



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0053909  
(43) 공개일자 2019년05월20일

- |  |  |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/665 (2006.01)<br/>A61K 45/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)<br/>C07K 16/28 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>A61K 39/39558 (2013.01)<br/>A61K 31/665 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-7010764</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2017년09월14일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2019년04월15일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/AU2017/050998</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2018/049474<br/>국제공개일자 2018년03월22일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>2016903724 2016년09월16일 오스트레일리아(AU)</p> | <p>(71) 출원인<br/>바이오노믹스 리미티드<br/>오스트레일리아 5031 사우스 오스트레일리아주 더<br/>바톤 달글레이쉬 스트리트 31</p> <p>(72) 발명자<br/>라브라노스 티나 크리스틴<br/>오스트레일리아 5031 사우스 오스트레일리아주 더<br/>바톤 달글레이쉬 스트리트 31 바이오노믹스 리미<br/>티드<br/>잉글리스 다니엘 존<br/>오스트레일리아 5031 사우스 오스트레일리아주 더<br/>바톤 달글레이쉬 스트리트 31 바이오노믹스 리미<br/>티드<br/>레예스 크리스토퍼 엘.<br/>오스트레일리아 5031 사우스 오스트레일리아주 더<br/>바톤 달글레이쉬 스트리트 31 바이오노믹스 리미<br/>티드</p> <p>(74) 대리인<br/>리엔목특허법인</p> |
|--|--|

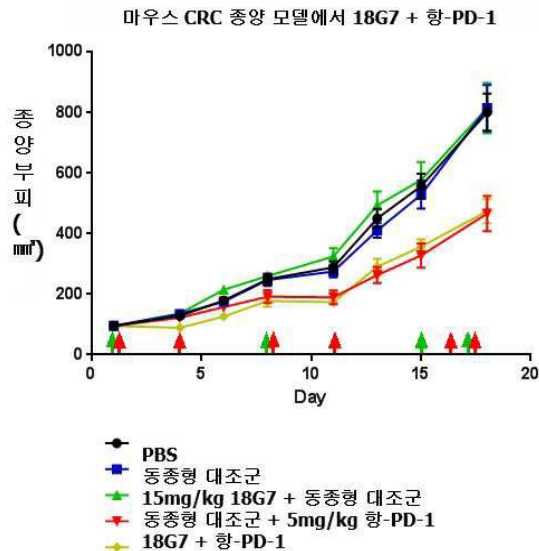
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 항체와 체크포인트 면역 억제제의 병용 요법

(57) 요약

본원 발명은 개체에서의 종양을 치료하기 위한 병용 요법을 제공한다. 상기 병용 요법은(i) 암 줄기세포에 대응하는 항체 및 (ii) 체크 포인트 억제제의 투여로 구성되어 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 45/06* (2013.01)

*A61P 35/00* (2018.01)

*C07K 16/28* (2013.01)

*C07K 16/2818* (2013.01)

*A61K 2039/505* (2013.01)

*A61K 2039/507* (2013.01)

*A61K 2300/00* (2013.01)

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

개체의 종양 치료를 위한 병용 요법으로서, (i) 암 줄기 세포에 대한 항체 및 (ii) 체크 포인트 억제제의 투여를 포함하는 병용 요법.

**청구항 2**

청구항 1에 있어서, 상기 (i)의 항체는 항-LGR5 항체인 병용 요법.

**청구항 3**

청구항 2에 있어서, 상기 항-LGR5항체는 인간화 또는 인간 단일 클론 항체인 병용 요법.

**청구항 4**

청구항 3에 있어서, 상기 항체는 서열번호 1의 아미노산 GYSFTAYW 또는 이의 보존적 변형을 갖는 중쇄 CDR1을 포함하는 것인 항체.

**청구항 5**

청구항 3 또는 4에 있어서, 상기 항체는 서열번호 2의 아미노산 ILPGSDST 또는 이의 보존적 변형을 갖는 중쇄 CDR2를 포함하는 것인 항체.

**청구항 6**

청구항 3 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 3의 아미노산 ARSGYYGSSQY 또는 이의 보존적 변형을 갖는 중쇄 CDR3를 포함하는 것인 항체.

**청구항 7**

청구항 3 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 4의 아미노산 ESVDSYGNSF 또는 이의 보존적 변형을 갖는 경쇄 CDR1를 포함하는 것인 항체.

**청구항 8**

청구항 3 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 5의 아미노산 LTS 또는 이의 보존적 변형을 갖는 경쇄 CDR2를 포함하는 것인 항체.

**청구항 9**

청구항 3 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 6의 아미노산 QQNAEDPRT 또는 이의 보존적 변형을 갖는 경쇄 CDR3를 포함하는 것인 항체.

**청구항 10**

청구항 3 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 7 또는 8을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 항체.

**청구항 11**

청구항 3 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 9 또는 10을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 항체.

**청구항 12**

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 체크 포인트 억제제는 예정 사멸 리간드 1(PD-L1), 예정 사멸

인자(PD-1), CTLA-4, PD-L2, LAG3, TIM3, 2B4, A2aR, B7H1, B7H3, B7H4, BTLA, CD2, CD27, CD28, CD30, CD40, CD70, CD80, CD86, CD137, CD160, CD226, CD276, DR3, GAL9, GITR, HAVCR2, HVEM, IDO1, IDO2, ICOS (유도성 T 세포 동시 자극제), KIR, LAIR1, LIGHT, MARCO (콜라겐 구조를 갖는 대식세포 수용체), PS (포스파티딜세린), OX-40, SLAM, TIGHT, VISTA, VTCN1 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 면역 체크 포인트 단백질의 억제제인 것인 체크 포인트 억제제.

**청구항 13**

청구항 12에 있어서, 상기 면역 체크 포인트 억제제는 PD-L1, PD-1 또는 CTLA-4의 억제제인 병용 요법.

**청구항 14**

청구항 12 또는 13에 있어서, 상기 체크 포인트 억제제는 항체인 병용 요법.

**청구항 15**

청구항 14에 있어서, 상기 항체는 이필리무맙(ipilimumab), 팜브로리주맙(pembrolizumab), 니볼루맙(nivolumab) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 병용 요법.

**청구항 16**

청구항 1 내지 15 중 어느 한 항에 있어서, 상기 병용 요법은 표준 암 치료와 함께 시행되는 것인 병용 요법.

**청구항 17**

청구항 16에 있어서, 상기 표준 암 치료는 화학 요법제 또는 화학 요법제 조합의 투여를 포함하는 것인 병용 요법.

**청구항 18**

청구항 17에 있어서, 상기 화학 요법제는 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 메소트렉세이트(methotrexate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 독소루비신(doxorubicin), 뮤스틴(mustine), 빈크리스틴(vincristine), 프로카바진(procarbazine), 프레드니솔론(prednisolone), 블레오미신(bleomycin), 빈블라스틴(vinblastine), 다카르바진(dacarbazine), 에토포시드(etoposide), 시스플라틴(cisplatin), 에피루비신(epirubicin), 카페씨타빈(capecitabine), 류코보린(leucovorin), 폴리닉산(folinic acid), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 겐시타빈(gemcitabine), 단백질 결합 파클리탁셀(protein bound paclitaxel), 이리노테칸(irinotecan) 및 이들의 조합으로 구성된 것인 병용 요법.

**청구항 19**

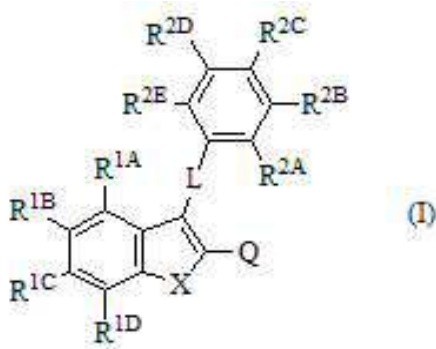
청구항 17 또는 19항에 있어서, 상기 표준 암 치료는 5-플루오로우라실 + 류코보린 + 이리노테칸을 포함하는 것인 병용 요법.

**청구항 20**

청구항 17에 있어서, 상기 화학 요법제는 혈관 저해제(vascular disrupting agent)인 병용 요법.

**청구항 21**

청구항 20에 있어서, 상기 혈관 저해제는 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 염, 용매화물 또는 프로드러그 및 이들의 염이며



상기;

X는 O, S, SO, SO<sub>2</sub>, Se, SeO, SeO<sub>2</sub> 또는 NR을 나타내며 상기 R은 H, O, 선택적으로 치환된 아실, 선택적으로 치환된 알케닐, 선택적으로 치환된 알킬, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 시클로알케닐, 선택적으로 치환된 시클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 헤테로시클릴, 및 선택적으로 치환된 설폰일로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R<sup>1A</sup> 및 R<sup>1B</sup>는 각각 독립적으로 H, 카복시, 시아노, 디할로메톡시, 할로젠, 히드록시, 니트로, 펜타할로에틸, 포스포릴아미노, 포스포노, 포스피닐, 설폰, 트리할로에테닐, 트리할로메타네티오, 트리할로메톡시, 트리할로메틸, 선택적으로 치환된 아실, 선택적으로 치환된 아실아미노, 선택적으로 치환된 아실이미노, 선택적으로 치환된 아실이미녹시, 선택적으로 치환된 아실옥시, 선택적으로 치환된 아릴알킬, 선택적으로 치환된 아릴알콕시, 선택적으로 치환된 알케닐, 선택적으로 치환된 알케닐록시, 선택적으로 치환된 알콕시, 선택적으로 치환된 알킬, 선택적으로 치환된 알킬닐, 선택적으로 치환된 알킬닐옥시, 선택적으로 치환된 아미노, 선택적으로 치환된 아미노아실, 선택적으로 치환된 아미노아실옥시, 선택적으로 치환된 아미노설폰닐, 선택적으로 치환된 아미노시오아실, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 아릴옥시, 선택적으로 치환된 시클로알케닐, 선택적으로 치환된 시클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 헤테로시클릴, 선택적으로 치환된 옥시아실, 선택적으로 치환된 옥시아실아미노, 선택적으로 치환된 옥시아실옥시, 선택적으로 치환된 옥시아실이미노, 선택적으로 치환된 옥시설피닐아미노, 선택적으로 치환된 옥시설폰닐아미노, 선택적으로 치환된 옥시시오아실, 선택적으로 치환된 옥시시오아실옥시, 선택적으로 치환된 설피닐, 선택적으로 치환된 설피닐아미노, 선택적으로 치환된 설폰닐, 선택적으로 치환된 설폰닐아미노, 선택적으로 치환된 시오, 선택적으로 치환된 시오아실, 선택적으로 치환된 시오아실아미노를 나타내며, 또는 R<sup>1A</sup> 및 R<sup>1B</sup>가 함께 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 헤테로시클릴, 선택적으로 치환된 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 시클로알킬, 또는 선택적으로 치환된 시클로알케닐을 형성하며;

R<sup>1C</sup>은 C<sub>1-3</sub> 알콕시, C<sub>1-3</sub> 알킬시오, C<sub>1-3</sub> 알킬아미노, 또는 C<sub>1-3</sub> 디알킬아미노를 나타내며;

R<sup>1D</sup>는 히드록시 또는 아미노를 나타내며;

L은 C=O, O, S, SO, SO<sub>2</sub>, Se, SeO, SeO<sub>2</sub>, C=NZ', 또는 NR'을 나타내며 상기 Z'는 H, 선택적으로 치환된 알킬, 선택적으로 치환된 아릴 또는 선택적으로 치환된 아미노; 및 상기 R'은 H, O, 선택적으로 치환된 아실, 선택적으로 치환된 알케닐, 선택적으로 치환된 알킬, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 시클로알케닐, 선택적으로 치환된 시클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 헤테로시클릴, 또는 선택적으로 치환된 설폰일에서 선택되는 것이며;

R<sup>2A</sup>-R<sup>2E</sup> 각각 독립적으로 H, 카복시, 시아노, 디할로메톡시, 할로젠, 히드록시, 니트로, 펜타할로에틸, 포스포릴아미노, 포스포노, 포스피닐, 설폰, 트리할로에테닐, 트리할로메탄에시오, 트리할로메톡시, 트리할로메틸, 선택적으로 치환된 아실, 선택적으로 치환된 아실아미노, 선택적으로 치환된 아실이미노, 선택적으로 치환된 아실이미녹시, 선택적으로 치환된 아실옥시, 선택적으로 치환된 아릴알킬, 선택적으로 치환된 아릴알콕시, 선택적으로 치환된 알케닐, 선택적으로 치환된 알케닐옥시, 선택적으로 치환된 알콕시, 선택적으로 치환된 알킬, 선택적으로 치환된 알킬닐, 선택적으로 치환된 알킬닐옥시, 선택적으로 치환된 아미노, 선택적으로 치환된 아미노아실, 선택적으로 치환된 아미노아실옥시, 선택적으로 치환된 아미노설폰닐, 선택적으로 치환된 아미노시오아실, 선택

적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 아릴옥시, 선택적으로 치환된 시클로알케닐, 선택적으로 치환된 시클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 헤테로시클릴, 선택적으로 치환된 옥시아실, 선택적으로 치환된 옥시아실아미노, 선택적으로 치환된 옥시아실이미노, 선택적으로 치환된 옥시아실옥시, 선택적으로 치환된 옥시설피닐아미노, 선택적으로 치환된 옥시설피닐아미노, 선택적으로 치환된 옥시시오아실, 선택적으로 치환된 옥시시오아실옥시, 선택적으로 치환된 옥시설피닐, 선택적으로 치환된 설피닐아미노, 선택적으로 치환된 설피닐, 선택적으로 치환된 설피닐아미노, 선택적으로 치환된 시오, 선택적으로 치환된 시오아실, 선택적으로 치환된 시오아실아미노, 선택적으로 치환된 시오아실옥시를 나타내며; 또는 R2A 및 R2B, R2B 및 R2C, R2C 및 R2D, 및 R2D 및 R2E 중 어느 하나가 함께 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 헤테로시클릴, 선택적으로 치환된 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 시클로알킬, 또는 선택적으로 치환된 시클로알케닐을 형성하며; 및

Q는H, CN, 할로젠, 트리알킬실릴, 선택적으로 치환된 알킬, 선택적으로 치환된 알케닐, 선택적으로 치환된 알키닐, 선택적으로 치환된 아실, 선택적으로 치환된 옥시아실, 선택적으로 치환된 아실아미노, 선택적으로 치환된 아미노아실아미노, OR'', SR'' 또는 NR''R''를 나타내며, 상기 각각의 R''은 독립적으로H, 선택적으로 치환된 알킬, 선택적으로 치환된 알케닐, 선택적으로 치환된 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 헤테로시클릴, 선택적으로 치환된 아실 및 선택적으로 치환된 옥시아실, 또는 NR''NR''를 나타내며, 상기 각각의 R''은 독립적으로 H, 선택적으로 치환된 알킬, 선택적으로 치환된 알케닐, 선택적으로 치환된 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴 및 선택적으로 치환된 헤테로아릴을 나타내는 것인 혈관 분열 작용제.

**청구항 22**

청구항 20 또는 21에 있어서, 상기 혈관 저해제는 2-메틸-7-히드록시-3-(3,4,5-트리메톡시벤조일)-6-메톡시벤조퓨란(BNC105) 또는 디소듐 [6-메톡시-2-메틸-1-3-(3,4,5-트리메톡시벤조일)-1-벤조퓨란-7-일] 포스페이트(BNC105P)인 병용요법.

**청구항 23**

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양은 방광암 종양, 유방암 종양, 결장암 종양, 위장암 종양, 신장암 종양, 폐암 종양, 난소암 종양, 췌장암 종양, 전립선암 종양, 근위 또는 원위 담관암 종양, 흑색종, 결장직장암 종양, 전이성 결장직장암 종양, 전이성 췌장암 종양, 삼중 음성 유방암 종양 및 소세포 폐암 종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 병용 요법.

**청구항 24**

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 따른 병용 요법을 포함하는, 개체의 종양을 치료하는 방법.

**청구항 25**

청구항 22에 있어서, 상기 종양은 방광암 종양, 유방암 종양, 결장암 종양, 위장암 종양, 신장암 종양, 폐암 종양, 난소암 종양, 췌장암 종양, 전립선암 종양, 근위 또는 원위 담관암 종양, 흑색종, 결장직장암 종양, 전이성 결장직장암 종양, 전이성 췌장암 종양, 삼중 음성 유방암 종양 및 소세포 폐암 종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 26**

성분 (i) 및 (ii)의 혼합물을 포함하는 조성물.

**청구항 27**

종양의 치료용 의약(들)의 제조에 있어서 청구항 1 내지 22 중 어느 한 항의 병용 요법의 성분 (i) 및 (ii)의 용도.

**청구항 28**

청구항 27에 있어서, 상기 종양은 방광암 종양, 유방암 종양, 결장암 종양, 위장암 종양, 신장암 종양, 폐암 종양, 난소암 종양, 췌장암 종양, 전립선암 종양, 근위 또는 원위 담관암 종양, 흑색종, 결장직장암 종양, 전이성 결장직장암 종양, 전이성 췌장암 종양, 삼중 음성 유방암 종양 및 소세포 폐암 종양으로 이루어진 군으로부터

선택되는 것인 용도.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 종양의 치료를 위한 병용 요법에 관한 것이다. 상기 병용은 암 줄기 세포 마커 및 체크 포인트 억제제에 대한 항체를 포함한다.

**배경 기술**

[0002] 현재 면역 요법의 임상적 이점을, 많은 환자가 반응을 나타내지 않는 보다 넓은 환자 집단으로 확대하려는 매우 강력한 움직임이 있다. 체크 포인트 억제제가 치료제로 사용되는 면역학적 접근법은 분화된 종양 세포로 구성된 종양 덩어리쪽으로 편향되어 있다.

[0003] 체크 포인트 억제제는 면역계 공격에 대한 암의 주요 방어를 극복하기 위해 노력한다. 면역계 T 세포는 질병이나 감염의 징후가 있는지 지속적으로 몸을 순찰한다. 그들은 다른 세포를 만날 때 세포의 정체(identity)를 나타내는 표식으로 작용하는 특정 단백질을 표면에서 탐침한다. 단백질이 세포가 정상적이고 건강하다는 것을 나타내면 T 세포가 그 세포를 그대로 둔다. 단백질이 세포가 감염되었거나 암이 있다는 것을 나타내면 T 세포가 그 세포를 공격한다. 일단 T 세포가 공격을 시작하면, 면역 체계는 공격이 신체의 정상 조직을 손상시키는 것을 막기 위해 일련의 추가 분자를 증가시킨다. 이 분자들은 면역 체크 포인트로 알려져 있다.

[0004] 종양 세포는 종종 세포의 암의 본성을 나타내는 형태의 단백질을 가지고 있다. 그러나 그들은 때때로 신원 도중에 해당하는 것을 행하여, 그들 스스로를 정상 세포의 단백질로 진열한다. 최근 연구에 따르면 암세포는 종종 면역 체계를 억제하고 회피하기 위해 면역 체크 포인트 분자를 사용한다. 이러한 정상적인 단백질에 속은 상태인 T 세포는 종양 세포를 공격하지 않을 수 있다.

[0005] 체크 포인트 억제제는 암세포에 있는 정상 단백질, 또는 이들에 반응하는 T 세포상의 단백질을 차단한다. 그 결과, T 세포가 세포를 암으로 인식하고 면역 체계가 그 세포들을 공격하도록 하는 것을 차단하는 눈가리개를 제거하게 된다.

[0006] 이필리무맙(ipilimumab(Yervoy®)), 펨 브로리주맙(pembrolizumab(Keytruda®)) 및 니블루맙(nivolumab(Opdivo®))을 포함하는 3개의 체크 포인트 억제제는 암에 대해 미국 FDA으로부터 신속 허가(rapid approval) 을 받았다. 이들 및 기타 면역 체크 포인트 요법은 오늘날 암 치료에서 가장 유망한 분야 중 하나다

[0007] 한편, 암 줄기 세포들(CSCs)은 이보다 분화된 종양 덩어리와 비교하여 별개의 유전자 및 항원 발현 프로파일을 나타낸다. 이는 체크 포인트 억제제의 치료 효과를 회피하고 종양을 재생성할 수 있게 한다. LGR5는 일부 고형암에서 CSCs 또는 종양 개시 서브집단의 기능적 마커로 확인되었으며, 상기 CSCs 및 종양 서브집단은 자가 재생 및 이러한 능력이 결여된 자손 세포로의 분화를 가능케 한다. 유의적인 증거에 따르면 또한 이들 CSCs가 면역 억제성 표현형을 가지고 있어서 항종양 숙주 면역 반응을 피할 수 있는 것으로 나타났다 [1-8]. 이것은 CSCs의 서브 세트가 T 세포 면역을 하향 조절할 수 있다는 가능성을 제시한다.

[0008] 체크 포인트 억제제를 회피하고 치료에 대한 전반적인 반응성을 하향 조절할 수 있는 종양 내 서브세트의 존재는, 항 -LGR5 항체를 체크 포인트 억제제와 조합함으로써 보다 큰 치료 효과를 갖는 병용 요법의 범위를 제공한다.

[0009] 면역 체크 포인트 요법과 CSC 표적 제제의 병용은 각각의 접근법의 임상 유용성을 향상시킬 수 있고 체크 포인트 억제제의 높은 치료학적 가치가 환자 집단이 더 많은 수의 "반응자(responders)"를 생성하도록 더 강한 영향을 미칠 수 있게 한다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0010] 체크 포인트 억제제 및 암 줄기 세포에 대한 항체를 이용해 암에 대한 효과적인 치료 방법을 제공한다.

**과제의 해결 수단**

- [0011] 본 발명자들은 암 줄기 세포에 대한 항체와 면역 치료제의 병용이 암 줄기 세포에 대한 항체 또는 면역 치료제 단독으로써 치료한 경우와 비교할 때 암 치료의 효능을 증가시킨다는 것을 밝혀냈다.
- [0012] 따라서, 제 1 양상에서, 본 발명은 (i) 암 줄기 세포에 대한 항체 및 (ii) 체크 포인트 억제제의 투여를 포함하는, 개체에서 종양을 치료하기 위한 병용 요법을 제공한다.
- [0013] 제 2 양상에서, 본 발명은 본 발명의 병용 요법을 포함하는, 개체에서 종양을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0014] 제 3 양상에서, 본 발명은 병용 요법의 성분 (i) 및 (ii)를 혼합하여 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0015] 제 4 양상에서, 본 발명은 종양의 치료를 위한 의약(들)의 제조에서 병용 요법의 성분 (i) 및 (ii)의 용도를 제공한다.

**발명의 효과**

- [0016] 본 발명자들은 암 줄기 세포에 대한 항체와 면역 치료제의 병용이 항암 줄기 세포 항체 또는 면역 치료제 단독으로써 치료한 경우와 비교할 때 암 치료의 효능을 증가시킨다는 것을 밝혀냈다.

**도면의 간단한 설명**

- [0017] 도 1은 마우스 결장직장암(CRC) 종양 모델에서의 종양 성장 억제를 나타낸다.
- 도 2는 종양에 대한 총 T 세포 동원으로써, 총 림프구의 %로서 종양 CD3<sup>+</sup> 를 나타낸다.
- 도 3은 종양에 대한 세포독성 T세포 동원으로써, CD3의 %로서 종양성 CD8<sup>+</sup> 을 나타낸다.
- 도 4는 CD4<sup>+</sup> 의 %로서 조절 T세포를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0018] 본 명세서 전반에 걸쳐, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, "포함하다"라는 단어 또는 "포함하는" 또는 "포함하는"과 같은 변형은 명시된 요소 또는 정수 또는 요소 또는 정수의 그룹을 포함하는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 다른 요소 또는 정수 또는 요소의 그룹 또는 정수의 그룹을 배제하지 않는다.
- [0019] 본 명세서에서 임의의 선행 공개문헌 (또는 이로부터 유도된 정보)에 대한, 또는 공지된 임의의 사안에 대한 언급은, 선행 공개 문헌(또는 그것으로부터 유래된 정보) 또는 알려진 사안이 본 명세서와 관련된 분야의 일반적 지식의 일부를 형성한다는 것을 인정하거나 승인하거나 또는 임의의 형태의 암시로서 간주해서는 안되며, 그렇게 해서는 안된다.
- [0020] 본 명세서에 언급 된 모든 공보는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.
- [0021] 본 명세서에서 사용 된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥 상 명확하게 달리 지시하지 않는 한 복수 측면을 포함한다는 것을 알아야한다. 따라서, 예를 들어, "물질"에 대한 언급은 하나 이상의 물질뿐만 아니라 2 개 이상의 물질을 포함한다; "분자"에 대한 언급은 하나 이상의 분자뿐만 아니라 2 개 이상의 분자를 포함한다; 기타 등등.
- [0022] 제 1 양상에서, 본 발명은 (i) 암 줄기 세포에 대한 항체 및 (ii) 체크 포인트 억제제를 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 종양을 치료하기 위한 병용 요법을 제공한다
- [0023] 제 2 양상에서, 본 발명은 본 발명의 병용 요법을 포함하는, 개체에서 종양을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0024] 제 3 양상에서, 본 발명은 병용 요법의 성분 (i) 및 (ii)를 혼합하여 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0025] 제 4 양상에서, 본 발명은 종양의 치료를 위한 의약(들)의 제조에서 병용 요법의 성분 (i) 및 (ii)의 용도를 제공한다.
- [0026] 암 줄기 세포에 대한 항체는 바람직하게는 항-LGR5 항체이다. 이러한 항체의 예는 W02015 / 153916에 상세히 기재되어 있으며, 이의 개시 내용은 상호 참고로 여기에 포함된다.
- [0027] 다수의 구체예에서 상기 언급 된 바와 같이, 병용 요법은 LRG5에 특이적으로 결합하는 인간 또는 인간화 항체의 사용을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 LGR5와 특이적으로 결합하지만 LGR5와의 R-Spo 결합을 억제하지 않

는다. 다른 구체에는 LGR5를 통한 R-Spo 신호 전달을 억제하지 않으면서 LGR5에 결합하는 항체를 포함한다. 또 다른 구체에는 LGR5에 결합하지만 LGR5를 통한 R-Spo 결합 또는 신호 전달 둘 모두를 억제하지 않는 항체를 포함한다. 또 다른 구체에는 LGR5에 결합하고 또한 Wnt 경로를 통해 LGR5 신호전달을 억제하는 항체이다. 일부 구체에서, 이들 항체는 Wnt 경로를 통한 LGR5 신호전달을 억제 할 수 있고, RSpO 신호전달과 독립적일 수 있다.

[0028] LGR5는 계통 추적 연구를 통해 소화관 내에서 정상 줄기세포와 종양-개시 세포의 매우 특이적인 마커로 확인되었다. 이전에 Wnt 발현이 중지 된 후에 그 유전자의 발현이 억제되는 약 150 개의 유전자가 밝혀졌다. 이 'Wnt 표적 유전자'의 종합적인 특성 규명 결과, LGR5가 음와 기반에서의 10-14 개의 증식 췌기형 세포 집단 상에 선택적으로 발현되는 것으로 나타났다. 이 음와 기반의 원주 세포(crypt-based columnar cells)는 이전에 후보 줄기 세포 집단으로 제안되었다. 유전성 lacZ-LGR5 리porter 유전자로 생체 내 계통 추적을 사용하여, LGR 장내 줄기 세포는 다분화성, 자가재생성인 성인 장내 줄기 세포집단으로서, 음와 기반에서 시작하여 음모 끝까지 확장되는 중단없는 lacZ+ 자손 세포 리본을 생성한다.

[0029] CSCs에 대한 LGR5의 특정 발현은 선택적이고 효과적으로 CSCs를 표적으로 하는 기회를 제공한다. LGR5는 정상 조직과 비교하여 CRC, 췌장 및 대부분의 다른 고품 종양에서 과발현되며, 그럼으로써 CRC, 췌장암, 유방암, 난소암, 폐암, 위암 및 간암에서 CSCs를 표적으로 하는 광범위한 치료 범위를 제공한다.

[0030] LGR5 자체는Wnt-Fzd-LRP 수용체 복합체의 매개 성분으로써, 분비된 R- 스폰딘 리간드에 결합하여 LGR5 양성 세포에서 Wnt 신호를 선택적으로 증폭시키고 증진시킨다. 또한, LGR5가 Wnt독립적인 방식으로 신호전달을 할 수 있다는 증거도 있다. 게다가, 관련 트랜스멤브레인 고리형(Ring-type) E3 유비퀴틴 리가제 ZNRF3 (Zn 및 RING Finger 3) 또는 RNF43 (RING Finger 43)는 LGR5 + 줄기 세포에서 유일하게 발현되거나 프리즐드(frizzled) 수용체를 선택적으로 유비퀴틴화하여 Wnt 신호를 감소시킴으로써, 이들 Wnt 수용체를 분해 표적으로 삼는다. R-스폰딘 리간드는 LGR5와 상호 작용하여, 트랜스 멤브레인 ZNRF3 또는 RNF43과의 삼원 복합체를 형성한다. 이러한 삼원 복합체의 형성은 Wnt-Fzd-LRP 복합체로부터 ZNRF3 또는 RNF43을 격리시키고 표준 및 비표준 Wnt 신호전달을 안정화시킨다. 마지막으로 Norrin은 미지의 관련 생물학적 특성을 지닌 LGR 계열의 추가 리간드로 확인되었다.

[0031] CRC에서의 관문 유지 돌연변이는 APC(adenomatous polyposis coli)의 상실이며, 이는 정상적으로는 대장 음와 내의 줄기 세포에서 자가 재생과 분화 사이의 균형을 정상적으로 조절하는, Wnt 신호 전달의 비정상적인 활성화를 초래한다. 장내 줄기세포에서 비정상적으로 조절된(Dysregulated) Wnt 신호 전달은 악성 CRC의 전구체인 결장 내의 선종성 용종의 형성을 유도한다. LGR5 줄기 세포는 유도된 APC 유전자 녹아웃(knockout) 마우스를, LGR5 줄기세포를 4개(GFP/YFP/ECFP/RFP)의 형광성 유전자 마커 중 하나를 사용하여 특이적이고 무작위적으로 표지한 마우스와 교배시키는 전략을 사용하여, LGR5 줄기 세포가 이들 마우스 장 종양의 근원 또는 뿌리임을 확인했다. APC 상실 유도 4주 후에 단색의 종양(즉, 모든 GFP 또는 모든 RFP)이 나타난 것은 이들 종양이 단일 LGR5 줄기 세포에서 발생했음을 확인시켜 주었다. 더 나아가, 이 모델은 또한 LGR5 줄기 세포의 형광성 유전자 태그가 다른 색으로 뒤집힐 수 있도록(flipped) 허용했다. 따라서 적색 종양을 생성하는 RFP+ LGR5 암 줄기 세포는 ECFP+ LGR5 암 줄기 세포로 중간 변환될 수 있으며, 그것은 여전히 종양을 시딩(seeding)하지만, 이제는 이전의 적색 GFP+종양 덩어리를 침범한 청색 종양 세포를 나타내는 것이다. 이러한 뒤집기(flipping) 실험은 LGR5 CSCs가 장내 종양의 기원이며, 장내 종양의 성장을 개시 및 시딩할 수 있을 뿐만 아니라 종양 형성을 지속적으로 유지한다는 것을 밝혀냈다(즉, 장기간 재촉적 능력을 가짐).

[0032] 암에서의 LGR5의 기능적 역할은 리보 핵산 간섭(RNAi) 녹다운(knockdown) 연구를 통해 입증되었다. CRC 종양 세포주의 패널에서 LGR5의 녹다운은 생체 외(in vitro)에서 부드러운 한천 콜로니의 성장을 현저히 억제하고, 또한 생체 내(in vivo)에서 HCT116 결장 종양 이종 이식물의 성장을 억제하였다. LGR5 RNAi 녹다운은 생체 외에서 환자 유래 CRC 종양 세포로부터 CSC 콜로니의 성장을 감소시키는 것으로 나타났다. 최종적으로, 선별된 LGR5+ 환자 유래 이종 이식 CRC 종양 세포는 대조군 LGR5- 세포와 비교하여 생체 내에서 종양 발생이 높았다.

[0033] CSCs는 수술 및 표준 화학 요법으로 치료된 많은 암 환자에서 높은 종양 재발 원인으로 여겨진다. 예를 들어, 유방암 환자의 CD44 + CSCs는 화학 요법 후에 많아진 것으로 밝혀졌으며 CSCs의 수치가 높으면 화학 요법에 대한 임상 반응이 좋지 않은 것으로 나타났다. 이와 유사하게 전이성 CRC에서, LGR5 발현은 화학 요법 후 손상된 간에서 상향 조절되었고, 이는 화학 요법 개시에 반응하여 LGR5 CSCs의 증가 및/또는 전이성 질환의 유발을 시사한다. 실제로, LGR5 발현은 원발성 CRC 종양과 비교하여 전이 부위에서 유의하게 더 높은 것으로 밝혀졌다.

[0034] 항-LGR5 항체들

- [0035] 본원에 사용된, "항체"는 합성 항체, 단일 클론 항체, 재조합 생산 항체, 인트라바디(intrabodies), 다중 특이성 항체(이중 항체를 포함함), 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 합성 항체, 단일 사슬 Fvs (scFv), Fab 단편, F(ab') 단편, 이황화-결합 Fvs (sdFv) (이중 특이성 sdFvs를 포함함), 및 항-이디오타입(anti-Id) 항체, 및 이들중 임의의 항체의 에피토프-결합 단편을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본원에 제공된 몇몇 실시양태의 상기 항체는 단일 특이성, 이중 특이성, 삼중 특이성 또는 보다 큰 다중 특이성일 수 있다. 다중 특이성 항체는 폴리펩티드의 상이한 항원결정기에 특이적일 수 있거나, 또는 이중 폴리펩티드 또는 고체 지지체 물질과 같은 이중 항원결정기뿐만 아니라 폴리펩티드 둘 다에 특이적일 수 있다. 예를 들어, PCT 공보 W093/17715; WO 92/08802; W091/00360; WO 92/05793; Tutt, 외., J. Immunol. 147:60-69 (1991); U.S. 특허 번호. 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,819; Kostelny 외., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992); 이들 각각은 그 전문이 본원에 참고로써 포함된다.
- [0036] 본 명세서에서, LGR5는 NCBI 등록 번호 NP\_003658.1의 폴리펩티드를 포함하는 인간 LGR5, 또는 NM\_003667.2 내의 코딩 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 그의 단편, 또는 그의 단편을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. NCBI 등록 번호 NP\_003658.1의 아미노산 서열 및 전체 기재 사항 및 NM\_003667.2의 염기 서열 및 전체 기재 사항은 그 전문이 참고로 본 명세서에 인용된다. 본원에서 고려되는 LGR5 단편의 예는 LGR5 세포의 도메인, 트랜스멤브레인 도메인 또는 세포내 도메인 및 이들의 부분을 포함한다.
- [0037] WO 2015/15396은 18G7H6A3 및 18G7H6A1로 지칭되는 항-LGR5 항체를 포함하는 항-LGR5 항체의 경쇄 및 / 또는 중쇄를 생산하는 하이브리도마를 개시한다. 인간 치료를 위해, 항-LGR5 항체는 인간화 또는 인간 단일 클론 항체인 것이 바람직하다. 이들 항체의 특정 버전은 WO 2015/153916에 기술된 18G7H6A1 또는 18G7H6A3이다.
- [0038] 특정 구체예에서, 항체는 서열번호 1의 아미노산 GYSFTAYW 또는 이의 보존적 변형을 갖는 중쇄 CDR 1을 포함한다.
- [0039] 특정 구체예에서, 항체는 서열번호 2의 아미노산 ILPGSDST 또는 이의 보존적 변형을 갖는 중쇄 CDR2를 포함한다.
- [0040] 특정 구체예에서, 항체는 서열번호 3의 아미노산 ARSGYYGSSQY 또는 이의 보존적 변형을 갖는 중쇄 CDR3를 포함한다.
- [0041] 특정 구체예에서, 항체는 서열번호 4의 아미노산 ESVDSYGNSF 또는 이의 보존적 변형을 갖는 경쇄 CDR1를 포함한다.
- [0042] 특정 구체예에서, 항체는 서열번호 5의 아미노산 LTS 또는 이의 보존적 변형을 갖는 경쇄 CDR2를 포함한다.
- [0043] 특정 구체예에서, 항체는 서열번호 6의 아미노산 QQNAEDPRT 또는 이의 보존적 변형을 갖는 경쇄 CDR3를 포함한다.
- [0044] 특정 구체예에서, 항체는 서열번호 7 또는 8을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0045] 특정 구체예에서, 항체는 서열번호 9 또는 10을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0046] 다양한 구체예에서, 상기 항체의 글리코실화는 변형될 수 있다. 예를 들어, 아글리코실화(aglycosylated)된 항체가 제조될 수 있다 (즉, 항체는 글리코실화가 결여된다). 글리코실화는, 예를 들어, 표적 항원에 대한 항체의 친화도를 증가시키도록 변경될 수 있다. 이러한 탄수화물 변형은 예를 들어, 항체 서열 내 하나 이상의 글리코실화 부위를 변경함으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 치환이 이루어져 하나 이상의 가변 부위 프레임워크(framework) 글리코실화 부위를 제거함으로써, 그 부위에서 글리코실화를 제거할 수 있다. 이러한 아글리코실화는 항원에 대한 항체의 친화력을 증가시킬 수 있다. 이러한 접근법은 미국 특허 제 5,002,304 호에 더 상세하게 기술되어있다. 미국 특허 제 5,714,350 호 및 제 6,350,861 호; 이들 각각은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.
- [0047] 몇몇 구체예에서, 상기 항체는 NCBI 등록번호 NP\_003658.1의 서열 번호 47의 인간 LGR5 폴리펩티드 또는 이의 단편과 적어도 60% 이상의 동일성, 또는 적어도 70% 이상의 동일성, 또는 적어도 80% 이상의 동일성, 적어도 85% 이상의 동일성, 적어도 90% 이상의 동일성, 적어도 95% 이상의 동일성, 또는 적어도 97% 이상의 동일성, 적어도 99% 이상의 동일성, 또는 적어도 100% 이상의 동일성을 갖는 LGR5 폴리펩티드를 포함하는 또는 이로 구성된 폴리펩티드에 특이적으로 결합할 수 있다. 그러한 단편은 예를 들어, LGR5 폴리펩티드의 적어도 대략 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 또는 900 개인 연속적 또는 비연속적 아미노산, 또는 전술한 길이내의 범위 내에 있는 임의의 숫자의 연속적 또는

비연속적 아미노산일 수 있다.

- [0048] 상기 기술한 바와 같이, 본 발명의 병용 요법은 체크 포인트 억제제의 사용을 포함한다. 본원에 사용된 "체크 포인트 억제제"는 면역 체크 포인트 단백질의 활성을 억제하는 임의의 화합물 또는 물질을 의미한다. 체크 포인트 억제제는 면역 체크 포인트 분자 결합 단백질, 면역 체크 포인트 분자에 결합하는 항체 (또는 그의 단편 또는 변이체), 면역 체크 포인트 분자의 발현을 하향 조절하는 핵산, 또는 면역 체크 포인트 분자에 결합하고 (즉, 소형 유기 분자, 펩타이드 유사체, aptamer 등) 면역 체크 포인트 단백질의 기능 및 / 또는 활성을 억제하는 임의의 다른 분자를 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0049] 하나의 구체예에서, 면역 체크 포인트 억제제는 예정 사멸 리간드 1(PD-L1, 또는 B7-H1, CD274로도 불림), 예정 사멸 인자 1 (PD-1), CTLA-4, PD-L2 (B7-DC, CD273), LAG3, TIM3, 2B4, A2aR, B7H1, B7H3, B7H4, BTLA, CD2, CD27, CD28, CD30, CD40, CD70, CD80, CD86, CD137, CD160, CD226, CD276, DR3, GAL9, GITR, HAVCR2, HVEM, IDO1, IDO2, ICOS (유도성 T 세포 동시 자극제), KIR, LAIR1, LIGHT, MARCO (콜라겐 구조를 갖는 대식세포 수용체), PS (포스포타티셀린), OX-40, SLAM, TIGIT, VISTA, 및/또는 VTCN 1의 억제제로부터 선택된다.
- [0050] 일부 구체예에서, 상기 면역 체크 포인트 억제제는 PD-1의 억제제이다. 한 구체예에서, 상기 면역 체크 포인트 억제제는 항-PD-1 항체이다. 하나의 특정 구체예에서, 상기 면역 체크 포인트 억제제는 니볼루맙이다. 예를 들어, 미국 특허 제 7,029,674 호; 6,808,710; 또는 미국 특허 출원 제 20050250106 호 및 제 20050159351 호에 개시된 PD-1 생물학적 활성의 억제제(또는 이의 리간드)가 본원에 제공된 방법에서 사용될 수 있다. PD-1에 대한 예시적인 항체는 다음을 포함한다: BioXcell의 항 마우스 PD-1 항체 클론 J43 (Cat # BE0033-2); BioXcell의 항 마우스 PD-1 항체 클론 RMP1-14 (Cat # BE0146); 마우스 항 -PD-1 항체 클론 EH12; 머크의 MK-3475 항-마우스 PD-1 항체(Keytruda, pembrolizumab, lambrolizumab); 및 ANB011으로 알려진 AnaptysBio의 항 PD-1 항체; 항체 MDX-1 106 (ONO-4538); 브리스톨 마이어스 스쿼프(Bristol-Myers Squibb)의 인간 IgG4 단일 클론 항체 니볼루맙(nivolumab)(Opdivo®, BMS-936558, MDX1106); 아스트라젠카(AstraZeneca)의 AMP-514 및 AMP-224; 및 피디리주맙(Pidilizumab)(CT-011), CureTech Ltd.
- [0051] 일부 구체예에서, 상기 면역 체크 포인트 억제제는 PD-L1의 억제제이다. 예시적인 면역 체크 포인트 억제제는 항체(예를 들어, 항-PD-L1 항체), RNAi 분자 (예를 들어, 항 -PD-L1 RNAi), 안티센스 분자 (예를 들어, 항 -PD-L1 안티센스 RNA), 우성음성 단백질 (예를 들어, 우성 음성 PD-L1 단백질), 및 소분자 억제제를 포함한다. 예시적인 항 -PD-L1 항체는 클론 EH12를 포함한다. PD-L1에 대한 예시적인 항체는 다음을 포함한다: Genentech의 MPDL3280A (RG7446); BioXcell 의 항-마우스PD-L1 항체 클론10F. 9G2 (Cat #BE0101); Bristol-Myers Squibb의 항-PD-L1 단일클론 항체 MDX-1105 (BMS-936559) 및 BMS-935559; MSB0010718C; 마우스 항-PD-L1 클론 29E. 2A3; 및 AstraZeneca의 MEDI4736.
- [0052] 일부 구체예에서, 상기 면역 체크 포인트 억제제는 PD-L2의 억제제이다. 다른 구체예에서, 상기 면역 체크 포인트 억제제는 PD-1과 PD-L2 사이의 상호 작용을 감소시킨다. 예시적인 면역 체크 포인트 억제제는 항체 (예 : 항 -PD-L2 항체), RNAi 분자 (예 : 항 PD-L2 RNAi), 안티센스 분자 (예 : 항 PD-L2 안티센스 RNA), 우성 음성 단백질 (예 : 우성 음성 PD-L2 단백질), 소분자 억제제 등이 있다. 항체에는 단클론 항체, 인간화 항체, 탈 면역화된 항체 및 Ig 융합 단백질이 포함된다.
- [0053] 일부 구체예에서, 상기 면역 체크 포인트 억제제는 CTLA-4의 억제제이다. 한 구체예에서, 상기 면역 체크 포인트 억제제는 항-CTLA-4 항체이다. 하나의 특정 구체예에서, 상기 면역 체크 포인트 억제제는 이필리무맙이다. 한 구체예에서, 상기 항-CTLA-4 항체는 항원 제시 세포에서 발현되는 CD80(B7-1) 및/또는 CD86(B7-2)에 대한 CTLA-4의 결합을 차단한다. CTLA-4에 대한 예시적인 항체는 다음을 포함한다: Bristol-Myers Squibb의 항-CTLA-4 항체 이필리무맙 (Yervoy®, MDX-010, BMS-734016 및 MDX-101); 항-CTLA-4 항체, Millipore의 클론 9H10; Pfizer의 트레메리무맙(CP-675,206, 티실리무맙); 및 Abcam의 항 -MTLA4 항체 클론 BNI3.
- [0054] 일부 구체예에서, 상기 항-CTLA-4 항체는, 예를 들어: WO 98/42752; 미국 특허 제 6,682,736 및 6,207,156호; Hurwitz 외. (1998); Camacho 외. (2004) (항체 CP-675206); Mokyr 외. (1998) (본원에 참고로 통합됨) 에 개시되어 있다.
- [0055] 일부 구체예에서, 상기 CTLA-4 억제제는 WO1996040915에 개시된 CTLA-4 리간드이다. 일부 구체예에서, 상기 CTLA-4 억제제는 CTLA-4 발현의 핵산 억제제이다.
- [0056] 임의의 적합한 면역 체크 포인트 억제제가 본원에 개시된 조성물, 투여 형태 및 방법과 함께 사용되도록 고려된다. 상기 면역 체크 포인트 억제제의 선택은 다수의 인자에 의존하며, 상기 면역 체크 포인트 억제제의 선택은

당업자의 기술 범위 내에 있다. 예를 들어, 고려해야 할 요소는 상기 면역 체크 포인트 억제제의 추가 약물 상호 작용 및 면역 체크 포인트 억제제를 복용 할 수 있는 기간을 포함한다. 소정의 경우에서, 상기 면역 체크 포인트 억제제는 장기간, 예를 들어 만성적으로 복용할 수 있는 면역 체크 포인트 억제제이다.

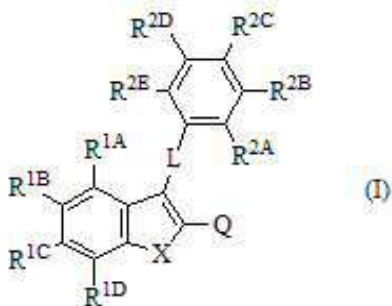
[0057] 구체예에서 상기 면역 체크 포인트 억제제가 항체인 경우, 항체는 단일 클론 항체, 합성 항체, 다클론 항체, 다중 특이성 항체 (이중 특이성 항체 포함), 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단일 항체 단일 사슬 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 이황화-결합된 Fv (sdFv) 및 상기 중 어느 것의 항원결정기 - 결합 단편을 포함하지 않기에 한정되는 것은 아니다. 특히, 본 발명에서 사용하기 위한 항체는 면역 글로불린 분자 및 면역 글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 즉 면역 체크 포인트 분자에 면역 특이적으로 결합하는, 면역 체크 포인트 분자에 대한 결합 부위를 함유하는 분자를 포함한다. 본 발명에서 사용하기 위한 상기 면역 글로불린 분자는 면역 글로불린 분자의 임의의 종류 (즉, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA and IgY), 클래스 (즉, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2) 또는 서브클래스일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에서 사용하기 위한 항체는 IgG, 보다 바람직하게는 IgG1일 수 있다.

[0058] 일 구체예에서, 추가적으로, 면역 체크 포인트 억제제는 MEDI-4736(WO2011066389 A1에 개시되어 있음), MPDL328 OA(US8217149 B2에 개시되어 있음) 및 MIH1(eBioscience (16.5983.82)를 통해 얻을 수 있는 아피메트릭스(Affymetrix)) 및 현재 연구 중인 다른 PD-L1 억제제와 같은 PD-L1을 차단하는 인간화 또는 완전 인간 항체를 포함 할 수있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에 따르면, 면역 체크 포인트 억제제는 바람직하게는 CTLA-4, PD-1 또는 PD-L1 억제제로부터 선택되며, 예를 들어 앞서 언급한 공지된 CTLA-4, PD-1 또는 PD-L1 억제제 (이필리무맙, 트레멜리무맙, 라브로리주맙, 니보루맙, 피디리주맙, AMP-244, MEDI-4736, MPDL328 OA, MIH1) 로부터 선택된다.

[0059] 본 발명의 상기 병용 요법은 일반적으로 환자에게 투여되는 전형적인 표준 암 치료의 보조요법로서 투여 될 것이다. 표준 화학 요법제의 예로는 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 메소트렉세이트(methotrexate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 독소루비신(doxorubicin), 뮤스틴(mustine), 빈크리스틴(vincristine), 프로카바진(procabazine), 프레드니솔론(prednisolone), 블레오미신(bleomycin), 빈블라스틴(vinblastine), 다카르바진(dacarbazine), 에토포시드(etoposide), 시스플라틴(cisplatin), 에피루비신(epirubicin), 카페씨타빈(capecitabine), 류코보린(leucovorin), 폴리닉산(folinic acid), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 겐시타빈(gemcitabine), 단백질 결합 파클리탁셀(protein bound paclitaxel), 이리노테칸(irinotecan) 등이 있다. 어떤 경우에는 표준 치료가 결장직장암 치료에 사용되는 5-플루오로우라실 + 류코보린 + 이리노테칸과 같은 복합제를 사용을 포함할 것이다.

[0060] 본 발명의 병용 요법은 혈관 저해제 (VDA)의 투여를 추가로 포함 할 수있다. 혈관 저해제에 관한 정보는 WO 06/084338, WO 07/087684 및 WO 08/070908에서 제공되며, 이들의 개시 내용은 본원에 참고로 인용되어 있다.

[0061] 바람직하게는, 혈관 저해제는 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 염, 용매화물 또는 프로드러그 및 이들의 염이다.



[0062]

[0063] 상기;

[0064] X는 O, S, SO, SO<sub>2</sub>, Se, SeO, SeO<sub>2</sub> 또는 NR을 나타내며 상기 R은 H, O, 선택적으로 치환된 아실, 선택적으로 치환된 알케닐, 선택적으로 치환된 알킬, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 시클로알케닐, 선택적으로 치환된 시클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 헤테로시클릴, 및 선택적으로 치환된 설포닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0065] R<sup>1A</sup> 및 R<sup>1B</sup> 는 각각 독립적으로 H, 카복시, 시아노, 디할로메톡시, 할로젠, 히드록시, 니트로, 펜타할로에틸, 포스

포털아미노, 포스포노, 포스피닐, 설펜, 트리할로에테닐, 트리할로메타네티오, 트리할로메톡시, 트리할로메틸, 선택적으로 치환된 아실, 선택적으로 치환된 아실아미노, 선택적으로 치환된 아실이미노, 선택적으로 치환된 아실이미녹시, 선택적으로 치환된 아실옥시, 선택적으로 치환된 아릴알킬, 선택적으로 치환된 아릴알콕시, 선택적으로 치환된 알케닐, 선택적으로 치환된 알케닐록시, 선택적으로 치환된 알콕시, 선택적으로 치환된 알킬, 선택적으로 치환된 알키닐, 선택적으로 치환된 알키닐옥시, 선택적으로 치환된 아미노, 선택적으로 치환된 아미노아실, 선택적으로 치환된 아미노아실옥시, 선택적으로 치환된 아미노설펜, 선택적으로 치환된 아미노시오아실, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 아릴옥시, 선택적으로 치환된 시클로알케닐, 선택적으로 치환된 시클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 헤테로시클릴, 선택적으로 치환된 옥시아실, 선택적으로 치환된 옥시아실아미노, 선택적으로 치환된 옥시아실옥시, 선택적으로 치환된 옥시아실이미노, 선택적으로 치환된 옥시설펜아미노, 선택적으로 치환된 옥시설펜아미노, 선택적으로 치환된 옥시시오아실, 선택적으로 치환된 옥시시오아실옥시, 선택적으로 치환된 설펜, 선택적으로 치환된 설펜아미노, 선택적으로 치환된 시오, 선택적으로 치환된 시오아실, 선택적으로 치환된 시오아실아미노를 나타내며, 또는 R<sup>1A</sup> 및 R<sup>1B</sup> 가 함께 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 헤테로시클릴, 선택적으로 치환된 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 시클로알킬, 또는 선택적으로 치환된 시클로알케닐을 형성하며;

[0066] R<sup>1C</sup> 은 C<sub>1-3</sub> 알콕시, C<sub>1-3</sub> 알킬시오, C<sub>1-3</sub> 알킬아미노, 또는 C<sub>1-3</sub> 디알킬아미노를 나타내며;

[0067] R<sup>1D</sup> 는 히드록시 또는 아미노를 나타내며;

[0068] L은 C=O, O, S, SO, SO<sup>2</sup>, Se, SeO, SeO<sup>2</sup>, C=NZ', 또는 NR'을 나타내며 상기 Z'는 H, 선택적으로 치환된 알킬, 선택적으로 치환된 아릴 또는 선택적으로 치환된 아미노; 및 상기 R' 은 H, O, 선택적으로 치환된 아실, 선택적으로 치환된 알케닐, 선택적으로 치환된 알킬, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 시클로알케닐, 선택적으로 치환된 시클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 헤테로시클릴, 또는 선택적으로 치환된 설펜에서 선택되는 것이며;

[0069] R<sup>2A</sup>-R<sup>2E</sup> 각각 독립적으로 H, 카복시, 시아노, 디할로메톡시, 할로젠, 히드록시, 니트로, 펜타할로에틸, 포스포릴 아미노, 포스포노, 포스피닐, 설펜, 트리할로에테닐, 트리할로메탄에시오, 트리할로메톡시, 트리할로메틸, 선택적으로 치환된 아실, 선택적으로 치환된 아실아미노, 선택적으로 치환된 아실이미노, 선택적으로 치환된 아실이미녹시, 선택적으로 치환된 아실옥시, 선택적으로 치환된 아릴알킬, 선택적으로 치환된 아릴알콕시, 선택적으로 치환된 알케닐, 선택적으로 치환된 알케닐옥시, 선택적으로 치환된 알콕시, 선택적으로 치환된 알킬, 선택적으로 치환된 알키닐, 선택적으로 치환된 알키닐옥시, 선택적으로 치환된 아미노, 선택적으로 치환된 아미노아실, 선택적으로 치환된 아미노아실옥시, 선택적으로 치환된 아미노설펜, 선택적으로 치환된 아미노시오아실, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 아릴옥시, 선택적으로 치환된 시클로알케닐, 선택적으로 치환된 시클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 헤테로시클릴, 선택적으로 치환된 옥시아실, 선택적으로 치환된 옥시아실아미노, 선택적으로 치환된 옥시아실이미노, 선택적으로 치환된 옥시아실옥시, 선택적으로 치환된 옥시설펜아미노, 선택적으로 치환된 옥시설펜아미노, 선택적으로 치환된 옥시시오아실, 선택적으로 치환된 옥시시오아실옥시, 선택적으로 치환된 설펜, 선택적으로 치환된 설펜아미노, 선택적으로 치환된 시오, 선택적으로 치환된 시오아실, 선택적으로 치환된 시오아실아미노, 선택적으로 치환된 시오아실옥시를 나타내며; 또는 R2A 및 R2B, R2B 및 R2C, R2C 및 R2D, 및 R2D 및 R2E 중 어느 하나가 함께 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 헤테로시클릴, 선택적으로 치환된 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 시클로알킬, 또는 선택적으로 치환된 시클로알케닐을 형성하며; 및

[0070] Q는H, CN, 할로젠, 트리알킬실릴, 선택적으로 치환된 알킬, 선택적으로 치환된 알케닐, 선택적으로 치환된 알키닐, 선택적으로 치환된 아실, 선택적으로 치환된 옥시아실, 선택적으로 치환된 아실아미노, 선택적으로 치환된 아미노아실아미노, OR'', SR'' 또는 NR''R''를 나타내며, 상기 각각의 R'' 은 독립적으로H, 선택적으로 치환된 알킬, 선택적으로 치환된 알케닐, 선택적으로 치환된 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 헤테로시클릴, 선택적으로 치환된 아실 및 선택적으로 치환된 옥시아실, 또는 NR''NR''을 나타내며, 상기 각각의 R''은 독립적으로 H, 선택적으로 치환된 알킬, 선택적으로 치환된 알케닐, 선택적으로 치환된 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴 및 선택적으로 치환된 헤테로아릴을 나타낸다.

[0071] 바람직하게는 상기 혈관 저해제는 2-메틸-7-히드록시-3-(3,4,5-트리메톡시벤조일)-6-메톡시벤조퓨란(BNC105)

또는 디소듐 [6-메톡시-2-메틸- 1-3-(3,4,5-트리메톡시벤조일)-1-벤조퓨란-7-일] 포스페이트(BNC105P)이다.

[0072] 치료하는 종양은 광범위한 종양 중 임의의 것일 수 있지만, 소정의 구체예에서 상기 병용 요법은 방광암 종양, 유방암 종양, 결장암 종양, 위장암 종양, 신장암 종양, 폐암 종양, 난소암 종양, 췌장암 종양, 전립선암 종양, 근위 또는 원위 담관암 종양, 흑색종, 결장직장암 종양, 전이성 결장직장암 종양, 전이성 췌장암 종양, 삼중 음성 유방암 종양 및 소세포 폐암 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된 종양에 대한 치료이다.

[0073] 실험예

[0074] 실험예 1. 18G7 (BNC101 마우스 등가물)과 항-PD1의 병용

[0075] 본 발명자들은 신체닉(syngenic) MC38 마우스 대장 종양 모델에서 면역 치료용 항-PD1 항체와 조합하여 18G7 (WO 2015/153916에서 상세히 기술됨)의 효능을 결정하기 위한 연구를 수행했다. 18G7 항체를 15 mg/kg i.v.로 1일, 8일 및 15일, 항-PD1 항체(클론 RMP1-14)를 5mg/kg i.p.로 1일, 4일, 8일, 12일 및 16일에 주사했다. C57/BL6 마우스에게 MC38 세포를 피하로 주입하였다. 종양이 대략 100-150mm<sup>3</sup>의 체적에 도달했을 때, 동물들을 무작위로 그룹당 10마리 마우스로 나누었다.

표 1

| 그룹 | 개체수 | 처리                    | 투여레벨    | 투여방식 | 투여일정/일              | 투약일                     |
|----|-----|-----------------------|---------|------|---------------------|-------------------------|
| 1  | 15  | PBS                   | -       | 복강 내 | 1, 4, 8, 12, 15, 16 | 1, 4, 8, 12, 15, 16, 19 |
| 2  | 15  | 마우스 IgG1 동종형(isotype) | 15mg/kg | 복강 내 | 1, 8, 15            | 1, 8, 15, 19            |
|    |     | 랫 IgG2a 동종형           | 5mg/kg  | 복강 내 | 1, 4, 8, 12, 16     | 1, 4, 8, 12, 16, 19     |
| 3  | 15  | 18G7 항체               | 15mg/kg | 복강 내 | 1, 8, 15            | 1, 8, 15, 19            |
|    |     | 랫 IgG2a 동종형           | 5mg/kg  | 복강 내 | 1, 4, 8, 12, 16     | 1, 4, 8, 12, 16, 19     |
| 4  | 15  | 마우스 IgG1 동종형          | 15mg/kg | 복강 내 | 1, 8, 15            | 1, 8, 15, 19            |
|    |     | 항-PD-1                | 5mg/kg  | 복강 내 | 1, 4, 8, 12, 16     | 1, 4, 8, 12, 16, 19     |
| 5  | 15  | 18G7 항체               | 15mg/kg | 복강 내 | 1, 8, 15            | 1, 8, 15, 19            |
|    |     | 항-PD-1                | 5mg/kg  | 복강 내 | 1, 4, 8, 12, 16     | 1, 4, 8, 12, 16, 19     |

[0076] 이 연구의 목적은 18G7 항체의 생체 내 치료 효능을 전임상으로 평가하는 것으로서, 18G7 항체는 C57BL / 6 면역성 마우스의 피하 MC38 마우스 결장 선암종 모델의 치료에서, 항-PD-1 항체와 조합하거나 또는 단독 요법으로 투여 될 수 있다. 이 신체닉 모델은 항 PD-1 단일 요법에 반응하여, 전통적인 종양 성장 억제 연구의 보완적인 치료법에서 상가 / 상승 효과를 나타낼 수 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 암 줄기 세포(CSC) 표적 체제에 대한 예상 효과는 직접적인 TGI 효과가 반드시 단기 연구에서 바로 보여지는 것은 아니고, 치료가 표준 화학 요법 또는 수술 후 종양과 면역 체계를 장기간 촉진하여, 반응 기간을 연장하도록 한다. 현재의 연구는 이것이 사실임을 나타낸다.

[0078] 도 1에서, 종양 성장 억제 그래프는 항 PD-1이 MC38 모델로부터 예상된 바와 같이 성장 억제면에서 효과자(effector)임을 나타낸다. 18일 동안 종양 성장 억제제를 관찰하고 있는 이 실험 포맷에서, 18G7 항체에 의한 LGR5 저해로부터의 추가적인 잇점은 도출해 내지 못했다. MC38 세포는 LGR5를 발현하는 것으로 알려져 있지만, 18G7 항체가 세포에 결합하는 것은 직접적인 항-증식 효과를 나타내지 않았다.

[0079] CSCs는 종양 미세 환경에 대한 면역 억제 능력을 갖고, 종양에 대한 면역 공격을 약화시키는 것으로 알려져 있다. BNC101 치료로 LGR5 + ve CSCs를 감소시키는 것이 이상적으로 면역 억제 능력을 제한하여 항 PD-1의 치료 활성을 더 높일 수 있다. 이 효과는 이러한 동물 모델의 윤리적 한계보다 더 오래 걸릴 수 있는 효과이며, 이는 재이식 분석(re-implantation assay)에서의 입증에 허용하거나 입증되어야 한다.

[0080] 이러한 한계를 고려할 때, 유세포 분석을 통한 유동 세포 측정 분석법은 초기 시기인 18일 내에 나타낼 수 없었

던(비록 항 PD-1이 이때, 추측되는 기전을 통한 활성을 가지고, 그로 인해 세포 독성 T 세포가 종양 표적에 대해 살아남을 수 있음에도 불구하고), 변화를 가리키는 세포수 변동을 나타내는, 효과자 면역 세포의 스냅 샷을 허용한다. 종료시 (20 일째)에 샘플에 대해 유동 세포 측정 분석법을 수행 하였다. 종양을 다음 집단에 대해 분석 하였다: CD3, CD4, CD8; CD4, CD25, Foxp3 및 CD11b, Ly6G, Ly6C.

[0081] 종양에 대한 총 T 세포(CD3+ve) 동원은, 항-PD-1 처리 동물로부터의 종양에서 T 세포 함량의 유의하지 않은 작은 증가가 관찰됨에도 불구하고, 치료를 통해 상대적으로 안정을 유지하며, 이는 CD8 세포(CD3의 서브세트)를 유지 / 증식시키는 치료와 일치한다(도 2)

[0082] 종양에 기초한 세포 독성 T 세포의 유의적인 증가는 항-PD-1 처리 동물에서 명백하며, 가장 흥미롭게도 18G7의 첨가에 의해 더욱 증가된다. 항-PD-1 및 항 -PD-1 + 18G7의 비교는 유의적이지 않다고 할지라도, 동종형에 비해 유의적인 증가는, 면역 억제성 CSC의 감소가 세포 독성 T 세포의 더 큰 축적을 허용한다 -"면역계를 제동을 끊는다"는 전제와 일치하는 효과를 보여준다는 것이다(도 3). CSCs만이 아닌 LGR5 발현 종양 덩어리의 항 -LGR5 타겟팅에 의해 유발되는 다른 종양 미세 환경 인자가 이러한 효과에 부가적으로 기여할 수 있다.

[0083] 종양 조절 T 세포의 분석은 실험 결과 중에서 아마도 가장 유망하다. 조절 T 세포 (CD4 + / CD25 + / FoxP3 +) 또는 억제 세포는 일반적으로 면역계의 국소 활성화를 억제하거나 하향 조절하여 병리학적 자기 반응성을 예방한다. 암에 관한 맥락에서 이것은 종양에 의한 면역 완충 및 면역 회피로 전환되어 세포 독성 CD8 세포의 유도 및 증식을 억제한다.

[0084] 조절 T 세포를 통한 CSC와 면역 억제 사이의 복잡한 신호 전달 전달 경로 연합은 문헌에 나타나며 잠재적으로 이것을 가리킨다. 동종형 대조군에 비해 조절 T 세포는 18G7 치료에서 감소하고(9.4%), 항 PD-1 단일 요법이 사용되는 경우 조절 T세포는 크게 감소하고(33.9 % 감소), 18G7 (57.3 % 감소)과 함께 사용되었을 때는, 조절 T세포가 더 크게 감소했다(도 4). 이 결과는 면역 요법 병용 분야에서 항-LGR5 항체 치료를 위한 입지를 이해하는데 핵심이 될 수 있다.

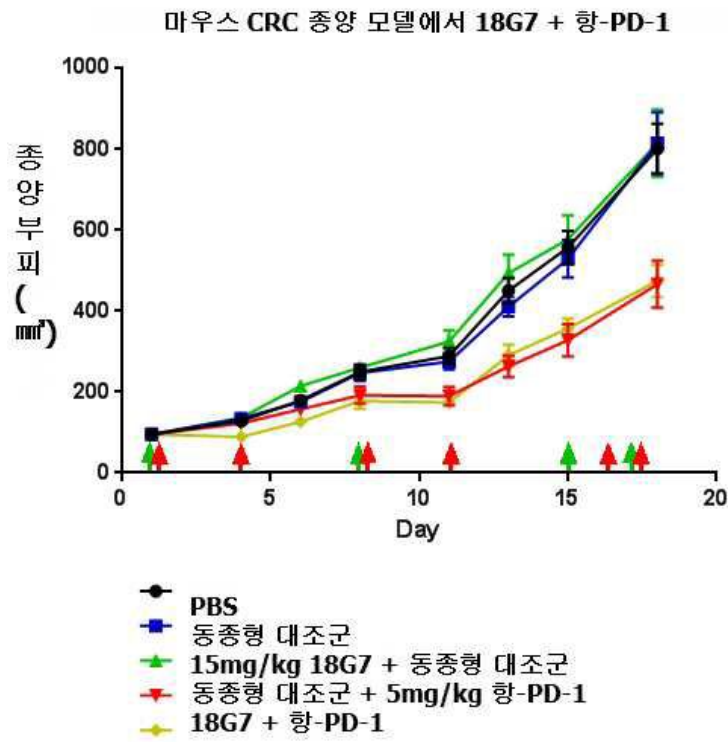
**표 2**

[0085]

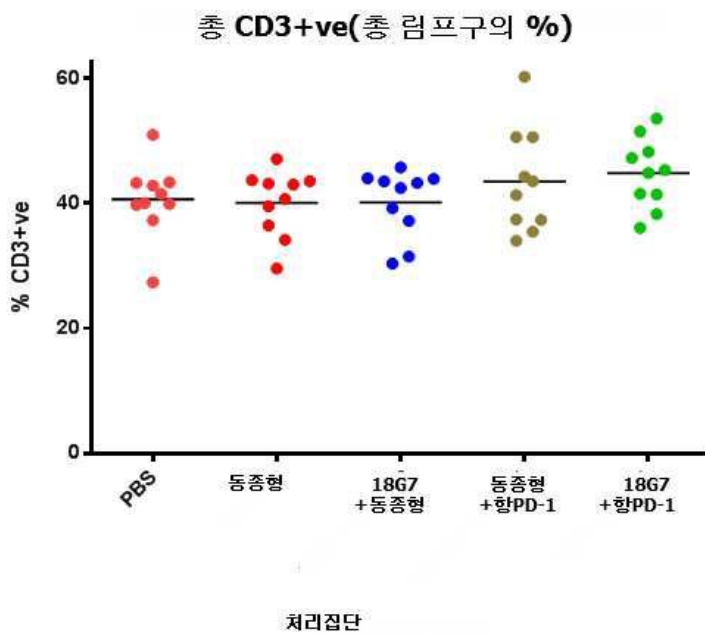
| 표현        | 서열 번호 |
|-----------|-------|
| 중쇄 CDR1   | 1     |
| 중쇄 CDR2   | 2     |
| 중쇄 CDR3   | 3     |
| 경쇄 CDR1   | 4     |
| 경쇄 CDR2   | 5     |
| 경쇄 CDR3   | 6     |
| 중쇄 가변 도메인 | 7     |
| 경쇄 가변 도메인 | 8     |
| 중쇄 가변 도메인 | 9     |
| 경쇄 가변 도메인 | 10    |

도면

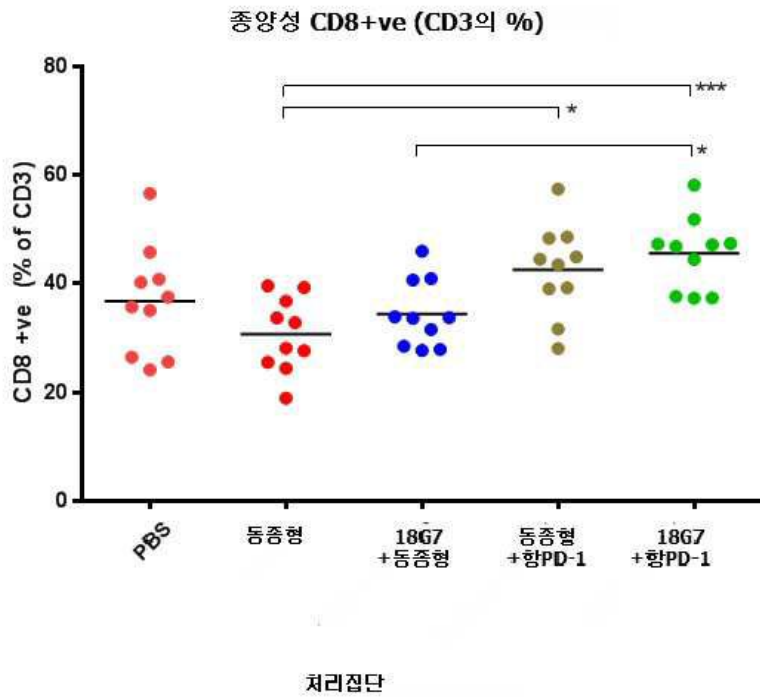
도면1



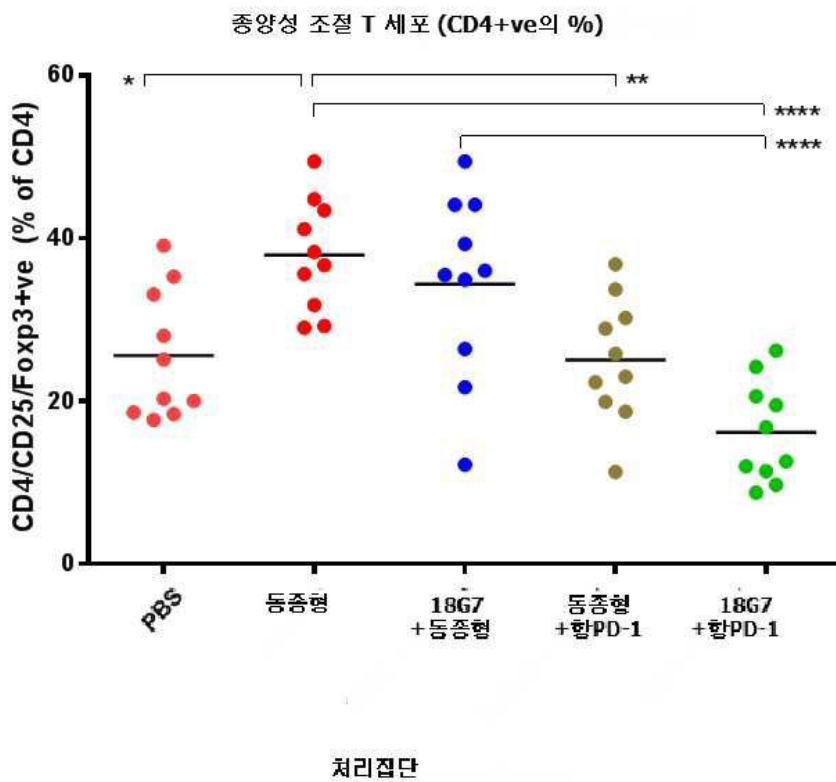
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> BIONOMICS LIMITED

<120> Antibody and checkpoint inhibitor combination therapy

<130> PM036039  
 <150> PCT/AU  
 <151> 2016-09-16  
 <160> 10  
 <170> KoPatentIn 3.0  
 <210> 1  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(24)  
 <223> Heavy Chain CDR1  
 <400> 1

Gly Leu Tyr Thr Tyr Arg Thr His Arg Pro His Glu Ser Glu Arg Gly  
 1 5 10 15

Leu Tyr Thr Tyr Arg Thr Arg Pro

20

<210> 2  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(22)  
 <223> 18G7.1 Heavy Chain CDR2 Amino Acid  
 <400> 2

Ile Leu Glu Leu Glu Pro Arg Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Ala Ser Pro  
 1 5 10 15

Ser Glu Arg Thr His Arg

20

<210> 3  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(33)

<223> Heavy Chain CDR3

<400> 3

Ala Leu Ala Ala Arg Gly Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Thr Tyr Arg Thr

1 5 10 15

Tyr Arg Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Ser Glu Arg Gly Leu Asn Thr Tyr

20 25 30

Arg

<210> 4

<211> 29

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(29)

<223> Light Chain CDR1

<400> 4

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

1 5 10 15

Arg Gly Leu Tyr Ala Ser Asn Ser Glu Arg Pro His Glu

20 25

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(8)

<223> Light Chain CDR2

<400> 5

Leu Glu Thr His Arg Ser Glu Arg

1 5

<210> 6

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(25)

<223> Light Chain CDR3

<400>

6

Gly Leu Asn Gly Leu Asn Ala Ser Asn Ala Leu Ala Gly Leu Ala Ser

1 5 10 15

Pro Pro Arg Ala Arg Gly Thr His Arg

20 25

<210> 7

<211> 391

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(391)

<223> Heavy Chain Variable Domain

<400> 7

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

1 5 10 15

Leu Pro His Glu Leu Glu Pro His Glu Pro His Glu Leu Glu Ser Glu

20 25 30

Arg Val Ala Leu Thr His Arg Thr His Arg Gly Leu Tyr Val Ala Leu

35 40 45

His Ile Ser Ser Glu Arg Gly Leu Val Ala Leu Gly Leu Asn Leu Glu

50 55 60

Val Ala Leu Gly Leu Asn Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Ala Leu Ala Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Ser Glu Arg Leu Glu Ala Arg Gly Ile Leu Glu Ser Glu Arg Cys



355 360 365  
 Gly Leu Tyr Thr His Arg Leu Glu Val Ala Leu Thr His Arg Val Ala

370 375 380  
 Leu Ser Glu Arg Ser Glu Arg

385 390

<210> 8

<211> 391

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(391)

<223> Heavy Chain Variable Domain

<400> 8

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

1 5 10 15

Leu Pro His Glu Leu Glu Pro His Glu Pro His Glu Leu Glu Ser Glu

20 25 30

Arg Val Ala Leu Thr His Arg Thr His Arg Gly Leu Tyr Val Ala Leu

35 40 45

His Ile Ser Ser Glu Arg Gly Leu Val Ala Leu Gly Leu Asn Leu Glu

50 55 60

Val Ala Leu Gly Leu Asn Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Ala Leu Ala Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Ser Glu Arg Leu Glu Ala Arg Gly Ile Leu Glu Ser Glu Arg Cys

100 105 110

Tyr Ser Leu Tyr Ser Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Thr Tyr

115 120 125

Arg Ser Glu Arg Pro His Glu Thr His Arg Ala Leu Ala Thr Tyr Arg

130 135 140

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

385                    390  
 <210>    9  
 <211>    365  
 <212>    PRT  
 <213>    Artificial Sequence  
 <220><223>    Synthetic  
 <220><221>    MISC\_FEATURE  
 <222>    (1)..(365)  
 <223>    Light Chain Variable Domain  
 <400>    9

Met Glu Thr Ser Glu Arg Val Ala Leu Pro Arg Thr His Arg Gly Leu  
       1                  5                  10                  15  
 Asn Val Ala Leu Leu Glu Gly Leu Tyr Leu Glu Leu Glu Leu Glu Leu  
                   20                  25                  30  
 Glu Thr Arg Pro Leu Glu Thr His Arg Ala Ser Pro Ala Leu Ala Ala  
                   35                  40                  45  
 Arg Gly Cys Tyr Ser Ala Ser Pro Ile Leu Glu Val Ala Leu Leu Glu  
       50                  55                  60  
 Thr His Arg Gly Leu Asn Ser Glu Arg Pro Arg Ala Leu Ala Ser Glu  
       65                  70                  75                  80  
 Arg Leu Glu Ala Leu Ala Val Ala Leu Ser Glu Arg Pro Arg Gly Leu  
                   85                  90                  95  
 Tyr Gly Leu Asn Ala Arg Gly Ala Leu Ala Thr His Arg Ile Leu Glu  
                   100                  105                  110  
  
 Thr His Arg Cys Tyr Ser Ala Arg Gly Ala Leu Ala Ser Glu Arg Gly  
       115                  120                  125  
 Leu Ser Glu Arg Val Ala Leu Ala Ser Pro Ser Glu Arg Thr Tyr Arg  
       130                  135                  140  
 Gly Leu Tyr Ala Ser Asn Ser Glu Arg Pro His Glu Met Glu Thr His  
       145                  150                  155                  160  
 Ile Ser Thr Arg Pro Thr Tyr Arg Gly Leu Asn Gly Leu Asn Leu Tyr  
                   165                  170                  175

Ser Pro Arg Gly Leu Tyr Gly Leu Asn Pro Arg Pro Arg Leu Tyr Ser  
 180 185 190  
 Leu Glu Leu Glu Ile Leu Glu Thr Tyr Arg Leu Glu Thr His Arg Ser  
 195 200 205  
 Glu Arg Ala Ser Asn Leu Glu Gly Leu Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Val  
 210 215 220  
 Ala Leu Pro Arg Ala Ser Pro Ala Arg Gly Pro His Glu Ser Glu Arg  
 225 230 235 240  
 Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Thr  
 245 250 255  
  
 His Arg Ala Ser Pro Pro His Glu Thr His Arg Leu Glu Thr His Arg  
 260 265 270  
 Ile Leu Glu Ala Ser Asn Pro Arg Val Ala Leu Gly Leu Ala Leu Ala  
 275 280 285  
 Ala Ser Asn Ala Ser Pro Ala Leu Ala Ala Leu Ala Thr His Arg Thr  
 290 295 300  
 Tyr Arg Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Gly Leu Asn Gly Leu Asn Ala Ser  
 305 310 315 320  
 Asn Ala Leu Ala Gly Leu Ala Ser Pro Pro Arg Ala Arg Gly Thr His  
 325 330 335  
 Arg Pro His Glu Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Gly Leu Tyr Thr His Arg  
 340 345 350  
 Leu Tyr Ser Leu Glu Gly Leu Ile Leu Glu Leu Tyr Ser  
 355 360 365  
 <210> 10  
 <211> 365  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(365)  
 <223> Light Chain Variable Domain

<400> 10

Met Glu Thr Ser Glu Arg Val Ala Leu Pro Arg Thr His Arg Gly Leu

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

Arg Leu Glu Ala Leu Ala Val Ala Leu Ser Glu Arg Pro Arg Gly Leu  
 85 90 95  
 Tyr Gly Leu Asn Ala Arg Gly Ala Leu Ala Thr His Arg Ile Leu Glu  
 100 105 110  
 Thr His Arg Cys Tyr Ser Ala Arg Gly Ala Leu Ala Ser Glu Arg Gly  
 115 120 125  
 Leu Ser Glu Arg Val Ala Leu Ala Ser Pro Ser Glu Arg Thr Tyr Arg  
 130 135 140  
 Gly Leu Tyr Ala Ser Asn Ser Glu Arg Pro His Glu Met Glu Thr His

145 150 155 160  
 Ile Ser Thr Arg Pro Thr Tyr Arg Gly Leu Asn Gly Leu Asn Leu Tyr  
 165 170 175  
 Ser Pro Arg Gly Leu Tyr Gly Leu Asn Pro Arg Pro Arg Leu Tyr Ser  
 180 185 190  
 Leu Glu Leu Glu Ile Leu Glu Thr Tyr Arg Leu Glu Thr His Arg Ser  
 195 200 205  
 Glu Arg Ala Ser Asn Leu Glu Gly Leu Ser Glu Arg Gly Leu Tyr Val  
 210 215 220

Ala Leu Pro Arg Ala Ser Pro Ala Arg Gly Pro His Glu Ser Glu Arg  
 225 230 235 240

