(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0021194
(43) 공개일자 2024년02월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/55* (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2818 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-7044611
(22) 출원일자(국제) 2022년06월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년12월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/072895
(87) 국제공개번호 WO 2022/266598
국제공개일자 2022년12월22일
(30) 우선권주장
63/210,111 2021년06월14일 미국(US)
63/365,375 2022년05월26일 미국(US)

(71) 출원인
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 울드 소우 밀 리버 로드 777
(72) 발명자
린 치아-양
미국 10591 뉴욕주 타리타운 울드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
우 지아시
미국 10591 뉴욕주 타리타운 울드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

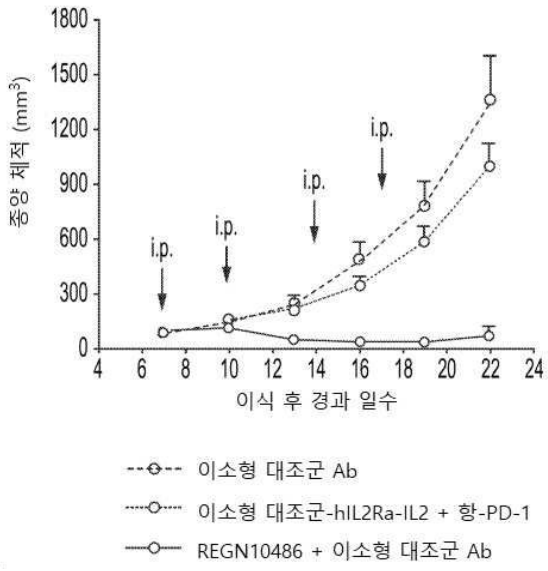
전체 청구항 수 : 총 70 항

(54) 발명의 명칭 **IL-2 및 항-PD-1 기반의 치료제 및 이의 이용 방법**

(57) 요 약

본 발명은 인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 항원-결합성 모이어티 및 IL2 모이어티를 포함하는 융합 단백질, 및 이의 이용 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
C07K 14/55 (2013.01)
C07K 14/7155 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2319/33 (2013.01)
(72) 발명자
블로치 니콜린
미국 10591 뉴욕주 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
장 통
미국 10591 뉴욕주 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
데이비스 사무엘
미국 10591 뉴욕주 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
스미스 에릭
미국 10591 뉴욕주 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
울먼 에리카
미국 10591 뉴욕주 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

(i) 인간 PD-1 (programmed cell death protein 1)에 특이적으로 결합하는 항원-결합성 모이어티 및 (ii) 인터루킨 2 (IL2) 모이어티를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항원-결합성 모이어티가 인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 인간 PD-1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 인간 단일클론 항체인, 융합 단백질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원-결합성 모이어티가 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 3종 (HCDR1, HCDR2 및 HCDR3)과 경쇄 CDR 3종 (LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하고,

HCDR1은 서열번호 43, 4 또는 24의 아미노산 서열을 포함하고;

HCDR2는 서열번호 45, 6 또는 26의 아미노산 서열을 포함하고;

HCDR3는 서열번호 47, 8 또는 28의 아미노산 서열을 포함하고;

LCDR1은 서열번호 12 또는 32의 아미노산 서열을 포함하고;

LCDR2는 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하고; 및

LCDR3는 서열번호 16 또는 35의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 항원-결합성 모이어티가 (i) 서열번호 43, 45, 47, 12, 14 및 16; (ii) 서열번호 4, 6, 8, 12, 14 및 16; 또는 (iii) 서열번호 24, 26, 28, 32, 14 및 35의 각각의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 항원-결합성 모이어티가 서열번호 43, 45, 47, 12, 14 및 16의 아미노산 서열을 각각 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원-결합성 모이어티가 서열번호 41, 2 또는 22의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (HCVR) 및 서열번호 10 또는 30의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 HCVR이 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 LCVR이 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 HCVR이 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하고, LCVR이 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 HCVR이 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하고, LCVR이 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원-결합성 모이어티가 서열번호 55의 중쇄 불변 영역과 서열번호 56의 경쇄 불변 영역을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원-결합성 모이어티가 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 중쇄는 서열번호 61, 57 또는 59의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄는 서열번호 62, 58 또는 60의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원-결합성 모이어티가 서열번호 61/62, 57/58 또는 59/60의 중쇄/경쇄 서열 쌍을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원-결합성 모이어티가 서열번호 61/62의 중쇄/경쇄 서열 쌍을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL2 모이어티가 (i) IL2 또는 이의 단편; 및 (ii) IL2 수용체 α (IL2Rα) 또는 이의 단편을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 IL2 또는 이의 단편이 인간 IL2 (hIL2) 또는 이의 단편인, 융합 단백질.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 IL2Rα 또는 이의 단편이 인간 IL2Rα (hIL2Rα) 또는 이의 단편인, 융합 단백질.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL2 또는 이의 단편이 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 19

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL2Rα 또는 이의 단편이 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 20

제15항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL2 또는 이의 단편이 링커를 통해 IL2Rα 또는 이의 단편의 C-말단에 연결된, 융합 단백질.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 20항에 있어서, 상기 IL2 모이어티가 링커를 통해 항원-결합성 모이어티의 중쇄 불변 영역의 C-말단에 연결된, 융합 단백질.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 링커가 GGGGS (서열번호 67) 반복체 하나 이상으로 된 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 23

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커가 서열번호 50 또는 52의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL2 모이어티가 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 25

(i) 인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 인간 항체의 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 (ii) (a) 인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 영역 (HCVR)과 (b) IL2 모이어티를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 HCVR이 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 3종 (HCDR1, HCDR2 및 HCDR3)을 포함하고, 상기 LCVR이 경쇄 CDR 3종 (LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하고,

HCDR1은 서열번호 43, 4 또는 24의 아미노산 서열을 포함하고;

HCDR2는 서열번호 45, 6 또는 26의 아미노산 서열을 포함하고;

HCDR3는 서열번호 47, 8 또는 28의 아미노산 서열을 포함하고;

LCDR1은 서열번호 12 또는 32의 아미노산 서열을 포함하고;

LCDR2는 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하고; 및

LCDR3는 서열번호 16 또는 35의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3가 (i) 서열번호 43, 45, 47, 12, 14 및 16; (ii) 서열번호 4, 6, 8, 12, 14 및 16; 또는 (iii) 서열번호 24, 26, 28, 32, 14 및 35의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 상기 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3가 각각 서열번호 43, 45, 47, 12, 14 및 16의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 29

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HCVR 및 상기 LCVR이 (i) 서열번호 41 및 10; (ii) 서열번호 2 및 10; 또는 (iii) 서열번호 22 및 30의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 30

제25항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드가 LCVR에 연결된 경쇄 불변 영역을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 경쇄 불변 영역이 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 32

제25항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 폴리펩타이드가 HCVR에 연결된 중쇄 불변 영역을 포함하고, 상기 IL2 모이어티가 중쇄 불변 영역의 C-말단에 연결된, 융합 단백질.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 중쇄 불변 영역이 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 34

제25항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드가 서열번호 62, 58 또는 60의 경쇄 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 35

제25항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 폴리펩타이드가 서열번호 61, 57 또는 59의 중쇄 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 36

제25항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 61/62, 57/58 또는 59/60의 중쇄/경쇄 서열 쌍을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 37

제25항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 61/62의 중쇄/경쇄 서열 쌍을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 38

제25항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL2 모이어티가 (i) IL2 또는 이의 단편; 및 (ii) IL2Rα 또는 이의 단편을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 39

제25항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL2 모이어티가 중쇄 불변 영역의 C-말단에 링커를 통해 연결된, 융합 단백질.

청구항 40

제38항 또는 제39항에 있어서, 상기 IL2 또는 이의 단편이 IL2Rα 또는 이의 단편의 C-말단에 링커를 통해 연결된, 융합 단백질.

청구항 41

제38항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL2 또는 이의 단편이 인간 IL2 (hIL2) 또는 이의 단편인, 융합 단백질.

청구항 42

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL2Rα 또는 이의 단편이 인간 IL2Rα (hIL2Rα) 또는 이의 단편인, 융합 단백질.

청구항 43

제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL2 또는 이의 단편이 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 44

제38항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL2Rα 또는 이의 단편이 서열번호 51의 아미노산 서열을 포

함하는, 융합 단백질.

청구항 45

제40항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커가 GGGGS (서열번호 67) 반복체 하나 이상으로 된 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 링커가 서열번호 50 또는 52의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 47

제25항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL2 모이어티가 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 48

제25항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드가 서열번호 62, 58 또는 60의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 49

제25항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 폴리펩타이드가 서열번호 63, 64 또는 65의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 50

제25항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드가 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 제2 폴리펩타이드가 서열번호 64의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 51

제25항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드가 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 제2 폴리펩타이드가 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 52

제25항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 폴리펩타이드가 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 제2 폴리펩타이드가 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질 형태가 이량체성 융합 단백질인, 융합 단백질.

청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질이 각각의 중쇄 불변 영역을 통해 이량체를 형성하는, 융합 단백질.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질이 PD-1에의 결합에 대해 REGN2810, 펨브롤리주맙 (Pembrolizumab) 또는 니볼루맙 (Nivolumab)과 교차-경쟁하지 않는, 융합 단백질.

청구항 56

제1항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질이 IL2와 비교해 인간 IL2Rα/β/γ 및 IL2Rβ/γ 복합체를 활성화하는데 감소된 활성을 나타내는, 융합 단백질.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질이 비-표적화된 IL2Rα-IL2와 비교해 인간 IL2Rα를 활성화하는데 증가된 활성을 나타내는, 융합 단백질.

청구항 58

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질이 야생형 인간 IL2와 비교해 IFN-γ 방출 수준에 의한 측정시 T 세포를 자극하는데 증가된 활성을 나타내는, 융합 단백질.

청구항 59

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질이 IL2Rα, IL2Rβ 및 IL2Rγ에 대해 감쇠된 결합성을 나타내는, 융합 단백질.

청구항 60

제1항 내지 제59항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 또는 복수의 핵산.

청구항 61

제60항의 핵산 또는 복수의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 62

제60항의 핵산 또는 복수의 핵산 또는 제61항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 63

제62항에 있어서, 제25항 내지 제59항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질의 제1 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 벡터, 및 제25항 내지 제59항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질의 제2 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 벡터를 발현하는, 숙주 세포.

청구항 64

제62항 또는 제63항에 따른 숙주 세포를 융합 단백질 또는 이의 단편의 생산을 허용하는 조건에서 배양하고, 생산된 융합 단백질 또는 이의 단편을 회수하는 것을 포함하는, 제1항 내지 제59항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질의 생산 방법.

청구항 65

제1항 내지 제59항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 66

제65항에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 추가로 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 항-PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 PD-1에의 결합에 대해 융합 단백질과 교차-경쟁하지 않는, 약학적 조성물.

청구항 68

제1항 내지 제59항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질 또는 제65항 또는 제67항 중 어느 한 항에 따른 약학적 조성물을 치료학적 유효량으로 필요한 개체에 투여하는 것을 포함하는, 암 치료 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 개체에 상기 융합 단백질을 개체 체중에 대해 0.005 mg/kg 내지 10 mg/kg 함량으로 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 70

제68항 또는 제69항에 있어서, 상기 개체에 제2 치료학적 물질 또는 요법을 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일반적으로 IL2 기반의 치료제 및 이의 이용 방법에 관한 것이며, 보다 상세하게는 IL2 모이어티 및 인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 항원-결합성 모이어티를 포함하는 융합 단백질뿐 아니라 이의 이용 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인터루킨 2 (IL-2 또는 IL2)는 활성화된 T 세포에 의해 주로 생산되는 만능성 사이토카인이다. 이는 T 세포의 증식과 분화를 자극하고, 세포독성 T 림프구 (CTL)의 생성과 말초혈 림프구에서 세포독성 세포 및 림포카인-활성화된 살상 (LAK) 세포로의 분화를 유도하고, T 세포에 의한 사이토카인 및 세포용해성 분자의 발현을 촉진하고, B 세포의 증식 및 분화와 B 세포에 의한 면역글로불린의 합성을 용이하게 하고, 자연 살상 NK 세포의 생성, 증식 및 활성화를 자극한다 (Waldmann, 2006, Nat Rev Immunol 6:595-601; 및 Malek, 2008, Annu Rev Immunol 26:453-79). IL2는 억제성 T 세포로도 알려진 말초 CD4+ CD25+ 조절성 T (Treg) 세포를 유지하는 데에도 참여한다 (예, Fontenot *et al.*, 2005, Nature Immunol 6:1142-51). 이는 T 세포 보조 및 활성화를 저해함으로써 세포-세포 접촉을 통해 또는 IL-10 또는 TGFβ와 같은 면역억제 사이토카인의 분비를 통해, 작동자 T 세포가 이의 (자기-)표적을 파괴하지 못하게 억제한다. Treg 세포의 고갈이 IL2-유발된 항-종양 면역을 강화하는 것으로 밝혀져 있다 (Imai *et al.*, 2007, Cancer Sci 98:416-23).

[0003] 그러나, IL2는 이의 다면발현 효과로 인해 종양 증식을 저해하는데 최적인 것은 아니다. 항신생물제로서 IL2의 사용은 종양 반응에 필요한 용량에 수반된 심각한 독성으로 인해 제한적이다. 프로루킨 (proleukin)® (Prometheus Laboratories, San Diego, Calif.)은 전이성 흑색종 및 전이성 신장암의 치료에 대해 승인된 재조합 형태의 IL2이지만, 이의 부작용이 매우 심각해 이의 사용은 집중 치료를 받을 수 있는 병원 환경에서만 권장된다. IL2 요법의 주요 부작용은 혈관 누출 증후군 (VLS)이며, 이는 폐 및 간에 간질액의 축적으로 이어져 폐 부종 및 간 손상을 초래한다. IL2를 중단하는 것 외에는 VLS 치료법은 없다. 기능성의 고-친화성 IL2 수용체를 낮은 수준 내지 중간 수준으로 발현하는 폐 내피 세포에 IL2가 직접 결합함으로써, IL2-유발성 폐 부종이 발생하는 것으로 입증되어 있다 (Krieg *et al.*, 2010, Proc Nat Acad Sci USA 107:11906-11). CD122 지시된 IL2 요법 분야에서 암 요법의 개발이 일반적으로 용인됨에도 불구하고, 이러한 분자는 암 요법에서 치료 지수가 좋지 않으며, 약간의 항암 효과를 부여하기 위해 독성의 고 용량이 필요한 것으로 놀랍게도 밝혀졌다.

[0004] 따라서, 치료학적 효능과 안전성 프로파일이 개선된 새로운 IL2 요법이 당해 기술분야에서 절실하게 요구되고 있다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 전술한 한가지 이상의 요구를 다룬다. 본 발명의 융합 단백질은 종양-반응성 T 세포를 표적으로 하는, 인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 항원-결합성 모이어티를 포함한다. 항원-결합성 모이어티는 종양-반응성 T 세포에 대한 선택적인 재구성 활성을 보조한다. 융합 단백질은 IL2 모이어티를 추가로 포함하며, 여기서 IL2 모이어티는 IL2Rα에 결합된 IL2를 포함한다. 특정 구현예에서, 융합 단백질은 비-변형된 IL2 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 융합 단백질은 내인성 IL2Rα에 인게이징하는 능력을 가진다. 융합 단백질은 트랜스-격리된 입체구조 (trans-sequestered conformation)로 IL2 모이어티를 포함한다. 이는 활성화된 CD8+ T 세포와의 인게이징은 유지하지만; IL2 모이어티의 결합된 입체구조는 IL2의 은폐와 이의 활성의 감쇠를 보조하며, 따라서 전신 독성 감소로 이어진다. 예를 들어, 본 발명의 융합 단백질은 야생형 IL2와 비교해 마우스에서 급성 폐 부종 (혈관 누출)을 유발하지 않는다. 본 발명의 융합 단백질은 IL2 단독과 비교해 또는 PD-1 저해제 (예, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편)와 조합한 경우와 비교해, 강화된 항-종양 효능 및 개선된 치료 지수를 제공한다.

[0006] 일 측면에서, 개시된 기술은, (i) 인간 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1 (PD-1)에 특이적으로 결합하는 항원-

결합성 모이어티와 (ii) 인터루킨 2 (IL2) 모이어티를 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 항원-결합성 모이어티는 인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 PD-1에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 단일클론 항체이다. 일부 구현예에서, 항원-결합성 모이어티는 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 3종 (HCDR1, HCDR2 및 HCDR3)과 경쇄 CDR 3종 (LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하고, 여기서 HCDR1은 서열번호 43, 4 또는 24의 아미노산 서열을 포함하고; HCDR2는 서열번호 45, 6 또는 26의 아미노산 서열을 포함하고; HCDR3는 서열번호 47, 8 또는 28의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR1은 서열번호 12 또는 32의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR2는 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR3는 서열번호 16 또는 35의 아미노산 서열을 포함한다.

[0007] 일부 구현예에서, 항원-결합성 모이어티는, (i) 서열번호 43, 45, 47, 12, 14 및 16; (ii) 서열번호 4, 6, 8, 12, 14 및 16; 또는 (iii) 서열번호 24, 26, 28, 32, 14 및 35의 아미노산 서열을 각각 포함하는, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합성 모이어티는 서열번호 43, 45, 47, 12, 14 및 16의 각각의 아미노산 서열을 포함하는, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합성 모이어티는 서열번호 41, 2 또는 22의 아미노산 서열을 포함한 중쇄 가변 영역 (HCVR); 및 서열번호 10 또는 30의 아미노산 서열을 포함한 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함한다. 일부 구현예에서, HCVR은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하고, LCVR은 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HCVR은 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하고, LCVR은 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HCVR은 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하고, LCVR은 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합성 모이어티는 서열번호 55의 중쇄 불변 영역과 서열번호 56의 경쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합성 모이어티는 중쇄와 경쇄를 포함하고, 중쇄는 서열번호 61, 57 또는 59의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열번호 62, 58 또는 60의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합성 모이어티는 서열번호 61/62, 57/58 또는 59/60의 중쇄/경쇄 서열 쌍을 포함한다.

[0008] 일부 구현예에서, 항원-결합성 모이어티는 서열번호 61/62의 중쇄/경쇄 서열 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 (i) IL2 또는 이의 단편; 및 (ii) IL2 수용체 α (IL2Rα) 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, IL2 또는 이의 단편은 인간 IL2 (hIL2) 또는 이의 단편이다. 일부 구현예에서, IL2Rα 또는 이의 단편은 인간 IL2Rα (hIL2Rα) 또는 이의 단편이다. 일부 구현예에서, IL2 또는 이의 단편은 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, IL2Rα 또는 이의 단편은 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, IL2 또는 이의 단편은 링커를 통해 IL2Rα 또는 이의 단편의 C-말단에 연결된다. 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 링커를 통해 항원-결합성 모이어티의 중쇄 불변 영역의 C-말단에 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 반복체 GGGGS (서열번호 67) 하나 이상으로 구성된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 서열번호 50 또는 52의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함한다.

[0009] 다른 측면에서, 개시된 기술은, (i) 인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 인간 항체의 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 (ii) (a) 인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 영역 (HCVR)과 (b) IL2 모이어티를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는, 융합 단백질에 관한 것이다. 일부 구현예에서, HCVR은 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 3종 (HCDR1, HCDR2 및 HCDR3)을 포함하고, LCVR은 경쇄 CDR 3종 (LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하며, 여기서: HCDR1은 서열번호 43, 4 또는 24의 아미노산 서열을 포함하고; HCDR2는 서열번호 45, 6 또는 26의 아미노산 서열을 포함하고; HCDR3는 서열번호 47, 8 또는 28의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR1는 서열번호 12 또는 32의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR2는 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하고; 및 LCDR3는 서열번호 16 또는 35의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 (i) 서열번호 43, 45, 47, 12, 14 및 16; (ii) 서열번호 4, 6, 8, 12, 14 및 16; 또는 (iii) 서열번호 24, 26, 28, 32, 14 및 35의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 각각 서열번호 43, 45, 47, 12, 14 및 16의 아미노산 서열을 포함한다.

[0010] 일부 구현예에서, HCVR 및 LCVR은 (i) 서열번호 41 및 10; (ii) 서열번호 2 및 10; 또는 (iii) 서열번호 22 및 30의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드는 LCVR에 연결된 경쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 경쇄 불변 영역은 서열번호 56의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 폴리펩타이드는 HCVR에 연결된 중쇄 불변 영역을 포함하고, 여기서 IL2 모이어티가 중쇄 불변 영역의 C-말단에 연결된다. 일부 구현예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호 55의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드는 서열번호 62, 58 또는 60의 경쇄 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 폴리펩타이드는 서열번호 61, 57 또는 59의 중쇄 서열을 포함한다.

[0011] 일부 구현예에서, 융합 단백질은 서열번호 61/62, 57/58 또는 59/60의 중쇄/경쇄 서열 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 서열번호 61/62의 중쇄/경쇄 서열 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 (i) IL2 또는 이의 단편; 및 (ii) IL2Rα 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 링커를 통해 중쇄 불변 영역의 C-말단에 연결된다. 일부 구현예에서, IL2 또는 이의 단편은 링커를 통해 IL2Rα 또는 이의 단편의 C-말단에 연결된다. 일부 구현예에서, IL2 또는 이의 단편은 인간 IL2 (hIL2) 또는 이의 단편이다. 일부 구현예에서, IL2Rα 또는 이의 단편은 인간 IL2Rα (hIL2Rα) 또는 이의 단편이다. 일부 구현예에서, IL2 또는 이의 단편은 서열번호 53의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, IL2Rα 또는 이의 단편은 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 반복체 GGGGS (서열번호 67) 하나 이상으로 구성된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 서열번호 50 또는 52의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드는 서열번호 62, 58 또는 60의 아미노산 서열을 포함한다.

[0012] 일부 구현예에서, 제2 폴리펩타이드는 서열번호 63, 64 또는 65의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드는 서열번호 58의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩타이드는 서열번호 64의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드는 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩타이드는 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드는 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩타이드는 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 이량체성 융합 단백질을 형성한다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 이의 각각의 중쇄 불변 영역을 통해 이량체를 형성한다.

[0013] 일부 구현예에서, 융합 단백질은 REGN2810, 펨브롤리주맙 (Pembrolizumab) 또는 니볼루맙 (Nivolumab)과 PD-1에의 결합에 대해 교차-경쟁하지 않는다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 IL2와 비교해 인간 IL2Rα/β/γ 및 IL2Rβ/γ 복합체를 활성화하는데 감소된 활성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 비-표적화된 IL2Rα-IL2와 비교해 인간 IL2Rα를 활성화하는데 증가된 활성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 야생형 인간 IL2와 비교해 IFN-γ 방출 수준에 의해 측정된 바와 같이 T 세포를 자극하는데 증가된 활성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 IL2Rα, IL2Rβ 및 IL2Rγ에 대해 약화된 결합성을 나타낸다.

[0014] 다른 측면에서, 개시된 기술은 본원에 개시된 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 핵산 또는 복수의 핵산에 관한 것이다. 다른 측면에서, 개시된 기술은 본원에 개시된 핵산 또는 복수의 핵산을 포함한 벡터에 관한 것이다. 다른 측면에서, 개시된 기술은 본원에 개시된 핵산 또는 복수의 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 본원에 개시된 융합 단백질의 제1 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 벡터와 본원에 개시된 융합 단백질의 제2 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 벡터를 발현한다.

[0015] 다른 측면에서, 개시된 기술은 본원에 개시된 숙주 세포를 융합 단백질 또는 단편의 생산을 허용하는 조건 하에 배양하는 단계, 및 생산된 융합 단백질 또는 이의 단편을 회수하는 단계를 포함하는, 본원에 개시된 융합 단백질의 생산 방법에 관한 것이다.

[0016] 다른 측면에서, 개시된 기술은 본원에 개시된 융합 단백질을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 항-PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 PD-1에의 결합에 대해 융합 단백질과 교차-경쟁하지 않는다.

[0017] 다른 측면에서, 개시된 기술은 본원에 개시된 융합 단백질 또는 약학적 조성물을 치료학적 유효량으로 필요한 개체에 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 본 방법은 개체에 융합 단백질을 개체 체중에 대해 0.005 mg/kg 내지 10 mg/kg의 함량으로 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 제2 치료학적 물질 또는 요법을 개체에 투여하는 것을 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1A, 1B, 1C 및 1D는 실시예 6에 기술된 바와 같은 생체내 실험 결과를 도시한 그래프이다. 도 1A 및 1B는 이소형 대조군 Ab, 이소형 대조군-hIL2Rα-IL2 + 항-PD-1, REGN10486 + 이소형 대조군 Ab 처리 마우스의 종양 체적 (mm^3)(도 1A) 및 생존율 % (도 1B)를 도시한다. 도 1C 및 1D는 이소형 대조군, REGN10486, REGN10595 및 REGN10597 처리 마우스의 종양 체적 (mm^3)(도 1C) 및 생존율 % (도 1D)를 도시한다.

도 2A 및 2B는 실시예 8에 기술된 바와 같이, PD1+ 세포에의 항-alpha-hPD1 항체 ("αhPD1" 또는 "ahPD1") 부

모 항체의 결합 (도 2A)을, PD1+ 세포에의 항-αhPD1 항체-IL2Rα-IL2 융합 구조체의 결합 (도 2B)과 비교한, FACS 결합 분석의 결과를 도시한 그래프 세트이다.

도 3A 및 3B는 실시예 9에 기술된 바와 같이, 실험 설계 (도 3A), 및 명시된 항체 혼합물과 비교해, 항-PD-1-IL2Ra-IL2 + hIgG4 항체 혼합물에 대해 수득한 네이티브 질량 스펙트럼 (도 3B)을 도시한 것이다.

도 4A 및 4B는 실시예 10에 기술된 바와 같이 항체 또는 사이토카인 타이트레이션 반응에 따른 IFNɣ 분비 및 T-세포의 증식을 도시한 그래프 세트이다. 동종이계 PBMC를 T 세포와 혼합한 다음, 재조합 IL2, 항-PD-1-IL2Rα-IL2 (REGN10597, REGN10595 및 REGN10486) 또는 이소형-IL2Rα-IL2 대조군 (REGN9903)을 용량 타이트레이션으로 처리하여, IFNɣ 분비 (도 4A) 및 증식 (도 4B)을 평가하였다.

도 5A 및 5B는 실시예 11에 기술된 바와 같이, REGN2810의 부재 (도 5A) 또는 존재 (도 5B) 하에 항체 또는 사이토카인 타이트레이션에 대한 반응으로 T 세포의 IFNɣ 분비를 도시한 그래프 세트이다. RAJI/CD80 KO/CD86 KO/PDL1 세포를 T 세포와 함께 인큐베이션하고, 항-CD3xCD20 (REGN1979)을 고정된 용량으로, 이소형 대조군 (REGN7540), 이소형-IL2Rα-IL2 항체 (REGN9903), mAb9048 (REGN15187)의 가변 영역을 가진 항-PD1 항체, 항-PD1-IL2Rα-IL2 (REGN10597), 또는 REGN9903 + REGN15187 조합을 용량 타이트레이션으로 REGN2810의 부재 (도 5A) 또는 존재 (도 5B) 하에 처리하였다. IFNɣ 분비를 측정하였다.

도 6A, 6B, 6C, 6D, 6E, 6F, 6G 및 6H는 실시예 12에 기술된 바와 같이, PD1xLAG3 인간화된 마우스에서 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체 REGN10597의 생체내 활성 평가를, 주로 비-표적화된 대조군 REGN9904 및 PD-1 차단 항체 REGN2810의 조합 (도 6A 및 6B), 경쟁자 항-PD1-표적화된 "non-alpha" (3m) 분자 REGN13233 (도 6C, 6D, 6E 및 6F), 및 REGN10597과 모두 동일한 성분을 포함하지만 IL2 및 IL2Rα가 역 순서로 서로 융합된 구조체 (도 6G 및 6H)와 비교하여, 나타낸 그래프이다.

도 7A 및 7B는 실시예 13에 기술된 IL2 결합 분석에 대한 그래프를 도시한 것이다. YT/STAT5-Luc/IL2Ra KO (도 7A) 또는 YT/STAT5-Luc/IL2Ra OE (도 7B)를, IL2와 인-라인으로 융합된 항체 (REGN8512; 점선의 회색 오픈 원 기호) 또는 IL2Ra 및 IL2와 인-라인으로 융합된 항체 (REGN9904; 실선의 검정색으로 칠해진 원 기호)와 타이트레이션으로 함께 인큐베이션하였다. 세포를 헹구고, 2차 AF647 항-인간 IgG로 염색한 후 다신 헹구고, 고정한 다음 iQue Plus 유세포 측정기에서 획득하였다.

도 8A 및 8B는 실시예 14에 기술된 바와 같이 Ab-IL2Ra-IL2 및 Ab-IL2-IL2Ra의 IL2 리포터 분석 비교를 도시한 그래프이다. YT/STAT5-Luc/IL2Ra KO/hPD1 (도 8A) 또는 YT/STAT5-Luc/hIL2Ra/hPD1 (도 8B)을, 비-표적화된 IL2Ra-IL2 (검정색 점선의 검정 오픈 원 기호, REGN9903), 비-표적화된 IL2-IL2Ra (회색 점선의 회색 오픈 사각 기호), 항-PD1-IL2Ra-IL2 (검정 실선의 검정색으로 칠해진 원 기호, REGN10597), 또는 항-PD1-IL2-IL2Ra (회색 실선의 회색으로 칠해진 사각 기호)와 타이트레이션으로 인큐베이션하였다. 4h 및 30분 후, STAT5 활성을 발광 판독에 의해 평가하였다.

도 9A 및 9B는 실시예 14에 기술된 바와 같이 Ab-IL2Ra-IL2 및 Ab-IL2(3m)의 IL2 리포터 분석 비교를 도시한 그래프이다. YT/STAT5-Luc/IL2Ra KO/hPD1 (도 9A) 또는 YT/STAT5-Luc/hIL2Ra/hPD1 (도 9B)을, 비-표적화된 IL2Ra-IL2 (검정색 점선의 검정 오픈 원 기호, REGN9904), 비-표적화된 IL2(3m) (회색 점선의 회색 오픈 다이아몬드 기호), 항-PD1-IL2Ra-IL2 (검정 실선의 검정색으로 칠해진 원 기호, REGN10597), 또는 항-PD1-IL2(3m) (회색 실선의 회색으로 칠해진 다이아몬드 기호)와 타이트레이션으로 인큐베이션하였다. 4h 후, STAT5 활성을 발광 판독에 의해 평가하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 기술된 구체적인 방법 및 시험 조건으로 한정되지 않는 것으로 이해되며, 이러한 방법과 조건은 다양할 수 있다. 또한, 본원에 사용된 용어는 구체적인 구현예들을 설명하기 위한 목적일 뿐 제한하고자 하는 것은 아닌 것으로 이해되며, 본 발명의 범위는 첨부된 청구항에 의해서만 제한될 것이다. 달리 정의되지 않은 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 가진다. 본원에 언급된 바와 유사하거나 또는 동등한 임의의 방법 및 물질들이 본 발명을 실시 또는 검사하는데 이용될 수 있지만, 이제 바람직한 방법 및 물질을 설명한다. 본원에 언급된 모든 간행물들은 달리 언급되지 않은 한 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0020] **융합 단백질**

[0021] 일 측면에서, 본 개시내용은 (i) 인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 항원-결합성 모이어티, 및 (ii) IL2 모이어

티를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 개시된 융합 단백질은 T 세포를 자극하고 종양 증식을 저해하는데 항-hPD1 항체 (예, REGN2810)와 비교해 놀랍게도 효과적이다. 특정 구현예에서, 융합 단백질은 항-PD-1-표적화된 IL2 분자 (예, REGN13233)와 비교해 더 나은 안전성 프로파일을 가진다.

[0022] 개시된 융합 단백질은 단량체 또는 다량체, 예를 들어 이량체 (동형이량체 또는 이형이량체)일 수 있거나 또는 더 고차원의 복합체일 수 있다. 간단히, 동형이량체 (또는 동일한 폴리펩타이드로 이루어진 고차원의 다량체)로서 융합 단백질이 이의 구성성분 단량체들에 의해 기술되지만; 구성요소 단량체들이 적절한 세포주에서 재조합에 의해 발현되면, 동형이량체 (또는 고차원의 당량체) 분자가 만들어질 수 있다.

[0023] 일부 구현예에서, 항원-결합성 모이어티는 인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 PD-1에 결합하는 항원-결합성 모이어티는 인간 단일클론 항체이다.

[0024] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 중(H) 쇄 2개와 경(L) 쇄 2개가 이황화 결합에 의해 상호 연결된 폴리펩타이드 쇄 4개로 구성된 면역글로불린 분자 (즉, "완전 항체 분자") 뿐 아니라 이의 다량체 (예, IgM) 또는 이의 항원 결합 단편을 지칭한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역 ("HCVR" 또는 "VH") 및 중쇄 불변 영역 (도메인 CH1, CH2 및 CH3로 구성됨)으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역 ("LCVR 또는 "VL")과 경쇄 불변 영역 (CL)으로 구성된다. VH 및 VL 영역은 상보성 결정 영역 (CDR)으로 지칭되는 과변이 영역으로 추가로 세분될 수 있으며, 그 사이에 프래임워크 영역 (FR)으로 지칭되는 보다 보존된 영역이 분포한다. 각각의 VH 및 VL은 CDR 3개와 FR 4개로 구성되며, 아미노 말단에서 카르복시 말단 방향으로 다음과 같은 순서로 정렬된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 일부 구현예에서, 항체 (또는 이의 항원 결합 단편)의 FR은 사람 생식계열 서열과 동일할 수 있거나 또는 천연적으로 또는 인공적으로 변형될 수 있다. 아미노산 컨센서스 서열은 2 이상의 CDR의 병렬 (side-by-side) 분석을 기반으로 정의될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 또한 전체 항체 분자의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0025] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 항체의 "항원-결합 단편", 항체의 "항원-결합 부분" 등은 항원에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는, 자연적으로 생성되거나, 효소적으로 수득 가능하거나, 합성 또는 유전자 조작된 폴리펩타이드 또는 당단백질을 포함한다. 항체의 항원-결합 단편은, 예를 들어, 단백질 가수분해 절단 또는 항체 가변 도메인 및 선택적으로 불변 도메인을 코딩하는 DNA의 조작 및 발현을 수반하는 재조합 유전공학 기법과 같은 임의의 적합한 표준 기법을 이용하여 전체 항체 분자로부터 유래할 수 있다. 이러한 DNA는 공지되어 있거나 및/또는 예를 들어 상업적 공급원, DNA 라이브러리 (예, 파지-항체 라이브러리)로부터 쉽게 입수 가능하거나, 또는 합성할 수 있다. DNA는 화학적으로 또는 분자 생물학 기법을 이용함으로써 서열분석 및 조작하여, 예를 들어, 하나 이상의 가변 및/또는 불변 도메인을 적절한 구성으로 배열하거나, 코돈을 도입하거나, 시스테인 잔기를 구축하거나, 아미노산을 수정, 부가 또는 제거할 수 있다.

[0026] 항원-결합 단편에 대한 비-제한적인 예로는 다음을 포함한다: (i) Fab 단편; (ii) F(ab')2 단편; (iii) Fd 단편; (iv) Fv 단편; (v) 단쇄 Fv (scFv) 분자; (vi) dAb 단편; 및 (vii) 항체의 과가변 영역을 모방하는 아미노산 잔기로 구성되는 최소 인지 단위 (예, CDR3 펩타이드와 같은 단리된 상보성 결정 영역 (CDR)), 또는 제한된 FR3-CDR3-FR4 펩타이드. 도메인-특이 항체, 단일 도메인 항체, 도메인-결손 항체, 키메라 항체, CDR-그라프팅된 항체, 다이아바디 (diabody), 트리아바디 (triabody), 테트라바디 (tetrabody), 미니바디 (minibody), 나노바디 (nanobody)(예, 1가 나노바디, 2가 나노바디 등), 소형 모듈식 면역의약제 (small modular immunopharmaceuticals (SMIP)), 및 shark 가변성 IgNAR 도메인과 같은, 기타 조작된 분자들 또한 본원에 사용되는 표현 "항원-결합 단편"에 포함된다.

[0027] 항체의 항원-결합 단편은 전형적으로 하나 이상의 가변성 도메인을 포함할 것이다. 가변성 도메인은 임의의 크기 또는 아미노산 조성일 수 있으며, 일반적으로, 하나 이상의 프레임워크 서열에 인접하거나 또는 이와 인 프레임으로 있는 적어도 하나의 CDR을 포함할 것이다. V_L 도메인과 연합된 V_H 도메인을 가진 항원-결합 단편에서, V_H 도메인과 V_L 도메인은 상호 임의의 적절한 배열로 배치될 수 있다. 예를 들어, 가변 영역은 이량체성일 수 있으며, V_H-V_H, V_H-V_L 또는 V_L-V_L 이량체를 포함할 수 있다. 대안적으로, 항체의 항원-결합 단편은 단량체성 V_H 또는 V_L 도메인을 함유할 수 있다.

[0028] 일부 구현예에서, 항체의 항원-결합 단편은 적어도 하나의 불변 도메인과 공유 결합에 의해 연결된 적어도 하나의 가변성 도메인을 함유할 수 있다. 본 발명의 항체의 항원-결합 단편에서 발견될 수 있는 가변성 도메인과 불변성 도메인에 대한 비-제한적인 예시적인 구조는 다음을 포함한다: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3;

(iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; 및 (xiv) V_L-C_L. 전술한 예시 구조들 중 임의의 것을 비롯한 가변성 도메인과 불변성 도메인의 임의의 배열에서, 가변성 도메인과 불변성 도메인은 서로 직접 연결되거나 또는 힌지 전장 또는 일부 또는 링커 영역에 의해 서로 연결될 수 있다. 힌지부는 인접한 가변성 도메인 및/또는 불변성 도메인 간에 유연한 또는 반-유연한 연결을 통해 단일 폴리펩타이드 분자를 형성하는, 적어도 2개의 (예, 5개, 10개, 15개, 20개, 40개, 60개 또는 그보다 많은) 아미노산들로 구성될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체의 항원-결합 단편은 서로 및/또는 하나 이상의 단량체 V_H 또는 V_L 도메인과 비-공유 결합 (예, 이황화 결합(들))으로, 전술한 임의의 가변성 도메인과 불변성 도메인 배열들 중 임의의 것의 동형-이량체 또는 이형-이량체 (또는 기타 다량체)를 포함할 수 있다.

[0029] 본원에 개시된 융합 단백질에 포함된 항체 또는 이의 항원 결한 단편은 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래한 가변성 도메인과 불변성 영역을 가진 항체를 지칭한다. 본 발명의 융합 단백질에 포함되는 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 그럼에도 불구하고, 예를 들어 CDR, 특히 CDR3에서 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예, 시험관내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 마우스와 같은 다른 포유류 종의 생식계열로부터 유래한 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 그라프팅된 항체를 포함하는 것으로 의도하는 것은 아니다.

[0030] 본원에 개시된 융합 단백질에 포함되는 항체는 재조합 인간 항체일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "재조합 인간 항체"는, 숙주 세포에 형질감염된 재조합 발현 벡터를 이용하여 발현된 항체 (아래에서 추가로 설명됨), 재조합, 조합 (combinatorial) 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 (아래에서 추가로 설명됨), 인간 면역글로불린 유전자에 대해 트랜스제닉 (transgenic)인 동물 (예, 마우스)로부터 단리된 항체 (예, Taylor et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295 참조), 또는 기타 DNA 서열로의 인간 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱을 수반하는 임의의 기타 수단에 의해 제조, 발현, 구축 또는 단리된 항체와 같이, 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 구축 또는 단리되는 모든 인간 항체를 망라한다. 이러한 재조합 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래한 가변성 영역과 불변성 영역을 가진다. 그러나, 일부 구현예에서, 이러한 재조합 인간 항체는 시험관내 돌연변이 유발되며 (또는, 인간 Ig 서열에 대해 트랜스제닉인 동물을 이용할 경우, 생체내 체세포 돌연변이 유발), 따라서, 재조합 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열은, 인간 생식계열 V_H 및 V_L 서열로부터 유래하며 이와 관련 있지만 생체내 인간 항체 생식계열 레퍼토리에 본래 존재하지 않는 것일 수 있는, 서열이다.

[0031] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 PD-1에 특이적으로 결합한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "특이적으로 결합한다" 또는 비슷한 표현은, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 항원과 생리학적 조건에서 상대적으로 안정한 복합체를 형성하는 것을 의미한다. 항체가 항원에 특이적으로 결합하는지를 결정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 평형 투석법 (equilibrium dialysis), 표면 플라스몬 공명 (surface plasmon resonance) 등을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 맥락에서 사용되는, 인간 PD-1에 "특이적으로 결합하는" 항체는 표면 플라스몬 공명 분석으로 측정시, 약 500 nM 미만, 약 300 nM 미만, 약 200 nM 미만, 약 100 nM 미만, 약 90 nM 미만, 약 80 nM 미만, 약 70 nM 미만, 약 60 nM 미만, 약 50 nM 미만, 약 40 nM 미만, 약 30 nM 미만, 약 20 nM 미만, 약 10 nM 미만, 약 5 nM 미만, 약 4 nM 미만, 약 3 nM 미만, 약 2 nM 미만, 약 1 nM 미만 또는 약 0.5 nM 미만의 K_D로, 인간 PD-1 또는 그 일부에 결합하는 항체를 포함한다. 그러나, 인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 기타 (비-인간) 종으로부터 유래한 PD-1 분자와 같은, 기타 항원에 대해 교차 반응성을 가질 수 있다.

[0032] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 3종 (HCDR1, HCDR2 및 HCDR3)과 경쇄 CDR 3종 (LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하며, 여기서: HCDR1은 서열번호 4, 24 또는 43의 아미노산 서열을 포함하고; HCDR2는 서열번호 6, 26 또는 45의 아미노산 서열을 포함하고; HCDR3는 서열번호 8, 28 또는 47의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR1은 서열번호 12 또는 32의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR2는 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR3는 서열번호 16 또는 35의 아미노산 서열을 포함한다.

[0033] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, (i) 서열번호 4, 6, 8, 12, 14 및 16; (ii) 서열번호 24, 26, 28, 32, 14 및 35; 또는 (iii) 서열번호 43, 45, 47, 12, 14 및 16의 각 아미노산 서열을 포함하는,

HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함한다.

[0034] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 43, 45, 47, 12, 14 및 16의 아미노산 서열을 각각 포함하는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함한다.

[0035] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 2, 22 또는 41의 아미노산 서열 또는 서열번호 2, 22 또는 41에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (HCVR), 및 서열번호 10 또는 30의 아미노산 서열 또는 서열번호 10 또는 30에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함한다.

[0036] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 서열번호 2에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 HCVR과, 서열번호 10의 아미노산 서열 또는 서열번호 10에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 LCVR을 포함한다.

[0037] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 22의 아미노산 서열 또는 서열번호 22에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 HCVR과, 서열번호 30의 아미노산 서열 또는 서열번호 30에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 LCVR을 포함한다.

[0038] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 41의 아미노산 서열 또는 서열번호 41에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 HCVR과, 서열번호 10의 아미노산 서열 또는 서열번호 10에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 LCVR을 포함한다.

[0039] 일부 구현예에서, 융합 단백질은 서열번호 55의 아미노산 서열 또는 서열번호 55에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 중쇄 불변 영역과, 서열번호 56의 아미노산 서열 또는 서열번호 56에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열의 경쇄 불변 영역을 추가로 포함한다.

[0040] 일부 구현예에서, 융합 단백질은 중쇄와 경쇄를 포함하되, 중쇄는 서열번호 57, 59 또는 61의 아미노산 서열 또는 서열번호 57, 59 또는 61에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열번호 58, 60 또는 62의 아미노산 서열 또는 서열번호 58, 60 또는 62에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 가진다.

[0041] 일부 구현예에서, 융합 단백질은 중쇄와 경쇄를 포함하되, 중쇄는 서열번호 57의 아미노산 서열 또는 서열번호 57에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열번호 58의 아미노산 서열 또는 서열번호 58에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0042] 일부 구현예에서, 융합 단백질은 중쇄와 경쇄를 포함하되, 중쇄는 서열번호 59의 아미노산 서열 또는 서열번호 59에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열번호 61의 아미노산 서열 또는 서열번호 61에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0043] 일부 구현예에서, 융합 단백질은 중쇄와 경쇄를 포함하되, 중쇄는 서열번호 61의 아미노산 서열 또는 서열번호 61에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열번호 62의 아미노산 서열 또는 서열번호 62에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0044] 일부 구현예에서, 융합 단백질은 서열번호 57/58, 59/60 또는 61/62의 중쇄/경쇄 서열 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 서열번호 61/62의 중쇄/경쇄 서열 쌍을 포함한다.

[0045] 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 (i) IL2 또는 이의 단편; 및 (ii) IL2 수용체 α (IL2Rα) 또는 이의 단편을 포함한다.

[0046] 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 야생형 또는 변이체 IL2 도메인을 포함할 수 있으며, 이는 선택적으로 링커를

통해 IL-2Rα의 IL2 결합성 도메인과 융합된다. IL-2Rα의 IL2 결합성 도메인은 야생형 또는 변이체 IL2 도메인에 대해 N-말단 또는 C-말단일 수 있다. 일부 구현예에서, IL-2Rα의 IL2 결합성 도메인은 야생형 또는 변이체 IL2 도메인에 대해 N-말단이다.

[0047] 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 서열번호 54의 아미노산 서열 또는 서열번호 54에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0048] 진핵생물 세포에서, 인간 IL2는 아미노산 153개로 된 전구체 폴리펩타이드로 합성되고, 이중 아미노산 20개가 제거되어 분비되는 성숙한 IL2가 만들어진다 (Taniguchi *et al.*, 1983, Nature 302(5906):305-10). 성숙한 인간 IL2는 하기 아미노산 서열을 가진다:

[0049] APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT (서열번호 75)

[0050] 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 IL2Ra를 지향 (IL2Ra directed) 할 수 있으며, 예를 들어 이는 IL-2Rβ에 비해 IL-2Rα에 선호적으로 결합하게 만드는 하나 이상의 아미노산 치환을 IL2 도메인에 가진다. 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 CD122를 지향하지 않으며, 예를 들어 이는 IL-2Rα와 비교해 IL-2Rβ에 선호적으로 결합하게 만드는 아미노산 치환을 IL2 도메인에 가지지 않는다.

[0051] 일부 구현예에서, 본 발명의 융합 단백질은 IL2 도메인에 IL-2Rβ에의 결합을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 가진다. 예를 들어, 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 야생형 인간 IL2와 비교해 인간 IL-2Rβ에 대해 최대 50배 (일부 구현예에서 최대 100배) 내지 1,000배 감쇠된 결합성을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, IL-2Rβ에 대해 감소된 결합성을 가진 IL2 모이어티는 IL-2Rα에 대한 자체 친화성을 유지할 수 있거나, 또는 IL-2Rα에 대해 감소된 결합성을 가질 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 야생형 인간 IL2와 비교해 IL-2Rα에 대해 최대 50배 감쇠된 결합성을 가질 수 있다. 일 구현예에서, IL2 도메인은 IL-2Rβ에 대한 친화성은 낮추고 IL2-Rα에 대한 친화성은 보존하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 아미노산 치환의 예는 N88D이다. IL-2Rβ에 대한 IL2의 친화성을 낮추거나 또는 없애는 다른 아미노산 치환은 D20T, N88R, N88D 또는 Q126D이다 (예, 미국 특허 공개번호 US 2007/0036752).

[0052] 일부 구현예에서, IL2 도메인은 IL2-Rα에 대한 친화성은 낮추고 IL-2Rβ에 대한 친화성은 보존하거나 또는 더 낮은 정도로 낮추어, CD122를 지향하는 IL2 모이어티를 만드는, 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. CD122를 지향하는 IL2 도메인의 예는 H16A 및 F42A 치환을 모두 포함하는 것이다. 이에, 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 H16A 및 F42A 치환을 가진 인간 IL2의 아미노산 서열을 포함한다.

[0053] 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 인간 IL2의 잔기 3에 대응하는 위치에서 IL2의 O-당화 부위를 없애는 아미노산 치환을 포함한다. T3에서의 아미노산 치환의 예는 T3A, T3G, T3Q, T3E, T3N, T3D, T3R, T3K 및 T3P이다. 구체적인 구현예에서, 치환은 T3A이다.

[0054] 일부 구현예에서, IL2 도메인은 C125에 치환을 포함할 수 있다. C125는 미국 특허 4,518,584에 기술된 바와 같이, 단백질 응집을 낮추기 위해 S, V 또는 A로 치환될 수 있다. 일부 구현예에서, IL2 도메인은 미국 특허 5,206,344에 기술된 바와 같이 메티오닌 104의 알라닌과 같은 중성 아미노산으로의 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, IL2 도메인은 IL2의 N-말단 알라닌 잔기가 없을 수 있으며, 그래서 des-A1 IL2가 형성될 수 있다.

[0055] 일부 구현예에서, IL2 도메인은 IL2의 이의 수용체에 대한 결합을 변경하는 기타 변이와 더불어, des-A1 M104A IL2, des-A1 M104A C125S IL2, M104A IL2, M104A C125A IL2, des-A1 M104A C125A IL2 및 M104A C125S IL2로부터 선택되는 아미노산 결손 및/또는 치환을 가질 수 있다. 이러한 돌연변이 및 기타 돌연변이는 미국 특허 5,116,943 및 Weiger *et al.*, 1989, Eur J Biochem 180:295-300에서 확인할 수 있다.

[0056] 일부 구현예에서, IL2 도메인은 성숙한 인간 IL2에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 약 적어도 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0057] 일부 구현예에서, IL2 또는 이의 단편은 서열번호 53의 아미노산 서열 또는 서열번호 53에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0058] 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 IL2의 C-말단 또는 N-말단에서 선택적으로 링커를 통해 융합된, IL-2Rα의 IL2 결합성 도메인 ("IL2-Rα 도메인"으로 지칭됨), 예를 들어 IL-2Rα의 세포외 도메인을 추가로 포함한다. 일

부 구현예에서, IL2Rα 또는 이의 단편은 인간 IL2Rα (hIL2Rα) 또는 이의 단편이다. 일부 구현예에서, IL2-Rα 도메인은 성숙한 인간 IL-2Rα 세포외 도메인 (인간 IL-Rα의 아미노산 22-272에 해당함)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, IL2-Rα 도메인은 (인간 IL-2Rα의 아미노산 22-186에 해당하는, "sushi" 도메인 2개를 포함하는) 인간 IL-2Rα 세포외 도메인의 IL2 결합성 부분을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, IL2-Rα 도메인은 인간 IL-2Rα의 아미노산 22-240에 해당하는, 인간 IL-2Rα 세포외 도메인의 대안적인 IL2 결합성 부분을 포함할 수 있다.

[0059] 일부 구현예에서, IL2-Rα 도메인 또는 IL-2Rα 세포외 도메인의 IL2 결합성 부분은 전술한 임의 서열, 즉 IL-2Rα의 아미노산 22-186, IL-2Rα의 아미노산 22-240, IL-2Rα의 아미노산 22-272 또는 이들의 임의의 IL2 결합성 부분 중 어느 하나에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 가진다.

[0060] 일부 구현예에서, IL2-Rα 도메인 또는 IL2 결합성 부분은 인간 IL-2Rα의 IL2 결합성 부분에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성될 수 있으며, 선택적으로, 결합성 부분은 인간 IL2-Rα의 세포외 도메인의 (a) 아미노산 160개 이상, 161개 이상, 162개 이상, 164개 이상 또는 165개 이상 및/또는 (b) 아미노산 최대 251, 최대 240, 최대 230, 최대 220, 최대 210, 최대 200, 최대 190, 최대 180 또는 170개로 된 아미노산 서열을 가진다. 특정 구현예에서, 인간 IL-2Rα의 부분은 전술한 문장에서 (a) 및 (b) 중 어느 하나에 의해, 예를 들어 인간 IL-2Rα로부터 유래한 아미노산 160개 이상 및 최대 180개, 인간 IL-2Rα로부터 유래한 아미노산 162개 이상 및 최대 200개, 인간 IL-2Rα로부터 유래한 아미노산 160개 이상 및 최대 220개, 인간 IL-2Rα로부터 유래한 아미노산 164개 이상 및 최대 190개 등에 의해 제한된다.

[0061] 일부 구현예에서, IL2-Rα 도메인 또는 IL2 결합성 부분은, IL2-Rα의 아미노산 잔기 186에 대해 C-말단에, 추가로 아미노산 최대 5개, 최대 10개, 최대 15개, 최대 20개, 최대 30개 또는 최대 40개가 부가되거나 또는 부가되지 않으면서, 아미노산 22-186에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다.

[0062] 일부 구현예에서, IL2-Rα 도메인 또는 IL-2Rα 세포외 도메인은, 예를 들어, 아미노산 N49, 아미노산 N68, 아미노산 T74, 아미노산 T85, 아미노산 T197, 아미노산 T203, 아미노산 T208 및 아미노산 T216 중 하나 이상에서의 치환에 의해, 네이티브 IL-2Rα의 세포외 도메인과 비교해 O-당화 및/또는 N-당화가 하나 이상 더 적다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 치환은 아스파라긴에서 알라닌, 트레오닌, 세린, 아르기닌, 아스파르트산, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소루신, 루신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판, 티로신 및 발린으로부터 선택되는 아미노산으로의 치환이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 치환은 트레오닌에서 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소루신, 루신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트립토판, 티로신 및 발린으로부터 선택되는 아미노산으로의 치환이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 치환은 아미노산 S50 (예를 들어, S50P), 아미노산 S51 (예를 들어, S51R, S51N, S51D, S51C, S51Q, S51E, S51G, S51H, S51I, S51L, S51K, S51M, S51F, S51P, S51W, S51Y 또는 S51V), 아미노산 T69 (예를 들어, T69P), 아미노산 T70 (예를 들어, T70R, T70N, T70D, T70C, T70Q, T70E, T70G, T70H, T70I, T70L, T70K, T70M, T70F, T70P, T70W, T70Y 또는 T70V, 아미노산 C192 (예를 들어, C192R, C192N, C192D, C192Q, C192E, C192G, C192H, C192I, C192L, C192K, C192M, C192F, C192P, C192W, C192Y 또는 C192V), 또는 이들의 임의 조합 위치에 존재한다.

[0063] 일부 구현예에서, IL2Rα 또는 이의 단편은 서열번호 51의 아미노산 서열 또는 서열번호 51에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0064] 융합 단백질은 분자의 다양한 구성성분들을 연결하는 하나 이상의 링커 (예를 들어, 펩타이드 링커 또는 비-펩타이드 링커)를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 융합 단백질의 2 이상의 구성성분이 펩타이드 링커에 의해 서로 연결된다. 예를 들어, 비-제한적으로, 링커를 이용해, (a) IL2 모이어티 및 항원-결합성 모이어티; (b) IL2 모이어티 내 서로 다른 도메인 (예를 들어, IL2 도메인 및 IL-Rα 도메인); 또는 (c) 항원-결합성 모이어티 내 서로 다른 도메인 (예를 들어, 항-PD-1 항체의 서로 다른 구성성분들)을 연결할 수 있다.

[0065] 펩타이드 링커는 아미노산 2-60개 또는 그 이상의 범위일 수 있으며, 일부 구현예에서 펩타이드 링커는 아미노산 3-50개, 아미노산 4-30, 아미노산 5-25, 아미노산 10-25, 아미노산 10-60, 아미노산 12-20, 아미노산 20-50 또는 아미노산 25-35개 길이 범위일 수 있다.

[0066] 일부 구현예에서, 펩타이드 링커는 아미노산 5개 이상, 6개 이상 또는 7개 이상 길이이며, 선택적으로 아미노산 최대 30개, 최대 40개, 최대 50개 또는 최대 60개 길이이다. 일부 구현예에서, 링커는 아미노산 5-50개 길이 범위이며, 예를 들어 아미노산 5-50, 5-45, 5-40, 5-35, 5-30, 5-25 또는 5-20개 길이 범위이다. 전술한 구현예에 대한 다른 구현예에서, 링커는 아미노산 6-50개 길이 범위이며, 예를 들어 아미노산 6-50, 6-45, 6-40, 6-35, 6-30, 6-25 또는 6-20개 길이 범위이다. 전술한 구현예에 대한 또 다른 구현예에서, 링커는 아미노산 7-50개 길이 범위이며, 예를 들어 아미노산 7-50, 7-45, 7-40, 7-35, 7-30, 7-25 또는 7-20개 길이 범위이다.

[0067] 일부 구현예에서, 링커는 극성 잔기 (예를 들어, 세린(S)) 또는 하전된 잔기 (예를 들어, 라이신 (K))를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 유연한 링커이며, 예를 들어, 글리신 (G) 또는 세린 (S) 잔기 하나 이상을 포함하는 유연한 링커이다.

[0068] 본 발명의 융합 단백질에 사용 가능할 수 있는 유연한 링커의 예로는 Chen et al., 2013, Adv Drug Deliv Rev. 65(10): 1357-1369 및 Klein et al., 2014, Protein Engineering, Design & Selection 27(10): 325-330에 개시된 것을 포함한다. 특히 유용한 유연한 링커는 글리신 및 세린으로 이루어진 반복체이거나 또는 이를 포함하며, 예를 들어, GnS 또는 SGn의 단량체 또는 다량체이거나 또는 이를 포함하며, 여기서 n은 1-10의 정수, 예를 들어, 1 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다. 일 구현예에서, 링커는 G4S (GGGGS; 서열번호 67)의 반복체 단량체 또는 다량체, 예를 들어, (GGGGS)n이거나 또는 이를 포함한다.

[0069] 폴리글리신 링커가 본 발명의 융합 단백질에 적절하게 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, 펩타이드 링커는 연속적인 글리신 2개 (2Gly), 연속적인 글리신 3개 (3Gly), 연속적인 글리신 4개 (4Gly) (서열번호 68), 연속적인 글리신 5개 (5Gly) (서열번호 69), 연속적인 글리신 6개 (6Gly) (서열번호 70), 연속적인 글리신 7개 (7Gly) (서열번호 71), 연속적인 글리신 8개 (8Gly) (서열번호 72) 또는 연속적인 글리신 9개 (9Gly) (서열번호 73)를 포함한다.

[0070] 일부 구현예에서, IL2 모이어티와 항원-결합성 모이어티는 링커를 통해 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 GGGGS (서열번호 67) 반복체 하나 이상으로 된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 서열번호 50 또는 52의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 항원-결합성 모이어티의 C-말단에 펩타이드 링커를 통해 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함한다.

[0071] 다른 측면에서, 본 개시내용은 (i) 인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 인간 항체의 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하는 제1 폴리펩타이드; 및 (ii) (a) 인간 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 영역 (HCVR)과 (b) IL2 모이어티를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는, 융합 단백질을 제공한다.

[0072] 일부 구현예에서, HCVR은 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR) 3종 (HCDR1, HCDR2 및 HCDR3)을 포함하고, LCVR은 경쇄 CDR 3종 (LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하며, 여기서: HCDR1은 서열번호 4, 24 또는 43의 아미노산 서열을 포함하고; HCDR2는 서열번호 6, 26 또는 45의 아미노산 서열을 포함하고; HCDR3는 서열번호 8, 28 또는 47의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR1은 서열번호 12 또는 32의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR2는 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하고; LCDR3는 서열번호 16 또는 35의 아미노산 서열을 포함한다.

[0073] 일부 구현예에서, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 (i) 서열번호 4, 6, 8, 12, 14 및 16; (ii) 서열번호 24, 26, 28, 32, 14 및 35; 또는 (iii) 서열번호 43, 45, 47, 12, 14 및 16의 각각의 아미노산 서열을 포함한다.

[0074] 일부 구현예에서, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 서열번호 43, 45, 47, 12, 14 및 16의 각각의 아미노산 서열을 포함한다.

[0075] 일부 구현예에서, HCVR은 서열번호 2, 22 또는 41의 아미노산 서열 또는 서열번호 2, 22 또는 41에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, LCVR은 서열번호 10 또는 30의 아미노산 서열 또는 서열번호 10 또는 30에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0076] 일부 구현예에서, HCVR은 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 서열번호 2에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하고, LCVR은 서열번호 10의 아미노산 서열 또는 서열번호 10에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0077] 일부 구현예에서, HCVR은 서열번호 22의 아미노산 서열 또는 서열번호 22에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하고, LCVR은 서열번호 30의 아미노산 서열 또는 서열

번호 30에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0078] 일부 구현예에서, HCVR은 서열번호 41의 아미노산 서열 또는 서열번호 41에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하고, LCVR은 서열번호 10의 아미노산 서열 또는 서열번호 10에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0079] 일부 구현예에서, HCVR 및 LCVR은 각각 (i) 서열번호 2 및 10; (ii) 서열번호 22 및 30; 또는 (iii) 서열번호 41 및 10의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, HCVR 및 LCVR은 각각 서열번호 41 및 10의 아미노산 서열을 포함한다.

[0080] 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드는 LCVR에 연결된 경쇄 불변 영역을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 경쇄 불변 영역은 서열번호 56의 아미노산 서열 또는 서열번호 56에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0081] 일부 구현예에서, 제2 폴리펩타이드는 HCVR과 IL2 모이어티 사이에 정렬된 중쇄 불변 영역을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호 55의 아미노산 서열 또는 서열번호 55에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0082] 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드는 서열번호 58, 60 또는 62의 경쇄 아미노산 서열 또는 서열번호 58, 60 또는 62에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0083] 일부 구현예에서, 제2 폴리펩타이드는 서열번호 57, 59 또는 61의 중쇄 아미노산 서열 또는 서열번호 57, 59 또는 61에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 중쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0084] 일부 구현예에서, 융합 단백질은 서열번호 57/58, 59/60 또는 61/62의 중쇄/경쇄 서열 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 서열번호 61 / 62의 중쇄/경쇄 서열 쌍을 포함한다.

[0085] 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 중쇄 불변 영역의 C-말단에 링커를 통해 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 GGGGS (서열번호 67) 반복체 하나 이상으로 된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 서열번호 50 또는 52의 아미노산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 링커는 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함한다.

[0086] 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 (i) IL2 또는 이의 단편; 및 (ii) IL2 수용체 α (IL2Rα) 또는 이의 단편을 포함한다.

[0087] 일부 구현예에서, IL2 또는 이의 단편은 인간 IL2 (hIL2) 또는 이의 단편이다. 일부 구현예에서, IL2 또는 이의 단편은 서열번호 53의 아미노산 서열 또는 서열번호 53에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0088] 일부 구현예에서, IL2Rα 또는 이의 단편은 인간 IL2Rα (hIL2Rα) 또는 이의 단편이다. 일부 구현예에서, IL2Rα 또는 이의 단편은 서열번호 51의 아미노산 서열 또는 서열번호 51에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0089] 일부 구현예에서, IL2 모이어티는 서열번호 54의 아미노산 서열 또는 서열번호 54에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0090] 일부 구현예에서, IL2 또는 이의 단편은 IL2Rα 또는 이의 단편의 C-말단에 링커를 통해 연결된다. 일 구현예에서, 링커는 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함한다.

[0091] 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드는 서열번호 58, 60 또는 62의 아미노산 서열 또는 서열번호 58, 60 또는 62에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 폴리펩타이드는 서열번호 63, 64 또는 65의 아미노산 서열 또는 서열번호 63, 64 또는 65에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0092] 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드는 서열번호 58의 아미노산 서열 또는 서열번호 58에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩타이드는 서열번호 64의 아미노산 서열 또는 서열번호 64에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0093] 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드는 서열번호 60의 아미노산 서열 또는 서열번호 60에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩타이드는 서열번호 63의

아미노산 서열 또는 서열번호 63에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0094] 일부 구현예에서, 제1 폴리펩타이드는 서열번호 62의 아미노산 서열 또는 서열번호 62에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩타이드는 서열번호 65의 아미노산 서열 또는 서열번호 65에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0095] 또한, 본 개시내용은 본원에 기술된 융합 단백질에 의해 형성된 이량체성 융합 단백질을 제공한다. 일부 구현예에서, 이량체성 융합 단백질은 구성하는 각각의 단량체가 본원에 기술된 융합 단백질을 포함하는, 동형이량체 융합 단백질이다. 일부 구현예에서, 구성하는 각각의 단량체가 본원에 기술된 융합 단백질을 구성한다. 일부 구현예에서, 이량체성 융합 단백질의 단량체는 각 단량체의 중쇄 불변 영역을 통해 이량체를 형성한다.

[0096] **생물학적 활성**

[0097] 본 발명의 융합 단백질은 IL2Rα, IL2Rβ 및 IL2Rɣ에 대해 감쇠된 결합성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 REGN2810, 펨브롤리주맙 또는 니볼루맙과 경쟁하지 않는다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 비-표적화된 IL2Rα-IL2 구조체와 비교해 인간 IL2Rα/β/ɣ 삼량체 및 IL2Rβ/ɣ 이량체 수용체 복합체를 활성화하는데 감소된 활성을 나타내고, 인간 IL2Rα/β/ɣ 삼량체 및 IL2Rβ/ɣ 이량체 수용체 복합체를 활성화하는데 증가된 활성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 야생형 인간 IL2와 비교해 IFN-ɣ 분비 수준에 의해 측정한 바와 같이 항원-활성화된 T 세포를 자극하는데 증가된 활성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 IL2 단독 또는 항-PD-1 항체와의 조합과 비교해 강화된 항-종양 효능을 나타낸다.

[0098] **핵산 및 숙주 세포**

[0099] 다른 측면에서, 본 개시내용은 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 또는 핵산들을 제공한다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 단일한 핵산에 의해 코딩된다. 다른 구현예에서, 예를 들어, 동형이량체 분자 또는 폴리펩타이드 쇄 2개 이상으로 구성된 항-PD-1 항체를 포함하는 분자의 경우, 융합 단백질은 핵산 여러 개 (예, 2, 3, 4개 이상)에 의해 코딩될 수 있다.

[0100] 단일한 핵산은 단일한 폴리펩타이드 쇄를 포함하는 융합 단백질, 폴리펩타이드 쇄 2개 이상을 포함하는 융합 단백질, 또는 폴리펩타이드 쇄 3개 이상을 포함하는 융합 단백질의 일부를 코딩할 수 잇다 (예를 들어, 단일한 핵산이 폴리펩타이드 쇄 3개, 4개 또는 그 이상을 포함하는 융합 단백질의 폴리펩타이드 쇄 2개, 또는 폴리펩타이드 쇄 4개 이상을 포함하는 융합 단백질의 폴리펩타이드 쇄 3개를 코딩할 수 있음). 발현을 개별 통제하기 위해, 폴리펩타이드 쇄 2개 이상을 코딩하는 오픈 리딩 프래임들이 개별 전사 조절 인자 (예, 프로모터 및/또는 인핸서)의 통제 하에 놓일 수 있다. 폴리펩타이드 2 이상을 코딩하는 오픈 리딩 프레임들은 또한 동일한 전사 조절 인자에 의해 통제될 수 있으며, 내부 리포솜 도입 부위 (IRES) 서열에 의해 분리되어 있어 개별 폴리펩타이드로 번역될 수 있다.

[0101] 일부 구현예에서, 폴리펩타이드 쇄 2 이상을 포함하는 융합 단백질은 핵산 2 이상에 의해 코딩된다. 융합 단백질을 코딩하는 핵산의 개수는 융합 단백질 내 폴리펩타이드의 개수와 동일하거나 또는 (예를 들어, 폴리펩타이드 쇄 2개 이상이 단일한 핵산에 의해 코딩될 경우) 그보다 적을 수 있다.

[0102] 본 개시내용의 핵산은 DNA 또는 RNA (예를 들어, mRNA)일 수 있다.

[0103] 다른 측면에서, 본 개시내용은 본 발명의 핵산을 포함하는 숙주 세포 및 벡터를 제공한다. 핵산은 하기에서 더욱 상세히 기술된 바와 같이 동일한 숙주 세포 또는 분리된 숙주 세포에 존재하는 단일한 벡터 또는 분리된 벡터에 존재할 수 있다.

[0104] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 본원에 기술된 바와 같이 항체의 HCVR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 벡터와, 본원에 기술된 바와 같이 항체의 LCVR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 벡터를 발현한다.

[0105] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 본원에 기술된 바와 같이 융합 단백질의 제1 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 벡터와, 본원에 기술된 바와 같이 융합 단백질의 제2 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 벡터를 발현한다.

[0106] 본 개시내용은 본원에 기술된 융합 단백질 또는 융합 단백질 구성성분, 예를 들어 절반 항체의 폴리펩타이드 쇄

들 중 하나 또는 2개를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 벡터는 바이러스, 플라스미드, 코스미드, 람다 파지 또는 효모 인공 염색체 (YAC)를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0107] 다수의 벡터 시스템을 이용할 수 있다. 예를 들어, 한가지 계열의 벡터는 예를 들어 보바인 파필로마바이러스, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 베큘로바이러스, 레트로바이러스 (라우스 육종 바이러스, MMTV 또는 MOMLV) 또는 SV40 바이러스와 같은 동물 바이러스로부터 유래한 DNA 인자들을 이용한다. 다른 계열의 벡터는 셈리키 포레스트 바이러스, 동부 말 뇌염 바이러스 및 플라비바이러스와 같은 RNA 바이러스로부터 유래한 RNA 인자들을 이용한다.

[0108] 아울러, DNA를 이의 염색체에 안정적으로 통합하는 세포는, 형질감염된 숙주 세포를 선택하도록 허용하는 하나 이상의 마커를 도입함으로써 선택할 수 있다. 마커는, 예를 들어, 프로토트로피 (prototropy) 또는 영양요구성 숙주, 살생물제 내성 (예, 항생제) 또는 구리 등과 같은 중금속에 대한 내성을 제공할 수 있다. 선별가능한 마커 유전자는 공동-형질전환에 의해 동일한 세포 안으로 도입되거나 또는 발현시킬 DNA 서열에 직접 연결될 수 있다. 또한, mRNA를 최적으로 합성하기 위해 부가적인 인자들이 필요할 수도 있다. 이러한 인자들은 스플라이스 신호뿐 아니라 전사 프로모터, 인핸서 및 종결 신호를 포함할 수 있다.

[0109] 구조체를 함유한 발현 벡터 또는 DNA 서열이 일단 발현을 위해 준비되면, 발현 벡터를 적절한 숙주 세포에 형질감염시키거나 또는 도입할 수 있다. 이를 달성하기 위해, 예를 들어 원형질체 융합, 칼슘 포스페이트 침강, 전기천공, 레트로바이러스 형질도입, 바이러스 형질감염, 유전자 총, 지질-기반의 형질감염 또는 기타 통상적인 기법과 같은 다양한 기법들이 채택될 수 있다. 수득한 형질감염된 세포를 배양하고 발현된 폴리펩타이드를 회수하는 방법 및 조건들은 당해 기술 분야의 당업자들에게 공지되어 있으며, 이는 본 내용에 기반하여 채택한 구체적인 발현 벡터 및 포유류 숙주 세포에 따라 달라질 수 있거나 최적화될 수 있다.

[0110] 또한, 본 개시내용은 본 발명의 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일 구현예에서, 숙주 세포는 본원에 기술된 하나 이상의 핵산을 포함하도록 유전자 조작된다. 일 구현예에서, 숙주 세포는 발현 카세트를 이용함으로써 유전자 조작된다. 표현 "발현 카세트"는 이러한 서열을 이용하기 적합한 숙주에서 유전자의 발현에 영향을 미칠 수 있는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 이러한 카세트는 프로모터, 인트론이 존재하거나 또는 없는 오픈 리딩 프래임 및 종결 신호를 포함할 수 있다. 발현을 구현하는데 필수이거나 또는 도움이 되는 부가적인 인자, 예를 들어 유도성 프로모터를 이용할 수도 있다.

[0111] 또한, 본 개시내용은 본원에 기술된 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0112] 세포는 진핵생물 세포, 박테리아 세포, 곤충 세포 또는 인간 세포일 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 적합한 진핵생물 세포로는 Vero 세포, HeLa 세포, COS 세포, CHO 세포, HEK293 세포, BHK 세포 및 MDCKII 세포 등이 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 적합한 곤충 세포로는 Sf9 세포 등이 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0113] **약학적 조성물**

[0114] 본원에 기술된 바와 같이 융합 단백질 또는 이량체성 융합 단백질은 융합 단백질 (예를 들어, 이량체성 융합 단백질) 및 하나 이상의 담체, 부형제 및/또는 희석제를 포함하는 조성물 형태로 존재할 수 있다.

[0115] 조성물은 수의학적 용도 또는 인간에서의 약제학적 용도와 같이 특수 용도로 제형화할 수 있다. 조성물의 형태 (예, 건조 분말, 액체 제형 등) 및 이용되는 부형제, 희석제 및/또는 담체는 융합 단백질 또는 이량체성 융합 단백질의 의도한 용도 및 치료학적 용도, 투여 방식에 따라 결정될 것이다.

[0116] 치료학적 용도의 경우, 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 함유한 멸균 약학적 조성물의 일부로 공급될 수 있다. 이러한 조성물은 (바람직한 환자 투여 방법에 따라) 임의의 적절한 형태일 수 있다. 약학적 조성물은 경구, 경피, 피하, 비강내, 정맥내, 근육내, 종양내, 척수강내, 국소적으로 또는 국부적으로와 같은 다양한 경로를 통해 환자에 투여할 수 있다. 임의의 소정의 경우에 가장 적합한 투여 경로는 구체적인 항체, 개체, 질환의 특성과 중증성, 개체의 신체 상태에 따라 결정될 것이다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 정맥내 또는 피하로 투여될 것이다.

[0117] 약학적 조성물은 투여 당 본 발명의 융합 단백질을 지정된 양으로 함유한 단위 투약 형태로 편리하게 제공될 수 있다. 단위 용량에 함유된 융합 단백질의 양은 치료 중인 질환뿐 아니라 당해 기술 분야에 잘 공지된 기타 인자에 따라 결정될 것이다. 이러한 단위 투여량은 단일 투여하기에 적합한 함량으로 융합 단백질을 함유한 동결건조된 건조 분말 형태이거나, 또는 액체 형태일 수 있다. 건조 분말 단위 투약 형태는 주사기, 적량의 희석제 및

/또는 투여하기에 유용한 기타 구성성분과 함께 키트로 포장될 수 있다. 액체 형태의 단위 투여량은 단일 투여하기에 적합한 함량으로 융합 단백질이 미리 충진된 주사기 형태로 편리하게 공급될 수 있다. 또한, 약학적 조성물은 수회 투여하기에 적합한 함량으로 융합 단백질을 함유한 벌크로 공급될 수 있다.

[0118] 약학적 조성물은 보관을 위해 동결건조된 제형으로 또는 원하는 순도의 융합 단백질을 당해 기술 분야에서 전형적으로 채택되는 선택적인 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제, 즉 (이들 모두 본원에서 "담체"로 지칭되는) 완충화제, 안정화제, 보존제, 등장화제 (isotonifier), 비-이온성 디터전트, 항산화제 및 기타 다양한 첨가제 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition (Osol, ed. 1980))와 혼합함으로써 수성 용액제로서 제조할 수 있다. 이러한 첨가제는 채택된 투여량 및 농도에서 수여체에 무독성이어야 한다.

[0119] **이용 방법**

[0120] 본 발명의 융합 단백질은, 숙주의 면역계를 자극하는 것이 유익한 질환 상태, 특히 강화된 세포성 면역 반응이 요망되는 병태를 치료하는데 유용하다. 이는 숙주 면역 반응이 충분하지 않거나 또는 결핍된 질환 상태를 포함할 수 있다. 본 발명의 융합 단백질을 투여할 수 있는 질환 상태로는, 예를 들어, 세포성 면역 반응이 특이적인 면역에 중추적인 기전인 감염 또는 종양을 포함한다. 본 발명의 융합 단백질이 채택될 수 있는 구체적인 질환 상태로는 암, 예를 들어 신장 세포 암종 또는 흑색종; 특히 HIV 양성 환자, 면역억제 환자에서 면역 결핍, 만성 감염 등을 포함한다. 본 발명의 융합 단백질은 그 자체로 또는 임의의 적합한 약학적 조성물 형태로 투여할 수 있다.

[0121] 일 측면에서, 의약제로서 이용하기 위한 본 발명의 융합 단백질을 제공한다. 추가적인 측면에서, 질환 치료에 이용하기 위한 본 발명의 융합 단백질을 제공한다. 일부 구현예에서, 치료 방법에 이용하기 위한 본 발명의 융합 단백질을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 필요한 개체에서 질환 치료에 이용하기 위한 본원에 기술된 융합 단백질을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 융합 단백질을 치료학적 유효량으로 개체에 투여하는 것을 포함하는 질환을 가진 개체를 치료하는 방법에 이용하기 위한 융합 단백질을 제공한다. 일부 구현예에서, 치료할 질환은 증식성 장애이다. 일부 구현예에서, 질환은 암이다.

[0122] 일부 구현예에서, 방법은 하나 이상의 부가적인 치료학적 물질을 치료학적 유효량으로, 예를 들어, 치료할 질환이 암일 경우, 항암제를 개체에 투여하는 것을 추가로 포함한다. 추가적인 구현예에서, 본 개시내용은 면역계를 자극하는데 이용하기 위한 융합 단백질을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 면역계를 자극하기 위해 융합 단백질을 유효량으로 개체에 투여하는 것을 포함하는 개체에서 면역계를 자극하는 방법에 이용하기 위한 융합 단백질을 제공한다.

[0123] 본원의 임의 구현예에 따른 "면역계의 자극"은 면역 기능의 일반적인 증가, T 세포 기능의 증가, B 세포 기능의 증가, 림프구 기능의 회복, IL-2 수용체의 발현 증가, T 세포 반응성 증가, 자연 살상 세포 활성 증가 또는 림포카인-활성화된 살상 (LAK) 세포 활성 증가 등 중 임의의 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0124] 다른 측면에서, 본 개시내용은 필요한 개체에서 질환 치료용 의약제의 제조 또는 조제에서 본 발명의 융합 단백질의 용도를 제공한다. 일 구현예에서, 의약제는 질환을 가진 개체에 의약제를 치료학적 유효량으로 투여하는 것을 포함하는 질환의 치료 방법에 이용하기 위한 것이다. 일부 구현예에서, 치료할 질환은 증식성 장애이다. 일부 구현예에서, 질환은 암이다. 이러한 일 구현예에서, 방법은 개체에 하나 이상의 부가적인 치료학적 물질을, 예를 들어 치료할 질환이 암일 경우, 항암제를 치료학적 유효량으로 투여하는 것을 추가로 포함한다. 추가적인 구현예에서, 의약제는 면역계를 자극하기 위한 것이다. 추가적인 구현예에서, 의약제는 면역계를 자극하기 위해 의약제를 유효한 양으로 개체에 투여하는 것을 포함하는 개체에서 면역계를 자극하는 방법에 이용하기 위한 것이다.

[0125] 일부 구현예에서, 치료할 질환은 증식성 장애, 바람직하게는 암이다. 암에 대한 비-제한적인 예로는 방광암, 뇌암, 두경부암, 췌장암, 폐암, 유방암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 대장암, 결장직장암, 직장암, 위암, 전립선암, 혈액암, 피부암, 편평 세포 암종, 골암 및 신장암을 포함한다. 본 발명의 융합 단백질을 이용해 치료할 수 있는 다른 세포 증식 장애로는, 복부, 뼈, 유방, 소화기, 간, 췌장, 복막, 내분비선 (부신, 부갑상선, 뇌하수체, 고환, 난소, 흉선, 갑상선), 눈, 두경부, 신경계 (중추 및 말초), 림프계, 골반, 피부, 연조직, 비장, 흉부 영역 및 비뇨생식기계에 위치한 신생물 등이 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 또한, 전-암성 병태 또는 병변 및 암 전이도 포함한다. 일부 구현예에서, 암은 신장세포암, 피부암, 폐암, 결장직장암, 유방암, 뇌암, 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 마찬가지로, 다른 세포 증식 장애 역시 본 발명의 융합 단백질에 의해 치료할 수 있다. 이러한 세포 증식 장애에 대한 예로는 고감마글로불린

혈증, 림프증식성 장애, 이상단백질혈증, 자반병, 사르코이드증, 세자리 증후군, 발덴스트롬의 마크로글로불린혈증, 고세병, 조직구증 및 전술한 장기 시스템에 위치한, 신생물증 외에, 임의의 기타 세포 증식 질환 등이 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 다른 구현예에서, 질환은 자가면역, 이식 거부, 외상 후 면역 반응 및 감염성 질환 (예, HIV)과 관련 있다. 보다 구체적으로, 융합 단백질은 림프종 자가면역, 이식 거부, 이식 편대 숙주 질환, 허혈증 및 뇌졸중 등의 면역 세포-매개 장애에 참여하는 세포를 제거하는데 이용할 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 다수 경우에, 융합 단백질이 완치를 제공하지 않을 수 있지만 일부 혜택만을 제공할 수 있음을 쉽게 이해할 것이다. 일부 구현예에서, 일부 혜택을 제공하는 생리학적 변화는 또한 치료학적으로 유익한 것으로 간주한다. 따라서, 일부 구현예에서, 생리학적 변화를 제공하는 융합 단백질의 양은 "유효량" 또는 "치료학적 유효량"으로 간주한다. 치료가 필요한 개체 또는 환자는 전형적으로 포유류이고, 보다 구체적으로 인간이다.

[0126] 본 발명에서는 비-제한적으로 1회 또는 다양한 시점들에 걸친 수회 투여, 볼루스 투여 및 펄스 주입 등의 다양한 투여 계획이 고려된다.

[0127] 본 발명의 융합 단백질은 일반적으로 의도한 목적을 달성하기에 유효한 양으로 사용될 것이다. 질환 상태를 치료 또는 예방하기 위한 용도에서, 본 발명의 융합 단백질 또는 이의 약학적 조성물은 치료학적 유효량으로 투여 또는 적용된다.

[0128] 한가지 전형적인 일일 투여량 (daily dosage)은 약 1 ㎍/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 이상 범위일 수 있다. 병태에 따라 수일 또는 그 이상의 기간에 걸쳐 반복 투여하는 경우, 치료는 일반적으로 질환 증상의 요망한 억제가 이루어질 때까지 지속될 것이다. 융합 단백질의 투여량에 대한 일 예는 약 0.005 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 범위일 것이다. 다른 비-제한적인 예에서, 용량은 또한 투여 당 약 1 ㎍/kg/체중, 약 5 ㎍/kg/체중, 약 10 ㎍/kg/체중, 약 50 ㎍/kg/체중, 약 100 ㎍/체중 kg, 약 200 ㎍/kg/체중, 약 350 ㎍/체중 kg, 약 500 ㎍/체중 kg, 약 1 mg/체중 kg, 약 5 mg/체중 kg, 약 10 mg/체중 kg, 약 50 mg/체중 kg, 또는 약 100 mg/체중 kg 또는 그 이상, 및 이로부터 유추 가능한 임의 범위를 포함할 수 있다. 여기에 열거된 수치로부터 유추 가능한 범위에 대한 비-제한적인 예로, 약 5 mg/체중 kg 내지 약 50 mg/체중 kg, 약 5 ㎍/체중 kg 내지 약 100 mg/체중 kg 등의 범위 역시 전술한 수치에 기반하여 투여할 수 있다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 5.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 이들의 임의 조합)의 용량 하나 이상을 환자에 투여할 수 있다. 이러한 용량은 간헐적으로, (예를 들어, 환자가 융합 단백질을 약 2 내지 약 20회, 예를 들어 약 6회 투여받도록) 예를 들어 매주 또는 3주 간격으로 투여할 수 있다. 처음에 더 높은 부하 용량으로 투여한 후 더 낮은 용량을 1회 이상 투여할 수 있다. 그러나, 다른 투여량 용법도 이용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통례적인 기법 및 분석으로 쉽게 모니터링한다.

[0129] 본원에 기술된 융합 단백질의 치료학적 유효량은 일반적으로 실질적인 독성을 유발하지 않으면서 치료학적 혜택을 제공할 것이다. 융합 단백질의 독성 및 치료학적 효능은 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준적인 약학 절차에 의해 확인할 수 있다. 세포 배양 분석 및 동물 실험을 이용해 LD50 (집단의 50%에 치명적인 용량) 및 ED50 (집단의 50%에 치료학적으로 유효한 용량)을 결정할 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 간의 용량 비율이 치료 지수이며, 이는 LD50/ED50 비율로 표시할 수 있다. 치료 지수가 높은 융합 단백질이 바람직하다. 일 구현예에서, 본 발명에 따른 융합 단백질은 높은 치료 지수를 나타낸다. 세포 배양 분석 및 동물 실험에서 수득한 데이터는 인간에 사용하기 적합한 투여량 범위를 공식화하는데 이용할 수 있다. 투여량은 바람직하게는 독성이 거의 또는 전혀 없는 ED50을 포함하는 순환 농도 범위 내이다. 투여량은 다양한 인자, 예를 들어, 채택한 투약 형태, 이용한 투여 경로, 개체 상태 등에 따라 상기 범위 내에서 달라질 수 있다 (예를 들어, Fingl *et al.*, 1975, In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1, p. 1을 참조하며, 그 전체가 원용에 의해 본원에 포함됨).

[0130] 본 발명의 융합 단백질은 저독성으로 인해 야생형 IL2와 비교해 더 높은 최대 치료학적 용량을 가질 수 있다.

[0131] 본 발명에 따른 융합 단백질은 하나 이상의 다른 물질 또는 요법과 조합하여 투여할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 융합 단백질은 하나 이상의 부가적인 치료학적 물질 또는 요법과 공동-투여할 수 있다. 용어 "치료학적 물질"은 이러한 치료가 필요한 개체에서 증상 또는 질환을 치료하기 위해 투여되는 임의 물질을 망라한다. 이러한 부가적인 치료학적 물질은 치료 중인 구체적인 적응증에 적합한 임의의 활성 성분을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 서로 부정적으로 영향을 미치지 않는 보완적인 활성을 가진 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 부가적인 치료학적 물질은 면역조절제, 세포생장억제제, 세포 부착의 저해제, 세포독성제, 세포자살의 활성제, 또는 세포자살 유도제에 대한 세포 민감성을 높이는 물질이다. 구체적인 구현예에서, 부가적인 치료학적 물질은 항암제, 예를 들어, 미세소관 파괴제 (microtubule disruptor), 항-대사산물, 토포이소머라제 저해제, DNA 인터

칼레이터, 알킬화제, 호르몬 요법, 키나제 저해제, 수용체 길항제, 종양 세포의 세포자살 활성제 또는 항-혈관신생제이다.

[0132] 특정 구현예에서, 2차 치료학적 물질 또는 요법은 다음으로부터 선택된다: 방사선, 수술, 화학치료제, 종양살상 바이러스 (oncolytic virus), 암 백신, PD-1 저해제, B7-H3 저해제, B7-H4 저해제, 림프구 활성화 유전자 3 (LAG3) 저해제, T 세포 막 단백질 3 (TIM3) 저해제, 갈렉틴9 (GAL9) 저해제, T-세포 활성화의 V-도메인 면역글로불린 (Ig)-함유 억제자 (VISTA) 저해제, 살상-세포 면역글로불린-유사 수용체 (KIR) 저해제, B 및 T 림프구 감쇠자 (BTLA) 저해제, Ig 및 ITIM 도메인 (TIGIT)을 가진 T 세포 면역수용체의 저해제, CTLA4 저해제, CD38 저해제, CD47 저해제, CD28 활성제, 4-1BB 활성제, GITR 작용제, CD40 작용제, OX40 모듈레이터, 인돌아민-2,3-다이옥시게나제 (IDO) 저해제, 혈관 내피 성장인자 (VEGF) 길항제, 안지오포이에틴-2 (Ang2) 저해제, 형질전환 성장인자 β (TGFβ) 저해제, 상피 성장 인자 수용체 (EGFR) 저해제, 종양-특이 항원에 대한 항체, 바실러스 Calmette-Guerin 백신, 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자, 세포독소, 인터루킨 6 수용체 (IL-6R) 저해제, 인터루킨 4 수용체 (IL-4R) 저해제, IL-10 저해제, IL-7, IL-12, IL-21, IL-15, IL-18, I형 인터페론, 및 항체-약물 접합체, 항-염증성 약물, 및 이들의 조합.

[0133] 특정 구현예에서, 본 발명의 융합 단백질은 항-PD-1 항체와 조합하여 사용할 수 있으며, 여기서 항체는 인간 PD-1에의 결합에 대해 융합 단백질과 교차-경쟁하지 않는다.

[0134] 이러한 기타 물질은 의도한 목적에 유효한 양으로 조합물에 적절하게 존재한다. 이러한 기타 물질의 유효량은 사용되는 융합 단백질의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 전술한 기타 인자에 따라 결정된다. 융합 단백질은 일반적으로 본원에 기술된 바와 같이 동일한 투여량으로, 그리고 투여 경로로 이용되거나, 또는 본원에 기술된 투여량의 약 1 내지 99%로, 또는 경험적으로/임상적으로 적절한 것으로 결정된 임의 투여량 및 임의 경로로 사용된다.

[0135] 상기에 언급된 이러한 조합 요법은 조합 투여 (치료학적 물질 2종 이상이 동일한 조성물 또는 분리된 조성물에 포함됨) 및 개별 투여를 망라하며, 이 경우, 본 발명의 융합 단백질의 투여는 부가적인 치료학적 물질 및/또는 보강제를 투여하기 전, 이와 동시에 및/또는 이의 투여 후 이루어질 수 있다. 본 발명의 융합 단백질은 또한 방사선 요법 및/또는 수술과 조합하여 이용할 수 있다.

[0136] **추가적인 정의**

[0137] 본 발명에 따른 조성물 및 방법에 대한 상세한 내용 파악을 돕기 위해, 몇몇 표현의 정의 (본원에 도처에 기술된 정의와 더불어)가 본 개시내용의 다양한 측면에 대한 명확한 기술을 용이하게 하도록 제공된다. 달리 정의되지 않은 한, 본 발명에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어들은 본 개시내용이 속하는 당해 기술 분야의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 가진다.

[0138] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "융합 단백질" 또는 "융합 폴리펩타이드"는 폴리펩타이드 서열 2 이상이 서로 공유 또는 비-공유적으로 연결된 단백질을 의미한다. 예를 들어, 본 발명에 망라되는 융합 폴리펩타이드는, 제1 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 제2 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열과 연결하여 단일한 오픈 리딩 프래임을 형성하는, 키메라 유전자 구조체의 번역 산물을 포함할 수 있다. 대안적으로, 융합 단백질은 숙주 세포에서 공동-발현될 수 있는 2 이상의 유전자 구조체를 분리된 벡터들에 의해 코딩할 수 있다. 다시 말해, "융합 폴리펩타이드" 또는 "융합 단백질"은 단백질 2 이상이 펩타이드 결합을 통해 또는 수개의 펩타이드를 통해 연결된 재조합 단백질이다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 또한 도메인 2 이상 사이에 펩타이드 링커를 포함할 수 있다.

[0139] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드", 및 "단백질"은 본원에서 상호 호환적으로 사용되며, 아미노산 임의 길이의 폴리머를 지칭한다. 폴리머는 선형 또는 분지형일 수 있으며, 변형될 아미노산을 포함할 수 있으며, 비-아미노산이 개입되어 있을 수 있다. 또한, 이 용어는 변형된 아미노산 폴리머를 망라한다; 예를 들어 이황화 결합 형성, 당화, 지질화 (lipidation), 아세틸화, 인산화, 페길화 또는 임의의 기타 조작, 예를 들어 표지 성분과의 접합. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "아미노산"은 글리신 및 D 또는 L 광학 이성질체, 아미노산 유사체 및 펩티드 모방체 등의, 천연 및/또는 비-천연 또는 합성 아미노산을 포괄한다.

[0140] 본원에 사용된 바와 같이, IL-2의 "야생형" 형태는, 야생형 형태가 돌연변이 IL-2 폴리펩타이드의 각 아미노산 위치에 야생형 아미노산을 가진 것을 제외하고는, 달리 돌연변이 IL-2 폴리펩타이드와 동일한 IL-2의 형태이다. 예를 들어, IL-2 돌연변이가 전장 IL-2 (즉, 임의의 다른 분자가 융합 또는 접합되지 않은 IL-2)이라면, 이 돌연변이의 야생형 형태는 전장 네이티브 IL-2이다. IL-2 돌연변이가 IL-2와 IL-2의 하류를 코딩하는 다른 폴리펩

타이드 (예, 항체 쇄) 간의 융합체라면, 이 IL-2 돌연변이의 야생형 형태는 동일한 하류 폴리펩타이드에 융합된 야생형 아미노산 서열을 가진 IL-2이다. 아울러, IL-2 돌연변이가 IL-2의 절단된 형태 (truncated form)(IL-2의 비-절단된 부분 내 돌연변이 또는 변형된 서열)라면, 이 IL-2 돌연변이의 야생형 형태는 야생형 서열을 가진 유사하게 절단된 IL-2이다.

[0141] 본원에 기술된 바와 같이 융합 단백질은 하나 이상의 보존적인 변형을 포함할 수 있다. 하나 이상의 보존적인 변형을 가진 융합 단백질은 요망하는 기능적인 특성을 보유할 수 있으며, 이는 당해 기술 분야에 공지된 기능 분석을 이용해 검사할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "보존적인 서열 변형"은 아미노산 서열을 함유한 단백질의 결합 특징에 현저하게 영향을 미치지 않거나 또는 변경하지 않는 아미노산 변형을 지칭한다. 이러한 보존적이 변형은 아미노산 치환, 부가 및 결손을 포함한다. 변형은 부위-특이적인 돌연변이 유발 및 PCR-매개 돌연변이 유발과 같이 당해 기술 분야에서 공지된 표준 기법에 의해 도입할 수 있다. 보존적인 아미노산 치환은, 아미노산 잔기를 비슷한 측쇄를 가진 아미노산 잔기로 치환하는 것이다. 비슷한 측쇄를 가진 아미노산 잔기 계열은 당해 기술 분야에서 정의되어 있다. 이러한 계열로는 다음을 포함한다: 염기성 측쇄를 가진 아미노산 (예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘); 산성 측쇄를 가진 아미노산 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산); 비-하전된 극성 측쇄를 가진 아미노산 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판); 비-극성 측쇄를 가진 아미노산 (예를 들어, 알라닌, 발린, 루신, 이소루신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌); 베타-분지형 측쇄를 가진 아미노산 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소루신); 및 방향족 측쇄를 가진 아미노산 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘). 이는 하나 이상의 보존적인 변형을 포함한다. 하나 이상의 보존적인 변형을 가진 Cas 단백질은 당해 기술 분야에서 공지된 기능 분석을 이용해 검사할 수 있는 요망하는 기능 특성을 가질 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "보존적인 서열 변형"은 아미노산 서열을 함유한 단백질의 결합 특성에 현저하게 영향을 미치지 않거나 또는 변경하지 않는 아미노산 변형을 지칭한다. 이러한 보존적인 변형은 아미노산 치환, 부가 및 결손을 포함한다. 변형은 부위-특이적인 돌연변이 유발 및 PCR-매개 돌연변이 유발과 같이 당해 기술 분야에서 공지된 표준 기법에 의해 도입할 수 있다. 보존적인 아미노산 치환은, 아미노산 잔기를 비슷한 측쇄를 가진 아미노산 잔기로 치환하는 것이다. 비슷한 측쇄를 가진 아미노산 잔기 계열은 당해 기술 분야에서 정의되어 있다. 이러한 계열로는 다음을 포함한다: 염기성 측쇄를 가진 아미노산 (예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘); 산성 측쇄를 가진 아미노산 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산); 비-하전된 극성 측쇄를 가진 아미노산 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판); 비-극성 측쇄를 가진 아미노산 (예를 들어, 알라닌, 발린, 루신, 이소루신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌); 베타-분지형 측쇄를 가진 아미노산 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소루신); 및 방향족 측쇄를 가진 아미노산 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘).

[0142] 본원에 사용된 바와 같이, 아미노산 서열 2종 간의 상동성 %는 서열 2종 간의 동일성 %와 등가이다. 서열 2종 간의 동일성 %는, 서열 2개를 최적으로 정렬하기 위해 도입하여야 하는 갭 수 및 각 갭의 길이를 감안하여, 서열들 간에 공유되는 동일한 위치 개수의 함수이다 (즉, 상동성 % = 동일한 위치의 수/위치의 총 수 x 100). 서열 비교 및 서열 2개 간의 동일성 % 결정은 하기 비-제한적인 예들에 기술된 바와 같은 수학적인 알고리즘을 이용해 달성할 수 있다.

[0143] 아미노산 서열 2종 간의 상동성 %는 ALIGN 프로그램 (버전 2.0)에 병합된 E. Meyers and W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) 알고리즘을 이용하여, PAM120 가중 잔기 표, 갭 길이 패널티 12 및 갭 패널티 4를 적용해, 결정할 수 있다. 또한, 아미노산 서열 2종 간의 상동성 %는 GCG 소프트웨어 패키지 (www.gcg.com에서 이용가능함)의 GAP 프로그램에 병합된 Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) 알고리즘을 이용하여, Blossum 62 행렬 또는 PAM250 행렬 및 갭 가중치 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4 및 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5 또는 6을 적용해, 결정할 수 있다.

[0144] 부가적으로 또는 대안적으로, 본 발명의 단백질 서열은 예를 들어 관련 서열을 동정하기 위해 공개 데이터베이스에서 검색하기 위해 "질의 서열"로서 추가로 이용할 수 있다. 이러한 검색은 Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10의 XBLAST 프로그램 (version 2.0)을 이용해 수행할 수 있다. BLAST 단백질 검색은 XBLAST 프로그램에서, 스코어 = 50, 워드 길이 = 3로 수행하여, 본 발명의 항체 분자에 상동적인 아미노산을 수득할 수 있다. 비교 목적으로 갭이 적용된 정렬을 달성하기 위해, Gapped BLAST를 Altschul *et al.*(1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402에 기술된 바와 같이 이용할 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 이용하는 경우, 각 프로그램 (예, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터를 이용할 수 있다 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

[0145] 본원에 사용된 바와 같이, 핵산 또는 이의 단편을 언급하는 경우 "실질적인 동일성" 또는 "실질적으로 동일한"

이란 용어는, 적절한 뉴클레오티드 삽입 또는 결손을 다른 핵산 (또는 이의 상보적인 가닥)과 최적으로 배열하였을 경우, 아래에 논의된 바와 같이, FASTA, BLAST 또는 GAP와 같은 임의의 잘-알려진 서열 동일성 알고리즘에 의해 측정한 바와 같이, 뉴클레오티드 염기의 적어도 약 90%, 더 바람직하게는 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%에서 뉴클레오티드 서열 동일성이 존재하는 것을 의미한다. 어떤 경우, 참조 핵산 분자에 대해 실질적인 동일성을 가진 핵산 분자는 참조 핵산 분자에 의해 코딩되는 폴리펩타이드와 동일하거나 또는 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 가진 폴리펩티드를 코딩할 수 있다. 폴리펩티드에 적용되는 바와 같이, "실질적인 유사성" 또는 "실질적으로 유사한"이란 용어는, 프로그램 GAP 또는 BESTFIT 등의 의해 디폴트 갭 가중 (default gap weight)을 이용하여 최적으로 정렬하였을 경우, 폴리펩타이드 서열 2종이 적어도 90%의 서열 동일성, 보다 더 바람직하게는 적어도 95%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 공유하는 것을 의미한다. 바람직하게는, 동일하지 않은 잔기 위치들은 보존적인 아미노산 치환 차이를 가진다. "보존적인 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성 (예, 전하 또는 소수성)의 측쇄 (R 기)를 가진 다른 아미노산 잔기로 치환되는 것이다. 일반적으로, 보존적인 아미노산 치환은 단백질의 기능적 특성을 실질적으로 변형시키지 않을 것이다. 보존적인 치환에 의해 2 이상의 아미노산 서열에 차이가 존재하는 경우, 서열 유사성 % 또는 유사성 정도는 치환의 보존적인 특성을 교정하기 위해 상향 조정될 수 있다. 이러한 조정을 수행하기 위한 수단은 당해 기술 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331을 참조하며, 이는 원용에 의해 본 명세서에 통합된다.

[0146] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "재조합"은, 예를 들어 DNA 스플라이싱 및 트랜스제닉 발현을 망라하는, 재조합 DNA 기법과 같이 당해 기술 분야에 공지된 기법 또는 방법에 의해 구축, 발현, 단리 또는 수득되는 본 발명의 단백질 또는 이의 단편을 지칭한다. 이 용어는 비-인간 포유류 (트랜스제닉 비-인간 포유류, 예를 들어 형질전환 마우스 등) 또는 세포 (예, CHO 세포) 발현 시스템에서 발현되거나, 또는 재조합 컴비네이토리얼 인간 항체 라이브러리 (recombinant combinatorial human antibody library)로부터 단리된, 융합 단백질을 지칭한다.

[0147] 본원에 사용된 바와 같이, 융합 단백질 또는 이의 구성성분 (예, 항체와 같은 표적화 모이어티)의 맥락에서 용어 "결합된"은 폴리펩타이드 쇄 2 이상 간의 기능적인 관계를 지칭한다. 구체적으로, 용어 "결합된"은 2 이상의 폴리펩타이드가 서로 결합된, 예를 들어 분자 상호작용을 통해 비-공유적으로 또는 하나 이상의 이황화 결합 또는 화학적 가교를 통해 공유적으로 결합되어, 기능적인 융합 단백질을 형성하는 것을 의미한다. 본 발명의 융합 단백질에 존재할 수 있는 결합의 예로는 (비-제한적으로) Fc 영역 내 동형이량체성 또는 이형이량체성 Fc 도메인들 간의 결합, Fab 또는 scFv 내 VH 영역과 VL 영역 간의 결합, Fab 내 CH1과 CL 간의 결합, 및 도메인 치환된 Fab 내 CH3와 CH3 간의 결합을 포함한다.

[0148] 본원에 사용된 바와 같이, 융합 단백질 내 IL2 모이어티 및/또는 표적화 모이어티에 대한 언급에서 용어 "일가"는 각각 IL2 모이어티 및/또는 표적화 모이어티 (예, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합성 부분) 단 하나만 가진 융합 단백질을 의미한다.

[0149] 본원에 사용된 바와 같이, 융합 단백질 내 IL2 모이어티 및/또는 표적화 모이어티에 대한 언급에서 용어 "2가"는 각각 IL2 모이어티 및/또는 표적화 모이어티 (예, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합성 부분)를 2개 가진 융합 단백질을 의미한다. 전형적으로, IL2 모이어티 및/또는 표적화 모이어티에 대해 2가인 융합 단백질은 이량체 (동형이량체 또는 이형이량체)이다.

[0150] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 항원 특이성 및 결합 친화성을 부여하는 항체 가변 영역 내 아미노산 서열을 지칭한다. 일반적으로, 각 중쇄 가변 영역에 CDR 3개 (CDR-H1, CDR-H2, HCDR-H3)가, 각 경쇄 가변 영역에 CDR 3개 (CDR1-L1, CDR-L2, CDR-L3)가 존재한다. CDR의 경계를 식별하기 위해 이용할 수 있는 규정의 예로는, 예를 들어, Kabat 정의, Chothia 정의, ABM 정의 및 IMGT 정의 등이 있다. 예를 들어, Kabat, 1991, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (Kabat numbering scheme); Al-Lazikani *et al.*, 1997, J. Mol. Biol. 273:927-948 (Chothianumbering scheme); Martin *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (ABM numbering scheme); 및 Lefranc *et al.*, 2003, Dev. Comp. Immunol. 27:55-77 (IMGT numbering scheme)을 참조한다. 항체에서 CDR 서열을 식별하는데 공개 데이터베이스 역시 이용가능하다.

[0151] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "Fc 도메인"은 다른 중쇄의 대응하는 부분과 쌍을 형성하는 중쇄의 부분을 지칭한다. 용어 "Fc 영역"은 중쇄 Fc 도메인 2개 간의 결합에 의해 형성된 항체-기반의 결합 분자의 영역을 지칭한다. Fc 영역에서 Fc 도메인 2개는 서로 동일하거나 또는 서로 다를 수 있다. 천연 항체에서, Fc 도메인은 전형적으로 동일하지만, Fc 도메인 중 하나 또는 둘다가 예를 들어 놉-인-홀 (knob-in-hole) 상호작용을 통해 이형

이량체 형성을 허용하도록 유리하게 변형될 수 있다.

[0152] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "EC50"은 명시된 노출 시간 경과 후 베이스라인과 최고값 사이의 절반의 반응을 유발하는, 분자 (예, 융합 단백질)의 최대 유효 농도의 1/2을 지칭한다. EC50은 기본적으로 최대 효과의 50%가 관찰되는 항체 또는 융합 단백질의 농도를 지칭한다. 일부 구현예에서, EC50 값은 분석에서 최대 STAT5 활성화의 절반을 제공하는 융합 단백질의 농도에 해당한다.

[0153] 에피토프 또는 항원 결정기는 본원에 기술된 바와 같이 항체 또는 기타 항원-결합성 모이어티에 의해 인지되는 항원 (예, 표적 분자)의 부분이다. 에피토프는 선형 또는 입체 구조형일 수 있다.

[0154] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "개체"는 인간 및 비-인간 동물을 포함한다. 비-인간 동물로는 모든 척추동물, 예를 들어 포유류 및 비-포유류, 예를 들어 인간을 제외한 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류 및 파충류 등이 있다. 명시된 경우를 제외하고는, 용어 "환자" 또는 "개체"는 본원에서 상호 호환적으로 사용된다.

[0155] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "표적 분자"는 본 발명의 융합 단백질 내 표적화 모이어티에 의해 특이적으로 결합될 수 있는 세포 표면 상 또는 세포외 매트릭스 내에서 발현되는 임의의 생물학적 분자 (예, 단백질, 탄수화물, 지질 또는 이들의 조합)를 지칭한다.

[0156] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료한다", "치료" 및 "치료하는"은 본 발명의 하나 이상의 융합 단백질의 투여로 발생하는, 증식성 장애의 진행, 심각성 및/또는 지속 기간의 감소 또는 개선, 또는 증식성 장애의 하나 이상의 증상 (바람직하게는, 식별가능한 증상)의 개선을 지칭한다. 구체적인 구현예에서, 용어 "치료한다", "치료" 및 "치료하는"은 환자에 의해 반드시 식별가능한 것은 아닌, 종양 증식과 같은 증식성 장애의 하나 이상의 측정가능한 물리적 매개변수의 개선을 지칭한다. 다른 구현예에서, 용어 "치료한다", "치료" 및 "치료하는"은 증식성 장애의 진행의, 물리적으로, 예를 들어 식별가능한 증상의 안정화에 의해, 생리학적으로, 예를 들어 물리적 매개변수의 안정화에 의해, 또는 이 둘다에 의한 저해를 지칭한다. 다른 구현예에서, 용어 "치료한다", "치료" 및 "치료하는"은 종양 크기 또는 암성 세포의 수적 감소 또는 안정화를 의미한다.

[0157] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "암"은 비정상적인 세포의 비-통제성 (종종 빠른) 증상을 특징으로 하는 질환을 지칭한다. 암 세포는 국소 전파되거나 또는 혈류 및 림프계를 통해 신체의 다른 부위로 퍼질 수 있다. 다양한 암의 예들이 본원에 기술되어 있으며, 비-제한적으로, 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장직장암, 신장암, 간암, 뇌암, 부신암, 자율 신경절 암 (cancer, autonomic ganglial cancer), 담관암, 골암, 자궁내막암, 안구암, 자궁관암, 생식기암, 거대 장암 (large intestinal cancer), 뇌척수막 암, 식도암, 복막암, 뇌하수체 암, 음경암, 태반암, 흉막암, 침샘암, 소장암, 위암, 고환암, 흉선암, 갑상선암, 상부 호흡소화기암 (upper aerodigestive cancer), 요로암, 질암, 외음부암, 림프종, 백혈병, 폐암 등을 포함한다.

[0158] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "종양"은 본원에서 용어 "암"과 상호 호환적으로 사용되며, 예를 들어 이들 용어 둘다 고형 종양 및 액상 종양, 예를 들어 미만성 또는 순환계 종양을 망라한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "암" 또는 "종양"은 전악성뿐 아니라 악성 암 및 종양을 망라한다.

[0159] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "숙주 세포"는 본 발명의 핵산이 도입된 세포를 지칭한다. 용어 "숙주 세포"와 "재조합 숙주 세포"는 본원에서 상호 호환적으로 사용된다. 이들 용어는 특정 대상 세포와 이러한 세포의 자손 또는 잠재적인 자손을 지칭하는 것으로 이해된다. 돌연변이 또는 환경 영향으로 인해 연속 세대에 특정한 변형이 생길 수 있으므로, 이러한 자손은 부모 세포와 실제 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본 발명의 용어 범위에 포함된다. 전형적인 숙주 세포는 포유류 숙주 세포와 같은 진핵생물 숙주 세포이다.

[0160] 본원에 사용된 바와 같이, "발현"은 폴리뉴클레오티드가 DNA 주형으로부터 (예, mRNA 또는 기타 RNA 전사체로) 전사되는 프로세스 및/또는 전사된 mRNA가 이후 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질로 번역되는 프로세스를 지칭한다. 전사체 및 코딩된 폴리펩타이드는 총괄적으로 "유전자 산물(들)"로 지칭할 수 있다. 폴리뉴클레오티드가 게놈 DNA로부터 유래한다면, 발현은 진핵생물 세포에서 mRNA의 스플라이싱을 포함할 수 있다.

[0161] 본원에 사용된 바와 같이, "단리된" 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오티드는 이의 천연 환경으로부터 회수된 핵산 분자, DNA 또는 RNA를 지칭한다. 예를 들어, 벡터에 함유된 치료학적 폴리펩타이드를 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 목적에서 단리된 것으로 간주된다. 단리된 폴리뉴클레오티드에 대한 추가적인 예로는 이종의 숙주 세포에서 유지되는 재조합 폴리뉴클레오티드 또는 용액 중의 (일부 또는 실질적으로) 정제된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 단리된 폴리뉴클레오티드는 보통 폴리뉴클레오티드 분자를 함유한 세포에 함유된 폴리뉴클레오티드를 포함하지만, 폴리뉴클레오티드 분자는 염색체 외에 존재하거나 또는 이의 본래의 염색체 위치와는 다른 염색체 위치에 존재한다. 단리된 RNA 분자는 본 발명의 생체내 또는 시험관내 RNA 전사체뿐 아니라 (-)

및 (+) 가닥 형태, 및 이중 가닥 형태를 포괄한다. 본 발명에 따른 단리된 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 합성에 의해 생산된 이러한 분자를 추가로 망라한다. 아울러, 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 프로모터, 리보솜 결합 부위 또는 전사 종결인자 등의 조절 인자이거나 또는 이를 포함할 수 있다.

[0162] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "질환"은 일반적으로 모두 정상적인 기능을 손상시키는 인간 또는 동물 신체의 비정상적인 상태를 반영하고, 전형적으로 구분되는 징후 및 증상으로 드러나고, 인간 또는 동물에서 삶의 질 또는 수명 감소를 유발한다는 점에서, 용어 "장애" 및 (의학적인 상태에서와 같은) "병태"와 동의어로 의도되며, 이와 상호 호환적으로 사용된다.

[0163] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "조성물" 또는 "약학적 조성물"은 담체, 안정화제, 희석제, 분산화제, 현탁화제, 증점제 및/또는 부형제와 같은 다른 성분과 조합하여, 본 발명에 개시된 융합 단백질과 함께 이용가능한 하나 이상의 성분들의 혼합물을 지칭한다. 약학적 조성물은 본 개시내용의 하나 이상의 성분을 유기체에 투여하는 것을 용이하게 한다.

[0164] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약제학적으로 허용가능한"은 조성물의 생물학적 활성 또는 특성을 무효화하지 않으면서 비교적 무독성인 담체 또는 희석제와 같은 물질을 지칭하며, 즉 이 물질은 조성물에 함유된 임의 성분과 유해한 방식으로 상호작용하거나 또는 부적절한 생물학적 효과를 유발하지 않으면서 개체에 투여할 수 있다.

[0165] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약제학적으로 허용가능한 담체"는 의도한 기능을 수행할 수 있도록, 본 발명의 화합물을 개체 체내로 또는 개체에 운반 또는 전달하는데 참여하는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질 등의, 약제학적으로 허용가능한 염, 약제학적으로 허용가능한 물질, 조성물 또는 담체를 포괄한다. 전형적으로, 이러한 화합물들은 한 장기 또는 신체 부위에서 다른 장기 또는 신체 부위로 운반 또는 전달된다. 각 염 또는 담체는 제형의 다른 성분과 혼용가능하고 개체에 유해하지 않다는 점에서 "허용가능하여"야 한다. 약제학적으로 허용가능한 담체로서 이용 가능한 물질에 대한 일부 예로는 당, 예를 들어 락토스, 글루코스 및 슈크로스; 전분, 예를 들어 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스 및 이들의 유도체, 예를 들어 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 트라가칸트 분말; 말트; 젤라틴; 탈크; 부형제, 예를 들어 코코아 버터 및 좌제용 왁스; 오일, 예를 들어 땅콩 오일, 면실유, 홍화 오일, 참깨 오일, 올리브 오일, 옥수수 오일 및 대두 오일; 글리콜, 예를 들어 프로필렌 글리콜; 폴리올, 예를 들어 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; 에스테르, 예를 들어 에틸 올리에이트 및 에틸 라우레이트; 아가 완충화제, 예를 들어 마그네슘 하이드록사이드 및 알루미늄 하이드록사이드; 알긴산; 발열원 제거 수 (pyrogen-free water); 등장성 식염수; 링거액; 에틸 알코올; 포스페이트 완충제 용액; 희석제; 과립화제; 윤활제; 결합제; 붕해제; 습윤제; 유화제; 착색제; 이형제 (release agent); 코팅제; 감미제; 착향제; 향제; 보존제; 항산화제; 가소제; 겔화제; 증점제; 경화제; 유착제 (setting agent); 현탁화제; 계면활성제; 보습제; 담체; 안정제; 및 약학적 제형에 사용되는 기타 무독성 혼용가능한 물질, 또는 이들의 임의 조합을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용가능한 담체"는 또한 임의의 모든 코팅제, 항세균제 및 항진균제와 흡수 지연제, 및 본 발명의 성분 하나 이상의 활성과 혼용가능하며 개체에 생리학적으로 허용가능한 유사 물질들을 포괄한다. 보충적인 활성 화합물 역시 조성물에 투입될 수 있다.

[0166] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "조절한다"는 생물학적 상태에 대한 임의 변화, 즉 증가, 감소 등을 지칭하는 것을 의미한다.

[0167] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "증가된", "증가한다" 또는 "강화" 또는 "활성화한다"는 모두 일반적으로 통계학적으로 유의한 수준의 증가를 의미하는 것으로 사용되며; 임의의 의심의 여지를 피하기 위해, 용어 "증가된", "증가한다" 또는 "강화" 또는 "활성화한다"는 참조 수준과 비교해 적어도 10% 증가, 예를 들어, 참조 수준과 비교해 적어도 약 20% 또는 적어도 약 30% 또는 적어도 약 40% 또는 적어도 약 50% 또는 적어도 약 60% 또는 적어도 약 70% 또는 적어도 약 80% 또는 적어도 약 90% 또는 최대 100% 증가, 또는 10-100%의 임의의 증가, 또는 참조 수준과 비교해 적어도 약 2배 또는 적어도 약 3배 또는 적어도 약 4배 또는 적어도 약 5배 또는 적어도 약 10배 중가 또는 2-10배 또는 그 이상의 임의 증가를 의미한다.

[0168] 본원에 사용된 바와 같이, 단수 형태 ("a", "an" 및 "the")는 문맥상 달리 명확하게 명시되지 않은 한 복수의 언급을 망라한다.

[0169] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "비롯하여", "포함하는", "함유하는" 또는 "가지는" 및 이의 변형 표현들은 달리 명시되지 않은 한 이 용어 다음에 열거된 항목 및 이의 등가물뿐 아니라 부가적인 대상 주체를 망라하는 것을 의미한다.

[0170] 본원에 사용된 바와 같이, 표현 "일 구현예에서", "다양한 구현예에서", "일부 구현예에서" 등이 반복적으로 사용된다. 이러한 표현들이 반드시 동일한 구현예를 지칭하는 것은 아니지만 문맥상 달리 지시하지 않은 한 그럴 수도 있다.

[0171] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "및/또는" 또는 "/"은 항목들 중 어느 하나, 항목들의 임의 조합 또는 그 항목과 관련한 모든 항목을 의미한다.

[0172] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "실질적으로"는 "완전히"를 배제하지 않으며, 예를 들어, Y가 "실질적으로 결여"된 조성물은 Y가 완전히 없을 수도 있다. 필요에 따라, 용어 "실질적으로"는 정의에서 생략될 수도 있다.

[0173] 본원에 사용된 바와 같이, 하나 이상의 대상 값에 적용되는, 용어 "대략" 또는 "약"은, 언급된 참조 값과 비슷한 값을 지칭한다. 일부 구현예에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 (이러한 수치가 가능한 값의 100%를 초과한 경우를 제외하고는) 달리 언급되지 않은 한 또는 문맥상 명백하지 않은 한 언급된 참조 값에 대해 어느 한 방향 (이보다 크거나 또는 낮은)으로의 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그 미만 이내에 해당하는 범위의 값들을 지칭한다. 본원에서 달리 언급되지 않은 한, 용어 "약"은 개별 성분, 조성물 또는 구현예의 기능 측면에서 동등한, 언급된 범위에 근접한 값, 예를 들어 중량%를 망라하는 것으로 의도된다.

[0174] 본원에 기술된 바와 같이, 여러 값 범위들이 제시된다. 문맥상 달리 명확하게 지시되지 않은 한, 해당 범위의 상한과 하한 사이의 하한 단위의 1/10까지의 각각의 중간 값 (intervening value) 역시 구체적으로 기술하는 것으로 이해된다. 임의의 언급된 값 또는 언급된 범위내 중간 값에서 임의의 다른 언급된 값 또는 언급된 범위내 다른 중간 값까지의 각각 더 작은 범위도 본 개시내용에 포함된다. 이러한 더 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 그 범위에 포함되거나 또는 제외될 수 있으며, 언급된 범위에서 특별히 제외되는 임의의 제한에 한해, 더 작은 범위의 양쪽 한계가 둘다 포함되거나, 어느 한쪽만 포함되거나 또는 둘다 포함되지 않는 범위도 본 개시내용에 포함된다. 언급된 범위가 양쪽 한계 중 한쪽 또는 둘다를 포함하는 경우, 이들 포함된 어느 한쪽 또는 양쪽 한계가 제외된 범위 역시 본 개시내용에 포함된다.

[0175] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "각각"은 항목 집합을 언급하는데 사용되는 경우 집합의 개개 항목을 식별하지만 반드시 집합의 모든 항목을 언급하는 것은 아닌 것으로 의도된다. 명백한 개시내용 또는 문맥이 명확하게 달리 지시한다면, 예외도 있을 수 있다.

[0176] 본원에 제공된 임의의 모든 예 또는 예시적인 표현 (예를 들어, "와 같은")의 사용은 주로 본 발명을 더 잘 설명하기 위한 것이며, 달리 청구되지 않은 한 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것은 아니다. 명세서에서 이러한 표현은 임의의 청구되지 않은 요소가 본 발명을 실시하는데 필수임을 의미하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0177] 본원에 기술된 모든 방법들은 본원에서 달리 나타내지 않은 한 또는 문맥상 명백하게 상충하지 않은 한 임의의 적절한 순서로 수행된다. 제공된 임의의 방법과 관련하여, 방법의 단계들은 동시에 또는 순차적으로 이루어질 수 있다. 방법의 단계들이 순차적으로 이루어지는 경우, 단계들은 달리 언급되지 않은 한 임의 순서로 이루어질 수 있다. 방법이 단계들의 조합을 포함하는 경우, 단계들의 각각의 모든 조합 또는 하위-조합은, 본원에서 달리 언급되지 않은 한, 개시내용의 범위에 망라된다.

[0178] 본원에 언급된 각 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참조문헌은 본 개시내용과 모순되지 않은 한 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 통합된다. 본원에 개시된 간행물은 본 발명의 출원일 이전의 개시 내용에 대해서만 제공된다. 본원에서 어떤 것도 본 발명이 이전의 개시로 인해 이러한 간행물을 우선할 자격이 없다는 용인으로 해석되어서는 안된다. 나아가, 제공된 발표 날짜는 실제 발표 날짜와 다를 수 있으며, 별도로 검토해야 할 수도 있다.

[0179] 본원에 기술된 실시예 및 구현예들은 단순 예시 목적일 뿐이며, 이에 비추어 다양한 변형 또는 변화가 당해 기술 분야의 당업자에게 제안될 것이며 첨부된 청구항의 범위와 본 출원의 사상 및 범위에 포함되는 것으로 이해된다.

[0180] **실시예**

[0181] 아래 실시예들은 당업자에게 본 발명의 방법 및 조성물을 제조 및 이용하는 방법에 대한 충분한 설명과 묘사를 제공하기 위해 제시되는 것일 뿐 본 발명자들이 발명으로 간주하는 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다. 마찬가지로, 기술 내용은 본 발명에 기술된 임의의 구체적인 바람직한 구현예들로 제한되는 것은 아니다. 실제, 당해 기술 분야의 당업자라면 본 명세서를 숙지할 경우 구현예들에 대한 수정 및 변경이 자명할 것이며, 발명의

사상 및 범위로부터 이탈하지 않으면서 행할 수 있다. 언급된 수치 (예를 들어, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하고자 노력하였지만, 일부 실험적인 오차 및 편차가 고려되어야 한다. 달리 언급되지 않은 한, 부(parts)는 중량부이고, 분자량은 평균 분자량이며, 온도는 섭씨 온도이고, 실온은 약 25℃이고, 압력은 대기압이거나 대기압에 가깝다.

[0182] **실시예 1: 인간 PD-1에 대한 인간 항체 제작**

[0183] PD-1 단백질에 대한 인간 항체를 인간 면역글로불린 중쇄 및 카파 경쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA를 포함하는 VELOCIMMUNE® 마우스에서 구축하였다. 마우스를, GenBank Accession NP_005009.2의 아미노산 25 - 170 범위의 PD-1 단편을 보강제의 존재 하에 이용해 면역화하였다. PD-1 특이적인 면역분석으로 항체 면역 반응을 모니터링하였다. 원하는 면역 반응이 달성되면, 비장세포를 회수하여 마우스 골수종 세포와 융합함으로써, 이의 생존성을 보존하고 하이브리도마 세포주를 구축하였다. 하이브리도마 세포주를 스크리닝 및 선별하여, PD-1 특이적인 항체를 생산하는 세포주를 식별하였다.

[0184] 미국 특허 7,582,298에 기술된 바와 같이, 항원-양성 마우스 B 세포로부터 골수종 세포와 융합하지 않고 직접 항-PD-1 항체를 단리하였으며, 상기 문헌은 그 전체가 원용에 의해 본원에 구체적으로 통합된다.

[0185] 이 방법을 이용해 완전 인간 항-PD-1 항체 (즉, 인간 가변성 도메인 및 인간 불변 도메인을 가진 항체) 여러 종을 수득하였다.

[0186] 표 1 및 2에서 식별된 바와 같이 HCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCVR, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 아미노산 및 핵산 서열을 가진, 전술한 바와 같이 제작한 예시적인 항체들을 mAb29512, mAb7798 및 mAb9048로 명명하였다.

[0187] 예시적인 항-PD-1 항체는 당해 기술 분야에서 공지된 표준 분자 생물학 기법을 이용해 IL2-기반한 시약 제작에 이용하였다. 표 4는 이들 시약의 아미노산 서열을 기술한다.

[0188] 본 실시예의 방법에 따라 제작한 예시적인 단백질의 생물학적 특성을 아래 기술한 실시예에서 상세하게 설명한다.

[0189] **실시예 2: 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 및 뉴클레오티드 서열**

[0190] 표 1은 예시적인 항-PD-1 항체의 중쇄 및 경쇄 가변성 영역 서열, CDR 서열의 아미노산 서열 식별자를 나타낸다.

[0191] **표 1: 아미노산 식별자**

표 1

[0192]

	서열번호							
항체 ID	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb29512	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb7798	22	24	26	28	30	32	14	35
mAb9048	41	43	45	47	10	12	14	16

[0193] 예시적인 항-PD-1 항체의 상응하는 핵산 서열 식별자를 표 2에 나타낸다.

[0194] **표 2: 핵산 식별자**

표 2

[0195]

	서열번호							
항체 ID	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb29512	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb7798	21	23	25	27	29	31	33	34
mAb9048	40	42	44	46	9	11	13	15

[0196] 항체는 인간 또는 마우스 Fc 이소형일 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자에게 이해되는 바와 같이, 특정한 Fc 이소형 항체는 다른 Fc 이소형 항체로 변환할 수 있지만 (예를 들어, 마우스 IgG1 Fc를 가진 항체는 인간 IgG1

또는 인간 IgG4 등을 가진 항체로 변환할 수 있음), 임의 경우에 (CDR을 비롯한) 가변성 도메인 - 이는 표 1에 나타낸 숫자 식별자에 의해 표시됨 - 은 동일하게 유지될 것이며, 항원에 대한 결합 특성은 Fc 도메인 특성과 무관하게 동일하거나 또는 실질적으로 유사할 것으로 예상된다.

[0197] 힌지부 (S108P)에 세린에서 프롤린으로의 돌연변이를 포함하는 인간 IgG4 Fc를 가진 예시적인 항체, 즉 mAb29512, mAb7798 및 mAb9048을 각각 H4H29512, REGN2810 및 H4H9048로 명명하였다. 표 3은 이들 항체의 전장 중쇄 및 경쇄 서열의 아미노산 서열 식별자를 나타낸다.

[0198] **표 3: 항-PD-1 항체의 중쇄 (HC) 및 경쇄 (LC) 서열**

표 3

[0199]

항체 ID	항체 명칭	서열번호			
		HC		LC	
		DNA	PEP	DNA	PEP
mAb29512	H4H29512	17	18	19	20
mAb7798	REGN2810	36	37	38	39
mAb9048	H4H9048	48	49	19	20

[0200] REGN2810 (세미플리맙이라고도 함; LIBTAYO®)은 US 9,987,500에서 최초로 언급되었으며, 이후 피부 편평 세포 암종, 기저 세포 암종 및 비-소 세포성 폐암의 치료용으로 승인되었다. 표 4는 항-PD-1-IL2Rα-IL2 시약들의 아미노산 서열 식별자를 나타낸다.

[0201] **표 4: 항-PD-1-IL2Rα-IL2의 아미노산 서열 식별자**

표 4

[0202]

	서열번호										
ID	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HC	LC	IL2 모이어티
REGN10595	2	4	6	8	10	12	14	16	57	58	54
REGN10486	22	24	26	28	30	32	14	35	59	60	54
REGN10597	41	43	45	47	10	12	14	16	61	62	54

[0203] IL2 모이어티는 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 링커를 통해 중쇄 불변 영역 (서열번호 55)의 C-말단에 연결된다. REGN10595의 경우, 중쇄 (HC) 서열번호 57은 HCVR (서열번호 2), 중쇄 불변 영역 (서열번호 55), 링커 (서열번호 50) 및 IL2 모이어티 (서열번호 54)의 아미노산 서열을 포함한다. REGN10486의 경우, 중쇄 (HC) 서열번호 59는 HCVR (서열번호 22), 중쇄 불변 영역 (서열번호 55), 링커 (서열번호 50) 및 IL2 모이어티 (서열번호 54)의 아미노산 서열을 포함한다. REGN10597의 경우, 중쇄 (HC) 서열번호 61은 HCVR (서열번호 41), 중쇄 불변 영역 (서열번호 55), 링커 (서열번호 50) 및 IL2 모이어티 (서열번호 54)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0204] **이하 실시예에 사용한 대조군 구조체:**

[0205] 다음과 같은 대조군 구조체들을 하기 실시예에 비교 목적으로 포함하였다: "Comp 1": WO 2008/156712 (Merck Sharp & Dohme)에 따른 항체 "MK-3475"의 V_H/V_L 서열을 가진 단일클론 항-PD-1 항체; "Comp 2": WO2006/121168 (Medarex, Inc/E R Squibb)에 따른 항체 "5C4"의 V_H/V_L 서열을 가진 단일클론 항-PD-1 항체; 및 "REGN13233": 서열번호 41/10의 VH/VL 서열을 포함하고 CD25 결합성이 비활성화된 IL2 변이체 (IL2(3m)가 연결된 항-PD-1 항체 (Klein et al., 2017, Oncoimmunology).

[0206] **실시예 3: 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체 및 2가 부모 항-PD1 항체의 결합 카이네틱스**

[0207] 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체 및 2가 부모 항-PD1 항체의 결합 카이네틱스를 평가하기 위해, 정제된 항-PD-1 부모 mAb 및 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체에 결합하는, C-말단 myc-myc-헥사히스티딘 태그 (hPD-1.mmH, 서열번호 66)와 함께 발현되는 인간 PD-1에 대한 평형 해리 상수 (K_D 값)을, 실시간 표면 플라스몬 공명 바이오센서를 이용해 Biacore 3000 또는 4000 장치에서 결정하였다. CM5 Biacore 센서 표면을 단일클론 마우스 항-인간 Fc 항체 (GE, # BR-1008-39)와의 아민 커플링에 의해 유도체화 하였다. 모든 Biacore 결합 실험은 0.01M HEPES pH

7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% v/v 계면활성제 P20 (HBS-EP 전개 완충제)로 구성된 완충제 중에 수행하였다. HBS-EP 전개 완충제에서 준비한 여러가지 농도 (100-3.7 nM 범위의 3배 희석 또는 90 nM 내지 3.33 nM의 3배 희석)의 hPD-1.mmH를, 항-PD-1 항체 또는 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체가 고정된 표면으로, 유속 30 또는 50㎕/분으로 투입하였다. 항체-시약 결합을 4 또는 5분간 모니터링하고, HBS-EP 전개 완충제에서 10분간 해리를 모니터링하였다. 각 사이클 종료 시점에 항-PD-1 mAb 또는 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체가 고정된 표면으로 20mM 인산을 12초간 투입하여 재생하였다. 모든 결합 카이네틱 실험은 25℃에서 수행하였다.

[0208] Scrubber 2.0c 곡선 피팅 소프트웨어에서 실시간 센소그램을 1:1 결합 모델에 피팅하여, 카이네틱 결합 (k_a) 및 해리 (k_d) 속도 상수를 구하였다. 결합 해리 평형 상수 (K_D) 및 해리 반감기 (t½)를 다음과 같이 카이네틱 속도 상수로부터 계산하였다:

[0209] $$K_D\,(M) = \frac{kd}{ka}, \qquad t½\,(min) = \frac{\ln(2)}{60*kd}$$

[0210] 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체 및 2가 항-PD1 부모 항체의 결합 카이네틱스를 표 5에 요약 개시한다.

[0211] **표 5. 25℃에서 항-PD-1 mAb 및 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체에 대한 hPD-1.mmH의 결합 카이네틱스**

표 5

[0212]

REGN # / Ab PID #	mAb 고정 (RU)	90nM 또는 100nM hPD-1.mmH 결합 (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (분)
REGN10486	241.8 ± 6.4	46.9	1.07E+05	3.02E-04	2.83E-09	38.3
REGN2810	337.6 ± 3.9	88.7	9.88E+04	2.53E-04	2.56E-09	45.7
REGN10595	186.5 ± 1.5	44.7	1.04E+05	4.76E-04	4.59E-09	24.3
mAb29512	481.1 ± 1.3	123.8	1.38E+05	4.27E-04	3.10E-09	27.1
REGN10597	211.5 ± 2.6	41.8	1.48E+05	5.82E-04	3.92E-09	19.9
mAb9048	229.91	52.7	1.37E+05	1.23E-03	8.95E-09	9.4

[0213] **실시예 4: 항-PD-1 mAb 및 항-PD1-IL2Rα-IL2의 교차-경쟁**

[0214] 항-PD-1 mAb 및 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체의 교차 경쟁을 평가하기 위해, 항-PD1-IL2Rα-IL2와 시판 항-PD-1 mAb 간의 결합 경쟁을 Octet HTX 바이오센서 (ForteBio Corp., A Division of Sartorius)에서 실시간 비-표지 생물층 간섭측정 (BLI) 분석으로 측정하였다. 0.01M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% v/v 계면활성제 P20, 0.1mg/mL BSA (Octet HBS-EP 완충제)로 구성된 완충제 중에 25℃에서 1000rpm 속도로 플레이트를 교반하면서 전체 실험을 수행하였다. 항체 2종이 hPD-1.mmH (서열번호 66) 상의 각각의 에피토프에 결합하는데 서로 경쟁하는지를 평가하기 위해, 바이오센서를 2분간 20㎍/mL hPD-1.mmH 용액이 든 웰에 침지하여, HIS1K 항체-코팅된 Octet 바이오센서 (Fortebio Inc, # 18-5120)에 hPD-1.mmH를 대략 ~0.34nm로 먼저 고정하였다. 50㎍/mL mAb-1 용액이 든 웰에 5분간 침지하여 먼저 항원-고정된 바이오센서를 항-PD-1 항체 또는 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체 (이하 mAb-1으로 언급)로 포화하였다. 그런 후, 바이오센서를 50㎍/mL 항-PD-1 2차 항체 또는 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체 (이하 mAb-2로 언급) 용액이 든 웰에 3분간 침지하였다. 바이오센서는 모두 실험 단계 사이에 Octet HBS-EP 완충제로 헹구었다. 실시간 결합 반응을 실험 코스 중에 모니터링하고, 모든 단계 종료시 결합 반응을 기록하고 - mAb-1과 사전 복합체 형성된 hPD-1.mmH에 대한 mAb-2 결합 반응을 비교하고, 여러 항-PD-1 항체들의 경쟁/비-경쟁 거동을 50% 저해 역치를 이용해 결정하였다.

[0215] 표 6은 결합 순서와 무관하게 양 방향으로 항체 경쟁 관계를 정의한다.

[0216] **표 6. hPD-1.mmh에의 결합에 대한 항-PD-1 mAb 및 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체의 교차-경쟁**

표 6

[0217]

HIS1K Octet 바이오센서를 이용해 고정한 1차 mAb (mAb-1)	mAb-1과 경쟁하는 것으로 확인된 mAb-2 항체
REGN10486	REGN2810
REGN2810	REGN10486
REGN10595	REGN10597
REGN10597	REGN10595

[0218] 표 6은, REGN10486 및 이의 부모 항체 REGN2810이 hPD-1에의 결합에 대해 REGN10595 또는 REGN10597과 교차-경쟁하지 않음을 보여준다.

[0219] **실시예 5: 항-PD1-IL2Rα-IL2 구조체의 시험관내 기능적인 특징 규명**

[0220] **세포주 조작**

[0221] *YT/리포터 세포의 조작:* 인간 T/NK 세포 백혈병 YT 세포주에, STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5) - 루시퍼라제 리포터 구조체 - 를 전기천공으로 도입하고, Iscoves + 20% FBS + P/S/G + 200 μg/mL 히그로마이신에서 유지시켰다. IL-2에 대해 고 반응성인 세포 클론 하나를 식별하고, 이 클론에서 재명명한 YT/Stat5-Luc cl.4. IL2Rα (CD25)를 CRISPR-Cas9 기법을 이용해 넉아웃한 다음 생성된 세포주 YT/STAT5-Luc/IL2Rα KO를 유세포 측정에 의해 검증하였다. 그런 다음, 인간 IL2Rα를 YT/STAT5-Luc/IL2Rα KO 세포주 (아미노산 M1-I272, 등재 번호 NP_000408.1)에 재도입하고, 수득한 세포주 YT/STAT5-Luc/hIL2Rα를 유세포 측정에 의해 검증한 후 Iscoves + 20% FBS + P/S/G + 200μg/mL 히그로마이신 + 15μg/mL 블라스티시딘에서 유지시켰다. YT/Stat5-Luc cl.4, YT/Stat5-Luc/IL2Rα KO 및 YT/Stat5-Luc/hIL2Rα 세포를 인간 PD1 (아미노산 M1-L288, 등재 번호 NP_005009.2, 2Q=>E 돌연변이 존재)을 안정적으로 발현하도록 조작하고, 1mg/mL G418 첨가 배지에서 세포 선별하였다. 세포를 유세포 측정으로 검증하고, YT/STAT5-Luc/hPD1, YT/STAT5-Luc/IL2Rα KO/hPD1 및 YT/STAT5-Luc/hIL2Rα/hPD1으로 재명명하였다.

[0222] *PD1 리포터 세포의 조작:* Jurkat E6-1 세포를 AP1 (Activation Protein 1) 루시퍼라제 리포터 구조체를 안정적으로 발현하도록 조작하고, 항생제-내성 세포를 선별해 RPMI + 10% FBS + P/S/G + 1 μg/mL 푸로마이신에서 유지시켰다. 생성된 리포터 세포 풀을 인간 PD1 (아미노산 M1-L288, 등재 번호 NP_005009.2 2Q=>E 돌연변이 존재)을 발현하도록 조작한 다음, PD-1을 발현하는 클론 세포주를 형광-활성화된 세포 분류에 의해 단리하여 RPMI + 10% FBS + P/S/G + 1 μg/mL 푸로마이신에서 유지시켰다. 수득한 클론을 Jurkat/AP1-Luc/hPD1 cl. 4E5로 재명명하였다.

[0223] *HEK293/항-CD3/PD-L1 세포의 조작:* HEK293 세포를, 인간 CD79a (hIga: M1-P226, 등재 번호 NP_001774.1), 인간 CD79b (hIgb: M1-E229, 등재 번호 NP_000617.1), 항-CD3 가변성 도메인 (항-CD3 mIgE 중쇄, 항-CD3 카파 경쇄; clone 2706N, IgE genbank# AAB59424.1, CemX-migis-Cyto/TM PIR# PIH1215) 및 인간 PD-L1 (아미노산 M1-T290, 등재 번호 NP_054862.1)을 코딩하는 렌티바이러스 벡터에 의해 형질도입한 다음, DMEM + 10% FBS + P/S/G + 500μg/mL G418 + 100μg/mL 히그로마이신 + 1μg/mL 푸로마이신에서 유지시켰다. 항-CD3 및 PD-L1 발현을 유세포 측정에 의해 검증하고, 수득한 세포주를 293/aCD3/hPD-L1 cl. A3로 재명명하였다.

[0224] *Raji/CD80 KO/CD86 KO 및 Raji/CD80 KO/CD86 KO/PD-L1 세포의 조작:* Raji 세포에서 CRISPR-Cas9 기법을 이용해 CD80 및 CD86 발현을 제거하였다. Raji/CD80 KO/CD86 KO 세포를 단일-세포로 클로닝하였으며, 수득한 클론 (Raji/CD80 KO/CD86 KO cl.1D6)은 인간 PD-L1 (아미노산 M1-T290, 등재 번호 NP_054862.1)을 발현하도록 조작하였다. 생성된 세포주 Raji/CD80 KO/CD86 KO/hPD-L1는 유세포 측정에 의해 검증하였으며, RPMI-1640 + 10% FBS + HEPES + NaPyr + P/S/G + 0.5μg/mL 푸로마이신에서 유지시켰다.

[0225] **PD1 길항성 분석**

[0226] 막-결합형 항-hCD3 엡실론 및 인간 PD-L1을 발현하는 HEK293 세포를 Jurkat/AP1-Luc/hPD-1 리포터 T 세포와 인큐베이션하였다. HEK293 세포 상에서 항-CD3를 통한 리포터 세포의 T 세포 수용체와의 복합체로서 CD3의 클러스터링이 전사 인자 AP1의 활성화를 유도하고, 이는 루시퍼라제 리포터 유전자의 발현을 구동한다. 그러나, 리포터 T 세포에서 루시퍼라제 발현은 HEK293 세포 상에서 PD-L1과 저해성 수용체 PD-1의 상호작용에 의해 억제될 수 있는데, 이는 PD1/PD-L1 축을 차단하는 항체를 첨가함으로써 해결할 수 있다.

[0227] 세포 현탁물 및 항체 희석물을 제조하기 위한 분석 매질로서 10% FBS 및 P/S/G가 첨가된 RPMI1640을 이용하였다. 스크리닝하기 전날, 조작된 Jurkat/AP1-Luc/hPD1 리포터 세포를 $3x10^5$ 세포/mL로 희석하였다. 분석 당일에, 세포를 스핀 다운하여 분석 매질에 재현탁한 다음, 바닥부가 평평한 96웰 백색 플레이트에 $2.5x10^4$ 293/aCD3/hPD-L1 세포/웰로 접종하였다. 11-포인트 타이트레이션 범위 (500nM - 477 fM)에서 연속 희석 (1:4)한 비-표적화된 IL2Rα-IL2 [항-PSMA-IL2Rα-IL2 (비관련 (PSMA) 항체에 융합된 IL2Rα-IL2), 항-PD1 (REGN2810, H4H29512 또는 H4H9048), 항-PD1-IL2Rα-IL2 (REGN10486, REGN10595, REGN10597) 또는 이소형 대조

군 (이소형 대조군 1 또는 이소형 대조군 2)을, 재조합 단백질 비-함유된 12th 포인트와 함께, 접종한 세포에 투입한 다음, Jurkat/AP1-Luc/hPD1 리포터 세포를 2.5x10^{4}/웰로 투입하였다. 플레이트를 5시간 동안 37℃/ 5% CO_2 하에 인큐베이션하고, 웰에 ONE-Glo™ (Promega) 시약 100 ㎕를 첨가해 세포를 세포용해 처리한 다음 루시퍼라제 활성을 검출하였다. 방출된 광을 멀티라벨 플레이트 리더 Envision (PerkinElmer)에서 상대적인 광 단위 (RLU)로 측정하였다. GraphPad Prism™ 소프트웨어를 이용해 12-포인트 용량-반응 곡선에 대한 4-매개변수 로지스틱 등식으로 항체의 EC_{50} 값을 구하였다. 유도 배수를 하기 식으로 계산하였다:

[0228] $$\text{유도 배수} = \frac{\text{검사한 용량 범위에서 최대 평균 } RLU}{\text{단백질 비함유 대조군의 평균 } RLU}$$

[0229] **IL2 리포터 분석**

[0230] 본 실험에서, 조작한 YT 리포터 세포를 재조합 IL2-Fc, 비-표적화된 IL2Rα-IL2 또는 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체에 의해 자극하였다. IL2R 서브유닛 (IL2Rα, IL2Rβ 및 IL2Rɣ)의 차별적인 조립에 의해 기능적인 IL2 수용체가 형성되며, IL2Rβ/IL2Rɣ 서브유닛의 조립은 저 친화성 수용체를, 서브유닛 3종 모두 (IL2Rα/IL2Rβ/IL2Rɣ) 함유한 수용체는 고 친화성 수용체를 형성한다. IL2R에 의한 사이토카인의 결합시 STAT5의 활성화가 이루어지고, 이는 조작된 세포주에서 루시퍼라제 생산을 유발한다. 저 친화성 (IL2Rβ/ɣ) 또는 고 친화성 (IL2Rα/β/ɣ) IL2 수용체의 존재 하에 항-PD1-IL2Rα-IL2의 상대적인 효력을 평가하기 위해, 내인성 IL2Rα를 발현하는 YT/STAT5-Luc 리포터 세포를 IL2Rα가 결핍되거나 또는 과다 발현하도록 조작하였다. 리포터 세포는 내인성 PD1을 발현하지만, 항-PD1-IL2Rα-IL2 효력에 대해 PD1 발현 수준이 미치는 영향을 평가하기 위해 PD1을 과다 발현하는 유도체를 제작하였다.

[0231] 세포 현탁물 및 항체 희석물을 제조하기 위한 분석 매질로서 10% FBS 및 P/S/G가 첨가된 RPMI1640을 이용하였다. 스크리닝하기 전날, IL2Rα를 과다 발현하거나 또는 결핍되고 PD1을 내인성으로 발현하거나 또는 과다 발현하는, 조작된 리포터 YT/Stat5-Luc 세포를 3x10^{5} 세포/mL로 희석하였다. 분석 당일, 리포터 세포를 2.5x10^{4} 세포/웰로, 바닥부가 평평한 96웰 백색 플레이트에 신선한 분석 매질 중에 접종한 다음, 11-포인트 타이트레이션 범위 (200nM - 191 fM)로 연속 희석 (1:4)한 IL2-Fc (서열번호 74), 비-표적화된 IL2Rα-IL2, REGN10486, REGN10595, REGN10597 또는 이소형 대조군, 그리고 재조합 단백질이 함유되지 않은 12th 포인트와 인큐베이션하였다. 플레이트를 5시간 동안 37℃/ 5% CO_2 하에 인큐베이션한 다음 웰에 ONE-Glo™ (Promega) 시약 100 ㎕를 첨가해 세포용해 처리하고 루시퍼라제 활성을 검출하였다. 방출된 광을 멀티라벨 플레이트 리더 Envision (PerkinElmer)에서 RLU로 측정하였다. GraphPad Prism™ 소프트웨어를 이용해 12-포인트 용량-반응 곡선에 대한 4-매개변수 로지스틱 등식으로 항체의 EC_{50} 값을 구하였다. 유도 배수를 하기 식으로 계산하였다:

[0232] $$\text{유도 배수} = \frac{\text{검사한 용량 범위에서의 최대 평균 } RLU}{\text{단백질 비함유 대조군의 평균 } RLU}$$

[0233] **PD1 경쟁 분석**

[0234] 비-표적화된 IL2Rα-IL2 또는 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체를 통해 자극하기 전, 조작한 YT 리포터 세포에 항-PD1 2가 항체 또는 이소형 대조군을 첨가하였다. 2가 항-PD1이 항-PD1-IL2Rα-IL2와 경쟁하면 항-PD1-IL2Rα-IL2의 표적 능력이 약화될 것이며, 따라서 PD-1을 발현하는 STAT5-Luc 리포터 세포가 활성화될 것이다. PD1을 과다 발현하는 리포터 세포를 이용해 표적화 효율을 극대화하여, 항-PD1 2가 항체가 항-PD1-IL2Rα-IL2와 경쟁하는 것을 가장 잘 검출할 수 있다.

[0235] 세포 현탁물 및 항체 희석물을 제조하기 위한 분석 매질로서 10% FBS 및 P/S/G가 첨가된 RPMI1640을 이용하였다. 스크리닝하기 전날, IL2Rα를 과다 발현하거나 또는 넉아웃된 YT/Stat5-Luc/hPD1 리포터 세포를 3x10^{5} 세포/mL로 희석하였다. 분석 당일에, 리포터 세포를 2.5x10^{4} 세포/웰로, 바닥부가 평평한 96웰 백색 플레이트에 분석 매질 중에 접종한 다음, 항-PD1 2가 또는 이소형 대조군 항체 (5-포인트, 1:10 희석, 500nM - 0.05nM 범위, 재조합 단백질이 첨가되지 않은 6th 포인트 포함)를 타이트레이션으로 첨가하였으며, 이후 비-표적화된 IL2Rα-IL2, REGN10486, REGN10595 또는 REGN10597 (62.5nM - 59.6 fM; 1:4 연속 희석, 11-포인트 희석

범위, 재조합 단백질이 첨가되지 않은 12th 포인트 포함)을 타이트레이션으로 첨가하였다. 플레이트를 4시간 동안 37℃/ 5% CO_2 하에 인큐베이션한 다음 웰에 ONE-Glo™ (Promega) 시약 100 ㎕를 첨가해 세포를 세포용해 처리하고 루시퍼라제 활성을 검출하였다. 방출된 광을 멀티라벨 플레이트 리더 Envision (PerkinElmer)에서 RLU로 측정하였다. GraphPad Prism™ 소프트웨어를 이용해 12-포인트 용량-반응 곡선에 대한 4-매개변수 로지스틱 등식으로 항체의 EC_{50} 값을 구하였다. 유도 배수를 하기 식으로 계산하였다:

[0236] $$\text{유도 배수} = \frac{\text{검사한 용량 범위에서의 최대 평균 } RLU}{\text{단백질 비함유 대조군의 평균 } RLU}$$

[0237] **일차 T 세포 자극 분석**

[0238] 미토마이신-처리된 Raji/CD80 KO/CD86 KO 세포와 4일간 공배양해 일차 T-세포 세포를 자극하였다. Raji 세포는 CD20을 내인성으로 발현하므로, 일차 T 세포를 활성화하기 위해 CD20xCD3 이중 특이적인 항체를 첨가하였다. 공배양 중에 이소형 대조군, IL2, 항-PD1, 비-표적화된 IL2Rα-IL2 항체 (REGN9904) 또는 항-PD1-IL2Rα-IL2 (REGN10486, REGN10595 또는 REGN10597)를 트리트레이션으로 첨가하고, 동질적인, 비-세척, AlphaLISA 키트 (Perkin Elmer)를 이용하여 세포 배양 상층액에서의 IFN-γ 방출을 측정해 T 세포 활성에 미치는 효과를 결정하였다.

[0239] 건강한 공여자 leukopak에서 EasySep Direct Human PBMC 분리 키트 (Stemcell)를 제조사의 권장 프로토콜에 따라 사용해 인간 말초혈 단핵 세포 (PBMC)를 분리하였다. PBMC에서 EasySep Human T 세포 분리 키트 (Stemcell)를 제조사의 프로토콜에 따라 사용해 T 세포를 분리하였다. 세포를 스핀 다운하여 자극 매질 (10% FBS, HEPES, NaPyr, NEAA 및 0.01 mM BME가 첨가된 X-VIVO 15 세포 배양 매질)에 재현탁한 다음 세포를 $1x10^5$ 세포/웰로 둥근 바닥형 96웰 플레이트에 접종하였다. Raji/CD80 KO/CD86 KO 및 Raji/CD80 KO/CD86 KO/hPD-L1 세포에 20 ㎍/mL 미토마이신 C를 $10x10^6$ 세포/mL 농도로 1차 자극 매질 중에 1시간 동안 37℃에서 처리해, 세포 증식을 중단시켰다. 그 후, 2% FBS가 첨가된 D-PBS로 세포를 3번 헹구고, 세포를 웰 당 5 $x10^4$개로 첨가하였다. 그런 후, 0.5nM 항-CD3xanti-CD20 이중 특이성 항체를, 500nM - 0.3pM 범위의 9-포인트 1:6 연속 희석 타이트레이션으로 항-PD1, IL2, REGN2810 + IL2 조합, 비-표적화된 IL2Rα-IL2 항체, 항-PD1-IL2Rα-IL2 (REGN10486, REGN10595 또는 REGN10597) 또는 이소형 대조군 항체 (이소형 대조군 1 또는 이소형 대조군 2)와, 또한 이중 특이성 항체를 단 0.5nM의 고정된 양으로 함유한 10th 희석 포인트와 함께, 첨가하였다. 플레이트를 96시간 동안 37℃ / 5% CO_2에서 인큐베이션하였다. 세포 배양 상층물에서 AlphaLISA 분석을 제조사의 프로토콜에 따라 이용해, IFN-γ를 지정된 농도로 함유한 샘플을 이용해 IFN-γ를 정량하여, 각 샘플 웰에서 IFN-γ의 pg/mL을 추정하였다. 멀티라벨 플레이트 리더 Envision (Perkin Elmer)에서 측정값을 입수하였다. GraphPad Prism™ 소프트웨어를 이용해 10-포인트 용량-반응 곡선에 대한 4-매개변수 로지스틱 등식으로 사이토카인의 EC_{50} 값을 구하였으며, 여기서 10th 희석 포인트는 이중 특이성 항체를 0.5nM의 고정된 양으로만 함유하였다.

[0240] **결과 요약 및 결론**

[0241] *PD1 길항성 분석:*

[0242] PD1/PD-L1-매개 TCR 신호전달을 억제하는 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체의 억제능을 AP1-리포터 세포-기반의 생물분석을 이용해 평가하였다. 293/aCD3/hPD-L1 세포를 Jurkat/AP1-Luc/hPD1 리포터 세포와 인큐베이션하면, PD-L1에 의한 PD1 활성화로 인해 리포터 활성이 감소한다. 2가 항-PD1 항체 또는 항체에 융합된 IL2Rα-IL2 단백질이 PD1-PD-L1 상호작용을 차단하는 능력 및 리포터 활성을 구제하는 능력을 평가하였다. 조작된 리포터 세포에 대한 EC_{50} 및 유도 배수 값을 표 7에 요약 개시한다.

[0243] 리포터 세포에 대조군 단백질 (이소형 대조군 Ab 1, 이소형 대조군 Ab 2 또는 비-표적화된 IL2Rα-IL2)을 처리하였을 경우, 루시퍼라제 활성 증가는 검출되지 않았다. 반면, 리포터 세포를 항-PD1 항체, REGN2810, 또는 상응하는 항-PD1-IL2Rα-IL2, REGN10486와 인큐베이션하면, 루시퍼라제 활성 (각각 19.210배 및 17.740배)이 강화되었으며, 효력은 비슷하였다 (각각 3.668E-09 및 5.351E-09). 한편, 2가 PD1 항체, H4H29512 및 H4H9048은 루시퍼라제 활성을 강화하지 않았으며, 상응하는 항-PD1-IL2R-IL2 단백질, REGN10595 및 REGN10597은 낮은 수준으로 루시퍼라제 활성을 유도하였으며 (각각 2.725배 및 3.038배), 효력이 약하였다 (각각 1.266E-08 및

1.264E-08).

[0244] *IL2 리포터 분석:*

[0245] PD1 표적화된 IL-2 수용체의 신호전달을 유도하는 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체의 능력을 STAT5-리포터 분석을 이용해 평가하였다. 내인성 IL2Rα를 발현하거나, IL2Rα 발현이 결핍되거나 (KO 세포) 또는 IL2Rα를 과다 발현하고, 아울러 PD1을 내인성으로 발현하거나 또는 과다 발현하는 YT/STAT5-Luc 리포터 세포를, 이소형 대조군, IL2-Fc, 비-표적화된 IL2Rα-IL2 또는 항-PD1-IL2Rα-IL2 (REGN10486, REGN10595, 또는 REGN10597)와 공배양하여, STAT5 리포터 활성을 측정하였다. 유도 배수 값과 EC_{50}을 각각 표 8 및 9에 요약 개시한다.

[0246] IL2와 비교해, 비-표적화된 IL2Rα-IL2는 IL2Rα의 발현과 무관하게 STAT5 리포터 활성의 감소를 유도하였다. PD1 표적화된 분자는 IL2Rα 발현과 무관하게 비-표적화된 IL2Rα-IL2와 비교해 증가된 효력을 나타내었다. 아울러, PD1을 리포터 세포에서 과다 발현하였을 경우, 항-PD1-IL2Rα-IL2 효력은 IL2와 비슷한 효력으로 더욱 증가하였다.

[0247] *PD-1 경쟁 분석:*

[0248] 항-PD1 2가 mAb가 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체를 간섭하는 능력을 STAT5-리포터 생물분석을 이용해 평가하였다. IL2Rα를 과다 발현하거나 또는 IL2Rα의 발현이 결핍되고 PD1을 과다 발현하는 YT/STAT5-Luc 리포터 세포를, 500nM 이소형 대조군 또는 항-PD1 2가 mAb (REGN2810, Comp 1 또는 Comp 2)와 인큐베이션한 다음, 비-표적화된 IL2Rα-IL2 또는 PD1 표적화된 항-PD1-IL2Rα-IL2 구조체 (REGN10486, REGN10595, 또는 REGN10597)와 타이트레이션으로 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 후 STAT5 리포터 활성을 평가하였다. 항-PD1 2가 mAb와 항-PD1-IL2Rα-IL2 간의 경쟁으로, 항-PD1-IL2Rα-IL2에 의한 PD1 표적화 감소가 발생할 것이며, 이는 리포터 활성의 감소로 이어질 것이다. EC_{50} 값을 표 10에 요약 개시한다.

[0249] 2가 PD1 mAb 존재시, PD1 표적화된 IL2Rα-IL2 (REGN10486, REGN10595, REGN10597)는 비-표적화된 IL2Rα-IL2 (REGN9904)와 비교해 더 높은 효능을 나타내었다. REGN10486 효능은 리포터 세포와 PD1 항체 (REGN2810, Comp 1 또는 Comp 2)의 인큐베이션에 의해 크게 감소되었으며, REGN10595 및 REGN10597 효력에 대한 영향은 IL2Rα 발현과 무관하게 최소 수준이었다. 항-PD1 (REGN2810, Comp 1 또는 Comp 2)의 첨가는 비-표적화된 IL2Rα-IL2의 효능에는 영향이 없었다.

[0250] *일차 T 세포 자극 분석:*

[0251] 항-PD1-IL2Rα-IL-2가 T 세포 자극을 강화하는 능력을 기능성 일차 T 세포 분석에서 IFN-γ 사이토카인 생산을 측정함으로써 평가하였다. 미토마이신 C 처리된 Raji/CD80 KO/CD86 KO 또는 Raji/CD80 KO/CD86 KO/hPD-L1 세포와 인큐베이션한 T 세포에, 항-CD3xanti-CD20 2중 특이성 항체를 0.5nM 고정된 양으로, 그리고 이소형 대조군, IL2, 항-PD1 2가 항체 (REGN2810) 단독 또는 IL2와의 조합물, 비-표적화된 IL2Rα-IL2, 또는 항-PD1-IL2Rα-IL2 (REGN10486, REGN10595 또는 REGN10597)를 타이트레이션으로 처리하였다. T 세포를 Raji 세포와 4일간 함께 인큐베이션한 결과, IFN-γ가 측정가능한 수준으로 방출되었다. Raji/CD80 KO/CD86 KO 세포의 존재 하에 T 세포를 항-PD1-IL2Rα-IL2, IL2 또는 IL2와 REGN2810의 조합과 처리한 결과, IFNγ가 비슷한 수준으로 방출된 반면, 비-표적화된 IL2Rα-IL2, 이소형 대조군 항체 및 REGN2810의 경우에는 IFNγ가 더 낮은 수준으로 방출되었다. hPD-L1을 발현하는 Raji/CD80 KO/CD86 KO 세포의 존재 하에, 전체 IFNγ 방출은 PD-L1을 발현하지 않는 RAJI 세포와 비교해 이소형 대조군 처리 샘플에서 감소하였다. 비-표적화된 IL2Ra-IL2 및 REGN2810 처리시 이소형 대조군과 비교해 IFNγ 방출이 유사한 수준으로 증가한 반면, IL2, REGN10597 및 REGN10595를 처리한 경우에는 반응이 심지어 더 높았다. 최대 반응은 REGN10486 또는 IL2 + REGN2810 조합에서 관찰되었다. 항체 용량 범위에서 EC_{50} 및 최대 인터페론 방출을 표 11에 요약 기술한다.

[0252] **표 7. PD1 길항성 분석에서 항-PD1 및 항-PD1-IL2Rα-IL2 구조체에 의해 결정한 EC_{50} 및 유도 배수**

표 7

[0253]

	유도 배수*	EC_{50} (M)
이소형 대조군 1	1.126	ND
이소형 대조군 2	1.202	ND
비-표적화된 IL2Rα-IL2	1.076	ND
REGN2810	19.210	3.668E-09

REGN10486	17.740	5.351E-09
H4H29512	1.286	ND
REGN10595	2.725	1.266E-08
H4H9048	1.237	ND
REGN10597	3.038	1.264E-08
ND: 농도-의존적인 반응이 관찰되지 않아 결정 안함. *유도 배수는 항체 부재시 평균 RLU에 대해 검사한 용량 범위에서의 최대 평균 RLU임.		

[0254] **표 8. IL2 리포터 분석으로 결정한 IL2-Fc, 비-표적화된 IL2Rα-IL2 및 항-PD1-IL2Rα-IL2 구조체들에서의 유도 배수**

표 8

[0255]

	이소형 대조군	비-표적화된 IL2Rα-IL2	IL2-Fc	REGN10486	REGN10595	REGN10597
YT/Stat5-Luc	1.072	3.206	4.955	3.426	3.254	3.295
YT/Stat5-Luc/IL2Rα KO	1.118	2.622	5.397	3.093	2.834	2.851
YT/Stat5-Luc/hIL2Rα	1.074	4.868	5.485	5.080	5.016	5.187
YT/Stat5-Luc/hPD1	1.082	4.521	7.967	5.605	6.638	6.393
YT/Stat5-Luc/IL2Rα KO/hPD1	1.061	2.586	3.870	3.347	3.612	3.538
YT/Stat5-Luc/hIL2Rα/hPD1	1.000	2.770	3.060	2.714	3.013	2.879
*유도 배수는 항체 부재시 평균 RLU에 대해 검사한 용량 범위에서의 최대 평균 RLU임.						

[0256] **표 9. IL2 리포터 분석으로 결정한 IL2-Fc, 비-표적화된 IL2Rα-IL2 및 항-PD1-IL2Rα-IL2 구조체의 EC_{50}**

표 9

[0257]

	이소형 대조군	비-표적화된 IL2Rα-IL2	IL2-Fc	REGN10486	REGN10595	REGN10597
YT/Stat5-Luc	ND	NC	4.023E-10	NC	NC	NC
YT/Stat5-Luc/IL2Rα KO	ND	NC	1.327E-09	NC	NC	NC
YT/Stat5-Luc/hIL2Rα	ND	1.631E-09	2.415E-11	7.524E-10	8.87E-10	8.482E-10
YT/Stat5-Luc/hPD1	ND	NC	3.918E-10	1.702E-10	2.193E-10	1.749E-10
YT/Stat5-Luc/IL2Rα KO/hPD1	ND	NC	4.423E-10	1.948E-10	1.865E-10	1.913E-10
YT/Stat5-Luc/hIL2Rα/hPD1	ND	9.714E-10	2.316E-11	1.668E-11	5.777E-11	3.533E-11
NC: 데이터가 4-매개변수 로지스틱 식에 피팅되지 않아, 계산 안함. ND: 농도-의존적인 반응이 관찰되지 않아 결정 안함.						

[0258] **표 10. 항-PD1 항체 또는 이소형 대조군의 존재 하에 비-표적화된 IL2Rα-IL2 및 항-PD1-IL2Rα-IL2 구조체의 EC_{50} 값**

표 10

[0259]

		-	이소형 대조군	REGN2810	Comp 1	Comp 2
비-표적화된 IL2Rα-IL2	YT/STAT5-Luc/IL2Rα KO/hPD1	NC	NC	NC	NC	NC
	YT/STAT5-Luc/hIL2Rα/hPD1	7.033E-10	7.906E-10	6.506E-10	9.182E-10	9.376E-10
REG10486	YT/STAT5-Luc/IL2Rα KO/hPD1	9.388E-11	1.295E-10	NC	NC	NC
	YT/STAT5-Luc/hIL2Rα/hPD1	1.499E-11	2.018E-11	5.860E-10	6.927E-10	4.531E-10

REGN10595	YT/STAT5-Luc/IL2Rα KO/hPD1	2.499E-10	3.623E-10	4.550E-10	3.480E-10	2.941E-10
	YT/STAT5-Luc/hIL2Rα/hPD1	5.300E-11	6.223E-11	1.375E-10	1.335E-10	1.531E-10
REGN10597	YT/STAT5-Luc/IL2Rα KO/hPD1	1.285E-10	1.317E-10	2.216E-10	3.058E-10	2.807E-10
	YT/STAT5-Luc/hIL2Rα/hPD1	5.448E-11	7.094E-11	1.172E-10	7.649E-11	8.046E-11
NC: 데이터가 4-매개변수 로지스틱 식에 피팅되지 않아, 계산 안함.						

[0260] **표 11. IL2, 항-PD1 또는 항-PD1-IL2Rα-IL2 구조체로 처리된 일차 T 세포의 EC_{50} 및 최대 IFNγ 방출 수치**

표 11

[0261]

	최대 IFNγ (pg/mL)		EC_{50} (M)	
	Raji/ CD80 KO/ CD86 KO	Raji/ CD80 KO/ CD86 KO/ hPD-L1	Raji /CD80 KO/ CD86 KO	Raji/CD80 KO/ CD86 KO/ hPD-L1
이소형 대조군 1	1512	386	ND	ND
이소형 대조군 2	1563	343	ND	ND
비-표적화된 IL2Rα-IL2	1687	859	7.325E-09	NC
REGN10486	2306	1687	NC	1.457E-09
REGN10595	2108	1157	1.096E-09	2.047E-09
REGN10597	2484	1261	4.798E-10	1.839E-09
IL2	2544	1081	4.914E-10	2.660E-10
REGN2810	1172	858	ND	1.833E-09
IL2 + REGN2810	2500	1868	3.148E-10	2.016E-10
NC: 데이터가 4-매개변수 로지스틱 식에 피팅되지 않아, 계산 안함. ND: 농도-의존적인 반응이 관찰되지 않아 결정 안함.				

[0262] **실시예 6: PD1xLAG3 인간화된 마우스에서 생체내 항-종양 효능 평가**

[0263] **실험 #1:**

[0264] 인간 PD1 x LAG3 넉인 마우스 (Burova E. *et al.*, Mol Cancer Ther 2019 (18) (11) 2051-2062)에 MC38 종양 세포 $3x10^5$개를 0일에 s.c. 접종하고, 종양의 평균 크기가 $95mm^3$에 도달하면 7일에 무작위 할당하였다. 그 후, 이소형 대조군 Ab (0.33 mg/kg), 이소형-IL2Rα-IL2 (0.5 mg/kg) + 항-hPD1 항체 (0.33 mg/kg) 또는 항-hPD1-IL2Rα-IL2 (0.5 mg/kg) + 이소형 대조군 Ab (0.33 mg/kg)를 주당 2회로 총 4회 마우스에 복막내 주사하였다. 각 처리군에서 평균 종양 체적 (mm^3 + SEM)을 도표로 작성하였다 (도 1A). 종양 크기는 v=ab^2/2로 계산하였으며, 여기서 a는 종양의 최장 직경이고 b는 종양의 수직 직경이다. 도 1A에서 화살 표시는 처리한 날을 표시한다.

[0265] 각 처리군에서 카플란-마이어 생존 곡선을 또한 작성하였다 (도 1B). 생존 소실은 종양에서 심각한 궤양이 관찰되거나 또는 종양이 임의 치수가 20 mm에 도달하거나 또는 총 체적 2250 mm^3에 도달하였을 때의 안락사로 정의하였다.

[0266] **실험 #2:**

[0267] 인간 PD1 x LAG3 넉인 마우스에 MC38 종양 세포 $3x10^5$개를 0일에 s.c. 접종하고, 종양의 평균 크기가 105 mm^3에 도달하면 7일에 무작위 할당하였다. 그 후, 이소형 (0.5 mg/kg) 또는 항-hPD1-IL2Rα-IL2 (0.5 mg/kg) 클론 3종을 주당 2회로 총 4회 복막내 주사하였다. 각 처리군에서 평균 종양 체적 (mm^3 + SEM)을 나타내었다 (도 1C). 종양 크기는 v=ab^2/2로 계산하였으며, 여기서 a는 종양의 최장 직경이고 b는 종양의 수직 직경이다. 도면에서 화살 표시는 처리한 날을 표시한다.

[0268] 각 처리군에서 카플란-마이어 생존 곡선을 또한 작성하였다 (도 1D). 생존 소실은 종양에서 심각한 궤양이 관찰되거나 또는 종양이 임의 치수가 20 mm에 도달하거나 또는 총 체적 2250 mm^3에 도달하였을 때의 안락사로 정의

하였다.

[0269] **결과 요약 및 결론**

[0270] 실험 #1에서, 항-hPD1-IL2Rα-IL2의 항-종양 효능을, 2종의 개별 성분, 즉 이소형-IL2Rα-IL2 및 동일 몰수의 부모 항-hPD1 차단 항체의 조합과 비교해, 평가하였다.

[0271] 이소형-IL2Rα-IL2 + 항-hPD1은 검사한 용량에서 유효한 종양 방제를 제공하지 못한 반면, 동일 몰 용량의 항-hPD1-IL2Rα-IL2 + 이소형 처리는 확립된 종양을 퇴행시켜, 처리된 마우스 대부분에서 장기간 무-종양성 생존으로 이어질 수 있었다 (도 1A-B). 이러한 결과는, 항-hPD1-표적화된 IL2Rα-IL2가 비-표적화된-IL2Rα-IL2 및 부모 항-hPD1 항체의 조합과 비교해 우수한 항-종양 효능을 가짐을 입증해준다.

[0272] 실험 #2에서, 항-hPD1-IL2Rα-IL2의 서로 다른 클론 3종의 항-종양 활성을 비교하였다. 항-hPD1 클론 한종이 강력한 차단제인 반면, 다른 2종은 hPD1 신호전달을 최소한으로 차단하였다. 항-hPD1-IL2Rα-IL2 분자 클론 3종 모두 비교적 강한 항-종양 효능을 보였으며, 유사한 장기간 무-종양 생존성을 나타내었다 (도 1C-D). 이러한 결과는 차단 활성보다는 우수한 항-hPD1-표적화된 IL2Rα-IL2의 전달이 주로 항-hPD1-IL2Rα-IL2 요법의 견고한 항-종양 효능에 기여함을 의미한다. 이는 또한 항-hPD1-IL2Rα-IL2 분자를 비-경쟁적인 PD1 차단 시약과 조합함으로써 이의 치료학적 효능을 추가로 강화할 가능성이 있음을 의미한다.

[0273] **실시예 7: 용액에서 재조합 단량체 IL2Rα, IL2Rβ 또는 IL2Rɣ 단백질에 결합하는 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체의 결합력**

[0274] *인간 IL-2 수용체 α 결합*

[0275] C-말단 헥사히스티딘 태그와 함께 발현된 인간 IL2Rα (hIL2Rα.6H, R&D, Catalog # 10305-RL-050)가 C-말단 IL2Rα-IL2 융합체를 가진 정제된 항-PD1 항체에 대한 결합을 Biacore S-200 장치를 이용한 실시간 표면 플라스몬 공명 바이오센서 기술로 확인하였다. hIgG 고정된 표면을 준비하기 위해, CM5 Biacore 센서 표면을 단일클론 항-인간 Fab 항체 (Cytiva, catalog # 28-9583-25) 혼합물로 아민 커플링하여 유도체화 하였다. 모든 Biacore 결합 실험은 0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA 및 0.05% v/v 계면활성제 P20 (HBS-EP 전개 완충제)으로 구성된 완충제에서 25℃에서 수행하였다. 3 ㎍/mL 용액을 1분간 8 ㎕/min으로 주입하여 이 항-hFab 표면에 항-PD1-IL2Rα-IL2 구조체 및 대조군을 고정하였다. 그 후, HBS-EP 전개 완충제 중에 준비한 1 μM hIL2Rα.6H 용액을 항체 IL2 융합 구조체가 고정된 표면으로 유속 50 ㎕/min으로 투입하였다. IL2 융합 항체의 결합을 1분간 모니터링한 다음 HBS-EP 전개 완충제에서 1분 해리 단계를 수행하였다. 주입 종료 시점에 결합 반응을 측정하였으며, 표 12에 나타내었다. 각 사이클 종료시, 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체가 고정된 표면에 10mM 글리신, pH 1.5을 30초간 주입하여 재생하였다.

[0276] *인간 IL-2 수용체 β/ɣ 결합*

[0277] C-말단 myc-myc-헥사히스티딘 태그와 함께 발현된 인간 IL2 수용체 베타 (hIL2Rβ)(hIL2Rβ.mmH, REGN9169) 또는 C-말단 myc-myc-헥사히스티딘 태그와 함께 발현된 인간 IL2 수용체 gamma (hIL2Rɣ)의 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체에 대한 결합을, Biacore S-200 장치를 이용한 실시간 표면 플라스몬 공명 바이오센서 기술로 확인하였다. CM5 Biacore 센서 표면을 단일클론 항-인간 Fab 항체 (Cytiva, catalog # 28-9583-25) 혼합물로 아민 커플링하여 유도체화 하였다. 모든 Biacore 결합 실험은 0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA 및 0.05% v/v 계면활성제 P20 (HBS-EP 전개 완충제)으로 구성된 완충제 중에 25℃에서 수행하였다. 모든 IL2 수용체 성분들은 동일한 완충제 중에 준비하였다. 3 ㎍/mL 용액을 1분간 8 ㎕/min으로 주입하여 이 항-hFab 표면에 항-PD1-IL2Rα-IL2 구조체 및 대조군을 고정하였다.

[0278] 문헌 (Liparoto, *et al. Biochemistry*. 2002)에서 IL2Rɣ는 IL2에 대해 IL2Rβ 또는 IL2Rα/β 의존적인 친화성을 가진 것으로 발표된 바 있다. 즉, IL2Rβ를 첨가하면 검출가능한 삼중체 복합체가 형성될 수 있다. 미리-결합된 IL2Rβ의 존재 하에 IL2Rɣ 결합성을 조사하기 위해 순차적인 결합 실험을 설계하였다. 항-PD1-IL2Rα-IL2 표면에, 1 μM IL2Rβ.mmH를 50 ㎕/min 속도로 30초간 주입한 후 바로 1μM IL2Rβ.mmh 및 1 μM IL2Rɣ.mmH 혼합물 용액을 1분간 주입하였다. 각 주입 완료 후 결합 신호를 기록하였다. 그 결과를 표 13에 나타낸다. 각 사이클 종료 시점에 10mM 글리신, pH 1.5을 30초간 주입하여 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체가 고정된 표면을 재생하였다.

[0279] 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체의 활성을 계산하기 위해, 먼저 고정된 항-PD1-IL2-IL2Rα 융합체의 양, IL2 수용체 상호작용의 화학량론 및 상호작용하는 단백질의 분자량을 기반으로 이론적인 최고 신호 (TRmax)를 계산하

였다. 그 후, 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체의 활성을 계산한 TRmax의 %로 표시하였다. 아울러, TRmax의 %를 대조군 항체 (REGN1945 및 REGN8512)에 대해 하기 식에 따라 표준화하였다:

[0280] $$\text{표준화된 활성 (\%)} = \frac{(\%TRmax\ \text{샘플} - \%TRmaxREGN1945)}{(\%TRmaxREGN8512) - \%TRmaxREGN1945)} X\ 100$$

[0281] **결과, 요약 및 결론**

[0282] 항-PD1-IL2-IL2Rα 융합 구조체는 비-감쇠된 (IL2 단독) 대조군과 비교해 hIL2Rα에 대한 결합을 크게 감소시키는 것으로 나타났다.

[0283] 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체는 비-감쇠된 (IL2 단독) 대조군과 비교해 일부 감소된 결합 신호로 hIL2Rβ에 결합하는 결합력을 나타내었다. 결합된 hIL2Rβ의 존재시, 비-감쇠된 IL2 대조군 구조체와 비교해 hIL2Rγ의 한계 결합 (marginal binding)이 관찰되었다.

[0284] **표 12. 재조합 단량체 IL2Rα 단백질에 결합하는 항-PD1 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체의 결합성**

표 12

[0285]

Ab 시약	IL2Ra				
	mAb 포획 (RU)	1 μM hIL2Rα.6H 결합 (RU)	TRmax (RU)	% TRmax	표준화된 활성에 대한 %
REGN10486	275.7	0.9	58.5	1.5	1.3
REGN10595	152.1	2.1	32.0	6.6	6.6
REGN10597	206.7	0.6	43.6	1.4	1.2
REGN8512 (IL2에 연결된 Ab)	585.6	144.9	151.0	96.0	100.0
이소형 대조군	422.3	0.3	133.3	0.2	0.0

[0286] **표 13: 사전-결합된 IL2Rβ의 존재 하에 재조합 단량체 IL2Rβ 또는 IL2Rγ 결합에 결합하는 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체의 결합성**

표 13

[0287]

Ab 시약	IL2Rβ					IL2Rβ 이후 IL2Rγ			
	mAb 고정 (RU)	1 μM hIL2Rβ.mmH 결합 (RU)	TRmax (RU)	% TRmax	표준화된 활성에 대한 %	1 μM hIL2Rγ.mmH 결합 (RU)	TRmax (RU)	% TRmax	표준화된 활성에 대한 %
REGN10486	355.1	13.3	111.5	12.0	46.4	0.8	125.7	0.6	5.5
REGN10595	324.1	15.6	101.7	15.3	61.6	2.2	114.7	1.9	12.6
REGN10597	304.3	16.8	95.5	17.6	71.9	1.4	107.7	1.3	9.3
REGN8512 (IL2에 연결된 Ab)	1474.0	110.3	462.6	23.8	100.0	90.0	521.7	17.3	100.0
이소형 대조군	611.8	3.2	192.0	1.7	0.0	-0.7	216.5	-0.3	0.0

[0288] **실시예 8: FACS 결합 분석에 의해 규명한 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체 및 부모 mAb의 세포 결합성**

[0289] αhPD1-IL2Rα-IL2 단백질의 hPD1 결합성을 각각의 부모 항-hPD1 항체와 비교하기 위해, hPD1을 내인성 수준으로 발현하는 YT/STAT5 luc/C14 세포를 FACS 세척 (PBS+2%FBS)으로 2회 헹군 후, FACS 세척액에 1x10^6 세포/ml로 다시 현탁하였다. 그 후, 세포를 U자 바닥형 96웰 플레이트에 (100㎕/웰) 접종하였다. 세포를 스핀 다운 (1200 RPM, 5분)하여, mAb 클론 ID에 열거된 다양한 항체 희석물에 100㎕/웰로 다시 현탁하였다. FACS 세척액에서의 6배 희석을 이용해 20 ㎍/ml부터 시작해 항체 타이트레이션을 준비하였다. 세포를 항체와 30분간 4℃에서 인큐베이션하였다. 그런 후, 세포를 FACS 세척액으로 2번 헹궈 미결합된 항체는 제거하였다. 그 후, 세포를 APC-항-인간 Fcγ 2차 항체의 1:200 희석물에 100 ㎕/웰로 다시 현탁하였다. 세포를 4℃에서 30분간 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 FACS 세척액으로 2번 헹궈 미결합된 항체를 제거하였다. 세포를 다시 FACS 세척액에 160 ㎕/웰로

다시 현탁하고, 이를 전개시켜 BD FACSCanto™ 유세포 측정기를 이용해 결합성을 조사하였다.

[0290] 항-hPD1-IL2Rα-IL2 단백질 및 이의 각각의 항-hPD1 부모 항체는 PD1+ 세포에 비슷하게 결합하였다 (도 2A, 2B). 항-hPD1-IL2Rα-IL2 단백질의 결합성은 상응하는 부모 mAb에 비해 약간 더 낮은 (~2x) 친화성을 나타내었다.

[0291] **실시예 9: 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체들에 대한 Fab-교환 및 네이티브 질량 분광 측정 (MS) 분석**

[0292] Fab-교환 및 네이티브 질량 분광 측정 (MS) 분석을 이용해, PD-1-IL2Ra-IL2 융합 분자들의 입체구조를 확인하였다. REGN10597, REGN8509, REGN2810 및 REGN475에 각각 펩타이드 N-글리코시다제 F (PNGase F; 1 IUB milliunit / 단백질 10 ㎍)를 45℃에서 1시간 처리해, 각 중쇄 불변 영역에서 글리칸 쇄를 완전히 제거하였다. 탈당화된 단백질 샘플을 이후 도 3A 및 하기 표 14에 따라 혼합하고, 각 혼합물을 37℃에서 2 mM DTT의 존재 하에 30분간 인큐베이션하였다. 그 후, 처리한 단백질 혼합물에 대해 네이티브 탈염 크기 배제 크로마토그래피 및 질량 분광 측정 (SEC-MS)을 네이티브 LC-MS 플랫폼에서 수행하였다 (가출원 #10724 참조). 탈염 SEC는 BEH® SEC 컬럼 (4.6 x 30 mm, 200Å, 1.7 ㎛)에서 등용매성 흐름으로서 150 mM 암모늄 아세테이트 (pH 6.8)를 유속 0.2 mL/min으로 적용해 수행하였다. Thermo Q-Exactive UHMR 질량 분광기에서 분자량 측정을 수행하였다.

[0293] **표 14. Fab-교환 및 네이티브 MS 분석을 위한 REGN10597, REGN8509, REGN2810 및 REGN475의 혼합**

표 14

[0294]

	구성성분		혼합 비율 (몰 비율)	최종 단백질 농도
혼합물 1	REGN2810	REGN475	1:1	5 mg/mL
혼합물 2	REGN8509	REGN475	1:1	5 mg/mL
혼합물 3	REGN10597	REGN475	1:1	5 mg/mL

[0295] 힌지 영역의 이황화 결합 파괴시 IgG4 분자는 신속하게 Fab 교환이 이루어지며, 그 산물을 네이티브 MS 분석으로 모니터링할 수 있다. IgG4 항체 2종의 혼합물 (혼합물 1) 또는 IgG4 항체 1종 + 항-hCD20-IL2의 혼합물 (혼합물 2)을 이용한 대조군 실험에서, 부분적으로 환원된 조건에서 Fab 교환이, FabRICATOR 효소분해 처리 조건에서 Fc 교환이 관찰되었다 (도 3B). PD1-IL2Rα-IL2 + IgG4 분자의 혼합물 (혼합물 3)의 경우, 부분적으로 환원된 조건 또는 FabRICATOR 효소분해 처리 조건에서 각각 Fab 또는 Fc 교환 산물은 관찰되지 않았으며, 이는 PD1-IL2Rα-IL2 분자가 IL2Rα와 IL2 간의 강력한 쇄-간 상호작용이 Fab (또는 Fc) 교환을 막는 비활성 형태로 주로 존재함을 시사한다 (도 3B). 요컨대, Fab-교환 및 네이티브 MS 분석은, 항-PD1-IL2Rα-IL2 분자가 주로 트랜스-격리된 입체구조로 존재함을 보여준다.

[0296] **실시예 10: 혼합 림프구 반응 (MLR) 분석에 의해 평가한, 인간 일차 T 세포 활성화를 강화하는 항-PD1-IL2Rα-IL2 구조체의 능력**

[0297] 항-PD1-IL2Ra-IL2 구조체가 인간 일차 T 세포 활성화를 강화하는 능력을 혼합 림프구 반응 (MLR) 분석을 이용해 평가하였다. 동종이계 도너 PBMC는 T 세포를 자극해, 이의 증식 및 사이토카인의 방출로 이어질 것이다. 재조합 IL-2의 첨가가 T 세포 활성화를 추가로 뒷받침할 수 있다. 따라서, 이 분석을 이용해 PD1 표적화된 IL2Ra-IL2가 T 세포 활성화의 지표로 활용되는 T 세포 증식 및 IFNg 방출에 어떻게 영향을 미치는 지를 평가하였다.

[0298] *인간 일차 세포의 단리*

[0299] 정밀 의학 (도너 1) 또는 줄기 세포 기법 (도너 2)에서 수득한 건강한 공여자 2명의 말초혈 leukopak으로부터 EasySepTM Direct Human PBMC 단리 키트를 제조사의 권장 프로토콜에 따라 사용해 인간 PBMC를 단리하였다. 도너 2의 CD3+ T-세포는 StemCell Technologies 사의 EasySepTM 인간 CD3+ T 세포 단리 키트를 제조사의 권장 지침에 따라 이용해 PBMC로부터 단리하였다.

[0300] *분석 공정:*

[0301] 단리한 도너 2 CD3+ T-세포를 일차 배양 배지 (10% FBS, 10mM HEPES, 1mM 소듐 피루베이트, 1X 비-필수 아미노산 및 0.01 mM β-머캅토에탄올이 첨가된 X Vivo 15 배지)에 $1x10^6$ 세포/ml의 농도로 다시 현탁하였다. 도너 1 PBMC ($10x10^6$ 세포/ml)에 일차 배양 배지에서 희석한 50㎍/mL 미토마이신 C를 1시간 동안 37℃/5% CO_2에서 (세포 증식을 중단하기 위해) 처리하였다. 일차 배양 배지로 3번 헹군 후, PBMC를 재현탁하여 도너 2 T-세포에, T-

세포 : PBMC 최종 비율 1:3 ($1x10^6$ T-세포 + $3x10^6$ PBMC/ml)으로 첨가하였다. CD3+ T-세포/PBMC 혼합물을 6일간 인큐베이션한 후, Miltenyi CD3+ Microbeads를 제조사의 지침에 따라 이용해 T 세포를 다시 단리하였다. 그런 후, 단리한 세포를 일차 세포 배양 배지에서 24시간 동안 휴지시켰다. T-세포 100,000개를 둥근 바닥형 마이크로타이터 플레이트의 웰에 첨가하고, 신선하게 미토마이신 C 처리한 도너 1 PBMC를 웰에 300,000 세포/웰로 투입하였다. 항-PD1-IL2Rα-IL2 (REGN10597, REGN10595 또는 REGN10486), 이소형-IL2Rα-IL2 대조군 (REGN9903), 항-PD1 (REGN2810), 재조합 IL2, 또는 매칭되는 IgG4 및 IgG4s 이소형 대조군 (각각 REGN1945 및 REGN7540)을 1000 nM 내지 0.595 pM 범위의 9-포인트 희석으로 1:6 타이트레이션하고, 항체를 함유하지 않은 마지막 10^{th}-포인트 (곡선에서 최하 포인트로 표시됨)도 이용하였다. 각 조건은 3세트로 수행하였다. 37℃/5% CO_2에서 72시간 인큐베이션한 후, 마이크로타이터 플레이트를 원심분리해 세포를 펠릿화하여 배지 상층액 50 ㎕를 수집하였다. 수집한 상층액으로부터 5 ㎕를 취해 인간 IFNγ AlphaLISA (PerkinElmer) 분석에서 제조사의 프로토콜에 따라 이용해 검사하였다. 측정값은 멀티라벨 플레이트 리더 Envision (PerkinElmer)에서 획득하였다. 펠릿화된 세포를 3H-티미딘 (1.25 mCi/ml)이 함유된 일차 자극 배지에 재현탁하여 37℃/5% CO_2에서 6시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 Filtermate Cell Harvester (PerkinElmer)를 사용해 처리하고, MicroBeta2 Microplate counter (PerkinElmer)를 사용해 측정하였다. 값은 분당 카운트 (CPM)로 기록하였다. 항체의 EC_{50} 값은 GraphPad Prism™ 소프트웨어를 이용해 10-포인트 용량-반응 곡선에서 4-매개변수 로지스틱 식을 통해 구하였다.

[0302] T 세포를 동종이계 PBMC의 존재 하에 재조합 IL-2, 항-PD-1-IL2Rα-IL2 (REGN10597, REGN10595, REGN10486) 또는 이소형-IL2Rα-IL2 대조군 (REGN9903)으로 용량 타이트레이션으로 처리한 결과, IFNγ 방출 및 증식이 용량-의존적으로 증가하였다 (도 4A, 4B 및 표 15). 재조합 IL2가 가장 높은 최대 사이토카인 방출 및 가장 강력한 증식을 유도하였으며, 그 다음이 항-PD1-IL2Rα-IL2 분자였다. 이소형-표적화된 IL2Rα-IL2는 PD-1 표적화된 경우와 비교해, 사이토카인 방출 및 증식에 감소된 효력을 나타내었다. REGN2810은 IFNγ에서만 최소한의 용량-의존적인 증가를 유도한 반면, 매칭된 IgG4 및 IgG4s 이소형 대조군 (각각 REGN1945 및 REGN7540)은 사이토카인 방출 및 증식에 영향을 미치지 않았다.

[0303] **표 15. IFNγ 방출 및 증식에 대한 최대값 및 EC_{50} 값**

표 15

[0304]

항체	IFNγ 방출		증식	
	최대 [pg/mL]	EC_{50} [M]	최대 [CPM]	EC_{50} [M]
REGN10486	1709.7	4.44E-09	22558	1.3E-10
REGN10595	1395.2	1.27E-09	25376	6.1E-11
REGN10597	1534.0	9.53E-09	26602	1.8E-10
REGN9903	1268.0	1.53E-08	21951	4.88E-10
REGN2810	158.3	NC	4671	ND
REGN1945	2.4	ND	4342	ND
rhIL-2	5552.6	NC	20711	NC
REGN7540	6.2	ND	5702	ND
약어: ND: 농도-의존적인 반응이 관찰되지 않아 결정 안함; NC: 데이터가 4-매개변수 로지스틱 식에 피팅되지 않아, 계산 안함.				

[0305] **실시예 11: Raji-기반의 일차 T 세포 자극 분석에서 항-PD1-IL2Rα-IL2와 이소형 대조군-IL2Rα-IL2 + 항-PD1 구조체의 비교**

[0306] 항-PD1-IL2Rα-IL2 구조체가 인간 일차 T 세포 활성화를 강화하는 능력을 Raji-세포 기반의 일차 T 세포 분석을 이용해 평가하였다. CD80 및 CD86이 넉아웃되고 인간 PD-L1 (Raji/CD80 KO/CD86 KO/hPD-L1)을 과다 발현하는 Raji 세포와 CD3xCD20 2중 특이성 항체의 존재 하에 공배양하여 T 세포를 자극하였으며, 그래서 T 세포가 사이토카인을 분비한다. 재조합 IL-2 첨가시 T 세포 활성화를 추가로 지원할 수 있다. 즉, 이 분석을 이용해, PD1 표적화된 IL2Rα-IL2가 T 세포 활성화의 지표로 활용되는 T 세포의 IFNγ 방출에 어떻게 영향을 미칠 수 있는지 평가하였다.

[0307] *인간 일차 세포의 단리:*

[0308] 정밀 의학에서 수득한 건강한 공여자의 말초혈 leukopak로부터 EasySepTM Direct Human PBMC 단리 키트를 제조사의 권장 프로토콜에 따라 이용해 인간 PBMC를 단리하였다. StemCell Technologies 사의 EasySepTM 인간 CD3+ T 세포 단리 키트를 제조사의 권장 지침에 따라 이용해 PBMC로부터 CD3+ T-세포를 단리하였다.

[0309] *Raji-기반의 T 세포 분석 공정:*

[0310] T 세포를 스핀 다운하여 자극 배지 (10% FBS, 10mM HEPES, 1mM 소듐 피루베이트, 1X 비-필수 아미노산 및 0.01 mM β-머캅토에탄올이 첨가된 X Vivo 15 배지)에 재현탁한 다음 96웰 둥근 바닥형 플레이트에 $1x10^5$ 세포/웰로 접종하였다. Raji/CD80 KO/CD86 KO/hPD-L1 세포 ($1x10^7$ 세포/ml)에, 세포 증식을 중단하기 위해 자극 배지에서 희석한 20 mg/ml 미토마이신 C를 1시간 동안 37℃/5% CO_2에서 처리하였다. 그런 후, 세포를 2% FBS가 첨가된 D-PBS로 3번 헹구고 자극 배지에 재현탁한 다음 세포 $5x10^4$개를 각 웰에 투입하였다. 그 후, 0.5nM 항-CD3 x 항-CD20 2중 특이성 항체 (REGN1979)를 20nM 고정 이소형 대조군 (REGN1945) 또는 항-PD1 (REGN2810)과 함께 첨가하였다. 이소형 대조군 (REGN7540), 이소형-IL2Rα-IL2 항체 (REGN9903), 항-PD1 항체 + mAb9048의 VR (REGN15187), 항-PD1-IL2Rα-IL2 (REGN10597), 또는 동일 몰 타이트레이션의 REGN9903 + REGN15187을 타이트레이션으로, 분자 당 500 nM 내지 0.3 pM 범위의 9-포인트 1:6 희석으로, 그리고 0.5nM 고정으로 REGN1979 및 20nM REGN2810 또는 REGN1945만 함유한 10^{th} 희석 포인트와 더불어, 웰에 투입하였다. 각 조건을 2세트로 수행하였다. 플레이트를 37℃/5% CO_2에서 96시간 동안 인큐베이션하였다. 세포 배양 상층액에서 AlphaLISA 분석을 제조사의 프로토콜에 따라 이용해 IFNγ를 정량하였다. 측정값은 멀티라벨 플레이트 리더 Envision (PerkinElmer)에서 획득하였다. 사이토카인의 EC_{50} 값은 GraphPad Prism™ 소프트웨어를 이용해 10-포인트 용량-반응 곡선에서 4-매개변수 로지스틱 식을 통해 구하였으며, 여기서 10^{th} 희석 포인트는 0.5nM 고정의 REGN1979 및 20nM REGN2810 또는 REGN1945만 함유한 것이다.

[0311] **결과 요약**

[0312] T 세포에, Raji/CD80 KO/CD86 KO/hPDL1의 존재 하에, 이소형-IL2Rα-IL2 (REGN9903) 또는 항-PD1-IL2Rα-IL2 (REGN10597)를, REGN2810 존재 또는 부재 조건에서 용량 타이트레이션으로 처리한 결과, IFNγ 방출이 용량-의존적인 방식으로 놀랍게도 유의하게 증가하였다 (표 16 및 도 5A, 5B). 항-PD1-IL2Rα-IL2 분자가 가장 높은 최대 사이토카인 방출을 유도하였으며, 그 다음이 이소형-IL2Rα-IL2 단독 또는 이소형-IL2Rα-IL2와 항-PD1 항체 REGN15187의 조합이었다. 매칭된 IgG4 및 IgG4s 이소형 대조군 (각각 REGN1945 및 REGN7540)은 IFNγ 방출에 영향을 미치지 않았다.

[0313] **표 16. IFNγ 방출의 최대값**

표 16

[0314]

	최대 IFNγ 방출 [pg/mL]	
	고정 - 20nM REGN1945	고정 - 20nM REGN2810
REGN7540	5.1	75.0
REGN9903	46.9	110.6
REGN15187	17.0	79.5
REGN9903 + REGN15187	47.6	140.0
REGN10597	133.0	258.5

[0315] **실시예 12: 항-PD1-IL2Rα-IL2 융합 구조체의 생체내 항-종양 효능 및 안전성 프로파일**

[0316] 1차 실험에서, 단일 물질 REGN10597의 생체내 항-종양 효능을 평가하였다. 인간 PD1 x LAG3 넉-인 마우스 (Burova E. *et al.*, 2019)에 MC38 종양 세포 $3x10^5$개를 0일에 s.c. 접종하고, 종양의 평균 크기가 105 mm^3에 도달하면 7일에 무작위 할당하였다. 각 무작위 할당한 군의 마우스에 지정된 분자를 특정 용량 수준에서 주당 2회 총 4회 주사 복막내 주사하였다. 각 처리군에서 평균 종양 체적 (mm^3 + SEM)을 도표로 작성하였다 (도 6A). 종양 크기를 v=ab^2/2로 계산하였으며, 여기서 a는 종양의 최장 직경이고 b는 종양의 수직 직경이다. 도면에서 화살 표시는 처리한 날을 표시한다. 개별 종양 증식 곡선 및 각 처리군에서 완전한 종양 거부가 관찰되는 마우스

의 빈도를 나타내었다 (도 6B).

[0317] REGN10597 단일요법은 0.5 또는 1 mg/kg 용량 수준에서, 1 mg/kg REGN9904 및 10 mg/kg REGN2810의 조합에 비해 우수한 항-종양 활성을 보였으며, 처리된 마우스에서 완전한 종양 퇴행 빈도가 더 높았다. 0.2 mg/kg REGN10597 처리시 중간 수준의 항-종양 효능이 관찰되었다 (도 6A, 6B).

[0318] 2차 실험에서, REGN10597의 생체내 활성 및 독성 프로파일을 경쟁자 REGN13233, 즉 IL2Ra에의 결합이 무효화된 항-PD1-표적화된 IL2 돌연변이와 비교하였다. 인간 PD1 x LAG3 넉-인 마우스 (Burova E. *et al.*, 2019)에 MC38 종양 세포 $3x10^5$개를 0일에 s.c. 접종하고, 종양의 평균 크기가 70 mm^3에 도달하면 7일에 무작위 할당하였다. 각 무작위 할당한 군의 마우스에 지정된 분자를 특정 용량 수준에서 주당 2회로 총 4회 복막내 주사하였다. 각 처리군에서 평균 종양 체적 (mm^3 + SEM)(도 6C), 카플란-마이어 생존 곡선 (도 6D) 및 체중 변화 % (평균 + SD)(도 6E)를 도표로 작성하였다. 도 6A에서 화살 표시는 처리한 날을 표시한다. 완전한 종양 거부가 관찰된 마우스의 빈도를 (도 6D)에 선택 군에 표시하였다. 13일에 모든 군에서 혈액을 채혈하여 유세포 측정에 의해 분석하였다. 총 백색 혈액 세포의 수치를 나타내었다 (도 6F).

[0319] REGN10597 및 REGN13233 단일요법 둘다, REGN2810와 이의 각각의 비-표적화된 대조군 (REGN10597의 경우 REGN9904, REGN13233의 경우 REGN13234)의 조합에 비해, 우수한 항-종양 효능을 보였으며, 양쪽 군에서 처리 마우스 대부분에서 완전한 종양 퇴행이 관찰되었다 (도 6C, 6D).

[0320] 그러나, 처리한 마우스에서 명백한 체중 변화가 없었던 REGN10597과는 달리, REGN13233을 동일 용량으로 처리하면 유의한 체중 감소와 동시에 순환성 림프구의 현저한 증가가 관찰되었다 (도 6E). REGN13234 처리군에서도 동일한 체중 감소 및 백색 혈액 세포의 수치 증가가 관찰되었으므로, 이러한 독성 차이는 REGN10597 및 REGN13233에서 상이한 IL-2 모이어티에 기인한 것으로 보였다 (도 6E, 6F). 다중-매개변수 유세포 측정에 의해 백색 혈액 세포의 면역형을 추가로 분석한 바, REGN10597은 $PD\text{-}1^+$ CD4 및 CD8 T 세포를 더 선택적으로 증폭시킨 반면, REGN13233은 이러한 세포를 증폭시킬 뿐 아니라 $CD44^+CD62L^+$ CD8 T 세포 및 NK 세포 집단을 대폭 증가시키는 것으로 드러났다.

[0321] 이러한 결과는, REGN10597 및 경쟁자 분자 REGN13233 둘다 견고한 항-종양 효능을 발휘하였음에도 불구하고, 더 광범위한 $CD8^+$ T 및 NK 세포 집단을 증폭시키는 REGN13233과 비교해, $PD1^+$ T 세포를 생체내에서 더 선택적으로 증폭시키는 능력으로 인해 틀림없이 REGN10597이 더 나은 안전성 프로파일을 가짐을, 입증해준다.

[0322] 3차 실험에서, REGN10597의 생체내 항-종양 효능을, REGN10597과 동일한 파트들을 모두 함유하지만 IL2 및 IL2Rα 모이어티가 서로 역순으로 융합된 분자인 aPD1-IL2-IL2Rα와 비교하였다. 인간 PD1 x LAG3 넉-인 마우스 (Burova E. *et al.*, 2019)에 MC38 종양 세포 $3x10^5$개를 0일에 s.c. 접종하고, 종양의 평균 크기가 120 mm^3에 도달하면 9일에 무작위 할당하였다. 그 후, 각 군의 마우스에 지정된 분자를 특정 용량 수준에서 총 2회 주사로 매주 복막내 주사하였다. (도 6G). 각 처리군에서 평균 종양 체적 (mm^3 + SEM)을 도표로 작성하였다. 종양 크기는 v=a·b^2/2로 계산하였으며, 여기서 a는 종양의 최장 직경이고 b는 종양의 수직 직경이다. 도면에서 화살 표시는 처리한 날을 표시한다 (도 6H). 각 처리군의 카플란-마이어 생존 곡선도 도시하였다. 생존 소실은 종양에서 심각한 궤양이 관찰되거나 또는 종양이 임의 치수가 20 mm에 도달하거나 또는 총 체적 2250 mm^3에 도달하였을 때의 안락사로 정의하였다. 완전한 종양 거부가 관찰된 마우스의 빈도를 선택 군들에 표시하였다.

[0323] 생체내에서 견고한 항-종양 활성을 나타낸 REGN10597과는 달리, aPD1-IL2-IL2Rα는 동일한 용량 또는 더 고 용량에서 최소한의 종양 증식 방제를 나타내었다. 이 결과는, REGN10597에서 IL2Rα-IL2의 올바른 융합 순서가 생체내 강력한 항-종양 활성에 중요함을, 보여준다 (도 6G, 6H).

[0324] **실시예 13: Ab-IL2Ra-IL2 융합 분자의 IL2 수용체에 대한 유동 결합 (flow binding)**

[0325] IL2R 서브유닛들 (IL2Ra = CD25, IL2Rb = CD122 및 IL2Rg = CD132)을 차별적으로 조립하여, 면역 세포 상에 발현되는 중간 친화성 IL2 수용체 (IL2Rb/IL2Rg) 및 고 친화성 IL2 수용체 (IL2Ra/IL2Rb/IL2Rg)를 형성함으로써, 기능성 IL2 수용체를 구축한다 (PMID: 16293754). IL2 및 IL2Ra-IL2 키메라 항체가 중간 친화성 IL2 수용체 (IL2Rb/g, IL2Ra 넉아웃) 또는 고 친화성 수용체 (IL2Rb/g 및 IL2Ra 과다 발현)를 발현하는 세포에 결합하는 결합력을 유세포 측정을 이용해 평가하였다.

[0326] YT 세포는 내인성 인간 PD1을 발현하지만, 과다-발현하는 PD-1 세포 (PD1 OE)를 제작하였다. 세포에 대한 인간

IL2 및 인간 IL2Ra-IL2 키메라 항체 (= 일차 항체)의 결합성을 조사하기 위해, IL2 수용체 서브유닛 3종을 모두 내인성으로 발현하는 YT/STAT5-Luc/PD1 OE 리포터 세포를, IL2Ra 서브유닛 (CD25 KO)을 넉아웃하여 중간 친화성 IL2 수용체 또는 IL2Ra (CD25 OE)를 과다 발현시켜 고 친화성 수용체를 세포 표면 상에 나열하도록, 유전자 변형하였다. 이들 세포에 대한 항체의 결합성을 형광-표지된 2차 항체를 이용해 유세포 측정에 의해 검출하였다. 간략하게는, CD25 KO 또는 CD25 OE인 PD1 OE YT 세포를 염색 완충제 (2% FBS/PBS)에 현탁하고, 96웰 플레이트에 웰 당 세포 $3x10^5$개로 접종한 다음 1:5로 연속 희석한 일차 항체 [이소형-IL2 (REGN8512) 또는 이소형-IL2Ra-IL2 (REGN9904)]와 얼음 위에서 30분간 인큐베이션하였다. 최종 항체 농도는 768 fM 내지 300 nM 범위였으며, "2차 단독"으로 표지된 항체 대조군은 포함하지 않았다. 인큐베이션한 후, 샘플을 빙랭한 염색 완충제로 헹군 다음 AF647-표지된 항-인간 IgG 항체와 얼음 위에서 30분간 인큐베이션하였다. 미결합된 2차 항체는 제거하고, 샘플을 빙랭한 PBS로 1회 헹군 후, 생존성 염료로 염색하고 다시 빙랭한 염색 완충제로 1회 헹군 다음 실온에서 30분간 고정하였으며, 염색 완충제에서 헹궈 염색 완충제에 재현탁하고, 여과한 다음 기하 평균 형광 강도 (gMFI)를 구하기 위해 iQue Plus 유세포 측정기에서 분석하였다. 하기 식을 이용해 2차 단독 대비 최대 결합 배수를 계산하였다:

[0327] $$\text{유도 배수} = \frac{\text{검사한 용량 범위에서 최대 } gMFI}{\text{1차 항체 비함유 대조군의 평균 } gMFI}$$

[0328] 결과 요약

[0329] 표 17은 CD25 넉아웃 또는 과다 발현 세포에 결합하는 항체-IL2 또는 항체-IL2Ra-IL2 키메라 구조체들에 대한 최대 기하 MFI 및 유도 배수 값을 요약 개시한다. 중간 친화성 IL2Rβ/γ 수용체 (CD25 KO) 또는 고 친화성 IL2Rα/β/γ 수용체 (CD25 OE)를 발현하는 조작된 YT 세포 2종에서, 이소형 IL2 분자 (REGN8512) 및 이소형 IL2Ra-IL2 분자 (REGN9904)의 용량 의존적인 결합이 관찰되었다 (도 7A, 7B; 표 17). 예상한 바와 같이, CD25 OE 세포 상의 2종의 구조체에 대해 최대 결합 배수가 더 높았다. 그러나, Ab-IL2Ra-IL2의 결합은 IL2Rα/β/γ- 및 IL2Rβ/γ-발현성 세포주 둘다에서 Ab-IL2와 비교해 크게 감소하였으며, 이는 융합 단백질에서 IL2Ra의 존재에 의한 IL-2의 "은폐"를 시사한다.

[0330] **표 17: IL2 유도 결합 분석 - 최대 gMFI 및 유도 배수 값 요약**

표 17

[0331]

	검사물	최대 gMFI	유도 배수*
CD25 KO /PD1 OE	이소형-IL2 [REGN8512]	7.18E+04	31.2
	이소형-IL2Ra-IL2 [REGN9904]	3.99E+03	1.704
CD25 OE /PD1 OE	이소형-IL2 [REGN8512]	3.33E+06	1341
	이소형-IL2Ra-IL2 [REG9904]	7.76E+04	33.11
* 항체 부재 조건에서 관찰된 gMFI 대비 검사한 용량 범위에서 최대 gMFI 값으로서 정의되는 유도 배수.			

[0332] **실시예 14: PD1-IL2R2-IL2 분자의 효력을 평가하기 위한 생물분석**

[0333] IL2R 서브유닛들 (IL2Ra = CD25, IL2Rb = CD122 및 IL2Rg = CD132)을 차별적으로 조립하여, 면역 세포 상에 발현되는 중간 친화성 IL2 수용체 (IL2Rβ/γ) 및 고 친화성 IL2 수용체 (IL2Rα/β/γ)를 형성함으로써, 기능성 IL2 수용체를 구축한다 (PMID: 16293754).

[0334] IL2 또는 IL2Ra-IL2 또는 IL-2-IL2Ra 키메라 항체의 생활성을 분석하기 위해, 조작된 YT/STAT5-Luc 상의 중간 친화성 또는 고 친화성 IL2 수용체에 IL2가 결합하면 STAT5 구동성 루시퍼라제 발현의 활성화로 이어지는 세포-기반의 리포터 분석을 확립하였다. YT 세포는 인간 PD1을 내인성으로 발현하지만, 과다-발현하는 PD-1 세포 (PD1 OE)를 제작하였다. IL2 수용체 서브유닛 3종을 모두 내인성으로 발현하는 YT/STAT5-Luc/PD1 OE 리포터 세포를, IL2Ra 서브유닛 (CD25 KO)을 넉아웃하여 중간 친화성 IL2 수용체 또는 IL2Ra (CD25 OE)를 과다 발현시켜 고 친화성 수용체를 세포 표면 상에 나열하도록, 유전자 변형하였다.

[0335] 10% FBS 및 P/S/G가 첨가된 RPMI1640을 세포 현탁물 및 항체 희석물을 제조하기 위한 분석 매질로 이용하였다. 스크리닝하기 전날, 조작된 YT/STAT5-Luc 리포터 세포 (CD25 KO/PD1 OE 및 CD25 OE/PD1 OE)를 $3x10^5$ 세포/ml로 희석하였다. 분석 당일, 세포를 스핀 다운하여 분석 매질에 재현탁한 다음 바닥부가 평평한 96웰 백색 플레이트

에 2.5x10^4 리포터 세포/웰로 접종하고, 11-포인트 타이트레이션 범위 (200nM - 21 fM)에 걸쳐 연속 희석 (1:5)(도 1A, 1B, 1C, 1D) 또는 11-포인트 타이트레이션 범위 (250nM - 238 fM)(도 2A, 2B)에 걸쳐 (1:4)로 희석한, 이소형-IL2Ra-IL2 [REGN9903 또는 REGN9904], 이소형-IL2-IL2Ra, 이소형-IL2(3m) [REGN13234], 항-PD1(arm 9048)-표적화된-IL2Ra-IL2 [REGN10597], 항-PD1(arm 9048)-표적화된-IL2-IL2Ra 또는 항-PD1(arm 9048)-표적화된-IL2(3m) [REGN13233]와, 그리고 재조합 단백질이 함유되지 않은 12th 포인트와 함께 인큐베이션하였다. 플레이트를 4시간 30분 (도 1A, 1B, 1C, 1D) 또는 4시간 (도 2A, 2B) 동안 37℃/ 5% CO_2 하에 인큐베이션한 다음 ONE-Glo™ (Promega) 시약 100 mL을 웰에 첨가하여 세포를 세포용해시키고 루시퍼라제 활성을 검출하였다. 방출된 광을 멀티라벨 플레이트 리더 Envision (PerkinElmer)에서 RLU로 측정하였다. GraphPad Prism™ 소프트웨어를 이용해 12-포인트 용량-반응 곡선에 대한 4-매개변수 로지스틱 등식으로 항체의 EC_{50} 값을 구하였다. 유도 배수를 하기 식으로 계산하였다:

[0336] $$\text{최대 유도 배수} = \frac{\text{검사한 용량 범위에서 최대 평균 } RLU}{\text{단백질 비함유 대조군의 평균 } RLU}$$

[0337] 결과 요약

[0338] 이소형 IL2Ra-IL2 (REGN9903), 이소형-IL2-IL2Ra, 항-PD1 표적화된-IL2Ra-IL2 (REGN10597) 및 항-PD1 표적화된-IL2-IL2Ra는 리포터 세포 상에서 IL2Ra가 부재 (도 8A) 또는 존재 (도 8B)하는 경우 둘다에서 STAT5-구동성 리포터 발현을 용량 의존적으로 증가시켰다 (표 18). PD-1 표적화된 분자는 이소형 표적화된 분자와 비교해 강화된 효력을 발휘하였다. IL2-IL2Ra 키메라 분자는 리포터 세포 상에서 IL2Ra 발현의 존재 또는 부재 하에 IL2Ra-IL2 키메라 분자와 비교해 감소된 효력을 나타내었다.

[0339] **표 18: Ab-IL2Ra-IL2 및 Ab-IL2-IL2Ra의 IL2 리포터 분석 비교**

[0340] **EC_{50} 값과 유도 배수 요약**

표 18

[0341)

	EC50 (M)		최대 유도 배수*	
	CD25 KO / PD1 OE	CD25 OE / PD1 OE	CD25 KO / PD1 OE	CD25 OE/ PD1 OE
이소형-IL2Ra-IL2 [REGN9903]	NC	3.313E-10	4.37	7.00
aPD1(9048)-IL2Ra-IL2 [REGN10597]	5.781E-11	3.297E-11	5.72	7.36
이소형-IL2-IL2Ra	NC	1.408E-09	1.25	7.78
aPD1(9048)-IL2-IL2Ra	2.052E-09	1.748E-10	4.42	7.77
NC: 데이터가 4-매개변수 로지스틱 식에 피팅되지 않아, 계산 안함. * 유도 배수는 항체 부재 조건에서 평균 RLU 대비 검사한 용량 범위에서 최고 평균 RLU 값임				

[0342] 이소형 IL2Ra-IL2 (REGN9903), 이소형-IL2(3m) (REGN13234), 항-PD1 표적화된-IL2Ra-IL2 (REGN10597) 및 항-PD1 표적화된-IL2(3m) (REGN13233)는 리포터 세포 상에서 IL2Ra 발현이 부재 (도 9A) 또는 존재 (도 9B)하는 경우 둘다에서 STAT5-구동성 리포터 발현을 용량 의존적으로 증가시켰다 (표 19). PD-1 표적화된 분자는 리포터 세포 상에서 IL2Ra 발현의 부재 (REGN13233: 53pM, REGN10597: 84pM) 또는 존재 (REGN13233: 46pM, REGN10597: 37pM) 하에 비슷한 효력을 발휘하였다. PD1 표적화 부재 조건에서, IL2Ra-IL2 키메라 분자는 IL2(3m) 키메라 분자와 비교해 감소된 효력을 나타내었다.

[0343] **표 19: Ab-IL2Ra-IL2 및 Ab-IL2(3m)의 IL2 리포터 분석 비교**

[0344] **EC_{50} 값과 유도 배수 요약**

표 19

[0345]

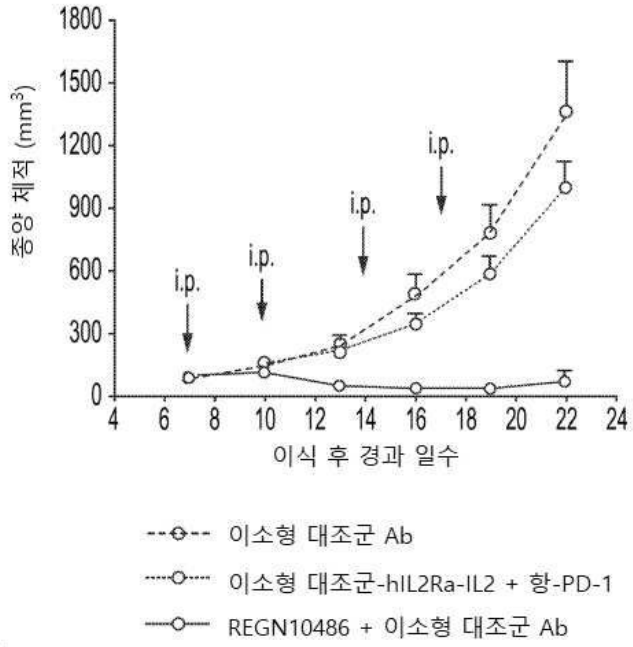
	EC50 (M)		최대 유도 배수*	
	CD25 KO/ PD1 OE	CD25 OE/ PD1 OE	CD25 KO/ PD1 OE	CD25 OE/ PD1 OE
이소형-IL2(3m) [REGN13234]	1.743E-09	3.875E-10	4.25	4.49
이소형-IL2Ra-IL2 [REGN9904]	NC	7.687E-10	3.24	4.57

aPD1(9048)-IL2(3m) [REGN13233]	5.317E-11	4.644E-11	4.24	4.62
aPD1(9048)-IL2Ra-IL2 [REGN10597]	8.383E-11	3.706E-11	4.36	5.10
NC: 데이터가 4-매개변수 로지스틱 식에 피팅되지 않아, 계산 안함. * 유도 배수는 항체 부재 조건에서 평균 RLU 대비 검사한 용량 범위에서 최고 평균 RLU 값임				

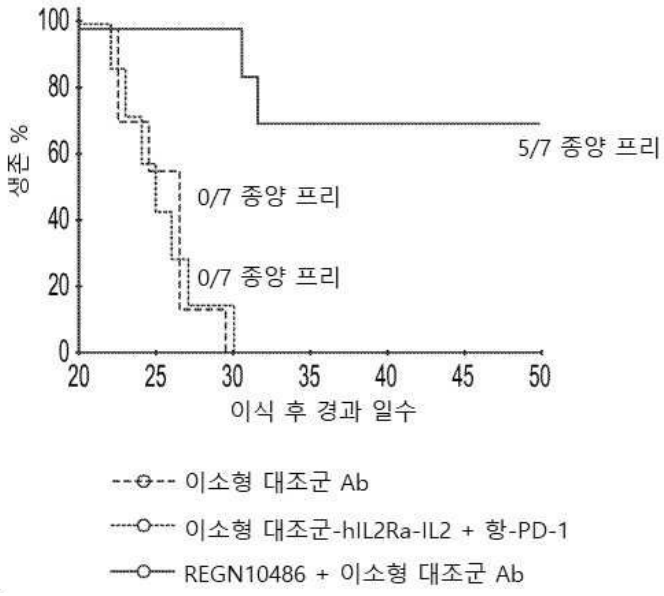
[0346] 본 발명은 본원에 기술된 구체적인 구현예에 의해 범위가 제한되는 것은 아니다. 실제, 당해 기술 분야의 당업자라면 본원에 기술된 내용 외에도 본 개시내용에 대한 다양한 변형도 전술한 설명 및 첨부된 도면으로부터 명확해질 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구항의 범위에 속하는 것으로 의도된다.

도면

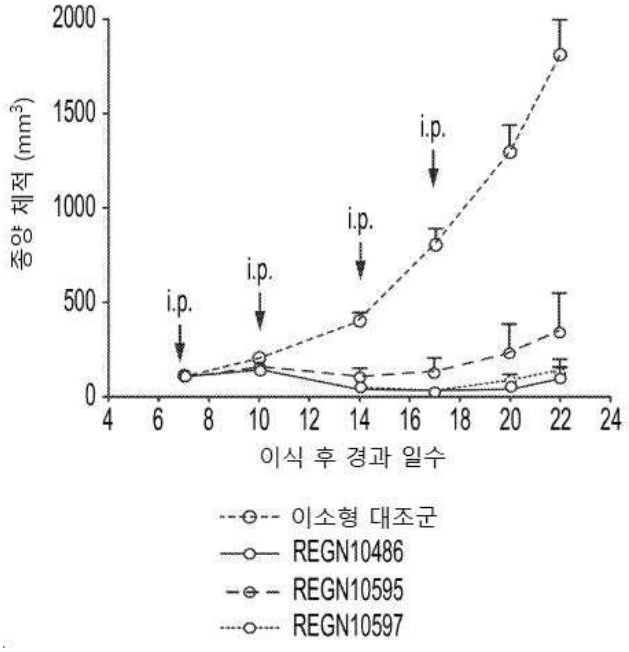
도면1a



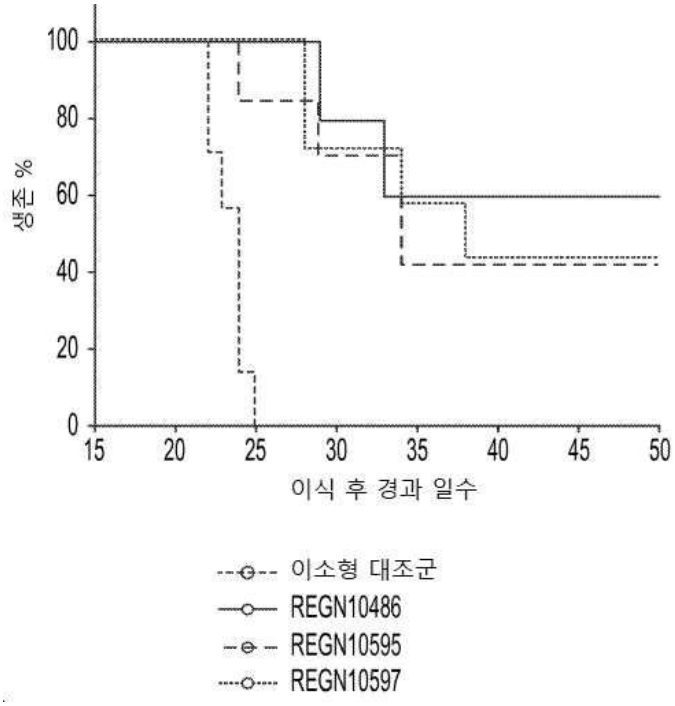
도면1b



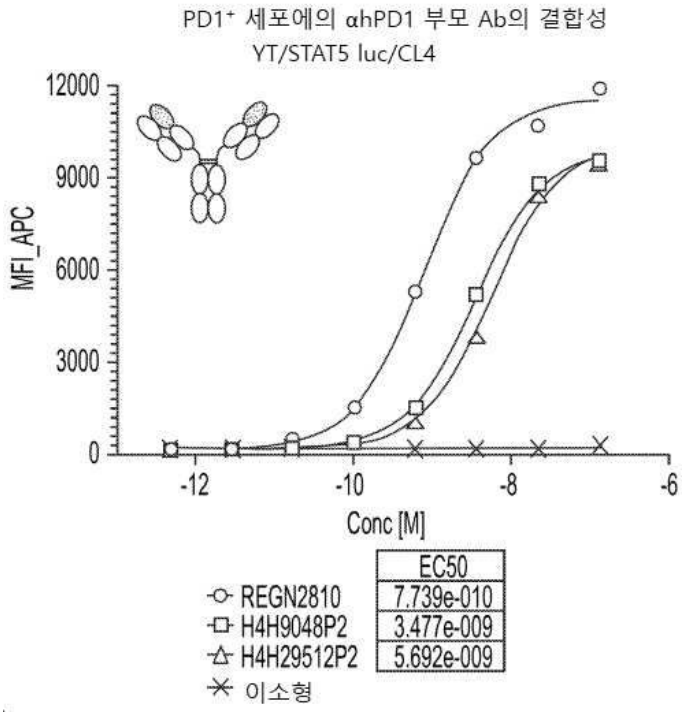
도면1c


종양 체적 (mm³)
2000
1500
1000
500
0
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
i.p.
i.p.
i.p.
i.p.
이식 후 경과 일수
이소형 대조군
REGN10486
REGN10595
REGN10597

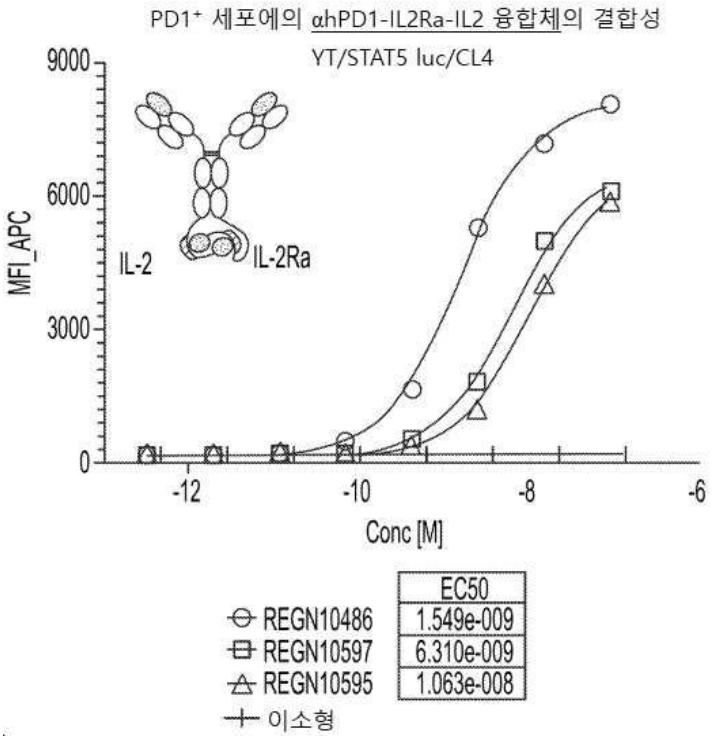
도면1d


생존 %
100
80
60
40
20
0
15
20
25
30
35
40
45
50
이식 후 경과 일수
이소형 대조군
REGN10486
REGN10595
REGN10597

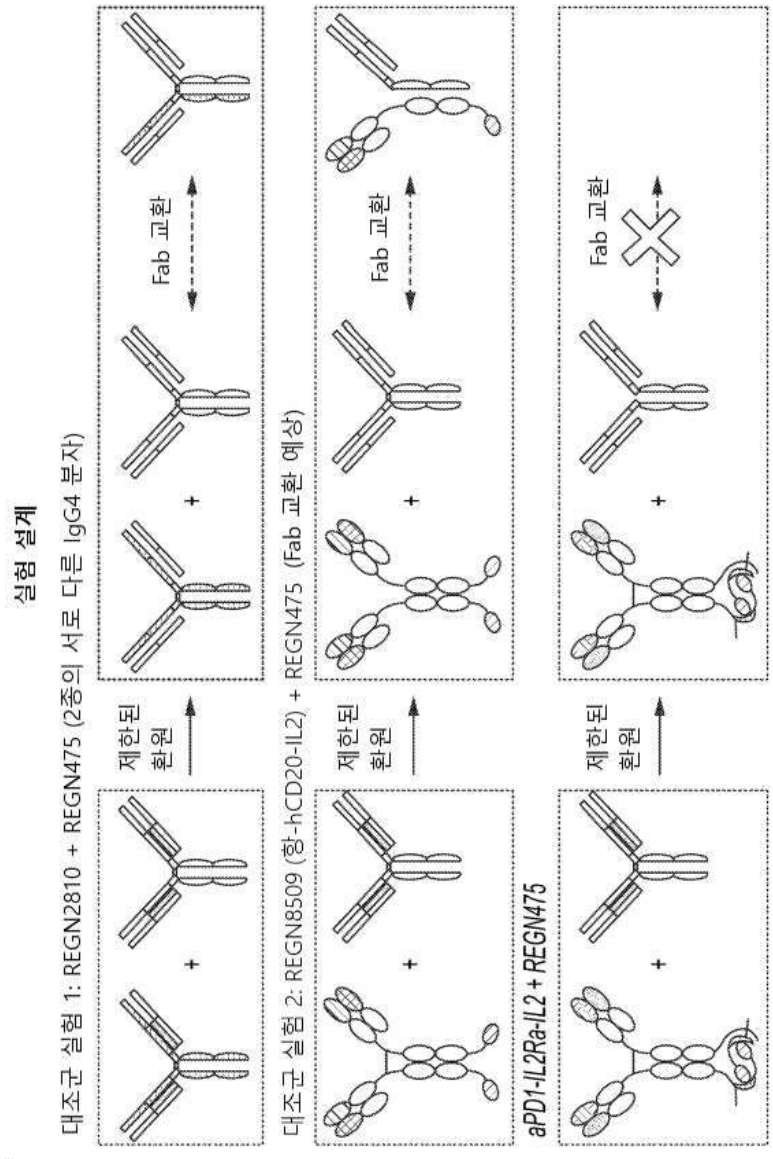
도면2a


PD1+ 세포에의 αhPD1 부모 Ab의 결합성
YT/STAT5 luc/CL4
MFI_APC
12000
9000
6000
3000
0
-12
-10
-8
-6
Conc [M]
EC50
REGN2810 7.739e-010
H4H9048P2 3.477e-009
H4H29512P2 5.692e-009
이소형

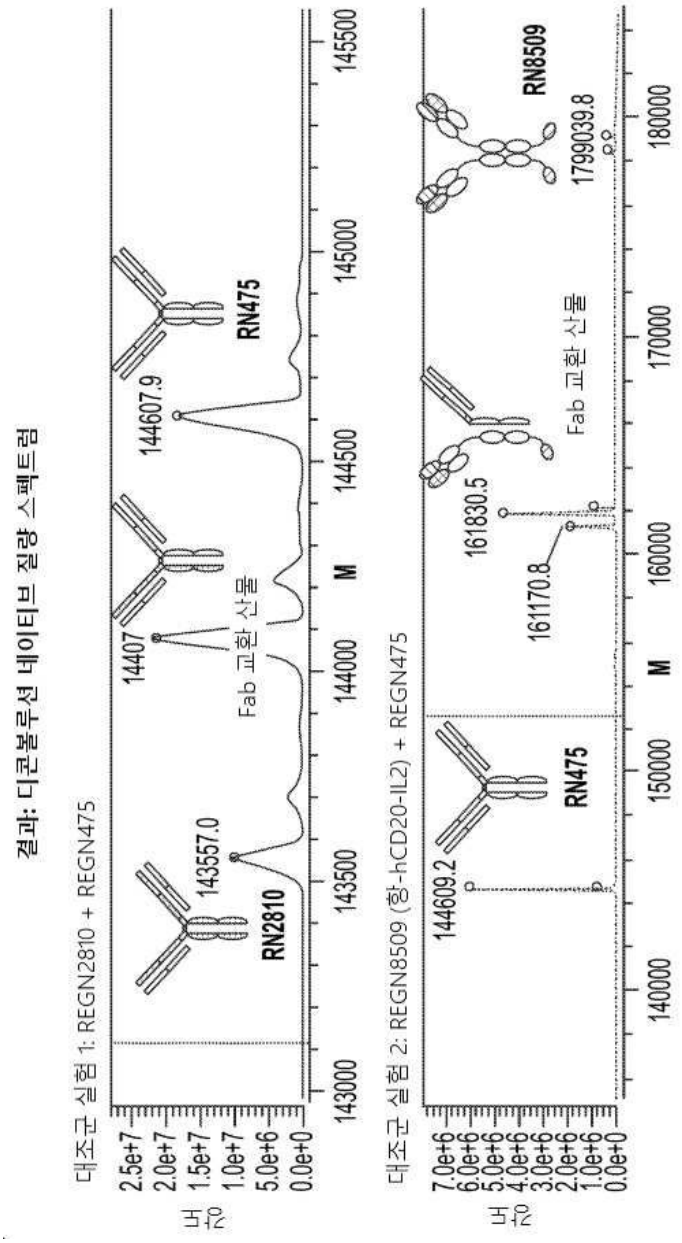
도면2b


PD1+ 세포에의 αhPD1-IL2Ra-IL2 융합체의 결합성
YT/STAT5 luc/CL4
MFI_APC
9000
6000
3000
0
IL-2
IL-2Ra
-12
-10
-8
-6
Conc [M]
EC50
REGN10486 1.549e-009
REGN10597 6.310e-009
REGN10595 1.063e-008
이소형

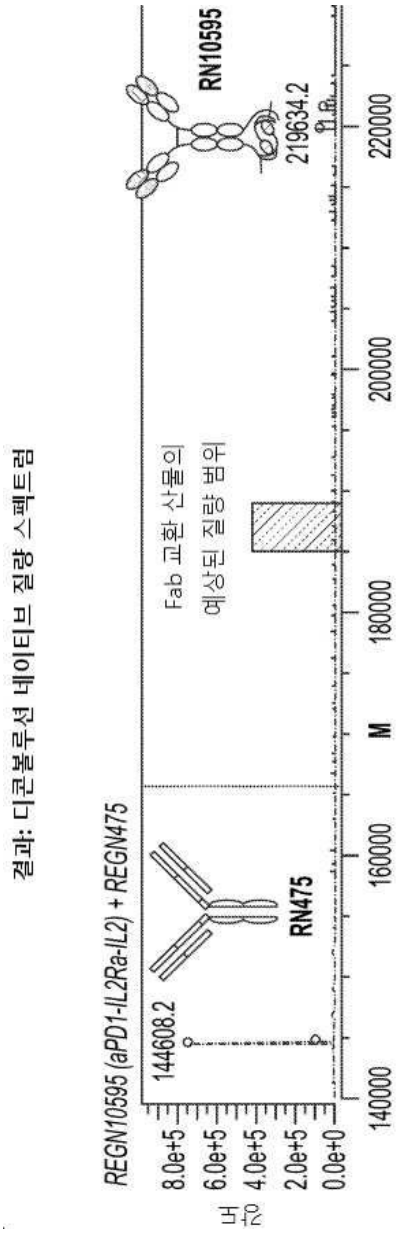
도면3a


실험 설계
대조군 실험 1: REGN2810 + REGN475 (2종의 서로 다른 IgG4 분자)
제한된 환원
Fab 교환
대조군 실험 2: REGN8509 (항-hCD20-IL2) + REGN475 (Fab 교환 예상)
제한된 환원
Fab 교환
aPD1-IL2Ra-IL2 + REGN475
제한된 환원
Fab 교환

도면3b

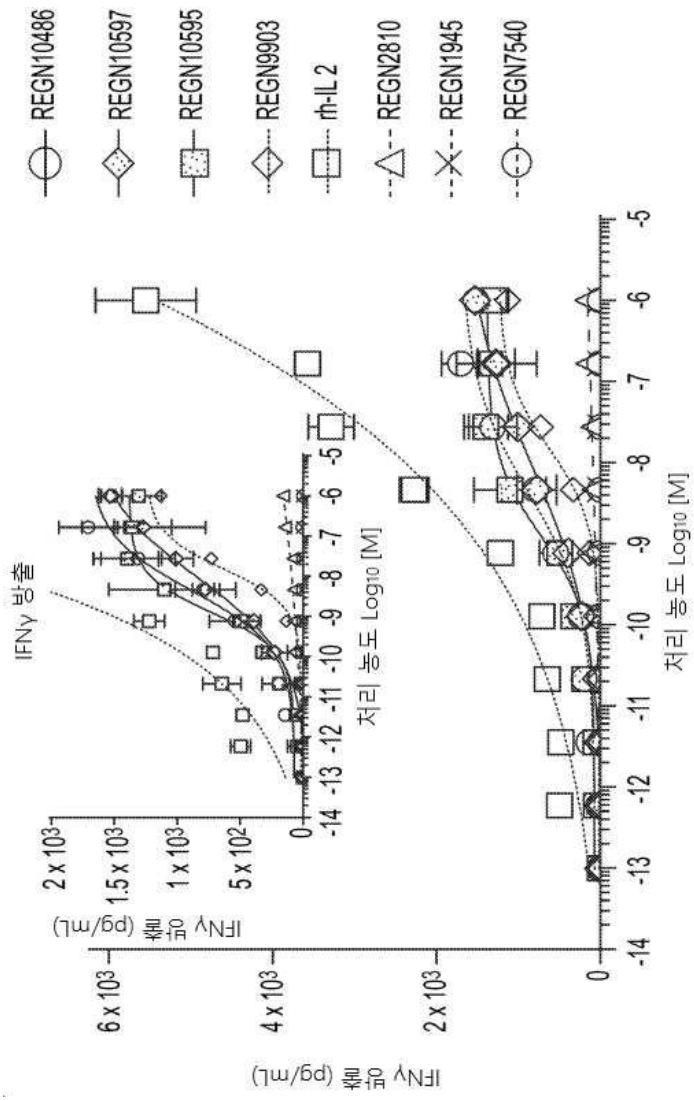

결과: 디콘볼루션 네이티브 질량 스펙트럼
대조군 실험 1: REGN2810 + REGN475
143557.0
RN2810
Fab 교환 산물
144607.9
RN475
M
대조군 실험 2: REGN8509 (항-hCD20-IL2) + REGN475
144609.2
RN475
161170.8
161830.5
Fab 교환 산물
1799039.8
RN8509
M
높음

도면3bb

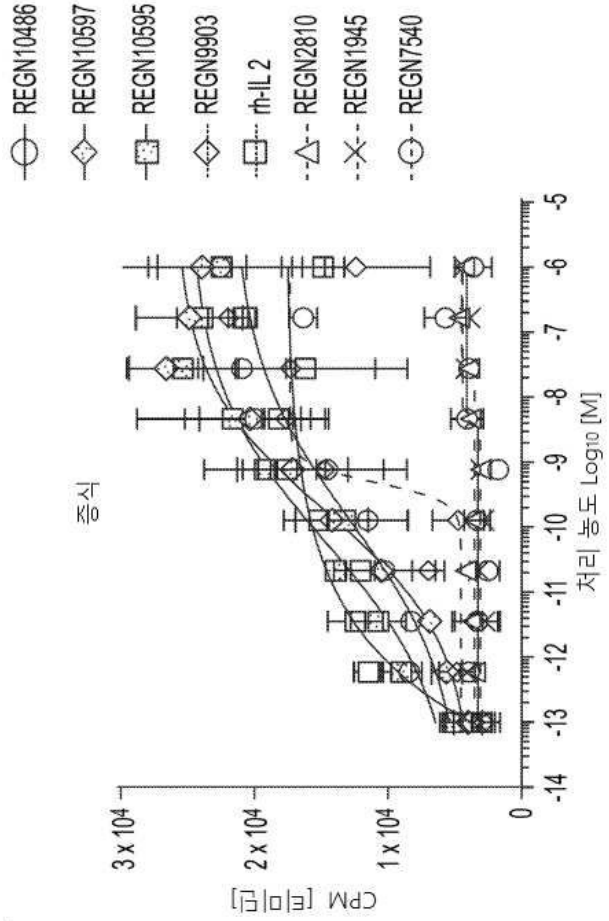

결과: 디콘볼루션 네이티브 질량 스펙트럼
REGN10595 (aPD1-IL2Ra-IL2) + REGN475
144608.2
RN475
Fab 교환 산물의
예상된 질량 범위
RN10595
219634.2
8.0e+5
6.0e+5
4.0e+5
2.0e+5
0.0e+0
강도
140000
160000
180000
200000
220000
M

도 3B
계속

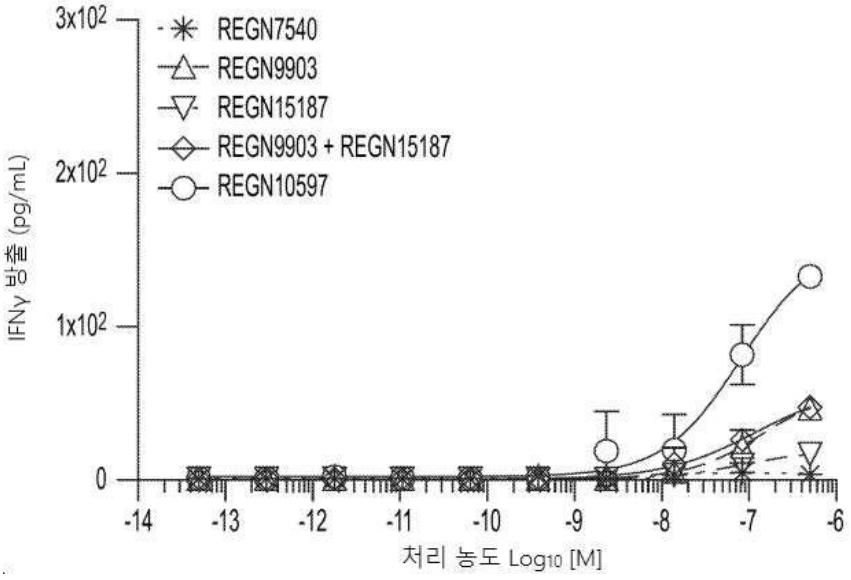
도면4a


REGN10486
REGN10597
REGN10595
REGN9903
rh-IL 2
REGN2810
REGN1945
REGN7540
IFNγ 방출
IFNγ 농도 (pg/mL)
처리 농도 Log10 [M]
IFNγ 농도 (pg/mL)
처리 농도 Log10 [M]

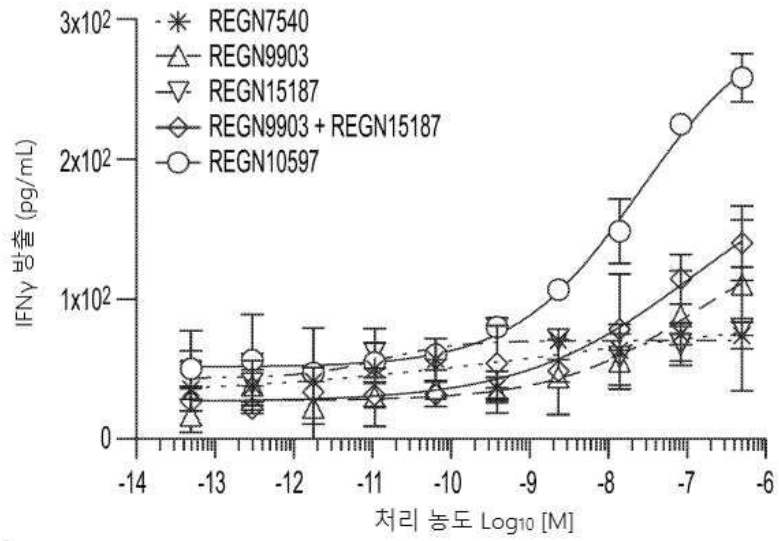
도면4b


REGN10486
REGN10597
REGN10595
REGN9903
rh-IL 2
REGN2810
REGN1945
REGN7540
증식
CPM [타미딘]
3 x 10⁴
2 x 10⁴
1 x 10⁴
0
-5
-6
-7
-8
-9
-10
-11
-12
-13
-14
처리 농도 Log10 [M]

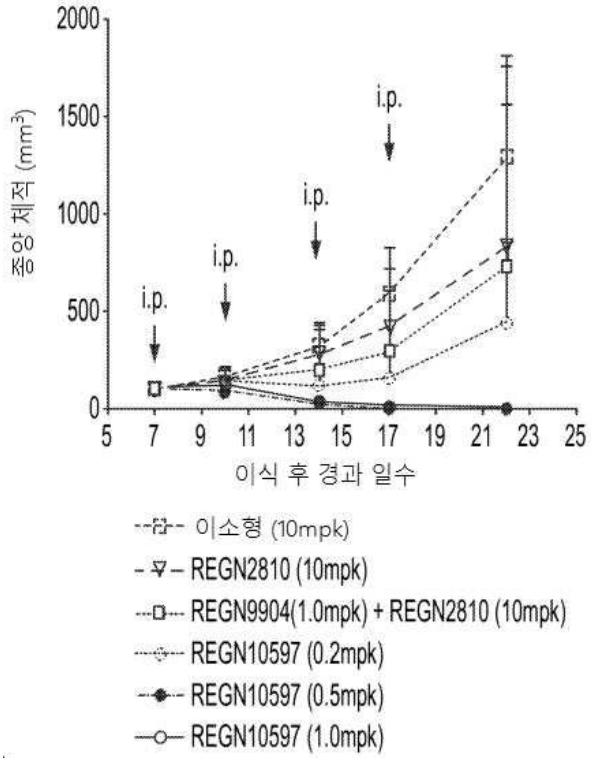
도면5a


3x10²
2x10²
1x10²
0
REGN7540
REGN9903
REGN15187
REGN9903 + REGN15187
REGN10597
IFNγ 방출 (pg/mL)
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
처리 농도 Log10 [M]

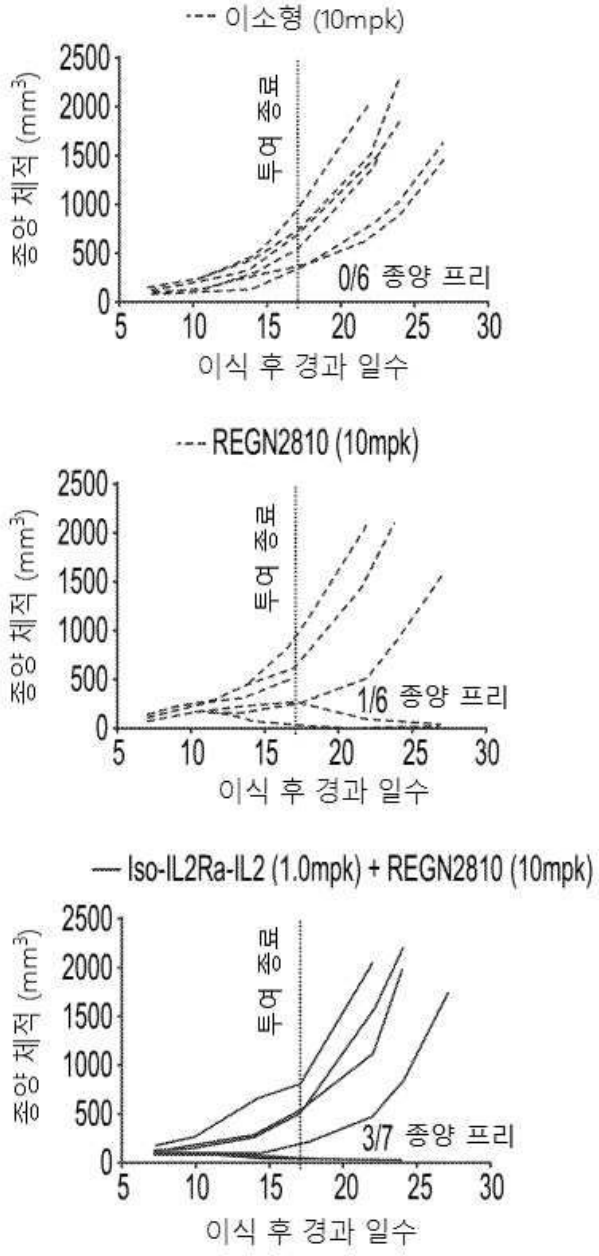
도면5b


3x10²
2x10²
1x10²
0
IFNγ 방출 (pg/mL)
REGN7540
REGN9903
REGN15187
REGN9903 + REGN15187
REGN10597
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
처리 농도 Log10 [M]

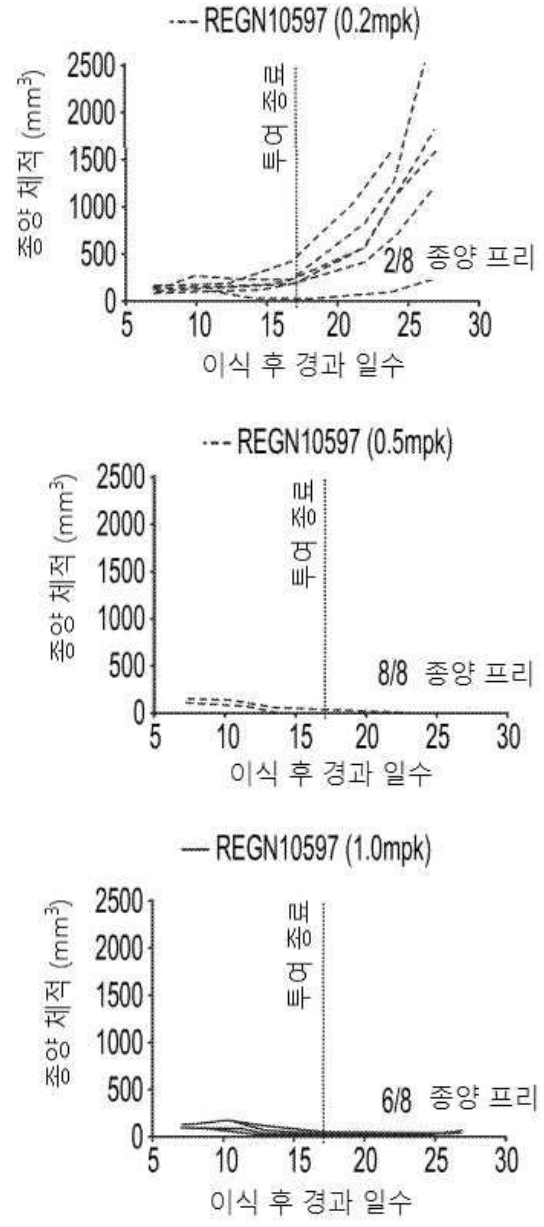
도면6a


2000
1500
1000
500
0
종양 체적 (mm³)
i.p.
i.p.
i.p.
i.p.
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
이식 후 경과 일수
이소형 (10mpk)
REGN2810 (10mpk)
REGN9904(1.0mpk) + REGN2810 (10mpk)
REGN10597 (0.2mpk)
REGN10597 (0.5mpk)
REGN10597 (1.0mpk)

도면6b

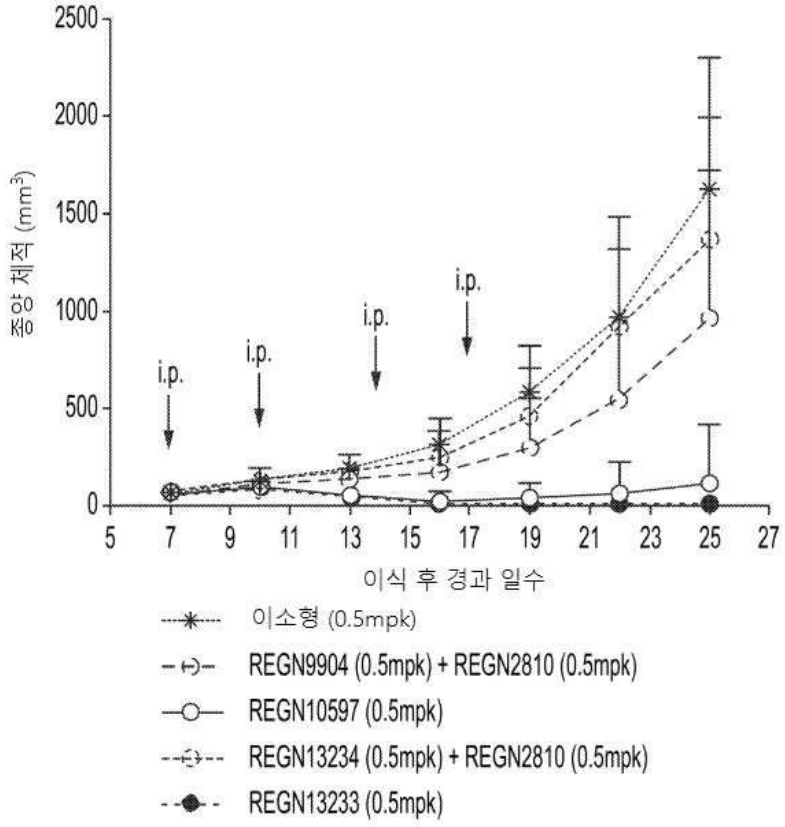

--- 이소형 (10mpk)
종양 체적 (mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
투여 종료
0/6 종양 프리
5
10
15
20
25
30
이식 후 경과 일수
--- REGN2810 (10mpk)
종양 체적 (mm³)
투여 종료
1/6 종양 프리
이식 후 경과 일수
— Iso-IL2Ra-IL2 (1.0mpk) + REGN2810 (10mpk)
종양 체적 (mm³)
투여 종료
3/7 종양 프리
이식 후 경과 일수

도면6bb

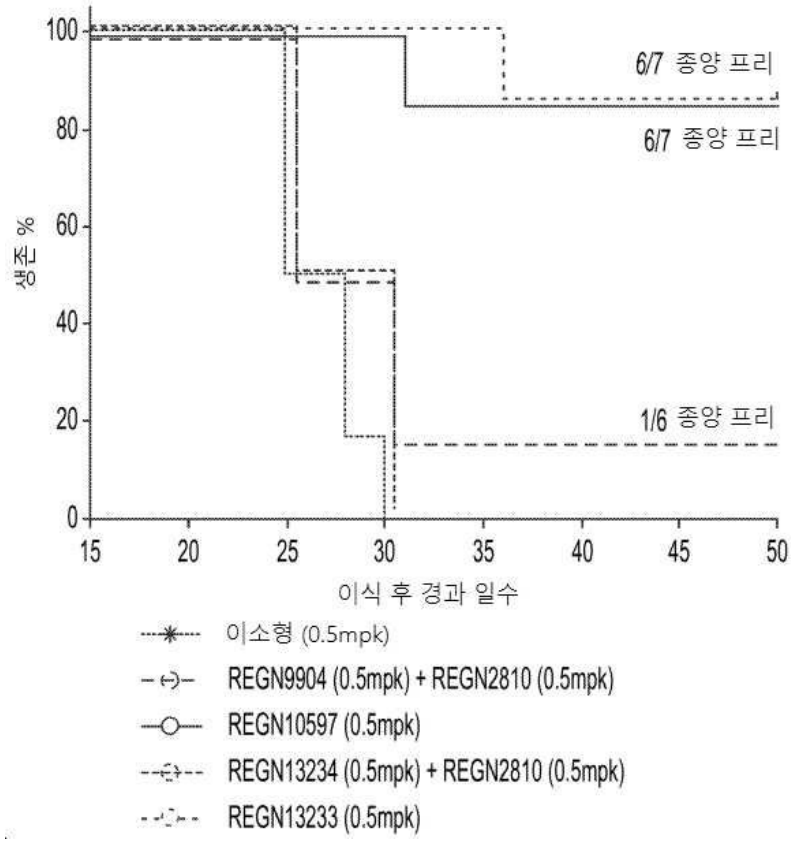

--- REGN10597 (0.2mpk)
종양 체적 (mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
투여 종료
2/8 종양 프리
5
10
15
20
25
30
이식 후 경과 일수
--- REGN10597 (0.5mpk)
종양 체적 (mm³)
투여 종료
8/8 종양 프리
이식 후 경과 일수
— REGN10597 (1.0mpk)
종양 체적 (mm³)
투여 종료
6/8 종양 프리
이식 후 경과 일수

도 6B
계속

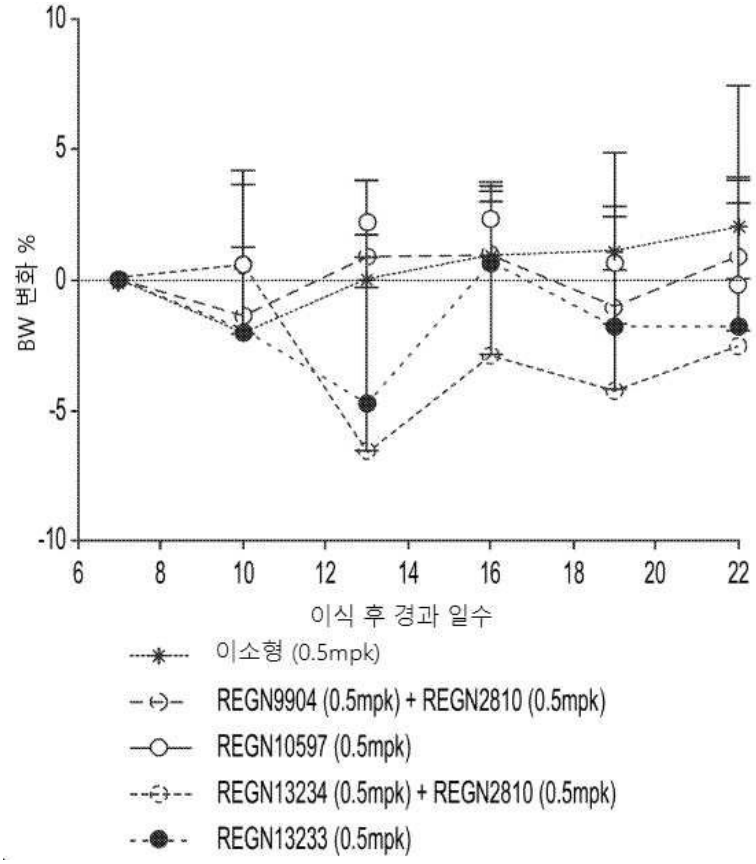
도면6c


종양 체적 (mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
i.p.
i.p.
i.p.
i.p.
5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27
이식 후 경과 일수
이소형 (0.5mpk)
REGN9904 (0.5mpk) + REGN2810 (0.5mpk)
REGN10597 (0.5mpk)
REGN13234 (0.5mpk) + REGN2810 (0.5mpk)
REGN13233 (0.5mpk)

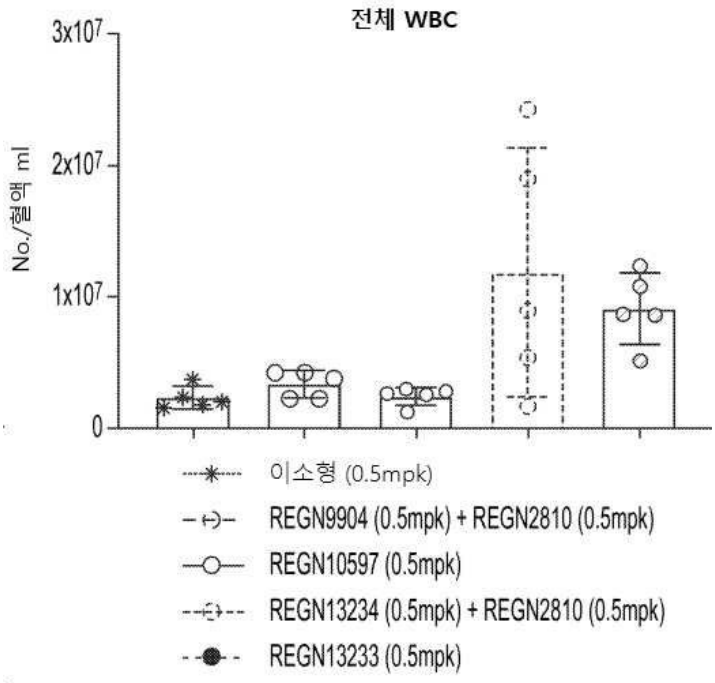
도면6d


생존 %
100
80
60
40
20
0
6/7 종양 프리
6/7 종양 프리
1/6 종양 프리
15 20 25 30 35 40 45 50
이식 후 경과 일수
이소형 (0.5mpk)
REGN9904 (0.5mpk) + REGN2810 (0.5mpk)
REGN10597 (0.5mpk)
REGN13234 (0.5mpk) + REGN2810 (0.5mpk)
REGN13233 (0.5mpk)

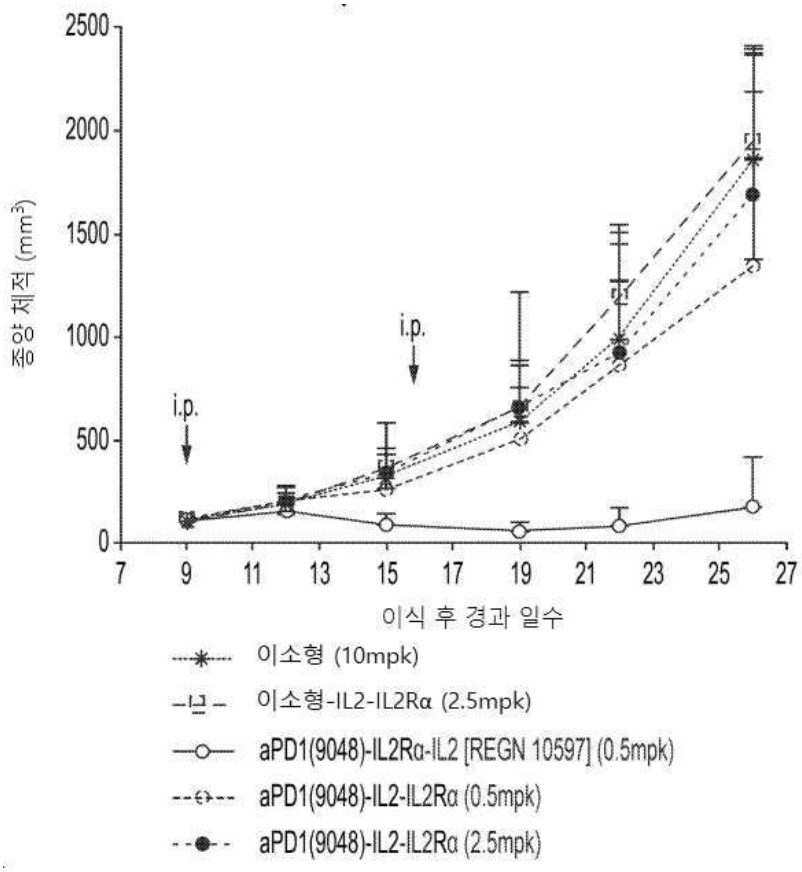
도면6e


10
5
0
-5
-10
BW 변화 %
6
8
10
12
14
16
18
20
22
이식 후 경과 일수
이소형 (0.5mpk)
REGN9904 (0.5mpk) + REGN2810 (0.5mpk)
REGN10597 (0.5mpk)
REGN13234 (0.5mpk) + REGN2810 (0.5mpk)
REGN13233 (0.5mpk)

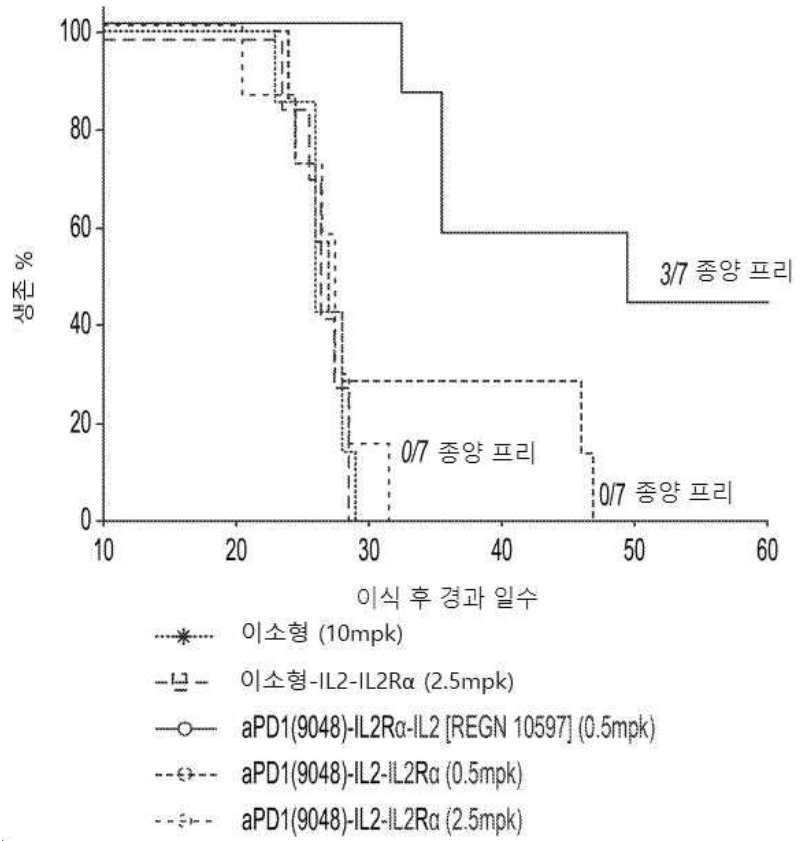
도면6f


전체 WBC
3x10⁷
2x10⁷
1x10⁷
0
No./혈액 ml
이소형 (0.5mpk)
REGN9904 (0.5mpk) + REGN2810 (0.5mpk)
REGN10597 (0.5mpk)
REGN13234 (0.5mpk) + REGN2810 (0.5mpk)
REGN13233 (0.5mpk)

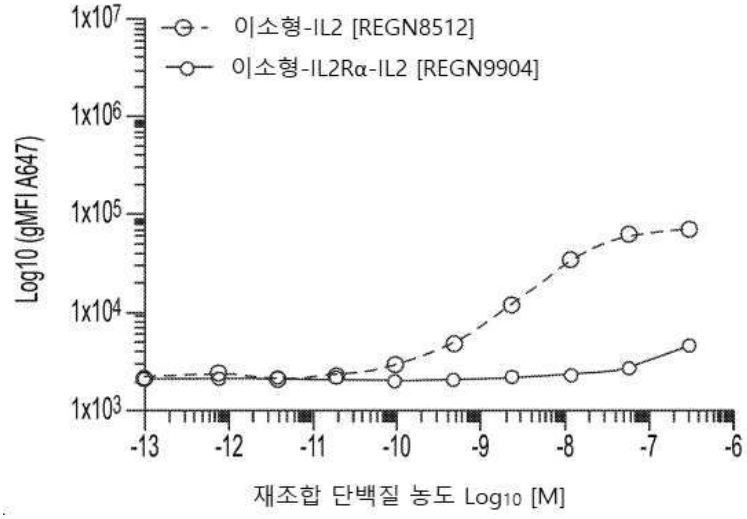
도면6g


종양 체적 (mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
i.p.
i.p.
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27
이식 후 경과 일수
이소형 (10mpk)
이소형-IL2-IL2Rα (2.5mpk)
aPD1(9048)-IL2Rα-IL2 [REGN 10597] (0.5mpk)
aPD1(9048)-IL2-IL2Rα (0.5mpk)
aPD1(9048)-IL2-IL2Rα (2.5mpk)

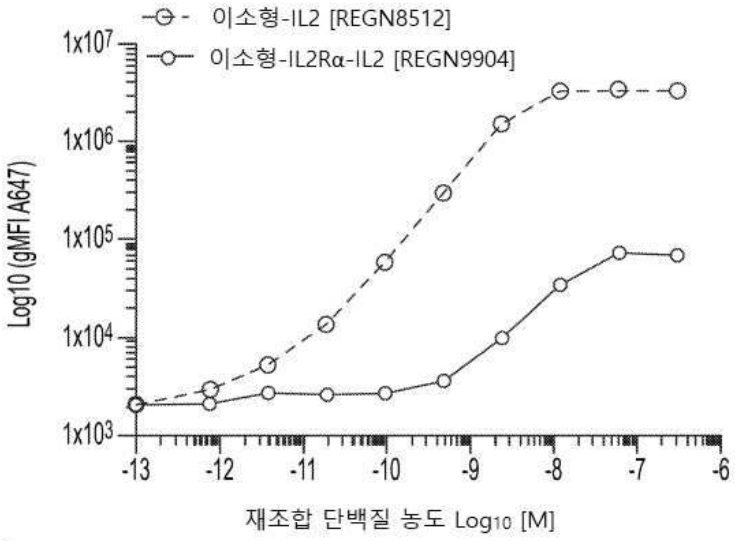
도면6h


생존 %
100
80
60
40
20
0
10
20
30
40
50
60
3/7 종양 프리
0/7 종양 프리
0/7 종양 프리
이식 후 경과 일수
이소형 (10mpk)
이소형-IL2-IL2Rα (2.5mpk)
aPD1(9048)-IL2Rα-IL2 [REGN 10597] (0.5mpk)
aPD1(9048)-IL2-IL2Rα (0.5mpk)
aPD1(9048)-IL2-IL2Rα (2.5mpk)

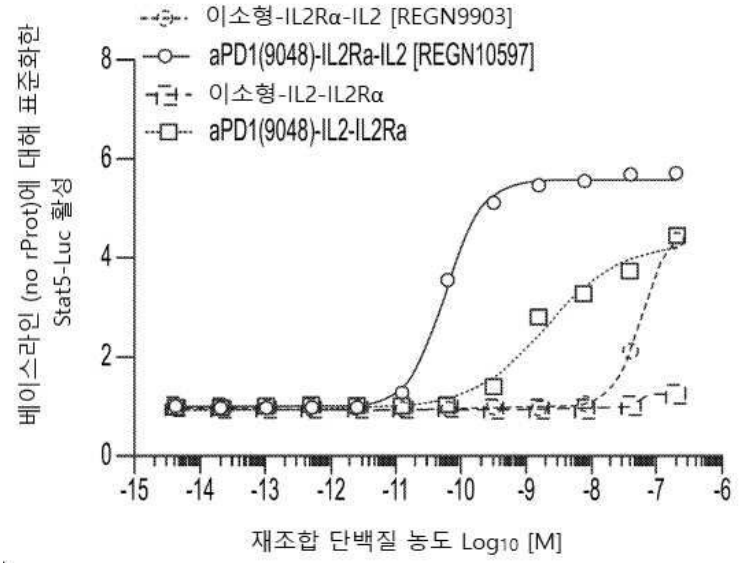
도면7a


이소형-IL2 [REGN8512]
이소형-IL2Rα-IL2 [REGN9904]
Log10 (gMFI A647)
1x10^7
1x10^6
1x10^5
1x10^4
1x10^3
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
재조합 단백질 농도 Log10 [M]

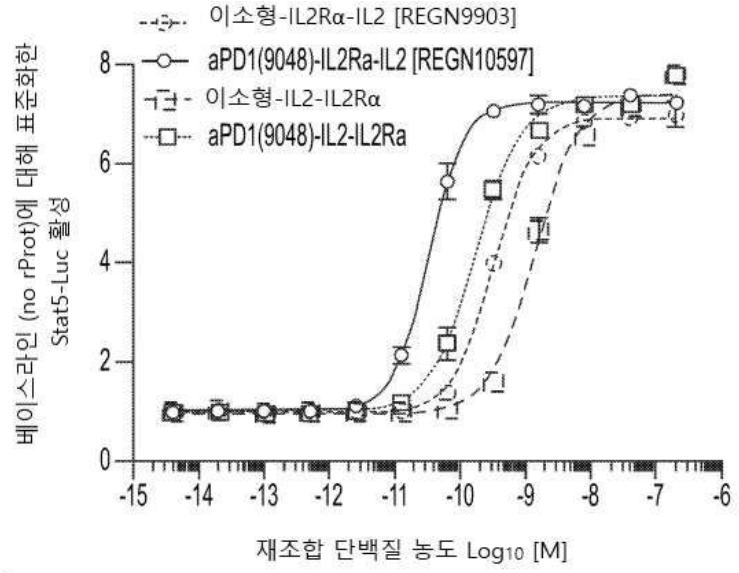
도면7b


이소형-IL2 [REGN8512]
이소형-IL2Rα-IL2 [REGN9904]
Log10 (gMFI A647)
1x10^7
1x10^6
1x10^5
1x10^4
1x10^3
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
재조합 단백질 농도 Log10 [M]

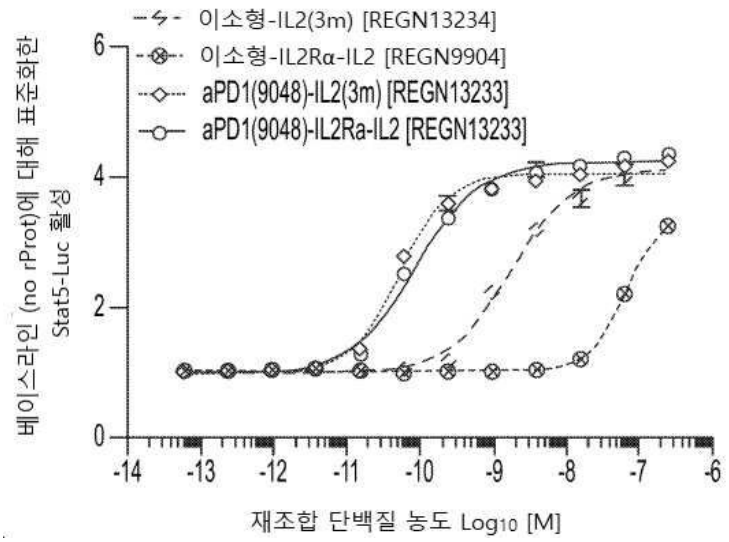
도면8a


이소형-IL2Rα-IL2 [REGN9903]
aPD1(9048)-IL2Ra-IL2 [REGN10597]
이소형-IL2-IL2Rα
aPD1(9048)-IL2-IL2Ra
베이스라인 (no rProt)에 대해 표준화한 Stat5-Luc 활성
재조합 단백질 농도 Log10 [M]

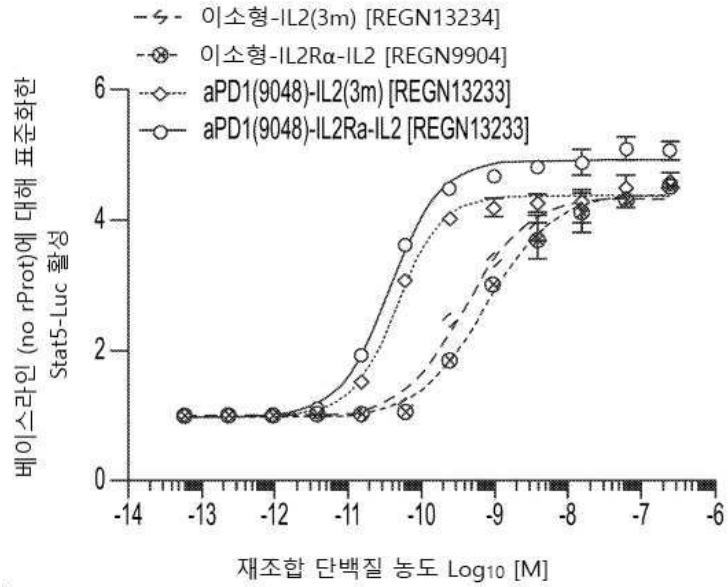
도면8b


이소형-IL2Rα-IL2 [REGN9903]
aPD1(9048)-IL2Ra-IL2 [REGN10597]
이소형-IL2-IL2Rα
aPD1(9048)-IL2-IL2Ra
베이스라인 (no rProt)에 대해 표준화한 Stat5-Luc 활성
재조합 단백질 농도 Log10 [M]

도면9a



도면9b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> IL2-Based Therapeutics and Methods of Use Thereof

<130> 179227.02702; 10949WO01

<160> 75

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

caggtgcagc tggtacagtc tgggactgag gtgaggaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaaga cttctggagt caccttcaac aattatgcca tcacctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggagga atcatccccg tctttagtcc accaaactac 180

gcacagaaat ttcagggcag agtcacgatt accgcggacg agtccacgaa cacagcctac 240

atggagctga acagcctgag atctgatgac acggccatat atttctgtgc gagagagggg 300

gaacgtggat acacgtatgg ttatgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

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

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

Ala Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

ggagtcacct tcaacaatta tgcc 24

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

Gly Val Thr Phe Asn Asn Tyr Ala

1 5

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

atcatccccg tctttagtcc acca 24

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

Ile Ile Pro Val Phe Ser Pro Pro

1 5

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

gcgagagagg gggaacgtgg atacacgtat ggttatgact ac 42

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

Ala Arg Glu Gly Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Tyr Asp Tyr

1 5 10

<210> 9

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 10

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 11

cagagcatta gcagctat 18

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 12

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 13

gctgcatcc 9

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

Ala Ala Ser

1

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

caacagagtt acagtacccc tccgatcacc 30

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 16

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr

1 5 10

<210> 17

<211> 1347

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 17

caggtgcagc tggtacagtc tgggactgag gtgaggaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaaga cttctggagt caccttcaac aattatgcca tcacctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggagga atcatccccg tctttagtcc accaaactac 180

gcacagaaat ttcagggcag agtcacgatt accgcggacg agtccacgaa cacagcctac 240

atggagctga acagcctgag atctgatgac acggccatat atttctgtgc gagagagggg 300

gaacgtggat acacgtatgg ttatgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360

tcagcctcca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 420

gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag 600

acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 660

tccaaatatg gtcccccatg cccaccctgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca 720

gtcttcctgt tcccccccaaa acccaaggac actctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780

acgtgcgtgg tggtggacgt gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 840

gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg 900

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960

aagtgcaagg tctccaacaa aggcctcccg tcctccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020

aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc 1080

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1140

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200

tccgacggct ccttcttcct ctacagcagg ctcaccgtgg acaagagcag gtggcaggag 1260

gggaatgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag 1320

tccctctccc tgtctctggg taaatga 1347

<210> 18

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Ser Pro Pro Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

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

115 120 125

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

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

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

405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440 445

<210> 19

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 19

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttag 648

<210> 20

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 20

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 21

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 21

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagtt ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt aattttggca tgacgtgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg gactggagtg ggtctcaggt attagtggtg gcggtcgtga cacatacttc 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa tacgttgtat 240

ctacagatga acagcctgaa aggcgaggac acggccgtat attactgtgt gaagtgggga 300

aatatttact ttgactactg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc a 351

<210> 22

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 22

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe

20 25 30

Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Lys Trp Gly Asn Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 23

ggattcacct ttagtaattt tggc 24

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 24

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Gly

1 5

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 25

attagtggtg gcggtcgtga caca 24

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 26

Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr

1 5

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 27

gtgaagtggg gaaatattta ctttgactac 30

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 28

Val Lys Trp Gly Asn Ile Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 29

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cagcatcacc 60

atcacttgcc gggcgagtct gtccattaac acctttttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct gcgtccagtt tacatggtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagcggctc tgggacagat ttcactctca ccatcagaac tcttcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttccaata ccccattcac tttcggccct 300

gggaccgtag tggatttcag a 321

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 30

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

Asp Ser Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Leu Ser Ile Asn Thr Phe
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu His Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Thr Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Val Val Asp Phe Arg
100 105

<210> 31

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 31

ctgtccatta acaccttt 18

<210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 32

Leu Ser Ile Asn Thr Phe

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 33

gctgcgtcc 9

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 34

caacagagtt ccaatacccc attcact 27

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 35

Gln Gln Ser Ser Asn Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 36

<211> 1335

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 36

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagtt ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt aattttggca tgacgtgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg gactggagtg ggtctcaggt attagtggtg gcggtcgtga cacatacttc 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa tacgttgtat 240

ctacagatga acagcctgaa aggcgaggac acggccgtat attactgtgt gaagtgggga 300

aatatttact ttgactactg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc agcctccacc 360

aagggcccat cggtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc 420

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 540

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc 600

aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt 660

cccccatgcc caccctgccc agcacctgag ttcctggggg gaccatcagt cttcctgttc 720

cccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg 780

gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 840

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc 900

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960

tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1020

cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1080

agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1200

ttcttcctct acagcaggct caccgtggac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc 1260

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagtc cctctccctg 1320

tctctgggta aatga 1335

<210> 37

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 37

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe

20 25 30

Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

```
        35                  40                  45
Ser Gly Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr Tyr Phe Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
    210                 215                 220
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225                 230                 235                 240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
                245                 250                 255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
            260                 265                 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
        275                 280                 285
```

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

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

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 38
<211> 645
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 38
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cagcatcacc 60

atcacttgcc gggcgagtct gtccattaac acctttttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct gcgtccagtt tacatggtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagcggctc tgggacagat ttcactctca ccatcagaac tcttcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttccaata ccccattcac tttcggccct 300
gggaccgtag tggatttcag acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 39

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 39

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

1 5 10 15

Asp Ser Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Leu Ser Ile Asn Thr Phe

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu His Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Thr Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Thr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Val Val Asp Phe Arg Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

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

<210> 40
<211> 363
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 40
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaggc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg tatctggagt caccttcagg aattttgcta tcatctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagga atcatccctt tctttagtgc agcaaattac 180
gcacagagct tccagggcag agtcacgatt accccggacg aatccacgag cacagccttc 240
atggagctgg ccagtctgag atctgaggac acggccgttt attattgtgc gagagagggg 300
gaacgtggac acacctatgg gtttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360

tca 363
<210> 41
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 41
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Val Thr Phe Arg Asn Phe
20 25 30
Ala Ile Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 42
ggagtcacct tcaggaattt tgct 24

<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 43
Gly Val Thr Phe Arg Asn Phe Ala
1 5

<210> 44
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic

<400> 44

atcatccctt tctttagtgc agca 24

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 45

Ile Ile Pro Phe Phe Ser Ala Ala

1 5

<210> 46

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 46

gcgagagagg gggaacgtgg acacacctat gggtttgact ac 42

<210> 47

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Synthetic

<400> 47

Ala Arg Glu Gly Glu Arg Gly His Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 48

<211> 1347

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 48

caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaggc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg tatctggagt caccttcagg aattttgcta tcatctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggagga atcatccctt tctttagtgc agcaaattac 180

gcacagagct tccagggcag agtcacgatt accccggacg aatccacgag cacagccttc 240

atggagctgg ccagtctgag atctgaggac acggccgttt attattgtgc gagagagggg 300

gaacgtggac acacctatgg gtttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360

tcagcctcca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 420

gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag 600

acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 660

tccaaatatg gtcccccatg cccaccctgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca 720

gtcttcctgt tcccccaaa acccaaggac actctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780

acgtgcgtgg tggtggacgt gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 840

gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg 900

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960

aagtgcaagg tctccaacaa aggcctcccg tcctccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020

aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc 1080

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1140

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200

tccgacggct ccttcttcct ctacagcagg ctcaccgtgg acaagagcag gtggcaggag 1260

gggaatgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag 1320

tccctctccc tgtctctggg taaatga 1347

<210> 49

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 49

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Phe Phe Ser Ala Ala Asn Tyr Ala Gln Ser Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Pro Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Gly Glu Arg Gly His Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

260 265 270

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

275 280 285

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

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

385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 50
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic
<400> 50
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 51
<211> 165
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 51

Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys
1 5 10 15

Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg
20 25 30

Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly
35 40 45

Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser
50 55 60

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

Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp
85 90 95

Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn
100 105 110

Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr
115 120 125

Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu
130 135 140

Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln
145 150 155 160

Leu Ile Cys Thr Gly
165

<210> 52

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 52

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 53

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 53

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210

> 54

<211> 323

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 54

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

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

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

180 185 190
Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu
195 200 205
Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro
210 215 220
Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala
225 230 235 240
Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile

290 295 300

Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser

305 310 315 320

Thr Leu Thr

<210> 55

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 56

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 56

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

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

85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 57

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 57

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

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

85 90 95

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

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

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

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 58
<211> 215
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 58
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

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

85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala

100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 59

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 59

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe

20 25 30

Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Lys Trp Gly Asn Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

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

210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro

225 230 235 240

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

245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn

260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
340 345 350
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

370 375 380
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400
Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
405 410 415
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 60
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 60
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Ser Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Leu Ser Ile Asn Thr Phe
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu His Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Thr Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 61
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 61
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Val Thr Phe Arg Asn Phe

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Pro Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80
Met Glu Leu Ala Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

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

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

210 215 220
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

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

405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440 445

<210> 62

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 62

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 63
<211> 781
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 63

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

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

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

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220
Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255
Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
260 265 270
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285
Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val

290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320
Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
340 345 350
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400
Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
405 410 415
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser
435 440 445
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Cys Asp Asp Asp
450 455 460
Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu
465 470 475 480
Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys
485 490 495

Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser
500 505 510
Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr
515 520 525
Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr
530 535 540

Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly
545 550 555 560

His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile
565 570 575
Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly
580 585 590
Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr
595 600 605
His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Gly
610 615 620

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
625 630 635 640
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys
645 650 655
Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile
660 665 670
Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu
675 680 685

Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu
690 695 700
Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu
705 710 715 720
Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn
725 730 735
Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met
740 745 750

Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg
755 760 765
Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
770 775 780

<210> 64

<211> 785

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 64

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

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

Ala Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

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

405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly

435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu

450 455 460

Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys Ala Met

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr

515 520 525

Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu

530 535 540

Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp Gln Ala

545 550 555 560

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

565 570 575

Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln

580 585 590

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

595 600 605

Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile

610 615 620

Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

625 630 635 640

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser

645 650 655

Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp

660 665 670

Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu

675 680 685

Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu

690 695 700

Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu
705 710 715 720
Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp

725 730 735
Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu
740 745 750
Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu
755 760 765
Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu
770 775 780
Thr
785

<210> 65
<211> 785
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 65
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Val Thr Phe Arg Asn Phe
20 25 30
Ala Ile Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Phe Phe Ser Ala Ala Asn Tyr Ala Gln Ser Phe

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

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

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385 390 395 400

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

405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Gly

435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu

450 455 460

Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys Ala Met

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr

515 520 525

Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu

530 535 540

Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp Gln Ala

545 550 555 560

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

565 570 575

Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln

580 585 590

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

595 600 605

Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile

610 615 620

Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

625 630 635 640

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser

645 650 655

Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp

660 665 670

Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu

675 680 685

Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu

690 695 700

Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu

705 710 715 720

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

725 730 735

Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu

740 745 750

Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu

755 760 765

Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu

770 775 780

Thr

785

<210> 66

<211> 174

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 66

Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro

35 40 45

Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln

50 55 60

Pro Gly Gln Asp Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg

65 70 75 80

Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr

85 90 95

Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu

100 105 110

Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro

115 120 125

Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr

130 135 140

Leu Val Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln

145 150 155 160

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His

165 170

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 67

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 68

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 68

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 69

Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 70

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 70

Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 71

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 72

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 73

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 74

<211> 366

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 74

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

130 135 140

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe

145 150 155 160

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

165 170 175

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val

180 185 190

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

195 200 205

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

210 215 220

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

225 230 235 240

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

245 250 255

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

260 265 270

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

275 280 285

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

290 295 300

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

305 310 315 320

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

325 330 335

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

340 345 350

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

355 360 365

<210> 75

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 75

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130