



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0148304
(43) 공개일자 2022년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/20 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/2086 (2013.01)
A61K 38/1793 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7036248(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년08월08일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2016-7005437
원출원일자(국제) 2014년08월08일
심사청구일자 2019년08월08일
(85) 번역문제출일자 2022년10월18일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2014/002182
(87) 국제공개번호 WO 2015/018529
국제공개일자 2015년02월12일
(30) 우선권주장
13003964.7 2013년08월08일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
싸이툼 파마
프랑스 낭뜨 44100 셰네 프레스와 뒤 슈망 3
인스티튜트 구스타브 루시
프랑스, 94800 빌레쥬프, 뒤 까밀레 데스플린스, 39
(72) 발명자
베샤르, 데이비드
프랑스 에프-44360 상-에띠엔느 데 몽뤼크, 뒤-디-로미에르, 레 쿠르티
샤뫼, 나탈리
프랑스, 에프-75015 파리, 파사지 뒤 게슬링 14
데브와, 델러니
프랑스, 낭뜨 44100, 슈망 3 뒤 셰네 프레스와, 싸이툼 파마 에스에이에스
(74) 대리인
특허법인다나

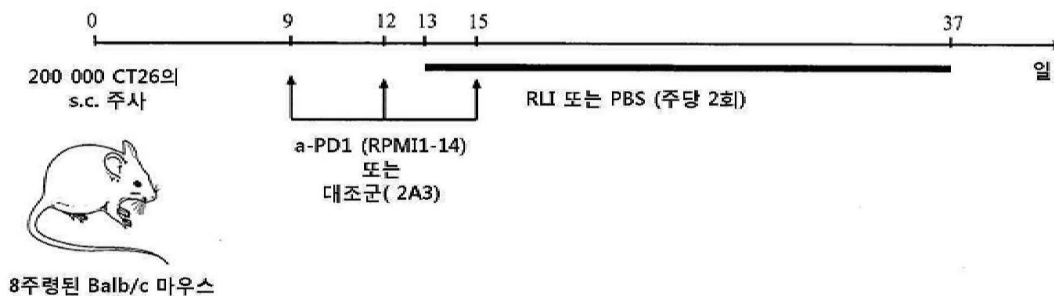
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 병용 약학 조성물

(57) 요약

본 명세서에서는 a) i) 인터루킨 15 또는 이의 유도체의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드, 및 ii) IL-15R α 또는 이의 유도체의 스시 도메인의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 컨쥬게이트; 그것을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 그러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터; 및 b) T 세포 활성화의 억제에 관련된 면역 경로를 길항하는 항체, 또는 이의 단편, 그것을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 그러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하기 위한 동시, 개별 또는 순차적 투여에 적합한 병용 약학 조성물에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/5443 (2013.01)

C07K 14/7155 (2013.01)

C07K 16/2818 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/54 (2013.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

컨쥬게이트, 그것을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 포함하는 암 치료용 약학 조성물로서,

상기 컨쥬게이트는

(i) 서열번호 3의 아미노산 서열과 적어도 92.5%의 유사도를 갖는 인터루킨 15 또는 이의 유도체의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드, 및

(ii) 서열번호 8 또는 서열번호 9의 아미노산 서열과 적어도 92.5%의 유사도를 갖는 IL-15R α 또는 이의 유도체의 스시 도메인의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하고,

상기 약학 조성물은 항체 또는 이의 단편, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터와 조합하여 투여되고,

상기 항체 또는 이의 단편은 T 세포 활성화의 억제에 관련된 면역 경로를 길항하고 PD-1/PD-L1 및 PD-1/PD-L2 안타고니스트 중에서 선택되는, 암 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 약학 조성물 및 상기 항체 또는 이의 단편은 동시, 개별 또는 순차적으로 투여되는, 암 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

a) 상기 컨쥬게이트는 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하의 용량으로 주사 투여되고, 및

b) 상기 항체 또는 이의 단편은 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하의 용량으로 주사 투여되는, 암 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 컨쥬게이트의 (i) 및 (ii) 폴리펩타이드는 융합 단백질로서 공유결합되어 있는, 암 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 인터루킨 15는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는, 암 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 IL-15R α 의 스시 도메인은 서열번호 8 또는 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는, 암 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 컨쥬게이트는 서열번호 16 또는 서열번호 17의 아미노산 서열을 갖는, 암 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 항체는 니볼루맵 (nivolumab), RG7446 및 람브롤리주맵 (lambrolizumab)에서 선택되는, 암 치료용 약학 조성물.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 국제 특허 출원은 2013년 8월 8일자로 출원된 유럽 특허 출원 EP13003964.7의 우선권을 청구하며, 여기에 문헌이 인용된다.

[0002] 본 발명은 신규한 "병용 약학 조성물", 보다 상세하게는, 암 치료를 위한 특이 IL-15 슈퍼아고니스트 및 T 세포 활성화의 억제에 관련된 면역 경로를 길항하는 항체의 병용에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 입양 면역 반응은 2개의 주요 림프구 클래스, 일명 T 세포 및 B 세포의 활성화, 선택 및 비정상적인 증식과 연관되어 있다. 항원과 조우한 후 T 세포는 증식하고, 항원-특이 효과기 세포로 분화되나, B 세포는 증식하고, 항체-분비 세포로 분화된다.

[0004] T 세포 활성화는 T 세포 및 항원-제시 세포 (APC) 간의 몇몇 신호전달 사건을 요구하는 다-단계 과정이다. T 세포 활성화가 일어나도록, 2가지 타입의 신호가 휴지기 T 세포에 전달되어야 한다.

[0005] 첫 번째 타입은 항원-특이 T 세포 수용체 (TCR)에 의해 매개되며, 면역 반응에 특이성을 부여한다.

[0006] 두 번째, 보조자극 타입은 반응의 정도를 조절하고, 부속 수용체를 통해 T 세포에 전달된다. 이들 수용체는 면역억제 수용체 (예컨대, CTLA-4, PD-1, 또는 억제성 KIRs) 및 보조-자극 수용체 (예컨대, CD40, 4-1BB, OX-40 또는 glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR))를 포함한다.

[0007] 면역계의 항-종양 반응을 강화하기 위해 면역억제 수용체의 억제 또는 보조-자극 수용체의 활성화에 대한 치료 전략들이 개발되어 왔다.

[0008] 복합 전략들이 또한 실제로 예상된다. 현재, 시험 물질에 따라 결과들은 매우 위험하다.

발명의 내용**해결하려는 과제****과제의 해결 수단**

[0009] 지금, 본 발명자들은 그들의 특이 화합물, 일명 RLI와 T 세포 활성화의 억제에 관련된 면역 경로를 길항하는 항체의 병용이 매우 높은 비율로 종양 경감을 가져다주나, 그러한 경감이 RLI 또는 면역억제 수용체의 안타고니스트 단독에서 얻은 종양 경감의 측면에서는 예상될 수 없음을 보여준다.

[0010] 더욱이, 이 시너지 작용은 또한 저-용량의 RLI와 저-용량의 항-PDI를 병용한 저-용량의 병용으로부터 얻었다. 놀랍게도, 앞선 병용과 비교하여, 이 병용은 종양 성장의 강하고 시너지한 억제를 제공하였다.

[0011] 이 강한 시너지는 새로운 치료법을 예상할 수 있게 한다.

[0012] 결과적으로, 본 발명은 대상체에서 암을 치료하기 위한 동시, 개별 또는 순차적 이용을 위한 복합 제제로서

[0013] 1) (i) 인터루킨 15 또는 이의 유도체의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드, 및 (ii) IL-15R α 또는 이의 유도체의 스시 도메인의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 컨쥬게이트; 그것을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 그러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터; 및

[0014] 2) T 세포 활성화의 억제에 관련된 면역 경로를 길항하는 항체 또는 이의 단편, 그것을 코딩하는 폴리뉴클레오

타이드, 또는 그러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하기 위한 동시, 개별 또는 순차적 투여에 적합한 병용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0015] 두 번째 양상에서, 본 발명은

[0016] 1) 상기 개시된 컨쥬게이트, 그것을 코딩하는 핵산, 또는 그러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 및

[0017] 2) T 세포 활성화의 억제에 관련된 면역 경로를 길항하는 항체 또는 이의 단편, 그것을 코딩하는 핵산 서열, 또는 그러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터의 치료적 유효량을 그것을 필요로 하는 대상체에 동시적, 개별적 또는 순차적으로 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 BIOCELL 항-PD1를 마우스 암 모델에서 사용한 주사 프로토콜을 나타낸다.

도 2는 CT16 모델에서 TILs 존재를 나타낸다.

도 3은 마우스에서 항-PD1 (RPMI1-14) 및 RLI의 병용 요법을 나타낸다.

도 4는 항-PD1 / RLI 병용 처리에 대한 마우스 생존을 나타낸다.

도 5는 마우스 암 모델에서 사용된 주사 프로토콜을 나타낸다.

도 6은 마우스에서 항-PD1 (mBAT) 및 RLI의 병용 요법을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 컨쥬게이트

[0020] 용어 "인터루킨 15"는 종래의 일반적인 의미로, IL-2와 구조적으로 유사한 사이토카인을 의미한다 (GRABSTEIN *et al*, *Science*, vol.264(5161), p:965-968, 1994). 이 사이토카인은 또한 IL-15, IL 15 또는 MGC9721로 알려져 있다. 이 사이토카인과 IL-2는 많은 생물학적 활성들을 공유하며, 그들은 공통의 헤마토포이에틴 수용체 서브유닛과 결합하는 것으로 밝혀져 있다. 따라서, 그들은 같은 수용체에 대해 경쟁하여 서로의 활성을 부정적으로 조절할 것이다. IL-15는 T 세포 및 자연살해세포 활성화 및 증식을 조절하고, CD8+ 메모리 세포의 수는 이 사이토카인과 IL-2 간의 균형에 의해 조절되는 것으로 보인다고 입증되었다. IL-15 활성화는 실시예에 기재된 바와 같이, kit225 세포주에서 그것의 증식 유도를 측정하여 평가될 수 있다 (HORI *et al*, *Blood*, vol.70(4), p: 1069-72, 1987).

[0021] 상기 IL-15 또는 이의 유도체는 kit225 세포주의 증식 유도 시 인간 인터루킨 15의 활성의 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 25%, 및 더욱 바람직하게는 적어도 50%를 가진다.

[0022] 상기 인터루킨 15는 포유동물의 인터루킨-15, 바람직하게는 영장류의 인터루킨-15, 및 더욱 바람직하게는 인간의 인터루킨-15이다.

[0023] 포유동물의 인터루킨 15는 당업자에 의해 간단히 확인될 수 있다. 예시로서, 돼지 (*Sus scrofa*)(Accession number ABF82250), 시궁쥐 (*Rattus norvegicus*)(Accession number NP 037261), 생쥐 (*Mus musculus*)(Accession number NP 032383), 소 (*Bos Taurus*)(Accession number NP_776515), 집토끼 (*Oryctolagus cuniculus*)(Accession number NP_001075685), 양 (*Ovis aries*)(Accession number NP 001009734), 고양이 (*Felis catus*)(Accession number NP_001009207), 필리핀원숭이 (*Macaca fascicularis*)(Accession number BAA 19149), 인간 (*Homo sapiens*)(Accession number NP_000576), 붉은털원숭이 (*Macaca Mulatta*)(Accession number NP_001038196), 기니피그 (*Cavia porcellus*)(Accession number NP_001166300), 또는 사바나원숭이 (*Chlorocebus sabaeus*)(Accession number ACI289) 유래의 인터루킨-15를 예로 들 수 있다.

[0024] 여기에 사용된, 용어 "포유동물의 인터루킨 15"는 공통서열 SEQ ID NO: 1을 의미한다.

[0025] 영장류의 인터루킨 15는 당업자에 의해 간단히 확인될 수 있다. 예시로서, 돼지 (*Sus scrofa*)(Accession number ABF82250), 집토끼 (*Oryctolagus cuniculus*)(Accession number NP_001075685), 필리핀원숭이 (*Macaca fascicularis*)(Accession number BAA 19149), 인간 (*Homo sapiens*)(Accession number NP_000576), 붉은털원숭이 (*Macaca Mulatta*)(Accession number NP_001038196), 또는 사바나원숭이 (*Chlorocebus sabaeus*)(Accession

number ACI289) 유래의 인터루킨-15를 예로 들 수 있다.

- [0026] 여기에 사용된, 용어 "영장류의 인터루킨 15"는 공통서열 SEQ ID NO: 2를 의미한다.
- [0027] 인간의 인터루킨 15는 당업자에 의해 간단히 확인될 수 있으며, 아미노산 서열 SEQ ID NO: 3을 의미한다.
- [0028] 여기에 사용된, 용어 "인터루킨 15 유도체"는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 및 SEQ ID NO: 3으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열과 적어도 92.5% (즉, 약 10개의 아미노산 치환에 해당), 바람직하게는 적어도 96% (즉, 약 5개의 아미노산 치환에 해당), 및 더욱 바람직하게는 적어도 98.5% (즉, 약 2개의 아미노산 치환에 해당) 또는 적어도 99% (즉, 약 1개의 아미노산 치환에 해당)의 유사도 (percentage of identity)를 갖는 아미노산을 의미한다. 그러한 유도체는 그것의 개인적 지식 및 본 특허 출원의 기술의 관점에서 당업자에 의해 간단히 확인될 수 있다. 그러한 유도체의 예시로서, 국제 특허 출원 WO 2009/135031에 기재된 것을 예로 들 수 있다. 또한, 천연 아미노산은 화학적으로 변형된 아미노산에 의해 대체될 수 있을 것으로 이해될 것이다. 일반적으로, 그러한 화학적으로 변형된 아미노산은 폴리펩타이드의 반감기를 증가시킨다.
- [0029] 여기에 사용된, 2개의 아미노산 서열 간의 "유사도"는 상기 서열들의 최상의 배열로 얻은 비교되는 2개의 서열 간 동일한 아미노산의 비율을 의미하고, 이 비율은 순수하게 통계적이며 이들 2개의 서열 간의 차이는 아미노산 서열들 내에 무작위로 퍼져있다. 여기에 사용된, "최상의 배열" 또는 "최적의 배열"은 측정된 유사도 (아래를 볼 것)가 가장 높은 배열을 의미한다. 2개의 아미노산 서열 간의 서열 비교는 보통 최상의 배열을 따라 미리 배열되어 있는 이들 서열들을 비교하여 실현된다; 이 비교는 유사성이 있는 국소 영역을 확인하고 비교하기 위해 비교 단편 (segment)에서 실현된다. 비교를 수행하기 위한 최상의 서열 배열은 수작업 외에 SMITH 및 WATERMAN에 의해 개발된 국소 상동성 알고리즘 (*Ad. App. Math.*, vol.2, p:482, 1981), NEDDLEMAN 및 WUNSCH에 의해 개발된 전체 상동성 알고리즘 (*J. Mol. Biol.*, vol.48, p:443, 1970), PEARSON 및 LIPMAN에 의해 개발된 유사성의 방법 (*Proc. Natl. Acd. Sci. USA*, vol.85, p:2444, 1988), 그러한 알고리즘을 이용한 컴퓨터 소프트웨어 (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA in the Wisconsin Genetics software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI USA), MUSCLE 복수 배열 알고리즘 (Edgar, Robert C, *Nucleic Acids Research*, vol. 32, p: 1792, 2004), 또는 CLUSTAL (GOUJON *et al*, *Nucleic acids research*, vol.38, W695-9, 2010)을 이용하여 실현될 수 있다. 최상의 국소 배열을 얻기 위해, 바람직하게는 BLOSUM 62 matrix를 포함하는 BLAST 소프트웨어를 이용할 수 있다. 2개의 아미노산 서열 간의 유사도는 최적으로 배열된 이들 2개의 서열을 비교하여 측정되며, 아미노산 서열들은 이들 2개의 서열 간 최상의 배열을 얻기 위해 참고 서열과 비교하여 부가 또는 결실을 포함할 수 있다. 유사도는 이들 2개의 서열 간에 동일한 위치의 개수를 측정하고, 이 개수를 비교된 위치의 전체 개수로 나누고, 여기에 100을 곱하여 이들 2개의 서열 간의 유사도를 얻는다.
- [0030] 바람직하게는, 인터루킨 15 유도체는 IL-15 아고니스트 (agonist) 또는 슈퍼아고니스트 (superagonist)이다. 당업자는 IL-15-아고니스트 또는 -슈퍼아고니스트를 간단히 확인할 수 있다. IL-15-아고니스트 또는 -슈퍼아고니스트의 예시로서, 국제 특허 출원 WO 2005/085282 또는 ZHU 등 (*J. Immunol*, vol.183(6), p:3598-607, 2009)에 개시된 것을 예로 들 수 있다.
- [0031] 더욱 바람직하게는, 상기 IL-15 아고니스트 또는 슈퍼아고니스트는 L45D, L45E, S51D, L52D, N72D, N72E, N72A, N72S, N72Y 및 N72P (인간 IL-15, SEQ ID NO: 3의 서열과 관련됨)로 이루어진/포함하는 군에서 선택된다.
- [0032] 여기에 사용된 용어 "IL-15R α 의 스시 도메인"은 종래기술에서의 그것의 일반적인 의미를 가지며, IL-15R α 의 시그널 펩타이드 이후 첫 번째 시스테인 잔기 (C1)에서 시작하고, 상기 시그널 펩타이드 이후 네 번째 시스테인 잔기 (C4)에서 끝나는 도메인을 의미한다. IL-15R α 의 세포외 영역의 부분에 해당하는 상기 스시 도메인은 IL-15와의 결합에 필수적이다 (WEI *et al*, *J. Immunol*, vol.167(1), p:277-282, 2001).
- [0033] IL-15R α 또는 이의 유도체의 상기 스시 도메인은 인간 인터루킨-15와 인간 IL-15R α 의 스시 도메인의 결합 활성의 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 25% 및 더욱 바람직하게는 적어도 50%를 갖는다. 상기 결합 활성은 WEI 등 (상기 기재, 2001)에 개시된 방법에 의해 쉽게 측정될 수 있다.
- [0034] 상기 IL-15R α 의 스시 도메인은 포유동물의 IL-15R α 의 스시 도메인, 바람직하게는 영장류의 IL-15R α 의 스시 도메인 및 더욱 바람직하게는 인간의 IL-15R α 의 스시 도메인이다.
- [0035] 포유동물의 IL-15R α 의 스시 도메인은 당업자에 의해 간단히 확인될 수 있다. 예시로서, 시궁쥐 (*Rattus norvegicus*)(Accession number XP 002728555), 생쥐 (*Mus musculus*)(Accession number EDL08026), 소 (*Bos Taurus*)(Accession number XP 0026921 13), 집토끼 (*Oryctolagus cuniculus*)(Accession number

XP_002723298), 필리핀원숭이 (*Macaca fascicularis*)(Accession number ACI42785), 돼지꼬리원숭이 (*Macaca nemestrina*)(Accession number ACI42783), 인간 (*Homo sapiens*)(Accession number Q13261.1), 붉은털원숭이 (*Macaca Mulatta*)(Accession number NP_001 166315), 오랑우탄 (*Pongo abelii*)(Accession number XP_002820541), 수티망가베이 (*Cercocebus torquatus*)(Accession number ACI42784), 마모셋원숭이 (*Callithrix jacchus*)(Accession number XP_002750073), 또는 기니피그 (*Cavia porcellus*)(Accession number NP_001166314) 유래의 IL-15R α 의 스시 도메인을 예로 들 수 있다.

- [0036] 여기에 사용된, 용어 "포유동물의 IL-15R α 의 스시 도메인"은 공통서열 SEQ ID NO: 4를 의미한다.
- [0037] 바람직하게는, 포유동물의 IL-15R α 의 스시 도메인의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드는 공통서열 SEQ ID NO: 5를 의미한다.
- [0038] 영장류의 IL-15R α 의 스시 도메인은 당업자에 의해 간단히 확인될 수 있다. 예시로서, 집토끼 (*Oryctolagus cuniculus*), 필리핀원숭이 (*Macaca fascicularis*), 돼지꼬리원숭이 (*Macaca nemestrina*), 인간 (*Homo sapiens*), 붉은털원숭이 (*Macaca Mulatta*), 오랑우탄 (*Pongo abelii*), 수티망가베이 (*Cercocebus torquatus*), 또는 마모셋원숭이 (*Callithrix jacchus*) 유래의 IL-15R α 의 스시 도메인을 예로 들 수 있다.
- [0039] 여기에 사용된, 용어 "영장류의 IL-15R α 의 스시 도메인"은 공통서열 SEQ ID NO: 6을 의미한다.
- [0040] 바람직하게는, 영장류의 IL-15R α 의 스시 도메인의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드는 공통서열 SEQ ID NO: 7을 의미한다.
- [0041] 인간의 IL-15R α 의 스시 도메인은 당업자에 의해 간단히 확인될 수 있으며, 아미노산 서열 SEQ ID NO: 8을 의미한다.
- [0042] 바람직하게는, 인간의 IL-15R α 의 스시 도메인의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 9를 의미한다.
- [0043] 여기에 사용된, 용어 "IL-15R α 의 스시 도메인의 유도체"는 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 및 SEQ ID NO: 9로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열과 적어도 92%(즉, 약 5개의 아미노산 치환에 해당), 바람직하게는 적어도 96%(즉, 약 2개의 아미노산 치환에 해당), 및 더욱 바람직하게는 적어도 98%(즉, 약 1개의 아미노산 치환에 해당)의 유사도를 갖는 아미노산 서열을 의미한다. 그러한 유도체는 IL-15R α 의 스시 도메인의 4개의 시스테인 잔기들을 포함하며, 그/그녀의 개인적 지식 및 본 특허 출원의 기술의 관점에서 당업자에 의해 간단히 확인될 수 있다. 또한, 천연 아미노산은 화학적으로 변형된 아미노산에 의해 대체될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 일반적으로, 그러한 화학적으로 변형된 아미노산은 폴리펩타이드의 반감기를 증가시킬 수 있다.
- [0044] 바람직한 구체예에 따르면, 컨주게이트는 IL-15R α 또는 이의 유도체의 스시 및 힌지 도메인의 아미노산 서열을 포함하는 (ii) 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0045] IL-15R α 힌지 도메인은 스시 도메인 이후 첫 번째 아미노산 잔기에서 시작하고 글리코실화의 첫 번째 잠재적 부위 전 마지막 아미노산 잔기에서 끝나는 아미노산 서열로 정의된다. 인간의 IL-15R α 에서, 힌지 영역의 아미노산 서열은 상기 스시 도메인에 상대적인 C-말단 위치에서 IL-15R α 의 스시 도메인 이후에 위치한 14개의 아미노산으로 구성된다. 즉, 상기 IL-15R α 힌지 영역은 상기 시스테인 잔기 (C4) 이후 첫 번째 아미노산에서 시작하고, 14번째 아미노산 (보통 "N-말단에서 C-말단" 방향으로 계수함)에서 끝난다.
- [0046] 상기 IL-15R α 의 상기 스시 및 힌지 도메인은 포유동물의 IL-15R α 의 스시 및 힌지 도메인, 바람직하게는, 영장류의 IL-15R α 의 스시 및 힌지 도메인, 및 더욱 바람직하게는, 인간 IL-15R α 의 스시 및 힌지 도메인이다.
- [0047] 포유동물의 IL-15R α 의 스시 및 힌지 도메인의 아미노산 서열은 당업자에 의해 간단히 확인될 수 있다. 여기에 사용된, 용어 "포유동물의 IL-15의 스시 및 힌지 도메인"은 공통서열 SEQ ID NO: 10을 의미한다.
- [0048] 영장류의 IL-15R α 의 스시 및 힌지 도메인의 아미노산 서열은 당업자에 의해 간단히 확인될 수 있다. 여기에 사용된, 용어 "영장류의 IL-15R α 의 스시 및 힌지 도메인"은 공통서열 SEQ ID NO: 11을 의미한다.
- [0049] 인간의 IL-15R α 의 스시 및 힌지 도메인의 아미노산 서열은 당업자에 의해 간단히 확인될 수 있다. 여기에 사용된, 용어 "인간의 IL-15R α 의 스시 및 힌지 도메인"은 공통서열 SEQ ID NO: 12를 의미한다.
- [0050] 여기에 사용된, 용어 "IL-15R α 의 스시 및 힌지 도메인의 유도체"는 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 및 SEQ ID

NO: 12로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 93%(즉, 약 5개의 아미노산 치환에 해당), 바람직하게는 적어도 97%(약 2개의 아미노산 치환에 해당), 및 더욱 바람직하게는 적어도 98%(약 1개의 아미노산 치환에 해당)의 유사도를 갖는 아미노산 서열을 의미한다. 그러한 유도체는 IL-15R α 의 스시 도메인의 4개의 시스테인 잔기를 포함하고, 그것의 일반적인 지식 및 본 특허 출원의 기술의 관점에서 당업자에 의해 간단히 확인될 수 있다. 또한, 천연 아미노산은 화학적으로 변형된 아미노산으로 대체될 수 있을 것으로 이해될 것이다. 일반적으로, 그러한 화학적으로 변형된 아미노산은 폴리펩타이드 반감기를 증가시킬 수 있다.

[0051] 컨주게이트의 폴리펩타이드 i) 및 ii) 둘 다 미국특허 제8,124,084 B2호에 개시된 복합체에서와 같이 비-공유적으로 연결될 것이다. 상기 컨주게이트 또는 복합체는 적당한 함량의 폴리펩타이드 i)를 제공하고, 적당한 함량의 폴리펩타이드 ii)를 제공하며, 복합체 (즉, 컨주게이트) 형성을 허용하기에 충분한 기간에 적당한 pH 및 이온 조건하에서 두 폴리펩타이드를 혼합하고, 및 선택적으로, 상기 복합체를 농축 또는 정제하여 간단히 얻을 수 있다. 복합체 (즉, 컨주게이트)의 폴리펩타이드는 예를 들어, 표준 방법들에 따라 펩타이드 합성기를 이용하거나; 세포 또는 세포 추출물에서 별도로 각 폴리펩타이드를 발현하고 나서 폴리펩타이드를 분리 및 정제하여 형성될 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 치료적 폴리펩타이드 복합체는 같은 세포 또는 세포 추출물에서 폴리펩타이드 i) 및 ii) 둘 다를 발현하고, 예를 들어, 림포카인 부분, 림포카인 수용체 부분 또는 복합체에 대한 항체를 이용한 어피니티 크로마토그래피 같은 크로마토그래피 기술을 이용하여 복합체를 분리 및 정제하여 형성될 수 있다.

[0052] 또한, 컨주게이트의 폴리펩타이드 i) 및 ii) 둘 다 이기능 (bifunctional) 단백질 커플링제를 이용하여 공유적으로 연결되거나, 융합 단백질로 존재할 것이다.

[0053] 이기능 단백질 커플링제는 그들을 이용하는 방법들처럼 당업자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어, N-석시니미딜 (2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (N-succinimidyl (2-pyridyldithio) propionate (SPDP)), 석시니미딜 (N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카르복실레이트 (succinimidyl (N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate), 이미노티올란 (iminothiolane (IT)), 이미도에스테르 (imidoester)의 이기능 유도체 (예를 들어, 디메틸 아디피디데이트 HCL), 활성 에스테르 (예를 들어, 디석시니미딜 수버레이트 (disuccinimidyl suberate)), 알데히드 (예를 들어, 글루타알데히드 (glutaraldehyde)), 비스-아지도 화합물 (bis-azido compounds)(예를 들어, 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민 (bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine)), 비스-디아조늄 유도체 (bis-diazonium derivatives)(예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민 (bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine)), 디이소시아네이트 (예를 들어, 톨리엔 2,6-디이소시아네이트 (tolylene 2,6-diisocyanate)) 및 비스-활성 플루오린 화합물 (bis-active fluorine compounds)(예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠 (1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene))을 포함한다.

[0054] 용어 "융합 단백질"은 원래 개별 단백질들을 코딩하는 둘 이상의 유전자들의 접합 (joining)을 통해 생기는 단백질을 의미한다. 또한, 키메라 단백질로 알려져 있다. 이 융합 유전자의 번역을 통해 오리지널 단백질 각각에서 유래하는 기능적인 특성들을 갖는 싱글 폴리펩타이드가 생긴다. 재조합 융합 단백질은 생물학적 연구 또는 치료학에서 사용하는 재조합 DNA 기술에 의해 인위적으로 생성된다. 재조합 융합 단백질은 융합 유전자의 유전자 공학을 통해 생기는 단백질이다. 이는 일반적으로 첫 번째 단백질을 코딩하는 cDNA 서열로부터 종결 코돈을 제거하고 나서, 라이게이션 또는 오버랩 연장 PCR을 통해 프레임에 두 번째 단백질의 cDNA 서열을 추가하는 것을 포함한다. 그리고 나서, 그 DNA 서열은 싱글 단백질로서 세포에서 발현될 것이다. 단백질은 오리지널 단백질 둘 다 또는 둘 중 하나의 부분의 전체 서열을 포함하도록 변형될 수 있다.

[0055] 바람직한 구체예에서, 컨주게이트는 융합 단백질이다.

[0056] 인터루킨 15 또는 이의 유도체의 아미노산 서열은 IL-15R α 또는 이의 유도체의 스시 도메인의 아미노산 서열에 해당하는 C-말단 또는 N-말단 위치에서 존재할 수 있다. 바람직하게는, 인터루킨 15 또는 이의 유도체의 아미노산 서열은 IL-15R α 또는 이의 유도체의 스시 도메인의 아미노산 서열에 해당하는 C-말단에 존재한다.

[0057] 인터루킨 15 또는 이의 유도체의 아미노산 서열 및 IL-15R α 또는 이의 유도체의 스시 도메인의 아미노산 서열은 제1 "링커" 아미노산 서열에 의해 분리될 것이다. 상기 제1 "링커" 아미노산 서열은 융합 단백질이 적당한 2차 및 3차 구조를 형성할 수 있을 정도로 충분히 길 것이다.

[0058] 제1 링커 아미노산 서열의 길이는 융합 단백질의 생물학적 활성에 유의적으로 영향을 주지 않는 정도로 다양할 것이다. 일반적으로, 제1 링커 아미노산 서열은 적어도 하나를 포함하나, 30개 아미노산 미만, 즉, 2-30개의 아미노산으로 된 링커, 바람직하게는 10-30개의 아미노산, 더욱 바람직하게는 15-30개의 아미노산, 더욱 더 바람

직하계는 15-25개의 아미노산, 가장 바람직하계는 18-22개의 아미노산이다.

[0059] 바람직한 링커 아미노산 서열은 컨주게이트가 적당한 입체구조 (conformation)(즉, IL-15R 베타/감마 신호전달 경로를 통한 적당한 신호전달활성이 가능한 입체구조)를 취할 수 있도록 하는 것이다.

[0060] 가장 적당한 제1 링커 아미노산 서열은 (1) 유연한 연장된 입체구조를 취하거나, (2) 융합 단백질의 기능성 도메인과 상호작용할 수 있는 잘 배열된 2차 구조를 전개하는 경향을 나타내지 않거나, (3) 기능성 단백질 도메인과 상호작용을 촉진할 수 있는 최소 소수성 또는 하전된 특성을 가질 것이다.

[0061] 바람직하계는, 제1 링커 아미노산 서열은 Gly (G), Asn (N), Ser (S), Thr (T), Ala (A), Leu (L) 및 Gin (Q)를 포함하는 군에서, 가장 바람직하계는 Gly (G), Asn (N) 및 Ser (S)를 포함하는 군에서 선택된 거의 중성의 아미노산을 포함한다.

[0062] 링커 서열의 예시는 미국 특허 제5,073,627호 및 제5,108,910호에 기재되어 있다.

[0063] 보다 상세하계는 본 발명에 적당한 예시적인 유연한 링커들은 SEQ ID NO: 13 (SGGSGGGSGGGSGGGSLQ), SEQ ID NO: 14 (SGGSGGGSGGGSGGGSGG) 또는 SEQ ID NO: 15 (SGGSGGGSGGGSGGGSLQ)의 서열에 의해 코딩되는 것들을 포함한다.

[0064] 더욱 바람직하계는, 컨주게이트는 SEQ ID NO: 16 또는 SEQ ID NO: 17의 서열을 갖는다.

[0065] 면역억제 수용체 안타고니스트 항체

[0066] 용어 "항체"는 4개의 폴리펩타이드 체인, 이황화 결합에 의해 서로 연결된 2개의 동일한 중쇄 (H)(전체 길이일 때 약 50-70 kDa) 및 2개의 동일한 경쇄 (L)(전체 길이일 때 약 25 kDa)를 포함하는 테트라머에 해당하는 이뮤노글로불린 분자를 의미한다. 경쇄는 카파 및 람다로 분류된다. 중쇄는 감마, 타우, 알파, 델타, 또는 엡실론으로 분류되고, 각각 항체의 아이소타입, IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE으로 정의한다. 각 중쇄는 N-말단 중쇄 가변 영역 (여기에서, HCVR로 줄여 쓴다) 및 중쇄 불변 영역으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 IgG, IgD 및 IgA에 대해 3개의 도메인 (CH1, CH2 및 CH3); 및 IgM 및 IgE에 대해 4개의 도메인 (CH1, CH2, CH3 및 CH4)으로 이루어진다. 각 경쇄는 N-말단 경쇄 가변 영역 (여기에서, LCVR로 줄여 쓴다) 및 경쇄 불변 영역으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인 CL로 이루어진다. HCVR 및 LCVR 영역은 훨씬 더 보존된 영역, 일명 골격 부위 (framework regions, FR) 사이에 배치되어 있는 과변이 (hypervariability)의 영역, 일명 상보성 결정 부위 (complementarity determining regions, CDRs)로 추가로 세분화될 수 있다. 각 HCVR 및 LCVR는 3개의 CDRs 및 4개의 FRs로 구성되며, 다음의 순서, FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4로 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 배열된다. 각 도메인에 대한 아미노산의 배치는 잘 알려진 관습에 따른다. 특정 항원과 결합하는 항체의 기능성은 각 경쇄/중쇄의 가변 영역에 달려 있으며, CDRs에 의해 주로 결정된다.

[0067] 여기에 사용된, 용어 "항체"는 단일클론 항체 그 자체를 의미한다. 단일클론 항체는 인간 항체, 키메라 항체 및/또는 인간화 항체일 수 있다.

[0068] 유리하계는, 용어 항체는 IgG, 예를 들어, IgG1, IgG2 (IgG2a 또는 IgG2b), IgG3 및 IgG4를 의미한다. 바람직하계는, 용어 항체는 IgG1 또는 IgG2 및 더욱 바람직하계는 IgG2a이다.

[0069] "키메라 항체"는 쥐의 이뮤노글로불린의 가변 영역 및 인간의 이뮤노글로불린의 불변 영역으로 구성된 항체를 의미한다. 이러한 변형은 단순히 인간 항체의 불변 영역을 쥐의 불변 영역으로 치환하여 구성하므로 약학적 용도에 적합하도록 충분히 낮은 면역원성을 갖는 인간/쥐 키메라를 생산케 한다. 그러한 키메라 항체를 생산하는 많은 방법이 지금도 보고되고 있어, 당업자의 일반적인 지식의 일부를 형성한다 (예를 들어, 미국 특허 제 5,225,539호를 볼 것).

[0070] "인간화 항체"는 비-인간 상보성 결정 부위 (CDR)를 갖는 항체의 서열을 바꾸어 인간 항체 생식세포에서 유래된 아미노산 서열의 부분 또는 전체로 구성된다. 항체의 가변 영역 및 최종적으로 CDR의 인간화는 현재 종래기술로 잘 알려져 있는 기술에 의해 제조된다. 예를 들어, 영국 특허 출원 GB 2188638A 및 미국 특허 제5,585,089호는 치환된 항체의 유일한 부분이 상보성 결정 부위, 또는 "CDR"이 되도록 재조합 항체를 생산하는 공정을 개시하고 있다. CDR 그래프팅 기술은 쥐의 CDRs 및 인간의 가변 영역 골격 및 불변 영역으로 구성된 항체를 생산하는데 사용되어 왔다 (예를 들어, RIECHMANN *et al*, *Nature*, vol.332, p: 323-327, 1988를 볼 것). 이들 항체들은 Fc 의존적인 효과기 기능에 필수적인 인간의 불변 영역을 보유하고 있으나, 항체에 대한 면역 반응을 훨씬 덜 유발하는 것 같다. 예를 들어, 가변 영역의 골격 부위가 비-인간의 CDR을 실질적으로 그대로 두고 해당 인간의 골격 부위에 의해 치환되거나, 심지어 인간의 게놈 유래의 서열로 CDR이 치환된다. 적어도 인간 항체는 인간의 면역

시스템에 대응하기 위해 바뀐 면역 시스템을 갖는 유전적으로 변형된 마우스에서 생산된다. 상기에서 언급된 바와 같이, 골격 제시 단일 체인 형태를 포함하는 항체의 면역학적 특이 골격을 사용하기 위해 본 발명의 방법들을 충분히 사용할 수 있다.

[0071] 인간화 항체는 인간의 골격, 비-인간 항체 유래의 적어도 하나의 CDR 및 인간 이뮤노글로불린 불변 영역과 실질적으로 동일한, 즉 적어도 약 85% 또는 90%, 바람직하게는 적어도 95% 동일한 임의의 불변 영역을 포함하는 항체를 의미한다. 그리하여, 아마도 CDR을 제외한 인간화 항체의 모든 부분들은 인간의 네이티브 이뮤노글로불린 서열의 하나 이상의 해당 부분들에 실질적으로 동일하다. 예를 들어, 인간화 이뮤노글로불린은 일반적으로 키메라 마우스 가변 영역/인간 불변 영역 항체를 포함하지 않을 것이다. 예를 들어, 인간화 이뮤노글로불린의 설계는 다음과 같이 수행될 것이다: 아미노산이 다음의 카테고리 하에서 포함될 때, 사용된 인간 이뮤노글로불린의 골격 아미노산 (어셉터 이뮤노글로불린)은 CDR-제공하는 비-인간 이뮤노글로불린 (도너 이뮤노글로불린) 유래의 골격 아미노산으로 치환된다: (a) 어셉터 이뮤노글로불린의 인간 골격 영역에서 아미노산은 그 위치에서 인간 이뮤노글로불린에 대해 특이적이지만, 도너 이뮤노글로불린에서 해당 아미노산은 그 위치에서 인간 이뮤노글로불린에 대해 특이적이다; (b) 아미노산의 위치는 CDRs 중 하나에 밀착하여 근접해 있다; 또는 (c) 골격 아미노산의 임의의 사이드 체인 원자는 3차원 이뮤노글로불린 모델 (QUEEN *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.88, p:2869, 1991)에서 CDR 아미노산의 임의의 원자의 약 5-6 암스트롱(중심-대-중심) 내에 있다. 어셉터 이뮤노글로불린의 인간의 골격 부위에서 아미노산과 도너 이뮤노글로불린에서 해당 아미노산 각각은 그 위치에서 인간 이뮤노글로불린에 대해 특이적일 때, 그러한 아미노산은 그 위치에서 인간 이뮤노글로불린에 대해 특이적인 아미노산에 의해 치환된다.

[0072] 여기에 사용된 용어 "항체 단편"은 이의 항체 카운터파트 보다는 같은 항원과 반응할 수 있는 항체 단편을 의미한다. 그러한 단편은 당업자에 의해 간단히 확인될 수 있고, 예를 들어, F_{ab} 단편 (예컨대, 파페인 분해에 의해), $F_{ab'}$ 단편 (예컨대, 펩신 분해 및 부분 환원에 의해), $F_{(ab')_2}$ 단편 (예컨대, 펩신 분해에 의해), F_{ac} (예컨대, 플라스민 분해에 의해), F_d (예컨대, 펩신 분해, 부분 환원 및 재응집에 의해) 및 본 발명에 의해 포함된 scFv(단일 체인 Fv; 예컨대, 분자 생물학 기술에 의해) 단편을 포함한다.

[0073] 그러한 단편은 종래기술 및/또는 여기에 기재된 효소적 절단, 합성 또는 재조합 기술에 의해 생산될 수 있다. 또한, 항체들은 하나 이상의 종결 코돈이 천연 종결 부위의 업스트림에 도입된 항체 유전자들을 이용하여 다양한 끝이 절단된 형태 (truncated forms)로 생산될 수 있다. 예를 들어, $F_{(ab')_2}$ 중쇄 부분을 코딩하는 결합 유전자는 중쇄의 CH₁ 도메인 및/또는 힌지 영역을 코딩하는 DNA 서열을 포함하도록 설계될 수 있다. 항체들의 다양한 부분들은 전통적인 기술들에 의해 화학적으로 서로 결합되거나, 유전공학적인 기술을 이용한 연속 단백질(contiguous protein)로 제조될 수 있다.

[0074] 바람직하게는, 상기 항체 단편은 scFv 단편이다.

[0075] 용어 "T 세포 활성화의 억제에 관련된 면역 경로를 길항하는 항체"는 CTL-A4, PD-1, 또는 억제성 KIRs 등의 면역억제 수용체를 이 수용체와 결합하거나 이의 리간드와 결합하여 길항함으로써 하향조절 신호를 억제하여 면역 활성화를 촉진하는 항체를 의미한다. 면역억제 수용체 안타고니스트 항체의 예시로, CTL-A4, PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2, 억제성 KIRs, CD276, VTCN1, BTLA/HVEM, LAG3, HAVCR2 및 ADORA2A 안타고니스트에 대한 항체들, 바람직하게는 PD-1/PD-L1 항체들을 예로 들 수 있다.

[0076] CTL-A4 (세포독성 림프구 관련된 항원, 또한 CD152로 명시됨)는 1987년에 발견되었다 (BRUNET *et al*, *Nature*, vol.328, p:267-270, 1987). CTL-A4의 역할은 우선 T 세포 활성화를 억제하고, 이는 대량 림프구증식 (massive lymphoproliferation)를 겪는 CTL-A4 결핍 마우스에서 나타난다 (CHAMBERS *et al*, *Immunity*, vol.7, p:8855-8959, 1997). 현재, CTL-A4의 차단은 인 비트로 (WALUNAS *et al*, *Immunity*, vol.1, p:405-413, 1994) 및 인 비보 (KEARNEY, *J. Immunol*, vol.155, p: 1032- 1036, 1995)에서 T 세포 반응을 향상시키고, 항종양 면역을 증가 시킴을 보여준 바 있다 (LEACH, *Science*, vol.271, p: 1734- 1736, 1996). CTL-A4 안타고니스트에 해당하는 항체의 예시로, WO 01/14424에 개시된 이필리무맙 (ipilimumab)(또한, MDX-010 및 10D1로 언급되고, MEDAREX로부터 이용할 수 있으며, BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY에서 YERVOY™ 로 판매된다), WO 00/37504에 개시된 티실리무맙 (ticilimumab)(또한, 1 1.2.1 및 CP-675,206로 알려져 있다) 및 또한 문헌이 인용된 국제 특허 출원 WO 98/42752, WO 01/14424, WO 2004/035607 및 WO 2012/120125, EP 1212422 및 EP 1262193, US 5,811,097, US 5,855,887, US 5,977,318, US 6,051,227, US 6,207,156, US 6,682,736, US 6,984,720, US 7,109,003 및 US

7,132,281에 개시된 CTL-A4 항체들을 예로 들 수 있다.

- [0077] 또한, PD-1 (또한, PDCD1 또는 CD279로 언급된다)으로 알려져 있는 programmed cell death 1은 ~ 55 kD 타입 I 막 당단백질이다. PD-1은 나이브 T, B 및 NK 세포에서 적당히 발현되며, 림프구, 단핵구 및 골수세포에서 T/B 세포 수용체 신호전달에 의해 상향-조절되어 있는 CD28 보조자극 유전자 패밀리의 수용체이다. PD-1은 다른 발현 프로파일을 갖는 2개의 알려진 리간드, PD-L1 (B7-H1) 및 PD-L2 (B7-DC)를 가지고 있다. PD-L1 (B7-H1)는 나이브 림프구, 활성화된 B 및 T 세포, 단핵구 및 수지상세포에서 널리 발현되나, PD-L2 (B7-DC)의 발현은 활성화된 수지상세포, 대식세포 및 단핵구 및 혈관내피세포로 한정된다. 몇몇 쥐 이형 종양 모델 (syngeneic tumor model)에서, PD-1 또는 PD-L1 어느 쪽의 차단은 유의적으로 종양 성장을 억제하거나 완전 퇴화를 유도하였다. 따라서, PD-1은 면역 조절 및 말초관용의 유지에 중요한 역할을 담당하는 것으로 인식된다. PD-1 안타고니스트에 해당하는 항체들의 예시로, WO 2006/121168에 개시되어 있는 니볼루맙 (nivolumab)(또한 BMS-936558 또는 MDX1 106; 항-PD-1 항체, BRISTOL-MYERS SQUIBB로 알려져 있다), WO 2009/114335에 개시되어 있는 Merck 3745 (또한, 항-PD-1 항체인 MK-3475 또는 SCH-900475로 알려져 있다), WO 2009/101611에 개시된 CT-011 (또한, hBAT 또는 hBAT-1, 항-PD-1 항체로 알려져 있다), WO 2008/156712에 개시된 람브롤리주맙 (lambrolizumab), WO 2010/027423, WO 2010/027827, WO 2010/027828 및 WO 2010/098788에 개시된 AMP514 및 또한 국제 특허 출원 WO 2004/056875, WO 2006/056875, WO 2008/083174, WO 2010/029434, WO 2010/029435, WO 2010/036959, WO 2010/089411, WO 2011/110604, WO 2012/135408 및 WO 2012/145493에 개시된 항체들을 예로 들 수 있다. 상기 PD-1 안타고니스트는 문헌이 인용된 WO 2007/005874에 개시된 MDX-1 105 (또한, BMS-936559, 항-PD-L1 항체로 알려져 있다), 또는 WO 2010/077634에 개시된 YW243.55.S70 (또한, MPDL3280A 또는 RG7446; 항-PD-L1 항체로 알려져 있다) 같은 항-PD-L1 항체에 해당할 것이다.
- [0078] Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIRs)는 자연살해세포로 불리는 면역 시스템의 중요한 세포에서 발견되는 세포 표면 단백질의 패밀리아다. 그들은 모든 세포 타입에서 발현되는 MHC 클래스 I 분자와 상호작용하여 이들 세포의 살해 기능을 조절한다. 이 상호작용은 그들로 하여금 그들의 표면에서 클래스 I MHC의 특징적인 낮은 수준을 갖는 바이러스 감염된 세포 또는 종양세포를 탐지하도록 한다. 대부분의 KIRs는 억제성이며, MHC의 인식은 그들의 NK 세포의 세포독성 활성을 억제함을 의미한다. 단지 제한된 수의 KIRs가 세포를 활성화하는 능력을 가지고 있다.
- [0079] 억제성 KIRs는 그들의 MHC 클래스 I 리간드의 관여 시 NK 세포에 억제 신호를 전달하는 Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif (ITIM)를 포함하는 긴 세포질성 꼬리를 가지고 있다. 알려진 억제성 KIRs는 KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2 및 KIR3DL3를 포함하는 KIR2DL 및 KIR3DL 서브패밀리의 구성원을 포함한다. 억제성 KIRs 안타고니스트에 해당하는 항체들의 예시로, 참고로 여기에 포함된 WO 2006/003179에 개시된 항체 1-7F9를 예로 들 수 있다.
- [0080] B7 리간드 패밀리의 구성원들은 면역 세포 및 보다 최근에는 종양 세포에 의해 강한 면역조절 활성을 갖는 것으로 알려져 있으며, 이 패밀리는 CD276 및 VTCN1을 포함한다.
- [0081] CD276 (Cluster of Differentiation 276) (B7H3, B7-H3; B7RP-2; 4Ig-B7-H3로 알려져 있다)는 B7 리간드 패밀리의 유래의 타입 I 트랜스멤브레인 단백질이며, 수지상세포에서 최초로 확인되었고, T 세포를 활성화한다. CD276은 어떤 고형암에서 발현되며, T 세포-매개된 면역 반응의 조절에 참여하는 것으로 사료된다. 보다 상세하게는, CD276은 T-헬퍼 면역 반응을 하향조절하고 면역성을 억제하는 것 같다 (SUH *et al.*, 2003). CD276 안타고니스트의 예시로, 특허 출원 US 2005/0169932 및 WO 2008/116219에 개시된 항체 8H9, WO 2011/109400에 개시된 MGA271 같은 다른 항체들을 예로 들 수 있다.
- [0082] VTCN1 (V-set domain-containing T-cell activation inhibitor 1)는 또한 B7X; B7H4; B7S1; B7-H4로 알려져 있고, 또한 B7 패밀리의 구성원이다. VTCN1은 T 세포 반응의 억제성 조절에서 역할을 담당하는 것으로 사료되며, 이 단백질의 높은 수준이 종양 진행에 연관되어 있음이 연구들을 통해 밝혀졌다. VTCN1 안타고니스트의 예시로, WO 2009/073533에 개시된 항체들을 예로 들 수 있다.
- [0083] CD272로 알려진, BTLA (B- and T-lymphocyte attenuator)는 T 세포의 활성화 동안 유도되고, Th1 세포에서 발현된 채 남아 있으나, Th2 세포에서는 그렇지 않다. BTLA는 tumor necrosis factor (receptor), herpes virus entry mediator (HVEM)로 알려져 있는 member 14 (TNFRSF14), TR2; ATAR; HVEA; CD270; LIGHTR과의 상호작용에 의한 T-세포 억제를 나타낸다. TNFRSF14는 허피스 심플렉스 바이러스 (HSV) 엔트리의 세포성 매개체로 확인되었다. 이 수용체의 세포질 영역은 면역 반응을 활성화하는 신호전달경로를 매개하는 몇몇 TRAF 패밀리 구성원과 결합하는 것으로 밝혀져 있다. 마지막으로, BTLA/HVEM 복합체는 T-세포 면역 반응을 부정적으로 조절한다.

BTLA/HVEM 안타고니스트의 예시로, WO 2008/076560, WO 2010/106051 및 WO 2011/014438에 개시된 항체들을 예로 들 수 있다.

[0084] LAG3 (Lymphocyte-activation gene 3, 또한 CD223로 알려져 있다)는 이뮤노글로불린 (Ig) 슈퍼패밀리에 속하며, 4개의 세포의 Ig-유사 도메인을 포함한다. LAG3 안타고니스트의 예시로, WO 2010/019570에 개시된 항체들을 예로 들 수 있다.

[0085] HAVCR2 (Hepatitis A virus cellular receptor 2, 또한 Tim-3, KIM-3; TIMD3; Tim-3; 및 TIMD-3로 알려져 있다)는 이뮤노글로불린 슈퍼패밀리에 속하는 Th1-특이 세포 표면 단백질이다. HAVCR2는 대식세포 활성화를 조절하고 Th1-매개 자가- 및 동종-면역 반응을 억제하여 면역 관용을 촉진한다. HAVCR2 안타고니스트의 예시로, WO 2013/006490A에 개시된 항체들을 예로 들 수 있다.

[0086] ADORA2A (adenosine A_{2A} receptor, 또한, A2aR, RDC8; 또는 ADORA2로 알려져 있다)는 클래스 및 서브타입으로 세분화되는 guanine nucleotide-binding protein (G protein)-coupled receptor (GPCR) 슈퍼패밀리에 속한다. 이 단백질은 많은 생물학적 기능, 예컨대, 심장리듬 및 순환, 뇌 및 신장 혈류, 면역 기능, 통증 조절 및 수면에서 중요한 역할을 담당한다. 병리적인 상태, 예컨대, 염증 질환 및 신경퇴행적 장애에 관련되어 있다.

[0087] 상기 항체 또는 이의 단편 및 상기 컨쥬게이트는 연결되어 있지 않다.

[0088] 핵산 및 벡터

[0089] 여기에 사용된, 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 RNA 또는 DNA, 바람직하게는 DNA를 의미한다.

[0090] 바람직하게는, 그러한 "폴리뉴클레오타이드"는 유전자 발현 서열에 작동 가능하게 연결되어 있고, 원핵세포 또는 진핵세포, 바람직하게는 진핵세포에서 핵산의 발현을 유도한다. "유전자 발현 서열"은 임의의 조절성 뉴클레오타이드 서열, 예컨대, 프로모터 서열 또는 프로모터-인핸서 조합이며, 작동 가능하게 연결되어 이뮤노사이토카인 핵산의 효과적인 전사 및 번역을 촉진한다. 유전자 발현 서열은, 예를 들어, 포유동물 또는 바이러스 프로모터, 예컨대, 항시성 또는 유도성 프로모터일 것이다.

[0091] 포유동물의 항시성 프로모터는 다음의 유전자에 대한 프로모터를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다: 하이포잔틴 포스포리보실 트랜스퍼라아제 (hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPTR)), 아데노신 디아미나아제 (adenosine deaminase), 피루베이트 키나아제 (pyruvate kinase), 베타-액틴 프로모터 (beta-actin promoter), 근육 크레아틴 키나아제 프로모터 (muscle creatine kinase promoter), 인간 신장 인자 프로모터 (human elongation factor promoter) 및 다른 항시성 프로모터. 진핵세포에서 구성 요소로서 기능을 수행하는 예시적인 바이러스 프로모터는, 예를 들어, 원숭이 바이러스 (즉, SV40), 파필로마 바이러스, 아데노바이러스, 인간 면역 결핍 바이러스 (HIV), 사이토메갈로 바이러스 (CMV), 라우스 육종 바이러스 (RSV), B형 간염 바이러스 (HBV), 말로니 류케미아 바이러스 및 다른 레트로바이러스의 long terminal repeats (LTR) 유래의 프로모터 및 허피스 심플렉스 바이러스의 티미딘 키나아제 프로모터를 포함한다. 다른 항시성 프로모터들은 당업자에게 알려져 있다.

[0092] 유전자 발현 서열로 유용한 프로모터는 또한 유도성 프로모터들을 포함한다. 유도성 프로모터들은 유도제의 존재에서 발현된다. 예를 들어, 프로모터 내 메탈로티온 (metallothione)은 특정한 금속 이온의 존재에서 전사 및 번역을 촉진하기 위해 유도된다. 다른 유도성 프로모터들은 당업자에게 알려져 있다.

[0093] 일반적으로, 유전자 발현 서열은 필수적으로, 전사 및 번역의 개시에 관련된 각각 5' 비-전사 및 5' 비-번역 서열, 예컨대, TATA 박스, 캡핑 서열, CAAT 서열 등을 포함한다. 특히, 그러한 5' 비-전사 서열은 작동 가능하게 연결된 핵산의 전사 조절을 위한 프로모터 서열을 포함하는 프로모터 영역을 포함할 것이다. 유전자 발현 서열은 설계될 때 인핸서 서열 또는 업스트림 활성화인자 서열을 선택적으로 포함한다. 여기에 사용된, 본 발명의 이뮤노사이토카인을 인코딩하는 핵산 서열과 유전자 발현 서열은 유전자 발현 서열의 영향 또는 조절 하에서 본 발명의 이뮤노사이토카인 코딩 서열의 발현 또는 전사 및/또는 번역을 배치하기 위한 그러한 방식으로 상기 "작동 가능하게 연결된다"라고 한다.

[0094] 2개의 DNA 서열은 만약 5' 유전자 발현 서열에서 프로모터의 유도를 통해 본 발명의 이뮤노사이토카인의 전사가 일어나고, 2개의 DNA 서열 간의 연관된 근원이 (1) 프레임-시프트 돌연변이의 도입, (2) 본 발명의 이뮤노사이토카인의 전사를 유도하는 프로모터 영역의 능력을 방해, 또는 (3) 단백질로 번역되도록 하는 해당 RNA 전사체의 능력을 방해하지 않는다면 작동 가능하게 연결된다고 한다. 그리하여, 만약 유전자 발현 서열이 핵산 서열의 전사에 영향을 줄 수 있고, 결과적으로 생긴 전사체가 설계된 폴리펩타이드로 번역된다면 유전자 발현 서열은

본 발명의 이뮤노사이토카인을 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결될 것이다.

- [0095] 유리하게는, pre-mRNA 분자는 보통 제조합 분자의 생산 수율을 개선하는 것으로 입증되어 있어 상기 핵산 서열은 인트론을 포함한다. 인트론의 임의의 서열이 사용될 것이며, 예컨대, ZAGO 등 (*Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol.52(Pt 3), p: 191-8, 2009) 및 CAMPOS-DA-PAZ 등 (*Mol. Biotechnol.*, vol.39(2), p: 155-8, 2008)에서 개시된 것들을 예로 들 수 있다.
- [0096] 컨쥬게이트 또는 면역조절 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 인 비보에서 스스로 또는 벡터에 결합되어 전달될 것이다.
- [0097] 넓은 의미에서, "벡터"는 본 발명의 이뮤노사이토카인을 코딩하는 핵산의 세포로의 전달을 촉진할 수 있는 임의의 비히클이다. 바람직하게는, 벡터는 벡터가 없을 때 생길 수 있는 분해 정도에 비해 감소된 분해로 세포에 핵산을 전달한다. 일반적으로, 본 발명에 유용한 벡터는 플라스미드, 코스미드, 파지미드, 에피솜, 인공 염색체, 바이러스, 이뮤노사이토카인 핵산 서열의 삽입 또는 결합에 의해 조작된 바이러스 또는 박테리아 공급원 유래 다른 비히클을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0098] 플라스미드 벡터는 벡터의 바람직한 형태이며, 종래기술에 널리 기재되어 있고, 당업자에게 잘 알려져 있다. SANBROOK 등, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989를 볼 것. 플라스미드의 비제한적 예시로, pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 및 pBlueScript를 포함하며, 다른 플라스미드들은 당업자에게 잘 알려져 있다. 추가로, 플라스미드는 DNA의 특정 단편들을 제거 및 부가하기 위해 제한효소 및 라이게이션 반응을 이용하여 설계되는 관습을 따를 것이다.
- [0099] 바람직하게는, 핵산 벡터는 박테리아 및 포유동물 세포 둘 다에서 활성이 있는 선별 마커를 포함할 수 있다.
- [0100] **약학 조성물 및 치료 방법**
- [0101] 여기에 사용된, 용어 "대상체"는 포유동물, 예를 들어, 설치류, 고양이과, 개, 또는 영장류, 및 가장 바람직하게는 인간을 의미한다.
- [0102] 본 발명의 약학 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 것이다.
- [0103] 표현 "약학적으로 허용 가능한"은 생리학적으로 견딜만하고, 일반적으로 인간에게 투여될 때 알려지 또는 유사한 바람직하지 못한 반응, 예를 들어, 위장 전도 (gastric upset), 현기증 등을 야기하지 않는 물질 (molecular entities) 또는 조성물을 의미한다. 바람직하게는, 여기에 사용된, 표현 "약학적으로 허용 가능한"은 동물 및 더 바람직하게는 인간에서 사용하기 위해 연방 또는 주 정부의 감독 기관에 의해 승인받을 수 있거나 미국 약전 또는 다른 일반적으로 공인된 약전에 나열되어 있음을 의미한다.
- [0104] 용어 "담체"는 용매, 아쥘런트, 부형제, 또는 화합물이 투여되는 비히클을 의미한다. 그러한 약학적 담체는 멸균액, 예를 들어, 물과 석유, 동물, 식물 또는 합성 오리진의 오일, 예를 들어, 땅콩오일, 콩기름, 미네랄 오일, 참기름 등을 포함하는 오일일 수 있다.
- [0105] 본 발명의 문맥에서, 여기에 사용된, 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 그러한 용어가 적용되는 장애 또는 질병, 또는 그러한 장애 또는 질병의 하나 이상의 증상을 예방하거나, 그것의 진행을 역전, 완화, 억제하는 것을 의미한다. 여기에 사용된 표현 "암을 치료하는"은 암세포의 생장의 억제를 의미한다. 바람직하게는, 그러한 치료는 또한 종양 생장의 퇴화, 즉, 측정 가능한 종양 크기의 감소로 이어진다. 가장 바람직하게는, 그러한 치료는 종양의 완전한 퇴화로 이어진다.
- [0106] 표현 "치료적 유효량"은 암세포의 생장을 억제하기에 충분한 함량, 바람직하게는 종양 생장의 퇴화를 유도하기에 충분한 함량을 의미한다. 투여량은 다양한 파라미터의 함수, 특히 사용된 투여 방식, 관련 병리학, 또는 양자택일로 처치의 바람직한 기간의 함수에 따라 변경될 수 있다. 물론, 약학 조성물의 제형, 투여 경로, 투약량 및 섭생은 당연히 처치 조건, 질환의 심각도, 나이, 체중 및 대상체의 성별 등에 달려 있다. 유효 용량의 범위는 본 발명에 제한되어서는 안되나, 바람직한 용량의 범위를 제시한다. 그러나, 바람직한 용량은 과도한 실험 없이 당업자에 의해 이해되거나 결정될 수 있어 각 대상체에 맞출 수 있다.
- [0107] 본 발명의 혼합의 현저한 효율면에서, 당업자는 대상체를 치료하기 위한 매우 소량의 용량을 이용하는 것으로 계획할 수 있다.
- [0108] 비제한적 예시로, 본 발명의 면역억제 수용체 안타고니스트 항체는 500 $\mu\text{g/kg}$ 이하, 바람직하게는, 100 $\mu\text{g/kg}$ 이하, 및 가장 바람직하게는 50 $\mu\text{g/kg}$ 이하의 용량으로 주사 투여될 수 있다.

- [0109] 바람직하게는, 상기 면역억제 수용체 안타고니스트 항체는 적어도 1 $\mu\text{g/kg}$ subject, 바람직하게는, 적어도 5 $\mu\text{g/kg}$ subject, 및 가장 바람직하게는 적어도 10 $\mu\text{g/kg}$ subject의 용량으로 주사 투여될 수 있다.
- [0110] 비제한적 예시로, 본 발명의 컨쥬게이트는 60 $\mu\text{g/kg}$ subject 이하, 바람직하게는 10 $\mu\text{g/kg}$ subject 이하, 및 가장 바람직하게는 5 $\mu\text{g/kg}$ subject 이하의 용량으로 주사 투여될 수 있다.
- [0111] 바람직하게는, 상기 컨쥬게이트는 적어도 0.5 $\mu\text{g/kg}$ subject, 바람직하게는 적어도 0.7 $\mu\text{g/kg}$ subject, 및 가장 바람직하게는 적어도 0.8 $\mu\text{g/kg}$ subject의 용량으로 주사 투여될 수 있다.
- [0112] 예를 들어, 투여 단계는 국소, 구강, 비강, 안구 내, 정맥 내, 근육 내, 종양 내 또는 피하 투여 등에 해당될 수 있다. 바람직하게는, 이들 투여 단계는 주사에 해당한다. 그러므로, 컨쥬게이트, 면역조절 항체 또는 이의 단편, 그러한 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 그러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터는 주사되는 제형을 위해 약학적으로 허용 가능한 비히클에 결합되어 있다. 이들은 특히 등장, 살균, 식염 용액 (모노소듐 또는 디소듐 포스페이트, 소듐, 포타슘, 칼슘 또는 마그네슘 클로라이드 등 또는 그러한 염의 혼합), 또는 건조, 특히 추가 시 경우에 따라 살균수 또는 생리 식염의 동결-건조된 조성물일 것이다. 적당한 약학적 담체는 E.W. Martin의 "Remington's Pharmaceutical Sciences" 에 기재되어 있다.
- [0113] 컨쥬게이트, 면역조절 항체 또는 이의 단편, 그러한 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 그러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터는 버퍼 또는 물 또는 에멀전, 마이크로에멀전, 하이드로겔 (예를 들어, PLGA-PEG-PLGA 트리블록 공중합체 기반 하이드로겔), 마이크로스피어, 나노스피어, 미세입자, 나노입자 (예를 들어, 폴리(락틱-코-글리콜릭 애시드)(poly(lactic-co-glycolic acid)) 미세입자 (예를 들어, poly lactic acid(PLA); poly (lactide-co-glycolic acid)(PLGA); polyglutamate 마이크로스피어, 나노스피어, 미세입자 또는 나노입자), 리포솜, 또는 다른 생약 제형에 결합되어 용해될 것이다. 모든 경우에서, 제형은 살균되어야 하며, 허용 가능한 주사 가능성 (syringability)의 정도로 유동적이어야 한다. 제조 및 저장 조건하에서 안정해야 하며, 박테리아 및 곰팡이 등의 미생물의 오염 영향에 반하여 보존되어야 한다.
- [0114] 유리 염기 또는 약학적으로 허용 가능한 염으로서 활성 화합물의 용액은 계면활성제, 예컨대 하이드록시프로필 셀룰로오스와 적절히 혼합된 물에서 제조될 수 있다.
- [0115] 분산은 또한 글리세롤, 액상 폴리에틸렌 글리콜 및 이의 혼합물 및 오일에서 제조될 수 있다. 저장 및 사용의 보통 조건하에서, 이들 제조는 미생물의 성장을 예방하기 위한 방부제를 포함한다.
- [0116] 컨쥬게이트, 면역조절 항체 또는 이의 단편, 그러한 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 그러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터는 중성 또는 염 형태로서 조성물에 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염은 예를 들어, 염산 또는 인산 같은 무기산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등의 그러한 유기산으로 형성되는 산 부가염 (단백질의 유리 아미노기로 구성됨)을 포함한다. 유리 카르복실기로 구성된 염은 또한 무기 염기, 예를 들어, 소듐, 포타슘, 암모늄, 칼슘, 또는 수산화철 및 그러한 유기 염기, 예를 들어, 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유래될 수 있다.
- [0117] 담체는 또한 용매 또는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액상 폴리에틸렌 글리콜 등), 이의 적당한 혼합 및 식물성 오일을 포함하는 분산 매체일 수 있다. 폴리펩타이드는 또한 생물학적 적용도 (biodisponibility)를 증가시키기 위해 예를 들어 폐길화에 의해 변형될 것이다.
- [0118] 적당한 유동성은 예를 들어, 레시틴 같은 코팅의 사용에 의해, 분산의 경우에서 요구되는 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 억제는 다양한 항균 및 항곰팡이제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에서, 등장제 (isotonic agent), 예를 들어, 당 또는 소듐 클로라이드가 바람직할 것이다.
- [0119] 주사 조성물의 장기 흡수는 흡수 지연제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트, 젤라틴, 폴리올 및 반감기 향상 공유 및 비공유 제형의 조성물로 사용하여 달성될 수 있다.
- [0120] 가수분해 및 변성을 포함하여 펩타이드 불안정성 또는 분해의 수많은 원인이 있다. 소수성 상호작용은 분자들이 함께 엉기는 것 (즉, 응집)을 유발할 것이다. 안정제는 그러한 문제를 줄이거나 예방하기 위해 첨가될 것이다.
- [0121] 안정제는 사이클로덱스트린 및 이의 유도체 (미국 특허 제5,730,969호를 볼 것)를 포함한다. 적당한 방부제, 예컨대, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 트레할로스, 텍스트란 및 글리세린이 또한 최종 제형을 안정시키기 위해 부가될 수 있다. 이온 및 비이온성 계면활성제, D-글루코스, D-갈락토스, D-자일로스, D-갈락투론산, 트레할로스, 텍스트란, 하이드록시에틸 전분 및 이의 혼합으로부터 선택된 안정제가 상기 제형에 부가될 것이다. 알칼리 금

속염 또는 마그네슘 클로라이드의 부가는 펩타이드를 안정시킬 것이다. 펩타이드는 또한 텍스트란, 콘드로이틴 황산, 전분, 글리코겐, 텍스트린 및 알긴산 염으로 구성된 그룹에서 선택된 당류와 접촉하여 안정화될 것이다. 부가될 수 있는 다른 당으로 단당류, 이당류, 당알코올 및 이의 혼합 (예를 들어, 글루코스, 만노스, 갈락토스, 프룩토스, 수크로스, 말토스, 락토스, 만니톨, 자일리톨)을 포함한다. 폴리올은 펩타이드를 안정시킬 것이며, 물과 섞일 수 있거나, 물에 녹을 수 있다. 적당한 폴리올로 만니톨, 글리콜, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 트리메틸 글리콜, 비닐 피롤리돈, 글루코스, 프룩토스, 아라비노스, 만노스, 말토스, 수크로스 및 이의 중합체를 포함하는 폴리하이드록시 알코올, 단당류 및 이당류일 것이다. 다양한 부형제 역시 혈청 알부민, 아미노산, 헤파린, 지방산 및 인지질, 계면활성제, 금속, 폴리올, 환원제, 금속 킬레이팅제, 폴리비닐 피롤리돈, 가수분해된 젤라틴 및 암모늄 설페이트를 포함하여, 펩타이드를 안정화할 것이다.

[0122] 하기에서, 본 발명은 아미노산 서열, 핵산 서열 및 예시들을 참조하여 보다 구체적으로 기재되어 있다. 그러나, 구체적인 예시들에 의해 본 발명이 한정되어서는 안된다. 오히려, 본 발명은 여기에 예시로 명시적으로 언급되지 않은 것을 구체적으로 포함하는 임의의 구체예를 포함하나, 당업자는 과도한 노력 없이 찾을 수 있다.

[0123] 실시예

[0124] 1) PD1/PD-L1 압 모델

[0125] BALB/C 마우스의 오른쪽 옆구리에 CT26 종양 세포 (2×10^5 /mouse)를 피하주사하였다. 9일에 종양이 $20-30 \text{ mm}^2$ 에 도달할 때, $250 \text{ } \mu\text{g}/\text{mouse}$ 의 항-PD1 (BIOXCELL, clone RPM1-14, #BE0146) 단독 또는 아이소타입 대조군 (rat IgG2a; BIOXCELL, clone 2A3, #BE0089)을 마우스에 처리하였다. 항-PD1 (a-PD1) 또는 아이소타입 대조군 (2A3)을 9일, 12일 및 15일에 주사하였다. 13일에서 37일까지, 마우스에 1주에 2회씩 $2 \text{ } \mu\text{g}$ 의 RLI CHO (1004-14p) 또는 대조군으로 PBS를 처리하였다. 종양은 칼리퍼를 사용하여 주당 3회 측정하였고, 종양 면적은 다음과 같이 계산하였다: 길이 \times 너비. 마우스는 종양 크기가 300 mm^2 에 도달하거나 궤양화 되었을 때 희생시켰다.

[0126] 프로토콜은 도 1에 도시하였다. CT26 종양을 갖고 있는 마우스는 9일에서 15일까지 3회, 3 용량 ($250 \text{ } \mu\text{g}/\text{dose}$)의 항-PD1 또는 아이소타입 대조군을 받았다. RLI 처리 ($2 \text{ } \mu\text{g}/\text{dose}$)는 주당 2회씩 13일에서 37일까지 주사되었다.

[0127] CT26 종양 모델은 PD-L1 (PD1의 리간드; (DURAISWAMY *et al*, *Cancer Res.*, Jun 5, 2013)을 발현했고, PD1 수용체를 높게 발현하는 T 세포에 의해 침윤되었다. 도 2는 CT26 모델에서 PD-1 및 Tim-3를 함께 발현하는 높은 빈도의 종양 침윤 CD8+ T 세포를 보여준다. CT26 종양을 갖고 있는 마우스에서 분리된 비장 및 종양을 염색하고 플로우 사이토메트리에 의해 분석하였다. CD3+ CD8+ T 세포에서 Tim-3 및 PD-1의 공동-발현이 비장 (왼쪽 패널) 및 종양 (오른쪽 패널)에서 보인다.

[0128] 도 3은 앞서 개시된 프로토콜에 따라 항-PD1 (aPD1) 또는 대조군 (2A3), RLI 또는 대조군 (PBS) 또는 두 처리의 병용 (aPD1 + RLI)이 처리된 CT26 종양을 갖고 있는 마우스에서 종양 크기의 진전을 나타낸다. (A)는 각 그룹에서 종양 성장 ($n=5 \text{ mice}/\text{group}$), (B)는 (A)에서와 같으나, 두 번째 실험 결과, (C)는 각 그룹에서 완전한 종양 퇴화를 나타내는 마우스의 비율, (D-G)는 대조군 처리된 그룹 (D), RLI 단독 처리된 그룹 (F), aPD1 단독 처리된 그룹 (F) 및 aPD1 + RLI 처리된 그룹 (F)에서 각 마우스의 종양 성장 (실험 1 및 2의 병용, $n=10$)이다. 통계 실험은 2-way ANOVA. * $p<0.05$; *** $p<0.001$ 를 사용하여 결정하였다.

[0129] 도 4는 항-PD1/RLI 혼합 처리가 마우스의 전체 생존을 증가시키는 것을 나타낸다. A는 각 처리 그룹에서 전체 생존 ($n=10/\text{group}$)이다.

[0130] 따라서, 항-PD1+RLI 병용 처리는 단독 그룹과 비교하여 항종양 효과를 향상시키는 것으로 나타났다. 특히, RLI/aPD1 처리는 완전한 종양 퇴화를 보이는 마우스의 수와 전체 생존을 증가시킨다 (도 3C 및 4). 놀랍게도, CT26 종양의 전체 경감 후 145일에 다시 RLI 및 항-PD1의 병용 처리된 종양이 없는 마우스는 종양 생장이 전혀 없어, 보호적인 항-종양 면역성이 지속되고 있음을 시사한다 (미도시됨). 이들 결과는

[0131] i) RLI 단독 처리는 종양 접종 후 10일에 처리를 시작하면 종양 성장에 영향을 주지 않으며,

[0132] ii) 그때에, 항-PD1은 생존을 향상시키나, 완전한 퇴화는 거의 유도하지 않음 (5.9%)을 입증하는 다른 일련의 실험들에서 확인되었다.

[0133] 항-PD1 및 RLI의 병용은 생존과 오래도록 지속되는 완전한 경감 (30.4%)을 증가시켰다. 이 병용은 효과적인 항종양 메모리 면역 반응을 유도하였다. 왜냐하면, 종양 복귀를 나타내지 않는 치료받은 마우스의 전체 퇴화 및

재-처리 후 145일 동안 마우스는 여전히 종양이 없었기 때문이다 (미도시됨).

[0134] BALB/C 마우스의 오른쪽 옆구리에 CT26 종양 세포 (2×10^5 /mouse)를 피하주사하였다. 10일에서 저용량의 항-PD1 (clone mBAT, 12 μ g/mouse) 또는 대조군, 2 μ g RLI CHO (1004-15p) 또는 대조군 또는 두 처리의 혼합을 마우스에 i.p. 처리하였다. 1주일 후 (17일) 마우스에 항-PD1, RLI 또는 대조군을 두 번째 주사하였다. 종양은 캘리퍼를 사용하여 2일 마다 측정하였고, 종양 면적은 다음과 같이 계산하였다: 길이 \times 너비. 마우스는 종양 크기가 300 mm²에 도달하거나 궤양화 되었을 때 희생시켰다. 프로토콜은 도 5에 도시하였다.

[0135] 도 6은 RLI와 병용하여 저용량의 항-PD1를 2회 i.p. 주사한 CT26 종양을 갖는 마우스에서 CT26 종양 성장을 나타낸다. 통계 실험은 2-way ANOVA. *** p<0.001를 사용하여 결정하였다.

[0136] 이 결과는, 저용량의 항-PD1 또는 RLI 단독은 원발성 피하 종양 성장의 억제를 지원할 수 없는 것으로 나타났다. 그러나, 저용량의 항-PD1과 RLI의 병용 처리는 종양 성장 억제를 가능케 하였다. 이 실험은 RLI이 항-PD1 실험의 차선의 용량으로 조차 종양 성장을 방지하는 항-PD1 전략을 도출 수 있음을 확인해주었다.

[0137] 마지막으로, 저용량의 병용은 현저한 시너지를 이끌어 강한 종양 성장 억제를 유도하는 것 같다.

[0138] 2) 전이성 흑색종

[0139] B16F10 종양은 0일에 C57BL/6 마우스의 옆구리에 3×10^4 B16F10 세포의 i.d. 주사에 의해 이식된다. 2 μ g의 RLI CHO와 함께 7일에서 25일까지 1주에 2회씩 i.p. 주사된 RLI CHO (2 μ g/mouse)와 병용하거나 그렇지 않고 항-CTLA-4 (clone: UC10-4F10-11 100 또는 clone: 9D9) 또는 항-PD-1 (clone RPM1-14, #BE0146) 또는 항-PD-L1 mAb (clone: 10F.9G2)을 마우스에 i.p. 처리하였다. 주사 시 항-CTLA-4 또는 항-PD-1 또한 항-PD-L1 항체의 용량은 3일에 200 μ g + 6일 및 9일에 100 μ g이다. 대조군은 해당 용량의 항체 아이소타입을 받았다. 종양 크기 및 발생 정도는 신체 검사를 하여 시간 마다 추적 관찰하였다.

[0140] 3) 진행성 폐암

[0141] 종양세포주, TC-1은 C57BL/6 마우스의 원발성 폐 상피 세포에서 유래하였고, 형질전환된 인간 파필로마 바이러스 16 (HPV-16) E6/E7 및 c-Ha-Ras가 존재한다. 1×10^5 의 TC-1 폐암세포를 C57BL/6 마우스의 등에서 상부 진피에 s.c. 주사하였다. 종양이 명백하게 보이고, $\sim 15\text{--}20$ mm²의 크기로 감지될 때 상응하는 종양 접종 후 10일에 치료를 개시한다. 항-CTLA-4 mAb (100 μ g/mouse, clone: UC10-4F10-11 100 또는 clone: 9D9) 또는 항-PD-1 (250 μ g/mouse, clone RPM1-14, #BE0146) 또는 항-PD-L1 mAb (100 μ g/mouse, clone: 10F.9G2)를 세 번의 단일 시간 시점 (10, 14, 17일)에서 제공하고, RLI (2 μ g/mouse)는 10, 13 및 18일에 제공한다. 마지막 시점까지 주당 2회씩 측정된 종양 성장을 이용하여 단일 시약 대 RLI와 각 항체의 이중 병용 처리를 비교하였다. 대조군은 해당 용량의 항체 아이소타입을 받았다.

[0142] 4) 진행성 방광암

[0143] MB49 종양세포주는 C57BL/6 수컷 마우스에서 유래된 방광 상피 오리진의 발암물질에 의해 유도된 종양으로부터 기원한다. 1×10^6 의 MB49 방광암 세포를 C57BL/6 마우스의 등에서 상부 진피에 s.c. 주사하였다. 종양이 명백하게 보이고, ~ 15 mm²의 크기로 감지될 때 상응하는 종양 접종 후 6일에 치료를 개시한다. 항-CTLA-4 mAb (100 μ g/mouse, clone: UC 10- 4F10-11 100 또는 clone: 9D9) 또는 항-PD-1 (100 μ g/mouse, clone RPM1-14, #BE0146) 또는 항-PD-L1 mAb (100 μ g/mouse, clone: 10F.9G2)를 세 번의 단일 시간 시점 (6, 9, 12일)에서 제공하고, RLI (2 μ g/mouse)는 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16일 및 17일에 제공한다. 대조군은 해당 용량의 항체 아이소타입을 받았다. 종양은 캘리퍼를 사용하여 주당 3회씩 측정하였고, 종양 면적은 다음과 같이 계산하였다: 길이 \times 너비. 마우스는 300 mm²에 도달하거나 궤양화되었을 때 희생시켰다.

[0144] 5) 유방암

[0145] 0일에 5×10^4 의 4T1 유방암 세포를 BALB/c 마우스의 유선에 접종하였다. 종양이 명백하게 보이고, $\sim 15\text{--}20$ mm²의 크기로 감지될 때 상응하는 종양 접종 후 10일에 치료를 개시한다. 항-CTLA-4 mAb (100 μ g/mouse, clone: UC10-4F10-1 1 100 또는 clone: 9D9) 또는 항-PD-1 (250 μ g/mouse, clone RPM1-14, #BE0146) 또는 항-PD-L1 mAb (200 μ g/mouse, clone: 10F.9G2)를 세 번의 단일 시간 시점 (10, 13, 16일)에서 제공하고, RLI (2 μ

/mouse)는 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19 및 20일에 제공한다. 단일 시약 대 RLI과 각 항체의 이중 병용 처리를 비교하였다. 대조군은 해당 용량의 항체 아이소타입을 받았다. 종양은 캘리퍼를 사용하여 주당 3회 측정하였다. 마우스는 27일에 희생시켰다. 쌍안 현미경 하에서 폐 전이성 결절을 계수하였다.

[0146]

[0147]

6) 난소암

[0148]

ID8-VEGF 난소 암종 세포주는 마우스 난소 상피 혈청 유두상 선암 세포주로부터 이미 개발되었다. C57BL/6 마우스의 오른쪽 옆구리에 어느 하나의 5×10^6 의 ID8 종양 세포를 피하 이식하였다. 종양이 명백하게 보이고, ~ 15-20 mm²의 크기로 감지될 때 상응하는 종양 접종 후 10일에 치료를 개시한다. 항-CTLA-4 mAb (100 µg/mouse, clone: UC10-4F10-11 100 또는 clone: 9D9) 또는 항-PD-1 (250 µg/mouse, clone RPM1-14, #BE0146) 또는 항-PD-L1 mAb (200 µg/mouse, clone: 10F.9G2)은 네 번의 단일 시간 시점 (10, 13, 16일)에서 제공하고, RLI (2 µg/mouse)는 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19 및 20일에 제공한다. 마지막 시점까지 주당 2회씩 측정된 종양 생장을 이용하여 단일 시약 대 RLI과 각 항체의 이중 병용 처리를 비교하였다. 대조군은 해당 용량의 항체 아이소타입을 받았다. 종양은 캘리퍼를 사용하여 주당 3회씩 측정하였고, 종양 면적은 다음과 같이 계산하였다: 길이×너비. 마우스는 300 mm²에 도달하거나 궤양화되었을 때 희생시켰다.

[0149]

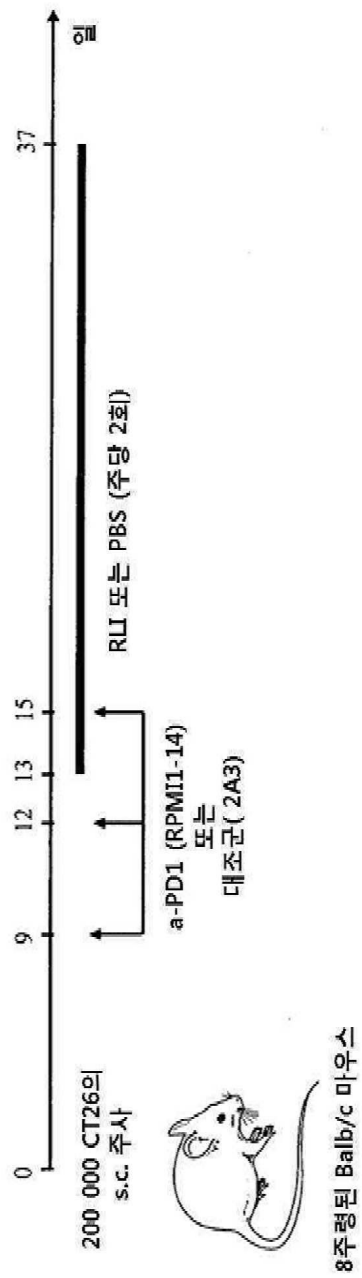
7) 전립선암: RM-1

[0150]

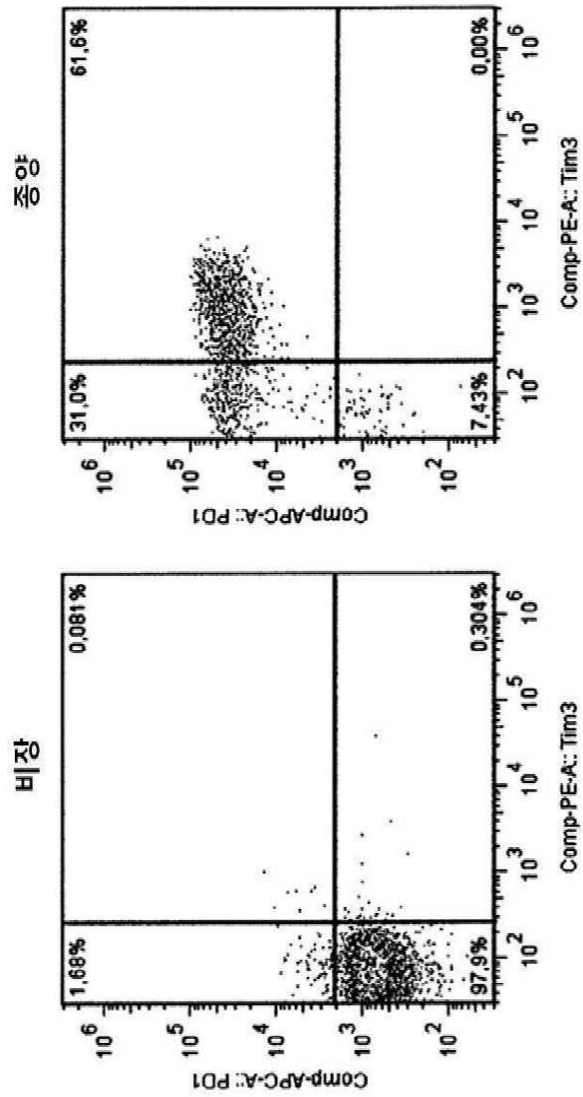
C57BL/6 암컷 마우스에 2×10^5 의 RM-1 쥐 전립선암 세포를 s.c. 접종하였다. 종양이 명백하게 보이고, ~ 15-20 mm²의 크기로 감지될 때 상응하는 종양 접종 후 3일에 치료를 개시한다. 항-CTLA-4 mAb (100 µg/mouse, clone: UC10-4F10-11 100 또는 clone: 9D9) 또는 항-PD-1 (250 µg/mouse, clone RPM1-14, #BE0146) 또는 항-PD-L1 mAb (200 µg/mouse, clone: 10F.9G2)은 세 번의 단일 시간 시점 (3, 6, 9일)에서 제공하고, RLI (2 µg/mouse)는 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 18 및 19일에 제공한다. 마지막 시점까지 주당 2회씩 측정된 종양 생장을 이용하여 단일 시약 대 RLI과 각 항체의 이중 병용 처리를 비교하였다. 대조군은 해당 용량의 항체 아이소타입을 받았다. 종양은 캘리퍼를 사용하여 주당 3회씩 측정하였고, 종양 면적은 다음과 같이 계산하였다: 길이×너비. 마우스는 300 mm²에 도달하거나 궤양화되었을 때 희생시켰다.

도면

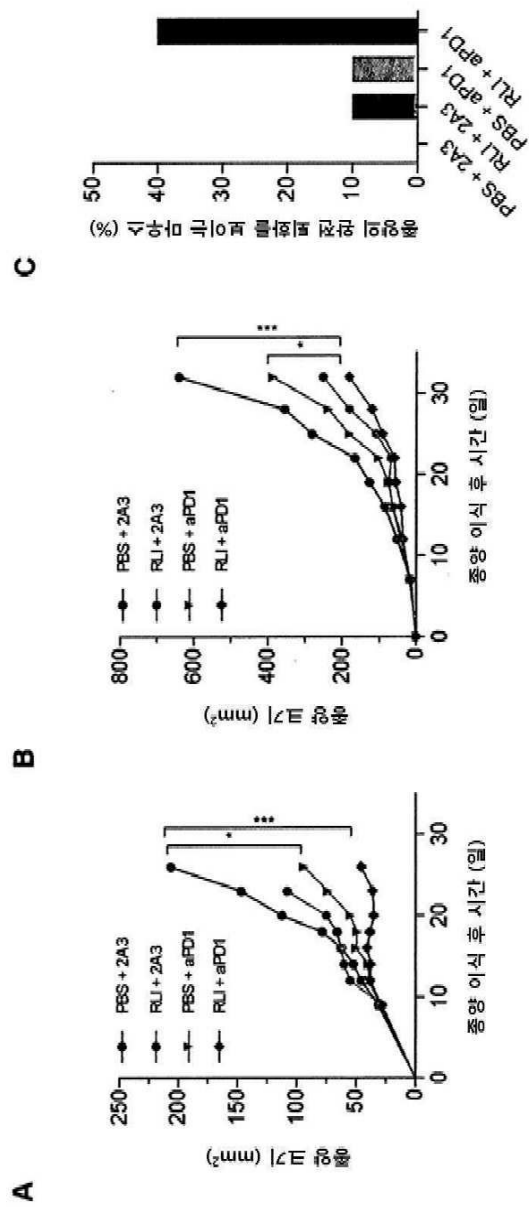
도면1



도면2

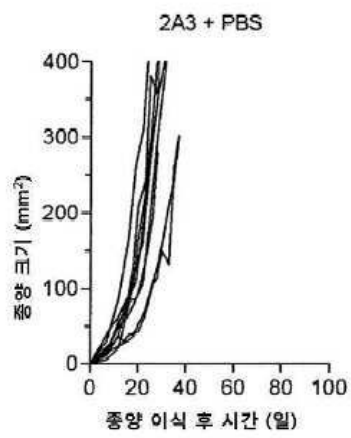


도면3a

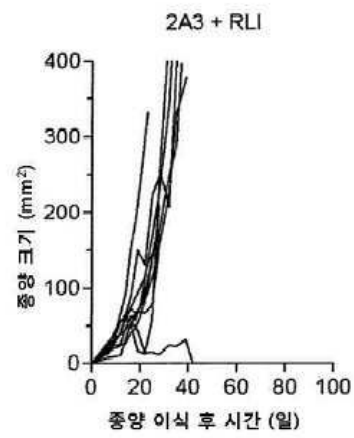


도면3b

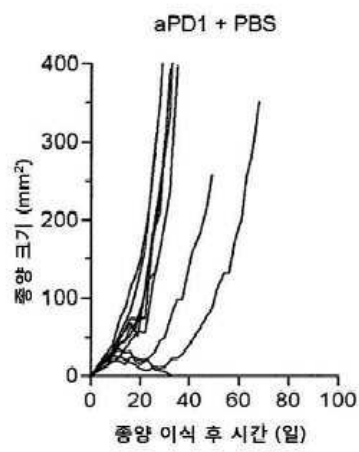
D



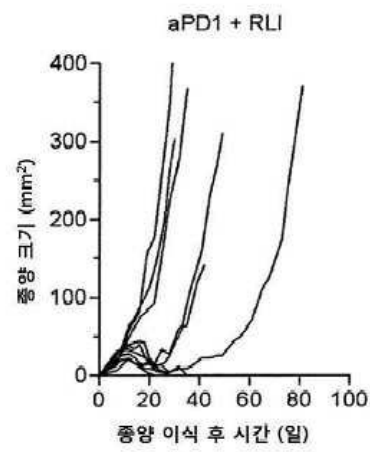
E



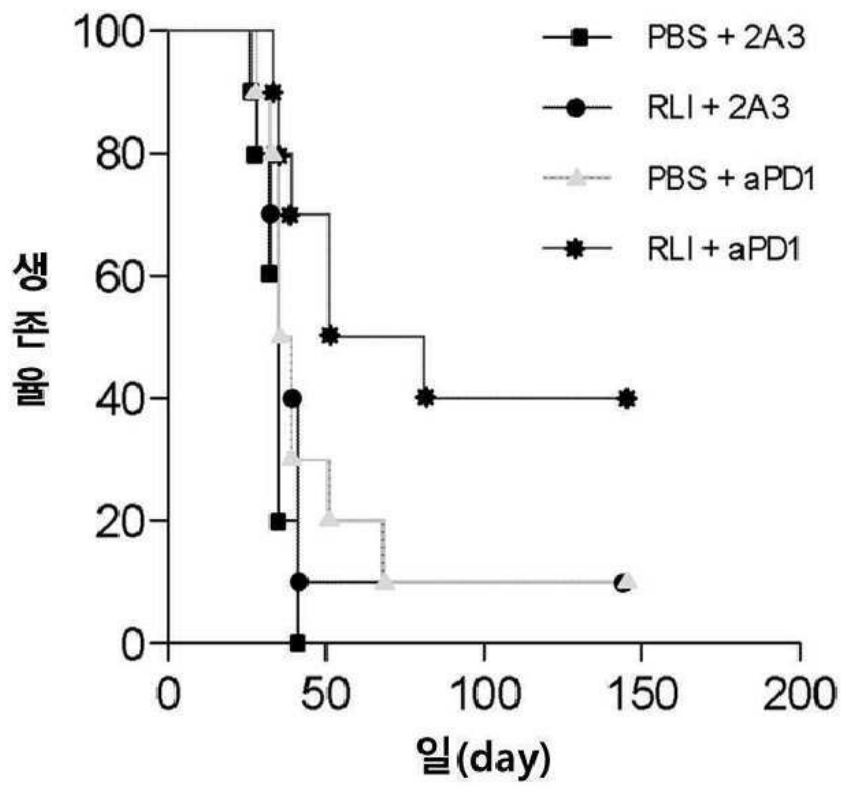
F



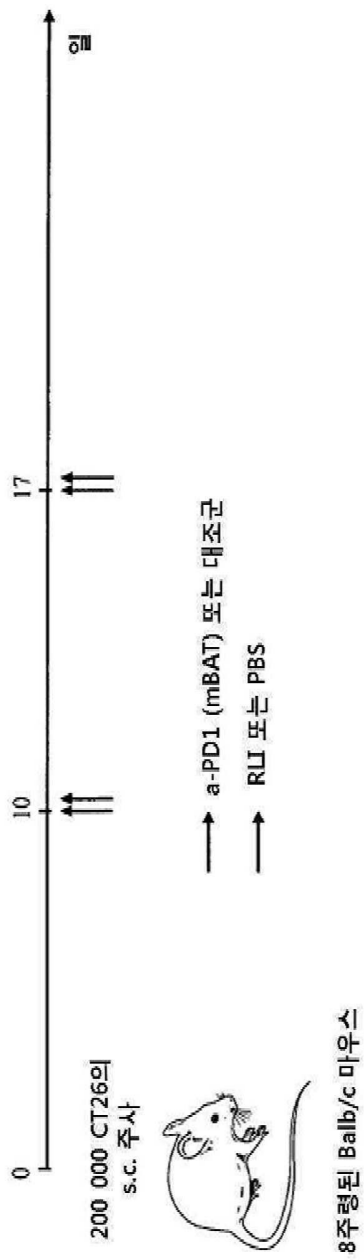
G



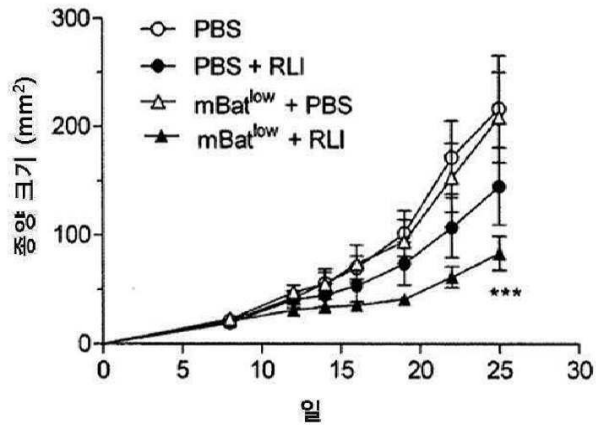
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> CYTUNE PHARMA
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY (IGR)
- <120> Combined pharmaceutical composition
- <130> I22010C0162P/DE
- <150> EP 13003964.7
- <151> 2013-08-08
- <160> 17
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 114
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> mammalian interleukin 15 consensus sequence
- <220><221> UNSURE
- <222> (1)
- <223> X=N,S,T or I
- <220><221> UNSURE
- <222> (3)
- <223> X= V, H, I, Q or E
- <220><221> UNSURE
- <222> (4)
- <223> X= N, Y, F or D

<220><221> UNSURE

<222> (6)

<223> X= I or R

<220><221> UNSURE

<222> (7)

<223> X= S, N, L, Y, K or R

<220><221> UNSURE

<222> (10)

<223> X= K, E, R or Q

<220><221> UNSURE

<222> (11)

<223> X= K, T or R

<220><221> UNSURE

<222> (13)

<223> X= E, D or Q

<220><221> UNSURE

<222> (14)

<223> X= D, H, S or N

<220><221> UNSURE

<222> (16)

<223> X= I or T

<220><221> UNSURE

<222> (17)

<223> X=Q, R or K

<220><221> UNSURE

<222> (18)

<223> X= S or F

<220><221> UNSURE

<222> (19)

<223> X= M, I or L

<220><221> UNSURE

<222> (21)

<223> X= I, V or M

<220><221> UNSURE

<222> (23)
 <223> X=A or T
 <220><221> UNSURE
 <222> (28)
 <223> X=E or D
 <220><221> UNSURE
 <222> (30)
 <223> X= D or G
 <220><221> UNSURE
 <222> (31)
 <223> X= V, F, A or I
 <220><221> UNSURE
 <222> (34)
 <223>
 X= S, N or R
 <220><221> UNSURE
 <222> (37)
 <223> X= V or I
 <220><221> UNSURE
 <222> (39)
 <223> X= A or T
 <220><221> UNSURE
 <222> (41)
 <223> X= K, Q or N
 <220><221> UNSURE
 <222> (48)
 <223> X= Q, G, R, H or E
 <220><221> UNSURE
 <222> (51)
 <223> X= S or L
 <220><221> UNSURE
 <222> (52)
 <223> X= L, Q or H
 <220><221> UNSURE
 <222> (54)

<223> X= S, F or Y

<220><221> UNSURE

<222> (55)

<223> X= G, K, S, N or R

<220><221> UNSURE

<222> (56)

<223> X= D, H, S or N

<220><221> UNSURE

<222> (57)

<223> X= A, H, M, E, G, S or T

<220><221> UNSURE

<222> (58)

<223> X= S, V, P, T, N or D

<220><221> UNSURE

<222> (59)

<223> X= I or L

<220><221> UNSURE

<222> (60)

<223> X= H, S, K, N, Y or E

<220><221> UNSURE

<222> (61)

<223> X= D or E

<220><221> UNSURE

<222> (62)

<223> X= T, I or A

<220><221> UNSURE

<222> (63)

<223>

> X= V or I

<220><221> UNSURE

<222> (64)

<223> X= E, T, Q, R or K

<220><221> UNSURE

<222> (66)

<223> X= L or V

<220><221> UNSURE

<222> (67)

<223> X= I, T or L

<220><221> UNSURE

<222> (68)

<223> X=I, M, F, Y or L

<220><221> UNSURE

<222> (72)

<223> X= N, T, R, D or S

<220><221> UNSURE

<222> (73)

<223> X= S, N, R, T or I

<220><221> UNSURE

<222> (75)

<223> X= S or N

<220><221> UNSURE

<222> (76)

<223> X= S or A

<220><221> UNSURE

<222> (77)

<223> X= N, I or K

<220><221> UNSURE

<222> (78)

<223> X= G, E or K

<220><221> UNSURE

<222> (79)

<223> X= N, Y, D or T

<220><221> UNSURE

<222> (80)

<223> X= V, K or I

<220><221> UNSURE

<222> (81)

<223> X= T, A or I

<220><221> UNSURE

<222> (83)

<223> X= S, L or T

<220><221> UNSURE

<222> (87)

<223> X= E or V

<220><221> UNSURE

<222> (93)

<223> X= E or K

<220><221> UNSURE

<222> (94)

<223> X= K or R

<220><221> UNSURE

<222> (95)

<223> X= N, T or S

<220><221> UNSURE

<222> (96)

<223> X= I or F

<220><221> UNSURE

<222> (97)

<223> X= K, N, A, or T

<220><221> UNSURE

<222> (101)

<223> X= Q, K or E

<220><221> UNSURE

<222> (104)

<223> X= V, I or K

<220><221> UNSURE

<222> (105)

<223> X= H or R

<220><221> UNSURE

<222> (112)

<223> X= N or Y

<220><221> UNSURE

<222> (113)

<223> X= T, S, P, L or A

<220><221> UNSURE

<222> (114)

<223> X= S or P

<400> 1

Xaa Trp Xaa Xaa Val Xaa Xaa Asp Leu Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Leu Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa His Xaa Asp Xaa Thr Leu Tyr Thr Xaa Ser Xaa Xaa His

20 25 30

Pro Xaa Cys Lys Xaa Thr Xaa Met Xaa Cys Phe Leu Leu Glu Leu Xaa

35 40 45

Val Ile Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

50 55 60

Asn Xaa Xaa Xaa Leu Ala Asn Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

65 70 75 80

Xaa Glu Xaa Gly Cys Lys Xaa Cys Glu Glu Leu Glu Xaa Xaa Xaa Xaa

85 90 95

Xaa Glu Phe Leu Xaa Ser Phe Xaa Xaa Ile Val Gln Met Phe Ile Xaa

100 105 110

Xaa Xaa

<210> 2

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> primate uinterleukin 15 consensus sequence

<220><221> UNSURE

<222> (1)

<223> X = N or I

<220><221> UNSURE

<222> (4)
 <223> X = N or D
 <220><221> UNSURE
 <222> (10)
 <223> X = K or R
 <220><221> UNSURE
 <222> (11)
 <223> X = K or R
 <220><221> UNSURE
 <222> (13)
 <223> X = E or Q
 <220><221> UNSURE
 <222> (16)
 <223> X = I or T
 <220><221> UNSURE
 <222> (19)
 <223> X = M or I
 <220><221> UNSURE
 <222> (30)

 <223> X = D or G
 <220><221> UNSURE
 <222> (31)
 <223> X = V or I
 <220><221> UNSURE
 <222> (34)
 <223> X = S or R
 <220><221> UNSURE
 <222> (52)
 <223> X = L or H
 <220><221> UNSURE
 <222> (55)
 <223> X = G or N
 <220><221> UNSURE
 <222> (56)

<223> X = D or N

<220><221> UNSURE

<222> (57)

<223> X = A or T

<220><221> UNSURE

<222> (58)

<223> X = S, N or D

<220><221> UNSURE

<222> (60)

<223> X = H or N

<220><221> UNSURE

<222> (63)

<223> X = V or I

<220><221> UNSURE

<222> (67)

<223> X = I or L

<220><221> UNSURE

<222> (72)

<223> X = N or R

<220><221> UNSURE

<222> (73)

<223> X =S or I

<220><221> UNSURE

<222> (76)

<223> X =S or A

<220><221> UNSURE

<222> (79)

<223> X =N or T

<220><221> UNSURE

<222> (80)

<223> X =V or I

<220><221> UNSURE

<222> (93)

<223> X =E or K

<220><221> UNSURE

<222> (112)

<223> X = N or Y

<220><221> UNSURE

<222> (113)

<223> X = T or A

<400> 2

Xaa Trp Val Xaa Val Ile Ser Asp Leu Xaa Xaa Ile Xaa Asp Leu Xaa

1 5 10 15

Gln Ser Xaa His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Xaa Xaa His

20 25 30

Pro Xaa Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln

35 40 45

Val Ile Ser Xaa Glu Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Asp Thr Xaa Glu

50 55 60

Asn Leu Xaa Ile Leu Ala Asn Xaa Xaa Leu Ser Xaa Asn Gly Xaa Xaa

65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Xaa Lys Asn Ile

85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Xaa

100 105 110

Xaa Ser

<210> 3

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile

1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His

20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
35 40 45
Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
50 55 60
Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
65 70 75 80
Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Xaa Lys Asn Ile
85 90 95
Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
100 105 110
Thr Ser

<210> 4
<211> 61
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> mammalian sushi domain consensus sequence
<220><221> UNSURE
<222> (3)
<223> X= P or A

<220><221> UNSURE
<222> (5)
<223> X= M or V
<220><221> UNSURE
<222> (7)
<223> X= V or I
<220><221> UNSURE
<222> (13)
<223> X= W, R or Q
<220><221> UNSURE
<222> (16)
<223> X= S or N
<220><221> UNSURE

<222> (19)

<223> X= L or V

<220><221> UNSURE

<222> (20)

<223> X= Y, H or N

<220><221> UNSURE

<222> (26)

<223> X= I or V

<220><221> UNSURE

<222> (39)

<223> X= S or T

<220><221> UNSURE

<222> (41)

<223> X=T or I

<220><221> UNSURE

<222> (45)

<223> X=T or I

<220><221> UNSURE

<222> (45)

<223> X= L or I

<220><221> UNSURE

<222> (48)

<223> X= A or N

<220><221> UNSURE

<222> (51)

<223> X= V or A

<220><221> UNSURE

<222> (53)

<223> X= H or Y

<400> 4

Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Xaa Glu His Ala Asp Ile Xaa Val Lys Xaa

1 5 10 15

Tyr Ser Xaa Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly Phe Lys

20 25 30
 Arg Lys Ala Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Glu Cys Val Xaa Asn Lys Xaa
 35 40 45
 Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys
 50 55 60

<210> 5

<211> 64

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> enlarged mammalian sushi domain consensus sequence

<220><221> UNSURE

<222> (1)

<223> X= T, V or I

<220><221> UNSURE

<222> (5)

<223> X= P or A

<220><221> UNSURE

<222> (7)

<223> X= M or V

<220><221> UNSURE

<222> (9)

<223> X= V or I

<220><221> UNSURE

<222> (15)

<223> X= W, R or Q

<220><221> UNSURE

<222> (18)

<223> X= S or N

<220><221> UNSURE

<222> (21)

<223> X=L or V

<220><221> UNSURE

<222> (22)

<223> X=Y, H or N

<220><221> UNSURE

<222> (28)

<223> X= I or V

<220><221> UNSURE

<222> (41)

<223> X= S or T

<220><221>

UNSURE

<222> (43)

<223> X= T or I

<220><221> UNSURE

<222> (47)

<223> X= L or I

<220><221> UNSURE

<222> (50)

<223> X= A or N

<220><221> UNSURE

<222> (53)

<223> X= V or A

<220><221> UNSURE

<222> (55)

<223> X= H or Y

<400> 5

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Xaa Glu His Ala Asp Ile Xaa Val

1 5 10 15

Lys Xaa Tyr Ser Xaa Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly

20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Glu Cys Val Xaa Asn

35 40 45

Lys Xaa Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile

50 55 60

<210> 6

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> primate sushi domain consensus sequence

<220><221> UNSURE

<222> (3)

<223> X= P or A

<220><221> UNSURE

<222> (5)

<223> X= M or V

<220><221> UNSURE

<222> (13)

<223> X= W, R or Q

<220><221> UNSURE

<222> (20)

<223> X= Y or H

<220><221> UNSURE

<222> (26)

<223> X= I or V

<220><221> UNSURE

<222> (51)

<223> X= V or A

<220><221> UNSURE

<222> (53)

<223> X= V or A

<400> 6

Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Val Glu His Ala Asp Ile Xaa Val Lys Ser

1 5 10 15

Tyr Ser Leu Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly Phe Lys

20 25 30

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala

35 40 45

Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys

50 55 60

<210> 7

<211> 63
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> enlarged primate sushi domain consensus sequence
 <220><221> UNSURE
 <222> (1)
 <223> X= V or I
 <220><221> UNSURE
 <222> (5)
 <223> X= P or A
 <220><221> UNSURE
 <222> (7)

<223> X= M or V
 <220><221> UNSURE
 <222> (15)
 <223> X= W, R or Q
 <220><221> UNSURE
 <222> (22)
 <223> X= Y or H
 <220><221> UNSURE
 <222> (28)
 <223> X= I or V
 <220><221> UNSURE
 <222> (53)
 <223> X=V or A
 <220><221> UNSURE
 <222> (55)
 <223> X=H or Y
 <400> 7

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Val Glu His Ala Asp Ile Xaa Val

1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly

20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn

35 40 45

Lys Ala Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys

50 55 60

<210> 8

<211> 61

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser

1 5 10 15

Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys

20 25 30

Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala

35 40 45

Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys

50 55 60

<210> 9

<211> 64

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val

1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly

20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn

35 40 45

Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile

50 55 60

<210> 10

<211> 77

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mammalian sushi and domains consensus sequence

<220><221> UNSURE

<222> (1)

<223> X= T, V or I

<220><221> UNSURE

<222> (5)

<223> X= P or A

<220><221> UNSURE

<222> (7)

<223> X= M or V

<220><221> UNSURE

<222> (9)

<223> X= V or I

<220><221> UNSURE

<222> (15)

<223> X= W, R or Q

<220><221> UNSURE

<222> (18)

<223> X= S or N

<220><221> UNSURE

<222> (21)

<223> X= L or V

<220><221> UNSURE

<222> (22)

<223> X= Y, H or N

<220><221> UNSURE

<222> (28)

<223> X= I or V

<220><221> UNSURE

<222> (41)

<223> X= S or T

<220><221> UNSURE

<222> (43)
 <223> X= T or I
 <220><221> UNSURE
 <222> (47)
 <223> X= L or I
 <220><221> UNSURE
 <222> (50)
 <223> X=A or N
 <220><221> UNSURE
 <222> (53)
 <223> X= V or A
 <220><221> UNSURE
 <222> (55)
 <223> X= H or Y
 <220><221> UNSURE
 <222> (68)
 <223> X=A, S or L
 <220><221> UNSURE
 <222> (70)
 <223> X= V, A, S or T
 <220><221> UNSURE
 <222> (71)
 <223> X= H or R
 <220><221> UNSURE
 <222>
 > (72)
 <223> X= Q or H
 <220><221> UNSURE
 <222> (73)
 <223> X= R, S or K
 <220><221> UNSURE
 <222> (75)
 <223> X= A, V or P
 <220><221> UNSURE
 <222> (76)

<223> X= P or S

<220><221> UNSURE

<222> (77)

<223> X= P or T

<400> 10

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Xaa Glu His Ala Asp Ile Xaa Val

1 5 10 15

Lys Xaa Tyr Ser Xaa Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly

20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Glu Cys Val Xaa Asn

35 40 45

Lys Xaa Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile

50 55 60

Arg Asp Pro Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa

65 70 75

<210> 11

<211> 77

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> primate sushi and domains consensus sequence

<220><221> UNSURE

<222> (1)

<223> X= V or I

<220><221> UNSURE

<222> (5)

<223> X= P or A

<220><221> UNSURE

<222> (7)

<223> X= M or V

<220><221> UNSURE

<222> (15)

<223> X= W, R or Q

<220><221> UNSURE

<222> (22)
 <223> X= Y or H
 <220><221> UNSURE

<222> (28)
 <223> X= I or V
 <220><221> UNSURE

<222> (53)
 <223> X= V or A
 <220><221> UNSURE

<222> (55)
 <223> X= H or Y
 <220><221> UNSURE

<222> (68)
 <223> X= A, S or L
 <220><221>

> UNSURE
 <222> (70)
 <223> X= V, A or T
 <220><221> UNSURE

<222> (71)
 <223> X= H or R
 <220><221> UNSURE

<222> (75)
 <223> X= A or V
 <400> 11

Xaa Thr Cys Pro Xaa Pro Xaa Ser Val Glu His Ala Asp Ile Xaa Val

1 5 10 15

Lys Ser Tyr Ser Leu Xaa Ser Arg Glu Arg Tyr Xaa Cys Asn Ser Gly

20 25 30

Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn

35 40 45

Lys Ala Thr Asn Xaa Ala Xaa Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile

50 55 60

Arg Asp Pro Xaa Leu Xaa Xaa Gln Arg Pro Xaa Pro Pro

65	70	75
<210>	12	
<211>	77	
<212>	PRT	
<213>	Homo sapiens	
<400>	12	
Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val		
1	5	10
Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly		
	20	25
		30

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

65	70	75
<210>	13	
<211>	20	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	peptidic linker	
<400>	13	
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		

1	5	10	15
Gly	Ser	Leu	Gln
	20		
<210>	14		
<211>	20		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	peptidic linker		
<400>	14		
Ser	Gly	Gly	Ser
Gly	Gly	Gly	Gly
Gly	Ser	Gly	Gly
Gly	Gly	Gly	Ser
Gly	Gly	Gly	Gly

1 5 10 15
 Gly Ser Gly Gly
 20
 <210> 15
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptidic linker
 <400> 15
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15
 Gly Gly Ser Leu Gln
 20
 <210> 16
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RLI1
 <400> 16
 Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val

1 5 10 15
 Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
 20 25 30
 Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn

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

100 105 110
 Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
 115 120 125
 His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
 130 135 140
 Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
 145 150 155 160
 Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
 165 170 175
 Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
 180 185 190
 Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
 195 200 205
 Asn Thr Ser
 210
 <210> 17
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RLI2
 <400> 17
 Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
 1 5 10 15
 Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
 20 25 30
 Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
 35 40 45
 Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60
 Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Gly Gly
 65 70 75 80
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

85 90 95
 Gly Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu

 100 105 110
 Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
 115 120 125
 His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
 130 135 140
 Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
 145 150 155 160
 Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
 165 170 175

 Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
 180 185 190
 Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
 195 200 205
 Asn Thr Ser
 210