간IgG Fc 흐름 항체(Abcam, ab98596)를 넣으며, 드레인 건으로 세포를 균일하게 불고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하며;
- [0613] 7) 300 g에서 원심분리하여 상등액을 제거하고, FACS 완충액을 넣어 세포를 재현탁시키며;
- [0614] 8) 단계10)을 2회 중복하고, 웰에 FACS 완충액을 넣으며, 각 웰은 200 μL이고, 세포를 재현탁시키며, 유세포 분석기(Beckman, CytoFLEX A00-1-1102)로 검출하였다.
- [0615] 하기 표 10과 같이, FACS 검출 결과에 따르면, 본 발명자는 양성 및 음성을 각각 “+” (결합이 있음을 나타냄) 및 “-” (결합이 없음을 나타냄)으로 나타내고, 표 10에 따라 알 수 있다 시피, NB22D-21-4는 다양한 세포에서 모두 비특이적 결합이 없으며, 대조 항체는 비특이적 결합을 나타내지 않는다.

**표 10**

**표 10. 항체와 B7 패밀리의 단백질 특이성**

클론/세포	B7-H2	B7-H3	B7-H4	B7-H5
NB22D-21-huVH2	-	-	-	-
NB22D-21-4	-	-	-	-
KN035(대조)	-	-	-	-

- [0616] 실시예22 NB22D-21-4항체의 체외 MLR 활성 검증
- [0618] 후보 분자가 체외에서 T세포 활성화를 자극하는 능력을 확인하기 위하여, 본 발명자는 체외에서 혼합 림프구 반응 시스템을 구축하였고, 구체적인 방법은 다음과 같다.
- [0619] 밀테니 분류 키트(Miltenyibiotec, 130-050-201)를 사용하여 체외에서 CD14양성 단핵구 및 CD4 양성 T세포를 분류하고, 체외에서 100 ng/mL의 IL-4 및 100 ng/mL의 GM-CSF를 사용하여 7일 동안 유도 배양하여 단핵구를 수지상 세포(Dendritic cell, DC)가 되도록 유도하며, 다음 CD4 양성 T세포와 DC를 10:1의 세포수 비율로 혼합하고, 세포에 구배 희석된 후보 항체 및 대조 항체를 넣으며, 37°C 세포 인큐베이터에서 5일 동안 배양하고, 72시간 동안 배양한 후 세포 상등액을 취하며, PBS 희석 후 IL-2 ELISA 키트를 사용하여 배양 상등액에서의 IL-2 분량을 검출하고; 5일 동안 배양한 후 세포 상등액을 취하며, PBS 희석 후 IFN-γ ELISA 키트를 사용하여 배양 상등액에서의 IFN-γ 분량을 검출하였다.
- [0620] IFN-γ 및 IL-2의 분비를 검출하여, 본 발명자는 항체 분자의 혼합 림프구 반응 테스트의 검증 결과를 얻었고, 도 16에 도시된 바와 같다. 도 16로부터 알 수 있다 시피, 본 발명의 나노 항체 후보 분자 NB22D-21-4는 면역 반응을 활성화시킬 수 있다.
- [0621] 실시예23 후보 항체의 제2차 친화력 성숙
- [0622] 무린PD-L1 항원에 결합하는 항체 분자의 친화력 및 차단 활성을 보다 향상시키기 위하여, 인간화 변형 후 수득한 항체 유래 분자에 대하여 친화력 성숙 설계를 수행하였다.
- [0623] 본 라운드의 친화력 성숙은 싱글-포인트 포화 돌연변이 방법을 사용하고, Trim 프라이머 기술을 사용하여 CDR 영역에 대한 프라이머를 정향 설계하며, 친화력 성숙 항체 라이브러리를 구축하고, 계속하여 파지 디스플레이 기술을 이용하여 친화력 성숙된 분자를 스크리닝한다. 무린 항원을 이용하여 친화력 성숙 라이브러리에 대하여 각각 검색 및 예비 스크리닝하고, 단일 클론 후 전장 항체를 구축 및 발현하며, FACS를 사용하여 후보 클론의 친화력, 인간 무린 교차 및 차단 활성을 검출한다. 스크리닝을 통해 원래 모본보다 활성이 우수한 5개의 클론을 얻었고, 각각 NB22D-21-45-106, NB22D-21-123, NB22D-21-154, NB22D-21-94 및 NB22D-21-109이다.
- [0624] 구체적인 실험 결과는 도 12, 도 13 및 도 14에 도시된 바와 같고, 결과로부터 알 수 있다 시피, NB22D-21-45-

106, NB22D-21-123, NB22D-21-154, NB22D-21-94 및 NB22D-21-109의 5개의 분자의 결합 활성 및 차단 활성은 모두 대조 NB22D21-4 샘플과 매우 유사하거나 더 우수하며, 무린 교차 활성은 또한 모본 분자 NB22D-21-huVH2보다 우수하였다. 그러나 실시예15 및 실시예17의 시험 결과로부터 알 수 있다시피, 모본 NB22D-21 분자에 비해, NB22D21-4 분자의 결합 활성 및 차단 활성은 더 우수하였고, 친화력 성숙 후 모본 분자에 의해 얻은 5개 분자의 친화성 및 차단 활성은 모본 NB22D-21 분자와 매우 유사하거나 더 우수하며, 무린 교차 활성은 모본 분자 및 대조 항체KN035보다 우수함을 알 수 있다.

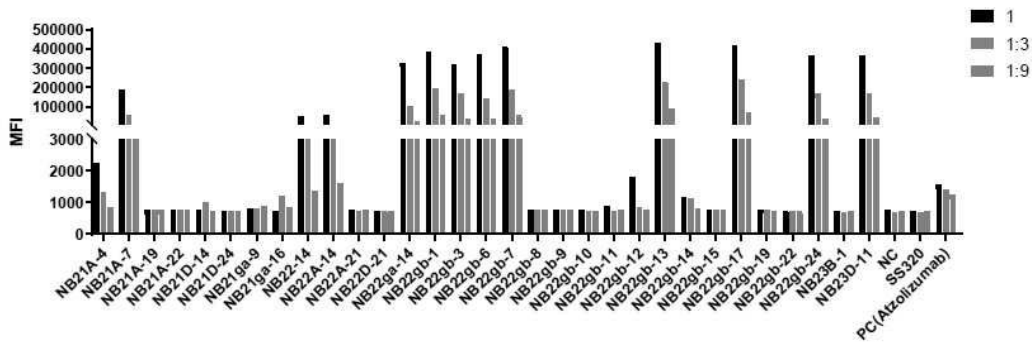
[0625]

본 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 그 사상 또는 중심 특징을 벗어나지 않고 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있음을 더 이해할 것이다. 본 발명의 전술한 설명은 단지 그 예시적인 실시형태를 개시하고 있기 때문에, 다른 변화도 본 발명의 범위에 있는 것으로 간주되는 것을 이해해야 한다. 따라서, 본 발명은 여기에 상세하게 설명된 특정 실시형태에 한정되지 않는다. 반대로, 첨부된 특허청구범위를 참조하여 본 발명의 범위 및 내용을 나타내어야 한다.

도면

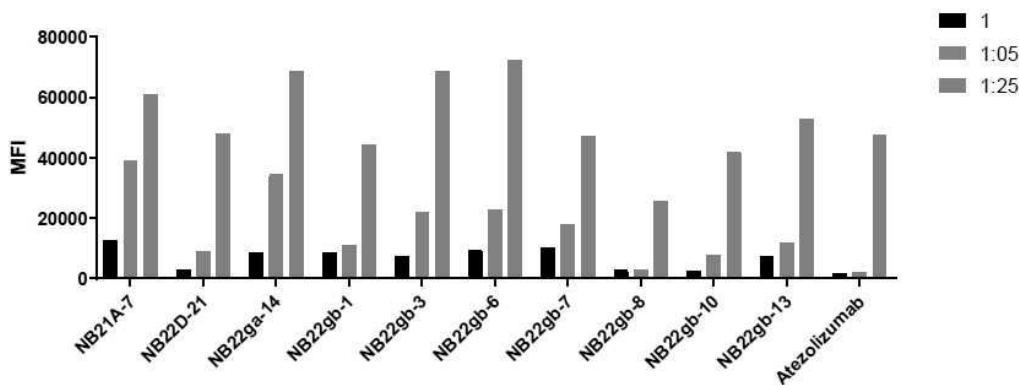
도면1

PD-L1에 결합하는 VHH 항체 용해액 샘플의 결합 친화력 스크리닝

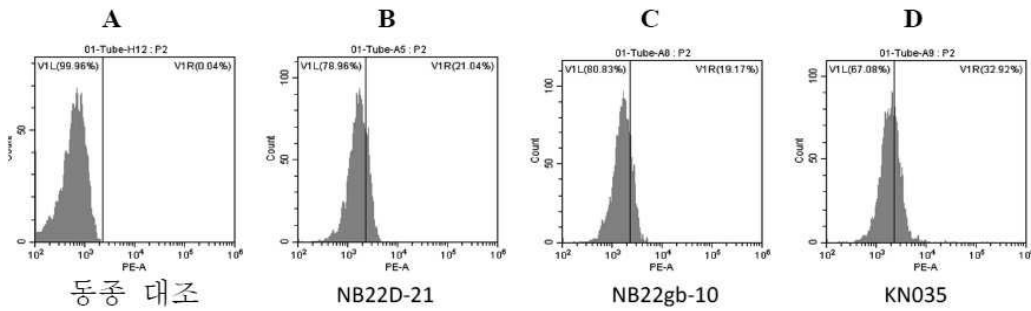


도면2

항PD-L1 후보 항체 분자의 차단 실험

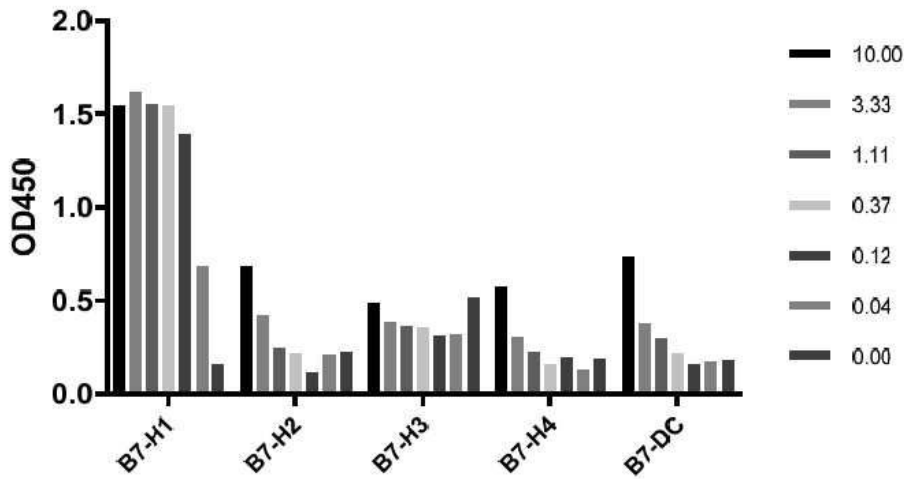


도면3



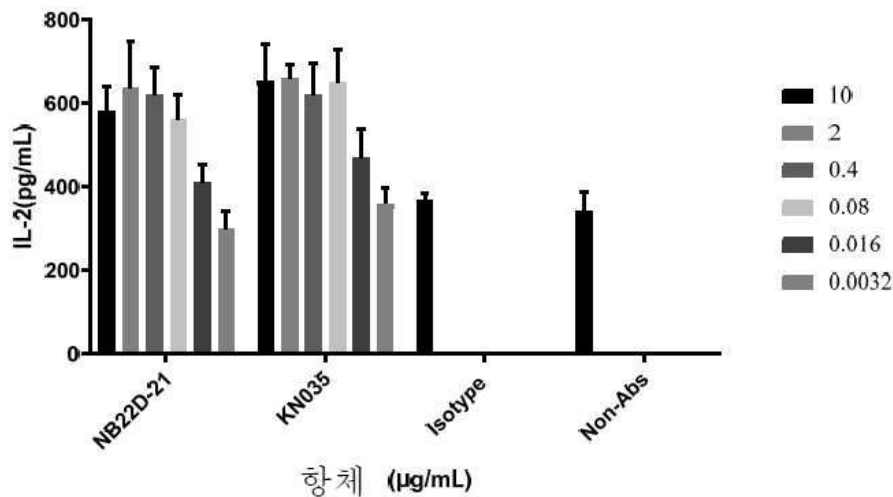
도면4

NB22D-21 분자의 특이적 결합 반응 실험



도면5

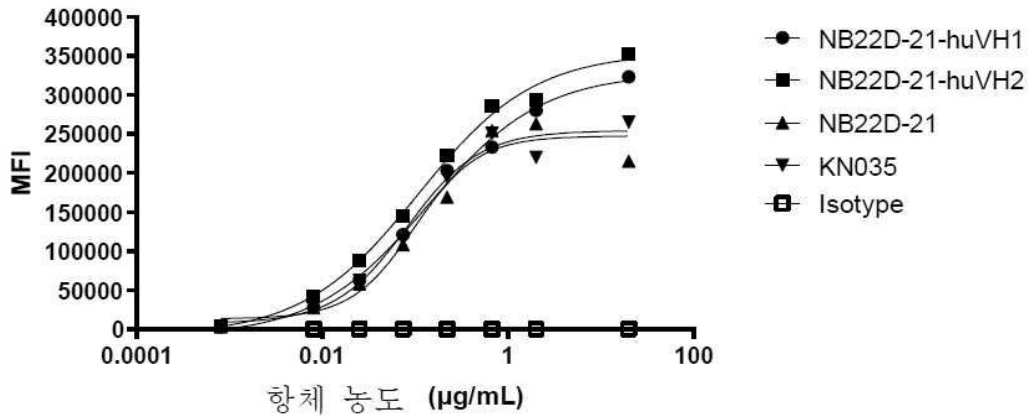
NB22D-21 분자의 혼합 림프구 반응 테스트





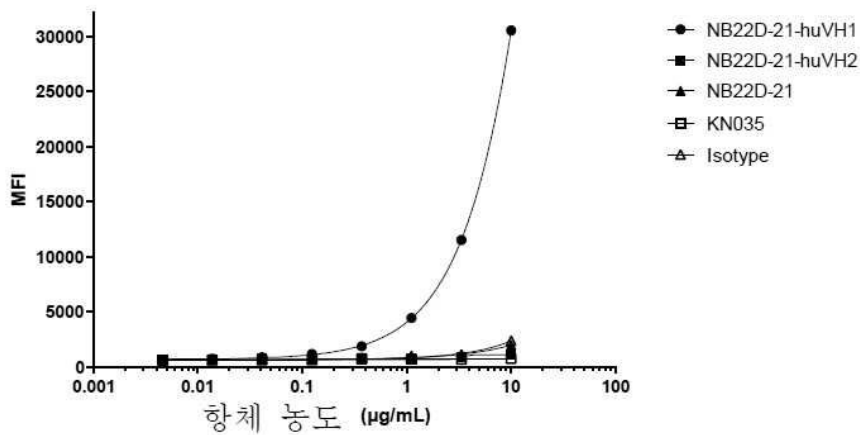
도면6

NB22D-21 분자 및 이의 인간화 변형된 분자의 결합 실험

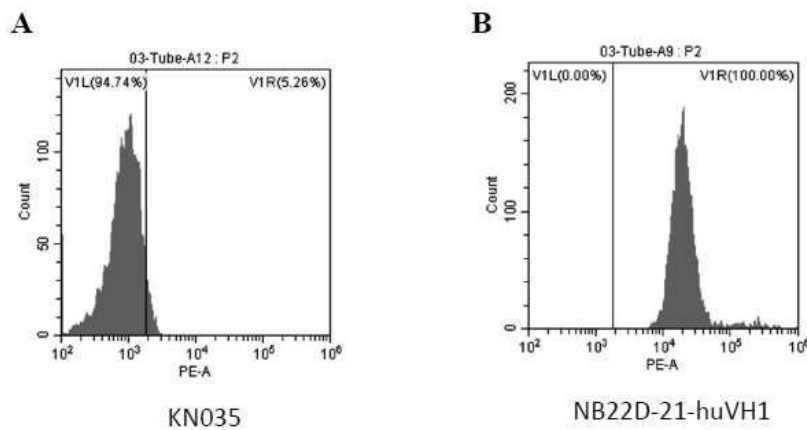


도면7

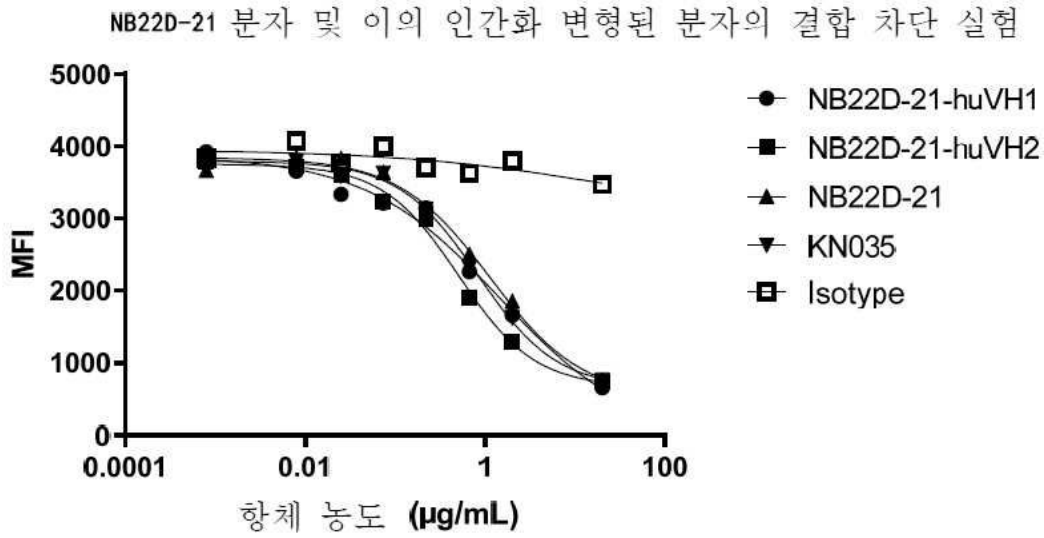
NB22D-21 분자 및 이의 인간화 변형된 분자의 인간-뮤린 교차 반응 실험



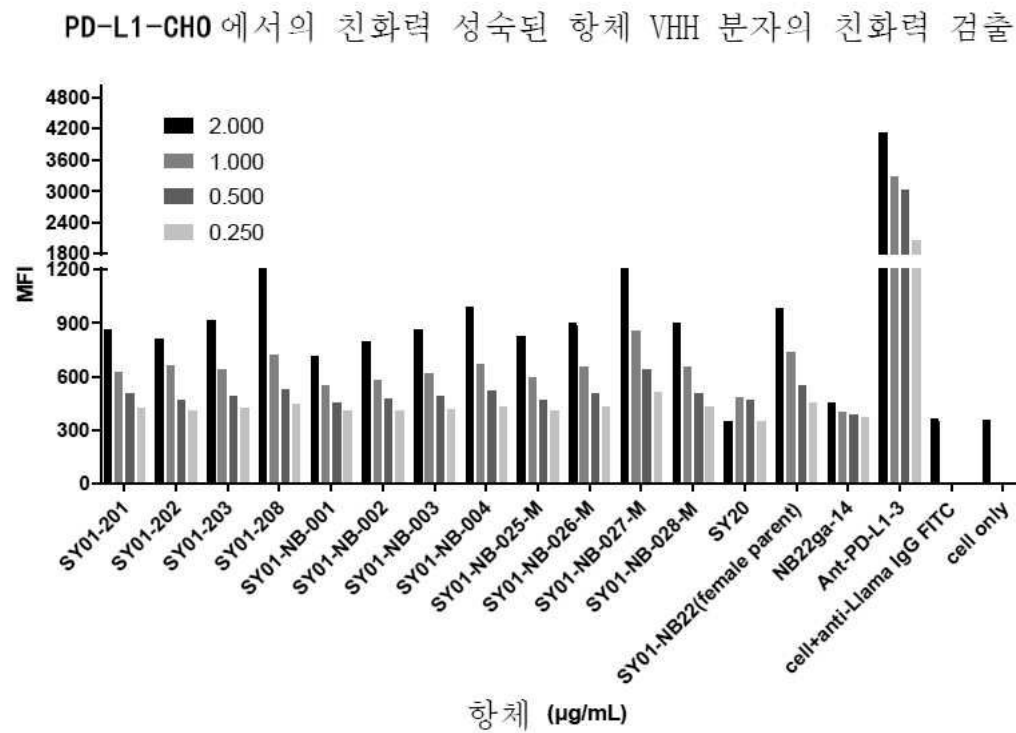
도면8



도면9

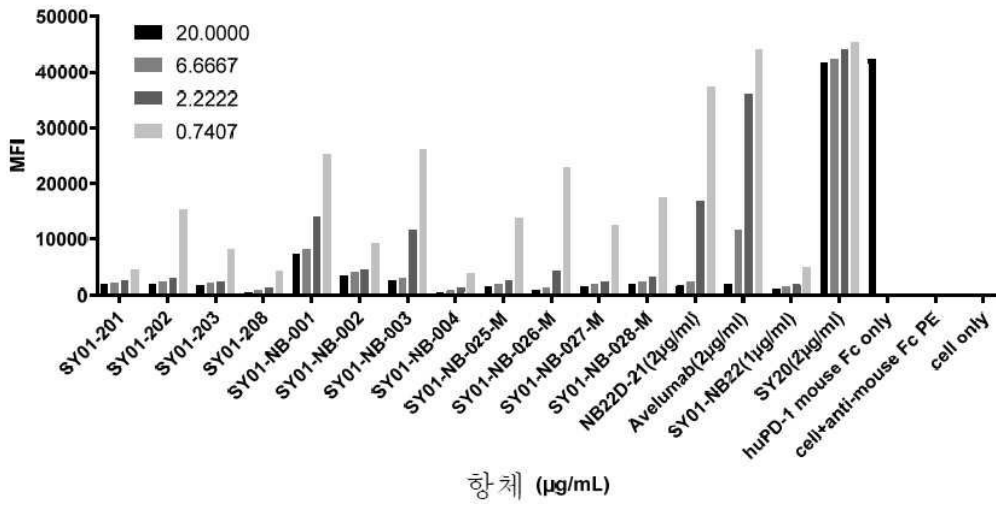


도면10



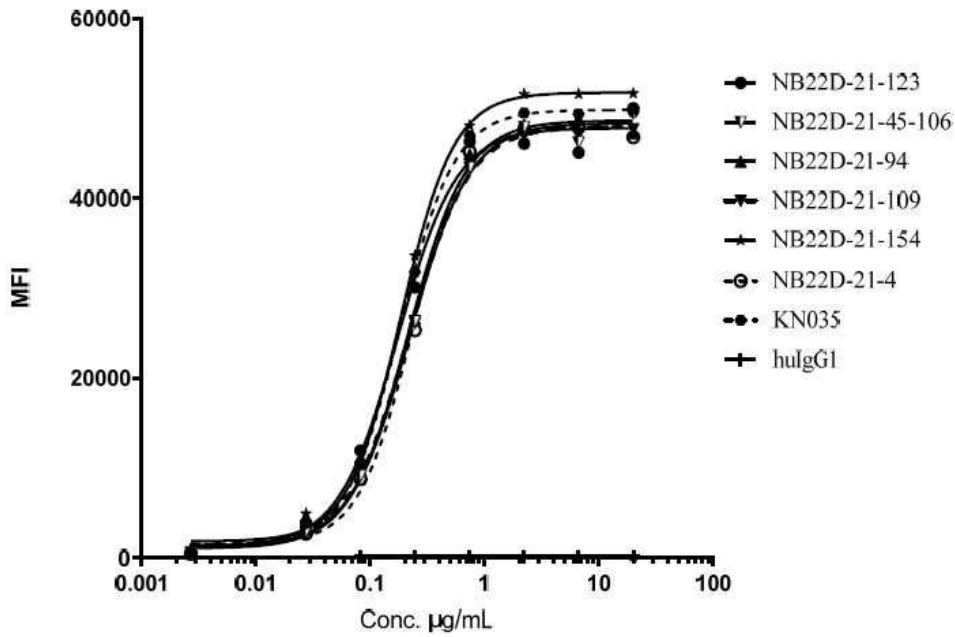
도면11

친화력 성숙된 항체 VHH 분자가 PD-L1-CHO 세포에 대한 PD-1 결합을 차단

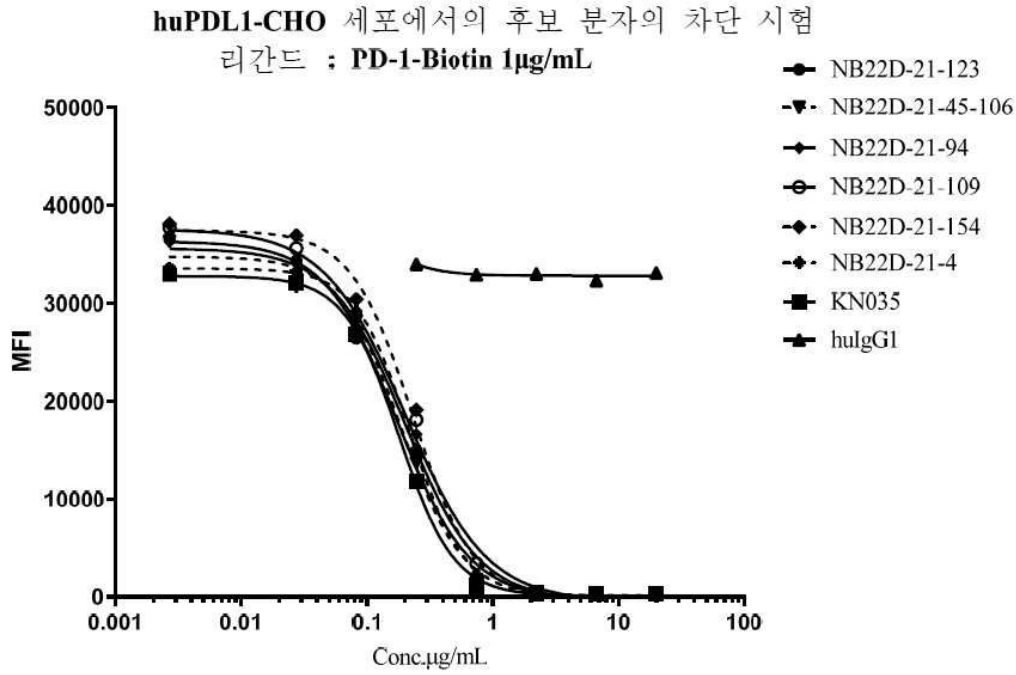


도면12

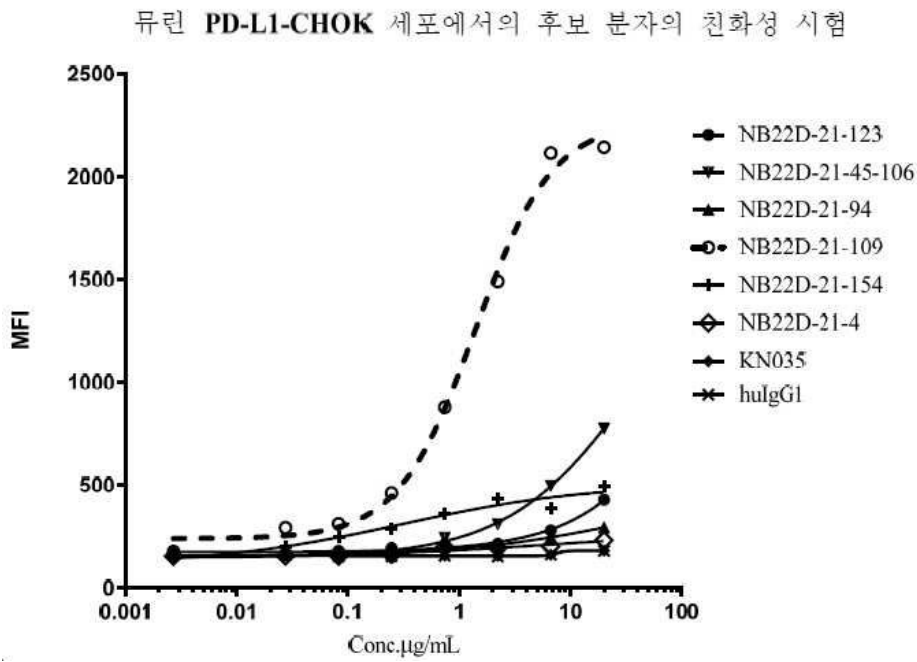
huPD-L1-CHOK 세포에서의 후보 분자의 결합 시험



도면13

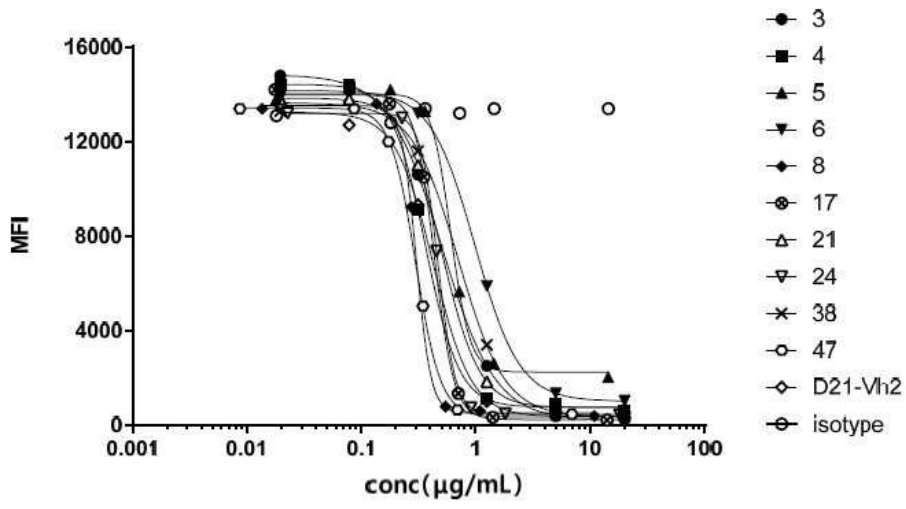


도면14



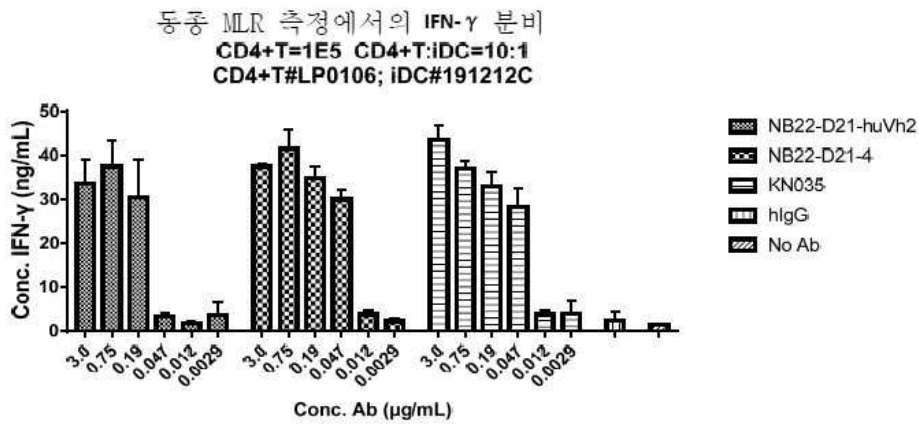
도면15

NB22-D21 분자의 약물 가능성이 변형된 후보 분자 용해액 샘플의 차단 활성 평가

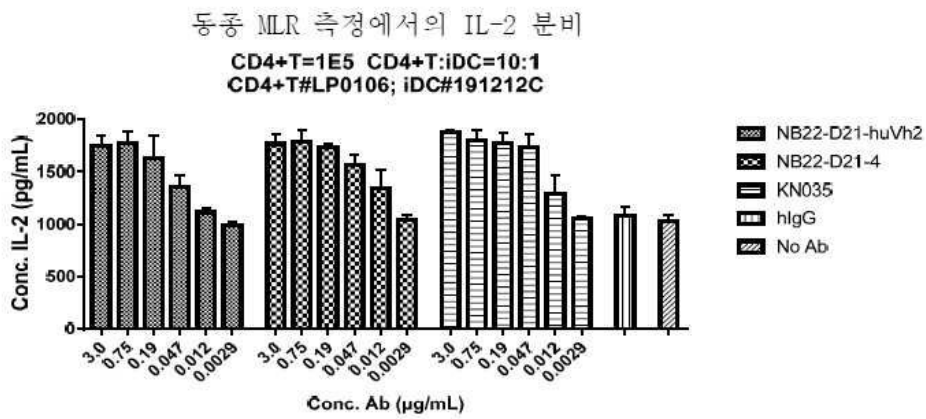


도면16

(A)

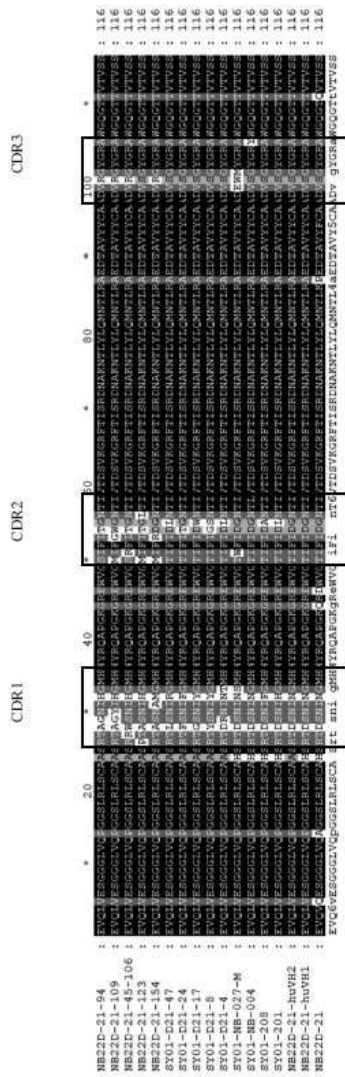


(B)





도면17



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> 상유생물의학(상해)유한회사(Sanyou Biopharmaceutical (Shanghai) Co., Ltd.)
- <120> PD-L1 결합 분자
- <130> IEC196121PCT
- <150> CN2019111044297.0
- <151> 2019-10-30
- <150> CN202010765530.0
- <151> 2020-07-31
- <160> 65
- <170> Patent In version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 1

Arg Thr Asp Ser Asn Ile Asn Gly Met His

1                    5                    10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 2

Thr Ile Phe Ile Asp Gly Asn Thr Ile

1                    5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 3

Asp Val Ser Gly Tyr Gly Arg Ala

1                    5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 4

Arg Thr Asp Ser Asn Ile His Gly Met His

1                    5                    10

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 5

Thr Ile Phe Ile Asp Leu Asn Thr Ile

1                   5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 6

Arg Thr Asp Ser Asn Ile Phe Gly Met His

1                   5                   10

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 7

Thr Ile Phe Ile Asp Ala Asn Thr Ile

1                   5

<210> 8

<211

> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 8

Thr Ile Phe Ile Asp Gly Asn Thr Leu

1                   5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 9

Asp Val Ser Gly Tyr Gly Arg Tyr

1                    5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 10

Arg Thr Asp Ser Asn Ile Asn Ser Met His

1                    5                    10

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 11

Thr Trp Phe Ile Asp Gly Asn Thr Ile

1                    5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 12

Asp Glu Trp Met Tyr Gly Arg Ala

1                    5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 13

Arg Thr Asp Arg Asn Ile Asn Thr Met His

1                    5                    10

<210>

14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 14

Arg Thr Tyr Ser Asn Ile Tyr Gly Met His

1                    5                    10

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 15

Thr Ile Phe Ile Gly Ser Asn Thr Ile

1                    5

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 16

Arg Thr Gly Ser Asn Ile Tyr Gly Met His

1                    5                    10

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 17

Thr Ile Phe Ile Asp Trp Asn Thr Ile

1                   5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 18

Arg Thr Phe Ser Asn Ile Phe Gly Met His

1                   5                   10

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 19

Thr Ile Phe Ile Thr Gly Asn Thr Ile

1                   5

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 20

Arg Thr Leu Ser Asn Ile Arg Gly Met His

1                   5                   10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 21

Arg Arg Trp Ser Asn Ile His Gly Met His



1                    5                    10

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 22

Ser Arg Phe Ile Thr Gly Asn Thr Ile

1                    5

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 23

Asp Val Arg Gly Tyr Gly Arg Ala

1                    5

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 24

Pro Thr Ala Ser Asn Ile His Gly Met His

1                    5                    10

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 25

Met Ile Phe Ile Thr Gly Leu Thr Ile

1                    5

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 26

Arg Thr Ala Ser Asn Ala Met Gly Met His

1                    5                    10

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 27

Met Ile Phe Arg Asp Gly Asn Thr Ile

1                    5

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 28

Arg Thr Ala Gly Asn Ile His Gly Met His

1                    5                    10

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 29

Ser Ile Phe Ile Thr Gly Asn Thr Ile

1                    5

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 30

Arg Thr Ala Gly Tyr Ile His Gly Met His

1                    5                    10

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 31

Met Ile Phe Gly Trp Gly Asn Thr Ile

1                    5

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 32

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Arg Cys Lys Ala

1                    5                    10

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 33

Lys Ile Leu Thr Thr Ser Gly Ser Thr Tyr

1                    5                    10

<210> 34

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 34

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

1 5 10 15

Phe Gln Tyr

<210> 35

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys Lys Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val

35 40 45

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

50 55 60

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

100 105 110

Gly Ala Phe Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 36

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 36

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

Gly Met His Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Trp Val  
                   35                    40                    45

Gly Thr Ile Phe Ile Asp Gly Asn Thr Ile Val Thr Asp Ser Val Lys  
                   50                    55                    60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65                    70                    75                    80

Gln Met Asn Thr Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala  
                   85                    90                    95

Ala Asp Val Ser Gly Tyr Gly Arg Ala Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val  
                   100                    105                    110

Thr Val Ser Ser  
                   115

<210> 37

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 37

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

Gly Met His Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Trp Val  
                   35                    40                    45

Gly Thr Ile Phe Ile Asp Gly Asn Thr Ile Val Thr Asp Ser Val Lys  
                   50                    55                    60

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

Ala Asp Val Ser Gly Tyr Gly Arg Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
                          100                      105                      110

Thr Val Ser Ser  
                          115

<210> 38

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 38

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

Gly Met His Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Trp Val  
                          35                      40                      45

Gly Thr Ile Phe Ile Asp Gly Asn Thr Ile Val Thr Asp Ser Val Lys  
                          50                      55                      60

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

Ala Asp Val Ser Gly Tyr Gly Arg Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
                          100                      105                      110

Thr Val Ser Ser  
                          115

<210> 39

<211> 116



<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 39

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

Gly Met His Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Trp Val  
                   35                    40                    45

Gly Thr Ile Phe Ile Asp Leu Asn Thr Ile Val Thr Asp Ser Val Lys  
                   50                    55                    60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65                    70                    75                    80

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

Ala Asp Val Ser Gly Tyr Gly Arg Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
                   100                    105                    110

Thr Val Ser Ser  
                   115

<210> 40

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 40

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

Gly Met His Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Trp Val  
                   35                    40                    45

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

Ala Asp Val Ser Gly Tyr Gly Arg Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 41

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 41

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

Gly Met His Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Trp Val  
 35 40 45

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

Ala Asp Val Ser Gly Tyr Gly Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 42

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 42

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

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

Ala Asp Glu Trp Met Tyr Gly Arg Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
                   100                    105                    110  
 Thr Val Ser Ser  
                   115

<210> 43

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 43

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

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

Ala Asp Val Ser Gly Tyr Gly Arg Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 44

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 44

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

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

Ala Asp Val Ser Gly Tyr Gly Arg Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 45

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 45

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

Gly Thr Ile Phe Ile Asp Trp Asn Thr Ile Val Thr Asp Ser Val Lys

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 46

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 46

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

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Thr Phe Ser Asn Ile Phe

20 25 30

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

35 40 45

Gly Thr Ile Phe Ile Thr Gly Asn Thr Ile Val Thr Asp Ser Val Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 47

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 47

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Thr Leu Ser Asn Ile Arg

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95



Ala Asp Val Ser Gly Tyr Gly Arg Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 48

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 48

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Arg Trp Ser Asn Ile His  
 20 25 30

Gly Met His Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Ser Arg Phe Ile Thr Gly Asn Thr Ile Val Thr Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80

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

Ala Asp Val Arg Gly Tyr Gly Arg Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 49

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 49

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

1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Pro Thr Ala Ser Asn Ile His  
                          20                    25                    30

Gly Met His Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Trp Val  
                          35                    40                    45

Gly Met Ile Phe Ile Thr Gly Leu Thr Ile Val Thr Asp Ser Val Lys  
                          50                    55                    60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65                    70                    75                    80

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

Ala Asp Val Ser Gly Tyr Gly Arg Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
                          100                    105                    110

Thr Val Ser Ser  
                          115

<210> 50

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 50

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Thr Ala Ser Asn Ala Met  
                          20                    25                    30

Gly Met His Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Trp Val  
                          35                    40                    45

Gly Met Ile Phe Arg Asp Gly Asn Thr Ile Val Thr Asp Ser Val Lys  
                          50                    55                    60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65                    70                    75                    80

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

85 90 95

Ala Asp Val Arg Gly Tyr Gly Arg Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 51

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 51

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Thr Ala Gly Asn Ile His

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ser Ile Phe Ile Thr Gly Asn Thr Ile Val Thr Asp Ser Val Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Asp Val Arg Gly Tyr Gly Arg Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 52

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 52

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Thr Ala Gly Tyr Ile His  
                   20                    25                    30

Gly Met His Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Trp Val  
                   35                    40                    45

Gly Met Ile Phe Gly Trp Gly Asn Thr Ile Val Thr Asp Ser Val Lys  
                   50                    55                    60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65                    70                    75                    80

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

Ala Asp Val Arg Gly Tyr Gly Arg Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
                   100                    105                    110

Thr Val Ser Ser  
                   115

<210> 53

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 53

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser  
                   20                    25

<210> 54

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 54

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Trp Val Gly

1                    5                    10

<210> 55

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 55

Val Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala

1                    5                    10                    15

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Lys Pro Glu Asp Thr

                  20                    25                    30

Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala

                  35

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR4

<400> 56

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1                    5                    10

<210> 57

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 57

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

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

                  20                    25

<210> 58

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 58

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Trp Val Gly

1                    5                    10

<210> 59

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 59

Val Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala

1                    5                    10                    15

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr

                  20                    25                    30

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala

                  35

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR4

<400> 60

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1                    5                    10

<210> 61

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 61

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser  
                          20                    25

<210> 62

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 62

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
                          20                    25

<210> 63

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 63

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val Ala

1                    5                    10

<210> 64

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 64

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

1                    5                    10                    15

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

                         20                    25                    30

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala



35

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR4

<400> 65

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1

5

10