(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년05월22일
(11) 등록번호 10-2667654
(24) 등록일자 2024년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 38/18* (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
*A61K 39/00* (2006.01) *A61K 47/60* (2017.01)
*A61P 35/00* (2006.01) *C07K 14/475* (2006.01)
*C07K 14/52* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 38/185* (2013.01)
*A61K 38/1787* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7019343
(22) 출원일자(국제) 2017년12월06일
심사청구일자 2020년11월25일
(85) 번역문제출일자 2019년07월03일
(65) 공개번호 10-2019-0103172
(43) 공개일자 2019년09월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/064883
(87) 국제공개번호 WO 2018/106790
국제공개일자 2018년06월14일
(30) 우선권주장
62/430,757 2016년12월06일 미국(US)
62/481,027 2017년04월03일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
J Biol Chem. 1996 Oct 18, 271(42) 26049~56.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
**더 보드 오브 트러스티스 오브 더 리랜드 스탠포드 쥬니어 유니버시티**
미국 캘리포니아 94305-2038 스탠포드 피오박스 20386 메인 쿼드 오피스 오브 더 제너럴 카운셀 빌딩170 3층
(72) 발명자
**김 준 우**
미국 캘리포니아 94040 마운틴 뷰 라담 스트리트 2050 아파트먼트 21호
**코크란 제니퍼 알.**
미국 캘리포니아 94303 스탠포드 캠퍼스 드라이브 웨스트 318 엠씨 5439 더 제임스 에이치. 클라크 센터 더블유 250
**스위트 에릭 알레잔드로**
미국 캘리포니아 94131 샌프란시스코 처치 스트리트 1411
(74) 대리인
**특허법인와이에스장**

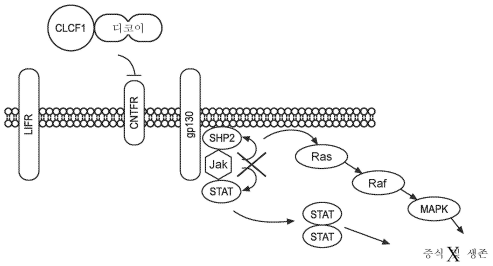
전체 청구항 수 : 총 11 항 심사관 : 최연정

(54) 발명의 명칭 **섬모 신경영양 인자 수용체 리간드-결합제 및 이의 사용 방법**

## (57) 요 약

섬모 신경영양 인자 수용체(CNTFR)의 리간드에 특이적으로 결합하는 작용제가 제공된다. 특정 양태에서, 본 개시의 작용제는 가용성 CNTFR 폴리펩티드이다. 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 하나 이상의 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛에 대하여 변경된(예를 들어, 감소된) 결합 친화성, 하나 이상의 CNTFR 리간드에 대하여 변경된(예를 들어, 증가된) 결합 친화성 또는 이들의 임의의 조합을 가질 수 있다. 본 개시의 작용제를 포함하는 조성물이 또한 제공되며,(예를 들어, 세포 증식성 장애를 치료하기 위하여) 상기 작용제를 사용하는 방법 및 CNTFR 신호전달과 관련된 세포 증식성 장애를 갖는 개체를 동정하는 방법이 제공된다.

## 대 표 도



(52) CPC특허분류
***A61K 47/60*** (2017.08)
***A61P 35/00*** (2018.01)
***C07K 14/475*** (2013.01)
***C07K 14/52*** (2013.01)
*A61K 2039/505* (2013.01)
*C07K 2319/21* (2013.01)
*C07K 2319/30* (2013.01)

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

CNTFR 신호전달과 관련된 암을 갖는 개체에게 치료적 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법에 사용하기 위한 약학적 조성물로서,

카디오트로핀-유사 사이토카인 인자 1(CLCF1)에 특이적으로 결합하는 가용성 CNTFR 폴리펩티드로서, 여기서 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 Fc 도메인에 융합되고,

야생형 CNTFR 폴리펩티드와 비교하여 백혈병 저해 인자 수용체(LIFR)에 대한 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 결합 친화성을 감소시키는 돌연변이로서, 여기서 돌연변이는 Y177H 및 K178N을 포함하는 돌연변이;

야생형 CNTFR 폴리펩티드와 비교하여 CLCF1에 대한 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 결합 친화성을 증가시키는 돌연변이로서, 여기서 돌연변이는 R110Q, T174P, S237F 및 I287F를 포함하는 돌연변이; 및

야생형 CNTFR 폴리펩티드에 비해 당단백질 130(gp130)에 대한 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 결합 친화성을 감소시키는 돌연변이로서, 여기서 돌연변이는 T268A 및 D269A를 포함하는 돌연변이를 포함하되,

돌연변이는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CNTFR 폴리펩티드에 대해 존재하는, 가용성 CNTFR 폴리펩티드; 및

약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 약학적 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서, Fc 도메인은 인간 Fc 도메인인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 모이어티에 컨쥬게이션되어 있는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 항암 약물, 검출 가능한 표지 또는 이들의 임의의 조합인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, CLCF1에 대한 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 결합은 CNTFR에 대한 CLCF1의 결합을 저해하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 암은 폐암인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 폐암은 비소세포 폐암(NSCLC)인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 8

CLCF1에 특이적으로 결합하는 가용성 CNTFR 폴리펩티드로서,

야생형 CNTFR 폴리펩티드와 비교하여 백혈병 저해 인자 수용체(LIFR)에 대한 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 결합 친화성을 감소시키는 돌연변이로서, 여기서 돌연변이는 Y177H 및 K178N을 포함하는 돌연변이;

야생형 CNTFR 폴리펩티드와 비교하여 CLCF1에 대한 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 결합 친화성을 증가시키

는 돌연변이로서, 여기서 돌연변이는 R110Q, T174P, S237F 및 I287F를 포함하는 돌연변이; 및

야생형 CNTFR 폴리펩티드에 비해 당단백질 130(gp130)에 대한 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 결합 친화성을 감소시키는 돌연변이로서, 여기서 돌연변이는 T268A 및 D269A를 포함하는 돌연변이를 포함하되,

돌연변이는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CNTFR 폴리펩티드에 대해 존재하고,

가용성 CNTFR 폴리펩티드는 Fc 도메인에 융합되는 가용성 CNTFR 폴리펩티드.

**청구항 9**

제8항의 가용성 CNTFR 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산.

**청구항 10**

제9항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

**청구항 11**

제9항의 핵산 또는 제10항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

삭제

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

삭제

**청구항 31**

삭제

**청구항 32**

삭제

**청구항 33**

삭제

**청구항 34**

삭제

**청구항 35**

삭제

**청구항 36**

삭제

**청구항 37**

삭제

**청구항 38**

삭제

**청구항 39**

삭제

**청구항 40**

삭제

**청구항 41**

삭제

**청구항 42**

삭제

**청구항 43**

삭제

**청구항 44**

삭제

**청구항 45**

삭제

**청구항 46**

삭제

**청구항 47**

삭제

**청구항 48**

삭제

**청구항 49**

삭제

**청구항 50**

삭제

**청구항 51**

삭제

**청구항 52**

삭제

**청구항 53**

삭제

**청구항 54**

삭제

**청구항 55**

삭제

**청구항 56**

삭제

**청구항 57**

삭제

**청구항 58**

삭제

**청구항 59**

삭제

**청구항 60**

삭제

**청구항 61**

삭제

**청구항 62**

삭제

**청구항 63**

삭제

**청구항 64**

삭제

**청구항 65**

삭제

**청구항 66**

삭제

**청구항 67**

삭제

**청구항 68**

삭제

**청구항 69**

삭제

**청구항 70**

삭제

**청구항 71**

삭제

**청구항 72**

삭제

**청구항 73**

삭제

**청구항 74**

삭제

**청구항 75**

삭제

**청구항 76**

삭제

**청구항 77**

삭제

**청구항 78**

삭제

**청구항 79**

삭제

**청구항 80**

삭제

**청구항 81**

삭제

**청구항 82**

삭제

**청구항 83**

삭제

**청구항 84**

삭제

**청구항 85**

삭제

**청구항 86**

삭제

**청구항 87**

삭제

**청구항 88**

삭제

**청구항 89**

삭제

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2016년 12월 6일자 출원된 미국 가특허출원 제62/430,757호 및 2017년 4월 3일자 출원된 미국 가특허출원 제62/481,027호의 우선권의 이익을 주장하며, 이들은 그 전문이 본원에 참조로서 원용되어 포함된다.

### 배 경 기 술

[0003] 섬모 신경영양 인자(CNTF)는 병아리 섬모 뉴런에 대한 생존 인자로서 동정되었으며, 구조적으로 관련된 혈액- 및 신경형성 사이토카인의 인터류킨(IL)-6 패밀리(IL-6, IL-11, 카디오트로핀(cardiotrophin)-유사 사이토카인 인자 1(CLCF1), 백혈병 저해 인자(LIF), 온코스타틴(oncostatin) M(OSM), 카디오트로핀-1(CT-1))에 속한다. CNTF 및 IL-6 유형 사이토카인에 대한 세포 반응은 막-스패닝(membrane-spanning) 130-kDa 당단백질인, gp130을 포함하는 상이한 다중유닛 수용체 복합체에 의해 유도된다. CNTF는 먼저 신호 전달에 관여하지 않는, GPI-고정된 CNTF 수용체(CNTFR)에 1:1 화학양론으로 결합한다. 막-결합된 또는 가용성 CNTFR에 대한 CNTF의 결합은 세포내 신호전달 연쇄를 유발하는, 신호 전달 β-수용체 gp130과 LIF 수용체(LIFR)의 이종이량체(heterodimer)를 유도한다.

[0004] 암은 종양 형성 과정의 결과로서 그 자체가 변경된 미세환경 내에서 개시되고 진행한다. 암 세포와 접촉된 간질 세포는 종양 진행을 촉진시키기 위해 종양 세포로의 신호전달에 의해 직접적으로, 또는 다른 간질 구성요소를 모집함에 의해 간접적으로 작용할 수 있는 사이토카인 및 성장 인자를 분비한다. 이러한 과정의 중요한 측면은 암-관련 섬유아세포(CAF)의 확장이다. CAF는 상이한 종양 및 조직에서 별개의 특징을 갖는 간질 세포의 다양한 집단이다.

[0005] CAF는 종양 세포의 성장을 자극하는 가용성 인자의 분비에 의해 생체내 암 세포(예를 들어, 폐암 세포)의 성장을 지지한다. 하나의 이러한 가용성 인자는 카디오트로핀-유사 사이토카인 인자 1(CLCF1)이다. 간질 내 세포에 의해 생성된 CLCF1은 이러한 단백질-CNTFR에 대한 수용체를 발현하는 종양 세포에 의해 성장 신호로서 수신된다. 예를 들어, 기능적 연구로 비(非)소세포 폐암(NSCLC)의 성장을 촉진하는 데 있어서의 CLCF1-CNTFR 신호전달의 역할을 확인하였다.

### 발명의 내용

[0006] 섬모 신경영양 인자 수용체(CNTFR)의 리간드에 특이적으로 결합하는 작용제가 제공된다. 특정 양태에서, 본 개시의 작용제는 가용성 CNTFR 폴리펩티드이다. 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 하나 이상의 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛(subunit)에 대하여 변경된(예를 들어, 감소된) 결합 친화성, 하나 이상의 CNTFR 리간드에 대하여 변경된(예를 들어, 증가된) 결합 친화성, 또는 이들의 임의의 조합을 가질 수 있다. 본 개시의 작용제를 포함하는 조성물이 또한 제공되며,(예를 들어, 세포 증식성 장애를 치료하기 위하여) 상기 작용제를 사용하는 방법 및 CNTFR 신호전달과 관련된 세포 증식성 장애를 갖는 개체를 동정하는 방법이 제공된다.

### 도면의 간단한 설명

[0007] **도 1**은, 본 개시의 하나의 구현예에 따른, 다운스트림 CNTFR 신호전달 경로를 저해하는 전략을 도식적으로 예시한다. 이러한 구현예에서, CNTFR의 리간드에 특이적으로 결합하는 작용제는, CLCF1이 막 결합된 CNTFR과 상호작용하는 것을 저해하여 JAK STAT 경로 및 MAPK/ERK 경로와 같은 CLCF1-CNTFR 매개 신호전달 경로의 활성화를 방

지하는 가용성 CNTFR "디코이(decoy) 수용체"이다.

**도 2**는 재조합 CLCF1이 STAT3을 활성화시킨다는 것을 입증하는 데이터를 제공한다. 패널 A(도 2a): NSCLC 세포주 A549에서 Tyr705에서의 p-STAT3의 수준을 처리 15분 및 30분 후에 검출한 것이다. 패널 B(도 2b): p-STAT3 신호의 강도를 CNTFR 발현에 의해 정규화한 후에 정량화한 것이다. 패널 C(도 2c): STAT3 활성화를 H23 및 H358과 같은 다른 NSCLC 세포주에서 검출한 것이다.

**도 3**은 A549 및 H23 세포 생존에 대한 CLCF1의 처리 효과를 입증하는 데이터를 나타낸다. 무혈청 조건에서 24시간 기아(starvation) 후, 세포를 무혈청 배지에서 72시간 동안 CLCF1로 처리하였다. CLCF1은 농도 의존적으로 A549(패널 A(도 3a))와 H23(패널 B(도 3b)) 세포 생존을 증가시켰다.

**도 4는** CNTFR의 효모 표면을 디스플레이하는 것이다. 패널 A(도 4a): CNTFR이 효모 표면 단백질 Aga2p에 대한 융합체로서 디스플레이되었다. 디스플레이된 단백질은 발현 수준을 측정할 수 있게 하는 c-말단 c-myc 태그를 함유한다. 패널 B(도 4b): 20 nM CLCF1로 처리된 경우, CNTFR을 발현하는 효모 집단이 CLCF1 결합에 대한 신호를 증가시켰음을 나타내는 유세포 분석 산점도.

**도 5는** 효모-디스플레이된 CNTFR이 CLCF1의 존재 하에서 베타 수용체에 결합하는 것을 보이고 있다. 항-cMyc 항체만(패널 A(도 5a)), LIFR-Fc과 함께(패널 B(도 5b)), CLCF1 및 LIFR-Fc와 함께(패널 C(도 5c)), 및 CLCF1, LIFR-F 및 gp130-HIS와 함께(패널 D(도 5d)) 인큐베이션한 효모를 디스플레이하는 CNTFR을 나타내는 산점도. 형광으로 표지된 2차 항체를 사용하여, 유세포 분석에 의해 다양한 구성요소의 결합을 검출하였다. 패널 E(도 5e): 패널 B, C 및 D(도 5b, 5c 및 5d)의 산점도들을 겹친 것.

**도 6는** 효모-디스플레이된 CNTFR-CLCF1이 LIFR 없이 gp130에 결합할 수 있는 것을 보이고 있다. 항-cMyc 항체만(패널 A(도 6a)), gp130-Fc과 함께(패널 B(도 6b)), CLCF1 및 gp130-Fc와 함께(패널 C(도 6c)), 및 CLCF1, gp130-Fc 및 LIFR-HIS와 함께(패널 D(도 6d)) 인큐베이션한 효모를 디스플레이하는 CNTFR을 나타내는 산점도. 형광으로 표지된 2차 항체를 사용하여, 유세포 분석에 의해 다양한 구성요소의 결합을 검출하였다. 패널 E(도 6e): 패널 B, C 및 D(도 6b, 6c 및 6d)의산점도들을 겹친 것.

**도 7**은 CLCF1에 대하여 무작위로 돌연변이시킨 CNTFR 라이브러리를 3회 분류한 후 중간 친화성 집단으로부터 단리된 변이체를 나타낸다.

**도 8** 은 CLCF1에 대하여 무작위로 돌연변이시킨 CNTFR 라이브러리를 3회 분류한 후 최고 친화성 집단으로부터 단리된 변이체를 나타낸다.

**도 9**는 CLCF1에 대하여 셔플링된(shuffled) CNTFR 라이브러리3회 분류한 후 최고 친화성 집단으로부터 단리된 변이체를 나타낸다.

**도 10은** 친화성 성숙된 CNTFR 변이체의 특징분석을 보이고 있다. 패널 A(도 10a): 친화성 성숙 스크린으로부터 단리된 CNTFR 구조체를 발현하는 효모에 대한 CLCF1 결합. 패널 B(도 10b): 효모 디스플레이된 CNTFR 구조체의 겉보기 Kd 값. 패널 C(도 10c): 효모 디스플레이된 야생형 CNTFR 및 변이체 4에 대한 CNTF 결합. 패널 D(도 10d): hCLCF1 이외에 mCLCF1에 결합된 변이체 4.

**도 11은** T268A 및 D269A 돌연변이를 함유하는 CNTFR 변이체가 gp130이 아니라 CLCF1 및 LIFR에 결합하는 것을 보이고 있다. CLCF1(패널 A(도 11a)), gp130-Fc(패널 B(도 11b)) 및 LIFR-Fc(패널 C(도 11c))에 대한 CNTFR T268A D269A 구조체 결합 신호.

**도 12는** LIFR에 결합하지 않는 CNTFR 변이체에 대한 라이브러리 스크리닝을 보이고 있다. 고친화성 CLCF1 결합제에 대한 초기 스크리닝을 수행한 후, 낮은 LIFR-Fc 신호를 갖는 집단을 단리하였다(패널 A(도 12a)). 다음으로 CLCF1 결합제에 대한 또 다른 스크리닝(패널 C(도 12c)) 및 비(非)LIFR 결합제에 대한 스크리닝이 이어졌다. 패널 D(도 12d): 6회 분류 후, 스크리닝된 라이브러리는 감소된 LIFR 결합을 나타내지만 CLCF1 결합은 변하지 않은 것. A 상단 패널(도 12a의 상단 패널), B 하단 패널(도 12b의 하단 패널) 및 C 하단 패널(도 12c의 하단 패널)에서의 게이트는 각 분류 회차에서 단리된 집단을 나타낸다.

**도 13은** LIFR에 결합하지 않는 CNTFR 변이체의 특징분석을 보이고 있다. 패널 A(도 13a): LIFR에 대한 음성 분류(neg. sort)를 사용하는 라이브러리 스크리닝 접근법으로부터 단리된 변이체가 2 개의 공통(consensus) 돌연변이, Y177H 및 K178N을 가지고 있는 것. 패널 B(도 13b): 이러한 2 개의 돌연변이가, 조합된 경우, LIFR 결합 친화성을 감소시키는 것에 대한 부가 효과를 나타내고 있는 것. V4= 도 10으로부터의 변이체 4.

**도 14는** 가용성 eCNTFR 구조체의 특징분석을 보이고 있다. 패널 A(도 14a): 가용성으로 발현된eCNTFR-HIS 및 eCNTFR-Fc가, wtCNTFR 단백질과 비교하여, CLCF1에 대한 유의미하게 개선된 결합을 나타내고 있는 것. 패널 B(도 14b): 가용성 eCNTFR 구조체가 가용성 gp130 및 LIFR에 대한 최소의 결합을 나타내고 있는 것(각각의 경우에 대하여, 좌측에서 우측으로: wtCNTFR-HIS; wtCNTFR-Fc; eCNTFR-HIS; eCNTFR-Fc).

**도 15는** 세포 신호전달 및 생존에 대한 eCNTFR-Fc의 효과를 보이고 있다. 패널 A(도 15a): A549 비소세포 폐암 세포를 10 nM CNTFR-Fc 변이체로 20 분 동안 처리하고, pSTAT3을 검출하기 위해 웨스턴 블롯(western blot)을 수행한 것을 보이고 있다. eCNTFR-Fc 처리는 A549(패널 B(도 15b)) 및 H23 세포(패널 C(도 15c))에서 CLCF1의 생존-증진 효과를 저해하였다. 패널 B 및 C(도 15b 및 도 15c)의 경우, 각각의 농도에 대하여, CLCF1에 대한 결과는 좌측에 있고, CLCF1 + eCNTFR-Fc에 대한 결과는 우측에 있다.

**도 16은** eCNTFR-Fc에 의한 CLCF1의 격리가 A549 이종이식 모델에서 종양 성장을 저해하는 것을 보이고 있다. 패널 A(도 16a): 체중 1kg 당 1mg 투여 후 48시간에 걸친 eCNTFR-Fc의 CLCF1 격리 및 청소율(clearance). 패널 B(도 16b): A549 NSCLC 세포의 이종이식 모델에서의 종양 부담. 마우스를 PBS, 체중 1kg 당 1mg 또는 체중 1kg 당 10mg의 eCNTFR-Fc로 17 일 동안 주 2회(화살표) 처리하였다(원: PBS, 정사각형: 1 mg/kg eCNTFR-Fc, 삼각형: 10 mg/kg eCNTFR-Fc). 패널 C(도 16c): 시간 0에서 정규화된 개별 종양 크기의 폭포 차트(waterfall plot).

**도 17은** eCNTFR-Fc가 H23 이종이식 모델에서 종양 성장을 저해하는 것을 보이고 있다. 패널 A(도 17a): H23 NSCLC 세포의 이종이식 모델에서의 종양 부담. 마우스를 PBS(원), 체중 1kg 당 10mg의 wtCNTFR-Fc(정사각형) 또는 eCNTFR-Fc(삼각형)를 사용하여 39일에 걸쳐 주 3회 처리하였다. 패널 B(도 17b): 개별 종양의 폭포 차트.

**도 18**의 패널 A 및 B(도 18a 및 도 18b)는, 조작된 CLCF1 트랩(eCNTFR)에서 증가된 특이성 및 시험관내 효능을 입증하는 데이터를 나타낸다. 하기와 같이 나타내었다: eCNTFR-Fc + mCLCF1(원); wtCNTFR-Fc + CNTF(삼각형); wtCNTFR-Fc + mCLCF1(다이아몬드); 및 eCNTFR-Fc + CNTF. STAT3 인산화의 저해를 사용하여 저해 효과를 입증하였다.

**도 19**의 패널 A 내지 I(도19a 내지 도19ib)는, eCNTFR의 생체내 효과를 나타내는 데이터를 제공한다. 패널 A(도 19a): NOD/SCID/감마 마우스에서의 10 mg/kg eCNTFR-Fc의 복강내(i.p.) 투여 후 혈액 청소율 및 CLCF1 격리. 주사 후 혈청 샘플을 수집하고, 미결합된 CLCF1을 포획제로서 eCNTFR-Fc를 사용하여 ELISA로 측정하였다. 비히클-처리된 마우스를 사용하여 기준선 CLCF1 수준을 결정하였다. 혈중 eCNTFR-Fc 수준을 포획제로서 항-Fc 항체를 사용하여 ELISA로 정량화하였다. 패널 B(도 19b): A549 이종이식편의 종양 부피 정량화 [$n$ = PBS를 제외한 8개 종양($n$ = 마지막 시점에서 6개 종양), 하나의 실험]. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, 이원(two-way) ANOVA 사용. 데이터는 평균 ± 측정의 표준오차(s.e.m)로 나타내었다. 패널 C(도 19c): 최종 시점에서의 최종 시점 A549 이종이식편의 종양 부피 정량화. 위스커(whisker)는 최대 및 최소 값을 나타내고; 박스는 75번째 및 25번째 백분위수를 나타내고, 선은 중간값을 나타낸다. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, 일원(one-way) ANOVA 사용. 패널 D(도 19d): A549 이종이식편에 대한 기준선으로부터의 종양% 변화를 나타내는 폭포 차트. 패널 E(도 19e): 환자 유래 이종이식(PDTX) 모델의 종양 부피 정량화. ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$, 이원 ANOVA 사용. 데이터는 평균 ± 측정의 표준오차(s.e.m)로 나타내었다. 패널 F(도 19f): 최종 시점에서의 PDTX 모델의 종양 부피 정량화. 위스커는 최대 및 최소 값을 나타내고; 박스는 75번째 및 25번째 백분위수를 나타내고, 선은 중간값을 나타낸다. ** $P < 0.01$, 양측 독립 스튜던트 t 검정(two-tailed unpaired Student's $t$-test) 사용. 패널 G(도 19g): PDTX 모델에 대한 기준선으로부터의 종양% 변화를 나타내는 폭포 차트. 패널 H(도 19h): PDTX 종양의 대표적인 이미지. 스케일바(scale bar), 1 cm. 패널 I(도 19ia): 포스포-히스톤 H3(PH3) 및 절단된 카스파아제-3(CC3)에 대한 대표적인 H&E 염색 및 IHC. 스케일바, 50 ㎛. PH3- 및 CC3-양성 초점의 정량화(두 번째 패널 I(도 19ib)). * $P < 0.05$; **** $P < 0.0001$, 일원 ANOVA 사용. 데이터는 평균 ± 측정의 표준오차(s.e.m)로 나타내었다.

**도 20**의 패널 A 내지 D(도 20a 내지 도 20d)는, CLCF1 및 CNTFR이 비소세포 폐암(NSCLC)에서 발현되었음을 입증하는 데이터를 제공한다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0008] 섬모 신경영양 인자 수용체(CNTFR)의 리간드에 특이적으로 결합하는 작용제가 제공된다. 특정 양태에서, 본 개시의 작용제는 가용성 CNTFR 폴리펩티드이다. 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 하나 이상의 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛에 대하여 변경된(예를 들어, 감소된) 결합 친화성, 하나 이상의 CNTFR 리간드에 대하여 변경된(예를 들

어, 증가된) 결합 친화성, 또는 이들의 임의의 조합을 가질 수 있다. 본 개시의 작용제를 포함하는 조성물이 또한 제공되며,(예를 들어, 세포 증식성 장애를 치료하기 위하여) 상기 작용제를 사용하는 방법 및 CNTFR 신호전달과 관련된 세포 증식성 장애를 갖는 개체를 동정하는 방법이 제공된다.

[0009] 본 개시의 작용제, 조성물 및 방법을 보다 상세하게 기재하기 전, 작용제, 조성물 및 방법이 기재된 특정 구현예에 제한되지 않으며, 당연히 변할 수 있다는 것을 이해해야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 특정 구현예를 기재하기 위한 목적이며, 작용제, 조성물 및 방법의 범위는 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것이기 때문에, 제한하고자 하는 것이 아니라는 것을 이해해야 한다.

[0010] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 해당 범위의 상한과 하한 사이의, 하한 단위의 1/10까지의 각각의 사이에 있는 값, 및 상기 명시된 범위에서 임의의 다른 명시된 또는 사이에 있는 값이, 작용제, 조성물 및 방법에 포함된다고 이해된다. 이러한 보다 작은 범위의 상한 및 하한은, 독립적으로 보다 작은 범위에 포함될 수 있으며, 이는 또한 명시된 범위에서 임의의 구체적으로 배제된 한계를 조건으로, 작용제, 조성물 및 방법에 포함된다. 명시된 범위가 양쪽 한계 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우, 포함된 한계 중 어느 하나 또는 둘 모두를 배제하는 범위 또한 작용제, 조성물 및 방법에 포함된다.

[0011] 용어 "약"이 선행되는 수치 값을 갖는 특정 범위가 본원에 제시된다. 용어 "약"은, 그것이 선행하는 정확한 숫자에 대한 문자 그대로의 뒷받침뿐만 아니라, 그 용어가 선행하는 숫자의 근사치이거나 그에 근접한 숫자를 제공하기 위해 본원에서 사용된다. 한 숫자가 구체적으로 인용된 숫자의 근사치이거나 그에 근접한 숫자인지를 결정하는 데 있어서, 인접한 또는 근사치인 미인용된 숫자는, 그것이 제시된 문맥에서, 구체적으로 인용된 숫자와 실질적으로 동등한 것을 제공하는 숫자일 수 있다.

[0012] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 작용제, 조성물 및 방법이 속하는 업계의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 작용제, 조성물 및 방법이 또한 작용제, 조성물 및 방법의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 대표적인 작용제, 조성물 및 방법의 예가 여기서 기재된다.

[0013] 본 명세서에 인용된 모든 출판물 및 특허는, 각각의 개별 출판물 또는 특허가 구체적으로 및 개별적으로 참조로서 인용되는 것으로 지시된 바와 같이, 본원에 참조로서 인용되고, 그 인용된 출판물과 관련된 물질 및/또는 방법을 개시 및 기재하기 위해 본원에 참조로서 인용된다. 임의의 출판물의 인용은 출원일 전에 개시된 것에 대한 것이며, 제공된 공개 날짜는 실제 공개 날짜와 상이할 수 있어, 독자적으로 확인해야할 필요가 있을 수 있기 때문에, 본 발명의 작용제, 조성물 및 방법이 그러한 출판물에 앞서 있을 자격이 없다는 것을 인정하는 것으로서 해석되어서는 안된다.

[0014] 본원 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바, 단수 형태의 표현은, 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 복수의 언급 대상을 포함한다는 것에 유의해야 한다. 나아가, 청구범위는 임의의 임의적 요소를 배제하도록 작성될 수 있다는 것에 유의해야 한다. 이와 같이, 이러한 설명은 청구 요소의 인용 또는 "부정적인" 제한의 사용과 관련하여 "단독으로", "오로지" 등과 같은 배타적인 용어의 사용에 대한 선행 기준으로서 역할을 하기 위한 것이다.

[0015] 명확성을 위해, 별도의 구현예의 맥락에서 기재된, 작용제, 조성물 및 방법의 특정한 특징은, 또한 단일 구현예에서 조합으로 제공될 수 있다고 이해된다. 반대로, 간결성을 위해, 단일 구현예의 맥락에서 기재된, 작용제, 조성물 및 방법의 다양한 특징은, 또한 별도로 또는 임의의 적합한 하위 조합으로 제공될 수 있다. 구현예의 모든 조합은 본 개시에 의해 구체적으로 포함되며, 각각의 및 모든 조합이 개별적으로 및 명시적으로 개시된 바와 같이, 그러한 조합이 실행 가능한 방법 및/또는 조성물을 포함하는 범위까지 본원에 개시된다. 또한, 그러한 변수를 설명하는 구현예에 열거된 모든 하위 조합이 또한 작용제, 조성물 및 방법에 의해 구체적으로 포함되며, 각각의 및 모든 하위 조합이 개별적으로 및 명시적으로 개시된 바와 같이 본원에 개시된다.

[0016] 본 개시를 읽을 때 당업자에게 명백할 수 있는 바와 같이, 본원에 기재 및 예시된 각각의 개별 구현예는, 본 방법의 범위 또는 의미를 벗어나지 않는 한, 임의의 다른 몇몇 구현예의 특징으로부터 쉽게 분리되거나 조합될 수 있는, 개별 구성요소 및 특징을 갖는다. 임의의 인용된 방법은 인용된 사건의 순서대로 또는 논리적으로 가능한 임의의 다른 순서로 수행될 수 있다.

[0017] CNTFR 리간드-결합제

[0018] 상기 요약된 바와 같이, 본 개시의 양태는 섬모 신경영양 인자 수용체(CNTFR)의 리간드에 특이적으로 결합하는 작용제를 포함한다. CNTFR(또한 CNTF 수용체 서브유닛 α로서 지칭됨)은 1형 사이토카인 수용체 패밀리의 구성원이다. CNTFR은 섬모 신경영양 인자(CNTF)뿐만 아니라, 카디오트로핀-유사 사이토카인 인자 1(CLCF1) 및 뉴로

포에틴(NP)과 같은 다른 리간드에 대한 3자(tripartite) 수용체의 리간드-특이적 구성요소이다. CNTFR에 대한 리간드의 결합은 수용체, gp130 및 백혈병 저해 인자 수용체(LIFR)의 막관통 구성요소를 모집하여, 신호 전달을 가능하게 한다.

[0019] 본원에 사용된 바, "섬모 신경영양 인자 수용체(CNTFR)의 리간드에 특이적으로 결합하는 작용제"는, 하나 이상의 CNTFR 리간드(예를 들어, CLCF1, CNTFR 및/또는 NP 중 하나 이상)에 대한 결합 친화성을, 약 $10^{-5}$ M 이하, 약 $10^{-6}$ M 이하, 약 $10^{-7}$ M 이하, 약 $10^{-8}$ M 이하, 또는 약 $10^{-9}$ M, $10^{-10}$ M, $10^{-11}$ M 또는$10^{-12}$ M 이하의 $K_D$로 나타내는 작용제이다. 이러한 친화성은 통상적인 기술을 사용하여, 예컨대 평형 투석; 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술의 사용(예를 들어, BIAcore 2000 기기, 제조업자에 의해 개략된 일반 절차를 사용하여); 방사면역검정법; 또는 하기 실시예에 기재되거나 당업자에게 공지된 또 다른 방법에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0020] 본 개시의 작용제는, 비제한적으로, 압타머, 항체 등을 포함하는 CNTFR 리간드에 특이적으로 결합하는, 임의의 적합한 유형의 작용제일 수 있다. 특정 양태에서, 작용제는 가용성 CNTFR 폴리펩티드이다.

[0021] 본 개시의 CNTFR 리간드-결합제의 비제한적인 구현예가 이제 상세하게 기재될 것이다.

[0022] 가용성 CNTFR 폴리펩티드

[0023] 상기 요약된 바와 같이, 특정 양태에서, CNTFR의 리간드에 특이적으로 결합하는 작용제는 가용성 CNTFR 폴리펩티드이다. "가용성 CNTFR 폴리펩티드"는, 세포막 내로 통합되지 않는 CNTFR 폴리펩티드를 의미한다. 야생형 인간 CNTFR 아미노산 서열(UniProtKB - P26992)이 하기 표 1에 제공되어 있다.

표 1

표 1: 야생형 인간 CNTFR 아미노산 서열(비(非)가용성)

[0024]

| | 아미노산 서열 |
|---|---|
| 야생형 인간 CNTFR(비가용성) (서열번호 1) | MAAPVPWACCAVLAAAAAVVYAQRHSPQEAPHVQYERLGSDVTL PCGTANWDAAVTWRVNGTDLAPDLLNGSQLVLHGLELGHSGLYA CFHRDSWHLRHQVLLHVGLPPREPVLSCRSNTYPKGFYCSWHLPT PTYIPNTFNVTVLHGSKIMVCEKDPALKNRCHIRYMHLFSTIKYKV SISVSNALGHNATAITFDEFTIVKPDPPENVVARPVPSNPRRLEVTW QTPSTWPDPESFPLKFFLRYRPLILDQWQHVELSDGTAHTITDAYA GKEYIIQVAAKDNEIGTWSDWSVAAHATPWTEEPRHLTTEAQAAE TTTSTTSSLAPPPTTKICDPGELGSGGGPSAPFLVSVPITLALAAAAA TASSLLI |

[0025] 특정 구현예에 있어서, 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 하나 이상의 용해성-부여 돌연변이를 갖는 폴리펩티드에 의해 세포막 내로 통합되지 않는다. 본 개시 전반에 걸쳐 사용된 바, "돌연변이" 또는 "돌연변이들"은, 관련 폴리펩티드, 예를 들어 본 개시의 CNTFR 폴리펩티드에, 하나 이상의 아미노산 치환, 하나 이상의 아미노산 결실(예를 들어, 절단), 하나 이상의 아미노산 삽입 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0026] 하나 이상의 용해성-부여 돌연변이는 CNTFR 폴리펩티드의 임의의 적합한 영역(들)에 위치할 수 있다. 특정 양태에서, 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 야생형 CNTFR을 세포막에 고정시키는 도메인에 하나 이상의 용해성-부여 돌연변이를 포함한다. 이러한 도메인은 단백질을 세포막에 고정시키는, 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI)로 번역 후 변형된 지질화 부위(S342)를 함유한다. CNTFR을 세포막에 고정시키는 야생형 인간 CNTFR 도메인은, 서열번호 1에 기재된 343 내지 372번째 아미노산(표 1에 밑줄 그어진 것)으로 이루어지는 것으로서 정의될 수 있다. 특정 조건 하에서, CNTFR의 이러한 부분은 효소적으로 개질되어, 세포막으로부터 CNTFR을 유리시킨다. 일부 구현예에 있어서, 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 GPI로의 번역 후 변형을 불가능하게 하여 용해성을 부여하는, S342에서의 치환 돌연변이를 포함한다. 야생형 인간 CNTFR은 또한 서열번호 1의 1 내지 22번째 아미노산(표 1에 밑줄 그어진 것)으로 이루어진 신호 펩티드를 포함한다.

[0027] 특정 구현예에 있어서, CNTFR을 세포막에 고정시키는 CNTFR 도메인은, CNTFR 폴리펩티드가 세포막에 고정될 수 있는 이의 능력을 상실하게 되어 용해성을 부여하는, 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 대안적으로, 또는 부가적으로, 가용성 CNTFR 폴리펩티드는, CNTFR 폴리펩티드가 세포막에 고정될 수 있는 이의 능력을 상실하여

용해성을 부여하는,(예를 들어, CNTFR을 세포막에 고정시키는 CNTFR 도메인에) 절단을 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 CNTFR을 세포막에 고정시키는 CNTFR 도메인이 결여되어 있다. 예를 들어, 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 서열번호 1에 기재된 343 내지 372번째 아미노산이 결여되어 있을 수 있다.

[0028] 임의로 하나 이상의 용해성-부여 돌연변이를 포함하는 것 이외에, 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 폴리펩티드에 하나 이상의 다른 바람직한 특성을 부여하는 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 관심있는 다른 바람직한 특성에는, 비제한적으로, 하나 이상의 다른 CNTFR 리간드와 비교하여 CNTFR 리간드에 대하여 변경된(예를 들어, 보다 큰) 결합 친화성, 관심있는 특정한 CNTFR 리간드에 대하여 변경된(예를 들어, 보다 큰) 특이성, 야생형 CNTF 수용체, 예를 들어 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 수용체 또는 이의 성숙한 형태에 비해, 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛(예를 들어, gp130, LIF 등)에 대하여 변경된(예를 들어, 감소된) 결합 친화성이 포함된다.

[0029] "보다 큰 결합 친화성" 또는 "증가된 결합 친화성"은, 가용성 CNTFR 폴리펩티드가 야생형 CNTF 수용체와 비교하여, 분자(예를 들어, CNTFR 리간드, 예컨대 CLCF1)에 대한 보다 단단한 결합(보다 낮은 $K_D$ 값으로 나타내어진 바와 같음)을 나타낸다는 것을 의미한다. "보다 낮은 결합 친화성" 또는 "감소된 결합 친화성"은, 가용성 CNTFR 폴리펩티드가 야생형 CNTF 수용체와 비교하여, 분자(예를 들어, 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛, 예컨대 LIFR, gp130 또는 둘 모두)에 대한 덜 단단한 결합(보다 높은 $K_D$ 값으로 나타내어진 바와 같음)을 나타낸다는 것을 의미한다.

[0030] 관심있는 분자, 예를 들어 CNTFR 리간드, 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛, 예컨대 LIFR, gp130 등에 대한 CNTFR 리간드-결합제(예를 들어, 가용성 CNTFR 폴리펩티드)의 결합 친화성을 측정하는 방법이 이용 가능하다. 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술(예를 들어, BIAcore™ 2000 기기 사용), KinExA® 역학적 배제 검정법(kinetic exclusion assay)(Sapidyne Instruments), 바이오층 간섭법(Bio-Layer Interferometry(BLI)) 기술(예를 들어, ForteBio Octet®) 또는 다른 유사한 검정법/기술이, CNTFR 리간드-결합제가 목적하는 결합 친화성을 나타내는지를 결정하는 데 이용될 수 있다. 본 개시의 맥락에서 결합 친화성을 측정하는 데 적합한 접근법에는, 예를 들어 문헌[Hunter, S.A. and Cochran, J.R.(2016) *Methods Enzymol.* 580:21-44]에 기재된 것들이 포함된다.

[0031] 일부 구현예에서, 직접적인 결합 검정법에서, 평형 결합 상수($K_D$)는 형광단 또는 방사성동위원소에 컨쥬게이션된 CNTFR 폴리펩티드, 또는 표지된 항체에 의해 검출되는 N- 또는 C-말단 에피토프 태그를 함유하는 CNTFR 폴리펩티드를 사용하여 측정될 수 있다. 표지 또는 태그가 실현 가능하거나 바람직하지 않은 경우, 경쟁 결합 검정법을 사용하여, 표지된 경쟁자의 최대 신호의 50%가 검출 가능한 미표지된 CNTFR 폴리펩티드의 양인, 반수 최대(half-maximal) 저해 농도($IC_{50}$)를 결정할 수 있다. 이어서, 측정된 $IC_{50}$ 값으로부터 $K_D$ 값을 계산할 수 있다.

[0032] 상기 요약된 바와 같이, 특정 양태에서, 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 야생형 CNTF 수용체, 예를 들어 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 수용체 또는 이의 성숙한 형태에 비해, 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛에 대한 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 결합 친화성을 변경시키는(예를 들어, 감소시키는) 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. "리간드-CNTFR 복합체 서브유닛"은, 리간드에의 CNTFR의 결합 시, 야생형 CNTFR과 회합하는 단백질을 의미한다. 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛의 비제한적인 예에는, 백혈병 저해 인자 수용체(LIFR) 및 당단백질 130(gp130)이 포함된다. 특정 양태에서, 하나 이상의 돌연변이는 LIFR, gp130 또는 둘 모두에 대한 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 결합 친화성을 감소시킨다. 이러한 하나 이상의 돌연변이는, 예를 들어 CNTFR-매개 신호전달을 감소시키는(예를 들어, 세포 증식을 감소시키는) 것이 바람직한 경우, 리간드에의 결합 시, 가용성 CNTFR 폴리펩티드가 아고니스트(agonist)로서 작용하는 것을 방지할 수 있다.

[0033] 특정 구현예에 있어서, 가용성 CNTFR 폴리펩티드가 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛에 대하여 감소된 결합 친화성을 나타내는 경우, 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 결합 친화성은 10 nM의 CLCF1 존재 하에서 100 nM 이상의 $K_D$ 값을 갖는다.

[0034] 특정 양태에서, 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 LIFR에 대한 감소된 결합 친화성을 갖고, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CNTFR 폴리펩티드에 대해, 아미노산 위치 177, 178 또는 둘 모두에 돌연변이(예를 들어, 아미노산 치환)를 포함한다. 위치 177에서의 돌연변이의 예는 Y177H이다. 위치 177에서의 돌연변이의 또 다른 예는 Y177A이다. 위치 178에서의 돌연변이의 예는 K178N이다. 위치 178에서의 돌연변이의 또 다른 예는 K178A이다. 하기 실시예 부분에서 입증되는 바와 같이, 본 발명자들은, 이러한 돌연변이는 CNTFR 신호전달의 저

해제인 가용성 CNTFR 폴리펩티드를 유도하지만, 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛에 대하여 변경되지 않은 친화성을 갖는 가용성 CNTFR 폴리펩티드는, 리간드에의 결합 시, 예를 들어 LIFR 및 gp130을 모집하는 이의 능력으로 인해 아고니스트로서 작용한다고 결정하였다. 특정 양태에서, 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 돌연변이 Y177H 및 K178N, 또는 돌연변이 Y177A 및 K178A, 또는 돌연변이 Y177H 및 K178A, 또는 돌연변이 Y177A 및 K178N을 포함한다.

[0035] 특정 구현예에 있어서, 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 gp130에 대한 감소된 결합 친화성을 갖고, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CNTFR 폴리펩티드에 대해, 아미노산 위치 268, 269 또는 둘 모두에 돌연변이(예를 들어, 아미노산 치환)를 포함한다. 위치 268에서의 돌연변이의 예는 T268A이다. 위치 269에서의 돌연변이의 예는 D269A이다. 특정 양태에서, 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 돌연변이 T268A 및 D269A를 포함한다.

[0036] 상기 요약된 바와 같이, 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 야생형 CNTF 수용체, 예를 들어 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 수용체 또는 이의 성숙한 형태에 비해, 관심있는 CNTFR 리간드(예를 들어, CLCF1, NP, CNTF, 또는 또 다른 관심있는 CNTFR 리간드)에 대한 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 결합 친화성 및/또는 특이성을 변경시키는(예를 들어, 증가시키는) 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 특정 구현예에 있어서, 가용성 CNTFR 폴리펩티드가 CNTFR 리간드에 대하여 증가된 결합 친화성을 나타내는 경우, 리간드에 대한 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 결합 친화성은10 nM 이하의 $K_D$ 값을 갖는다.

[0037] 특정 구현예에 있어서, 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 CLCF1에 대한 결합 친화성 및/또는 특이성을 증가시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 특정 양태에서, 이러한 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CNTFR 폴리펩티드에 대해, 아미노산 위치 110, 174, 237, 287 또는 이들의 임의의 조합에 돌연변이(예를 들어, 아미노산 치환)를 포함한다. 위치 110에서의 돌연변이의 예는 R110Q이다. 위치 174에서의 돌연변이의 예는 T174P이다. 위치 237에서의 돌연변이의 예는 S237F이다. 위치 237에서의 돌연변이의 또 다른 예는 S237Y이다. 위치 287에서의 돌연변이의 예는 I287F이다. 특정 양태에서, 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 돌연변이 R110Q, T174P, S237F/S237Y 및I287F 중 하나 또는 임의의 조합(예를 들어, 각각)을 포함한다.

[0038] 일부 구현예에서, 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CNTFR 폴리펩티드에 대해, 아미노산 위치 110, 174, 177, 178, 237, 268, 269, 287 또는 이들의 임의의 조합에 돌연변이(예를 들어, 아미노산 치환)를 포함한다.

[0039] 특정 양태에서, 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 돌연변이 R110Q, T174P, Y177H/Y177A, K178N/K178A, S237F/S237Y, T268A, D269A 및 I287F 중 하나 또는 임의의 조합(예를 들어, 각각)을 포함한다.

[0040] 본 개시의 하나의 구현예에 따른 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 하기 표 2에 기재된 아미노산 서열(서열번호 2)을 포함한다. 표 2에서, 돌연변이는 볼드체 표시/밑줄 표시되어 있다. 이러한 예에서, 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 야생형 CNTF 수용체에 비해, 343 내지 372번째 아미노산의 C-말단 절단을 포함한다. 특정 양태에서, 이러한 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 신호 펩티드(표 2에 밑줄 그어진 것)를 포함하지 않는다.

표 2

표 2: 예시적인 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 아미노산 서열

[0041]

| | 아미노산 서열 |
|---|---|
| 예시적인 가용성 CNTFR 폴리펩티드(서열번호 2)<br><br>(R110Q, T174P, Y177H, K178N, S237F, T268A, D269A, I287F) | MAAPVPWACCAVLAAAAAVVYAQRHSPQEAPHVQYERLGSDVTL PCGTANWDAAVTWRVNGTDLAPDLLNGSQLVLHGLELGHSGLYA CFHRDSWHLRHQVLLHVGLPP**Q**EPVLSCRSNTYPKGFYCSWHLPT PTYIPNTFNVTVLHGSKIMVCEKDPALKNRCHIRYMHLFS**P**IK**HN**V SISVSNALGHNATAITFDEFTIVKPDPPENVVARPVPSNPRRLEVTW QTPSTWPDPE**F**FPLKFFLRYRPLILDQWQHVELSDGTAHTI**AA**AYA GKEYIIQVAAKDNE**F**GTWSDWSVAAHATPWTEEPRHLTTEAQAAE TTTSTTSSLAPPPTTKICDPGELGS |

[0042] 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 하기 실시예 부분, 및 도 7, 도 8 및 도 9 중 임의의 것에 제시된 CNTFR 폴리펩티드 중 임의의 것을 포함한다(또는 이에 해당한다).

[0043] 특정 구현예에 있어서, 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 23 내지 342번째 아미노산 또는 이의 단편, 예컨대 250 내지 319번째 아미노산, 250 내지 260번째 아미노산, 260 내지 270번째 아미노산, 270 내지 280 번째 아미노산, 280 내지 290번째 아미노산, 290 내지 300번째 아미노산, 300 내지 310 번째 아미노산, 또는 310 내지 319번째 아미노산의 길이를 갖는 단편과, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 가용성인 것 이외에, 이러한 CNTFR 폴리펩티드는 하나 이상의 바람직한 특징, 예컨대 하나 이상의 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛(예를 들어, LIFR, gp130 또는 둘 모두)에 대하여 감소된 결합 친화성, CNTFR 리간드(예를 들어, CLCF1)에 대하여 증가된 결합 친화성/특이성, CNTFR 리간드(예를 들어, CNTF, NP 등)에 대하여 감소된 결합 친화성, 및 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0044] 항체

[0045] 특정 양태에서, CNTFR의 리간드에 특이적으로 결합하는 작용제는 항체이다. 용어 "항체", "항체들" 및 "면역글로불린"은, 임의의 이소형(isotype)의 항체 또는 면역글로불린, 전체 항체(예를 들어, 결국 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 2 개의 이량체로 구성되어 있는, 사량체로 구성된 항체); 단쇄 항체; CNTFR 리간드(예를 들어, CLCF1, NP 및/또는 CNTF)에 대한 특이적 결합을 보유하는 항체의 단편(예를 들어, 전체 또는 단쇄 항체의 단편)(비제한적으로 Fab, Fab', Fv, scFv 및 디아바디; 키메라 항체; 및 인간화 항체, 예를 들어 인간화 전체 항체 또는 인간화 항체 단편을 포함함)을 포함한다.

[0046] "Fab" 단편은 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인($CH_1$)을 함유한다. Fab 단편은 항체 힌지(hinge) 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 $CH_1$ 도메인의 카르복실 말단에서의 몇몇 잔기의 첨가에 의해 Fab' 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 보유하는 Fab'에 대한 본원에서의 지정이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 본래 이들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

[0047] "단쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 $V_H$ 및 $V_L$ 도메인을 포함하며, 이러한 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. 일부 구현예에서, Fv 폴리펩티드는 $V_H$과 $V_L$ 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함하며, 이는 sFv가 항원 결합에 대하여 목적하는 구조를 형성하는 것을 가능하게 한다.

[0048] 특정 양태에서, CNTFR의 리간드에 특이적으로 결합하는 항체는, CNTF 또는 NP1과 비교하여, CLCF1에 우선적으로 특이적으로 결합한다. 특정 구현예에 있어서, CNTFR의 리간드에 특이적으로 결합하는 항체는, CNTF 또는 NP1이 아닌, CLCF1에 특이적으로 결합한다.

[0049] CNTFR 리간드-결합제의 조작(engineering)/개발 및 제조

[0050] 또한, 본 개시에는 하나 이상의 목적하는 기능을 갖는 부가적인 CNTFR 리간드-결합제를 조작/개발하는 방법이 제공된다. CNTFR 리간드-결합제가 개발되는 방식은 다양할 수 있다. 신규한 특성, 예를 들어 하나 이상의 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛(예를 들어, LIFR, gp130 또는 둘 모두)에 대하여 감소된 결합 친화성, CNTFR 리간드(예를 들어, CLCF1)에 대하여 증가된 결합 친화성 및/또는 특이성, CNTFR 리간드(예를 들어, CNTF, NP 등)에 대하여 감소된 결합 친화성, 및 이들의 임의의 조합을 갖는 CNTFR 리간드-결합제를 조작하기 위해, 합리적이고 조합적인 접근법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 가용성 CNTFR 폴리펩티드 또는 항체를 개발하기 위해, CNTFR 폴리펩티드 또는 항체의 라이브러리는, 예를 들어 박테리아 디스플레이, 파지 디스플레이, 효모 표면 디스플레이, 형광-활성화 세포 분류(FACS) 및/또는 임의의 다른 적합한 스크리닝 방법에 의해 생성 및 스크리닝될 수 있다.

[0051] 효모 표면 디스플레이는 신규한 분자 인식 특성, 증가된 표적 결합 친화성, 적절한 폴딩(folding) 및 개선된 안정성을 갖는 단백질을 조작하는 데 사용되었던 강력한 조합적인 기술이다. 이러한 플랫폼에서, 단백질 변이체의 라이브러리는 목적하는 생화학적 및 생물리학적 특성을 갖는 돌연변이를 단리하기 위해 고-처리량 방식으로 생성 및 스크리닝된다. 하기 실시예 부분에서 입증되는 바와 같이, 본 발명자들은 바람직한 방식으로 CLCF1, LIFR 및 gp130에 대하여 변경된 결합 친화성을 갖는 CNTFR 폴리펩티드를 조작하기 위해 효모 표면 디스플레이를 성공적으로 이용하였다. 효모 표면 디스플레이는 진핵세포 분비 경로의 품질 제어 메카니즘, 샤페론-보조 폴딩 및

효율적인 디설파이드 결합 형성에 있어서 이점이 있다.

[0052] 관심있는 바람직한 특성을 갖는 가용성 CNTFR 폴리펩티드를 개발하기 위한 하나의 접근법의 예에는, 효모 세포벽 단백질 Aga1p에 대한 2 개의 디설파이드 결합에 의해 부착된 효모 결합 아글루티닌(agglutinin) 단백질 Aga2p에, CNTFR 폴리펩티드를 유전적으로 융합시키는 것이 포함된다. 이러한 Aga2p-융합 구조체 및 염색체적으로 통합된 Aga1p 발현 카세트는, 적합한 프로모터, 예컨대 갈락토오스-유도성 프로모터의 제어 하에서 발현될 수 있다. 형광 표지된 1차 또는 2차 항체를 사용하는 유세포 분석에 의해 세포 표면 발현 수준을 측정하기 위해, N- 또는 C-말단 에피토프 태그가 포함될 수 있다. 이러한 구조체는 CNTFR 폴리펩티드(또는 조작하고자 하는 다른 단백질)의 N-말단이 Aga2에 융합된 가장 널리 사용되는 디스플레이 포맷을 나타내지만, 효모 표면 디스플레이 플라스미드의 몇몇의 대안적인 변형이 기재되어 있으며, 이는 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드를 개발하는 데 이용될 수 있다. 파지 또는 mRNA 디스플레이가 사용되는 패닝(panning) 기반 방법에 비해 이러한 스크리닝 플랫폼의 이점 중 하나는, 2색 FACS를 사용하여, 특정한 표적에 대한 결합 친화성에 있어서 최소 2배 차이가 나는 클론을 정량적으로 구별할 수 있다는 점이다.

[0053] DNA 수준에서 CNTFR을 선택적으로 돌연변이시키기 위한, 접근법의 하나의 예는, 교정 활성을 보유하지 않는 폴리머라아제(즉 엑소뉴클레아제)를 사용하는 것, 뉴클레오시드 유사체의 트리포스페이트 유도체의 혼합물을 사용하는 것, dNTP의 변경된 비를 사용하는 것, 마그네슘 또는 망간의 농도를 변화시키는 것 등을 포함하는, 임의의 수의 변경된 반응 조건에 의해 돌연변이를 도입하는 데 사용될 수 있는, 실수 유발(error prone) PCR이다. 대안적으로, 퇴화 코돈이, 예를 들어 중첩 연장 PCR을 사용하여 올리고뉴클레오티드 어셈블리에 의해 도입될 수 있다. 다음으로, 유전 물질이 효모에서 상동성 재조합을 위한 효모 디스플레이 벡터와 충분한 중첩을 갖는 측면(flanking) 프라이머를 사용하여 증폭될 수 있다. 이러한 방법들은 비교적 낮은 비용과 노력으로 CNTFR 라이브러리를 생성할 수 있게 한다. 라이브러리 조성에 있어서의 정의된 제어가 가능한 합성 라이브러리 및 최근의 방법이 개발되었다.

[0054] 특정 양태에서, 디스플레이 라이브러리(예를 들어, 효모 디스플레이 라이브러리)는 FACS에 의해 관심있는 표적(예를 들어, 관심있는 CNTFR 리간드, 예컨대 CLCF1)에 대한 결합에 대하여 스크리닝된다. 2색 FACS가 라이브러리 스크리닝에 사용될 수 있는데, 여기서 하나의 형광 표지는 c-myc 에피토프 태그를 검출하는 데 사용될 수 있고, 다른 하나는 관심있는 결합 표적에 대한 CNTFR 폴리펩티드의 상호작용을 측정하는 데 사용될 수 있다. 상이한 계기 레이저 및/또는 필터 세트가 단일-세포 분해능에서 2 개의 형광단의 여기 및 방사 특성을 측정하는 데 사용될 수 있다. 이는 결합을 이용하여 효모 발현 수준을 정규화하는 것을 가능하게 한다. 즉, 불량한 효모 발현을 나타내지만 많은 양의 표적에 결합하는 CNTFR 폴리펩티드는, 높은 수준으로 발현되지만 표적에 약하게 결합하는 CNTFR 폴리펩티드와 구별될 수 있다. 따라서, 발현 대 결합의 2차원 유세포 분석 플롯은 표적 항원에 결합하는 효모 세포의 대각선 집단을 유도할 것이다. 고친화성 결합제는 라이브러리 분류 게이트를 사용하여 단리될 수 있다. 대안적으로, 초기 분류 회차에서, 전장 단백질을 발현하지 않는 바람직하지 않은 클론의 라이브러리를 제거하는 것이 유용할 수 있다.

[0055] 관심있는 CNTFR 폴리펩티드를 인코딩하는 클론에 대한 CNTFR 라이브러리의 강화(enrichment) 후, 효모 플라스미드가 회수되고 시퀀싱(sequencing)된다. FACS의 추가의 회차는 증가된 분류 엄격성 하에서 수행될 수 있다. 이어서, 개별 효모-디스플레이된 CNTFR 클론의 결합 친화성 또는 역학적 오프율(off-rate)이 측정될 수 있다.

[0056] 관심있는 CNTFR 폴리펩티드가 표면 디스플레이(예를 들어, 효모 표면 디스플레이)에 의해 동정되면, 적합한 방법을 사용하여 조작된 CNTFR 폴리펩티드가 제조될 수 있다. 특정 구현예에 있어서, CNTFR 폴리펩티드는 고체상 펩티드 합성에 의해 제조된다. CNTFR 폴리펩티드 서열은 자동 합성기 상에서 고체상 펩티드 화학을 사용하여 합성될 수 있다. 예를 들어, 표준 9-플루오레닐메틸옥시카르보르닐(Fmoc)-기반 고체상 펩티드 화학이 이용될 수 있다. 고체상 합성에 이어 정제, 예를 들어 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)가 뒤따를 수 있다.

[0057] 특정 양태에서, 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 재조합 DNA 접근법을 사용하여 제조된다. 다양한 숙주 세포 유형에서 재조합 방법을 사용하여 CNTFR 폴리펩티드와 같은 단백질을 제조하기 위한 전략이 개발되었다. 예를 들어, 기능성 가용성 CNTFR 폴리펩티드는, 대장균(*E. coli*) 원형질막 주변 공간에서 폴딩을 촉진시키고 유용한 정제 처리로서 역할을 하는, 유전자 융합 파트너로서의 바르나아제(barnase)를 이용하여 제조될 수 있다. 특정 구현예에 있어서, 조작된 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 효모(예를 들어, 효모 균주 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 또는 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)) 또는 포유류 세포(예를 들어 인간 배아 신장 세포 또는 중국 햄스터 난소 세포)에서 발현된다. 발현 구조체는 하나 이상의 태그(예를 들어 금속 킬레이트화 크로마토그래피(Ni-NTA)에 의한, 예를 들어 정제를 위한 C-말단 헥사히스티딘 태그)를 인코딩할 수

있다. 이어서, 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여, 응집물, 미스폴딩된(misfolded) 다량체 등을 제거할 수 있다.

[0058] 본 개시의 양태는, 본 개시의 CNTFR 리간드 결합제를 인코딩하는 핵산을 포함한다. 즉, 본원에 기재된 CNTFR 리간드 결합제 중 임의의 것(예를 들어, 본원에 기재된 가용성 CNTFR 폴리펩티드, 항체 등 중 임의의 것)을 인코딩하는 핵산이 제공된다. 특정 양태에서, 이러한 핵산은 발현 벡터에 존재한다. 발현 벡터는 작용제(예를 들어, 가용성 CNTFR 폴리펩티드)를 인코딩하는 핵산에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함하며, 상기 프로모터는 작용제를 발현시키기 위해 선택된 숙주 세포의 유형을 기준으로 선택된다. 적합한 발현 벡터는 전형적으로 에피솜 또는 숙주 염색체 DNA의 필수 부분으로서 숙주 유기체에서 복제 가능하다. 통상적으로, 발현 벡터는 목적하는 DNA 서열로 형질전환된 세포의 검출을 가능하게 위해, 선별 마커(예를 들어, 암피실린(ampicillin) 내성, 히그로마이신(hygromycin) 내성, 테트라시클린(tetracycline) 내성, 카나마이신(kanamycin) 내성, 네오마이신(neomycin) 내성 등)를 함유한다.

[0059] 또한, 본원에 기재된 CNTFR 리간드 결합제 중 임의의 것(예를 들어, 본원에 기재된 가용성 CNTFR 폴리펩티드, 항체 등 중 임의의 것)뿐만 아니라, 이를 포함하는 임의의 발현 벡터를 인코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 대장균(*Escherichia coli*)은 본 개시의 CNTFR 리간드 결합제를 인코딩하는 핵산을 클로닝하기 위해 사용될 수 있는 원핵 숙주 세포의 하나의 예이다. 사용에 적합한 다른 미생물 숙주에는, 바실러스, 예컨대 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 및 다른 장내세균(enterobacteriaceae), 예컨대 살모넬라(Salmonella), 세라티아(Serratia) 및 다양한 슈도모나스(Pseudomonas) 종이 포함된다. 이러한 원핵 숙주에서, 전형적으로 숙주 세포(예를 들어, 복제 기점)와 상용성인 발현 제어 서열을 함유하는 발현 벡터를 또한 제조할 수 있다. 또한, 락토오스 프로모터 시스템, 트립토판(trp) 프로모터 시스템, 베타-락타마아제 프로모터 시스템 또는 파지 람다로부터의 프로모터 시스템과 같은, 임의의 수의 다양한 널리 공지된 프로모터가 존재할 것이다. 프로모터는 전형적으로 임의로 작동자 서열을 이용하여 발현을 제어하며, 전사 및 번역을 개시하고 완료하기 위한 리보솜 결합 부위 서열 등을 가질 것이다.

[0060] 효모와 같은 다른 미생물도 또한 발현에 유용하다. 사카로마이세스(예를 들어, 사카로마이세스 세레비시아에(*S. cerevisiae*)) 및 피키아는, 목적하는 경우 발현 제어 서열(예를 들어, 프로모터), 복제 기점, 종결 서열 등을 갖는 적합한 벡터를 갖는, 적합한 효모 숙주 세포의 예이다. 전형적인 프로모터에는, 3-포스포글리세레이트 키나아제 및 다른 당분해 효소가 포함된다. 유도성 효모 프로모터에는, 특히, 알코올 데히드로게나아제, 이소시토크롬 C, 및 말토오스 및 갈락토오스 이용에 관여하는 효소로부터의 프로모터가 포함된다.

[0061] 미생물 이외에, 포유류 세포(예를 들어, 시험관내 세포 배양에서 성장한 포유류 세포)가 또한 본 개시의 CNTFR 리간드 결합제를 발현 및 제조하는 데 사용될 수 있다. 적합한 포유류 숙주 세포에는, 인간 세포주, 비(非)인간 영장류 세포주, 설치류(예를 들어, 마우스, 래트) 세포주 등이 포함된다. 적합한 포유류 세포주에는, 비제한적으로, HeLa 세포(예를 들어, American Type Culture Collection(ATCC) 번호 CCL-2), CHO 세포(예를 들어, ATCC 번호 CRL9618, CCL61, CRL9096), 293 세포(예를 들어, ATCC 번호 CRL-1573), Vero 세포, NIH 3T3 세포(예를 들어, ATCC 번호 CRL-1658), Huh-7 세포, BHK 세포(예를 들어, ATCC 번호CCL10), PC12 세포(ATCC 번호 CRL1721), COS 세포, COS-7 세포(ATCC 번호 CRL1651), RAT1 세포, 마우스 L 세포(ATCC 번호 CCLI.3), 인간 배아 신장(HEK) 세포(ATCC 번호 CRL1573), HLHepG2 세포 등이 포함된다. 이러한 세포에 대한 발현 벡터는 복제 기점, 프로모터 및 인핸서(enhancer)와 같은 발현 제어 서열, 및 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위 및 전사 종결자 서열과 같은 필요한 가공 정보 부위를 포함할 수 있다. 적합한 발현 제어 서열의 예는, 면역글로불린 유전자, SV40, 아데노바이러스, 소 유두종 바이러스, 사이토메갈로바이러스 등에서 유도된 프로모터이다.

[0062] 일단(화학적으로 또는 재조합적으로) 합성되면, CNTFR 리간드 결합제는 황산암모늄 침전, 친화성 컬럼, 컬럼 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 정제, 겔 전기영동 등을 포함하는 당업계에 공지된 표준 절차에 따라 정제될 수 있다. 대상 CNTFR 리간드 결합제는 실질적으로 순수할 수 있으며, 예를 들어 적어도 약 80% 내지 85% 순도, 적어도 약 85% 내지 90% 순도, 적어도 약 90% 내지 95% 순도, 또는 98% 내지 99% 또는 그 이상의 순도를 가질 수 있고, 예를 들어 CNTFR 리간드 결합제 이외의 세포 파편, 거대분자 등과 같은 오염물이 없을 수 있다.

[0063] 융합 단백질 및 컨쥬게이트(conjugate)

[0064] 특정 양태에서, 이종(heterologous) 모이어티와 안정적으로 회합된(예를 들어, 융합된, 컨쥬게이션된 또는 다르게는 이에 부착된) CNTFR 리간드-결합제(예를 들어, 본원에 기재된 가용성 CNTFR 폴리펩티드 또는 항체 중 임의

의 것)가 제공된다.

[0065] 일부 구현예에서, 폴리펩티드 CNTFR 리간드-결합제(예를 들어, 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드 또는 항체 중 임의의 것)가 이종 폴리펩티드에 융합된 융합 단백질이 제공된다. 관심있는 이종 폴리펩티드에는, 비제한적으로, Fc 도메인(예를 들어, 인간 또는 마우스 Fc 도메인), 알부민, 트랜스페린, XTEN, 동종-아미노산 중합체, 프롤린-알라닌-세린 중합체, 엘라스틴-유사 펩티드 또는 이들의 임의의 조합이 포함된다. 특정 양태에서, 이종 폴리펩티드는 이를 필요로 하는 개체에게 투여한 때의 CNTFR 리간드-결합제의 안정성 및/또는 혈청 반감기를, 이종 폴리펩티드에 융합되지 않은 동일한 CNTFR 리간드-결합제에 비해서, 증가시킨다. 특정 양태에서, 인간 Fc 도메인(예를 들어, 전장 인간 Fc 도메인 또는 이의 단편)에 융합된 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드 중 임의의 것을 포함하는 융합 단백질이 제공된다. 특정 구현예에 있어서, 이러한 융합 단백질은, 예를 들어 본 개시의 방법에 따라 이를 필요로 하는 개체(예를 들어, CNTFR 신호전달과 관련된 세포 증식성 장애를 갖는 개체)에게 투여하는 것에서의 사용이 확인된다. 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드 중 임의의 것에 융합될 수 있는 인간 Fc 도메인의 비제한적인 예는, 하기 표 3에 기재된 서열(서열번호 3)을 갖는 인간 IgG1 Fc 도메인, 또는 이의 단편이다.

*표 3*

표 3: 예시적인 인간 Fc 도메인의 아미노산 서열

[0066]

| | 아미노산 서열 |
|---|---|
| 예시적인 인간 Fc 도메인 (서열번호 3) | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK |

[0067] 특정 구현예에 있어서, 본 개시의 CNTFR 리간드-결합제가 모이어티에 컨쥬게이션되어 있는 컨쥬게이트가 제공된다. 관심있는 모이어티에는, 비제한적으로, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 항암 약물, 검출 가능한 표지 및 이들의 조합이 포함된다.

[0068] 관심있는 항암 약물에는 세포 증식을 저해하고/하거나 암 세포를 죽이는 작용제가 포함된다. 이러한 작용제는 다양할 수 있으며, 세포 증식 억제제(cytostatic agent) 및 세포 독성제(예를 들어, 표적 세포로 내재화되는지 여부에 관계없이 표적 세포 조직을 죽일 수 있는 작용제)를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 치료제는 엔디인(enediyne), 렉시트롭신(lexitropsin), 듀오카마이신(duocarmycin), 탁산(taxane), 푸로마이신(puromycin), 돌라스타틴(dolastatin), 메이탄시노이드(maytansinoid) 및 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid)로부터 선택되는 세포 독성제이다. 일부 구현예에서, 세포 독성제는 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), CC-1065, CPT-11(SN-38), 토포테칸(topotecan), 독소루비신(doxorubicin), 모르폴리노-독소루비신, 리족신(rhizoxin), 시아노모르폴리노-독소루비신, 돌라스타틴(dolastatin)-10, 에키노마이신(echinomycin), 콤브레타스타틴(combretastatin), 칼리케아마이신(calicheamicin), 메이탄신(maytansine), 메이탄신 DM1, 메이탄신 DM4, DM-1, 아우리스타틴(auristatin) 또는 다른 돌라스타틴 유도체, 예컨대 아우리스타틴 E 또는 아우리스타틴 F, AEB(AEB-071), AEVB(5-벤조일발레르산-AE 에스테르), AEFP(항체-엔도스타틴 융합 단백질), MMAE(모노메틸아우리스타틴 E), MMAF(모노메틸아우리스타틴 F), 피롤로벤조디아제핀(PBD), 엘레우테로빈(eleutherobin), 네트롭신(netropsin) 또는 이들의 임의의 조합이다. 특정 구현예에 있어서, 작용제는 헤미아스텔린(hemiasterlin) 및 헤미아스텔린 유사체, 예컨대 HTI-286(예를 들어, 미국 특허 제7,579,323호; 국제 공개 WO 2004/026293호; 및 미국 특허 제8,129,407호 참조, 이들 문헌의 전체 개시는 본원에 참조로서 인용됨), 아브린(abrin), 브루신(brucine), 시쿠톡신(cicutoxin), 디프테리아 독소, 바트라코톡신(batrachotoxin), 보툴리즘 독소, 시가 독소, 내독소, 슈도모나스 외독소, 슈도모나스 내독소, 테타누스(tetanus) 독소, 페르투시스(pertussis) 독소, 안트락스(anthrax) 독소, 콜레라 독소, 팔카리놀(falcarinol), 푸모니신(fumonisin) B1, 푸모니신 B2, 아플라(afla) 독소, 마우로톡신(maurotoxin), 아기톡신(agitoxin), 샤립도톡신(charybdotoxin), 마르가톡신(margatoxin), 슬로톡신(slotoxin), 실라톡신(scyllatoxin), 헤푸톡신(hefutoxin), 칼시셉틴(calciseptine), 타이카톡신(taicatoxin), 칼시클루딘(calcicludine), 겔다나마이신(geldanamycin), 겔로닌(gelonin), 로타우스트랄린(lotaustralin), 오크라톡신(ocratoxin) A, 파툴린(patulin), 리신(ricin), 스트리크닌(strychnine), 트리코테

센(trichothecene), 제알레논(zearlenone) 및 테트라도톡신(tetradotoxin)으로부터 선택되는 단백질 독소이다. 이용될 수 있는 효소적으로 활성인 독소 및 이의 단편에는, 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비(非)결합 활성 단편, 외독소 A 사슬(슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa) 유래), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신(modeccin) A 사슬, 알파-사르신(alpha-sarcin), 알레우리테스 포르디이(Aleurites fordii) 단백질, 디안틴(dianthin) 단백질, 피토라카 아메리카나(Phytolaca Americana) 단백질(PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(Momordica charantia) 저해제, 쿠르신(curcin), 크로틴(crotin), 사파오나리아 오피시날리스(Sapaonaria officinalis) 저해제, 겔로닌, 미토겔린(mitogellin), 레스트릭토신(restrictocin), 페노마이신(phenomycin), 에노마이신(neomycin) 및 트리코테센이 포함된다.

[0069] 검출 가능한 표지는 관심있는 적용(예를 들어, 시험관내 및/또는 생체내 연구 및/또는 임상 적용)에서 검출될 수 있는 표지를 포함한다. 관심있는 검출 가능한 표지에는, 방사성동위원소, 검출 가능한 생성물(예를 들어, 홀스래디쉬 퍼옥시다아제, 알칼리성 포스파타아제 등)을 생성하는 효소, 형광 단백질, 상자성 원소 등이 포함된다. 특정 양태에서, CNTFR 리간드-결합제는 검출 가능한 표지의 특정 결합 파트너에 컨쥬게이션된다(예를 들어, 검출이 아비딘/스트렙타비딘을 포함하는 검출 가능한 표지를 통해 이루어질 수 있도록 비오틴에 컨쥬게이션됨).

[0070] 특정 구현예에 있어서, 작용제는 생체내 이미징(imaging), 예컨대 근적외선(NIR) 광학 이미징, 단일-광자 방출 컴퓨터 단층 촬영술(SPECT)/CT 이미징, 양전자 방출 단층 촬영술(PET), 핵 자기 공명(NMR) 분광법 등에서 사용이 확인되는 표지제이다. 이러한 적용에서 사용이 확인되는 표지제에는, 비제한적으로, 형광 표지, 방사성동위원소 등이 포함된다. 특정 양태에서, 표지제는 2가지 이상의 이미징 접근법을 사용하여 생체내 이미징을 가능하게 하는 다중 모드 생체내 이미징제이다(예를 들어, 문헌[Thorp-Greenwood and Coogan(2011) *Dalton Trans.* 40:6129-6143] 참조).

[0071] 특정 양태에서, 표지제는, 작용제가 Kodak X-SIGHT 염료, Pz 247, DyLight 750 및 800 Fluor, Cy 5.5 및 7 Fluor, Alexa Fluor 680 및 750 Dye, IRDye 680 및 800CW Fluor로부터 선택되는, 근적외선(NIR) 이미징 적용에서 사용이 확인되는 생체내 이미징제이다. 특정 구현예에 있어서, 표지제는, 작용제가 $^{99m}$Tc, $^{111}$In, $^{123}$In, $^{201}$Tl 및 $^{133}$Xe로부터 선택되는, SPECT 이미징 적용에서 사용이 확인되는 생체내 이미징제이다. 특정 양태에서, 표지제는, 작용제가 $^{11}$C, $^{13}$N, $^{15}$O, $^{18}$F, $^{64}$Cu, $^{62}$Cu, $^{124}$I, $^{76}$Br, $^{82}$Rb 및 $^{68}$Ga로부터 선택되는, 양전자 방출 단층 촬영술(PET) 이미징 적용에서 사용이 확인되는 생체내 이미징제이다.

[0072] 본 개시의 컨쥬게이트에서 사용이 확인되는 링커에는, 에스테르 링커, 아미드 링커, 말레이미드 또는 말레이미드계 링커; 발린-시트룰린 링커; 히드라존 링커; N-숙신이미딜-4-(2-피리딜디티오)부티레이트(SPDB) 링커; 숙신이미딜-4-(*N*-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC) 링커; 비닐술폰계 링커; 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 예컨대 비제한적으로, 테트라에틸렌 글리콜을 포함하는 링커; 프로판산을 포함하는 링커; 카프롤레산을 포함하는 링커 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 링커가 포함된다.

[0073] 링커를 통해 관심있는 모이어티에 CNTFR 리간드-결합제를 연결하는 데 이용 가능한 다수의 전략이 존재한다. 예를 들어, 관심있는 모이어티는 링커를 약물에 공유결합적으로 부착시킴에 의해 유도체화될 수 있으며, 여기서 링커는 CNTFR 리간드-결합제 상의 "화학 손잡이(chemical handle)"와 반응할 수 있는 관능기를 갖는다. 링커 상의 관능기는 다양할 수 있으며, CNTFR 리간드-결합제 상의 화학 손잡이와의 상용성에 기초하여 선택될 수 있다. 하나의 구현예에 있어서, CNTFR 리간드-결합제 상의 화학 손잡이는 CNTFR 리간드-결합제 내로의 화학 손잡이를 갖는 비(非)천연 아미노산의 혼입에 의해 제공된다. 이러한 비천연 아미노산은, 예를 들어 화학적 합성 또는 재조합 접근법을 통해(예를 들어, 숙주 세포에서의 번역 동안 비천연 아미노산의 혼입에 적합한 직교 아미노 아실 tRNA 합성효소-tRNA 쌍을 사용하여) CNTFR 리간드-결합제 내로 혼입될 수 있다.

[0074] CNTFR 리간드-결합제에 존재하는 비천연 아미노산의 관능기는 아지드, 알킨, 알켄, 아미노-옥시, 히드라진, 알데히드, 니트론, 니트릴 옥시드, 시클로프로펜, 노르보르넨, 이소-시아니드, 아릴 할라이드, 보론산 또는 다른 적합한 관능기일 수 있으며, 링커 상의 관능기는 비천연 아미노산의 관능기와 반응하도록 선택된다(또는 그 반대로).

[0075] 조성물

[0076] 또한, 본 개시의 CNTFR 리간드-결합제를 포함하는 조성물이 제공된다. 조성물은 본원에 기재된 가용성 CNTFR 폴리펩티드 및 항체 중 임의의 것을 포함하여, 본원에 기재된 CNTFR 리간드-결합제 중 임의의 것을 포함할 수 있

다.

[0077] 특정 양태에서, 조성물은 액체 매질 중에 존재하는 본 개시의 CNTFR 리간드-결합제를 포함한다. 액체 매질은 수성 액체 매질, 예컨대 물, 완충된 용액 등일 수 있다. 염(예를 들어, NaCl, $MgCl_2$, KCl, $MgSO_4$), 완충제(Tris 완충제, N-(2-히드록실에틸)피페라진-N'-(2-에탄술폰산)(HEPES), 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산(MES), 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 나트륨 염(MES), 3-(N-모르폴리노)프로판술폰산(MOPS), N-트리스[히드록시메틸]메틸-3-아미노프로판술폰산(TAPS) 등), 프로테아제 저해제, 글리세롤 등과 같은 하나 이상의 첨가제가 이러한 조성물에 존재할 수 있다.

[0078] 약학적 조성물이 또한 제공된다. 약학적 조성물은 본 개시의 CNTFR 리간드-결합제 중 임의의 것(예를 들어, 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드 및 항체 중 임의의 것), 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 약학적 조성물은 일반적으로 CNTFR 리간드-결합제의 치료적 유효량을 포함한다. "치료적 유효량"은, 목적하는 결과를 생성하는 데 충분한 투여량, 예를 들어 CNTFR 신호전달과 관련된 세포 증식성 장애를 갖는 개체에서 유익한 또는 목적하는 치료적(예방적 포함) 결과, 예컨대 세포 증식의 감소를 이끌어내는 데 충분한 양을 의미한다.

[0079] 본 개시의 CNTFR 리간드-결합제는 치료적 투여를 위한 다양한 제형에 혼입될 수 있다. 더욱 특히, CNTFR 리간드-결합제는 적절한 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 희석제와의 조합에 의해 약학적 조성물로 제형화될 수 있으며, 고체, 반고체, 액체 또는 가스 형태, 예컨대 정제, 캡슐, 분말, 과립, 연고, 용액, 주사, 흡입제 및 에어로졸의 제제로 제형화될 수 있다.

[0080] 개체에의 투여에 적합한(예를 들어, 인간 투여에 적합한) 본 개시의 CNTFR 리간드-결합제의 제형은, 일반적으로 멸균된 것이며, 나아가 선택된 투여 경로에 따라 개체에의 투여에 금지된 검출 가능한 발열원 또는 다른 오염물을 함유하지 않을 수 있다.

[0081] 약학적 투여량 형태에서, CNTFR 리간드-결합제는 단독으로 또는 적절한 연합으로뿐만 아니라, 다른 약학적으로 활성인 화합물과 조합으로 투여될 수 있다. 하기 방법 및 부형제는 단지 예시이며, 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0082] 경구 제제의 경우, CNTFR 리간드-결합제는 단독으로, 또는 정제, 분말, 과립 또는 캡슐을 제조하는 데 적절한 첨가제, 예를 들어 통상적인 첨가제, 예컨대 락토오스, 만니톨, 옥수수 전분 또는 감자 전분; 결합제, 예컨대 결정질 셀룰로오스, 셀룰로오스 유도체, 아카시아, 옥수수 전분 또는 젤라틴; 붕해제, 예컨대 옥수수 전분, 감자 전분 또는 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스; 윤활제, 예컨대 탈크 또는 마그네슘 스테아레이트; 및 목적하는 경우, 희석제, 완충제, 습윤제, 보존제 및 향미제와 조합으로 사용될 수 있다.

[0083] CNTFR 리간드-결합제는, 목적하는 경우, 통상적인 첨가제, 예컨대 가용화제, 등장화제, 현탁제, 유화제, 안정화제 및 보존제와 함께, 수성 또는 비수성 용매, 예컨대 식물성 또는 다른 유사한 오일, 합성 지방족 산 글리세리드, 고급 지방족 산의 에스테르 또는 프로필렌 글리콜 중에 이를 용해, 현탁 또는 유화시킴으로써 주사용 제제로 제형화될 수 있다.

[0084] 약학적 조성물은 액체 형태, 동결건조된 형태, 또는 동결건조된 형태로부터 재구성된 액체 형태일 수 있으며, 여기서 동결건조된 제제는 투여 전 멸균 용액으로 재구성되어야 한다. 동결건조된 조성물을 재구성하기 위한 표준 절차는 일정 부피의 순수한 물(전형적으로 동결건조 동안 제거된 부피와 동일한 부피로)을 첨가하는 것이지만; 항균제를 포함하는 용액이 비경구 투여용 약학적 조성물의 제조를 위해 사용될 수 있다.

[0085] CNTFR 리간드-결합제의 수성 제형은 pH-완충된 용액 중에, 예를 들어 약 4.0 내지 약 7.0, 또는 약 5.0 내지 약 6.0 범위, 또는 대안적으로 약 5.5의 pH로 제조될 수 있다. 이러한 범위 내 pH에 적합한 완충제의 예에는, 포스페이트-완충제, 히스티딘-완충제, 시트레이트-완충제, 숙시네이트-완충제, 아세테이트-완충제 및 다른 유기산 완충제가 포함된다. 완충제 농도는, 예를 들어 완충제 및 제형의 목적하는 긴장도(tonicity)에 따라, 약 1 mM 내지 약 100 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 50 mM일 수 있다.

[0086] 사용 방법

[0087] 또한, 본 개시의 CNTFR 리간드-결합제 및 조성물의 사용 방법이 제공된다. 특정 구현예에 있어서, 본 개시의 CNTFR 리간드-결합제 또는 약학적 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함하는 방법으로서, 리간드에 대한 작용제의 결합이 CNTFR에 대한 리간드의 결합을 저해하는 방법이 제공된다. 특정 양태에서, 이를 필요로 하는 개체는 CNTFR 신호전달과 관련된 세포 증식성 장애를 갖고, 투여는 세포 증식성 장애를 치료하는 데 효과적이다. 특정 양태에서, 세포 증식성 장애는 암이다.

[0088] 예를 들어, 일부 구현예에서, 본 개시의 CNTFR 리간드-결합제 또는 약학적 조성물은, CNTFR 리간드-결합제 또는 약학적 조성물이 유효량으로 투여되는 경우, 숙주에서 암 세포(들)의 성장, 전이 및/또는 침습을 저해한다. "암 세포"는, 예를 들어 비정상 세포 성장, 비정상 세포 증식, 밀도 의존적 성장 저해의 손실, 고정-의존적 성장 잠재력, 면역이 약화된 비-인간 동물 모델에서 종양 성장 및/또는 발전을 촉진시키는 능력 및/또는 세포 형질전환의 임의의 적절한 지표 중 하나 이상에 의해 특징지어질 수 있는, 신생물성 세포 표현형을 나타내는 세포를 의미한다. "암 세포"는 "종양 세포", "악성 세포" 또는 "암성 세포"와 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있으며, 고형 종양, 반고형 종양, 원발성 종양, 전이성 종양 등의 암 세포를 포함한다.

[0089] 본 개시의 방법을 사용하여 치료될 수 있는 암에는, 비제한적으로, 고형 종양, 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암(NSCLC)), 유방암, 전립선암, 췌장암, 결장직장암, 신장 세포 암종, 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 비(非)호지킨 림프종, 역형성 대세포 림프종, 급성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, 및 본 개시의 CNTFR 리간드-결합제 또는 약학적 조성물을 사용하여 치료될 수 있는 임의의 다른 유형의 암이 포함된다.

[0090] CNTFR 리간드-결합제는 단독으로(예를 들어, 단일 요법으로) 또는 하나 이상의 부가적인 치료제와 조합으로(예를 들어, 병용 요법으로) 투여될 수 있다.

[0091] 일부 구현예에서, CNTFR 리간드-결합제(또는 이를 포함하는 약학적 조성물)의 유효량은, 단독으로(예를 들어, 단일 요법으로) 또는 하나 이상의 부가적인 치료제와 조합으로(예를 들어, 병용 요법으로), 하나 이상의 용량으로 투여되는 경우, 개체에서 세포 증식성 장애(예를 들어, 암)의 증상을, CNTFR 리간드-결합제 또는 약학적 조성물로 치료받지 않은 개체에서의 증상과 비교하여, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90% 또는 그 이상 감소시키는 데 효과적인 양이다.

[0092] 특정 양태에서, 본 개시의 방법은, CNTFR 리간드-결합제 또는 약학적 조성물이 유효량으로 투여되는 경우, 개체에서 암 세포의 성장, 전이 및/또는 침습을 저해한다.

[0093] CNTFR 리간드-결합제 또는 약학적 조성물은 생체내 및 생체외 방법뿐만 아니라, 전신 및 국소 투여 경로를 포함하는, 약물 전달에 적합한 임의의 이용 가능한 방법 및 경로를 사용하여 개체에게 투여될 수 있다. 전형적인 및 약학적으로 허용 가능한 투여 경로에는, 비강내, 근육내, 기관내, 피하, 피내, 국소 적용, 안구, 정맥내, 동맥내, 비강, 경구, 및 다른 장내 및 비경구 투여 경로가 포함된다. 투여 경로는, 목적하는 경우, CNTFR 리간드-결합제 및/또는 목적하는 효과에 따라 조합 또는 조정될 수 있다. CNTFR 리간드-결합제 또는 약학적 조성물은 단일 용량 또는 다중 용량으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, CNTFR 리간드-결합제 또는 약학적 조성물은 정맥내로 투여된다. 일부 구현예에서, CNTFR 리간드-결합제 또는 약학적 조성물은, 예를 들어 전신 전달(예를 들어, 정맥내 주입)을 위한 또는 국소 부위에의 주사에 의해 투여된다.

[0094] 다양한 개체가 대상 방법에 따라 치료 가능하다. 일반적으로, 이러한 대상은 "포유동물" 또는 "포유류"이며, 여기서 이러한 용어는 육식동물(예를 들어, 개 및 고양이), 설치류(예를 들어, 마우스, 기니어 피그 및 래트) 및 영장류(예를 들어, 인간, 침팬지 및 원숭이) 계급을 포함하는, 포유류 계열 내에 있는 유기체를 기재하는 데 광범위하게 사용된다. 일부 구현예에서, 개체는 인간일 수 있다.

[0095] "치료하는" 또는 "치료"는, 개체의 세포 증식성 장애(예를 들어, 암)와 관련된 증상에 있어서의 적어도 개선을 의미하며, 여기서 개선은 넓은 의미에서 치료하고자 하는 세포 증식성 장애와 관련된 파라미터, 예를 들어 증상의 크기를 적어도 감소시키는 것을 나타낸다. 이와 같이, 치료는 또한 개체가 더이상 세포 증식성 장애, 또는 적어도 세포 증식성 장애를 특징으로 하는 증상으로 고통받지 않도록, 세포 증식성 장애, 또는 적어도 이와 관련된 증상이, 완전히 억제되는, 예를 들어 발생이 예방되는, 또는 중단되는, 예를 들어 종결되는 상황을 포함한다.

[0096] 투약은 치료하고자 하는 질환 상태의 중증도 및 반응성에 따라 달라진다. 최적의 투약 일정은 환자의 신체 내 약물 축적의 측정치로부터 계산될 수 있다. 투여하는 의사는 최적의 투여량, 투약 방법 및 반복률을 결정할 수 있다. 최적의 투여량은 개별적인 CNTFR 리간드-결합제의 상대적 역가에 따라 달라질 수 있으며, 이는 일반적으로 시험관내 및 생체내 동물 모델 등에서 효과적인 것으로 확인된 $EC_{50}$에 기초하여 추정될 수 있다. 일반적으로, 투여량은 체중 1kg 당 0.01㎍ 내지 100g이며, 매일, 매주, 매달 또는 매년 1회 이상으로 제공될 수 있다. 치료하는 의사는 체액 또는 조직 내에서 측정된 약물의 농도 및 체류 시간에 기초하여 투약의 반복률을 추정할 수 있다. 성공적인 치료 후, 대상은 질환 상태의 재발을 방지하기 위해, CNTFR 리간드-결합제 또는 약학적 조성물이 체중 1kg 당 0.01㎍ 내지 100g 범위의 유지 용량으로, 매일 1회 이상에서, 수 개월에 1회, 6개월에 1회, 매

년 1회, 또는 임의의 다른 적합한 빈도로 투여되는, 유지 요법을 받는 것이 바람직할 수 있다.

[0097] 본 개시의 치료 방법은 단일 유형의 CNTFR 리간드-결합제를 대상에게 투여하는 것을 포함할 수 있거나, 또는 CNTFR 리간드-결합제가, 예를 들어 별개의 CNTFR 리간드에 결합하도록 조작된 상이한 CNTFR 리간드-결합제 칵테일의 투여에 의해, 2가지 이상의 유형의 CNTFR 리간드-결합제를 대상에게 투여하는 것을 포함할 수 있다.

[0098] 일부 구현예에서, 상기 방법은, CNTFR 리간드-결합제 또는 약학적 조성물을 투여하기 전, CNTFR 신호전달과 관련된 세포 증식성 장애를 갖는 개체를 동정하는 단계를 포함한다. CNTFR 신호전달과 관련된 세포 증식성 장애를 갖는 개체를 동정하는 것은, 다양한 접근법 및 이들의 조합을 사용하여 수행될 수 있다. 특정 양태에서, 동정은 개체로부터 수득된 샘플에서의 CNTFR 리간드 존재비(abundance)에 기초한다. CNTFR 리간드는 CNTF, CLCF1, NP 등, 및 이들의 임의의 조합 중 하나 이상일 수 있다. 특정 양태에서, 샘플은 암-관련 섬유아세포(CAF, 예컨대 정상 폐 섬유아세포(NLF))를 포함하며, CNTFR 신호전달과 관련된 세포 증식성 장애를 갖는 개체를 동정하는 것은, CAF에서의 CLCF1 발현 수준에 기초한다. 일부 구현예에서, CNTFR 리간드 존재비는 CNTFR 리간드 포획제로서 가용성 CNTFR 폴리펩티드, 예를 들어 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드 중 임의의 것을 사용하여 정량화된다. 예를 들어, CNTFR 리간드 포획제로서 사용되는 가용성 CNTFR 폴리펩티드는, 본원에 기재된 가용성 CNTFR 폴리펩티드 중 임의의 것일 수 있다.

[0099] 특정 구현예에 있어서, 동정은 개체로부터 수득된 샘플에서의 CNTFR 존재비 및/또는 CNTFR-gp130-LIFR 3자 수용체 복합체의 존재비에 기초한다. 특정 양태에서, 동정은 개체로부터 수득된 샘플에서의 CNTFR 신호전달 수준에 기초한다. CNTFR 신호전달 수준은 하나 이상의 CNTFR 신호전달 경로 분자의 인산화 상태에 기초할 수 있다. 예를 들어, 본 발명자들은, CLCF1에의 CNTFR의 결합이 Jak-STAT 및 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 경로의 활성화를 유도한다고 결정하였다. 이와 같이, Jak, STAT, Ras, Raf, MEK, ERK 또는 이들의 임의의 조합 중 임의의 것의, 존재비, 활성, 인산화 상태 등을 평가하여, 개체에서의 비정상 CNTFR 신호전달을 결정할 수 있다.

[0100] 동정은 임의의 적합한 접근법을 사용하여 정량화된, 리간드, CNTFR 분자, CNTFR-gp130-LIFR 3자 수용체 복합체 등에 기초할 수 있다. 특정 구현예에 있어서, 동정은 면역검정법에 기초한다. ELISA, 유세포 분석 검정법, 조직 절편 샘플 상에서의 면역조직화학법, 조직 절편 샘플 상에서의 면역형광법, 웨스턴(Western) 분석 등을 포함하는, 다양한 적합한 면역검정법 포맷이 이용 가능하다.

[0101] 일부 구현예에서, 동정은 핵산 시퀀싱에 기초한다. 예를 들어, 관심있는 단백질을 인코딩하는 mRNA에 상응하는 시퀀싱 판독의 수를 사용하여, 단백질의 발현 수준을 결정할 수 있다. 특정 양태에서, 시퀀싱은 차세대 시퀀싱 시스템, 예컨대 Illumina®(예를 들어, HiSeq™, MiSeq™ 및/또는 Genome Analyzer™ 시퀀싱 시스템); Ion Torrent™(예를 들어, Ion PGM™ 및/또는 Ion Proton™ 시퀀싱 시스템); Pacific Biosciences(예를 들어, PACBIO RS II 시퀀싱 시스템); Life Technologies™(예를 들어, SOLiD 시퀀싱 시스템); Roche(예를 들어, 454 GS FLX+ 및/또는 GS Junior 시퀀싱 시스템)에 의해 제공되는 시퀀싱 플랫폼; 또는 관심있는 임의의 다른 시퀀싱 플랫폼을 사용하여 수행된다. 조직 또는 유체 샘플로부터 핵산을 단리하는 프로토콜뿐만 아니라, 목적하는 시퀀싱 플랫폼에 적절한 시퀀싱 어댑터를 갖는 시퀀싱 라이브러리를 제조하기 위한 프로토콜이 용이하게 이용 가능하다.

[0102] 일부 구현예에서, CNTFR 신호전달과 관련된 세포 증식성 장애를 갖는 개체를 동정하는 단계를 포함하는 방법은, 개체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0103] 또한, CNTFR 신호전달과 관련된 세포 증식성 장애를 갖는 개체를 동정하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. CNTFR 신호전달과 관련된 세포 증식성 장애를 갖는 개체를 동정하는 것은, 다양한 접근법 및 이들의 조합을 사용하여 수행될 수 있다. 특정 양태에서, 동정은 개체로부터 수득된 샘플에서의 CNTFR 리간드 존재비에 기초한다. CNTFR 리간드는 CNTF, CLCF1, NP 등, 및 이들의 임의의 조합 중 하나 이상일 수 있다. 특정 양태에서, 샘플은 암-관련 섬유아세포(CAF, 예컨대 정상 폐 섬유아세포(NLF))를 포함하며, CNTFR 신호전달과 관련된 세포 증식성 장애를 갖는 개체를 동정하는 것은, CAF에서의 CLCF1 발현 수준에 기초한다. 일부 구현예에서, CNTFR 리간드 존재비는 CNTFR 리간드 포획제로서 가용성 CNTFR 폴리펩티드, 예를 들어 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드 중 임의의 것을 사용하여 정량화된다. 예를 들어, CNTFR 리간드 포획제로서 사용되는 가용성 CNTFR 폴리펩티드는, 본원에 기재된 가용성 CNTFR 폴리펩티드 중 임의의 것일 수 있다. 특정 구현예에 있어서, 동정은 개체로부터 수득된 샘플에서의 CNTFR 존재비 및/또는 CNTFR-gp130-LIFR 3자 수용체 복합체의 존재비에 기초한다. 특정 양태에서, 동정은 개체로부터 수득된 샘플에서의 CNTFR 신호전달 수준에 기초한다. CNTFR 신호전달 수준은 하나 이상의 CNTFR 신호전달 경로 분자의 인산화 상태에 기초에 기초예를 들어, 본 발명자들은, CLCF1에의 CNTFR의 결합이 Jak-STAT 및 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달 경로의 활성화를 유도한다고 결정하

였다. 이와 같이, Jak, STAT, Ras, Raf, MEK, ERK 또는 이들의 임의의 조합 중 임의의 것의, 존재비, 활성, 인산화 상태 등을 평가하여, 개체에서의 비정상 CNTFR 신호전달을 결정할 수 있다. 동정은 임의의 적합한 접근법, 예컨대 면역검정법, 핵산 시퀀싱 등을 사용하여 정량화된, 리간드, CNTFR 분자, CNTFR-gp130-LIFR 3자 수용체 복합체 등에 기초할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 개체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0104] 개체로부터 수득된 샘플은, 개체가 CNTFR 신호전달과 관련된 세포 증식성 장애를 갖는지를 결정하는 데 적합한 임의의 샘플일 수 있다. 특정 양태에서, 샘플은 유체 샘플, 예컨대 전혈, 혈청, 혈장 등이다. 일부 구현예에서, 샘플은 조직 샘플이다. 관심있는 조직 샘플에는, 비제한적으로, 종양 생검 샘플 등이 포함된다.

[0105] 키트

[0106] 또한, 키트가 본 개시에 의해 제공된다. 특정 구현예에 있어서, 키트는 본원에 기재된 CNTFR 리간드-결합제 중 임의의 것 또는 본원에 기재된 약학적 조성물 중 임의의 것의 치료적 유효량, 및 CNTFR 리간드-결합제 또는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체(예를 들어, CNTFR 신호전달과 관련된 세포 증식성 장애를 갖는 것으로 동정된 개체)에게 투여하기 위한 지침서를 포함한다. 특정 양태에서, 키트는 컨테이너에 존재하는 본 개시의 CNTFR 리간드-결합제 또는 약학적 조성물을 포함한다. 컨테이너는 튜브, 바이알 등일 수 있다. 특정 구현예에 있어서, 키트는 하나 이상의 단위 투여량, 예컨대 1개, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 등의 단위 투여량에 존재하는 CNTFR 리간드-결합제 또는 약학적 조성물을 포함한다.

[0107] 키트의 구성요소들이 별도의 컨테이너에 존재할 수 있거나, 또는 다수의 구성요소들이 하나의 컨테이너에 존재할 수 있다.

[0108] CNTFR 리간드-결합제 또는 약학적 조성물을 개체에게 투여하기 위한 지침서가 적합한 기록 매체 상에 기록되어 있을 수 있다. 예를 들어, 지침서는 종이 또는 플라스틱 등과 같은 기재(substrate) 상에 인쇄되어 있을 수 있다. 이와 같이, 지침서는 키트에 패키지 삽입물로서 존재할 수 있거나, 또는 키트 또는 이의 구성요소의 컨테이너의 표지(즉, 포장 또는 속포장과 결합되어) 등에 존재할 수 있다. 다른 구현예에서, 지침서는 적합한 컴퓨터 판독 가능한 저장 매체, 예를 들어 휴대용 플래시 드라이브, DVD, CD-ROM, 디스켓 등에 존재하는 전자 저장 데이터 파일로서 존재한다. 또 다른 구현예에서, 실제 지침서는 키트에 존재하지 않지만, 원격 소스로부터 예를 들어 인터넷을 통해 지침서를 얻는 수단이 제공된다. 이러한 구현예의 한 예는, 지침서를 볼 수 있고/있거나 지침서를 다운로드할 수 있는 웹 주소가 포함된 키트이다. 지침서와 마찬가지로, 지침서를 얻기 위한 수단도 적합한 기재 상에 기록되어 있다.

[0109] 일부 구현예에서, CNTFR 리간드 포획제, 및 생물학적 샘플에 존재하는 CNTFR 리간드 존재비를 정량화하기 위해 상기 포획제를 사용하기 위한 지침서를 포함하는 키트가 제공된다. CNTFR 리간드는 CNTF, CLCF1, NP 등, 및 이들의 임의의 조합 중 하나 이상일 수 있다. 일부 구현예에서, CNTFR 리간드 존재비는 CNTFR 리간드 포획제로서 가용성 CNTFR 폴리펩티드, 예를 들어 본 개시의 가용성 CNTFR 폴리펩티드 중 임의의 것을 사용하여 정량화된다. 예를 들어, CNTFR 리간드 포획제로서 사용되는 가용성 CNTFR 폴리펩티드는, 본원에 기재된 가용성 CNTFR 폴리펩티드 중 임의의 것일 수 있다.

[0110] 하기 실시예들은 제한의 의미가 아니라 예시로서 제공된다.

[0111] 시험적 실시예

[0112] 서문

[0113] 상피 세포와 그 아래에 있는 간질 사이의 커뮤니케이션(communication)은 중요하지만, 유기체 생물학의 측면에서 이해가 부족하다. 비정상적으로 조절되는 경우, 이러한 상호작용은 종양을 형성하는 것으로 입증될 수 있다. 암-관련 섬유아세포(CAF)가 종양의 성장을 촉진시키고 유지시키는 것으로 공지되어 있지만, 근본적인 메커니즘은 완전히 이해되지 않은 채로 남아있다. 본 발명자들은, CAF가 종양 세포 상에 섬모 신경영양 인자 수용체(CNTFR)를 결합하고 신생물성 성장을 촉진시키는 사이토카인인, 카디오트로핀-유사 사이토카인 인자 1(CLCF1)을 분비한다는, 신규한 커뮤니케이션의 메커니즘을 확인하였다.

[0114] 가용성 CNTFR 폴리펩티드가 CNTFR 신호전달을 감소시키는 치료제로서 이용될 수 있으며, 야생형 CNTFR과 비교하여 CLCF1에 대하여 보다 큰 결합 친화성을 갖는 가용성 CNTFR 폴리펩티드가 바람직할 수 있다는 가설이 세워졌다. CLCF1에 대하여 보다 큰 결합 친화성을 갖는 가용성 CNTFR 폴리펩티드를 조작하기 위해, 실수 유발 PCR을 통해 CNTFR에 돌연변이를 무작위로 도입하였다. 생성된 라이브러리는 효모 세포 표면 상에 융합 단백질로서 디

스플레이되었으며(도 4의 패널 A(도 4a)에 도식적으로 예시됨), 여기서 서브세트는 CLCF1에 대한 결합을 유지하였다.

[0115] 실시예 1 - 기능성 CLCF1의 재조합 발현

[0116] CLCF1을 박테리아 발현 플라스미드 pET28b에 클로닝하고, Rosetta-gami 2(DE)3 세포로 형질전환시켰다. 발현 시, 재조합 CLCF1은 5 mM DTT를 함유하는, 60% ddH2O, 40% 아세토니트릴, 0.1% TFA 중에 용해된 봉입체에 축적되었다. 역상 고성능 액체 크로마토그래피를 사용하여 CLCF1을 정제하였다. CLCF1을 이용한 인간 비소세포 폐암 세포주 A549의 처리는 수 분 내에 Tyr705에서 STAT3의 인산화를 유도하였다(도 2의 패널 A(도 2a)). STAT3의 활성화를 또한 2가지 다른 세포주 H23 및 H358에서 검출하였다(도 2의 패널 B(도 2b)). 이러한 결과는, CLCF1이 STAT3에서 Tyr705의 인산화를 증가시킨다는 것을 보여준다.

[0117] 실시예 2 - 재조합 CLCF1은 세포 생존을 증가시킴

[0118] 사이토카인 매개 STAT3 활성화는 아폽토시스(apoptosis)로부터 세포를 보호하는 것으로 나타났다. CLCF1이 또한 세포 생존을 증가시킬 수 있는지를 시험하기 위해, A549 세포를 24 시간의 혈청 기아 후 CLCF1로 처리하였다. 72시간의 인큐베이션 후, CLCF1은 세포 생존을 농도 의존적으로 증가시키는 것으로 나타났다(도 3의 패널 A(도 3a)). H23 세포에 대하여 시험한 경우, 마찬가지로 높은 CLCF1 농도는 증가된 생존을 유도하였다(도 3의 패널 B(도 3b)). CLCF1 처리의 이러한 효과는, 혈청이 검정법에 포함되었던 경우에는 나타나지 않았으며, 이는 이러한 효과가 혈청 기아와 같은 스트레스 요인이 유도된 조건에서 보다 명백하다는 것을 시사한다.

[0119] 실시예 3 - 효모-디스플레이된 CNTFR은 재조합적으로 발현된 CLCF1에 결합함

[0120] CNTFR의 세포외 도메인을 효모 표면 디스플레이 플라스미드 pCTCON2에 클로닝하고, 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주 EBY 100으로 형질전환시켰다. 이러한 플라스미드는 효모 아글루티닌 단백질 Aga2p에 대한 유전자 결합을 통해 효모 세포 표면 상에서의 CNTFR의 발현을 가능하게 한다(도 4의 패널 A(도 4a)). CNTFR은 N-말단 헤마글루티닌(HA) 및 C-말단 c-Myc 태그의 측면에 위치하였는데, 이는 항체 표지화 및 유세포 분석 검출에 의해 전장 단백질의 검출을 가능하게 하였다. 유도된 효모는 50%의 발현 백분율을 나타냈으며, 2차 항체를 사용한 유세포 분석에 의해 측정 시, 20 nM CLCF와 함께 인큐베이션한 경우, 발현 집단은 재조합적으로 발현된 CLCF1에 주로 결합되어 있었다(도 4의 패널 B(도 4b)).

[0121] 실시예 4 - 효모-디스플레이된 CNTFR은 CLCF1, gp130 및 LIFR을 갖는 3자 수용체 복합체를 형성함

[0122] 상기 언급된 바와 같이, CNTFR-CLCF1 복합체는 gp130 및 LIFR에 결합하여, 3자 수용체 복합체를 형성한다. 따라서, 완전 기능성 CNTFR은 CLCF1과 함께 인큐베이션한 경우, 2 개의 베타 서브유닛에 결합하는 것으로 예상된다. LIFR 및 gp130의 가용성 구조체를 제조하기 위해, 세포외 도메인을 포유류 발현 플라스미드 Add2에 클로닝하고, 인간 배아 신장(HEK) 293 현탁 세포로 트랜스펙션시켰다. 정제를 용이하게 하기 위해, 구조체를 His-태그 및 마우스 IgG2융합체로 제조하였다. His-태깅된 구조체를 니켈 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제하고, Fc-융합 구조체를 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 효모-디스플레이된 CNTFR을 LIFR-Fc와 함께 인큐베이션한 경우, 결합 신호는 검출되지 않았는데, 이는, CLCF1 없이, CNTFR이 다운스트림 신호전달 경로를 활성화시키는 베타 수용체에 결합하지 않기 때문이라고 예상되었다(도 5의 패널 A 및 B(도 5a 및 도5b)). 하지만, CLCF1의 첨가 시, LIFR-Fc 결합 신호전달은 증가되었으며, 이는 CLCF1의 존재 하에서, CNTFR이 실제로 LIFR과 상호작용한다는 것을 나타낸다(도 5의 패널 C(도 5c)). 효모 디스플레이된-CNTFR을 CLCF1 및 gp130과 함께 인큐베이션한 경우, LIFR-Fc 결합 신호는 보다 더 증가되었으며, 이는, gp130이 LIFR과 CNTFR 사이의 결합에 추가로 기여한다는 것을 나타낸다(도 5의 패널 D 및 E(도 5d 및 도 5e)).

[0123] 몇몇의 이전 연구는, CNTFR과 베타 수용체와의 상호작용이 특정한 순서로 일어날 수 있다는 것을 시사한다. 예를 들어, CNTF가 먼저 CNTFR에 결합한 후, gp130을 모집하고, 최종적으로 LIFR과 복합체를 형성한다고 제안되었다. 상기 실험은, CLCF1이 먼저 결합하는 한, gp130의 부재 하에서 LIFR에 대한 CNTFR의 결합이 일어날 수 있다는 것을 보여준다. 또한, CLCF1 없이, gp130-Fc는 효모-디스플레이된 CNTFR에 대한 검출 가능한 결합을 나타내지 않았다(도 6의 패널 A 및 B(도 6a 및 도 6b)). CLCF1의 첨가 시, gp130-Fc 신호는 유의미하게 증가되었으며, 이는, gp130이, LIFR 없이, CNTFR에 결합할 수 있다는 것을 나타낸다(도 6의 패널 C(도 6c)). LIFR이 첨가되는 경우, gp130 결합 신호는 약간 증가되었다. 함께, 도 6에 제시된 한 세트의 결합 실험은, LIFR과 gp130 사이에는 CNTFR-CLCF1에 대한 상조적 또는 부가적 결합이 존재함을 시사한다(도 6의 패널 D 및 E(도 6d 및 도 6e)).

[0124] 실시예 5 - 효모 표면 디스플레이를 사용한 CLCF1에 대한 CNTFR의 친화성 성숙

[0125] 실수 유발 PCR을 사용하여 CNTFR의 세포외 도메인(20 내지 342번째)에 돌연변이를 무작위로 도입하는, 단백질 조작 전략을 고안하였다. 약 1 ㅅ$10^8$ 개의 형질전환체의 추정된 다양성을 갖는 생성된 라이브러리는, 상기 기재된 바와 같이 효모 세포 표면 상에 융합 단백질로서 디스플레이되었다. 평형 결합 조건을 사용하여 유세포 분석 분류(FACS)에 의해 스크리닝된 라이브러리는, 주어진 양의 c-Myc 발현에 대하여 정규화된, 증가된 CLCF1 결합을 나타내는 변이체에 대하여 강화되었다. 각각의 연속적인 분류 회차에서 라이브러리와 함께 인큐베이션한 CLCF1의 농도를 감소시켜, 스크리닝 엄격성을 부여하였다. FACS를 사용한 3회의 스크리닝 후, 상이한 수준의 CLCF1 결합 신호를 갖는 3 개의 효모 집단이 관찰되었다. 공통 돌연변이가 2 개의 가장 높은 CLCF1 결합 집단에서 나타났다: T174P는 중간 친화도 집단에서 관찰되었으며, S237F는 가장 높은 친화성 집단에서 관찰되었다(도 7 및 도 8).

[0126] 실시예 6 - 고친화성 CLCF1 변이체를 동정하기 위한 셔플링된 CNTFR 라이브러리의 스크리닝

[0127] 강화된 공통 돌연변이에도 불구하고, 분류된 라이브러리는 여전히 실질적인 다양성을 함유하고 있었다. 2 개의 상위 결합 집단에서 확인된 돌연변이의 부가 효과를 시험하기 위해, 클론을 Staggered Extension Process(StEP) 방법을 사용하여 셔플링하였다. 이러한 라이브러리를 이용하여 증가된 엄격성을 부가하기 위해, 평형 결합 및 역학적 오프율 스크린의 조합을 사용하였다. 3회의 스크리닝 후, 4 개의 돌연변이(R110Q, T174P, S237F 및 I287F)의 조합이 생겨났다(도 9). 정성적 효모-디스플레이된 결합 연구는, 각각의 이러한 돌연변이가 CLCF1에 대한 결합 친화성에 기여한다고 시사하였으며, 따라서 4 개의 돌연변이를 모두 함유하는 클론(변이체 4)을 추가 실험을 위해 선택하였다(도 10의 패널 A 및 B(도 10a 및 도 10b)). 흥미롭게도, 효모 디스플레이된 야생형 CNTFR은 CNTF에 결합되었지만, 변이체 4는 CNTF에 결합되지 않았으며, 이는 통제된 진화의 과정이 CLCF1에 대한 특이성을 증가시켰다는 것을 나타낸다(도 10의 패널 C(도 10c)). 변이체 4는 여전히 hCLCF1에 더하여 mCLCF1에도 결합하였다(도 10의 패널 D(도 10d)).

[0128] 실시예 7 - LIFR에 대한 감소된 결합을 위한 친화성 성숙된 CNTFR의 음성 스크리닝

[0129] CNTFR의 268 및 269번째 아미노산 잔기에서의 알라닌 치환은 CNTFR과 베타 수용체의 상호작용을 감소시키는 것으로 이전에 제시되었다. T268A 및 D269A를 효모 세포 표면 상에 디스플레이된 CNTFR에 도입하는 경우, 이러한 돌연변이는 gp130에 대한 결합을 감소시키지만, LIFR에 대해서는 상당한 결합이 남아있다는 것을 발견하였다(도 11). 따라서, LIFR에 대한 이의 결합을 감소시키기 위해 CNTFR을 추가로 조작하기 위해서, 실수 유발 PCR을 사용하여 또 다른 무작위 돌연변이를 도 10의 패널 B(도 10b)로부터의 변이체 4에 도입하였다. 생성된 라이브러리를 다시 효모 상에 디스플레이하였는데, 이번에는 CLCF1의 존재 하에서 LIFR에 대한 결합 신호가 감소되었던 집단에 대하여 스크리닝하였다. CLCF1에 대한 결합 친화성을 유지하기 위해, CLCF1 결합에 대한 양성 선별과 LIFR에 대한 음성 선별을 교대로 스크리닝하였다(도 12). 6회 분류 후, 2 개의 공통 돌연변이가 생겨났다(Y177H 및 K178N)(도 13의 패널 A(도 13a)). 이러한 돌연변이는 LIFR 결합을 감소시키는 데 부가적으로 기여하였기 때문에, 2 개의 돌연변이를 모두 갖는 클론(eCNTFR로 명명됨)을 추가 특징분석을 위해 선택하였다. eCNTFR은 변이체 4로부터 고친화성 CLCF1 결합을 부여하는 4 개의 돌연변이뿐만 아니라, LIFR에 대한 결합을 감소시키는 2 개의 신규한 돌연변이를 함유한다.

[0130] 실시예 8 - 가용성 조작된 CNTFR의 특징분석

[0131] eCNTFR 변이체를 Add2 포유류 발현 벡터에 클로닝하고, HEK293 세포에 트랜스펙션시켜, His-태그 및 마우스 IgG2a Fc에 융합된 가용성 구조체를 제조하였다. 야생형 CNTFR(wtCNTFR)은 세포 배양 1리터 당 8밀리그램을 수득하였지만, eCNTFR은 1리터 당 4밀리그램을 수득하였다. 가용성 CNTFR 구조체의 결합 친화성을 측정하기 위해, 이를 먼저 CLCF1과 함께 실온에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 항-his 항체 또는 항-마우스 Fc 항체로 코팅된 마이크로티터 플레이트를 사용하여 복합체를 포획하였다. 토끼 항-CLCF1 1차 항체, 이어서 HRP 태깅된 항-토끼 2차 항체를 사용하여, CLCF1과 가용성 CNTFR 사이의 결합 상호작용을 측정할 수 있었다. His 태깅된 및 Fc 융합된 eCNTFR 모두 CLCF1에 대한 피코몰농도의 결합 친화성을 나타냈다(도 14의 패널 B(도 14b)). 비교로, CLCF1 결합 친화성은 너무 약하여 wtCNTFR에 대하여 정량화할 수 없었다. 동일한 접근법을 사용하여, 베타 수용체와의 결합 상호작용을 특징분석하였다. 이러한 실험에서, eCNTFR-His 및 eCNTFR-Fc는, 2 개의 수용체 모두에 결합된 wtCNTFR과 달리, gp130 및 LIFR에 대한 검출 가능한 결합 신호를 나타내지 않았다(도13의 패널 B(도 13b)). 이러한 결과는 효모-디스플레이된 구조체로부터 관찰된 결과와 일치하였다. 사구체 여과를 회피하기 위해 작은 단백질의 크기를 증가시키는 것은 혈청 반감기를 유의미하게 증가시킬 수 있기 때문에, CLCF1 저해의 다운스트림 효과를 평가하기 위해, 마우스 IgG2a Fc 도메인에 융합된 eCNTFR-Fc를 선택하였다. 이러한 Fc 융합은 또한 생체내 반감기 연장을 위한 FcRn-매개 재순환으로부터 유익을 얻을 수 있다.

[0132] 예시적인 가용성 CNTFR 폴리펩티드-Fc 융합체("eCNTFR-Fc" - 서열번호 4)의 아미노산 서열이 하기 표 4에 기재되어 있다. 이러한 예에서, 서열번호 2의 가용성 CNTFR 폴리펩티드는 전장 마우스 Fc 영역에 융합된다(표 4에 밑줄 그어진 것).

**표 4**

표 4: 예시적인 가용성 CNTFR 폴리펩티드-Fc 융합체의 아미노산 서열

| | 아미노산 서열 |
|---|---|
| 예시적인 가용성 CNTFR 폴리펩티드(서열번호 4)<br><br>(R110Q, T174P, Y177H, K178N, S237F, T268A, D269A, I287F) | MAAPVPWACCAVLAAAAAVVYAQRHSPQEAPHVQYERLGSDVTL PCGTANWDAAVTWRVNGTDLAPDLLNGSQLVLHGLELGHSGLYA CFHRDSWHLRHQVLLHVGLPP**Q**EPVLSCRSNTYPKGFYCSWHLPT PTYIPNTFNVTVLHGSKIMVCEKDPALKNRCHIRYMHLFS**P**IK**HN**V SISVSNALGHNATAITFDEFTIVKPDPPENVVARPVPSNPRRLEVTW QTPSTWPDPE**F**FPLKFFLRYRPLILDQWQHVELSDGTAHTI**AA**AYA GKEYIIQVAAKDNE**F**GTWSDWSVAAHATPWTEEPRHLTTEAQAAE TTTSTTSSLAPPPTTKICDPGELGSRRLEPRGPTIKPCPPCKCPAPNL LGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNN VEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNN KDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKK NWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK |

[0133]

[0134] 실시예 9 - eCNTFR-Fc는 인간 NSCLC 세포에서 STAT3 활성화를 저해함

[0135] eCNTFR-Fc가 CLCF1을 효과적으로 중화시키고 STAT3 인산화를 저해하는지를 결정하기 위해, 2가지 인간 NSCLC 세포주, A549 및 H23에 대한 이의 효과를 시험하였다. 세포를 가용성 CNTFR 구조체의 존재 및 부재 하에서 CLCF1로 자극하였다. 놀랍게도, wtCNTFR-Fc는STAT3(Tyr705)의 인산화를 증가시킨 반면, eCNTFR-Fc로의 처리는 STAT3 인산화를 효과적으로 감소시켰다(도 15의 패널 A(도 15a)). 나아가, eCNTFR-Fc와의 인큐베이션은, A549 및 H23 세포 둘 모두에서, 혈청 기아 조건에서 CLCF1-매개 세포 생존을 저해하였다(각각, 도 15의 패널 B 및 C(도 15b 및 도 15c)).

[0136] 실시예 10 - eCNTFR-Fc는 마우스 이종이식 모델에서 종양 성장을 감소시킴

[0137] 다음으로, eCNTFR-Fc가 CLCF1을 격리시키고 생체내 종양 성장을 감소시키는 이의 능력을 유지하는지에 대하여 시험하였다. 비(非)종양 보유 마우스에게 체중 1kg 당 1mg으로 eCNTFR-Fc의 단일 용량을 제공하고, 혈청 중 미결합된 CLCF1의 양을 포획제로서 eCNTFR-Fc를 사용하여 ELISA로 상이한 시점에서 측정하였다. 주사 6, 12, 24, 36 및48시간 후, 혈청 샘플을 수집하고 분석하였다. 혈청 CLCF1은 주사된 eCNTFR-Fc에 의해 빠르게 격리되었으나, 48시간 후, CLCF1 수준은 미처리된 기준선에 이르렀다(도 16의 패널 A(도 16a)). 주사 6시간 후부터 시작하여 측정된 eCNTFR-Fc 수준은 약48시간의 추정 반감기로 감소하였고, 이는 혈청 CLCF1의 격리와 상관관계가 있었다.

[0138] eCNTFR-Fc가 생체내 종양 성장에 영향을 미치는지를 시험하기 위해, 비소세포 폐암의 2가지 상이한 모델을 eCNTFR-Fc로 처리하였다. 제1 모델에서, A549 세포를 피하 주사하고, 각각의 마우스의 2 개의 반대 측면 상에서 성장시켰다. 종양 크기가 약 100 $mm^3$까지 성장한 후, 마우스에게 4주 동안 주 2회 체중 1kg 당 10 mg 또는 1mg, 또는 식염수 대조군을 주사하였다. eCNTFR-Fc의 2 가지 농도로의 처리는 식염수 대조군과 비교하여, 처리 17일 후 종양 성장을 유의미하게 감소시켰다(도 16의 패널 B 및 C(도 16b 및 도 16c)).

[0139] H23 세포를 갖는 이종이식 모델을 사용하여 유사한 방식으로, 또 다른 실험을 수행하였다. 이번에는, 10 mg/kg으로의 eCNTFR-Fc 처리를 wtCNTFR-Fc 처리 및 식염수 대조군과 비교하였고, 주사 빈도를 39일 동안 주 3회로 증가시켰다. 유사한 결과가 관찰되었는데, 이러한 결과가 통계적으로 유의하지 않음에도 불구하고, eCNTFR-Fc는 연구의 종결 시 종양 부피를 유의미하게 감소시켰지만, wtCNTFR-Fc는 종양 크기를 약간 증가시킨 것으로 보였다(도 17).

[0140] 실시예 11 - 조작된 CLCF1 트랩(eCNTFR)의 특이성

[0141] CNTF(섬모 신경영양 인자)는 CLCF1과 CNTFR의 리간드 결합 모티프를 공유하는, CNTFR에 대한 또 다른 리간드이

다. CNTF-매개 신호전달은 뉴런 세포 생존에 있어서 중요하고, 손상에 의해 유도된 세포보호 효과를 가질 수 있기 때문에, CNTF를 통한 CLCF1에 대한 eCNTFR-Fc의 결합 친화성은, 부작용이 CNTF를 저해하는 것을 방지하는 데 유리할 수 있다. 재조합적으로 생성된 CNTF에 대한 eCNTFR-Fc의 결합 친화성을 ELISA를 사용하여 측정한 경우, wtCNTFR-Fc는 CNTF에 대한 실질적인 결합을 입증한 반면, eCNTFR-Fc는 시험된 농도에서 CNTF에 대한 이의 친화성을 손실하였다. 한편, eCNTFR-Fc는 마우스 CLCF1(mCLCF1)에 대하여 높은 친화성을 나타내었는데, 마우스 CLCF1이 인간 세포에서 STAT3을 인산화시킬 수 있기 때문에, 이는 생체내 마우스 모델 실험에 중요할 수 있다. 데이터는 도 18의 패널 A(도 18a)에 제시되어 있다.

[0142] eCNTFR-Fc가 CLCF1을 효과적으로 중화시키고 STAT3 인산화를 저해하는지를 결정하기 위해, 2가지 인간 NSCLC 세포주 A549 및 H23에 대한 이의 효과를 시험하였다. 세포를 가용성 CNTFR 구조체의 존재 및 부재 하에서 CLCF1로 자극시켰다. wtCNTFR-Fc는 STAT3(Tyr705)의 인산화를 증가시켰던 반면, eCNTFR-Fc는 2가지 세포주 모두에서 인산화를 효과적으로 감소시켰다. 데이터는 도 18의 패널 B(도 18b)에 제시되어 있다.

[0143] 실시예 12 - CLCF1 격리 및 eCNTFR-Fc 청소율의 약동학

[0144] eCNTFR-Fc가 생체내 CLCF1을 격리시키는 이의 능력을 유지하는지를 시험하기 위해, NOD/SCID/감마 마우스에서 10 mg/kg eCNTFR-Fc의 복강내(i.p.) 투약 후, 혈액 청소율 및 CLCF1 격리를 정량화하였다. 주사 후 혈청 샘플을 수집하고, 미결합된 CLCF1(정사각형)을 포획제로서 eCNTFR-Fc를 사용하여 ELISA로 측정하였다. 비히클 처리된 마우스를 사용하여 기준선 CLCF1 수준을 결정하였다. 혈중 eCNTFR-Fc 수준(원)을 포획제로서 항-Fc 항체를 사용하여 ELISA로 정량화하였다. 혈청 CLCF1은 주사된 eCNTFR-Fc에 의해 빠르게 격리되었지만, 72시간에서, CLCF1 수준은 미처리된 기준선에 도달하였다. (도 19의 패널 A(도 19a)). 이러한 데이터는, eCNTFR-Fc가 마우스 CLCF1에 효과적으로 결합한다는 것을 입증하며, 이는 생체내 임의의 유의한 독성이 마우스에 관찰될 수 있어야 함을 시사한다.

[0145] 실시예 13 - eCNTFR-Fc는 생체내 종양 성장을 저해함

[0146] 생체내 eCNTFR의 약리학적 효능을 시험하기 위해, NSCLC 세포주를 면역결핍 마우스에 이식하였다. 원발성 종양을 대략 100-150 $mm^3$의 크기까지 성장시켰다. 초기에, 마우스를 하기 4가지 군 중 하나로 무작위화하였다: 비히클(PBS), 야생형 CNTFR(wtCNTFR-Fc), 저용량(1 mg/kg)의 eCNTFR-Fc, 및 고용량(10 mg/kg)의 eCNTFR-Fc(도 21의 패널 B(도 21b)). 마우스를 18일 동안 주 2회 복강내(i.p.) 주사하였다. eCNTFR-Fc의 투여는 용량-의존적 종양 저해를 입증하였다(도 19의 패널 B 내지 D(도 19b 내지 도 19d)). 필적하는 효과가 제2 NSCLC 세포주에서 관찰되었다.

[0147] PDTX가 인간 종양 생물학을 충실하게 개괄하고, 치료에 대한 반응을 예측한다는 증거가 증가하고 있다. 인간에서 외과적으로 절제된 종양을 마우스에게 직접 이식하여 수득된 PDTX는, 형태학적 유사성을 유지하고, 본래 종양의 분자 프로파일을 개괄한다고 공지되어 있다. 이와 같이, 임상적으로 적절한 설정에서 본 발명의 발견을 입증하기 위해, eCNTFR-Fc를 시험하기 위한 NSCLC PDTX 모델을 생성하였다. 하나의 LUAD PDTX 모델은, 3주 동안 또는 대조군(PBS) 마우스에서 이환의 징후가 나타날 때까지, i.p. 주사로 주 3회 eCNTFR-Fc 처리 시, 유의한 종양 성장 저해를 나타냈다(도 19의 패널 E 내지 H(도 19e 내지 도 19h)).

[0148] 각각의 이종이식 모델에서, eCNTFR에 대한 반응에서의 증식 및 아폽토시스를, 각각 PH3 및 CC3 면역염색으로 검정하였다. 증식의 유의한 감소 및 아폽토시스의 증가가 eCNTFR-Fc로의 처리 후에 관찰되었다(도 19의 패널 I(도 19ia)). 도 19의 두 번째 패널 I(도 19ib)의 바 그래프에서, 좌측에서 우측으로, PBS, WT CNTFR, eCNTFR(1mg/kg) 및 eCNTFR(10mg/kg)에 대한 결과가 제공되어 있다. 종합하면, 이러한 결과는, 종양 세포에서 CLCF1-유도성 신호전달의 파괴가 eCNTFR을 사용하여 효과적으로 달성될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0149] 실시예 15 - 폐암에서 CLCF1 및 CNTFR의 발현

[0150] 암-관련 섬유아세포(CAF)는 CLCF1을 발현하고 생체내 이러한 사이토카인에 대한 공급원일 수 있지만, 본 연구는 NSCLC 세포주가 또한 CLCF1을 분비한다고 결정하였는데, 이는 이러한 사이토카인에 대하여 주변분비(paracrine) 및 자가분비(autocrine) 신호전달 메커니즘이 모두 존재한다는 것을 시사한다(도 20의 패널 A(도 20a)). CLCF1에 대한 수용체인 CNTFR이 또한, 시험된 모든 NSCLC 세포주 및 환자 유래 이종이식(PDTX) 모델에서 발현되는 것으로 결정되었다(도 20의 패널 B 및 C(도 20b 및 도 20c)). CNTFR의 발현은 또한 KrasG12D;P53f/f 유전자-조작된 마우스 모델에서 생성된 종양에서 및 PDTX 모델에서 면역조직화학법에 의해 관찰되었다(도 20의 패널 D(도 20d)). 이러한 결과를 종합하면, CLCF1-CNTFR 신호전달 축이 폐 선암종에서 활성화되어 있으며, 이는 종양형성,

특히 종양형성 Kras에 의해 유도되는 종양에서 역할을 담당할 수 있다는 것을 시사한다.

[0151] 첨부된 청구범위에 불구하고, 본 개시는 또한 하기 조항에 의해 정의된다.

[0152] 1. 약학적 조성물로서,

[0153] 섬모 신경영양 인자 수용체(CNTFR)의 리간드에 특이적으로 결합하는 작용제; 및

[0154] 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

[0155] 2. 제1조항에 있어서, CNTFR의 리간드에 특이적으로 결합하는 작용제가 섬모 신경영양 인자(CNTF), 카디오트로핀-유사 사이토카인 인자 1(CLCF1), 뉴로포에틴(NP) 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 리간드에 특이적으로 결합하는, 약학적 조성물.

[0156] 3. 제1조항 또는 제2조항에 있어서, CNTFR의 리간드에 특이적으로 결합하는 작용제가 가용성 CNTFR 폴리펩티드인, 약학적 조성물.

[0157] 4. 제3조항에 있어서, 가용성 CNTFR 폴리펩티드가 야생형 CNTFR 폴리펩티드에 비해 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛에 대한 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 결합 친화성을 감소시키는 돌연변이를 포함하는, 약학적 조성물.

[0158] 5. 제4조항에 있어서, 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛이 당단백질 130(gp130), 백혈병 저해 인자 수용체(LIFR) 또는 둘 모두인, 약학적 조성물.

[0159] 6. 제5조항에 있어서, 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛이 LIFR인, 약학적 조성물.

[0160] 7. 제6조항에 있어서, LIFR에 대한 결합 친화성을 감소시키는 돌연변이가, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CNTFR 폴리펩티드에 대해, 아미노산 위치 177, 178 또는 둘 모두에 존재하는, 약학적 조성물.

[0161] 8. 제5조항에 있어서, 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛이 gp130인, 약학적 조성물.

[0162] 9. 제8조항에 있어서, gp130에 대한 결합 친화성을 감소시키는 돌연변이가, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CNTFR 폴리펩티드에 대해, 아미노산 위치 268, 269 또는 둘 모두에 존재하는, 약학적 조성물.

[0163] 10. 제3조항 내지 제9조항 중 어느 한 조항에 있어서, 가용성 CNTFR 폴리펩티드가 야생형 CNTFR을 세포막에 고정시키는 도메인에 용해성-부여 돌연변이를 포함하는, 약학적 조성물.

[0164] 11. 제10조항에 있어서, 가용성 CNTFR 폴리펩티드가 야생형 CNTFR을 세포막에 고정시키는 도메인에 절단을 포함하는, 약학적 조성물.

[0165] 12. 제10조항에 있어서, 가용성 CNTFR 폴리펩티드가 야생형 CNTFR을 세포막에 고정시키는 도메인이 결여되어 있는, 약학적 조성물.

[0166] 13. 제3조항 내지 제12조항 중 어느 한 조항에 있어서, 가용성 CNTFR 폴리펩티드가 야생형 CNTFR 폴리펩티드에 비해 CNTFR 리간드에 대한 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 결합 친화성을 증가시키는 돌연변이를 포함하는, 약학적 조성물.

[0167] 14. 제13조항에 있어서, CNTFR 리간드가 섬모 신경영양 인자(CNTF), 카디오트로핀-유사 사이토카인 인자 1(CLCF1), 뉴로포에틴(NP) 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

[0168] 15. 제13조항에 있어서, CNTFR 리간드가 CLCF1인, 약학적 조성물.

[0169] 16. 제15조항에 있어서, CLCF1에 대한 결합 친화성을 증가시키는 돌연변이가, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CNTFR 폴리펩티드에 대해, 아미노산 위치 110, 174, 237, 287 또는 이들의 임의의 조합에 존재하는, 약학적 조성물.

[0170] 17. 제1조항 또는 제2조항에 있어서, 작용제가 항체인, 약학적 조성물.

[0171] 18. 제1조항 내지 제17조항 중 어느 한 조항에 있어서, 작용제가 이종(heterologous) 폴리펩티드에 융합된 폴리펩티드인, 약학적 조성물.

[0172] 19. 제18조항에 있어서, 이종 폴리펩티드가 Fc 도메인, 알부민, 트랜스페린, XTEN, 동종-아미노산 중합체, 프롤린-알라닌-세린 중합체, 엘라스틴-유사 펩티드 또는 이들의 임의의 조합인, 약학적 조성물.

[0173] 20. 제19조항에 있어서, 이종 폴리펩티드가 Fc 도메인인, 약학적 조성물.

[0174] 21. 제20조항에 있어서, Fc 도메인이 인간 Fc 도메인인, 약학적 조성물.

[0175] 22. 제1조항 내지 제21조항 중 어느 한 조항에 있어서, 작용제가 모이어티에 컨쥬게이션되어 있는, 약학적 조성물.

[0176] 23. 제22조항에 있어서, 모이어티가 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 항암 약물, 검출 가능한 표지 또는 이들의 임의의 조합인, 약학적 조성물.

[0177] 24. 제1조항 내지 제23조항 중 어느 한 조항의 약학적 조성물 또는 제58조항 내지 제74조항 중 어느 한 조항의 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 치료적 유효량을, 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하며, 리간드에 대한 작용제의 결합이 CNTFR에 대한 상기 리간드의 결합을 저해하는, 방법.

[0178] 25. 제24조항에 있어서, 이를 필요로 하는 개체가 CNTFR 신호전달과 관련된 세포 증식성 장애를 갖고, 투여가 세포 증식성 장애를 치료하는 데 효과적인, 방법.

[0179] 26. 제24조항 또는 제25조항에 있어서, 투여하는 단계 전, CNTFR 신호전달과 관련된 세포 증식성 장애를 갖는 개체를 동정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

[0180] 27. 제26조항에 있어서, 동정이 개체로부터 수득된 샘플에서의 CNTFR 리간드 존재비에 기초하는, 방법.

[0181] 28. 제27조항에 있어서, 존재비가 CNTF, CLCF1, NP 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 CNTFR 리간드의 존재비인, 방법.

[0182] 29. 제27조항 또는 제28조항에 있어서, CNTFR 리간드 존재비가 CNTFR 리간드 포획제로서 가용성 CNTFR 폴리펩티드를 사용하여 정량화되는, 방법.

[0183] 30. 제29조항에 있어서, CNTFR 리간드 포획제로서 사용되는 가용성 CNTFR 폴리펩티드가, 제58조항 내지 제74조항 중 어느 한 조항의 가용성 CNTFR 폴리펩티드인, 방법.

[0184] 31. 제26조항에 있어서, 동정이 개체로부터 수득된 샘플에서의 CNTFR 존재비에 기초하는, 방법.

[0185] 32. 제26조항에 있어서, 동정이 개체로부터 수득된 샘플에서의 CNTFR 신호전달 수준에 기초하는, 방법.

[0186] 33. 제32조항에 있어서, 샘플에서의 CNTFR 신호전달의 정량화가 하나 이상의 CNTFR 신호전달 경로 분자의 인산화 상태를 정량화하는 것을 포함하는, 방법.

[0187] 34. 제27조항 내지 제33조항 중 어느 한 조항에 있어서, 동정이 면역검정법에 기초하는, 방법.

[0188] 35. 제27조항 내지 제33조항 중 어느 한 조항에 있어서, 동정이 핵산 시퀀싱에 기초하는, 방법.

[0189] 36. 제27조항 내지 제35조항 중 어느 한 조항에 있어서, 샘플이 조직 샘플인, 방법.

[0190] 37. 제27조항 내지 제35조항 중 어느 한 조항에 있어서, 샘플이 유체 샘플인, 방법.

[0191] 38. 제27조항 내지 제37조항 중 어느 한 조항에 있어서, 개체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

[0192] 39. 제25조항 내지 제38조항 중 어느 한 조항에 있어서, 세포 증식성 장애가 암인, 방법.

[0193] 40. 제39조항에 있어서, 암이 폐암인, 방법.

[0194] 41. 제40조항에 있어서, 폐암이 비소세포 폐암(NSCLC)인, 방법.

[0195] 42. CNTFR 신호전달과 관련된 세포 증식성 장애를 갖는 개체를 동정하는 단계를 포함하는 방법.

[0196] 43. 제42조항에 있어서, 동정이 개체로부터 수득된 샘플에서의 CNTFR 리간드 존재비에 기초하는, 방법.

[0197] 44. 제43조항에 있어서, 존재비가 CNTF, CLCF1, NP 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 CNTFR 리간드의 존재비인, 방법.

[0198] 45. 제42조항 또는 제43조항에 있어서, CNTFR 리간드 존재비가 CNTFR 리간드 포획제로서 가용성 CNTFR 폴리펩티드를 사용하여 정량화되는, 방법.

[0199] 46. 제45조항에 있어서, CNTFR 리간드 포획제로서 사용되는 가용성 CNTFR 폴리펩티드가, 제58조항 내지 제74조항 중 어느 한 조항의 가용성 CNTFR 폴리펩티드인, 방법.

[0200] 47. 제42조항에 있어서, 동정이 개체로부터 수득된 샘플에서의 CNTFR 존재비에 기초하는, 방법.

[0201] 48. 제42조항에 있어서, 동정이 개체로부터 수득된 샘플에서의 CNTFR 신호전달 수준에 기초하는, 방법.

[0202] 49. 제48조항에 있어서, 샘플에서의 CNTFR 신호전달 수준이 하나 이상의 CNTFR 신호전달 경로 분자의 인산화 상태에 기초하여 결정되는, 방법.

[0203] 50. 제42조항 내지 제49조항 중 어느 한 조항에 있어서, 동정이 면역검정법에 기초하는, 방법.

[0204] 51. 제42조항 내지 제49조항 중 어느 한 조항에 있어서, 동정이 핵산 시퀀싱에 기초하는, 방법.

[0205] 52. 제42조항 내지 제51조항 중 어느 한 조항에 있어서, 샘플이 조직 샘플인, 방법.

[0206] 53. 제42조항 내지 제51조항 중 어느 한 조항에 있어서, 샘플이 유체 샘플인, 방법.

[0207] 54. 제43조항 내지 제53조항 중 어느 한 조항에 있어서, 개체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

[0208] 55. 제42조항 내지 제54조항 중 어느 한 조항에 있어서, 세포 증식성 장애가 암인, 방법.

[0209] 56. 제55조항에 있어서, 암이 폐암인, 방법.

[0210] 57. 제56조항에 있어서, 폐암이 비소세포 폐암(NSCLC)인, 방법.

[0211] 58. 야생형 CNTFR 폴리펩티드에 비해 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛에 대한 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 결합 친화성을 감소시키는 돌연변이,

[0212] 야생형 CNTFR 폴리펩티드에 비해 CNTFR 리간드에 대한 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 결합 친화성을 증가시키는 돌연변이, 또는

[0213] 둘 모두를 포함하는, 가용성 CNTFR 폴리펩티드.

[0214] 59. 제58조항에 있어서, 야생형 CNTFR 폴리펩티드에 비해 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛에 대한 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 결합 친화성을 감소시키는 돌연변이를 포함하며, 여기서 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛은 당단백질 130(gp130), 백혈병 저해 인자 수용체(LIFR), 또는 둘 모두인, 가용성 CNTFR 폴리펩티드.

[0215] 60. 제59조항에 있어서, 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛이 LIFR인, 가용성 CNTFR 폴리펩티드.

[0216] 61. 제60조항에 있어서, LIFR에 대한 결합 친화성을 감소시키는 돌연변이가, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CNTFR 폴리펩티드에 대해, 아미노산 위치 177, 178 또는 둘 모두에 존재하는, 가용성 CNTFR 폴리펩티드.

[0217] 62. 제59조항에 있어서, 리간드-CNTFR 복합체 서브유닛이 gp130인, 가용성 CNTFR 폴리펩티드.

[0218] 63. 제62조항에 있어서, gp130에 대한 결합 친화성을 감소시키는 돌연변이가, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CNTFR 폴리펩티드에 대해, 아미노산 위치 268, 269 또는 둘 모두에 존재하는, 가용성 CNTFR 폴리펩티드.

[0219] 64. 제58조항 내지 제63조항 중 어느 한 조항에 있어서, 야생형 CNTFR을 세포막에 고정시키는 도메인에 용해성-부여 돌연변이를 포함하는, 가용성 CNTFR 폴리펩티드.

[0220] 65. 제64조항에 있어서, 야생형 CNTFR을 세포막에 고정시키는 도메인에 절단을 포함하는, 가용성 CNTFR 폴리펩티드.

[0221] 66. 제64조항에 있어서, 야생형 CNTFR을 세포막에 고정시키는 도메인이 결여되어 있는, 가용성 CNTFR 폴리펩티드.

[0222] 67. 제58조항 내지 제66조항 중 어느 한 조항에 있어서, 야생형 CNTFR 폴리펩티드에 비해 CNTFR 리간드에 대한 가용성 CNTFR 폴리펩티드의 결합 친화성을 증가시키는 돌연변이를 포함하는, 가용성 CNTFR 폴리펩티드.

[0223] 68. 제67조항에 있어서, CNTFR 리간드가 섬모 신경영양 인자(CNTF), 카디오트로핀-유사 사이토카인 인자 1(CLCF1), 뉴로포에틴(NP) 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 가용성 CNTFR 폴리펩티드.

[0224] 69. 제67조항에 있어서, CNTFR 리간드가 CLCF1인, 가용성 CNTFR 폴리펩티드.

[0225] 70. 제69조항에 있어서, CLCF1에 대한 결합 친화성을 증가시키는 돌연변이가, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CNTFR 폴리펩티드에 대해, 아미노산 위치 110, 174, 237, 287, 또는 이들의 임의의 조합에 존재하는, 가용성 CNTFR 폴리펩티드.

[0226] 71. 제58조항 내지 제70조항 중 어느 한 조항에 있어서, 가용성 CNTFR 폴리펩티드가 이종 폴리펩티드에 융합되어 있는, 가용성 CNTFR 폴리펩티드.

[0227] 72. 제71조항에 있어서, 이종 폴리펩티드가 Fc 도메인, 알부민, 트랜스페린, XTEN, 동종-아미노산 중합체, 프롤린-알라닌-세린 중합체, 엘라스틴-유사 펩티드 또는 이들의 임의의 조합인, 가용성 CNTFR 폴리펩티드.

[0228] 73. 제71조항에 있어서, 이종 폴리펩티드가 Fc 도메인인, 가용성 CNTFR 폴리펩티드.

[0229] 74. 제73조항에 있어서, Fc 도메인이 인간 Fc 도메인인, 가용성 CNTFR 폴리펩티드.

[0230] 75. 제58조항 내지 제74조항 중 어느 한 조항의 가용성 CNTFR 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산.

[0231] 76. 제75조항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

[0232] 77. 제58조항 내지 제70조항 중 어느 한 조항의 가용성 CNTFR 폴리펩티드, 제75조항의 핵산, 제76조항의 발현 벡터, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 숙주 세포.

[0233] 78. 제77조항에 있어서, 당해 숙주 세포가 원핵 세포인, 숙주 세포.

[0234] 79. 제77조항에 있어서, 당해 숙주 세포가 진핵 세포인, 숙주 세포.

[0235] 80. 제79조항에 있어서, 진핵 세포가 포유류 세포인, 숙주 세포.

[0236] 81. 제80조항에 있어서, 포유류 세포가 인간 세포인, 숙주 세포.

[0237] 82. 세포 표면 디스플레이 단백질(cell surface display protein)에 융합된 CNTFR 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산.

[0238] 83. 제82조항에 있어서, CNTFR 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CNTFR 폴리펩티드에 대해 하나 이상의 돌연변이를 포함하는, 핵산.

[0239] 84. 제83조항에 있어서, 세포 표면 디스플레이 단백질이 박테리아 표면 디스플레이 단백질, 파지 디스플레이 단백질 및 효모 디스플레이 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 핵산.

[0240] 85. 제84조항에 있어서, 세포 표면 디스플레이 단백질이 효모 디스플레이 단백질인, 핵산.

[0241] 86. 제85조항에 있어서, 효모 디스플레이 단백질이 Aga2p인, 핵산.

[0242] 87. 제82조항 내지 제86조항 중 어느 한 조항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

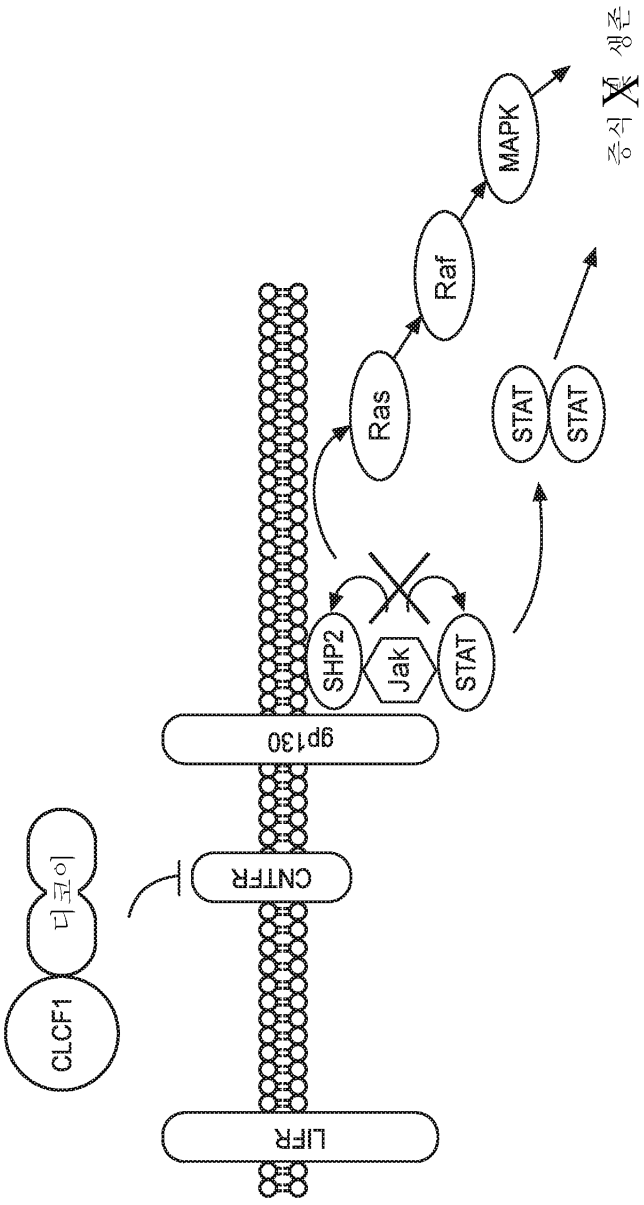
[0243] 88. 제82조항 내지 제86조항 중 어느 한 조항의 핵산 또는 제87조항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

[0244] 89. 제82조항 내지 제86조항 중 어느 한 조항의 핵산에 의해 인코딩되거나, 또는 제87조항의 발현 벡터에 의해 인코딩된 CNTFR 폴리펩티드.

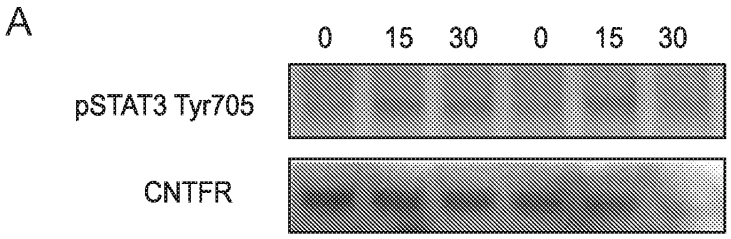
[0245] 따라서, 상술한 내용은 단지 본 개시의 원리를 예시하는 것이다. 당업자는, 본원에 명시적으로 기재 또는 제시되지는 않았지만, 본 발명의 원리를 구현하고, 이의 의미 및 범위에 포함되는 다양한 배열이 고안될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 나아가, 본원에 인용된 모든 실시예 및 조건부 언어는, 주로 독자가 본 발명의 원리, 및 본 발명자가 해당 분야를 발전시키는 데 기여한 개념을 이해하는 것을 돕기 위한 것이며, 특히 인용된 예 및 조건에 제한되지 않는 것으로서 해석되어야 한다. 나아가, 본 발명의 원리, 양태 및 구현예뿐만 아니라, 이의 특정예를 인용한 본원의 모든 설명은, 이의 구조적 및 기능적 등가물 모두를 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 이러한 등가물은, 현재 공지된 등가물 및 미래에 개발될 등가물, 즉 구조에 관계없이 동일한 기능을 수행하는 임의의 개발된 요소를 모두 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, 본 발명의 범위는 본원에 제시 및 기재된 예시적인 구현예에 제한되는 것이 아니라고 의도된다. 오히려, 본 발명의 범위 및 의미는 첨부된 청구범위에 의해 구현된다.

도면

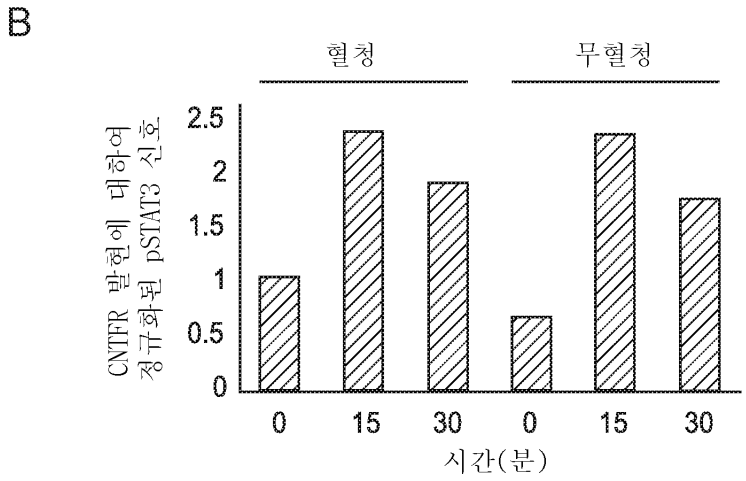
도면1


CLCF1
디코이
CNTFR
gp130
LIFR
SHP2
Jak
STAT
Ras
Raf
MAPK
STAT
STAT
증식 X
생존 X

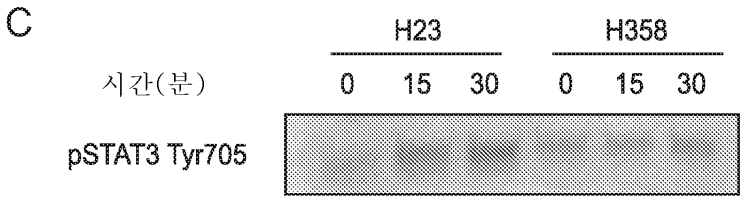
도면2a



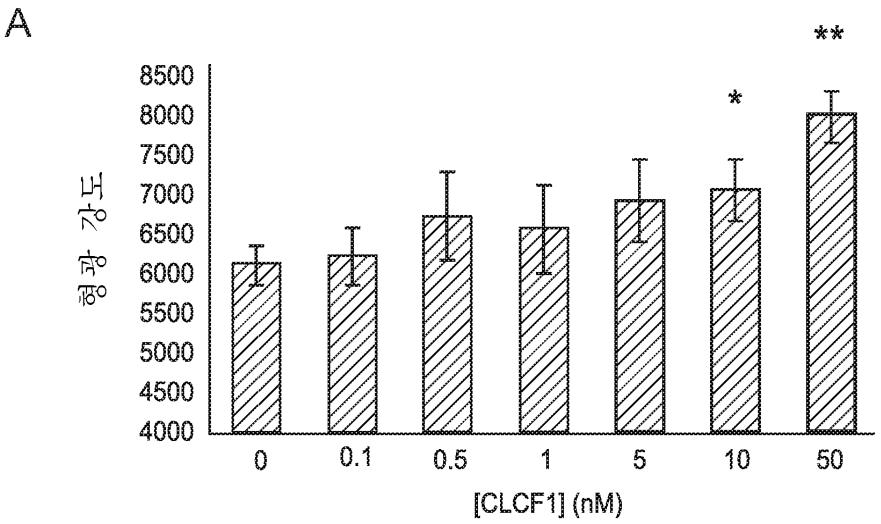

도면2b



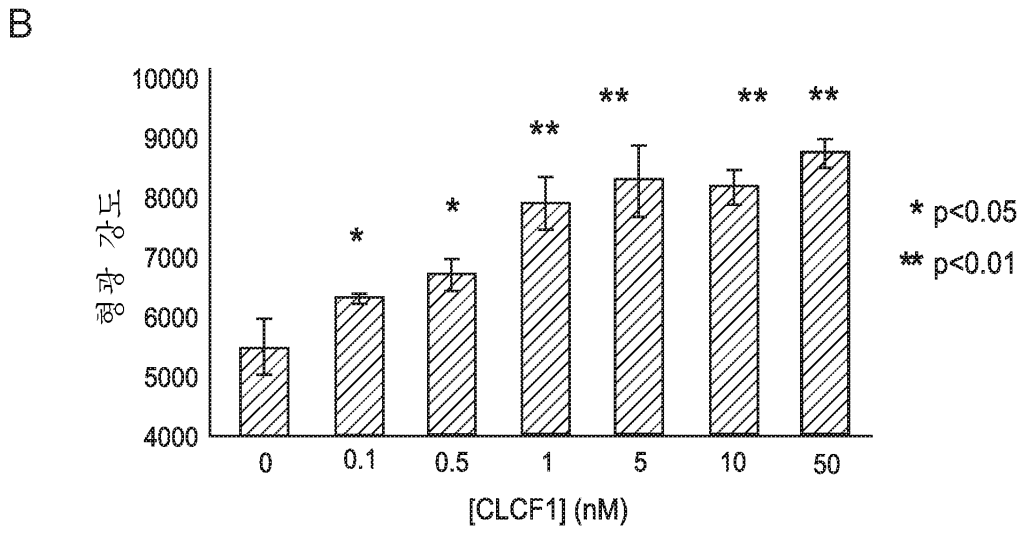

도면2c



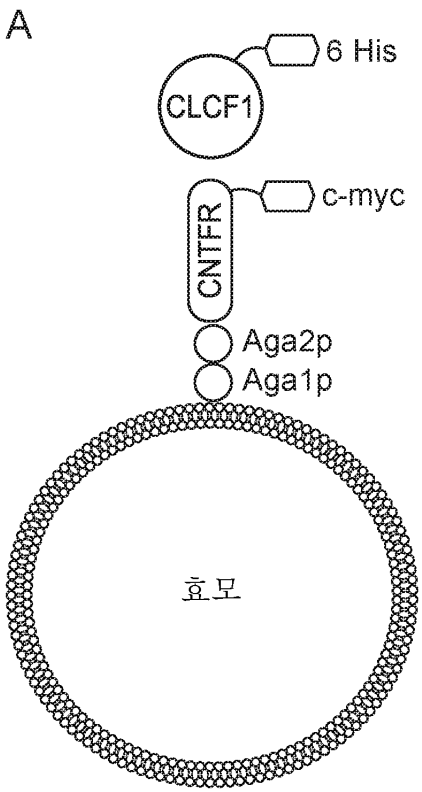
도면3a


A
형광 강도
8500
8000
7500
7000
6500
6000
5500
5000
4500
4000
0
0.1
0.5
1
5
10
50
[CLCF1] (nM)
*
**

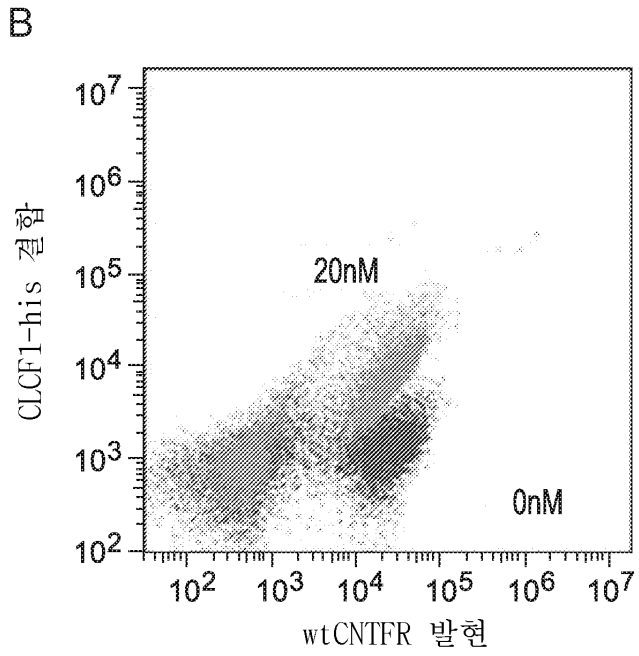
도면3b


B
형광 강도
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
0
0.1
0.5
1
5
10
50
[CLCF1] (nM)
* p<0.05
** p<0.01

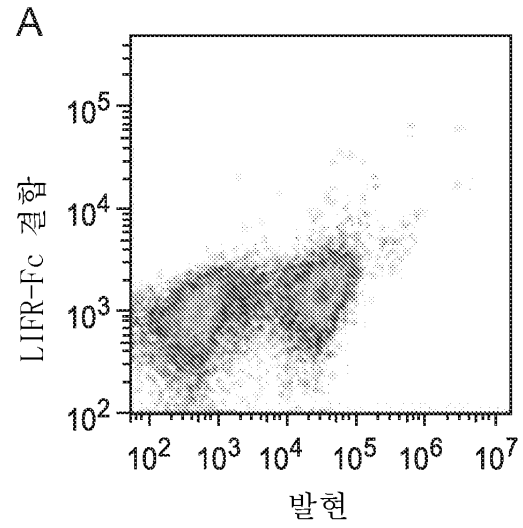
도면4a


A
6 His
CLCF1
c-myc
CNTFR
Aga2p
Aga1p
효모

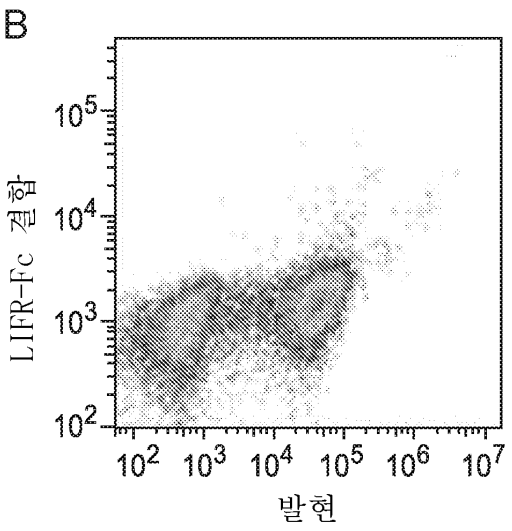
도면4b


B
CLCF1-his 결합
wtCNTFR 발현
20nM
0nM
$10^2$
$10^3$
$10^4$
$10^5$
$10^6$
$10^7$

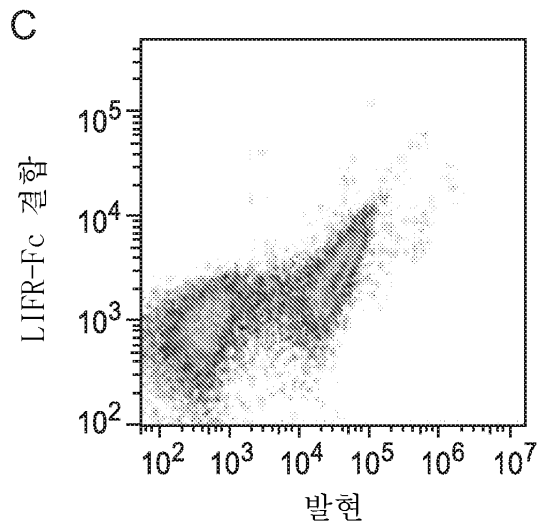
도면5a


A
LIFR-Fc 결합
$10^2$
$10^3$
$10^4$
$10^5$
$10^2$ $10^3$ $10^4$ $10^5$ $10^6$ $10^7$
발현

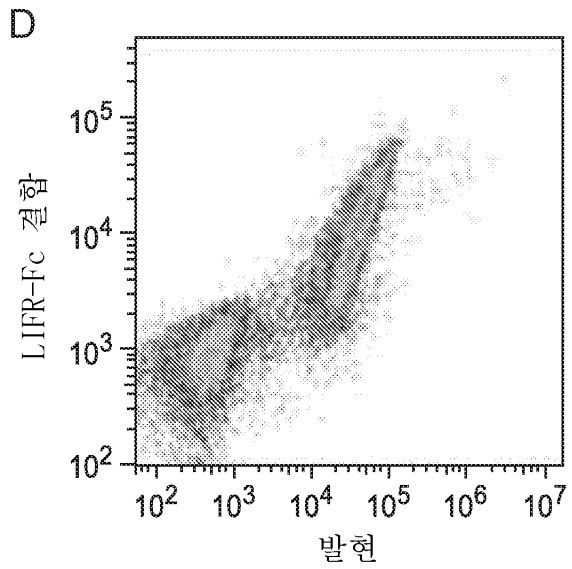
도면5b


B
LIFR-Fc 결합
$10^2$
$10^3$
$10^4$
$10^5$
$10^2$ $10^3$ $10^4$ $10^5$ $10^6$ $10^7$
발현

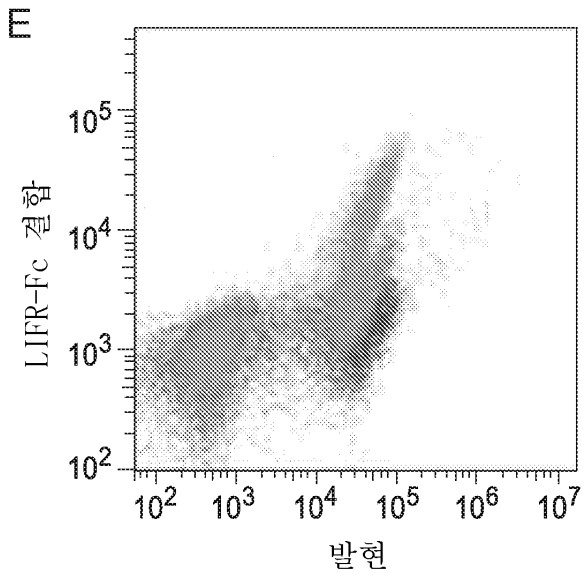
도면5c


C
LIFR-Fc 결합
$10^2$
$10^3$
$10^4$
$10^5$
$10^6$
$10^7$
발현

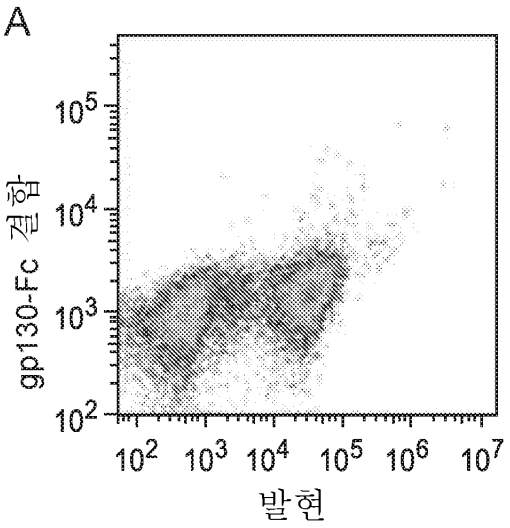
도면5d


D
LIFR-Fc 결합
$10^2$
$10^3$
$10^4$
$10^5$
$10^6$
$10^7$
발현

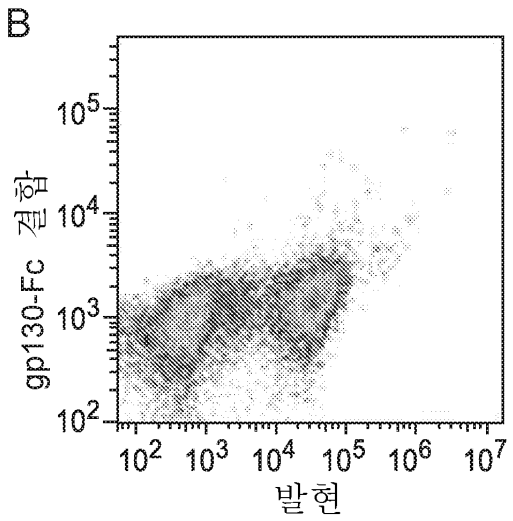
도면5e


E
LIFR-Fc 결합
$10^5$
$10^4$
$10^3$
$10^2$
$10^2$ $10^3$ $10^4$ $10^5$ $10^6$ $10^7$
발현

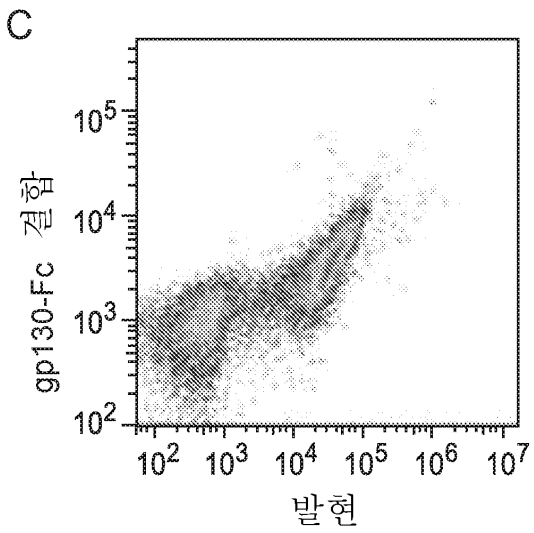
도면6a


A
gp130-Fc 결합
$10^5$
$10^4$
$10^3$
$10^2$
$10^2$ $10^3$ $10^4$ $10^5$ $10^6$ $10^7$
발현

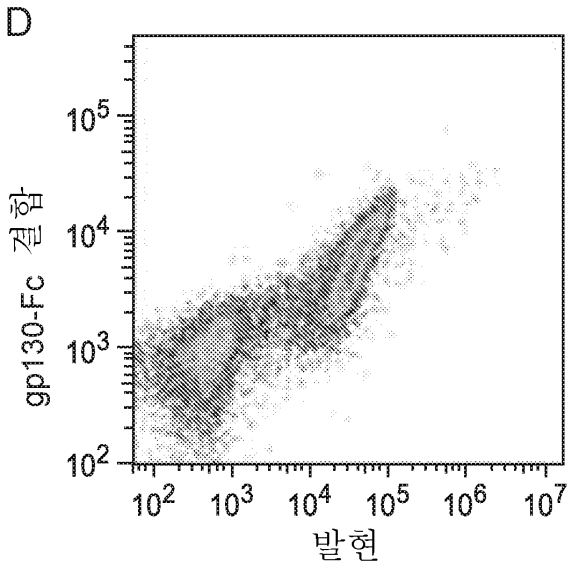
도면6b


B
gp130-Fc 결합
$10^2$ $10^3$ $10^4$ $10^5$
$10^2$ $10^3$ $10^4$ $10^5$ $10^6$ $10^7$
발현

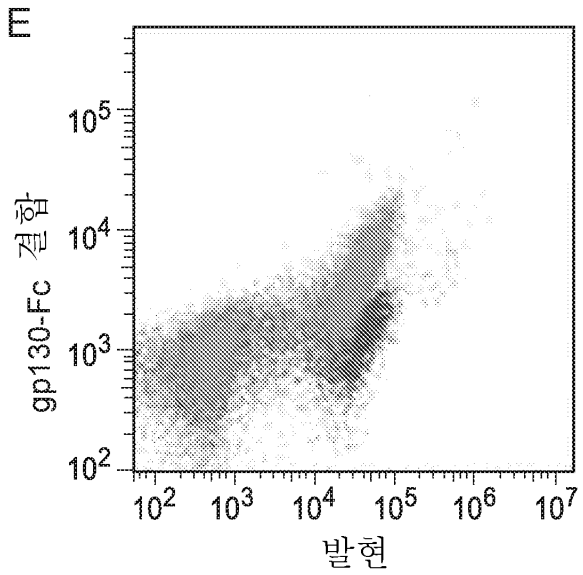
도면6c


C
gp130-Fc 결합
$10^2$ $10^3$ $10^4$ $10^5$
$10^2$ $10^3$ $10^4$ $10^5$ $10^6$ $10^7$
발현

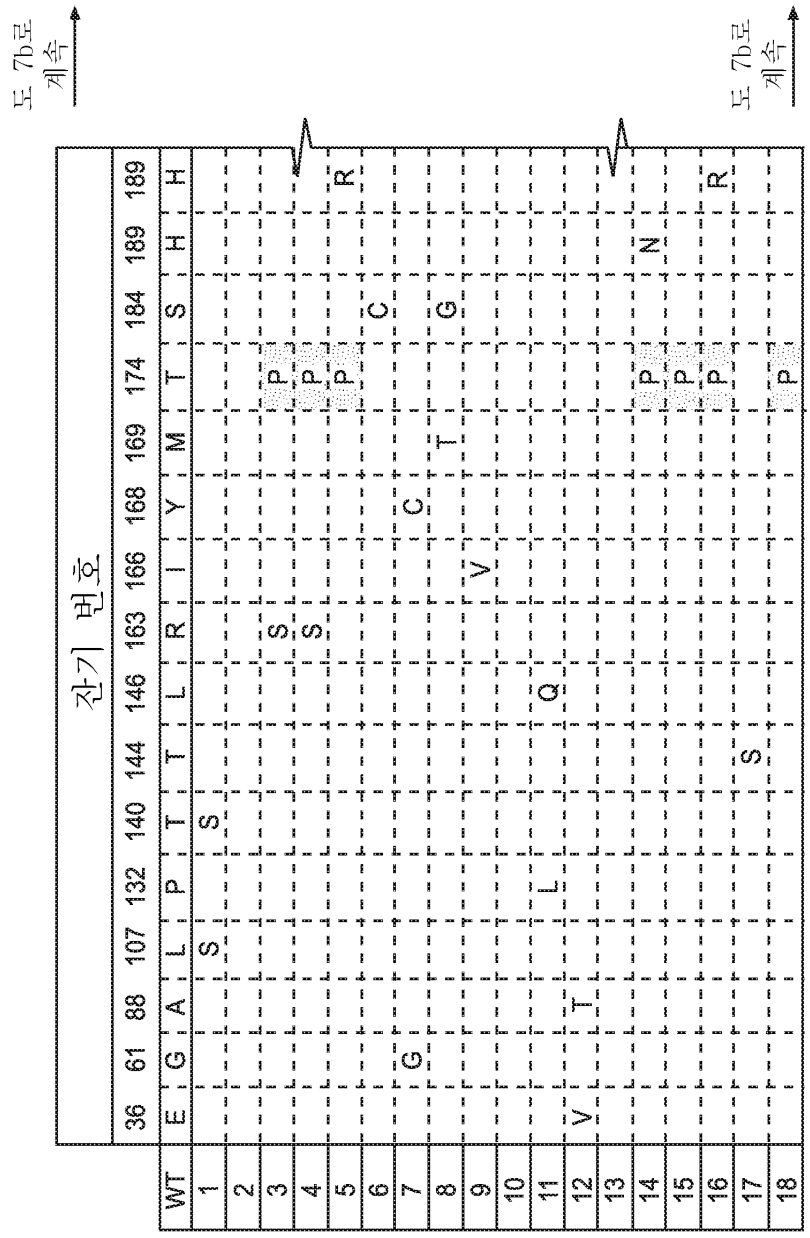
도면6d


D
gp130-Fc 결합
$10^5$
$10^4$
$10^3$
$10^2$
$10^2$ $10^3$ $10^4$ $10^5$ $10^6$ $10^7$
발현

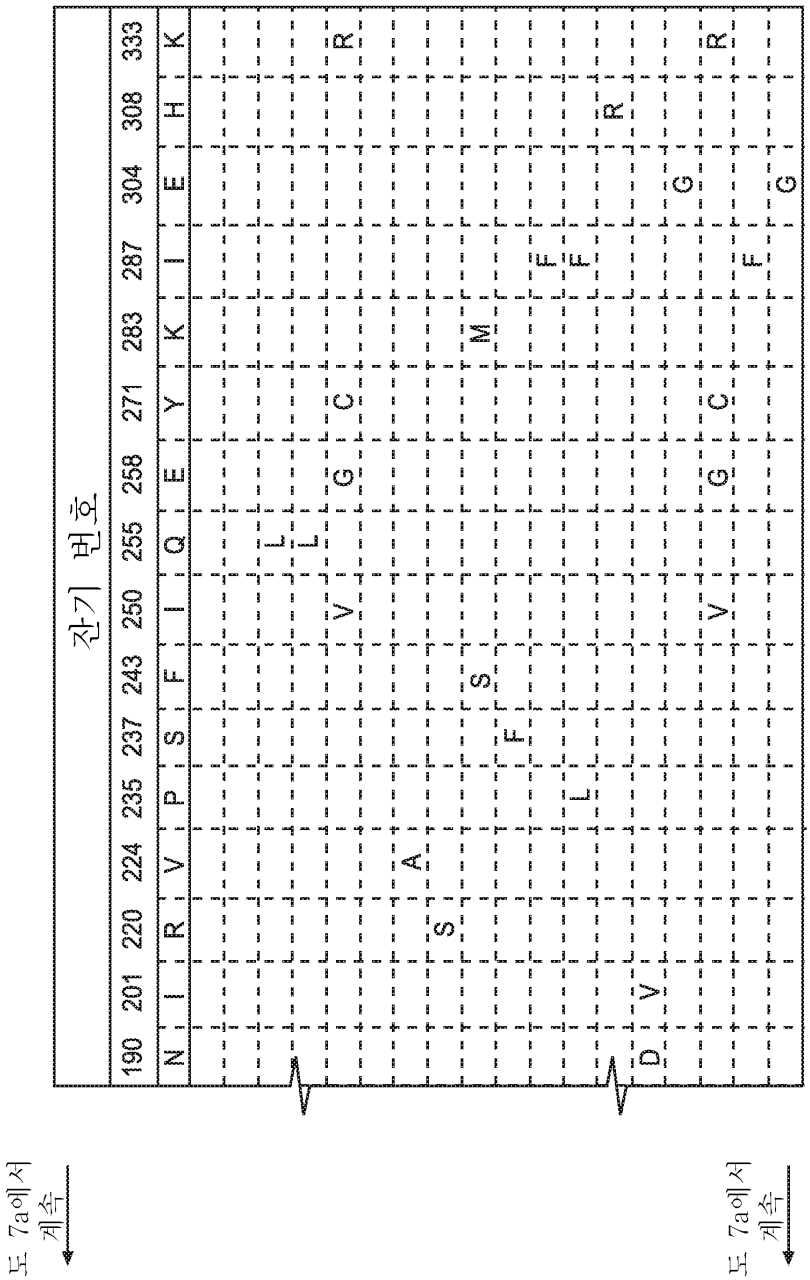
도면6e


E
gp130-Fc 결합
$10^5$
$10^4$
$10^3$
$10^2$
$10^2$ $10^3$ $10^4$ $10^5$ $10^6$ $10^7$
발현

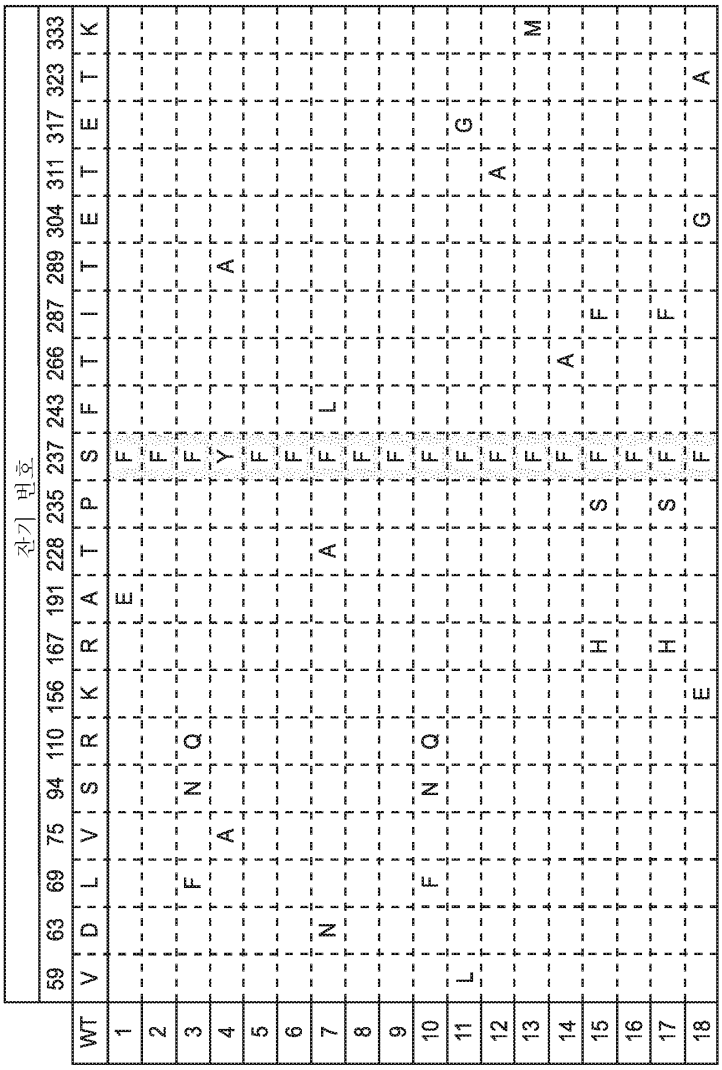
도면7a


도 7b로 계속
잔기 번호
36 61 88 107 132 140 144 146 163 166 168 169 174 184 189 189
E G A L P T T L R I Y M T S H H
WT
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
도 7b로 계속

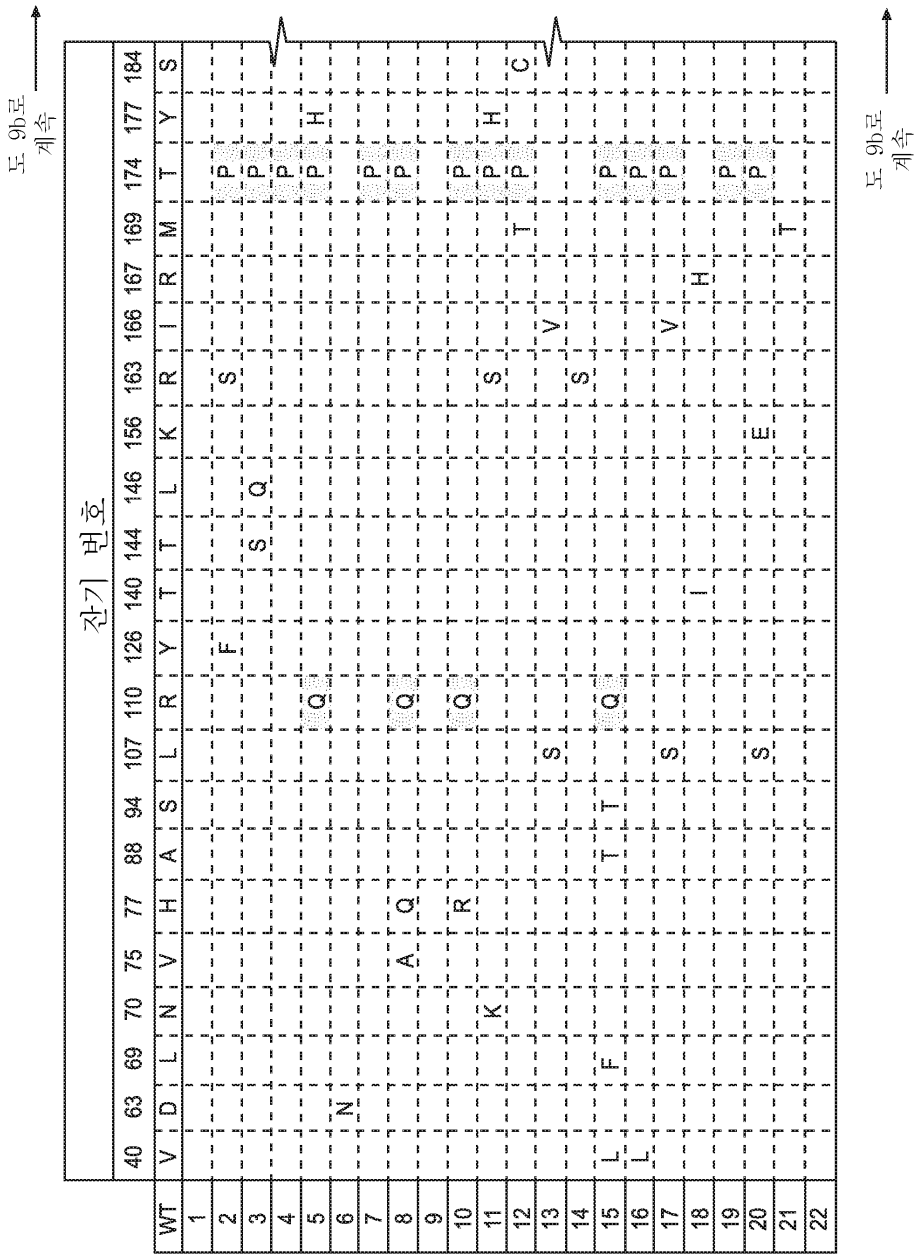
도면7b


잔기 번호
190 201 220 224 235 237 243 250 255 258 271 283 287 304 308 333
N I R V P S F I Q E Y K I E H K
D V S A L F S V L G C M F F R G G R G
도 7a에서 계속
도 7a에서 계속

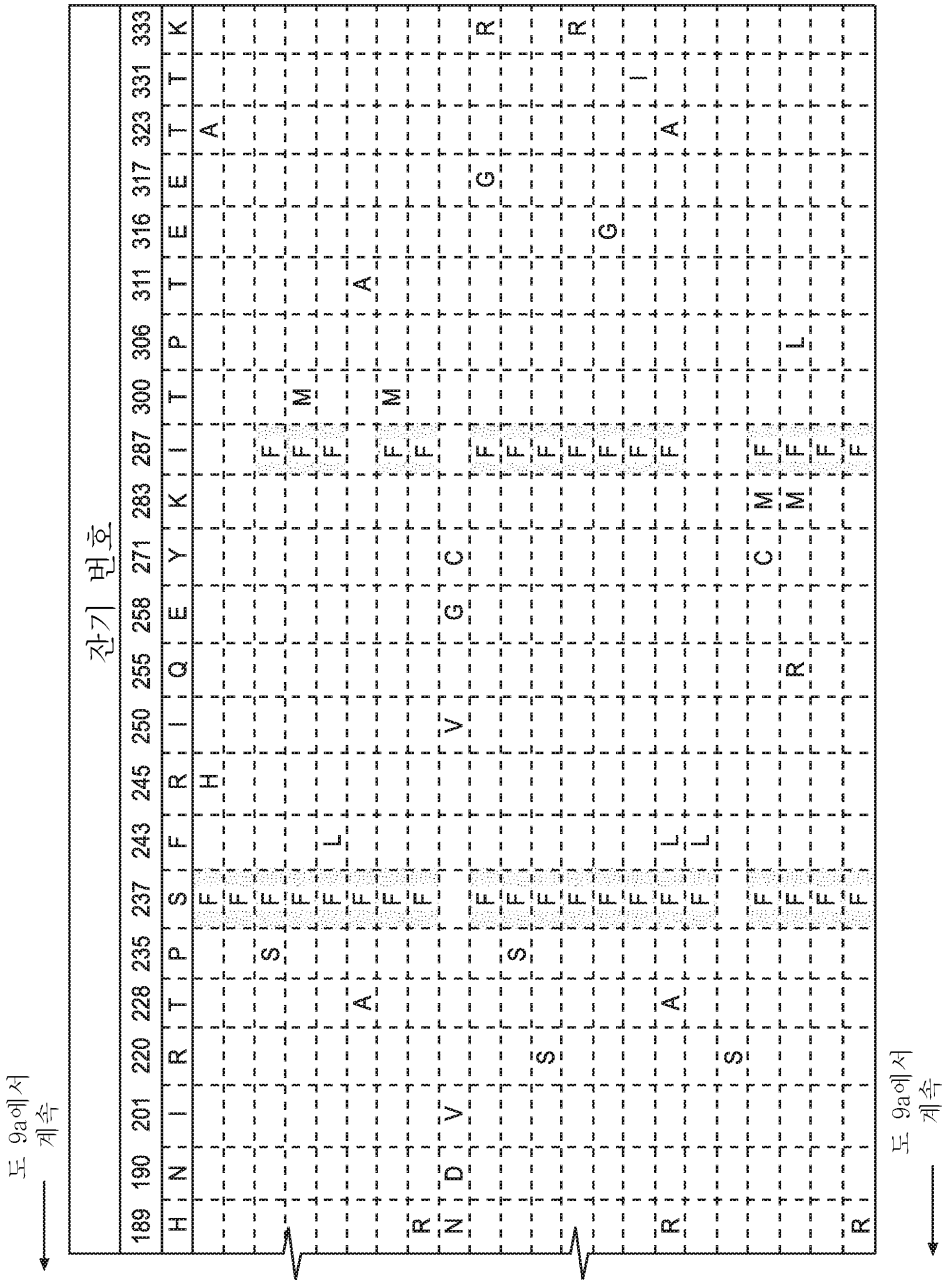
도면8


잔기 번호
59 63 69 75 94 110 156 167 191 228 235 237 243 266 287 289 304 311 317 323 333
V D L V S R K R A T P S F T I T E T E T K
WT
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

도면9a

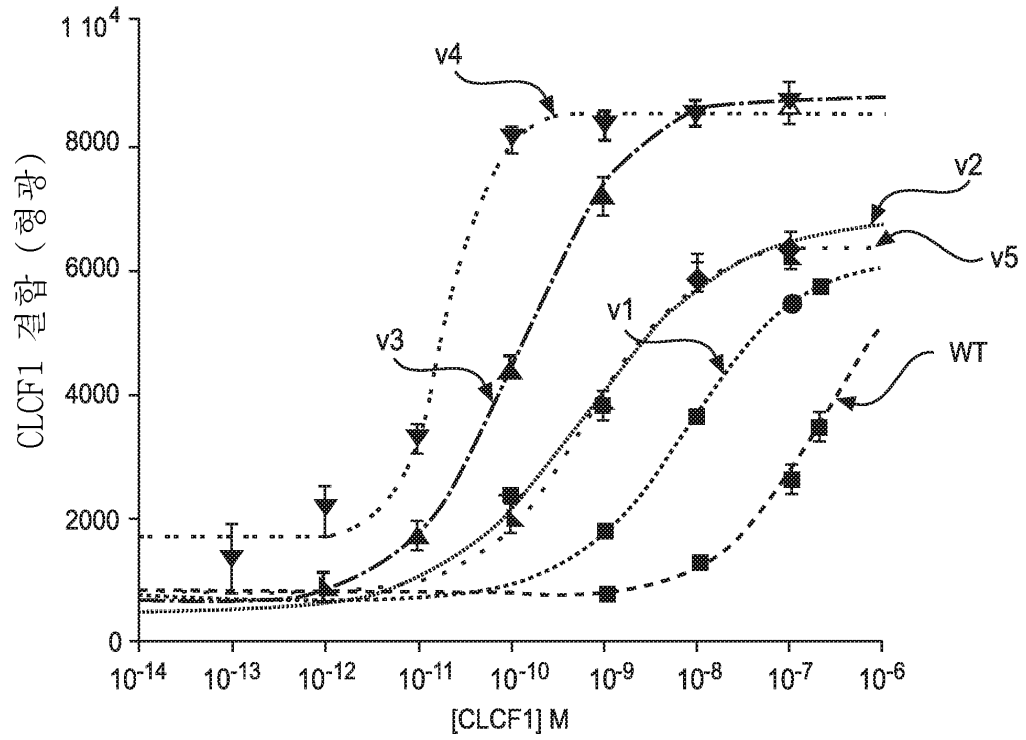

도 9b로 계속
잔기 번호
40 63 69 70 75 77 88 94 107 110 126 140 144 146 156 163 166 167 169 174 177 184
V D L N V H A S L R Y T T L K R I R M T Y S
WT 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
도 9b로 계속

도면9b


도 9a에서 계속
잔기 번호
189 190 201 220 228 235 237 243 245 250 255 258 271 283 287 300 306 311 316 317 323 331 333
H N I R T P S F R I Q E Y K I T P T E E T T K
도 9a에서 계속

도면10a

A

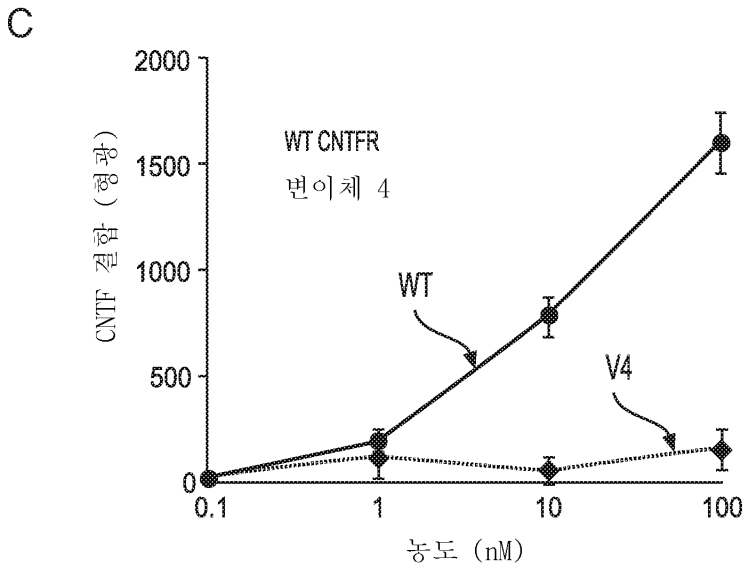



도면10b

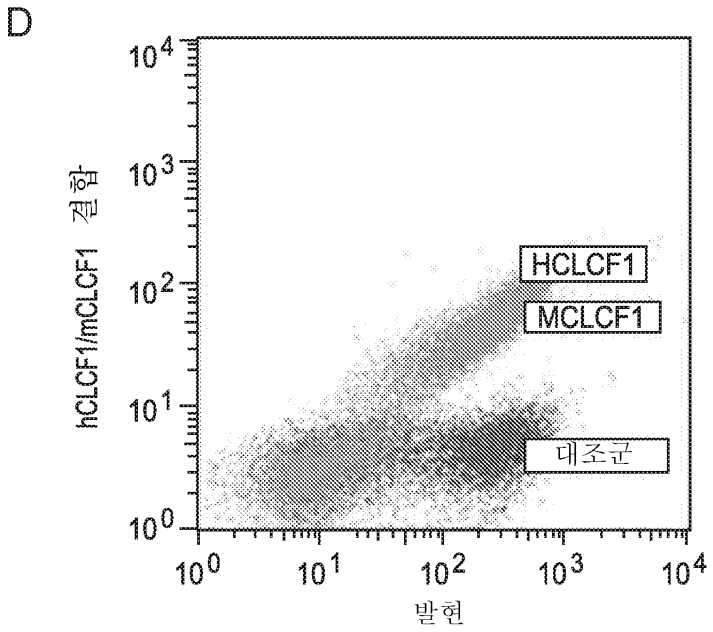
B

| | 잔기 번호 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 110 | 174 | 237 | 287 | Kd (nM) |
| WT | R | T | S | I | .. |
| 변이체 1 | | | F | | 4100 ± 400 |
| 변이체 2 | | P | F | | 890 ± 20 |
| 변이체 3 | | P | F | F | 49 ± 6 |
| 변이체 4 | Q | P | F | F | 19 ± 3 |
| 변이체 5 | | | F | F | 740 ± 70 |

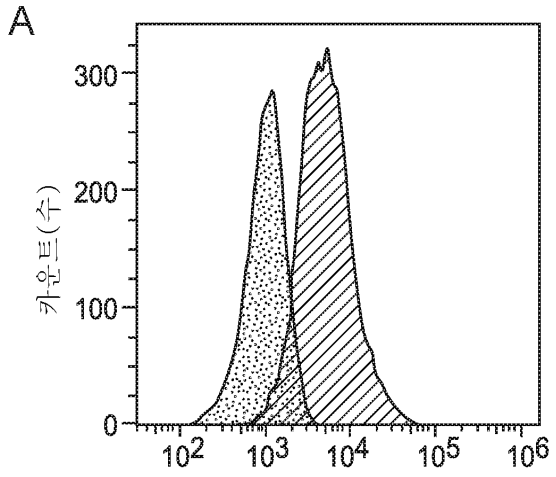
도면10c


C
2000
1500
1000
500
0
CNTF 결합 (형광)
WT CNTFR
변이체 4
WT
V4
0.1
1
10
100
농도 (nM)

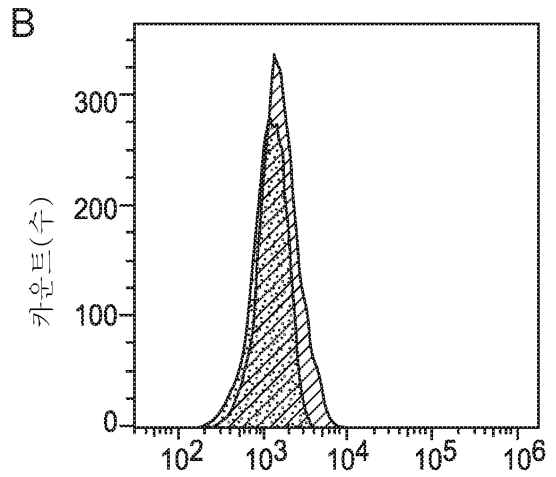
도면10d


D
$10^4$
$10^3$
$10^2$
$10^1$
$10^0$
hCLCF1/mCLCF1 결합
HCLCF1
MCLCF1
대조군
$10^0$
$10^1$
$10^2$
$10^3$
$10^4$
발현

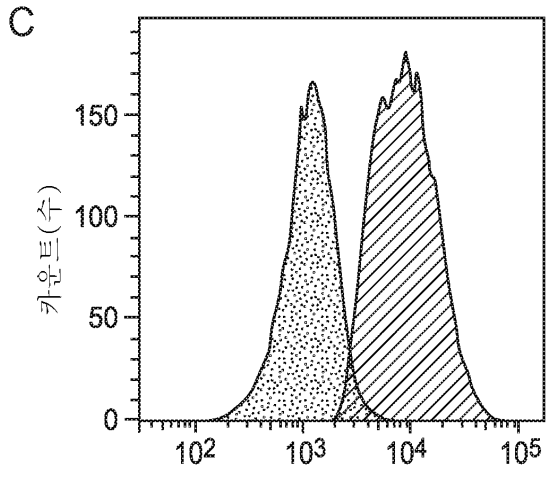
도면11a



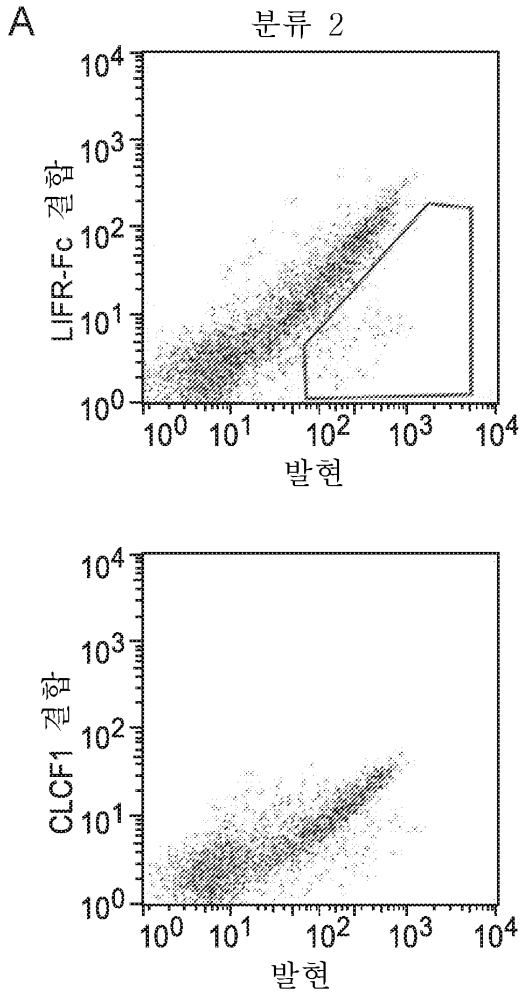

도면11b



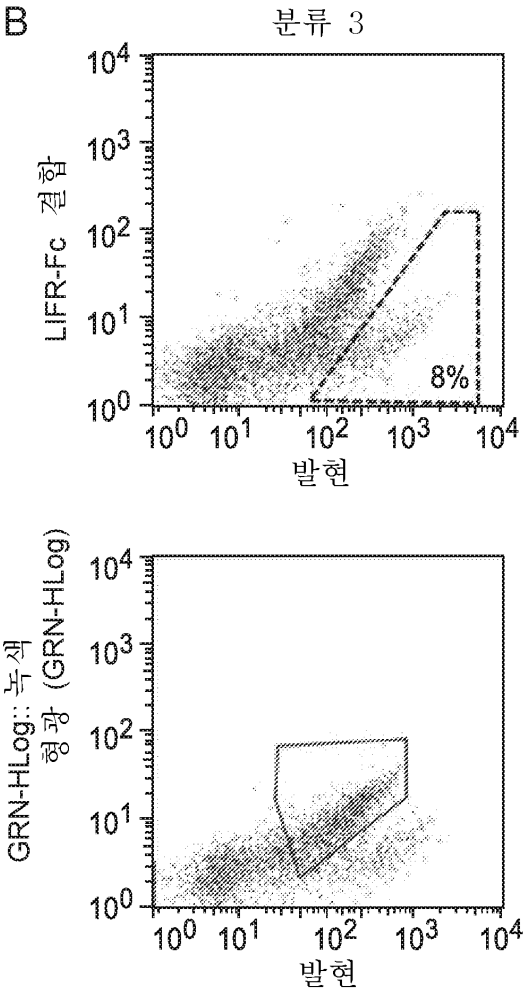

도면11c



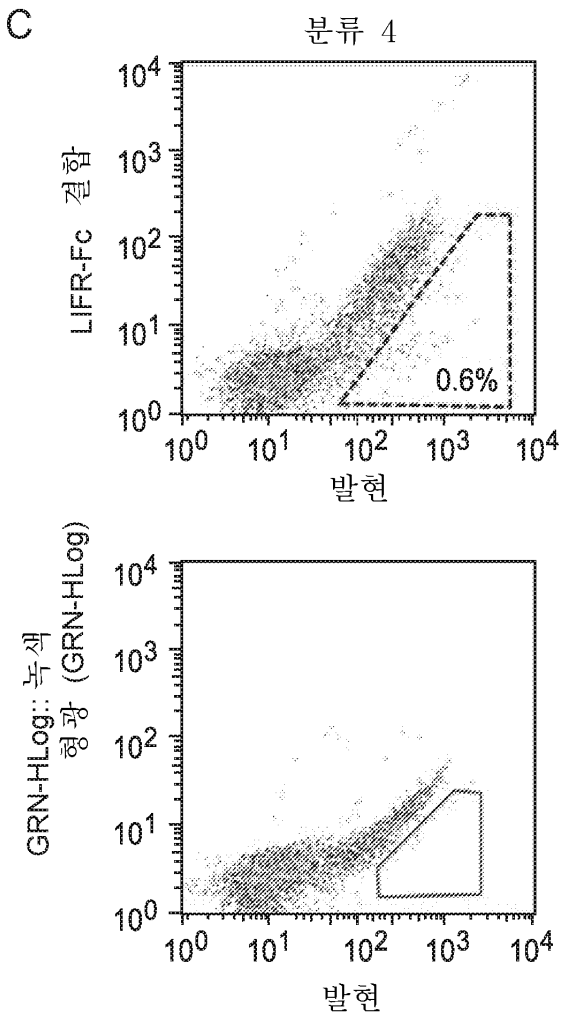
도면12a



도면12b

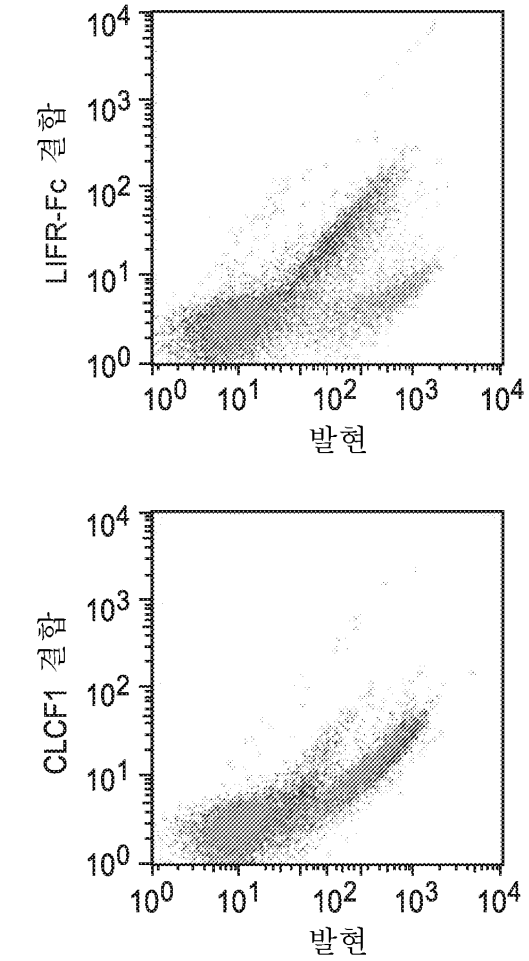


도면12c



도면12d

D

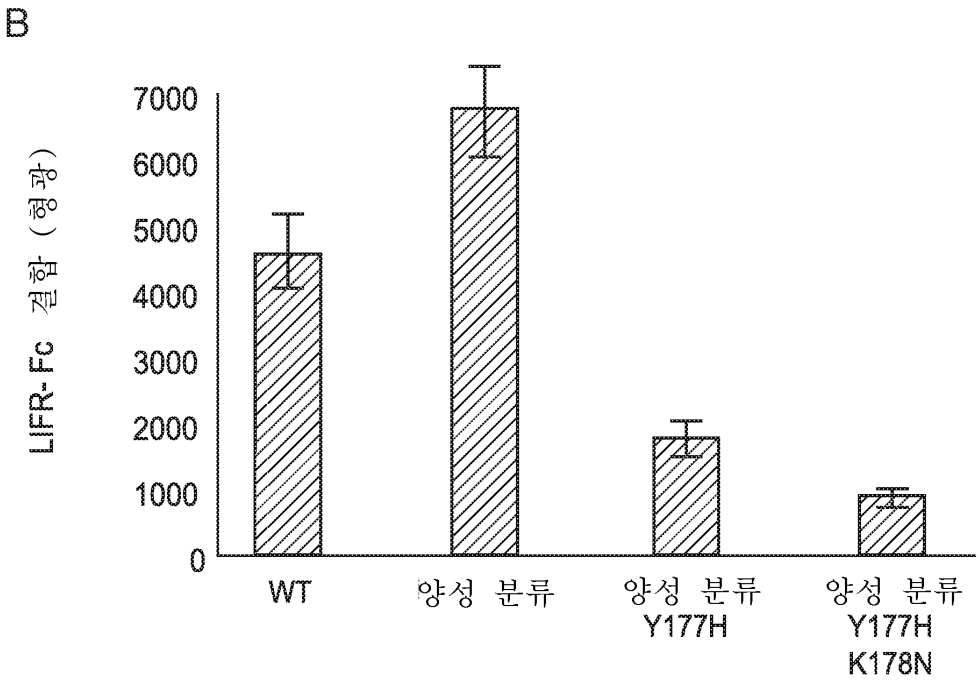



도면13a

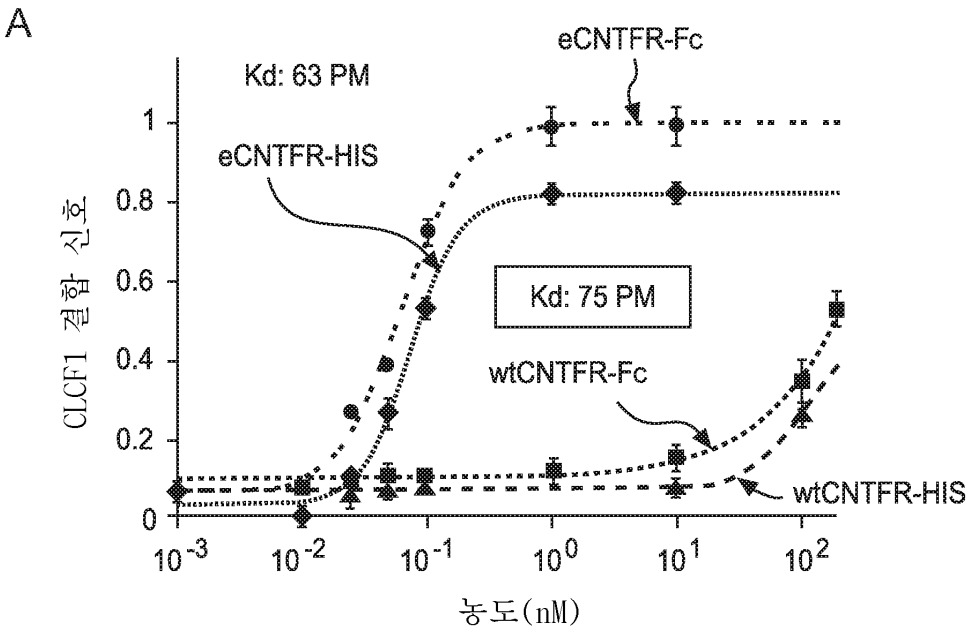
A

| | 잔기 번호 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 110 | 174 | 177 | 178 | 237 | 287 | CLCF1에 대한 Kd |
| WT | R | T | Y | K | S | I | .. |
| 양성 분류 | Q | P | | | F | F | 19 pM |
| 음성 분류 | Q | P | H | N | F | F | 14 pM |

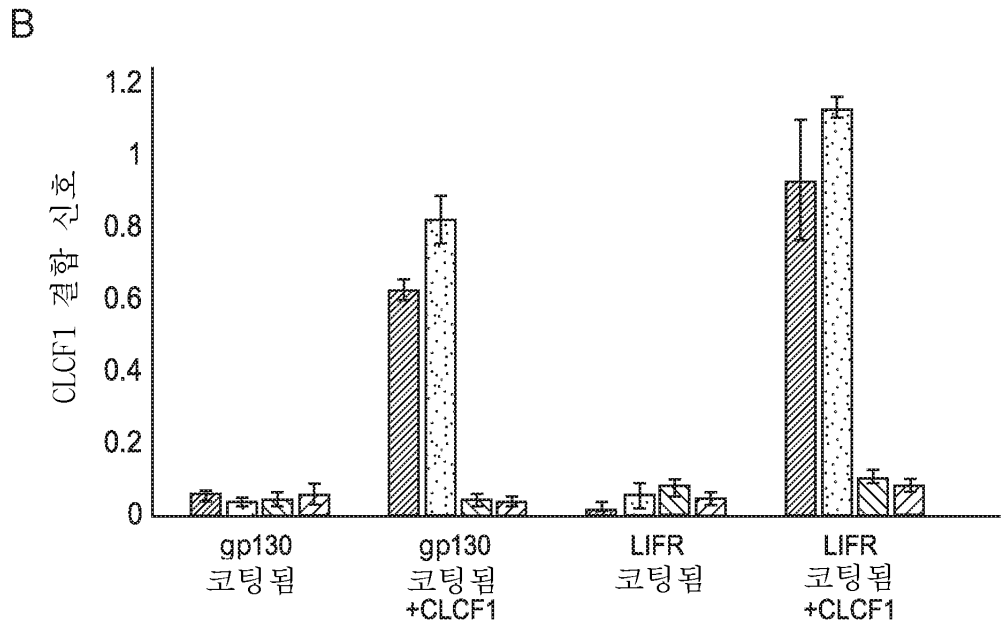
도면13b


B
LIFR-Fc 결합 (형광)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
WT
양성 분류
양성 분류 Y177H
양성 분류 Y177H K178N

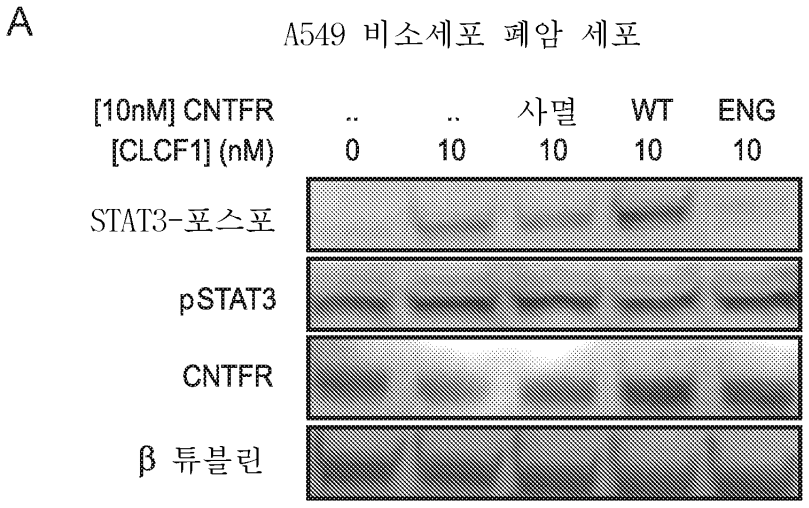
도면14a


A
eCNTFR-Fc
Kd: 63 PM
eCNTFR-HIS
CLCF1 결합 신호
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Kd: 75 PM
wtCNTFR-Fc
wtCNTFR-HIS
10-3
10-2
10-1
100
101
102
농도(nM)

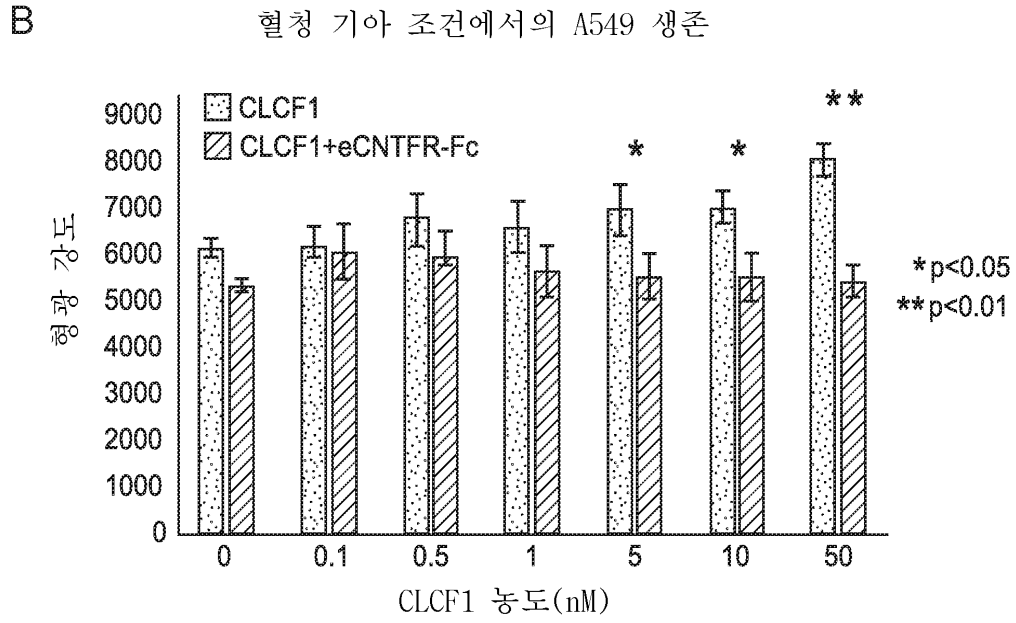
도면14b


B
CLCF1 결합 신호
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
gp130 코팅됨
gp130 코팅됨 +CLCF1
LIFR 코팅됨
LIFR 코팅됨 +CLCF1

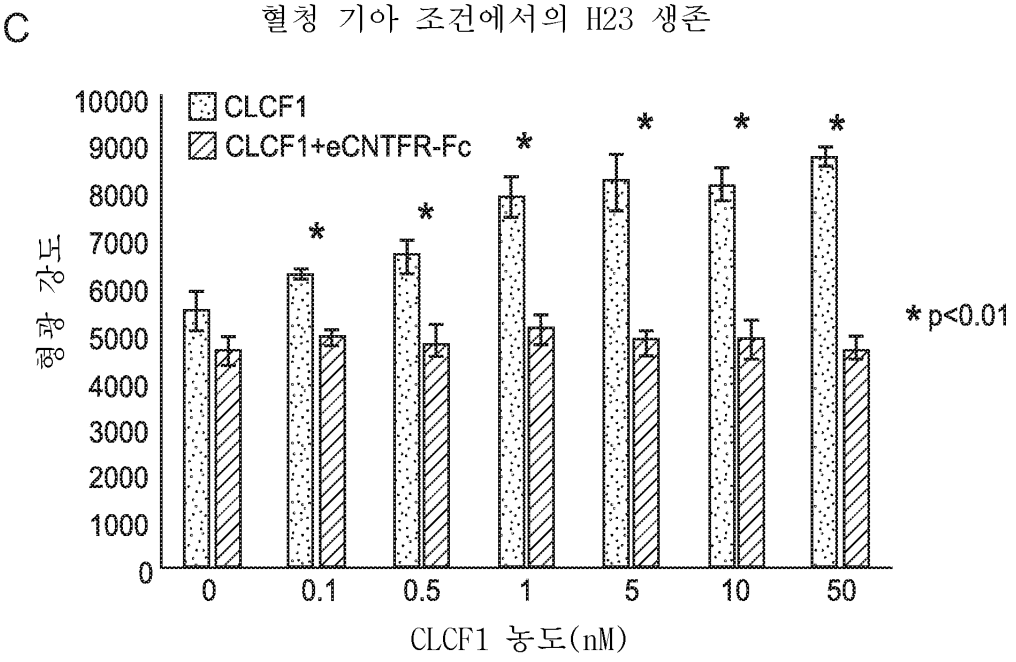
도면15a


A
A549 비소세포 폐암 세포
[10nM] CNTFR .. .. 사멸 WT ENG
[CLCF1] (nM) 0 10 10 10 10
STAT3-포스포
pSTAT3
CNTFR
β 튜블린

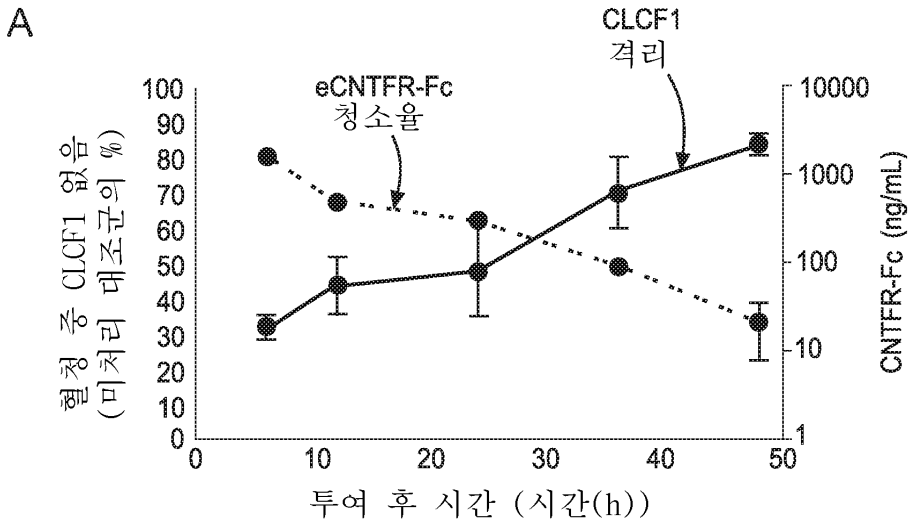
도면15b


B
혈청 기아 조건에서의 A549 생존
CLCF1
CLCF1+eCNTFR-Fc
형광 강도
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
0.1
0.5
1
5
10
50
CLCF1 농도(nM)
*
*
**
*p<0.05
**p<0.01

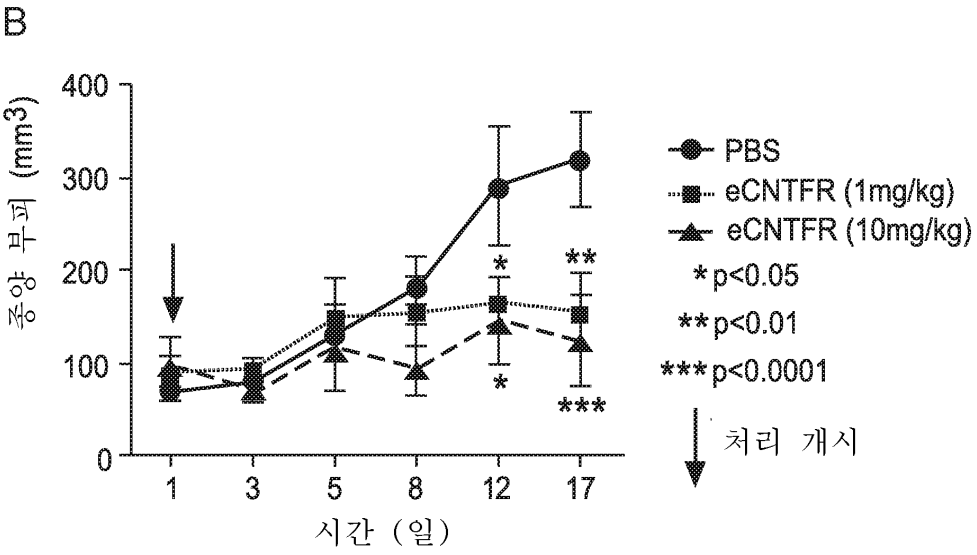
도면15c


C
혈청 기아 조건에서의 H23 생존
CLCF1
CLCF1+eCNTFR-Fc
형광 강도
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
0.1
0.5
1
5
10
50
CLCF1 농도(nM)
*
*
*
*
*
*
*p<0.01

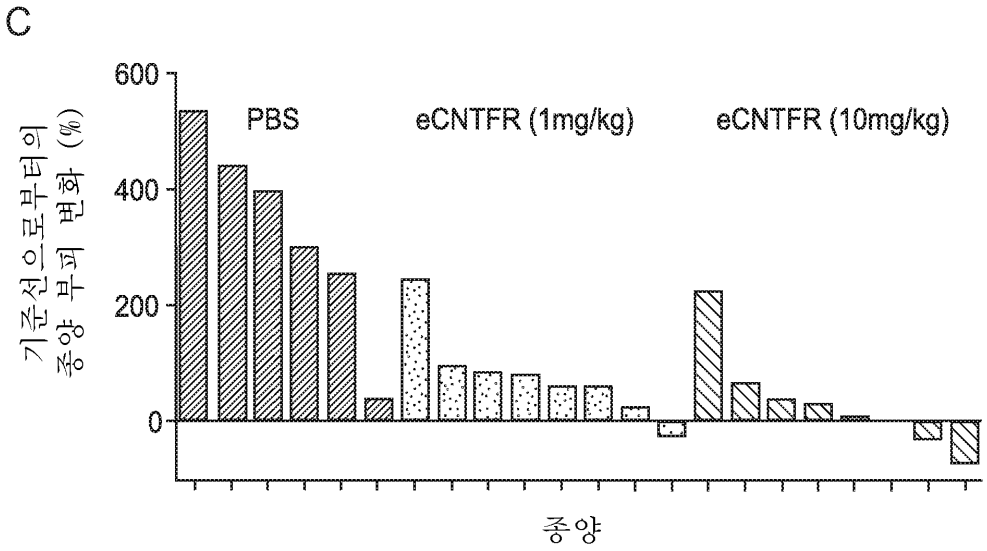
도면16a


A
CLCF1
격리
eCNTFR-Fc
청소율
혈청 중 CLCF1 없음
(미처리 대조군의 %)
CNTFR-Fc (ng/mL)
투여 후 시간 (시간(h))

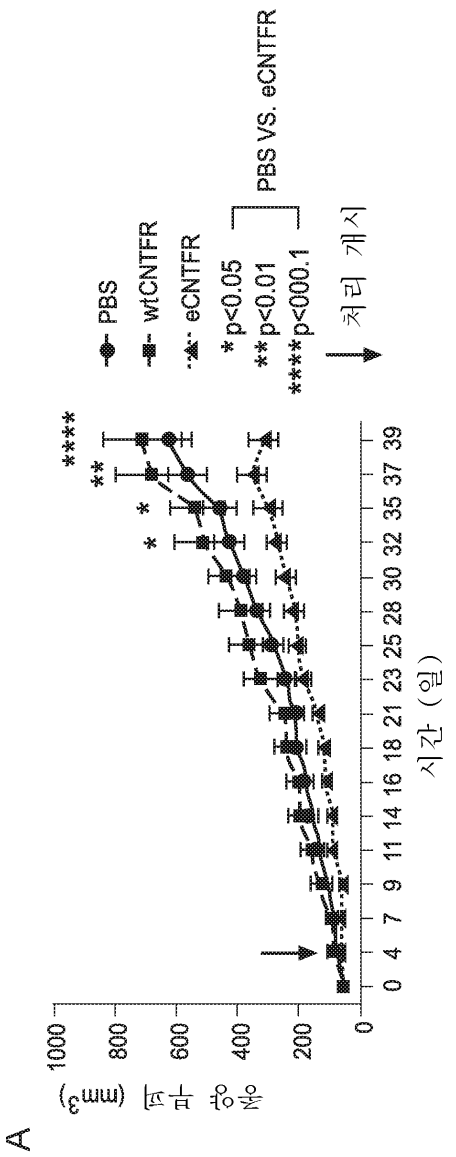
도면16b


B
종양 부피 (mm3)
시간 (일)
PBS
eCNTFR (1mg/kg)
eCNTFR (10mg/kg)
*p<0.05
**p<0.01
***p<0.0001
처리 개시

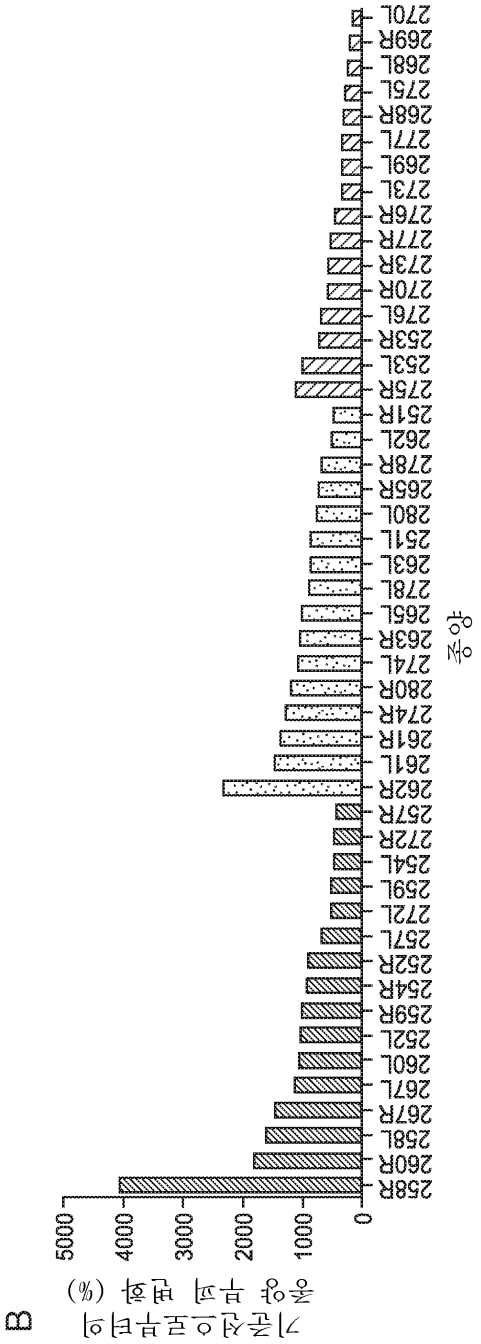
도면16c


C
600
400
200
0
PBS
eCNTFR (1mg/kg)
eCNTFR (10mg/kg)
기준선으로부터의
종양 부피 변화 (%)
종양

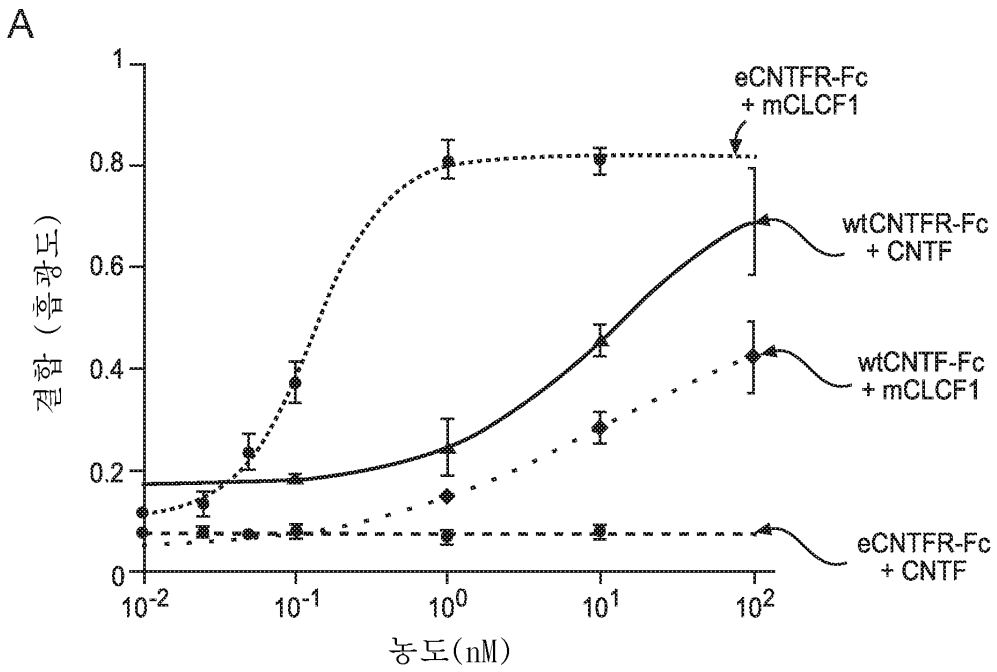
도면17a


A
종양 부피 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0 4 7 9 11 14 16 18 21 23 25 28 30 32 35 37 39
시간 (일)
처리 개시
PBS
wtCNTFR
eCNTFR
* p<0.05
** p<0.01
**** p<000.1
PBS VS. eCNTFR
*
*
**
****

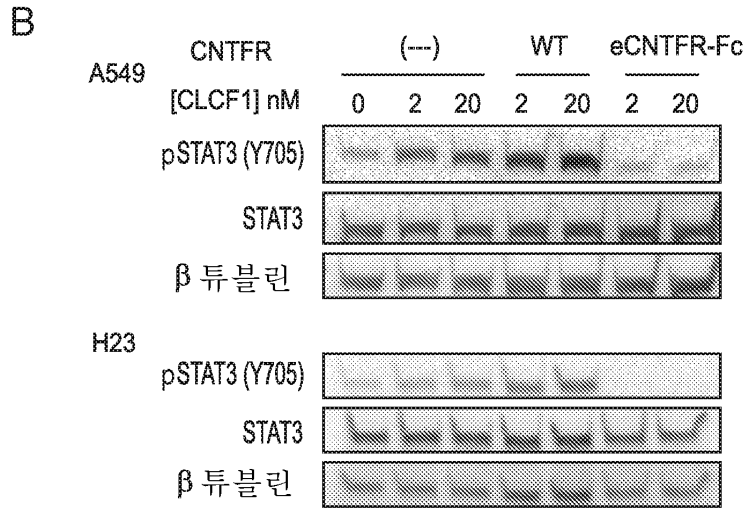
도면17b


B
기준선으로부터의
중앙 부피 변화 (%)
5000
4000
3000
2000
1000
0
중앙
258R
260R
258L
267R
267L
260L
252L
259R
254R
252R
257L
272L
259L
254L
272R
257R
262R
261L
261R
274R
280R
274L
263R
265L
278L
263L
251L
280L
265R
278R
262L
251R
275R
253L
253R
276L
270R
273R
277R
276R
273L
269L
277L
268R
275L
268L
269R
270L

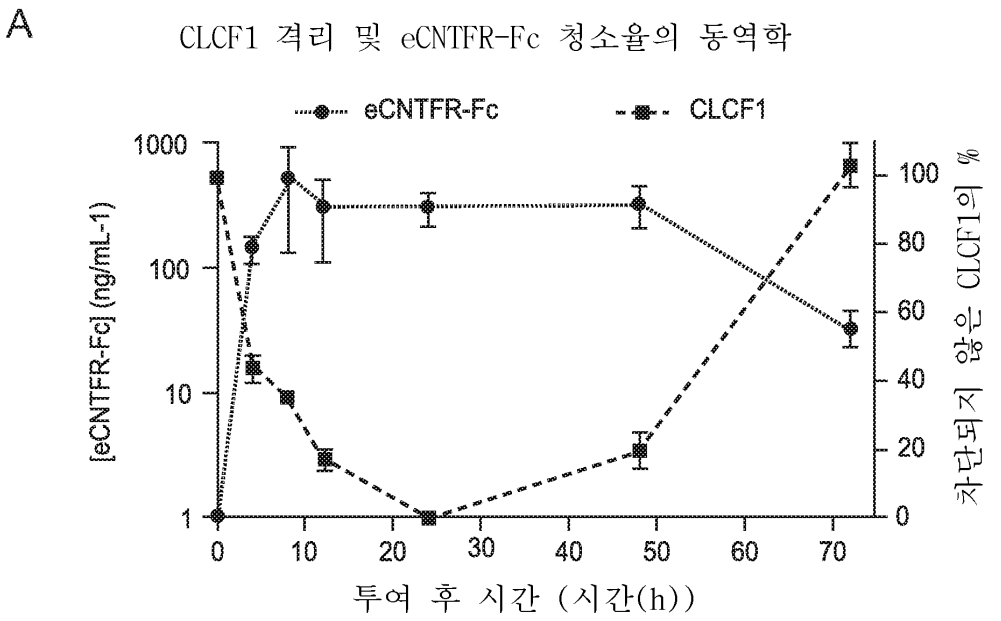
도면18a


A
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
결합 (흡광도)
eCNTFR-Fc
+ mCLCF1
wtCNTFR-Fc
+ CNTF
wtCNTF-Fc
+ mCLCF1
eCNTFR-Fc
+ CNTF
10-2
10-1
100
101
102
농도(nM)

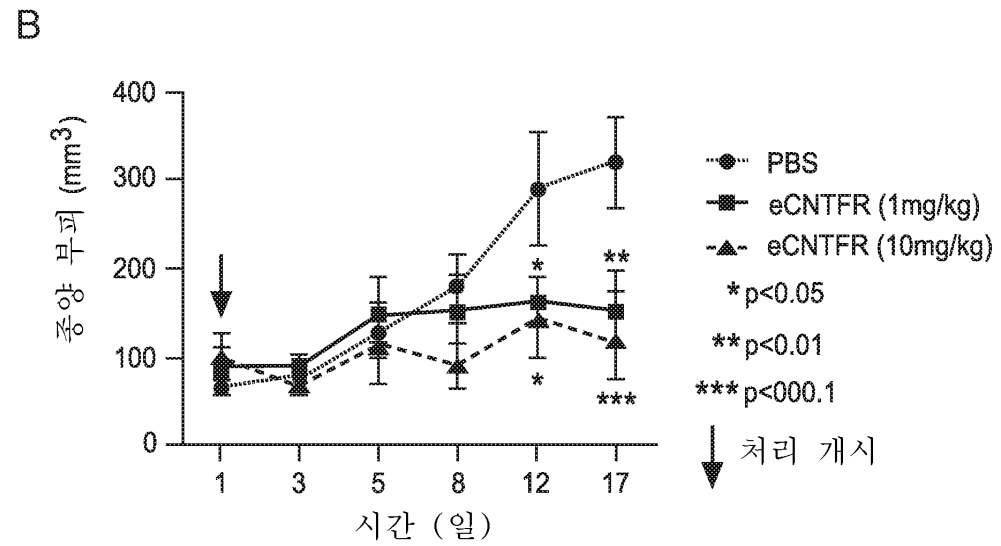
도면18b


B
A549
CNTFR
(---)
WT
eCNTFR-Fc
[CLCF1] nM
0
2
20
2
20
2
20
pSTAT3 (Y705)
STAT3
β 튜블린
H23
pSTAT3 (Y705)
STAT3
β 튜블린

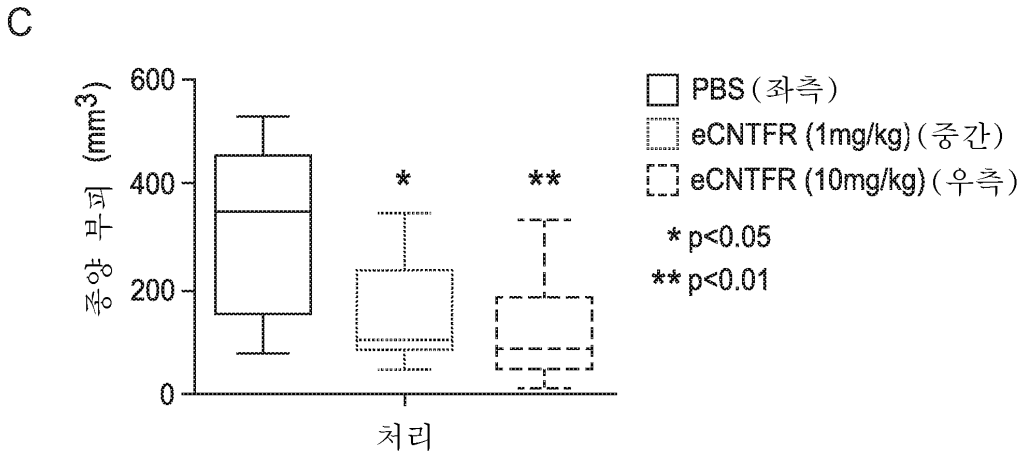
도면19a


A
CLCF1 격리 및 eCNTFR-Fc 청소율의 동역학
eCNTFR-Fc
CLCF1
[eCNTFR-Fc] (ng/mL-1)
차단되지 않은 CLCF1의 %
투여 후 시간 (시간(h))

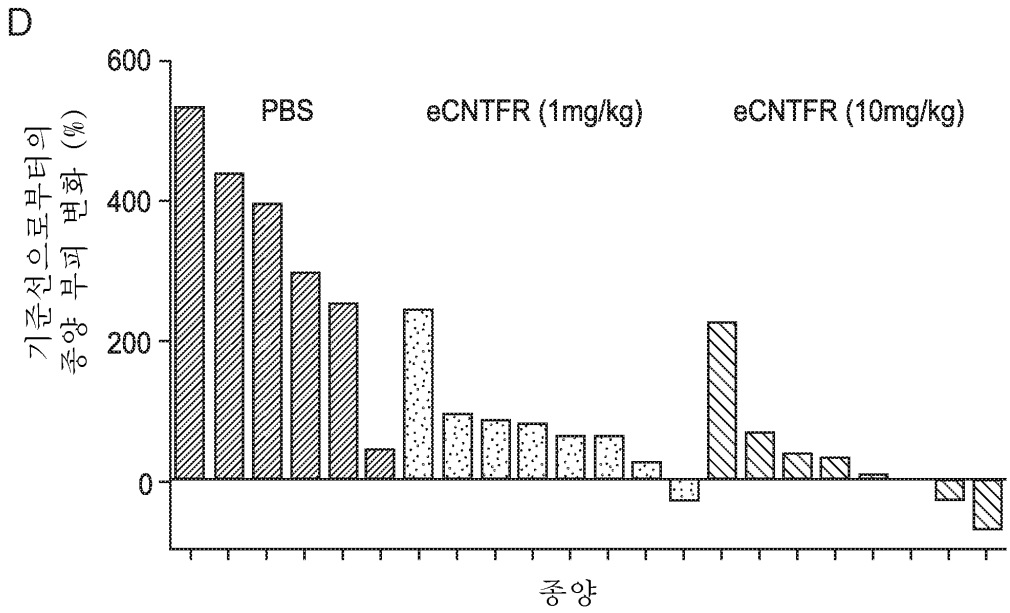
도면19b


B
종양 부피 (mm3)
시간 (일)
PBS
eCNTFR (1mg/kg)
eCNTFR (10mg/kg)
* p<0.05
** p<0.01
*** p<000.1
처리 개시

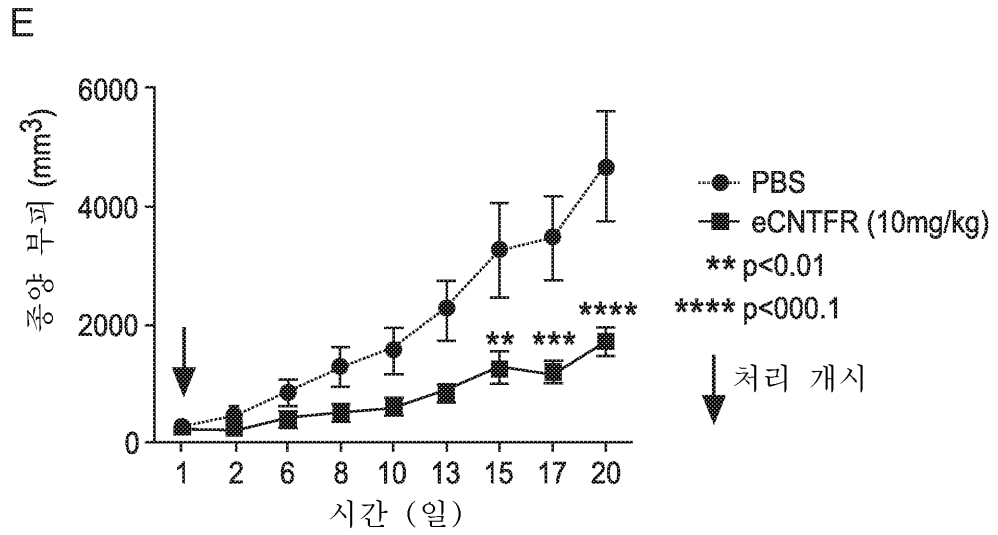
도면19c


C
600
400
200
0
종양 부피 (mm3)
*
**
처리
PBS (좌측)
eCNTFR (1mg/kg) (중간)
eCNTFR (10mg/kg) (우측)
* p<0.05
** p<0.01

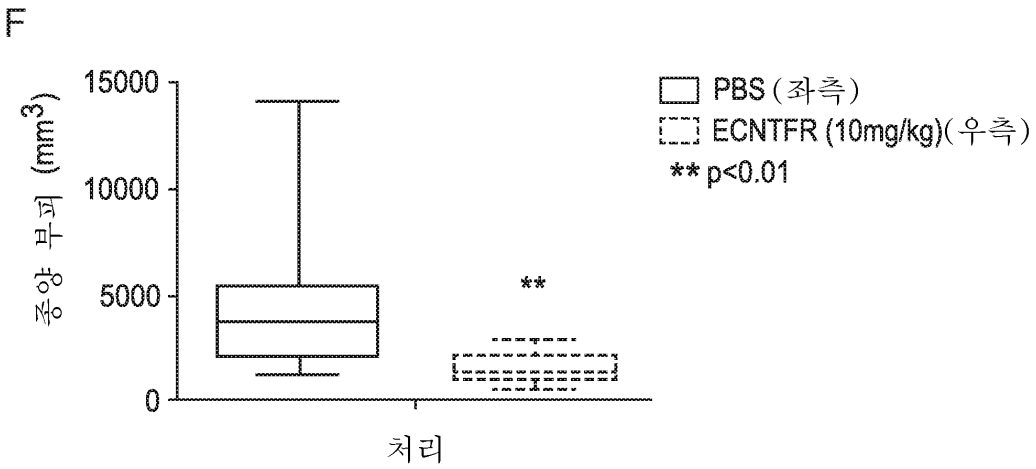
도면19d


D
600
400
200
0
기준선으로부터의
종양 부피 변화 (%)
PBS
eCNTFR (1mg/kg)
eCNTFR (10mg/kg)
종양

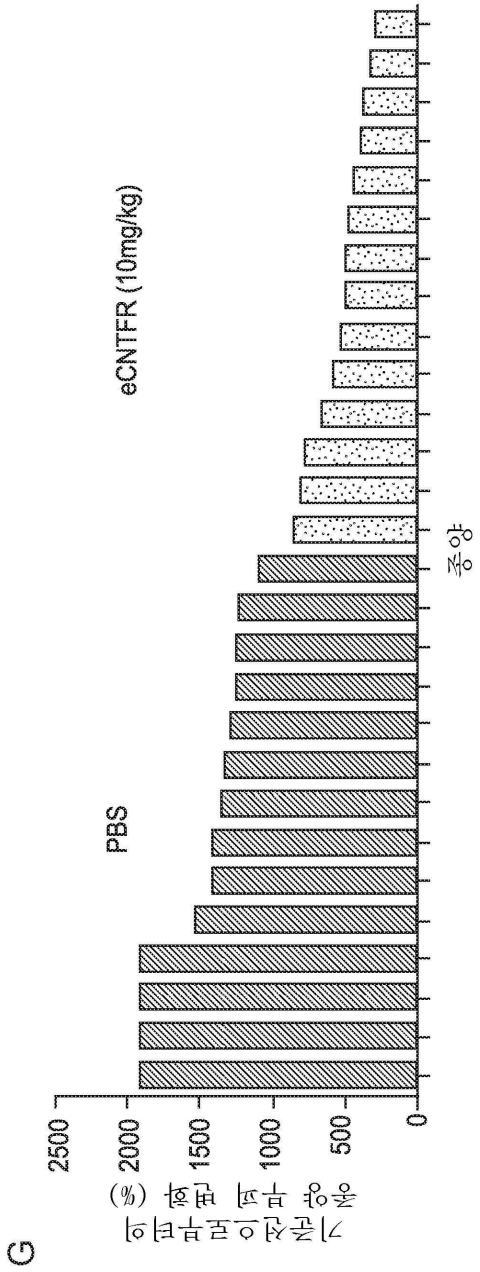
도면19e


E
6000
4000
2000
0
종양 부피 (mm3)
1 2 6 8 10 13 15 17 20
시간 (일)
**
***
****
PBS
eCNTFR (10mg/kg)
** p<0.01
**** p<000.1
처리 개시

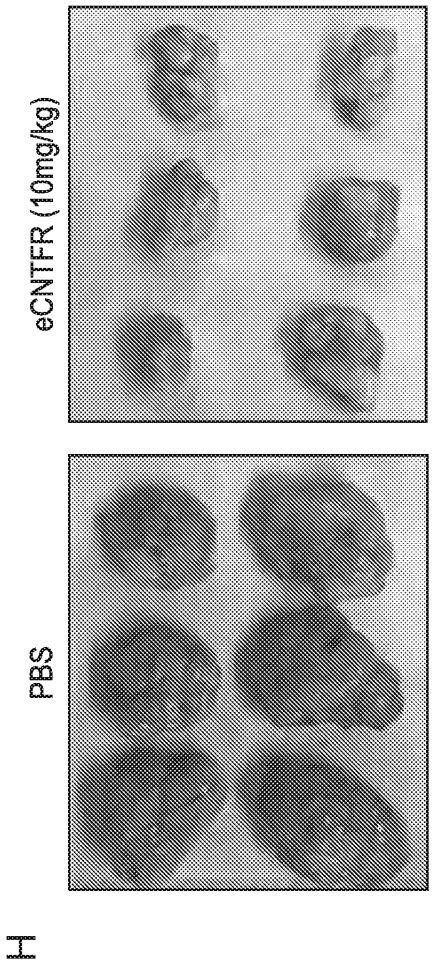
도면19f


F
15000
10000
5000
0
종양 부피 (mm3)
**
처리
PBS (좌측)
ECNTFR (10mg/kg)(우측)
** p<0.01

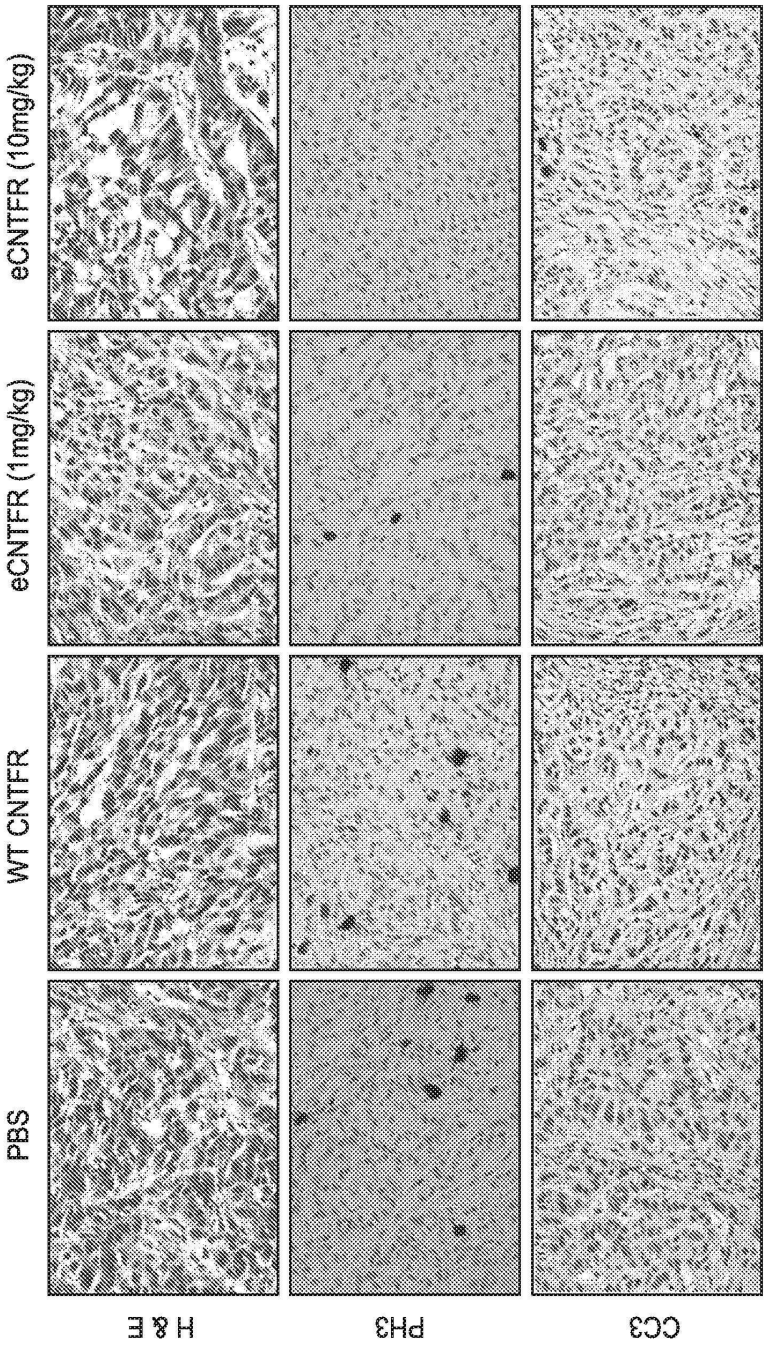
도면19g


G
기준선으로부터의
종양 부피 변화 (%)
2500
2000
1500
1000
500
0
PBS
eCNTFR (10mg/kg)
종양

도면19h

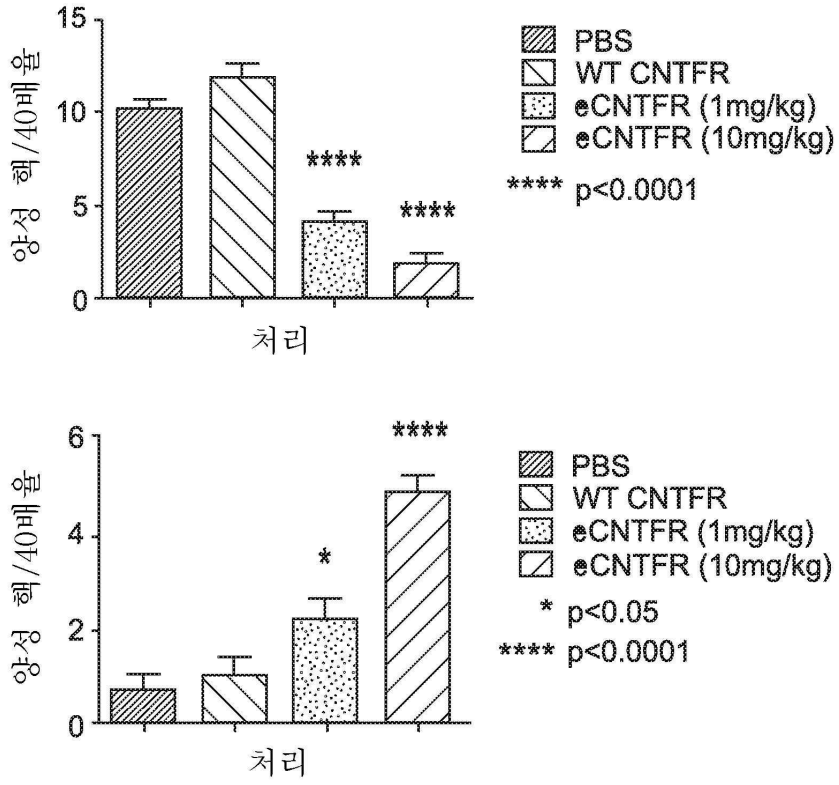


도면19ia

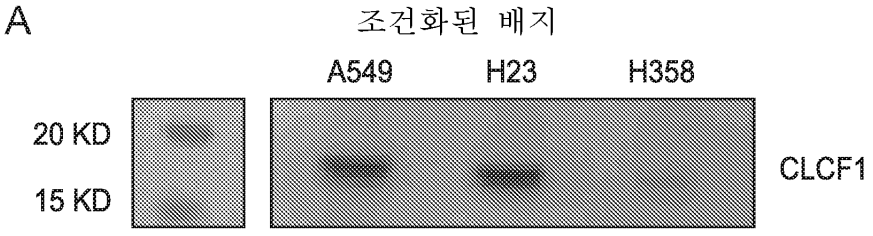


도면19ib

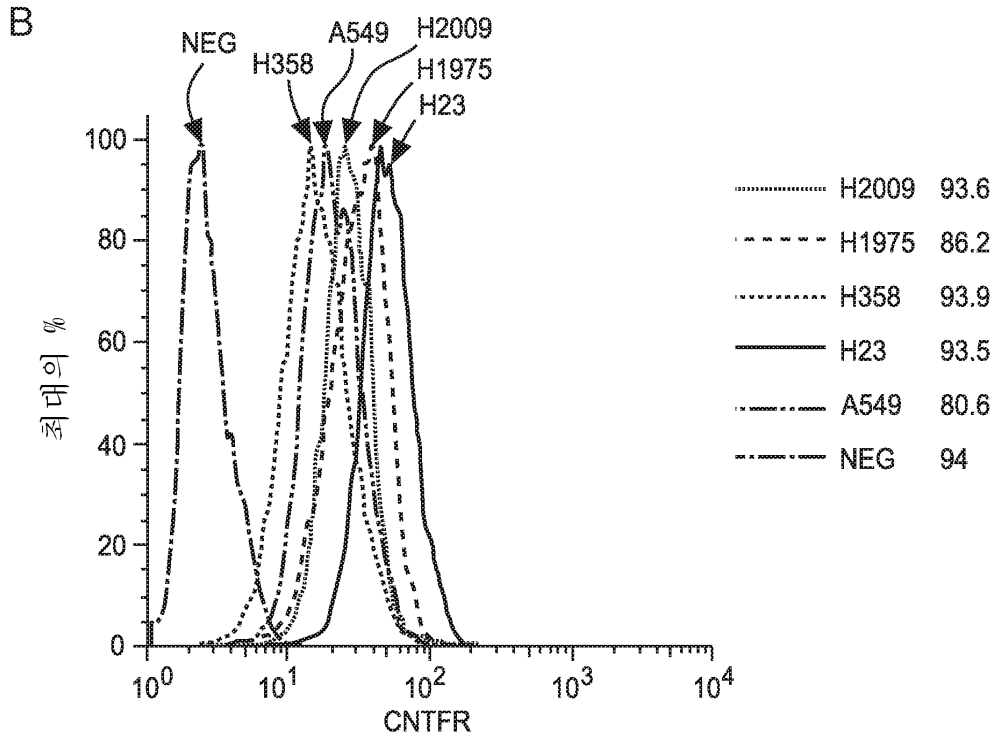
I



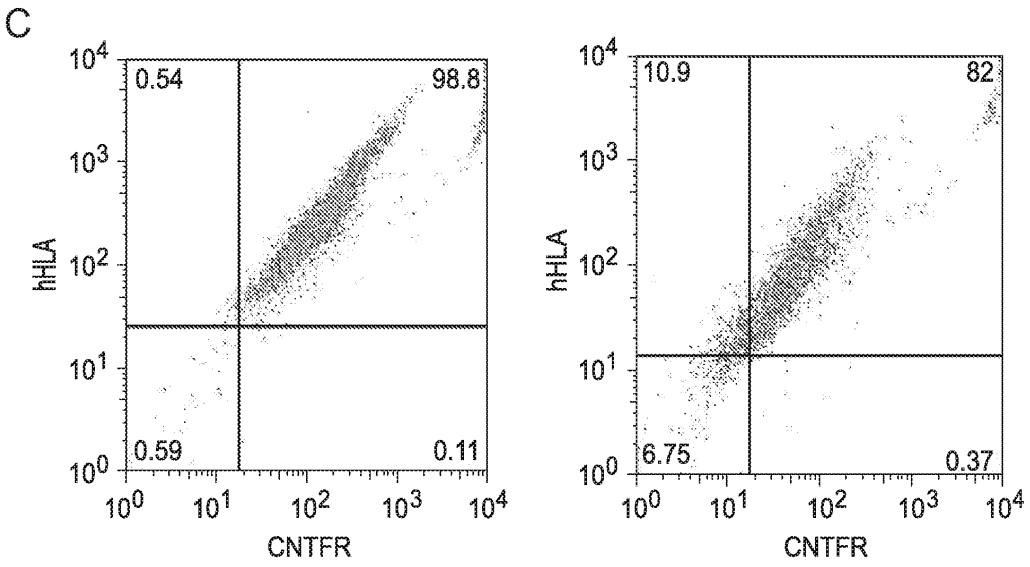

도면20a



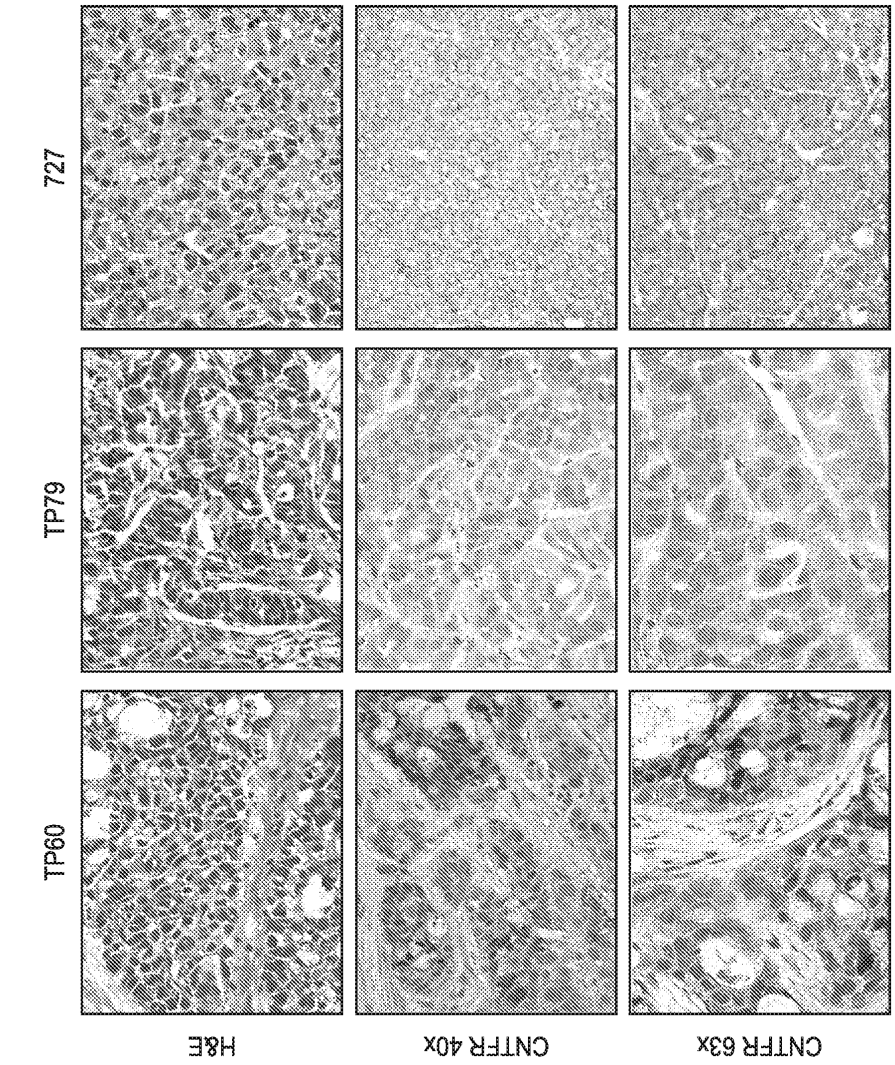
도면20b


B
NEG
H358
A549
H2009
H1975
H23
100
80
60
40
20
0
최대의 %
$10^0$
$10^1$
$10^2$
$10^3$
$10^4$
CNTFR
H2009 93.6
H1975 86.2
H358 93.9
H23 93.5
A549 80.6
NEG 94

도면20c


C
$10^4$
$10^3$
$10^2$
$10^1$
$10^0$
hHLA
0.54
98.8
0.59
0.11
CNTFR
10.9
82
6.75
0.37

도면20d




D

## 서 열 목 록

<110> The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior University

<120> CILIARY NEUROTROPHIC FACTOR RECEPTOR LIGAND-BINDING AGENTS AND METHODS OF USING THE SAME

<130> STAN-1370WO

<150> US 62/430,757

<151> 2016-12-06

<150> US 62/481,027

<151> 2017-04-03

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 372

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ala Pro Val Pro Trp Ala Cys Cys Ala Val Leu Ala Ala Ala
1 5 10 15

Ala Ala Val Val Tyr Ala Gln Arg His Ser Pro Gln Glu Ala Pro His
20 25 30

Val Gln Tyr Glu Arg Leu Gly Ser Asp Val Thr Leu Pro Cys Gly Thr
35 40 45

Ala Asn Trp Asp Ala Ala Val Thr Trp Arg Val Asn Gly Thr Asp Leu
50 55 60

Ala Pro Asp Leu Leu Asn Gly Ser Gln Leu Val Leu His Gly Leu Glu
65 70 75 80

Leu Gly His Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Phe His Arg Asp Ser Trp His

85 90 95

Leu Arg His Gln Val Leu Leu His Val Gly Leu Pro Pro Arg Glu Pro
100 105 110

Val Leu Ser Cys Arg Ser Asn Thr Tyr Pro Lys Gly Phe Tyr Cys Ser
115 120 125

Trp His Leu Pro Thr Pro Thr Tyr Ile Pro Asn Thr Phe Asn Val Thr
130 135 140

Val Leu His Gly Ser Lys Ile Met Val Cys Glu Lys Asp Pro Ala Leu
145 150 155 160

Lys Asn Arg Cys His Ile Arg Tyr Met His Leu Phe Ser Thr Ile Lys
165 170 175

Tyr Lys Val Ser Ile Ser Val Ser Asn Ala Leu Gly His Asn Ala Thr
180 185 190

Ala Ile Thr Phe Asp Glu Phe Thr Ile Val Lys Pro Asp Pro Pro Glu
195 200 205

Asn Val Val Ala Arg Pro Val Pro Ser Asn Pro Arg Arg Leu Glu Val

210 215 220

Thr Trp Gln Thr Pro Ser Thr Trp Pro Asp Pro Glu Ser Phe Pro Leu

225 230 235 240

Lys Phe Phe Leu Arg Tyr Arg Pro Leu Ile Leu Asp Gln Trp Gln His

245 250 255

Val Glu Leu Ser Asp Gly Thr Ala His Thr Ile Thr Asp Ala Tyr Ala

260 265 270

Gly Lys Glu Tyr Ile Ile Gln Val Ala Ala Lys Asp Asn Glu Ile Gly

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Ser Thr Thr Ser Ser Leu Ala Pro Pro Pro Thr Thr Lys Ile Cys Asp

325 330 335

Pro Gly Glu Leu Gly Ser Gly Gly Gly Pro Ser Ala Pro Phe Leu Val

340 345 350

Ser Val Pro Ile Thr Leu Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Ser

355 360 365

Ser Leu Leu Ile

370

<210> 2

<211> 342

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 2

Met Ala Ala Pro Val Pro Trp Ala Cys Cys Ala Val Leu Ala Ala Ala

1 5 10 15

Ala Ala Val Val Tyr Ala Gln Arg His Ser Pro Gln Glu Ala Pro His

20 25 30

Val Gln Tyr Glu Arg Leu Gly Ser Asp Val Thr Leu Pro Cys Gly Thr

```
          35                  40                  45
Ala Asn Trp Asp Ala Ala Val Thr Trp Arg Val Asn Gly Thr Asp Leu

     50                  55                  60
Ala Pro Asp Leu Leu Asn Gly Ser Gln Leu Val Leu His Gly Leu Glu
 65                  70                  75                  80
Leu Gly His Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Phe His Arg Asp Ser Trp His
                 85                  90                  95
Leu Arg His Gln Val Leu Leu His Val Gly Leu Pro Pro Gln Glu Pro
            100                 105                 110
Val Leu Ser Cys Arg Ser Asn Thr Tyr Pro Lys Gly Phe Tyr Cys Ser
        115                 120                 125

Trp His Leu Pro Thr Pro Thr Tyr Ile Pro Asn Thr Phe Asn Val Thr
    130                 135                 140
Val Leu His Gly Ser Lys Ile Met Val Cys Glu Lys Asp Pro Ala Leu
145                 150                 155                 160
Lys Asn Arg Cys His Ile Arg Tyr Met His Leu Phe Ser Pro Ile Lys
                165                 170                 175
His Asn Val Ser Ile Ser Val Ser Asn Ala Leu Gly His Asn Ala Thr
            180                 185                 190
Ala Ile Thr Phe Asp Glu Phe Thr Ile Val Lys Pro Asp Pro Pro Glu

        195                 200                 205
Asn Val Val Ala Arg Pro Val Pro Ser Asn Pro Arg Arg Leu Glu Val
    210                 215                 220
Thr Trp Gln Thr Pro Ser Thr Trp Pro Asp Pro Glu Phe Phe Pro Leu
225                 230                 235                 240
Lys Phe Phe Leu Arg Tyr Arg Pro Leu Ile Leu Asp Gln Trp Gln His
                245                 250                 255
Val Glu Leu Ser Asp Gly Thr Ala His Thr Ile Ala Ala Ala Tyr Ala
            260                 265                 270

Gly Lys Glu Tyr Ile Ile Gln Val Ala Ala Lys Asp Asn Glu Phe Gly
        275                 280                 285
```

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

340

<210> 3
<211> 227
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly Lys

225

<210> 4

<211> 578

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Sequence

<400> 4

Met Ala Ala Pro Val Pro Trp Ala Cys Cys Ala Val Leu Ala Ala Ala

1 5 10 15

Ala Ala Val Val Tyr Ala Gln Arg His Ser Pro Gln Glu Ala Pro His

20 25 30

Val Gln Tyr Glu Arg Leu Gly Ser Asp Val Thr Leu Pro Cys Gly Thr

35 40 45

Ala Asn Trp Asp Ala Ala Val Thr Trp Arg Val Asn Gly Thr Asp Leu

50 55 60

Ala Pro Asp Leu Leu Asn Gly Ser Gln Leu Val Leu His Gly Leu Glu

65 70 75 80

Leu Gly His Ser Gly Leu Tyr Ala Cys Phe His Arg Asp Ser Trp His

85 90 95

Leu Arg His Gln Val Leu Leu His Val Gly Leu Pro Pro Gln Glu Pro

100 105 110

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

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

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

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

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

370 375 380

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

450 455 460
Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
465 470 475 480
Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu
485 490 495
Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp
500 505 510
Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val
515 520 525

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu
530 535 540
Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His
545 550 555 560
Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro
565 570 575
Gly Lys