

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022년 8월 25일 (25.08.2022)

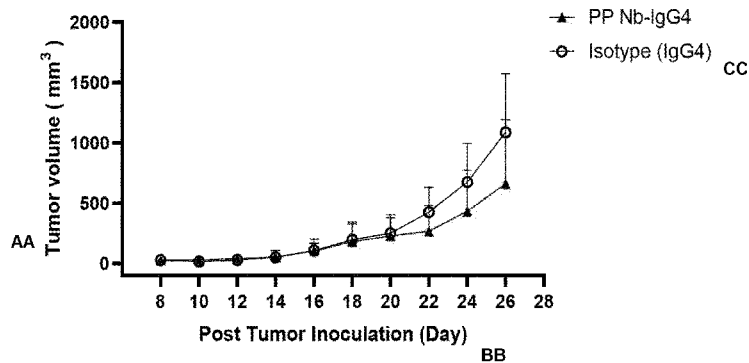


(10) 국제공개번호
WO 2022/177393 A1

- (51) 국제특허분류: *C07K 16/28* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2022/002529
- (22) 국제출원일: 2022년 2월 21일 (21.02.2022)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2021-0022807 2021년 2월 19일 (19.02.2021) KR
- (71) 출원인: (주)샤페론 (SHAPERON INC.) [KR/KR]; 06373 서울특별시 강남구 자곡로 174-10, 강남에이스타워 606호, Seoul (KR). 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 성승용 (SEONG, Seung Yong); 05507 서울특별시 송파구 올림픽로 435, 118동 2602호, Seoul (KR). 이상범 (LEE, Sang Beum); 06374 서울특별시 강남구 자곡로 101, 611동 602호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 김보정 (KIM, Bo Jung); 06735 서울특별시 서초구 강남대로 39길 15-9, 6층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: SINGLE DOMAIN ANTIBODY AGAINST PD-L1 AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: PD-L1에 대한 단일 도메인 항체 및 이의 용도



AA ... Volume tumoral (mm3)
BB ... Post inoculation tumorale (jour)
CC ... Isotype (IgG4)

(57) Abstract: The present invention relates to a single domain antibody against PD-L1 and use thereof. Particularly, a single domain antibody that specifically binds to PD-L1, which is an immune checkpoint protein, was produced and confirmed to have affinity to the immune antigen thereof and an anti-tumor effect, and thus, the single domain antibody can be effectively used as an immune checkpoint inhibitor in cancer immunotherapy.

(57) 요약서: 본 발명은 PD-L1에 대한 단일 도메인 항체 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 면역관문 단백질(immune checkpoint protein)인 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단일 도메인 항체를 제작하였고, 이의 면역 항원에 대한 친화성 및 항종양 효과를 확인하였으므로, 상기 단일 도메인 항체를 면역관문 억제제로 면역항암요법에 유용하게 이용할 수 있다.



WO 2022/177393 A1

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: PD-L1에 대한 단일 도메인 항체 및 이의 용도 기술분야

[1] 본 발명은 면역관문 단백질(immune checkpoint protein)인 PD-L1에 대한 단일 도메인 항체 및 이의 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 최근에 인체의 면역시스템을 이용해 새롭게 개발된 면역항암요법의 치료 효과가 입증되면서 기존의 화학치료제 및 표적치료제를 사용하였던 항암치료요법은 면역치료제를 이용하는 면역항암요법으로 변화하고 있다.

[4] 기본적으로 암환자의 면역세포는 암 항원에 대해 내성(tolerance)이 생겨서 암세포를 인식할 수는 있지만 기능적으로는 억제되어 있어서 암세포를 효과적으로 제거하지 못한다. 내성에 빠진 면역세포를 깨워서 활성화된 면역세포로 유도하여 암세포를 파괴하는 것이 면역치료의 핵심이다. 이러한 면역치료에는 IFN- γ , IL-2 등 사이토카인 치료제, 수지상세포를 이용한 암백신, T 세포를 이용한 세포치료제, 면역관문 단백질(immune checkpoint protein)을 차단하는 면역관문 억제제 (immune checkpoint inhibitor, ICI) 등이 있으며, 이러한 치료제를 통상적으로 면역항암제(immuno-oncology therapy)라고 부른다. 그 중에서도 국제적인 제약회사들이 경쟁적으로 개발하고 있는 면역항암제는 면역관문 억제제이다.

[5] 면역관문 단백질(immune checkpoint protein)은 세포막 단백질로서 면역세포의 분화, 증식, 활성을 억제한다. 구체적으로, 이 단백질은 대체로 활성화된 T 세포에서 발현되어서, T 세포의 증식, 사이토카인 분비, 세포독성을 감소시키고, T 세포의 과도한 활성을 억제하는 기능이 있기 때문에 co-inhibitory 분자라고도 불린다. 대표적으로 T 세포에는 co-inhibitory 수용체인 CTLA-4와 PD-1이 발현되어 있어서 각각의 리간드인 B7.1/2 및 PD-L1과의 결합을 통해 T 세포의 활성을 조절하게 된다. 한편, PD-L1은 암세포에서 발현되어 암 특이적인 T 세포를 비활성화시키고 세포사멸을 유도하여 T 세포의 면역공격으로부터 암세포를 보호해 주는 중요한 분자방패(molecular shield) 역할을 하고 있어서 암의 면역회피 기전이 되기도 한다. 또한, 암세포에 이소성(ectopic)으로 PD-L1이 발현된 암환자는 그렇지 않은 암환자에 비해 예후가 더 나쁜 것으로 보고되고 있다.

[6] 면역관문 억제제는 이러한 T 세포 억제에 관여하는 면역관문 단백질의 활성을 차단하여 T 세포를 활성화시켜 암세포를 공격하는 약제로서 대표적으로 CTLA-4, PD-1, PD-L1을 인식하는 항체를 사용한다. CTLA-4 억제제인 이피리무맙(ipilimumab (Yervoy))이 면역관문 억제제 중에서는 처음으로 전이

흑색종에 대한 2차 치료제로 2011년 FDA 승인을 획득하였다. 이후 2014년 PD-1 차단제인 니보루맵(nivolumab (Opdivo))과 펌브롤리주맵(pembrolizumab (Keytruda))이 전이 흑색종에 대해 각각 FDA 승인을 획득하였다. 이후 PD-L1에 대한 면역관문 억제제인 아테조리주맵(atezolizumab(Tecentriq))이 방광암에 대해서(2016년), 아베루맵(avelumab (Bavencio))이 피부암의 일종인 전이 머클세포암 치료에, 더바루맵(durvalumab (Imfinzi))이 방광암에 대해서 2017년에 FDA 승인을 획득하였다. 2018년에는 PD-1 저해제인 케미프리맵(cemiplimab(Libtayo))가 피부편평상피암에 대해 FDA 승인을 얻었다. 현재 이들 약제는 치료 적응증을 확대하면서 점점 더 많은 암종의 치료에 대해 FDA 승인을 얻고 있다. 2019년 기준 6종의 PD-1/PD-L1 저해제는 총 18개 암종에 대해 FDA 승인을 얻었다. 이외에도 B7-H4, ICOS, HVEM, PDL-2, PVRIG 등 면역조절단백질 등이 새로운 타겟으로 전임상시험에 진입하고 있다. 대부분의 이러한 치료제들은 T 세포상에 발현되어 있는 타겟을 표적으로 하고 있다.

- [7] 이렇게 T 세포 중심의 편향적인 타겟발굴 경향을 극복하기 위해 최근에는 대식세포, 수지상세포 등 myeloid 계열의 세포에서 발현되는 면역관문 단백질을 표적으로 하는 억제제들이 개발되고 있다. 이 중에 CSF1R, CD47, TLR7 등이 중요한 타겟으로 부상되고 있다.
- [8] T 세포의 활성을 억제시킴으로써 종양세포가 면역체계로부터 공격을 회피할수 있도록 하는 면역관문단백질의 하나인 PD-L1(Programmed Death-Ligand 1)은 림프계 및 비림프성 조직의 백혈구 및 비조혈(Nongematopoietic) 세포에서 주로 발현하며 대장암, 췌장암, 흑색종 및 자궁경부암 등 다양한 종양세포의 표면에서도 발현한다. 특히 활성화된 T 세포 표면에서 발현하는 PD-1(Programmed Death-1)과 상호작용하여 TCR-매개 T 세포 활성화(TCR mediated T-cell activation), 사이토카인 발현(Cytokine release) 및 T 세포의 증식(T-cell proliferation)을 억제함으로써 T 세포의 면역 반응을 부정적으로 조절한다.
- [9]
- [10] 이에, 본 발명자들은 면역관문 단백질을 타겟으로 하는 면역관문 억제제를 개발함으로써, 본 출원에 이르게 되었다.
- [11]
- [12] [선행기술문헌]
- [13] [특허문헌]
- [14] 미국 등록특허 제8,008,449호
- [15] [비특허문헌]
- [16] Pol Specenier (2016): Ipilimumab in melanoma, Expert Review of Anticancer Therapy.
- [17] DB Johnson, C Peng et al. Nivolumab in melanoma: latest evidence and clinical potential. Ther Adv Med Oncol 2015, Vol. 7(2) 97-106

[18] Liu J, Wang L, Zhao F, Tseng S, Narayanan C, Shura L, et al. (2015) Pre-Clinical Development of a Humanized Anti-CD47 Antibody with Anti-Cancer Therapeutic Potential. PLoS ONE 10(9): e0137345.

[19]

발명의 상세한 설명 기술적 과제

[20] 본 발명의 목적은 면역관문 단백질(immune checkpoint protein)인 PD-L1에 대한 단일 도메인 항체 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

[21]

과제 해결 수단

[22] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단일 도메인 항체(sdAb)를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

[23] 상기 sdAb가 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR1; 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR2; 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR3를 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.

[24] 본 발명의 일 양태에서, 상기 sdAb는 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 FR1; 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 FR2; 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 FR3; 및 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 FR4를 포함하는 VHH 도메인을 포함할 수 있으며, 일부 구현예에서, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

[25] 본 발명의 일 양태에서, 상기 sdAb는 적어도 1개 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있고, 상기 적어도 1개 이상의 아미노산 치환이 보존적 치환일 수 있으며, 아미노산의 비-유전자 코딩 아미노산 또는 합성 아미노산으로의 치환일 수 있다.

[26] 본 발명의 일 양태에서, 상기 sdAb는 단량체성 또는 다량체성일 수 있다. 다량체성일 경우 상기 sdAb 간 펩티드 링커를 통해 융합될 수 있고, 일부 구현예에서, 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

[27] 본 발명의 일 양태에서, 상기 sdAb가 Fc 단편에 융합된 중쇄-단독 항체(HCAb)를 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 HCAb는 서열번호 5 및 11 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

[28] 본 발명의 일 양태에서, 상기 HCAb는 단량체성 또는 다량체성일 수 있다.

[29] 본 발명의 일 양태에서, 상기 Fc 단편에 sdAb가 펩티드 링커를 통해 융합될 수 있고, 상기 Fc 단편은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4일 수 있다.

[30] 본 발명의 일 양태에서, 상기 HCAb는 적어도 1개 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있고, 상기 적어도 1개 이상의 아미노산 치환이 보존적 치환일 수 있으며, 아미노산의 비-유전자 코딩 아미노산 또는 합성 아미노산으로의 치환일

수 있다.

- [31] 본 발명의 일 양태에서, (a) 상기 sdAb를 포함하는 제 1 항원 결합 부분; 및 (b) 제 2 에피토프에 특이적으로 결합하는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는 항체를 제공한다.
- [32] 본 발명의 일 양태에서, 상기 항체는 이중특이적 또는 다중특이적일 수 있다.
- [33] 본 발명의 일 양태에서, 상기 제 2 항원 결합 부분은 제 1 항원 결합 부분과 펩티드 링커를 통해 서로 융합될 수 있고, 상기 제 2 항원 결합 부분은 전장 항체, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, 단일쇄 Fv(scFv), scFv-scFv, 미니바디, 디아바디 또는 제 2 sdAb일 수 있다.
- [34] 본 발명의 일 양태에서, 면역조정제, 사이토카인, 세포독성제, 화학요법제, 진단제, 항바이러스제, 항미생물제 또는 약물이 접합될 수 있다. 이에, 본 발명은 면역조정제, 사이토카인, 세포독성제, 화학요법제, 진단제, 항바이러스제, 항미생물제 또는 약물에 접합된 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 항체 접합체를 제공한다.
- [35] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는, 핵산 분자를 제공한다.
- [36] 또한, 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는, 발현 벡터를 제공한다.
- [37] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.
- [38] 또한, 본 발명은
- [39] (a) 항체가 발현되도록 하는 조건 하에 상기 숙주 세포를 배양하는 단계; 및
- [40] (b) 발현된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 회수하는 단계
- [41] 를 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생산하는 방법을 제공한다.
- [42] 또한, 본 발명은 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 상기 항체 접합체를 유효성분으로 함유하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 상기 항체 접합체를 약학적으로 유효한 양으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암 예방 또는 치료 방법; 및 암의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 상기 항체 접합체의 용도를 제공한다.
- [43] 본 발명의 일 양태에서, 상기 암은 흑색종, 폐암, 간암, 교세포종, 난소암, 대장암, 두경부암, 방광암, 신장세포암, 위암, 유방암, 전이암, 전립선암, 췌장암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 다발성 골수종, 백혈병, 림프종, 골수이형성증후군, 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 고립성 골수종 및 재생불량성 빈혈로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [44] 본 발명의 일 양태에서, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 더 포함할 수 있다.
- [45] 아울러, 본 발명은
- [46] (i) 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 시료를 접촉시키는 단계; 및

- [47] (ii) 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 PD-L1 간의 복합체 형성을
검출하거나 복합체의 양을 결정하는 단계를 포함하는,
[48] 시료에서 PD-L1을 검출하거나 PD-L1의 양을 결정하는 방법을 제공한다.
[49]

발명의 효과

- [50] 본 발명에서는 면역관문 단백질(immune checkpoint protein)인 PD-L1에
특이적으로 결합하는 단일 도메인 항체를 제작하였고, 이들의 면역 항원에 대한
친화성 및 항종양 효과를 확인하였으므로, 상기 단일 도메인 항체를 면역관문
억제제로 면역항암요법에 유용하게 이용할 수 있다.

[51]

도면의 간단한 설명

- [52] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 CHO-K1_PD-L1 세포주(PD-L1
항원의 발현을 유도한 CHO-K1 세포)와 항-PD-L1 HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1)를
농도별로 반응하여 세포 표면에서 발현하는 PD-L1 항원에 대한 결합능 (EC50)을
확인한 도이다.
- [53] 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 CHO-K1_PD-L1 세포주(PD-L1
항원의 발현을 유도한 CHO-K1 세포)와 PD-1 단백질의 결합 후 항-PD-L1
HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1)가 PD-L1/PD-1 상호작용에 미치는 억제능(IC50)을
확인한 도이다.
- [54] 도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 CHO-K1_PD-L1 세포주(PD-L1
항원의 발현을 유도한 CHO-K1 세포)와 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)를
농도별로 반응하여 세포 표면에서 발현하는 PD-L1 항원에 대한 결합능 (EC50)을
확인한 도이다.
- [55] 도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 CHO-K1_PD-L1 세포주(PD-L1
항원의 발현을 유도한 CHO-K1 세포)와 PD-1 단백질의 결합 후 항-PD-L1 2가
HCAb(PP Nb-IgG4)가 PD-L1/PD-1 상호작용에 미치는 억제능(IC50)을 확인한
도이다.
- [56] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)의
PD-L1/PD-1 상호작용 저해능을 CHO-K1_PD-L1 세포(PD-L1 단백질의 과발현은
유도한 CHO-K1 세포)와 PD-1이 발현하는 Jurkat 세포를 이용하여 확인한
도이다.
- [57] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)를
B16F10_PD-L1 세포주(PD-L1 항원의 발현을 유도한 종양세포)로 종양 형성을
유도한 C57BL/6 마우스에 복강투여 후 항종양 효과를 확인한 도이다.

[58]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [59] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게

실시할 수 있도록 본 발명의 실시형태를 들어 상세히 설명한다. 본 발명의 실시형태는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다. 따라서 본 발명의 실시형태는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 실시형태로 한정되는 것은 아니다.

[60]

[61] 본 발명에서, 용어 "에피토프"는 항체에 특이적 결합을 할 수 있는 단백질 결정요인을 의미한다. 에피토프는 일반적으로 분자, 예컨대 아미노산 또는 당 측쇄의 화학적 활성 표면 그룹화로 이루어지고 일반적으로 특이적 3차원 구조 특징, 뿐만 아니라 특이적 전하 특징을 갖는다.

[62]

용어 "치료"는 본원에 개시된 장애 또는 질환, 예를 들어 질환의 증상 또는 합병증을 늦추거나, 중단시키거나, 중지시키거나, 제어하거나, 정지시키거나, 완화하거나 또는 개선하는 것, 또는 그의 진행을 역전시키는 것일 수 있지만, 반드시 모든 질환 또는 장애 증상의 완전한 제거를 나타내는 것은 아닌 모든 과정을 의미한다.

[63]

용어 "예방"은 질환 또는 장애, 예를 들어 질환의 예방적 치료, 또는 질환 또는 장애의 발병 또는 진행을 지연시키는 것을 의미한다.

[64]

용어 "개체" 또는 "대상체"는, 비제한적으로, 인간, 소과, 말, 고양이, 개, 설치류, 또는 영장류를 포함하는, 포유동물을 지칭한다. 일부 구현예에서, 개체는 인간이다.

[65]

용어 "항체"는 이의 가장 넓은 의미로 사용되고, 이들이 원하는 항원-결합 활성을 나타내는 한, 비제한적으로 단클론성 항체, 다클론성 항체, 다중특이적 항체 (예를 들면, 이중특이적 항체), 전장 항체 및 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 다양한 항체 구조를 포괄한다. 용어 "항체"는 종래의 4-쇄 항체, 단일 도메인 항체, 및 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[66]

기본 4-쇄 항체 유닛은 2개의 동일한 경 (L) 쇠 및 2개의 동일한 중 (H) 쇠로 구성된 헤테로사량체성 당단백질이다. IgM 항체는 J 쇠로 불리는 추가의 폴리펩티드와 함께 기본 헤테로사량체 유닛들 중 5개로 이루어지고, 10개의 항원-결합 부위를 함유하는 반면, IgA 항체는 J 쇠와 조합으로 다가 집합체를 형성하기 위해 중합화할 수 있는 기본 4-쇄 유닛들 중 2-5개를 포함한다. IgG의 경우에, 4-쇄 유닛은 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각각의 L 쇠는 1개의 공유 디설파이드 결합에 의해 H 쇠에 연결되는 반면, 2개의 H 쇠는 H 쇠 아이소타입에 의존하여 하나 이상의 디설파이드 결합에 의해 서로에 연결된다. 각각의 H 및 L 쇠는 또한 규칙적으로 이격된 쇠간 디설파이드 브릿지를 갖는다. 각각의 H 쇠는 N-말단에서, α 및 γ 쇠의 각각에 대하여 가변 도메인 (VH) 이어서 3개의 불변 도메인 (CH) 그리고 μ 및 ϵ 아이소타입에 대하여 4개의 CH 도메인을 갖는다. 각각의 L 쇠는 N-말단에서, 이의 다른 단부에 가변 도메인 (VL) 이어서 불변 도메인을 갖는다. VL은 VH와 정렬되고 CL은 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)과

정렬된다. VH 및 VL의 짝짓기는 단일 항원-결합 부위를 함께 형성한다. 임의의 척추동물 종으로부터 L쇄는, 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기반하여, 카파 및 람다로 불리는, 2개의 분명히 구별되는 유형들 중 하나로 배정될 수 있다. 그들의 중쇄의 불변 도메인 (CH)의 아미노산 서열에 의존하여, 면역글로불린은 상이한 클래스 또는 아이소타입으로 배정될 수 있다. 면역글로불린의 5개의 클래스가 있다: α , δ , ϵ , γ 및 μ , 각각으로 지정된 중쇄를 갖는, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM. γ 및 α 클래스는 CH 서열 및 기능에서 상대적으로 소수의 차이에 근거하여 서브클래스로 추가 분할되고, 예를 들면, 인간은 하기 서브클래스를 발현시킨다: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2.

- [67] 용어 "중쇄-단독 항체" 또는 "HCAb"는, 중쇄를 포함하지만 4-쇄 항체에서 일반적으로 발견된 경쇄가 부족한 기능성 항체를 지칭한다.
- [68] 용어 "단일-도메인 항체", "나노바디" 또는 "sdAb"는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)를 갖는 단일 항원-결합 폴리펩티드를 지칭한다. sdAb 단독은 상응하는 CDR-함유 폴리펩티드와 짝짓기 없이 항원에 결합할 수 있다. 일부 경우에, 단일-도메인 항체는 낙타과 HCAb로부터 조작되고, 그들의 중쇄 가변 도메인은 "VHH" (중쇄 항체의 중쇄의 가변 도메인)으로서 본원에서 지칭된다. 기본 VHH는 N-말단부터 C-말단까지 하기 구조를 갖는다:
FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, 여기에서 FR1 내지 FR4는 프레임워크 영역 1 내지 4 각각을 지칭하고, CDR1 내지 CDR3은 상보성 결정 영역 1 내지 3을 지칭한다.
- [69] 항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 "VH" 및 "VL" 각각으로서 지칭될 수 있다. 이들 도메인은 일반적으로 (동일한 클래스의 다른 항체에 비하여) 항체의 최대 가변성 부분이고 항원 결합 부위를 함유한다. 낙타과 종으로부터 중쇄-단독 항체는 "VHH"로서 지칭되는 단일 중쇄 가변 영역을 갖는다.
- [70] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정한 분절이 항체들 중 서열에서 광범위하게 상이하다는 사실을 지칭한다. V 도메인은 항원 결합을 매개하고 이의 특정 항원에 대하여 특정 항체의 특이성을 정의한다. 하지만, 가변성은 가변 도메인의 전체 범위에 걸쳐서 고르게 분포되지 않는다. 대신에, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 둘 모두에서 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 초가변 영역 (HVR)로 불리는 3개의 분절에서 농축된다. 가변 도메인의 더욱 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)로 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은, 루프 연결을 형성하는, 3개의 CDR로 연결된, 베타-시트 구성을 주로 채택하는, 그리고 일부 경우에 베타-시트 구조의 일부를 형성하는, 4개의 FR 영역을 포함한다. 각각의 쇠에서 CDR는 FR 영역에 의해 아주 근접하여 함께 유지되고, 다른 쇠로부터 CDR는 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다 (Kabat, Elvin A., Sequence of

Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)을 참고한다). 불변 도메인은 항원에 대한 항체의 결합에 직접적으로 관여되지 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체-의존적 세포 독성에서 항체의 참여를 나타낸다.

- [71] 용어 "불변 도메인"은, 항원-결합 부위를 함유하는, 면역글로불린의 다른 부분, 가변 도메인에 비하여 더 많은 보존된 아미노산 서열을 가지고 있는 면역글로불린 분자의 부분을 지칭한다. 불변 도메인은 중쇄의 CH1, CH2 및 CH3 도메인 (집합적으로, CH) 및 경쇄의 CHL (또는 CL) 도메인을 함유한다.
- [72] 용어 "전장 항체", "온전한 항체", 또는 "전체의 항체"는, 항체 단편과 대조적으로, 이의 실질적으로 온전한 형태로 항체를 지칭하기 위해 호환적으로 사용된다. 특이적으로, 전장 4-쇄 항체는 Fc 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 가진 것들을 포함한다. 전장 중쇄-단독 항체는 중쇄 가변 도메인 (예컨대 VHH) 및 Fc 영역을 포함한다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들면, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 일부 경우에, 온전한 항체는 하나 이상의 이펙터 기능을 가질 수 있다.
- [73] "항체 단편" 또는 "항원-결합 단편"은 온전한 항체의 한 부분, 바람직하게는 온전한 항체의 항원 결합 및/또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 비제한적으로 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 (scFv) 분자; 단일 도메인 항체 (예컨대 VHH), 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. "Fv"는 완전 항원-인식 및 -결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 단편은 치밀한, 비-공유 회합에서 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 영역 도메인의 이량체로 이루어진다. "단일-쇄 Fv" 또한 약칭 "sFv" 또는 "scFv"는 단일 폴리펩티드 쇠에 연결된 VH 및 VL 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 바람직하게는, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위하여 원하는 구조를 형성할 수 있도록 하는 VH와 VL 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. "디아바디"는 V 도메인의 쇠내가 아닌 쇠간 짝짓기가 달성되도록 VH와 VL 도메인 사이의 짧은 링커 (약 5-10개의 잔기)를 가진 sFv 단편을 작제하고, 그것에 의해 2가 단편, 즉, 2개의 항원-결합 부위를 갖는 단편을 초래함으로써 제조된 작은 항체 단편을 지칭한다. 이중특이적 디아바디는 2개의 항체의 VH 및 VL 도메인이 상이한 폴리펩티드 쇠에서 존재하는 2개의 "교차" sFv 단편의 헤테로이량체이다.
- [74] 용어 "인간화된 항체"는 "키메라 항체"의 서브셋으로서 사용된다.
- [75] 비-인간 (예를 들면, 라마 또는 낙타과) 항체의 "인간화된" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 일부 구현예에서, 인간화된 항체는 수령체의 (이하에서 정의된) CDR로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화성, 및/또는 수용력을 갖는 비-인간 중 (공여체 항체) 예컨대 마우스, 랫트, 토끼, 낙타, 라마, 알파카, 또는 비-인간 영장류의 CDR로부터의 잔기로 대체되는 인간 면역글로불린 (수령체 항체)이다.

- [76] 일부 사례에서, 인간 면역글로불린의 프레임워크 ("FR") 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화된 항체는 수령체 항체에서 또는 공여체 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능, 예컨대 결합 친화성을 추가로 개선하기 위해 실시될 수 있다.
- [77] 용어 "초가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는, 본원에서 사용된 경우 서열에서 초가변성이고/거나 구조적으로 정의된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 단일 도메인 항체는 3개의 HVR (또는 CDR): HVR1 (또는 CDR1), HVR2 (또는 CDR2), 및 HVR3 (또는 CDR3)을 포함한다. HVR3 (또는 CDR3)은 3개의 HVR의 최고 다양성을 표시하고, 항체에 미세 특이성 부여에서 고유의 역할을 한다고 알려져 있다. 예를 들면, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996)을 참고한다.
- [78] 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 카바트 시스템에 의해 정의된 바와 같이 초가변 영역을 지칭하는데 사용된다. Kabat, Elvin A., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)을 참고한다. 카바트 상보성 결정 영역 (CDR)는 서열 가변성에 근거하고 가장 흔하게 사용된다.
- [79] 용어 "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 정의된 바와 같이 HVR 잔기 이외의 가변-도메인 잔기이다.
- [80] 용어 "특이적"은 항원의 특정 에피토프에 대하여 항원 결합 단백질 (예컨대 sdAb)의 선택적 인식을 지칭한다.
- [81] 천연 항체는, 예를 들어, 단일특이적이다. 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "다중특이적"은 항원 결합 단백질이 폴리에피토프 특이성을 갖는 (즉, 1개의 생물학적 분자에서 2개의, 3개의, 또는 초과, 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있거나 2개의, 3개의, 또는 초과, 상이한 생물학적 분자에서 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는) 것을 나타낸다. 본원에서 사용된 바와 같이 "이중특이적"은 항원 결합 단백질이 2개의 상이한 항원-결합 특이성을 갖는 것을 나타낸다.
- [82] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "단일특이적"은 동일한 항원의 동일한 에피토프를 결합시키는 하나 이상의 결합 부위 각각을 갖는 항원 결합 단백질을 나타낸다.
- [83] 용어 "가"는 항원 결합 단백질에서 결합 부위의 명시된 수의 존재를 나타낸다. 예를 들어, 용어 "2가" "3가", "4가", "5가" 및 "6가"는 항원 결합 단백질에서 2개의 결합 부위, 3개의 결합 부위, 4개의 결합 부위, 5개의 결합 부위, 및 6개의 결합 부위의 존재를 나타낸다.
- [84] "항체 이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 그들 생물학적 활성을 지칭하고, 항체 아이소타입으로 다양하다. 항체 이펙터 기능의 예는 하기를 포함한다: C1q 결합

및 보체 의존적 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC); 식균작용; 세포 표면 수용체 (예를 들면, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화. "보체 의존적 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하에서 표적 세포의 용해를 지칭한다. 고전적 보체 경로의 활성화는 보체 시스템의 제 1 성분 (C1q)의 그들의 동족 항원에 결합되는 (적당한 서브클래스의) 항체에 대한 결합에 의해 개시된다. "항체-의존적 세포-매개된 세포독성" 또는 ADCC는 특정한 세포독성 세포 (예를 들면, 자연 살해 (NK) 세포, 중성구 및 대식세포)에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합되어 있는 분비된 Ig가 이들 세포독성 이펙터 세포를 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합시키고 후속으로 표적 세포를 세포독소로 사멸시키는 세포독성의 한 형태를 지칭한다.

- [85] 본원에서 용어 "Fc 영역" 또는 "단편 결정화가능 영역"은, 천연-서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함하는, 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는데 사용된다. 본원에서 기재된 항체에서 사용하기 위한 적합한 천연-서열 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 및 IgG4를 포함한다.
- [86] "결합 친화성"은 일반적으로 분자 (예를 들면, 항체)의 단일 결합 부위와 이의 결합 파트너 (예를 들면, 항원) 사이의 비-공유 상호작용의 총계의 강도를 지칭한다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에서 사용된 바와 같이, "결합 친화성"은 결합 쌍의 구성원 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화성을 지칭한다. 결합 친화성은 K_d , K_{off} , K_{on} , 또는 K_a 로 표시될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 평형 해리 상수 " K_D " 또는 " K_d "는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 상수를 지칭하고, 평형에서 항체 분자의 용액에 존재하는 모든 항체-결합 도메인의 이분의 일을 차지하는데 필요한 항원의 농도를 기재하고, M의 단위로 표현된다. K_D 의 측정은 모든 결합 제제가 용액내인 것을 전제한다. 해리 상수 (K_D 또는 K_d)는 항원에 대한 항체의 친화성을 나타내는 지표로서 사용된다. 예를 들어, 쉬운 분석은 다양한 마커 제제들로 마킹된 항체를 이용하는 스캐차드(Scatchard) 방법에 의해, 뿐만 아니라 키트에 부착된 사용자의 매뉴얼 및 실험 작동 방법에 따른, 일반의약품, 측정 키트 이용에 의해 가능하다. 이들 방법을 사용하여 유래될 수 있는 K_D 값은 M (Mols)의 단위로 표현된다.
- [87] 펩티드, 폴리펩티드 또는 항체 서열에 대하여 "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성" 및 "상동성"은, 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해, 필요하다면, 서열 정렬 및 갭 도입 후, 그리고 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 치환 고려 없이, 특이적 펩티드 또는 폴리펩티드 서열에서 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에서 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성의 결정 목적을 위한 정렬은 당업계에서 기술 내에 있는 다양한 방식으로, 예를 들어, 공공연하게 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 MEGALIGN™ (DNATAR) 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 당업계에서 숙련가는, 비교될 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여 정렬 측정을 위한 적당한 파라미터를

결정할 수 있다.

[88]

[89] 본 발명은 (이후 "항-PD-L1 sdAb"로 지칭되는) PD-L1에 특이적으로 결합하는 단일 도메인 항체(sdAb)를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 예컨대, 항-PD-L1 sdAb, 항-PD-L1 중쇄-단독 항체(HCAb) (예를 들면, 인간 면역글로불린 G (IgG)의 결정성 단편(Fc 단편)에 항-PD-L1 sdAb가 융합된 항-PD-L1 sdAb-Fc 융합 단백질), 또는 다른 sdAb, 전장 4-쇄 항체 또는 이의 항원 결합 단편 (예를 들면, Fab 또는 scFv)에 항-PD-L1 sdAb가 융합된 다중특이적 항원 결합 단백질, 그리고 이의 제조 및 용도에 관한 것이다.

[90]

[91] 이에, 본 발명은 항-PD-L1 sdAb를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.

[92] 본 발명에서, 상기 항-PD-L1 sdAb를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 항-PD-L1 sdAb 또는 이의 항원-결합 단편일 수 있다.

[93] 본 발명에서, 상기 항-PD-L1 sdAb는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR1; 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR2; 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR3를 포함한다.

[94] 상기 CDR 서열은 표 6에서 제공된다.

[95] 본 발명에서, 상기 항-PD-L1 sdAb는 FR 영역에 대하여 임의의 적합한 서열을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 FR 서열은 하기 표 1 내지 표 4로 표시되는 아미노산 서열일 수 있다.

[96] [표 1]

No	FR1	서열번호
1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	6

[98] [표 2]

No	FR2	서열번호
1	MSWVRQAPGKGLEWVSD	7

[100] [표 3]

No	FR3	서열번호
1	DYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYC	8

[102] [표 4]

No	FR4	서열번호
1	RGQGTQVTVSS	9

[104] 보다 구체적으로, 상기 항-PD-L1 sdAb는 하기 FR1, FR2, FR3 및 FR4를 포함할 수 있다: 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 FR1;

[105] 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 FR2;

- [106] 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 FR3; 및
- [107] 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 FR4.
- [108] 본 발명에서, 상기 항-PD-L1 sdAb는 상기 FR 영역을 포함하는 VHH 도메인을 포함할 수 있다.
- [109] 구체적으로, 상기 항-PD-L1 sdAb는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열, 또는 상기 아미노산 서열에 적어도 80%(예컨대 적어도 임의의 80%, 58%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 서열 상동성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다.
- [110] 본 발명에서, 상기 항-PD-L1 sdAb는 단량체성 또는 다량체성일 수 있다. 또한, 다량체성일 경우, 예를 들면, 본원에서 기재된 항-PD-L1 sdAb와 상이한 항-PD-L1 sdAb를 포함하는, 다중특이적 및 다가 (예컨대 이중특이적 및 2가)일 수 있고, 또는 동일한 항-PD-L1 sdAb의 2개 이상의 카피를 포함하는, 단일특이적 및 다가 (예를 들면, 2가)일 수 있다. 또한, sdAb 간 펩티드 링커를 통해 융합될 수 있다. 일부 구현예에서, 펩티드 링커는 인접한 도메인이 서로에 대하여 자유롭게 움직이도록 가요성 잔기 (예컨대 글리신 및 세린)을 포함한다. 예를 들어, 글리신-세린 더블릿은 적합한 펩티드 링커일 수 있다. 또한, 펩티드 링커는 임의의 적합한 길이일 수 있다. 일부 구현예에서, 펩티드 링커는 적어도 약 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100개 또는 더 많은 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서 상기 항-PD-L1 sdAb는 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열, 또는 상기 아미노산 서열에 적어도 80%(예컨대 적어도 임의의 80%, 58%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 서열 상동성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다.
- [111] 본 발명에서, 상기 항-PD-L1 sdAb는 PD-L1의 에피토프에 결합한다.
- [112] 또한, 상기 항-PD-L1 sdAb와 PD-L1 사이의 결합의 K_D 는 10^{-6} M 내지 10^{-12} M, 10^{-6} M 내지 10^{-11} M, 10^{-6} M 내지 10^{-10} M, 10^{-6} M 내지 10^{-9} M, 또는 10^{-6} M 내지 10^{-8} M일 수 있다.
- [113] 또한, 상기 항-PD-L1 sdAb의 EC_{50} 은 FACS 분석에서 500 nM 미만일 수 있고, 구체적으로 0.1 nM 내지 500 nM, 0.1 nM 내지 400 nM, 0.1 nM 내지 300 nM, 0.1 nM 내지 200 nM, 0.1 nM 내지 100 nM, 0.1 내지 50 nM, 0.1 내지 10 nM, 1 nM 내지 500 nM, 1 nM 내지 400 nM, 1 nM 내지 300 nM, 1 nM 내지 200 nM, 1 nM 내지 100 nM, 1 내지 50 nM 또는 1 내지 10 nM일 수 있다.
- [114]
- [115] 본 발명에 따른 단일 도메인 항체(sdAb)는 중쇄-단독 항체로부터의 중쇄 가변 도메인 (예를 들면, 낙타과에서 VHH (중쇄 항체의 중쇄의 가변 도메인)), 종래의 4-쇄 항체로부터 유래된 경쇄, 단일 도메인 (예컨대 VH 또는 VL)이 자연적으로 결합된 결합 분자, 인간화된 중쇄 단독 항체, 인간 중쇄 분절을 발현시키는 유전자이식 마우스 또는 랫트에 의해 생산된 인간 단일 도메인 항체, 및 항체로부터 유래된 것들 이외 조작된 도메인 및 단일 도메인 스캐폴드를

비제한적으로 포함할 수 있다. sdAb는 마우스, 랫트, 인간, 낙타, 라마, 칠성장어, 어류, 상어, 염소, 토끼, 및 소과를 비제한적으로 포함하는 임의의 종으로부터 유래될 수 있다. 또한 낙타과 이외 종으로부터의 자연 발생 sdAb 분자를 포함할 수 있다.

- [116] 또한, sdAb는 경쇄가 결합된 중쇄 항체로서 공지된 자연 발생 단일 도메인 항원 결합 분자로부터 유래된다. 그와 같은 단일 도메인 분자는, 예를 들어 WO 94/04678 및 Hamers-Casterman, et al., (1993) Nature 363:446-448에서 개시된다. 경쇄가 자연적으로 결합된 중쇄 분자로부터 유래된 가변 도메인은 본원에서 VHH로서 공지되어 이것을 4개의 쇠 면역글로불린의 종래의 VH와 구별시킨다. 그와 같은 VHH 분자는 낙타과 종, 예를 들어, 낙타, 라마, 비쿠냐, 단봉 낙타, 알파카 및 과나코에서 생성된 항체로부터 유래될 수 있다. 낙타과 이외의 다른 종은 경쇄가 자연적으로 결합된 중쇄 분자를 생산할 수 있고, 그와 같은 VHH는 본원의 범위 내이다
- [117] 또한, sdAb는 재조합, CDR-그래프팅, 인간화, 낙타화, 탈-면역화 및/또는 시험관내 생성될 수 있다 (예를 들면, 파아지 디스플레이에 의해 선택된다). 일부 구현예에서, 프레임워크 영역의 아미노산 서열은 프레임워크 영역에서 특이적 아미노산 잔기의 "낙타화"에 의해 변경될 수 있다. 낙타화는 중쇄 항체의 VHH 도메인에서 상응하는 위치(들)에 발생하는 아미노산 잔기의 하나 이상에 의해 종래의 4-쇄 항체로부터 (자연 발생) VH 도메인의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기의 하나 이상의 대체 또는 치환을 지칭하며, 당업계에 공지된 방식으로 수행될 수 있다.
- [118] 또한, sdAb는 인간 중쇄 분절을 발현시키는 유전자이식 마우스 또는 랫트에 의해 생산된 인간 sdAb일 수 있다. 예를 들면, 특허 US20090307787A1, US8,754,287, US20150289489A1, US20100122358A1, 및 WO 2004/049794를 참고한다.
- [119] 또한, 특정 항원 또는 표적에 대한 자연 발생 VHH 도메인은 낙타과 VHH 서열의 (미접촉 또는 면역) 라이브러리로부터 획득될 수 있다. 그와 같은 방법은 상기 항원 또는 표적을 이용하는 그와 같은 라이브러리, 또는 그 자체로 공지된 하나 이상의 스크리닝 기술을 이용하는 임의 적어도 일부분, 단편, 항원성 결정요인 또는 에피토프 스크리닝을 관여시킬 수 있거나 아닐 수 있다. 그와 같은 라이브러리 및 기술은 예를 들어 특허 WO 99/37681, WO 01/90190, WO 03/025020 및 WO 03/035694에서 기재된다. 대안적으로, (미접촉 또는 면역) VHH 라이브러리로부터 유래된 개선된 합성 또는 반-합성 라이브러리, 예컨대 예를 들어 특허 WO 00/43507에서 기재된 바와 같이, 기술 예컨대 무작위 돌연변이 유발 및/또는 CDR 서플링에 의해 (미접촉 또는 면역) VHH 라이브러리로부터 획득된 VHH 라이브러리는 사용될 수 있다.
- [120] 또한, sdAb는 종래의 4-쇄 항체로부터 생성될 수 있다. 예를 들어, Ward et al., Nature 1989 Oct. 12; 341 (6242): 544-6, Holt et al., Trends Biotechnol., 2003,

21(11):484-490; 특허 WO 06/030220; 및 WO 06/003388를 참고한다.

- [121] 또한, 본 발명에 따른 sdAB는 키메라 항체일 수 있다. 특정한 키메라 항체는, 예를 들면, 특허 US4,816,567; 및 Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984))에서 기재된다. 일부 구현예에서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역 (예를 들면, 낙타과 종, 예컨대 라마로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함할 수 있다. 또한, 키메라 항체는 인간화될 수 있다. 전형적으로, 비-인간 항체는 인간화되어 인간에 대한 면역원성을 감소시키는 반면, 친계 비-인간 항체의 특이성 및 친화성을 유지시킨다. 일반적으로, 인간화된 항체는 HVR, 예를 들면, CDR, (또는 이의 부분)이 비-인간 항체로부터 유래되고, FR (또는 이의 부분)이 인간 항체 서열로부터 유래되는 하나 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화된 항체는 임의로 또한 인간 불변 영역의 적어도 한 부분을 포함할 것이다. 일부 구현예에서, 인간화된 항체에 있어서 일부 FR 잔기는, 예를 들면, 항체 특이성 또는 친화성을 회복 또는 개선하기 위해, 비-인간 항체 (예를 들면, HVR 잔기가 유래되는 항체)로부터 상응하는 잔기로 치환된다.
- [122]
- [123] 본 발명에서, 상기 항-PD-L1 sdAb를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 항-PD-L1 HCAb 또는 이의 항원-결합 단편일 수 있다.
- [124] 구체적으로, 항-PD-L1 HCAb는 본원에 기재된 항-PD-L1 sdAb가 하나 이상의 CH2 및/또는 CH3 도메인, 예를 들면 Fc 단편에 융합된 것이다.
- [125] 상기 CH2 및/또는 CH3 도메인은 면역글로불린으로부터 유래된다. 상기 면역글로불린은 IgA, IgD, IgE, IgG 또는 IgM일 수 있고, 구체적으로 IgG 일 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 HCAb는 IgG, 예컨대, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 Fc 단편을 포함할 수 있고, 상기 Fc 단편은 인간 Fc, 예컨대 인간 IgG1 (hIgG1) Fc, hIgG2 Fc, hIgG3 Fc 또는 hIgG4 Fc일 수 있다.
- [126] 상기 항-PD-L1 HCAb는 단량체성 또는 다량체성일 수 있다. 또한, 다량체성일 경우, 예를 들면, 본원에서 기재된 항-PD-L1 sdAb와 상이한 항-PD-L1 sdAb를 포함하는, 다중특이적 및 다가 (예컨대 이중특이적 및 2가)일 수 있고, 또는, 동일한 항-PD-L1 sdAb의 2개 이상의 카피를 포함하는, 단일특이적 및 다가 (예를 들면, 2가)일 수 있다.
- [127] 본 발명에서, 상기 항-PD-L1 sdAb 및 CH2 및/또는 CH3 도메인, 구체적으로 Fc 단편은 펩티드 링커를 융합될 수 있다. 상기 펩티드 링커의 길이, 가요성 정도 및/또는 다른 특성은, 하나 이상의 특정 항원 또는 에피토프에 대하여 비제한적으로 친화성, 특이성 또는 결합능을 포함하는, 특성에서 일부 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 더 긴 펩티드 링커는 2개의 인접한 도메인이 서로를 입체적으로 방해하지 않는다는 것을 보장하도록 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 펩티드 링커는 인접한 도메인이 서로에 대하여 자유롭게 움직이도록 가요성 잔기 (예컨대 글리신 및 세린)을 포함한다. 예를 들어, 글리신-세린 더블릿은 적합한 펩티드 링커일 수 있다. 또한, 펩티드 링커는

임의의 적합한 길이일 수 있다. 일부 구현예에서, 펩티드 링커는 적어도 약 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100개 또는 더 많은 아미노산 길이이다.

- [128] 또한, 상기 펩티드 링커는 자연 발생 서열, 또는 비-자연 발생 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 중쇄-단독 항체의 힌지 영역으로부터 유래된 서열이 링커로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 특허 WO 1996/34103를 참고한다. 일부 구현예에서, 상기 펩티드 링커는 hIgG1 힌지, hIgG2 힌지, hIgG3 힌지, hIgG4 힌지 또는 이들의 변이체일 수 있다.
- [129] 본 발명에서, 상기 항-PD-L1 HCAb는 서열번호 5 및 11 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열, 또는 상기 아미노산 서열에 적어도 80%(예컨대 적어도 임의의 80%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 서열 상동성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다.
- [130]
- [131] 본 발명에서, 상기 항-PD-L1 sdAb를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 다른 sdAb, 전장 4-쇄 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 항-PD-L1 sdAb가 융합된 다중특이적 항원 결합 단백질(MABP) (예를 들어, (이하, 항-PD-L1 BABP로 지칭되는) 항-PD-L1 sdAb가 융합된 이중특이적 항원 결합 단백질(BABP)) 또는 이의 항원-결합 단편일 수 있다.
- [132] 상기 항-PD-L1 BABP는 (a) 본원에 기재된 항-PD-L1 sdAb를 포함하는 제 1 항원 결합 부분; 및 (b) 제 2 에피토프에 특이적으로 결합하는 제 2 항원 결합 부분을 포함한다.
- [133] 상기 제 2 에피토프는 PD-L1 이외 항원, 또는 PD-L1에서의 제 2 에피토프일 수 있다.
- [134] 상기 제 2 항원 결합 부분은 전장 항체, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, 단일쇄 Fv(scFv), scFv-scFv, 미니바디, 디아바디 또는 제 2 sdAb일 수 있다. 또한, 제 2 항원 결합 부분은 VH를 포함하는 중쇄 및 VL을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 제 1 항원 결합 부분은 중쇄의 N-말단, 경쇄의 N-말단, Fc 영역의 N-말단, 중쇄의 C-말단, 또는 경쇄의 C-말단에서 제 2 항원 결합 부분에 융합될 수 있다. 일부 구현예에서, 제 2 항원 결합 부분은 Fab 또는 scFv를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 제 1 항원 결합 부분은 Fab 또는 scFv의 C-말단에서 제 2 항원 결합 부분에 융합될 수 있다. 일부 구현예에서, 제 2 항원 결합 부분은 전장 4-쇄 항체를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 제 1 항원 결합 부분은 펩티드 링커를 통해 제 2 항원 결합 부분에 융합될 수 있다. 일부 구현예에서, 제 2 항원 결합 부분은 Fc 영역, 예컨대 IgG1 Fc, IgG2 Fc, IgG3 Fc 또는 IgG4 Fc을 포함할 수 있다.
- [135] 상기 항-PD-L1 MABP는 적어도 2개의 상이한 에피토프를 특이적으로 결합시키는 적어도 2개의 항원 결합 부분을 포함한다. 적어도 2개의 항원 결합 부분 중 일부는, MABP가 2개의 상이한 에피토프용 결합 부위를 갖는 한, 동일할 수 있다. 또한, 항-PD-L1 MABP는 본원에서 기재된 항-PD-L1 sdAb를 각각

포함하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8개 또는 초과 상이한 항원 결합 부분 중 어느 하나를 포함할 수 있다.

[136] 또한, 항-PD-L1 MABP는 PD-L1의 제1 에피토프 및/또는 제2 에피토프에 대하여 가수의 임의의 적합한 수, 및 특이성의 임의의 적합한 수를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-L1 MABP는 PD-L1에 대하여 2가, 3가, 4가, 5가, 6가, 또는 더 높은 가수일 수 있다. 일부 구현예에서, MABP는 삼중특이적일 수 있고, 사중특이적일 수 있다.

[137] 본 발명에 따른 다중특이적 항체의 제조 기술은, 비제한적으로, 상이한 특이성을 갖는 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 제조합 공-발현 (예를 들면, Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)); WO 93/08829; Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), 및 "놉-인-홀" 엔지니어링 (예를 들면, 특허 US5731168)을 포함한다. 다중-특이적 항체는 또한 항체 Fc-헤테로이량체성 분자 제조용 정전기 조향 효과의 조작 (WO 2009/089004A1); 2개 이상의 항체 또는 단편의 가교결합 (예를 들면, 특허 US4676980, 및 Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); 이중-특이적 항체를 생산하기 위한 류신 지퍼의 이용 (예를 들면, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); 이중특이적 항체 단편 제조용 "디아바디" 기술의 이용 (예를 들면, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); 및 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체의 이용 (예를 들면, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); 및, 예를 들면, Tutt et al., *J. Immunol.* 147: 60 (1991)에서 기재된 바와 같이 삼중특이적 항체의 제조; 및 탠덤 단일-도메인 항체를 포함하는 폴리펩티드의 창출 (예를 들면, 특허 US20110028695; 및 Conrath et al., *J. Biol. Chem.*, 2001; 276(10):7346-50)에 의해 실시될 수 있다.

[138]

[139] 본 발명에서, 상기 항-PD-L1 sdAb를 포함한 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 아미노산 서열 변이체를 포함한다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 인코딩하는 핵산 서열에의 적당한 변형 도입에 의해, 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 그와 같은 변형은, 예를 들어, 항체의 아미노산 서열 내에서 잔기의 결실, 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 결실, 삽입, 및 치환의 임의의 조합은 최종 작제물에 이르도록 만들어질 수 있고, 단 최종 작제물은 원하는 특징, 예를 들면, 항원-결합을 보유한다. 일부 구현예에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 그와 같은 변형이 항원을 결합시키는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한 하나 이상의 추가 변 영역(HVR) 내에서 발생할 수 있다. 예를 들어, 결합 친화성을 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변형은 HVR에서 실시될 수 있다. 그와 같은 변형은 HVR "핫스팟" 또는 CDR의 외부일 수 있다.

[140] 또한, 상기 아미노산 치환은 적어도 1개(예컨대, 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 아미노산 치환일 수 있다. 또한, 상기 적어도 1개의 아미노산 치환은 보존적 치환일 수 있고, 비-유전자 코딩 아미노산 또는 합성 아미노산으로의 치환일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 아미노산 치환은 CDR

영역에 있을 수 있고, CDR1, CDR2 및/또는 CDR3에서 적어도 1개(예컨대, 임의의 1, 2, 3, 또는 4개)의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 아미노산 치환은 FR 영역에 있을 수 있고, FR1, FR2, FR3 및/또는 FR4에서 적어도 1개(예컨대, 임의의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개)의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

- [141] 또한, 상기 아미노산 서열 삽입은 1개의 잔기부터 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드까지 길이 범위의 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 가진 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드 또는 (예를 들면, ADEPT의 경우) 효소에 대한 항체의 N- 또는 C-말단에의 융합을 포함할 수 있다.
- [142] 또한, 하나 이상의 아미노산 변형은 본원에서 제공된 항-PD-L1 sdAb를 포함한 항체 또는 이의 항원-결합 단편 (예를 들면, 항-PD-L1 HCAb, 또는 항-PD-L1 MABP)의 Fc 영역에 도입되어, 그것에 의해 Fc 영역 변이체를 생성할 수 있다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (예를 들면 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들면, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc)을 포함할 수 있다.
- [143]
- [144] 본 발명에서, 상기 항-PD-L1 sdAb를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 진단 모이어티 또는 생체적합성 조절제와 연결되거나, 그에 융합되거나, 그에 접합되거나 (예를 들어, 공유 또는 비-공유), 또는 달리 그와 회합될 수 있다. 예를 들어, 펩티드 또는 폴리펩티드(예를 들어, 생물독소, 바이오마커, 정제 태그 등), 단백질, 중합체, 핵산 분자, 소분자, 모방제, 합성 약물, 무기 분자, 유기 분자 또는 방사성동위원소가 접합 또는 회합될 수 있다.
- [145] 또한, 상기 항-PD-L1 sdAb를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 생물학적 분자(예를 들어, 펩티드 또는 뉴클레오티드), 소분자, 형광단, 또는 방사성동위원소일 수 있는 진단제 또는 검출가능한 작용제, 마커 또는 리포터에 접합 또는 회합될 수 있다. 표지된 조절자는 PD-L1과 관련된 질환, 예컨대 암의 발생 또는 진행을 모니터링하는데, 또는 본원에 개시된 항체를 포함하는 특정한 요법의 효능을 결정하거나 (즉 테라그노시스), 또는 향후의 치료 과정을 결정하는 임상 시험 절차의 일부로서 유용할 수 있다. 이러한 마커 또는 리포터는 또한 본원에 개시된 항체를 정제하는데 유용할 수 있다.
- [146] 또한, 상기 항-PD-L1 sdAb를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 면역조절제, 사이토카인, 세포독성제, 화학요법제, 진단제, 항바이러스제, 항미생물제 또는 약물에 접합될 수 있다. 이에, 본 발명은 면역조절제, 사이토카인, 세포독성제, 화학요법제, 진단제, 항바이러스제, 항미생물제 또는 약물에 접합된 본 발명에 따른 항-PD-L1 sdAb를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 항체 접합체를 제공한다.

[147]

[148] 또한, 본 발명은 본원에 개시된 항-PD-L1 sdAb를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.

[149] 또한, 본 발명은 (a) 항체가 발현되도록 하는 조건 하에 상기 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 발현된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생산하는 방법을 제공한다.

[150] 본 발명에서, 본원에 개시된 항-PD-L1 sdAb를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여 (예를 들어, 항체 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리되고 서열분석될 수 있다. 단리되고 서브클로닝된 하이브리도마 세포 (또는 파지 또는 효모 유래 콜로니)는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로서의 역할을 할 수 있다. 보다 특히, 단리된 DNA (변형될 수 있음)는 항체의 제조를 위해 불변 및 가변 영역 서열을 클로닝하는데 사용될 수 있다.

[151] 하나의 예시적인 방법은 선택된 세포로부터의 RNA의 추출, cDNA로의 전환, 및 항체 특이적 프라이머를 사용한 PCR에 의한 증폭을 수반한다. 적합한 프라이머는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 본원에 예시된 바와 같이 많은 상업적 공급원으로부터 용이하게 이용가능하다. 조합 라이브러리의 스크리닝에 의해 단리된 재조합 인간 또는 비-인간 항체를 발현시키기 위해, 항체를 코딩하는 DNA를 재조합 발현 벡터 내로 클로닝하고, 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모, 및 박테리아를 포함한 숙주 세포 내에 도입된다. 일부 구현예에서, 달리 목적하는 구축물을 생산하지 않는 원숭이 COS 세포, NS0 세포, 차이나이즈 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 골수종 세포 내로 조정자가 도입되어 그에 의해 발현된다.

[152] 본 발명에서, 상기 핵산 분자는 벡터 내에, 적절한 경우에 핵산의 발현을 제어하는 프로모터와 함께 존재한다. 상기 벡터는 그의 가장 일반적인 의미로 사용되고, 핵산이 예를 들어 원핵 및/또는 진핵 세포 내로 도입되고 적절한 경우에 게놈 내로 통합될 수 있게 하는, 핵산을 위한 임의의 중간 비히클을 포함한다. 이러한 종류의 벡터는 바람직하게는 세포 내에서 복제되고/거나 발현된다. 벡터는 플라스미드, 파지미드, 박테리오파지 또는 바이러스 게놈을 포함할 수 있다. 상기 플라스미드는 일반적으로 염색체 DNA와 독립적으로 복제할 수 있는 염색체외 유전 물질 구축물, 통상적으로 원형 DNA 듀플렉스에 관한 것이다.

[153] 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 방법을 사용하여 항체 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 제어 신호를 포함하는 발현 벡터를 구축할 수 있다. 이들 방법은, 예를 들어, 시험관내 재조합 DNA 기술, 합성 기술, 및 생체내 유전자 재조합을 포함한다.

- [154] 본 발명에서, 상기 숙주 세포 또는 재조합 숙주 세포는 발현 벡터가 도입된 세포를 의미한다. 재조합 숙주 세포 및 숙주 세포는 특정한 대상 세포뿐만 아니라 이러한 세포의 자손도 의미한다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 후속 세대에서 특정 변형이 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은 사실상 모세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본원에 사용된 용어 숙주 세포의 범주 내에 포함된다. 이러한 세포는 상기 기재된 바와 같은 벡터를 포함할 수 있다.
- [155] 또한, 관련 기술분야에서 인식되는 분자 생물학 기술 및 현재의 단백질 발현 방법론을 사용하여, 본원에 개시된 항체의 실질적인 양이 생산될 수 있다. 보다 구체적으로, 이러한 항체를 코딩하는 핵산 분자는 다양한 유형의 숙주 세포를 포함한 널리 공지되고 상업적으로 입수가 가능한 단백질 생산 시스템 내로 통합되어, 전임상, 임상, 또는 상업적인 양의 목적하는 제약 제품을 제공할 수 있다. 일부 구현예에서, 항체를 코딩하는 핵산 분자는 선택된 숙주 세포 내로의 효율적인 통합 및 후속적인 항체의 높은 발현 수준을 제공하는 벡터 또는 발현 벡터 내로 조작된다.
- [156] 바람직하게는 본원에 개시된 항체를 코딩하는 핵산 분자 및 이들 핵산 분자를 포함하는 벡터는 적합한 포유동물, 식물, 박테리아 또는 효모 숙주 세포의 형질감염에 사용될 수 있지만, 원핵 시스템이 또한 사용될 수 있다. 형질감염은 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 임의의 공지된 방법에 의해 이루어질 수 있다. 이종 폴리뉴클레오티드를 포유동물 세포 내로 도입하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 덱스트란-매개 형질감염, 인산칼슘 침전, 폴리브렌-매개 형질감염, 원형질체 융합, 전기천공, 리포솜 내 폴리뉴클레오티드(들)의 캡슐화, 및 DNA의 핵 내로의 직접 미세주사를 포함한다. 또한, 핵산 분자를 바이러스 벡터에 의해 포유동물 세포 내로 도입할 수 있다. 포유동물 세포를 형질전환하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 식물 세포를 형질전환하는 방법이 또한 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 아그로박테리움-매개 형질전환, 바이올리스틱 형질전환, 직접 주사, 전기천공, 및 바이러스 형질전환을 포함한다. 박테리아 및 효모 세포를 형질전환하는 방법이 또한 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다.
- [157] 많은 상업적으로 입수가 가능한 다양한 숙주-발현 벡터 시스템이 본원에 개시된 항체를 발현시키는데 사용될 수 있다. 이러한 숙주-발현 시스템은 관심 코딩 서열이 발현되고 후속해서 정제될 수 있는 비히클을 나타낼 뿐만 아니라, 적절한 뉴클레오티드 코딩 서열로 형질전환되거나 형질감염된 경우에 본 발명의 분자를 계내 발현할 수 있는 세포를 나타낸다. 이러한 시스템은 조정자 코딩 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 미생물, 예컨대 박테리아 (예를 들어, 이. 콜라이(E. coli), 비. 서브틸리스(B. subtilis), 스트렙토미세스(streptomyces)); 조정자 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질감염된 효모 (예를 들어,

사카로미세스(Saccharomyces), 피키아(Pichia)); 조정자 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어, 바클로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 재조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어, 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염되거나 또는 조정자 코딩 서열을 함유하는 재조합 플라스미드 발현 벡터 (예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질감염된 식물 세포 시스템 (예를 들어, 니코티아나(Nicotiana), 아라비도시스(Arabidopsis), 좁개구리밥, 옥수수, 밀, 감자 등); 또는 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래되거나 (예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 (예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터) 프로모터를 함유하는 재조합 발현 구축물을 보유하는 포유동물 세포 시스템 (예를 들어, COS, CHO, BHK, 293, 3T3 세포)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[158] 본원에 개시된 항체가 재조합 발현 또는 본원에 개시된 다른 기술 중 어느 하나에 의해 생산되었으면, 이는 면역글로불린의 정제에 대해 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해, 또는 보다 일반적으로 단백질의 정제에 대한 임의의 다른 표준 기술에 의해 정제될 수 있다.

[159]

[160] 또한, 본 발명은 본원에 개시된 항-PD-L1 sdAb를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 항체 접합체를 유효성분으로 함유하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[161] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효량의 본원에 개시된 항-PD-L1 sdAb를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 항체 접합체를 포함하는 약학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[162] 또한, 본 발명은 암의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 본원에 개시된 항-PD-L1 sdAb를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 항체 접합체의 용도를 제공한다.

[163] 본 발명에서, 상기 암은 면역관문 단백질의 활성을 차단하여 T 세포를 활성화시키는 것이 필요한 암으로, 예컨대 흑색종, 폐암, 간암, 교세포종, 난소암, 대장암, 두경부암, 방광암, 신장세포암, 위암, 유방암, 전이암, 전립선암, 췌장암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 다발성 골수종, 백혈병, 림프종, 골수이형성증후군, 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 고립성 골수종 및 재생불량성 빈혈로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[164] 본 발명에서, 상기 항-PD-L1 sdAb를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 항체 접합체에 대한 내용은 전술한 바와 동일하므로, 구체적인 설명은 상기 내용을 원용하고,

이하에서는 약학적 조성물 및 용도의 특유한 구성에 대해서만 설명하도록 한다.

[165]

[166] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본원에 기재된 1종 이상 (예를 들어, 2 또는 3종)의 항-PD-L1 sdAb를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함할 수 있다.

[167] 본 발명에 따른 약학적 조성물을 개체, 구체적으로 암 환자에 투여함으로써, 암을 예방 또는 치료할 수 있다.

[168] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본원에 기재된 항체의 형태, 의도된 전달 방식, 및 수많은 다른 변수에 따라, 관련 기술분야에서 인식되는 기술을 사용하여 목적하는 바와 같이 제제화될 수 있다. 또한, 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고 투여를 용이하게 하거나 또는 전달을 위해 제약상 최적화된 제제로 활성 화합물을 가공하는 것을 보조하는 비교적 불활성 물질인 부형제 및 보조제를 포함하는 적합한 제약상 허용되는 담체를 함유하도록 제제화될 수 있다. 예를 들어, 비히클, 보조제, 및 희석제를 포함한 다양한 제약상 허용되는 담체는 수많은 상업적 공급원으로부터 용이하게 입수가 가능하다. 또한, 제약상 허용되는 보조 물질 분류, 예컨대 pH 조정제 및 완충제, 조성 조정제, 안정화제, 습윤제 등이 또한 입수가 가능하다. 특정의 비제한적 예시적인 담체는 염수, 완충 염수, 덱스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올, 및 그의 조합을 포함한다.

[169] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 경장, 비경구 또는 국소 투여를 위해 제제화될 수 있다. 사실상, 모든 3가지 유형의 제제를 동시에 사용하여 활성 성분의 전신 투여를 달성할 수 있다. 비경구 및 비-비경구 약물 전달을 위한 부형제 뿐만 아니라 제제가 관련 기술분야에 공지되어 있다. 비경구 투여에 적합한 제제는 수용성 형태의 활성 화합물, 예를 들어, 수용성 염의 수용액을 포함한다. 또한, 유성 주사 현탁액에 적절한 활성 화합물의 현탁액이 투여될 수 있다. 적합한 친지성 용매 또는 비히클은 지방 오일, 예를 들어, 참깨 오일, 또는 합성 지방산 에스테르, 예를 들어, 에틸 올레에이트 또는 트리글리세리드를 포함한다. 수성 주사 현탁액은 현탁액의 점도를 증가시키는 물질을 함유할 수 있고, 예를 들어, 소듐 카르복시메틸 셀룰로오스, 소르비톨, 및/또는 덱스트란을 포함한다. 임의로, 현탁액은 또한 안정화제를 함유할 수 있다. 또한 리포솜을 사용하여 세포로의 전달을 위해 작용제를 캡슐화할 수 있다.

[170] 경장 투여에 적합한 제제는 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐, 환제, 코팅된 정제를 비롯한 정제, 엘릭시르, 현탁액, 시럽 또는 흡입제 및 그의 제어 방출 형태를 포함한다.

[171] 일반적으로, 본원에 개시된 항체는 이를 필요로 하는 대상체에게 경구, 정맥내, 동맥내, 피하, 비경구, 비강내, 근육내, 심장내, 뇌실내, 기관내, 협측, 직장, 복강내, 피내, 국소, 경피, 및 척추강내, 또는 달리 이식 또는 흡입에 의한 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 경로에 의해 생체내 투여될 수 있다. 투여의 적절한 제제 및 경로는 의도된 용도 및 치료 요법에 따라 선택될 수 있다.

- [172] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 암의 치료 또는 예방을 위한 약학적으로 유효량으로 투여된다. 상기 약학적으로 유효량은 의사 또는 다른 임상시에 의해 추구되는, 대상체에서 생물학적 또는 의학적 반응을 도출할 항체 또는 이를 포함하는 약학적 조성물의 양을 의미한다. 또한, 예방 및/또는 치료 효과를 갖는 요법의 양을 달성하기 위해 특정 빈도로 다중 용량의 항체 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 투여할 수 있다.
- [173] 상기 약학적으로 유효량은 전형적으로 치료될 대상체의 체중, 그의 신체 상태, 치료될 상태의 광범위함, 및 치료될 대상체의 연령에 따라 좌우된다. 일반적으로, 본원에 개시된 항체는 용량당 약 10 ng/kg 체중 내지 약 100 mg/kg 체중 범위, 약 50 µg/kg 체중 내지 약 5 mg/kg 체중 범위, 약 100 µg/kg 체중 내지 약 10 mg/kg 체중 범위, 약 100 µg/kg 체중 내지 약 20 mg/kg 체중 범위, 0.5 mg/kg 체중 내지 약 20 mg/kg 체중 범위의 양으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 항체는 적어도 약 100 µg/kg 체중, 적어도 약 250 µg/kg 체중, 적어도 약 750 µg/kg 체중, 적어도 약 3 mg/kg 체중, 적어도 약 5 mg/kg 체중, 또는 적어도 약 10 mg/kg 체중의 용량으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [174] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약 100 mg 내지 약 10,000 mg의 용량, 약 200 mg 내지 약 9,000 mg의 용량, 약 300 mg 내지 약 8,000 mg 용량, 약 400 mg 내지 7,000 mg 용량, 500 mg 내지 5,000 mg 용량으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [175] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 통상적으로 환자에게 다수회 투여된다. 예시적인 치료 요법은 2주마다 1회, 1개월 1회, 또는 3 내지 6개월마다 1회 투여를 수반한다. 예를 들어, 환자는 사이클로서 4주마다, 예를 들어 28일마다 1회 항체를 (예를 들어, 정맥내 제제로서) 제공받을 수 있다. 투여 빈도는 환자에서의 항체의 약동학적 프로파일에 따라 조정될 수 있다. 예를 들어, 항체의 반감기는 2주 투여 빈도를 필요로 할 수 있다. 일부 방법에서, 상이한 결합 특이성을 갖는 2종 이상의 항체가 동시에 투여될 수 있고, 이러한 경우에 투여되는 각각의 항체의 투여량은 제시된 범위 내에 속한다.
- [176] 투여량 및 빈도는 환자에서의 항체의 반감기에 따라 달라진다. 일반적으로, 인간 항체가 가장 긴 반감기를 나타내고, 그 다음으로 인간화 항체, 키메라 항체, 및 비인간 항체이다. 투여량 및 투여 빈도는 치료가 예방적인지 또는 치료적인지에 따라 달라질 수 있다.
- [177] 치료 요법의 지속기간은 치료될 질환, 환자의 연령 및 상태, 환자의 질환의 병기 및 유형, 환자가 치료에 어떻게 반응하는지 등에 좌우된다. 임상시는 요법의 효과를 면밀하게 관찰하고 필요에 따라 임의의 조정을 행할 수 있다. 작용제가 조합되어 사용되는 경우에, 2종 이상의 치료제는 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 투여되고, 즉 본원에 개시된 항체는 제 2 치료제를 투여하기 전에, 제 2 치료제와 공동으로, 또는 제 2 치료제의 투여에 후속하여 투여될 수 있다.

[178]

[179] 아울러, 본 발명은

[180] (i) 본 발명에 개시된 항-PD-L1 sdAb를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 시료를 접촉시키는 단계; 및

[181] (ii) 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 PD-L1 간의 복합체 형성을 검출하거나 복합체의 양을 결정하는 단계를 포함하는,

[182] 시료에서 PD-L1을 검출하거나 PD-L1의 양을 결정하는 방법을 제공한다.

[183] 본 발명에서, 상기 항-PD-L1 sdAb를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 항체 접합체에 대한 내용은 전술한 바와 동일하므로, 구체적인 설명은 상기 내용을 원용한다.

[184] 본 발명에서, 상기 시료는 세포 시료, 즉 암세포 같은 세포들을 포함하는 시료일 수 있다.

[185]

[186] 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편을 이용하여 PD-L1 또는 PD-L1 발현 세포들의 검출 또는 PD-L1 또는 PD-L1 발현 세포들의 양의 결정할 수 있다. PD-L1과 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편 간의 복합체의 양을 검출하거나 또는 결정함으로써 PD-L1 또는 PD-L1 발현 세포들이 검출되거나 또는 PD-L1 또는 PD-L1 발현 세포들의 양이 결정된다. 복합체의 형성은 PD-L1 또는 PD-L1 발현 세포들의 존재를 나타낸다. 그러한 양의 검출 또는 결정은 많은 방법들, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편을 이용하는 면역검출을 포함하지만 이에 한정되지 않는 방법들로 실시될 수 있다. 펩타이드들 또는 단백질들을 검출하기 위해 항체들을 이용하는 방법들은 잘 알려져 있으며 ELISA, 경쟁적 결합 어세이들, 및 이와 유사한 방법을 포함한다. 일반적으로, 그러한 어세이들은 검출을 위해 제공하는 표지, 예를 들어 지시인자 (indicator) 효소들, 방사성표지들, 형광단들, 또는 상자성 입자들에 직접적으로 또는 간접적으로 결합된 타겟 펩타이드 또는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체 단편을 이용한다. 본 발명의 방법들은 PD-L1 레벨 또는 PD-L1 발현 세포들의 레벨의 정량적 및/또는 정성적 평가 (evaluations), 예를 들어 절대적 및/또는 상대적 평가를 가능하게 한다.

[187]

[188] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[189] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[190]

[191] <실시예 1> 면역 및 채혈

[192] 면역 항원으로 인간 PD-L1 단백질을 면역 보조제(GERBU)와 혼합하여 1마리의 알파카에 3회에 걸쳐 근육주사를 통해 면역하였다. 3차에 걸쳐 면역을 진행하였고, 마지막 면역 후 14일째 알파카로부터 10 ml씩 채혈하여 ELISA를

통해 면역 반응을 분석하였다. 항체 생성 여부는 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 면역 항원을 코팅버퍼를 이용하여 96웰 마이크로플레이트에 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 코팅하였다. 96웰 마이크로플레이트는 PBST로 3회 세척 후, 비특이적 결합을 억제하기 위하여 5% 스킴 밀크(skim milk)를 상온에서 2시간 동안 처리하여 블로킹(blocking)하였다. 이후 PBST로 3회 세척 후, 면역 전(day 0), 면역 후 14일(day 14), 28일(day 28), 42일(day 42)에 확보한 혈청 시료를 단계별 희석 농도로 처리하였다. 이후 96웰 마이크로플레이트는 PBST로 5회 세척 후, goat anti-Llama IgG HRP 항체를 상온에서 1시간 동안 반응하였고 TMB 반응으로 면역 항원에 결합된 항체 여부를 확인하였다.

[193]

[194] <실시예 2> 라이브러리 제작 및 평가

[195] 상기 <실시예 1>에서 확인한 면역 항원에 결합하는 단일도메인 항체를 코딩하는 유전자 증폭을 통해 라이브러리를 구축하였다. 라이브러리 구축을 위해 혈액으로부터 피콜(Ficoll)을 이용하여 말초혈액 단핵세포(PBMC)를 분리하였다. 분리된 말초혈액 단핵세포(PBMC)로부터 추출한 총 RNA(Total RNA)로부터 특이 프라이머(specific primer)를 이용하여 단일도메인 항체를 코딩하는 유전자 단편을 증폭하고, pComb3x vector에 클로닝하였다. 제작된 면역 라이브러리의 크기는 5.4×10^8 이었다.

[196]

[197] <실시예 3> 라이브러리 증폭

[198] 상기 <실시예 2>에서 제작한 면역 라이브러리를 XL1-blue 균주에 형질전환(transformation)하였다. 형질전환한 XL1-blue 균주는 2% 글루코스, 100 $\mu\text{g/ml}$ 암피실린을 함유한 10 ml의 2x YT 배지에 첨가하여 37°C 진탕교반기에서 배양하였다. OD₆₀₀에서 흡광도가 0.5가 될 때까지 배양하고 M13K07 파아지(Invitrogen)를 1×10^{11} pfu/ml가 되도록 첨가하였다. 이후 37°C에서 30분간 정지배양 후 37°C 진탕교반기에서 200 rpm으로 30분 추가 배양하였다. 배양액은 상온, 4,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 이후 100 $\mu\text{g/ml}$ 암피실린, 50 $\mu\text{g/ml}$ 카나마이신을 함유한 2x YT 배지 10 ml를 첨가하여 배양액의 펠렛을 재부유하고 30°C 진탕배양기에서 250 rpm으로 하룻밤 동안 배양하였다. 이후 4°C, 4,000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 상등액은 PEG 침전법을 이용하여 침전하였고 4°C, 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 펠렛은 PBS로 재부유하였으며 4°C, 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 새로운 튜브에 옮겨 사용하기 전까지 4°C에서 보관하였다.

[199]

[200] <실시예 4> 바이오패닝(bio-panning)

[201] 면역 항원에 특이적인 단일도메인 항체를 선별하기 위해 96웰 마이크로플레이트에 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 코팅버퍼를 이용하여 면역 항원을 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 코팅하였다. 단일도메인 항체를 선별하기 위한

사용될 라이브러리(상기 <실시예 3>의 라이브러리)는 96-웰 마이크로플레이트에 분주하여 상온에서 30분간 반응하였다. 이후 새로운 웰에 라이브러리를 옮기고 상온에서 30분간 반응하는 작업을 4회 반복하였다. 이러한 작업은 마이크로플레이트 웰에 비특이적으로 결합하는 라이브러리를 감소시키기 위해 실시하였다. 라이브러리는 1.7 ml 튜브에 옮기고 사용하기 전까지 4°C에서 보관하였다. 면역 항원이 코팅된 마이크로플레이트는 PBST로 5회 세척한 뒤 5% 스킵 밀크를 첨가하여 상온에서 2시간 동안 블로킹하였다. 이후 PBST로 5회 세척한 뒤 비특이적 결합물이 감소된 라이브러리를 바인딩 용액(2.5% 스킵 밀크, 0.5% tween 20)과 함께 5×10^{12} virions/well으로 분주하여 상온에서 30분간 반응하였다. 이후 세척 용액(PBS, 0.5% tween 20)으로 10회 세척 후 PBST로 3회 추가 세척하였다. 면역 항원에 특이적으로 결합된 단일도메인 항체는 웰당 5 μ g 면역 항원을 첨가한 뒤 상온, 500 rpm으로 30분간 반응하여 선택적으로 용출시켰다. 용출된 파아지는 대수증식기의 XL-1 blue 세포에 감염시킨 뒤, 2x YT 한천 배지에 도말하였다. 두 번째 선별을 위한 패닝을 위해 위와 동일한 조건 하에서 반복하였다. 한천배지에 생성된 단일 파아지 클론은 각각 증폭하여 FACS를 이용하여 스크리닝하였다.

[202]

[203] <실시예 5> 파아지 스크리닝

[204] Expi-CHO 세포에서 면역 항원의 일시적 과발현을 유도하기 위해 면역 항원을 암호화하는 유전자를 pCMV6-GFP vector에 삽입하여 pCMV6-면역 항원-GFP 플라스미드를 구축하였다. Expi-CHO 세포는 DPBS로 세척한 뒤 상온, 1,200 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 2% 스킵 밀크로 세포를 재부유하여 4°C에서 30분간 블로킹하였다. 세포는 상온, 1200 rpm에서 3분간 원심분리하여 상등액을 제거한 뒤 DPBS로 2회 세척하였고, 96 웰 마이크로플레이트에 3×10^5 cells/100 μ l/well이 되도록 분주하였다. 각 웰에 단일클론 파아지를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응한 뒤 DPBS로 2회 세척하였다. 세포에 파아지에 특이적으로 결합하는 항체(M13 major coat protein Alexa Flour 647(Santacruz))를 분주하고 빛을 차단한 채로 4°C에서 30분간 반응한다. 세포는 DPBS로 2회 세척 후 새로운 DPBS로 재부유하여 Accuri C6(BD) 장비를 이용하여 FACS 분석하였다. FACS 시스템을 이용하여 스크리닝된 클론을 선별하고, 염기서열분석을 진행하였다.

[205]

[206] <실시예 6> 인간 IgG Fc 도메인이 융합된 단일 도메인 항체의 발현 및 정제

[207] <6-1> 인간 IgG1 Fc 도메인이 융합된 1가 단일 도메인 항체의 발현 및 정제

[208] 상기 <실시예 5>에서 선별한 클론은 TGEX-Fc(IgG1) 발현 벡터에 클로닝하였다. 인간 IgG1 Fc 도메인이 융합된 단일도메인 항체의 발현을 위해 생존률 95~99%의 Expi-CHO 세포를 계수하여 7×10^6 세포를 25 ml의 배양배지(Expi-CHO expression medium (Gibco))에 첨가하였고, 8% CO₂가

유지되는 37°C 진탕 배양기에서 125 rpm으로 하룻밤 동안 배양하였다. 이후 80 μ l의 ExpiFectamine™ CHO Reagent(Gibco, 100033021)와 920 μ l의 OptiPRO™ medium 혼합액에 인간 IgG1 Fc 도메인이 융합된 단일도메인 항체를 코딩하는 20 μ g의 플라스미드 DNA와 1 ml의 OptiPRO™ medium 혼합액을 첨가하여 상온에서 5분간 반응한 뒤 배양된 세포에 첨가하였다. 세포는 8% CO₂가 유지되는 진탕배양기에서 125 rpm으로 20시간 배양하였다. 이후 인간 IgG1 Fc 도메인이 융합된 단일 도메인 항체의 발현을 강화시키는 150 μ l의 ExpiFectamine™ CHO enhancer(Gibco)와 6 ml의 ExpiCHO Feed(Gibco)를 넣고 5% CO₂가 유지되는 32°C 진탕배양기에서 125 rpm으로 5일간 배양하였다. 배양된 세포는 4°C에서 4,000 rpm으로 30분간 원심분리하였고, 상등액을 0.2 μ m 실린지 필터를 이용하여 필터링하였다. 이후 HiTrap protein G HP column(GE Healthcare)에 상등액을 로딩하고, PBS로 세척한 뒤 IgG elution buffer(Thermo)를 이용하여 인간 IgG1 Fc 도메인이 융합된 단일도메인 항체를 column으로 부터 용리하였다. 용리된 시료는 1M Tris-HCl(pH 9.0)을 첨가하여 중화한 뒤 사용하기 전까지 4°C에서 보관하였다.

[209]

[210] <6-2> 인간 IgG4 Fc 도메인이 융합된 PD-L1 항원 특이적 2가 단일 도메인 항체의 발현 및 정제

[211] 상기 <실시예 5>에서 선별한 클론을 2개의 G2S 링커 (GGSGGS)를 이용하여 연결함으로써 2가 단일 도메인 항체를 제작하였다. 상기 2가 단일 도메인 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드는 유전자 합성(마크로젠, 대한민국)을 통해 확보하였다. 인간 IgG4 Fc 도메인이 융합된 단일도메인 항체의 발현 및 정제를 위해 합성된 유전자는 TGEX-Fc(IgG4) 발현벡터에 클로닝하였다. 이후, 상기 실시예 <6-1>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 발현 및 정제하였다.

[212]

[213] <실시예 7> FACS를 이용한 인간 IgG Fc 도메인이 융합된 단일 도메인 항체와 면역 항원의 결합능 평가

[214] 상기 <실시예 6>에서 정제한 항-PD-L1 HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1), 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)와 면역 항원의 결합능을 FACS를 통해 확인하였다.

[215] 구체적으로, CHO-K1_PD-L1 세포주(PD-L1 항원이 과발현되는 CHO-K1 세포)를 DPBS로 세척한 뒤 상온, 1,200 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 2% 스킵 밀크로 세포를 재부유하여 4°C에서 30분간 블로킹하였다. 세포는 상온, 1,200 rpm에서 3분간 원심분리하여 상등액을 제거한 뒤 DPBS로 2회 세척하였다. 이후 각 웰에 3×10⁵ cells/100 μ l/well로 세포를 분주한 뒤, 항-PD-L1 HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1), 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)를 각각 농도별로 처리하였고, 음성대조군으로 isotype control 항체를 사용하였다. 세포는 4°C에서 1시간 동안 반응한 뒤, DPBS로 2회 세척하였다. 이후, 인간 Fc 도메인에 특이적으로 결합하는 항체(Anti-human IgG Fc APC 항체(Biolegend))를

처리하고 빛을 차단한 채로 4°C에서 30분간 반응하였다. 세포는 DPBS로 2회 세척 후 100 μ l의 DPBS로 재부유하여 Accuri C6 (BD) 장비를 이용하여 FACS 분석하였다.

[216]

[217] <실시예 8> FACS를 이용한 인간 IgG Fc 도메인이 융합된 단일도메인 항체의 면역 항원 상호작용에 대한 억제능 평가

[218] 상기 <실시예 6>에서 정제한 항-PD-L1 HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1), 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)가 PD-1/PD-L1의 상호작용에 미치는 억제능을 평가하였다.

[219] 구체적으로, PD-1/PD-L1 상호작용에 대한 항-PD-L1 HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1), 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)의 평가를 위해 CHO-K1_PD-L1 세포주(PD-L1 항원이 일정하게 발현하는 CHO-K1 세포)를 96웰 마이크로플레이트에 웰당 2×10^5 cell로 분주하고, 10 μ g/ml의 인간 PD-1-His 단백질을 처리하였다. 이후 항-PD-L1 HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1), 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)를 각각 농도별로 처리하였으며, 음성대조군은 isotype control 항체를 처리하였다. 세포는 1시간 동안 4°C에서 반응하였으며 DPBS로 3회 세척 후, His 항원에 특이적으로 결합하는 항체(Goat anti-His PE)를 첨가하여 빛을 차단한 채로 4°C에서 30분간 반응하였다. 세포는 DPBS로 3회 세척 후 100 μ l의 DPBS로 재부유하였고, Accuri C6 (BD) 장비로 CHO-K1_PD-L1 세포(PD-L1 항원이 일정하게 발현하는 CHO-K1 세포)에 남아있는 PD-1-His 단백질 양을 확인함으로써 항-PD-L1 HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1), 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)가 PD-1/PD-L1 상호작용에 미치는 억제능을 평가하였다.

[220]

[221] <실시예 9> 인간 IgG Fc 도메인이 융합된 단일 도메인 항체의 면역 항원과의 친화도 평가

[222] Octet RED 96e (ForteBio) 장비를 이용하여 상기 <실시예 6>에서 정제한 항-PD-L1 HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1), 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)와 면역 항원 단백질의 친화도(Kd)를 측정하였다.

[223] 구체적으로, anti-human Fc가 코팅된 바이오센서팁(Fortebio)을 5 μ g/ml의 항-PD-L1 HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1), 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)가 각각 분주된 96-웰 마이크로플레이트(Greiner)에서 1.5 nm 수준으로 포화 결합 시켰다. PD-L1 항원은 10 ~ 400 nM로 1X kinetic buffer(ForteBio)를 이용하여 2배수로 단계별 희석하였으며 30°C, 1,000 rpm으로 교반하면서 반응하였다. 시료의 결합과 해리 반응은 각각 200, 400초 동안 분석하였다. 결과 데이터는 1:1 상호작용 모델 (Global fitting) 방법을 이용하여 분석하였다.

[224]

[225] <실시예 10> 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)의 *in vitro* 유효성 평가

[226] CHO-K1_PD-L1 세포(PD-L1 항원의 과발현을 유도한 CHO-K1 세포)와 PD-1이 발현하는 Jurkat 세포를 이용하여 상기 <실시예 6>에서 정제한 항-PD-L1 2가

HCAb(PP Nb-IgG4)의 *in vitro* 유효성을 평가하였다.

[227] 구체적으로, CHO-K1_PD-L1 세포(PD-L1 항원을 과발현을 유도한 CHO-K1 세포)를 96웰 마이크로플레이트에 웰당 2×10^4 cell로 분주한 뒤 5% CO₂가 유지되는 배양기에서 16시간 동안 배양하였다. 이후 배지를 제거하였고, 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)를 농도별로 처리하고 1시간 동안 반응하였다. Jurkat 세포는 5×10^5 cell/100 μ l로 준비한 뒤 PHA를 0.5 mg/ml이 되도록 처리하였고, 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)가 처리된 CHO-K1_PD-L1 세포에 첨가하여 48시간 동안 반응하였다. 이후 상등액은 ELISA 방법을 통하여 IL-2 농도를 측정하여 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)의 *in vitro* 유효성을 평가하였다.

[228]

[229] <실시예 11> 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)의 *in vivo* 유효성 평가

[230] 상기 <실시예 6>에서 정제한 인항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)의 *in vivo* 유효성은 인간 PD-L1 발현을 유도한 종양 세포주(B16F10 세포)를 C57BL/6 마우스에 주입하여 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)에 의한 항종양 효과를 평가하였다.

[231] 구체적으로, 6-8주령된 C57BL/6 암컷 마우스에 B16F10_PD-L1 세포주(PD-L1의 과발현을 유도한 B16F10 세포)를 8×10^5 cell/100 μ l를 주입하였다. 종양 크기가 가로 \times 세로 크기로 3×3 mm에 도달할 때까지 종양 형성을 유도하였다. 이후, 2일 간격으로 10 mpk의 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)를 7회에 걸쳐 복강투여 및 종양 크기를 측정하였다. 마지막 복강투여 후 2일 간격으로 1주일간 종양 크기를 측정하여 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)의 *in vivo* 유효성을 평가하였다.

[232]

[233] <실시예 1> 항-PD-L1 HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1)의 제작

[234] 면역 항원으로 인간 PD-L1 항원을 이용하여 상기 <실시예 5>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 PD-L1 단백질에 특이적인 단일 도메인 항체 클론을 선별하여 염기서열분석을 진행하였다. 상기 선별한 항-PD-L1 sdAb(PDL1 Nb#01)의 아미노산 서열은 하기 [표 5] 및 [표 6]에 나타내었다.

[235] 또한, 상기 선별한 항-PD-L1 sdAb(PD-L1 Nb#01)을 이용하여 실시예 <6-1>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 인간 IgG1 Fc 도메인을 포함하는 PD-L1에 특이적인 1가 단일도메인 항체를 발현 및 정제하였고, 정제된 1가 단일도메인 항체는 항-PD-L1 HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1)으로 명명하였다. 인간 IgG1 Fc 도메인을 포함하는 항-PD-L1 HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1)의 아미노산 서열은 하기 [표 7]에 나타내었다.

[236] 또한, 상기 선별한 항-PD-L1 sdAb(PDL1 Nb#01) 클론을 이용하여 실시예 <6-2>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 인간 IgG4 Fc를 포함하는 PD-L1에 특이적인 2가 단일 도메인 항체를 발현 및 정제하였고, 정제된 2가 단일 도메인

항체는 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)로 명명하였다. 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)에서 인간 IgG4 Fc를 제외한 항-PD-L1 2가 sdAb(PP Nb)의 아미노산 서열은 하기 [표 8]에 나타내었고, 인간 IgG4 Fc 도메인을 포함하는 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)의 아미노산 서열은 하기 [표 9]에 나타내었다.

[237] [표 5]

단일 도메인 항체	단일 도메인 항체 시열	시열번호
항-PD-L1 sdAb (PDL1 Nb#01)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSFAMSWVRQAPGKGLEWVSDI NTGGDSTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAKGPKE MVHVYSQRGGGTQVTVSS	1

[239] [표 6]

단일 도메인 항체	CDR1	서열 번호	CDR2	서열 번호	CDR3	서열 번호
항-PD-L1 sdAb (PDL1 Nb#01)	GFTFSSFA	2	INTGGDST	3	AKGPKEMVHVYSQ	4

[241] [표 7]

단일 도메인 항체	단일 도메인 항체 시열 + Human IgG1 Fc 시열	시열번호
항-PD-L1 HCAb (PDL1 Nb#01-IgG1)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSFAMSWVRQAPGKGLEWVSD INTGGDSTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAKGP KEMVHVYSQRGGGTQVTVSSGGGPEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	5

[243] [표 8]

단일 도메인 항체	단일 도메인 항체 시열	시열번호
항-PD-L1 2가 sdAb (PP Nb)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSFAMSWVRQAPGKGLEWVS DINTGGDSTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAK GPKEMVHVYSQRGGGTQVTVSSGGSGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSSFAMSWVRQAPGKGLEWVSDINTGGDSTDYADSVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAKGPKEVHVYSQRGGGTQVTVS S	10

[245] [표 9]

[246]

단일 도메인 항체	단일 도메인 항체 서열 + Human IgG4 Fc 서열	서열번호
항-PD-L1 2가 HCAb (PP Nb-IgG4)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMSWVRQAPGKGLEWVS DINTGGDSTDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAK GPKEMVHVYSQRGQGTQVTVSSGGSGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSFAMSWVRQAPGKGLEWVSDINTGGDSTDYADSVKGRFTI SRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAKGPKEVHVYSQRGQGTQVTVS SGPGGPESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIISKIPEVTC VVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	11

[247]

[248] <실험예 2> 항-PD-L1 HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1) 및 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)의 항원 결합능 및 PD-1/PD-L1 상호작용에 대한 억제능 평가

[249] 상기 <실시에 7>과 <실시에 8>에 기재된 방법과 동일하게 FACS를 이용하여 상기 <실험예 1>에서 정제한 항-PD-L1 HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1) 및 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)의 항원 결합능(도 1a 및 도 2a)과 PD-1/PD-L1 상호작용에 미치는 억제능(도 1b 및 도 2b)을 평가하였다

[250] 그 결과, 도 1a 및 도 1b에 나타난 바와 같이, 항-PD-L1 HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1)는 CHO-K1_PD-L1 세포(PD-L1 항원이 일정하게 발현하는 CHO-K1 세포)에서 23.31 nM(EC50)의 항원 결합능이 확인되었고, PD-1/PD-L1 상호작용에 미치는 억제능은 4.60 nM(IC50)으로 확인되었다.

[251] 또한, 도 2a 및 도 2b에 나타난 바와 같이, 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)는 CHO-K1_PD-L1 세포(PD-L1 항원이 일정하게 발현하는 CHO-K1 세포)에서 1.93 nM(EC50)의 항원 결합능이 확인되었고, PD-1/PD-L1 상호작용에 미치는 억제능은 2.86 nM(IC50)으로 확인되었다.

[252]

[253] <실험예 3> 항-PD-L1 HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1) 및 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)와 면역 항원과의 친화도 평가

[254] 상기 <실험예 1>에서 정제한 항-PD-L1 HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1) 및 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)는 각각 PD-L1 항원과의 친화도를 상기 <실시에 9>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 평가하였다.

[255] 그 결과, 표 10에 나타난 바와 같이, 항-PD-L1 HCAb(PDL1 Nb#01-IgG1)는 PD-L1 항원과 7.08 nM의 항원친화력을 확인하였고, 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)는 PD-L1 항원과 4.58 nM의 항원 친화력을 확인하였다.

[256] [표 10]

[257]	단일 도메인 항체	$K_d(M)$	$k_{on}(1/MS)$	$k_{dis}(1/s)$
	항-PD-L1 HCAb (PDL1 Nb#01-IgG1)	7.08E-09	5.27E+05	3.73E-03
	항-PD-L1 2가 HCAb (PP Nb-IgG4)	4.58E-09	4.02E+05	1.84E-03

[258]

[259] <실험예 4> 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)의 *in vitro* 유효성 평가[260] 상기 <실험예 1>에서 정제한 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)를 이용하여 *in vitro* 유효성을 평가하였다.[261] 구체적으로, 상기 <실시예 10>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 CHO-K1_PD-L1 세포(PD-L1을 일정하게 발현하는 CHO-K1 세포)와 PD-1을 발현하는 jurkat 세포간의 상호작용을 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)가 방해하여 jurkat 세포로부터 발현된 IL-2 농도를 측정함으로써 *in vitro* 유효성을 평가하였다.

[262] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)는 PD-1을 발현하는 jurkat 세포와 PD-L1을 발현하는 CHO-K1 세포에 간섭하여 CHO-K1 세포와 jurkat 세포의 상호작용에 0.80 nM(IC50)의 저해 효능이 확인되었다.

[263]

[264] <실험예 5> 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)의 *in vivo* 유효성 평가[265] 상기 <실험예 1>에서 정제한 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)의 *in vivo* 유효성 평가는 마우스 종양모델을 이용하여 수행하였다.

[266] 구체적으로, 상기 <실시예 11>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)는 PD-L1 항원이 발현하는 종양세포(B16F10 세포)를 주입하여 종양이 형성된 마우스 모델에서 복강투여를 통해 항종양 효과를 관찰하였다.

[267] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 항-PD-L1 2가 HCAb(PP Nb-IgG4)는 음성대조군(Isotype group) 대비 약 39.2%의 항종양 효과가 나타남을 확인하였다.

[268]

산업상 이용가능성

[269] 본 발명에 따른 단일 도메인 항체는 면역관문 단백질(immune checkpoint protein)인 PD-L1에 대한 우수한 친화성 및 항종양 효과를 나타내므로, 면역관문억제제로 면역항암요법에 유용하게 이용될 수 있다.

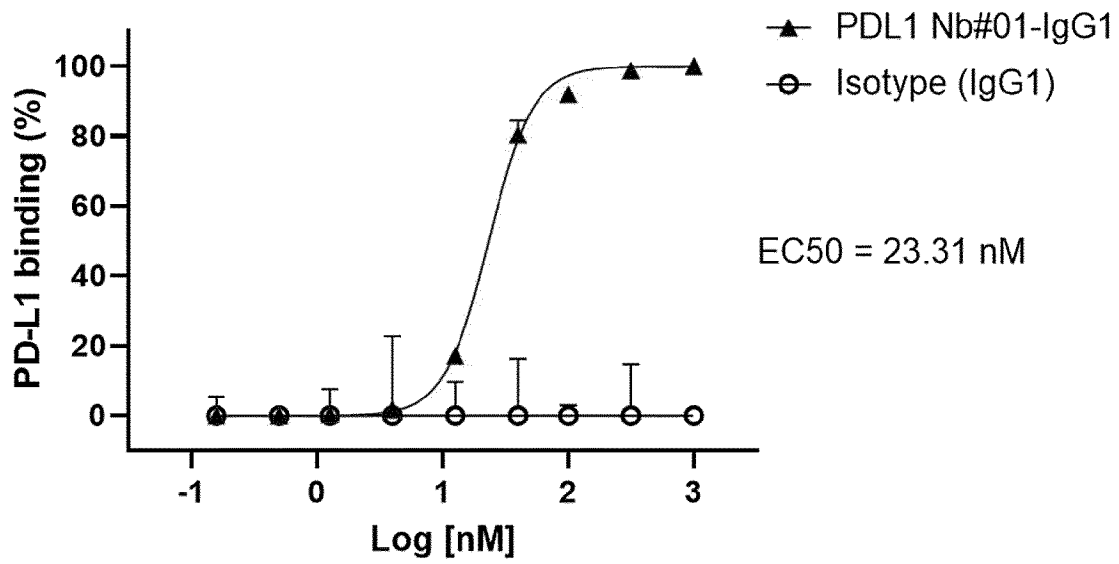
청구범위

- [청구항 1] PD-L1에 특이적으로 결합하는 단일 도메인 항체(sdAb)를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,
상기 sdAb가 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR1; 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR2; 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 CDR3를 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 sdAb는 하기의 VHH 도메인을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편:
서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 FR1;
서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 FR2;
서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 FR3; 및
서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 FR4.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 sdAb는 서열번호 1 및 10 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 4] 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 적어도 1개 이상의 아미노산 치환이 보존적 치환인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서, 적어도 1개의 아미노산 치환이 아미노산의 비-유전자 코딩 아미노산 또는 합성 아미노산으로의 치환인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 7] 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 sdAb가 Fc 단편에 융합된 중쇄-단독 항체(HCAb)인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서, 상기 HCAb는 단량체성 또는 다량체성인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 9] 제 7항에 있어서, 상기 Fc 단편은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 10] 제 7항에 있어서, 상기 sdAb가 펩티드 링커를 통해 Fc 단편에 융합되는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 11] 제 7항에 있어서, 상기 HCAb는 서열번호 5 및 11 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 12] 제 11항에 있어서, 적어도 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 13] 제 12항에 있어서, 적어도 1개 이상의 아미노산 치환이 보존적 치환인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 14] 제 13항에 있어서, 적어도 1개의 아미노산 치환이 아미노산의 비-유전자

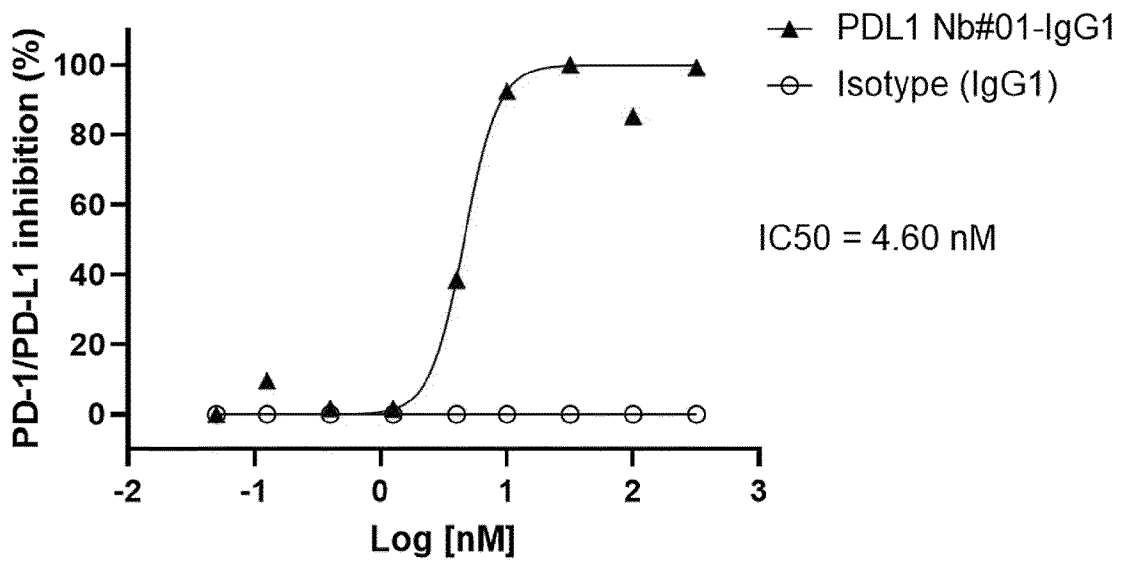
- 코딩 아미노산 또는 합성 아미노산으로의 치환인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 15] 제 1항에 있어서, (a) 상기 sdAb를 포함하는 제 1 항원 결합 부분; 및 (b) 제 2 에피토프에 특이적으로 결합하는 제 2 항원 결합 부분을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 16] 제 15항에 있어서, 상기 제 2 항원 결합 부분은 전장 항체, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, 단일쇄 Fv(scFv), scFv-scFv, 미니바디, 디아바디 또는 제 2 sdAb인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 17] 제 15항에 있어서, 상기 제 1 항원 결합 부분 및 제 2 항원 결합 부분은 펩티드 링커를 통해 서로 융합되는 것인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 18] 제 1항에 있어서, 면역조정제, 사이토카인, 세포독성제, 화학요법제, 진단제, 항바이러스제, 항미생물제 또는 약물에 접합된 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [청구항 19] 면역조정제, 사이토카인, 세포독성제, 화학요법제, 진단제, 항바이러스제, 항미생물제 또는 약물에 접합된 제1항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 항체 접합체.
- [청구항 20] 제 1항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 핵산 분자.
- [청구항 21] 제 20항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.
- [청구항 22] 제 21항의 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포.
- [청구항 23] (a) 항체가 발현되도록 하는 조건 하에 제 22항의 숙주 세포를 배양하는 단계; 및
(b) 발현된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생산하는 방법.
- [청구항 24] 제 1항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 제 19항의 항체 접합체를 유효성분으로 함유하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 25] 제 24항에 있어서, 상기 암은 흑색종, 폐암, 간암, 교세포종, 난소암, 대장암, 두경부암, 방광암, 신장세포암, 위암, 유방암, 전이암, 전립선암, 췌장암, 비호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 다발성 골수종, 백혈병, 림프종, 골수이형성증후군, 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 고립성 골수종 및 재생불량성 빈혈로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.
- [청구항 26] 제 24항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 더 포함하는, 약학적 조성물.
- [청구항 27] 제 1항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 제 19항의 항체 접합체를 약학적으로 유효한 양으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 28] 암의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 제 1항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 제 19항의 항체 접합체의 용도.

- [청구항 29] (i) 제 1항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 시료를 접촉시키는 단계; 및
(ii) 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 PD-L1 간의 복합체 형성을
검출하거나 복합체의 양을 결정하는 단계를 포함하는,
시료에서 PD-L1을 검출하거나 PD-L1의 양을 결정하는 방법.

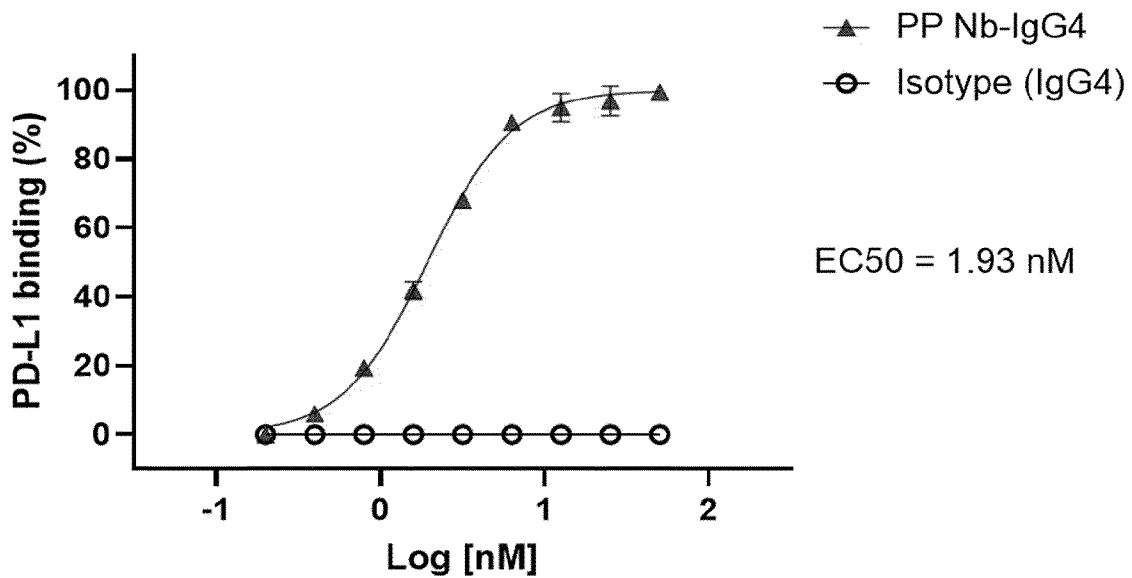
[도 1a]



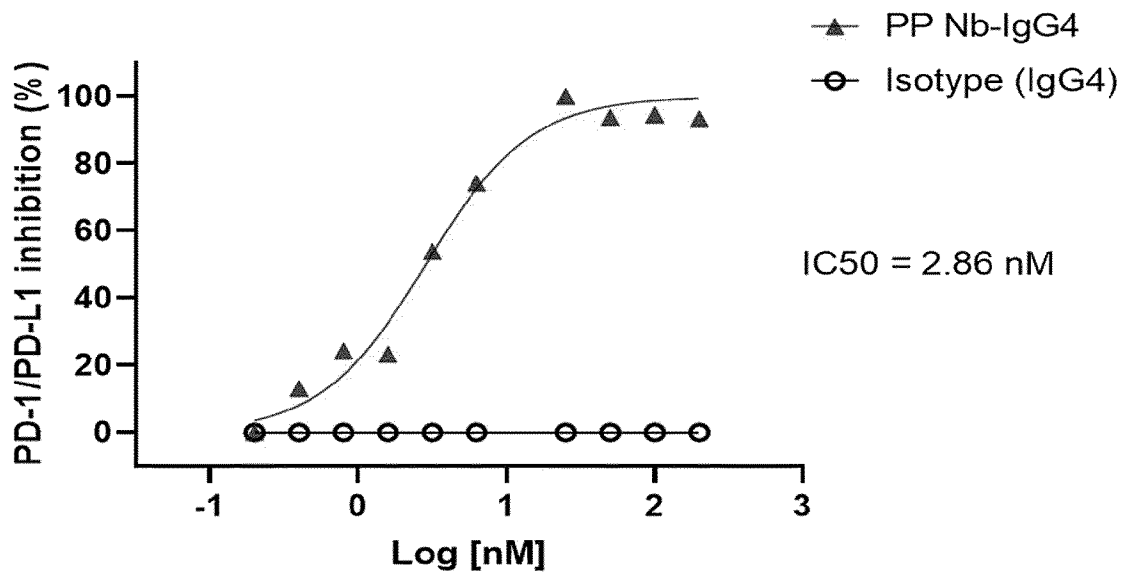
[도 1b]



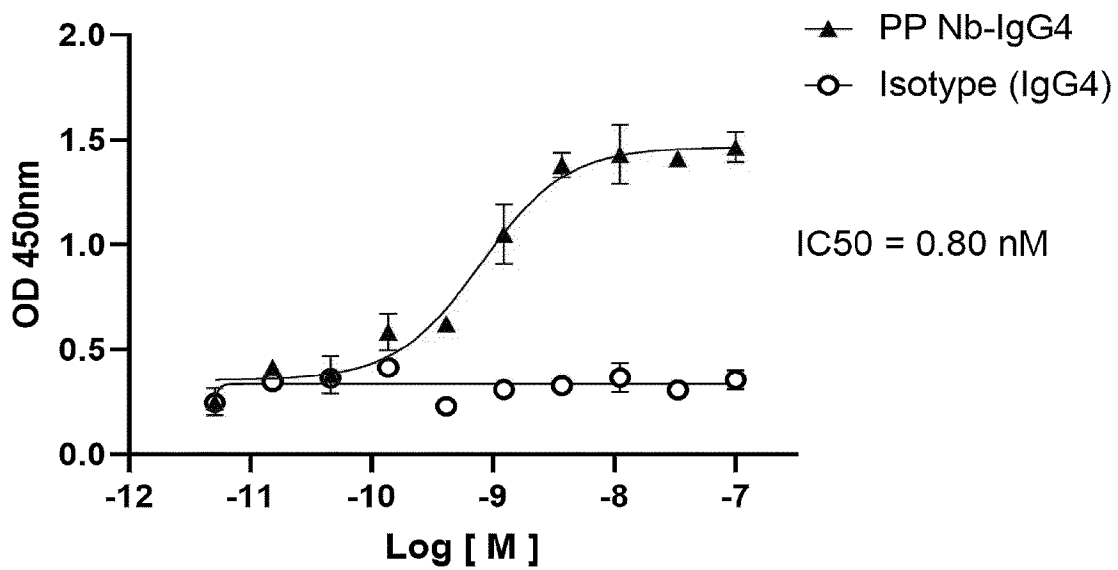
[도 2a]



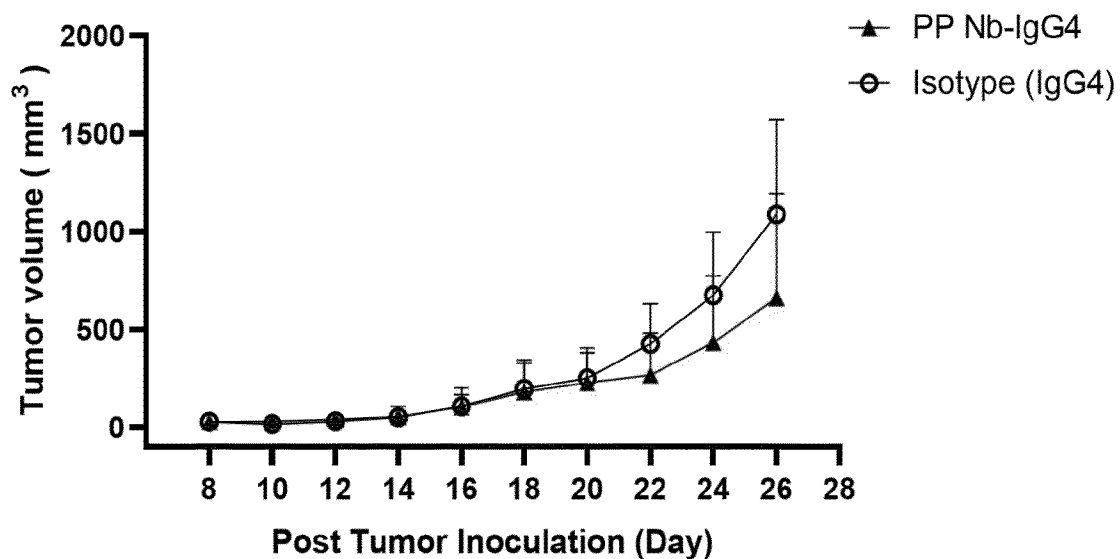
[도2b]



[도3]



[도4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/002529

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 16/28(2006.01); A61K 39/00(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61P 35/00(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: PD-L1, 단일 도메인 항체(single domain antibody; sdAB), CDR, 암(cancer)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2019-0078771 A (PHARMABCINE INC.) 05 July 2019 (2019-07-05) See claims 1-10.	1-26,28-29
A	KR 10-2018-0016321 A (Y-BIOLOGICS INC.) 14 February 2018 (2018-02-14) See claims 1-12.	1-26,28-29
A	WO 2021-009267 A1 (CAPELLA BIOSCIENCE LTD) 21 January 2021 (2021-01-21) See claims 1-8.	1-26,28-29
A	KR 10-2020-0058542 A (JOINT STOCK COMPANY "BIOCAD") 27 May 2020 (2020-05-27) See entire document.	1-26,28-29
A	WO 2019-185035 A1 (ADAGENE INC.) 03 October 2019 (2019-10-03) See entire document.	1-26,28-29
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 June 2022		Date of mailing of the international search report 02 June 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 27 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/002529

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2019-0078771 A	05 July 2019	EP 3733706 A1	04 November 2020
		KR 10-2311838 B1	14 October 2021
		US 2021-0054078 A1	25 February 2021
		WO 2019-132533 A1	04 July 2019
KR 10-2018-0016321 A	14 February 2018	AU 2017-306507 A1	21 March 2019
		AU 2017-306507 B2	14 May 2020
		BR 112019002282 A2	16 July 2019
		CA 3032806 A1	08 February 2018
		CA 3032806 C	27 April 2021
		CN 110072889 A	30 July 2019
		EP 3495391 A1	12 June 2019
		JP 2019-526279 A	19 September 2019
		JP 6925421 B2	25 August 2021
		KR 10-2048477 B1	26 November 2019
		RU 2721582 C1	20 May 2020
		US 10919966 B2	16 February 2021
		US 2019-0322750 A1	24 October 2019
		WO 2018-026249 A1	08 February 2018
WO 2021-009267 A1	21 January 2021	CA 3143957 A1	21 January 2021
		EP 3999113 A1	25 May 2022
		KR 10-2022-0057526 A	09 May 2022
KR 10-2020-0058542 A	27 May 2020	AR 113342 A1	22 April 2020
		AU 2018-345458 A1	14 May 2020
		BR 112020006706 A2	06 October 2020
		CA 3078413 A1	11 April 2019
		CL 2020000919 A1	16 October 2020
		CN 111801352 A	20 October 2020
		CO 2020004199 A2	24 April 2020
		EA 201791961 A1	30 April 2019
		EP 3693390 A1	12 August 2020
		EP 3693390 A4	03 November 2021
		JP 2020-535839 A	10 December 2020
		MA 49599 A1	29 January 2021
		PE 20210460 A1	08 March 2021
		PH 12020550214 A1	15 February 2021
		RU 2020115122 A	29 October 2021
		TW 201922781 A	16 June 2019
		US 2020-0270345 A1	27 August 2020
WO 2019-068302 A1	11 April 2019		
WO 2019-185035 A1	03 October 2019	AU 2019-241345 A1	15 October 2020
		CA 3095076 A1	03 October 2019
		CN 112424225 A	26 February 2021
		EP 3774920 A1	17 February 2021
		JP 2021-521267 A	26 August 2021
		KR 10-2021-0016514 A	16 February 2021
		US 2021-0122824 A1	29 April 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 16/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 16/28(2006.01); A61K 39/00(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61P 35/00(2006.01)		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: PD-L1, 단일 도메인 항체(single domain antibody; sdAB), CDR, 암(cancer)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2019-0078771 A (주식회사 파맵신) 2019.07.05 청구항 1-10	1-26,28-29
A	KR 10-2018-0016321 A (주식회사 와이바이오로지스) 2018.02.14 청구항 1-12	1-26,28-29
A	WO 2021-009267 A1 (CAPELLA BIOSCIENCE LTD) 2021.01.21 청구항 1-8	1-26,28-29
A	KR 10-2020-0058542 A (조인트 스타트업 "바이오케드") 2020.05.27 전체 문헌	1-26,28-29
A	WO 2019-185035 A1 (ADAGENE INC.) 2019.10.03 전체 문헌	1-26,28-29
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2022년06월02일(02.06.2022)	2022년06월02일(02.06.2022)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - 서면 혹은 이미지 파일
 - b. PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
 - c. 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).
2. 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.
3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. 청구항: 27
 이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
 청구항 27은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및
 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. 청구항:
 이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관
 련됩니다. 구체적으로는,

3. 청구항:
 이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2019-0078771 A	2019/07/05	EP 3733706 A1	2020/11/04
		KR 10-2311838 B1	2021/10/14
		US 2021-0054078 A1	2021/02/25
		WO 2019-132533 A1	2019/07/04
KR 10-2018-0016321 A	2018/02/14	AU 2017-306507 A1	2019/03/21
		AU 2017-306507 B2	2020/05/14
		BR 112019002282 A2	2019/07/16
		CA 3032806 A1	2018/02/08
		CA 3032806 C	2021/04/27
		CN 110072889 A	2019/07/30
		EP 3495391 A1	2019/06/12
		JP 2019-526279 A	2019/09/19
		JP 6925421 B2	2021/08/25
		KR 10-2048477 B1	2019/11/26
		RU 2721582 C1	2020/05/20
		US 10919966 B2	2021/02/16
		US 2019-0322750 A1	2019/10/24
		WO 2018-026249 A1	2018/02/08
WO 2021-009267 A1	2021/01/21	CA 3143957 A1	2021/01/21
		EP 3999113 A1	2022/05/25
		KR 10-2022-0057526 A	2022/05/09
KR 10-2020-0058542 A	2020/05/27	AR 113342 A1	2020/04/22
		AU 2018-345458 A1	2020/05/14
		BR 112020006706 A2	2020/10/06
		CA 3078413 A1	2019/04/11
		CL 2020000919 A1	2020/10/16
		CN 111801352 A	2020/10/20
		CO 2020004199 A2	2020/04/24
		EA 201791961 A1	2019/04/30
		EP 3693390 A1	2020/08/12
		EP 3693390 A4	2021/11/03
		JP 2020-535839 A	2020/12/10
		MA 49599 A1	2021/01/29
		PE 20210460 A1	2021/03/08
		PH 12020550214 A1	2021/02/15
		RU 2020115122 A	2021/10/29
		TW 201922781 A	2019/06/16
		US 2020-0270345 A1	2020/08/27
WO 2019-068302 A1	2019/04/11		
WO 2019-185035 A1	2019/10/03	AU 2019-241345 A1	2020/10/15
		CA 3095076 A1	2019/10/03
		CN 112424225 A	2021/02/26
		EP 3774920 A1	2021/02/17
		JP 2021-521267 A	2021/08/26
		KR 10-2021-0016514 A	2021/02/16
US 2021-0122824 A1	2021/04/29		