(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월28일
(11) 등록번호 10-2679324
(24) 등록일자 2024년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/22 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/22 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2019-7019645
(22) 출원일자(국제) 2018년01월05일
심사청구일자 2020년12월14일
(85) 번역문제출일자 2019년07월05일
(65) 공개번호 10-2019-0101991
(43) 공개일자 2019년09월02일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/050289
(87) 국제공개번호 WO 2018/127570
국제공개일자 2018년07월12일
(30) 우선권주장
17305014.7 2017년01월05일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160106074 A*
WO2016197204 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
네트리 파르마
프랑스 에프-69008 리옹 28 뤼 라에네크 상뜨르레옹 베라르드
위니베르시테 끌로드 베르나르 리옹 I
프랑스 빌뢰르반 에프-69100, 불바르 뒤 11 노바브르 1918 43
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
두카루즈 벤자민
프랑스 38110 엘에이 투어 두 핀 뤼 데 브휴이예흐 12
골드슈나이더 데이비드
프랑스 69100 빌뢰르반 뤼 두 4 우트 107
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정홍식, 김태헌

전체 청구항 수 : 총 11 항 심사관 : 김종호

(54) 발명의 명칭 **네트린-1 간섭 약물과 면역 관문 억제제 약물의 조합 치료**

(57) 요 약

본 발명은 암의 치료에서 (i) 본원에서 소위 NTN1 중화제로 불리우는, 네트린-1/네트린-1 수용체 상호작용 또는 네트린-1-매개된 수용체 이량체화를 방해하거나 지연시킬 수 있는 화합물로서, 네트린-1에 결합하는 항체 또는 항-네트린-1 항체일 수 있는 화합물, 및 (ii) 면역 관문 억제제의 조합 또는 조합된 용도이다. 상기 조성물은 항-네트린-1 항체와 면역 관문 억제제의 환자로의 동시, 별도 또는 순차적 투여와 함께 항암 약물로서 사용하기 위한, 항-네트린-1 항체 및 면역 관문 억제제를 포함할 수 있다.

대 표 도 - 도1

NP006	HUM03	항-CTLA4+ NP006	항-CTLA4+ HUM03
0/12	0/12	2/12	8/12 p=0.0394 (만델 콕스)

(52) CPC특허분류
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/30 (2013.01)
A61K 2039/507 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)
(73) 특허권자
쌩뜨레 나티오날 데 라 르세르쉬 생띠끄
프랑스 75016 파리 뤼 미셸 엔지 3
상뜨로 레옹 베라르
프랑스 에프-69008 리옹 뤼 래넥 28
인스티튜트 내셔널 드 라 싼데 에 드 라 리셰르셰 메디칼르 (인 썸)
프랑스, 파리 75013, 뤼에 드 톨비아크 101

(72) 발명자
리데이비드 안나 마리아 리타
이탈리아 70018 루티글리아노 비아 몬테벌진 186
지베르트 벤자민
프랑스 69100 빌뢰르반 뤼 클레멘트 미추트 14
미헬렌 패트릭
프랑스 38300 세레진-드-라-투어 루트 드 니볼라스 780

명 세 서

청구범위

청구항 1

암의 치료를 위한 약제학적 조성물에 있어서,

모노클로날 항-네트린-1 항체 및 면역 관문 억제제를 포함하고,

상기 면역 관문 억제제는 항-PD1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA-4 모노클로날 항체이고, 관문 단백질을 억제하거나 관문 단백질의 리간드와 상호작용하며,

상기 항-네트린-1 항체는 서열번호 35의 아미노산 서열의 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하고, 네트린-1/네트린-1 수용체 상호작용 또는 네트린-1-매개된 수용체 이량체화를 방해하거나 지연시킬 수 있고,

상기 항-네트린-1 항체가

(i) 서열번호 5의 서열의 CDR1-H, 서열번호 6의 서열의 CDR2-H, 서열번호 7의 서열의 CDR3-H, 및 서열번호 8의 서열의 CDR1-L, YAS 서열의 CDR2-L 및 서열번호 9의 서열의 CDR3-L, 또는

(ii) 서열번호 28의 서열의 CDR1-H, 서열번호 29의 서열의 CDR2-H, 서열번호 30의 서열의 CDR3-H, 및 서열번호 31의 서열의 CDR1-L, 서열번호 32의 서열의 CDR2-L 및 서열번호 9의 서열의 CDR3-L을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 치료될 암이 네트린-1 발현을 갖고 단독의 면역 관문 억제제에는 반응할 수 없는 암인, 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 암이 유방암, 흑색종 또는 결장암인, 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항, 제3항 또는 제4항에 있어서, 항-네트린-1 항체 및 면역 관문 억제제를 환자에게 동시, 별도 또는 순차적 투여하기 위한, 약제학적 조성물.

청구항 6

항암 약제학적 조성물(anti-cancerous pharmaceutical composition)에 있어서,

모노클로날 항-네트린-1 항체 및 면역 관문 억제제를 포함하고,

상기 면역 관문 억제제는 항-PD1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA-4 모노클로날 항체이고, 관문 단백질을 억제하거나 관문 단백질의 리간드와 상호작용하며,

상기 항-네트린-1 항체가 서열번호 35의 아미노산 서열의 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하고, 네트린-1/네트린-1 수용체 상호작용 또는 네트린-1-매개된 수용체 이량체화를 방해하거나 지연시킬 수 있고,

상기 항-네트린-1 항체가 (i) 서열번호 5의 서열의 CDR1-H, 서열번호 6의 서열의 CDR2-H, 서열번호 7의 서열의 CDR3-H, 및 서열번호 8의 서열의 CDR1-L, YAS 서열의 CDR2-L 및 서열번호 9의 서열의 CDR3-L, 또는 (ii) 서열번호 28의 서열의 CDR1-H, 서열번호 29의 서열의 CDR2-H, 서열번호 30의 서열의 CDR3-H, 및 서열번호 31의 서열의 CDR1-L, 서열번호 32의 서열의 CDR2-L 및 서열번호 9의 서열의 CDR3-L을 포함하는, 항암 약제학적 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 항-네트린-1 항체가

서열번호 20 및 14, 서열번호 21 및 15, 서열번호 22 및 16, 서열번호 23 및 17, 서열번호 24 및 17, 서열번호 25 및 16, 서열번호 26 및 17, 서열번호 22 및 17, 서열번호 25 및 18 또는 서열번호 21 및 16의

VH 및 VL 아미노산 서열의 쌍들을 포함하는 항-네트린-1 항체들로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 항암 약제학적 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 면역 관문 억제제가 항-PD1 및 항-CTLA-4 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 항암 약제학적 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 항-네트린-1 항체 및 상기 면역 관문 억제제가 항-네트린-1 항체 및 면역 관문 억제제를 환자에게 동시, 별도 또는 순차적 투여를 위해 분리되어 있는, 항암 약제학적 조성물.

청구항 11

항암 약제학적 조성물에 있어서,

모노클로날 항-네트린-1 항체 및 면역 관문 억제제를 포함하고,

상기 면역 관문 억제제는 항-PD1 또는 항-CTLA-4 모노클로날 항체이고, 관문 단백질을 억제하거나 관문 단백질의 리간드와 상호작용하며,

상기 항-네트린-1 항체가

(i) 서열번호 5의 서열의 CDR1-H, 서열번호 6의 서열의 CDR2-H, 서열번호 7의 서열의 CDR3-H, 및 서열번호 8의 서열의 CDR1-L, YAS 서열의 CDR2-L 및 서열번호 9의 서열의 CDR3-L, 또는

(ii) 서열번호 28의 서열의 CDR1-H, 서열번호 29의 서열의 CDR2-H, 서열번호 30의 서열의 CDR3-H, 및 서열번호 31의 서열의 CDR1-L, 서열번호 32의 서열의 CDR2-L 및 서열번호 9의 서열의 CDR3-L을 포함하는, 항암 약제학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 항-네트린-1 항체가 서열번호 20 및 14, 서열번호 21 및 15, 서열번호 22 및 16, 서열번호 23 및 17, 서열번호 24 및 17, 서열번호 25 및 16, 서열번호 26 및 17, 서열번호 22 및 17, 서열번호 25 및 18, 또는 서열번호 21 및 16의 VH 및 VL 아미노산 서열의 쌍을 포함하는 항-네트린-1 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 항암 약제학적 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 항-네트린-1 항체가 서열번호 22 및 16의 VH 및 VL 아미노산 서열의 쌍을 포함하는, 항암 약제학적 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 암을 치료하기 위한 신규 조합 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 축삭돌기 유도 단백질 네트린-1은 프로그램화된 세포사를 조절함에 의해 암 진행에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 제안된 가용성 단백질이다.

[0003] 실제로, DCC 및 UNC5H (즉, UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3 및 UNC5H4 또한 UNC5A, UNC5B, UNC5C 또는 UNC5D로 불림)와 같은 네트린-1 수용체는 소위 종속 수용체 계열에 속한다. 이들 막관통 수용체는 2개의 상반된 방식으로 작용한다: 이들은 이들의 리간드 네트린-1의 존재하에 세포 증식, 생존 및 분화를 유도하는 양성 신호 전달을 유도한다. 네트린-1의 부재하에, 이들 수용체는 미결합된 경우 음성 신호전달 촉발 아폽토시스를 형질도입한다. 리간드 인출시 세포사 유도의 신호 전달 경로는 특이적 정점 카스파제에 의한 상호작용 및 절단을 요구하였다. 결과로서, 수용체의 세포 내 부분에서 카스파제 부위의 돌연변이는 네트린-1의 부재하에 관찰되는, 세포사 유도를 차단한다. 따라서, 아스파트산-1290 (D1290) 잔기상에 단일 점 돌연변이는 DCC 양성 신호전달과의 간섭 없이 DCC 유도 세포사를 억제하기에 충분하다. 이 돌연변이를 갖는 마우스는 자발적으로 상대적으로 낮은 수준의 장 신생물을 생성한다. APC^{1638N} 배경에서 교차되는 경우, 이들은 종양 발생률의 증가를 나타낸다.

[0004] 아폽토시스를 유도하는 종속 수용체의 성질은 이들에게 종양 서프레서 활성을 부여한다. 이들은 제한된 양의 네트린-1을 제공하는 영역에서 비정상적으로 성장하는 세포를 제거할 수 있다. 종속 수용체의 모델에서, 리간드 농도가 제한된 환경하에 있는 형질전환된 세포 또는 리간드가 부재인 원거리 부위로 이동하는 전이성 세포는 미결합된 종속 수용체를 나타냄에 따라서 아폽토시스를 진행한다. 이 기전은 종양 발생에 대한 대안적 제한을 제공한다. 공격적 종양에서, 종양 세포는 종속 수용체 유도된 세포사를 정지시켰다. 상기 가설과 일치하여, 수용체 발현의 상실은 종양 세포에 대한 선택적 이점을 나타내고 이러한 보호 기전을 극복하는 주요 방법인 것으로 보인다. 암에서 종속 수용체 발현 상실을 유도하는 수많은 분자 기전이 관련되어 있다. 종속 수용체 발현은 이종접합성의 상실 (LOH)에 의한, 과메틸화 또는 후성적 기전, 해독 후 변형, 예를 들어, 마이크로RNA 및 미스센스 돌연변이에 의한 사일런싱과 관련되어 있다. 따라서, *DCC* 유전자는 70%의 사람 결장직장 암종에서 LOH에 의해 기능적으로 사일런싱된다. UNCH5 계열 수용체의 발현은 많은 경우에 프로모터 메틸화 또는 돌연변이로 인해 다양한 암에서 하향조절되는 것으로 나타난다.

[0005] 종속 수용체는 리간드가 부재인 영역에서 세포사를 유도하기 때문에 종양 회피를 위한 추가의 기전은 종양 세포에 의한 네트린-1의 자가분비 합성이다. 따라서, 네트린-1의 발현은 난소암, 신경모세포종, B-세포 림프종, 비-소세포 폐암, 수모세포종과 같은 종양 유형의 대부분에서 또는 염증 연관된 결장직장암에서 증가와 관련되었다. 추가로, 네트린-1 과발현은 유방암의 전이성 및 공격적 형태와 상호관련된다.

[0006] 치료학적 표적으로서 특징 분석하기 위한 개념 증명 연구는 생체내에서 수행되었다. 결과적으로, 네트린-1/종속 수용체 상호작용에서 siRNA 또는 간섭에 의한 네트린-1의 사일런싱은 종양 세포 아폽토시스를 수반한다. 항-네트린-1 모노클로날 항체 (HUM03)는 특징분석되었고 면역-손상된 마우스에서 전형적인 증식성 종양 성장 모델에서 효과적인 것으로 나타났다(참조: Grandin et al., Cancer Cell, 2016 및 WO2015/104360). 상기 항체는 네트린-1/종속 수용체 상호작용 또는 네트린-1 매개된 네트린-1 수용체 이량체화를 방해할 수 있다.

[0007] 더욱이, 네트린-1은 면역 세포 이동의 조절인자로서 최근에 동정되었고 네트린-1이 급성 및 만성 신장 질환, 염증성 관절염, 죽상동맥경화증 또는 당뇨병/비만과 같은 여러 병리에서 염증 및 염증성 세포 이동을 어떻게 제어하는지를 조사하는 다수의 연구를 유도하였다. 네트린-1은 염증 부위로부터, 동맥 벽의 플라크로부터 대식세포 출구를 차단함에 의해, 또는 이들 세포를 지방 조직에 축적시킴에 따라서 만성 염증 및 인슐린 내성을 촉진시킴에 의해 염증 관절염, 죽상동맥경화증 또는 비만을 촉진시키는 것으로 나타났다. 따라서, 네트린-1은 염증을 조절하지만 이것이 일어나는 기전은 알려지지 않은 것으로 보인다.

[0008] 면역치료는 면역 관문 억제제, 특히, PD1/PDL1 또는 CTLA4에 대해 지시된 모노클로날 항체를 사용하여 치료받은 환자에서 관찰되는 명확하고 지속적인 반응으로 암 치료 분야에서 현재 혁신이다.

[0009] CTLA4 (세포독성 T-림프구-연관된 단백질 4, 또한 CD152 (분화 152의 클러스터로서)로서 공지됨)는 면역 관문으로서 작용하여 면역 반응을 하향조절하는 단백질 수용체이다. CTLA4는 T-림프구-조절인자 (Treg)로 항상성으로 발현되고 활성화 후 통상적인 T-림프구에서 상향조절된다. 이것은 항원 제시 세포 (APC)의 세포 표면에서 CD80 또는 CD86에 결합되는 경우 "오프" 스위치로서 작용한다. PD-1 (프로그램화된 세포사 - 1) 수용체 (CD279로도 공지됨)는 활성화된 T 세포의 표면 상에서 발현된다. 이의 리간드, PD-L1 (B7-H1; CD274) 및 PD-L2 (B7-DC; CD273)는 통상적으로 대식세포 또는 수지상 세포의 표면에서 발현된다. PD1 및 PD-L1/PD-L2는 T 세포 반응의 발생을 중단하거나 제한할 수 있는 동시-억제 인자로서 작용하는 면역 관문 단백질 계열에 속한다. PD1/PD-L1

상호작용은 면역계가 지속적인 자가면역 염증의 가능성을 감소시키기 위해 적당한 시점에서만 활성화되는 것을 보장한다.

[0010] PD-1이 PD-L1에 결합하는 경우, 음성 신호 전달이 T 세포에서 전송되어, 사이토킨 생성을 감소시키고 T-세포 증식을 억제한다. 종양 세포는 상기 경로를 검출을 피하고 면역 반응을 차단시키기 위한 기전으로서 회피한다. PD-L1은 종양 세포에 의해 또는 미세환경에 의해 과발현되는 것으로 기재된다. 종양 세포 상에 발현되는 PD-L1은 활성화된 T 세포 상에 PD-1 수용체에 결합하고, 이는 세포독성 T 세포의 억제를 유도한다. 이들 탈활성화된 T 세포는 종양 미세환경에서 억제된 상태로 남아있다. PD1/PD-L1 경로는 내인성 항-종양 활성에 응답하는 종양 세포에 의해 발휘되는 후천성 면역 내성 기전을 나타낸다. 암 면역치료 연구는 면역 반응을 차단하고 암에 대해 효과적인 상태로 유지되도록 신체 자체의 기전을 자극하는 암의 능력을 극복하기 위해 노력하고 있다.

[0011] 그러나, 2개의 주요 한계가 보고되었다:

[0012] - 주요 한계는 환자들의 단지 일부가 이들 면역 관문 억제제에 대한 반응을 보이기 때문에 화합물의 효능이다 (면역 관문 억제제에 응답하지 않을 수 있다). 따라서, 흑색종을 갖는 환자의 50%만이 CTLA4 및 PD1의 조합 차단에 대한 객관적 반응을 나타내고, 상기 퍼센트는 비-소세포 폐암에서 ~20%로 및 유방 또는 결장암에서 <5%로 하락한다.

[0013] - 두번째 한계는 지금까지 환자가 양성으로 반응할지의 여부를 예측할 수 없다는 것이다. 종양 베드에서 면역억제 세포 (특히 FOXP3+ 조절 T 세포, Tregs)의 결핍과 조합된 면역 이펙터 (및 특히 CD8+ 세포독성 T 림프구, CTL)의 풍부함은 중요하지만 아직 불완전한 예후 인자이다. 상이한 보고는 화학치료요법이 특히 일부 세포독성 제제가 악성 세포의 면역원성 세포사 (ICD)를 자극시킴에 따라서 이들의 면역 인지를 선호할 수 있게 하기 때문에 면역-종양학 약물의 효과를 강화시킬 수 있음을 시사하였다. 네트린-1 간섭에 의해 유도된 세포사가 면역원성인지는 지금까지 공지되어 있지 않다. 더욱이 심지어 네트린-1이 암 진행에서 생존 인자로서 작용하는 것으로 나타났지만, 이것은 최근에 네트린-1이 T 세포 또는 대식세포를 위한 면역 유도 단서로서 작용할 수 있는 것으로 나타났고 이러한 상반된 데이터가 보고되었다(참조: Ramkhelawon et al., Nature Med, 2013: Boneschansker et al., J. Immunology, 2016). CXCL 12와 같은 종양 조직에 의해 생성되는 상이한 케모킨은 Treg 및 골수-유래된 면역서프레서 세포와 같은 면역억제성 세포를 동원하는 것으로 공지되어 있다. 이들 세포는 세포독성 T 세포 및 수지상 세포, 예를 들어, TGF-베타 (형질전환 성장 인자-베타), IL10 (인터류킨-10) 및 VEGF (혈관 내피 성장 인자)의 기능을 손상시켜 면역-관용성 미세환경을 생성하는 상이한 매개체를 방출한다. 모든 이들 분비된 단백질은 네트린-1과 관련된 것으로 보고되었다. 실제로, (i) 네트린-1이 CXCL12의 주화성을 특이적으로 촉진시키고, (ii) IL-10이 네트린-1의 발현을 증가시킴에 의해 신경돌기 과성장을 촉진시키고, (iii) TGF-베타와 네트린-1이 상호 연계되어 있고, (iv) 네트린-1이 생체내 혈관형성을 자극하여 혈관 내피 성장 인자에 대한 반응을 증강시키기 때문에 VEGF와 네트린-1이 상호 연계되어 있는 것으로 나타났다.

발명의 내용

[0014] 약물 조합 효과는 본래에 예측 불가능하다. 흔히 하나의 약물이 부분적으로 또는 완전히 다른 것의 효과를 억제하는 경향이 있다. 본 발명은 항-네트린-1 항체 HUM03 및 CTLA4 또는 PD-1에 대한 모노클로날 항체를 사용하는 조합 치료요법에 의해 이종이식된 마우스 생존 및 보다 긴 질환 제어를 유의적으로 증가시킨다는 놀라운 결과에 기반한다. 수득된 데이터는 네트린-1에 대해 지시된 모노클로날 항체의 현재 면역치료학적 치료로의 조합이 이들의 효능을 부스팅하는 관점을 지지한다. 네트린-1 간섭의 존재하에 면역 관문 억제제의 상기 증진된 효과를 설명할 수 있는 기전의 연구에서, 본원 발명자는 단독치료요법 또는 조합 치료에 반응하는 종양 면역 침윤을 분석한다. 도 5에 제공된 바와 같이, 단독치료요법 (HUM03 또는 CTLA4)은 T 세포 이펙터/T 세포 조절인자의 비율을 유의적으로 영향을 주지 않고 상기 조합은 상기 비율을 T 세포 이펙터로 전환시킨다. 이것은 상기 조합이 킬러 림프성 세포 (T 세포 이펙터)의 존재를 증진시킴을 시사함으로써 증가된 효능을 지지한다.

[0015] 본 발명의 목적은 암의 치료에서 (i) 본원에서 소위 NTN1 중화제로 불리우는, 네트린-1/네트린-1 수용체 상호작용 또는 네트린-1-매개된 매개된 수용체 이량체화를 방해하거나 지연시킬 수 있는 화합물로서, 네트린-1에 결합하는 항체 또는 항-네트린-1 항체일 수 있는 화합물, 및 (ii) 면역 관문 억제제의 조합 또는 조합된 용도이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 암의 치료에서 네트린-1에 결합하는 항체 또는 항-네트린-1 항체 및 면역 관문 억제제의 조합 또는 조합된 용도이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 화합물 (i)과 면역 관문 억제제 (ii)의 환자에게 동시, 별도 또는 순차적 투여와 함께 항암 약물로서 사용하기 위한, (i) 네트린-1/네트린-1 수용체 상호작용 또는 네트린-1-매개된 수용체 이량체

화를 방해하거나 지연시킬 수 있는 화합물로서, 네트린-1에 결합하는 항체 또는 항-네트린-1 항체일 수 있는 화합물 및 (ii) 면역 관문 억제제를 포함하는 조성물이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 항-네트린-1 항체와 면역 관문 억제제의 환자로의 동시, 별도 또는 순차적 투여와 함께 항암 약물로서 사용하기 위한, (i) 네트린-1에 결합하는 항체 또는 항-네트린-1 항체 및 (ii) 면역 관문 억제제를 포함하는 조성물이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 (i) 네트린-1/네트린-1 수용체 상호작용 또는 네트린-1-매개된 수용체 이량체화를 방해하거나 지연시킬 수 있는 화합물로서, 네트린-1에 결합하는 항체 또는 항-네트린-1 항체일 수 있는 화합물, 및 (ii) 면역 관문 억제제의 환자로의 투여를 포함하는 조합된 항암 치료의 방법이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적은 또한 (i) 네트린-1에 결합하는 항체 또는 항-네트린-1 항체, 및 (ii) 면역 관문 억제제의 환자로의 투여를 포함하는 조합된 항암 치료의 방법이다.

[0021] 본 발명의 또 다른 목적은 (i) 네트린-1/네트린-1 수용체 상호작용 또는 네트린-1-매개된 수용체 이량체화를 방해하거나 지연시킬 수 있는 화합물로서, 네트린-1에 결합하는 항체 또는 항-네트린-1 항체일 수 있는 화합물, 및 (ii) 면역 관문 억제제의 환자로의 투여를 포함하는, 생체내 종양 침윤물 (즉, 림프구 T 또는 B, 대식세포, 천연 킬러 세포)을 조절하는 방법이다.

[0022] 본 발명의 또 다른 목적은 (i) 네트린-1에 결합하는 항체 또는 항-네트린-1 항체, 및 (ii) 면역 관문 억제제의 환자로의 투여를 포함하는, 종양 침윤물 (즉, 림프구 T 또는 B, 대식세포, 천연 킬러 세포)을 조절하기 위한 방법이다.

[0023] 또 다른 목적은 (i) 네트린-1/네트린-1 수용체 상호작용 또는 네트린-1-매개된 수용체 이량체화를 방해하거나 지연시킬 수 있는 화합물로서, 네트린-1에 결합하는 항체 또는 항-네트린-1 항체일 수 있는 화합물, 및 (ii) 면역 관문 억제제의 환자로의 투여를 포함하는 암 세포 사멸 또는 면역원성 세포사를 활성화시킴에 의한 활성화 면역 반응이다.

[0024] 또 다른 목적은 (i) 네트린-1에 결합하는 항체 또는 항-네트린-1 항체, 및 (ii) 면역 관문 억제제의 환자로의 투여를 포함하는, 암 세포사 또는 면역원성 세포사를 활성화시킴에 의한 활성화 면역 반응이다.

[0025] 발명의 또 다른 특정 목적은 다음과 같다:

[0026] - 암의 치료를 위한 방법에 사용하기 위한, 항-네트린-1 항체 및 면역 관문 억제제를 포함하는 약제학적 조성물로서, 상기 항-네트린-1 항체가 네트린-1/네트린-1 수용체 상호작용 또는 네트린-1-매개된 수용체 이량체화를 방해하거나 지연시킬 수 있는, 약제학적 조성물;

[0027] - 항-네트린-1 항체 및 면역 관문 억제제를 포함하는 약제학적 조성물로서, 상기 항-네트린-1 항체가 서열번호 35의 아미노산 서열의 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하고, 네트린-1/네트린-1 수용체 상호작용 또는 네트린-1-매개된 수용체 이량체화를 방해하거나 지연시킬 수 있는, 약제학적 조성물;

[0028] - 항-네트린-1 항체 및 면역 관문 억제제를 포함하는 약제학적 조성물로서, 상기 항-네트린-1 항체가 (i) 서열번호 5의 서열의 CDR1-H, 서열번호 6의 서열의 CDR2-H, 서열번호 7의 서열의 CDR3-H, 및 서열번호 8의 서열의 CDR1-L, YAS 서열의 CDR2-L 및 서열번호 9의 서열의 CDR3-L, 또는 (ii) 서열번호 28의 서열의 CDR1-H, 서열번호 29의 서열의 CDR2-H, 서열번호 30의 서열의 CDR3-H, 및 서열번호 31의 서열의 CDR1-L, 서열번호 32의 서열의 CDR2-L 및 서열번호 9의 서열의 CDR3-L을 포함하는, 약제학적 조성물;

[0029] - 항-네트린-1 항체 및 면역 관문 억제제를 포함하는 약제학적 조성물로서, 상기 항-네트린-1 항체가 네트린-1/네트린-1 수용체 상호작용 또는 네트린-1-매개된 수용체 이량체화를 방해하거나 지연시킬 수 있고 면역 관문 억제제가 항-PD1, 항-PD-L1, 항-PD-L2 및 항-CTLA-4 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물;

[0030] - 항-네트린-1 항체 및 면역 관문 억제제의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하는 항암 치료 방법으로서, 상기 항-네트린-1 항체가 네트린-1/네트린-1 수용체 상호작용 또는 네트린-1-매개된 수용체 이량체화를 방해하거나 지연시킬 수 있는, 방법.

[0031] 일 구현예에서, 치료될 암은 네트린-1을 발현하고 면역 관문 억제제에 반응할 수 없는 (단독으로, 즉 항-네트린-1 항체 등과 조합되지 않는 경우) 암이다.

[0032] 이들 상이한 대상은 특히 이후 제시될 HUMO3 항체 또는 이의 모 항체 중 하나를 사용하여 제조될 수 있다.

[0033] 본 발명의 이들 상이한 대상에서, 면역 관문 억제제는 특히 항체, 바람직하게 모노클로날 항체일 수 있거나 이를 포함할 수 있다.

[0034] 발명의 상세한 설명

[0035] NTN1 (네트린-1) 중화제

[0036] NTN1 중화제는 네트린-1 수용체와 상호작용하는 네트린-1 능력에 간섭하거나 네트린-1 수용체의 이량체화 또는 다량체화를 유도하는 네트린-1의 능력을 간섭하는 약물이다. 이것은 본원에서 네트린-1 및 종속 수용체 상호작용 또는 종속 수용체 이량체화를 방해하거나 지연시킬 수 있는 화합물로 불리운다. 당업자는 본원에 참조로 인용되는 WO2007/099133을 참조할 수 있고, 이것은 네트린-1과 이의 수용체 간의 간섭을 기재하고, 네트린-1과 수용체 간의 상호작용 또는 결합의 감소 또는 억제, 또는 네트린-1 수용체의 이량체화 또는 다량체화를 유도하는 네트린-1의 능력의 감소 또는 억제 (본원 발명자는 단순히 본원에서 이량체화를 언급하고, 이것은 다량체화를 포함할 수 있다)로 네트린-1 수용체-유도된 아폽토시스가 촉진됨을 기재한다.

[0037] 일 구현예에서, NTN1 중화제는 작은 간섭 RNA 또는 siRNA이고 이는 이중가닥 RNA (dsRNA) (이것은 즉 10 내지 50개 뉴클레오타이드 길이를 가질 수 있다)이고 네트린-1을 암호화하는 유전자의 발현을 감소시킨다. 제1 가닥 부분은 표적 유전자에 상보적이고, 즉, 이것은 표적 유전자에 하이브리드화하기에 충분한 상보성을 갖는다. 예를 들어, 표적 유전자 또는 이의 일부와 적어도 80%의 동일성이 있다. AP: 인간 네트린-1 mRNA 서열 승인 번호: NM_004822. 사용될 수 있는 siRNA 서열: 서열 NM_004822의 아미노산 94 내지 114.

[0038] 제2 구현예에서, NTN1 중화제는 네트린-1에 결합하는 분자 (예를 들어, 항체, 폴리펩타이드, 소분자 등)이고 네트린-1은 이의 수용체에 결합할 수 있도록 하거나 네트린-1 수용체, 특히 DCC 및/또는 UNC5의 이량체화/다량체화를 유도할 수 없게 한다.

[0039] 제3 구현예에서, NTN1 중화제는 네트린-1 수용체에 결합하는 분자 (예를 들어, 항체, 폴리펩타이드, 소분자 등)이고 상기 결합은 NTN1의 수용체로의 결합 또는 수용체의 이량체화/다량체화를 억제한다.

[0040] NTN1 중화제는 NTN1 수용체-매개된 아폽토시스를 유도할 수 있다.

[0041] 네트린-1 수용체는 특히 DCC, UNC5A, UNC5B, UNC5C 또는 UNC5D, 네오게닌 및 A2b일 수 있다.

[0042] 바람직한 구현예에서, NTN1 중화제는 네트린-1에 결합하는 항체이다.

[0043] 항-NTN1 항체 (항-네트린-1 항체 또는 네트린-1에 결합하는 항체)

[0044] 이것은 바람직하게 네트린-1에 특이적으로 결합하는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이다. 항체는 바람직하게 네트린-1/네트린-1 수용체 상호작용 또는 네트린-1-매개된 수용체 이량체화 (즉, UNC5B, A, C, D, DCC, 네오게닌 및 A2b를 포함하는 네트린-1 수용체)를 방해하거나 지연시킬 수 있다.

[0045] NTN1 폴리클로날 항체는 특히 선택된 아미노산 서열의 도움으로 토끼, 마우스 등과 같은 동물을 면역화시키고, 예를 들어, 당업자에게 공지된 방법에 따라 수용체를 함유하는 면역흡착제 상에 수득된 항혈청을 수거함에 이어서 고갈시킴에 의해 수득될 수 있다.

[0046] 네트린-1 아미노산 서열은 서열번호 1에 도시된 바와 같고 네트린-1은 전체적으로 또는 부분적으로 항체를 디자인하기 위해 사용될 수 있다.

[0047] 일반적으로, 모노클로날 항체는 문헌(참조: Kohler and Milstein, (Nature, 1975, 256(5517): 495-7)에 기재된 림프구 융합 및 림프종 배양물의 통상적인 방법에 따라 수득될 수 있다. 모노클로날 항체를 제조하기 위한 다른 방법 또한 공지되어 있다(참조: Harlow et al., ed., 1988 "Antibodies: a laboratory manual"). 모노클로날 항체는 포유동물 (예를 들어, 마우스, 래트, 토끼 또는 심지어 인간 등)을 면역화시키고 하이브리도마를 유도하는 림프구 융합 기술을 사용함에 의해 제조될 수 있다(참조: Kohler and Milstein, 1975). 통상의 기술에 대한 대안적 기술이 존재한다. 예를 들어, 하이브리도마로부터 클로닝된 핵산을 발현시킴에 의해 모노클로날 항체를 생성할 수 있다. 또한, 항체에 대한 cDNA를 벡터에 도입함에 의한 파아지 디스플레이 기술에 의해 항체를 생산할 수 있고, 상기 벡터는 전형적으로 파아지 (예를 들어, *E. coli*에 대한 fUSE5, Scott J.K., Smith G.P. Science 1990; 249:386-390)의 표면에서 유전자 라이브러리 V를 나타내는 필라멘트 파아지이다. 이들 항체 라이브러리를 작제하기 위한 프로토콜은 문헌(참조: J.D. Marks et al., J. Mol. Biol., 222 (1991), p. 581)에 기재되어 있다. 시그날 서열 (서열번호 2)을 갖는 전장 네트린-1에 상응하거나, 이의 적합한 단편에 상

응하는 cDNA를 사용하여 이들 방법에 따라 모노클로날 항체를 생성할 수 있다.

[0048] 바람직한 구현예에서, NTN1 중화 항체는 본원에 참조로 인용되는 WO2015/104360에 기재된 항체이다. 이것은 NTN1 에피토프 또는 서열번호 3 또는 35의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 또는 이의 변이체에 특이적으로 결합하는 항체이다. 이들 항체는 NTN1에 결합하는 성질을 갖고 UNC5 또는 DCC 수용체와 같은 네트린-1 수용체를 통한 종양 세포의 세포사 또는 아폽토시스를 유도한다. 이들 항체는 바람직하게 모노클로날 항체이다. 이들 항체는 네트린-1/네트린-1 수용체 상호작용 또는 네트린-1 매개된 이량체화를 방해하거나 지연시킬 수 있다. 다양하게 유도될 수 있는 형태의 항체 (이의 단편 및 조합을 포함하는)는 이후 본원에서 기재된다.

[0049] 일 구현예에서, IMGT CDR의 정의를 기준으로, 상기 항체는 서열번호 5의 서열의 CDR1-H, 서열번호 6의 서열의 CDR2-H, 서열번호 7의 서열의 CDR3-H, 서열번호 8의 서열의 CDR1-L, 서열 YAS의 CDR2-L 및 서열번호 9의 서열의 CDR3-L을 포함한다. 캐뱃 CDR의 정의를 기준으로, 상기 항체는 서열번호 28의 서열의 CDR1-H, 서열번호 29의 서열의 CDR2-H, 서열번호 30의 서열의 CDR3-H, 서열번호 31의 서열의 CDR1-L, 서열번호 32의 서열의 CDR2-L 및 서열번호 9의 서열의 CDR3-L을 포함한다.

[0050] 제1 시리즈의 구현예에서, 본 발명의 항체는 서열번호 10, 11, 12 또는 13의 아미노산 서열을 포함한다. 전형적으로, 이것은 서열번호 10 및 11의 서열 또는 서열번호 12 및 13의 서열 둘 다를 포함한다.

[0051] 제2 시리즈의 구현예에서, 항체는 인간화된다. 바람직하게, 이것은 서열번호 14 내지 19 (VL)의 그룹으로부터 및/또는 서열번호 20 내지 27 (VH)의 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 전형적으로, 상기 항체는 인간화되고 서열번호 14 내지 19의 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 서열번호 20 내지 27의 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0052] 특이적 구현예는 하기의 인간화된 항체이다. 이 표에서 열거된 첫번째는 쥐 CDR의 인간 IgG1로의 이식에 상응한다. HUM으로 불리우는 다른 것들은 가변 인간 골격 영역을 갖는 모노클로날 항체이다. 일 구현예에서, 본 발명은 HUM01, HUM02, HUM03, HUM04, HUM05, HUM06, HUM07, HUM08, HUM09 및/또는 HUM10을 사용하거나 본 발명의 조성물은 이들을 포함한다. 전형적인 구현예에서, HUM03이 사용된다. 표 1은 또한 인간 IgG1의 CH 및 CL에 대한 참조를 제공한다:

표 1

[0053]

	VH 서열번호	불변 중쇄	VL 서열번호	불변 경쇄
CDR 그래프트 (인간 IgG1 VH 또는 VL로 이식된 쥐 CDR)	27	인간 IgG1 (GenBank: AEL33691.1 변형된 R97K)	19	인간 IgG1 (GenBank: CAC20459.1)
HUM01	20	인간 IgG1	14	인간 IgG1
HUM02	21	인간 IgG1	15	인간 IgG1
HUM03	22	인간 IgG1	16	인간 IgG1
HUM04	23	인간 IgG1	17	인간 IgG1
HUM05	24	인간 IgG1	17	인간 IgG1
HUM06	25	인간 IgG1	16	인간 IgG1
HUM07	26	인간 IgG1	17	인간 IgG1
HUM08	22	인간 IgG1	17	인간 IgG1
HUM09	25	인간 IgG1	18	인간 IgG1
HUM10	21	인간 IgG1	16	인간 IgG1

[0054] NTN1 수용체 폴리펩타이드

[0055] 또 다른 구현예에서, NTN1 (네트린-1) 중화제 약물은 네트린-1 수용체의 세포외 도메인 또는 상기 세포외 도메인의 단편을 포함하는 화합물이다. 예를 들어, 네트린-1 수용체의 세포외 도메인 또는 상기 세포외 도메인의 단편의 아미노산 서열은 UniProt 서열 ID [세포외 도메인 위치 범위]로 나타낸다: UNC5A : Q6ZN44 [aas 26-306, 또는 단편 34-240]; UNC5B : Q8IZJ1 [aas 27-377 또는 단편 29-244]; UNC5C : 095185 [aas 41-380 또는 단편 61-258]; UNC5D : Q6UXZ4 [aas 33-379]; DCC : P43146 [aas 26-1097]. 상기 약물은 네트린-1에 결합할 수 있다. 네트린-1 수용체는 DCC, UNC5A, UNC5B, UNC5C 또는 UNC5D일 수 있다.

[0056] 일 구현예에서, 세포외 도메인 또는 이의 부분은 항체 Fc 부분에 결합한다. 바람직한 구현예에서, Fc 부분은

인간 IgG의 Fc 또는 이의 부분이다. 인간 IgG는 즉, IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3일 수 있다. 바람직한 구현예에서, IgG는 IgG1이다.

[0057] 일 구현예에서, 융합 단백질은 단일쇄이고, 이는 단백질이 각각 DCC의 제4 또는 제5 피브로넥 유사 도메인 또는 UNC5의 2개의 Ig 유사 도메인을 포함하거나 이들로 구성된 DCC 또는 UNC5 단편 및 화합물의 약제학적 파라미터를 개선시키는 펩타이드 또는 단백질 서열로 만들어져 있음을 의미한다.

[0058] 또 다른 바람직한 구현예에서, 융합 단백질은 이중 쇄이고, 이는 상기 융합 단백질이 각각 DCC의 제4 또는 제5 피브로넥틴 유사 도메인 또는 UNC5의 2개의 Ig 유사 도메인을 포함하거나 이들로 구성된 2개의 쇄 및 항체 Fc 부분으로 만들어져 있음을 의미하고, 2개의 쇄는 함께 바람직하게 하나 이상, 예를 들어, 2개의 디설파이드 결합에 의해 연결되어 있다.

[0059] 일 구현예에서, 상기 약물은 DCC의 제5 피브로넥틴 도메인 (Fn5 또는 5Fbn)을 포함한다. 바람직하게, 상기 약물은 항체 Fc 부분에 융합된 상기 Fn5를 포함하는 DCC-융합 단백질을 포함한다. 바람직한 구현예에서, Fc 부분은 인간 IgG의 Fc 또는 이의 부분이다. 인간 IgG는 즉, IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3일 수 있다. 바람직한 구현예에서, IgG는 IgG1이다. DCC 유전자는 예를 들어, ID 1630 (2012년 7월 14일자로 업데이트됨)하에 NCBI로부터 가용하고, 이것은 2012년 7월 11자로 업데이트된 Uniprot P43146으로서 DCC 수용체 단백질을 암호화한다. 본 발명에 유용하고 Fn5를 포함하는 DCC-융합 단백질은 본원에 참조로 인용된 문헌(WO2012025618)에 기재되어 있다. 일 구현예에서, 융합 단백질은 문헌(참조: WO2012025618)에서 서열번호 2, 3 또는 4의 아미노산 서열을 갖는다. 일 구현예에서, 융합 단백질은 문헌(참조: WO2012025618)에서 서열번호 1의 DNA 서열에 의해 암호화되어 있다. Fn5를 포함하는 융합 단백질의 다른 예는 문헌(참조: WO2007099133)에 기재된 글루타티온-S-트랜스퍼라제 (DCC-5Fbn-GST)와의 DCC-5-피브로넥틴 융합 단백질이다.

[0060] 일 구현예에서, 약물은 UNC5의 2개의 Ig-유사 도메인을 포함한다. 바람직하게, 상기 약물은 항체 Fc 부분에 융합된 UNC5의 2개의 Ig 유사 도메인을 포함하는 UNC5-융합 단백질을 포함한다. 인간 IgG는 즉, IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3일 수 있다. 바람직한 구현예에서, IgG는 IgG1이다. 일 구현예에서, UNC5는 UNC5A이다. 또 다른 구현예에서, UNC5는 UNC5B이다. 또 다른 구현예에서, UNC5는 UNC5C이다. 여전히 또 다른 구현예에서, UNC5는 UNC5D이다.

[0061] 일 구현예에서, UNC5A-융합에서 UNC5A 단백질은 본원에 참조로 인용되는 문헌(참조: WO2014/041088)에서의 서열번호 1의 아미노산 20 내지 217을 포함하거나 이들로 이루어진다. 상기 융합 단백질은 서열번호 1의 아미노산 220 내지 446을 포함하거나 이들로 이루어진 IgG1 Fc를 추가로 포함할 수 있다. 상기 Fc는 예를 들어, GT와 같은 링커를 통해 UNC5A 단백질에 융합된다. 일 구현예에서, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하거나 이것으로 이루어진 UNC5A 단백질의 UNC5A-융합: Kappa2 신호 펩타이드 서열: aas 1 내지 19; UNC5A의 Ig-유사 도메인: aas 20 내지 217; 링커: aas 218-219; 인간 IgG1 Fc: aas 220 내지 446에 관한 것이다. 일 구현예에서, 성숙한 융합 단백질은 kappa2 신호 펩타이드 서열을 포함하지 않는다. 바람직한 구현예에서, 상기 융합 단백질은 이중 쇄이다. 본 발명은 또한 서열번호 1의 20 내지 217의 아미노산 서열 또는 아미노산 20 내지 446의 전체 길이에 대해 90% 이상, 바람직하게 96, 95, 94, 93, 92 또는 91% 동일한 퍼센트를 갖는 변이체 서열을 포함한다. 아미노산 치환은 예를 들어, 서열번호 1의 20 내지 217 아미노산 서열의 전체 길이 상에서 위치 9, 72, 74, 87, 144, 164, 170, 193 및/또는 210 중 하나 또는 여러 위치에서 일어날 수 있다.

[0062] 또 다른 구현예에서, UNC5B-융합에서 UNC5B 단백질은 본원에 참조로 인용되는 문헌(참조: WO2014/041088)에서의 서열번호 2의 아미노산 20 내지 215를 포함하거나 이들로 이루어진다. 상기 융합 단백질은 서열번호 2의 아미노산 218 내지 444를 포함하거나 이들로 이루어진 IgG1 Fc를 추가로 포함할 수 있다. 상기 Fc는 예를 들어, GT와 같은 링커를 통해 UNC5B 단백질에 융합된다. 일 구현예에서, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하거나 이것으로 이루어진 UNC5B 단백질의 UNC5B-융합에 관한 것이다: Kappa2 신호 펩타이드 서열: aas 1 내지 19; UNC5B의 Ig-유사 도메인: aas 20 내지 215; 링커: aas 216-217; 인간 IgG1 Fc: aas 218 내지 444에 관한 것이다. 일 구현예에서, 성숙한 융합 단백질은 kappa2 신호 펩타이드 서열을 포함하지 않는다. 바람직한 구현예에서, 상기 융합 단백질은 이중 쇄이다. 본 발명은 서열번호 2의 20 내지 215의 아미노산 서열 또는 아미노산 20 내지 444의 전체 길이에 대해 90% 이상, 바람직하게 96, 95, 94, 93, 92 또는 91% 동일한 퍼센트를 갖는 변이체 서열을 포함한다. 아미노산 치환은 예를 들어, 서열번호 2의 20 내지 215 아미노산 서열의 전체 길이 상에서 위치 29, 74, 100, 109, 113, 146, 149, 155, 172, 184, 189, 201, 213 및/또는 214 중 하나 또는 여러 위치에서 일어날 수 있다.

[0063] 여전히 또 다른 구현예에서, UNC5C-융합에서 UNC5C 단백질은 문헌(참조: WO2014/041088)에서의 서열번호 3의 아

미노산 20 내지 217을 포함하거나 이들로 이루어진다. 상기 융합 단백질은 서열번호 3의 아미노산 220 내지 446을 포함하거나 이들로 이루어진 IgG1 Fc를 추가로 포함할 수 있다. 이 Fc는 예를 들어, GT와 같은 링커를 통해 UNC5C 단백질에 융합된다. 일 구현예에서, 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나 이것으로 이루어진 UNC5C 단백질의 UNC5C-융합에 관한 것이다: Kappa2 신호 펩타이드 서열: aas 1 내지 19; UNC5C의 Ig-유사 도메인: aas 20 내지 217; 링커: aas 218-219; 인간 IgG1 Fc: aas 220 내지 446에 관한 것이다. 일 구현예에서, 성숙한 융합 단백질은 kappa2 신호 펩타이드 서열을 포함하지 않는다. 바람직한 구현예에서, 상기 융합 단백질은 이중 쇄이다. 본 발명은 서열번호 3의 20 내지 217의 아미노산 서열 또는 아미노산 20 내지 446의 전체 길이에 대해 90% 이상, 바람직하게 96, 95, 94, 93, 92 또는 91% 동일한 퍼센트를 갖는 변이체 서열을 포함한다. 아미노산 치환은 예를 들어, 서열번호 3의 20 내지 217 아미노산 서열의 전체 길이 상에서 위치 33, 66, 109, 129, 136, 178, 189 및/또는 211 중 하나 또는 여러 위치에서 일어날 수 있다.

[0064] 여전히 또 다른 구현예에서, UNC5D-융합에서 UNC5D 단백질은 문헌(참조: WO2014/041088)에서의 서열번호 4의 아미노산 20 내지 217을 포함하거나 이들로 이루어진다. 상기 융합 단백질은 서열번호 4의 아미노산 220 내지 446을 포함하거나 이들로 이루어진 IgG1 Fc를 추가로 포함할 수 있다. 상기 Fc는 예를 들어, GT와 같은 링커를 통해 UNC5D 단백질에 융합된다. 일 구현예에서, 본 발명은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하거나 이것으로 이루어진 UNC5D 단백질의 UNC5D-융합에 관한 것이다: Kappa2 신호 펩타이드 서열: aas 1 내지 19; UNC5D의 Ig-유사 도메인: aas 20 내지 217; 링커: aas 218-219; 인간 IgG1 Fc: aas 220 내지 446에 관한 것이다. 일 구현예에서, 성숙한 융합 단백질은 kappa2 신호 펩타이드 서열을 포함하지 않는다. 바람직한 구현예에서, 상기 융합 단백질은 이중 쇄이다. 본 발명은 서열번호 4의 20 내지 217의 아미노산 서열 또는 아미노산 20 내지 446의 전체 길이에 대해 90% 이상, 바람직하게 96, 95, 94, 93, 92 또는 91% 동일한 퍼센트를 갖는 변이체 서열을 포함한다. 아미노산 치환은 예를 들어, 서열번호 4의 20 내지 217 아미노산 서열의 전체 길이 상에서 위치 38, 79, 80, 115, 131, 178, 186, 201 및/또는 212 중 하나 또는 여러 위치에서 일어날 수 있다.

[0065] 본 발명은 폴리펩타이드 자체 보다는 차라리 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 투여를 제공할 수 있다. 환자에서 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 벡터를 통상적인 바와 같이 사용할 수 있다. 당업자는 본 발명을 수행하는데 사용될 수 있는, 벡터 및 벡터를 제조하는 방법 및 이들의 용도를 기재하는 WO2007/099133 및 WO2014/041088을 언급할 수 있다.

[0066] 관문 억제제

[0067] 하나의 양상에서 면역 관문 억제제는 생물학적 치료학적 또는 소분자이다. 또 다른 양상에서, 관문 억제제는 모노클로날 항체, 인간화된 항체, 완전히 사람 항체, 융합 단백질 또는 이들의 조합이다. 항체는 상기 경로에 관여하는 임의의 단백질에 대해 및 보다 특히 수용체 또는 리간드에 대해 지시될 수 있다. 공지된 바와 같이, 면역 관문 억제제는 암 세포에 대한 면역 반응을 회복시킬 수 있다. 특히, 억제제는 상호 작용 단백질 간의 상호작용을 방해하거나 지연시키거나 억제하여 종양 세포를 사멸하는 T 세포를 허용한다. 추가의 양상에서, 관문 억제제는 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, A2aR, B-7 또는 이들의 조합일 수 있는 관문 단백질을 억제한다. 추가의 양상에서, 관문 억제제는 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, A2aR, B-7 또는 이들의 조합일 수 있는 관문 단백질의 리간드와 상호작용한다.

[0068] 항-PD1, 항-PD-L1 및 항-PD-L2 항체

[0069] 본 발명은 PD1/PD-L1 및/또는 PD1/PD-L2 경로를 차단하거나, 억제하거나 감소시키는 항체를 사용한다.

[0070] 현재 시판되거나 임상 평가 중에 있는, 경로를 차단하는 적어도 5개의 제제가 있고, 임의의 이들은 본 발명과 조합하여 유용할 수 있다. 이들 제제는 BMS-936558 (항-PD-L1 mAb, 니볼루맙/ONO-4538, 브리스톨-마이어 스쿠입 (Bristol-Myers Squibb), 이전에 MDX-1106 (WO 2006/121168 중 항체 5C4), MK-3475 (항-PD1 mAb, 람브롤리주맙 또는 펨브롤리주맙, Keytruda®, Merck), MPDL3280A/RG7446 (항-PD-L1 mAb, Roche/Genentech), AMP-224 (항-PD-L2, 암플리뮨 및 GSK를 포함하는 면역어드헤신), 피들리주맙 (항-PD1 mAb, CT-011, CureTech/TEVA - WO 2009/101611)이다.

[0071] 인간화된 항체 h409A11의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 암호화하는 MK-3475 DNA 작제물에 대해, 기탁기관 (American Type Culture Collection Patent Depository (10801 University Bld., Manassas, VA))에 기탁하였다. h409A-I 1의 중쇄를 암호화하는 DNA를 함유하는 플라스미드는 2008년 6월 9일자로 기탁되었고,

081469_SPD-H로 지정되었으며, h409AI 1의 경쇄를 암호화하는 DNA를 함유하는 플라스미드는 2008년 6월 9일자로 기탁되었고 0801470_SPD-L-I 1로 지정되었다.

[0072] 추가의 공지된 PD-1 항체 및 다른 PD-1 억제제는 AMP-224 (GSK에게 허가된 B7-DC/IgG1 융합 단백질), WO 2012/145493에 기재된 AMP-514, WO2011/066389 및 US2013/034559에 기재된 항체 MEDI-4736 (AstraZeneca/Medimmune에 의해 개발된 항-PD-L-1), WO2010/077634에 기재된 항체 YW243.55.S70 (항-PD-L1)을 포함하고, 또한 BMS-936559로서 공지된 MDX-1105는 WO2007/005874에 기재된, 브리스톨-마이어 스쿠입 (Bristol-Myers Squibb)에 의해 개발된 항-PD-L1 항체, 및 WO2006/121168, WO2009/014708, WO2009/114335 및 WO2013/019906에 기재된 항체 및 억제제이다. 본원에 언급된 임의의 참조문헌의 개시내용은 본원에 참조로 인용된다. 항-PD1 항체의 추가의 예는 WO2015/085847에 기재되고, 예를 들어, 각각 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8의 경쇄 가변 도메인 CDR1, 2 및 3을 갖는 항체, 및 각각 서열번호 3, 서열번호 4 및 서열번호 5의 항체 중쇄 가변 도메인 CDR1, 2 및 3을 갖는 항체이고, 여기서, 서열번호는 WO2015/085847에 따라 넘버링한다.

[0073] 항-CTLA-4 항체

[0074] 또한 CD152로서 공지된 CTLA-4 (세포독성 T-림프구-연합된 단백질 4)는 수용체의 CD28 계열의 또 다른 억제제 구성원이고, T 세포 상에서 발현된다. CTLA-4를 결합하고 억제하는 항체는 당업계에 공지되어 있다.

[0075] 하나의 예에서, 항체는 이필리무맙 (상표명 Yervoy®, 브리스톨-마이어스 스쿠입(Myers Squibb)), 인간 IgG 항체이다.

[0076] 이들 면역 관문 억제제 중 각각의 하나, 특히 PD1, PD-L1 또는 2에 대한 또는 CTLA-4 또는 천연 결합 파트너 또는 리간드에 대한 이들 항체의 각각의 하나는 표 1에서 본원에 기재된 모노클로날 항체, 특히, HUM01, HUM02, HUM03, HUM04, HUM05, HUM06, HUM07, HUM08, HUM09 및/또는 HUM10 중 하나와 조합되거나 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 조합 또는 사용은 HUM03과 함께이다.

[0077] 본 발명의 정의 및 추가의 구현예, 변이체 및 대안물:

[0078] 본원에 사용된 바와 같은 서열 "참조 서열과 적어도 85% 동일성"은 전체 길이 상에서 참조 서열의 전체 길이와 85% 이상, 특히 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 서열이다.

[0079] "서열 동일성"의 퍼센트는 비교 윈도우 상에서 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교함에 의해 결정될 수 있고, 여기서, 비교 윈도우에서 폴리펩타이드 서열 부분은 2개의 서열의 최적의 정렬을 위한 참조 서열 (이는 부가 또는 결실을 포함하지 않는다)과 비교하여 부가 또는 결실 (즉, 갭)을 포함할 수 있다. 백분율은 동일한 아미노산 잔기가 매칭된 위치의 수를 산출하기 위해 2개의 서열에 존재하는 위치의 수를 결정하고, 상기 매칭된 위치의 수를 비교 윈도우에서 위치의 총수로 나누고 서열 동일성의 퍼센트를 산출하기 위해 상기 결과에 100을 곱함에 의해 계산된다. 비교를 위한 서열의 최적의 정렬은 예를 들어, 문헌(참조: Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443)의 알고리즘을 사용하여 글로벌 쌍형성 정렬에 의해 수행된다. 서열 동일성의 백분율은 예를 들어, 프로그램 니들을 사용하여 용이하게 결정될 수 있고, BLOSUM62 매트릭스, 및 하기의 파라미터 갭-개방=10, 갭-연장=0.5를 갖는다.

[0080] 본 발명과 관련하여, "보존성 아미노산 치환(conservative amino acid substitution)"은 아미노산 잔기가 유사한 화학적 성질 (예를 들어, 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄 그룹을 갖는 또 다른 아미노산 잔기에 의해 치환된 것이다. 일반적으로, 보존성 아미노산 치환은 단백질의 기능성 성질을 실질적으로 변화시키지 않는다. 유사한 화학적 성질을 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 그룹의 예는 1) 지방족 측쇄: 글라이신, 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신; 2) 지방족-하이드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌; 3) 아미드-함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; 4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판; 5) 염기성 측쇄: 라이신, 아르기닌, 및 히스티딘; 6) 산성 측쇄: 아스파르트산 및 글루탐산; 및 7) 황-함유 측쇄: 시스테인 및 메티오닌을 포함한다. 보존성 아미노산 치환 그룹은: 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신-트립토판, 라이신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루타메이트-아스파르테이트, 및 아스파라긴-글루타민이다.

[0081] 본원의 전반에 걸쳐, 용어 "포함하는"은 임의의, 추가의, 비특정 용어뿐만 아니라 모든 구체적으로 언급된 특징을 포함하는 것으로서 해석되어야 한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "포함하는"의 사용은 또한 구체적으로 언급된 특징 이외의 다른 특징이 존재하지 않는 (즉, "로 이루어진") 구현예를 기재한다.

[0082] "항체"는 2개의 중쇄가 디설파이드 결합에 의해 서로 연결되고 각각의 중쇄가 디설파이드 결합에 의해 경쇄에

연결된 천연 또는 통상의 항체일 수 있다. 2개의 유형의 경쇄, 람다 (λ) 및 카파 (k)가 있다. 항체 분자의 기능적 활성을 결정하는 5개의 주요 중쇄 부류 (또는 이소형)가 있다: IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE. 각각의 쇄는 독특한 서열 도메인을 함유한다. 경쇄는 2개의 도메인 또는 영역, 가변 도메인 (VL) 및 불변 도메인 (CL)을 포함한다. 중쇄는 4개의 도메인, 가변 도메인 (VH) 및 3개의 불변 도메인 (각각 CH로서 언급되는 CH1, CH2 및 CH3)을 포함한다. 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH)의 가변 영역은 항원에 대한 결합 인지 및 특이성을 결정한다. 경쇄 (CL) 및 중쇄 (CH)의 불변 영역 도메인은 중요한 생물학적 성질, 예를 들어, 항체 쇄 연합, 분비, 경-태반 이동, 보체 결합 및 Fc 수용체 (FcR)로의 결합과 같은 중요한 생물학적 성질을 부여한다. Fv 단편은 면역글로불린의 Fab 단편의 N-말단 부분이고 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄의 가변 부분으로 이루어진다. 항체의 특이성은 항체 조합 부위와 항원성 결정인자 간의 구조적 상보성에 있다. 항체 조합 부위는 초가변 또는 상보성 결정 영역 (CDR)으로부터 주로 기원하는 잔기들로 구성되어 있다. 때로는, 비-초가변 또는 골격 영역 (FR)으로부터의 잔기들은 전체 도메인 구조에 영향을 미치고 따라서 조합 부위에 영향을 미친다.

[0083] "상보성 결정 영역(Complementarity Determining Region)" 또는 "CDR"은 본래의 면역글로불린 결합 부위의 천연 Fv 영역의 결합 친화성 및 특이성을 함께 한정하는 아미노산 서열을 언급한다. 면역글로불린 각각의 경쇄 및 중쇄는 각각 CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L 및 CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H로 지정된 3개의 CDR을 갖는다. 따라서 통상적인 항체 항원-결합 부위는 중쇄 및 경쇄 V 영역 각각으로부터의 CDR 세트를 포함하는, 6개 CDR을 포함한다.

[0084] "골격 영역(Framework Region)" (FR)은 CDR 사이에 위치하는 아미노산 서열, 즉, 단일 종에서 상이한 면역글로불린 중에 상대적으로 보존된 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 상기 부분을 언급한다. 면역글로불린 각각의 경쇄 및 중쇄는 각각 FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L 및 FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H로 지정된 4개의 FR을 갖는다.

[0085] 본원에 사용된 바와 같은 "인간 골격 영역(human framework region)"은 천연적으로 존재하는 인간 항체의 골격 영역과 실질적으로 동일한 (약 85% 이상, 특히, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 100%) 골격 영역이다.

[0086] 본 발명과 관련하여, 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄 내 CDR/FR 정의는 IMGT 정의(참조: Lefranc *et al.* (2003) *Dev Comp Immunol.* **27**(1):55-77; www.imgt.org)를 기준으로 결정되어야 한다.

[0087] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항체"는 단일 도메인 항체 및 이의 단편, 특히, 단일 도메인 항체의 가변 중쇄 및 키메라, 인간화된, 이특이적 또는 다중특이적 항체 뿐만 아니라 통상의 항체 및 이의 단편을 지칭한다.

[0088] 본원에 사용된 바와 같은 항체 또는 면역글로불린은 또한 "단일 도메인 항체"를 포함하고, 이는 보다 최근에 보고되었고 이는 이의 상보성 결정 영역이 단일 도메인 폴리펩타이드의 일부인 항체이다. 단일 도메인 항체의 예는 중쇄 항체, 천연적으로 경쇄가 없는 항체, 통상적인 4개의 쇄 항체로부터 유래된 단일 도메인 항체, 가공된 단일 도메인 항체를 포함한다. 단일 도메인 항체는 마우스, 인간, 낙타, 라마, 염소, 토끼 및 소를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 종으로부터 유래할 수 있다. 단일 도메인 항체는 경쇄가 없는 중쇄 항체로서 공지된 천연의 단일 도메인 항체일 수 있다. 특히, 낙타과 종, 예를 들어, 낙타, 단봉낙타, 라마, 알파카 및 구아나코는 경쇄가 천연적으로 없는 중쇄 항체를 생성한다. 낙타과 중쇄 항체는 또한 CH1 도메인이 부재이다.

[0089] 경쇄가 없는 이들 단일 도메인 항체의 가변 중쇄는 당업계에서 "VHH" 또는 "나노바디"로서 공지되어 있다. 통상적인 VH 도메인과 유사하게, VHH는 4개의 FR 및 3개의 CDR을 함유한다. 나노바디는 통상의 항체 보다 이점을 갖고: 이들은 IgG 분자 보다 약 10배 작고, 결과로서, 적당히 폴딩된 기능성 나노바디는 고수율을 성취하면서 시험관내 발현에 의해 제조될 수 있다. 추가로, 나노바디는 매우 안정하고 프로테아제의 작용에 내성이다. 나노바디의 성질 및 제조는 문헌(참조: Harmsen and De Haard (2007) Appl. Microbiol. Biotechnol. 77:13-22)에 의해 검토되었다.

[0090] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체" 또는 "mAb"는 특정 항원에 대해 지시되고 임의의 특정 방법에 의해 항체의 생성을 요구하는 것으로서 해석되지 않는 단일 아미노산 조성의 항체 분자를 언급한다. 모노클로날 항체는 B 세포의 단일 클론 또는 하이브리도마에 의해 생성될 수 있지만, 즉, 단백질 가공에 의해 생성되는 재조합체일 수도 있다.

[0091] (통상적인) 항체의 "단편(Fragment)"은 온전한 항체의 부분, 특히, 온전한 항체의 항원 결합 영역 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fab', dsFv, $(dsFv)_2$, scFv, $sc(Fv)_2$, 디아바디, 항체 단편으로부터 형성된 이특이적 및 다중특이적 항체를 포함한다. 통상적인 항체의 단편은 또한 중쇄 항체 또는 VHH와 같은 단일 도메인 항체일 수 있다.

[0092] 용어 "Fab"는 약 50,000 Da 분자량 및 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편을 지칭하고, 여기서, 프로테아제인, 파파인으로 IgG를 처리함에 의해 수득된 단편 중에서 H 쇄 및 전체 L 쇄의 N-말단 측쇄의 약 절반은 함께 디설파이드 결합을 통해 결합되어 있다.

[0093] 용어 "$F(ab')_2$"는 약 100,000 Da의 분자량 및 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편을 언급하고, 이는 IgG를 프로테아제인 펩신으로 처리함에 의해 수득된 단편들 중에서 힌지 영역의 디설파이드 결합을 통해 결합된 Fab 보다 약간 크다.

[0094] 단일쇄 Fv ("scFv") 폴리펩타이드는 공유적으로 결합된 VH::VL 이종이량체이고, 이는 통상적으로 펩타이드-암호화 링커에 의해 연결된 VH 및 VL 암호화 유전자를 포함하는 유전자 융합으로부터 발현된다. 본 발명의 사람 scFv 단편은 특히 유전자 재조합 기술을 사용함에 의해 적당한 형태로 유지되는 CDR을 포함한다. 2가 및 다가 항체 단편은 1가 scFv의 연합에 의해 자발적으로 형성될 수 있거나 펩타이드 링커, 예를 들어, 2가 $sc(Fv)_2$와 같은 펩타이드 링커에 의해 1가 scFv를 커플링시킴에 의해 생성될 수 있다.

[0095] "dsFv"는 디설파이드 결합에 의해 안정화되는 VH::VL 이종이량체이다.

[0096] "$(dsFv)_2$"는 펩타이드 링커에 의해 커플링된 2개의 dsFv를 지칭한다.

[0097] 용어 "이특이적 항체" 또는 "BsAb"는 단일 분자 내 2개의 항체의 항원-결합 부위를 조합하는 항체를 지칭한다. 따라서, BsAb는 2개의 상이한 항원에 동시에 결합할 수 있다. 유전학적 가공은 예를 들어, EP 2 050 764 A1에 기재된 바와 같이 결합 성질 및 이펙터 기능의 목적하는 세트와 함께 항체 또는 항체 유도체를 디자인하고, 변형시키고 생성하기 위해 증가하는 빈도로 사용되어 왔다.

[0098] 용어 "다중특이적 항체"는 단일 분자 내 2개 이상의 항체의 항원-결합 부위를 조합하는 항체를 지칭한다.

[0099] 용어 "디아바디(diabody)"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 언급하고, 상기 단편은 동일한 폴리펩타이드 쇄 (VH-VL)에서 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 동일한 쇄 상에 2개의 도메인 간의 쌍형성을 가능하게 하기에는 너무 짧은 링커를 사용함에 의해, 상기 도메인은 또 다른 쇄의 상보적 도메인과 쌍을 형성하고 2개의 항원-결합 부위를 생성하도록 강제된다.

[0100] 특정 구현예에서, 에피토프-결합 단편은 Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fab', dsFv, $(dsFv)_2$, scFv, $sc(Fv)_2$, 디아바디 및 VHH로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0101] 본원에 사용된 바와 같은 "키메라 항체"는 불변 영역 또는 이의 일부가 변형되거나, 대체되거나 교환되어 가변 영역이 상이한 종의 불변 영역에 연결되거나 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속하게 되는 항체이다. "키메라 항체"는 또한 가변 영역 또는 이의 일부가 변형되거나, 대체되거나 교환되어 불변 영역이 상이한 종의 가변 영역에 연결되거나 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속하게 되는 항체를 언급한다.

[0102] 용어 "인간화된 항체(humanized antibody)"는 처음에 전반적으로 또는 부분적으로 비-인간 기원이고 인간에서 면역 반응을 회피하거나 최소화하기 위해 중쇄 및 경쇄의 골격 영역 내 특정 아미노산을 대체하도록 변형된 항체를 언급한다. 인간화된 항체의 불변 도메인은 대부분 인간 CH 및 CL 도메인이다. 일 구현예에서, 인간화된 항체는 인간 기원의 불변 도메인을 갖는다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "인간화된 항체"는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열, 예를 들어, CDR을 함유하는 키메라 항체를 언급한다.

[0103] 용어 "항체"는 모든 이들 종류의 항체, 이의 단편 또는 조합을 포괄하기 위해 사용된다.

[0104] 인간화의 목표는 항체의 완전한 항원 결합 친화성 및 특이성을 유지하면서 사람으로의 도입을 위한 쥐 항체와 같은 이종발생성 항체의 면역원성을 감소시키는 것이다. 인간화된 항체, 또는 다른 포유동물에 의해 거부되지 않도록 적응된 항체는 재표면화 및 CDR 이식과 같은 여러 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 보강 기술은 분자 모델링, 통계학적 분석 및 돌연변이 유발의 조합을 사용하여 항체 가변 영역의 비-CDR 표면을 변형시켜 표적 숙주의 공지된 항체의 표면을 재어셈블리한다.

[0105] 항체는 CDR-이식 (EP0239400; WO91/09967; 미국 특허 제5,530,101호 및 제5,585,089호), 베니어링 또는 재표면화 (EP0592106; EP0519596; Padlan (1991) *Molecular Immunology* **28**(4/5):489-498; Studnicka *et al.* (1994) *Protein Engineering* **7**(6):805-814; Roguska *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **91**:969-973), 및 쇄 셔플링 (미국 특허 제5,565,332호)을 포함하는 다양한 다른 기술을 사용하여 인간화될 수 있다. 인간 항체는 파아지 디스플레이 방법을 포함하는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 또한 문헌(미국

특허 제4,444,887호, 제4,716,111호, 제5,545,806호, 및 제5,814,318호; 및 국제 특허 출원 WO98/46645, WO98/50433, WO98/24893, WO98/16654, WO96/34096, WO96/33735, 및 WO91/10741)을 참조한다.

[0106] 본 발명과 관련하여, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 상기 용어가 적용되는 장애 또는 병태, 또는 상기 장애 또는 병태의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 이의 진행을 억제하거나 예방함을 의미한다.

[0107] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "암을 치료하는"은 특히, 종양의 악성 세포의 성장 및/또는 상기 종양으로부터 전이의 진행의 억제를 의미한다. 상기 치료는 또한 종양 성장의 퇴행, 즉, 측정 가능한 종양 크기의 감소를 유발할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 치료는 종양 또는 전이의 부분적 퇴행을 유도한다. 또 다른 특정 구현예에서, 상기 치료는 종양 또는 전이의 완전한 퇴행을 유도한다. 일부 양상에서, 치료는 전이를 예방한다.

[0108] 본 발명에 따라 용어 "환자" 또는 "이를 필요로 하는 환자"는 악성 종양으로 영향을 받거나 영향을 받을 가능성이 있는 인간 또는 비-인간 포유동물에 대해 의도된다.

[0109] "치료학적 유효량"이란 임의의 의학 치료에 적용될 수 있는 합리적 이득/위험 비율로 상기 암 질환을 치료하에 충분한 양의 활성제를 의미한다. 그러나, 활성제의 총 하루 사용량은 완전한 의학적 판단 범위 내에 담당의에 의해 결정되는 것으로 이해된다. 임의의특정 환자에 대한 특이적 치료학적 유효량은 치료받는 장애 및 장애의 중증도; 사용되는 특이적 폴리펩타이드 또는 항체의 활성; 사용되는 특이적 조성, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이; 투여 시간, 투여 경로 및 사용되는 특이적 활성제의 분비율; 치료의 지속 기간; 사용되는 특이적 활성제와 조합하거나 이와 일치하는 투여에서 사용되는 약물 및 의학 분야에 널리 공지된 인자들에 좌우된다.

[0110] "약제학적으로" 또는 "약제학적으로 허용되는"은 포유동물, 바람직하게 인간에게 적정하게 투여되는 경우 역반응, 알레르기 반응 또는 다른 원치 않는 반응을 생성하지 않는 분자 실체 및 조성물을 언급한다. 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제는 비-독성 고체, 반고체 또는 액체 충전제, 희석제, 캡슐화 물질 또는 임의의 유형의 제형 보조제를 언급한다.

[0111] 약제학적 조성물:

[0112] 본 발명의 폴리펩타이드 또는 항체를 포함하는 약제학적 조성물의 형태 및 투여 경로는 전형적으로 치료받는 병태, 병의 중증도, 환자의 연령, 체중 및 성별 등에 의존한다.

[0113] 본 발명의 활성제는 국소, 경구, 비경구, 비강내, 정맥내, 근육내, 피하, 또는 안내 투여 등일 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 활성제는 정맥내로 투여된다.

[0114] 특히, 본 발명의 활성제를 포함하는 약제학적 조성물은 주사될 수 있는 제형에 대해 약제학적으로 허용되는 비히클을 함유할 수 있다. 이들은 특히, 등장성, 멸균성, 식염수 용액 (인산 일나트륨 또는 인산 이나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘 또는 염화마그네슘 또는 상기 염의 혼합물), 또는 경우에 따라 멸균수 또는 생리학적 식염수의 첨가시 주사 가능한 용액의 구성을 허용하는 건조, 특히, 동결 건조된 조성물일 수 있다.

[0115] 약제학적 조성물을 제조하기 위해, 본 발명의 유효량의 활성제는 약제학적으로 허용되는 담체 또는 수성 매질에서 용해되거나 분산될 수 있다.

[0116] 주사 가능한 용도를 위해 적합한 약제학적 형태는 멸균 주사 가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수성 용제 또는 분산제 및 멸균 산제를 포함한다. 모든 경우에, 상기 형태는 멸균성이어야만 하고 용이한 주사능이 존재하는 정도로 유동성이어야 한다. 이는 제조 및 저장 조건하에서 안정해야 하고 세균 및 진균류와 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야만 한다.

[0117] 상기 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적당한 유동성은 예를 들어, 렉시틴과 같은 코팅을 사용함에 의해, 분산제의 경우에 요구되는 입자 크기를 유지함에 의해, 그리고 계면활성제, 안정화제, 냉동보호제 또는 항산화제에 의한 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 예방은 항세균 및 항진균류 제제에 의해 수행될 수 있다. 많은 경우에, 등장성 제제, 예를 들어, 당 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 수 있다.

[0118] 멸균 주사 가능한 용액은 요구되는 바와 같이 상기 계수된 수개의 성분들과 함께 적당한 용매 중에서 요구되는 양으로 활성제를 혼입함에 의해 제조된다. 일반적으로, 분산제는 다양한 안정화된 활성 성분을 기본 분산

매질, 및 상기 열거된 것들로부터 요구되는 다른 성분들을 함유하는 멸균 비히클로 혼입시킴에 의해 제조된다. 멸균 주사 가능한 용액의 제조를 위한 멸균 산제의 경우에, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조 기술이고 이는 활성 성분 및 이의 이전의 멸균-여과된 용액으로부터 임의의 추가의 목적하는 성분의 산제를 생성시킨다.

[0119] 제형화시, 용액은 투여 제형과 상용성인 방식으로 치료학적 유효량으로서 투여될 것이다. 상기 제형은 상기된 바와 같은 주사 가능한 용액의 유형과 같은 다양한 투여 형태로 용이하게 투여되지만 약물 방출 캡슐 등이 또한 사용될 수 있다.

[0120] 수용액 중에 비경구 투여를 위해, 예를 들어, 용액은 필요한 경우 적합하게 완충되어야만 하고 액체 희석제는 먼저 충분한 식염수 또는 글루코스와 등장성이어야 한다. 이들 특정 수용액은 특히 정맥내, 근육내, 피하 및 복막내 투여를 위해 적합하다. 이와 관련하여, 사용될 수 있는 멸균 수성 매질은 본원의 개시내용의 관점에서 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 하나의 용량은 1 ml의 등장성 NaCl 용액 중에 용해시킬 수 있고 1000 ml의 피하주입 유체에 첨가되거나 제안된 주입 부위에 주사된다(참조: 예를 들어, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580). 일부 용량 변화는 필연적으로 치료받은 대상체의 병태에 의존하여 일어난다. 투여에 관여하는 사람은 어떠한 경우에도 개별 대상체에 대해 적당한 용량을 결정할 것이다.

[0121] 약물의 투여 및 사용 방법:

[0122] 본원에 사용된 바와 같은 "동시에"는 2개의 제제가 동시에 투여되는 것을 의미하고, 반면 용어 "과 조합된"은 이들이 이들 둘 다가 동일 시간표 내에 치료학적으로 작용하기에 가용한 시간표 내에서, 동시가 아니라면 "순차적으로" 투여됨을 의미하기 위해 사용된다. 따라서, 투여 "순차적으로"는 하나의 제제가 다른 제제 후 5분 이내, 10분 이내 또는 수시간 내에 투여되도록 하고, 단, 제1 투여된 제제의 순환 반감기는 이들이 둘 다 동시에 치료학적 유효량으로 존재하도록 제공된다. 성분들의 투여 사이의 시간 지연은 성분들의 정확한 성질, 이들 간의 상호작용 및 이들의 각각의 반감기에 따라 다양하다.

[0123] "와 조합으로" 또는 "순차적으로"와는 대조적으로, "별도로"는 본원에서 하나의 제제와 다른 제제 간의 차이가 유의적인, 즉, 수시간을 의미하기 위해 사용되고 이것은 제1 투여된 제제가 제2 제제가 투여되는 경우 치료학적 유효량으로 혈류에 더 이상 존재하지 않는 경우를 포함할 수 있다.

[0124] 본 발명의 일 구현예에서, NTN1 중화제 또는 항-네트린-1 항체는 면역 관문 억제제 전 순차적으로 또는 별도로 투여된다.

[0125] 특히 바람직한 구현예에서, 면역 관문 억제제는 NTN1 중화제 또는 항-네트린-1 항체 전 순차적으로 또는 별도로 투여된다.

[0126] 일 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 NTN1 중화제 또는 항-네트린-1 항체 및 면역 관문 억제제 둘 다는 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 및/또는 희석제와 함께 동일한 조성물 내에 있다.

[0127] 또 다른 구현예에서, 이들은 별도의 약제학적 형태 또는 부품 키트 (kit-of-parts) 하에 제공된다. 이것은 환자에게 동시, 별도 또는 순차적 투여를 위해 NTN1 중화제 또는 항-네트린-1 항체 및 면역 관문 억제제를 포함하는 조성물 또는 세트 또는 부품 키트를 형성한다. 따라서, 본 발명은 (i) 혼합물로서 2개의 활성 성분들을 포함하는 조성물, 또는 (ii) 동일한 컨디셔닝 또는 별도의 컨디셔닝 하에 별도로 유지되는 활성 성분들을 포함하는 조성물을 포함할 수 있으며 일반적으로 (ii)의 경우에서 부품 키트를 언급할 수 있다.

[0128] 치료 방법, 용도 및 사용을 위한 조성물의 일 구현예에서, 투여는 순차적으로 또는 별도로 수행된다. 2개의 투여 간의 간격은 적어도 5, 10, 15, 20 또는 24 시간, 바람직하게 24 내지 96시간, 보다 바람직하게 24 내지 72 시간, 또는 보다 특히 24시간 내지 48시간, 예를 들어, 24시간일 수 있다. 일 구현예에서, 하나의 제제 또는 약물은 다른 제제 또는 약물 투여 후에 간단히 투여된다.

[0129] 상이한 약제학적 형태는 충분한 양으로 발명의 치료 방법에 사용될 수 있다.

[0130] 본 발명은 면역 관문 억제제의 용법을 의미하거나 의미하지 않을 수 있다. 그러나, NTN1 중화제 또는 항-네트린-1 항체와 함께 일어나는 상승작용은 환자 내 면역 관문 억제제의 하한 용량을 사용할 수 있게 한다. 당업자는 본 발명에 의해 제공된 조합 치료와 관련하여 최적의 투여 용법을 결정할 수 있다.

[0131] 약제학적 조성물은 적합한 용량, 즉, NTN1 중화제 또는 항-네트린-1 항체에 대해 암이 치료되어야만 하는 대상

체의 체중 kg 당 적어도 1 mg, 예를 들어, 약 1 mg 내지 약 100 mg, 특히, 약 10 mg 내지 약 60 mg의 용량으로 대상체에 투여될 수 있다. 면역 관문 억제제는 조합이 상승작용 효능을 갖는 한 통상의 용량으로 또는 통상의 용량 보다 감소된 용량으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 면역 관문 억제제의 용량은 10, 20, 30, 40, 50% 이상 감소된다.

[0132] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "상승작용성"은 활성 성분, 예를 들어, 항체가 조합하여 사용되는 경우 2개의 성분의 개별 효과를 부가하는 것으로 예상되는 것 보다 큰 효과를 생성함을 의미한다. 유리하게, 상승작용성 상호작용은 각각의 성분의 하한 용량이 환자에게 투여될 수 있도록 하여, 동일한 치료학적 효과를 생성하고/하거나 유지하면서 화학치료요법의 독성을 감소시킬 수 있다. 따라서, 특히 바람직한 구현예에서, 각각의 성분은 준-치료학적 용량으로 투여될 수 있다.

[0133] [표 2] 서열 기재

서열 번호	기재	서열
1	볼드체의 신호 펩타이드 및 볼드체로 맵핑되고 밑줄쳐진 선형 에피토프를 갖는 NTN1 아미노산 (aa) 서열 (seq.)	***MMRAVWEALAALAAVACLVGAVRG***GPGLSMFAGQAA QPDPCSDENGHPRRCIPDFVNAAFGKDVRVSSTCGRP PARYCVVSERGEERLRSCHLCNASDPKKAHPPAFLTDL NNPHNLTCWQSENYLQFPHNVTLTLSLGKKFEVTYVSL QFCSPRPESMAIYKSMDYGRTWVPFQFYSTQCRKMYN RPHRAPITKQNEQEAVCTDSHTDMRPLSGGLIAFSTLDG RPSAHDFDNSPVLQDWVTATDIRVAFSRLHTFGDENED DSELARDSYFYAVSDLQVGGRCKCNGHAARCVRDRDD SLVCDCRHNTAGPECDRCKPFHYDRPWQRATAREANE C**VACNCNLHARRCRFNMELYKLSGRKSGGVCLNCRH NTAGRHCH**YCKEGYYRDMGKPITHRKACKACDCHPVG AAGKTCNQTTGQCPCKDGVTGITCNRCAKGYQQSRSPI APCIKIPVAPPTTAASSVEEPEDCDSYCKASKGKLKINMK KYCKKDYAVQIHILKADKAGDWWKFTVNIISVYKQGTSRI RRGDQSLWIRSRDIACKCPKIKPLKKYLLLGNAEDSPDQ SGIVADKSSLVIQWRDTWARRLRKFQQREKKGKCKKA
2	NTN1 핵산 서열	ATGATGCGCGCAGTGTGGGAGGCGCTGGCGGCGCT GGCGGCGGTGGCGTGCCTGGTGGGCGCGGTGCGCG GCGGGCCCGGGCTCAGCATGTTCGCGGGCCAGGCG GCGCAGCCCGATCCCTGCTCGGACGAGAACGGCCAC CCGCGCCGCTGCATCCCGGACTTTGTCAATGCGGCC TTCGGCAAGGACGTGCGCGTGTCCAGCACCTGCGGC CGGCCCCCGGCGCGCTACTGCGTGGTGAGCGAGCG CGGCGAGGAGCGGCTGCGCTCGTGCCACCTCTGCAA CGCGTCCGACCCCAAGAAGGCGCACCCGCCCGCCTT CCTCACCGACCTCAACAACCCGCACAACCTGACGTG CTGGCAGTCCGAGAACTACCTGCAGTTCCCGCACAA CGTCACGCTCACACTGTCCCTCGGCAAGAAGTTCGAA GTGACCTACGTGAGCCTGCAGTTCTGCTCGCCGCGG CCCGAGTCCATGGCCATCTACAAGTCCATGGACTACG GGCGCACGTGGGTGCCCTTCCAGTTCTACTCCACGC AGTGCCGCAAGATGTACAACCGGCCGCACCGCGCGC

[0134]

		CCATCACCAAGCAGAACGAGCAGGAGGCCGTGTGCA CCGACTCGCACACCGACATGCGCCCGCTCTCGGGCG GCCTCATCGCCTTCAGCACGCTGGACGGGCGGCCCT CGGCGCACGACTTCGACAACTCGCCCGTGCTGCAGG ACTGGGTCACGGCCACAGACATCCGCGTGGCCTTCA GCCGCCTGCACACGTTCGGCGACGAGAACGAGGAC GACTCGGAGCTGGCGCGCGACTCGTACTTCTACGCG GTGTCCGACCTGCAGGTGGGCGGCCGGTGCAAGTG CAACGGCCACGCGGCCCGCTGCGTGCGCGACCGCG ACGACAGCCTGGTGTGCGACTGCAGGCACAACACGG CCGGCCCGGAGTGCGACCGCTGCAAGCCCTTCCACT ACGACCGGCCCTGGCAGCGCGCCACAGCCCGCGAA GCCAACGAGTGCGTGGCCTGTAACTGCAACCTGCAT GCCCGGCGCTGCCGCTTCAACATGGAGCTCTACAAG CTTTCGGGGCGCAAGAGCGGAGGTGTCTGCCTCAAC TGTCGCCACAACACCGCCGGCCGCCACTGCCATTAC TGCAAGGAGGGCTACTACCGCGACATGGGCAAGCCC ATCACCCACCGGAAGGCCTGCAAAGCCTGTGATTGC CACCCTGTGGGTGCTGCTGGCAAAACCTGCAACCAA ACCACCGGCCAGTGTCCCTGCAAGGACGGCGTGACG GGTATCACCTGCAACCGCTGCGCCAAAGGCTACCAG CAGAGCCGCTCTCCCATCGCCCCCTGCATAAAGATC CCTGTAGCGCCGCCGACGACTGCAGCCAGCAGCGTG GAGGAGCCTGAAGACTGCGATTCCTACTGCAAGGCC TCCAAGGGGAAGCTGAAGATTAACATGAAAAAGTACT GCAAGAAGGACTATGCCGTCCAGATCCACATCCTGAA GGCGGACAAGGCGGGGGACTGGTGGAAGTTCACGG TGAACATCATCTCCGTGTATAAGCAGGGCACGAGCC GCATCCGCCGCGGTGACCAGAGCCTGTGGATCCGCT CGCGGGACATCGCCTGCAAGTGTCCCAAAATCAAGC CCCTCAAGAAGTACCTGCTGCTGGGCAACGCGGAGG ACTCTCCGGACCAGAGCGGCATCGTGGCCGATAAAA GCAGCCTGGTGATCCAGTGGCGGGACACGTGGGCG CGGCGGCTGCGCAAGTTCCAGCAGCGTGAGAAGAAG GGCAAGTGCAAGAAGGCCTAGCG

[0135]

3	NTN1 aa 에피토프 서열	VACNCNLHARRCRFNMELYKLSGRKSGGVCLNCRHNT AGRHCH
4	NTN1 에피토프 cDNA 서열	GTGGCCTGTAACTGCAACCTGCATGCCCGGCGCTGC CGCTTCAACATGGAGCTCTACAAGCTTTCGGGGCGC AAGAGCGGAGGTGTCTGCCTCAACTGTCGCCACAAC ACCGCCGGCCGCCACTGCCAT
5	CDR1-H (IMGT)의 aa 서열	GYTFTSYN
6	CDR2-H (IMGT)의 aa 서열	IYPGNGDT
7	CDR3-H (IMGT)의 aa 서열	ARGGTGFAY
8	CDR1-L (IMGT)의 aa 서열	QSVSND
-	CDR2-L (IMGT)의 aa 서열	YAS
9	CDR3-L (IMGT et 캐뱃)의 aa 서열	QQDYSSPWT
10	마우스 4C11 VH의 aa 서열	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS**GYTFTSYN**MHWV KQTPRQGLEWIGA**IYPGNGDT**SYNQKFKGKATLTVDKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC**ARGGTGFAY**WGQGTLV TVSA
11	마우스 4C11 VL의 aa 서열	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKAS**QSVSND**VAWYQQ KPGQSPKLLIY**YAS**NRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTIST VQAEDLAVYFC**QQDYSSPWT**FGGGTKLEIK
12	4C11의 완전한 aa 서열 (VH + 마우스	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS**GYTFTSYN**MHWV KQTPRQGLEWIGA**IYPGNGDT**SYNQKFKGKATLTVDKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC**ARGGTGFAY**WGQGTLV

[0136]

	IgG1 CH)	TVSAAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFP EPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLESDLYTLSSSVTVPSS PRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVP EVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQF SWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQD WLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAE NYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSV LHEGLHNHHTEKSLSHSPGK
13	4C11의 완전한 aa 서열 (VL + 마우스 카파 CL)	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKAS**QSVSND**VAWYQQ KPGQSPKLLIY**YAS**NRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTIST VQAEDLAVYFC**QQDYSSPWT**FGGGTKLEIKRADAAPTV SIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNS YTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
14	4C11의 인간화된 변이체의 VL aa 서열	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKAS**QSVSND**VAWYQQ KPGKAPKLLIY**YAS**NRYTGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNI ESEDAAYYFC**QQDYSSPWT**FGQG
15	4C11의 인간화된 변이체의 VL aa 서열	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS**QSVSND**VAWFQQ RPGQSPRRLIY**YAS**NRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISS LEAEDAATYYC**QQDYSSPWT**FGQG
16	4C11의 인간화된 변이체의 VL aa 서열	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS**QSVSND**VAWYQQ KPGQAPRLLIY**YAS**NRYTGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNI ESEDAAYYFC**QQDYSSPWT**FGQG
17	4C11의 인간화된 변이체의 VL aa 서열	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS**QSVSND**VAWYLQ KPGQSPQLLIY**YAS**NRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISS LEAEDAATYYC**QQDYSSPWT**FGQG
18	4C11의 인간화된 변이체의 VL aa 서열	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCKAS**QSVSND**VAWYQQ KPGQAPRLLIY**YAS**NRYTGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNI ESEDAAYYFC**QQDYSSPWT**FGQG
19	4C11의 인간화된 변이체의 VL aa 서열	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS**QSVSND**VAWYQQ KPGQAPRLLIY**YAS**NRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSL QSEDFAVYYC**QQDYSSPWT**FGQG
20	4C11의 인간화된	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTSYN**MHWV

[0137]

	변이체의 VH aa 서열	RQATGQGLEWMGA**IYPGNGDT**SYNQKFKGRVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYC**ARGGTGFAY**WGQG
21	4C11의 인간화된 변이체의 VH aa 서열	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GYTFTSYN**MHWIR QPPGKGLEWIGA**IYPGNGDT**SYNQKFKGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYC**ARGGTGFAY**WGQG
22	4C11의 인간화된 변이체의 VH aa 서열	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GYTFTSYN**MHWVR QATGQGLEWMGA**IYPGNGDT**SYNQKFKGRLTISKDTSK NQVVLTMTNMDPVDTATYYC**ARGGTGFAY**WGQG
23	4C11의 인간화된 변이체의 VH aa 서열	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGS**GYTFTSYN**MHWV RQATGQGLEWMGA**IYPGNGDT**SYNQKFKGRFTISRDD SKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYC**ARGGTGFAY**WGQG
24	4C11의 인간화된 변이체의 VH aa 서열	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**GYTFTSYN**MHWV RQAPGQGLEWMGA**IYPGNGDT**SYNQKFKGRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC**ARGGTGFAY**WGQG
25	4C11의 인간화된 변이체의 VH aa 서열	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTSYN**MHWV RQATGQGLEWMGA**IYPGNGDT**SYNQKFKGRVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYC**ARGGTGFAY**WGQG
26	4C11의 인간화된 변이체의 VH aa 서열	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GYTFTSYN**MHWVR QATGQGLEWMGA**IYPGNGDT**SYNQKFKGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDTAVYYC**ARGGTGFAY**WGQG
27	4C11의 인간화된 변이체의 VH aa 서열	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTSYN**MHWV RQAPGQGLEWMGA**IYPGNGDT**SYAQKFKGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYC**ARGGTGFAY**WGQ
28	CDR1-H (캐뱃)의 aa 서열	SYNMH
29	CDR2-H (캐뱃)의 aa 서열	AIYPGNGDTSYNQKFKG
30	CDR3-H (캐뱃)의 aa 서열	GGTGFAY
31	CDR1-L (캐뱃)의 aa 서열	KASQSVSNDVA

[0138]

32	CDR2-L (캐뱃)의 aa 서열	YASNRYT
33	정배향 프라이머	aaaagtactgcaagaaggactatgc
34	역배향 프라이머	ccctgcttatacacggagatg
35	NTN1 aa 에피토프 서열	ARRCRFNMELYKLSGRKSGGVC
36	NTN1 에피토프 cDNA 서열	GCCCGGCGCTGCCGCTTCAACATGGAGCTCTACAAG CTTTCGGGGCGCAAGAGCGGAGGTGTCTGC

[0139]

[0140] IMGT 하에 CDR은 적당한 경우 표 1에 볼드체로 나타낸다.

[0141] 이하에서 본 발명은 도면을 참조로 비-제한적인 실시예를 사용하여 기재된다.

도면의 간단한 설명

[0142] 도 1: 마우스에 EMT-6 유방 세포주를 이식하고 항-네트린-1 간섭 약물 (HUM03); 대조군 항체(NP006); HUM03 + 항-CTLA-4 또는 NP006+ 항-CTLA-4 (n=12마리 동물/그룹)로 처리하였다. 종양 용적은 외부적으로 측정하고 종양 용적의 전체 퇴행은 이식 28일 후에 정량하였다. 표는 28일 후 종양이 없는 마우스의 수를 보여준다.

도 2: 도 1과 동일하지만 도면은 EMT-6 유방 종양의 이식 후 80일까지 캐플란-메이어 분석 후 정량된 마우스 생존 백분율을 보여준다 (P=0.046).

도 3: 도 1 및 2에서와 동일한 실험이지만 각각의 동물의 종양 성장을 나타낸다. 동물의 희생은 †로 나타낸다.

도 4: 도 1-2-3과 동일한 유형의 실험이지만 마우스에 4T1 유방 암 세포주를 이식하고 HUM03 +항-PD-1 또는 NP001+ 항-PD-1 (n=7 동물/그룹)으로 처리하였다. 마우스 생존은 25일째에 캐플란-메이어 분석에 의해 정량하였다 (P=0.0411).

도 5: HUM03과 항-CTLA4의 조합은 상승작용성 EMT6 이종이식체 마우스 모델에서 종양 T 세포 이펙터/Treg 균형을 조절한다. 10^6 EMT6 세포는 BalbCJ 8주 암컷 마우스의 측면에 피하 이식하였다. 동물은 단독으로 또는 항-CTLA4 (BioXcell-클론 9H10-20 mg/Kg I.P.)와 연합된 HUM03 (10 mg/kg I.P.) 또는 NP001 IgG1 대조군 이소형에 의해 3회 (예를 들어, 10일, 14일 18일) 처리되는 4개 그룹으로 무작위로 분리하였다. EMT6 종양은 개별적으로 해리시키고 소모성 림프구 및 골수 염색 패널을 사용한 유동 세포측정에 의해 분석하였다. 여기서, 본원 발명자는 CD8 T 세포 이펙터 (좌측), CD4 ; FoxP3 TReg (중앙) 및 이들 간의 균형 (우측)에 집중하였다. 우측 패널에 나타낸 바와 같이, HUM03/CTLA4 mAb의 조합에서 T 세포 이펙터/T 조절제의 균형은 T 세포 이펙터를 향해 이동한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0143] 실시예 1:

[0144] 재료 및 방법

[0145] 세포주:

[0146] 쥐 유방 암종 EMT6 (ATCC® CRL2755™- LGC 표준- 프랑스) 세포는 10%의 태아 소 혈청 및 항생제 (스트렙토마이신 및 페니실린)가 보충된 이글 최소 필수 배지에서 배양하였다.

[0147] 무스 무스쿨루스 (Mus Musculus) 유방 선 4T1 (ATCC® CRL-2539™ LGC 표준- 프랑스) 세포는 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM), 10% FBS에서 배양하였다.

[0148] 마우스 실험:

[0149] 마우스는 특정 병원체 부재 동물 시설에서 유지하고 기관의 가이드라인 및 동물 케어 및 사용 위원회 (Comite d'Evaluation Commun au Centre Leon Berard, a l'Animalerie de transit de l'ENS, au PBES et au laboratoire P4; CECCAP)에 의해 승인된 프로토콜에 따라 취급하였다.

[0150] 5.10^5 또는 10.10^5 EMT6 세포는 BalbCJ 8주 암컷 마우스의 측면에 피하 이식하였다. 모든 동물은 7, 11 및 14일에 항-CTLA4 (BioXcell USA-클론 9H10-)의 400 μg/주사로 3회 처리하였다. 동물은 각각 HUM03; NP006 IgG1 대조군 이소형 (Netris Pharma, France); HUM03 + 항-CTLA4 및 NP001 + 항-CTLA-4로 처리된 4개 그룹으로 무작위 분리하였다. NP006 및 HUM03 항체는 10 mg/kg으로 주당 3회로 복막내 투여하였다. 종양은 외부 캘리퍼에 의해 주당 2회 측정하였다. 종양 진행은 이식 후 29일 후에 결정하였다. 종양이 2000 mm^3의 용적에 도달한 경우, 마우스를 희생시키고 생존을 결정한다.

[0151] 5.10^5 4T1 세포는 BalbC/J 7주 암컷 마우스의 측면에 피하 이식하였다. 동물은 상응하는 그룹 (BioXcell USA-클론 RMP1-14)에서 항-PD1 항체의 100 μg/주사로 2주 처리하였다. 동물은 각각 PBS; HUM03 + 항-PD1 및 NP001

(Netris Pharma, France)으로 처리된 3개 그룹으로 무작위 분리하였다. 종양은 외부 캘리퍼에 의해 주당 3회 측정하였다. 종양이 1500 mm^3의 용적에 도달한 경우, 마우스를 희생시키고 생존을 결정한다.

[0152] 통계:

[0153] 통계는 그래프패드 소프트웨어를 사용하여 수행하였고, 스튜던트 T 시험을 2개 편으로 나누고 0.05 미만의 P 값이 통계학적으로 유의적인 것으로서 고려되었다.

[0154] 생존 곡선은 그래프패드 소프트웨어 상에서 캐플란-메이어 방법에 의해 생성하였다. 데이터는 만텔-콕스 시험으로 분석하였다. n은 반복 수를 지적한다. 모든 통계학적 시험은 2개 편으로 나누고 0.05 미만의 P 값이 통계학적으로 유의적인 것으로서 고려되었다.

[0155] 결과/논의

[0156] 1) HUMO3과 CTLA4 mAb의 조합은 종양 재발을 지연시키고 EMT6 유방암 모델의 마우스 생존을 증가시킨다.

[0157] 항-네트린-1 mAb 및 항-CTLA4의 조합을 시험하기 위해, 유방 EMT-6 암 세포는 BalbC/J 마우스에 이식하였다.

[0158] 도 1-3에 제공된 바와 같이, HUMO3과 면역 관문 억제제 CTLA4의 조합은 단독의 CTLA4를 사용하여 관찰된 항-종양 반응을 크게 증가시킨다. 치료 28일 째에 종양이 없는 마우스의 수는 각각 단독의 HUMO3 그룹에서 0/12 및 단독의 CTLA4 그룹에서 2/12 마리에서 콤보 치료에서 8/12로 이동한다 (도 1).

[0159] 마우스의 생존은 또한 80일 동안에 캐플란 메이어 분석 후 정량하였고 (p=0.046) 이것은 상기 조합이 마우스 생존을 유의적으로 증가시킴을 보여주고 (도 2) 이것은 조합 치료요법에 의해 보다 긴 질환 제어와 연관된 것으로 나타난다 (도 3). 조합의 증가된 활성이 CTLA4로 제한되는지 또는 다른 면역 관문 억제제로 연장될 수 있는지를 분석하기 위해, 본원 발명자는 이어서 HUMO3과 PD-1의 조합 효과를 분석하였다.

[0160] 2) HUMO3과 PD-1 mAb의 조합은 4T1 유방암 모델의 마우스 생존을 증가시킨다.

[0161] 항-네트린-1 mAb 및 항-PD1의 조합을 시험하기 위해, 유방 선 4T1 암 세포를 BalbC/J 마우스에 이식하였다. 도 4에 제공된 바와 같이, 마우스 생존은 이식 20일 후 캐플란 메이어 분석 후 정량하였다 (p=0.0411) (도 4). CTLA4를 사용하여 관찰된 것과 유사하게, PD-1/HUMO3의 조합은 단독의 PD-1 보다 더 효율적이다. 실제로, 단독의 단독치료요법 PD1 mAb가 어떠한 생존 증가와 연관이 없었고 (7마리 마우스 중 4마리가 대조군 처리 그룹에서 관찰된 것과 유사하게 20일 째에 생존하였다), HUMO3과 PD1의 조합은 마우스의 생존을 100%로 증가시킨다 (7마리 마우스 중 7마리는 20일째에 생존하였다).

[0162] 이들 데이터를 종합해 보면 HUMO3과 현재 면역치료학적 치료의 조합이 이들의 효능을 부스팅시킨다는 관점을 지지한다. 네트린-1 간섭의 존재하에 면역 관문 억제제의 상기 증진된 효과를 설명할 수 있는 기전의 연구에서, 본원 발명자는 단독치료요법 또는 조합 치료에 반응하는 종양 면역 침윤을 분석한다.

[0163] 3) HUMO3과 CTLA4 mAb의 조합은 EMT6 유방 암의 모델에서 종양 T 세포 이펙터/T 조절제 비율을 선호한다.

[0164] 종양 면역 침윤에 있어서 항-네트린-1 mAb와 항-CTLA4의 조합의 효과를 분석하기 위해, 유방 EMT-6 암 세포를 상기 나타낸 바와 같이 BalbC/J 마우스에 이식하고 HUMO3 단독 (대 대조군 이소형 NP001), CTLA4 단독 또는 HUMO3 + CTLA4 mAb 조합으로 처리하였다. 종양은 해리되었고 림프 세포 내용물은 유세포 분석에 의해 분석되었다. 도 5에 제공된 바와 같이, 단독치료요법 (HUMO3 또는 CTLA4)은 T 세포 이펙터/T 세포 조절인자의 비율을 유의적으로 영향을 주지 않고, 상기 조합은 상기 비율을 T 세포 이펙터로 전환시킨다. 이것은 상기 조합이 킬러 림프성 세포 (T 세포 이펙터)의 존재를 증진시킴을 시사함에 의해 증가된 효능을 지지한다.

[0165] 실시예 2:

[0166] 5.10^5 EO771 세포는 C57b6J 8주 암컷 마우스의 측면에 피하 이식하였다. 이식 후 6일 째에, 동물은 NP137 또는 NP001 IgG1 대조군 이소형 단독으로 또는 항-PD-1 항체와 조합하여 처리된 4개 그룹으로 무작위로 분리하였다. 모든 동물은 20 mg/kg에서 항-CTLA4 (BioXcell-클론 9H10)로 및/또는 10 mg/kg에서 NP 항체로 IP 경로에 의해 주당 2회 처리하였다. 종양 용적은 외부 캘리퍼에 의해 주당 2회 측정하였다. 종양이 2000 mm^3의 용적에 도달한 경우, 마우스를 희생시킨다.

[0167] 5.10^5 MC38 세포는 C57b6J 8주 암컷 마우스의 옆구리에 피하 이식하였다. 이식 후 6일 째에, 동물은 NP137 또는 NP001 IgG1 대조군 이소형 단독으로 또는 항-PD-1 항체와 조합하여 처리된 4개 그룹으로 무작위로 분리하였

다. 모든 동물은 5 mg/kg에서 항-PD-1 (BioXcell-클론 RMP1-14)으로 및 /또는 10 mg/kg에서 NP 항체로 IP 경로에 의해 주당 2회 처리하였다. 종양 용적은 외부 캘리퍼에 의해 주당 2회 측정하였다. 종양이 2000 mm^3의 용적에 도달한 경우, 마우스를 희생시킨다.

[0168] 5.10^6 0016eM3 세포는 C57b6J 8주 암컷 마우스의 옆구리에 피하 이식하였다. 이식 후 6일 째에, 동물은 NP137 또는 NP001 IgG1 대조군 이소형 단독으로 또는 항-PD-1 항체와 조합하여 처리된 4개 그룹으로 무작위로 분리하였다. 모든 동물은 5 mg/kg에서 항-PD-1 (BioXcell-클론 RMP1-14)로 및/또는 10 mg/kg에서 NP 항체로 IP 경로에 의해 주당 2회 처리하였다. 종양 용적은 외부 캘리퍼에 의해 주당 2회 측정하였다. 종양이 2000 mm^3의 용적에 도달한 경우, 마우스를 희생시킨다.

[0169] EMT-6 및 4T1 세포 (실시예 1을 참조함)는 또한 유사한 조건에서 사용되었다.

[0170] 하기의 표는 NP137 및 항-PD1 항체의 조합으로부터 비롯되는 강화 또는 상승작용을 입증한다.

[0171]

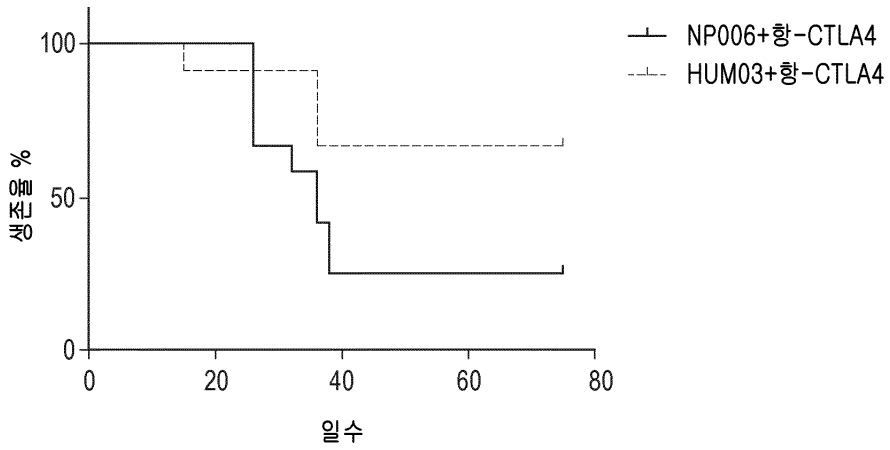
세포주	기관	사용된 ICI	반응		
			NP137	ICI	ICI + NP137
EMT-6	유방암	CTLA-4	-	++	+++
EO771	유방암	CTLA-4	-	+++	++++
4T1	유방암	PD1	-	-	+
0016eM3	흑색종	PD1	-	+++	++++
MC38	결장암	PD1	-	+	++

도면

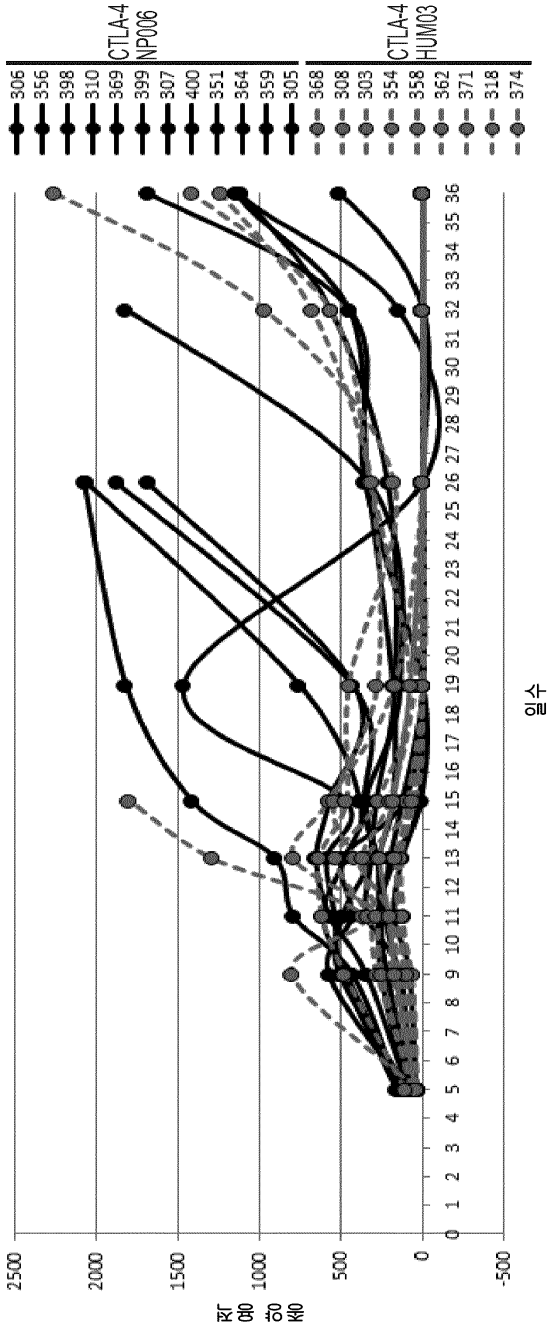
도면1

NP006	HUM03	항-CTLA4+ NP006	항-CTLA4+ HUM03
0/12	0/12	2/12	8/12 p=0.0394 (만텔 콕스)

도면2



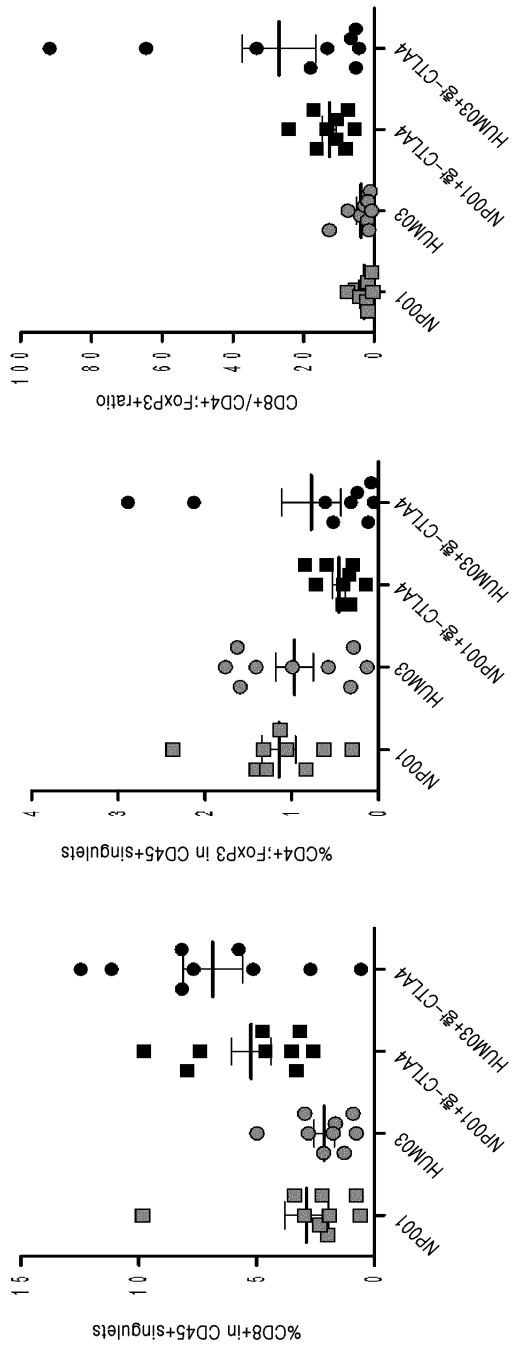
도면3



도면4

PBS	항-PD1+NP006	항-PD1+HUM03
4/7	4/7	7/7 p=0.0411 (만델 콕스)

도면5



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> NETRIS PHARMA

<120> COMBINED TREATMENT WITH NETRIN-1 INTERFERING DRUG AND IMMUNE CHECKPOINT INHIBITORS DRUGS

<130> BET 16L3456

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 604

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(24)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (339)..(381)

<223> linear epitope

<400> 1

```
Met Met Arg Ala Val Trp Glu Ala Leu Ala Ala Leu Ala Ala Val Ala
1               5                  10                  15

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

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

Thr Tyr Val Ser Leu Gln Phe Cys Ser Pro Arg Pro Glu Ser Met Ala
145                 150                 155                 160
Ile Tyr Lys Ser Met Asp Tyr Gly Arg Thr Trp Val Pro Phe Gln Phe
```

165 170 175

Tyr Ser Thr Gln Cys Arg Lys Met Tyr Asn Arg Pro His Arg Ala Pro

180 185 190

Ile Thr Lys Gln Asn Glu Gln Glu Ala Val Cys Thr Asp Ser His Thr

195 200 205

Asp Met Arg Pro Leu Ser Gly Gly Leu Ile Ala Phe Ser Thr Leu Asp

210 215 220

Gly Arg Pro Ser Ala His Asp Phe Asp Asn Ser Pro Val Leu Gln Asp

225 230 235 240

Trp Val Thr Ala Thr Asp Ile Arg Val Ala Phe Ser Arg Leu His Thr

245 250 255

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

260 265 270

Phe Tyr Ala Val Ser Asp Leu Gln Val Gly Gly Arg Cys Lys Cys Asn

275 280 285

Gly His Ala Ala Arg Cys Val Arg Asp Arg Asp Asp Ser Leu Val Cys

290 295 300

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

305 310 315 320

Phe His Tyr Asp Arg Pro Trp Gln Arg Ala Thr Ala Arg Glu Ala Asn

325 330 335

Glu Cys Val Ala Cys Asn Cys Asn Leu His Ala Arg Arg Cys Arg Phe

340 345 350

Asn Met Glu Leu Tyr Lys Leu Ser Gly Arg Lys Ser Gly Gly Val Cys

355 360 365

Leu Asn Cys Arg His Asn Thr Ala Gly Arg His Cys His Tyr Cys Lys

370 375 380

Glu Gly Tyr Tyr Arg Asp Met Gly Lys Pro Ile Thr His Arg Lys Ala

385 390 395 400

Cys Lys Ala Cys Asp Cys His Pro Val Gly Ala Ala Gly Lys Thr Cys

405 410 415

Asn Gln Thr Thr Gly Gln Cys Pro Cys Lys Asp Gly Val Thr Gly Ile
420 425 430
Thr Cys Asn Arg Cys Ala Lys Gly Tyr Gln Gln Ser Arg Ser Pro Ile
435 440 445
Ala Pro Cys Ile Lys Ile Pro Val Ala Pro Pro Thr Thr Ala Ala Ser
450 455 460

Ser Val Glu Glu Pro Glu Asp Cys Asp Ser Tyr Cys Lys Ala Ser Lys
465 470 475 480
Gly Lys Leu Lys Ile Asn Met Lys Lys Tyr Cys Lys Lys Asp Tyr Ala
485 490 495
Val Gln Ile His Ile Leu Lys Ala Asp Lys Ala Gly Asp Trp Trp Lys
500 505 510
Phe Thr Val Asn Ile Ile Ser Val Tyr Lys Gln Gly Thr Ser Arg Ile
515 520 525

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

Gln Gln Arg Glu Lys Lys Gly Lys Cys Lys Lys Ala
595 600

<210> 2
<211> 1817
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 2
atgatgcgcg cagtgtggga ggcgctggcg gcgctggcgg cggtggcgtg cctggtgggc 60
gcggtgcgcg gcgggcccgg gctcagcatg ttcgcgggcc aggcggcgca gcccgatccc 120
tgctcggacg agaacggcca cccgcgccgc tgcatcccgg actttgtcaa tgcggccttc 180

ggcaaggacg tgcgcgtgtc cagcacctgc ggccggcccc cggcgcgcta ctgcgtggtg 240

agcgagcgcg gcgaggagcg gctgcgctcg tgccacctct gcaacgcgtc cgaccccaag 300

aaggcgcacc cgcccgcctt cctcaccgac ctcaacaacc cgcacaacct gacgtgctgg 360

cagtccgaga actacctgca gttcccgcac aacgtcacgc tcacactgtc cctcggcaag 420

aagttcgaag tgacctacgt gagcctgcag ttctgctcgc cgcggcccga gtccatggcc 480

atctacaagt ccatggacta cgggcgcacg tgggtgccct tccagttcta ctccacgcag 540

tgccgcaaga tgtacaaccg gccgcaccgc gcgcccatca ccaagcagaa cgagcaggag 600

gccgtgtgca ccgactcgca caccgacatg cgcccgctct cgggcggcct catcgccttc 660

agcacgctgg acgggcggcc ctcggcgcac gacttcgaca actcgcccgt gctgcaggac 720

tgggtcacgg ccacagacat ccgcgtggcc ttcagccgcc tgcacacgtt cggcgacgag 780

aacgaggacg actcggagct ggcgcgcgac tcgtacttct acgcggtgtc cgacctgcag 840

gtgggcggcc ggtgcaagtg caacggccac gcggcccgct gcgtgcgcga ccgcgacgac 900

agcctggtgt gcgactgcag gcacaacacg gccggcccgg agtgcgaccg ctgcaagccc 960

ttccactacg accggccctg gcagcgcgcc acagcccgcg aagccaacga gtgcgtggcc 1020

tgtaactgca acctgcatgc ccggcgctgc cgcttcaaca tggagctcta caagctttcg 1080

gggcgcaaga gcggaggtgt ctgcctcaac tgtcgccaca acaccgccgg ccgccactgc 1140

cattactgca aggagggcta ctaccgcgac atgggcaagc ccatcaccca ccggaaggcc 1200

tgcaaagcct gtgattgcca ccctgtgggt gctgctggca aaacctgcaa ccaaaccacc 1260

ggccagtgtc cctgcaagga cggcgtgacg ggtatcacct gcaaccgctg cgccaaaggc 1320

taccagcaga gccgctctcc catcgccccc tgcataaaga tccctgtagc gccgccgacg 1380

actgcagcca gcagcgtgga ggagcctgaa gactgcgatt cctactgcaa ggcctccaag 1440

gggaagctga agattaacat gaaaaagtac tgcaagaagg actatgccgt ccagatccac 1500

atcctgaagg cggacaaggc gggggactgg tggaagttca cggtgaacat catctccgtg 1560

tataagcagg gcacgagccg catccgccgc ggtgaccaga gcctgtggat ccgctcgcgg 1620

gacatcgcct gcaagtgtcc caaaatcaag cccctcaaga agtacctgct gctgggcaac 1680

gcggaggact ctccggacca gagcggcatc gtggccgata aaagcagcct ggtgatccag 1740

tggcgggaca cgtgggcgcg gcggctgcgc aagttccagc agcgtgagaa gaagggcaag 1800

tgcaagaagg cctagcg 1817

<210> 3

<211> 43

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Ala Cys Asn Cys Asn Leu His Ala Arg Arg Cys Arg Phe Asn Met

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys Arg His Asn Thr Ala Gly Arg His Cys His

35 40

<210> 4

<211> 129

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gtggcctgta actgcaacct gcatgcccgg cgctgccgct tcaacatgga gctctacaag 60

ctttcggggc gcaagagcgg aggtgtctgc ctcaactgtc gccacaacac cgccggccgc 120

cactgccat 129

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr

1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Gln Ser Val Ser Asn Asp

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 10

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(33)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(58)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (97)..(105)

<223>

CDR according to IGMT

<400> 10

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ala

115

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(32)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(52)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (89)..(97)

<223> CDR according to IGMT

<400> 11

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 12

<211> 440

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(33)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(58)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (97)..(105)

<223> CDR according to IGMT

<400> 12

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

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

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

Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240
Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val
245 250 255
Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val
260 265 270
Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln
290 295 300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala

305 310 315 320

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

325 330 335

Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr

385 390 395 400

Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe

405 410 415

Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys

420 425 430

Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys

435 440

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(32)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(52)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (89)..(97)

<223> CDR according to IGMT

<400> 13

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala

100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu

145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys

210

<210> 14

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized variant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(32)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(52)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (89)..(97)

<223> CDR according to IGMT

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly

100

<210> 15

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized variant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(32)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(52)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (89)..(97)

<223> CDR according to IGMT

<400> 15

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly
100

<210> 16

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized variant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(32)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(52)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (89)..(97)

<223> CDR according to IGMT

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly

100

<210

> 17

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized variant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(32)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(52)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (89)..(97)

<223> CDR according to IGMT

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly

100

<210> 18

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized variant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(32)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(52)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (89)..(97)

<223> CDR according to IGMT

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly

100

<210> 19

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized variant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(32)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (50)..(52)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (89)..(97)

<223> CDR according to IGMT

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly

100

<210> 20

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized variant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(33)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(58)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (97)..(105)

<223> CDR according to IGMT

<400> 20

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105

<210> 21

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized variant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(33)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(58)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (97)..(105)

<223> CDR according to IGMT

<400> 21

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105

<210> 22

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized variant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(33)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(58)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (97)..(105)

<223> CDR according to IGMT

<400> 22

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

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

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val
65 70 75 80

Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105

<210> 23

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> humanized variant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(33)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(58)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (97)..(105)

<223> CDR according to IGMT

<400> 23

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105

<210> 24

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized variant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(33)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(58)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (97)..(105)

<223> CDR according to IGMT

<400> 24

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105

<210> 25

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized variant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(33)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(58)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (97)..(105)

<223> CDR according to IGMT

<400> 25

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105

<210>

26

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized variant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(33)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(58)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (97)..(105)

<223> CDR according to IGMT

<400> 26

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

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

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> humanized variant

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(33)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (51)..(58)

<223> CDR according to IGMT

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (97)..(105)

<223> CDR according to IGMT

<400

> 27

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

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

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

<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 28
Ser Tyr Asn Met His
1 5

<210> 29
<211> 17
<212> PRT

<213> Mus musculus
<400> 29
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 30

Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr

1 5

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala

1 5 10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213

> Mus musculus

<400> 32

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 33

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for PCR of human netrin-1 gene

<400> 33

aaaagtactg caagaaggac tatgc 25

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for PCR of human netrin-1 gene

<400> 34

ccctgcttat acacggagat g 21

<210> 35

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Ala Arg Arg Cys Arg Phe Asn Met Glu Leu Tyr Lys Leu Ser Gly Arg

1 5 10 15

Lys Ser Gly Gly Val Cys

20

<210> 36

<211> 66

<212> DNA

<213> cDNA

<400> 36

gcccggcgct gccgcttcaa catggagctc tacaagcttt cggggcgcaa gagcggaggt 60

gtctgc 66