 <b>(19) 대한민국특허청(KR)</b> <b>(12) 공개특허공보(A)</b>	<b>(11) 공개번호</b> 10-2011-0074850 <b>(43) 공개일자</b> 2011년07월04일
<p>(51) Int. Cl.  <i>C07K 19/00</i> (2006.01) <i>C07K 14/705</i> (2006.01)  <i>C12N 15/62</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2011-7006753</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년08월25일          심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2011년03월24일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2009/054971</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2010/027828          국제공개일자 2010년03월11일</p> <p>(30) 우선권주장          61/091,502 2008년08월25일 미국(US)          (뒷면에 계속)</p>	<p>(71) 출원인          애플리문, 인크.          미국 20850 메릴랜드주 록빌 스위트 씨-120 메디컬 센터 드라이브 9800</p> <p>(72) 발명자          랭거만, 솔로몬          미국 21215 메릴랜드주 볼티모어 크로스 컨트리 블레바드 6606          리우, 린다          미국 21029 메릴랜드주 클락스빌 티퍼러리 코트 6512</p> <p>(74) 대리인          양영준, 양영환</p>

전체 청구항 수 : 총 30 항

#### (54) PD-1 길항제 및 그의 사용 방법

#### (57) 요약

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 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 초과 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 C $\gamma$ 1 사슬의 힌지, C $\mu$ 2 및 C $\mu$ 3 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 라이제이션은 T 세포의 항원-특이적 증식을 증가시키고, 시토카인 생산을 향상시키고, 분화 및 효과기 기능을 활성화시키고, T 세포의 생존을 촉진한다 ([Lenschow, 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 활성화의 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 세포의 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  $\beta$ -가닥의 층을 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 MYPPPY 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)). MYPPPY 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 프로파일은 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 먼 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 흉선세포의 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 펩티드 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 라이제이션의 주요 결과는 TCR의 하류에서 신호 전달을 억제하는 것이다. 따라서, PD-1을 통한 신호 전달은 대체로 감소된 T 세포 증식 또는 T 세포 활성화의 다른 감소를 일으키는 억압 또는 억제 신호를 T 세포에 제공한다.

[0010] PD-1<sup>-/-</sup> 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<sup>-/-</sup> 마우스는 치명적인 자가면역 확장성 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 겔보기에 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)에의 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-라이제이션을 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

- [0020] **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 폴리펩티



드에 융합된 링커 (linker) 펩티드 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<sub>γ</sub>1 사슬의 힌지, C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 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 길항제 폴리펩티드 및 융합 단백질을 코딩하는 핵산, 및 그러한 핵산을 벡터 내에 함유하는 숙주 세포를 또한 제공한다.

[0026] 개시된 PD-1 수용체 길항제를 함유하는 면역원성 조성물을 또한 제공한다. 면역원성 조성물은 항원, PD-1 수용체 길항제의 공급원 및 임의로 아두반트 (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 길항제를 사용하는 방법을 제공한다. PD-1 수용체 길항제 및 그를 코딩하는 핵산의 치료 용도를 제공한다. PD-1 수용체 길항제 조성물은 암에 대한 면역 반응을 향상시키기 위해 사용될 수 있다. PD-1 수용체 길항제 조성물은 또한 면역억제된 대상체의 면역 반응을 자극하기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, PD-1 수용체 길항제 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

[0029] I. 정의

[0030] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단리된"은 예를 들어, 펩티드를 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.

[0031] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "폴리펩티드"는 변형 (예를 들어, 인산화 또는 당화)에 상관없이 임의의 길이의 아미노산의 사슬을 나타낸다.

[0032] 본원에서 사용되는 바와 같이, "변이체" 폴리펩티드는 상응하는 야생형 폴리펩티드의 아미노산 서열에 비해 적어도 하나의 아미노산 서열 변경을 함유한다.

[0033] 본원에서 사용되는 바와 같이, "아미노산 서열 변경"은 예를 들어, 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 또는 삽입일 수 있다.

[0034] 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 게놈 내에서 핵산의 한쪽 또는 양쪽 측면에 접하는 핵산을 포함한, 포유동물 게놈 내에 존재하는 다른 핵산 분자로부터 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 게놈 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 결합되는 Fab 및 F(ab')<sub>2</sub> 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.

[0049] **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 돕는다.
- [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 길항제는 PD-1 수용체 외의 수용체에 결합함으로써 T 세포를 활성화시킬 수 있다.

[0052] PD-1 길항제는 소분자 길항제일 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 길항제는 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 길항제는 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.

## [0054] A. PD-L2 기반 PD-1 길항제

### [0055] 1. PD-1에 결합하는 PD-L2 기반 PD-1 길항제

[0056] PD-1 길항제는 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 길항제이다.

[0057] 대표적인 폴리펩티드 길항제는 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 길항제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 면역 시냅스 환경에서 펩티드-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 약화된 세포를 활성화시킨다.

### [0058] 2. 예시적인 PD-L2 폴리펩티드 PD-1 길항제

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

```

MLLLLPILNL SLQLHPVAAL FTVTAPKEVY TVDVGSSVSL ECDFDRECT ELEGIRASLQ    60
KVENDTSLQS ERATLLEEQL PLGKALFHIP SVQVRDSGQY RCLVICGAAW DYKYLTVKVK    120
ASYMRIDTRI LEVPGTGEVQ LTCQARGYPL AEVSWQNVSV PANTSHIRTP EGLYQVTSVL    180
RLKQPQSRNF SCMFNAHMK ELTSAIIDPL SRMEPKVPRT WPLHVFIPAC TIALIFLAIV    240
IIQRKRI                                     247

```

(서열 1) 또는

```

LFTVTAPKEV YTDVGSSVSL LECDFDREC TELEGRASL QKVENDTSLQ SERATLLEEQ    60
LPLGKALFHI PSVQVRDSGQ YRCLVICGAA WDKYLTVKV KASYMRIDTR ILEVPGTGEV    120
QLTCQARGYP LAEVSQNVSV VPANTSHIRT PEGLYQVTSV LRLKQPQSRN FSCMFNAHM    180
KELTSAIIDP LSRMEPKVPR TWPLHVFIPA CTIALIFLAI VIIQRKRI                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 FTVTPKELY IIEHGSNVTI ECNFDTGSHV NLGAITASLQ 60  
 KVENDTSPHR ERATLLEEQL PLGKASFHIP QVQVRDEGQY QCIIYGVAV DYKYLTLKVK 120  
 ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL 180  
 RLKPPPGRNF SCVFWNTHVR ELTLASIDLQ SQMEPRTHPT WLLHIFIPFC IIAFIFIATV 240  
 IALRKQLCQK LYSSKDTTKR PVTITKREV N SAI 273

(서열 3) 또는

LFTVTPKEL YIEHGSNVT LECNFDTGSH VNLGAITASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ 60  
 LPLGKASFHI PQVQVRDEGQ YQCIIYGVAV WDKYLTLKV KASYRKINTH ILKVPETDEV 120  
 ELTCQATGYPL LAEVSWPVNS VPANTSHSRTP PEGLYQVTSV LRLKPPPGRN FSCVFWNTHV 180  
 RELTLASIDL SQSQMEPRTHP TWLLHIFIFP CIIAFIFIAT VIALRKQLCQ KLYSSKDTTK 240  
 RPTTTTKREV NSAI 254

(서열 4).

[0062]

[0063]

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

MIFLLMLSL ELQLHQIAAL FTVTPKELY IIEHGSNVTI ECNFDTGSHV NLGAITASLQ 60  
 KVENDTSPHR ERATLLEEQL PLGKASFHIP QVQVRDEGQY QCIIYGVAV DYKYLTLKVK 120  
 ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL 180  
 RLKPPPGRNF SCVFWNTHVR ELTLASIDLQ SQMEPRTHPT WLLHIFIPSC IIAFIFIATV 240  
 IALRKQLCQK LYSSKDATKR PVTITKREV N SAI 273

(서열 5) 또는

LFTVTPKEL YIEHGSNVT LECNFDTGSH VNLGAITASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ 60  
 LPLGKASFHI PQVQVRDEGQ YQCIIYGVAV WDKYLTLKV KASYRKINTH ILKVPETDEV 120  
 ELTCQATGYPL LAEVSWPVNS VPANTSHSRTP PEGLYQVTSV LRLKPPPGRN FSCVFWNTHV 180  
 RELTLASIDL SQSQMEPRTHP TWLLHIFIPS CIIAFIFIAT VIALRKQLCQ KLYSSKDATK 240  
 RPTTTTKREV NSAI 254

(서열 6).

[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-라이제이션이 없기 때문에, PD-L1 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-L1 폴리펩티드를 사용하여 PD-1 신호 전달을 억제하면 그렇지 않으면 약화될 세포를 활성화시킨다.

[0069]

### 2. 예시적인 PD-L1 폴리펩티드 PD-1 길항제

[0070]

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

MRIFAGIIFT ACCHLLRAFT ITAPKDLYVV EYGSNVTMEC RFFVERELDL LALVVYWEKE 60  
 DEQVIQFVAG EEDLKQHSN FRGRASLPKD QLLKGNALQ ITDVKLQDAG VYCCIISYGG 120  
 ADYKRITLKV NAPIRKINQR ISVDPATSEH ELICQAEQY EAEVIWNSD HQPVSGKRSV 180  
 TTSRTEGMLL NVTSSLRVNA TANDVFYCTF WRSQPGQNH AELIPELPA THPPQNRTHW 240  
 VLLGSILLFL IVVSTVLLFL RKQVRMLDVE KCGVEDTSSK NRNDTQFEET 290

(서열 7) 또는

FTITAPKDLY VVEYGSNVTM ECRFPVEREL DLLALVVYWE KEDEQVIQFV AGEEDLKQHSN 60  
 SNFRGRASLP KDQLKGNAA LQITDVKLQD AGVYCCIISY GGADYKRITL KVNAPIRKIN 120  
 QRISVDPATS EHELICQAEQ YPEARVIWNS SDHQPVSGKR SVTTSRTEGM LLNVTSSLRV 180  
 NATANDVFYC TFWRSPGQGN HTAELIPEL PATHPPQNRT HWVLLGSILL FLIVVSTVLL 240  
 FLRKQVRMLD VEKCGVEDTS SKNRNDTQFE ET 272

(서열 8).

[0071]

[0072]

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

MRIFAVFIFM TYWHLNRAFT VTPKDLVYV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME 60  
 DKNIIQFVHG EEDLKQVHSS YRQRARLLKD QLSLGNAAQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG 120  
 ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPVTSE HELTCQAEY PKAEVIWTS DHQVLSGKTT 180  
 TTNSKREEKL FNVSTILRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVLPIELP LAHPNERNH 240  
 LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMDVK KCGIQDTNSK QSDTHLEET 290

(서열 9) 또는

FTVTVPKDLV VVEYGSNMTI ECKFPVEKQL DLAALIVYWE MEDKNIIQFV HGEEDLKVQH 60  
 SSYRQRARLL KDQLSLGNAA LQITDVKLQD AGVYRCMISY GGADYKRITV KVNAPYNKIN 120  
 QRILVVDPVT SEHELTCQAE GYPKAEVIWT SSDHQVLSGK TTTNSKREE KLFNVSTILR 180  
 INTTNEIFY CTFRRLDPEE NHTAEVLPIE LFLAHPNERN THLVILGAIL LCLGVALTFI 240  
 FLRKGRMDMD 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 TPLKFPCCPR LILLFVLLIR LSQVSSDVDE QLSKSVKDKV LLPCRYNSPH 60  
 EDESEDRIYV QKHDKVVLVS IAGKLKWPE YKNRTLYDNT TYSLIILGLV LSDRGTYSCV 120  
 VQKKERGTYE VKHLALVKLS IKADFSTPNI TESGNFSADT KRITCFASGG FPKPRFSWLE 180  
 NGRELPGINT TISQDPESEL YTISSQLDFN TTRNHTIKCL IKYGDHVSSE DFTWEKFPED 240  
 PPDGKNTLVL FGAGFGAVIT VVVIVVVIKC FCKHRSCFRR NEASRETNNS LTFGPPEEALA 300  
 EQTVFL 306

(서열 11) 또는

VDEQLSKSVK DKVLLPCRYN SPHEDESEDR IYWQKHDKVV LSVIAGKLKV WPEYKNRTLY 60  
 DNTTYSLIIL GLVLSDRGTY SCVVQKKERG TYEVKHLALV KLSIKADFST PNITESGNPS 120  
 ADTKRITCFA SGGFPPKPRFS WLENGRELPG INTTISQDPE SELYTISSQL DFNTTRNHTI 180  
 KCLIKYGDH VSEDFTWEKP PEDPPDSKNT LVLFAGAGFGA VITVVVIVVI IKCFCKHRSC 240  
 FRNEASRET NNSLTFGPPEE ALAEQTVFL 269

(서열 12).

[0080]

[0081]

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

MGHTRRQGS PSKCPYLNEF QLLVLAGLSH FCSGVIHVK EVKEVATLSC GHNVSVLELA 60  
 QTRIIYWQKEK KMLTMMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTVECVVLK 120  
 YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIIRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE 180  
 ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP 240  
 DNLLPSWAIT LISVNGIFVI CCLTYCFAPR CRERRRNERL RRESVRPV 288

(서열 13) 또는

VIHVTKEVKE VATLSCGHNH SVEELAQTIR YWQKEKQVNL TMMSGDMNIW PEYKNRTIFD 60  
 ITNNLSIVIL ALRPSDEGT ECVVLKYEKD AFKREHLAEV TSVKADFPT PSISDFEIFT 120  
 SNIRRIICST SGGFPEPHLS WLENGEELNA INTTVSQDPE TELYAVSSKL DFNTTNNHSF 180  
 MCLIKYGLHR VNQTFNWNIT QEHFFDNLL PSWAITLISV NGIFVICCLT YCFAPRCRER 240  
 RRNERLRRES VRPV 254

(서열 14).

[0082]

[0083]

서열 11 및 13은 각각 신호 펩티드를 함유한다.

[0084]

### 3. 예시적인 PD-1 폴리펩티드 PD-1 길항제

[0085]

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

있다:

MQIPQAPWV VVAVLQLGWR PGWFLDSPDR FWNPTFFPA LLVTEGDNA TFCFSFNTS	60
ESFVLNWMYR SPSNQTDKLA APFEDRSQPG QDCRFVTVQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT	120
YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHFSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS	180
LVLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP	240
CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL	288

(서열 15).

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

MQIPQAPWV VVAVLQLGWR PGWFLESFDR FWNAPTFFPA LLVTEGDNA TFCFSFNTS	60
ESFVLNWMYR SPSNQTDKLA APFEDRSQPG QDCRFVTVQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT	120
YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHFSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS	180
LVLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP	240
CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL	288

(서열 16).

서열 15 및 16은 각각 신호 펩티드를 함유한다.

#### D. PD-1 길항제 폴리펩티드의 단편

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.

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% 초과 능력을 가진다.

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% 초과 능력을 가진다.

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 것이 이해될 것이다. 별법으로, 세포외 도메인은 C-말단, N-말단, 또는 둘 모두로부터 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산이 제거될 수 있다.

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 분자 생물학 기술을 이용하여 다른 폴리펩티드의 신호 서열로 교체될 수 있다. PD-1 길항제 폴리펩티드 신호 서열을 교체하기 위해 사용되는 신호 서열은 당업계에서 공지된 임의의 것일 수 있다.

#### 1. PD-L2 세포외 도메인

##### a. 인간 PD-L2 세포외 도메인

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 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩될 수 있다:



```

atgatctttc ttctcttgat gctgtctttg gaattgcaac ttcaccaaat cgcggccctc 60
tttactgtga cagtgcacaa agaactgtat atcattgagc acgggtccaa tgtgaccctc 120
gaatgtaact ttgacaccgg cagccacgtt aacctggggg ccatcactgc cagcttgcaa 180
aaagttagaa acgacacttc acctcaccgg gagagggcaa cctctctgga ggagcaactg 240
ccattgggga aggcctcctt tcatatccct caggtgcagg ttcgggatga gggacagtac 300
cagtgacatta ttatctacgg cgtggcttgg gattacaagt atctgaccct gaaggtgaaa 360
gogtcctatc ggaaattaa cactcacatt ctttaagggtc cagagacgga cgaggtggaa 420
ctgacatgcc aagccaccgg ctaccggttg gcagaggtca gctggcccaa cgtgagcgta 480
cctgctaaca cttctcatc taggacaccc gagggcctct accagggtac atcogtgctc 540
cgccccaac cgccccagc cgggaatttt agttgcgtgt tttggaatac ccacgtgcga 600
gagctgactc ttgcatctat tgatctgcag tcccagatgg agccacggac tcatccaact 660
tgg 663

```

(서열 17).

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

```

MIFLLMLSL ELQLHQIAAL FTVTPKELY IIEHGSNVTL
MIFLLMLSL ELQLHQIAAL FTVTPKELY IIEHGSNVTL ECNFDTGSHV NLGAIASLQ 60
KVENDTSPHR ERATLLEEQL PLGKASFHIP QVQVRDEGQY QCIIYGVAV DYKYLTLKVK 120
ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL 180
RLKPPPGRNF SCVFWNTHVR ELTLASIDLQ SQMEPRTHPT W 221

```

(서열 18).

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

```

LFTVTPKELY IIEHGSNVT LECNFDTGSH VNLGAIASL QKVENDTSPH RERATLLEEQL 60
LPLGKASFHI PQVQVRDEGQ YQCIIYGVA WDKYLTLKV KASYRKINTH ILKVPETDEV 120
ELTCQATGYPLAEVSWPNVS VPANTSHSRTP EGLYQVTSVLRLKPPPGRN FSCVFWNTHV 180
RELTLASIDLQSQMEPRTHPTW 202

```

(서열 19).

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 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩될 수 있다:

```

tttactgtga cagtgcacaa agaactgtat atcattgagc acgggtccaa tgtgaccctc 60
gaatgtaact ttgacaccgg cagccacgtt aacctggggg ccatcactgc cagcttgcaa 120
aaagttagaa acgacacttc acctcaccgg gagagggcaa cctctctgga ggagcaactg 180
ccattgggga aggcctcctt tcatatccct caggtgcagg ttcgggatga gggacagtac 240
cagtgacatta ttatctacgg cgtggcttgg gattacaagt atctgaccct gaag 294

```

(서열 20).

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

```

FTVTPKELY IIEHGSNVTL ECNFDTGSHV NLGAIASLQ KVENDTSPHR ERATLLEEQL 60
PLGKASFHIP QVQVRDEGQY QCIIYGVAV DYKYLTLK 98

```

(서열 21).

## b. 비-인간 영장류 PD-L2 세포외 도메인

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 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩될 수 있다:

```

atgatcttcc tectgctaata gttgagcctg gaattgcagc ttcaccagat agcagcttta 60
ttcacagtga cagtcacctaa ggaactgtac ataataagagc atggcagcaa tgtgaccttg 120
gaatgcaact ttgacactgg aagtcattgtg aaccttggag caataacagc cagtttgcaa 180
aaggtggaaa atgatacatc cccacaccgt gaaagagcca ctttgctgga ggagcagctg 240
cccctaggga aggcctcgtt ccacatacct caagtccaag tgagggacga aggacagtac 300
caatgcataa tcatctatgg ggtgcctgg gactacaagt acctgactct gaaagtcaaa 360
gcttcttaca gaaaataaaa cactcacatc ctaaggttc cagaaacaga tgaggtagag 420
ctcacctgcc aggcctacag ttatcctctg gcagaagtat cctggccaaa cgtcagcgtt 480
cctgccaaca ccagccactc caggaccctt gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg 540
cgctaaaagc caccocctgg cagaaacttc agctgtgtgt tctggaatac tcacgtgagg 600
gaacttactt tggccagcat tgacctcaa agtcagatgg aaccaggac ccaccaact 660
tgg 663

```

(서열 22).

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

```

MIFLLMLSL ELQLHQIAAL FTVTPKELY IIEHGSNVT ECFDTGSHV NLGAIASLQ 60
KVENDTSPHR ERATLLEEQL PLGKASPHIP QVQVRDEGQY QCIIYGVAV DYKYLTLKVK 120
ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL 180
RLKPPFGRNF SCVFWNTHVR ELTLASIDLQ SQMEPRTHPT W 221

```

(서열 23).

신호 서열은 성숙 단백질 내에서 제거될 것이다. 추가로, 제조 동안 숙주로부터 융합 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:

```

LFTVTPKEL YIIEHGSNVT LECNFDGSH VNLGAIASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ 60
LPLGKASPHI PQVQVRDEGQ YQCIIYGVAV WDKYLTLLK KASYRKINTH ILKVPETDEV 120
ELTCQATGYPL LAEVSWPVSV VPANTSHSRT PEGLYQVTSV LRLKPPGRN FSCVFWNTHV 180
RELTLASIDL QSQMEPRTHPT TW 202

```

(서열 24).

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

```

ttcacagtga cagtcacctaa ggaactgtac ataataagagc atggcagcaa tgtgaccttg 60
gaatgcaact ttgacactgg aagtcattgtg aaccttggag caataacagc cagtttgcaa 120
aaggtggaaa atgatacatc cccacaccgt gaaagagcca ctttgctgga ggagcagctg 180
cccctaggga aggcctcgtt ccacatacct caagtccaag tgagggacga aggacagtac 240
caatgcataa tcatctatgg ggtgcctgg gactacaagt acctgactct gaaa 294

```

(서열 25).

PD-1 길항제 폴리펩티드는 다음 비-인간 영장류 아미노산 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다 (PD-L2로서도 칭해진다):

```

FTVTPKELY IIEHGSNVT ECFDTGSHV NLGAIASLQ KVENDTSPHR ERATLLEEQL 60
PLGKASPHIP QVQVRDEGQY QCIIYGVAV DYKYLTLK 98

```

(서열 26).

#### d. 류린 PD-L2 세포의 도메인

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



```

atgctgctcc tgctgccgat actgaacctg agcttacaac ttcacccctgt agcagcttta    60
ttcacccgtga cagcccccata agaagtgtac accgtagacg tcggcagcag tgtgagcctg    120
gagtgcgatt ttgaccgcag agaatgcact gaactggaag ggataagagc cagttttgcag    180
aaggtagaaa atgatacgtc tctgcaaagt gaaagagcca cctgctgga ggagcagctg    240
cccctgggaa aggcctttgtt ccacatccct agtgtccaag tgagagattc cgggcagtag    300
cgttgccctgg tcattctcgg ggccgcctgg gactacaagt acctgacggt gaaagtcaaa    360
gcttcttaca tgaggataga cactaggatc ctggagggttc caggtacagg ggaggtgcag    420
cttacctgcc aggcctagagg ttatccccta gcagaagtgt cctggcaaaa tgtcagtggt    480
cctgccaca cagccacat caggaccccc gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg    540
cgcccaagc ctacagcctag cagaaacttc agctgcattg tctggaatgc tcacatgaag    600
gagctgactt cagccatcat tgacctctg agtcggatgg aaccocaaagt ccccaagaag    660
tgg

```

(서열 27).

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

```

MELLLPILNL SLQLHPVAAL FTVTAPKEVY TVDVGSSVSL ECDFFDRRECT ELEGIRASLQ    60
KVENDTSLQS ERATLLEEQL PLGKALFHIP SVQVRDSGQY RCLVICGAAN DYKYLTVKVK    120
ASYMRIDTRI LEVPGTGEVQ LTCQARGYPL AEVSWQNVSV PANTSHIRT EGLYQVTSVL    180
RLKPQPSRNF SCMFVNAHMK ELTSAIIDPL SRMEPKVPR W

```

(서열 28).

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 류린 아미노산 서열을 제공한다:

```

LFTVTAPKEV YTVDVGSSVS LECDFDRREC TELEGIRASL QKVENDTSLQ SERATLLEEQL    60
LPLGKALFHI PSVQVRDSGQ YRCLVICGAA WDKYLTVKV KASYMRIDTR ILEVPGTGEV    120
QLTCQARGYP LAEVSQNVSV VPANTSHIRT PEGLYQVTSV LRLKPQPSRN FSCMFVNAHM    180
KELTSAIIDP LSRMEPKVPR TW

```

(서열 29).

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

```

ttcacccgtga cagcccccata agaagtgtac accgtagacg tcggcagcag tgtgagcctg    60
gagtgcgatt ttgaccgcag agaatgcact gaactggaag ggataagagc cagttttgcag    120
aaggtagaaa atgatacgtc tctgcaaagt gaaagagcca cctgctgga ggagcagctg    180
cccctgggaa aggcctttgtt ccacatccct agtgtccaag tgagagattc cgggcagtag    240
cgttgccctgg tcattctcgg ggccgcctgg gactacaagt acctgacggt gaaa

```

(서열 30).

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

```

FTVTAPKEVY TVDVGSSVSL ECDFFDRRECT ELEGIRASLQ KVENDTSLQS ERATLLEEQL    60
PLGKALFHIP SVQVRDSGQY RCLVICGAAN DYKYLTVK

```

(서열 31).

#### d. PD-L2 세포의 도메인 단편

PD-L2 세포의 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 결합되는 PD-L2 세포의 도메인의 단편이 사용될 수 있다.

제1 융합 파트너로서 사용될 수 있는 류린 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 펩티드의 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 펩티드는 서열 1 내에 함유된 신호 펩티드를 포함한 본원에 개시된 임의의 것일 수 있거나, 당업계에 공지된 임의의 신호 펩티드일 수 있다.
- [0139] 제1 융합 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 펩티드의 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 펩티드는 서열 3 내에 함유된 신호 펩티드를 포함한 본원에 개시된 임의의 것일 수 있거나, 당업계에 공지된 임의의 신호 펩티드일 수 있다.
- [0146] 제1 융합 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]

[0149] 비-인간 영장류 PD-L2의 추가의 적합한 단편은 임의로 N-말단 단부에 부착된 신호 펩티드의 1 내지 5개의 아미노산을 갖는, 다음 서열을 포함하고 이로 제한되지 않는다:

[0150] 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.

[0151]

[0152] 신호 펩티드는 서열 5 내에 함유된 신호 펩티드를 포함한 본원에 개시된 임의의 것일 수 있거나, 당업계에 공지된 임의의 신호 펩티드일 수 있다.

[0153]

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 폴리펩티드 또는 PD-1 결합 단편은 또한 서열 3의 잔기 110-114에서 아미노산 WDKY 또는 서열 23의 잔기 91-95에서 WDKY를 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 WDKY 또는 서열 23의 잔기 91-95에서 WDKY를 포함할 것이다.

## [0154] 2. PD-L1 세포외 도메인

[0155] 한 실시양태에서, 변이체 PD-L1 폴리펩티드는 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:

FTVTVPKDLV VVEYGSNMTI ECKFPVEKQL DLALIVYWE MEDKNIIQFV HGEEDLKVQH	60
SSYRQRARLL KDQLSLGNAA LQITDVKLQD AGVYRCMISY GGADYKRITV KVNAPYRKIN	120
QRILVVDVPT SEHELTCQAE GYPKAEVIWT SSDHQVLSGK TTTTNSKREE KLFNVSTLR	180
INTTTNEIFY CTFRRLDPEE NHTAELVIPE LPLAHPNER	220

(서열 32).

[0156]

[0157] PD-L1의 막횡단 도메인은 서열 9의 아미노산 위치 239에서 시작한다. PD-L1의 적합한 단편은 신호 펩티드 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.

[0158] 무런 PD-L1의 세포외 도메인은 다음 아미노산 서열을 가진다:

FTITAPKDLV VVEYGSNVTM ECRFPVEREL DLLALVYWE KEDEQVIQFV AGEEDLKPQH	60
SNFRGRASLP KDQLLKGNA LQITDVKLQD AGVYCCII SY GGADYKRITL KVNAPYRKIN	120
QRISVDPAT S EHELICQAE G YPEAEVIWTN SDHQPVSGKR SVTTSRTEGM LLNVTSLSRV	180
NATANDVFYC TFWRSQPGQN HTAELIPEL PATHFPQNR HTVLLGSILL FLIVVSTVL	239

(서열 33).

[0159]

[0160] 유린 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, 유린 PD-L1의 세포외 도메인을 포함한다

### [0161] 3. B7.1 세포외 도메인

#### [0162] a. 유린 B7.1 세포외 도메인

[0163] 한 실시양태에서, PD-1 길항제 폴리펩티드는 유린 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:

```
atggcttgca attgtcagtt gatgcaggat acaccactcc tcaagtttcc atgtccaagg      60
ctcattcttc tctttgtgct gctgattcgt ctttcacaag tgtcttcaga tgttgatgaa    120
caactgtcca agtcagtgaa agataaggta ttgtgcctt gccgttacaa ctctctcat      180
gaagatgagt ctgaagaccg aatctactgg caaaacatg acaaaagtgt gctgtctgtc    240
attgctggga aactaaaagt gtggcccgag tataagaacc ggactttata tgacaacact    300
acctactctc ttatcatcct gggcctggct ctttcagacc ggggcacata cagctgtgtc    360
gttcaaaaga aggaagagg aacgtatgaa gttaaacact tggctttagt aaagtgtgcc    420
atcaagctg acttctctac ccccaacata actgagctcg gaaacccatc tgcagacact    480
aaaaggatta cctgctttgc ttccgggggt ttcccaagc ctgccttctc ttggttgga    540
aatggaagag aattacctgg catcaatacg acaatttccc aggatcctga atctgaattg    600
tacaccatta gtagccaact agatttcaat acgactcgca accacaccat taagtgtctc    660
attaatatg gagatgtcga cgtgtcagag gacttcaact gggaaaaacc ccagaagac    720
cctcctgata gcaagaac                                738
```

(서열 34).

[0164]

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

```
MACNCQLMQD TPLLKFCPR LILFVLLIR LSQVSSDVDE QLSKSVKDKV LLPCRYNSPH      60
EDESEDRIYW QKHKVVLVS IAGKLKWPE YKNRTLYDNT TYSLIILGLV LSDRGTYSCV    120
VQKKERGTYE VKHLALVKLS IKADFSTPNI TEGNPSADT KRITCFASGG FPKPRFSWLE    180
NGRELPGINT TISQDFESEL YTISSQLDFN TTRNHTIKCL IKYGDHVS DFTWEKPPED    240
PPDSKN                                246
```

(서열 35).

[0166]

[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 유린 아미노산 서열을 제공한다:

```
VDEQLSKSVK DKVLLPCRYN SPHEDESEDR IYWQKHKV LSVIAGKLKV WPEYKNRTLY      60
DNNTYSLIIL GLVLSDRGTY SCVVQKKERG TYEVKHLALV KLSIKADFST PNITESGNPS    120
ADTKRITCFA SGGFPKPRFS WLENGRELPG INTTISQDPE SELYTISSQL DNNTTRNHTI    180
KCLIKYGDH VSEDFTWEKP PEDPPDSKN                                209
```

(서열 36).

[0168]

[0169] 다른 실시양태에서, PD-1 길항제 폴리펩티드는 유린 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:

```
gttgatgaac aactgtccaa gtcagtgaaa gataaggat tgcgtgccttg ccgttacaa      60
tctcctcatg aagatgagtc tgaagaccga atctactggc aaaaacatga caaagtgggtg    120
ctgtctgtga ttgctgggaa actaaaagtgt tggcccgagt ataagaaccg gactttatat    180
gacaacacta cctactctct tatcatcctg ggcttggtcc tttcagaccg gggcacatac    240
agctgtgtcg ttcaaaagaa ggaagaggga acgtatgaag ttaaacactt g              291
```

(서열 37).

[0170]

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

```
VDEQLSKSVK DKVLLPCRYN SPHEDESEDR IYWQKHKV LSVIAGKLKV WPEYKNRTLY      60
DNNTYSLIIL GLVLSDRGTY SCVVQKKERG TYEVKHL                                97
```

(서열 38).

[0172]

[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:

```
atggggcaca cagggagca gggaaacatca ccatccaagt gtccatacct caattttctt 60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag 120
gaagtgaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacatg tttctgtga agagctggca 180
aaaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac 240
atgaatatat ggcccgagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc 300
attgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360
tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
gacttcctca cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480
atttgcctca cctctggagg ttttccagag cctcacctct cctggttgga aaatggagaa 540
gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaaataca ccaagcaaga gcattttcct 720
gataacctgc 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:

```
MGHTRRQGTG PSKCPYLNFQ QLLVLAGLSH FCSGVIHVTG EVKEVATLSC GHNVSVLELA 60
QTRIYWQKEK KMWLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDIINNLS IVILALRPSD EGYECVVLK 120
YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLWLENGE 180
ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSEFMCLIKY 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:

```
VIHVTKEVKE VATLSCGHNV SVEELAQTRI YWQKEKKMVL TMMSGDMNIW PEYKNRTIFD 60
ITNNLSIVIL ALRPSDEGTG ECVVLKYEKD AFKREHLAEV TLSVKADFPT PSISDFEIFT 120
SNIRRIICST SGGFPEPHLS WLENGEELNA INTTVSQDPE TELYAVSSKL DFNMTTNHSE 180
MCLIKYGHRL VNQTFNWNTT QKEHFDNL 209
```

[0179] (서열 41).

[0180] 다른 실시양태에서, PD-1 길항제 폴리펩티드는 인간 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:

```
gttatccacg tgaccaagga agtgaaagaa gtggcaacgc tgtcctgtgg tcacaatgtt 60
tctgttgaag agctggcaca aactcgcatc tactggcaaa aggagaagaa aatggtgctg 120
actatgatgt ctggggacat gaatatatgg cccgagtaca agaaccggac catctttgat 180
atcactaata acctctccat tgtgatcctg gctctgcgcc catctgacga gggcacatac 240
gagtggtgtg ttctgaagta tgaaaaagac gctttcaagc gggaacacct ggctgaagtg 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):

```
VIHVTKEVKE VATLSCGHNV SVEELAQTRI YWQKEKKMVL TMMSGDMNIW PEYKNRTIFD 60
ITNNLSIVIL ALRPSDEGTG ECVVLKYEKD AFKREHLAEV 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]
- [0188] 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]
- [0191] 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]
- [0195] 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]
- [0198] 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 길항제는 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 촉진할 수 없도록 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 초과 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 무린, 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. 이들 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, 소수성, 또는 부피가 유의하게 변경된 치환이다. 비-보존적 치환은 (a) 예를 들어, 시트 또는 나선 입체형태로서 치환 영역 내의 펩티드 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); 3) 극성, 양대전 잔기 (His, Arg, Lys); 4) 큰 지방족, 비극성 잔기 (Met, Leu, Ile, Val, Cys); 및 5) 큰 방향족 잔기 (Phe, Tyr, Trp). 비-보존적 아미노산 치환의 예는 1) 친수성 잔기, 예를 들어 세린 또는 트레오닌이 소수성 잔기, 예를 들어, 류실, 이소류실, 페닐알라닌, 발릴, 또는 알라닌을 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 아스파르틸을 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, 아스파라긴, 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 이룰 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 억제제를 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 헬퍼 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 플라즈몬 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 세포의 도메인의 전부 또는 일부를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 단편은 전장 단백질의 보다 짧은 폴리펩티드인 폴리펩티드의 임의의 하위세트를 나타낸다.

## [0215] 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 억제제를 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

리셉티드의 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.

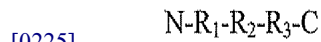
[0220] 변이체 폴리펩티드는 전장 폴리펩티드일 수 있거나, 전장 폴리펩티드의 단편일 수 있다. 바람직한 단편은 PD-L2 및/또는 PD-L1에 결합하기에 효과적인 세포의 도메인의 전부 또는 일부를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 단편은 전장 단백질의 보다 짧은 폴리펩티드인 폴리펩티드의 임의의 하위세트를 나타낸다.

## [0221] 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 보조자극성 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 펩티드 또는 폴리펩티드 링커 도메인을 함유한다.

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



[0226] 여기서, "N"은 융합 단백질의 N-말단을 나타내고, "C"는 융합 단백질의 C-말단을 나타내고, "R<sub>1</sub>"은 PD-L2, PD-L1, B7.1, 또는 PD-1 폴리펩티드 또는 항원-결합 표적화 도메인이고, "R<sub>2</sub>"는 펩티드/폴리펩티드 링커 도메인이고, "R<sub>3</sub>"은 표적화 도메인 또는 항원-결합 표적화 도메인이고, 여기서 "R<sub>1</sub>"이 항원-결합 표적화 도메인일 때 "R<sub>3</sub>"은 폴리펩티드 도메인이고, "R<sub>1</sub>"이 PD-L2, PD-L1, B7.1, 또는 PD-1 폴리펩티드 도메인일 때 "R<sub>3</sub>"은 항원-결합 표적화 도메인이다. 바람직한 실시양태에서, "R<sub>1</sub>"은 PD-L2, PD-L1, B7.1, 또는 PD-1 폴리펩티드 도메인이고, "R<sub>3</sub>"은 항원-결합 표적화 도메인이다.

[0227] 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 펩티드/폴리펩티드 링커 도메인) 중의 하나에 함유될 수 있다.

[0228] 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 이종이량체/이종다량체일 수 있다.

[0229] 융합 단백질의 모듈 (module) 성질 및 상이한 조합으로 이량체화 또는 다량체화하는 그들의 능력은 종양 세포 미세환경에 대한 면역 반응을 향상시키는 기능을 하는 표적화 분자에 대한 풍부한 선택을 제공한다.

## [0230] 1. 항원-결합 표적화 도메인

[0231] 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.

## [0232] 종양/종양 연관 혈관 표적화 도메인

[0233] 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 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 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 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.
- [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 공지 구조의 종양 항원은 다음 세포 표면 수용체를 포함한다: HER1 (GenBank 기탁 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, D32075, 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);  $\beta$ -인간 융모성 성선자극 호르몬 ( $\beta$ -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)]); 글리코실트랜스퍼라제  $\beta$ -1,4-N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제 (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 ([Vijayasardahi, 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-Abl 융합 단백질, Casp-8, 베타-카테닌, cdc27, cdk4, cdkn2a, coa-1, dek-can 융합 단백질, EF2, ETV6-AML1 융합 단백질, LDLR-푸코실트랜스퍼라제 AS 융합 단백질, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-1, 2, 및 3, neo-PAP, 미오신 클래스 I, OS-9, pm1-RAR  $\alpha$  융합 단백질, PTPRK, K-ras, N-ras, 트리오포스페이트 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, 엡스타인 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,  $\beta$ -카테닌, CDK4, Mum-1, p16, TAGE, PSMA, PSCA, CT7, 텔로머라제, 43-9F, 5T4, 791Tgp72,  $\alpha$ -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

[0244] 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.

[0245] 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

[0247] 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 먼 부위로 전이를 가능하게 하도록 그를 왜곡하기 위해 종양성 백혈구 프로파일의 조작에 의해 달성되는 성장을 용이하게 한다. 따라서, 케모킨은 종양 진행에 매우 중요하다.

[0248] 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, 무린 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 과잉 상태가 존재한다.

[0249] 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

[0252] 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

[0254] 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.

[0255] *Fc 도메인*

[0256] 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 무린 면역글로불린으로부터 유래된다. 보다 바람직한 실시양태에서, Fc 도메인은 C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 영역을 포함하는 인간 IgG1 또는 무린 IgG2a로부터 유래된다.

[0257] 한 실시양태에서, 인간 면역글로불린 C<sub>Y</sub>1 사슬의 힌지, C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 영역은 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 핵산에 의해 코딩된다:

```
gagcctaagt catgtgacaa gaccatacgt tgcacacccct gtcccgtccc agaactgctg    60
gggggaccta gcgtttttctt gttcccccca aagcccaagg acaccctcat gatctcacgg    120
actcccgaaag taacatgcgt agtagtcgac gtgagccacg aggatcctga agtgaagtgt    180
aatgtgtacg tggacggagt cgaggtgcat aatgccaaaa ctaaaccctcg ggaggagcag    240
tataacagta cctaccgcgt ggtatccgtc ttgacagtgc tccaccagga ctggctgaat    300
ggtaaggagt ataaatgcaa ggtagcgaac aaagctcttc cggccccaat tgaagaagact    360
atcagcaagg ccaagggaca accccgcgag cccaggtttt acacccttcc accttcacga    420
gacgagctga ccaagaacca ggtgtctctg acttgtcttg tcaaaggttt ctatccttcc    480
gacatgcgag tggagtggga gtcaaacggg cagcctgaga ataactacaa gaccacaccc    540
ccagtgcctg atagcgatgg gagctttttc ctctacagta agctgactgt ggacaaatcc    600
cgctggcagc agggaaacgt tttctcttgt agcgtcatgc atgaggccct ccacaacctat    660
tatactcaga aaagcctgag tctgagtcctc ggcaaaa    696
```

(서열 44).

[0259] 서열 44에 의해 코딩되는 인간 면역글로불린 C<sub>Y</sub>1 사슬의 힌지, C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 영역은 다음 아미노산 서열을 가진다:

```
EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF    60
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT    120
ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKQVSL TCLVKGFPYS DIAVEWESNG QPENNYKTP    180
PVLDSGSGFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTKSLSLSP GK    232
```

(서열 45).

[0261] 다른 실시양태에서, 무린 면역글로불린 C<sub>Y</sub>2a 사슬의 힌지, C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 영역은 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 핵산에 의해 코딩된다:

```
gagccaagag gtccatcagat caagccctgc cggccttgta aatgccagc tccaaatttg    60
ctgggtggac cgtcagctctt tatcttcccg ccaaagataa aggacgtctt gatgattagt    120
ctgagcccca tcgtgacatg cgttggtggtg gatgtttcag aggatgacct cgacgtgcaa    180
atcagttggt tcgttaacaa cgtggaggtg cataccgctc aaaccagac ccacagagag    240
gattataaca gcaccctgcg ggtagtgtcc gccctgcgga tccagcatca ggattggatg    300
agcgggaaag agttcaagtg taaggtaaac aacaaagatc tgccagcgcc gattgaacga    360
accattagca agccgaaaagg gagogtgccg gcacctcagg tttacgtcct tcctccacca    420
gaagaggaga tgacgaaaaa gcaggtgacc ctgacatgca tggttaactga ctttatgcca    480
gaagatattt acgtggaatg gactaataac ggaagacagc agctcaatta caagaacact    540
gagcctgttc tggattctga tggcagctac tttatgtact ccaaataggg ggtcgagaag    600
aagaattggg tcgagagaaa cagttatagt tgctcagtggt tgcagtaggg cctccataat    660
catcacacca caaagtcctt cagccgaacg cccgggaaa    699
```

(서열 46).

[0263] 서열 46에 의해 코딩되는 무린 면역글로불린 C<sub>Y</sub>2a 사슬의 힌지, C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 영역은 다음 아미노산 서열을 가진다:

```

EPRGFTIKPC PPCKCPAPNL LGGPSVFIFP PKIKDVLMS LSPIVTCVVV DVSEDDPDVQ    60
ISWFVNNEV HTAQQTQTHRE DYNSTLRVVS ALPIQHQDWM SGKEFKCKVN NKDLPAPIER    120
TISKFKGSRV APQVYVLPFP EEMTKKQVT LTCMVTDFMP EDIYVEWTNN GKTELNYKNT    180
EPVLDSGGSY FMYSLRVEK KNWVERNSYS CSVVHEGLHN HHTTKFSFRT 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) 림프종 또는 발덴스트롬 (Waldenstrom) 거대글로불린혈증에 대해 리툭시맙 (CD20에 대한 키메라 (chimera) 마우스/인간 IgG1 모노클로날 항체)으로 치료한 환자에서 치료 결과는 Fc $\gamma$  수용체의 대립유전자 변이체의 개체의 발현을 인간 IgG1의 Fc 도메인에 대한 별개의 고유 친화도와 상호관련시켰다. 특히, 저친화도 활성화 Fc 수용체 CD16A (Fc $\gamma$ RIIA)의 고친화도 대립유전자를 갖는 환자는 보다 높은 반응물을 보였고, 비-호지킨 림프종의 경우에 진행이 없는 생존을 개선시켰다. 다른 실시양태에서, Fc 도메인은 저친화도 억제성 Fc 수용체 CD32B (Fc $\gamma$ RIIB)에 대한 결합을 감소시키고 저친화도 활성화 Fc 수용체 CD16A (Fc $\gamma$ 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 당업계에서 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]

글리코실포스파티딜이노시톨 앵커 (anchor) 도메인

[0268]

다른 실시양태에서, 종양 또는 종양 연관 신생혈관 표적화 도메인은 글리코실포스파티딜이노시톨 (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 ( $\omega$ -부위)에서 한 세트의 작은 아미노산들에 이어 친수성 스페이스 (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 ( $\alpha$ 1-2)만노스 ( $\alpha$ 1-6)만노스 ( $\alpha$ 1-4)글루코사민 ( $\alpha$ 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 융합 파트너에 대한 필요 없이 T 세포 수용체 결합 도메인 폴리펩티드에 직접 첨가될 수 있다.

[0272] **2. 펩티드 또는 폴리펩티드 링커 도메인**

[0273] 본원에 개시된 융합 단백질은 임의로 보조자극 폴리펩티드 도메인을 항원-결합 표적화 도메인으로부터 분리시키는 펩티드 또는 폴리펩티드 링커 도메인을 함유한다.

[0274] *항체의 힌지 영역*

[0275] 한 실시양태에서, 링커 도메인은 면역글로불린의 힌지 영역을 함유한다. 바람직한 실시양태에서, 힌지 영역은 인간 면역글로불린으로부터 유래된다. 힌지가 유래될 수 있는 적합한 인간 면역글로불린은 IgG, IgD 및 IgA를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 힌지 영역은 인간 IgG로부터 유래된다.

[0276] 다른 실시양태에서, 링커 도메인은 상기한 바와 같이 면역글로불린의 힌지 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<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 영역을 포함하는 인간 IgG로부터 유래된다.

[0277] 다른 실시양태에서, 링커 도메인은 면역글로불린의 힌지 영역, 및 면역글로불린 중쇄의 C<sub>H</sub>1 도메인 또는 면역글로불린 경쇄의 C<sub>L</sub> 도메인을 함유한다. 바람직한 실시양태에서, C<sub>H</sub>1 또는 C<sub>L</sub> 도메인은 인간 면역글로불린으로부터 유래된다. C<sub>L</sub> 도메인은 κ 경쇄 또는 λ 경쇄로부터 유래될 수 있다. 보다 바람직한 실시양태에서, C<sub>H</sub>1 또는 C<sub>L</sub> 도메인은 인간 IgG로부터 유래된다.

[0278] 면역글로불린 힌지 영역 및 다른 도메인의 아미노산 서열은 당업계에 잘 공지되어 있다.

[0279] *다른 펩티드/폴리펩티드 링커 도메인*

[0280] 다른 적합한 펩티드/폴리펩티드 링커 도메인은 자연 발생하는 또는 비-자연 발생하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다. 펩티드 링커 서열은 적어도 2개의 아미노산 길이이다. 바람직하게는, 펩티드 또는 폴리펩티드 도메인은 가요성 펩티드 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 펩티드 결합(들)에 의해 연결된 2개 이상의 아미노산 잔기를 함유하는 펩티드 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 펩티드/폴리펩티드는 아미노산 서열 Gly-Ser, Gly-Ser-Gly-Ser (서열 48), Ala-Ser, Gly-Gly-Gly-Ser (서열 49), (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub> (서열 50) 및 (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>4</sub> (서열 51)를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 추가의 가요성 펩티드/폴리펩티드 서열은 당업계에 잘 공지되어 있다.

[0281] **3. 이량체화 및 다량체화 도메인**

[0282] 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/동시억제성 수용체 결합 도메인, 종양/종양 신생혈관 항원-결합 도메인, 또는 펩티드/폴리펩티드 링커 도메인) 중 하나 내에 함유될 수 있다.

[0283] 이량체화 도메인

[0284] "이량체화 도메인"은 적어도 2개의 아미노산 잔기 또는 적어도 2개의 펩티드 또는 폴리펩티드 (동일한 또는 상이한 아미노산 서열을 가질 수 있음)의 회합에 의해 형성된다. 펩티드 또는 폴리펩티드는 공유 및/또는 비-공유 회합(들)을 통해 서로 상호작용할 수 있다. 바람직한 이량체화 도메인은 파트너 융합 단백질 상의 시스템

과 분자간 디설피드 결합을 형성할 수 있는 적어도 하나의 시스테인을 함유한다. 이량체화 도메인은 파트너 융합 단백질들 사이에 디설피드 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 펩티드/폴리펩티드 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<sub>H</sub>1-C<sub>L</sub> 쌍, 미국 특허 5,821,333에 기재된 바와 같은 조작된 "마디 (knob)" 및/또는 "용기부"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. Biochem. Mol. Biol., 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 이중 이량체, 예를 들어 LFA-1 및 GPIIb/IIIa), 또는 그의 이량체화 영역(들), 이량체성 리간드 폴리펩티드 (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. 폴리펩티드 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, 펩티드 서열의 라이브러리를 예를 들어, WO 01/00814에 기재된 방법을 이용하여 이중이량체화에 대해 스크리닝할 수 있다. 단백질-단백질 상호작용을 위한 유용한 방법은 또한 미국 특허 6,790,624에 기재되어 있다.

[0286] 다량체화 도메인

[0287] "다량체화 도메인"은 3개 이상의 펩티드 또는 폴리펩티드가 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 펩티드 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. 세포의 공간에서, 이중삼량체성 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 폴리펩티드 다량체화를 매개하는 다른 도메인은 당업계에 공지되어 있고, 개시된 융합 단백질에서 사용하기에 적합하다.

[0290] **4. 예시적인 융합 단백질**

[0291] **B7-DC**

[0292] 대표적인 류린 PD-L2 융합 단백질은 다음 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 핵산에 의해 코딩된다:

```

atgtctgctcc tgcgtgccgat actgaacctgt agcttacaac ttcattcctgt agcagcttta 60
ttcaccgtga cagcccccata agaagtgtac accgtagacg tcggcagcag tctgagcctg 120
gagtgcgatt ttgaccgcag agaatgoact gaactggaag ggataagagc cagttttgcag 180
aaggtagaaa atgatacgtc tctgcaaagt gaaagagcca ccctgctgga ggagcagctg 240
ccctgggaaa aggcctttgtt ccacatccct agtgtccaag tgagagattc cgggcagtag 300
cgttgccctg toatctgcgg ggccgcctgg gactacaagt acctgacggt gaaagtcaaa 360
gctttcttaca tgaggataga cactaggatc ctggagggttc caggtagagg ggaggtagcag 420
cttacctgcc aggctagagg ttatccccta gcagaagtgt cctggcaaaa tgtcagtggt 480
cctgccaaca ccagcccatc caggaccccc gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg 540
cgcctcaagc ctacagcctag cagaaacttc agctgcattg tctggaaatgc tcacatgaag 600
gagctgactt cagccatcat tgaccctctg agtcggatgg aacccaaagt ccccgaaagc 660
tgaggagcaa gaggctctac gatcaagccc tgccgcctct gtaaatgccc agctccaaat 720
ttgctgggtg gaccgtcagt ctttatcttc ccgcaaaaga taaaggacgt cttgatgatt 780
agtctgagcc ccactgtgac atgcgttgtg gtggatgttt cagaggatga ccccagcgtg 840
caaatcagtt ggttcgttaa caacgtggag gtgcataccg ctcaaaccca gaccacaga 900
gaggattata acagcacctc gcgggtagtg tccgcctcgc cgatccagca tcaggattgg 960
atgagcggga aagagttcaa gtgtaaggta aacaacaaag atctgccagc gccgattgaa 1020
cgaaccatta gcaagccgaa agggagcgtg cgcgcacctc aggtttacgt ccttccctcca 1080
ccagaagagg agatgacgaa aaagcagggtg accctgacat gcattgtaac tgactttatg 1140
ccagaagata ttacgtgga atggactaat aacggaaaga cagagctcaa ttacaagaac 1200
actgagcctg ttctggattc tgatggcagc tactttatgt actccaaatt gagggctgag 1260
aagaagaatt gggctcagag aaacagttat agttgtcagc tgggtcatga ggcctccat 1320
aatcatcaca ccacaaagtc cttcagccga acgcccggga aatga 1365

```

(서열 52).

[0293]

[0294]

서열 52에 의해 코딩된 류린 PD-L2 융합 단백질은 다음 아미노산 서열을 가진다:

```

MLLLLPIILNL SLQLHPVAAL FVTAPKEVY TVDVGSSVSL ECDFFRRECT ELEGIRASLQ 60
KVENDTSLQS ERATLLEEQL PLGKALFHIP SVQVRDSGQY RCLVICGAAM DYKYLTVKVK 120
ASYMRIDTRI LEVPGTGEVQ LTCQARGYPL AEVSWQNVSV PANTSHIRTP EGLYQVTSVL 180
RLKPQPSRNF SCHFWNAHMK ELTSAIIDPL SRMEPKVPRT WEPRGPTIKP CPPCKCFAPN 240
LEGGPSVFIF PPKIKDVLMI SLSPIVTCVV VDVSEDDPDV QISWFWNNVE VHTAQQTQTHR 300
EDYNSTLRV V SALPIQHQDW MSGKEFKCKV NNKDLPAPIE RTISKPKGSV RAPQVYVLP 360
PEEEMTKKQV TLTCMVTDPM PEDIIYVEWTN NGKTELNYKN TEPVLDSGGS YFMYSKLRVE 420
KKNWVERNSY SCSVVHEGLH NHHTTKSFSR TPGK 454

```

(서열 53).

[0295]

[0296]

신호 서열이 없는 서열 53의 류린 PD-L2 융합 단백질의 아미노산 서열은 다음 서열이다:

```

LFTVTAPKEV YTVDVGSSVS LECDFDRREC TELEGRASL QKVENDTSLQ SERATLLEEQ 60
LPLGKALFHI PSVQVRDSGQ YRCLVICGAA WDKYLTVKVK KASYMRIDTR ILEVPGTGEV 120
QLTCQARGYP LAEVSQNVSV VPANTSHIRT PEGLYQVTSV LRLKPQPSRN FSCMFVNAHM 180
KELTSAIIDP LSRMEPKVPR TWEPGPTIK PCPPCKCPAP NLGGPSVFI FPPKIKDVL 240
ISLSPIVTCV VVDVSEDDPD VQISWFWNNV EVHTAQQTQTH REDYNSTLRV VSALPIQHQD 300
WMSGKEFKCK VNNKDLPAPI ERTISKPKGS VRAPQVYVLP PPEEEMTKKQ VTLTCMVTD 360
MPEDIYVEWT NNGKTELNYK NTEPVLDSG SYFMYSKLRV EKKNWVERNS YSCSVVHEGL 420
HNHTTKSFS RTPGK 435

```

(서열 54).

[0297]

[0298]

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

```

atgatcttct tctcttgat gctgtctttg gaattgcaac ttcacaaat cgcggccctc 60
tttactgtga cctgtccaaa agaactgtat atcattgagc acgggtccaa tgtgacctc 120
gaatgtaact ttgacaccgg cagccacgtt aacctggggg ccatcactgc cagcttgcaa 180
aaagtggaaa acgacacttc acctcaccgg gagagggcaa cctcttgga ggagcaactg 240
ccattgggga aggcctcctt tcatatccct cagggtgcagg ttoggggatga gggacagtac 300
cagtgacatta ttatctacgg cgtggcttgg gattacaagt atctgacctt gaaggtgaaa 360
gcgtctctatc ggaaaattaa cactcacatt ctaaggtgc cagagacgga cgaggtggaa 420
ctgacatgcc aagccaccgg ctaccgcttg gcagaggtca gctggcccaa cgtgagcgta 480
cctgtcaaca cttctcattc taggacaccc gagggcctct accaggttac atcogtgctc 540
cgctctcaaa cgcgccaccg ccggaatttt agttgcgtgt tttggaatac ccacgtgcga 600
gagctgactc ttgcatctat tgatctgcag tcccagatgg agccacggga tcatccaact 660
tgggaaacct aatcttgcca taaaactcat acctgtcccc cttgccacgc ccccgagctt 720
ctggggaggtc ccagtggttt tctgtttccc ccaaaacctt aggcacacct tatgatattc 780
cgaaacggcg aagtgcacatg cgtgggtgtg gacgtctcac acgaagacc ggaggtgaaa 840
ttcaactggt acgttgacgg agttgaggtt cataacgcta agaccaagcc cagagaggag 900
caatacaatt ccacctatcg agtgggttagt gtactgacgc ttttgacca agactggctg 960
aatggaaaag aatagcagtg caaagtatca acaaggctt tgcctgcacc catcgagaag 1020
acaatttcta aagccaaagg gcagccaccg gaaccgcagg tgtacacct cccaccatcc 1080
cgcgacgagc tgacaaagaa tcaagtatcc ctgacctgcc tgggtgaaagg cttttaccca 1140
tctgacattg cctgtgaatg ggaatcaaat ggacaacctg agaacaacta caaaaccact 1200
ccacctgtgc ttgacacgga cgggtccttt ttctgtgata gtaagctcac tgtcgataag 1260
tctcgtggc agcagggcaa cgtcttttca tgtagtgtga tgcacgaagc tctgcacaa 1320
cattacaccc agaagtcctt gtcactgagc ccaggtaaat ga 1362

```

(서열 55).

[0299]

[0300]

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

```

MIFLLMLSL ELQLHQIAAL FTVVPKELY IIEHGSNVT ECFDGTGSHV NLGAIASLQ 60
KVENDTSPHR ERATLLEBQL PLGKASFHIP QVQVRDEGQY QCIIYGVAV DYKYLTLKVK 120
ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL 180
RLKPPPPGRNF SCVFWNTHVR ELTLASIDLQ SQMEPRTHPT WEPKSCDKTH TCPPCPAPEL 240
LGGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTPREE 300
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS 360
RDELTKNQVS LTCVLKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKT PPVLDSDSGS FLYSKLTVDK 420
SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSL SPK 453

```

(서열 56).

[0301]

[0302]

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

```

LFTVVPKEL YIIEHGSNVT LECNFDGTGSH VNLGAIASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ 60
LPLGKASFHI PQVQVRDEGQ YQCIIYGVAV WDKYLTLKV KASYRKINTH ILKVPETDEV 120
ELTQCATGYF LAEVSWPVSV VPANTSHSRT EGLYQVTSV LRLKPPPPGRN SCVFWNTHV 180
RELTLASIDL QSQMEPRTHP TWEPKSCDKT HTCPPCPAPE LGGPSVFLFP PPKPKDTLMI 240
SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV FKNWYVDGVE VHNKTPPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW 300
LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REFQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY 360
PSDIAVEWES NGQPENNYKT TFPVLDSDGS FFLYSLKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH 420
NHYTQKSLSL SPKG 434

```

(서열 57).

[0303]

[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 라이브러리 또는 게놈 라이브러리, 또는 게놈 DNA 제한 소화를 함유하는 겔 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, 당업계에서 공지되고 상기 논의된 인간 B7-DC, 인간 PD-L1 또는 유린 PD-L2 및 유린 PD-L1의 뉴클레오타이드 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'-O-메틸 또는 2'-O-알릴 당을 형성하도록 리보스 당의 2' 히드록실의 변형을 포함할 수 있다. 데옥시리보스 포스페이트 백본은 모노폴리노 핵산 (여기서, 각각의 염기 모이어티는 6원의 모노폴리노 고리에 연결된다), 또는 펩티드 핵산 (여기서, 데옥시포스페이트 백본은 슈도펩티드 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.

# [0309] H. PD-1 수용체 길항제를 발현하는 벡터 및 숙주 세포

[0310] 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.

[0311] 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 뉴클레오타이드 내에서 DNA 분자의 영역으로 구성된 발현 제어 서열이다. 코딩 서열을 프로모터의 제어 하에 놓기 위해, 폴리펩티드의 번역 관독 프레임의 번역 개시 부위를 프로모터의 하류의 1 내지 약 50개의 뉴클레오타이드 사이에 배치할 필요가 있다. 인핸서는 시간, 위치 및 수준의 측면에서 발현 특이성을 제공한다. 프로모터와 달리, 인핸서는 전사 부위로부터 다양한 거리에 위치할 때 기능할 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.

[0312] 적합한 발현 벡터는 비제한적으로 예를 들어, 박테리오파지, 바쿨로바이러스, 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 노바젠 (Novagen, 미국 위스콘신주 메디슨), 클론테크 (Clontech, 미국 캘리포니아주 팔로 알토), 스트라타젠 (Stratagene, 미국 캘리포니아주 라 줄라), 및 인비트로젠 라이프 테크놀로지스 (Invitrogen Life Technologies, 미국 캘리포니아주 칼스바드)와 같은 회사로부터 상업적으로 입수가 가능하다.

[0313] 발현 벡터는 태그 (tag) 서열을 포함할 수 있다. 태그 서열은 일반적으로 코딩된 폴리펩티드와의 융합체로서 발현된다. 상기 태그는 카르복실 또는 아미노 말단을 포함한 폴리펩티드 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 $\gamma$  1 사슬의 힌지, C $\mu$ 2 및 C $\mu$ 3 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 등



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

[0315] **I. 항체 PD-1 길항제**

[0316] PD-1 길항제, 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.

[0317] 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.

[0318] 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.

[0319] 항-개별특이형 항체는 예를 들어 문헌 [Idiotypy 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)]; [Jerme, 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.

[0320] 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 길항제 에피토프에 결합할 수 있는 그의 단편을 모두 포함하는 것을 의미한다. 이들은 무손상 항체의 Fc 단편이 절여지고, 혈류로부터 보다 신속하게 제거되고, 무손상 항체보다 더 적은 비-특이적 조직 결합을 가질 수 있는 Fab 및 F(ab')<sub>2</sub> 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).

[0321] 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 황산암모늄 침전, 이온 교환 크로마토그래피 및 친화도 크로마토그래피로 처리할 수 있다.

[0322] 면역원은 완전 PD-1 길항제, PD-1, 또는 그의 단편 또는 유도체를 포함할 수 있다. 바람직한 면역원은 PD-1 길항제 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.

[0323] 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 림프질, 비장 또는 말초 혈액으로부터 B 림프구를 일반적으로 융합 촉진제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)의 존재 하에 골수종 세포와 융합시킨다. 상기 용도를 위해 임의의 많은 무린 골수종 세포주가 이용가능하다: P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-k0Ag8.653, Sp2/0-Ag14, 또는 HL1-653 골수종주 (ATCC (미국 메릴랜드주 록빌)로부터 이용가능함). 후속 단계는 비융합된 모 골수종 세포 및 공여체 림프구 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 회석에 의해 서브클로닝하고, 모노클로날 항체를 분리시킨다.

[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 다량체형 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.

### [0326] III. 제조 방법

#### [0327] A. PD-1 길항제 폴리펩티드 및 그의 변이체의 생산 방법

[0328] 분리된 PD-1 길항제 폴리펩티드, 그의 변이체, 및 그의 융합 단백질은 예를 들어, 화학 합성에 의해 또는 숙주 세포 내에서 재조합 생산에 의해 얻을 수 있다. PD-1 길항제 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 길항제 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 길항제 폴리펩티드를 발현하기 위해 이용될 수 있다. 바이러스 기반 발현 시스템은 당업계에 잘 공지되어 있고, 마를로바이러스, 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 (인비트로젠 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, 리포펙션, 인산칼슘, 또는 염화칼슘 동시침전, DEAE 텍스트란, 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). 관심있는 폴리펩티드가 발현되도록 형질감염된 세포를 배양할 수 있고, 폴리펩티드를 예를 들어, 세포 배양 상등액으로부터 또는 용해된 세포로부터 회수할 수 있다. 별법으로, PD-1 길항제 폴리펩티드는 (a) 증폭된 서열을 포유동물 발현 벡터, 예를 들어 pcDNA3 (인비트로젠 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 길항제 폴리펩티드는 예를 들어, 크로마토그래피 방법, 예를 들어 DEAE 이온 교환, 겔 여과, 및 히드록실 아파타이트 크로마토그래피를 이용하여 분리할 수 있다. 예를 들어, 세포 배양 상등액 또는 세포질 추출물 내



의 보조자극 폴리펩티드는 단백질 G 컬럼을 이용하여 분리할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변이체 보조자극 폴리펩티드는 폴리펩티드가 친화도 매트릭스 상에 포획되도록 허용하는 아미노산 서열을 함유하도록 "조작될" 수 있다. 폴리펩티드 정제를 돕도록 예를 들어 태그, 예를 들어 c-myc, 헤마글루티닌, 폴리히스티딘, 또는 Flag<sup>TM</sup> (코닥)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 돕는 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 펩티드에 대해 스크리닝하기 위해, 무작위 펩티드 디스플레이 라이브러리가 사용될 수 있다. 그러한 무작위 펩티드 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 펩티드 디스플레이 라이브러리 및 그러한 라이브러리를 스크리닝하기 위한 키트는 상업적으로 이용가능하다.

#### [0334] B. PD-1 길항제 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자의 생산 방법

[0335] PD-1 길항제 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 비제한적으로 일반적인 분자 클로닝 및 화학적 핵산 합성 기술을 포함한 표준 기술에 의해 생산할 수 있다. 변이체 보조자극 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 얻기 위해, 예를 들어, 중합효소 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 올리고뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 길이이지만, 10개 뉴클레오타이드 내지 수백 개 뉴클레오타이드 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 올리고뉴클레오타이드로서 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 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, >100 뉴클레오타이드)가 합성될 수 있고, 여기서 각각의 쌍은 상보성의 짧은 세그먼트 (예를 들어, 약 15개 뉴클레오타이드)를 함유하여, 올리고뉴클레오타이드 쌍이 어닐링(annealing)될 때 이중체 (duplex)가 형성될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드를 연장시키기 위해 DNA 중합효소가 사용될 수 있어서, 올리고뉴클레오타이드 쌍마다 단일의 이중 가닥 핵산 분자를 생성시키고, 이것은 이후에 벡터 내로 라이게이션될 수 있다. 단리된 핵산은 또한 돌연변이유발에 의해 얻을 수 있다. PD-1 길항제 코딩 핵산은 PCR을 통한 올리고뉴클레오타이드-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.

#### [0337] IV. 제형

##### [0338] A. PD-1 길항제 제형

[0339] PD-1 길항제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 펩티드 또는 폴리펩티드를 함유하는 제약 조성물은 비경구 (근내, 복강내, 정맥내 (IV) 또는 피하 주사), 경피 (수동적으로 또는 전기이온영동 (iontophoresis) 또는 전기천공을 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. 펩티드 또는 폴리펩티드가 아닌 PD-1 수용체의 길항제를 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, 펩티드 및 폴리펩티드를 함유하는 것을 포함하여 개시된 조성물은 비경구 주사에 의해 수용액으로 투여된다. 또한, 제형은 현탁액 또는 에멀전의 형태일 수 있다. 일반적으로, 유효량의 펩티드 또는 폴리펩티드를 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, 아세트레이트, 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 주사가능 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 펩티드는 고체 중합체 매트릭스 또는 미세캡슐 내에 분산되고, 여기서 코어는 중합체 쉘과 상이한 물질로 이루어지고, 펩티드는 자연 상태에서 액체 또는 고체일 수 있는 코어에 분산되거나 현탁된다. 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 겔, 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 압통, 욕창성 궤양 등의 치유를 촉진하기 위해 사용되는 매트릭스의 경우에서와 같이 치유를 돕기 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 프로파일의 보다 우수한 특성 때문에 합성 중합체가 바람직하다. 중합체는 방출이 요구되는 기간을 기초로 하여 선택된다. 일부 경우에, 선형 방출이 가장 유용할 수 있지만, 다른 경우에는 펄스 (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) 메커니즘에 의한 방출을 가능하게 하는 불활성 매트릭스, 예를 들어 필름 또는 겔 내로 혼입될 수 있다. 서서히 분해되는 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 유도제)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 불침투성인)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.

### [0350] 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, 사세제 (cachet), 펠렛, 분말, 또는 과립, 또는 중합체 화합물, 예를 들어 폴리락트산, 폴리글리콜산 등의 입자형 제제 내로 또는 리포솜 내로 물질의 혼입된 것을 포함한다. 상기 조성물은 본 발명의 단백질 및 유도제의 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 & Wilins, Baltimore, Md. 21201) pages 889-964]을 참조한다. 조성물은 액체 형태로 제조될 수 있거나, 건조 분말 (예를 들어, 동결건조) 형태로 존재할 수 있다. 조성물을 제형화하기 위해 리포솜 또는 중합체 캡슐화가 사용될 수 있다. 또한, 문헌 [Marshall, K. In: Modern Pharmaceutics Edited by G.S. Banker 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 에멀전, 용액, 현탁액, 및 시럽은 불활성 희석제; 아주반트, 예를 들어 습윤제, 유화 및 현탁화제; 및 감미, 조미, 및 향미제를 포함한 다른 성분을 함유할 수 있다.

### [0353] 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, 이들 폴리펩티드 및 그의 융합 단백질 또는 변이체를 코딩하는 핵산, 또는 PD-1 길항제 폴리펩티드를 발현하는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 포함한다.

#### [0355] 1. 항원

[0356] 항원은 펩티드, 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 이중성 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-푸코실트랜스퍼라제 AS 융합 단백질, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-1, 2, 및 3, neo-PAP, 미오신 클래스 I, OS-9, pm1-RAR α 융합 단백질, PTPRK, K-ras, N-ras, 트리오포스페이트 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, 엡스타인 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,  $\beta$ -카테닌, CDK4, Mum-1, p16, TAGE, PSMA, PSCA, CT7, 텔로머라제, 43-9F, 5T4, 791Tgp72,  $\alpha$ -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

[0360] 임의로, 본원에 기재된 백신은 아주반트를 포함할 수 있다. 아주반트는 다음 중 하나 이상일 수 있고 이로 제한되지 않는다: 오일 에멀전 (예를 들어, 프로인트 (Freund) 아주반트); 사포닌 제형; 비로즘 및 바이러스-유사 입자; 세균 및 미생물 유도체; 면역자극성 올리고뉴클레오타이드; 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; 리포솜; 폴리옥시에틸렌 에테르 및 폴리옥시에틸렌 에스테르 제형; 폴리포스파젠; 라우라밀 펩티드; 이미다조퀴놀론 화합물; 및 표면 활성 물질 (예를 들어 리소레시틴, 플루로닉 폴리올, 폴리음이온 (polyanion), 펩티드, 오일 에멀전, 키홀 림펫 (keyhole limpet) 헤모시아닌, 및 디니트로페놀).

[0361] 아주반트는 또한 면역조절물질, 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- $\gamma$ ), 대식세포 콜로니 자극 인자, 및 종양 괴사 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

[0364] 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.

[0365] 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. 이들 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 외의 T 세포 수용체에 결합하는 것으로 보인다. PD-1을 통한 음성 신호를 전달하지 않으면서 PD-1 수용체에 결합하여 차단하는 PD-1 길항제가 또한 바람직하다. 이들 길항제의 예는 그들이 PD-1에 결합하는 신호 전달을 촉발하지 않는 PD-1의 재조합 리간드, 예를 들어 PD-L2 및 PD-L1을 포함한다.

[0366] 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.

[0367] 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 칭함), 대식세포, 단핵구, 또는 B 세포] 상의 동중항원 (예를 들어, MHC 동중항원) 에, 또는 임의의 상기 APC에 의해 단백질 항원을 처리함으로써 생산되고 APC의 표면 상의 MHC 분자에 의해 T 세포에 제시된 항원성 펩티드에 노출될 수 있다. T 세포는 CD4<sup>+</sup> T 세포 또는 CD8<sup>+</sup> T 세포일 수 있다.



- [0368] 일부 실시양태에서, PD-1 길항제 폴리펩티드는 T 세포에 직접 투여될 수 있다. 별법으로, APC, 예를 들어 대식 세포, 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 첨가될 수 있다. 그러한 분석에 PD-1 길항제 폴리펩티드를 첨가하는 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 활성화에 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: 방광, 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.

### [0381] 3. 아주반트 요법

[0382] 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 항제-매개된) 후에 PD-1 길항제 또는 그를 코딩하는 핵산의 수동 투여를 포함한다. PD-1 길항제는 1차 반응을 향상/증가시켜, 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 증대시키기 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(항제 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. 트라스투주맵 (헤르셉틴 (Herceptin))이 HER2 양성 종양을 표적화하는 아주반트 요법으로서 사용된다.

[0385] 일반적으로, 아주반트 요법은 다수 메커니즘을 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. 지연형 "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 무린 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 중앙 침윤성 백혈구의 집단을 증가시키는 방법을 제공한다.

## [0391] 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.

## [0393] 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, 크리스탄타스파제, 시클로포스파미드, 시타라빈, 다카르바진, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독세탁셀, 독소루비신, 에피루비신, 에토포시드, 플루다라빈, 플루오로우라실, 겐시타빈, 히드록시카르바미드, 이다루비신, 이포스파미드, 이리노테칸, 류코보린, 리포좀 독소루비신, 리포좀 다우노루비신, 로무스틴, 멜팔란, 메르캅토피린, 메스나, 메토트렉세이트, 미토마이신, 미톡산트론, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 페메트렉세드, 펜토스타틴, 프로카르바진, 라티트렉세드, 사트라플라틴, 스트렙토조신, 테가푸르-우라실, 테모졸로미드, 테니포시드, 티오테파, 티오구아닌, 토포테칸, 트레오술판, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 비노렐빈 또는 이들의 조합물을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 대표적인 세포자멸 유도제는 플루다라빈타우로스포린, 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 초과 PD-1 길항제가 조합으로 사용될 수 있다.

## [0396] 2. 면역 반응을 향상시키는 융합 단백질

[0397] 다른 실시양태에서, PD-1 길항제는 면역 반응을 향상시키는 다른 B7 패밀리의 보조자극 분자를 함유하는 조성물과 동시-투여될 수 있다. 다른 B7 보조자극 폴리펩티드는 임의의 종에서 기원할 수 있다. 한 실시양태에서, 보조자극 폴리펩티드는 포유동물 종의 것이다. 바람직한 실시양태에서, 보조자극 폴리펩티드는 무린 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 패밀리의 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 패밀리의 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% 초과 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 분자 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 분자 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 분자에 비해 B7 수용체 폴리펩티드에 결합하는 능력의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 100%, 또는 심지어 100% 초과하는 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.

#### [0404] 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 향상 또는 촉진하는 기능을 하는 하나 이상의 추가의 물질과 동시-투여될 수 있다.

#### [0406] E. 입양 전달

[0407] 입양 T-세포 요법은 확립된 종양이 있는 환자의 치료를 위한 유망한 전략이지만, 종종 생체의 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  $\mu$ M일 수 있다.

#### [0409] 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 비해 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 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 종양발생형질전환 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 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 Immun., 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 증피종 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.

## [0416] 2. 종양 신생혈관과 연관된 항원

[0417] 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.

[0418] 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.

## [0419] 실시예



- [0420] 본 발명은 다음 비-제한적인 실시예를 참조하여 추가로 이해될 수 있다.
- [0421] **실시예 1: PD-1에 대한 B7-DC 결합**
- [0422] 인간 B7-DC-Ig의 PD-1 결합 활성은 ELISA에 의해 평가하였다. 96-웰 ELISA 플레이트를 2시간 동안 BupH 탄산염/중탄산염 pH 9.4 버퍼 (피어스 (Pierce)) 내에 희석시킨 100  $\mu$ L 0.75  $\mu$ g/mL 재조합 인간 PD-1/Fc (알앤디 시스템즈 (R&D Systems))으로 코팅한 후, BSA 용액 (잭슨 면역리서치 (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  $\mu$ L의 0.5  $\mu$ 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] 무린 B7-DC-Ig의 PD-1 결합 활성을 ELISA에 의해 평가하였다. 96-웰 ELISA 플레이트를 2시간 동안 BupH 탄산염/중탄산염 pH 9.4 버퍼 (피어스) 내에 희석시킨 100  $\mu$ L 0.75  $\mu$ g/mL 재조합 마우스 PD-1/Fc (알앤디 시스템즈)로 코팅한 후, BSA 용액 (캔더-바이오사이언스 (Candor-Bioscience))으로 90분 동안 차단시켰다. 연속 희석시킨 무린 B7-DC-Ig (야생형, 및 PD-1에 대한 감소된 결합에 대해 선택된 D111S 및 K113S 돌연변이체) 및 무린 IgG2a 이소형 대조군을 90분 동안 결합시켰다. 결합된 B7-DC-Ig를 100  $\mu$ L의 0.25  $\mu$ 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 ( $\mu$ g/ml)의 선 그래프를 보여준다. 도 4A 1A는 4 개의 상이한 로트의 인간 B7-DC-Ig의 결합을 보여준다. 도 4B 1B는 야생형 무린 B7-DC-Ig (원), DS 돌연변이체 (D111S 치환을 가진 B7-DC-Ig; 삼각형) 및 KS 돌연변이체 (K113S 치환을 가진 B7-DC-Ig; 사각형), 및 무린 IgG2a 이소형 대조군 (다이아몬드형)의 결합을 보여준다.
- [0425] **실시예 2: PD-1 발현 CHO 세포에 대한 B7-DC 결합**
- [0426] 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 인큐베이션하였다. 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).
- [0427] **실시예 3: B7-DC-Ig는 PD-1에 대한 결합을 위해 B7-H1과 경쟁한다.**
- [0428] B7-H1-Ig를 먼저 알로피코시아닌 (APC)과 접합시켰다. 표지되지 않은 B7-DC-Ig를 다양한 농도에서 먼저 PD-1을 구성적으로 발현하는 CHO 세포주와 함께 인큐베이션한 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.
- [0429] **실시예 4: P815 비만세포종 모델**
- [0430] 무린 B7-DC-Ig의 생체내 활성을 P815 비만세포종 종양 모델에서 시험하였다. P815 비만세포종 세포는 메틸콜란 트랜 (MCA) 처리 후 DBA/2 마우스로부터 유래되었다.  $5 \times 10^4$  개 세포의 SC의 주사는 종양 접종 약 35일 후에 사망을 일으킬 수 있다.
- [0431] DBA/2 마우스 (6-10주령, 암컷)에게 먼저 옆구리에 SC 주사한  $5 \times 10^4$  개의 살아있는 P815 세포를 접종하였다. 6일 후에, 마우스를 IP 주사를 통해 무린 B7-DC-Ig로 처리하였다. 도 4에 제시된 투약 요법은 주사당 100  $\mu$ g의 무린 B7-DC-Ig (약 5 mg/kg)을 매주 2회 6회까지의 투여이었다. 대조군을 비히클 단독으로 또는 무린 IgG로 처리하였다. 종양 크기를 2-3일마다 디지털 캘리퍼스 (digital calipers)로 측정하였다. 미국 적십자 (ARC; 앰플리문 (Amplimmune)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<sup>3</sup>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 근절되었고, 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 mm <sup>3</sup> 의 수	종양 ≥ 500 mm <sup>3</sup> 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 근절을 보여준다. 이어서, 종양이 없는 마우스에게 제52일에 1차 접종 부위 반대편의 옆구리에 투여한  $5 \times 10^4$  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 근절을 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 애플리케이션에서 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 희석으로 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 펠렛을 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  $\mu$ L 세포 + 40  $\mu$ L 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  $6.7 \times 10^5$  세포/mL로 희석하고, 얼음 상에 보관하였다. 일반적으로, 각각의 마우스를 150  $\mu$ L ( $1 \times 10^5$  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:
- [0448] 종양 부피 =  $\pi(D_{\text{short}})^2 \times (D_{\text{long}})/6$  = 약  $0.52 \times (D_{\text{short}})^2 \times (D_{\text{long}})$ .
- [0449] 마우스를 안락사시키고 종양 부피가 2000 mm<sup>3</sup>에 도달하면 또는 종양 집중 부위에 피부 궤양 및 감염이 있으면 연구로부터 제외하였다.
- [0450] **실시예 5: 시클로포스파미드 및 B7-DC-Ig의 조합물은 확립된 종양을 근절할 수 있다**
- [0451] 9 내지 11주령의 Balb/C 마우스에게 상기한 바와 같이  $1.0 \times 10^5$  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  $\mu$ g의 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 단독군 내의 모든 마우스는 종양 성장의 결과로서 죽거나, 종양이 IACUC에서 승인된 크기를 초과하였으므로 안락사시켰다 (결과를 도 6에 제시함). 이들 결과는 단순한 예방만이 아니라 확립된 종양에 대한 치료 요법의 유효성을 입증한다.
- [0452] **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  $1 \times 10^5$ 개의 CT26 세포를 제44일 및 제70일에 재접종하였다. 재접종으로부터 종양이 성장하지 않았고, 이것은 시클로포스파미드 및 B7-DC-Ig 조합요법으로부터 장기 항-종양 면역성을 발달시켰음을 제한한다. 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 조합요법이 종양 항원에 대해 기억 반응을 생성하였음을 보여준다.
- [0454] **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  $2.5 \times 10^5$ 개의 CT26 세포를 제44일에 재접종하였다. 7일 후에, 마우스 비장을 단리하였다. 마우스 비장세포를 골지 (Golgi) 차단제 (비디 바이오사이언스)의 존재 하에 5 또는 50  $\mu$ g/mL의 난알부민 (OVA) 또는 AH1 펩티드로 6시간 동안 팽창하였다. CD8+/IFN  $\gamma$  + 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

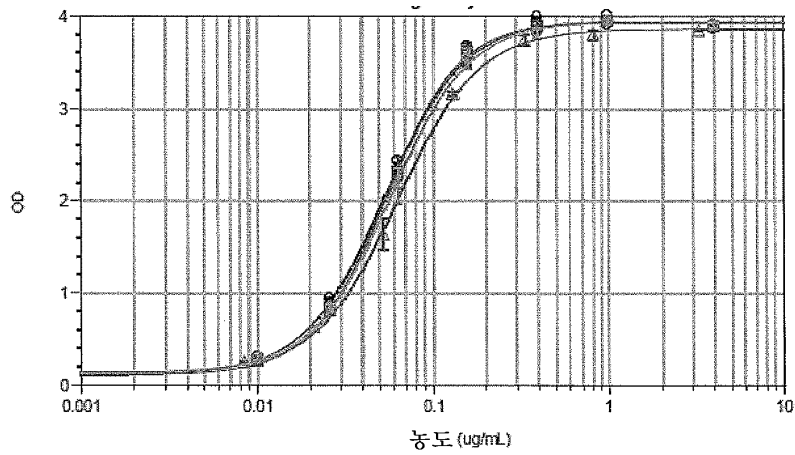
으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0457]

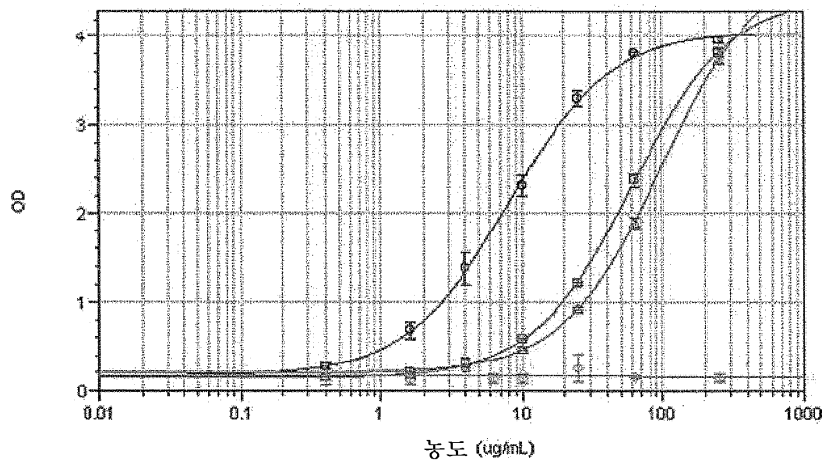
당업자는 단지 통상적인 실험을 통해 본원에 기재된 발명의 특정 실시양태의 많은 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 상기 균등물은 하기 특허청구범위에 포함되는 것으로 의도된다.

## 도면

### 도면1

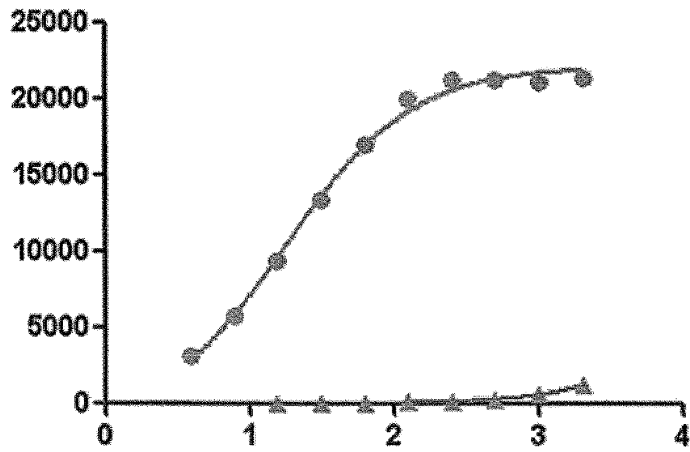


1A

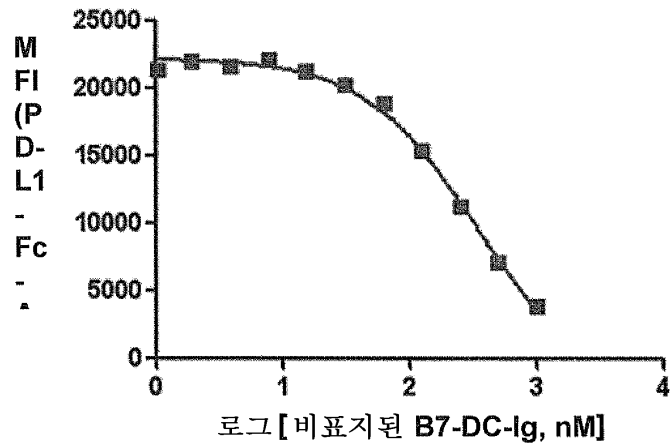


1B

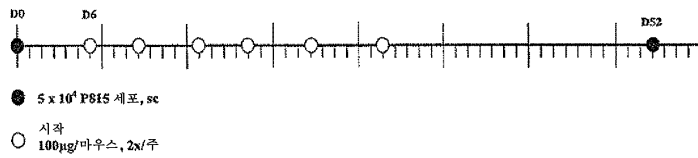
도면2



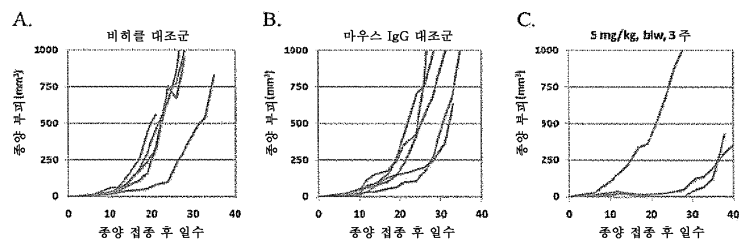
도면3



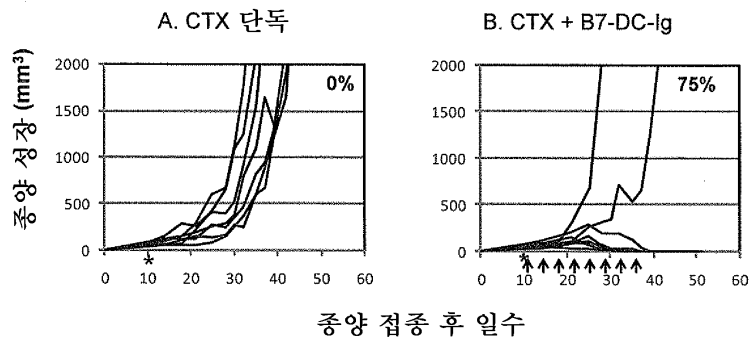
도면4



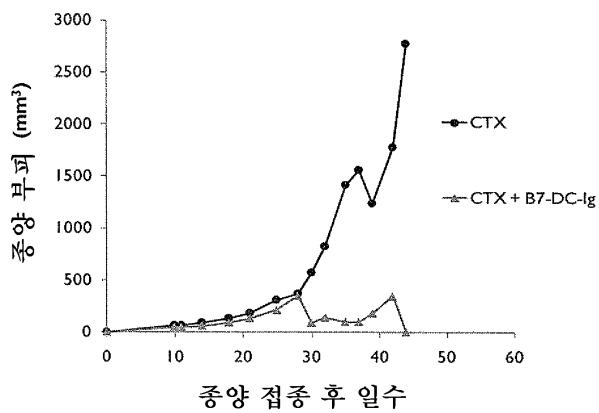
도면5



도면6

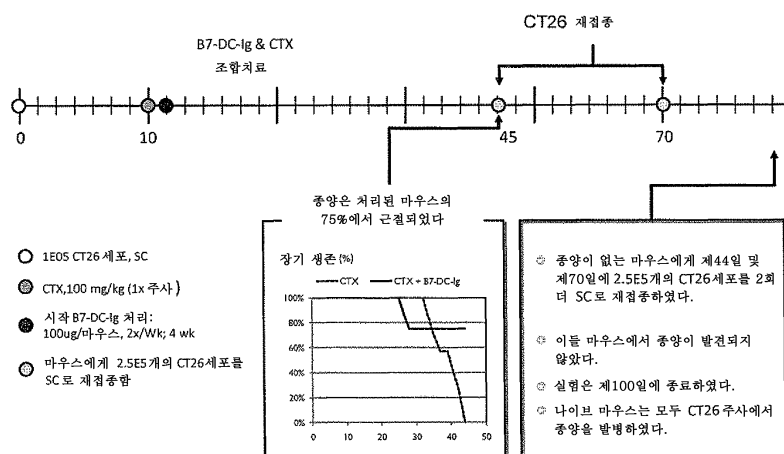


6A-B



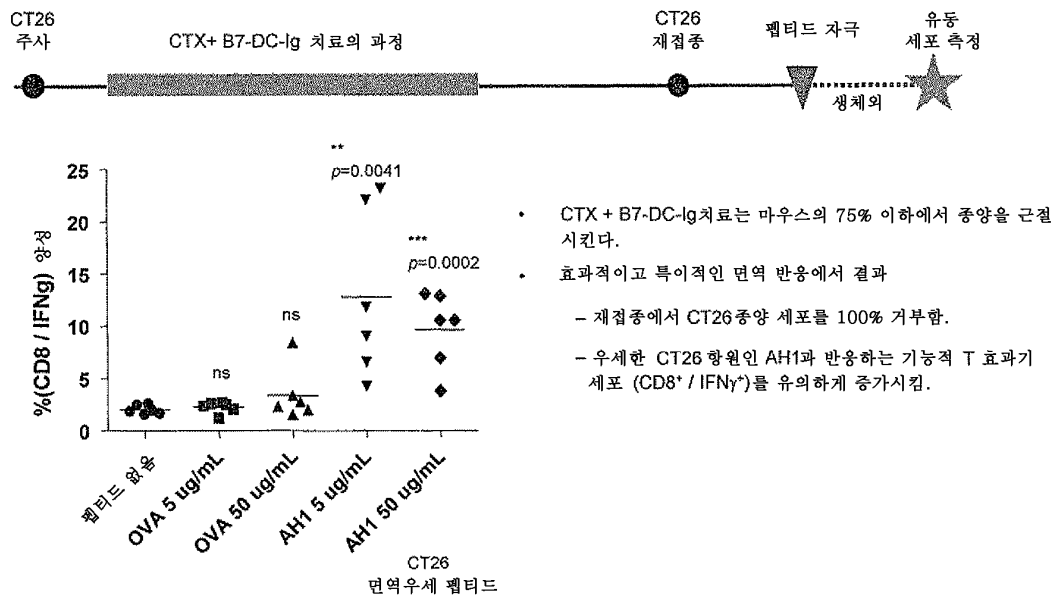
6C

도면7





## 도면8



## 서열 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

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 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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  
 225 230 235 240  
 Arg Pro Val Thr 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

&lt;211&gt; 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                      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 Leu Leu  
 225                      230                      235                      240  
 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                      15  
 Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr  
                     20                      25                      30  
 Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu  
                     35                      40                      45  
  
 Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile  
                     50                      55                      60  
 Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser  
 65                      70                      75                      80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn  
 85 90 95  
 Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr  
 100 105 110  
  
 Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val  
 115 120 125  
 Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val  
 130 135 140  
 Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser  
 165 170 175  
  
 Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn  
 180 185 190  
 Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr 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 Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg 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 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 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 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  
 225 230 235 240  
 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 15  
 Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp  
 20 25 30  
 Asn Pro Pro Thr Phe 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 80  
 Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg  
 85 90 95  
 Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg  
 100 105 110  
 Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu  
 115 120 125  
 Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val  
 130 135 140

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

```

atgatctttc ttctcttgat gctgtctttg gaattgcaac ttcaccaaat cgcggccctc    60
tttactgtga ccgtgccaaa agaactgtat atcattgagc acgggtccaa tgtgaccctc    120
gaatgtaact ttgacaccgg cagccacgtt aacctggggg ccatcactgc cagcttgcaa    180
aaagttgaaa acgacaattc acctcaccgg gagagggcaa cctctttgga ggagcaactg    240

ccattgggga aggccctcctt tcatatccct caggtgcagg ttcgggatga gggacagtac    300
cagtgcatta ttatctacgg cgtggcttgg gattacaagt atctgaccct gaaggtgaaa    360
gcgtcctatc ggaaaattaa cactcacatt ctttaagggtc cagagacgga cgaggtggaa    420
ctgacatgcc aagccaccgg ctaccctgtg gcagaggtca gctggcccaa cgtgagcgtg    480
cctgctaaca cttctcattc taggacaccc gagggcctct accaggttac atccgtgctc    540
cgcctcaaac cgccccagg ccggaatttt agttgcgtgt tttggaatac ccacgtgcga    600
gagctgactc ttgcatctat tgatctgcag tcccagatgg agccacggac tcatccaact    660

```

tgg 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 Ile
           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

```

[illegible]

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> 20

<211> 294

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

tttactgtga ccgtgccaaa agaactgtat atcattgagc acgggtccaa tgtgaccctc 60

gaatgtaact ttgacaccgg cagccacgtt aacctggggg ccatcactgc cagcttgcaa 120

aaagttgaaa acgacacttc acctcaccgg gagagggcaa ccctcttgga ggagcaactg 180

ccattgggga aggcctcctt tcataccct caggtgcagg ttcgggatga 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 tctgctaata gttgagcctg gaattgcagc ttcaccagat agcagcttta 60

ttcacagtga cagtccttaa ggaactgtac ataataagagc atggcagcaa tgtgaccctg 120

gaatgcaact ttgacactgg aagtcatgtg aaccttggag caataacagc cagtttgcaa 180

aaggtggaaa atgatacatc cccacaccgt gaaagagcca ctttgctgga ggagcagctg 240

cccctaggga aggcctcggt ccacatacct caagtccaag tgagggacga aggacagtac 300

caatgcataa tcatctatgg ggtcgcttgg gactacaagt acctgactct gaaagtcaaa 360

gcttcctaca ggaaaataaa cactcacatc ctaaagggtc cagaaacaga tgaggtagag 420

ctcacctgcc aggtacaggt ttatcctctg gcagaagtat cctggccaaa cgtcagcgtt 480

cctgccaaca ccagccactc caggaccctt gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg 540

cgcctaaagc caccctctgg cagaaacttc agctgtgtgt tctggaatac tcacgtgagg 600  
gaacttactt tggccagcat tgaccttcaa 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 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 cagtccttaa ggaactgtac ataatagagc atggcagcaa tgtgaccctg 60  
  
gaatgcaact ttgacactgg aagtcattgtg aaccttggag caataacagc cagtttgcaa 120  
aaggtggaaa atgatacatc cccacaccgt gaaagagcca ctttgctgga ggagcagctg 180  
cccctaggga aggcctcgtt ccacatacct caagtccaag tgagggacga aggacagtac 240  
caatgcataa tcatttatgg ggtcgcctgg 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 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

```

atgctgctcc tgctgccgat actgaacctg agcttacaac ttcacacctgt agcagcttta      60
ttcacctga cagccccctaa agaagtgtac accgtagacg tcggcagcag tgtgagcctg      120
gagtgcgatt ttgaccgcag agaatgcact gaactggaag ggataagagc cagtttgcag      180
aaggtagaaa atgatacgtc tctgcaaagt gaaagagcca ccctgctgga ggagcagctg      240
ccctgggaa aggctttgtt ccacatccct agtgtccaag tgagagattc cgggcagtac      300

cgttgcctgg tcatctgcgg ggccgcctgg gactacaagt acctgacggt gaaagtcaaa      360
gtttcttaca tgaggataga cactaggatc ctggaggttc caggtacagg ggaggtgcag      420
cttacctgcc aggctagagg ttatcccctt gcagaagtgt cctggcaaaa tgtcagtgtt      480
cctgccaaca ccagccacat caggaccccc gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg      540
cgctcaagc ctcagcctag cagaaacttc agctgcatgt tctggaatgc tcacatgaag      600
gagctgactt cagccatcat tgacctctg agtcggatgg aaccctaaagt cccagaacg      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 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  
                     195                      200

<210> 30

<211> 294

<212>

DNA

<213> Mus musculus

<400> 30

ttcacgtga cagcccctaa agaagtgtac accgtagacg tcggcagcag tgtgagcctg 60  
 gagtgcgatt ttgaccgcag agaatgcact gaactggaag ggataagagc cagtttgcag 120  
 aaggtagaaa atgatacgtc tctgcaaagt gaaagagcca ccctgctgga ggagcagctg 180  
 cccctgggaa aggctttgtt ccacatccct agtgtccaag tgagagattc cgggcagtac 240  
 cgttgctctg 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 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 Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly Lys  
50 55 60  
Ala Leu Phe His Ile Pro Ser Val Gln Val Arg Asp Ser Gly Gln Tyr

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



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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

<210> 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
ctcattcttc tctttgtgct gctgattcgt ctttcacaag tgtcttcaga tgttgatgaa	120
caactgtcca agtcagttaa agataaggta ttgctgcctt gccgttacaa ctctctcat	180
gaagatgagt ctgaagaccg aatctactgg caaaaacatg acaaagtggt gctgtctgtc	240
attgctggga aactaaaagt gtggcccagag tataagaacc ggactttata tgacaacact	300

acctactctc ttatcatcct gggcctgggc ctttcagacc ggggcacata cagctgtgtc 360

gttcaaaaga aggaaagagg aacgtatgaa gttaaact tggctttagt aaagttgtcc 420

atcaaagctg acttctctac cccaacata actgagtctg gaaacccatc tgcagacact 480

aaaaggatta ccigctttgc ttccgggggt ttcccaaagc ctcgcttctc ttggttgga 540

aatggaagag aattacctgg catcaatacg acaatttccc aggatcctga atctgaattg 600

tacaccatta gtagccaact agatttcaat acgactcgca accacaccat taagtgtctc 660

attaaatatg gagatgctca cgtgtcagag gacttcacct gggaaaaacc ccagaagac 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 gtcagtgaag gataaggtat tgctgccttg ccgttacaac 60  
tctcctcatg aagatgagtc tgaagaccga atctactggc aaaaacatga caaagtgggtg 120  
ctgtctgtca ttgctgggaa actaaaagtg tggcccgagt ataagaaccg gactttatat 180  
gacaacacta cctactctct tatcatcctg ggcttggtcc 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

atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt 60

cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac tttctgtcag gtgttatcca cgtgaccaag 120

gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca 180

caaaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatgggtgc tgactatgat gtctggggac 240

atgaatatat ggcccagta caagaaccgg accatctttg atactactaa taacctctcc 300

attgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag 360

tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420

gacttccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata 480

atttgctcaa cctctggagg tttccagag cctcacctct cctggttgga aaatggagaa 540

gaattaaatg ccatcaacac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt 600

agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660

ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tgggaatacaa ccaagcaaga gcattttcct 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 agtgaaagaa gtggcaacgc tgcctgtgg tcacaatgtt 60

tctgttgaag agctggcaca aactcgcac tactggcaaa aggagaagaa aatggtgctg 120

actatgatgt ctggggacat gaatatatgg cccgagtaca agaaccggac catctttgat 180

atcactaata acctctccat tgtgatcctg gctctgcgcc catctgacga gggcacatac 240

gagtgtgttg ttctgaagta tgaaaaagac gctttcaagc gggaacacct ggctgaagtg 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 catgtgacaa gaccatacgt tgcccaccct gtcccgtcc agaactgctg 60  
 gggggaccta gcgttttctt gtcccccca aagcccaagg acaccctcat gatctcacgg 120  
 actcccgaag taacatgcgt agtagtcgac gtgagccacg aggatcctga agtgaagttt 180  
 aattggtacg tggacggagt cgaggtgcat aatgccaaaa ctaaacctcg ggaggagcag 240  
 tataacagta cctaccgcgt ggtatccgtc ttgacagtgc tccaccagga ctggctgaat 300

ggtaaggagt ataatgcaa ggtcagcaac aaagctcttc ccgcccgaat tgaaaagact 360  
 atcagcaagg ccaagggaca accccgcgag ccccgagttt acacccttcc accttcacga 420  
 gacgagctga ccaagaacca ggtgtctctg acttgtctgg tcaaaggttt ctatccttcc 480  
 gacatcgagc tggagtggga gtcaaacggg cagcctgaga ataactaaa gaccacaccc 540  
 ccagtgttg atagcgatgg gagcttttct ctctacagta agctgactgt ggacaaatcc 600  
 cgctggcagc agggaaacgt tttctcttgt agcgtcatgc atgaggccct ccacaacat 660  
 tatactcaga aaagcctgag tctgagtcct 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 80  
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 85 90 95  
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 100 105 110  
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
  
 115 120 125  
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr  
 130 135 140  
 Lys Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 145 150 155 160  
 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 gtccctacgat caagccctgc cgccttgta aatgcccagc tccaaatttg 60

ctgggtggac cgtcagtcctt tatcttcccg ccaaagataa aggacgtctt gatgattagt 120

ctgagcccca tcgtgacatg cgttgtggtg gatgtttcag aggatgaccc cgacgtgcaa 180

atcagttggt tcgttaacaa cgtggagggtg cataccgctc aaaccagac ccacagagag 240

gattataaca gcaccctgcg ggtagtgtcc gccctgccga tccagcatca ggattggatg 300

agcgggaaag agttcaagtg taaggtaaac aacaaagatc tgccagcgcc gattgaacga 360

accattagca agccgaaagg gagcgtgcgc gcacctcagg ttacgtcct tcctccacca 420

gaagaggaga tgacgaaaaa gcaggtgacc ctgacatgca tggttaactga ctttatgcca 480

gaagatattt acgtggaatg gactaataac ggaaagacag agctcaatta caagaacact 540

gagcctgttc tggattctga tggcagctac ttatgtact ccaaattgag ggtcgagaag 600

aagaattggg tcgagagaaa cagttatagt tgcctcagtg tgcatgaggg cctccataat 660

catcacacca caaagtcctt cagccgaacg cccgggaaa 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 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 Lys 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 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 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 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 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 tgctgccgat actgaacctg agcttacaac ttcacacctgt agcagcttta 60  
ttcacctga cagccccctaa agaagtgtac accgtagacg tcggcagcag tgtgagcctg 120  
gagtgcgatt ttgaccgcag agaatgcact gaactggaag ggataagagc cagtttgcag 180  
aaggtagaaa atgatacgtc tctgcaaagt gaaagagcca cctgctgga ggagcagctg 240  
cccctgggaa aggcctttgtt ccacatccct agtgtccaag tgagagattc cgggcagtac 300  
cgttgcctgg tcactctcgg ggccgcctgg gactacaagt acctgacggt gaaagtcaaa 360  
gcttcttaca tgaggataga cactaggatc ctggaggttc caggtacagg ggaggtgcag 420

cttacctgcc aggctagagg ttatccccta gcagaagtgt cctggcaaaa tgtcagtgtt 480  
cctgccaaca ccagccacat caggaccccc gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg 540  
cgctcaagc ctcagcctag cagaaacttc agctgcatgt tctggaatgc tcacatgaag 600

gagctgactt cagccatcat tgaccctctg agtcggatgg aacccaaagt cccagaacg 660  
 tgggagccaa gaggtcctac gatcaagccc tgcccgcctt gtaaatgccc agctccaaat 720  
 ttgctgggtg gaccgtcagt ctttatcttc cgcctaaaga taaaggacgt cttgatgatt 780  
 agtctgagcc ccatcgtgac atgcgtttgt gtggatgttt cagaggatga ccccgacgtg 840

caaatcagtt ggttcgttaa caacgtggag gtgcataaccg ctcaaacca gaccacaga 900  
 gaggattata acagcacctt gcgggtagtg tccgccctgc cgatccagca tcaggattgg 960  
 atgagcggga aagagttcaa gtgtaaggta aacaacaaag atctgccagc gccgattgaa 1020  
 cgaaccatta gcaagccgaa agggagcgtg cgcgcacctc aggtttacgt ctttctcca 1080  
 ccagaagagg agatgacgaa aaagcagggtg accctgacat gcatggtaac tgactttatg 1140  
 ccagaagata ttacgtgga atggactaat aacggaaaga cagagctcaa ttacaagaac 1200  
 actgagcctg ttctggattc tgatggcagc tactttatgt actccaaatt gagggtcgag 1260

aagaagaatt gggtcgagag aaacagttat agttgctcag tggatcatga gggcctccat 1320  
 aatcatcaca ccacaaagtc cttcagccga acgcccggga aatga 1365

<210> 53

<211> 454

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 53

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 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                      240  
 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                      320  
 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 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 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 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                      400  
 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

atgatctttc ttctcttgat gctgtctttg gaattgcaac ttcaccaa	60
tttactgtga ccgtgccaaa agaactgtat atcattgagc acgggtccaa t	120
gaatgtaact ttgacaccgg cagccacgtt aacctggggg ccatcactgc	180
aaagttgaaa acgacacttc acctcaccgg gagagggcaa ccctcttgga	240
ccattgggga aggcctcctt tcatatccct caggtgcagg ttcgggatga	300
cagtgcatta ttatctacgg cgtggttg gattacaagt atctgacct ga	360
gcgtcctatc ggaaaattaa cactcacatt cttaaagtgc cagagacgga	420
ctgacatgcc aagccaccgg ctacccttg gcagaggtca gctggcccaa	480
cctgctaaca cttctcattc taggacaccc gagggcctct accaggttac	540
cgctcaaac cgccccagg ccggaatttt agttgcgtgt tttggaatac	600
gagctgactc ttgcatctat tgatctgcag tcccagatgg agccacggac	660
tgggaaccta aatcttgcca taaaactcat acctgtcccc cttgcccagc	720
ctgggagggtc ccagtgtgtt tctgtttccc ccaaaaccta aggacacact	780
cgaacgccgg aagtgcacat cgtggttgtg gacgtctcac acgaagacc	840

ttcaactggg acgttgacgg agttgaggtt cataacgcta agaccaagcc cagagaggag 900  
 caatacaatt ccacctatcg agtggtagt gtactgaccg ttttgacca agactggctg 960  
 aatggaaaag aatacaagtg caaagtatca aacaaggctt tgcctgcacc catcgagaag 1020

acaatttcta aagccaaagg gcagcccagg gaaccgcagg tgtacacact cccaccatcc 1080  
 cgcgacgagc tgacaaagaa tcaagtatcc ctgacctgcc tggtgaaagg cttttaccca 1140  
 tctgacattg ccgtggaatg ggaatcaaat ggacaacctg agaacaacta caaaaccact 1200  
 ccacctgtgc ttgacagcga cgggtccttt ttctgtaca gtaagctcac tgtcgataag 1260  
 tctcgtggc agcagggcaa cgtcttttca ttagtgtga tgcacgaagc tctgcacaac 1320  
 cattacccc 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	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 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	240
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	320
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 Lys 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 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 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