



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0051651
(43) 공개일자 2018년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/525 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) C12N 7/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/525 (2013.01)
A61K 38/177 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7012378
(22) 출원일자(국제) 2016년09월30일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년04월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/054598
(87) 국제공개번호 WO 2017/059168
국제공개일자 2017년04월06일
(30) 우선권주장
62/235,727 2015년10월01일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
히트 바이오로직스, 인코퍼레이티드
미국 노스캐롤라이나주 27713 더럼 베이 12 카피
톨라 드라이브 801
(72) 발명자
슈라이버 테일러
미국 노스캐롤라이나주 27713 더럼 베이 12 카피
톨라 드라이브 801 히트 바이오로직스, 인코퍼레이티드 내
프롬 조지
미국 노스캐롤라이나주 27713 더럼 베이 12 카피
톨라 드라이브 801 히트 바이오로직스, 인코퍼레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아주김장리

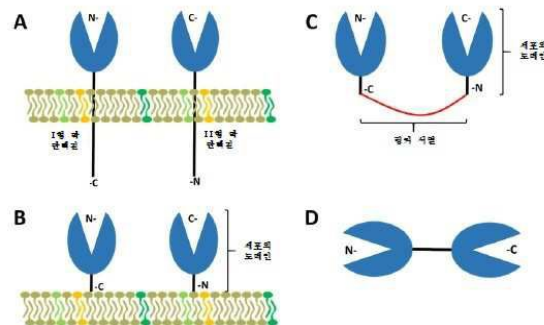
전체 청구항 수 : 총 48 항

(54) 발명의 명칭 비상동성 키메라 단백질로서의 I형 및 II형 세포외 도메인을 인접시키기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 특히 질환의 치료, 예컨대 암 및 자가면역에 대한 면역치료에서 용도가 발견되는 키메라 단백질을 포함하는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 부분적으로, 본 발명은, 다양한 실시형태에서, 자극 또는 저해 효과를 가질 수 있는 막관통 단백질의 세포외 도메인의 융합을 제공한다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 38/191 (2013.01)
C07K 14/70596 (2013.01)
C12N 15/85 (2013.01)
C12N 7/00 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

드 실바 수레쉬

미국 노스캐롤라이나주 27713 더럼 베이 12 카피톨
 라 드라이브 801 히트 바이오로직스, 인코퍼레이티
 드 내

실링 널

미국 노스캐롤라이나주 27713 더럼 베이 12 카피톨
 라 드라이브 801 히트 바이오로직스, 인코퍼레이티
 드 내

(30) 우선권주장

62/263,313 2015년12월04일 미국(US)
 62/372,574 2016년08월09일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

비상동성 키메라 단백질로서,

(a) N 말단에서의 또는 그 근처에서의 I형 막관통 단백질의 제1 세포외 도메인, (b) C 말단에서의 또는 그 근처에서의 II형 막관통 단백질의 제2 세포외 도메인, 및 (c) 링커를 포함하되,

상기 제1 및 제2 세포외 도메인 중 하나는 면역 저해 신호이고, 그리고

상기 제1 및 제2 세포외 도메인 중 하나는 면역 자극 신호인, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 면역 저해 신호는 TIM-3, BTLA, PD-1, TMIGD2, TIGIT, CD172a/SIRP α , VSIG8 또는 이들의 변이체 중 하나 이상인, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 면역 저해 신호는 PD-1, 또는 이의 변이체인, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 면역 자극 신호는 4-1BB 리간드, GITR 리간드, OX-40 리간드, LIGHT(CD258), CD70, CD30 리간드, CD40 리간드, TRAIL 및 TL1A, 또는 이들의 변이체 중 하나 이상인, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 면역 자극 신호는 OX40 리간드, 또는 이의 변이체인, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 (i) 상기 PD-1의 세포외 도메인 및 (ii) OX40L의 세포외 도메인을 포함하는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 서열 번호 22와 적어도 95%의 서열 유사성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 (i) 상기 PD-1의 세포외 도메인 및 (ii) GITRL의 세포외 도메인을 포함하는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 (i) 상기 BTLA의 세포외 도메인 및 (ii) OX40L의 세포외 도메인을 포함하는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 (i) 상기 TIGIT의 세포외 도메인 및 (ii) OX40L의 세포외 도메인을 포함하는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 (i) 상기 TIM3의 세포의 도메인 및 (ii) OX40L의 세포의 도메인을 포함하는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 (i) 상기 CD172a의 세포의 도메인 및 (ii) CD40L의 세포의 도메인을 포함하는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 용합은 (i) 상기 CD115의 세포의 도메인 및 (ii) 상기 CD40L의 세포의 도메인을 포함하는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 재조합 용합 단백질인, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 세포의 도메인 중 하나는 저해 면역 신호를 감소시키거나 마스킹하거나 제거할 수 있는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 세포의 도메인 중 하나는 면역 자극 신호를 증가시키거나 자극하거나 활성화할 수 있는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 (i) 면역 저해 신호를 감소시키거나 제거하는 것, (ii) 면역 자극 신호를 증가시키거나 활성화하는 것 둘 다를 할 수 있는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 이펙터 T 세포 대 조절 T 세포의 비율을 증가시킬 수 있는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 세포독성 T 세포; 이펙터 기억 T 세포; 중앙 기억 T 세포; CD8⁺ 줄기 세포 기억 이펙터 세포; TH1 이펙터 T 세포; TH2 이펙터 T 세포; TH9 이펙터 T 세포; TH17 이펙터 T 세포; 및/또는 이펙터 T 세포 분비 IL-2, IL-4 및/또는 IFN- γ 의 하위집단을 증가시키고/시키거나, 이들의 감소를 방지할 수 있는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 상기 키메라 단백질의 적절한 용량을 한정하는 수단으로서 사용될 수 있는 동물의 말초 혈액에서의 사이토카인 반응을 발생시키는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 21

제1항에 있어서, 상기 링커는 임의로 가요성 아미노산 서열, IgG 힌지 영역 또는 항체 서열로부터 선택된 폴리펩타이드인, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 링커는 합성 링커, 임의로 PEG인, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 링커는 IgG1, 임의로 인간 IgG1로부터 유래된 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인을 포함하는, 비상

동성 키메라 단백질.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 링커는 IgG1, 임의로 인간 IgG4로부터 유래된 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인을 포함하는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 25

제1항에 있어서, 상기 키메라 단백질은 분비 가능한 및 완전히 기능성인 단일 폴리펩타이드 사슬로서 포유류 숙주 세포에서 제조 가능한, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 비상동성 키메라 단백질을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 비상동성 키메라 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는, 발현 벡터.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 발현 벡터는 포유류 발현 벡터인, 발현 벡터.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 발현 벡터는 DNA 또는 RNA를 포함하는, 발현 벡터.

청구항 30

제27항 내지 제29항 중 어느 한 항의 발현 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 31

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 키메라 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 바이러스.

청구항 32

암을 치료하는 방법으로서, 암의 치료를 요하는 대상체에게 유효량의 제26항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 33

자가면역 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 자가면역 질환 또는 장애의 치료를 요하는 대상체에게 유효량의 제26항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 34

환자의 면역 반응을 조절하는 방법으로서, 면역 반응의 조절을 요하는 대상체에게 유효량의 제26항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 35

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자의 T 세포는 면역 자극 신호를 가지는 세포의 도메인에 의해 활성화된, 방법.

청구항 36

제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 종양을 가지고, 하나 이상의 종양 세포는 면역 저해 신호를 가지는 세포의 도메인에 의해 활성화된 면역억제 신호를 절단하는 것이 방지되는, 방법.

청구항 37

비상동성 키메라 단백질로서,

(i) 서열 번호 39 내지 55 중 어느 하나, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열; 및

(ii) 서열 번호 56 내지 69 중 어느 하나, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 포함하는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 38

제37항에 있어서, (iii) 서열 번호 70 내지 72 중 어느 하나, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 추가로 포함하되, (iii)은 (i)과 (ii) 사이에 대체된, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 39

제37항에 있어서, (iv) 서열 번호 73 내지 78 중 하나의 아미노산 서열 중 하나 이상을 추가로 포함하고, (iv)는 (iii)에 인접한, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 40

비상동성 키메라 단백질로서, 서열 번호 2 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 포함하는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 41

비상동성 키메라 단백질로서, 서열 번호 5 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 포함하는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 42

비상동성 키메라 단백질로서, 서열 번호 7 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 포함하는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 43

비상동성 키메라 단백질로서, 서열 번호 9 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 포함하는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 44

비상동성 키메라 단백질로서, 서열 번호 11 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 포함하는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 45

비상동성 키메라 단백질로서, 서열 번호 13 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 포함하는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 46

비상동성 키메라 단백질로서, 서열 번호 15 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 포함하는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 47

비상동성 키메라 단백질로서, 서열 번호 22 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 포함하는, 비상동성 키메라 단백질.

청구항 48

제37항 내지 제47항 중 어느 한 항의 비상동성 키메라 단백질을 포함하는, 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 우선권

[0002] 본 출원은 2015년 10월 1일에 출원된 미국 가출원 제62/235,727호, 2015년 12월 4일에 출원된 미국 가출원 제62/263,313호 및 2016년 8월 9일에 출원된 미국 가출원 제62/372,574호(이들 모두 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)의 이익 및 이에 대한 우선권을 주장한다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 특히 질환의 치료, 예컨대 암 및 자가면역에 대한 면역치료에서 용도가 발견되는 키메라 단백질을 포함하는 조성물 및 방법에 관한 것이다.

[0005] 전자로 제출된 텍스트 파일의 설명

[0006] 본 명세서와 함께 전자로 제출된 텍스트 파일의 내용은 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함된다: 서열 목록의 컴퓨터 판독 가능한 포맷 카피(파일명: HTB-023PC-Sequence Listing.txt; 기록된 날짜: 2016년 9월 29일; 파일 크기: 140KB).

배경 기술

[0007] 암과 면역계 사이의 상호작용은 복잡하고 다측면적이다. 문헌[de Visser *et al.*, *Nat. Rev. Cancer* (2006) 6:24-37]을 참조한다. 많은 암 환자가 항종양 면역 반응을 발생시키는 것으로 나타나지만, 암은 또한 면역 검출 및 파괴를 피하는 전략을 발생시킨다. 최근에, 면역치료는 암 및 다른 장애의 치료 및 예방을 위해 개발되었다. 면역치료는 다른 치료 양상이 결여하는 세포 특이성의 이점을 제공한다. 그러므로, 면역 기반 치료의 효율을 증대시키는 방법이 임상적으로 유리할 수 있다. 면역 반응을 조절하는 기전 및 분자를 한정하는 데 있어서의 진전은 암을 치료하기 위한 신규한 치료학적 표적을 제공하였다. 예를 들어, 동시자극 및 동시저해 분자는 T 세포 면역 반응의 조절에서 중요한 역할을 한다. 그러나, 예를 들어 항-PD-1/PD-L1을 포함하는, 이들 동시자극 및 동시저해 분자를 표적화하는 항체 물질에 대한 인상적인 환자 반응에도 불구하고, 관문 저해 치료는 많은 환자에서 여전히 실패한다. 따라서, 대부분의 암 치료에서처럼, 이들 물질의 유효성을 개선할 수 있는 새로운 조성물 및 방법에 대한 수요가 여전히 있다.

발명의 내용

[0008] 따라서, 다양한 양태에서, 본 발명은 예를 들어 치료학적 이익에 대해 면역 신호를 조작하거나 변형시키기 위해 암 면역치료에 유용한 조성물 및 방법을 제공한다. 다양한 실시형태에서, 본 발명은, 유리한 상황에서 면역 활성화 또는 동시자극 신호를 제공하면서, 면역 저해 신호를 역전시키거나 억제한다. 예를 들어, 일 양태에서, 본 발명은 (a) N 말단에서의 또는 그 근처에서의 I형 막관통 단백질의 제1 세포외 도메인, (b) C 말단에서의 또는 그 근처에서의 II형 막관통 단백질의 제2 세포외 도메인, 및 (c) 링커를 포함하는 키메라 단백질로서, 제1 및 제2 세포외 도메인 중 하나는 면역 저해 신호이고, 제1 및 제2 세포외 도메인 중 하나는 면역 자극 신호인, 키메라 단백질을 제공한다. 기능적 배향에서 이들 2개의 분자를 연결함으로써, 양성 신호와 음성 신호 사이의 조화가 달성될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은, 다양한 실시형태에서, 단일 작제물에서 음성 면역 신호의 마스킹 및 양성 면역 신호의 자극을 제공한다. 다양한 실시형태에서, 본 발명은 항체가 아닌 조성물을 제공하거나, 항체 유래 항원 결합 도메인(예를 들어, 상보성 결정 영역, CDR)에 기초하여, 그러나 오히려 직접적인 수용체/리간드 상호작용을 제공한다.

[0009] 암 환자에서, 면역 반응은 종양 세포를 살해하는 환자의 자체의 면역계를 활성화하도록 종양 항원에 대해 자극될 수 있다. 그러나, 몇몇 암 세포는 면역 편집으로 공지된 과정에서 면역 반응을 피하는 전략을 고안한다. 이것은 특정한 항원의 하향조절, MHC I의 하향조절, 면역 조절 표면 분자(PD-L1, PD-L2, CEACAM1, 갈락틴-9, B7-H3, B7-H4, VISTA, CD47 등)의 상향조절 또는 가용성 면역 저해 분자(IDO, TGF- β , MICA 등)의 상향조절을 포함할 수 있다. 일반적으로, 종양 침윤 면역 살해 세포가 종양 세포와 마주칠 때, 이들 세포가 면역억제 인자에 의해 직접적으로 저해되고 따라서 종양 세포를 살해할 수 없도록, 이 전략은 종양 세포에 의해 호선된다. 면역 반응을 억제하도록 종양 세포에 의해 호선되는 많은 면역억제 리간드는 I형 막 단백질인 수용체와

상호작용한다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 면역 저해제의 세포의 도메인, 예를 들어, 제한 없이, TIM-3, BTLA, PD-1, CTLA-4, B7-H4, PD-L1, PD-L2, B7-H3, CD244, TIGIT, CD172a/SIRP α , VISTA/VSIG8, CD115, CD200, CD223 및 TMIGD2 중 하나 이상을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 면역 저해 특성을 가지는 I형 막 단백질의 세포의 도메인을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 키메라 단백질은 면역 저해 신호의 전달, 비제한적인 예로서, PD-1과 PD-L1 또는 PD-L2의 결합 및/또는 CD172a와 CD47의 결합 및/또는 TIM-3과 갈렉틴-9 및/또는 포스파티딜세린 중 하나 이상의 결합을 파괴하고/하거나, 차단하고/하거나, 감소시키고/시키거나, 저해하도록 조작된다.

[0010] 추가로, 면역 저해 신호전달의 억제 이외에, 면역 반응을 부스팅하도록 면역 자극 신호 전달을 증대시키는 것, 예를 들어 환자의 항종양 면역 반응을 증대시키는 것이 대개 바람직하다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은, 제한 없이, OX-40 리간드, LIGHT(CD258), GITR 리간드, CD70, CD30 리간드, CD40 리간드, CD137 리간드, TRAIL 및 TL1A 중 하나 이상인 면역 자극 신호의 세포의 도메인을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 면역 자극 특성을 가지는 II형 막 단백질의 세포의 도메인을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 키메라 단백질은 면역 자극 신호의 전달, 비제한적인 예로서, GITR과 하나 이상의 GITR 리간드의 결합 및/또는 OX40과 OX40L 및/또는 CD40과 CD40 리간드의 결합을 증대시키고/시키거나, 증가시키고/시키거나, 자극하도록 조작된다.

[0011] 다양한 실시형태에서, 키메라 단백질은, 종양 세포의 면역 저해 신호를 마스킹하면서, 제한 없이, 면역 자극을 T 세포에 전달할 수 있는, 면역 자극 리간드 세포의 도메인 및 면역 저해 수용체 세포의 도메인을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 면역 자극 신호에 대해 면역 저해 신호의 치환을 효과적으로 발생시킴으로써 개선된 면역치료학적 이익을 제공한다. 예를 들어, (i) PD-1의 세포의 도메인 및 (ii) OX40L의 세포의 도메인을 포함하는 키메라 단백질 작제물은 저해 PD-L1/L2 신호의 파괴 및 자극 OX40L에 의한 이의 대체를 허용한다. 따라서, 본 키메라 단백질은, 몇몇 실시형태에서, 저해 면역 신호를 감소시키거나, 제거하고/하거나, 면역 자극 신호를 증가시키거나 활성화하는 것을 할 수 있거나, 이를 포함하는 방법에서 용도가 발견된다. 이러한 유리한 특성은 본 키메라 단백질의 단일 작제물 접근법에 의해 향상된다. 예를 들어, 신호 대체는 거의 동시에 실행될 수 있고, 신호 대체는 임상적으로 중요한 부위(예를 들어, 종양 미소환경)에서 국부적이 되도록 맞춰진다. 추가의 실시형태는 동일한 원칙을 무엇보다도 예를 들어 (i) PD-1의 세포의 도메인 및 (ii) GITRL의 세포의 도메인; (i) BTLA의 세포의 도메인 및 (ii) OX40L의 세포의 도메인; (i) TIGIT의 세포의 도메인 및 (ii) OX40L의 세포의 도메인; (i) TMIGD2의 세포의 도메인 및 (ii) OX40L의 세포의 도메인; (i) TIM3의 세포의 도메인 및 (ii) OX40L의 세포의 도메인; 및 (i) CD172a 또는 CD115의 세포의 도메인 및 (ii) CD40L의 세포의 도메인과 같은 다른 키메라 단백질 작제물에 적용한다.

[0012] 더욱 추가로, 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 종양의 면역 공격을 지지하여 면역 세포의 균형을 이동시킬 수 있고 이를 포함하는 방법에서 용도가 발견된다. 예를 들어, 본 키메라 단백질은 종양을 살해할 수 있는 세포(예를 들어, T 세포, 세포독성 T 림프구, T 헬퍼 세포, 자연 살해(natural killer: NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 항종양 대식세포(예를 들어, M1 대식세포), B 세포, 및 수지상 세포를 지지하여 그리고 종양을 보호하는 세포(예를 들어, 골수성 유래 억제인자 세포(myeloid-derived suppressor cell: MDSC), 조절 T 세포(regulatory T cell: Treg); 종양 연관 호중구(tumor associated neutrophil: TAN), M2 대식세포, 및 종양 연관 대식세포(tumor associated macrophage: TAM))에 반대로 임상적으로 중요한 부위에서 면역 세포의 비율을 이동시킬 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 이펙터 T 세포 대 조절 T 세포의 비율을 증가시킬 수 있다.

[0013] 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 예상치 못하게 더 긴 해리 속도(K_d 또는 K_{off})로 각각의 결합 파트너에 대한 세포의 도메인 성분의 결합을 제공하고, 따라서, 특히 리간드에 대한 수용체의 더 긴 점유도에 부합하고, 반대도 그러하다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, 이것은 지속적인 음성 신호 마스킹 효과를 제공한다. 추가로, 몇몇 실시형태에서, 이것은 (예를 들어, 사이토카인과 같은 자극 신호의 증식 및/또는 방출을 위해) 예를 들어 이펙터 세포가 적절히 자극되도록 더 긴 양성 신호 효과를 전달한다. 또한, 세포(예를 들어, 음성 신호를 보유하는 종양 세포 및 종양을 공격하는 T 세포)의 이 안정한 시냅스는 종양 세포를 공격하도록 T 세포를 배치하는 것 및/또는 본 발명의 키메라 단백질에 의해 마스킹되는 것을 뛰어넘는 음성 신호를 포함하는 음성 신호를 종양 세포가 전달하는 것을 입체적으로 막는 것과 같은 종양 감소를 선호하는 공간 배향을 제공한다. 더욱 추가의 실시형태에서, 이것은 키메라 단백질의 혈청 $t_{1/2}$ 와 비교하여 더 긴 온-타겟(예를 들어, 종양내) 반감기($t_{1/2}$)를 제공한다. 이러한 특성은 키메라 단백질의 전신 분포와 연관된 오프-타겟 독성의 조합된 이점을 가질 수 있

다.

[0014]

또한, 다양한 양태에서, 본 키메라 단백질은 유효량의 키메라 단백질을 포함하는 약제학적 조성물을 암의 치료를 요하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법에서 사용된다. 추가의 양태에서, 본 키메라 단백질은, 제한 없이, 바이러스 감염 또는 다른 세포내 병원균을 포함하는 감염을 치료하는 방법에서 사용된다. 더욱 추가의 양태에서, 본 키메라 단백질은 자가면역 질환을 치료하는 방법에서 사용된다.

도면의 간단한 설명

[0015]

도 1은 세포막에서의 I형(왼쪽) 및 II형(오른쪽) 막 단백질의 배향의 예시를 보여준다. 왼쪽 패널의 I형 막 단백질에서, 아미노 말단("N"이라 칭함)은 세포외 환경을 마주보고, 카복시 말단("C"라 칭함)은 세포내 환경에 국재화된다. 반대로, 오른쪽 패널의 II형 막 단백질은 세포내 공간에서 세포외 마주보는 카복시 말단 및 아미노 말단을 특징으로 한다.

도 2는 본 발명에 관련된 면역 저해 및 면역 자극 신호전달이다(문헌[Mahoney, *Nature Reviews Drug Discovery* 2015;14:561-585]로부터).

도 3은 어떻게 I형 및 II형 막 단백질(패널 A)이 제거된 막관통 및 세포내 도메인(패널 B)에 의해 조작되고, 단일 융합 단백질을 생성하기 위해 링커 서열(패널 C)을 사용하여 인접해질 수 있는지의 도식적 예시를 보여주고, 여기서 I형 및 II형 막 단백질의 세포외 도메인은 각각 단일 융합 단백질에서 바깥을 마주본다(패널 D). 패널 C는 각각의 단백질의 막관통 및 세포내 도메인의 제거에 의한 I형 및 II형 막 단백질의 연결을 도시하고, 여기서 각각의 단백질로부터 방출된 세포외 도메인(ECD)은 링커 서열에 의해 인접해진다. 이 도시에서의 ECD는 통상적으로 세포막 바깥에서 국재화된 후보 I형 또는 II형 단백질의 전체 아미노산 서열, 또는 의도된 수용체 또는 리간드에 대한 결합을 보유하는 임의의 이의 일부를 포함할 수 있다. 패널 D는 선형 작제물에서 인접한 세포외 도메인을 도시하고, 이 작제물에서 I형 막 단백질의 세포외 도메인은 작제물의 '왼쪽' 측을 마주보고, II형 막 단백질의 세포외 도메인은 작제물의 '오른쪽' 측을 마주본다.

도 4는 종양 세포가, T 세포에 의해 발현된 PD-1에 결합할 수 있는(패널 B), 세포 표면에서 PD-L1을 발현할 수 있다(패널 A)는 것을 보여준다. 이 상호작용은 T 세포의 활성화를 억제한다. OX40L의 세포외 도메인에 인접한, PD-1의 세포외 도메인의 융합 단백질은 종양 세포의 표면 상의 PD-L1에 결합하여, T 세포의 표면 상의 PD-1의 결합을 방지할 수 있다(패널 C). 이후, 융합 단백질은 종양 세포의 표면으로부터 '매달릴' 수 있고, 이후 융합 단백질의 OX40L 부분은 T 세포의 표면에서 발현된 OX40에 결합할 수 있다. 이것은 T 세포의 항종양 활성을 증대시키도록 동시자극 OX40 신호에 의한 저해 PD-L1 신호의 대체를 발생시킬 것이다.

도 5는 마우스 IgG 포획 및 항-mIgG 검출 ELISA 검정을 이용하여 검출된 CHO-K1 세포로부터의 키메라 마우스(m) PD-1-Fc 및 PD-1-Fc-OX40 리간드(L)의 발현을 보여준다.

도 6은 mOX40에 대한 mPD-1-Fc-OX40L의 결합을 확인시켜주는 ELISA 검정으로부터의 결과를 보여준다. 패널 A는 mOX40에 대한 mPD-1-Fc-OX40L의 결합을 검출하기 위해 이용된 ELISA 방법의 도식적 도해를 보여준다. 인간 Fc에 융합된 재조합 mOX40(mOX40-hFc)은 배양 배지에서 mPD-1-Fc-OX40L을 포획하기 위해 사용된다. mPD-1에 대한 토끼 다중클론 항체는 키메라 단백질에서 mPD-1 도메인을 검출하도록 사용되고, 후속하여 토끼 IgG(H+L)에 대한 겨자무 과산화효소(horseradish peroxidase: HRP) 접합된 다중클론 항체를 사용하여 검출되었다. 패널 B는 mPD-1-Fc-OX40L 단백질을 함유하는 CHO-K1 배양 배지의 2배 연속 희석이 플레이트 결합된 mOX40-hFc와 항온처리되고, 450nm에서의 흡광도에 의해 결합이 측정되는 결과를 보여준다. (재조합 마우스 OX40에 결합하는 것으로 예상되지 않은) 배양 배지를 함유하는 mPD-1-Fc 단백질 및 배양 배지 단독을 음성 대조군으로서 사용하였다.

도 7은 mPD-L1에 대한 mPD-1-Fc-OX40L의 결합을 확인시켜주는 ELISA 검정으로부터의 결과를 보여준다. 패널 A는 mPD-L1에 대한 mPD-1-Fc-OX40L의 결합을 검출하기 위해 이용된 ELISA 방법의 도식적 도해를 보여준다. 인간 Fc에 융합된 재조합 mPD-L1(mPD-L1-hFc)은 배양 배지에서 mPD-1-Fc-OX40L 키메라 단백질을 포획하기 위해 사용된다. 마우스 IgG(H+L)에 대한 겨자무 과산화효소(HRP) 접합된 다중클론 항체를 결합된 단백질의 검출에 사용하였다. 패널 B는 mPD-1-Fc-OX40L 단백질을 함유하는 CHO-K1 배양 배지의 2배 연속 희석이 플레이트 결합된 mPD-L1-hFc와 항온처리되고, 450nm에서의 흡광도에 의해 결합이 측정되는 결과를 보여준다. 배양 배지를 함유하는 mPD-1-Fc 단백질을 양성 대조군으로서 사용하고, 배지 단독을 음성 대조군으로서 사용하였다.

도 8은 플라스미드 DNA 코딩 마우스(m) PD-1-Fc-OX40L의 생체내 종양내 전달이 항원 특이적 CD8+ T 세포를 증식

시킨다는 것을 보여준다. "EP 단독"은 전기천공 음성 대조군이다. 이 실험에서, C57BL/6 마우스는 종양 접종 전 2일에 난알부민 특이적 CD8+ T 세포(OT-I)에 의해 입양 전달되었다. 이후, B16-F10-ova 종양을 0일에 각각의 마우스의 뒷 옆구리에서 이식하였다. 7일 확립된 B16-F10-ova 종양을 플라스미드 DNA 코딩 mPD1-Fc-OX40L에 의해 주사하고, EP 단독 대조군과 비교하여 이후 바로 7일 및 10일에 전기천공하였다. OT-I 세포의 빈도를 유세포분석법에 의해 말초 혈액에서 표시된 일자에 측정하였다.

도 9는 플라스미드 DNA 코딩 mPD-1-Fc-OX40L의 생체내 종양내 전달이 B16.F10-ova 흑색종 종양 모델에서 종양 퇴행을 발생시킨다는 것을 보여준다. "EP 단독"은 전기천공 음성 대조군이다. 마우스를 도 9에 표시된 바대로 처리하고, 종양 직경을 표시된 일자에 측정하였다.

도 10은 mPD-1-Fc-OX40L의 추가의 규명으로부터의 결과를 보여준다. 패널 A는, (각각의 블롯 위에 '+' 또는 '-' 마크로 표시된 바대로) 탈글라이코실화효소 PNGase F와 함께 또는 이것 없이 및 환원 또는 비환원 조건에서 실행되는, mPD-1(왼쪽 꺾), mFc(중간 패널) 및 mOX40L(오른쪽 패널)에 대한 항체에 의해 프로빙된 웨스턴 블롯 분석을 제공한다. 첫과 단백질은 단백질로서 약 60kDa의 예측된 분자량을 가진다. 패널 B는 mPD-L1 및 mOX40에 대한 mPD-1-Fc-OX40L의 결합을 입증하는 기능성 ELISA 검정으로부터의 결과를 보여준다. 히스토그램의 각각의 세트에 대해, 막대는 왼쪽으로부터 오른쪽으로 정제된 mPD1-Fc-OX40L 용합 단백질의 연속 희석을 나타낸다. 패널 C는 mFc에 대한 mPD-1-Fc-OX40L의 결합을 입증하는 기능성 ELISA 검정으로부터의 결과를 보여준다(각각의 농도에 대해, OX40-His는 왼쪽 막대이고, HVEM-His는 오른쪽 막대임). 패널 D는 HLA I-A/I-E⁺PD-L1⁺(APC⁺PD-L1⁺) 및 CD4⁺OX40⁺ 세포에서 검출된 바와 같은 활성화된 마우스 비장세포에 대한 mPD-1-Fc-OX40L에 대한 결합을 보여준다(각각의 그래프에 대해, 왼쪽의 세포 집단은 APC⁺PD-L1⁺ 또는 CD4⁺OX40⁺ 세포를 나타내고, 오른쪽의 세포 집단은 APC⁺PD-L1⁺ 또는 CD4⁺OX40⁺ 세포를 나타냄). 패널 E는 PD-L1_{low}(4T1) 및 PD-L1_{high}(B16.F10) 세포주의 식별을 보여준다. 패널 F는 비장세포/종양 동시배양 검정으로부터의 결과를 보여준다. IL2 ELISA를 초기 수확 후 5일에 수행하였다. 왼쪽으로부터 오른쪽의 선 그래프는 +4T1 세포(-FP), +4T1 세포(+500ng FP), +4T1 세포(+5μg FP), +B16 세포(-FP), +B16 세포(+500ng FP) 및 +B16 세포(+5μg FP)를 나타낸다.

도 11은 mPD-1-Fc-OX40L의 항종양 효율을 보여준다. 패널 A는 표시된 섭생에 의한 치료 후 MC38 종양 성장 동역학을 보여준다. Balb.c 마우스를 뒷 옆구리에서 2.5×10^5 MC38-ova 종양 세포에 의해 접종하였다. 5일 및 8일에, 마우스를 표시된 치료군에 의해 치료하였다. 항-OX40 치료된 동물은 2일의 각각에 100μg의 OX86 mAb를 받았고, 항-PD-L1 치료된 동물은 2일의 각각에 100μg의 10F.9G2 mAb를 받았고, 항-OX40 및 항-PD-L1 조합 치료된 동물은 2일의 각각에 100μg의 각각의 OX86 및 10F.9G2를 받았고, mPD1-Fc-OX40L 치료된 마우스는 2일의 각각에 100μg의 전체의 mPD1-Fc-OX40L을 받았다. 종양 면적을 전자 캘리퍼스를 사용하여 수직 종양 직경 측정을 취함으로써 표시된 일자에 계산하였다. 40일에, 이전의 종양이 완전히 거부된(보이거나 손으로 만져지는 종양이 남지 않음) 마우스를 임의의 추가의 치료 없이 2.5×10^5 MC38 모(ova 비발현) 종양 세포에 의해 시험감염시키고, 종양 면적을 상기 기재된 바대로 계산하였다. 패널 B는 IACUC 프로토콜에 따라 150mm³를 초과하는 전체 종양 크기에 의해 결정된 바와 같은 실험의 과정에 걸친 각각의 치료군에 대한 전체 생존율을 보여준다(65일에, 곡선은 상부에서 하부로 αOX40/αPD-L1, mPD1-Fc-OX40L, αOX40, αPD-L1 및 비치료된이다). 패널 C는 각각의 표시된 치료군에 대한 CD4/CD8 비율(상부) 및 FOXP3+ Treg 세포의 백분율(하부)의 말초 혈액 분석을 보여준다(그래프 둘 다에서, 치료군은 왼쪽에서 오른쪽으로 비치료된, αOX40, αPD-L1, αOX40/αPD-L1 및 mPD1-Fc-OX40L임). 패널 D는 IFNγ, TNFα, IL4 및 IL6의 혈청 사이토카인 분석을 보여준다. 데이터의 각각의 세트에 대해, 왼쪽으로부터 오른쪽의 선 그래프는 비치료된, α-OX40, α-PD-L1, α-OX40/α-PD-L1 및 mPD-1-Fc-OX40L을 나타낸다(4개의 그래프에서, 치료군은 왼쪽에서 오른쪽으로 비치료된, αOX40, αPD-L1, αOX40/αPD-L1 및 mPD1-Fc-OX40L임). 패널 E는 실험의 13일에 각각의 치료군에 대한 평균 종양 크기를 보여준다(각각의 그래프에 대해, 샘플은 왼쪽에서 오른쪽으로 비치료된, mPD1-Fc-OX40L, mPD1-Fc-GITRL, mCD172a-Fc-CD40L, αOX40, αPD-L1 및 αGITR임). 패널 F는 실험의 13일에 각각의 치료군에 대한 종양으로부터 단리된 KSP 사합체 특이적 CD8+ T 세포(TIL)의 백분율을 보여준다(각각의 그래프에 대해, 샘플은 왼쪽에서 오른쪽으로 비치료된, mPD1-Fc-OX40L, mPD1-Fc-GITRL, mCD172a-Fc-CD40L, αOX40, αPD-L1 및 αGITR임). 패널 G는 실험의 13일에 각각의 치료군에 대한 잘 규명된 '면역 기억' 마커에 따른 CD8+ 비장세포의 표현형을 보여준다(각각의 그래프에 대해, 샘플은 왼쪽에서 오른쪽으로 비치료된, mPD1-Fc-OX40L, mPD1-Fc-GITRL, mCD172a-Fc-CD40L, αOX40, αPD-L1 및 αGITR임). 패널 H는 실험의 13일에 각각의 치료군에 대한 말초 혈액(왼쪽 패널), 비장(중간 패널) 및 종양(오른쪽 패널)에서의 CD4 대 CD8 세포의 비율을 보여준다(각각의 그래프에 대해, 샘플은 왼쪽에서 오른쪽으로

로 비치리된, mPD1-Fc-OX40L, mPD1-Fc-GITRL, mCD172a-Fc-CD40L, α OX40, α PD-L1 및 α GITR임). 패널 I는 각각의 동물이 CT26 종양 모델을 사용하여 각각의 실험에서 어떻게 치료되는지의 도식을 보여준다. 패널 J는 BioLegend로부터의 Legend Plex bead 어레이 키트를 사용한 각각의 표시된 혈청 사이토카인의 혈청 농도를 계산하기 위해 이용된 대표적인 유세포분석법 선도를 제공한다. 패널에 포함된 각각의 표시된 사이토카인이 표시되고, 각각의 비드 클러스터의 평균 형광 강도는 혈청에서의 각각의 사이토카인의 상대 농도를 계산하기 위해 이용된다. 패널 K는 Legend Plex 검정이 PD1-Fc-OX40L 융합 단백질에 대한 용량 반응의 약물학적 바이오마커로서 어떻게 사용될 수 있는지의 예를 제공한다. 예로서 IFN γ 의 농도를 사용하여, 증가하는 농도의 이 사이토카인은 증가하는 치료 양의 PD1-Fc-OX40L과 상응하는 것으로 나타났다(패널 K는 왼쪽에서 오른쪽으로 비치리된, 40 μ g x 1, 40 μ g x 2, 100 μ g x 1, 및 100 μ g x 2를 보여줌). 패널 L은 각각의 치료군에 대한 CT26 종양 성장 동역학을 보여준다.

도 12, 패널 A는 RaptorX에 의해 결정된 바와 같은 인간 PD-1-Fc-OX40L의 예측된 3차 구조를 보여준다. 패널 B는, 독점적 T 세포 에피토프 데이터베이스라고 상호 참조된, iTope, 인 실리코 모델링 알고리즘 (ANTITOPE/ABZENA)을 이용한 인간 PD-1-Fc-OX40L의 면역원성 평가를 보여준다.

도 13은 (SL-279252라 또한 칭해지는) 인간 PD-1-Fc-OX40L의 규명을 보여준다. 패널 A는 안정한(인하우스) 및 또는 일시적 형질감염(Thermo) 제제로부터 정제된 SL-279252로부터의 단백질 A 용리 피크(OD₄₅₀)를 보여준다. 각각의 용리 피크로부터의 ELISA 결과를 흡수 판독에서 오버레이하여, SL279252 단백질이 칼럼으로부터 제1 용리 피크 내에 함유된다는 것을 나타낸다. 패널 B는 탈글라이코실화효소 PNGase F와 함께 또는 이것 없이 비환원 및 환원 조건 하에 인간 항-PD-1(왼쪽 겔), 항-Fc(중간 겔) 및 항-OX40L(오른쪽 겔) 항체에 의해 정제된 단백질을 프로빙함으로써 수행된 SL-279252의 웨스턴 블롯 분석을 보여준다. 단량체 SL-279252의 예측된 분자량은 60.3kDa이다. 패널 C는 재조합 인간 OX40L-Fc 표준품과 비교하여 재조합 hOX40에 의한 포획 및 Gt-hOX40L/Gt-HRP에 의한 검출을 이용한 기능성 ELISA로부터의 결과를 보여준다. 패널 D는 동시에 SL-279252의 각각의 측에 대한 시험 기능성 결합에 설계된 기능성 ELISA로부터의 결과를 보여준다. 구체적으로, 재조합 인간 PD-L1을 플레이트에 흡수시키고, SL-279252를 포획하도록 사용하였다. 이후, 포획된 단백질을 특이성에 대해 음성 대조군으로서 재조합 hOX40-his/HRP 토끼 항-his 대 HVEM-his를 사용하여 검출하였다.

도 14는 SL-279252의 표면 플라스몬 공명(SPR) 및 반감기 분석을 보여준다. '결합속도(Ka)', '해리속도(Kd)' 및 결합 친화도(K_D)를, 적절한 대조군과 비교하여, 인간 PD-L1(패널 A), 인간 PD-L2(패널 B), 인간 OX40(패널 C), 인간 Fc γ R1A(패널 D) 및 FcRn(패널 E)에 결합할 때, SL-279252에 대해 결정하였다. 패널 F는 시험된 각각의 조건에 대한 결합속도(Ka), 해리속도(Kd) 및 결합 친화도(KD)를 요약한다. 구별되는 리더 펩타이드, 및 FcRn에 대한 결합을 증가시키는 Fc 영역에서의 돌연변이를 함유하는 변형된 SL-279252 작제물의 결합을, 적절한 대조군과 비교하여, 인간 PD-L1(패널 G), 인간 PD-L2(패널 H), 인간 OX40(패널 I), 인간 Fc γ R1A(패널 J) 및 FcRn(패널 K)에 결합할 때, 또한 시험하였다. 패널 L은 시험된 각각의 조건에 대한 결합속도(Ka), 해리속도(Kd) 및 결합 친화도(KD)를 요약한다. 패널 M은 C57BL/6 마우스에서의 SL-279252의 생체내 혈청 반감기를 보여준다. 패널 N은 옆구리에서 인간 PD-L1 양성 종양(HeLa-PD-L1) 및 반대 옆구리에서 PD-L1 음성 종양(HeLa)이 이식된 면역손상된(NSG) 마우스에서의 SL-279252의 생체내 종양내 반감기를 보여준다. 표시된 일자에, 2개의 종양을 절제하고 이 등분하였다. 이등분된 종양의 절반을 분해하고, 인간 OX40L에 대한 항체를 사용하여 유세포분석법에 의해 SL-279252 결합에 대해 시험하였다. 패널 O는 SL-279252의 단일 주사에 의한 치료 후 6시간, 2일 및 5일에 이등분된 종양의 다른 절반으로부터의 냉동된 절편을 보여준다. 도면은 투여 후 적어도 5일에 SL-279252의 지속성을 나타낸다.

도 15는 시험관내 세포에 대한 SL-279252의 결합을 보여준다. 패널 A에서, hOX40-APC 항체를 사용하여 유세포분석법에 의해 모 주카트(왼쪽의 세포 집단) 및 주카트/hOX40(오른쪽의 세포 집단) 세포를 평가하였다. 패널 B에서, hPD-L1-APC 항체를 사용하여 유세포분석법에 의해 모 CHO-K1 세포(왼쪽의 세포 집단) 및 CHO-K1/hPD-L1(오른쪽의 세포 집단)을 평가하였다. 패널 C에서, hCD47-APC 항체를 사용하여 유세포분석법에 의해 모 CHO-K1 세포(왼쪽의 세포 집단) 및 CHO-K1/hCD47(오른쪽의 세포 집단)을 평가하였다. 패널 D에서, 증가하는 농도의 SL-279252를 모 CHO-K1 세포(왼쪽 패널) 및 CHO-K1/hPD-L1(중간 패널)과 항온처리하고, 항-인간 OX40L-APC 항체에 의해 검출하였다. 오른쪽 패널은 증가하는 농도의 SL-279252에 대한 적정 곡선을 보여준다. 패널 E에서, 증가하는 농도의 SL-279252를 모 주카트 세포(왼쪽 패널) 또는 주카트/hOX40 세포(중간 패널)와 항온처리하고, 항-인간 OX40L-APC 항체에 의해 검출하였다. 오른쪽 패널은 증가하는 농도의 SL-279252에 대한 적정 곡선을 보여준다. 패널 F에서, 증가하는 농도의 hCD172a-Fc-OX40L을 모 CHO-K1 세포(왼쪽 패널) 또는 CHO-K1-CD47 세포(중간 패널)와 항온처리하고, 항-인간 OX40L-APC 항체에 의해 검출하였다. 오른쪽 패널은 증가하는 농도의

hCD172a-Fc-OX40L에 대한 적정 곡선을 보여준다. 패널 G는 모 주카트 세포(왼쪽 패널) 또는 주카트-hOX40 세포(중간 패널)에 대한 증가하는 농도의 hCD172a-Fc-OX40L의 결합을 보여준다. 오른쪽 패널은 증가하는 농도의 hCD172a-Fc-OX40L에 대한 적정 곡선을 보여준다. 패널 H에서, 인간 PD-L1_{low}(PC3 세포; 왼쪽의 세포 집단) 및 PD-L1_{high}(HCC827; 오른쪽의 세포 집단)를 유세포분석법에 의해 식별하였다. 패널 I에서, 증가하는 농도의 SL-279252를 PC3 세포와 항온처리하였다. 패널 J에서, 증가하는 농도의 SL-279252를 2시간 동안 HCC827 세포와 항온처리하였다. 세포를 세척하고, SL-279252 결합(Fc-PE 항체)에 대해 유세포분석법에 의해 분석하였다.

도 16은 SL-279252의 생체외 기능성 규명을 보여준다. 패널 A에서, 2일 동안 PMA/PHA/이오노마이신(Ion.)에 의해 치료된 PBMC로부터 단리된 인간 T 세포에서 OX40 발현을 검출하였다. 패널 B에서, SL-279252의 결합을 활성화된 CD4+ 및 CD8+ 세포(Fc-PE 2차)에서 평가하였다. 패널 C는 T 세포 활성화를 검출하기 위한 T 세포/중양 동시배양 검정, 및 실험에 대한 시각표의 도식적 도해를 제공한다. 패널 D에서, 동시배양 배지를 초기 T 세포 단리 후 6일일에 IL2 ELISA에 의해 평가하였다. 왼쪽으로부터 오른쪽의 선 그래프는 +PC3(-FP), +PC3(+500ng FP), +PC3(+5μg FP), +HCC827(-FP), +HCC827(+500ng FP) 및 +HCC827(+5μg FP)을 나타낸다. 패널 E에서, 동시배양된 T 세포를 CD4+ 및 CD8+ 세포(Ki67)의 증식을 위해 초기 단리 후 5일에 및 CD8+ 세포에서의 사이토카인 발현을 위해 단리 후 7일에 유세포분석법에 의해 분석하였다. 왼쪽으로부터 오른쪽의 선 그래프는 +HCC827(-FP), +HCC827(+500ng FP) 및 +HCC827(+5μg FP)을 나타낸다.

도 17, 패널 A는 hCD172a-Fc-OX40L, hPD1-Fc-TL1A, hBTLA-Fc-OX40L, hTMIGD2-Fc-OX40L, hTIM3-Fc-OX40L, mPD1-Fc-GITRL, mPD1-Fc-4-1BBL, mPD1-Fc-TL1A, mCD172a-Fc-CD40L을 포함하는 다양한 키메라 단백질의 웨스턴 블롯 분석을 보여준다. 각각의 키메라 단백질을 각각의 결합 말단 및 중양 Fc 도메인에 특이적인 항체에 의해 프로빙하였다. 인간 OX40에 대한 다양한 키메라 단백질의 결합을 확인하도록 ELISA 검정을 수행하였다. 패널 B는 인간 OX40에 대한 키메라 단백질의 결합을 검출하기 위해 이용된 ELISA 방법의 도식적 도해를 보여준다. 패널 C는 모 주카트 세포(왼쪽 패널, 왼쪽 곡선) 또는 주카트/OX40 세포(왼쪽 패널, 오른쪽 곡선)에 대한 인간 PD1-Fc-OX40L 결합의 결과를 보여준다. 특이성을 입증하도록 2개의 음성 대조군을 사용하였다: 인간 PD1-Fc-TL1A(중간 패널) 및 개과 PD1-Fc-OX40L(오른쪽 패널). 패널 D는 RaptorX에 의해 결정된 바와 같은 인간 CD172a-Fc-OX40L의 예측된 3차 구조를 보여준다. 패널 E는 쿠마시-겔을 포함하는 인간 PD1-Fc-OX40L(SL-279252)의 예시적인 생성 및 정제(상부 왼쪽), 항-IgG 웨스턴 블롯(상부 오른쪽), 용리된 단백질 농도(하부 왼쪽) 및 친화도 크로마토그래피로부터의 용리 프로파일(하부 오른쪽)을 보여준다. 패널 F는 쿠마시-겔을 포함하는 인간 CD172a-Fc-OX40L의 예시적인 생성 및 정제(상부 왼쪽), 항-IgG 웨스턴 블롯(상부 오른쪽), 용리된 단백질 농도(하부 왼쪽) 및 친화도 크로마토그래피로부터의 용리 프로파일(하부 오른쪽)을 보여준다. 패널 G는 정제 매개 변수를 포함하는 마우스 CD172a-Fc-CD40L의 예시적인 생성 및 정제(상부 표) 및 LabChip 정제된 단백질 분석(하부 패널)을 보여준다. 패널 H는 쿠마시-겔을 포함하는 인간 TIGIT-Fc-OX40L의 예시적인 생성 및 정제(상부 왼쪽), 항-IgG 웨스턴 블롯(상부 오른쪽), 용리된 단백질 농도(하부 왼쪽) 및 친화도 크로마토그래피로부터의 용리 프로파일(하부 오른쪽)을 보여준다. 패널 I는 부동화된 재조합 CD47에 대한 인간 CD172a-Fc-OX40L의 결합 친화도를 보여준다. 패널 J는 부동화된 재조합 인간 OX40에 대한 인간 CD172a-Fc-OX40L의 결합 친화도를 보여준다. 패널 K는 부동화된 재조합 인간 FcγRIIA에 대한 인간 CD172a-Fc-OX40L의 결합 친화도를 보여준다. 패널 L은 부동화된 재조합 인간 FcRn에 대한 인간 CD172a-Fc-OX40L의 결합 친화도를 보여준다. 패널 M은 시험된 각각의 조건에 대한 결합속도(Ka), 해리속도(Kd) 및 결합 친화도(KD)의 요약을 보여준다. 패널 N은 쿠마시-겔을 포함하는 개과 PD1-Fc-OX40L의 예시적인 생성 및 정제(상부 왼쪽), 항-IgG 웨스턴 블롯(상부 오른쪽), 용리된 단백질 농도(하부 왼쪽) 및 친화도 크로마토그래피로부터의 용리 프로파일(하부 오른쪽)을 보여준다. 패널 O는 쿠마시-겔을 포함하는 마우스 PD1-Fc-OX40L의 예시적인 생성 및 정제(상부 왼쪽), 항-IgG 웨스턴 블롯(상부 오른쪽), 용리된 단백질 농도(하부 왼쪽) 및 친화도 크로마토그래피로부터의 용리 프로파일(하부 오른쪽)을 보여준다. 패널 P는 쿠마시-겔을 포함하는 마우스 PD1-Fc-GITRL의 예시적인 생성 및 정제(상부 왼쪽), 항-IgG 웨스턴 블롯(상부 오른쪽), 용리된 단백질 농도(하부 왼쪽) 및 친화도 크로마토그래피로부터의 용리 프로파일(하부 오른쪽)을 보여준다. 패널 Q는 쿠마시-겔을 포함하는 마우스 PD1-Fc-41BBL의 예시적인 생성 및 정제(상부 왼쪽), 항-IgG 웨스턴 블롯(상부 오른쪽), 용리된 단백질 농도(하부 왼쪽) 및 친화도 크로마토그래피로부터의 용리 프로파일(하부 오른쪽)을 보여준다. 패널 R은 쿠마시-겔을 포함하는 마우스 PD1-Fc-TL1A의 예시적인 생성 및 정제(상부 왼쪽), 항-IgG 웨스턴 블롯(상부 오른쪽), 용리된 단백질 농도(하부 왼쪽) 및 친화도 크로마토그래피로부터의 용리 프로파일(하부 오른쪽)을 보여준다. 패널 S는 쿠마시-겔을 포함하는 마우스 CD115-Fc-CD40L의 예시적인 생성 및 정제(상부 왼쪽), 항-IgG 웨스턴 블롯(상부 오른쪽), 용리된 단백질 농도(하부 왼쪽) 및 친화도 크로마토그래피로부터의 용리 프로파일(하부 오른쪽)을 보여준다. 패널 T는 쿠마시-겔을 포함하는 인간 PD1-Fc-GITRL의 예시

적인 생성 및 정제(상부 왼쪽), 항-IgG 웨스턴 블롯(상부 오른쪽), 용리된 단백질 농도(하부 왼쪽) 및 친화도 크로마토그래피로부터의 용리 프로파일(하부 오른쪽)을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명은, 부분적으로, 암의 치료에서, 키메라 단백질이 이들 단백질(예를 들어, I형 대 II형)의 배향을 이용하고, 따라서 예를 들어 면역 저해 신호의 마스킹 및 면역 자극 신호에 의한 이의 대체를 포함하는 면역 자극 및/또는 면역 저해 신호의 전달을 허용하는 방식으로, 면역조절 막관통 단백질의 세포외 또는 이펙터 영역으로부터 조작될 수 있다는 발견에 기초한다.
- [0017] **키메라 단백질**
- [0018] 일 양태에서, 본 발명은 (a) N 말단에서의 또는 그 근처에서의 I형 막관통 단백질의 제1 세포외 도메인, (b) C 말단에서의 또는 그 근처에서의 II형 막관통 단백질의 제2 세포외 도메인, 및 (c) 링커를 포함하는 키메라 단백질(여기서, 제1 및 제2 세포외 도메인 중 하나는 면역 저해 신호이고, 제1 및 제2 세포외 도메인 중 하나는 면역 자극 신호임)에 관한 것이다.
- [0019] 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 재조합 융합 단백질, 예를 들어 본 명세서에 기재된 세포외 도메인(및, 임의로 링커)를 가지는 단일 폴리펩타이드에 관한 것이다. 예를 들어, 다양한 실시형태에서, 키메라 단백질은 세포에서 단일 단위로서 번역된다. 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은, 예를 들어 시험관내 (예를 들어, 본 명세서에 기재된 하나 이상의 합성 링커와) 단일 단위를 생성하도록 연결된, 다수의 폴리펩타이드의 재조합 단백질, 예를 들어 본 명세서에 기재된 다수의 세포외 도메인에 관한 것이다.
- [0020] 몇몇 실시형태에서, 세포외 도메인은 세포외 환경과 상호작용할 수 있는 막관통 단백질의 부분에 관한 것이다. 다양한 실시형태에서, 세포외 도메인은 리간드 또는 수용체에 결합하고 세포에 신호를 효과적으로 전달하기에 충분한 막관통 단백질의 부분을 의미한다. 다양한 실시형태에서, 세포외 도메인은 세포의 외부 또는 세포막인 막관통 단백질의 전체 아미노산 서열이다. 다양한 실시형태에서, 세포외 도메인은 세포의 외부 또는 세포막이고, 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 분석될 수 있는 것처럼 신호 전달 및/또는 리간드 결합에 필요한, 아미노산 서열의 부분이다(예를 들어, 시험관내 리간드 결합 및/또는 세포 활성화 검정).
- [0021] 몇몇 실시형태에서, 면역 저해 신호는 면역 반응을 줄이거나 제거하는 신호를 의미한다. 예를 들어, 종양학의 맥락에서, 이러한 신호는 항종양 면역을 감소시키거나 제거할 수 있다. 정상 생리학적 조건 하에, 저해 신호는 자가 관용의 유지(예를 들어, 자가면역의 방지)에서 및 또한 면역계가 병원성 감염에 반응할 때 손상으로부터 조직을 보호하기 위해 유용하다. 예를 들어, 제한 없이, 면역 저해 신호는 이러한 저해 신호가 차단될 때 세포 증식, 사이토카인 생성, 세포 사멸 활성 또는 식세포 활성의 증가를 검출함으로써 식별될 수 있다. 구체적인 예에서, 이러한 저해 신호는 항체 매개된 봉쇄를 사용하여 또는 PD-1 함유 융합 단백질을 사용하여 PD-L1/L2의 경쟁적 저해를 통해 PD-L1/L2의 PD-1의 봉쇄를 포함한다. 이러한 저해 신호가 PD-L1/L2의 저해를 통해 차단될 때, 이것은 PD-L1 또는 PD-L2에 의해 더 이상 저해되지 않으므로 T 세포에 의한 종양 사멸 활성을 증대시킨다. 또 다른 예에서, 저해 신호는 CD172a를 발현하는 대식세포에 대해 CD47에 의해 제공될 수 있다. CD172a에 대한 CD47의 결합은 통상적으로 표적 세포를 식세포작용하는 대식세포의 능력을 저해하고, 이것은 차단 항체에 의한 CD47의 봉쇄를 통해 또는 CD172a 함유 융합 단백질을 사용하여 CD47의 경쟁적 저해를 통해 회복될 수 있다.
- [0022] 몇몇 실시형태에서, 면역 자극 신호는 면역 반응을 증대시키는 신호를 의미한다. 예를 들어, 종양학의 맥락에서, 이러한 신호는 항종양 면역을 증대시킬 수 있다. 예를 들어, 제한 없이, 면역 자극 신호는 증식, 사이토카인 생성, 백혈구의 사멸 활성 또는 식세포 활성을 직접적으로 자극함으로써 식별될 수 있다. 구체적인 예는 수용체 작용제 항체 중 어느 하나를 사용하여 또는 이러한 수용체에 대한 리간드(각각 OX40L, 4-1BBL, TL1A)를 코딩하는 융합 단백질을 사용하여 TNF 슈퍼패밀리 수용체, 예컨대 OX40, 4-1BB 또는 TNFRSF25의 직접적인 자극을 포함한다. 이들 수용체 중 임의의 하나로부터의 자극은 개별 T 세포 하위집단의 사이토카인 생성 및 증식을 직접적으로 자극할 수 있다. 또 다른 예는 이러한 면역 억제인자 세포의 활성을 저해하는 수용체를 통한 면역 저해 세포의 직접적인 자극을 포함한다. 이것은 예를 들어 GITR 작용제 항체 또는 GITRL 함유 융합 단백질에 의한 CD4+FoxP3+ 조절 T 세포의 자극을 포함할 것이고, 이는 종래의 CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 증식을 억제하는 이 조절 T 세포의 능력을 감소시킬 것이다. 또 다른 예에서, 이것은 CD40 작용제 항체 또는 CD40L을 함유하는 융합 단백질을 사용하여 항원 제시 세포의 표면에서의 CD40의 자극을 포함할 것이고, 이는 항원 제시 세포의 활성화, 예컨대 적절한 네이티브 동시자극 분자, 예컨대 B7 또는 TNF 슈퍼패밀리에서의 것의 상황에서 항원을 제시하는 이 세포의 능력의 증대를 발생시킨다.

- [0023] 막 단백질은 통상적으로 세포의 도메인, 하나의 또는 일련의 막관통 도메인 및 세포내 도메인으로 이루어진다. 이론에 구속되고자 바라지 않으면서, 막 단백질의 세포의 도메인은 가용성 또는 막 결합된 수용체 또는 리간드와의 상호작용을 담당한다. 이론에 구속되고자 바라지 않으면서, 막관통 도메인(들)은 혈장 막에 단백질을 국재화하는 것을 담당한다. 이론에 구속되고자 바라지 않으면서, 막 단백질의 세포내 도메인은 세포내 반응을 세포외 환경과 조화시키도록(또는 그 반대) 세포 신호전달 분자와의 상호작용을 조화시키는 것을 담당한다. 세포의 아미노 말단 및 세포내 카복시 말단을 가지는 것(I형) 및 세포의 카복시 말단 및 세포내 아미노 말단을 가지는 것(II형)의 단일 통과 막 단백질의 2개의 타입이 존재한다. I형 및 II형 막 단백질 둘 다는 수용체 또는 리간드 중 어느 하나일 수 있다. I형 막 단백질에 대해, 단백질의 아미노 말단은 세포 밖을 바라보고, 따라서 세포외 환경에서 다른 결합 파트너(리간드 또는 수용체 중 어느 하나)와 상호작용하는 것을 담당하는 기능성 도메인을 함유한다(도 1, 왼쪽 이미지). II형 막 단백질에 대해, 단백질의 카복시 말단은 세포 밖을 바라보고, 따라서 세포외 환경에서 다른 결합 파트너(리간드 또는 수용체 중 어느 하나)와 상호작용하는 것을 담당하는 기능성 도메인을 함유한다(도 1, 오른쪽 이미지). 따라서, 단백질의 이들 2개의 타입은 서로에 반대의 배향을 가진다.
- [0024] I형 및 II형 막 단백질의 밖으로 향하는 도메인이 반대이므로(도 1), 분자의 '밖으로 향하는' 도메인이 또한 서로에 반대 배향에 있도록 I형 및 II형 막 단백질의 세포의 도메인을 연결할 수 있다(도 3). 생성된 작제물은 따라서 링커 서열을 사용하여, 분자의 '오른쪽' 측에서의 II형 막 단백질의 세포의 도메인에 연결된, 분자의 '왼쪽' 측에서의 I형 막 단백질의 세포의 도메인으로 이루어진다. 이 작제물은 벡터(플라스미드, 바이러스 또는 기타)로의 이들 3개의 단편(I형 단백질의 세포의 도메인, 이어서 링커 서열, 이어서 II형 단백질의 세포의 도메인)의 클로닝에 의해 제조되고, 여기서 완전한 서열의 아미노 말단은 I형 단백질을 함유하는 분자의 '왼쪽' 측에 상응하고, 완전한 서열의 카복시 말단은 II형 단백질을 함유하는 분자의 '오른쪽' 측에 상응한다. 따라서, 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 이렇게 조작된다.
- [0025] 몇몇 실시형태에서, 세포의 도메인은 그 수용체의 리간드에 의해 신호전달을 경쟁적으로 저해하도록 가용성 단백질을 제조하도록 사용될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 세포의 도메인은 인공 신호전달을 제공하도록 사용될 수 있다.
- [0026] 몇몇 실시형태에서, I형 막관통 단백질의 세포의 도메인은 면역 저해 신호이다. 몇몇 실시형태에서, II형 막관통 단백질의 세포의 도메인은 면역 자극 신호이다.
- [0027] 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 I형 막관통 단백질의 세포의 도메인, 또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 II형 막관통 단백질의 세포의 도메인, 또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 I형 막관통 단백질의 세포의 도메인, 또는 이의 기능성 단편, 및 II형 막관통 단백질의 세포의 도메인, 또는 이의 기능성 단편을 포함한다.
- [0028] 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 표 1에 기재된 바와 같은 인간 I형 막관통 단백질의 세포의 도메인, 또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 표 2에 기재된 바와 같은 인간 II형 막관통 단백질의 세포의 도메인, 또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 표 1에 기재된 바와 같은 I형 막관통 단백질의 세포의 도메인, 또는 이의 기능성 단편, 및 표 2에 기재된 바와 같은 II형 막관통 단백질의 세포의 도메인, 또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 표 1 및 표 2는 본 명세서에서 그 외 제공된다.
- [0029] 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 인간 백혈구에 있는 하나 이상의 분자, 예를 들어, 제한 없이, (적용 가능한 경우) SLAMF4, IL-2 R α , 4-1BB/TNFRSF9, IL-2 R β , ALCAM, B7-1, IL-4 R, B7-H3, BLAME/SLAMFS, CEACAM1, IL-6 R, IL-7 R α , IL-10 R α , IL-10 R β , IL-12 R β 1, IL-12 R β 2, CD2, IL-13 R α 1, IL-13, CD3, CD4, ILT2/CDS5j, ILT3/CDS5k, ILT4/CDS5d, ILT5/CDS5a, 루테그린 α 4/CD49d, CDS, 인테그린 α E/CD103, CD6, 인테그린 α M/CD 11 b, CDS, 인테그린 α X/CD11c, 인테그린 β 2/CD1S, KIR/CD15S, CD27/TNFRSF7, KIR2DL1, CD2S, KIR2DL3, CD30/TNFRSF8, KIR2DL4/CD15Sd, CD31/PECAM-1, KIR2DS4, CD40 리간드/TNFSF5, LAG-3, CD43, LAIR1, CD45, LAIR2, CDS3, 류코트리엔 B4-R1, CDS4/SLAMF5, NCAM-L1, CD94, NKG2A, CD97, NKG2C, CD229/SLAMF3, NKG2D, CD2F-10/SLAMF9, NT-4, CD69, NTB-A/SLAMF6, 공통 γ 사슬/IL-2 R γ , 오스테오펀틴, CRACC/SLAMF7, PD-1, CRTAM, PSGL-1, CTLA-4, RANK/TNFRSF11A, CX3CR1, CX3CL1, L-선택틴, SIRP β 1, SLAM, TCCR/WSX-1, DNAM-1, 티모포이에틴, EMMRIN/CD147, TIM-1, EphB6, TIM-2, Fas/TNFRSF6, TIM-3, Fas 리간드/TNFSF6, TIM-4, Fc γ RIII/CD16, TIM-6, TNFR1/TNFRSF1A, 그라눌린, TNF RIII/TNFRSF1B, TRAIL R1/TNFRSF10A, ICAM-1/CD54, TRAIL R2/TNFRSF10B, ICAM-2/CD102, TRAILR3/TNFRSF10C, IFN- γ R1, TRAILR4/TNFRSF10D, IFN- γ R2, TSLP, IL-1 R1 및 TSLP R의 세포의 도메인을 표적화하도록 조작될 수 있다.

- [0030] 조절 T 세포의 활성화는 동시자극 및 동시저해 신호에 의해 중요하게 영향을 받는다. 동시자극 분자의 2개의 주요 패밀리는 B7 및 종양 괴사 인자(TNF) 패밀리를 포함한다. 이들 분자는 각각 CD28 또는 TNF 수용체 패밀리에 속하는 T 세포에서의 수용체에 결합한다. 많은 잘 규정된 동시저해제 및 이의 수용체는 B7 및 CD28 패밀리에 속한다.
- [0031] 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 면역 저해에 관여한 하나 이상의 분자, 예를 들어 CTLA-4, PD-L1, PD-L2, PD-1, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA/VSIG8, KIR, 2B4, TIGIT, CD160(또한 BY55라 칭함), CHK 1 및 CHK2 키나제, A2aR, CEACAM(예를 들어, CEACAM-1, CEACAM-3 및/또는 CEACAM-5), 및 다양한 B-7 패밀리 리간드(B7-1, B7-2, B7-DC, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6 및 B7-H7 포함(이들로 제한되지는 않음)) 등을 표적화하도록 조작될 수 있다.
- [0032] 다양한 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 면역 저해제의 세포외 도메인, 예컨대 제한 없이, TIM-3, BTLA, PD-1, CTLA-4, CD244, CD160, TIGIT, SIRP α/CD172a, 2B4, VISTA, VSIG8, LAG3, CD200 및 TMIGD2 중 하나 이상을 포함한다.
- [0033] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 면역 저해 특성을 가지는 I형 막 단백질의 세포외 도메인을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 키메라 단백질은 면역 저해 신호의 전달, 비제한적인 예로서, PD-1과 PD-L1 또는 PD-L2의 결합 및/또는 CD172a와 CD47의 결합 및/또는 TIM-3과 갈렉틴-9 및/또는 포스파티딜세린의 결합을 파괴하고/하거나, 차단하고/하거나, 감소시키고/시키거나, 저해하도록 조작된다.
- [0034] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 면역 자극 신호의 세포외 도메인, 예컨대 OX-40 리간드(OX-40L), LIGHT(CD258), GITR 리간드(GITRL), CD70, CD30 리간드, CD40 리간드(CD40L), CD137 리간드, TRAIL 및 TL1A 중 하나 이상을 포함한다.
- [0035] 다양한 실시형태에서, 키메라 단백질은 동족 수용체에 대한 저해 신호 리간드의 결합(예를 들어, PD-L1 또는 PD-L2에 대한 PD-1; 예를 들어 CD47에 대한 CD172a; 예를 들어 CSF1에 대한 CD115; 예를 들어 갈렉틴-9 또는 포스파티딜세린에 대한 TIM-3)을 자극하지만, 면역 세포(예를 들어, T 세포, 대식세포 또는 다른 백혈구)에 대한 저해 신호 전달을 저해한다.
- [0036] 다양한 실시형태에서, 키메라 단백질은, 종양 세포의 면역 저해 신호를 마스킹하면서, 제한 없이, 면역 자극을 T 세포에 전달할 수 있는, 면역 자극 리간드 세포외 도메인 및 면역 저해 수용체 세포외 도메인을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 키메라 단백질은 T 세포 활성화의 순 결과를 가지는 신호를 전달한다.
- [0037] 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 면역 저해 신호의 수용체의 ECD인 면역 저해 신호를 포함하고, 이것은 면역 저해 신호의 동족 리간드를 보유하는 종양 세포에 작용한다. 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 면역 자극 신호의 리간드의 ECD인 면역 자극 신호를 포함하고, 이것은 면역 자극 신호의 동족 수용체를 보유하는 T 세포에서 작용한다. 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 (i) 면역 저해 신호의 수용체이고, 이것이 면역 저해 신호의 동족 리간드를 보유하는 종양 세포에 작용하는, 면역 저해 신호 및 (ii) 면역 자극 신호의 리간드이고, 이것이 면역 자극 신호의 동족 수용체를 보유하는 T 세포에 작용하는, 면역 자극 신호 둘 다를 포함한다.
- [0038] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 문헌[Mahoney, *Nature Reviews Drug Discovery* 2015;14:561-585](이의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재된 면역조절제 중 하나 이상의 세포외 도메인을 포함한다. 예를 들어, 본 도 2를 참조하여, 키메라 단백질은 쌍의 수용체인 ("-"로 표시된) 면역 저해 신호를 보유하고(즉, 도면의 오른쪽 측), 종양 세포는 도면의 왼쪽 측으로부터 선택된 리간드를 보유한다. 추가의 예로서, 본 도 2를 참조하여, 키메라 단백질은 쌍의 리간드인 ("+"로 표시된) 면역 자극 신호를 보유하고(즉, 도면의 왼쪽 측), 종양 세포는 도면의 오른쪽 측으로부터 선택된 수용체를 보유한다.
- [0039] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 면역 자극 특성을 가지는 II형 막 단백질의 세포외 도메인을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 키메라 단백질은 면역 자극 신호의 전달, 비제한적인 예로서, GITR과 하나 이상의 GITR 리간드의 결합 및/또는 OX40과 OX40L의 결합 및/또는 CD40과 CD40 리간드의 결합을 증대시키고/시키거나, 증가시키고/시키거나, 자극하도록 조작된다.
- [0040] 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 면역 저해제 PD-1의 세포외 도메인을 포함하고, 하기와 같은 면역 자극제와 쌍을 짓는다: PD-1/4-1BBL; PD-1/OX-40L; PD-1/LIGHT; PD-1/GITRL; PD-1/CD70; PD-1/CD30L; PD-1/CD40L; 및 PD-1/TL1A.
- [0041] 실시형태에서, 키메라 단백질은 면역 저해제 PD-1의 세포외 도메인을 포함하고, 면역 자극제 OX-40L과 쌍을 짓

는다. 실시형태에서, 키메라 단백질은 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 키메라 단백질은 약 1nM 내지 약 5nM, 예를 들어 약 1nM, 약 1.5nM, 약 2nM, 약 2.5nM, 약 3nM, 약 3.5nM, 약 4nM, 약 4.5nM 또는 약 5nM의 K_D 로 인간 PD-L1 또는 PD-L2에 결합한다. 다양한 실시형태에서, 키메라 단백질은 약 5nM 내지 약 15nM, 예를 들어 약 5nM, 약 5.5nM, 약 6nM, 약 6.5nM, 약 7nM, 약 7.5nM, 약 8nM, 약 8.5nM, 약 9nM, 약 9.5nM, 약 10nM, 약 10.5nM, 약 11nM, 약 11.5nM, 약 12nM, 약 12.5nM, 약 13nM, 약 13.5nM, 약 14nM, 약 14.5nM, 또는 약 15nM의 K_D 로 인간 PD-L1에 결합한다.

- [0042] 다양한 실시형태에서, 키메라 단백질은 증대된 안정성 및 단백질 반감기를 나타낸다. 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 높은 친화도로 FcRn에 결합한다. 다양한 실시형태에서, 키메라 단백질은 약 70nM 내지 약 80nM의 K_D 로 FcRn에 결합할 수 있다. 예를 들어, 키메라 단백질은 약 70nM, 약 71nM, 약 72nM, 약 73nM, 약 74nM, 약 75nM, 약 76nM, 약 77nM, 약 78nM, 약 79nM, 또는 약 80nM의 K_D 로 FcRn에 결합할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 이펙터 기능을 가지는 다른 Fc 수용체(즉, FcRn 이외의 것)에 실질적으로 결합하지 않는다.
- [0043] 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 PD-L1 또는 PD-L2인 면역 저해제의 세포외 도메인을 포함하고, 하기와 같이 면역 자극 수용체와 쌍 지어진다: PD-L1/4-1BB; PD-L1/OX-40; PD-L1/HVEM; PD-L1/GITR; PD-L1/CD27; PD-L1/CD28; PD-L1/CD30; PD-L1/CD40 및 PD-L1/CD137.
- [0044] 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 PD-L2인 면역 저해제의 세포외 도메인을 포함하고, 하기와 같이 면역 자극제와 쌍 지어진다: PD-L2/4-1BB; PD-L2/OX-40; PD-L2/HVEM; PD-L2/GITR; PD-L2/CD27; PD-L2/CD28; PD-L2/CD30; PD-L2/CD40 및 PD-L2/CD137.
- [0045] 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 TIM-3인 면역 저해제의 세포외 도메인을 포함하고, 하기와 같이 면역 자극제와 쌍 지어진다: TIM-3/OX-40L; TIM-3/LIGHT; TIM-3/GITRL; TIM-3/CD70; TIM-3/CD30L; TIM-3/CD40L; TIM-3/CD137L; TIM-3/TL1A; 및 TIM-3/OX40L.
- [0046] 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 BTLA인 면역 저해제의 세포외 도메인을 포함하고, 하기와 같이 면역 자극제와 쌍 지어진다: BTLA/OX-40L; BTLA/LIGHT; BTLA/GITRL; BTLA/CD70; BTLA/CD30L; BTLA/CD40L; BTLA/CD137L; BTLA/TL1A; 및 BTLA/OX40L.
- [0047] 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 CD172a/SIRP α 인 면역 저해제의 세포외 도메인을 포함하고, 하기와 같이 면역 자극제와 쌍 지어진다: CD172a/OX-40L; CD172a/LIGHT; CD172a/CD70; CD172a/CD30L; CD172a/CD40L; CD172a/CD137L; CD172a/TL1A; 및 CD172a/OX40L.
- [0048] 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 CD115인 면역 저해제의 세포외 도메인을 포함하고, 하기와 같이 면역 자극제와 쌍 지어진다: CD115/OX-40L; CD115/LIGHT; CD115/CD70; CD115/CD30L; CD115/CD40L; CD115/CD137L; CD115/TL1A; 및 CD115/OX40L.
- [0049] 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 TIGIT인 면역 저해제의 세포외 도메인을 포함하고, 하기와 같이 면역 자극제와 쌍 지어진다: TIGIT/OX-40L; TIGIT/LIGHT; TIGIT/GITRL; TIGIT/CD70; TIGIT/CD30L; TIGIT/CD40L; TIGIT/CD137L; TIGIT/TL1A; 및 TIGIT/OX40L.
- [0050] 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 TMIGD2인 면역 저해제의 세포외 도메인을 포함하고, 하기와 같이 면역 자극제와 쌍 지어진다: TMIGD2/OX-40L; TMIGD2/LIGHT; TMIGD2/GITRL; TMIGD2/CD70; TMIGD2/CD30L; TMIGD2/CD40L; TMIGD2/CD137L; TMIGD2/TL1A; 및 TMIGD2/OX40L.
- [0051] 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 LAG3인 면역 저해제의 세포외 도메인을 포함하고, 하기와 같이 면역 자극제와 쌍 지어진다: LAG3/OX-40L; LAG3/LIGHT; LAG3/GITRL; LAG3/CD70; LAG3/CD30L; LAG3/CD40L; LAG3/CD137L; LAG3/TL1A; 및 LAG3/OX40L.
- [0052] 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 VSIG8인 면역 저해제의 세포외 도메인을 포함하고, 하기와 같이 면역 자극제와 쌍 지어진다: VSIG8/OX-40L; VSIG8/LIGHT; VSIG8/GITRL; VSIG8/CD70; VSIG8/CD30L; VSIG8/CD40L; VSIG8/CD137L; VSIG8/TL1A; 및 VSIG8/OX40L.
- [0053] 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 CD200인 면역 저해제의 세포외 도메인을 포함하고, 하기와 같이 면역 자극제와 쌍 지어진다: CD200/OX-40L; CD200/LIGHT; CD200/GITRL; CD200/CD70; CD200/CD30L; CD200/CD40L; CD200/CD137L; CD200/TL1A; 및 CD200/OX40L.

[0054] 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 본 명세서에 기재된 세포의 도메인의 변이체, 예를 들어 세포의 도메인, 예를 들어 인간 세포의 도메인의 공지된 아미노산 또는 핵산 서열, 예를 들어 여기서 표시된 도메인에 대해 또는 전체로서 서열 번호 1-15 중 하나 이상과 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 61%, 또는 적어도 약 62%, 또는 적어도 약 63%, 또는 적어도 약 64%, 또는 적어도 약 65%, 또는 적어도 약 66%, 또는 적어도 약 67%, 또는 적어도 약 68%, 또는 적어도 약 69%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 71%, 또는 적어도 약 72%, 또는 적어도 약 73%, 또는 적어도 약 74%, 또는 적어도 약 75%, 또는 적어도 약 76%, 또는 적어도 약 77%, 또는 적어도 약 78%, 또는 적어도 약 79%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 81%, 또는 적어도 약 82%, 또는 적어도 약 83%, 또는 적어도 약 84%, 또는 적어도 약 85%, 또는 적어도 약 86%, 또는 적어도 약 87%, 또는 적어도 약 88%, 또는 적어도 약 89%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 91%, 또는 적어도 약 92%, 또는 적어도 약 93%, 또는 적어도 약 94%, 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 96%, 또는 적어도 약 97%, 또는 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%) 서열 동일성의 서열을 포함할 수 있다. 서열 번호 1-15로서의 다양한 예시적인 서열이 본 명세서에 포함되고, 이것은 밑줄 그어지거나 또는 **볼드체**의 세포의 도메인 및 일반 텍스트의 링커를 보여준다. 다양한 실시형태에서, 링커는 본 명세서에 기재된 또 다른 것에 대해 스와핑될 수 있다.

[0055] 예시적인 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 인간 IgG4 항체 서열로부터의 힌지-CH2-CH3 도메인을 사용하여 PD-1의 세포의 도메인 및 OX40L의 세포의 도메인을 포함한다. 이 실시형태에서, PD-1의 세포의 도메인은 밑줄 있고, 이어서 인간 IgG4의 힌지-CH2-CH3 도메인 및 짧은 링커(일반 텍스트), 이어서 OX40L의 세포의 도메인(볼드체)가 있다:

ATGCAGATCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACCTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTC
TTAGACTCCCAGACAGGCGCTGGAACCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGAC
AACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATGAGCCCC
AGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCGCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGT
GTCACACAACCTGCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGCGCAATGACAGCGGCACC
TACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTCAGGGTG
ACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCACCCAGCCCTCACCCAGGCCAGCCGCGCAGTTCCAATCT
AAGTACGGCCCTCCCTGCCCTAGCTGTCCCGCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCCTCGTGTTCCTGTTCCTCC
CCAAAGCCCAAGGACACCTGTATGATCAGCGGACCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGATGTGTCCAG
GAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGGTGGAAGTGACACAACGCCAAGACCAAGCCGAGA
GAGGAACAGTTCAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGTGCACCAGGATTGGCTGAGCGGC
AAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAGCAAGGGCTGCCAGCAGCATCGAAAAGACCATCAGCAACGCCACC
GGCCAGCCCAGGGAACCCAGGTGTACACTGCCCCCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCC
CTGACATGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGCCAGCCAGAG
AACAACCTACAAGACACCCCTCAGTGTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCCGCTGACAGTG
GACAAGAGCAGCTGGCAGGAAGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTATGCACGAAGCCCTGCACAACCACTAC
ACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAAATAGAGGGACGAATGGACCAGGTATCACATCGGTATCCT
CGAATTCAAAGTATCAAAGTACAATTTACCGAATATAAGAAGGAGAAAGTTTCATCCTCACTTCCAAAAGG
AGGATGAAATCATGAAGGTGCAGAACAATCAGTCATCATCAACTGTGATGGGTTTTATCTCATCTCCCTGAA
GGGCTACTTCTCCAGGAAGTCAACATTAGCCTTCATTACCAGAAGGATGAGGAGCCCTCTTCCAACCTGAAG
AAGGTCAGGTCTGTCAACTCCTTGATGGTGGCCTCTCTGACTTACAAAGACAAAGTCTACTTGAATGTGACCA
CTGACAATACCTCCCTGGATGACTTCCATGTGAATGGCGGAGAACTGATTCTTATCCATCAAAATCCTGGTGA
ATTCTGTGTCCTTTGA (서열 번호 1).

[0056]

[0057] 이 서열은 아미노산 서열을 가지는 단백질을 코딩한다:

M Q I P Q A P W P V V W A V L Q L G W R P G W F L D S P D R P W N P P T
F S P A L L V V T E G D N A T F T C S F S N T S E S F V L N W Y R M S P
S N Q T D K L A A F P E D R S Q P G Q D C R F R V T Q L P N G R D F H M
S V V R A R R N D S G T Y L C G A I S L A P K A Q I K E S L R A E L R V
T E R R A E V P T A H P S P S P R P A G Q F Q S K Y G P P C P S C P A P
E F L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q
E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S
V L T V L H Q D W L S G K E Y K C K V S S K G L P S S I E K T I S N A T
G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D
I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V
D K S S W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K I
E G R M D Q V S H R Y P R I Q S I K V Q F T E Y K K E K G F I L T S Q K E
D E I M K V Q N N S V I I N C D G F Y L I S L K G Y F S Q E V N I S L H Y
Q K D E E P L F Q L K K V R S V N S L M V A S L T Y K D K V Y L N V T T D
N T S L D D F H V N G G E L I L I H Q N P G E F C V L Stop (서열 번호 2)

[0058]

[0059] 추가로, 이 아미노산 서열, 및 본 명세서에 기재된 임의의 세포의 도메인의 아미노산 서열(명확히 기재되든 또는 아니든)은 코돈 최적화된 핵산 서열, 예컨대 중국 햄스터(CHO) 세포에 의한 발현에 최적화된 하기 서열에 의해 또한 달성될 수 있다:

A T G C A G A T T C C T C A G G C C C C T T G G C C T G T C G T G T G G G C T G T G C T G C A G C T G G G A T G G C G G C C T G G C T G G T T T
C T G G A C A G C C C C G A C A G A C C C T G G A A C C C C C T A C A T T T C C C C T G C C C T G C T G G T C G T G A C C G A G G G C G A C
A A T G C C A C C T T C A C C T G T A G C T T C A G C A A C A C C A G C G A G A G C T T C G T G C T G A A C T G G T A C A G A A T G A G C C C C
A G C A A C C A G A C C G A C A A G C T G G C C G C C T T C C C C G A G G A T A G A T C T C A G C C C G G C C A G G A C T G C C G G T T C A G A
G T G A C C C A G C T G C C C A A C G G C C G G G A C T T C C A C A T G T C T G T C G T G C G G G C C A G A C G A A C G A C A G C G G C A C A
T A T C T G T G C G G C C C A T C A G C C T G G C C C C A A G G C C C A G A T C A A G A G A G C C T G A G A G C C G A G C T G A G A G T G
A C C G A G A G A A G G G C G A A G T G C C T A C C G C C C A C C C T A G C C C A T C T C C A A G A C C T G C C G G C C A G T T C C A G T C T
A A G T A C G G C C C T C C T T G C C C C A G C T G T C C C G C C C T G A A T T T C T G G G C G G A C C A G C G T G T C C T G T T C C C C
C C A A G C C C A A G G A C A C C C T G A T G A T C A G C C G A C C C C G A A G T G A C C T G C G T G G T G G T G A T G T C C C A G
G A A G A T C C C G A G G T G C A G T T C A A T T G G T A C G T G G A C G G C G T G G A A G T G C A C A C C C A A G A C C A A G C C C A G A
G A G G A A C A G T T C A A C A G A C A C T A C C G G G T G G T G T C C G T G C T G A C C G T G C T G C A C C A G G A T T G G C T G A G C G G C
A A A G A T A C A A G T G C A A G G T G T C C A G C A A G G G C C T G C C C A G C A G C A T C G A G A A A C C A T C A G C A A C G C C A C C
G G C C A G C C C A G G A A C C C C A G G T G T A C A C A C T G C C C C T A G C C A G A A G A G A T G A C C A A G A C C A G G T G T C C
C T G A C C T G T C T C G T G A A G G G C T T C T A C C C C T C C G A T A T C G C C G T G G A A T G G G A G A G A A C G G C C A G C C T G A G
A A C A A C T A C A A G A C C A C C C C C A G T G T G G A C A G C G A C G G C T C A T T T T C C T G T A C T C C A G A C T G A C C G T G
G A C A A G A G C A G C T G G C A G G A A G G C A A C G T G T T C A G C T G C T C C G T G A T G C A C G A G G C C C T G C A C A A C C A C T A C
A C C C A G A A G T C C C T G T C T C T G A G C C T G G G C A A G A T C G A G G G C C G G A T G G A T A G A G C C C A G G G C G A A G C C T G C
G T G C A G T T C C A G G C T C T G A A G G G C C A G A A T T C G C C C C A G C C A C C A G C A G G T G A C G C C C C T C T G A G A G C T G
A C G G C G A C A A G C C T A G A G C C C A C C T G A C A G T C G T G C G G C A G A C C C T A C C A G C A C T T C A A G A A T C A G T T C C C
A G C C C T G C A C T G G G A G C A G A G C T G G G C C T G G C C T T C A C C A A G A C A G A A T G A A C T A C A C C A A A G T T T C T G
C T G A T C C C C G A G A G C G G C A C T A C T T C A T C T A C A G C C A A G T G A C C T T C C G G G G C A T G A C C A G C A G T G C A G C G
A G A T C A G A C A G G C C G G C A G A C C T A A C A A G C C C G A C A G C A T C A C C G T C G T G A T C A C C A A A G T G A C C G A C A G C T A
C C C C G A G C C C A C A C A G C T G T G A T G G G C A C C A A G A G C G T G T G C G A A G T G G G C A G A A C T G G T T C C A G C C C A T C
T A C T T G G G C G C C A T G T T C A G T C T G C A A G A G G G C G A A A G C T G A T G G T C A A G T G T C C G A C A T C T C C C T G G T G G
A T T A C A C C A A A G A G G A C A A G A C C T T C T T C G G C G C C T T T C T G C T C T G A (서열 번호 3)

[0060]

[0061] 본 키메라 단백질의 또 다른 실시형태는 PD-1의 세포의 도메인 및 동시자극 리간드, 예컨대 TL1A, 4-1BBL, ICOSL, GITRL, CD27 또는 CD40L의 세포의 도메인을 포함한다. PD-1의 세포의 도메인(밑줄)-Fc(일반 텍스트)-TL1A의 세포의 도메인(볼드체)를 코딩하는 예시적인 서열은 하기와 같다:

ATGCAGATCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAACTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTC
TTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCACCCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGAC
AACGCCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAACTGGTACCGCATGAGCCCC
AGCAACCAGACGGACAAGGTGGCCGCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGT
GTCACACAAGTCCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACC
TACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCTTCGGGCAGAGCTCAGGGTG
ACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCACCCAGCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAATCT
AAGTACGGCCCTCCCTGCCCTAGCTGTCCCGCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCCTCCGTGTTTCTGTTCCCC
CCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGACCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGTCCCAG
GAAGATCCCGAGGTGCGATTCAATTGGTACGTGGACGGGGTGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCAGA
GAGGAACAGTTCAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGTGCACCAGGATTGGCTGAGCGGC
AAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAGCAAGGGCTGCCAGCAGCATCGAAAAGACCATCAGCAACGCCACC
GGCCAGCCAGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCC
CTGACATGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCAGAG
AACAACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTTCTTCTGTACTCCCGGCTGACAGTG
GACAAGAGCAGCTGGCAGGAAGGCAACGTGTTCACTGCAGCGTGATGCAGGAAGCCCTGCACAACCACTAC
ACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAAATAGAGGGACGAATGGACCGGGCCAGGGAGAGGCCTGT
GTGAGTTCCAGGCTCTAAAAGGACAGGAGTTTGACCTTCACATCAGCAAGTTTATGCACCTCTTAGAGCAG
ACGGAGATAAGCCAAGGGCACACCTGACAGTTGTGAGACAACTCCACACAGCAGCTTTAAAAATCAGTTCCC
AGCTCTGCACTGGGAACATGAAGTGGCTGGCCTTACCAAGAACCGAATGAAGTATACCAACAAATTCCTG
CTGATCCCAGAGTCGGGAGACTACTTCATTTACTCCAGGTGACATTCGTGGGATGACCTCTGAGTGCAAGT
AAATCAGACAAGCAGCGCCGACCAACAAGCCAGACTCCATCACTGTGGTCATCACCAAGGTAACAGACAGCTA
CCCTGAGCCAACCCAGCTCCTCATGGGACCAAGTCTGTATGCGAAGTAGGTAGCAACTGGTTCAGCCCATC
TACCTCGGAGCCATGTTCTCCTTGAAGAAGGGGACAAGCTAATGGTGAACGTCAGTGACATCTCTTTGGTGG
ATTACACAAAAGAAGATAAAACCTTCTTTGGAGCCTTCTTACTATAG (서열 번호 4)

[0062]

[0063]

서열 번호 4의 이 뉴클레오타이드 서열은 하기 아미노산 서열을 가지는 단백질을 코딩하도록 코돈 최적화될 수 있다:

M Q I P Q A P W P V V W A V L Q L G W R P G W F L D S P D R P W N P P T
F S P A L L V V T E G D N A T F T C S F S N T S E S F V L N W Y R M S P
S N Q T D K L A A F P E D R S Q P G Q D C R F R V T Q L P N G R D F H M
S V V R A R R N D S G T Y L C G A I S L A P K A Q I K E S L R A E L R V
T E R R A E V P T A H P S P S P R P A G Q F Q S K Y G P P C P S C P A P
E F L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q
E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S
V L T V L H Q D W L S G K E Y K C K V S S K G L P S S I E K T I S N A T
G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D
I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V
D K S S W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K I
E G R M D R A Q G E A C V Q F Q A L K G Q E F A P S H Q Q V Y A P L R A D
G D K P R A H L T V V R Q T P T Q H F K N Q F P A L H W E H E L G L A F T
K N R M N Y T N K F L L I P E S G D Y F I Y S Q V T F R G M T S E C S E I
R Q A G R P N K P D S I T V V I T K V T D S Y P E P T Q L L M G T K S V C
E V G S N W F Q P I Y L G A M F S L Q E G D K L M V N V S D I S L V D Y T
K E D K T F F G A F L L Stop (서열 번호 5)

[0064]

[0065]

동족 수용체의 세포외 도메인을 코딩하는 융합 단백질에 의해 마스킹될 수 있는 종양 세포에 의해 발현된 많은 I형 막 단백질이 존재한다. 추가의 예는 Fc를 통해 OX40L에 연결된 BTLA의 세포외 도메인을 코딩하는 융합 단백질을 포함할 것이다. 이러한 작제물은 하기 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다:

ATGAAGACATTGCCTGCCATGCTTGGAACTGGGAAATTATTTTGGGTCTTCTTCTTAATCCCATATCTGGAC
ATCTGGAACATCCATGGGAAAGATCATGTGATGTACAGCTTTATATAAAGAGACAATCTGAACACTCCATC
TTAGCAGGAGATCCCTTTGAACTAGAAATGCCCTGTGAAATACTGTGCTAACAGGCCCTCATGTGACTTGGTGC
AAGCTCAATGGAACAACATGTGTAAACTTGAAGATAGACAAACAAGTTGGAAGGAAGAGAAGAACATTTCA
TTTTTCATTCTACATTTTGAACCACTGCTTCCTAATGACAATGGGTGATACCGCTGTCTGCAAAATTTTCAG
TCTAATCTCATTGAAAGCCACTCAACAATCTTTATGTGACAGATGTAAAAAGTGCCTCAGAACGACCTCC
AAGGACGAAATGGCAAGCTCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTAGCTGTCCCGCCCTGAATTTCTGGGCGGA
CCCTCCGTGTTTCTGTTCCTCCCAAGGCCAAGGACACCTGATGATCAGCCGACCCCGAAGTGACCTGT
GTGGTGGTGGATGTGTCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGGGTGAAGTGCAC
AAGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGTG
CACCAGGATTGGCTGAGCGGCAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAGCAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAA
AAGACCATCAGCAACGCCACCGGCCAGCCAGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCCTAGCCAGGAAGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACATGCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGG
GAGAGCAACGGCCAGCCAGAGAACAATAAGAACACCCCCAGTGTGGACAGCGACGGCTCATTCTTC
CTGTACTCCCGCTGACAGTGGACAAGAGCAGCTGGCAGGAAGGCAACGTGTTACGTGCAGCGTGTATGCAC
GAAGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAAGTCCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAAATAGAGGGACGAATGGAC
CAGGTATCACATCGGTATCCTCGAATTCAAAGTATCAAAGTACAATTTACCGAATATAAGAAGGAGAAAGGTT
TCATCTCACTTCCCAAAAGGAGGATGAAATCATGAAGGTGCAGAACAACTCAGTCATCATCAACTGTGTATGG
GTTTATCTCATCTCCCTGAAGGGCTACTTCTCCAGGAAGTCAACATTAGCCTTCATTACCAGAAGGATGAG
GAGCCCCCTCTCCAACTAAGAAGGTGAGGTCTGTCAACTCCTTGATGGTGGCTCTCTGACTTACAAAGACA
AAGTCTACTTGAATGTGACCACTGACAATACCTCCCTGGATGACTTCCATGTGAATGGCGGAGAACTGATTCT
TATCCATCAAAATCCTGGTGAATTCGTGTCTTTGA (서열 번호 6)

[0066]

[0067]

이 뉴클레오타이드 서열은 아미노산 서열을 가지는 단백질을 코딩한다:

M K T L P A M L G T G K L F W V F F L I P Y L D I W N I H G K E S C D V
Q L Y I K R Q S E H S I L A G D P F E L E C P V K Y C A N R P H V T W C
K L N G T T C V K L E D R Q T S W K E E K N I S F F I L H F E P V L P N
D N G S Y R C S A N F Q S N L I E S H S T T L Y V T D V K S A S E R P S
K D E M A S S K Y G P P C P S C P A P E F L G G P S V F L F P P K P K D
T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H
N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L S G K E Y K C
K V S S K G L P S S I E K T I S N A T G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E
M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T
T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S S W Q E G N V F S C S V M H
E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K I E G R M D Q V S H R Y P R I Q S I
K V Q F T E Y K K E K G F I L T S Q K E D E I M K V Q N N S V I I N C D G
F Y L I S L K G Y F S Q E V N I S L H Y Q K D E E P L F Q L K K V R S V N
S L M V A S L T Y K D K V Y L N V T T D N T S L D D F H V N G G E L I L I
H Q N P G E F C V L Stop (서열 번호 7)

[0068]

[0069]

또 다른 예는 Fc 링커를 통해 인간 OX40L에 연결된 TIGIT의 세포의 도메인을 포함하는 융합 단백질을 포함할 것이다:

ATGCGCTGGTGTCTCCTCTGATCTGGGCCAGGGGCTGAGGCAGGCTCCCTCGCCTCAGGAATGATGACA
GGCACAATAGAAACAACGGGAACATTTCTGCAGAGAAAGGTGGCTCTATCATCTTACAATGTCACCTCTCC
TCCACCACGGCACAAGTGACCCAGGTCAACTGGGAGCAGCAGGACCAGCTTCTGGCCATTTGTAATGCTGAC
TTGGGGTGGCACAATCTCCCCATCCTTCAAGGATCGAGTGGCCCCAGGTCCCGGCCCTGGGCCTCACCCTCCAG
TCGCTGACCGTGAACGATACAGGGGAGTACTTCTGCATCTATCACACCTACCCTGATGGGACGTACACTGGG
AGAATCTTCTGGAGGTCTAGAAAGCTCAGTGGCTGAGCACGGTGCCAGGTCCAGATTCCATCTAAGTAC
GGCCCTCCCTGCCCTAGCTGTCCCGCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCCTCCGTGTTTCTGTTCCCCCAAAG
CCCAAGGACACCTGATGATCAGCCGACCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGTCCAGGAAGAT
CCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAA
CAGTTCAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGACCAGGATTGGCTGAGCGGCAAAGAG
TACAAGTGCAAGGTGTCCAGCAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAAAAGACCATCAGCAACGCCACCGGCCAG
CCCAGGAACCCAGGTGTACACTGCCCCCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACA
TGCCCTGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCAGAGAACAAC
TACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCCGGCTGACAGTGGACAAG
AGCAGCTGGCAGGAAGGCAACGTGTTCACTGTCAGCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCACTACACCCAG
AAGTCCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAAATAGAGGGACGAATGGACAGGTATCACATCGGTATCCTCGAATT
CAAAGTATCAAAGTACAATTTACCGAATATAAGAAGGAGAAAGGTTTCATCTCACTTCCCAAAGGAGGATG
AAATCATGAAGGTGCAGAACAACCTCAGTCATCATCAACTGTGATGGGTTTATCTCATCTCCCTGAAGGGCTA
CTTCTCCAGGAAGTCAACATTAGCCTTCAATTACCAGAAGGATGAGGAGCCCTCTTCCAAGTGAAGAAGGTC
AGGTCTGTCAACTCCTTGATGGTGGCCTCTCTGACTTACAAAGACAAAGTCTACTTGAATGTGACCACTGACA
ATACCTCCCTGGATGACTTCCATGTGAATGGCGGAGAACTGATTCTTATCCATCAAAATCCTGGTGAATTCTG
TGTCTTTGA (서열 번호 8).

[0070]

[0071]

이러한 서열은 아미노산 서열을 가지는 단백질을 코딩하도록 코돈 최적화될 수 있다:

MRWCLLLIWAQGLRQAPLASGMMTGTTIETTGNISAE
KGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEEQQDQLLAICNAD
LGWHISPSFKDRVAPGPGGLTLQSLTVNDTGEYFC
IYHTYPTDGTYTGRIFLEVLES SVAEHGARFQIPSKY
GPPCPSCPAPFEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLSGKEYKCKVSSKGLPS
SIEKTISNATGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSLGKIEGRMDQVSHRYPRIQS IKVQFTEYKK
EKGFILTSQKEDEIMKVQNN SVIINC DG FYLISLKG Y
FSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTY
KDKVYLVNTTNDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCV
L Stop (서열 번호 9).

[0072]

[0073]

또 다른 예는 Fc 영역을 통해 인간 OX40L에 연결된 TIM3의 세포외 도메인을 포함하는 융합 단백질을 포함할 수 있다:

ATGTTTTCACATCTTCCCTTTGACTGTGCTGCTGCTGCTGCTACTTACAAGGTCCTCAGAAGTG
GAATACAGAGCGGAGGTCGGTCAGAATGCCTATCTGCCCTGCTTCTACACCCAGCCGCCAGGGAACCTC
GTGCCCGTCTGCTGGGGCAAAGGAGCCTGTCTGTGTTTGAATGTGGCAACGTGGTGCTCAGGACTGATGAA
AGGGATGTGAATTATTGGACATCCAGATACTGGCTAAATGGGGATTTCGCGAAAGGAGATGTGTCCCTGACC
ATAGAGAATGTGACTCTAGCAGACAGTGGGATCTACTGCTGCCGATCCAAATCCAGGCATAATGAATGAT
GAAAAATTAACTGAAGTTGGTCATCAAAACAGCCAAGGTCACCCCTGCACCGACTCGGCAGAGAGACTTC
ACTGCAGCCTTTCCAAGGATGCTTACCACCAGGGGACATGGCCAGCAGAGACACAGACACTGGGGAGCCTC
CCTGATATAAATCTAACACAAATATCCACATTGGCCAATGAGTTACGGGACTCTAGATTGGCCAATGACTTA
CGGGACTCTGGAGCAACCATCAGAATAGGCTCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTAGCTGTCCCGCCCTGAA
TTTCTGGGCGGACCTCCGTGTTTCTGTTCCCGCCAAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCCGGACCCCTC
GAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGTCCAGGAAGATCCCGAGGTGACAGTTCAATTGGTACGTGGACGGG
GTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCTGTG
CTGACCGTGTGCACAGGATTTGGCTGAGCGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAGCAAGGGCCTGCC
AGCAGCATCGAAAAGACCATCAGCAACGCCACCGGCCAGCCAGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCCT
AGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACATGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATC
GCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCAGAGAACAACTACAAGACCACCCCGCAGTGTGGACAGCGAC
GGCTCATTTCTCTGACTCCCGGCTGACAGTGGACAAGAGCAGCTGGCAGGAAGGCAACGTGTTAGCTGC
AGCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAAATAGAG
GGACGAATGGACAGGTATCACATCGGTATCCTCGAATTCAAAGTATCAAAGTACAATTTACCGAATATAAGA
AGGAGAAAGGTTTATCTCTACTTCCCAAAAGGAGGATGAAATCATGAAGGTGCAGAACAACTCAGTCATCAT
CAACTGTGATGGGTTTATCTCATCTCCCTGAAGGGCTACTTCTCCAGGAAGTCAACATTAGCCTTCATTAC
CAGAAGGATGAGGAGCCCTCTTCCAAGTGAAGAGGTCAGGTCTGTCAACTCCTTGATGGTGGCCTCTCTGA
CTTACAAAGACAAAGTCTACTTGAATGTGACCACTGACAATACCTCCCTGGATGACTTCCATGTGAATGGCGG
AGAACTGATTCTTATCCATCAAAATCCTGGTGAATTCTGTGTCCTTGA (서열 번호 10).

[0074]

[0075]

이러한 서열은 아미노산 서열을 가지는 단백질을 코딩하도록 코돈 최적화될 수 있다:

M F S H L P F D C V L L L L L L L L T R S S E V E Y R A E V G Q N A Y L
P C F Y T P A A P G N L V P V C W G K G A C P V F E C G N V V L R T D E
R D V N Y W T S R Y W L N G D F R K G D V S L T I E N V T L A D S G I Y
C C R I Q I P G I M N D E K F N L K L V I K P A K V T P A P T R Q R D F
T A A F P R M L T T R G H G P A E T Q T L G S L P D I N L T Q I S T L A
N E L R D S R L A N D L R D S G A T I R I G S K Y G P P C P S C P A P E
F L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E
D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V
L T V L H Q D W L S G K E Y K C K V S S K G L P S S I E K T I S N A T G
Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I
A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P V L D S D G S F F L Y S R L T V D
K S S W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K I E
G R M D Q V S H R Y P R I Q S I K V Q F T E Y K K E K G F I L T S Q K E D
E I M K V Q N N S V I I N C D G F Y L I S L K G Y F S Q E V N I S L H Y Q
K D E E P L F Q L K K V R S V N S L M V A S L T Y K D K V Y L N V T T D N
T S L D D F H V N G G E L I L I H Q N P G E F C V L Stop (서열 번호 11).

[0076]

[0077]

또 다른 예는 인간 OX40L의 세포의 도메인에 Fc 링커 서열과 인접한 CD172a의 세포의 도메인을 포함할 수 있다:

ATGGAGCCCGCCGGCCCGGCCCGCCCGCTCGGGCCGCTGCTCTGCCTGCTGCTCGCCGCGTCTGCGCC
TGGTCAGGAGTGGCGGTGAGGAGGAGCTGCAGGTGATTCAGCCTGACAAGTCCGTGTTGGTTGCAGCTGGA
GAGACAGCCACTCTGCGCTGCACTGCGACCTCTCTGATCCCTGTGGGGCCCATCCAGTGGTTCAGAGGAGCT
GGACCAGGCCGGGAATTAATCTACAATCAAAAAGAAGGCCACTTCCCCCGGTAACAAGTGTTCAGACCTC
ACAAAGAGAAACAACATGGACTTTTCCATCCGCATCGGTAAATCACCAGCAGATGCCGGCACCTACTAC
TGTGTGAAGTTCGGAAAGGAGCCCGATGACGTGGAGTTAAGTCTGGAGCAGGCACTGAGCTGTCTGTG
CGCGCAAACCTCTGCCCCGTTGGTATCGGGCCCTGCGGCGAGGGCCACCTCAGCACACAGTGAGCTTC
ACCTGCGAGTCCACGGCTTCTACCCAGAGACATCACCCTGAAATGGTTCAAAAATGGGAATGAGCTCTCA
GACTTCCAGACCAACGTGGACCCCGTAGGAGAGAGCGTGTCTACAGCATCCACAGCACAGCCAAGGTGGTG
CTGACCCGCGAGGACGTTCACTCTCAAGTCATCTGCGAGGTGGCCACGTCACCTTGCAGGGGACCTCTT
CGTGGGACTGCCAATGTCTGAGACCATCCGAGTTCACCCACCTTGGAGGTACTCAACAGCCCGTGAGG
GCAGAGAACCAGGTGAATGTCACCTGCCAGGTGAGGAAGTTCTACCCAGAGACTACAGCTGACCTGGTTG
GAGAATGGAACGTGTCCCGACAGAAACGGCCTCAACCGTTACAGAGAACAAGGATGGTACCTACAAGTGG
ATGAGCTGGCTCCTGGTGAATGTATCTGCCACAGGATGATGTGAAGCTACCTGCCAGGTGGAGCATGAC
GGGCAGCCAGCGGTGACGAAAAGCCATGACCTGAAGTCTCAGCCACCCGAGGAGCAGGGCTCAAAATACC
GCCGCTGAGAACTGGATCTAATGAACGGAACATCTATTCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTAGCTGTCCC
GCCCTGAATTTCTGGGCGGACCTCCGTGTTTCTGTTCCTCCAAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGC
CGGACCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGTCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTAC
GTGGACGGGTGGAAGTGACACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACCGGGTG
GTGTCTGTGCTGACCGTGTGCAACAGGATTTGGCTGAGCGGCAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAGCAAG
GGCTGCCAGCAGCATGAAAAGACCATCAGCAACGCCACCGGCCAGCCAGGGAACCCAGGTGTACACA
CTGCCCTTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACATGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCC
TCCGATATCGCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCAGAGAACAATAAGACACCCCCCAGTGCTG
GACAGCGACGGCTATTCTTCTGTACTCCCGGTGACAGTGGAAGAGCAGCTGGCAGGAAGGCAACGTG
TTACAGTGCAGCGTATGACGAAGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCCCTGGGC
AAAATAGAGGGACGAATGGACCGGTATCACATCGGTATCTCGAATTCAAAGTATCAAAGTACAATTTACC
GAATATAAGAAGGAGAAAGGTTTCATCTCACTTCCAAAAGGAGGATGAAATCATGAAGGTGCAGAACAACT
CAGTCATCATCAACTGTGATGGGTTTATCTCATCTCCCTGAAGGGCTACTTCTCCAGGAAGTCAACATTAG
CCTTATTACCAGAAGGATGAGGAGCCCTCTTCCAAGTGAAGAAGGTGAGTCTGTCAACTCCTTGATGGTG
GCCTCTGACTTACAAAGACAAAGTCTACTTGAATGTGACCACTGACAATACCTCCCTGGATGACTTCCATG
TGAATGGCGGAGAACTGATTCATTATCCATCAAAATCCTGGTGAATTCTGTGTCCTTTGA (서열 번호 12).

[0078]

[0079] 이러한 서열은 아미노산 서열을 가지는 단백질을 코딩하도록 코돈 최적화될 수 있다:

MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQV
IQPDKSVLVAAGETATLRCCTATSLIPVGP IQWFRGA
GPGREL IYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRI
GNITPADAGTYCYVKFRKGSPPDVEFKSGAGTELSV
RAKPSAPVVSGPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDI
TLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVV
LTREDVHSQV ICEVAHVTLQGDPLRG TANLSETIRV
PPTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWL
ENGNVSRTE TASTVTENKDGTYNWM SWLLVNVSAHR
DDVKLT CQVEHDGQPAVSKSHDLK VSAHPKEQGSNT
AAENTGSNERNIYSKYGP PSCPAP EFLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTP E VTCVVVDVSQEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL
SGKEYKCKVSSKGLPSSIEK TISNATGQPREPQVYT
LPFSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSSWQEGNV
FSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLKIEGRMDQVSHR
YPRIQSIK VQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNS
VIINC DGFYLI SLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQL
KKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLVNVT TDNTSLDDFHVN
GGELIL I HQNPGEFCVL Stop (서열 번호 13).

[0080]

[0081] 또 다른 예는 인간 OX40L의 세포의 도메인에 Fc 링커 서열과 인접한 TMIGD2의 세포의 도메인을 포함할 수 있다:

ATGGGGTCCCGGGCATGGTGCTGGGCCTCCTGGTGCAGATCTGGGCCCTGCAAGAAGCCTCAAGCCTGAGC
GTGCAGCAGGGGCCAACTTGCTGCAGGTGAGGCAGGGCAGTCAGGCGACCCTGGTCTGCCAGGTGGACCAG
GCCACAGCCTGGGAACGGCTCCGTGTAAAGTGGACAAAGGATGGGGCCATCCTGTGTCAACCGTACATCACC
AACGGCAGCCTCAGCCTGGGGGTCTGCGGGCCCCAGGGACGGCTCTCCTGGCAGGCACCCAGCCATCTCACC
CTGCAGCTGGACCCTGTGAGCCTCAACCACAGCGGGCGTACGTGTGCTGGGCGGCCGTAGAGATTCTTGAG
TTGGAGGAGGCTGAGGGCAACATAACAAGGCTCTTTGTGGACCCAGATGACCCACACAGAACAGAAACCGG
ATCGCAAGCTTCCAGGATCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTAGCTGTCCCGCCCTGAATTTCTGGGCGGA
CCCTCCGTGTTTCTGTGTCCCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCCGACCCCGAAGTGACCTGT
GTGGTGGTGGATGTGTCCAGGAAGATCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGGTGGAAGTGCAC
AACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACCGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTG
CACCAGGATTGGCTGAGCGGCAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAGCAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAA
AAGACCATCAGCAACGCCACCGGCCAGCCAGGGAACCCAGGTGTACACTGCCCCCTAGCCAGGAAGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACATGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGG
GAGAGCAACGGCCAGCCAGAGAACAACTACAAGACACCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTC
CTGTACTCCCGGTGACAGTGGACAAGAGCAGCTGGCAGGAAGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCAC
GAAGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAAATAGAGGGACGAATGGAC
CAGGTATCATATCGGTATCTCGAATTCAAAGTATCAAAGTACAATTTACCGAATATAAGAAGGAGAAAGGTT
TCATCTCACTTCCCAAAAGGAGGATGAAATCATGAAGGTGCAGAACAACTCAGTCATCATCAACTGTGATGG
GTTTATCTCATCTCCCTGAAGGGTACTTCTCCAGGAAGTCAACATTAGCCTTCATTACCAGAAGGATGAG
GAGCCCTCTTCAACTGAAGAAGGTGAGGTCTGTCAACTCCTTGATGGTGGCCTCTCTGACTTACAAAGACA
AAGTCTACTTGAATGTGACCACTGACAATACCTCCCTGGATGACTTCCATGTGAATGGCGGAGAACTGATTCT
TATCCATCAAAATCCTGGTGAATTCGTGTCTTTGA (서열 번호 14).

[0082]

[0083] 이러한 서열은 아미노산 서열을 가지는 단백질을 코딩하도록 코돈 최적화될 수 있다:

MGSPGMVLGLLVQI~~W~~ALQEASSLSVQQGPNLLQVRQ
 GSQATLVLCQVDQATAWERLRVKWTKDGA~~I~~LCQPYIT
 NGSLSLGVCGPQGRLSWQAPSHLTLQLDPVSLNHSG
 AYVCWAAVEIPELEEEAEGNITRLFVDPDDPTQNRNR
 IASFPFGSKYGPFCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTP EVTTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLSGKEYKC
 KVSSKGLPSSIEKTI~~S~~NATGQPREPQVYTLPPSQEE
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSSWQEGNVFSCSVMH
 EALHNH~~Y~~TQKSLSLSLGKIEGRMDQVSHRYPRIQSI
 KVQFT~~E~~YKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDG
 FYLISLKG~~Y~~FSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVN
 SLMVASLTYKDKVYLVNVT~~T~~DN~~T~~SLDDFHVNGGELIL
 HQNPGEFCVL Stop (서열 번호 15)

[0084]

[0085] 다양한 실시형태에서, 키메라 단백질은 본 명세서에 기재된 임의의 단백질 서열에 대해 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 독립적으로 치환, 삽입, 결실 및 절두로부터 선택될 수 있다.

[0086] 몇몇 실시형태에서, 아미노산 돌연변이는 아미노산 치환이고, 보존적 및/또는 비보존적 치환을 포함할 수 있다.

[0087] "보존적 치환"은 예를 들어 관여한 아미노산 잔기의 극성, 전하, 크기, 가용성, 소수화도, 친수화도 및/또는 양친매성 성질에서 유사성에 기초하여 이루어질 수 있다. 20개의 천연 발생 아미노산은 하기 6개의 표준 아미노산 기로 그룹화될 수 있다: (1) 소수성: Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr; Asn, Gln; (3) 산성: Asp, Glu; (4) 염기성: His, Lys, Arg; (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro; 및 (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0088] 본 명세서에 사용된 바와 같은, "보존적 치환"은 상기 기재된 6개의 표준 아미노산 군의 동일한 군 내에 기재된 또 다른 아미노산에 의한 아미노산의 교환으로 정의된다. 예를 들어, Glu에 의한 Asp의 교환은 이렇게 변형된 폴리펩타이드에서 하나의 음전하를 보유한다. 또한, 글라이신 및 프롤린은 α -나선을 파괴하는 이의 능력에 기초하여 서로에 대해 치환될 수 있다.

[0089] 본 명세서에 사용된 바대로, "비보존적 치환"은 상기 기재된 6개의 표준 아미노산 군 (1) 내지 (6)의 상이한 군에 기재된 또 다른 아미노산에 의한 아미노산의 교환으로서 정의된다.

[0090] 다양한 실시형태에서, 치환은 비전통적인 아미노산(예를 들어, 일반적으로 셀레노시스테인, 피로라이신, N-폼일메티오닌 β -알라닌, GABA 및 δ -아미노레볼린산, 4-아미노벤조산(PABA), 공통 아미노산의 D-이성질체, 2,4-다이아미노뷰티르산, α -아미노 아이소뷰티르산, 4-아미노뷰티르산, Abu, 2-아미노 뷰티르산, γ -Abu, 입실론기호-Ahx, 6-아미노 헥산산, Aib, 2-아미노 아이소뷰티르산, 3-아미노 프로피온산, 오르니틴, 노르류신, 노르발린, 하이드록시프롤린, 사르코스메(sarcosine), 시트룰린, 호모시트룰린, 시스테인, t-뷰틸글라이신, t-뷰틸알라닌, 페닐글라이신, 사이클로헥실알라닌, β -알라닌, 플루오로-아미노산, 디자인어 아미노산, 에컨대 β 메틸 아미노산, C α -메틸 아미노산, N α -메틸 아미노산, 및 아미노산 유사체)를 또한 포함할 수 있다.

[0091] 돌연변이는 코돈 축퇴성을 고려하는 것을 포함하여 유전적 코드를 참조하여 키메라 단백질의 뉴클레오타이드 서열에 또한 이루어질 수 있다.

[0092] 다양한 실시형태에서, 키메라 단백질은 링커를 포함한다. 다양한 실시형태에서, 링커는 천연 발생 다중-도메인 단백질로부터 유래할 수 있거나, 예를 들어 문헌[Chichili *et al.*, (2013), Protein Sci. 22(2):153-167, Chen *et al.*, (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65(10):1357-1369](이의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재된 바와 같은 경험상 링커이다. 몇몇 실시형태에서, 링커는 링커 설계하는 데이터베이스 및 컴퓨터 프로그램, 예컨대 문헌[Chen *et al.*, (2013), Adv Drug Deliv Rev. 65(10):1357-1369 및 Crasto *et al.*, (2000), Protein Eng. 13(5):309-312](이의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재된 것을 사용하여 설계될 수

있다.

[0093]

몇몇 실시형태에서, 링커는 합성 링커, 예컨대 PEG이다.

[0094]

다른 실시형태에서, 링커는 폴리펩타이드이다. 몇몇 실시형태에서, 링커는 약 500개 미만의 아미노산 길이, 약 450개의 아미노산 길이, 약 400개의 아미노산 길이, 약 350개의 아미노산 길이, 약 300개의 아미노산 길이, 약 250개의 아미노산 길이, 약 200개의 아미노산 길이, 약 150개의 아미노산 길이, 또는 약 100개의 아미노산 길이이다. 예를 들어, 링커는 약 100개 미만, 약 95개, 약 90개, 약 85개, 약 80개, 약 75개, 약 70개, 약 65개, 약 60개, 약 55개, 약 50개, 약 45개, 약 40개, 약 35개, 약 30개, 약 25개, 약 20개, 약 19개, 약 18개, 약 17개, 약 16개, 약 15개, 약 14개, 약 13개, 약 12개, 약 11개, 약 10개, 약 9개, 약 8개, 약 7개, 약 6개, 약 5개, 약 4개, 약 3개, 또는 약 2개의 아미노산 길이일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 링커는 가요성이다. 또 다른 실시형태에서, 링커는 경질이다.

[0095]

다양한 실시형태에서, 링커는 실질적으로 글라이신 및 세린 잔기(예를 들어, 약 30%, 또는 약 40%, 또는 약 50%, 또는 약 60%, 또는 약 70%, 또는 약 80%, 또는 약 90%, 또는 약 95%, 또는 약 97% 글라이신 및 세린)로 이루어진다.

[0096]

다양한 실시형태에서, 링커는 항체(예를 들어, IgG, IgA, IgD 및 IgE(하위종류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4, 및 IgA1 및 IgA2)를 포함)) 힌지 영역이다. IgG, IgA, IgD 및 IgE 종류 항체에서 발견되는 힌지 영역은 가요성 스페이서로서 작용하여, Fab 부분이 공간에서 자유로이 이동하게 한다. 불변 영역과 반대로, 힌지 도메인은 면역글로불린 종류 및 하위종류 중에서 서열 및 길이 둘 다가 변하여 구조적으로 다양하다. 예를 들어, 힌지 영역의 길이 및 가요성은 IgG 하위종류 중에서 변한다. IgG1의 힌지 영역은 216-231번 아미노산을 포함하고, 이것이 자유로이 가요성이므로, Fab 단편은 이의 대칭 축 주위로 회전하고 2개의 중쇄간 다이설파이드 브릿지 중 첫번째에서 중양화된 구 내에 이동할 수 있다. IgG2는 12개의 아미노산 잔기 및 4개의 다이설파이드 브릿지를 가지며 IgG1보다 짧은 힌지를 가진다. IgG2의 힌지 영역은 글라이신 잔기가 없고, 비교적 짧고, 추가의 중쇄간 다이설파이드 브릿지에 의해 안정화된 경질 폴리-프롤린 이중 나선을 함유한다. 이들 특성은 IgG2 분자의 가요성을 제한한다. IgG3은, 62개의 아미노산(21개의 프롤린 및 11개의 시스테인 함유)을 함유하고, 비가요성 폴리-프롤린 이중 나선을 형성하는, 이의 고유한 연장된 힌지 영역(IgG1 힌지보다 약 4배 김)에 의해 다른 하위종류와 다르다. IgG3에서, Fab 단편은 Fc 단편과 비교적 멀어서, 분자에 더 큰 가요성을 제공한다. IgG3에서의 세장된 힌지는 또한 다른 하위종류와 비교하여 이의 더 높은 분자량을 담당한다. IgG4의 힌지 영역은 IgG1의 것보다 짧고, 이의 가요성은 IgG1 및 IgG2의 것 사이의 중간이다. 힌지 영역의 가요성은 보고에 의하면 $IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2$ 의 순서로 감소한다. 다른 실시형태에서, 링커는 인간 IgG4로부터 유래하고, 이합체화(S228P 포함) 또는 FcRn 결합을 증대시키는 하나 이상의 돌연변이를 함유한다.

[0097]

결정학적 연구에 따라, 면역글로불린 힌지 영역은 3개의 영역으로 기능적으로 추가로 세분될 수 있다: 상부 힌지 영역, 코어 영역 및 하부 힌지 영역. 문헌[Shin *et al.*, 1992 *Immunological Reviews* 130:87]을 참조한다. 상부 힌지 영역은 C_{H1}의 카복실 말단으로부터 이동을 제한하는 힌지에서 제1 잔기, 일반적으로 2개의 중쇄 사이에 사슬간 다이설파이드 결합을 형성하는 제1 시스테인 잔기로의 아미노산을 포함한다. 상부 힌지 영역의 길이는 항체의 분절성 가요성과 상관된다. 코어 힌지 영역은 중쇄간 다이설파이드 브릿지를 함유하고, 하부 힌지 영역은 C_{H2} 도메인의 아미노 말단 끝에 연결되고, C_{H2}에서의 잔기를 포함한다. *Id.* 야생형 인간 IgG1의 코어 힌지 영역은, 다이설파이드 결합 형성에 의해 이합체화될 때, 피벗으로 작용하는 것으로 생각되는(이로써 가요성을 부여함), 사이클릭 옥타펩타이드를 생성시키는 서열 Cys-Pro-Pro-Cys를 함유한다. 다양한 실시형태에서, 본 링커는 임의의 항체(예를 들어, IgG, IgA, IgD 및 IgE(하위종류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4, 및 IgA1 및 IgA2)를 포함))의 상부 힌지 영역, 코어 영역 및 하부 힌지 영역 중 1개 또는 2개 또는 3개를 포함한다. 힌지 영역은 탄수화물 부착에 대한 부위의 다수의 구조적으로 구별되는 타입을 포함하는 하나 이상의 글라이코실화 부위를 또한 함유할 수 있다. 예를 들어, IgA1은 힌지 영역의 17개 아미노산 분절 내에 5개의 글라이코실화 부위를 함유하여서, 분비성 면역글로불린에 유리한 특성으로 생각되는, 장 프로테아제에 힌지 영역 폴리펩타이드의 저항을 부여한다. 다양한 실시형태에서, 본 발명의 링커는 하나 이상의 글라이코실화 부위를 포함한다.

[0098]

다양한 실시형태에서, 링커는 항체(예를 들어, IgG, IgA, IgD 및 IgE(하위종류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4, 및 IgA1 및 IgA2)를 포함))의 Fc 도메인을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 링커는 인간 IgG4 항체로부터 유래된 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 링커는 인간 IgG1 항체로부터 유래된 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, Fc 도메인은 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 증가한 친화도 및 증대된 결합을 나타낸다. 몇몇 실시형태에서, Fc 도메인은 친화도를 증가시키고 FcRn에 대한 결합을

증대시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 이론에 구속되고자 바라지 않으면서, FcRn에 대한 증가한 친화도 및 증대된 결합이 본 키메라 단백질의 생체내 반감기를 증가시킨다고 생각된다.

- [0099] 몇몇 실시형태에서, Fc 도메인 링커는 (넘버링에 따라) 250번, 252번, 254번, 256번, 308번, 309번, 311번, 428번, 433번 또는 434번 아미노산 잔기, 또는 이의 균등물에서 하나 이상의 아미노산 치환을 함유한다. 실시형태에서, 250번 아미노산 잔기에서의 아미노산 치환은 글루타민에 의한 치환이다. 실시형태에서, 252번 아미노산 잔기에서의 아미노산 치환은 타이로신, 페닐알라닌, 트립토판 또는 트레오닌에 의한 치환이다. 실시형태에서, 254번 아미노산 잔기에서의 아미노산 치환은 트레오닌에 의한 치환이다. 실시형태에서, 256번 아미노산 잔기에서의 아미노산 치환은 세린, 아르기닌, 글루타민, 글루탐산, 아스파르트산 또는 트레오닌에 의한 치환이다. 실시형태에서, 308번 아미노산 잔기에서의 아미노산 치환은 트레오닌에 의한 치환이다. 실시형태에서, 309번 아미노산 잔기에서의 아미노산 치환은 프롤린에 의한 치환이다. 실시형태에서, 311번 아미노산 잔기에서의 아미노산 치환은 세린에 의한 치환이다. 실시형태에서, 385번 아미노산 잔기에서의 아미노산 치환은 아르기닌, 아스파르트산, 세린, 트레오닌, 히스티딘, 라이신, 알라닌 또는 글라이신에 의한 치환이다. 실시형태에서, 386번 아미노산 잔기에서의 아미노산 치환은 트레오닌, 프롤린, 아스파르트산, 세린, 라이신, 아르기닌, 아이소류신 또는 메티오닌에 의한 치환이다. 실시형태에서, 387번 아미노산 잔기에서의 아미노산 치환은 아르기닌, 프롤린, 히스티딘, 세린, 트레오닌 또는 알라닌에 의한 치환이다. 실시형태에서, 389번 아미노산 잔기에서의 아미노산 치환은 프롤린, 세린 또는 아스파라긴에 의한 치환이다. 실시형태에서, 428번 아미노산 잔기에서의 아미노산 치환은 류신에 의한 치환이다. 실시형태에서, 433번 아미노산 잔기에서의 아미노산 치환은 아르기닌, 세린, 아이소류신, 프롤린 또는 글루타민에 의한 치환이다. 실시형태에서, 434번 아미노산 잔기에서의 아미노산 치환은 히스티딘, 페닐알라닌 또는 타이로신에 의한 치환이다.
- [0100] 몇몇 실시형태에서, Fc 도메인 링커(예를 들어, IgG 불변 영역 포함)는 하나 이상의 돌연변이, 예컨대 (카뎃 넘버링에 따라) 252번, 254번, 256번, 433번, 434번 또는 436번에서의 아미노산 잔기에서의 치환을 포함한다. 실시형태에서, IgG 불변 영역은 삼중 M252Y/S254T/T256E 돌연변이 또는 YTE 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, IgG 불변 영역은 삼중 H433K/N434F/Y436H 돌연변이 또는 KFH 돌연변이를 포함한다. 추가의 실시형태에서, IgG 불변 영역은 조합으로 YTE 및 KFH 돌연변이를 포함한다.
- [0101] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 변형된 인간화 항체는 250번, 253번, 307번, 310번, 380번, 428번, 433번, 434번 및 435번 아미노산 잔기에서 하나 이상의 돌연변이를 함유하는 IgG 불변 영역을 포함한다. 예시적인 돌연변이는 T250Q, M428L, T307A, E380A, I253A, H310A, M428L, H433K, N434A, N434F, N434S 및 H435A를 포함한다. 실시형태에서, IgG 불변 영역은 M428L/N434S 돌연변이 또는 LS 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, IgG 불변 영역은 T250Q/M428L 돌연변이 또는 QL 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, IgG 불변 영역은 N434A 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, IgG 불변 영역은 T307A/E380A/N434A 돌연변이 또는 AAA 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, IgG 불변 영역은 I253A/H310A/H435A 돌연변이 또는 IHH 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, IgG 불변 영역은 H433K/N434F 돌연변이를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, IgG 불변 영역은 M252Y/S254T/T256E 및 H433K/N434F 돌연변이를 조합으로 포함한다.
- [0102] IgG 불변 영역에서의 추가의 예시적인 돌연변이는 예를 들어, 문헌[Robbie, *et al.*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2013), 57(12):6147-6153, Dall' Acqua *et al.*, JBC (2006), 281(33):23514-24, Dall' Acqua *et al.*, Journal of Immunology (2002), 169:5171-80, Ko *et al.* Nature (2014) 514:642-645, Grevys *et al.* Journal of Immunology. (2015), 194(11):5497-508], 및 미국 특허 제7,083,784호(이의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.
- [0103] 몇몇 실시형태에서, 링커는 서열 번호 70, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 가진다. 다양한 실시형태에서, 돌연변이는 안정성 및/또는 반감기를 증가시키도록 서열 번호 70에 이루어진다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, 링커는 서열 번호 71 또는 72, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 가진다. 예시적인 Fc 안정화 돌연변이체는 S228P이다. 예시적인 Fc 반감기 연장 돌연변이체는 T250Q, M428L, V308T, L309P 및 Q311S이고, 본 링커는 이들 돌연변이체의 1, 또는 2, 또는 3, 또는 4, 또는 5를 포함할 수 있다.
- [0104] 추가로, 하나 이상의 연결 링커는 본 IgG 링커(예를 들어, 서열 번호 70, 71, 또는 71 중 하나, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성) 및 세포외 도메인을 연결하도록 사용될 수 있다. 예를 들어, 서열 번호 73, 서열 번호 74, 서열 번호 75, 서열 번호 76, 서열 번호 77, 서열 번호

78, 또는 이들의 변이체 중 임의의 하나는 본 명세서에 기재된 바와 같은 세포의 도메인 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 링커를 연결할 수 있다. 임의로, 서열 번호 73, 서열 번호 74, 서열 번호 75, 서열 번호 76, 서열 번호 77, 서열 번호 78, 또는 이들의 변이체 중 임의의 하나는 본 명세서에 기재된 바와 같은 세포의 도메인 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 링커 사이에 대체된다.

[0105] 추가의 예시적인 링커는 서열 LE, GGGGS(서열 번호 23), $(GGGGS)_n$ ($n = 1$ 내지 4), $(Gly)_8$, $(Gly)_6$, $(EAAAK)_n$ ($n = 1$ 내지 3)(서열 번호 24), $A(EAAAK)_nA$ ($n = 2$ 내지 5)(서열 번호 25), AEAAAKEAAKA(서열 번호 26), $A(EAAAK)_4ALEA(EAAAK)_4A$ (서열 번호 27), PAPAP(서열 번호 28), KESGSVSSEQLAQFRSLD(서열 번호 29), EKGSSGSGSESKST(서열 번호 30), GSAGSAAGSGEF(서열 번호 31) 및 $(XP)_n$ (여기서, X는 임의의 아미노산, 예를 들어 Ala, Lys 또는 Glu를 지칭함)을 가지는 링커를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0106] 다양한 실시형태에서, 링커는 기능성일 수 있다. 예를 들어, 제한 없이, 링커는 본 키메라 단백질의 폴딩 및/또는 안정성을 개선하고/하거나, 발현을 개선하고/하거나, 약동학을 개선하고/하거나, 생물활성을 개선하도록 작용할 수 있다. 또 다른 예에서, 링커는 키메라 단백질을 특정한 세포 유형 또는 위치로 표적화하도록 작용할 수 있다.

[0107] 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 (예를 들어, 종양에 대해) 면역 활성화를 촉진하는 것을 할 수 있고, 이를 포함하는 방법에서 사용될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 (예를 들어, 종양이 생존하게 하는) 면역 저해를 할 수 있고, 이를 포함하는 방법에서 사용될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 작제물의 키메라 성질에 의해 제공된 신호전달의 근접성으로 인해 개선된 면역 활성화 및/또는 개선된 면역 저해 억제를 제공한다.

[0108] 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 면역 반응의 양의 조절, 예를 들어 이펙터 출력의 수준의 조절을 할 수 있거나, 이를 포함하는 방법에서 사용될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 예를 들어 암의 치료에 사용될 때, 본 키메라 단백질은 제한 없이, 사이토카인 생성, 증식 또는 표적 살해 잠재력의 수준의 증가를 자극하는 것을 포함하여 T 세포 반응의 양을 증가시키도록 면역 저해와 비교하여 면역 자극의 정도를 변경한다.

[0109] 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은, 몇몇 실시형태에서, 종양 세포의 표면에서 저해 리간드를 마스킹하는 것 및 면역 자극 리간드에 의해 그 면역 저해 리간드를 대체하는 것을 할 수 있거나, 이를 포함하는 방법에서 용도가 발견된다(예를 들어, 도 4 참조). 예를 들어, (i) PD-1의 세포의 도메인 및 (ii) OX40L의 세포의 도메인을 포함하는 키메라 단백질 작제물은 저해 PD-L1 신호의 파괴 및 자극 OX40L에 의한 이것의 대체를 허용한다. 따라서, 본 키메라 단백질은, 몇몇 실시형태에서, 저해 면역 신호를 감소시키거나 제거하는 것 및/또는 면역 자극 신호를 증가시키거나 활성화하는 것을 할 수 있거나, 이를 포함하는 방법에서 용도가 발견된다. 예를 들어, 저해 신호를 보유하는(그리고 이로써 면역 반응을 회피하는) 종양 세포는 T 세포에서 양성 신호 결합에 치환될 수 있고, 이것은 이후 종양 세포를 공격할 수 있다. 따라서, 몇몇 실시형태에서, 저해 면역 신호는 본 작제물에 의해 마스킹되고, 자극 면역 신호는 활성화된다. 이러한 유리한 특성은 본 키메라 단백질의 단일 작제물 접근법에 의해 향상된다. 예를 들어, 신호 대체는 거의 동시에 실행될 수 있고, 신호 대체는 임상적으로 중요한 부위(예를 들어, 종양 미소환경)에서 국부적이 되도록 맞춰진다. 추가의 실시형태는 다른 키메라 단백질 작제물, 예컨대 무엇보다도 (i) PD-1의 세포의 도메인 및 (ii) GITRL의 세포의 도메인; (i) BTLA의 세포의 도메인 및 (ii) OX40L의 세포의 도메인; (i) TIGIT의 세포의 도메인 및 (ii) OX40L의 세포의 도메인; (i) TIM3의 세포의 도메인 및 (ii) OX40L의 세포의 도메인; 및 (i) CD172a의 세포의 도메인 및 (ii) CD40L의 세포의 도메인; 및 (i) CD115의 세포의 도메인 및 (ii) CD40L의 세포의 도메인; 및 (i) TIM3의 세포의 도메인 및 (ii) OX40L의 세포의 도메인; 및 (i) TIGIT의 세포의 도메인 및 (ii) OX40L의 세포의 도메인에 동일한 원칙을 적용한다.

[0110] 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 면역 자극 수용체/리간드 쌍의 결합을 자극하거나 증대시키는 것을 포함할 수 있고 이러한 방법에서 용도가 발견된다. 예시적인 T 세포 동시자극 수용체 및 이의 리간드는 OX40:OX40-L, CD27:CD70, CD30:CD30-L, CD40:CD40-L; CD137:CD137-L, HVEM:LIGHT, GITR:GITR-L, TNFRSF25:TL1A, DR5:TRAIL 및 BTLA:HVEM을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 면역 저해 수용체/리간드 쌍의 결합을 저해하거나 감소시키는 것을 포함할 수 있고 이러한 방법에서 용도가 발견된다. 예시적인 T 세포 동시저해 수용체 및 이의 리간드는 무엇보다도 예를 들어 CTLA-4:CD80/CD86, PD-1:PD-L1/PD-L2, BTLA:HVEM, TIM-3:갈락틴-9/포스파티딜세린, TIGIT/CD155 또는 CD112, VISTA/VSIG8, CD172a/CD47, B7H3R/B7H3, B7H4R/B7H4, CD244/CD48, TMIGD2/HHLA2를 포함한다.

- [0111] 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 PD-1 및 PD-L1 또는 PD-L2 및/또는 PD-1의 PD-L1 또는 PD-L2와의 결합을 차단하고/하거나, 감소시키고/시키거나, 저해한다. 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 CTLA-4의 활성 및/또는 CTLA-4와 AP2M1, CD80, CD86, SHP-2 및 PPP2R5A 중 하나 이상의 결합을 차단하고/하거나, 감소시키고/시키거나, 저해한다. 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 GITR 및/또는 GITR과 GITR 리간드 중 하나 이상과의 결합을 증가시키고/시키거나, 자극한다. 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 OX40 및/또는 OX40과 OX40 리간드 중 하나 이상의 결합을 증가시키고/시키거나, 자극한다.
- [0112] 다른 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 면역 조절을 증대시키고/시키거나, 회복하고/하거나, 증진시키고/시키거나, 자극하는 것을 할 수 있거나, 이를 포함하는 방법에서 용도가 발견된다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 본 키메라 단백질은 종양 세포에 대한 하나 이상의 면역 세포, 예컨대 T 세포, 세포독성 T 림프구, T 헬퍼 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 항종양 대식세포(예를 들어, M1 대식세포), B 세포 및 수지상 세포(이들로 제한되지는 않음)의 활성 또는 활성화를 회복하고/하거나, 증진시키고/시키거나, 자극한다. 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 T 세포의 활성 및/또는 활성화, 예컨대, 비제한적인 예로서, 하나 이상의 T 세포 고유 신호, 예컨대 생존촉진 신호; 자가분비 또는 주변분비 성장 신호; p38 MAPK-, ERK-, STAT-, JAK-, AKT- 또는 PI3K 매개된 신호; 항아포토시스 신호; 및/또는 전염증성 사이토카인 생성 또는 T 세포 이동 또는 T 세포 종양 침입 중 하나 이상을 촉진하고/하거나 이에 필요한 신호의 활성화 및/또는 자극을 증대시키고/시키거나, 회복하고/하거나, 증진시키고/시키거나, 자극한다.
- [0113] 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 종양 또는 종양 미소환경으로 T 세포(제한 없이 세포독성 T 림프구, T 헬퍼 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포 포함), B 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 수지상 세포, 단핵구 및 대식세포(예를 들어, M1 및 M2 중 하나 이상) 중 하나 이상의 증가를 발생시키는 것을 할 수 있거나, 이를 포함하는 방법에서 용도가 발견된다. 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 종양 및/또는 종양 미소환경(TME)에 대한 면역억제 세포(예를 들어, 골수성 유래 억제인자 세포(MDSC), 조절 T 세포(Treg), 종양 연관된 호중구(TAN), M2 대식세포, 및 종양 연관된 대식세포(TAM))의 동원을 저해하고/하거나, 이의 감소를 발생시키는 것을 할 수 있거나, 이를 포함하는 방법에서 용도가 발견된다. 몇몇 실시형태에서, 본 치료는 종양 부위에서 M1 대 M2 대식세포 및/또는 TME 대 선호 M1 대식세포의 비율을 변경할 수 있다.
- [0114] 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은, 유효량의 본 명세서에 기재된 키메라 단백질을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, T 세포 불활성화 및/또는 종양에 대한 면역 관용을 저해하고/하거나, 감소시키는 것을 할 수 있고, 이를 포함하는 방법에서 사용될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 다양한 사이토카인, 예컨대 IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, 및 IL-22 중 하나 이상(이들로 제한되지는 않음)의 혈청 수준을 증가시킬 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 치료된 대상체의 혈청에서 IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-22, TNF α 또는 IFN γ 를 증대시킬 수 있다(예를 들어, 도 11, 패널 J 참조). 이러한 사이토카인 반응의 검출은 표시된 키메라 융합 단백질에 대한 최적 투약 섭생을 결정하는 방법을 제공할 수 있다(예를 들어, 도 11, 패널 K 참조).
- [0115] 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 항종양 CD8 $^{+}$ 및/또는 CD4 $^{+}$ T 세포의 세포사를 저해하고/하거나, 차단하고/하거나 감소시키거나; 프로-종양 T 세포의 세포사를 자극하고/하거나, 유도하고/하거나 증가시킨다. T 세포 기능소실은, 클론 결실에서 절정에 달하는, 증식성 및 이펙터 기능의 진행성 소실을 특징으로 하는 T 세포 기능이상 상태이다. 따라서, 프로-종양 T 세포는 많은 만성 감염 및 암 동안 생기는 T 세포 기능이상 상태를 의미한다. 이 기능이상은 불량한 증식성 및/또는 이펙터 기능, 저해 수용체의 지속적인 발현 및 기능성 이펙터 또는 기억 T 세포의 것과 다른 전사 상태로 정의된다. 기능소실은 감염 및 종양의 최적 조절을 막는다. 또한, 항종양 CD8 $^{+}$ 및/또는 CD4 $^{+}$ T 세포는 종양에 대한 면역 반응을 시작할 수 있는 T 세포를 의미한다. 예시적인 프로-종양 T 세포는 Treg, 하나 이상의 관문 저해 수용체를 발현하는 CD4 $^{+}$ 및/또는 CD8 $^{+}$ T 세포, Th2 세포 및 Th17 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 관문 저해 수용체는 비조절된 면역 반응을 막거나 저해하는 면역 세포에서 발현된 수용체(예를 들어, CTLA-4, B7-H3, B7-H4, TIM-3)를 의미한다.
- [0116] 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 이펙터 T 세포 대 조절 T 세포의 비율을 증가시키는 것을 할 수 있고, 이를 포함하는 방법에서 사용될 수 있다. 예시적인 이펙터 T 세포는 ICOS $^{+}$ 이펙터 T 세포; 세포독성 T 세포(예를 들어, $\alpha\beta$ TCR, CD3 $^{+}$, CD8 $^{+}$, CD45RO $^{+}$); CD4 $^{+}$ 이펙터 T 세포(예를 들어, $\alpha\beta$ TCR, CD3 $^{+}$, CD4 $^{+}$, CCR7 $^{+}$, CD62Lhi, IL7R/CD127 $^{+}$); CD8 $^{+}$ 이펙터 T 세포(예를 들어, $\alpha\beta$ TCR, CD3 $^{+}$, CD8 $^{+}$, CCR7 $^{+}$, CD62Lhi, IL7R/CD127 $^{+}$); 이펙터 기억 T 세포(예를 들어, CD62Llow, CD44 $^{+}$, TCR, CD3 $^{+}$, IL7R/CD127 $^{+}$, IL-15R $^{+}$, CCR7low); 중

양 기억 T 세포(예를 들어, $CCR7^+$, $CD62L^+$, $CD27^+$; 또는 $CCR7^{hi}$, $CD44^+$, $CD62L^{hi}$, TCR , $CD3^+$, $IL-7R/CD127^+$, $IL-15R^+$); $CD62L^+$ 이펙터 T 세포; $CD8^+$ 이펙터 기억 T 세포(TEM), 예컨대 초기 이펙터 기억 T 세포($CD27^+ CD62L^-$) 및 후기 이펙터 기억 T 세포($CD27^- CD62L^-$)(각각 TemE 및 TemL); $CD127^+ CD25^{low/-}$ 이펙터 T 세포; $CD127^- CD25^-$ 이펙터 T 세포; $CD8^+$ 줄기 세포 기억 이펙터 세포(TSCM)(예를 들어, $CD44^{low} CD62L^{high} CD122^{(높은)} sca^+$); TH1 이펙터 T 세포(예를 들어, $CXCR3^+$, $CXCR6^+$ 및 $CCR5^+$; 또는 $\alpha\beta$ TCR, $CD3^+$, $CD4^+$, $IL-12R^+$, $IFN-\gamma R^+$, $CXCR3^+$), TH2 이펙터 T 세포(예를 들어, $CCR3^+$, $CCR4^+$ 및 $CCR8^+$; 또는 $\alpha\beta$ TCR, $CD3^+$, $CD4^+$, $IL-4R^+$, $IL-33R^+$, $CCR4^+$, $IL-17RB^+$, $CRTH2^+$); TH9 이펙터 T 세포(예를 들어, $\alpha\beta$ TCR, $CD3^+$, $CD4^+$); TH17 이펙터 T 세포(예를 들어, $\alpha\beta$ TCR, $CD3^+$, $CD4^+$, $IL-23R^+$, $CCR6^+$, $IL-1R^+$); $CD4^+ CD45RO^+ CCR7^+$ 이펙터 T 세포, $CD4^+ CD45RO^+ CCR7^-$ 이펙터 T 세포; 및 이펙터 T 세포 분비 IL-2, IL-4 및/또는 IFN- γ 를 포함한다. 예시적인 조절 T 세포는 ICOS⁺ 조절 T 세포, $CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ 조절 T 세포, $CD4^+ CD25^+$ 조절 T 세포, $CD4^+ CD25^-$ 조절 T 세포, $CD4^+ CD25^{high}$ 조절 T 세포, TIM-3⁺PD-1⁺ 조절 T 세포, 림프구 활성화 유전자-3(LAG-3)⁺ 조절 T 세포, CTLA-4/CD152⁺ 조절 T 세포, 뉴로핀린-1(Nrp-1)⁺ 조절 T 세포, $CCR4^+ CCR8^+$ 조절 T 세포, $CD62L^{(L-선택틴)^+}$ 조절 T 세포, $CD45RBlow$ 조절 T 세포, $CD127^{low}$ 조절 T 세포, LRRC32/GARP⁺ 조절 T 세포, $CD39^+$ 조절 T 세포, GATR⁺ 조절 T 세포, LAP⁺ 조절 T 세포, 1B11⁺ 조절 T 세포, BTLA⁺ 조절 T 세포, 1형 조절 T 세포(Tr1 세포), T 헬퍼 타입 3(Th3) 세포, 자연 살해 T 세포 표현형의 조절 세포(NKTreg), $CD8^+$ 조절 T 세포, $CD8^+ CD28^-$ 조절 T 세포 및/또는 조절 T 세포 분비 IL-10, IL-35, TGF- β , TNF- α , 갈락틴-1, IFN- γ 및/또는 MCP1을 포함한다.

[0117] 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 약 12시간 이하, 약 24시간, 약 48시간, 약 72시간 또는 약 96시간 또는 약 1주 또는 약 2주 동안 이펙터 T 세포를 일시적으로 자극하는 것을 할 수 있고, 이를 포함하는 방법에서 사용될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 약 12시간 이하, 약 24시간, 약 48시간, 약 72시간 또는 약 96시간 또는 약 1주 또는 약 2주 동안 조절 T 세포를 일시적으로 고갈시키거나 저해하는 것을 할 수 있고, 이를 포함하는 방법에서 사용될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 이펙터 T 세포의 일시적 자극 및/또는 조절 T 세포의 일시적 고갈 또는 저해는 실질적으로 환자의 혈류 또는 특히 조직/위치, 예컨대 림프구 조직, 예컨대 골수, 림프절, 비장, 흉선, 점막 연관된 림프구 조직(MALT), 비림프구 조직, 또는 종양 미세환경 등에서 발생한다.

[0118] 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은, 제한 없이, 사용의 용이성 및 제조의 용이성을 포함하는 이점을 제공한다. 이것은 2개의 구별되는 면역치료제가 단일 생성물로 조합되고, 이는 2개의 독립적인 제조 공정 대신에 단일 제조 공정을 허용하기 때문이다. 또한, 2개의 별개의 물질 대신에 단일 물질의 투여는 더 쉬운 투여 및 더 큰 환자 순응도를 허용한다. 추가로, 예를 들어 다수의 다이설파이드 결합 및 번역후 변형, 예컨대 글라이코실화를 함유하는 큰 다합체 단백질인 단일클론 항체와 반대로, 본 키메라 단백질은 제조하기 더 쉽고 더 비용 효과적이다.

[0119] 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 분비 가능한 및 완전히 기능성인 단일 폴리펩타이드 사슬로서 포유류 숙주 세포에서 제조 가능하다(예를 들어, 도 13, 패널 A, 도 17, 패널 E-H, 도 17, 패널 N-S 참조).

[0120] 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 예상치 못하게 느린 해리속도(Kd 또는 K_{off})로 각각의 결합 파트너에 대한 세포의 도메인 성분의 결합을 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 이것은 예상치 못하게 리간드에 대한 수용체의 긴 상호작용 및 그 반대를 제공한다. 이러한 효과는 지속적인 음성 신호 마스킹 효과를 허용한다(예를 들어, 도 14, 도 17, 패널 I-M 참조). 추가로, 몇몇 실시형태에서, 이것은 예를 들어 항종양 효과에 대해 이펙터 세포가 적절하게 자극되게 허용하도록 더 긴 양성 신호 효과를 전달한다. 예를 들어, 긴 해리속도 결합을 통해 예를 들어 본 키메라 단백질은 T 세포 증식을 제공하기에 충분한 신호 전달을 허용하고, 항종양 공격을 허용한다. 추가의 예로서, 예를 들어 긴 해리속도 결합을 통한 본 키메라 단백질은 또한 자극 신호, 예를 들어 사이토카인 등의 방출을 제공하도록 충분한 신호 전달을 허용한다. 본 물질에 의해 촉진된 세포(예를 들어, 음성 신호를 보유하는 종양 세포 및 종양을 공격할 수 있는 T 세포)의 안정한 시냅스는 종양 감소를 선호하는 공간 배향, 예컨대 종양 세포를 공격하도록 T 세포를 배치하는 것 및/또는 본 발명의 키메라 단백질에 의해 마스킹되는 것을 넘는 음성 신호를 포함하는 음성 신호를 종양 세포가 전달하는 것을 입체적으로 막는 것을 제공한다.

- [0121] 몇몇 실시형태에서, 이것은 키메라 단백질의 혈청 $t_{1/2}$ 과 비교하여 더 긴 온-타겟(예를 들어, 종양내) 반감기($t_{1/2}$)를 제공한다. 이러한 특성은 키메라 단백질의 전신 분포와 연관된 오프 타겟 독성을 감소시키는 것의 조합된 이점을 가질 수 있다(예를 들어, 도 14, 패널 M-O 참조).
- [0122] 추가로, 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 2개의 면역치료제의 개선된 부위 특이적 상호작용을 허용하면서 상승작용의 치료학적 효과를 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 부위 밖 및/또는 전신 독성을 감소시키는 잠재력을 제공한다.
- [0123] **질환; 치료의 방법, 및 환자 선택**
- [0124] 다양한 실시형태에서, 본 발명은 암 및/또는 종양; 예를 들어, 암 및/또는 종양의 치료 또는 예방에 관한 것이다. 본 명세서에서 그 외 기재된 바대로, 암의 치료는, 다양한 실시형태에서, 면역 저해에 대해 면역 자극을 선호하도록 본 키메라 단백질에 의해 면역계를 조절하는 것을 포함할 수 있다.
- [0125] 암 또는 종양은 신체 장기 및 시스템의 정상 기능을 방해하는 비조절된 세포 성장 및/또는 비정상적 증가한 세포 생존 및/또는 아포토시스의 저해를 의미한다. 양성 및 악성 암, 용종, 과다형성, 및 휴먼 종양 또는 미소 전이가 포함된다. 또한, 면역계에 의해 지연되지 않는 비정상 증식을 가지는 세포(예를 들어, 바이러스 감염된 세포)가 포함된다. 암은 원발성 암 또는 전이성 암일 수 있다. 원발성 암은 임상적으로 검출 가능하게 되는 기원하는 부위에서의 암 세포의 구역일 수 있고, 원발성 종양일 수 있다. 반대로, 전이성 암은 하나의 장기 또는 부분으로부터 또 다른 비인접한 장기 또는 부분으로의 질환의 분산일 수 있다. 전이성 암은 국소 구역에서 둘러싼 정상 조직에 침투하고 이를 침윤시켜 새로운 종양을 형성하는 능력(이는 국부 전이일 수 있음)을 획득하는 암 세포에 의해 야기될 수 있다. 암은 림프관 및/또는 혈관의 벽을 침투하는 능력을 획득하는 암 세포에 의해 또한 야기될 수 있고, 이후 암 세포는 혈류를 통해 신체에서의 다른 부위 및 조직으로 순환할 수 있다(이로써 순환하는 종양 세포임). 암은 림프성 또는 혈행성 분산과 같은 과정으로 인할 수 있다. 암은 또 다른 부위에 머물고, 혈관 또는 벽을 통해 침투하고, 계속해서 증식하고, 결국 또 다른 임상적으로 검출 가능한 종양을 형성하는 종양 세포에 의해 또한 야기될 수 있다. 암은 전이성(또는 2차) 종양일 수 있는 이 새로운 종양일 수 있다.
- [0126] 암은 전이된, 2차 또는 전이성 종양일 수 있는, 종양 세포에 의해 야기될 수 있다. 종양의 세포는 원래의 종양에서의 것과 같을 수 있다. 예로서, 유방암 또는 대장암이 간으로 전이하는 경우, 2차 종양은, 간에 존재하면서, 비정상 간 세포가 아니라 비정상 유방 또는 대장 세포로 이루어진다. 간에서의 종양은 이에 따라 간암이 아니라 전이성 유방암 또는 전이성 대장암일 수 있다.
- [0127] 암은 임의의 조직의 기원을 가질 수 있다. 암은 흑색종, 대장, 유방 또는 전립선으로부터 유래할 수 있고, 이에 따라 각각 원래 피부, 대장, 유방 또는 전립선인 세포로 이루어질 수 있다. 암은 또한 백혈병 또는 림프종일 수 있는 혈액학적 악성종양일 수 있다. 암은 조직, 예컨대 간, 폐, 방광 또는 장을 침범할 수 있다.
- [0128] 본 발명의 대표적인 암 및/또는 종양은 기저 세포 암종, 담도암; 방광암; 골암; 뇌 및 중추 신경계 암; 유방암; 복막의 암; 자궁경부암; 융모막 암종; 대장암 및 직장암; 연결 조직 암; 소화관의 암; 자궁내막암; 식도암; 눈암; 두경부의 암; 위암(위장관암 포함); 교아종; 간 암종; 간세포암; 상피내 신생물; 신장암 또는 신암; 후두암; 백혈병; 간암; 폐암(예를 들어, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암 및 폐의 편평 암종); 흑색종; 골수종; 신경아세포종; 구강암(입술, 혀, 입 및 인두); 난소암; 췌장암; 전립선암; 망막아세포종; 횡문근육종; 직장암; 호흡기의 암; 침샘 암종; 육종; 피부암; 편평 세포 암; 위암; 고환암; 갑상선암; 자궁암 또는 자궁내막암; 비뇨기계의 암; 외음부암; 림프종, 예컨대 호지킨 및 비호지킨 림프종, 및 B 세포 림프종, 예컨대 저등급/여포성 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma: NHL); 소형 림프구(small lymphocytic: SL) NHL; 중등급/여포성 NHL; 중등급 미만성 NHL; 고등급 면역아구성 NHL; 고등급 림프아구성 NHL; 고등급 소형 비절단된 세포 NHL; 벌키 질환 NHL; 외투 세포 림프종; AIDS 관련 림프종; 및 왈덴스트롬 마크로글로불린혈증; 만성 림프구 백혈병(chronic lymphocytic leukemia: CLL); 급성 림프아구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia: ALL); 모발 세포 백혈병; 만성 골수아구성 백혈병; 및 다른 암종 및 육종; 및 이식후 림프구증식성 장애(post-transplant lymphoproliferative disorder: PTLD), 및 모반종과 연관된 비정상 혈관 증식, 부종(예컨대, 뇌종양과 연관된 것), 및 메이크스 증후군을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0129] 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 치료 불응성 암을 가지는 대상체를 치료하기 위해 사용된다. 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 하나 이상의 면역조절제에 불응성인 대상체를 치료하기 위해 사용된다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 치료의 12주 또는 이상 후에 치료에 무반응을 제시하거나, 심지어 진행하는 대상체를 치료하기 위해 사용된다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, 대상체는 PD-1 및/또는 PD-L1 및/또는 PD-L2

물질에 불응성이고, 예를 들어 니볼루맵(ONO-4538/BMS-936558, MDX1106, OPDIVO, BRISTOL MYERS SQUIBB), 캄브롤리주맵(KEYTRUDA, MERCK), 피딜리주맵(CT-011, CURE TECH), MK-3475(MERCK), BMS 936559(BRISTOL MYERS SQUIBB), 이브루티닙(PHARMACYCLICS/ABBVIE), 아테졸리주맵(TECENTRIQ, GENENTECH) 및/또는 MPDL3280A(ROCHE) 불응성 환자이다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, 대상체는 항-CTLA-4 물질에 불응성이고, 예를 들어 이플리무맵(YERVOY) 불응성 환자(예를 들어, 흑색종 환자)이다. 따라서, 다양한 실시형태에서 본 발명은 하나 이상의 면역조절제의 단일치료를 포함하는 다양한 치료에 비반응성인 환자를 구제하는 암 치료의 방법을 제공한다.

[0130] 몇몇 실시형태에서, 본 방법은 추가 물질에 불응성인 환자에서 키메라 단백질에 의한 치료를 제공하고, 이러한 "추가 물질"은 본 명세서에서 그외 기재되어 있고, 제한 없이, 본 명세서에 기재된 다양한 화학치료제를 포함한다.

[0131] 몇몇 양태에서, 본 키메라 물질은 세포내 병원균을 제거하도록 사용된다. 몇몇 양태에서, 본 키메라 물질은 하나 이상의 감염을 치료하도록 사용된다. 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 바이러스 감염(예를 들어, HIV 및 HCV 포함), 기생충 감염(예를 들어, 말라리아 포함) 및 박테리아 감염을 치료하는 방법에서 사용된다. 다양한 실시형태에서, 감염은 면역억제를 유도한다. 예를 들어, HIV 감염은 대개 감염된 대상체에서 면역억제를 발생시킨다. 따라서, 본 명세서에서 그 외 기재된 바대로, 이러한 감염의 치료는, 다양한 실시형태에서, 면역 저해에 대해 면역 자극을 선호하도록 본 키메라 단백질에 의해 면역계를 조절하는 것을 포함할 수 있다. 대안적으로, 본 발명은 면역활성화를 유도하는 감염을 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 간 연충 감염은 만성 면역활성화와 연관된다. 이 실시형태에서, 이러한 감염의 치료는 면역 자극에 대해 면역 저해를 선호하도록 본 키메라 단백질에 의해 면역계를 조절하는 것을 포함할 수 있다.

[0132] 다양한 실시형태에서, 본 발명은 바이러스 감염, 예를 들어, 제한 없이, 급성 또는 만성 바이러스 감염, 예를 들어 호흡기, 유두종 바이러스 감염, 단순 포진 바이러스(herpes simplex virus: HSV) 감염, 인간 면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus: HIV) 감염, 및 내부 장기의 바이러스 감염, 예컨대 간염 바이러스에 의한 감염을 치료하는 방법을 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 바이러스 감염은 패밀리 플라비비리다에(Flaviviridae)의 바이러스에 의해 야기된다. 몇몇 실시형태에서, 패밀리 플라비비리다에의 바이러스는 황열 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 뎅기 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 세인트 루이스 뇌염 바이러스 및 C형 간염 바이러스로부터 선택된다. 다른 실시형태에서, 바이러스 감염은 패밀리 피코르나비리다에(Picornaviridae)의 바이러스, 예를 들어 폴리오바이러스, 리노바이러스, 콕사키바이러스에 의해 야기된다. 다른 실시형태에서, 바이러스 감염은 오르토믹소비리다에(Orthomyxoviridae)의 구성원, 예를 들어 인플루엔자 바이러스에 의해 야기된다. 다른 실시형태에서, 바이러스 감염은 레트로비리다에(Retroviridae)의 구성원, 예를 들어 렌티바이러스에 의해 야기된다. 다른 실시형태에서, 바이러스 감염은 파라믹소비리다에(Paramyxoviridae)의 구성원, 예를 들어 호흡기 세포융합 바이러스, 인간 파라인플루엔자 바이러스, 루볼라바이러스(예를 들어, 볼거리 바이러스), 홍역 바이러스 및 인간 메타뉴모바이러스에 의해 야기된다. 다른 실시형태에서, 바이러스 감염은 부니아비리다에(Bunyaviridae)의 구성원, 예를 들어 한타바이러스에 의해 야기된다. 다른 실시형태에서, 바이러스 감염은 레오비리다에(Reoviridae)의 구성원, 예를 들어 로타바이러스에 의해 야기된다.

[0133] 다양한 실시형태에서, 본 발명은 기생충 감염, 예컨대 원생동물 또는 연충류 감염을 치료하는 방법을 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 기생충 감염은 원생동물 기생충에 의한 것이다. 몇몇 실시형태에서, 오리티지아(oritiziab) 기생충은 장 원생동물, 조직 원생동물 또는 혈액 원생동물로부터 선택된다. 예시적인 원생동물 기생충은 엔타모에바 히스톨리티카(*Entamoeba histolytica*), 지아르디아 람블리아(*Giardia lamblia*), 크립토스포리듐 무리스(*Cryptosporidium muris*), 트리파노소마티다 감비엔스(*Trypanosomatida gambiense*), 트리파노소마티다 로데시엔스(*Trypanosomatida rhodesiense*), 트리파노소마티다 크루시(*Trypanosomatida cruzi*), 리슈마니아 멕시카나(*Leishmania mexicana*), 리슈마니아 브라질리엔시스(*Leishmania braziliensis*), 리슈마니아 트로피카(*Leishmania tropica*), 리슈마니아 도노바니(*Leishmania donovani*), 톡소플라스마 고나디(*Toxoplasma gondii*), 플라스모듐 비박스(*Plasmodium vivax*), 플라스모듐 오발레(*Plasmodium ovale*), 플라스모듐 말라리아에(*Plasmodium malariae*), 플라스모듐 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 트리코모나스 바기날리스(*Trichomonas vaginalis*) 및 히스토모나스 멜레아그리디스(*Histomonas meleagridis*)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 몇몇 실시형태에서, 기생충 감염은 연충 기생충, 예컨대 선충류(예를 들어, 쌍기충강(Adenophorea))에 의한 것이다. 몇몇 실시형태에서, 기생충은 쌍선충강(Sacculinaria)(예를 들어, 트리추리스 트리치우라(*Trichuris trichiura*), 아스카리스 룬브리코이데스(*Ascaris lumbricoides*), 엔테로비우스 베르미쿨라리스(*Enterobius vermicularis*), 안킬로스토마 듀오데날레(*Ancylostoma duodenale*), 네카토 아메리카누스(*Necator americanus*), 스트롱글리오이데스 스테르코칼리스(*Strongyloides stercoralis*), 울체레리아 반크로프티(*Hucheria*

bancrofti), 드라쿤쿨루스 메디넨시스(*Dracunculus medinensis*))으로부터 선택된다. 몇몇 실시형태에서, 기생충은 흡충류(예를 들어, 혈액 흡충류, 간 흡충류, 장 흡충류 및 폐 흡충류)로부터 선택된다. 몇몇 실시형태에서, 기생충은 스킴스토소마 만소니(*Schistosoma mansoni*), 스킴스토소마 헤마토비움(*Schistosoma haematobium*), 스킴스토소마 야포니쿰(*Schistosoma japonicum*), 파스시올라 헤파티카(*Fasciola hepatica*), 파스시올라 기간티카(*Fasciola gigantica*), 헤테로피에스 헤테로피에스(*Heterophyes heterophyes*), 파라고니무스 웨스터마니(*Paragonimus westermani*)로부터 선택된다. 몇몇 실시형태에서, 기생충은 촌충류(예를 들어, 타에니아 솔리움(*Taenia solium*), 타에니아 사기나타(*Taenia saginata*), 하이메노레피스 나나(*Hymenolepis nana*), 에치노코커스 그라눌로수스(*Echinococcus granulosus*))로부터 선택된다.

[0134]

다양한 실시형태에서, 본 발명은 박테리아 감염을 치료하는 방법을 제공한다. 다양한 실시형태에서, 박테리아 감염은 그람 양성 박테리아, 그람 음성 박테리아, 호기성 및/또는 혐기성 박테리아에 의한다. 다양한 실시형태에서, 박테리아는 스태필로코커스(*Staphylococcus*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 사르시나(*Sarcina*), 에스체리치아(*Escherichia*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 아시네토박터(*Acinetobacter*), 마이코박테리움(*Mycobacterium*), 프로테우스(*Proteus*), 캄필로박터(*Campylobacter*), 시트로박터(*Citrobacter*), 니세리아(*Nisseria*), 바실러스(*Bacillus*), 박테로이데스(*Bacteroides*), 펩토코커스(*Peptococcus*), 클로스트리듐(*Clostridium*), 살모넬라(*Salmonella*), 쉬겔라(*Shigella*), 세라티아(*Serratia*), 헤모필루스(*Haemophilus*), 브루셀라(*Brucella*) 및 다른 유기체로부터 선택되지만, 이들로 제한되지는 않는다. 몇몇 실시형태에서, 박테리아는 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 아시도보란스(*Pseudomonas acidovorans*), 슈도모나스 알칼리게네스(*Pseudomonas alcaligenes*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 스테노트로포모나스 말토피라(*Stenotrophomonas maltophilia*), 부르크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*), 아에로모나스 하이드로필라(*Aeromonas hydrophilia*), 에스체리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 시트로박터 프레운디(*Citrobacter freundii*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*), 살모넬라 파라티피(*Salmonella paratyphi*), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*), 쉬겔라 디센테리아에(*Shigella dysenteriae*), 쉬겔라 플렉네리(*Shigella flexneri*), 쉬겔라 손네이(*Shigella sonnei*), 엔테로박터 클로아카에(*Enterobacter cloacae*), 엔테로박터 아에로게네스(*Enterobacter aerogenes*), 클레브시엘라 뉴모니아에(*Klebsiella pneumoniae*), 클레브시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*), 세라티아 마르세스센스(*Serratia marcescens*), 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*), 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로비덴시아 알칼리파시엔스(*Providencia alcalifaciens*), 프로비덴시아 레트게리(*Providencia rettgeri*), 프로비덴시아 스투아르티(*Providencia stuartii*), 아시네토박터 바우만니(*Acinetobacter baumannii*), 아시네토박터 칼로아세티쿠스(*Acinetobacter calcoaceticus*), 아시네토박터 헤몰리티쿠스(*Acinetobacter haemolyticus*), 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 예르시니아 슈도투베르쿨로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*), 예르시니아 인테르메디아(*Yersinia intermedia*), 보르데텔라 페르투스시(*Bordetella pertussis*), 보르데텔라 파라페르투스시(*Bordetella parapertussis*), 보르데텔라 브론키셉티카(*Bordetella bronchiseptica*), 헤모필루스 인플루엔자에(*Haemophilus influenzae*), 헤모필루스 파라인플루엔자에(*Haemophilus parainfluenzae*), 헤모필루스 헤몰리티쿠스(*Haemophilus haemolyticus*), 헤모필루스 파라헤몰리티쿠스(*Haemophilus parahaemolyticus*), 헤모필루스 두크레이(*Haemophilus ducreyi*), 파스테우렐라 톨토시다(*Pasteurella multocida*), 파스테우렐라 헤몰리티카(*Pasteurella haemolytica*), 브란하멜라 카타르할리스(*Branhamella catarrhalis*), 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*), 캄필로박터 페투스(*Campylobacter fetus*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 캄필로박터 콜라이(*Campylobacter coli*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*), 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 나이세리아 고노르호에아(*Neisseria gonorrhoeae*), 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 킹겔라(*Kingella*), 모락셀라(*Moraxella*), 가르드넬라 바기날리스(*Gardnerella vaginalis*), 박테로이데스 프라길리스(*Bacteroides fragilis*), 박테로이데스 디스타소니스(*Bacteroides distasonis*), 박테로이데스 3452A 상동성 그룹, 박테로이데스 불가투스(*Bacteroides vulgatus*), 박테로이데스 오발루스(*Bacteroides ovalus*), 박테로이데스 테타이오타오미크론(*Bacteroides thetaiotaomicron*), 박테로이데스 유니포르미스(*Bacteroides uniformis*), 박테로이데스 에게르티(*Bacteroides eggerthii*), 박테로이데스 스플란크니쿠스(*Bacteroides splanchnicus*), 클로스트리듐 디피실(*Clostridium difficile*), 마이코박테리움 투베쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코박테리움 아비움

(*Mycobacterium avium*), 마이코박테륨 인트라셀룰라에(*Mycobacterium intracellulare*), 마이코박테륨 레프라에(*Mycobacterium leprae*), 코리네박테륨 디프테리아에(*Corynebacterium diphtheriae*), 코리네박테륨 올세란스(*Corynebacterium ulcerans*), 스트렙토코커스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 스트렙토코커스 아갈락티아에(*Streptococcus agalactiae*), 스트렙토코커스 피요게네스(*Streptococcus pyogenes*), 엔테로코커스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*), 엔테로코커스 파에시움(*Enterococcus faecium*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스태필로코커스 에피데르미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스태필로코커스 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*), 스태필로코커스 인테르메디우스(*Staphylococcus intermedius*), 스태필로코커스 하이쿠스 아종 하이쿠스(*Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*), 스태필로코커스 헤몰리티쿠스(*Staphylococcus haemolyticus*), 스태필로코커스 호미니스(*Staphylococcus hominis*) 또는 스태필로코커스 사카롤리티쿠스(*Staphylococcus saccharolyticus*)로부터 선택되지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0135] 몇몇 양태에서, 본 키메라 물질은 하나 이상의 자가면역 질환 또는 장애를 치료하도록 사용된다. 다양한 실시형태에서, 자가면역 질환 또는 장애의 치료는 면역 자극에 대해 면역 저해를 선호하도록 본 키메라 단백질에 의해 면역계를 조절하는 것을 포함할 수 있다. 본 키메라 단백질에 의해 치료 가능한 예시적인 자가면역 질환 또는 장애는 신체 자체의 항원이 면역 반응에 대한 표적이 되는 것, 예를 들어 류마티스 관절염, 전신 홍반성 낭창, 진성 당뇨병, 강직성 척추염, 쇼그렌 증후군, 염증성 장 질환(예를 들어, 궤양성 대장염, 크론병), 다발성 경화증, 유육종증, 건선, 그레이브병, 하시모토 갑상선염, 건선, 과민성 반응(예를 들어, 알레르기, 고초열, 천식 및 급성 부종은 I형 과민성 반응을 야기함) 및 혈관염 등을 포함한다.

[0136] 더욱 또 다른 양태에서, 본 발명은 T 세포 매개된 질환 및 장애, 예컨대 본 명세서에서 그 외 기재된 질환 또는 장애 및 염증성 질환 또는 장애, 이식편 대 숙주 질환(graft-versus-host disease: GVHD), 이식 거부, 및 T 세포 증식성 장애(이들로 제한되지는 않음)를 치료하고 예방하는 방법에 관한 것이다. 본 사용 방법과 사용되는 I형 ECD 도메인의 구체적인 예는 무엇보다도 TNFRSF1b, BTNL2, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, B7-H3, B7-H4, CD40, OX40, CD137을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0137] 몇몇 양태에서, 본 키메라 물질은 예를 들어 면역 자극 신호를 가지는 세포외 도메인을 통해 T 세포를 활성화하는 방법에서 사용된다.

[0138] 몇몇 양태에서, 본 키메라 물질은 면역억제 신호의 세포 전달을 방지하는 방법에서 사용된다.

[0139] 병용 치료 및 조합

[0140] 몇몇 실시형태에서, 본 발명은 키메라 단백질 및 대상체에게 추가 물질을 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법을 제공한다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명은 동시투여 및/또는 동시제제화에 관한 것이다. 본 명세서에 기재된 임의의 조성물은 동시제제화 및/또는 동시투여될 수 있다.

[0141] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 단백질은 또 다른 물질과 동시투여될 때 상승적으로 작용하고, 이러한 물질이 단일치료로서 사용될 때 흔히 사용되는 것보다 낮은 용량으로 투여된다. 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 언급된 임의의 물질은 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 단백질과 조합되어 사용될 수 있다.

[0142] 몇몇 실시형태에서, 제한 없이, 암 분야를 포함하여, 본 발명은 추가 물질로서의 화학치료제에 관한 것이다. 화학치료제의 예는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 CYTOXAN 사이클로스포스파마이드; 알킬 설포네이트, 예컨대 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카보퀸, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 예컨대 알트레타민, 트라이에틸렌멜라민, 트라이에틸렌포스포르아마이드, 트라이에틸렌티오포스포르아마이드 및 트라이메틸올로멜라민; 아세토게닌(예를 들어, 블라타신 및 블라타시논); 캄프토테신(합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(이의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크리토피신(예를 들어, 크리토피신 1 및 크리토피신 8); 둘라스타틴; 듀오카르마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CB 1-TM1 포함); 엘루에테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕틴; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로르암부실, 클로르나파진, 클로로포스포아마이드, 에스트라무스틴, 이포스포아마이드, 멜클로레타민, 멜클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노렘비신, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스포아마이드, 유라실 머스타드; 나이트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대 엔디인 항생제(예를 들어, 칼리키아미신, 특히 칼리키아미신 감말 및 칼리키아미신 오메갈(예를 들어, 문헌[Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); 다이네미산, 예컨대 다이네미산 A; 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트; 에스페라미신; 및 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색소단백

질 엔다인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우쓰라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 악티노마이신, 다우노루비신, 테토루비신, 6-다이하조-5-옥소-L-노르류신, ADRIAMYCIN 독소루비신(모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 테옥시 독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 펠로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니맥스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물질, 예컨대 메토타렉세이트 및 5-플루오로유라실(5-FU); 엽산 유사체, 예컨대 테노프테린, 메토타렉세이트, 프테로프테린, 트라이메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 사이타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토스테론; 항아드레날린, 예컨대 미노글루테티미드, 미토탄, 트리로스탄; 엽산 보충제, 예컨대 프롤린산; 에세글라톤; 알도포스파마이드 글라이코사이드; 아미노레블린산; 에닐루라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트라세이트; 데메콜신; 다이아지퀸; 엘포르미틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에토틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라자이드; 프로카바진; PSK 폴리사카라이드 복합체(JHS Natural Products(오리건주 유진)); 라족산; 리족신; 시조푸란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지퀸; 2,2',2"-트라이클로로트라이에틸아민; 트리코테센(예를 들어, T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 사이클로포스파마이드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 TAXOL 파클리탁셀(Bristol-Myers Squibb Oncology(뉴저지주 프린스턴), 파클리탁셀의 ABRAXANE Cremophor 비함유, 알부민 조작된 나노입자 제제(American Pharmaceutical Partners(사움베르크 111)), 및 TAXOTERE 독세타셀(Rhone-Poulenc Rorer(프랑스 안토니)); 클로르암부실; GEMZAR 겐시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토타렉세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포사이드(VP-16); 이포스파마이드; 미톡산트론; 빈크리스틴; NAVELBINE, 비노렐빈; 노반트론; 테니포사이드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이만드로네이트; 이리노테칸(Camptosar, CPT-11)(5-FU 및 류코보린에 의한 이리노테칸의 치료 섭생 포함); 토포아이스머라제 저해제 RFS 2000; 다이플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산; 카페시타빈; 콤브레타스타틴; 류코보린(LV); 옥살리플라틴 치료 섭생(FOLFOX)을 포함하는 옥살리플라틴; 라파티닙(TYKERB); 세포 증식을 감소시키는 PKC- α , Raf, H-Ras, EGFR(예를 들어, 에를로티닙(Tarceva)) 및 VEGF-A의 저해제, 및 임의의 상기의 약제학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다, 또한, 치료 방법은 방사선의 사용을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 치료 방법은 광역학 치료의 사용을 추가로 포함할 수 있다.

[0143] 다양한 실시형태에서, 제한 없이, 암 분야를 포함하여, 본 추가 물질은 PD-1 및 PD-L1 또는 PD-L2의 활성 및/또는 PD-1과 PD-L1 또는 PD-L2(비제한적인 예로서, 니볼루맵(ONO-4538/BMS-936558, MDX1106, OPDIVO, BRISTOL MYERS SQUIBB), 캅브롤리주맵(KEYTRUDA, Merck), 피딜리주맵(CT-011, CURE TECH), MK-3475(MERCK), BMS 936559(BRISTOL MYERS SQUIBB), 아테졸리주맵(TECENTRIQ, GENENTECH), MPDL3280A(ROCHE) 중 하나 이상)과의 결합을 차단하고/하거나, 감소시키고/시키거나, 저해하는 물질, CD137(4-1BB)의 활성 및/또는 4-1BB 리간드(비제한적인 예로서, 우렐루맵(BMS-663513 및 항-4-1BB 항체) 중 하나 이상과의 CD137(4-1BB)의 결합을 증가시키고/시키거나 자극하는 물질, 및 CTLA-4의 활성 및/또는 AP2M1, CD80, CD86, SHP-2 및 PPP2R5A 중 하나 이상과의 CTLA-4의 결합 및/또는 OX40과 OX40L(비제한적인 예로서 GBR 830(GLENMARK), MEDI6469(MED면역)과의 결합을 차단하고/하거나, 감소시키고/시키거나, 저해하는 물질로부터 선택된 하나 이상의 면역조절제이다.

[0144] 몇몇 실시형태에서, 제한 없이, 감염성 질환 분야를 포함하여, 본 발명은 추가 물질로서 항감염제에 관한 것이다. 몇몇 실시형태에서, 항감염제는 항바이러스제, 예컨대 아바카버, 아시클로버, 아데포버, 암프레나버, 아타자나버, 시도포버, 다루나버, 델라비르딘, 디다노신, 도코사놀, 에파비렌즈, 엘비테그라버, 엠트리시타빈, 엔푸비르티드, 에트라비린, 팜시클로버 및 포스카르네트(이들로 제한되지는 않음)이다. 몇몇 실시형태에서, 항감염제는 항박테리아제, 예컨대 세팔로스포린 항생제(세팔렉신, 세푸록심, 세파드록실, 세파졸린, 세팔로틴, 세파클러, 세파만돌, 세폭시틴, 세프프로질 및 세프트비프롤); 플루오로퀴놀론 항생제(시프로, 레바퀴, 플록신, 테킨, 아벨록스 및 노르플록스); 테트라사이클린 항생제(테트라사이클린, 미노사이클린, 옥시테트라사이클린 및 독시사이클린); 페니실린 항생제(아목시실린, 암피실린, 페니실린 V, 다이클록사실린, 카르베니실린 반코마이신 및 메티실린); 모노박탐 항생제(아스트레오남); 및 카바페넴 항생제(에르타페넴, 도리페넴, 이미페넴/실라스타틴 및 메로페넴)(이들로 제한되지는 않음)이다. 몇몇 실시형태에서, 항감염제는 항말라리아제(예를 들어,

클로로퀸, 퀴닌, 메플로퀸, 프리마퀸, 독시사이클린, 아르테메티르/루메판트린, 아토바퀸/프로쿠아닐 및 설파독신/피리메타민), 메트로니다졸, 티니다졸, 이베르멕틴, 피란텔 파모에이트 및 알벤다졸을 포함한다.

[0145] 몇몇 실시형태에서, 제한 없이, 자가면역 분야를 포함하여, 추가 물질은 면역억제제이다. 몇몇 실시형태에서, 면역억제제는 소염제, 예컨대 스테로이드성 소염제 또는 비스테로이드성 소염제(NSAID)이다. 스테로이드, 특히 부신 코르티코스테로이드 및 이의 합성 유사체는 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 본 발명에서 유용한 코르티코스테로이드의 예는, 제한 없이, 하이드록실트라이암시놀론, 알파-메틸 텍사메타손, 베타-메틸 베타메타손, 베타메타손 다이프로피오네이트, 베타메타손 벤조에이트, 베타메타손 다이프로피오네이트, 베타메타손 발러레이트, 클로베타솔 발러레이트, 데소나이드, 데스옥시메타손, 텍사메타손, 다이플로라손 다이아세테이트, 다이플루코르톨론 발러레이트, 플루아드레놀론, 플루클로롤론 아세토나이드, 플루메타손 피발레이트, 플루오시놀론 아세토나이드, 플루오시노나이드, 플루코르틴 뷰틸에스터, 플루오코르톨론, 플루프레드니덴(플루프레드닐리덴) 아세테이트, 플루란드레놀론, 할시노나이드, 하이드로코르티손 아세테이트, 하이드로코르티손 뷰티레이트, 메틸프레드니솔론, 트라이암시놀론 아세토나이드, 코르티손, 코르토독손, 플루세토니드, 플루드로코르티손, 다이플루오로손 다이아세테이트, 플루라드레놀론 아세토나이드, 메드리손, 암시나펜, 암시나피드, 베타메타손 및 이의 에스터의 밸런스, 클로로프레드니손, 클로코르텔론, 클레스시놀론, 다이클로리손, 다이플루프레드네이트, 플루클로로나이드, 플루니솔리드, 플루오로메탈론, 플루페롤론, 플루프레드니솔론, 하이드로코르티손, 메프레드니손, 파라메타손, 프레드니솔론, 프레드니손, 베타메타손 다이프로피오네이트를 포함한다. 본 발명에서 사용될 수 있는 (NSAIDS)는 살리실산, 아세틸 살리실산, 메틸 살리실레이트, 글라이콜 살리실레이트, 살리실마이드, 벤질-2,5-다이아세톡시벤조산, 이부프로펜, 풀린산, 나프록센, 케토프로펜, 에토포페나메이트, 페닐부타존 및 인도메타신을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 몇몇 실시형태에서, 면역억제제는 정균제, 예컨대 알킬화제, 항대사물질(예를 들어, 아자티오프린, 메토폭세이트), 세포독성 항생제, 항체(예를 들어, 바실릭시맙, 다클리주맙 및 무로모넵), 항이뮤노필린(예를 들어, 사이클로스포린, 타크롤리무스, 시롤리무스), 인터페론, 오피오이드, TNF 결합 단백질, 마이코페놀레이트 및 작은 생물체(예를 들어, 팅글리모드, 미리오신)일 수 있다.

[0146] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)은 공유 부착이 조성물의 활성을 막지 않도록 즉 조성물에 대한 분자의 임의의 타입의 공유 부착에 의해 변형된 유도체를 포함한다. 제한의 방식이 아니라, 예를 들어, 유도체는 특히 글라이코실화, 지질화, 아세틸화, 페길화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호/차단 기에 의한 유도체화, 단백질분해 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에 대한 연결 등에 의해 변형된 조성물을 포함한다. 임의의 다수의 화학 변형은 공지된 기법, 예컨대 특정한 화학 절단, 아세틸화, 폼일화, 투리카마이신의 대사 합성 등(이들로 제한되지는 않음)에 의해 수행될 수 있다. 추가로, 유도체는 하나 이상의 비전통적 아미노산을 함유할 수 있다. 더욱 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)은, 예시적인 실시형태에서, 독소, 화학치료제, 방사선동위원소, 및 아포토시스 또는 세포사를 야기하는 물질을 포함하는 세포독성 물질을 추가로 포함한다. 이러한 물질은 본 명세서에 기재된 조성물에 접합될 수 있다.

[0147] 본 명세서에 기재된 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)은 이에 따라 이펙터 모이어티 예컨대 화학 링커, 검출 가능한 모이어티, 예를 들어 형광성 염료, 효소, 기질, 생물발광 재료, 방사능 재료, 및 화학발광 모이어티 등, 또는 기능성 모이어티, 예를 들어 스트렙타비딘, 아비딘, 바이오틴, 세포독소, 세포독성 물질, 및 방사능 재료 등을 첨가하도록 번역후 변형될 수 있다.

[0148] **제제**

[0149] 본 명세서에 기재된 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)은 약제학적으로 허용 가능한 염을 형성하기 위해 무기 또는 유기 산과 반응할 수 있는 충분히 염기성인 작용기, 또는 무기 또는 유기 염기와 반응할 수 있는 카복실기를 보유할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 산 부가염은 당해 분야에 공지된 바대로 약제학적으로 허용 가능한 산으로부터 형성된다. 이러한 염은 예를 들어 문헌[*Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 2-19 (1977)] 및 *The Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use*. P. H. Stahl and C. G. Wermuth (eds.), Verlag, Zurich (Switzerland) 2002](본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)에 기재된 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함한다.

[0150] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 염의 형태이다.

[0151] 추가로, 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 비히클을 포함하는 조성물의 성분으로서 대상체에게 투여될 수 있다. 이러한 조성물은 적절한 투여를 위한 형태를 제공하도록 적합한 양의 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 임의로 포함할 수 있다. 약제학적 부형제는 액

체, 예컨대 물 및 오일, 예컨대 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것, 예컨대 땅콩유, 대두유, 광유, 참깨유 등일 수 있다. 약제학적 부형제는 예를 들어 식염수, 아카시아 검, 젤라틴, 전분 페이스트, 활석, 케라틴, 콜로이드성 실리카, 우레아 등일 수 있다. 또한, 보조제, 안정화제, 증점제, 활택제 및 착색제를 사용할 수 있다. 일 실시형태에서, 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 대상체에게 투여될 때 무균이다. 물은 본 명세서에 기재된 임의의 물질이 정맥내로 투여될 때 유용한 부형제이다. 식염수 용액 및 수성 텍스트로스와 글라이세롤 용액은 구체적으로 주사용 용액을 위한 액체 부형제로서 또한 사용될 수 있다. 적합한 약제학적 부형제는 또한 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 스테아르산나트륨, 글라이세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 클로라이드, 탈지분유, 글라이세롤, 프로필렌, 글라이콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 본 명세서에 기재된 임의의 물질은, 원하는 경우, 또한 소량의 습윤 또는 유화 물질, 또는 pH 완충제를 포함할 수 있다.

[0152] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 식염수 완충제(제한 없이 TBS, PBS 등 포함) 중에 재현탁된다.

[0153] 다양한 실시형태에서, 키메라 단백질은 반감기를 연장하거나 그렇지 않으면 약물학적 및 약동학적 특성을 개선하도록 또 다른 물질과 접합되고/되거나 융합될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 PEG, XTEN(예를 들어, rPEG로서), 폴리시알산(POLYXEN), 알부민(예를 들어, 인간 혈청 알부민 또는 HAS), 엘라스틴 유사 단백질(ELP), PAS, HAP, GLK, CTP, 트랜스페린 등 중 하나 이상과 융합되거나 접합될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 각각의 개별 키메라 단백질은 문헌[BioDrugs (2015) 29:215-239](이의 전체 내용은 본 명세서에 그 전문이 포함됨)에 기재된 물질 중 하나 이상에 융합된다.

[0154] 투여, 투약 및 치료 설정

[0155] 본 발명은 다양한 제제에서 기재된 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)을 포함한다. 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)은 용액, 현탁액, 에멀션, 드롭, 정제, 환제, 펠렛, 캡슐, 액체 함유 캡슐, 산제, 서방 제제, 좌제, 에멀션, 에어로졸, 스프레이, 현탁액의 형태, 또는 사용에 적합한 임의의 다른 형태를 취할 수 있다. 단백질 서열을 코딩하는 DNA 또는 RNA 작제물을 또한 사용할 수 있다. 일 실시형태에서, 조성물은 캡슐의 형태이다(예를 들어, 미국 특허 제5,698,155호). 적합한 약제학적 부형제의 다른 예는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 1447-1676(Alfonso R. Gennaro eds., 19th ed. 1995)](본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0156] 필요한 경우, 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)을 포함하는 제제는 또한 가용화제를 포함할 수 있다. 또한, 상기 물질은 당해 분야에 공지된 바와 같은 적합한 비히클 또는 전달 장치에 의해 전달될 수 있다. 본 명세서에 기재된 병용 치료는 단일 전달 비히클 또는 전달 장치에서 동시전달될 수 있다. 투여를 위한 조성물은 임의로 국소 마취제, 예컨대, 예를 들어 주사의 부위에서 통증을 경감시키는 리그노카인을 포함할 수 있다.

[0157] 본 발명의 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)을 포함하는 제제는 편리하게는 단위 제형에서 제시될 수 있고, 약학의 분야에 널리 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방법은 일반적으로 치료학적 물질을 하나 이상의 보조 성분을 구성하는 담체와 회합되게 하는 단계를 포함한다. 통상적으로, 제제는 치료제를 액체 담체, 미세하게 분쇄된 고체 담체 또는 둘 다와 균일하게 및 친밀하게 있게 한 후, 필요한 경우, 생성물을 원하는 제제의 제형으로 성형(예를 들어, 습식 또는 건식 과립화, 분말 블렌드 등, 이어서 당해 분야에 공지된 종래의 방법을 이용한 타정)함으로써 제조된다.

[0158] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)은 본 명세서에 기재된 투여 방식에 채택된 조성물로서 일상적 절차에 따라 제제화된다.

[0159] 투여 경로는 예를 들어 피내, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비강내, 경막외, 경구, 설하, 비강내, 대뇌내, 질내, 경피, 직장, 흡입, 또는 특히 귀, 코, 눈 또는 피부에 대한 국소를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 투여는 경구로 또는 비경구 주사에 의해 실행된다. 대부분의 경우에, 투여는 혈류로의 본 명세서에 기재된 임의의 물질의 방출을 발생시킨다.

[0160] 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)은 경구로 투여될 수 있다. 이러한 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)은 또한 임의의 다른 편리한 경로, 예를 들어 정맥내 점적주사 또는 볼루스 주사, 상피 또는 점막피부 내벽(예를 들어, 경구 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고, 또 다른 생물학적으로 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신 또는 국부일 수 있다. 다양한 전달 시스템, 예를 들어 리포솜, 마이크로입자, 마이크로캡슐, 캡슐 등 중의 캡슐화는 공지되어 있고, 투여하도록 사용될 수 있다.

- [0161] 구체적 실시형태에서, 치료를 요하는 구역에 국부로 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 일 실시형태에서, 예를 들어 암의 치료에서, 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)은 종양 미소환경(예를 들어, 종양 세포를 둘러싸고 이를 영양공급하는 세포, 분자, 세포외 기질 및/또는 혈관, 예를 들어 종양 맥관구조; 종양 침윤 림프구; 섬유아 세포 세망 세포; 내피 전구체 세포(EPC); 암 연관 섬유아세포; 주피세포; 다른 기질 세포; 세포외 기질(ECM)의 성분; 수지상 세포; 항원 제시 세포; T 세포; 조절 T 세포; 대식세포; 호중구; 및 종양에 근접하게 위치한 다른 면역 세포를 포함) 또는 림프절에서 투여되고/되거나, 종양 미소환경 또는 림프절에 표적화된다. 다양한 실시형태에서, 예를 들어 암의 치료에서, 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)은 종양내 투여된다.
- [0162] 다양한 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 종래의 면역치료(예를 들어, OPDIVO, KEYTRUDA, YERVOY 및 TECENTRIQ 중 하나 이상에 의한 치료)에 의해 보이는 것보다 더 적은 부작용을 제공하는 이중 효과를 허용한다. 예를 들어, 본 키메라 단백질은 다양한 조직 및 장기, 예컨대 피부, 위장관, 신장, 말초 및 중추 신경계, 간, 림프절, 눈, 췌장 및 내분비계; 예컨대 뇌하수체염, 대장염, 간염, 폐렴, 발진 및 류마티스성 질환에 영향을 미치는 흔히 관찰되는 면역 관련 부작용을 감소시키거나 예방한다. 추가로, 예를 들어 종양내와 같은 본 국부 투여는 종래의 면역치료(예를 들어, OPDIVO, KEYTRUDA, YERVOY 및 TECENTRIQ 중 하나 이상에 의한 치료)에 의해 사용되는 것과 같은 표준 전신 투여, 예를 들어 IV 점적주사에 의해 보이는 부작용을 제거한다.
- [0163] 비경구 투여(예를 들어, 정맥내, 근육내, 복강내, 피하 및 관절내 주사 및 점적주사)에 적합한 제형은 예를 들어 용액, 현탁액, 분산액, 에멀션 등을 포함한다. 이들은 또한 사용 직전에 무균 주사용 매질 중에 용해되거나 현탁될 수 있는 무균 고체 조성물(예를 들어, 동결건조된 조성물)의 형태로 제조될 수 있다. 이들은 예를 들어 당해 분야에 공지된 현탁제 또는 분산제를 함유할 수 있다.
- [0164] 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)의 투약량, 및 투약 스케줄은 다양한 매개변수, 예컨대 (이들로 제한되지는 않음), 치료되는 질환, 대상체의 일반 건강 및 투여하는 주치의의 결정에 따라 달라질 수 있다. 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 단백질은 이를 요하는 대상체에게 추가 물질의 투여와 동시에 또는 이에 후속하여(예를 들어, 5분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 또는 12주 후에) 전에(예를 들어, 5분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 또는 12주 전에) 투여될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 단백질 및 추가 물질은 1분 떨어져, 10분 떨어져, 30분 떨어져, 1시간 미만 떨어져, 1시간 떨어져, 1시간 내지 2시간 떨어져, 2시간 내지 3시간 떨어져, 3시간 내지 4시간 떨어져, 4시간 내지 5시간 떨어져, 5시간 내지 6시간 떨어져, 6시간 내지 7시간 떨어져, 7시간 내지 8시간 떨어져, 8시간 내지 9시간 떨어져, 9시간 내지 10시간 떨어져, 10시간 내지 11시간 떨어져, 11시간 내지 12시간 떨어져, 24시간 이하 떨어져 또는 48시간 이하 떨어져 투여된다.
- [0165] 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)의 투약량은 여러 인자, 예컨대 병태의 중증도, 병태가 치료되거나 예방되는지, 및 치료되는 대상체의 연령, 체중 및 건강에 따라 달라질 수 있다. 추가로, 특정한 대상체에 대한 파마코게놈(치료제의 약동학적, 약물학적 또는 효율 프로필에 대한 유전자형의 효과) 정보는 사용된 투약량에 영향을 미칠 수 있다. 더욱이, 정확한 개별 투약량은 투여되는 물질, 투여 시간, 투여 경로, 제제의 성질, 배설 속도, 치료되는 특정한 질환, 장애의 중증도 및 장애의 해부학적 위치의 특정한 조합을 포함하는 다양한 인자에 따라 다소 조정될 수 있다. 투약량의 약간의 변동이 예상될 수 있다.
- [0166] 비경구 주사에 의한 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)의 투여를 위해, 투약량은 보통 매일 0.1mg 내지 250mg, 매일 1mg 내지 20mg, 또는 매일 3mg 내지 5mg이다. 주사는 매일 4회 이하로 주어질 수 있다. 일반적으로, 경구로 또는 비경구로 투여될 때, 본 명세서에 기재된 임의의 물질의 투약량은 보통 매일 0.1mg 내지 1500mg, 또는 매일 0.5mg 내지 10mg, 또는 매일 0.5mg 내지 5mg이다. 매일 3000mg 이하의 투약량이 투여될 수 있다.
- [0167] 또 다른 실시형태에서, 전달은 베시클, 특히 리포솜 중에 있을 수 있다(문헌[Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989)]을 참조한다).
- [0168] 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)은 조절 방출 또는 서방 방출 수단 또는 당해 분야의 숙련자에게 널리 공지된 전달 장치에 의해 투여될 수 있다. 예는 미국 특허 제3,845,770호; 제3,916,899호; 제3,536,809호; 제3,598,123호; 제4,008,719호; 제5,674,533호; 제5,059,595호; 제5,591,767호; 제5,120,548호; 제5,073,543호; 제5,639,476호; 제5,354,556호; 및 제5,733,556호(이들은 각각 본 명세서에서 그 전문이 참고로 포함됨)에 기재된 것을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 이러한 제형은

다양한 비율로 원하는 방출 프로필을 제공하도록 예를 들어 하이드로프로필메틸 셀룰로스, 다른 중합체 매트릭스, 겔, 투과성 막, 삼투 시스템, 다층 코팅, 마이크로입자, 리포솜, 마이크로구, 또는 이들의 조합을 사용하여 하나 이상의 활성 성분의 조절 방출 또는 서방 방출을 제공하기에 유용할 수 있다. 활성 성분의 조절 방출 또는 서방 방출은 다양한 조건, 예를 들어 pH의 변화, 온도의 변화, 적절한 광 파장에 의한 자극, 효소의 농도 또는 이용 가능성, 물의 농도 또는 이용 가능성, 또는 다른 생리학적 조건 또는 화합물(이들로 제한되지는 않음)에 의해 자극될 수 있다.

[0169] 또 다른 실시형태에서, 중합체 재료를 사용할 수 있다(문헌[*Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61]을 참조하고; 또한 문헌[Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105]을 참조한다).

[0170] 또 다른 실시형태에서, 조절 방출 시스템은 치료되는 표적 면적의 근처에 위치하여서, 전신 용량의 분획만을 요할 수 있다(예를 들어, 문헌[Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)]을 참조한다). 문헌[Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533]에 의해 검토에서 기재된 다른 조절 방출 시스템을 사용할 수 있다.

[0171] 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)의 투여는 독립적으로 매일 1회 내지 4회 또는 매월 1회 내지 4회 또는 매년 1회 내지 6회 또는 2년, 3년, 4년 또는 5년마다 1회일 수 있다. 투여는 1일 또는 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 1년, 2년, 3년의 기간 동안 일 수 있고, 심지어 대상체의 생애 동안일 수 있다.

[0172] 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)을 사용하는 투약량 섭생은 다양한 인자, 예컨대 대상체의 유형, 종, 연령, 체중, 성별 및 의학 상태; 치료되는 병태의 중증도; 투여 경로; 대상체의 신장 또는 간 기능; 개인의 과마코게놈 메이크업; 및 사용되는 본 발명의 특정한 화합물에 따라 선택될 수 있다. 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)은 단일 매일 용량으로 투여될 수 있거나, 전체 매일 투약량은 매일 2회, 3회 또는 4회의 분할 용량으로 투여될 수 있다. 더욱이, 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)은 투약량 섭생에 걸쳐 간헐적이기보다는 연속해서 투여될 수 있다.

[0173] 세포 및 핵산

[0174] 다양한 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 키메라 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 다양한 실시형태에서, 발현 벡터는 DNA 또는 RNA를 포함한다. 다양한 실시형태에서, 발현 벡터는 포유류 발현 벡터이다.

[0175] 원핵생물 및 진핵생물 벡터 둘 다는 키메라 단백질의 발현에 사용될 수 있다. 원핵생물 벡터는 이. 콜라이 서열에 기초한 작제물을 포함한다(예를 들어, 문헌[Makrides, *Microbiol Rev* 1996, 60:512-538]을 참조한다). 이. 콜라이에서의 발현에 사용될 수 있는 조절 영역의 비제한적인 예는 lac, trp, lpp, phoA, recA, tac, T3, T7 및 λ P_L을 포함한다. 원핵생물 발현 벡터의 비제한적인 예는 λ gt 벡터 시리즈, 예컨대 λ gt11(Huynh *et al.*, in "DNA Cloning Techniques, Vol. I: A Practical Approach," 1984, (D. Glover, ed.), pp. 49-78, IRL Press, Oxford), 및 pET 벡터 시리즈(Studier *et al.*, *Methods Enzymol* 1990, 185:60-89)를 포함할 수 있다. 그러나, 원핵생물 숙주-벡터 시스템은 포유류 세포의 번역후 과정을 많이 수행할 수 없다. 따라서, 진핵생물 숙주-벡터 시스템이 특히 유용할 수 있다. 다양한 조절 영역은 포유류 숙주 세포에서의 키메라 단백질의 발현에 사용될 수 있다. 예를 들어, SV40 초기 및 후기 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시 초기 프로모터 및 라우스 육종 바이러스 긴 말단 반복부(RSV-LTR) 프로모터를 사용할 수 있다. 포유류 세포에서 유용할 수 있는 유도성 프로모터는, 제한 없이, 메탈로티오네인 II 유전자, 마우스 유방 종양 바이러스 글루코코르티코이드 반응성 긴 말단 반복부(MMTV-LTR), β -인터페론 유전자 및 hsp70 유전자와 연관된 프로모터를 포함한다(문헌[Williams *et al.*, *Cancer Res* 1989, 49:2735-42; 및 Taylor *et al.*, *Mol Cell Biol* 1990, 10:165-75]을 참조한다). 열 충격 프로모터 또는 스트레스 프로모터는 재조합 숙주 세포에서의 융합 단백질의 발현을 추진하기에 또한 유리할 수 있다.

[0176] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 발현 벡터는, 포유류 세포에서 기능성인 발현 조절 영역, 또는 이의 보체에 작동 가능하게 연결된, 키메라 단백질을 코딩하는 핵산(및/또는 추가 물질), 또는 이의 성분을 포함한다. 발현 조절 영역은, 차단 및/또는 자극 물질이 발현 벡터에 의해 형질전환된 인간 세포에서 생성되도록, 핵산을 코딩하는

작동 가능하게 연결된 차단 및/또는 자극 물질의 발현을 추진할 수 있다.

- [0177] 발현 조절 영역은 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현에 영향을 미치는 조절 폴리뉴클레오타이드(때때로 본 명세서에서 유전요소라 칭함), 예컨대 프로모터 및 인핸서이다. 본 발명의 발현 벡터의 발현 조절 영역은 인간 세포에서 작동 가능하게 연결된 코딩 핵산을 발현할 수 있다. 실시형태에서, 세포는 종양 세포이다. 또 다른 실시형태에서, 세포는 비종양 세포이다. 실시형태에서, 발현 조절 영역은 작동 가능하게 연결된 핵산에 조절 가능한 발현을 부여한다. 신호(때때로 자극이라 칭함)는 이러한 발현 조절 영역에 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현을 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 신호에 반응하여 발현을 증가시키는 이러한 발현 조절 영역은 대개 유도성이라 칭해진다. 신호에 반응하여 발현을 감소시키는 이러한 발현 조절 영역은 대개 억제성이라 칭해진다. 통상적으로, 이러한 유전요소에 의해 부여되는 증가 또는 감소의 양은 존재하는 신호의 양에 비례하고, 신호의 양이 더 높을수록, 발현의 증가 또는 감소가 더 높다.
- [0178] 실시형태에서, 본 발명은 신호에 반응하여 발현의 높은 수준을 일시적으로 실행할 수 있는 유도성 프로모터의 사용을 고려한다. 예를 들어, 종양 세포에 근접할 때, 이러한 발현 조절 서열을 포함하는 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)에 대해 발현 벡터에 의해 형질전환된 세포는 적절한 신호에 대해 형질전환된 세포를 노출시킴으로써 물질의 높은 수준을 일시적으로 생성하도록 유도된다. 예시적인 유도성 발현 조절 영역은 신호에 의해 자극될 수 있는 유도성 프로모터를 포함하는 것, 예컨대 소분자 화학 화합물을 포함한다. 특정한 예는 예를 들어 미국 특허 제5,989,910호, 제5,935,934호, 제6,015,709호 및 제6,004,941호(이들은 각각 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)에서 발견될 수 있다.
- [0179] 발현 조절 영역 및 유전좌위 조절 영역은 전장 프로모터 서열, 예컨대 네이티브 프로모터 및 인핸서 유전요소, 및 하위서열 또는 폴리뉴클레오타이드 변이체(전장 또는 비변이체 기능의 전부 또는 일부를 보유)를 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "기능성" 및 이의 문법적 변형은, 핵산 서열, 하위서열 또는 단편을 언급하여 사용될 때, 서열이 네이티브 핵산 서열(예를 들어, 비변이체 또는 비변형된 서열)의 하나 이상의 기능을 가진다는 것을 의미한다.
- [0180] 본 명세서에 사용된 바대로, "작동 가능한 연결"은 이의 의도된 방식으로 이들이 기능하게 허용하는 것으로 기재되는 성분의 물리적 병치를 의미한다. 핵산과 작동 가능한 연결에 있는 발현 제어 유전요소의 예에서, 관계는 제어 유전요소가 핵산의 발현을 조절하게 하는 것이다. 통상적으로, 전사를 조절하는 발현 조절 영역은 전사된 핵산의 5' 말단 근처에(즉, "상류에") 병치된다. 발현 조절 영역은 또한 전사된 서열의 3' 말단에(즉, "하류에") 또는 전사체 내에(예를 들어, 인트론에서) 위치할 수 있다. 발현 제어 유전요소는 전사된 서열로부터 떨어진 거리(예를 들어, 핵산으로부터 100개 내지 500개, 500개 내지 1000개, 2000개 내지 5000개, 또는 이것 초과 뉴클레오타이드)에 위치할 수 있다. 발현 제어 유전요소의 구체적인 예는 전사된 서열의 5'에 보통 위치하는 프로모터이다. 발현 제어 유전요소의 또 다른 예는 전사된 서열의 5' 또는 3'에 또는 전사된 서열 내에 위치할 수 있는 인핸서이다.
- [0181] 인간 세포에서의 발현 시스템 기능성은 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 바이러스 시스템을 포함한다. 일반적으로, 인간 세포에서의 프로모터 기능성은 포유류 RNA 중합효소에 결합하고, mRNA로의 코딩 서열의 하류(3') 전사를 개시할 수 있는 임의의 DNA 서열이다. 프로모터는 코딩 서열의 5' 말단에 보통 근접하게 위치하는 전사 개시 영역, 및 통상적으로 전사 개시 부위의 상류에서 TATA 박스 위치한 25개 내지 30개의 염기쌍을 가질 것이다. TATA 박스는 정확한 부위에서 RNA 합성을 시작하도록 RNA 중합효소 II를 지시하는 것으로 생각된다. 프로모터는, 통상적으로 TATA 박스의 상류에서 100개 내지 200개의 염기쌍 내에 위치한, 상류 프로모터 유전요소(인핸서 유전요소)를 또한 통상적으로 가질 것이다. 상류 프로모터 유전요소는 전사가 개시되고 어느 한 방향으로 작용할 수 있는 속도를 결정한다. 포유류 바이러스 유전자로부터의 프로모터가 프로모터로서 특별히 사용되는데, 이는 바이러스 유전자가 대개 고도로 발현되고 광범위한 숙주 범위를 가지기 때문이다. 예는 SV40 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 LTR 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 단순 포진 바이러스 프로모터 및 CMV 프로모터를 포함한다.
- [0182] 통상적으로, 포유류 세포에 의해 인식되는 전사 종결 및 폴리아데닐화 서열은 번역 중지 코돈에 3'에 위치한 조절 영역이고, 이에 따라, 함께 프로모터 유전요소와 함께, 코딩 서열을 플랜킹한다. 성숙 mRNA의 3' 말단은 부위 특이적 번역후 절단 및 폴리아데닐화에 의해 형성된다. 전사 종결자 및 폴리아데닐화 신호의 예는 SV40으로부터 유래된 것을 포함한다. 인트론은 발현 작제물에 또한 포함될 수 있다.
- [0183] 생육 가능한 세포로 핵산을 도입하기 위해 이용 가능한 다양한 기법이 존재한다. 시험관내 포유류 세포로 핵산을 운반하기에 적합한 기법은 리포솜의 사용, 전기천공, 마이크로주사, 세포 융합, 중합체 기반 시스템, DEAE-

텍스트란, 바이러스 형질유도, 칼슘 포스페이트 침전 방법 등을 포함한다. 생체내 유전자 운반을 위해, 리포솜; 천연 중합체 기반 전달 비히클, 예컨대 키토산 및 젤라틴을 포함하는 다수의 기법 및 시약을 또한 사용할 수 있고, 바이러스 벡터는 생체내 형질유도에 또한 적합하다. 몇몇 상황에서, 표적화제, 예컨대 종양 세포 표면 막 단백질에 특이적인 항체 또는 리간드를 제공하는 것이 바람직하다. 리포솜이 사용되는 경우, 내포작용과 연관된 세포 표면 막 단백질에 결합하는 단백질, 예를 들어 특정한 세포 유형에 트로픽한 캅시드 단백질 또는 이의 단편, 사이클링에서 내재화를 겪는 단백질에 대한 항체, 세포내 내재화를 표적화하고 세포내 반감기를 증대시키는 단백질은 표적화에 및/또는 흡수를 촉진하도록 사용될 수 있다. 수용체 매개된 내포작용의 기법은 예를 들어 문헌[Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432(1987); 및 Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414(1990)]에 의해 기재된다.

[0184] 적절한 경우, 유전자 전달 물질, 예를 들어 통합 서열 등을 또한 사용할 수 있다. 다수의 통합 서열은 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Nunes-Duby *et al.*, Nucleic Acids Res. 26:391-406, 1998; Sadwoski, J. Bacteriol., 165:341-357, 1986; Bestor, Cell, 122(3):322-325, 2005; Plasterk *et al.*, TIG 15:326-332, 1999; Kootstra *et al.*, Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003]을 참조한다). 이들은 제조합효소 및 전이효소를 포함한다. 예는 Cre(Sternberg and Hamilton, J. Mol. Biol., 150:467-486, 1981), 람다(Nash, Nature, 247, 543-545, 1974), FIp(Broach, *et al.*, Cell, 29:227-234, 1982), R(Matsuzaki, *et al.*, J. Bacteriology, 172:610-618, 1990), cpC31(예를 들어, 문헌[Groth *et al.*, J. Mol. Biol. 335:667-678, 2004] 참조), 슬리핑 뷰티(sleeping beauty), 매리너 패밀리의 전이효소(상기 Plasterk 등의 문헌 참조), 및 바이러스, 예컨대 AAV, 레트로바이러스, 및 바이러스 통합을 제공하는 성분을 가지는 안티바이러스를 통합하기 위한 성분, 예컨대 레트로바이러스 또는 렌티바이러스의 LTR 서열 및 AAV의 ITR 서열(Kootstra *et al.*, Ann. Rev. Pharm. Toxicol., 43:413-439, 2003)을 포함한다. 또한, 키메라 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 삽입하기 위해 CRISPR/CAS9, 아연 핑거, TALEN 및 메가뉴클레아제 유전자 편집 기술을 포함하는 직접적인 및 표적화된 유전적 통합 전략을 사용할 수 있다.

[0185] 일 양태에서, 본 발명은 바이러스 벡터인 키메라 단백질(및/또는 추가 물질)의 발현을 위한 발현 벡터를 제공한다. 유전자 치료에 유용한 많은 바이러스 벡터는 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Lundstrom, Trends Biotechnol., 21: 1 17, 122, 2003]을 참조한다). 예시적인 바이러스 벡터는 안티바이러스(LV), 레트로바이러스(RV), 아데노바이러스(AV), 아데노 연관된 바이러스(AAV) 및 α 바이러스로부터 선택된 것을 포함하지만, 다른 바이러스 벡터를 또한 사용할 수 있다. 생체내 사용을 위해, 숙주 게놈으로 통합되지 않는 바이러스 벡터, 예컨대 α 바이러스 및 아데노바이러스는 사용하기에 적합하다. α 바이러스의 예시적인 타입은 신드비스 바이러스, 베네수엘라 말 뇌염(VEE) 바이러스 및 쉼리키 포레스트 바이러스(SFV)를 포함한다. 시험관내 사용을 위해, 숙주 게놈으로 통합하는 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스, AAV 및 안티바이러스가 적합하다. 일 실시형태에서, 본 발명은 생체내 고품종양을 본 발명의 바이러스 벡터와 접촉시키는 단계를 포함하는 생체내 인간 세포를 형질유도하는 방법을 제공한다.

[0186] 다양한 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 키메라 단백질을 포함하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0187] 발현 벡터는 본 키메라 단백질을 제조하기 위해 숙주 세포로 도입될 수 있다. 세포는 예를 들어 시험관내 배양되거나 유전적으로 조작될 수 있다. 유용한 포유류 숙주 세포는, 제한 없이, 인간, 원숭이 및 설치류로부터 유래된 세포를 포함한다(예를 들어, 문헌[Kriegler in "Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual," 1990, New York, Freeman & Co.]을 참조한다). 이들은 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 세포주(예를 들어, COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 라인(예를 들어, 현탁 배양에서 성장을 위해 서브클로닝된 293, 293-EBNA 또는 293 세포, Graham *et al.*, J Gen Virol 1977, 36:59); 베이비 햄스터 신장 세포(예를 들어, BHK, ATCC CCL 10); 중국 햄스터 난소 세포-DHFR(예를 들어, CHO, Urlaub and Chasin, Proc Natl Acad Sci USA 1980, 77:4216); DG44 CHO 세포, CHO-K1 세포, 마우스 세르톨리 세포(Mather, Biol Reprod 1980, 23:243-251); 마우스 섬유아세포 세포(예를 들어, NIH-3T3), 원숭이 신장 세포(예를 들어, CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(예를 들어, VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포(예를 들어, HELA, ATCC CCL 2); 개과 신장 세포(예를 들어, MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 랫트 간 세포(예를 들어, BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(예를 들어, W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(예를 들어, Hep G2, HB 8065); 및 마우스 유방 종양 세포(예를 들어, MMT 060562, ATCC CCL51)를 포함한다. 본 명세서에 기재된 융합 단백질을 발현하기 위한 예시적인 암 세포 유형은 마우스 섬유아세포 세포주, NIH3T3, 마우스 루이스 폐 암종 세포주, LLC, 마우스 비만세포종 세포주, P815, 마우스 림프종 세포주, EL4 및 이의 난알부민 형질감염체, E.G7, 마우스 흑색종 세포

주, B16F10, 마우스 섬유육종 세포주, MC57, 및 인간 소세포 폐 암종 세포주, SCLC#2 및 SCLC#7을 포함한다.

[0188] 숙주 세포는 정상 또는 이화된 대상체, 예컨대 건강한 인간, 암 환자 및 감염성 질환을 가지는 환자, 개인 실험실 기탁물, 공공 배양 수집품, 예컨대 미국 균주 은행(American Type Culture Collection), 또는 상업용 공급자로부터의 것으로부터 얻어질 수 있다.

[0189] 시험관내, 생체의 및/또는 생체내 본 키메라 단백질을 제조하기 위해 사용될 수 있는 세포는, 제한 없이, 상피 세포, 내피 세포, 각질세포, 섬유아세포, 근육 세포, 간세포; 혈액 세포, 예컨대 T 림프구, B 림프구, 단핵구, 대식세포, 호중구, 호산구, 거핵구, 과립구; 다양한 줄기 또는 전구체 세포, 특히 조혈 줄기 또는 전구체 세포 (예를 들어, 골수로부터 얻어지는 것과 같은), 제대혈, 말초 혈액, 태아 간 등을 포함한다. 세포 유형의 선택은 치료되거나 예방되는 종양 또는 감염성 질환의 유형에 따라 달라지고, 당해 분야의 숙련자에 의해 결정될 수 있다.

[0190] **대상체 및/또는 동물**

[0191] 몇몇 실시형태에서, 대상체 및/또는 동물은 포유류, 예를 들어 인간, 마우스, 랫트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 토끼, 양 또는 비인간 영장류, 예컨대 원숭이, 침팬지 또는 개코원숭이이다. 다른 실시형태에서, 대상체 및/또는 동물은 비포유류, 예를 들어 제브라피시이다. 몇몇 실시형태에서, 대상체 및/또는 동물은 (예를 들어 GFP에 의해) 형광성으로 태그화된 세포를 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 대상체 및/또는 동물은 형질전환 동물은 형광성 세포를 포함하는 형질전환 동물이다.

[0192] 몇몇 실시형태에서, 대상체 및/또는 동물은 인간이다. 몇몇 실시형태에서, 인간은 소아 인간이다. 다른 실시형태에서, 인간은 성인 인간이다. 다른 실시형태에서, 인간은 노인 인간이다. 다른 실시형태에서, 인간은 환자라 칭해질 수 있다.

[0193] 소정의 실시형태에서, 인간은 약 0개월 내지 약 6개월, 약 6 내지 약 12개월, 약 6 내지 약 18개월, 약 18 내지 약 36개월, 약 1세 내지 약 5세, 약 5 내지 약 10세, 약 10 내지 약 15세, 약 15 내지 약 20세, 약 20 내지 약 25세, 약 25 내지 약 30세, 약 30 내지 약 35세, 약 35 내지 약 40세, 약 40 내지 약 45세, 약 45 내지 약 50세, 약 50 내지 약 55세, 약 55 내지 약 60세, 약 60 내지 약 65세, 약 65 내지 약 70세, 약 70 내지 약 75세, 약 75 내지 약 80세, 약 80 내지 약 85세, 약 85 내지 약 90세, 약 90 내지 약 95세 또는 약 95 내지 약 100세의 범위의 나이를 가진다.

[0194] 다른 실시형태에서, 대상체는 비인간 동물이고, 따라서 본 발명은 수의 용도에 관한 것이다. 구체적인 실시형태에서, 비인간 동물은 애완동물이다. 또 다른 구체적인 실시형태에서, 비인간 동물은 가축 동물이다.

[0195] **키트**

[0196] 본 발명은 본 명세서에 기재된 임의의 물질의 투여를 단순화할 수 있는 키트를 제공한다. 본 발명의 예시적인 키트는 단위 제형으로 본 명세서에 기재된 임의의 조성물을 포함한다. 일 실시형태에서, 단위 제형은 본 명세서에 기재된 임의의 물질 및 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 부형제 또는 비히클을 함유하는 용기, 예컨대 무균일 수 있는 프리필드 주사기이다. 키트는 본 명세서에 기재된 임의의 물질의 사용을 지시하는 라벨 또는 인쇄된 설명서를 추가로 포함할 수 있다. 키트는 뚜껑 검경, 국소 마취제 및 투여 위치에 대한 세정 물질을 또한 포함할 수 있다. 키트는 하나 이상의 본 명세서에 기재된 추가 물질을 또한 추가로 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 키트는 유효량의 본 발명의 조성물 및 유효량의 또 다른 조성물, 예컨대 본 명세서에 기재된 것을 함유하는 용기를 포함한다. 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 기재될 것이고, 이는 청구항에 기재된 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0197] **실시예**

[0198] 실시예 1. 마우스 PD-1-Fc-OX40L 작제물의 작제 및 규명

[0199] 키메라 마우스 PD-1-Fc-OX40L 작제물을 생성하고, CHO-K1 세포에서의 이의 발현을 마우스 IgG 포획 ELISA 검정 (여기서, Fc는 IgG1로부터 유래함)을 사용하여 검증하였다. 구체적으로, CHO-K1 세포를 Fc에 융합된 PD-1(mPD-1-Fc)의 마우스 세포의 도메인(ECD) 또는 OX40L의 ECD에 융합된 mPD-1-Fc(mPD-1-Fc-OX40L) 중 어느 하나를 발현하는 pVITRO2-GS-하이그로 또는 pcDNA3.4 벡터에 의해 안정하게 뉴클레오펙션하였다. 제한 희석에 의해 항생제 내성 단일 세포 클론을 단리하였다. 배양 배지로 분비된 각각의 키메라 단백질의 농도를 도 5에 도시된 바와 같은 mIgG 포획 ELISA에 의해 결정하였다.

- [0200] mOX40, 및 mPD-L1에 결합하는 마우스 PD-1-Fc-OX40L의 능력을 규명하기 위해 결합 검정을 수행하였다. 도 6, 패널 A는 mOX40에 대한 마우스 PD-1-Fc-OX40L의 결합을 검출하기 위해 이용된 ELISA 검정의 도식적 도해를 보여준다. 구체적으로, 배양 배지에서 mPD-1-Fc-OX40L을 포획하기 위해 인간 Fc에 융합된 재조합 mOX40(mOX40-hFc)을 사용하였다. 키메라 단백질에서 mPD-1 도메인을 검출하도록 mPD-1에 대한 토끼 다중클론 항체를 사용하고, 후속하여 토끼 IgG(H+L)에 대한 겨자무 과산화효소(HRP) 접합된 다중클론 항체를 사용하여 검출하였다. 도 6, 패널 B는 마우스 PD-1-Fc-OX40L이 mPD-1-Fc 음성 대조군과 비교하여 OX40에 효율적으로 결합한다는 것을 보여준다. 도 7, 패널 A는 mPD-L1에 대한 마우스 PD-1-Fc-OX40L의 결합을 검출하기 위해 이용된 ELISA 검정의 도식적 도해를 보여준다. 구체적으로, 배양 배지에서 mPD-1-Fc-OX40L 키메라 단백질을 포획하기 위해 인간 Fc에 융합된 재조합 mPD-L1(mPD-L1-hFc)을 사용하였다. 마우스 IgG(H+L)에 대한 겨자무 과산화효소(HRP) 접합된 다중클론 항체를 결합된 단백질의 검출에 사용하였다. 도 7, 패널 B는 마우스 PD-1-Fc-OX40L이 재조합 마우스 PD1-Fc를 사용하여 음성 배지 대조군 및 양성 대조군과 비교하여 PD-L1에 효율적으로 결합한다는 것을 보여준다.
- [0201] T 세포 반응을 이끌어내고 종양을 치료하는 데 있어서의 마우스 PD-1-Fc-OX40L의 활성을 규명하도록 실험을 수행하였다. 닭 난알부민 항원 특이적 OT-I/EGFP, CD8+ T 세포(5×10^5)를 마우스의 오른쪽 옆구리로 B16.F10-ova 종양 세포(5×10^5)에 의한 접종 전 2일에 꼬리 정맥 주사를 통해 C57/BL6-알비노 마우스로 입양으로 전달하였다. 종양이 3 내지 5mm 직경에 이르면, PD-1-Fc-OX40L 발현 DNA($50 \mu\text{g}$)를 $100 \mu\text{S}$ 에서 8 펄스를 사용하여 한정된 전기 펄스($1500\text{V}/\text{cm}$)를 사용하여 종양으로 전기천공하였다. 말초 혈액에서의 CD8+ OT-I/EGFP 세포의 백분율을 전기천공 후 배정된 시간 기간에 걸쳐 유세포분석법 분석에 의해 정량화하였다. 도 8에 도시된 바대로, 마우스(m) PD-1-Fc-OX40L의 생체내 종양내 전달은 항원 특이적 CD8+ T 세포의 증식을 발생시켰다.
- [0202] 도 9는 생체내 mPD-1-Fc-OX40L의 종양내 전달이 또한 B16.F10-ova 종양 모델에서 종양 퇴행을 발생시킨다는 것을 보여준다. CD8+ OT-I/EGFP 세포에 의해 입양으로 전달된 C57/BL6-알비노 마우스에서 B16.F10-ova 종양을 생성하고, mPD-1-Fc-OX40L 발현 DNA($50 \mu\text{g}$)에 의해 1회 전기천공하였다. 대조군 마우스는 DNA를 받지 않았지만, 전기천공으로 처리되었다(EP 단독). 전기천공 후 배정된 시간 기간에 걸쳐 디지털 캘리퍼스를 사용하여 종양 직경을 측정하였다. 도 9는 mPD-1-Fc-OX40L의 투여가 종양 크기를 상당히 감소시킨다는 것을 입증한다.
- [0203] 실시예 2. 마우스 PD-1-Fc-OX40L 작제물의 추가의 규명
- [0204] IgG1로부터 유래된 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인(mPD-1-Fc-OX40L)을 통해 OX40L의 ECD에 융합된 PD-1의 마우스 세포의 도메인(ECD)을 포함하는, mPD-1-Fc-OX40L 작제물을 생성하였다. mPD-1-Fc-OX40L 작제물을 293 세포에서 일시적으로 발현시키고, 단백질 A 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. mPD-1-Fc-OX40L의 모든 3개의 성분의 검출 및 결합을 검정하도록 웨스턴 블롯 및 기능성 ELISA 분석을 수행하였다(도 10, 패널 A). 컷과 IgG 포획 및 검출 ELISA를 사용하여 mPD1-Fc-OX40L의 정량화를 평가할 수 있다(도 10, 패널 B). mPD-1-Fc-OX40L을 mPD-L1-Fc에 의해 포획하고 이것을 mOX40-His, 이어서 화학발광 정량화를 위해 His-HRP에 의해 검출함으로써 각각 파트너 mPD-L1 및 mOX40에 대한 mPD-1 및 mOX40L의 결합은 동시에 입증되었다(도 8, 패널 C). mPD-1-Fc-OX40L의 단량체 및 이합체 입체구조가 있다는 것을 또한 주목한다.
- [0205] mPD-1-Fc-OX40L의 생체의 세포 결합을 평가하기 위해, OX40 및 PD-L1 발현을 상향조절하기 위해 1차 마우스 비장세포를 단리하고 PMA/PHA/이오노마이신에 의해 2일 동안 활성화하였다. 이후, 활성화된 비장세포를 $500\text{ng}/\text{ml}$ 의 mPD-1-Fc-OX40L에 의해 치료하고, 결합(Fc-PE)에 대해 유세포분석법에 의해 분석하였다(도 8, 패널 D). PD-L1 발현 세포를 단리하기 위해, 비장세포를 항원 제시 세포(I-A/I-E)에서 MHC II를 표적화하는 항체에 의해 동시염색하였다. OX40 발현 세포를 단리하기 위해, 비장세포를 CD4와 동시염색하였다. mPD-1-Fc-OX40L은 비장세포의 PD-L1+ 및 OX40+ 집단 둘 다에 상당히 결합하여서, mPD-1-Fc-OX40L이 유능하게 생성되고 정제되어서 1차 유래한 세포에서 이의 표적에 결합한다는 것을 나타낸다. PD-L1을 발현하는 1차 마우스 종양 세포주에 대한 mPD1-Fc-OX40L의 결합 활성을 또한 평가하였다. 컷과 4T1 종양 세포주는 낮은 양의 PD-L1을 발현하고, B16.F10 종양 세포주는 비교적 높은 양의 PD-L1을 발현하는 것으로 확인되었다. mPD1-Fc-OX40L은 PD-L1 낮은 4T1 종양 세포주보다 더 높은 정도로 PD-L1 양성 B16.F10 종양 세포주에 결합하는 것으로 나타났다(도 10, 패널 E).
- [0206] T 세포 활성화/종양 동시배양 검정을 이용하여 mPD-1-Fc-OX40L의 추가의 기능적 활성을 규명하였다. 처음에, 유세포분석법에 의해 컷과 PD-L1_{low}(4T1) 및 PD-L1_{high}(B16.F10) 세포를 식별하였다(도 8, 패널 E). 다음에, 마우스 비장세포를 CD3/CD28 비드 및 IL2의 준포화 농도에 의해 2일 동안 활성화하였다. 2일 후, mPD-1-Fc-OX40L의 존재 또는 부재 하에 활성화된 비장세포를 조사된 4T1 또는 B16.F10 세포와 동시배양하였다. 비장세포의 초기 단리 후 5일에, 배양 배지를 수집하고, 사이토카인 IL2에 대해 ELISA에 의해 분석하였다(도 8, 패널 F). 특히 PD-

L1_{high} 종양 세포를 함유하는 동시배양물에서 mPD-1-Fc-OX40L이 IL2 분비를 상당히 유도할 수 있다는 것이 관찰되었다. 이론에 구속되고자 바라지 않으면서, mPD-1-Fc-OX40L이 PD-L1의 억제 효과를 부수적으로 차단하면서, 또한 OX40/OX40L 신호전달을 통해 T 세포를 활성화하여서 IL2 분비를 유도한다고 생각된다. 종합하면, 이들 발견은 mPD-1-Fc-OX40L이 전임상 모델에서 상당한 항종양 면역을 제공할 수 있다는 것을 제시한다.

[0207] 몇몇 전임상 종양 모델 시스템을 사용하여 mPD-1-Fc-OX40L의 항종양 효력을 시험하였다. 구체적으로, 종양 성장, 전체 생존 및 치료 후 혈청 사이토카인 반응의 유도에 대한 mPD-1-Fc-OX40L의 효과를 평가하도록 대장직장암의 쥐과 모델(CT26 및 MC38)을 이용하였다. 복강내 주사(각각 100 μ g의 2 용량)를 통해 mPD-1-Fc-OX40L에 동등한 활성 용량으로 단일치료로 또는 병용으로 주어진 광범위하게 규명된 OX40 작용제(OX86) 및 PD-L1 차단(10F.9G2) 항체에 의해 헤드 대 헤드로 이 실험을 수행하였다. 도 11, 패널 A에 도시된 것처럼, mPD-1-Fc-OX40L은 MC38 모델에서 종양 크기를 상당히 감소시켰다. 더 특히, mPD-1-Fc-OX40L의 투여는 개별적으로 또는 병용으로 투여된 OX40 작용제 및 PD-L1 차단 항체보다 더 큰 종양 퇴행을 발생시켰다. 중요하게는, 각각의 군에 대해 MC38 종양 세포주에 의한 원발성 종양을 거부한 마우스의 반복 시험감염을 수행하였다. 이 데이터는 반복 치료의 부재 하에 mPD-1-Fc-OX40L에 의해 치료된 마우스가 임의의 다른 치료군보다 높은 정도로 모 종양에 의한 재시험감염을 거부할 수 있다는 것을 입증한다(도 11, 패널 A 및 B). 추가로, mPD-1-Fc-GITRL 및 mPD-1-Fc-41BBL을 포함하는 다른 융합 작제물을 제조하고, mPD-1-Fc-OX40L에 대해 기재된 바대로 종양 보유 마우스에서 사용하였다. 작제물을 함유하는 GITRL 및 41BBL 둘 다는 치료된 동물에서 종양 크기를 감소시켰다.

[0208] 종양 크기를 측정하는 것 이외에, 생체내 mPD-1-Fc-OX40L 신호전달에 대한 약물학적 바이오마커를 또한 결정하였다. 구체적으로, 항-PD-L1 및 항-OX40 항체, 및 PD-1-Fc-OX40L에 의해 치료된 마우스에 대한 혈청 사이토카인 분석을 수행하였다. 도 11, 패널 B 및 C에 도시된 바대로, 증가한 IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17A 및 IL-22를 포함하는, 항-PD-L1 및 항-OX40 항체의 병용 투여 후 관찰된 사이토카인 서명과 현저히 유사한, mPD-1-Fc-OX40L에 의한 치료 후 용량 의존적 사이토카인 서명이 있었다(도 11, 패널 C, D 및 J). 중요하게는, mPD-1-Fc-OX40L에 의한 치료 후 혈청 사이토카인 반응의 검출은 용량 의존적인 것으로 밝혀졌다. 구체적으로, 40 μ g의 1 또는 2의 주사에 의한 치료는 검출 가능한 혈청 사이토카인 반응을 발생시키지 않는 한편, 1회 100 μ g에 의한 치료는 중간 사이토카인 반응을 발생시키고, 2회 100 μ g에 의한 치료는 더 높은 사이토카인 반응을 발생시켰다(도 11, 패널 K). mPD-1-Fc-GITRL에 의한 마우스의 치료는 특정한 혈청 사이토카인 반응을 자극하는 것으로 또한 나타났다.

[0209] 몇몇 실험에서, 종양, 말초 혈액 및 비장에서 세포 면역 반응을 평가하기 위해 MC38 종양을 보유하는 마우스를 실험의 13일에 희생시켰다. 실험의 13일에, mPD-1-Fc-OX40L, mPD-1-Fc-GITRL 및 mCD172a-Fc-CD40L은 모두 비치료된 동물 또는 OX40 작용제 항체, GITR 작용제 항체 또는 PD-L1 차단 항체에 의해 치료된 동물과 비교하여 종양 성장을 감소시키는 것으로 나타났다(도 11, 패널 E). 이 데이터에 따라, mPD-1-Fc-OX40L 또는 mPD-1-Fc-GITRL에 의해 치료된 마우스는 실험의 13일에 종양 항원 특이적 종양 침윤 림프구(TIL)의 수의 증가를 가지는 것으로 나타났다(도 11, 패널 F). CD8+ T 세포의 비장에서의 기억 표현형의 분석을 수행하고(도 11, 패널 G), 다중 치료에 걸쳐 CD4/CD8 T 세포 비율을 또한 비교하였다(도 11, 패널 H).

[0210] CT26 모델을 사용하여 생체내 PD-1-Fc-OX40L 신호전달을 위한 약물학적 바이오마커를 또한 결정하였다. 구체적으로, 개별적으로 또는 병용되어 항-PD-L1 및 항-OX40 항체, 및 PD-1-Fc-OX40L에 의해 치료된 마우스에 대한 혈청 사이토카인 분석을 수행하였다. 도 11, 패널 D에 도시된 바대로, mPD-1-Fc-OX40L에 의한 치료 후 사이토카인 서명은 항-PD-L1 및 항-OX40 항체의 병용 투여 후에 관찰된 사이토카인 서명과 현저히 유사하였다. 구체적으로, 사이토카인 서명은 증가한 IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F 및 IL-22를 포함하였다(도 11, 패널 J 및 K).

[0211] MC38 모델로부터 도출된 결과와 일치하게, mPD-1-Fc-OX40L의 투여는 또한 CT26 대장직장암 모델에서 종양 크기를 현저히 감소시켰다. 특히, mPD-1-Fc-OX40L의 사용은 OX40 작용제 및 PD-L1 차단 항체보다 높은 종양 퇴행을 발생시켰다(도 11, 패널 L). 추가로, mPD-1-Fc-OX40L이 투여된 마우스는 OX40 작용제 및 PD-L1 차단 항체가 투여된 마우스보다 긴 생존 시간을 나타냈다(도 11, 패널 L). 또한, PD-1-Fc-GITRL, PD-1-Fc-41BBL 및 PD-1-Fc-TL1A를 포함하는 다른 키메라 융합 단백질 작제물은 모두 CT26 모델에서 지연된 종양 성장 퇴행을 나타내는 것으로 밝혀졌다(도 11, 패널 L).

[0212] 종합하면, 이들 데이터는 특히 생체내 mPD-1-Fc-OX40L의 기능적 활성을 명확히 입증한다.

[0213] 실시예 3. 인간 PD-1-Fc-OX40L의 작제 및 규명

[0214] 인간 면역글로불린 4(IgG4) 항체로부터 유래된 힌지-CH2-CH3 Fc 도메인을 통해 OX40L에 연결된 인간 PD-1을 포함하는 인간 PD-1-Fc-OX40L을 작제하였다. 이 작제물은 SL-279252라 칭해진다.

[0215] 인간 OX40L의 mRNA 서열은 하기와 같다:

```

1  TCAATCGCCT TTTATCTCTG GCCCTGGGAC CTTGCCTAT TTTCTGATTG ATAGGCTTTG
61  TTTTGTCTTT ACCTCCTTCT TTCTGGGGAA AACTTCAGTT TTATCGCACG TTCCCCTTTT
121 CCATATCTTC ATCTTCCCTC TACCCAGATT GTGAAGATGG AAAGGGTCCA ACCCCTGGAA
181 GAGAATGTGG GAAATGCAGC CAGGCCAAGA TTCGAGAGGA ACAAGCTATT GCTGGTGGCC
241 TCTGTAATTC AGGGACTGGG GCTGCTCCTG TGCTTCACCT ACATCTGCCT GCACTTCTCT
301 GCTCTTCAGG TATCACATCG GTATCCTCGA ATTCAAAGTA TCAAAGTACA ATTTACCGAA
361 TATAAGAAGG AGAAAGGTTT CATCCTCACT TCCCAAAAGG AGGATGAAAT CATGAAGGTG
421 CAGAACAAC T CAGTCATCAT CAACTGTGAT GGGTTTATC TCATCTCCCT GAAGGGCTAC
481 TTCTCCCAAG AGTCAACAT TAGCCTTCAT TACCAGAAGG ATGAGGAGCC CCTCTCCAA
541 CTGAAGAAGG TCAGGTCTGT CAACTCCTTG ATGGTGGCCT CTCTGACTTA CAAAGACAAA
601 GTCTACTTGA ATGTGACCAC TGACAATACC TCCCTGGATG ACTTCCATGT GAATGGCGGA
661 GAACTGATTC TTATCCATCA AAATCCTGGT GAATTCTGTG TCCTTTGAGG GGCTGATGGC
721 AATATCTAAA ACCAGGCACC AGCATGAACA CCAAGCTGGG GGTGGACAGG GCATGGATTC
781 TTCATTGCAA GTGAAGGAGC CTCCCAGCTC AGCCACGTGG GATGTGACAA GAAGCAGATC
841 CTGGCCCTCC CGCCCCCACC CCTCAGGGAT ATTTAAACT TATTTTATAT ACCAGTTAAT
901 CTTATTTATC CTTATATTTT CTAAATTGCC TAGCCGTCAC ACCCAAGAT TGCCTTGAGC
961 CTAAGGCA CCTTTGTGAG AAAGAAAAA TAGATGCCTC TTCTCAAGA TGCATTGTTT
1021 CTATTGGTCA GGCAATTGTC ATAATAAACT TATGTCATTG AAAACGGTAC CTGACTACCA
1081 TTTGTGGAA ATTTGACATG TGTGTGGCAT TATCAAAATG AAGAGGAGCA AGGAGTGAAG
1141 GAGTGGGGTT ATGAATCTGC CAAAGGTGGT ATGAACCAAC CCCTGGAAGC CAAAGCGGCC
1201 TCTCAAGGT TAAATTGATT GCAGTTTGCA TATTGCCTAA ATTTAACTT TCTCATTGG
1261 TGGGGTTCA AAAGAAGAAT CAGCTTGTA AAAATCAGGA CTTGAAGAGA GCCGTCTAAG
1321 AAATACCACG TGCTTTTTTT CTTTACCATT TTGCTTTCCC AGCCTCCAAA CATAGTTAAT
1381 AGAAATTTCC CTTCAAAGAA CTGTCTGGGG ATGTGATGCT TTGAAAAATC TAATCAGTGA
1441 CTTAAGAGAG ATTTTCTTGT ATACAGGGAG AGTGAGATAA CTTATTGTGA AGGGTTAGCT
1501 TTAAGTACA GGATAGCAGG GAACTGGACA TCTCAGGGTA AAAGTCAGTA CGGATTTTAA
1561 TAGCCTGGGG AGGAAAACAC ATTCTTTGCC ACAGACAGGC AAAGCAACAC ATGCTCATCC
1621 TCCTGCCTAT GCTGAGATAC GCACTCAGCT CCATGTCTTG TACACACAGA AACATTGCTG
1681 GTTCAAGAA ATGAGGTGAT CCTATTATCA AATTCAATCT GATGTCAAAT AGCACTAAGA
1741 AGTTATTGTG CCTTATGAAA AATAATGATC TCTGTCTAGA AATACCATAG ACCATATATA
1801 GTCTCACATT GATAATTGAA ACTAGAAGGG TCTATAATCA GCCTATGCCA GGGCTTCAAT
1861 GGAATAGTAT CCCCTTATGT TTAGTTGAAA TGTCCCTTA ACTTGATATA ATGTGTTATG
1921 CTTATGGCGC TGTGGACAAT CTGATTTTTC ATGTCAACTT TCCAGATGAT TTGTAAC TTC

```

[0216]

1981 TCTGTGCCAA ACCTTTTATA AACATAAATT TTTGAGATAT GTATTTTAAA ATTGTAGCAC
 2041 ATGTTTCCCT GACATTTTCA ATAGAGGATA CAACATCACA GAATCTTTCT GGATGATTCT
 2101 GTGTTATCAA GGAATTGTAC TGTGCTACAA TTATCTCTAG AATCTCCAGA AAGGTGGAGG
 2161 GCTGTTGCC CTTACACTAA ATGGTCTCAG TTGGATTTT TTTTCTGTT TTCTATTTC
 2221 TCTTAAGTAC ACCTTCAACT ATATTCCCAT CCCTCTATTT TAATCTGTTA TGAAGGAAGG
 2281 TAAATAAAAA TGCTAAATAG AAGAAATTGT AGGTAAGGTA AGAGGAATCA AGTTCTGAGT
 2341 GGCTGCCAAG GCACTCACAG AATCATAATC ATGGCTAAAT ATTTATGGAG GGCCTACTGT
 2401 GGACCAAGCA CTGGGCTAAA TACTTACATT TACAAGAATC ATTCTGAGAC AGATATTCAA
 2461 TGATATCTGG CTCTACTACT CAGAAGATTG TGTGTGTGTT TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG
 2521 TATTTCACCT TTTGTTATG ACCATGTTCT GCAAAATGTC AGTTACTCAG TGAGTGATAT
 2581 CCGAAAAAGT AAACGTTTAT GACTATAGGT AATATTTAAG AAAATGCATG GTTCATTTTT
 2641 AAGTTTGAA TTTTATCTA TATTTCTCAC AGATGTGCAG TGCACATGCA GGCCTAAGTA
 2701 TATGTTGTGT GTGTTGTTG TCTTTGATGT CATGGTCCCC TCTCTTAGGT GCTCACTCGC
 2761 TTTGGGTGCA CCTGGCCTGC TCTTCCCATG TTGGCCTCTG CAACCACACA GGGATATTC
 2821 TGCTATGCAC CAGCCTCACT CCACCTTCTT TCCATCAAAA ATATGTGTGT GTGTCTCAGT
 2881 CCCTGTAAGT CATGTCCTTC ACAGGGAGAA TTAACCTTTC GATATACATG GCAGAGTTTT
 2941 GTGGGAAAAG AATTGAATGA AAAGTCAGGA GATCAGAATT TTAAATTGA CTTAGCCACT
 3001 AACTAGCCAT GTAACCTTGG GAAAGTCATT TCCCATTCT GGGTCTTGCT TTTCTTTCTG
 3061 TTAAATGAGA GGAATGTTAA ATATCTAACA GTTTAGAATC TTATGCTTAC AGTGTATCT
 3121 GTGAATGCAC ATATTAAATG TCTATGTTCT TGTGCTATG AGTCAAGGAG TGTAACCTTC
 3181 TCCTTTACTA TGTGAATGT ATTTTTTTCT GGACAAGCTT ACATCTTCTT CAGCCATCTT
 3241 TGTGAGTCCT TCAAGAGCAG TTATCAATTG TTAGTTAGAT ATTTTCTATT TAGAGAATGC
 3301 TTAAGGGATT CCAATCCCGA TCCAAATCAT AATTGTCTT TAAGTATACT GGCAGGTCC
 3361 CCTATTTTAA GTCATAATTT TGTATTTAGT GCTTTCCTGG CTCTCAGAGA GTATTAATAT
 3421 TGATATTAAT AATATAGTTA ATAGTAATAT TGCTATTTAC ATGGAAACAA ATAAAAGATC
 3481 TCAGAATTCA CTA (서열 번호 16)

[0217]

[0218]

인간 OX40L의 아미노산 서열은 하기와 같다(음영 - 세포의 도메인):

MERVQPLEENVGNAARPRFRFNKLLLVASVIQGLGLLLCFTYICLHFSALQVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKE
 KGFILTSQKEDEIMKVQNNSVI INCDGFYLI SLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLT
 YKDKVYLVNVTDTNTSLDDFHVNGGELIL IHQNPGEFCVL (서열 번호 17)

[0219]

[0220]

인간 IgG4로부터의 힌지-CH2-CH3 서열의 핵산 서열은 하기와 같다:

TCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTAGCTGTCCCGCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCCTCCGTGTTTCTGTTT
 CCCCCAAAGCCCAAGGACCCCTGATGATCAGCCGACCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGTCC
 CAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGGTGGAAGTGACACAACGCCAAGACCAAGCCC
 AGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGTGCACCAAGGATTGGCTGAGC
 GGCAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCAGCAAGGGCTGCCAGCAGCATCGAAAAGACCATCAGCAACGCC
 ACCGGCCAGCCAGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
 TCCCTGACATGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCA
 GAGAACAACATAAGACCACCCCCCAGTGTGACAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCCGGCTGACA
 GTGGACAAGAGCAGCTGGCAGGAAGGCAACGTGTTACGCTGCAGCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCAC
 TACACCCAGAAGTCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAA (서열 번호 18)

[0221]

[0222] 인간 PD-1의 cDNA 서열은 하기와 같다:

ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAAC TGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTC
TTAGACTCCCCAGACAGGCGCTGGAACCCCCCACCCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCAAGGGGAC
AACGCCACCTTCACTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCATGAGCCCC
AGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGT
GTCACACAAC TGGCCACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACC
TACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTCAGGGTG
ACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCACCCAGCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACC
CTGGTGGTTGGTGTCTGGGCGGCTGTGGGCAGCCTGGTGTCTAGTCTGGGTCTGGCCGTATCTGC
TCCCGGGCGCAGAGGGACAATAGGAGCCAGGCGCACCGGCCAGCCCTGAAGGAGGACCCCTCAGCCGTG
CCTGTGTTCTGTGTGAGTATGGGGAGCTGGATTTCAGTGGCGAGAGAAGACCCGAGCCCCCGTGCCC
TGTTGCCCTGAGCAGACGGAGTATGCCACCATTTGCTTTCTAGCGGAATGGGCACCTCATCCCCGCCCCG
AGGGGCTCAGCTGACGGCCCTCGGAGTGCCAGCCACTGAGGCCTGAGGATGGACACTGCTCTTGGCCCCCT
TGA (서열 번호 19)

[0223]

[0224] 인간 PD-1-Fc-0X40L의 핵산 서열은 하기와 같다:

GTCGACGCCACCATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAAC TGGGCTGGCGG
CCAGGATGGTTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCACCCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTG
ACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTAC
CGCATGAGCCCCAGCAACAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCGAGGACCGCAGCCAGCCGGGCCAGGAC
TGCCGCTTCCGTGTACACAAC TGGCCACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCGGCGCAAT
GACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCA
GAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCACCCAGCCCTCACCCAGGCCAGCCGGC
CAGTTCCAATCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTAGCTGTCCCGCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCCTCCGTG
TTTCTGTTCACCAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTG
GATGTGTCCAGGAAGATCCCGAGGTGACGTTCATTTGGTACGTGGACGGGGTGGAAGTGCACAACGCCAAG
ACCAAGCCAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGTGACCGTGTGCACCAGGAT
TGGCTGAGCGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAGCAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAAAAGACCATC
AGCAACGCCACCGGCCAGCCAGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCAGGAAGAGATGACCAAG
AACCAGGTGTCCCTGACATGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAAC
GGCCAGCCAGAGAACACTACAAGACCACCCCCAGTGTGGACAGCGAGGCTCATTCTTCTGTACTCC
CGGCTGACAGTGGACAAGAGCAGCTGGCAGGAAGGCAACGTGTTACGTGCAGCGTGATGCACGAAGCCCTG
CACAAACCACTACCCAGAAAGTCCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAAATAGAGGGACGAATGGACcaggtatca
catcggatcctcgaattcaaagatcaaagtaaatatccgaatatagaaggagaaaggtttcatcctca
cttcccaaaaggaggatgaaatcatgaaggtgcagaacaactcagtcacatcaactgtgatgggtttatct
catctcctgaagggtacttctcccaggaagtaacattagccttcattaccagaaggatgaggagccctc
ttccaactgaagaaggtcaggtctgtcaactccttgatgggtggcctctctgacttacaagacaaagtctact
tgaatgtgacctgacaatacctcctggatgacttccatgtgaatggcgagaaactgattcttatccatca
aatcctggatgaattctgtgtccttTGAGTCGAC (서열 번호 20)

[0225]

[0226] 서열을 하기과 같은 중국 햄스터(CHO) 세포에 의해 발현에 대해 코돈 최적화하였다:

CACCGGCGAGATCTGCCACCATGCAGATCCCTCAGGCCCCCTGGCCTGTCGTGTGGGCTGTGCTGCAGCTGG
GATGGCGGCTGGCTGGTTCTCGGACTCTCCTGACAGACCCTGGAACCCCCCACTTTAGCCCTGCTCTGC
TGGTCGTGACCGAGGGCGACAACGCCACCTTCACCTGTTCTTCAGCAACACCTCCGAGTCTTCGTGCTGA
ACTGGTACAGAATGTCCCCAGCAACAGACCGACAAGCTGGCCGCCCTTCCCGAGGATAGATCCCAGCCTG
GACAGGACTGCCGGTTCAGAGTGACCCAGCTGCCAACGGCCGGGACTTCCACATGTCTGTGTCGGGGCCA
GACGGAACGACTCCGGCACATATCTGTGCGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCTCAGATCAAGAGTCTC
TGCGGGCCGAGCTGAGAGTGACCGAGAGAAGGGCTGAGGTGCCAACGCCACCCTAGCCATCTCCAAGAC
CTGCCGGCCAGTTCCAGTCTAAGTACGGCCCTCTTGCCCTAGCTGCCCTGCCCCCTGAATTTCTGGGCGGAC
CCTCCGTGTTCTGTTCCTCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCG
TGGTGGTGGATGTGTCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACA
ACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGTGACCGTGCTGC
ACCAGGATTGGCTGTCCGGCAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCTCCAAGGGCTGCCCTCCAGCATCGAAA
AGACCATCTCTAACGCCACCGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGA
TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGG
AGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAATAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC
TGTAATCCCGCTGACCGTGGACAAGTCTCTGCGAGGAAGCAACGTGTTCTCTGCTCCGTGATGCACG
AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCAAGATCGAGGGCCGGATGGATC
AGGTGTACACAGATACCCCGGATCCAGTCCATCAAGTGCAAGTTTACCGAGTACAAGAAAGAGAAGGGAT
TCATCTGACCTCCAGAAAGAGGACGAGATCATGAAGGTGCAGAAACAATCCGTGATCATCAACTGCGACG
GGTCTACCTGATCTCCCTGAAGGGCTACTTCAGTCAGGAAGTGAACATCAGCCTGCACTACCAGAAGGACG
AGGAACCCCTGTTCCAGTGAAGAAAGTGGGAGCGTGAACCTCCCTGATGGTGGCTCTCTGACCTACAAGG
ACAAGGTGTACCTGAACGTGACCACCGACAATACCTCCCTGGACGACTTCCACGTGAACGGCGCGAGCTGA
TCCTGATCCACCAGAACCCTGGCGAGTTCTGCGTGTGTGACTCGAGGGTAGC (서열 번호 21)

[0227]

[0228] 따라서, SL-279252의 아미노산 서열은 하기과 같다:

MQIQAPWPVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESVLWNWYRMSP
SNQTDKLAAPFEDRSQFQDCRFVTLQPNGRDFHMSVVRARRNSGYLCAISLAPKAQIKESLRAELRV
TERRAEVPTAHPSPSRPAGQFQSKYGPPCPSCPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNATKTPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLGSKEYKCKVSSKGLPSSIETISNAT
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSSWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKIEGRMDQVSHRYPRIQSIVKQFTEYKKEKGFILTSQK
EDEIMKVNQNSVIINCDFYLSLKGYSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLVN
TTDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL (서열 번호 22)

[0229]

[0230] 대안적으로, SL-279252는 다른 신호전달 펩타이드, 예컨대 인간 콜라겐 V 또는 인간 IgG 중쇄로부터 유래된 것
을 포함할 수 있다. 대안적으로, SL-279252는 안정성을 증가시키거나 FcRn에 대한 결합 친화도를 증가시키기 위
한 Fc 도메인에서의 하나 이상의 돌연변이, 예컨대 이전에 기재된 것을 포함할 수 있다. 인간 PD-1-Fc-OX40L 작
제물은 단백질 3차 예측 소프트웨어 RaptorX로 불러오기 되어서, 3개의 주요 도메인의 적절한 폴딩을 보장하였
다(도 12, 패널 A). 각각의 성분(즉, PD-1, Fc 및 OX40L)의 3차 구조는 더 큰 거대분자 내에 이의 네이티브 입
체구성을 채택하여서, PD-1-Fc-OX40L이 모든 도메인의 결합 역량 및 분자 기능을 보유한다는 것을 제안한다. 다
음에, PD-1-Fc-OX40L의 면역원성 확률을, T 세포 에피토프 데이터베이스라 상호 참조된, 인 실리콘 분자 모델링
알고리즘을 사용하여 평가하였다(ABZENA/ANTITOPE, 도 12, 패널 B). 모든 코딩 서열이 인간이지만, 치료 후 면
역 반응을 이끌어내기 위해 리드 및 링커 서열에 대한 최소 가능성이 있었다. iTope 항원 예측 기술 인 실리콘
(ANTITOPE)를 이용하여 추가의 분석을 수행하였다. 이 분석에 기초하여, SL-279252는 면역원성의 '낮은 위험'을
가지는 것으로 예측되었는데, 왜냐하면 식별 가능한 T 세포 에피토프가 검출되지 않았기 때문이다. 따라서, SL-
279252는 낮은 면역원성을 가지는 것으로 예상되었다.

[0231] 이후, SL-279252의 코돈 최적화된 DNA 서열을 합성하고, pcDNA3.4-하이그로-mcs(THERMO FISHER) 및 pVITRO2-하
이그로-mcs(INVIVOGEN) 발현 벡터로 방향이 있게 클로닝하였다. 이후, 벡터를 CHO-K1 및 293T 세포로 일시적으
로 또는 안정하게 형질감염시키고, 표준 단백질 A 아가로스 친화도 크로마토그래피를 이용하여 배양 상청액을

정제하였다. 정제된 단백질의 (안정한 형질감염 실험으로부터의) 용리된 분획에서의 인간 Fc/IgG ELISA는 일시적 형질감염 실험으로부터 얻은 대규모 정제로부터 검출된 제1 주요 피크와 정렬하는 한정적 피크를 보여주어서 (도 13, 패널 A), SL-279252의 성공적인 제조가 일상적 단백질 정제 기법, 예컨대 단백질 A를 이용하여 달성될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0232] SL-279252의 모든 3개의 도메인이 온전하고 단백질 검출 검정에 의해 인식 가능하다는 것을 확인하기 위해, 인간 항-PD-1, 항-Fc 및 항-OX40L에 대한 정제된 융합 단백질 프로빙에서 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다(도 13, 패널 B). SL-279252는 모든 3개의 항체에 의해 검출되었고, 단백질이 환원 조건 하에 실행될 때, 대략 75kDa에서 이동하였다. 비환원된 단백질의 대략 50%는 이합체로서 실행하였고, 이는 OX40/L 신호전달 및 기능과 연관된 생체내 올리고머화를 고려하여 잠재적 이점이다. SL-279252에 대한 예측된 분자량은 60.3kDa이었다. SL-279252의 환원된 분획은 더 높은 분자량에서 검출되었고, 이론에 구속되고자 바라지 않으면서, 이는 글라이코실화로 인할 수 있다. 이는 PNGase F인 단백질 탈글라이코실화효소에 의해 SL-279252를 치료함으로써 입증되었다(도 13, 패널 B). 탈글라이코실화 후, SL-279252의 환원된 분획은 정확히 60.3kDa의 예측된 분자량에서 이동하였다. 이는 SL-279252가 글라이코실화를 통해 동시/변역후 변형된다는 증거를 제공하고, 이것은 단백질의 적절한 폴딩 및 안정성, 및 세포 대 세포 유착에서 필수 역할을 하였다(Dalziel M, Dwek RA. Science 2014, Maverakis E, Lebrilla CB. J Autoimmun. 2015).

[0233] 다음에, SL-279252가 기능성 ELISA 검정에서 플레이트 부동화된 재조합 단백질을 사용하여 이의 수용체/리간드 표적에 결합할 수 있는지를 결정하기 위해 분석을 수행하였다. SL-279252를 재조합 인간 OX40에 의해 성공적으로 포획하고(도 13, 패널 C), 항-인간 OX40L/항-염소 HRP에 의해 검출하였다. 이와 관련하여, 인간 OX40에 의한 SL-279252의 포획, 이후 염소-항-OX40L, 이어서 항-염소-HRP에 의한 2단계 항온처리에 의한 검출은 효율적인 검출을 발생시켰다. SL-279252의 양 말단이 이의 각각의 수용체/리간드에 동시에 결합할 수 있는지를 확립하기 위해, 플레이트 흡수된 인간 PD-L1을 사용하여 SL-279252를 포획하고 재조합 OX40-his를 사용하여 SL-279252를 검출하는 또 다른 ELISA 검정을 개발하였다(도 13, 패널 D). 이 검정은 SL-279252가 인간 PD-L1 및 인간 OX40에 동시에 결합할 수 있다는 것을 입증한다.

[0234] 다음에, SL-279252가 hPD-L1, hPD-L1, hOX40 및 다양한 인간 Fc 수용체에 결합하는 친화도를 결정하기 위해 표면 플라즈몬 공명(SPR) 분석을 수행하였다(도 14). 구체적으로, 재조합 인간 PD-L1, PD-L2 및 인간 OX40의 폴리히스티딘 태그화된 버전을 ProteOn HTG 트리스-NTA 칩(BIORAD)에 결합시켰다. 이후, SL-279252를 시간 과정에 걸쳐 결합된 리간드 위에서 흐르게 하고, 각각의 파트너에 대한 SL-279252의 결합 친화도(K_D)를 계산하기 위해 '결합속도'(K_a) 및 '해리속도'(K_d)의 상대 지수를 생성하였다. 재조합 인간 PD-1-Fc 및 OX40L-Fc를 결합에 대한 양성 대조군으로서 사용하였다. 이 대조군은 비교적 빠른 '결합속도' 및 동등하게 빠른 '해리속도'를 가져서, 낮은 나노몰 결합 친화도를 생성시켰다. 이 결과와 일치하게, 인간 PD-L1에 대한 SL-279252의 '결합속도'는 빠르지만, '해리속도'는 훨씬 더 낮고, 재조합 PD-1-Fc의 '해리속도'보다 약 20배 더 느려서, SL-279252가 긴 온타깃 잔류 시간에 의해 빨리 그리고 안정하게 결합한다는 것을 나타낸다(도 14, 패널 A). 인간 PD-L1에 대한 SL-279252 결합의 K_D 는 BMS의 OPDIVO의 관찰된 K_D (약 4nM)와 거의 동일한 2.08nM인 것으로 계산되었다. 인간 PD-L2에 대한 SL-279252 결합의 K_D 는 1.24nM인 것으로 계산되었다(도 14, 패널 B). SL-279252는 다시 빠른 '결합속도' 및 느린 '해리속도'에 의해 인간 OX40에 높은 친화도(246pM)로 결합하였다(도 14, 패널 C).

[0235] SL-279252의 분자 특징을 추가로 규정하기 위해, SPR을 수행하여서, 칩 결합된 Fc γ 수용체 Fc γ R1A 및 FcRn인 신생아 수용체에 대한 SL-279252의 결합 친화도를 분석하였다. 인간 면역글로불린 IgG1은 Fc γ R2B에 대한 낮은 수준 결합 이외에 Fc γ R1A, 이어서 FcRn에 대해 가장 높은 친화도로 결합하는 것으로 나타났다(도 14, 패널 C 및 D). SL-279252는 Fc γ R1A 또는 Fc γ R2B에 결합하지 않았지만, 73nM 친화도로 FcRn에 결합하였다(도 14, 패널 D 및 E). 이론에 구속되고자 바라지 않으면서, FcRn이 세포의 표면에 대한 IgG 재순환에 관여하여서, 리소좀 분해를 피하고 가능하게는 SL-279252의 생체내 반감기를 연장하므로, 이 결합 특징은 융합 단백질에 중요할 수 있다. SL-279252 결합 친화도에 대한 요약 데이터가 포함된다(도 14, 패널 F).

[0236] 다음에, FcRn에 대한 결합을 증가시키는 콜라겐 V 리더 펩타이드 및 Fc 영역 돌연변이(colPD1-FcRnOX40L이라 칭함)를 함유하는 돌연변이된 SL-279252 작제물이 hPD-L1, hPD-L1, hOX40 및 다양한 인간 Fc 수용체에 대한 결합에 대해 시험되는 친화도를 결정하기 위해 표면 플라즈몬 공명(SPR) 분석을 수행하였다(도 14). 구체적으로, 재조합 인간 PD-L1, PD-L2 및 인간 OX40의 폴리히스티딘 태그화된 버전을 ProteOn HTG 트리스-NTA 칩(BIORAD)에 결합시켰다. 이후, colPD1-FcRnOX40L을 시간 과정에 걸쳐 결합된 리간드 위에서 흐르게 하고, 각각의 파트너에 대한 colPD1-FcRnOX40L의 결합 친화도(K_D)를 계산하기 위해 '결합속도'(K_a) 및 '해리속도'(K_d)의 상대 지수를

생성하였다. 재조합 인간 PD-1-Fc 및 OX40L-Fc를 결합에 대한 양성 대조군으로서 사용하였다. 이 대조군은 비교적 빠른 '결합속도' 및 동등하게 빠른 '해리속도'를 가져서, 낮은 나노몰 결합 친화도를 생성시켰다. 이 결과와 일치하게, 인간 PD-L1에 대한 colPD1-FcRnOX40L의 '결합속도'는 빠르지만, '해리속도'는 훨씬 더 낮고, 재조합 PD-1-Fc의 '해리속도'보다 약 10배 더 느려서, colPD1-FcRnOX40L이 긴 온-타겟 잔류 시간에 의해 빨리 그리고 안정하게 결합한다는 것을 나타낸다(도 14, 패널 G). 인간 PD-L1에 대한 colPD1-FcRnOX40L 결합의 K_D 는 BMS의 OPDIV0의 관찰된 K_D (약 4nM)와 거의 동일한 6.35nM인 것으로 계산되었다. 인간 PD-L2에 대한 colPD1-FcRnOX40L 결합의 K_D 는 7.93nM인 것으로 계산되었다(도 14, 패널 H). colPD1-FcRnOX40L은 다시 빠른 '결합속도' 및 느린 '해리속도'에 의해 인간 OX40에 높은 친화도(9.61pM)로 결합하였다(도 14, 패널 I).

[0237] colPD1-FcRnOX40L의 분자 특징을 추가로 규정하기 위해, SPR을 수행하여서, 칩 결합된 Fc γ 수용체 Fc γ R1A 및 FcRn인 신생아 수용체에 대한 colPD1-FcRnOX40L의 결합 친화도를 분석하였다. 인간 면역글로불린 IgG1은 Fc γ R2B에 대한 낮은 수준 결합 이외에 Fc γ R1A, 이어서 FcRn에 대해 가장 높은 친화도로 결합하는 것으로 나타났다(도 14, 패널 J 및 K). colPD1-FcRnOX40L은 Fc γ R1A 또는 Fc γ R2B에 결합하지 않았지만, 2.51nM 친화도로 FcRn에 결합하였다(도 14, 패널 K). 이론에 구속되고자 바라지 않으면서, FcRn이 세포의 표면에 대한 IgG 재순환에 관여하여서, 리소좀 분해를 피하고 가능하게는 colPD1-FcRnOX40L의 생체내 반감기를 연장하므로, 이 결합 특징은 융합 단백질에 중요할 수 있다. colPD1-FcRnOX40L 결합 친화도에 대한 요약 데이터가 포함된다(도 14, 패널 L).

[0238] 추가로, 복강내 주사에 의해 200 μ g의 단백질을 주사함으로써 C57BL/6 마우스에서 정제된 SL-279252의 생체내 반감기를 시험하였다. 이후, 10분, 30분, 1시간, 3, 6, 12 및 24시간에 심장 천자에 의해 치료된 동물로부터 혈액을 수집하고, 실온에서 2시간 동안 응고되게 하였다. 이후, 혈청을 상기 기재된 바와 같은 인간 IgG 또는 OX40L 특이적 ELISA를 이용하여 분석하였다. 도 14, 패널 M에 도시된 바대로, 200 μ g의 단백질의 단일 주사 후 마우스에서의 SL-279252의 혈청 반감기는 7시간 내지 15시간에 있는 것으로 결정되었다. FcRn에 대한 결합 친화도를 증가시키는 돌연변이를 함유하는 작제물은 생체내 더 긴 반감기를 발생시키는 것으로 예측되었다.

[0239] SPR에 의해 검출된 느린 해리속도는 SL-279252가 혈청 반감기보다 더 긴 온-타겟(즉, 종양내) 반감기를 가질 수 있다는 것을 제안한다. 이 질문을 조사하기 위해, 면역손상된 NSG 마우스를 일 옆구리에서 PD-L1 음성 HeLa(인간 자궁경부암) 종양에 의해 그리고 반대 옆구리에서 PD-L1 발현 HeLa 종양에 의해 이식하였다. 마우스를 200 μ g의 SL-279252의 단일 주사에 의해 치료하고, 개별 마우스를 규정된 시점에서 희생시켰다. 희생 시에, HeLa 종양들 다를 절제하고 이등분하였다. 종양의 절반을 분해하고, 유세포분석법에 의해 SL-279252 결합에 대해 시험하였다. 이 분석은 SL-279252가 PD-L1 음성 종양에서가 아니라 PD-L1 양성 종양에서 특이적으로 축적된다는 것을 입증한다. SL-279252의 농도는 치료 후 48시간 이하에 종양에서 증가하는 것으로 관찰되었다(도 14, 패널 N). 추가로, 각각의 종양의 다른 절반의 면역조직화학 분석은 인간 OX40L에 대한 상당한 염색이 치료 후 5일에 존재한다는 것을 입증하여서, SL-279252가 단일 치료 후 적어도 5일에 PD-L1 양성 인간 종양에서 검출 가능하다는 것을 제안한다(도 14, 패널 O).

[0240] 실시예 4. 인간 PD-1-Fc-OX40L의 추가의 기능적 규명

[0241] 이전의 데이터는 SL-279252가 낮은 나노몰 친화도로 부동화된 표적에 결합하고 다중 단백질 검정에 의해 검출 가능하다는 것을 나타낸다. SL-279252가 시험관내 살아 있는 세포의 표면에서 이의 표적에 결합하는지를 결정하기 위해 추가의 분석을 수행하였다. 인간 OX40 수용체에 대한 SL-279252 결합을 평가하기 위해, 인간 AML T 세포주 주카트를 OX40를 과발현하도록 조작하여서, 주카트/hOX40 세포를 생성하였다(유세포분석법에 의해 검증됨; 도 15, 패널 A). PD-L1에 대한 결합을 평가하도록, 인간 PD-L1을 발현하지 않는 CHO-K1인 중국 햄스터 난소 세포주를 인간 PD-L1을 안정하게 발현하도록 형질감염시켰다(도 15, 패널 B). 인간 CD47에 대한 결합을 평가하도록, CHO-K1 세포를 인간 CD47을 안정하게 발현하도록 형질감염시켰다(도 15, 패널 C).

[0242] 이후, CHO-K1 또는 CHO-K1-PD-L1 세포를 증가하는 양의 SL-279252에 의해 치료하고, 항-인간 OX40L-APC 항체를 사용하여 인간 OX40L 도메인의 검출에 대해 유세포분석법에 의해 분석하였다. SL-279252는 검출 가능한 인간 PD-L1을 발현하지 않으므로 모 CHO-K1 세포에 결합하지 않았다. 그러나, 거의 CHO-K1-PD-L1 세포의 전체 집단은 상당히 이동하여서, SL-279252의 인간 PD1 성분이 살아 있는 세포에서 이의 수용체에 결합할 수 있다는 것을 나타낸다(도 15, 패널 D). 이후, 주카트 또는 주카트/OX40 세포를 증가하는 양의 SL-279252에 의해 치료하고, 항-인간 OX40L-APC 항체를 사용하여 인간 OX40L 도메인의 검출에 대해 유세포분석법에 의해 분석하였다. SL-279252는 낮은 양의 인간 OX40을 발현하므로 높은 효율로 모 주카트 세포에 결합하지 않았다. 그러나, 거의 주카트

/OX40 세포의 전체 집단은 상당히 이동하여서, SL-279252의 인간 OX40L 성분이 살아 있는 세포에서 이의 수용체에 결합할 수 있다는 것을 나타낸다(도 15, 패널 E).

[0243] 또 다른 키메라 융합 단백질의 결합을 조사하기 위해, 인간 CD172a-Fc-OX40L, CHO-K1 또는 CHO-K1-CD47 세포를 이후 증가하는 양의 CD172a-Fc-OX40L에 의해 치료하고, 항-인간 OX40L-APC 항체를 사용하여 인간 OX40L 도메인의 검출에 대해 유세포분석법에 의해 분석하였다. CD172a-Fc-OX40L은 검출 가능한 인간 CD47을 발현하지 않으므로 CHO-K1 세포에 결합하지 않았다. 그러나, 거의 CHO-K1-PD-L1 세포의 전체 집단은 상당히 이동하여서, CD172a-Fc-OX40L의 인간 CD172a 성분이 살아 있는 세포에서 이의 수용체에 결합할 수 있다는 것을 나타낸다(도 15, 패널 F). 이후, 주카트 또는 주카트/OX40 세포를 증가하는 양의 CD172a-Fc-OX40L에 의해 치료하고, 항-인간 OX40L-APC 항체를 사용하여 인간 OX40L 도메인의 검출에 대해 유세포분석법에 의해 분석하였다. CD172a-Fc-OX40L은 낮은 양의 인간 OX40을 발현하므로 높은 효율로 주카트 세포에 결합하지 않았다. 그러나, 거의 주카트/OX40 세포의 전체 집단은 상당히 이동하여서, CD172a-Fc-OX40L의 인간 OX40L 성분이 살아 있는 세포에서 이의 수용체에 결합할 수 있다는 것을 나타낸다(도 15, 패널 G).

[0244] 추가로, 유세포분석법에 의해 내인성 인간 PD-L1 발현의 다른 수준에 대해 다수의 인간 종양 세포주를 스크리닝하였다. PD-L1_{low}로서의 전립선암 세포주(PC3) 및 PD-L1_{high}로서의 폐 선암 세포주(HCC827)를 식별하였다(도 15, 패널 H). PC3 및 HCC827 세포를 증가하는 양의 SL-279252와 항온처리하고, 유세포분석법을 이용하여 결합을 검출하였다. SL-279252는 PC3 세포(PD-L1_{low})에 효율적으로 결합하지 않았다(도 15, 패널 I). 그러나, SL-279252는 농도 의존적 방식으로 HCC827 세포(PD-L1_{high})에 상당히 결합하였다(도 15, 패널 J). 이것은 SL-279252가 세포 표면에서 발현된 인간 OX40 및 PD-L1 둘 다에 결합한다는 것을 명확히 나타내어서, 이의 이중 결합 기능에 대한 강력한 증거를 제공한다.

[0245] 이 결과를 연장하기 위해, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 분리된 1차 T 세포에 대한 SL-279252 결합에서 실험을 수행하고, 공지된 화학 조합(포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트; PMA, 식물성 혈구응집소; PHA, 및 이오노마이신)에 의해 생체외 2일 동안 OX40 발현을 자극하도록 유도하였다. 예상된 바대로, PMA/PHA/Ion 치료 후 CD4+ 및 CD8+ T 세포에서의 OX40 발현의 큰 증가가 관찰되었다(도 16, 패널 A). 상기 기재된 방법을 이용하여 CD4+ 및 CD8+ 세포에 대한 SL-279252의 결합이 확인되었다(도 16, 패널 B). SL-279252가 인간 T 세포(CD4+ 및 CD8+ 둘 다)에 효율적으로 결합한다는 것에 주목한다.

[0246] 세포가 동시배양될 때, 종양 세포에서의 PD-L1 발현이 항종양형성 사이토카인 IL2의 T 세포 분비를 저해하는 정도를 평가하기 위해 T 세포 활성화/IL2 방출 검정을 이용하였다(도 16, 패널 C). 2일 후, 활성화된 T 세포를 SL-279252의 존재 또는 부재 하에 조사된 PD-L1_{low}(PC3) 및 PD-L1_{high}(HCC827) 발현 암 세포주에서 플레이트팅하였다. IL2 분비(도 16, 패널 D), 증식 및 사이토카인 발현(도 16, 패널 E)을 포함하는, 초기 T 세포 분리 후 1주 이하 동안 T 세포 활성화의 다양한 판독을 평가하였다. (SL-279252의 부재 하의) IL2 분비의 기준 수준은 T 세포 분리 후 6일에 PD-L1_{high} HCC827 세포에 의한 것보다 PD-L1_{low} PC3 동시배양물에서 상당히 더 높아서, 종양 PD-L1 발현이, IL2 분비에 의해 결정된 바대로, T 세포의 추가의 활성화를 직접적으로 또는 간접적으로 억제한다는 것을 제안한다(도 16, 패널 D). PC3 및 HCC827 동시배양물 둘 다에 대한 SL-279252의 첨가는 농도 의존적 방식으로 IL2 분비를 증가시켰다. 구체적으로, 기준(SL-279252 무)으로부터 5 μ g/ml의 SL-279252의 HCC827 동시배양물(PD-L1_{high})로부터의 관찰된 IL-2 증가는 PC3 세포(PD-L1_{low})에 의해 동시배양될 때의 1.27배와 비교하여 1.92배였다.

[0247] 더욱이, 증식 마커 Ki67의 발현을 포함하는 T 세포 활성화의 추가의 특징을 분석하였다(도 16, 패널 E; 상부). PD-L1_{high} HCC827 세포와의 활성화된 T 세포의 동시배양은 HCC827 세포의 부재 하에 관찰된 수준과 비교하여 증식을 저해하였다(검정 선). 동시배양물에 대한 SL-279252의 첨가는 CD4+ 및 CD8+ T 세포 둘 다에서 Ki67 염색을 증가시켰다. 더구나, 활성화된 T 세포는 가능하게는 종양 세포에 의한 다른 자극 인자의 분비로 인해, T 세포가 단독 배양될 때보다 HCC827 세포에서 동시배양될 때 더 높은 수준의 사이토카인 IFN γ 및 TNF α 를 발현하였다(도 16, 패널 E; 하부). 이들 사이토카인의 발현은 SL-279252에 의한 치료 후 상당히 증가하였다.

[0248] 종합하면, 이들 데이터는 특히 SL-279252가 파트너 PD-L1 및 OX40에 단단히 결합하고, 시험관내 PD-L1 양성 인간 종양 세포에 의해 PD-L1 매개된 T 세포 저해를 역전시킬 수 있다는 것을 입증한다.

[0249] 실시예 5. 추가의 키메라 단백질의 작제 및 규명

[0250] 추가의 작제물을 추가의 인간 PD-1-Fc-OX40L 작제물, 및 인간 hCD172a-Fc-OX40L, hPD1-Fc-TL1A, hBTLA-Fc-

OX40L, hTMIGD2-Fc-OX40L, hTIM3-Fc-OX40L, mPD1-Fc-GITRL, mPD1-Fc-41BBL, mPD1-Fc-TL1A, mCD172a-Fc-CD40L, hTIGIT-Fc-OX40L 및 개과 PD-1-Fc-OX40L을 포함하도록 생성하였다. 각각의 이들 작제물을 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포에서의 발현에 대해 코돈 최적화하고, CHO 세포로 형질감염시키고, 높은 발현에 대해 개별 클론을 선택하였다. 이후, 높은 발현 클론을 교반된 바이오반응기에서 혈청 비함유 배지에서 소규모 제조에 대해 사용하고, 관련 키메라 융합 단백질을 단백질 A 결합 수지 칼럼에 의해 정제하였다. 도 17, 패널 A는 hCD172a-Fc-OX40L, hPD1-Fc-TL1A, hBTLA-Fc-OX40L, hTMIGD2-Fc-OX40L, hTIM3-Fc-OX40L, mPD1-Fc-GITRL, mPD1-Fc-41BBL, mPD1-Fc-TL1A, mCD172a-Fc-CD40L, hTIGIT-Fc-OX40L을 포함하는 다양한 키메라 단백질의 웨스턴 블롯 규명을 보여준다.

[0251] hOX40에 결합하는 다양한 인간 ECD-Fc-OX40L 작제물의 능력을 규명하도록 결합 검정을 수행하였다. hX_{ECD} -Fc-OX40L과 관련하여, X는 왼쪽에서 괄호 안에 기재된 각각의 단백질의 ECD를 의미한다(도 17, 패널 B를 참조함). 도 17의 패널 B는 hOX40에 대한 hX_{ECD} -Fc-OX40L의 결합을 검출하기 위해 이용된 ELISA 방법의 도식적 도해를 보여준다. 배양 배지에서 hX_{ECD} -Fc-OX40L을 포획하도록 인간 Fc에 융합된 재조합 hOX40(hOX40-hFc)을 사용하였다. 표적 융합 단백질을 포획하기 위해 사용된 hOX40 융합 단백질은 또한 hIgG 영역을 함유하므로, 표적 융합 단백질을 함유하는 배양 상청액과 항온처리하기 전에 HRP 비접합된 항-hIgG를 사용하여 차단을 수행하였다. 키메라 단백질에서 hIgG 도메인을 검출하도록 hIgG에 대한 토끼 다중클론 항체를 사용하고, 후속하여 토끼 IgG(H+L)에 대한 겨자무 과산화효소(HRP) 접합된 다중클론 항체를 사용하여 검출하였다.

[0252] 유세포분석법에 의해 주카트 세포에서 세포 표면 발현된 OX40에 대한 SL-279252의 결합을 인간 OX40에 결합하는 것으로 예상되지 않은 2개의 음성 대조군 단백질과 비교하였다. 이 데이터는 SL-279252가 인간 OX40에 효율적으로 결합하는 한편(왼쪽 패널), 인간 PD1-Fc-TL1A 또는 개과 PD1-Fc-OX40L이 인간 OX40에 결합하지 않는 것으로 관찰된다는 것을 입증한다(도 17, 패널 C).

[0253] 인간 CD172a-Fc-OX40L 작제물을 단백질 3차 예측 소프트웨어 RaptorX로 불러오기를 하여 3차 구조를 결정하였다. 예측된 3차 구조는 도 17, 패널 D에 도시되어 있다.

[0254] 몇몇 키메라 융합 단백질의 코돈 최적화된 DNA 서열을 합성하고, pVITRO2, pcDNA3.4 및 다른 발현 벡터로 방향이 있게 클로닝하였다. 이후, 벡터를 CHO 또는 293 세포로 일시적으로 또는 안정하게 형질감염시키고, 높은 발현에 대해 개별 클론을 선택하였다. 예를 들어, SL-279252를 293 세포로부터의 일시적 형질감염으로부터 제조하고, 단백질 A 칼럼으로 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하고, 쿠마시 염색, 웨스턴 블롯에 의해 평가하고, BCG 표준품과 비교하여 정량화하였다(도 17, 패널 E).

[0255] 또 다른 예에서, CD172a-Fc-OX40L을 293 세포로부터의 일시적 형질감염으로부터 제조하고, 단백질 A 칼럼으로 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하고, 쿠마시 염색, 웨스턴 블롯에 의해 평가하고, BCG 표준품과 비교하여 정량화하였다(도 17, 패널 F). 또 다른 예에서, CD172a-Fc-CD40L을 293 세포로부터의 일시적 형질감염으로부터 제조하고, 단백질 A 칼럼으로 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하고, Perkin Elmer LabChip 시스템에 의해 평가하고, BCG 표준품과 비교하여 정량화하였다(도 17, 패널 G). 또 다른 예에서, 인간 TIGIT-Fc-OX40L을 293 세포로부터의 일시적 형질감염으로부터 제조하고, 단백질 A 칼럼으로 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하고, 쿠마시 염색, 웨스턴 블롯에 의해 평가하고, BCG 표준품과 비교하여 정량화하였다(도 17, 패널 H).

[0256] hCD47, hOX40 및 다양한 인간 Fc 수용체에 대한 표면 플라스몬 공명(SPR) 분석에 의해 인간 CD172a-Fc-OX40L의 결합 친화도를 평가하였다(도 17, 패널 I-M). 구체적으로, 재조합 인간 CD47 및 인간 OX40의 폴리히스티딘 태그화된 버전은 ProteOn HTG 트리스-NTA 칩(BIORAD)에 결합하였다. 이후, CD172a-Fc-OX40L을 시간 과정에 걸쳐 결합된 리간드 위에서 흐르게 하고, 각각의 파트너에 대한 CD172a-Fc-OX40L의 결합 친화도(K_D)를 계산하기 위해 '결합속도'(K_a) 및 '해리속도'(K_d)의 상대 지수를 생성하였다. 재조합 인간 CD47-Fc 및 OX40-Fc를 결합에 대한 양성 대조군으로서 사용하였다. 이 대조군은 비교적 빠른 '결합속도' 및 동등하게 빠른 '해리속도'를 가져서, 낮은 나노몰 결합 친화도를 생성시켰다. 이 결과와 일치하게, 인간 CD47에 대한 CD172a-Fc-OX40L의 '결합속도'는 빠르지만, '해리속도'는 훨씬 더 낮고, 재조합 CD47-Fc의 '해리속도'보다 약 40배 더 느려서, CD172a-Fc-OX40L이 긴 온-타겟 잔류 시간에 의해 빨리 그리고 안정하게 결합한다는 것을 나타낸다(도 17, 패널 I). 인간 CD47에 대한 CD172a-Fc-OX40L 결합의 K_D 는 3.59nM인 것으로 계산되었다. CD172a-Fc-OX40L은 다시 빠른 '결합속도' 및 느린 '해리속도'에 의해 인간 OX40(869 pM)에 높은 친화도로 결합하였다(도 17, 패널 J).

[0257] CD172a-Fc-OX40L의 분자 특징을 추가로 규정하기 위해, SPR을 수행하여서, 칩 결합된 Fc γ 수용체 Fc γ R1A 및 FcRn인 신생아 수용체에 대한 CD172a-Fc-OX40L의 결합 친화도를 분석하였다. 인간 면역글로불린 IgG1은 Fc γ R2B

에 대한 낮은 수준 결합 이외에 Fc γ R1A, 이어서 FcRn에 대해 가장 높은 친화도로 결합하는 것으로 나타났다(도 17, 패널 K 및 L). CD172a-Fc-OX40L은 Fc γ R1A 또는 Fc γ R2B에 결합하지 않았지만, 790nM 친화도로 FcRn에 결합하였다(도 17, 패널 L). 이론에 구속되고자 바라지 않으면서, FcRn이 세포의 표면에 대한 IgG 재순환에 관여하여서, 리소솜 분해를 피하고 가능하게는 CD172a-Fc-OX40L의 생체내 반감기를 연장하므로, 이 결합 특징은 융합 단백질에 중요할 수 있다. CD172a-Fc-OX40L 결합 친화도에 대한 요약 데이터가 포함된다(도 17, 패널 M).

[0258] 몇몇 추가의 키메라 융합 단백질의 코돈 최적화된 DNA 서열을 합성하고, pVITR02, pcDNA3.4 및 다른 발현 벡터로 방향이 있게 클로닝하였다. 이후, 벡터를 CHO 또는 293 세포로 일시적으로 또는 안정하게 형질감염시키고, 높은 발현에 대해 개별 클론을 선택하였다. 예를 들어, 개과 PD1-Fc-OX40L을 293 세포로부터의 일시적 형질감염으로부터 제조하고, 단백질 A 칼럼으로 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하고, 쿠마시 염색, 웨스턴 블롯에 의해 평가하고, BCG 표준품과 비교하여 정량화하였다(도 17, 패널 N). 또 다른 예에서, 마우스 PD1-Fc-OX40L을 293 세포로부터의 일시적 형질감염으로부터 제조하고, 단백질 A 칼럼으로 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하고, 쿠마시 염색, 웨스턴 블롯에 의해 평가하고, BCG 표준품과 비교하여 정량화하였다(도 17, 패널 O). 또 다른 예에서, 마우스 PD1-Fc-GITRL을 293 세포로부터의 일시적 형질감염으로부터 제조하고, 단백질 A 칼럼으로 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하고, 쿠마시 염색, 웨스턴 블롯에 의해 평가하고, BCG 표준품과 비교하여 정량화하였다(도 17, 패널 P). 또 다른 예에서, 마우스 PD1-Fc-41BBL을 293 세포로부터의 일시적 형질감염으로부터 제조하고, 단백질 A 칼럼으로 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하고, 쿠마시 염색, 웨스턴 블롯에 의해 평가하고, BCG 표준품과 비교하여 정량화하였다(도 17, 패널 Q). 또 다른 예에서, 마우스 PD1-Fc-TL1A를 293 세포로부터의 일시적 형질감염으로부터 제조하고, 단백질 A 칼럼으로 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하고, 쿠마시 염색, 웨스턴 블롯에 의해 평가하고, BCG 표준품과 비교하여 정량화하였다(도 17, 패널 R). 더 또 다른 예에서, CD115-Fc-CD40L을 293 세포로부터의 일시적 형질감염으로부터 제조하고, 단백질 A 칼럼으로 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하고, 쿠마시 염색, 웨스턴 블롯에 의해 평가하고, BCG 표준품과 비교하여 정량화하였다(도 17, 패널 S).

[0259] 각각의 정제된 단백질을 마커, 예를 들어 의도된 저해 리간드, 및 의도된 동시자극 수용체에 결합시키도록 ELISA 검정에 의해 규명하였다. 예를 들어, 정제된 인간 PD-1-Fc-OX40L의 결합을 시험하기 위해, 재조합 PD-L1-Fc를 미량적정 플레이트에 흡착시키고, PD-1-Fc-OX40L을 포획하도록 사용하였다. 이후, 바이오틴에 연결된 재조합 인간 OX40-Fc를 사용하여 임의의 결합된 PD-1-Fc-OX40L을 검출하고, 이것을 이후 스트렙타비딘-HRP와의 결합을 통해 발색 검정에서 검출하였다.

[0260] 또한, 각각의 정제된 단백질을 의도된 저해 리간드, 및 의도된 동시자극 수용체에 결합시키도록 유세포분석법에 의해 규명하였다. 예를 들어, 인간 종양 세포주를 PD-L1의 내인성 발현에 대해 규명하고, 이는 몇몇 인간 흑색종 종양 세포주에서 특히 풍부한 것으로 밝혀졌다. 이들 동일한 종양 세포주는 인간 OX40L에 음성인 것으로 밝혀졌다. PD-1-Fc-OX40L과의 항온처리 후, 임의의 결합된 키메라 융합 단백질을 인간 OX40L 특이적 항체에 의해 검출하였다. 유사하게, 인간 주카트 세포를 인간 OX40에 의해 형질감염시키고, 인간 PD-L1에 음성인 것으로 나타났다. 키메라 PD-1-Fc-OX40L 작제물과의 항온처리 후, 항-인간 PD-L1 특이적 항체를 사용하여 임의의 결합된 복합체를 검출하였다. 각각의 수용체/리간드에 대한 각각의 키메라 융합 단백질의 특이적 세포 표면 결합을 검출하기 위해 일련의 스크리닝 세포주를 생성하였고, 이들은 CHO-K1-CD47, CHO-K1-PD-L1, CHO-K1-HVEM, CHO-K1-HHLA2, CHO-K1-VISTA, CHO-K1-Gal9, HeLa-PD-L1, HeLa-CD47, HeLa-HVEM, HeLa-HHLA2, HeLa-VISTA, HeLa-Gal9를 포함한다.

[0261] 각각의 수용체의 기능적 활성을 결정하기 위해, 저해 리간드 양성 인간 종양 세포의 존재 하에 시험관내 T 세포 증식 검정을 수행하였다. 예를 들어, PD-L1을 발현하는 인간 흑색종 종양 세포를 헨 에그 라이소자임(hen egg lysozyme: HEL)에 특이적인 펩타이드에 의해 펄스화하고, OX40 수용체를 발현하는 인간 HEL 특이적 T 세포와 항온처리하였다. 이들 세포의 증식을 PD-1-Fc-OX40L 작제물의 존재 및 부재 하에 모니터링하고, 키메라 작제물의 존재에 기능적으로 반응성인 것으로 밝혀졌다. 유사한 시스템에서, HVEM, CD47, 갈렉틴-9, TIGIT 수용체 또는 TMIGD2 수용체를 발현하는 인간 종양을 사용하였다.

[0262] 몇몇 실험에서, 쥐과 PD-L1에 대해 양성인 것으로 공지된 쥐과 종양(B16-F10 흑색종, MC38 대장 암종 및 CT26 대장 암종 포함)을 치료하기 위해 마우스 PD-1-Fc-OX40L 또는 마우스 PD-1-Fc-TL1A를 사용하였다. 이 시스템에서, 확립된 종양을 PD-1-Fc 융합 단백질, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 단일클론 항체 또는 항-OX40 또는 항-GITR 단일클론 항체와 비교하여 정제된 키메라 융합 단백질에 의해 치료하였다. 이 실험에서, 키메라 작제물의 활성은 개별 치료제와 비교하여 증대된 항원 특이적 T 세포 반응 및 증가한 종양 거부 비율을 발생시키는 것으로 관찰되었다. 몇몇 실험에서, PD-1-Fc-OX40L 또는 PD-1-Fc-TL1A를 코딩하는 핵산 작제물을 직접적으로 확립된 종양으

로 전기천공하였다. 이 실험에서, 키메라 작제물은 말초 혈액에서 및 확립된 종양 내에서의 둘 다에서 검출된 증가한 종양 거부 비율, 및 증가한 종양 항원 특이적 CD8+ T 세포 증식을 발생시키는 것으로 나타났다.

[0263] 인간 종양 외식편에 대한 정제된 키메라 융합 단백질의 결합을 결정하기 위해, 새로운 동결된 인간 종양 샘플을 얻고, 각각의 키메라 융합 단백질에 의해 접종하였다. 임의의 결합된 융합 단백질을 항-인간 OX40L에 의해 검출하고, 항-인간 OX40L에 의한 별개의 염색에 의해 배경 염색에 대해 조절하였다.

[0264] 각각의 융합 단백질의 분자 특징을 결정하기 위해, 정제된 키메라 융합 단백질을 크기 배제 크로마토그래피에 의해 규명하였다. 이 분석은 중요한데, 왜냐하면 예를 들어 OX40L ECD는 동종삼합체를 형성하는 것으로 공지된 한편, Fc 영역은 동종이합체를 형성하는 것으로 공지된 반면, 저해 리간드 결합 수용체는 단량체(예를 들어, PD-1)일 수 있거나 동종다합체(예를 들어, TIM3)를 형성할 수 있기 때문이다. 따라서, 이들 키메라 작제물에 의해 형성될 수 있는 개별 종에 대한 몇몇 가능성이 존재한다. 질량 분광법, 열 안정성, pH 안정성, 물리적 안정성, 전하 프로파일, 소수화도, 물리적 안정성, 완충제 상용성 및 100mg/ml 이하의 용해도에 의한 추가의 분자 규명을 또한 수행한다.

첨부된 서열 목록의 서열의 표

서열 번호	예시적인 설명
1	PD-1의 세포의 도메인, 이어서 인간 IgG4 및 짧은 링커의 힌지-CH2-CH3 도메인, 이어서 OX40L의 세포의 도메인을 포함하는, 키메라 단백질의 DNA 서열.
2	PD-1의 세포의 도메인, 이어서 인간 IgG4 및 짧은 링커의 힌지-CH2-CH3 도메인, 이어서 OX40L의 세포의 도메인을 포함하는, 키메라 단백질의 아미노산 서열.
3	중국 햄스터 난소(CHO) 세포에 의한 발현에 최적화된 코돈 최적화된 핵산 서열
4	PD-1의 세포의 도메인-Fc-TL1A의 세포의 도메인을 코딩하는, DNA 서열
5	서열 번호 4의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열
6	작제물의 뉴클레오타이드 서열(예: OX40L의 Fc를 통해 연결된 BTLA의 세포의 도메인을 코딩하는 융합 단백질)
7	서열 번호 6의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열
8	인간 OX40L의 Fc 영역을 통해 연결된, TIGIT의 세포의 도메인을 통합한 융합 단백질의 DNA 서열
9	서열 번호 8의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열
10	인간 OX40L의 Fc 영역을 통해 연결된, TIM3의 세포의 도메인을 통합한 융합 단백질의 DNA 서열
11	서열 번호 10의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열
12	인간 OX40L의 세포의 도메인의 Fc 링커 서열과 결합하는 CD172a의 세포의 도메인의 뉴클레오타이드 서열
13	서열 번호 12의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열
14	인간 OX40L의 세포의 도메인의 Fc 링커 서열과 결합하는 TIMGD2의 세포의 도메인의 뉴클레오타이드 서열
15	서열 번호 14의 코돈 최적화된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열

[0265]

16	인간 OX40L 의 mRNA 서열
17	인간 OX40L 의 아미노산 서열
18	인간 IgG1 로부터의 힌지-CH2-CH3 서열의 핵산 서열
19	인간 PD-1 의 cDNA 서열
20	중국 햄스터 난소(CHO) 세포에 의한 발현에 코돈 최적화된 인간 PD-1-Fc-OX40L 의 핵산 서열
21	인간 PD-1-Fc-OX40L 의 핵산 서열
22	SL-279252 의 아미노산 서열
23	링크어의 아미노산 서열
24	링크어의 아미노산 서열
25	링크어의 아미노산 서열
26	링크어의 아미노산 서열
27	링크어의 아미노산 서열
28	링크어의 아미노산 서열
29	링크어의 아미노산 서열
30	링크어의 아미노산 서열
31	링크어의 아미노산 서열
32	CD279 의 아미노산 서열
33	CD172a 의 아미노산 서열
34	BTLA 의 아미노산 서열
35	TIGIT 의 아미노산 서열
36	TIM3 의 아미노산 서열
37	CD200 의 아미노산 서열
38	TMIGD2 의 아미노산 서열
39	VISTA 의 아미노산 서열
40	VSIG8 의 아미노산 서열

[0266]

41	BTNL2의 아미노산 서열
42	TIMFRSF1b의 아미노산 서열
43	CD276의 아미노산 서열
44	CD244의 아미노산 서열
45	LAG3의 아미노산 서열
46	CSF1R의 아미노산 서열
47	TGFBFR1의 아미노산 서열
48	IL-10R의 아미노산 서열
49	CD40의 아미노산 서열
50	OX40의 아미노산 서열
51	41BB의 아미노산 서열
52	CTLA4의 아미노산 서열
53	PD-L1의 아미노산 서열
54	PD-L2의 아미노산 서열
55	B7-H4의 아미노산 서열
56	OX40L의 아미노산 서열
57	GITRL의 아미노산 서열
58	41BBL의 아미노산 서열
59	TL1A의 아미노산 서열
60	CD40L의 아미노산 서열
61	CD30L의 아미노산 서열
62	TRAIL의 아미노산 서열
63	CD70의 아미노산 서열
64	블랭크
65	블랭크
66	블랭크
67	블랭크
68	블랭크
69	블랭크
70	링커의 아미노산 서열 - IgG4 힌지-CH2-CH3
71	링커의 아미노산 서열 - IgG4 힌지-CH2-CH3 S228P
72	링커의 아미노산 서열 - IgG4 힌지-CH2-CD3 S228P FeRn
73	연결 링커의 아미노산
74	연결 링커의 아미노산
75	연결 링커의 아미노산
76	연결 링커의 아미노산
77	연결 링커의 아미노산
78	연결 링커의 아미노산

[0267]

[0268]

몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 (i) 서열 번호 32, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열, 및 (ii) 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62, 서열 번호 63, 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66, 서열 번호 67, 서열 번호 68, 및 서열 번호 69, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열 중 하나, 및, 임의로 (iii) 서열 번호 70, 서열 번호 71, 및 서열 번호 72, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열로부터 선택된 Ig 링커를 포함하고, 여기서, 또한 임의로, (i) 및 (ii) 중 하나 이상은 (iii)에 (iv) 서열 번호 73, 서열 번호 74, 서열 번호 75, 서열 번호 76, 서열 번호 77, 서열 번호 78의 연결 링커, 또는 이들의 변이체를 통해 연결된다. 다양한 실시형태에서, 링커(iii) 또는 (iv)는 서열 번호 23 내지 31, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열에 대해 치환될 수 있다.

[0269]

몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 (i) 서열 번호 33, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열, 및 (ii) 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62, 서열 번호 63, 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66, 서열 번호 67, 서열 번호 68, 및 서열 번호 69, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열 중 하나, 및, 임의로 (iii) 서열 번호 70, 서열 번호 71, 및 서열 번호 72, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열로부터 선택된 Ig 링커를 포함하고, 여기서, 또한 임의로, (i) 및 (ii) 중 하나 이상은

에 대해 치환될 수 있다.

- [0292] 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 서열 번호 2, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0293] 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 서열 번호 5, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0294] 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 서열 번호 7, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0295] 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 서열 번호 9, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0296] 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 서열 번호 11, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0297] 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 서열 번호 13, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0298] 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 서열 번호 15, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0299] 몇몇 실시형태에서, 본 키메라 단백질은 서열 번호 22, 또는 이에 대한 적어도 90%, 또는 93%, 또는 95%, 또는 97%, 또는 98%, 또는 99%의 동일성의 아미노산 서열을 포함한다.

[0300] **균등물**

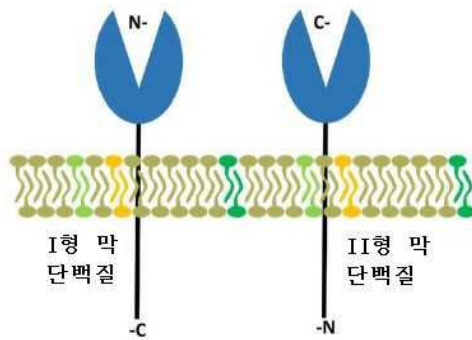
- [0301] 본 발명이 이의 구체적인 실시형태와 관련하여 기재되어 있지만, 이것이 추가의 변형을 할 수 있고, 본 발명이 속하는 분야 내에 공지된 또는 관례적인 실행 내에 있으면서, 그리고 상기 기재된 및 첨부된 청구항의 범위에서 하기하는 것처럼 본질적인 특징에 적용될 수 있으면서, 본 개시내용으로부터의 이러한 일탈을 포함하여, 일반적으로 본 발명의 원칙에 따라 본 출원이 본 발명의 임의의 변동, 용도 또는 적응을 포괄하는 것으로 의도된다고 이해될 것이다.
- [0302] 당해 분야의 숙련자는 단지 일상적 실험을 이용하여 본 명세서에 구체적으로 기재된 구체적인 실시형태에 대한 다수의 균등물을 인식하거나 확신할 수 있다. 이러한 균등물은 하기 청구항의 범위에 포함되도록 의도된다.

[0303] **참조에 의한 포함**

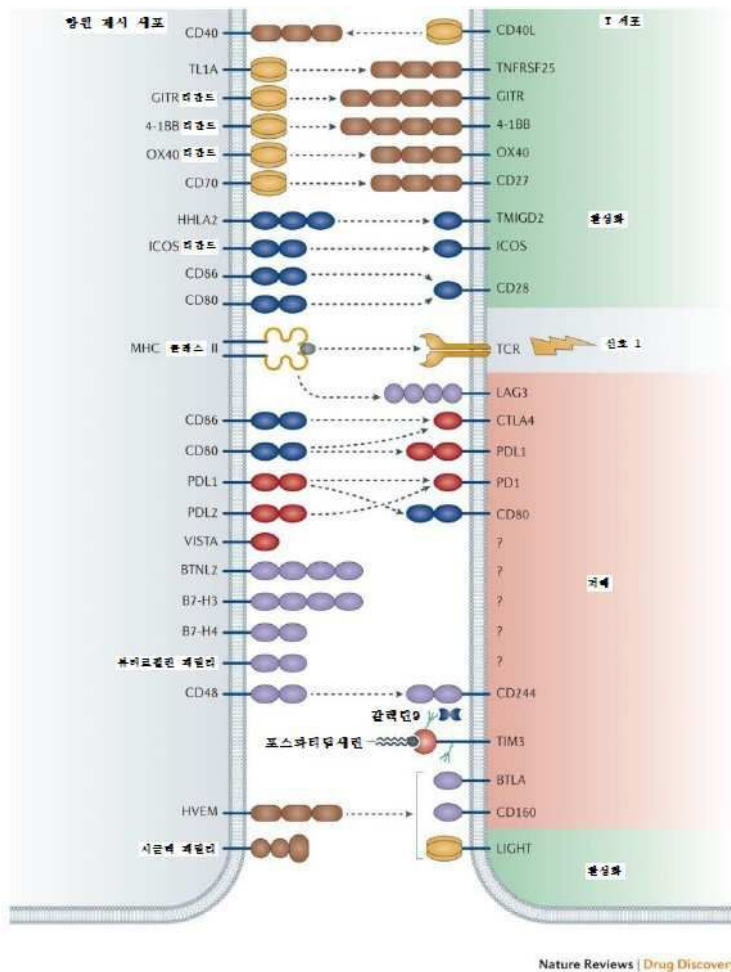
- [0304] 본 명세서에 언급된 모든 특허 및 공보는 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함된다.
- [0305] 본 명세서에 기재된 공보는 본 출원의 출원일 전에 오직 이의 개시내용에 대해 제공된다. 본 명세서에서의 어떤 것도 본 발명이 이전 발명에 의해 이러한 공개를 선행하도록 권한 부여하지 않는다는 인정으로서 해석되지 않아야 한다.
- [0306] 본 명세서에 사용된 바대로, 모든 주제는 임의의 방식으로 본 개시내용을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 임의의 개별 섹션의 내용은 모든 섹션에 동등하게 적용 가능할 수 있다.

도면

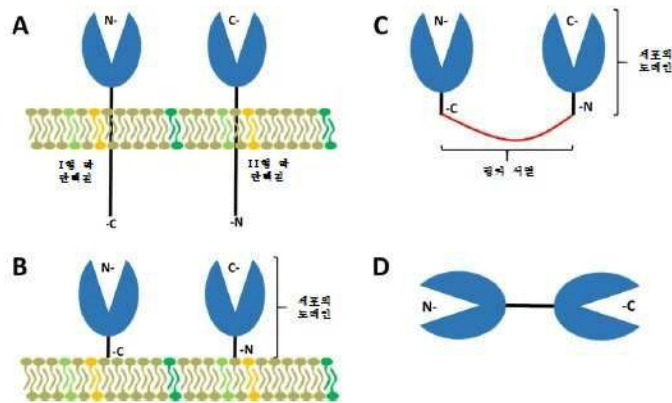
도면1



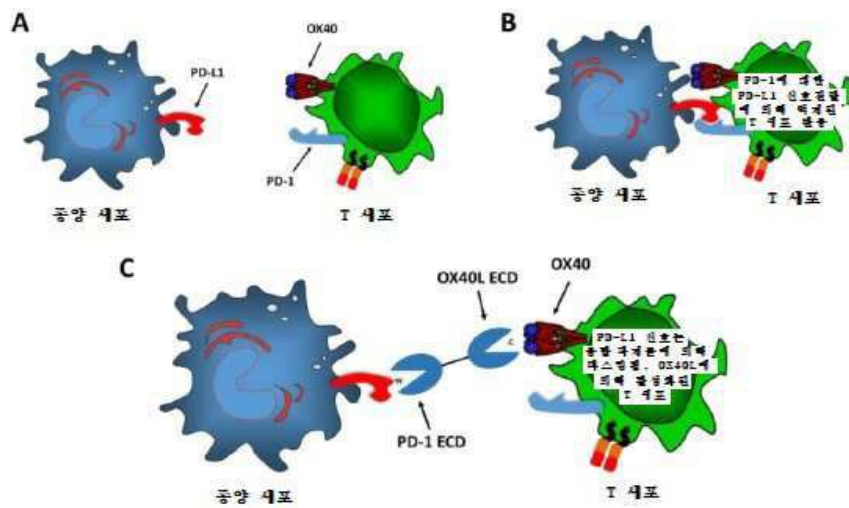
도면2



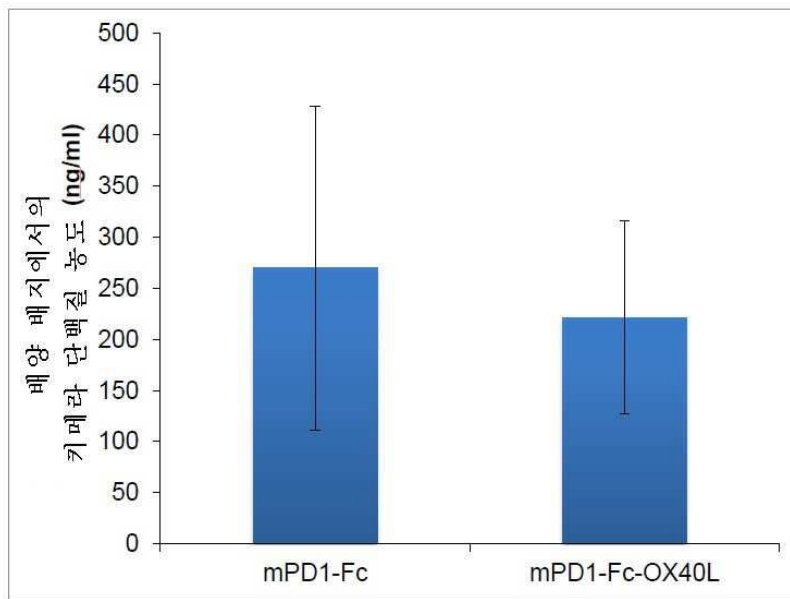
도면3



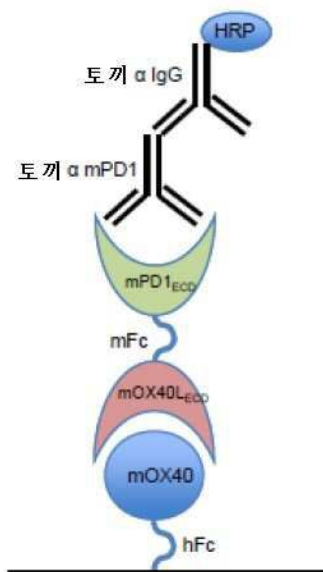
도면4



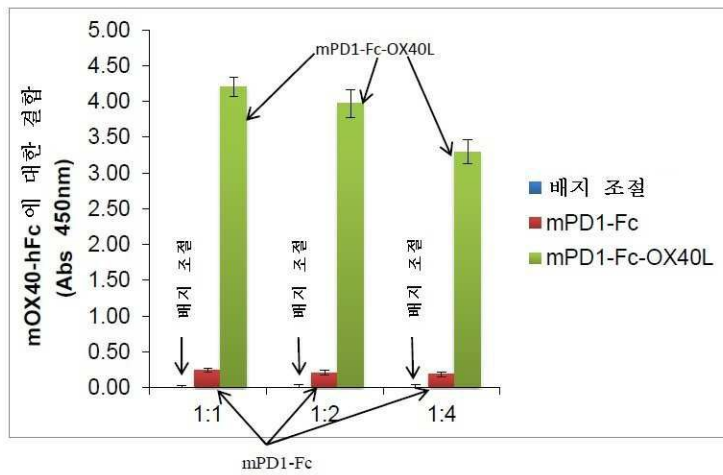
도면5



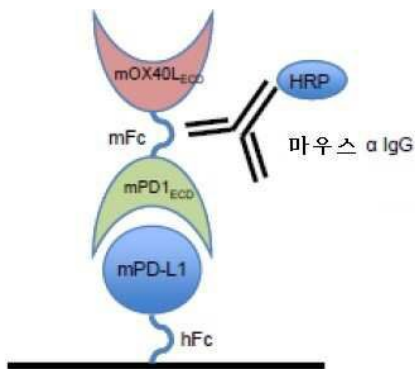
도면6a



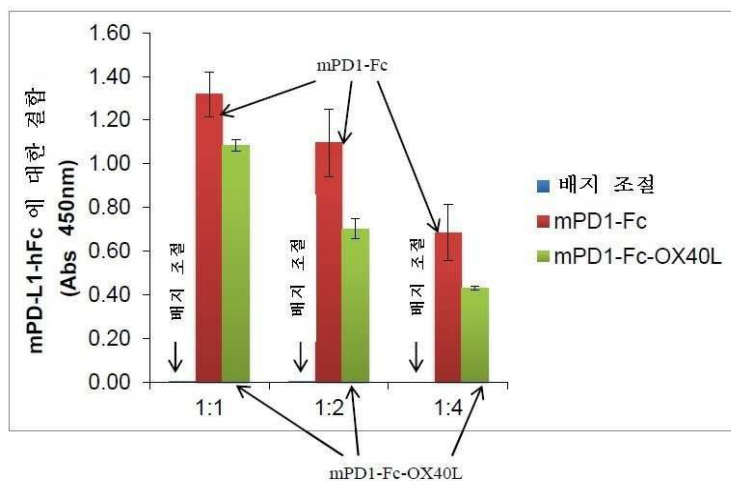
도면6b



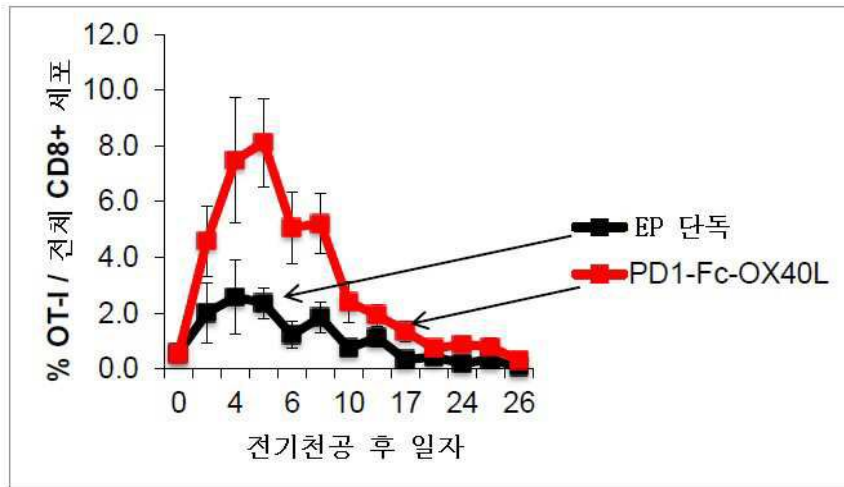
도면7a



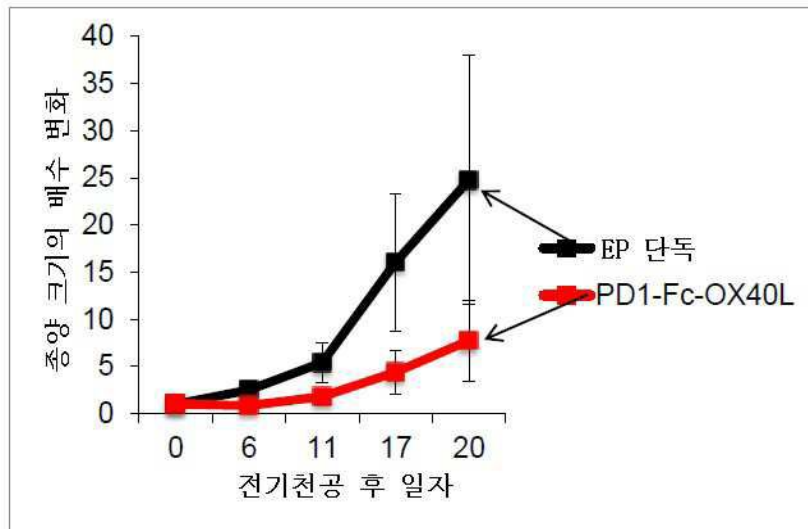
도면7b



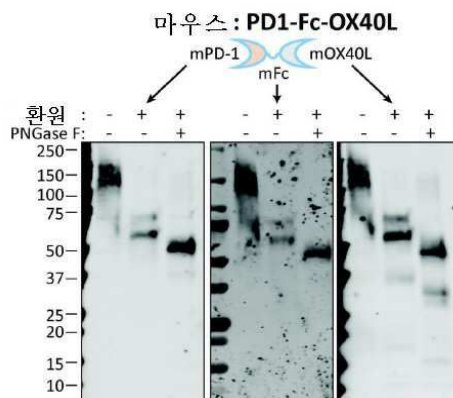
도면8



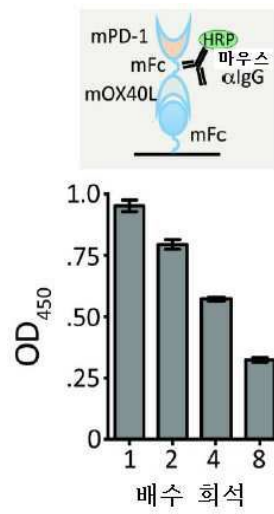
도면9



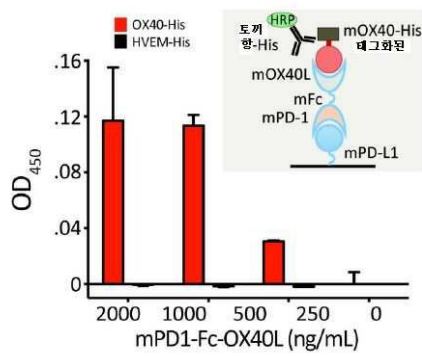
도면10a



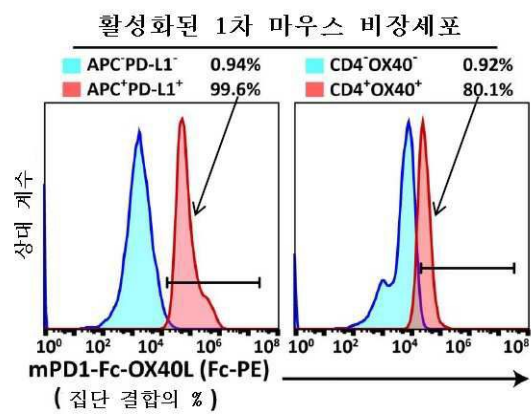
도면10b



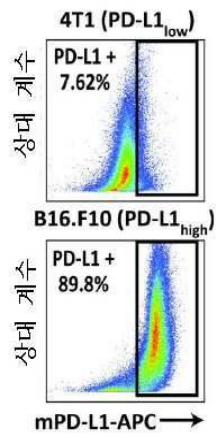
도면10c



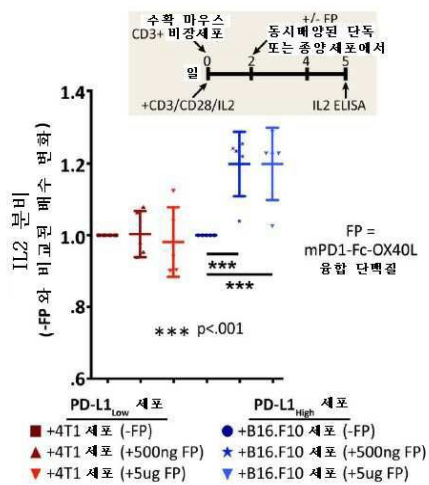
도면10d



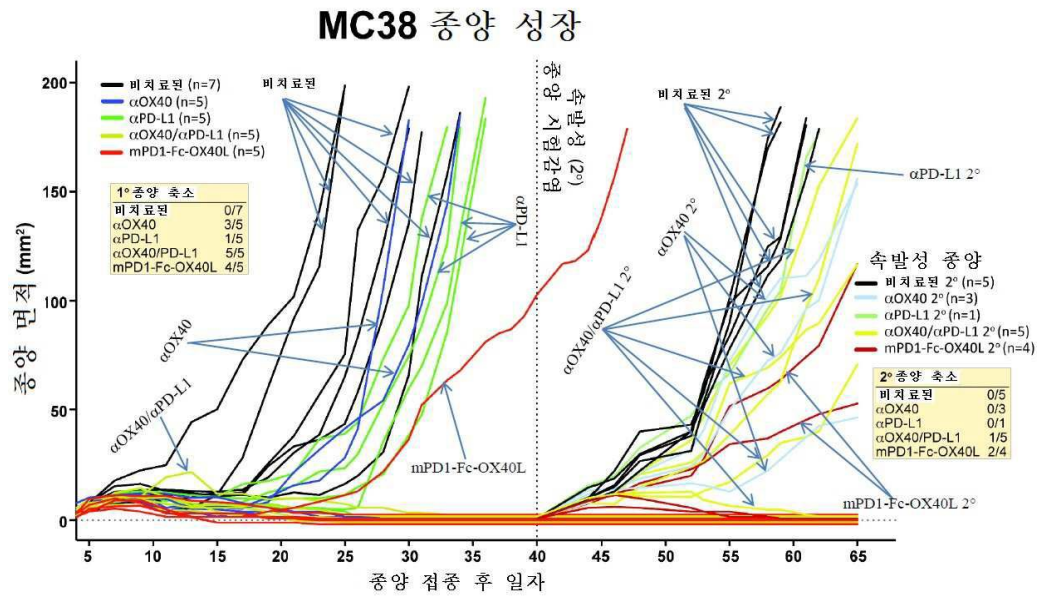
도면10e



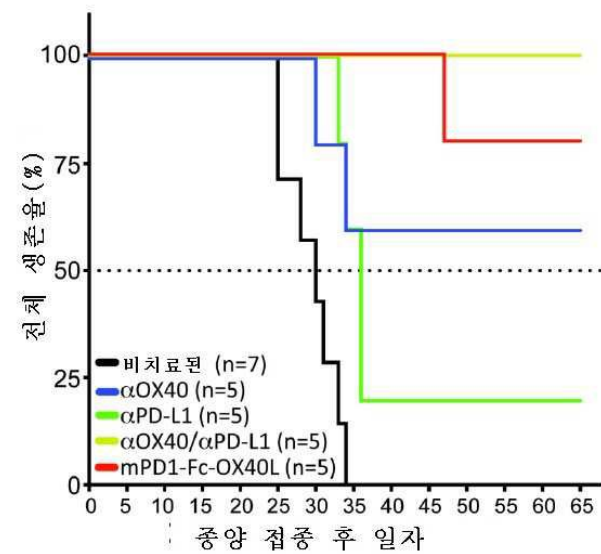
도면10f



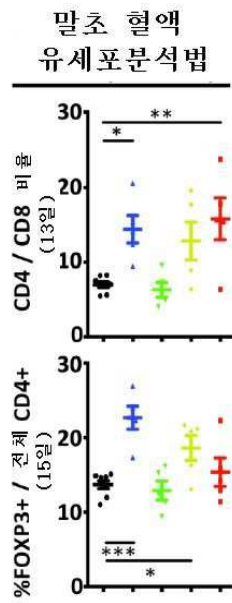
도면11a



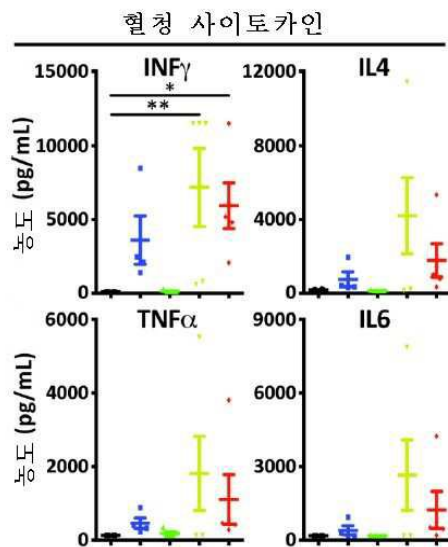
도면11b



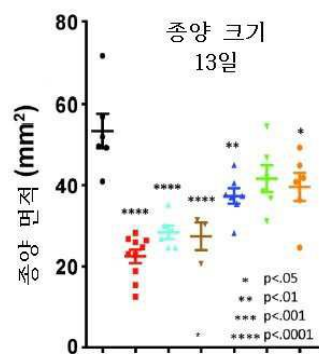
도면11c



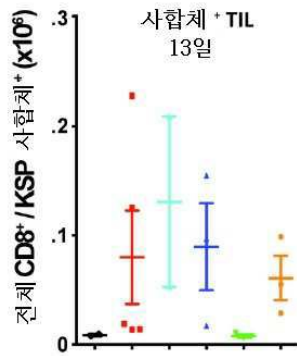
도면11d



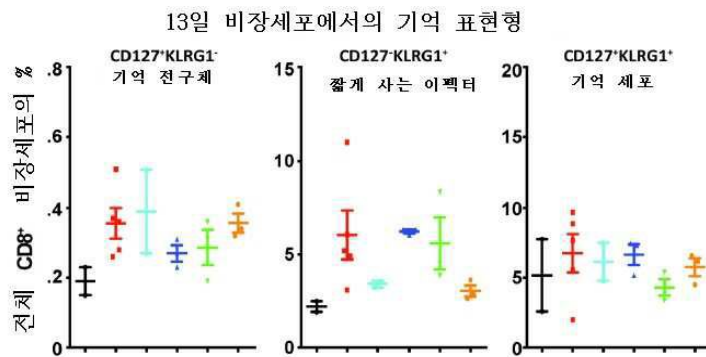
도면11e



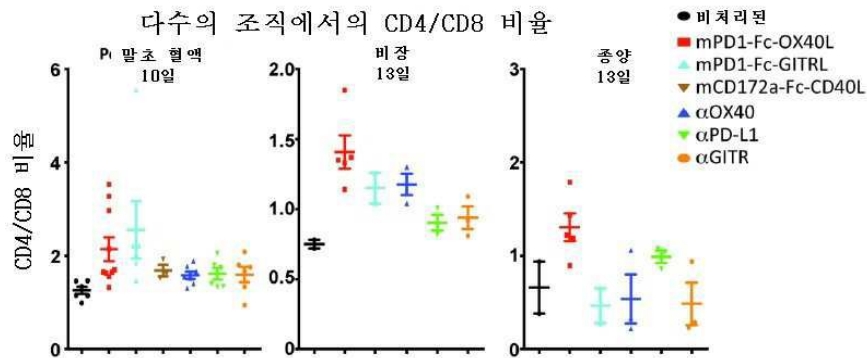
도면11f



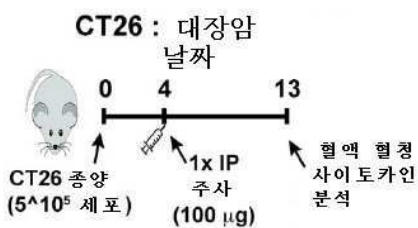
도면11g



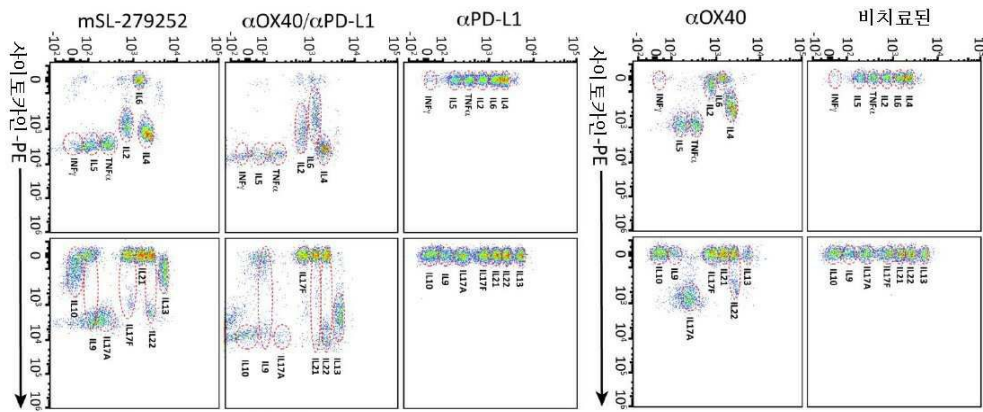
도면11h



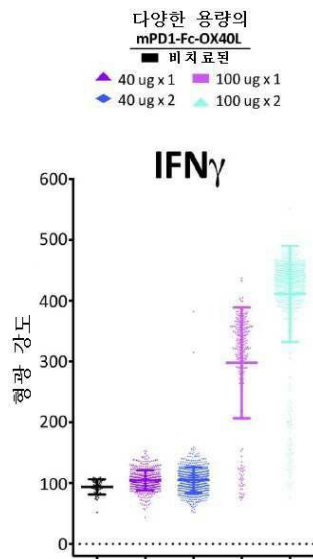
도면11i



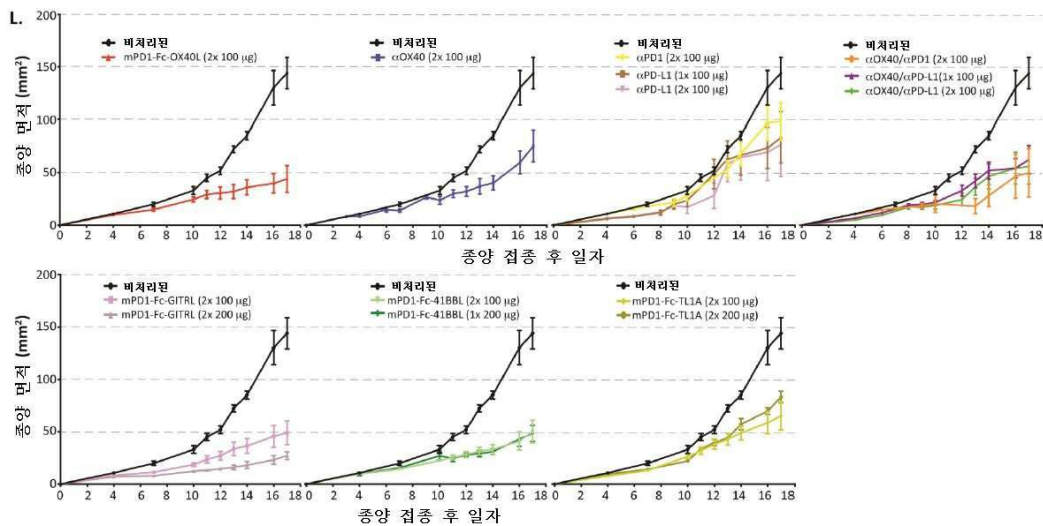
도면11j



도면11k

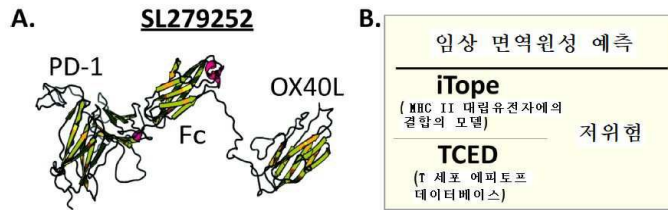


도면11l

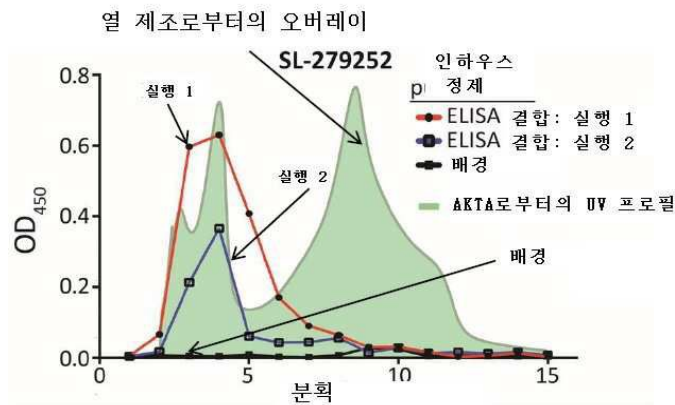


도면12

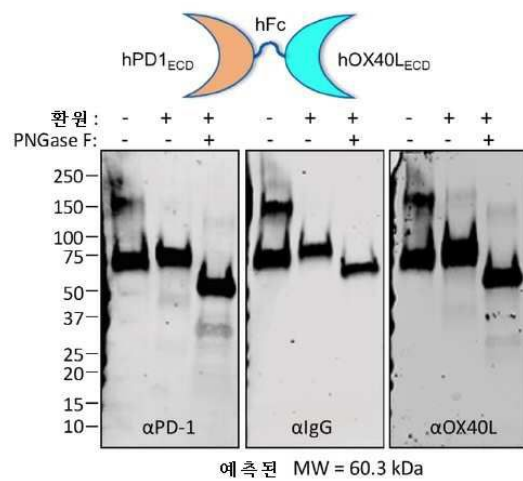
SL-279252의 예측된 구조 및 면역원성



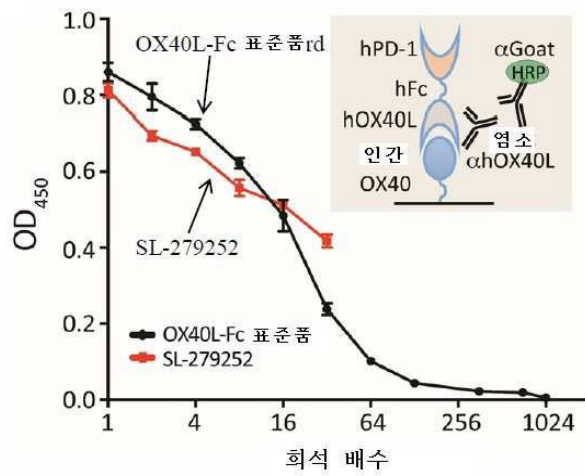
도면13a



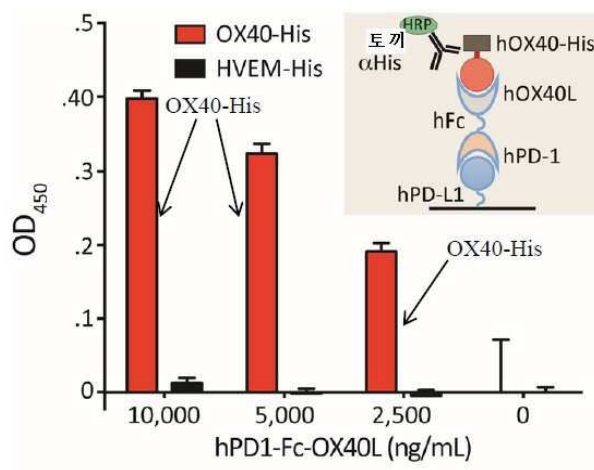
도면13b



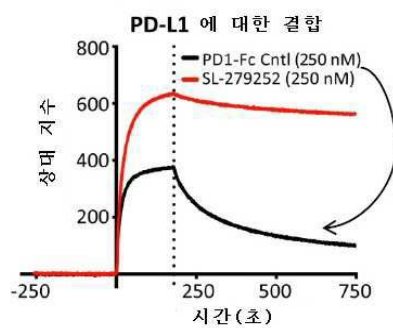
도면13c



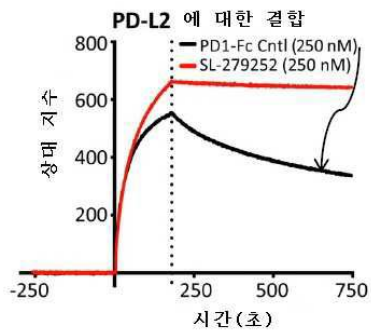
도면13d



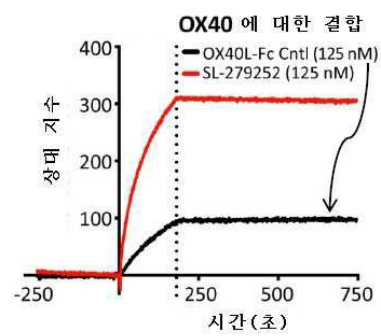
도면14a



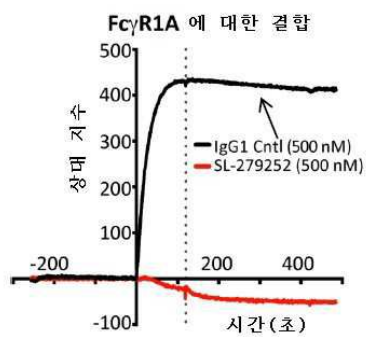
도면14b



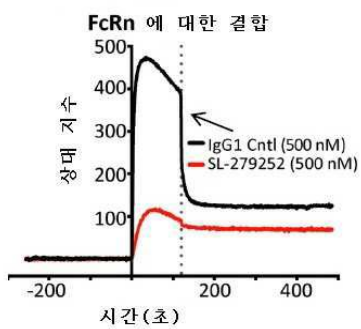
도면14c



도면14d



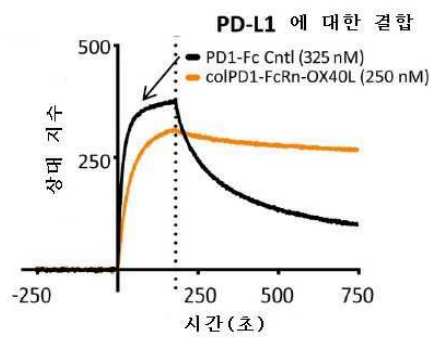
도면14e



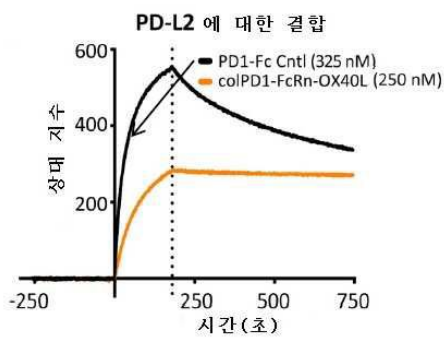
도면14f

샘플	Ka (결합속도; 1/Ms)	Kd (해리속도; 1/s)	KD (결합; M)
PD-L1			
PD1-Fc	1.25 E+6	3.32 E-3	2.67 nM
SL-279252	8.45 E+4	1.76 E-4	2.08 nM
PD-L2			
PD1-Fc	1.13 E+5	8.97 E-4	7.93 nM
SL-279252	5.40 E+4	6.70 E-5	1.24 nM
OX40			
OX40L-Fc	1.35 E+0	6.90 E-4	9.28 nM
SL-279252	7.73 E+4	1.90 E-5	.246 nM
에 대한 결합			
IgG1	2.49 E+4	4.40 E-4	17.7 nM
SL-279252	ND	ND	ND
FcRn			
IgG1	9.45 E+5	4.60 E-3	4.87 nM
SL-279252	2.55 E+5	2.34 E-3	9.17 nM

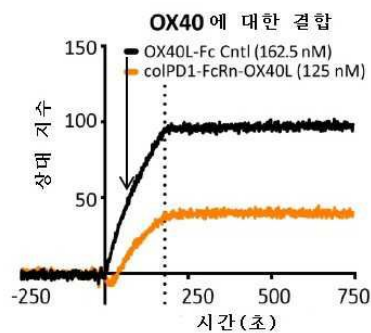
도면14g



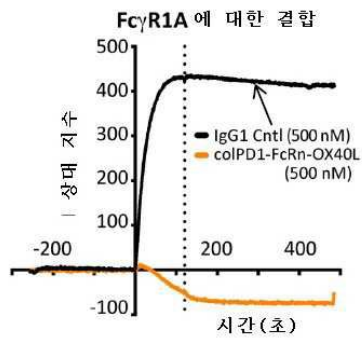
도면14h



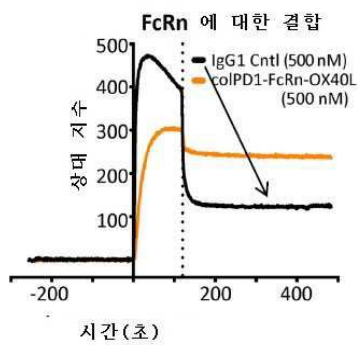
도면14i



도면14j



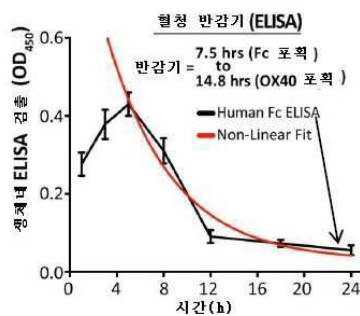
도면14k



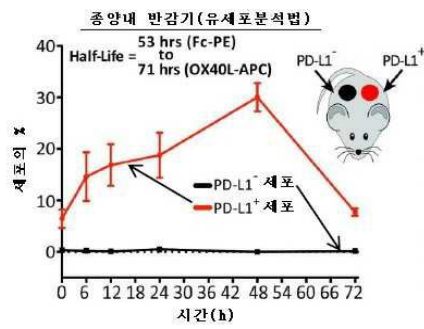
도면14l

샘플	Ka (결합속도; 1/Ms)	Kd (해리속도; 1/s)	KD (결합; M)
PD1-Fc	1.25 E+6	3.32 E-3	2.67 nM
colPD1-FcRn-OX40L	5.67 E+4	3.60 E-4	6.35 nM
PD1-Fc	1.13 E+5	8.97 E-4	7.93 nM
colPD1-FcRn-OX40L	3.74 E+4	1.01 E-4	2.69 nM
OX40L-Fc	1.35 E+0	6.90 E-4	9.28 nM
colPD1-FcRn-OX40L	1.48 E+4	1.42 E-4	9.61 nM
IgG1	2.49 E+4	4.40 E-4	17.7 nM
colPD1-FcRn-OX40L	ND	ND	ND
IgG1	9.45 E+5	4.60 E-3	4.87 nM
colPD1-FcRn-OX40L	2.33 E+5	5.85 E-4	2.51 nM

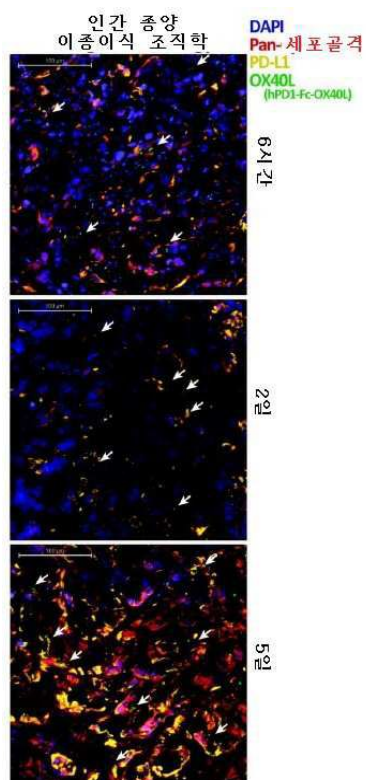
도면14m



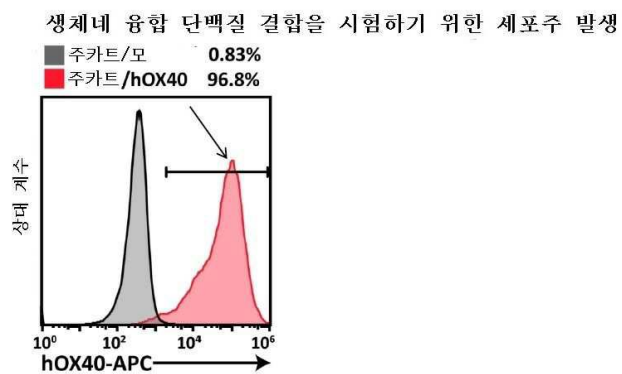
도면14n



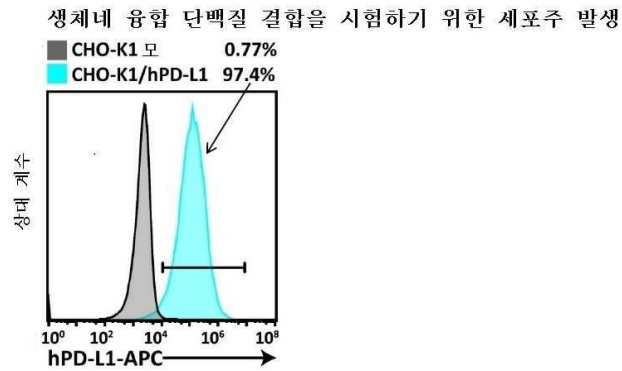
도면14o



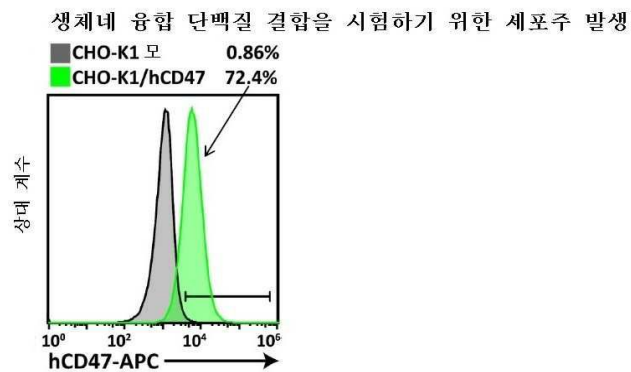
도면15a



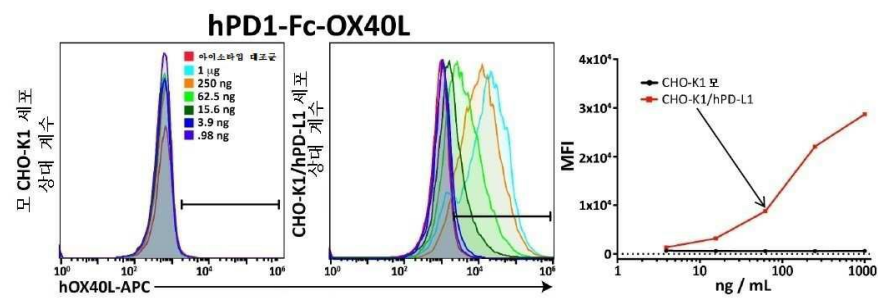
도면15b



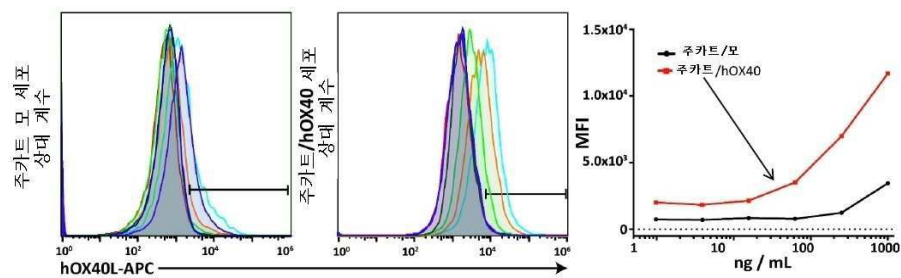
도면15c



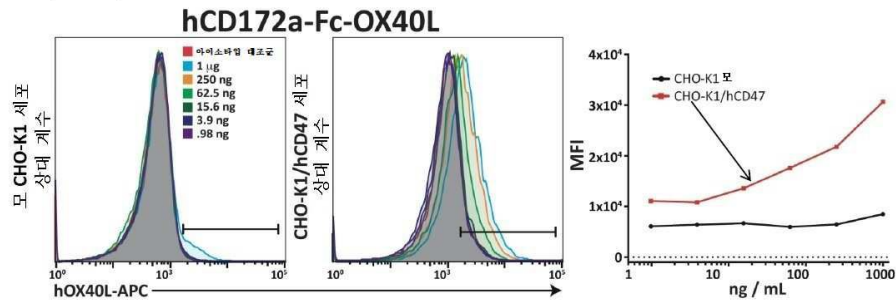
도면15d



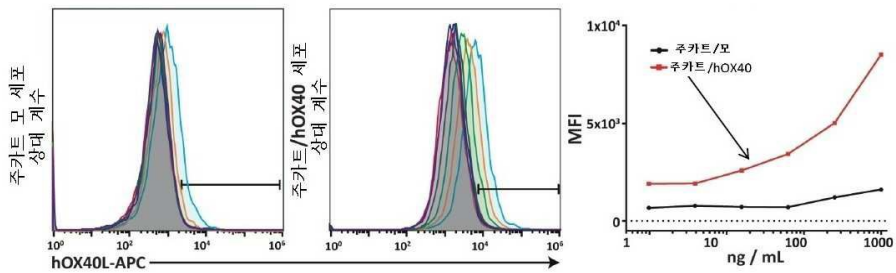
도면15e



도면15f

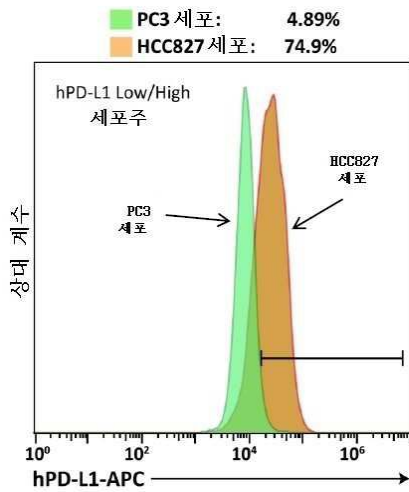


도면15g



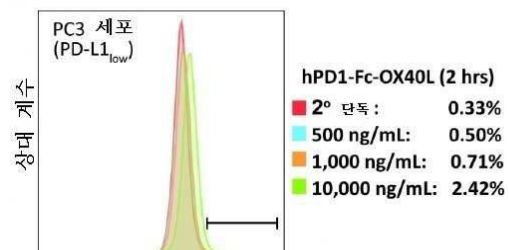
도면15h

PD-L1 발현 세포에 대한 생체내 인간 SL-279252 결합



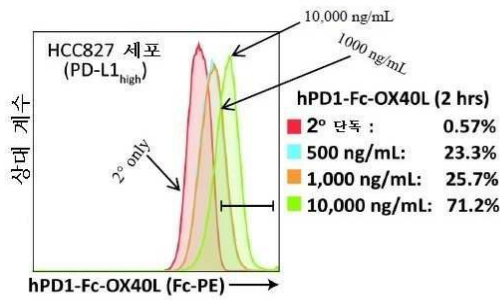
도면15i

PD-L1 발현 세포에 대한 생체내 인간 SL-279252 결합

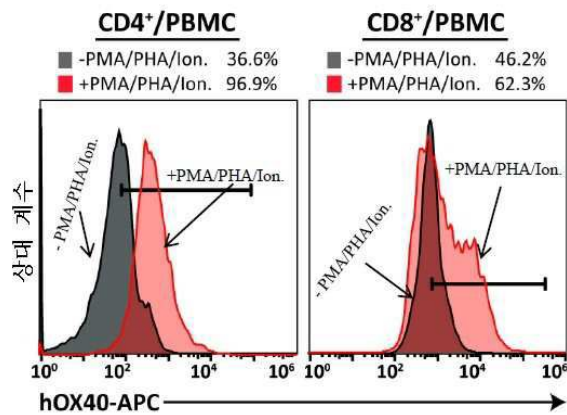


도면15j

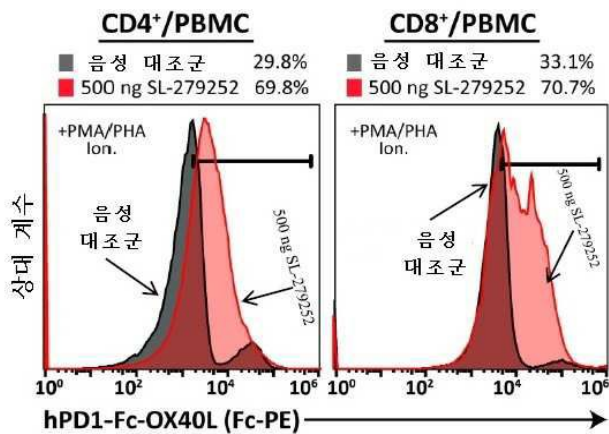
PD-L1 발현 세포에 대한 생체내 인간 SL-279252 결합



도면16a



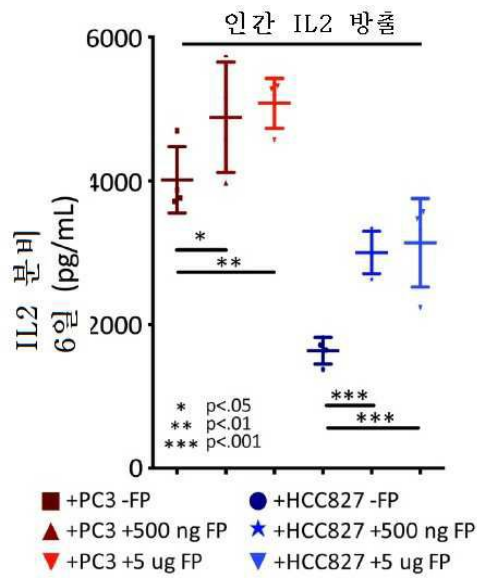
도면16b



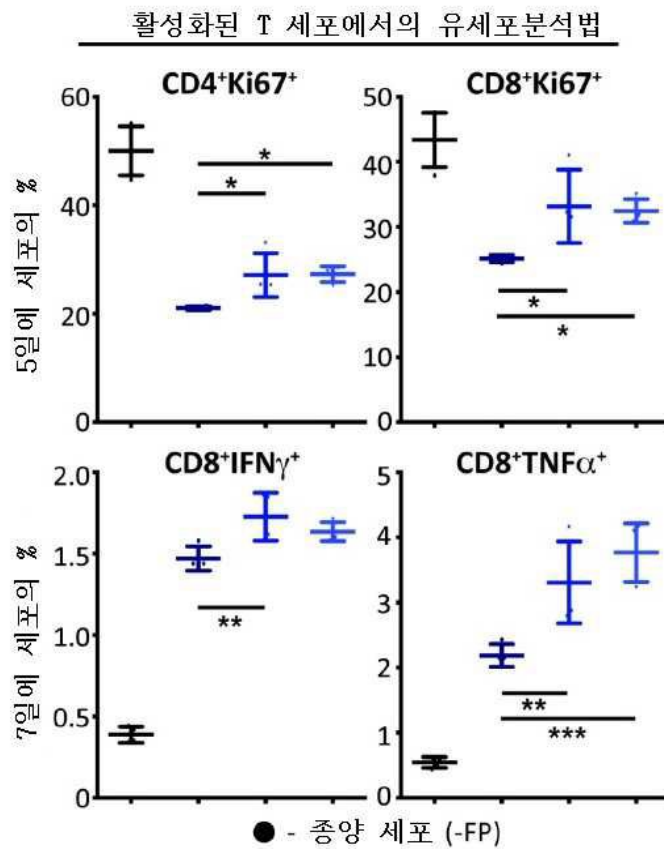
도면16c



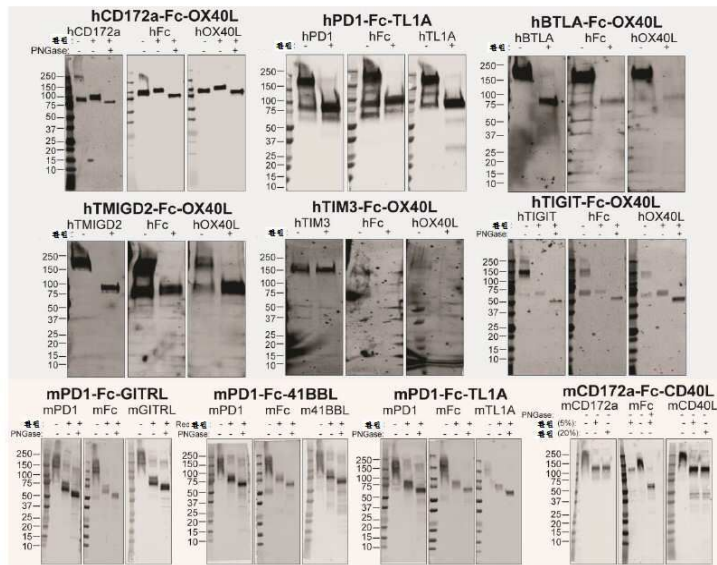
도면16d



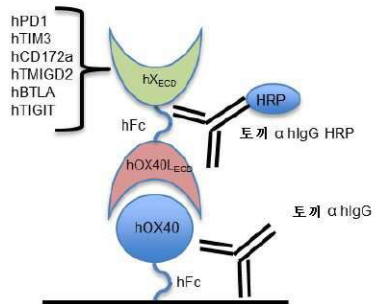
도면16e



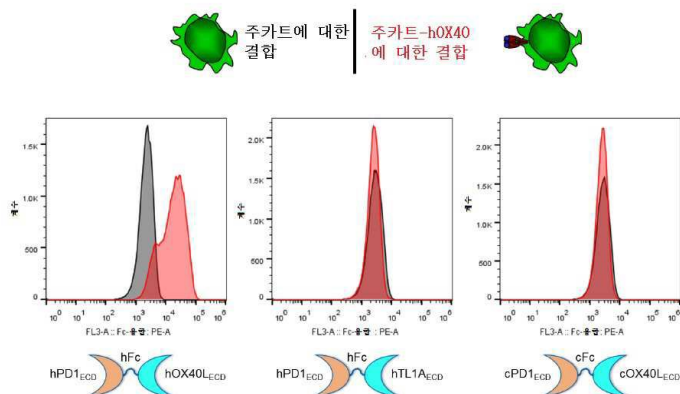
도면17a



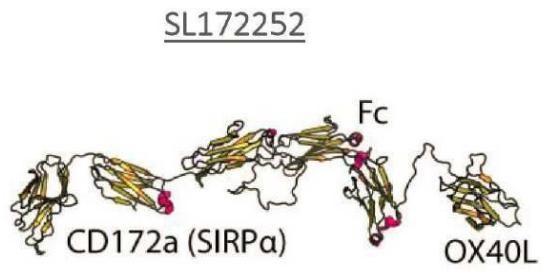
도면17b



도면17c



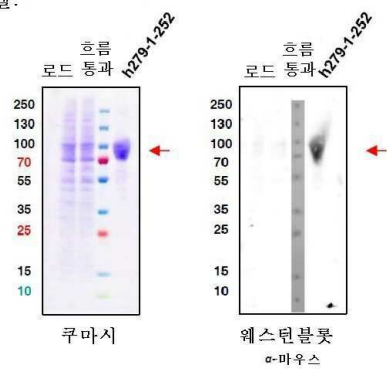
도면17d



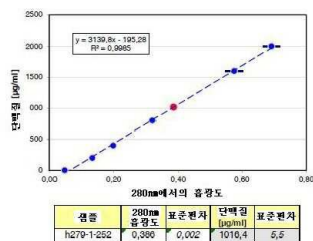
도면17e

SL-279252의 예시적인 정제

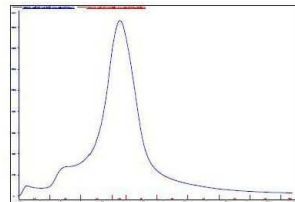
쿠마시-겔:



정량화: BGG 표준 곡선



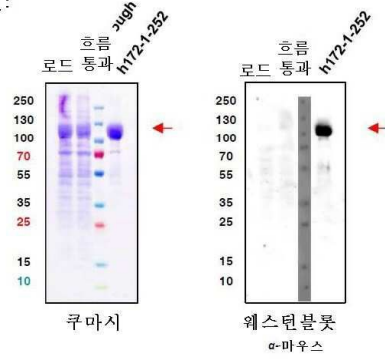
용리 프로파일:



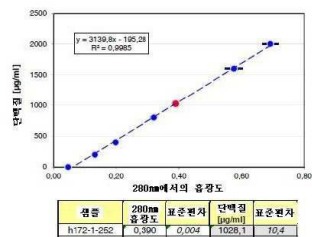
도면17f

인간 CD172a-Fc-OX40L 의 예시적인 정제

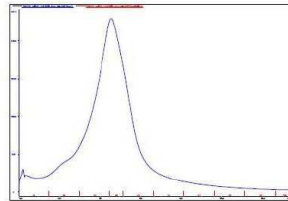
쿠마시-겔:



정량화: BGG 표준 곡선



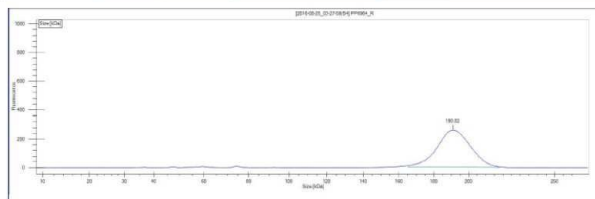
용리 프로파일:



도면17g

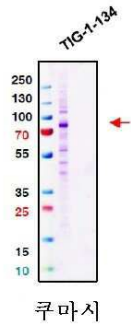
CD172a-Fc-CD40L 의 예시적인 정제 실행

단백질 명칭	m172154
로트 번호	6964-839176
소광 계수 (농도 계수에 사용됨)	1.11 mg/mL ⁻¹ cm ⁻¹
단백질 농도	0.22 mg/mL
용적	1.40 mL
전체 단백질	0.30 mg
내독소	비측정됨
물리적 상태	액체

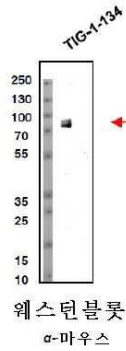


도면17h

인간 TIGIT-Fc-OX40L 의 예시적인 정제
쿠마시-겔:

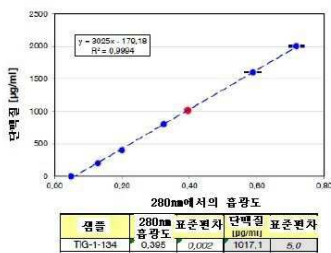


쿠마시

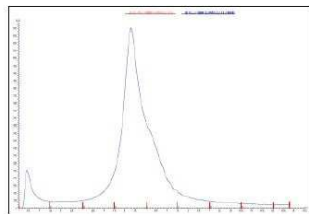


웨스턴블롯
α-마우스

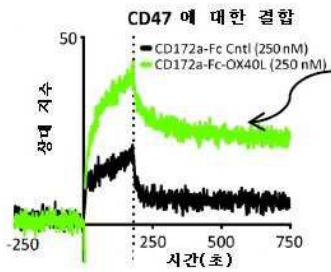
정량화: BGG 표준 곡선



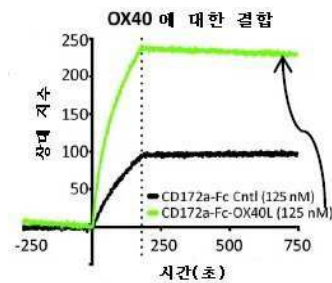
용리 프로파일:



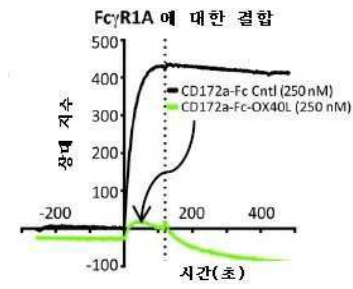
도면17i



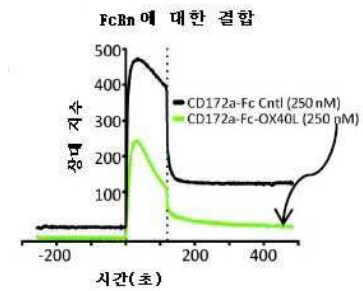
도면17j



도면17k



도면17l



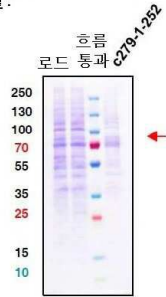
도면17m

FcRn FcγR1A OX40 CD47 에 대한 결합 요약	샘플	Ka (결합속도; 1/Ms)	Kd (해리속도; 1/s)	KD (결합; M)
	CD172a-Fc	7.56 E+5	2.39 E-3	3.16 nM
	CD172a-Fc-OX40L	2.42 E+5	8.61 E-4	3.59 nM
	OX40L-Fc	1.35 E+0	6.90 E-4	9.28 nM
	CD172a-Fc-OX40L	6.39 E+4	5.55 E-5	.869 nM
	IgG1	2.49 E+4	4.40 E-4	17.7 nM
	CD172a-Fc-OX40L	ND	ND	ND
	IgG1	9.45 E+5	4.60 E-3	4.87 nM
	CD172a-Fc-OX40L	9.56 E+3	7.56 E-3	790 nM

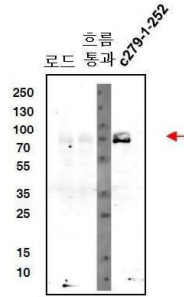
도면17n

개과 PD1-Fc-OX40L 의 예시적인 정제 실행

쿠마시-겔:

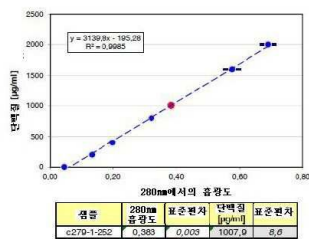


쿠마시

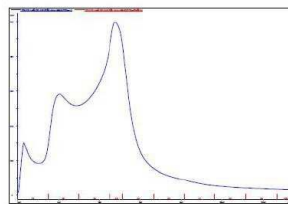


웨스턴블롯
α-마우스

정량화: BGG 표준 곡선



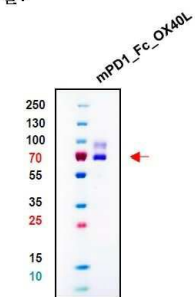
용리 프로파일:



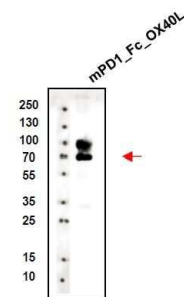
도면17o

마우스 PD1-Fc-OX40L 의 예시적인 정제 실행

쿠마시-겔:

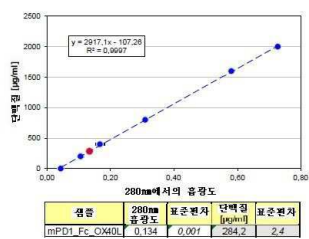


쿠마시

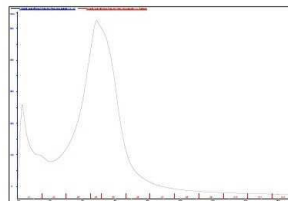


웨스턴블롯
α-마우스

정량화: BGG 표준 곡선



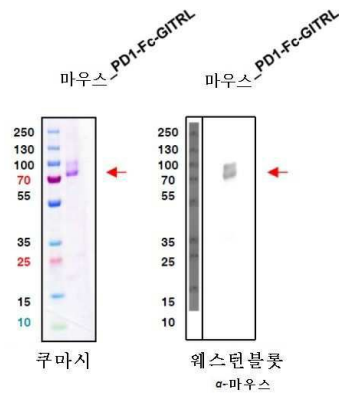
용리 프로파일:



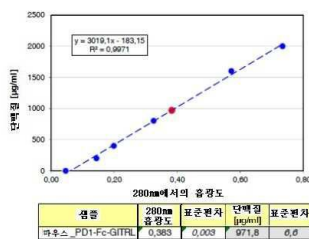
도면17p

마우스 PD1-Fc-GITRL 의 예시적인 정제 실행

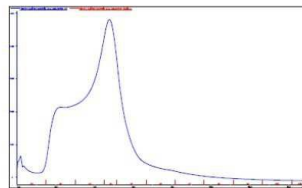
쿠마시-겔:



정량화: BGG 표준 곡선



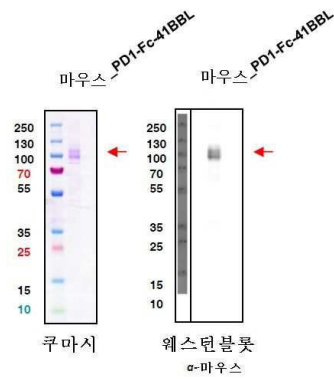
용리 프로파일:



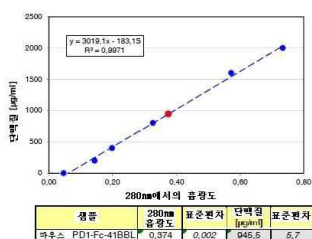
도면17q

마우스 PD1-Fc-41BBL 의 예시적인 정제 실행

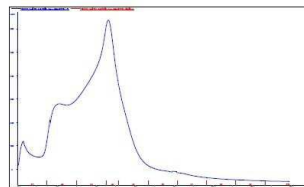
쿠마시-겔:



정량화: BGG 표준 곡선



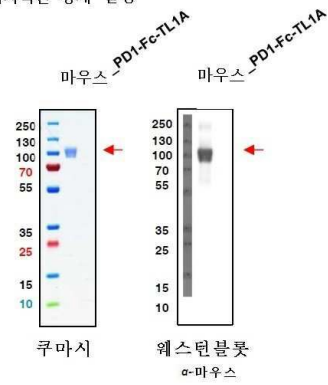
용리 프로파일:



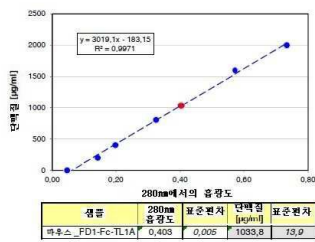
도면17r

마우스 PD1-Fc-TL1A 의 예시적인 정제 실행

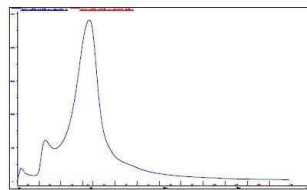
쿠마시-겔:



정량화: BGG 표준 곡선



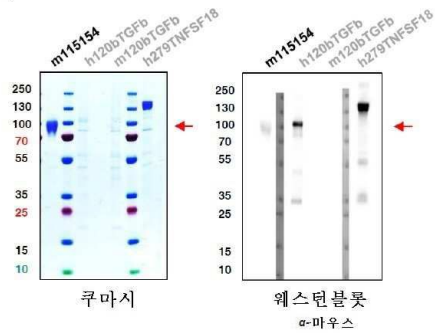
용리 프로파일:



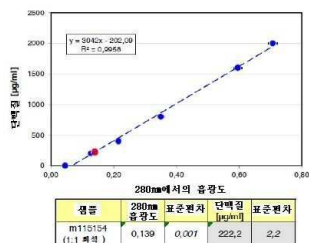
도면17s

CD115-Fc-CD40L 의 예시적인 정제 실행 -

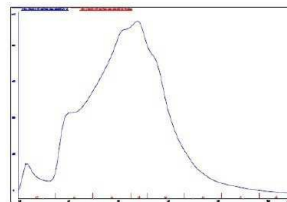
쿠마시-겔:



정량화: BGG 표준 곡선



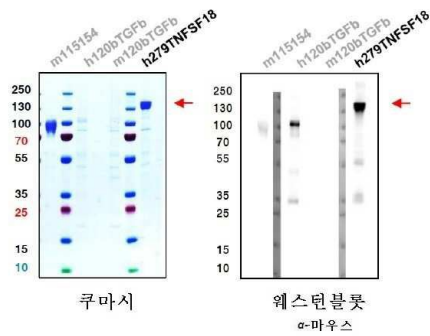
용리 프로파일:



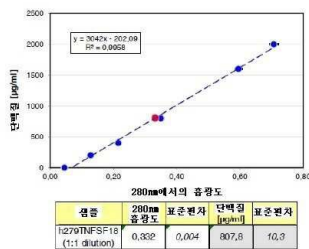
도면17t

인간 PD1-Fc-GITRL 의 예시적인 정제 실험

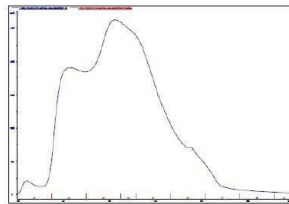
쿠마시-겔:



정량화: BGG 표준 곡선



용리 프로파일:



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Heat Biologics, Inc.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR ADJOINING TYPE I AND TYPE II
EXTRACELLULAR DOMAINS AS HETEROLOGOUS CHIMERIC PROTEINS

<130> WO2017/059168

<140> PCT/US2016/054598

<141> 2016-09-30

<150> US 62/235,727

<151> 2015-10-01

<150> US 62/263,313

<151> 2015-12-04

<150> US 62/372,574

<151> 2016-08-09

<160> 78

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1605

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 1

atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg	60
ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccttgggaacc cccccacctt ctccccagcc	120
ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg	180
gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc	240
gccttccccg aggaccgcag ccagcccgcc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg	300
cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcaggggccc ggcgcaatga cagcggcacc	360
tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca	420
gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgccacag cccacccag cccctcaccc	480
aggccagccg gccatttcca atctaagtac ggccctccct gccctagctg tcccggccct	540
gaatttctgg gcggaccctc cgtgtttctg tccccccaa agcccaagga caccctgatg	600
atcagccgga cccccgaagt gacctgtgtg gtggtggatg tgtcccagga agatcccag	660
gtgcagtcca attggtacgt ggacgggggtg gaagtgcaca acgccaagac caagcccaga	720
gaggaacagt tcaacagcac ctaccgggtg gtgtctgtgc tgaccgtgct gcaccaggat	780
tggctgagcg gcaaagagta caagtgaag gtgtccagca agggcctgcc cagcagcatc	840
gaaaagacca tcagcaacgc caccggccag cccaggaac cccaggtgta cacactgccc	900
cctagccagg aagagatgac caagaaccag gtgtccctga catgcctcgt gaagggttc	960
taccctccg atatgccgt ggaatgggag agcaacggcc agccagagaa caactacaag	1020
accaccccc cagtgtcga cagcgacggc tcattcttcc tgtactccc gctgacagtg	1080
gacaagagca gctggcagga aggcaactg ttcagctgca gcgtgatgca cgaagccctg	1140
cacaaccact acaccagaa gtccctgagc ctgtccctgg gcaaaataga gggacgaatg	1200
gaccaggtat cacatcggtg tcctcgaatt caaagtatca aagtacaatt taccgaatat	1260
aagaaggaga aaggtttcat cctcacttcc caaaaggagg atgaaatcat gaaggtgcag	1320
aacaactcag tcatcatcaa ctgtgatggg ttttatctca tctccctgaa gggctacttc	1380
tcccaggaag tcaacattag ccttcattac cagaaggatg aggagccct cttccaactg	1440
aagaaggtca ggtctgtcaa ctcttctgat gtggcctctc tgacttacaa agacaaagtc	1500
tacttgaatg tgaccactga caatacctcc ctggatgact tccatgtgaa tggcggagaa	1560
ctgattctta tccatcaaaa tcctgggtgaa ttctgtgtcc tttga	1605

<210> 2

<211> 534

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 2

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp

20 25 30

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

35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val

50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala

65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg

85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg

100 105 110

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

115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val

130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro

145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser

165 170 175

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

180 185 190

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

195	200	205	
Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn			
210	215	220	
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg			
225	230	235	240
Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val			
245	250	255	
Leu His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser			
260	265	270	
Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr			
275	280	285	
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu			
290	295	300	
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe			
305	310	315	320
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
325	330	335	
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe			
340	345	350	
Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly			
355	360	365	
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr			
370	375	380	
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met			
385	390	395	400
Asp Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln			
405	410	415	
Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys			
420	425	430	
Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys			
435	440	445	

Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val
 450 455 460
 Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu
 465 470 475 480
 Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr
 485 490 495
 Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp
 500 505 510

Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro
 515 520 525
 Gly Glu Phe Cys Val Leu
 530

<210> 3

<211> 1782

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 3

atgcagattc ctcaggcccc ttggcctgtc gtgtgggctg tgctgcagct gggatggcgg	60
cctggctgggt ttctggacac ccccgacaga ccttgaacc cccctacatt tccccctgcc	120
ctgctggctc tgaccgaggg cgacaatgcc accttcacct gtagcttcag caacaccagc	180
gagagcttcg tgctgaactg gtacagaatg agccccagca accagaccga caagctggcc	240
gccttccccg aggatagatc tcagcccgcc caggactgcc ggctcagagt gaccagctg	300
cccaacggcc gggacttcca catgtctgtc gtgcgggcca gacggaacga cagcggcaca	360
tatctgtgcg gcgccatcag cctggcccc aagggccaga tcaaagagag cctgagagcc	420
gagctgagag tgaccgagag aagggccgaa gtgcctaccg cccaccctag cccatctcca	480
agacctgccg gccagttcca gtctaagtac ggccctcctt gcccagctg tccgcccct	540
gaatttctgg gcggaccag cgtgttctg tccccccaa agcccaagga caccctgatg	600
atcagccgga cccccaagt gacctgcgtg gtggtggatg tgtcccagga agatcccag	660
gtgcagtcca attggtacct ggacggcgtg gaagtgcaca acgccaagac caagcccaga	720
gaggaacagt tcaacagcac ctaccgggtg gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggat	780
tggctgagcg gcaaagagta caagtgaag gtgtccagca agggcctgcc cagcagcatc	840

gagaaaacca tcagcaacgc caccggccag cccagggaac cccaggtgta cacactgccc 900
cctagccagg aagagatgac caagaaccag gtgtccctga cctgtctcgt gaagggttc 960
taccctccg atatgccgt ggaatgggag agcaacggcc agcctgagaa caactacaag 1020

accaccccc cagtgtgga cagcgacggc tcatttttcc tgtactccag actgaccgtg 1080
gacaagacga gctggcagga aggcaactg ttcagctgct ccgtgatgca cgaggccctg 1140
cacaaccact acaccagaa gtccctgtct ctgagcctgg gcaagatcga gggccggatg 1200
gatagagccc agggcgaagc ctgctgacag ttccaggctc tgaaggcca ggaattcgcc 1260
cccagccacc agcaggtgta cgccctctg agagctgacg gcgacaagcc tagagcccac 1320
ctgacagtgc tgcggcagac ccctaccag cacttcaaga atcagttccc agccctgcac 1380
tgggagcacg agctgggcct ggccttcacc aagaacagaa tgaactacac caacaagttt 1440

ctgctgatcc ccgagagcgg cgactacttc atctacagcc aagtgacctt ccggggcatg 1500
accagcgagt gcagcgagat cagacaggcc ggcagacctt acaagcccga cagcatcacc 1560
gtcgtgatca ccaaagtac cgacagctac cccgagccca cacagctgct gatgggcacc 1620
aagagcgtgt gcgaagtggg cagcaactgg ttccagccca tctacctggg cgccatgttc 1680
agtctgcaag agggcgataa gctgatggtc aacgtgtccg acatctccct ggtggattac 1740
accaaagagg acaagacctt cttcggcgcc tttctgtct ga 1782

<210> 4

<211> 1782

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 4

atgcagatcc cacaggcgc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggtggcgg 60
ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccttggaacc cccccacctt ctcccagcc 120
ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacateg 180
gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240
gccttcccc aggaccgcag ccagcccgcc caggactgcc gcttcctgt cacacaactg 300
cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcaggcccc ggcgcaatga cagcggcacc 360
tacctctgtg gggccatctc cctggcccc aaggcgaga tcaaagagag cctgcgggca 420

gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccacccag cccctcacc 480
aggccagccg gccattcca atctaagtac ggccctccct gccctagctg tcccgcctt 540

gaattttctgg gcggaccctc cgtgtttctg tccccccaa agcccaagga caccctgatg 600
atcagccgga cccccgaagt gacctgtgtg gtggtggatg tgtcccagga agatcccag 660
gtgcagttca atttggtacgt ggacgggggtg gaagtgcaca acgccaagac caagcccaga 720
gaggaacagt tcaacagcac ctaccgggtg gtgtctgtgc tgaccgtgct gcaccaggat 780
tggctgagcg gcaaagagta caagtgcag gtgtccagca agggcctgcc cagcagcatc 840

gaaaagacca tcagcaacgc caccggccag cccaggaac cccaggtgta cacactgccc 900
cctagccagg aagagatgac caagaaccag gtgtccctga catgcctcgt gaagggttc 960
taccctccg atatcgccgt ggaatgggag agcaacggcc agccagagaa caactacaag 1020
accaccccc cagtgtgga cagcgacggc tcattcttcc tgtactccg gctgacagtg 1080
gacaagagca gctggcagga aggcaacgtg ttcagctgca gcgtgatgca cgaagccctg 1140
cacaaccact acaccagaa gtccctgagc ctgtccctgg gcaaaataga gggacgaatg 1200
gaccgggccc agggagaggc ctgtgtgcag ttccaggctc taaaaggaca ggagtttgca 1260

ccttcacatc agcaagtta tgcacctctt agagcagacg gagataagcc aagggcacac 1320
ctgacagttg tgagacaaac tccacacag cactttaaaa atcagttccc agctctgcac 1380
tggaacatg aactaggcct ggccttcacc aagaaccgaa tgaactatac caacaaattc 1440
ctgtgatcc cagagtcggg agactacttc atttactccc aggtcacatt ccgtgggatg 1500
acctctgagt gcagtgaat cagacaagca ggccgaccaa acaagccaga ctccatcact 1560
gtggtcatca ccaaggtaac agacagctac cctgagccaa cccagctcct catggggacc 1620
aagtctgtat gcgaagtagg tagcaactgg ttccagccca tctacctcg agccatgttc 1680

tccttgcaag aaggggacaa gctaattgtg aacgtcagt acatctcttt ggtggattac 1740
acaaaagaag ataaaacctt ctttgagacc ttcttactat ag 1782

<210> 5

<211> 593

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 5

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp

20 25 30

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

 Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
 100 105 110
 Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
 115 120 125
 Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
 130 135 140
 Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
 145 150 155 160

 Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser
 165 170 175
 Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 180 185 190
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 195 200 205
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 210 215 220

 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 225 230 235 240
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 245 250 255
 Leu His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 260 265 270
 Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr

275 280 285
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 290 295 300
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 305 310 315 320
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 325 330 335
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 340 345 350

 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly
 355 360 365
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 370 375 380
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met
 385 390 395 400
 Asp Arg Ala Gln Gly Glu Ala Cys Val Gln Phe Gln Ala Leu Lys Gly
 405 410 415

 Gln Glu Phe Ala Pro Ser His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg Ala
 420 425 430
 Asp Gly Asp Lys Pro Arg Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr Pro
 435 440 445
 Thr Gln His Phe Lys Asn Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His Glu
 450 455 460
 Leu Gly Leu Ala Phe Thr Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe
 465 470 475 480

 Leu Leu Ile Pro Glu Ser Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Val Thr
 485 490 495
 Phe Arg Gly Met Thr Ser Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala Gly Arg
 500 505 510
 Pro Asn Lys Pro Asp Ser Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr Asp
 515 520 525

Ser Tyr Pro Glu Pro Thr Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val Cys
530 535 540

Glu Val Gly Ser Asn Trp Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe
545 550 555 560

Ser Leu Gln Glu Gly Asp Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser
565 570 575

Leu Val Asp Tyr Thr Lys Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu
580 585 590

Leu

<210> 6

<211> 1554

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400

> 6

atgaagacat tgcttgccat gcttggaact gggaaattat tttgggtctt cttcttaatc 60
ccatatctgg acatctggaa catccatggg aaagaatcat gtgatgtaca gctttatata 120
aagagacaat ctgaacactc catcttagca ggagatccct ttgaactaga atgcctgtg 180
aaatactgtg ctaacaggcc tcatgtgact tggtgcaagc tcaatggaac aacatgtgta 240
aaacttgaag atagacaaac aagttggaag gaagagaaga acatttcatt ttcatctta 300
cattttgaac cagtgtctcc taatgacaat gggtcatacc gctgttctgc aaattttcag 360
tctaattcct ttgaaagcca ctcaacaact ctttatgtga cagatgtaaa aagtcctca 420

gaacgaccct ccaaggacga aatggcaagc tctaagtacg gccctccctg ccctagctgt 480
cccgccctg aatttctggg cggaccctcc gtgtttctgt tcccccaaa gcccaaggac 540
accctgatga tcagccggac ccccgaaagt accctgtgtg tgggtgatgt gtcccaggaa 600
gatcccaggg tgcagttcaa ttggtacgtg gacggggtgg aagtgcacaa cgccaagacc 660
aagcccagag aggaacagtt caacagcacc taccgggtgg tgtctgtgct gaccgtgctg 720
caccaggatt ggctgagcgg caaagagtac aagtgaagg tgtccagcaa gggcctgccc 780
agcagcatcg aaaagaccat cagcaacgcc accggccagc ccagggaacc ccaggtgtac 840

acactgcccc ctagccagga agagatgacc aagaaccagg tgtccctgac atgcctcgtg 900

aagggttctt acccctccga tatcgccgtg gaatgggaga gcaacggcca gccagagaac 960
aactacaaga ccaccccc agtgctggac agcgacggct cattcttcct gtactcccg 1020
ctgacagtgg acaagagcag ctggcaggaa ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac 1080
gaagccctgc acaaccacta caccagaag tccctgagcc tgtccctggg caaaatagag 1140
ggacgaatgg accaggtatc acatcggtat cctcgaattc aaagtatcaa agtacaattt 1200
accgaatata agaaggagaa aggtttcatc ctcacttccc aaaaggagga tgaaatcatg 1260

aaggtgcaga acaactcagt catcatcaac tgtgatgggt tttatctcat ctccctgaag 1320
ggctacttct cccaggaagt caacattagc cttcattacc agaaggatga ggagccctc 1380
ttccaactga agaaggtcag gtctgtcaac tccttgatgg tggcctctct gacttacaaa 1440
gacaaagtct acttgaatgt gaccactgac aatacctccc tggatgactt ccatgtgaat 1500
ggcggagaac tgattcttat ccatcaaaat cctggtgaat tctgtgtcct ttga 1554

<210> 7

<211> 517

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 7

Met Lys Thr Leu Pro Ala Met Leu Gly Thr Gly Lys Leu Phe Trp Val

1	5	10	15
Phe	Phe	Leu	Ile
Pro	Tyr	Leu	Asp
Ile	Trp	Asn	Ile
His	Gly	Lys	Glu
20	25	30	
Ser	Cys	Asp	Val
Gln	Leu	Tyr	Ile
Lys	Arg	Gln	Ser
Glu	His	Ser	Ile
35	40	45	
Leu	Ala	Gly	Asp
Pro	Phe	Glu	Leu
Glu	Cys	Pro	Val
Lys	Tyr	Cys	Ala
50	55	60	
Asn	Arg	Pro	His
Val	Thr	Trp	Cys
Lys	Leu	Asn	Gly
Thr	Thr	Cys	Val

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

115 120 125
 Thr Thr Leu Tyr Val Thr Asp Val Lys Ser Ala Ser Glu Arg Pro Ser

 130 135 140
 Lys Asp Glu Met Ala Ser Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys
 145 150 155 160
 Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 165 170 175
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 180 185 190
 Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp

 195 200 205
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 210 215 220
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 225 230 235 240
 His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser
 245 250 255
 Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly

 260 265 270
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 275 280 285
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 290 295 300
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 305 310 315 320
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

 325 330 335
 Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn
 340 345 350
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 355 360 365

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp

370

375

380

Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe

385

390

395

400

Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu

405

410

415

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

420

425

430

Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn

435

440

445

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

450

455

460

Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys

465

470

475

480

Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp

485

490

495

Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly

500

505

510

Glu Phe Cys Val Leu

515

<210

> 8

<211> 1527

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 8

atgcgctggt gtctctctct gatctgggcc caggggctga ggcaggctcc cctcgctca	60
ggaatgatga caggcacaat agaaacaacg gggaacattt ctgcagagaa aggtggctct	120
atcatcttac aatgtcacct ctctccacc acggcacaag tgaccaggt caactgggag	180
cagcaggacc agcttctggc catttgtaat gctgacttgg ggtggcacat ctcccatcc	240
ttcaaggatc gagtggcccc aggtcccggc ctgggcctca ccctccagtc gctgaccgtg	300

aacgatacag gggagtactt ctgcatctat cacacctacc ctgatgggac gtacactggg 360

agaatcttcc tggaggtcct agaaagctca gtggctgagc acggtgccag gttccagatt 420

ccatctaagt acggccctcc ctgccctagc tgtcccgcct ctgaatttct gggcggaccc 480

tccgtgtttc tgttccccc aaagcccaag gacacctga tgatcagccg gacccccgaa 540

gtgacctgtg tgggtgtgga tgtgtcccag gaagatcccg aggtgcagtt caattggtac 600

gtggacgggg tggaagtga caacccaag accaagcca gagaggaaca gttcaacagc 660

acctaccggg tgggtgtctgt gctgacctg ctgcaccagg attggctgag cggcaaagag 720

tacaagtga aggtgtccag caaggcctg cccagcagca tcgaaaagac catcagcaac 780

gccaccggcc agcccaggga accccaggig tacacactgc cccctagcca ggaagagatg 840

accaagaacc aggtgtccct gacatgcctc gtgaagggt tctaccctc cgatatcgcc 900

gtggaatggg agagcaacgg ccagccagag aacaactaca agaccacccc cccagtgtg 960

gacagcgacg gctattctt cctgtactcc cggtgacag tggacaagag cagctggcag 1020

gaaggcaacg tgttcagctg cagcgtgatg cacgaagccc tgcacaacca ctacaccag 1080

aagtccctga gcctgtccct gggcaaaata gagggacgaa tggaccaggt atcacatcgg 1140

tatcctcgaa ttcaaagat caaagtacaa ttaccgaat ataagaagga gaaaggtttc 1200

atcctcactt cccaaaagga ggatgaaatc atgaaggtgc agaacaactc agtcatcatc 1260

aactgtgatg ggttttatct catctccctg aagggtact tctcccagga agtcaacatt 1320

agccttcatt accagaagga tgaggagccc ctcttccaac tgaagaaggt caggtctgtc 1380

aactccttga tgggtggcctc tctgacttac aaagacaaag tctacttgaa tgtgaccact 1440

gacaatacct ccctggatga cttccatgtg aatggcggag aactgattct tatccatcaa 1500

aatcctggtg aattctgtgt cctttga 1527

<210> 9

<211> 508

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 9

Met Arg Trp Cys Leu Leu Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu Arg Gln Ala

1 5 10 15

Pro Leu Ala Ser Gly Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn

20 25 30

Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser
35 40 45

Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln
50 55 60

Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser
65 70 75 80

Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln
85 90 95

Ser Leu Thr Val Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr
100 105 110

Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu
115 120 125

Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Ser Lys Tyr
130 135 140

Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
145 150 155 160

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
165 170 175

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
180 185 190

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
195 200 205

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
210 215 220

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu
225 230 235 240

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
245 250 255

Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
260 265 270

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

275 280 285
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 290 295 300
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 305 310 315 320

 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 325 330 335
 Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 340 345 350
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 355 360 365
 Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile
 370 375 380

 Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe
 385 390 395 400
 Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn
 405 410 415
 Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly
 420 425 430
 Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu
 435 440 445

 Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met
 450 455 460
 Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr
 465 470 475 480
 Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile
 485 490 495
 Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
 500 505

<210> 10

<211

> 1710

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 10

atgttttcac atcttcctt tgactgtgtc ctgctgtgtc tgctgtact attacaagg	60
tcctcagaag tggaatacag agcggagggtc ggtcagaatg cctatctgcc ctgcttctac	120
acccagccg cccagggaa cctcgtgccc gtctgtgtgg gcaaaggagc ctgtcctgtg	180
tttgaatgtg gcaacgtggt gctcaggact gatgaaagg atgtgaatta ttggacatcc	240
agatactggc taaatgggga ttccgcgaaa ggagatgtgt ccctgacat agagaatgtg	300
actctagcag acagtgggat ctactgtgtc cggatccaaa tcccaggcat aatgaatgat	360
gaaaaattta acctgaagtt ggtcatcaaa ccagccaagg tcaccctgc accgactcg	420
cagagagact tcaactgcagc cttccaagg atgcttacca ccaggggaca tggcccagca	480
gagacacaga cactggggag cctccctgat ataatctaa cacaataatc cacattggcc	540
aatgagttac gggactctag attggccaat gacttacggg actctggagc aaccatcaga	600
ataggctcta agtacggccc tccctgccct agctgtcccg cccctgaatt tctgggcgga	660
ccctccgtgt ttctgttccc cccaaagccc aaggacacc tgatgatcag ccggaccccc	720
gaagtacat gtgtggtggt ggatgtgtcc caggaagatc ccgaggtgca gttcaattgg	780
tacgtggacg ggggtggaagt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga acagttaac	840
agcacctacc ggggtgtgtc tgtgtgtacc gtgtgtcacc aggatggct gagcggcaaa	900
gagtacaagt gcaaggtgtc cagcaagggtc ctcccagca gcatcgaaaa gaccatcagc	960
aacgccaccg gccagcccag ggaaccccag gtgtacacac tggccctag ccaggaagag	1020
atgaccaaga accaggtgtc cctgacatgc ctctgaagg gcttctacc ctccgatatc	1080
gccgtggaat gggagagcaa cggccagcca gagaacaact acaagaccac ccccccagt	1140
ctggacacgc acggctcatt ctctctgtac tcccggtga cagtggacaa gacagctgg	1200
caggaaggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgaag cctgcacaa ccactacacc	1260
cagaagtccc tgagcctgtc cctgggcaaa atagagggtc gaattggacca ggtatcacat	1320
cggatctctc gaattcaaag tatcaaagta caattaccg aatataagaa ggagaaaggt	1380
ttcatcctca ctccccaaaa ggaggatgaa atcatgaagg tgcagaacaa ctcatcatc	1440
atcaactgtg atgggtttta tctcatctcc ctgaagggt acttctcca ggaagtcaac	1500
attagcttc attaccagaa ggatgaggag cccctcttc aactgaagaa ggtcaggtct	1560
gtcaactcct tgatggtggc ctctctgact tacaagaca aagtctactt gaatgtgacc	1620

actgacaata cctccctgga tgacttccat gtgaatggcg gagaactgat tcttatccat 1680
caaaatcctg gtgaattctg tgtcctttga 1710

<210> 11
<211> 569
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence
<400> 11

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

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

Ile Glu Asn Val Thr Leu Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Cys Cys Arg Ile
100 105 110
Gln Ile Pro Gly Ile Met Asn Asp Glu Lys Phe Asn Leu Lys Leu Val
115 120 125
Ile Lys Pro Ala Lys Val Thr Pro Ala Pro Thr Arg Gln Arg Asp Phe
130 135 140
Thr Ala Ala Phe Pro Arg Met Leu Thr Thr Arg Gly His Gly Pro Ala
145 150 155 160

Glu Thr Gln Thr Leu Gly Ser Leu Pro Asp Ile Asn Leu Thr Gln Ile
165 170 175
Ser Thr Leu Ala Asn Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu
180 185 190

Arg Asp Ser Gly Ala Thr Ile Arg Ile Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
195 200 205

Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
210 215 220

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
225 230 235 240

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
245 250 255

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
260 265 270

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
275 280 285

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
290 295 300

Lys Val Ser Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
305 310 315 320

Asn Ala Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
325 330 335

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
340 345 350

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
355 360 365

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
370 375 380

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Trp
385 390 395 400

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
405 410 415

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Glu
420 425 430

Gly Arg Met Asp Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile

435 440 445
 Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr
 450 455 460
 Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile
 465 470 475 480

Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser
 485 490 495
 Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu
 500 505 510
 Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser
 515 520 525
 Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr
 530 535 540

Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His
 545 550 555 560
 Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
 565

<210> 12

<211> 2223

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 12

atggagcccc ccggcccgcc ccccgccgc ctcgggcccgc tgctctgcct gctgctcgcc 60
 gcgtcctgcg cctggtcagg agtggcgggt gaggaggagc tgcaggtgat tcagcctgac 120
 aagtcctgtg tggttgcagc tggagagaca gccactctgc gctgcactgc gacctctctg 180

atccctgtgg ggcccatcca gtggttcaga ggagctggac caggccggga attaatctac 240
 aatcaaaaag aaggccactt ccccgggta acaactgttt cagacctcac aaagagaaac 300
 aacatggact ttccatccg catcggtaac atcacccag cagatgccgg cacctactac 360
 tgtgtgaagt tccgaaaagg gagccccgat gacgtggagt ttaagtctgg agcaggcact 420
 gagctgtctg tgcgcgcaa accctctgcc cccgtggtat cgggccctgc ggcgagggcc 480
 acacctcagc acacagtgag cttcacctgc gattccacg gcttctcacc cagagacatc 540

accctgaaat gggtcaaaaa tgggaatgag ctctcagact tccagaccaa cgtggacccc 600

gtaggagaga gcgtgtccta cagcatccac agcacagcca aggtggtgct gacccgcgag 660

gacgttact ctcaagtcac ctgcgaggtg gccacgtca ccttgacagg ggacctctt 720

cgtgggactg ccaactgtc tgagaccatc cgagttccac ccaccttga ggttactcaa 780

cagccctga gggcagagaa ccaggtgaat gtcacctgcc aggtgaggaa gttctacccc 840

cagagactac agctgacctg gttggagaat ggaaacgtgt cccggacaga aacggcctca 900

accgttacag agaacaagga tggtagctac aactggatga gctggctcct ggtgaatga 960

tctgcccaca gggatgatgt gaagctcacc tgccaggtgg agcatgacgg gcagccagcg 1020

gtcagcaaaa gccatgacct gaaggtctca gccacccga aggagcaggg ctcaaatacc 1080

gccgctgaga aacttgatc taatgaacgg aacatctatt ctaagtacgg ccctccctgc 1140

cctagctgtc ccgccccga atttctgggc ggacctccg tgtttctgtt cccccaaag 1200

ccaaggaca ccctgatgat cagccggacc ccgaagtga cctgtgtggt ggtggatgtg 1260

tcccaggaag atcccaggt gcagttcaat tggtagctgg acggggtgga agtgacaaac 1320

gccaagacca agccagaga ggaacagttc aacagcacct accgggtggt gtctgtgctg 1380

accgtgctgc accaggattg gctgagcggc aaagagtaca agtgcaaggt gtccagcaag 1440

ggcctgcccc gcagcatcga aaagaccatc agcaacgcca ccggccagcc cagggaaccc 1500

caggtgtaca cactgcccc tagccaggaa gagatgacca agaaccaggt gtccctgaca 1560

tgccctgtga agggcttcta cccctccgat atcgccgtgg aatgggagag caacggccag 1620

ccagagaaca actacaagac cccccccca gtgctggaca gcgacggctc atttctctg 1680

tactccggc tgacagtga caagagcagc tggcaggaag gcaacgtgtt cagctgcagc 1740

gtgatgcacg aagccctgca caaccactac acccagaagt ccctgagcct gtccctgggc 1800

aaaatagagg gacgaatgga ccaggtatca catcggtatc ctgaattca aagtatcaaa 1860

gtacaattta ccgaatataa gaaggagaaa ggtttcatcc tcacttcca aaaggaggat 1920

gaaatcatga aggtgcagaa caactcagtc atcatcaact gtgatgggtt ttatctcatc 1980

tcctgaagg gctacttctc ccaggaagtc aacattagcc ttattacca gaaggatgag 2040

gagccctct tccaactgaa gaagtcagg tctgtcaact ccttgatggt ggcctctctg 2100

acttacaag acaaagtcta cttgaatgtg accactgaca atacctccct ggatgacttc 2160

catgtgaatg gcggagaact gattcttatc catcaaaatc ctggtgaatt ctgtgtcctt 2220

tga 2223

<210> 13

<211> 740

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 13

Met Glu Pro Ala Gly Pro Ala Pro Gly Arg Leu Gly Pro Leu Leu Cys

1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Ala Ser Cys Ala Trp Ser Gly Val Ala Gly Glu Glu

20 25 30

Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala Ala Gly

35 40 45

Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro Val Gly

50 55 60

Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu Ile Tyr

65 70 75 80

Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser Asp Leu

85 90 95

Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn Ile Thr

100 105 110

Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys Gly Ser

115 120 125

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

130 135 140

Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala Arg Ala

145 150 155 160

Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly Phe Ser

165 170 175

Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Ser

180 185 190

Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser Tyr Ser

195 200 205

Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val His Ser
210 215 220
Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp Pro Leu
225 230 235 240
Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro Thr Leu
245 250 255
Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn Val Thr
260 265 270
Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr Trp Leu
275 280 285
Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val Thr Glu
290 295 300
Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val Asn Val
305 310 315 320
Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu His Asp
325 330 335
Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser Ala His
340 345 350
Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly Ser Asn
355 360 365
Glu Arg Asn Ile Tyr Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
370 375 380
Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
385 390 395 400
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
405 410 415
Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
420 425 430
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
435 440 445
Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

450 455 460
 Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys
 465 470 475 480
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln
 485 490 495
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met

 500 505 510
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 515 520 525
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 530 535 540
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 545 550 555 560
 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val

 565 570 575
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 580 585 590
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp Gln
 595 600 605
 Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr
 610 615 620
 Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp

 625 630 635 640
 Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly
 645 650 655
 Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile
 660 665 670
 Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys
 675 680 685
 Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp

 690 695 700

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

705 710 715 720

His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu

725 730 735

Phe Cys Val Leu

740

<210> 14

<211> 1554

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 14

atgggggtccc cgggcatggt gctgggcctc ctggtgcaga tctgggcctt gcaagaagcc 60

tcaagcctga gcgtgcagca ggggccaac ttgctgcagg tgaggcaggg cagtcaggcg 120

accctggtct gccaggtgga ccaggccaca gcctgggaac ggctccgtgt taagtggaca 180

aaggatgggg ccatcctgtg tcaaccgtac atcaccaacg gcagcctcag cctgggggtc 240

tgcgggcccc agggacggct ctctctggcag gcaccacagc atctaccct gcagctggac 300

cctgtgagcc tcaaccacag cggggcgtag gtgtgctggg cggccgtaga gattcctgag 360

ttggaggagg ctgagggcaa cataacaagg ctctttgtgg acccagatga cccacacag 420

aacagaaacc ggatcgcaag ctctccagga tctaagtacg gccctccctg ccctagctgt 480

ccgccccctg aatttctggg cggaccctcc gtgtttctgt tcccccaaa gccaaggac 540

accctgatga tcagccggac cccgaagtg acctgtgtgg tggatgatgt gtcccaggaa 600

gatcccgagg tgcagttcaa ttggtacgtg gacggggtgg aagtgcacaa cgccaagacc 660

aagcccagag aggaacagtt caacagcacc taccgggtgg tgtctgtgct gaccgtgctg 720

caccaggatt ggctgagcgg caaagagtac aagtgaagg tgtccagcaa gggcctgccc 780

agcagcatcg aaaagacat cagcaacgcc accggccagc ccagggaacc ccagggttac 840

acactgcccc ctagccagga agagatgacc aagaaccagg tgtccctgac atgcctcgtg 900

aagggtctct acccctccga tatcgccgtg gaatgggaga gcaacggcca gccagagaac 960

aactacaaga ccaccccccc agtgtctggac agcgacggct cattcttcct gtactccgg 1020

ctgacagtgg acaagagcag ctggcaggaa ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac 1080

gaagccctgc acaaccacta caccagaag tcctgagcc tgtccctggg caaaatagag 1140

ggacgaatgg accaggtatc acatcggtat cctcgaattc aaagtatcaa agtacaattt 1200

accgaatata agaaggagaa aggtttcatc ctcacttccc aaaaggagga tgaaatcatg 1260
aaggtgcaga acaactcagt catcatcaac tgtgatgggt tttatctcat ctccctgaag 1320

ggctacttct cccaggaagt caacattagc cttcattacc agaaggatga ggagccctc 1380
ttccaactga agaaggtcag gtctgtcaac tccttgatgg tggcctctct gacttacaaa 1440
gacaaagtct acttgaatgt gaccactgac aatacctccc tggatgactt ccatgtgaat 1500
ggcgggagaac tgattcttat ccatcaaaat cctggtgaat tctgtgtcct ttga 1554

<210> 15

<211> 517

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 15

Met Gly Ser Pro Gly Met Val Leu Gly Leu Leu Val Gln Ile Trp Ala

1 5 10 15

Leu Gln Glu Ala Ser Ser Leu Ser Val Gln Gln Gly Pro Asn Leu Leu

20 25 30

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

35 40 45

Ala Thr Ala Trp Glu Arg Leu Arg Val Lys Trp Thr Lys Asp Gly Ala

50 55 60

Ile Leu Cys Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Gly Ser Leu Ser Leu Gly Val

65 70 75 80

Cys Gly Pro Gln Gly Arg Leu Ser Trp Gln Ala Pro Ser His Leu Thr

85 90 95

Leu Gln Leu Asp Pro Val Ser Leu Asn His Ser Gly Ala Tyr Val Cys

100 105 110

Trp Ala Ala Val Glu Ile Pro Glu Leu Glu Glu Ala Glu Gly Asn Ile

115 120 125

Thr Arg Leu Phe Val Asp Pro Asp Asp Pro Thr Gln Asn Arg Asn Arg

130 135 140

Ile Ala Ser Phe Pro Gly Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys

145 150 155 160
 Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 165 170 175
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 180 185 190
 Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 195 200 205

 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 210 215 220
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 225 230 235 240
 His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser
 245 250 255
 Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly
 260 265 270

 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 275 280 285
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 290 295 300
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 305 310 315 320
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 325 330 335

 Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn
 340 345 350
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 355 360 365
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Asp
 370 375 380
 Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe
 385 390 395 400

Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu
 405 410 415
 Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp
 420 425 430
 Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn
 435 440 445
 Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys
 450 455 460

Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys
 465 470 475 480
 Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp
 485 490 495
 Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly
 500 505 510
 Glu Phe Cys Val Leu
 515

<210> 16
 <211> 3493
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

tcaatgcct tttatctctg gccctgggac ctttgcctat tttctgattg ataggctttg	60
ttttgtcttt acctccttct ttctggggaa aacttcagtt ttatcgacag tccccctttt	120
ccatacttc atcttcctc taccagatt gtgaagatgg aaagggtcca accctggaa	180
gagaatgtgg gaaatgcagc caggccaaga ttcgagagga acaagctatt gctggtggcc	240
tctgtaattc agggaactggg gctgctcctg tgcttcacct acatctgcct gcacttctct	300
gctcttcagg tatcacatcg gtatcctcga attcaaagta tcaaagtaca attaccgaa	360
tataagaagg agaaaggttt catctcact tccaaaagg aggatgaaat catgaaggtg	420
cagaacaact cagtcatcat caactgtgat gggttttatc tcatctcct gaagggtac	480
tttctccagg aagtcaacat tagccttcac taccagaagg atgaggagcc cctcttccaa	540
ctgaagaagg tcaggtctgt caactccttg atggtggcct ctctgactta caagacaaa	600
gtctacttga atgtgaccac tgacaatacc tcctggatg acttccatgt gaatggcgga	660

gaactgattc ttatccatca aaatcctggt gaattctgtg tcctttgagg ggctgatggc	720
aatatctaaa accaggcacc agcatgaaca ccaagctggg ggtggacagg gcatggattc	780
ttcattgcaa gtgaaggagc ctcccagctc agccacgtgg gatgtgacaa gaagcagatc	840
ctggccctcc cgccccacc cctcagggat atttaaaact tattttatat accagttaat	900
cttattttatc cttatatattt ctaaattgcc tagccgtcac accccaagat tgccttgagc	960
ctactaggca cctttgtgag aaagaaaaaa tagatgcctc ttcttcaaga tgcattgttt	1020
ctatttgtca ggcaattgtc ataataaact tatgtcattg aaaacggtac ctgactacca	1080
tttgctggaa atttgacatg tgtgtggcat tatcaaaatg aagaggagca aggagtgaag	1140
gagtggggtt atgaatctgc caaagggtgt atgaaccaac ccctggaagc caaagcggcc	1200
tctccaaggt taaattgatt gcagtttgca tattgcctaa atttaaacct tctcatttgg	1260
tgggggttca aaagaagaat cagcttgtga aaaatcagga cttgaagaga gccgtctaag	1320
aaataccacg tgcttttttt ctttaccatt ttgctttccc agcctccaaa catagttaat	1380
agaaatttcc cttcaaagaa ctgtctgggg atgtgatgct ttgaaaaatc taatcagtga	1440
cttaagagag attttcttgt atacagggag agtgagataa cttatttgtga agggttagct	1500
ttactgtaca ggatagcagg gaactggaca tctcagggtg aaagtcagta cggattttaa	1560
tagcctgggg aggaaaacac attctttgcc acagacaggc aaagcaacac atgctcatcc	1620
tctgcctat gctgagatac gcactcagct ccatgtcttg tacacacaga aacattgctg	1680
gtttcaagaa atgaggatgat cctattatca aattcaatct gatgtcaaat agcactaaga	1740
agttattgtg cttatgaaa aataatgatc tctgtctaga aataccatag accatatata	1800
gtctcacatt gataattgaa actagaaggg tctataatca gcctatgcca gggcttcaat	1860
ggaatagtat ccccttatgt ttagttgaaa tgtccctta acttgatata atgtgttatg	1920
cttatggcgc tgtggacaat ctgatttttc atgtcaactt tccagatgat ttgtaacttc	1980
tctgtgccaa accttttata aacataaatt tttagatat gtattttaaa attgtagcac	2040
atgtttccct gacattttca atagaggata caacatcaca gaatctttct ggatgattct	2100
gtgttatcaa ggaattgtac tgtgtacaaa ttatctctag aatctccaga aagggtggagg	2160
gctgttcgcc cttacactaa atggctcag ttggattttt ttttcctgtt ttctatttcc	2220
tcttaagtac accttcaact atattcccat cctctatatt taatctgtta tgaaggaagg	2280
taaaataaaa tgctaaatag aagaaattgt aggttaaggta agaggaatca agttctgagt	2340
ggctgccaag gcactcacag aatcataatc atggctaaat atttatggag ggcctactgt	2400
ggaccaggca ctgggctaaa tacttacatt tacaagaatc attctgagac agatattcaa	2460

tgatatctgg cttcactact cagaagattg tgtgtgtgtt tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 2520

tatttcactt ttgtttattg accatgttct gcaaaattgc agttactcag tgagtgatat 2580

ccgaaaaagt aaacgtttat gactataggt aatatttaag aaaatgcatg gttcattttt 2640

aagtttggaa tttttatcta tatttctcac agatgtgcag tgcacatgca ggcctaagta 2700

tatgttgtgt gtgttgtttg tctttgatgt catggtcccc tctcttaggt gctcactcgc 2760

tttgggtgca cctggcctgc tcttcccatg ttggcctctg caaccacaca gggatatttc 2820

tgctatgcac cagcctcact ccaccttcct tccatcaaaa atatgtgtgt gtgtctcagt 2880

ccctgtaagt catgtccttc acagggagaa ttaacccttc gatatacatg gcagagtttt 2940

gtgggaaaag aattgaatga aaagtcagga gatcagaatt ttaaatttga cttagccact 3000

aactagccat gtaaccttgg gaaagtcatt tcccatttct gggctttgct tttctttctg 3060

ttaaagtaga ggaatgttaa atatctaaca gtttagaatc ttatgcttac agtggttatct 3120

gtgaatgcac atattaaatg tctatgttct tgttgctatg agtcaaggag tgtaaccttc 3180

tcctttacta tgttgaatgt attttttctt ggacaagctt acatcttcct cagccatctt 3240

tgtgagtcct tcaagagcag ttatcaattg ttagttagat attttctatt tagagaatgc 3300

ttaagggtatt ccaatccga tccaatcat aatttgttct taagtatact gggcagggtcc 3360

cctattttaa gtcataattt tgtatttagt gctttcctgg ctctcagaga gtattaatat 3420

tgatattaat aatatagtta atagtaatat tgctatttac atggaaacaa ataaaagatc 3480

tcagaattca cta 3493

<210> 17

<211> 183

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg

1 5 10 15

Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln

20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser

35 40 45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val

50 55 60

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

Cys	Asp	Gly	Phe	Tyr	Leu	Ile	Ser	Leu	Lys	Gly	Tyr	Phe	Ser	Gln	Glu
100				105				110							
Val	Asn	Ile	Ser	Leu	His	Tyr	Gln	Lys	Asp	Glu	Glu	Pro	Leu	Phe	Gln
115				120				125							
Leu	Lys	Lys	Val	Arg	Ser	Val	Asn	Ser	Leu	Met	Val	Ala	Ser	Leu	Thr
130				135				140							
Tyr	Lys	Asp	Lys	Val	Tyr	Leu	Asn	Val	Thr	Thr	Asp	Asn	Thr	Ser	Leu
145				150				155				160			

Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
165 170 175
Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
180

<210> 18

<211> 684

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 18

tctaagtacg gccctccctg ccctagctgt cccgccccctg aatttctggg cggaccctcc	60
gtgtttctgt tcccccaaa gcccaaggac acctgatga tcagccggac ccccggaagtg	120
acctgtgtgg tgggtggatgt gtcccaggaa gatcccgagg tgcagttcaa ttggtacctg	180

gacggggtgg aagtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggaacagtt caacagcacc	240
taccgggtgg tgtctgtgct gaccgtgctg caccaggatt ggctgagcgg caaagagtac	300
aagtgcagg tgtccagcaa gggcctgccc agcagcatcg aaaagaccat cagcaacgcc	360
accggccagc ccagggaacc ccagggtgtac aactgcccc ctagccagga agagatgacc	420
aagaaccagg tgtccctgac atgcctcgtg aagggtttct acccctccga tatcgccgtg	480
gaatgggaga gcaacggcca gccagagaac aactacaaga ccaccccccc agtgcctggac	540

agcgacggct cattcttctt gtactcccgg ctgacagtgg acaagagcag ctggcaggaa 600

ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac gaagccctgc acaaccacta caccagaag 660

tccctgagcc tgtccctggg caaa 684

<210> 19

<211> 867

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60

ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccctggaacc ccccccactt ctccccagcc 120

ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 180

gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240

gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 300

cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcaggggccc ggcgcaatga cagcggcacc 360

tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgagaga tcaaagagag cctgcgggca 420

gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccacccag cccctcacc 480

aggccagccg gccagttcca aacctgggtg gttggtgtcg tgggcggcct gctgggcagc 540

ctggtgctgc tagtctgggt cctggccgtc atctgctccc gggccgcacg agggacaata 600

ggagccaggc gcaccggcca gccctgaag gaggaccct cagccgtgcc tgtgttctct 660

gtggactatg gggagctgga ttccagtggt cgagagaaga ccccgagacc cccctgccc 720

tgtgtccctg agcagacgga gtatgccacc attgtctttc ctacggaat gggcacctca 780

tccccgccc gcaggggctc agctgacggc cctcggagtg cccagccact gaggcctgag 840

gatggacact gctcttggcc cctctga 867

<210> 20

<211> 1623

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 20

gtcgacgcca ccatgcagat cccacaggcg ccctggccag tcgtctgggc ggtgctacaa 60

ctgggctggc ggccaggatg gttcttagac tccccagaca ggccctggaa cccccacc 120

ttctccccag ccctgctcgt ggtgaccgaa ggggacaacg ccaccttcac ctgcagcttc 180
 tccaacacat cggagagctt cgtgctaaac tggtagcgca tgagccccag caaccagacg 240
 gacaagctgg ccgccttccc cgaggaccgc agccagcccc gccaggactg ccgcttccgt 300
 gtacacaaac tgcccaacgg gcgtgacttc cacatgagcg tggtagggc ccggcgcaat 360
 gacagcggca cctacctctg tggggccatc tccttgcccc ccaaggcgca gatcaaagag 420
 agcctgcggg cagagctcag ggtgacagag agaaggcgag aagtgcaccac agcccccccc 480
 agcccctcac ccaggccagc cggccagtgc caatctaagt acggccctcc ctgccctagc 540

 tgteccgccc ctgaatttct gggcggaccc tccgtgttgc tgttcccccc aaagcccaag 600
 gacaccctga tgatcagccg gacccccgaa gtgacctgtg tggtagtgga tgtgtcccag 660
 gaagatcccc aggtgcagtt caattggtac gtggacgggg tggaagtgc caacgccaag 720
 accaagccca gagaggaaca gtccaacagc acctaccggg tggtagtctgt gctgaccgtg 780
 ctgcaccagg attggctgag cggcaaagag tacaagtgc aggtgtccag caagggcctg 840
 cccagcagca tcgaaaagac catcagcaac gccaccggcc agcccaggga accccaggtg 900
 tacacactgc cccctagcca ggaagagatg accaagaacc aggtgtccct gacatgcctc 960

 gtgaagggtc tctacccctc cgatatcgcc gtggaatggg agagcaacgg ccagccagag 1020
 aacaactaca agaccacccc cccagtgtg gacagcgacg gctcattctt cctgtactcc 1080
 cggctgacag tggacaagag cagctggcag gaaggcaacg tgttcagctg cagcgtgatg 1140
 cacgaagccc tgcacaacca ctaccccag aagtccctga gcctgtccct gggcaaaata 1200
 gaggcgacgaa tggaccaggt atcacatcgg taccctcgaa ttcaaagtat caaagtacaa 1260
 ttaccgaat ataagaagga gaaagggttc atcctcactt cccaaaagga ggatgaaatc 1320
 atgaagggtc agaacaactc agtcatcatc aactgtgatg ggttttatct catctccctg 1380

 aagggtact tctcccagga agtcaacatt agccttcatt accagaagga tgaggagccc 1440
 ctcttccaac tgaagaaggt caggctctgc aactcctga tggtaggcctc tctgacttac 1500
 aaagacaaag tctacttgaa tgtgaccact gacaatacct ccctggatga cttccatgtg 1560
 aatggcggag aactgattct tatccatcaa aatcctgggtg aattctgtgt cctttgagtc 1620
 gac 1623

 <210> 21
 <211> 1637
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 21

caccggcgag atctgccacc atgcagatcc ctcaggcccc ctggcctgtc gtgtgggctg 60

tgctgcagct gggatggcgg cctggctggt tcctggactc tcctgacaga ccctggaacc 120

ccccacctt tagccctgct ctgctggctg tgaccgaggg cgacaacgcc accttcacct 180

gttccttcag caacacctcc gagtccttcg tctgaactg gtacagaatg tccccagca 240

accagaccga caagctggcc gccttccccg aggatagatc ccagcctgga caggactgcc 300

ggttcagagt gaccagctg cccaacggcc gggacttcca catgtctgtc gtgcgggcca 360

gacggaacga ctccggcaca tatctgtgcg gcgccatctc cctggcccc aaggctcaga 420

tcaaagagtc tctgcgggcc gagctgagag tgaccgagag aagggtgag gtgccaaccg 480

cccacctag cccatctcca agacctgccg gccagtcca gtctaagtac ggccctcctt 540

gccctagctg cctgccccct gaatttctgg gcggaccctc cgtgttctg tccccccaa 600

agcccaagga caccctgatg atctcccga ccccgaagt gacctgcgtg gtggtggatg 660

tgtcccagga agatcccag gtgcagttca attggtacgt ggacggcgtg gaagtgcaca 720

acgccaagac caagcccaga gaggaacagt tcaactccac ctaccgggtg gtgtccgtgc 780

tgaccgtgct gcaccaggat tggctgtccg gcaaagagta caagtgaag gtgtcctcca 840

agggcctgcc ctccagcatc gaaaagacca tctctaacgc caccggccag ccccggaac 900

cccagtgta cacactgect ccaagccagg aagagatgac caagaaccag gtgtccctga 960

cctgtctcgt gaagggttc taccctccg atatcgccgt ggaatgggag tccaacggcc 1020

agcctgagaa caactacaag accaccccc ctgtgctgga ctccgacggc tccttcttc 1080

tgtactcccg cctgaccgtg gacaagtect cctggcagga aggcaacgtg ttctctctgt 1140

ccgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acaccagaa gtccctgtcc ctgtctctgg 1200

gcaagatcga gggccggatg gatcaggtgt cacacagata ccccggtac cagtccatca 1260

aagtgcagtt taccgagtac aagaaagaga agggattcat cctgacctcc cagaaagagg 1320

acgagatcat gaaggtgcag aacaactccg tgatcatcaa ctgcgacggg ttctacctga 1380

tctccctgaa gggctacttc agtcaggaag tgaacatcag cctgcactac cagaaggacg 1440

aggaaccctt gtccagctg aagaaagtgc ggagcgtgaa ctccctgatg gtggcctctc 1500

tgacctacaa ggacaagggtg tacctgaacg tgaccaccga caatacctcc ctggacgact 1560

tccacgtgaa cggcggcgag ctgacctga tccaccagaa ccctggcgag ttctgcgtgc 1620

tgtgactcga ggctagc 1637

<210> 22

<211> 534

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 22

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp

20 25 30

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

35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val

50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala

65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg

85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg

100 105 110

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

115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val

130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro

145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser

165 170 175

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

180 185 190

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

195 200 205

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn

210 215 220

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 225 230 235 240
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 245 250 255

 Leu His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 260 265 270
 Ser Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr
 275 280 285
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 290 295 300
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 305 310 315 320

 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 325 330 335
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 340 345 350
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly
 355 360 365
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 370 375 380

 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met
 385 390 395 400
 Asp Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln
 405 410 415
 Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys
 420 425 430
 Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys
 435 440 445

 Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val
 450 455 460
 Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu

465 470 475 480
 Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr
 485 490 495
 Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp
 500 505 510

Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro
 515 520 525
 Gly Glu Phe Cys Val Leu
 530

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 23

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 24

Glu Ala Ala Ala Lys

1 5

<210> 25

<211>

7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 25

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Ala

1 5

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 26

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala

1 5 10

<210> 27

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 27

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Lys Ala Leu Glu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala

20 25 30

Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala

35 40 45

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 28

Pro Ala Pro Ala Pro

1 5

<210> 29

<211> 18

<212> PRT

<213>

> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 29

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser

1 5 10 15

Leu Asp

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 30

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr

1 5 10

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 31

Gly Ser Ala Gly Ser Ala Ala Gly Ser Gly Glu Phe

1 5 10

<210> 32

<211> 143

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro

35 40 45

Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln

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

100 105 110
 Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro
 115 120 125
 Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln
 130 135 140

<210> 33

<211> 343

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Glu Glu Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Leu Val Ala
 1 5 10 15

Ala Gly Glu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Thr Ala Thr Ser Leu Ile Pro
 20 25 30
 Val Gly Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Gly Arg Glu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser
 50 55 60
 Asp Leu Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn
 65 70 75 80

Ile Thr Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys
 85 90 95
 Gly Ser Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu
 100 105 110
 Ser Val Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala
 115 120 125

Arg Ala Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly

130 135 140

Phe Ser Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu

145 150 155 160

Leu Ser Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser

165 170 175

Tyr Ser Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val

180 185 190

His Ser Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp

195 200 205

Pro Leu Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro

210 215 220

Thr Leu Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn

225 230 235 240

Val Thr Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr

245 250 255

Trp Leu Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val

260 265 270

Thr Glu Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val

275 280 285

Asn Val Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu

290 295 300

His Asp Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser

305 310 315 320

Ala His Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly

325 330 335

Ser Asn Glu Arg Asn Ile Tyr

340

<210> 34

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys Ala Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys Leu Asn Gly Thr Thr

35 40 45

Cys Val Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp Lys Glu Glu Lys Asn

50 55 60

Ile Ser Phe Phe Ile Leu His Phe Glu Pro Val Leu Pro Asn Asp Asn

65 70 75 80

Gly Ser Tyr Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser

85 90 95

His Ser Thr Thr Leu Tyr Val Thr Asp Val Lys Ser Ala Ser Glu Arg

100 105 110

Pro Ser Lys Asp Glu Met Ala Ser Arg Pro Trp Leu Leu Tyr Arg

115 120 125

<210> 35

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln

20 25 30

Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys

35 40 45

Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val

50 55 60

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

65	70								75								80			
Asp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Phe	Cys	Ile	Tyr	His	Thr	Tyr	Pro	Asp	Gly	Thr					
				85				90				95								
Tyr	Thr	Gly	Arg	Ile	Phe	Leu	Glu	Val	Leu	Glu	Ser	Ser	Val	Ala	Glu					
				100				105				110								
His	Gly	Ala	Arg	Phe	Gln	Ile	Pro													
				115				120												
<210>	36																			
<211>	181																			
<212>	PRT																			
<213>	Homo sapiens																			
<400>	36																			
Ser	Glu	Val	Glu	Tyr	Arg	Ala	Glu	Val	Gly	Gln	Asn	Ala	Tyr	Leu	Pro					
1					5					10					15					
Cys	Phe	Tyr	Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Gly	Asn	Leu	Val	Pro	Val	Cys	Trp					
				20				25				30								
Gly	Lys	Gly	Ala	Cys	Pro	Val	Phe	Glu	Cys	Gly	Asn	Val	Val	Leu	Arg					
				35				40				45								
Thr	Asp	Glu	Arg	Asp	Val	Asn	Tyr	Trp	Thr	Ser	Arg	Tyr	Trp	Leu	Asn					
50				55				60												
Gly	Asp	Phe	Arg	Lys	Gly	Asp	Val	Ser	Leu	Thr	Ile	Glu	Asn	Val	Thr					
65					70				75				80							
Leu	Ala	Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr	Cys	Cys	Arg	Ile	Gln	Ile	Pro	Gly	Ile					
				85				90				95								
Met	Asn	Asp	Glu	Lys	Phe	Asn	Leu	Lys	Leu	Val	Ile	Lys	Pro	Ala	Lys					
				100				105				110								
Val	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Arg	Gln	Arg	Asp	Phe	Thr	Ala	Ala	Phe	Pro					
				115				120				125								
Arg	Met	Leu	Thr	Thr	Arg	Gly	His	Gly	Pro	Ala	Glu	Thr	Gln	Thr	Leu					
130				135				140												
Gly	Ser	Leu	Pro	Asp	Ile	Asn	Leu	Thr	Gln	Ile	Ser	Thr	Leu	Ala	Asn					
145					150				155				160							

Glu Leu Arg Asp Ser Arg Leu Ala Asn Asp Leu Arg Asp Ser Gly Ala

165 170 175

Thr Ile Arg Ile Gly

180

<210> 37

<211> 202

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Gln Val Gln Val Val Thr Gln Asp Glu Arg Glu Gln Leu Tyr Thr Pro

1 5 10 15

Ala Ser Leu Lys Cys Ser Leu Gln Asn Ala Gln Glu Ala Leu Ile Val

20 25 30

Thr Trp Gln Lys Lys Lys Ala Val Ser Pro Glu Asn Met Val Thr Phe

35 40 45

Ser Glu Asn His Gly Val Val Ile Gln Pro Ala Tyr Lys Asp Lys Ile

50 55 60

Asn Ile Thr Gln Leu Gly Leu Gln Asn Ser Thr Ile Thr Phe Trp Asn

65 70 75 80

Ile Thr Leu Glu Asp Glu Gly Cys Tyr Met Cys Leu Phe Asn Thr Phe

85 90 95

Gly Phe Gly Lys Ile Ser Gly Thr Ala Cys Leu Thr Val Tyr Val Gln

100 105 110

Pro Ile Val Ser Leu His Tyr Lys Phe Ser Glu Asp His Leu Asn Ile

115 120 125

Thr Cys Ser Ala Thr Ala Arg Pro Ala Pro Met Val Phe Trp Lys Val

130 135 140

Pro Arg Ser Gly Ile Glu Asn Ser Thr Val Thr Leu Ser His Pro Asn

145 150 155 160

Gly Thr Thr Ser Val Thr Ser Ile Leu His Ile Lys Asp Pro Lys Asn

165 170 175

Gln Val Gly Lys Glu Val Ile Cys Gln Val Leu His Leu Gly Thr Val

180 185 190

Thr Asp Phe Lys Gln Thr Val Asn Lys Gly

195 200

<210> 38

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Leu Ser Val Gln Gln Gly Pro Asn Leu Leu Gln Val Arg Gln Gly Ser

1 5 10 15

Gln Ala Thr Leu Val Cys Gln Val Asp Gln Ala Thr Ala Trp Glu Arg

20 25 30

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

35 40 45

Ile Thr Asn Gly Ser Leu Ser Leu Gly Val Cys Gly Pro Gln Gly Arg

50 55 60

Leu Ser Trp Gln Ala Pro Ser His Leu Thr Leu Gln Leu Asp Pro Val

65 70 75 80

Ser Leu Asn His Ser Gly Ala Tyr Val Cys Trp Ala Ala Val Glu Ile

85 90 95

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

100 105 110

Pro Asp Asp Pro Thr Gln Asn Arg Asn Arg Ile Ala Ser Phe Pro Gly

115 120 125

<210> 39

<211> 162

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Phe Lys Val Ala Thr Pro Tyr Ser Leu Tyr Val Cys Pro Glu Gly Gln

1 5 10 15

Asn Val Thr Leu Thr Cys Arg Leu Leu Gly Pro Val Asp Lys Gly His
 20 25 30
 Asp Val Thr Phe Tyr Lys Thr Trp Tyr Arg Ser Ser Arg Gly Glu Val
 35 40 45
 Gln Thr Cys Ser Glu Arg Arg Pro Ile Arg Asn Leu Thr Phe Gln Asp
 50 55 60
 Leu His Leu His His Gly Gly His Gln Ala Ala Asn Thr Ser His Asp
 65 70 75 80

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

Asn Cys Val Val Tyr Pro Ser Ser Ser Gln Asp Ser Glu Asn Ile Thr
 145 150 155 160
 Ala Ala

<210> 40
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 40

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

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

 100 105 110
 Ala Thr Arg Lys Val Ile Val Thr Val Gln Ala Arg Pro Ala Val Pro
 115 120 125
 Met Cys Trp Thr Glu Gly His Met Thr Tyr Gly Asn Asp Val Val Leu
 130 135 140
 Lys Cys Tyr Ala Ser Gly Gly Ser Gln Pro Leu Ser Tyr Lys Trp Ala
 145 150 155 160
 Lys Ile Ser Gly His His Tyr Pro Tyr Arg Ala Gly Ser Tyr Thr Ser

 165 170 175
 Gln His Ser Tyr His Ser Glu Leu Ser Tyr Gln Glu Ser Phe His Ser
 180 185 190
 Ser Ile Asn Gln Gly Leu Asn Asn Gly Asp Leu Val Leu Lys Asp Ile
 195 200 205
 Ser Arg Ala Asp Asp Gly Leu Tyr Gln Cys Thr Val Ala Asn Asn Val
 210 215 220
 Gly Tyr Ser Val Cys Val Val Glu Val Lys Val Ser Asp Ser Arg Arg

 225 230 235 240
 Ile Gly

<210> 41

<211> 427

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Glu Asp Phe Arg Val Ile Gly Pro Ala His Pro Ile Leu Ala Gly Val

1 5 10 15

Gly Glu Asp Ala Leu Leu Thr Cys Gln Leu Leu Pro Lys Arg Thr Thr
 20 25 30
 Met His Val Glu Val Arg Trp Tyr Arg Ser Glu Pro Ser Thr Pro Val
 35 40 45

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

 Leu Lys Val Ala Gly Leu Gly Ser Ala Pro Ser Ile His Met Glu Gly
 115 120 125
 Pro Gly Glu Ser Gly Val Gln Leu Val Cys Thr Ala Arg Gly Trp Phe
 130 135 140
 Pro Glu Pro Gln Val Tyr Trp Glu Asp Ile Arg Gly Glu Lys Leu Leu
 145 150 155 160
 Ala Val Ser Glu His Arg Ile Gln Asp Lys Asp Gly Leu Phe Tyr Ala
 165 170 175

 Glu Ala Thr Leu Val Val Arg Asn Ala Ser Ala Glu Ser Val Ser Cys
 180 185 190
 Leu Val His Asn Pro Val Leu Thr Glu Glu Lys Gly Ser Val Ile Ser
 195 200 205
 Leu Pro Glu Lys Leu Gln Thr Glu Leu Ala Ser Leu Lys Val Asn Gly
 210 215 220
 Pro Ser Gln Pro Ile Leu Val Arg Val Gly Glu Asp Ile Gln Leu Thr
 225 230 235 240

 Cys Tyr Leu Ser Pro Lys Ala Asn Ala Gln Ser Met Glu Val Arg Trp
 245 250 255
 Asp Arg Ser His Arg Tyr Pro Ala Val His Val Tyr Met Asp Gly Asp

260 265 270
 His Val Ala Gly Glu Gln Met Ala Glu Tyr Arg Gly Arg Thr Val Leu
 275 280 285
 Val Ser Asp Ala Ile Asp Glu Gly Arg Leu Thr Leu Gln Ile Leu Ser
 290 295 300

 Ala Arg Pro Ser Asp Asp Gly Gln Tyr Arg Cys Leu Phe Glu Lys Asp
 305 310 315 320
 Asp Val Tyr Gln Glu Ala Ser Leu Asp Leu Lys Val Val Ser Leu Gly
 325 330 335
 Ser Ser Pro Leu Ile Thr Val Glu Gly Gln Glu Asp Gly Glu Met Gln
 340 345 350
 Pro Met Cys Ser Ser Asp Gly Trp Phe Pro Gln Pro His Val Pro Trp
 355 360 365

 Arg Asp Met Glu Gly Lys Thr Ile Pro Ser Ser Ser Gln Ala Leu Thr
 370 375 380
 Gln Gly Ser His Gly Leu Phe His Val Gln Thr Leu Leu Arg Val Thr
 385 390 395 400
 Asn Ile Ser Ala Val Asp Val Thr Cys Ser Ile Ser Ile Pro Phe Leu
 405 410 415
 Gly Glu Glu Lys Ile Ala Thr Phe Ser Leu Ser
 420 425

 <210> 42
 <211> 235

 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 42

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

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
50 55 60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65 70 75 80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
85 90 95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
100 105 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
115 120 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
130 135 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145 150 155 160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
165 170 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
180 185 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
195 200 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
210 215 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp
225 230 235

<210> 43

<211> 438

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Leu Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr
1 5 10 15

Asp Ala Thr Leu Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu
 20 25 30
 Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val
 35 40 45
 His Ser Phe Ala Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg
 50 55 60
 Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg
 65 70 75 80

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

 Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly
 145 150 155 160
 Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val
 165 170 175
 His Ser Ile Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys
 180 185 190
 Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr
 195 200 205

 Ile Thr Pro Gln Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro
 210 215 220
 Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys
 225 230 235 240
 Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile
 245 250 255
 Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly

260 265 270
 Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp
 275 280 285
 Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val
 290 295 300
 Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly
 305 310 315 320
 Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser
 325 330 335

 Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr
 340 345 350
 Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp
 355 360 365
 Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln
 370 375 380
 Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val
 385 390 395 400

 Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val
 405 410 415
 Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met
 420 425 430
 Thr Phe Pro Pro Glu Ala
 435
 <210> 44
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 44
 Cys Gln Gly Ser Ala Asp His Val Val Ser Ile Ser Gly Val Pro Leu
 1 5 10 15

 Gln Leu Gln Pro Asn Ser Ile Gln Thr Lys Val Asp Ser Ile Ala Trp

20 25 30
 Lys Lys Leu Leu Pro Ser Gln Asn Gly Phe His His Ile Leu Lys Trp
 35 40 45
 Glu Asn Gly Ser Leu Pro Ser Asn Thr Ser Asn Asp Arg Phe Ser Phe
 50 55 60
 Ile Val Lys Asn Leu Ser Leu Leu Ile Lys Ala Ala Gln Gln Gln Asp
 65 70 75 80

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

Ser Tyr Ala Trp Tyr Arg Gly Ser Lys Leu Ile Gln Thr Ala Gly Asn
 145 150 155 160
 Leu Thr Tyr Leu Asp Glu Glu Val Asp Ile Asn Gly Thr His Thr Tyr
 165 170 175
 Thr Cys Asn Val Ser Asn Pro Val Ser Trp Glu Ser His Thr Leu Asn
 180 185 190
 Leu Thr Gln Asp Cys Gln Asn Ala His Gln Glu Phe Arg Phe Trp Pro
 195 200 205

<210> 45

<211> 422

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

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

Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro
35 40 45
Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp
50 55 60
Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly
65 70 75 80
Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu
85 90 95
Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg
100 105 110
Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg
115 120 125
Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr
130 135 140
Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn
145 150 155 160
Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg
165 170 175
Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His
180 185 190
Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser
195 200 205
Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser
210 215 220
Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu
225 230 235 240
Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu
245 250 255
Pro Ala Gly Val Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro
260 265 270
Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe

275 280 285
 Thr Leu Arg Leu Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr
 290 295 300
 Cys His Ile His Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu

 305 310 315 320
 Ala Ile Ile Thr Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu
 325 330 335
 Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe
 340 345 350
 Val Trp Ser Ser Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro
 355 360 365
 Trp Leu Glu Ala Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys

370 375 380
 Gln Leu Tyr Gln Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr
 385 390 395 400
 Glu Leu Ser Ser Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala
 405 410 415
 Leu Pro Ala Gly His Leu

420

<210> 46

<211> 498

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val Lys Pro Gly

1 5 10 15
 Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val Glu Trp Asp
 20 25 30
 Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ser
 35 40 45
 Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly Thr Tyr Arg
 50 55 60

Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu

65 70 75 80

Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val

85 90 95

Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp

100 105 110

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

115 120 125

Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr

130 135 140

Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala

145 150 155 160

Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val

165 170 175

Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu

180 185 190

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

195 200 205

Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys

210 215 220

Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys

225 230 235 240

Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn

245 250 255

Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met

260 265 270

Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Glu Gln

275 280 285

Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn Leu Lys Val

290 295 300

Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp Thr Tyr Leu

305 310 315 320
 Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala Asn Ala Thr

 325 330 335
 Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu Pro Arg Leu
 340 345 350
 Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg Asn Pro Gly
 355 360 365
 Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr Pro Pro Glu
 370 375 380
 Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr Leu Leu Cys

 385 390 395 400
 Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu Gln Cys Ser
 405 410 415
 Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln Val Trp Asp
 420 425 430
 Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His Lys Val Thr
 435 440 445
 Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn Gln Thr Tyr

 450 455 460
 Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp Ala Phe Ile
 465 470 475 480
 Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu Phe Leu Phe
 485 490 495
 Thr Pro

<210> 47

<211> 93

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp

35 40 45

Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr

50 55 60

Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro Thr

65 70 75 80

Thr Val Lys Ser Ser Pro Gly Leu Gly Pro Val Glu Leu

85 90

<210> 48

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

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

1 5 10 15

Phe Phe His His Ile Leu His Trp Thr Pro Ile Pro Asn Gln Ser Glu

20 25 30

Ser Thr Cys Tyr Glu Val Ala Leu Leu Arg Tyr Gly Ile Glu Ser Trp

35 40 45

Asn Ser Ile Ser Asn Cys Ser Gln Thr Leu Ser Tyr Asp Leu Thr Ala

50 55 60

Val Thr Leu Asp Leu Tyr His Ser Asn Gly Tyr Arg Ala Arg Val Arg

65 70 75 80

Ala Val Asp Gly Ser Arg His Ser Asn Trp Thr Val Thr Asn Thr Arg

85 90 95

Phe Ser Val Asp Glu Val Thr Leu Thr Val Gly Ser Val Asn Leu Glu

100 105 110

Ile His Asn Gly Phe Ile Leu Gly Lys Ile Gln Leu Pro Arg Pro Lys

115 120 125
Met Ala Pro Ala Asn Asp Thr Tyr Glu Ser Ile Phe Ser His Phe Arg
130 135 140
Glu Tyr Glu Ile Ala Ile Arg Lys Val Pro Gly Asn Phe Thr Phe Thr
145 150 155 160
His Lys Lys Val Lys His Glu Asn Phe Ser Leu Leu Thr Ser Gly Glu

165 170 175
Val Gly Glu Phe Cys Val Gln Val Lys Pro Ser Val Ala Ser Arg Ser
180 185 190
Asn Lys Gly Met Trp Ser Lys Glu Glu Cys Ile Ser Leu Thr Arg Gln
195 200 205
Tyr Phe Thr Val Thr Asn

210
<210> 49
<211> 173
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 49
Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln

1 5 10 15
Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr
20 25 30
Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu
35 40 45
Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp
50 55 60
Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp

65 70 75 80
Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys
85 90 95
Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val Lys
100 105 110

Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu Pro Cys Pro Val
115 120 125
Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys Cys His Pro Trp
130 135 140
Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln Ala Gly Thr Asn
145 150 155 160
Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu Arg
165 170
<210> 50
<211> 186
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 50
Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His
1 5 10 15
Glu Cys Arg Pro Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln
20 25 30
Asn Thr Val Cys Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val
35 40 45
Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly
50 55 60
Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg
65 70 75 80
Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp
85 90 95
Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala
100 105 110
Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln
115 120 125
Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro
130 135 140

Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr
145 150 155 160
Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr
165 170 175
Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala
180 185
<210> 51
<211> 163
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 51
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160
Ser Pro Gln

<210> 52

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu

35 40 45

Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp

50 55 60

Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr

65 70 75 80

Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val

85 90 95

Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr

100 105 110

Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120 125

<210> 53

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

1 5 10 15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu

20 25 30

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln

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

 Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
 100 105 110
 Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
 115 120 125
 Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
 130 135 140
 Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
 145 150 155 160

 Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
 165 170 175
 Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
 180 185 190
 Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
 195 200 205
 Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg
 210 215 220
 <210> 54
 <211
 > 201
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 54
 Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly
 1 5 10 15
 Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn
 20 25 30

Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
 35 40 45
 Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
 50 55 60
 Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln
 65 70 75 80
 Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
 85 90 95
 Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu
 100 105 110
 Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly
 115 120 125
 Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
 130 135 140
 Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp
 165 170 175
 Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser
 180 185 190
 Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr
 195 200
 <210> 55
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 55
 Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys
 20 25 30

Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu

35 40 45

Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp

50 55 60

Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe

65 70 75 80

Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val

85 90 95

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

100 105 110

Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met

115 120 125

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

130 135 140

Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln

145 150 155 160

Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu

165 170 175

Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn

180 185 190

Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala

195 200 205

Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg

210 215 220

Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser Lys Ala Ser

225 230 235

<210> 56

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe
1 5 10 15
Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu
20 25 30
Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp
35 40 45
Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn
50 55 60
Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys
65 70 75 80
Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys
85 90 95
Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp
100 105 110
Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly
115 120 125
Glu Phe Cys Val Leu
130
<210> 57
<211> 132
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 57
Thr Ser Leu Lys Pro Thr Ala Ile Glu Ser Cys Met Val Lys Phe Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Ser Lys Trp His Met Thr Ser Pro Lys Pro His Cys Val
20 25 30
Asn Thr Thr Ser Asp Gly Lys Leu Lys Ile Leu Gln Ser Gly Thr Tyr
35 40 45
Leu Ile Tyr Gly Gln Val Ile Pro Val Asp Lys Lys Tyr Ile Lys Asp
50 55 60
Asn Ala Pro Phe Val Val Gln Ile Tyr Lys Lys Asn Asp Val Leu Gln

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

 100 105 110
 Ile Gln Lys Thr Asn Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Leu Met Pro Asp Leu
 115 120 125
 Pro Phe Ile Ser
 130
 <210> 58
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 58
 Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala
 1 5 10 15
 Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro
 20 25 30

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

 Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val
 100 105 110
 Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala
 115 120 125
 Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg
 130 135 140

Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly
145 150 155 160

Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala
165 170 175

Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr
180 185 190

Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
195 200 205

<210> 59

<211> 195

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Ser Gln Leu Arg Ala Gln Gly Glu Ala Cys Val Gln Phe Gln Ala Leu
1 5 10 15

Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu
20 25 30

Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln
35 40 45

Thr Pro Thr Gln His Phe Lys Asn Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu
50 55 60

His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn
65 70 75 80

Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln
85 90 95

Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala
100 105 110

Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val
115 120 125

Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser
130 135 140

Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala
145 150 155 160
Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp
165 170 175
Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala
180 185 190
Phe Leu Leu
195
<210> 60
<211> 215
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 60
His Arg Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp
1 5 10 15
Phe Val Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser
20 25 30
Leu Ser Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe
35 40 45
Val Lys Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser
50 55 60
Phe Glu Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val
65 70 75 80
Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu
85 90 95
Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly
100 105 110
Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln
115 120 125
Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile
130 135 140
Ala Ser Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu

145 150 155 160
 Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser
 165 170 175
 Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe
 180 185 190
 Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr

 195 200 205
 Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu
 210 215
 <210> 61
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 61
 Gln Arg Thr Asp Ser Ile Pro Asn Ser Pro Asp Asn Val Pro Leu Lys
 1 5 10 15
 Gly Gly Asn Cys Ser Glu Asp Leu Leu Cys Ile Leu Lys Arg Ala Pro
 20 25 30
 Phe Lys Lys Ser Trp Ala Tyr Leu Gln Val Ala Lys His Leu Asn Lys

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

 100 105 110
 Thr Val Cys Glu Ser Gly Met Gln Thr Lys His Val Tyr Gln Asn Leu
 115 120 125
 Ser Gln Phe Leu Leu Asp Tyr Leu Gln Val Asn Thr Thr Ile Ser Val
 130 135 140

Asn Val Asp Thr Phe Gln Tyr Ile Asp Thr Ser Thr Phe Pro Leu Glu
145 150 155 160
Asn Val Leu Ser Ile Phe Leu Tyr Ser Asn Ser Asp
165 170
<210> 62
<211> 243
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 62
Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp Lys Tyr Ser Lys Ser Gly Ile
1 5 10 15
Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser Tyr Trp Asp Pro Asn Asp Glu
20 25 30
Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val Lys Trp Gln Leu Arg Gln
35 40 45
Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr
50 55 60
Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly
65 70 75 80
Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn
85 90 95
Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys
100 105 110
Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn
115 120 125
Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr
130 135 140
Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu
145 150 155 160
Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr
165 170 175

Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys
 180 185 190
 Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly
 195 200 205
 Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn
 210 215 220
 Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe
 225 230 235 240

Leu Val Gly

<210> 63

<211> 155

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

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

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

115 120 125
 Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu Pro Ser Arg Asn Thr Asp

130	135	140
Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg Pro		
145	150	155
<210> 64		
<211> 0		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 64		
000		
<210> 65		
<211> 0		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 65		
000		
<210> 66		
<211> 0		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 66		
000		
<210> 67		
<211> 0		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 67		
000		
<210> 68		
<211> 0		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 68		
000		
<210> 69		

<211> 0

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

000

<210> 70

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 70

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys

85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

145 150 155 160

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

165 170 175
Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215

<210> 71

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 71

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

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

115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val

 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215
 <210> 72
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 72
 Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

 Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Thr Pro His
 65 70 75 80

 Ser Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Ser Lys
 85 90 95
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Asn Ala Thr Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asn Val

180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

210 215

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 73

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1 5 10

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 74

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 75

<211> 6

<212>

PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 75

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

1 5

<210> 76

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 76

Ile Glu Gly Arg Met Asp

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 77

Gly Gly Gly Val Pro Arg Asp Cys Gly

1 5

<210> 78

<211> 15

<212>

> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 78

Ile Glu Gly Arg Met Asp Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15