



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0004725
(43) 공개일자 2025년01월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/519 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/39558 (2013.01)
A61K 31/519 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7037073
(22) 출원일자(국제) 2023년04월07일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년11월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/065489
(87) 국제공개번호 WO 2023/196943
국제공개일자 2023년10월12일
(30) 우선권주장
63/328,951 2022년04월08일 미국(US)

- (71) 출원인
인히브릭스 바이오사이언스, 인크.
미국 캘리포니아 92037 라 호야 엔. 토리 파인스
로드 11025 스위트 140
- (72) 발명자
크라고 윌리엄
미국 92037 캘리포니아 라 졸라 노스 토리 파인스
로드 11025 스위트 140 인히브릭스 바이오사이언스
인크. 내
에켈만 브렌단 피
미국 92037 캘리포니아 라 졸라 노스 토리 파인스
로드 11025 스위트 140 인히브릭스 바이오사이언스
인크. 내
윌리스 케이틀린 엠
미국 92037 캘리포니아 라 졸라 노스 토리 파인스
로드 11025 스위트 140 인히브릭스 바이오사이언스
인크. 내
(74) 대리인
김진희, 김태홍

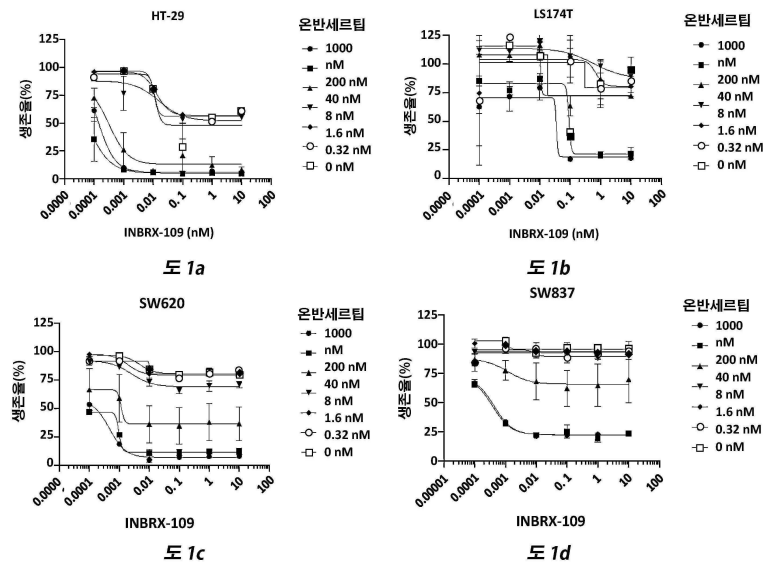
전체 청구항 수 : 총 63 항

(54) 발명의 명칭 DR5 효능제 및 PLK1 억제제 또는 CDK 억제제 조합 요법

(57) 요약

본원에서는 DR5 효능제와 PLK1 억제제의 조합을 이용하여 암을 치료하는 방법을 제공한다. 본원에서는 또한 DR5 효능제와 CDK 억제제의 조합을 이용하여 암을 치료하는 방법도 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2878 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

C07K 2317/22 (2013.01)

C07K 2317/569 (2013.01)

C07K 2317/75 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

암 치료를 필요로 하는 피험체에게 (a) 사멸 수용체 5(DR5) 효능제, 및 (b) 폴로 유사 키나제 1(PLK1: Polo-Like Kinase 1) 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료를 필요로 하는 피험체에서 암을 치료하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, DR5 효능제가 INBRX-109, 에프토자네르민 알파(eftozanermin alfa)(ABBV-621), IGM-8444(IGM Biosciences), BI 905711(Boehringer Ingelheim), GEN1029(HexaBody®-DR5/DR5; Genmab), TAS266(Novartis), MM-201a(Merrimack Pharmaceuticals), 또는 MM201-b(Merrimack Pharmaceuticals)인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, DR5 효능제가 INBRX-109인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, DR5 효능제가 DR5 결합 폴리펩티드인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 적어도 4가인 방법.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 적어도 하나의 VHH 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 적어도 하나의 VHH 도메인이 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제3항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드는 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 VHH 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제3항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 Fc 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, Fc 영역이 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제3항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 VHH-링커-VHH-링커-Fc 구조를 갖는 것인 방법.

청구항 12

제3항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 각 VHH 도메인은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는

것인 방법.

청구항 13

제3항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, VHH-링커-VHH가 서열 번호 5의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, VHH-링커-VHH가 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제3항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 서열 번호 7의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제3항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제3항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 서열 번호 7의 아미노산 서열로 구성된 것인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, PLK1 억제제가 소분자 또는 간섭 RNA(siRNA)인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, PLK1 억제제가 온반세르티프, 볼라세르티프, 리고세르티프, BI2536(Boehringer Ingelheim), *N*-[[4-[(6-클로로-3-피리디닐)메톡시]-3-메톡시페닐]메틸]-3,4-디메톡시벤젠에탄아민 하이드로클로라이드(SBE 13 HC1), MLN0905(Takeda Oncology), GSK461364(GlaxoSmithKline), 폴록신, 폴록신-2HT, RO3280(CAS 번호 1062243-51-9), HMN-214(CAS 번호 173529-46-9), HMN-176(CAS 번호 173529-10-7), 2-시아노-2-[3-에틸-4-옥소-5-[[3-(2-피롤리딘-1-일에틸)아닐리노]메틸]-1,3-티아졸리딘-2-일]-*N*-(2,2,2-트리플루오로에틸)아세트아미드(ZK-티아졸리딘), 또는 사이클라폴린 9(CAS 번호 40533-25-3), 5-(5,6-디메톡시-1*H*-벤즈이미다졸-1-일)-3-[[2-(트리플루오로메틸)페닐]메톡시]-2-티오펜카복사미드(GW 843682X)인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, PLK1 억제제가 온반세르티프, 볼라세르티프, 리고세르티프, BI2536(Boehringer Ingelheim), MLN0905(Takeda Oncology), GSK461364(GlaxoSmithKline), CYC140(Cyclacel), TKM-080301(TKM-PLK1; Arbutus Biopharma), 또는 TAK-960(Takeda Pharmaceutical Company)인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, PLK1 억제제가 온반세르티프인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 효능제 및 PLK1 억제제가 별개로 투여되는 것인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, DR5 효능제 및 PLK1 억제제가 순차적으로 투여되는 것인 방법.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 적어도 1회 용량, 또는 제1 용량의 DR5 효능제가 PLK1 억제제 전에 투여되는 것인 방법.

청구항 25

제22항 또는 제23항에 있어서, 적어도 1회 용량, 또는 제1 용량의 DR5 효능제가 PLK1 억제제 후에 투여되는 것인 방법.

청구항 26

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 효능제 및 PLK1 억제제가 동시에 투여되는 것인 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 효능제 및 PLK1 억제제가 시너지적으로 작용하는 것인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 시너지가 시험관내 세포 생존 검정법으로 결정되는 것인 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 효능제 및 PLK1 억제제의 투여가, 각 작용제를 단독으로 투여하는 것과 비교하여 시너지 효과를 가져오는 것인 방법.

청구항 30

암 치료를 필요로 하는 피험체에게 (a) 사멸 수용체 5(DR5) 효능제, 및 (b) 사이클린 의존적 키나제(CDK) 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료를 필요로 하는 피험체에서 암을 치료하는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, DR5 효능제가 INBRX-109, 에프토자네르민 알파(ABBV-621), IGM-8444(IGM Biosciences), BI 905711(Boehringer Ingelheim), GEN1029(HexaBody®-DR5/DR5; Genmab), TAS266(Novartis), MM-201a(Merrimack Pharmaceuticals), 또는 MM201-b(Merrimack Pharmaceuticals)인 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, DR5 효능제가 INBRX-109인 방법.

청구항 33

제30항에 있어서, DR5 효능제가 DR5 결합 폴리펩티드인 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 적어도 4개인 방법.

청구항 35

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 적어도 하나의 VHH 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 적어도 하나의 VHH 도메인이 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 37

제32항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는

VHH 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 38

제32항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 Fc 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, Fc 영역이 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 40

제32항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 VHH-링커-VHH-링커-Fc 구조를 갖는 것인 방법.

청구항 41

제32항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 각 VHH 도메인은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 것인 방법.

청구항 42

제32항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, VHH-링커-VHH가 서열 번호 5의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, VHH-링커-VHH가 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 44

제32항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 서열 번호 7의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 45

제32항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 46

제32항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 서열 번호 7의 아미노산 서열로 구성된 것인 방법.

청구항 47

제30항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, CDK 억제제가 CDK9 억제제인 방법.

청구항 48

제30항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, CDK 억제제가 소분자인 방법.

청구항 49

제30항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, CDK 억제제가 플라보피리돌, 셀리시클립, 디나시클립, 아투메시클립, 에니토시클립, AZD4573, i-CDK9, 또는 NVP-2인 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, CDK 억제제가 디나시클립, NVP-2, 플라보피리돌, 에니토시클립, 또는 AZD4573인 방법.

청구항 51

제30항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 효능제 및 CDK 억제제가 별개로 투여되는 것인 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, DR5 효능제 및 CDK 억제제가 순차적으로 투여되는 것인 방법.

청구항 53

제51항 또는 제52항에 있어서, 적어도 1회 용량, 또는 제1 용량의 DR5 효능제가 CDK 억제제 전에 투여되는 것인 방법.

청구항 54

제51항 또는 제52항에 있어서, 적어도 1회 용량, 또는 제1 용량의 DR5 효능제가 CDK 억제제 후에 투여되는 것인 방법.

청구항 55

제30항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 효능제 및 CDK 억제제가 동시에 투여되는 것인 방법.

청구항 56

제30항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 효능제 및 CDK 억제제가 시너지적으로 작용하는 것인 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 시너지가 시험관내 세포 생존 검정법으로 결정되는 것인 방법.

청구항 58

제30항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, DR5 효능제 및 CDK 억제제의 투여가, 각 작용제를 단독으로 투여하는 것과 비교하여 시너지 효과를 가져오는 것인 방법.

청구항 59

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 부신암; 성상세포종; 기저 세포 암종, 담관암; 방광암; 골암; 뇌 및 중추신경계 암; 유방암; 복막암; 자궁경부암; 용모막암종; 연골육종; 유잉 육종(Ewing sarcoma); 결장 및 직장 암(결장직장암); 결합 조직 암; 소화계 암; 자궁내막암; 식도암; 안암; 두부경부암; 위암; 위장암; 교아세포종; 간암종; 간종양; 상피내 신생물; 신장암 또는 신세포암(kidney or renal cancer); 후두암; 백혈병; 간암; 폐암; 소세포 폐암; 비소세포 폐암; 폐 선암종; 폐 편평세포 암종; 흑색종; 골수종; 신경아세포종; 구강암(구순암, 설암, 구강암, 및/또는 인두암); 난소암; 췌장암, 예컨대 췌장 선암종; 뇌하수체 암; 전립선암; 망막아세포종; 횡문근육종; 직장암; 호흡계 암; 중피종; 타액선 암종; 육종; 피부암; 편평세포암; 위암; 고환암; 갑상선암; 자궁 또는 자궁내막 암; 비뇨계 암; 및 외음부암; 림프종; 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma); 비호지킨 림프종; B 세포 림프종; 저등급/여포성 비호지킨 림프종(NHL); 소형 림프구성(SL) NHL; 중간 등급/여포성 NHL; 중간 등급 미만성 NHL; 고등급 면역아세포성 NHL; 고등급 림프아구성 NHL; 고등급 소형 비절단 세포 NHL; 벌키 질환 NHL; 외투 세포 림프종; AIDS 관련 림프종; 발덴스트롬 마크로글로빈혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia); 만성 림프구성 백혈병(CLL); 급성 림프아구성 백혈병(ALL); 모발상 세포 백혈병; 만성 골수아구성 백혈병; 뿐만 아니라, 다른 암종 및 육종; 및 이식 후 림프증식성 장애(PTLD) 뿐만 아니라, 모종종과 연관된 비정상적인 혈관 증식, 부종(예컨대, 뇌종양과 연관된 부종), 및 메이그스 증후군(Meigs' syndrome)인 방법.

청구항 60

PLK1 억제제와 조합하여 DR5 효능제를 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법에서 사용하기 위한 DR5 효능제.

청구항 61

암 치료용 의약 제조를 위한 DR5 효능제의 용도로서, 의약은 PLK1 억제제와 함께 투여하기 위한 것인 용도.

청구항 62

CDK 억제제, 예컨대 CDK9 억제제와 조합하여 DR5 효능제를 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법에서 사용하기 위한 DR5 효능제.

청구항 63

암 치료용 의약 제조를 위한 DR5 효능제의 용도로서, 의약은 CDK 억제제, 예컨대 CDK9 억제제와 함께 투여하기 위한 것인 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 2022년 4월 8일 출원된 미국 가출원 제63/328,951호의 우선권의 이익을 주장하며; 상기 가출원은 그 전문이 임의의 목적을 위해 본원에서 참조로 포함된다.

[0003]

기술분야

[0004]

본 발명은 DR5 효능제 및 PLK1 억제제의 조합, 또는 DR5 효능제와 CDK 억제제, 예컨대 CDK9 억제제의 조합을 이용한 암 치료에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

사멸 수용체 5(DR5: Death receptor 5; TNFRSF10B 또는 TRAILR2로도 공지)는 TNF 수용체 슈퍼패밀리(TNFRSF: TNF receptor superfamily)의 일원이며, TNF 관련 아포토시스 유도 리간드(TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand)에 결합하는 TNF 수용체 슈퍼패밀리의 세포 표면 수용체이다. TRAIL은 건강한 세포 집단으로부터 원치않는 감염된 악성 세포를 선택적으로 근절시킴으로써 포유동물 발생 및 숙주 방어에서 중요한 역할을 하도록 진화하였다. TNF 수용체 패밀리 구성원인 DR4 또는 DR5 결합시, TRAIL은 카스파제 의존적 아포토시스를 통해 세포 사멸을 유도한다. DR5는 TRAIL 경로의 관찰된 중앙 편향 활성을 촉진시키는 중앙 세포의 주요 수용체인 것으로 보인다. DR5는 천연 리간드 TRAIL에 의해 활성화되는데, 이는 3개의 DR5 수용체가 가까이 근접해 있도록 하여 세포내 카스파제-8을 활성화시키고, 예컨대 카스파제-9 및 카스파제-3과 같은 다른 사멸 유도 카스파제의 활성화를 개시한다. 따라서, 이러한 세포 사멸 경로가 개시되기 위해서는 효율적인 세포 사멸을 위해 DR5 수용체가 클러스터링되어야 한다. DR5 효능제는 암을 치료하는 데 유망한 치료 후보물질이다.

[0006]

폴로 유사(Polo-like) 키나제는 세포 주기 진행, 중심체 주기, 유사 분열 및 DNA 손상에 대한 세포 반응에 관여하는 유사 분열 세린/트레오닌 키나제 패밀리에 속한다. 현재까지 포유동물 세포에서 5가지의 폴로 유사 키나제: PLK1, PLK2, PLK3, PLK4, 및 PLK5가 확인되었다. 폴로 유사 키나제는 많은 진핵 세포에서 고도로 보존되어 있으며, N-말단 세린/트레오닌 단백질 키나제 도메인(PLK5 제외) 및 폴로 박스(PB: polo box)로 불리는 유사한 C-말단 영역 1 또는 2개가 존재하는 것을 특징으로 한다. 폴로 유사 키나제 패밀리 구성원 중 PLK1의 특징이 가장 잘 규명되어 있다. PLK1은 유사 분열 진입, G2/M 체크포인트, 방추 어셈블리 성숙화, 염색체 분리 및 유사 분열 종료를 포함하는 세포 주기 진행 및 유사 분열의 상이한 단계에서 중요한 역할을 한다. PLK1은 여러 중앙 유형에서 과다발현되며, 증식을 증가시키는 것으로 보인다. 대부분의 정상적인 성인 조직에서는 거의 검출되지 않는다. PLK1 억제제는 세포 증식을 중단시키고, 유사 분열에 큰 변동을 일으킴에 따라, PLK1은 암 치료를 위한 치료 표적이 된다.

[0007]

사이클린 의존적 키나제(CDK: Cyclin dependent kinase)는 조절 사이클린 단백질에 의해 활성화되는 세린/트레오닌 단백질 키나제이다. 인간 계통은 세포내 및 세포외 신호에 대한 반응으로 예컨대, 세포 분열 및 전사와 같은 수많은 세포 과정에서 특정 역할을 하는 20개의 CDK를 코딩한다. CDK9는 전사 조절인자이며, 암 세포의 생존을 유지하기 위해 단백질을 지속적으로 생산하기 위해 특정 암 세포에 의해 이용된다. 그의 주요 사이클린 파트너인 사이클린 T1과 함께 CDK9는 RNA 폴리머라제 II(RNAP II: RNA Polymerase II)의 C-말단 도메인(CTD: C-terminal domain)에서 YSPTSPS 탠덤 반복부의 S2 잔기를 인산화함으로써 진핵 세포에서의 주요 기능이 신생 mRNA 가닥의 전사 신장을 매개하는 것인 양성 전사 신장 인자 b(P-TEFb: Positive Transcription Elongation

Factor b)를 형성한다. CDK9는 골수성 세포 백혈병-1(MCL-1: myeloid cell leukemia)의 발현에 필요하다. CDK9 경로의 조절 장애는 다수의 암 유형에서 예후 및 항암 치료제에 대한 내성에 관련되어 있는 바, CDK9는 암 치료를 위한 치료 표적이 된다.

발명의 내용

- [0008] 본원에서는 사멸 수용체 5(DR5) 효능제 및 폴로 유사 키나제 1(PLK1) 억제제를 이용하여 피험체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 다가 사멸 수용체 5(DR5) 결합 폴리펩티드 및 폴로 유사 키나제 1(PLK1) 억제제를 투여하는 단계를 포함한다. 본원에서는 또한 사멸 수용체 5(DR5) 효능제 및 사이클린 의존적 키나제 9(CDK9) 억제제를 이용하여 피험체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 다가 사멸 수용체 5(DR5) 결합 폴리펩티드 및 CDK9 억제제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다가 DR5 결합 폴리펩티드는 적어도 4가이다. 다양한 실시양태에서, DR5 결합 폴리펩티드는 DR5 효능제이다.
- [0009] 실시양태 1. 암 치료를 필요로 하는 피험체에게 (a) 사멸 수용체 5(DR5) 효능제, 및 (b) 폴로 유사 키나제 1(PLK1) 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료를 필요로 하는 피험체에서 암을 치료하는 방법.
- [0010] 실시양태 2. 실시양태 1에 있어서, DR5 효능제가 INBRX-109, 에프토자네르민 알파(eftozanermin alfa)(ABBV-621), IGM-8444(IGM Biosciences), BI 905711(Boehringer Ingelheim), GEN1029(HexaBody®-DR5/DR5; Genmab), TAS266(Novartis), MM-201a(Merrimack Pharmaceuticals), 또는 MM201-b(Merrimack Pharmaceuticals)인 방법.
- [0011] 실시양태 3. 실시양태 2에 있어서, DR5 효능제가 INBRX-109인 방법.
- [0012] 실시양태 4. 실시양태 1에 있어서, DR5 효능제가 DR5 결합 폴리펩티드인 방법.
- [0013] 실시양태 5. 실시양태 4에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 적어도 4가인 방법.
- [0014] 실시양태 6. 실시양태 3-5 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 적어도 하나의 VHH 도메인을 포함하는 것인 방법.
- [0015] 실시양태 7. 실시양태 6에 있어서, 적어도 하나의 VHH 도메인이 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0016] 실시양태 8. 실시양태 3-7 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드는 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 VHH 도메인을 포함하는 것인 방법.
- [0017] 실시양태 9. 실시양태 3-8 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 Fc 영역을 포함하는 것인 방법.
- [0018] 실시양태 10. 실시양태 9에 있어서, Fc 영역이 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0019] 실시양태 11. 실시양태 3-10 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 VHH-링커-VHH-링커-Fc 구조를 갖는 것인 방법.
- [0020] 실시양태 12. 실시양태 3-11 중 어느 한 실시양태에 있어서, 각 VHH 도메인은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 것인 방법.
- [0021] 실시양태 13. 실시양태 3-12 중 어느 한 실시양태에 있어서, VHH-링커-VHH가 서열 번호 5의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0022] 실시양태 14. 실시양태 13에 있어서, VHH-링커-VHH가 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0023] 실시양태 15. 실시양태 3-14 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 서열 번호 7의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0024] 실시양태 16. 실시양태 3-15 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0025] 실시양태 17. 실시양태 3-15 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 서열 번호 7의 아미노산 서

열로 구성된 것인 방법.

- [0026] 실시양태 18. 실시양태 1-17 중 어느 한 실시양태에 있어서, PLK1 억제제가 소분자 또는 간섭 RNA(siRNA)인 방법.
- [0027] 실시양태 19. 실시양태 1-18 중 어느 한 실시양태에 있어서, PLK1 억제제가 온반세르티프, 볼라세르티프, 리고세르티프, BI2536(Boehringer Ingelheim), *N*-[[4-[(6-클로로-3-피리디닐)메톡시]-3-메톡시페닐]메틸]-3,4-디메톡시벤젠에탄아민 하이드로클로라이드(SBE 13 HC1), MLN0905(Takeda Oncology), GSK461364(GlaxoSmithKline), 폴록신, 폴록신-2HT, RO3280(CAS 번호 1062243-51-9), HMN-214(CAS 번호 173529-46-9), HMN-176(CAS 번호 173529-10-7), 2-시아노-2-[3-에틸-4-옥소-5-[[3-(2-피롤리딘-1-일)에틸]아닐리노]메틸]-1,3-티아졸리딘-2-일]-*N*-(2,2,2-트리플루오로에틸)아세트아미드(ZK-티아졸리딘), 또는 사이클라폴린 9(CAS 번호 40533-25-3), 5-(5,6-디메톡시-1*H*-벤즈이미다졸-1-일)-3-[[2-(트리플루오로메틸)페닐]메톡시]-2-티오펜카복사미드(GW 843682X)인 방법.
- [0028] 실시양태 20. 실시양태 19에 있어서, PLK1 억제제가 온반세르티프, 볼라세르티프, 리고세르티프, BI2536(Boehringer Ingelheim), MLN0905(Takeda Oncology), GSK461364(GlaxoSmithKline), CYC140(Cyclacel), TKM-080301(TKM-PLK1; Arbutus Biopharma), 또는 TAK-960(Takeda Pharmaceutical Company)인 방법.
- [0029] 실시양태 21. 실시양태 1-18 중 어느 한 실시양태에 있어서, PLK1 억제제가 온반세르티프인 방법.
- [0030] 실시양태 22. 실시양태 1-21 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 효능제 및 PLK1 억제제가 별개로 투여되는 것인 방법.
- [0031] 실시양태 23. 실시양태 22에 있어서, DR5 효능제 및 PLK1 억제제가 순차적으로 투여되는 것인 방법.
- [0032] 실시양태 24. 실시양태 22 또는 23에 있어서, 적어도 1회 용량, 또는 제1 용량의 DR5 효능제가 PLK1 억제제 전에 투여되는 것인 방법.
- [0033] 실시양태 25. 실시양태 22 또는 23에 있어서, 적어도 1회 용량, 또는 제1 용량의 DR5 효능제가 PLK1 억제제 전에 투여되는 것인 방법.
- [0034] 실시양태 26. 실시양태 1-21 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 효능제 및 PLK1 억제제가 동시에 투여되는 것인 방법.
- [0035] 실시양태 27. 실시양태 1-26 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 효능제 및 PLK1 억제제가 시너지적으로 작용하는 것인 방법.
- [0036] 실시양태 28. 실시양태 27에 있어서, 시너지가 시험관내 세포 생존 검정법으로 결정되는 것인 방법.
- [0037] 실시양태 29. 실시양태 1-28 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 효능제 및 PLK1 억제제의 투여가, 각 작용제를 단독으로 투여하는 것과 비교하여 시너지 효과를 가져오는 것인 방법.
- [0038] 실시양태 30. 암 치료를 필요로 하는 피험체에게 (a) 사멸 수용체 5(DR5) 효능제, 및 (b) 사이클린 의존적 키나제(CDK) 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료를 필요로 하는 피험체에서 암을 치료하는 방법.
- [0039] 실시양태 31. 실시양태 30에 있어서, DR5 효능제가 INBRX-109, 에프토자네르민 알파(ABBV-621), IGM-8444(IGM Biosciences), BI 905711(Boehringer Ingelheim), GEN1029(HexaBody®-DR5/DR5; Genmab), TAS266(Novartis), MM-201a(Merrimack Pharmaceuticals), 또는 MM201-b(Merrimack Pharmaceuticals)인 방법.
- [0040] 실시양태 32. 실시양태 31에 있어서, DR5 효능제가 INBRX-109인 방법.
- [0041] 실시양태 33. 실시양태 30에 있어서, DR5 효능제가 DR5 결합 폴리펩티드인 방법.
- [0042] 실시양태 34. 실시양태 33에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 적어도 4가인 방법.
- [0043] 실시양태 35. 실시양태 32-34 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 적어도 하나의 VHH 도메인을 포함하는 것인 방법.
- [0044] 실시양태 36. 실시양태 35에 있어서, 적어도 하나의 VHH 도메인이 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

- [0045] 실시양태 37. 실시양태 32-36 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 VHH 도메인을 포함하는 것인 방법.
- [0046] 실시양태 38. 실시양태 32-37 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 Fc 영역을 포함하는 것인 방법.
- [0047] 실시양태 39. 실시양태 38에 있어서, Fc 영역이 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0048] 실시양태 40. 실시양태 32-39 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 VHH-링커-VHH-링커-Fc 구조를 갖는 것인 방법.
- [0049] 실시양태 41. 실시양태 32-40 중 어느 한 실시양태에 있어서, 각 VHH 도메인은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 것인 방법.
- [0050] 실시양태 42. 실시양태 32-41 중 어느 한 실시양태에 있어서, VHH-링커-VHH가 서열 번호 5의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0051] 실시양태 43. 실시양태 42에 있어서, VHH-링커-VHH가 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0052] 실시양태 44. 실시양태 32-43 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 서열 번호 7의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0053] 실시양태 45. 실시양태 32-44 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0054] 실시양태 46. 실시양태 32-44 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 결합 폴리펩티드가 서열 번호 7의 아미노산 서열로 구성된 것인 방법.
- [0055] 실시양태 47. 실시양태 30-46 중 어느 한 실시양태에 있어서, CDK 억제제가 CDK9 억제제인 방법.
- [0056] 실시양태 48. 실시양태 30-47 중 어느 한 실시양태에 있어서, CDK 억제제가 소분자인 방법.
- [0057] 실시양태 49. 실시양태 30-48 중 어느 한 실시양태에 있어서, CDK 억제제가 플라보피리돌, 셀리시클립, 디나시클립, 아투메시클립, 에니토시클립, AZD4573, i-CDK9, 또는 NVP-2인 방법.
- [0058] 실시양태 50. 실시양태 49에 있어서, CDK 억제제가 디나시클립, NVP-2, 플라보피리돌, 에니토시클립, 또는 AZD4573인 방법.
- [0059] 실시양태 51. 실시양태 30-50 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 효능제 및 CDK 억제제가 별개로 투여되는 것인 방법.
- [0060] 실시양태 52. 실시양태 51에 있어서, DR5 효능제 및 CDK 억제제가 순차적으로 투여되는 것인 방법.
- [0061] 실시양태 53. 실시양태 51 또는 52, 적어도 1회 용량, 또는 제1 용량의 DR5 효능제가 CDK 억제제 전에 투여되는 것인 방법.
- [0062] 실시양태 54. 실시양태 51 또는 52, 적어도 1회 용량, 또는 제1 용량의 DR5 효능제가 CDK 억제제 후에 투여되는 것인 방법.
- [0063] 실시양태 55. 실시양태 30-51 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 효능제 및 CDK 억제제가 동시에 투여되는 것인 방법.
- [0064] 실시양태 56. 실시양태 30-55 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 효능제 및 CDK 억제제가 시너지적으로 작용하는 것인 방법.
- [0065] 실시양태 57. 실시양태 56에 있어서, 시너지가 시험관내 세포 생존 검정법으로 결정되는 것인 방법.
- [0066] 실시양태 58. 실시양태 30-57 중 어느 한 실시양태에 있어서, DR5 효능제와 CDK 억제제의 투여가, 각 작용제를 단독으로 투여하는 것과 비교하여 시너지 효과를 가져오는 것인 방법.
- [0067] 실시양태 59. 실시양태 1-58 중 어느 한 실시양태에 있어서, 암이 부신암; 성상세포종; 기저 세포 암종, 담관암; 방광암; 골암; 뇌 및 중추신경계 암; 유방암; 복막암; 자궁경부암; 용모막암종; 연골육종; 유잉 육종

(Ewing sarcoma); 결장 및 직장 암(결장직장암); 결합 조직 암; 소화계 암; 자궁내막암; 식도암; 안암; 두부경부암; 위암; 위장암; 교아세포종; 간암종; 간종양; 상피내 신생물; 신장암 또는 신세포암(kidney or renal cancer); 후두암; 백혈병; 간암; 폐암; 소세포 폐암; 비소세포 폐암; 폐 선암종; 폐 편평세포 암종; 흑색종; 골수종; 신경아세포종; 구강암(구순암, 설암, 구강암, 및/또는 인두암); 난소암; 췌장암, 예컨대 췌장 선암종; 뇌하수체 암; 전립선암; 망막아세포종; 횡문근육종; 직장암; 호흡계 암; 중피종; 타액선 암종; 육종; 피부암; 편평세포암; 위암; 고환암; 갑상선암; 자궁 또는 자궁내막 암; 비뇨계 암; 및 외음부암; 림프종; 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma); 비호지킨 림프종; B 세포 림프종; 저등급/여포성 비호지킨 림프종(NHL: non-Hodgkin's lymphoma); 소형 림프구성(SL: small lymphocytic) NHL; 중간 등급/여포성 NHL; 중간 등급 미만성 NHL; 고등급 면역아세포성 NHL; 고등급 림프아구성 NHL; 고등급 소형 비절단 세포 NHL; 벌키 질환 NHL; 외투 세포 림프종; AIDS 관련 림프종; 발덴스트롬 마크로글로빈혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia); 만성 림프구성 백혈병(CLL: chronic lymphocytic leukemia); 급성 림프아구성 백혈병(ALL: acute lymphoblastic leukemia); 모발상 세포 백혈병; 만성 골수아구성 백혈병; 뿐만 아니라, 다른 암종 및 육종; 및 이식 후 림프증식성 장애(PTLD: post-transplant lymphoproliferative disorder) 뿐만 아니라, 모종증과 연관된 비정상적인 혈관 증식, 부종(예컨대, 뇌종양과 연관된 부종), 및 메이그스 증후군(Meigs' syndrome)인 방법.

[0068] 실시양태 60. PLK1 억제제와 조합하여 DR5 효능제를 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법에서 사용하기 위한 DR5 효능제.

[0069] 실시양태 61. 암 치료용 의약 제조를 위한 DR5 효능제의 용도로서, 의약은 PLK1 억제제와 함께 투여하기 위한 것인 용도.

[0070] 실시양태 62. CDK 억제제, 예컨대 CDK9 억제제와 조합하여 DR5 효능제를 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법에서 사용하기 위한 DR5 효능제.

[0071] 실시양태 63. 암 치료용 의약 제조를 위한 DR5 효능제의 용도로서, 의약은 CDK 억제제, 예컨대 CDK9 억제제와 함께 투여하기 위한 것인 용도.

도면의 간단한 설명

[0072] 도 1a-1f는 상이한 암 세포주를 다양한 농도의 INBRX-109(0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 또는 10 nM) 및 온반세르티프(0.32, 1.6, 8, 40, 200, 또는 1000 nM)와 접촉시킨 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 HT-29(도 1a), LS174T(도 1b), SW620(도 1c), SW837(도 1d), SW1463(도 1e), 및 LS411N(도 1f)에 대해 제시되어 있다.

도 2a-2f는 상이한 암 세포주를 다양한 농도의 INBRX-109(0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 또는 10 nM) 단독으로, 또는 200 nM 온반세르티프와 조합하여 접촉시킨 INBRX-109 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 HT-29(도 2a), LS174T(도 2b), SW620(도 2c), SW837(도 2d), SW1463(도 2e), 및 LS411N(도 2f)에 대해 제시되어 있다. "Cpd 단독"으로 표지된 점선은 200 nM 온반세르티프 단독으로 처리된 암 세포의 생존율(%)을 보여주는 것이다.

도 3a-3f는 상이한 암 세포주를 다양한 농도의 온반세르티프(0.32, 1.6, 8, 40, 200, 또는 1000 nM) 단독으로, 또는 1 nM INBRX-109와 조합하여 접촉시킨 온반세르티프 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 HT-29(도 3a), LS174T(도 3b), SW620(도 3c), SW837(도 3d), SW1463(도 3e), 및 LS411N(도 3f)에 대해 제시되어 있다. "Ab 단독"으로 표지된 점선은 1 nM INBRX-109 단독으로 처리된 암 세포의 생존율(%)을 보여주는 것이다.

도 4a-4i, 5a-5i, 및 6a-6i는 상이한 결장직장암 세포주를 다양한 농도의 온반세르티프(274 pM, 823 pM, 2.47 nM, 7.41 nM, 22.22 nM, 66.67 nM, 200 nM, 600 nM, 및 1.8 μM) 단독으로, 또는 1 nM INBRX-109와 조합하여 접촉시킨 온반세르티프 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 본 결과는 암 세포주 SK-CO-1(도 4a), SNU-C5(도 4b), LS 1034(도 4c), LS 123(도 4d), LS 180(도 4e), T84(도 4f), SW-48(도 4g), SW01116(도 4h), SW-1463(도 4i), SW-837(도 5a), SW-948(도 5b), LS 513(도 5c), NCI-H716(도 5d), HCT 116(도 5e), DLD-1(도 5f), HCT-15(도 5g), LS 174T(도 5h), Ht-55(도 5i), SNU-81(도 6a), HT-29(도 6b), SW-620(도 6c), Hu Tu 80(도 6d), SW-480(도 6e), SW-403(도 6f), LoVo(도 6g), SNU-C2A(도 6h), NCI-H747(도 6i), COLO320DM(도 6j), RKO(도 6k), HCT-8(도 6l)에 대해 제시되어 있다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. "Ab 단독"으로 표지된 점선은 1 nM INBRX-109 단독으로 처리된 암 세포의 생존율(%)을 보여주는 것이다.

도 7a-7i 및 8a-8h는 상이한 췌장암 세포주들을 다양한 농도의 온반세르티프(274 pM, 823 pM, 2.47 nM, 7.41 nM, 22.22 nM, 66.67 nM, 200 nM, 600 nM, 및 1.8 μ M) 단독으로, 또는 1 nM INBRX-109와 조합하여 접촉시킨 온반세르티프 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 본 결과는 암 세포주 MA PaCa-2(도 7a), Panc 05.24(도 7b), SW-1990(도 7c), HuP-T4(도 7d), BxPC-3(도 7e), Capan-2(도 7f), KP4(도 7g), AsPC-1(도 7h), PSN-1(도 7i), HPAF-II(도 8a), PANC-1(도 8b), Capan-1(도 8c), CFPAC-1(도 8d), Panc 03.27(도 8e), SU.86.86(도 8f), PL45(도 8g), Panc 10.05(도 8h)에 대해 제시되어 있다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. "Ab 단독"으로 표시된 점선은 1 nM INBRX-109 단독으로 처리된 암 세포의 생존율(%)을 보여주는 것이다.

도 9a-9e는 상이한 암 세포주를 다양한 농도의 INBRX-109(0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 또는 10 nM) 및 디나시클립(0.2, 1, 5, 25, 125, 또는 625 nM)과 접촉시킨 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 CAL-78(도 9a), OUMS-27(도 9b), SW1353(도 9c), H-EMC-SS(도 9d), 및 SW620(도 9e)에 대해 제시되어 있다.

도 10a-10e는 상이한 암 세포주를 다양한 농도의 INBRX-109(0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 또는 10 nM) 단독으로, 또는 25 nM 디나시클립과 조합하여 접촉시킨 INBRX-109 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 CAL-78(도 10a), OUMS-27(도 10b), SW1353(도 10c), H-EMC-SS(도 10d), 및 SW620(도 10e)에 대해 제시되어 있다. "Cpd 단독"으로 표시된 점선은 25 nM 디나시클립 단독으로 처리된 암 세포의 생존율(%)을 보여주는 것이다.

도 11a-11e는 상이한 암 세포주를 다양한 농도의 디나시클립(0.2, 1, 5, 25, 125, 또는 625 nM) 단독으로, 또는 1 nM INBRX-109와 조합하여 접촉시킨 디나시클립 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 CAL-78(도 11a), OUMS-27(도 11b), SW1353(도 11c), H-EMC-SS(도 11d), 및 SW620(도 11e)에 대해 제시되어 있다. "Ab 단독"으로 표시된 점선은 1 nM INBRX-109 단독으로 처리된 암 세포의 생존율(%)을 보여주는 것이다.

도 12a-12e는 상이한 암 세포주를 다양한 농도의 INBRX-109(0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 또는 10 nM) 및 NVP-2(0.2, 1, 5, 25, 125, 또는 625 nM)와 접촉시킨 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 CAL-78(도 12a), OUMS-27(도 12b), SW1353(도 12c), H-EMC-SS(도 12d), 및 SW620(도 12e)에 대해 제시되어 있다.

도 13a-13e는 상이한 암 세포주를 다양한 농도의 INBRX-109(0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 또는 10 nM) 단독으로, 또는 125 nM NVP-2와 조합하여 접촉시킨 INBRX-109 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 CAL-78(도 13a), OUMS-27(도 13b), SW1353(도 13c), H-EMC-SS(도 13d), 및 SW620(도 13e)에 대해 제시되어 있다. "Cpd 단독"으로 표시된 점선은 125 nM NVP-2 단독으로 처리된 암 세포의 생존율(%)을 보여주는 것이다.

도 14a-14e는 상이한 암 세포주를 다양한 농도의 NVP-2(0.2, 1, 5, 25, 125, 또는 625 nM) 단독으로, 또는 1 nM INBRX-109와 조합하여 접촉시킨 NVP-2 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 CAL-78(도 14a), OUMS-27(도 14b), SW1353(도 14c), H-EMC-SS(도 14d), 및 SW620(도 14e)에 대해 제시되어 있다. "Ab 단독"으로 표시된 점선은 1 nM INBRX-109 단독으로 처리된 암 세포의 생존율(%)을 보여주는 것이다.

도 15a-15f는 상이한 암 세포주를 다양한 농도의 INBRX-109(0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 또는 10 nM) 및 플라보피리돌(0.2, 1, 5, 25, 125, 또는 625 nM)과 접촉시킨 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 CAL-78(도 15a), OUMS-27(도 15b), HS-SY-II(도 15c), SW1353(도 15d), H-EMC-SS(도 15e) 및 SW620(도 15f)에 대해 제시되어 있다.

도 16a-16f는 상이한 암 세포주를 다양한 농도의 INBRX-109(0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 또는 10 nM) 단독으로, 또는 125 nM 플라보피리돌과 조합하여 접촉시킨 INBRX-109 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 CAL-78(도 16a), OUMS-27(도 16b), HS-SY-II(도 16c), SW1353(도 16d), H-EMC-SS(도 16e) 및 SW620(도 16f)에 대해 제시되어 있다. "Cpd 단독"으로 표시된 점선은 125 nM 플라보피리돌 단독으로 처리된 암 세포의 생존율(%)을 보여주는 것이다.

도 17a-17f는 상이한 암 세포주를 다양한 농도의 플라보피리돌(0.2, 1, 5, 25, 125, 또는 625 nM) 단독으로, 또는 1 nM INBRX-109와 조합하여 접촉시킨 플라보피리돌 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 CAL-78(도 17a), OUMS-27(도 17b), HS-SY-II(도 17c), SW1353(도 17d), H-EMC-SS(도 17e) 및 SW620(도 17f)에 대해 제시되어 있다.

II(도 17c), SW1353(도 17d), H-EMC-SS(도 17e) 및 SW620(도 17f)에 대해 제시되어 있다. "Ab 단독"으로 표지된 점선은 1 nM INBRX-109 단독으로 처리된 암 세포의 생존율(%)을 보여주는 것이다.

도 18a-18f는 상이한 암 세포주를 다양한 농도의 INBRX-109(0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 또는 10 nM) 및 에니토시클립(0.2, 1, 5, 25, 125, 또는 625 nM)과 접촉시킨 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 CAL-78(도 18a), OUMS-27(도 18b), HS-SY-II(도 18c), SW1353(도 18d), H-EMC-SS(도 18e) 및 SW620(도 18f)에 대해 제시되어 있다.

도 19a-19f는 상이한 암 세포주를 다양한 농도의 INBRX-109(0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 또는 10 nM) 단독으로, 또는 125 nM 에니토시클립과 조합하여 접촉시킨 INBRX-109 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 CAL-78(도 19a), OUMS-27(도 19b), HS-SY-II(도 19c), SW1353(도 19d), H-EMC-SS(도 19e) 및 SW620(도 19f)에 대해 제시되어 있다. "Cpd 단독"으로 표지된 점선은 125 nM 에니토시클립 단독으로 처리된 암 세포의 생존율(%)을 보여주는 것이다.

도 20a-20f는 상이한 암 세포주를 다양한 농도의 에니토시클립(0.2, 1, 5, 25, 125, 또는 625 nM) 단독으로, 또는 1 nM INBRX-109와 조합하여 접촉시킨 에니토시클립 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 CAL-78(도 20a), OUMS-27(도 20b), HS-SY-II(도 20c), SW1353(도 20d), H-EMC-SS(도 20e) 및 SW620(도 20f)에 대해 제시되어 있다. "Ab 단독"으로 표지된 점선은 1 nM INBRX-109 단독으로 처리된 암 세포의 생존율(%)을 보여주는 것이다.

도 21a-21b는 상이한 암 세포주를 다양한 농도의 INBRX-109(0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 또는 10 nM) 및 AZD-5991(0.0032, 0.016, 0.08, 0.4, 2.0, 10 nM)와 접촉시킨 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 CAL-78(도 21a), OUMS-27(도 21b), HS-SY-II(도 21c), SW1353(도 21d), H-EMC-SS(도 21e) 및 SW620(도 21f)에 대해 제시되어 있다.

도 22a-22f는 상이한 암 세포주를 다양한 농도의 INBRX-109(0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 또는 10 nM) 단독으로, 또는 2 nM AZD-5991과 조합하여 접촉시킨 INBRX-109 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 CAL-78(도 22a), OUMS-27(도 22b), HS-SY-II(도 22c), SW1353(도 22d), H-EMC-SS(도 22e) 및 SW620(도 22f)에 대해 제시되어 있다. "Cpd 단독"으로 표지된 점선은 2 nM AZD-5991 단독으로 처리된 암 세포의 생존율(%)을 보여주는 것이다.

도 23a-23f는 상이한 암 세포주를 다양한 농도의 AZD-5991(0.0032, 0.016, 0.08, 0.4, 2.0, 10 nM) 단독으로, 또는 1 nM INBRX-109와 조합하여 접촉시킨 AZD-5991 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 CAL-78(도 23a), OUMS-27(도 23b), HS-SY-II(도 23c), SW1353(도 23d), H-EMC-SS(도 23e) 및 SW620(도 23f)에 대해 제시되어 있다. "Ab 단독"으로 표지된 점선은 1 nM INBRX-109 단독으로 처리된 암 세포의 생존율(%)을 보여주는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0073] 본원에 제공된 실시양태는 사멸 수용체 5(DR5) 효능제 및 폴로 유사 키나제 1(PLK1) 억제제의 조합을 이용한 암을 치료하는 방법 및/또는 사멸 수용체 5(DR5) 효능제 및 사이클린 의존적 키나제(CDK) 억제제, 예컨대 CDK9 억제제의 조합을 이용한 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0074] 정의 및 다양한 실시양태
- [0075] 본원에서 사용된 섹션 표제는 단지 구성 목적을 위한 것이며, 설명된 주제를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.
- [0076] 특허 출원, 특허 공보 및 진뱅크 수탁 번호(Genbank Accession number)를 포함하여 본원에 인용된 모든 참고문헌은 마치 각각의 개별 참고문헌 그 전문이 참조로 포함되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 명시된 것과 같이 본원에서 참조로 포함된다.
- [0077] 본원에 기술되거나, 또는 참조된 기술 및 절차는 일반적으로 잘 이해되고, 일반적으로 당업자에 의해 통상적인 방법론, 예컨대, 예를 들어, 문헌 [Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, *et al.* eds., (2003))]; 시리즈 [METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995))], [Harlow and

Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE(R. I. Freshney, ed. (1987)); [Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press]; [Animal Cell Culture (R. I. Freshney), ed., 1987)]; [Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press]; [Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.)]; [Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987)]; [PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al.*, eds., 1994)]; [Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan *et al.*, eds., 1991)]; [Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999)]; [Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997)]; [Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989)]; [Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000)]; [Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)]; [The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)]; 및 [Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 1993)]; 및 그의 최신 버전에 기술된, 널리 사용되는 방법론을 사용하여 보편적으로 사용된다.

- [0078] 달리 정의되지 않는 한, 본 개시내용과 관련하여 사용되는 과학 및 기술 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 가져야 한다. 추가로, 문맥상 달리 요구되거나, 또는 명시적으로 표시되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함하여야 하고, 복수 용어는 단수를 포함하여야 한다. 다양한 출처나 참고문헌 간의 정의가 충돌하는 경우 본원에서 제공하는 정의가 우선할 것이다.
- [0079] 일반적으로, 면역글로불린 중쇄의 잔기 넘버링은 문헌 [Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]에서와 같은 EU 인텍스의 것이다. "Kabat에서와 같은 EU 인텍스"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다.
- [0080] 본원에 기술된 본 발명의 실시양태는 실시양태로 "구성된" 및/또는 실시양태로 "본질적으로 구성된"이라는 것을 포함하는 것으로 이해된다. 본원에서 사용되는 바, "하나"("a," "an") 및 "그"라는 단수 형태는 달리 명시되지 않는 한, 복수의 지시대상을 포함한다. 본원에서 "또는"이라는 용어를 사용한다고 해서 대안이 상호 배타적이라는 의미는 아니다.
- [0081] 본 출원에서, "또는"의 사용은 당업자가 명시적으로 언급하거나 이해하지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 다중 종속항의 맥락에서, "또는"의 사용은 1 초과의 이전 독립항 또는 종속항을 다시 참조한다.
- [0082] "참조 샘플," "참조 세포" 또는 "참조 조직"이라는 어구는 적어도 하나의 비공지된 특징을 갖는 샘플과의 비교로서 사용될 수 있는 적어도 하나의 공지된 특징을 갖는 샘플을 의미한다. 일부 실시양태에서, 참조 샘플은 양성 또는 음성 지표로 사용될 수 있다. 참조 샘플은 비공지된 특징을 갖는 샘플에 존재하는 단백질 및/또는 mRNA의 수준과 대조적으로, 예를 들어 건강한 조직에 존재하는 단백질 및/또는 mRNA의 수준을 확립하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 참조 샘플은 동일한 피험체로부터 유래하지만, 시험되는 피험체의 다른 부분으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 참조 샘플은 암 주위 또는 암에 인접한 조직 영역으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 참조 샘플은 시험되는 피험체로부터의 것이 아니라, 문제의 장애(예를 들어, 특정 암 또는 DR5 관련 장애)를 앓거나, 또는 앓지 않는 것으로 알려진 피험체로부터의 샘플이다. 일부 실시양태에서, 참조 샘플은 동일한 피험체로부터의 것이지만, 피험체에서 암이 발생하기 전 시점으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 참조 샘플은 동일하거나, 또는 상이한 피험체로부터의 양성 암 샘플로부터의 것이다. 음성 참조 샘플이 비교를 위해 사용되는 경우, 음성 참조 샘플에서 문제의 분자의 발현 수준 또는 양은 본 개시내용을 고려할 때, 분자가 존재하기 않고/거나, 분자가 낮은 수준으로 존재한다는 것을 당업자가 인식할 수준을 나타낼 것이다. 양성 참조 샘플이 비교를 위해 사용되는 경우, 양성 참조 샘플에서 문제의 분자의 발현 수준 또는 양은 본 개시내용을 고려할 때, 분자가 일정 수준으로 존재한다는 것을 당업자가 인식할 수준을 나타낼 것이다.
- [0083] 치료제의 투여로부터 이익을 얻거나, 또는 이에 반응하는 것의 맥락에서 본원에서 사용되는 용어 "이익," "임상적 이익," "반응성" 및 "치료 반응성"은 예컨대, 지속화 및 완전한 정지를 포함하는 질환 진행을 어느 정도까지 억제; 질환 에피소드 및/또는 증상의 수 감소; 병변 크기 축소; 인접한 말초 기관 및/또는 조직으로의 질환 세포 침윤의 억제(즉, 감소, 지속화 또는 완전한 정지); 질환 확산의 억제(즉, 감소, 지속화 또는 완전한 정지);

장애와 연관된 하나 이상의 증상을 어느 정도까지 완화; 치료 후 무질환 제시 기간, 예를 들어, 무진행 생존 기간의 연장; 전체 생존율 증가; 더 높은 반응률; 및/또는 치료 후 주어진 시점에서 사망률 감소와 같은 다양한 종점을 평가함으로써 측정될 수 있다. "무반응" 또는 "반응 실패"인 피험체 또는 암은 "반응성"이라는 상기 언급된 자격을 충족시키지 못한 것이다.

[0084] 용어 "핵산 분자," "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 상호교환적으로 사용될 수 있으며, 뉴클레오타이드의 중합체를 지칭한다. 상기 뉴클레오타이드 중합체는 천연 및/또는 비천연 뉴클레오타이드를 함유할 수 있고, DNA, RNA 및 PNA를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. "핵산 서열"은 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오타이드에 포함된 선형 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다.

[0085] 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하는 것으로 상호교환적으로 사용되며, 최소 길이로 제한되지는 않는다. 상기 아미노산 잔기의 중합체는 천연 또는 비천연 아미노산 잔기를 함유할 수 있고, 펩티드, 올리고펩티드, 아미노산 잔기의 이량체, 삼량체 및 다량체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 전장의 단백질 및 그의 단편, 둘 모두가 본 정의에 포함된다. 본 용어는 또한 폴리펩티드의 발현 후 변형, 예를 들어, 글리코실화, 시알틸화, 아세틸화, 인산화 등을 포함한다. 추가로, 본 개시내용의 목적을 위해, "폴리펩티드"는 단백질이 원하는 활성을 유지하는 한, 천연 서열에 대한 결실, 부가 및 치환(일반적으로 자연적으로 보존적 치환)과 같은 변형을 포함하는 단백질을 지칭한다. 상기 변형은 부위 지정 돌연변이 유발과 같이 의도적일 수도 있고, 예컨대, 단백질을 생산하는 숙주의 돌연변이 또는 PCR 증폭으로 인한 오류를 통한 것과 같이 우발적일 수도 있다.

[0086] 본원에서 사용되는 용어 "DR5," "사멸 수용체 5," "TNFRSF10B," 및 "TRAILR2"는 세포에서 DR5 전구체의 프로세싱으로부터 생성되는 임의의 천연 성숙 DR5를 지칭한다. 본 용어는 달리 명시되지 않는 한, 포유동물, 예컨대, 영장류(예컨대, 인간 및 시노물구스 또는 레수스 원숭이) 및 설치류(예컨대, 마우스 및 래트)를 비롯한 임의의 척추동물 공급원으로부터의 DR5를 포함한다. 본 용어는 또한 DR5의 자연적으로 발생된 변이체, 예컨대, 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. 비제한적인 예시적인 전구체 인간 DR5 아미노산 서열은 예컨대, NCBI 수탁 번호 NP_003833.4에 제시되어 있다. 서열 번호 8을 참조한다. 비제한적인 예시적인 전구체 인간 DR5 아미노산 서열은 예컨대, 서열 번호 9에 제시되어 있다.

[0087] 본원에서 사용되는 용어 "PLK1" 및 "폴로 유사 키나제 1"은 임의의 천연 성숙 PLK1을 지칭한다. 본 용어는 달리 명시되지 않는 한, 포유동물, 예컨대, 영장류(예컨대, 인간 및 시노물구스 또는 레수스 원숭이) 및 설치류(예컨대, 마우스 및 래트)를 비롯한 임의의 척추동물 공급원으로부터의 PLK1을 포함한다. 본 용어는 또한 PLK1의 자연적으로 발생된 변이체, 예컨대, 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. 비제한적인 PLK1 아미노산 서열은 예컨대, UniProtKB/Swiss-Prot 수탁 번호 P53350.1에 제시되어 있다. 서열 번호 10을 참조한다.

[0088] 본원에서 사용되는 용어 "CDK9" 및 "사이클린 의존적 키나제 9"는 임의의 천연 성숙 CDK9를 지칭한다. 본 용어는 달리 명시되지 않는 한, 포유동물, 예컨대, 영장류(예컨대, 인간 및 시노물구스 또는 레수스 원숭이) 및 설치류(예컨대, 마우스 및 래트)를 비롯한 임의의 척추동물 공급원으로부터의 CDK9를 포함한다. 본 용어는 또한 CDK9의 자연적으로 발생된 변이체, 예컨대, 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. 비제한적인 아미노산 서열은 예컨대, UniProtKB/Swiss-Prot 수탁 번호 P50750-1에 제시되어 있다. 서열 번호 11을 참조한다.

[0089] 항원 또는 에피토프에 "특이적으로 결합한다"라는 용어는 당업계에서 널리 이해되는 용어이고, 상기 특이적 결합을 결정하는 방법 또한 당업계에 널리 공지되어 있다. 분자가 대체 세포 또는 물질의 경우보다 특정 세포나 물질과 더 빈번하게, 더 빠르게, 더 긴 지속 시간 및/또는 더 큰 친화도로 반응하거나, 또는 회합한다면, 분자는 "특이적 결합" 또는 "우선적 결합"을 나타낸다고 한다. 단일 도메인 항체(sdAb: single-domain antibody) 또는 VHH 함유 폴리펩티드는 다른 물질에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로, 결합력으로, 더 쉽게 및/또는 더 긴 지속 시간으로 결합한다면, 표적에 "특이적으로 결합하거나," 또는 "우선적으로 결합하는 것이다." 예를 들어, DR5 에피토프에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 sdAb 또는 VHH 함유 폴리펩티드는 다른 DR5 에피토프 또는 비DR5 에피토프에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로, 결합력으로, 더 쉽게 및/또는 더 긴 지속 시간으로 상기 에피토프에 결합하는 sdAb 또는 VHH 함유 폴리펩티드이다. 예를 들어, 제1 표적에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 sdAb 또는 VHH 함유 폴리펩티드는 제2 표적에 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있거나, 또는 결합하지 않을 수 있다는 본 정의를 관독함으로써 이 또한 이해된다. 따라서, "특이적 결합" 또는 "우선적 결합"은 (포함할 수도 있지만) 배타적 결합을 반드시 요구하지는 않는다. 반드시 그런 것은 아니지만, 일반적으로, 결합에 대한 언급은 우선적 결합을 의미한다. "특이성"은 항원에 선택적으로 결합하는 결합 단백질의 능력을 지

칭한다.

[0090] "억제" 또는 "억제하다"라는 용어는 임의의 표현형 특징의 감소 또는 중단, 또는 해당 특징의 발생률, 정도 또는 가능성의 감소 또는 중단을 지칭한다. "감소시키다" 또는 "억제하다"라는 것은 참조와 비교하여 활성, 기능 및/또는 양을 저하시키거나, 감소시키거나, 또는 정지시키는 것이다. 일부 실시양태에서, "감소시키다" 또는 "억제하다"라는 것은 10% 이상의 전반적인 감소를 유발하는 능력을 의미한다. 일부 실시양태에서, "감소시키다" 또는 "억제하다"라는 것은 50% 이상의 전반적인 감소를 유발하는 능력을 의미한다. 일부 실시양태에서, "감소시키다" 또는 "억제하다"라는 것은 75%, 85%, 90%, 95%, 또는 그 초과와 전반적인 감소를 유발하는 능력을 의미한다. 일부 실시양태에서, 상기 언급된 양은 동일한 기간에 걸친 대조군에 비해 일정 기간에 걸쳐 억제되거나 감소된다.

[0091] 본원에서 사용되는 바, 용어 "에피토프"는 항원 결합 분자(예를 들어, sdAb 또는 VHH 함유 폴리펩티드)가 표적 분자(예를 들어, 항원, 예컨대, 단백질, 핵산, 탄수화물 또는 지질) 상의 부위를 지칭한다. 에피토프는 종종 예컨대, 아미노산, 폴리펩티드 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 그룹을 포함하며, 특정 3차원 구조적 특징 뿐만 아니라, 특정 전하 특징을 갖는다. 에피토프는 표적 분자의 연속 및/또는 병치된 비연속 잔기(예를 들어, 아미노산, 뉴클레오타이드, 당, 지질 모이어티)로부터 형성될 수 있다. 인접한 잔기(예를 들어, 아미노산, 뉴클레오타이드, 당, 지질 모이어티)로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매에 노출시 유지되는 반면, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매로 처리시 손실된다. 에피토프는 적어도 3, 적어도 5 또는 8-10개의 잔기(예를 들어, 아미노산 또는 뉴클레오타이드)를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 에피토프의 길이는 20개 미만의 잔기(예를 들어, 아미노산 또는 뉴클레오타이드), 15개 미만의 잔기 또는 12개 미만의 잔기이다. 두 항체가 항원에 대해 경쟁적 결합을 나타낸다면, 상기 항체는 항원 내의 동일한 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 항원 결합 분자 상의 CDR 잔기까지의 특정 최소 거리에 의해 확인될 수 있다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 상기 거리에 의해 확인될 수 있고, 추가로 항원 결합 분자의 잔기와 항원 잔기 사이의 결합(예를 들어, 수소 결합)에 관여하는 잔기에 한정될 수 있다. 에피토프는 또한 다양한 스캔에 의해 확인될 수 있으며, 예를 들어, 알라닌 또는 아르기닌 스캔은 항원 결합 분자가 상호작용할 수 있는 하나 이상의 잔기를 나타낼 수 있다. 명시적으로 표시되지 않는 한, 에피토프로서의 잔기 세트는 특정 항원 결합 분자에 대한 에피토프의 일부가 되는 것으로부터 다른 잔기를 배제하지 않는다. 오히려, 상기 세트의 존재는 에피토프의 최소 시리즈(또는 종 세트)를 지정한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 에피토프로 확인된 잔기 세트는 항원 상의 에피토프에 대한 잔기의 배타적 목록이 아니라, 항원에 대한 관련성이 있는 최소 에피토프를 지정한다.

[0092] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 통상적인 항체(전형적으로 적어도 하나의 중쇄 및 적어도 하나의 경쇄 포함), 단일 도메인 항체(sdAb, 적어도 하나의 VHH 도메인 및 Fc 영역 포함), VHH 함유 폴리펩티드(적어도 하나의 VHH 도메인을 포함하는 폴리펩티드), 및 원하는 항원 결합 활성을 나타내는 한, 상기 중 임의의 것의 단편을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 항체 유사 항원 결합 도메인을 포함하는 다양한 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 이량체화 도메인을 포함한다. 상기 이량체화 도메인은 중쇄 불변 도메인(CH1, 힌지, CH2 및 CH3을 포함하며, 여기서, CH1은 전형적으로 경쇄 불변 도메인 CL과 쌍을 형성하고, 힌지는 이량체화를 매개한다) 및 Fc 영역(힌지, CH2, 및 CH3을 포함하며, 여기서, 힌지는 이량체화를 매개한다)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0093] 용어 항체는 또한 키메라 항체, 인간화 항체, 예컨대, 낙타류(라마 포함), 상어, 마우스, 인간, 시노몰구스 원숭이 등과 같은 다양한 종의 항체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0094] 본원에서 사용되는 바, 용어 "항원 결합 도메인"은 항원과 결합하기에 충분한 항체의 부분을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 통상적인 항체의 항원 결합 도메인은 3개의 중쇄 CDR 및 3개의 경쇄 CDR을 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3, 및 항원에 대한 결합을 유지하는 데 필요한 FR1 및/또는 FR4의 임의의 부분을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3, 및 항원에 대한 결합을 유지하는 데 필요한 FR1 및/또는 FR4의 임의의 부분을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, sdAb 또는 VHH 함유 폴리펩티드의 항원 결합 도메인은 VHH 도메인의 3개의 CDR을 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, sdAb 또는 VHH 함유 폴리펩티드의 항원 결합 도메인은 CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3, 및 항원에 대한 결합을 유지하는 데 필요한 FR1 및/또는 FR4의 임의의 부분을 포함하는 VHH 도메인을 포함한다.

[0095] 본원에서 사용되는 바, 용어 "VHH" 또는 "VHH 도메인" 또는 "VHH 항원 결합 도메인"은 단일 도메인 항체, 예컨대, 낙타류 항체 또는 상어 항체의 항원 결합부를 지칭한다. 일부 실시양태에서, VHH는 FR1, CDR1, FR2, CDR2,

FR3, CDR3, 및 FR4로 지정된 3개의 CDR 및 4개의 프레임워크 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, VHH는 VHH가 실질적으로 항원 결합 및 특이성을 유지하는 한, 부분적인 FR1 및/또는 FR4만을 포함하거나, 또는 이들 프레임워크 영역 중 하나 또는 둘 모두가 결여되도록 N-말단 또는 C-말단에서 말단절단될 수 있다.

[0096] 용어 "단일 도메인 항체" 및 "sdAb"는 경쇄가 없는 VHH 도메인과 같은 적어도 하나의 단량체 도메인 및 Fc 영역을 포함하는 항체를 지칭하는 것으로 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 일부 실시양태에서, sdAb는 각각의 폴리펩티드가 적어도 하나의 VHH 도메인 및 Fc 영역을 포함하는 2개의 폴리펩티드의 이량체이다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "단일 도메인 항체" 및 "sdAb"는 다중 VHH 도메인을 포함하는 폴리펩티드, 예컨대, 구조 VHH₁-VHH₂-Fc 또는 VHH₁-VHH₂-VHH₃-Fc를 갖는 폴리펩티드를 포함하며, 여기서, VHH₁, VHH₂, 및 VHH₃은 동일하거나, 또는 상이한 것일 수 있다.

[0097] 용어 "VHH 함유 폴리펩티드"는 적어도 하나의 VHH 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, VHH 폴리펩티드는 2개, 3개, 또는 4개 또는 그 초과 VHH 도메인을 포함하며, 여기서, 각각의 VHH 도메인은 동일하거나, 또는 상이한 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, VHH 함유 폴리펩티드는 Fc 영역을 포함한다. 상기의 일부 실시양태에서, VHH 함유 폴리펩티드는 sdAb로 지칭될 수 있다. 추가로, 상기의 일부 실시양태에서, VHH 폴리펩티드는 이량체를 형성할 수 있다. sdAb이기도 한 VHH 함유 폴리펩티드의 비제한적인 구조는 VHH₁-Fc, VHH₁-VHH₂-Fc, 및 VHH₁-VHH₂-VHH₃-Fc를 포함하며, 여기서, VHH₁, VHH₂, 및 VHH₃은 동일하거나, 또는 상이한 것일 수 있다. 상기 구조의 일부 실시양태에서, 한 VHH는 링커에 의해 또 다른 VHH에 연결될 수 있거나, 또는 한 VHH는 링커에 의해 Fc에 연결될 수 있다. 상기의 일부 실시양태에서, 링커는 1-20개의 아미노산, 바람직하게는 주로 글리신 및 임의적으로, 세린으로 구성된 1-20개 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, VHH 함유 폴리펩티드가 Fc를 포함하는 경우, 이는 이량체를 형성한다. 따라서, 구조 VHH₁-VHH₂-Fc가 이량체를 형성하는 경우, 4가인 것으로 간주된다(즉, 이량체는 4개의 VHH 도메인을 갖는다). 유사하게, 구조 VHH₁-VHH₂-VHH₃-Fc가 이량체를 형성하는 경우, 6가인 것으로 간주된다(즉, 이량체는 6개의 VHH 도메인을 갖는다).

[0098] 용어 "단일클론 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단의 항체(sdAb 또는 VHH 함유 폴리펩티드 포함)를 지칭하며, 즉, 집단을 구성하는 개별 항체는 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연적으로 발생된 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 단일클론 항체는 단일 항원 부위에 대해 고도로 특이적이다. 추가로, 전형적으로 상이한 결정기(에피토프)에 대한 상이한 항체를 포함하는 다중클론 항체 제제와 달리, 각각의 단일클론 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대한 것이다. 따라서, 단일클론 항체 샘플은 항원 상의 동일한 에피토프에 결합할 수 있다. "단일클론"이라는 수식어는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 것이라는 항체의 특징을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의한 항체 생산을 요구하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 예를 들어, 단일클론 항체는 문헌 [Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495]에 최초로 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 예컨대, 미국 특허 제4,816,567호에 기술된 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다. 단일클론 항체는 또한 예를 들어, 문헌 [McCafferty *et al.*, 1990, Nature 348:552-554]에 기술된 기술을 사용하여 생성된 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0099] 용어 "CDR"은 당업자에게 적어도 하나의 확인 방식에 의해 정의되는 상보성 결정 영역을 의미한다. 일부 실시양태에서, CDR은 코티아(Chothia) 넘버링 체계, 카바트(Kabat) 넘버링 체계, 카바트 및 코티아의 조합, AbM 정의, 및/또는 접촉 정의 중 임의의 것에 따라 정의될 수 있다. VHH는 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 지정된 3개의 CDR을 포함한다.

[0100] 본원에서 사용되는 바, 용어 "중쇄 불변 영역"은 적어도 3개의 중쇄 불변 도메인, C_H1, 힌지, C_H2, 및 C_H3을 포함하는 영역을 지칭한다. 물론, 도메인 내에서 기능을 변경하지 않는 결실 및 변경은 달리 지정되지 않는 한, "중쇄 불변 영역"이라는 용어의 범주 내에 포함된다. 비제한적인 예시적 중쇄 불변 영역은 γ , δ 및 α 를 포함한다. 비제한적인 예시적 중쇄 불변 영역은 또한 ϵ 및 μ 도 포함한다. 각각의 중쇄 불변 영역은 항체 이소타입에 상응한다. 예를 들어, γ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgG 항체이고, δ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgD 항체이고, α 불변 영역을 포함하는 항체는 IgA 항체이다. 추가로, μ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgM 항체이고, ϵ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgE 항체이다. 특정 이소타입은 서브부류로 추가로 세분화될 수 있다. 예를 들어, IgG 항체는 IgG1(γ_1 불변 영역 포함), IgG2(γ_2 불변 영역 포함), IgG3(γ_3 불변 영역 포함), 및 IgG4(γ_4 불변 영역 포함) 항체를 포함하나, 이에 제한되지 않고; IgA 항체는 IgA1(α_1 불변 영역 포함) 및 IgA2(α_2 불변 영역 포함) 항체를 포함하나, 이에 제한되지 않고; IgM 항체는 IgM1 및 IgM2를 포함하나, 이에

제한되지 않는다.

- [0101] 본원에서 사용되는 바, "Fc 영역"은 CH2 및 CH3을 포함하는 중쇄 불변 영역의 일부를 지칭한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 힌지, CH2 및 CH3을 포함한다. 다양한 실시양태에서, Fc 영역이 힌지를 포함하는 경우, 힌지는 2개의 Fc 함유 폴리펩티드 사이의 이량체화를 매개한다. Fc 영역은 본원에서 논의된 임의의 항체 중쇄 불변 영역 이소타입의 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다.
- [0102] 본원에서 사용되는 바, "수용자 인간 프레임워크"는 본원에 논의된 바와 같이, 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 중쇄 가변 도메인(V_H) 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 수용자 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 아미노산 서열 변이를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 변이의 개수는 예컨대, VHH와 같은 단일 항원 결합 도메인의 모든 인간 프레임워크에 걸쳐 10개 미만, 9개 미만, 8개 미만, 7개 미만, 6개 미만, 5개 미만, 4개 미만, 또는 3개 미만이다.
- [0103] "친화도"는 분자(예를 들어, 항체, 예컨대, sdAb, 또는 VHH 함유 폴리펩티드)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너(예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총합의 강도를 지칭한다. 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화도 또는 결합 친화도는 일반적으로 각각 해리 상수(K_D) 또는 K_{D-결보기}로 표시될 수 있다. 친화도는 본원에 기술된 것을 포함하여, 당업계에 공지된 일반적인 방법(예컨대, 예를 들어, ELISA K_D, KinExA, 유세포 분석법 및/또는 표면 플라즈몬 공명 장치)에 의해 측정될 수 있다. 상기 방법은 BIA코어(BIAcore)®, 옥테트(Octet)® 또는 유세포 분석법을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0104] 본원에서 사용되는 바, 용어 "K_D"는 항원 결합 분자/항원 상호작용의 평형 해리 상수를 지칭한다. 본원에서 "K_D"라는 용어가 사용되는 경우, K_D 및 K_{D-결보기}를 포함한다.
- [0105] 일부 실시양태에서, 항원 결합 분자의 K_D는 항원 발현 세포주를 사용하고 각 항체 농도에서 측정된 평균 형광을 비선형 단일 부위 결합 방정식(Prism Software 그래프패드)에 피팅하는 유세포 분석에 의해 측정된다. 상기의 일부 실시양태에서, K_D는 K_{D-결보기}이다.
- [0106] 용어 "생물학적 활성"은 (생체내에서 발견된 대로 자연적으로 존재하든, 또는 재조합 수단에 의해 제공되거나, 가능하든) 분자의 임의의 하나 이상의 생물학적 특성을 지칭한다. 생물학적 특성은 리간드 결합, 세포 증식 유도 또는 증가, 및 사이토카인 발현 유도 또는 증가를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0107] "효능제" 또는 "활성화" 항체 또는 폴리펩티드는 그의 표적 항원의 생물학적 활성을 증가시키고/거나, 활성화시키는 것이다. 일부 실시양태에서, 효능제 항체 또는 폴리펩티드는 항원에 결합하고, 그의 생물학적 활성을 적어도 약 20%, 40%, 60%, 80%, 85% 또는 그 초과만큼 증가시킨다.
- [0108] "길항제," "차단" 또는 "중화" 항체는 표적 항원의 생물학적 활성을 억제하고/거나, 감소시키고/거나, 불활성화시키는 것이다. 일부 실시양태에서, 중화 항체는 항원에 결합하고, 생물학적 활성을 적어도 약 20%, 40%, 60%, 80%, 85% 90%, 95%, 99% 또는 그 초과만큼 감소시킨다.
- [0109] "친화성 성숙화된" sdAb 또는 VHH 함유 폴리펩티드는 변형을 보유하지 않는 모체 sdAb 또는 VHH 함유 폴리펩티드와 비교하여 하나 이상의 CDR에 하나 이상의 변형이 있는 sdAb 또는 VHH 함유 폴리펩티드로서, 상기 변형은 항원에 대한 sdAb 또는 VHH 함유 폴리펩티드의 친화도를 개선시키는 것인 sdAb 또는 VHH 함유 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0110] 본원에서 사용되는 바, "인간화 VHH"는 하나 이상의 프레임워크 영역이 인간 프레임워크 영역으로 실질적으로 대체된 VHH를 지칭한다. 일부 경우에서, 인간 면역글로불린의 특정 프레임워크 영역(FR) 잔기가 상응하는 비인간 잔기로 대체된다. 추가로, 인간화 VHH는 원래의 VHH 또는 인간 프레임워크 서열에서는 발견되지 않지만, sdAb VHH 함유 폴리펩티드 성능을 추가로 정제하고 최적화하기 위해 포함되는 잔기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간화 sdAb 또는 VHH 함유 폴리펩티드는 인간 Fc 영역을 포함한다. 인식되는 바와 같이, 인간화 서열은 그의 1차 서열에 의해 확인될 수 있으며, 반드시 항체가 생성된 프로세스를 나타내는 것은 아니다.
- [0111] "이펙터-양성 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 "이펙터 기능"을 보유한다. 예시적인 "이펙터 기능"으로는 Fc 수용체 결합; C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성(CDC: complement dependent cytotoxicity); Fc 수용체 결합; 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity); 포식작용; 세포 표면

수용체(예를 들어 B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화 등을 포함한다. 상기 이펙터 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인(예를 들어, 항체 가변 도메인)과 결합되어야 하며, 다양한 검정법을 사용하여 평가될 수 있다.

[0112] "천연 서열 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연 서열 인간 Fc 영역은 천연 서열 인간 IgG1 Fc 영역(비A 및 A 알로타입); 천연 서열 인간 IgG2 Fc 영역; 천연 서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 천연 서열 인간 IgG4 Fc 영역 영역 뿐만 아니라, 그의 자연적으로 발생된 변이체를 포함한다.

[0113] "변이체 Fc 영역"은 적어도 하나의 아미노산 변형으로 인해 천연 서열 Fc 영역의 것과 다른 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, "변이체 Fc 영역"은 적어도 하나의 아미노산 변형으로 인해 천연 서열 Fc 영역과 다르지만, 천연 서열 Fc 영역의 적어도 하나의 이펙터 기능을 유지하는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역과, 또는 모체 폴리펩티드의 Fc 영역과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 치환, 예를 들어, 천연 서열 Fc 영역 중에 또는 모체 폴리펩티드의 Fc 영역 중에 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환, 및 바람직하게, 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에서 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역과 및/또는 모체 폴리펩티드의 Fc 영역과 적어도 약 80%의 서열 동일성, 그와 적어도 약 90%의 서열 동일성, 그와 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 서열 동일성을 가질 것이다.

[0114] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기술한다. 일부 실시양태에서, Fc γ R은 천연 인간 FcR이다. 일부 실시양태에서, FcR은 IgG 항체에 결합하는 것(감마 수용체)이고, Fc γ RI, Fc γ RRII 및 Fc γ RRIII 서브클래스의 수용체(상기 수용체의 대립유전자 변이체 및 선택적으로 스플라이싱된 형태 포함)를 포함한다. Fc γ RRII 수용체는 Fc γ RRIIA("활성화 수용체") 및 Fc γ RRIIB("억제 수용체")를 포함하며, 이는 주로 그의 세포질 도메인이 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RRIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif)를 함유하고, 억제 수용체 Fc γ RRIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신 기반 억제 모티프(ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)를 함유한다(예를 들어, 문헌 [Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 예를 들어, 문헌 [Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)]; [Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994)]; 및 [de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)]에 리뷰되어 있다. 향후 확인되는 FcR을 포함하여 다른 FcR은 본원에서 용어 "FcR"에 포함된다. 예를 들어, 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 모체 IgG를 태아로 전달(문헌 [Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976)] 및 [Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)]) 및 면역글로불린의 항상성을 조절하는 역할을 하는 신생아 수용체인 FcRn도 포함한다. FcRn에의 결합을 측정하는 방법은 공지되어 있다(예를 들어, 문헌 [Ghetie and Ward, *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997)]; [Ghetie *et al.*, *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997)]; [Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004)]; WO 2004/92219 (Hinton *et al.*) 참조).

[0115] 본원에서 사용되는 바, "실질적으로 유사한" 또는 "실질적으로 동일"이라는 용어는 당업자가 둘 이상의 수치 값 사이의 차이가 상기 값에 의해 측정된 생물학적 특징의 맥락 내에서 생물학적 및/또는 통계적 유의성이 거의 또는 전혀 없는 것으로 간주할 수 있을 정도로 둘 이상의 수치 값 사이의 유사성이 충분히 높다는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 둘 이상의 실질적으로 유사한 값은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 또는 50% 중 어느 하나의 값 이하만큼 차이가 난다.

[0116] 폴리펩티드 "변이체"는 서열을 정렬하고, 필요한 경우, 최대 서열 동일성(%)을 달성하기 위해 갭을 도입한 후, 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로서 간주하지 않으면서, 천연 서열 폴리펩티드와 적어도 약 80%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 생물학적으로 활성인 폴리펩티드를 의미한다. 상기 변이체로는 예를 들어, 폴리펩티드의 N-또는 C-말단에 하나 이상의 아미노산 잔기가 부가되거나, 결실된 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체는 적어도 약 80%의 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다. 일부 실시양태에서, 변이체는 적어도 약 90%의 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다. 일부 실시양태에서, 변이체는 천연 서열 폴리펩티드와 적어도 약 95%의 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다.

[0117] 본원에서 사용되는 바, 펩티드, 폴리펩티드 또는 항체 서열과 관련하여 "아미노산 서열 동일성(%) 및 "상동성"은 서열을 정렬하고, 필요한 경우, 최대 서열 동일성(%)을 달성하기 위해 갭을 도입한 후, 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로서 간주하지 않으면서, 특정 펩티드 또는 폴리펩티드 서열 중 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 중의 아미노산 잔기의 백분율(%)로서 정의된다. 아미노산 서열 동일성(%)을 결정하기 위한 정렬은 당업계

의 기술 범위 내에 있는 다양한 방식으로, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 MEGALIGN™(DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다.

[0118] 아미노산 치환은 폴리펩티드 내의 한 아미노산을 또 다른 아미노산으로 대체하는 것을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 치환은 표 1에 제시되어 있다. 아미노산 치환은 관심 항체에 도입될 수 있으며, 생성물은 원하는 활성, 예를 들어, 항원 결합 유지/개선, 면역원성 감소 또는 ADCC 또는 CDC 개선에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0119] <표 1>

표 1

원래의 잔기	예시적인 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신

[0120]

[0121] 아미노산은 일반적인 측쇄 특성에 따라 분류될 수 있다:

[0122] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0123] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0124] (3) 산성: Asp, Glu;

[0125] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0126] (5) 측쇄 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

- [0127] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0128] 비보존적 치환은 상기 부류 중 하나의 구성원을 또 다른 부류 대신으로 교환하는 것을 수반할 것이다.
- [0129] 용어 "벡터"는 클로닝된 폴리뉴클레오타이드 또는 숙주 세포에서 증식될 수 있는 폴리뉴클레오타이드를 함유하도록 조작될 수 있는 폴리뉴클레오타이드를 기술하는 데 사용된다. 벡터는 하기 요소 중 하나 이상의 것을 포함할 수 있다: 복제 기점, 관심 폴리펩티드의 발현을 조절하는 하나 이상의 조절 서열(예컨대, 예를 들어, 프로모터 및/또는 인핸서), 및/또는 하나 이상의 선별가능한 마커 유전자(예컨대, 예를 들어, 항생제 내성 유전자 및 비색 검정법에 사용될 수 있는 유전자, 예를 들어, β -갈락토시다제). 용어 "발현 벡터"는 숙주 세포에서 관심 폴리펩티드를 발현시키는 데 사용되는 벡터를 지칭한다.
- [0130] "숙주 세포"는 벡터 또는 단리된 폴리뉴클레오타이드의 수용자일 수 있거나, 또는 수용자였던 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포일 수 있다. 예시적인 진핵 세포로는 포유동물 세포, 예컨대, 영장류 또는 비영장류 동물 세포; 진균 세포, 예컨대, 효모; 식물 세포; 및 곤충 세포를 포함한다. 비제한적인 예시적 포유동물 세포로는 NSO 세포, PER.C6[®] 세포(Crucell), 및 293 및 CHO 세포, 및 그의 유도체, 예컨대, 293-6E, CHO-DG44, CHO-K1, CHO-S, 및 CHO-DS 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 숙주 세포는 단일 숙주 세포의 자손을 포함하며, 자손은 자연적, 우발적 또는 고의적 돌연변이로 인해 (형태 또는 게놈 DNA 상보체에 있어서) 원래 모체 세포와 완전히 동일할 필요는 없다. 숙주 세포는 본원에 제공된 폴리뉴클레오타이드(들)로 생체내에서 형질감염된 세포를 포함한다.
- [0131] 본원에서 사용되는 바, "단리된"이라는 용어는 전형적으로 자연에서 발견되거나, 또는 생산되는 성분 중 적어도 일부로부터 분리된 분자를 지칭한다. 예를 들어, 폴리펩티드는 그것이 생산된 세포의 구성 요소 중 적어도 일부로부터 분리되었을 때, "단리된" 것으로 지칭된다. 폴리펩티드가 발현 후 세포에 의해 분비되는 경우, 폴리펩티드를 생산한 세포로부터 폴리펩티드를 함유하는 상청액을 물리적으로 분리하는 것은 폴리펩티드를 "단리시키는" 것으로 간주된다. 유사하게, 폴리뉴클레오타이드는 전형적으로 자연에서 발견되는 더 큰 폴리뉴클레오타이드(예컨대, 예를 들어, DNA 폴리뉴클레오타이드의 경우, 게놈 DNA 또는 미토콘드리아 DNA)의 일부가 아닌 경우, 또는 예를 들어, RNA 폴리뉴클레오타이드의 경우, 이것이 생산된 세포의 구성 요소 중 적어도 일부로부터 분리된 때에 "단리된" 것으로 지칭된다. 따라서, 숙주 세포 내부의 벡터에 포함된 DNA 폴리뉴클레오타이드는 "단리된" 것으로 지칭될 수 있다.
- [0132] 용어 "개체" 및 "피험체"는 동물, 예컨대, 포유동물을 지칭하는 것으로 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 일부 실시양태에서, 인간, 설치류, 유인원, 고양이과, 개, 말, 소, 돼지, 양, 염소, 포유동물 실험실 동물, 포유동물 농장 동물, 포유동물 스포츠 동물 및 포유동물 애완동물을 포함하나, 이에 제한되지 않는 포유동물을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 예에서, "개체" 또는 "피험체"는 질환 또는 장애에 대한 치료가 필요한 개체 또는 피험체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 치료를 받을 피험체는 피험체가 치료와 관련된 장애를 앓거나, 상기 장애에 걸릴 적절한 위험이 있는 것으로 확인되었다는 사실을 지정하는 환자일 수 있다.
- [0133] 본원에서 사용되는 바, "질환" 또는 "장애"는 치료가 필요하고/거나, 요구되는 병태를 지칭한다.
- [0134] 달리 지정되지 않는 한, 용어 "종양 세포," "암 세포," "암," "종양" 및/또는 "신생물"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 조절되지 않는 성장 및/또는 비정상적인 세포 생존 증가 및/또는 신체 기관 및 시스템의 정상적인 기능을 방해하는 아폽토시스의 억제를 보이는 세포(들)을 지칭한다. 본 정의에는 양성 및 악성 암, 폴립, 과형성 뿐만 아니라, 휴면 종양 또는 미세전이가 포함된다.
- [0135] 용어 "암" 및 "종양"은 고형암 및 혈액암/림프암을 포함하며, 또한 악성, 전악성 및 양성 성장, 예컨대, 이형성 증도 포함한다. 예시적인 암으로는 부신암; 성상세포종; 기저 세포 암종; 담관암; 방광암; 골암; 뇌 및 중추신경계 암; 유방암; 복막암; 자궁경부암; 용모막암종; 연골육종, 유잉 육종, 결장 및 직장 암(결장직장암); 결합조직 암; 소화계 암; 자궁내막암; 식도암; 안암; 두부경부암; 위암(위장암 포함); 교아세포종; 간암종; 간종양; 상피내 신생물; 신장암 또는 신세포암; 후두암; 백혈병; 간암; 폐암(예컨대, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐선암종, 및 폐 편평세포 암종); 흑색종; 골수종; 신경아세포종; 구강암(구순암, 설암, 구강암, 및 인두암); 난소암; 췌장암, 예컨대, 췌장 선암종; 뇌하수체 암; 전립선암; 망막아세포종; 횡문근육종; 직장암; 호흡계 암; 중피종; 타액선 암종; 육종; 피부암; 편평세포암; 위암; 고환암; 갑상선암; 자궁 또는 자궁내막 암; 비뇨계 암; 외음부암; 호지킨 및 비호지킨 림프종 뿐만 아니라, B 세포 림프종, 예컨대, 저등급/여포성 비호지킨 림프종(NHL); 소형 림프구성(SL) NHL; 중간 등급/여포성 NHL; 중간 등급 미만성 NHL; 고등급 면역아세포성 NHL; 고등급 림프아구성 NHL; 고등급 소형 비절단 세포 NHL; 별키 질환 NHL; 외투 세포 림프종; AIDS 관련 림프종을 비롯

한 림프종; 및 발덴스트롬 마크로글로빈혈증; 만성 림프구성 백혈병(CLL); 급성 림프아구성 백혈병(ALL); 모발 상 세포 백혈병; 만성 골수아구성 백혈병; 뿐만 아니라, 다른 암종 및 육종; 및 이식 후 림프증식성 장애(PTLD) 뿐만 아니라, 모종종과 연관된 비정상적인 혈관 증식, 부종(예컨대, 뇌종양과 연관된 부종), 및 메이그스 증후군을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0136] 일부 실시양태에서, "증가" 또는 "감소"는 각각 통계적으로 유의적인 증가 또는 감소를 지칭한다. 당업자에게 명백한 바와 같이, "조정하는"이라는 것은 또한 시험 작용제가 존재하지 않는 동일한 조건과 비교하여 그의 리간드, 결합 파트너, 동종다량체 또는 이종다량체 형태로의 회합을 위한 파트너, 또는 기질 중 하나 이상의 것에 대한 표적 또는 항원의 친화성, 결합력, 특이성 및/또는 선택성을 변화(이는 증가 또는 감소일 수 있다)시키는 것; 표적 또는 항원이 존재하는 매질 또는 주변 환경의 하나 이상의 조건(예컨대, pH, 이온 강도, 보조인자 존재 등)에 대한 표적 또는 항원의 감수성 및/또는 세포 증식 또는 사이토카인 생산을 변화(이는 증가 또는 감소일 수 있다)시키는 것 또한 포함할 수 있다. 이는 관련된 표적에 따라 임의의 적합한 방식으로 및/또는 자체 공지되거나, 본원에 기술된 임의의 적합한 검정법을 사용하여 결정될 수 있다.

[0137] 본원에서 사용되는 바, "치료"는 유익하거나, 또는 원하는 임상 결과를 얻기 위한 접근법이다. 본원에서 사용되는 바, "치료"는 인간을 포함한 포유동물의 질환 치료제의 임의의 투여 또는 적용을 포함한다. 본 개시내용의 목적을 위해, 유익하거나, 또는 원하는 임상 결과로는 하나 이상의 증상의 완화, 질환의 정도 감소, 질환 확산 예방 또는 지연(예를 들어, 전이, 예를 들어, 폐 또는 림프절로의 전이), 질환의 재발 방지 또는 지연, 질환 진행의 지연 또는 저속화, 질환 상태의 호전, 질환 또는 그의 진행 억제 또는 저속화, 질환 발생 정지, 및 (부분적이든 전체적이든) 관해 중 임의의 하나 이상의 것을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 증식성 질환의 병리학 적 결과의 감소 또한 "치료"에 포함된다. 본원에 제공된 방법은 이러한 치료 측면 중 임의의 하나 이상의 것을 고려한다. 상기와 같은 맥락에서, 치료라는 용어는 장애의 모든 측면을 100% 제거할 필요는 없다.

[0138] "호전시키는"이란, 치료제를 투여하지 않는 것과 비교하여 하나 이상의 증상이 완화되거나, 또는 개선되는 것을 의미한다. "호전시키는"이라는 것은 증상 지속 기간의 단축 또는 감소도 포함한다.

[0139] 용어 "항암제"는 하나 이상의 암 치료에 사용되는 작용제를 지칭하는 것으로 본원에서 가장 광범위한 의미로 사용된다. 상기 작용제의 예시적인 부류로는 화학요법제, 항암 생물체제(예컨대, 사이토카인, 수용체 세포외 도메인-Fc 융합제, 및 항체), 방사선 요법, CAR-T 요법, 치료 올리고뉴클레오타이드(예컨대, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 siRNA) 및 종양용해성 바이러스를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0140] 본원에서 사용되는 바, 용어 "시너지적," "시너지적으로" 및 "시너지"는 2개 이상의 작용제의 상가 효과보다 큰 것을 지칭한다. DR5 효능제와 PLK1 억제제 또는 DR5 효능제와 CDK 억제제, 예컨대, CDK9 억제제 사이의 시너지 효과를 결정하는 것은 본원에 기술된 검정법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0141] 용어 "생물학적 샘플"은 일정량의, 생물체 또는 이전에 생물체로부터 유래된 물질을 의미한다. 상기 물질로는 혈액(예를 들어, 전혈), 혈장, 혈청, 소변, 양수, 윤활액, 내피 세포, 백혈구, 단핵구, 다른 세포, 기관, 조직, 골수, 림프절 및 비장을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0142] 용어 "대조군" 또는 "참조"는 분석물을 함유하지 않거나("음성 대조군"), 또는 피분석물을 함유하는 것으로 알려진("양성 대조군") 조성물을 의미한다. 양성 대조군은 알려진 농도의 피분석물을 포함할 수 있다.

[0143] 본원에서 사용되는 바, "질환의 발생을 지연시키는"이란, 질환(예컨대, 암)의 발달을 지연, 방해, 저속화, 지체, 안정화, 억제 및/또는 연기하는 것을 의미한다. 이러한 지연은 질환의 병력 및/또는 치료되는 개체에 따라 기간이 달라질 수 있다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 충분하거나 상당한 지연은 개체에서 질환이 발생하지 않는다는 점에서 사실상 예방을 포함할 수 있다. 예를 들어, 예컨대, 전이 발생과 같은 말기 암은 지연될 수 있다.

[0144] 본원에서 사용되는 바, "예방하는"이란, 질환에 걸릴 경향이 있을 수 있지만, 아직 질환으로 진단받지 않은 피험체에서 질환의 발생 또는 재발에 관한 예방을 제공하는 것을 포함한다. 달리 명시하지 않는 한, "감소시키다," "억제하다" 또는 "예방하다"라는 용어는 전체 기간에 걸친 완전한 예방을 의미하거나 요구하지 않고 특정되는 기간 동안에만 적용된다.

[0145] 물질/분자, 효능제 또는 길항제의 "치료 유효량"은 예컨대, 개체의 질환, 연령, 성별, 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 유도할 수 있는 물질/분자, 효능제 또는 길항제의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 치료 유효량은 또한 물질/분자, 효능제 또는 길항제의 임의의 독성 또는 해로운 효과보다 치료적으로 유익한 효과가 더 큰 양이다. 치료 유효량은 1회 이상의 투여로 전달될 수 있다. 치료 유효량은 원하는 치료 및/또는 예방 결과를

달성하는 데 필요한 투여량 및 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다.

- [0146] 용어 "약학 제제" 및 "약학 조성물"은 상호교환적으로 사용되며, 활성 성분(들)의 생물학적 활성이 효과적이라도 하는 형태이고, 본 제제를 투여받게 되는 피험체에게 허용할 수 없을 정도의 독성을 가진 추가 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다. 상기 제제는 멸균 제제일 수 있다.
- [0147] "약학적으로 허용되는 담체"는 피험체에게 투여하기 위한 "약학적 조성물"을 함께 포함하는 치료제와 함께 사용하기 위한 당업계에서 통상적인 비독성 고체, 반고체 또는 액체 충전제, 희석제, 캡슐화 물질, 제형 보조제 또는 담체를 지칭한다. 약학적으로 허용되는 담체는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이며, 제제의 다른 성분과 상용성이다. 약학적으로 허용되는 담체는 사용되는 제제에 적합하다.
- [0148] 하나 이상의 추가 치료제와 "조합하여" 투여하는 것은 동시(simultaneous)(동시(concurrent)) 및 임의 순서의 순차적 투여를 포함한다.
- [0149] 본원에서 사용되는 "동시에"라는 용어는 투여의 적어도 일부가 시간상 중복되거나, 또는 한 치료제의 투여가 다른 치료제의 투여에 비해 짧은 기간 내에 속하거나, 또는 두 치료제 모두의 치료 효과가 적어도 일정 기간 동안 중복되는 것인, 2개 이상의 치료제를 투여하는 것을 지칭한다.
- [0150] 본원에서 사용되는 "순차적으로"라는 용어는 시간상 중복되지 않거나, 상기 치료제의 치료 효과가 중복되지 않는 것인, 2개 이상의 치료제를 투여하는 것을 지칭한다.
- [0151] 본원에서 사용되는 바, "~와 함께"라는 것은 또 다른 치료 양식 외에도 한 치료 양식을 투여하는 것을 지칭한다. 따라서, "~와 함께"라는 것은 개체에게 다른 치료 양식을 투여하기 전, 그 동안 또는 그 후에 한 치료 양식을 투여하는 것을 지칭한다.
- [0152] 용어 "패키지 삽입물"은 적응증, 용법, 용량, 투여, 조합 요법, 금기 사항 및/또는 치료 생성물 사용과 관련된 경고에 대한 정보를 포함하는 상기 치료 생성물의 상업적 패키지에 관례상 포함된 지침서를 지칭하는 것으로 사용된다.
- [0153] "제조 물품"은 질환 또는 장애(예를 들어, 암) 치료용 의약 같은 적어도 하나의 시약, 또는 본원에 기술된 바이오마커를 특이적으로 검출하기 위한 프로브를 포함하는 임의의 제품(예컨대, 패키지 또는 용기) 또는 키트이다. 일부 실시양태에서, 제품 또는 키트는 본원에 기술된 방법을 수행하기 위한 단위로서 홍보, 배포 또는 판매된다.
- [0154] 용어 "표지" 및 "검출가능한 표지"는 특이적 결합 쌍의 구성원 사이의 반응(예를 들어, 결합)을 검출가능하게 하기 위해 예를 들어, 항체 또는 항원에 부착된 모이어티를 의미한다. 특이적 결합 쌍의 표지된 구성원은 "검출가능하게 표지된" 것으로 지칭한다. 따라서, 용어 "표지된 결합 단백질"은 결합 단백질의 식별을 제공하는 표지가 도입된 단백질을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 표지는 시각적 또는 도구적 수단, 예를 들어, 방사성 표지된 아미노산의 도입 또는 마킹된 아비딘(예를 들어, 광학적 또는 비색적 방법으로 검출할 수 있는 형광 마커 또는 효소 활성을 함유하는 스트렙타비딘)에 의해 검출될 수 있는 비오티닐 모이어티의 폴리펩티드에 대한 부착과 같이 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 검출가능한 마커이다. 폴리펩티드에 대한 표지의 예로는 하기: 방사성동위원소 또는 방사성 핵종(예를 들어, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , 또는 ^{153}Sm); 발색원, 형광 표지(예를 들어, FITC, 로다민, 란타나이드 인광체), 효소 표지(예를 들어, 호스래디시 퍼옥시다제, 루시페라제, 알칼리성 포스파타제); 2차 리포터에 의해 인식되는 미리 결정된 폴리펩티드 에피토프(예를 들어, 류신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그); 및 자성 물질, 예컨대, 가돌리늄 킬레이트를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 면역검정법에 일반적으로 사용되는 표지의 대표적인 예로는 발광 모이어티, 예를 들어, 아크리디늄 화합물, 및 형광 생성 모이어티, 예를 들어, 플루오레세인을 포함한다. 이와 관련하여, 모이어티 자체는 검출가능하게 표지되지 않을 수 있지만, 추가의 또 다른 모이어티와의 반응시 검출 가능해질 수 있다.
- [0155] 예시적인 DR5 효능제
- [0156] 본원에서는 DR5 효능제를 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 비제한적인 예시적인 DR5 효능제로는 INBRX-109, 에프토자네르민 알파(ABBV-621), IGM-8444(IGM Biosciences), BI 905711(Boehringer Ingelheim), GEN1029(HexaBody®-DR5/DR5; Genmab), TAS266(Novartis), MM-201a(Merrimack Pharmaceuticals), 및 MM201-b(Merrimack Pharmaceuticals)를 포함한다. 일부 실시양태에서, DR5 효능제는 DR5 결합 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 DR5 결합 폴리펩티드는 다가이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된

DR5 결합 폴리펩티드는 적어도 4가이다.

- [0157] 다양한 실시양태에서, DR5 결합 폴리펩티드는 서열 번호 1의 서열을 포함하는 CDR1, 서열 번호 2의 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열 번호 3의 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 적어도 하나의 VHH 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 VHH 도메인은 인간화된 것이다. 일부 실시양태에서, DR5 결합 폴리펩티드는 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 적어도 하나의 VHH 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, DR5 결합 폴리펩티드는 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 적어도 하나의 VHH 도메인을 포함한다.
- [0158] 일부 실시양태에서, DR5 결합 폴리펩티드는 DR5에 결합하는 적어도 하나의 VHH 도메인 및 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 DR5 결합 폴리펩티드는 DR5에 결합하는 2개의 VHH 도메인 및 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 DR5 결합 부위의 수를 배가시키는 이량체가 형성되도록 하는 생리학적 조건하에서 DR5 결합 폴리펩티드의 이량체화를 매개한다. 예를 들어, DR5에 결합하는 2개의 VHH 도메인 및 Fc 영역을 포함하는 DR5 결합 폴리펩티드는 단량체로서 2가이지만, 생리학적 조건에서 Fc 영역은 이량체화를 매개하여 DR5 결합 폴리펩티드는 상기 조건에서 4가 이량체로서 존재한다.
- [0159] 다양한 실시양태에서, 각 VHH 도메인이 서열 번호 1의 서열을 포함하는 CDR1, 서열 번호 2의 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열 번호 3의 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 적어도 하나의 VHH 도메인을 포함하는 것인 DR5 결합 폴리펩티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 각 VHH 도메인은 인간화된 것이다.
- [0160] 일부 실시양태에서, DR5 결합 폴리펩티드는 VHH-링커-VHH-링커-Fc 구조를 포함한다. 일부 실시양태에서, DR5 결합 폴리펩티드의 VHH-링커-VHH 부분은 서열 번호 5의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, DR5 결합 폴리펩티드의 VHH-링커-VHH 부분은 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc는 힌지를 포함한다. 일부 상기 실시양태에서, Fc는 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2개의 VHH 도메인 및 Fc 영역을 포함하는 DR5 결합 폴리펩티드는 서열 번호 7의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2개의 VHH 도메인 및 Fc 영역을 포함하는 DR5 결합 폴리펩티드는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, DR5 결합 폴리펩티드는 서열 번호 7의 아미노산 서열로 구성된다. 서열 번호 7, 또는 말단 리신이 결여된 서열 번호 7의 아미노산 서열로 구성된 DR5 결합 폴리펩티드는 INBRX-109로 지칭될 수 있다.
- [0161] 일부 실시양태에서, DR5에 결합하는 VHH 도메인은 인간화된 것일 수 있다. 인간화 항체(예컨대, sdAb 또는 VHH 함유 폴리펩티드)는, 인간화 항체가 항체 치료제에 대한 면역 반응을 초래할 수 있고, 치료제의 유효성을 감소시킬 수 있는 비인간 항체에 대한 인간 면역 반응을 감소시키거나, 또는 제거하기 때문에 치료 분자로서 유용하다. 일반적으로, 인간화 항체는 CDR(또는 그의 일부)이 비인간 항체로부터 유래되고, FR(또는 그의 일부)이 인간 항체 서열로부터 유래되는 하나 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 임의적으로, 인간 불변 영역 중 적어도 일부도 또한 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체에서 일부 FR 잔기는 예를 들어, 항체 특이성 또는 친화성을 회복하거나 개선시키기 위해 비인간 항체(예를 들어, CDR 잔기의 유래 기점이 되는 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.
- [0162] 인간화 항체 및 이를 제조하는 방법은 예를 들어, 문헌 [Almagro and Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13: 1619-1633]에 리뷰되어 있고, 예를 들어, 문헌 [Riechmann *et al.*, (1988) *Nature* 332:323-329]; [Queen *et al.*, (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033]; 미국 특허 제5,821,337호, 제7,527,791호, 제6,982,321호, 및 제7,087,409호; [Kashmiri *et al.*, (2005) *Methods* 36:25-34]; [Padlan, (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-498]("리서피싱" 기술); [Dall'Acqua *et al.*, (2005) *Methods* 36:43-60]("FR 셔플링" 기술); 및 [Osbourn *et al.*, (2005) *Methods* 36:61-68] 및 [Klimka *et al.*, (2000) *Br. J. Cancer*, 83:252-260](FR 셔플링에 대한 "가이드된 선택" 접근법 기술)에 추가로 기술되어 있다.
- [0163] 인간화에 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역으로는 "최적 적합" 방법을 사용하여 선택된 프레임워크 영역(예를 들어, 문헌 [Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151 :2296] 참조); 중쇄 가변 영역의 특정 서브군의 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 프레임워크 영역(예를 들어, 문헌 [Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285]; 및 [Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151:2623] 참조); 인간 성숙한(체세포적으로 돌연변이화된) 프레임워크 영역 또는 인간 생식계열 프레임워크 영역(예를 들어, 문헌 [Almagro and Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633] 참조); 및 FR 라이브러리 스크리닝으로부터 유래된 프레임워크 영역(예를 들어, 문헌 [Baca *et al.*, (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684] 및 [Rosok *et al.*, (1996) *J. Biol.*

Chem. 271:22611-22618] 참조)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 전형적으로, VHH의 FR 영역은 인간 FR 영역으로 대체되어 인간화 VHH가 제조된다. 일부 실시양태에서, 인간화 VHH의 하나 이상의 특성을 개선시키기 위해 인간 FR의 특정 FR 잔기가 대체된다. 상기 대체된 잔기를 갖는 VHH 도메인은 본원에서 여전히 "인간화"된 것으로 지칭된다.

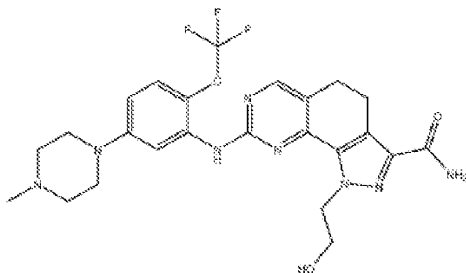
[0164] 다양한 실시양태에서, DR5 결합 폴리펩티드에 포함된 Fc 영역은 인간 Fc 영역이거나, 또는 인간 Fc 영역으로부터 유래된 것이다.

[0165] 일부 실시양태에서, DR5 결합 폴리펩티드에 포함된 Fc 영역은 인간 Fc 영역으로부터 유래되고, IgG1 E233, L234, 및 L235에 상응하는 하부 힌지에 3개의 아미노산 결실을 포함하고, 이는 본원에서 "Fc xELL"로 지칭된다. Fc xELL 폴리펩티드는 Fc γ R과 결합하지 않는 바, 따라서, "이펙터 침묵" 또는 "이펙터 널(null)"로 지칭되지만, 일부 실시양태에서, xELL Fc 영역은 FcRn에 결합하는 바, 따라서, FcRn 매개 리사이클링과 연관된 반감기 연장 및 트랜스사이토시스를 나타낸다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG1 xELL Fc 영역이다.

[0166] 예시적인 PLK1 억제제

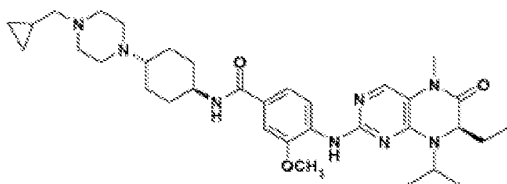
[0167] 본원에서는 PLK1 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, PLK1 억제제는 소분자이다. 일부 실시양태에서, PLK1 억제제는 RNAi이다. 일부 실시양태에서, PLK1 억제제는 온반세르팁, 볼라세르팁, 리고세르팁, BI2536(Boehringer Ingelheim), *N*-[[4-[(6-클로로-3-피리디닐)메톡시]-3-메톡시페닐]메틸]-3,4-디메톡시벤젠에탄아민 하이드로클로라이드(SBE 13 HCl), MLN0905(Takeda Oncology), GSK461364(GlaxoSmithKline), CYC140(Cyclacel), TKM-080301(TKM-PLK1; Arbutus Biopharma), TAK-960(Takeda Pharmaceutical Company), 폴록신, 폴록신-2HT, R03280(CAS 번호 1062243-51-9), 2-시아노-2-[3-에틸-4-옥소-5-[[3-(2-피롤리딘-1-일)에틸]아닐리노]메틸]-1,3-티아졸리딘-2-일]-*N*-(2,2,2-트리플루오로에틸)아세트아미드(ZK-티아졸리딘), 사이클라폴린 9(CAS 번호 40533-25-3), 5-(5,6-디메톡시-1*H*-벤즈이미다졸-1-일)-3-[[2-(트리플루오로메틸)페닐]메톡시]-2-티오펜카복사미드(GW 843682X), HMN-214(CAS 번호 173529-46-9), 또는 HMN-176(CAS 번호 173529-10-7)이다. 일부 실시양태에서, PLK1 억제제는 온반세르팁, 볼라세르팁, 리고세르팁, BI2536(Boehringer Ingelheim), MLN0905(Takeda Oncology), GSK461364(GlaxoSmithKline), CYC140(Cyclacel), TKM-080301(TKM-PLK1; Arbutus Biopharma), 또는 TAK-960(Takeda Pharmaceutical Company)이다.

[0168] 일부 실시양태에서, PLK1 억제제는 온반세르팁이다. 온반세르팁(이는 또한 PCM-075 또는 NMS-1286937로도 공지)은 구조



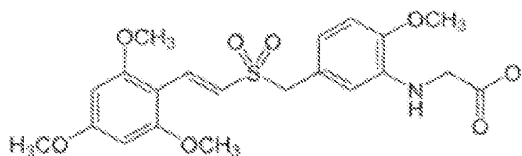
[0169] 를 갖는 선택적 ATP 경쟁적 PLK1 억제제, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물이다. 예컨대, 미국 특허 제8,927,530호를 참조한다. 온반세르팁은 PLK1에 특이적이며, 고형 및 혈액 약성 중앙 모델, 둘 모두에서 강력한 시험관내 및 생체내 항종양 활성을 갖는다.

[0170] 일부 실시양태에서, PLK1 억제제는 볼라세르팁이다. 볼라세르팁은 구조



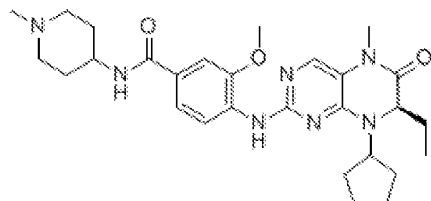
[0171] 를 갖는 선택적 PLK1 억제제, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물이다. 예컨대, WO 04/076454 및 WO 07/090844를 참조한다.

[0172] 일부 실시양태에서, PLK1 억제제는 리고세르팁이다. 리고세르팁은 구조



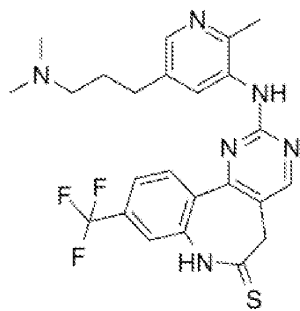
[0173] 를 갖는, PI3-K 및 PLK1을 비롯한 다중 키나제의 억제제, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물이다. 예컨대, 미국 특허 제7,598,232호(화합물 4)를 참조한다.

[0174] 일부 실시양태에서, PLK1 억제제는 BI2536이다. BI2536은 구조



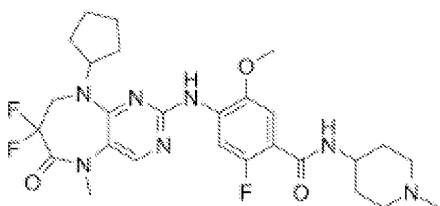
[0175] 를 갖는, PLK1의 선택적 억제제, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물이다. 예컨대, 문헌 [Steegmaier et al., Current Biology, 17: 316-322 (2007)]을 참조한다.

[0176] 일부 실시양태에서, PLK1 억제제는 MLN0905이다. MLN0905는 구조



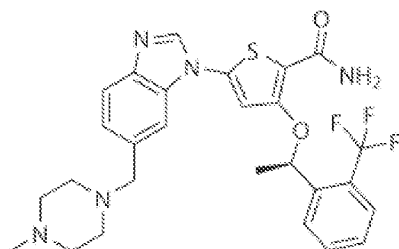
[0177] 를 갖는, PLK1의 선택적 억제제, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물이다. 예컨대, 문헌 [Mol Cancer Ther, 11: 2045-53 (2012)]를 참조한다.

[0178] 일부 실시양태에서, PLK1 억제제는 TAK-960이다. TAK-960은 구조



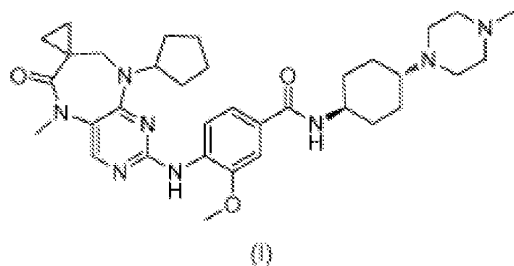
[0179] 를 갖는, PLK1의 선택적 억제제, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물이다. 예컨대, 문헌 [Mol Cancer Ther, 11: 700-9 (2012)]를 참조한다.

[0180] 일부 실시양태에서, PLK1 억제제는 GSK461364이다. GSK461364는 구조



[0181] 를 갖는, ATP 경쟁적 PLK1 억제제, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물이다. 예컨대, 문헌 [Clin Cancer Res. 17(10):3420-30 (2011)]을 참조한다.

[0182] 일부 실시양태에서, PLK1 억제제는 CYC140이다. 일부 실시양태에서, PLK1 억제제는 구조



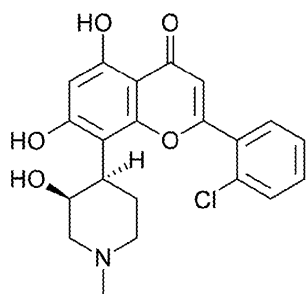
[0183] 를 갖는 것, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물이다. 예컨대, WO 2009/040556을 참조한다.

[0184] 일부 실시양태에서, PLK1 억제제는 TKM-080301이다. TKM-080301은 4개의 지질 및 인간 PLK1 mRNA에 대한 합성 이중 가닥 siRNA를 포함하는 지질 나노입자(LNP: lipid nanoparticle) 제제이다. 합성 siRNA는 RNA 간섭 메커니즘을 통해 전사 후 유전자 억제를 달성하도록 설계된 상보적 RNA 올리고뉴클레오타이드의 이중체이다. 예컨대, 문헌 [Oncologist, 24(6):747-e218 (2019)]; WO 2008/342535를 참조한다.

[0185] 예시적인 CDK 억제제

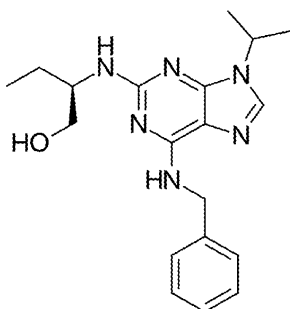
[0186] 본원에서는 DK 억제제, 예컨대, CDK9 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, CDK 억제제는 소분자이다. 일부 실시양태에서, CDK 억제제는 플라보피리돌(Tolero Pharmaceuticals), 셀리시클립(로스코비틴/CYC202), 디나시클립(Merck), 아투베시클립(Bayer), 에니토시클립(Vincerx Pharma), AZD4573(AstraZeneca), i-CDK9, 또는 NVP-2이다.

[0187] 일부 실시양태에서, CDK 억제제는 플라보피리돌이다. 플라보피리돌(이는 또한 L86-8275, 알보시딕, NSC 649890, 또는 HMR-1275로도 공지; Tolero Pharmaceuticals)은 구조



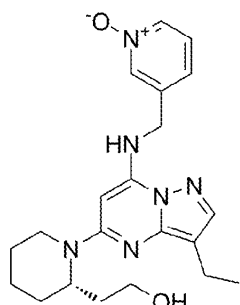
[0188] 를 갖는 선택적 ATP 경쟁적 CDK9 억제제, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물이다. 플라보피리돌은 CDK9의 강력하고 선택적인 억제제이며, 예컨대, 인간 폐 암종 및 유방 암종과 같은 다양한 종양 세포주에 대한 항종양 활성을 갖고, 이는 또한 이중익식 모델에서 종양 성장을 억제시킨다. 예컨대, 문헌 [Anshabo, et al., Frontiers in Oncology, 11 (2021)]을 참조한다.

[0189] 일부 실시양태에서, CDK 억제제는 셀리시클립(이는 또한 로스코비틴 또는 CYC202로도 공지)이다. 셀리시클립은 구조



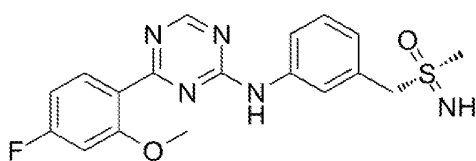
[0190] 를 갖는 선택적 CDK 억제제, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물이다. 예컨대, 문헌 [Anshabo, et al., Frontiers in Oncology, 11 (2021)]을 참조한다.

[0191] 일부 실시양태에서, CDK 억제제는 디나시클립(이는 또한 SCH 727965로도 공지; Merck)이다. 디나시클립은 구조



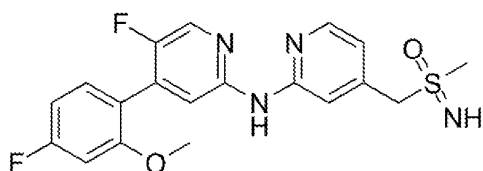
[0192] 를 갖는, CDK1, CDK2, CDK5, 및 CDK9를 비롯한 CDK의 강력하고, 선택적인 소분자 억제제, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물이다. 예컨대, 문헌 [Anshabo, et al., *Frontiers in Oncology*, 11 (2021)]을 참조한다.

[0193] 일부 실시양태에서, CDK 억제제는 아투베시클립(이는 또한 BAY1143572로도 공지; Bayer)이다. 아투베시클립은 구조



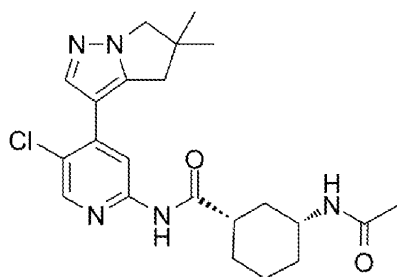
[0194] 를 갖는, CDK9 및 사이클린-T(CycT)로 구성된, 양성 전사 신장 인자 b(PTEF-b: positive transcription elongation factor b)의 강력하고, 고도로 선택적인 억제제, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물이다. 예컨대, 문헌 [Anshabo, et al., *Frontiers in Oncology*, 11 (2021)]을 참조한다.

[0195] 일부 실시양태에서, CDK 억제제는 에니토시클립(이는 또한 BAY1251152 또는 VIP152로도 공지; Vincerox Pharma)이다. 에니토시클립은 구조



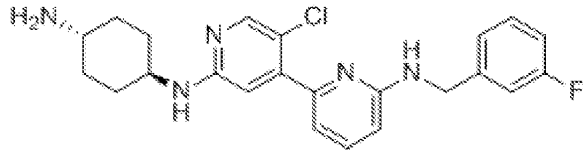
[0196] 를 갖는, 강력하고, 고도로 선택적인 PTEF-b/CDK9 억제제, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물이다. 예컨대, 문헌 [Anshabo, et al., *Frontiers in Oncology*, 11 (2021)]을 참조한다.

[0197] 일부 실시양태에서, CDK 억제제는 AZD4573(AstraZeneca)이다. AZD4573은 구조



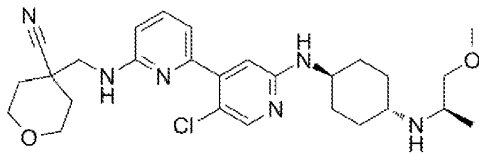
[0198] 를 갖는, CDK9의 선택적 억제제, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물이다. 예컨대, 문헌 [Anshabo, et al., *Frontiers in Oncology*, 11 (2021)]을 참조한다.

[0199] 일부 실시양태에서, CDK 억제제는 i-CDK9이다. i-CDK9는 구조



[0200] 를 갖는, 다른 CDK 대비 CDK9에 대하여 600배인 선택성을 갖는 CDK 억제제, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물이다. i-CDK9는 CDK9에 비해 효능이 낮기는 하지만, i-CDK9는 이중 특이성 티로신 인산화 조절된 키나제(DYRK: dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase) 1A 및 1B를 억제시킨다. 예컨대, 문헌 [Anshabo, et al., *Frontiers in Oncology*, 11 (2021)]을 참조한다.

[0201] 일부 실시양태에서, CDK 억제제는 NVP-2이다. NVP-2는 ATP 경쟁적, 아미노피리미딘 기반 억제제이고, i-CDK9의 화학적 유사체이며, 구조



[0202] 를 갖는 것, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물이다. 예컨대, 문헌 [Nat Chem Biol 14, 163-170 (2018)]을 참조한다.

[0203] 폴리펩티드 발현 및 제조

[0204] DR5 결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산 분자를 제공한다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 또한 DR5 결합 폴리펩티드의 분비를 지시하는 리더 서열을 코딩할 수 있으며, 리더 서열은 전형적으로 분비된 폴리펩티드에 존재하지 않도록 절단된다. 리더 서열은 천연 중쇄(또는 VHH) 리더 서열일 수 있거나, 또 다른 이중성 리더 서열일 수 있다.

[0205] 핵산 분자는 당업계에 통상적인 재조합 DNA 기술을 사용하여 구성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 선택된 숙주 세포에서의 발현에 적합한 발현 벡터이다.

[0206] 본원에 기술된 DR5 결합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 상기 벡터는 DNA 벡터, 파지 벡터, 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 원하는 세포 유형, 예컨대, CHO 또는 CHO 유래 세포에서, 또는 NSO 세포에서 폴리펩티드의 발현을 위해 최적화된 벡터가 선택된다. 예시적인 상기 벡터는 예를 들어, 문헌 [Running Deer *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 20:880-889 (2004)]에 기술되어 있다.

[0207] 일부 실시양태에서, DR5 결합 폴리펩티드는 원핵 세포, 예컨대, 박테리아 세포에서; 또는 진핵 세포, 예컨대, 진균 세포(예컨대, 효모), 식물 세포, 곤충 세포 및 포유동물 세포에서 발현될 수 있다. 상기 발현은 예를 들어, 당업계에 공지된 절차에 따라 수행될 수 있다. 폴리펩티드를 발현하는 데 사용될 수 있는 예시적인 진핵 세포로는 COS 세포(COS 7 세포 포함); 293 세포(293-6E 세포 포함); CHO 세포(CHO-S, DG44, Lec13 CHO 세포, 및 FUT8 CHO 세포 포함); PER.C6[®] 세포(Cruce11); 및 NSO 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, DR5 결합 폴리펩티드는 효모에서 발현될 수 있다. 예컨대, 미국 공개 번호 S 2006/0270045 A1을 참조한다. 일부 실시양태에서, 특정 진핵 숙주 세포는 폴리펩티드에 원하는 번역 후 변형을 가하는 능력에 기초하여 선택된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, CHO 세포는 293 세포에서 생산된 동일한 폴리펩티드보다 더 높은 수준의 시알틸화를 갖는 폴리펩티드를 생산한다.

[0208] 원하는 숙주 세포 내로 하나 이상의 핵산(예컨대, 벡터)을 도입하는 것은 인산칼슘 형질감염, DEAE-텍스트란 매개 형질감염, 양이온성 지질 매개 형질감염, 전기천공, 형질도입, 감염 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는 임의의 방법에 의해 달성될 수 있다. 비제한적인 예시적 방법은 예를 들어, 문헌 [Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)]에 기술되어 있다. 핵산은 임의의 적합한 방법에 따라 원하는 숙주 세포에 일시적으로 또는 안정적으로 형질감염될 수 있다.

[0209] 본원에 기술된 임의의 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포 또한 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된

DR5 결합 폴리펩티드를 발현하는 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포에서 발현된 DR5 결합 폴리펩티드는 임의의 적합한 방법에 의해 정제될 수 있다. 상기 방법으로는 친화성 매트릭스 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피의 사용을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 적합한 친화성 리간드는 ROR1 ECD 및 Fc 영역에 결합하는 작용제를 포함한다. 예를 들어, 단백질 A, 단백질 G, 단백질 A/G 또는 항체 친화성 컬럼을 사용하여 Fc 영역에 결합하고, Fc 영역을 포함하는 DR5 결합 폴리펩티드를 정제할 수 있다. 소수성 상호작용 크로마토그래피, 예를 들어, 부틸 또는 페닐 컬럼 또한 항체와 같은 일부 폴리펩티드를 정제하는 데 적합할 수 있다. 이온 교환 크로마토그래피 (예를 들어, 음이온 교환 크로마토그래피 및/또는 양이온 교환 크로마토그래피) 또한 항체와 같은 일부 폴리펩티드를 정제하는 데 적합할 수 있다. 혼합 모드 크로마토그래피(예를 들어, 역상/음이온 교환, 역상/양이온 교환, 친수성 상호작용/음이온 교환, 친수성 상호작용/양이온 교환 등) 또한 항체와 같은 일부 폴리펩티드를 정제하는 데 적합할 수 있다. 폴리펩티드를 정제하는 많은 방법이 당업계에 공지되어 있다.

[0210] 일부 실시양태에서, DR5 결합 폴리펩티드는 무세포 시스템에서 생산된다. 비제한적인 예시적인 무세포 시스템은 예를 들어, 문헌 [Sitaraman *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009)]; [Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004); Endo *et al.*, *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003)]에 기술되어 있다.

[0211] 일부 실시양태에서, 상기 기술된 방법에 의해 제조된 DR5 결합 폴리펩티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, DR5 결합 폴리펩티드는 숙주 세포에서 제조된다. 일부 실시양태에서, DR5 결합 폴리펩티드는 무세포 시스템에서 제조된다. 일부 실시양태에서, DR5 결합 폴리펩티드는 정제된다. 일부 실시양태에서, DR5 결합 폴리펩티드를 포함하는 세포 배양 배지를 제공한다.

[0212] 일부 실시양태에서, 상기 기술된 방법에 의해 제조된 항체를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 숙주 세포에서 제조된 DR5 결합 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 무세포 시스템에서 제조된 DR5 결합 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 정제된 DR5 결합 폴리펩티드를 포함한다.

[0213] 약학 조성물

[0214] 일부 실시양태에서, DR5 효능제, PLK1 억제제, 및/또는 CDK 억제제를 포함하는 조성물은 매우 다양한 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 제제로 제공된다(예를 들어, 문헌 [Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed. (2003)]; [Ansel *et al.*, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004)]; [Kibbe *et al.*, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)] 참조). 비히클, 애주번트, 및 희석제를 포함한, 다양한 약학적으로 허용되는 담체가 이용가능하다. 게다가, 다양한 약학적으로 허용되는 보조 물질, 예컨대, pH 조정제 및 완충화제, 조성 조정제, 안정제, 습윤화제 등도 또한 이용가능하다.

[0215] 일부 실시양태에서, INBRX-109는 50 mg/mL INBRX-109, 10 mM 히스티딘 HCl, 8% w/v 수크로스, 0.2% w/v 폴록사머-88(pH 6.0)을 포함하는 제제로 제공된다.

[0216] DR5 효능제 및 PLK1 억제제를 이용한 예시적인 암 치료 방법

[0217] 일부 실시양태에서, DR5 효능제 및 PLK1 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0218] 일부 실시양태에서, 본 방법은 개체에게 유효량의 DR5 효능제 및 PLK1 억제제를 투여하는 단계를 포함한다. 상기 치료 방법은 인간 또는 동물에서 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간을 치료하는 방법을 제공한다. 본원에 제공된 DR5 효능제 및 PLK1 억제제의 조합을 이용하여 치료될 수 있는 비제한적인 예시적인 암으로는 부신암; 성상세포종; 기저 세포 암종; 담관암; 방광암; 골암; 뇌 및 중추신경계 암; 유방암; 복막암; 자궁경부암; 융모막암종; 연골육종; 유방 육종; 결장 및 직장 암(결장직장암); 결합 조직 암; 소화계 암; 자궁내막암; 식도암; 안암; 두부경부암; 위암; 위장암; 교아세포종; 간암종; 간종양; 상피내 신생물; 신장암 또는 신세포암; 후두암; 백혈병; 간암; 폐암; 소세포 폐암; 비소세포 폐암; 폐 선암종; 폐 편평세포 암종; 흑색종; 골수종; 신경아세포종; 구강암(구순암, 설암, 구강암, 및 인두암); 난소암; 췌장암, 예컨대, 췌장 선암종; 뇌하수체 암; 전립선암; 망막아세포종; 횡문근육종; 직장암; 호흡계 암; 중피종; 타액선 암종; 육종; 피부암; 편평세포암; 위암; 고환암; 갑상선암; 자궁 또는 자궁내막 암; 비뇨계 암; 및 외음부암; 림프종; 호지킨 림프종; 비호지킨 림프종; B 세포 림프종; 저등급/여포성 비호지킨 림프종(NHL); 소형 림프구성(SL) NHL; 중간 등급/여포성 NHL;

중간 등급 미만성 NHL; 고등급 면역아세포성 NHL; 고등급 림프아구성 NHL; 고등급 소형 비절단 세포 NHL; 별키 질환 NHL; 외투 세포 림프종; AIDS 관련 림프종; 발렌스트롬 마크로글로빈혈증; 만성 림프구성 백혈병(CLL); 급성 림프아구성 백혈병(ALL); 모발상 세포 백혈병; 만성 골수아구성 백혈병; 뿐만 아니라, 다른 암종 및 육종; 및 이식 후 림프증식성 장애(PTLD) 뿐만 아니라, 모종종과 연관된 비정상적인 혈관 증식, 부종(예컨대, 뇌종양과 연관된 부종), 및 메이그스 증후군을 포함한다.

[0219] DR5 효능제 및 PLK1 억제제는 필요에 따라 피험체에게 투여될 수 있다. 각 작용제의 투여 빈도는 예컨대, 치료되는 병태, 치료되는 피험체의 연령, 치료되는 병태의 중증도, 치료되는 피험체의 일반적인 건강 상태 등을 고려하여 주치의와 같은 당업자에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 유효량의 하나 이상의 치료제는 피험체에게 1회 이상 투여된다. 일부 실시양태에서, 유효량의 DR5 효능제 및/또는 PLK1 억제제는 피험체에게 매일, 주 2회, 주 1회, 2주마다, 월 1회 등으로 투여된다. 유효량의 DR5 효능제 및/또는 PLK1 억제제는 피험체에게 적어도 1회 투여된다. 일부 실시양태에서, 유효량의 DR5 효능제 및/또는 PLK1 억제제는 적어도 1개월, 적어도 6개월 또는 적어도 1년 동안에 걸쳐 다회인 것을 포함하여 다회에 걸쳐 투여될 수 있다.

[0220] 일부 실시양태에서, DR5 효능제는 암을 치료(예방 포함)하는 데 효과적인 양으로 투여된다. 치료 유효량은 전형적으로 치료되는 피험체의 체중, 남성 또는 여성 피험체의 신체 또는 건강 상태, 치료하고자 하는 병태의 광범위성 또는 치료되는 피험체의 연령에 따라 달라진다. 일반적으로, DR5 결합 폴리펩티드는 용량당 약 0.05 mg/kg(체중) 내지 약 100 mg/kg(체중) 범위, 또는 용량당 약 10 μ g/kg(체중) 내지 약 100 mg/kg(체중) 범위, 또는 용량당 약 50 μ g/kg(체중) 내지 약 5 mg/kg(체중) 범위, 또는 용량당 약 100 μ g/kg(체중) 내지 약 10 mg/kg(체중) 범위, 또는 용량당 약 100 μ g/kg(체중) 내지 약 20 mg/kg(체중) 범위, 또는 용량당 약 0.5 mg/kg(체중) 내지 약 20 mg/kg(체중) 범위, 또는 용량당 약 1 mg/kg(체중) 내지 약 10 mg/kg(체중) 범위인 양으로 투여될 수 있다.

[0221] 일부 실시양태에서, PLK1 억제제(또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물)는 예를 들어, 10 mg/m² 내지 500 mg/m², 10 mg/m² 내지 300 mg/m², 또는 10 mg/m² 내지 200 mg/m²를 포함하는, 1 mg/m² 내지 1000 mg/m²의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, PLK1 억제제(또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물)는 예를 들어, 10 mg 내지 5,000 mg, 또는 10 mg 내지 1,000 mg, 또는 10 mg 내지 500 mg을 포함하는, 1 mg 내지 10,000 mg의 용량으로 투여된다.

[0222] 일부 실시양태에서, 온반세르티프는 2 mg/m² 내지 100 mg/m²의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 볼라세르티프는 10 내지 500 mg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 리고세르티프는 10 내지 1,000 mg의 용량으로 투여된다.

[0223] 일부 실시양태에서, 치료제는 경구, 근육내, 정맥내, 동맥내, 비경구, 복강내 또는 피하를 포함하나, 이에 제한되지 않는 다양한 경로에 의해 생체내 투여될 수 있다. 적절한 제제 및 투여 경로는 의도된 적용에 따라 선택될 수 있다.

[0224] 일부 실시양태에서, DR5 효능제 및 PLK1 억제제는 별개로 투여된다. 일부 실시양태에서, DR5 효능제 및 PLK1 억제제는 순차적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 적어도 1회 용량의 DR5 효능제는 PLK1 억제제 전에 투여된다. 일부 실시양태에서, 적어도 1회 용량의 DR5 효능제는 PLK1 억제제 후에 투여된다.

[0225] 일부 실시양태에서, DR5 효능제 및 PLK1 억제제는 동시에 투여된다.

[0226] 일부 실시양태에서, DR5 효능제 및 PLK1 억제제는 시너지적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 시너지는 시험관내 세포 생존 검정법으로 결정된다. 일부 실시양태에서, DR5 효능제 및 PLK1 억제제의 투여는 각 작용제를 단독으로 투여하는 것과 비교하여 시너지 효과를 가져온다.

[0227] 일부 실시양태에서, PLK1 억제제와 조합하여 DR5 효능제를 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법에서 사용하기 위한 DR5 효능제를 제공한다.

[0228] 일부 실시양태에서, 암 치료용 의약 제조를 위한 DR5 효능제의 용도로서, 여기서, 의약은 PLK1 억제제와 함께 투여하기 위한 것인 용도를 제공한다.

[0229] **DR5 효능제 및 CDK 억제제를 이용한 예시적인 암 치료 방법**

[0230] 일부 실시양태에서, DR5 효능제 및 CDK 억제제, 예컨대, CDK9 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.

- [0231] 일부 실시양태에서, 본 방법은 개체에게 유효량의 DR5 효능제 및 CDK 억제제를 투여하는 단계를 포함한다. 상기 치료 방법은 인간 또는 동물에서 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간을 치료하는 방법을 제공한다. 본원에 제공된 DR5 효능제 및 CDK 억제제의 조합을 이용하여 치료될 수 있는 비제한적인 예시적인 암으로는 부신암; 성상세포종; 기저 세포 암종; 담관암; 방광암; 골암; 뇌 및 중추신경계 암; 유방암; 복막암; 자궁경부암; 용모막암종; 연골육종; 유잉 육종; 결장 및 직장 암(결장직장암); 결합 조직 암; 소화계 암; 자궁내막암; 식도암; 안암; 두부경부암; 위암; 위장암; 교아세포종; 간암종; 간종양; 상피내 신생물; 신장암 또는 신세포암; 후두암; 백혈병; 간암; 폐암; 소세포 폐암; 비소세포 폐암; 폐 선암종; 폐 편평세포 암종; 흑색종; 골수종; 신경아세포종; 구강암(구순암, 설암, 구강암, 및 인두암); 난소암; 췌장암, 예컨대, 췌장 선암종; 뇌하수체 암; 전립선암; 망막아세포종; 횡문근육종; 직장암; 호흡계 암; 중피종; 타액선 암종; 육종; 피부암; 편평세포암; 위암; 고환암; 갑상선암; 자궁 또는 자궁내막 암; 비뇨계 암; 및 외음부암; 림프종; 호지킨 림프종; 비호지킨 림프종; B 세포 림프종; 저등급/여포성 비호지킨 림프종(NHL); 소형 림프구성(SL) NHL; 중간 등급/여포성 NHL; 중간 등급 미만성 NHL; 고등급 면역아세포성 NHL; 고등급 림프아구성 NHL; 고등급 소형 비절단 세포 NHL; 별키질환 NHL; 외투 세포 림프종; AIDS 관련 림프종; 발렌스트롬 마크로글로빈혈증; 만성 림프구성 백혈병(CLL); 급성 림프아구성 백혈병(ALL); 모발상 세포 백혈병; 만성 골수아구성 백혈병; 뿐만 아니라, 다른 암종 및 육종; 및 이식 후 림프증식성 장애편(PTLD) 뿐만 아니라, 모종종과 연관된 비정상적인 혈관 증식, 부종(예컨대, 뇌종양과 연관된 부종), 및 메이그스 증후군을 포함한다.
- [0232] DR5 효능제 및 CDK 억제제는 필요에 따라 피험체에게 투여될 수 있다. 각 작용제의 투여 빈도는 예컨대, 치료되는 병태, 치료되는 피험체의 연령, 치료되는 병태의 중증도, 치료되는 피험체의 일반적인 건강 상태 등을 고려하여 주치의와 같은 당업자에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 유효량의 하나 이상의 치료제는 피험체에게 1회 이상 투여된다. 일부 실시양태에서, 유효량의 DR5 효능제 및/또는 CDK 억제제는 피험체에게 매일, 주 2회, 주 1회, 2주마다, 월 1회 등으로 투여된다. 유효량의 DR5 효능제 및/또는 CDK 억제제는 피험체에게 적어도 1회 투여된다. 일부 실시양태에서, 유효량의 DR5 효능제 및/또는 CDK 억제제는 적어도 1개월, 적어도 6개월 또는 적어도 1년 동안에 걸쳐 다회인 것을 포함하여 다회에 걸쳐 투여될 수 있다.
- [0233] 일부 실시양태에서, DR5 효능제는 암을 치료(예방 포함)하는 데 효과적인 양으로 투여된다. 치료 유효량은 전형적으로 치료되는 피험체의 체중, 남성 또는 여성 피험체의 신체 또는 건강 상태, 치료하고자 하는 병태의 광범위성 또는 치료되는 피험체의 연령에 따라 달라진다. 일반적으로, DR5 결합 폴리펩티드는 용량당 약 0.05 mg/kg(체중) 내지 약 100 mg/kg(체중) 범위, 또는 용량당 약 10 μ g/kg(체중) 내지 약 100 mg/kg(체중) 범위, 또는 용량당 약 50 μ g/kg(체중) 내지 약 5 mg/kg(체중) 범위, 또는 용량당 약 100 μ g/kg(체중) 내지 약 10 mg/kg(체중) 범위, 또는 용량당 약 100 μ g/kg(체중) 내지 약 20 mg/kg(체중) 범위, 또는 용량당 약 0.5 mg/kg(체중) 내지 약 20 mg/kg(체중) 범위, 또는 용량당 약 1 mg/kg(체중) 내지 약 10 mg/kg(체중) 범위인 양으로 투여될 수 있다.
- [0234] 일부 실시양태에서, CDK 억제제(또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물)는 예를 들어, 10 mg/m² 내지 500 mg/m², 10 mg/m² 내지 300 mg/m², 또는 10 mg/m² 내지 200 mg/m²를 포함하는, 1 mg/m² 내지 1000 mg/m²의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, CDK 억제제(또는 그의 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물)는 예를 들어, 10 mg 내지 5,000 mg, 또는 10 mg 내지 1,000 mg, 또는 10 mg 내지 500 mg을 포함하는, 1 mg 내지 10,000 mg의 용량으로 투여된다.
- [0235] 일부 실시양태에서, 플라보피리들은 2 mg/m² 내지 100 mg/m²의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 셀리시클립은 10 내지 500 mg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 디나시클립은 10 내지 2,000 mg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 아투베시클립은 10 내지 1,000 mg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 에니토시클립은 10 내지 500 mg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, AZD4573은 1 내지 100 mg의 용량으로 투여된다.
- [0236] 일부 실시양태에서, 치료제는 경구, 근육내, 정맥내, 동맥내, 비경구, 복강내 또는 피하를 포함하나, 이에 제한되지 않는 다양한 경로에 의해 생체내 투여될 수 있다. 적절한 제제 및 투여 경로는 의도된 적용에 따라 선택될 수 있다.
- [0237] 일부 실시양태에서, DR5 효능제 및 CDK 억제제는 별개로 투여된다. 일부 실시양태에서, DR5 효능제 및 CDK 억제제는 순차적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 적어도 1회 용량의 DR5 효능제는 CDK 억제제 전에 투여된다. 일부 실시양태에서, 적어도 1회 용량의 DR5 효능제는 CDK 억제제 후에 투여된다.

- [0238] 일부 실시양태에서, DR5 효능제 및 CDK 억제제는 동시에 투여된다.
- [0239] 일부 실시양태에서, DR5 효능제 및 CDK 억제제는 시너지적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 시너지는 시험관 내 세포 생존 검정법으로 결정된다. 일부 실시양태에서, DR5 효능제 및 CDK 억제제의 투여는 각 작용제를 단독으로 투여하는 것과 비교하여 시너지 효과를 가져온다.
- [0240] 일부 실시양태에서, CDK 억제제와 조합하여 DR5 효능제를 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법에서 사용하기 위한 DR5 효능제를 제공한다.
- [0241] 일부 실시양태에서, 암 치료용 의약 제조를 위한 DR5 효능제의 용도로서, 여기서, 의약은 CDK 억제제와 함께 투여하기 위한 것인 용도를 제공한다.
- [0242] 키트
- [0243] 본원에서는 또한 본원에 제공된 임의의 DR5 효능제 및/또는 PLK1 억제제 및 적합한 패키징을 포함하는 제조 물품 및 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 (i) DR5 효능제를 포함하는 제제, (ii) PLK1 억제제를 포함하는 제제, 및 (iii) 개체에게 제제를 투여하기 위한 키트 사용 지침서를 포함하는 키트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 (i) DR5 효능제를 포함하는 제제, 및 (ii) 개체에게 제제를 PLK1 억제제와 조합하여 투여하기 위한 키트 사용 지침서를 포함하는 키트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 (i) PLK1 억제제를 포함하는 제제, 및 (ii) 개체에게 제제를 DR5 효능제와 조합하여 투여하기 위한 키트 사용 지침서를 포함하는 키트를 포함한다.
- [0244] 본원에 제공된 임의의 DR5 효능제 및/또는 CDK 억제제 및 적합한 패키징을 포함하는 제조 물품 및 키트 또한 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 (i) DR5 효능제를 포함하는 제제, (ii) CDK 억제제를 포함하는 제제, 및 (iii) 개체에게 제제를 투여하기 위한 키트 사용 지침서를 포함하는 키트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 (i) DR5 효능제를 포함하는 제제, 및 (ii) 개체에게 제제를 CDK 억제제와 조합하여 투여하기 위한 키트 사용 지침서를 포함하는 키트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 (i) CDK 억제제를 포함하는 제제, 및 (ii) 개체에게 제제를 DR5 효능제와 조합하여 투여하기 위한 키트 사용 지침서를 포함하는 키트를 포함한다.
- [0245] 본원에 기술된 조성물에 적합한 패키징은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 바이알(예컨대, 밀봉된 바이알), 베늘, 앰플, 병, 단지, 가요성 패키징(예컨대, 밀봉된 Mylar 또는 플라스틱 백) 등을 포함한다. 상기 제조 물품은 추가로 멸균 및/또는 밀봉될 수 있다. 본원에 기술된 조성물을 포함하는 단위 투여 형태 또한 제공한다. 상기 단위 투여 형태는 단일 또는 다중 단위 투여량으로 적합한 패키징에 보관될 수 있으며, 추가로 또한 멸균 및 밀봉될 수도 있다. 본 발명의 키트에 공급되는 지침서는 전형적으로 라벨 또는 패키지 삽입물(예컨대, 키트에 포함된 종이 시트)에 작성된 지침이지만, 기계 판독가능한 지침서(예컨대, 자기 또는 광학 저장 디스크에 저장된 지침서) 또한 허용된다. DR5 효능제 PLK1 억제제, 및/또는 CDK 억제제 사용과 관련된 지침서는 일반적으로 의도된 치료 또는 산업적 사용을 위한 투여량, 투여 스케줄 및 투여 경로에 대한 정보를 포함한다. 키트는 적합한 개체 또는 치료를 선택하는 것에 관한 설명을 추가로 포함할 수 있다.
- [0246] 용기는 단위 용량, 벌크 패키지(예컨대, 다중 용량 패키지) 또는 서브단위 용량일 수 있다. 연장된 기간, 예컨대, 약 1주, 2주, 3주, 4주, 6주, 8주, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 또는 그 초과 중 임의의 기간 동안 개체에게 효과적인 치료를 제공하는 데 충분한 투여량의 본원에 개시된 분자를 함유하는 키트 또한 제공할 수도 있다. 키트는 또한 다회 단위 용량의 분자 및 사용 지침서를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 병원 약국 및 조제 약국과 같은 약국에서 보관 및 사용하기에 충분한 양으로 패키징될 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 일반적으로 안정한 DR5 효능제 수용액을 형성하기 위해 재구성, 재현탁 또는 재수화될 수 있는 건성(예컨대, 동결건조된) 조성물을 포함한다.
- [0247] 실시예
- [0248] 하기 논의되는 실시예는 본 발명을 순전히 예시하기 위한 것이며, 어떤 방식으로든 본 발명을 제한하는 것으로 간주되지 않아야 한다. 본 실시예는 하기 실험이 수행된 모든 실험 또는 유일한 실험임을 나타내는 것으로 의도되지 않는다. 사용된 수치(예를 들어, 양, 온도 등)에 대한 정확성을 보장하기 위해 노력했지만, 일부 실험상 오류 및 편차를 고려하여야 한다. 달리 명시하지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 평균 분자량이며, 온도는 섭씨 도이고, 압력은 대기압이거나, 또는 대기압에 가까운 값이다.
- [0249] 실시예 1: INBRX-109와 온반세르팁의 조합 활성

- [0250] INBRX-109와 온반세르팁의 조합을 다양한 암 세포주에서 시험하여 암 세포에 대한 세포 독성을 결정하였다.
- [0251] **검정 프로토콜**
- [0252] 1일째 세포를 하기와 같이 시딩하였다. 각 세포주의 단층 배양물을 하기 상세히 설명되는 바와 같이 화합물 스크리닝을 위해 수확하였다. 배양 배지를 흡인하고, 세포를 PBS로 1회 세척하였다. 아큐타제(Accutase)를 첨가하고, 세포가 분리될 때까지 플라스크를 37℃에서 인큐베이션시켰다. 동일한 부피의 완전 배지를 첨가하여 아큐타제를 퀘칭한 후, 이어서, 세포를 수확에 걸쳐 위아래로 피펫팅하여 균질한 단일 세포 현탁액을 생성하였다. 세포의 밀도 및 생존능은 TC20 자동 세포 계수기를 사용하여 트리판 블루(Trypan Blue)에 의해 결정하였다. 실험 세포를 이글스 최소 필수 배지(EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium)/10% FBS/안티-안티(Anti-Anti) 배지(완전 EMEM) 중에서 $0.17 \times 10^6/\text{mL}$ 의 농도로 재현탁시키고, 384 웰 발광 플레이트의 내부 웰에 $15 \mu\text{L}/\text{Well}$ (최종 2,500/Well)로 시딩하였다. 각 세포주를 별도의 플레이트에 이중으로 플레이트팅하였다. 외부 웰은 $50 \mu\text{L}$ PBS로 충진시킨 후, 이어서, 플레이트를 가습 온도 제어 37℃ 조직 배양 인큐베이터에서 5% CO_2 로 16시간 동안 밤새도록 인큐베이션시켰다.
- [0253] 2일째, 하기 시험 및 대조군 물품을 제조하였다: 온반세르팁, INBRX-109, 및 스타우로스포린.
- [0254] 온반세르팁: 10 mg의 온반세르팁 스톡을 셀렉 케미컬즈(Selleck Chemicals)로부터 구입하고, DMSO 중에 10 mM으로 재현탁시켰다. 이어서, 이를 분취하고, -80℃에서 보관하였다. 검정에서 희석 및 사용 직전에 분취물을 해동하였다. 연속 희석액(500 μM 에서 시작하는 100% DMSO에서 6 포인트 5배 희석액, 및 DMSO 단독 대조군)의 500x 마스터 플레이트를 제조하고, 피펫으로 부드럽게 혼합하였다. 온반세르팁의 5x 작업 희석 플레이트를 생성하기 위해, 500x 플레이트에서 완전 배지(EMEM)로 1:100 희석을 수행하였다.
- [0255] INBRX-109: INBRX-109 검정 농도 범위를 선택하여 여러 양성 세포주를 대상으로 한 이전 세포독성 검정법에서 확인된 최소 및 최대 활성을 팔호로 묶었으며, 여기서, 1 nM을 최대 효능 농도로 정의하였다. INBRX-109 연속 희석액(500 nM에서 시작하는 완전 EMEM에서 6 포인트 10배 희석액, 및 완전 EMEM 단독 대조군)의 50x 마스터 플레이트를 제조하고, 피펫으로 부드럽게 혼합하였다. INBRX-109의 5x 작업 희석 플레이트를 생성하기 위해, 50x 마스터 플레이트로부터의 각 웰을 완전 배지(EMEM)로 1:10으로 희석하였다.
- [0256] 스타우로스포린: 스타우로스포린은 세포독성에 대한 양성 대조군으로 검정에 포함하였다. 제조업체로부터 구입한 10 mM DMSO 스톡을 해동하고, 분취하고, -80℃에서 보관하였다. 검정에서 희석 및 사용 직전에 분취물을 해동하였다. 5 μL 의 10 mM 스타우로스포린 스톡 용액을 495 μL 완전 EMEM에 첨가하여 5x 스타우로스포린 작업 희석액(100 μM)을 제조한 후, 잘 혼합하였다.
- [0257] 또한 2일째 시험 및 대조군 물품을 첨가하였다. 온반세르팁 소분자 작업 희석액(5 μL 의 5x), INBRX-109 작업 희석액(5 μL 의 5x), 또는 스타우로스포린 양성 대조군(5 μL 의 5x)을 각각의 실험 웰에 첨가하였다. 온반세르팁 적정은 플레이트를 가로질러 수행하였고, INBRX-109 적정은 플레이트를 따라 아래로 수행하여 두 시험 물품의 모든 가능한 조합의 매트릭스를 생성하였다. 상기 시험 물품을 각 세포주에 이중으로 첨가하였다. 이어서, 플레이트를 400x g로 1분 동안 원심분리한 후, 이어서, 37℃ 습도 제어 조직 배양 인큐베이터(5% CO_2)에서 48시간 동안 인큐베이션시켰다.
- [0258] 4일째, 생존능을 측정하였다. 플레이트를 10분 동안 실온으로 평형화시킨 후, 이어서, 각 웰에 25 μL 의 셀타이터-글로 2.0(CellTiter-Glo 2.0)[®]을 첨가하였다. 플레이트를 400x g로 1분 동안 회전시킨 후, 커버하고, 암실에서 실온에서 10분 동안 인큐베이션시켰다. 임의의 눈에 보이는 기포를 100% 에탄올 증기로 제거한 후, 이어서, 발광(RLU)을 스펙트라 맥스 M5e(Spectra Max M5e) 플레이트 판독기에서 384 웰 불투명 플레이트 세팅 및 SoftMaxPro v5.4 소프트웨어를 사용하여 통합 시간 50 밀리초로 판독하였다. 시험 물품이 세포 생존능에 미치는 효과를 결정하기 위해 원시 RLU 값을 Excel로 내보내고, 생존율(%)은 비히클 대조군(EMEM 중 0.5% DMSO) 대비 비율(%)로 계산하였고, 여기서, 비히클 대조군을 100%로 설정한다. 데이터는 GraphPad Prism 9에서 그래프로 표시하였다.
- [0259] **결과**
- [0260] 도 1a-1f는 다양한 암 세포주를 상이한 농도의 INBRX-109(0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 또는 10 nM) 및 온반세르팁(0, 0.32, 1.6, 8, 40, 200, 또는 1000 nM)과 접촉시킨 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 결과는 암 세포주 HT-29, LS174T, SW620, SW837, SW1463, 및

LS411N에 대해 제시되어 있다.

[0261] 도 2a-2f는 다양한 암 세포주를 상이한 농도의 INBRX-109(0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 또는 10 nM) 단독으로, 또는 200 nM 온반세르티프와 조합하여 접촉시킨 INBRX-109 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 HT-29, LS174T, SW620, SW837, SW1463, 및 LS411N에 대해 제시되어 있다. "Cpd 단독"으로 표지된 점선은 200 nM 온반세르티프 단독으로 처리된 암 세포의 생존율(%)을 보여주는 것이다.

[0262] 도 3a-3f는 다양한 암 세포주를 상이한 농도의 온반세르티프(0.32, 1.6, 8, 40, 200, 또는 1000 nM) 단독으로, 또는 1 nM INBRX-109와 조합하여 접촉시킨 온반세르티프 적정 실험의 결과를 보여주는 것이다. 암 세포의 생존율(%)은 각 그래프의 y축에 제시되어 있다. 본 결과는 암 세포주 HT-29, LS174T, SW620, SW837, SW1463, 및 LS411N에 대해 제시되어 있다. "Ab 단독"으로 표지된 점선은 INBRX-109 단독으로 처리된 암 세포의 생존율(%)을 보여주는 것이다.

[0263] 표 1은 200 nM 온반세르티프 존재 및 부재하의 INBRX-109 적정 곡선의 EC_{50} 값을 보여준다. 최대 세포독성은 100에서 생존율(%)을 감산함으로써 계산하였다.

표 1

표 1

세포주	INBRX-109 단독		INBRX-109 + 200 nM 온반세르티프	
	EC_{50} (pM)	최대 세포독성 (%)	EC_{50} (pM)	최대 세포독성 (%)
HT-29	11.58	71.42	0.0554	94.94
LS174T	10.65	59.68	90.66	79.32
SW620	4.775	20.25	0.965	88.56
SW837	1.234	6.43	0.371	80.64
SW1463	65.98	38.14	4.946	73.74
LS411N	불안정	13.27	0.687	88.9

[0264]

[0265] 표 2는 1 nM INBRX-109 존재 및 부재하의 온반세르티프 적정 곡선의 EC_{50} 값을 보여준다. 최대 세포독성은 100에서 생존율(%)을 감산함으로써 계산하였다.

표 2

표 2

세포주	온반세르티프 단독		온반세르티프 + 1 nM INBRX-109	
	EC ₅₀ (nM)	200 nM에서의 최대 세포독성 (%)	EC ₅₀ (nM)	200 nM에서의 최대 세포독성 (%)
HT-29	~ 2.296	5.54	21.41	94.63
LS174T	~ 196.7	16.93	~ 54.73	79.32
SW620	31.3	51.37	30.45	87.53
SW837	27247	27.17	~ 43.16	80.64
SW1463	124.3	25.79	~ 38.19	74.39
LS411N	~ 4145862	12.35	~ 10.27	84.45

[0266]

[0267]

INBRX-109와 온반세르티프의 조합시, 본 스크린에서 시험된 모든 암 세포주에 대한 세포 사멸이 증가한 것으로 나타났다. 일반적으로 온반세르티프 농도가 40 nM 초과일 때, 더 큰 이익이 관찰되었다. 상기 농도에서, 조합은 INBRX-109 단독 처리의 EC₅₀과 비교하여 INBRX-109의 EC₅₀ 변화로 분명히 알 수 있는 바와 같이 시너지 효과를 가져왔다. 예컨대, 도 2 및 표 1을 참조한다. 추가로, 상기 조합을 통해 약물 단독으로 처리한 것과 비교하여 전체 세포 생존은 감소하였다.

[0268]

실질적으로 상기 기술된 바와 같이, 추가의 암 세포주를 1 nM INBRX-109 단독, 온반세르티프 단독, 또는 1 nM INBRX-109와 상이한 농도의 온반세르티프(274 pM, 823 pM, 2.47 nM, 7.41 nM, 22.22 nM, 66.67 nM, 200 nM, 600 nM, 및 1.8 μM)의 조합 존재하에서 세포 사멸에 대해 검정하였다. 표 3 및 4, 및 도 4-8은 1 nM INBRX-109 단독의 최대 세포독성, 및 1 nM INBRX-109의 존재 및 부재하의 온반세르티프 적정 곡선의 EC₅₀ 값을 보여준다. 결장 직장암 세포주 패널에 대한 결과는 표 3 및 도 4-6에 제시되어 있고, 췌장 세포주 패널에 대한 결과는 표 4 및 도 7 및 8에 제시되어 있다.

표 3

표 3

세포주	1 nM INBRX-109 단독		온반세르티프 단독		온반세르티프 + 1 nM INBRX-109	
	EC ₅₀ (nM)	1 nM에서의 최대 세포독성 (%)	EC ₅₀ (nM)	600 nM에서의 최대 세포독성 (%)	EC ₅₀ (nM)	600 nM에서의 최대 세포독성 (%)
SK-CO-1	N/A	92.2	113.4	52.8	111.0	94.2
SNU-C5	N/A	48.6	95.6	42.9	57.7	87.7
LS 1034	N/A	56.9	236.6	38.8	199.4	85.8
LS 123	N/A	3.1	150.1	9.6	171.6	24.1
LS 180	N/A	27.2	505.0	42.9	196.6	86.2
T84	N/A	9.1	355.3	32.1	297.2	62.9
SW-48	N/A	93.9	37.3	76.6	28.3	99.4
SW-1116	N/A	15.3	441.4	10.4	411.1	39.4
SW-1463	N/A	28.5	201.1	21.0	98.0	64.2
SW-837	N/A	7.1	226.7	24.5	183.5	73.5
SW-948	N/A	98.5	97.0	43.2	23.3	99.0
LS 513	N/A	92.3	215.0	39.6	100.9	93.7
NCI-H716	N/A	9.2	81.3	34.8	83.6	51.2
HCT 116	N/A	54.4	112.0	76.0	66.8	96.6
DLD-1	N/A	41.9	280.0	45.8	183.6	90.4
HCT-15	N/A	49.6	268.0	61.4	175.3	94.9
LS174T	N/A	41.2	251.7	59.5	109.1	94.1
HT-55	N/A	48.4	51.4	41.8	44.1	87.9
SNU-81	N/A	82.1	187.3	24.3	71.9	92.3
HT-29	N/A	19.9	61.6	45.6	43.0	98.3
SW620	N/A	19.4	62.1	61.8	54.6	90.4
Hutu 80	N/A	4.0	137.8	85.4	133.4	86.5
SW-480	N/A	19.7	126.0	40.7	93.3	86.3
SW-403	N/A	15.7	62.5	46.4	64.9	89.0
LoVo	N/A	16.2	34.1	29.6	41.8	90.8
SNU-C2A	N/A	41.4	72.7	42.9	42.9	78.0
NCI-H747	N/A	13.4	71.6	17.4	78.7	44.5
COLO320DM	N/A	4.7	382.5	58.3	283.0	79.6
RKO	N/A	3.6	85.9	65.7	54.7	93.8
HCT-8	N/A	6.7	205.0	52.7	200.0	81.3

[0269]

표 4

표 4

세포주	1 nM INBRX-109 단독		온반세르티프 단독		온반세르티프 + 1 nM INBRX-109	
	EC ₅₀ (nM)	1 nM에서의 최대 세포독성 (%)	EC ₅₀ (nM)	600 nM에서의 최대 세포독성 (%)	EC ₅₀ (nM)	600 nM에서의 최대 세포독성 (%)
MIA PaCa-2	N/A	77.9	179.0	67.0	81.3	96.4
Panc 05.04	N/A	97.0	204.9	44.4	61.1	97.4
SW-1990	N/A	54.7	699.7	13.4	598.4	68.7
HuP-T4	N/A	80.7	138.1	33.7	35.1	85.3
BxPC-3	N/A	51.3	139.4	70.1	119.3	91.8
Capan-2	N/A	11.1	149.7	3.9	134.5	46.2
KP4	N/A	7.8	104.7	74.7	82.4	97.8
AsPC-1	N/A	14.5	444.3	19.9	230.3	60.0
PSN-1	N/A	91.9	85.3	83.2	63.0	98.0
HPAF-II	N/A	22.8	63.3	27.2	51.9	68.2
PANC-1	N/A	32.6	152.1	36.2	120.8	87.2
Capan-1	N/A	86.9	186.2	27.8	79.0	94.3
CFPAC-1	N/A	23.8	134.5	45.3	153.7	86.4
Panc 03.27	N/A	53.2	121.5	36.7	90.0	87.5
SU 86.86	N/A	92.5	629.1	30.5	91.4	98.9
PL45	N/A	14.1	83.6	56.5	68.1	82.2
Panc 10.05	N/A	23.8	81.9	47.2	81.7	83.3

[0270]

[0271] 본 스크린에서는 어느 작용제이든 단독인 것과 비교하여 INBRX-109와 온반세르티프의 조합이 암 세포주에 대해 세포 사멸 증가를 보였고, 일부 경우에서, 1 nM INBRX-109 첨가는 온반세르티프 단독인 것과 비교하여 EC50을 실질적으로 감소시켰다.

[0272] 본 데이터는 개별 약물 그 자체와 비교하여 DR5 효능제, 예컨대, INBRX-109와 PLK1 억제제, 예컨대, 온반세르티프의 조합이 암 세포 사멸을 개선시키거나, 또는 시너지화한다는 것을 시사한다.

[0273] 실시예 2: INBRX-109와 CDK9 억제제의 조합 활성

[0274] 다양한 세포주에 대해 추가 검정을 수행하여 INBRX-109와 사이클린 의존적 키나제 9(CDK9) 억제제(디나시클립, NVP-2, 플라보피리돌, 및 에니토시클립), 또는 하류 MCL-1 억제제(AZD5991)의 조합을 시험하여 암 세포에 대한 세포독성을 결정하였다.

[0275] 검정 프로토콜

[0276] 1일제 세포를 하기와 같이 시딩하였다. 각 세포주(연골육종: CAL-78, OUMS-27, SW1353, 및 H-EMC-SS; 결장직장암: SW620; 및 활막 육종: HS-SY-II)의 단층 배양물을 화학물 스크리닝을 위해 수확하였다. 배양 배지를 흡인하

고, 세포를 PBS로 1회 세척하였다. 아큐타제를 첨가하고, 세포가 분리될 때까지 플라스크를 37℃에서 인큐베이션시켰다. 동일한 부피의 완전 배지를 첨가하여 아큐타제를 켜친 후, 이어서, 세포를 수회에 걸쳐 위아래로 피펫팅하여 균질한 단일 세포 현탁액을 생성하였다. 세포의 밀도 및 생존능은 TC20 자동 세포 계수기를 사용하여 트리판 블루에 의해 결정하였다. 실험 세포를 이글스 최소 필수 배지(EMEM)/10% FBS/안티-안티 배지(완전 EMEM) 중에서 0.17 x10⁶/mL의 농도로 재현탁시키고, 384 웰 발광 플레이트의 내부 웰에 15 mL/웰(최종 2,500/웰)로 시딩하였다. 각 세포주를 별도의 플레이트에 이중으로 플레이트링하였다. 외부 웰은 50 mL PBS로 충전시킨 후, 이어서, 플레이트를 가습 온도 제어 37℃ 조직 배양 인큐베이터에서 5% CO₂로 16시간 동안 밤새도록 인큐베이션시켰다.

[0277] 2일째, 하기 시험 물품 및 INBRX-109를 하기 제공되는 바와 같이 제조하였다:

[0278] 디나시클립(MedChemExpress로부터 구입): 완전 배지(EMEM) 중에서 5X 작업 연속 희석 플레이트를 제조하였다(최종 농도 범위 625 nM 내지 0.2 nM에 대해 312.5 uM에서 시작하는 6 포인트, 5배 희석액).

[0279] NVP-2(MedChemExpress로부터 구입): 완전 배지(EMEM) 중에서 5X 작업 연속 희석 플레이트를 제조하였다(최종 농도 범위 625 nM 내지 0.2 nM에 대해 312.5 uM에서 시작하는 6 포인트, 5배 희석액).

[0280] 플라보피리돌(MedChemExpress로부터 구입): 완전 배지(EMEM) 중에서 5X 작업 연속 희석 플레이트를 제조하였다(최종 농도 범위 625 nM 내지 0.2 nM에 대해 312.5 uM에서 시작하는 6 포인트, 5배 희석액).

[0281] 에니토시클립(MedChemExpress로부터 구입): 완전 배지(EMEM) 중에서 5X 작업 연속 희석 플레이트를 제조하였다(최종 농도 범위 625 nM 내지 0.2 nM에 대해 312.5 uM에서 시작하는 6 포인트, 5배 희석액).

[0282] AZD-5991(MedChemExpress로부터 구입): 완전 배지(EMEM) 중에서 5X 작업 연속 희석 플레이트를 제조하였다(최종 농도 범위 10 uM 내지 3.2 nM에 대해 5 mM에서 시작하는 6 포인트, 5배 희석액).

[0283] INBRX-109: 완전 배지(EMEM) 중에서 5X 작업 연속 희석 플레이트를 제조하였다(최종 농도 범위 10 nM 내지 0.0001 nM에 대해 50 nM에서 시작하는 6 포인트, 10배 희석액).

[0284] 시험 물품을 하기와 같이 세포에 첨가하였다: 소분자 화합물 작업 희석액(5 µl의 5x), INBRX-109 작업 희석액(5 µl의 5x), 또는 배지 단독을 각각의 실험 웰에 첨가하였다. 소분자 화합물 적정은 플레이트를 가로질러 수행하였고, INBRX-109 적정은 플레이트를 따라 아래로 수행하여 두 시험 물품의 모든 가능한 조합의 매트릭스를 생성하였다. 상기 시험 물품을 각 세포주에 이중으로 첨가하였다. 이어서, 플레이트를 400x g로 1분 동안 원심분리한 후, 이어서, 37℃ 습도 제어 조직 배양 인큐베이터(5% CO₂)에서 48시간 동안 인큐베이션시켰다.

[0285] 시험 물품과 인큐베이션시킨 후, 간략하게 생존능을 측정하였다. 플레이트를 10분 동안 실온으로 평형화시킨 후, 이어서, 각 웰에 25 µl의 셀타이터-글로 2.0®을 첨가하였다. 플레이트를 400x g로 1분 동안 회전시킨 후, 커버하고, 암실에서 실온에서 10분 동안 인큐베이션시켰다. 임의의 눈에 보이는 기포를 100% 에탄올 증기로 제거한 후, 이어서, 발광(RLU)을 스펙트라 맥스 M5e 플레이트 판독기에서 384 웰 불투명 플레이트 세팅 및 SoftMax® Pro v5.4 소프트웨어를 사용하여 통합 시간 50 밀리초로 판독하였다. 시험 물품이 세포 생존능에 미치는 효과를 결정하기 위해 원시 RLU 값을 Excel로 내보내고, 생존율(%)은 비히클 대조군(EMEM 중 0.5% DMSO) 대비 비율(%)로 계산하였고, 여기서, 비히클 대조군을 100%로 설정한다. 데이터는 GraphPad Prism 9에서 그래프로 표시하였다.

[0286] **결과**

[0287] 상기 적정 실험의 결과는 도 9a-9e(적정된 INBRX-109 및 디나시클립), 10a-10e(적정된 INBRX-109 단독 또는 25 nM 디나시클립과 조합), 11a-11e(적정된 디나시클립 단독 또는 1 nM INBRX-109와 조합), 12a-12e(적정된 INBRX-109 및 NVP-2), 13a-13e(적정된 INBRX-109 단독 또는 125 nM NVP-2와 조합), 14a-14e(적정된 NVP-2 단독 또는 1 nM INBRX-109와 조합), 15a-15f(적정된 INBRX-109 및 플라보피리돌), 16a-16f(적정된 INBRX-109 단독 또는 125 nM 플라보피리돌과 조합), 17a-17f(적정된 플라보피리돌 단독 또는 1 nM INBRX-109와 조합), 18a-18f(적정된 INBRX-109 및 에니토시클립), 19a-19f(적정된 INBRX-109 단독 또는 125 nM 에니토시클립과 조합), 20a-20f(적정된 에니토시클립 단독 또는 1 nM INBRX-109와 조합), 21a-21f(적정된 INBRX-109 및 AZD-5991), 22a-22f(적정된 INBRX-109 단독 또는 2 nM AZD-5991과 조합), 및 23a-23f(적정된 AZD-5991 단독 또는 1 nM INBRX-109와 조합)에 제시되어 있다. "Ab 단독"으로 표지된 점선은 1 nM INBRX-109 단독으로 처리된 암 세포의 생존율(%)을 보여주는 것이고, "Cpd 단독"으로 표지된 점선은 명시된 소분자 억제제로 처리된 암 세포의 생존율(%)을 보여주는 것이다.

[0288] 표 5는 25 nM 디나시클립 존재 및 부재하의 INBRX-109 적정 곡선의 EC50 값을 보여준다. 최대 세포독성은 100에서 생존율(%)을 감산함으로써 계산하였다.

표 5

표 5

세포주	INBRX-109 단독		INBRX-109 + 25 nM 디나시클립	
	EC ₅₀ (pM)	1 nM에서의 최대 세포독성(%)	EC ₅₀ (pM)	최대 세포독성 (%)
CAL-78	>3597	9.3	0.16	91.7
OUMS-27	982.2	6.4	0.68	86.1
SW1353	불안정	6.9	0.81	84.6
H-EMC-SS	2.2	99.1	0.22	99.7
SW620	7.8	27.6	0.20	99.1

[0289]

[0290] 표 6은 1 nM INBRX-109 존재 및 부재하의 디나시클립 적정 곡선의 EC50 값을 보여준다. 최대 세포독성은 100에서 생존율(%)을 감산함으로써 계산하였다.

표 6

표 6

세포주	디나시클립 단독		디나시클립+ 1 nM INBRX-109	
	EC ₅₀ (nM)	25 nM에서의 최대 세포독성(%)	EC ₅₀ (nM)	최대 세포독성(%)
CAL-78	5.76	47.1	3.70	91.4
OUMS-27	불안정	15.1	6.18	86.13
SW1353	8.23	58.0	7.38	85.11
H-EMC-SS	4.62	54.0	7.61	99.62
SW620	3.82	46.2	4.80	99.52

[0291]

[0292] 표 7은 25 nM NVP-2 존재 및 부재하의 INBRX-109 적정 곡선의 EC50 값을 보여준다. 최대 세포독성은 100에서 생존율(%)을 감산함으로써 계산하였다.

표 7

표 7

세포주	INBRX-109 단독		INBRX-109 + 125 nM NVP-2	
	EC ₅₀ (pM)	1 nM에서의 최대 세포독성(%)	EC ₅₀ (pM)	최대 세포독성(%)
CAL-78	불안정	9.3	0.13	82.2
OUMS-27	>4090	4.2	0.42	84.3
SW1353	불안정	0.8	0.50	71
H-EMC-SS	1.96	96.5	0.17	98.8
SW620	98.06	20.8	0.11	98.1

[0293]

[0294] 표 8은 1 nM INBRX-109 존재 및 부재하의 NVP-2 적정 곡선의 EC50 값을 보여준다. 최대 세포독성은 100에서 생존율(%)을 감산함으로써 계산하였다.

표 8

표 8

세포주	NVP-2 단독		NVP-2 + 1 nM INBRX-109	
	EC ₅₀ (nM)	125 nM에서의 최대 세포독성 (%)	EC ₅₀ (nM)	최대 세포독성(%)
CAL-78	23.25	42.2	26.44	92.4
OUMS-27	9.0	20.4	16.31	88.5
SW1353	30.63	52.8	22.28	79.5
H-EMC-SS	23.51	46.4	24.46	98.7
SW620	12.57	39.5	4.91	98.7

[0295]

[0296] 표 9는 25 nM 플라보피리돌 존재 및 부재하의 INBRX-109 적정 곡선의 EC50 값을 보여준다. 최대 세포독성은 100에서 생존율(%)을 감산함으로써 계산하였다.

표 9

표 9

세포주	INBRX-109 단독		INBRX-109 + 125 nM 플라보피리돌	
	EC ₅₀ (pM)	1 nM에서의 최대 세포독성 (%)	EC ₅₀ (pM)	최대 세포독성(%)
CAL-78	17.19	11	0.60	77.3
OUMS-27	0.95	6.2	0.89	61.3
HS-SY-II	불안정	8.5	1.93	64.1
SW1353	불안정	4.1	2.81	39.8
H-EMC-SS	9.25	96.2	1.46	98.5
SW620	1.37	8.2	0.90	90.8

[0297]

[0298] 표 10은 1 nM INBRX-109 존재 및 부재하의 플라보피리돌 적정 곡선의 EC50 값을 보여준다. 최대 세포독성은 100에서 생존율(%)을 감산함으로써 계산하였다.

표 10

표 10

세포주	플라보피리돌 단독		플라보피리돌 + 1 nM INBRX-109	
	EC ₅₀ (nM)	125 nM에서의 최대 세포독성 (%)	EC ₅₀ (nM)	최대 세포독성 (%)
CAL-78	145.5	10.9	114.6	94
OUMS-27	109.1	24.0	118.2	87.8
HS-SY-II	108.4	55.8	102.6	95.1
SW1353	201.8	21.7	133.4	88.3
H-EMC-SS	114.4	21.9	53.94	99
SW620	불안정	21.7	50.20	98.7

[0299]

[0300] 표 11은 125 nM 에니토시클립 존재 및 부재하의 INBRX-109 적정 곡선의 EC₅₀ 값을 보여준다. 최대 세포독성은 100에서 생존율(%)을 감산함으로써 계산하였다.

표 11

표 11

세포주	INBRX-109 단독		INBRX-109 + 125 nM 에니토시클립	
	EC ₅₀ (pM)	1 nM에서의 최대 세포독성(%)	EC ₅₀ (pM)	최대 세포독성(%)
CAL-78	28.95	11.2	0.68	72.6
OUMS-27	불안정	~0	0.93	56.5
HS-SY-II	11.02	7.4	646.0	71.0
SW1353	9.1	8.8	1.05	45.1
H-EMC-SS	9.26	95.8	2.33	98.2
SW620	1.98	10.6	0.67	93.0

[0301]

[0302] 표 12는 1 nM INBRX-109 존재 및 부재하의 에니토시클립 적정 곡선의 EC₅₀ 값을 보여준다. 최대 세포독성은 100에서 생존율(%)을 감산함으로써 계산하였다.

표 12

표 12

세포주	에니토시클립 단독		에니토시클립 + 1 nM INBRX-109	
	EC ₅₀ (nM)	125 nM에서의 최대 세포독성 (%)	EC ₅₀ (nM)	최대 세포독성(%)
CAL-78	144.2	10.9	108.5	90.8
OUMS-27	51.00	25.6	90.36	81
HS-SY-II	73.95	73.2	89.10	94
SW1353	102.2	28.0	102.7	64.6
H-EMC-SS	123.6	15.8	113.8	99.2
SW620	25.76	27.3	39.27	97.6

[0303]

[0304] 표 13은 2 μM AZD-5991 존재 및 부재하의 INBRX-109 적정 곡선의 EC₅₀ 값을 보여준다. 최대 세포독성은 100에서 생존율(%)을 감산함으로써 계산하였다.

표 13

표 13

세포주	INBRX-109 단독		INBRX-109 + 2 μ M AZD-5991	
	EC ₅₀ (pM)	1 nM에서의 최대 세포독성 (%)	EC ₅₀ (pM)	최대 세포독성 (%)
CAL-78	0.62	12.9	3.93	64.9
OUMS-27	8872.0	7.0	8.71	8.2
HS-SY-II	0.83	27.5	불안정	92.1
SW1353	불안정	6.6	5.33	27.7
H-EMC-SS	10.19	96.2	2.59	99.6
SW620	9.84	9.9	5.78	23.2

[0305]

[0306]

표 14는 1 nM INBRX-109 존재 및 부재하의 AZD-5991 적정 곡선의 EC₅₀ 값을 보여준다. 최대 세포독성은 100에서 생존율(%)을 감산함으로써 계산하였다.

표 14

표 14

세포주	AZD-5991 단독		AZD-5991 + 1 nM INBRX-109	
	EC ₅₀ (μ M)	2 μ M에서의 최대 세포독성 (%)	EC ₅₀ (μ M)	최대 세포독성 (%)
CAL-78	0.084	37.2	0.096	64.9
OUMS-27	>5000	~0	0.015	13.3
HS-SY-II	0.04	87.5	0.13	88.6
SW1353	10.12	~0	0.58	30.8
H-EMC-SS	0.18	11.9	0.007	99.5
SW620	285.7	7.6	불안정	64.1

[0307]

[0308]

시험된 각 CDK9 억제제인 디나시클립, NVP-2, 플라보피리돌, 및 에니토시클립과 INBRX-109의 조합은 본 스크린에서 시험된 거의 모든 암 세포주에 대해 세포 사멸 증가를 보였다. INBRX-109와 MCL-1(CDK9 하류의 표적)의 억제제인 AZD-5991의 조합 또한 다수의 세포주에서 세포 사멸 증가를 보였다. 디나시클립 및 NVP-2의 경우, 25 nM 초과 농도에서, 플라보피리돌 및 에니토시클립의 경우, 125 nM 이상의 농도에서, 및 AZD-5991의 경우, 0.4 μ M 초과 농도에서 더 큰 이익이 관찰되었다. 상기 농도에서, 조합은 INBRX-109 단독 처리의 사멸 곡선과 비교하여 CDK9, 및 하류 MCL-1 억제제와 조합된 INBRX-109의 사멸 곡선의 변화로 분명히 알 수 있는 바와 같이 시너지 효과를 가져왔다. 예컨대, 도 9-23 및 표 5-14를 참조한다. 추가로, 상기 조합을 통해 어느 약물이든 약물 단독으로 처리한 것과 비교하여 전체 세포 생존은 감소하였다.

[0309]

본 개시내용은 본 개시내용의 정신 또는 본질적인 특징에서 벗어나지 않고 다른 특정 형태로 구현될 수 있다. 따라서, 상기 실시양태는 모든 측면에서 본 개시내용을 제한하기보다는 예시적인 것으로 간주되어야 한다. 따라서, 본 개시내용의 범주는 상기 설명보다는 첨부된 청구범위에 의해 명시되며, 따라서, 청구범위의 의미 및 균등 범위 내에 있는 모든 변경은 본원에 포함되는 것으로 의도된다.

특정 서열 표

서열 번호	설명	서열
1	INBRX-109 CDR1	SGLTFPNYGM
2	INBRX-109 CDR2	AIYWSGGTVY
3	INBRX-109 CDR3	AVTIRGAATQTWKYDYW
4	INBRX-109 VHH	EVQLLSEGGGEVQPGGSLRLSCAASGLTFPNYGMGWFQAPGKEREFSVSAIYWS GGTVVYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAVTIRGAATQWTW KYDYWGQGTLLTVKPGG
5	INBRX-109 VHH-펍커- VHH	EVQLLSEGGGEVQPGGSLRLSCAASGLTFPNYGMGWFQAPGKEREFSVSAIYWS GGTVVYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAVTIRGAATQWTW KYDYWGQGTLLTVKPGGSGGSEVQLLSEGGGEVQPGGSLRLSCAASGLTFPNYGMGWFQAPGKEREFSVSAIYWSGGTVVYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAVTIRGAATQWTWKYDYWGQGTLLTVKPGG
6	Fc (헛지 포합)	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQK SLSLSPGK
7	INBRX-109	EVQLLSEGGGEVQPGGSLRLSCAASGLTFPNYGMGWFQAPGKEREFSVSAIYWS GGTVVYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAVTIRGAATQWTW KYDYWGQGTLLTVKPGGSGGSEVQLLSEGGGEVQPGGSLRLSCAASGLTFPNYGMGWFQAPGKEREFSVSAIYWSGGTVVYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAVTIRGAATQWTWKYDYWGQGTLLTVKPGGSGGDKTHTCPPCPAPGG PSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
8	인간 DR5 (헛호 펍터드, 아미노산 1-55 포합)	MEQRGQNAPA ASGARKRHGP GPREARGARP GPRVFKTLVL VVAAVLLLVSA AESALITQDD LAPQQRAPQ QKRSSPSEGL CPPGHHSIED GRDCISCKYG QDYSTHWN DL LFCLRCTRCD SGEVELSPCT TTRNTVCQCE EGTFREEDSP EMCRKCRGTC PRGMVKVGDC TPWSDIECVH KESGTHKSGE VPAVEETVTS SPGTPASPCS LSGIIIGVTV AAVVLIVAVF VCKSLLWKV LPYLKGICSG GGGDPFVRDR SSQRPGAEDN VLNEIVSILQ PTQVPEQEME VQEPAEPTGV NMLSPGESEH LLEPAEAERS QRRRLVLPAN EGDPTETLRQ CFDDFADLVP FDSWEPLMRK LGLMDNEIKV AKAEAAGHRD TLYTMLIKWV NKTGRDASVH TLDDALETLG ERLAKQKIED HLLSSGKFMY LEGNADSAMS
9	헛숙 인간 DR5	ITQDD LAPQQRAPQ QKRSSPSEGL CPPGHHSIED GRDCISCKYG QDYSTHWN DL LFCLRCTRCD SGEVELSPCT TTRNTVCQCE EGTFREEDSP EMCRKCRGTC PRGMVKVGDC TPWSDIECVH KESGTHKSGE VPAVEETVTS SPGTPASPCS LSGIIIGVTV AAVVLIVAVF VCKSLLWKV LPYLKGICSG GGGDPFVRDR SSQRPGAEDN VLNEIVSILQ PTQVPEQEME VQEPAEPTGV NMLSPGESEH LLEPAEAERS QRRRLVLPAN EGDPTETLRQ CFDDFADLVP FDSWEPLMRK LGLMDNEIKV AKAEAAGHRD TLYTMLIKWV NKTGRDASVH TLDDALETLG ERLAKQKIED HLLSSGKFMY LEGNADSAMS
10	인간 PLK1	MSAAVTAGKL ARAPADPGKA GVPGVAAPGA PAAAPPAKEI FEVLVDPRSR RRYVRGRFLG KGGFAKCFEI SDADTKEVFA GKIVPKSLLL KPHQREKMSM EISIHRS LAH QHVVGFGHFF EDNDFVFFVL ELCRRRSLL LHKRRKALTE PEARYYLRQI VLGCQYLHRN RVIHRDLKLG NLFLNEDLEV KIGDFGLATK VEYDGERKKT LCGTPNYIAP EVLSKKGHSF EVDVWSIGCI MYTLLVGKPP FETSCLKETY LRIKKNEYSI PKHINPVAAS LIQKMLQTDPTARPTINELL

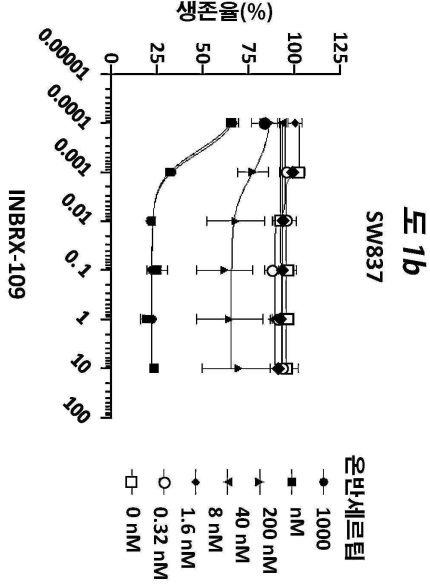
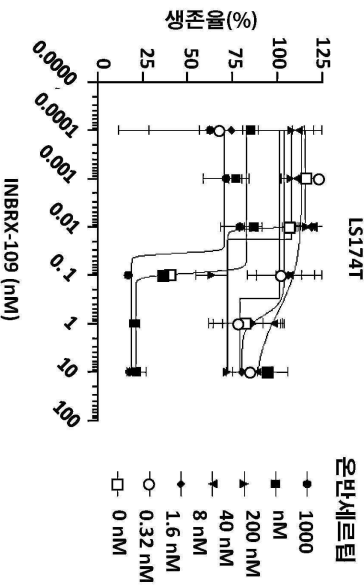
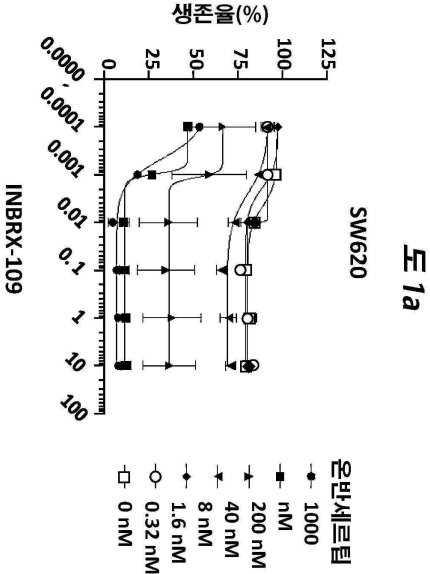
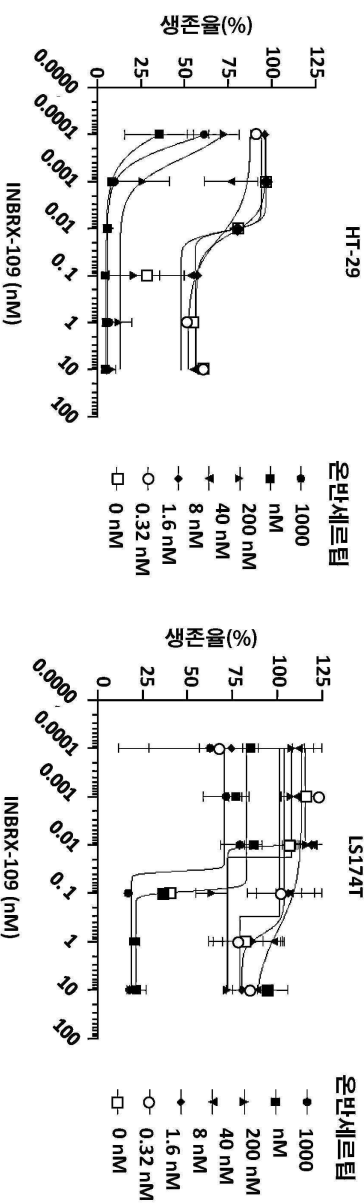
[0310]

		NDEFTSGYI PARLPITCLT IPRFSIAPS SLDPSNRKPL TVLNKGLNPL LPERPREKEE PVVRETGEV DCHLSDMLQQ LHSVNASKPS ERGLVRQEEA EDPACIPIFW VSKWVDYSDK YGLGYQLCDN SVGVLFNDST RLILYNDGDS LQYIERDGTE SYLTVSSHNP SLMKKITLLK YFRNYMSEHL LKAGANITPR EGDELARLPY LRTWFRTRSA IILHLSNGSV QINFFQDHTK LILCPLMAAV TYIDEKRDRF TYRLSLEEY GCCKELASRL RYARTMVDKL LSSRSASNRL KAS
11	인간 CDK9	MAKQYDSVECPFCDEVSKYEKLAKIGQGTFGGEVFKARHRTGQKVALKKVLMEN EKEGFPITALREIKILQLLKHENNVNLEIEICRTKASPYNRCKGSIYLVDFCEH DLAGLLSNVLVKFTLSEIKRVMQMLNLNGLYYIHRNKILHRDMKAANVLITRDGV LKLADFGLARAFSLAKNSQPNRYTNRVVTLWYRPPPELLLGERDYGPPIDLWGAG CIMAEMWTRSPIMQGNTEQHQLALISQLCGSITPEVWPVNDNYELYEKLELVKG QKRKVKDRKLKAYVRDPYALDLIDKLVLDPAQRIDSDDALNHDFWSDPMPSDL KGMLSHTLTSMEFYLAPPRKSGSQITQOSTNQSRNPATTNQTEFERVF

[0311]

도면

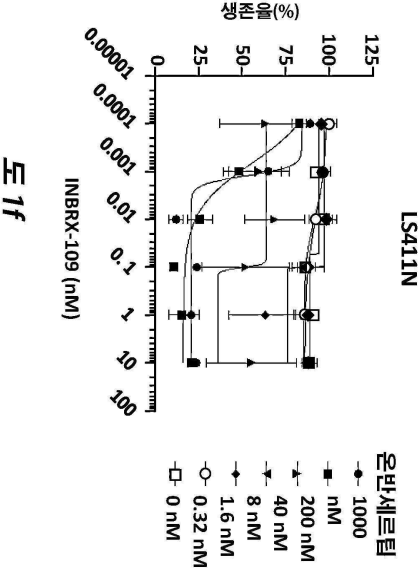
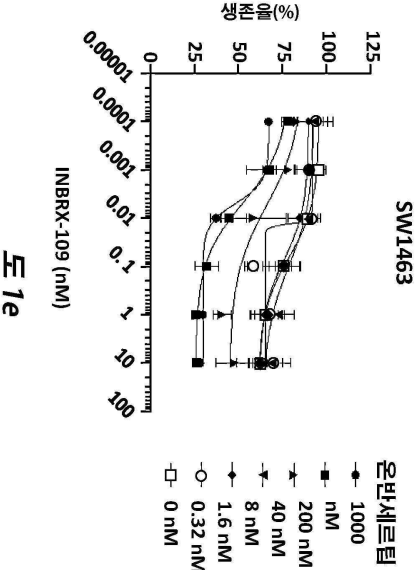
도면1ad



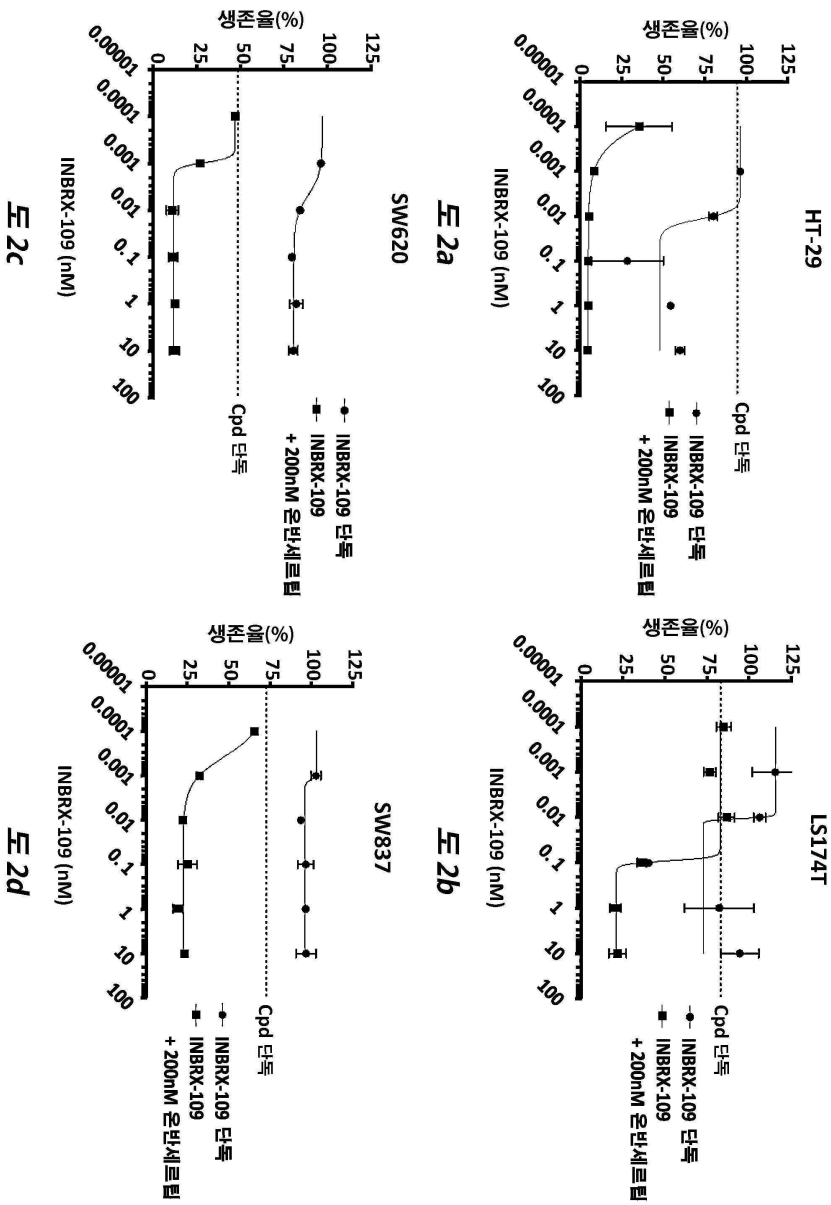
도 1c

도 1d

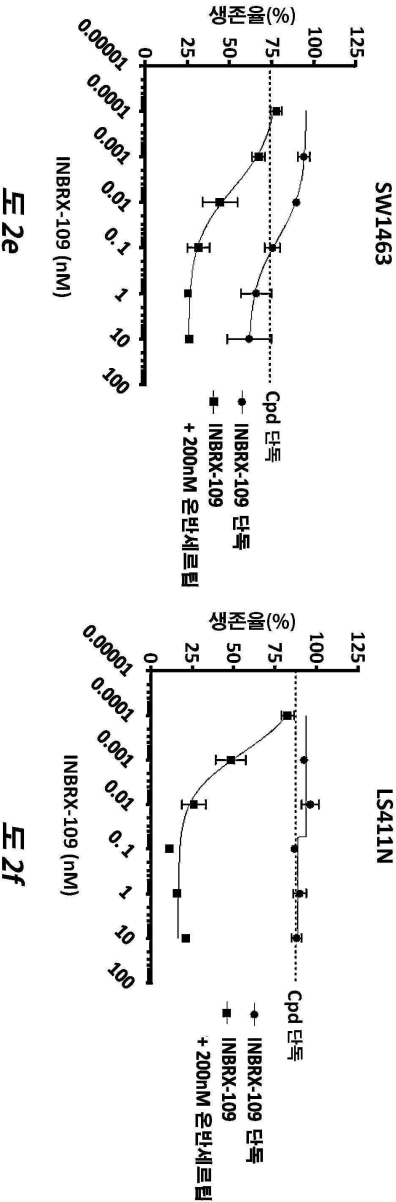
도면1ef



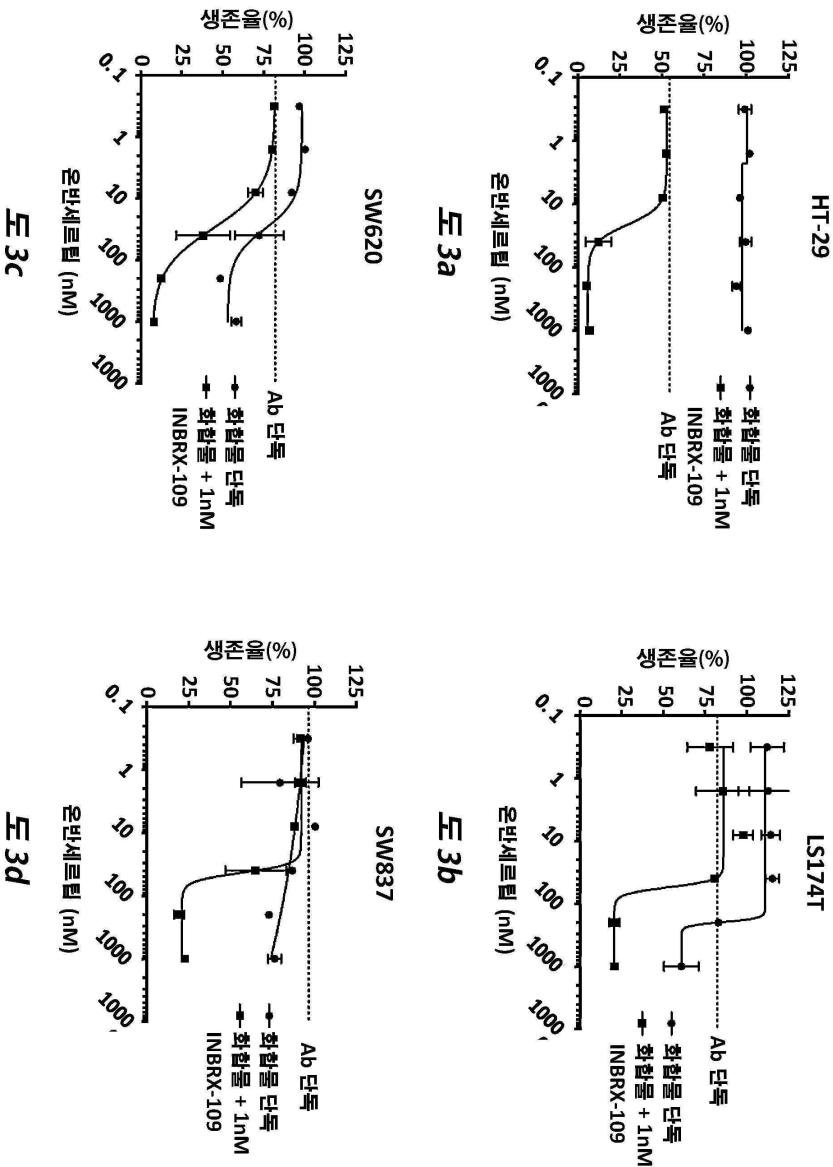
도면2ad



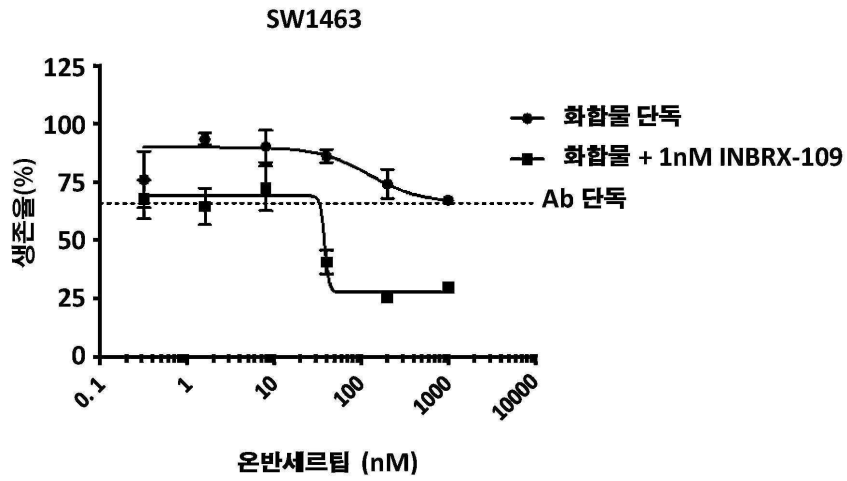
도면2ef



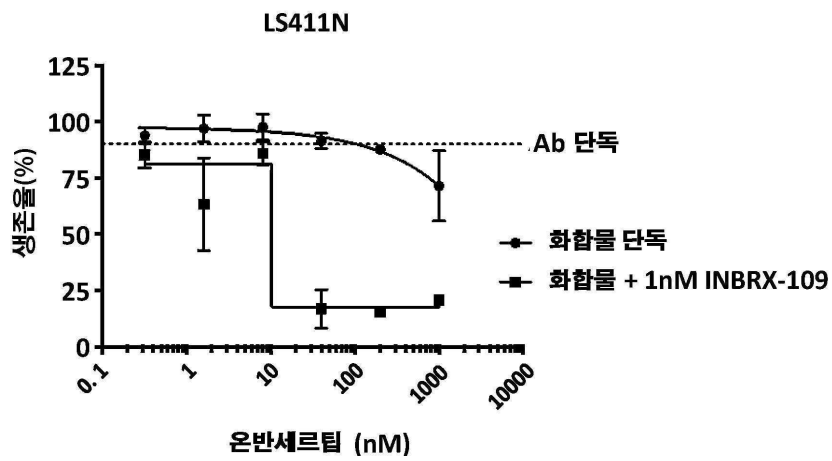
도면3ad



도면3ef

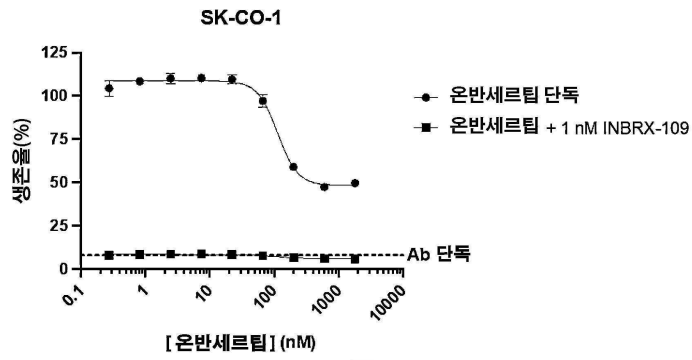


도 3e

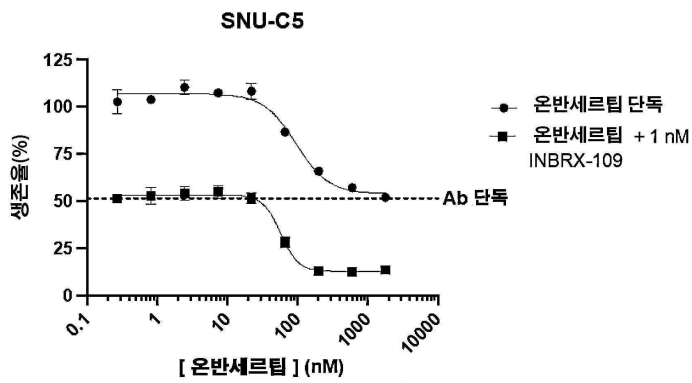


도 3f

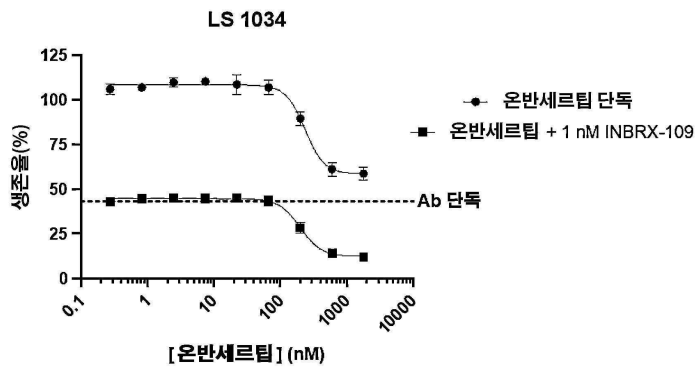
도면4ac



도 4a

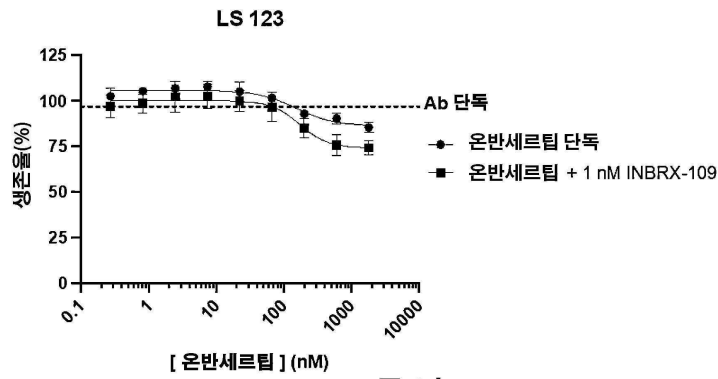


도 4b

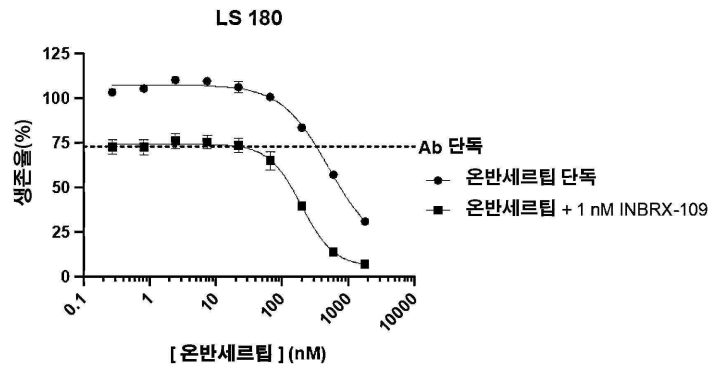


도 4c

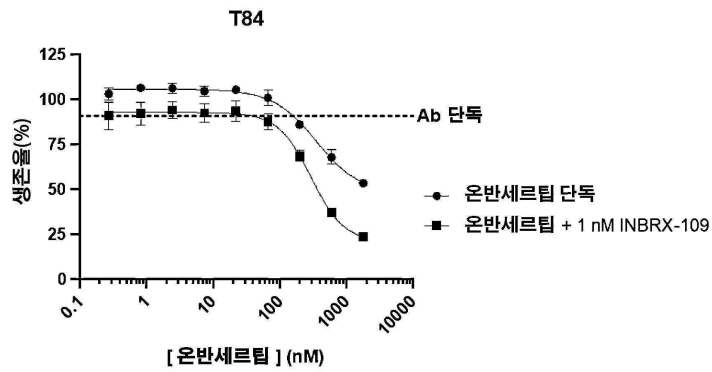
도면4df



도 4d

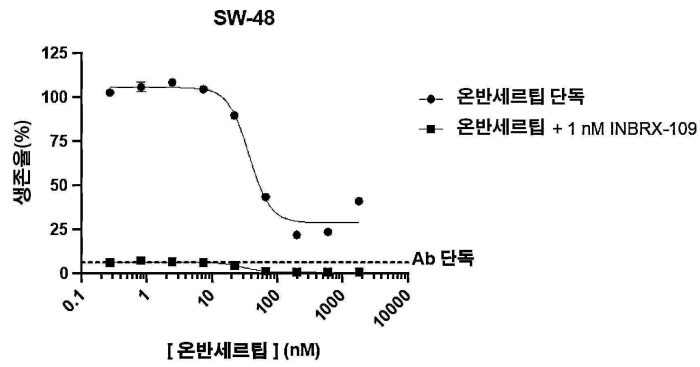


도 4e

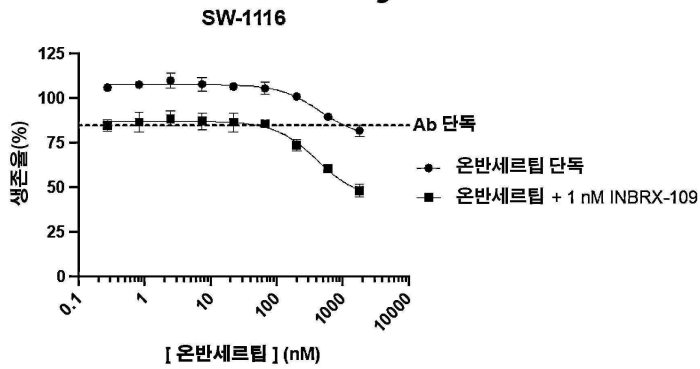


도 4f

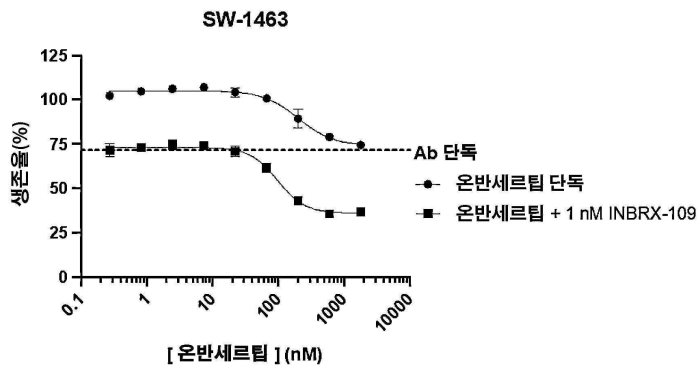
도면4gi



도 4g

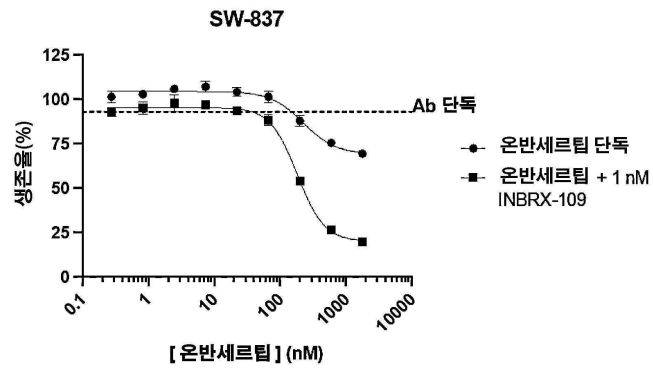


도 4h

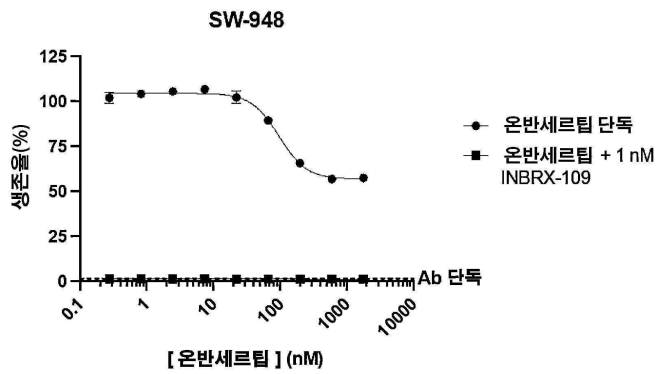


도 4i

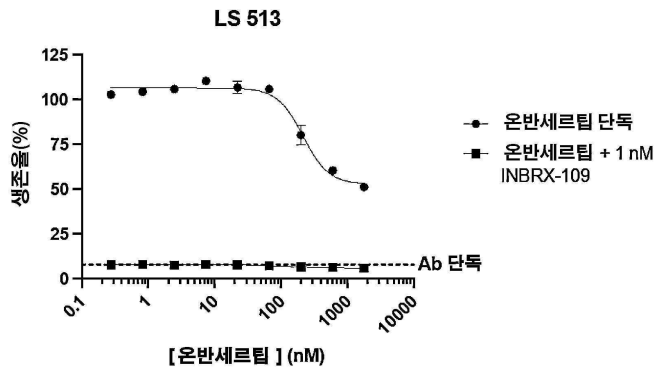
도면5ac



도 5a

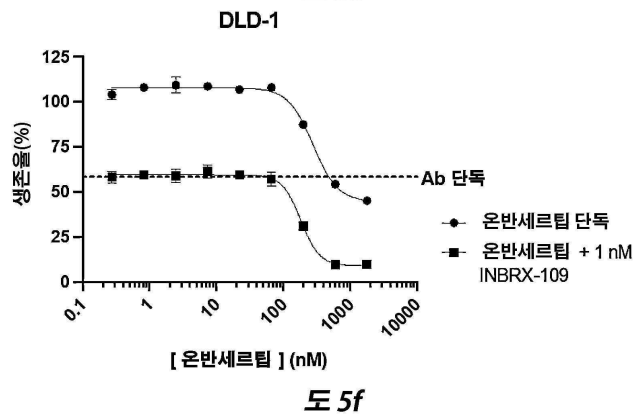
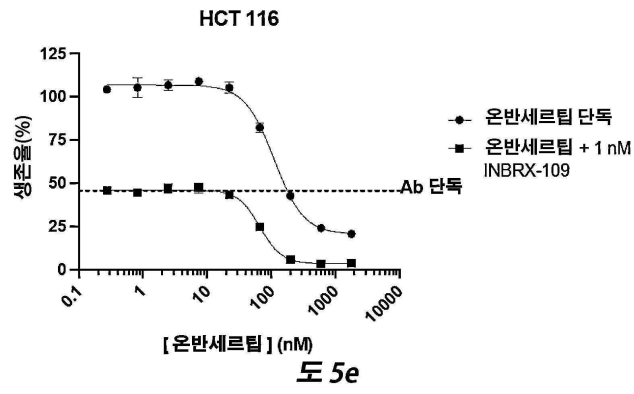
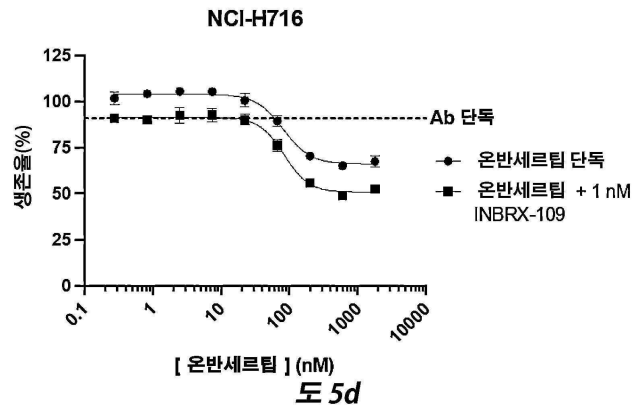


도 5b

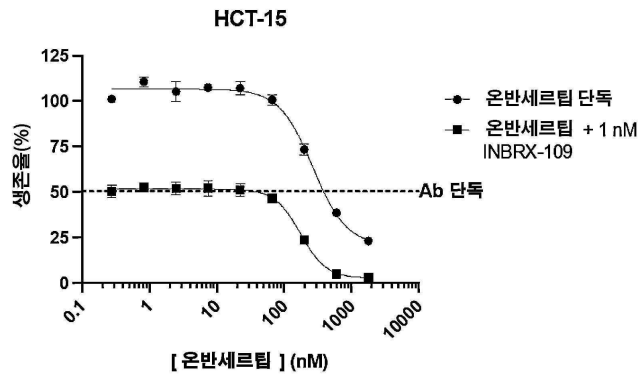


도 5c

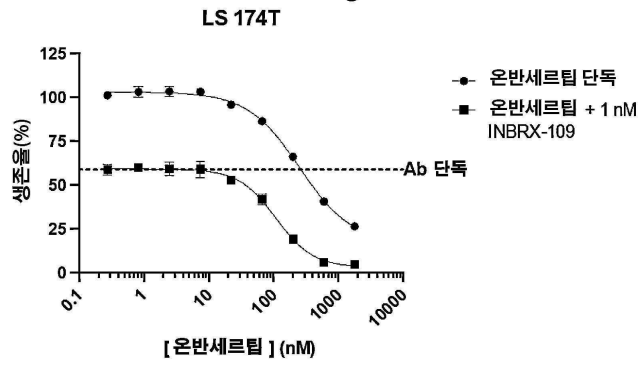
도면5df



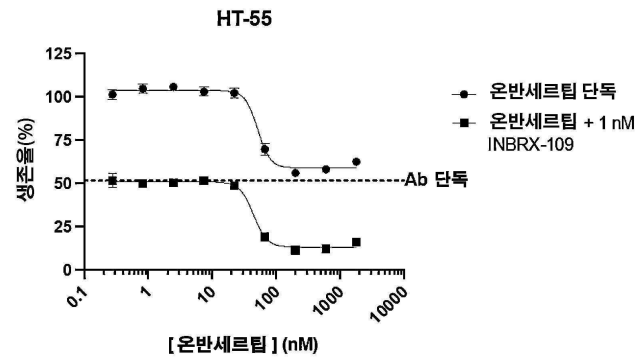
도면5gi



도 5g

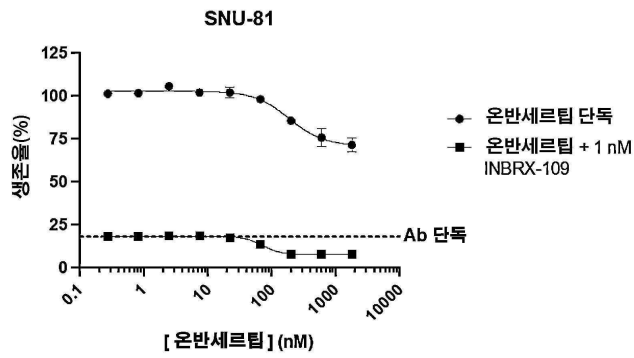


도 5h

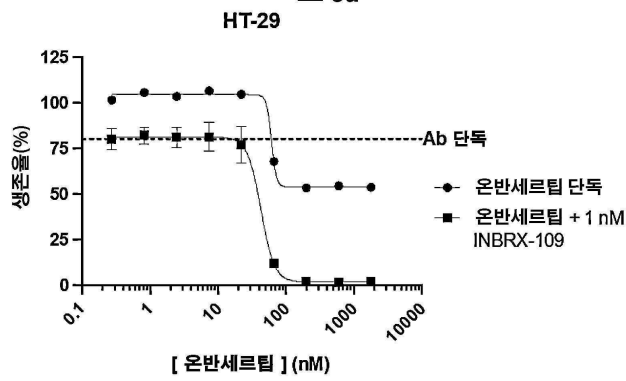


도 5i

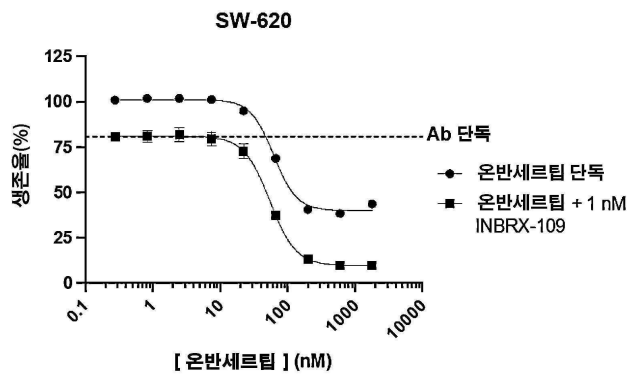
도면6ac



도 6a

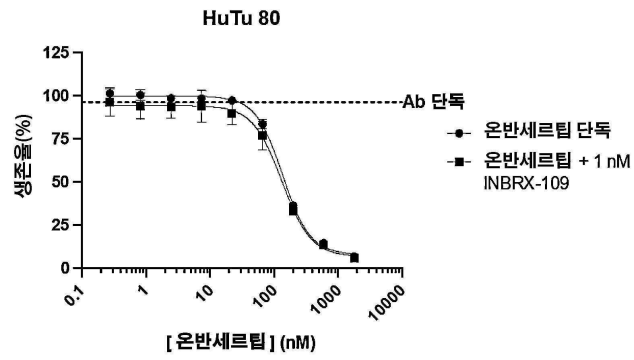


도 6b

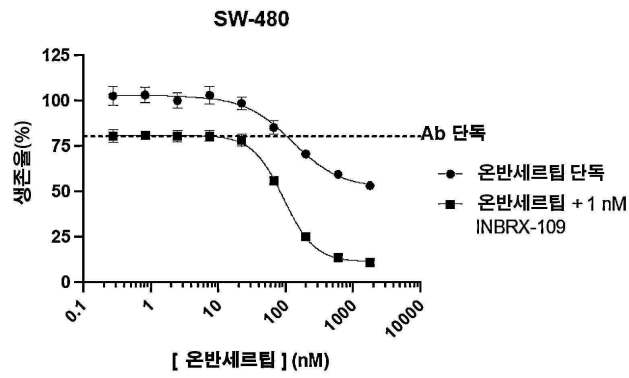


도 6c

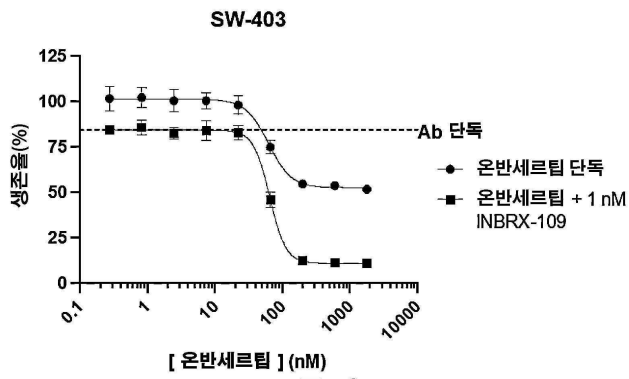
도면6df



도 6d

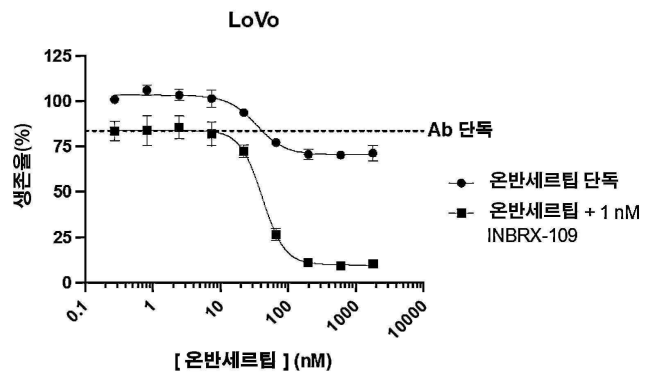


도 6e

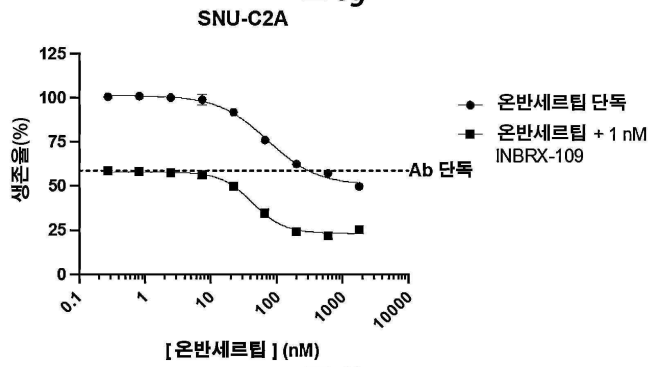


도 6f

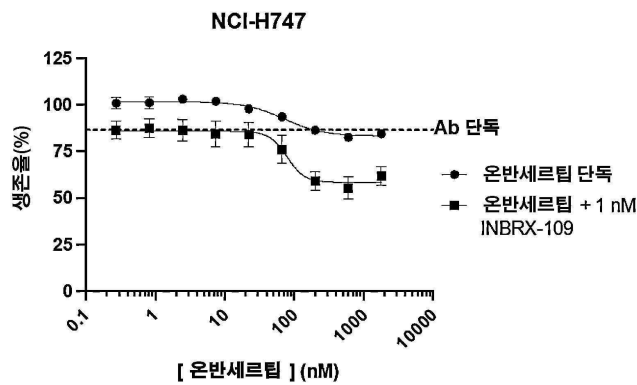
도면6gi



도 6g

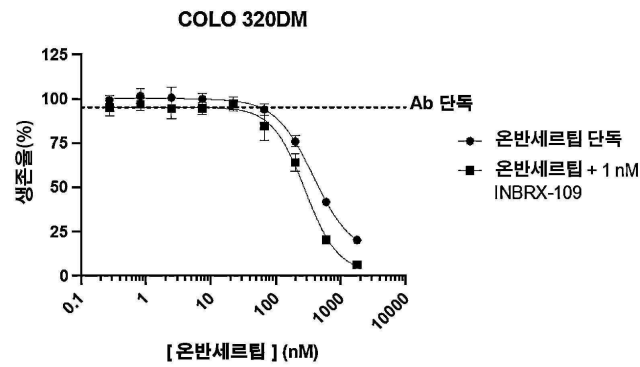


도 6h

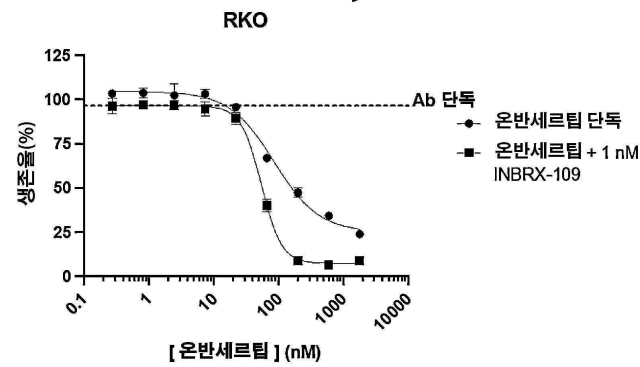


도 6i

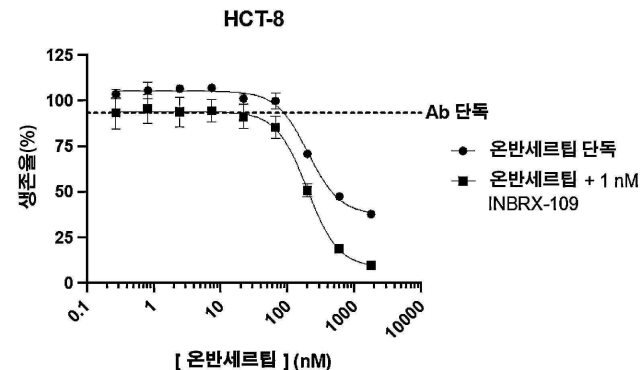
도면6j1



도 6j

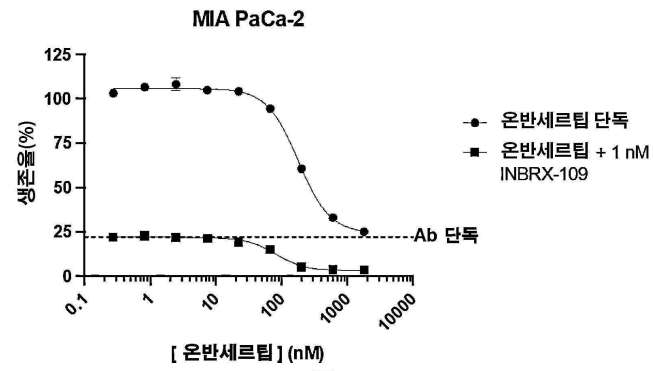


도 6k

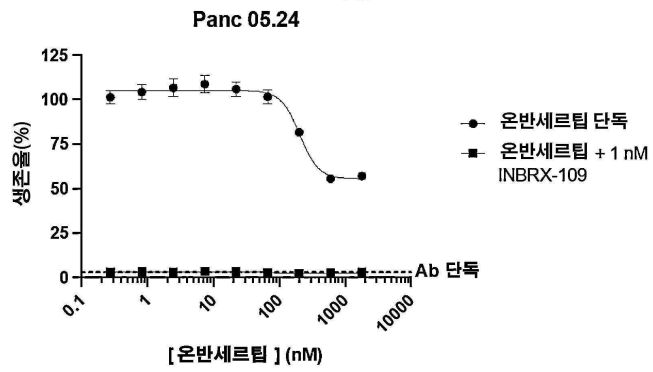


도 6l

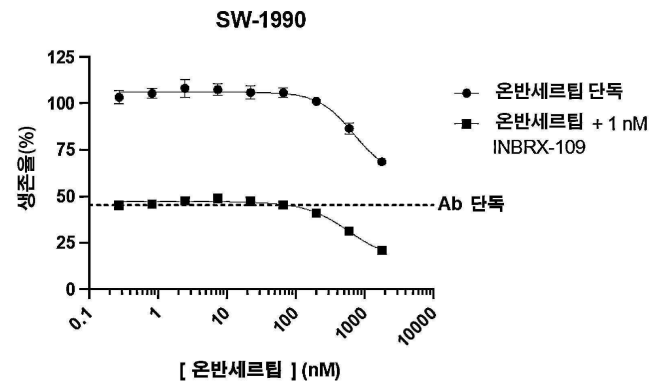
도면7ac



도 7a

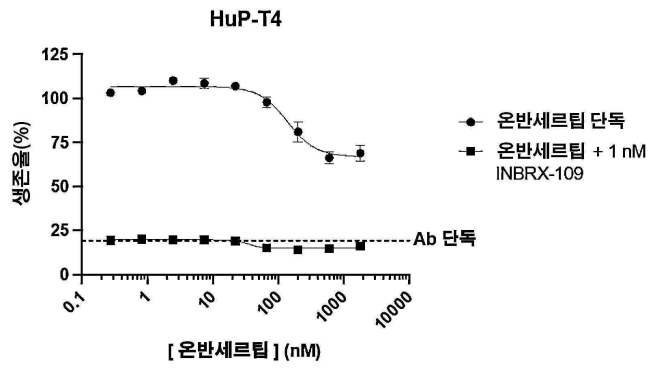


도 7b

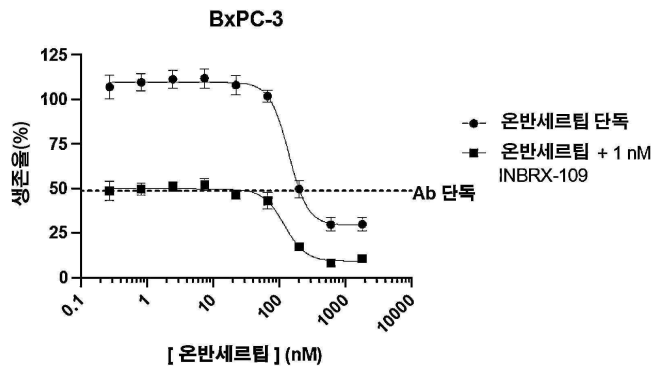


도 7c

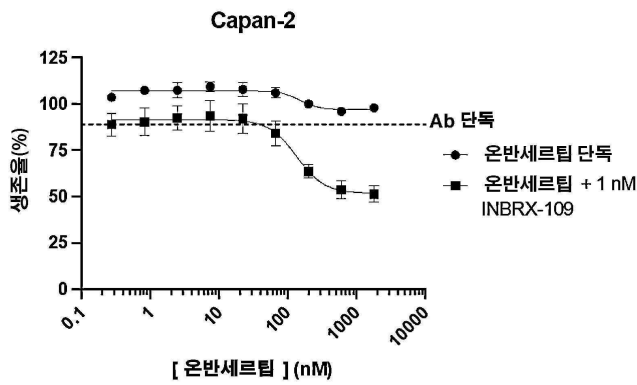
도면7df



도 7d

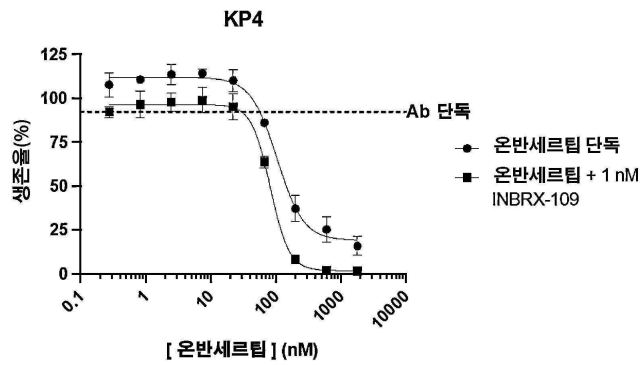


도 7e

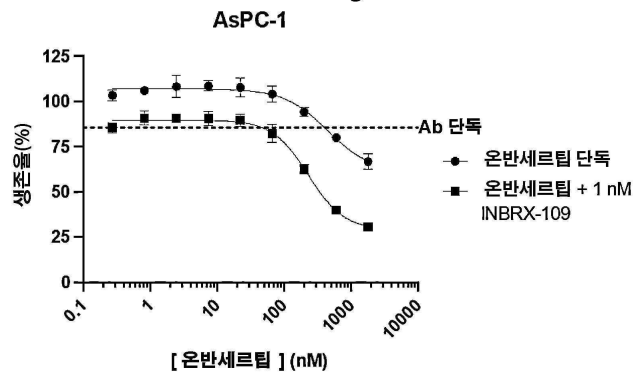


도 7f

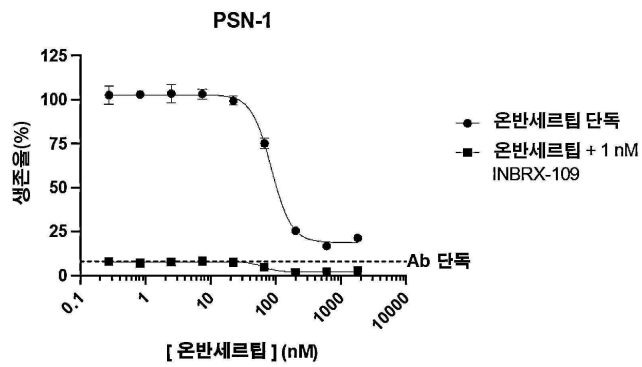
도면7gi



도 7g

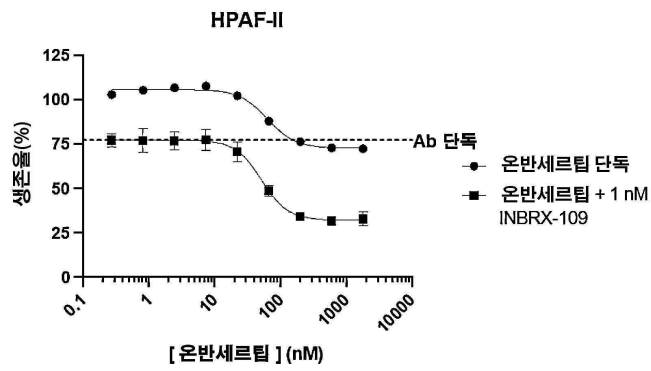


도 7h

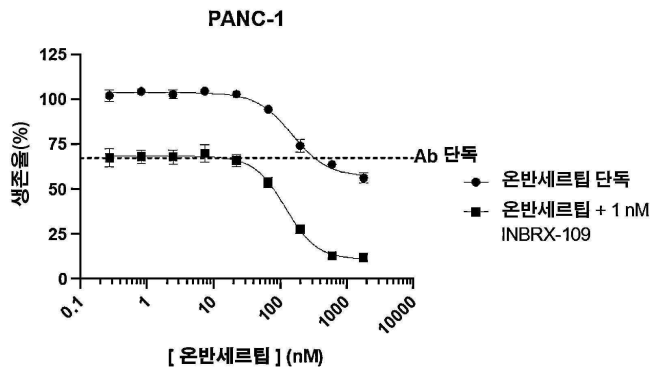


도 7i

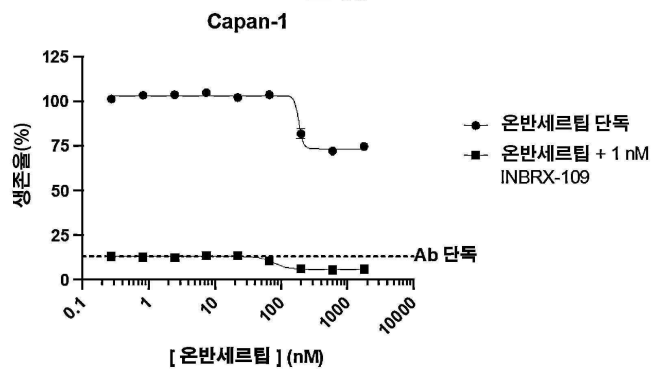
도면 8ac



도 8a

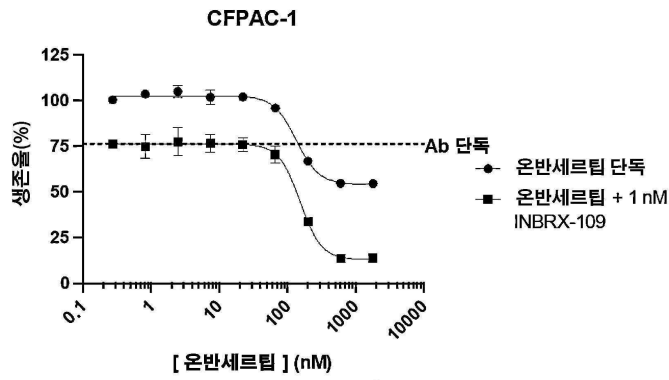


도 8b

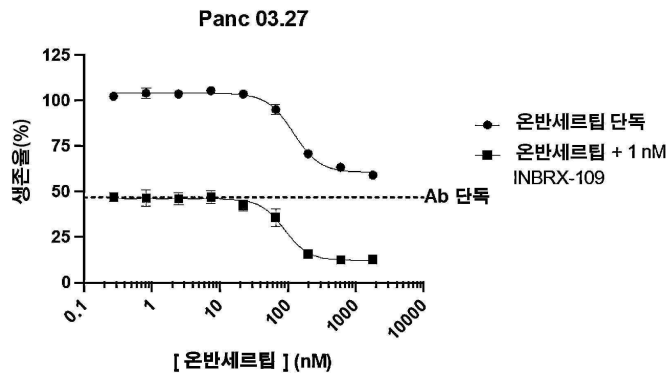


도 8c

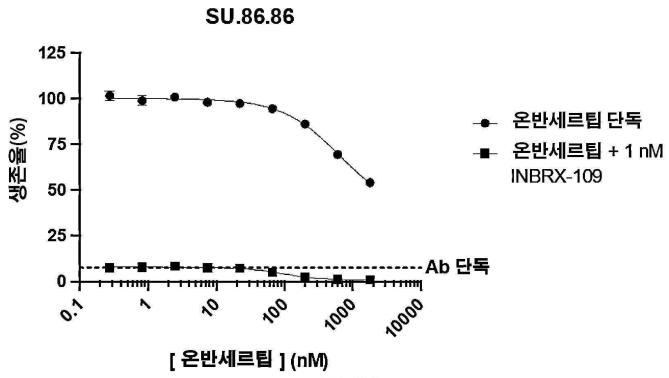
도면8df



도 8d

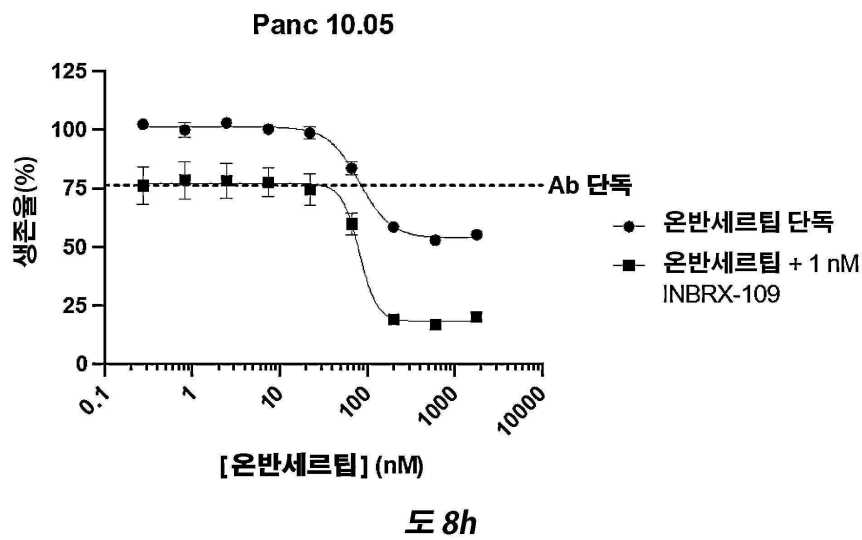
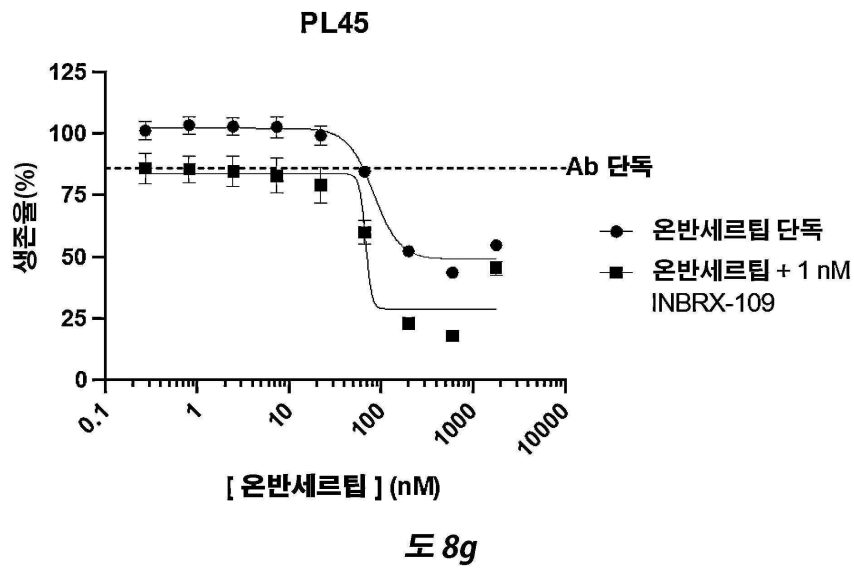


도 8e

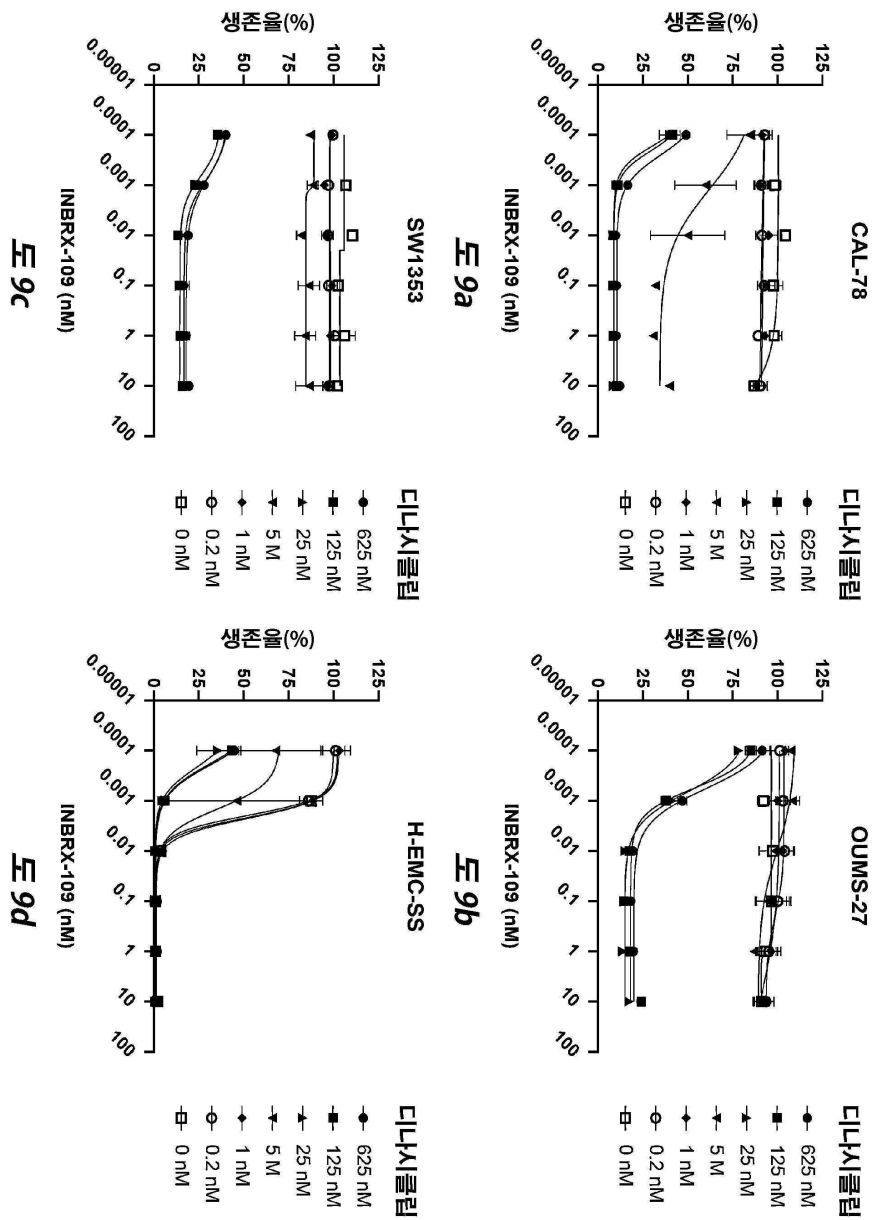


도 8f

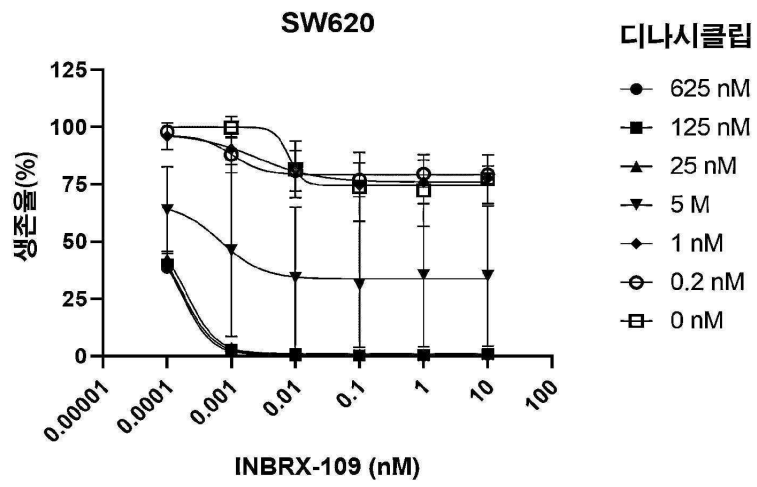
도면 8gh



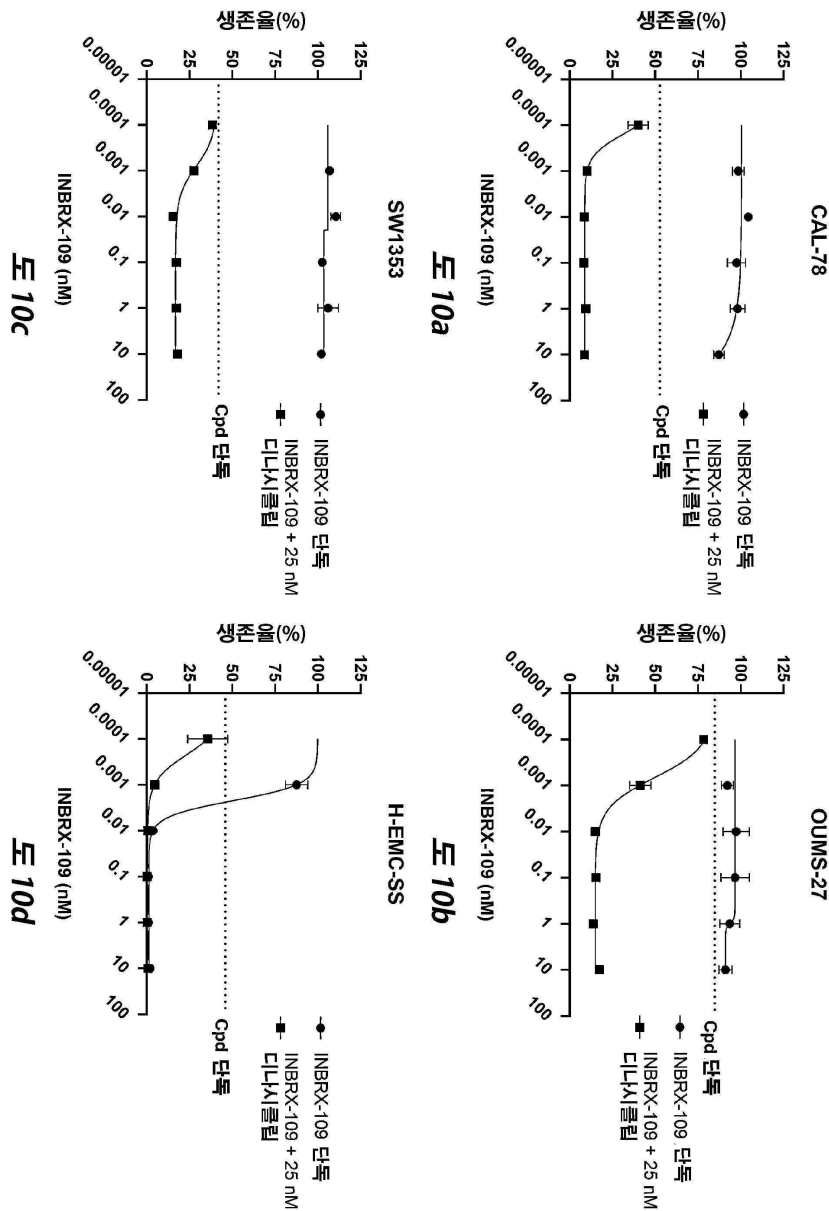
도면9ad



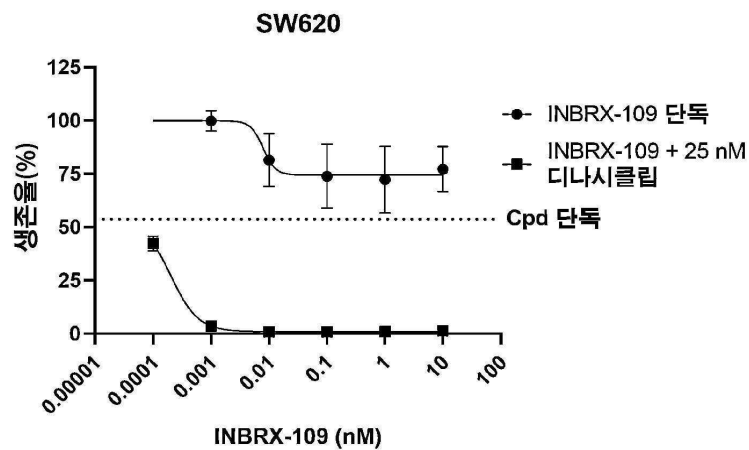
도면9e



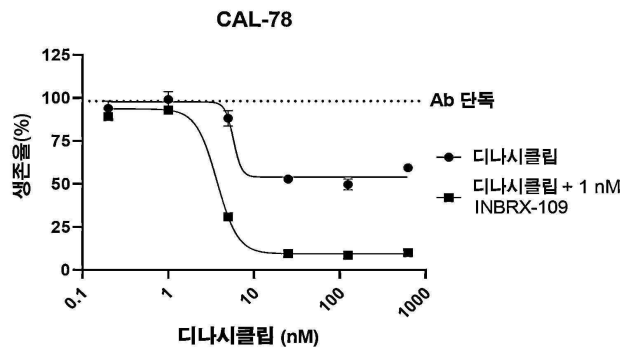
도면10ad



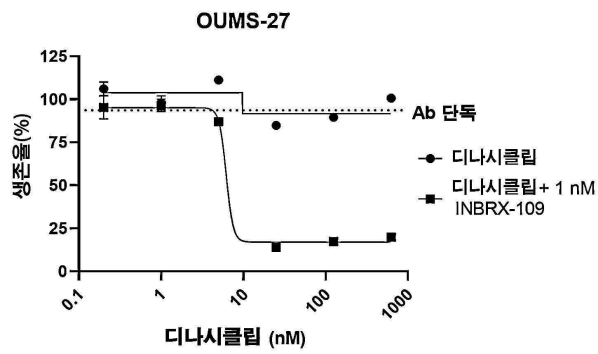
도면10e



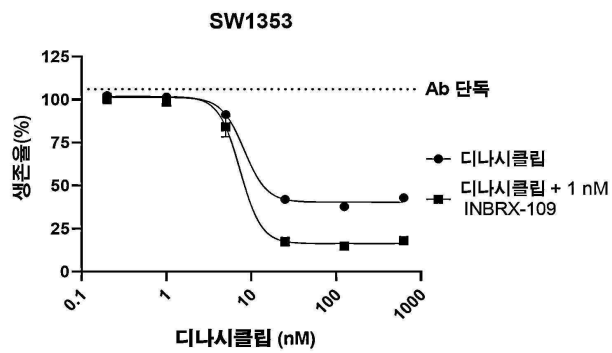
도면11ac



도 11a

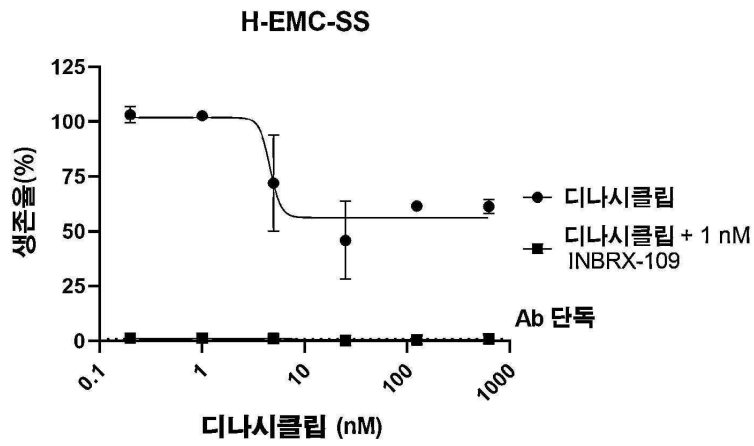


도 11b

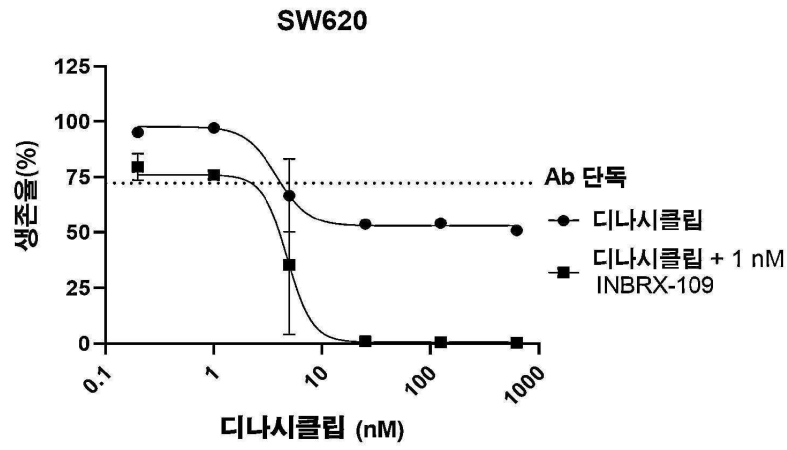


도 11c

도면11de

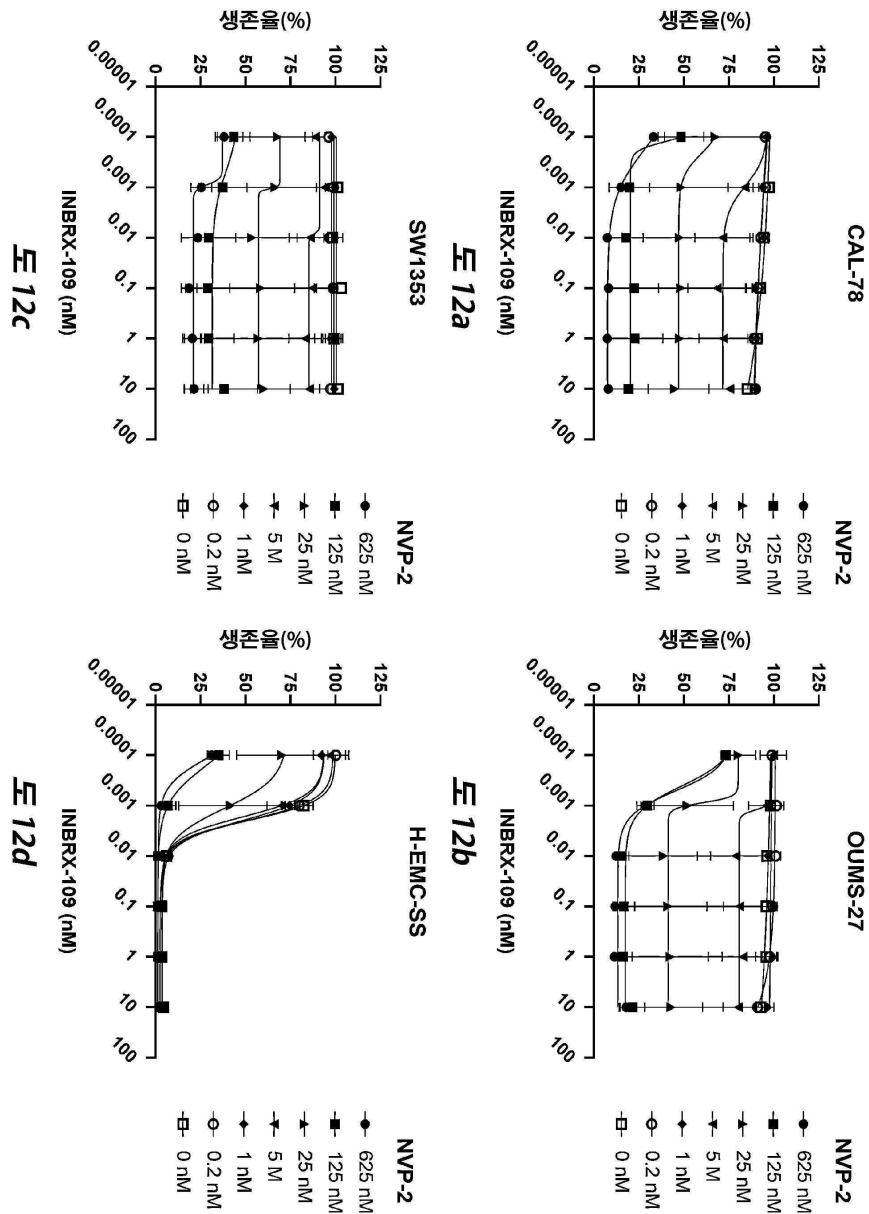


도 11d

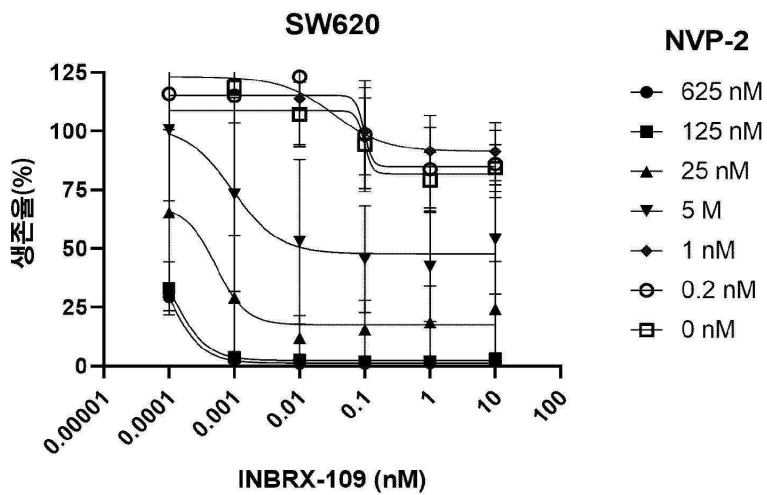


도 11e

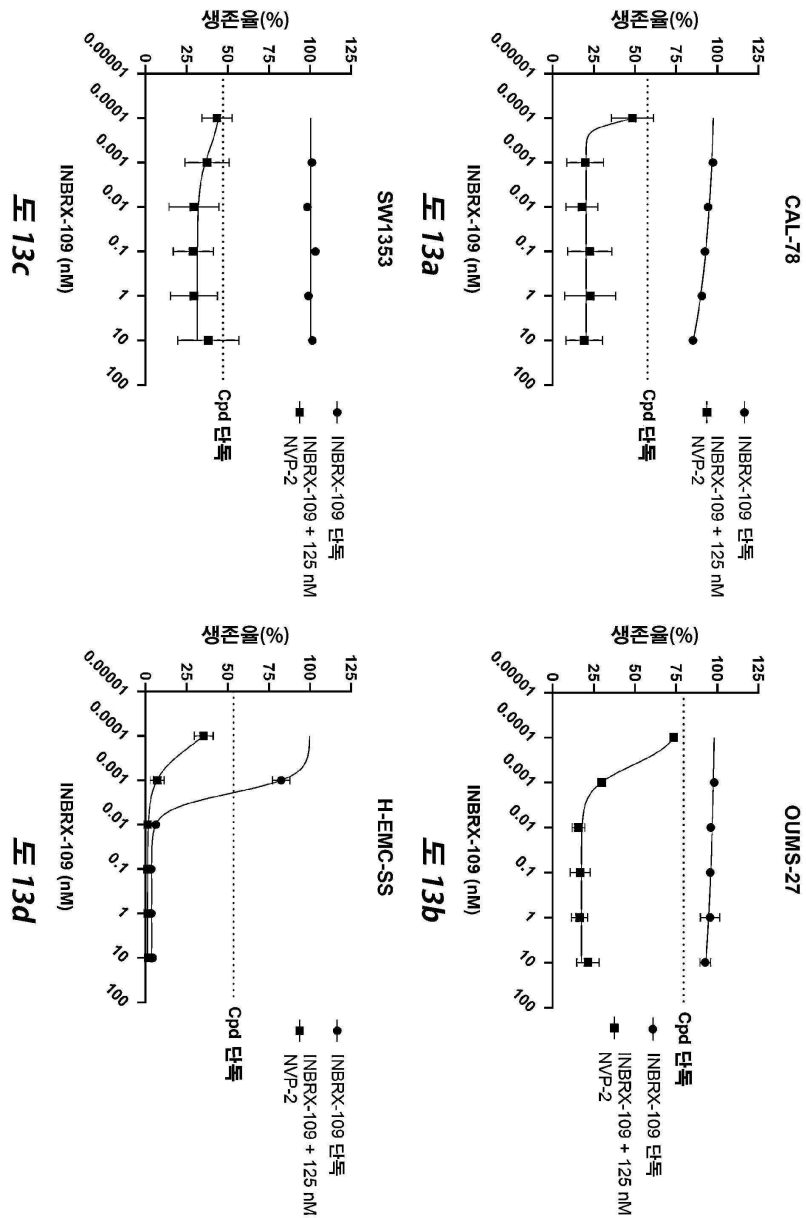
도면12ad



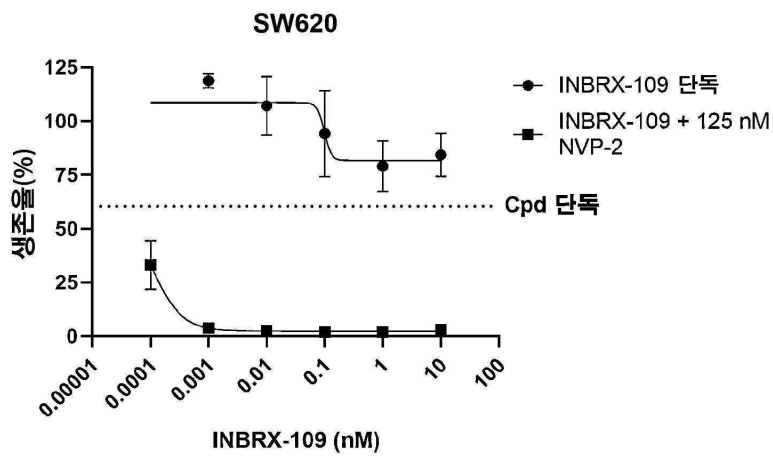
도면12e



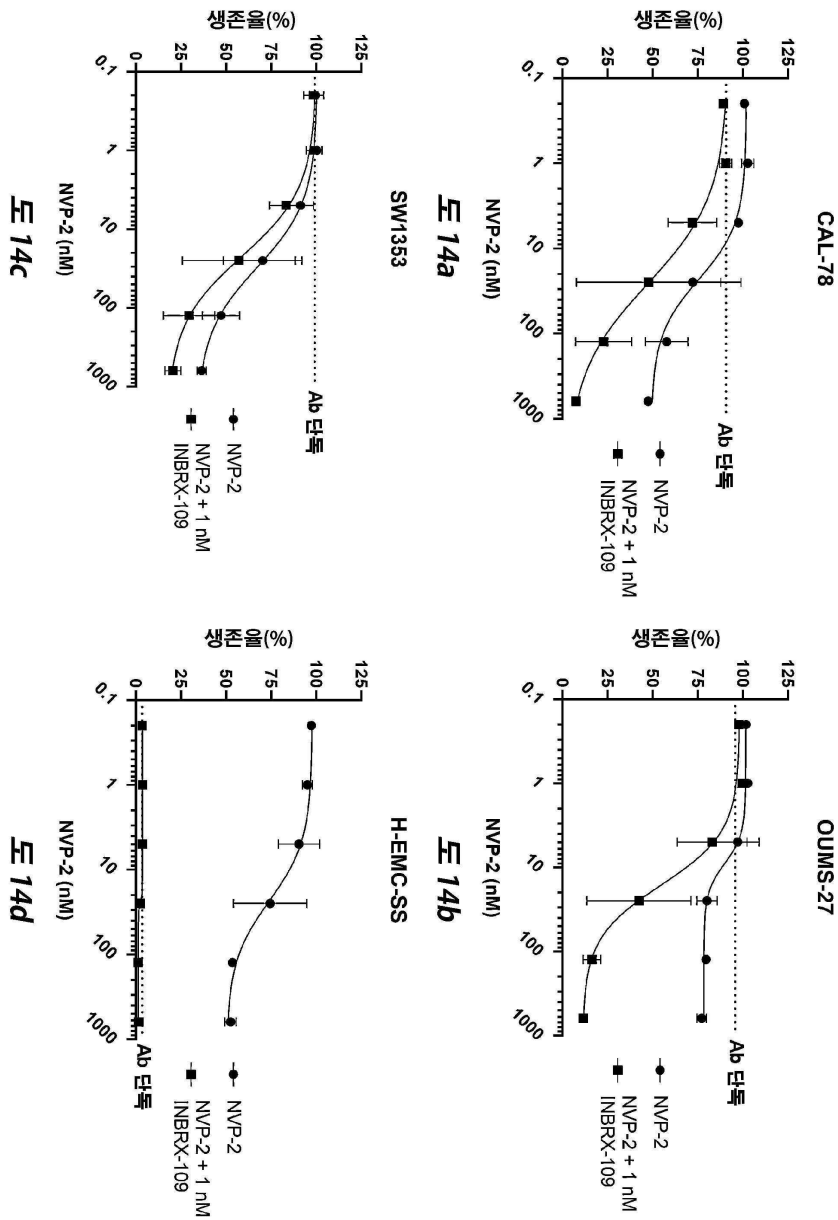
도면13ad



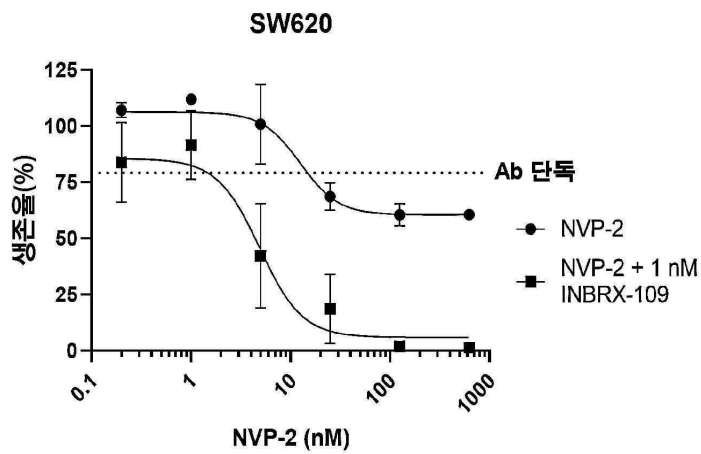
도면13e



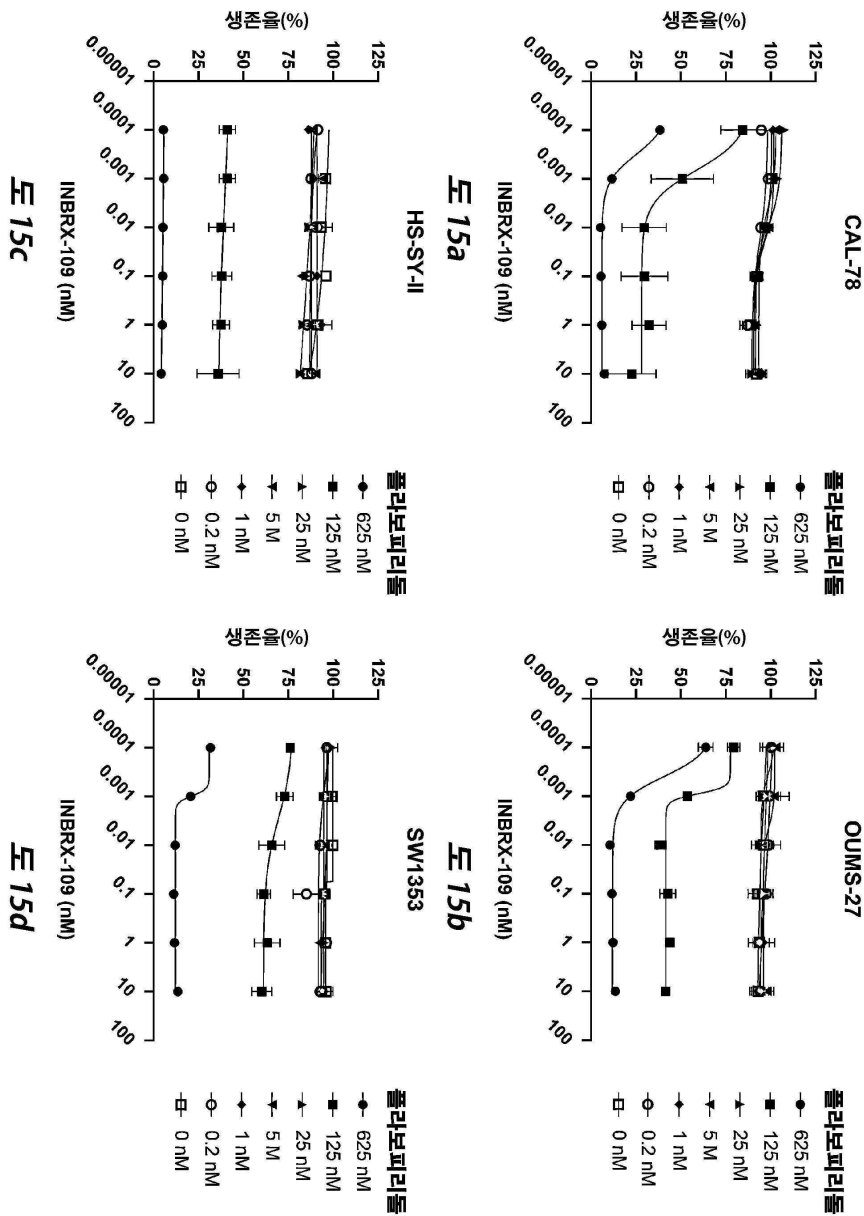
도면14ad



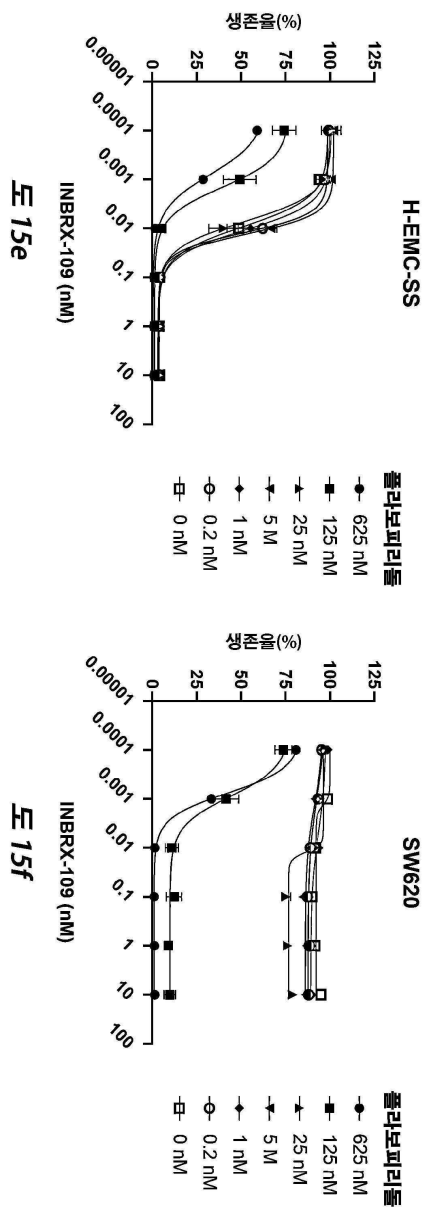
도면14e



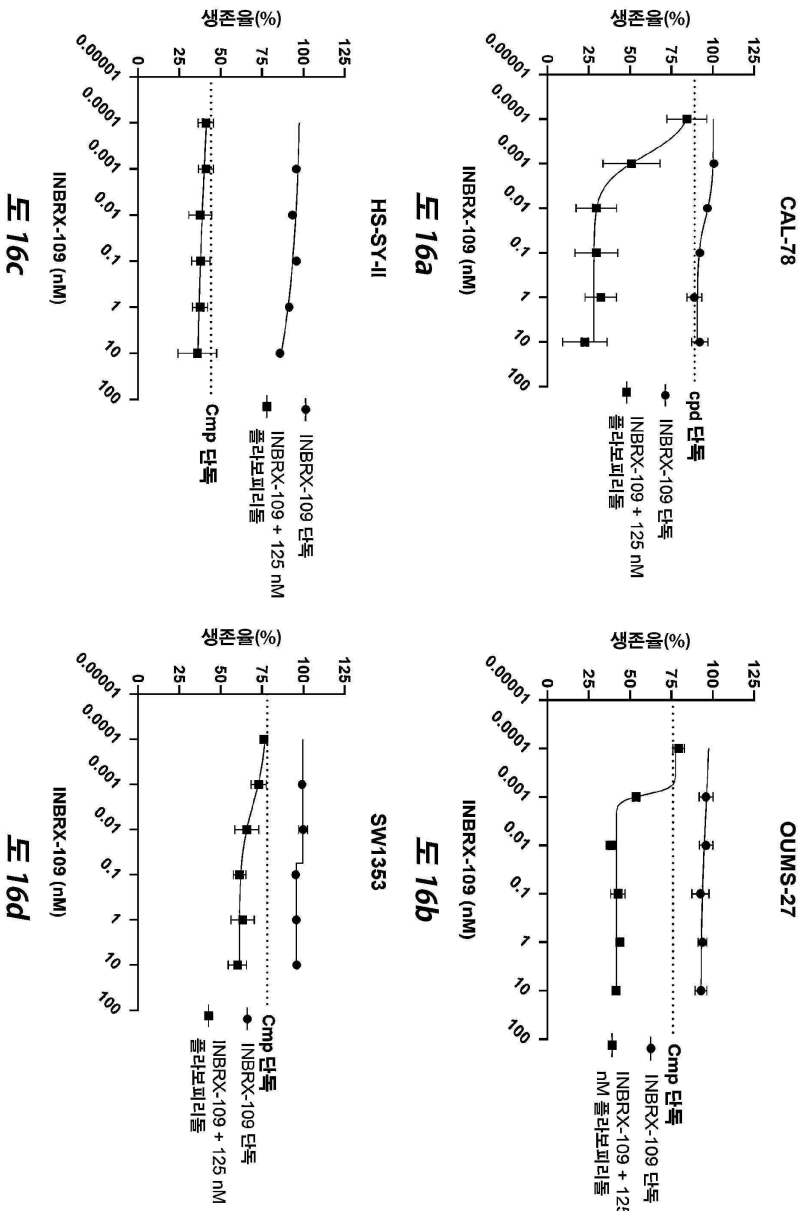
도면15ad



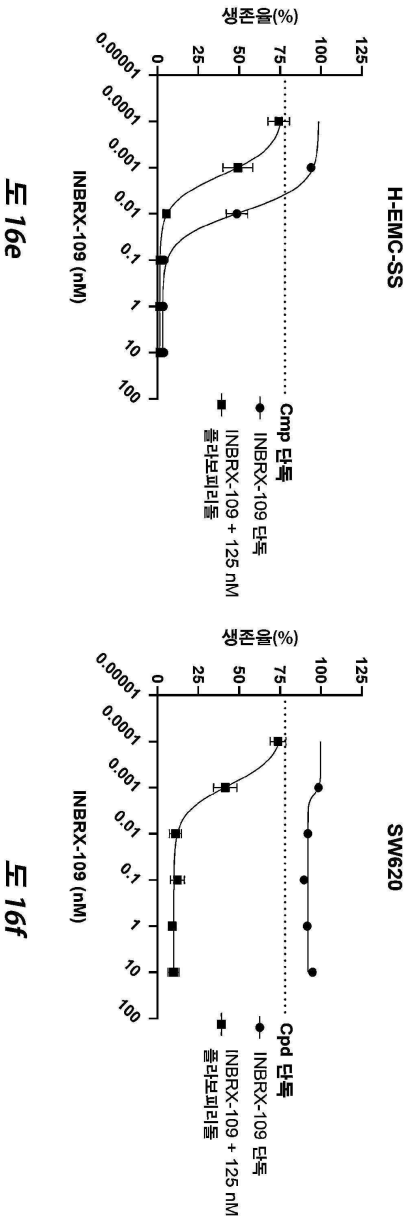
도면15ef



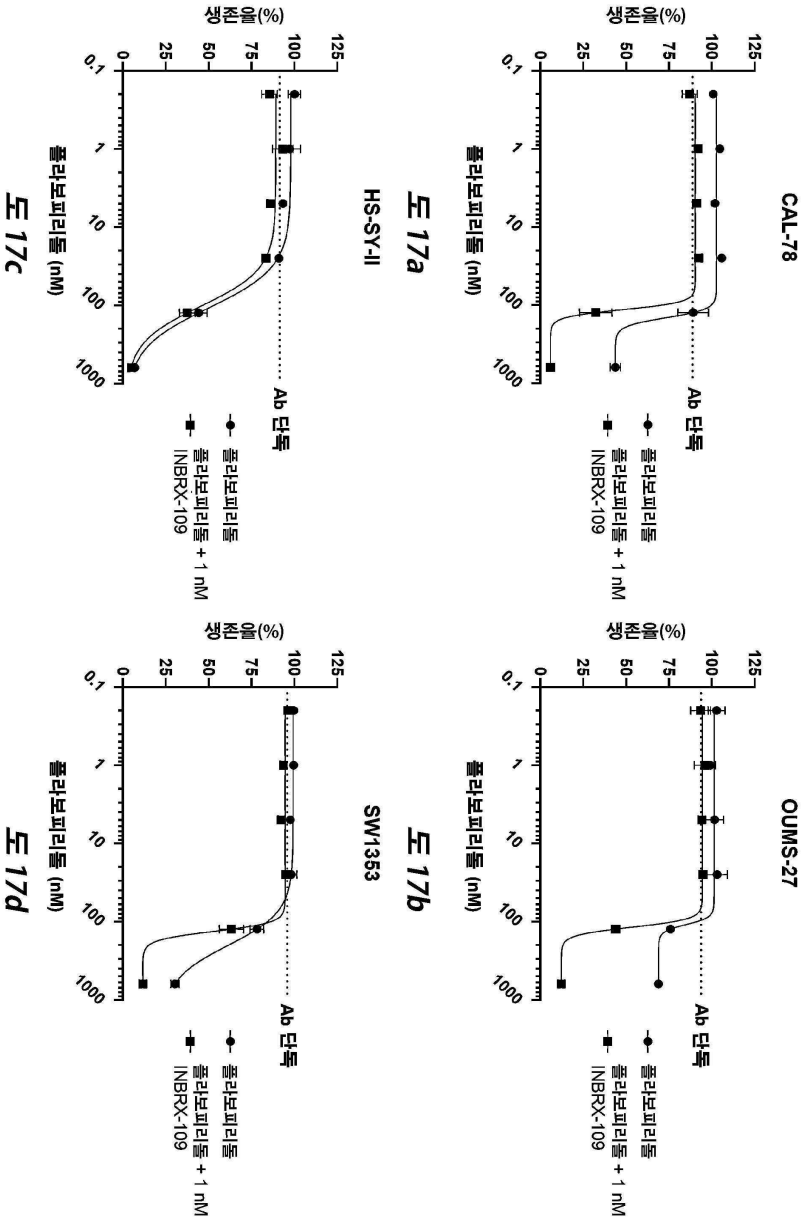
도면16ad



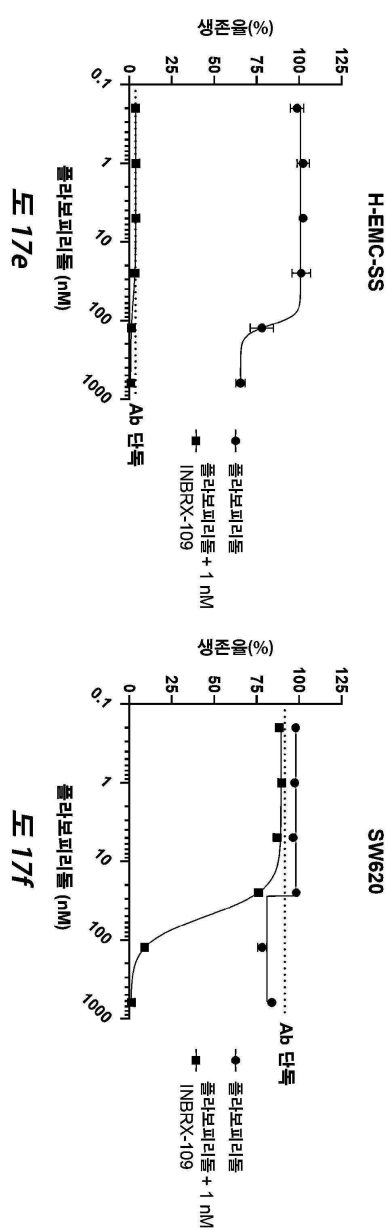
도면16ef



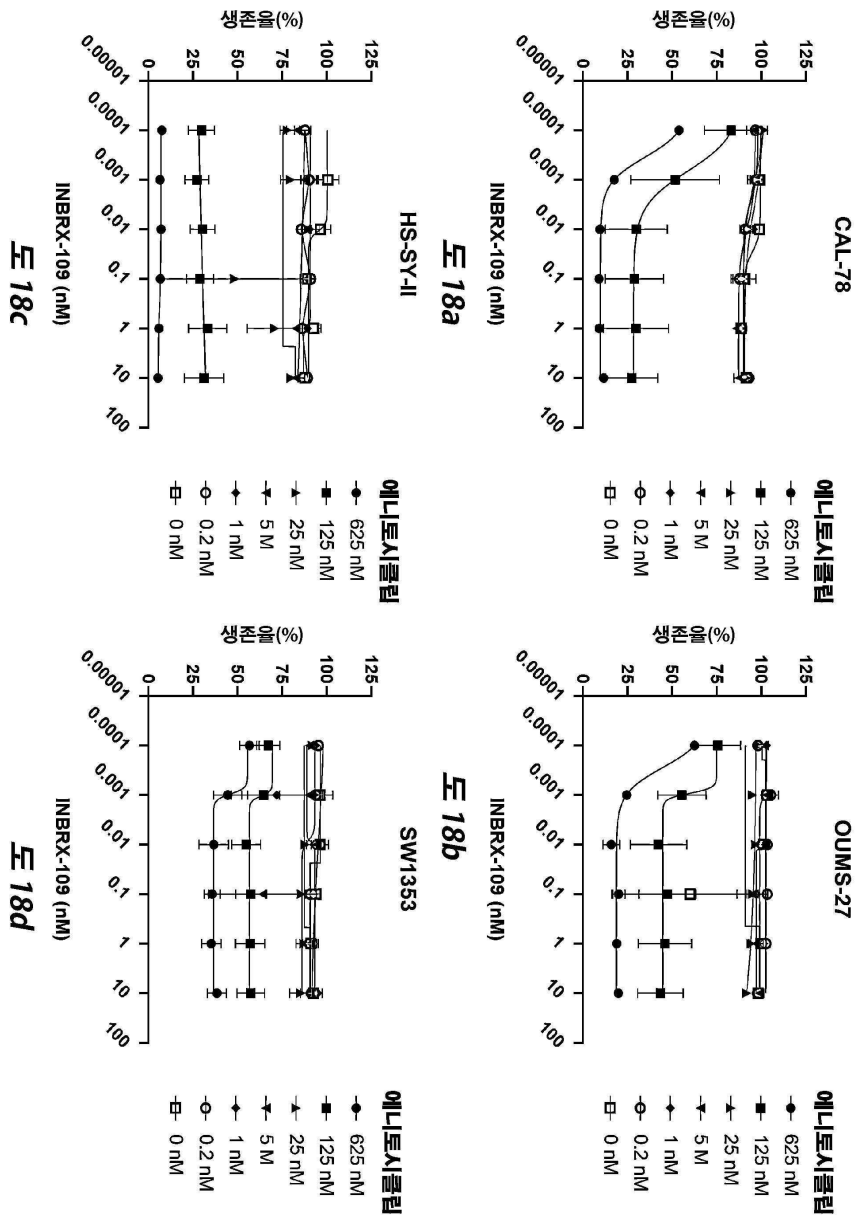
도면17ad



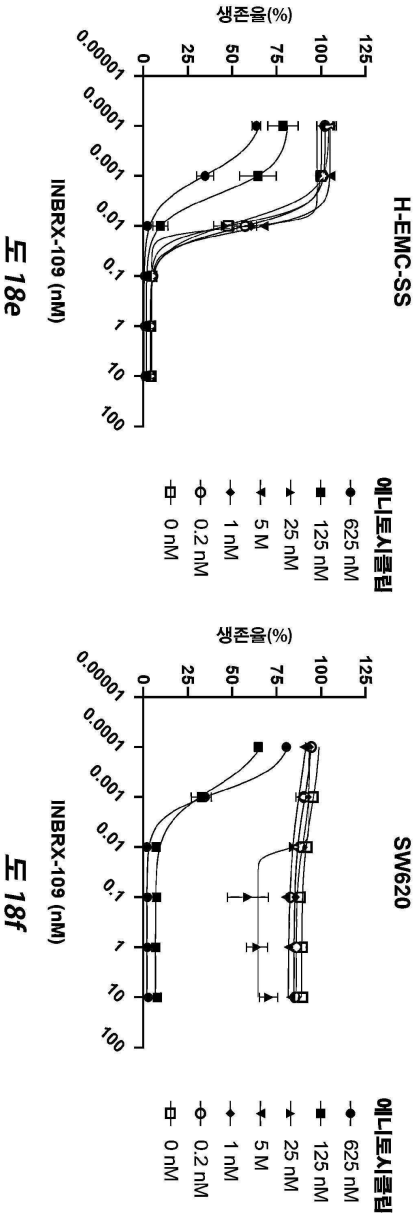
도면17ef



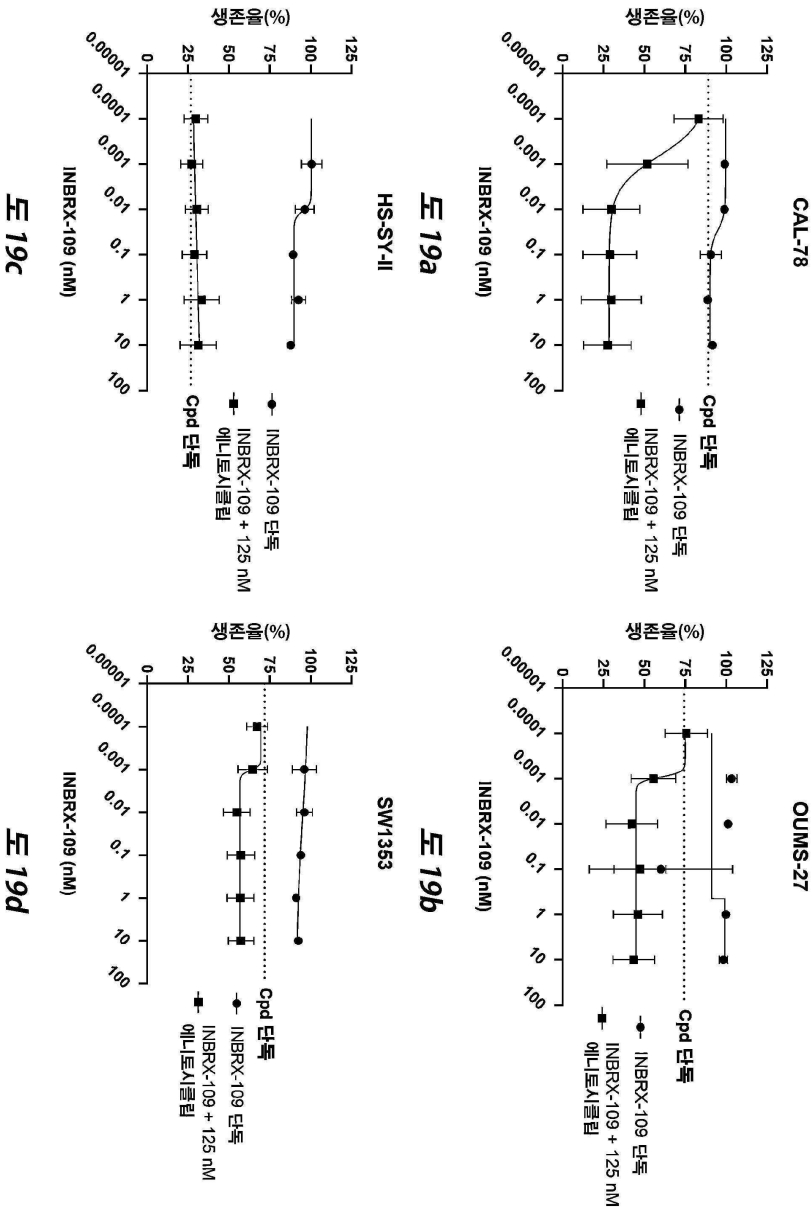
도면18ad



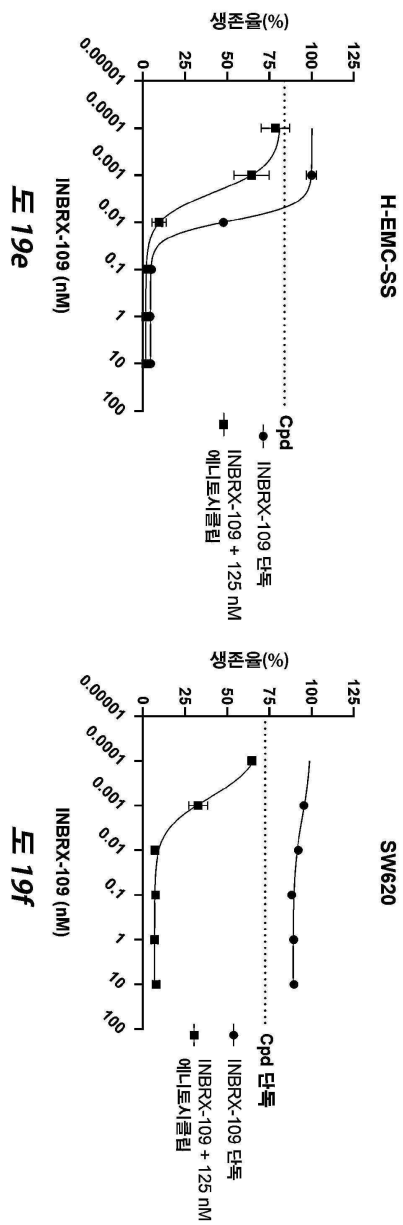
도면18ef



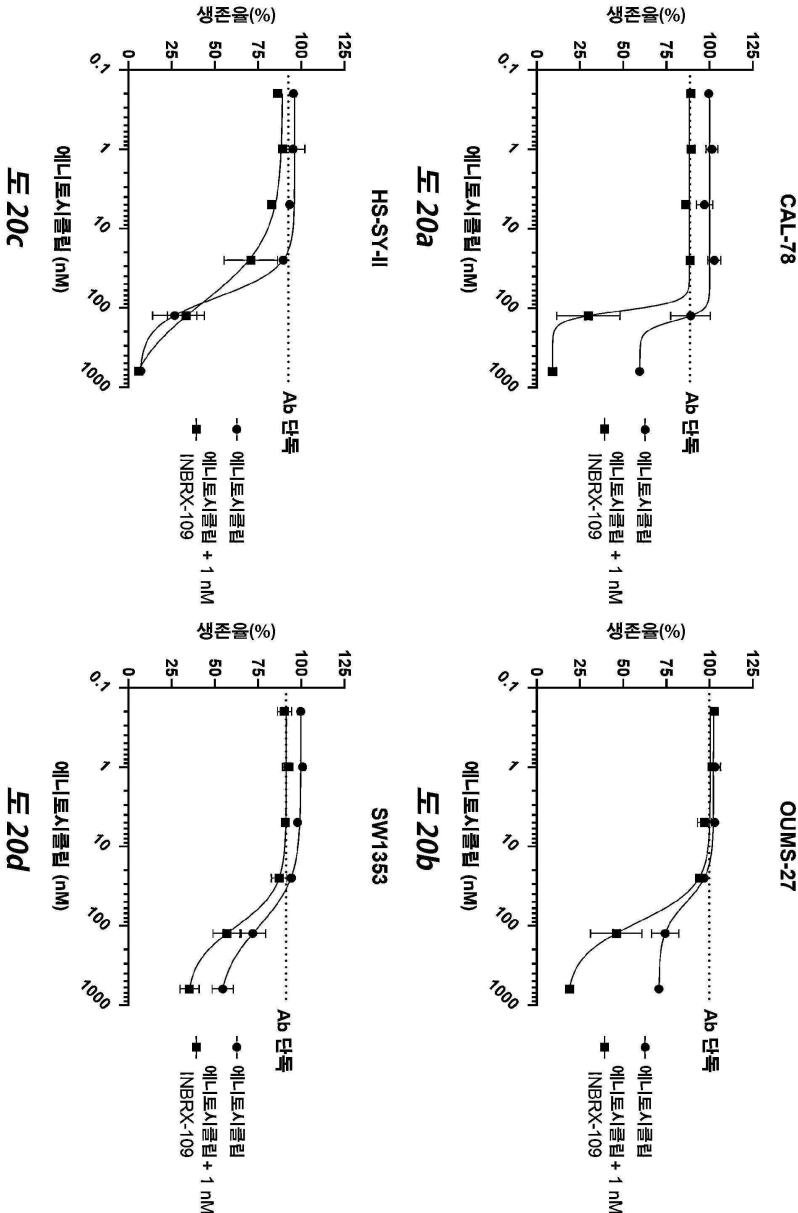
도면 19ad



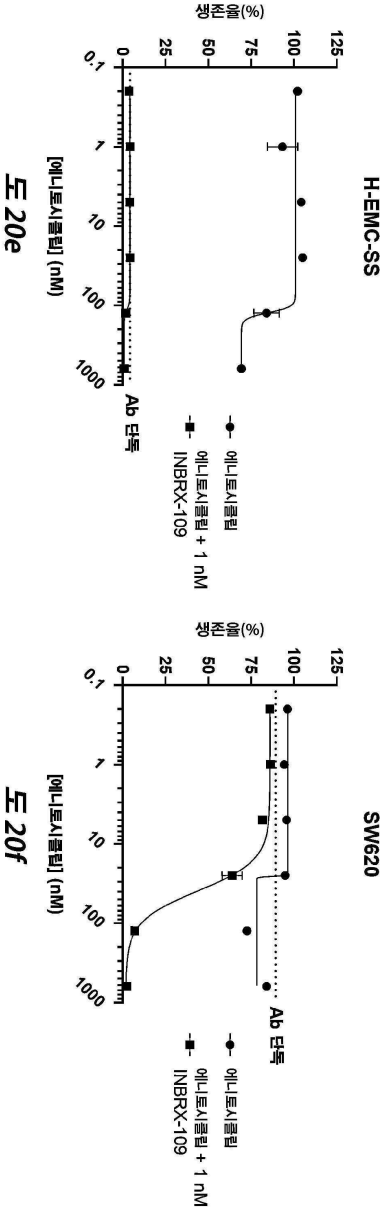
도면19ef



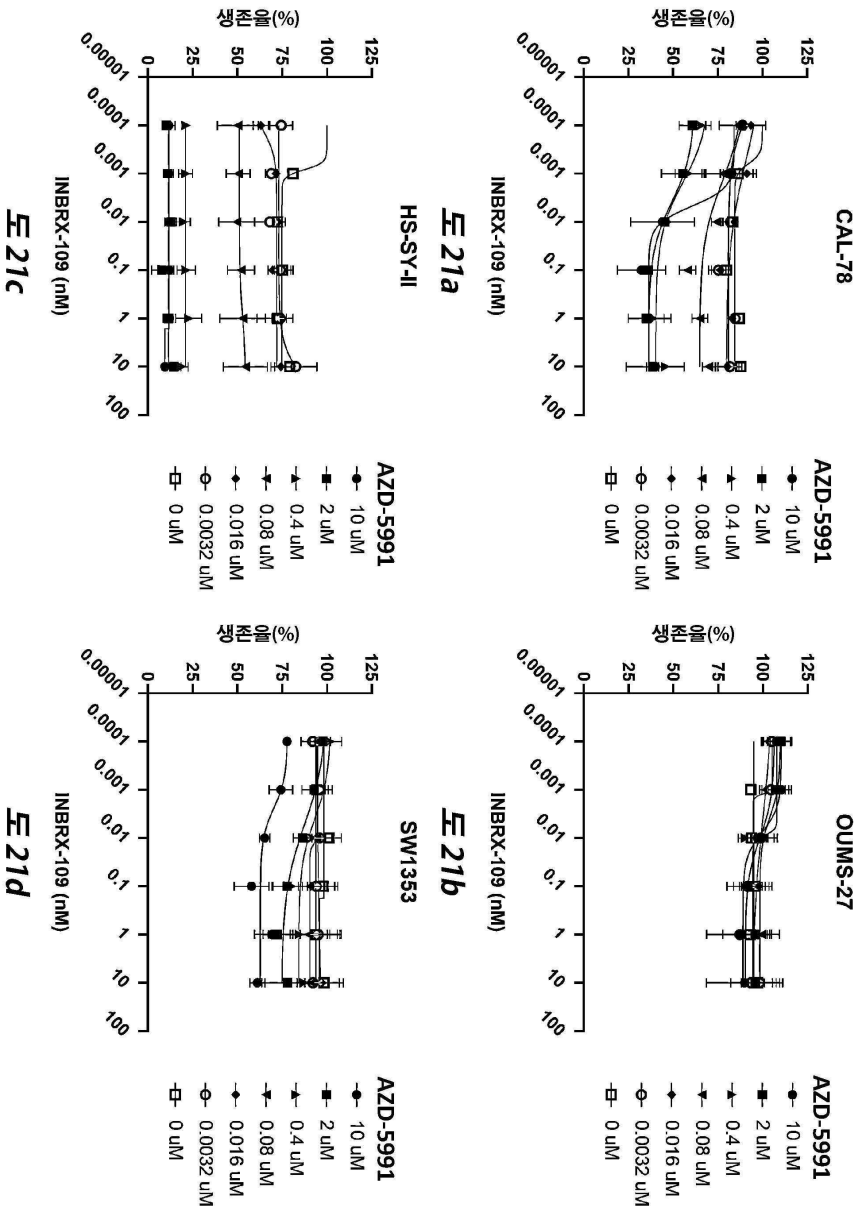
도면20ad



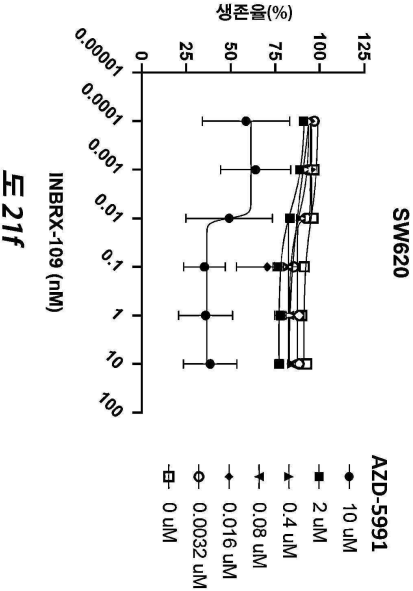
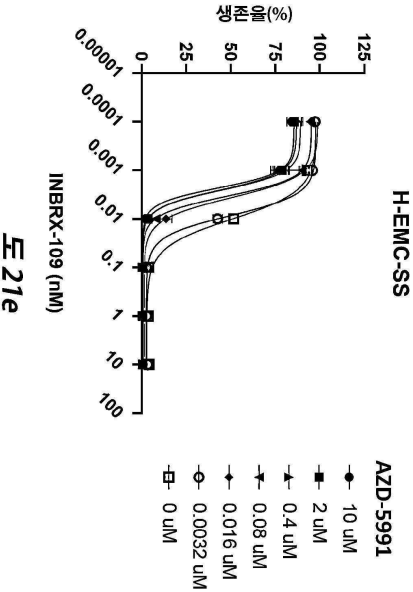
도면20ef



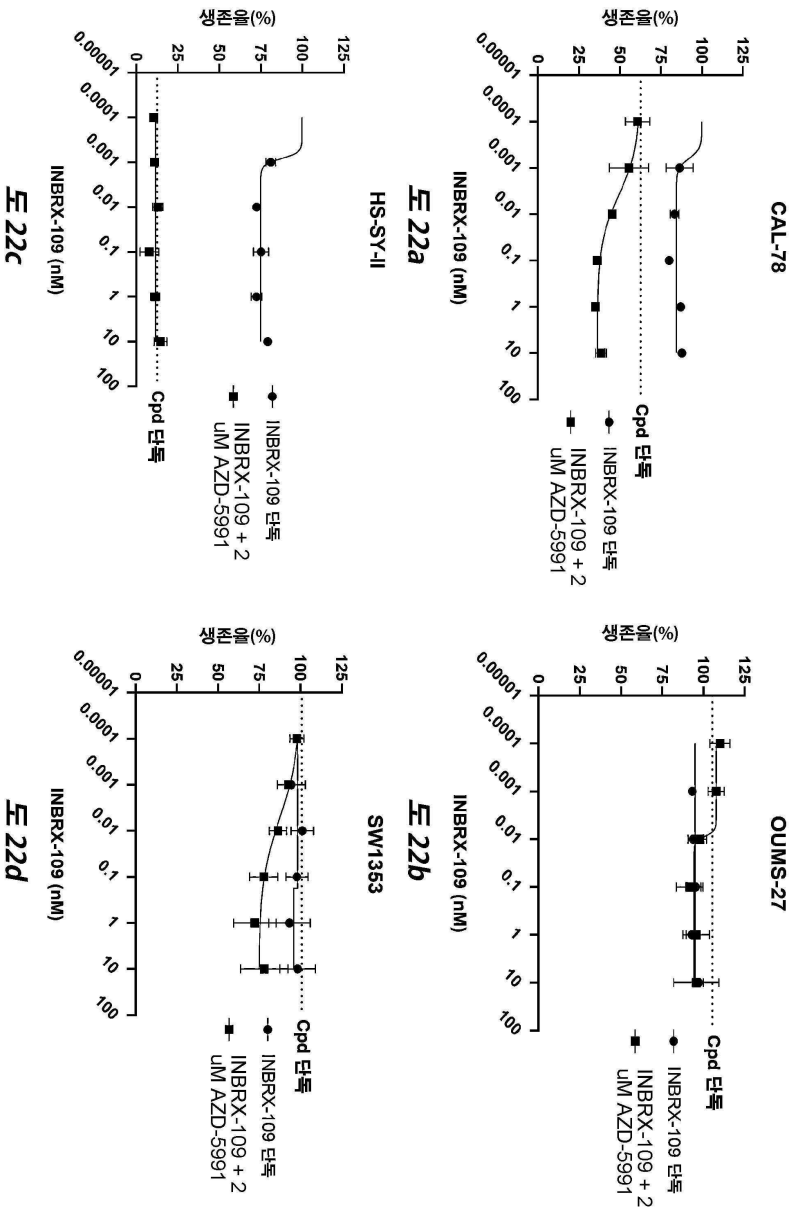
도면21ad



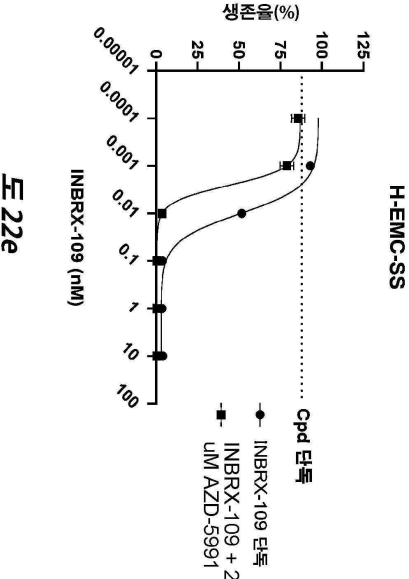
도면21ef



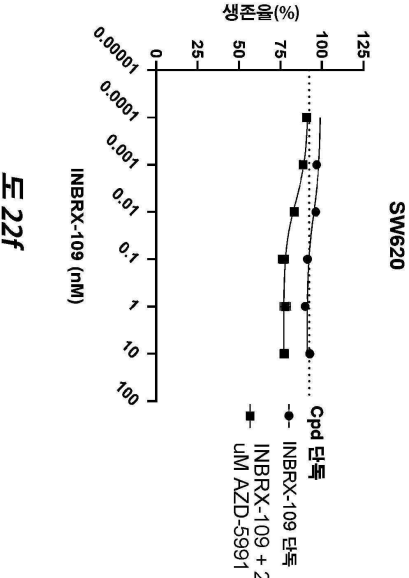
도면22ad



도면22ef

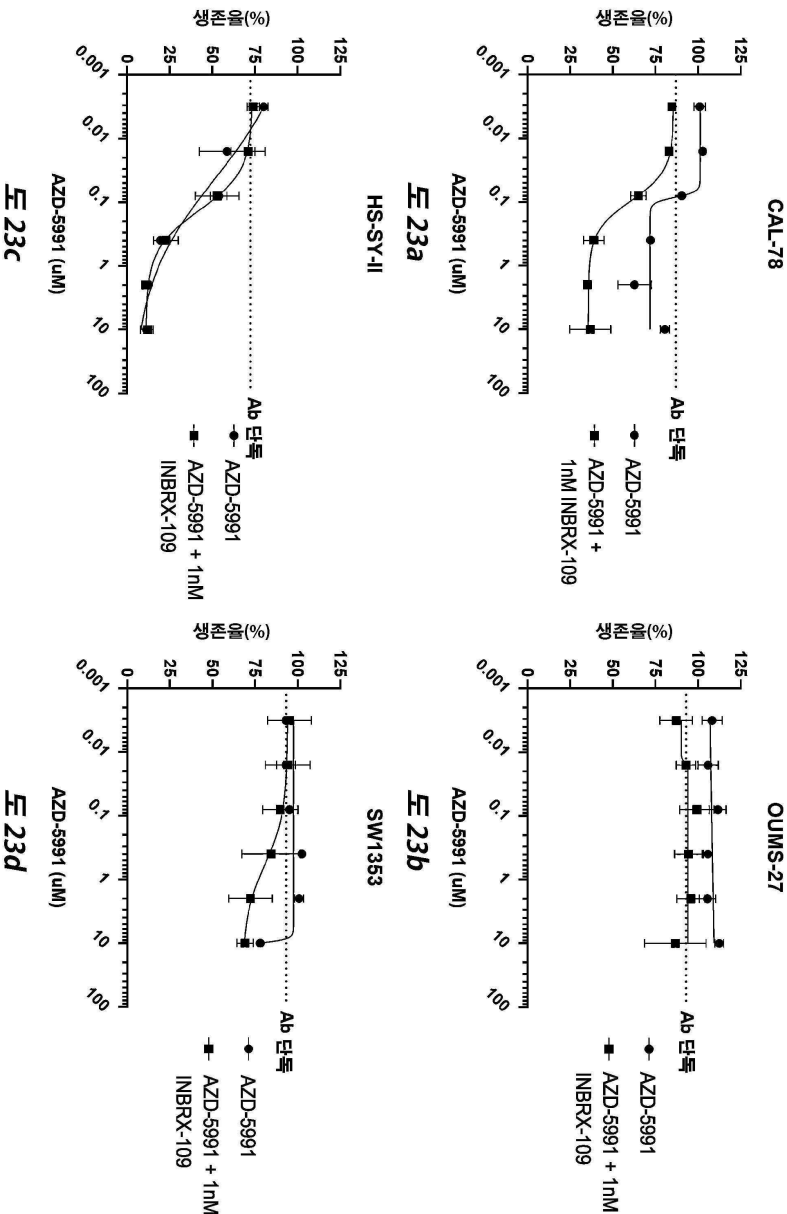


도 22e

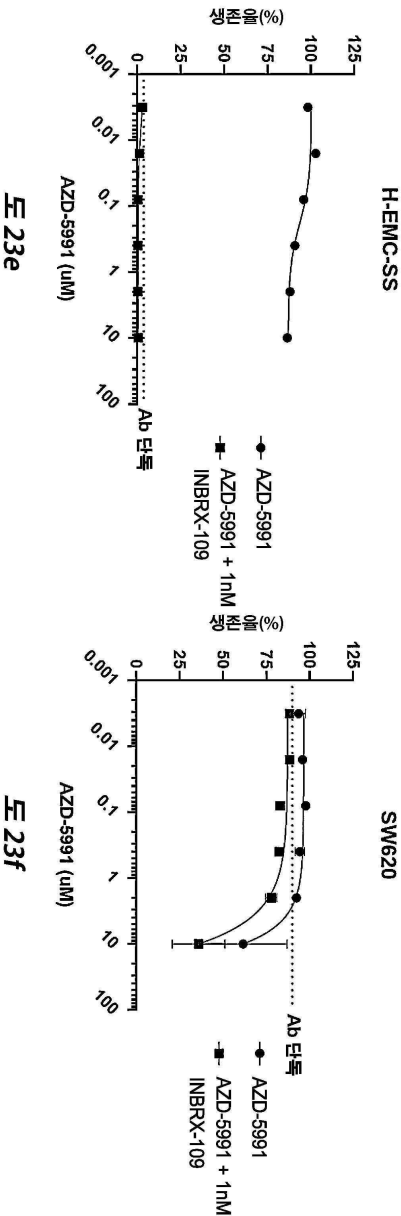


도 22f

도면23ad



도면23ef



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.