



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0074850
 (43) 공개일자 2011년07월04일

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7006753

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년08월25일
 심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2011년03월24일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/054971

(87) 국제공개번호 WO 2010/027828
 국제공개일자 2010년03월11일

(30) 우선권주장

61/091,502 2008년08월25일 미국(US)
 (뒷면에 계속)

(71) 출원인

앰플리뮨, 임크.

미국 20850 메릴랜드주 록빌 스위트 씨-120 메디컬 센터 드라이브 9800

(72) 벌명자

랭거만, 솔로몬

미국 21215 메릴랜드주 볼티모어 크로스 컨트리 블레바드 6606

리우, 린다

미국 21029 메릴랜드주 클락스빌 티퍼러리 코트 6512

(74) 대리인

양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) PD-1 길항제 및 그의 사용 방법

(57) 요 약

T 세포의 활성화를 항상 및/또는 연장시키거나 (즉, T 세포의 항원-특이적 증식을 증가시키고/시키거나, T 세포에 의한 시토카인 생산을 항상시키고/시키거나, T 세포의 분화 및 효과기 기능을 자극하고/하거나 T 세포 생존을 촉진하거나), T 세포 고갈 및/또는 무응답 (anergy)을 극복하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 적합한 조성물은 PD-1로부터 억제 신호를 촉발하지 않으면서 내인성 PD-1 수용체에 결합하여 차단하거나, PD-1 수용체 리간드에 결합하여 차단함으로써 이들이 PD-1 수용체와 상호작용하는 것을 방지하는 PD-1 수용체 길항제를 포함한다. 그를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 향상시키기 위해 PD-1 수용체 길항제를 사용하는 방법을 제공한다.

(30) 우선권주장

61/091,694 2008년08월25일 미국(US)

61/091,705 2008년08월25일 미국(US)

61/091,709 2008년08월25일 미국(US)

61/142,548 2009년01월05일 미국(US)

61/165,652 2009년04월01일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

종양에 대한 면역 반응을 유도, 증대 또는 향상시키는 유효량의 PD-1 길항제를 투여하는 것을 포함하며, 여기서 분자의 용량, 분자의 투여 시기 및/또는 분자의 친화도가 PD-1 수용체에 대한 리간드의 간헐적 접근 (intermittent access)을 허용하는 것인, 면역 반응의 조정 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, PD-1 길항제가 PD-1에 대한 내인성 PD-L1의 결합을 억제 또는 감소시키는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, PD-1 길항제가 PD-1에 대한 내인성 PD-L2의 결합을 억제 또는 감소시키는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, PD-1 길항제가 PD-1에 결합하는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, PD-1 길항제가 PD-1, PD-L1, PD-L2, B7.1, 및 그의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 분자가 생체내 투여 후 3개월 이하 동안 PD-1 또는 그의 리간드에 결합하는 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 1종 초과의 PD-1 길항제가 투여되는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 종양이 방광, 뇌, 유방, 자궁경부, 결장직장, 식도, 신장, 간, 폐, 비인두, 췌장, 전립선, 피부, 위, 자궁, 난소, 고환 및 혈액으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 암으로부터 형성되는 것인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 종양에 대한 면역 반응을 향상시키기 위해, 종양 항원을 PD-1 길항제와 조합하여 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, PD-1 길항제가 PD-1 리간드의 융합 단백질인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 융합 단백질이 PD-1에 결합할 수 있는 PD-L2의 세포외 도메인 또는 그의 단편을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 융합 단백질이 서열 57에 따른 아미노산 서열을 갖는 것인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, PD-1 길항제를, 면역조절물질, Treg의 기능을 고갈 또는 억제하는 작용제 및 보조자극 분자로 이루어지는 군으로부터 선택되는 추가의 활성 작용제와 함께 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

제17항에 있어서, 추가의 활성 작용제가 CD4+CD25⁺ Treg의 기능을 고갈 또는 억제하는 작용제인 방법.

청구항 15

제17항에 있어서, CD4+CD25⁺ Treg의 기능을 고갈 또는 억제하는 작용제가 시클로포스파미드인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 항원 제시 세포 (APC)를 APC에서 PD-1 신호 전달을 억제, 감소 또는 차단하거나 또는 환부의 청소를 향상시키는데 유효한 양의 PD-1 길항제와 접촉시키는 것을 포함하는, 항원 제시 세포 기능을 향상시키기 위한 방법.

청구항 17

생체 내에서 PD-1 수용체의 리간드에 결합하여 PD-1 수용체 신호 전달을 감소 또는 억제하는 유효량의 PD-1 수용체 길항제를 포함하는 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, PD-1 길항제가, B7-H1 폴리펩티드에 결합하여 PD-1 수용체에 대한 B7-H1 폴리펩티드의 결합을 억제 또는 감소시키는 B7-DC 폴리펩티드 또는 그의 단편을 포함하는 것인 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 단편이 B7-H1에 결합하는 B7-DC의 세포외 도메인 또는 그의 단편 또는 B7-DC에 결합하는 B7-H1의 세포외 도메인 또는 그의 단편을 포함하는 것인 조성물.

청구항 20

제17항에 있어서, PD-1 길항제가 융합 단백질을 포함하는 것인 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 융합 단백질이 PD-1 수용체를 통한 신호 전달을 촉발하지 않으면서 PD-1 수용체에 결합하는 것인 조성물.

청구항 22

제17항에 있어서, PD-1 수용체 길항제가, B7-DC 폴리펩티드에 결합하여 PD-1 수용체에 대한 B7-DC 폴리펩티드의 결합을 억제 또는 감소시키는 B7-H1 폴리펩티드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, PD-1 수용체 길항제가 융합 단백질을 포함하는 것인 조성물.

청구항 24

PD-1을 통한 신호 전달을 촉발하지 않으면서 생체 내에서 PD-1에 결합하는 유효량의 폴리펩티드를 포함하는 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 폴리펩티드가, 신호 전달을 촉발하지 않으면서 PD-1에 결합하도록 변형된 B7-DC 또는 B7-H1 폴리펩티드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 26

제24항에 있어서, 폴리펩티드가, PD-1을 통한 신호 전달을 촉발하지 않으면서 폴리펩티드가 PD-1에 결합하도록 변형된 B7-DC 또는 B7-H1의 변이체 세포외 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 27

- a) 제1 융합 파트너, 및
- b) 제2 융합 파트너

를 포함하고, 여기서, 제1 융합 파트너는, PD-1을 통한 신호 전달을 촉발하지 않으면서 PD-1에 결합하도록 변형된 PD-1의 리간드의 변이체 세포외 도메인 또는 그의 단편을 포함하고, 제1 융합 파트너가 제2 융합 파트너에 직접 융합되거나, 또는 임의로, 제2 융합 파트너에 융합된 링커 서열에 융합되는 것인 융합 폴리펩티드.

청구항 28

제27항에 있어서, 제2 융합 파트너가 Ig 중쇄 불변 영역의 하나 이상의 도메인을 포함하는 것인 융합 폴리펩티드.

청구항 29

제28항에 있어서, 제2 폴리펩티드가 인간 면역글로불린 Cγ1 사슬의 헌지, C_H2 및 C_H3 영역에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 융합 폴리펩티드.

청구항 30

제27항에 있어서, 제1 폴리펩티드가, PD-1을 통한 신호 전달을 촉발하지 않으면서 PD-1에 결합하도록 변형된 B7-DC 또는 B7-H1의 세포외 도메인을 포함하는 것인 융합 폴리펩티드.

명세서

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 교차 참조

[0002]

본원은 2008년 8월 25일자로 출원된 미국 특허 가출원 61/091,502, 61/091,694, 61/091,709 및 61/091,705, 2009년 1월 5일자로 출원된 미국 특허 가출원 61/142,548 및 2009년 4월 1일자로 출원된 미국 특허 가출원 61/165,652의 우선권 및 그 이익을 주장하며, 상기 출원들은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0003]

발명의 분야

[0004]

본 발명은 T-세포 활성화를 조정하기 위한 조성물 및 방법, 특히 T-세포 활성화를 향상시키기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

항원 특이적 T 세포 반응은 2개의 신호에 의해 매개된다: 1) T 세포 수용체 (TCR)와 MHC의 환경에서 제시되는 항원성 펩티드와의 결합 (신호 1), 및 2) 상이한 수용체/리간드 쌍 사이의 접촉에 의해 전달되는 제2 항원-비의존 신호 (신호 2). 상기 "제2 신호"는 T 세포 반응의 종류 (활성화 vs 억제) 및 그 반응의 강도 및 지속기간을 결정하는데 중요하고, B7 패밀리의 단백질과 같은 보조자극 분자로부터의 양성 및 음성 신호 모두에 의해 조절된다. 가장 광범위하게 특성이 결정된 T 세포 보조자극 경로는 B7-CD28이고, 여기서 B7-1 (CD80) 및 B7-2 (CD86)은 각각 활성화 CD28 수용체 및 억제성 CTLA-4 (CD152) 수용체에 결합할 수 있다. T 세포 수용체를 통한 신호 전달과 함께, CD28 라이케이션은 T 세포의 항원-특이적 증식을 증가시키고, 시토카인 생산을 향상시키고, 분화 및 효과기 기능을 활성화시키고, T 세포의 생존을 촉진한다 ([Lenshow, et al., Annu. Rev. Immunol., 14:233-258 (1996)]; [Chambers and Allison, Curr. Opin. Immunol., 9:396-404 (1997)]; 및 [Rathmell and Thompson, Annu. Rev. Immunol., 17:781-828 (1999)]). 이와 달리, CTLA-4를 통한 신호 전달은 T 세포 증식, IL-2 생산, 및 세포 주기 진행을 억제하는 음성 신호를 전달하는 것으로 생각된다 ([Krummel and Allison, J. Exp. Med., 183:2533-2540 (1996)]; 및 [Walunas, et al., J. Exp. Med., 183:2541-2550 (1996)]). B7 패밀리의 다른 구성원은 PD-L1 ([Dong, et al., Nature Med., 5:1365-1369 (1999)]; 및 [Freeman, et al., J. Exp. Med., 192:1-9 (2000)]), PD-L2 ([Tseng, et al., J. Exp. Med., 193:839-846 (2001)]); 및 [Latchman, et al., Nature Immunol., 2:261-268 (2001)]), B7-H2 ([Wang, et al., Blood, 96:2808-2813 (2000)]; [Swallow, et al., Immunity, 11:423-432 (1999)]; 및 [Yoshinaga, et al., Nature, 402:827-832 (1999)]), B7-H3 ([Chapoval, et al., Nature Immunol., 2:269-274 (2001)]) 및 B7-H4 ([Choi, et al., J. Immunol., 171:4650-4654 (2003)]; [Sica, et al., Immunity, 18:849-861 (2003)]; [Prasad, et al., Immunity, 18:863-

873 (2003)]; 및 [Zang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100:10388-10392 (2003)])을 포함한다. B7-H5는 B7 패밀리의 비교적 새로 발견된 구성원이다. B7-H5는 PCT 공개 WO 2006/012232에 기재되어 있다. 기능적 연구에서는 B7-H5가 T 세포를 활성화하는 기능을 하는 T 세포 활성의 양성 조절자임을 나타낸다.

[0006] PD-L1 및 PD-L2는 PD-1 (프로그래밍된 (programmed) 세포 사멸-1)에 대한 리간드이고, B7-H2는 ICOS에 대한 리간드이고, B7-H3, B7-H4 및 B7-H5는 현재 고아 (orphan) 리간드로 남아있다 (Dong, et al., Immunol. Res., 28:39-48 (2003)).

[0007] 막 근위 불변 IgC 도메인 및 막 원위 IgV 도메인을 갖는 대부분의 B7 패밀리 분자는 세포 표면 상에서 발현된다. 이들 리간드에 대한 수용체는 공통의 세포외 IgV-유사 도메인을 공유한다. 수용체-리간드 쌍의 상호작용은 주로 리간드의 IgV 도메인 및 수용체 내의 잔기들을 통해 매개된다 (Schwartz, et al., Nature Immunol., 3:427-434 (2002)). 일반적으로, IgV 도메인은 각각 β -가닥의 총을 포함하는 2개의 시트 (sheet)를 갖는 것으로서 설명된다 (Williams and Barclay, Annu. Rev. Immunol., 6:381-405 (1988)). CTLA-4의 전면 및 후면 시트는 각각 가닥 A'GFC'C 및 ABEDC"를 포함하는 반면 (Ostrov, et al., Science, 290:816-819 (2000)), B7 IgV 도메인의 전면 및 후면 시트는 각각 가닥 AGFCC'C" 및 BED로 구성된다 ([Schwartz, et al., Nature, 410:604-608 (2001)]; [Stamper, et al., Nature, 410:608-611 (2001)]; 및 [Ikemizu, et al., Immunity, 12:51-60 (2000)]). 결정학 분석을 통해 CTLA-4/B7 결합 계면이 MYPYYY 모티프로 구성된, CTLA-4로부터의 CDR3-유사 루프와 주로 G, F, C, C' 및 C" 가닥에 의해 형성된 B7 상의 표면과의 상호작용에 의해 지배됨이 밝혀졌다 ([Schwartz, et al., Nature, 410:604-608 (2001)]; 및 [Stamper, et al., Nature, 410:608-611 (2001)]). 아미노산 상동성, 돌연변이, 및 컴퓨터 모델링으로부터의 데이터는 상기 모티프가 또한 CD28에 대한 주요 B7-결합 부위라는 개념을 지지한다 (Bajorath, et al., J. Mol. Graph. Model., 15:135-139 (1997)). MYPYYY 모티프는 ICOS에서 보존되지 않지만, 연구에서는 서열 FDPPPF를 갖고 유사한 위치에 존재하는 관련 모티프가 B7-H2에 대한 ICOS의 결합에 대한 주요 결정인자임을 나타내었다 (Wand, et al., J. Exp. Med., 195:1033-1041 (2002)).

[0008] PD-L2 (B7-DC로도 불림)는 B7 패밀리의 비교적 새로운 구성원이고, PD-L1 (B7-H1로도 불림)에 약 34% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 인간 및 마우스 PD-L2 오르토로그 (orthologue)는 약 70% 아미노산 동일성을 공유한다. PD-L1 및 PD-L2 전사체는 다양한 조직에서 발견되지만 ([Dong, et al., Nature Med., 5:1365-1369 (1999)]; [Latchman, et al., Nature Immunol., 2:261-268 (2001)]; 및 [Tamura, Blood, 97:1809-1816 (2001)]), 단백질의 발현 프로필은 매우 구별된다. PD-L1 단백질의 발현은 본질적으로 대식세포-유사 세포 외의 정상 조직에서 발견되지 않지만 다양한 조직 및 세포 종류에서 유도될 수 있다 ([Dong, et al., Nature Med., 5:1365-1369 (1999)]; 및 [Ishida, et al., Immunol. Lett., 84:57-62 (2000)]). 이와 달리, PD-L2는 수지상 세포 및 단핵구에서만 발현된다.

[0009] PD-L1 및 PD-L2는 둘 모두 그의 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-기반 억제성 모티프 (ITIM)을 갖는 CD28 패밀리의 면 구성원 (Ishida, et al., EMBO J., 11:3887-3895 (1992))인 PD-1에 결합하는 것으로 나타났다 (Freeman, et al., J. Exp. Med., 192:1027-1034 (2000)). PD-1은 흥선세포의 하위세트 상에서 발현되고, 활성화 후에 T, B 및 골수 세포 상에서 상향-조절된다 (Agala, et al., Int. Immunol., 8:765-772 (1996)). PD-1은 주요 조직적합 복합체 (MHC)에 의해 제시된 웹티드 항원에 결합한 후 TCR의 하류에서 신호 전달을 길항하는 작용을 한다. PD-1 신호 전달은 T 세포 및 항원 제시 세포 사이의 면역 시냅스에서 발생하는 TCR:MHC 복합체에 매우 근접하게 리간드에 결합하는 것을 요구하는 것으로 생각된다 (Freeman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105:10275-10276 (2008)). 그의 리간드에 의한 PD-1 라이게이션의 주요 결과는 TCR의 하류에서 신호 전달을 억제하는 것이다. 따라서, PD-1을 통한 신호 전달은 대체로 감소된 T 세포 증식 또는 T 세포 활성의 다른 감소를 일으키는 억압 또는 억제 신호를 T 세포에 제공한다.

[0010] PD-1^{-/-} 마우스의 표현형은 PD-1이 생체 내에서 면역 반응의 음성 조절자라는 직접적인 증거를 제공한다. PD-1의 부재 하에, C57BL/6 배경 상의 마우스는 루푸스-유사 사구체신염 및 진행성 관절염을 서서히 발병한다 (Nishimura, et al., Immunity, 11:141-151 (1999)). BALB/c 배경 상의 PD-1^{-/-} 마우스는 치명적인 자가면역 학장성 심근병증을 급속하게 발병한다 (Nishimura, et al., Science, 291:319-322 (2001)). 그러나, 실질적인 증거는 PD-L2가 T 세포 반응을 활성화하는 기능을 할 수 있음을 나타낸다. 최적 미만의 (suboptimal) TCR 신호의 존재 하에, PD-L2는 시험관 내에서 시토카인의 증가된 증식 및 생산을 자극한다 (Tseng, et al., J. Exp. Med., 193:839-846 (2001)). 다른 한편으로, 시험관내 연구는 T 세포 반응에서 PD-L2에 대한 음성 조절 역할을 나타낸다. 이들 겉보기에 모순되는 데이터는 PD-1 이외의 T 세포 상에서 PD-L2에 대한 추가의 수용체의 발현에

의해 최상으로 해석되어 진다.

- [0011] PD-L1은 T 세포에서 억제 신호 전달을 일으키는 주요 PD-1 리간드이다. PD-1 신호 전달은 TCR:MHC 복합체에 매우 근접하게 PD-1 리간드 (대개 PD-L1)에 결합을 요구하는 것으로 생각되므로, 수용체를 차단함으로써 또는 그의 리간드를 억제함으로써 PD-1 수용체가 그의 내인성 리간드와 상호작용하는 것을 차단하고, 따라서, T 세포 막 상에서 PD-1 및 TCR의 동시-라이게이션을 방지하는 단백질, 항체 또는 소분자는 고려되는 유용한 PD-1 길항제이다.
- [0012] 따라서, 본 발명의 목적은 T 세포 상에서 PD-1을 통한 신호 전달을 억제하기 위한 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 PD-1에 결합하지만 PD-1 신호 전달을 활성화시키지 않는 PD-1 길항제를 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 PD-1 리간드에 결합하여 리간드와 PD-1의 상호작용을 억제 또는 감소시키는 PD-1 길항제를 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 PD-1 수용체를 통한 신호 전달에 참여하지 않으면서 PD-1 수용체에 결합하거나, PD-1의 리간드에 결합하여 리간드와 PD-1 수용체의 상호작용을 억제 또는 감소시키고, 임의로 별개의 수용체 경로를 통해 T 세포를 활성화시키는 PD-1 길항제를 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 PD-1의 길항제 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 발현하는 벡터를 함유하는 세포를 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 추가 목적은 T 세포를 PD-1을 활성화시키지 않으면서 PD-1에 결합하거나, PD-1의 리간드에 결합하여 리간드와 PD-1 수용체의 상호작용을 억제 또는 감소시키는 폴리펩티드와 접촉시킴으로써, T 세포의 활성화를 향상 및/또는 연장하거나 T 세포 고갈 및/또는 T 세포 무응답 (anergy)을 극복하기 위한 방법을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 추가 목적은 PD-1의 길항제 폴리펩티드, 그를 코딩하는 핵산, 또는 PD-1의 길항제 폴리펩티드를 코딩하는 핵산으로 형질감염되거나 형질도입된 세포를 그를 필요로 하는 포유동물에게 투여하는 방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 추가 목적은 PD-1의 길항제 폴리펩티드를 항원 또는 백신과 조합하여 투여함으로써, 항원 또는 백신에 대한 면역 반응을 증강시키는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 내용

발명의 개요

- [0021] T 세포의 활성화를 향상 및/또는 연장시키거나 (즉, T 세포의 항원-특이적 증식을 증가시키고/시키거나, T 세포에 의한 시토카인 생산을 향상시키고/시키거나, T 세포의 분화 및 효과기 기능을 자극하고/하거나 T 세포 생존을 촉진하거나), T 세포 고갈 및/또는 무응답을 극복하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 대표적인 조성물은 PD-1로부터 억제 신호를 촉발하지 않으면서 면역 세포 상의 내인성 PD-1에 결합하여 차단하는 PD-1 길항제를 포함한다. 다른 실시양태에서, 조성물은 PD-1 리간드에 결합하여 차단함으로써, 이들이 PD-1과 상호작용하는 것을 방지하는 PD-1 길항제를 포함한다. 그를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 향상시키기 위해 PD-1 길항제를 사용하는 방법을 제공한다.
- [0022] 면역 세포, 바람직하게는 T 세포 상의 내인성 PD-1에 결합하여 차단하는 PD-1 길항제는 PD-L1 및 PD-L2 폴리펩티드, 그의 PD-1-결합 단편, PD-1 항체, 융합 단백질, 및 그의 변이체를 포함한다. 이들 PD-1 길항제는 생리학적 조건 하에 PD-1에 결합하고, T 세포 억제를 차단한다.
- [0023] 천연 PD-1 리간드에 결합하는 PD-1 길항제는 PD-1 및 B7.1 폴리펩티드, 그의 단편, 항체, 및 융합 단백질을 포함한다. 이들 PD-1 길항제는 B7-H1 및 B7-DC에 결합하고, 이들이 면역 세포 상에서 PD-1을 통한 억제 신호 전달을 촉발하는 것을 방지한다.
- [0024] 바람직한 실시양태에서, B7-DC 및 B7-H1 폴리펩티드, 또는 그의 변이체는 PD-1을 통한 신호 전달을 일으키지 않으면서 PD-1 수용체에 결합함으로써 PD-1 수용체를 길항하는 융합 단백질을 형성시키기 위해 다른 폴리펩티드에 결합된다. 일반적으로, 융합 폴리펩티드는 (i) 제2 폴리펩티드에 직접 융합된, 또는 (ii) 임의로 제2 폴리펩티드

드에 융합된 링커 (linker) 패티드 서열에 융합된 B7-DC 또는 B7-H1, 또는 그의 변이체의 일부 또는 전부를 갖는 제1 융합 파트너 (partner)를 갖는다. 융합 파트너의 존재는 폴리펩티드의 용해도, 친화도 및/또는 결합가 (valency)를 변경할 수 있다. 특정 실시양태에서, B7-DC, B7-H1 또는 그의 변이체는 바람직하게는 인간 면역글로불린 C_γ1 사슬의 헌자, C_η2 및 C_η3 영역에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 Ig 중쇄 불변 영역의 하나 이상의 도메인에 융합된다. B7.1 및 PD-1을 사용하여 유사한 융합 단백질을 제공한다.

[0025] PD-1 수용체 길항체 폴리펩티드 및 융합 단백질을 코딩하는 핵산, 및 그러한 핵산을 벡터 내에 함유하는 숙주 세포를 또한 제공한다.

[0026] 개시된 PD-1 수용체 길항체를 함유하는 면역원성 조성물을 또한 제공한다. 면역원성 조성물은 항원, PD-1 수용체 길항체의 공급원 및 임의로 아주반트 (adjuvant)를 포함한다. 적합한 항원은 바이러스, 세균, 기생충, 환경 및 종양 항원을 포함한다.

[0027] T 세포 억제를 감소시키고/시키거나 T 세포의 활성화를 연장하거나, T 세포 고갈 및/또는 무응답을 억제하기 위해 PD-1 수용체 길항체를 사용하는 방법을 제공한다. PD-1 수용체 길항체 및 그를 코딩하는 핵산의 치료 용도를 제공한다. PD-1 수용체 길항체 조성물은 암에 대한 면역 반응을 향상시키기 위해 사용될 수 있다. PD-1 수용체 길항체 조성물은 또한 면역억제된 대상체의 면역 반응을 자극하기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, PD-1 수용체 길항체 조성물은 백신과 조합하여 투여된다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1A-B는 실시예 1에 기재된 바와 같이 PD-1 결합 ELISA에서 PD-1에 대한 B7-DC-Ig 결합을 보여주는 그래프이다.

도 2는 B7-DC-Ig가 PD-1 발현 CHO 세포에 결합함을 보여주는 그래프이다.

도 3은 B7-DC-Ig가 PD-1에 대한 결합을 위해 PD-L1과 경쟁함을 보여주는 그래프이다.

도 4는 P815 종양 모델에 대한 예시적인 투약 요법의 도표이다.

도 5A-C는 시간 및 처리의 함수로서 플로팅한 종양 부피의 선 그래프이다: A) 비히클 대조군, B) 마우스 IgG 대조군, 및 C) 뮤린 B7-DC-Ig.

도 6A-C는 시클로포스파미드 (CTX) 및 B7-DC-Ig의 조합물이 마우스에서 확립된 CT26 종양 (결장 암종)의 근절을 일으켰음을 보여주는 선 그래프이다.

도 7은 CTX 및 B7-DC-Ig의 조합물이 마우스에서 확립된 CT26 종양 (결장 암종)을 근절시키고, CT26의 재-접종 (re-challenge)에 대해 보호하였음을 보여준다.

도 8은 CTX 및 B7-DC-Ig 치료가 종양 특이적 기억 CTL의 생성을 일으켰음을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 정의

[0029] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단리된"은 예를 들어, 패티드를 자연에서 발견되지 않는 농도로 농축함으로써 그의 자연 환경으로부터 분리된, 화합물이 자연적으로 발생하는 것과 상이한 환경 내에 있는 관심있는 화합물 (예를 들어, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드)을 설명하기 위한 의미이다. "단리된"은 관심있는 화합물에 대해 실질적으로 농축시킨 및/또는 관심있는 화합물이 부분적으로 또는 실질적으로 정제된 샘플 내에 있는 화합물을 포함하는 의미이다.

[0030] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "폴리펩티드"는 변형 (예를 들어, 인산화 또는 당화)에 상관없이 임의의 길이의 아미노산의 사슬을 나타낸다.

[0031] 본원에서 사용되는 바와 같이, "변이체" 폴리펩티드는 상응하는 야생형 폴리펩티드의 아미노산 서열에 비해 적어도 하나의 아미노산 서열 변경을 함유한다.

[0032] 본원에서 사용되는 바와 같이, "아미노산 서열 변경"은 예를 들어, 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 또는 삽입일 수 있다.

[0033] 본원에서 사용되는 바와 같이, "벡터"는 다른 DNA 세그먼트가 삽입된 세그먼트의 복제를 일으키도록 삽입될 수

있는 레플리콘 (replicon), 예를 들어 플라스미드, 파지, 또는 코스미드이다. 본원에 기재된 벡터는 발현 벡터일 수 있다.

[0035] 본원에서 사용되는 바와 같이, "발현 벡터"는 하나 이상의 발현 제어 서열을 포함하는 벡터이다.

[0036] 본원에서 사용되는 바와 같이, "발현 제어 서열"은 다른 DNA 서열의 전사 및/또는 번역을 제어하고 조절하는 DNA 서열이다.

[0037] 본원에서 사용되는 바와 같이, "작동가능하게 연결된"은 발현 제어 서열이 관심있는 코딩 서열의 발현을 효과적으로 제어하도록 유전자 구성체 내로 포함되는 것을 의미한다.

[0038] 본원에서 사용되는 바와 같이, 폴리펩티드의 "단편"은 전장 단백질의 보다 짧은 폴리펩티드인 폴리펩티드의 임의의 하위세트를 나타낸다. 일반적으로, 단편은 5개 이상의 아미노산 길이일 것이다.

[0039] 본원에서 사용되는 바와 같이, "결합가"는 분자 당 이용가능한 결합 부위의 수를 나타낸다.

[0040] 본원에서 사용되는 바와 같이, "보존적" 아미노산 치환은 치환된 아미노산이 유사한 구조적 또는 화학적 특성을 갖는 치환이다.

[0041] 본원에서 사용되는 바와 같이, "비-보존적" 아미노산 치환은 치환된 아미노산의 전하, 소수도, 또는 부피가 유의하게 변경된 치환이다.

[0042] 본원에서 사용되는 바와 같이, "단리된 핵산"은 정상적으로는 포유동물 계놈 내에서 핵산의 한쪽 또는 양쪽 측면에 접하는 핵산을 포함한, 포유동물 계놈 내에 존재하는 다른 핵산 문자로부터 분리된 핵산을 나타낸다.

[0043] 핵산에 관하여 본원에서 사용될 때, 용어 "단리된"은 임의의 비-천연-발생 핵산 서열을 포함하고, 이는 그러한 비-천연-발생 서열은 자연에서 발견되지 않고, 천연-발생 계놈 내에서 바로 인접하는 서열을 갖지 않기 때문이다.

[0044] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "숙주 세포"는 재조합 발현 벡터가 도입될 수 있는 원핵 및 진핵 세포를 나타낸다.

[0045] 본원에서 사용되는 바와 같이, "형질전환된" 및 "형질감염된"은 당업계에 공지된 많은 기술에 의한 세포 내로의 핵산 (예를 들어, 벡터)의 도입을 포함한다.

[0046] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 무손상 분자, 및 항원-결합 부위를 포함하는 그의 단편을 모두 포함하는 의미이다. 이들은 무손상 항체의 Fc 단편이 결여되는 Fab 및 F(ab')₂ 단편을 포함한다.

[0047] 용어 "개체", "숙주", "대상체" 및 "환자"는 본원에서 상호교환되게 사용되고, 포유동물, 예를 들어 비제한적으로 인간, 설치류, 예를 들어 마우스 및 래트, 및 다른 실험 동물을 나타낸다.

[0048] 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 치료되는 질환 상태의 하나 이상의 증상을 치료하거나 억제하거나 완화하기 위해 또는 달리 목적하는 약물학적 및/또는 생리학적 효과를 제공하기 위해 충분한 용량을 의미한다. 정확한 용량은 대상체-의존 변수 (예를 들어, 연령, 면역계 건강 등), 질환, 및 투여되는 치료와 같은 다양한 인자에 따라 변할 것이다.

II. PD-1 길항제

[0050] PD-1 및 PD-L1 사이의 상호작용을 저해하기 위한 바람직한 PD-1 길항제 화합물은 PD-1을 통한 억제 신호 전달을 촉발하지 않으면서 PD-1에 결합하여 차단하고, PD-1에 대한 PD-L1의 결합을 방지하는 PD-L2 (B7-DC로서도 알려짐), PD-L2의 세포외 도메인, PD-L2의 융합 단백질, 및 그의 변이체이다. 추가의 PD-1 길항제는 PD-1을 통한 억제 신호 전달을 촉발하지 않으면서 PD-1에 결합하는 PD-L1의 단편, T 세포 상의 PD-1의 리간드에 결합하여 내인성 PD-1 수용체에 대한 결합을 방지하는 PD-1 또는 그의 가용형 단편, 및 PD-L1에 결합하여 PD-1에 대한 PD-L1의 결합을 방지할 수 있는 B7.1 또는 그의 가용형 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, PD-1 길항제는 대상체에서 T 세포 세포독성을 증가시킨다. 다수 기능성 PD-1 길항제는 대상체에서 강건한 면역 반응을 유도하고 T 세포 고갈 및 T 세포 무응답을 극복하는 것을 돋는다.

[0051] PD-1 길항제는 PD-1의 리간드에 결합하여 PD-1 수용체에 대한 리간드의 결합을 저해 또는 억제하거나, PD-1 수용체를 통한 신호 전달에 참여하지 않으면서 PD-1 수용체에 직접 결합한다. 바람직한 실시양태에서, PD-1 길항제는 PD-1에 직접 결합하여 PD-1 억제 신호 전달을 차단한다. 다른 실시양태에서, PD-1 길항제는 PD-1의 리간

드에 결합하여 리간드가 PD-1을 통한 억제 신호 전달을 촉발하는 것을 감소 또는 억제한다. 또 다른 실시양태에서, PD-1 길항체는 PD-1 수용체 외의 수용체에 결합함으로써 T 세포를 활성화시킬 수 있다.

[0052] PD-1 길항체는 소분자 길항체일 수 있다. 용어 "소분자"는 분자량이 100 달톤 초과 내지 약 2,500 달톤 미만, 바람직하게는 100 내지 2000 달톤, 보다 바람직하게는 약 100 내지 약 1250 달톤, 보다 바람직하게는 약 100 내지 약 1000 달톤, 보다 바람직하게는 약 100 내지 약 750 달톤, 보다 바람직하게는 약 200 내지 약 500 달톤인 작은 유기 화합물을 나타낸다. 소분자는 종종 하나 이상의 관능기로 치환된 환식 탄소 또는 헤테로환 구조 및/또는 방향족 또는 폴리방향족 구조를 포함한다. 소분자 길항체는 PD-1의 리간드, 예를 들어 PD-L1 및 PD-L2에 결합하여 리간드가 PD-1과 상호작용하는 것을 방지함으로써 또는 PD-1 수용체를 통한 신호 전달을 촉발하지 않으면서 PD-1 수용체에 직접 결합함으로써 PD-1 수용체 신호 전달을 감소 또는 저해한다.

[0053] 예시적인 PD-1 길항체는 PD-L2, PD-L1, PD-1 또는 B7-1 폴리펩티드, 및 그의 변이체, 단편 또는 융합 단백질을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 추가의 실시양태는 임의의 이들 단백질에 결합하는 항체를 포함한다.

A. PD-L2 기반 PD-1 길항체

1. PD-1에 결합하는 PD-L2 기반 PD-1 길항체

[0056] PD-1 길항체는 면역 세포 상의 PD-1에 결합하고, 억제성 PD-1 신호 전달을 차단한다. PD-1 신호 전달은 면역 시냅스 내에서 TCR:MHC 복합체에 매우 근접하게 PD-1 리간드 (PD-L2 또는 PD-L1; 대개 PD-L1)에 의한 PD-1에 대한 결합을 요구하는 것으로 생각된다. 따라서, PD-1을 통한 억제 신호 전달을 차단하고 임의로 T 세포 막 상에서 PD-1 및 TCR의 동시-라이게이션을 방지하는 단백질, 항체 또는 소분자가 유용한 PD-1 길항체이다.

[0057] 대표적인 폴리펩티드 길항체는 PD-L2 폴리펩티드, 그의 단편, 그의 융합 단백질, 및 그의 변이체를 포함하고 이로 제한되지 않는다. PD-1에 결합하여 PD-1을 통한 억제 신호 전달을 차단하는 PD-L2 폴리펩티드는 바람직한 실시양태 중 하나이다. 다른 실시양태는 PD-1의 천연 리간드가 결합하여 신호 전달을 촉발하는 것을 방지하는 PD-1 길항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 면역 시냅스 환경에서 웨티드-MHC 복합체에 의한 TCR의 동시-라이게이션이 없기 때문에, 개시된 PD-L2 폴리펩티드는 PD-1 수용체를 통한 신호 전달을 촉발하는 능력이 감소하거나 없는 것으로 생각된다. PD-1 수용체를 통한 신호 전달은 T-세포 활성화 및 T-세포 증식을 약화시키는 음성 신호를 전달하기 때문에, PD-1 신호 전달 경로를 억제하면 그렇지 않으면 약화될 세포를 활성화시킨다.

2. 예시적인 PD-L2 폴리펩티드 PD-1 길항체

[0059] 뮤린 PD-L2 폴리펩티드는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다:

MLLLLPILNL	SLQLHPVAAL	FTVTAPKEVY	TVDVGSSVSL	ECDFDRRECT	ELEGIRASIQ	60
KVENDTSLQS	ERATLLEEEQL	PLGKALFHIP	SVQVRDSGQY	RCLVICGAAW	DYKYLTIVKV	120
ASYMRIDTRI	LEVPGTGEVQ	LTCQARGYPL	AEVSWQNNSV	PANTSHIRT	EGLYQVTSVL	180
RLKPQPSRNF	SCMFNWNAHMK	ELTSAIIDPL	SRMEPKVPRT	WPLHVFIPAC	TIALIFLAIV	240
IIQRKRRI						247

(서열 1) 또는

LFTVTAPKEV	YTVDVGSSVS	LECDFDRREC	TELEGIRASL	QKVENDTSLQ	SERATLLEEQ	60
LPLGKALFHI	PSVQVRDSGQ	YRCLVICGAA	WDYKYLTIVKV	KASYMRIDTR	ILEVPGTGEV	120
QLTCQARGYP	LAEVSWQNVS	V PANTSHIRT	PEGLYQVTSV	LRLKPQPSRN	FSCMFNWNAHM	180
KELTSAIIDP	LSRMEPKVPR	WPLHVFIPAC	CTIALIFLAI	VIIQRKRRI		228

(서열 2).

[0061] 인간 PD-L2 폴리펩티드는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다:

MIFLLMLSL ELQLHQIAAL FTVTVPKELY IIEHGSNVTLC ECFNDTGSV NLGAIATASLQ 60
 KVENDTSPHR ERATLLEEQPL PLGKASFHIP QVQVRDEGQY QCIIYGVAV DYKYLTILKV 120
 ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL 180
 RLKPPGRNF SCVFWNTHVR ELTLASIDLQ SQMMPRTHTP WLLHIFIPFC IIAFIFIATV 240
 TALRKQLCQK LYSSKDTTKR PVTTKREVN SAI 273

(서열 3) 또는

LFTVTVPKEL YIEHGSNVTLC ECFNDTGSV VNLLGAIATASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ 60
 LPLGKASFHI PQVQVRDEGQ YQCIIYGVAV WDYKYLTILKV KASYRKINTH ILKVPETDEV 120
 ELTCQATGYPL AEVSWPNVSV VPANTSHSRTP EGLYQVTSVL 180
 RELTLASIDLQ SQMMPRTHTP TWLLHIFIPFC IIAFIFIATV 240
 RPVTTKREVN NSAI 254

(서열 4).

[0062]

[0063]

비)-인간 영장류 (시노몰구스 원숭이) PD-L2 폴리펩티드는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다:

MIFLLMLSL ELQLHQIAAL FTVTVPKELY IIEHGSNVTLC ECFNDTGSV NLGAIATASLQ 60
 KVENDTSPHR ERATLLEEQPL PLGKASFHIP QVQVRDEGQY QCIIYGVAV DYKYLTILKV 120
 ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL 180
 RLKPPGRNF SCVFWNTHVR ELTLASIDLQ SQMMPRTHTP WLLHIFIPFC IIAFIFIATV 240
 TALRKQLCQK LYSSKDTTKR PVTTKREVN SAI 273

(서열 5) 또는

LFTVTVPKEL YIEHGSNVTLC ECFNDTGSV VNLLGAIATASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ 60
 LPLGKASFHI PQVQVRDEGQ YQCIIYGVAV WDYKYLTILKV KASYRKINTH ILKVPETDEV 120
 ELTCQATGYPL AEVSWPNVSV VPANTSHSRTP EGLYQVTSVL 180
 RELTLASIDLQ SQMMPRTHTP TWLLHIFIPFC IIAFIFIATV 240
 RPVTTKREVN NSAI 254

[0064]

[0065]

서열 1, 3 및 5는 각각 신호 펩티드를 함유한다.

[0066]

B. PD-L1 기반 PD-1 길항제

[0067]

1. PD-1 수용체에 결합하는 PD-L1 기반 PD-1 길항제

[0068]

PD-1 수용체에 결합하는 다른 PD-1 길항제는 PD-L1 폴리펩티드, 그의 단편, 그의 융합 단백질, 및 그의 변이체를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 이들 PD-1 폴리펩티드 길항제는 PD-1 수용체에 결합하여 차단하고, PD-1 수용체를 통한 억제 신호 전달을 촉발하는 능력이 감소되거나 없다. 한 실시양태에서, 면역 시냅스 환경에서 펩티드-MHC 복합체에 의한 TCR의 동시-라이케이션이 없기 때문에, PD-1 폴리펩티드는 PD-1 수용체를 통한 신호 전달을 촉발하는 능력이 감소하거나 없는 것으로 생각된다. PD-1 수용체를 통한 신호 전달은 T-세포 활성화 및 T-세포 증식을 약화시키는 음성 신호를 전달하기 때문에, PD-1 폴리펩티드를 사용하여 PD-1 신호 전달을 억제하면 그렇지 않으면 약화될 세포를 활성화시킨다.

[0069]

2. 예시적인 PD-L1 폴리펩티드 PD-1 길항제

[0070]

무린 PD-L1 폴리펩티드는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다:

MRIFAGIIFT ACCHLRAFT ITAPKDLYVV EYGSNVTMEC RFPVEREELDL LALVVVWEKE 60
 DEQVIQFVAG EEDLKPKQHSN FRGRASLPKQ QLLKGNAALQ ITDVKLQDAG VYCCIISYGG 120
 ADYKRITLKV NAPYRKINQR ISVDPATSEH ELICQAEGYP EAEVIWTNSD HQPVGSKRSV 180
 TTSRTEGMLL NVTSSLRVNA TANDVFYCTF WRSQPGQNHT AELIIPELPA THPPQNRTHW 240
 VLLGSILLFL IVVSTVLLFL RKQVRMLDVE KCGVEDTSSK NRNDTQFEET 290

(서열 7) 또는

FTITAPKDLY VVEYGSNVTM ECRFPVEREL DLLALVVVWE KEDEQVQFV AGEEDLKPQH 60
 SNFRGRASLP KDQLLKGNAQ LQITDVKLQD AGVYCCISY GGADYKRITL KVNAQYRKIN 120
 QRISVDPATSEH EHLICQAEG YPEAEVIWTN SDHQPVSGKR SVTTSRTEGM LLNVTSSLRV 180
 NATANDVFYCTF TFWRSQPGQN HTAELIIPEL PATHPPQNRT HWVLLGSILL FLIVVSTVLL 240
 FLRKQVRMLD VEKCGVEDTS SKNRNDTQFEET 272

[0071]

(서열 8).

[0072]

인간 PD-L1 폴리펩티드는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다:

MRIFAVFIFM TYWHLNNAFT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME	60
DKNIIQFVHG EEDLKVKHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG	120
ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTVSE HELTCQAEGY PKEVIWTSS DHQVLSGKTT	180
TINSKREEKL FNVTSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLPPEENH TAEELVIEPLP LAHPPNERTH	240
LVLCAILLC LGVALTFIFR LRKGRRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET	290

(서열 9) 또는

FTVTVPKDLV VVEYGSNMTI ECKFPVKEQL DLAALIVYWE MEDKNIIQFV HGEEDLKVKQH	60
SSYRQRARLL KDQLSLGNAA LQITDVKLQD AGVYRCMISY GGADYKRITV KVNAPOYNKIN	120
QRILVVDFT SEHELTQCQE GYPAEVIWV SSDHQVLSGK TTTTNSKREE KLFVNSTLIR	180
INTTNEIFY CTFRRLDPEE NHAEELVIEPLP LPLAHPPNER THLVILGAIL LCLGVALTFF	240
FRLRKGRMMMD VKKCGIQDTN SKKQSDTHLE ET	272

(서열 10).

[0073]

[0074]

서열 7 및 9는 각각 신호 펩티드를 함유한다.

[0075]

C. B7.1 및 PD-1 기반 PD-1 길항제

[0076]

1. PD-L1 및 PD-L2에 결합하는 B7.1 및 PD-1 기반 PD-1 길항제

[0077]

다른 유용한 폴리펩티드는 PD-1 리간드, 예를 들어 PD-L1 또는 PD-L2에 결합하여 내인성 PD-1 수용체에 대한 결합을 방지하여 억제 신호 전달을 방지할 수 있는 PD-1 수용체 단백질, 또는 그의 가용형 단편을 포함한다. 그러한 단편은 또한 임의로 천연 리간드에 대한 결합을 증가시키는 돌연변이, 예를 들어 A99L 돌연변이를 포함하는 PD-1 단백질의 가용형 ECD 부분을 포함한다. PD-L1은 또한 단백질 B7.1에 결합하는 것으로 나타났다 (Butte, et al., *Immunity*, 27(1): 111-122 (2007)). 따라서, PD-L1 리간드에 결합하여 내인성 PD-1 수용체에 대한 결합을 방지하여 억제 신호 전달을 방지할 수 있는 B7.1 또는 그의 가용형 단편이 또한 유용하다.

[0078]

2. 예시적인 B7.1 폴리펩티드 PD-1 길항제

[0079]

뮤린 B7.1 폴리펩티드는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다:

MACNCQLMQD TPILLKPPCPR LILLFVLLIR LSQVSSDVDE QLSKSVKDKV LLPCRYNSPH	60
EDESBDRRIW QKHDKVVLV TAGKLKWPE YKNRTFLYDNT TYSLILGLV LSDRGTYSCV	120
VQKKERGTYE VKHLALVQLS IKADFSTPNI TESGNPSADT KRITCFASGG FPKPRFSWLE	180
NGRELPGINT TISQDPESEL YTISQLDFN TTRNHTIKCL IKYGDAAHVSE DFTWEKFPPED	240
PPDSKNTLVLV FGAGFGAVIT VVIVIVIIC FCKHRSCFRR NEASRETNNNS LTFGPEEALA	300
EQTVFL	306

(서열 11) 또는

VDEQLSKSVK DKVLLPCRYN SPHEDESEDR IYWQKHDKV LSVIAGKLKV WPEYKNRTL	60
DNTTYSLIIL GLVLSDRGTY SCVVKKHERG TYEVKHLALV KLSIKADFST PNITESGNPS	120
ADTKRITCFA SGCFPKPRFS WLENGRELPG INTTISQDPE SELYTISQL DFNTTRNHTI	180
KCLIKYGAH VSEDFTWEKP PEDPPDSKNT LVLFAGAGFGA VITVVVIVVI IKCFCKHRSC	240
FRRNEASRET NNSTLTFGPEE ALAEQTVFL	269

(서열 12).

[0080]

인간 B7.1 폴리펩티드는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다:

MGHTRRQGTFS PSKCPYLNFQ QLLVLAGLSH FCSCVIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEEILA	60
QTRIYQKEK KMVLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVIILALRPSD ECTYRCVVLK	120
YEKDAFKREH LAEVTLVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLЕНGE	180
ELNAINTTWS QDPETELYAV SSKLDFNMMT NNSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP	240
DNLPSWAIT LISVNGIFVI CCLTYCFAPR CRERRRNRL RRESVRPF	288

(서열 13) 또는

VIHVTKEVKE VATLSCGHNV SVEELAQTRI YWQKEKKMVL TMMMSGDMNIW PEYKNRTIFD	60
ITNNLSIVIL ALRPSDEGTY ECVVVKYKEKD AFKREHHLAEV TLSVKADFPT PSISDFEIPT	120
SNRIKICST SGGFPPEPHLS WLENGEELNA INTTVSQDPE TELYAVSSKL DFNMNTTNHSF	180
MCLIKYGHLR VNQTFNWNTT KQEHFPDNLL PSWAITLISV NGIFVICCLT YCFAPRCRER	240
RRNERLRRRES VRPV	254

(서열 14).

[0082]

서열 11 및 13은 각각 신호 펩티드를 함유한다.

[0083]

3. 예시적인 PD-1 폴리펩티드 PD-1 길항제

[0084]

인간 PD-1 폴리펩티드는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수

있다:

MQIPQAPWFWV	VWAVLQLGWR	PGWFLESPDR	PWNAPTFSPA	LLLVTEGDNA	TFTCSFSNTS	60
ESFVLNWYRM	SPSNQTDKLA	AFFPEDRSQPG	QDCRFRVTRL	PNGRDFHMSV	VRARRNDSGT	120
YLCAISLAP	KAQIKESLRA	ELRVTERRAE	VPTAHPSPSP	RPAGQFQTLV	VGVVGGLGS	180
LVLLWVVLAV	ICSRAARGTI	GARRTGQPLK	EDPSAVPVFS	VDYGELDFQW	REKTPEPPVP	240
CVEPEQTEYAT	IVFESGMGTS	SPARRGSADG	PRSAQPLRPE	DGHCSWPL		288

(서열 15).

[0086]

비)-인간 영장류 (시노몰구스 원숭이) PD-1 폴리펩티드는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다:

MQIPQAPWFWV	VWAVLQLGWR	PGWFLESPDR	PWNAPTFSPA	LLLVTEGDNA	TFTCSFSNAS	60
ESFVLNWYRM	SPSNQTDKLA	AFFPEDRSQPG	QDCRFRVTRL	PNGRDFHMSV	VRARRNDSGT	120
YLCAISLAP	KAQIKESLRA	ELRVTERRAE	VPTAHPSPSP	RPAGQFQTLV	VGVVGGLGS	180
LVLLWVVLAV	ICSRAARGTI	GARRTGQPLK	EDPSAVPVFS	VDYGELDFQW	REKTPEPPVP	240
CVEPEQTEYAT	IVFESGMGTS	SPARRGSADG	PRSAQPLRPE	DGHCSWPL		288

(서열 16).

[0088]

서열 15 및 16은 각각 신호 펩티드를 함유한다.

[0089]

D. PD-1 길항제 폴리펩티드의 단편

[0090]

PD-1 길항제 폴리펩티드는 전장 폴리펩티드일 수 있거나 전장 폴리펩티드의 단편일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, PD-1 길항제 폴리펩티드의 단편은 전장 단백질의 보다 짧은 폴리펩티드인 폴리펩티드의 임의의 하위세트를 나타낸다.

[0091]

유용한 단편은 그들의 천연 리간드에 결합하는 능력을 보유하는 것이다. 전장 PD-1 길항제 폴리펩티드의 단편인 PD-1 길항제 폴리펩티드는 일반적으로 전장 PD-1 길항제 폴리펩티드에 비해 그의 천연 리간드(들)에 결합하는 능력의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 100%, 또는 심지어 100% 초과의 능력을 가진다.

[0092]

예를 들어, PD-L2 및 PD-L1의 유용한 단편은 PD-1에 결합하는 능력을 보유하는 것이다. PD-L2 및 PD-L1 단편은 일반적으로 전장 PD-L2 및 PD-L1에 비해 PD-1에 결합하는 능력의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 100%, 또는 심지어 100% 초과의 능력을 가진다.

[0093]

PD-1 길항제 폴리펩티드의 단편은 가용형 단편을 포함한다. 가용형 PD-1 길항제 폴리펩티드 단편은 생산 세포로부터 흘러나오거나 분비되거나 달리 추출될 수 있는 PD-1 길항제 폴리펩티드의 단편이다. PD-1 길항제 폴리펩티드의 가용형 단편은 폴리펩티드의 세포외 도메인의 일부 또는 전부를 포함하고, 세포내 및/또는 막횡단 도메인의 일부 또는 전부가 결여된다. 한 실시양태에서, PD-1 길항제 폴리펩티드 단편은 PD-1 길항제 폴리펩티드의 전체 세포외 도메인을 포함한다. 세포외 도메인은 막횡단 도메인으로부터 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산을 포함할 수 있는 것이다. 별법으로, 세포외 도메인은 C-말단, N-말단, 또는 둘 모두로부터 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산이 제거될 수 있다.

[0094]

일반적으로, PD-1 길항제 폴리펩티드 또는 그의 단편은 신호 서열을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산으로부터 발현된다. 신호 서열은 일반적으로 미성숙 폴리펩티드로부터 제거되어, 신호 서열이 결여되는 성숙 폴리펩티드를 생성시킨다. PD-1 길항제 폴리펩티드의 신호 서열은 폴리펩티드의 발현 수준, 분비, 용해도, 또는 다른 특성에 영향을 미치도록 표준 문자 생물학 기술을 이용하여 다른 폴리펩티드의 신호 서열로 교체될 수 있다. PD-1 길항제 폴리펩티드 신호 서열을 교체하기 위해 사용되는 신호 서열은 당업계에 공지된 임의의 것일 수 있다.

[0095]

1. PD-L2 세포외 도메인

[0096]

a. 인간 PD-L2 세포외 도메인

[0097]

한 실시양태에서, PD-1 길항제 폴리펩티드는 인간 PD-L2의 세포외 도메인 또는 그의 단편을 포함한다. PD-1 길항제 폴리펩티드는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다:

atgtattttc ttctcttgat gctgttggaaatgcaccaat cgcggccctc	60
tttactgtga ccgtgccccaa agaactgtat atcattggac acgggtccaa tgtgaccctc	120
gaatgtaaat ttgcacccgg cagccacgtt aacctggggg ccatcaactgc cagcttgaaa	180
aaatgtggaaa acgcacacttc acctcacccgg gagaggccaa ccctcttggaa ggaccaactg	240
ccatggggaa aggccctccct tcataatccct cagttggcagg ttccggatgaa gggacagtac	300
cagtgcatttttatactacgg cgtggcttgg gattacaatgttgcacccctt gaagggtggaaa	360
gggtccatc tggaaaaattaa cactcacatt cttaaggctc cagagacggaa cgagggtggaa	420
ctgacatgcg aacggccacccgg ctaccccggtt ccggagggtca gctggcccaa cgtggcgtca	480
cgtcttacaa ctcttcatttc taggacacccggggccctt accaggttac atccgtgtc	540
ccgcctcaaac cggccccccagg cggaaatttt agttgtgtt tttggatataccacgtgcgaa	600
gagctgacttc ttgcatttat tgatgtcag tccccagatgg agccacggac tcataccaat	660
tgg	663

(서열 17).

[0100]

다른 실시양태에서, PD-1 길항체 폴리펩티드는 다음 인간 아미노산 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다:

MIFLLLMLSL	ELQLHQIAAL	FTVTVPKELY	IIEHGSNVTL	
MIFLLLMLSL	ELQLHQIAAL	FTVTVPKELY	IIEHGSNVTL	ECNFDTGSHV NLGAIATSLQ
KVENDTSPHR	ERATLLEEQL	PLGKASFHIP	QVQVRDEGGY QCIIIIYGVAW	DYKVLTTLKV
ASYRKINTHI	LKVPETDEVE	LTCQRTGYPL	AEVSPWNVSV	PANTISHSRTP EGLYQVTSVL
RLKPPPPGRNF	SCVFWNTHVRE	ELTLASIDLQ	SOMEPRTHPT W	

(서열 18).

[0101]

신호 서열은 성숙 단백질 내에서 제거될 것임이 이해될 것이다. 추가로, 제조 동안 숙주로부터 단백질 분비를 향상시키기 위해 다른 유기체로부터의 신호펩티드가 사용될 수 있음이 이해될 것이다. 다음 서열 19는 신호서열이 없는 서열 18의 인간 아미노산 서열을 제공한다:

LFTVTVPKEL YIIHGHSNTV LECNFDTGSH VNLGAITASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ	60
LPLGKASFH PQVQVRDEQQ YQCIIIIYGVW WDVKYLTLKV KASYRKINTH ILKVPETDEV	120
ELTCQATGYP LAEVSWPNVS VFANTSHSRT PEGLYQVTSV LRLKPPGRN FSCVFWNTHV	180
RELTLSASIDL QSQMEPRTHP TW	202

[0103]

다른 실시양태에서, PD-1 길항제 폴리펩티드는 인간 PD-L2의 IgV 도메인을 포함한다. 제1 융합 파트너는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다:

ttaactgtga ccgtgcggaaa agaactgtat atcattggac acgggtccaa tgtgaccctc	60
gaatgtaaat ttgcaccccg cagccacgtt aacctggggg ccatcaactgc cagctgcaa	120
aaatgtgaaa accgacacttc actctacccgg gagaggccaa cccttttggg ggagcaactg	180
ccatggggg aggccctctt tcatatccct caggtgcagg ttccggatga gggacagtac	240
caatgcattt ttatctacgg ctgtacatgtt gtttacaaat atctggaccctt gaat	294

[0105]

PD-1 길항제 폴리펩티드는 다음 인간 아미노산 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다 (PD-1 2V로션도 친해진다):

FTVTVPKELY IIEHGSNVTL ECNFDTGSHV NLGAIATSLQ KVENDTSPHR ERATLLEEQI
PLGKASEHPIQ QWQVRDEGOY OCTILLYGVAW DYKYLTTK 60
98

[0107]

b. 비-이간 열차를 PDH 2 세포워도메인

[0109]

한 실시양태에서, PD-1 길항제 폴리펩티드는 비-인간 영장류 (시노몰구스 원숭이) PD-L2의 세포외 도메인 또는 그의 단편을 포함한다. PD-1 길항제 폴리펩티드는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다:

atgatcttcc tcctgcta at gttgaggcgt gaattgcgc ttcaccagat agcagctta	60
ttcacagtga cagtcctaa ggaactgtac ataatacagc atggcagcaa tgtgaccctg	120
gaatgcaact ttgacactgg aagtcatgtg aaccttggag caataacagc cagttgcaa	180
aagggtggaa atgatacata cccacacccgt gaaagagcca ctgtctggg ggagcagctg	240
ccccttaggg aggccctcggtt ccacatacct caagtccaa tgagggacga aggacagtac	300
caatgcataa tcatctatgg ggtcgctgg gactacaatg acctgactct gaaagtcaaa	360
gttcttaca gggaaaataaa cactcacatc ctaaagggtt cagaaacaga tgaggttagag	420
ctcacctgcc aggtctacagg ttatcctctg gcagaagtat cctggccaaa cgtcagcggtt	480
cctgccaaca ccagccactc caggaccctt gaaaggctct accaggctac cagtgttctg	540
cgcctaaaggc cccccctgg cagaacttc agtgtgtgt tctggatac tcacgtgagg	600
gaacttactt tggccagcat tgaccttcaa agtcaatgg aacccaggac ccatacact	660
tgg	663

[0110] (서열 22).

[0111]

다른 실시양태에서, PD-1 길항체 폴리펩티드는 다음 비-인간 영장류 아미노산 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다:

MIFPLLLMLSL ELQLHQIAAL FTVTVPKELY IIEHGSNVTI ECNFDTGSHV NLGAITASLQ	60
KVENDTSPHR ERATLLEEQL PLGKASHFIP QVQVRDEGGY QCIIIIYGVAW DYKYLTFLKV	120
ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL	180
RLKPPPPGRNF SCVFWNTHVR ETLTASIDLQ SQMPEPRTHPT W	221

[0112] (서열 23).

[0113]

신호 서열은 성숙 단백질 내에서 제거될 것이다. 추가로, 제조 동안 숙주로부터 용합 단백질의 분비를 향상시키기 위해 다른 유기체로부터의 신호 펩티드가 사용될 수 있다. 다음 서열 24는 신호 서열이 없는 서열 23의 비-인간 영장류 아미노산 서열을 제공한다:

LFTVTVPKEL YIIIEHGSNVT LECDNFDTGSH VNLGAITASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ	60
LPLGKASFH PQVQVRDEGG YQCIIIIYGVA WDYKYLTFLKV KASYRKINTH ILKVPETDEV	120
ELTCQATGYP LAEVSWPNVS VRANTSHSRT PEGLYQVTSV LRLKPPPPGRN FSCVFWNTHV	180
RELTIASIDL QSQMEPRTHPT TW	202

[0114] (서열 24).

[0115]

다른 실시양태에서, PD-1 길항체 폴리펩티드는 비-인간 영장류 PD-L2의 IgV 도메인을 포함한다. 제1 용합 파트 너는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다:

ttcacagtga cagtcctaa ggaactgtac ataatacagc atggcagcaa tgtgaccctg	60
gaatgcaact ttgacactgg aagtcatgtg aaccttggag caataacagc cagtttgc	120
aagggtggaa atgatacata cccacacccgt gaaagagcca ctgtctggg ggagcagctg	180
ccccttaggg aggccctcggtt ccacatacct caagtccaa tgagggacga aggacagtac	240
caatgcataa tcatctatgg ggtcgctgg gactacaatg acctgactct gaaa	294

[0116] (서열 25).

[0117]

PD-1 길항체 폴리펩티드는 다음 비-인간 영장류 아미노산 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다 (PD-L2V로서도 칭해진다):

FTVTVPKELY IIEHGSNVTI ECNFDTGSHV NLGAITASLQ KVENDTSPHR ERATLLEEQL	60
PLGKASHFIP QVQVRDEGGY QCIIIIYGVAW DYKYLTFLK	98

[0118] (서열 26).

[0119]

d. 뮤린 PD-L2 세포외 도메인

[0120]

한 실시양태에서, PD-1 길항체 폴리펩티드는 뮤린 PD-L2의 세포외 도메인 또는 그의 단편을 포함한다. PD-1 길항체 폴리펩티드는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다:

atgctgctcc	tgctgccgat	actgaacctg	agcttacaac	ttcatcctgt	agcagctta	60
ttcacccgtga	cagcccccta	agaagtgtac	accgttagacg	tcggcagcag	tgtgagcctg	120
gagtgcgatt	ttgaccgcag	agaatgcact	gaactggaa	ggataagagc	cagttgcag	180
aaggtagaaa	atgatacgtc	tctgcaea	gaaagagcca	ccctgcttgg	ggagcagctg	240
cccctggaa	aggcttgtt	ccacatccct	agtgtccaa	tgagagatcc	cgcccagttac	300
cgttgcctgg	tcatctgcgg	ggccgcctgg	gactacaat	acctgacgg	gaaagtcaaa	360
gttacatcata	tgaggataga	cactaggatc	ctggaggatc	cagttacagg	ggaggtgcag	420
cattacatgc	aggcttagagg	ttatccccct	gcagaagatg	cctggcaaaa	tgtcaatgtt	480
cctggcaaca	ccagccacat	caggcccc	gaaggccct	accaggcac	cagtgttctg	540
cgcctcaagc	ctcagccat	cagaacatc	agctgcac	tctggaaatgc	tcacatgaag	600
gagctgactt	cagocatcat	tgaccctctg	agtcggatg	aacccaaatg	ccccagaa	660
tgg						663

(서열 27).

[0121]

다른 실시양태에서, PD-1 길항제 폴리펩티드는 다음 뮤린 아미노산 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다:

MLLLPIILNL	SLQLHPVAAL	FTVTAPKEVY	TVDVGSSVSL	ECDFDRECT	ELEGIRASLQ	60
KVENDTSLQS	ERATLLEEQL	PLGKALFHIP	SVQVRDSGQY	RCLVICGAAW	DYKYLTVKV	120
ASYMRIDTRI	LEVPGTGEVQ	LTCQARGYPL	AEVSWQNVSV	PANTSHIRP	EGLYQVTSVL	180
RLKPQPSRNF	SCMFWNNAHM	ELTSAIIDPL	SRMEPKVPR	W		221

(서열 28).

[0123]

신호 서열은 성숙 단백질 내에서 제거될 것이다. 추가로, 제조 동안 숙주로부터 단백질 분비를 향상시키기 위해 다른 유기체로부터의 신호 펩티드가 사용될 수 있다. 다음 서열 29는 신호 서열이 없는 서열 28의 뮤린 아미노산 서열을 제공한다:

LFTVTAPKEV	YTVDVGSSVS	LECDFDREC	TELEGIRASL	QKVENDTSIQ	SERATLLEEQ	60
LPLGKALFHI	PSVQVRDSGQ	YRCLVICGAA	WDYKYLTVKV	KASYMRIDTR	ILEVPGTGEV	120
QLTCQARGYP	LAEVSWQNVS	VPAINTSHIRT	PEGLYQVTSV	LRLKQPSRN	FSCMFWNNAHM	180
KELTSAIIDP	LSRMEPKVPR	TW				202

(서열 29).

[0125]

다른 실시양태에서, PD-1 길항제 폴리펩티드는 뮤린 PD-L2의 IgV 도메인을 포함한다. 제1 융합 파트너는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다:

ttcacccgtga	cagcccccta	agaagtgtac	accgttagacg	tcggcagcag	tgtgagcctg	60
gagtgcgatt	ttgaccgcag	agaatgcact	gaactggaa	ggataagagc	cagttgcag	120
aaggtagaaa	atgatacgtc	tctgcaea	gaaagagcca	ccctgcttgg	ggagcagctg	180
cccctggaa	aggcttgtt	ccacatccct	agtgtccaa	tgagagatcc	cgcccagttac	240
cgttgcctgg	tcatctgcgg	ggccgcctgg	gactacaat	acctgacgg	gaaa	294

(서열 30).

[0127]

PD-1 길항제 폴리펩티드는 다음 뮤린 아미노산 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다 (PD-L2V로서도 칭해진다):

FTVTAPKEVY	TVDVGSSVSL	ECDFDRECT	ELEGIRASLQ	KVENDTSLQS	ERATLLEEQL	60
PLGKALFHIP	SVQVRDSGQY	RCLVICGAAW	DYKYLTVK			98

(서열 31).

[0129]

d. PD-L2 세포외 도메인 단편

[0131]

PD-L2 세포외 도메인은 신호 펩티드 또는 PD-L2의 추정 막횡단 도메인으로부터 하나 이상의 아미노산을 함유할 수 있다. 분비 동안, 절단되는 신호 펩티드의 아미노산의 수는 발현 시스템 및 숙주에 따라 변할 수 있다. 추가로, PD-1에 결합하는 능력을 보유하는, C-말단 또는 N-말단으로부터의 하나 이상의 아미노산이 결여되는 PD-L2 세포외 도메인의 단편이 사용될 수 있다.

[0132]

제1 융합 파트너로서 사용될 수 있는 뮤린 PD-L2의 예시적인 적합한 단편은 다음 서열을 포함하고 이로 제한되지 않는다:

- [0133] 서열 53의
24-221, 24-220, 24-219, 24-218, 24-217, 24-216, 24-215,
23-221, 23-220, 23-219, 23-218, 23-217, 23-216, 23-215,
22-221, 22-220, 22-219, 22-218, 22-217, 22-216, 22-215,
21-221, 21-220, 21-219, 21-218, 21-217, 21-216, 21-215,
20-221, 20-220, 20-219, 20-218, 20-217, 20-216, 20-215,
19-221, 19-220, 19-219, 19-218, 19-217, 19-216, 19-215,
18-221, 18-220, 18-219, 18-218, 18-217, 18-216, 18-215,
17-221, 17-220, 17-219, 17-218, 17-217, 17-216, 17-215,
16-221, 16-220, 16-219, 16-218, 16-217, 16-216, 16-215.
- [0134]
- [0135] 뮤린 PD-L2의 추가의 적합한 단편은 임의로 N-말단 단부에 부착된 신호 패티드의 1 내지 5개의 아미노산을 갖는, 다음 서열을 포함하고 이로 제한되지 않는다:
- [0136] 서열 1의
20-221, 33-222, 33-223, 33-224, 33-225, 33-226, 33-227,
21-221, 21-222, 21-223, 21-224, 21-225, 21-226, 21-227,
22-221, 22-222, 22-223, 22-224, 22-225, 22-226, 22-227,
23-221, 23-222, 23-223, 23-224, 23-225, 23-226, 23-227,
24-221, 24-222, 24-223, 24-224, 24-225, 24-226, 24-227.
- [0137]
- [0138] 신호 패티드는 서열 1 내에 함유된 신호 패티드를 포함한 본원에 개시된 임의의 것일 수 있거나, 당업계에 공지된 임의의 신호 패티드일 수 있다.
- [0139] 제1 용합 파트너로서 사용될 수 있는 인간 PD-L2의 예시적인 적합한 단편은 다음 서열을 포함하고 이로 제한되지 않는다:
- [0140] 서열 56의
24-221, 24-220, 24-219, 24-218, 24-217, 24-216, 24-215,
23-221, 23-220, 23-219, 23-218, 23-217, 23-216, 23-215,
22-221, 22-220, 22-219, 22-218, 22-217, 22-216, 22-215,
21-221, 21-220, 21-219, 21-218, 21-217, 21-216, 21-215,
20-221, 20-220, 20-219, 20-218, 20-217, 20-216, 20-215,
19-221, 19-220, 19-219, 19-218, 19-217, 19-216, 19-215,
18-221, 18-220, 18-219, 18-218, 18-217, 18-216, 18-215,
17-221, 17-220, 17-219, 17-218, 17-217, 17-216, 17-215,
16-221, 16-220, 16-219, 16-218, 16-217, 16-216, 16-215.
- [0141]
- [0142] 인간 PD-L2의 추가의 적합한 단편은 임의로 N-말단 단부에 부착된 신호 패티드의 1 내지 5개의 아미노산을 갖는, 다음 서열을 포함하고 이로 제한되지 않는다:
- [0143] 서열 3의
20-221, 33-222, 33-223, 33-224, 33-225, 33-226, 33-227,
21-221, 21-222, 21-223, 21-224, 21-225, 21-226, 21-227,
22-221, 22-222, 22-223, 22-224, 22-225, 22-226, 22-227,
23-221, 23-222, 23-223, 23-224, 23-225, 23-226, 23-227,
24-221, 24-222, 24-223, 24-224, 24-225, 24-226, 24-227.
- [0144]
- [0145] 신호 패티드는 서열 3 내에 함유된 신호 패티드를 포함한 본원에 개시된 임의의 것일 수 있거나, 당업계에 공지된 임의의 신호 패티드일 수 있다.
- [0146] 제1 용합 파트너로서 사용될 수 있는 비-인간 영장류 PD-L2의 예시적인 적합한 단편은 다음 서열을 포함하고 이로 제한되지 않는다:

[0147]

서열 5의

24-221, 24-220, 24-219, 24-218, 24-217, 24-216, 24-215,
 23-221, 23-220, 23-219, 23-218, 23-217, 23-216, 23-215,
 22-221, 22-220, 22-219, 22-218, 22-217, 22-216, 22-215,
 21-221, 21-220, 21-219, 21-218, 21-217, 21-216, 21-215,
 20-221, 20-220, 20-219, 20-218, 20-217, 20-216, 20-215,
 19-221, 19-220, 19-219, 19-218, 19-217, 19-216, 19-215,
 18-221, 18-220, 18-219, 18-218, 18-217, 18-216, 18-215,
 17-221, 17-220, 17-219, 17-218, 17-217, 17-216, 17-215,
 16-221, 16-220, 16-219, 16-218, 16-217, 16-216, 16-215.

[0148]

비-인간 영장류 PD-L2의 추가의 적합한 단편은 임의로 N-말단 단부에 부착된 신호 웨티드의 1 내지 5개의 아미노산을 갖는, 다음 서열을 포함하고 이로 제한되지 않는다:

[0149]

서열 5의

20-221, 33-222, 33-223, 33-224, 33-225, 33-226, 33-227,
 21-221, 21-222, 21-223, 21-224, 21-225, 21-226, 21-227,
 22-221, 22-222, 22-223, 22-224, 22-225, 22-226, 22-227,
 23-221, 23-222, 23-223, 23-224, 23-225, 23-226, 23-227,
 24-221, 24-222, 24-223, 24-224, 24-225, 24-226, 24-227.

[0150]

신호 웨티드는 서열 5 내에 함유된 신호 웨티드를 포함한 본원에 개시된 임의의 것일 수 있거나, 당업계에 공지된 임의의 신호 웨티드일 수 있다.

[0151]

PD-L2 단백질은 또한 서열 3 (인간 전장)의 아미노산 20-121, 또는 서열 23 (세포외 도메인 또는 ECD)의 아미노산 1-102의 PD-1 결합 단편을 포함한다. 그의 구체적 실시양태에서, PD-L2 폴리웨티드 또는 PD-1 결합 단편은 또한 서열 3의 잔기 110-114에서 아미노산 WDYKY 또는 서열 23의 잔기 91-95에서 WDYKY를 포함한다. 비-제한적인 예로서, 상기 PD-1 결합 단편은 서열 3의 아미노산 20-121의 서열의 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 75, 적어도 80, 적어도 85, 적어도 90, 적어도 95, 또는 적어도 100개의 인접하는 아미노산을 포함하고, 여기서 각각의 그러한 PD-1 결합 단편의 바람직한 실시양태는 하위 단편으로서 서열 3의 잔기 110-114에서 발견되는 아미노산 WDYKY 또는 서열 23의 잔기 91-95에서 WDYKY를 포함할 것이다.

[0152]

2. PD-L1 세포외 도메인

[0153]

한 실시양태에서, 변이체 PD-L1 폴리웨티드는 세포외 도메인의 전부 또는 일부를 포함한다. PD-L1의 대표적인 세포외 도메인의 아미노산 서열은 다음 서열에 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%의 서열 동일성을 가질 수 있다:

FTVTVPKDLY VVEYGSNMTI ECKFPVKEQL DLAALIVYWE MEDKNNIQFV HGEEDLKVQH	60
SSYRQRARLL KDQLSLGNAA LQITDVKLQD AGVYRCMTSY GGADYKRITV KVNAAPYNNIN	120
QRILVVDPVT SEHELTQCQAE GYPKAEVINT SSDHQVLSGK TTTTNSKREE KLFNVTSTLR	180
INTTTNEIFY CTFRRLDPEE NHATAELVTP E LPLAHPPNER	220

[0154]

(서열 32).

[0155]

PD-L1의 막횡단 도메인은 서열 9의 아미노산 위치 239에서 시작한다. PD-L1의 적합한 단편은 신호 웨티드 서열, 예를 들어 서열 9 또는 그의 변이체의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 인접하는 아미노산, 막횡단 도메인의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있음이 이해될 것이다.

[0156]

무린 PD-L1의 세포외 도메인은 다음 아미노산 서열을 가진다:

FTITAPKDLY VVEYGSNVTM ECRFPVEREL DLLALVVVYWE KEDEQVIQFV AGEEDLKPQH	60
SNFRGRASLP KDQLLKGNAA LQITDVKLQD AGVYCCILSY GGADYKRITV KVNAAPYRNIN	120
QRISVDPATS EHHLICQAEG YPEAEVINT SDHQFVSGKR SVTTTSRTEGM LLNVNTSSLRV	180
NATANDVFYC TFWRSQPGQN HTAELIIPEL PATHFPQNRT HWVLLGSILL FLIVVSTVL	239

[0157]

(서열 33).

[0160] 뮤린 PD-L1의 막횡단 도메인은 서열 7의 아미노산 위치 240에서 시작한다. 특정한 실시양태에서, PD-L1 폴리펩티드는 신호 펩티드의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 인접하는 아미노산, 막횡단 도메인의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 인접하는 아미노산, 또는 이들의 조합을 갖는, 뮤린 PD-L1의 세포외 도메인을 포함한다

3. B7.1 세포외 도메인

a. 뮤린 B7.1 세포외 도메인

[0163] 한 실시양태에서, PD-1 길항체 폴리펩티드는 뮤린 B7.1의 세포외 도메인 또는 그의 단편을 포함한다. PD-1 길항체 폴리펩티드는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다:

```
atggcttgcata ttgttcaggat gatgcaggat acaccactcc tcaagttcc atgtccaaagg 60
cttcatttttc tcttttgtgtc gctgattcgat ctttccaaagtg tgtcttcaga tggtgtgaa 120
caactgtccaa agtcgtgaa agataaaggta ttgtgtccccc gcgcgttacaa ctgttccat 180
gaagatggat ctgaaaggccg aatctactgg caaaaacatg acaaagggtt gctgtctgtc 240
attgtctggaa aactaaaaagggt gtggcccgag tataagaacc ggactttata tgacaacact 300
acactacttc ttatcatctt gggcctgtgtc ctttcagacc ggggcacata cagctgtgtc 360
gttcaaaaaga aggaaaggagg aacgtatgaa gttaaacact tggcttagt aaagttgtcc 420
atcaaaagctg acttctctact ccccaacata actgagtctg gaaacccatc tgccagacact 480
aaaagaggata ctcgttgc ttcgggggtt ttcggggatc ctcgttcttc ttgggttggaa 540
aatggaaagg aatctactgg catcaatcag acaatttccaggatcgttca atctgaatttgc 600
tacaccatc ttgcactaact agatctcaat acgactcgca accacacat taagtgttcc 660
attaaatatg gagatgttca ctgttcagag gacttcaccc gggaaaaacc cccagaagac 720
cttcgttgcata gcaaggaaac 738
```

(서열 34).

[0165] 다른 실시양태에서, PD-1 길항체 폴리펩티드는 다음 뮤린 아미노산 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다:

```
MACNCQLMQD TPLLKFPCCPR LILLFVLLIR LSQVSSDVDE QLSKSVKDKV LLPCRYNSPH 60
EDESEDRRIW QKHKDKVVLSV TAGKLKVWPE YKNRTRLYDNT TYSLIIILGLV LSDRGTYSCV 120
VQKKERGTYE VKHLALVKLS IKADFSTPNI TESGNPSADT KRITCFASGG FPKPRFSWLE 180
NGRELPGINT TISQDPESEL YTISSQLDFN TTRNHTIKCL IKYGDAAHVSE DFTWEKPPED 240
PPDSKN 246
```

(서열 35).

[0167] 신호 서열은 성숙 단백질 내에서 제거될 것이다. 추가로, 제조 동안 숙주로부터 단백질 분비를 향상시키기 위해 다른 유기체로부터의 신호 펩티드가 사용될 수 있다. 다음 서열 36은 신호 서열이 없는 서열 35의 뮤린 아미노산 서열을 제공한다:

```
VDEQLSKSVK DKVLLPCRYN SPHEDESEDR IYWQKHDKVV LSVIAGKLKV WPEYKNRTLY 60
DNNTYSLIIL GLVLSDRGTY SCVVKKKERG TYEVKHLALV KLSIKADFST PNITESGNPS 120
ADTKRITCFA SGFFPKPRFC WLENGRELPG INTTISQDPE SELYTISQDFN DFNTTRNHTI 180
KCLIKYGDAAH VS EDFTWEKP PEDFPDSKN 209
```

(서열 36).

[0169] 다른 실시양태에서, PD-1 길항체 폴리펩티드는 뮤린 B7.1의 IgV 도메인을 포함한다. 제1 융합 파트너는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다:

```
gttgcgttca aactgtccaa gtcgttcaaa gataaggat tgcgtccccc ccgttacac 60
tctccatcg aagatgttca tgaaggccgat atctactggc aaaaacatgca caaagggtt 120
ctgtgttca ttgtgtccccc actaaaaagggtt ggcccccggat ataaggacccg gactttat 180
gacacacta cttactctt tatcatctgtt gggcctgtgtc tttcagacccg gggcacatc 240
agctgtgtcg ttcaaaaaggaa gggaaaggaggaa acgttatgaa gttaaacactt 291
```

(서열 37).

[0171] PD-1 길항체 폴리펩티드는 다음 뮤린 아미노산 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다 (B7.1V로서도 칭해짐):

```
VDEQLSKSVK DKVLLPCRYN SPHEDESEDR IYWQKHDKVV LSVIAGKLKV WPEYKNRTLY 60
DNNTYSLIIL GLVLSDRGTY SCVVKKKERG TYEVKHL 97
```

(서열 38).

[0173] b. 인간 B7.1 세포외 도메인

[0174] 한 실시양태에서, PD-1 길항제 폴리펩티드는 인간 B7.1의 세포외 도메인 또는 그의 단편을 포함한다. PD-1 길항제 폴리펩티드는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다:

```
atgggccaca cacggggca gggacatca ccattccaa gtccataacct caatttcttt    60
cagctctgg tgctggctgg ttcttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag    120
gaagtggaaag aagtggcaac gctgtctgt ggtcacaaat tttctgttgaa agagctggca    180
caaactcgca ttactggca aaaggagaag aaaatgggtgc tgactatgat gtatggggac    240
atgaatataat ggcggagta caagaaccgg accatcttgc atatcaataa taacctctcc    300
atttgtatcc tggctctcgccc catctgcg gagggcacat acgagtgtgt tttctgtgaag    360
tataaaaaag acgcttcaaa gggggacac ctggctgaag tgacggttattc agtcaaagct    420
gacttcccta cacatggat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata    480
atttgtctaa cctctggagg ttttcagag cctcacctct cctgggttggaa aaatggagaa    540
gaattaaaatg ccatacac aacagtttcc caagatccctg aaactgagct ctatgtgtt    600
agcagcaaac tggatttcaaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtt catcaaggat    660
ggacatitaa gagtaatcaaa gacccatcaac tggaaatacaa ccaagcaaga gcattttcct    720
gataaccatgc tc                                         732
```

[0175] (서열 39).

[0176] 다른 실시양태에서, PD-1 길항제 폴리펩티드는 다음 인간 아미노산 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다:

```
MGHTRRQGTS PSKCPYLNFF QLLVLAGLSH FCSGVIVHVTK EVKEVATLSC GHNVSVLELA    60
QTRIYQKEK KMVLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTYECVVLK    120
YEKDAFKREH LAEVTLVSKA DFPTPSISDF BIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE    180
ELNAINNTVS QDPETELYAV SSKLDNFNMFTT NHSPMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP    240
DNL                                         243
```

[0177] (서열 40).

[0178] 신호 서열은 성숙 단백질 내에서 제거될 것이다. 추가로, 제조 동안 숙주로부터 단백질 분비를 향상시키기 위해 다른 유기체로부터의 신호 펩티드가 사용될 수 있다. 다음 서열 41은 신호 서열이 없는 서열 40의 인간 아미노산 서열을 제공한다:

```
VIHVTVKEVKE VATLSCGHNV SVEELAQTRI YWQKEKKMVL TMMSGDMNIW PEYKNRTIFD    60
ITNNLSIVIL ALRPSDEGYT ECVVLKYEKD AFKREHIAEV TLSVKADFPT PSISDFEIPT    120
SNIRRIICST SGGFPEPHLS WLNGEELNA INTTVSQDPE TELYAVSSKL DFNMTTNHSF    180
MCLIKYGHLR VNQTFNWNTT KQEHEFPDNL                                         209
```

[0179] (서열 41).

[0180] 다른 실시양태에서, PD-1 길항제 폴리펩티드는 인간 B7.1의 IgV 도메인을 포함한다. 제1 용합 파트너는 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다:

```
gttatccacg tgaccaagaa agtggaaagaa gtggcaacgc tgccctgtgg tcacaatgtt    60
tctgttgaag agctggcaca aactcgcatc tactggccaa aggagaagaa aatgggtctg    120
actatgtatgt ctggggacat gaatatatgg cccggatcaca aqaaacggac catctttgtat    180
atcaactaata acctctccat tggatctgtg gctctgcgcc catctgacga gggcacatatac    240
gagtggttgg ttctgttgaaatc tggaaaagac gctttcaagc gggacacatc ggctgttgg    300
acg                                         303
```

[0181] (서열 42).

[0182] PD-1 길항제 폴리펩티드는 다음 인간 아미노산 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다 (B7.1V로서도 칭해짐):

```
VIHVTVKEVKE VATLSCGHNV SVEELAQTRI YWQKEKKMVL TMMSGDMNIW PEYKNRTIFD    60
ITNNLSIVIL ALRPSDEGYT ECVVLKYEKD AFKREHIAEV T                                         101
```

[0183] (서열 43).

[0184] 3. B7.1 세포외 도메인 단편

[0185] 보조자극 폴리펩티드 도메인으로서 사용될 수 있는 뮤린 B7.1의 예시적인 적합한 단편은 다음 서열을 포함하고 이로 제한되지 않는다:

[0186]

서열 11의

42-246, 42-245, 42-244, 42-243, 42-242, 42-241, 42-240,
 41-246, 41-245, 41-244, 41-243, 41-242, 41-241, 41-240,
 40-246, 40-245, 40-244, 40-243, 40-242, 40-241, 40-240,
 39-246, 39-245, 39-244, 39-243, 39-242, 39-241, 39-240,
 38-246, 38-245, 38-244, 38-243, 38-242, 38-241, 38-240,
 37-246, 37-245, 37-244, 37-243, 37-242, 37-241, 37-240,
 36-246, 36-245, 36-244, 36-243, 36-242, 36-241, 36-240,

35-246, 35-245, 35-244, 35-243, 35-242, 35-241, 35-240,
 34-246, 34-245, 34-244, 34-243, 34-242, 34-241, 34-240.

[0187]

뮤린 B7.1의 추가의 적합한 단편은 임의로 N-말단 단부에 부착된 신호 펩티드의 1 내지 5개의 아미노산을 갖는, 다음 서열을 포함하고 이로 제한되지 않는다:

[0189]

서열 11의

38-246, 38-247, 38-248, 38-249, 38-250, 38-251, 38-252,
 39-246, 39-247, 39-248, 39-249, 39-250, 39-251, 39-252,
 40-246, 40-247, 40-248, 40-249, 40-250, 40-251, 40-252,
 41-246, 41-247, 41-248, 41-249, 41-250, 41-251, 41-252,

42-246, 42-247, 42-248, 42-249, 42-250, 42-251, 42-252.

[0190]

신호 펩티드는 서열 11 내에 함유된 신호 펩티드를 포함한 본원에 개시된 임의의 것일 수 있거나, 당업계에 공지된 임의의 신호 펩티드일 수 있다.

[0192]

보조자극 폴리펩티드 도메인으로서 사용될 수 있는 인간 B7.1의 예시적인 적합한 단편은 다음 서열을 포함하고 이로 제한되지 않는다:

[0193]

서열 13의

39-243, 39-242, 39-241, 39-240, 39-239, 39-238, 39-237,
 38-243, 38-242, 38-241, 38-240, 38-239, 38-238, 38-237,
 37-243, 37-242, 37-241, 37-240, 37-239, 37-238, 37-237,
 36-243, 36-242, 36-241, 36-240, 36-239, 36-238, 36-237,
 35-243, 35-242, 35-241, 35-190, 35-239, 35-238, 35-237,
 34-243, 34-242, 34-241, 34-240, 34-239, 34-238, 34-237,
 33-243, 33-242, 33-241, 33-240, 33-239, 33-238, 33-237,
 32-243, 32-242, 32-241, 32-240, 32-239, 32-238, 32-237,

31-243, 31-242, 31-241, 31-240, 31-239, 31-238, 31-237.

[0194]

인간 B7.1의 추가의 적합한 단편은 임의로 N-말단 단부에 부착된 신호 펩티드의 1 내지 5개의 아미노산을 갖는, 다음 서열을 포함하고 이로 제한되지 않는다:

[0196]

서열 13의

35-243, 35-244, 35-245, 35-246, 35-247, 35-248, 35-249,
 36-243, 36-244, 36-245, 36-246, 36-247, 36-248, 36-249,
 37-243, 37-244, 37-245, 37-246, 37-247, 37-248, 37-249,
 38-243, 38-244, 38-245, 38-246, 38-247, 38-248, 38-249,

39-243, 39-244, 39-245, 39-246, 39-247, 39-248, 39-249.

[0197]

신호 펩티드는 서열 13 내에 함유된 신호 펩티드를 포함한 본원에 개시된 임의의 것일 수 있거나, 당업계에 공지된 임의의 신호 펩티드일 수 있다.

[0199]

E. 변이체

[0200]

1. 변이체 PD-L2 및 PD-L1 PD-1 길항제

- [0201] 추가의 PD-1 길항체는 생리학적 조건 하에 PD-1에 결합하는 능력을 보유하거나, PD-1에 대한 결합이 증가되거나, 비-돌연변이된 PD-1에 비해 PD-1에 대한 결합이 감소되지만 PD-1 수용체를 통한 신호 전달을 촉진 할 수 있도록 돌연변이된 PD-L2 및 PD-L1 폴리펩티드 및 그의 단편을 포함한다. 하나의 실시양태에서는 비-돌연변이된 PD-L2 또는 PD-L1에 비해 PD-1을 활성화하고 T 세포에 억제 신호를 전달하는 폴리펩티드의 능력을 억제 또는 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 또는 삽입을 함유하는 단리된 PD-L2 및 PD-L1 폴리펩티드를 제공한다. PD-L2 및 PD-L1 폴리펩티드는 임의의 종에서 기원할 수 있다. 한 실시양태에서, PD-L2 또는 PD-L1 폴리펩티드는 포유동물 종의 것이다. 바람직한 실시양태에서, PD-L2 또는 PD-L1 폴리펩티드는 인간 또는 비-인간 영장류 기원의 것이다.
- [0202] 다른 실시양태에서, 변이체 PD-L2 또는 PD-L1 폴리펩티드는 야생형 또는 비-변이체 PD-L2 또는 PD-L1과 동일한 PD-1에 대한 결합 활성을 가지지만, 비-돌연변이된 PD-L2 또는 PD-L1 폴리펩티드에 비해 PD-1 수용체를 통한 신호 전달을 자극하는 능력을 갖지 않거나 10% 미만으로 갖는다. 다른 실시양태에서, 변이체 PD-L2 또는 PD-L1 폴리펩티드는 야생형 PD-L2 또는 PD-L1보다 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 또는 그 초과의 PD-1에 대한 결합 활성을 갖고, 비-돌연변이된 PD-L2 또는 PD-L1 폴리펩티드에 비해 PD-1 수용체를 통한 신호 전달을 자극하는 능력의 50%, 40%, 30%, 20%, 또는 10% 미만을 가진다.
- [0203] 변이체 PD-L2 또는 PD-L1 폴리펩티드는 아미노산 치환, 결실 또는 삽입의 임의의 조합을 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 단리된 PD-L2 또는 PD-L1 변이체 폴리펩티드는 그들의 아미노산 서열이 야생형 PD-L2 또는 PD-L1 폴리펩티드의 아미노산 서열과 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 100% 동일성을 공유하도록 정수의 아미노산 변경을 가진다. 바람직한 실시양태에서, B7-H1 변이체 폴리펩티드는 야생형 뮤린, 비-인간 영장류 또는 인간 PD-L2 또는 PD-L1 폴리펩티드의 아미노산 서열과 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 100% 동일성을 공유하는 아미노산 서열을 가진다.
- [0204] 서열 동일성 %는 컴퓨터 프로그램 또는 직접 서열 비교를 이용하여 계산할 수 있다. 2개의 서열들 사이에 동일성을 결정하기 위해 바람직한 컴퓨터 프로그램 방법은 GCG 프로그램 패키지, FASTA, BLASTP, 및 TBLASTN을 포함하고 이로 제한되지 않는다 (예를 들어, 문헌 [D. W. Mount, 2001, Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.] 참조). BLASTP 및 TBLASTN 프로그램은 NCBI 및 다른 공급원으로부터 공개적으로 이용가능하다. 공지의 스미쓰 워터만 (Smith Waterman) 알고리즘도 또한 동일성을 결정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0205] 아미노산 서열 비교를 위한 예시적인 파라미터는 다음을 포함한다: 1) 문헌 [Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443-453 (1970)]의 알고리즘; 2) 문헌 [Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:10915-10919 (1992)]의 BLOSSUM62 비교 매트릭스; 3) 갭 페널티 = 12; 및 4) 갭 길이 페널티 = 4. 이를 파라미터를 갖는 유용한 프로그램은 "갭" 프로그램 (제네틱스 컴퓨터 그룹 (Genetics Computer Group, 미국 위스콘신주 메디슨))으로서 공개적으로 이용가능하다. 상기 언급한 파라미터는 폴리펩티드 비교를 위한 디폴트 파라미터이다 (말단 갭에 대한 페널티를 갖지 않음).
- [0206] 별법으로, 폴리펩티드 서열 동일성은 다음 식을 이용하여 계산할 수 있다:
- [0207] % 동일성 = (동일한 잔기의 수)/(아미노산 잔기 내의 정렬 길이) * 100. 상기 계산을 위해, 정렬 길이는 내부 갭을 포함하지만 말단 갭을 포함하지 않는다.
- [0208] PD-L2 또는 PD-L1 폴리펩티드 내의 아미노산 치환은 "보존적" 또는 "비-보존적"일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "보존적" 아미노산 치환은 치환된 아미노산이 유사한 구조적 또는 화학적 특성을 갖는 치환이고, "비-보존적" 아미노산 치환은 치환된 아미노산의 전하, 소수도, 또는 부피가 유의하게 변경된 치환이다. 비-보존적 치환은 (a) 예를 들어, 시트 또는 나선 입체형태로서 치환 영역 내의 웹티드 백본 (backbone)의 구조, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 부피를 유지하는 것에 대한 그들의 효과에서 보다 유의하게 상이할 것이다.
- [0209] 보존적 아미노산 치환의 예는 치환이 다음 5개의 군 중의 하나 내에서 이루어지는 것을 포함한다: 1) 작은 지방족, 비극성 또는 경미한 극성 잔기 (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); 2) 극성, 음대전 잔기 및 그들의 아미드 (Asp, Asn, Glu, Gln); 극성, 양대전 잔기 (His, Arg, Lys); 큰 지방족, 비극성 잔기 (Met, Leu, Ile, Val, Cys); 및 큰 방향족 잔기 (Phe, Tyr, Trp). 비-보존적 아미노산 치환의 예는 1) 친수성 잔기, 예를 들어 세릴 또는 트레오닐이 소수성 잔기, 예를 들어, 류실, 이소류실, 페닐알라닐, 빌릴, 또는 알라닐을 치환하거나 (또는 이에 의해 치환되거나); 2) 시스테인 또는 프롤린이 임의의 다른 잔기를 치환하거나 (또는 이에 의해 치환되거나); 3)

양전성 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들어, 라이실, 아르기닐, 또는 히스티딜이 음전성 잔기, 예를 들어, 글루타밀 또는 아스파르테일을 치환하거나 (또는 이에 의해 치환되거나); 또는 4) 부피가 큰 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들어, 페닐알라닌이 측쇄를 갖지 않는 잔기, 예를 들어, 글라이신을 치환하는 (또는 이에 의해 치환되는) 것이다.

[0210] 그러나, 열거된 아미노산 위치에서 치환은 임의의 아미노산 또는 아미노산 유사체를 사용하여 이루어질 수 있음이 이해된다. 예를 들어, 열거된 위치에서 치환은 임의의 천연-발생 아미노산 (예를 들어, 알라닌, 아스파르트산, 아스파라진, 아르기닌, 시스테인, 글라이신, 글루탐산, 글루타민, 히스티딘, 류신, 발린, 이소류신, 라이신, 메티오닌, 프롤린, 트레오닌, 세린, 페닐알라닌, 트립토판, 또는 티로신)을 사용하여 이루어질 수 있다.

[0211] 본원에 기재된 치환은 마우스, 비-인간 영장류 및 인간 PD-L2 또는 PD-L1에 관한 것이지만, 당업자는 다른 종 (예를 들어, 래트, 햄스터, 기니 피그, 게르빌루스쥐, 토끼, 개, 고양이, 말, 돼지, 양 또는 소)으로부터 대응하는 폴리펩티드에서 동등한 변경을 쉽게 이를 수 있음에 주목한다. 그러나, 결합은 종-특이적 성분을 가지므로, PD-1 길항제를 인간에게 투여할 때 인간을 이용하는 것이 바람직하다.

[0212] 한 실시양태에서, 개시된 단리된 변이체 PD-L2 또는 PD-L1 폴리펩티드는 PD-1의 길항제이고, PD-1을 통한 신호 전달을 촉발하지 않으면서 PD-1에 결합하여 차단한다. PD-1 신호 전달에 의한 T 세포의 약화를 방지함으로써, 보다 많은 T 세포가 활성화되도록 이용가능하다. T 세포 억제를 방지하는 것은 PD-1 길항제와 접촉되지 않은 T 세포에 비해 T 세포 반응을 향상시키거나, T 세포의 증식을 향상시키거나, T 세포에 의한 시토카인의 생산 및/또는 분비를 향상시키거나, T 세포의 분화 및 효과기 기능을 자극하거나, T 세포의 생존을 촉진한다. 상호작용으로 인한 T 세포 반응은 대개 PD-1 길항제 폴리펩티드의 부재 하의 반응보다 더 크다. PD-1 길항제 폴리펩티드의 부재 하에 T 세포의 반응은 반응이 없거나, PD-1 길항제 폴리펩티드의 존재 하의 반응보다 유의하게 더 낮은 반응일 수 있다. T 세포의 반응은 효과기 (예를 들어, CTL 또는 항체-생산 B 세포) 반응, 하나 이상의 효과기 (예를 들어, CTL 또는 항체-생산 B 세포) 반응에 도움을 제공하는 혼합 반응, 또는 억압 반응일 수 있다.

[0213] 2개의 분자들 사이의 결합 친화도를 측정하는 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다. PD-1에 대한 변이체 PD-L2 또는 PD-L1 폴리펩티드의 결합 친화도를 측정하는 방법은 형광 활성화 세포 분류 (FACS), 표면 플라스몬 공명, 형광 이방성, 친화도 크로마토그래피 및 친화도 선택-질량 분광법을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0214] 본원에 개시된 변이체 폴리펩티드는 전장 폴리펩티드일 수 있거나, 전장 폴리펩티드의 단편일 수 있다. 바람직한 단편은 PD-1에 결합하기에 효과적인 세포외 도메인의 전부 또는 일부를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 단편은 전장 단백질의 보다 짧은 폴리펩티드인 폴리펩티드의 임의의 하위세트를 나타낸다.

2. 변이체 B7.1 및 PD-1 길항제

[0216] 추가의 PD-1 길항제는 생리학적 조건 하에 PD-L2 및/또는 PD-L1에 결합하는 능력을 보유하거나, PD-L2 및/또는 PD-L1에 대한 결합이 증가되거나 감소되도록 변형된 B7.1 및 PD-1 폴리펩티드 및 그의 단편을 포함한다. B7.1 및 PD-1 폴리펩티드는 임의의 종에서 기원할 수 있다. 한 실시양태에서, B7.1 또는 PD-1 폴리펩티드는 포유동물 종의 것이다. 바람직한 실시양태에서, B7.1 또는 PD-1 폴리펩티드는 인간 또는 비-인간 영장류 기원의 것이다.

[0217] 변이체 B7.1 또는 PD-1 폴리펩티드는 아미노산 치환, 결실 또는 삽입의 임의의 조합을 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 단리된 B7.1 또는 PD-1 변이체 폴리펩티드는 그들의 아미노산 서열이 야생형 B7.1 또는 PD-1 폴리펩티드의 아미노산 서열과 적어도 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, 99.5 또는 100% 동일성을 공유하도록 정수의 아미노산 변경을 가진다. 바람직한 실시양태에서, B7.1 또는 PD-1 변이체 폴리펩티드는 야생형 류린, 비-인간 영장류 또는 인간 B7.1 또는 PD-1 폴리펩티드의 아미노산 서열과 적어도 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, 99.5 또는 100% 동일성을 공유하는 아미노산 서열을 가진다.

[0218] B7.1 또는 PD-1 폴리펩티드 내의 아미노산 치환은 "보존적" 또는 "비-보존적"일 수 있다. 보존적 및 비-보존적 치환은 상기한 바와 같다.

[0219] 한 실시양태에서, 개시된 단리된 변이체 B7.1 또는 PD-1 폴리펩티드는 PD-1의 길항제이고, PD-L2 및/또는 PD-L1에 결합하여, 내인성 PD-1에 대한 그들의 결합을 차단한다. PD-1 신호 전달에 의한 T 세포의 약화를 방지함으로써, 보다 많은 T 세포가 활성화되도록 이용가능하다. T 세포 억제를 방지하는 것은 PD-1 길항제와 접촉되지 않은 T 세포에 비해 T 세포 반응을 향상시키거나, T 세포의 증식을 향상시키거나, T 세포에 의한 시토카인의 생산 및/또는 분비를 향상시키거나, T 세포의 분화 및 효과기 기능을 자극하거나, T 세포의 생존을 촉진한다. 상호작용으로 인한 T 세포 반응은 대개 PD-1 길항제 폴리펩티드의 부재 하의 반응보다 더 크다. PD-1 길항제 폴

리펩티드의 부재 하에 T 세포의 반응은 반응이 없거나, PD-1 길항제 폴리펩티드의 존재 하의 반응보다 유의하게 더 낮은 반응일 수 있다. T 세포의 반응은 효과기 (예를 들어, CTL 또는 항체-생산 B 세포) 반응, 하나 이상의 효과기 (예를 들어, CTL 또는 항체-생산 B 세포) 반응에 도움을 제공하는 헬퍼 반응, 또는 억압 반응일 수 있다.

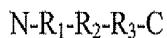
[0220] 변이체 폴리펩티드는 전장 폴리펩티드일 수 있거나, 전장 폴리펩티드의 단편일 수 있다. 바람직한 단편은 PD-L2 및/또는 PD-L1에 결합하기에 효과적인 세포외 도메인의 전부 또는 일부를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 단편은 전장 단백질의 보다 짧은 폴리펩티드인 폴리펩티드의 임의의 하위세트를 나타낸다.

F. 융합 단백질

[0222] 일부 실시양태에서, PD-1 길항제는 제1 폴리펩티드 도메인, 및 융합 단백질을 종양 세포 또는 종양 세포-연관 신생혈관에 표적화시키는 항원-결합 도메인인 제2 표적화 도메인을 함유하는 융합 단백질이다. 융합 단백질은 T 세포 수용체에 결합하여 T 세포 반응을 향상시킬 수 있거나, 바람직하게는 융합 단백질은 예를 들어 PD-1에 경쟁적으로 결합함으로써 T 세포에 결합하여 T 세포로의 억제 신호 전달을 차단할 수 있다. 천연 억제성 리간드 결합 PD-1을 저해함으로써, 개시된 조성물은 PD-1을 통한 신호 전달을 효과적으로 차단한다. 적합한 보조자 극성 폴리펩티드는 억제성 T 세포 신호 전달 수용체, 예를 들어 PD-1에 대한 결합 친화도가 증가 또는 감소된 변이체 폴리펩티드 및/또는 그의 단편을 포함한다.

[0223] 또한, 융합 단백질은 임의로 제1 폴리펩티드 도메인을 항원-결합 도메인과 분리시키는 웨티드 또는 폴리펩티드 링커 도메인을 함유한다.

[0224] 본원에 개시된 융합 단백질은 하기 화학식 I로 표시된다:



[0225] 여기서, "N"은 융합 단백질의 N-말단을 나타내고, "C"는 융합 단백질의 C-말단을 나타내고, " R_1 "은 PD-L2, PD-L1, B7.1, 또는 PD-1 폴리펩티드 또는 항원-결합 표적화 도메인이고, " R_2 "는 웨티드/폴리펩티드 링커 도메인이고, " R_3 "은 표적화 도메인 또는 항원-결합 표적화 도메인이고, 여기서 " R_1 "이 항원-결합 표적화 도메인일 때 " R_3 "은 폴리펩티드 도메인이고, " R_1 "이 PD-L2, PD-L1, B7.1, 또는 PD-1 폴리펩티드 도메인일 때 " R_3 "은 항원-결합 표적화 도메인이다. 바람직한 실시양태에서, " R_1 "은 PD-L2, PD-L1, B7.1, 또는 PD-1 폴리펩티드 도메인이고, " R_3 "은 항원-결합 표적화 도메인이다.

[0226] 임의로, 융합 단백질은 추가로 2개 이상의 융합 단백질을 이량체화 또는 다량체화하는 기능을 하는 도메인을 함유한다. 융합 단백질을 이량체화 또는 다량체화하는 기능을 하는 도메인은 별개의 도메인일 수 있거나, 별법으로 융합 단백질의 하나의 다른 도메인 (PD-L2, PD-L1, B7.1, 또는 PD-1 폴리펩티드 도메인, 항원-결합 표적화 도메인, 또는 웨티드/폴리펩티드 링커 도메인) 중의 하나에 함유될 수 있다.

[0227] 융합 단백질은 이량체화 또는 다량체화될 수 있다. 이량체화 또는 다량체화는 이량체화 또는 다량체화 도메인을 통해 2개 이상의 융합 단백질 사이에서 일어날 수 있다. 별법으로, 융합 단백질의 이량체화 또는 다량체화는 화학적 가교결합에 의해 일어날 수 있다. 형성되는 이량체 또는 다량체는 동종이량체/동종다량체 또는 이종 이량체/이종다량체일 수 있다.

[0228] 융합 단백질의 모듈 (module) 성질 및 상이한 조합으로 이량체화 또는 다량체화하는 그들의 능력은 종양 세포 미세환경에 대한 면역 반응을 향상시키는 기능을 하는 표적화 문자에 대한 풍부한 선택을 제공한다.

1. 항원-결합 표적화 도메인

[0229] 융합 단백질은 또한 항원-결합 표적화 도메인을 함유한다. 일부 실시양태에서, 표적화 도메인은 종양 세포 또는 종양 연관 신생혈관에 특이적이거나 정상 조직에 비해 종양 세포 또는 종양 연관 신생혈관에서 상향조절되는 항원, 리간드 또는 수용체에 결합한다. 일부 실시양태에서, 표적화 도메인은 감염성 질환 원인 물질에 반응하여 T 세포 활성화의 조절에 관여하는 면역 조직에 특이적인 항원, 리간드 또는 수용체에 결합한다.

종양/종양 연관 혈관 표적화 도메인

[0230] 종양-특이적 및 종양 연관 항원을 표적화하는 항원, 리간드 및 수용체

- [0234] 한 실시양태에서, 융합 단백질은 종양 세포에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하는 도메인을 함유한다. 종양에 의해 발현되는 항원은 종양에 특이적일 수 있거나, 비-종양 세포에 비해 종양 세포 상에서 보다 높은 수준으로 발현될 수 있다. 암 세포에 의해 독특하게 발현되거나 적절한 대조군에 비해 악성 병태가 있는 대상체에서 현저하게 더 높은 수준으로 존재하는 (예를 들어, 통계학상 유의한 방식으로 상승된) 항원성 마커 (marker), 예를 들어 종양 연관 항원으로서 알려진 혈청학상 규정된 마커가 특정한 실시양태에서 사용하기 위해 고려된다.
- [0235] 종양 연관 항원은 예를 들어, 세포 종양유전자-코딩된 산물 또는 비정상적으로 발현된 원-종양유전자-코딩된 산물 (예를 들어, neu, ras, trk, 및 kit 유전자에 의해 코딩된 산물), 또는 돌연변이된 형태의 성장 인자 수용체 또는 수용체-유사 세포 표면 분자 (예를 들어, c-erb B 유전자에 의해 코딩된 표면 수용체)를 포함할 수 있다. 다른 종양 연관 항원은 형질전환 사건에 직접 관여할 수 있는 분자, 또는 종양발생성 형질전환 사건에 직접 관여하지 않을 수 있지만 종양 세포에 의해 발현되는 분자 (예를 들어, 암배아 항원, CA-125, 흑색종 연관 항원 등)을 포함한다 (예를 들어, 미국 특히 6,699,475; [Jager, et al., Int. J. Cancer, 106:817-20 (2003)]; [Kennedy, et al., Int. Rev. Immunol., 22:141-72 (2003)]; [Scanlan, et al. Cancer Immun., 4:1 (2004)] 참조).
- [0236] 세포 종양 연관 항원을 코딩하는 유전자는 비정상적으로 발현된 세포 종양유전자 및 원-종양유전자를 포함한다. 일반적으로, 세포 종양유전자는 세포의 형질전환에 직접 관련되는 산물을 코딩하고, 이 때문에 이들 항원은 면역요법을 위해 특히 바람직한 표적이다. 한 예는 종양발생성 형질전환에 관여되는 세포 표면 분자를 코딩하는 종양 형성 neu 유전자이다. 다른 예는 ras, kit, 및 trk 유전자를 포함한다. 원-종양유전자 (종양유전자를 형성하도록 돌연변이되는 정상 유전자)의 산물을 비정상적으로 발현될 (예를 들어, 과다발현될) 수 있고, 이러한 비정상적인 발현은 세포 형질전환에 관련될 수 있다. 따라서, 원-종양유전자에 의해 코딩된 산물이 표적화될 수 있다. 일부 종양유전자는 종양 세포 표면 상에서 발현되는 성장 인자 수용체 분자 또는 성장 인자 수용체-유사 분자를 코딩한다. 한 예는 c-erbB 유전자에 의해 코딩되는 세포 표면 수용체이다. 다른 종양 연관 항원은 악성 형질전환에 직접 관여할 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 그러나, 이들 항원은 특정한 종양 세포에 의해 발현되고, 따라서 효과적인 표적을 제공할 수 있다. 일부 예는 암배아 항원 (CEA), CA 125 (난소 암종과 연관됨), 및 흑색종 특이적 항원이다.
- [0237] 난소 및 다른 암종에서, 예를 들어, 종양 연관 항원은 쉽게 입수된 생물학적 유체, 예를 들어 혈청 또는 점막 분비의 샘플 내에서 검출가능하다. 하나의 그러한 마커는 CA125 (그가 혈청 내에서 검출가능한 장소인 혈류 내로 또한 흘러나오는 암종 연관 항원)이다 (예를 들어, 문헌 [Bast, et al., N. Eng. J. Med., 309:883 (1983)]; [Lloyd, et al., Int. J. Canc., 71:842 (1997)]). 혈청 및 다른 생물학적 유체 내의 CA125 수준은 난소 및 다른 암종의 진단 및/또는 예후 프로필을 제공하기 위해 다른 마커, 예를 들어, 암배아 항원 (CEA), 편평 세포 암종 항원 (SCC), 조직 폴리펩티드 특이적 항원 (TPS), 시알릴 TN 뮤신 (STN), 및 태반 알칼린 포스파타제 (PLAP)의 수준과 함께 측정되었다 (예를 들어, 문헌 [Sarandakou, et al. Acta Oncol., 36:755 (1997)]; [Sarandakou, et al., Eur. J. Gynaecol. Oncol., 19:73 (1998)]; [Meier, et al., Anticancer Res., 17(4B):2945 (1997)]; [Kudoh, et al., Gynecol. Obstet. Invest., 47:52 (1999)]). 상승된 혈청 CA125는 또한 신경모세포종을 동반할 수 있는 반면 (예를 들어, [Hirokawa, et al., Surg. Today, 28:349 (1998)]), 상승된 CEA 및 SCC는 특히 결장직장암을 동반할 수 있다 (Gebauer, et al., Anticancer Res., 17(4B):2939 (1997)).
- [0238] 모노클로날 항체 K-1과의 반응성에 의해 규정된 종양 연관 항원인 메소텔린 (mesothelin)은 대다수의 편평 세포 암종, 예를 들어 상피 난소, 경부, 및 식도 종양 상에, 및 중피종 상에 존재한다 ([Chang, et al., Cancer Res., 52:181 (1992)]; [Chang, et al., Int. J. Cancer, 50:373 (1992)]; [Chang, et al., Int. J. Cancer, 51:548 (1992)]; [Chang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:136 (1996)]; [Chowdhury, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:669 (1998)]). MAb K-1을 사용하여, 메소텔린은 세포-연관 종양 마커로서만 검출가능하고, 난소암 환자로부터의 혈청 내에서 또는 OVCAR-3 세포에 의해 조건화된 배지 내에서 가용형 형태로 발견되지 않았다 (Chang, et al., Int. J. Cancer, 50:373 (1992)). 그러나, 구조상 관련된 인간 메소텔린 폴리펩티드는 또한 종양 연관 항원 폴리펩티드, 예를 들어 구별되는 메소텔린 관련 항원 (MRA) 폴리펩티드를 포함하고, 이는 악성종양이 있는 환자로부터의 생물학적 유체 내에서 자연 발생하는 가용형 항원으로서 검출가능하다 (WO 00/50900 참조).
- [0239] 종양 항원은 세포 표면 분자를 포함할 수 있다. 알려지거나 설명된 기능을 갖는 공지의 구조의 종양 항원은 다음 세포 표면 수용체를 포함한다: HER1 (GenBank 기록 번호 U48722), HER2 ([Yoshino, et al., J. Immunol.,

152:2393 (1994)]; [Disis, et al., Canc. Res., 54:16 (1994)]; GenBank 기탁 번호 X03363 및 M17730), HER3 (GenBank 기탁 번호 U29339 및 M34309), HER4 (Plowman, et al., Nature, 366:473 (1993); GenBank 기탁 번호 L07868 및 T64105), 상피 성장 인자 수용체 (EGFR) (GenBank 기탁 번호 U48722 및 K03193), 혈관 내피 세포 성장 인자 (GenBank No. M32977), 혈관 내피 세포 성장 인자 수용체 (GenBank 기탁 번호 AF022375, 1680143, U48801 및 X62568), 인슐린-유사 성장 인자-I (GenBank 기탁 번호 X00173, X56774, X56773, X06043, 유럽 특허 GB 2241703), 인슐린-유사 성장 인자-II (GenBank 기탁 번호 X03562, X00910, M17863 및 M17862), 트랜스페린 수용체 ([Trowbridge and Omary, Proc. Nat. Acad. USA, 78:3039 (1981)]; GenBank 기탁 번호 X01060 및 M11507), 에스트로겐 수용체 (GenBank 기탁 번호 M38651, X03635, X99101, U47678 및 M12674), 프로게스테론 수용체 (GenBank 기탁 번호 X51730, X69068 및 M15716), 난포 자극 호르몬 수용체 (FSH-R) (GenBank 기탁 번호 Z34260 및 M65085), 레티노산 수용체 (GenBank 기탁 번호 L12060, M60909, X77664, X57280, X07282 및 X06538), MUC-1 ([Barnes, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86:7159 (1989)]; GenBank 기탁 번호 M65132 및 M64928), NY-ESO-1 (GenBank 기탁 번호 AJ003149 및 U87459), NA 17-A (PCT 공개 WO 96/40039), 멜란 (Melan)-A/MART-1 ([Kawakami, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 91:3515 (1994)]; GenBank 기탁 번호 U06654 및 U06452), 티로시나제 ([Topalian, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 91:9461 (1994)]; GenBank 기탁 번호 M26729; [Weber, et al., J. Clin. Invest., 102:1258 (1998)]), Gp-100 ([Kawakami, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 91:3515 (1994)]; GenBank 기탁 번호 S73003, [Adema, et al., J. Biol. Chem., 269:20126 (1994)]), MAGE ([van den Bruggen, et al., Science, 254:1643 (1991)]; GenBank 기탁 번호 U93163, AF064589, U66083, D32077, D32076, U10694, U10693, U10691, U10690, U10689, U10688, U10687, U10686, U10685, L18877, U10340, U10339, L18920, U03735 및 M77481), BAGE (GenBank 기탁 번호 U19180; 미국 특허 5,683,886 및 5,571,711), GAGE (GenBank 기탁 번호 AF055475, AF055474, AF055473, U19147, U19146, U19145, U19144, U19143 및 U19142), 임의의 CTA 클래스의 수용체, 예를 들어 특히 SSX2 유전자에 의해 코딩되는 HOM-MEL-40 항원 (GenBank 기탁 번호 X86175, U90842, U90841 및 X86174), 암배아 항원 (CEA, [Gold and Freedman, J. Exp. Med., 121:439 (1985)]; GenBank 기탁 번호 M59710, M59255 및 M29540), 및 PyLT (GenBank 기탁 번호 J02289 및 J02038); p97 (멜라노트랜스페린) ([Brown, et al., J. Immunol., 127:539-46 (1981)]; [Rose, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:1261-61 (1986)]).

[0240]

추가의 종양 연관 항원은 전립선 표면 항원 (PSA) (미국 특허 6,677,157; 6,673,545); β -인간 응모성 성선자극 호르몬 (β -HCG) ([McManus, et al., Cancer Res., 36:3476-81 (1976)]; [Yoshimura, et al., Cancer, 73:2745-52 (1994)]; [Yamaguchi, et al., Br. J. Cancer, 60:382-84 (1989)]; [Alfthan, et al., Cancer Res., 52:4628-33 (1992)]); 글리코실트랜스페라제 β -1,4-N-아세틸갈락토사마닐트랜스페라제 (GalNAc) ([Hoon, et al., Int. J. Cancer, 43:857-62 (1989)]; [Ando, et al., Int. J. Cancer, 40:12-17 (1987)]; [Tsuchida, et al., J. Natl. Cancer, 78:45-54 (1987)]; [Tsuchida, et al., J. Natl. Cancer, 78:55-60 (1987)]); NUC18 ([Lehmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9891-95 (1989)]; [Lehmann, et al., Cancer Res., 47:841-45 (1987)]); 흑색종 항원 gp75 ([Vijayasaradhi, et al., J. Exp. Med., 171:1375-80 (1990)]; GenBank 기탁 번호 X51455); 인간 사이토케라틴 8; 고분자량 흑색종 항원 (Natali, et al., Cancer, 59:55-63 (1987)); 케라틴 19 (Datta, et al., J. Clin. Oncol., 12:475-82 (1994))를 포함한다.

[0241]

관심있는 종양 항원은 악성 병태가 존재하는 대상체에서 면역원성인 "암/고환" (CT) 항원으로 당업계에서 간주되는 항원을 포함한다 (Scanlan, et al., Cancer Immun., 4:1 (2004)). CT 항원은 MAGEA (CT1); BAGE (CT2); MAGEB (CT3); GAGE (CT4); SSX (CT5); NY-ESO-1 (CT6); MAGEC (CT7); SYCP1 (C8); SPANXB1 (CT11.2); NA88 (CT18); CTAGE (CT21); SPA17 (CT22); OY-TES-1 (CT23); CAGE (CT26); HOM-TES-85 (CT28); HCA661 (CT30); NY-SAR-35 (CT38); FATE (CT43); 및 TPTE (CT44)를 포함하고 이로 제한되지 않는, 하나 이상의 멤버를 포함하고 면역 반응을 유도할 수 있는 적어도 19개의 상이한 항원 패밀리를 포함한다.

[0242]

종양 연관 또는 종양-특이적 항원을 포함한, 표적화될 수 있는 추가의 종양 항원은 알파-악티닌-4, Bcr-Ab1 융합 단백질, Casp-8, 베타-카테닌, cdc27, cdk4, cdkn2a, coa-1, dek-can 융합 단백질, EF2, ETV6-AML1 융합 단백질, LDLR-푸코실트랜스페라제 AS 융합 단백질, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAAO205, Mart2, Mum-1, 2, 및 3, neo-PAP, 미오신 클래스 I, OS-9, pm1-RAR α 융합 단백질, PTPRK, K-ras, N-ras, 트리오스포스페이트 이소머라제, Bage-1, Gage 3,4,5,6,7, GnTV, Herv-K-mel, Lage-1, Mage-A1,2,3,4,6,10,12, Mage-C2, NA-88, NY-Eso-1/Lage-2, SP17, SSX-2, 및 TRP2-Int2, MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), 티로시나제, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15(58), CEA, RAGE, NY-ESO (LAGE), SCP-1, Hom/Mel-40, PRAME, p53, H-Ras, HER-2/neu, BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, 업스타인 바르 (Epstein Barr) 바이러스 항원, EBNA, 인간 유두종바이러스 (HPV) 항원 E6 및 E7, TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2,

p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, β -카테닌, CDK4, Mum-1, p16, TAGE, PSMA, PSCA, CT7, 텔로마라제, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, α -태아단백질, 13HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB\70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (Mac-2 결합 단백질\시클로필린 C-연관 단백질), TAAL6, TAG72, TLP, 및 TPS를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 다른 종양 연관 및 종양-특이적 항원은 당업자에게 공지되어 있고, 개시된 융합 단백질에 의한 표적화에 적합하다.

[0243] 종양 신생혈관과 연관된 항원

단백질 치료제는 종양 투파에 비효율적이기 때문에 종양을 치료하는데 무효할 수 있다. 종양 연관 신생혈관은 그를 통해 단백질 치료제가 종양에 접근할 수 있는 쉽게 접근 가능한 경로를 제공한다. 다른 실시양태에서, 융합 단백질은 종양과 연관된 신생혈관에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하는 도메인을 함유한다.

항원은 종양 신생혈관에 특이적일 수 있거나, 정상 혈관에 비교할 때 종양 신생혈관에서 보다 높은 수준으로 발현될 수 있다. 정상 혈관에 비교할 때 종양 연관 신생혈관에 의해 과다발현되는 예시적인 항원은 VEGF/KDR, Tie2, 혈관세포 부착 분자 (VCAM), 엔도글린 및 $\alpha_5\beta_3$ 인테그린/비트로넥틴을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 정상 혈관에 비교할 때 종양 연관 신생혈관에 의해 과다-발현되는 다른 항원은 당업자에게 공지되어 있고, 개시된 융합 단백질에 의한 표적화에 적합하다.

[0246] 케모킨/케모킨 수용체

다른 실시양태에서, 융합 단백질은 케모킨 또는 케모킨 수용체에 특이적으로 결합하는 도메인을 함유한다. 케모킨은 그들의 동족 (cognate) G-단백질 결합 수용체 (GPCR)에 결합하여 세포 반응, 대체로 방향적 (directional) 이동 또는 화학주성을 유발하는 가용형 소분자량 (8-14 kDa) 단백질이다. 종양 세포는 케모킨을 분비하고 그에 반응하고, 이는 증가된 내피 세포 동원 및 혈관신생, 면역학적 감시의 파괴, 및 케모킨 방출이 종양 성장 및 면 부위로 전이를 가능하게 하도록 그를 왜곡하기 위해 종양성 백혈구 프로필의 조작에 의해 달성되는 성장을 용이하게 한다. 따라서, 케모킨은 종양 진행에 매우 중요하다.

케모킨의 보존된 2개의 N-말단 시스테인 잔기의 위치 배치에 기초하여, 이들은 4개의 군, 즉 CXC, CC, CX3C 및 C 케모킨으로 분류된다. CXC 케모킨은 CXC 서열 앞에 모티프 'glu-leu-arg (ELR 모티프)'의 존재 또는 부재에 기초하여 ELR+ 및 ELR- 케모킨으로 추가로 분류될 수 있다. CXC 케모킨은 호중구, 림프구, 내피 및 상피 세포 상의 그들의 동족 케모킨 수용체에 결합하여 그를 활성화시킨다. CC 케모킨은 수지상 세포, 림프구, 대식세포, 호산구, 천연 킬러 세포의 몇몇 하위세트에 작용하지만, 뮤린 호중구를 제외하고는 이들은 CC 케모킨 수용체가 결핍되므로 호중구를 자극하지 않는다. 약 50개의 케모킨 및 단지 20개의 케모킨 수용체가 존재하고, 따라서 상기 시스템의 리간드/수용체 상호작용에서 상당한 파악 상태가 존재한다.

종양 및 간질 세포로부터 만들어진 케모킨은 종양 및 간질 세포 상에 존재하는 케모킨 수용체에 결합한다. 종양 세포의 자가분비 루프, 및 종양과 간질 세포 사이의 측분비 자극성 루프는 종양의 진행을 용이하게 한다. 특히, CXCR2, CXCR4, CCR2 및 CCR7이 종양 발생 및 전이에서 주요 역할을 한다. CXCR2는 혈관신생에서 중대한 역할을 수행하고, CCR2는 종양 미세환경 내로 대식세포의 동원에서 역할을 수행한다. 림프절이 CCR7, CCL21에 대한 리간드를 가지므로 CCR7은 전초 림프절 내로 종양 세포의 전이에 관여한다. CXCR4는 매우 다양한 종양의 전이성 확산에 주로 관여한다.

[0250] 표적화 도메인의 분자 클래스

[0251] 리간드 및 수용체

한 실시양태에서, 종양 또는 종양 연관 신생혈관 표적화 도메인은 종양 세포 또는 종양 연관 신생혈관 상에서 특이적으로 발현되거나 정상 조직에 비해 종양 세포 또는 종양 연관 신생혈관에서 과다발현되는 세포 표면 항원 또는 수용체에 결합하는 리간드이다. 또한, 종양은 종양 미세환경 내로 종양 성장 및 발달에 영향을 미치는 매우 많은 리간드를 분비한다. 비제한적으로 성장 인자, 시토카인 및 케모킨, 예를 들어 상기 제공된 케모킨을 포함한 종양에 의해 분비된 리간드에 결합하는 수용체가 개시된 융합 단백질에 사용하기에 적합하다. 종양에 의해 분비된 리간드는 분비된 리간드에 결합하는 수용체의 가용형 단편을 사용하여 표적화될 수 있다. 가용형 수용체 단편은 생산 세포로부터 흘러나오거나 분비되거나 달리 추출될 수 있는 단편 폴리펩티드이고, 전체 세포 외 도메인 또는 그의 단편을 포함한다.

[0253] 단일 폴리펩티드 항체

다른 실시양태에서, 종양 또는 종양 연관 신생혈관 표적화 도메인은 종양 세포 또는 종양 연관 신생혈관 상에서 특이적으로 발현되거나 정상 조직에 비해 종양 세포 또는 종양 연관 신생혈관에서 과다발현되는 세포 표면 항원 또는 수용체에 결합하는 단일 폴리펩티드 항체이다. 단일 도메인 항체는 동시억제성 수용체 길항제 도메인에 관하여 위에서 설명된다.

Fc 도메인

다른 실시양태에서, 종양 또는 종양 연관 신생혈관 표적화 도메인은 종양 세포 또는 종양 연관 신생혈관 상에서 발현된 Fc 수용체에 결합하는 면역글로불린 중쇄의 Fc 도메인이다. Fc 영역은 본원에서 사용될 때, 제1 불변 영역 면역글로불린 도메인을 제외한 항체의 불변 영역을 함유하는 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, Fc는 IgA, IgD, 및 IgG의 마지막 2개의 불변 영역 면역글로불린 도메인, 및 IgE 및 IgM의 마지막 3개의 불변 영역 면역글로불린 도메인을 나타낸다. 바람직한 실시양태에서, Fc 도메인은 인간 또는 뮤린 면역글로불린으로부터 유래된다. 보다 바람직한 실시양태에서, Fc 도메인은 C_H2 및 C_H3 영역을 포함하는 인간 IgG1 또는 뮤린 IgG2a로부터 유래된다.

한 실시양태에서, 인간 면역글로불린 C_y1 사슬의 헌지, C_{H2} 및 C_{H3} 영역은 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 핵산에 의해 코딩된다:

gaggcctaagt	catgtgacaa	gaccctatacg	tgcggccacct	gtccccgtcc	agaactgtgt	60
gggggaccta	cgcttttctt	gttcccccca	aagcccaagg	acaccctat	gatctcacgg	120
actcccgaaag	taacatcggt	agttagtcgac	gtgagccacg	aggatctgt	agtgaatgtt	180
aattgggtacg	tgggacggagt	cggatgtcat	aatgcaaaaa	ctaaaccccg	ggaggagcag	240
tataacagta	ccttacccgt	ggtagatccgtc	ttagacgtgc	tccaccagg	ctggctgtaa	300
ggtagggagt	ataaatgcaa	ggtcagcaac	aaagcttctt	cggcccccatt	tgaaaagact	360
atcagcaagg	ccaaaggaca	accctcgcg	cggccaggat	acacccttcc	acccatcaca	420
gacgagatgt	ccaaagaacca	ggtgtctgt	acttgtctgt	tcaaaaggttt	ctatccctcc	480
gacatcgccag	tgggatgtggaa	gtcaaaacggg	cggccgtgaga	ataactacaa	gaccaccc	540
ccatgtgttg	atagcgtatgg	gagcttttc	ctctacagta	agtgtactgt	ggacaatcc	600
cgctggcgc	aggggaaaacgt	tttctcttgt	agggtatgtc	ataggccct	ccacaacat	660
tataactcaga	aaaggcctgag	tctgtatccc	ggcaaaa			696

(서열 44).

서열 44에 의해 코딩되는 인간 면역글로불린 C_y1 사슬의 헌지, C_y2 및 C_y3 영역은 다음 아미노산 서열을 가진다:

EPKSCDKTHT	CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF	60
NWYVDGVVEVH	NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWL GKEYKCKVSN KALPAPIEKT	120
ISKAKGQPREG	PQVYTLPPSR DELTKQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP	180
PVLDSDGSFF	LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVVHEALHNH YTQKSLSLSP GK	232

(서열 45).

다른 실시양태에서, 뮤린 면역글로불린 Cg2a 사슬의 헌지, C_H2 및 C_H3 영역은 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 해사에 의해 코딩된다:

```

gagccaagag gtcctacat caagccctgc cccgcttgc aatggcccagc tccaaatttg 60
ctgggtggac cgtagtctt tatcttcccg ccaagataa aggacgttt gatgttttagt 120
ctgagcccc tcgtgacatg ctgtgtggt gatgtttccag agatgaccc cgacgtgca 180
atcgttgttgc tcgttaacaa cgtggagggtt cataccgctc aaaccggac ccacagagag 240
gattataaca gcaccctgcg ggtagtgtcc gcctcgccga tccagcatca ggattggatg 300
agcgggaaag agttcaagtgc taaggtaacaa aacaagatc tgccgcgccc gattgaacga 360
accattagca agccgaaagg gagcgtgcgc gcaccctcagg tttagtgcct tccctccacca 420
gaagaggaga tgacggaaaaa cgacgtgacc ctgacatgc tggtaactgc cttagtgc 480
gaagatattt acgtgtttttt gactaaataac ggaagacactt agtcaatttta caagaacact 540
gacgttgc tggatgttc tggcagtttcc ttatgtact ccaatttgag ggtcgagaag 600
aaaatgggg tcgtggggaaa cttttatgtat tgctcgttttgc tcatgaggg cttccataat 660
catcacacca caaaatccctt caagccaaacgc cccggaaaaa 699

```

(서열 46),

서열 46에 의해 코딩되는 뮤린 면역글로불린 C_y2a 사슬의 헌지, C_H2 및 C_H3 영역은 다음 아미노산 서열을 가진다:

EPRGPTIKPC PPCKCPAPNL LGGPSVFIFF PKIKDVLMS LSPIVTCVVV DVSEDDPDVQ	60
ISWFVNNEVEV HTAQQTQTHRE DYNSTLRVVS ALPIQHQDNM SGKEFKCKVN NKDLPPAPIER	120
TISKEPKGSVR APQVYVLPPI EEMMTKKQVT LTCMVTDFMP EDIYVEWTTNN GKTELNYKNT	180
EPVLDSDGGSY FMYSKLRVEK KNWVERNSYS CSVVHEGLHN HHTTKSFSRT PGK	233

(서열 47).

[0264]

[0265] 한 실시양태에서, Fc 도메인은 종양 또는 종양 연관 신생혈관 상에서 특이적으로 발현되거나 정상 조직에 비해 종양 또는 종양 연관 신생혈관에서 과다발현되는 특이적 Fc 수용체에 대한 결합을 향상시키는 하나 이상의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 함유할 수 있다. 적합한 아미노산 치환은 상기한 바와 같은 보존적 및 비-보존적 치환을 포함한다.

[0266]

비-호지킨 (Hodgkin) 램프종 또는 밸덴스트롬 (Waldenstrom) 거대글로불린혈증에 대해 리토시맙 (CD20에 대한 키메라 (chimera) 마우스/인간 IgG1 모노클로날 항체)으로 치료한 환자에서 치료 결과는 Fc γ 수용체의 대립유전자 변이체의 개체의 발현을 인간 IgG1의 Fc 도메인에 대한 별개의 고유 친화도와 상호관련시켰다. 특히, 저 친화도 활성화 Fc 수용체 CD16A (Fc γ RIIA)의 고친화도 대립유전자를 갖는 환자는 보다 높은 반응률을 보였고, 비-호지킨 램프종의 경우에 진행이 없는 생존을 개선시켰다. 다른 실시양태에서, Fc 도메인은 저친화도 억제성 Fc 수용체 CD32B (Fc γ RIIB)에 대한 결합을 감소시키고 저친화도 활성화 Fc 수용체 CD16A (Fc γ RIIA)에 대한 야생형 결합 수준을 보유하거나 그에 대한 결합을 향상시키는 하나 이상의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 함유할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, Fc 도메인은 CD16A에 대한 결합을 향상시키는 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 함유한다. CD16A에 대한 결합을 증가시키고 CD32B에 대한 결합을 감소시키는 인간 IgG1의 Fc 도메인에서의 매우 많은 치환이 당업계에 공지되어 있고, 문헌 [Stavenhagen, et al., Cancer Res., 57(18):8882-90 (2007)]에 설명되어 있다. CD32B에 대한 감소된 결합 및/또는 CD16A에 대한 증가된 결합을 갖는 인간 IgG1 Fc 도메인의 예시적인 변이체는 F243L, R929P, Y300L, V305I 또는 P296L 치환을 함유한다. 이들 아미노산 치환은 인간 IgG1 Fc 도메인 내에 임의의 조합으로 존재할 수 있다. 한 실시양태에서, 인간 IgG1 Fc 도메인 변이체는 F243L, R929P 및 Y300L 치환을 함유한다. 다른 실시양태에서, 인간 IgG1 Fc 도메인 변이체는 F243L, R929P, Y300L, V305I 및 P296L 치환을 함유한다.

[0267]

글리코포스파티딜이노시톨 앵커 (anchor) 도메인

[0268]

다른 실시양태에서, 종양 또는 종양 연관 신생혈관 표적화 도메인은 글리코실폴스파티딜이노시톨 (GPI) 앵커의 번역후 첨가를 위한 신호를 제공하는 폴리펩티드이다. GPI 앵커는 많은 진핵세포 단백질의 C-말단에 번역후에 첨가되는 당지질 구조이다. 상기 변형은 부착된 단백질을 세포막의 외엽 내에 고착시킨다. GPI 앵커는 T 세포 수용체 결합 도메인을 T 세포에의 제시를 위해 세포의 표면에 부착시키기 위해 사용될 수 있다. 상기 실시양태에서, GPI 앵커 도메인은 T 세포 수용체 결합 도메인에 대해 C-말단 쪽이다.

[0269]

한 실시양태에서, GPI 앵커 도메인은 폴리펩티드가 진핵세포계 내에서 발현될 때 GPI 앵커의 번역후 첨가를 위해 신호를 전달하는 폴리펩티드이다. 앵커 첨가는 앵커 첨가 부위 (ω -부위)에서 한 세트의 작은 아미노산들에 이어 친수성 스페이서 (spacer)로 이루어지고 소수성 스트레치로 끝나는 GPI 앵커 신호 서열에 의해 결정된다 (Low, FASEB J., 3:1600-1608 (1989)). 상기 신호 서열의 절단은 앵커의 첨가 전에, 보존된 중심 성분과 함께 (Low, FASEB J., 3:1600-1608 (1989)), 그러나 가변적인 말초 모이어티 (moiety)와 함께 (Homans et al., Nature, 333:269-272 (1988)) ER에서 일어난다. GPI-고착된 단백질의 C-말단은 포스포에탄올아민 다리를 통해 고도로 보존된 코어 글리칸, 만노스(α 1-2)만노스(α 1-6)만노스(α 1-4)글루코사민(α 1-6)미오이노시톨에 연결된다. 인지질 꼬리 (tail)는 GPI 앵커를 세포막에 부착시킨다. 글리칸 코어는 측쇄, 예를 들어 포스포에탄올아민기, 만노스, 갈락토스, 시알산, 또는 다른 당을 사용하여 다양하게 변형될 수 있다. 제1 만노스 잔기에 부착된 가장 일반적인 측쇄는 다른 만노스이다. 글리칸 코어의 제3 만노스에 부착된 복합체 측쇄, 예를 들어 N-아세틸갈락토사민-함유 다당류가 포유동물 앵커 구조에서 발견된다. 코어 글루코사민은 거의 변형되지 않는다. 단백질 및 기원하는 종에 따라, 포스포이노시톨 고리의 지질 앵커는 디아실글리세롤, 알킬아실글리세롤, 또는 세라미드이다. 지질 종은 14 내지 28개의 탄소 범위로 길이가 변하고, 포화 또는 불포화될 수 있다. 많은 GPI 앵커는 또한 이노시톨 고리의 2-히드록실 상에 추가의 지방산, 예를 들어 팔미트산을 함유한다. 상기 잉여 지방산은 GPI 앵커가 PI-PLC에 의한 절단에 내성으로 만든다.

[0270]

GPI 앵커 부착은 GPI 번역후 변형을 수행할 수 있는 진핵세포계에서 GPI 앵커 도메인을 함유하는 융합 단백질의 발현에 의해 달성할 수 있다. GPI 앵커 도메인은 종양 또는 종양 혈관 표적화 도메인으로서 사용될 수 있거나, 추가로 이미 별개의 종양 또는 종양 혈관 표적화 도메인을 함유하는 융합 단백질에 첨가될 수 있다.

[0271]

다른 실시양태에서, GPI 앵커 모이어티는 시험관내 효소적 또는 화학적 과정을 통해 단리된 T 세포 수용체 결합

도메인에 직접 첨가된다. 상기 실시양태에서, GPI 앵커는 GPI 앵커 도메인에 대한 필요 없이 폴리펩티드에 첨가될 수 있다. 따라서, GPI 앵커 모이어티는 T 세포 수용체 결합 도메인 및 종양 또는 종양 혈관 표적화 도메인을 갖는 본원에 기재된 융합 단백질에 첨가될 수 있다. 별법으로, GPI 앵커는 종양 또는 종양 혈관 표적화 도메인을 코딩하는 파트너에 대한 필요 없이 T 세포 수용체 결합 도메인 폴리펩티드에 직접 첨가될 수 있다.

[0272] 2. 웨티드 또는 폴리펩티드 링커 도메인

본원에 개시된 융합 단백질은 임의로 보조자극 폴리펩티드 도메인을 항원-결합 표적화 도메인으로부터 분리시키는 웨티드 또는 폴리펩티드 링커 도메인을 함유한다.

[0274] 항체의 헌지 영역

한 실시양태에서, 링커 도메인은 면역글로불린의 헌지 영역을 함유한다. 바람직한 실시양태에서, 헌지 영역은 인간 면역글로불린으로부터 유래된다. 헌지가 유래될 수 있는 적합한 인간 면역글로불린은 IgG, IgD 및 IgA를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 헌지 영역은 인간 IgG로부터 유래된다.

다른 실시양태에서, 링커 도메인은 상기한 바와 같이 면역글로불린의 헌지 영역을 함유하고, 하나 이상의 추가의 면역글로불린 도메인을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 추가의 도메인은 면역글로불린의 Fc 도메인을 포함한다. 본원에서 사용될 때 Fc 영역은 제1 불변 영역 면역글로불린 도메인을 제외한 항체의 불변 영역을 함유하는 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, Fc는 IgA, IgD, 및 IgG의 마지막 2개의 불변 영역 면역글로불린 도메인, 및 IgE 및 IgM의 마지막 3개의 불변 영역 면역글로불린 도메인을 나타낸다. 바람직한 실시양태에서, Fc 도메인은 인간 면역글로불린으로부터 유래된다. 보다 바람직한 실시양태에서, Fc 도메인은 C_H2 및 C_H3 영역을 포함하는 인간 IgG로부터 유래된다.

다른 실시양태에서, 링커 도메인은 면역글로불린의 헌지 영역, 및 면역글로불린 중쇄의 C_H1 도메인 또는 면역글로불린 경쇄의 C_L 도메인을 함유한다. 바람직한 실시양태에서, C_H1 또는 C_L 도메인은 인간 면역글로불린으로부터 유래된다. C_L 도메인은 κ 경쇄 또는 λ 경쇄로부터 유래될 수 있다. 보다 바람직한 실시양태에서, C_H1 또는 C_L 도메인은 인간 IgG로부터 유래된다.

면역글로불린 헌지 영역 및 다른 도메인의 아미노산 서열은 당업계에 잘 공지되어 있다.

[0279] 다른 웨티드/폴리펩티드 링커 도메인

다른 적합한 웨티드/폴리펩티드 링커 도메인은 자연 발생하는 또는 비-자연 발생하는 웨티드 또는 폴리펩티드를 포함한다. 웨티드 링커 서열은 적어도 2개의 아미노산 길이이다. 바람직하게는, 웨티드 또는 폴리펩티드 도메인은 가요성 웨티드 또는 폴리펩티드이다. "가요성 링커"는 본원에서 그에 의해 연결된 2개의 폴리펩티드에 대해 2개의 연결된 폴리펩티드가 가요성 링커의 부재 하에 가지는 것보다 증가된 회전 자유도를 제공하는 웨티드 결합(들)에 의해 연결된 2개 이상의 아미노산 잔기를 함유하는 웨티드 또는 폴리펩티드를 나타낸다. 그러한 회전 자유도는 가요성 링커에 의해 연결된 2개 이상의 항원 결합 부위가 각각 표적 항원(들)에 보다 효율적으로 접근하도록 허용한다. 예시적인 가요성 웨티드/폴리펩티드는 아미노산 서열 Gly-Ser, Gly-Ser-Gly-Ser (서열 48), Ala-Ser, Gly-Gly-Gly-Ser (서열 49), (Gly₄-Ser)₃ (서열 50) 및 (Gly₄-Ser)₄ (서열 51)를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 추가의 가요성 웨티드/폴리펩티드 서열은 당업계에 잘 공지되어 있다.

3. 이량체화 및 다량체화 도메인

본원에 개시된 융합 단백질은 임의로 2개 이상의 융합 단백질을 이량체화 또는 다량체화하는 기능을 하는 이량체화 또는 다량체화 도메인을 함유한다. 융합 단백질을 이량체화 또는 다량체화하는 기능을 하는 도메인은 별개의 도메인일 수 있거나, 별법으로 융합 단백질의 다른 도메인 (T 세포 보조자극성/동시역제성 수용체 결합 도메인, 종양/종양 신생혈관 항원-결합 도메인, 또는 웨티드/폴리펩티드 링커 도메인) 중 하나 내에 함유될 수 있다.

[0283] 이량체화 도메인

"이량체화 도메인"은 적어도 2개의 아미노산 잔기 또는 적어도 2개의 웨티드 또는 폴리펩티드 (동일한 또는 상이한 아미노산 서열을 가질 수 있음)의 회합에 의해 형성된다. 웨티드 또는 폴리펩티드는 공유 및/또는 비-공유 회합(들)을 통해 서로 상호작용할 수 있다. 바람직한 이량체화 도메인은 파트너 융합 단백질 상의 시스테인

과 분자간 디슬피드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인을 함유한다. 이량체화 도메인은 파트너 융합 단백질들 사이에 디슬피드 결합(들)이 형성될 수 있도록 하나 이상의 시스테인 잔기를 함유할 수 있다. 한 실시양태에서, 이량체화 도메인은 1, 2 또는 3 내지 약 10개의 시스테인 잔기를 함유한다. 바람직한 실시양태에서, 이량체화 도메인은 면역글로불린의 힌지 영역이다. 상기 특정 실시양태에서, 이량체화 도메인은 융합 단백질의 링커 웨პ티드/폴리웨პ티드 내에 함유된다.

[0285] 추가의 예시적인 이량체화 도메인은 당업계에 공지된 임의의 것일 수 있고, 코일드 코일 (coiled coil), 산 패치 (acid patch), 아연 핑거 (zinc finger), 칼슘 핸드 (hand), C_H1-C_L 쌍, 미국 특허 5,821,333에 기재된 바와 같은 조작된 "마디 (knob)" 및/또는 "융기부"를 갖는 "계면", 류신 지퍼 (zipper) (예를 들어, jun 및/또는 fos로부터) (미국 특허 5,932,448), SH2 (src 상동체 2), SH3 (src 상동체 3) (Vidal, et al., Biochemistry, 43, 7336-44 ((2004)), 포스포티로신 결합 (PTB) (Zhou, et al., Nature, 378:584-592 (1995)), WW (Sudol, Prog. Biophys. Mol. Bio., 65:113-132 (1996)), PDZ ([Kim, et al., Nature, 378: 85-88 (1995)]; [Komau, et al., Science, 269:1737-1740 (1995)]) 14-3-3, WD40 (Hu, et al., J. Biol. Chem., 273, 33489-33494 (1998)) EH, Lim, 이소류신 지퍼, 수용체 이량체 쌍 (예를 들어, 인터류킨-8 수용체 (IL-8R); 및 인테그린 이종 이량체, 예를 들어 LFA-1 및 GPIIb/IIIa), 또는 그의 이량체화 영역(들), 이량체성 리간드 폴리웨პ티드 (예를 들어 신경 성장 인자 (NGF), 뉴로트로핀-3 (NT-3), 인터류킨-8 (IL-8), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), VEGF-C, VEGF-D, PDGF 구성원, 및 뇌-유래된 항신경성 인자 (BDNF) ([Arakawa, et al., J. Biol. Chem., 269(45): 27833-27839 (1994)] 및 [Radziejewski, et al., Biochem., 32(48): 1350 (1993)])을 포함하고 이로 제한되지 않고, 또한 친화도가 변경된 이들 도메인의 변이체일 수 있다. 폴리웨პ티드 쌍은 효모 2 하이브리드 (yeast two hybrid) 스크린을 포함한 당업계에 공지된 방법에 의해 확인할 수 있다. 효모 2 하이브리드 스크린은 둘 모두 그 전체를 본원에 참고로 포함시킨 미국 특허 5,283,173 및 6,562,576에 기재되어 있다. 상호작용하는 도메인의 쌍 사이의 친화도는 문헌 [Katahira, et al., J. Biol. Chem., 277, 9242-9246 (2002)])에 기재된 바와 같이 당업계에 공지된 방법을 이용하여 결정할 수 있다. 별법으로, 웨პ티드 서열의 라이브러리를 예를 들어, WO 01/00814에 기재된 방법을 이용하여 이종이량체화에 대해 스크리닝할 수 있다. 단백질-단백질 상호작용을 위한 유용한 방법은 또한 미국 특허 6,790,624에 기재되어 있다.

다량체화 도메인

[0287] "다량체화 도메인"은 3개 이상의 웨პ티드 또는 폴리웨პ티드가 공유 및/또는 비-공유 회합(들)을 통해 서로 상호작용하도록 하는 도메인이다. 적합한 다량체화 도메인은 코일드 코일 도메인을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 코일드 코일은 다량체 나선 다발을 형성하도록 조립되는 (접히는), 대체로 7개의 아미노산 (heptad repeat) 또는 11개의 아미노산 (undecad repeat)의 서열 내에서 3 및 4개 잔기가 이격된 주로 소수성 잔기의 인접한 패턴을 갖는 웨პ티드 서열이다. 3 및 4개의 잔기 간격의 일부 불규칙한 분포를 포함하는 서열을 갖는 코일드 코일이 또한 고려된다. 소수성 잔기는 특히 소수성 아미노산 Val, Ile, Leu, Met, Tyr, Phe 및 Trp이다. 주로 소수성은 잔기의 적어도 50%가 언급된 소수성 아미노산으로부터 선택되어야 함을 의미한다.

[0288] 코일드 코일 도메인은 라미닌 (laminin)으로부터 유래될 수 있다. 세포외 공간에서, 이종삼량체성 코일드 코일 단백질 라미닌은 기저막 형성에서 중요한 역할을 한다. 명백하게, 다기능성 올리고머 구조가 라미닌 기능을 위해 요구된다. 코일드 코일 도메인은 또한 3개의 (TSP-1 및 TSP-2) 또는 5개의 (TSP-3, TSP-4 및 TSP-5) 사슬이 연결되는 트롬보스폰딘으로부터, 또는 평행한 5-가닥 코일드 코일로 접히는 (Malashkevich, et al., Science, 274: 761-765 (1996)) COMP (COMPcc) (Guo, et al., EMBO J., 1998, 17: 5265-5272)로부터 유래될 수 있다.

[0289] 다른 단백질로부터 유래된 추가의 코일드 코일 도메인, 및 폴리웨პ티드 다량체화를 매개하는 다른 도메인은 당업계에 공지되어 있고, 개시된 융합 단백질에서 사용하기에 적합하다.

4. 예시적인 융합 단백질

B7-DC

[0290] 대표적인 뮤린 PD-L2 융합 단백질은 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 핵산에 의해 코딩된다:

atgcgtgtcc tgctgccat actgaacctg agcttacaaac ttcatccctgt	60
ttcacccgtga cagccccata agaagtgtac accgtagacg tcggcagcag tggagccctg	120
gagtgccatt ttgaccgcg agaatgcact gaactggaaag ggataagagc cagtttgcag	180
aaggtagaaa atgatacgtc tctgcaagt gaaagagccs ccctgctgaa ggagcagctg	240
ccccctggaa aggctttgtt ccacatccc agtgcgttccag tgagagatc cggcagtc	300
cgttgcgttgc tcatctgcgg ggccgcctgg gactacaagt acctgcgtt gaaagtcaaa	360
gttttacatcata tgaggataga cactaggatc ctggaggatc caggtacagg ggagggtcg	420
cttacactgcg aggcttaggg ttatcccta gcagaagtgt cctggcaaaa tgtcagtgtt	480
cctggcaaca ccagccacat caggaccctt accagggtcac cagtgttctg	540
cgcctcaagc ctcagcttag cagaacttc agtgcgttcc tctggaatgc tcacatgaaag	600
gagctgactt cagccatcat tgaccctctg agtgcgttcc aacccaaagt ccccaaaacg	660
tgggagccaa gaggtcttcc gatcaagcccc tgcccccctt gtaaatgccc agtccaaat	720
ttgctgggtt gaccgtcgtt ctttatcttc cggccaaaga aaaaaggactt cttgtatgtt	780
agtctgagcc ccatctgtac atgcgttgcgtt gtggatgtt cagaggatc cccggacgtg	840
caaattcgtt gtttcgttca caacgtggatc gtgcataccg ctcaaaaccca gacccacaga	900
gaggattata acagccaccc tccgggttagtgc tccggccctgc cgatccagca tcaggattgg	960
atgagcggaa aagagtcaaa gtgtaaaggta aacaacaaag atctgcgcgc gccgattgaa	1020
cgaaccatca gcaagccgaa auggagcgtgc cgccgcaccc aggtttacgt ccttcctcca	1080
ccagaagagg agatgacgaa aaagcaggtgc accctgcacat gcatggtaac tgactttatg	1140
ccagaagata titacgttca atggactaat aacggaaaaga cagagctcaaa ttacaagaac	1200
actgagccgtg ttctgttcc ttgtggcgcg tactttatgt actccaaat ggggtcg	1260
aagaagaattt ggttcgagaa aaacagtat agttgtcttag tggtgtcatg gggcctccat	1320
aatcatcaca ccacaaagtcc cttcagccgaa acggccggaa aatgaa	1365

[0293] (서열 52).

[0294] 서열 52에 의해 코딩된 뮤린 PD-L2 융합 단백질은 다음 아미노산 서열을 가진다:

MLLLLPIILNL SLOLHPVAAI FTVTAPKEVY TVDVGSVSVL ECDPDRRECT ELEGIRASLQ	60
KVENDTSILQS ERATLLEEEQL PLGKALFHIP SVQVRDGGY RCLVICGAAM DYKYLTVKVK	120
ASYMRIDTRI LEVPGTGEVQ LTCQARGYPL AEVSWQNVS PANTSHIRT EGLYQVTSVL	180
RLKPQPSRNF SCMFWNNAHMK ELTSAIIDPL SRMEPKVPR WEPRGPTIK CPPCKCPAPN	240
LLGGPSVIFIF PPKIKDVLMI SLSPIVTCVV VDVSEDDPPDV QISWFVNNE VHTAQQTQTHR	300
EDYNSTLRRV SALPIQHQDW MSGKEFKCKV NNKDLPPAPIE RTISKPKGSV RAPQVYVLPP	360
PEEEMTKQV TLTCTMVTDFM PEDIVYEWNT NGKTELNYKN TEPVLDSDGS YFMYSKLRVE	420
KKNWVERNSY SCSVVHEGLM NHHTTKSFSR RTPGK	454

[0295] (서열 53).

[0296] 신호 서열이 없는 서열 53의 뮤린 PD-L2 융합 단백질의 아미노산 서열은 다음 서열이다:

LFTTVTAPKEV YTVDVGSSVS LECDFDRREC TELEGIASLQ QKVENDTSILQ SERATLLEEQ	60
LPLGKALPHI PSVQVRDGGY YRCLVICGAA WDYKYLTVKV KASYMRIDTR ILEVPGTGEV	120
QLTCQARGYP LAEVSWQNVS VPANTSHIRT PEGLYQVTSV LRLKPQPSRN FSCMFWNNAHM	180
KELTSAIIDP LSRMEPKVPR TWEPRGPTIK PCPPCKCPAP NLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI	240
ISLSPIVTCV VDVSEDDPPDV VQISWFVNNE EVHTAQQTQTHR REDYNSTLRRV VSALPIQHQDW	300
WMSGKEFKCK VNNKDLPPAPI ERTISKPKGS VRAPQVYVLP PPEEEMTKQV TLTCTMVTDFM	360
MPEDIVYEWNT NNGKTELNYK NTEPVLDSDG SYFMYSKLRV EKKNWVERNS YSCSVVHEGL	420
HNHHTTKSFS RTPGK	435

[0297] (서열 54).

[0298] 대표적인 인간 PD-L2 융합 단백질은 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 핵산에 의해 코딩된다:

atgatcttc ttcttgcgt gctgtctttg gaattgcaac ttcaccaaata cgccggccctc 60
 ttactgtga ccgtgcacaa agaactgtat atcattgagc acgggtccaa tggaccctc 120
 gaatgttaact ttgacaccgg cggcacatcg aacctggggg ccattactgc cagttgcaa 180
 aaagtggaaa acgacacttc acctcaccgg gagaggcaca ccctcttggg ggagcaactg 240
 ccattggga aggccctt tcataatccct cagttgcaagg ttcggatgaa gggacagtac 300
 cagttcattt tttatctacgg cttttttttt gattacaatg atctgacccat gaaggtgaaa 360
 gggccatcg gaaaaattaa cactcacattt cttaaggatgc cagagacggg cgaggttgaa 420
 ctgacatgc aagccacccgg ctacccttgc gcagaggatca gctggccca cgtgagcgta 480
 cctgttaaca ctttcttccat tagacacccc accaggatc atccgtgtc 540
 cggcccaaac cggccccccgg cggatattt agttgcgtgt tttggatataccatc 600
 gggctacttc ttgcataatc tgatctgcgatccatg agccacggc tcatccaact 660
 tgggaaaccta aatcttgcgat taaaactcat acctgtcccc cttggccca ccccgagctt 720
 ctggggggc ccaatgtgtt tctgtttccc ccaaaaccta aggacacact tatgatatcc 780
 cgaaccccccgg aagtgcacat cgtgtgtgtg gacgtctac acgaagaccc ggaggtgaaa 840
 ttcaacttgtt acgttgcggg agttgggggat cataacgcta agaccaaggg cagagaggag 900
 caatacaatt ccacccatcg agtggtagt gtactgaccc ttttgcacca agactggctg 960
 aatggaaaag aatacaatgt caaatgtatca aacaaggctt tgccctgcacc catcgagaag 1020
 acaatttcta aagccaaagg gcagccagg gaaccgcagg ttttgcacact cccaccatcc 1080
 cggccggcgc tgacaaagaa tcaatgtatcc ctgacccatcg ttttgcacca 1140
 tctgacatgg cctgtggatg gggatcaat ggacaaacctg agaacaacta caaaaccact 1200
 ccacccatcg ttttgcacca cgggtccctt ttctgttaca gtaagctcac ttttgcacca 1260
 ttttgcacca cggggggcaat ctttttttca ttttgcacca ttttgcacca 1320
 ctttttgcacca cggggggcaat ctttttttca ttttgcacca ttttgcacca 1362

(서열 55).

[0299]

서열 55에 의해 코딩된 인간 PD-L2 융합 단백질은 다음 아미노산 서열을 가진다:

MIFLLLMISL ELQLHQIAAL FTVTVPKELY IIEHGSNVTL ECNFDTGSHV NLGAITASLQ 60
 KVENDTSPH ERATLLEPQL PLGKASFHIP QVQVRDEGGQY QCIIIIYGVAP DYKYLTLEKV 120
 ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSQL 180
 RLKPPGRNF SCVFWNTHVR ELTILASIDLQ SQMPEPRTHPT WEPKSCDKTH TCPPCPAPE 240
 LGGPSVFLFP PKPKDITLMS RTEPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYYVDGVEV HNAKTKPREE 300
 QYNSTYRVVS VLTVVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQP EPQVYTLPPS 360
 RDELTKNQVS LTCLVKGFYPS SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK 420
 SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL PGK 453

[0301]

(서열 56).

[0302]

신호 서열이 없는 서열 56의 인간 PD-L2 융합 단백질의 아미노산 서열은 다음 서열이다:

LFTVTVPKEL YIIEHGSNVTL LECNFDTGSHV VNLLGAITASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ 60
 LPLGKASFHI PQVQVRDEGGQY QCIIIIYGVAP WDYKYLTLEKV KASYRKINTHI ILKVPETDEV 120
 ELTCQATGYPL LAEVSWPNVSV VPANTSHSRTP PEGLYQVTSQL LRLKPPPGRN FSCVFWNTHV 180
 RELTILASIDLQ QSQMEPRTHPT TWEPKSCDKTH HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDITLMI 240
 SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVK KFNWYYVDGVE VHNAKTKPREE EQYNSTYRVV SVLTVLRQDW 300
 LNGKEYKCKVS SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY 360
 PSDIAVEWESN GQPENNYKTT TPPVLDSDGSF FFLYSKLTVD KSRWQQGNVFS SCSVMHEALHN 420
 NHYTQKSLSL SPKG 434

[0303]

(서열 57).

[0304]

G. PD-1 수용체 길항제를 코딩하는 단리된 핵산 분자

[0305]

PD-1 길항제 폴리펩티드, 그의 변이체 및 그의 융합 단백질을 코딩하는 단리된 핵산 서열을 개시한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "단리된 핵산"은 정상적으로는 포유동물 게놈 내에서 핵산의 한쪽 또는 양쪽 측면에 접하는 핵산을 포함한, 포유동물 게놈 내에 존재하는 다른 핵산 분자로부터 분리된 핵산을 나타낸다.

[0306]

단리된 핵산은 예를 들어, 천연-발생 게놈 내에서 그 DNA 분자에 바로 측면이 접하는 것으로 정상적으로 발견되는 핵산 서열 중 하나가 제거되거나 부재하는 DNA 분자일 수 있다. 따라서, 단리된 핵산은 비제한적으로 다른 서열에 독립적으로 별개의 분자로서 존재하는 DNA 분자 (예를 들어, 화학적으로 합성된 핵산, 또는 PCR 또는 제한 엔도뉴클레아제 처리에 의해 생산되는 cDNA 또는 게놈 DNA 단편), 및 벡터, 자율적으로 복제하는 플라스미드, 바이러스 (예를 들어, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 또는 포진 바이러스) 내로 또는 원핵생물 또는 진핵생물의 게놈 DNA 내로 포함되는 재조합 DNA를 포함한다. 또한, 단리된 핵산은 조작된 핵산, 예를 들어 하이브리드 또는 융합 핵산의 일부인 재조합 DNA 분자를 포함할 수 있다. 예를 들어, cDNA 라이브리 또는 게놈 라이브리, 또는 게놈 DNA 제한 소화를 함유하는 젤 슬라이스 (gel slice) 내에서 수백 내지 수백만의 다른 핵산 중에 존재하는 핵산은 단리된 핵산으로 간주하지 않아야 한다.

[0307]

핵산은 센스 또는 안티센스 배향으로 존재할 수 있거나, B7-DC, PD-L1, PD-1 또는 B7.1 폴리펩티드 또는 그의

변이체를 코딩하는 참조 서열에 상보성일 수 있다. 참조 서열은 예를 들어, 당업계에 공지되고 상기 논의된 인간 B7-DC, 인간 PD-L1 또는 뮤린 PD-L2 및 뮤린 PD-L1의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0308] 핵산은 DNA, RNA, 또는 핵산 유사체일 수 있다. 핵산 유사체는 염기 모이어티, 당 모이어티, 또는 포스페이트 백본에서 변형될 수 있다. 그러한 변형은 예를 들어, 핵산의 안정성, 혼성화, 또는 용해도를 개선할 수 있다. 염기 모이어티에서 변형은 데옥시티미딘에 대한 데옥시우리딘, 및 데옥시시티딘에 대한 5-메틸-2'-데옥시시티딘 또는 5-브로모-2'-데옥시시티딘을 포함할 수 있다. 당 모이어티의 변형은 2'-0-메틸 또는 2'-0-알릴 당을 형성하도록 리보스 당의 2' 헤드록실의 변형을 포함할 수 있다. 데옥시리보스 포스페이트 백본은 모르폴리노 핵산 (여기서, 각각의 염기 모이어티는 6원의 모르폴리노 고리에 연결된다), 또는 웨이드 핵산 (여기서, 데옥시포스페이트 백본은 슈도웹티드 백본으로 교체되고 4개의 염기는 유지된다)을 생산하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 문헌 ([Summerton and Weller (1997) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7:187-195]; 및 [Hyrup et al. (1996) Bioorgan. Med. Chem. 4:5-23])을 참조한다. 추가로, 데옥시포스페이트 백본은 예를 들어, 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 백본, 포스포로아미다이트, 또는 알킬 포스포트리에스테르 백본으로 교체될 수 있다.

H. PD-1 수용체 길항제를 발현하는 벡터 및 숙주 세포

[0309] 상기한 것과 같은 핵산은 세포 내에서 발현을 위해 벡터 내로 삽입될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "벡터"는 다른 DNA 세그먼트가 삽입된 세그먼트의 복제를 일으키도록 삽입될 수 있는 레플리콘, 예를 들어 플라스미드, 파지, 또는 코스미드이다. 벡터는 발현 벡터일 수 있다. "발현 벡터"는 하나 이상의 발현 제어 서열을 포함하는 벡터이고, "발현 제어 서열"은 다른 DNA 서열의 전사 및/또는 번역을 제어하고 조절하는 DNA 서열이다.

[0310] 벡터 내의 핵산은 하나 이상의 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "작동가능하게 연결된"은 발현 제어 서열이 관심있는 코딩 서열의 발현을 효과적으로 제어하도록 유전자 구성체 내로 포함되는 것을 의미한다. 발현 제어 서열의 예는 프로모터, 인핸서, 및 전사 종결 영역을 포함한다. 프로모터는 일반적으로 전사가 시작하는 지점 (일반적으로 RNA 중합효소 II에 대한 개시 부위 부근)의 상류 100개 뉴클레오티드 내에서 DNA 분자의 영역으로 구성된 발현 제어 서열이다. 코딩 서열을 프로모터의 제어 하에 놓기 위해, 폴리웹티드의 번역 판독 프레임의 번역 개시 부위를 프로모터의 하류의 1 내지 약 50개의 뉴클레오티드 사이에 배치할 필요가 있다. 인핸서는 시간, 위치 및 수준의 측면에서 발현 특이성을 제공한다. 프로모터 와 달리, 인핸서는 전사 부위로부터 다양한 거리에 위치할 때 가능할 수 있다. 인핸서는 또한 전사 개시 부위로부터 하류에 위치할 수 있다. 코딩 서열은 RNA 중합효소가 코딩 서열을 mRNA (이것은 이후 코딩 서열에 의해 코딩된 단백질로 번역될 수 있다)로 전사할 수 있을 때 세포 내에서 발현 제어 서열에 "작동가능하게 연결되고" 그의 "제어 하에" 있다.

[0311] 적합한 발현 벡터는 비제한적으로 예를 들어, 박테리오파지, 바콜로이러스, 담배 모자이크 바이러스, 포진 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, 우두 바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노-연관 바이러스로부터 유도된 플라스미드 및 바이러스 벡터를 포함한다. 많은 벡터 및 발현 시스템이 노바겐 (Novagen, 미국 위스콘신주 메디슨), 클론테크 (Clontech, 미국 캘리포니아주 팔로 알토), 스트라타젠 (Stratagene, 미국 캘리포니아주 라 졸라), 및 인비트로겐 라이프 테크놀로지스 (Invitrogen Life Technologies, 미국 캘리포니아주 칼스바드)와 같은 회사로부터 상업적으로 입수가능하다.

[0312] [0313] 발현 벡터는 태그 (tag) 서열을 포함할 수 있다. 태그 서열은 일반적으로 코팅된 폴리웹티드와의 융합체로서 발현된다. 상기 태그는 카르복실 또는 아미노 말단을 포함한 폴리웹티드 내의 임의의 위치에 삽입될 수 있다. 유용한 태그의 예는 초록 형광 단백질 (GFP), 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (GST), 폴리히스티딘, c-myc, 헤마글루티닌, Flag™ 태그 (코닥 (Kodak), 미국 코네티컷주 뉴 헤이븐), 말토스 E 결합 단백질 및 단백질 A를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 한 실시양태에서, 변이체 PD-L2 융합 단백질은 바람직하게는 인간 면역글로불린 C_γ 1 사슬의 헌지, C_H2 및 C_H3 영역에 대응하는 아미노산 서열을 갖는 Ig 중쇄 불변 영역의 하나 이상의 도메인을 코딩하는 핵산을 함유하는 벡터 내에 존재한다.

[0314] 발현시킬 핵산을 함유하는 벡터는 숙주 세포 내로 전달될 수 있다. 용어 "숙주 세포"는 그 내부로 재조합 발현 벡터가 도입될 수 있는 원핵 세포 및 진핵 세포를 포함하는 것으로 의도된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "형질전환된" 및 "형질감염된"은 많은 기술 중 하나에 의한 세포 내로 핵산 (예를 들어, 벡터)의 도입을 포함한다. 특정 기술에 제한되지 않지만, 많은 이들 기술은 당업계에 잘 확립되어 있다. 원핵 세포는 예를 들어, 전기천공 또는 염화칼슘 매개 형질전환에 의해 핵산으로 형질전환시킬 수 있다. 핵산은 예를 들어 인산칼슘 동

시침전, DEAE-덱스트란-매개 형질감염, 리포펙션 (lipofection), 전기천공, 또는 미세주사를 포함하는 기술에 의해 포유동물 세포 내로 형질감염될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 PD-1 길항체 폴리펩티드를 생산하기 위해 숙주 세포 (예를 들어, 원핵 세포 또는 진핵 세포, 예를 들어 CHO 세포)가 사용될 수 있다.

I. 항체 PD-1 길항체

PD-1 길항체, 또는 PD-1의 에피토프와 반응성인 모노클로날 및 폴리클로날 항체를 개시한다. 모노클로날 항체 (mAb) 및 그들의 생산과 사용 방법은 문헌 [Kohler and Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975)]; 미국 특허 4,376,110; [Hartlow, E. et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988]; [*Monoclonal Antibodies and Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, New York, N.Y.(1980)]; [H. Zola et al., in *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press (1982)]에 기재되어 있다.

PD-1에 결합하여 PD-1을 통한 신호 전달을 차단하고, 항체가 투여 후 3개월, 2개월, 1개월, 3주, 2주, 1주, 또는 수일 미만의 기간 내에 해리되도록 허용하는, 현재 사용되는 것보다 더 낮은 친화도를 갖는 항체가 면역 반응의 향상, 증대 또는 자극을 위해 바람직하다.

면역분석 방법은 문헌 [Coligan, J. E. et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Wiley-Interscience, New York 1991 (또는 최신판)]; [Butt, W. R. (ed.) *Practical Immunoassay: The State of the Art*, Dekker, N.Y., 1984]; [Bizollon, Ch. A., ed., *Monoclonal Antibodies and New Trends in Immunoassay*, Elsevier, N.Y., 1984]; [Butler, J.E., ELISA (Chapter 29), In: van Oss, C. J. et al., (eds.), *Immunochemistry*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1994, pp. 759-803]; [Butler, J.E. (ed.), *Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, 1991]; [Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassay*, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986]; [Work, T.S. et al., *Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology*, North Holland Publishing Company, NY (1978) (Chapter by Chard, T., "An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques")]에 기재되어 있다.

항-개별특이형 항체는 예를 들어 문헌 [*Idiotypic in Biology and Medicine*, Academic Press, New York, 1984]; [*Immunological Reviews Volume 79*, 1984]; [*Immunological Reviews Volume 90*, 1986]; [*Curr. Top. Microbiol., Immunol. Volume 119*, 1985]; [Bona, C. et al., *CRC Crit. Rev. Immunol.*, pp. 33-81 (1981)]; [Jerne, N K, *Ann. Immunol.* 125C:373-389 (1974)]; [Jerne, N K, In: *Idiotypes-Antigens on the Inside*, Westen-Schnurr, I., ed., Editiones Roche, Basel, 1982], [Urbain, J. et al., *Ann. Immunol.* 133D:179-(1982)]; [Rajewsky, K. et al., *Ann. Rev. Immunol.* 1:569-607 (1983)]에 기재되어 있다.

항체는 이종, 동종, 동계 (syngeneic), 또는 그의 변형된 형태, 예를 들어 인간화 또는 키메라 항체일 수 있다. 특이적 항체, 예를 들어 항-PD-L2 항체의 개별특이형에 특이적인 항개별특이형 항체가 또한 포함된다. 용어 "항체"는 무손상 분자, 및 항원-결합 부위를 포함하고 PD-1 길항체 에피토프에 결합할 수 있는 그의 단편을 모두 포함하는 것을 의미한다. 이들은 무손상 항체의 Fc 단편이 결여되고, 혈류로부터 보다 신속하게 제거되고, 무손상 항체보다 더 적은 비-특이적 조직 결합을 가질 수 있는 Fab 및 F(ab')₂ 단편을 포함한다 (Wahl et al., *J. Nuc. Med.* 24:316-325 (1983)). Fv 단편도 또한 포함된다 ([Hochman, J. et al. (1973) *Biochemistry* 12:1130-1135]; [Sharon, J. et al. (1976) *Biochemistry* 15:1591-1594]). 이들 다양한 단편은 통상적인 기술, 예를 들어 프로테아제 절단 또는 화학적 절단을 이용하여 생산된다 (예를 들어, 문헌 [Rousseaux et al., *Meth. Enzymol.*, 121:663-69 (1986)] 참조).

폴리클로날 항체는 토끼, 염소, 설치류 등과 같은 면역화시킨 동물로부터 혈청으로서 입수되고, 추가로 처리하지 않고 직접 사용할 수 있거나 통상적인 농축 또는 정제 방법, 예를 들어 횡산암모늄 침전, 이온 교환 크로마토그래피 및 친화도 크로마토그래피로 처리할 수 있다.

면역원은 완전 PD-1 길항체, PD-1, 또는 그의 단편 또는 유도체를 포함할 수 있다. 바람직한 면역원은 PD-1 길항체 또는 PD-1의 세포외 도메인 (ECD)의 전부 또는 일부를 포함하고, 여기서 이들 잔기는 번역후 변형, 예를 들어 당화를 포함한다. 세포외 도메인을 포함하는 면역원은 당업계에 공지된 다양한 방식, 예를 들어, 통상적인 재조합 방법을 이용한 클로닝된 유전자의 발현 또는 기원 세포로부터의 단리에 의해 생산된다.

모노클로날 항체는 통상적인 하이브리도마 기술, 예를 들어 문헌 [Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975)]에서 도입된 절차 및 그의 변형 (상기 참조문)을 이용하여 제조할 수 있다. 동물, 바람직하게는 마우스

를 프라이밍 (priming)된 동물에서 목적하는 항체 반응을 유발하기 위해 상기한 바와 같은 면역원을 사용하는 면역화에 의해 프라이밍시킨다. 프라이밍된 동물의 램프절, 비장 또는 말초 혈액으로부터 B 램프구를 일반적으로 융합 촉진제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)의 존재 하에 골수종 세포와 융합시킨다. 상기 용도를 위해 임의의 많은 뮤린 골수종 세포주가 이용가능하다: P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-k0Ag8.653, Sp2/0-Ag14, 또는 HL1-653 골수종주 (ATCC (미국 매릴랜드주 록빌)로부터 이용가능함). 후속 단계는 비융합된 모 골수종 세포 및 공여체 램프구 세포는 궁극적으로 죽는 반면 하이브리도마 세포만 생존하도록 선택 배지 내에서 성장을 포함한다. 이들을 클로닝하고 성장시키고, 그들의 상등액을 예를 들어 PD-L2 또는 PD-L1 융합 단백질을 사용하여 면역분석 기술에 의해 목적하는 특이성의 항체의 존재에 대해 스크리닝한다. 양성 클론을 예를 들어, 제한 희석에 의해 서브클로닝하고, 모노클로날 항체를 단리시킨다.

[0324] 이들 방법에 따라 생산된 하이브리도마를 당업계에 공지된 기술을 이용하여 시험관 내에서 또는 생체 내에서 (복수액 내에서) 번식시킬 수 있다 (일반적으로 [Fink et al., Prog. Clin. Pathol., 9:121-33 (1984)] 참조). 일반적으로, 개별 세포주를 배양액 내에서 번식시키고, 고농도의 단일 모노클로날 항체를 함유하는 배양 배지를 경사여과 (decantation), 여과, 또는 원심분리에 의해 수거할 수 있다.

[0325] 항체는 정상 다량체성 구조 대신에 단일쇄 항체 또는 scFv로서 생산될 수 있다. 단일쇄 항체는 관심있는 Ig로부터의 초가변 영역을 포함하고, 무손상 Ig의 크기의 일부이면서 천연 Ig의 항원 결합 부위를 재현한다 ([Skerra, A. et al. Science, 240:1038-1041 (1988)]; [Pluckthun, A. et al. Methods Enzymol. 178: 497-515 (1989)]; [Winter, G. et al. Nature, 349: 293-299 (1991)]). 바람직한 실시양태에서, 항체는 통상적인 분자 생물학 기술을 이용하여 생산된다.

III. 제조 방법

A. PD-1 길항체 폴리펩티드 및 그의 변이체의 생산 방법

[0328] 단리된 PD-1 길항체 폴리펩티드, 그의 변이체, 및 그의 융합 단백질은 예를 들어, 화학 합성에 의해 또는 숙주 세포 내에서 재조합 생산에 의해 얻을 수 있다. PD-1 길항체 폴리펩티드를 재조합 방식으로 생산하기 위해, 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 핵산이 세균 또는 진핵 숙주 세포 (예를 들어, 곤충, 효모, 또는 포유동물 세포)를 형질전환시키거나 형질도입하거나 형질감염시키기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 핵산 구성체는 PD-1 길항체 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 조절 서열을 포함한다. 조절 서열 (본원에서 발현 제어 서열로도 칭해짐)은 일반적으로 유전자 산물을 코딩하지 않지만, 대신에 그들이 작동가능하게 연결된 핵산 서열의 발현에 영향을 미친다.

[0329] 당업계에 잘 공지되어 있는 폴리펩티드를 발현 및 생산하기 위해 유용한 원핵세포계 및 진핵세포계는 예를 들어, 에스체리키아 콜라이 (*Escherichia coli*) 균주, 예를 들어 BL-21, 및 배양된 포유동물 세포, 예를 들어 CHO 세포를 포함한다.

[0330] 진핵 숙주 세포에서, 많은 바이러스-기반 발현 시스템이 PD-1 길항체 폴리펩티드를 발현하기 위해 이용될 수 있다. 바이러스 기반 발현 시스템은 당업계에 잘 공지되어 있고, 바클로바이러스, SV40, 레트로바이러스, 또는 우두 기반 바이러스 벡터를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0331] 변이체 보조자극 폴리펩티드를 안정하게 발현하는 포유동물 세포주는 적절한 제어 요소 및 선택가능 마커를 갖는 발현 벡터를 사용하여 생산할 수 있다. 예를 들어, 진핵 발현 벡터 pCR3.1 (인비트로겐 라이프 테크놀로지스) 및 p91023(B) ([Wong et al. (1985) Science 228:810-815] 참조)가 예를 들어, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, COS-1 세포, 인간 배아 신장 293 세포, NIH3T3 세포, BHK21 세포, MDCK 세포, 및 인간 혈관 내피 세포 (HUVEC) 내에서 변이체 보조자극 폴리펩티드의 발현에 적합하다. 전기천공, 리포액션, 인산칼슘, 또는 염화칼슘 동시침전, DEAE 엑스트란, 또는 다른 적합한 형질감염 방법에 의한 발현 벡터의 도입 후에, 안정한 세포주를 선택할 수 있다 (예를 들어, G418, 카나마이신, 또는 히그로마이신에 대한 항생제 내성에 의해). 관심 있는 폴리펩티드가 발현되도록 형질감염된 세포를 배양할 수 있고, 폴리펩티드를 예를 들어, 세포 배양 상등액으로부터 또는 용해된 세포로부터 회수할 수 있다. 별법으로, PD-1 길항체 폴리펩티드는 (a) 증폭된 서열을 포유동물 발현 벡터, 예를 들어 pcDNA3 (인비트로겐 라이프 테크놀로지스) 내로 라이게이팅하고, (b) 맥아 (wheat germ) 추출물 또는 토끼 망상적혈구 용해물을 사용하여 시험관 내에서 전사 및 번역시킴으로써 생산할 수 있다.

[0332] PD-1 길항체 폴리펩티드는 예를 들어, 크로마토그래피 방법, 예를 들어 DEAE 이온 교환, 겔 여과, 및 히드록실 아파타이트 크로마토그래피를 이용하여 단리할 수 있다. 예를 들어, 세포 배양 상등액 또는 세포질 추출물 내

의 보조자극 폴리펩티드는 단백질 G 컬럼을 이용하여 단리할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변이체 보조자극 폴리펩티드는 폴리펩티드가 친화도 매트릭스 상에 포획되도록 허용하는 아미노산 서열을 함유하도록 "조작될" 수 있다. 폴리펩티드 정제를 돋도록 예를 들어 태그, 예를 들어 c-myc, 헤마글루티닌, 폴리히스티딘, 또는 FlagTM (코다)이 사용될 수 있다. 그러한 태그는 카르복실 또는 아미노 말단을 포함한 폴리펩티드 내의 임의의 위치에 삽입될 수 있다. 유용할 수 있는 다른 융합체는 폴리펩티드의 검출을 돋는 효소, 예를 들어 알칼린 포스파타제를 포함한다. 면역친화도 크로마토그래피가 또한 보조자극 폴리펩티드를 정제하기 위해 사용될 수 있다.

[0333] 변이체 폴리펩티드를 생산하도록 무작위 돌연변이를 도입하기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다. PD-1 수용체 또는 리간드와 상호작용하는 웨პ티드에 대해 스크리닝하기 위해, 무작위 웨პ티드 디스플레이 라이브러리를 사용될 수 있다. 그러한 무작위 웨პ티드 디스플레이 라이브러리를 생성하고 스크리닝하기 위한 기술은 당업계에 공지되어 있고 (미국 특허 5,223,409 (Ladner et al.); 미국 특허 4,946,778 (Ladner et al.); 미국 특허 5,403,484 (Ladner et al.) 및 미국 특허 5,571,698 (Ladner et al.)), 무작위 웨პ티드 디스플레이 라이브러리 및 그러한 라이브러리를 스크리닝하기 위한 키트는 상업적으로 이용가능하다.

B. PD-1 길항체 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자의 생산 방법

[0335] PD-1 길항체 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 비제한적으로 일반적인 문자 클로닝 및 화학적 핵산 합성 기술을 포함한 표준 기술에 의해 생산할 수 있다. 변이체 보조자극 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 얻기 위해, 예를 들어, 종합효소 연쇄 반응 (PCR) 기술을 사용할 수 있다. PCR은 표적 핵산이 효소에 의해 증폭되는 기술이다. 일반적으로, 관심있는 영역 또는 그를 넘어서의 단부로부터 서열 정보를 사용하여, 증폭시킬 주형의 반대 가닥에 대해 서열이 동일한 올리고뉴클레오티드 프라이머를 설계할 수 있다. PCR은 DNA 및 RNA로부터의 특이적 서열, 예를 들어 총 게놈 DNA 또는 총 세포성 RNA로부터의 서열을 증폭하기 위해 사용될 수 있다. 프라이머는 대개 14 내지 40개 뉴클레오티드 길이이지만, 10개 뉴클레오티드 내지 수백 개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일반적인 PCR 기술은 예를 들어 문헌 [PCR Primer: A Laboratory Manual, ed. by Dieffenbach and Dveksler, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995]에 기재되어 있다. 주형의 공급원으로서 RNA를 사용할 때, 상보성 DNA (cDNA) 가닥을 합성하기 위해 역전사효소가 사용될 수 있다. 단리된 핵산을 얻기 위해 리가제 (ligase) 연쇄 반응, 가닥 치환 (strand displacement) 증폭, 자기-지지 서열 복제 또는 핵산 서열-기반 증폭을 또한 이용할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Lewis (1992) Genetic Engineering News 12:1]; [Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878]; 및 [Weiss (1991) Science 254:1292-1293]을 참조한다.

[0336] 단리된 핵산은 단일 핵산 분자로서 또는 일련의 올리고뉴클레오티드로서 화학적으로 합성할 수 있다 (예를 들어, 3'에서 5' 방향으로 자동화 DNA 합성을 위해 포스포르아미다이트 기술을 이용하여). 예를 들어, 목적하는 서열을 함유하는 하나 이상의 쌍의 긴 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, >100 뉴클레오티드)가 합성될 수 있고, 여기서 각각의 쌍은 상보성의 짧은 세그먼트 (예를 들어, 약 15개 뉴클레오티드)를 함유하여, 올리고뉴클레오티드 쌍이 어닐링 (annealing)될 때 이중체 (duplex)가 형성될 수 있다. 올리고뉴클레오티드를 연장시키기 위해 DNA 중합효소가 사용될 수 있어서, 올리고뉴클레오티드 쌍마다 단일의 이중 가닥 핵산 분자를 생성시키고, 이것은 이후에 벡터 내로 라이게이션될 수 있다. 단리된 핵산은 또한 돌연변이유발에 의해 얻을 수 있다. PD-1 길항체 코딩 핵산은 PCR을 통한 올리고뉴클레오티드-지정 돌연변이유발 및/또는 부위-지정 돌연변이유발을 포함한 표준 기술을 이용하여 돌연변이될 수 있다. 문헌 [Short Protocols in Molecular Biology. Chapter 8, Green Publishing Associates and John Wiley & Sons, edited by Ausubel et al., 1992]을 참조한다. 변형될 수 있는 아미노산 위치의 예는 본원에 기재된 것을 포함한다.

IV. 제형

A. PD-1 길항체 제형

[0337] PD-1 길항체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 웨პ티드 또는 폴리펩티드를 함유하는 제약 조성물은 비경구 (근내, 복강내, 정맥내 (IV) 또는 피하 주사), 경피 (수동적으로 또는 전기이온영동 (iontophoresis) 또는 전기 천공을 사용하여), 또는 경점막 (비내, 질내, 직장, 또는 설하) 투여 경로에 의한 투여를 위한 것일 수 있다. 또한, 조성물은 생분해성 삽입물을 사용하여 투여될 수 있고, 적절한 림프 조직 (예를 들어, 비장, 림프절, 또는 점막-결합 림프 조직)에 직접 또는 장기 또는 종양에 직접 전달될 수 있다. 조성물은 각각의 투여 경로에 적합한 투여 형태로 제형화될 수 있다. 웨პ티드 또는 폴리펩티드가 아닌 PD-1 수용체의 길항체를 함유하는 조성물은 추가로 장내 투여를 위해 제형화될 수 있다.

- [0340] 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 치료되는 질환의 하나 이상의 증상을 치료하거나 억제하거나 완화하기 위해 또는 달리 목적하는 약물학적 및/또는 생리학적 효과를 제공하기 위해 충분한 용량을 의미한다. 정확한 용량은 대상체-의존 변수 (예를 들어, 연령, 면역계 건강 등), 질환, 및 수행되는 치료와 같은 다양한 인자에 따라 변할 것이다. PD-1 길항제의 치료 유효량은 면역 반응이 활성화, 향상, 증가 또는 유지되고/되거나, T 세포 고갈 및/또는 T 세포 무응답을 극복하거나 완화시키고/시키거나, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포 및 다른 항원 제시 세포 ("APC")를 활성화시킨다.
- [0341] 바람직한 실시양태에서, PD-1 길항제는 종양 모델링에 의한 외삽 및 생체이용률을 기초로 하여 0.1 - 20 mg/kg의 범위로 투여된다. 가장 바람직한 범위는 5-20 mg의 PD-1 길항제/kg이다. 일반적으로, 정맥내 주사 또는 주입을 위해, 용량은 다른 경로에 의해 투여될 때보다 더 낮을 수 있다.
- [0342] 1. 비경구 투여를 위한 제형
- [0343] 바람직한 실시양태에서, 웨티드 및 폴리웨티드를 함유하는 것을 포함하여 개시된 조성물은 비경구 주사에 의해 수용액으로 투여된다. 또한, 제형은 혼탁액 또는 에멀젼의 형태일 수 있다. 일반적으로, 유효량의 웨티드 또는 폴리웨티드를 포함하는 제약 조성물이 제공되고, 임의로 제약상 허용되는 희석제, 보존제, 가용화제, 유화제, 아주반트 및/또는 담체를 포함한다. 상기 조성물은 멸균수, 완충된 염수 (예를 들어, Tris-HCl, 아세테이트, 포스페이트), pH 및 이온 강도; 및 임의로, 첨가제, 예를 들어 세제 및 가용화제 (예를 들어, TWEEN® 20, TWEEN 80, 폴리소르베이트 80), 항산화제 (예를 들어, 아스코르브산, 메타중아황산나트륨) 및 보존제 (예를 들어, 티메르솔, 벤질 알콜) 및 충전 물질 (예를 들어, 락토스, 만니톨)을 포함한다. 비-수성 용매 또는 비히클의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물유, 예를 들어 올리브유 및 옥수수유, 젤라틴, 및 주사 가능한 유기 에스테르, 예를 들어 에틸 올레이트이다. 제형은 동결건조되고, 사용 직전에 재용해/재현탁될 수 있다. 제형은 예를 들어 세균 보유 필터를 통한 여과에 의해, 멸균제를 조성물에 혼입함으로써, 조성물에 방사선을 조사함으로써, 또는 조성물을 가열함으로써 멸균될 수 있다.
- [0344] 2. 제어 전달 중합체 매트릭스
- [0345] 하나 이상의 PD-1 길항제 또는 PD-1 길항제를 코딩하는 핵산을 함유하는 조성물을 제어 방출 제형으로 투여할 수 있다. 제어 방출 중합체 장치는 중합체 장치 (막대, 원통, 필름, 디스크)의 이식 또는 주사 (미세입자) 후에 전신적인 장기간 방출을 위해 제조될 수 있다. 매트릭스는 미세입자, 예를 들어 미세구의 형태로 존재할 수 있고, 여기서 웨티드는 고체 중합체 매트릭스 또는 미세캡슐 내에 분산되고, 여기서 코어는 중합체 켈과 상이한 물질로 이루어지고, 웨티드는 자연 상태에서 액체 또는 고체일 수 있는 코어에 분산되거나 혼탁된다. 본원에서 구체적으로 규정되지 않으면, 미세입자, 미세구, 및 미세캡슐은 상호 교환가능하게 사용된다. 별법으로, 중합체는 수나노미터 내지 4 센티미터의 얇은 슬래브 (slab) 또는 필름, 연마 또는 다른 표준 기술에 의해 제조된 분말, 또는 심지어 켈, 예를 들어 히드로겔로서 제조될 수 있다. 또한, 매트릭스는 면역 반응을 조정하기 위해, 면역손상된 환자 (예를 들어, 카테테르가 삽입된 노인 또는 조산아)에서 감염을 방지하기 위해 또는 암통, 육창성 궤양 등의 치유를 촉진하기 위해 사용되는 매트릭스의 경우에서와 같이 치유를 돋기 위해 의료 장치 내에 또는 장치 상에 도입될 수 있다.
- [0346] 비-생분해성 또는 생분해성 매트릭스가 PD-1 길항제 또는 이들을 코딩하는 핵산의 전달을 위해 사용될 수 있지만, 생분해성 매트릭스가 바람직하다. 이들은 천연 또는 합성 중합체일 수 있지만, 분해 및 방출 프로필의 보다 우수한 특성 때문에 합성 중합체가 바람직하다. 중합체는 방출이 요구되는 기간을 기초로 하여 선택된다. 일부 경우에, 선형 방출이 가장 유용할 수 있지만, 다른 경우에는 필스 (pulse) 방출 또는 "벌크 (bulk) 방출"이 보다 효과적인 결과를 제공할 수 있다. 중합체는 히드로겔 (일반적으로 약 90 중량% 이하의 물을 흡수)의 형태일 수 있고, 임의로 다가 이온 또는 중합체와 가교결합될 수 있다.
- [0347] 매트릭스는 용매 증발, 분무 건조, 용매 추출 및 당업자에게 알려진 다른 방법에 의해 형성될 수 있다. 생분해성 미세구는 예를 들어 문헌 [Mathiowitz and Langer, J. Controlled Release, 5:13-22 (1987)]; [Mathiowitz, et al., Reactive Polymers, 6:275-283 (1987)]; 및 [Mathiowitz, et al., J. Appl. Polymer Sci., 35:755-774 (1988)]에 기재된 바와 같이 약물 전달을 위한 미세구를 제조하기 위해 개발된 임의의 방법을 사용하여 제조될 수 있다.
- [0348] 제어 방출 경구 제형이 바람직할 수 있다. PD-1 억제 신호 전달의 길항제는 확산 또는 침출 (leaching) 메카니즘에 의한 방출을 가능하게 하는 불활성 매트릭스, 예를 들어 필름 또는 겉내로 혼입될 수 있다. 서서히 봉해되는 매트릭스도 제형 내에 혼입될 수 있다. 다른 형태의 제어 방출은, 물이 도입되고 삼투 효과에 의해 하나

의 작은 개구부를 통해 약물이 배출되도록 하는 반투과성 막에 약물이 봉입된 것이다. 경구 제형의 경우, 방출 위치는 위, 소장 (십이지장, 공장, 또는 회장), 또는 대장일 수 있다. 바람직하게는, 방출은 활성 작용제 (또는 유도체)의 보호 또는 위 환경을 지나서, 예를 들어 장 내에서의 활성 작용제의 방출에 의해 위 환경의 유해한 효과를 피할 것이다. 위에 대한 완전한 저항을 보장하기 위해, 장용 코팅 (즉, 적어도 pH 5.0에 대해 불침 투성인)이 필수적이다. 상기 코팅은 혼합된 필름 또는 캡슐, 예를 들어 배너 파마캡스 (Banner Pharmacaps)로부터 입수할 수 있는 것으로서 사용될 수 있다.

[0349] 장치는 이식 또는 주사 영역을 치료하도록 국소 방출을 위해 제형화될 수 있고, 일반적으로 전체 신체의 치료를 위한 용량보다 훨씬 더 적은 용량을 전달한다. 또한, 장치는 전신 전달을 위해 제형화될 수도 있다. 이들은 이식되거나 피하 주사될 수 있다.

3. 장내 투여를 위한 제형

[0351] 또한, PD-1의 길항제는 경구 전달을 위해 제형화될 수 있다. 경구 고체 투여 형태는 당업자에게 알려져 있다. 고체 투여 형태는 정제, 캡슐, 환제 (pill), 트로키 또는 로젠지제, 샤세제 (cachet), 펠렛, 분말, 또는 과립, 또는 중합체 화합물, 예를 들어 폴리락트산, 폴리글리콜산 등의 입자형 제제 내로 또는 리포좀 내로 물질의 흡입된 것을 포함한다. 상기 조성물은 본 발명의 단백질 및 유도체의 물리적 상태, 안정성, 생체내 방출 속도, 및 생체내 청소 속도에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Ed. (2005, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. 21201) pages 889-964]을 참조한다. 조성물을 액체 형태로 제조될 수 있거나, 건조 분말 (예를 들어, 동결건조) 형태로 존재할 수 있다. 조성물을 제형화하기 위해 리포좀 또는 중합체 캡슐화가 사용될 수 있다. 또한, 문헌 [Marshall, K. In: Modern Pharmaceutics Edited by G.S. Bunker and C.T. Rhodes Chapter 10, 1979]을 참조한다. 일반적으로, 제형은 활성 작용제, 및 PD-1 길항제를 위 환경 내에서 보호하고 생물 활성 물질을 장 내에 방출시키는 불활성 성분을 포함할 것이다.

[0352] 경구 투여를 위한 액체 투여형, 예를 들어 제약상 허용되는 에멀젼, 용액, 혼탁액, 및 시럽은 불활성 희석제; 아주반트, 예를 들어 습윤제, 유화 및 혼탁화제; 및 감미, 조미, 및 향미제를 포함한 다른 성분을 함유할 수 있다.

B. PD-1 수용체 길항제를 포함하는 백신

[0354] 백신은 암 세포를 제거하기 위해 강한 T 세포 반응을 요구한다. 본원에 기재된 PD-1 길항제는 T 세포에 대한 억제 신호를 방지하기 위해 백신의 성분으로서 투여될 수 있다. 본원에 개시된 백신은 항원, PD-1 길항제 폴리펩티드의 공급원 및 임의로 아주반트 및 표적화 분자를 포함한다. PD-1 길항제 폴리펩티드의 공급원은 임의의 개시된 B7-DC, PD-L1, PD-1 또는 B7.1 폴리펩티드, 그의 융합 단백질, 그의 변이체, 이를 폴리펩티드 및 그의 융합 단백질 또는 변이체를 코딩하는 핵산, 또는 PD-1 길항제 폴리펩티드를 발현하는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 포함한다.

1. 항원

[0356] 항원은 웹티드, 단백질, 다당류, 당류, 지질, 핵산, 또는 그의 조합물일 수 있다. 항원은 형질전환된 세포, 예를 들어 암 또는 백혈병 세포로부터 유래될 수 있고, 전체 세포 또는 그의 면역원 성분일 수 있다. 적합한 항원은 당업계에 공지되어 있고, 상업적, 정부 및 과학 공급원으로부터 이용가능하다. 항원은 종양으로부터 정제된 또는 부분적으로 정제된 폴리펩티드일 수 있거나, 폴리펩티드 항원을 코딩하는 DNA를 이종성 발현 시스템 내에서 발현시킴으로써 생산된 재조합 폴리펩티드일 수 있다. 항원은 항원성 단백질의 전부 또는 일부를 코딩하는 DNA일 수 있다. DNA는 벡터 DNA, 예를 들어 플라스미드 DNA의 형태로 존재할 수 있다.

[0357] 항원은 단일 항원으로서 제공될 수 있거나, 조합물로 제공될 수 있다. 항원은 또한 폴리펩티드 또는 핵산의 복합체 혼합물로서 제공될 수 있다.

[0358] 항원은 종양 항원, 예를 들어 알파-악티닌-4, Bcr-Ab1 융합 단백질, Casp-8, 베타-카테닌, cdc27, cdk4, cdkn2a, coa-1, dek-can 융합 단백질, EF2, ETV6-AML1 융합 단백질, LDLR-푸코실트랜스페라제 AS 융합 단백질, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-1, 2, 및 3, neo-PAP, 미오신 클래스 I, OS-9, pml-RAR α 융합 단백질, PTPRK, K-ras, N-ras, 트리오스포스페이트 이소머라제, Bage-1, Gage 3,4,5,6,7, GnTV, Herv-K-mel, Lage-1, Mage-A1,2,3,4,6,10,12, Mage-C2, NA-88, NY-Eso-1/Lage-2, SP17, SSX-2, 및 TRP2-Int2, MelanA (MART-1), gp100 (Pmel 17), 티로시나제, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15(58), CEA, RAGE, NY-ESO (LAGE), SCP-1, Hom/Mel-40, PRAME, p53, H-Ras, HER-2/neu, BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, 앰스타인 바르 바이러스 항원, EBNA, 인간 유두종바이러스 (HPV) 항원 E6 및 E7, TSP-180,

MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, β -카테닌, CDK4, Mum-1, p16, TAGE, PSMA, PSCA, CT7, 텔로머라제, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, α -태아단백질, 13HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB\70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (Mac-2 결합 단백질\시클로필린 C-연관 단백질), TAAL6, TAG72, TLP, 및 TPS를 포함하고 이로 제한되지 않는 종양 연관 또는 종양-특이적 항원일 수 있다.

[0359] 2. 아주반트

임의로, 본원에 기재된 백신은 아주반트를 포함할 수 있다. 아주반트는 다음 중 하나 이상일 수 있고 이로 제한되지 않는다: 오일 에멀젼 (예를 들어, 프로인트 (Freund) 아주반트); 사포닌 제형; 비로좀 및 바이러스-유사입자; 세균 및 미생물 유도체; 면역자극성 올리고뉴클레오티드; ADP-리보실화 독소 및 제독 유도체; 명반; BCG; 광물-함유 조성물 (예를 들어, 광물염, 예를 들어 알루미늄염 및 칼슘염, 수산화물, 인산염, 황산염 등); 생물 접착제 및/또는 점막접착제 (mucoadhesive); 미세입자; 리포좀; 폴리옥시에틸렌 에테르 및 폴리옥시에틸렌 에스테르 제형; 폴리포스파젠; 라우라밀 웨პ티드; 이미다조퀴놀론 화합물; 및 표면 활성 물질 (예를 들어 리소례시틴, 플루로닉 폴리올, 폴리음이온 (polyanion), 웨პ티드, 오일 에멀젼, 키홀 림펫 (keyhole limpet) 해모시아닌, 및 디니트로페놀).

[0360] 아주반트는 또한 면역조정물질, 예를 들어 시토카인, 인터류킨 (예를 들어, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 등), 인터페론 (예를 들어, 인터페론- γ), 대식세포 콜로니 자극 인자, 및 종양 피사 인자를 포함할 수 있다. PD-1 길항제에 추가로, 다른 보조-자극 분자, 예를 들어 B7 패밀리의 다른 폴리펩티드를 투여할 수 있다. 그러한 단백질성 아주반트는 전장 폴리펩티드로서 또는 활성 그의 단편으로서, 또는 DNA, 예를 들어 플라스미드 DNA의 형태로 제공될 수 있다.

[0362] IV. 사용 방법

[0363] A. T 세포의 활성화

PD-1 길항제 폴리펩티드 및 소분자, 그의 변이체, 그의 융합 단백질, PD-1 길항제 폴리펩티드 및 융합 단백질을 코딩하는 핵산, 또는 PD-1 길항제 폴리펩티드 및 융합체 단백질을 발현하는 세포는 T 세포의 불활성화를 방지하고/하거나 T 세포의 활성화를 연장하거나 (즉, T 세포의 항원-특이적 증식을 증가시키고/시키거나, T 세포에 의한 시토카인 생산을 향상시키고/시키거나, T 세포의 분화 및 효과기 기능을 자극하고/하거나 T 세포 생존을 촉진하거나), T 세포 고갈 및/또는 무응답을 극복하기 위해 사용될 수 있다.

[0364] 바람직한 PD-1 길항제는 내인성 PD-L1 또는 PD-L2에 결합하여 PD-L1 및 PD-L2가 PD-1 수용체, 예를 들어 PD-1 또는 B7-1 폴리펩티드와 상호작용하는 것을 감소 또는 억제하는 폴리펩티드를 포함한다. 이를 리간드와 PD-1의 상호작용을 감소시킴으로써, PD-1에 의해 전달되는 음성 신호가 방지 또는 감소된다. 최적 미만의 TCR 신호의 존재 하에, 외인성 PD-L2 또는 PD-L1 폴리펩티드는 시험관 내에서 시토카인의 증가된 증식 및 생산을 자극할 수 있다. 따라서, PD-L2 및 PD-L1은 PD-1 의 T 세포 수용체에 결합하는 것으로 보인다. PD-1을 통한 음성 신호를 전달하지 않으면서 PD-1 수용체에 결합하여 차단하는 PD-1 길항제가 또한 바람직하다. 이를 길항제의 예는 그들이 PD-1에 결합하는 신호 전달을 촉발하지 않는 PD-1의 재조합 리간드, 예를 들어 PD-L2 및 PD-L1을 포함한다.

[0365] PD-1 길항제 폴리펩티드를 사용하는 방법은 T 세포를 T 세포에서 PD-1 신호 전달을 억제 또는 감소시키는데 유효한 양으로 PD-1 길항제 폴리펩티드와 접촉시키는 것을 포함한다. 접촉은 시험관 내에서, 생체 외에서, 또는 생체 내에서 (예를 들어, 포유동물, 예를 들어 마우스, 래트, 토끼, 개, 소, 돼지, 비-인간 영장류, 또는 인간에서) 일어날 수 있다.

[0366] 접촉은 T 세포의 활성화 전에, 활성화 동안 또는 활성화 후에 일어날 수 있다. 일반적으로, T 세포와 PD-1 길항제 폴리펩티드의 접촉은 활성화와 실질적으로 동시에 일어날 수 있다. 활성화는 예를 들어, T 세포를 T 세포 수용체 (TCR) 또는 TCR과 물리적으로 회합된 CD3 복합체의 폴리펩티드 중 하나에 결합하는 항체에 노출시킴으로써 일어날 수 있다. 별법으로, T 세포는 예를 들어, APC [예를 들어, 상호교차 (interdigitating) 수지상 세포 (본원에서 수지상 세포로서 청함), 대식세포, 단핵구, 또는 B 세포] 상의 동종항원 (예를 들어, MHC 동종항원)에, 또는 임의의 상기 APC에 의해 단백질 항원을 처리함으로써 생산되고 APC의 표면 상의 MHC 분자에 의해 T 세포에 제시된 항원성 웨პ티드에 노출될 수 있다. T 세포는 CD4 $^+$ T 세포 또는 CD8 $^+$ T 세포일 수 있다.

- [0368] 일부 실시양태에서, PD-1 길항제 폴리펩티드는 T 세포에 직접 투여될 수 있다. 별법으로, APC, 예를 들어 대식세포, 단핵구, 상호교차 수지상 세포 (본원에서 수지상 세포로서 칭함), 또는 B 세포는 PD-1 길항제 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 코딩하는 핵산으로 형질전환되거나, 형질도입되거나, 형질감염될 수 있고, T 세포는 형질전환되거나 형질도입되거나 형질감염된 APC에 의해 접촉될 수 있다. 형질전환되거나 형질도입되거나 형질감염된 세포는 형질전환되거나 형질도입되거나 형질감염되기 전에, 그를 투여한 대상체로부터 또는 다른 대상체 (예를 들어, 동일한 종의 다른 대상체)로부터 얻을 수 있는 세포 또는 세포의 자손체일 수 있다.
- [0369] PD-1 길항제 폴리펩티드는 임의의 개시된 아미노산 변경을 포함한 본원에 기재된 임의의 PD-1 길항제 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편, 융합 단백질 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0370] 활성화가 시험관 내에서 이루어질 경우, PD-1 길항제 폴리펩티드는 관련 배양 용기의 바닥, 또는 비드 또는 다른 고체 지지체, 예를 들어 플라스틱 미세적정 플레이트의 웰에 결합될 수 있다.
- [0371] PD-1 길항제 폴리펩티드의 시험관내 적용은 예를 들어, 면역 메카니즘의 기초 과학 연구에서, 또는 T 세포 기능의 연구 또는 예를 들어 수동 면역요법에서 사용하기 위한 활성화된 T 세포의 생산을 위해 유용할 수 있다. 또한, PD-1 길항제 폴리펩티드는 T 세포를 얻은 대상체에서 관심있는 항원에 대한 면역성에 대해 시험하기 위해 설계된 시험관내 분석 (예를 들어, T 세포 증식 분석)에 참가될 수 있다. 그러한 분석에 PD-1 길항제 폴리펩티드를 참가하는 것은 보다 강력하고, 따라서 보다 쉽게 검출가능한 시험관내 반응을 일으키는 것으로 예상될 것이다. 추가로, PD-1 길항제 폴리펩티드, 또는 그러한 폴리펩티드를 코딩하는 핵산으로 형질전환되거나 형질도입되거나 형질감염된 APC는 (a) 다른 분자에 의한 T 세포 향상 활성에 대해 시험하기 위한 분석에서 양성 대조군으로서; 또는 (b) T 보조자극을 억제하는데 유용한 화합물 (예를 들어, 자가면역 질환 또는 장기 이식 거부를 치료하기 위해 잠재적으로 유용한 화합물)에 대한 스크리닝 분석에서 사용될 수 있다.
- [0372] B. PD-1 길항제의 치료 용도**
- [0373] 1. 암의 치료**
- [0374] 본원에서 제공되는 PD-1 길항제는 면역 반응-자극 치료제로서 생체 내에서 및 생체 외에서 일반적으로 유용하다. 일반적으로, 개시된 길항제 조성물은 대상체의 면역계가 면역 반응에 착수하는 임의의 질환 또는 장애가 있거나 그러한 질환 또는 장애에 소인이 있는 대상체를 치료하기 위해 유용하다. PD-1 신호 교류를 억제 또는 감소시키는 PD-1 길항제의 능력은 보다 강건한 면역 반응이 가능하도록 허용한다. 개시된 조성물은 T 세포를 수반한 면역 반응을 자극 또는 향상시키기 위해 유용하다.
- [0375] 개시된 PD-1 길항제는 대상체에서 T 세포를 보조자극하는데 유효한 양의 PD-1 길항제를 대상체에게 투여함으로써, 암을 치료하기 위해 숙주에서 면역 반응을 자극 또는 향상시키기 위해 유용하다. 제공된 조성물 및 방법으로 치료할 수 있는 암의 종류는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 병광, 뇌, 유방, 자궁경부, 결장직장, 식도, 신장, 간, 폐, 비인두, 췌장, 전립선, 피부, 위, 자궁, 난소, 고환 및 혈액.
- [0376] 치료될 수 있는 악성 종양은 종양이 유래되는 조직의 배아 기원에 따라 본원에서 분류된다. 암종은 내배엽 또는 외배엽 조직, 예를 들어 피부 또는 내부 장기 및 분비 장기의 상피층으로부터 발생하는 종양이다. 덜 빈번하게 발생하는 육종은 내배엽 결합 조직, 예를 들어 뼈, 지방 및 연골로부터 유래한다. 백혈병 및 림프종은 골수의 조혈 세포의 악성 종양이다. 백혈병은 단일 세포로서 증식하는 반면, 림프종은 종양 덩어리로서 성장하는 경향이 있다. 악성 종양은 암을 확립하기 위해 신체의 수많은 장기 또는 조직에서 나타날 수 있다.
- [0377] 2. 백신에서 PD-1 길항제의 용도**
- [0378] 개시된 PD-1 길항제 또는 그를 코딩하는 핵산은 단독으로 또는 임의의 다른 적합한 치료와 조합으로 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, PD-1 길항제는 백신 조성물과 함께 또는 그의 성분으로서 투여될 수 있다. 백신 조성물의 적합한 성분은 상기 설명된다. 개시된 PD-1 길항제는 백신 투여 전에, 동시에 또는 후에 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, PD-1 길항제 조성물은 백신 투여와 동시에 투여된다.
- [0379] 개시된 PD-1 길항제 조성물은 기존의 항원, 예를 들어 암이 있는 대상체에서 종양 항원에 대한 대상체의 면역 반응을 개시 또는 향상시키기 위해 사용될 수 있는 치료 백신 또는 예방 백신과 함께 투여될 수 있다.
- [0380] 예방, 치료 또는 탈감작된 면역 반응의 목적하는 결과는 당업계에 잘 공지된 원칙에 따라 질환에 따라 변할 수 있다. 이와 유사하게, 암, 알레르겐 또는 감염성 물질에 대한 면역 반응은 질환을 완전히 치료할 수 있거나, 증상을 완화할 수 있거나, 질환에 대한 총 치료적 개입에서 하나의 측면일 수 있다. 예를 들어, 암에 대한 면역 반응의 자극은 치료에 영향을 주기 위해 외과, 화학치료, 방사선, 호르몬 및 다른 면역학적 방안과 결합될

수 있다.

3. 아주반트 요법

[0381] 개시된 PD-1 길항제 또는 그를 코딩하는 핵산은 항원에 대한 허용성을 극복하고, 따라서 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 동시-신호 전달 경로의 적절한 표적화는 T 세포의 활성화를 일으키고 종양 항원에 대한 허용성을 극복할 수 있다. 하나의 실시양태는 항원 허용성을 극복하기 위해 유효량의 PD-1 길항제 또는 그를 코딩하는 핵산을 투여하는 것을 제공한다. PD-1 음성 신호 전달의 억제 또는 감소는 또한 제1 치료제의 투여 후에 T 세포 반응 및 종 면역성, 또는 면역원성이 낮은 항원, 예를 들어 종양 연관 항원에 대한 반응을 증폭시킬 수 있다. 하나의 실시양태는 1차 치료, 백신 접종, 또는 종양의 사멸 (화학치료 또는 방사선 조사 또는 그의 임의의 조합과 함께 항체-매개된) 후에 PD-1 길항제 또는 그를 코딩하는 핵산의 수동 투여를 포함한다. PD-1 길항제는 1차 반응을 향상/증가시키, 종양에 대한 강건하고 장기 작용성 보호 반응을 생성시키는 것으로 생각된다.

[0383] 종양을 근절하기 위해 제1 치료제에 추가로 투여되는 치료는 아주반트 요법으로서 칭해진다. 아주반트 요법은 암이 재발할 기회를 감소시키기 위해 1차 치료, 예를 들어 수술 또는 방사선 조사를 중대시키기 위해 제공된다. 상기 추가의 치료는 보다 강력한 및/또는 지속적인 반응에 의해 입증되는 바와 같이 1차 반응의 증폭을 일으킬 수 있다.

[0384] 다음과 같은 5가지 주요 유형의 아주반트 요법 (이들 중 일부는 1차/단계 요법으로서 또한 사용됨에 주목한다) 이 존재한다: 1.) 암 세포가 증식하는 것을 방지함으로써 또는 세포가 자가-파괴하도록 함으로써 암 세포를 죽이기 위해 약물을 사용하는 화학치료, 2.) 호르몬 생산을 감소시키고 암이 성장하는 것을 방지하기 위한 호르몬 요법, 3.) 암 세포를 죽이기 위해 고성능 광선을 사용하는 방사선 요법, 4.) 임의의 남아있는 암 세포를 공격하여 근절하기 위해 시체 자신의 면역계에 영향을 미치기 위한 면역요법, (면역요법은 신체 사진의 방어를 자극하거나 (암 백신) 이들을 보충(항체 또는 면역 세포의 수동 투여) 할 수 있음), 또는 5.) 정상적인 건강한 세포를 그대로 남겨놓고, 암 세포 내에 존재하는 특이적 분자를 표적으로 하는 표적화 요법. 예를 들어, 많은 경우의 유방암은 HER2로 불리는 단백질을 너무 많이 생산하는 종양에 의해 유발된다. 트라스투주맙 (헤르셉틴 (Herceptin))이 HER2 양성 종양을 표적화하는 아주반트 요법으로서 사용된다.

[0385] 일반적으로, 아주반트 요법은 다수 메카니즘을 유도하고 종양을 근절하는 기회를 증가시키기 위해 1차 치료와 함께 제공되거나 동시-투여된다. 면역요법 및 특히 백신은 정교한 특이성 및 존재하는 면역 관용을 피하는 능력을 갖는 지속적인 항종양 효과를 유도하는 독특한 잇점을 제공한다. 자연형 "아주반트 요법"은 반응을 최대화하고 종양을 근절하는 기회를 증가시키는 것으로 밝혀졌다.

[0386] 바람직한 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 PD-1 길항제 또는 그를 코딩하는 핵산은 암 치료제와 같은 제1 치료제의 투여 후에 투여된다. 아주반트의 투여 시기는 1차 치료 후 제0일 내지 제14일까지 변할 수 있고, 단일 또는 다수의 치료를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, PD-1 길항제는 1차 치료의 투여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 후에 투여된다. 아주반트는 바람직하게는 환자에게 전신 투여된다 (IV, IM 또는 SQ).

[0387] 면역 반응을 향상시키기 위해 사용하기 위한 PD-1 길항제의 선택은 원래의 1차 치료 방식에 따라 결정될 수 있다. 예를 들어, 화학치료와 함께 사용된 동일한 PD-1 길항제는 방사선 요법에서는 잘 작용하지 않을 수 있다. 따라서, 최적 효능을 위해 치료제 및 PD-1 길항제 분자의 특이적인 조합이 요구될 수 있다. PD-1 길항제는 예를 들어 친화도 성숙을 이용하여 암의 종류, 예를 들어 고형 대 액상형 종양에 대해 최적화될 수 있다.

[0388] PD-1 길항제 및 그를 코딩하는 핵산은 종양에 대한 면역 반응의 유도 또는 향상에 유용할 수 있다. 예를 들어, 세포는 본원에 기재된 바와 같은 PD-1 길항제를 코딩하는 핵산을 보유하도록 조작된 후, 대상체에서 종양-특이적 허용성을 방해하기 위해 대상체에게 투여될 수 있다. 특히, B7 음성 뮤린 종양 세포에서 B7-1의 이소성 발현은 마우스에서 종양 접종에 대해 종양 거부 및 지속적인 보호를 동반한 T-세포 매개된 특이적 면역성을 유도하는 것으로 나타났다. B7-관련 인자를 사용하는 세포 유전자 요법 치료를 동물 실험 (문헌 [K. Dunussi-Joannopoulos et al., J. Pediatr. Hematol. Oncol. 19:356-340 (1997)]; [K. Hiroishi et al., Gene Ther. 6:1988-1994 (1999)]; [B.K. Martin et al. J. Immunol. 162:6663-6670 (1999)]; [M. Kuiper et al., Adv. Exp. Med. Biol. 465:381-390 (2000)]), 또는 인간 I상 임상 실험 (H.L. Kaufman et al. Hum. Gene Ther. 11:1065-1082 (2000))에서 모델링할 수 있고, 여기서는 유전자 전달 요법을 위해 B7-1 또는 B7-2를 사용한다.

[0389] 투여는 기존의 종양 또는 감염성 질환의 치료에 제한되지 않고, 또한 개체에서 그러한 질환의 발병을 예방하거나 발병의 위험을 낮추기 위해, 즉, 예방 용도로 사용될 수 있다. 예방 백신 접종에 대한 잠재적인 후보는 암

을 발병할 위험이 큰 개체, 즉, 특정 종류의 암의 개인 또는 가족력이 있는 개체를 포함한다.

[0390] 또 다른 실시양태는 대상체의 T 세포의 활성화를 향상시키기 위한 유효량의 PD-1 길항제 또는 그를 코딩하는 핵산을 대상체에게 투여함으로써, 대상체에서 종양 침윤성 백혈구의 집단을 증가시키는 방법을 제공한다.

C. 조합 요법

[0392] 개시된 PD-1 길항제 조성물은 그를 필요로 하는 대상체에게 단독으로 또는 하나 이상의 추가의 치료제 또는 열거된 PD-1 길항제의 조합물과 조합하여 투여될 수 있다. 추가의 치료제는 치료할 병태, 장애 또는 질환에 기초하여 선택된다. 예를 들어, PD-1 길항제는 면역 반응을 향상 또는 촉진하는 기능을 하는 하나 이상의 추가의 물질과 동시-투여될 수 있다.

1. 화학요법제

[0394] PD-1 길항제는 또한 하나 이상의 추가의 치료제와 조합될 수 있다. 대표적인 치료제는 화학요법제 및 세포자멸 유도제 (pro-apoptotic agent)를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 대표적인 화학요법제는 암사크린, 블레오마이신, 부술판, 카페시타빈, 카르보플라틴, 카르무스틴, 클로람부실, 시스플라틴, 클라드리빈, 클로파라빈, 크리산타스파제, 시클로포스파미드, 시타라빈, 다카르바진, 닉티노마이신, 다우노루비신, 독세탁셀, 독소루비신, 에피루비신, 에토포시드, 플루다라빈, 플루오로우라실, 켐시타빈, 히드록시카르바미드, 이다루비신, 이포스파미드, 이리노테칸, 류코보린, 리포졸 독소루비신, 리포졸 다우노루비신, 로무스틴, 멜팔란, 메르캅토퓨린, 메스나, 메토트렉세이트, 미토마이신, 미톡산트론, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 페메트렉세드, 펜토스타틴, 프로카르바진, 랄티트렉세드, 사트라플라틴, 스트렙토조신, 테가푸르-우라실, 테모졸로미드, 테니포시드, 티오태파, 티오구아닌, 토포테칸, 트레오술판, 빙글라스틴, 빙크리스틴, 빈데신, 비노렐빈 또는 이들의 조합물을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 대표적인 세포자멸 유도제는 플루다라빈우로스포린, 시클로헥시미드, 악티노마이신 D, 락토실세라미드, 15d-PGJ(2) 및 이들의 조합물을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0395] 특정 실시양태에서, 대상체에서 면역 반응을 증가 또는 향상시키기 위해 1종 초과의 PD-1 길항제가 조합으로 사용될 수 있다.

2. 면역 반응을 향상시키는 융합 단백질

[0397] 다른 실시양태에서, PD-1 길항제는 면역 반응을 향상시키는 다른 B7 패밀리 보조자극 분자를 함유하는 조성물과 동시에-투여될 수 있다. 다른 B7 보조자극 폴리펩티드는 임의의 종에서 기원할 수 있다. 한 실시양태에서, 보조자극 폴리펩티드는 포유동물 종의 것이다. 바람직한 실시양태에서, 보조자극 폴리펩티드는 뮤린 또는 인간 기원의 것이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드는 B7.1이다. 유용한 추가의 인간 B7 폴리펩티드는 GenBank 기탁 번호 U04343을 갖는 핵산에 의해 코딩되는 B7-2 폴리펩티드; 또는 GenBank 기탁 번호 NP_071436을 갖는 핵산에 의해 코딩되는 B7-H5 폴리펩티드에 적어도 약 80, 85, 90, 95 또는 100%의 서열 동일성을 가진다. B7-H5는 또한 PCT 공개 WO 2006/012232에 개시되어 있다.

[0398] 바람직한 실시양태에서, 추가의 B7 패밀리 분자는 본원에 기재된 바와 같은 가용형 융합 단백질로서 제공된다. 이량체 또는 다량체를 형성하는 B7 분자의 가용형 융합 단백질은 그들의 동족 수용체에 가교결합하는 능력을 갖고 따라서 수용체 효능제로서 기능을 한다.

[0399] 한 실시양태에서, 제1 융합 파트너는 B7 패밀리 분자의 단편, 예를 들어 비제한적으로 B7-1, B7-2, 또는 B7-H5이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, B7 분자의 단편은 전장 단백질의 보다 짧은 폴리펩티드인 폴리펩티드의 임의의 하위세트를 나타낸다. 유용한 단편은 그들의 천연 리간드에 결합하는 능력을 보유하는 것이다. 전장 B7 분자의 단편인 B7 폴리펩티드는 일반적으로 전장 B7 분자에 비해 그의 천연 리간드(들)에 결합하는 능력의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 100%, 또는 심지어 100% 초과의 능력을 가진다.

[0400] B7 폴리펩티드의 단편은 가용형 단편을 포함한다. 가용형 B7 폴리펩티드 단편은 생산 세포로부터 흘러나오거나 분비되거나 달리 추출될 수 있는 B7 폴리펩티드의 단편이다. B7 폴리펩티드의 가용형 단편은 수용체 폴리펩티드의 세포외 도메인의 일부 또는 전부를 포함하고, 세포내 및/또는 막횡단 도메인의 일부 또는 전부가 결여된다. 한 실시양태에서, B7 폴리펩티드 단편은 B7 폴리펩티드의 전체 세포외 도메인을 포함한다. 다른 실시양태에서, B7 폴리펩티드의 가용형 단편은 B7 생물학적 활성을 보유하는 세포외 도메인의 단편을 포함한다. 세포외 도메인은 막횡단 도메인으로부터 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산을 포함할 수 있는 것이 이해될 것이다. 별법으로, 세포외 도메인은 C-말단, N-말단, 또는 둘 모두로부터 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산이 제거

될 수 있다.

[0401] 일반적으로, B7 폴리펩티드 또는 그의 단편은 신호 서열을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산으로부터 발현된다. 신호 서열은 일반적으로 미성숙 폴리펩티드로부터 제거되어, 신호 서열이 결여되는 성숙 폴리펩티드를 생성시킨다. B7 폴리펩티드의 신호 서열은 폴리펩티드의 발현 수준, 분비, 용해도, 또는 다른 특성에 영향을 미치도록 표준 문자 생물학 기술을 이용하여 다른 폴리펩티드의 신호 서열로 교체될 수 있음이 이해될 것이다. 신호 서열을 교체하기 위해 사용되는 신호 서열은 당업계에 공지된 임의의 것일 수 있다.

[0402] B7 문자 융합 폴리펩티드는 야생형 폴리펩티드 서열에 비해 하나 이상의 아미노산의 결실, 치환, 삽입, 또는 재배열을 함유하도록 돌연변이된 변이체 폴리펩티드를 포함한다. 유용한 변이체 B7 융합 단백질은 수용체 폴리펩티드에 결합하는 능력을 보유하는 것이다. 변이체 B7 융합 폴리펩티드는 일반적으로 전장 B7 문자에 비해 B7 수용체 폴리펩티드에 결합하는 능력의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 100%, 또는 심지어 100% 초과의 능력을 가진다.

[0403] 변이체 B7-H5 융합 폴리펩티드는 아미노산 치환, 결실 또는 삽입의 임의의 조합을 가질 수 있다. 변이체 폴리펩티드는 제1 융합 파트너, 제2 폴리펩티드, 및/또는 선택적인 링커 펩티드 서열 내에 하나 이상의 아미노산 결실, 치환, 삽입, 또는 재배열을 함유할 수 있다.

D. 조합 요법

[0405] PD-1 길항제 조성물은 그를 필요로 하는 대상체에게 단독으로 또는 하나 이상의 추가의 치료제와 조합하여 투여될 수 있다. 추가의 치료제는 치료할 병태, 장애 또는 질환에 기초하여 선택된다. 예를 들어, PD-1 길항제는 면역 반응을 항상 또는 촉진하는 기능을 하는 하나 이상의 추가의 물질과 동시-투여될 수 있다.

E. 입양 전달

[0407] 입양 T-세포 요법은 확립된 종양이 있는 환자의 치료를 위한 유망한 전략이지만, 종종 생체외 배양을 위한 T 세포의 공급원인 종양-침윤성 림프구를 얻을 수 있는 특정한 암에 제한된다. 한 실시양태에서 항원 특이적 T 세포의 입양 T-세포 요법과 조합으로, 종양 세포에서 PD-1 수용체 매개된 신호 전달을 억제 또는 감소시키는 유효량의 PD-1에 대한 길항제를 투여함으로써, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 입양 T-세포 전달은 PD-1의 길항제의 투여 전에 또는 투여 후에 대상체에게 투여되거나, 생체 외에서 세포에 첨가될 수 있다.

[0408] 항원-특이적 T-세포주는 항원을 사용한 시험관내 자극 후에, CD3/CD28 비드 상에서 비특이적 팽창에 의해 생성될 수 있다. 항원-특이적 T 세포를 팽창시키는 능력은 IFN-감마 및 그랜자임 B 효소 연결 면역흡착 스폿(spot)을 이용하여 평가할 수 있다. FOXP3-발현 CD4(+) T 세포의 존재를 포함한, 생성되는 T-세포주의 표현형은 유동 세포 측정에 의해 평가할 수 있다. 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 항원-특이적 T 세포 집단의 증폭은 대체로 IL-2의 존재 하에 최적 길이 항원성 펩티드를 사용한 반복된 시험관내 자극을 통해 수행된다. 특이적 T 세포 팽창을 모니터링하기 위해 흔히 사용된 크롬 방출 분석에서 밝혀진 바와 같이, 림포카인-활성화된 킬러 세포의 활성화/팽창을 피하기 위해 저용량의 IL-2 (10 내지 50 U/ml)가 전통적으로 사용되었다. 항원성 펩티드의 농도는 0.1-10 μM일 수 있다.

1. 종양-특이적 및 종양 연관 항원

[0410] T 세포를 팽창시키기 위해 유용한 항원은 치료할 대상체로부터 종양의 생검에서 얻을 수 있다. 항원은 종양 생검으로부터 생화학적으로 정제될 수 있다. 별법으로, 항원은 재조합 폴리펩티드일 수 있다. 종양에 의해 발현되는 항원은 종양에 특이적일 수 있거나, 비-종양 세포에 비해 종양 세포에서 더 높은 수준으로 발현될 수 있다. 암 세포에 의해 독특하게 발현되거나 적절한 대조군에 의해 악성 병태가 있는 대상체에서 현저하게 더 높은 수준으로 존재하는 (예를 들어, 통계학상 유의한 방식으로 상승된) 항원성 마커, 예를 들어 종양 연관 항원으로서 알려진 혈청학상 규정된 마커가 특정한 실시양태에서 사용하기 위해 고려된다.

[0411] 종양 연관 항원은 예를 들어, 세포 종양유전자-코딩된 산물 또는 비정상적으로 발현된 원-종양유전자-코딩된 산물 (예를 들어, neu, ras, trk, 및 kit 유전자에 의해 코딩된 산물), 또는 돌연변이된 형태의 성장 인자 수용체 또는 수용체-유사 세포 표면 문자 (예를 들어, c-erb B 유전자에 의해 코딩된 표면 수용체)를 포함할 수 있다. 다른 종양 연관 항원은 형질전환 사건에 직접 관여할 수 있는 문자, 또는 종양발생성 형질전환 사건에 직접 관여하지 않을 수 있지만 종양 세포에 의해 발현되는 문자 (예를 들어, 암배아 항원, CA-125, 흑색종 연관 항원 등)을 포함한다 (예를 들어, 미국 특허 6,699,475; [Jager, et al., Int. J. Cancer, 106:817-20 (2003)]; [Kennedy, et al., Int. Rev. Immunol., 22:141-72 (2003)]; [Scanlan, et al. Cancer Immunol., 4:1 (2004)])

참조).

[0412] 세포 종양 연관 항원을 코딩하는 유전자는 비정상적으로 발현된 세포 종양유전자 및 원-종양유전자를 포함한다. 일반적으로, 세포 종양유전자는 세포의 형질전환에 직접 관련되는 산물을 코딩하고, 이 때문에 이들 항원은 면역요법을 위해 특히 바람직한 표적이다. 그 예는 종양발생성 형질전환에 관여되는 세포 표면 분자를 코딩하는 종양 형성 neu 유전자이다. 다른 예는 ras, kit, 및 trk 유전자를 포함한다. 원-종양유전자 (종양유전자를 형성하도록 돌연변이되는 정상 유전자)의 산물은 비정상적으로 발현될 (예를 들어, 과다발현될) 수 있고, 이러한 비정상적인 발현은 세포 형질전환에 관련될 수 있다. 따라서, 원-종양유전자에 의해 코딩된 산물이 표적화될 수 있다. 일부 종양유전자는 종양 세포 표면 상에서 발현되는 성장 인자 수용체 분자 또는 성장 인자 수용체-유사 분자를 코딩한다. 한 예는 c-erbB 유전자에 의해 코딩되는 세포 표면 수용체이다. 다른 종양 연관 항원은 악성 형질전환에 직접 관여할 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 그러나, 이들 항원은 특정한 종양 세포에 의해 발현되고, 따라서 효과적인 표적을 제공할 수 있다. 일부 예는 암배아 항원 (CEA), CA 125 (난소 암종과 연관됨), 및 흑색종 특이적 항원이다.

[0413] 난소 및 다른 암종에서, 예를 들어, 종양 연관 항원은 쉽게 입수된 생물학적 유체, 예를 들어 혈청 또는 점막 분비의 샘플 내에서 검출가능하다. 하나의 그러한 마커는 CA125 (그가 혈청 내에서 검출가능한 장소인 혈류 내로 또한 흘러나오는 암종 연관 항원)이다 (예를 들어, 문헌 [Bast, et al., N. Eng. J. Med., 309:883 (1983)]; [Lloyd, et al., Int. J. Canc., 71:842 (1997)]). 혈청 및 다른 생물학적 유체 내의 CA125 수준은 난소 및 다른 암종의 진단 및/또는 예후 프로필을 제공하기 위해 다른 마커, 예를 들어, 암배아 항원 (CEA), 편평 세포 암종 항원 (SCC), 조직 폴리펩티드 특이적 항원 (TPS), 시알릴 TN 뮤신 (STN), 및 태반 알칼린 포스파타제 (PLAP)의 수준과 함께 측정되었다 (예를 들어, 문헌 [Sarandakou, et al. Acta Oncol., 36:755 (1997)]; [Sarandakou, et al., Eur. J. Gynaecol. Oncol., 19:73 (1998)]; [Meier, et al., Anticancer Res., 17(4B):2945 (1997)]; [Kudoh, et al., Gynecol. Obstet. Invest., 47:52 (1999)]). 상승된 혈청 CA125는 또한 신경모세포종을 동반할 수 있는 반면 (예를 들어, [Hirokawa, et al., Surg. Today, 28:349 (1998)]), 상승된 CEA 및 SCC는 특히 결장직장암을 동반할 수 있다 (Gebauer, et al., Anticancer Res., 17(4B):2939 (1997)).

[0414] 모노클로날 항체 K-1과의 반응성에 의해 규정된 종양 연관 항원인 메소텔린은 대다수의 편평 세포 암종, 예를 들어 상피 난소, 경부, 및 식도 종양 상에 및 중피종 상에 존재한다 ([Chang, et al., Cancer Res., 52:181 (1992)]; [Chang, et al., Int. J. Cancer, 50:373 (1992)]; [Chang, et al., Int. J. Cancer, 51:548 (1992)]; [Chang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:136 (1996)]; [Chowdhury, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:669 (1998)]). MAb K-1을 사용하여, 메소텔린은 세포-연관 종양 마커로서만 검출가능하고, 난소암 환자로부터의 혈청 내에서 또는 OVCAR-3 세포에 의해 조건화된 배지 내에서 가용형 형태로 발견되지 않았다 (Chang, et al., Int. J. Cancer, 50:373 (1992)). 그러나, 구조상 관련된 인간 메소텔린 폴리펩티드는 또한 종양 연관 항원 폴리펩티드, 예를 들어 구별되는 메소텔린 관련 항원 (MRA) 폴리펩티드를 포함하고, 이는 악성종양이 있는 환자로부터의 생물학적 유체 내에서 자연 발생하는 가용형 항원으로서 검출가능하다.

[0415] 종양 항원은 세포 표면 분자를 포함할 수 있다. 알려지거나 설명된 기능을 갖는 공지의 구조의 종양 항원은 상기한 것을 참조한다.

2. 종양 신생혈관과 연관된 항원

[0416] 단백질 치료제는 종양 투과에 비효율적이기 때문에 종양을 치료하는데 무효할 수 있다. 종양 연관 신생혈관은 그를 통해 단백질 치료제가 종양에 접근할 수 있는 쉽게 접근가능한 경로를 제공한다. 다른 실시양태에서, 융합 단백질은 종양과 연관된 신생혈관에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하는 도메인을 함유한다.

[0417] 항원은 종양 신생혈관에 특이적일 수 있거나, 정상 혈관에 비교할 때 종양 신생혈관에서 보다 높은 수준으로 발현될 수 있다. 정상 혈관에 비교할 때 종양 연관 신생혈관에 의해 과다발현되는 예시적인 항원은 VEGF/KDR, Tie2, 혈관세포 부착 분자 (VCAM), 엔도글린 및 $\alpha_5\beta_3$ 인테그린/비트로넥틴을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 정상 혈관에 비교할 때 종양 연관 신생혈관에 의해 과다-발현되는 다른 항원은 당업자에게 공지되어 있고, 개시된 융합 단백질에 의한 표적화에 적합하다.

실시예

[0420] 본 발명은 다음 비-제한적인 실시예를 참조하여 추가로 이해될 수 있다.

실시예 1: PD-1에 대한 B7-DC 결합

[0422] 인간 B7-DC-Ig의 PD-1 결합 활성을 ELISA에 의해 평가하였다. 96-웰 ELISA 플레이트를 2시간 동안 BupH 탄산 염/중탄산염 pH 9.4 버퍼 (피어스 (Pierce)) 내에 희석시킨 100 μ L 0.75 μ g/mL 재조합 인간 PD-1/Fc (알앤디 시스템즈 (R&D Systems))으로 코팅한 후, BSA 용액 (잭슨 이뮤노리서치 (Jackson ImmunoResearch))으로 90-120 분 동안 차단하였다. 연속 희석시킨 인간 B7-DC-Ig 및 인간 IgG1 이소형 대조군을 90분 동안 결합시켰다. 결합된 B7-DC-Ig는 100 μ L의 0.5 μ g/mL 비오틴 접합된 항-인간 B7-DC 클론 MIH18 (이바이오사이언스 (eBioscience))에 이어, 1:1000 희석된 HRP-스트렙타비딘 (비디 바이오사이언스 (BD Bioscience)) 및 TMB 기질 (BioFX)을 사용하여 검출하였다. 450 nm에서 흡광도는 플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이시스 (Molecular Devices))를 사용하여 판독하고, 데이터는 4-파라미터 로지스틱 피트 (logistic fit)를 이용하여 SoftMax에서 분석하였다.

[0423] 뮤린 B7-DC-Ig의 PD-1 결합 활성을 ELISA에 의해 평가하였다. 96-웰 ELISA 플레이트를 2시간 동안 BupH 탄산 염/중탄산염 pH 9.4 버퍼 (피어스) 내에 희석시킨 100 μ L 0.75 μ g/mL 재조합 마우스 PD-1/Fc (알앤디 시스템즈)로 코팅한 후, BSA 용액 (캔더-바이오사이언스 (Candor-Bioscience))으로 90분 동안 차단시켰다. 연속 희석시킨 뮤린 B7-DC-Ig (야생형, 및 PD-1에 대한 감소된 결합에 대해 선택된 D111S 및 K113S 돌연변이체) 및 뮤린 IgG2a 이소형 대조군을 90분 동안 결합시켰다. 결합된 B7-DC-Ig를 100 μ L의 0.25 μ g/mL 비오틴 접합된 항-마우스 B7-DC 클론 112 (이바이오사이언스)에 이어 1:2000 희석된 HRP-스트렙타비딘 (비디 바이오사이언스) 및 TMB 기질 (BioFX)을 사용하여 검출하였다. 450 nm에서 흡광도는 플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이시스)를 사용하여 판독하고, 데이터는 4-파라미터 로지스틱 피트를 이용하여 SoftMax에서 분석하였다.

[0424] 도 1A 및 1B는 PD-1 결합 ELISA에서 OD450 대 B7-DC-Ig의 양 (μ g/ml)의 선 그래프를 보여준다. 도 4A 1A는 4 개의 상이한 로트의 인간 B7-DC-Ig의 결합을 보여준다. 도 4B 1B는 야생형 뮤린 B7-DC-Ig (원), DS 돌연변이체 (D111S 치환을 가진 B7-DC-Ig; 삼각형) 및 KS 돌연변이체 (K113S 치환을 가진 B7-DC-Ig; 사각형), 및 뮤린 IgG2a 이소형 대조군 (다이아몬드형)의 결합을 보여준다.

실시예 2: PD-1 발현 CHO 세포에 대한 B7-DC 결합

[0425] B7-DC-Ig를 먼저 알로피코시아닌 (APC)과 접합시킨 후, 다양한 농도에서 PD-1을 구성적으로 발현하는 CHO 세포 주 또는 PD-1을 발현하지 않는 모 CHO 세포와 함께 인큐베이팅하였다. 결합을 유동 세포 측정에 의해 분석하였다. 도 2는 B7-DC-Ig-APC의 중간 형광 강도 (MFI) (y-축)를 프로브의 농도 (x-축)의 함수로서 보여준다. B7-DC-Ig-APC는 CHO.PD-1 세포에 결합하지만 (속이 찬 원), 형질감염되지 않은 CHO 세포에 결합하지 않는다 (회색 삼각형).

실시예 3: B7-DC-Ig는 PD-1에 대한 결합을 위해 B7-H1과 경쟁한다.

[0426] B7-H1-Ig를 먼저 알로피코시아닌 (APC)과 접합시켰다. 표지되지 않은 B7-DC-Ig를 다양한 농도에서 먼저 PD-1을 구성적으로 발현하는 CHO 세포주와 함께 인큐베이팅한 후, B7-H1-Ig-APC를 프로브 및 세포 혼합물에 첨가하였다. 도 3은 B7-H1-Ig-APC의 중간 형광 강도 (MFI) (y-축)를 첨가된 표지되지 않은 B7-DC-Ig 경쟁자의 농도 (x-축)의 함수로서 보여준다. 표지되지 않은 B7-DC-Ig의 농도가 증가함에 따라, CHO 세포에 결합된 B7-H1-Ig-APC의 양은 감소하고, 이것은 B7-DC-Ig가 PD-1에 대한 결합을 위해 B7-H1과 경쟁함을 입증한다.

실시예 4: P815 비만세포종 모델

[0427] 뮤린 B7-DC-Ig의 생체내 활성을 P815 비만세포종 종양 모델에서 시험하였다. P815 비만세포종 세포는 메틸콜안 트렌 (MCA) 처리 후 DBA/2 마우스로부터 유래되었다. 5×10^4 개 세포의 SC의 주사는 종양 접종 약 35일 후에 사망을 일으킬 수 있다.

[0428] DBA/2 마우스 (6-10주령, 암컷)에게 먼저 옆구리에 SC 주사한 5×10^4 개의 살아있는 P815 세포를 접종하였다. 6일 후에, 마우스를 IP 주사를 통해 뮤린 B7-DC-Ig로 처리하였다. 도 4에 제시된 투약 요법은 주사당 100 μ g의 뮤린 B7-DC-Ig (약 5 mg/kg)을 매주 2회 6회까지의 투여이었다. 대조군은 비히를 단독으로 또는 뮤린 IgG로 처리하였다. 종양 크기를 2-3일마다 디지털 캘리퍼스 (digital calipers)로 측정하였다. 미국 적십자 (ARC; 앰플리언 (AmpImmune)의 사육장 지역)의 동물 실험 윤리 위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee: IACUC)에서 승인된 프로토콜에 따라 마우스를 그들의 종양 크기가 1000 mm^3 에 도달하거나 그를 초과

할 때 안락사시키고 죽은 것으로 규정하였다. 생존하는 종양이 없는 마우스에게 제52일에 P815 종양 세포를 재접종하였다.

[0432] 표 1 및 도 4에 제시된 바와 같이, 비히클 또는 대조군 마우스 IgG로 처리한 모든 마우스는 그들의 종양 부피가 IACUC 한계에 도달하였으므로 제38일에 안락사를 필요로 하였다. 5마리의 뮤린 B7-DC-Ig 처리된 마우스 중 4마리가 처리에 반응하였고: 2마리의 마우스에서 종양은 균질되었고, 2마리의 추가의 마우스는 뮤린 B7-DC-Ig 처리 동안 지연된 종양 성장을 보였다.

표 1

P815 종양 모델 결과

군	처리	종양이 없는 마우스 수	종양 $< 500 \text{ mm}^3$ 의 수	종양 $\geq 500 \text{ mm}^3$ 의 수
A	비히클 대조군	0	0	5
B	마우스 IgG 대조군	0	0	5
C	뮤린 B7-DC-Ig (5 mg/kg IP biw, 제6일에 시작하여 3주)	2	2	1

[0433]

[0434] 도 5A-C는 뮤린 B7-DC-Ig를 사용하여 마우스에서 종양 균절을 보여준다. 이어서, 종양이 없는 마우스에게 제52일에 1차 접종 부위 반대편의 옆구리에 투여한 5×10^4 개의 P815 세포를 재접종하였다. 마우스는 1차 접종 후 74일에 걸쳐 종양이 없게 유지된 한편, P815 세포를 접종한 모든 나이브 (naive) 마우스는 종양을 발병하였다. 이것은 P815 세포를 접종하고 뮤린 B7-DC-Ig로 처리한 마우스가 P815 비만세포종에 대해 장기 면역성을 발달시켰음을 제안한다.

[0435]

CTX + B7-DC-Ig 요법의 원리

[0436]

뮤린 B7-DC-Ig는 단독으로 비교적 면역원성인 것으로 간주되는 P815 모델에서 효과적이지만, 보다 공격적이고 덜 면역원성인 종양 종류에 대해 최소 활성을 보인다. 본 발명자들은 인간 암 환자에서 효과적인 항-종양 면역 반응을 촉진하는 것이 어려울 것으로 예상한다.

[0437]

B7-DC-Ig 및 그의 뮤린 유사체의 활성을 개선하기 위해, 저용량의 CTX가 암 면역요법의 활성을 안전하고 효과적으로 증대함을 입증하는 연구에 기초하여 CTX를 치료 요법에 포함시켰다. 인간에서 $100 - 300 \text{ mg/m}^2$ 또는 마우스에서 20-200 mg/kg의 용량이 일반적으로 사용된다. 이들 용량은 치료 미만량이고, 직접적인 항-종양 활성을 갖지 않는다.

[0438]

암 환자에서 및 암의 뮤린 동계 및 유전자 모델에서, 저용량의 CTX는 Treg의 선택적 결핍을 일으켰다. Treg는 종양 미세환경에서 비교적 풍부하고, 항-종양 면역 반응을 억압하는데 일정 역할을 한다. 항원성 자극, 백신, 또는 시토카인을 사용한 처리 전에 CTX를 투여하면, 종양 균절을 향상시키는 보다 기능적인 항-종양 면역 반응을 촉진한다. 단일제로서 또는 암 백신 또는 시토카인과 조합하여 투여된 저용량 CTX의 많은 임상 시험은 매우 잘 허용되고, 면역 향상 및 임상 효능의 증거를 보여주었다.

[0439]

저용량 CTX를 사용한 광범위한 경험 및 안전성, 면역증강제로서 그의 특성 결정 및 앰플이문에서 생성한 데이터에 기초하여, B7-DC-Ig는 CTX 투여에 이은 B7-DC-Ig 투여로 이루어지는 표준 요법으로 투여해야 한다. 100 mg/kg의 용량을 동물 연구에서 사용하였다. CTX는 B7-DC-Ig 또는 뮤린 B7-DC-Ig 처리를 개시하기 24시간 전에 전달하였다. 메트로놈 (metronomic) CTX와 같은 대체 투약 요법이 사용될 수 있다.

[0440]

실시예 6: CT26 종양 모델

[0441]

마우스 결장직장 종양 세포주 CT26을 ATCC로부터 얻었다. 계대배양 (Passage) 4에서 마스터 (master) 세포 은행을 ATCC 지침에 따라 생성하였다. 세포를 시험하고, 미코플라스마 및 다른 병원체 오염이 없음을 확인하였다. 1개의 바이알의 종양 세포를 냉동보관 원액으로부터 해동시키고, 접종 전에 2 계대배양 동안 성장시켰다.

[0442]

CT26 세포를 2일 배양을 위해 30 mL 완전 배지 (RPMI + 10% FBS, 2 mM L-Glu, 및 1 x P/S)로 1:5 회석으로 또

는 3일 배양을 위해 30 mL 완전 배지로 1:10 희석으로 나누었다.

[0443] CT26 세포는 배지를 흡인시키고, 플라스크를 5 mL PBS로 세정하고, 5 mL 트립신을 첨가하고, 37°C에서 2 min 동안 인큐베이팅한 후, 10 mL 완전 배지로 중화시킴으로써 수거하였다. 600 x g (약 1000 rpm)에서 5 min 동안 원심분리 후에, 배지를 흡인시키고, 세포 웰렛을 10 mL 플레인 (plain) RPMI로 피펫팅함으로써 재현탁시켰다. 상기 세척 단계를 3회 반복하였다.

[0444] 접종된 세포의 세포 수 및 생존성을 적합한 희석 (예를 들어 1:5 희석, 10 μL 세포 + 40 μL 트리판 블루)으로 트리판 블루 염료 염색에 의해 분석하고, 마지막 세척 단계 동안 NOVA 세포 계수에 의해 확인하였다. 세포 생존성은 일반적으로 접종을 위해 95%보다 더 컸다.

[0445] CT26 세포를 플레인 RPMI로 초기 접종을 위해 6.7×10^5 세포/mL로 희석하고, 얼음 상에 보관하였다. 일반적으로, 각각의 마우스를 150 μL (1×10^5 세포)로 접종하였다.

[0446] 제9일에, 모든 종양 보유 마우스를 먼저 래트 케이지 내로 모으고, 마우스를 실험군으로 무작위로 나누었다. CTX 용액은 1x PBS에 의해 4 mg/mL로 재구성하였다. 마우스에게 20 g 마우스에 대해 2 mg, 즉 100 mg/kg로 0.5 mL의 CTX 용액을 복강내 (IP) 주사하였다.

[0447] 제10일에, 마우스에게 20 g 마우스에 대해 0.1 mg, 즉 5 mg/kg로 0.5 mL의 B7-DC-Ig (0.2 mg/mL)를 IP 주사하였다. 동일한 용량을 4주 동안 매주 2회, 총 8회 용량을 제공하였다. 종양을 디지털 캘리퍼스를 통해 B7-DC-Ig를 제공한 날에 시작하여 매주 2회 측정함으로써 종양 성장을 모니터링하였다. 종양 부피는 다음과 같이 계산하였다:

$$\text{종양 부피} = \pi (\text{Dshort})^2 \times (\text{Dlong}) / 6 = \text{약 } 0.52 \times (\text{Dshort})^2 \times (\text{Dlong}).$$

[0449] 마우스를 안락사시키고 종양 부피가 2000 mm³에 도달하면 또는 종양 접종 부위에 피부 궤양 및 감염이 있으면 연구로부터 제외하였다.

실시예 5: 시클로포스파미드 및 B7-DC-Ig의 조합물은 확립된 종양을 근절할 수 있다

[0451] 9 내지 11주령의 Balb/C 마우스에게 상기한 바와 같이 1.0×10^5 CT26 결장직장 종양 세포를 피하 이식하였다. 종양 이식 후 제10일에, 마우스에게 100 mg/kg의 시클로포스파미드를 제공하였다. B7-DC-Ig 처리는 1일 후인 제11일에 시작하였다. 마우스를 100 μg의 B7-DC-Ig로 매주 2회 용량으로 4주 동안, 총 8회 용량으로 처리하였다. CTX + B7-DC-Ig 치료 요법을 받은 마우스의 75%가 제44일에 확립된 종양을 근절한 반면, 대조군 CTX 단독 군 내의 모든 마우스는 종양 성장의 결과로서 죽거나, 종양이 IACUC에서 승인된 크기를 초과하였으므로 안락사 시켰다 (결과를 도 6에 제시함). 이들 결과는 단순한 예방만이 아니라 확립된 종양에 대한 치료 요법의 유효성을 입증한다.

실시예 6: 시클로포스파미드 및 B7-DC-Ig의 조합물은 확립된 종양을 근절하고, 종양 재접종에 대해 보호할 수 있다

[0453] 상기한 실험으로부터 확립된 CT26 결장직장 종양을 근절시킨 마우스에게 1×10^5 개의 CT26 세포를 제44일 및 제70일에 재접종하였다. 재접종으로부터 종양이 성장하지 않았고, 이것은 시클로포스파미드 및 B7-DC-Ig 조합 요법으로부터 장기 항-종양 면역성을 발달시켰음을 제안한다. 비히클 대조군 내의 모든 마우스는 종양을 발생하였다 (결과를 도 7에 제시함). 이들 결과는 확립된 종양에 대한 치료 요법의 유효성, 및 시클로포스파미드 및 B7-DC-Ig 조합 요법이 종양 항원에 대해 기억 반응을 생성하였음을 보여준다.

실시예 7: 시클로포스파미드 및 B7-DC-Ig의 조합물은 종양 특이적, 기억 세포독성 T 림프구를 생성할 수 있다

[0455] 상기한 실험으로부터 확립된 CT26 결장직장 종양을 근절시킨 마우스에게 2.5×10^5 개의 CT26 세포를 제44일에 재접종하였다. 7일 후에, 마우스 비장을 단리하였다. 마우스 비장세포를 골지 (Golgi) 차단제 (비디 바이오사이언스)의 존재 하에 5 또는 50 μg/mL의 난알부민 (OVA) 또는 AH1 웨티드로 6시간 동안 펄싱하였다. CD8+/IFN γ+ T 세포를 평가함으로써, 기억 T 효과기 세포를 분석하였다. 도 8의 결과는 CT26 종양을 근절시킨 마우스 내에 유의한 양의 CT26 특이적 T 효과기 세포가 존재하였음을 보여준다.

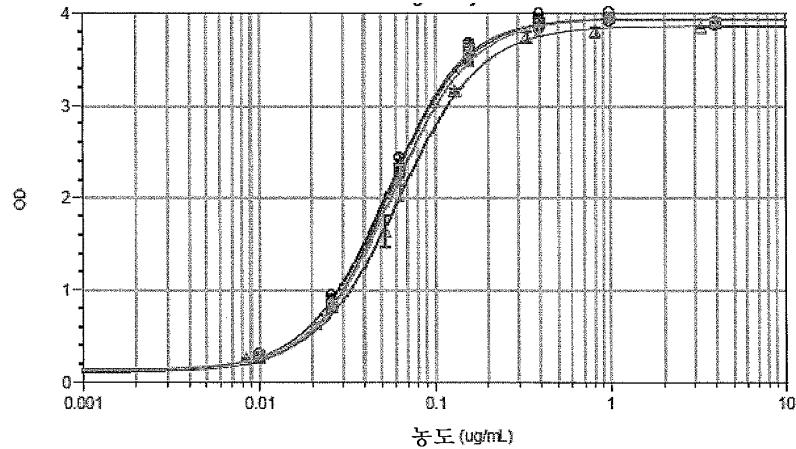
[0456] 달리 규정하지 않으면, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 학술 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 일반적

으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다.

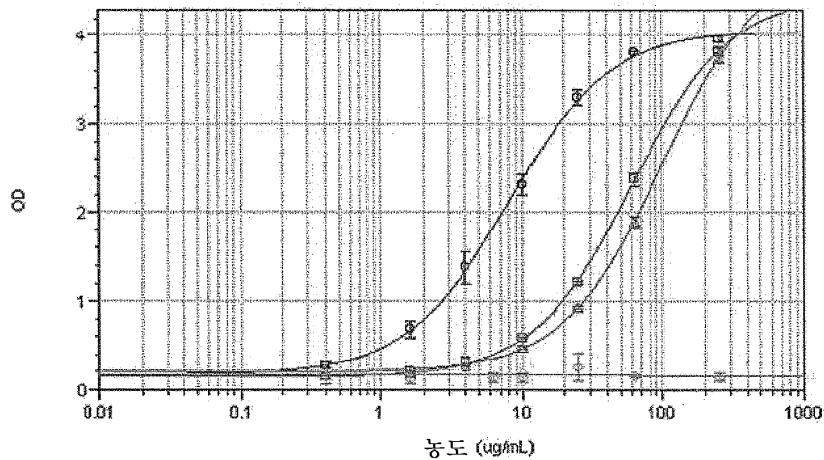
- [0457] 당업자는 단지 통상적인 실험을 통해 본원에 기재된 발명의 특정 실시양태의 많은 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 상기 균등물은 하기 특허청구범위에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

도면1

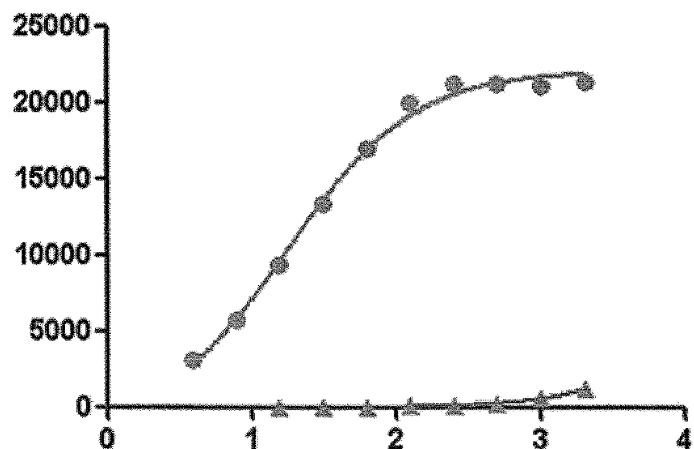


1A

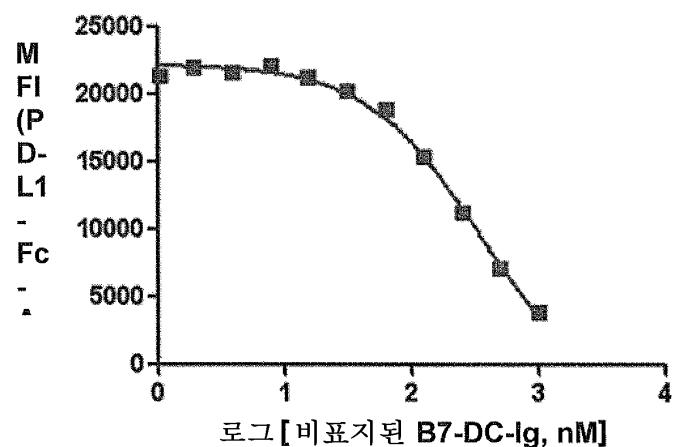


1B

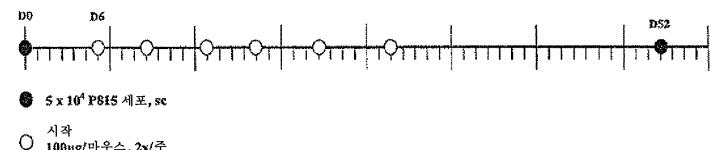
도면2



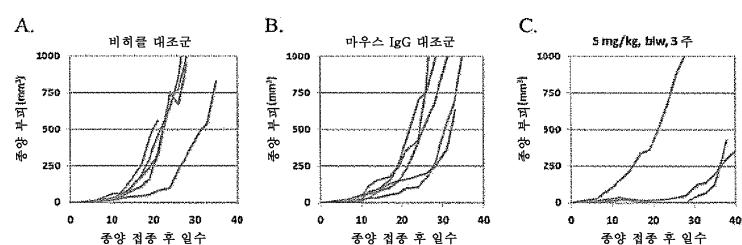
도면3



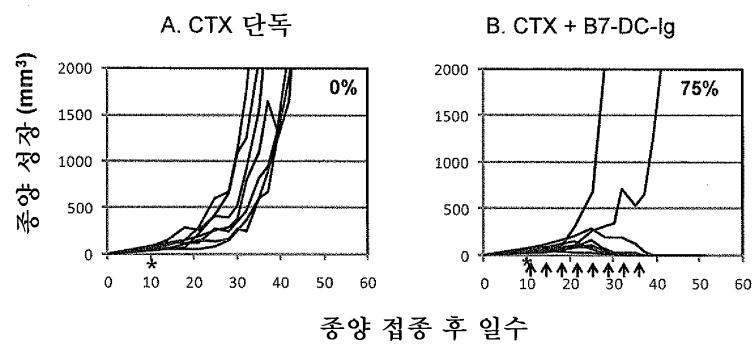
도면4



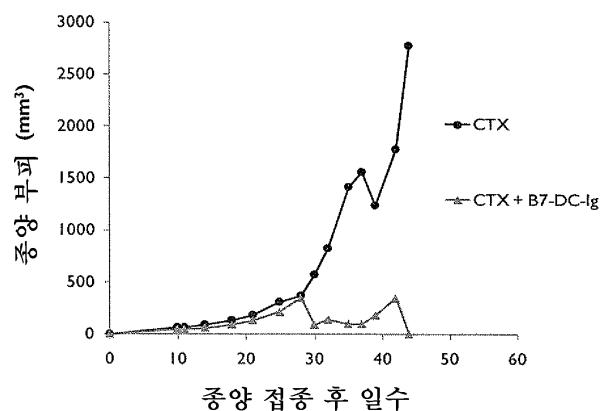
도면5



도면6

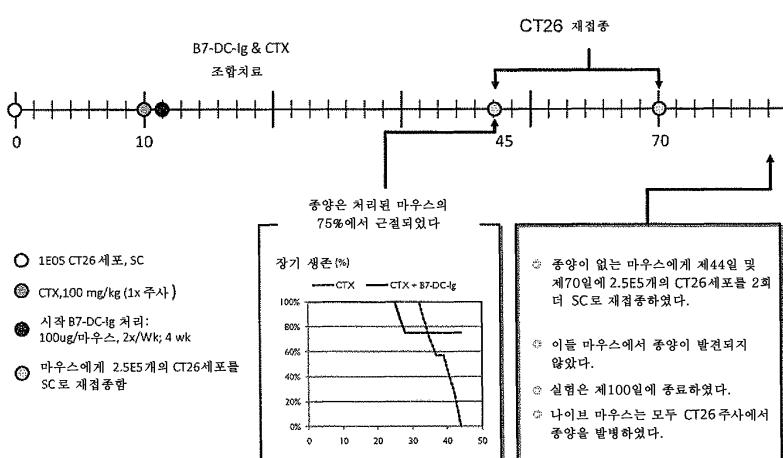


6A-B

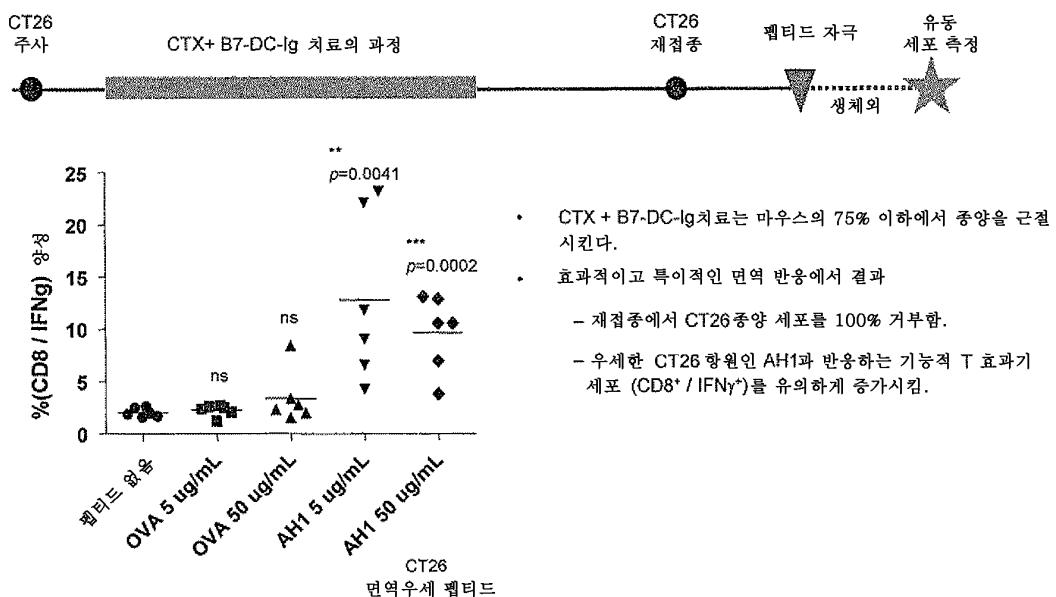


6C

도면7



도면8



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Amplimmune, Inc

Langermann, Solomon

Liu, Linda

<120> PD-1 ANTAGONISTS AND METHODS OF USE THEREOF

<130> AMP 224.P4

<140> PCT/US 09/054971

<141> 2009-08-25

<160> 60

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 247

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 1

Met Leu Leu Leu Leu Pro Ile Leu Asn Leu Ser Leu Gln Leu His Pro

1 5 10 15

Val Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val

Asp Val Gly Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gly Gln Tyr Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr

100 105 110

Lys Tyr Leu Thr Val Lys Val Lys Ala Ser Tyr Met Arg Ile Asp Thr

115 120 125

Arg Ile Leu Glu Val Pro Gly Thr Gly Glu Val Gln Leu Thr Cys Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Gln Pro Ser Arg Asn Phe Ser Cys

180 185 190

Met Phe Trp Asn Ala His Met Lys Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp

195 200 205

Pro Leu Ser Arg Met Glu Pro Lys Val Pro Arg Thr Trp Pro Leu His

210 215 220

Val Phe Ile Pro Ala Cys Thr Ile Ala Leu Ile Phe Leu Ala Ile Val

225 230 235 240

Ile Ile Gln Arg Lys Arg Ile

245

<210> 2

<211> 228

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

1 5 10 15

Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu Cys Thr Glu

20 25 30

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

35 40 45

Leu Gln Ser Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Gln Leu Pro Leu Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu

85 90 95

Thr Val Lys Val Lys Ala Ser Tyr Met Arg Ile Asp Thr Arg Ile Leu

100 105 110

Glu Val Pro Gly Thr Gly Glu Val Gln Leu Thr Cys Gln Ala Arg Gly

115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Gln Asn Val Ser Val Pro Ala Asn

130 135 140

Thr Ser His Ile Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val

145 150 155 160

Leu Arg Leu Lys Pro Gln Pro Ser Arg Asn Phe Ser Cys Met Phe Trp

165 170 175

Asn Ala His Met Lys Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp Pro Leu Ser

180 185 190

Arg Met Glu Pro Lys Val Pro Arg Thr Trp Pro Leu His Val Phe Ile

195 200 205

Pro Ala Cys Thr Ile Ala Leu Ile Phe Leu Ala Ile Val Ile Ile Gln

210 215 220

Arg Lys Arg Ile

225

<210> 3

<211> 273

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln

1 5 10 15

Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile

20 25 30

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

35 40 45

His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn

50 55 60

Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr

100 105 110

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

115 120 125

His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln

130 135 140

Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys

180 185 190

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

195 200 205

Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His

210	215	220
Ile Phe Ile Pro Phe Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val		
225	230	235
		240
Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp		
245	250	255
Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala		
260	265	270
Ile		
<210> 4		
<211> 254		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 4		
Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly		
1	5	10
Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn		
20	25	30
Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser		
35	40	45
Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly		
50	55	60
Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln		
65	70	75
Tyr Gln Cys Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu		
85	90	95
Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu		
100	105	110
Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly		
115	120	125
Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn		
130	135	140

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

145 150 155 160

Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp

165 170 175

Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser

180 185 190

Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His Ile Phe Ile

195 200 205

Pro Phe Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val Ile Ala Leu

210 215 220

Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Thr Thr Lys

225 230 235 240

Arg Pro Val Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala Ile

245 250

<210> 5

<211> 273

<212> PRT

<213> Cynomolgus sp

<400> 5

Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln

1 5 10 15

Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile

20 25 30

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

35 40 45

His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn

50 55 60

Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr
 100 105 110

Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr
 115 120 125

His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln
 130 135 140

Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val
 145 150 155 160

Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
 165 170 175

Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys
 180 185 190

Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp
 195 200 205

Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His
 210 215 220

Ile Phe Ile Pro Ser Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val
 225 230 235 240

Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp
 245 250 255

Ala Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala
 260 265 270

Ile

<210> 6

<211> 254

<212> PRT

<213> Cynomolgus sp

<400> 6

Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly

1 5 10 15

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

20	25	30
Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser		
35	40	45
Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly		
50	55	60
Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln		
65	70	75
Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu		
85	90	95
Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu		
100	105	110
Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly		
115	120	125
Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn		
130	135	140
Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val		
145	150	155
Leu Arg Leu Lys Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp		
165	170	175
Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser		
180	185	190
Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His Ile Phe Ile		
195	200	205
Pro Ser Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val Ile Ala Leu		
210	215	220
Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Ala Thr Lys		
225	230	235
Arg Pro Val Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala Ile		
245	250	
<210> 7		
<211> 290		

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Met Arg Ile Phe Ala Gly Ile Ile Phe Thr Ala Cys Cys His Leu Leu

1 5 10 15

Arg Ala Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr

20 25 30

Gly Ser Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu

35 40 45

Asp Leu Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Phe Arg Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn

85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr

100 105 110

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

115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp

130 135 140

Pro Ala Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro

145 150 155 160

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

165 170 175

Lys Arg Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val

180 185 190

Thr Ser Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys

195 200 205

Thr Phe Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile

210 215 220

Ile Pro Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg Thr His Trp

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Val Leu Leu Gly Ser Ile Leu Leu Phe Leu Ile Val Val Ser Thr Val

245	250	255	
-----	-----	-----	--

Leu Leu Phe Leu Arg Lys Gln Val Arg Met Leu Asp Val Glu Lys Cys

260	265	270	
-----	-----	-----	--

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

275	280	285	
-----	-----	-----	--

Glu Thr

290

<210> 8

<211> 272

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

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

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

Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu Asp Leu

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

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

35	40	45	
----	----	----	--

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

50	55	60	
----	----	----	--

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

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

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

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

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

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

Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp Pro Ala

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

Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Glu Ala

130	135	140
Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly Lys Arg		
145	150	155
Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val Thr Ser		
165	170	175
Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys Thr Phe		
180	185	190
Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile Ile Pro		
195	200	205
Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg Thr His Trp Val Leu		
210	215	220
Leu Gly Ser Ile Leu Leu Phe Leu Ile Val Val Ser Thr Val Leu Leu		
225	230	235
Phe Leu Arg Lys Gln Val Arg Met Leu Asp Val Glu Lys Cys Gly Val		
245	250	255
Glu Asp Thr Ser Ser Lys Asn Arg Asn Asp Thr Gln Phe Glu Glu Thr		
260	265	270
<210> 9		
<211> 290		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 9		
Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu		
1	5	10
Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr		
20	25	30
Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu		
35	40	45
Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile		
50	55	60
Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser		
65	70	75
60		
80		

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

85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr

100 105 110

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

115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val

130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr

145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser

165 170 175

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

180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr

195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu

210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His

225 230 235 240

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

245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys

260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu

275 280 285

Glu Thr

290

<210> 10

<211> 272

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

260 265 270
 <210> 11
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 11

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

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

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

Ser Trp Leu Glu Asn Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile

180 185 190

Ser Gln Asp Pro Glu Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp

195 200 205

Phe Asn Thr Thr Arg Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly

210 215 220

Asp Ala His Val Ser Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp

225 230 235 240

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

245 250 255

Ala Val Ile Thr Val Val Val Ile Val Val Ile Ile Lys Cys Phe Cys

260 265 270

Lys His Arg Ser Cys Phe Arg Arg Asn Glu Ala Ser Arg Glu Thr Asn

275 280 285

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

290 295 300

Phe Leu

305

<210> 12

<211> 269

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65	70	75	80
Ser Cys Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr Tyr Glu Val Lys His			
85	90	95	
Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser Ile Lys Ala Asp Phe Ser Thr Pro Asn			
100	105	110	
Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ala Asp Thr Lys Arg Ile Thr Cys			
115	120	125	
Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe Ser Trp Leu Glu Asn			
130	135	140	
Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile Ser Gln Asp Pro Glu			
145	150	155	160
Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp Phe Asn Thr Thr Arg			
165	170	175	
Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly Asp Ala His Val Ser			
180	185	190	
Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Ser Lys			
195	200	205	
Asn Thr Leu Val Leu Phe Gly Ala Gly Phe Gly Ala Val Ile Thr Val			
210	215	220	
Val Val Ile Val Val Ile Ile Lys Cys Phe Cys Lys His Arg Ser Cys			
225	230	235	240
Phe Arg Arg Asn Glu Ala Ser Arg Glu Thr Asn Asn Ser Leu Thr Phe			
245	250	255	
Gly Pro Glu Glu Ala Leu Ala Glu Gln Thr Val Phe Leu			
260	265		
<210> 13			
<211> 288			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 13			
Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr			
1	5	10	15

Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys

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

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

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

Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr

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

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

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

Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg

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

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

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

Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu

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

Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp

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

Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met

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

Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg

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

Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Asp Asn Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly

245	250	255
-----	-----	-----

Ile Phe Val Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg

260	265	270
Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val		
275	280	285
<210> 14		
<211> 254		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 14		
Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys		
1	5	10
Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp		
20	25	30
Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn		
35	40	45
Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn		
50	55	60
Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr		
65	70	75
Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His		
85	90	95
Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser		
100	105	110
Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys		
115	120	125
Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn		
130	135	140
Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu		
145	150	155
Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr		
165	170	175
Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn		

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

245	250	
<210> 15		
<211> 288		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 15		
Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln		
1	5	10
Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp		
20	25	30
Asn Pro Pro Thr Phe Phe Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp		
35	40	45

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

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

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
 145 150 155 160
 Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
 165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
 180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
 195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
 210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
 225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
 245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
 260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
 275 280 285

<210> 16

<211> 288

<212> PRT

<213> Cynomolgus sp

<400> 16

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

1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Glu Ser Pro Asp Arg Pro Trp
 20 25 30

Asn Ala Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Leu Val Thr Glu Gly Asp
 35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Ala Ser Glu Ser Phe Val
 50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu

275 280 285

<210> 17

<211> 663

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

ccattgggaa	aggcctctt	tcataccct	caggtgcagg	tgcggatga	ggcacagta	300
cagtgcatta	ttatctacgg	cgtggcttgg	gattacaagt	atctgaccct	gaaggtgaaa	360
gcgtcctatc	ggaaaattaa	cactcacatt	cttaaggtgc	cagagacgga	cgaggtggaa	420
ctgacatgcc	aagccacccgg	ctaccgttg	gcagaggtca	gctggccaa	cgtgagcgt	480
cctgctaaca	cttctcatc	taggacaccc	gagggcctct	accaggttac	atccgtgctc	540
cgccctaaac	cgcggccagg	ccgaaattt	agttgcgtgt	tttggaaatac	ccacgtgcga	600
gagctgatc	tgcgtat	tgtatgcag	tcccgatgg	agccacggac	tcatccaact	660

t_{gg} 663

<210> 18

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln

1 5 10 15

Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile I

20 25 30

Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu

35

40

45

Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr

50

55

60

Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu

65 70 75 80

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

85

90

95

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

100	105	110
Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His		
115	120	125
Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile		
130	135	140
Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys		
145	150	155
Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr		
165	170	175
Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu		
180	185	190
Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg		
195	200	205
Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro		
210	215	220
Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg		
225	230	235
Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg		
245	250	255
Thr His Pro Thr Trp		
260		
<210> 19		
<211> 202		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 19		
Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly		
1	5	10
Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn		
20	25	30
Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser		

35	40	45
Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly		
50	55	60
Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln		
65	70	75
Tyr Gln Cys Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu		
85	90	95
Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu		
100	105	110
Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly		
115	120	125
Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn		
130	135	140
Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val		
145	150	155
Leu Arg Leu Lys Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp		
165	170	175
Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser		
180	185	190
Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp		
195	200	
<210> 20		
<211> 294		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 20		
tttactgtga ccgtgccaaa agaactgtat atcattgagc acgggtccaa tgtgaccctc 60		
gaatgttaact ttgacacccgg cagccacgtt aacctggggg ccatcaactgc cagcttgcaa 120		
aaagttagaa acgacacttc acctcacccgg gagaggccaa ccctcttgaa ggagcaactg 180		
ccattggga aggccctcctt tcatatccct caggtgcagg ttcggtatga gggacagtac 240		
cagtgcatta ttatctacgg cgtggcttgg gattacaagt atctgaccct gaag 294		
<210> 21		

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly Lys

50 55 60

Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Lys

<210> 22

<211> 663

<212> DNA

<213> Cynomolgus sp

<400> 22

atgatcttcc tcctgcta at gttgagcctg gaattgcagc tt caccagat agcagctta 60

ttcacagtga cagtccctaa ggaactgtac ata atagagc atggcagcaa tgtgaccctg 120

gaatgcaact ttgacactgg aagtcatgtg aaccttggag caataacagc cagttgcaa 180

aagggtggaaa atgatacatc cccacaccgt gaaagagcca ct tgcgtgga ggagcagctg 240

ccccttaggga aggctcggtt ccacataacct caagtccaag tgagggacga aggacagtac 300

caatgcataa tcatctatgg ggtcgccctgg gactacaagt acctgactct gaaagtcaaa 360

gcttcctaca ggaaaataaa cactcacatc ctaaagggtc cagaaacaga tgaggtagag 420

ctcacctgcc aggctacagg ttatcctctg gcagaagtat cctggccaaa cg tcagcgtt 480

cctgccaaca ccagccactc caggaccctc gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg 540

cgccctaaagc cacccctgg cagaaacttc agctgtgtt tctggaatac tcacgtgagg 600
 gaaccttactt tgccagcat tgaccaa agtcagatgg aaccaggac ccatccaact 660
 tgg 663

<210> 23

<211> 221

<212> PRT

<213> Cynomolgus sp

<400>

> 23

Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln

1 5 10 15

Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile

20 25 30

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

35 40 45

His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn

50 55 60

Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr

100 105 110

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

115 120 125

His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln

130 135 140

Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys

180 185 190

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

195 200 205

Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp

210 215 220

<210> 24

<211> 202

<212> PRT

<213> Cynomolgus sp

<400> 24

Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser

35 40 45

Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly

50 55 60

Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln

65 70 75 80

Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu

85 90 95

Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu

100 105 110

Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly

115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp

165	170	175	
Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser			
180	185	190	
Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp			
195	200		
<210> 25			
<211> 294			
<212> DNA			
<213> Cynomolgus sp			
<400> 25			
ttcacagtga cagtcctaa ggaactgtac ataatagagc atggcagcaa tgtgaccctg 60			
gaatgcaact ttgacactgg aagtcatgtg aacctggag caataacagc cagttgcaa 120			
aagggtggaaa atgataacatc cccacaccgt gaaagagcca ctttgctgga ggagcagctg 180			
ccccttaggga aggcctcggtt ccacataacct caagtccaag tgagggacga aggacagtac 240			
caatgcataaa tcatctatgg ggtcgctgg gactacaagt acctgactct gaaa 294			
<210> 26			
<211> 98			
<212> PRT			
<213> Cynomolgus sp			
<400> 26			
Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly Ser			
1	5	10	15
Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn Leu			
20	25	30	
Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser Pro			
35	40	45	
His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Gln Leu Pro Leu Gly Lys			
50	55	60	
Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln Tyr			
65	70	75	80
Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu Thr			
85	90	95	

Leu Lys

<210> 27

<211> 663

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 27

atgtgcgtcc tgctgccat actgaacctg agcttacaac ttcatcctgt agcagctta	60
ttcacccgtga cagccccata agaagtgtac accgttagacg tcggcagcag tgtgagcctg	120
gagtgcgatt ttgaccgcag agaatgcact gaactggaag ggataagagc cagtttcag	180
aaggtagaaa atgatacgtc tctgcaaagt gaaagagcca ccctgctgga ggaggcagctg	240
cccctggaa aggtttgtt ccacatccct agtgtccaag tgagagattt cggcagttac	300

cgttgctgg tcatctgcgg ggccgcctgg gactacaagt acctgacggt gaaagtcaaa	360
gcttcttaca tgaggataga cactaggatc ctggaggatc caggtacagg ggagggtgcag	420
cttacctgcc aggcttaggg ttatcccta gcagaagtgt cctggcaaaa tgtcagtgtt	480
cctgccaaca ccagccacat caggaccccc gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg	540
cgcctcaagc ctccgcctag cagaaacttc agctgcattt tctggaatgc tcacatgaag	600
gagctgactt cagccatcat tgaccctctg agtcggatgg aacccaaagt ccccagaacg	660
tgg	663

<210> 28

<211> 221

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Met Leu Leu Leu Leu Pro Ile Leu Asn Leu Ser Leu Gln Leu His Pro

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

Val Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val

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

Asp Val Gly Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Asp Thr Ser Leu Gln Ser Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu
 65 70 75 80
 Pro Leu Gly Lys Ala Leu Phe His Ile Pro Ser Val Gln Val Arg Asp
 85 90 95
 Ser Gly Gln Tyr Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr
 100 105 110
 Lys Tyr Leu Thr Val Lys Val Lys Ala Ser Tyr Met Arg Ile Asp Thr
 115 120 125
 Arg Ile Leu Glu Val Pro Gly Thr Gly Glu Val Gln Leu Thr Cys Gln
 130 135 140
 Ala Arg Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Gln Asn Val Ser Val
 145 150 155 160
 Pro Ala Asn Thr Ser His Ile Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
 165 170 175
 Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Gln Pro Ser Arg Asn Phe Ser Cys
 180 185 190
 Met Phe Trp Asn Ala His Met Lys Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp
 195 200 205
 Pro Leu Ser Arg Met Glu Pro Lys Val Pro Arg Thr Trp
 210 215 220
 <210> 29
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 29
 Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val Asp Val Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu Cys Thr Glu
 20 25 30
 Leu Glu Gly Ile Arg Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
 35 40 45
 Leu Gln Ser Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Gln Leu Pro Leu Gly

50	55	60
Lys Ala Leu Phe His Ile Pro Ser Val Gln Val Arg Asp Ser Gly Gln		
65	70	75
Tyr Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu		
85	90	95
Thr Val Lys Val Lys Ala Ser Tyr Met Arg Ile Asp Thr Arg Ile Leu		
100	105	110
Glu Val Pro Gly Thr Gly Glu Val Gln Leu Thr Cys Gln Ala Arg Gly		
115	120	125
Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Gln Asn Val Ser Val Pro Ala Asn		
130	135	140
Thr Ser His Ile Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val		
145	150	155
Leu Arg Leu Lys Pro Gln Pro Ser Arg Asn Phe Ser Cys Met Phe Trp		
165	170	175
Asn Ala His Met Lys Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp Pro Leu Ser		
180	185	190
Arg Met Glu Pro Lys Val Pro Arg Thr Trp		
195	200	
<210> 30		
<211> 294		
<212>		
DNA		
<213> Mus musculus		
<400> 30		
ttcacgtga cagccctaa agaagtgtac accgttagacg tcggcagcag tgtgagcctg 60		
gagtgcgatt ttgaccgcag agaatgcact gaactggaag ggataagagc cagttgcag 120		
aaggtagaaa atgatacgtc tctgcaaagt gaaagagcca ccctgctgga ggagcagctg 180		
ccccctggaa aggcttgtt ccacatccct agtgtccaag tgagagattc cggcagctac 240		
cgttgcctgg tcatctgcgg ggccgcctgg gactacaagt acctgacggt gaaa 294		
<210> 31		
<211> 98		
<212> PRT		

<213> Mus musculus

<400> 31

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

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

<210> 32

<211> 220

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Extracellular domain of PD-L1

<400> 32

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

1	5	10	15
Asn	Met	Thr	Ile
Glu	Cys	Lys	Phe
Phe	Pro	Val	Glu
			Lys
			Gln
			Leu
			Asp
			Leu
20	25	30	

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

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

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

85 90 95

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

100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr

180 185 190

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

195 200 205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg

210 215 220

<210> 33

<211> 238

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

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

1 5 10 15

Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu Asp Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn Ala Ala
65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp Pro Ala

115 120 125

Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Glu Ala

130 135 140

Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly Lys Arg

145 150 155 160

Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val Thr Ser

165 170 175

Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys Thr Phe

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Leu Gly Ser Ile Leu Leu Phe Leu Ile Val Val Ser Thr Val

225 230 235

<210> 34

<211> 738

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 34

atggcttgca	attgtcagtt	gatgcaggat	acaccactcc	tcaagtttcc	atgtccaagg	60
ctcatttttc	tcttgtgct	gctgattcgt	ctttcacaag	tgtcttcaga	tgttgatgaa	120
caactgtcca	agtcaagtcaa	agataaggta	ttgctgcctt	gccgttacaa	ctctcctcat	180
gaagatgagt	ctgaagaccg	aatctactgg	caaaaacatg	acaaagtgg	gctgtctgtc	240
attgctggaa	aactaaaagt	gtggcccgag	tataagaacc	ggactttata	tgacaacact	300

acctactctc ttatcatcct gggcctggc ctttcagacc gggcacata cagctgtgc 360

gttcaaaaga agaaaaggagg aacgtatgaa gttaaacact tggcttagt aaagtgtcc 420
 atcaaagctg acttctctac ccccaacata actgagtctg gaaaccatc tgcagacact 480
 aaaaggatta cctgcttgc ttccggggt ttcccaaagc ctgccttctc ttgggtggaa 540
 aatggaagag aattacctgg catcaatacg acaattccc aggatcctga atctgaattg 600
 tacaccatta gttagccaact agatttcaat acgactcgca accacaccat taagtgtctc 660
 attaaatatg gagatgctca cgtgtcagag gacttcacct gggaaaaacc cccagaagac 720
 cctcctgata gcaagaac 738

<210> 35

<211> 246

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

Met Ala Cys Asn Cys Gln Leu Met Gln Asp Thr Pro Leu Leu Lys Phe

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

Pro Cys Pro Arg Leu Ile Leu Leu Phe Val Leu Leu Ile Arg Leu Ser

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

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

35	40	45
----	----	----

Lys Val Leu Leu Pro Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His Glu Asp Glu Ser

50	55	60
----	----	----

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

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

Ile Ala Gly Lys Leu Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu

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

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

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

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

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

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

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

Phe Ser Thr Pro Asn Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ala Asp Thr
 145 150 155 160
 Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe
 165 170 175
 Ser Trp Leu Glu Asn Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile
 180 185 190
 Ser Gln Asp Pro Glu Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp
 195 200 205
 Phe Asn Thr Thr Arg Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Asp Ala His Val Ser Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp
 225 230 235 240
 Pro Pro Asp Ser Lys Asn
 245

<210> 36
<211> 209
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 36

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

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

100 105 110
 Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ala Asp Thr Lys Arg Ile Thr Cys

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

180 185 190
 Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Ser Lys
 195 200 205
 Asn

<210> 37
<211> 291
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 37
gttgatgaac aactgtccaa gtcagtgaaa gataaggtat tgctgccttg ccgttacaac 60
tctcctcatg aagatgagtc tgaagaccga atctactggc aaaaacatga caaagtggtg 120
ctgtctgtca ttgctggaa actaaaagtg tggcccgagt ataagaaccg gactttatat 180
gacaacacta cctactctt tatcatcctg ggcctggtcc tttcagaccg gggcacatac 240

agctgtgtcg ttcaaaagaa ggaaagagga acgtatgaag ttaaacactt g 291
<210> 38
<211> 97
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu

<210> 39

<211> 732

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

atggccaca cacggaggca ggaaacatca ccatccaagt gtccataacct caatttcttt 60

cagctcttgg tgcgtggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag 120

gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgtga agagctggca 180

caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240

atgaatatat gccccgagta caagaaccgg accatcttg atatcactaa taacctctcc 300

attgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360

tatgaaaaag acgtttcaa gcggaaacac ctggctgaag tgacgttatac agtcaaagct 420

gactcccta cacctagtagt atctgacttt gaaattccaa cttctaataat tagaaggata 480

atttgctcaa cctctggagg tttccagag cctcacctct cctgggttgaa aaatggagaa 540

gaattaaatg ccatcaacac aacagttcc caagatcctg aaactgagct ctatgtgtt 600

agcagcaaac tggattcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtagt 660

ggacattaa gagtgaatca gaccccaac tgaaatacaa ccaagcaaga gcatttcct 720

gataacctgc tc 732

<210> 40

<211> 283

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 40

Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln

1 5 10 15

Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile

20 25 30

Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met

100 105 110

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

115 120 125

Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu

130 135 140

Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile

180 185 190

Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe

195 200 205

Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala

210 215 220

Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val
 225 230 235 240
 Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys
 245 250 255
 Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn
 260 265 270
 Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn Leu
 275 280
<210> 41
<211> 209
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 41

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu

145 150 155 160

Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr

165 170 175

Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn

180 185 190

Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn

195 200 205

Leu

<210> 42

<211> 303

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

gttatccacg tgaccaagga agt gaaagaa gtggcaacgc tgcctgtgg tcacaatgtt 60
tctgttgaag agtggcaca aactcgcatc tactggcaa aggagaagaa aatggtgctg 120

actatgatgt ctggggacat gaatataatgg cccgagtaca agaacccggac catcttgat 180

atcactaata acctctccat tgtatcctg gctctgcgcc catctgacga gggcacatac 240

gagtggttgt ttctgaagta taaaaagac gcttcaagc gggAACACCT ggctgaagt 300

acg 303

<210> 43

<211> 101

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn

35 40 45

Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn

50	55	60	
Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr			
65	70	75	80
Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His			

85	90	95	
Leu Ala Glu Val Thr			

100

<210> 44

<211> 696

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

gagcctaagt catgtacaa gaccatacg tgcccacct gtccgcgtcc agaactgctg	60
gggggaccta gcgtttctt gttccccca aagcccaagg acaccctcat gatctcacgg	120
actcccgaaag taacatgcgt agtagtcgac gtgagccacg aggatcctga agtgaagttt	180
aatttgtacg tggacggagt cgaggtgcat aatgcacaaa ctaaacctcg ggaggagcag	240
tataacagta cctaccgcgt ggtatccgtc ttgacagtgc tccaccagga ctggctgaat	300

ggtaaggagt ataaatgcaa ggtcagcaac aaagctttc ccgcggcaat tgaaaagact	360
atcagcaagg ccaagggaca accccgcgag ccccagggtt acacccttcc accttcacga	420
gacgagctga ccaagaacca ggtgtcttg acttgtctgg tcaaagggtt ctatccttcc	480
gacatcgcag tggagtggga gtcaaacggg cagcctgaga ataactacaa gaccacaccc	540
ccagtgcttg atagcgatgg gagtttttc ctctacagta agctgactgt ggacaaatcc	600
cgctggcgc agggaaacgt ttcttctgt agcgtcatgc atgaggccct ccacaaccat	660
tataactcaga aaagcctgag tctgagttccc ggcaaa	696

<210> 45

<211> 231

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

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

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

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

20	25	30
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
35	40	45
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
50	55	60
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
65	70	75
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
85	90	95
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
100	105	110
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
115	120	125
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr		
130	135	140
Lys Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
145	150	155
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
165	170	175
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
180	185	190
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
195	200	205
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
210	215	220
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
225	230	
<210> 46		
<211> 699		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		
<400> 46		

gagccaagag gtcctacgt caagccctgc ccgccttcta aatgcccagc tccaaatttg 60

ctgggtggac cgtcagtctt tatcttcccg ccaaagataa aggacgtctt gatgattagt 120

ctgagccccca tcgtgacatg cgttgtggtg gatgttcag aggtgaccc cgacgtgcaa 180

atcagtttgt tcgttaacaa cgtggagggtg cataccgctc aaacccagac ccacagagag 240

gattataaca gcaccctgcg ggttagtgcgc gcccgtccga tccagcatca ggattggatg 300

agcggaaag agtcaagtgt taaggtaaac aacaaagatc tgccagcgcc gattgaacga 360

accattagca agccgaaagg gagcgtgcgc gcacaccttgg tttacgtcct tcctccacca 420

gaagaggaga tgacgaaaaa gcaggtgacc ctgacatgca tggtaactga ctttatgcca 480

gaagatattt acgtggaatg gactaataac ggaaagacag agctcaatta caagaacact 540

gagcctgttc tggattctga tggcagctac ttatgtact ccaaattgag ggtcgagaag 600

aagaattggg tcgagagaaa cagttatagt tgctcagtgg tgcatgaggg cctccataat 660

catcacacca caaagtctt cagccgaacg cccggaa 699

<210> 47

<211> 233

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

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

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

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

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

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

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

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

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

Gln Asp Trp Met Ser Gly Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys

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

Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser
 115 120 125
 Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met
 130 135 140
 Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro
 145 150 155 160
 Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn
 165 170 175
 Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met
 180 185 190
 Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser
 195 200 205
 Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr
 210 215 220
 Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 225 230
 <210> 48
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic linker peptide
 <400> 48
 Gly Ser Gly Ser
 1
 <210> 49
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic linker peptide
 <400> 49
 Gly Gly Gly Ser
 1
 <210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic linker peptide

<400> 50

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic linker peptide

<400> 51

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 52

<211> 1365

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 52

atgctgctcc tgcgtcccgat actgaacctg agcttacaac ttcatcctgt	60
ttcacccgtga cagccccctaa agaagtgtac accgttagacg tcggcagcag	120
tgatgtcgatt ttgaccgcag agaatgcact gaactggaag ggataagagc	180
cagtttgcgaaa atgatacgtc tctgcaaagt gaaagagcca ccctgctgga	240
cccttggaa aggctttgtt ccacatccct agtgtccaag tgagagattc	300
cggttgcctgg tcatctgcgg ggccgcctgg gactacaagt acctgacggt	360
gcttcttaca tgaggataga cactaggatc ctggaggttc caggtacagg	420

cttacacctgcc aggcttagagg ttatccccta gcagaagtgt cctggcaaaa	480
tgtcagtgtt cctgccaaca ccagccacat caggaccccc gaaggcctct	540
accaggtcac cagtgttctg cgcctcaagc ctcagcctag cagaaacttc	600

gagctgactt cagccatcat tgaccctctg agtcggatgg aacccaaagt ccccagaacg 660
 tgggagccaa gaggcttac gatcaagccc tgccgcctt gtaaatgccc agctccaaat 720
 ttgtgggtg gaccgtcagt ctatcttc cgccaaaga taaaggacgt ctgtatgatt 780
 agtctgagcc ccatcggtac atgcgttg gtggatgtt cagaggatga cccgacgtg 840

caaatcagtt gttcgtaa caacgtggag gtgcataccg ctcaaaccga gaccacaga 900
 gaggattata acagcacccct gcgggttagtg tccgcctgc cgatccagca tcaggattgg 960
 atgagcggga aagagttcaa gtgttaaggta aacaacaaag atctgccagc gccgattgaa 1020
 cgaaccatta gcaagccgaa agggagcgtg cgccacccctc aggttacgt cttcccca 1080
 ccagaagagg agatgacgaa aaagcaggatg accctgacat gcatggtaac tgactttatg 1140
 ccagaagata ttacgtgga atggactaat aacggaaaga cagagctcaa ttacaagaac 1200
 actgagcctg ttctggattc tgatggcage tactttatgt actccaaatt gagggtcgag 1260

aagaagaatt gggcgagag aaacagttat agttgtcag tggtgcatga gggctccat 1320

aatcatcaca ccacaaagtc cttcagccga acgcccggga aatga 1365

<210> 53

<211> 454

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 53

Met Leu Leu Leu Pro Ile Leu Asn Leu Ser Leu Gln Leu His Pro

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

Val Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val

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

Asp Val Gly Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

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

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

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

Ser Gly Gln Tyr Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr

100	105	110
Lys Tyr Leu Thr Val Lys Val Lys Ala Ser Tyr Met Arg Ile Asp Thr		
115	120	125
Arg Ile Leu Glu Val Pro Gly Thr Gly Glu Val Gln Leu Thr Cys Gln		
130	135	140
Ala Arg Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Gln Asn Val Ser Val		
145	150	155
Pro Ala Asn Thr Ser His Ile Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val		
165	170	175
Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Gln Pro Ser Arg Asn Phe Ser Cys		
180	185	190
Met Phe Trp Asn Ala His Met Lys Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp		
195	200	205
Pro Leu Ser Arg Met Glu Pro Lys Val Pro Arg Thr Trp Glu Pro Arg		
210	215	220
Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn		
225	230	235
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp		
245	250	255
Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp		
260	265	270
Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn		
275	280	285
Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn		
290	295	300
Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp		
305	310	315
Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro		
325	330	335
Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala		
340	345	350

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

355 360 365

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

370 375 380

Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Ser Arg Thr Pro Gly Lys

450

<210> 54

<211> 435

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54

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

1 5 10 15

Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu Cys Thr Glu

20 25 30

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

35 40 45

Leu Gln Ser Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Gln Leu Pro Leu Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu

85 90 95

Thr Val Lys Val Lys Ala Ser Tyr Met Arg Ile Asp Thr Arg Ile Leu
 100 105 110
 Glu Val Pro Gly Thr Gly Glu Val Gln Leu Thr Cys Gln Ala Arg Gly
 115 120 125
 Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Gln Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
 130 135 140
 Thr Ser His Ile Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Lys Pro Gln Pro Ser Arg Asn Phe Ser Cys Met Phe Trp
 165 170 175
 Asn Ala His Met Lys Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp Pro Leu Ser
 180 185 190
 Arg Met Glu Pro Lys Val Pro Arg Thr Trp Glu Pro Arg Gly Pro Thr
 195 200 205
 Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly
 210 215 220
 Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met
 225 230 235 240
 Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu
 245 250 255
 Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val
 260 265 270
 His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu
 275 280 285
 Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly
 290 295 300
 Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile
 305 310 315 320
 Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val
 325 330 335
 Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr

340	345	350
Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu		
355	360	365
Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro		
370	375	380
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val		
385	390	395
Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val		
405	410	415
His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr		
420	425	430
Pro Gly Lys		
435		
<210> 55		
<211> 1362		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 55		
atgattttc ttcttttat gctgttttg gaatttcaac ttccacaaat cgcggccctc 60		
tttactgtga ccgtgc当地 agaactgtat atcattgagc acgggtccaa tgtgaccctc 120		
gaatgttaact ttgacacccgg cagccacgtt aacctggggg ccatcactgc cagcttgcaa 180		
aaaggtaaaa acgacacttc acctcacccgg gagaggccaa ccctcttggg ggagcaactg 240		
ccattgggaa aggccctcctt tcatatccct caggtgcagg ttccggatga gggacagtac 300		
cagtgcatta ttatctacgg cgtggcttgg gattacaagt atctgaccct gaaggtgaaa 360		
gcgtcctatac gaaaaattaa cactcacatt cttaagggtgc cagagacggg cgagggtggaa 420		
ctgacatgcc aagccacccgg ctacccgttgc gcagagggtca gctggccaa cgtgagcgta 480		
cctgctaaca cttcttattc taggacaccc gaggccctt accaggttac atccgtgctc 540		
cgcctcaaac cgcggccagg ccggaaatttt agttgcgtgt tttggaaatac ccacgtgcga 600		
gagctgactc ttgcatctat tgatctgcag tcccagatgg agccacggac tcatccaact 660		
tgggaaccta aatcttgcga taaaactcat acctgtcccc cttgcccagc ccccgagctt 720		
ctgggagggtc ccagtgtgtt tctgtttccc ccaaaaccta aggacacact tatgatatcc 780		
cgaacgcccgg aagtgacatg cgtgggtgtg gacgtctcac acgaagaccc ggagggtgaaa 840		

ttcaactgg acgttgacgg agttgagggtt cataacgcta agaccaagcc cagagaggag 900
 caatacaatt ccacctatcg agtggttagt gtactgaccg tttgcacca agactggctg 960
 aatggaaaag aatacaagtg caaagtatca aacaaggctt tgccctgcacc catcgagaag 1020

acaatttcta aagccaaagg gcagcccagg gaaccgcagg tgtacacact cccaccatcc 1080
 cgcgacgagg tgacaaagaa tcaagtatcc ctgacctgcc tggtaaagg ctttaccca 1140
 tctgacattg ccgtggaatg ggaatcaa at ggacaacctg agaacaacta caaaaccact 1200
 ccacctgtgc ttgacagcga cgggtcctt ttccgtaca gtaagctcac tgtcgataag 1260
 tctcgctggc agcaggca a cgttttca tgtagtgtga tgcacgaagc tctgcacaac 1320
 cattacaccc agaagtctct gtcactgagc ccaggtaaat ga 1362

<210> 56

<211> 453

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 56

Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln

1 5 10 15

Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile

20 25 30

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

35 40 45

His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn

50 55 60

Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr

100 105 110

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

115 120 125

His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln

130	135	140
Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val		
145	150	155
Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val		
165	170	175
Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys		
180	185	190
Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp		
195	200	205
Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Glu Pro Lys		
210	215	220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		
225	230	235
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
245	250	255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
260	265	270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
290	295	300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
305	310	315
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
325	330	335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
340	345	350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
355	360	365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
370	375	380

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

Leu Ser Pro Gly Lys

450

<210> 57

<211> 434

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
 50 55 60

Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln
 65 70 75 80

Tyr Gln Cys Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
 85 90 95

Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu
 100 105 110

Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly
 115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn

130	135	140	
Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val			
145	150	155	160
Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp			
165	170	175	
Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser			
180	185	190	
Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
195	200	205	
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
210	215	220	
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
225	230	235	240
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
245	250	255	
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
260	265	270	
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
275	280	285	
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
290	295	300	
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
305	310	315	320
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
325	330	335	
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
340	345	350	
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
355	360	365	
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
370	375	380	

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

Gly Lys

<210> 58
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> unknown
 <220><223> CTLA-4/B7 binding surface motif
 <400> 58

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr

1 5

<210> 59
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> unknown
 <220><223> ICOS to B7-H2 binding motif
 <400> 59

Phe Asp Pro Pro Pro Phe

1 5

<210> 60
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> unknown
 <220><223> Amino acid incorporated in PD-L2 polypeptide or PD-1 binding
 fragment
 <400> 60

Trp Asp Tyr Lys Tyr

1 5