



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0069903
(43) 공개일자 2018년06월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) **A61K 38/00** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) **C07K 16/00** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/70532 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7014561
- (22) 출원일자(국제) 2016년11월01일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2018년05월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/059838
- (87) 국제공개번호 WO 2017/079117
국제공개일자 2017년05월11일
- (30) 우선권주장
62/249,836 2015년11월02일 미국(US)
62/373,654 2016년08월11일 미국(US)

- (71) 출원인
파이브 프라임 테라퓨티스, 인크.
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 오
이스터 포인트 불러바드 111
- (72) 발명자
브레넌 토마스
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 투
코퍼레이트 드라이브
벨러빈 데이비드
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 투
코퍼레이트 드라이브
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인코리아나

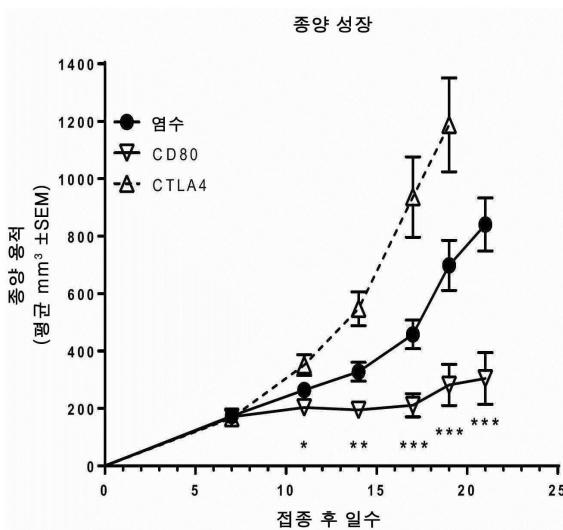
전체 청구항 수 : 총 92 항

- (54) 발명의 명칭 CD80 세포외 도메인 폴리펩타이드 및 이들의 암 치료에서의 용도

(57) 요약

본 출원은 CD80 (B7-1) 세포외 도메인 (ECD) 폴리펩티드 및 CD80-ECD 융합 분자, 및 암의 치료에 있어서의, 둘 모두 단독으로서의, 그리고 기타 치료제, 예컨대 면역 자극제 예컨대 PD-1/PD-L1 억제제와 병용한, 이들의 용도에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

A61K 38/1774 (2013.01)

A61K 39/39558 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

C07K 16/00 (2013.01)

C07K 16/2803 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

(72) 발명자

부샤 레이비드

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 투

코퍼레이트 드라이브

세니노 바바라

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 투
코퍼레이트 드라이브

명세서

청구범위

청구항 1

CD80 세포외 도메인 (ECD) 융합 분자로서,

인간 CD80 ECD 폴리펩ти드 및 인간 IgG1 Fc 도메인을 포함하되,

상기 CD80 ECD 융합 분자는 10 내지 60 mol SA 대 CD80 ECD Fc 단백질의 mol을 포함하고, 그리고 상기 분자는 적어도 2주에 걸쳐 적어도 하나의 마우스 동계(syngeneic) 또는 이종이식(xenograft) 암 모델에서 적어도 80%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 예컨대 적어도 98%의 종양 세포 성장 억제 능력이 있는, CD80 세포외 도메인 (ECD) 융합 분자.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 분자는 적어도 15 mol SA 대 단백질의 mol, 예컨대 적어도 20 mol SA 대 단백질의 mol을 포함하는, CD80 세포외 도메인 (ECD) 융합 분자.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 분자는 15 내지 30 mol SA 대 단백질의 mol을 포함하는, CD80 ECD Fc 융합 분자.

청구항 4

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 분자는 15 내지 25 mol SA 대 단백질의 mol을 포함하는, CD80 ECD Fc 융합 분자.

청구항 5

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 분자는 20 내지 30 mol SA 대 단백질의 mol을 포함하는, CD80 ECD Fc 융합 분자.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 서열 번호:14의 아미노산 서열을 포함하는, CD80 ECD Fc 융합 분자.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자는 2 또는 3 주의 기간에 걸쳐 마우스 내 CT26 종양 세포 성장의 적어도 80%, 예컨대 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%의 감소 능력이 있는, CD80 ECD Fc 융합 분자.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 마우스에, 상기 ECD Fc 융합 분자의 0.3 내지 0.6 mg/kg의 용량으로 1, 2, 또는 3회 투여하는, CD80 ECD Fc 융합 분자.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항의 CD80 ECD 융합 분자를 포함하고, 그리고 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 추가 치료제를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 추가 치료제는 적어도 하나의 면역 자극제인, 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 적어도 하나의 면역 자극제는 프로그램된 세포 사멸 1 (PD-1) / 프로그램된 세포 사멸 리간드 1 (PD-L1) 억제제인, 조성물.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 PD-1/PD-L1 억제제는 항체인, 조성물.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 PD-1/PD-L1 억제제는 항-PD-1 항체인, 조성물.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 항-PD-1 항체는 니볼루맙, 피딜리주맙, 및 펜브로리주맙으로부터 선택된 항체의 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR을 포함하는, 조성물.

청구항 16

청구항 14에 있어서, 상기 항-PD-1 항체는 니볼루맙, 피딜리주맙, 및 펜브로리주맙으로부터 선택된 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 조성물.

청구항 17

청구항 14에 있어서, 상기 항-PD-1 항체는 니볼루맙, 피딜리주맙, 및 펜브로리주맙으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 18

청구항 12에 있어서, 상기 PD-1/PD-L1 억제제는 항-PD-L1 항체인, 조성물.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 항-PD-L1 항체는 BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736, 및 MSB0010718C로부터 선택된 항체의 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR을 포함하는, 조성물.

청구항 20

청구항 18에 있어서, 상기 항-PD-L1 항체는 BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736, 및 MSB0010718C로부터 선택된 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 조성물.

청구항 21

청구항 18에 있어서, 상기 항-PD-1 항체는 BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736, 및 MSB0010718C로부터 선택되는, 조성물.

청구항 22

청구항 12에 있어서, 상기 PD-1/PD-L1 억제제는 PD-1 융합 분자인, 조성물.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 융합 분자는 AMP-224인, 조성물.

청구항 24

청구항 12에 있어서, 상기 PD-1/PD-L1 억제제는 폴리펩티드 예컨대 AUR-012인, 조성물.

청구항 25

대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에 유효량의, 청구항 1 내지 8 중 어느 한 항의 CD80 세포외 도메인 (ECD) 융합 분자 또는 청구항 9의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 상기 암은 고형 종양인, 방법.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 상기 암은 결장직장암, 유방암, 위암, 비-소세포 폐암, 흑색종, 두경부 편평상피 세포 암 종, 난소암, 췌장암, 신장 세포 암종, 간세포 암종, 방광암, 및 자궁내막암으로부터 선택되는, 방법.

청구항 28

청구항 25 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은, 수술, 화학요법, 방사선 요법, 또는 이의 조합으로부터 선택된 요법 후 재발성 또는 진행성인, 방법.

청구항 29

청구항 25 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD80 ECD 융합 분자는 CD80 ECD Fc 융합 분자이되,

(a) 상기 CD80 ECD Fc 융합 분자는, 상동한 아미노산 서열의 CD80 ECD Fc 단백질의 것보다 큰 정도로, 그러나 10 mol SA 대 CD80 ECD Fc 단백질의 mol 미만의 정도로, 적어도 2주의 기간에 걸쳐 마우스 내 CT26 종양 세포 성장을 감소시키고/시키거나,

(b) 상기 CD80 ECD Fc 융합 분자는, 항-CTLA4 항체의 것보다 더 큰 정도로, 적어도 2주의 기간에 걸쳐 마우스 내 CT26 종양 세포 성장을 감소시키는, 방법.

청구항 30

청구항 29에 있어서, 상기 융합 분자는 15 mol SA 대 단백질의 mol, 예컨대 적어도 20 mol SA 대 단백질의 mol 을 포함하는, 방법.

청구항 31

청구항 29에 있어서, 상기 융합 분자는 15 내지 40, 15 내지 30, 15 내지 25, 또는 20 내지 30 mol SA 대 단백질의 mol 을 포함하는, 방법.

청구항 32

대상체에서 암을 치료하는데 있어서 CD80 ECD 융합 단백질의 효능을 증진시키는 방법으로서, 상기 대상체에, 증가된 수준의 시알산 (SA)를 포함하는 상기 CD80 ECD 융합 단백질을 투여함으로써 상기 CD80 ECD 융합 단백질 내 시알산 (SA)의 수준을 증가시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 상기 SA 수준은 5, 10, 20, 30, 40, 또는 50 mol 대 CD80 ECD 단백질의 mol 만큼 증가되는, 방법.

청구항 34

청구항 32 또는 33에 있어서, 증진된 효능은, 상기 증가된 SA 수준의 부재 하에서의 상기 CD80 ECD 융합 분자의 투여와 비교하여, 마우스 동계 또는 이종이식 모델에서의, 적어도 하나의 종양의 성장에서의 보다 큰 감소로서, 전체 생존의 증가로서, 또는 무-질환 생존의 증가로서 측정되는, 방법.

청구항 35

청구항 32 내지 34 중 어느 한 항에 있어서, 상기 증진된 효능은, 상기 증가된 SA 수준의 부재 하에서의 상기 CD80 ECD 융합 분자의 투여와 비교하여, 마우스 동계 또는 이종이식 모델 예컨대 CT26 마우스 모델에서의 종양

성장의 보다 큰 감소로서, 또는 동물 또는 인간 대상체에서의 청소율의 감소율로서 측정되는, 방법.

청구항 36

청구항 32 내지 35 중 어느 한 항에 있어서, 상기 증진된 효능은, (a) 상기 증가된 SA 수준의 부재 하에서의 상기 CD80 ECD 융합 분자의 투여와 비교하여, 동물 또는 인간 대상체에서의 적어도 하나의 종양의 종양 성장의 추가 감소, 및/또는 (b) 상기 증가된 SA 수준의 부재 하에서의 상기 CD80 ECD 융합 분자의 투여와 비교하여, 마우스 동계 또는 이종이식 모델에서의 종양 성장의 추가 감소로서 측정되며, 상기 종양 성장은 상기 증가된 SA 수준의 부재 하에서의 상기 CD80 ECD 융합 분자의 투여와 비교하여, 증가된 SA 수준의 존재 하에서의 상기 CD80 ECD 융합 분자의 투여에서 적어도 10%, 예컨대 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90% 만큼 추가로 감소되는, 방법.

청구항 37

대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에 CD80 세포외 도메인 (ECD) 또는 CD80 ECD 융합 분자 및 프로그램된 세포 사멸 1 (PD-1) / 프로그램된 세포 사멸 리간드 1 (PD-L1) 억제제의 조합의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 상기 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자 및 상기 PD-1/PD-L1 억제제의 상기 조합은, 상기 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자 또는 상기 PD-1/PD-L1 억제제 중 하나의 단독 치료와 비교하여, 첨가 방식 (additive fashion)으로, 또는 상승작용적으로, 마우스 동계 또는 이종이식 모델에서 종양 성장을 감소시키는, 방법.

청구항 39

청구항 38에 있어서, 상기 마우스 모델은 뮤린 결장직장 암종 CT26 세포를 포함하는 결장직장암 모델인, 방법.

청구항 40

청구항 37 또는 38에 있어서, 상기 암은 고형 종양인, 방법.

청구항 41

청구항 37 내지 40 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 결장직장암, 유방암, 위암, 비-소세포 폐암, 흑색종, 두경부 편평상피 세포 암종, 난소암, 췌장암, 신장 세포 암종, 간세포 암종, 방광암, 및 자궁내막암으로부터 선택되는, 방법.

청구항 42

청구항 37 내지 41 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은, 수술, 화학요법, 방사선 요법, 또는 이의 조합으로부터 선택된 요법 후 재발성 또는 진행성인, 방법.

청구항 43

청구항 37 내지 42 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조합은 IgG Fc 도메인, 알부민, 및 PEG로부터 선택된 융합 상대를 갖는 CD80 ECD 융합 분자를 포함하는, 방법.

청구항 44

청구항 43에 있어서, 상기 융합 상대는 서열 번호: 9 내지 16 중 하나를 포함하는, Fc 도메인, 예컨대 Fc 도메인인, 방법.

청구항 45

청구항 37 내지 44 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는, 서열 번호:1, 서열 번호:3, 서열 번호:4, 및 서열 번호:5의 아미노산 35 내지 말단으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 서열 번호:20 또는 서열 번호: 21의 서열을 포함하는, 방법.

청구항 46

청구항 37 내지 45 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD-1/PD-L1 억제제는 항-PD-1 항체인, 방법.

청구항 47

청구항 46에 있어서, 상기 항-PD-1 항체는 니볼루맙, 퍼딜리주맙, 및 펜브로리주맙으로부터 선택된 항체의 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR을 포함하는, 방법.

청구항 48

청구항 47에 있어서, 상기 항-PD-1 항체는 니볼루맙, 퍼딜리주맙, 및 펜브로리주맙으로부터 선택된 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 방법.

청구항 49

청구항 48에 있어서, 상기 항-PD-1 항체는 니볼루맙, 퍼딜리주맙, 및 펜브로리주맙으로부터 선택된, 방법.

청구항 50

청구항 37 내지 49 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD-1/PD-L1 억제제는 항-PD-L1 항체인, 방법.

청구항 51

청구항 50에 있어서, 상기 항-PD-L1 항체는, BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736, 및 MSB0010718C로부터 선택된 항체의 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR을 포함하는, 방법.

청구항 52

청구항 51에 있어서, 상기 항-PD-L1 항체는, BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736, 및 MSB0010718C로부터 선택된 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 방법.

청구항 53

청구항 52에 있어서, 상기 항-PD-1 항체는 BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736, 및 MSB0010718C로부터 선택되는, 방법.

청구항 54

청구항 37 내지 45 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD-1/PD-L1 억제제는 PD-1 융합 분자인, 방법.

청구항 55

청구항 54에 있어서, 상기 융합 분자는 AMP-224인, 방법.

청구항 56

청구항 37 내지 45 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD-1/PD-L1 억제제는 폴리펩티드 예컨대 AUR-012인, 방법.

청구항 57

청구항 37 내지 56 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자 및 상기 PD-1/PD-L1 억제제는 동시에, 또는 순차적으로 투여되는, 방법.

청구항 58

청구항 57에 있어서, 상기 PD-1/PD-L1 억제제의 1회 이상의 용량이, 상기 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자를 투여 하기 이전에 투여되는, 방법.

청구항 59

청구항 58에 있어서, 상기 대상체는, 상기 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자의 투여 이전에, PD-1/PD-L1 억제

제 요법의 완결된 과정(complete course)을 수용하였던, 방법.

청구항 60

청구항 58에 있어서, 상기 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는, PD-1/PD-L1 억제제 요법의 제2 과정 동안 투여되는, 방법.

청구항 61

청구항 58 내지 60 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는, 상기 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자의 투여 이전에, 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4회 용량의 상기 PD-1/PD-L1 억제제를 수용하였던, 방법.

청구항 62

청구항 58 내지 61 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PD-1/PD-L1 억제제의 적어도 1회 용량이 상기 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자와 동시에 투여되는, 방법.

청구항 63

청구항 37 내지 62 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자의 1회 이상의 용량이, PD-1/PD-L1 억제제를 투여하기 이전에 투여되는, 방법.

청구항 64

청구항 63에 있어서, 상기 대상체는, 상기 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자의 적어도 2, 적어도 3, 적어도 3, 또는 적어도 4회의 용량을, 상기 PD-1/PD-L1 억제제를 투여하기 이전에 수용하였던, 방법.

청구항 65

청구항 63 또는 64에 있어서, 상기 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자의 적어도 1회의 용량이, 상기 PD-1/PD-L1 억제제와 동시에 투여되는, 방법.

청구항 66

청구항 37 내지 65 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 PD-1/PD-L1 억제제로의 치료에 내성이 있는, 방법.

청구항 67

청구항 66에 있어서, 상기 대상체는 사전에 PD-1/PD-L1 억제제를 수용하였던, 방법.

청구항 68

청구항 37 내지 67 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에 적어도 하나 추가 치료제, 예컨대 적어도 하나 화학요법 제제, 성장 억제성 제제, 항-혈관형성 제제 및/또는 항-신생물성 조성물이 투여되는, 방법.

청구항 69

청구항 37 내지 68 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는, 10-60 mol 시알산(SA) 대 CD80 ECD 단백질의 mol을 포함하는 CD80 ECD 융합 분자인, 방법.

청구항 70

청구항 69에 있어서, 상기 CD80 ECD 융합 분자는, 적어도 15 mol SA 대 단백질의 mol, 예컨대 적어도 20 mol SA 대 단백질의 mol을 포함하는, 방법.

청구항 71

청구항 69에 있어서, 상기 CD80 ECD 융합 분자는 15 내지 30 mol SA 대 단백질의 mol을 포함하는, 방법.

청구항 72

청구항 69에 있어서, 상기 CD80 ECD 융합 분자는 15 내지 25 mol SA 대 단백질의 mol을 포함하는, 방법.

청구항 73

청구항 72에 있어서, 상기 CD80 ECD 융합 분자는 20 내지 30 mol SA 대 단백질의 mol을 포함하는, 방법.

청구항 74

청구항 69 내지 73 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD80 ECD 융합 분자는 융합 상대로서 Fc 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 75

청구항 74에 있어서, 상기 융합 상대는 야생형 IgG1 Fc 도메인인, 방법.

청구항 76

청구항 37 내지 75 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는, 2 또는 3주의 기간에 걸쳐 적어도 하나의 마우스 동계 또는 이종이식 모델에서 종양 세포 성장의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%의 감소 능력이 있는, 방법.

청구항 77

청구항 76에 있어서, 상기 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는, 2 또는 3주의 기간에 걸쳐 마우스 내 CT26 종양 세포 성장의 적어도 95%, 예컨대 적어도 98%의 감소 능력이 있는, 방법.

청구항 78

청구항 77에 있어서, 마우스에, 상기 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자의 0.3 내지 0.6 mg/kg의 1, 2, 또는 3회 용량을 투여하는, 방법.

청구항 79

청구항 37 내지 78 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는, 청구항 1 내지 8 중 어느 한 항의 CD80 ECD Fc 융합 분자인, 방법.

청구항 80

CD80 세포외 도메인 (ECD) 융합 분자로서, 인간 CD80 ECD 폴리펩티드, 및 L234F, L235E, 및 P331S 아미노산 치환을 갖는 인간 IgG1 Fc 도메인을 포함하는, CD80 세포외 도메인 (ECD) 융합 분자.

청구항 81

청구항 80에 있어서, 서열 번호: 5, 서열 번호: 12, 및 서열 번호: 21로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 상기 CD80 ECD 융합 분자.

청구항 82

청구항 80 또는 81에 있어서, 상기 Fc 도메인 아미노산 서열은, 상기 CD80 ECD 아미노산 서열의 C-말단 아미노산에 직접적으로 부착되는, CD80 ECD 융합 분자.

청구항 83

청구항 80 또는 81에 있어서, 상기 Fc 도메인 아미노산 서열은, 링커 웹티드, 예컨대 GS 링커를 통하여 상기 CD80 ECD 아미노산 서열의 C-말단 아미노산에 부착되는, CD80 ECD 융합 분자.

청구항 84

청구항 80 내지 83 중 어느 한 항의 CD80 ECD 융합 분자를 포함하고, 그리고 적어도 하나의 약제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 85

청구항 84에 있어서, 추가 치료제, 예컨대 적어도 하나 면역 자극제를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 86

청구항 85에 있어서, 상기 적어도 하나의 면역 자극제는 프로그램된 세포 사멸 1 (PD-1) / 프로그램된 세포 사멸 리간드 1 (PD-L1) 억제제, 예컨대 PD-1 융합 분자 (즉 AMP 224), 예컨대 폴리펩티드 (즉 AUR-012), 또는 예컨대 항체, 예컨대 항-PD-1 항체 (즉 니볼루맙, 피딜리주맙, 또는 펜브로리주맙) 또는 항-PD-L1 항체 (즉 BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736, 또는 MSB0010718C)를 포함하는, 조성물.

청구항 87

대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 유효량의, 청구항 80 내지 83 중 어느 한 항의 CD80 세포외 도메인 (ECD) 융합 분자 또는 청구항 84 내지 86 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 88

청구항 87에 있어서, 상기 암은 고형 종양인, 방법.

청구항 89

청구항 88에 있어서, 상기 암은 결장직장암, 유방암, 위암, 비-소세포 폐암, 흑색종, 두경부 편평상피 세포 암종, 난소암, 퀘장암, 신장 세포 암종, 간세포 암종, 방광암, 및 자궁내막암으로부터 선택되는, 방법.

청구항 90

청구항 87 내지 89 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은, 수술, 화학요법, 방사선 요법, 또는 이의 조합으로부터 선택된 요법 후 재발성 또는 진행성인, 방법.

청구항 91

청구항 87 내지 90 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD80 ECD 융합 분자 또는 조성물은, 청구항 86의 제제와 같은 적어도 하나의 추가 치료제와 병용하여 투여되는, 방법.

청구항 92

청구항 91에 있어서, 상기 추가 치료제는 적어도 하나의 화학요법 제제, 성장 억제성 제제, 항-혈관형성 제제 및/또는 항-신생물성 조성물을 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호참조

본 출원은 2016년 8월 11일에 출원된 미국 가출원 제62/373,654호, 및 2015년 11월 2일에 출원된 제62/249,836호의 우선권을 주장하며, 이들 모두는 본원에 참고로 포함되어 있다.

[0003] 기술분야

본 출원은 CD80(B7-1) 세포외 도메인(ECD) 폴리펩타이드 및 CD80-ECD 융합 분자 및 단독 및 다른 치료제, 예컨대 PD-1/PD-L1 억제제와 같은 면역 자극제와 조합된 이들의 암 치료에서의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] B7-1로도 알려진 CD80은 이들의 리간드 결합 활성을 통해 공동자극 또는 공동억제 반응을 전달함으로써 면역 조절에 관여하는 막 결합 단백질의 B7 계열 중 하나이다. B7 계열 단백질의 다른 구성원은 CD86(B7-2), 유도성 공동자극자 리간드(ICOS-L), 프로그램화된 사멸-1 리간드(PD-L1; B7-H1), 프로그램화된 사멸-2 리간드(PD-L2; B7-H2), B7-H3, 및 B7-H4를 포함한다. CD80은 T 세포, B 세포, 수지상 세포 및 단핵구의 표면에서 발현되는 막 관통 단백질이며 수용체 CD28, CTLA4(CD152), 및 PD-L1. CD80 및 CD86에 결합하고, 이들의 수용체 CTLA4 및

CD28은 T 세포 활성화, 확장, 분화, 및 생존을 제어하기 위한 공동자극-공동억제 시스템으로서 작동한다. CD80 및 CD86과 CD28과의 상호작용은, 예를 들면, T 세포 반응의 활성화를 야기하는 공동자극 신호를 야기한다. CD80은 결국 CD80에 결합시 이전에 CD80/CD28 상호작용에 의해 촉발된 T 세포 반응을 억제하는 작용을 하는 CTLA4의 상향조절을 자극한다. 이러한 피드백 루프는 면역 반응을 정밀하게 제어한다.

[0006] CD80은 또한 CD28과 유사한 친화성으로 또 다른 B7 계열 구성원인 PD-L1과 상호작용하는 것으로 나타난 반면, CD86은 PD-L1과 상호작용하지 않는다. PD-L1은 프로그램화된 사멸-1(PD-1) 단백질에 대한 2개의 리간드 중 하나이며, 이는 T 세포 조절에도 관여한다. 구체적으로, T 세포에서 PD-1의 발현은 T 세포가 활성화된 후 유도될 수 있고, PD-1의 PD-L1에의 결합은 T 세포 불활성화를 촉진함으로써 T 세포 활성을 하향조절한다. 많은 종양 세포는 표면에 PD-L1을 발현하여, 잠재적으로 PD-1/PD-L1 상호작용을 야기하고 종양에 대한 T 세포 반응의 억제를 야기한다. 이러한 관찰은 환자에서 종양에 대한 자연 면역 반응을 차단하도록 고안된 암 치료제로서 PD-1/PD-L1 상호작용의 억제제의 개발로 이어졌다.

[0007] CD80의 PD-L1에의 결합은 PD-1/PD-L1 상호작용을 차단하고 종양 부위에서 T 세포 반응의 억제를 방지하는 대안적인 기전으로서 작용할 수 있다. 그러나, 동시에, CD80의 증가된 수준은 또한 CD28에 결합하고 CTLA4를 유도하여 T 세포 반응을 유도하거나 억제하는데 이용가능할 수 있다. CD80의 일부 가용성 형태는 또한 내인성 CD80 활성을 차단함으로써 CTLA4 활성화를 차단하는 기능을 할 수 있다. 또한, 상이한 가용성 CD80 단백질 형태는 단백질 형태와 종양 세포 사이의 다른 상호작용을 통해 종양 성장에 상이한 영향을 미칠 수 있고, 이러한 영향은 시험 전에 예측될 수 없다. CD80의 다양한 가용성 형태가 실제로 생체내에서 종양 성장에 어떻게 영향을 미치는지에 대해서는 이전에 직접 시험되지 않았다. 본 발명자들은, 단독 투여될 때, 및 PD-1/PD-L1 억제제와 함께 투여될 때, 마우스 모델에서 종양 성장에 특히 강력한 효과를 갖는 CD80 세포의 도메인(ECD) 융합 분자 세트를 개발하였다. 하기 실시예에 나타난 데이터에 기초하여, 본원의 구현에는 암 치료에서 최고의 치료 효과를 제공할 수 있다.

발명의 내용

[0008] 일부 구현예에서, CD80 세포의 도메인(ECD) 폴리펩타이드 또는 CD80 ECD 융합 분자가 제공된다. 일부 구현예에서, 융합 분자는 CD80 ECD 및 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4와 같은 면역글로불린의 Fc 도메인, 알부민, 또는 PEG와 같은 중합체를 포함하는 적어도 하나의 융합 파트너를 포함한다. 일부 구현예에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 인간 CD80, 예컨대 서열번호:5의 인간 CD80, 또는 CD80 아형 2 또는 아형 3으로부터의 인간 CD80 ECD(서열번호: 3 및 4)를 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 분자는 Fc 도메인, 예컨대 서열번호: 9-16으로부터 선택되는 서열을 포함하는 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 분자는 인간 IgG1 Fc 도메인, 예컨대 야생형 서열을 갖는 인간 IgG1 Fc 도메인, 예컨대 서열번호:14의 인간 IgG1 Fc 도메인, 또는 대안적으로, L234F, L235E, 및 P331S 아미노산 치환을 갖는 돌연변이 서열, 예컨대 서열번호:12의 돌연변이 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자는 서열번호: 5, 서열번호: 12, 서열번호:14, 서열번호: 20, 및 서열번호: 21로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자 융합 파트너는 CD80 ECD 아미노산 서열의 C-말단 아미노산 또는 성숙한 CD80 ECD 아미노산 서열의 N-말단 아미노산에 직접 부착된다. 일부 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자는 링커 웹타이드, 예컨대 GS 링커를 통해 CD80 ECD에 부착될 수 있다.

[0009] 일부 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자는 10-60 mol 시알산(SA)/mol 단백질, 예컨대 15-60 mol SA/mol 단백질의 시알산 함량을 갖는다. 일부 구현예에서, 함량은 10-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 15-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 20-40 mol SA/mol 단백질, 20-30 mol SA/mol 단백질, 15-25 mol SA/mol 단백질, 15-30 mol SA 대 단백질의 mol, 또는 30-40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 적어도 15, 예컨대 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 또는 적어도 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 이러한 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자는, 예를 들면, 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 Fc 도메인과 같은 야생형 Fc 도메인, 또는, 대안적으로, L234F, L235E, 및 P331S에 치환을 갖는 IgG1 Fc 도메인을 갖는, CD80 ECD Fc 융합이다. 일부 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자는 서열번호: 5, 서열번호: 12, 서열번호:14, 서열번호: 20, 및 서열번호: 21로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 상기 일부 구현예에서, 융합 분자는 동일한 아미노산 서열을 갖지만 SA 함량이 더 낮은 융합 분자보다 마우스 동계 또는 이종이식 모델에서, 예컨대 CT26 마우스 모델에서 더 큰 백분율 종양 성장 억제를 갖는다. 상기 일부 구현예에서, 융합 분자가 적어도 10 mol SA/mol 단백질, 예컨대 적어도 15 mol SA/mol 단백질, 예컨대 적어도 20 mol SA/mol 단백질을 포함하는 경우, 융합 분자는 동일한 아미노산 서열을 갖지만 각각 10 mol SA/mol 단백

질 미만 또는 15 mol SA/mol 단백질 미만 또는 20 mol SA/mol 단백질 미만을 갖는 융합 분자보다 마우스 동계 또는 이종이식 모델에서, 예컨대 CT26 마우스 모델에서 더 큰 백분율 종양 성장 억제를 갖는다.

[0010] 본원의 일부 구현예는 CD80 ECD 융합 분자를 포함하며, 상기 분자는 적어도 10일, 예컨대 적어도 2주의 기간 동안, 예컨대 10일 내지 2주 또는 2주 내지 3주, 또는 적어도 3주의 기간 동안, 적어도 하나의 마우스 동계 또는 이종이식 암 모델, 예컨대 CT26 모델에서 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 예컨대 적어도 98% 종양 세포 성장을 억제할 수 있다.

[0011] 일부 구현예에서, 마우스에게 CD80 ECD Fc 융합 분자의 0.3 내지 3 mg/kg, 예컨대 0.3 내지 0.6 mg/kg의 1 내지 3개의 용량이 제공된다. 일부 이러한 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자는 또한 10-60 mol 시알산(SA)/mol 단백질, 예컨대 15-60 mol SA/mol 단백질의 시알산 함량을 갖는다. 일부 구현예에서, 함량은 10-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 15-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 20-40 mol SA/mol 단백질, 20-30 mol SA/mol 단백질, 15-25 mol SA/mol 단백질, 15-30 mol SA 대 단백질의 mol, 또는 30-40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 적어도 15, 예컨대 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 또는 적어도 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자는 융합 파트너로서 Fc, 예컨대 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 Fc 도메인을 갖는다. 일부 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자는 서열번호: 5, 서열번호: 12, 서열번호: 14, 서열번호: 20, 및 서열번호: 21로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 융합 분자가 적어도 10 mol SA/mol 단백질, 예컨대 적어도 15 mol SA/mol 단백질, 예컨대 적어도 20 mol SA/mol 단백질을 포함하는 상기 일부 구현예에서, 상기 분자는 동일한 아미노산 서열을 갖지만 각각 10 mol SA/mol 단백질 미만 또는 15 mol SA/mol 단백질 미만 또는 20 mol SA/mol 단백질 미만을 갖는 융합 분자보다 마우스 동계 또는 이종이식 모델에서, 예컨대 CT26 마우스 모델에서 더 큰 백분율 종양 성장 억제를 갖는다. 융합 분자가 적어도 10 mol SA/mol 단백질, 예컨대 적어도 15 mol SA/mol 단백질, 예컨대 적어도 20 mol SA/mol 단백질을 포함하는 상기 일부 구현예에서, 상기 분자는 항-CTLA4 항체, 예컨대 항-CTLA4 항체 클론 9D9보다, 적어도 10일 또는 적어도 2주 또는 적어도 3주, 예컨대 10일 내지 2주 또는 2주 내지 3주 후, 마우스 동계 또는 이종이식 모델에서, 예컨대 CT26 마우스 모델에서 더 큰 백분율 종양 성장 억제를 갖는다.

[0012] 상기 구현예 중 일부에서, CD80 ECD Fc 융합 분자는 또한 동계 또는 이종이식 종양 모델, 예컨대 CT26 모델로부터 마우스에서 완전한 종양 퇴행을 유도할 수 있다.

[0013] 또한, 상기 기재된 구현예 중 어느 것의 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자를 포함하고, 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 이러한 조성물은 적어도 하나의 부가적인 치료제를 추가로 포함한다.

[0014] 일부 구현예에서, 부가적인 치료제는 적어도 하나의 면역 자극제를 포함한다. 일부 구현예에서, 면역 자극제는 프로그램화된 세포 사멸 1(PD-1) / 프로그램화된 세포 사멸 리간드 1(PD-L1) 억제제를 포함한다. PD-1/PD-L1 억제제는 항체, 예컨대 항-PD-1 항체 또는 항-PD-L1 항체, 웨타이드 또는 융합 분자, 또는 소분자일 수 있다.

[0015] 일부 구현예에서, PD-1/PD-L1 억제제는 항-PD-1 항체, 예컨대 니볼루맙, 피딜리주맙, 및 펜브롤리주맙으로부터 선택된 항체의, 중쇄 및 경쇄 CDR을 포함하거나, 또는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하거나, 또는 전체 아미노산 서열을 포함하는 항체이다. 일부 구현예에서, PD-1/PD-L1 억제제는 항-PD-L1 항체, 예컨대 BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736, 및 MSB0010718C로부터 선택된 항체의, 중쇄 및 경쇄 CDR, 중쇄 및 경쇄 가변 영역, 또는 전체 아미노산 서열을 포함하는 항체이다.

[0016] 일부 구현예에서, PD-1/PD-L1 억제제는 PD-1 융합 분자, 예컨대 AMP-224 또는 폴리펩타이드, 예컨대 AUR-012이다.

[0017] 또한, 상기 기재된 구현예 중의 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 단백질 또는 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 암을 치료하는 방법이 본원에 포함된다. 일부 구현예에서, 암은 고형 종양이다. 일부 구현예에서, 암은 결장암, 유방암, 위암, 비소세포 폐암, 흑색종, 두경부의 편평 세포 암종, 난소암, 췌장암, 신장 세포 암종, 간세포 암종, 방광암, 및 자궁내막암으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 암은 수술, 화학요법, 방사선 요법, 또는 이의 조합으로부터 선택된 요법 후에 재발성이거나 진행성이다.

[0018] 본원의 방법 중 일부에서, CD80 ECD, CD80 ECD 융합 분자, 또는 조성물은 적어도 하나의 부가적인 치료제와 조합하여 투여된다. 일부 이러한 구현예에서, 부가적인 치료제는 동일한 조성물의 일부로서 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자와 함께 포장될 수 있고, 예컨대 하나의 조성물에서 함께 혼합되거나 별개의 용기, 바이알, 또는

다른 패키지로 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, 부가적인 치료제는 적어도 하나의 면역 자극제를 포함한다. 일부 구현예에서, 면역 자극제는 프로그램화된 세포 사멸 1(PD-1) / 프로그램화된 세포 사멸 리간드 1(PD-L1) 억제제를 포함한다. PD-1/PD-L1 억제제는 항체, 예컨대 항-PD-1 항체 또는 항-PD-L1 항체, 펩타이드 또는 융합 분자, 또는 소분자일 수 있다.

[0019] 일부 구현예에서, PD-1/PD-L1 억제제는 항-PD-1 항체, 예컨대 니볼루맙, 피딜리주맙, 및 펜브롤리주맙으로부터 선택된 항체의, 중쇄 및 경쇄 CDR을 포함하거나, 또는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하거나, 또는 전체 아미노산 서열을 포함하는 항체이다. 일부 구현예에서, PD-1/PD-L1 억제제는 항-PD-L1 항체, 예컨대 BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736, 및 MSB0010718C로부터 선택된 항체의, 중쇄 및 경쇄 CDR, 중쇄 및 경쇄 가변 영역, 또는 전체 아미노산 서열을 포함하는 항체이다.

[0020] 일부 구현예에서, PD-1/PD-L1 억제제는 PD-1 융합 분자, 예컨대 AMP-224 또는 폴리펩타이드, 예컨대 AUR-012이다.

[0021] 본원의 방법의 일부 구현예에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자 및 부가적인 치료제, 예컨대 면역 자극제, 예컨대 PD-1/PD-L1 억제제는 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 일부 경우, PD-1/PD-L1 억제제의 하나 이상의 용량은 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자를 투여하기 전에 투여된다. 일부 경우, 대상체는 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자의 투여 전에 면역 자극제, 예컨대, PD-1/PD-L1 억제제 요법의 완전한 과정을 받았다. 일부 경우, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 면역 자극제, 예컨대 PD-1/PD-L1 억제제 요법의 두 번째 과정 동안 투여된다. 일부 경우, 대상체는 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자의 투여 전에 면역 자극제, 예컨대 PD-1/PD-L1 억제제의 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개, 또는 적어도 4개의 용량을 받았다. 일부 경우, 면역 자극제, 예컨대 PD-1/PD-L1 억제제의 적어도 하나의 용량은 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자와 동시에 투여된다.

[0022] 일부 구현예에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자의 하나 이상의 용량은 부가적인 치료제, 예컨대 면역 자극제, 예컨대 PD-1/PD-L1 억제제의 투여 전에 투여된다. 일부 이러한 경우에, 대상체는 면역 자극제, 예컨대 PD-1/PD-L1 억제제의 투여 전에 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자의 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개, 또는 적어도 4개의 용량을 받았다. 일부 경우, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자의 적어도 하나의 용량은 면역 자극제, 예컨대 PD-1/PD-L1 억제제와 동시에 투여된다.

[0023] 본원의 방법 중 어느 것에서, 대상체는 PD-1/PD-L1 억제제를 이용한 치료에 내성일 수 있다. 일부 이러한 경우에, 대상체는 이전에 PD-1/PD-L1 억제제 요법을 받은 반면, 다른 경우에, 대상체는 이전에 PD-1/PD-L1 억제제 요법을 받지 않았지만 특정 형질과 같은 다른 수단을 통해 내성으로서 확인된다.

[0024] 상기 방법 중 어느 것에서, 대상체는 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자 외에, 적어도 하나의 화학요법제, 성장 억제제, 항-혈관신생제 및/또는 항-신생 조성물을 포함하는 부가적인 치료제를 투여받을 수 있다.

[0025] 일부 구현예에서, 대상체에게 투여되는 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자 및 면역 자극제, 예컨대 PD-1/PD-L1 억제제의 조합은 단독으로 제공되는 CD80 ECD 또는 융합 분자 또는 면역 자극제, 예컨대 PD-1/PD-L1 억제제를 이용한 치료와 비교하여 상승 방식으로 적어도 하나의 마우스 동계 또는 이종이식 암 모델에서 종양 성장을 감소시키거나 억제하는 것으로 나타났다. 일부 구현예에서, 마우스 모델은 뮤린 결장 암종 CT26 세포를 갖는 결장 암 모델이다. 다른 구현예에서, 모델은 MC38 모델 또는 B16 모델일 수 있다.

[0026] 상기 방법 구현예 중 어느 것에서, 대상체에게 투여되는 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 1주, 10일, 2주, 또는 3주의 기간 동안 적어도 하나의 마우스 동계 또는 이종이식 암 모델에서 종양 성장을, 예를 들면, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%까지 억제할 수 있거나, 또는 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 또는 1년의 기간 동안 환자에서 종양의 성장을 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%까지 억제할 수 있다. 상기 방법 구현예 중 어느 것에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자의 투여는, 예를 들면, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 또는 1년의 기간 동안, 동물 또는 인간 대상체에서 적어도 하나의 종양의 부피를 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%까지 감소시킬 수 있다. 일부 이러한 구현예에서, 종양은 고형 종양이다.

[0027] 상기 조합 요법 방법 구현예 중 어느 것에서, 대상체에게 투여되는 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자와 부가적인 치료제, 예컨대 면역 자극제, 예컨대 PD-1/PD-L1 억제제와의 조합은 1주, 10일, 2주, 또는 3주의 기간 동안

적어도 하나의 마우스 동계 또는 이종이식 암 모델에서의 종양 성장을, 예를 들면, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%까지 억제할 수 있거나, 또는 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 또는 1년의 기간 동안 환자에서 종양의 성장을 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%까지 억제할 수 있다. 상기 조합 요법 방법 구현예 중 어느 것에서, 대상체에게 투여되는 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자와 부가적인 치료제, 예컨대 면역 자극제, 예컨대 PD-1/PD-L1 억제제와의 조합은, 예를 들면, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 또는 1년의 기간 동안, 동물 또는 인간 대상체에서 적어도 하나의 종양의 부피를 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%까지 감소시킬 수 있다. 일부 이러한 구현예에서, 종양은 고형 종양이다.

[0028] 상기 조합 요법 구현예 중 일부에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 10-60 mol 시알산(SA) 대 CD80 ECD 단백질의 mol, 예컨대 15-60 mol SA/mol 단백질을 포함하는 CD80 ECD 융합 분자이다. 일부 구현예에서, 함량은 10-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 15-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 20-40 mol SA/mol 단백질, 20-30 mol SA/mol 단백질, 15-25 mol SA/mol 단백질, 15-30 mol SA 대 단백질의 mol, 또는 30-40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 적어도 15, 예컨대 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 또는 적어도 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 이러한 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자는 융합 파트너로서 Fc 도메인, 예컨대 야생형 Fc 도메인, 예컨대 야생형 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자는 서열번호: 5, 서열번호: 12, 서열번호: 14, 서열번호: 20, 및 서열번호: 21로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 이러한 구현예에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 적어도 10일, 예컨대 적어도 2주, 예컨대 적어도 3주의 기간 동안, 예컨대 10일 내지 2주 또는 2 내지 3주의 기간 동안, 마우스에서 CT26 종양 세포의 성장을 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 또는 적어도 98% 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 결과는 마우스에게 CD80 ECD Fc 융합 분자의 0.3 내지 3 mg/kg, 예컨대 0.3 내지 0.6 mg/kg의 1개 내지 3개의 용량을 제공한 후에 얻어진다.

[0029] 또한, 인간 CD80 ECD 폴리펩타이드 및 인간 IgG1 Fc 도메인, 예컨대 야생형 인간 IgG1 Fc를 포함하는 CD80 ECD 융합 분자가 본원에 포함되며, CD80 ECD Fc는 10-60 mol SA 대 CD80 ECD Fc 단백질의 mol, 예컨대 15-60 mol SA/mol 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 함량은 10-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 15-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 20-40 mol SA/mol 단백질, 20-30 mol SA/mol 단백질, 15-25 mol SA/mol 단백질, 15-30 mol SA 대 단백질의 mol, 또는 30-40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 적어도 15, 예컨대 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 또는 적어도 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 서열번호:14의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 분자는 서열번호:20의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 분자는 적어도 10일, 예컨대 적어도 2주, 예컨대 적어도 3주의 기간 동안, 예컨대 10일 내지 2주 또는 2주 내지 3주의 기간 동안, 마우스에서 CT26 종양 세포의 성장을 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 또는 적어도 98% 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 결과는 마우스에게 CD80 ECD Fc 융합 분자의 0.3 내지 3 mg/kg, 예컨대 0.3 내지 0.6 mg/kg의 1개 내지 3개의 용량을 제공한 후에 얻어진다.

[0030] 또한, CD80 ECD IgG1 Fc를 포함하고 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 조성물이 포함된다. 이러한 조성물은 또한 부가적인 치료제를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 부가적인 치료제는 적어도 하나의 면역 자극제, 예컨대 프로그램화된 세포 사멸 1(PD-1) / 프로그램화된 세포 사멸 리간드 1(PD-L1) 억제제이다. 일부 경우, PD-1/PD-L1 억제제는 항체, 예컨대 항-PD-1 항체, 예컨대 니볼루맙, 피딜리주맙, 및 펨브롤리주맙이다. 예를 들면, 항체는 니볼루맙, 피딜리주맙, 및 펨브롤리주맙으로부터 선택된 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 가질 수 있다. 다른 구현예에서, PD-1/PD-L1 억제제는 항-PD-L1 항체이다. 항-PD-L1 항체는, 예를 들면 BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736, 및 MSB0010718C로부터 선택된 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR을 가질 수 있거나, 또는 BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736, 또는 MSB0010718C의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736, 및 MSB0010718C로부터 선택된다. 대안적으로, PD-1/PD-L1 억제제는 PD-1 융합 분자, 예컨대 AMP-224 또는 폴리펩타이드, 예컨대 AUR-012일 수 있다.

[0031] 본 발명은 또한 상기 기재된 바와 같은 CD80 ECD IgG1 Fc 융합 분자의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 포함한다. 일부 구현예에서, 암은 고형 종양, 예컨대 결장암, 유방암,

위암, 비소세포 폐암, 흑색종, 두경부의 편평 세포 암종, 난소암, 췌장암, 신장 세포 암종, 간세포 암종, 방광암, 및 자궁내막암으로부터 선택되는 암이다. 일부 구현예에서, 암은 수술, 화학요법, 방사선 요법, 또는 이의 조합으로부터 선택되는 요법 후에 재발성이거나 진행성이다.

[0032]

이러한 방법 구현예 중 일부에서, CD80 ECD Fc는 10-60 mol SA 대 CD80 ECD Fc 단백질의 mol, 예컨대 15-60 mol SA/mol 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 함량은 10-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 15-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 20-40 mol SA/mol 단백질, 20-30 mol SA/mol 단백질, 15-25 mol SA/mol 단백질, 15-30 mol SA 대 단백질의 mol, 또는 30-40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 적어도 15, 예컨대 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 또는 적어도 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 Fc 도메인이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 서열번호:14의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 분자는 서열번호:20 또는 21의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 분자는 마우스에게 종양 세포를 접종한 후 2주 또는 3주의 기간 동안 마우스에서 CT26 종양 세포의 성장을 적어도 90% 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 분자는 마우스에게 종양 세포를 접종한 후 2주 또는 3주의 기간 동안 마우스에서 CT26 종양 세포의 성장을 적어도 95%, 예컨대 적어도 98% 감소시킬 수 있다. 예를 들면, 이러한 결과는 마우스에게 ECD Fc 융합 분자의 0.3 내지 3.0 mg/kg, 예컨대 0.3 내지 0.6 mg/kg의 1개 내지 3개의 용량이 제공될 때 달성될 수 있다. 방법 구현예 중 일부에서, CD80 ECD Fc는 10-40 mol SA 대 CD80 ECD Fc 단백질의 mol를 포함하고, CD80 ECD Fc는 10 mol 미만의 SA 대 CD80 ECD Fc 단백질의 mol을 포함하는 동일한 아미노산 서열의 CD80 ECD Fc 단백질보다 더 큰 정도로 2주 또는 3주의 기간 동안 마우스에서 CT26 종양 세포의 성장을 감소시킨다. 본원의 발명은 또한 CD80 ECD 융합 단백질에서 시알산(SA)의 수준을 증가시키는 것 또는 증가된 SA 수준을 갖는 CD80 ECD 융합 단백질을 제공하는 것 및 증가된 수준의 SA를 포함하는 CD80 ECD 융합 단백질을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는데 있어서 CD80 ECD 융합 단백질의 효능을 향상시키는 방법을 포함한다. 일부 이러한 구현예에서, SA 수준은 5, 10, 20, 30, 40, 또는 50 mol 대 CD80 ECD 단백질의 mol까지 증가된다. 이러한 방법 구현예 중 일부에서, CD80 ECD Fc는 10-60 mol SA 대 CD80 ECD Fc 단백질의 mol, 예컨대 15-60 mol SA/mol 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 함량은 10-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 15-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 20-40 mol SA/mol 단백질, 20-30 mol SA/mol 단백질, 15-25 mol SA/mol 단백질, 15-30 mol SA 대 단백질의 mol, 또는 30-40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 Fc 도메인이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 서열번호:14의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 분자는 서열번호:20 또는 21의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 분자는 2주 또는 3주의 기간 동안 마우스에서 CT26 종양 세포의 성장을 적어도 90% 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 분자는 적어도 10일, 예컨대 적어도 2주, 예컨대 적어도 3주의 기간 동안, 예컨대 10일 내지 2주 또는 2주 내지 3주의 기간 동안 마우스에서 CT26 종양 세포의 성장을 적어도 95%, 예컨대 적어도 98% 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 결과는 마우스에게 CD80 ECD Fc 융합 분자의 0.3 내지 3 mg/kg, 예컨대 0.3 내지 0.6 mg/kg의 1개 내지 3개의 용량이 제공된 후 얻어진다.

[0033]

이러한 방법 구현예 중 일부에서, 향상된 효능은 전체 생존의 증가, 무병 생존의 증가, 또는 동물 또는 인간 대상체에서 적어도 하나의 종양의 성장의 더 큰 감소로서 측정된다. 즉, 이러한 매개변수 중 하나 이상은 더 낮은 SA 함량을 갖는 CD80 ECD 융합 분자와 비교하여 더 높은 SA 함량을 갖는 CD80 ECD 융합 분자의 투여시에 개선된다. 다른 구현예에서, 향상된 효능은 마우스 동계 또는 이종이식 모델, 예컨대 CT26 마우스 모델에서 종양 성장의 더 큰 감소로서 또는 동물 또는 인간 대상체에서 감소된 제거율로서 측정된다. 일부 구현예에서, 효능은 대상체에서 적어도 하나의 종양의 종양 성장의 더 큰 감소 또는 적어도 하나의 마우스 동계 또는 이종이식 모델에서 종양 성장의 더 큰 감소로서 측정되며, 여기서 종양 성장은 증가된 SA 수준이 없는 CD80 ECD 융합 분자의 투여와 비교하여 증가된 SA 수준을 갖는 CD80 ECD 융합 분자의 투여시에 적어도 10%, 예컨대 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%까지 더 감소된다.

[0034]

전술한 일반적인 설명 및 다음의 상세한 설명은 단지 예시적이고 설명적인 것이며 청구범위를 제한하지 않는 것으로 이해되어야 한다. 본원에 사용된 섹션 제목은 단지 조직적인 목적을 위한 것이며 설명된 주제를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 특히 출원 및 공개를 포함하는 본원에 인용된 모든 참고문헌은 임의의 목적을 위해 그 전체가 참조로 본원에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0035]

도. 1a-1b는 뮤린 결장 암종 세포주 CT26 세포가 이식된 마우스에게 CTLA4 ECD Fc 융합 분자 및 식염수 대조군과 비교하여 CD80 ECD Fc 융합 분자를 투여하는 효과를 나타낸다. **도. 1a**는 마우스에게 CT26 세포를 접종한 후 21일까지 종양 부피를 나타낸다. 도에 나타낸 바와 같이, CTLA4 ECD Fc는 종양 성장을 향상시킨 반면, CD80 ECD Fc는 식염수 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 방식으로 종양 성장을 억제하였다. P -값을 각 연구일에 계산된 종양 부피의 독립(unpaired), 양측(two-tailed) t-검정 분석을 사용하여 계산하였다(* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$). **도. 1b**는 3개의 그룹에 대하여 접종 후 19일에 개별 종양 부피를 나타낸다.

도. 2a-2b는 뮤린 결장 암종 세포주 CT26 세포가 이식된 마우스에게 식염수 대조군과 비교하여 CD80 ECD Fc 융합 분자 또는 항-PD-1 항체 또는 이 둘의 조합을 투여하는 효과를 나타낸다. **도. 2a**는 접종 후 14일까지 종양 부피를 나타낸다. CD80 ECD Fc 및 항-PD-1 조합이 투여된 마우스는 CD80 ECD Fc(9일 후부터 $p<0.01$) 또는 항-PD-1(14일에 $p<0.01$) 단일 요법과 비교하여 종양 성장의 통계학적으로 유의한 감소를 나타내었다. 통계학적 유의성은 조합 그룹을 CD80 ECD Fc 그룹과 비교하는 양측, 독립 t-검정을 통해 결정하였다. **도. 2b**는 14일에 개별 종양 부피를 나타낸다.

도. 3a-b는 마우스에서 CT26 종양의 종양 성장에 대한 CD80 ECD Fc 융합 분자의 효과에 대한 Fc 융합 폴리펩타이드 서열의 효과를 나타낸다. 구체적으로, 마우스에게 식염수 대조군, 또는 인간 IgG1 야생형 Fc 도메인 융합 파트너를 갖는 CD80 ECD Fc(CD80-IgG1 WT), 또는 돌연변이(L234F/L235E/P331S) 인간 IgG1 Fc 도메인 융합 파트너를 갖는 CD80 ECD Fc(CD80-IgG1 MT)를 투여하였다. **도. 3a**는 접종 후 21일까지 종양 부피의 변화를 나타낸다. 돌연변이된 Fc 도메인은 향상된 항-종양 활성을 야기하였고, 이는 접종 후 14일부터 통계학적으로 유의하였다($p<0.01$). 통계학적 유의성은 양측, 독립 t-검정을 통해 결정하였다. **도. 3b**는 접종 후 21일에 개별 종양 부피를 나타낸다.

도. 4a-b는 식염수 대조군에 노출 후 또는 야생형 및 돌연변이 Fc 융합 파트너를 갖는 CD80 ECD Fc 융합 분자에 노출 후 CD3+ 및 CD4+ T 세포의 존재에 대한 뮤린 종양 세포의 염색을 나타낸다. **도. 4a**는 식염수, CD80-IgG1 WT 또는 CD80-IgG1 MT의 주사 후 7일에 수집된 CT26 종양에서 CD3+ 세포(상부 이미지) 및 상응하는 DAPI 염색(핵, 하부 이미지)을 나타내는 대표적인 이미지를 제공한다. CD80-IgG1 WT 및 CD80-IgG1 MT 모두는 비히클과 비교하여 종양 내 CD3+ 세포의 수를 증가시켰지만, 증가 크기는 CD80-IgG1 MT 후에 더 커졌다. 이미지를 10X 대물렌즈를 사용하여 수집하였다. **도. 4b**는 식염수, CD80-IgG1 WT 또는 CD80-IgG1 MT의 주사 후 7일에 수집된 CT26 종양에서 CD3+ 세포(상부 열) 및 CD4+ 세포(하부 열)를 나타내는 대표적인 이미지를 제공한다. 이미지를 동일한 시야에서 촬영하였지만, 상이한 채널로 촬영하였다. CD80-IgG1 WT 및 CD80-IgG1 MT 모두는 비히클과 비교하여 침윤성 CD4+ 세포의 수를 증가시켰다. CD3+ 대 CD4+ 세포의 비율은 CD80-IgG1 WT와 비교하여 CD80-IgG1 MT에서 증가하였다. 이미지를 10X 대물렌즈를 사용하여 수집하였다.

도. 5a-d는 0.01, 0.1, 또는 1 μ g/웰의 CD80 ECD IgG1 Fc 도메인 융합 분자(CD80-Fc)로 코팅된 단백질 A 비드에 노출된 96 웰 조직 배양 플레이트 상의 T-세포로부터의 사이토카인 IFN- γ 및 TNF- α 의 방출을 나타낸다.

도. 5a 및 5c는, 가용성 사이토카인 생산에 의해 측정된 바와 같이, 비드-고정화된 CD80-Fc 단독이 유의한 T-세포 활성화를 유발하지 않았음을 나타낸다. **도. 5b 및 5d**는 소량의 OKT3-scFv(그 자체로 T-세포 자극을 유발하기에 너무 낮음)가 CD80-Fc와 함께 고정화될 때, 사이토카인 방출이 관찰되었음을 나타낸다.

도. 6은 식염수 대조군 또는 3개의 상이한 시알산(SA) 함량을 갖는 CD80 ECD Fc 융합 분자의 3개의 상이한 롯트의 0.3 또는 0.6 mg/kg 용량으로 처리한 후 뮤린 CT26 종양의 종양 성장을 나타낸다. 롯트 A는 5 mol SA/mol 단백질을 갖고, 롯트 D는 15 mol SA/mol 단백질을 가지며, 롯트 E는 20 mol SA/mol 단백질을 갖는다. 0.3 또는 0.6 mg/kg 용량의 CD80 ECD Fc 롯트 E 처리는 대조군과 비교하여 93% 및 98%의 종양 성장 억제를 야기하였다($P<0.001$). 0.3 또는 0.6 mg/kg 용량의 CD80 ECD Fc 롯트 D 처리는 대조군과 비교하여 93% 및 95%의 종양 성장 억제를 야기하였다($P<0.001$). 그에 반해, 0.3mg/kg의 CD80 ECD Fc 롯트 A 처리는 대조군과 비교하여 종양 성장을 억제하지 않았고 0.6mg/kg으로 투여될 때, 종양 성장의 70% 억제($P<0.001$)만을 유도하였다.

도. 7은 10mg/kg의 마우스 IgG2b; 0.3mg/kg의 뮤린 CD80 ECD-Fc SA 20 mol/mol; 10mg/kg의 항-CTLA4 항체 클론 9D9; 및 1.5mg/kg의 항-CTLA4 항체 클론 9D9로 처리된 CT26 종양의 종양 성장을 나타낸다. 화살표는 마우스에게 투여된 때를 나타낸다. 별표 기호(*)는 0.3mg/kg의 뮤린 CD80 ECD-Fc SA 20 mol/mol 및 다른 처리 사이의 통계학적 유의차를 나타낸다.

도. 8은 10mg/kg의 마우스 IgG2b; 3mg/kg의 뮤린 CD80 ECD-Fc SA 20 mol/mol; 10mg/kg의 항-CTLA4 항체 클론 9D9; 및 1.5mg/kg의 항-CTLA4 항체 클론 9D9로 처리된 MC38 종양의 종양 성장을 나타낸다. 화살표는 마우스에게 투여된 때를 나타낸다. 별표 기호(*)는 3mg/kg의 뮤린 CD80 ECD-Fc SA 20 mol/mol 및 다른 처리 사이의 통계학

적 유의차를 나타낸다.

도. 9는 10mg/kg의 마우스 IgG2b; 3mg/kg의 뮤린 CD80 ECD-Fc SA 20 mol/mol; 10mg/kg의 항-CTLA4 항체 클론 9D9; 및 1.5mg/kg의 항-CTLA4 항체 클론 9D9로 처리된 B16 종양의 종양 성장을 나타낸다. 화살표는 마우스에게 투여된 때를 나타낸다. 별표 기호(*)는 3mg/kg의 뮤린 CD80 ECD-Fc SA 20 mol/mol 및 다른 처리 사이의 통계학적 유의차를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 정의

달리 정의하지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용된 과학적 및 기술적 용어는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 또한, 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함할 것이며, 복수 용어는 단수를 포함할 것이다.

[0038] 본원에서, "또는"의 사용은 달리 언급하지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 다중 종속항의 문맥에서, "또는"의 사용은 오직 대안에서 둘 이상의 이전 독립항 또는 종속항을 대안으로만 언급한다. 또한, 용어, 예컨대 "요소" 또는 "구성요소"는, 달리 구체적으로 언급하지 않는 한 하나의 단위를 포함하는 요소 및 구성요소 및 둘 이상의 하위단위를 포함하는 요소 및 구성요소 모두를 포함한다.

[0039] 재조합 DNA, 올리고뉴클레오타이드 합성, 조직 배양 및 형질전환(예컨대, 전기천공, 리포펙션), 효소 반응, 및 정제 기술과 관련하여 사용된 예시적인 기술은 다른 여러 곳 중에서, 예컨대, 문헌[Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))]에 기재되어 있다.

[0040] 본 발명에 따라 이용되는 바와 같이, 다르게 나타내지 않는 한, 하기 용어는 하기 의미를 것으로 이해될 것이다:

[0041] 용어 "핵산 분자" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 상호교환적으로 사용될 수 있으며, 뉴클레오타이드의 중합체를 지칭한다. 이러한 뉴클레오타이드의 중합체는 천연 및/또는 비-천연 뉴클레오타이드를 함유할 수 있으며, 비제한적으로, DNA, RNA, 및 PNA를 포함한다. "핵산 서열"은 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드의 선형 서열을 지칭한다.

[0042] 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용되며, 최소 길이로 제한되지 않는다. 이러한 아미노산 잔기의 중합체는 천연 또는 비-천연 아미노산 잔기를 함유할 수 있으며, 이는 비제한적으로, 아미노산 잔기의 펩타이드, 올리고펩타이드, 이량체, 삼량체, 및 다량체를 포함한다. 전장 단백질 및 이의 단편 모두가 상기 정의에 포함된다. 용어는 또한 폴리펩타이드의 발현후 변형, 예를 들면, 당화, 시알릴화, 아세틸화, 인산화 등을 포함한다. 또한, 본 발명의 목적을 위해, "폴리펩타이드"는, 단백질이 원하는 활성을 유지하는 한, 원상태 서열에 대한 변형, 예컨대 결실, 부가, 및 치환(일반적으로 자연에서 보존적)을 포함하는 단백질을 지칭한다. 이러한 변형은 부위 지정 돌연변이유발을 통해서와 같이 고의적일 수 있거나, 또는 단백질을 생산하는 숙주의 돌연변이 또는 PCR 증폭으로 인한 오류를 통해서와 같이 우발적일 수 있다.

[0043] "CD80 세포외 도메인" 또는 "CD80 ECD"는 CD80의 세포외 도메인 폴리펩타이드를 지칭하며, 이는 이의 천연 및 조작된 변이체를 포함한다. CD80 ECD의 비제한적인 예는 서열번호:--를 포함한다. "CD80 ECD 융합 분자"는 CD80 ECD 및 융합 파트너, 예컨대 Fc 도메인, 알부민, 또는 PEG를 포함하는 분자를 지칭한다. 융합 파트너는, 예를 들면, CD80 ECD의 N- 또는 C-말단 또는 내부 위치에 공유 부착될 수 있다. CD80 ECD 융합 분자의 비제한적인 예는 서열번호:--를 포함한다.

[0044] 용어 "프로그램화된 세포 사멸 단백질 1" 및 "PD-1"은 CD28 계열에 속하는 면역억제 수용체를 지칭한다. PD-1은 생체내에서 이전에 활성화된 T 세포에서 주로 발현되며, 2개의 리간드 PD-L1 및 PD-L2에 결합한다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "PD-1"은 인간 PD-1(hPD-1), hPD-1의 변이체, 아형, 및 종 동족체, 및 hPD-1과 적어도 하나의 공통된 에피토프를 갖는 유사체를 포함한다. 완전한 hPD-1 서열은 GenBank 승인번호 U64863 하에 발견될 수 있다. 일부 구현예에서, PD-1은 서열번호: --(신호 서열을 갖는 전구체) 또는 서열번호: --(신호 서열이 없는 성숙한)의 아미노산 서열을 갖는 인간 PD-1이다.

[0045] 용어 "프로그램화된 세포 사멸 1 리간드 1" 및 "PD-L1"은 PD-1에 결합시 T 세포 활성화 및 사이토카인 분비를 하향조절하는 PD-1에 대한 2개의 세포 표면 당단백질 리간드 중 하나(다른 것은 PD-L2임)를 지칭한다. 본원에

사용된 바와 같이 용어 "PD-L1"은 인간 PD-L1(hPD-L1), hPD-L1의 변이체, 아형, 및 종 동족체, 및 hPD-L1과 적어도 하나의 공통된 에피토프를 갖는 유사체를 포함한다. 완전한 hPD-L1 서열은 GenBank® 승인번호 Q9NZQ7 하에 발견될 수 있다. 일부 구현예에서, PD-L1은 서열번호: --(신호 서열을 갖는 전구체) 또는 서열번호: --(신호 서열이 없는 성숙한)의 아미노산 서열을 갖는 인간 PD-L1이다.

[0046] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "면역 자극제"는 공동자극 분자를 포함하는 면역 자극 분자의 작용제로서 작용함으로써, 또는 공동억제 분자를 포함하는 면역 억제 분자의 길항제로서 작용함으로써 면역 시스템을 자극하는 분자를 지칭한다. 면역 자극제는 생물제제, 예컨대 항체 또는 항체 단편, 다른 단백질, 또는 백신일 수 있거나, 또는 소분자 약물일 수 있다. "면역 자극 분자"는 면역 반응을 향상시키거나, 자극하거나, 또는 "턴온(turn-on)"하는 수용체 또는 리간드를 포함한다. 본원에 정의된 바와 같은 면역 자극 분자는 공동자극 분자를 포함한다. "면역 억제 분자"는 면역 반응을 감소시키거나, 억제하거나, 저해하거나, 또는 "턴오프(turn-off)"하는 작용을 하는 수용체 또는 리간드를 포함한다. 본원에 정의된 바와 같은 면역 억제 분자는 공동억제 분자를 포함한다. 이러한 면역 자극 및 면역 억제 분자는, 예를 들면, 면역 세포, 예컨대 T 세포 상에서 발견되거나, 또는 선천 면역에 관여하는 세포, 예컨대 NK 세포 상에서 발견되는 수용체 또는 리간드일 수 있다.

[0047] 용어 "PD-1/PD-L1 억제제"는 PD-1/PD-L1 신호전달 경로를 파괴하는 모이어티를 지칭한다. 일부 구현예에서, 억제제는 PD-1 및/또는 PD-L1에 결합함으로써 PD-1/PD-L1 신호전달 경로를 억제한다. 일부 구현예에서, 억제제는 또한 PD-L2에 결합한다. 일부 구현예에서, PD-1/PD-L1 억제제는 PD-1의 PD-L1에의 결합 및/또는 PD-L2에의 결합을 차단한다. 비제한적인 예시적인 PD-1/PD-L1 억제제는 PD-1에 결합하는 항체; PD-1에 결합하는 항체; 융합 단백질, 예컨대 AMP-224; 및 웨타이드, 예컨대 AUR-012를 포함한다.

[0048] 용어 "PD-1을 억제하는 항체"는 PD-1에 결합하거나 PD-L1에 결합하여 PD-1 및/또는 PD-L1 신호전달을 억제하는 항체를 지칭한다. 일부 구현예에서, PD-1을 억제하는 항체는 PD-1에 결합하고 PD-L1 및/또는 PD-L2의 PD-1에의 결합을 차단한다. 일부 구현예에서, PD-1을 억제하는 항체는 PD-L1에 결합하고 PD-1의 PD-L1에의 결합을 차단한다. PD-L1에 결합하는 PD-1을 억제하는 항체는 항-PD-L1 항체로 지칭될 수 있다. PD-1에 결합하는 PD-1을 억제하는 항체는 항-PD-1 항체로 지칭될 수 있다.

[0049] CD80 ECD 및 CD80 ECD 융합 분자와 관련하여, 용어 리간드의 "결합을 차단하다", 및 이의 문법적 변형은 CD80 및 CD80 리간드, 예컨대 CD28, CTLA4, 또는 PD-L1 사이의 상호작용을 억제하는 능력을 지칭한다. 이러한 억제는 CD80 리간드와의 결합에 대해 경쟁하는 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자에 의한 것을 포함하는, 임의의 기전을 통해 발생할 수 있다.

[0050] 항-PD-1 항체 및 PD-1 융합 분자 또는 웨타이드와 관련하여, 용어 리간드, 예컨대 PD-L1의 "결합을 차단하다", 및 이의 문법적 변형은 PD-1 및 PD-1 리간드, 예컨대 PD-L1 사이의 상호작용을 억제하는 능력을 지칭하기 위해 사용된다. 이러한 억제는, 예컨대, PD-1 상의 중첩 결합 부위, 및/또는 리간드 친화성 등을 변경하는 항체에 의해 유도된 PD-1의 형태 변화로 인한, 리간드 결합의 직접적인 방해를 포함하는 임의의 기전을 통해, 또는 PD-1 융합 분자 또는 웨타이드의 경우, PD-1 리간드와의 결합에 대해 경쟁함으로써, 발생할 수 있다.

[0051] "친화성" 또는 "결합 친화성"은 분자(예컨대, 폴리웨타이드)의 단일 결합 부위 및 그의 결합 파트너(예컨대, 리간드) 사이의 비공유 상호작용이 총합의 강도를 지칭한다. 일부 구현예에서, "결합 친화성"은 결합 쌍(예컨대, 폴리웨타이드 및 리간드)의 구성원 사이에 1:1 상호작용을 반영하는, 고유의 결합 친화성을 지칭한다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 친화성을 일반적으로 해리 상수(K_d)로 나타낼 수 있다.

[0052] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "항체"는 중쇄의 적어도 상보성 결정 영역(CDR) 1, CDR2, 및 CDR3 및 경쇄의 적어도 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 분자를 지칭하며, 상기 분자는 항원에 결합할 수 있다. 용어 항체는, 비제한적으로, 항원에 결합할 수 있는 단편, 예컨대 Fv, 단일-사슬 Fv(scFv), Fab, Fab', 및 (Fab')₂를 포함한다. 용어 항체는 또한, 비제한적으로, 키메라 항체, 인간화 항체, 및 다양한 종, 예컨대 마우스, 인간, 시노몰구스 원숭이 등의 항체를 포함한다.

[0053] 일부 구현예에서, 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 적어도 하나의 중쇄, 및 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 적어도 하나의 경쇄를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 각각 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 2개의 중쇄, 및 각각 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 2개의 경쇄를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 단일-사슬 Fv(scFv), 또는 6개의 모든 CDR(3개의 중쇄 CDR 및 3개의 경쇄 CDR)을 포함하는 단일 폴리웨타이드 사슬을 포함하는 임의의 다른 항체는 중쇄 및

경쇄를 갖는 것으로 간주된다. 일부 이러한 구현예에서, 중쇄는 3개의 중쇄 CDR을 포함하는 항체의 영역이고, 경쇄는 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 항체의 영역이다.

[0054] 용어 "중쇄 가변 영역"은 중쇄 HVR1, 프레임워크(FR) 2, HVR2, FR3, 및 HVR3을 포함하는 영역을 지칭한다. 일부 구현예에서, 중쇄 가변 영역은 또한 FR1의 적어도 일부 및/또는 FR4의 적어도 일부를 포함한다.

[0055] 용어 "중쇄 불변 영역"은 적어도 3개의 중쇄 불변 도메인 C_H1, C_H2, 및 C_H3을 포함하는 영역을 지칭한다. 비제한적인 예시적인 중쇄 불변 영역은 γ, δ, 및 α를 포함한다. 비제한적인 예시적인 중쇄 불변 영역은 또한 ε 및 μ를 포함한다. 각각의 중쇄 불변 영역은 항체 아이소타입에 상응한다. 예를 들면, γ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgG 항체이고, δ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgD 항체이며, α 불변 영역을 포함하는 항체는 IgA 항체이다. 또한, μ 불변 영역을 포함하는 항체는 IgM 항체이고, ε 불변 영역을 포함하는 항체는 IgE 항체이다. 특정 아이소타입은 하위클래스로 더 세분화될 수 있다. 예를 들면, IgG 항체는, 비제한적으로, IgG1(γ₁ 불변 영역 포함), IgG2(γ₂ 불변 영역 포함), IgG3(γ₃ 불변 영역 포함), 및 IgG4(γ₄ 불변 영역 포함) 항체를 포함하고; IgA 항체는, 비제한적으로, IgA1(α₁ 불변 영역 포함) 및 IgA2(α₂ 불변 영역 포함) 항체를 포함하며; IgM 항체는, 비제한적으로, IgM1 및 IgM2를 포함한다.

[0056] 용어 "중쇄"는 리더 서열을 갖거나 리더 서열이 없는 적어도 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다. 일부 구현예에서, 중쇄는 중쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함한다. 용어 "전장 중쇄"는 리더 서열을 갖거나 리더 서열이 없는 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다.

[0057] 용어 "경쇄 가변 영역"은 경쇄 HVR1, 프레임워크(FR) 2, HVR2, FR3, 및 HVR3을 포함하는 영역을 지칭한다. 일부 구현예에서, 경쇄 가변 영역은 또한 FR1 및/또는 FR4를 포함한다.

[0058] 용어 "경쇄 불변 영역"은 경쇄 불변 도메인 C_L을 포함하는 영역을 지칭한다. 비제한적인 예시적인 경쇄 불변 영역은 λ 및 κ를 포함한다.

[0059] 용어 "경쇄"는 리더 서열을 갖거나 리더 서열이 없는 적어도 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다. 일부 구현예에서, 경쇄는 경쇄 불변 영역의 적어도 일부를 포함한다. 용어 "전장 경쇄"는 리더 서열을 갖거나 리더 서열이 없는 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 지칭한다.

[0060] 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열이 초가변성이고/이거나 구조적으로 정의된 루프("초가변 루프")를 형성하는 항체 가변 도메인의 각각의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 원상태 4-사슬 항체는 6개의 HVR; V_H 내에 3개(H1, H2, H3), 및 V_L 내에 3개(L1, L2, L3)를 포함한다. HVR은 일반적으로 초가변 루프 및/또는 "상보성 결정 영역"("CDR")으로부터의 아미노산 잔기를 포함하고, 후자는 가장 높은 서열 가변성이고/이거나 항원 인식에 관여한다. 예시적인 초가변 루프는 아미노산 잔기 26-32(L1), 50-52(L2), 91-96(L3), 26-32(H1), 53-55(H2), 및 96-101(H3)에서 발생한다(Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). 예시적인 CDR(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 24-34, L2의 50-56, L3의 89-97, H1의 31-35B, H2의 50-65, 및 H3의 95-102에서 발생한다(Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). 용어 초가변 영역(HVR) 및 상보성 결정 영역(CDR) 모두는 항원 결합 영역을 형성하는 가변 영역의 부분을 지칭한다.

[0061] 본원에 사용된 바와 같이 "키메라 항체"는 제1 종(예컨대 마우스, 랫트, 시노몰구스 원숭이 등)으로부터의 적어도 하나의 가변 영역 및 제2 종(예컨대 인간, 시노몰구스 원숭이 등)으로부터의 적어도 하나의 불변 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. 일부 구현예에서, 키메라 항체는 적어도 하나의 마우스 가변 영역 및 적어도 하나의 인간 불변 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항체는 적어도 하나의 시노몰구스 가변 영역 및 적어도 하나의 인간 불변 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항체는 적어도 하나의 랫트 가변 영역 및 적어도 하나의 마우스 불변 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항체의 가변 영역 모두는 제1 종으로부터 유래되고 키메라 항체의 불변 영역 모두는 제2 종으로부터 유래된다.

[0062] 본원에 사용된 바와 같이 "인간화 항체"는 비-인간 가변 영역의 프레임워크 영역 내의 적어도 하나의 아미노산이 인간 가변 영역으로부터의 상응하는 아미노산으로 대체된 항체를 지칭한다. 일부 구현예에서, 인간화 항체는 적어도 하나의 인간 불변 영역 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간화 항체는 Fab, scFv, (Fab')₂ 등이다.

- [0063] 본원에 사용된 바와 같이 "인간 항체"는 인간에서 생산된 항체, 인간 면역글로불린 유전자를 포함하는 비인간 동물, 예컨대 XenoMouse[®]에서 생산된 항체, 및 시험관내 방법, 예컨대 파아지 디스플레이를 사용하여 선택된 항체를 지칭하며, 여기서 상기 항체 레퍼토리는 인간 면역글로불린 서열에 기초한다.
- [0064] 용어 "리더 서열"은 포유동물 세포로부터 폴리펩타이드의 분비를 용이하게 하는 폴리펩타이드의 N 말단에 위치한 아미노산 잔기의 서열을 지칭한다. 리더 서열은 포유동물 세포로부터 폴리펩타이드의 배출시 절단되어, 성숙한 단백질을 형성할 수 있다. 리더 서열은 천연 또는 합성일 수 있고, 이들은 부착된 단백질에 이종 또는 동족일 수 있다. 비제한적인 예시적인 리더 서열은 또한 이종 단백질로부터의 리더 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 리더 서열이 결여된다. 일부 구현예에서, 항체는 적어도 하나의 리더 서열을 포함하며, 이는 원상태 항체 리더 서열 및 이종 리더 서열로부터 선택될 수 있다.
- [0065] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "단리된"은 전형적으로 자연에서 발견되는 성분 중 적어도 일부로부터 분리된 분자를 지칭한다. 예를 들면, 폴리펩타이드가 그것이 생산되는 세포의 성분 중 적어도 일부와 분리되는 경우, "단리된" 것으로 지칭된다. 폴리펩타이드가 발현 후 세포에 의해 분비되는 경우, 폴리펩타이드를 함유하는 상등액을 그것을 생산한 세포와 물리적으로 분리하는 것은 폴리펩타이드를 "단리된" 것으로 간주된다. 유사하게, 폴리뉴클레오타이드는 그것이 전형적으로 자연에서 발견되는 더 큰 폴리뉴클레오타이드(예컨대, 예를 들면, DNA 폴리뉴클레오타이드의 경우, 게놈 DNA 또는 미토콘드리아 DNA)의 일부가 아니거나, 또는, 예컨대, RNA 폴리뉴클레오타이드의 경우, 그것이 생산된 세포의 성분의 적어도 일부로부터 분리된 경우, "단리된" 것으로 지칭된다. 따라서, 숙주 세포 내의 벡터에 함유된 DNA 폴리뉴클레오타이드는 상기 폴리뉴클레오타이드가 자연에서 상기 벡터에서 발견되지 않는 한 "단리된" 것으로 지칭될 수 있다.
- [0066] 종양 부피와 같은 매개변수에 적용될 때 용어 "감소시키다"는 상기 매개변수의 수준을 관찰가능한, 측정가능한 방식으로 낮추는 것을 의미한다. 일부 구현예에서, 감소는 적어도 10%, 예컨대 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%일 수 있다. 일부 구현예에서, 감소는 대체 처리 또는 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의할 수 있다.
- [0067] 용어 "대상체" 및 "환자"는 인간을 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 일부 구현예에서, 비제한적으로, 설치류, 원숭이, 고양이, 개, 말, 소, 돼지, 양, 염소, 포유동물 실험 동물, 포유동물 농장 동물, 스포츠 동물, 및 포유동물 애완동물을 포함하는 다른 포유동물을 치료하는 다른 방법이 또한 제공된다.
- [0068] 치료제를 이용한 치료의 문맥에서 사용될 때 용어 "내성" 또는 "비반응성"은 대상체가 이전에 치료제의 표준 용량에 대한 대상체의 반응과 비교하여, 또는 치료제의 표준 용량에 대해 유사한 장애를 갖는 유사한 대상체의 예측된 반응과 비교하여, 치료제의 표준 용량에 대해 감소된 반응 또는 반응 부족을 나타내는 것을 의미한다. 따라서, 일부 구현예에서, 대상체는 이전에 치료제를 제공받지 않았음에도 불구하고 치료제에 내성이 될 수 있거나, 또는 하나 이상의 이전 경우에 제제에 대해 반응한 후 치료제에 대해 내성이 생길 수 있다.
- [0069] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "샘플"은, 예를 들면 물리적, 생화학적, 화학적 및/또는 생리학적 특징에 기초하여, 규명되고, 정량화되고/되거나 확인될 세포 및/또는 다른 분자 물질을 함유하는 대상체로부터 수득되거나 유래되는 조성물을 지칭한다. 예시적인 샘플은 조직 샘플이다.
- [0070] 용어 "조직 샘플"은 대상체의 조직으로부터 수득된 유사한 세포의 집합을 지칭한다. 조직 샘플의 공급원은 신선한, 동결된 및/또는 보존된 기관으로부터 고체 조직 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물; 혈액 또는 임의의 혈액 구성요소; 체액, 예컨대 뇌 척수액, 양수, 복막액, 활액, 또는 간질액; 대상체의 임신 또는 발달의 어느 시점으로부터의 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 조직 샘플은 활액 생검 조직 샘플 및/또는 활액 샘플이다. 일부 구현예에서, 조직 샘플은 활액 샘플이다. 조직 샘플은 또한 일차 또는 배양된 세포 또는 세포주일 수 있다. 선택적으로, 조직 샘플은 질환 조직/기관으로부터 수득된다. 조직 샘플은 자연에서 조직과 자연적으로 섞이지 않는 화합물, 예컨대 보존제, 항응집제, 완충제, 고정제, 영양소, 항생제 등을 함유할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "대조군 샘플" 또는 "대조군 조직"은 대상체가 치료되고 있는 질환으로 고통받고 있지 않다고 알려지거나 여겨지는 공급원으로부터 수득된 샘플, 세포, 또는 조직을 지칭한다.
- [0071] 본원에서의 목적을 위해, 조직 샘플의 "절편"은 조직 샘플의 부분 또는 조각, 예컨대 고체 조직 샘플로부터의 절단된 조직 또는 세포의 얇은 슬라이스를 의미한다.
- [0072] 용어 "암"은 비정상적으로 높은 수준의 증식 및 성장을 나타내는 세포의 그룹을 지칭하기 위해 본원에 사용된다. 암은 양성(양성 종양으로도 지칭됨), 전암성(pre-malignant), 또는 악성일 수 있다. 암 세포는 고형 암세포(즉 "고형 종양") 또는 백혈병 암세포일 수 있다. 용어 "암 성장"은 암의 크기 또는 규모의 상승하는 증

가를 야기하는 암을 포함하는 세포에 의한 증식 또는 성장을 지칭하기 위해 본원에 사용된다.

[0073] 암의 예는 비제한적으로, 암종, 림프종, 아세포종, 육종, 및 백혈병을 포함한다. 이러한 암의 보다 구체적인 비제한적인 예는 편평 세포암, 소세포 폐암, 뇌하수체 암, 식도암, 성상세포종, 연조직 육종, 비소세포 폐암(편평 세포 비소세포 폐암 포함), 폐의 선암종, 폐의 편평 암종, 복막의 암, 간세포암, 위장암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간암, 유방암, 대장암, 결장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액샘 암종, 신장암, 신장 세포 암종, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 뇌암, 자궁내막암, 고환암, 담관암종, 담낭 암종, 위암, 흑색종, 및 다양한 유형의 두경부암(두경부의 편평 세포 암종 포함)을 포함한다.

[0074] 본원에 사용된 바와 같이, "치료"는 치료적 치료 및 예방적 또는 보호적 조치 모두를 지칭하며, 상기 목적은 표적화된 병적 상태 또는 장애를 예방하거나 늦추는(줄이는) 것이다. 특정 구현예에서, 용어 "치료"는 인간을 포함하는 포유동물에서 질환을 위한 치료제의 임의의 투여 및 적용을 포함하며, 질환 또는 질환의 진행을 억제시키거나 늦추는 것; 예를 들면, 퇴행을 유발함으로써 질환을 부분적으로 또는 완전히 완화시키는 것 또는 순실된, 결여된, 또는 결함이 있는 기능을 회복시키거나 수리하는 것; 비효율적인 과정을 자극하는 것; 또는 질환 안정기가 감소된 중증도를 갖도록 유발하는 것을 포함한다. 용어 "치료"는 또한 임의의 표현형 특징의 중증도를 감소시키는 것 및/또는 상기 특징의 발병율, 정도, 또는 가능성을 감소시키는 것을 포함한다. 치료를 필요로 하는 사람들은 장애를 이미 가진 사람들뿐만 아니라 장애를 갖기 쉬운 사람들 또는 장애가 예방될 하는 사람들을 포함한다.

[0075] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "효능"은, 예컨대 1년, 5년, 또는 10년 동안 생존 또는 무병 생존과 같은 하나 이상의 매개변수뿐만 아니라 대상체에서 하나 이상의 종양의 성장의 감소와 같은 매개변수로부터 결정될 수 있다. 생체이용률 및 근본적인 매개변수, 예컨대 제거율과 같은 약동학 매개변수가 또한 효능에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, "향상된 효능"(즉, 효능의 개선)은 개선된 약동학 매개변수뿐만 아니라 개선된 효력 때문일 수 있으며, 이는 시험 동물 또는 인간 대상체에서 제거율 및 종양 성장뿐만 아니라 생존, 재발률, 또는 무병 생존과 같은 매개변수를 비교함으로써 측정될 수 있다.

[0076] 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는데 효과적인 약물의 양을 지칭한다. 특정 구현예에서, 유효량은 원하는 치료 또는 예방 결과를 달성하기 위해, 필요한 투여량에서 그리고 시간 동안 효과적인 양을 지칭한다. CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자의 치료적 유효량은 인자, 예컨대 개체의 질환 상태, 연령, 성별, 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 유도하는 약물의 능력에 따라 달라질 수 있다. 치료적 유효량은 약물의 임의의 독성 또는 해로운 효과가 치료적 유익한 효과보다 큰 양을 포함한다. 일부 구현예에서, 표현 "유효량"은 암을 치료하는데 효과적인 약물의 양을 지칭한다.

[0077] 하나 이상의 추가 치료제, 예컨대 면역 자극제와 "조합된" 투여는, 동시(병행) 및 임의의 순서의 연속(순차적) 투여를 포함한다.

[0078] "약제학적으로 허용가능한 담체"는 대상체에게 투여하기 위한 "약제학적 조성물"을 포함하는 치료제와 함께 사용하기 위한, 비독성 고체, 반고체, 또는 액체 충진제, 희석제, 캡슐화 물질, 제제 보조제, 또는 당업계에 통상적인 담체를 지칭한다. 약제학적으로 허용가능한 담체는 사용되는 투여량 및 농도에서 수령체에게 비독성이며, 제제의 다른 구성요소와 양립가능하다. 약제학적으로 허용가능한 담체는 사용되는 제제에 대해 적절하다. 예를 들면, 치료제가 경구 투여되는 경우, 담체는 젤 캡슐일 수 있다. 치료제가 피하 투여되는 경우, 담체는 이상적으로 피부에 민감하지 않으며 주사 부위 반응을 유발하지 않는다.

예시적인 CD80 세포외 도메인 및 세포외 도메인 융합 분자

[0080] CD80 ECD 및 CD80 ECD 융합 분자가 본원에 제공된다. CD80 ECD는, 예를 들면, 인간 CD80 아형 1, 아형 2, 및 아형 3의 ECD(서열번호: 1-3 참고)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CD80 ECD는 서열번호:5의 아미노산 서열을 포함한다.

[0081] CD80 ECD 융합 분자는 융합 파트너, 예컨대 중합체, 폴리펩타이드, 친유성 모이어티, 및 석시닐 그룹을 포함할 수 있다. 예시적인 폴리펩타이드 융합 파트너는, 비제한적으로, 혈청 알부민 및 IgG Fc 도메인을 포함한다. 추가의 예시적인 중합체 융합 파트너는, 비제한적으로, 분지 및/또는 선형 사슬을 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 특정 예시적인 Fc 도메인의 아미노산 서열이 본원의 서열번호: 9-16에 나타나 있다.

[0082] 특정 구현예에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 신호 웨პ타이드가 결여되어 있다. 특정 구현예에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 적어도 하나의 신호 웨პ타이드를 포함하며, 이는 원상태 CD80 신호 웨პ타이드(서

열번호: 7 또는 서열번호:1의 아미노산 1-34) 및/또는 이종 신호 펩타이드로부터 선택될 수 있다.

[0083] CD80 ECD 융합 분자의 경우, 융합 파트너는 폴리펩타이드의 아미노-말단 또는 카복시-말단에 연결될 수 있다. 특정 구현예에서, 폴리펩타이드 및 융합 파트너는 공유 결합된다. 융합 파트너가 또한 폴리펩타이드("융합 파트너 폴리펩타이드")이면, 폴리펩타이드 및 융합 파트너 폴리펩타이드는 연속적인 아미노산 서열의 부분일 수 있다. 이러한 경우, 폴리펩타이드 및 융합 파트너 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 및 융합 파트너 폴리펩타이드 모두를 코딩하는 코딩 서열로부터 단일 폴리펩타이드로서 번역될 수 있다. 일부 이러한 경우, 상기 2개의 폴리펩타이드는 하나의 폴리펩타이드의 N-말단이 개재 아미노산 없이 다른 폴리펩타이드의 C-말단에 바로 따라오도록 순차적으로 직접 연결된다. 다른 경우, 링커 펩타이드 서열, 예컨대 GS 링커 서열이 상기 2개의 폴리펩타이드 사이에 삽입된다. 특정 구현예에서, CD80 ECD 및 융합 파트너는 다른 수단, 예컨대, 예를 들면, 펩타이드 결합 이외의 화학적 연결을 통해 공유 결합된다. 특정 구현예에서, 폴리펩타이드 및 융합 파트너는 비공유 결합된다. 특정 이러한 구현예에서, 이들은, 예를 들면, 결합 쌍을 사용하여 연결될 수 있다. 예시적인 결합 쌍은, 비제한적으로, 바이오틴 및 아비딘 또는 스트렙타비딘, 항체 및 그의 항원 등을 포함한다.

[0084] 일부 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자는 서열번호: 20 또는 21의 서열을 포함한다.

[0085] CD80 ECD 융합 분자는, 이들이 생산되는 방법에 따라, 상이한 수준의 특정한 당화 변형을 가질 수 있다. 예를 들면, CD80 ECD 융합 분자는 CD80 ECD 단백질의 농도와 관련하여 상이한 농도의 시알산 잔기를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 더 높은 시알산 함량은 체내에서 더 긴 제거 시간을 가질 수 있고 따라서 증가된 전체 생체이용률을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자의 시알산 함량은 10 내지 60 mol 시알산(SA) 대 mol 단백질이다. 일부 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자의 시알산 함량은 15 내지 60 mol 시알산(SA) 대 mol 단백질이다. 예를 들면, 일부 구현예에서, SA 함량은 10-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 15-30 mol SA/mol 단백질, 예컨대 15-25 mol SA/mol 단백질, 예컨대 20-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 20-30 mol SA/mol 단백질, 예컨대 30-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 10, 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 적어도 15 mol SA/mol 단백질, 예컨대 적어도 20 mol SA/mol 단백질, 적어도 25 mol SA/mol 단백질, 적어도 30 mol SA/mol 단백질, 적어도 35 mol SA/mol 단백질, 또는 적어도 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 이러한 구현예에서, 융합 파트너는 Fc 도메인, 예컨대 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 Fc 도메인이다.

[0086] 일부 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자의 SA 함량은 현재의 CD80 ECD 융합 분자와 비교하여 증가되거나 상대적으로 높은 수준으로 유지된다. 일부 구현예에서, 예컨대 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50 mol SA 대 CD80 ECD 단백질의 mol까지의 SA 함량의 증가는, 적어도 하나의 마우스 동계 또는 이종이식 종양 모델에서 향상된 효능을 야기할 수 있다. 예를 들면, 일부 구현예에서, SA 함량이, 예컨대 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50 mol SA 대 CD80 ECD 단백질의 mol까지 증가하는 경우, 마우스 종양 모델에서 종양 성장은 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 98%까지 더 감소될 수 있다.

[0087] 예를 들면, 일부 구현예에서, CD80 ECD Fc 융합 분자, 10 내지 60 mol SA/mol 단백질을 포함하는 인간 IgG1 Fc 도메인을 포함하는 융합 분자는 종양 세포의 접종 후 적어도 10일 또는 적어도 2주 또는 적어도 3주, 예컨대 10일 내지 2주 또는 2주 내지 3주의 기간 동안 적어도 하나의 마우스 동계 또는 이종이식 암 모델에서 적어도 80%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 예컨대 적어도 98% 종양 세포 성장을 억제할 수 있다. 일부 이러한 구현예에서, 상기 분자는 적어도 15 mol SA/mol 단백질, 예컨대 적어도 20 mol SA/mol 단백질, 또는 15-30, 15-25, 또는 20-30 mol SA/mol 단백질 범위를 포함한다. 일부 구현예에서, 마우스 모델은 CT26, MC38, 또는 B16 마우스 종양 모델이다. 일부 구현예에서, 종양이 최소 부피에 도달하면, 마우스에게, 예를 들면 1주의 기간 동안, 0.3 내지 3.0 mg/kg, 예컨대 0.3 내지 0.6 mg/kg의 분자의 1개 내지 3개의 용량이 제공된다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 서열번호:14의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자는 서열번호: 20 또는 21의 아미노산 서열을 포함한다.

[0088] 일부 구현예에서, CD80 ECD Fc 융합 분자는 동일한 아미노산 서열을 갖지만 단백질의 mol당 더 낮은 수준의 SA를 갖는 CD80 ECD Fc 융합 단백질보다 더 큰 정도로, 접종 후 적어도 10일 또는 적어도 2주 또는 적어도 3주, 예컨대 10일 내지 2주 또는 2주 내지 3주의 기간 동안 마우스에서 CT26 종양 세포의 성장을 감소시킨다. 일부 구현예에서, CD80 ECD Fc 융합 분자는 항-CTLA4 항체, 예컨대 항-CTLA4 항체 클론 9D9보다 더 큰 정도로, 접종 후 적어도 10일 또는 적어도 2주의 기간 동안, 예컨대 10일 내지 2주 또는 2 내지 3주 동안 마우스에서 CT26 종양의 성장을 감소시킨다. 일부 이러한 구현예에서, CD80 ECD Fc 분자는 0.3 mg/kg, 0.6 mg/kg, 또는 3.0 mg/kg으로 1회 내지 3회 투여되는 반면, 항-CTLA4 항체는 1.5 또는 10 mg/kg으로 동일한 횟수로 투여된다. 일부 이러한 구현예에서, 모델은 CT26, MC38, 또는 B16 뮤린 종양 모델이다.

- [0089] 본원 실시예 6은, 예를 들면, 15 또는 20 mol SA/mol 단백질을 갖는 CD80 ECD 융합 분자를 이용한 마우스 동계 종양 모델의 처리가 0.3 mg/kg의 하나의 용량 후 종양 성장을 적어도 93% 억제한 반면, 5 mol SA/mol 단백질만을 갖는 분자를 이용한 동일한 처리는 종양 성장을 유의하게 억제하지 않았음을 나타내는 데이터를 제공한다. 유사하게, 15 또는 20 mol SA/mol 단백질을 갖는 CD80 ECD 융합 분자의 0.6 mg/kg 용량은 종양 성장을 95% 내지 98% 억제한 반면, 5 mol SA/mol 단백질을 갖는 분자를 이용한 동일한 처리는 단지 70%까지 종양 성장을 억제하였다. (도 6 참고). 종양을 접종한 후 약 3주에 억제 정도를 평가하였다.
- [0090] 또한, 본원의 실시예 7은 3개의 상이한 동계 마우스 종양 모델인 CT26, MC38, 및 B16 모델에서 1.5 mg/kg 및 10 mg/kg 용량의 항-CTLA4 항체(클론 9D9)와 비교하여 0.3 mg/kg(CT26) 또는 3.0 mg/kg(MC38 및 B16) 용량의 20 mol SA/mol 단백질을 갖는 CD80 ECD Fc 융합 분자(마우스 대리모)에 대한 데이터를 나타낸다. 도 7-9(화살표는 투여일을 나타냄)에 도시된 바와 같이, 각 단백질을 종양 세포의 접종 며칠 후 7일 동안 3회 투여하였다. 각각의 경우, CD80 ECD Fc는 2주 내지 3주 연구 과정 동안 항-CTLA4 항체에 대한 종양 성장 억제에서 우수하였다(도 7-9.) 예를 들면, 종양 세포 접종 후 21일에 CT26 모델에서, CD80 ECD Fc 융합 분자는 항-CTLA4의 2개의 용량 수준에 대해 75% 또는 53%와 비교하여 종양 성장의 90% 감소를 나타내었다. 접종 후 19일에 MC38 모델에서, CD80 ECD Fc 분자는 항-CTLA4의 더 높은 용량에 대해 단지 21% 종양 성장과 비교하여 종양 성장 억제의 약 80% 감소를 나타내었지만 더 낮은 항-CTLA4 용량에 대해 종양 성장 억제를 나타내지 않았다. B16 모델에서, CD80 ECD Fc 융합 분자는 접종 후 13일에 41% 종양 성장 억제를 나타낸 반면, 항-CTLA4 항체는 어느 하나의 용량 수준에서 종양 성장을 억제하지 않았다(도 7-9. 참고).
- [0091] 이러한 연구에 기초하여, CD80 ECD 융합 분자는 적어도 2주의 기간 동안 특정한 백분율로 종양 성장을 억제할 수 있고, 예를 들면 마우스에게 종양 세포를 접종한 후 약 2주, 및 또한 융합 분자를 투여한 후, 처리된 마우스에서 대량 명시된 백분율의 평균 종양 성장 억제가 관찰된다. CD80 ECD 융합 분자는 2주 내지 3주의 기간 동안 특정 백분율로 종양 성장을 억제할 수 있고, 예를 들면, 마우스에게 종양 세포를 접종한 후 2주 내지 3주, 및 또한 융합 분자를 투여한 후, 처리된 마우스에서 대량 명시된 백분율의 평균 종양 성장 억제가 관찰된다.
- [0092] 실시예 6 및 7은 또한 CD80 ECD 융합 분자로 처리된 CT26 모델로부터의 많은 마우스가 2 내지 3주 기간 동안 완전한 종양 퇴행을 가지고 있었음을 보여준다. 더욱이, 더 큰 비율의 마우스는 비교 치료보다 더 높은 SA 함량을 갖는 CD80 ECD 융합 분자로 완전한 종양 퇴행을 가지고 있었고, 더 큰 비율의 마우스는 항-CTLA4 항체보다 CD80 ECD 융합 분자로 완전한 종양 퇴행을 가지고 있었다. 따라서, 일부 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자, 예컨대 0.3 mg/kg 내지 0.6 mg/kg CD80 ECD 융합 분자 또는 0.3 mg/kg 내지 3.0 mg/kg CD80 ECD 융합 분자를 이용한 처리는 동계 또는 이종이식 모델, 예컨대 CT26, MC38, 또는 B16의 마우스에서 완전한 종양 퇴행을 야기할 수 있다.
- [0093] 예시적인 Fc 도메인 융합 파트너
- [0094] 일부 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자는 융합 파트너로서 Fc 도메인을 갖는다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4로부터 유래된다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 야생형 서열, 예컨대 야생형 인간 IgG1 또는 IgG2(예컨대 IgG2a) 서열을 갖는다. 다른 구현예에서, Fc 도메인은 천연 또는 조작된 변이체이다. 일부 구현예에서, Fc와 하나 이상의 Fc 감마 수용체와의 상호작용을 변경한 Fc 도메인이 선택된다. 일부 구현예에서, Fc와 하나 이상의 보체 인자와의 상호작용을 변경한 Fc 도메인이 선택된다. 일부 구현예에서, Fc와 하나 이상의 Fc 감마 수용체와의 상호작용을 변경하고 하나 이상의 보체 인자와의 상호작용을 변경한 Fc 도메인이 선택된다.
- [0095] 일부 구현예에서, Fc 도메인은 WO 2014/144960호에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 접 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 위치 E233, L234, L235, P238, D265, N297, A327, P329, 또는 P331(여기서, 이들 위치의 넘버링은 Kabat에서와 같은 EU 지수를 따름) 중 하나 이상에서 치환을 갖는 인간 Fc 도메인이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 L234, L235, 및/또는 P331에서 돌연변이를 갖는 인간 Fc 도메인이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 치환 L234F, L235E, 및 P331S를 갖는 인간 Fc 도메인이다. (예컨대, 서열번호:12 참고). 일부 구현예에서, Fc 도메인은 위치 N297에서 아미노산 치환을 갖는다. (예컨대, 서열번호: 13 참고). 일부 구현예에서, Fc 도메인은 C237S 돌연변이를 포함한다. (예컨대, 서열번호: 9 참고)
- [0096] 일부 구현예에서, 돌연변이된 Fc 융합 파트너는 CD80 ECD Fc 융합 분자가 Fc 도메인 돌연변이를 제외하고 동일한 아미노산 서열을 갖는 CD80 ECD 융합 분자의 것과 비교하여 하나 이상의 Fc 감마 수용체와의 변경된 상호작용을 갖게 한다. 일부 구현예에서, Fc는 야생형 Fc 도메인과 비교하여 FcRN, RI, RIIA, RIIB, 및 RIII 중 하나 이상과 같은 Fc 감마 수용체에 대해 감소된 친화성을 갖는다. 일부 구현예에서, Fc는 야생형 Fc 도메인과 비교

하여 FcRN, RI, RIIA, RIIB, 및 RIII 모두에 대해 감소된 친화성을 갖는다.

[0097] 일부 구현예에서, 돌연변이된 Fc 융합 파트너는 CD80 ECD Fc 융합 분자가 하나 이상의 보체 인자, 예컨대 C1, C2, C3, C4, 및 이들의 결단 생성물, 예컨대 C4a, C4b, C2a, C2b, C3a, 및 C3b과의 변경된 상호작용을 갖게 한다. 일부 구현예에서, 돌연변이된 Fc 융합 파트너는 CD80 ECD Fc 융합 분자가 Fc 도메인 돌연변이를 제외하고 동일한 아미노산 서열을 갖는 CD80 ECD 융합 분자의 것과 비교하여 하나 이상의 보체 인자와의 변경된 상호작용을 갖게 한다.

[0098] 일부 구현예에서, CD80 ECD 및 융합 파트너, 예컨대 Fc 융합 파트너는 Fc의 N- 또는 C-말단 아미노산이 CD80 ECD 서열의 N- 또는 C-말단 아미노산에 바로 선행하거나 후행하도록 직접 연결된다. (예컨대, 서열번호: 20 및 21 참고). 다른 구현예에서, CD80 ECD 및 융합 파트너는 링커 분자, 예컨대 링커 펫타이드 서열, 예컨대 GS 링커 서열에 의해 연결된다.

치료 조성물 및 방법

암을 치료하는 방법

[0101] 일부 구현예에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 제공된다.

[0102] 일부 구현예에서, 암은 양성(양성 종양으로도 지칭됨), 전암, 또는 악성일 수 있다. 일부 구현예에서, 암은 고형 암세포(즉 "고형 종양")를 포함할 수 있거나 또는 대안적으로, 그것은 백혈병 암세포를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 치료되는 암에 대해 인간 또는 동물 대상체에서, 또는 마우스 동계 또는 이종이식 모델에서 암 성장을 감소시키는데 효과적이다. 일부 구현예에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 치료되는 암에 대해 마우스 동계 또는 이종이식 모델에서와 같이 종양 부피를 감소시키는데 효과적이다.

[0103] 치료될 수 있는 특정 암의 예는 비제한적으로, 암종, 림프종, 아세포종, 육종, 및 백혈병을 포함한다. 이러한 암의 보다 특정한 비제한적인 예는 비제한적으로 편평 세포암, 소세포 폐암, 뇌하수체 암, 식도암, 성상세포종, 연조직 육종, 비소세포 폐암(편평 세포 비소세포 폐암 포함), 폐의 선암종, 폐의 편평 암종, 복막의 암, 간세포암, 위장암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간암, 유방암, 대장암, 결장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액샘 암종, 신장암, 신장 세포 암종, 간암, 전립선암, 외음부 암, 갑상선암, 간 암종, 뇌암, 자궁내막암, 고환암, 담관암종, 담낭 암종, 위암, 흑색종, 및 다양한 유형의 두경부암(두경부의 편평 세포 암종 포함)을 포함한다.

[0104] 상기 방법 구현예 중 어느 것에서, 대상체에게 투여되는 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 1주, 10일, 2주, 또는 3주의 기간 동안 마우스 동계 이종이식 암 모델에서, 예를 들면, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%까지 종양 성장을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서, CD80 ECD 융합 분자는 접종 후 2주 또는 3주에 CT26 마우스 이종이식 종양 모델에서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%까지 종양 성장을 억제할 수 있다. 일부 이러한 경우, 융합 분자는 0.3 내지 3 mg/kg, 예컨대 0.3 내지 0.6 mg/kg로 1 내지 3회 투여될 수 있다. 상기 방법 구현예 중 어느 것에서, 대상체에게 투여되는 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자의 투여는, 예를 들면, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 또는 1년의 기간 동안 인간 또는 동물 대상체에서, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%까지 적어도 하나의 종양의 부피를 감소시킬 수 있다. 일부 경우, CD80 ECD Fc 융합 분자는 마우스 종양 모델, 예컨대 CT26 모델에서, 예를 들면 시험된 마우스의 유의한 부분에서, 예컨대 마우스의 적어도 40%, 또는 적어도 50%에서 완전한 종양 퇴행을 야기할 수 있다.

[0105] 이러한 방법 중 어느 것에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 10-60 mol SA 대 CD80 ECD Fc 단백질의 mol, 예컨대 15-60 mol SA/mol 단백질을 포함하는 CD80 ECD Fc일 수 있다. 일부 구현예에서, 함량은 10-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 15-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 20-40 mol SA/mol 단백질, 20-30 mol SA/mol 단백질, 15-25 mol SA/mol 단백질, 15-30 mol SA 대 단백질의 mol, 또는 30-40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 적어도 15, 예컨대 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 또는 적어도 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 Fc 도메인이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 서열번호:14의 아

미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 분자는 서열번호:20 또는 21의 아미노산 서열을 포함한다.

[0106] PD-1/PD-L1 억제제를 포함하는 면역 자극제를 이용한 조합 치료

일부 구현예에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 적어도 하나의 면역 자극제의 유효량과 조합되어 상기 암 중 하나를 치료하기 위해 투여된다. 면역 자극제는, 예를 들면, 소분자 약물 또는 생물제제를 포함할 수 있다. 생물제제 면역 자극제의 예는, 비제한적으로, 항체, 항체 단편, 예를 들면 수용체-리간드 결합을 차단하는 수용체 또는 리간드 폴리펩타이드의 단편, 백신 및 사이토카인을 포함한다.

일부 구현예에서, 적어도 하나의 면역 자극제는 공동자극 분자를 포함하는 면역 자극 분자의 작용제를 포함하는 반면, 일부 구현예에서, 적어도 하나의 면역 자극제는 공동억제 분자를 포함하는 면역 억제 분자의 길항제를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 면역 자극제는 면역 세포, 예컨대 T 세포에서 발견되는 공동자극 분자를 포함하는 면역-자극 분자의 작용제를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 면역 자극제는 면역 세포, 예컨대 T 세포에서 발견되는 공동억제 분자를 포함하는 면역 억제 분자의 길항제를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 면역 자극제는 선천 면역에 관여하는 세포, 예컨대 NK 세포에서 발견되는 공동자극 분자를 포함하는 면역-자극 분자의 작용제를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 면역 자극제는 선천 면역에 관여하는 세포, 예컨대 NK 세포에서 발견되는 공동억제 분자를 포함하는 면역 억제 분자의 길항제를 포함한다. 일부 구현예에서, 조합은 치료되는 대상체에서 항원-특이적 T 세포 반응을 향상시키고/시키거나 대상체에서 선천 면역 반응을 향상시킨다. 일부 구현예에서, 조합은 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자 또는 면역 자극제 단독의 투여와 비교하여, 동물 암 모델, 예컨대 동계 또는 이종이식 모델에서 개선된 항-종양 반응을 야기한다. 일부 구현예에서, 조합은 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자 또는 면역 자극제 단독의 투여와 비교하여, 동물 암 모델, 예컨대 동계 또는 이종이식 모델에서 상승 반응을 야기한다.

상기 조합 요법 방법 구현예 중 어느 것에서, 대상체에게 투여되는 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자와 면역 자극제, 예컨대 PD-1/PD-L1 억제제의 조합은 1주, 10일, 2주, 또는 3주의 기간 동안 마우스 동계 또는 이종이식 암 모델에서, 예를 들면, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%까지 종양 성장을 억제할 수 있다. 상기 조합 요법 방법 구현예 중 어느 것에서, 대상체에게 투여되는 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자와 면역 자극제, 예컨대 PD-1/PD-L1 억제제의 조합은, 예를 들면, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 또는 1년의 기간 동안 대상체 또는 동물 모델에서, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%까지 적어도 하나의 종양의 부피를 감소시킬 수 있다.

조합 요법 방법 중 어느 것에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 10–60 mol SA 대 CD80 ECD Fc 단백질의 mol, 예컨대 15–60 mol SA/mol 단백질을 포함하는 CD80 ECD Fc일 수 있다. 일부 구현예에서, 함량은 10–40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 15–40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 20–40 mol SA/mol 단백질, 20–30 mol SA/mol 단백질, 15–25 mol SA/mol 단백질, 15–30 mol SA 대 단백질의 mol, 또는 30–40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 적어도 15, 예컨대 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 또는 적어도 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 Fc 도메인이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 서열번호:14의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 분자는 서열번호:20 또는 21의 아미노산 서열을 포함한다.

특정 구현예에서, 면역 자극제는 면역글로불린 수퍼페밀리(IgSF)의 구성원인 자극 또는 억제 분자를 표적화한다. 예를 들면, 면역 자극제는 폴리펩타이드의 B7 계열의 또 다른 구성원을 표적화하는(또는 특이적으로 결합하는) 제제일 수 있다. 면역 자극제는 막 결합된 리간드의 TNF 계열의 구성원 또는 TNF 계열의 구성원에 특이적으로 결합하는 공동자극 또는 공동억제 수용체를 표적화하는 제제일 수 있다. 면역 자극제에 의해 표적화될 수 있는 예시적인 TNF 및 TNFR 계열 구성원은 CD40 및 CD40L, OX-40, OX-40L, GITR, GITRL, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137(4-1BB), TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, 림포톡신 α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT β R, 림포톡신 α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY 및 NGFR을 포함한다.

일부 구현예에서, 면역 자극제는 (i) T 세포 활성화를 억제하는 단백질(예컨대, 면역 체크포인트 억제제)의 길항제, 예컨대 CTLA4, LAG-3, TIM3, 갈렉틴 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, 갈렉틴-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, B7-H3, B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1, TIM-4, 및 ILT4를 포함할 수 있고/있거나 및 (ii) T 세포 활성화를 자극하는 단백질의 작용제, 예컨대 B7-2, CD28, 4-1BB(CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40,

OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, CD40, CD40L, DR3 및 CD28H를 포함할 수 있다.

[0113] 일부 구현예에서, 면역 자극제는 T 세포 활성화를 억제하는 사이토카인(예컨대, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF, 및 다른 면역억제 사이토카인)을 억제하거나 이의 길항제인 제제를 포함할 수 있고, 일부 구현예에서, 면역 자극제는 T 세포 활성화를 자극하는 사이토카인, 예컨대 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 및 IFN α (예컨대, 사이토 카인 자체)의 작용제인 제제를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 면역 자극제는 케모카인, 예컨대 CXCR2(예컨대, MK-7123), CXCR4(예컨대, AMD3100), CCR2, 또는 CCR4(모가물리주맙)의 길항제를 포함할 수 있다.

[0114] 일부 구현예에서, 면역 자극제는 NK 세포 상의 억제 수용체의 길항제 또는 NK 세포 상의 활성화 수용체의 작용제를 포함할 수 있다. 예를 들면, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 KIR의 길항제와 조합될 수 있다.

[0115] 면역 자극제는 또한 TGF- β 신호전달을 억제하는 제제, 종양 항원 제시를 향상시키는 제제, 예컨대, 수지상 세포 백신, GM-CSF 분비 세포성 백신, CpG 올리고뉴클레오타이드, 및 이미퀴모드, 또는 종양 세포의 면역원성을 향상시키는 요법(예컨대, 안트라사이클린)을 포함할 수 있다.

[0116] 면역 자극제는 또한 특정 백신, 예컨대 메소텔린-표적화 백신 또는 약화된 리스테리아 암 백신, 예컨대 CRS-207 을 포함할 수 있다.

[0117] 면역 자극제는 또한 Treg 세포를 고갈시키거나 차단하는 제제, 예컨대 CD25에 특이적으로 결합하는 제제를 포함할 수 있다.

[0118] 면역 자극제는 또한 대사 효소, 예컨대 인돌아민 디옥시게나아제(IDO), 디옥시게나아제, 아르기나아제, 또는 산화 질소 합성효소를 억제하는 제제를 포함할 수 있다.

[0119] 면역 자극제는 또한 아데노신의 형성을 억제하거나 또는 아데노신 A2A 수용체를 억제하는 제제를 포함할 수 있다.

[0120] 면역 자극제는 또한 T 세포 무반응(anergy) 또는 탈진(exhaustion)을 역전/예방하는 제제 및 종양 부위에서 선천 면역 활성화 및/또는 염증을 촉발하는 제제를 포함한다.

[0121] 일부 구현예에서, 면역 자극제는 CD40 작용제, 예컨대 CD40 작용제 항체를 포함할 수 있다. CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 또한 하기 중 하나 이상과 같은, 면역 경로의 다수의 요소를 표적화하는 조합 접근법과 조합될 수 있다: 종양 항원 제시를 향상시키는 적어도 하나의 제제(예컨대, 수지상 세포 백신, GM-CSF 분비 세포 백신, CpG 올리고뉴클레오타이드, 이미퀴모드); 예컨대, CTLA4 경로를 억제하고/하거나 Treg 또는 다른 면역 억제 세포를 고갈시키거나 차단함으로써, 음성 면역 조절을 억제하는 적어도 하나의 제제; 예컨대, CD-137, OX-40 및/또는 GITR 경로를 자극하고/하거나 T 세포 효과기 기능을 자극하는 작용제를 이용하여, 양성 면역 조절을 자극하는 제제; 항-종양 T 세포의 빈도를 전신으로 증가시키는 적어도 하나의 제제; 예컨대, CD25의 길항제(예컨대, 다클리주맙)를 사용하여 또는 생체외 항-CD25 비드 고갈에 의해, 종양에서의 Treg와 같이 Treg를 고갈시키거나 억제하는 요법; 종양 내의 억제자 골수 세포의 기능에 영향을 미치는 적어도 하나의 제제; 종양 세포의 면역원성을 향상시키는 요법(예컨대, 안트라사이클린); 유전적으로 변형된 세포, 예컨대, 키메라 항원 수용체에 의해 변형된 세포를 포함하는 입양(adoptive) T 세포 또는 NK 세포(CAR-T 요법); 대사 효소, 예컨대 인돌아민 디옥시게나아제(IDO), 디옥시게나아제, 아르기나아제 또는 산화 질소 합성효소를 억제하는 적어도 하나의 제제; T 세포 무반응 또는 탈진을 역전/예방하는 적어도 하나의 제제; 종양 부위에서 선천 면역 활성화 및/또는 염증을 촉발하는 요법; 면역 자극 사이토카인의 투여 또는 면역 억제 사이토카인의 차단.

[0122] 예를 들면, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 양성 공동자극 수용체를 결찰시키는 하나 이상의 작용제; 억제 수용체를 통한 신호전달을 약화시키는 하나 이상의 길항제(차단제), 예컨대 종양 미세환경 내의 구별되는 면역 억제 경로를 극복하는 길항제; 항-종양 면역 세포, 예컨대 T 세포의 빈도를 전신으로 증가시키거나, Treg를 고갈시키거나 억제하는(예컨대, CD25를 억제함으로써) 하나 이상의 제제; 대사 효소, 예컨대 IDO를 억제하는 하나 이상의 제제; T 세포 무반응 또는 탈진을 역전/예방하는 하나 이상의 제제; 종양 부위에서 선천 면역 활성화 및/또는 염증을 촉발하는 하나 이상의 제제와 함께 사용될 수 있다.

[0123] 일 구현예에서, 적어도 하나의 면역 자극제는 CTLA4 길항제, 예컨대 길항적 CTLA4 항체를 포함한다. 적합한 CTLA4 항체는, 예를 들면, YERVOY(이필리무맙) 또는 트레멜리무맙을 포함한다.

[0124] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 면역 자극제는 LAG-3 길항제, 예컨대 길항적 LAG-3 항체를 포함한다. 적합한 LAG-3 항체는, 예를 들면, BMS-986016(W010/19570, W014/08218), 또는 IMP-731 또는 IMP-321(W008/132601,

W009/44273)을 포함한다.

- [0125] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 면역 자극제는 CD137(4-1BB) 작용제, 예컨대 작용적 CD137 항체를 포함한다. 적합한 CD137 항체는, 예를 들면, 우렐루맙 또는 PF-05082566(W012/32433)을 포함한다.
- [0126] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 면역 자극제는 GITR 작용제, 예컨대 작용적 GITR 항체를 포함한다. 적합한 GITR 항체는, 예를 들면, TRX-518(W006/105021, W009/009116), MK-4166(W011/028683) 또는 W02015/031667에 개시된 GITR 항체를 포함한다.
- [0127] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 면역 자극제는 OX40 작용제, 예컨대 작용적 OX40 항체를 포함한다. 적합한 OX40 항체는, 예를 들면, MEDI-6383, MEDI-6469 또는 MOXR0916(RG7888; W006/029879)을 포함한다.
- [0128] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 면역 자극제는 CD27 작용제, 예컨대 작용적 CD27 항체를 포함한다. 적합한 CD27 항체는, 예를 들면, 발릴루맙(CDX-1127)을 포함한다.
- [0129] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 면역 자극제는 B7H3을 표적화하는 MGA271(W011/109400)을 포함한다.
- [0130] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 면역 자극제는 KIR 길항제, 예컨대 리릴루맙을 포함한다.
- [0131] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 면역 자극제는 IDO 길항제를 포함한다. IDO 길항제는, 예를 들면, INCB-024360(W02006/122150, W007/75598, W008/36653, W008/36642), 인독시모드, NLG-919(W009/73620, W009/1156652, W011/56652, W012/142237) 또는 F001287을 포함한다.
- [0132] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 면역 자극제는 툴(Toll)-유사 수용체 작용제, 예컨대, TLR2/4 작용제(예컨대, 바실러스 칼메테-구에린(Calmette-Guerin)); TLR7 작용제(예컨대, 힐토놀 또는 이미퀴모드); TLR7/8 작용제(예컨대, 레시퀴모드); 또는 TLR9 작용제(예컨대, CpG7909)를 포함한다.
- [0133] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 면역 자극제는 TGF- β 억제제, 예컨대, GC1008, LY2157299, TEW7197 또는 IMC-TR1을 포함한다.
- [0134] 일부 구현예에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 PD-1/PD-L1 억제제의 유효량과 조합되어 상기 암 중 하나를 치료하기 위해 투여된다.
- [0135] 예시적인 PD-1/PD-L1 억제제**
- [0136] PD-1/PD-L1 억제제는 항체, 융합 단백질, 및 웹타이드를 포함한다. PD-1/PD-L1 억제제인 비제한적인 예시적인 융합 단백질은 AMP-224(Amplimmune, GlaxoSmithKline)이다. PD-1/PD-L1 억제제인 비제한적인 예시적인 웹타이드는 AUR-012이다. 다른 예시적인 PD-1/PD-L1 억제제는 PD-1을 억제하는 항체, 예컨대 항-PD-1 항체 및 항-PD-L1 항체를 포함한다. 이러한 항체는 인간화 항체, 키메라 항체, 마우스 항체, 및 인간 항체일 수 있다.
- [0137] 일부 구현예에서, 조합은 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자 또는 PD-1/PD-L1 억제제 단독의 투여와 비교하여, 동물 암 모델, 예컨대 이종이식 모델에서 개선된 항-종양 반응을 야기한다. 일부 구현예에서, 조합은 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자 또는 PD-1/PD-L1 억제제 단독의 투여와 비교하여, 동물 암 모델, 예컨대 이종이식 모델에서 상승 반응을 야기한다.
- [0138] PD-1은 활성화된 T 및 B 세포에 의해 발현되는 핵심 면역 체크포인트 수용체이며 면역억제를 매개한다. PD-1은 CD28, CTLA4, ICOS, PD-1, 및 BTLA를 포함하는, CD28 계열의 수용체의 구성원이다. PD-1에 대한 2개의 세포 표면 당단백질 리간드인 프로그램화된 사멸 리간드-1(PD-L1) 및 프로그램화된 사멸 리간드-2(PD-L2)가 확인되었다. 이들 리간드는 항원-제시 세포뿐만 아니라 많은 인간 암에서 발현되며, PD-1에 결합시 T 세포 활성화 및 사이토카인 분비를 하향조절하는 것으로 나타났다. PD-1/PD-L1 상호작용의 억제는 전임상 모델에서 강력한 항종양 활성을 매개한다.
- [0139] 높은 친화성으로 PD-1에 특이적으로 결합하는 인간 단클론 항체(HuMAb)가 미국 특허 제8,008,449호에 개시되었다. 다른 항-PD-1 mAb는, 예를 들면, 미국 특허 제6,808,710호, 제7,488,802호, 제8,168,757호 및 제8,354,509호, 및 PCT 공개 제 WO 2012/145493호에 기재되었다. 미국 특허 제8,008,449호에 개시된 항-PD-1 HuMAb 각각은: (a) Biacore 바이오센서 시스템을 이용한 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정된 바와 같이, 1×10^{-7} M 이하의 K_D 로 인간 PD-1에 결합하고; (b) 인간 CD28, CTLA-4 또는 ICOS에 실질적으로 결합하지 않으며; (c) 혼합림프구 반응(MLR) 분석에서 T-세포 증식을 증가시키고; (d) MLR 분석에서 인터페론- γ 생산을 증가시키며; (e) MLR 분석에서 IL-2 분비를 증가시키고; (f) 인간 PD-1 및 시노몰구스 원숭이 PD-1에 결합하며; (g) PD-L1 및/또

는 PD-L2의 PD-1에의 결합을 억제하고; (h) 항원-특이적 기억 반응을 자극하며; (i) 항체 반응을 자극하고/하거나; (j) 생체내에서 종양 세포 성장을 억제한다. 본 발명에서 사용가능한 항-PD-1 항체는 인간 PD-1에 특이적으로 결합하고 선행 특징 (a) 내지 (j) 중 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개를 나타내는 항체를 포함한다.

[0140] 일 구현예에서, 항-PD-1 항체는 니볼루맙("옵디보"로도 알려짐; 이전에 5C4, BMS-936558, MDX-1106, 또는 ONO-4538로 지정됨)은 PD-1 리간드(PD-L1 및 PD-L2)와의 상호작용을 선택적으로 방지하여, 항종양 T-세포 기능의 하향조절을 차단하는 완전 인간 IgG4(S228P) PD-1 면역 체크포인트 억제제 항체이다(미국 특허 제8,008,449; Wang *et al.*, 2014 *Cancer Immunol Res.* 2(9):846-56).

[0141] 또 다른 구현예에서, 항-PD-1 항체는 펜브롤리주맙("케이트루다", 램브롤리주맙, 및 MK-3475로도 알려짐)은 인간 세포 표면 수용체 PD-1(프로그램화된 사멸-1 또는 프로그램화된 세포 사멸-1)에 대한 인간화 단클론 IgG4 항체이다. 펜브롤리주맙은, 예를 들면, 미국 특허 제8,900,587호에 기재되어 있으며; 또한 "www" dot "cancer" dot "gov" slash "dnigdictionary?cdr_id=695789" (마지막 접속: 2014년 12월 14일)의 주소를 갖는 사이트를 참고한다. 펜브롤리주맙은 재발된 또는 난치성 흑색종의 치료용으로 FDA에 의해 승인받았다.

[0142] 다른 구현예에서, 항-PD-1 항체는 MEDI0608(이전에 AMP-514)이며, 이는 PD-1 수용체에 대한 단클론 항체이다. MEDI0608은, 예를 들면, 미국 특허 제8,609,089,B2호, 또는 하기: www "dot" cancer "dot" gov "slash" drugdictionary?cdr_id=756047 (마지막 접속 2014년 12월 14일)에 기재되어 있다.

[0143] 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 피딜리주맙(CT-011)이며, 이는 인간화 단클론 항체이다. 피딜리주맙은 미국 특허 제8,686,119호 B2 또는 WO 제2013/014668호 A1에 기재되어 있다.

[0144] 개시된 방법에서 사용가능한 항-PD-1 항체는 또한 인간 PD-1에 특이적으로 결합하고 인간 PD-1에의 결합에 대해 니볼루맙과 상호 경쟁하는 단리된 항체를 포함한다(예컨대, 미국 특허 제8,008,449호; WO 제2013/173223호 참고). 항원에의 결합에 대해 상호 경쟁하는 항체들의 능력은 이들 항체가 항원의 동일한 에피토프 영역에 결합하며 상호 경쟁하는 다른 항체가 상기 특정 에피토프 영역에 결합하는 것을 입체적으로 방해한다는 것을 나타낸다. 이러한 상호 경쟁하는 항체는 이들이 PD-1의 동일한 에피토프 영역에 결합함으로써 니볼루맙과 매우 유사한 기능적 특성을 가질 것으로 예상된다. 상호 경쟁하는 항체들은 표준 PD-1 결합 분석, 예컨대 Biacore 분석, ELISA 분석 또는 유세포분석(예컨대, WO 제2013/173223호 참고)에서 니볼루맙과 상호 경쟁하는 이들의 능력에 기초하여 쉽게 확인될 수 있다.

[0145] 특정 구현예에서, 인간 PD-1에의 결합에 대해 니볼루맙과 상호 경쟁하거나 니볼루맙과 인간 PD-1의 동일한 에피토프 영역에 결합하는 항체는 단클론 항체이다. 인간 대상체에게 투여하기 위해, 이러한 상호 경쟁하는 항체는 키메라 항체일 수 있거나, 또는 인간화 또는 인간 항체일 수 있다.

[0146] 개시된 발명의 방법에 사용가능한 항-PD-1 항체는 또한 상기 항체의 항원-결합 부분을 포함한다. 예는 (i) V_L , V_H , C_L 및 C_{H1} 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 헌지 영역에서 디설파이드 다리에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (iii) V_H 및 C_{H1} 도메인으로 이루어진 Fd 단편; 및 (iv) 항체의 단일 아암의 V_L 및 V_H 도메인으로 이루어진 Fv 단편을 포함한다.

면역 자극제 또는 PD-1/PD-L1 억제제와 조합된 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 단백질의 투여

[0148] 일부 구현예에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자 및 면역 자극제 또는 PD-1/PD-L1 억제제는 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자 및 면역 자극제 또는 PD-1/PD-L1 억제제는 순차적으로 투여된다. 일부 구현예에서, CD80 ECD 또는 CD80 융합 분자의 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개의 용량, 적어도 5개의 용량, 또는 적어도 10개의 용량은 면역 자극제 또는 PD-1/PD-L1 억제제의 투여 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 면역 자극제 또는 PD-1/PD-L1 억제제의 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개의 용량, 적어도 5개의 용량, 또는 적어도 10개의 용량은 CD80 ECD 또는 CD80 융합 분자의 투여 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 면역 자극제 또는 PD-1/PD-L1 억제제의 마지막 용량은 CD80 ECD 또는 CD80 융합 분자의 첫 번째 용량 전 적어도 1일, 2일, 3일, 5일 또는 10일, 또는 1주, 2주, 3주, 5주, 12주, 또는 24주에 투여된다. 일부 다른 구현예에서, CD80 ECD 또는 CD80 융합 분자의 마지막 용량은 면역 자극제 또는 PD-1/PD-L1 억제제의 첫 번째 용량 전 적어도 1일, 2일, 3일, 5일 또는 10일, 또는 1주, 2주, 3주, 5주, 12주, 또는 24주에 투여된다. 일부 구현예에서, 대상

체는 면역 자극제 또는 PD-1/PD-L1 억제제 요법을 받았거나 받고 있으며, CD80 ECD 또는 CD80 융합 분자는 치료 요법에 첨가된다.

[0149] 일부 구현예에서, 대상체는 면역 자극제 또는 PD-1/PD-L1 억제제 불충분 반응군(즉, 하나 이상의 면역 자극제 또는 PD-1/PD-L1 억제제에 대해 내성을 보임)이다. PD-1/PD-L1 억제제 불충분 반응군인 대상체는, 예를 들면, 이전에 PD-1/PD-L1 억제제에 대해 반응하였을 수 있으나, PD-1/PD-L1 억제제에 대해 덜 반응성이 될 수 있거나, 또는 대상체는 PD-1/PD-L1 억제제에 반응하지 않았을 수 있다. 면역 자극제 또는 PD-1/PD-L1 억제제에 대한 불충분한 반응은 PD-1/PD-L1 억제제의 표준 용량 후 개선될 것으로 예상될 병태의 측면이 개선되지 않고/않거나 표준 용량 초과가 투여될 때에만 개선이 발생한다는 것을 의미한다. 일부 구현예에서, 면역 자극제 또는 PD-1/PD-L1 억제제 불충분 반응군은 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 6주, 또는 적어도 12주 동안 표준 용량을 받은 후 약물에 대해 불충분한 반응을 경험하였거나 경험하고 있다. 면역 자극제 또는 PD-1/PD-L1 억제제의 "표준" 용량은 의료 전문가에 의해 결정될 수 있고, 대상체의 연령, 체중, 건강 이력, 질환의 중증도, 투여 빈도 등에 따라 달라질 수 있다. 일부 구현예에서, 면역 자극제 또는 PD-1/PD-L1 억제제 불충분 반응군은 항-PD-1 항체 및/또는 항-PD-L1 항체에 대한 불충분한 반응을 경험하였거나 경험하고 있다. 일부 구현예에서, PD-1/PD-L1 억제제 불충분 반응군은 AMP-224에 대한 불충분한 반응을 경험하였거나 경험하고 있다. 일부 구현예에서, PD-1/PD-L1 억제제 불충분 반응군은 니볼루맙, 피딜리주맙, 및 펜브롤리주맙으로부터 선택되는 PD-1/PD-L1 억제제에 대한 불충분한 반응을 경험하였거나 경험하고 있다.

[0150] 상기 구현예 중 어느 것에서, 대상체에게 투여되는 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자와 PD-1/PD-L1 억제제의 조합은 1주, 10일, 또는 2주의 기간 동안 마우스 동계 또는 이종이식 암 모델에서, 예를 들면, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%까지 종양 성장을 억제할 수 있다. 상기 조합 요법 방법 구현예 중 어느 것에서, 대상체에게 투여되는 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자와 PD-1/PD-L1 억제제의 조합은 예를 들면, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 또는 1년의 기간 동안 대상체에서 또는 동물 모델 대상체에서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%까지 적어도 하나의 종양의 부피를 감소시킬 수 있다.

[0151] 이러한 조합 요법 방법 중 어느 것에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 10-60 mol SA 대 CD80 ECD Fc 단백질의 mol, 예컨대 15-60 mol SA/mol 단백질을 포함하는 CD80 ECD Fc일 수 있다. 일부 구현예에서, 함량은 10-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 15-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 20-40 mol SA/mol 단백질, 20-30 mol SA/mol 단백질, 15-25 mol SA/mol 단백질, 15-30 mol SA 대 단백질의 mol, 또는 30-40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 적어도 15, 예컨대 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 또는 적어도 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 Fc 도메인이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 서열번호:14의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 분자는 서열번호:20 또는 21의 아미노산 서열을 포함한다.

투여 경로 및 담체

[0153] 다양한 구현예에서, 폴리펩타이드 및 융합 분자는, 비제한적으로 경구, 동맥내, 비경구, 비강내, 정액내, 근육내, 심장내, 심실내, 기관내, 구강, 직장, 복강내, 피내, 국소, 경피, 및 척추강내, 또는 이식 또는 흡입을 포함하는, 다양한 경로에 의해 생체내로 투여될 수 있다. 대상 조성물은, 비제한적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 연고, 용액, 좌제, 관장제, 주사제, 흡입제, 및 에어로졸을 포함하는, 고체, 반고체, 액체, 또는 기체 형태의 제제로 제형화될 수 있다. 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 분자는 금 미세입자 상에 코팅될 수 있고 충격 장치(bombardment device), 또는 문헌(예컨대, Tang et al., *Nature* 356:152-154 (1992) 참고)에 기재된 바와 같은 "유전자 총"에 의해 피내로 전달될 수 있다. 적절한 제제 및 투여 경로는 의도된 적용에 따라 선택될 수 있다.

[0154] 다양한 구현예에서, 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 다양한 약제학적으로 허용가능한 담체를 갖는 제제로 제공된다(예컨대, Gennaro, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus*, 20th ed. (2003); Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe et al., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000) 참고). 비히클, 보조제, 및 회석제를 포함하는 다양한 약제학적으로 허용가능한 담체가 이용가능하다. 더욱이, 다양한 약제학적으로 허용가능한 보조 물질, 예컨대 pH 조절 및

완충제, 긴장성 조절제, 안정화제, 습윤제 등이 또한 이용가능하다. 비제한적인 예시적인 담체는 식염수, 완충식염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올, 및 이의 조합을 포함한다.

[0155] 다양한 구현예에서, 폴리펩타이드 및 융합 분자를 포함하는 조성물은, 원하는 경우, 종래의 첨가제, 예컨대 가용화제, 등장화제, 혼탁화제, 유화제, 안정화제 및 보존제와 함께, 이들을 수성 또는 비수성 용매, 예컨대 식물성 또는 다른 오일, 합성 지방족산 글리세라이드, 고차 지방족산의 에스테르, 또는 프로필렌 글리콜에 용해시키거나, 혼탁시키거나 또는 유화시킴으로써, 피하 투여를 포함하는 주사용으로 제제화될 수 있다. 다양한 구현예에서, 조성물은, 예를 들면, 가압된 허용가능한 추진제, 예컨대 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소 등을 사용하여 흡입용으로 제제화될 수 있다. 조성물은 또한, 다양한 구현예에서, 예컨대 생분해성 또는 비생분해성 중합체를 사용하여 지효성 방출 미세캡슐로 제제화될 수 있다. 비제한적인 예시적인 생분해성 제제는 폴리 젯산-글리콜산 중합체를 포함한다. 비제한적인 예시적인 비생분해성 제제는 폴리글리세린 지방산 에스테르를 포함한다. 이러한 제제를 제조하는 특정 방법은, 예를 들면, EP 1 125 584호 A1에 기재되어 있다.

[0156] 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드의 조합의 하나 이상의 용량을 각각 함유하는, 하나 이상의 용기를 포함하는 약제학적 팩 및 키트가 또한 제공된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 부가적인 제제를 갖거나 없이, 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드의 조합을 포함하는 조성물의 미리 결정된 양을 함유하는 단위 투여량이 제공된다. 일부 구현예에서, 이러한 단위 투여량은 1회용의 미리 충진된 주사용 주사기에서 제공된다. 다양한 구현예에서, 단위 투여량에 함유된 조성물은 식염수, 수크로스 등; 완충제, 예컨대 인산염 등을 포함할 수 있고/있거나; 안정하고 효과적인 pH 범위 내에서 제제화될 수 있다. 대안적으로, 일부 구현예에서, 조성물은 적절한 액체, 예를 들면, 멸균수의 첨가시 재구성될 수 있는 동결건조 분말로서 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 비제한적으로 수크로스 및 아르기닌을 포함하는, 단백질 응집을 억제하는 하나 이상의 물질을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 조성물은 헤파린 및/또는 프로테오글리칸을 포함한다.

[0157] 약제학적 조성물은 특정 정후의 치료 또는 예방에 효과적인 양으로 투여된다. 치료적 유효량은 전형적으로 치료되는 대상체의 체중, 그의 신체적 또는 건강 상태, 치료되는 병태의 포괄성, 또는 치료되는 대상체의 연령에 의존적이다. 일부 구현예에서, PD-1/PD-L1 억제제, 예컨대 항체 또는 융합 단백질은 1 내지 4 mg/kg의 용량의 CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자와 함께 투여된다. 일부 구현예에서, PD-1/PD-L1 억제제는 1, 2, 3, 또는 4 mg/kg의 용량으로 투여된다.

[0158] 투여 빈도는 치료되는 병태, 치료되는 대상체의 연령, 치료되는 병태의 중증도, 치료되는 대상체의 건강의 일반 상태 등을 고려하여 당업자, 예컨대 담당 의사에 의해 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자의 유효 용량은 대상체에게 1회 이상 투여된다. 다양한 구현예에서, 유효 용량은 대상체에게 1개 월에 1회, 1개월에 1회 미만, 예컨대, 예를 들면, 2개월마다 또는 3개월마다 투여된다. 다른 구현예에서, 유효 용량은 1개월에 1회 초과, 예컨대, 3주마다, 2주마다 또는 매주마다 투여된다. 일부 구현예에서, 유효 용량은 1, 2, 3, 4, 또는 5주당 1회 투여된다. 일부 구현예에서, 유효 용량은 주당 2회 또는 3회 투여된다. 유효 용량은 대상체에게 적어도 1회 투여된다. 일부 구현예에서, 유효 용량은 적어도 1개월, 적어도 6개월, 또는 적어도 1년의 기간 동안 복수 횟수로 투여될 수 있다.

부가적인 조합 요법

[0160] CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 단독으로, PD-1/PD-L1 억제제와 함께, 및/또는 다른 치료 방식과 함께 투여될 수 있다. CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 다른 치료 방식, 예를 들면, 수술, 화학요법, 방사선 요법, 또는 또 다른 생물제제의 투여 전에, 이와 실질적으로 동시에, 또는 이후에 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, 암은 수술, 화학요법, 및 방사선 요법, 또는 이의 조합으로부터 선택되는 요법 후에 재발하였거나 진행되었다.

[0161] 암의 치료를 위해, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 하나 이상의 부가적인 항암제, 예컨대 화학치료제, 성장 억제제, 항-혈관신생제 및/또는 항-신생 조성물과 함께 투여될 수 있다. 본 발명의 항체와 조합하여 사용될 수 있는 화학치료제, 성장 억제제, 항-혈관신생제, 항암제 및 항-신생 조성물의 비제한적인 예는 하기 정의에 제공된다.

[0162] 상기 조합 요법 방법 구현예 중 어느 것에서, 대상체에게 투여되는 요법은 1주, 10일, 또는 2주의 기간 동안 마우스 동계 또는 이종이식 암 모델에서, 예를 들면, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%까지 종양 성장을 억제할 수 있다. 상기 조합 요법 방법 구현예 중 어느 것에서, 대상체에게 투여되는 요법은, 예를 들면, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 또는 1년의 기간 동안, 대상체에서 또는 동물 모델 대상체에서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도

도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%까지 적어도 하나의 종양의 부피를 감소시킬 수 있다.

[0163] 이러한 추가적인 조합 요법 방법 중 어느 것에서, CD80 ECD 또는 CD80 ECD 융합 분자는 10-60 mol SA 대 CD80 ECD Fc 단백질의 mol, 예컨대 15-60 mol SA/mol 단백질을 포함하는 CD80 ECD Fc일 수 있다. 일부 구현예에서, 함량은 10-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 15-40 mol SA/mol 단백질, 예컨대 20-40 mol SA/mol 단백질, 20-30 mol SA/mol 단백질, 15-25 mol SA/mol 단백질, 15-30 mol SA 대 단백질의 mol, 또는 30-40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 적어도 15, 예컨대 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35, 또는 적어도 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, SA 함량은 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40 mol SA/mol 단백질이다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 인간 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 Fc 도메인이다. 일부 구현예에서 Fc 도메인은 서열번호:14의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 분자는 서열번호:20 또는 21의 아미노산 서열을 포함한다.

[0164] "화학치료제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학치료제의 예는, 비체한적으로, 알킬화제, 예컨대 티오텐과 및 사이토신[®] 사이클로포스파미드; 알킬 설포네이트, 예컨대 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보퀸, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예컨대 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸롤로멜라민; 아세토게닌(특히 불라타신 및 불라타시논); 캄프토데신(합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(그의 아도젤레신, 카르겔레신 및 비겔레신 합성 유사체 포함); 크립토피신(특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 두오카르마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘류데로빈; 판크라티스타틴; 사르코디티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라님누스틴; 항생제, 예컨대 에네딘 항생제(예컨대, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가I1(참고: 예컨대, Agnew, *Chem Int'l. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); 디네미신, 예컨대 디네미신 A; 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 크로모포어 및 관련 색소단백질 에네딘 항생제 크로모포어), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캄티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신[®] 독소루비신(모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 폐플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 퀼라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물질, 예컨대 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 엽산 유사체, 예컨대 데놉테린, 메토트렉세이트, 프테롭테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시티빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시풀루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-부신체, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충제, 예컨대 프롤린산(프롤린산); 아세글락톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지퀸; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 웬티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카르바진; PSK[®] 다당류 복합체(JHS Natural Products, Eugene, OR); 라족산; 리족신; 시조페란; 스피로게르마늄; 테나우존산; 트리아지퀸; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센(특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 디카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오태파; 탁소이드, 예컨대, 탁솔[®] 파클리탁셀(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), 아브락신[®] 무-크레모포어, 파클리탁셀의 알부민-조작된 나노입자 제제(American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois), 및 탁소이드[®] 독세탁셀(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로람부실; 챔자르[®] 쟁시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시

드(VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빙크리스틴; 나벨빈[®] 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반트로네이트; 이리노테칸(Camptosar, CPT-11)(5-FU 및 류코보린을 갖는 이리노테칸의 치료 요법 포함); 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산; 카페시타빈; 콤브레스타틴; 류코보린(LV); 옥살리플라틴, 예컨대 옥살리플라틴 치료 요법 (FOLFOX); PKC-알파, Raf, H-Ras, EGFR의 억제제(예컨대, 엘로티닙(타르세바[®])) 및 세포 증식을 감소시키는 VEGF-A 및 상기 중 어느 것의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0165] 추가의 비제한적인 예시적인 화학치료제는 암에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항-호르몬제, 예컨대 항-에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM), 예를 들면, 타목시펜(놀바택스[®] 타목시펜 포함), 랄록시펜, 드롤록시펜, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 캐옥시펜, LY117018, 오나프리스톤, 및 파레스톤[®] 토레미펜; 부신에서 에스트로겐 생산을 조절하는 효소 아로마타아제를 억제하는 아로마타아제 억제제, 예컨대, 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메가세[®] 메게스트를 아세테이트, 아로마신[®] 엑세메스탄, 포르메스타니, 파드로졸, 리비소르[®] 보로졸, 페마라[®] 레트로졸, 및 아리미텍스[®] 아나스트로졸; 및 항-안드로겐, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드, 및 고세렐린; 뿐만 아니라 트록사시타빈(1,3-디옥솔란 뉴클레오사이드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 특히 비정상적인 세포 증식과 관련된 신호 전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것, 예컨대, PKC-알파, Ralf 및 H-Ras; 리보자임, 예컨대 VEGF 발현 억제제(예컨대, 안지오자임[®] 리보자임) 및 HER2 발현 억제제; 백신, 예컨대 유전자 요법 백신, 예를 들면, 알로백틴[®] 백신, 류백틴[®] 백신, 및 박시드[®] 백신; 프로류킨[®] rIL-2; 루르토테칸[®] 토포이소머라제 1 억제제; 아바렐릭스[®] rmRH; 및 상기 중 어느 것의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0166] "항-혈관신생제" 또는 "혈관신생 억제제"는 혈관신생, 맥관형성, 또는 바람직하지 않은 혈관 투과성을 직접 또는 간접적으로 억제하는, 작은 문자량 물질, 폴리뉴클레오타이드(예컨대, 억제성 RNA(RNAi 또는 siRNA) 포함), 폴리펩타이드, 단리된 단백질, 재조합 단백질, 항체, 또는 이의 접합체 또는 융합 단백질을 지칭한다. 항-혈관신생제는 혈관신생 인자 또는 그의 수용체에 결합하고 그의 혈관신생 활성을 차단하는 제제를 포함하는 것으로 이해해야 한다. 예를 들면, 항-혈관신생제는 혈관신생제에 대한 항체 또는 다른 길항제, 예컨대, VEGF-A에 대한 항체(예컨대, 베바시주맙(Avastin[®])) 또는 VEGF-A 수용체에 대한 항체(예컨대, KDR 수용체 또는 Flt-1 수용체), 항-PDGFR 억제제, 예컨대 글리벡[®](이마티닙 메실레이트), VEGF 수용체 신호전달을 차단하는 소분자(예컨대, PTK787/ZK2284, SU6668, 수텐트[®]/SU11248(수니티닙 말레이트), AMG706, 또는 예컨대, 국제특허 출원 WO 제2004/113304호에 기재된 것)이다. 항-혈관신생제는 또한 원상태 혈관신생 억제제, 예컨대, 안지오스타틴, 엔도스타틴 등을 포함한다. 예컨대, 문헌[Klagsbrun and D'Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39; Streit and Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179(예컨대, 악성 흑색종에서 항-혈관신생 요법을 열거하는 표 3); Ferrara & Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12):1359-1364; Tonini *et al.* (2003) *Oncogene* 22:6549-6556(예컨대, 공지된 항-혈관신생을 열거하는 표 2); 및, Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206(예컨대, 임상 시험에서 사용되는 항-혈관신생제를 열거하는 표 1)]을 참고한다.

[0167] 본원에 사용된 바와 같이 "성장 억제제"는 시험관내에서 또는 생체내에서 세포(예컨대, VEGF를 발현하는 세포)의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 성장 억제제는 S기에서 세포(예컨대 VEGF를 발현하는 세포)의 백분율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는, 비제한적으로, 세포 주기 진행 (S기 이외의 위치에서)을 차단하는 제제, 예컨대 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 제제를 포함한다. 고전적인 M기 차단제는 빈카(빙크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산, 및 토포이소머라제 II 억제제, 예컨대 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드, 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 제제, 예를 들면, DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로르에타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실, 및 아라-C는 또한 S기 정지로 확대된다. 추가의 정보는 문헌[Murakami 등에 의한 "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs"라는 명칭의 Mendelsohn and Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, Chapter 1 (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), 예컨대, 13페이지]에서 발견될 수 있다. 탁산(파클리탁셀 및 도세탁셀)은 주목으로부터 유래된 항암 약물이다. 서양 주목으로부터 유래된 도세탁셀(탁소테레[®], Rhone-Poulenc Rorer)은 파클리탁셀(탁솔[®], Bristol-Myers Squibb)의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세

탁셀은 투불린 이량체로부터 미세소관의 조립을 촉진하고, 탈중합을 예방하여 미세소관을 안정화시켜, 세포에서 유사분열을 억제한다.

[0168] 용어 "항-신생 조성물"은 적어도 하나의 활성 치료제를 포함하는 암을 치료하는데 유용한 조성물을 지칭한다. 치료제의 예는, 비제한적으로, 예컨대, 화학치료제, 성장 억제제, 세포독성제, 방사선 요법에서 사용되는 제제, 항-혈관신생제, PD-1/PD-L1 억제제를 제외한 다른 암 면역치료제, 세포사멸제, 항-투불린제, 및 암을 치료하는 다른 제제, 예컨대 항-HER-2 항체, 항-CD20 항체, 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 길항제(예컨대, 티로신 키나아제 억제제), HER1/EGFR 억제제(예컨대, 엘로티닙(타르세바[®]), 혈소판 유래 성장 인자 억제제(예컨대, 글리벡[®](이마티닙 메실레이트)), COX-2 억제제(예컨대, 셀레콕십), 인터페론, CTLA-4 억제제(예컨대, 항-CTLA 항체 이필리무맙(YERVOY[®])), PD-L2 억제제(예컨대, 항-PD-L2 항체), TIM3 억제제(예컨대, 항-TIM3 항체), 사이토카인, 하기 표적 ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-베타, BlyS, APRIL, BCMA, PD-L2, CTLA-4, TIM3, 또는 VEGF 수용체(들) 중 하나 이상에 결합하는 길항제(예컨대, 중화 항체), TRAIL/Apo2, 및 다른 생물활성 및 유기화학 물질 등을 포함한다. 이의 조합이 또한 본 발명에 포함된다.

실시예

[0169] [0170] 하기에 논의된 실시예는 단지 발명을 예시하기 위한 것이며 발명을 어떤 식으로든 한정하는 것으로 간주되지 않아야 한다. 실시예는 하기 실험이 수행된 모든 실험 또는 유일한 실험이라는 것을 나타내고자 하는 것이 아니다. 사용된 숫자(예를 들면, 양, 온도 등)에 대한 정확성을 확보하기 위해 노력하였지만, 일부 실험 오차 및 편차가 고려되어야 한다. 달리 언급하지 않는 한, 부분은 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이며, 온도는 섭씨 온도이고, 압력은 대기압 또는 대기압 근처이다.

실시예 1: CD80 ECD Fc 융합 분자는 뮤린 결장 암종 세포주 CT26이 이식된 마우스에서 종양 성장을 감소시킨다

[0171] [0172] 7주령 암컷 BALB/c 마우스를 찰스 리버 연구소(Hollister, CA)로부터 구입하여 연구 시작 전에 2주간 적응시켰다. 뮤린 결장 암종 세포주 CT26을 1.0×10^6 세포/200 μ l/마우스로 마우스의 우측 옆구리에 피하 이식하였다. 접종 전, 세포를 10% 열 불활성화된 우태아혈청(FBS), 2mM L-글루타민이 보충된 RPMI 1640 배지에서 3번 이하의 계대 동안 배양하였다. 세포를 5% CO_2 를 갖는 가습 분위기에서 37°C에서 성장시켰다. 80-85% 컨플루언스에 도달 시, 세포를 수확하고 밀리리터당 5×10^6 세포로 무혈청 RPMI 1640 및 마트리겔[®]의 1:1 혼합물에 재현탁시켰다.

[0173] 마우스를 세포 이식 후 매주 2회 종양 성장에 대해 모니터링하였다. 종양 측정을 위해, 각 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼스를 이용하여 측정하고, 부피를 식에 따라 계산하였다: 종양 부피(mm^3) = ($폭(mm)$ x 길이(mm)) 2 /2. 7일에, 모든 종양을 측정하고, 마우스를 치료 그룹으로 무작위로 할당하였다. 치료 그룹에 등록된 모든 동물의 평균 종양 부피는 $175 mm^3$ 였다. 마우스에게 RIPPSSM를 통해 식염수 또는 플라스미드 DNA를 투여하였다. RIPPSSM를 통해 투여된 플라스미드 DNA는 뮤린 CD80 또는 CTLA4의 세포외 도메인(ECD)뿐만 아니라 인간 IgG2a의 Fc 도메인의 서열을 함유하였다. 종양 부피가 동물 체중의 10%, 또는 약 $2000 mm^3$ 를 초과할 때까지 종양을 계속 매주 적어도 2회 측정하였다.

[0174] 종양 크기의 변화가 동물에 CT26 세포를 접종한 일자와 비교하여 평균 종양 부피를 도식화함으로써 나타나 있다. (도. 1a.) CD80 ECD를 갖는 RIPPS는 11일부터 식염수 대조군과 비교하여 종양 성장을 유의하게 감소시켰다($p<0.05$). (도. 1a-b.). P -값을 각 연구 일자에 계산된 종양 부피의 독립, 양측(unpaired, two tailed) t-검정 분석을 사용하여 계산하였다(* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$). CD80 ECD에 의한 종양 성장 억제는 식염수 대조군과 비교하여 78.8%인 것으로 결정되었고, 이는 $100 \times (1 - (CD80\text{에 대한 종양 부피의 평균 변화}) / (\text{식염수에 대한 종양 부피의 평균 변화}))$ 로서 계산되었다. 또한, 도. 1a에 나타난 바와 같이, 마우스 CTLA4-ECD Fc를 갖는 RIPPS는 식염수 대조군과 비교하여 종양 성장을 실제로 향상시켰다. 이 결과에 대한 한 가지 설명은 CTLA4-ECD Fc 제작물이 CD80에 대한 리간드 트랩으로 작용하여, CD80이 CD28에 결합하는 것을 방지하고 종양 세포에 대한 T 세포 활성을 자극할지도 모른다는 것이다.

실시예 2: 항-PD-1 항체와 조합된 CD80 ECD Fc 융합 분자는 뮤린 결장 암종 세포주 CT26이 이식된 마우스에서 종양 성장을 감소시킨다

[0175] [0176] 7주령 암컷 BALB/c 마우스를 찰스 리버 연구소(Hollister, CA)로부터 구입하여 연구 시작 전에 12일간 적응시켰다. 뮤린 결장 암종 세포주 CT26을 1.0×10^6 세포/200 μ l/마우스로 마우스의 우측 옆구리에 피하 이식하였다.

접종 전, 세포를 10% 열 불활성화된 우태아혈청(FBS), 2mM L-글루타민이 보충된 RPMI 1640 배지에서 3번 이하의 계대 동안 배양하였다. 세포를 5% CO₂를 갖는 가습 분위기에서 37°C에서 성장시켰다. 80-85% 컨플루언스에 도달 시, 세포를 수확하고 밀리리터당 5 x10⁶ 세포로 무혈청 RPMI 1640 및 마트리겔®의 1:1 혼합물에 재현탁시켰다.

[0177] 마우스를 세포 이식 후 매주 2회 종양 성장에 대해 모니터링하였다. 종양 측정을 위해, 각 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼스를 이용하여 측정하고, 부피를 식에 따라 계산하였다: 종양 부피(mm³) = (폭(mm) x 길이(mm))²/2. 7일에, 모든 종양을 측정하고, 마우스를 치료 그룹으로 무작위로 할당하였다. 치료 그룹에 등록된 모든 동물의 평균 종양 부피는 약 150 mm³였다. 마우스에게 RIPPSSM를 통해 마우스 CD80 ECD 및 인간 IgG2a로부터의 Fc 또는 Fc 단독(음성 대조군)을 코딩하는 플라스미드 DNA를 투여하였다. 단백질을 항-PD1(클론 RMP1-14) 또는 Rat IgG2a(클론 2A3, 음성 대조군)에게 투여하였다. 투여 그룹은 다음과 같았다: 1) Fc RIPPSSM 및 랫트 IgG2a, 2) CD80 RIPPSSM 및 랫트 IgG2a, 3) Fc RIPPSSM 및 항-PD1, 또는 4) CD80 RIPPSSM 및 항-PD1. 종양 부피가 동물 체중의 10%, 또는 약 2000 mm³를 초과할 때까지 종양을 계속 매주 적어도 2회 측정하였다.

[0178] 종양 크기의 변화가 연구 말기에 모든 그룹에 대해 평균 종양 무게를 도식화함으로써 나타나 있다. (도. 2a.). 마우스 CD80 ECD를 갖는 RIPPSSM 또는 항-PD1의 투여는 대조군과 비교하여 종양 성장을 감소시켰다. (도. 2a-b.) CD80 RIPPSSM 및 항-PD1의 조합은 치료 개시 후 9일부터 CD80(9일부터 p<0.01) 또는 항-PD-1(14일에 p<0.01) 단독(p<0.05)과 비교하여 종양 성장을 유의하게 감소시켰다. P-값을 각 측정일에 계산된 종양 부피의 독립, 양측 t-검정 분석을 사용하여 계산하였다.

[0179] CD80 ECD 및 항-PD1에 의한 종양 성장 억제(TGI)는 대조군과 비교하여 각각 28.7% 및 41.5%인 것으로 결정되었다. CD80 ECD 및 항-PD1 조합의 조합에 의한 TGI는 83%인 것으로 결정되었다. (도. 2b. 참고). TGI는 식 100x(1-(평균 △부피 치료 그룹/평균 △부피 식염수))를 사용하여 계산하였다.

[0180] 실시예 3: 야생형 및 돌연변이 인간 IgG1 Fc 융합 폴리펩타이드 서열을 갖는 CD80 ECD Fc 융합 분자의 활성의 비교

[0181] 7주령 암컷 BALB/c 마우스를 찰스 리버 연구소(Hollister, CA)로부터 구입하여 연구 시작 전에 2주간 적응시켰다. 뮤린 결장 암종 세포주 CT26을 1.0x10⁶ 세포/200 μl/마우스로 마우스의 우측 옆구리에 피하 이식하였다. 접종 전, 세포를 10% 열 불활성화된 우태아혈청(FBS), 2mM L-글루타민이 보충된 RPMI 1640 배지에서 3번 이하의 계대 동안 배양하였다. 세포를 5% CO₂를 갖는 가습 분위기에서 37°C에서 성장시켰다. 80-85% 컨플루언스에 도달 시, 세포를 수확하고 밀리리터당 5 x10⁶ 세포로 무혈청 RPMI 1640 및 마트리겔®의 1:1 혼합물에 재현탁시켰다.

[0182] 마우스를 세포 이식 후 매주 2회 종양 성장에 대해 모니터링하였다. 종양 측정을 위해, 각 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼스를 이용하여 측정하고, 부피를 식에 따라 계산하였다: 종양 부피(mm³) = (폭(mm) x 길이(mm))²/2. 5일에, 모든 종양을 측정하고, 마우스를 치료 그룹으로 무작위로 할당하였다. 치료 그룹에 등록된 모든 동물의 평균 종양 부피는 175 mm³였다. 마우스에게 RIPPSSM를 통해 식염수 또는 플라스미드 DNA를 투여하였다. RIPPSSM를 통해 투여된 플라스미드 DNA는 인간 IgG1의 Fc 도메인을 갖는 뮤린 CD80의 세포외 도메인(ECD)에 대한 서열을 함유하였다. Fc와 Fc 감마 수용체(CD80-IgG1 MT)의 상호작용을 변경하기 위해 2개의 클론인 야생형 인간 IgG1 Fc(CD80-IgG1 WT)를 갖는 클론 및 3개의 돌연변이된 아미노산(L234F/L235E/P331S)을 갖는 이러한 Fc를 갖는 클론을 RIPPSSM를 통해 투여하였다. 종양 부피가 동물 체중의 10%, 또는 약 2000 mm³를 초과할 때까지 종양을 계속 매주 적어도 2회 측정하였다.

[0183] 종양 크기의 변화가 동물에게 CT26 세포를 접종한 일자와 비교하여 평균 종양 무게를 도식화함으로써 나타나 있다(도. 3a-b.). CD80-IgG1 WT를 갖는 RIPPSSM는 14일부터 식염수 대조군과 비교하여 종양 성장을 유의하게 감소시켰다(p<0.05). CD80-IgG MT는 14일부터 CD80-IgG1 WT와 비교하여 종양 성장을 유의하게 감소시켰다(p<0.01). P-값을 각 연구 일자에 계산된 종양 부피의 독립, 양측 t-검정 분석을 사용하여 계산하였다(* p<0.05, ** p<0.01). CD80-IgG1 WT에 의한 종양 성장 억제(TGI)는 식염수 대조군과 비교하여 69.4%인 것으로 결정되었고, CD80-IgG MT에 대한 TGI와 비교하여, 98%로서 계산되었다(도. 3b. 참고). TGI를 100x(1-(평균 △부피 치료 그

룹/평균 △부피 식염수)를 사용하여 결정하였다.

[0184] 실시예 4: CT26 종양에서 침윤성 T 세포에 대한 야생형 및 돌연변이 인간 IgG1 Fc 융합 폴리펩타이드 서열을 갖는 CD80 ECD Fc 융합 분자의 효과

[0185] 별도의 생체내 연구를 수행하여 CD80-IgG1 WT 및 CD80-IgG1 MT가 치료 초기 단계에 CT26 종양 내의 침윤성 T 세포에 미치는 효과를 분석하였다.

[0186] 7주령 암컷 BALB/c 마우스를 찰스 리버 연구소(Hollister, CA)로부터 구입하여 연구 시작 전에 2주간 적응시켰다. 뮤린 결장 암종 세포주 CT26을 1.0×10^6 세포/200 μ l/마우스로 마우스의 우측 옆구리에 피하 이식하였다. 접종 전, 세포를 10% 열 불활성화된 우태아혈청(FBS), 2mM L-글루타민이 보충된 RPMI 1640 배지에서 3번 이하의 계대 동안 배양하였다. 세포를 5% CO₂를 갖는 가습 분위기에서 37°C에서 성장시켰다. 80-85% 컨플루언스에 도달 시, 세포를 수확하고 밀리리터당 5 $\times 10^6$ 세포로 무혈청 RPMI 1640 및 마트리겔®의 1:1 혼합물에 재현탁시켰다.

[0187] 마우스를 세포 이식 후 매주 2회 종양 성장에 대해 모니터링하였다. 종양 측정을 위해, 각 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼스를 이용하여 측정하고, 부피를 식에 따라 계산하였다: 종양 부피(mm^3) = (폭(mm) x 길이(mm))²/2. 5일에, 모든 종양을 측정하고, 마우스를 치료 그룹(그룹당 n= 5마리의 마우스)으로 무작위로 할당하였다. 치료 그룹에 등록된 모든 동물의 평균 종양 부피는 72 mm^3 였다. Fc 감마 수용체와의 상호작용을 변경하기 위해, 마우스에게 식염수, 야생형 인간 IgG1 Fc를 갖는 CD80(CD80-IgG1 WT)의 뮤린 세포외 도메인(ECD), 또는 돌연변이된 인간 IgG1 Fc를 갖는 CD80(CD80-IgG1 MT, 돌연변이된 L234F/L235E/P331S)의 뮤린 ECD를 투여하였다. 종양을 5일과 11일에 측정하였다.

[0188] 12일에, 마우스를 CO₂로 안락사시키고, 인산 완충 식염수(PBS), pH 7.4로 관류시켰다. 간략히, 마우스 흉부를 빠르게 열고, 20-케이지 바늘을 갖는 주사기를 사용하여 좌심실에서의 절개를 통해 대동맥 내로 40mL의 PBS를 주입하였다. 혈액 및 PBS가 우심방의 구멍을 통해 배출되었다. 종양을 꺼내어 4°C의 10% 중성 완충 포르말린에 침지시켰다. 2시간 후, 조직을 PBS에서 3회 행군 다음, 밤새 PBS 중의 30% 수크로스에 옮겼다. 다음날, 종양을 OCT 화합물에서 동결시키고 -80°C에 보관하였다.

[0189] 동결 절편을 20- μm 두께로 절단하였다. 절편을 수퍼프로스트® 플러스 슬라이드 상에서 1 내지 2시간 동안 건조시켰다. 표본을 0.3% 트리톤® X-100을 함유하는 PBS로 투과화시키고, 비특이적 항체 결합을 차단하기 위해 실온에서 1시간 동안 PBS 0.3% 트리톤® X-100(차단 용액) 중의 5% 염소 정상 혈청에서 배양하였다. T-세포를 검출하기 위해, 절편을 차단 용액에서 1:500으로 희석된 랫트-항-CD4(GK1.5/ eBiosciences) 및 토끼 항-CD3 항체(SP7/ Thermo Scientific)와 함께 밤새 배양하였다. 대조군 표본을 동일한 기간 동안 일차 항체 대신에 5% 정상 혈청에서 배양하였다. 0.3% 트리톤® X-100을 함유하는 PBS로 행군 후, 표본을 PBS에서 1:400으로 희석된 알렉사® 594-표지된 염소 항-랫트 및 알렉사® 488-표지된 염소 항-토끼 이차 항체(Jackson ImmunoResearch)와 함께 4시간 동안 배양하였다. 표본을 0.3% 트리톤® X-100을 함유하는 PBS로 행구고, 1% 파라포름알데히드(PFA)에서 고정시키고, PBS로 다시 행구고, DAPI를 갖는 벡터쉴드 안티페이드 마운팅 배지(Vector laboratories)에 마운팅하였다.

[0190] 표본을 AxioCam® HRc 카메라가 장착된 제이스 악시오포트 2 플러스(Zeiss Axiphoto® 2 plus) 형광 현미경으로 조사하였다. 종양 내에 CD3⁺ 및 CD4⁺ 세포의 양 및 분포를 보이는 각 실험 그룹에 대한 대표 이미지를 수집하였고, 이는 도. 4a 및 4b에 나타나 있다.

[0191] CD80-IgG1 WT 또는 CD80-IgG1 MT의 처리는 식염수와 비교하여 종양내 CD3⁺ 및 CD4⁺ 세포의 수를 증가시켰다(도. 4a 및 4b). CD4⁺ 세포의 양은 CD80-IgG1 WT 또는 CD80-IgG1 MT 처리 종양에서 유사하였지만, CD80-IgG1 MT 처리는 CD80-IgG1 WT와 비교하여 종양 침윤성 CD3⁺ T 세포를 더 크게 증가시켰다 (도. 4b). CD3⁺ 대 CD4⁺ 세포의 비율은 CD80-IgG1 WT와 비교하여 CD80-IgG1 MT에서 증가하였다.

[0192] 실시예 5: CD80 ECD Fc 융합 분자의 사이토카인 방출 효과

[0193] 방법

[0194] 단백질 처리

[0195]

인간 CD80 ECD IgG1 Fc 융합 분자(CD80-Fc)를 RPMI 1640, 100 IU 페니실린/100 ug/ml 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민, 100 nM 비필수 아미노산, 55 uM 2-머캅토에탄올 및 10% 초저-IgG 우태아혈청을 함유하는 T-세포 증식 배지에서 자성 단백질-A 비드(Life Technologies)에 결합시켰다. 결합 반응을 ml당 300만 개 비드의 비드 농도로 웰당 100ul의 부피에서 96 웰 평바닥 조직 배양 플레이트에서 수행하였다. CD80-Fc를 일련의 농도에서 비드에 결합시켰다: 10, 1, 0.1 ug/ml. 결합 반응의 부가적인 세트를 또한 3 ng/ml OKT3-scFv을 첨가하여 수행하였다. 단백질을 흔들리는 플랫폼 상에서 실온에서 1시간 동안 결합시킨 후, 100ul의 20 ug/ml(최종 농도 10 ug/ml) IgG1 Free-Fc(FPT)를 각 웰에 첨가하고, 비드 상의 임의의 비점유 단백질-A 결합 부위를 차단하기 위해 1시간 동안 결합시켰다. 이후, 비결합된 단백질을 제거하기 위해, 완전 로딩되고 차단된 비드를 자성 96-웰 플레이트 스탠드를 사용하여 PBS로 3회 세척하였다. 이후, 1×10^6 세포/ml의 농도의 100ul의 인간 범(Pan) T-세포를 건조된 세척된 비드의 각 웰에 첨가하였다. 각 조건을 3 반복으로 시험하였다.

[0196] 세포

[0197]

인간 PBMC를 피콜[®](Biochrom) 구배 밀도 원심분리를 사용하여 단리하기 ~18시간 전에 건강한 공여자로부터 수집된 성분채집술 농축 혈액(버피코트)으로부터 단리하였다. 이후, 범 T-세포를 인간 범 T-세포 단리 키트(Miltenyi)를 사용하여 PBMC로부터 단리하였다. T-세포를 8 ng/ml IL-2 및 인간 T-세포 활성자 다이나비드[®](Life Tech) 1 비드/세포가 보충된 증식 배지(상기)에서 T225 조직 배양 플라스크에서 100만 세포/ml의 밀도로 시딩하였다. 시딩 후, 세포에 신선한 IL-2를 공급하고 2일마다 신선한 증식 배지를 첨가하여 30만개 세포/ml의 농도로 계속 유지시켰다. 세포를 5% CO₂에서 유지된 37°C 물 자켓식 배양기에 유지시켰다. 확장 6일 후, 활성자-비드를 자성 튜브 스탠드를 사용하여 제거하고, 세포를 IL-2가 없는 신선한 증식 배지에서 100만개 세포/ml의 농도로 재현탁시켰다. 24시간 후, 세포를 단백질-A 비드 고정화된 단백질로 분석하였다.

[0198] 사이토카인 측정

[0199]

가용성 인터페론 감마(IFN-γ) 및 종양 괴사 인자 알파(TNF-α) 수준을 제조사의 지침에 따라 세포에 단백질-A 비드 고정화된 단백질을 처리한 후 24시간에 HTRF-ELISA 키트(Cisbio)를 사용하여 상등액에서 측정하였다.

[0200] 결과

[0201]

비드-고정화된 CD80-Fc 단독은 가용성 사이토카인 생산에 의해 측정된 바와 같이 유의한 인간 T-세포 활성화를 유발하지 않았다(도. 5a & c). 그러나, 소량의 OKT3-scFv가 CD80-Fc와 함께 고정화된 경우, 강력한 CD80-의존적 IFN-γ 및 TNF-α 방출이 관찰되었다(도. 5b & d). 여기에서 사용된 OKT3-scFv의 양은 그 자체로 T-세포 자극을 유발하기에 너무 낮았으며, 따라서 공동자극 단백질로서 CD80의 존재가 필요하였다. 그러므로, 이러한 결과는 이 분석에서 사용된 CD80-Fc가 실제로 생물학적 활성이었음을 확인시켜준다.

[0202]

이 분석에서 IFN-γ 및 TNF-α의 방출이 CD80-Fc의 생물학적 활성이었음을 나타내었지만, 사이토카인, 예컨대 IFN-γ 및 TNF-α의 과도한 방출은 해로울 수 있다. 따라서, CD80 ECD Fc 처리의 잠재적 안정성을 다루기 위해, 이러한 결과를 T-세포 "과작용제(superagonist)"이고 인간 대상체에서 IFN-γ 및 TNF-α과 같은 사이토카인의 과도하고 해로운 수준을 방출하는 것으로 나타난 단클론 항-CD28 항체인 TGN1412의 이전에 공개된 결과와 비교하였다. .

[0203]

고정화된 TGN1412 단독은 인간 CD80 단독보다 인간 T-세포로부터 사이토카인 방출을 유도하는데 있어서 유의하게 더 강력한 것으로 보인다. 문헌[Findlay et al., *J. Immunological Methods* 352: 1-12 (2010)]은 1ug/웰의 TGN1412가 강력한 TNF α 방출, ~2000pg/ml을 유발하였음을 보고하였고, 문헌[Vessillier et al., *J. Immunological Methods* 424: 43-52 (2015)]은 동일한 양의 TGN1412가 강력한 IFN-γ, ~10000 pg/ml를 유발하였음을 보고하였다. 본 발명의 분석에서, 동일한 양의 고정화된 CD80-Fc는 사이토카인의 유의한 방출을 유발하지 않았다. 이러한 결과는 CD80-Fc가 TGN1412과 비교하여 사이토카인 방출을 유도하는데 있어 적어도 1000배 덜 강력하다는 것을 시사하며, 따라서 TGN1412보다 인간에서 사이토카인 폭풍을 유도할 위험성을 유의하게 더 낮춘다는 것을 시사한다.

[0204]

실시예 6: 상이한 시알산(SA) 함량을 갖는 Fc 도메인을 갖는 CD80 ECD Fc 융합 분자의 생체내에서 CT26 종양에 대한 효과

[0205]

생체내 연구를 CT26 종양에서 수행하여 상이한 시알산(SA) 함량을 갖는 야생형 인간 IgG1 Fc에 융합된 CD80 ECD

의 3개의 상이한 룻트의 효과를 분석하였다. 구체적으로, CD80 ECD Fc의 룻트 E는 20 mol SA/mol 단백질을 함유하며, 룻트 D는 15 mol SA/mol 단백질을 함유하고, 룻트 A는 5 mol SA/mol 단백질을 함유한다.

[0206] 7주령 암컷 BALB/c 마우스를 찰스 리버 연구소(Hollister, CA)로부터 구입하여 연구 시작 전에 1주간 적응시켰다. 뮤린 결장 암종 세포주 CT26을 1.0×10^6 세포/200 μ l/마우스로 마우스의 우측 옆구리에 피하 이식하였다. 접종 전, 세포를 10% 열 불활성화된 우태아혈청(FBS), 2mM L-글루타민이 보충된 RPMI 1640 배지에서 3번 이하의 계대 동안 배양하였다. 세포를 5% CO₂를 갖는 가습 분위기에서 37°C에서 성장시켰다. 80~85% 컨플루언스에 도달 시, 세포를 수확하고 밀리리터당 5×10^6 세포로 무혈청 RPMI 1640 및 마트리겔®의 1:1 혼합물에 재현탁시켰다.

[0207] 마우스를 세포 이식 후 매주 2회 종양 성장에 대해 모니터링하였다. 종양 측정을 위해, 각 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼스를 이용하여 측정하고, 부피를 식에 따라 계산하였다: 종양 부피(mm^3) = (폭(mm) x 길이(mm))²/2. 7일에, 모든 종양을 측정하고, 마우스를 7개의 치료 그룹(실험 그룹당 n= 10마리 마우스)으로 할당하였다. 등록된 모든 동물의 평균 종양 부피는 94 mm^3 였다. 제1 그룹에게 200 μ l의 PBS(대조군)를 꼬리 정맥내로 정맥내(i.v.) 주사하였다. 제2 그룹에게 0.3 mg/kg으로 정맥내 투여된 20 mol SA/mol 단백질의 CD80 ECD Fc(漉트 E)를 주사하였다. 제3 그룹에게 0.6 mg/kg으로 정맥내 투여된 20 mol SA/mol 단백질의 CD80 ECD Fc(漉트 E)를 주사하였다. 제4 그룹에게 0.3 mg/kg으로 정맥내 투여된 15 mol SA/mol 단백질의 CD80 ECD Fc(漉트 D)를 주사하였다. 제5 그룹에게 0.6 mg/kg으로 정맥내 투여된 15 mol SA/mol 단백질의 CD80 ECD Fc(漉트 D)를 주사하였다. 제6 그룹에게 0.3 mg/kg으로 정맥내 투여된 5 mol SA/mol 단백질의 CD80 ECD Fc (漉트 A)를 주사하였다. 제7 그룹에게 0.6 mg/kg으로 정맥내 투여된 5 mol SA/mol 단백질의 CD80 ECD Fc(漉트 A)를 주사하였다. 종양을 10, 14, 16, 18, 22, 24일에 측정하였다.

[0208] 0.3 또는 0.6 mg/kg으로 투여된 20 mol SA/mol 단백질의 CD80 ECD Fc(漉트 E)의 처리는 대조군과 비교하여 종양 성장을 93% 및 98% 억제하였다(P<0.001). 0.3 또는 0.6 mg/kg으로 투여된 15 mol SA/mol 단백질의 CD80 ECD Fc(漉트 D)의 처리는 대조군과 비교하여 종양 성장을 93% 및 95% 억제하였다(P<0.001). 그에 반해, 0.3mg/kg(5 mol SA/mol 단백질을 가짐)의 CD80 ECD Fc 룻트 A의 처리는 대조군과 비교하여 종양 성장을 억제하지 않았고, 0.6mg/kg으로 투여될 때, 그것은 단지 70% 억제를 유도하였다(P<0.001)(도 6).

[0209] 종양이 없는 마우스의 발병율을 37일에 분석하였다. 0.3 또는 0.6 mg/kg로 투여된 20 mol/mol SA의 CD80 ECD-Fc(漉트 E)의 처리는 마우스의 8/10(80%) 또는 10/10(100%)에서 완전한 종양 퇴행을 야기하였다. 0.3 또는 0.6 mg/kg으로 투여된 15 mol/mol SA의 CD80 ECD-Fc(漉트 D)의 처리는 마우스의 9/10(90%)에서 완전한 종양 퇴행을 야기하였다. 그에 반해, 0.6mg/kg으로 투여된 CD80 ECD-Fc 룻트 A의 처리는 하기 표에 나타낸 바와 같이, 마우스의 1/10(10%)에서만 종양 퇴행을 유도하였다.

치료 그룹	37 일에 종양이 없는 마우스
식염수	0% (0/10 마우스)
0.3mg/kg 1 용량의 CD80 ECD-Fc SA 20 mol/mol (롯트 E)	80% (8/10 마우스)
0.6mg/kg 1 용량의 CD80 ECD-Fc SA 20 mol/mol (롯트 E)	100% (10/10 마우스)
0.3mg/kg 1 용량의 CD80 ECD-Fc SA 15 mol/mol (롯트 D)	90% (9/10 마우스)
0.6mg/kg 1 용량의 CD80 ECD-Fc SA 15 mol/mol (롯트 D)	90% (9/10 마우스)
0.3mg/kg 1 용량의 CD80 ECD-Fc SA 5 mol/mol (롯트 A)	0% (0/10 마우스)
0.6mg/kg 1 용량의 CD80 ECD-Fc SA 5 mol/mol (롯트 A)	10% (1/10 마우스)

[0210]

실시예 7: 3개의 상이한 동계 종양 모델에서 종양 성장에 대한 뮤린 CD80 ECD - 뮤린 Fc 융합 분자의 효과

[0211]

생체내 연구를 마우스 IgG2a 야생형의 Fc 도메인에 연결된 뮤린 CD80의 세포외 도메인(ECD)(뮤린 CD80 ECD-Fc)을 포함하는 마우스 대리모를 사용하여 수행하였다. 뮤린 CD80 ECD-Fc의 효과를 3개의 상이한 동계 종양 모델인 CT26 대장암종, MC38 대장암종 및 B16 흑색종 모델의 항-CTLA4 항체 클론 9D9 (IgG2b)의 것과 비교하였다.

[0212]

CT26 종양 모델

[0213]

7주령 암컷 BALB/c 마우스를 찰스 리버 연구소(Hollister, CA)로부터 구입하여 연구 시작 전에 1주간 적응시켰다. 뮤린 결장암종 세포주 CT26을 1.0×10^6 세포/200 μ l/마우스로 마우스의 우측 옆구리에 피하 이식하였다. 접종 전, 세포를 10% 열 불활성화된 우태아혈청(FBS), 2mM L-글루타민이 보충된 RPMI 1640 배지에서 3번 이하의 계대 동안 배양하였다. 세포를 5% CO_2 를 갖는 가습 분위기에서 37°C에서 성장시켰다. 80-85% 컨플루언스에 도달 시, 세포를 수확하고 무혈청 RPMI 1640 및 마트리겔의 1:1 혼합물에 재현탁시켰다.

[0214]

마우스를 세포 이식 후 매주 2회 종양 성장에 대해 모니터링하였다. 종양 측정을 위해, 각 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼스를 이용하여 측정하고, 부피를 식에 따라 계산하였다: 종양 부피(mm^3) = ($폭(mm) \times 길이(mm)^2 / 2$). 7일에, 모든 종양을 측정하고, 마우스를 7개의 치료 그룹(실험 그룹당 n= 15마리 마우스)으로 무작위로 할당하였다. 등록된 모든 동물의 평균 종양 부피는 96 mm^3 였다. 마우스에게 4, 7 및 11일에 3회 투여하였다. 제1 그룹에게 10mg/kg으로 복강내 투여된 마우스 IgG2b(mIgG2b)를 주사하였다(대조군). 제2 그룹에게 0.3 mg/kg으로 정맥내 투여된 뮤린 CD80 ECD-Fc 20 mol/mol SA를 주사하였다. 제3 그룹에게 1.5 mg/kg으로 복강내 투여된 항-CTLA4 항체 클론 9D9(IgG2b)를 주사하였다. 제4 그룹에게 10 mg/kg으로 복강내 투여된 항-CTLA4 항체 클론 9D9(IgG2b)를 주사하였다. 종양을 10, 13, 17, 19, 21, 24일에 측정하였다.

[0215]

21일에(모든 대조군이 여전히 연구 중인 경우), 0.3 mg/kg으로 투여된 20 mol/mol SA의 뮤린 CD80 ECD-Fc의 처

리는 대조군과 비교하여 종양 성장을 90% 억제하였다($P<0.001$). 10 mg/kg의 항-CTLA4 항체의 처리는 대조군과 비교하여 종양 성장을 75% 억제하였다($P<0.001$). 그에 반해, 1.5 mg/kg의 항-CTLA4 항체의 처리는 단지 종양 성장의 53% 억제를 유도하였다($P<0.001$)**(도 7)**. 21일에, 0.3 mg/kg으로 투여된 20 mol/mol SA의 뮤린 CD80 ECD-Fc의 처리가 종양 성장에 미치는 영향은 1.5mg/kg($P<0.001$) 또는 10mg/kg($P=0.009$)으로 투여된 항-CTLA4 항체보다 유의하게 더 컸다.

[0217] 종양이 없는 마우스의 발병율을 37일에 분석하였다. 0.3 mg/kg으로 투여된 20 mol/mol SA의 뮤린 CD80 ECD-Fc의 처리는 마우스의 7/15(47%)에서 완전한 종양 퇴행을 야기하였다. 10 mg/kg의 항-CTLA4 항체의 처리는 마우스의 3/15(20%)에서 완전한 종양 퇴행을 야기하였다. 1.5 mg/kg의 항-CTLA4 항체로 처리된 마우스는 완전한 종양 퇴행이 없었다.

MC38 종양 모델

[0219] 7주령 암컷 C57B1/6 마우스를 찰스 리버 연구소(Hollister, CA)로부터 구입하여 연구 시작 전에 1주간 적응시켰다. 뮤린 결장 암종 세포주 MC38을 0.5×10^6 세포/100 μ l/마우스로 마우스의 우측 옆구리에 피하 이식하였다. 접종 전, 세포를 10% 열 불활성화된 우태아혈청(FBS), 2mM L-글루타민이 보충된 RPMI 1640 배지에서 3번 이하의 계대 동안 배양하였다. 세포를 5% CO₂를 갖는 가습 분위기에서 37°C에서 성장시켰다. 80~85% 컨플루언스에 도달 시, 세포를 수확하고 무혈청 RPMI 1640 및 마트리겔의 1:1 혼합물에 재현탁시켰다.

[0220] 마우스를 세포 이식 후 매주 2회 종양 성장에 대해 모니터링하였다. 종양 측정을 위해, 각 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼스를 이용하여 측정하고, 부피를 식에 따라 계산하였다: 종양 부피(mm^3) = (폭(mm) x 길이(mm))²/2. 7일에, 모든 종양을 측정하고, 마우스를 7개의 치료 그룹(실험 그룹당 n= 15마리 마우스)으로 무작위로 할당하였다. 등록된 모든 동물의 평균 종양 부피는 78 mm³였다. 마우스에게 7, 10 및 14일에 3회 투여하였다. 제1 그룹에게 10mg/kg으로 복강내 투여된 마우스 IgG2b(mIgG2b)를 주사하였다(대조군). 제2 그룹에게 3 mg/kg으로 정맥내 투여된 뮤린 CD80 ECD-Fc 20 mol/mol SA를 주사하였다. 제3 그룹에게 1.5 mg/kg으로 복강내 투여된 항-CTLA4 항체 클론 9D9(IgG2b)를 주사하였다. 제4 그룹에게 10 mg/kg으로 복강내 투여된 항-CTLA4 항체 클론 9D9(IgG2b)를 주사하였다. 종양을 11, 14, 17, 및 19일에 측정하였다.

[0221] 19일에(모든 대조군이 여전히 연구중인 경우), 3 mg/kg으로 투여된 20 mol/mol SA의 뮤린 CD80 ECD-Fc의 처리는 대조군과 비교하여 종양 성장을 79% 억제하였다($P<0.001$). 더욱이, 20 mol/mol SA의 뮤린 CD80 ECD-Fc는 항-CTLA4 항체와 비교하여 종양 성장에 더 큰 영향을 미쳤다($P<0.001$). 10 mg/kg의 항-CTLA4 항체의 처리는 대조군과 비교하여 종양 성장을 21% 감소시킨 반면($P=0.05$), 1.5 mg/kg의 항-CTLA4 항체의 처리는 종양 크기에 유의하게 영향을 미치지 않았다**(도 8)**. 21일에, 3 mg/kg으로 투여된 20 mol/mol SA의 뮤린 CD80 ECD-Fc의 처리가 종양 성장에 미치는 영향은 1.5mg/kg($P<0.001$) 또는 10mg/kg($P=0.009$)으로 투여된 항-CTLA4 항체보다 유의하게 더 컸다.

[0222] CD80 ECD-Fc의 3 mg/kg 용량이 이 실험에 사용되었지만, CD80 ECD-Fc의 0.3 mg/kg 용량 역시 MC38 종양 모델에서 종양 세포 성장을 감소시켰다(데이터 나타내지 않음).

B16 종양 모델

[0224] 7주령 암컷 C57B1/6 마우스를 찰스 리버 연구소(Hollister, CA)로부터 구입하여 연구 시작 전에 1주간 적응시켰다. 뮤린 흑색종 세포주 B16-F10을 0.5×10^6 세포/100 μ l/마우스로 마우스의 우측 옆구리에 피하 이식하였다. 접종 전, 세포를 10% 열 불활성화된 우태아혈청(FBS), 2mM L-글루타민이 보충된 DMEM 배지에서 3번 이하의 계대 동안 배양하였다. 세포를 5% CO₂를 갖는 가습 분위기에서 37°C에서 성장시켰다. 80~85% 컨플루언스에 도달 시, 세포를 수확하고 무혈청 DMEM 및 마트리겔의 1:1 혼합물에 재현탁시켰다.

[0225] 마우스를 세포 이식 후 매주 2회 종양 성장에 대해 모니터링하였다. 종양 측정을 위해, 각 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼스를 이용하여 측정하고, 부피를 식에 따라 계산하였다: 종양 부피(mm^3) = (폭(mm) x 길이(mm))²/2. 7일에, 모든 종양을 측정하고, 마우스를 7개의 치료 그룹(실험 그룹당 n= 15마리 마우스)으로 무작위로 할당하였다. 등록된 모든 동물의 평균 종양 부피는 70 mm³였다. 마우스에게 3, 6 및 10일에 3회 투여하였다. 제1 그룹에게 10mg/kg으로 복강내 투여된 마우스 IgG2b(mIgG2b)를 주사하였다(대조군). 제2 그룹에게 3 mg/kg으로 정맥내 투여된 뮤린 CD80 ECD-Fc 20 mol/mol SA를 주사하였다. 제3 그룹에게 1.5 mg/kg으로 복강내 투여된 항-

CTLA4 항체 클론 9D9(IgG2b)를 주사하였다. 제4 그룹에게 10 mg/kg으로 복강내 투여된 항-CTLA4 항체 클론 9D9(IgG2b)를 주사하였다. 종양을 10, 13, 15, 16, 17일에 측정하였다.

[0226] 13일에(모든 대조군이 여전히 연구중인 경우), 3 mg/kg으로 투여된 20 mol/mol SA의 뮤린 CD80 ECD-Fc의 처리는 대조군과 비교하여 종양 성장을 41% 억제하였다($P<0.001$). 10 mg/kg 또는 1.5 mg/kg의 항-CTLA4 항체의 처리는 대조군과 비교하여 종양 성장에 유의하게 영향을 미치지 않았다(도 9).

서열 표

[0228] 하기 표는 본원에 언급된 특정 서열의 목록을 제공한다.

서열 번호	설명	서열
1	인간 CD80 전구체 (신호 서열 존재) 아미노산 서열	MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCGV/HVTKEVATLSCGHNVSEELAQTRIYWQKEKKMVLTTMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYSVLEKDAFKREHLAEVTLSVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQEHPDNLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRRESVRPV
2	마우스 CD80 전구체 (신호 서열 존재) 아미노산 서열	MACNCQLMQDTPLLKFPCCPRLILLFVLLIRLSQVSSDVDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKVVLSSIAGKLKVWPEYKNRTLYDNTTYSLLIILGLVLSDRGTYSCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISSQLDFNTRNHTIKCLIKYGDAAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKNTLVLFGAGFGAVITVVIVVIIKCFCKHRSCFRNEASRETNNSLTFGPEEEALAEQTVFL
3	인간 CD80 이소형 2 (신호 서열 부재)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSEELAQTRIYWQKEKKMVLTTMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYSVLEKDAFKREHLAEVTLSVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTSFAPRCRERRRNERLRRRESVRPV
4	인간 CD80 이소형 3 (신호 서열 부재)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSEELAQTRIYWQKEKKMVLTTMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYSVLEKDAFKREHLAEVTLSVKGFAPRCRERRRNERLRRRESVRPV
5	인간 CD80 ECD 서열 (신호 서열 부재)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSEELAQTRIYWQKEKKMVLTTMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYSVLEKDAFKREHLAEVTLSVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQEHPDN
6	마우스 CD80 ECD 서열 (신호 서열 부재)	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKVVLSSIAGKLKVWPEYKNRTLYDNTTYSLLIILGLVLSDRGTYSCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISSQLDFNTRNHTIKCLIKYGDAAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKN
7	인간 CD80 신호 서열	MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCG
8	마우스 CD80	MACNCQLMQDTPLLKFPCCPRLILLFVLLIRLSQVSSD

[0229]

	신호 서열	
9	Fc C237S	EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYV/DGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISAKGQPREF PQVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP VLDSDGSSFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	Fc	ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPKPKD TLMISRTEV TCVVVDVSH DPEVQFNWYV DGVEVHNAK TPREEQFNST FRVSVLT HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTSKT KGQPREFQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFPYPSDIA EWESNGQOPEN NYKTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
11	Fc	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGP SVFLFPKPK DTLMISRTEV TCVVVDVSH DPEVQFNWYV DGVEVHNAK TPREEQFNST FRVSVLT LHQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTSKT AKGQPREFQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV VKGFYPSDIA EWESNGQOPEN NYKTTPPMLD DSDGSFFLYSK RLTVKSRWQQ EGNNVFSCSVM HEALHNHYTQK SLSLSPGK
12	인간 IgG1 Fc L234F, L235E, P331S 돌연변이체	EPKSSDKTHTCPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV/DGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKT TISKAKGQPREFQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGYP SDIAVEWESNGQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	인간 IgG1 Fc N297 돌연변이체	EPKSSDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV/DGVEVHNAKTKPREE QYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREFQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGYP PSDIAVEWESNGQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	Fc 인간 IgG1	EPKSSDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV/DGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE TISKAKGQPREFQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGYP SDIAVEWESNGQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	Fc 인간 IgG3	ELKPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCCRPEPKSCDT PPPCPRCPEPKSCDTPPPCCRPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV/DGVEVH NAKTKPREEQYNSFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN NKALPAPIEKTISKAKGQPREFQVYTLPPSREEMT KNQVS LTCLVKGYPDIAVIEWESSGQOPENNYNTTPMLSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRTQKSLSL SPGK
16	Fc 인간 IgG4	ESKYGPPCPCCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV/DGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREFQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGYP DIAVIEWESNGQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
17	마우스 CD80 ECD 마우스 Fc	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKV VLSVIAGKLKVWPEYKNRFTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTY

[0230]

	IgG2a (Fc 부분 밀출표시됨)	SCVVQKKERGTYEVKHLALVQLSIKADFSTPNITESGNPSA DTKRITCFASGGFPKPFRFSWLENGRELPGINTTISQDPES ELYTISSQLDFNTRNHTIKCLIKYGDAHVSDFTWKEPKPE DPPDSKNEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKPK DVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNEVHTAQ TQTHREDYNSTLRV/SALPIQHQDWMSGKEFKCKVNKNKD LPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEMTKQVTLTC MVTDFMPEDIYIEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFM YSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHHTKSFSRTP GK
18	마우스 CD80 ECD 인간 Fc IgG1 WT (Fc 부분 밀출표시됨)	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYSNPHEDESDRIYWQKHDKV VLSVIAGKLKVWPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTY SCVVQKKERGTYEVKHLALVQLSIKADFSTPNITESGNPSA DTKRITCFASGGFPKPFRFSWLENGRELPGINTTISQDPES ELYTISSQLDFNTRNHTIKCLIKYGDAHVSDFTWKEPKPE DPPDSKNEPKSSDKHTCPCPAPEFEGGGSVFLFPPKPK DTLMSRTPETCVV/DVSHEDPEVKFNWYV/DGVEV/HNA KTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
19	마우스 CD80 ECD Fc IgG1 MT (234, 235, 331) (Fc 부분 밀출표시됨; 돌연변이체 굵게 표시됨)	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYSNPHEDESDRIYWQKHDKV VLSVIAGKLKVWPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTY SCVVQKKERGTYEVKHLALVQLSIKADFSTPNITESGNPSA DTKRITCFASGGFPKPFRFSWLENGRELPGINTTISQDPES ELYTISSQLDFNTRNHTIKCLIKYGDAHVSDFTWKEPKPE DPPDSKNEPKSSDKHTCPCPAPEFEGGGSVFLFPPKPK DTLMSRTPETCVV/DVSHEDPEVKFNWYV/DGVEV/HNA KTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP PGK
20	마우스 CD80 ECD 인간 Fc IgG1 WT (Fc 부분 밀출표시됨)	VIHVTKEVKEVALSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKML TMMSGDMNIW/PEYKNRTIDITNNLSIVILARPSDEGTYE CVVLKYEKDAFKREHLAEVTLSVKADFPPTSISDFEIPTSNI RIIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELY AVSSKLDNFNMTTNHSFMCILIKYGHRLRVNQTFNWNNTKQE HFPDNEPKSSDKHTCPCPAPEFEGGGSVFLFPPKPKDT LMISRTPETCVV/DVSHEDPEVKFNWYV/DGVEVHNAK KTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
21	인간 CD80 ECD 인간 Fc IgG1 L234F, L235E, P331S MT (Fc 부분 밀출표시됨; 돌연변이체 굵게 표시됨)	VIHVTKEVKEVALSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKML TMMSGDMNIW/PEYKNRTIDITNNLSIVILARPSDEGTYE CVVLKYEKDAFKREHLAEVTLSVKADFPPTSISDFEIPTSNI RIIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELY AVSSKLDNFNMTTNHSFMCILIKYGHRLRVNQTFNWNNTKQE HFPDNEPKSSDKHTCPCPAPEFEGGGSVFLFPPKPKDT LMISRTPETCVV/DVSHEDPEVKFNWYV/DGVEVHNAK KTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
22	인간 PD-1	MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR

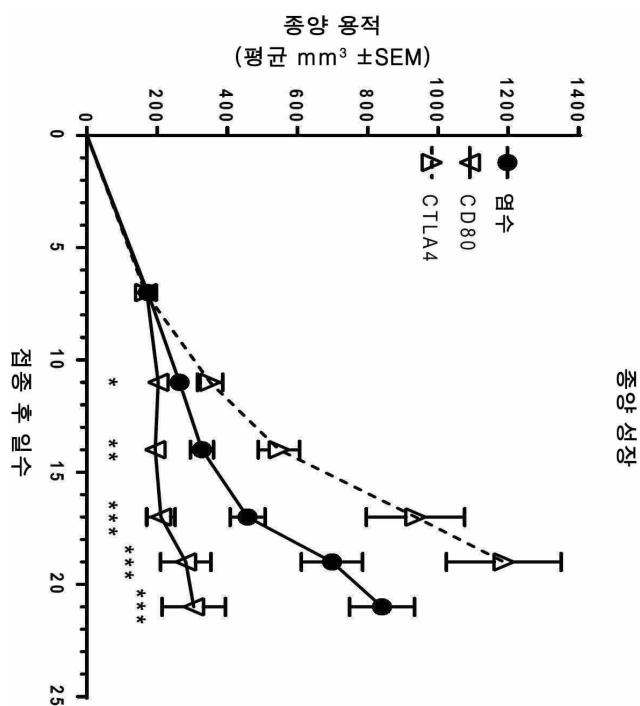
[0231]

	전구체 (신호 서열 존재) UniProtKB/Swiss-Prot: Q15116.3, 01-OCT-2014	PWNPPTFSPA LLVVTEDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVVVLA ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGEELDFQW REKTPEPPVPV CPEQTEYAT IVFPGMGTSPARRGSAADG PRSAQPLRPE DHGCSWPL
23	인간 PD-1 (성숙, 신호 서열 부재)	PGWFLDSDPR PWNPPTFSPA LLVVTEDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVVVLA ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGEELDFQW REKTPEPPVPV CPEQTEYAT IVFPGMGTSPARRGSAADG PRSAQPLRPE DHGCSWPL
24	인간 PD-L1 전구체 (신호 서열 존재) UniProtKB/Swiss-Prot: Q9NZQ7.1, 01-OCT-2014	MRIFAVFIFM TYWHLLNAFT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVKQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPVTE HELTCQAEGY PKAEVIWTS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVTSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPELP LAHPPNERTH LVLGAILLC LGVALTFIFR LRKGRRMMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET
25	인간 PD-L1 (성숙, 신호 서열 부재)	FT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVKQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPVTE HELTCQAEGY PKAEVIWTS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVTSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPELP LAHPPNERTH LVLGAILLC LGVALTFIFR LRKGRRMMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET

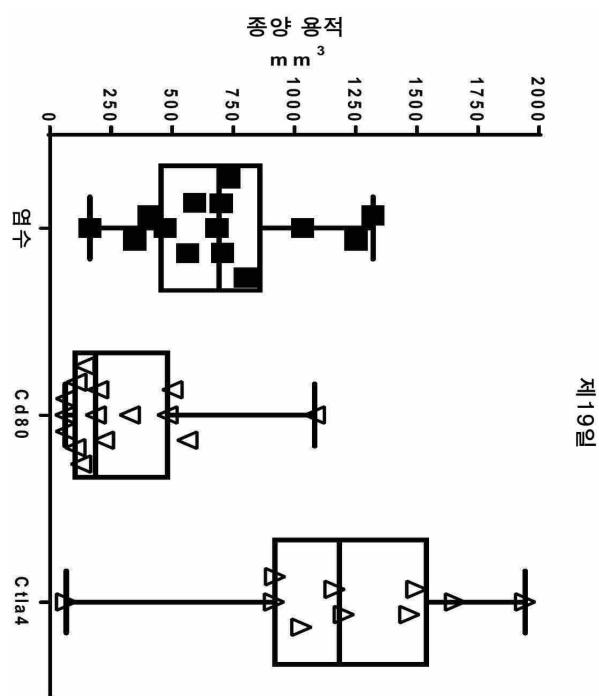
[0232]

도면

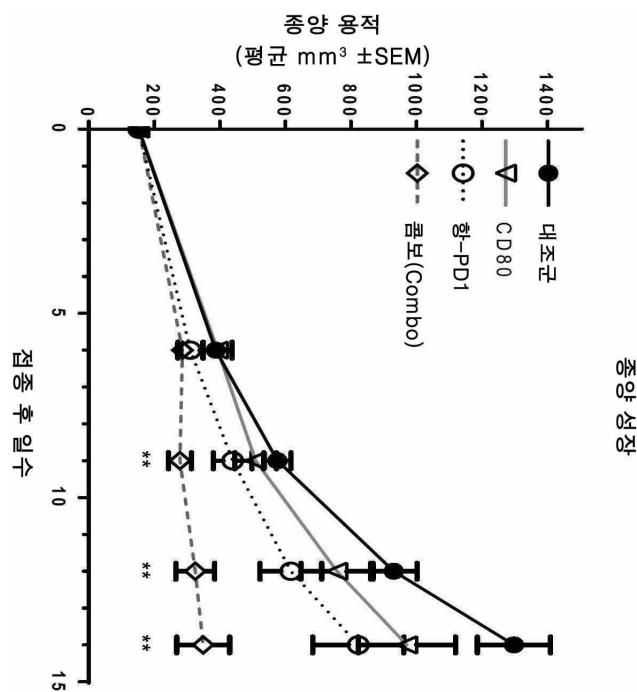
도면1a



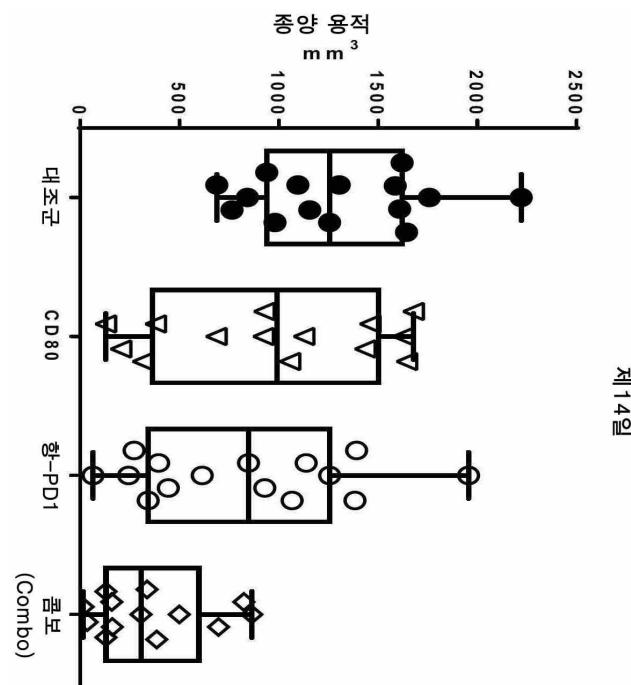
도면1b



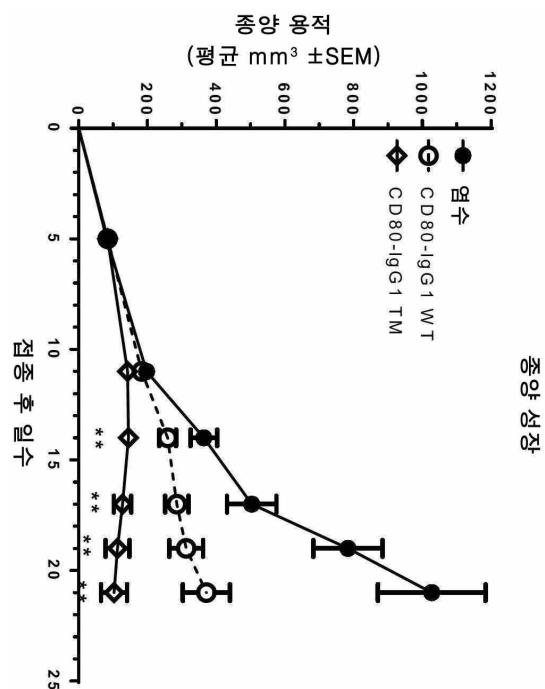
도면2a



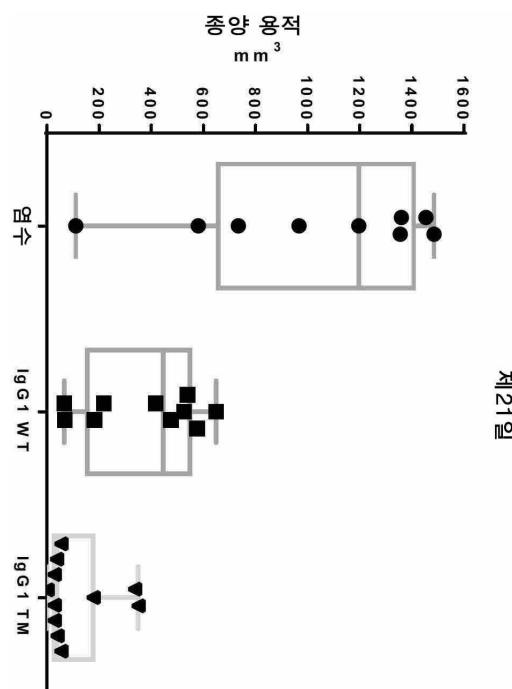
도면2b



도면3a

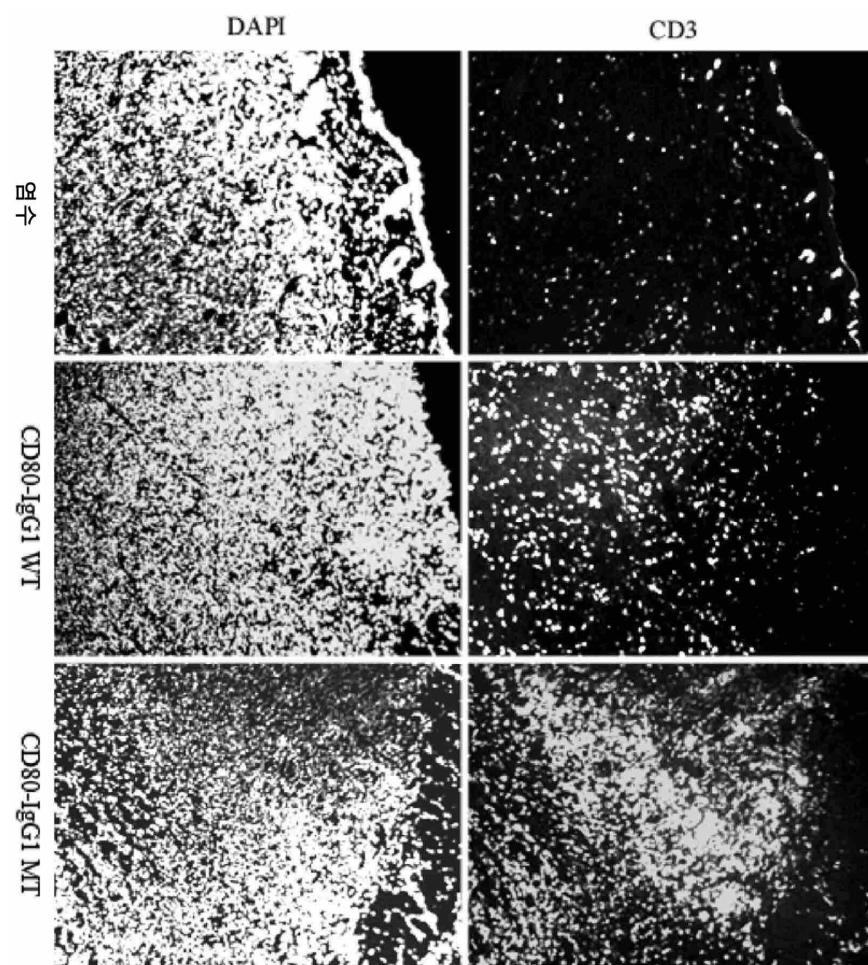


도면3b

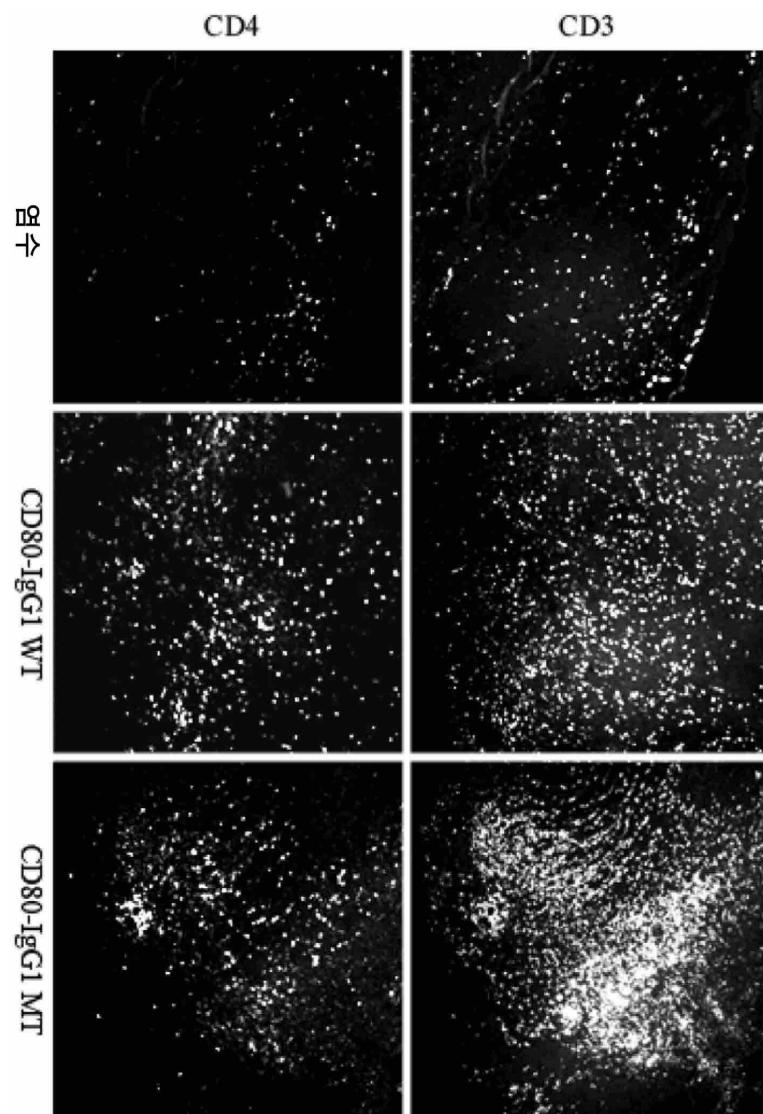


제21일

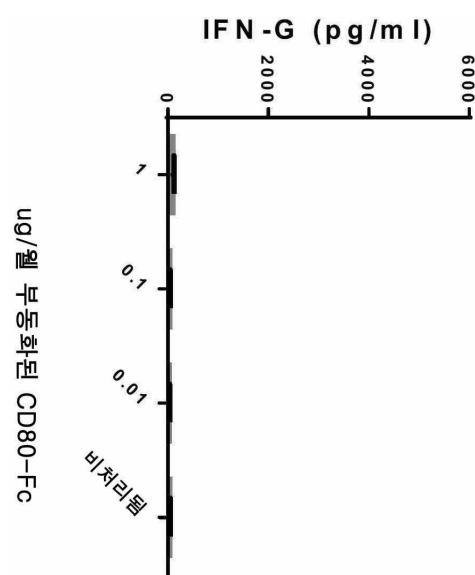
도면4a



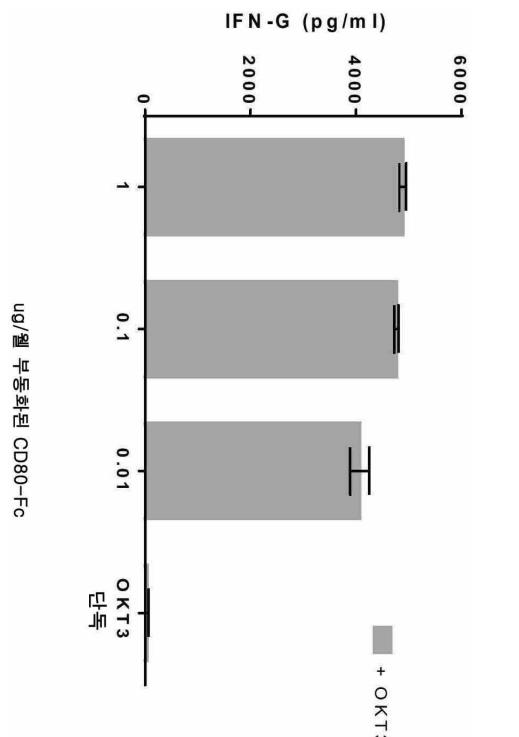
도면4b



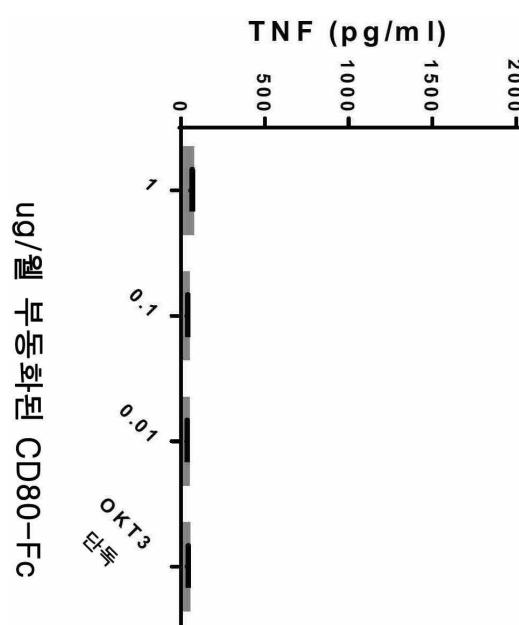
도면5a



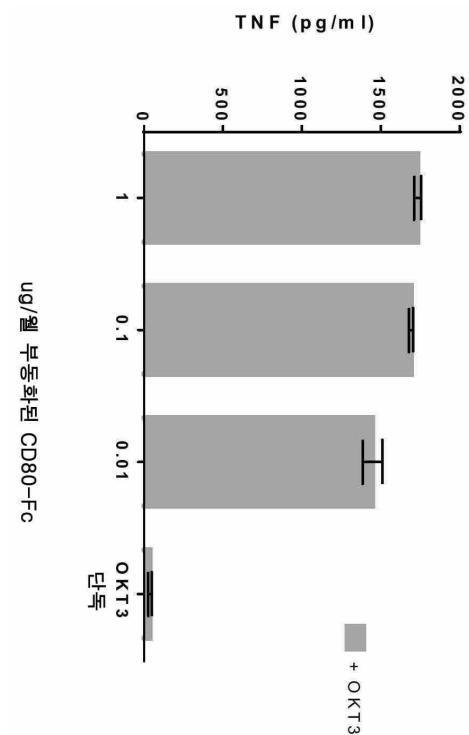
도면5b



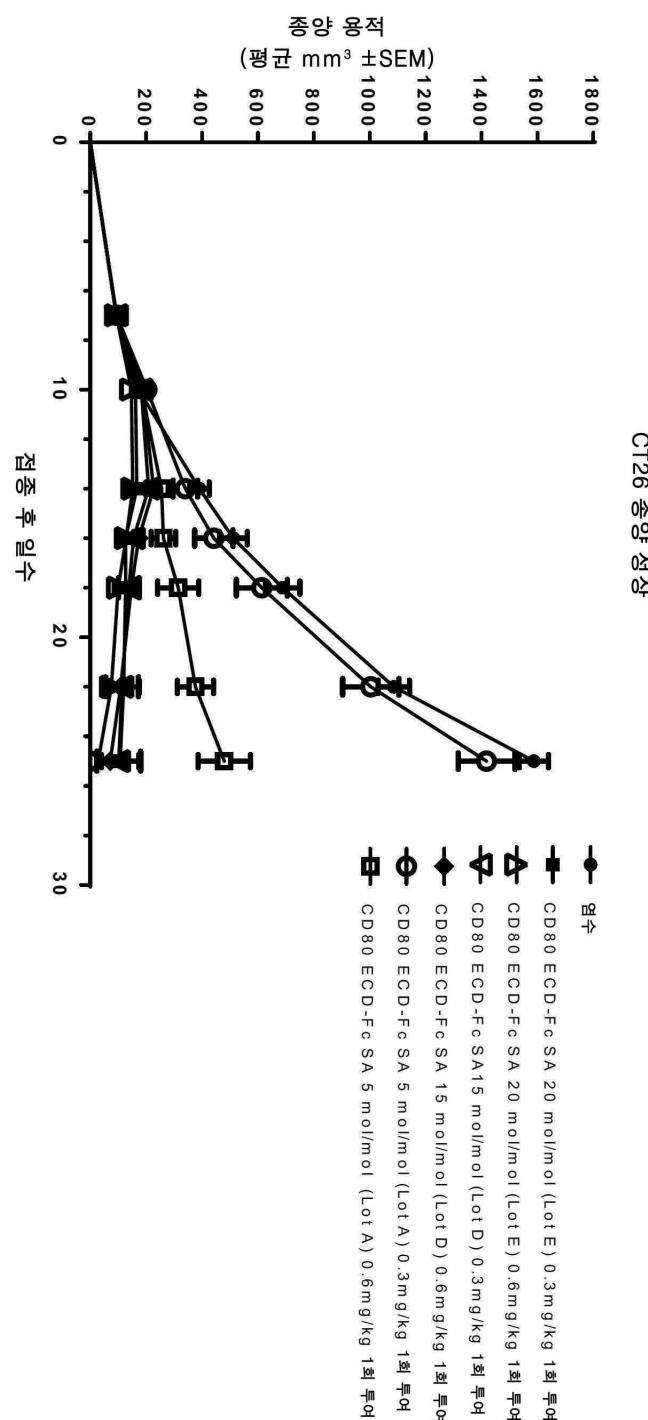
도면5c



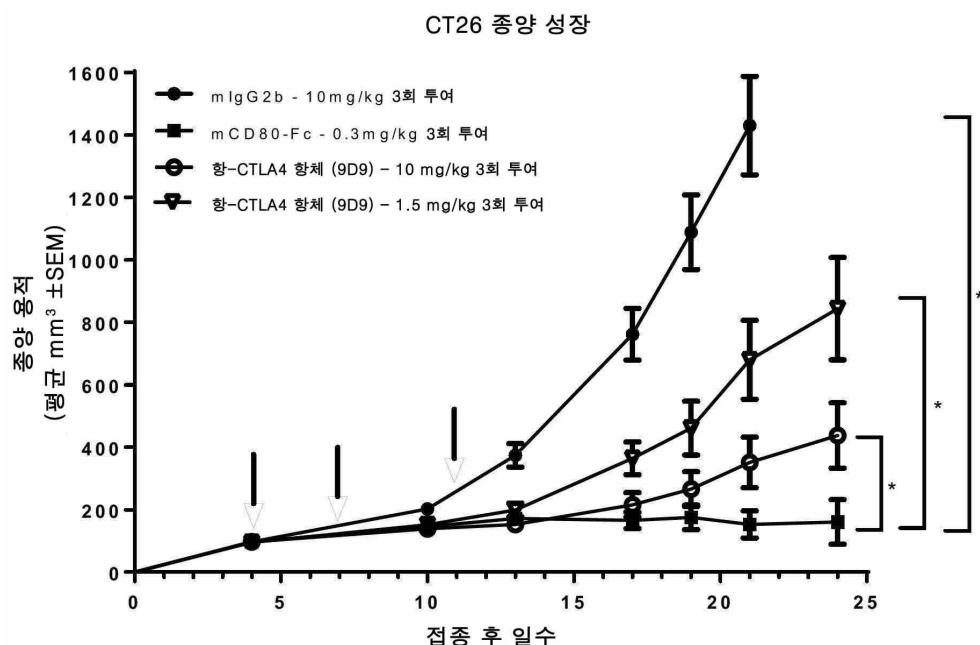
도면5d



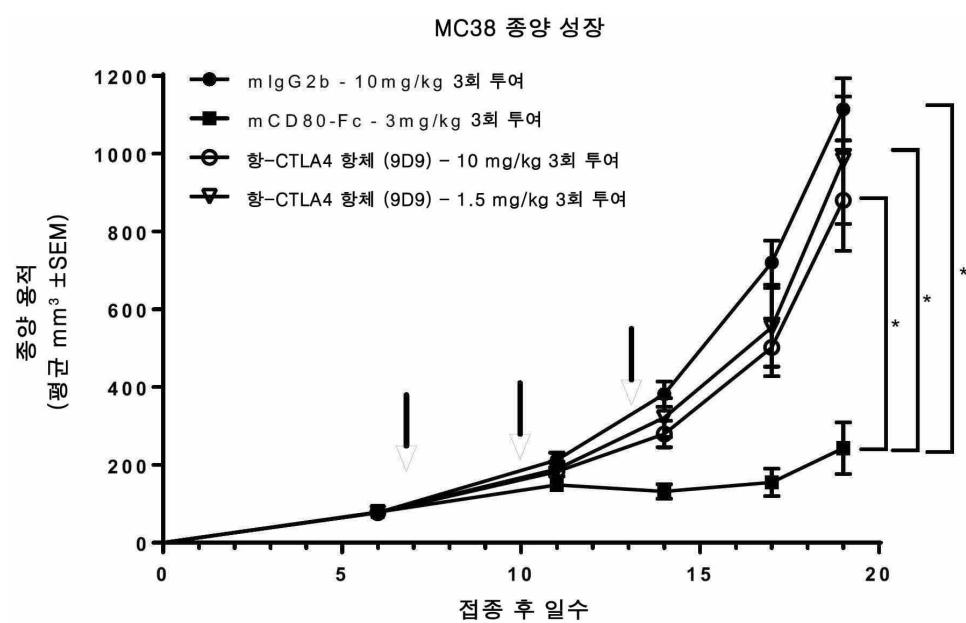
도면6



도면7

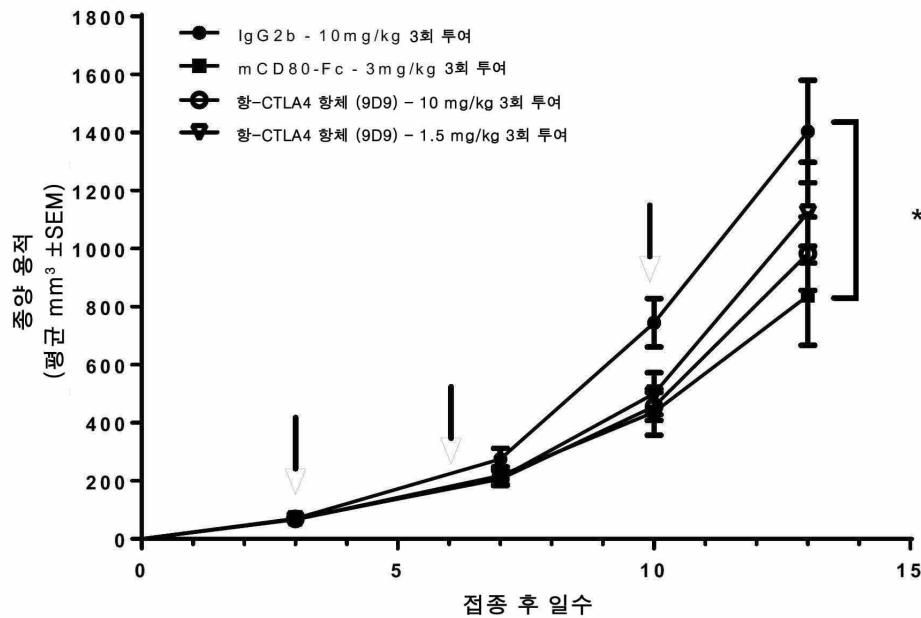


도면8



도면9

B16 종양 성장



서 열 목록

- <110> FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC.
- <120> CD80 EXTRACELLULAR DOMAIN POLYPEPTIDES AND THEIR USE IN CANCER TREATMENT
- <130> 01134-0047-00PCT
- <150> US 62/249,836
- <151> 2015-11-02
- <150> US 62/373,654
- <151> 2016-08-11
- <160> 25
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 288
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220><221> UNSURE
- <222> (1)..(288)
- <223> Human CD80 precursor (with signal sequence)
- <400> 1

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr

1	5	10	15
Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys			
20	25	30	
Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu			
35	40	45	
Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile			
50	55	60	
Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp			
65	70	75	80
Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr			
85	90	95	
Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly			
100	105	110	
Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg			
115	120	125	
Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr			
130	135	140	
Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile			
145	150	155	160
Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu			
165	170	175	
Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp			
180	185	190	
Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met			
195	200	205	
Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg			
210	215	220	
Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro			
225	230	235	240
Asp Asn Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly			
245	250	255	
Ile Phe Val Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg			

260	265	270
Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val		
275	280	285
<210> 2		
<211> 306		
<212> PRT		
<213> Mus musculus		
<220><221> UNSURE		
<222> (1)..(306)		
<223> Mouse CD80 precursor (with signal sequence)		
<400> 2		
Met Ala Cys Asn Cys Gln Leu Met Gln Asp Thr Pro Leu Leu Lys Phe		
1	5	10
Pro Cys Pro Arg Leu Ile Leu Leu Phe Val Leu Leu Ile Arg Leu Ser		
20	25	30
Gln Val Ser Ser Asp Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys Ser Val Lys Asp		
35	40	45
Lys Val Leu Leu Pro Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His Glu Asp Glu Ser		
50	55	60
Glu Asp Arg Ile Tyr Trp Gln Lys His Asp Lys Val Val Leu Ser Val		
65	70	75
Ile Ala Gly Lys Leu Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu		
85	90	95
Tyr Asp Asn Thr Thr Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser		
100	105	110
Asp Arg Gly Thr Tyr Ser Cys Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr		
115	120	125
Tyr Glu Val Lys His Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser Ile Lys Ala Asp		
130	135	140
Phe Ser Thr Pro Asn Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ala Asp Thr		
145	150	155
Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe		

165	170	175
Ser Trp Leu Glu Asn Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile		
180	185	190
Ser Gln Asp Pro Glu Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp		
195	200	205
Phe Asn Thr Thr Arg Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly		
210	215	220
Asp Ala His Val Ser Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp		
225	230	235
240		
Pro Pro Asp Ser Lys Asn Thr Leu Val Leu Phe Gly Ala Gly Phe Gly		
245	250	255
Ala Val Ile Thr Val Val Val Ile Val Val Ile Ile Lys Cys Phe Cys		
260 265 270		
Lys His Arg Ser Cys Phe Arg Arg Asn Glu Ala Ser Arg Glu Thr Asn		
275	280	285
Asn Ser Leu Thr Phe Gly Pro Glu Glu Ala Leu Ala Glu Gln Thr Val		
290	295	300
Phe Leu		
305		
<210>	3	
<211>	222	
<212>	PRT	
<213>	Homo sapiens	
<220><221>	UNSURE	
<222>	(1)..(222)	
<223>	Human CD80 Isoform 2 (without signal sequence)	
<400>	3	
Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys		

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

35	40	45
Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn		
50	55	60
Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr		
65	70	75
Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His		
85	90	95
Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser		
100	105	110
Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys		
115	120	125
Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn		
130	135	140
Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu		
145	150	155
Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr		
165	170	175
Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn		
180	185	190
Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Ser Phe Ala Pro Arg Cys Arg Glu Arg		
195	200	205
Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val		
210	215	220
<210> 4		
<211> 128		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<220><221> UNSURE		
<222> (1)..(128)		
<223> Human CD80 Isoform 2 (without signal sequence)		
<400> 4		
Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys		

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

115	120	125	
<210>	5		
<211>	208		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<220><221>	UNSURE		
<222>	(1)..(208)		
<223>	Human CD80 ECD sequence (without signal sequence)		
<400>	5		

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

35	40	45	
Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn			
50	55	60	
Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr			

65	70	75	80
Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His			
85	90	95	
Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser			
100	105	110	
Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys			
115	120	125	
Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn			
130	135	140	
Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu			
145	150	155	160
Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr			
165	170	175	
Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn			
180	185	190	
Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn			
195	200	205	
<210>	6		
<211>	209		
<212>	PRT		
<213>	Mus musculus		
<220><221>	UNSURE		
<222>	(1)..(209)		
<223>	Mouse CD80 ECD sequence (without signal sequence)		
<400>	6		
Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys Ser Val Lys Asp Lys Val Leu Leu Pro			
1	5	10	15
Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His Glu Asp Glu Ser Glu Asp Arg Ile Tyr			
20	25	30	
Trp Gln Lys His Asp Lys Val Val Leu Ser Val Ile Ala Gly Lys Leu			
35	40	45	
Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu Tyr Asp Asn Thr Thr			

50	55	60
Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser Asp Arg Gly Thr Tyr		
65	70	75
Ser Cys Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr Tyr Glu Val Lys His		80
	85	90
		95
Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser Ile Lys Ala Asp Phe Ser Thr Pro Asn		
	100	105
Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ala Asp Thr Lys Arg Ile Thr Cys		110
	115	120
Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe Ser Trp Leu Glu Asn		125
	130	135
Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile Ser Gln Asp Pro Glu		140
	145	150
Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp Phe Asn Thr Thr Arg		155
		160
165	170	175
Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly Asp Ala His Val Ser		
	180	185
Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Ser Lys		190
	195	200
Asn		205
<210> 7		
<211> 34		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Human CD80 signal sequence		
<400> 7		
Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr		
1	5	10
Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys		15
	20	25
Ser Gly		30

<210> 8
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mouse CD80 signal sequence
<400> 8

Met Ala Cys Asn Cys Gln Leu Met Gln Asp Thr Pro Leu Leu Lys Phe
1 5 10 15

Pro Cys Pro Arg Leu Ile Leu Leu Phe Val Leu Leu Ile Arg Leu Ser
20 25 30

Gln Val Ser Ser Asp
35

<210> 9
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Fc C237S
<400> 9

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 10

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc

<400> 10

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

65	70	75	80
----	----	----	----

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn

85	90	95
----	----	----

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro

100	105	110
-----	-----	-----

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

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

145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro

165	170	175
-----	-----	-----

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

180	185	190
-----	-----	-----

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

195	200	205
-----	-----	-----

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

210	215	220
-----	-----	-----

Ser Pro Gly Lys

225

<210> 11

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc

<400> 11

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

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

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

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

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser

100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210> 12

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human IgG1 Fc L234F, L235E, P331S mutant

<400> 12

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

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

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

 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

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

225 230
 <210> 13
 <211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human IgG1 Fc N297 mutant

<400> 13

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 14

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc human IgG1

<400> 14

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 15
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fc human IgG3
 <400> 15

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
 1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
 35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro
 50 55 60

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 65 70 75 80

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 85 90 95

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp
 100 105 110

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

115 120 125

Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 130 135 140

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 145 150 155 160

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

225 230 235 240

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser

245 250 255

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

260 265 270

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

275

<210> 16

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc human IgG4

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110

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

 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys
 225
 <210> 17
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220><221> UNSURE
 <222> (1)..(442)
 <223> Mouse CD80 ECD mouse Fc IgG2a
 <400> 17
 Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys Ser Val Lys Asp Lys Val Leu Leu Pro

 1 5 10 15
 Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His Glu Asp Glu Ser Glu Asp Arg Ile Tyr
 20 25 30

Trp Gln Lys His Asp Lys Val Val Leu Ser Val Ile Ala Gly Lys Leu

35 40 45

Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu Tyr Asp Asn Thr Thr

50 55 60

Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser Asp Arg Gly Thr Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser Ile Lys Ala Asp Phe Ser Thr Pro Asn

100 105 110

Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ala Asp Thr Lys Arg Ile Thr Cys

115 120 125

Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe Ser Trp Leu Glu Asn

130 135 140

Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile Ser Gln Asp Pro Glu

145 150 155 160

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

165 170 175

Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly Asp Ala His Val Ser

180 185 190

Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Ser Lys

195 200 205

Asn Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys

210 215 220

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

225 230 235 240

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

245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp

260 265 270

Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg

275 280 285

Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln

290	295	300
His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn		
305	310	315
Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly		
325	330	335
Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu		
340	345	350
Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met		
355	360	365
Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu		
370	375	380
Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe		
385	390	395
Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn		
405	410	415
Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr		
420	425	430
Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys		

435	440		
<210>	18		
<211>	441		
<212>	PRT		
<213>	Mus musculus		
<220><221>	UNSURE		
<222>	(1)..(441)		
<223>	Mouse CD80 ECD Human Fc IgG1 WT		
<400>	18		
Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys Ser Val Lys Asp Lys Val Leu Leu Pro			
1	5	10	15
Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His Glu Asp Glu Ser Glu Asp Arg Ile Tyr			
20	25	30	

Trp Gln Lys His Asp Lys Val Val Leu Ser Val Ile Ala Gly Lys Leu

35	40	45
Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu Tyr Asp Asn Thr Thr		
50	55	60
Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser Asp Arg Gly Thr Tyr		
65	70	75
Ser Cys Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr Tyr Glu Val Lys His		
85	90	95
Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser Ile Lys Ala Asp Phe Ser Thr Pro Asn		
100	105	110

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

180	185	190
Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Ser Lys		
195	200	205
Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
210	215	220
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
225	230	235
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
245	250	255

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr		
260	265	270
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		

275

280

285

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

290

295

300

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

305

310

315

320

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

325

330

335

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

340

345

350

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

355

360

365

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

370

375

380

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

385

390

395

400

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

405

410

415

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

420

425

430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435

440

<210> 19

<211> 441

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> UNSURE

<222> (1)..(441)

<223> Mouse CD80 ECD Fc IgG1 MT (234, 235, 331)

<400> 19

Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys Ser Val Lys Asp Lys Val Leu Leu Pro

1

5

10

15

Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His Glu Asp Glu Ser Glu Asp Arg Ile Tyr

20	25	30
Trp Gln Lys His Asp Lys Val Val Leu Ser Val Ile Ala Gly Lys Leu		
35	40	45
Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu Tyr Asp Asn Thr Thr		
50	55	60
Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser Asp Arg Gly Thr Tyr		
65	70	75
Tyr Ser Cys Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr Tyr Glu Val Lys His		
85	90	95
Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser Ile Lys Ala Asp Phe Ser Thr Pro Asn		
100	105	110
Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ala Asp Thr Lys Arg Ile Thr Cys		
115	120	125
Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe Ser Trp Leu Glu Asn		
130	135	140
Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile Ser Gln Asp Pro Glu		
145	150	155
Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp Phe Asn Thr Thr Arg		
165	170	175
Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly Asp Ala His Val Ser		
180	185	190
Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Ser Lys		
195	200	205
Asn Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro		
210	215	220
Ala Pro Glu Phe Glu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
225	230	235
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
245	250	255
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr		
260	265	270
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		

275

280

285

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

290

295

300

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

305 310 315 320

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

325

330

335

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

340

345

350

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

355

360

365

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

370

375

380

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

385 390 395 400

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

405

410

415

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

420

425

430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435

440

<210> 20

<211> 440

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> UNSURE

<222> (1)..(440)

<223> Human CD80 ECD Human Fc IgG1 WT

<400> 20

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys

1

5

10

15

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

20	25	30
Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn		
35	40	45
Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn		
50	55	60
Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr		
65	70	75
Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His		
85	90	95
Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser		
100	105	110
Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys		
115	120	125
Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn		
130	135	140
Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu		
145	150	155
Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr		
165	170	175
Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn		
180	185	190
Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn		
195	200	205
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
210	215	220
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
225	230	235
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
245	250	255
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
260	265	270

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

 325 330 335
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 340 345 350
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 355 360 365
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 370 375 380
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 385 390 395 400

 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 405 410 415
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 21
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> UNSURE
 <222> (1)..(440)
 <223> Human CD80 ECD Human Fc IgG1 L234F, L235E, P331S MT
 <400> 21
 Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys

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

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

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

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

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

275 280 285

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

290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440

<210> 22

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> UNSURE

<222> (1)..(288)

<223> human PD-1 precursor (with signal 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 Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly

165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys

180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro

195 200 205

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

210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro

225 230 235 240

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

245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg

	260	265	270
Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu			
	275	280	285
<210>	23		
<211>	268		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<220><221>	UNSURE		
<222>	(1)..(268)		
<223>	human PD-1 (mature, without signal sequence)		
<400>	23		
Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr			
	1	5	10
	15		
Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe			
	20	25	30
Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr			
	35	40	45
Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu			
	50	55	60
Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu			
	65	70	75
	80		
Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn			
	85	90	95
Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala			
	100	105	110
Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg			
	115	120	125
Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly			
	130	135	140
Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser			
	145	150	155
	160		
Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala			

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

225	230	235	240
Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg Ser Ala Gln Pro			
245	250	255	
Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu			
260	265		

<210> 24
<211> 290
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> UNSURE
<222> (1)..(290)
<223> human PD-L1 precursor (with signal sequence)
<400> 24

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu

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

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn

85	90	95	
Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr			
100	105	110	
Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val			
115	120	125	
Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val			
130	135	140	
Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr			
145	150	155	160
Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser			
165	170	175	
Gly Lys Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn			
180	185	190	
Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr			
195	200	205	
Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu			
210	215	220	
Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His			
225	230	235	240
Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr			
245	250	255	
Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys			
260	265	270	
Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu			
275	280	285	
Glu Thr			
290			
<210>	25		
<211>	272		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<220><221>	UNSURE		

<222> (1)..(272)

<223> human PD-L1 (mature, without signal sequence)

<400> 25

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 Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr

165 170 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn 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 Thr His Leu Val

210 215 220

Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile

225 230 235 240
Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile
245 250 255
Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr

260 265 270