



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0039200  
(43) 공개일자 2019년04월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(71) 출원인
<i>A61K 38/17</i> (2006.01) <i>A61K 31/513</i> (2006.01)	<b>메르크 패트ент 게엠베하</b>
<i>A61K 39/00</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01)	독일 64293 다틈스타트 프랑크푸르터 스트라세
<i>A61K 45/06</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)	250
<i>C07K 14/705</i> (2006.01) <i>C07K 14/71</i> (2006.01)	(72) 발명자
<i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>C07K 16/30</i> (2006.01)	로, 킴-밍
(52) CPC특허분류	미국 02420 매사추세츠주 렉싱턴 캐럴 레인 6
<i>A61K 38/179</i> (2013.01)	란, 엔
<i>A61K 31/513</i> (2013.01)	미국 02478 매사추세츠주 벨몬트 뉴턴 스트리트
(21) 출원번호 10-2019-7006703	21
(22) 출원일자(국제) 2017년08월11일	(74) 대리인
심사청구일자 없음	양영준, 김영
(85) 번역문제출일자 2019년03월07일	
(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/070513	
(87) 국제공개번호 WO 2018/029367	
국제공개일자 2018년02월15일	
(30) 우선권주장	
62/374,621 2016년08월12일 미국(US)	

전체 청구항 수 : 총 44 항

(54) 발명의 명칭 암에 대한 조합 요법

### (57) 요 약

본 발명은 일반적으로 암의 치료를 위한 조합 요법, 특히 (i) TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 TGF $\beta$ RII 또는 그의 단편 및 면역 체크포인트 단백질, 예컨대 프로그램화된 사멸 리간드 1 (PD-L1)에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 이중기능적 분자 및 (ii) 적어도 1종의 추가의 항암 치료제의 조합에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

*A61K 31/555* (2013.01)  
*A61K 33/243* (2019.01)  
*A61K 39/3955* (2013.01)  
*A61K 39/39558* (2013.01)  
*A61K 45/06* (2013.01)  
*A61P 35/00* (2018.01)  
*C07K 14/71* (2013.01)  
*C07K 16/2827* (2013.01)  
*C07K 16/30* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

유효량의 적어도 1종의 추가의 항암제와 조합하여 암을 치료하는데 사용하기 위한, TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 인간 TGF $\beta$ RII 또는 그의 단편; 및 인간 단백질 프로그램화된 사멸 리간드 1 (PD-L1)에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 단백질

을 포함하며, 여기서 상기 항암제와 조합되어 사용되는 상기 단백질은 각각 단독으로 투여된 단백질 및 적어도 1종의 추가의 항암제의 효과와 비교하여 증진된 치료 효과를 갖는 것인 제약 조성물.

#### 청구항 2

유효량의 적어도 1종의 추가의 항암제와 조합하여 종양 성장을 억제하는데 사용하기 위한, TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 인간 TGF $\beta$ RII 또는 그의 단편을 포함하는 제1 모이어티, 및 인간 단백질 프로그램화된 사멸 리간드 1 (PD-L1)에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 단백질

을 포함하며, 여기서 상기 항암제와 조합되어 사용되는 상기 단백질은 각각 단독으로 투여된 단백질 및 적어도 1종의 추가의 항암제의 효과와 비교하여 증진된 치료 효과를 갖는 것인 제약 조성물.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, PD-L1에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 서열식별번호: 2의 아미노산 1-120을 포함하는 것인 제약 조성물.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, PD-L1에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이, C-말단 리신이 알라닌으로 돌연변이된 것을 제외하고, 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 것인 제약 조성물.

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, PD-L1에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 아미노산 서열 SYIMM (HVR-H1), SIYPSGGITFYADTVKG (HVR-H2) 및 IKLGTVTTVDY (HVR-H3)를 포함하는 것인 제약 조성물.

#### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 인간 TGF $\beta$ RII 또는 그의 단편이 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 것인 제약 조성물.

#### 청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 단백질이 서열식별번호: 1 및 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 것인 제약 조성물.

#### 청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 항암제가 화학요법제인 제약 조성물.

#### 청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 항암제가 방사선인 제약 조성물.

#### 청구항 10

제8항에 있어서, 화학요법제가 알킬화제인 제약 조성물.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 알킬화제가 5-FU인 제약 조성물.

### 청구항 12

제8항에 있어서, 화학요법제가 백금-기반 작용제인 제약 조성물.

### 청구항 13

제12항에 있어서, 백금 기반 작용제가 옥살리플라틴인 제약 조성물.

### 청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 암이 결장직장암, 유방암, 난소암, 췌장암, 위암, 전립선암, 신장암, 자궁경부암, 골수종, 림프종, 백혈병, 갑상선암, 자궁내막암, 자궁암, 방광암, 신경내분비암, 두경부암, 간암, 비인두암, 고환암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 흑색종, 기저 세포 피부암, 편평 세포 피부암, 용기성 피부섬유육종, 메르켈 세포 암종, 교모세포종, 신경교종, 육종, 중피종, 및 골수이형성 증후군으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 제약 조성물.

### 청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 단백질이 (i) 상기 암의 치료에 사용되는 것으로 알려져 있는 투여량 및 (ii) 상기 암을 치료하는데 사용되는 것으로 알려져 있는 농도와 비교하여 더 낮은 투여량으로 이루어진 군으로부터 선택된 투여량으로 제공되는 것인 제약 조성물.

### 청구항 16

제8항에 있어서, 단백질이 (i) 상기 암의 치료에 사용되는 것으로 알려져 있는 투여량 및 (ii) 상기 암을 치료하는데 사용되는 것으로 알려져 있는 농도와 비교하여 더 낮은 투여량으로 이루어진 군으로부터 선택된 투여량으로 제공되는 것인 제약 조성물.

### 청구항 17

제9항에 있어서, 방사선이 (i) 상기 암의 치료에 사용되는 것으로 알려져 있는 투여량 및 (ii) 상기 암을 치료하는데 사용되는 것으로 알려져 있는 농도와 비교하여 더 낮은 투여량으로 이루어진 군으로부터 선택된 투여량으로 제공되는 것인 제약 조성물.

### 청구항 18

제16항에 있어서, 단백질이 상기 암을 치료하는데 사용되는 것으로 알려져 있는 투여량보다 2 내지 10배 더 낮은 투여량으로 제공되는 것인 제약 조성물.

### 청구항 19

제9항에 있어서, 원발성 종양의 방사선과 조합되어 사용되는 상기 단백질이 방사선으로 처리된 원발성 종양에 대한 속발성 종양 또는 원위 전이의 성장을 억제하는 것인 제약 조성물.

### 청구항 20

(i) TGF  $\beta$ 에 결합할 수 있는 인간 TGF  $\beta$  RII 또는 그의 단편; 및 인간 단백질 프로그램화된 사멸 리간드 1 (PD-L1)에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 단백질; 및

(ii) 유효량의 적어도 1종의 추가의 항암제

를 암 환자에게 투여하여,

각각 단독으로 투여된 단백질 및 적어도 1종의 추가의 항암제의 효과와 비교하여 증진된 치료 효과를 갖는 조합요법을 제공하는 것을 포함하는

암을 치료하는 방법.

### 청구항 21

(i) TGF  $\beta$ 에 결합할 수 있는 인간 TGF  $\beta$  RII 또는 그의 단편을 포함하는 제1 모이어티, 및 인간 단백질 프로그램 화된 사멸 리간드 1 (PD-L1)에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 단백질; 및

(ii) 유효량의 적어도 1종의 추가의 항암제

에 중앙을 노출시켜,

각각 단독으로 투여된 단백질 및 적어도 1종의 추가의 항암제의 효과와 비교하여 증진된 치료 효과를 갖는 조합 요법을 제공하는 것을 포함하는

종양 성장을 억제하는 방법.

#### 청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, PD-L1에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 서열식별번호: 2의 아미노산 1-120을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 23

제20항 또는 제21항에 있어서, PD-L1에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이, C-말단 리신이 알라닌으로 돌연변이된 것을 제외하고, 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 24

제20항 또는 제21항에 있어서, PD-L1에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 아미노산 서열 SYIMM (HVR-H1), SIYPSGGITFYADTVKG (HVR-H2) 및 IKLGTVTTVDY (HVR-H3)를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 25

제20항 또는 제21항에 있어서, TGF  $\beta$ 에 결합할 수 있는 인간 TGF  $\beta$  RII 또는 그의 단편이 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 26

제20항 또는 제21항에 있어서, 단백질이 서열식별번호: 1 및 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 27

제20항 또는 제21항에 있어서, 항암제가 화학요법제인 방법.

#### 청구항 28

제20항 또는 제21항에 있어서, 항암제가 방사선인 방법.

#### 청구항 29

제27항에 있어서, 화학요법제가 알킬화제인 방법.

#### 청구항 30

제29항에 있어서, 알킬화제가 5-FU인 방법.

#### 청구항 31

제27항에 있어서, 화학요법제가 백금-기반 작용제인 방법.

#### 청구항 32

제31항에 있어서, 백금 기반 작용제가 옥살리플라틴인 방법.

#### 청구항 33

제20항 또는 제21항에 있어서, 암이 결장직장암, 유방암, 난소암, 췌장암, 위암, 전립선암, 신장암, 자궁경부암, 골수종, 텁프종, 백혈병, 갑상선암, 자궁내막암, 자궁암, 방광암, 신경내분비암, 두경부암, 간암, 비인두암, 고환암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 흑색종, 기저 세포 피부암, 편평 세포 피부암, 용기성 피부암, 유육종, 메르켈 세포 암종, 교모세포종, 신경교종, 육종, 중피종, 및 골수이형성 증후군으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

#### 청구항 34

제27항에 있어서, 화학요법의 초기 용량의 투여에 이어 단백질이 투여되는 것인 방법.

#### 청구항 35

제28항에 있어서, 방사선의 초기 선량의 투여에 이어 단백질이 투여되는 것인 방법.

#### 청구항 36

제27항에 있어서, 화학요법의 다중 용량이 투여되는 것인 방법.

#### 청구항 37

제28항에 있어서, 방사선의 다중 선량이 투여되는 것인 방법.

#### 청구항 38

제20항 또는 제21항에 있어서, 단백질의 다중 용량이 투여되는 것인 방법.

#### 청구항 39

제20항 또는 제21항에 있어서, 단백질의 투여량이 (i) 상기 암의 치료에 사용되는 것으로 알려져 있는 투여량 및 (ii) 상기 암을 치료하는데 사용되는 것으로 알려져 있는 농도와 비교하여 더 낮은 투여량으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

#### 청구항 40

제27항에 있어서, 화학요법제의 투여량이 (i) 상기 암의 치료에 사용되는 것으로 알려져 있는 투여량 및 (ii) 상기 암을 치료하는데 사용되는 것으로 알려져 있는 농도와 비교하여 더 낮은 투여량으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

#### 청구항 41

제28항에 있어서, 방사선의 투여량이 (i) 상기 암의 치료에 사용되는 것으로 알려져 있는 투여량 및 (ii) 상기 암을 치료하는데 사용되는 것으로 알려져 있는 농도와 비교하여 더 낮은 투여량으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

#### 청구항 42

제39항에 있어서, 단백질의 보다 낮은 투여량이 상기 암을 치료하는데 사용되는 것으로 알려져 있는 투여량보다 2 내지 10배 더 낮은 것인 방법.

#### 청구항 43

제20항 또는 제21항에 있어서, 단백질 및 1종의 추가의 항암제가 순차적으로 투여되는 것인 방법.

#### 청구항 44

제28항에 있어서, 방사선으로 처리된 원발성 종양에 대한 속발성 종양 또는 원위 전이의 성장을 억제하는 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2016년 8월 12일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/374,621에 대한 우선권 및 그의 이익을 주장하며, 그의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 암의 치료를 위한 조합 요법, 특히 (i) TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 TGF $\beta$ RII 또는 그의 단편 및 면역 체크포인트 단백질, 예컨대 프로그램화된 사멸 리간드 1 (PD-L1)에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 이중기능적 분자 및 (ii) 적어도 1종의 추가의 항암 치료제의 조합에 관한 것이다. 항암 치료제는 예를 들어 방사선, 화학요법제, 생물제제 또는 백신을 포함한다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 조합 요법은 상승작용적 항암 효과를 제공한다.

## 배경 기술

[0005] 암 치료에서, 화학요법은 높은 독성과 연관되고 저항성 암 세포 변이체의 출현으로 이어질 수 있다는 것이 오랫동안 인식되어 왔다. 대부분의 화학요법제는 심장 및 신장 독성, 탈모증, 오심 및 구토를 포함한 바람직하지 않은 부작용을 유발한다. 방사선 요법이 또한 암 치료에 사용된다. 이러한 치료는 암 세포를 파괴하거나 손상시키기 위해 고-에너지 입자 또는 파장, 예컨대 X선, 감마선, 전자 빔 또는 양성자를 사용한다. 암과 싸우는 약물에 전신이 노출되는 화학요법과는 달리, 방사선 요법은 보다 통상적으로는 국부 치료이다. 그러나, 비정상적 조직에만 치료 방사선을 선택적으로 투여하는 것은 어렵고, 따라서 비정상적 조직 근처의 정상 조직이 또한 처리 동안 잠재적으로 해로운 방사선 선량에 노출된다.

[0006] 암 면역요법은 암 세포를 표적화하는 대신 면역계의 활성화에 초점을 맞춘, 암 치료에서의 새로운 패러다임이다. 그의 원리는 면역 감시를 제공하여 암 세포, 특히 다른 형태의 치료를 회피한 최소 잔류 질환을 사멸시키고, 따라서 오래 지속되는 보호 면역을 달성하도록 숙주의 면역 반응, 특히 적응성 T 세포 반응을 재무장시키는 것이다.

[0007] 2011년의 흑색종 치료를 위한 항-CTLA-4 항체 이필리무맙의 FDA 승인은 암 면역요법의 새로운 시대를 안내하였다. 임상 시험에서 항-PD-1 또는 항-PD-L1 요법이 흑색종, 신장암 및 폐암에서 지속적인 반응을 유도하였다는 입증은 그의 시대의 도래를 추가로 확인시켜준다 (Pardoll, D.M., Nat Immunol. 2012; 13:1129-32). 그러나, 이필리무맙 요법은 그의 독성 프로파일에 의해 제한되며, 이는 항-CTLA-4 치료가, 1차 T 세포 억제 체크포인트를 방해하는 것에 의해, 새로운 자가반응성 T 세포의 생성으로 이어질 수 있기 때문으로 추정된다. PD-L1/PD-1 상호작용의 억제는 속성 면에서 주로 항바이러스성 또는 항암성인 소진된 T 세포에서의 기존의 만성 면역 반응의 탈-억제를 발생시키지만 (Wherry, E.J., Nat Immunol. 2011; 12:492-9), 그럼에도 불구하고 항-PD-1 요법은 때때로 잠재적으로 치명적인 폐-관련 자가면역 유해 사건을 발생시킬 수 있다. 지금까지의 항-PD1 및 항-PD-L1의 유망한 임상 활성에도 불구하고, 치료 활성을 증가시키거나, 독성을 감소시키거나, 또는 둘 다에 의해 치료 지수를 증가시키는 것은 여전히 면역요법제의 개발에서의 중심 목표이다.

## 발명의 내용

[0008] 본 발명은 TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 TGF $\beta$  수용체 II (TGF $\beta$ RII)의 적어도 일부 및 면역 체크포인트 단백질 예컨대 인간 단백질 프로그램화된 사멸 리간드 1 (PD-L1)에 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편을 함유하는 이중기능적 단백질의 투여를 포함하는, 암에 대한 조합 요법의 발견에 기초한다. 조합 요법은 또한 항암 치료제 예컨대, 예를 들어, 방사선, 화학요법제, 생물제제 및/또는 백신의 투여를 포함한다. 조합 요법은 개별 작용제를 개별적으로 투여하는 효과와 비교하여 상승작용적 효과를 나타낸다.

[0009] 따라서, 제1 측면에서, 본 발명은 (i) TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 인간 TGF $\beta$ RII 또는 그의 단편 (예를 들어, 가용성 단편) 및 PD-L1에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (예를 들어, 본원에 기재된 항체 또는 항체 단편 중 임의의 것)을 포함하는 이중기능적 단백질의 투여; 및 (ii) 적어도 1종의 추가의 제2 항암 치료제의 투여를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법을 특색으로 한다.

[0010] 특정 실시양태에서, 본 발명의 조합 치료 방법은 적어도 1종의 추가의 항암 치료제와 조합된, (a) 적어도 PD-L1에 결합하는 항체의 중쇄의 가변 도메인 (예를 들어, 서열식별번호(SEQ ID NO): 2의 아미노산 1-120); 및 (b) TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 인간 TGF $\beta$ RII 또는 그의 가용성 단편 (예를 들어, 인간 TGF $\beta$ RII 세포의 도메인 (ECD), 서열식별번호: 9의 아미노산 24-159, 또는 본원에 기재된 것 중 임의의 것)을 포함하는 폴리펩티드의 용

도를 특색으로 한다. 폴리펩티드는 가변 도메인의 C-말단을 TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 인간 TGF $\beta$ RII 또는 그의 가용성 단편의 N-말단에 연결시키는 아미노산 링커를 추가로 포함할 수 있다. 폴리펩티드는 서열식별번호: 3의 아미노산 서열 또는 서열식별번호: 3과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 항체 단편은 scFv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, 또는 Fv 단편일 수 있다.

[0011] 특정 실시양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 서열식별번호: 2를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 인간 TGF $\beta$ RII를 포함한다. 항체는 변형된 불변 영역 (예를 들어, C-말단 Lys→Ala 치환, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 서열의 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20)로의 돌연변이, 또는 IgG1 힌지 영역 및 IgG2 CH2 도메인을 포함하는 하이브리드 불변 영역을 포함하는, 본원에 기재된 임의의 것)을 임의로 포함할 수 있다.

[0012] 특정 실시양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 서열식별번호: 2를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 인간 TGF $\beta$ RII의 단편 (예를 들어, 가용성 단편)을 포함한다. 항체는 변형된 불변 영역 (예를 들어, C-말단 Lys→Ala 치환, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 서열의 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20)로의 돌연변이, 또는 IgG1 힌지 영역 및 IgG2 CH2 도메인을 포함하는 하이브리드 불변 영역을 포함하는, 본원에 기재된 임의의 것)을 임의로 포함할 수 있다.

[0013] 특정 실시양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 서열식별번호: 2를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 인간 TGF $\beta$ RII ECD를 포함한다. 항체는 변형된 불변 영역 (예를 들어, C-말단 Lys→Ala 치환, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 서열의 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20)로의 돌연변이, 또는 IgG1 힌지 영역 및 IgG2 CH2 도메인을 포함하는 하이브리드 불변 영역을 포함하는, 본원에 기재된 임의의 것)을 포함할 수 있다.

[0014] 특정 실시양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 서열식별번호: 2의 아미노산 1-120을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 인간 TGF $\beta$ RII를 포함한다. 항체는 변형된 불변 영역 (예를 들어, C-말단 Lys→Ala 치환, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 서열의 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20)로의 돌연변이, 또는 IgG1 힌지 영역 및 IgG2 CH2 도메인을 포함하는 하이브리드 불변 영역을 포함하는, 본원에 기재된 임의의 것)을 포함할 수 있다.

[0015] 특정 실시양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 서열식별번호: 2의 아미노산 1-120을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 인간 TGF $\beta$ RII의 단편 (예를 들어, 가용성 단편)을 포함한다. 항체는 변형된 불변 영역 (예를 들어, C-말단 Lys→Ala 치환, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 서열의 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20)로의 돌연변이, 또는 IgG1 힌지 영역 및 IgG2 CH2 도메인을 포함하는 하이브리드 불변 영역을 포함하는, 본원에 기재된 임의의 것)을 포함할 수 있다.

[0016] 특정 실시양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 서열식별번호: 2의 아미노산 1-120을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 인간 TGF $\beta$ RII ECD를 포함한다. 항체는 변형된 불변 영역 (예를 들어, C-말단 Lys→Ala 치환, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 서열의 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20)로의 돌연변이, 또는 IgG1 힌지 영역 및 IgG2 CH2 도메인을 포함하는 하이브리드 불변 영역을 포함하는, 본원에 기재된 임의의 것)을 포함할 수 있다.

[0017] 특정 실시양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 서열식별번호: 2에 존재하는 초가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 인간 TGF $\beta$ RII를 포함한다. 항체는 변형된 불변 영역 (예를 들어, C-말단 Lys→Ala 치환, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 서열의 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20)로의 돌연변이, 또는 IgG1 힌지 영역 및 IgG2 CH2 도메인을 포함하는 하이브리드 불변 영역을 포함하는, 본원에 기재된 임의의 것)을 포함할 수 있다.

[0018] 특정 실시양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 서열식별번호: 2에 존재하는 초가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 인간 TGF $\beta$ RII의 단편 (예를 들어, 가용성 단편)을 포함한다. 항체는 변형된 불변 영역 (예를 들어, C-말단 Lys→Ala 치환, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 서열의 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20)로의 돌연변이, 또는 IgG1 힌지 영역 및 IgG2 CH2 도메인을 포함하는 하이브리드 불변 영역을 포함하는, 본원에 기재된 임의의 것)을 포함할 수 있다.

[0019] 특정 실시양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 서열식별번호: 2에 존재하는 초가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 인간 TGF $\beta$ RII ECD를 포함한다. 항체는 변형된 불변 영역 (예를 들어, C-말단 Lys→Ala 치환, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 서열의 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20)로의 돌연변이, 또는 IgG1 힌지 영역 및 IgG2 CH2 도메인을 포함하는 하이브리드 불변 영역을 포함하는, 본원에 기재된 임의의

것)을 포함할 수 있다.

- [0020] 특정 실시양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 서열식별번호: 12를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 인간 TGF $\beta$ RII를 포함한다. 항체는 변형된 불변 영역 (예를 들어, C-말단 Lys→Ala 치환, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 서열의 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20)로의 돌연변이, 또는 IgG1 힌지 영역 및 IgG2 CH2 도메인을 포함하는 하이브리드 불변 영역을 포함하는, 본원에 기재된 임의의 것)을 포함할 수 있다.
- [0021] 특정 실시양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 서열식별번호: 12를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 인간 TGF $\beta$ RII의 단편 (예를 들어, 가용성 단편)을 포함한다. 항체는 변형된 불변 영역 (예를 들어, C-말단 Lys→Ala 치환, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 서열의 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20)로의 돌연변이, 또는 IgG1 힌지 영역 및 IgG2 CH2 도메인을 포함하는 하이브리드 불변 영역을 포함하는, 본원에 기재된 임의의 것)을 포함할 수 있다.
- [0022] 특정 실시양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 서열식별번호: 12를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 인간 TGF $\beta$ RII ECD를 포함한다. 항체는 변형된 불변 영역 (예를 들어, C-말단 Lys→Ala 치환, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 서열의 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20)로의 돌연변이, 또는 IgG1 힌지 영역 및 IgG2 CH2 도메인을 포함하는 하이브리드 불변 영역을 포함하는, 본원에 기재된 임의의 것)을 포함할 수 있다.
- [0023] 특정 실시양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 서열식별번호: 12에 존재하는 초가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 인간 TGF $\beta$ RII를 포함한다. 항체는 변형된 불변 영역 (예를 들어, C-말단 Lys→Ala 치환, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 서열의 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20)로의 돌연변이, 또는 IgG1 힌지 영역 및 IgG2 CH2 도메인을 포함하는 하이브리드 불변 영역을 포함하는, 본원에 기재된 임의의 것)을 포함할 수 있다.
- [0024] 특정 실시양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 서열식별번호: 12에 존재하는 초가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 인간 TGF $\beta$ RII의 단편 (예를 들어, 가용성 단편)을 포함한다. 항체는 변형된 불변 영역 (예를 들어, C-말단 Lys→Ala 치환, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 서열의 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20)로의 돌연변이, 또는 IgG1 힌지 영역 및 IgG2 CH2 도메인을 포함하는 하이브리드 불변 영역을 포함하는, 본원에 기재된 임의의 것)을 포함할 수 있다.
- [0025] 특정 실시양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 서열식별번호: 12에 존재하는 초가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 인간 TGF $\beta$ RII ECD를 포함한다. 항체는 변형된 불변 영역 (예를 들어, C-말단 Lys→Ala 치환, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 서열의 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20)로의 돌연변이, 또는 IgG1 힌지 영역 및 IgG2 CH2 도메인을 포함하는 하이브리드 불변 영역을 포함하는, 본원에 기재된 임의의 것)을 포함할 수 있다.
- [0026] 특정 실시양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 서열식별번호: 14를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 인간 TGF $\beta$ RII를 포함한다. 항체는 변형된 불변 영역 (예를 들어, C-말단 Lys→Ala 치환, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 서열의 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20)로의 돌연변이, 또는 IgG1 힌지 영역 및 IgG2 CH2 도메인을 포함하는 하이브리드 불변 영역을 포함하는, 본원에 기재된 임의의 것)을 포함할 수 있다.
- [0027] 특정 실시양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 서열식별번호: 14를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 인간 TGF $\beta$ RII의 단편 (예를 들어, 가용성 단편)을 포함한다. 항체는 변형된 불변 영역 (예를 들어, C-말단 Lys→Ala 치환, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 서열의 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20)로의 돌연변이, 또는 IgG1 힌지 영역 및 IgG2 CH2 도메인을 포함하는 하이브리드 불변 영역을 포함하는, 본원에 기재된 임의의 것)을 포함할 수 있다.
- [0028] 특정 실시양태에서, 단백질 또는 폴리펩티드는 서열식별번호: 14를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 인간 TGF $\beta$ RII ECD를 포함한다. 항체는 변형된 불변 영역 (예를 들어, C-말단 Lys→Ala 치환, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 서열의 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20)로의 돌연변이, 또는 IgG1 힌지 영역 및 IgG2 CH2 도메인을 포함하는 하이브리드 불변 영역을 포함하는, 본원에 기재된 임의의 것)을 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명은 또한 상기 기재된 폴리펩티드 및, 폴리펩티드와 조합되었을 때 적어도 PD-L1에 결합하는 항원-결합 부위를 형성하는 항체의 가변 도메인을 포함하는 단백질의, 본 발명의 조합 요법에서의 용도를 제공한다. 단백질은 (a) 서열식별번호: 3의 아미노산 서열로 이루어진 아미노산 서열을 각각 갖는 2개의 폴리펩티드, 및 (b) 서열식별번호: 1의 아미노산 서열로 이루어진 아미노산 서열을 각각 갖는 2개의 추가의 폴리펩

티드를 포함할 수 있다.

- [0030] 본 발명은 암을 치료하는데 사용하기 위한 또는 종양 성장을 억제하는데 사용하기 위한, 1종 이상의 추가의 항암 치료제의 투여와 조합된, 상기 기재된 단백질의 투여를 포함하는 암의 치료를 위한 조합 요법을 특색으로 한다. 1종 이상의 추가의 항암 치료제는 방사선, 화학요법제, 생물제제 및/또는 백신을 포함한다.
- [0031] 암 또는 종양은 결장직장암, 유방암, 난소암, 췌장암, 위암, 전립선암, 신장암, 자궁경부암, 골수종, 림프종, 백혈병, 갑상선암, 자궁내막암, 자궁암, 방광암, 신경내분비암, 두경부암, 간암, 비인두암, 고환암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 흑색종, 기저 세포 피부암, 편평 세포 피부암, 융기성 피부섬유육종, 메르켈 세포 암종, 교모세포종, 신경교종, 육종, 중피종, 및 골수이형성 중후군으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0032] 본 발명은 또한 종양 성장을 억제하거나 암을 치료하는 조합 요법 방법을 특색으로 한다. 방법은 종양을 상기 기재된 단백질에 노출시키는 것을 포함한다. 방법은 종양을 방사선에 노출시키는 것 및 또는 화학요법제, 생물제제 또는 백신을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 종양 또는 암은 결장직장암, 유방암, 난소암, 췌장암, 위암, 전립선암, 신장암, 자궁경부암, 골수종, 림프종, 백혈병, 갑상선암, 자궁내막암, 자궁암, 방광암, 신경내분비암, 두경부암, 간암, 비인두암, 고환암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 흑색종, 기저 세포 피부암, 편평 세포 피부암, 융기성 피부섬유육종, 메르켈 세포 암종, 교모세포종, 신경교종, 육종, 중피종, 및 골수이형성 중후군으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0033] "TGF $\beta$  RII" 또는 "TGF $\beta$  수용체 II"는 야생형 인간 TGF $\beta$  수용체 유형 2 이소형 A 서열 (예를 들어, NCBI 참조서열 (RefSeq) 수탁 번호 NP\_001020018의 아미노산 서열 (서열식별번호: 8))을 갖는 폴리펩티드, 또는 야생형 인간 TGF $\beta$  수용체 유형 2 이소형 B 서열 (예를 들어, NCBI RefSeq 수탁 번호 NP\_003233의 아미노산 서열 (서열식별번호: 9))을 갖는 폴리펩티드, 또는 서열식별번호: 8 또는 서열식별번호: 9의 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 서열을 갖는 폴리펩티드를 의미한다. TGF $\beta$  RII는 야생형 서열의 TGF $\beta$ -결합 활성의 적어도 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 25%, 35%, 50%, 75%, 90%, 95%, 또는 99%를 보유할 수 있다. 발현된 TGF $\beta$  RII의 폴리펩티드는 신호 서열이 결여되어 있다.
- [0034] "TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 TGF $\beta$  RII의 단편"은 야생형 수용체 또는 상응하는 야생형 단편의 TGF $\beta$ -결합 활성의 적어도 일부 (예를 들어, 적어도 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 25%, 35%, 50%, 75%, 90%, 95%, 또는 99%)를 보유하는, 적어도 20개 (예를 들어, 적어도 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 175, 또는 200개)의 아미노산 길이의 NCBI RefSeq 수탁 번호 NP\_001020018 (서열식별번호: 8) 또는 NCBI RefSeq 수탁 번호 NP\_003233 (서열식별번호: 9), 또는 서열식별번호: 8 또는 서열식별번호: 9와 실질적으로 동일한 서열의 임의의 부분을 의미한다. 전형적으로, 이러한 단편은 가용성 단편이다. 예시적인 이러한 단편은 서열식별번호: 10의 서열을 갖는 TGF $\beta$  RII 세포외 도메인이다.
- [0035] "실질적으로 동일한"은 참조 아미노산 서열에 대해 적어도 50%, 바람직하게는 60%, 70%, 75%, 또는 80%, 보다 바람직하게는 85%, 90%, 또는 95%, 및 가장 바람직하게는 99% 아미노산 서열 동일성을 나타내는 폴리펩티드를 의미한다. 비교 서열의 길이는 일반적으로 적어도 10개의 아미노산, 바람직하게는 적어도 15개의 인접 아미노산, 보다 바람직하게는 적어도 20, 25, 50, 75, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 또는 350개의 인접 아미노산, 및 가장 바람직하게는 전장 아미노산 서열일 것이다.
- [0036] "환자"는 인간 또는 비-인간 동물 (예를 들어, 포유동물)을 의미한다.
- [0037] 환자에서 질환, 장애 또는 상태 (예를 들어, 암)를 "치료하는 것"은 치료제를 환자에게 투여하는 것에 의해 질환, 장애 또는 상태의 적어도 1종의 증상을 감소시키는 것을 의미한다.
- [0038] "암"은 비정상적인 방식으로 증대하는 세포들의 집합을 의미한다.
- [0039] 본 발명의 다른 실시양태 및 세부사항이 본원에서 하기에 제시된다.

### 도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>Gly 링커를 통해 TGF $\beta$  수용체 II의 2개의 세포외 도메인 (ECD)에 융합된 1개의 항-PD-L1 항체를 포함하는 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 분자의 개략적 도면이다.
- 도 2는 연구 "TI13-027: C57B/L6 야생형 마우스의 MC38 종양 모델에서의 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩과 5-FU 및 옥살리플라틴 요법의 조합"에 대한 연구 설계를 요약한 표이며, 여기서 군 및 처리는 N=10 마우스/군이다.

도 3은 연구 "TI14-012: B 세포 결핍 마우스의 MC38 종양 모델에서의 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩과 5-FU 및 옥살리플라틴 요법의 조합"에 대한 연구 설계를 요약한 표이며, 여기서 군 및 처리는 N=10 마우스/군이다.

도 4a-4d는 옥살리플라틴/5-FU 및 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 조합이 종양 성장 억제 및 종양-반응성 CD8 $^+$  T 세포 반응을 증진시킨다는 것을 보여주는 일련의 그래프이다 (C57BL/6 마우스; 연구 TI13-027). 도 4a 및 도 4d. 종양 부피를 연구 기간 동안 1주에 2회 측정하였다. 종양 부피 데이터는 로그 변환하였고, 이원, 반복 측정 ANOVA를 수행하였다. 도 4b. 종양 중량 데이터를 일원 ANOVA에 의해 평가하였다. 도 4c. IFN- $\gamma$  생산, P15E-특이적 CD8 $^+$  T 세포의 빈도를 ELISpot 검정에 의해 정량화하였다. ELISpot 데이터를 일원 ANOVA에 의해 평가하였다. 모든 ANOVA는 처리 군 사이의 통계적 차이를 측정하기 위해 다중 비교를 위한 터키 보정을 포함하였다.  $p<0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 결정되었다.

도 5a-5d는 옥살리플라틴/5-FU 및 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 조합이 종양 성장 억제 및 종양-반응성 CD8 $^+$  T 세포 반응을 증진시킨다는 것을 보여주는 일련의 그래프이다 (B6.129S2-Ighm<sup>tm1Cgn</sup>/J 마우스; 연구 TI14-012). 도 5a 및 5d. 종양 부피 데이터는 로그 변환하였고, 이원, 반복 측정 ANOVA를 수행하였다. 도 5b. 종양 중량 데이터를 일원 ANOVA에 의해 평가하였다. 도 5c. IFN- $\gamma$  생산, P15E-특이적 CD8 $^+$  T 세포의 빈도를 ELISpot 검정에 의해 정량화하였다. ELISpot 데이터를 일원 ANOVA에 의해 평가하였다. 모든 ANOVA는 처리 군 사이의 통계적 차이를 측정하기 위해 다중 비교를 위한 터키 보정을 포함하였다.  $p<0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 결정되었다.

도 6a-6c는 방사선 및 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩이 상승작용적 종양 성장 억제 및 종양-반응성 CD8 $^+$  T 세포 반응을 유도한다는 것을 보여주는 일련의 그래프이다 (TI13-109). 도 6a. 종양 부피를 1주에 2회 측정하고, 평균 종양 부피를 평균  $\pm$  평균의 표준 오차 (SEM)로 나타내었다. 도 6b. 종양 중량 데이터를 제14일에 결정하였다. 도 6c. IFN- $\gamma$  생산, P15E-특이적 CD8 $^+$  T 세포의 빈도를 ELISpot 검정에 의해 제14일에 정량화하였다. 164  $\mu$ g의 용량 수준에서의 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩의 데이터는, 단독요법으로서 또는 조합으로서, 55  $\mu$ g의 용량 수준에서의 데이터와 유사하였다.

도 7a-7c는 방사선 및 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩이 상승작용적 종양 성장 억제 및 종양-반응성 CD8 $^+$  T 세포 반응을 유도한다는 것을 보여주는 일련의 그래프이다 (반복 연구) (TI14-013). 도 7a. 종양 부피를 1주에 2회 측정하고, 평균 종양 부피를 평균  $\pm$  평균의 표준 오차 (SEM)로 나타내었다. 도 7b. 종양 중량을 제14일에 평가하였다. 도 7c. IFN- $\gamma$  생산, P15E-특이적 CD8 $^+$  T 세포의 빈도를 ELISpot 검정에 의해 제14일에 정량화하였다.

도 8a-8d는 방사선 및 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩이 종양-침윤 CD8 $^+$  T 세포 및 NK 세포를 촉진한다는 것을 보여주는 일련의 그래프이다 (TI14-013). 도 8a. 종양-침윤 CD8 $^+$  TIL. 도 8b. 종양-침윤 NK1.1 $^+$  TIL. 도 8c. CD8 $^+$  TIL EOMES 발현. 도 8d. CD8 $^+$  TIL 탈과립화.

도 9a는 암스코팔 효과를 시험하기 위해 원발성 및 속발성 종양을 보유하는 마우스에서의 방사선의 투여를 입증하는 개략적 다이어그램이다.

도 9b는 처리 시작 이후 날의 마우스에서의 원발성 종양 부피를 보여주는 선 그래프이다.

도 9c는 처리 시작 이후 날의 마우스에서의 속발성 종양 부피 ( $\text{mm}^3$ )를 보여주는 선 그래프이다. (● = 이소형 대조군 400  $\mu$ g; ◆ = 항-PDL1-TGF $\beta$  트랩  $\mu$ g; ■ = 방사선 500 rad; ▼ = 방사선 + 항-PDL1-TGF $\beta$  트랩).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 본 발명은 일반적으로 암의 치료를 위한 조합 요법, 특히 (i) TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 TGF $\beta$ RII 또는 그의 단편 및 면역 체크포인트 단백질, 예컨대 프로그램화된 사멸 리간드 1 (PD-L1)에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 이중기능적 분자 및 (ii) 적어도 1종의 추가의 항암 치료제의 조합에 관한 것이다. 이러한 항암 치료제는 예를 들어 방사선, 화학요법제, 생물제제 및/또는 백신을 포함한다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 조합 요법은 상승작용적 항암 효과를 제공한다.

[0042] 본 발명의 조합 요법은, 각각의 작용제 단독의 효과와 비교하여 항암 효과가 증진될 뿐만 아니라, 조합 요법에서 1종 이상의 작용제의 투여량이 각각의 작용제에 의한 단독요법과 비교하여 감소될 수 있고, 한편 전반적인

항암 효과를 달성할 수 있기 때문에 특히 유리하다. 상승작용적 효과로 인해, 환자에게 투여되는 약물의 총량은 유리하게 감소될 수 있고, 그에 의해 부작용이 감소될 수 있다.

[0043]

본 발명의 조합 요법은 특정 종양 세포 또는 면역 세포의 외부 표면 상에서 발견되는 세포성 면역 체크포인트 수용체를 표적화하는 항체 모이어티에 테더링된 가용성 시토카인 수용체 ( $TGF\beta$ RII)를 사용하여  $TGF\beta$ 를 포획함으로써 종양 미세환경 내의  $TGF\beta$ 의 국재화된 감소를 가능하게 한다. 면역 체크포인트 단백질에 대한 본 발명의 항체 모이어티의 예는 항-PD-L1이다. 본 문서에서 때때로 "항체-시토카인 트랩"으로 지칭되는 이러한 이중 기능적 분자는 항-수용체 항체 및 시토카인 트랩이 물리적으로 연결되기 때문에 정확하게 효과적이다. (예를 들어, 항체 및 수용체를 별개의 분자로서 투여하는 것에 비한) 결과적인 장점은, 부분적으로, 시토카인이 자가분비 및 주변분비 기능을 통해 국부 환경에서 우세하게 기능하기 때문이다. 항체 모이어티는 국부 면역억제성 자가분비 또는 주변분비 효과를 중화함으로써 가장 효과적일 수 있는 종양 미세환경으로 시토카인 트랩을 향하게 한다. 또한, 항체의 표적이 항체 결합 시 내재화되는 경우에, 시토카인/시토카인 수용체 복합체의 소거를 위한 효과적인 메카니즘이 제공된다. 항체-매개 표적 내재화는 PD-L1에 대해 제시된 바 있다. 이는 항-TGF $\beta$  항체를 사용하는 것에 비해 뚜렷한 장점으로, 첫째, 항-TGF $\beta$  항체는 완전히 중화성이지 않을 수 있고; 둘째, 항체가 시토카인의 반감기를 연장시키는 담체로서 작용할 수 있고, 항체/시토카인 복합체가 종종, 증강되고 궁극적으로는 해리되어 시토카인을 다시 순환에 방출하는 순환 싱크로서 작용하기 때문이다 (Montero-Julian et al., Blood. 1995; 85:917-24). 또한 리간드를 중화하기 위해 시토카인 트랩을 사용하는 것은 CSF-1의 경우에서와 같이 수용체를 항체로 차단하는 것보다 더 나은 전략일 수 있다. 수용체-매개 세포내이입에 의해 CSF-1이 순환으로부터 소거되기 때문에, 항-CSF-1 수용체 항체 차단은 순환 CSF-1 농도의 유의한 증가를 유발하였다 (Hume et al., Blood. 2012;119:1810-20).

[0044]

하기 기재된 바와 같이, 적어도 1종의 추가의 항암 치료제와 조합된 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩에 의한 처리는 종양 세포 상의 PD-L1과 면역 세포 상의 PD-1 사이의 상호작용의 동시 차단, 종양 미세환경에서 TGF $\beta$ 의 중화, 및 항암제의 치료 효과로 인해 상승작용적 항종양 효과를 도출한다. 이론에 얹매이지는 않지만, 이는 아마도 2가지 주요 면역 회피 메카니즘의 동시 차단, 및 또한, 단일 분자 엔티티에 의한 종양 미세환경에서의 TGF $\beta$ 의 표적화된 고갈, 뿐만 아니라 추가의 항암제(들)의 항종양 효과로부터 수득되는 상승작용적 효과로 인한 것일 수 있다. 이러한 고갈은 (1) 종양 세포의 항-PD-L1 표적화; (2) TGF $\beta$  트랩에 의한 종양 미세환경에서의 TGF $\beta$  자가분비/주변분비의 결합; 및 (3) 결합된 TGF $\beta$ 의 PD-L1 수용체-매개 세포내이입을 통한 파괴에 의해 달성된다. 상기 언급된 작용 메카니즘은 단일 작용제 항-PD-L1, TGF $\beta$  트랩 및 추가의 항암 치료제의 조합 요법에 의해 달성될 수 없다. 또한, Fc (IgG의 결정화 단편)의 C-말단에 융합된 TGF $\beta$ RII는 Fc의 N-말단에 TGF $\beta$ RII가 위치한 TGF $\beta$ RII-Fc보다 수배 더 강력하였다. 항-PDL1/TGF $\beta$  트랩에 의해 수득된 우수한 효능은 또한 TGF $\beta$ RII가 TGF $\beta$ 2를 포획하지 않는다는 일부 우려를 완화시킨다. 문헌 [Yang et al., Trends Immunol. 2010; 31:220-227]에서 지적된 바와 같이, 일부 종양 유형은 초기에 TGF $\beta$ 2를 분비하지만, 종양이 진행됨에 따라, 종양 미세환경 내의 TGF $\beta$ 는 TGF $\beta$ 1을 분비하는 골수성-유래 억제 세포에 의해 우세하게 분비된다. 효과적인 면역-종양학 요법으로서 훌륭한 전망을 나타내는 것에 더하여, 가용성 TGF $\beta$ RII에 의한 치료는 TGF $\beta$  표적화 요법, 특히 TGF $\beta$ RI 키나제 억제제의 심장독성 우려를 잠재적으로 감소시킬 수 있다. 이는 배아의 심장 발생, 뿐만 아니라 허혈 및 재판류 손상 후 심근 손상의 복구에서의 TGF $\beta$ 2가 중요한 역할을 하기 때문이다 (Roberts et al., J Clin Invest. 1992; 90:2056-62).

[0045]

암 표적으로서 TGF $\beta$

[0046]

TGF $\beta$ 는 암의 분자상 지킬 및 하이드로서의 그의 모순적인 역할로 인해 암 면역요법에서 다소 모호한 표적이었다 (Berie et al., Nat Rev Cancer. 2006; 6:506-20). 일부 다른 시토카인과 같이, TGF $\beta$  활성은 발생 단계 및 상황 의존적이다. 실제로, TGF $\beta$ 는 종양 촉진자 또는 종양 억제자로서 작용하여, 종양 개시, 진행 및 전이에 영향을 미칠 수 있다. TGF $\beta$ 의 이러한 이중 역할의 기저 메카니즘은 여전히 불명확하다 (Yang et al., Trends Immunol. 2010; 31:220-227). Smad-의존성 신호전달이 TGF $\beta$  신호전달의 성장 억제를 매개하는 한편, Smad 비의존성 경로는 그의 종양-촉진 효과에 기여하는 것으로 상정되어 있지만, Smad-의존성 경로가 종양 진행에 수반된다는 것을 나타내는 데이터도 또한 존재한다 (Yang et al., Cancer Res. 2008; 68:9107-11).

[0047]

TGF $\beta$  리간드 및 수용체 둘 다는 치료 표적으로서 집중적으로 연구되고 있다. 3가지 리간드 이소형, TGF $\beta$ 1, 2 및 3이 존재하고, 이들은 모두 동종이량체로서 존재한다. 또한 3가지 TGF $\beta$  수용체 (TGF $\beta$ RI)가 존재하고, 이들은 TGF $\beta$ RI 유형 I, II 및 III으로 불린다 (Lopez-Casillas et al., J Cell Biol. 1994; 124:557-68). TGF $\beta$ RI은 신호전달 쇄이고, 리간드에 결합할 수 없다. TGF $\beta$ RII는 높은 친화도로 리간드 TGF $\beta$ 1 및 3에 결합하지만, TGF $\beta$ 2에는 결합하지 않는다. TGF $\beta$ RII/TGF $\beta$  복합체는 TGF $\beta$ RI을 동원하여, 신호전달 복합체를 형성한다 (Won

et al., *Cancer Res.* 1999; 59:1273-7). TGF $\beta$ RIII은 TGF $\beta$ 가 그의 신호전달 수용체에 결합하는 것의 양성 조절자이고, 모든 3가지 TGF $\beta$  이소형에 높은 친화도로 결합한다. 세포 표면 상에서, TGF $\beta$ /TGF $\beta$ RIII 복합체는 TGF $\beta$ RI에 결합하고, 이어서 TGF $\beta$ RI를 동원하고, 이는 TGF $\beta$ RIII을 대체하여 신호전달 복합체를 형성한다.

[0048] 3가지 상이한 TGF $\beta$  이소형 모두가 동일한 수용체를 통해 신호를 전달하지만, 이들은 생체 내에서 차등 발현 패턴 및 비-중첩 기능을 갖는 것으로 공지되어 있다. 3가지 상이한 TGF- $\beta$  이소형 녹아웃 마우스는 별개의 표현형을 갖고, 이는 수많은 비-보상 기능을 나타낸다 (Bujak et al., *Cardiovasc Res.* 2007; 74:184-95). TGF $\beta$ 1 널 마우스는 조혈 및 혈관생성 결함을 갖고, TGF $\beta$ 3 널 마우스는 폐 발생 및 결함있는 구개발생을 나타내는 한편, TGF $\beta$ 2 널 마우스는 다양한 발생 이상을 나타내고, 가장 현저한 것은 다중 심장 변형이다 (Bartram et al., *Circulation*. 2001; 103:2745-52; Yamagishi et al., *Anat Rec.* 2012; 295:257-67). 또한, TGF $\beta$ 는 혀혈 및 재관류 손상 후의 심근 손상의 복구에서 주요 역할을 하는 것에 연루된다. 성인 심장에서, 심근세포는 TGF $\beta$ 를 분비하고, 이는 자가분비물로서 작용하여 자발적인 박동수를 유지시킨다. 중요하게는, 심근세포에 의해 분비되는 TGF $\beta$ 의 70-85%는 TGF $\beta$ 2이다 (Roberts et al., *J Clin Invest.* 1992; 90:2056-62). 요약하면, 종양 미세환경 및 심장 생리학에서의 TGF $\beta$ 1 및 TGF $\beta$ 2의 우세한 역할을 각각 고려하여, TGF $\beta$ 1을 중화하지만 TGF $\beta$ 2는 중화하지 않는 치료제가 항종양 활성을 손상시키지 않으면서 심장독성을 최소화함으로써 최적의 치료 지수를 제공할 수 있다. 이는 원숭이에서 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩에 대한 심장독성을 포함한 독성의 결여를 관찰한 본 발명자들의 발견과 일치한다.

[0049] TGF $\beta$ 를 중화하는 치료 접근법은 가용성 수용체 트랩으로서의 TGF $\beta$  수용체의 세포외 도메인 및 중화 항체를 사용하는 것을 포함한다. 수용체 트랩 접근법에서, 가용성 TGF $\beta$ RIII은 모든 3가지 TGF $\beta$  리간드에 결합하기 때문에 확실한 선택으로 보일 수 있다. 그러나, 762개의 아미노산 잔기의 세포외 도메인을 갖는 280-330 kD 글리코사미노글리칸 (GAG)-당단백질로서 자연 발생하는 TGF $\beta$ RIII은 생물요법제 개발을 위한 매우 복합적인 단백질이다. GAG가 없는 가용성 TGF $\beta$ RIII이 곤충 세포에서 생산될 수 있고, 이는 강력한 TGF $\beta$  중화제인 것으로 제시되었다 (Vilchis-Landeros et al., *Biochem J* 355:215, 2001). TGF $\beta$ RIII의 2개의 개별 결합 도메인 (엔도글린-관련 및 우로모듈린-관련)은 독립적으로 발현될 수 있지만, 이는 가용성 TGF $\beta$ RIII의 친화도보다 20 내지 100배 더 낮은 친화도 및 훨씬 감소된 중화 활성을 갖는 것으로 제시되었다 (Mendoza et al., *Biochemistry*. 2009; 48:11755-65). 다른 한편으로는, TGF $\beta$ RII의 세포외 도메인은 단지 136개의 아미노산 잔기 길이이고, 25-35 kD의 글리코실화 단백질로서 생산될 수 있다. 추가로 재조합 가용성 TGF $\beta$ RII는 200 pM의 K<sub>d</sub>로 TGF $\beta$ 1에 결합하는 것으로 제시되었고, 이는 세포 상의 전장 TGF $\beta$ RII에 대한 50 pM의 K<sub>d</sub>와 꽤 유사하다 (Lin et al., *J Biol Chem.* 1995; 270:2747-54). 가용성 TGF $\beta$ RII-Fc가 항암제로서 시험되었고, 종양 모델에서 이는 확립된 유린 악성 중피종 성장을 억제하는 것으로 나타났다 (Suzuki et al., *Clin Cancer Res.* 2004; 10:5907-18). TGF $\beta$ RII는 TGF $\beta$ 2에 결합하지 않고, TGF $\beta$ RIII은 TGF $\beta$ RII보다 더 낮은 친화도로 TGF $\beta$ 1 및 3에 결합하기 때문에, TGF $\beta$ RIII의 엔도글린 도메인과 TGF $\beta$ RII의 세포외 도메인의 융합 단백질이 박테리아에서 생산되었고, TGF $\beta$ RII 또는 RIII보다 효과적으로 세포 기반 검정에서 TGF $\beta$ 1 및 2의 신호전달을 억제하는 것으로 나타났다 (Verona et al., *Protein Eng Des Sel.* 2008; 21:463-73). 종양 모델에서의 약간의 고무적인 항종양 활성에도 불구하고, 본 발명자들이 알기로는, TGF $\beta$  수용체 트랩 재조합 단백질은 임상에서 시험되지 않았다.

[0050] TGF $\beta$  리간드의 모든 3가지 이소형을 중화하는 또 다른 접근법은 범-중화 항-TGF $\beta$  항체, 또는 수용체가 TGF $\beta$  1, 2 및 3에 결합하는 것을 차단하는 항-수용체 항체를 스크리닝하는 것이다. TGF $\beta$ 의 모든 이소형에 대해 특이적인 인간 항체인 GC1008이 진행성 악성 흑색종 또는 신세포 암종 환자에서 I상/II상 연구 중이다 (Morris et al., *J Clin Oncol* 2008; 26:9028 (Meeting abstract)). 치료가 안전하고 잘 허용되는 것으로 확인되었지만, 제한된 임상 효능만이 관찰되었고, 따라서 면역학적 효과의 추가의 특징화 없이 항-TGF $\beta$  요법의 중요성을 해석하기는 어려웠다 (Flavell et al., *Nat Rev Immunol.* 2010; 10:554-67). 또한 임상에서 시험된 TGF $\beta$ -이소형-특이적 항체가 존재하였다. TGF $\beta$ 1에 특이적인 항체인 메텔리무맙은 녹내장 수술에 대한 과도한 수술후 반흔형성을 방지하기 위한 치료로서 2상 임상 시험에서 시험되었고; TGF $\beta$ 2에 특이적인 항체인 레르델리무맙은 3상 연구에서 눈 수술 후, 안전하지만 반흔형성을 개선시키는데 비효과적인 것으로 확인되었다 (Khaw et al., *Ophthalmology* 2007; 114:1822-1830). 또한 수용체가 모든 3가지 TGF $\beta$  이소형에 결합하는 것을 차단하는 항-TGF $\beta$ RII 항체, 예컨대 항-인간 TGF $\beta$ RII 항체 TR1 및 항-마우스 TGF $\beta$ RII 항체 MT1은 마우스 모델에서 원발성 종양 성장 및 전이에 대해 일부 치료 효능을 나타내었다 (Zhong et al., *Clin Cancer Res.* 2010; 16:1191-205). 지금까지, 종종 꽤 독성인 TGF $\beta$  신호전달의 소분자 억제제를 포함한, TGF $\beta$  표적화 항암 치료에 대한 연구의 대부분은 거의 전임상 단계이고, 수득된 항종양 효능은 제한적이었다 (Calone et al., *Exp Oncol.* 2012; 34:9-16; Connolly et al., *Int J Biol Sci.* 2012; 8:964-78).

- [0051] 본 발명의 조합 요법에 사용하기 위한 본 발명의 항체-TGF $\beta$  트랩은 TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 인간 TGF $\beta$  수용체 II (TGF $\beta$  RII)의 적어도 일부를 함유하는 이중기능적 단백질이다. 한 실시양태에서, TGF $\beta$  트랩 폴리펩티드는 TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 인간 TGF $\beta$  수용체 유형 2 이소형 A (서열식별번호: 8)의 가용성 부분이다. 추가 실시양태에서, TGF $\beta$  트랩 폴리펩티드는 적어도 서열식별번호: 8의 아미노산 73-184를 함유한다. 추가 실시양태에서, TGF $\beta$  트랩 폴리펩티드는 서열식별번호: 8의 아미노산 24-184를 함유한다. 또 다른 실시양태에서, TGF $\beta$  트랩 폴리펩티드는 TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 인간 TGF $\beta$  수용체 유형 2 이소형 B (서열식별번호: 9)의 가용성 부분이다. 추가 실시양태에서, TGF $\beta$  트랩 폴리펩티드는 적어도 서열식별번호: 9의 아미노산 48-159를 함유한다. 추가 실시양태에서, TGF $\beta$  트랩 폴리펩티드는 서열식별번호: 9의 아미노산 24-159를 함유한다. 추가 실시양태에서, TGF $\beta$  트랩 폴리펩티드는 서열식별번호: 9의 아미노산 24-105를 함유한다.
- [0052] 면역 체크포인트 탈-억제
- [0053] 치료 항체에 의한 탈-억제를 위해 T 세포 억제 체크포인트를 표적화하는 접근법은 집중 연구 분야이다 (검토를 위해, 문헌 [Pardoll, Nat Rev Cancer. 2012; 12:253-264] 참조). 하나의 접근법에서, 항체 모이어티 또는 그의 항원 결합 단편은 T 세포 상의 T 세포 억제 체크포인트 수용체 단백질, 예컨대, 예를 들어: CTLA-4, PD-1, BTLA, LAG-3, TIM-3, 및 LAIR1을 표적화한다. 또 다른 접근법에서, 항체 모이어티는 항원 제시 세포 및 종양 세포 상의 대응-수용체 (그 자신의 면역 회피를 위해 이를 대응-수용체 중 일부를 선취함), 예컨대, 예를 들어: PD-L1 (B7-H1), B7-DC, HVEM, TIM-4, B7-H3, 또는 B7-H4를 표적화한다.
- [0054] 본 발명은 항체 TGF $\beta$  트랩의 항체 모이어티 또는 그의 항원 결합 단편을 통해 탈-억제를 위해 T 세포 억제 체크포인트를 표적화하는 항체 TGF $\beta$  트랩의 사용을 고려한다. 이를 위해, 본 발명자들은 TGF $\beta$  트랩을 다양한 T 세포 억제 체크포인트 수용체 단백질, 예컨대 항-PD-1, 항-PD-L1, 항-TIM-3 및 항-LAG3을 표적화하는 항체와 조합한 것의 항종양 효능을 시험하였다. 본 발명자들은 TGF $\beta$  트랩을 항-PD-L1 항체와 조합한 것이 단독요법으로 관찰되는 것을 넘어서는 놀라운 항종양 활성을 나타냈다는 것을 발견하였다. 대조적으로, 상기 열거된 표적에 대한 항체와의 다른 조합은 어떠한 뛰어난 효능도 나타내지 않았다. 특히, PD-1 / PD-L1은 서로 결합하여 면역 체크포인트 억제를 발생시키는 동족 수용체이기 때문에, TGF $\beta$  트랩과 항-PD-1 항체의 조합 처리는 항-PD-L1에 의해 관찰되는 것과 유사한 활성을 입증할 것으로 예상할 수 있다. 그러나, 이는 본 발명자들이 발견한 것이 아니다.
- [0055] 항-PD-L1 항체
- [0056] 본 발명은 관련 기술 분야에 기재된 임의의 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 사용을 포함할 수 있다. 항-PD-L1 항체, 예를 들어, 29E2A3 항체 (바이오레전드(Biolegend), 카탈로그 번호 329701)는 상업적으로 입수 가능하다. 항체는 모노클로날 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체일 수 있다. 항체 단편은 Fab, F(ab') $2$ , scFv 및 Fv 단편을 포함하고, 이는 하기의 추가의 세부사항에 기재되어 있다.
- [0057] 예시적인 항체는 PCT 공개 WO 2013/079174에 기재되어 있다. 이들 항체는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함한 중쇄 가변 영역 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서
- [0058] (a) HVR-H1 서열은 X<sub>1</sub>YX<sub>2</sub>MX<sub>3</sub>이고;
- [0059] (b) HVR-H2 서열은 SIYPSGGX<sub>4</sub>TFYADX<sub>5</sub>VKG<sub>6</sub>이고;
- [0060] (c) HVR-H3 서열은 IKLGTVTX<sub>4</sub>Y<sub>5</sub>이고;
- [0061] 추가로 여기서: X<sub>1</sub>은 K, R, T, Q, G, A, W, M, I, 또는 S이고; X<sub>2</sub>는 V, R, K, L, M, 또는 I이고; X<sub>3</sub>은 H, T, N, Q, A, V, Y, W, F, 또는 M이고; X<sub>4</sub>는 F 또는 I이고; X<sub>5</sub>는 S 또는 T이고; X<sub>6</sub>은 E 또는 D이다.
- [0062] 한 실시양태에서, X<sub>1</sub>은 M, I, 또는 S이고; X<sub>2</sub>는 R, K, L, M, 또는 I이고; X<sub>3</sub>은 F 또는 M이고; X<sub>4</sub>는 F 또는 I이고; X<sub>5</sub>는 S 또는 T이고; X<sub>6</sub>은 E 또는 D이다.
- [0063] 또 다른 실시양태에서 X<sub>1</sub>은 M, I, 또는 S이고; X<sub>2</sub>는 L, M, 또는 I이고; X<sub>3</sub>은 F 또는 M이고; X<sub>4</sub>는 I이고; X<sub>5</sub>는 S 또는 T이고; X<sub>6</sub>은 D이다.
- [0064] 또 다른 실시양태에서, X<sub>1</sub>은 S이고; X<sub>2</sub>는 I이고; X<sub>3</sub>은 M이고; X<sub>4</sub>는 I이고; X<sub>5</sub>는 T이고; X<sub>6</sub>은 D이다.

- [0065] 또 다른 측면에서, 폴리펩티드는 식: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)에 따른, HVR 사이에 병치된 가변 영역 중쇄 프레임워크 서열을 추가로 포함한다.
- [0066] 또 다른 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열 또는 인간 배선 프레임워크 서열로부터 유래된다.
- [0067] 추가 측면에서, 프레임워크 서열 중 적어도 1개는 하기이다:
- [0068] HC-FR1은 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS;
- [0069] HC-FR2는 WVRQAPGKGLEWVS;
- [0070] HC-FR3은 RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR;
- [0071] HC-FR4는 WGQGTLVTVSS.
- [0072] 추가 측면에서, 중쇄 폴리펩티드는 HVR-L1, HVR-L2 및 HVR-L3을 포함한 가변 영역 경쇄와 추가로 조합되고, 여기서:
- [0073] (a) HVR-L1 서열은 TGTX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>DVGX<sub>9</sub>YNYVS이고;
- [0074] (b) HVR-L2 서열은 X<sub>10</sub>VX<sub>11</sub>X<sub>12</sub>RPS이고;
- [0075] (c) HVR-L3 서열은 SSX<sub>13</sub>TX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>RV이고;
- [0076] 추가로 여기서: X<sub>7</sub>은 N 또는 S이고; X<sub>8</sub>은 T, R, 또는 S이고; X<sub>9</sub>는 A 또는 G이고; X<sub>10</sub>은 E 또는 D이고; X<sub>11</sub>은 I, N 또는 S이고; X<sub>12</sub>는 D, H 또는 N이고; X<sub>13</sub>은 F 또는 Y이고; X<sub>14</sub>는 N 또는 S이고; X<sub>15</sub>는 R, T 또는 S이고; X<sub>16</sub>은 G 또는 S이고; X<sub>17</sub>은 I 또는 T이다.
- [0077] 또 다른 실시양태에서, X<sub>7</sub>은 N 또는 S이고; X<sub>8</sub>은 T, R, 또는 S이고; X<sub>9</sub>는 A 또는 G이고; X<sub>10</sub>은 E 또는 D이고; X<sub>11</sub>은 N 또는 S이고; X<sub>12</sub>는 N이고; X<sub>13</sub>은 F 또는 Y이고; X<sub>14</sub>는 S이고; X<sub>15</sub>는 S이고; X<sub>16</sub>은 G 또는 S이고; X<sub>17</sub>은 T이다.
- [0078] 또 다른 실시양태에서, X<sub>7</sub>은 S이고; X<sub>8</sub>은 S이고; X<sub>9</sub>는 G이고; X<sub>10</sub>은 D이고; X<sub>11</sub>은 S이고; X<sub>12</sub>는 N이고; X<sub>13</sub>은 Y이고; X<sub>14</sub>는 S이고; X<sub>15</sub>는 S이고; X<sub>16</sub>은 S이고; X<sub>17</sub>은 T이다.
- [0079] 추가 측면에서, 경쇄는 식: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)에 따른, HVR 사이에 병치된 가변 영역 경쇄 프레임워크 서열을 추가로 포함한다.
- [0080] 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열 또는 인간 배선 프레임워크 서열로부터 유래된다.
- [0081] 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 람다 경쇄 서열이다.
- [0082] 추가 측면에서, 프레임워크 서열 중 적어도 1개는 하기이다:
- [0083] LC-FR1은 QSALTQPASVSGSPGQSITISC;
- [0084] LC-FR2는 WYQQHPGKAPKLMYI;
- [0085] LC-FR3은 GVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYC;
- [0086] LC-FR4는 FGTGTKVTVL.
- [0087] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-PD-L1 항체 또는 항원 결합 단편을 제공하며, 여기서:
- [0088] (a) 중쇄는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3을 포함하고, 여기서 추가로: (i) HVR-H1 서열은 X<sub>1</sub>YX<sub>2</sub>MX<sub>3</sub>이고; (ii) HVR-H2 서열은 SIYPSGGX<sub>4</sub>TFYADX<sub>5</sub>VKG이고; (iii) HVR-H3 서열은 IKLGTVTTVX<sub>6</sub>Y이고;
- [0089] (b) 경쇄는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3을 포함하고, 여기서 추가로: (iv) HVR-L1 서열은 TGTX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>DVGX<sub>9</sub>YNYVS이고; (v) HVR-L2 서열은 X<sub>10</sub>VX<sub>11</sub>X<sub>12</sub>RPS이고; (vi) HVR-L3 서열은 SSX<sub>13</sub>TX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>RV이고; 여기

서:  $X_1$ 은 K, R, T, Q, G, A, W, M, I, 또는 S이고;  $X_2$ 는 V, R, K, L, M, 또는 I이고;  $X_3$ 은 H, T, N, Q, A, V, Y, W, F, 또는 M이고;  $X_4$ 는 F 또는 I이고;  $X_5$ 는 S 또는 T이고;  $X_6$ 은 E 또는 D이고;  $X_7$ 은 N 또는 S이고;  $X_8$ 은 T, R, 또는 S이고;  $X_9$ 는 A 또는 G이고;  $X_{10}$ 은 E 또는 D이고;  $X_{11}$ 은 I, N, 또는 S이고;  $X_{12}$ 는 D, H, 또는 N이고;  $X_{13}$ 은 F 또는 Y이고;  $X_{14}$ 는 N 또는 S이고;  $X_{15}$ 는 R, T, 또는 S이고;  $X_{16}$ 은 G 또는 S이고;  $X_{17}$ 은 I 또는 T이다.

[0090] 한 실시양태에서,  $X_1$ 은 M, I, 또는 S이고;  $X_2$ 는 R, K, L, M, 또는 I이고;  $X_3$ 은 F 또는 M이고;  $X_4$ 는 F 또는 I이고;  $X_5$ 는 S 또는 T이고;  $X_6$ 은 E 또는 D이고;  $X_7$ 은 N 또는 S이고;  $X_8$ 은 T, R, 또는 S이고;  $X_9$ 는 A 또는 G이고;  $X_{10}$ 은 E 또는 D이고;  $X_{11}$ 은 N 또는 S이고;  $X_{12}$ 는 N이고;  $X_{13}$ 은 F 또는 Y이고;  $X_{14}$ 는 S이고;  $X_{15}$ 는 S이고;  $X_{16}$ 은 G 또는 S이고;  $X_{17}$ 은 T이다.

[0091] 또 다른 실시양태에서,  $X_1$ 은 M, I, 또는 S이고;  $X_2$ 는 L, M, 또는 I이고;  $X_3$ 은 F 또는 M이고;  $X_4$ 는 I이고;  $X_5$ 는 S 또는 T이고;  $X_6$ 은 D이고;  $X_7$ 은 N 또는 S이고;  $X_8$ 은 T, R, 또는 S이고;  $X_9$ 는 A 또는 G이고;  $X_{10}$ 은 E 또는 D이고;  $X_{11}$ 은 N 또는 S이고;  $X_{12}$ 는 N이고;  $X_{13}$ 은 F 또는 Y이고;  $X_{14}$ 는 S이고;  $X_{15}$ 는 S이고;  $X_{16}$ 은 G 또는 S이고;  $X_{17}$ 은 T이다.

[0092] 또 다른 실시양태에서,  $X_1$ 은 S이고;  $X_2$ 는 I이고;  $X_3$ 은 M이고;  $X_4$ 는 I이고;  $X_5$ 는 T이고;  $X_6$ 은 D이고;  $X_7$ 은 S이고;  $X_8$ 은 G이고;  $X_9$ 은 D이고;  $X_{10}$ 은 S이고;  $X_{11}$ 은 N이고;  $X_{12}$ 은 Y이고;  $X_{13}$ 은 S이고;  $X_{14}$ 는 S이고;  $X_{15}$ 는 S이고;  $X_{16}$ 은 S이고;  $X_{17}$ 은 T이다.

[0093] 추가 측면에서, 중쇄 가변 영역은 (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)로서 HVR 사이에 병치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 (LC-FR1 MHVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)로서 HVR 사이에 병치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함한다.

[0094] 추가 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 컨센서스 프레임워크 서열 또는 인간 배선 서열로부터 유래된다.

[0095] 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기이다:

[0096] HC-FR1은 EVQLLESGGGLVQPGGLRLSCAASGFTFS;

[0097] HC-FR2는 WVRQAPGKGLEWVS;

[0098] HC-FR3은 RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR;

[0099] HC-FR4는 WGQGTILTVSS.

[0100] 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 람다 경쇄 서열이다.

[0101] 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기이다:

[0102] LC-FR1은 QSALTQPASVSGSPGQSITISC;

[0103] LC-FR2는 WYQQHPGKAPKLMY;

[0104] LC-FR3은 GVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYC;

[0105] LC-FR4는 FGTGTVKTVL.

[0106] 추가 측면에서, 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 항체 또는 항체 단편은 적어도  $C_{H1}$  도메인을 추가로 포함한다.

[0107] 보다 구체적 측면에서, 중쇄 가변 영역 폴리펩티드, 항체 또는 항체 단편은  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ , 및  $C_{H3}$  도메인을 추가로 포함한다.

[0108] 추가 측면에서, 가변 영역 경쇄, 항체 또는 항체 단편은  $C_L$  도메인을 추가로 포함한다.

[0109] 추가 측면에서, 항체는  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ , 및  $C_L$  도메인을 추가로 포함한다.

[0110] 추가의 구체적 측면에서, 항체는 인간 또는 뮤린 불변 영역을 추가로 포함한다.

- [0111] 추가 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0112] 추가의 구체적 측면에서, 인간 또는 뮤린 불변 영역은 IgG1이다.
- [0113] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-PD-L1 항체를 특색으로 하며, 여기서:
- [0114] (a) 중쇄는 각각 SYIMM, SIYPSGGITFYADTVKG, 및 IKLGTVTTVDY에 대해 적어도 80% 전체 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3을 포함하고,
- [0115] (b) 경쇄는 각각 TGTSSDVGGYNYVS, DVSNRPS, 및 SSYTSSSTRV에 대해 적어도 80% 전체 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3을 포함한다.
- [0116] 구체적 측면에서, 서열 동일성은 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%이다.
- [0117] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-PD-L1 항체를 특색으로 하며, 여기서:
- [0118] (a) 중쇄는 각각 MYMMM, SIYPSGGITFYADSVKG, 및 IKLGTVTTVDY에 대해 적어도 80% 전체 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3을 포함하고,
- [0119] (b) 경쇄는 각각 TGTSSDVGAYNYVS, DVSNRPS, 및 SSYTSSSTRV에 대해 적어도 80% 전체 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3을 포함한다.
- [0120] 구체적 측면에서, 서열 동일성은 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%이다.
- [0121] 추가 측면에서, 본 발명에 따른 항체 또는 항체 단편에서, HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3의 서열과 비교하여, 하기와 같이 밀줄로 강조된 적어도 그러한 아미노산은 변화되지 않고 유지되고:
- [0122] (a) HVR-H1에서 SYIMM,
- [0123] (b) HVR-H2에서 SIYPSGGITFYADTVKG,
- [0124] (c) HVR-H3에서 IKLGTVTTVDY;
- [0125] 추가로 여기서, HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3의 서열과 비교하여, 하기와 같이 밀줄로 강조된 적어도 그러한 아미노산은 변화되지 않고 유지된다:
- [0126] (a) HVR-L1 TGTSSDVGGYNYVS
- [0127] (b) HVR-L2 DVSNRPS
- [0128] (c) HVR-L3 SSYTSSSTRV.
- [0129] 또 다른 측면에서, 중쇄 가변 영역은 (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)로서 HVR 사이에 병치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)로서 HVR 사이에 병치된 1개 이상의 프레임워크 서열을 포함한다.
- [0130] 또 다른 측면에서, 프레임워크 서열은 인간 배선 서열로부터 유래된다.
- [0131] 추가 측면에서, 중쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기이다:
- [0132] HC-FR1은 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS;
- [0133] HC-FR2는 WVRQAPGKGLEWVS;
- [0134] HC-FR3은 RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR;
- [0135] HC-FR4는 WGQGTLVTVSS.
- [0136] 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열은 람다 경쇄 서열로부터 유래된다.
- [0137] 추가 측면에서, 경쇄 프레임워크 서열 중 1개 이상은 하기이다:

- [0138] LC-FR1은 QSALTQPVSGSPGQSITISC;
- [0139] LC-FR2는 WYQQHPGKAPKLMIY;
- [0140] LC-FR3은 GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC;
- [0141] LC-FR4는 FGTGTVKTVL.
- [0142] 추가의 구체적 측면에서, 항체는 인간 또는 뮤린 불변 영역을 추가로 포함한다.
- [0143] 추가 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0144] 추가 실시양태에서, 본 발명은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-PD-L1 항체를 특색으로 하며, 여기서:
- [0145] (a) 중쇄 서열은 하기 중쇄 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖고:
- [0146] EVQLLESGGGLVQPGGLRLSCAASGFTFSSYIMMVWRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADWKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGT  
VTTVDYWGQGTLTVSS,
- [0147] (b) 경쇄 서열은 하기 경쇄 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖는다:
- [0148] QSALTQPVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSN  
RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKTVL.
- [0149] 구체적 측면에서, 서열 동일성은 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%이다.
- [0150] 추가 실시양태에서, 본 발명은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-PD-L1 항체를 제공하며, 여기서:
- [0151] (a) 중쇄 서열은 하기 중쇄 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖고:
- [0152] EVQLLESGGGLVQPGGLRLSCAASGFTFSYMMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARIKLG  
VTTVDYWG QGTLTVSS,
- [0153] (b) 경쇄 서열은 하기 경쇄 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖는다:
- [0154] QSALTQPVSGSPGQSITISCTGTSSDVGAYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNR  
PSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKTVL.
- [0155] 구체적 측면에서, 서열 동일성은 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 인간, 마우스 또는 시노몰구스 원숭이 PD-L1에 결합한다. 구체적 측면에서 항체는 인간, 마우스 또는 시노몰구스 원숭이 PD-L1과 각각의 인간, 마우스 또는 시노몰구스 원숭이 PD-1 수용체 사이의 상호작용을 차단할 수 있다.
- [0156] 또 다른 실시양태에서, 항체는 인간 PD-L1에  $5 \times 10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ , 바람직하게는  $2 \times 10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ , 및 보다 더 바람직하게는  $1 \times 10^{-9}$  M 이하의  $K_D$ 로 결합한다.
- [0157] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 인간 PD-L1의 잔기 Y56 및 D61을 포함하는 기능적 에피토프에 결합하는 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편에 관한 것이다.
- [0158] 구체적 측면에서, 기능적 에피토프는 인간 PD-L1의 E58, E60, Q66, R113, 및 M115를 추가로 포함한다.
- [0159] 보다 구체적 측면에서, 항체는 인간 PD-L1의 잔기 54-66 및 112-122를 포함하는 임체형태적 에피토프에 결합한다.
- [0160] 추가 실시양태에서, 본 발명은 PD-L1에의 결합에 대해 본원에 기재된 바와 같은 본 발명에 따른 항체와 교차-경쟁하는 항-PD-L1 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 사용에 관한 것이다.
- [0161] 추가 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 조합 요법에 사용하기 위한, 적어도 1종의 제약상 허용되는 담체와 조합된 상기 기재된 항-PD-L1 항체 중 임의의 것을 포함하는 단백질 및 폴리펩티드를 특색으로 한다.
- [0162] 추가 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리펩티드, 또는 항-PD-L1 항체의 경쇄 또는 중쇄 가

변 영역 서열, 또는 그의 항원 결합 단편을 코딩하는 단리된 핵산의 사용을 특색으로 한다. 추가 실시양태에서, 본 발명은 항-PD-L1 항체의 경쇄 또는 중쇄 가변 영역 서열을 코딩하는 단리된 핵산을 제공하며, 여기서:

[0163] (a) 중쇄는 각각 SYIMM, SIYPSGGITFYADTVKG, 및 IKLGTVTTVDY에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하거나, 또는

[0164] (b) 경쇄는 각각 TGTSSDVGGYNYVS, DVSNRPS, 및 SSYTSSSTRV에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.

[0165] 구체적 측면에서, 서열 동일성은 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%이다.

[0166] 추가 측면에서, 중쇄에 대한 핵산 서열은 하기이고:

atggagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttccctgctag ctccagcgag	60
gtgcagctgc tggaatccgg cgaggactg gtgcagcctg gcggctccct gagactgtct	120
tgcgccgcct ccggcttcac cttctccagc tacatcatga tgggggtgcg acaggcccct	180
ggcaaggggcc tggaatgggt gtcctccatc taccctcccg gcggcatcac cttctacgcc	240
gacaccgtga agggccgggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg	300
cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccggatcaagctg	360
ggcaccgtga ccaccgtgga ctactggggc cagggcaccc tggtgacagt gtcctccgccc	420
tccaccaagg gcccattcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagacac ctctggggc	480
acagcgcccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttcccc aaccggtgac ggtgtcgctgg	540
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtccatc gtcctcagga	600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	660
atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaagggtgg acaagaaaat tgagcccaa	720
tcttgacaa aactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	780
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctcgag	840
gtcacatgct tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtag	900
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	960
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	1020
tacaagtgc aaggctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaa	1080
gccaaggggc agcccccaga accacagggt tacaccctgc ccccatcacg ggtgagctg	1140
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccg cgacatcgcc	1200
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg	1260
gactccgacg gtccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag	1320
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	1380
aagagcctct cccgtcccc gggtaaa	1407

[0167]

[0168] 경쇄에 대한 핵산 서열은 하기이다:

```

atggagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcctgccttc cttaagccag      60
tccgcctga cccagcctgc ctccgtgtct ggctccctg gccagtcac caccatcagc      120
tgcacccggca cctccagcga cgtgggcggc tacaactacg tgtcctggta tcagcagcac      180
cccgcaagg ccccccaagct gatgatctac gacgtgtcca accggccctc cggcgtgtcc      240
aacagattct ccggctccaa gtccggcaac accgcctccc tgaccatcag cggactgcag      300
gcagaggacg aggccgacta ctactgctcc tcctacaccc cctccagcac cagagtgttc      360
ggcacccggca caaaaagtgac cgtgctggc cagcccaagg ccaacccaa cgtgacactg      420
ttccccccat cctccgagga actgcaggcc aacaaggcca ccctggtctg cctgatctca      480
gatttctatc caggcgccgt gaccgtggcc tggaggctg atggctcccc agtgaaggcc      540
ggcgtggaaa ccaccaagcc ctccaagcag tccaacaaca aatacgccgc ctccctctac      600
ctgtccctga cccccggca gtggaaagtcc caccggtcct acagctgcca ggtcacacac      660
gagggtctcca ccgtggaaaa gaccgtcgcc cccacccgagt gctca      705

```

[0169]

[0170] 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩에 사용될 수 있는 추가적인 예시적인 항-PD-L1 항체는 미국 특히 출원 공개 US 2010/0203056에 기재되어 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 항체 모이어티는 YW243.55S70이다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 항체 모이어티는 MPDL3280A이다.

[0171]

추가 실시양태에서, 본 발명은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-PD-L1 항체 모이어티의 사용을 특색으로 하며, 여기서:

[0172] (a) 중쇄 서열은 하기 중쇄 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖고:

[0173] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY  
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS (서열식별번호: 12)

[0174] (b) 경쇄 서열은 하기 경쇄 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖는다:

[0175] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGLTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGT  
KVEIKR (서열식별번호: 13).

[0176] 구체적 측면에서, 서열 동일성은 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%이다.

[0177] 추가 실시양태에서, 본 발명은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-PD-L1 항체 모이어티의 사용을 특색으로 하며, 여기서:

[0178] (a) 중쇄 가변 영역 서열은 하기이고:

[0179] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY  
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS (서열식별번호: 12)

[0180] (b) 경쇄 가변 영역 서열은 하기이다:

[0181] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGLTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGT  
KVEIKR (서열식별번호: 13).

[0182] 추가 실시양태에서, 본 발명은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는 항-PD-L1 항체 모이어티를 특색으로 하며, 여기서.

[0183] (a) 중쇄 가변 영역 서열은 하기이고:

[0184] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHW  
PGFDYWGQGTLVTVSA (서열식별번호: 14)

[0185] (b) 경쇄 가변 영역 서열은 하기이다:

[0186] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGLTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGT  
KVEIKR (서열식별번호: 13).

- [0187] 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩에 사용될 수 있는 추가의 예시적인 항-PD-L1 항체는 미국 특허 공개 US 7,943,743에 기재되어 있다.
- [0188] 본 발명의 한 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 MDX-1105이다.
- [0189] 추가 실시양태에서, 항-PD-L1 항체는 MEDI-4736이다.
- [0190] 불변 영역
- [0191] 본 발명의 조합 요법에 사용하기 위한 단백질 및 웨티드는 이뮤노글로불린의 불변 영역, 또는 불변 영역의 단편, 유사체, 변이체, 돌연변이체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 불변 영역은 인간 이뮤노글로불린 중쇄, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 다른 부류로부터 유래된다. 한 실시양태에서, 불변 영역은 CH2 도메인을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 불변 영역은 CH2 및 CH3 도메인을 포함하거나, 또는 힌지-CH2-CH3을 포함한다. 대안적으로, 불변 영역은 힌지 영역, CH2 도메인 및/또는 CH3 도메인의 모두 또는 일부를 포함할 수 있다.
- [0192] 한 실시양태에서, 불변 영역은 Fc 수용체에 대한 친화도를 감소시키거나 또는 Fc 이펙터 기능을 감소시키는 돌연변이를 함유한다. 예를 들어, 불변 영역은 IgG 중쇄의 불변 영역 내의 글리코실화 부위를 제거하는 돌연변이를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 불변 영역은 IgG1의 Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Asn297, 또는 Pro331 (아미노산은 EU 명명법에 따라 넘버링됨)에 상응하는 아미노산 위치에서 돌연변이, 결실 또는 삽입을 함유한다. 특정한 실시양태에서, 불변 영역은 IgG1의 Asn297에 상응하는 아미노산 위치에서 돌연변이를 함유한다. 대안적 실시양태에서, 불변 영역은 IgG1의 Leu281, Leu282, Gly283, Gly284, Asn344, 또는 Pro378에 상응하는 아미노산 위치에서 돌연변이, 결실 또는 삽입을 함유한다.
- [0193] 일부 실시양태에서, 불변 영역은 인간 IgG2 또는 IgG4 중쇄로부터 유래된 CH2 도메인을 함유한다. 바람직하게는, CH2 도메인은 CH2 도메인 내의 글리코실화 부위를 제거하는 돌연변이를 함유한다. 한 실시양태에서, 돌연변이는 IgG2 또는 IgG4 중쇄의 CH2 도메인 내의 Gln-Phe-Asn-Ser (서열식별번호: 15) 아미노산 서열 내의 아스파라긴을 변경시킨다. 바람직하게는, 돌연변이는 아스파라긴을 글루타민으로 변화시킨다. 대안적으로, 돌연변이는 Gln-Phe-Asn-Ser (서열식별번호: 15) 아미노산 서열 내의 폐닐알라닌 및 아스파라긴 둘 다를 변경시킨다. 한 실시양태에서, Gln-Phe-Asn-Ser (서열식별번호: 15) 아미노산 서열은 Gln-Ala-Gln-Ser (서열식별번호: 16) 아미노산 서열로 대체된다. Gln-Phe-Asn-Ser (서열식별번호: 15) 아미노산 서열 내의 아스파라긴은 IgG1의 Asn297에 상응한다.
- [0194] 또 다른 실시양태에서, 불변 영역은 CH2 도메인, 및 힌지 영역의 적어도 일부를 포함한다. 힌지 영역은 이뮤노글로불린 중쇄, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 다른 부류로부터 유래될 수 있다. 바람직하게는, 힌지 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 다른 적합한 부류로부터 유래된다. 보다 바람직하게는, 힌지 영역은 인간 IgG1 중쇄로부터 유래된다. 한 실시양태에서, IgG1 힌지 영역의 Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys (서열식별번호: 17) 아미노산 서열 내의 시스테인이 변경된다. 바람직한 실시양태에서, Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys (서열식별번호: 17) 아미노산 서열이 Pro-Lys-Ser-Ser-Asp-Lys (서열식별번호: 18) 아미노산 서열로 대체된다. 한 실시양태에서, 불변 영역은 제1 항체 이소형으로부터 유래된 CH2 도메인, 및 제2 항체 이소형으로부터 유래된 힌지 영역을 포함한다. 구체적 실시양태에서, CH2 도메인은 인간 IgG2 또는 IgG4 중쇄로부터 유래되는 한편, 힌지 영역은 변경된 인간 IgG1 중쇄로부터 유래된다.
- [0195] Fc 부분과 비-Fc 부분의 접합부 근처의 아미노산의 변경은 Fc 융합 단백질의 혈청 반감기를 극적으로 증가시킬 수 있다 (PCT 공개 WO 01/58957, 그의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨). 따라서, 본 발명의 단백질 또는 폴리웨티드의 접합부 영역은 이뮤노글로불린 중쇄 및 에리트로포이에틴의 자연-발생 서열에 비해 바람직하게는 접합부 지점으로부터 약 10개 아미노산 내에 있는 변경을 함유할 수 있다. 이들 아미노산 변화는 소수성의 증가를 유발할 수 있다. 한 실시양태에서, 불변 영역은 C-말단 리신 잔기가 대체된 IgG 서열로부터 유래된다. 바람직하게는, 혈청 반감기를 추가로 증가시키기 위해 IgG 서열의 C-말단 리신은 비-리신 아미노산, 예컨대 알라닌 또는 류신으로 대체된다. 또 다른 실시양태에서, 불변 영역은 잠재적인 접합부 T-세포 에피토프를 제거하기 위해 불변 영역의 C-말단 근처의 Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 아미노산 서열이 변경된 IgG 서열로부터 유래된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, Leu-Ser-Leu-Ser 아미노산 서열은 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20) 아미노산 서열로 대체된다. 다른 실시양태에서, Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 절편 내의 아미노산은 다른 아미노산 예컨대 글리신 또는 프롤린으로 대체된다. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 다른 이뮤노글로불린 부류 문자의 C-말단 근처의 Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 절편의 아미노산 치환을 생성하는 상세한

방법이 미국 특허 공개 번호 2003/0166877에 기재되어 있고, 그의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0196]

본 발명에 적합한 힌지 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 및 다른 이뮤노글로불린 부류로부터 유래될 수 있다. IgG1 힌지 영역은 3개의 시스테인을 갖고, 이 중 2개는 이뮤노글로불린의 2개의 중쇄 사이의 디슬피드 결합에 수반된다. 이들 동일한 시스테인은 Fc 부분 사이에 효율적이고 일관적인 디슬피드 결합 형성을 가능하게 한다. 따라서, 본 발명의 바람직한 힌지 영역은 IgG1, 보다 바람직하게는 인간 IgG1로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG1 힌지 영역 내의 제1 시스테인은 또 다른 아미노산, 바람직하게는 세린으로 돌연변이된다. IgG2 이소형 힌지 영역은 4개의 디슬피드 결합을 갖고, 이는 재조합 시스템에서 분비 동안 올리고머화 및 가능하게는 부정확한 디슬피드 결합을 촉진하는 경향이 있다. 적합한 힌지 영역이 IgG2 힌지로부터 유래될 수 있고; 바람직하게는 처음 2개의 시스테인이 각각 또 다른 아미노산으로 돌연변이된다. IgG4의 힌지 영역은 쇄간 디슬피드 결합을 비효율적으로 형성하는 것으로 공지되어 있다. 그러나, 본 발명에 적합한 힌지 영역은, 바람직하게는 중쇄-유래 모이어티 사이의 디슬피드 결합의 정확한 형성을 증진시키는 돌연변이를 함유하는 IgG4 힌지 영역으로부터 유래될 수 있다 (Angal S, et al. (1993) Mol. Immunol., 30:105-8).

[0197]

본 발명에 따르면, 불변 영역은 상이한 항체 이소형으로부터 유래된 CH2 및/또는 CH3 도메인 및 힌지 영역, 즉, 하이브리드 불변 영역을 함유할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 불변 영역은 IgG2 또는 IgG4로부터 유래된 CH2 및/또는 CH3 도메인 및 IgG1로부터 유래된 돌연변이체 힌지 영역을 함유한다. 대안적으로, 또 다른 IgG 하위부류로부터의 돌연변이체 힌지 영역이 하이브리드 불변 영역에 사용된다. 예를 들어, 2개의 중쇄 사이의 효율적인 디슬피드 결합을 가능하게 하는 IgG4 힌지의 돌연변이체 형태가 사용될 수 있다. 또한 처음 2개의 시스테인이 각각 또 다른 아미노산으로 돌연변이된 IgG2 힌지로부터 돌연변이체 힌지가 유래될 수 있다. 이러한 하이브리드 불변 영역의 어셈블리는 미국 특허 공개 번호 2003/0044423에 기재되어 있고, 그의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0198]

본 발명에 따르면, 불변 영역은 본원에 기재된 1개 이상의 돌연변이를 함유할 수 있다. Fc 부분에서의 돌연변이의 조합은 이중기능적 분자의 연장된 혈청 반감기 및 증가된 생체내 효력에 대해 상가적 또는 상승작용적 효과를 가질 수 있다. 따라서, 하나의 예시적 실시양태에서, 불변 영역은 (i) Leu-Ser-Leu-Ser (서열식별번호: 19) 아미노산 서열이 Ala-Thr-Ala-Thr (서열식별번호: 20) 아미노산 서열로 대체된 IgG 서열로부터 유래된 영역; (ii) 리신 대신 C-말단 알라닌 잔기; (iii) 상이한 항체 이소형으로부터 유래된 CH2 도메인 및 힌지 영역, 예를 들어, IgG2 CH2 도메인 및 변경된 IgG1 힌지 영역; 및 (iv) IgG2-유래된 CH2 도메인 내의 글리코실화 부위를 제거하는 돌연변이, 예를 들어, IgG2-유래된 CH2 도메인 내의 Gln-Phe-Asn-Ser (서열식별번호: 15) 아미노산 서열 대신 Gln-Ala-Gln-Ser (서열식별번호: 16) 아미노산 서열을 함유할 수 있다.

[0199]

항체 단편

[0200]

본 발명의 조합 요법에 사용하기 위한 본 발명의 단백질 및 폴리펩티드는 또한 항체의 항원-결합 단편을 포함할 수 있다. 예시적인 항체 단편은 scFv, Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, 및 단일 도메인 VHH 단편 예컨대 낙타류 기원의 단편을 포함한다.

[0201]

단일쇄 항체 (scFv)로도 공지되어 있는 단일쇄 항체 단편은 전형적으로 항원 또는 수용체에 결합하는 재조합 폴리펩티드이고; 이를 단편은 1개 이상의 상호연결 링커의 존재 또는 부재 하에 항체 가변 경쇄 서열 (V<sub>L</sub>)의 적어도 1개의 단편에 테더링된 항체 가변 중쇄 아미노산 서열 (V<sub>H</sub>)의 적어도 1개의 단편을 함유한다. 이러한 링커는 V<sub>L</sub> 및 V<sub>H</sub> 도메인이 연결되면 V<sub>L</sub> 및 V<sub>H</sub> 도메인의 적절한 3차원 폴딩이 발생하는 것을 확실하게 하여 단일쇄 항체 단편이 유래되는 전체 항체의 표적 분자 결합-특이성을 유지하도록 선택된 짧은 가요성 웹티드일 수 있다. 일반적으로, V<sub>L</sub> 또는 V<sub>H</sub> 서열의 카르복실 말단이 이러한 웹티드 링커에 의해 상보적 V<sub>L</sub> 또는 V<sub>H</sub> 서열의 아미노산 말단에 공유 연결된다. 분자 클로닝, 항체 파지 디스플레이 라이브러리 또는 유사한 기술에 의해 단일쇄 항체 단편이 생성될 수 있다. 이를 단백질은 진핵 세포 또는 박테리아를 포함한 원핵 세포에서 생산될 수 있다.

[0202]

단일쇄 항체 단편은 본 명세서에 기재된 전체 항체의 가변 영역 또는 CDR 중 적어도 1개를 갖는 아미노산 서열을 함유하지만, 그러한 항체의 불변 도메인 중 일부 또는 모두는 결여되어 있다. 이들 불변 도메인은 항원 결합에 필요하지 않지만, 전체 항체의 구조의 주요 부분을 구성한다. 따라서 단일쇄 항체 단편은 불변 도메인의 일부 또는 모두를 함유하는 항체를 사용하는 것과 연관된 문제 중 일부를 극복할 수 있다. 예를 들어, 단일쇄 항체 단편은 생물학적 분자와 중쇄 불변 영역 사이의 바람직하지 않은 상호작용, 또는 다른 원치 않는 생물학적 활성이 없는 경향이 있다. 추가적으로, 단일쇄 항체 단편은 전체 항체보다 상당히 더 작고, 따라서 전체 항체 보다 더 큰 모세관 투과성을 가져, 단일쇄 항체 단편이 표적 항원 결합 부위에 보다 효율적으로 국재화하고 결

합하게 할 수 있다. 또한, 항체 단편은 원핵 세포에서 비교적 대규모로 생산될 수 있어서, 그의 생산을 용이하게 할 수 있다. 또한, 단일쇄 항체 단편의 비교적 작은 크기는 그것이 수용자에서 면역 반응을 유발할 가능성을 전체 항체보다 더 낮게 한다.

[0203] 전체 항체의 것과 동일하거나 대등한 결합 특징을 갖는 항체 단편이 또한 존재할 수 있다. 이러한 단편은 Fab 단편 또는  $F(ab')_2$  단편 중 하나 또는 둘 다를 함유할 수 있다. 항체 단편은 전체 항체의 모든 6개의 CDR을 함유할 수 있지만, 이러한 영역 모두보다 적은, 예컨대 3, 4 또는 5개의 CDR을 함유하는 단편이 또한 기능적이다.

[0204] 단백질 생산

[0205] 항체-시토카인 트랩 단백질은 일반적으로 단백질을 발현하도록 조작된 핵산을 함유하는 포유동물 세포를 사용하여 재조합적으로 생산된다. 적합한 세포주 및 단백질 생산 방법의 한 예가 실시예 1 및 2에 기재되어 있지만, 항체-기반 생물제약을 생산하기 위해 광범위한 적합한 벡터, 세포주 및 단백질 생산 방법이 사용되어 왔고, 이것이 이들 항체-시토카인 트랩 단백질의 합성에 사용될 수 있다.

[0206] 치료 적응증

[0207] 본 발명은 암의 치료 또는 종양 성장의 감소를 위한 조합 요법, 특히 (i) TGF $\beta$ 에 결합할 수 있는 TGF $\beta$ RII 또는 그의 단편 및 면역 체크포인트 단백질, 예컨대 프로그램화된 사멸 리간드 1 (PD-L1)에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 이중기능적 분자 및 (ii) 적어도 1종의 추가의 항암 치료제의 조합에 관한 것이다. 항암 치료제는 예를 들어 방사선, 화학요법제, 생물제제 또는 백신을 포함한다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 조합 요법은 상승작용적 항암 효과를 제공한다.

[0208] 예시적인 암은 결장직장암, 유방암, 난소암, 췌장암, 위암, 전립선암, 신장암, 자궁경부암, 골수종, 림프종, 백혈병, 갑상선암, 자궁내막암, 자궁암, 방광암, 신경내분비암, 두경부암, 간암, 비인두암, 고환암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 흑색종, 기저 세포 피부암, 편평 세포 피부암, 융기성 피부섬유육종, 메르켈 세포 암종, 교모세포종, 신경교종, 육종, 중피종, 및 골수이형성 증후군을 포함한다.

[0209] 1종 이상의 추가의 항암 치료제 시약, 예컨대 화학요법 및/또는 방사선 요법과 조합된, 항-PD-L1/ TGF $\beta$  트랩으로 치료될 암 또는 종양은 종양에서의 PD-L1 및 TGF $\beta$ 의 발현 또는 상승된 발현, 그의 발현 수준과 예후 또는 질환 진행의 상관관계, 및 PD-L1 및 TGF $\beta$ 를 표적화하는 치료에 대한 종양의 감수성에 대한 전임상 및 임상 경험에 기초하여 선택될 수 있다. 이러한 암 또는 종양은 결장직장암, 유방암, 난소암, 췌장암, 위암, 전립선암, 신장암, 자궁경부암, 방광암, 두경부암, 간암, 비소세포 폐암, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 및 중피종을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0210] 제약 조성물

[0211] 또한 본 발명은 본 발명의 치료 방법에 사용하기 위한 치료 유효량의 본원에 기재된 단백질을 함유하는 제약 조성물을 특색으로 한다. 조성물은 다양한 약물 전달 시스템에서 사용을 위해 제제화될 수 있다. 또한 1종 이상의 생리학상 허용되는 부형제 또는 담체가 적절한 제제를 위해 조성물 내에 포함될 수 있다. 본 발명에 사용하기에 적합한 제제는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985]에서 확인된다. 약물 전달 방법의 간략한 검토를 위해, 예를 들어, 문헌 [Langer (Science 249:1527-1533, 1990)]을 참조한다.

[0212] 제약 조성물은 치유적 치료를 위해, 예컨대 경피 수단에 의해, 비경구, 비강내, 국소, 경구 또는 국부 투여용으로 의도된다. 제약 조성물은 비경구로 (예를 들어, 정맥내, 근육내 또는 피하 주사에 의해), 또는 경구 섭취에 의해, 또는 혈관 또는 암 상태에 의해 이환된 구역에의 국소 적용 또는 관절내 주사에 의해 투여될 수 있다. 추가의 투여 경로는 혈관내, 동맥내, 종양내, 복강내, 뇌실내, 경막외내, 뿐만 아니라 비강, 안부, 공막내, 안와내, 직장, 국소, 또는 에어로졸 흡입 투여를 포함한다. 따라서, 본 발명은 허용되는 담체, 바람직하게는 수성 담체, 예를 들어, 물, 완충수, 염수, PBS 등에 용해되거나 혼탁된 상기 언급된 작용제를 포함하는 비경구 투여를 위한 조성물을 제공한다. 조성물은 생리학적 조건에 근접하는데 요구되는 바와 같은 제약상 허용되는 보조 물질, 예컨대 pH 조정제 및 완충제, 장성 조정제, 습윤제, 세제 등을 함유할 수 있다. 또한 본 발명은 경구 전달을 위한 조성물을 제공하고, 이는 정제, 캡슐 등의 제제를 위한 불활성 성분 예컨대 결합제 또는 충전제를 함유할 수 있다. 추가로, 본 발명은 국부 투여를 위한 조성물을 제공하고, 이는 크림, 연고 등의 제제를 위한 불활성 성분 예컨대 용매 또는 유화제를 함유할 수 있다.

[0213] 이들 조성물은 통상적인 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있거나 또는 멸균 여과될 수 있다. 생성된 수용액은 그대

로 사용되도록 포장될 수 있거나, 동결건조될 수 있고, 동결건조된 제제는 투여 전에 멸균 수성 담체와 조합된다. 제제의 pH는 전형적으로 3 내지 11, 보다 바람직하게는 5 내지 9 또는 6 내지 8, 가장 바람직하게는 7 내지 8, 예컨대 7 내지 7.5일 것이다. 생성된 고체 형태의 조성물은 각각 고정량의 상기 언급된 작용제 또는 작용제들을 함유하는 다수의 단일 용량 단위로, 예컨대 정제 또는 캡슐의 밀봉 포장으로 포장될 수 있다. 고체 형태의 조성물은 또한 탄력적인 양을 위한 용기 내에, 예컨대 국소로 적용가능한 크림 또는 연고용으로 설계된 짤 수 있는 튜브 내에 포장될 수 있다.

#### [0214] 치료

본 발명의 임의의 측면에 따른 투여량 및 치료 지속기간을 결정하는 것은 관련 기술분야의 전문가의 기술범위내의 것이다. 통상의 기술자는 치료를 시작할지, 계속할지, 중단할지, 또는 재개할지 여부를 결정하기 위해 환자를 용이하게 모니터링할 수 있다. 본 발명의 조합 치료 방법을 수행하기 위한 항체-TGF $\beta$  트랩, 항암 치료제의 양, 또는 방사선의 투여량은 치료될 상태, 환자의 전반적 건강, 및 투여 방법, 경로 및 용량과 같은 인자에 따라 달라질 것이다.

[0216] 특정 실시양태에 따르면 항체-TGF $\beta$  트랩 및 적어도 1종의 추가의 항암제는 특정 유형의 암을 치료하기 위해 사용되는 것으로 알려진 치료량으로 투여된다. 다른 실시양태에 따르면, 본 발명의 조합 요법과 연관되어 관찰되는 상승작용적 효과로 인해, 항체-TGF $\beta$  트랩 및 적어도 1종의 추가의 항암제는 암을 치료하기 위해 단독요법에서 사용되는 것으로 알려진 치료량보다 낮은 양으로 투여될 수 있다.

[0217] 항체-TGF $\beta$  트랩의 최적 용량은 시토카인 트랩이 매우 과량으로 사용되기 때문에 최대 치료 효과를 달성하기 위해 항체 모이어티에 의한 퍼센트 수용체 점유율에 기초한다. 예를 들어, 세포 수용체를 표적화하는 모노클로날 항체에 대한 치료 용량은 최저 수준이 약 10 내지 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 즉 60 내지 600 nM이도록 결정된다 (해리 상수 ( $K_D$ )가 6 nM인 항체의 경우, 이러한 최저 수준은 세포 상의 표적 수용체의 90 내지 99%가 항체에 의해 점유되는 것을 보장할 것이다). 이는 전형적으로 순환에서 pg 내지 ng/ml로 존재하는 시토카인을 매우 초과한다.

[0218] 본 발명의 치료 방법에 사용하기 위한 항체-TGF $\beta$  트랩 폴리펩티드의 최적 용량은 치료되는 질환, 질환의 중증도, 및 부작용의 존재에 좌우될 것이다. 최적 용량은 상용 실험에 의해 결정될 수 있다. 비경구 투여의 경우, 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg, 대안적으로 0.5 mg/kg 내지 50 mg/kg, 대안적으로, 1 mg/kg 내지 25 mg/kg, 대안적으로, 10 mg/kg 내지 25 mg/kg, 대안적으로, 5 mg/kg 내지 20 mg/kg, 대안적으로 2 mg/kg 내지 10 mg/kg, 대안적으로, 5 mg/kg 내지 10 mg/kg의 용량이 투여되고, 예를 들어, 치료 주기 당 매주 1회, 격주 1회, 3주마다 1회, 또는 매월 1회 제공될 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 조합 요법으로 치료 효과를 달성하기 위해 요구되는 항체-TGF $\beta$  트랩의 유효 용량은 유사한 치료 효과를 달성하기 위해 항체-TGF $\beta$  트랩 단독요법에서 요구되는 것보다 적을 것이다.

[0219] 본 발명의 일부 실시양태에서, 유효 용량은 유사한 치료 효과를 달성하기 위해 항체-TGF $\beta$  트랩 단독요법에서 요구되는 것보다 약 2-10배 적을 것이다. 또 다른 실시양태에서, 유효 용량은 유사한 치료 효과를 달성하기 위해 항체-TGF $\beta$  트랩 단독요법에서 요구되는 것보다 약 2-5배 적을 것이다.

[0220] 암의 치료를 위해 항체-TGF $\beta$  트랩과 조합하여 사용하기 위한, 추가의 화학요법제 시약 또는 방사선 요법의 유효 투여량은 사용되는 특정한 화합물 또는 제약 조성물, 투여 방식, 치료될 상태 및 치료될 상태의 중증도에 따라 달라질 수 있다. 통상의 지식의 의사 또는 임상의는 암의 진행을 치료 또는 예방하기 위해 필요한 각각의 추가의 화학요법제 시약 또는 방사선의 유효량을 용이하게 결정할 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 본 발명의 조합 요법에서 치료 효과를 달성하는데 요구되는 추가의 화학요법제 시약 또는 방사선 요법의 유효 용량은 유사한 치료 효과를 달성하기 위해 화학요법제 또는 방사선 단독요법에서 요구되는 것보다 적을 것이다.

[0221] 본 발명의 방법에 따르면, 화학요법제는 암을 치료하거나 종양 성장을 감소시키기 위해 항체-시토카인 트랩 분자와 조합되어 투여될 수 있다. 이러한 화학요법제는, 예를 들어, 알킬화제, 항대사물, 안트라시클린, 식물 알칼로이드, 토포이소머라제 억제제, 항신생물성 항생제, 호르몬제, 항혈관신생제, 분화 유도제, 세포 성장 정지 유도제, 아폽토시스 유도제, 세포독성제, 및 다른 항종양제를 포함한다. 이러한 약물은 세포 분열 또는 DNA 합성 및 기능에 어떠한 방식으로든 영향을 미칠 수 있다. 대표적인 화학요법제는 알킬화제 (예컨대 시스플라틴, 카르보플라틴, 옥살리플라틴, 메클로레타민, 시클로포스파미드, 클로람부실, 다카르바진, 로무스틴, 카르무스틴, 프로카르바진, 클로람부실 및 이포스파미드), 항대사물 (예컨대 플루오로우라실 (5-FU), 켐시타빈, 메토트렉세이트, 시토신 아라비노시드, 플루다라빈, 및 플록수리딘), 항유사분열제 (탁산 예컨대 파클리탁셀 및 도세탁셀 및 빈카 알칼로이드 예컨대 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈, 및 빈데신 포함), 안트라시클린 (독소

루비신, 다우노루비신, 발루비신, 이다루비신, 및 에피루비신, 뿐만 아니라 악티노마이신 예컨대 악티노마이신 D 포함), 세포독성 항생제 (미토마이신, 플리카마이신, 및 블레오마이신 포함), 및 토포이소머라제 억제제 (캄프로테신 예컨대 이리노테칸 및 토포테칸, 및 에피포도필로토신의 유도체 예컨대 암사크린, 에토포시드, 에토포시드 포스페이트, 및 테니포시드 포함)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0222] 특정 실시양태에서, 백금-기반 치료제 예컨대 시스플라틴, 카르보플라틴 및 옥살리플라틴이 사용된다. 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 분자와의 조합으로부터 치료 및 효과가 이익을 얻을 수 있는 다른 항암제는 DNA 합성을 방해하는 항대사물, 예컨대 플루오로우라실 (5-FU)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 1종 이상의 화학요법제의 조합이 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 분자와 함께 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, 1종 이상의 화학요법제의 조합이 방사선요법 및 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 분자와 함께 투여될 수 있다.

[0223] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 옥살리플라틴은  $20 \text{ mg}/\text{m}^2$  내지  $200 \text{ mg}/\text{m}^2$ , 대안적으로  $40 \text{ mg}/\text{m}^2$  내지  $160 \text{ mg}/\text{m}^2$ , 대안적으로,  $60 \text{ mg}/\text{m}^2$  내지  $145 \text{ mg}/\text{m}^2$ , 대안적으로,  $85 \text{ mg}/\text{m}^2$  내지  $135 \text{ mg}/\text{m}^2$ , 대안적으로  $40 \text{ mg}/\text{m}^2$  내지  $65 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 용량으로 투여될 수 있다.

[0224] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 5-FU는  $100 \text{ mg}/\text{m}^2$  내지  $3000 \text{ mg}/\text{m}^2$ , 대안적으로,  $250 \text{ mg}/\text{m}^2$  내지  $2400 \text{ mg}/\text{m}^2$ , 대안적으로,  $400 \text{ mg}/\text{m}^2$  내지  $1500 \text{ mg}/\text{m}^2$ , 대안적으로,  $200 \text{ mg}/\text{m}^2$  내지  $600 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 용량으로 투여될 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 5-FU 용량은, 예를 들어, 연장된 시간 기간에 걸쳐 주입에 의해 투여될 수 있다.

[0225] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 5-FU의 효과를 증진시키거나 또는 화학요법과 연관된 부작용을 감소시키기 위해 류코보린이 또한 투여될 수 있다.

[0226] 본 발명의 구체적 실시양태에서, 하기 화학치료 요법은 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 분자와 조합하여 사용하기 위한 예로서 제공된다. 제1일에, 옥살리플라틴  $85 \text{ mg}/\text{m}^2$  및 류코보린  $200 \text{ mg}/\text{m}^2$ 가 투여되고 이어서 2시간 후 5-FU  $400 \text{ mg}/\text{m}^2$  볼루스 및 5-FU  $600 \text{ mg}/\text{m}^2$  주입이 투여된다. 제2일에, 류코보린  $200 \text{ mg}/\text{m}^2$ 가 투여되고, 이어서 2시간 후 5-FU  $400 \text{ mg}/\text{m}^2$  볼루스 및 5-FU  $600 \text{ mg}/\text{m}^2$  주입이 투여된다.

[0227] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 화학치료 요법은 예를 들어 제1일의 옥살리플라틴  $85 \text{ mg}/\text{m}^2$  용량, 류코보린  $400 \text{ mg}/\text{m}^2$  용량, 5-FU  $400 \text{ mg}/\text{m}^2$  IV 볼루스 용량 및 5-FU  $600 \text{ mg}/\text{m}^2$  주입에 이어서,  $1200 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{일} \times 2\text{일}$  (46-48시간에 걸쳐 총  $2400 \text{ mg}/\text{m}^2$ ) IV 연속 주입의 투여를 포함한다. 치료는 2주마다 반복된다.

[0228] 또 다른 실시양태에서, 류코보린  $400 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 2시간 주입이 투여된 다음 5-FU  $2400 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 46-시간 주입이 투여된다. 옥살리플라틴은 또한 제1일에  $130 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 용량으로 2시간 동안 주입된다. 치료는 2주마다 반복된다.

[0229] 본 발명의 방법에 따르면, 방사선은 암을 치료하기 위해 항체-시토카인 트랩 분자와 조합하여 투여될 수 있다. 방사선 요법은 전형적으로, 세포 DNA에서 돌연변이를 유도함으로써 암 세포를 근절하기 위해 고-에너지 입자 또는 파장, 예컨대 X선 및 감마선을 사용한다. 암 세포는 정상 세포보다 더 신속하게 분열하여, 종양 조직이 정상 조직보다 방사선에 더 감수성하게 만든다. 방사선의 선량이 유의한 부정적 부작용 없이 환자에게 허용되는 한, 임의의 유형의 방사선이 환자에게 투여될 수 있다. 적합한 유형의 방사선요법은, 예를 들어, 이온화 방사선 (예를 들어, X선, 감마선, 또는 높은 선형 에너지 방사선)을 포함한다. 이온화 방사선은 이온화, 즉 전자의 획득 또는 상실을 생성하기에 충분한 에너지를 갖는 입자 또는 광자를 포함하는 방사선으로 정의된다. 방사선의 효과는 임상의에 의해 적어도 부분적으로 제어될 수 있다. 방사선의 선량은 바람직하게는 최대 표적 세포 노출 및 감소된 독성을 위해 분획화된다. 방사선은 종양 세포의 사멸을 증진시키는 방사선증감제, 또는 방사선의 유해 효과로부터 건강한 조직을 보호하는 방사선보호제 (예를 들어, IL-1 또는 IL-6)와 공동으로 투여될 수 있다. 유사하게, 열 적용, 즉, 고온요법 또는 화학요법이 조직을 방사선에 대해 감작화시킬 수 있다.

[0230] 방사선의 공급원은 환자에 대해 외부 또는 내부일 수 있다. 외부 방사선 요법이 가장 통상적이고, 전형적으로, 예를 들어, 선형 가속기를 사용하여 고-에너지 방사선의 빔 (입자 빔)이 피부를 통해 종양 부위로 향하게 하는 것을 수반한다. 방사선 빔이 종양 부위에 국재화되면, 정상인 건강한 조직의 노출을 피하는 것은 거의 불가능하다. 그러나, 외부 방사선은 통상적으로 환자에 의해 잘 용인된다.

[0231] 또 다른 예에서, 방사선은 감마선을 사용하여 환자에게 외부에서 공급된다. 감마선은 방사성동위원소 예컨대

코발트 60의 파괴에 의해 생산된다. 정위 신체 방사선 요법 (SBRT)으로 불리는 치료 접근법을 사용하면, 감마선은 오직 표적 종양 조직에만 치밀하게 접촉될 수 있어서, 매우 적은 건강한 조직만이 손상된다. SBRT는 국부 종양을 갖는 환자에게 사용될 수 있다. 다른 한편으로는, 신체의 보다 넓은 구역에 걸쳐 방사선을 투여하는데 입자 가속기에 의해 생산된 X선이 사용될 수 있다.

[0232] 내부 방사선 요법은 방사선-방출 공급원, 예컨대 비드, 와이어, 펠럿, 캡슐 등을 신체 내 종양 부위에 또는 그 근처에 이식하는 것을 수반한다. 사용되는 방사선은 방사성동위원소 예컨대, 비제한적으로, 아이오딘, 스트론튬, 인, 팔라듐, 세슘, 이리듐, 포스페이트 또는 코발트에서 유래한다. 이러한 이식물은 치료 후 제거될 수 있거나, 또는 신체 내에서 불활성으로 남겨질 수 있다. 내부 방사선 요법의 유형은 근접요법, 간질 조사, 및 체강내 조사를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 현재 덜 흔한 형태의 내부 방사선 요법은 예컨대 방사성 물질에 결합된 종양-특이적 항체를 환자에게 투여하는 방사선면역요법에 의한, 방사성동위원소의 생물학적 담체를 수반한다. 항체는 종양 항원에 결합하며, 그에 의해 방사선 선량이 관련 조직에 효과적으로 투여된다.

[0233] 방사선 요법은 원발성 종양의 성장을 제어하는 요법의 구성요소로서 유용하다 (예를 들어 문헌 [Comphausen et al. (2001) "Radiation Therapy to a Primary Tumor Accelerates Metastatic Growth in Mice," Cancer Res. 61:2207-2211] 참조). 방사선 요법 단독은 암을 치료하는데 덜 효과적일 수 있지만, 방사선을 본원에 기재된 바와 같은 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 분자와 조합한 것은 방사선 요법의 국부 및 전신 효능을 증진시킬 수 있다.

[0234] 방사선은 면역 이팩터 세포를 사멸시키기 때문에, 방사선의 선량 및 시기는 중요하다. 조사된 종양에서 T 세포 및 수지상 세포는 조사 직후 감소하지만; T-세포 수준은 기준선 수준보다 더 높이 반등한다. 투여 방법에 관계 없이, 방사선의 완전한 1일 선량은 1일 과정에 걸쳐 투여될 수 있다. 바람직하게는, 총 용량은 수일에 걸쳐 분획화되어 투여된다. 따라서, 방사선의 1일 용량은 대략 1-50 Gy/일, 예를 들어, 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 1-4, 1-10, 1-20, 1-50, 2-4, 2-10, 2-20, 2-25, 2-50, 3-4, 3-10, 3-20, 3-25, 3-50 Gy/일을 포함할 것이다.

[0235] 1일 용량은 단일 용량으로서 투여될 수 있거나, 또는 1일 과정에 걸쳐 2개 이상의 부분으로 "미세분획화된" 용량으로 투여될 수 있다. 방사선의 내부 공급원, 예를 들어, 근접요법 또는 방사선-면역요법을 사용하는 경우에, 노출 시간은 전형적으로 방사선 강도의 감소에 상응하여 증가할 것이다.

[0236] 본 발명의 일부 실시양태에 따르면, 항체-TGF $\beta$  트랩 및 적어도 1종의 추가의 항암제는 동시에 투여된다. 또 다른 실시양태에 따르면, 항체-TGF $\beta$  트랩 및 적어도 1종의 추가의 항암제는 순차적으로 투여된다.

[0237] 항체-TGF $\beta$  트랩 및 적어도 1종의 추가의 항암 치료제의 투여 빈도는 투여 의사의 판단에 기초하여, 치료 과정에 걸쳐 조정될 수 있다.

[0238] 실시예

[0239] 지금까지 일반적으로 기재된 본 발명은 하기 실시예를 참조하여 보다 용이하게 이해될 것이고, 이는 단지 본 발명의 특정 측면 및 실시양태를 예시하는 목적으로만 포함되고, 어떠한 방식으로도 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0240] 실시예 1 - DNA 구축 및 단백질 발현

[0241] 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩은 항-PD-L1 항체-TGF $\beta$  수용체 II 융합 단백질이다. 분자의 경쇄는 항-PD-L1 항체의 경쇄 (서열식별번호: 1)와 동일하다. 분자의 중쇄 (서열식별번호: 3)는 가요성 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>Gly 링커 (서열식별번호: 11)를 통해 가용성 TGF $\beta$  수용체 II (서열식별번호: 10)의 N-말단에 유전자 융합된 항-PD-L1 항체의 중쇄 (서열식별번호: 2)를 포함하는 융합 단백질이다. 융합 접합부에서, 단백질분해적 절단을 감소시키기 위해 항체 중쇄의 C-말단 리신 잔기를 알라닌으로 돌연변이시켰다. 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩의 발현을 위해, 동일한 발현 벡터 또는 개별 발현 벡터에서 항-PD-L1 경쇄를 코딩하는 DNA (서열식별번호: 4) 및 항-PD-L1/TGF $\beta$  수용체 II를 코딩하는 DNA (서열식별번호: 5)를 사용하여 일시적 또는 안정적 형질감염을 위한 표준 프로토콜을 사용하여 포유동물 세포를 형질감염시켰다. 조건화된 배양 배지를 수거하고, 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 융합 단백질을 표준 단백질 A 세파로스 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 1개의 항-PD-L1 항체 및 2개의 가용성 TGF $\beta$  수용체 II 분자를 포함하는 정제된 단백질 (도 1)은 크기 배제 크로마토그래피 및 비-환원 조건 하에서의 SDS-폴리아크릴아미드 전기영동에서 약 190 킬로달톤의 추정 분자량 (MW)을 가졌다. 환원 조건 하에, 경쇄 및 중쇄는 각각 28 및 75 킬로달톤의 겉보기 MW를 갖는다.

[0242] 유사한 중쇄 융합 폴리펩티드 (서열식별번호: 7) 및 PD-L1에 결합하는 것을 제거하는 가변 영역의 돌연변이

A31G, D52E, R99Y를 갖는 경쇄 (서열식별번호: 6)를 함유하는 항-PD-L1(mut)/TGF $\beta$  트랩 융합 단백질을 유사하게 제조하였다. 이를 후속 실험에서 TGF $\beta$  트랩 대조군으로서 사용하였다.

[0243] 실시예 2 - 생물요법제로서의 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩의 생산

인간 배아 신장 293 (HEK) 세포의 일시적 형질감염에 의해 생산된 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩은 다양한 정도의 클리핑된 종을 함유하는 것으로 확인되었고, 이는 환원 조건 하에 SDS-PAGE에서 겉보기 MW가 약 60 kD인 희미한 밴드로서 나타났다. 이러한 밴드는 융합 접합부에 가까운 TGF $\beta$ RII의 N-말단 부분의 부위에서 절단된 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩의 중쇄인 것으로 확인되었다.

항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩을 발현하는 안정한 클론을 혼탁 배양으로의 무혈청 배지에서의 성장을 위해 사전-적합화된 CHO-S 숙주 세포주에서 생성하였다. 세포를 항-PD-L1-TGF $\beta$ RII 단백질 및 글루타민 신테타제 선택 마커를 코딩하는 유전자를 함유하는 발현 벡터로 형질감염시켰다. L-메티오닌 슬록시민 (MSX)을 사용하여 안정한 구성요소의 후속 선택을 행하였다. 미니풀 접근법을 사용하여 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 발현 세포주를 생성한 다음, 벡톤-디킨슨(Beckton-Dickinson) 형광 활성화된 세포 분류기 (FACS 아리아 II)를 사용하여 384-웰 플레이트 내로 단세포를 침착시켰다. 일반 플랫폼의 유가식 검정에서 성장, 생산성, 및 단백질 품질을 평가하였다. 이들 분석에 기초하여, 14개의 클론을 추가의 연구를 위한 선도 후보로서 선택하였다. 클론의 안정성 연구를 클론의 규모 확장 동안 확립된 리서치 세포 은행으로부터 ~90 PDL (집단 배가 수준)까지 수행하였다. 미니풀 개발의 종결 시에, 일시적 발현에서 관찰된 바와 같이, 중쇄-링커-TGF $\beta$ RII 서브유닛이 클리핑을 거쳤다는 것을 발견하였다. 안정성 연구에서 모든 클론이 클리핑된 종을 생산하였지만, 단백질 A-정제된 물질에서, 무손상 서브유닛 대비 퍼센트 클리핑된 종이 각각의 클론에 따라 다른 것으로 나타났다. 또한, 클리핑된 종의 공동-정제를 감소시키기 위해, 단백질 A 크로마토그래피에 이어지는 강한 양이온 교환으로 이루어진 개선된 정제 방법이 개발되었다. 개선된 방법에 의해서도, 클리핑된 종이 <5%의 요구되는 최종 수준으로 있는 정제된 물질은 오직 낮은 수준의 클리핑을 생성하는 클론을 사용한 경우에만 달성할 수 있었다. 이들 조합 분석에 기초하여, 클론 02B15를 최종 후보 클론으로서 선택하였다. 0 PDL, 30 PDL, 60 PDL 및 90 PDL의 이러한 클론에 의해 발현된 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩의 분석은 클리핑 백분율이 집단 배가 수준에 따라 증가하지 않았음을 나타낸다.

[0246] 실시예 3 - 피하 MC38 종양 마우스 모델에서의 화학요법 및 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩의 조합

결장직장암 (CRC)은 남성에서 세번째, 여성에서는 두번째로 가장 흔한 암이며, 전세계적으로 1백2십만건 초과의 새로운 사례가 존재한다. 지난 수십년에 걸친 치료에서의 유의한 진전에도 불구하고, CRC는 암-관련 사망의 네 번째의 가장 흔한 원인이다. 따라서, 신규 치료 양식이 필요하다. 하기 제시된 작업 실시예에서는, 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 분자의 효능을 결장직장암의 뮤린 모델에서 옥살리플라틴 (Ox) 및 5-플루오로우라실 (5-FU) 기반 요법과 조합하여 조사하였다.

[0248] 피하 MC38 종양을 갖는 마우스에서의 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 및 화학요법제 시약 Ox/5-FU에 의한 조합 치료는 종양 성장의 유의한 억제를 발생시켰다. 이를 전임상 데이터는 임상에서 결장직장암의 치료를 위해 화학요법 (Ox/5-FU)과 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 면역요법을 조합하는 전략을 지지한다.

[0249] 물질 및 방법

[0250] MC38 종양 세포주를 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (ATCC)에서 입수하였다. MC38 세포주를 우발적 바이러스 및 미코플라스마가 부재하는지 시험하고 이를 확인하였다. C57BL/6 마우스는 8-12주령의 것으로 찰스 리버 래보리토리즈(Charles River Laboratories)로부터 입수하였다. B6.129S2-Ighm<sup>tm1Cgn</sup>/J 마우스는 8-12주령의 것으로 잭슨 래보리토리즈(Jackson Laboratories)로부터 입수하였다.

[0251] 시험 물질 용량은 다음과 같았다: 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩: 24.6 mg/kg; 492  $\mu$ g/마우스; 2.46 mg/mL; 0.2 mL 용량 부피가 정맥내로 투여됨. 플루오로우라실 (5-FU): 60.0 mg/kg; 120  $\mu$ g/마우스; 6.00 mg/mL; 0.02 mL 용량 부피가 정맥내로 투여됨. 옥살리플라틴: 5.0 mg/kg; 10  $\mu$ g/마우스 0.500 mg/ml 0.02 mL가 i.p. 투여됨. 값은 mg/kg 단위로 대략적이고, 평균 체중은 마우스당 20 g으로 가정되었다.

[0252] 음성 대조군은 400  $\mu$ g/마우스의 시험 농도로 투여된 불활성 이소형 대조군 (항-PD-L1(mut))이었다.

[0253] 세포 배양. MC38 세포를 10% 열-불활성화된 태아 소 혈청을 함유하는 둘베코 최소 필수 배지 (DMEM)에서 무균 조건 하에 배양하고, 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 유지시켰다. 세포를 생체내 이식 전 총 2 계대 동안, 1:5의 비로 50-70% 전면생장률에 도달하면 계대배양하였다. 세포를 트립신처리에 의해 수거하고, 혈구계 및 트리판 블루 배제 염색을 사용하여 생존 세포 카운트를 결정하였다. 모든 세포 배양 시약은 라이프 테크놀로지스(Life

Technologies) (메릴랜드주 케이더스버그)로부터 구입하였다.

[0254] MC38 종양 모델. 연구 TI13-027에서, MC38 종양 세포 ( $1 \times 10^6$  개 세포/마우스)를 멸균 PBS의  $100 \mu\text{L}$  중에 혼탁시키고, 이를 C57BL/6 마우스의 우측 측복부에 이식하였다. 종양 크기가 평균  $\sim 45 \text{ mm}^3$ 에 도달하면, 마우스를 4개의 군 ( $N=10$  마우스/군)으로 무작위화하여 요법을 개시하였다. 처리는 도 2 및 도 3에 제시된 바와 같은 용량 스케줄에 따라 투여하였다. 종양의 길이 (L), 폭 (W) 및 높이 (H)를 디지털 캘리퍼로 측정하고, 윈웨지 (WinWedge) 소프트웨어를 사용하여 1주에 2회에 컴퓨터에 자동 기록하였다. 체중을 또한 1주에 2회 기록하여 내약성을 평가하였다. 종양 부피는 타원체 부피 공식에 의해 계산하였다: 부피 =  $\pi/6 \times (L \times W \times H)$ ; 여기서 L = 종양의 길이, W = 폭 및 H = 높이. 생체내 연구 지속기간 내내 종양 부피를 측정함으로써 효능을 결정하고, 하기 기재된 바와 같은 연구 종료 시점에 종양 중량을 측정하였다. 제17일에 모든 동물을 희생시키고, 종양을 절제하여 칭량하였다. IFN- $\gamma$  ELISPOT 분석을 위해 비장을 수거하였다.

[0255] 연구 TI14-012에서, MC38 종양 세포를 상기 기재된 바와 같이 B6.129S2-Ighm<sup>t<sub>ml</sub>Cgn</sup>/J 마우스 내로 주사하였다. 종양 성장 및 치료 효능의 평가를 위한 다른 모든 절차가 또한 상기 기재된 바와 같다.

[0256] IFN- $\gamma$  ELISPOT 검정. 효소-연결된 면역흡착 스팟 (ELISPOT) 검정을 사용하여 MC38 종양에서의 공지된 T 세포 거부 에피토프인 p15E 항원에 대한 세포독성 T 림프구 (CTL) 반응을 측정하였다 (Yang and Perry-Lalley J Immunotherapy 2000; 23:177-183). ELISPOT 검정은 p15E 에피토프 KPSWFTTL이 로딩된 항원 제시 세포 (APC)와의 공동-배양 후 IFN- $\gamma$  생산 CD8 $^+$  T 세포의 빈도를 측정한다. 닭 오브알부민 (OVA)으로부터 유래된 비관련 웨პ티드, SIINFEKL이 로딩된 APC를 음성 대조군으로서 제공하였다. 양성 대조군 샘플을 PMA 및 이오노마이신으로 자극하였고, 이는 세포독성 T 림프구의 비-특이적 활성화를 촉발하였다. ELISPOT 검정은 비디 바이오사이언시스(BD Biosciences)로부터의 마우스 IFN- $\gamma$  ELISPOT 키트를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 수행하였다. 연구 TI13-027의 제17일에,  $N=5$  마우스/군의 비장을 수거하고, 이를 단세포 혼탁액으로 프로세싱하고, P15E 웨პ티드로  $1 \mu\text{g/mL}$ 의 최종 농도로 자극한 다음,  $37^\circ\text{C}$ 에서 7일 동안 배양하였다. 시험관내 자극 후, CD8 $^+$  T 세포 단리 키트 (밀테니 바이오테크(Miltenyi Biotech)) 및 오토맥스 프로(AutoMACS Pro) 분리기를 사용하여 자기 활성화된 세포 분류에 의해 CD8 $^+$  T 세포를 단리하였다. 시험관내 자극 ELISPOT 검정을 위한 공동-배양 시스템을 확립하기 위해, 나이브 마우스 비장세포로부터 유래된 APC를 KPSWFTTL 웨პ티드 또는 비관련 SIINFEKL 웨პ티드로 1시간 동안 펄싱한 다음 감마셀 40 이그젝터(GammaCell 40 Exactor)에서 2 Gy로 조사하였다. 실험 마우스로부터 단리된 CD8 $^+$  T 세포 ( $1 \times 10^5$  개 세포/웰)를 웨პ티드-펄싱되고 조사된 APC ( $2.5 \times 10^5$  개 세포/웰)가 담긴 ELISPOT 검정 플레이트 (항-IFN- $\gamma$  항체 코팅됨)에서 삼중으로 배양하였다.

[0257] 연구 TI14-012의 제18일에,  $N=5$  마우스/군의 비장을 수거하고, 이를 단세포 혼탁액으로 프로세싱하고, CD8 $^+$  T 세포 단리 키트 (밀테니 바이오테크) 및 오토맥스 프로 분리기를 사용하여 자기 활성화된 세포 분류에 의해 CD8 $^+$  T 세포를 단리하여 생체의 ELISPOT 검정을 확립하였다. 생체의 ELISPOT 검정을 위한 공동-배양 시스템을 확립하기 위해, 나이브 마우스 비장세포로부터 유래된 APC를 KPSWFTTL 웨პ티드 또는 비관련 SIINFEKL 웨პ티드로 1시간 동안 펄싱한 다음 감마셀 40 이그젝터에서 2 Gy로 조사하였다. 실험 마우스로부터 단리된 CD8 $^+$  T 세포 ( $5 \times 10^5$  개 세포/웰)를 웨პ티드-펄싱되고 조사된 APC ( $5 \times 10^5$  개 세포/웰)가 담긴 ELISPOT 검정 플레이트 (항-IFN- $\gamma$  항체 코팅됨)에서 삼중으로 배양하였다.

[0258] 둘 다의 실험에서, 실험 CD8 $^+$  T 세포를 웨პ티드-펄싱된 APC와  $37^\circ\text{C}$ 에서 19-20시간 동안 공동-배양한 후 검정 플레이트에서 제거하였다. 비오티닐화된 항-IFN- $\gamma$  항체를 플레이트의 각 웰에 첨가한 다음, 세척 단계를 거치고, 이어서 스트렙타비딘-HRP 검출 접합체를 첨가하였다. 또 다른 세척 단계 후에, 플레이트를 발색원성 기질 용액과 함께 인큐베이션하고; 반응을 모니터링한 다음, 플레이트를 물로 헹구어 이를 정지시켰다. 검정 플레이트의 각각의 웰에서의 IFN- $\gamma$  양성 스팟의 수를 CTL-이뮤노스팟 S5UV 분석기 (셀룰라 테크놀로지 리미티드(Cellular Technology Limited))를 사용하여 카운팅하였다. 데이터를 스팟의 평균 수/웰 ± SEM로 나타낸다.

[0259] 사망률 검사는 연구 동안 1일 1회 수행하였다. 임상 관찰. 임상 정후 (예컨대 좋지 않은 건강 및 행동 변화)를 이전에 기재된 바와 같이 (Ullman-Cullere and Foltz, Lab Anim Sci. 1999; 49:319-23) 신체 상태 (BC) 스코어링 시스템을 사용하여 연구 동안 1일 1회 모든 동물에 대해 기록하였다. 빈사상태 마우스는  $\text{CO}_2$  질식에 의

해 인도적으로 안락사시켰다. 연구 중인 모든 동물에 대한 체중을 각각의 군의 종료일을 포함하여 1주에 2회 기록하였다. 디지털 캘리퍼를 사용하여 종양 부피를 3차원으로 측정하고, 실험의 지속기간 동안 원웨지 소프트웨어를 사용하여 1주에 2회에 컴퓨터에 자동 기록하였다. 종양 부피는 타원체 부피 공식을 사용하여 계산하였다: 부피 =  $0.5236 (L \times W \times H)$ ; 여기서 L = 종양의 길이, W = 폭 및 H = 높이. 희생 시점에, 원발성 종양을 절제하고, 2차 효능 종점으로서 칭량하였다. IFN- $\gamma$  생산, P15E-특이적 CD8 $^+$  T 세포의 빈도를 ELISpot 검정에 의해 정량화하였다. 마우스 IFN- $\gamma$  ELISpot 검정은 마우스 IFN- $\gamma$  ELISpot 키트 (비디 바이오사이언시스)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 수행하였다.

[0260] 통계적 분석. 연구 기간 내내 종양 부피를 1주에 2회 측정하였다. 종양 부피 데이터를 평균 ± 표준 오차 (SEM)로 제시하였다. 처리 군의 종양 부피를 대조군의 종양 부피로 나눈 다음 100을 곱하여 종양 성장 억제 % T/C 비를 계산하였다. 종양 부피 데이터를 로그 변환하고, 다중 비교를 위해 터키 보정과 함께 이원, 반복 측정 ANOVA를 수행하여 처리 군 사이의 통계적 차이를 측정하였다. 처리 군의 종양 부피를 대조군의 종양 부피로 나누어 T/C를 계산하였다. 연구 완료 시 종양 중량을 측정하였다. 데이터는 평균 ± SEM으로 나타내었다. 처리 군의 종양 중량을 대조군의 종양 중량으로 나눈 다음 100을 곱하여 % T/C 비를 계산하였다. 다중 비교를 위해 터키 보정과 함께 일원 ANOVA에 의해 종양 중량 데이터를 평가하여 처리 군 사이의 통계적 차이를 측정하였다. IFN- $\gamma$  ELISpot 데이터를 평균 ± SEM으로 표현하였다. 그레프패드 프리즘(GraphPad Prism) 소프트웨어를 사용한 통계적 분석을 위해 다중 비교를 위한 터키 보정과 함께 일원 ANOVA를 사용하였다.  $p<0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 결정하였다.

#### [0261] 결과

[0262] B 세포 적격 마우스에서 완전 인간화 항체에 의해 유발된 면역원성으로 인해, 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 분자는 연구 TI13-027에서 C57BL/6 야생형 마우스에 1주 내에 오직 3회만 투여될 수 있었다. 따라서, 유의한 항종양 활성은 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 단독요법에 의해서는 관찰되지 않았다 (% T/C = 종양 부피의 91%; 도 4 참조). 옥살리플라틴/5-FU 처리는 이소형 대조군과 비교하여 MC38 피하 종양 모델에서 유의한 종양 성장 억제를 유도하였다 (% T/C = 종양 부피의 53.2%;  $p<0.0001$ ). 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 및 옥살리플라틴/5-FU에 의한 조합 요법은 대조군과 비교하여 MC38 종양 성장을 유의하게 억제하였다 (% T/C = 종양 부피의 33.2%;  $p<0.0001$ ). 또한, 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 및 옥살리플라틴/5-FU의 조합은 옥살리플라틴/5-FU 단독에 비해 종양 성장 제어를 유의하게 개선시켰다 ( $439.6 \text{ mm}^3$  vs.  $703.7 \text{ mm}^3$ , 종양 부피;  $p<0.0001$ ). 조합 치료는 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 단독과 비교하여 종양 성장 제어에서 통계적으로 유의한 개선을 생성하여 동일한 추세가 관찰되었다 ( $439.6 \text{ mm}^3$  vs.  $1204.0 \text{ mm}^3$ ;  $p<0.0001$ ) (도 4a-d 및 표 1 참조).

#### [0263] 표 1

[0264] 연구 완료 시 종양 부피, 종양 중량, 및 ELISpot 검정의 결과 (C57BL6 마우스; 연구 TI13-027)

군	처리	종양 부피 ( $\text{mm}^3$ ) <sup>a</sup>	종양 부피의 % T/C	종양 중량 (mg) <sup>a</sup>	종양 중량의 % T/C	IFN- $\gamma$ ELISPOT
G1	이소형 대조군 (항-PD-L1(mut))	$1323.5 \pm 199.1$	100	$1448.5 \pm 220.0$	100	$49.0 \pm 4.0$
G2	항-PD-L1/TGF $\beta$ 트랩	$1204.0 \pm 217.2$	91	$1196.8 \pm 248.8$	82.6	$113.3 \pm 4.5$
G3	옥살리플라틴 + 5-FU	$703.7 \pm 115.6$	53.2	$701.4 \pm 102.8$	48.4	$108.3 \pm 23.6$
G4	옥살리플라틴/5-FU + 항-PD-L1/TGF $\beta$ 트랩	$439.6 \pm 71.1$	33.2	$438.2 \pm 71.9$	30.3	$258.0 \pm 14.3$

#### [0265]

[0266] 마지막으로, 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 단독요법 또는 옥살리플라틴/5-FU 단독요법은 ELISpot 검정에 의해 측정 시 이 소형 대조군과 비교하여 IFN- $\gamma$  생산 CD8 $^+$  T 세포의 빈도를 유의하게 증가시킨다는 것을 관찰하였다 (각각  $p<0.05$  및  $p<0.05$ ). 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 및 옥살리플라틴/5-FU의 조합은 어느 하나의 단독요법 군에 비해 P15E-특이적, IFN- $\gamma$  생산 CD8 $^+$  T 세포의 빈도를 유의하게 증진시켰다 ( $p<0.05$ ; 도 4c 참조).

#### [0267]

연구 TI14-012에서, 인간 항체에 대한 마우스 항체 (MAHA) 반응을 피하기 위해 B 세포 결핍 마우스를 사용하여, 실험 동물을 항-PDL1/TGF $\beta$  트랩으로 5회 처리하였다. 놀랍지 않게도, 야생형 마우스를 단지 3회만 처리한 연구 TI13-027과 비교하여 (% T/C = 종양 부피의 91%) 항-PDL1/TGF $\beta$  트랩 단독요법에 의한 보다 큰 항종양 활성이 관찰되었다 (% T/C = 종양 부피의 57.3%). 연구 TI14-012에서, 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 및 옥살리플라틴/5-FU에 의한 조합 처리는 단독요법 중 어느 하나 ( $p<0.0001$ ) 또는 이소형 대조군 ( $p<0.0001$ )과 비교하여 유의하게

더 효과적이었다 (도 5d 및 표 2 참조).

[0268] 표 2

[0269] 연구 완료 시 종양 부피, 종양 중량, 및 ELISpot 검정의 결과 (B6.129S2-Ighm<sup>t<sub>m1Cgn</sub></sup>/J 마우스; 연구 TI14-012)

군	처리	종양 부피 (mm <sup>3</sup> ) <sup>*</sup>	종양 부피의 % T/C	종양 중량 (mg) <sup>*</sup>	종양 중량의 % T/C	IFN-γ ELISpot
G1	이소형 대조군 (항-PD-L1(mut))	2003.4 ± 122.4	100	2336.2 ± 164.8	100	51.7 ± 5.5
G2	항-PD-L1/TGFβ 트랩	1147.7 ± 234.9	57.3	1265.0 ± 256.5	54.1	160.3 ± 18.5
G3	옥살리플라틴 + 5-FU	743.9 ± 92.4	37.1	822.7 ± 86.0	35.2	107.7 ± 13.0
G4	옥살리플라틴/5-FU + 항-PD-L1/TGFβ 트랩	380.8 ± 74.6	19.0	362.8 ± 70.9	15.5	369.7 ± 39.7

[0270]

[0271] 유사하게, 항-PD-L1/TGFβ 트랩 단독요법은 이소형 대조군과 비교하여 IFN-γ 생산 CD8<sup>+</sup> T 세포의 빈도를 유의하게 증가시켰다 (도 5c 참조; p<0.05). 항-PD-L1/TGFβ 트랩 및 옥살리플라틴/5-FU의 조합 처리는 어느 하나의 단독요법 군 또는 이소형 대조군과 비교하여 P15-특이적, IFN-γ 생산 CD8<sup>+</sup> T 세포의 빈도에서 상승작용적 증가를 발생시켰다 (도 5c 참조; p<0.05).

[0272]

항-PD-L1/TGFβ 트랩은 PD-1/PD-L1 축 및 TGFβ 신호전달의 이중 표적화를 통해 종양 미세환경에서 세포-내인성 및 외인성 면역 억제 둘 다를 반전시키기 위해 설계된 이중기능적 항체-시토카인 수용체 융합 단백질이다. 본원에 기재된 연구에서, 피하 MC38 종양을 갖는 마우스에서의 항-PDL1/TGFβ 트랩 및 0x/5-FU 처리의 조합에 의해 유의한 MC38 종양 성장 억제 및 P15E-특이적 CD8<sup>+</sup> T 세포 IFN-γ 생산의 상승작용적 유도가 관찰되었다. 암 생식 마우스에서 관찰된 항종양 효능 및 면역 반응에 대한 이들 효과는 B 세포 결핍 마우스에서 강조되었다. 차이는 주로 B 세포 결핍 마우스에서의 항-PD-L1/TGFβ 트랩의 보다 많은 용량 횟수의 투여 및 MAHA (인간 항체에 대한 마우스) 반응의 부재로 인한 것으로 여겨진다. 종합하면, 이들 데이터는 화학요법 성분 (0x/5-FU)이 항-PDL1/TGFβ 트랩 요법과 효과적으로 조합되어 마우스 결장직장암 모델에서 종양 성장 억제 및 종양-반응성 CD8<sup>+</sup> T 세포 반응을 증진시킬 수 있다는 것을 입증한다. 결론적으로, 전임상 결과는 임상에서의 결장직장암의 치료를 위해 조합을 지지한다.

[0273]

실시예 4 - 근육내 MC38 종양 마우스 모델에서의 방사선 요법 및 항-PD-L1/TGFβ 트랩의 조합

[0274]

항-PD-L1/TGFβ 트랩 분자는 인간 항-PD-L1 항체의 중쇄의 C-말단에 공유 연결된 인간 TGFβ RII (TGFβ 트랩)의 세포외 도메인으로 구성된다. 항-PD-L1/TGFβ 트랩 단독요법은 다수의 전임상 모델에서 뛰어난 항종양 효능을 제시한 바 있다. 본원에 보고된 연구에서, 본 발명자들은 근육내 MC38 결장직장 종양을 보유하는 B6.129S2-Ighm<sup>t<sub>m1Cgn</sub></sup>/J 마우스에서 분획화된 국부 방사선 요법과 조합된 항-PD-L1/TGFβ 트랩의 항종양 활성을 조사하였다. 데이터는 4개의 분획화된 선량의 국부 방사선으로 주어진 방사선 (360 rad/선량) 및 항-PD-L1/TGFβ 트랩의 단일 투여 (55 μg)의 조합이 마우스의 100%에서 종양 완화를 발생시키는 현저한 상승작용적 항종양 효과를 갖는다는 것을 보여주었다. 또한, 4개의 분획화된 선량의 국부 방사선으로 주어진 방사선 (500 rad/선량) 및 항-PD-L1/TGFβ 트랩의 단일 투여 (164 μg)의 조합은 조사된 종양에서 원위 부위의 종양에 대한 항암 효과, 압스코팔 효과의 증거, 및 이러한 처리가 전이를 치료하는데 유용할 것이라는 암시를 도출하였다. 그에 비해, 방사선 또는 항-PD-L1/TGFβ 트랩 처리 단독에 의한 단독요법은 종양 부담에서 중간 정도의 감소를 발생시켰다. 또한, 조합 요법을 제공받은 마우스에서 P15E-특이적, IFN-γ 생산 CD8<sup>+</sup> T 세포의 빈도에서의 유의한 증가가 관찰되었다. 마지막으로, 조합 요법은 이펙터 CD8<sup>+</sup> T 세포 및 NK 세포에 의한 MC38 종양의 개선된 침윤과 연관되었다. 이들 결과는 항-PD-L1/TGFβ 트랩 처리가 방사선과 상승작용하여 T 세포 매개 항종양 반응을 용이하게 한다는 것을 나타낸다. 하기 기재된 결과는 잠재적 임상 용도에 대한 이러한 조합 전략을 지지한다.

[0275]

물질 및 방법

[0276]

세포주: MC38 뮤린 결장 암종 세포주는 스크립스 리서치 인스티튜트 (Scripps Research Institute)로부터 제공받았다. 세포주를 뮤린 바이러스 및 미코플라스마의 부재에 대해 시험하고 이를 확인하였다. 동물 B6.129S2-Ighm<sup>t<sub>m1Cgn</sub></sup>/J 마우스 (C57BL/6)는 8-12주령의 것으로 짹슨 래보리토리즈로부터 입수하였다.

- [0277] 시험 물질 용량은 다음과 같았다: 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩: 2.75 mg/kg; 55  $\mu$ g/마우스; 13.75 mg/mL; 0.2 mL 용량 부피가 정맥내로 투여됨, 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩: 8.25 mg/kg; 164  $\mu$ g/마우스; 41.25 mg/mL; 0.2 mL 용량 부피가 정맥내로 투여됨.
- [0278] 음성 대조군은 다음과 같았다: 불활성 이소형 대조군 (항-PD-L1(mut) A11-121-6)을 133  $\mu$ g/마우스 또는 45  $\mu$ g/마우스의 시험 농도로 투여하였다.
- [0279] MC38 세포를 10% 열-불활성화된 태아 소 혈청을 함유하는 둘베코 최소 필수 배지에서 무균 조건 하에 배양하고, 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 유지시켰다. 세포를 생체내 이식 전 총 2 계대 동안, 1:5의 비로 50-70% 전면생장률에 도달하면 계대배양하였다. 세포를 트립신처리에 의해 수거하고, 혈구계 및 트리판 블루 배제 염색을 사용하여 생존 세포 카운트를 결정하였다.
- [0280] C38 종양 모델: C57BL/6.129S2-Ighmtm1Cgn/J 마우스에 제-8일에 0.1mL PBS 중 0.5x10<sup>6</sup>개의 생존 MC38 종양 세포를 우측 넓적다리 내로 근육내로 이식하였다. 종양이 ~128 mm<sup>3</sup>의 평균 부피에 도달하면, 마우스를 처리군으로 무작위화하였다. 처리는 제0일에 시작하였다 (종양 세포 접종 8일 후).
- [0281] 국재화된 방사선 요법은, "압스코팔" 효과로 공지된 현상인, 원위 부위에서의 항암 효과를 도출할 수 있다. 방사선 요법의 압스코팔 효과에 대한 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩의 효과를 시험하기 위해, 처리 7일 전, 마우스에 0.5 x 10<sup>6</sup>개의 생존 MC38 종양 세포를 접종하여 우측 넓적다리에 원발성, 근육내 MC38 종양을 생성하고, 1 x 10<sup>6</sup>개의 MC38 세포를 좌측 측복부의 피하로 접종하여 속발성, 피하 MC38 종양을 생성하였다 (도 9a). 처리는 제7일에 개시하였다.
- [0282] 방사선요법: 마우스를 전용 플렉시글라스 트레이에 두고, 조사할 종양 구역을 제외한 전신을 납 차폐에 의해 보호하였다. 방사선요법을 감마셀 40 이그젝터의 사용을 통해 종양 필드로 전달하였다.
- [0283] 효소-연결된 면역흡착 스팟 (ELISpot) 검정: ELISpot 검정을 사용하여 MC38 종양에 의해 발현된 공지된 T 세포 거부 에피토프인 p15E 항원에 대한 세포독성 T 림프구 (CTL) 반응을 측정하였다 (문헌 [Yang and Perry-Lalley 2000] 참조). ELISpot 검정은 p15E 에피토프 KPSWFTTL이 로딩된 항원 제시 세포 (APC)와의 공동-배양 후 IFN- $\gamma$  생산 CD8<sup>+</sup> T 세포의 빈도를 측정한다. 닦 오브알부민으로부터 유래된 비관련 웨티드 (SIINFEKL)가 로딩된 APC를 음성 대조군으로서 제공하였다. 양성 대조군 샘플을 PMA 및 이오노마이신으로 자극하였고, 이는 CTL의 비-특이적 활성화를 촉발하였다. ELISpot 검정은 비디 바이오사이언시스로부터의 키트를 사용하여 수행하였다. 연구 제14일에, 각각의 연구 군의 1마리의 마우스로부터 비장을 수거하고, 이를 단세포 혼탁액으로 프로세싱하였다. 밀테니 바이오테크로부터의 CD8<sup>+</sup> T 세포 단리 키트 및 오토맥스 프로 분리기를 사용하여 자기 활성화된 세포 분류에 의해 CD8<sup>+</sup> T 세포를 단리하였다. 이어서 CD8<sup>+</sup> T 세포를 ELISpot 검정 플레이트 (항-IFN- $\gamma$  항체 코팅됨) 내의, 1시간 동안 KPSWFTTL 웨티드로 펄싱된 나이브 마우스 비장세포로부터 유래된 APC와의 공동-배양 물 중에 시딩한 다음, 감마셀 40 이그젝터에서 2 Gy로 조사하였다. 37°C에서 16-20시간 인큐베이션 후, 검정 플레이트에서 세포를 제거하였다. 비오티닐화된 항-IFN- $\gamma$  항체를 플레이트의 각 웰에 첨가한 다음, 세척 단계를 거치고, 이어서 스트렙타비딘-HRP 검출 접합체를 첨가하였다. 또 다른 세척 단계 후에, 플레이트를 발색원성 기질 용액과 함께 인큐베이션하고; 반응을 모니터링한 다음, 플레이트를 물로 헹구어 이를 정지시켰다. 검정 플레이트의 각각의 웰에서의 IFN- $\gamma$  양성 스팟의 수를 이뮤노스팟 ELISpot 판독기 시스템을 사용하여 측정하였다.
- [0284] 면역 표현형: 적혈구의 기계적 파괴에 이은 용해에 의해 비장으로부터 세포 혼탁액을 제조하였다. 미세하게 세척된 종양 슬러리의 효소적 소화에 의해 종양 세포 혼탁액을 제조하였다. 슬러리를 유형 IV 롤라게나제 (400 유닛/mL) 및 DNase 1 (100  $\mu$ g/mL) 용액 중에서 빈번하게 교반하면서 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 종양 소화 후, 침강에 의해 과편을 분리하고, 혼탁액을 40  $\mu$ m 나일론 세포 스트레이너에 통과시켰다. FACS 분석을 위한 비장 및 종양 세포 혼탁액의 항체 염색을 제조업체의 권고 (예를 들어 이바이오사이언스 (eBioscience) 또는 비디 바이오사이언시스)에 따라 수행하였다.
- [0285] 비장 샘플의 분석을 위해, 전방 및 측방 산란 특징에 의해 확인되는 바와 같은 림프구 집단 주위에 모 게이트를 생성하였다. 림프구 게이트로부터, 면역 세포의 하위집단을 도트 플롯 상에서 확인하였다: 헬퍼 T 세포 (CD4<sup>+</sup>), 세포독성 T 림프구 (CD8<sup>+</sup>), NK 세포 (NK1.1<sup>+</sup>), 이펙터 기억 CD8<sup>+</sup> T 세포 (CD8<sup>+</sup>/CD44고/CD62L저), 중심

기억 CD8<sup>+</sup> T 세포 (CD8<sup>+</sup>/CD44고/CD62L고) 및 조절 T 세포 (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup>). 용해 활성의 척도로서 탈과립화를 평가하기 위해, 램프구 세포 표면 상의 CD107a를 측정하였다. 세포 표면 단백질의 염색 후, 샘플을 고정하고, 투과화하여, T-박스 전사 인자 (Eomes 및 T-bet) 및 이펙터 시토카인 (IFN-γ 및 그랜자임 B)의 세포내 염색이 가능하게 하였다. 백혈구 게이트로부터, 골수 세포의 하위집단을 도트 플롯 상에서 확인하였다: 수지상 세포 (CD11c<sup>+</sup>/I-Ab<sup>+</sup>), 호중구 (CD11b<sup>+</sup>/Ly6G<sup>+</sup>), 대식세포 (CD11b<sup>+</sup>/Ly-6C고) 및 MDSC (Gr-1+/CD11b<sup>+</sup>).

[0286] 종양 샘플의 분석을 위해, 종양 침윤 백혈구를 다른 종양 세포 및 기질 성분으로부터 확인하기 위해 모 게이트를 먼저 CD45<sup>+</sup> 세포 집단 주위에 생성하는 것을 제외하고, 유사한 게이팅 전략을 사용하였다.

[0287] 연구 설계. B-세포 결핍 마우스의 MC38 모델에서의 방사선과 항-PD-L1/TGFβ 트랩의 TI13-109 조합 요법. 군 및 처리 (N=10).

[0288] 파트 1: 효능

1. 이소형 대조군	133 µg i.v.	제2일
2. 방사선	360 rad/일	제0일-제3일
3. 항-PD-L1/TGFβ 트랩	55 µg i.v.	제2일
4. 항-PD-L1/TGF β 트랩	164 µg i.v.	제2일
5. 방사선	360 rad/일	제0일-제3일
항-PD-L1/TGF β 트랩	55 µg i.v.	제2일
6. 방사선	360 rad/일	제0일-제3일
항-PD-L1/TGF β 트랩	164 µg i.v.	제2일

[0289]

[0290] 파트 2: ELISpot 검정: 제14일에, 모든 마우스를 희생시키고, N=5 마우스/군의 하위세트를 ELISpot 검정을 통해 기능적 반응에 대해 분석하였다. 비장을 수거하고, 상기 기재된 바와 같이 ELISpot 검정을 위해 프로세싱하였다. 검정 플레이트의 각각의 웰에서의 IFN-γ 양성 스팟의 수를 이뮤노스팟 ELISpot 판독기 시스템을 사용하여 측정하였다.

[0291] 연구 설계: B-세포 결핍 마우스의 MC38 모델에서의 방사선과 항-PD-L1/TGFβ 트랩의 TI14-013 조합 요법. 군 및 처리 (N=10).

[0292] 파트 1: 효능

1. 이소형 대조군	45 µg i.v.	제2일
2. 방사선	360 rad/일	제0일-제3일
3. 항-PD-L1/TGFβ 트랩	55 µg i.v.	제2일
4. 방사선	360 rad/일	제0일-제3일
항-PD-L1/TGFβ 트랩	55 µg i.v.	제2일

[0293]

[0294] 파트 2: ELISpot 검정 및 면역 표현형: 제14일에, 모든 마우스를 희생시키고, N=5 마우스/군의 하위세트를 ELISpot 검정 및 TIL의 면역 표현형을 통해 비장의 기능적 반응에 대해 분석하였다. 비장을 수거하고, 상기 기재된 바와 같이 ELISpot 검정을 위해 프로세싱하였다. 검정 플레이트의 각각의 웰에서의 IFN-γ 양성 스팟의 수를 이뮤노스팟 ELISpot 판독기 시스템을 사용하여 측정하였다. 또한 종양 조직을 수거하고, 상기 기재된 바와 같이 프로세싱하였다. TIL 표현형을 % CD8<sup>+</sup> TIL, % NK1.1<sup>+</sup> TIL, CD8<sup>+</sup> TIL EOMES 발현, 및 CD8<sup>+</sup> TIL 탈과립화에 대해 FACS 분석에 의해 분석하였다.

[0295] 임상 징후 (예컨대 질병 및 건강 행동 변화)를 이전에 기재된 바와 같이 (Ullman-Cullere and Foltz, Lab Anim Sci. 1999; 49:319-23) 신체 상태 (BC) 스코어링 시스템을 사용하여 연구 동안 1일 1회 모든 동물에 대해 기록하였다. 빈사상태 마우스는 CO<sub>2</sub> 질식에 의해 인도적으로 안락사시켰다. 연구 중인 모든 동물에 대한 체중을 각각의 연구의 종료일을 포함하여 1주에 2회 기록하였다. 종양을 실험의 지속기간 동안 디지털 캘리퍼를 사용하

여 3차원으로 측정하였다. 종양 부피를 공식을 사용하여 계산하였다: 부피 =  $0.5236 (L \times W \times H)$ ; 여기서  $L$  = 종양의 길이,  $W$  = 폭 및  $H$  = 높이. 카플란-마이어 생존 곡선을 생성하여 종양 접종으로부터 희생시까지의 시간 간격을 정량화하고, 각각의 처리 군에 대한 중앙 생존 기간을 계산하였다.

[0296] ELISpot 검정을 사용하여 IFN- $\gamma$  생산, P15E-특이적 CD8 $^+$  T 세포의 빈도를 정량화하였다. 비장세포 및 종양 침윤 림프구 (TIL)의 면역 표현형은 FACS (형광-활성화된 세포 분류)에 의해 수행하였다.

[0297] 통계적 분석: 연구 기간 내내 종양 부피를 1주에 2회 측정하였다. 종양 부피 데이터를 평균 ± 표준 오차 (SEM)로 제시하였다. 종양 부피 데이터를 로그 변환하고, 다중 비교를 위해 터키 보정과 함께 이원, 반복 측정 ANOVA를 수행하여 처리 군 사이의 통계적 차이를 측정하였다. 연구 완료 시 종양 중량을 수집하였다. 데이터는 평균 ± SEM으로 나타내었다. 처리 군의 종양 부피 (또는 종양 중량)를 대조군의 종양 부피 (또는 종양 중량)로 나누어 T/C 비를 계산하였다. 다중 비교를 위해 터키 보정과 함께 일원 ANOVA에 의해 종양 중량 데이터를 평가하여 처리 군 사이의 통계적 차이를 측정하였다. IFN- $\gamma$  생산 CD8 $^+$  T 세포의 빈도를 ELISpot 검정에 의해 정량화하고, 웨일스 페어의 평균 수 (평균 ± SEM)로 나타내었다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용한 통계적 분석을 위해 다중 비교를 위한 터키 보정과 함께 일원 ANOVA를 사용하였다.  $p<0.05$ 를 통계적으로 유의한 것으로 결정하였다.

[0298] 연구 설계: 암스코팔 효과를 시험하기 위한 B-세포 결핍 마우스의 MC38 모델에서의 방사선과 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩의 조합 요법. 군 및 처리 ( $N=6$ ). 처리를 제0일에 이소형 대조군 ( $400 \mu\text{g}$ , 제0일, 제2일, 제4일), 방사선 ( $500 \text{ rad}/\text{일}$ , 제0일, 제1일, 제2일, 제3일), 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 ( $164 \mu\text{g}$ , 제0일), 및 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 ( $164 \mu\text{g}$ , 제0일) + 방사선 ( $500 \text{ rad}/\text{일}$ , 제0일, 제1일, 제2일, 제3일)을 사용하여 시작하였다. 방사선은 (도 9a)에 제시된 바와 같이 원발성 종양에만 적용하였다. 원발성 종양 부피 및 속발성 종양 부피를 매주 2회 측정하였다. 종양 부피를 평균 ± SEM으로 제시하였다.

#### 결과

[0300] 방사선과 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩의 조합은 상승작용적 항종양 효능을 입증하였다. MC38 근육내 종양 모델 (TI13-109)에서, 방사선 ( $360 \text{ rad}/\text{일}$ , 제0일-제3일) 또는 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 단독요법 ( $55$  또는  $164 \mu\text{g}$ , 제2일)은 유의한 종양 성장 억제를 유도한 반면에 (각각  $p<0.0001$ , vs. 이소형 대조군), 방사선 및 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩의 조합은 제10일의 방사선 ( $p<0.0001$ ) 또는 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 ( $p<0.0001$ )에 의한 단독요법과 비교하여 현저한 치료 상승작용을 유도하였다 (도 6a 참조). 종양 중량에 기초한 제14일의 T/C 비는 방사선 요법의 경우 0.45, 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩  $55 \mu\text{g}$  및  $164 \mu\text{g}$ 의 경우 각각 0.50 및 0.36, 및 방사선 및 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 조합 군의 경우 0.04 vs. 0.01 (각각  $55 \mu\text{g}$  vs.  $164 \mu\text{g}$ )이었다 (도 6b 참조). 종양 퇴행은 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 처리 후 4일만큼 일찍, 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 단독요법으로 처리된 마우스의 50% (20마리 중 10마리), 조합요법으로 처리된 마우스의 100% (20마리 중 20마리), 및 방사선 단독요법으로 처리된 마우스의 단지 10% (10마리 중 1마리)에서 관찰되었다. 또한, 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩은 단지 단일 용량으로 주어졌기 때문에, 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 단독요법 군에서 10개의 퇴행된 종양 중 4개는 다시 성장한 반면에, 조합 군에서의 모든 퇴행된 종양은 면역 기능의 평가를 위해 마우스를 희생시킨 제14일까지 수축된 채로 유지되었다.

[0301] 면역 활성화는 항종양 효능과 상관되었다. 제14일에, 마우스를 희생시키고, 생체외 ELISpot 검정을 사용하여 IFN- $\gamma$  생산, 종양-반응성 (P15E) CD8 $^+$  T 세포의 빈도를 정량화하였다 (도 6c 참조). 방사선 및 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 단독요법 군에서 오직 중간 정도의 IFN- $\gamma$  생산 종양-반응성 CD8 $^+$  T 세포의 유도만이 관찰되었다 (각각  $p>0.05$  및  $p<0.05$ , vs. 이소형 대조군). 관찰된 항종양 효능과 일치하였지만; 조합 요법으로 처리된 마우스는 P15E-특이적, IFN- $\gamma$  생산 CD8 $^+$  T 세포의 빈도에서 상승작용적 유도를 겪었다 (도 6c 참조). 조합 요법에 의해 유도된 CD8 $^+$  T 세포 IFN- $\gamma$  생산은 이소형 대조군의 것보다 7-배 초과였고 단독요법의 것보다 적어도 5-배 초과였다 ( $p<0.001$  vs. 각각의 단독요법, 각각). 이러한 연구에서 (TI13-109), 조합 요법에서  $55 \mu\text{g}$ 으로부터  $164 \mu\text{g}$ 으로의 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩의 용량의 증가는 종양 퇴행을 추가로 가속화하지 않았다. 고용량 군에서의 낮은 CD8 $^+$  T 세포 수율로 인해, IFN- $\gamma$  생산, 종양 반응성 (P15E) CD8 $^+$  T 세포의 빈도의 충분한 평가는 수행할 수 없었다. 따라서, 결과의 일관성을 보장하기 위해 반복 연구를 수행하였다.

[0302] 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩의 저용량  $55 \mu\text{g}$ 에 의한 반복 실험 (TI14-013)은 조합 요법에 의한 종양 성장 억제 및 P15E 특이적 CD8 $^+$  T 세포 IFN- $\gamma$  생산의 유도 둘 다에 대해 거의 동일한 상승작용적 효과를 생성하였다 (도 7a-

c 참조).

[0303] 연구 TI14-013에서 처리된 마우스의 종양-침윤 림프구의 분석은 어느 하나의 단독요법 또는 이소형 대조군에 비해 방사선 및 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩의 조합에 의한 처리 후 CD8 $^{+}$  TIL 및 NK 세포의 빈도에서의 상승을 밝혀내었다 (도 8a-b 참조). 추가의 분석은 방사선 및 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 요법의 조합이 종양-침윤 CD8 $^{+}$  T 세포 상에서의 T-box 전사 인자, Eomes의 발현, 및 탈파립화 (CD107a)를 촉진한다는 것을 나타내었다 (도 8c-d).

[0304] 방사선 및 단일 용량의 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩에 의한 조합 요법은 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 또는 방사선 단독에 비해 원발성 종양 부피를 감소시켰다 (둘 다의 경우  $p<0.0001$ , 제14일) (도 9b). 그러나, 조합 요법은 또한 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 또는 방사선 단독에 비해 속발성 종양 부피도 감소시켰다 (각각  $p=0.0066$  및  $p=0.0006$ , 제14일) (도 9c). 주목할 것으로, 방사선 단독 또는 단일 저용량의 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 중 어느 것도 이소형 대조군 처리에 비해 속발성 종양 성장을 유의하게 억제하지 못했고, 이는 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩이 방사선과 상승작용하여 압스코팔 효과를 유도한다는 것을 나타낸다.

[0305] 이펙터 CD8 $^{+}$  T 세포 및 NK 세포에 의한 증진된 침윤과 커플링된 항종양 효능 및 종양-반응성, IFN- $\gamma$  생산 CD8 $^{+}$  T 세포의 빈도에서 관찰된 상승작용은 방사선 및 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 분자에 의한 조합 요법에 의한 선천성 및 적응성 항종양 면역 반응의 강력한 유도와 일치한다. 따라서, 이러한 치료 조합은 암 환자에서 방사선요법을 개선시키기 위한 임상적으로 관련된 용도를 갖는다.

[0306] 본원에 기재된 데이터는 표준 관리 외부 빔 방사선 요법 (EBRT)이 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 요법과 조합되어 MC38 결장직장암 모델에서 상승작용적 종양 성장 억제 및 종양-반응성 CD8 $^{+}$  T 세포 반응의 유도를 달성할 수 있다는 것을 입증한다. P15E는 MC38 종양 세포주에서 발현되는 내인성 레트로바이러스 항원이기 때문에 (Zeh et al. J Immunol. 1999; 162:989-94), P15E-특이적, IFN- $\gamma$  생산 CD8 $^{+}$  T 세포에서 관찰되는 증가는 조합 요법 후 전신 T 세포 반응이 아닌, 종양-반응성 T 세포 반응을 구성한다. 이러한 상승작용적 면역학적 반응은 이러한 치료 요법에서 관찰되는 증진된 항종양 효능과 일치하고, 이는 방사선 및 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩에 의한 조합 처리가 CD8 $^{+}$  T 세포 매개 항종양 반응을 용이하게 한다는 것을 나타낸다. 방사선 및 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩 요법의 조합은 또한 CD8 $^{+}$  T 세포 및 NK 세포에 의한 MC38 종양 침윤을 촉진한다는 것을 보여주었다. 또한, 조합 요법은 전사 인자, Eomes, 및 탈파립화 마커, CD107a의 보다 높은 발현 수준에 의해 입증되는 바와 같이, 이펙터 CD8 $^{+}$  TIL 표현형을 유도하였다.

[0307] 관찰된 결과는 잠재적 임상 용도를 위한 이러한 조합 전략의 상승작용을 지지한다. 방사선 및 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩의 순차적 요법은 방사선요법 후 증가된 순환 TGF $\beta$  수준을 갖는 환자에게 이익이 될 수 있다. 또한, 심지어 단일 저용량의 항-PD-L1/TGF $\beta$  트랩에 의해서도 관찰되는 강력한 상승작용적 효과로 인해, 이러한 조합 요법에 의한 임상에서의 유리한 안전성 프로파일이 예상된다.

[0308]

서열

**SEQ ID NO: 1**

분비된 항-PD-L1 람다 경쇄의 펩티드 서열

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNVSWYQQHPGKAPKLMIFYDVSNRPSGVSNRF  
SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEE  
LQANKATLVCLISDFYFGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH  
RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

**SEQ ID NO: 2**

항-PDL1의 분비된 H쇄의 펩티드 서열

EVQLLESGGGLVQPGGSIRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTV  
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTVDYWGQGTLTVSSASTKGPSV  
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSISSLSSVTV  
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDILMI  
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
EYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK

[0309]

**SEQ ID NO: 3**항-PDL1/TGF $\beta$  트랩의 분비된 H체의 웨티드 서열

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTV  
 KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTLTVSSASTKGPSV  
 FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP  
 SSSLGTQTYICNVNHPKNSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI  
 SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  
 EYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPQREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
 ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSP  
 GAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSGIPPHVQKSVNNDMIVTDNNNAVFKFPQICLKFCDVRFSTCDNQ  
 KSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKK  
 PGETFFMCSCSSDECNDNIIIFSEEYNTSNPD

**SEQ ID NO: 4**

항-PD-L1 람다 경쇄의 번역 개시 코돈으로부터 번역 정지 코돈까지의 DNA 서열 (VL에 선행하는 리더 서열은 유로키나제 플라스미노겐 활성화제로부터의 신호 웨티드임)

atgagggccctgctggctagactgctgtgcgtgctggctgtccgacagcaaggccCAGT  
 CCGCCCTGACCCAGCCTGCCCTCCGTCTGGCTCCCCTGGCAGTCCATCACCATCAGCTGCAC  
 CGGCACCTCCAGCGACGTGGCGGCTACAACACTACGTGTCTGGTATCAGCAGCACCCGGCAAG  
 GCCCCAAGCTGATGATCTACGACGTCTAACCGGCCCTCCGGCGTGTCCAACAGATTCTCCG  
 GCTCCAAGTCGGAACACCGCCTCCCTGACCATCAGCGGACTGCAGGCAGAGGACGAGGCCGA  
 CTACTACTGCTCCTCCTACACCTCCTCCAGCACAGAGTGTTCGGCACCGGCACAAAAGTGACC  
 GTGCTGggccagcccaaggccaaaccaaccgtgacactgttccccccatcctccgaggaactgc  
 aggccaaacaaggccaccctggctgcctgatctcagattctatccaggccgtgaccgtggc  
 ctggaaaggctgatggctccccagtgaaggccggcgtggaaaccaccaagccctccaagcagtcc  
 aacaacaaaatacgccgcctcctcctacctgtccctgaccccccggcgtggaaagaccgtcgccccccaccggt  
 cctacagctgccaggtcacacacgaggcgtccaccgtggaaaagaccgtcgccccccaccgagt  
 ctcaTGA

**SEQ ID NO: 5**

번역 개시 코돈으로부터 번역 정지 코돈까지의 DNA 서열 (mVK SP 리더: 소문자 밀줄표시;

VH: 대문자; K에서 A로의 돌연변이를 갖는 IgG1m3: 소문자; (G4S)x4-G 링커: 볼드체 대문자;

TGF $\beta$ RII: 볼드체 밀줄표시 소문자; 2개의 정지 코돈: 볼드체 밀줄표시 대문자)

[0310]

[0311]

**SEQ ID NO: 6**

항-PD-L1(mut)/ TGF $\beta$  트랩의 분비된 람다 경쇄의 폴리펩티드 서열,  
돌연변이 A31G,D52E,R99Y를 가짐

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNVSWYQQHPGKAPKLMYEVSNRPSGVSNRF  
SGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCSSYTSSSTYVFGTGTKVTLGQPKANPTVTLFPPSSEE  
LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH  
RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

**SEQ ID NO: 7**

항-PD-L1(mut)/ TGF $\beta$  트랩의 분비된 중쇄의 폴리펩티드 서열  
EVQILLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSMYMMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADSV  
KGRFTISRDNSKNLTLQMNLSRAEDTAIYYCARIKLGTVTVDYWGQGTLTVSSASTKGPSV  
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP  
SSSLGTQTYICNVNWKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI  
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGK  
EYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
ESNGQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSP  
GAGGGGGGGGGGGGGGGGGGSGIPPHVQKSVNNMDIVTDNINGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQ  
KSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKK  
PGETFFMCSCSSDECNDNIIIFSEEVNTSNPD

**SEQ ID NO: 8**

인간 TGF $\beta$ RII 이소형 A 전구체 폴리펩티드 (NCBI RefSeq 수탁 번호: NP\_001020018)  
MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHPLRHINNDMIVT  
DNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHD  
PKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIIFSEEVNTSNPDLLVIFQV  
TGISLLPPLGVAISVIIIFCYRVNRQQQLSSTWETGKTRKLMEFSEHCAIILEDRSDISSTC  
ANNINHNTELLPIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEEYASWKTEKDI  
DINLKHENILQFLTAEERKTELGKQYWLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLARGIA  
HLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLCDGLSLRLDPTLSVDDLANSQVGTAR  
YMAPEVLESRMNLENVESFKQTDVYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPFGSKVREHPCVESM  
KDNVLRDRGRPEIPSFWLNHQGIQMVCTLTECWHDPEARLTAQCVAERFSELEHLDRLSGRS  
CSEEKIPEDGSLNTTK

[0312]

**SEQ ID NO: 9**

인간 TGF $\beta$ RII 이소형 B 전구체 폴리펩티드 (NCBI RefSeq 수탁 번호: NP\_003233)  
 MGRGLLRLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNNGAVKFPQLCKFCDFVRFSTCDNQ  
 KSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKK  
 PGETFFMCSSDECNDNIIIFSEEEYNTSNPDLLVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIFYCYRVN  
 RQQKLSSTWETGKTRKLMFSEHCAIILEDDRSISSTCANNINHTELLPIELDTLVGKGRFA  
 EVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFSDINLKHENILQFLTAERKTELGKQ  
 YWLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLARGIAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSN  
 ILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSQVGTARYMAPEVLESRMNLENVESFKQTDVY  
 SMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPPFGSKVREHPCVESMKDNVLDRGRPEIPSFWLNHQGIQM  
 VCETLTECWDHDPEARLTAQCVAFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK

**SEQ ID NO: 10**

인간 TGF $\beta$ RII 이소형 B 세포의 도메인 폴리펩티드  
 IPPHVQKSVNNDMIVTDNNNGAVKFPQLCKFCDFVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAV  
 WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKGETFFMCSSDECNDNIIIFSE  
 EYNTSNPD

**SEQ ID NO: 11**

(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>Gly 링커  
 GGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGSG

**SEQ ID NO: 12**

항-PD-L1 항체 MPDL3280A의 분비된 중쇄 가변 영역의 폴리펩티드 서열  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY  
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFYWGQGTLVTVSS

**SEQ ID NO: 13**

항-PD-L1 항체 MPDL3280A 및 항-PD-L1 항체 YW243.55S70의 분비된 경쇄 가변 영역의  
 폴리펩티드 서열  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG  
 SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR

**SEQ ID NO: 14**

항-PD-L1 항체 YW243.55S70의 분비된 중쇄 가변 영역의 폴리펩티드 서열  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSV  
 KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFYWGQGTLVTVSA

[0313] 참조로 포함

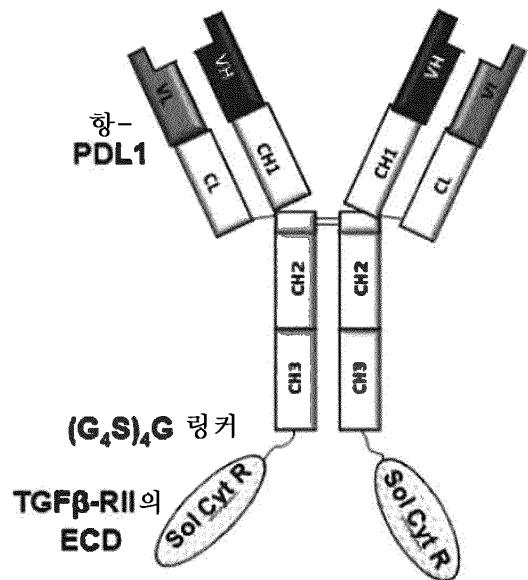
[0314] 본원에 언급된 각각의 특허 문헌 및 과학 논문의 전체 개시내용이 모든 목적상 참조로 포함된다. 미국 출원 번호 14/618,454의 전체 개시내용은 모든 목적상 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0315] 등가물

[0316] 본 발명은 그의 취지 또는 본질적인 특징으로부터 벗어나지 않는 다른 구체적 형태로 구체화될 수 있다. 따라서 상기 실시양태는 모든 측면에서 본원에 기재된 본 발명을 제한하기보다는 예시하는 것으로 간주되어야 한다. 상이한 실시양태의 다양한 구조적 요소 및 다양한 개시된 방법 단계가 다양한 조합 및 순열로 사용될 수 있고, 모든 이러한 변경은 본 발명의 형태로 간주되어야 한다. 따라서, 본 발명의 범주는 상기 기재에 의해서 보다는 첨부된 청구범위에 의해서 제시되고, 청구범위의 등가의 의미 및 범위 내에 있는 모든 변화가 그에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

도면1



## 도면2

MC38 절종  
(1x10<sup>6</sup>개 세포, s.c.)

일 -8 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

옥살리플라틴 (5 mg/kg)  
5-플루오로우라실 (60 mg/kg)

향-PD-L1/TGF- $\beta$  트랙  
(492  $\mu$ g, i.v.)

옥살리플라틴 (5 mg/kg)  
5-플루오로우라실 (60 mg/kg)

향-PD-L1/TGF- $\beta$  트랙  
(492  $\mu$ g, i.v.)

군	군/처리	용량	경로	스케줄
1	임수 이소형 대조군	0.2 mM 마우스 400 $\mu$ g 마우스	i.v. i.v.	제0일, 제14일 제3일, 제6일, 제8일
2	향-PD-L1/TGF- $\beta$ 트랙	492 $\mu$ g 마우스	i.v.	제3일, 제6일, 제8일
3	옥살리플라틴 5-FU	5 mg/kg 60 mg/kg	i.p. i.v.	제0일, 제14일 제0일, 제14일
4	옥살리플라틴 5-FU	5 mg/kg 60 mg/kg	i.p. i.v.	제0일, 제14일 제0일, 제14일
	향-PD-L1/TGF- $\beta$ 트랙	492 $\mu$ g 마우스	i.v.	제3일, 제6일, 제8일

T113-027: C57BL/6 암생형 마우스의 MC38 종양 모델에 서의 향-PD-L1/TGF- $\beta$  트랙과  
5-FU 및 옥살리플라틴 요법의 조합

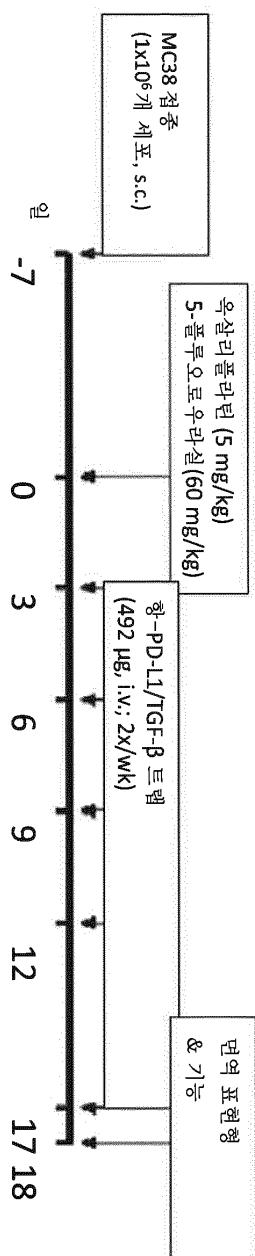
군 및 처리 (N=10 마우스/군):

도면3

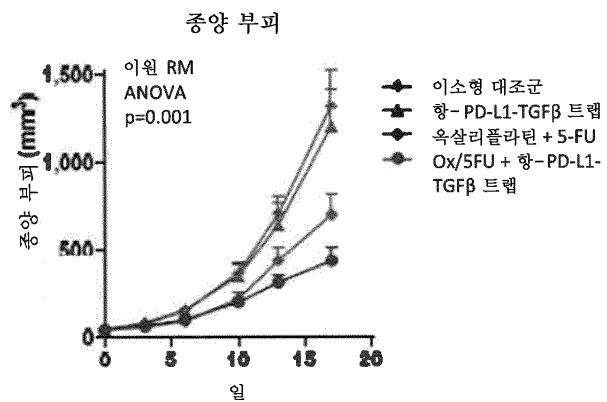
TI14-012: B 세포 결핍 마우스의 MC38 종양 모델에서의 흥-PD-L1/TGF $\beta$  트雷과 5-FU 및 옥살리플라틴 요법의 조합

군 및 처리 (N=10 마우스/군):

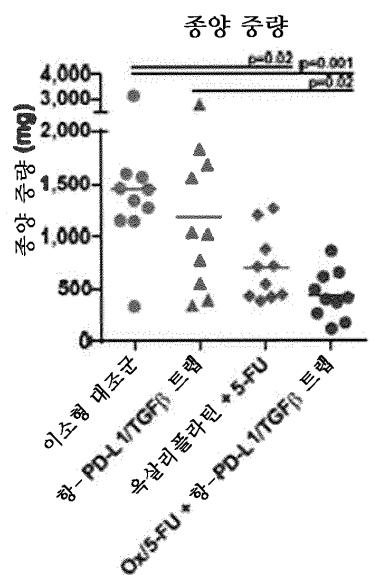
군	군/처리	용량	경로	스케줄
1	염수 이소형 대조군	0.2 mL/마우스 400 $\mu$ g 마우스	i.v.	제0일
2	흥-PD-L1/TGF $\beta$ 트雷	492 $\mu$ g 마우스	i.v.	제3일, 제6일, 제9일, 제12일, 제17일
3	옥살리플라틴 5-FU	5 mg/kg 60 mg/kg	i.p. i.v.	제0일, 제3일, 제6일, 제9일, 제12일, 제17일
4	옥살리플라틴 5-FU 흥-PD-L1/TGF $\beta$ 트雷	5 mg/kg 60 mg/kg 492 $\mu$ g 마우스	i.p. i.v. i.v.	제0일 제3일, 제6일, 제9일, 제12일, 제17일



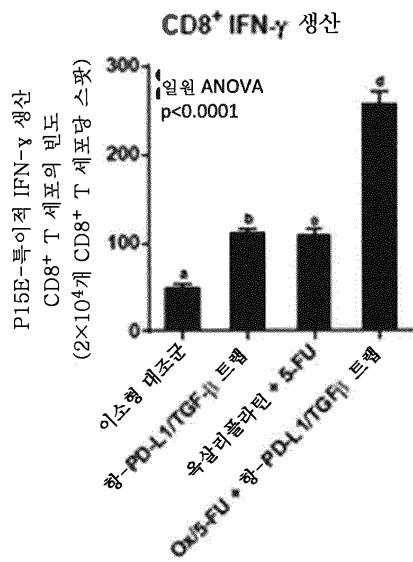
## 도면4a



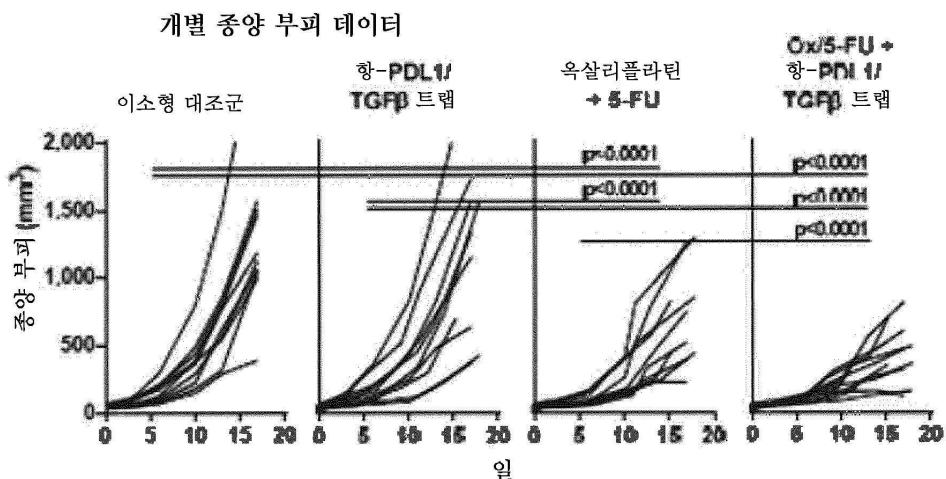
## 도면4b



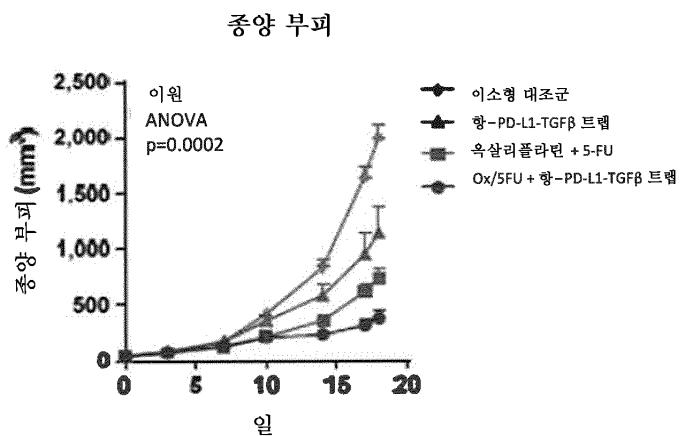
도면4c



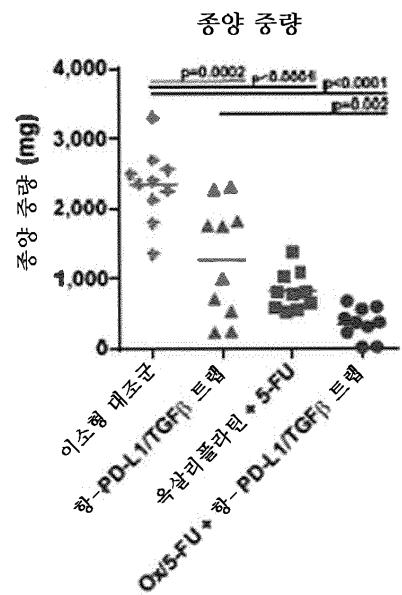
도면4d



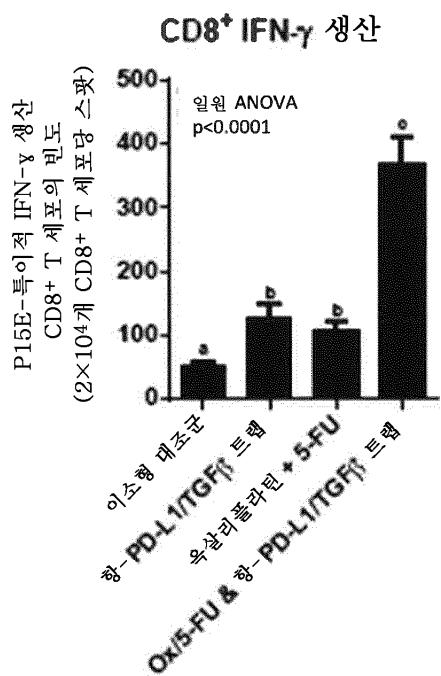
도면5a



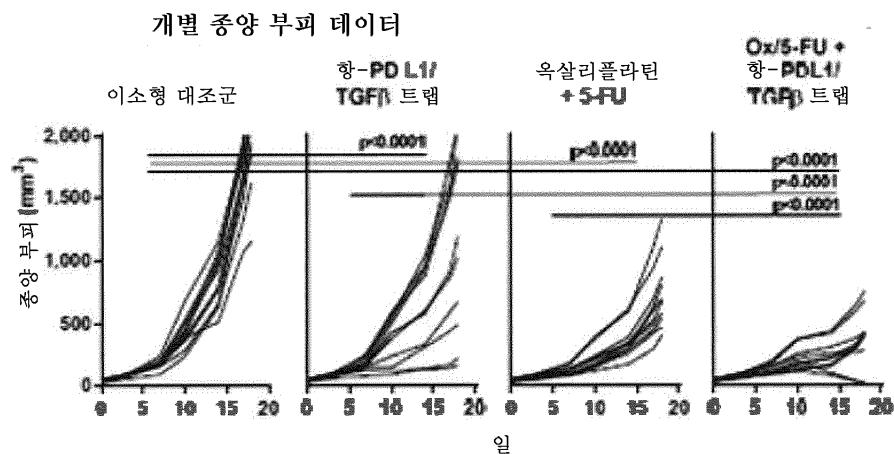
도면5b



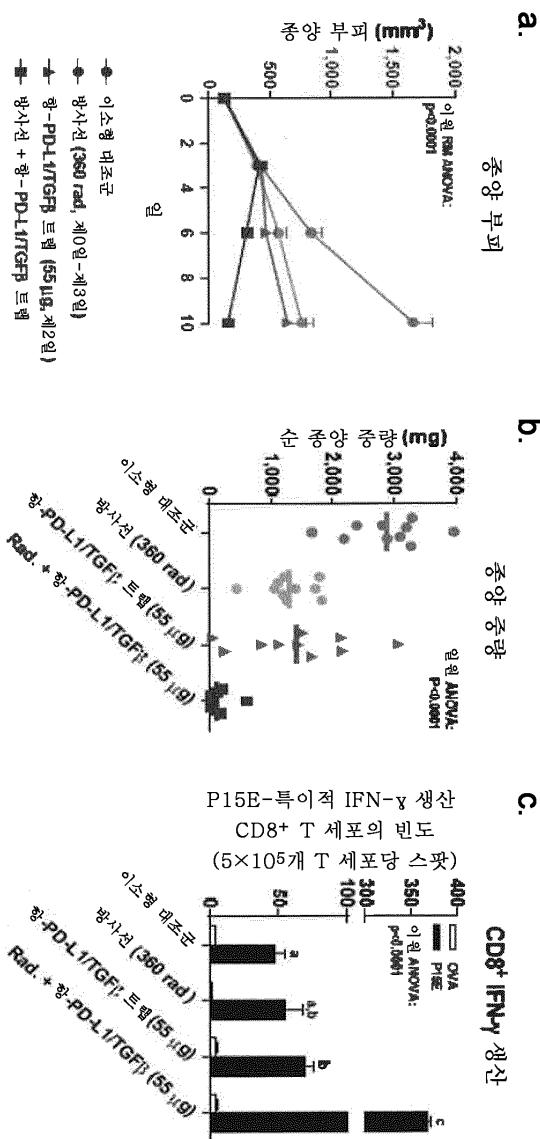
도면5c



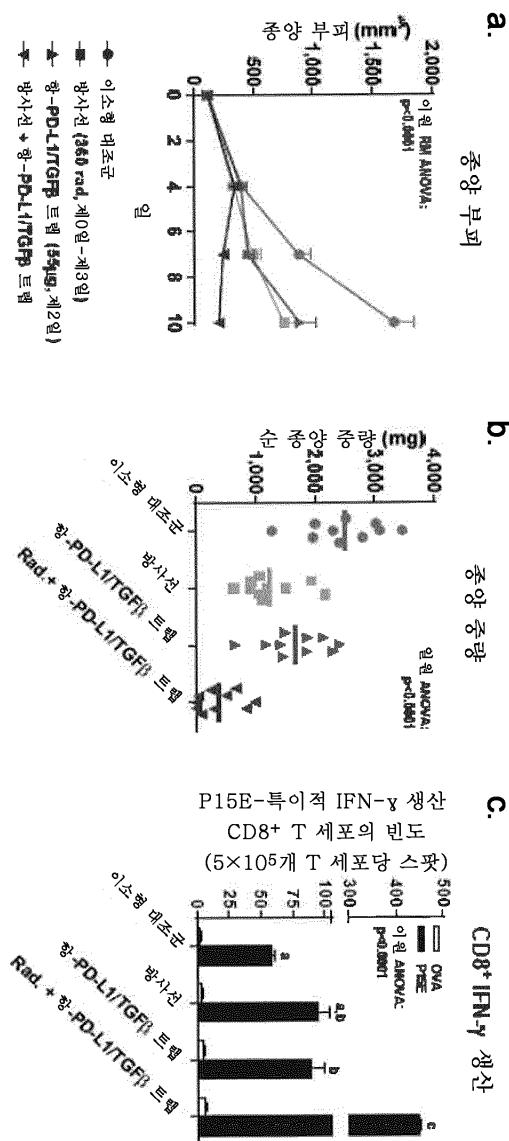
## 도면5d



## 도면6

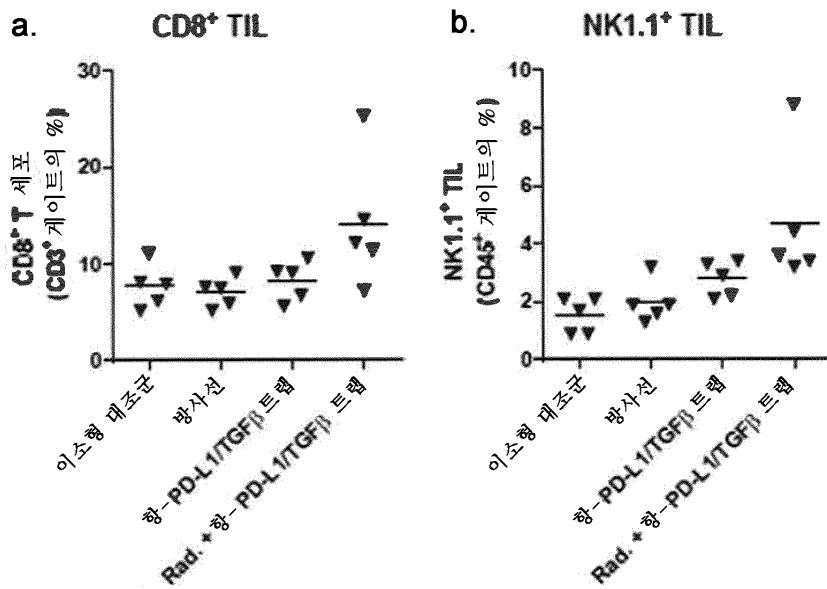


## 도면7

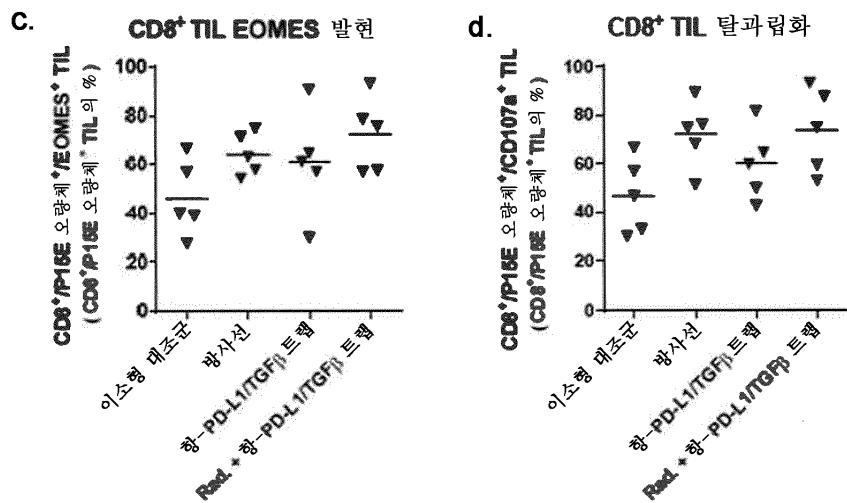


## 도면8i

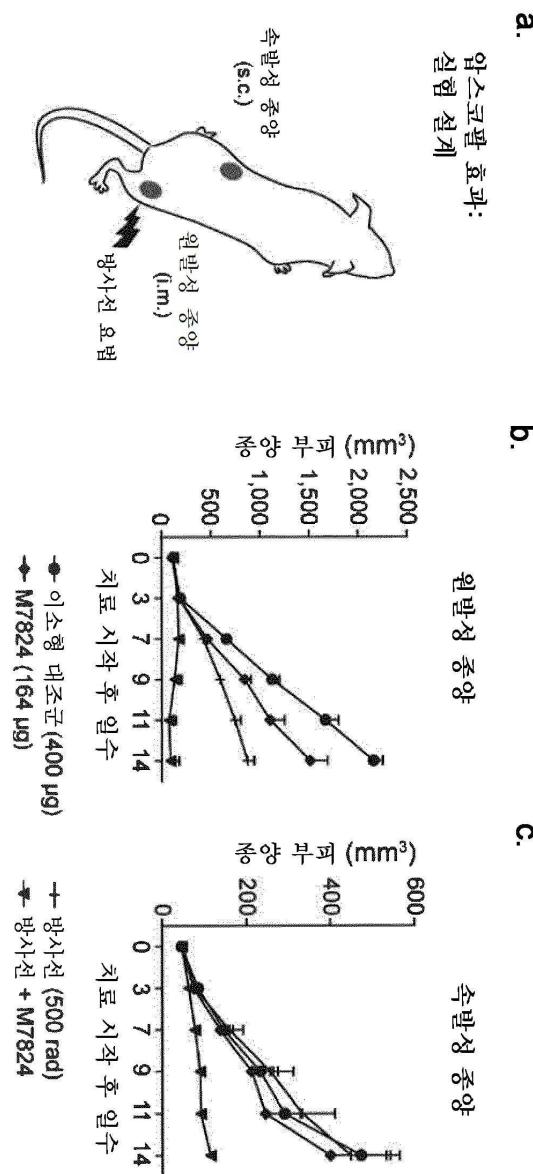
## 종양-침윤 이펙터 세포



## 도면8ii

종양-반응성 CD8<sup>+</sup> TIL 표현형

## 도면9



## 서 열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; MERCK PATENT GMBH

&lt;120&gt; COMBINATION THERAPY FOR CANCER

&lt;130&gt; EMD-004PC

&lt;140&gt; PCT/EP2017/070513

&lt;141&gt; 2017-08-11

&lt;150&gt; 62/374,621

&lt;151&gt; 2016-08-12

&lt;160&gt; 50

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 216

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

&lt;400&gt; 1

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

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu

115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys

145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr

165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His  
 180 185 190  
 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys  
 195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 2

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide"

<400> 2

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys

450

<210> 3

<211> 607

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide"

<400> 3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
225	230	235
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
355	360	365

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

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

450 455 460

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val

465 470 475 480

Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro

485 490 495

Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln

500 505 510

Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro

515 520 525

Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr

530 535 540

Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile

545 550 555 560

Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys

565 570 575

Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn

580 585 590

Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp

595 600 605

<210> 4

&lt;211&gt; 711

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide"

&lt;400&gt; 4

atgagggccc tgctggctag actgctgctg tgcgtgctgg tcgtgtccga cagcaaggc	60
cagtccgccc tgacccagcc tgcctccgtg tctggctccc ctggccagtc catcaccatc	120
agctgcaccc gcacctccag cgacgtggc ggctacaact acgtgtcccg gtatcagcag	180

cacccggca aggccccaa gctgatgatc tacgacgtgt ccaaccggcc ctccggcgtg	240
tccaaacagat tctccggctc caagtccggc aacaccgcct ccctgaccat cagcggactg	300
caggcagagg acgaggccga ctactactgc tcctctaca cctcctccag caccagagt	360
ttcggcaccg gcacaaaagt gaccgtgctg ggccagccca aggccaaaccc aaccgtgaca	420
ctgttcccc catctccga ggaactgcag gccaacaagg ccaccctggt ctgcctgatc	480
tcagattct atccaggcgc cgtgaccgtg gcctggaagg ctgatggctc cccagtgaag	540
gccggcgtgg aaaccaccaa gccctccaag cagtccaaca acaaatacgc cgccctcc	600

tacctgtccc tgaccccgaa gcagtggaaag tcccaccgtt cctacagctg ccaggtcaca	660
cacgaggcgtt ccaccgtgaa aaagaccgtc gccccaccg agtgcgtatg a	711

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1887

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide"

&lt;400&gt; 5

atggaaacag acaccctgt gctgtgggtg ctgctgctgt ggggtccccgg ctccacaggc	60
gaggtgcagc tgctggaatc cggcgaggaa ctgggtgcagc ctggcggtc cctgagactg	120
tcttgcggccg cctccggctt caccttctcc agctacatca tggatgtgggt ggcacaggcc	180

cctggcaagg gcctggaatg ggtgtccctcc atctaccctt ccggcggtat caccttctac	240
gccgacaccg tgaaggcccg gttcaccatc tcccgaaacttccaagaa caccctgtac	300

ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgcgtgt actactgcgc cggatcaag	360
ctggcaccc tgaccaccgt ggactactgg ggccaggca ccctggtgac agtgcctcc	420
gctagcacca agggccatc ggtttcccc ctggcaccc cctccaagag cacctctggg	480
ggcacagcgg cccggctg cttgtcaag gactacttcc cgaaccgt gacgggtcg	540
tggaacttag gcccctgac cagcggcgtg cacaccccttcc cggctgtctt acagtctca	600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg cacccagacc	660
tacatctgca acgtaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc	720
aaatcttgc acaaaactca cacatgccc ccgtgcccag cacctgaact cctggggga	780
ccgtcagtct tcctttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct	840
gaggtcacat gcgtgggtt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtaa gttcaactgg	900
taatgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaagc cgccggagga gcagtacaac	960
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag	1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	1080
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccattt ccgggaggag	1140
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaaag gtttatcc cagcgcacatc	1200
gccgtggagt gggagagcaa tggcagecg gagaacaact acaagaccac gcctccgtg	1260
ctggactccg acggctcctt cttcttat agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtgg	1320
cagcagggga acgtttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	1380
cagaagagcc tctccctgtc cccgggtgtt ggcggcggag gaagcggagg aggtggcagc	1440
ggtgtggcgtt gctccggcgg aggtggctcc ggaatccctc cccacgtgca gaagtccgtg	1500
aacaacgaca ttagtcgtac cgacaacaac ggccgtga agttccctca gctgtgcaag	1560
ttctgcgacg tgagggttcag cacctgcgac aaccagaagt cctgcgttgcgcaactgcgc	1620
atcacaagca tctgcgagaa gccccaggag gtgtgtgtgg ccgtgtggag gaagaacgac	1680
gaaaacatca ccctcgagac cgtgtgccat gaccccaagc tgcctacca cgacttcatc	1740
ctgaaagacg ccgcctcccc caagtgcacatc atgaaggaga agaagaagcc cggcggagacc	1800
ttcttcatgt gcagctgcag cagcgcacgag tgcaatgaca acatcatctt tagcgaggag	1860
tacaacacca gcaaccccgaa ctgataa	1887
<210> 6	
<211> 216	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

&lt;400&gt; 6

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

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Thr Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu

115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys

145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr

165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His

180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys

195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 607

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

&lt;400&gt; 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
225	230	235
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
245                    250                    255		
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305                    310                    315                    320		
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
355	360	365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
370                    375                    380		
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
385	390	395
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
420	425	430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

450 455 460

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val

465 470 475 480

Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro

485 490 495

Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln

500 505 510

Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro

515 520 525

Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr

530 535 540

Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile

545 550 555 560

Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys

565 570 575

Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn

580 585 590

Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp

595 600 605

<210> 8

<211> 592

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu

1 5 10 15

Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Asp

20 25 30

Val Glu Met Glu Ala Gln Lys Asp Glu Ile Ile Cys Pro Ser Cys Asn

35 40 45

Arg Thr Ala His Pro Leu Arg His Ile Asn Asn Asp Met Ile Val Thr

50 55 60

Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp

65 70 75 80

Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys

85 90 95

Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val

100 105 110

Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp

115 120 125

Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro

130 135 140

Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met

145 150 155 160

Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu

165 170 175

Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu Leu Leu Val Ile Phe Gln Val

180 185 190

Thr Gly Ile Ser Leu Leu Pro Pro Leu Gly Val Ala Ile Ser Val Ile

195 200 205

Ile Ile Phe Tyr Cys Tyr Arg Val Asn Arg Gln Gln Lys Leu Ser Ser

210 215 220

Thr Trp Glu Thr Gly Lys Thr Arg Lys Leu Met Glu Phe Ser Glu His

225 230 235 240

Cys Ala Ile Ile Leu Glu Asp Asp Arg Ser Asp Ile Ser Ser Thr Cys

245 250 255

Ala Asn Asn Ile Asn His Asn Thr Glu Leu Leu Pro Ile Glu Leu Asp

260 265 270

Thr Leu Val Gly Lys Gly Arg Phe Ala Glu Val Tyr Lys Ala Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Asn Thr Ser Glu Gln Phe Glu Thr Val Ala Val Lys Ile Phe

290 295 300

Pro Tyr Glu Glu Tyr Ala Ser Trp Lys Thr Glu Lys Asp Ile Phe Ser

305 310 315 320

Asp Ile Asn Leu Lys His Glu Asn Ile Leu Gln Phe Leu Thr Ala Glu

325 330 335

Glu Arg Lys Thr Glu Leu Gly Lys Gln Tyr Trp Leu Ile Thr Ala Phe

340 345 350

His Ala Lys Gly Asn Leu Gln Glu Tyr Leu Thr Arg His Val Ile Ser

355 360 365

Trp Glu Asp Leu Arg Lys Leu Gly Ser Ser Leu Ala Arg Gly Ile Ala

370 375 380

His Leu His Ser Asp His Thr Pro Cys Gly Arg Pro Lys Met Pro Ile

385 390 395 400

Val His Arg Asp Leu Lys Ser Ser Asn Ile Leu Val Lys Asn Asp Leu

405 410 415

Thr Cys Cys Leu Cys Asp Phe Gly Leu Ser Leu Arg Leu Asp Pro Thr

420 425 430

Leu Ser Val Asp Asp Leu Ala Asn Ser Gly Gln Val Gly Thr Ala Arg

435 440 445

Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Glu Ser Arg Met Asn Leu Glu Asn Val

450 455 460

Glu Ser Phe Lys Gln Thr Asp Val Tyr Ser Met Ala Leu Val Leu Trp

465 470 475 480

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

485 490 495

Pro Pro Phe Gly Ser Lys Val Arg Glu His Pro Cys Val Glu Ser Met

500 505 510

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

515 520 525

Trp Leu Asn His Gln Gly Ile Gln Met Val Cys Glu Thr Leu Thr Glu  
 530 535 540  
 Cys Trp Asp His Asp Pro Glu Ala Arg Leu Thr Ala Gln Cys Val Ala  
 545 550 555 560  
 Glu Arg Phe Ser Glu Leu Glu His Leu Asp Arg Leu Ser Gly Arg Ser  
 565 570 575  
 Cys Ser Glu Glu Lys Ile Pro Glu Asp Gly Ser Leu Asn Thr Thr Lys  
 580 585 590

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 567

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

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

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

115 120 125  
 Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn  
 130 135 140  
 Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu

145	150	155	160
Leu Leu Val Ile Phe Gln Val Thr Gly Ile Ser Leu Leu Pro Pro Leu			
165	170	175	
Gly Val Ala Ile Ser Val Ile Ile Phe Tyr Cys Tyr Arg Val Asn			
180	185	190	
Arg Gln Gln Lys Leu Ser Ser Thr Trp Glu Thr Gly Lys Thr Arg Lys			
195	200	205	
Leu Met Glu Phe Ser Glu His Cys Ala Ile Ile Leu Glu Asp Asp Arg			
210	215	220	
Ser Asp Ile Ser Ser Thr Cys Ala Asn Asn Ile Asn His Asn Thr Glu			
225	230	235	240
Leu Leu Pro Ile Glu Leu Asp Thr Leu Val Gly Lys Gly Arg Phe Ala			
245	250	255	
Glu Val Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln Asn Thr Ser Glu Gln Phe Glu			
260	265	270	
Thr Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Tyr Glu Glu Tyr Ala Ser Trp Lys			
275	280	285	
Thr Glu Lys Asp Ile Phe Ser Asp Ile Asn Leu Lys His Glu Asn Ile			
290	295	300	
Leu Gln Phe Leu Thr Ala Glu Glu Arg Lys Thr Glu Leu Gly Lys Gln			
305	310	315	320
Tyr Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Ala Lys Gly Asn Leu Gln Glu Tyr			
325	330	335	
Leu Thr Arg His Val Ile Ser Trp Glu Asp Leu Arg Lys Leu Gly Ser			
340	345	350	
Ser Leu Ala Arg Gly Ile Ala His Ser Asp His Thr Pro Cys			
355	360	365	
Gly Arg Pro Lys Met Pro Ile Val His Arg Asp Leu Lys Ser Ser Asn			
370	375	380	
Ile Leu Val Lys Asn Asp Leu Thr Cys Cys Leu Cys Asp Phe Gly Leu			
385	390	395	400

Ser Leu Arg Leu Asp Pro Thr Leu Ser Val Asp Asp Leu Ala Asn Ser

405 410 415

Gly Gln Val Gly Thr Ala Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Glu Ser

420 425 430

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

435 440 445

Ser Met Ala Leu Val Leu Trp Glu Met Thr Ser Arg Cys Asn Ala Val

450 455 460

Gly Glu Val Lys Asp Tyr Glu Pro Pro Phe Gly Ser Lys Val Arg Glu

465 470 475 480

His Pro Cys Val Glu Ser Met Lys Asp Asn Val Leu Arg Asp Arg Gly

485 490 495

Arg Pro Glu Ile Pro Ser Phe Trp Leu Asn His Gln Gly Ile Gln Met

500 505 510

Val Cys Glu Thr Leu Thr Glu Cys Trp Asp His Asp Pro Glu Ala Arg

515 520 525

Leu Thr Ala Gln Cys Val Ala Glu Arg Phe Ser Glu Leu Glu His Leu

530 535 540

Asp Arg Leu Ser Gly Arg Ser Cys Ser Glu Glu Lys Ile Pro Glu Asp

545 550 555 560

Gly Ser Leu Asn Thr Thr Lys

565

<210> 10

<211> 136

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr

1 5 10 15

Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp

20 25 30

Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys

35 40 45

Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val

50 55 60

Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp

65 70 75 80

Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro

85 90 95

Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met

100 105 110

Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu

115 120 125

Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp

130 135

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

&lt;400&gt; 11

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly

20

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt;

PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

&lt;400&gt; 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

&lt;400&gt; 13

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

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

100	105		
<210> 14			
<211> 118			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><221> source			
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"			

<400> 14			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser			
20	25	30	
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			

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

100	105	110	
Leu Val Thr Val Ser Ala			
115			
<210> 15			

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 15

Gln Phe Asn Ser

1

<210> 16

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 16

Gln Ala Gln Ser

1

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 17

Pro Lys Ser Cys Asp Lys

1 5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 18

Pro Lys Ser Ser Asp Lys

1 5

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 19

Leu Ser Leu Ser

1

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 20

Ala Thr Ala Thr

1

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Ile"

<220><221> MOD\_RES

<222> (14)..(14)

<223> /replace="Thr"

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no  
preference with respect to those in the annotations  
for variant positions"

<400> 21

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

1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (10)..(10)

<223> /replace="Asp"

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(11)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no  
preference with respect to those in the annotations  
for variant positions"

<400> 22

Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Glu Tyr

1 5 10

<210> 23

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt;

&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

&lt;400&gt; 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

&lt;400&gt; 24

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

1 5 10

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

&lt;400&gt; 25

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

1 5 10 15

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

20	25	30
<210> 26		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><221> source		
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"		
<400> 26		
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
1	5	10
<210> 27		
<211> 14		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><221> source		
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"		
<220><221> MOD_RES		
<		
222> (4)..(4)		
<223> /replace="Ser"		
<220><221> MOD_RES		
222> (5)..(5)		
<223> /replace="Arg" or "Ser"		
<220><221> MOD_RES		
222> (9)..(9)		
<223> /replace="Gly"		
<220><221> MISC_FEATURE		
222> (1)..(14)		
<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"		
<400> 27		
Thr Gly Thr Asn Thr Asp Val Gly Ala Tyr Asn Tyr Val Ser		

1 5 10

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Asp"

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Asn" or "Ser"

<220><221> MOD\_RES

<222> (4)..(4)

<223> /replace="His" or "Asn"

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 28

Glu Val Ile Asp Arg Pro Ser

1 5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> MOD\_RES

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> MOD\_RES

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Ser"

<220><221> MOD\_RES

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Thr" or "Ser"

<220><221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Ser"

<220><221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Thr"

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(10)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 29

Ser Ser Phe Thr Asn Arg Gly Ile Arg Val

1	5	10
---	---	----

<210> 30

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 30

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Ile Thr Ile Ser Cys

20

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

&lt;400&gt; 31

Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr

1 5 10 15

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

&lt;400&gt; 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

&lt;400&gt; 33

Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

1 5 10

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 34

Ser Tyr Ile Met Met

1 5

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 35

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

1 5 10 15

Gly

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

<400> 36

Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Val Asp Tyr

1 5 10

<210> 37

<211> 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

&lt;400&gt; 37

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser

1 5 10

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

&lt;400&gt; 38

Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser

1 5

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide"

&lt;400&gt; 39

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Arg Val

1 5 10

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt;

PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 40

Met Tyr Met Met Met

1 5

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 41

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

1 5 10 15

Gly

<210> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 42

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ala Tyr Asn Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 43

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

&lt;400&gt; 43

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

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
20	25	30	
Ile Met Met Val Trp Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Trp Lys			
50	55	60	
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu			
65	70	75	80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
85	90	95	
Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

&lt;400&gt; 44

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr

20	25	30
----	----	----

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35	40	45
----	----	----

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50	55	60													
Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu
65															
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Ser	Tyr	Thr	Ser	Ser
85															
Ser	Thr	Arg	Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu		
100															

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

&lt;400&gt; 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

&lt;400&gt; 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105 110

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 1407

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide"

&lt;400&gt; 47

atggagttgc ctgttaggct gttgggtctg atgttctgga ttctctgttag ctccagcgg 60

gtgcagctgc tggaatccgg cggaggactg gtgcagccctg gcccgtccct gagactgtct 120

tgcgccgcct ccggcttcac cttctccagc tacatcatga tgtgggtgcg acaggcccct 180

ggcaagggcc tggaatgggt gtcctccatc taccctccg gcgcatcac cttctacgcc 240  
 gacaccgtga agggccgggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 300  
 cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gatcaagctg 360

ggcacccgtga ccaccgtgga ctactggggc cagggcaccc tggtgacagt gtcctccgccc 420  
 tccaccaagg gccccatcggt cttcccccgt gcaccctcct ccaagagcac ctctggggc 480  
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540  
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 600  
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 660  
 atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaagggtgg acaagaaagt tgagcccaa 720  
 tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccc tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 780

tcagtcttcc tcttccccc aaaacccaag gacaccctca tcatctccg gacccttag 840  
 gtcacatgcg tgggtggtaa cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtag 900  
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 960  
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020  
 tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaa 1080  
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc cccatcacg ggatgagctg 1140  
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatccctcg cgacatcgcc 1200

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tccctgtctg 1260  
 gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcacgg tggacaagag caggtggcag 1320  
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380  
 aagagcctct ccctgtcccc gggtaaa 1407

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 705

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polynucleotide"

&lt;400&gt; 48

atggagttgc ctgttaggt gttgggtctg atgttctggta ttctgtctt cttaaaggccag 60

tccggccctga cccagcctgc ctccgtgtct ggctccctg gccagtcac caccatcagc 120

tgcacccggca cctccagcga cgtggcgcc tacaactacg tgtcctggta tcagcagcac	180
cccgcaagg ccccaagct gatgatctac gacgtgtcca accggccctc cggcgtgtcc	240
aacagattct ccggctccaa gtccggcaac accgcctccc tgaccatcag cggactgcag	300
gcagaggacg aggccgacta ctactgcgcc tcctacacct ctcgcagcac cagagtttc	360
ggcacccggca caaaagtgac cgtgctggc cagcccaagg ccaacccaac cgtgacactg	420
ttccccccat cctccgagga actgcaggcc aacaaggcca ccctggtctg cctgatctca	480

gatttctatc caggcgccgt gaccgtggcc tggaaggctg atggctcccc agtgaaggcc	540
ggcgtggaaa ccaccaagcc ctccaaagcag tccaaacaaca aatacggcgc ctcctctac	600
ctgtccctga ccccccggca gtggaaatcc caccggctct acagctgcca ggtcacacac	660
gagggctcca ccgtggaaaa gaccgtcgcc cccaccgagt gctca	705

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

&lt;400&gt; 49

Lys Pro Ser Trp Phe Thr Thr Leu

1 5

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Gallus sp.

&lt;400&gt; 50

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5