



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월13일

(11) 등록번호 10-2602137

(24) 등록일자 2023년11월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7003493
- (22) 출원일자(국제) 2017년07월05일
 심사청구일자 2020년07월03일
- (85) 번역문제출일자 2019년02월01일
- (65) 공개번호 10-2019-0026843
- (43) 공개일자 2019년03월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/040665
- (87) 국제공개번호 WO 2018/009507
 국제공개일자 2018년01월11일
- (30) 우선권주장
 62/359,073 2016년07월06일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 JP2015209376 A*
 WO2006121168 A1*
 WO2007005874 A2*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
 브리스톨-마이어스 스텝 컴퍼니
 미국, 뉴저지 08543-4000, 프린스턴, 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드
- (72) 발명자
 도일, 손
 미국 98117 워싱턴주 시애틀 26번 애비뉴 노스웨스트 9657
 셀비, 마크, 제이.
 미국 94063 캘리포니아주 레드우드 시티 베이 로드 700
 채드워, 에릭
 미국 98007 워싱턴주 벨뷰 153번 애비뉴 사우스이스트 2503
- (74) 대리인
 양영준

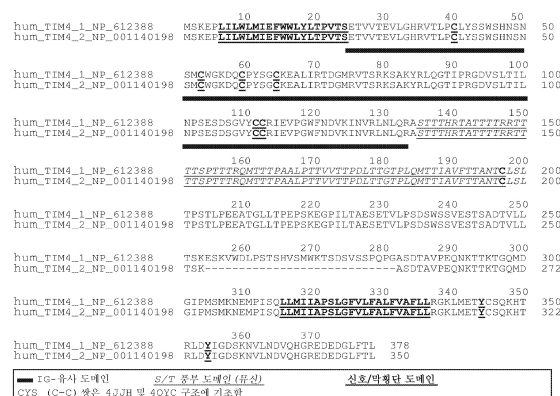
전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 유준석

(54) 발명의 명칭 TIM-4 길항제 및 PD-1 길항제의 조합물 및 사용 방법

(57) 요약

유효량의 PD-1 길항제 (예를 들어, 항체)를 TIM-4 길항제 (예를 들어, 항체)와 조합하여 사용하여 암을 치료하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다.

대표도

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2818 (2013.01)

A61K 2039/507 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서 암을 치료하기 위한 제약 조성물이며, PD-1 길항제 항체를 포함하는 제1 조성물을 포함하고, 상기 제1 조성물은 TIM-4 길항제 항체를 포함하는 제2 조성물과 조합되어 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 제2 조성물이 인간 TIM-4의 IgV 도메인에 결합하는 TIM-4 길항제 항체를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 제1 조성물의 PD-1 길항제 항체가

(a) 서열식별번호: 13에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 15에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인; 또는

(b) 서열식별번호: 1에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 3에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인

을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 제1 조성물의 PD-1 길항제 항체가

(a) 서열식별번호: 17에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 18에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 19에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 20에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 21에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 22에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 CDR3; 또는

(b) 서열식별번호: 5에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 6에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열식별번호: 7에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열식별번호: 8에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열식별번호: 9에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열식별번호: 10에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 CDR3

을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, PD-1 길항제 항체가

(a) 각각 서열식별번호: 13 및 15에 제시된 서열을 갖는 중쇄 및 경쇄 가변 영역;

(b) 각각 서열식별번호: 11 및 12에 제시된 서열을 갖는 중쇄 및 경쇄; 또는

(c) 각각 서열식별번호: 1 및 3에 제시된 서열을 갖는 중쇄 및 경쇄 가변 영역

을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 조성물 및 제2 조성물이 정맥내 투여를 위해 제제화되는 것인 제약 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 백혈병, 림프종, 모세포종, 암종, 육종, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 위장암, 결장직장암, 교모세포종 및 결장 암종으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 제약 조성물.

청구항 8

PD-1 길항제 항체 및 TIM-4 길항제 항체를 포함하는, 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, PD-1 길항제 항체가

(a) 서열식별번호: 13에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 15에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인; 또는

(b) 서열식별번호: 1에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 3에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인

을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, PD-1 길항제 항체가

(a) 각각 서열식별번호: 13 및 15에 제시된 서열을 갖는 중쇄 및 경쇄 가변 영역;

(b) 각각 서열식별번호: 11 및 12에 제시된 서열을 갖는 중쇄 및 경쇄; 또는

(c) 각각 서열식별번호: 1 및 3에 제시된 서열을 갖는 중쇄 및 경쇄 가변 영역

을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, TIM-4 길항제 항체가 인간 TIM-4의 IgV 도메인에 결합하는 항체인 제약 조성물.

청구항 12

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 백혈병, 림프종, 모세포종, 암종, 육종, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 위장암, 결장직장암, 교모세포종 및 결장 암종으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 제약 조성물.

청구항 13

(a) PD-1 길항제 항체를 포함하는 제1 제약 조성물;

(b) TIM-4 길항제 항체를 포함하는 제2 제약 조성물; 및

(c) 대상체에서 암을 치료하는 방법에 제1 제약 조성물 및 제2 제약 조성물을 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 데에 사용하기 위한 키트.

청구항 14

제13항에 있어서, 암이 백혈병, 림프종, 모세포종, 암종, 육종, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 위장암, 결장직장암, 교모세포종 및 결장 암종으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 키트.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2016년 7월 6일에 제출된 미국 가출원 번호 62/359073에 대한 우선권을 청구한다. 상기 언급된 출원의 내용은 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

- [0003] 미국 국립 암 연구소는 미국에서만 3명 중 1명이 일생 동안 암에 걸리는 것으로 추정하고 있다. 더욱이, 암에 걸린 사람들의 대략 50% 내지 60%는 결국 질환으로 사망할 것이다. 종양 세포가 원발성 부위로부터 누출되면, 그들은 림프계 및/또는 순환계를 통과하고 궁극적으로 소수는 원위 부위에 정착하여 전이를 일으키는 데, 선진국에서 고형 종양으로 인한 사망의 95%는 전이로 인한 것이다.
- [0004] 암 종양의 광범위한 발생은 개선된 항암 요법에 대한 필요성을 강조한다. 그러나, 다중모드 요법에서의 진전에도 불구하고, 암 환자에서의 전체 생존의 증가는 제한되어 있었다. 따라서, 본 발명의 목적은 그러한 종양을 갖는 대상체를 치료하기 위한 개선된 방법을 제공하는 것이다.

발명의 내용

- [0005] 발명의 개요
- [0006] 본 발명자들은 TIM-4 길항제 (예를 들어, 항체) 및 항-PD-1 길항제 (예를 들어, 항체)의 공-투여가 생체내에서 종양 성장을 유효하게, 심지어 상승작용적으로 억제한다는 것을 처음으로 발견했다. 따라서, 본 발명의 목적은 암을 갖는 대상체를 치료하기 위한 개선된 방법을 제공하는 것이다. 특히, 본 발명의 목적은 TIM-4 길항제와 암의 치료를 위해 항-PD-1 길항제와 조합되는 효과적인 조합 치료 요법을 제공하는 것이다.
- [0007] 한 측면에서, 본 발명은 유효량의 PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제를 공투여하는 것에 의한 대상체에서의 암의 치료를 위한 방법을 제공한다.
- [0008] 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 TIM-4 길항제는, 비제한적으로, 리간드, 항체 (예를 들어, 모노클로날 항체 및 이중특이적 항체) 및 다가 작용제를 포함한다. TIM-4 길항제는 비-활성화 리간드 또는 리간드 결합 파트너 (예를 들어, 소분자, 조작된 PS 에플레이터 또는 가용성 TIM-1, 또는 다른 결합 단백질)일 수 있다. 한 실시양태에서, TIM-4 길항제는 항-TIM4 항체이다. 한 실시양태에서, TIM-4 길항제는 TIM-4의 IgV 도메인 내의 에피토프에 결합하는 항체이다. 또 다른 실시양태에서, TIM-4 길항제는 9F4, RMT4-53, RMT4-54, F31-563 또는 21T112와 같은 항체이다.
- [0009] 예시적인 항-TIM-4 항체는 9F4, RMT4-53, RMT4-54, F31-563 또는 21T112의 중쇄 및 경쇄 CDR을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 함유하고, 상응하는 항체의 프레임워크 영역과 적어도 약 90%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 프레임워크 영역을 임의로 포함한다. 항-TIM-4 항체는 또한 항체 9F4, RMT4-53, RMT4-54, F31-563 또는 21T112의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인과 적어도 약 90%, 95% 또는 99% 동일한 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항-TIM-4 길항제 항체는 9F4, RMT4-53, RMT4-54, F31-563 또는 21T112와 결합에 대해 경쟁하고/거나 그와 동일한 TIM-4 상의 에피토프에 결합한다.
- [0010] 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 PD-1 길항제는, 비제한적으로, 리간드, 항체 (예를 들어, 모노클로날 항체 및 이중특이적 항체), 및 다가 작용제를 포함한다. 한 실시양태에서, PD-1 길항제는 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체이다. 또 다른 실시양태에서, PD-1 길항제는 MK-3475 또는 CT-011과 같은 항체이다. 한 실시양태에서, PD-1 길항제는 융합 단백질, 예를 들어, Fc 융합체 단백질, 예컨대 AMP-244이다.
- [0011] 예시적인 항-PD-1 항체는 각각 서열식별번호(SEQ ID NO): 11 및 12에 제시된 서열을 갖는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 5C4 (WO 2006/121168에서 5C4로 지칭되었고; MDX-1106, ONO-4538, 및 니볼루맙으로 또한 공지됨), 또는 그의 항원 결합 단편 및 변이체이다. 다른 실시양태에서, 항체는 5C4의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 가변 영역 (VR)을 포함한다. 따라서, 한 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 13에 제시된 서열을 갖는 5C4의 VH 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 15에 제시된 서열을 갖는 5C4의 VL 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 각각 서열식별번호: 17, 18 및 19에 제시된 서열을 갖는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 각각 서열식별번호: 20, 21 및 22에 제시된 서열을 갖는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 각각 서열식별번호: 13 및/또는 서열식별번호: 15에 제시된 아미노산 서열을 갖는 VH 및/또는 VL 영역을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 각각 서열식별번호: 14 및/또는 서열식별번호: 16에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩되는 중쇄 가변 (VH) 및/또는 경쇄 가변 (VL) 영역을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 상기 언급된 항체와 결합에 대해 경쟁하고/거나, 그와 동일한 PD-1 상의 에피토프에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 상기 언급된 항체와 적어도 약 90%의 가변 영역 아미노산 서열 동일성 (예를 들어, 서열식별번호: 13 또는 서열식별번호: 15와 적어도 약 90%, 95%

또는 99%의 가변 영역 동일성)을 갖는다.

- [0012] 한 실시양태에서, PD-1 길항제는 항-PD-L1 항체, 예컨대 MEDI4736 (항-B7-H1로 또한 공지됨) 또는 MPDL3280A (RG7446으로 또한 공지됨)이다. 예시적인 항-PD-L1 항체는 12A4 (WO 2007/005874 및 미국 특허 번호 7,943,743에서 12A4로 지칭됨)이다. 한 실시양태에서, 항체는 12A4의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 VR을 포함한다. 따라서, 한 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 1에 제시된 서열을 갖는 12A4의 VH 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 3에 제시된 서열을 갖는 12A4의 VL 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 각각 서열식별번호: 5, 6 및 7에 제시된 서열을 갖는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 각각 서열식별번호: 8, 9 및 10에 제시된 서열을 갖는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 각각 서열식별번호: 1 및/또는 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 VH 및/또는 VL 영역을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 각각 서열식별번호: 2 및/또는 서열식별번호: 4에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩되는 중쇄 가변 (VH) 및/또는 경쇄 가변 (VL) 영역을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 상기 언급된 항체와 결합에 대해 경쟁하고/거나, 그와 동일한 PD-L1 상의 에피토프에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 상기 언급된 항체와 적어도 약 90%의 가변 영역 아미노산 서열 동일성 (예를 들어, 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 3과 적어도 약 90%, 95% 또는 99%의 가변 영역 동일성)을 갖는다.
- [0013] 한 실시양태에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서
- [0014] (a) PD-1 길항제는 서열식별번호: 13에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 15에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함하는 항-PD-1 항체이고;
- [0015] (b) TIM-4 길항제는 항체이다.
- [0016] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서
- [0017] (a) PD-1 길항제는 서열식별번호: 1에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 3에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함하는 항-PD-L1 항체이고;
- [0018] (b) TIM-4 길항제는 항체이다.
- [0019] 본원에 제공된 치료 방법의 효능은 임의의 적합한 수단을 사용하여 평가될 수 있다. 한 실시양태에서, 치료는 종양 크기의 감소, 시간 경과에 따른 전이 병변의 수의 감소, 완전 반응, 부분 반응 및 안정 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치료 효과를 일으킨다. 또 다른 실시양태에서, PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제의 투여는, 예를 들어, PD-1 길항제 또는 TIM-4 길항제 단독에 의한 치료에 비해, 또는 치료의 개시 전의 종양 부피에 비해, 적어도 1, 1.25, 1.50, 1.75, 2, 2.25, 2.50, 2.75, 3, 3.25, 3.5, 3.75 또는 4배의 종양 부피의 감소를 발생시킨다. 또 다른 실시양태에서, PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제의 투여는, 예를 들어, PD-1 길항제 또는 TIM-4 길항제 단독에 의한 치료에 비해, 또는 치료의 개시 전의 종양 부피에 비해, 적어도 1배, 2배, 또는 보다 바람직하게는 3배의 종양 부피의 감소를 발생시킨다. 추가 실시양태에서, PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제의 투여는, 예를 들어, PD-1 길항제 또는 TIM-4 길항제 단독에 의한 치료에 비해, 또는 치료의 개시 전의 종양 부피에 비해, 적어도 50%, 60%, 70% 또는 80%의 종양 성장 억제를 발생시킨다. 특정 실시양태에서, 종양 부피는, 예를 들어, 치료의 개시 전의 종양 크기에 비해, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 초과만큼 감소된다.
- [0020] PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제는 적합한 투여량, 경로 (예를 들어, 정맥내, 복강내, 근육내, 척수강내 또는 피하)에 따라 투여될 수 있다. 길항제 및 효능제는 또한 임의의 적합한 스케줄에 따라 투여될 수 있다. 예를 들어, 길항제 및 효능제는 동시에 단일 제제로 투여될 수 있다. 대안적으로, 길항제 및 효능제는 개별 투여를 위해 제제화될 수 있으며, 여기서 그들은 공동으로 또는 순차적으로 투여된다. 한 실시양태에서, PD-1 길항제는 TIM-4 길항제의 투여 전에 투여된다. 또 다른 실시양태에서, TIM-4 길항제는 PD-1 길항제의 투여 전에 투여된다. 추가 실시양태에서, TIM-4 길항제 및 PD-1 길항제는 동시에 투여된다.
- [0021] 한 실시양태에서, 암은 암종, 육종, 모세포종, 림프종 및 백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암이다. 한 실시양태에서, 암은 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 위장암, 결장직장암, 위암, 결장 암종 및 교모세포종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 암은 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 필

라텔피아 염색체 양성 급성 림프모구성 백혈병 (Ph+ ALL), 편평 세포 암종, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 신경 교종, 위장암, 신암, 난소암, 간암, 결장직장암, 자궁내막암, 신장암, 전립선암, 갑상선암, 신경모세포종, 췌장 암, 다형성 교모세포종, 자궁경부암, 위암(stomach cancer), 방광암, 간세포암, 유방암, 결장 암종, 및 두경부 암, 위암(gastric cancer), 배세포 종양, 소아 육종, 부비동비강 자연 킬러, 다발성 골수종, 급성 골수 백혈병 (AML), 및 만성 림프구성 백혈병 (CML)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0022] 추가의 작용제 및 요법은 본원에 기재된 효능제 및 길항제와 조합하여 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 방법은 추가의 치료제 (예를 들어, 세포독소 또는 화학요법제)의 투여를 포함한다.
- [0023] PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제를 포함하는 조성물이 또한 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, 길항제는 리간드, 항체 (예를 들어, 모노클로날 항체 또는 이중특이적 항체) 또는 다가 작용제이다. 또 다른 실시양태에서, PD-1 길항제는 5C4의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 VR을 포함하는 항-PD-1 항체이다. 또 다른 실시양태에서, PD-1 길항제는 12A4의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 VR을 포함하는 항-PD-L1 항체이다.
- [0024] (a) PD-1 길항제의 용량;
- [0025] (b) TIM-4 길항제의 용량; 및
- [0026] (c) 본원에 기재된 방법에서 PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제를 사용하는 것에 대한 지침서
- [0027] 를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하기 위한 키트가 추가로 제공된다. 한 실시양태에서, TIM-4 길항제는 항체이다. 또 다른 실시양태에서, PD-1 길항제는 항체이다. 특정한 실시양태에서, PD-1 길항제는 서열식별번호: 13에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 15에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함하는 항-PD-1 항체이다. 또 다른 특정한 실시양태에서, PD-1 길항제는 서열식별번호: 1에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 3에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함하는 항-PD-L1 항체이다.
- [0028] 본 개시내용의 다른 특색 및 이점은 하기 상세한 설명 및 실시예로부터 명백해질 것이고, 이는 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 인간 TIM-4 이소형 1 및 2의 아미노산 서열의 정렬을 도시한다.
- 도 2는 시노볼구스 원숭이, 마우스 및 인간 TIM-4 오르토로그의 아미노산 서열의 정렬을 도시한다.
- 도 3A-E는 대조군, TIM-4 길항제 항체, PD-1 길항제 항체, 또는 항-PD-1 항체 및 항-TIM-4 항체의 조합물의 투여 후에 마우스로부터의 비장 및 종양에서의 골수 세포 집단을 도시하는 그래프이다.
- 도 4A-F는 대조군, TIM-4 길항제 항체, 항-PD-1 항체, 또는 항-PD-1 항체 및 항-TIM-4 항체의 조합물의 투여 후에 마우스로부터의 비장 및 종양에서의 CD8+ 세포 집단을 도시하는 그래프이다.
- 도 5A-F는 대조군, TIM-4 길항제 항체, 항-PD-1 항체, 또는 항-PD-1 항체 및 항-TIM-4 항체의 조합물의 투여 후에 마우스로부터의 비장 및 종양에서의 CD4+ 집단을 도시하는 그래프이다.
- 도 6A-D는 대조군, TIM-4 길항제 항체, 항-PD-1 항체, 또는 항-PD-1 항체 및 항-TIM-4 항체의 조합물의 투여 후에 개별 마우스에서의 종양 부피 (mm^3)를 도시하는 그래프이다.
- 도 7A-B는 대조군, TIM-4 길항제 항체, 항-PD-1 항체, 또는 항-PD-1 항체 및 항-TIM-4 항체의 조합물의 투여 후에 마우스에서의 평균 및 종양 종양 부피 (mm^3)를 도시하는 그래프이다.
- 도 8은 대조군, TIM-4 길항제 항체, 항-PD-1 항체, 또는 항-PD-1 항체 및 항-TIM-4 항체의 조합물의 투여 후에 마우스에서의 제28일 종양 부피 (mm^3)를 도시하는 그래프이다.
- 도 9 (A)는 CT26 동물 모델에서 대조군, TIM-4 길항제 항체, 항-PD-1 항체, 또는 항-PD-1 항체 및 항-TIM-4 항체의 조합물의 투여 후에 마우스의 생존율을 도시하는 그래프이고; (B)는 각 치료군의 종양 생존율을 나타내는 표이다.
- 도 10은 MC38 동물 모델에서 대조군, TIM-4 길항제 항체, 항-PD-1 항체, 또는 항-PD-1 항체 및 항-TIM-4 항체

의 조합물의 투여 후에 마우스의 백분율 무진행 생존율을 도시하는 그래프이다.

도 11은 도 10에 나타난 실험에 있었던 마우스에서의 이식 후 일수에 따른 평균 종양 부피를 보여준다.

도 12A-C는 도 10 및 11에 나타난 실험에 있었던 마우스에서의 이식 후 일수에 따른 개별 종양 부피를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 발명의 상세한 설명

[0031] 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명은 TIM-4 길항제 (예를 들어, 항체) 및 PD-1 길항제 (예를 들어, 항체)의 공-투여가 생체내에서 종양 성장을 유효하게, 심지어 상승작용적으로 억제한다는 발견에 기초한다. 따라서, 본 발명은 유효량의 PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제를 대상체 (예를 들어, 인간)에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서의 암의 치료를 위한 방법을 제공한다.

[0032] I. 정의

[0033] 본 발명의 설명이 보다 용이하게 이해될 수 있도록, 특정 용어가 먼저 정의된다. 추가의 정의는 상세한 설명 전반에 걸쳐 제시된다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖고, 번역학, 단백질 화학, 생화학, 재조합 DNA 기술 및 약리학의 통상적인 방법이 사용된다.

[0034] 본원에 사용된 단수 형태는 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다. "또는" 또는 "및"의 사용은 달리 언급되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 게다가, 용어 "포함하는", 뿐만 아니라 다른 형태, 예컨대, "포함하다", "포함한다" 및 "포함한"의 사용은 제한하는 것이 아니다.

[0035] 양, 시간 기간 등과 같은 측정가능한 값을 지칭할 때 본원에 사용된 용어 "약"은 특정한 값으로부터의 $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$, 보다 바람직하게는 $\pm 5\%$, 보다 더 바람직하게는 $\pm 1\%$, 더욱 더 바람직하게는 $\pm 0.1\%$ 의 편차를 포괄하는 것을 의미하고, 이것은 상기 편차가 개시된 방법을 수행하기에 적절하기 때문이다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 성분의 양, 분자량, 반응 조건 등과 같은 특성을 표현하는 모든 수치는 용어 "약"에 의해 수식되는 것으로서 이해되어야 한다.

[0036] 본원에 사용된 용어 "대상체" 또는 "환자"는 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 포유동물 예컨대 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 기니 피그, 토끼, 고양이, 개, 원숭이, 소, 말, 돼지 등 (예를 들어, 암을 갖는 환자)을 지칭한다.

[0037] "고형 종양"은 예를 들어 육종, 흑색종, 암종, 전립선 암종, 폐 암종, 결장 암종 또는 다른 고형 종양 암을 포함한다.

[0038] 용어 "암", "암성", 또는 "악성"은 전형적으로 비조절된 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물에서의 생리학적 조건을 지칭 또는 기재한다. 본원에 사용된 용어는 악성 암뿐만 아니라 전암성 암을 포함한다. 암의 예는 예를 들어 백혈병, 림프종, 모세포종, 암종 및 육종을 포함한다. 그러한 암의 보다 특정한 예는 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 필라델피아 염색체 양성 급성 림프모구성 백혈병 (Ph+ ALL), 편평 세포 암종, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 신경교종, 위장암, 신암, 난소암, 간암, 결장직장암, 자궁내막암, 신장암, 전립선암, 갑상선암, 신경모세포종, 췌장암, 다형성 교모세포종, 자궁경부암, 위암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암종, 및 두경부암, 위암, 배세포 종양, 소아 육종, 부비동비강 자연 킬러, 다발성 골수종, 급성 골수 백혈병 (AML), 및 만성 림프구성 백혈병 (CLL)을 포함한다.

[0039] 본원에 사용된 용어 "암종"은 상피 세포로부터 발생한 암의 유형을 지칭한다. 특히, 암종은 신체의 내부 또는 외부 표면을 싸고 있는 조직에서 시작하고 일반적으로 배아발생 동안 내배엽 또는 외배엽 배 층에서 기원하는 세포로부터 발생하는 암이다. 암종의 다양한 하위유형은 선암종 (미시적 선상-관련 조직 세포학, 조직 아키텍처, 및/또는 선-관련 분자 생성물, 예를 들어, 뮤신을 특색으로 함), 편평 세포 암종 (편평 분화를 나타내는 관찰가능한 특색 및 특징, 예를 들어, 세포간교, 각질화, 편평 진주), 선편평상피 암종 (선암종 및 편평 세포 암종 둘 다를 함유하는 혼합 종양, 여기서 이들 세포 유형 각각은 적어도 10%의 종양 부피를 포함함), 역형성 또는 미분화 암종 (보다 구체적으로 분화된 신생물 중 임의의 것에 대한 뚜렷한 조직학적 또는 세포학적 증거가 결여된 세포를 특색으로 하는 고등급 암종의 이종성 군), 대세포 암종 (풍부한 세포질을 갖는, 큰, 단조로운 원형이거나 명백히 다각형 형상의 세포로 구성됨), 소세포 암종 (세포가 통상적으로 원형이고, 휴지 림프구 및 거

의 분명하지 않은 세포질의 직경의 대략 3배 미만임)을 포함한다.

- [0040] 본원에 사용된 용어 "면역 세포"는 림프구, 예컨대 B 세포 및 T 세포; 자연 킬러 세포; 골수 세포, 예컨대 단핵구, 대식세포, 호산구, 비만 세포, 호염기구, 및 과립구를 포함하는, 면역 반응에서 역할을 하는 세포를 지칭한다.
- [0041] 본원에 사용된 용어 "면역 반응"은 T 세포 매개 및/또는 B 세포 매개 면역 반응, 예컨대 T 림프구, 대식세포, 및/또는 자연 킬러 세포의 자극을 포함하는, 세포성 면역 반응을 지칭한다.
- [0042] 용어 "골수-유래 억제 세포" 또는 "MDSC"는 수지상 세포, 대식세포 및 호중구가 또한 속하는, 골수계 (골수 줄기 세포로부터 기원하는 세포의 패밀리)로부터의 면역 세포의 이종성 군을 지칭하기 위해 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. MDSC는 변경된 조혈의 결과로서, 병리학적 상황, 예컨대 만성 감염 및 암에서 강하게 확장된다. MDSC는 추가로 2종의 하위유형, 단핵구성 MDSC 및 과립구성 MDSC로 분류된다. MDSC 억제자 기능은 T 세포 증식 및 활성화를 억제하는 그들의 능력에 의존한다. 예를 들어, 만성 염증성 상태 (바이러스 및 박테리아 감염) 또는 암의 경우, 골수성 분화는 MDSC의 확장으로 편중되어 있다. 이들 MDSC는 염증 부위 및 종양에 침윤하고, 여기서 그들이 예를 들어 T 세포 (예를 들어, CD8+ T 세포) 및 NK 세포를 억제함으로써 면역 반응을 억제한다. MDSC는 또한 시토키인 및 TGF-베타와 같은 인자의 발현을 통하여 혈관신생, 종양 진행 및 전이를 가속화한다.
- [0043] 용어 "손상-연관 분자 패턴" 또는 "DAMP"는 손상된 조직에 의해 방출되는 세포내 분자를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. DAMP는 세포 내부에서 생리학적 역할을 갖는 분자이지만, 세포의 환경에 노출될 때 추가의 기능을 획득한다. 예를 들어, DAMP는 위험에 대하여 신체에 경고하고, 염증 반응을 자극하고, 최종적으로 재생 과정을 촉진한다. 사멸 세포에 의한 그의 수동적 방출에 더하여, 일부 DAMP는 생명-위협 스트레스를 겪고 있는 살아있는 세포에 의해 분비되거나 노출될 수 있다. DAMP는 염증 및 관련 장애와 연계되어 있다. DAMP는 히스톤, 게놈 DNA, HMGB1, IL1a, IL33, ATP, F-액틴, 시클로필린 A, HSP, 요산 결정, S100, 미토콘드리아 DNA, 미토콘드리아 전사 인자 A, 칼레티쿨린을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0044] 용어 "에페로시토시스"는 사멸 중인/사멸 세포 (예를 들어, 아포토시스 또는 괴사성 세포)가 식세포 (예를 들어, 호중구, 단핵구, 대식세포, 비만 세포 및 수지상 세포)에 의해 제거되는 과정을 지칭한다. 에페로시토시스 동안, 식세포는 아포토시스 세포의 부위에 축적되고, 식세포의 세포 막은 큰 체액-충전된 소포인, 사멸 세포를 함유하는 "에페로좀"을 형성하면서 아포토시스 세포를 포식한다. 에페로시토시스의 효과는, 사멸 세포가 그의 막 완전성이 파괴되어 그의 내용물이 주위 조직으로 누설되기 전에 제거되는 것이다. 에페로시토시스는 예를 들어 항염증, 항-프로테아제 및 성장-촉진 효과를 생성시키는, 특정한 하류 세포내 신호 전달 경로를 촉발시킨다. 반대로, 손상된 에페로시토시스는 자가면역 질환 및 조직 손상과 연계되어 있다.
- [0045] "자가포식" 또는 "자가소화작용"은, 조절된 과정을 통하여, 불필요하거나 기능장애성인 세포 성분을 해체하는 천연, 파괴성 메카니즘이다. 자가포식은 세포 성분의 질서정연한 분해 및 재활용을 허용한다. 이 과정 동안, 표적화된 세포질 구성성분은 세포의 나머지 부분으로부터 자가포식소체로서 공지된 이중-막 소포 내에 단리된다. 이어서, 자가포식소체는 리소솜과 융합하고, 내용물은 분해되고 재활용된다. 통상적으로 기재되는 자가포식의 3종의 상이한 형태, 즉 거대자가포식, 미세자가포식 및 사페론-매개 자가포식이 존재한다. 질환과 관련하여, 자가포식은 생존을 촉진하는 스트레스에 대한 적응 반응으로서 나타났고, 반면에 다른 경우에서 그것은 세포 사멸 및 이환율을 촉진하는 것으로 보인다.
- [0046] 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료하는" 및 "치료"는 질환과 연관된 증상, 합병증, 상태 또는 생화학적 징후의 진행, 발달, 중증도 또는 재발을 역전, 완화, 호전, 억제 또는 감속 또는 예방할 목적으로 대상체에 대해 수행되는 임의의 유형의 개입 또는 과정, 또는 대상체에게 활성제 또는 활성제의 조합물을 투여하는 것을 지칭한다.
- [0047] 본원에 사용된 "유효 치료" 또는 "양성 치료 반응"은 유의한 효과, 예를 들어, 질환 또는 장애, 예를 들어, 암의 적어도 하나의 증상의 호전을 일으키는 치료를 지칭한다. 유의한 효과는 기준선을 넘어서는 개선, 즉 방법에 따른 요법의 개시 전에 이루어진 측정 또는 관찰을 넘어서는 개선의 형태를 취할 수 있다. 예를 들어, 유의한 효과는, 질환의 임상 또는 진단 증상의, 또는 암의 마커의 감소 또는 제거에 의해 입증되는 것과 같이, 임의의 임상 단계에서 대상체에서의 암의 진행을 감속, 안정화, 정지 또는 역전시키는 형태를 취할 수 있다. 유효 치료는 예를 들어, 종양 크기를 감소시키고/거나, 순환 종양 세포의 존재를 감소시키고/거나, 종양의 전이를 감소 또는 방지하고/거나, 종양 성장을 감속 또는 정지시키고/거나, 종양 재발 또는 악화를 방지 또는 지연시킬

수도 있다.

- [0048] 용어 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 바람직한 생물학적, 요법적 및/또는 예방적 결과를 제공하는 작용제 또는 작용제의 조합물의 양을 지칭한다. 그 결과는 질환의 징후, 증상 또는 원인 중 하나 이상의 감소, 호전, 경감, 약화, 지연 및/또는 완화, 또는 생물계의 임의의 다른 목적하는 변경일 수 있다. 고형 종양과 관련하여, 유효량은 종양 축소를 유발하고/거나 종양의 성장 속도를 감소시키거나 (예컨대 종양 성장을 억제하거나) 또는 다른 원치 않는 세포 증식을 방지 또는 지연시키는데 충분한 양을 포함한다. 일부 실시양태에서, 유효량은 종양 발달을 지연시키는데 충분한 양이다. 일부 실시양태에서, 유효량은 종양 재발을 방지하거나 지연시키는데 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 약물 또는 조성물의 유효량은 (i) 암 세포의 수를 감소시키고/거나; (ii) 종양 크기를 감소시키고/거나; (iii) 말초 기관으로의 암 세포 침윤을 어느 정도 억제, 지연, 감속, 및 아마 정지시키고/거나; (iv) 종양 전이를 억제 (즉, 어느 정도 늦춤), 및 아마 정지시키고/거나; (v) 종양 성장을 억제하고/거나; (vi) 종양 발생 및/또는 재발을 방지 또는 지연시키고/거나; (vii) 암과 연관된 증상 중 하나 이상을 어느 정도 경감시킬 수 있다. 한 예에서, "유효량"은 암의 유의한 감소 또는 암, 예컨대 진행성 고형 종양의 진행의 감속에 영향을 미치는, 조합된 PD-1 길항제 (예를 들어, 항체) 및 TIM-4 길항제 항체 (예를 들어, 항체)의 양이다. 조합 요법의 유효량은 PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제의 조합을 지칭하는 "유효 요법"에서 본원에 기재된 방법에 따라 투여되며, 여기서 투여 순서 및 투여량 빈도는 치료를 수행하기에 적당하다.
- [0049] "최적 생물학 용량 (OBD)"은 임상적으로 허용되지 않는 독성 없이 가장 최적의 지속적 생체내 반응을 제공하는 작용제 또는 작용제의 조합물의 최소 용량으로서 정의된다. 독성 및 치료 효능은, 예를 들어 LD50 (집단의 50%에 대한 치사 용량) 및 ED50 (집단의 50%에서의 치료 유효 용량)을 결정하기 위한, 세포 배양물 또는 실험 동물에서의 표준 제약 절차에 의해 결정될 수 있다. 독성과 치료 효과 사이의 용량 비가 치료 지수이며, 이는 LD50/ED50 비로 표현될 수 있다.
- [0050] 본원에 사용된 용어 "상승작용", "치료 상승작용" 및 "상승작용적 효과"는 치료제의 조합 (예를 들어, TIM-4 길항제와 조합된 PD-1 길항제)에 의한 환자의 치료가 단독으로 사용되는 경우에 사용된 조합물의 각각의 개별 구성성분에 의해 달성되는 결과보다 치료상 우수한 결과를 나타내는 현상을 지칭한다 (예를 들어 문헌 [T. H. Corbett *et al.*, 1982, *Cancer Treatment Reports*, 66, 1187] 참조). 이와 관련해서 치료상 우수한 결과는 하기 중 하나 이상을 포함한다: (a) 조합에서와 동일한 용량에서의 각각의 작용제 단독의 개별 효과를 합한 것보다 더 큰 치료 반응의 증가; (b) 치료 효능의 감소 없이 조합에서의 1종 이상의 작용제의 용량의 감소; (c) 조합에서와 동일한 용량에서의 각각의 작용제의 단독요법과 동등하거나 그보다 더 큰 치료 이익을 받으면서, 유해사건의 발생의 감소, (d) 각각의 작용제의 단독요법보다 더 큰 치료 이익을 받으면서, 용량-제한 독성의 감소; (e) 약물 내성의 유도의 지연 또는 최소화. 이중이식편 모델에서, 각각의 구성성분이 일반적으로 그의 개별 최대 허용 용량을 초과하지 않는 용량으로 존재할, 그의 최대 허용 용량으로 사용되는 조합물은, 조합물의 투여에 의해 달성된 종양 성장의 감소가 구성성분이 단독으로 투여될 때의 최고 구성성분의 종양 성장의 감소의 값보다 더 클 때 치료 상승작용을 나타낸다. 약물 조합물의 상승작용은, 예를 들어, 추-탈라레이(Chou-Talalay)의 조합 지수 (CI) 원리에 따라 결정될 수 있다 (Chou *et al.*, *Adv. Enzyme Regul.* 1984; 22:27-55; Chou, *Cancer Res.* 2010;70(2):440-446).
- [0051] "암 없음" 또는 "무질환" 또는 NED (질환의 증거 없음)는 환자가 현행 표준 관리 요법에 의한 치료에 의해 유도된 임상 반응을 입증했음을 의미한다. "임상 반응"에 의해, 비록 양성 세포는 여전히 신체 내에 존재할 수 있으나, 임상 징후, 방사선학적 징후, 및 암의 증상이 유의하게 감소되었거나, 임상 진단학에 기초하여 완전히 사라졌다는 것을 의미한다. 따라서, 임상 반응은 부분적 반응 및 완전 반응을 포괄하는 것으로 고려된다. CTC (순환 종양 세포)와 같은 잔류 암 세포의 존재는 검정에 의해 열거될 수 있고, 재발을 예측할 수 있다.
- [0052] "약화" 또는 "재발" 또는 "부활"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 개선 또는 반응의 주기 후에 암의 복귀의 방사선촬영 진단 또는 암의 복귀의 징후 및 증상을 지칭한다.
- [0053] 본원에 사용된 용어 "길항제"는 생물학적 활성을 차단하는 (예를 들어, 감소시키거나 방지하는) 분자를 지칭한다. 용어 "억제하다" 또는 "억제"는 측정가능한 양만큼 감소시킨다는 것을 의미한다.
- [0054] 본원에 사용된 용어 "리간드"는 생물학적 목적을 제공하기 위해 생체분자 (예를 들어, 수용체)와 복합체를 형성하는 분자를 지칭한다. 보다 좁은 의미에서, 표적 단백질 상의 부위에 결합하는, 신호 촉발 분자이다. 결합은 분자간 힘, 예컨대 이온 결합, 수소 결합 및 반 데르 발스 힘에 의해 발생한다. 도킹 (회합)은 통상적으로 가역적 (해리)이다. 리간드와 그의 표적 분자 사이의 실제 비가역적 공유 결합은 생물계에서 드물다. 수용체

(수용체 단백질)에 대한 리간드 결합은 그의 화학적 입체형태 (3차원 형상)를 변경한다. 수용체 단백질의 입체 형태적 상태는 그의 기능적 상태를 결정한다.

- [0055] 단백질의 "수준"은 전기영동, 모세관 전기영동, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC), 박층 크로마토그래피 (TLC), 과다화산 크로마토그래피, 유체 또는 겔 침전 반응, 흡수 분광분석법, 비색 검정, 분광광도계 검정, 유동 세포측정법, 면역확산, 용액 상 검정, 면역전기영동, 웨스턴 블롯팅, 방사선면역검정 (RIA), 효소-연결 면역 흡착 검정 (ELISA), 면역형광 검정 및 전기화학발광 면역검정을 포함하는, 단백질 수준을 측정하기 위한 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 결정된 바와 같은, 샘플에서의 단백질의 양을 지칭한다.
- [0056] 용어 "샘플"은 대상체로부터 단리된 유체, 세포 또는 조직의 집합을 지칭한다. 생물학적 유체는 전형적으로 생리학적 온도에 있는 액체이고, 대상체 또는 생물학적 공급원에 존재하거나, 그로부터 배출되거나, 발산되거나, 또는 달리 추출된 자연 발생 유체를 포함할 수 있다. 생물학적 유체의 예는 혈액, 혈청, 장막 유체, 혈장, 림프, 소변, 뇌척수액, 타액, 안구 유체, 낭성 유체, 눈물, 분변, 객담, 점막 분비물, 질 분비물, 부인과 유체, 복수액 예컨대 비-고체 종양과 연관된 것, 흉막, 심막, 복막, 복강 및 다른 체강의 유체, 기관지 세척액에 의해 수집된 유체 등을 포함한다.
- [0057] 본원에 사용된 용어 "대조군 샘플"은, 예를 들어 건강한 대상체로부터의 샘플 또는 평가될 대상체로부터 보다 이른 시점에 만들어진 샘플을 포함하여, 임의의 임상적으로 관련된 대조군 샘플을 지칭한다. 예를 들어, 대조군 샘플은 암의 개시 전에, 질환의 보다 이른 단계에서, 또는 치료 또는 치료의 일부의 투여 전에 대상체로부터 취한 샘플일 수 있다.
- [0058] 본원에 사용된 용어 "항체"는 전체 항체 및 임의의 항원 결합 단편 (즉, "항원-결합 단편" ("항원-결합 부분"으로 또한 공지됨))을 포함한다. 전체 항체는 디설피드 결합에 의해 상호-연결되어 있는 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 당단백질이다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 V_H 로 약기됨) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, C_H1 , C_H2 및 C_H3 으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 V_L 로 약기됨) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인, C_L 로 구성된다. V_H 및 V_L 영역은 프레임워크 영역 (FR)으로 칭해지는 보다 보존된 영역이 점재되어 있는 상보성 결정 영역 (CDR)으로 칭해지는 초가변 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L 은 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 하기 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 숙주 조직 또는 인자, 예컨대 면역계의 다양한 세포 (예를 들어, 이펙터 세포) 및 전통적 보체계의 제1 성분 (C1q)에 대한 이뮤노글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 용어 "항체"는 또한 키메라 항체, 인간화 항체, 완전 인간 항체, 뿐만 아니라 항체의 다량체 형태, 예컨대 미니바디, 비스-scFv, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 및 화학적으로 접합된 Fab' 다량체를 포괄한다.
- [0059] 본원에 사용된 용어 "항체 단편" ("항원-결합 단편" 또는 "항원-결합 부분"으로 또한 지칭됨)은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 1종 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 항체의 용어 "항원-결합 단편" 내에 포괄되는 결합 단편의 예는 (i) V_L , V_H , C_L 및 C_H1 도메인으로 이루어진 1가 단편, Fab 단편; (ii) 본질적으로 힌지 영역의 부분이 있는 Fab 인 2가 단편, $F(ab')_2$ 단편 (문헌 [FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3.sup.rd ed. 1993)] 참조); (iv) V_H 및 C_H1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (v) 항체의 단일 아암의 V_L 및 V_H 도메인으로 이루어진 Fv 단편, (vi) V_H 도메인으로 이루어져 있는 dAb 단편 (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546); (vii) 단리된 상보성 결정 영역 (CDR); 및 (viii) 단일 가변 도메인 및 2개의 불변 도메인을 함유하는 중쇄 가변 영역인 나노바디 (단일-도메인 항체 (sdAb)로 또한 공지됨)를 포함한다. 단일 도메인 항체는 V_H 단편 (낙타류에서 발견되는 중쇄 항체로부터 조작된 단일-도메인 항체), 뿐만 아니라 VNAR 단편 (연골 어류의 중쇄 항체로부터 수득된 단일-도메인 항체 (IgNAR, '이뮤노글로불린 신규 항원 수용체 (immunoglobulin new antigen receptor)))을 포함한다.
- [0060] "항원 결합 스캐폴드"는 표적 (또는 항원) 또는 에피토프에 특이적으로 결합하는 단백질, 예컨대 Ig 폴드 또는 Ig-유사 폴드를 포함하는 단백질이다. 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 또한 항원 결합 스캐폴드이다. 항원 결합 스캐폴드는 1가, 다가, 예를 들어, 2가, 3가, 4가이거나, 5개, 6개 또는 그 초과에 에피토프에 결합할 수 있다. 다가 항원 결합 스캐폴드는 단일특이적 또는 다중특이적일 수 있고, 즉, 서로 상이한 다중 (적어도 2, 3, 4 또는 5개) 에피토프에 결합할 수 있다. 예를 들어, 다가 단일특이적 항원 결합 스캐폴드는 적어도 2, 3,

4 또는 5개의 동일한 에피토프에 결합하는 단백질이고, 적어도 2, 3, 4 또는 5개의 동일한 항원 결합 부분을 포함하는 단백질일 수 있다. 예를 들어, TIM-4 결합 스캐폴드는 서로 동일하거나 상이할 수 있는 2-10개, 예를 들어, 2-6개, 2-5개, 2-4개 또는 2-3개의 TIM-4 결합 부분을 포함할 수 있다.

[0061] 다가 항체는 항원 결합 부분이 중쇄의 부분 및 경쇄의 부분을 포함할 수 있는, 항체의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과인 항원 결합 부분을 포함하는 항체를 포함한다. 항원 결합 부분은 단일 폴리펩티드 상에 있거나 하나 초과인 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 다가 항체는 서로 동일하거나 상이할 수 있는 2-10개의 항원 결합 부분을 포함할 수 있다. 다가 항체는 단일특이적 또는 다중특이적일 수 있다. 다중특이적 항체는 이중특이적, 삼중특이적, 사중특이적이거나, 또는 5개 이상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0062] 게다가, Fv 단편의 2개의 도메인, V_L 및 V_H 는 개별 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 V_L 및 V_H 영역이 쌍을 이루어 1가 분자를 형성한 단일 단백질 쇠 (단일 쇠 Fv (scFv)로 공지됨; 예를 들어 문헌 [Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; 및 Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883] 참조)로 제조될 수 있게 하는 합성 링커에 의해서 재조합 방법을 사용하여 연결될 수 있다. 이러한 단일 쇠 항체는 또한 항체의 용어 "항원-결합 단편" 내에 포괄되는 것으로 의도된다. 이들 항체 단편은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 통상적인 기술을 사용하여 수득되고, 단편은 무순상 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝된다.

[0063] 본원에 사용된, 항원 또는 그의 에피토프에 "특이적으로 결합하는" 항원 결합 스캐폴드는 항원 또는 그의 에피토프에 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M 또는 그 미만의 K_D 로 결합하는 항원 결합 스캐폴드이다. 예를 들어, TIM-4에 특이적으로 결합하는 항원 결합 스캐폴드는 TIM-4에 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M 또는 그 미만의 K_D 로 결합하는 항원 결합 스캐폴드이다. 예를 들어, "인간 PD-1에 특이적으로 결합하는" 또는 "인간 PD-L1에 특이적으로 결합하는" 항체는 각각 인간 PD-1 또는 PD-L1에 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M 또는 그 미만의 K_D 로 결합하는 항체를 지칭하는 것으로 의도된다. 항원 또는 에피토프에 결합하는 2개 이상의 영역을 포함하는 항원 결합 스캐폴드는, 심지어 상기 제공된 범위보다 항원 또는 에피토프에의 더 낮은 결합 친화도를 갖더라도 그것이 상승된 결합력으로 항원 또는 에피토프에 결합할 것이므로, 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0064] "이중특이적" 또는 "이중기능적 항체"는 2개의 상이한 중쇄/경쇄 쌍 및 2개의 상이한 결합 부위를 갖는 인공 하이브리드 항체이다. 이중특이적 항체는 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연결을 포함한 다양한 방법에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992)]을 참조한다.

[0065] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 모노클로날 항체의 생산 동안 생성될 수 있는 가능한 변이체 (이러한 변이체는 일반적으로 미량으로 존재함)를 제외하고는 특정한 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타내는 실질적으로 동종인 항체의 집단으로부터의 항체를 지칭한다. 따라서, 용어 "인간 모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조성물"은 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 임의적인 불변 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 수식어 "모노클로날"은 실질적으로 동종인 항체의 집단으로부터 수득됨에 따른 항체의 특징을 나타내며, 임의의 특정한 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 예를 들어, 본원에 기재된 모노클로날 항체는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다. 한 실시양태에서, 인간 모노클로날 항체는, 불멸화 세포에 융합된 인간 중쇄 트랜스젠 및 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 갖는 트랜스제닉 비-인간 동물, 예를 들어 트랜스제닉 마우스로부터 수득된 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생산된다.

[0066] 용어 "에피토프" 또는 "항원 결정기"는 이뮤노글로불린 또는 항체가 특이적으로 결합하는 항원 상의 부위를 지칭한다. 에피토프는 인접 아미노산 또는 단백질의 3차 폴딩에 의해 병치된 비인접 아미노산 둘 다로부터 형성될 수 있다. 인접 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매에 대한 노출 시에 보유하고, 반면에 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매를 사용한 처리 시에 상실된다. 에피토프는 전형적으로 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 아미노산을 고유한 공간 입체형태로

포함한다. 에피토프의 공간 입체형태를 결정하는 방법은 관련 기술분야의 기술 및 본원에 기재된 기술, 예를 들어 X선 결정학, HDX-MS 및 2-차원 핵 자기 공명을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [*Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)] 참조).

[0067] 용어 "에피토프 맵핑"은 항체-항원 인식을 위한 분자 결정기의 확인 과정을 지칭한다.

[0068] 2개 이상의 항체와 관련하여 용어 "동일한 에피토프에 결합한다"는 항체가 항원에의 결합에 대해 경쟁하고, 아미노산의 동일한, 중첩 또는 포괄적 연속 또는 불연속 절편에 결합한다는 것을 의미한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 어구 "동일한 에피토프에 결합한다"가 항체가 정확하게 동일한 아미노산에 결합한다는 것은 필수적으로 의미하지는 않는 것으로 이해한다. 항체가 결합하는 정확한 아미노산은 상이할 수 있다. 예를 들어, 제1 항체는 제2 항체에 의해 결합된 아미노산의 절편에 의해 완전히 포괄되는 아미노산의 절편에 결합할 수 있다. 또 다른 예에서, 제1 항체는 제2 항체에 의해 결합된 1개 이상의 절편과 유의하게 중첩되는 아미노산의 1개 이상의 절편에 결합한다. 본원의 목적상, 이러한 항체는 "동일한 에피토프에 결합하는" 것으로 간주된다. 2개의 항체는, 동일한 아미노산이 하나 이상의 주어진 방법에 의해 항체 둘 다에 대해 확인될 것을 필요로 하는 주어진 방법, 예를 들어, HDX-MS, 결정학 또는 표적 변이 분석에 의해 결정된 바와 같이 "동일한 에피토프에 결합한다".

[0069] 따라서, 또한, 본원에 기재된 특정한 항체에 의해 인식된 에피토프 (예를 들어, 동일한 또는 중첩 영역 또는 영역 사이에 또는 영역에 걸쳐있는 영역)의 전체 또는 일부를 포함하는 에피토프에 결합하거나, 또는 주어진 방법, 예를 들어, HDX-MS, 결정학 또는 표적 변이 분석에 의해 결정된 바와 같은 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 본 발명에 의해 포괄된다.

[0070] 본원에 기재된 항체와 결합에 대해 경쟁하고 임의로 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 또한 본 발명에 의해 포괄된다. 결합에 대해 경쟁하는 항체는 상용 기술을 사용하여 확인될 수 있다. 이러한 기술은, 예를 들어, 하나의 항체가 또 다른 항체의 표적 항원에의 결합을 차단하는 능력을 보여주는 면역검정, 즉 경쟁적 결합 검정을 포함한다. 경쟁적 결합은 검정에서 결정되며, 여기서 시험 하의 이뮤노글로불린이 공통 항원에 대한 참조 항체의 특이적 결합을 억제한다. 수많은 유형의 경쟁적 결합 검정, 예를 들어 비아코어, 유동 세포측정법, 고체 상 직접 또는 간접 방사선면역검정 (RIA), 고체 상 직접 또는 간접 효소 면역검정 (EIA), 샌드위치 경쟁 검정 (문헌 [Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)] 참조); 고체 상 직접 비오틴-아비딘 EIA (문헌 [Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)] 참조); 고체 상 직접 표지된 검정, 고체 상 직접 표지된 샌드위치 검정 (문헌 [Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)] 참조); I-125 표지를 사용하는 고체 상 직접 표지 RIA (문헌 [Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)] 참조); 고체 상 직접 비오틴-아비딘 EIA (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); 및 직접 표지된 RIA (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990))가 공지되어 있다. 전형적으로, 이러한 검정은 비표지 시험 이뮤노글로불린 및 표지된 참조 이뮤노글로불린 중 어느 하나를 보유하는 고체 표면 또는 세포에 결합된 정제된 항원의 사용을 수반한다. 경쟁적 억제는 시험 이뮤노글로불린의 존재 하에 고체 표면 또는 세포에 결합된 표지의 양을 결정함으로써 측정된다. 통상적으로, 시험 이뮤노글로불린은 과량으로 존재한다. 통상적으로, 경쟁 항체가 과량으로 존재하는 경우에, 이는 공통 항원에 대한 참조 항체의 특이적 결합을 적어도 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% 또는 그 초과 만큼 억제할 것이다.

[0071] 에피토프 맵핑 방법은 또한 에피토프의 원자 해상도를 제공하는 항원:항체 복합체의 결정의 X-선 분석을 포함한다. 다른 방법은 항원 단편 또는 항원의 돌연변이된 변이에 대한 항체의 결합을 모니터링하며, 여기서 항원 서열 내의 아미노산 잔기의 변형으로 인한 결합의 상실은 종종 에피토프 성분의 지표로 간주된다. 또한, 에피토프 맵핑에 대한 컴퓨터 조합 방법이 또한 사용될 수 있다. 이들 방법은 관심 항체가 조합 파지 디스플레이 또는 효모 디스플레이 펩티드 라이브러리로부터 특이적인 짧은 펩티드를 친화성 분리하는 능력에 의존한다. 이어서, 펩티드는 펩티드 라이브러리를 스크리닝하는 데 사용된 항체에 상응하는 에피토프를 정의하기 위한 리드로서 간주된다. 에피토프 맵핑을 위해 컴퓨터 알고리즘이 또한 개발되었고, 이는 입체형태적 불연속 에피토프를 맵핑하는 것으로 밝혀졌다.

[0072] 또 다른 폴리펩티드 또는 분자에 융합된, 항원 결합 도메인 또는 당사물을 포함하는 키메라 분자 (또는 융합 분자)도 또한 본 발명에 의해 포괄된다. 예를 들어, 폴리펩티드는 항체 Fc 영역 또는 그의 부분 (예를 들어, Fc 융합체 단백질)에 융합되거나 접합될 수 있다. 폴리펩티드에 융합된 항체 부분은 불변 영역, 힌지 영역, CH1 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인 또는 전체 도메인 또는 그의 부분의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 또한, 폴리펩티드를 상기 항체 부분에 융합시키거나 접합시켜 다량체를 형성할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리

펩티드에 융합된 Fc 부분은 Fc 부분 간의 디설피드 결합을 통해 이량체를 형성할 수 있다. 보다 다량체인 형태는 폴리펩티드를 IgA 및 IgM의 일부와 융합시켜 제조할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드를 항체 부분과 융합 또는 접합시키는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,336,603, 5,622,929, 5,359,046, 5,349,053, 5,447,851, 및 5,112,946; EP 307,434; EP 367,166; PCT 공개 번호 WO 96/04388 및 WO 91/06570; 문헌 [Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:10535-10539 (1991); Zheng et al., J. Immunol., 154:5590-5600 (1995); 및 Vil et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:11337-11341 (1992)]을 참조한다.

[0073] 본원에 사용된 용어 "면역접합체"는 치료 모이어티, 예컨대 세포독소, 약물 또는 방사성동위원소에 연결된 항체를 지칭한다. 세포독소에 접합될 때, 이들 항체 접합체는 "면역독소"로서 지칭된다. 세포독소 또는 세포독성체는 세포에 유해한 (예를 들어, 이를 사멸시키는) 임의의 작용제를 포함한다. 예는 탁솔, 시토킨 B, 그라미시딘 D, 브로민화메티딘, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드로시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-테히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 퓨로마이신 및 그의 유사체 또는 상동체를 포함한다. 치료제는 항대사물 (예를 들어, 메토폭세이트, 6-메르캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제 (예를 들어, 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU) 및 로무스틴 (CCNU), 시클로포스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 백금 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라시클린 (예를 들어, 다우노루비신 (이전의 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제 (예를 들어, 악티노마이신 (이전의 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신 (AMC)), 및 항유사분열제 (예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에 사용되는 항체는 방사성동위원소, 예를 들어, 방사성 아이오딘에 접합되어 암을 치료하기 위한 세포독성 방사성제약을 생성할 수 있다.

[0074] 면역접합체는 주어진 생물학적 반응을 변형시키는 데 사용될 수 있고, 약물 모이어티는 전형적 화학적 치료제로 제한된 것처럼 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 약물 모이어티는 목적하는 생물학적 활성을 보유하는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 이러한 단백질은, 예를 들어 효소적 활성 독소, 또는 그의 활성 단편, 예컨대 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 또는 디프테리아 독소; 종양 괴사 인자 또는 인터페론- γ 와 같은 단백질; 또는 생물학적 반응 변형제 예컨대, 예를 들어, 림포카인, 인터류킨-1 ("IL-1"), 인터류킨-2 ("IL-2"), 인터류킨-6 ("IL-6"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 ("GM-CSF"), 과립구 콜로니 자극 인자 ("G-CSF"), 또는 다른 성장 인자를 포함할 수 있다.

[0075] 항체에 이러한 치료 모이어티를 접합시키는 기술은 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 및 Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)]을 참조한다.

[0076] 본원에 사용된 용어 "다가"은 2개 초과와 생물학적 활성 절편을 혼입시킨 재조합 분자를 지칭한다. 다가 분자를 형성하는 단백질 단편은 구성성분 부분들을 부착시키고 각각을 독립적으로 기능하도록 허용하는 폴리펩티드 링커를 통해 임의로 연결될 수 있다.

[0077] 본원에 사용된 "기능적 등가물"은 그의 원래 면역학적 활성의 실질적인 양을 유지하는 펩티드 또는 폴리펩티드 (예를 들어, 항체 또는 그의 항원 결합 부분)를 지칭한다. 예를 들어, 특정 아미노산은 예를 들어 항체의 항원-결합 영역 또는 기질 분자 상의 결합 부위와 같은 구조와의 상호작용성 결합 능력의 평가가능한 상실을 보이지 않으면서 단백질 구조 내의 다른 아미노산을 치환할 수 있다. 따라서, 다양한 변화가 그의 생물학적 유용성 또는 활성의 평가가능한 상실 없이 개시된 조성물의 아미노산 서열에 이루어질 수 있음을 고려한다. 아미노산 치환은 아미노산 측쇄 치환기의 상대적인 유사성, 예를 들어 그의 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초할 수 있다. 다양한 상기 특징들을 고려한 예시적인 치환은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있으며,

면역학적으로 기능적 등가물이 또한 본 발명의 내에 포괄된다.

- [0078] 본원에서 "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성"은 서열을 정렬하고 필요한 경우 갭을 도입하여 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성한 후에, 서열 동일성의 일부로서 어떠한 보존적 치환도 고려하지 않고, 선택된 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기 백분율로서 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하기 위한 목적의 정렬은 예를 들어 공중 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 또는 메갈라인(Megalign) (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여, 관련 기술분야의 기술 내의 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다.
- [0079] 본원의 목적상, 소정의 아미노산 서열 B에 대한, 이와는 또는 이에 대항한 소정의 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성 (대안적으로, 소정의 아미노산 서열 B에 대한, 이와는 또는 이에 대항한 특정의 % 아미노산 서열 동일성을 갖거나 포함하는 소정의 아미노산 서열 A라는 어구로 기재될 수 있음)은 하기와 같이 계산된다: 100 곱하기 분획 X/Y, 여기서 X는 서열 정렬 프로그램, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 또는 메갈라인 (DNASTAR)에 의해 해당 프로그램의 A와 B의 정렬에서, 동일한 짝으로 점수화되는 아미노산 잔기의 수이며, Y는 B의 아미노산 잔기의 총 수임. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동등하지 않은 경우에, B에 대한 A의 % 아미노산 서열 동일성이 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 동일성과 동등하지 않을 것이 인정될 것이다.
- [0080] II. PD-1 길항제
- [0081] 본원에 사용된 용어 "단백질 PD-1", "PD-1", PD1", "PDCD1"은 "프로그램화된 사멸 1", "프로그램화된 세포 사멸 1"과 상호교환가능하게 사용된다. 완전 인간 PD-1 서열은 진뱅크(GenBank) 수탁 번호 U64863 (서열식별번호: 23) 하에서 찾을 수 있다.
- [0082] 본원에 사용된 용어 "PD-L1", "PDL1", "PDCD1L1", "PDCD1LG1", "CD274", "B7 상동체 1", "B7-H1", "B7-H" 및 "B7H1"은 "프로그램화된 세포 사멸 1 리간드 1"과 상호교환가능하게 사용된다. 완전 인간 PD-L1 아미노산 서열 - 이소형 전구체 -은 진뱅크 수탁 번호 NP_054862.1 (서열식별번호: 24) 하에서 찾을 수 있다. 완전 인간 PD-L1 아미노산 서열 - 이소형 b 전구체 -은 진뱅크 수탁 번호 NP_001254635.1 (서열식별번호: 25) 하에서 찾을 수 있다.
- [0083] 단백질 프로그램화된 사멸 1 (PD-1)은 CD28, CTLA-4, ICOS 및 BTLA를 또한 포함하는 CD28 패밀리에 속하는 억제제 구성원이다. PD-1은 활성화된 B 세포, T 세포, 및 골수 세포에서 발현된다 (Agata *et al.*, *supra*; Okazaki *et al.* (2002) *Curr. Opin. Immunol.* 14: 391779-82; Bennett *et al.* (2003) *J Immunol* 170:711-8). 패밀리의 초기 구성원인, CD28 및 ICOS는 모노클로날 항체의 첨가에 따른 T 세포 증식을 증진시키는 기능적 효과에 의해 발견되었다 (Hutloff *et al.* (1999) *Nature* 397:263-266; Hansen *et al.* (1980) *Immunogenetics* 10:247-260). PD-1은 아포토시스 세포에서의 차등 발현에 대한 스크리닝을 통해 발견되었다 (Ishida *et al.* (1992) *EMBO J* 11:3887-95). 패밀리의 다른 구성원인, CTLA-4 및 BTLA는 각각 세포독성 T 림프구 및 TH1 세포에서의 차등 발현에 대한 스크리닝을 통해 발견되었다. CD28, ICOS 및 CTLA-4 모두는 동종이량체화를 허용하는 비-쌍형성 시스템인 잔기를 갖는다. 대조적으로, PD-1은 다른 CD28 패밀리에 속하는 구성원에서 특징적인 비-쌍형성 시스템인 잔기가 결여되어, 단량체로서 존재하는 것으로 시사된다.
- [0084] PD-1 단백질은 Ig 유전자 슈퍼패밀리의 일부인 55 kDa 유형 I 막형 단백질이다 (Agata *et al.* (1996) *Int Immunol* 8:765-72). PD-1은 막 근위 면역수용체 티로신 억제제 모티프 (ITIM) 및 막 원위 티로신-기반 스위치 모티프 (ITSM)를 함유한다 (Thomas, M.L. (1995) *J Exp Med* 181:1953-6; Vivier, E and Daeron, M (1997) *Immunol Today* 18:286-91). CTLA-4와 구조적으로 유사하지만, PD-1은 B7-1 및 B7-2 결합에 중요한 MYPPPY 모티프 (서열식별번호: 27)가 결여되어 있다.
- [0085] CD28 패밀리의 억제제 구성원인 PD-1과 일치하게, PD-1 결핍 동물은 자가면역 심근병증, 및 관절염 및 신염을 갖는 루푸스-유사 증후군을 포함하는 다양한 자가면역 표현형을 발생시킨다 (Nishimura *et al.* (1999) *Immunity* 11:141-51; Nishimura *et al.* (2001) *Science* 291:319-22). 추가적으로, PD-1은 자가면역 뇌척수염, 전신 홍반성 루푸스, 이식편-대-숙주 질환 (GVHD), 제1형 당뇨병 및 류마티스 관절염에서 역할을 하는 것이 밝혀졌다 (Salama *et al.* (2003) *J Exp Med* 198:71-78; Prokunina and Alarcon-Riquelme (2004) *Hum Mol Genet* 13:R143; Nielsen *et al.* (2004) *Lupus* 13:510). 무린 B 세포 종양 세포주에서, PD-1의 ITSM은 BCR-매개 Ca^{2+} -유동 및 하류 이펙터 분자의 티로신 인산화를 차단하는 데 필수적인 것으로 나타났다 (Okazaki *et al.*

(2001) *PNAS* 98:13866-71).

- [0086] PD-1에 대한 2개의 리간드는 PD-1에의 결합 시에 T 세포 활성화를 하향조절하는 것으로 나타난 PD-L1 및 PD-L2로 확인되었다 (Freeman *et al.* (2000) *J Exp Med* 192:1027-34; Latchman *et al.* (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter *et al.* (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43). PD-L1 및 PD-L2 둘 다는 PD-1에 결합하지만 다른 CD28 패밀리 구성원에는 결합하지 않는 B7 상동체이다. PD-L1은 다양한 인간 암에서 풍부하다 (Dong *et al.* (2002) *Nat. Med.* 8:787-9). PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용은 종양 침윤 림프구의 감소, T-세포 수용체 매개 증식의 감소, 및 암성 세포에 의한 면역 회피를 발생시킨다 (Dong *et al.* (2003) *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank *et al.* (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi *et al.* (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). 면역 억제제는 PD-1의 PD-L1과의 국부 상호작용을 억제함으로써 역전될 수 있고, 그 효과는 PD-1의 PD-L2와의 상호작용이 또한 차단될 때 상가적이다 (Iwai *et al.* (2002) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 99:12293-7; Brown *et al.* (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66).
- [0087] 본 발명의 방법은 암을 치료하기 위해, PD-1 길항제 (예를 들어, 항체)를 TIM-4 길항제 (예를 들어, 항체)와 조합하여 사용하는 것을 수반한다. 따라서, 본 발명의 PD-1 길항제는 PD-1의 리간드에 결합하여 PD-1 수용체에 대한 하나 이상의 리간드의 결합을 방해, 감소, 또는 억제하거나, 또는 PD-1 수용체를 통한 신호 전달에 관여하지 않으면서 PD-1 수용체에 직접 결합한다. 한 실시양태에서, PD-1 길항제는 PD-1에 직접 결합하여 PD-1 억제 신호 전달을 차단한다. 또 다른 실시양태에서 PD-1 길항제는 PD-1의 하나 이상의 리간드 (예를 들어, PD-L1 및 PD-L2)에 결합하여 리간드(들)가 PD-1을 통하여 억제 신호 전달을 촉발하는 것을 감소 또는 억제한다. 한 실시양태에서, PD-1 길항제는 PD-L1에 직접 결합하여 PD-L1이 PD-1에 결합하는 것을 억제 또는 방지하며, 그로 인해 PD-1 억제 신호 전달을 차단한다.
- [0088] 본 발명의 방법 및 조성물에 사용된 PD-1 길항제는 PD-1 결합 스캐폴드 단백질을 포함하고, PD-1 리간드, 항체 및 다가 작용제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정한 실시양태에서, 길항제는 융합 단백질, 예컨대 AMP-224이다. 또 다른 실시양태에서, 길항제는 항-PD-1 항체 ("PD-1 항체")이다. 본 발명에 사용하기에 적합한 항-인간-PD-1 항체 (또는 이로부터 유래한 VH 및/또는 VL 도메인)는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 대안적으로, 관련 기술분야에서 인식되는 항-PD-1 항체가 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 니볼루맵 (오프디보(OPDIVO)TM), MK-3475 (렘브롤리주맵 (키트루다(KEYTRUDA)TM), PDR001 또는 CT-011이 사용될 수 있다. 추가적으로, 그의 교시가 본원에 참조로 포함되는 WO 2006/121168에 기재된 모노클로날 항체 5C4, 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 및 5F4가 사용될 수 있다. 또한 관련 기술분야에서 인식되는 항체 중 임의의 것과 PD-1에의 결합에 대해 경쟁하는 항체가 사용될 수 있다.
- [0089] 예시적인 항-PD-1 항체는 각각 서열식별번호: 11 및 12에 제시된 서열을 갖는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 5C4, 또는 그의 항원 결합 단편 및 변이체이다. 다른 실시양태에서, 항체는 5C4의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 가변 영역을 포함한다. 따라서, 한 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 13에 제시된 서열을 갖는 5C4의 VH의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 15에 제시된 서열을 갖는 5C4의 VL의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 각각 서열식별번호: 17, 18 및 19에 제시된 서열을 갖는 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 각각 서열식별번호: 20, 21 및 22에 제시된 서열을 갖는 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 각각 서열식별번호: 13 및/또는 서열식별번호: 15에 제시된 아미노산 서열을 갖는 VH 및/또는 VL 영역을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 각각 서열식별번호: 14 및/또는 서열식별번호: 16에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩되는 중쇄 가변 (VH) 영역 및/또는 경쇄 가변 (VL) 영역을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 상기 언급된 항체와 결합에 대해 경쟁하고/거나, 그와 동일한 PD-1 상의 에피토프에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 상기 언급된 항체와 적어도 약 90%의 가변 영역 아미노산 서열 동일성 (예를 들어, 서열식별번호: 13 또는 서열식별번호: 15와 적어도 약 90%, 95% 또는 99%의 가변 영역 동일성)을 갖는다.
- [0090] 특정 실시양태에서, PD1 항체는 하나 이상의 바람직한 기능적 특성, 예컨대 PD-1에 대한 고친화도 결합, 예를 들어, 10^{-7} M 이하의 K_D 로의 인간 PD-1에의 결합; 다른 CD28 패밀리 구성원, 예를 들어, CD28, CTLA-4 및 ICOS에 대한 유의한 교차-반응성의 결여; 혼합 림프구 반응 (MLR) 검정에서 T 세포 증식을 자극하는 능력; MLR에서 IFN- γ 및/또는 IL-2 분비를 증가시키는 능력; 1종 이상의 PD-1 리간드 (예를 들어, PD-L1 및/또는 PD-L2)의 PD-1에의 결합을 억제하는 능력; 항원-특이적 기억 반응을 자극하는 능력; 항체 반응을 자극하는 능력 및/또는 생체내에서 종양 세포의 성장을 억제하는 능력을 나타낸다.
- [0091] 또 다른 실시양태에서, PD-1 길항제는 항-PD-L1 항체이다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 항-인간-PD-L1 항체

(또는 이로부터 유래된 VH 및/또는 VL 도메인)는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 대안적으로, 관련 기술분야에서 인식되는 항-PD-L1 항체가 사용될 수 있다. 예를 들어, MEDI4736 (항-B7-H1로도 또한 공지됨; 두르발루맵 (임핀지(IMFINZI)TM)), MPDL3280A (RG7446으로도 또한 공지된 아테졸리주맵 (테센트릭(TECENTRIQ)TM)) 및 아벨루맵 (바벤시오(BAVENCIO)TM)이 사용될 수 있다. 추가적으로, WO 2007/005874 및 미국 특허 번호 7,943,743 (이들의 교시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 모노클로날 항체 12A4, 3G10, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 및 13G4가 사용될 수 있다. 또한 PD-L1에의 결합에 대해 이들 관련 기술분야에서 인식되는 임의의 항체와 경쟁하는 항체가 사용될 수 있다.

[0092] 예시적인 항-PD-L1 항체는 12A4 (WO 2007/005874 및 미국 특허 번호 7,943,743)이다. 한 실시양태에서, 항체는 12A4의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 VR을 포함한다. 따라서, 한 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 1에 제시된 서열을 갖는 12A4의 VH 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 3에 제시된 서열을 갖는 12A4의 VL 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 각각 서열식별번호: 5, 6 및 7에 제시된 서열을 갖는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 각각 서열식별번호: 8, 9 및 10에 제시된 서열을 갖는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 각각 서열식별번호: 1 및/또는 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 VH 및/또는 VL 영역을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 각각 서열식별번호: 2 및/또는 서열식별번호: 4에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩된 중쇄 가변 (VH) 및/또는 경쇄 가변 (VL) 영역을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 상기 언급된 항체와 결합에 대해 경쟁하고/거나, 그와 동일한 PD-L1 상의 에피토프에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 상기 언급된 항체와 적어도 약 90%의 가변 영역 아미노산 서열 동일성 (예를 들어, 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 3과 적어도 약 90%, 95% 또는 99%의 가변 영역 동일성)을 갖는다.

[0093] 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체는 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M 또는 그 미만의 K_D 로 각각 PD-1 또는 PD-L1에 결합할 수 있다.

[0094] 특정 실시양태에서, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체는 IgG 항체, 예컨대 IgG1, IgG2 또는 IgG4 항체이다. 구체적 실시양태에서, 항-PD-1 또는 PD-L1 항체는 무이펙터 불변 영역을 갖는다. 항-PD-1 또는 PD-L1 항체는 IgG4 항체, 예를 들어, S228P 돌연변이를 갖는 IgG4 항체일 수 있다.

[0095] III. TIM-4 길항제

[0096] 본원에 사용된, "T-세포 이뮤노글로불린 및 뮤신 도메인-함유 단백질 4", "T-세포 이뮤노글로불린 뮤신 수용체 4", "T-세포 막 단백질 4" 및 "스무클러(SMUCKLER)"로서도 또한 공지된 용어 "TIM-4" 및 "TIMD-4"는 상호교환 가능하게 사용된다. 인간 TIM-4의 이소형-1의 완전한 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열은 각각 진뱅크 수탁 번호 NP_612388.2 및 NM_138379.2 하에 발견될 수 있다 (서열식별번호: 26-27). 인간 TIM-4의 이소형-2의 완전한 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열은 각각 진뱅크 수탁 번호 NP_001140198.1 및 NM_001146726.1 하에 발견될 수 있다 (서열식별번호: 28-29) (Jones *et al.*, Int Arch Allergy Immunol. 2006;141(4):331-6). 2종의 인간 이소형의 정렬은 도 1에 도시된다.

[0097] 시노물구스 원숭이로부터의 TIM-4 이소형의 아미노산 서열은 진뱅크 수탁 번호 XP_005558436 및 EHH54702 하에 발견될 수 있고, 뮤린 TIM-4 이소형에 대한 아미노산 서열은 진뱅크 수탁 번호 NP_848874 및 NP_599009 하에 발견될 수 있다. 마우스, 시노물구스 원숭이 및 인간 TIM-4 폴리펩티드의 아미노산 서열의 정렬은 도 2에 제공되고, 인간, 시노물구스 및 뮤린 오르토로그의 전장 및 IgV 영역의 퍼센트 동일성은 표 1에 제시된다.

[0098] 표 1. TIM-4 오르토로그

	hTIM4-FL	hTIM4 IgV
시노	87%	93%
마우스	49%	64%

[0099]

[0100] 단백질 "TIM-4"는 T-세포 이뮤노글로불린 및 뮤신 도메인-함유 (TIM) 패밀리의 구성원인 유형 I 막 단백질이다. 인간 TIM 패밀리는 천식, 알레르기 및 자가면역과 연계된 염색체 영역에 위치하는, 인간 염색체 5q33.2 상의 3종의 구성원 (TIM-1, TIM-3 및 TIM-4)을 함유한다. TIM 단백질은 고도로 보존된 시스테인 잔기를 갖는 N-말단 이뮤노글로불린 (IgV)-유사 도메인, O-연결 및 N-연결 글리코실화를 갖는 트레오닌-풍부 뮤신 도메인, 단일 막 횡단 도메인, 및 세포질 영역을 포함하는 공통 구조적 특색을 갖는 유형 I 세포-표면 당단백질이다. 인간 TIM-1 및 TIM-3의 세포질 도메인은 티로신 인산화 모티프(들)를 함유하는 반면, TIM-4는 포스포티로신 모티프가 결

여되어 있다.

- [0101] TIM-4는 수지상 세포 (DC) 및 비장, 림프절 또는 복막강으로부터의 대식세포를 포함하는, 골수 세포 상에 발현된다. TIM-4는 IgV 도메인을 통해 TIM-1, MerTK, 인테그린 $\alpha v \beta 3$ 및 포스파티딜 세린에 결합하는 것으로 입증되었다. MerTK 및 인테그린 $\alpha v \beta 3$ 은 특정한 TIM4 매개 생물학적 활성에서 역할을 할 수 있다 (Nishi et al. (2014) Mol Cell Biol. 34(8):1512-20 및 Toda et al. (2012) Mol Cell Biol. 32(1):118-25). TIM-4는 면역 반응의 유도기 동안 천연 T 세포를 억제하고 이펙터기에서 T 세포 반응을 증진시킴으로써 T 세포 항상성을 상이하게 조절한다 (Rodriguez-Manzanet et al., supra). 예를 들어, TIM-4는 활성화된 T 세포 상에 존재하는 TIM-1에 결합하고, T 세포 증식을 공동-자극한다.
- [0102] TIM-4는 N-말단 이류노글로불린 가변 (IgV) 도메인에서 FG-CC' 결합 간극을 통하여 포스파티딜세린 (PS)에 결합한다. TIM-4는 DAMP의 방출 후에 상향조절되고, 대식세포에 의한 아포토시스 세포의 에페로시토시스를 증진시킨다 (Kobayashi, 2007; Albacker, et al., J. Immunol. 2010; 185:6839-6849; Mizui et al. Int. Immunol. 2008; 20:695-708). 대조적으로, TIM-4 녹아웃 마우스는 리소솜 분해, 항원 제시 및 교차-프라이밍에서 결함을 갖는다 (Miyanishi 2012, Rodrigues-Manzaneta, 2010).
- [0103] TIM-4는 종양 미세환경 (TME)에서 대식세포 및 DC 상에 발현되는 것으로 입증되었고, 종양 내 골수 세포와 항원-특이적 세포독성 T 세포 사이의 상호작용을 조정할 수 있다. 바그다디(Bahgdadi) 등 (상기 문헌)은, 아포토시스 종양 세포가 TIM-4+ 골수 유래 대식세포 (BMDM)에 의해 섭취되었는데, 이는 TIM-4가 섭취된 종양 세포의 과도한 리소솜 분해를 촉진함으로써 면역 관용에 기여하면서, TIM-4+ 종양-연관 대식세포 (TAM)에 의한 손상된 종양 항원 제시를 유도한다는 것을 시사한다고 보고했다. 이 기능을 억제하는 것은 항-TIM-4 차단 항체에 의한 단독요법 후에 항종양 활성을 촉진하는 것으로 보이고, 백신 요법 모델 (바그다디(Bahgdadi) 2013)의 맥락에서 항-TIM-3 차단 항체와 조합되는 경우 상승작용적 항종양 활성을 입증한다.
- [0104] TIM-4와 관련하여 사용된 용어 "길항제"는 시험관내에서, 계내에서, 또는 생체내에서 TIM-4의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 억제하는 임의의 분자를 지칭한다. 그러한 생물학적 활성의 예는 TIM-4의 PS에의 결합, 종양 세포의 에페로시토시스, 및 종양 항원 제시의 억제, 뿐만 아니라 추가로 문헌에 보고된 것들을 포함한다. TIM-4 길항제는 직접 또는 간접 방식으로 기능할 수 있다. 예를 들어, TIM-4 길항제는, TIM-4의 PS에 대한 직접 결합을 차단하고/거나 TIM-4의 다른 PS 수용체에 대한 상호작용을 차단하고 종양 세포의 에페로시토시스에 관여하는 세포 능력을 감소시킨 결과로서, 시험관내에서, 계내에서, 또는 생체내에서 TIM-4의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 억제하도록 기능할 수 있다. 또한, 길항제는 TIM-1과의 TIM-4 상호작용을 방해하여 이로써 직접 T 세포 조절 활성을 방지하는 것에 의해 기능할 수 있다. 또한, TIM-4 길항제는, 예를 들어, 또 다른 분자를 억제하고, 이것이 이어서 TIM-4 활성화 또는 발현을 차단한 결과로서, 시험관내에서, 계내에서, 또는 생체내에서 TIM-4의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 억제하도록 기능할 수 있다. 길항제가 TIM-4 발현 또는 활성을 차단하거나, 억제하거나, 감소시키도록 간접적으로 기능하는 분자로서 역할을 할 수 있다는 것이 고려된다.
- [0105] TIM-4 길항제는, 스스로든 또는 PD-1 길항제와 같은 또 다른 치료와 조합되어서든, 직접적으로 또는 간접적으로 TIM-4의 활성을 억제하거나 감소시키고 종양 성장을 감소시키는 임의의 분자일 수 있다. 예시적인 TIM-4 길항제는 TIM-4 결합 스캐폴드, 예컨대 항-TIM-4 항체 ("TIM-4 항체"), 예를 들어, 키메라, 인간화 또는 완전 인간 항체, 그의 항원 결합 부분 또는 이들 중 임의의 것에 기초하거나 그로부터 유래한 분자를 포함한다. 또한, TIM-4 길항제는 비-항체 단백질일 수 있다. 예를 들어, TIM-4 길항제는 또한 변형된 TIM-4 리간드 또는 결합 단백질, 예를 들어, TIM-1 및 PS로부터 유래하거나 이에 기초한 분자를 포함한다. 또한, TIM-4-조절된 생물학은 융합 단백질 예컨대 TIM-4: Ig에 의해 간섭될 수 있다.
- [0106] TIM-4 길항제는 1가 또는 다가일 수 있다. 특정 실시양태에서, TIM-4 길항제는 2가, 3가, 4가이거나, 또는 동일하거나 상이한 TIM-4 에피토프일 수 있는 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과 TIM-4 에피토프에 결합한다. 특정 실시양태에서, TIM-4 길항제는 다가 단일특이적 TIM-4 결합 스캐폴드, 예를 들어, 동일한 TIM-4 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과 영역을 포함하며, 결합 영역이 동일하거나 상이한 아미노산 서열로 구성될 수 있는, TIM-4 결합 스캐폴드를 포함하는 단백질이다. 예를 들어, TIM-4 길항제는 동일한 TIM-4 결합 영역, 예를 들어, N-말단 IgV 영역 또는 IgV 영역의 FG-CC' 결합 간극을 함유하는 그의 부분의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과 반복을 포함하는 TIM-4 결합 스캐폴드일 수 있다.
- [0107] 특정 실시양태에서, TIM-4 길항제는 TIM-4에 특이적으로 결합하지만, TIM 패밀리의 다른 구성원, 예컨대 TIM-1

또는 TIM-3에 유의하게 또는 특이적으로 결합하지 않는다. 다른 실시양태에서, TIM-4 길항제는 TIM-4 및 TIM-1에 특이적으로 결합한다.

[0108] 또 다른 실시양태에서, TIM-4 길항제는 항체, 예를 들어, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M 또는 그 미만의 K_D 로 인간 TIM-4에 결합하는 항체이며, 여기서 항체는 종양 성장을 억제하고/거나, 종양 항원 특이적 CTL을 증가시킨다. 인간 TIM-4에 결합하는 항체는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 이들 항체 중 임의의 것은 PD-1 길항제와 조합하여 사용될 수 있으며, 단 그의 조합은 예를 들어, 암을 갖는 대상체에서 종양 성장의 억제 또는 종양 크기의 감소를 발생시킨다. 예시적인 항체는 TIM-4의 N-말단 IgV 도메인(예를 들어, FG-CC" 결합 잔극)에 특이적으로 결합하는 것들을 포함한다. 항-TIM-4 항체는 인간 TIM-4, 예를 들어, 9F4 (바이오레전드(BioLegend))에 결합하는 것들을 포함한다. 항-마우스 항-TIM4 항체는 RMT4-53 (바이오엑셀(BioXCell), 진텍스(GeneTex)), RMT4-54 (바이오레전드) F31-5G3 및 21H12 (각각 바이오레전드, 비디 바이오사이언시스(BD Biosciences))를 포함한다. 이들 항체의 변이체, 예컨대 이들 항체의 CDR을 포함하는 항체, 또는 인간 또는 무린 TIM-4에 대한 결합에 대해 이들 항체 또는 이들 항체 중 하나와 동일하거나 유사한 TIM-4 상의 에피토프에 결합하는 항체 중 하나와 경쟁하는 항체가 PD-1 길항제와 조합하여 사용될 수 있다.

[0109] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 사용하기 위한 항-TIM4 항체는 IgV 도메인이 아니면서 예를 들어 TIM-4의 줄기 도메인 또는 세포외 도메인 내의 임의의 다른 영역일 수 있는 인간 TIM-4 상의 영역에 결합하고(단 항체는 TIM-4의 생물학적 활성을 길항함), 암을 치료하기 위해 사용되는 경우에(어느 작용제 단독인 것에 비해) PD-1 길항제와 적어도 상가적 효과를 갖는다.

[0110] 또 다른 실시양태에서, TIM-4 길항제는 다가 작용제, 예컨대 다량체(예를 들어, 삼량체화 도메인 및 TIM-4에 결합하는 폴리펩티드를 갖는 폴리펩티드 구조물)이다.

[0111] 또한, TIM-4에 대한 결합에 대해 본원에 나열된 임의의 예시적인 작용제와 경쟁하면서, 종양 성장을 억제하거나 종양 크기를 감소시키는 작용제가 사용될 수 있다. 본원에 나열된 임의의 항-TIM-4 항체와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 VL 쇄를 갖는 항체가 사용될 수 있다.

[0112] TIM-4 길항제의 투여는 포스파티딜세린(PS)-결합제(예를 들어, 아넥신 V 펩티드, TIM-4 결합 단편)에 의한 영상화에 의해 모니터링될 수 있으며, 여기서 PS 결합제는 영상화, 예를 들어 PET, SPECT, 형광 등을 위해 표지될 수 있다. 결합제는 표적 종양 세포와 접촉하게 되고, 결합된 작용제의 존재는 존재하여 TIM-4와 상호작용할 수 있는 PS를 나타낸다.

[0113] 예를 들어, 아넥신 V는 아포토시스 세포 또는 생리학상 스트레스 적용된 세포의 표면 상에 선택적으로 발현되는, 막-결합된 구성적 음이온성 인지질 포스파티딜세린(PS)에 대한 나노몰 친화도를 갖는 인간 내 편재성 세포내 단백질이다. 이와 같이, 아넥신 V의 방사성표지된 형태는 추적자를 치료 효능의 초기 대용물 마커로서 이용하기 위해 동물 모델 및 인간 I상 및 II상 시험 둘 다에 사용되었다(예를 들어, 문헌 [Blankenberg et al. Proc. Am. J. Thoracic. Soc. 2009; 6:469-476]). 예를 들어, 종양 미세환경 내에 있는 PS의 생체내 모니터링은(PET 또는 SPECT에 대해서는) 표지 방사성추적자에 연결된 항-아넥신 V에 의해, 또는 표지 또는 방사성 추적자에 연결된 TIM-4 융합 단백질에 의해 수행될 수 있다. 표지는 근 IR 영상화에 대해서는 q-점을, 또는 보다 통상적인 다른 표지를 포함할 수 있다. pK/Kd 연구는 방사성표지된 항체에 의해 수행될 수 있다.

[0114] IV. 조성물

[0115] 한 측면에서, 본 발명은(예를 들어, 단일 조성물에 함께 제제화되거나 개별적으로 제제화된) PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제를 포함하는 조성물을 제공한다. 한 실시양태에서, PD-1 길항제는 니볼루맙, 펌브롤리주맙, 두르발루맙, 아테졸리주맙, 아벨루맙 또는 PDR001이다. 한 실시양태에서, 조성물은 PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제를 포함하며, 여기서 (a) PD-1 길항제는 서열식별번호: 13에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 15에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함하는 항-PD-1 항체이고, (b) TIM-4 길항제는 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제를 포함하며, 여기서 (a) PD-1 길항제는 서열식별번호: 1에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 3에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함하는 항-PD-L1 항체이고, (b) TIM-4 길항제는 항체이다.

[0116] 인간 환자에게 투여하기에 적합한 제약 조성물은 전형적으로 비경구 투여를 위해, 예를 들어 액체 담체 중에 제제화되거나, 또는 정맥내 투여를 위한 액체 용액 또는 현탁액으로의 재구성에 적합하다.

- [0117] 일반적으로, 이러한 조성물은 전형적으로 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "제약상 허용되는"은 동물, 특히 인간에서의 사용에 대해 정부 규제 기관에 의해 승인되었거나 또는 미국 약전 또는 또 다른 일반적으로 인정된 약전에 열거되어 있음을 의미한다. 용어 "담체"는 화합물과 함께 투여되는 희석제, 아주반트, 부형제 또는 비히클을 지칭한다. 이러한 제약 담체는 멸균 액체, 예컨대 물, 및 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것들을 포함하는 오일, 예컨대 땅콩 오일, 대두 오일, 미네랄 오일, 참깨 오일, 글리세롤 폴리에틸렌 글리콜 리시놀레에이트 등일 수 있다. 물 또는 수용액 염수 및 수성 텍스트로스와 및 글리세롤 용액은, 특히 주사액을 위한 담체로서 사용될 수 있다. 비경구 투여를 위한 액체 조성물은 주사 또는 연속 주입에 의한 투여를 위해 제제화될 수 있다. 주사 또는 주입에 의한 투여 경로는 정맥내, 복강내, 근육내, 척수강내 및 피하를 포함한다.
- [0118] 경구 사용을 위해, 본 발명의 제약 조성물은 예를 들어 정제 또는 캡슐, 분말, 분산성 과립 또는 카세트의 형태로, 또는 수용액 또는 현탁액으로서 투여될 수 있다. 경구 사용을 위한 정제의 경우, 통상적으로 사용되는 담체는 락토스, 옥수수 전분, 탄산마그네슘, 활석 및 당을 포함하고, 운환제, 예컨대 스테아르산마그네슘이 통상적으로 첨가된다. 캡슐 형태의 경구 투여를 위해, 유용한 담체는 락토스, 옥수수 전분, 탄산마그네슘, 활석 및 당을 포함한다. 수성 현탁액이 경구 투여를 위해 사용되는 경우, 유화제 및/또는 현탁화제가 통상적으로 첨가된다.
- [0119] 게다가, 감미제 및/또는 향미제가 경구 조성물에 첨가될 수 있다. 근육내, 복강내, 피하 및 정맥내 사용을 위해, 활성 성분(들)의 멸균 용액이 통상적으로 사용되고, 용액의 pH가 적합하게 조절되고 완충되어야 한다. 정맥내 사용을 위해, 제제에 등장성을 제공하기 위해서 용질(들)의 총 농도가 제어되어야 한다.
- [0120] 본 발명에 따라 좌제를 제조하기 위해, 저융점 왁스 예컨대 지방산 글리세리드 또는 코코아 버터의 혼합물을 우선 용융시키고, 예를 들어 교반에 의해, 활성 성분을 왁스 내에 균질하게 분산시킨다. 그 후, 용융된 균질 혼합물을 통상적인 크기의 몰드에 붓고, 냉각시키고, 이로써 고체화시킨다.
- [0121] 액체 제제는 용액, 현탁액 및 에멀전을 포함한다. 이러한 제제는 비경구 주사를 위한 물 또는 물/프로필렌 글리콜 용액으로 예시된다. 또한, 액체 제제는 비강내 투여를 위한 용액을 포함할 수 있다.
- [0122] 흡입에 적합한 에어로졸 제제는 불활성 압축 기체와 같은 제약상 허용되는 담체와 조합될 수 있는 용액 및 분말 형태의 고체를 포함할 수 있다.
- [0123] 또한, 사용 직전에 경구 또는 비경구 투여를 위한 액체 제제로 전환되는 것으로 의도되는 고체 제제가 포함된다. 이러한 액체 형태는 용액, 현탁액 및 에멀전을 포함한다.
- [0124] V. 환자 집단
- [0125] 예를 들어, TIM-4 길항제 및 PD-1 길항제의 조합을 사용하여, 환자에서 암을 치료하는 효과적인 방법이 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, 환자는 암종, 육종, 모세포종, 백혈병 및 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암을 앓는다. 또 다른 실시양태에서, 환자는 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 위장암, 결장직장암, 위암, 결장암종 및 교모세포종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암을 앓는다. 또 다른 실시양태에서, 환자는 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 필라델피아 염색체 양성 급성 림프모구성 백혈병 (Ph+ ALL), 편평 세포 암종, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 신경교종, 위장암, 신암, 난소암, 간암, 자궁내막암, 신장암, 전립선암, 갑상선암, 신경모세포종, 췌장암, 다형성 교모세포종, 자궁경부암, 위암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장 암종, 및 두경부암, 위암, 배세포 종양, 소아 육종, 부비동비강 자연 킬러, 다발성 골수종, 급성 골수 백혈병 (AML), 및 만성 림프구성 백혈병 (CML)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암을 앓는다.
- [0126] VI. 추가의 작용제/요법
- [0127] 본 발명의 조합물 (예를 들어, TIM-4 길항제와 조합된 PD-1 길항제)은 또한 치료될 암에 대한 특정 유용성을 위해 선택된 다른 널리 공지된 요법과 함께 사용될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 조합물은 부적절한 경우, 공지된 제약상 허용되는 작용제(들)과 순차적으로 사용될 수 있다.
- [0128] 예를 들어, 본원에 기재된 PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제는 추가의 치료, 예컨대 조사, 화학요법 (예를 들어, 캄프토테신 (CPT-11), 5-플루오로우라실 (5-FU), 시스플라틴, 독소루비신, 이리노테칸, 파클리탁셀, 겐시타빈, 시스플라틴, 파클리탁셀, 독소루비신, 5-fu 또는 캄프토테신 + apo21/TRAIL (6X 콤보)을 사용함), 1종 이상의 프로테아솜 억제제 (예를 들어, 보르테조미드 또는 MG132), 1종 이상의 Bcl-2 억제제 (예를 들어, BH3I-2' (bcl-x1 억제제), AT-101 (R-(-)-고시폴 유도체), ABT-263 (소분자), GX-15-070 (오바토클락스), 또는 MCL-1 (골수성

백혈병 세포 분화 단백질-1) 길항제), iAP (아포토시스 단백질의 억제제) 길항제 (예를 들어, smac7, smac4, 소분자 smac 모방체, 합성 smac 펩티드 (문헌 [Fulda *et al.*, *Nat Med* 2002;8:808-15] 참조), ISIS23722 (LY2181308), 또는 AEG-35156 (GEM-640)), HDAC (히스톤 데아세틸라제) 억제제, 항-CD20 항체 (예를 들어, 리투시맵), 혈관신생 억제제 (예를 들어, 베바시주맵), VEGF 및 VEGFR를 표적화하는 항혈관신생제, 합성 트리테르페노이드 (문헌 [Hyer *et al.*, *Cancer Research* 2005;65:4799-808] 참조), c-FLIP (세포성 FLICE-억제 단백질) 조절제 (예를 들어, PPAR γ (피옥시슘 증식자-활성화된 수용체 γ)의 천연 및 합성 리간드, 5809354 또는 5569100), 키나제 억제제 (예를 들어, 소라페닙), 및/또는 유전자독성 약물과 조합하여 (예를 들어, 동시에 또는 개별적으로) 추가로 사용될 수 있다.

[0129] 본원에 기재된 PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제는 1종 이상의 항증식 세포독성제와 조합하여 추가로 사용될 수 있다. 항증식 세포독성제로서 사용될 수 있는 화합물의 부류는 하기를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다:

[0130] 알킬화제 (비제한적으로, 질소 머스타드, 에틸렌이민 유도체, 알킬 술포네이트, 니트로소우레아 및 트리아젠을 포함함): 우라실 머스타드, 클로르메틴, 시클로포스파미드 (시톡산(CYTOXAN)TM) 포스포미드, 멜팔란, 클로람부실, 피포브로만, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌티오포스포르아민, 부술판, 카르무스틴, 로무스틴, 스트렙토조신, 다카르바진, 및 테모졸로미드.

[0131] 항대사물 (비제한적으로, 폴산 길항제, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체 및 아데노신 데아미나제 억제제를 포함함): 메토틱렉세이트, 5-플루오로우라실, 플록수리딘, 시타라빈, 6-메르캅토피리딘, 6-티오구아닌, 플루다라빈 포스페이트, 펜토스타틴, 및 겐시타빈.

[0132] 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 항증식제는 관련 기술분야에 공지된 다른 마이크로튜불린 안정화제 이외에, 비제한적으로, 타산, 파클리탁셀 (파클리탁셀은 타솔(TAXOL).RTM으로서 상업적으로 입수가능함), 도세탁셀, 디스코데르몰리드 (DDM), 덕티오스타틴 (DCT), 펠로루시드 A, 에포틸론, 에포틸론 A, 에포틸론 B, 에포틸론 C, 에포틸론 D, 에포틸론 E, 에포틸론 F, 푸라노에포틸론 D, 데스옥시에포틸론 B1, [17]-데히드로데스옥시에포틸론 B, [18]데히드로데스옥시에포틸론 B, C12,13-시클로프로필-에포틸론 A, C6-C8 브릿지된 에포틸론 A, 트랜스-9,10-데히드로에포틸론 D, 시스-9,10-데히드로에포틸론 D, 16-데스메틸에포틸론 B, 에포틸론 B10, 디스코데로몰리드, 파투필론 (EPO-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, ABJ-789, XAA296A (디스코데르몰리드), TZT-1027 (소블리도틴), ILX-651 (타시도틴 히드로클로라이드), 할리콘드린 B, 에리블린 메실레이트 (E-7389), 헤미아스텔린 (HTI-286), E-7974, 크립토피신, LY-355703, 메이탄시노이드 면역접합체 (DM-1), MKC-1, ABT-751, T1-38067, T-900607, SB-715992 (이스피네시브), SB-743921, MK-0731, STA-5312, 엘레우테로빈, 17베타-아세톡시-2-에톡시-6-옥소-B-호모-에스트라-1,3,5(10)-트리엔-3-올, 시클로스트렙틴, 이소라울리말리드, 라울리말리드, 4-에피-7-데히드록시-14,16-디데메틸-(+)-디스코데르몰리드, 및 크립토티론 1을 포함한다.

[0133] 본 발명의 화학요법 방법에 의한 치료와 함께 또는 그 전에 비정상적으로 증식성인 세포를 정지시키는 것이 바람직한 경우, 호르몬 및 스테로이드 (합성 유사체 포함), 예컨대 17 α -에티닐에스트라디올, 디에틸stil베스트롤, 테스토스테론, 프레드니손, 플루옥시메스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 테스토락톤, 메게스트롤아세테이트, 메틸프레드니솔론, 메틸-테스토스테론, 프레드니솔론, 트리암시놀론, 클로로트리아니센, 히드록시프로게스테론, 아미노글루테티미드, 에스트라무스틴, 메드록시프로게스테론아세테이트, 류프롤리드, 플루타미드, 토레미펜, 졸라텍스(ZOLADEX)TM가 또한 환자에게 투여될 수 있다. 본 발명의 방법 또는 조성물을 사용하는 경우, 임상 세팅에서 중앙 성장 또는 전이를 조정하는 데에 사용되는 다른 작용제, 예컨대 진통제가 또한 필요에 따라 투여될 수 있다.

[0134] 화학요법제를 안전하고 효과적으로 투여하는 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 또한, 그의 투여가 표준 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 많은 화학요법제의 투여가 문헌 [Physicians' Desk Reference (PDR), e.g., 1996 edition (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA)]에 기재되어 있고; 그의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0135] PD-1 길항제 및 TIM4 길항제는 또한 면역계를 자극하는 1종 이상의 면역요법제, 예를 들어, 인간 CTLA-4, LAG-3, GITR, OX40, IDO, CSF-1R 등에 결합하는 작용제와 조합될 수 있다.

[0136] 화학요법제(들) 및/또는 방사선 요법은 관련 기술분야에 널리 공지된 치료 프로토콜에 따라 투여될 수 있다. 화학요법제(들) 및/또는 방사선 요법의 투여는 치료할 질환 및 이러한 질환에 대한 화학요법제(들) 및/또는 방사선 요법의 공지된 효과에 따라 다양할 수 있다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 또한, 숙련된 임상치의 지식에 따라, 치료 프로토콜 (예를 들어, 투여량 및 투여 시간)은 환자에 대한 투여된

치료제의 관찰되는 효과의 관점에서, 및 투여된 치료제에 대한 질환의 관찰되는 반응의 관점에서 달라질 수 있다.

[0137] VII. 치료 프로토콜

[0138] 환자에서 암을 치료하기 위한 적합한 치료 프로토콜은, 예를 들어 유효량의 PD-1 길항제 (예를 들어, 항체) 및 TIM-4 길항제 (예를 들어, 항체)를 환자에게 투여하는 것을 포함한다.

[0139] 본원에 사용된 보조적 또는 조합된 투여 (공-투여)는 동일하거나 상이한 투여 형태의 2종의 길항제의 동시 투여, 또는 2종의 길항제의 별개의 투여 (예를 들어, 순차적 투여)를 포함한다. 따라서, PD-1 길항제 (예를 들어, 항체) 및 TIM-4 길항제 (예를 들어, 항체)는 단일 제제로 동시에 투여될 수 있다. 대안적으로, PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제는 개별 투여를 위해 제제화될 수 있고, 공동으로 또는 순차적으로 투여된다.

[0140] 예를 들어, PD-1 길항제가 먼저 투여되고, 이어서 (예를 들어, 즉시 뒤따라) TIM-4 길항제가 투여될 수 있거나, 또는 그 반대의 경우일 수 있다. 한 실시양태에서, PD-1 길항제는 TIM-4 길항제의 투여 전에 투여되고, 예를 들어, PD-1 길항제가 먼저 환자로 주입되고, 10분 내지 3시간 후에 이어서 TIM-4 길항제가 주입된다. 한 실시양태에서, TIM-4 길항제는 PD-1 길항제의 투여 전에 투여되고, 예를 들어, TIM-4 길항제가 먼저 환자로 주입되고, 10분 내지 3시간 후에 이어서 PD-1 길항제가 주입된다. 이러한 공동 또는 순차적 투여는 바람직하게는 길항제 둘 다가 치료되는 환자에 동시에 존재하도록 한다. 또 다른 실시양태에서, TIM-4 길항제 및 PD-1 길항제는 동시에 투여된다.

[0141] 한 실시양태에서, 대상체에게 TIM-4 길항제의 단일 용량 및 PD-1 길항제, 예를 들어, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체의 단일 용량이 투여된다. 특정 실시양태에서, TIM-4 길항제의 다중 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과) 용량 및 PD-1 길항제의 다중 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과) 용량은 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. TIM-4 길항제 및 PD-1 길항제의 투여는 동일한 날에 이루어질 수 있고, 또는 대안적으로, TIM-4 길항제는 PD-1 길항제 1일 이상 전후에 투여될 수 있다.

[0142] 한 실시양태에서, TIM-4 길항제 및 PD-1 길항제의 투여는 매주 또는 매월 진행될 수 있고, 그러한 요법에서, 그들은 동일한 날 (예를 들어, 동시에) 또는 차례로 (예를 들어, 서로 1분 이상, 1시간 이상, 또는 1일 이상 전후에) 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, TIM-4 길항제 및 PD-1 길항제는 3일마다 투여된다.

[0143] 한 실시양태에서, PD-1 길항제 및/또는 TIM-4 길항제의 용량은 시간 경과에 따라 달라진다. 예를 들어, PD-1 길항제 및/또는 TIM-4 길항제는 처음에 고용량으로 투여될 수 있고, 시간 경과에 따라 낮아질 수 있다. 또 다른 실시양태에서, PD-1 길항제 및/또는 TIM-4 길항제는 처음에 저용량으로 투여되고, 시간 경과에 따라 증가된다.

[0144] 또 다른 실시양태에서, 투여된 PD-1 길항제 및/또는 TIM-4 길항제의 양은 각각의 용량에 대해 일정하다. 또 다른 실시양태에서, PD-1 길항제 및/또는 TIM-4 길항제의 양은 각각의 용량에 따라 달라진다. 예를 들어, 길항제의 유지 (또는 후속) 용량은 먼저 투여되는 부하 용량보다 더 높거나 또는 그와 동일할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 길항제의 유지 용량은 부하 용량보다 더 낮거나 또는 그와 동일할 수 있다. 임상의는 치료될 환자의 상태에 따라 필요로 하는 바람직한 투여량을 이용할 수 있다. 용량은 질환의 단계 등을 포함하는, 수많은 인자에 의존할 수 있다. 그러한 하나 이상의 인자의 존재에 기초하여 투여되어야 하는 특정 용량은 통상의 기술자의 기술 범위 내에 있다. 일반적으로, 치료는 화합물의 최적 용량 미만인 보다 적은 투여량으로 개시된다. 그 후, 최적 효과가 상기 상황 하에 도달될 때까지 투여량은 소량씩 증가된다. 편의상, 총 1일 투여량은 원하는 경우에 하루 동안 여러 부분으로 나누어 투여될 수 있다. 간헐적 요법 (예를 들어, 3주 중 1주 또는 4주 중 3주)이 또한 사용될 수 있다.

[0145] 한 실시양태에서, TIM-4 길항제 (예를 들어, 항체)는 0.1, 0.3, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 mg/kg 체중의 용량으로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, PD-1 길항제 (예를 들어, 항체)는 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 mg/kg 체중의 용량으로 투여된다. 일반적으로, 200 μ g/마우스는 대략 10 mg/kg이고, 100 μ g/마우스는 대략 5 mg/kg이다. 따라서, 본원에 기재된 실험에 기초하여, 1-20 mg/kg 체중, 1-10 mg/kg 체중, 5-20 mg/kg 체중 또는 5-10 mg/kg 체중 중 하나 이상의 용량의 TIM-4 길항제 및 PD-1 길항제가 대상체에게 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 0.3 mg/kg 내지 10 mg/kg 체중 용량의 TIM-4 길항제가 사용되고, 적어도 1 mg/kg, 예를 들어, 1-10 mg/kg 체중 용량의 PD-1 길항제가 사용된다.

[0146] VIII. 성과

- [0147] 본원에 개시된 방법에 따라 치료된 환자, 예를 들어, 인간은 바람직하게는 암의 적어도 하나의 징후에서의 개선을 경험한다. 한 실시양태에서, 개선은 측정가능한 종양 병변의 양 및/또는 크기의 감소에 의해 측정된다. 또 다른 실시양태에서, 병변은 흉부 X선 또는 CT 또는 MRI 필름 상에서 측정될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 세포학 또는 조직학을 사용하여 요법에 대한 반응성을 평가할 수 있다.
- [0148] 한 실시양태에서, 치료된 환자는 종양 크기의 감소, 시간의 경과에 따른 전이성 병변의 수의 감소, 완전 반응, 부분 반응, 및 안정 질환을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 치료된 환자는 종양 수축 및/또는 성장 속도의 감소, 즉 종양 성장의 억제를 경험한다. 또 다른 실시양태에서, 원치 않는 세포 증식이 감소되거나 또는 억제된다. 또 다른 실시양태에서, 하기 중 하나 이상이 발생할 수 있다: 암 세포의 수가 감소될 수 있음; 종양 크기가 감소될 수 있음; 말초 기관 내로의 암 세포 침윤이 억제되거나, 지연되거나, 감소되거나, 또는 정지될 수 있음; 종양 전이가 감소되거나 억제될 수 있음; 종양 성장이 억제될 수 있음; 종양 재발이 방지되거나 지연될 수 있음; 암과 연관된 증상 중 1종 이상이 어느 정도 경감될 수 있음.
- [0149] 또 다른 실시양태에서, 치료 방법은 PD-1 (예를 들어, 항체) 또는 TIM-4 길항제 (예를 들어, 항체) 단독에 의해 달성되는 것보다 비슷한 임상 이익률 (CBR = CR (완전 반응), PR (부분 반응) 또는 SD (안정 질환) \geq 6개월)을 더 잘 일으킨다. 다른 실시양태에서, 임상 이익률의 개선은, 예를 들어, PD-1 길항제 또는 TIM-4 길항제 단독에 의한 치료에 비해 또는 치료의 제1일에서의 또는 치료의 개시 직전의 종양 성장에 비해, 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 그 초과이다.
- [0150] 또 다른 실시양태에서, PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제의 투여는, 예를 들어, PD-1 길항제 또는 TIM-4 길항제 단독에 의한 치료에 비해 또는 치료의 제1일에서의 또는 치료의 개시 직전의 종양 성장에 비해, 종양 부피에서 적어도 3배의 감소 (예를 들어, 3.5배의 감소)를 발생시킨다.
- [0151] 추가 실시양태에서, PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제의 투여는, 예를 들어, PD-1 길항제 또는 TIM-4 길항제 단독에 의한 치료에 비해 또는 치료의 제1일에서의 또는 치료의 개시 직전의 종양 성장에 비해, 적어도 80%의 종양 성장 억제를 발생시킨다.
- [0152] 특정 실시양태에서, PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제의 투여는 치료의 개시 전의 또는 치료의 제1일에서의 종양 덩이에 비해 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%만큼 종양 덩이를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 종양 덩이는 본원에 기재된 바와 같은 치료 후에 더 이상 검출되지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 부분적 또는 완전한 완화 상태에 있다. 특정 실시양태에서, 대상체는 증가된 전체 생존, 종양 생존율, 및/또는 무진행 생존을 갖는다.
- [0153] IX. 키트 및 단위 투여 형태
- [0154] (a) PD-1 길항제 및 (b) TIM-4 길항제 및 제약상 허용되는 담체를 상기 방법에 사용하기 위해 적합화된 치료 유효량으로 함유하는 제약 조성물을 포함하는 키트가 또한 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, PD-1 길항제는 항체 (예를 들어, 각각 5C4 또는 12A4)이다. 또 다른 실시양태에서, TIM-4 길항제는 항체이다. 키트는 임의로, 진료의 (예를 들어, 의사, 간호사, 또는 환자)가 내부에 함유된 조성물을 암을 갖는 환자에게 투여하도록 하는, 예를 들어 투여 스케줄을 포함하는 지침서를 또한 포함할 수 있다. 키트는 또한 시린지를 포함할 수 있다.
- [0155] 임의로, 키트는 각각이 상기 제공된 방법에 따른 단일 투여를 위한 유효량의 PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제를 함유하는 단일-용량 제약 조성물의 다중 패키지를 포함한다. 제약 조성물(들)을 투여하는데 필요한 기기 또는 장치가 또한 키트에 포함될 수 있다. 예를 들어, 키트는 PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제의 양을 함유하는 1개 이상의 사전-충전된 시린지를 제공할 수 있다.
- [0156] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0157] (a) PD-1 길항제의 용량;
- [0158] (b) TIM-4 길항제의 용량; 및
- [0159] (c) 본원에 기재된 방법에서 PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제를 사용하는 것에 대한 지침서
- [0160] 를 포함하는, 환자에서 암을 치료하기 위한 키트를 제공한다.
- [0161] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0162] (a) PD-1 길항제의 하나 이상의 용량;

- [0163] (b) TIM-4 길항제의 하나 이상의 용량; 및
- [0164] (c) 본원에 기재된 방법에서 PD-1 길항제 및 TIM-4 길항제를 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는, 환자에서 암을 치료하기 위한 키트를 제공한다.
- [0166] 특정 실시양태에서, TIM-4 길항제는 항체이다. 특정 실시양태에서, PD-1 길항제는 항체이다. 특정한 실시양태에서, PD-1 길항제는 서열식별번호: 13에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 15에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함하는 항-PD-1 항체이다. 또 다른 특정한 실시양태에서, PD-1 길항제는 서열식별번호: 1에 제시된 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 서열식별번호: 3에 제시된 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함하는 항-PD-L1 항체이다.
- [0167] 하기 실시예는 단지 예시적이고, 관련 기술분야의 통상의 기술자가 본 개시내용을 읽었을 때 많은 변형 및 등가물이 그에게 명백할 것이기 때문에 어떠한 방식으로든 본 개시내용의 범주를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.
- [0168] 본원 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌, 진뱅크 등록물, 특허 및 공개 특허 출원의 내용은 명확하게 본원에 참조로 포함된다.
- [0169] 실시예
- [0170] 물질 및 방법
- [0171] 동물
- [0172] 10 내지 11주령 암컷 C57/BL6 마우스 (하를란(Harlan))를 본 연구에 사용하였다. 마우스는 음식물과 물을 자유롭게 제공받았고, 실험 동물 관리 평가 인증 협회 (AAALAC) 국제 규정에 따라 제어된 환경에서 유지시켰다. 모든 동물 연구는 적절한 윤리위원회에 의해 승인받았고, 따라서 1964년 헬싱키 선언 및 그의 후속 개정안에서 정해진 윤리 표준에 따라 수행하였다.
- [0173] 항체
- [0174] 항-마우스 PD-1 mAb (항-mPD-1 mAb) 클론 4H2, 마우스 IgG1 이소형을 브리스톨-마이어드 스쿼브(Bristol-Myers Squibb) (바이올로지컬 디스커버리, 캘리포니아주)에 의해 생산하고 정제하였다. 항-TIM-4 mAb, RMT4-53은 이전에 기재되었다 (Yeung *et al.*, *J. Immunol.* 2009; 191:4447-4455). 간략하게, 스프라그 돌리 래트를 마우스 IgG2a의 Fc 부분에 뮤린 TIM-4의 세포외 도메인 (aa 1-288)을 함유하고, LN 세포를 P3U1 골수종 세포와 융합시킨 TIM-4-Ig 융합 단백질에 의해 면역화시켰다. RMT4-53은 TIM-4/NRK 세포와 반응하지만, 부모 NRK 또는 다른 형질감염된 TIM 패밀리 (TIM-1 B6/NRK, TIM-1 BALB/NRK, TIM-2/NRK, TIM-3 B6/NRK, TIM-3 BALB/NRK) 세포와는 그러하지 않다. 항체는 <0.5 EU/mg 내독소 수준, >95% 순도 및 <5% 고분자량 종을 갖는 것으로 입증되었다. 항-mPD-1 mAb (클론 4H2; 마우스 IgG1) 및 항-mTIM-4 항체 (클론 RM 4-53; 래트 IgG2a)의 원액을 사용 전에 4℃에서 유지시켰다. 항-mPD-1 mAb 및 항-mTIM-4 mAb의 투여 용액을 멸균 포스페이트 완충 염수 (pH 7.0)에서 제조하고, 4℃에서 유지시켰다.
- [0175] 세포주
- [0176] CT-26은 섬유모세포 형태 (ATCC)를 갖는 미분화된 결장 암종 세포주이다. 피하로 접종된 마우스는 10^3 개의 세포에 의해 80% 빈도로, 10^4 개의 세포에 의해 100%로 치사성 종양을 발생시킨다. 폐 전이는 마우스가 10^4 개의 세포에 의해 정맥내로 접종되는 경우에 발생한다 (Wang *et al.*, *J. Immunol.* 1995; 154:4685-4692). MC38 세포주는 상피 형태를 갖는 C57BL6 뮤린 결장 선암종 세포 (CD44+ALDH1+)로부터 유래되었다.
- [0177] TIM-4의 발현
- [0178] 마우스 복막 대식세포 및 TAM 상의 TIM-4의 발현을 유동 세포측정법에서 확인하였다.
- [0179] 면역조직화학
- [0180] 토끼 항-TIM4 (아틀라스 안티바디스(Atlas Antibodies), HPA015625)를 사용한 면역조직화학적 분석은 인간 편도, 폐 및 간에 존재하는 조직 상주 대식세포 상에서의 TIM-4의 발현을 입증하였다. 발현은 5 마이크로미터의 두께로 절편화하여 슈퍼프rost 플러스(Superfrost Plus) 유리 슬라이드에 적용한 고정된 조직 상에서 입증

하였다. 절편을 실온에서 밤새 건조시켰다. 이어서, 조직을 크실렌 중에서 탈파라핀화시킨 다음, 에탄올의 등급화된 연속물에서 증류수로 수화시켰다. 항원 회복을 1분 동안 대략 115℃에서 바이오케어 메디칼(Biocare Medical) EDTA, pH 8.2 (1X)에 의해 HIER을 사용하여 수행하였고, 이어서 실온에 20분 동안 냉각시켰다. 절편을 TNT 완충제 (TBS + 0.5% 트윈(Tween))에서 행구고, PAP 펜을 사용하여 단리하였다. 차단은 실온에서 30분 동안 바이오케어 메디칼 백그라운드 스나이퍼에 의해 수행하였고, 이어서 1X TNT 완충제 행굼, 실온에서 10분 동안 다코(Dako) 퍼옥시다제 블록에서의 인큐베이션, 및 2X TNT 완충제 행굼을 수행하였다. 1차 항체 염색을 실온에서 60분 동안 바이오케어 메디칼 르네상스 항체 희석제 중 1/1000 희석물 및 백그라운드 환원제, 및 3X TNT 완충제 행굼을 사용하여 수행하였다. 검출 항체를 적절한 방울 수로 사용하여 적용함으로써 바이오케어 메디칼 MACH3 토끼 중합체-HRP를 갖는 섹션을 덮고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, 3X TNT 완충제 행굼을 수행하였다. 샘플을 바이오케어 메디칼 베타조이드 DAB(Betazoid DAB)와 인큐베이션하였고, 반응을 슬라이드를 물 중에 위치시킴으로써 정지시켰다. 섹션을 30초 동안 헤마톡실린, 라이카 (Leica)에서 대비염색시키고, 수돗물에서 세척하고, 45초 내지 1분 동안 청색화 용액 내에서 인큐베이션하고, 물에서 2X 세척하고, 알콜의 등급화된 연속물 및 크실렌 내에서 탈수한 다음, 마운팅하였다.

[0181] 실시예 1: 항-TIM-4 항체에 의한 에페로시토시스의 억제

[0182] 흉선세포를 BALB/c 마우스로부터 단리하고, 4시간 동안 텍사메타손과 함께 또는 텍사메타손 없이 배양하여 아포토시스를 유도하였다. 이어서, 세포를 제조업체의 지침서 (썬코퍼서 사이언티픽(Thermofisher Scientific))에 따라 5-10분 동안 pH로도(pHrodo) 염료와 인큐베이션하였다. 간략하게, 2×10^7 개의 세포를 혈청이 없는 배지에서 1 x 세척하고, 희석제 C (카탈로그 번호 G8278) 1 mL 내에 재현탁시켰다. 이어서, 세포를 2x 염료 용액 1 mL를 첨가하고 (희석제 C 1 mL에 PKH26 에탄올성 염료 용액 (카탈로그 번호 P9691) 4 mL를 첨가함) 샘플을 피펫팅하여 혼합함으로써 염색하였다. 인큐베이션을 주기적으로 혼합하면서 5분 동안 수행하였다. 염색 반응을 동등 부피의 혈청을 첨가하고 1분 인큐베이션함으로써 정지시켰다. 이어서, 세포를 혈청이 없는 배지에서 1 x 세척하고, PBS에서 2x 세척하였다. 3×10^6 개의 pH로도-표지된 세포를 BALB/c 마우스에게 i.p. 주사하였고, 안락사시킨 마우스의 복막강에 3 - 5 mL의 빙냉 PBS+ 2mM EDTA를 주입하고, 복부를 촉진한 다음, 바늘 흡인을 통해 용액을 수집하는 것에 의한 세척에 의해 복막 대식세포를 수집하였다. pH로도-표지된 흉선세포 T의 주사 1시간 전에 RMT4-53 항-TIM4 항체를 실험 동물에게 주사하였다.

[0183] 복막 대식세포에 의한 아포토시스 세포의 흡수는 유동 세포측정법을 사용하여 측정하였다. 간략하게, 복막 대식세포를 PBS에서 2x 세척하고, 100 μ L 생존력 염료 (이바이오사이언스(eBioscience)) 내에 재현탁시키고, 얼음 상에서 15분 인큐베이션하였다. 세포를 PBS에서 1 x 세척하고, 얼음 상에서 15분 동안 Fc블록(FcBlock) (바이오레전드) 내에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 얼음 상에서 30분 동안, CD45 (비디), Tim-4 (바이오레전드), CD 11b (바이오레전드), CD 206 (바이오레전드), 및 F4/80+ (바이오레전드)에 대한 항체로 염색하였다. 이어서, 세포를 1 x 세척하고, 펄스/픽스(Perm/Fix) 내에 재현탁시켰다. 이어서, 샘플을 LSR 포르테사(Fortessa) X20 (비디) 상에서 수집하였다. 에페로시토시스에 관련한 세포를 확인하기 위해, 살아있는 세포 집단으로부터 CD45 +/CD11b+ 골수 세포를 게이트링시켰다. 이들 세포 중에, 에페로시토시스에 관련한 대식세포는 F4/80+, OPKH26+로 규정되었다. 결과는 표 2에 제시되어 있다.

[0184] 표 2.

	% 아포토시스 세포
대조군	25-40
대조군 + Dex	50-70
실험 + 항-TIM4	10-15
실험 + Dex 및 TIM-4	22-42

[0185]

[0186] 결과는 비-아포토시스 세포 (25-40%)에 비해 아포토시스 세포 (50-70%)의 에페로시토시스가 증가함을 입증한다. 항-TIM-4 차단 항체의 첨가는 생존 세포 및 아포토시스 세포 둘 다의 흡수를 대단히 감소시켰다. 이것은 TIM-4가 세포 흡수의 중요한 매개체라는 것을 입증한다.

[0187] 실시예 2: 항-TIM-4 항체 및 항-PD-1 항체에 의한 조합 치료에 의한 CT26 모델에서의 생체내 종양 성장의 억제

[0188] 항-TIM-4 및 항-PD-1의 조합물이 항종양 효능을 강화할 것이라는 가설을 시험하기 위해 무린 종양 모델에서 실험을 수행하였다. SC CT-26 마우스, 결장 선암종 종양 모델 (TGM-1438)을 항-TIM4 항체, RTM-453 단독에 의한, 또는 항-PD1 항체, IgG1 D265A와의 조합에 의한 치료 후에 종양 성장에 대해 평가하였다.

[0189] 암컷 BALB/c 마우스 (하를란; 대략 8-9주령)에 제0일에 10^6 개의 CT-26 세포를 피하로 이식하였다. 60마리의 마우스를 하기 스케줄에 따라 2X/주 투여 후에 체중 및 종양 측정에 의해 평가하였다:

[0190] 표 3: 투여 스케줄:

군	N	처리	투여 요법
1	15	mIgG1 이소형 대조군 mAb	0.45 mg, IP, d. 7, 10, 13
2	15	mPD-1 IgG1 D265A mAb + 대조군 mAb	0.2 + 0.25* mg, IP, d. 7, 10, 13
4	15	mTIM-4 래트 IgG2a mAb + 대조군 mAb	0.25 + 0.2* mg, IP, d. 7, 10, 13
6	15	mTIM-4 + mPD-1 mAb	0.25 mg + 0.2 mg, IP, d. 7, 10, 13

[0191]

[0192] 투여일에, 2종의 항체를 합하고, 총 100 μ L의 합한 항체를 마우스 내로 주사하였다. 군당 5마리 마우스로부터의 비장 및 종양을 수집하고, 하기 프로토콜에 따라 제16일에 종양 침윤 림프구 (TIL) 및 비장 면역 세포의 유동 세포측정법 분석을 위해 처리하였다:

[0193] 간략하게, 세포를 PBS 내에 재현탁시키고, 플레이트로 분취하고 (비장 2×10^6 개/세포, 모든 종양 세포/웰), 이어서 PBS, 백스페이스에서 2x 세척하였다. 이어서, 세포를 100 μ L 생존력 염료 (이바이오사이언스) 내에 재현탁시키고, 얼음 상에서 15분 인큐베이션하였다. 세포를 PBS에서 1 x 세척하고, 얼음 상에서 15분 동안 50 μ L Fc블록 (바이오레전드) 내에서 인큐베이션한 다음, 30분 동안 하기 기재된 바와 같은 항체 염색 믹스 50 μ L로 염색시켰다. 이어서, 세포를 FACS 완충제로 1 x 세척하고, 펄프/픽스 내에 재현탁시켰다. 이어서, 샘플을 LSR 포트테사 X20 (비디) 상에 수집하였다.

[0194] T 세포 패널

플루오르	특이성	클론	항체	Cat#	회사	Ab 희석
알렉사 플루오르 488 (FITC)	CD107a	1D4B	알렉사 플루오르* 488 항-마우스 CD107a (LAMP-1) 항체	121608	바이오레전드	1:100
PE	CD115	AFS98	PE 항-마우스 CD115 (CSF-1R) 항체	135506	바이오레전드	1:100
PerCp-Cy5.5	CD49b	DX5	PerCp/Cy5.5 항-마우스 CD49b (뎀-NK 세포) 항체	108916	바이오레전드	1:100
BUV395	CD45	30-F11	BUV395 래트 항-마우스 CD45 항체	564279	이바이오사이언스	1:100
BV421	CD8	53-6.7	브릴리언트 바이올렛 421™ 항-마우스 CD8a 항체	100738	바이오레전드	1:200
BV510	CD4	RM4-5	브릴리언트 바이올렛 510™ 항-마우스 CD4 항체	100553	바이오레전드	1:200
BV605	Thy1.2	53-2.1	브릴리언트 바이올렛 605™ 항-마우스 CD90.2 (Thy-1.2) 항체	140317	바이오레전드	1:200
BV711	CD62L	MEL-14	브릴리언트 바이올렛 711™ 항-마우스 CD62L 항체	104445	바이오레전드	1:200
BV785	CD44	IM7	브릴리언트 바이올렛 785™ 항-마우스 CD44 항체	103041	바이오레전드	1:200
APC	FoxP3	FJK-16s	항-마우스/래트 Foxp3 APC	17-5773-80B	이바이오사이언스	1:100
PE-Cy7	Ki-67	SoIA15	항-마우스/래트 Ki-67 PE-식아닌7	25-5698-82	이바이오사이언스	1:100
APC e플루오르 780 (APC-Cy7)	고정가능한 생존력 염료	n/a	e플루오르* 780 고정가능한 생존력 염료	65-0865-14	이바이오사이언스	1:1000
Fc 블록	블록	93	트루스테인 FcX 항-마우스 CD16/32	101320	바이오레전드	

[0195]

[0196] 증식성 세포를 평가하기 위한 Ki-67+;

[0197] 하위세트 T 세포를 천연 T 세포, 활성화된 T 세포, 및 기억 T 세포 하위세트로 결정하기 위한 CD44/CD62L 분석;

[0198] Treg (FoxP3+CD4+T 세포)의 집단을 평가하기 위한 FoxP3;

[0199] 탈과립 CD8+ T 세포 (항원/종양-특이적 CTL)를 평가하기 위한 CD8+CD107a+

[0200] 골수 세포 패널

플루오르	특이성	클론	항체	Cat#	회사	
알렉사 플루오르 488 (FITC)	CD11c	N418	FITC 항-마우스 CD11c 항체	117306	바이오레전드	1:100
PE	CD115	AF598	PE 항-마우스 CD115 (CSF-1R) 항체	135506	바이오레전드	1:100
PerCP-Cy5.5	CD49b	DX5	PerCP/Cy5.5 항-마우스 CD49b (뱀-NK 세포) 항체	108916	바이오레전드	1:100
BUV 395	CD45	30-F11	BUV395 레트 항-마우스 CD45 항체	564279	이바이오사이언스	1:100
BV 421	Ly6C	HK1.4	브릴리언트 바이올렛 421™ 항-마우스 Ly6C 항체	128032	바이오레전드	1:200
BV 605	Thy 1.2 (CD90.2)	53-2.1	브릴리언트 바이올렛 605™ 항-마우스 Thy1.2 항체	140317	바이오레전드	1:200
BV 711	Gr-1	RB6-8C5	브릴리언트 바이올렛 711™ 항-마우스 Gr-1 항체	104731	바이오레전드	1:200
BV 785	F4-80	BM8	브릴리언트 바이올렛 785™ 항-마우스 F4/80 항체	123141	바이오레전드	1:200
APC	Ly6G	1A8	APC 항-마우스 Ly-6G 항체	127614	바이오레전드	1:200
AF-700	CD11b	M1/70	알렉사 플루오르 700 항-마우스/원간 CD11b 항체	101222	바이오레전드	1:100
PE-Cy7	MHC II	M5/114.15.2	PE-Cy7 항-마우스 I-A/I-E 항체	107630	이바이오사이언스	1:100
APC e플루오르 780 (APC-Cy7)	고정가능한 생존력 염료	n/a	e플루오르* 780 고정가능한 생존력 염료	65-0865-14	이바이오사이언스	1:1000
Fc 블록	블록	93	트루스테인 FcX 항-마우스 CD16/32	101320	바이오레전드	

[0201]

[0202] TAM, MDSC, NK 세포, B 세포에 대한 골수 세포 하위세팅

[0203] 활성화된 APC에 대한 CD80, CD86 염색

[0204] 비장 및 종양의 골수 세포 집단을 도 3에 나타낸다. 비장 및 종양 침윤 림프구의 CD8+ T 세포 집단을 도 4에 나타낸다. 비장 및 종양 침윤 림프구의 CD4+ 세포 집단을 도 5에 나타낸다. 데이터는 골수 세포 집단에서의 이동, 및 종양 침윤 림프구에서의 활성화된 T 세포의 증가를 입증한다.

[0205] 군당 남아있는 10마리의 마우스를 종양 성장에 대해 모니터링하였다. 종양 크기 및 체중을 매주 2회 측정하였다. 종양 크기 (mm^3 으로서 측정됨)를 종양 길이를 종양 폭의 제곱으로 곱하고 2로 나눔으로써 계산하였다. 치료를 피하 종양이 200 mm^3 의 종양 크기 (확립된 모델)에 도달했을 때 개시하였다.

[0206] 항-PD-1 항체와 조합하여 투여된 항-TIM-4 항체는 각각의 작용제 단독의 활성을 초과하는 증진된 항종양 활성을 제공하였다. 조합은 감소된 종양 성장 속도 (도 6-8), 및 상승된 전체 생존율 (도 9)을 입증했다. 요컨대, TIM-4 mAb 및 PD-1 mAb의 조합은 단일 작용제 단독에 의해 도출된 활성에 비해 상승작용적 활성을 생성하였다. 따라서, 본 연구로부터의 결과는 항-mTIM-4 mAb 및 PD-1 mAb의 조합 요법이 내약성이 우수하고, 뚜렷한 항종양 활성을 생성한다는 것을 입증한다.

[0207] 실시예 3: 항-TIM-4 항체 및 항-PD-1 항체에 의한 조합 치료에 의한 MC38 모델에서의 생체내 종양 성장의 억제

[0208] MC38 마우스, 결장 선암종 종양 모델을 항-TIM4 항체, RTM-453 단독에 의한, 또는 항-PD1 항체, IgG1 D265A와의 조합에 의한 치료 후에 종양 성장에 대해 평가하였다.

[0209] 암컷 C57/BL6 마우스 (하를란; 대략 8-9주령)에 제0일에 10^6 개의 MC38 세포를 피하로 이식하였다. 제6일에 마우스에게 투여하기 시작했다. $200 \mu\text{g}$ /주사에서의 3회 용량을 매 4일마다 IP 투여하였다. 2종의 항체를 마우스에게 투여하는 경우, 항체를 먼저 합하고, 마우스 내로 함께 투여하였다. 종양을 캘리퍼를 사용하여 측정하고, 종양 부피를 식 ($L \times W$)/2를 사용하여 계산하였다. 무진행 생존을 종양이 4x 초기 종양 부피에 도달하는 일수 #로서 규정하였다.

[0210] 결과를 도 10, 11 및 12 및 표 X에 제공한다. 이식 후 일수에 따른 무진행 생존의 백분율을 제공하는 도 10은, 항-PD-1 및 항-TIM4 항체의 조합물의 투여가 개별적으로 각 항체에 비해 및 이소형 대조군에 비해 더 높은 무진행 생존의 백분율을 생성한다는 것을 보여준다. 표 X는 조합 치료가 개별적으로 각 항체에 비해 및 이소형 대조군에 비해 더 완전한 퇴행을 제공하였다는 것을 보여준다. 이식 후 일수에 따른 MC38 평균 종양 부피를 보여주는 도 11은, 조합 치료가 개별적으로 각 항체에 비해 및 이소형 대조군에 비해 평균 종양 부피를 더 감소시켰다는 것을 나타낸다. 도 12A-C는 MC38 개별 종양 부피를 보여주고, 도 10, 11 및 표 X에 보여진 결과를 확인시켜준다.

[0211] 표 5: 종양의 완전 퇴행을 갖는 마우스의 수

처리	완전 퇴행
이소형 대조군	0/10
항-PD1 단독	2/10
항-TIM4 (RMT4-53 mIgG1 D265A) 단독	0/10
항-PD1 + 항-TIM4 (RMT4-53 mIgG1 D265A)	4/10

[0212]

[0213] 따라서, CT26 및 MC39 동물 모델에서 항-TIM4 항체의 항-PD-1 항체와의 조합물을 투여하는 것은 각 항체 단독에 비해 더 강한 항종양 효과를 생성했다.

[0214]

서열 목록의 개요

SEQ ID NO:	서열
1	중쇄 가변 영역 (VH) 아미노산 서열 항-PD-L1 mAb (12A4; WO 2007/005874 및 미국 특허 번호 7,943,743 내 12A4) QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKTSGDTFSTYAIISWVRQAPGGGLEWMGGII PIFGKAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLSRSEDVAVYFCARKFHFVS GSPFGMDVWGQGTITVTVSS
2	중쇄 가변 영역 (VH) 뉴클레오티드 서열 항-PD-L1 mAb (12A4; WO 2007/005874 및 미국 특허 번호 7,943,743 내 12A4) cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag act tct gga gac acc ttc agc acc tat gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ata ttt ggt aaa gca cac tac gca cag aag ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg agc aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat ttt tgt gcg aga aag ttt cac ttt gtt tcg ggg agc ccc ttc ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc
3	경쇄 가변 영역 (VL) 아미노산 서열 항-PD-L1 mAb (12A4; WO 2007/005874 및 미국 특허 번호 7,943,743 내 12A4) EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPTFG QGTKVEIK
4	경쇄 가변 영역 (VL) 뉴클레오티드 서열 항-PD-L1 mAb (12A4; WO 2007/005874 및 미국 특허 번호 7,943,743 내 12A4) gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg ccg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa
5	중쇄 CDR1 아미노산 서열 항-PD-L1 mAb (12A4; WO 2007/005874 및 미국 특허 번호 7,943,743 내 12A4) TYAIS
6	중쇄 CDR2 아미노산 서열 항-PD-L1 mAb (12A4; WO 2007/005874 및 미국 특허 번호 7,943,743 내 12A4) GIIPIFGKAHYAQKFQ

[0215]

SEQ ID NO:	서열
7	중쇄 CDR3 아미노산 서열 항-PD-L1 mAb (12A4; WO 2007/005874 및 미국 특허 번호 7,943,743 내 12A4) KFHFVSGSPFGMDV
8	경쇄 CDR1 아미노산 서열 항-PD-L1 mAb (12A4; WO 2007/005874 및 미국 특허 번호 7,943,743 내 12A4) RASQSVSSYLA
9	경쇄 CDR2 아미노산 서열 항-PD-L1 mAb (12A4; WO 2007/005874 및 미국 특허 번호 7,943,743 내 12A4) DASNRAT
10	경쇄 CDR3 아미노산 서열 항-PD-L1 mAb (12A4; WO 2007/005874 및 미국 특허 번호 7,943,743 내 12A4) QQRSNWPT
11	중쇄 아미노산 서열 항-PD-1 mAb (WO 2006/121168 내 5C4) (가변 영역 밑줄표시; 불변 영역 볼드체) QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGL EWVAVIWDGSKRYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDT AVYYCATNDDYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
12	경쇄 아미노산 서열 항-PD-1 mAb (WO 2006/121168 내 5C4) (가변 영역 밑줄표시; 불변 영역 볼드체) EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASN RATGIPARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQSSNWPR TFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13	중쇄 가변 영역 (VH) 아미노산 서열 항-PD-1 mAb (WO 2006/121168 내 5C4) (WO 2006/121168로부터의 SEQ ID NO:4) QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAV IWDGSKRYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATND DYWGQGLVTVSS

[0216]

SEQ ID NO:	서열
14	<p>중쇄 가변 영역 (VH) 뉴클레오타이드 서열 항-PD-1 mAb (WO 2006/121168 내 5C4) (WO 2006/121168로부터의 SEQ ID NO:60)</p> <p>cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc gac tgt aaa gcg tct gga atc acc ttc agt aac tct ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca gtt att tgg tat gat gga agt aaa aga tac tat gca gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg ttt ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aca aac gac gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca</p>
15	<p>경쇄 가변 영역 (VL) 아미노산 서열 항-PD-1 mAb (WO 2006/121168 내 5C4) (WO 2006/121168로부터의 SEQ ID NO:11)</p> <p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGGTDFLTITISSELPEDFAVYCCQQSSNWPRTFGQ GTKVEIK</p>
16	<p>중쇄 가변 영역 (VL) 뉴클레오타이드 서열 항-PD-1 mAb (WO 2006/121168 내 5C4) (WO 2006/121168로부터의 SEQ ID NO:67)</p> <p>gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agt agt tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag agt agc aac tgg cct cgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa</p>
17	<p>중쇄 CDR1 아미노산 서열 항-PD-1 mAb (WO 2006/121168 내 5C4) (WO 2006/121168로부터의 SEQ ID NO:18)</p> <p>NSGMH</p>
18	<p>중쇄 CDR2 아미노산 서열 항-PD-1 mAb (WO 2006/121168 내 5C4) (WO 2006/121168로부터의 SEQ ID NO:25)</p> <p>VIWYDGSKRYYADSVKG</p>
19	<p>중쇄 CDR3 아미노산 서열 항-PD-1 mAb (WO 2006/121168 내 5C4) (WO 2006/121168로부터의 SEQ ID NO:32)</p> <p>NDDY</p>

[0217]

SEQ ID NO:	서열
20	<p>경쇄 CDR1 아미노산 서열</p> <p>항-PD-1 mAb (WO 2006/121168 내 5C4)</p> <p>(WO 2006/121168로부터의 SEQ ID NO:39)</p> <p>RASQSVSSYLA</p>
21	<p>경쇄 CDR2 아미노산 서열</p> <p>항-PD-1 mAb (WO 2006/121168 내 5C4)</p> <p>(WO 2006/121168로부터의 SEQ ID NO:46)</p> <p>DASNRAT</p>
22	<p>경쇄 CDR3 아미노산 서열</p> <p>항-PD-1 mAb (WO 2006/121168 내 5C4)</p> <p>(WO 2006/121168로부터의 SEQ ID NO:53)</p> <p>QQSSNWPRT</p>

[0218]

SEQ ID NO:	서열
23	<p>완전 PD-1 서열 (진뱅크 수탁 번호: U64863)</p> <p>agtttccctt ccgctcacct ccgctgagc agtggagaag gcggcactct ggtggggctg ctccaggcat gcagatccca caggcgccct ggccagtcgt ctgggcggtg ctacaactgg gctggcgggc aggatggttc ttagactccc cagacaggcc ctggaacccc cccaccttct tcccagccct gctcgtggtg accgaagggg acaacgccac cttcacctgc agcttctcca acacatcgga gagcttcgtg ctaaactggt accgcatgag cccagcaac cagacggaca agctggcgcg cttccccgag gaccgcagcc agcccgggcca ggactgccgc ttccgtgtca cacaactgcc caacgggctg gacttccaca tgagcgtggt caggggcccg cgcaatgaca gcggcaccta cctctgtggg gccatctccc tggcccccaa ggcgagatc aaagagagcc tgccggcaga gctcaggggt acagagagaa gggcagaagt gcccacagcc caccacagcc cctcaccagg gccagccggc cagttccaaa ccctggtggt tgggtgtcgt ggcggcctgc tgggcagcct ggtgctgcta gtctgggtcc tggcgtcat ctgctcccg gccgcacgag ggacaatagg agccaggcgc accggccagc ccctgaagga ggacccctca gccgtgcctg tgtttctctg ggactatggg gagctggatt tccagtggcg agagaagacc ccggagcccc ccgtgccctg tgtccctgag cagacggagt atgccacat tgtctttcct agcggaatgg gcacctcatc ccccgcccg aggggctcag ccgacggccc tccgagtgcc cagccactga ggcctgagga tggacatgc tcttgccccc tctgacgggc ttccttgccc accagtgttc tgacagacct ccacctgag cccgggtcag cgcatttct caggagaagc aggcagggtg caggccattg ggtgctgcta aggggctgag ctgcctgggg gcgacgggg ctccagcctg cacctgcacc aggcacagcc ccaccacagg actcatgtct caatgccac agtgagccca ggcagcaggt gtcaccgtcc cctacaggga gggccagatg cagtactgc ttcaggtcct gccagcacag agctgcctgc gtccagctcc ctgaatctct gctgctgctg ctgctgctgc tgctgctgcc tgcggcccg ggctgaaggc gccgtggccc tgcctgacgc cccggagcct cctgcctgaa cttgggggct ggttgagat ggccttgag cagccaaggt gccctggca gtggcatccc gaaacgccct ggacgcagg cccaagactg ggacagggag tgggaggtac atggggctgg ggactcccca ggagttatct gctccctgca ggcctagaga agtttcaggg aaggtcagaa gagctcctgg ctgtggtggg cagggcagga aacccctccc accttacac atgccaggc agcacctcag gccctttgtg gggcaggga gctgaggcag taagcgggca ggcagagctg gaggcctttc aggccagcca gcactctggc ctctgcccgc cgcattccac ccagccctc cacaccactc gggagaggga catcctacgg tcccaaggtc aggagggcag ggctggggtt gactcaggcc cctcccagct gtggccacct ggggtgtggg agggcagaag tgacggcacc tagggccccc catgtgccca ccctgggagc tctccttga accatttct gaaattattt aaaggggttg gccgggctcc caccagggcc tgggtgggaa ggtacaggcg ttccccggg gcctagtacc ccccgctggc ctatccactc ctacatcca cactgcac ccccactct ggggcagggc caccagcatc caggcgcca gcaggcacct gagtggctgg gacaagggat ccccttccc tgtggttcta ttatattata attataatta aatatgagag catgct</p>
24	<p>인간 PD-L1 아미노산 서열 - 이소형 a 전구체 (진뱅크 수탁 번호 NP_054862.1)</p> <p>MRIFAVFIFM TYWHLNLAFT VTPKDLVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVPVTSE HELTCQAEY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTSLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVPIPELP LAHPNERTH LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK QSDTHLEET</p>
25	<p>인간 PD-L1 아미노산 서열 - 이소형 b 전구체 (진뱅크 수탁 번호 NP_001254635.1)</p> <p>MRIFAVFIFM TYWHLNLAFT VTPKDLVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME LSGKTTTNS KREEKLFNVT STLINTTTN EIFYCTFRRL DPEENHTAEL VPELPLAHP PNERTHLVIL GAILLCLGVA LTFIFRLRKG RMMDVKKCGI QDTNSKKQSD THLEET</p>

SEQ ID NO:	서열
26	<p>인간 TIM-4 아미노산 서열 - 이소형 1 (진뱅크 수탁 번호 NP_612388.2)</p> <p>MSKEPLILWLMIEFWWLYLTPVTSETVVTEVLGHRVTLPCLYSSWSHNSNSMCWGDQCPYSGCKEALIR TDGMRVTSRKSAKYRLQGTIPRGDVSLTILNPSESDSGVYCCRIEVPWFNDVKINVRNLQRASTTTHR TATTTTRRTTTTSPTTTRQMTTTPAALPTTVVTTTDLTTGTPLQMTTIAVFTTANTCLSLTPSTLPEEAT GLLTPEPSKEGPILTAESETVLPDSWSSVESTSADTVLLTSKESKVDLPSTSHVSMWKTSDSVSSPQP GASDTAVPEQNKTKTGQMDGIPMSMKNEMPISQLLMIAPSLGFVLFALFVAFLLRGKLMETCYCSQKHT RLDYIGDSKNVLNDVQHGREDEDGLFTL</p>
27	<p>호모 사피엔스 T-세포 (TIMD4), 전사체 변이체 1, mRNA (진뱅크 수탁 번호 NM_138379.2)</p> <p>ATAAGAGGTTGGGCTTTGGATAGATAGACAGACTCCTGGGTCCGGTCAACCGTCAAAATGTCCAAAGAAC CTCTCATTCTCTGGCTGATGATTGAGTTTGGTGGCTTTACCTGACACCACTCACTTCAGAGACTGTTGT GACGGAGGTTTGGGTACCGGGTGACTTTGCCCTGTCTGTACTCATCCTGGTCTCACACAGCAACAGC ATGTGCTGGGGAAAGACAGTCCCCCTACTCCGGTTGCAAGGAGGCGCTCATCCGCACTGATGGAATGA GGGTGACCTCAAGAAAGTCAGCAAAATATAGACTTCAGGGGACTATCCCGAGAGGTGATGTCTCCTTGAC CATCTTAAACCCCACTGAAAGTGACAGCGGTGTGTACTGCTGCCGCATAGAAGTGCTGGCTGGTTCAAC GATGTAAAGATAAACGTGCGCCTGAATCTACAGAGAGCCTCAACAACACGCACAGAACAGCAACCACCA CCACACGCAGAACAAACAACAGCCCCACCAACCCGACAAATGACAAACACCCAGCTGCACCTTCC AACAAACAGTCGTGACCACACCCGATCTCACAAACCGGAACACCACTCCAGATGACAACCATTGCCGTCTTC ACAACAGCAACACGTGCTCTTCTACTAACCCCAAGCACCTTCCGGAGGAAGCCACAGGTCTTCTGACTC CCGAGCCTTCTAAGGAAGGGCCCATCCTCACTGCAGAATCAGAACTGTCTCCCCAGTGATTCTGGAG TAGTGTTGAGTCTACTTCTGCTGACACTGTCTGCTGACATCCAAGAGTCCAAAGTTTGGGATCTCCCA TCAACATCCCACTGTCAATGTGGAACAGAGTGATTCTGTCTTCTCCTCAGCCTGGAGCATCTGATA CAGCAGTTCTGAGCAGAACAAAACAACAAAACAGGACAGATGGATGGAATACCCATGTCAATGAAGAA TGAAATGCCCATCTCCCACTACTGATGATCATCGCCCCCTCCTTGGGATTTGTGCTCTTCGCATTGTTT GTGGCGTTTCTCCTGAGAGGGAACCTCATGGAACCTATTGTTTCGAGAAACACACAAGGCTAGACTACA TTGGAGATAGTAAAAATGTCTCAATGACGTGCAGCATGGAAGGGAAGACGAAGACGGCCTTTTACCCT CTAACACGCAGTAGCATGTTAGATTGAGGATGGGGGCATGACACTCCAGTGTCAAAATAAGTCTTAGTA GATTTCCCTTGTTCATAAAAAAGACTCACTTATTCATGGATGTCATTGATCCAGGCTTGCTTTAGTTTC ATGAATGAAGGTACTTTAGAGACCACAACCTTCTCTGTCAAAA</p>
	<p>인간 TIM-4 아미노산 서열 이소형 2 (진뱅크 수탁 번호 NP_001140198.1)</p> <p>MSKEPLILWLMIEFWWLYLTPVTSETVVTEVLGHRVTLPCLYSSWSHNSNSMCWGDQCPYSGCKEALIR TDGMRVTSRKSAKYRLQGTIPRGDVSLTILNPSESDSGVYCCRIEVPWFNDVKINVRNLQRASTTTHR TATTTTRRTTTTSPTTTRQMTTTPAALPTTVVTTTDLTTGTPLQMTTIAVFTTANTCLSLTPSTLPEEAT GLLTPEPSKEGPILTAESETVLPDSWSSVESTSADTVLLTSKASDTAVPEQNKTKTGQMDGIPMSMKN EMPISQLLMIAPSLGFVLFALFVAFLLRGKLMETCYCSQKHTRLDYIGDSKNVLNDVQHGREDEDGLFTL</p>

[0220]

SEQ ID NO:	서열
	<p>호모 사피엔스 T-세포 (TIMD4), 전사체 변이체 2, mRNA (진뱅크 수탁 번호 NM_001146726.1)</p> <p>ATAAGAGGTTGGGCTTTGGATAGATAGACAGACTCCTGGGTCCGGTCAACCGTCAAAATGTCCAAAGAAC CTCTCATTCTCTGGCTGATGATTGAGTTTGGTGGCTTTACCTGACACCACTCACTTCAGAGACTGTTGT GACGGAGGTTTGGGTACCGGGTGACTTTGCCCTGTCTGTACTCATCCTGGTCTCACACAGCAACAGC ATGTGCTGGGGAAAGACAGTCCCCCTACTCCGGTTGCAAGGAGGCGCTCATCCGCACTGATGGAATGA GGGTGACCTCAAGAAAGTCAGCAAAATATAGACTTCAGGGGACTATCCCGAGAGGTGATGTCTCCTTGAC CATCTTAAACCCCACTGAAAGTGACAGCGGTGTGTACTGCTGCCGCATAGAAGTGCTGGCTGGTTCAAC GATGTAAAGATAAACGTGCGCCTGAATCTACAGAGAGCCTCAACAACACGCACAGAACAGCAACCACCA CCACACGCAGAACAAACAACAGCCCCACCAACCCGACAAATGACAAACACCCAGCTGCACCTTCC AACAAACAGTCGTGACCACACCCGATCTCACAAACCGGAACACCACTCCAGATGACAACCATTGCCGTCTTC ACAACAGCAACACGTGCTCTTCTACTAACCCCAAGCACCTTCCGGAGGAAGCCACAGGTCTTCTGACTC CCGAGCCTTCTAAGGAAGGGCCCATCCTCACTGCAGAATCAGAACTGTCTCCCCAGTGATTCTGGAG TAGTGTTGAGTCTACTTCTGCTGACACTGTCTGCTGACATCCAAGCATCTGATACAGCAGTTCTGAG CAGAACAAAACAACAAAACAGGACAGATGGATGGAATACCCATGTCAATGAAGAATGAAATGCCCATCT CCCAACTACTGATGATCATCGCCCCCTCCTTGGGATTTGTGCTCTTCGCATTGTTTGTGGCGTTTCTCCT GAGAGGGAACTCATGGAACCTATTGTTTCGAGAAACACACAAGGCTAGACTACATTGGAGATAGTAAA AATGTCTCAATGACGTGCAGCATGGAAGGGAAGACGAAGACGGCCTTTTACCCTCTAACACGCAGTA GCATGTTAGATTGAGGATGGGGGCATGACACTCCAGTGTCAAAATAAGTCTTAGTAGATTTCCTTGTTC ATAAAAAAGACTCACTTATTCATGGATGTCATTGATCCAGGCTTGCTTTAGTTTCATGAATGAAGGTA CTTTAGAGACCACAACCTTCTCTGTCAAAA</p>

[0221]

hum_TIM4_1_NP_612388 10 20 30 40 50
hum_TIM4_2_NP_001140198 MSKEDLIIMLMIEFWMLYLPVTSSETVVTEVLGHRVTLPCLYSSWSHNSN 50
MSKEDLIIMLMIEFWMLYLPVTSSETVVTEVLGHRVTLPCLYSSWSHNSN 50

hum_TIM4_1_NP_612388 60 70 80 90 100
hum_TIM4_2_NP_001140198 SMCWCKDQCPYSGCKEALIRTDGMRVTSRKSARYRLQGTIPRGDVSILTIL 100
SMCWCKDQCPYSGCKEALIRTDGMRVTSRKSARYRLQGTIPRGDVSILTIL 100

hum_TIM4_1_NP_612388 110 120 130 140 150
hum_TIM4_2_NP_001140198 NPSESDSGVYCCRIEVPGWENDVKINVRNLQRASTTTHRTATTTTRRTT 150
NPSESDSGVYCCRIEVPGWENDVKINVRNLQRASTTTHRTATTTTRRTT 150

hum_TIM4_1_NP_612388 160 170 180 190 200
hum_TIM4_2_NP_001140198 TTSPTTRQMTTTPAALPTTVVTPDLTTGTPLQMTTIAVEFTTANTCIST 200
TTSPTTRQMTTTPAALPTTVVTPDLTTGTPLQMTTIAVEFTTANTCIST 200

hum_TIM4_1_NP_612388 210 220 230 240 250
hum_TIM4_2_NP_001140198 TPSTLPEEATGILTPEPSKEGPIILTAESETVLPSDSWSSVESTSADTVLL 250
TPSTLPEEATGILTPEPSKEGPIILTAESETVLPSDSWSSVESTSADTVLL 250

hum_TIM4_1_NP_612388 260 270 280 290 300
hum_TIM4_2_NP_001140198 TSKESKVDLPSTSHVSMWKTSDSVSPQGASDTAVPEQNKTKTGQMD 300
TSK-----ASDTAVPEQNKTKTGQMD 272

hum_TIM4_1_NP_612388 310 320 330 340 350
hum_TIM4_2_NP_001140198 GIPMSKKNEMPISQILMTIAPSLGFTVLFALFVAFLLRGKIMETTYCSQKHT 350
GIPMSKKNEMPISQILMTIAPSLGFTVLFALFVAFLLRGKIMETTYCSQKHT 322

hum_TIM4_1_NP_612388 360 370
hum_TIM4_2_NP_001140198 RLDTYIGDSKNVLDVQHGREDEGLFTL 378
RLDTYIGDSKNVLDVQHGREDEGLFTL 350

도면1
도면

IG-유사 도메인 S/T 공부 도메인 (무신) 신호/막영단 도메인
CYS (C-C) 쌍은 4JUH 및 4OYC 구조에 기초함

TIM4_A1b1_EHH54702
TIM4_A1b2_XP_005558436
hum_TIM4_INP_612388
TIM4_mus_NP_848874

10 20 30 40 50 60 70
MSKEPILIMLVEFWMLYLTPVTSSEVTVTEVLGHRVLLPCLYSSWSQNSNMCWGKDKCPYSGCKEALIRTDGTR 75
MSKEPILIMLVEFWMLYLTPVTSSEVTVTEVLGHRVLLPCLYSSWSQNSNMCWGKDKCPYSGCKEALIRTDGTR 75
MSKEPILIMLVEFWMLYLTPVTSSEVTVTEVLGHRVLLPCLYSSWSQNSNMCWGKDKCPYSGCKEALIRTDGTR 75
MSKGLLLIMLVTLELWMLYLTPASEDITIGFLGQVTLPCHYLSWSQSRNSMCWGKSCPNKCNALLRTDGT 75

TIM4_A1b1_EHH54702
TIM4_A1b2_XP_005558436
hum_TIM4_INP_612388
TIM4_mus_NP_848874

80 90 100 120 120 130 140 150
VTSRKSARVRLPGTIOGNVSLTIINREGDSGVCCRIEVPGEFNDVKINVRNLQRETCLLVTASTTRRTR 150
VTSRKSARVRLPGTIOGNVSLTIINREGDSGVCCRIEVPGEFNDVKINVRNLQRETCLLVTASTTRRTR 150
VTSRKSARVRLPGTIOGNVSLTIINREGDSGVCCRIEVPGEFNDVKINVRNLQRETCLLVTASTTRRTR 142
IISRSKTKYTLGKVOEGEVSLTISNNRGDSGVCCRIEVPGEFNDVKINVRLELR-----ATTKKPTT 142

TIM4_A1b1_EHH54702
TIM4_A1b2_XP_005558436
hum_TIM4_INP_612388
TIM4_mus_NP_848874

160 170 180 190 200 210 220
TTSPTPTPHVTTTR-AALPTVMTTPTLTTEPLQTTTAVETTAN-TCPSPTSTLEPAATGILTPESKEGPI 223
TTSPTPTPHVTTTR-AALPTVMTTPTLTTEPLQTTTAVETTAN-TCPSPTSTLEPAATGILTPESKEGPI 215
TTSPTPTPHVTTTR-AALPTVMTTPTLTTEPLQTTTAVETTAN-TCPSPTSTLEPAATGILTPESKEGPI 223
TTRPTTTPYVTTTTPELLPTVMTTSLPTTTPQILATFASTAVTTCPTTPGSFSQETT-----KGSA 208

TIM4_A1b1_EHH54702
TIM4_A1b2_XP_005558436
hum_TIM4_INP_612388
TIM4_mus_NP_848874

230 240 250 260 270 280 290 300
LTAESRPVLPS-DSWSSTESP-ADTVLLTSRSKVMDLPTSHVSMKRTSDSVSSPOPASDPAVPEQNKTTKNG 300
LTAESRPVLPS-DSWSSTESP-ADTVLLTSRSKVMDLPTSHVSMKRTSDSVSSPOPASDPAVPEQNKTTKNG 296
LTAESRPVLPS-DSWSSTESP-ADTVLLTSRSKVMDLPTSHVSMKRTSDSVSSPOPASDPAVPEQNKTTKNG 288
LTAESRPVLPS-DSWSSTESP-ADTVLLTSRSKVMDLPTSHVSMKRTSDSVSSPOPASDPAVPEQNKTTKNG 297
FTTESFTLPASNGSQSRMNTSTDIAVIRPTGSNPGILPSTSGILTTQKTTLTSES-----LQKTTKSH 272

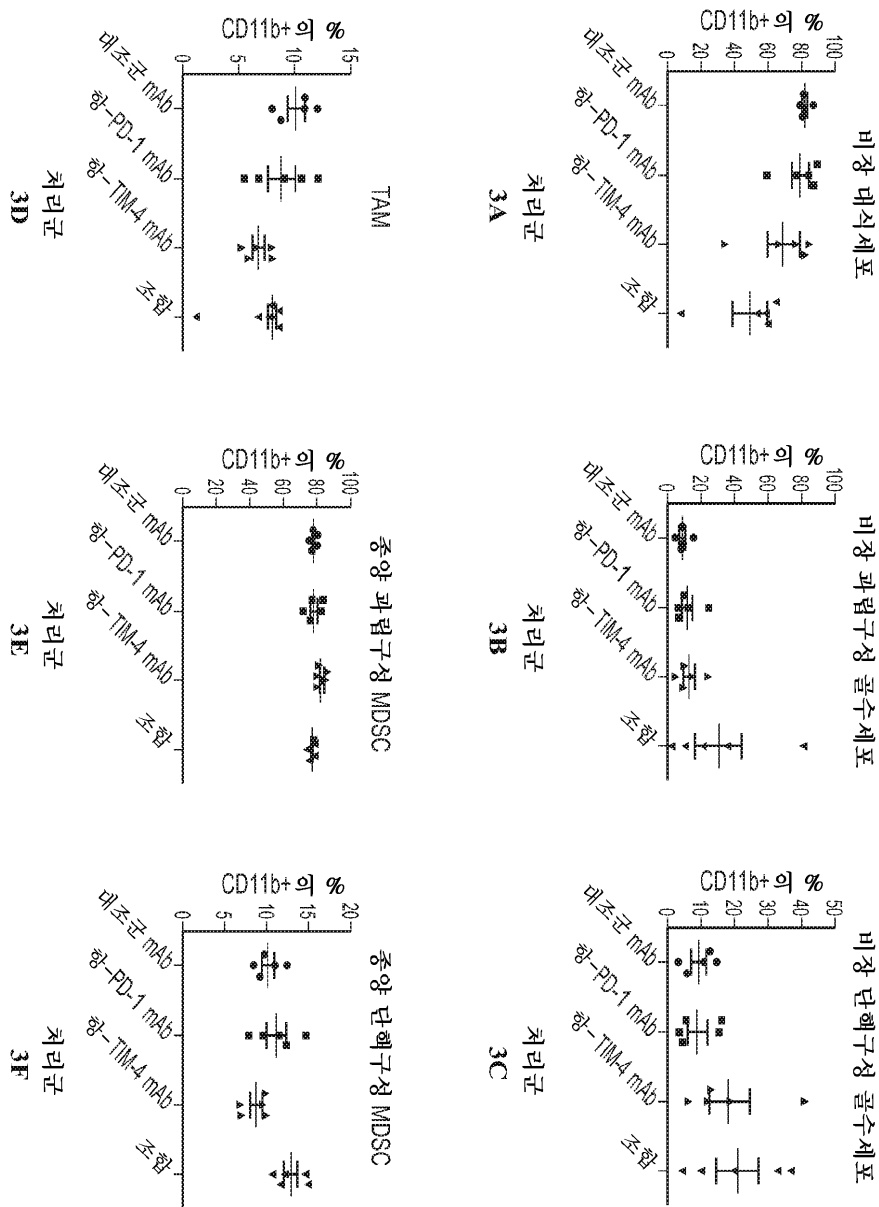
TIM4_A1b1_EHH54702
TIM4_A1b2_XP_005558436
hum_TIM4_INP_612388
TIM4_mus_NP_848874

310 320 330 340 350 360 370
QMDGMPMPKMEPIQILIMLIAPSLGFEVLA-LMAFLLRGKLMETNCLQKHTRLDCIGDSKNVLENDMRHGRE 370
QMDGMPMPKMEPIQILIMLIAPSLGFEVLA-LMAFLLRGKLMETNCLQKHTRLDCIGDSKNVLENDMRHGRE 362
QMDGMPMPKMEPIQILIMLIAPSLGFEVLA-LMAFLLRGKLMETNCLQKHTRLDCIGDSKNVLENDMRHGRE 371
QINDGIPMSMKMEPIQILIMLIAPSLGFEVLA-LMAFLLRGKLMETNCLQKHTRLDCIGDSKNVLENDMRHGRE 336
QIN-----SRQIILIAACVGFVLMVLLFLAFLLRGVTGANCLQRRKRPDNTEDSDSVLENDMSHGRD 336

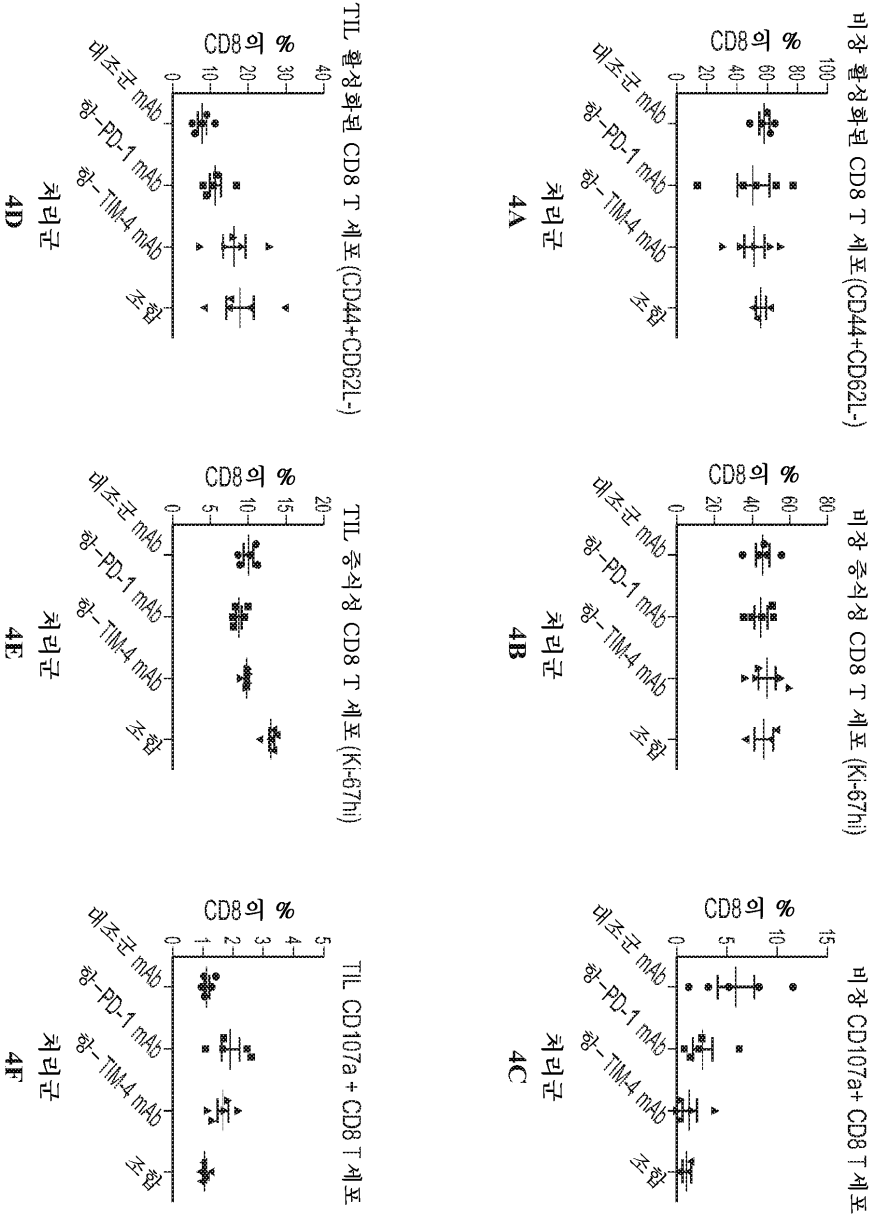
TIM4_A1b1_EHH54702
TIM4_A1b2_XP_005558436
hum_TIM4_INP_612388
TIM4_mus_NP_848874

380
EDGLFTL 377
EDGLFTL 369
EDGLFTL 378
EDGLFTL 343

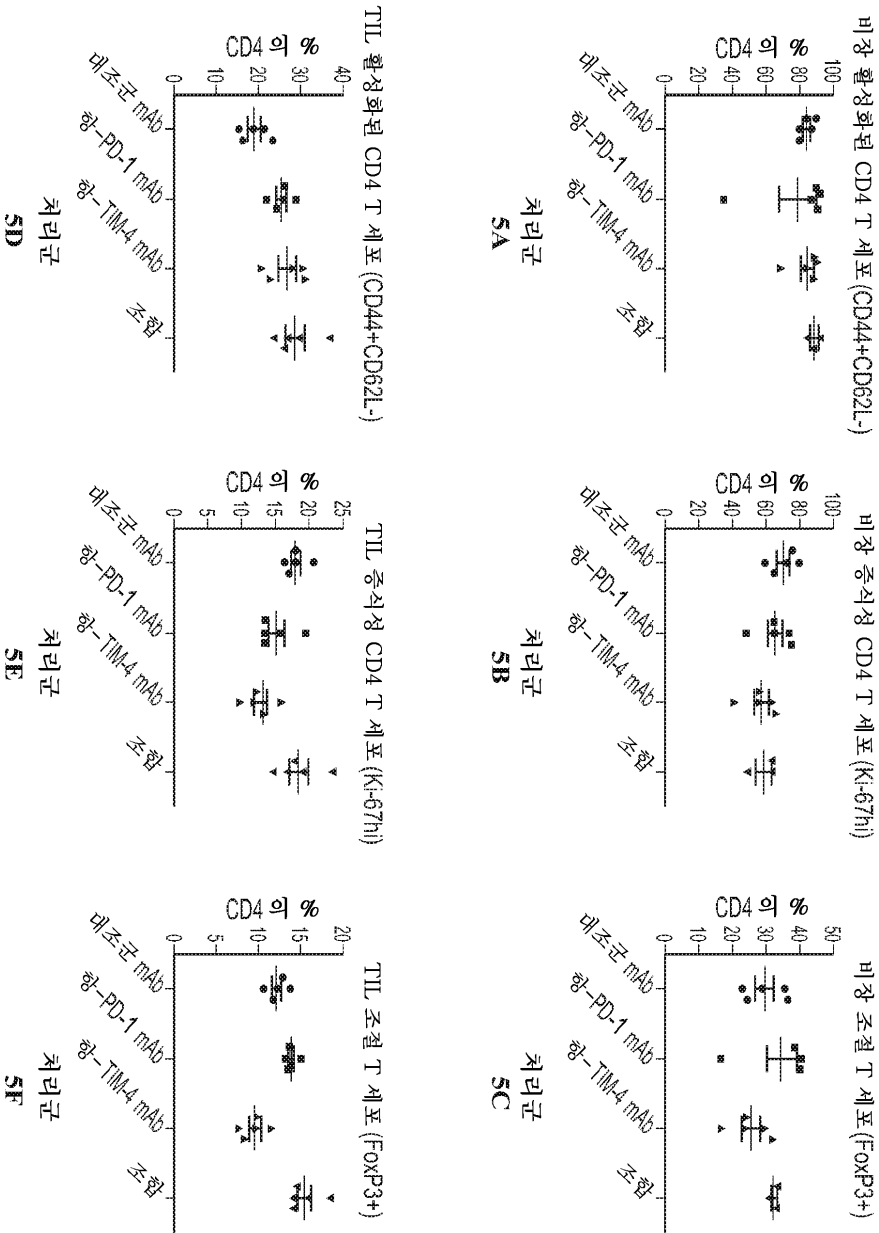
도면3



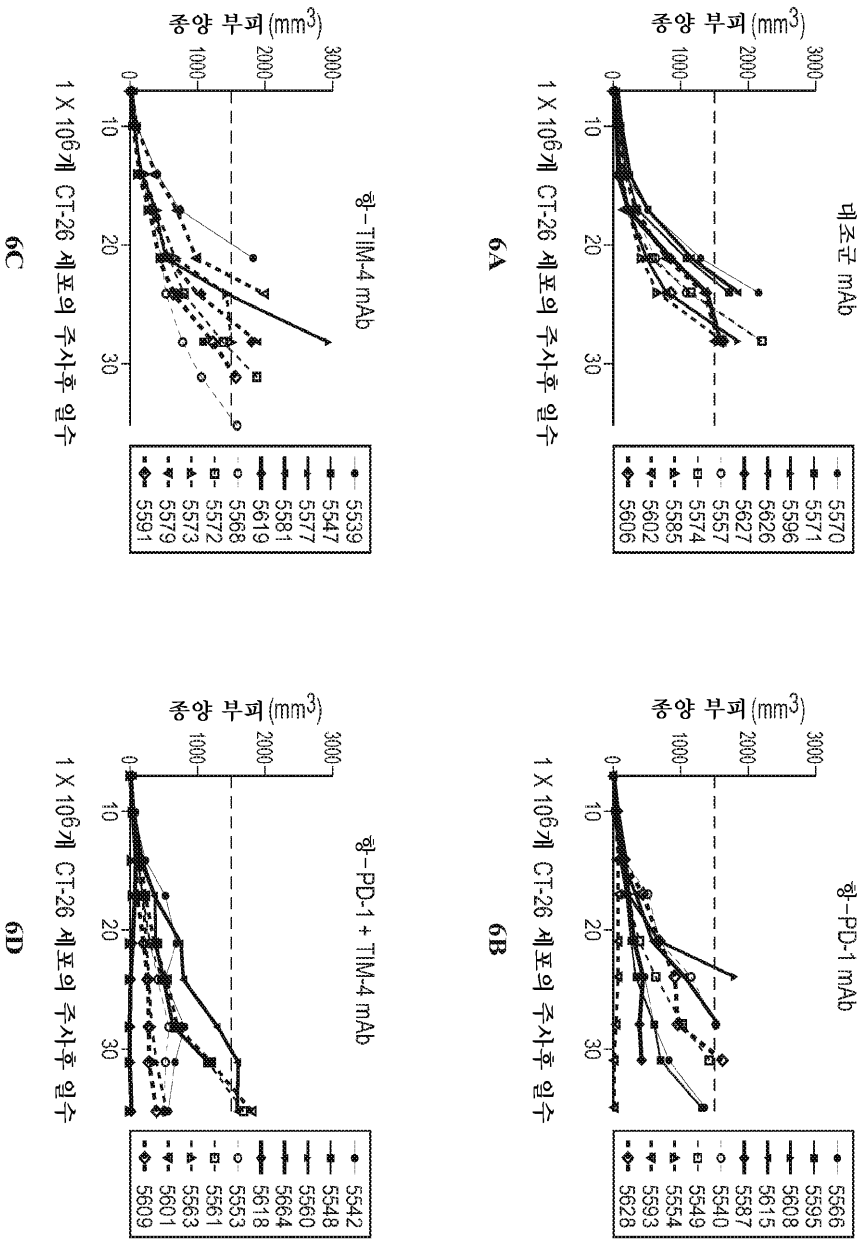
도면4



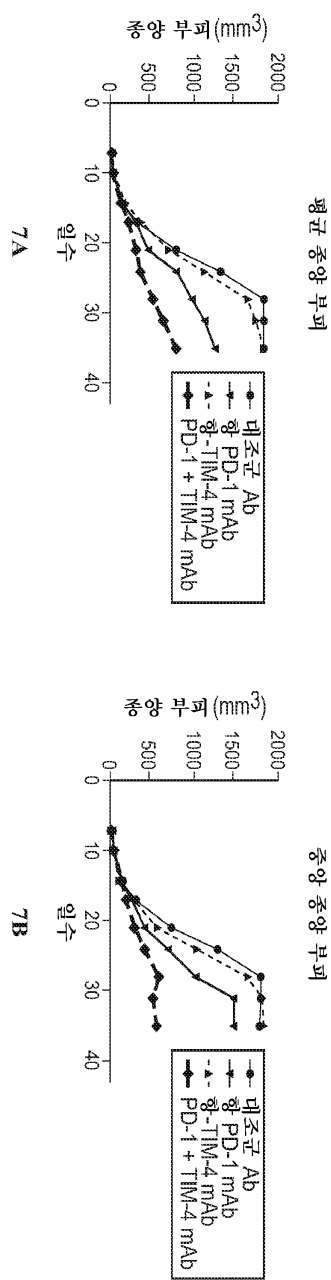
도면5



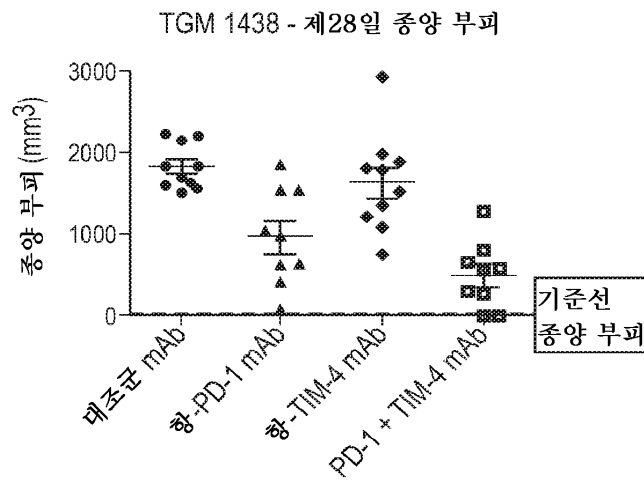
도면6



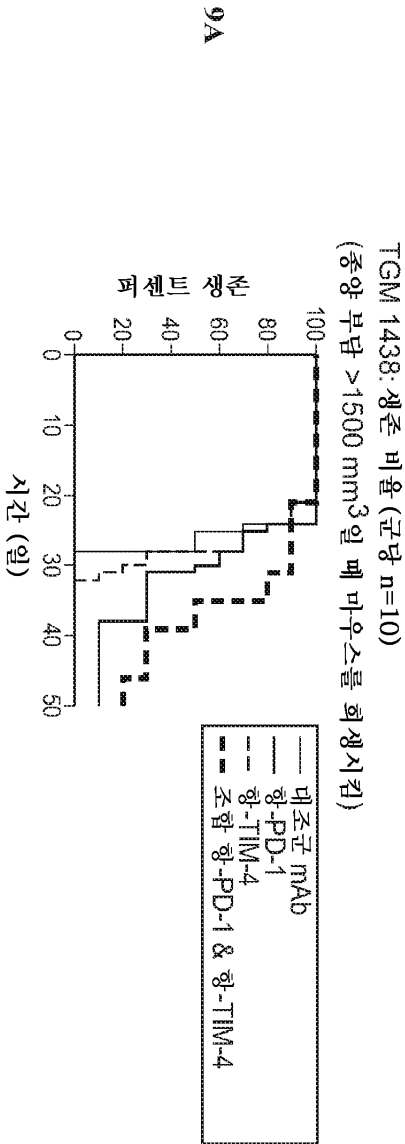
도면7



도면8



처리군 (3회 용량: 제7일, 제10일, 제13일)

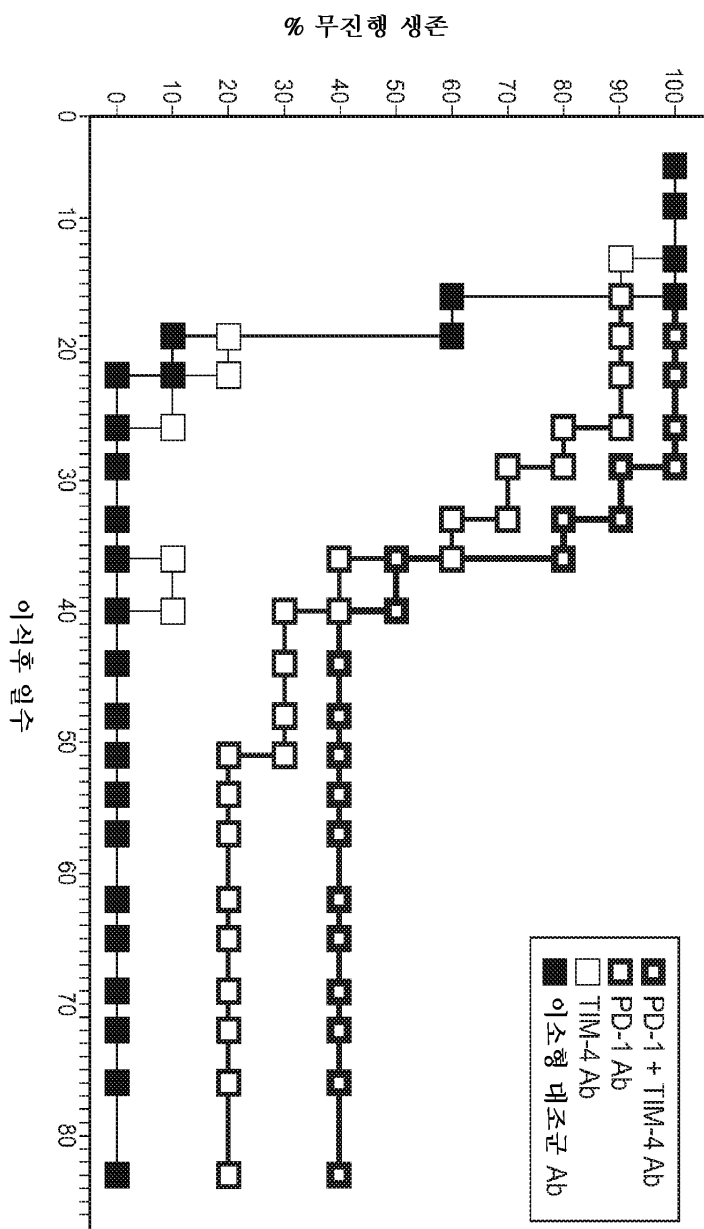


도면9

9B

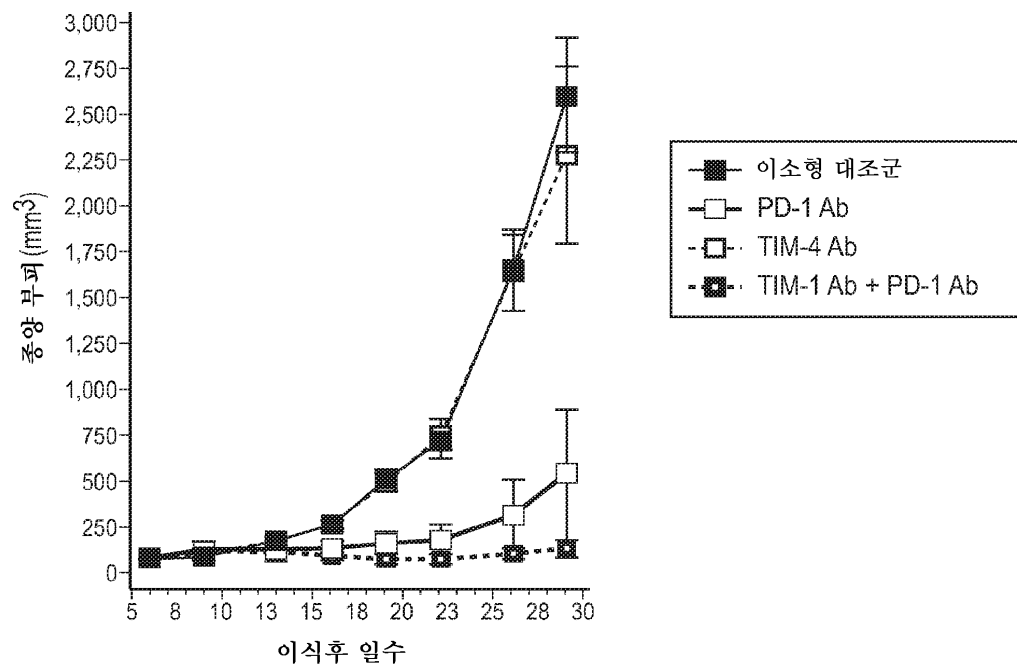
종양 생존	대조군 mAb	항-PD-1	항-TIM-4	조합 항-PD-1 & 항-TIM-4
	26.5	30.5	28	37

도면10

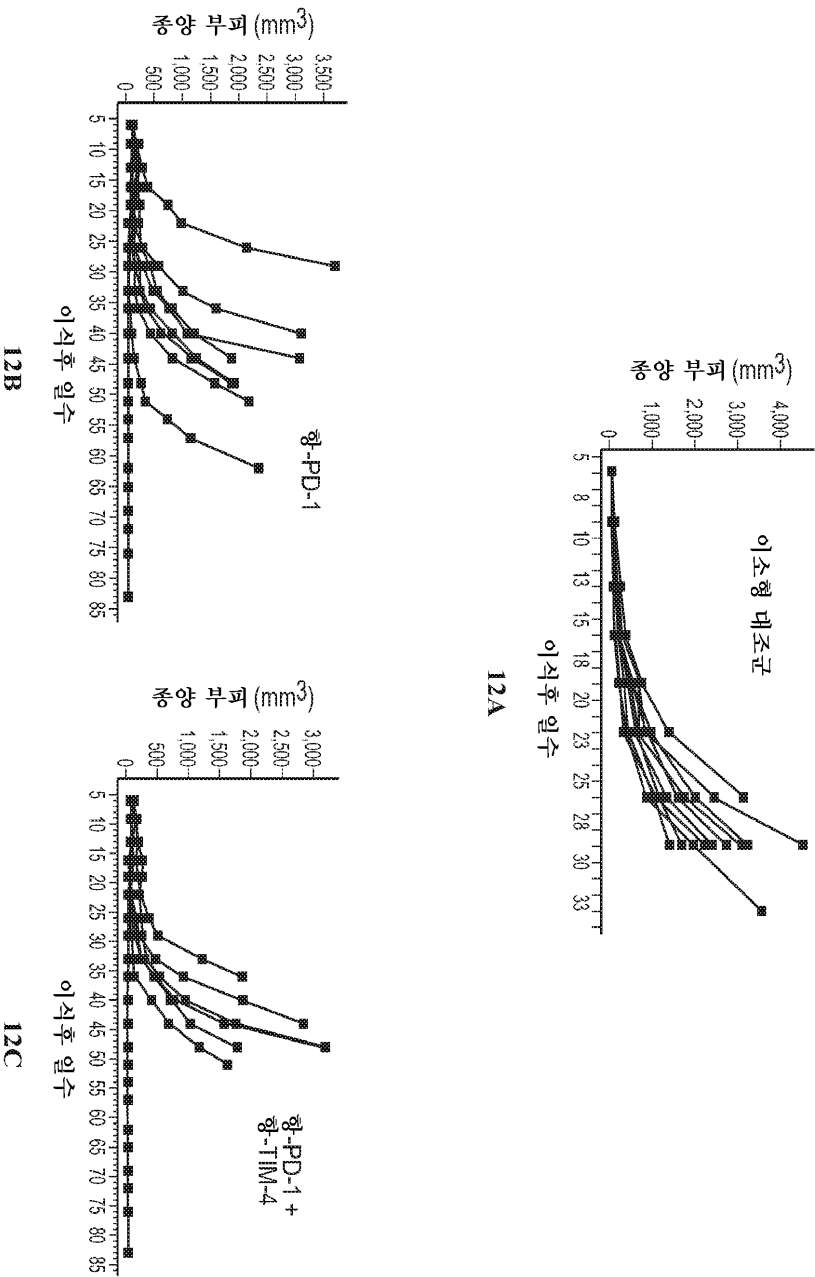


도면11

MC38-223 (TIM4 + PD-1 효능) - 종양 부피



도면12



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
- <120> COMBINATION OF TIM-4 ANTAGONIST AND PD-1 ANTAGONIST AND METHODS OF USE
- <130> MXI-550PC
- <140> PCT/US2017/040665
- <141> 2017-07-05

<150> US 62/359,073

<151> 2016-07-06

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Heavy Chain Variable Region (VH) Amino Acid Sequence

Anti-PD-L1 mAb (12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No.

7,943,743)

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Lys Phe His Phe Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 2

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Heavy Chain Variable Region (VH) Nucleotide Sequence

Anti-PD-L1 mAb (12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No.
7,943,743)

<400> 2

caggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60
tcctgcaaga cttctggaga caccttcagc acctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tatttggtaa agcacactac	180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt atttttgtgc gagaaagttt	300
cactttgttt cggggagccc cttcggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc	360
gtctcc	366

<210> 3

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Light Chain Variable Region (VL) Amino Acid Sequence

Anti-PD-L1 mAb (12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No.
7,943,743)

<400> 3

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

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

100 105

<210> 4

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Light Chain Variable Region (VL) Nucleotide Sequence

Anti-PD-L1 mAb (12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No.
7,943,743)

<400> 4

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct	240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgacgtt cggccaaggg	300
accaaggtgg aaatcaaa	318

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Heavy Chain CDR1 Amino Acid Sequence Anti-PD-L1 mAb

(12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No. 7,943,743)

<400> 5

Thr Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Heavy Chain CDR2 Amino Acid Sequence Anti-PD-L1 mAb

(12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No. 7,943,743)

<400> 6

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

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

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Heavy Chain CDR3 Amino Acid Sequence Anti-PD-L1 mAb
(12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No. 7,943,743)

<400> 7

Lys Phe His Phe Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val

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

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Light Chain CDR1 Amino Acid Sequence Anti-PD-L1 mAb
(12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No. 7,943,743)

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

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

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Light Chain CDR2 Amino Acid Sequence Anti-PD-L1 mAb
(12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No. 7,943,743)

<400> 9

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1	5
---	---

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Light Chain CDR3 Amino Acid Sequence Anti-PD-L1 mAb

(12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No. 7,943,743)

<400> 10

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr

1 5

<210> 11

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Heavy Chain Amino Acid Sequence Anti-PD-1 mAb (5C4 in
WO 2006/121168) (variable region underlined; constant region
bold)

<400> 11

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

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

20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100 105 110
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser

115 120 125
Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

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

145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
 180 185 190
 Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205
 Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 210 215 220
 Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 225 230 235 240
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 245 250 255
 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 260 265 270
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 275 280 285
 Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 290 295 300
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 305 310 315 320
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 325 330 335
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
 340 345 350
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 355 360 365
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 370 375 380
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 385 390 395 400
 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe

405 410 415
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440
 <210> 12
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: Light Chain Amino Acid Sequence Anti-PD-1 mAb (5C4 in

WO 2006/121168) (variable region underlined; constant region
 bold)

<400> 12
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 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> 13

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Heavy Chain Variable Region (VH) Amino Acid Sequence

Anti-PD-1 mAb (5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:4 from WO
 2006/121168)

<400> 13

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

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

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

<210> 14

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Heavy Chain Variable Region (VH) Nucleotide Sequence

Anti-PD-1 mAb (5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:60 from WO

2006/121168)

<400> 14

```
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc      60
gactgtaaag cgtctggaat caccttcagt aactctggca tgcactgggt ccgccaggct      120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atttggatg atggaagtaa aagatactat      180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gacaaacgac      300
gactactggg gccaggaac cctggtcacc gtctcctca                                339
```

<210> 15

<211>

107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Light Chain Variable Region (VL) Amino Acid Sequence

Anti-PD-1 mAb (5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:11 from WO

2006/121168)

<400> 15

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
           20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
           35           40           45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
```

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

<210> 16

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Light Chain Variable Region (VL) Nucleotide Sequence

Anti-PD-1 mAb (5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:67 from WO
 2006/121168)

<400> 16

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagt agttacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag agtagcaact ggcctcggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Heavy Chain CDR1 Amino Acid Sequence Anti-PD-1 mAb

(5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:18 from WO 2006/121168)

<400> 17

Asn Ser Gly Met His

1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Heavy Chain CDR2 Amino Acid Sequence Anti-PD-1 mAb

(5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:25 from WO 2006/121168)

<400> 18

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

1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Heavy Chain CDR3 Amino Acid Sequence Anti-PD-1 mAb

(5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:32 from WO 2006/121168)

<400> 19

Asn Asp Asp Tyr

1

<210> 20

<211> 11

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Light Chain CDR1 Amino Acid Sequence Anti-PD-1 mAb

(5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:39 from WO 2006/121168)

<400> 20

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Light Chain CDR2 Amino Acid Sequence Anti-PD-1 mAb

(5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:46 from WO 2006/121168)

<400> 21

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Light Chain CDR3 Amino Acid Sequence Anti-PD-1 mAb

(5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:53 from WO 2006/121168)

<400> 22

Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr

1 5

<210> 23

<211> 2106

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2106)

<223> Complete PD-1 sequence

<400> 23

agttttccctt ccgtcacct ccgcctgagc agtggagaag gcggcactct ggtggggctg 60

ctccaggcat gcagatccca caggcgcctt ggccagtcgt ctgggcggtg ctacaactgg 120

gctggcggcc aggatggttc ttagactccc cagacaggcc ctggaacccc cccacattct 180

tccagccctt gctcgtggtg accgaagggg acaacgccac cttcacctgc agctttctca 240

acacatcgga gagcttcgtg ctaaactggt accgcatgag ccccagcaac cagacggaca 300

agctggccgc cttccccgag gaccgcagcc agcccggcca ggactgccgc ttccgtgtca 360

cacaactgcc caacgggcgt gacttccaca tgagcgtggt caggggcccg cgcaatgaca 420

gcggcaccta cctctgtggg gccatctccc tggcccccaa ggccgagatc aaagagagcc 480

tgcgggcaga gtcagggtg acagagagaa gggcagaagt gcccacagcc caccacagcc 540

cctcaccag gccagccggc cagttccaaa ccttggtggt tgggtgtcgt ggccggcctgc 600

tgggcagcct ggtgctgcta gtctgggtcc tggccgtcat ctgctcccgg gccgcacgag 660

ggacaatagg agccaggcgc accggccagc cctgaagga ggaccctca gccgtgcctg 720

tgttctctgt ggactatggg gagctggatt tccagtggcg agagaagacc ccggagcccc 780

ccgtgccctg tgtccctgag cagacggagt atgccacat tgtctttcct agcggaatgg 840
gcacatcatc ccccgccgcg aggggctcag ccgacggccc tcggagtgcc cagccactga 900

ggcctgagga tggacaactgc tcttggcccc tctgaccggc ttccttggcc accagtgttc 960
tgcagaccct ccacatgag cccgggtcag cgcatttcct caggagaagc aggcagggtg 1020
caggccattg caggccgtcc aggggctgag ctgcctgggg gcgaccgggg ctccagcctg 1080
cacctgcacc aggcacagcc ccaccacagg actcatgtct caatgccac agtgagccca 1140
ggcagcaggt gtcaccgtcc cctacaggga gggccagatg cagtactgc ttcaggtcct 1200
gccagcacag agctgcctgc gtccagctcc ctgaatctct gctgctgctg ctgctgctgc 1260
tgctgctgcc tgcggcccg ggctgaaggc gccgtggccc tgcctgacgc cccggagcct 1320

cctgcctgaa cttgggggct ggttggagat ggcttggag cagccaaggt gcccctggca 1380
gtggcatccc gaaacgccct ggacgcaggg cccaagactg ggcacaggag tgggaggtac 1440
atggggctgg ggactccca ggagtatatct gctccctgca ggcctagaga agtttcaggg 1500
aaggtcagaa gagctcctgg ctgtgggtggg cagggcagga aaccctccc acctttacac 1560
atgccaggc agcacctcag gccctttgtg gggcaggga gctgaggcag taagcgggca 1620
ggcagagctg gaggcctttc aggcaccca gcactctggc ctctgcccgc cgcattccac 1680
cccagccct cacaccactc gggagaggga catctacgg tccaaggtc aggagggcag 1740

ggctgggggt gactcaggcc cctccagct gtggccacct ggggtttggg agggcagaag 1800
tgcaggcacc tagggcccc catgtccca cctgggagc tctccttgga accattcct 1860
gaaattatth aaaggggttg gccgggctcc caccagggcc tgggtgggaa ggtacaggcg 1920
ttccccggg gcctagtacc ccgcgtggc ctatccactc ctacatcca cacactgcac 1980
ccccactcct ggggcagggc caccagcatc caggcgcca gcaggcacct gagtggctgg 2040
gacaaggat ccccttccc tgtgtttcta ttatattata attataatta aatatgagag 2100
catgct 2106

<210> 24

<211> 290

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(290)

<223> Human PD-L1 amino acid sequence - isoform a precursor

<400> 24

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15
Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30
Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45
Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60
Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80
Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95
Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110
Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125
Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140
Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160
Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175
Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180 185 190
Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205
Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220
Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
225 230 235 240
Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr

245 250 255
 Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
 260 265 270
 Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
 275 280 285
 Glu Thr
 290
 <210> 25
 <211> 176
 <212>
 > PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(176)
 <223> Human PD-L1 amino acid sequence - isoform b precursor
 <400> 25
 Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
 1 5 10 15
 Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
 20 25 30
 Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
 35 40 45
 Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
 50 55 60
 Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
 65 70 75 80
 Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
 85 90 95
 Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
 100 105 110
 Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His Leu Val
 115 120 125
 Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile

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

<210> 26

<211> 378

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(378)

<223> Human TIM-4 amino acid sequence - isoform 1

<400> 26

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

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

Arg Ile Glu Val Pro Gly Trp Phe Asn Asp Val Lys Ile Asn Val Arg
115 120 125
Leu Asn Leu Gln Arg Ala Ser Thr Thr Thr His Arg Thr Ala Thr Thr
130 135 140
Thr Thr Arg Arg Thr Thr Thr Thr Ser Pro Thr Thr Thr Arg Gln Met

145 150 155 160
 Thr Thr Thr Pro Ala Ala Leu Pro Thr Thr Val Val Thr Thr Pro Asp
 165 170 175

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

Glu Ser Thr Ser Ala Asp Thr Val Leu Leu Thr Ser Lys Glu Ser Lys
 245 250 255
 Val Trp Asp Leu Pro Ser Thr Ser His Val Ser Met Trp Lys Thr Ser
 260 265 270
 Asp Ser Val Ser Ser Pro Gln Pro Gly Ala Ser Asp Thr Ala Val Pro
 275 280 285
 Glu Gln Asn Lys Thr Thr Lys Thr Gly Gln Met Asp Gly Ile Pro Met
 290 295 300

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

Arg Glu Asp Glu Asp Gly Leu Phe Thr Leu
 370 375

<210> 27

<211> 1374

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1374)

<223> Homo sapiens T-cell (TIMD4), transcript variant 1, mRNA

<400> 27

ataagagggtt gggcttttga tagatagaca gactcctggg tccgggtcaac cgtcaaatg	60
tccaaagaac ctctcattct ctggctgatg attgagtttt ggtggcttta cctgacacca	120
gtcacttcag agactgttgt gacggagggt ttgggtcacc ggggtgacttt gccctgtctg	180
tactcatcct ggcttcacaa cagcaacagc atgtgctggg ggaaagacca gtgccctac	240
tccggttgca aggaggcgt catccgact gatggaatga gggtagctc aagaaagtca	300
gcaaatata gacttcagg gactatcccg agaggtagt tctccttgac catcttaaac	360
cccagtgaat gtgacagcgg tgtgtactgc tgcccatag aagtgcctgg ctggttcaac	420
gatgtaaaga taaactgct cctgaatcta cagagagcct caacaaccac gcacagaaca	480
gcaaccacca ccacacgcag aacaacaaca acaagcccca ccaccaccg acaaatgaca	540
acaacccag ctgcattcc aacaacagtc gtgaccacac ccgatctac aaccggaaca	600
ccactccaga tgacaacat tgccgtcttc acaacagcaa acacgtgcct ttcactaacc	660
ccaagcacc ttccggagga agccacaggt cttctgactc ccgagccttc taaggaaggg	720
cccctcctca ctgcagaatc agaaactgtc ctccccagtg attcctggag tagtggtgag	780
tctacttctg ctgacactgt cctgtctgaca tccaaagagt ccaaagtttg ggatctccca	840
tcaacatccc acgtgtcaat gtggaaaacg agtgattctg tgtcttctcc tcagcctgga	900
gcatctgata cagcagttcc tgagcagaac aaaacaacaa aaacaggaca gatggatgga	960
atacccatgt caatgaagaa tgaaatgccc atctcccaac tactgatgat catcgcccc	1020
tccttgggat ttgtgctctt cgcattgttt gtggcgtttc tcctgagagg gaaactcatg	1080
gaaacctatt gttcgcagaa acacacaagg ctagactaca ttggagatag taaaaatgtc	1140
ctcaatgacg tgcagcatgg aagggaagac gaagacggcc tttttaccct ctaacaacgc	1200
agtagcatgt tagattgagg atgggggcat gacactccag tgtcaaaata agtcttagta	1260
gatttccttg tticataaaa aagactcact tattccatgg atgtcattga tccaggcttg	1320
ctttagtctt atgaatgaag ggtactttag agaccacaac ttctctgtca aaaa	1374

<210> 28

<211> 350

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(350)

<223> Human TIM-4 amino acid sequence isoform 2

<400> 28

Met Ser Lys Glu Pro Leu Ile Leu Trp Leu Met Ile Glu Phe Trp Trp

1 5 10 15

Leu Tyr Leu Thr Pro Val Thr Ser Glu Thr Val Val Thr Glu Val Leu

20 25 30

Gly His Arg Val Thr Leu Pro Cys Leu Tyr Ser Ser Trp Ser His Asn

35 40 45

Ser Asn Ser Met Cys Trp Gly Lys Asp Gln Cys Pro Tyr Ser Gly Cys

50 55 60

Lys Glu Ala Leu Ile Arg Thr Asp Gly Met Arg Val Thr Ser Arg Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Thr Ile Leu Asn Pro Ser Glu Ser Asp Ser Gly Val Tyr Cys Cys

100 105 110

Arg Ile Glu Val Pro Gly Trp Phe Asn Asp Val Lys Ile Asn Val Arg

115 120 125

Leu Asn Leu Gln Arg Ala Ser Thr Thr Thr His Arg Thr Ala Thr Thr

130 135 140

Thr Thr Arg Arg Thr Thr Thr Thr Ser Pro Thr Thr Thr Arg Gln Met

145 150 155 160

Thr Thr Thr Pro Ala Ala Leu Pro Thr Thr Val Val Thr Thr Pro Asp

165 170 175

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

180 185 190

Thr Ala Asn Thr Cys Leu Ser Leu Thr Pro Ser Thr Leu Pro Glu Glu

195 200 205

Ala Thr Gly Leu Leu Thr Pro Glu Pro Ser Lys Glu Gly Pro Ile Leu
 210 215 220
 Thr Ala Glu Ser Glu Thr Val Leu Pro Ser Asp Ser Trp Ser Ser Val
 225 230 235 240
 Glu Ser Thr Ser Ala Asp Thr Val Leu Leu Thr Ser Lys Ala Ser Asp
 245 250 255
 Thr Ala Val Pro Glu Gln Asn Lys Thr Thr Lys Thr Gly Gln Met Asp
 260 265 270
 Gly Ile Pro Met Ser Met Lys Asn Glu Met Pro Ile Ser Gln Leu Leu
 275 280 285
 Met Ile Ile Ala Pro Ser Leu Gly Phe Val Leu Phe Ala Leu Phe Val
 290 295 300
 Ala Phe Leu Leu Arg Gly Lys Leu Met Glu Thr Tyr Cys Ser Gln Lys
 305 310 315 320

His Thr Arg Leu Asp Tyr Ile Gly Asp Ser Lys Asn Val Leu Asn Asp
 325 330 335
 Val Gln His Gly Arg Glu Asp Glu Asp Gly Leu Phe Thr Leu
 340 345 350

<210> 29

<211> 1290

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1290)

<223> Homo sapiens T-cell (TIMD4), transcript variant 2, mRNA

<400> 29

ataagaggtt gggctttgga tagatagaca gactcctggg tccggtcaac cgtcaaatg	60
tccaaagaac ctctcattct ctggtgatg attgagtttt ggtggcttta cctgacacca	120
gtcacttcag agactgttgt gacggagggt ttgggtcacc gggtgacttt gcctgtctg	180
tactcatcct ggtctcaca cagcaacagc atgtgctggg ggaaagacca gtgccctac	240
tccggttgca aggaggcgct catccgact gatggaatga gggtagacct aagaaagtca	300
gcaaaatata gacttcagg gactatcccg agaggtgatg tctccttgac catcttaaac	360

cccagtgaaa gtgacagcgg tgtgtactgc tgccgcatag aagtcctgg ctggttcaac 420
gatgtaaaga taaacgtgcg cctgaatcta cagagagcct caacaaccac gcacagaaca 480
gcaaccacca ccacacgcag aacaacaaca acaagcccca ccaccaccg acaaatgaca 540

acaacccag ctgcacttcc aacaacagtc gtgaccacac ccatctcac aaccggaaca 600
ccactccaga tgacaacctt tgccgtcttc acaacagcaa acacgtgcct ttcactaacc 660
ccaagcacc ttccggagga agccacaggt cttctgactc ccgagccttc taaggagg 720
cccatcctca ctgcagaatc agaaactgtc ctccccagtg attcctggag tagtggtgag 780
tctacttctg ctgacactgt cctgtctgaca tccaaagcat ctgatacagc agttcctgag 840
cagaacaaaa caacaaaaac aggacagatg gatggaatac ccatgtcaat gaagaatgaa 900
atgcccatct cccaactact gatgatcatc gccccctcct tgggatttgt gctcttcgca 960

ttgtttgtgg cgtttctcct gagagggaac ctcattgaaa cctattgttc gcagaaacac 1020
acaaggctag actacattgg agatagtaaa aatgtcctca atgacgtgca gcatggaagg 1080
gaagacgaag acggcctttt taccctctaa caacgcagta gcatgttaga ttgaggatgg 1140
gggcatgaca ctccagtgtc aaaataagtc ttagtagatt tccttggttc ataaaaaaga 1200
ctcacttatt ccatggatgt cattgatcca ggcttgcttt agtttcatga atgaagggtg 1260
cttttagagac cacaacttct ctgtcaaaaa 1290

<210> 30

<211> 377

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(377)

<223> TIM-4 ortholog

<400> 30

Met Ser Lys Glu Pro Leu Ile Leu Trp Leu Val Met Glu Phe Trp Trp

1 5 10 15

Leu Tyr Leu Thr Pro Val Thr Ser Glu Thr Val Val Thr Glu Val Leu

20 25 30

Gly His Arg Val Thr Leu Pro Cys Leu Tyr Ser Ser Trp Ser Gln Asn

35 40 45

Ser Asn Ser Met Cys Trp Gly Lys Asp Lys Cys Pro Tyr Ser Gly Cys

50	55	60	
Lys Glu Ala Leu Ile Arg Thr Asp Gly Thr Arg Val Thr Ser Arg Lys			
65	70	75	80
Ser Ala Lys Tyr Arg Leu Pro Gly Thr Ile Gln Arg Gly Asn Val Ser			
	85	90	95
Leu Thr Ile Leu Asn Pro Arg Glu Gly Asp Ser Gly Val Tyr Cys Cys			
	100	105	110
Arg Ile Glu Val Pro Gly Trp Phe Asn Asp Val Lys Ile Asn Val Arg			
	115	120	125
Leu Asn Leu Gln Arg Glu Thr Cys Leu Leu Leu Val Thr Ala Ser Thr			
	130	135	140
Thr Thr Arg Arg Thr Arg Thr Thr Ser Pro Pro Thr Thr Pro His Val			
145	150	155	160
Thr Thr Thr Arg Ala Ala Leu Pro Thr Thr Val Met Thr Thr Pro Asp			
	165	170	175
Leu Thr Thr Glu Thr Pro Leu Gln Thr Thr Thr Thr Ala Val Phe Thr			
	180	185	190
Thr Ala Asn Thr Cys Pro Ser Pro Thr Pro Ser Thr Leu Pro Glu Ala			
	195	200	205
Ala Thr Gly Leu Leu Thr Pro Glu Pro Ser Lys Glu Gly Pro Ile Leu			
	210	215	220
Thr Ala Glu Ser Glu Pro Val Leu Pro Ser Asp Ser Trp Ser Ser Thr			
225	230	235	240
Glu Ser Pro Ala Asp Thr Val Leu Leu Thr Ser Arg Glu Ser Lys Val			
	245	250	255
Trp Asp Leu Pro Pro Thr Ser His Val Ser Met Trp Lys Thr Ser Asp			
	260	265	270
Ser Val Ser Ser Pro Gln Pro Gly Ala Ser Asp Thr Ala Val Pro Glu			
	275	280	285
Gln Asn Lys Thr Thr Lys Thr Gly Gln Met Asp Gly Met Pro Met Pro			
	290	295	300

Met Lys Asn Glu Met Pro Ile Ser Gln Leu Leu Met Ile Leu Ala Pro

305 310 315 320
 Ser Leu Gly Phe Val Leu Leu Ala Leu Leu Met Ala Phe Leu Leu Arg
 325 330 335
 Gly Lys Leu Met Glu Thr Asn Cys Leu Gln Lys His Thr Arg Leu Asp
 340 345 350
 Cys Ile Gly Asp Ser Lys Asn Val Leu Asn Asp Met Arg His Gly Arg
 355 360 365
 Glu Asp Glu Asp Gly Leu Phe Thr Leu
 370 375

<210> 31
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(369)
 <223> TIM-4 ortholog
 <400> 31

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

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

100	105	110	
Arg Ile Glu Val Pro Gly Trp Phe Asn Asp Val Lys Ile Asn Val Arg			
115	120	125	
Leu Asn Leu Gln Arg Ala Ser Thr Thr Thr Arg Arg Thr Arg Thr Thr			
130	135	140	
Ser Pro Pro Thr Thr Pro His Val Thr Thr Thr Arg Ala Ala Leu Pro			
145	150	155	160
Thr Thr Val Met Thr Thr Pro Asp Leu Thr Thr Glu Thr Pro Leu Gln			
165	170	175	
Thr Thr Thr Thr Ala Val Phe Thr Thr Ala Asn Thr Cys Pro Ser Pro			
180	185	190	
Thr Pro Ser Thr Leu Pro Glu Ala Ala Thr Gly Leu Leu Thr Pro Glu			
195	200	205	
Pro Ser Lys Glu Gly Pro Ile Leu Thr Ala Glu Ser Glu Pro Val Leu			
210	215	220	
Pro Ser Asp Ser Trp Asn Ser Thr Glu Ser Pro Ala Asp Thr Val Leu			
225	230	235	240
Leu Thr Ser Arg Glu Ser Lys Val Trp Asp Leu Pro Pro Thr Ser His			
245	250	255	
Val Ser Met Trp Thr Thr Ser Asp Ser Val Ser Ser Pro Gln Pro Gly			
260	265	270	
Ala Ser Asp Thr Ala Val Pro Glu Gln Asn Lys Thr Thr Lys Thr Gly			
275	280	285	
Gln Met Asp Gly Met Pro Met Pro Met Lys Asn Glu Met Pro Ile Ser			
290	295	300	
Gln Leu Leu Met Ile Leu Ala Pro Ser Leu Gly Phe Val Leu Leu Ala			
305	310	315	320
Leu Leu Met Ala Phe Leu Leu Arg Gly Lys Leu Met Glu Thr Asn Cys			
325	330	335	
Leu Gln Lys His Thr Arg Leu Asp Cys Ile Gly Asp Ser Lys Asn Val			
340	345	350	

Leu Asn Asp Met Arg His Gly Arg Glu Asp Glu Asp Gly Leu Phe Thr
 355 360 365

Leu

<210> 32

<211> 343

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(343)

<223> TIM-4 ortholog

<400> 32

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

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

Arg Ile Glu Val Pro Gly Trp Phe Asn Asp Val Lys Lys Asn Val Arg
 115 120 125
 Leu Glu Leu Arg Arg Ala Thr Thr Thr Lys Lys Pro Thr Thr Thr Thr
 130 135 140
 Arg Pro Thr Thr Thr Pro Tyr Val Thr Thr Thr Thr Pro Glu Leu Leu
 145 150 155 160

Pro Thr Thr Val Met Thr Thr Ser Val Leu Pro Thr Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Gln Thr Leu Ala Thr Thr Ala Phe Ser Thr Ala Val Thr Thr Cys Pro
180 185 190

Ser Thr Thr Pro Gly Ser Phe Ser Gln Glu Thr Thr Lys Gly Ser Ala
195 200 205

Phe Thr Thr Glu Ser Glu Thr Leu Pro Ala Ser Asn His Ser Gln Arg
210 215 220

Ser Met Met Thr Ile Ser Thr Asp Ile Ala Val Leu Arg Pro Thr Gly
225 230 235 240

Ser Asn Pro Gly Ile Leu Pro Ser Thr Ser Gln Leu Thr Thr Gln Lys
245 250 255

Thr Thr Leu Thr Thr Ser Glu Ser Leu Gln Lys Thr Thr Lys Ser His
260 265 270

Gln Ile Asn Ser Arg Gln Thr Ile Leu Ile Ile Ala Cys Cys Val Gly
275 280 285

Phe Val Leu Met Val Leu Leu Phe Leu Ala Phe Leu Leu Arg Gly Lys
290 295 300

Val Thr Gly Ala Asn Cys Leu Gln Arg His Lys Arg Pro Asp Asn Thr
305 310 315 320

Glu Asp Ser Asp Ser Val Leu Asn Asp Met Ser His Gly Arg Asp Asp
325 330 335

Glu Asp Gly Ile Phe Thr Leu
340