



공개특허 10-2019-0115053

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2019-0115053
(43) 공개일자 2019년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 403/14 (2006.01) *A61K 31/506* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07D 403/14 (2013.01)
A61K 31/506 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7025984

(22) 출원일자(국제) 2018년02월08일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2019년09월04일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2018/050783

(87) 국제공개번호 WO 2018/146612

국제공개일자 2018년08월16일

(30) 우선권주장

62/457,219 2017년02월10일 미국(US)

(71) 출원인
노파르티스 아게
스위스 4002 바젤
팔로바이오파마, 에스.엘.
스페인 바르셀로나 이-08302 마타로 오피시나 1
플란타 4 32 아베니다 어니스트 루치 3 테크노캠
피스 마타로

(72) 발명자

빌릭, 사넬라

미국 07936-1080 노스 캐롤라이나주 이스트 하노
버 원 헬쓰 플라자 노바티스 파마슈티칼스 코포레
이션

카마초 고메즈, 후안 알베르토

스페인 08302 마타로 바르셀로나 티씨엠2-0207 아
베니다 어니스트 루치 32 팔로바이오파마
에스.엘.

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-파라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-파라졸-4-올 및 암 치료에 있어
서의 이의 용도

(57) 요 약

본 발명은 아데노신 A2a 수용체의 활성을 조절하는, 5-브로모-2,6-디(1H-파라졸-1-일)파리민딘-4-아민의 활성 대
사물에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-파라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-파라졸-4-올
을 포함하는 약제학적 조성물, 뿐만 아니라 이의 제조 방법 및, 단독으로 또는 하나 이상의 면역치료제와 조합하
여 암을 치료하는 것에 있어서의 이의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/39558 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

카메론, 존 스콧

미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 매사추세츠 애비뉴 220 노바티스 인스티튜츠 포 바이오메디칼 리서치, 인크.

카스트로-팔로미노 라리아, 홀리오 세자르

스페인 08302 마타로 바르셀로나 티씨엠2-0207 아베니다 어니스트 루치 32 팔로바이오파마 에스.엘.

하워드, 대니 룰랜드, 주니어

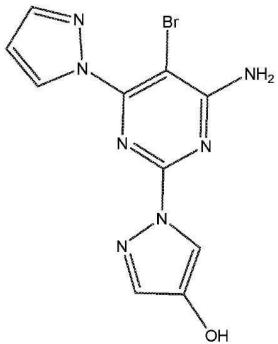
미국 07936-1080 뉴저지주 이스트 하노버 원 헬쓰 플라자 노바티스 파마슈티칼스 코포레이션

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화합물인, 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)페리미딘-4-아민의 대사물:



; 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

청구항 2

단리된 형태의 화합물 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-페리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올.

청구항 3

1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-페리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 4

치료적 유효량의 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-페리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 및 하나 이상의 면역치료제를 포함하는, 조합물.

청구항 5

치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 치료적 유효량의 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-페리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을; 단독으로 또는 하나 이상의 면역치료제와 조합하여 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 6

암 치료를 위한, 단독으로 또는 하나 이상의 면역치료제와 조합하여, 사용하는 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-페리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용도.

청구항 7

암 치료에 사용하기 위한, 제1항 또는 제2항에 따른 화합물 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-페리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올, 또는 제3항에 따른 약제학적 조성물.

청구항 8

암 치료에 사용하기 위한, 제4항에 따른 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-페리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올 및 하나 이상의 면역치료제의 조합물.

청구항 9

대상체에서 아데노신 A2a 수용체를 억제하는 방법으로서, 상기 방법은 치료적 유효량의 제1항 또는 제2항에 따른 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-페리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올을 대상체에게 투여하는 단계; 또

는 제3항에 따른 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 10

제5항의 방법, 제6항에 따른 용도, 또는 제7항에 따른 사용을 위한 화합물, 또는 제8항에 따른 사용을 위한 조합물로서, 상기 암은 폐암, 흑색종, 신장암, 간암, 골수종, 전립선암, 유방암, 결장직장암, 췌장암, 두경부암, 항문암, 위-식도암, 갑상선암, 자궁경부암, 림프세포증식 질환 또는 혈액암, T-세포 림프종, B-세포 림프종, 비-호지킨 림프종 또는 백혈병으로부터 선택되는, 방법, 용도, 또는 화합물, 또는 조합물.

청구항 11

제5항의 방법, 제6항에 따른 용도, 또는 제7항에 따른 사용을 위한 화합물, 또는 제8항에 따른 사용을 위한 조합물로서, 상기 암은 암종, 특히 폐암 및 더욱 구체적으로 비-소세포 폐암인, 방법, 용도, 또는 화합물, 또는 조합물.

청구항 12

제5항, 제10항 또는 제11항의 방법, 제6항, 제10항 또는 제11항에 따른 용도, 또는 제8항, 제10항 또는 제11항에 따른 사용을 위한 조합물로서, 하나 이상의 면역치료제는 항-CTLA4 항체, 항-PD-1 항체 및 항-PD-L1 항체로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법, 용도 또는 조합물.

청구항 13

제5항, 제10항 또는 제11항의 방법, 제6항, 제10항 또는 제11항에 따른 용도, 또는 제8항, 제10항 또는 제11항에 따른 사용을 위한 조합물로서, 상기 면역치료제는 하기로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법, 용도 또는 조합물: 이필리무맙, 트레멜리무맙, 니볼루맙, 웬브롤리주맙, 피딜리주맙(CT-011), AMP-224, AMP-514(MEDI0680), MPDL3280A, MEDI4736, MSB0010718C, YW243.55.S70 및 MDX-1105.

청구항 14

제5항, 제10항 또는 제11항의 방법, 제6항, 제10항 또는 제11항에 따른 용도, 또는 제8항, 제10항 또는 제11항에 따른 사용을 위한 조합물로서, 상기 면역치료제가 항-PD-1 항체인, 방법, 용도 또는 조합물.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 항-PD-1 항체는 하기를 포함하는, 방법, 용도 또는 조합물:

(a) SEQ ID NO: 4의 VHCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 5의 VHCDR2 아미노산 서열; 및 SEQ ID NO: 3의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH); 및 SEQ ID NO: 13의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 14의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 15의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL);

(b) SEQ ID NO: 1의 VHCDR1 아미노산 서열; SEQ ID NO: 2의 VHCDR2 아미노산 서열; 및 SEQ ID NO: 3의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VH; 및 SEQ ID NO: 10의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 11의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 12의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VL;

(c) SEQ ID NO: 41의 VHCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 5의 VHCDR2 아미노산 서열, 및 SEQ ID NO: 3의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VH; 및 SEQ ID NO: 13의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 14의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 15의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VL; 또는

(d) SEQ ID NO: 41의 VHCDR1 아미노산 서열; SEQ ID NO: 2의 VHCDR2 아미노산 서열; 및 SEQ ID NO: 3의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VH; 및 SEQ ID NO: 10의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 11의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 12의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VL.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 항-PD-1은 SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열을 포함하는

VL을 포함하는, 방법, 용도 또는 조합물.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 항-PD-1 항체는 SEQ ID NO: 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 방법, 용도 또는 조합물.

청구항 18

제14항에 있어서,

상기 항-PD-1 항체는 SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는, 방법, 용도 또는 조합물.

청구항 19

제14항에 있어서,

상기 항-PD-1 항체는 SEQ ID NO: 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 방법, 용도 또는 조합물.

청구항 20

제14항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-PD-1 항체 분자는 3주에 1회 약 300 mg의 용량으로 투여되는, 방법, 용도 또는 조합물.

청구항 21

제14항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-PD-1 항체 분자는 4주에 1회 약 400 mg의 용량으로 투여되는, 방법, 용도 또는 조합물.

청구항 22

제5항, 제10항 또는 제11항의 방법, 제6항, 제10항 또는 제11항에 따른 용도, 또는 제8항, 제10항 또는 제11항에 따른 사용을 위한 조합물로서, 상기 면역치료제가 항-PD-L1 항체인, 방법, 용도 또는 조합물.

청구항 23

제22항에 있어서,

상기 항 PD-L1 항체 분자는 하기를 포함하는, 방법, 용도 또는 조합물:

(a) SEQ ID NO: 47의 VHCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 48의 VHCDR2 아미노산 서열; 및 SEQ ID NO: 46의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH); 및 SEQ ID NO: 52의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 53의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 54의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL);

(b) SEQ ID NO: 44의 VHCDR1 아미노산 서열; SEQ ID NO: 45의 VHCDR2 아미노산 서열; 및 SEQ ID NO: 46의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VH; 및 SEQ ID NO: 49의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 50의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 51의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VL;

(c) SEQ ID NO: 63의 VHCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 48의 VHCDR2 아미노산 서열, 및 SEQ ID NO: 46의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VH; 및 SEQ ID NO: 52의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 53의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 54의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VL; 또는

(d) SEQ ID NO: 63의 VHCDR1 아미노산 서열; SEQ ID NO: 45의 VHCDR2 아미노산 서열; 및 SEQ ID NO: 46의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VH; 및 SEQ ID NO: 49의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 50의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 51의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VL.

청구항 24

제22항에 있어서,

상기 항 PD-L1 항체 분자는 SEQ ID NO: 55의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 SEQ ID NO: 58의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 방법, 용도 또는 사용을 위한 조합물.

청구항 25

제12항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

면역치료제는 단일 조성물로 함께 투여되거나 2가지 이상의 상이한 조성물 형태로 개별적으로 투여되는, 방법, 용도 또는 사용을 위한 조합물.

청구항 26

제12항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역치료제는 화합물: -(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올과 동시에, 그 전에, 또는 이후에 투여되는, 방법, 용도 또는 사용을 위한 조합물.

청구항 27

실시예 1에 따른 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아데노신 A2a 수용체를 조절하는 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)파리민딘-4-아민의 활성 대사물, 즉 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올을 포함하는 약제학적 조성물, 뿐만 아니라 이의 제조 방법 및 암 치료에 있어서의 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 전 세계적으로 주요 공중 보건 문제이다. 현재 미국과 여러 선진국에서 2번째 주요 사망 원인이며, 앞으로 몇 년 안에 주요 사망 원인으로서 심장 질환을 추월할 것으로 예상된다. (Siegel R L, 등, Cancer Statistics, 2015, CA Cancer J Clin 2015; 65:5-29. VC 2015 미국 암 협회 및 그 안의 참고문헌).

[0003] 암은 암 세포-내인성 및 세포-외인성 과정 들 다에 의해 지시되는 복합 질병으로 간주된다. 예를 들어, 폐 전이, 인간 폐 선암종 세포, 쥐 흑색종 세포, 쥐 난소암 세포, 쥐 유방암 세포를 비롯한 다양한 시험관내 및 동물 모델에서 수행된 몇몇 연구는 아데노신투여(adenosinergic) 시스템을 표적화하는 것이 여러 치료를 개발하는데 엄청난 잠재력을 가지고 있음을 확인하였다. 다수의 일련의 증거들은 신생물 미세환경에 축적되는 중요한 조절 자가분비 및 부신 인자로서 아데노신의 중요성을 강조한다. 보통 암 조직에 고농도로 존재하는 세포의 아데노신은 암에서 면역 세포 기능의 변화에 있어서 중요한 중재자이다. 이는 면역 세포의 엄격하게 조절된 아데노신 수용체 경로가 종양의 실질적인 변화를 겪음에 따라 이를 세포의 기능을 면역 감시 및 숙주 방어로부터 암세포 형질전환 및 증식의 촉진으로 전환하기 때문일 수 있다. (Antonioli L 등, 면역력, 염증 및 암: 아데노신의 선도적인 역할, Nature, 842, December 2013, Volume 13, 및 그 안의 참고문헌).

[0004] 알려져 있는 바와 같이, 종양은 종양의 성장을 촉진하기 위해 수많은 면역억제 기전을 사용한다(Koebel CM. 등, 적응 면역은 암세포를 평형 상태로 유지시킨다, Nature. 2007, 450, 7171:903-907 및 Schreiber RD. 등, 암 면역편집: 암 억제 및 촉진에 있어서 면역력의 역할을 통합하는 것, Science. 2011, 331, 6024:1565-1570). 상기 기전 중 하나가 면역억제성 아데노신으로의 세포의 AMP의 이화작용에 의해 매개된다는 연구가 있다(Ohta A. 등, A2A 아데노신 수용체는 항종양 T 세포로부터 종양을 보호한다. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103: 13132-13137 및 Ohta A. 등, A2A 아데노신 수용체는 세포의 아데노신-풍부한 미세환경에서 이펙터 기능이 결핍된 T 세포의 확장을 허용할 수 있다. J Immunol. 2009, 183, 9:5487-5493). 첫째, 세포의 ATP는 체외효소 CD39에 의해 AMP로 변환될 것이다. CD73 체외효소를 통한 AMP의 추가 탈인산화는 세포의 아데노신 생산을 초래할 것이다.

[0005] 이 과정에서 아데노신 키나아제의 활성이 또한 억제되어, 이 효소의 회수 활성이 저해되고 아데노신 수준이 증가한다. 예를 들어, 염증동안 또는 종양 미세환경 내에서 저산소 조건 하에, 아데노신 키나아제의 억제는 아데

노신의 세포외 및 세포내 수준을 모두 15~20배 증가시킨다(Decking UK. 등, 아데노신 키나아제의 저산소증-유도된 억제는 심장 아데노신 방출을 가능하게 한다. Circ. Res. 1997; 81(2):154-164. doi: 10.1161/01.RES.81.2.154). 생성된 세포외 아데노신은 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T 세포, 대식세포, 수지상 세포 및 골수-유도된 억제 세포(MDSC)를 포함하는 다중 면역 서브셋에서 발현되는 4개의 알려진 세포 표면 수용체(A1, A2A, A2B, 및 A3)에 결합한다. A2A 및 A2B 수용체 아형은 본질적으로 아데노신의 면역억제 효과에 책임이 있다. 이들은 공통 신호전달 경로를 공유하여, 아데닐레이트 사이클라제의 활성화와 세포내 cAMP의 축적을 초래한다. 세포내 cAMP가 T-세포 수용체-유발된 T-세포 활성화 경로의 초기 및 후기 단계에서 T-세포 수용체 신호전달을 억제하는 신호전달 분자임을 입증하는 몇 가지 증거들이 추가로 제시되었다. (Ohta A, Sitkovsky M, 염증의 하향조절 및 조직 손상으로부터의 보호에 있어서 G-단백질-결합된 아데노신 수용체의 역할, Nature, 2001, 414: 916-920).

- [0006] A_{2a} 수용체 길항제를 사용하는 A_{2a} 수용체의 유전적 제거 또는 A_{2a} 수용체 신호전달의 억제는 항-종양 T 세포의 억제를 방지하고 종양 거부를 개선하는 것으로 제안되었다(Ohta A. 등, A_{2a} 아데노신 수용체는 종양을 항종양 T 세포로부터 보호한다. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103: 13132-13137).
- [0007] A_{2a} 수용체는 과도한 부수적인 염증성 손상으로부터 정상 조직을 보호하기 위해, 활성화된 T 세포의 비-잉여 음성 조절자로서 기능한다. A_{2a} 수용체가 또한 암 조직을 '잘못 안내하여' 보호할 수도 있다고 제안되어 왔다. 이것이 실제로 사실이라면 A_{2a} 수용체의 유전적 불활성화 또는 약리학적 길항작용은 항-종양 T 세포의 억제를 막을 것이고, 따라서 이러한 탈-억제된 T 세포에 의한 종양 거부를 개선할 것이라고 추론되었다(Sitkovsky M. 등, 아데노신 A_{2a} 수용체 길항제: 아데노신 효과 및 T 조절 세포 차단, British Journal of Pharmacology, 2008, 153, S457-S464).
- [0008] 폐암은 전 세계적으로 암 사망의 주요 원인이며, 1985년 이래로 발병률과 사망률면에서 전 세계적으로 가장 혼한 암이다. 전 세계적으로 폐암은 새로운 암 진단(총 암 발생 건수의 12.4%)과 암 사망(총 암 사망 건수의 17.6%)에 가장 큰 원인을 제공한다.
- [0009] 폐암은 호흡기 상피 세포에서 발생하며, 크게 두 가지 범주로 나눌 수 있다. 소세포 폐암(SCLC)은 신경내분비 특성을 나타내는 세포에서 유래한 매우 악성인 종양이며, 폐암 사례의 15%를 차지한다. 사례의 나머지 85%를 차지하는 비-소세포 폐암(NSCLC)은 선암, 편평세포 암종 및 대세포 암종과 같은 3가지 주요 병리학적 아형으로 추가 분류된다. 선암 자체가 전체 폐암의 38.5%를 차지하며, 편평세포 암종이 20%, 대세포 암종이 2.9%를 차지한다. 지난 수십년 동안 선암의 발생률이 크게 증가했으며, 선암은 가장 혼한 유형의 NSCLC로서 편평세포 암종을 대체했다. (De la Cruz, C 등, 폐암: 역학, 원인 및 예방, Clin Chest Med. 2011 December; 32(4)).
- [0010] 특히, NSCLC의 경우, 질병 단계에 따라 수술, 방사선, 백금-기반 화학요법 및 세포 증식과 생존을 담당하는 신호전달 경로를 방해하는 것에 의한 최근에 표적화된 치료법을 포함하는 치료법이 결정된다. 질병의 초기 단계는 전신 화학요법(백금-이중제, 턱산, 켈시타빈, 페메트렉세드)으로 이익을 얻으며(Azzoli CG. 등, 2011 Focused Update of 2009 IV단계 비소세포 폐암을 위한 화학요법에 대한 미국 임상 종양 학회의 임상 실습 지침 개정, J Oncol Pract. 2012; 8:63-6 doi:10.1200/JOP.2011.000374), 적당한 효능을 얻어, 따라서 복합 치료 전략은 NSCLC 환자에게 중요한 치료 옵션이 되었다. 여러 연구에서 두 가지 이상의 약물 조합이 추가 독성을 없어 가면서 우수한 효능을 나타내는 것으로 입증되었다(Yoshida T. 등, 비소세포 폐암 환자에서 계피티닙 및 에를로티닙의 부작용 및 효능 비교: 후향적 분석, Med Oncol. 2013; 30:349).
- [0011] 최근, T-세포의 항암 반응을 증가시키고, 세포독성 림프구-관련 항원 4(CTLA4)를 차단하는 mAb 중에서 암세포를 감지하고 공격하는 능력을 회복시키기 위한 몇 가지 접근법이 개발되고 있고, 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(PD-1)-매개된 T-세포 이벤트가 개발되었다.
- [0012] CTLA4에 대한 완전한 인간 mAb인 이필리무맙은 SQCLC 환자에서 임상적 이점이 증가하는 추세를 보였다(Lynch TJ. 등, IIIB/IV단계 비-소세포 폐암에서의 일차 치료제인 파클리탁셀 및 카보플라틴과 병용하는 이필리무맙: 무작위, 이중 랭킹, 다중심 단계 II 연구로부터의 결과, J Clin Oncol. 2012; 30: 2046-54). PD-1 mAb(MEDI4735, BMS-936558, BMS-936559)는 과도하게 사전-치료받은 진행성 NSCLC 환자에서 현저한 지속적인 종양 퇴행을 보였다(Brahmer JR. 등, 진행성 암 환자에서 항-PD-L1 항체의 안전성 및 활성, N Engl J Med. 2012; 366: 2455-65).
- [0013] 세포외 종양 미세환경의 변화를 유발하는 변형을 보여주는 연구가 있다. 상기 세포외 변형 중 하나는 증가된 아

데노신 농도이며, 이는 T 세포 매개된 거부 반응을 손상시키고 혈관형성을 지원한다. 이 연구는 아데노신 A_{2a} 수용체를 발현하는 상당 수의 폐 선암을 보여, 항암 요법으로 아데노신 A_{2a} 수용체 길항제의 시험을 뒷받침했다. (Mediavilla-Varela, M 등, 폐 선암 종양 세포 및 암 관련된 섬유아세포에 의해 발현되는 아데노신 A_{2a} 수용체의 길항 작용은 그들의 성장을 억제한다, Cancer Biology & Therapy, September 2013, 14:9, 860-868).

[0014] 새로운 치료제 개발에도 불구하고, NSCLC는 여전히 겨우 14%의 5년 생존율을 보이고 있어 새로운 치료법에 대한 지속적인 연구의 필요성을 시사한다(Spira A. 등, 폐암의 종합 관리, N Engl J Med. 2004; 350:379-92 doi: 10.1056/NEJMra035536).

[0015] WO2011/121418은 파킨슨 병과 같은 신경퇴행성 질환의 치료에 사용하기 위한 아데노신 A_{2a} 수용체 길항제로서의 일련의 아미노피리미딘 유도체를 개시하고 있으며, 이의 관련 부분은 본 명세서에 참고문헌으로 포함된다. 또한, 암의 치료에 있어서 WO2011/121418에 기술된 화합물의 효과가 추후 조사되었다. 이 부류의 특정 화합물은 암 치료에 효과적인 것으로 밝혀진 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)피리미딘-4-아민이다. 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)피리민딘-4-아민의 구조는 하기에 나타낸다:



[0016]

[0017] PCT/IB2016/054834는 이러한 화합물 단독으로 또는 하나 이상의 면역치료제와 조합하여 암 치료에 사용하는 것을 개시한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0018] 본 발명은 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)피리민딘-4-아민의 활성 대사물, 즉 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)피리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 화합물을 실질적으로 단리된 형태로 제공한다. 본 발명은 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)피리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물을 추가로 제공한다.

[0019] 본 발명은 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)피리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함하는, 아데노신 A_{2a} 수용체를 억제하는 방법을 추가로 제공한다.

[0020] 본 발명은 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)피리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을, 단독으로 또는 하나 이상의 면역치료제와 조합하여 투여하는 단계를 포함하는, 상기 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 추가로 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 수성 표준(MH⁺: 308) 중의 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)피리민딘-4-아민의 XIC 크로마토그램, Q1 및 MS/MS 스펙트럼을 도시한다.

도 2는 인간 간 마이크로솜 120분(MH⁺: 308) 중의 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)피리민딘-4-아민의 XIC 크로마토그램, Q1 및 MS/MS 스펙트럼을 도시한다.

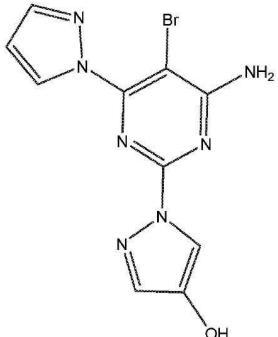
도 3은 인간 간 마이크로솜 120분(MH⁺: 324) 중의 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)피리민딘-4-아민의 단일산소화된 생성물의 XIC 크로마토그램, Q1 및 MS/MS 스펙트럼을 도시한다.

도 4는 인간 간 마이크로솜 120분(MH⁺: 324) 중의 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)피리민딘-4-아민(1 uM;

MH^+ :308) 및 이의 단일산소화된 생성물: 1-(6-아미노-5-브로모-2-(1 H -피라졸-1-일)-피리미딘-4-일)-1 H -피라졸-4-올(1 uM; MH^+ : 324) 및 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1 H -피라졸-1-일)-피리미딘-2-일)-1 H -피라졸-4-올(1 uM; MH^+ : 324)의 수성 표준의 Q1 스펙트럼 및 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1 H -피라졸-1-일)-피리미딘-2-일)-1 H -피라졸-4-올의 동정을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 따라서, 본 발명은 실시형태 1에서 하기 화합물: 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1 H -피라졸-1-일)-피리미딘-2-일)-1 H -피라졸-4-올에 관한 것이다:



[0023] ; 이는 동물, 인간 및/또는 시험관내 세포 분석에서 5-브로모-2,6-디(1 H -피라졸-1-일)피리미딘-4-아민의 대사에 의해 형성된다.

[0024] 실시형태 2에서, 본 발명은 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1 H -피라졸-1-일)-피리미딘-2-일)-1 H -피라졸-4-올, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 단리된 형태에 관한 것이다.

[0025] 실시형태 3에서, 본 발명은 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1 H -피라졸-1-일)-피리미딘-2-일)-1 H -피라졸-4-올, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0026] 실시형태 4에서, 본 발명은 치료적 유효량의 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1 H -피라졸-1-일)-피리미딘-2-일)-1 H -피라졸-4-올, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 및 하나 이상의 면역치료제를 포함하는 조합물, 특히 약제학적 조합물이다.

[0027] 실시형태 5에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 치료적 유효량의 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1 H -피라졸-1-일)-피리미딘-2-일)-1 H -피라졸-4-올, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을; 단독으로 또는 하나 이상의 면역치료제와 조합하여 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0028] 실시형태 6에서, 본 발명은 암 치료를 위한, 단독으로 또는 하나 이상의 면역치료제와 조합하여, 사용하는 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1 H -피라졸-1-일)-피리미딘-2-일)-1 H -피라졸-4-올, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용도에 관한 것이다.

[0029] 실시형태 7에서, 본 발명은 암 치료에 사용하기 위한, 실시형태 2에 따른 화합물 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1 H -피라졸-1-일)-피리미딘-2-일)-1 H -피라졸-4-올, 또는 실시형태 3에 따른 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0030] 실시형태 8에서, 본 발명은 암 치료에 사용하기 위한, 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1 H -피라졸-1-일)-피리미딘-2-일)-1 H -피라졸-4-올 및 하나 이상의 면역치료제의 조합물에 관한 것이다.

[0031] 실시형태 9에서, 본 발명은 대상체에서 아데노신 A2a 수용체를 억제하는 방법이며, 상기 방법은 치료적 유효량의 실시형태 2에 따른 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1 H -피라졸-1-일)-피리미딘-2-일)-1 H -피라졸-4-올을 대상체에게 투여하는 단계; 또는 실시형태 3에 따른 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0032] 실시형태 10에서, 본 발명은 실시형태 5의 방법, 실시형태 6에 따른 용도, 또는 실시형태 7에 따른 용도를 위한 화합물, 또는 실시형태 8에 따른 용도를 위한 조합물에 관한 것으로서, 상기 암은 폐암, 흑색종, 신장암, 간암, 골수종, 전립선암, 유방암, 결장직장암, 췌장암, 두경부암, 항문암, 위-식도암, 갑상선암, 자궁경부암, 림프세포증식 질환 또는 혈액암, T-세포 림프종, B-세포 림프종, 비-호지킨 림프종 또는 백혈병으로부터 선택된다.

- [0033] 실시형태 11에서, 본 발명은 실시형태 5의 방법, 실시형태 6에 따른 용도, 또는 실시형태 7에 따른 용도를 위한 조합물, 또는 실시형태 8에 따른 용도를 위한 조합물에 관한 것으로서, 상기 암은 암종, 특히 폐암 및 더욱 구체적으로 비-소세포 폐암이다.
- [0034] 실시형태 12에서, 본 발명은 실시형태 5, 10 또는 11의 방법, 실시형태 6, 10 또는 11에 따른 용도, 또는 실시형태 9, 10 또는 11에 따른 용도를 위한 조합물에 관한 것으로서, 하나 이상의 면역치료제는 항-CTLA4 항체, 항-PD-1 항체 및 항-PD-L1 항체로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0035] 실시형태 13에서, 본 발명은 실시형태 5, 10 또는 11의 방법, 실시형태 6, 10 또는 11에 따른 용도, 또는 실시형태 9, 10 또는 11에 따른 용도를 위한 조합물에 관한 것으로서, 상기 면역치료제는 하기로 구성된 군으로부터 선택된다: 이필리무맙, 트레멜리무맙, 니볼루맙, 펜브롤리주맙, 피딜리주맙(CT-011), AMP-224, AMP-514(MEDI0680-Medimmune), MPDL3280A(Genentech Roche), MEDI4736, MSB0010718C (Merck Serono), YW243.55.S70 및 MDX-1105.
- [0036] 실시형태 14에서, 본 발명은 실시형태 5, 10 또는 11의 방법, 실시형태 6, 10 또는 11에 따른 용도, 또는 실시형태 9, 10 또는 11에 따른 용도를 위한 조합물에 관한 것으로서, 상기 면역치료제는 항-PD-1 항체이다.
- [0037] 실시형태 14A에서, 본 발명은 실시형태 5, 10 또는 11의 방법, 실시형태 6, 10 또는 11에 따른 용도, 또는 실시형태 9, 10 또는 11에 따른 용도를 위한 조합물에 관한 것으로서, 상기 면역치료제는 니볼루맙, 펜브롤리주맙, 피딜리주맙, MEDI0680(AMP514 Medimmune), AMP224(Medimmune), 및 US 2015/0210769)에 기재된 항체로부터 선택되는 항-PD-1 항체이다.
- [0038] 실시형태 15에서, 본 발명은 실시형태 14에 따른 방법, 용도 또는 용도를 위한 조합물에 관한 것으로서, 상기 항-PD-1 항체는 하기를 포함한다:
- [0039] (a) SEQ ID NO: 4의 VHCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 5의 VHCDR2 아미노산 서열, 및 SEQ ID NO: 3의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH); 및 SEQ ID NO: 13의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 14의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 15의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL);
- [0040] (b) SEQ ID NO: 1의 VHCDR1 아미노산 서열; SEQ ID NO: 2의 VHCDR2 아미노산 서열; 및 SEQ ID NO: 3의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VH; 및 SEQ ID NO: 10의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 11의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 12의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VL;
- [0041] (c) SEQ ID NO: 41의 VHCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 5의 VHCDR2 아미노산 서열, 및 SEQ ID NO: 3의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VH; 및 SEQ ID NO: 13의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 14의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 15의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VL; 또는
- [0042] (d) SEQ ID NO: 41의 VHCDR1 아미노산 서열; SEQ ID NO: 2의 VHCDR2 아미노산 서열; 및 SEQ ID NO: 3의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VH; 및 SEQ ID NO: 10의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 11의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 12의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VL.
- [0043] 실시형태 16에서, 본 발명은 실시형태 14에 따른 방법, 용도 또는 용도를 위한 조합물에 관한 것으로서, 상기 항-PD-1은 SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다.
- [0044] 실시형태 17에서, 본 발명은 실시형태 14에 따른 방법, 용도 또는 용도를 위한 조합물에 관한 것으로서, 상기 항-PD-1 항체는 SEQ ID NO: 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0045] 실시형태 18에서, 본 발명은 실시형태 14에 따른 방법, 용도 또는 용도를 위한 조합물에 관한 것으로서, 상기 항-PD-1 항체는 SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다.
- [0046] 실시형태 19에서, 본 발명은 실시형태 14에 따른 방법, 용도 또는 용도를 위한 조합물에 관한 것으로서, 상기 항-PD-1 항체는 SEQ ID NO: 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0047] 실시형태 20에서, 본 발명은 실시형태 14 내지 19 중 어느 하나에 따른 방법, 용도 또는 용도를 위한 조합물에

관한 것으로서, 상기 항-PD-1 항체 분자는 3주에 1회 약 300 mg의 용량으로 투여된다.

[0048] 실시형태 21에서, 본 발명은 실시형태 14 내지 19 중 어느 하나에 따른 방법, 용도 또는 용도를 위한 조합물에 관한 것으로서, 상기 항-PD-1 항체 분자는 4주에 1회 약 400 mg의 용량으로 투여된다.

[0049] 실시형태 22에서, 본 발명은 실시형태 5, 10 또는 11의 방법, 실시형태 6, 10 또는 11에 따른 용도, 또는 실시형태 9, 10 또는 11에 따른 용도를 위한 조합물에 관한 것으로서, 상기 면역치료제는 항-PD-L1 항체이다.

[0050] 실시형태 22A에서, 본 발명은 실시형태 22에 따른 방법, 용도 또는 용도를 위한 조합물에 관한 것으로서, 상기 항 PD-L1 항체 분자는 YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C, MDX-1105 및 US 2016/0108123에 기재된 항 PD-L1 항체로부터 선택된다.

[0051] 실시형태 23에서, 본 발명은 실시형태 22에 따른 방법, 용도 또는 용도를 위한 조합물에 관한 것으로서, 상기 항 PD-L1 항체 분자는 하기를 포함한다:

[0052] (a) SEQ ID NO: 47의 VHCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 48의 VHCDR2 아미노산 서열; 및 SEQ ID NO: 46의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH); 및 SEQ ID NO: 52의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 53의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 54의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL);

[0053] (b) SEQ ID NO: 44의 VHCDR1 아미노산 서열; SEQ ID NO: 45의 VHCDR2 아미노산 서열; 및 SEQ ID NO: 46의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VH; 및 SEQ ID NO: 49의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 50의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 51의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VL;

[0054] (c) SEQ ID NO: 63의 VHCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 48의 VHCDR2 아미노산 서열, 및 SEQ ID NO: 46의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VH; 및 SEQ ID NO: 52의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 53의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 54의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VL; 또는

[0055] (d) SEQ ID NO: 63의 VHCDR1 아미노산 서열; SEQ ID NO: 45의 VHCDR2 아미노산 서열; 및 SEQ ID NO: 46의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VH; 및 SEQ ID NO: 49의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 50의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 51의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VL.

[0056] 실시형태 24에서, 본 발명은 실시형태 22에 따른 방법, 용도 또는 용도를 위한 조합물에 관한 것으로서, 상기 항 PD-L1 항체 분자는 SEQ ID NO: 55의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 SEQ ID NO: 58의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0057] 실시형태 25에서, 본 발명은 실시형태 12 내지 24 중 어느 하나에 따른 방법, 용도 또는 용도를 위한 조합물에 관한 것으로서, 면역치료제는 단일 조성물로 함께 투여되거나 2가지 이상의 상이한 조성물 형태로 개별적으로 투여된다.

[0058] 실시형태 26에서, 본 발명은 실시형태 12 내지 24 중 어느 하나에 따른 방법 방법, 용도 또는 용도를 위한 조합물에 관한 것으로서, 상기 면역치료제는 화합물: -(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-페리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올과 동시에, 그 전에, 또는 이후에 투여된다.

[0059] 실시형태 27에서, 본 발명은 실시예 1에 따른 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-페리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올의 제조 방법이다.

정의:

[0061] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 암은 신체의 다른 부위로 침투하거나 퍼질 가능성이 있는 비정상적인 세포 성장과 관련된 질환 그룹을 지칭하는데 사용된다. 암은 종양 세포가 닮은 세포의 유형에 따라 분류되어, 종양의 기원으로 추정된다. 이 유형에는 암종, 육종, 림프종 및 백혈병, 생식 세포 종양 및 모세포종이 포함된다.

[0062] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 암종은 상피 세포로부터 유래된 암을 지칭하는데 사용된다. 이 그룹에는 특히 고령자에서 가장 흔한 다수의 암이 포함되며, 유방, 전립선, 폐, 췌장 및 결장에서 발생하는 거의 모든 암이 포함된다.

[0063] 예를 들어, 용어 "암"은 고형 종양, 혈액 암(예를 들어, 백혈병, 림프종, 골수종, 예를 들어, 다발성 골수종) 및 전이성 병변을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일 실시형태에서, 암은 고형 종양이다. 고형 종양의 예는 악성종양, 예를 들어 육종 및 암종, 예를 들어 다양한 장기 시스템의 선암종, 예컨대 폐, 유방, 난소, 림프구, 위장(예를 들어, 결장), 항문, 생식기 및 비뇨 생식 기관(예를 들어, 신장, 요로 감염, 방광 세포, 전립선), 인

두, CNS(예를 들어 뇌, 신경 또는 신경 교세포), 두경부, 피부(예를 들어, 흑색종), 췌장의 선암종 뿐만 아니라 악성종양, 예컨대 결장암, 직장 암, 신장 세포 암종, 간암, 비-소세포 폐암, 소장 암 및 식도암을 포함하는 선암종을 포함한다. 암은 조기, 중기, 후기 또는 전이성 암으로 있을 수 있다.

[0064] 일 실시형태에서, 암은 폐암(예를 들어, 비-소세포 폐암(NSCLC)(예를 들어, 편평 및/또는 비-편평 조직학을 갖는 NSCLC 또는 NSCLC 선암종)), 흑색종(예를 들어, 진행성 흑색종), 신장 암(예컨대, 신장 세포 암종), 간암, 골수종(예를 들어, 다발성 골수종), 전립선 암, 유방암(예를 들어, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체 또는 Her2/neu 중 하나, 둘 또는 모두를 발현하지 않는 유방암, 예를 들어 삼중 음성 유방암), 결장 직장암, 췌장암, 두경부암(예를 들어, 두경부 편평 세포암종(HNSCC), 항문암, 위-식도 암, 갑상선암, 자궁 경부암, 림프 증식성 질환(예를 들어, 이식 후 림프 증식성 질환) 또는 혈액 암, T-세포 림프종, B-세포 림프종, 비-호지킨 림프종 또는 백혈병(예를 들어, 골수성 백혈병 또는 림프성 백혈병)으로부터 선택된다.

[0065] 또 다른 실시형태에서, 암은 예를 들어, 본 명세서에 기재된 암, 예컨대 폐암(편평상피암), 폐암(선암종), 두경부암, 자궁경부암(편평상피암), 위암, 갑상선암, 흑색종, 비인두암(예를 들어, 분화 또는 미분화 전이 또는 국소 재발 비인두 암종), 또는 유방암일 수 있다.

[0066] 또 다른 실시형태에서, 암은 암종(예를 들어, 진행성 또는 전이성 암종), 흑색종 또는 폐암종, 예를 들어 비-소세포 폐암종으로부터 선택된다.

[0067] 일 실시형태에서, 암은 폐암, 예를 들어 비-소세포 폐암 또는 소세포 폐암이다.

[0068] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 폐암(폐암 또는 폐암종으로도 알려져 있음)은 폐 조직에서 조절되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는 악성 폐 종양을 지칭하는데 사용된다.

[0069] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 비-소세포 폐암(NSCLC)은 소세포 폐암(SCLC) 이외의 임의의 유형의 폐암을 지칭하는데 사용된다.

[0070] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 면역요법 치료는 종양 세포의 면역-매개된 파괴를 유도하도록 지정된 광범위한 종류의 요법을 나타낸다. 상기 요법에서 면역치료제가 사용된다.

[0071] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 면역치료제는 암의 면역요법 치료를 수행하는데 유용한 화합물, 예컨대 항-CTLA4 항체, 예컨대 이필리무맙 및 트레멜리무맙, 항-PD-1 항체 예컨대 MDX-1106, MK3475, CT-011, AMP-224 또는 WO2015/112900에 기재된 항-PD-1 항체 분자; 및 항-PD-L1 항체 예컨대 MEDI4736, MDX-1105 또는 US 2016/0108123에 기재된 항-PD-L1 항체로 구성된 군으로부터 선택된 제제를 지칭한다.

[0072] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "예정사 1" 또는 "PD-1"은 아이소폼, 포유동물, 예를 들어 인간 PD-1, 인간 PD-1의 종 상동체 및 PD-1과 적어도 하나의 공통의 에피토프를 포함하는 유사체를 포함한다. PD-1, 예를 들어 인간 PD-1의 아미노산 서열은 해당 분야, 예를 들어 문헌[Shinohara T 등 (1994) *개놈학(enomics)* 23(3):704-6]; 문헌[Finger LR, 등 유전자(Gene) (1997) 197(1-2):177-87]에 공지되어 있다.

[0073] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "예정사 리간드 1" 또는 "PD-L1"은 아이소폼, 포유동물, 예를 들어 인간 PD-L1, 인간 PD-1의 종 상동체 및 PD-L1과 적어도 하나의 공통의 에피토프를 포함하는 유사체를 포함한다. PD-L1, 예를 들어 인간 PD-1의 아미노산 서열은 해당 분야, 예를 들어 문헌[Dong 등. (1999) *Nat Med.* 5(12):1365-9]; 문헌[Freeman 등 (2000) *J Exp Med.* 192(7):1027-34]에 공지되어 있다.

[0074] "단리된 형태"란 화합물이 생체내에서 대사적으로 형성될 때 통상적으로 동반되는 임의의 성분이 없다는 것을 의미한다. 예를 들어, 생체내에서 형성된 5-브로모-2,6-디(1H-페리졸-1-일)페리민딘-4-아민의 다른 대사를 뿐만 아니라 혈청 성분과 같은 임의의 생물학적 물질이 없다. 적합하게는, 화합물은 정제되고 단리된 형태이다. "정제된"이란 화합물이 편리하게는 75% 초과 순도, 보다 편리하게는 90% 초과 순도, 바람직하게는 95% 초과 순도, 가장 바람직하게는 98% 초과 순도인 것을 의미한다.

[0075] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "조합물"은 하나의 단위 투여형의 고정 조합물, 또는 화학식 I의 화합물과 조합 파트너(즉, 면역치료제)가 시간 간격 내에 개별적으로 또는 동시에 독립적으로, 특히 이들 시간 간격이 조합 파트너가 협동적, 예를 들어 상승적 효과를 제시하도록 하는 경우, 투여될 수 있는 조합 투여를 지칭한다. 단일 성분은 키트 내에 또는 개별적으로 패키징될 수 있다. 성분(예를 들어 분말 또는 액체) 중 하나 또는 둘 다는 투여 전에 목적하는 용량으로 재구성되거나 회석될 수 있다.

[0076] 본원에 사용된 용어 "동시-투여" 또는 "조합 투여" 등에는 선택된 조합 파트너를 그를 필요로 하는 단일 대상체

(예를 들어 환자)에게 투여하는 것을 포괄하려고 하며, 작용제가 반드시 동일한 투여 경로에 의해 또는 동시에 투여되지는 않는 것인 치료 요법을 포함하고자 한다.

[0077] 용어 "약제학적 조합물" 및 "조합 생성물"은 상호교환적으로 사용되며, 하나의 단위 투여형의 고정된 조합물 또는 비고정 조합 또는 병용 투여를 위한 부품 키트를 지칭하며, 여기서 2종 이상의 치료제가 시간 간격 내에 개별적으로 또는 동시에 독립적으로 투여될 수 있고, 특히 이러한 시간 간격은 조합 파트너가 협동적, 예컨대 상승적 효과를 나타낼 수 있게 한다. 용어 "고정 조합물"은 화학식 I의 화합물 및 조합 파트너(즉, 면역치료제)가 둘 다 단일 엔티티 또는 투여 형태로 환자에게 동시에 투여되는 것을 의미한다. 용어 "비-고정 조합물"은 화학식 I의 화합물 및 조합 파트너(즉, 면역치료제)가 둘 다 개별 엔티티로서 동시에, 공동으로, 또는 특정 시간 제한을 두지 않고 순차적으로 환자에게 투여되는 것을 의미하며, 여기서 이러한 투여는 환자의 신체에서 치료적 유효 수준의 2가지 화합물을 제공한다. 후자는 또한 각테일 요법, 예를 들어 3가지 이상의 치료제의 투여에 적용된다. 바람직한 실시형태에서, 약제학적 조합물은 비-고정 조합물이다.

[0078] 용어 "병용 요법"은 본 명세서에 기술된 암을 치료하기 위한 2종 이상의 치료제의 투여를 지칭한다. 상기 투여는 고정된 비율의 유효 성분들을 갖는 단일 캡슐에서와 같이, 실질적으로 동시적 방식으로 상기 치료제를 동시-투여하는 것을 포함한다. 대안적으로, 상기 투여는 각각의 유효 성분을 위한 다수의 또는 개별적인 컨테이너(예를 들어, 정제, 캡슐, 분말 및 액체)에서의 동시-투여를 포함한다. 분말 및/또는 액체는 투여하기 전에 원하는 용량으로 재구성되거나 희석될 수 있다. 또한, 이러한 투여는 또한, 대략 동일한 시간에 또는 상이한 시간에 각 유형의 치료제를 순차적인 방식으로 사용하는 것을 포괄한다. 어느 경우든, 치료 계획은 본 명세서에 기술된 병태 또는 장애를 치료하는데 있어서 약물 조합의 유익한 효과를 제공할 것이다.

[0079] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "약제학적으로 허용가능한 염"은 본 발명의 화합물의 생물학적 유효성 및 특성(생물학적으로나 달리 바람직하지 않은 것이 아님)을 보유하는 염을 의미한다. 많은 경우, 본 발명의 화합물은 아미노 및/또는 카르복실 기 또는 그와 유사한 기의 존재에 의해 산 및/또는 염기 염을 형성할 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 산 부가염은 무기산 및 유기산, 예를 들어, 아세테이트, 아스파테이트, 벤조에이트, 베실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설레이트/설레이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포르메이트, 푸마레이트, 글루셉테이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 헥사플루오로포스페이트, 히벤제이트, 하이드로클로라이드/클로라이드, 하이드로브로마이드/브로마이드, 하이드로요오다이드/요오다이드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설레이트, 나프틸레이트, 2-납실레이트, 니코티네이트, 니트레이트, 오로테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 인산염/인산수소/인산 이수소, 사카레이트, 스테아레이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 토실레이트 및 트리플루오로아세테이트 염에 의해 형성될 수 있다. 염이 유도될 수 있는 무기산은, 예를 들어 염화수소산, 브롬화수소산, 황산, 질산 및 인산을 포함한다. 염이 유도될 수 있는 유기 산은 예를 들어, 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 옥실산, 말레산, 말론산, 석신산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 신남산, 만델산, 메탄설풀산, 에탄설풀산, p-톨루엔설풀산, 및 살리실산을 포함한다. 약제학적으로 허용가능한 염기 부가 염은 무기 및 유기 염기로 형성될 수 있다. 염이 유도될 수 있는 무기 염기는 예를 들어 나트륨, 칼륨, 리튬, 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 철, 아연, 구리, 망간, 및 알루미늄을 포함하며; 특히 바람직하게는 암모늄, 칼륨, 나트륨, 칼슘 및 마그네슘 염이다. 염이 유도될 수 있는 유기 염기는, 예를 들어 1차, 2차, 및 3차 아민, 천연적으로 존재하는 치환된 아민을 포함하는 치환된 아민, 사이클릭 아민 및 염기성 이온 교환 수지, 특히 예컨대 이소프로필아민, 트리메틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 트리프로필아민 및 에탄올아민을 포함한다. 본 발명의 약제학적으로 허용가능한 염은 통상적인 화학적 방법에 의해 모체 화합물, 염기성 또는 산성 모이어티로부터 합성될 수 있다. 일반적으로, 상기 염은 유리 산 형태의 이들 화합물을 화학량론적 양의 적절한 염기(예컨대 Na, Ca, Mg 또는 K 수산화물, 탄산염, 중탄산염 등)와 반응시키거나 또는 유리 염기 형태의 이들 화합물을 화학량론적 양의 적절한 산과 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 상기 반응은 전형적으로 물 또는 유기 용매 중, 또는 둘의 혼합물 중에서 수행된다. 일반적으로 실행가능한 경우, 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 이소프로판올 또는 아세토니트릴과 같은 비-수성 매질이 바람직하다. 추가의 적합한 염의 목록은, 예를 들어 문헌["Remington's Pharmaceutical Sciences", 20th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985)]; 및 문헌["Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002)]에서 찾을 수 있다.

[0080] 본 발명은 본 발명의 약제학적으로 허용가능한 모든 동위원소-표지된 화합물, 즉 제1 내지 제17 실시형태의 화합물을 포함하며, 여기서 (1) 하나 이상의 원자는 동일한 원자 수를 갖지만 자연적으로 통상 발견되는 원자 질량 또는 질량 수와 다른 원자 질량 또는 원자 수를 갖는 원자에 의해 대체되며, 및/또는 (2) 하나 이상의 원자

의 동위원소 비율이 자연 발생 비와 상이하다.

[0081] 본 발명의 화합물에 포함시키기에 적합한 동위원소의 예는 수소 동위원소, 예컨대 ^2H 및 ^3H , 탄소, 예컨대 ^{11}C , ^{13}C 및 ^{14}C , 염소, 예컨대 ^{36}Cl , 불소, 예컨대 ^{18}F , 요오드, 예컨대 ^{123}I 및 ^{125}I , 질소, 예컨대 ^{13}N 및 ^{15}N , 산소, 예컨대 ^{15}O , ^{17}O 및 ^{18}O , 인, 예컨대 ^{32}P , 및 황, 예컨대 ^{35}S 를 포함한다.

[0082] 제1 내지 제17 실시형태의 특정 동위원소-표지된 화합물, 예를 들어, 방사성 동위원소를 포함하는 화합물은 약물 및/또는 기질 조직 분포 연구에 유용하다. 방사성 동위원소인 삼중 수소, 즉 ^3H , 및 탄소-14, 즉 ^{14}C 는 이들의 흡입의 용이성 및 쉽게 이용할 수 있는 감지 수단이라는 관점에서 이 목적에 특히 유용하다.

[0083] 보다 무거운 동위원소, 예컨대 중수소, 즉, ^2H 에 의한 치환은 더 큰 대사 안정성, 예를 들어 증가된 생체내 반감기 또는 감소된 투여량 요구으로 인한 특정한 치료적 장점을 제공할 수 있으며, 따라서 일부 상황에서는 바람직할 수 있다. 제1 내지 제17 실시형태의 특정 화합물에서, 잔기 R_9 또는 R_8 및 R_9 의 조합에 의해 형성된 고리는 생체내에서 화합물의 대사 안정성을 개선시키기 위해 하나 이상의 중수소 원자를 포함할 수 있다.

[0084] 양전자 방출 동위원소, 예컨대 ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O 및 ^{13}N 에 의한 치환은 기질 수용체 점유를 검사하는 양전자 방출 단층촬영(PET) 연구에 유용할 수 있다.

[0085] 제1 내지 제17 실시형태의 동위원소-표지된 화합물은 일반적으로 당업자에게 알려진 통상의 기법에 의하거나 첨부된 실시예 및 제조에 기술된 것과 유사한 공정에 의해 적절한 동위원소-표지 시약을 이전에 이용된 비-표지 시약 대신 사용하여 제조될 수 있다.

[0086] 본 발명에 따른 약제학적으로 허용가능한 용매화물은 결정화의 용매가 동위원소로 치환될 수 있는 것, 예를 들어, D_2O , d_6 -아세톤, d_6 -DMSO를 포함한다.

[0087] 본원에서 사용되는 바와 같이, "약제학적으로 허용가능한 담체"라는 용어는 일체의 용매, 분산 매질, 코팅제, 계면활성제, 산화방지제, 보존제(예를 들어, 항균제, 항진균제), 등장제, 흡수 지연제, 염, 보존제, 약물, 약물 안정제, 결합제, 부형제, 봉해제, 활택제, 감미제, 착향제, 염료, 예를 들어 당업자에게 공지된 바와 같은 물질 및 이들의 조합을 포함한다(예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329] 참조). 임의의 통상적인 담체가 활성 성분과 비상용성이지 않다면, 치료 조성물 또는 약제학적 조성물에서의 사용이 고려된다.

[0088] 본 발명의 화합물의 "치료적 유효량"이란 용어는 대상체의 생물학적 또는 의학적 반응, 예를 들어 효소 또는 단백질 활성의 감소 또는 억제를 유도하거나, 증상을 경감시키거나, 병태를 완화시키거나, 질병의 진행을 늦추거나 지연시키거나, 질병을 예방할 본 발명의 화합물의 양을 지칭한다. 하나의 비-제한적 실시형태에서, 용어 "치료적 유효량"은 대상체에 투여될 때 (1) (i) 그의 아데노신 A_{2a} 수용체에 의해 매개되는, 또는 (ii) 아데노신 또는 아데노신 A_{2a} 수용체의 활성과 관련된, 또는 (iii) 아데노신 A_{2a} 수용체의 비정상 활성을 특징으로 하는 질환 또는 장애, 또는 병태를 적어도 부분적으로 경감, 억제, 예방 및/또는 개선하거나; 또는 (2) 그의 아데노신 A_{2a} 수용체의 활성을 감소 또는 억제하는데 효과적인 본 발명의 화합물의 양을 지칭한다. 또 다른 비-제한적인 실시형태에서, 용어 "치료적 유효량"은 세포, 또는 조직, 또는 비-세포 생물학적 물질 또는 배지에 투여될 때, A_{2a} 수용체의 활성을 적어도 부분적으로 감소 또는 억제하거나; A_{2a} 수용체의 발현을 적어도 부분적으로 감소 또는 억제하는데 효과적인 화학식 I의 화합물의 양을 지칭한다.

[0089] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "대상체"는 동물을 지칭한다. 바람직하게는, 동물은 포유류이다. 또한, 대상체는 예를 들어, 영장류(예를 들어, 인간), 소, 양, 염소, 말, 개, 고양이, 토끼, 랙트, 마우스, 어류, 조류 등을 지칭한다. 바람직한 실시형태에서, 대상체는 인간이다.

[0090] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "저해" 또는 "저해하는"이라는 용어는 주어진 병태, 증상, 또는 장애, 또는 질환의 감소 또는 억제, 또는 생물학적 활성 또는 과정의 기준선 활성의 유의한 감소를 지칭한다.

[0091] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 임의의 질병 또는 장애에 대한 용어 "치료하는" 또는 "치료"는, 일 구현예에서, 질병 또는 장애를 호전시키는 것(즉, 질병 또는 이의 임상적 증상 중 적어도 하나의 발달을 둔화 또는 정지 또는 감소시키는 것)을 지칭한다. 또 다른 실시형태에서, "치료하는" 또는 "치료"는 환자가 식별하지 못할 수도 있는 것을 비롯하여 적어도 하나의 신체 파라미터를 완화시키거나 개선시키는 것을 지칭한다. 또 다른 실시형태

에서, "치료하는" 또는 "치료"는 물리적으로(예를 들어, 식별가능한 증상의 안정화), 생리적으로(예를 들어, 물리적 매개변수의 안정화) 또는 둘 모두로 질환 또는 질병을 조절하는 것을 지칭한다. 또 다른 실시형태에서, "치료하는" 또는 "치료"는 질환 또는 장애의 발병 또는 발달 또는 진행을 예방 또는 자연시키는 것을 지칭한다.

[0092] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태 및 본 발명의 내용에서 사용된 유사한 용어(특히 청구항의 문맥에서)는 달리 명시되지 않는 한 또는 문맥에 의해 명확하게 모순되지 않는 한, 단수 및 복수를 모두 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0093] 본 설명에 기술된 모든 방법은 본 설명에서 달리 지시되지 않는 한 또는 맥락에 의해 명백하게 달리 모순되지 않는 한, 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본 설명에 제공된 모든 예, 또는 예시적인 언어(예를 들어, "~와 같은")의 사용은 단지 본 발명을 더 잘 설명하고자 한 것으로, 달리 청구된 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0094] 본 발명의 화합물은 유리 형태, 이의 염, 또는 이의 전구약물 유도체로서 수득된다.

[0095] 본 발명은 또한, 생체내에서 본 발명의 화합물로 전환되는 본 발명의 화합물의 전구약물을 제공한다. 전구약물은 대상체에 전구약물의 투여 후 가수분해, 대사 등과 같은 생체내 생리적 활동을 통해 이 발명의 화합물로 화학적으로 변형되는 활성 또는 비활성 화합물이다. 전구약물의 제조 및 사용에 관련된 적합성 및 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다. 전구약물은 개념상 생물전구체 전구약물 및 담체 전구약물의 두 비-배타적인 카테고리로 분류될 수 있다. *The Practice of Medicinal Chemistry*, Ch. 31-32 (Ed. Wermuth, Academic Press, San Diego, Calif., 2001)를 참고한다. 일반적으로, 생물전구체 전구약물은 상응하는 활성 약물 화합물과 비교하여 낮은 활성을 갖거나 비활성인 화합물로, 하나 이상의 보호기를 포함하고 대사 또는 가용매분해에 의해 활성 형태로 전환된다. 활성 약물 형태 및 임의의 방출된 대사 산물 둘 다 허용 가능한 낮은 독성을 가져야 할 것이다.

[0096] 담체 전구약물은 수송 모이어티를 포함하는, 예를 들어 작용 부위(들)로의 흡수 및/또는 국소적 전달을 개선하는 약물 화합물이다. 이러한 담체 전구약물에 바람직하게는, 약물 모이어티와 수송 모이어티 사이의 연결이 공유 결합이고, 전구약물은 약물 화합물보다 덜 활성이거나 비활성이거나, 임의의 방출된 수송 모이어티는 허용 가능한 비-독성이다. 수송 모이어티가 흡수를 향상시키고자 하는 전구약물에서는, 전형적으로 수송 모이어티의 방출이 신속하여야 할 것이다. 다른 경우에는, 느린 방출을 제공하는 모이어티, 예를 들어, 특정 폴리머 또는 다른 모이어티, 예를 들어, 사이클로텍스트린을 이용하는 것이 바람직하다. 담체 전구약물은, 예를 들어, 다음 특성 중 하나 이상을 개선하기 위해 사용될 수 있다: 친유성 증가, 약리학적 작용의 지속 시간 증가, 부위-특이성 증가, 독성 및 유해 반응 저하, 및/또는 약물 제형화의 개선(예를 들어, 안정성, 수용성, 원치 않는 관능적 또는 물리화학적 특성의 억제). 예를 들어, 친유성은 친유성 카르복실산(예를 들어, 적어도 하나의 친유성 모이어티를 갖는 카르복실산)으로 수산기를 에스테르화함으로써 증가될 수 있다.

[0097] 예시적인 전구약물은 예를 들어, 알코올 또는 아릴알콜의 O-아실 유도체이다. 생리학적 조건 하에서 가용매분해에 의해 전환가능한 약제학적으로 허용가능한 에스테르 유도체가 바람직하다. 또한, 아민은 생체내 에스테라제에 의해 절단되어 유리 약물 및 포름알데히드를 방출하는 아릴카르보닐옥시메틸 치환된 유도체로서 마스킹된다(Bundgaard, *J. Med. Chem.* 2503 (1989)). *Chem.* 2503(1989] 참조)). 더욱이, 이미다졸, 이미드, 인돌 등과 같이 산성 NH 기를 포함하는 약물은 N-아실옥시메틸기로 마스킹된다(Bundgaard, *Design of Prodrugs*, Elsevier (1985)). 하이드록시 기는 에스테르 및 에테르로 마스킹되었다. EP 039,051(Sloan and Little)은 만니히-염기 하이드록삼산 전구약물, 이의 제조 및 용도를 개시한다.

[0098] 나아가, 그의 염을 포함한, 본 발명의 화합물은 또한, 그의 수화물의 형태로 수득될 수 있거나, 그의 결정화에 사용되는 다른 용매를 포함할 수 있다.

약제학적 조성물, 조합, 투여용량 및 투여

[0100] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 화합물, 및 담체, 예를 들어 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 약제학적 조성물은 경구 투여, 안과 투여(예를 들어, 국소 투여, 유리체강내 주사, 임플란트(유리체내형, 경공막내, 서브-테논(sub-Tenon) 등, 데포 등을 포함함) 및 비경구 투여 등과 같은 특정 투여 경로를 위해 제형화될 수 있다. 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 캡슐, 정제, 환제, 과립제, 산제 또는 좌제를 포함하는 고체 형태, 또는 용액, 혼탁액 또는 에멀젼을 포함하는 액체 형태로 만들어질 수 있다. 약제학적 조성물은 멸균과 같은 통상적인 약제학적 조작을 거칠 수 있고/있거나 통상의 불활성 희석제, 윤활제 또는 완충제 뿐만 아니라 보조제, 예컨대 방부제, 안정화제, 습윤제, 유화제 및 완충제 등을 함유할 수 있다.

- [0101] 전형적으로, 약제학적 조성물은 활성 성분을:
- [0102] a) 희석제, 예를 들어, 락토스, 엑스트로스, 수크로스, 만니톨, 소르비톨, 셀룰로스 및/또는 글리신;
- [0103] b) 윤활제, 예를 들어 실리카, 활석, 스테아르산, 그의 마그네슘 또는 칼슘 염 및/또는 폴리에틸렌글리콜; 또한, 정제용
- [0104] c) 결합제, 예를 들어 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸트, 메틸셀룰로스, 소듐 카르복시메틸셀룰로스 및/또는 폴리비닐파롤리돈; 원할 경우
- [0105] d) 봉해제, 예를 들어, 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염, 또는 발포성 혼합물; 및/또는
- [0106] e) 흡수제, 착색제, 향료 및 감미료
- [0107] 와 함께 포함하는 정제 및 젤라틴 캡슐이다.
- [0108] 정제는 당 업계에 공지된 방법에 따라 필름 코팅되거나 장용 코팅될 수 있다.
- [0109] 경구 투여에 적합한 조성물은 정제, 로젠지제, 수성 또는 유성 혼탁제, 분산성 분말 또는 과립제, 유제, 경질 또는 연질 캡슐, 또는 시럽 또는 엘릭서의 형태로 본 발명의 화합물을 유효량을 포함한다. 경구용 조성물은 약제학적 조성물의 제조를 위한 당 업계에 공지된 임의의 방법에 따라 제조되며, 상기 조성물은 약제학적으로 보기 좋고 맛 좋은 제제를 제공하기 위해 감미제, 향료, 착색제 및 보존제로 구성된 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 제제를 함유할 수 있다. 정제는 활성 성분을 정제의 제조에 적합한 제약상 허용가능한 무독성 부형제와의 혼합물로 함유한다. 상기 부형제는, 예를 들어, 불활성 희석제, 예컨대 탄산 칼슘, 탄산나트륨, 락토스, 인산 칼슘 또는 인산 나트륨; 과립화제 및 봉해제, 예를 들어, 옥수수 전분 또는 알긴산; 결합제, 예를 들어 전분, 젤라틴 또는 아카시아; 및 윤활제, 예를 들어 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 또는 탈크이다. 정제는 코팅되지 않거나, 또는 위장관에서의 봉해 및 흡수를 지연시키기 위해 공지의 기술에 의해 코팅되어, 장기간에 걸쳐 지속적인 작용을 제공한다. 예를 들어, 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트와 같은 시간 지연 물질이 사용될 수 있다. 경구용 제형은 활성 성분이 불활성 고체 희석제, 예를 들어 탄산 칼슘, 인산 칼슘 또는 카올린과 혼합된 경질 젤라틴 캡슐로서, 또는 활성 성분이 물 또는 오일 매질, 예를 들어 땅콩유, 액체 파라핀 또는 올리브유와 혼합된 연질 젤라틴 캡슐로서 제공될 수 있다.
- [0110] 특정 주사 조성물은 수성 등장 용액 또는 혼탁액이며, 좌제는 지방 에멀젼 또는 혼탁액으로부터 유리하게 제조된다. 상기 조성물은 멸균될 수 있고/있거나 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 용액 촉진제, 삼투압 조절용 염 및/또는 완충제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 기타 치료적으로 가치가 큰 물질을 함유할 수도 있다. 상기 조성물은 각각 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제조되며, 약 0.1 내지 75%의 활성 성분을 함유하거나 약 1 내지 50%의 활성 성분을 함유한다.
- [0111] 특정 주사 조성물은 안구내, 눈 주위, 결막 아래 및/또는 서브-테논 투여에 적합한 안구 임플란트 및 안구 데포 제제를 포함한다. 통상적인 주사가능한 조성물은 생체적합성 또는 생분해성 중합체 물질과 조합하여 제1 내지 제17 실시형태의 화합물을 포함한다.
- [0112] 본 발명은 추가로 활성 성분으로서 본 발명의 화합물을 포함하는 무수 약제학적 조성물 및 제형을 제공하는데, 물은 특정 화합물의 분해를 용이하게 할 수 있기 때문이다. 본 발명의 무수 약제학적 조성물 및 제형은 무수 또는 낮은 수분 함유 성분을 사용하여, 그리고 낮은 수분 또는 낮은 습도 조건을 사용하여 제조될 수 있다. 무수 약제학적 조성물은 이의 무수 성질이 유지되도록 제조 및 저장될 수 있다. 따라서, 무수 조성물은 바람직하게는, 이들이 적합한 처방 키트에 포함될 수 있도록 물에 대한 노출을 방지하는 것으로 알려진 재료를 사용하여 포장된다. 적합한 포장의 예는 완전 밀봉된 포일, 플라스틱, 단위 용량 용기(예를 들어, 바이알), 블리스터 팩, 및 스트립 팩을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0113] 본 발명은 추가로, 활성 성분으로서 본 발명의 화합물을 분해하는 속도를 감소시키는 하나 이상의 물질을 포함하는 약제학적 조성물 및 제형을 제공한다. 본원에서 "안정화제"로서 언급되는 이러한 물질은 아스코르브산과 같은 항산화제, pH 완충제, 또는 염 완충제 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0114] 바람직한 실시형태에서, 암 치료에 사용하기 위한, 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)페리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올, 또는 약제학적으로 허용가능한 염은 비경구 또는 경구 경로에 의한, 바람직하게는 경구 경로에 의한 투여를 위한 것이다.
- [0115] 본 발명의 약제학적 조성물 또는 조합물은 약 50 내지 70 kg의 대상체의 경우, 약 1 내지 1000 mg의 활성 성분

(들), 또는 약 1 내지 500 mg 또는 약 1 내지 250 mg 또는 약 1 내지 150 mg 또는 약 0.5 내지 100 mg, 또는 약 1 내지 50 mg의 활성 성분의 단위 투여량으로 존재할 수 있다. 화합물, 약제학적 조성물 또는 이들의 조합물의 치료적 유효 투여량은 치료받는 대상체의 종, 체중, 연령 및 개별 상태, 치료되는 장애 또는 질환 또는 이의 중증도에 의존한다. 통상의 지식을 가진 의사, 임상의 또는 수의사는 장애 또는 질병의 예방, 치료 또는 이의 진행의 억제에 필수적인 활성 성분 각각의 유효량을 용이하게 결정할 수 있다.

[0116] 위에 언급된 투여량 특성은 유리하게도 포유동물, 예컨대, 마우스, 랙트, 개, 원숭이 또는 분리된 기관, 조직 및 이의 표본을 이용한 시험관내 및 생체내 시험에서 증명할 수 있다. 본 발명의 화합물은 시험관내에서 용액, 예를 들어 바람직하게는, 수성 용액의 형태로, 및 생체내에서 장용으로, 비경구적으로, 유리하게는 정맥내로, 예를 들어 혼탁액 또는 수성 용액으로 적용될 수 있다. 시험관내 투여량은 약 10^{-3} 몰 내지 10^{-9} 몰 농도의 범위일 수 있다. 생체내에서 치료적으로 유효한 양은 투여 경로에 따라 약 0.1 내지 500 mg/kg 또는 약 1 내지 100 mg/kg의 범위일 수 있다.

[0117] 다른 실시형태에서, 제1 내지 제17 실시형태에 따른 적어도 하나의 화합물 및 적어도 하나의 담체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

치료 키트

[0119] 일 구현예에서, 본 발명은 둘 이상의 개별적인 약제학적 조성물을 포함하는 키트를 제공하며, 이 중 적어도 하나는 화학식 (I)의 화합물을 함유한다. 일 구현예에서, 키트는 상기 조성물들을 개별적으로 보유하는 수단, 예컨대 컨테이너, 분할 병 또는 분할 포일 패킷을 포함한다. 상기 키트의 예로는 정제, 캡슐 등의 포장에 전형적으로 사용되는 블리스터 팩(blister pack)이 있다.

[0120] 본 발명의 키트는 상이한 투여 형태, 예를 들어, 경구 및 비경구 투여 형태를 투여하기 위해, 상이한 투여 간격으로 개별 조성물을 투여하기 위해, 또는 서로에 대해 개별적인 조성물을 적정하기 위해 사용될 수 있다. 순응성을 돋기 위해, 본 발명의 키트는 전형적으로 투여 지침을 포함한다.

[0121] 본 발명의 조합 요법에서, 화학식 I의 화합물 및 다른 면역치료제는 동일하거나 상이한 제조자에 의해 제조 및/ 또는 제형화될 수 있다. 나아가, 본 발명의 화합물 및 다른 치료제는 (i) 의사에게 조합 제품을 배포하기 이전에(예를 들어 본 발명의 화합물 및 다른 치료제를 포함하는 키트의 경우); (ii) 투여 직전에 의사 자신에 의해(또는 의사의 지도 하에); (iii) 환자 자신에 의해, 예를 들어 본 발명의 화합물 및 다른 치료제를 순차적으로 투여하는 동안, 병용 요법으로 합해질 수 있다.

[0122] 따라서, 본 발명은 암 치료를 위한, 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공하며, 상기 약제는 다른 면역치료제와 함께 투여하기 위해 제조된다. 본 발명은 또한 암 치료를 위한, 면역치료제의 용도를 제공하며, 상기 약제는 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염과 함께 투여된다.

[0123] 본 발명은 또한, 암 치료방법에 사용하기 위한, 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공하며, 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올은 또 다른 면역치료제와 함께 투여하기 위해 제조된다. 본 발명은 또한, 암 치료방법에 사용하기 위한 또 다른 면역치료제를 제공하며, 다른 면역치료제는 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올과 함께 투여하기 위해 제조된다. 본 발명은 또한, 암 치료방법에 사용하기 위한, 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올을 제공하며, 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올은 또 다른 면역치료제와 함께 투여된다. 본 발명은 또한, 암 치료방법에 사용하기 위한 또 다른 면역치료제를 제공하며, 다른 치료제는 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올과 함께 투여된다.

[0124] 본 발명은 또한 암 치료를 위한, 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올의 용도를 제공하며, 환자는 이전에(예를 들어, 24시간 이내에) 또 다른 면역치료제로 치료를 받았다. 본 발명은 또한 암 치료를 위한, 또 다른 면역치료제의 용도를 제공하며, 환자는 이전에(예를 들어, 24시간 이내에) 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올; 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염으로 치료를 받았다.

병용 요법

[0126] 일 실시형태에서, 약제학적 조합물(또는 조합 생성물)은 화학식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한

염 또는 공-결정, 및 항-CTLA4 항체, 예컨대 이필리무맙 및 트레멜리무맙, 항-PD-1 항체, 예컨대 MDX-1106(니볼루맙), MK3475(펩브롤리주맙), CT-011(피딜리주맙), AMP-224, AMP-514(MEDI0680 Medimmune) 또는 WO2015/112900(US2015/0210769)에 기재된 항-PD-1 항체 분자; 및 항-PD-L1 항체, 예컨대 MPDL3280A, MEDI4736, MSB0010718C(Merch Sorono), YW243.55.S70, MDX-1105 또는 표제 "PD-L1에 대한 항체 분자 및 이의 용도"의 2015년 10월 13일자 US 2016/0108123호에 기재된 항-PD-L1 항체 분자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 면역치료제를 포함한다.

[0127] 조합 생성물의 성분은 동일한 제형, 또는 개별적인 제형으로 존재한다.

[0128] 바람직한 실시형태에서, 조합 생성물은 화학식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 공-결정, 및 암의 치료, 특히 암의 면역요법 치료에 유용한 하나 이상의 면역치료제를 포함하며, 상기 제제는 항-PD-1PD-1 항체, 예컨대 MDX-1106, MK3475, CT-011, AMP-224 또는 WO2015/112900(US2015/0210769)에 기재된 항-PD-1 항체 분자; 및 항-PD-L1 항체, 예컨대 MPDL3280A, MEDI4736, MDX-1105 또는 US 2016/0108123에 개시된 항-PD-L1 항체 분자로 구성된 군으로부터 선택된다.

항 PD-1 항체 분자의 예

[0130] 바람직한 실시형태에서, 상기 조합 생성물은 화학식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 공-결정, 및 항-PD-1 항체 분자, 예컨대 본 명세서에 기재된 것들을 포함한다.

[0131] PD-1은 예를 들어 활성화된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포, T_{regs} 및 B 세포 상에서 발현되는 CD28/CTLA-4 과 구성원이다.

그것은 이펙터 T 세포 신호전달 및 기능을 음성으로 조절한다. PD-1은 종양-침윤 T 세포 상에서 유도되며, 기능적 소진 또는 기능이상을 초래할 수 있다(문헌[Keir et al. (2008) *Annu. Rev. Immunol.* 26:677-704; Pardoll 등 (2012) *Nat Rev Cancer* 12(4):252-64]. PD-1은 그의 2개의 리간드, 예정사-리간드 1(PD-L1) 또는 예정사-리간드 2(PD-L2) 중 어느 하나로의 결합시에 공동억제 신호를 전달한다. PD-L1은 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 대식구, 수지상 세포(DC), B 세포, 상피 세포, 혈관 내피 세포 및 많은 유형의 종양을 포함하는 다수의 세포 유형 상에서 발현된다. 쥐 및 인간 종양 상에서의 PD-L1의 높은 발현은 다양한 암에서의 불량한 임상 결과와 연관되어 왔다(문헌[Keir 등 (2008) *Annu. Rev. Immunol.* 26:677-704; Pardoll 등 (2012) *Nat Rev Cancer* 12(4):252-64]. PD-L2는 수지상 세포, 대식구 및 일부 종양 상에서 발현된다. PD-1 경로의 차단은 암 면역요법을 위해 예비-임상적으로, 그리고 임상적으로 입증되었다. 예비임상 및 임상 연구 둘 모두에 의해, 항-PD-1 차단이 이펙터 T 세포의 활성을 복구시킬 수 있으며, 강력한 항-종양 반응을 초래하는 것이 입증되었다. 예를 들어 PD-1 경로의 차단은 소진된/기능이상 이펙터 T 세포 기능(예를 들어 증식, IFN- γ 분비 또는 세포용해 기능)을 복구시키고/거나 T_{reg} 세포 기능을 억제할 수 있다(문헌[Keir 등 (2008) *Annu. Rev. Immunol.* 26:677-704; Pardoll 등 (2012) *Nat Rev Cancer* 12(4):252-64]. PD-1 경로의 차단은 항체, 이의 항원 결합 단편, 면역부착소(immunoadhesin), 융합 단백질, 또는 PD-1, PD-L1 및/또는 PD-L2의 올리고펩타이드에 의해 수행될 수 있다.

[0132] 일 실시형태에서, PD-1 억제제는 항-PD-1 항체 분자이다. 일 실시형태에서, PD-1 억제제는 전문이 참조로 포함되는 표제 "Pd-1에 대한 항체 분자 및 이의 용도"의 2015년 7월 30일자 공개된 US 2015/0210769호에 기재된 바와 같은 항-PD-1 항체 분자이다.

[0133] 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 표 A에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로부터의 (예를 들어, 표 A에 개시된 BAP049-클론-E 또는 BAP049-클론-B의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열로부터의), 또는 표 A에 개시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 상보성 결정 영역(CDRs)(또는 집합적으로 모든 CDR)을 포함한다. 일부 실시형태에서, CDR은 Kabat 정의(예를 들어, 표 A에 제시된 바와 같음)에 따른다. 일부 실시형태에서, CDR은 Chothia 정의(예를 들어, 표 A에 제시된 바와 같음)에 따른다. 일부 실시형태에서, CDR은 Kabat 및 Chothia 둘다의 CDR 정의(예를 들어, 표 A에 제시된 바와 같음)에 따른다. 일 실시형태에서, VH CDR1의 Kabat 및 Chothia CDR의 조합은 아미노산 서열 GYTFTTYWMH(SEQ ID NO: 41)을 포함한다. 일 실시형태에서, CDR 중 하나 이상(또는 집합적으로 모든 CDR)은 표 A에 나타내거나, 표 A에 나타낸 뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩되는 아미노산 서열에 비하여, 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 변경, 예를 들어 아미노산 치환(예를 들어, 보존적 아미노산 치환) 또는 결실을 갖는다.

[0134] 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 SEQ ID NO: 1의 VHCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 2의 VHCDR2 아미노산 서열; 및 SEQ ID NO: 3의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH); 및 SEQ ID NO: 10의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 11의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 12의 VLCDR3 아미노산 서열을 포

함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며, 각각은 표 A에 개시되어 있다.

- [0135] 일 실시형태에서, 항체 분자는 SEQ ID NO: 24의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 VHCDR1; SEQ ID NO: 25의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 VHCDR2; 및 SEQ ID NO: 26의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 VHCDR3을 포함하는 VH; 및 SEQ ID NO: 29의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 VLCDR1, SEQ ID NO: 30의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 VLCDR2 및 SEQ ID NO: 31의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 VLCDR3을 포함하는 VL을 포함하며, 각각은 표 A에 개시되어 있다.
- [0136] 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 6에 대하여 적어도 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일하거나 그 이상인 아미노산 서열을 포함하는 VH를 포함한다. 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 20에 대하여 적어도 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일하거나 그 이상인 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다. 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 16에 대하여 적어도 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일하거나 그 이상인 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다. 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다. 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다.
- [0137] 일 실시형태에서, 항체 분자는 SEQ ID NO: 7의 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 7에 대하여 적어도 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일하거나 그 이상인 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 VH를 포함한다. 일 실시형태에서, 항체 분자는 SEQ ID NO: 21 또는 17의 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 21 또는 17에 대하여 적어도 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일하거나 그 이상인 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 VL을 포함한다. 일 실시형태에서, 항체 분자는 SEQ ID NO: 7의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 VH 및 SEQ ID NO: 21 또는 17의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 VL을 포함한다.
- [0138] 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 SEQ ID NO: 8의 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 8에 대하여 적어도 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일하거나 그 이상인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 22에 대하여 적어도 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일하거나 그 이상인 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 18에 대하여 적어도 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일하거나 그 이상인 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 SEQ ID NO: 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 SEQ ID NO: 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0139] 일 실시형태에서, 항체 분자는 SEQ ID NO: 9의 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 9에 대하여 적어도 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일하거나 그 이상인 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 중쇄를 포함한다. 일 실시형태에서, 항체 분자는 SEQ ID NO: 23 또는 19의 뉴클레오타이드 서열, 또는 SEQ ID NO: 23 또는 19에 대하여 적어도 85%, 90%, 95%, 또는 99% 동일하거나 그 이상인 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 경쇄를 포함한다. 일 실시형태에서, 항체 분자는 SEQ ID NO: 9의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 중쇄 및 SEQ ID NO: 23 또는 19의 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 경쇄를 포함한다.
- [0140] 본 명세서에 기술된 항체 분자는 전체가 참고 문헌으로 인용된 US 2015/0210769에 기재된 벡터, 숙주 세포 및 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0141] 정의
- [0142] VH 및 VL 영역은 "상보성 결정 영역"(CDR)으로 불리는 초가변성의 영역들로 세분될 수 있으며, 이들 사이에는 "프레임워크 영역"(FR 또는 FW)으로 불리는 더 보존된 영역들이 산재되어 있다.
- [0143] 프레임워크 영역 및 CDR의 범위는 다수의 방법에 의해 정확하게 정의되어 있다(문헌[Kabat, E. A., 등 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242]; 문헌[Chothia, C. 등 (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917]; 및 Oxford Molecular's AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된 AbM 정의 참조. 일반적으로, 예를 들어 문헌 [Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg)]을 참조한다.

- [0144] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "상보성 결정 영역" 및 "CDR"은 항원 특이성 및 결합 친화성을 부여하는 항체 가변 영역 내의 아미노산의 서열을 지칭한다. 일반적으로, 각각의 중쇄 가변 영역 내에 3개의 CDR(HCDR1, HCDR2, HCDR3)이 있고, 각각의 경쇄 가변 영역 내에 3개의 CDR(LCDR1, LCDR2, LCDR3)이 있다.
- [0145] 주어진 CDR의 정확한 아미노산 서열 경계는 문헌 [Kabat 등. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD](*"Kabat"* 넘버링 체계), 문헌[Al-Lazikani 등. (1997) *JMB* 273, 927-948]("Chothia" 넘버링 체계)에 기재된 것들을 포함하는 잘 알려진 여러 방법들을 사용하여 측정될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "Chothia" 번호 체계에 따라 정의된 CDR은 또한 때때로 "초가변 루프"로 지칭된다.
- [0146] 예를 들어, Kabat 하에서, 중쇄 가변 도메인(VH) 내의 CDR 아미노산 잔기는 31~35(HCDR1), 50~65(HCDR2), 및 95~102(HCDR3)로 넘버링되고; 경쇄 가변 도메인(VL) 내의 CDR 아미노산 잔기는 24~34(LCDR1), 50~56(LCDR2), 및 89~97(LCDR3)로 넘버링된다. Chothia 하에서, VH 내의 CDR 아미노산은 26~32(HCDR1), 52~56(HCDR2), 및 95~102(HCDR3)로 넘버링되고; VL 내의 아미노산 잔기는 26~32(LCDR1), 50~52(LCDR2), 및 91~96(LCDR3)으로 넘버링된다. Kabat 및 Chothia 둘 모두의 CDR 정의를 조합함으로써, CDR은 인간 VH 내의 아미노산 잔기 26~35(HCDR1), 50~65(HCDR2), 및 95~102(HCDR3) 및 인간 VL 내의 아미노산 잔기 24~34(LCDR1), 50~56(LCDR2), 및 89~97(LCDR3)로 이루어진다.
- [0147] 일반적으로, 구체적으로 지시되지 않는 한, 항-PD-1 항체 분자는 예를 들어, 표 A에 기재된 하나 이상의 Kabat CDR 및/또는 Chothia CDR의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 하기 정의들은 표 A에 기재된 항-PD-1 항체 분자: Kabat 및 Chothia 둘 모두의 조합된 CDR 정의에 따른 HCDR1, 및 Kabat의 CDR 정의에 따른 HCCDR 2~3 및 LCCDR 1~3에 대해 사용된다. 모든 정의 하에서, 각각의 VH 및 VL은 전형적으로 하기 순서: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4로 아미노-말단으로부터 카르복시-말단에 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR을 포함한다.
- [0148] 서열 간의 상동성 또는 서열 동일성(이 용어들은 본원에서 상호호환적으로 사용됨)의 계산은 하기와 같이 수행된다.
- [0149] 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산 서열의 동일성 백분율을 결정하기 위해, 서열은 최적의 비교 목적을 위해 정렬된다(예를 들어, 최적 정렬을 위해 캡이 제1 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열 중 하나 또는 둘 모두에 도입될 수 있으며, 비-상동 서열은 비교 목적으로 무시될 수 있다). 바람직한 실시형태에서, 비교 목적을 위해 정렬된 기준 서열의 길이는 기준 서열의 길이의 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%, 더욱 바람직하게는 적어도 50%, 60%, 및 더욱 바람직하게는 적어도 70%, 80%, 90%, 100%이다. 그리고나서, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드가 비교된다. 제1 서열의 위치가 제2 서열의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드에 의해 점유될 때, 분자는 그 위치에서 동일하다(본원에서 사용된 바와 같이, 아미노산 또는 핵산 "동일성"은 아미노산 또는 핵산 "상동성"과 동등함).
- [0150] 2개의 서열들 사이에서 동일성 백분율은 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수로서, 캡의 수 및 각각의 캡의 길이를 고려하며, 이들은 2개 서열의 최적의 정렬을 위해 도입될 필요가 있다.
- [0151] 2개 서열들 사이에서 서열의 비교 및 동일성 백분율의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 2개의 아미노산 서열 사이의 동일성 백분율은 블로섬(Blossum) 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 캡 가중치 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4, 및 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5 또는 6을 사용하여 GCG 소프트웨어 패키지 내의 GAP 프로그램(www.gcg.com에서 이용 가능함) 내로 흔입된 문헌 [Needleman and Wunsch ((1970) *J. Mol. Biol.* 48:444-453)] 알고리즘을 사용하여 결정된다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 2개의 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성 백분율은 NWGapDNA.CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70 또는 80의 캡 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치를 사용하여 GCG 소프트웨어 패키지의 GAP 프로그램(www.gcg.com에서 이용 가능함)을 사용하여 결정된다. 특히 바람직한 파라미터 세트(및 달리 지정되지 않으면 사용될 파라미터)는 캡 폐널티 12, 캡 확장 폐널티 4, 및 프레임이동 캡 폐널티 5를 갖는 블로섬 62 점수 매트릭스이다.
- [0152] 2개의 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성 백분율은 PAM120 가중 잔기 표, 캡 길이 폐널티 12 및 캡 폐널티 4를 사용하는, ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 통합된 문헌[E. Meyers and W. Miller, ((1988) CABIOS, 4:11-17)]의 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0153] 본 명세서에 기재된 핵산 및 단백질 서열은 예를 들어 다른 계열 구성원 또는 관련 서열을 식별하기 위해 공개 데이터베이스에 대한 검색을 수행하기 위한 "쿼리 서열"로서 사용될 수 있다. 이러한 검색은 Altschul, 등.

(1990) J. Mol. Biol. 215:403-10의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램(버전 2.0)을 사용하여 수행할 수 있다. BLAST 뉴클레오파이드 검색은 NBLAST 프로그램, 스코어 = 100, 워드길이 = 12로 수행되어 본 발명의 핵산 분자와 상동인 뉴클레오파이드 서열을 수득할 수 있다. BLAST 단백질 검색은 XBLAST 프로그램, 스코어 = 50, 워드길이 = 3으로 수행되어 본 발명의 단백질 분자와 상동인 아미노산 서열을 수득할 수 있다. 비교 목적을 위한 캡 정렬을 얻기 위해, 문헌[Altschul 등, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402]에 기술된 바와 같이, Gapped BLAST가 이용될 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 이용할 때, 각 프로그램(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 기본 파라미터가 사용될 수 있다. www.ncbi.nlm.nih.gov를 참조한다.

[0154]

"보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리가 당해 분야에 정의되어 있다. 이를 패밀리는 염기성 측쇄(예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다.

[0155]

[표 A]

예시적인 항-PD-1 항체 분자의 아미노산 및 뉴클레오파이드 서열

| BAP049-클론 -B HC | | |
|------------------------|--------|---|
| SEQ ID NO: 1 (Kabat) | HCDR1 | TYWMH |
| SEQ ID NO: 2 (Kabat) | HCDR2 | NIYPGTGGSNFDEKFKN |
| SEQ ID NO: 3 (Kabat) | HCDR3 | WTTGTGAY |
| SEQ ID NO: 4 (Chothia) | HCDR1 | GYTFYY |
| SEQ ID NO: 5 (Chothia) | HCDR2 | YPGTGG |
| SEQ ID NO: 3 (Chothia) | HCDR3 | WTTGTGAY |
| SEQ ID NO: 6 | VH | EVQLVQSGAEVKPGESLRISCKGSGY TFTTYWMHWVRQATGQGLEWMGNIYP GTGGSNFDEKFKNRVVTADKSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCTRWTGTGAY WGQGTTVTVSS |
| SEQ ID NO: 7 | DNA VH | GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCG CCGAAGTGAAAGAAGCCCAGGCGAGTC ACTGAGAATTAGCTGTAAAGGTTCA GCTACACCTTCACTACCTACTGGATG CACTGGTCCGCCAGGCTACCGGTCA AGGCCTCGAGTGGATGGTAATATCT ACCCCGGCACCCGGCGCTAACCTTC GACGAGAAGTTAAGAATAGAGTGAC TATCACCGCCGATAAGTCTACTAGCA CCGCCTATATGGAAGTGTCTAGCCTG |

[0156]

| | | |
|--------------|--------|--|
| | | AGATCAGAGGACACCGCCGTACTA CTGCACTAGGTGGACTACCGGCACAG GCGCCTACTGGGGTCAAGGCACTACC GTGACCGTGTCTAGC |
| SEQ ID NO: 8 | HC | EVQLVQSGAEVKPGESLRISCKGSGY TFTTYWMHWVRQATGQGLEWMGNIYP GTGGSNFDEKFKNRVTITADKSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCTRWTGTGAY WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPCCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVCVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSG |
| SEQ ID NO: 9 | DNA HC | GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCG CCGAAGTGAAGAACGCCGGCGAGTC ACTGAGAATTAGCTGTAAAGGTTTAG GCTACACCTTCACTACCTACTGGATG CACTGGGTCCGCCAGGCTACCGGTCA AGGCCTCGAGTGGATGGTAATATCT ACCCCCGGCACCGGGCGGCTAACTTC GACGAGAAGTTAAGAATAGAGTGAC TATCACCGCCGATAAGTCTACTAGCA CCGCCTATATGGAACTGTCTAGCCTG AGATCAGAGGACACCGCCGTACTA CTGCACTAGGTGGACTACCGGCACAG GCGCCTACTGGGTCAAGGCACTACC GTGACCGTGTAGCGCTAGCACTAA GGGCCCCTCGGTGTTCCCCCTGGCA CCTTGTAGCCGGAGCACTAGCGAATC CACCGCTGCCCTCGGCTGCCGTGGTCA AGGATTACTCCCGAGCCCGTGACC GTGTCCTGGAACAGCGGAGGCCCTGAC CTCCGGAGTGACACACCTTCCCCGCTG TGCTGCAGAGCTCCGGCTGTACTCG CTGTCGTGGTGGTCACGGTGCCCT ATCTAGCCTGGGTACCAAGACCTACA CTTGCAACGTGGACCACAAGCCTCC AACACTAAGGTGGACAAGCGCGTCGA ATCGAAGTACGGCCCACCGTGCCCCGC CTTGTCCCGCGCCGGAGTTCCTCGGC |

[0157]

| | | |
|-------------------------|--------|--|
| | | GGTCCTCGGTCTTCTGTTCCCACC GAAGCCCAGGACACTTGATGATT CCCGCACCCCTGAAGTGACATGCGTG GTCGTGGACGTGTCACAGGAAGATCC GGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGG ATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAA ACCAAGCCGAGGGAGGAGCAGTTCAA CTCCACTTACCGCGTGTGTCCGTGC TGACGGTGCTGCATCAGGACTGGCTG AACGGGAAGGGAGTACAAGTCAAAGT GTCCAACAAGGGACTTCCTAGCTCAA TCGAAAAGACCATCTCGAAAGCCAAG GGACAGCCCCGGGAACCCCAAGTGT ATACCCCTGCCACCGAGCCAGGAAGAA ATGACTAAGAACCAAGTCTCATTGACT TGCCTTGTGAAGGGCTTCTACCCATC GGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCA ACGGCCAGCCGGAAAACAACACTACAAG ACCACCCCTCCGGTGCTGGACTCAGA CGGATCCTTCTTCCTACTCGCGGC TGACCGTGGATAAGAGCAGATGGCAG GAGGGAAATGTGTTCAGCTGTTCTGT GATGCATGAAGCCCTGCACAACCACT ACACTCAGAAGTCCCTGTCCCTCTCC CTGGGA |
| BAP049- 클론 -B LC | | |
| SEQ ID NO: 10 (Kabat) | LCDR1 | KSSQSLDSGNQNKNFLT |
| SEQ ID NO: 11 (Kabat) | LCDR2 | WASTRES |
| SEQ ID NO: 12 (Kabat) | LCDR3 | QNDYSYPYT |
| SEQ ID NO: 13 (Chothia) | LCDR1 | SQSLLDSGNQKNF |
| SEQ ID NO: 14 (Chothia) | LCDR2 | WAS |
| SEQ ID NO: 15 (Chothia) | LCDR3 | DYSYPY |
| SEQ ID NO: 16 | VL | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQS LLDSGNQKNFLTWYQQKPGKAPKLLIY WASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS SLQPEDIATYYCQNDYSYPYTFGQGT VEIK |
| SEQ ID NO: 17 | DNA VL | GAGATCGTCCTGACTCAGTCACCCGC TACCTTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGC GGGCTACACTGAGCTGTAAATCTAGT CAGTCACTGCTGGATAGCGGTAAATCA GAAGAACCTCCTGACCTGGTATCAGC AGAAGCCCGTAAAGCCCTAAAGCTG CTGATCTACTGGCCTCTACTAGAGA ATCAGGGGTGCCCCCTAGGTTAGCG GTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACC TTCACTATCTAGCCTGCAGCCCGA |

| | | |
|--------------------------|--------|--|
| | | GGATATCGCTACCTACTACTGTCA ACGACTATAGCTACCCCTACACCTTC GGTCAAGGCACTAAGGTCGAGATTAA G |
| SEQ ID NO: 18 | LC | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQS LLDSGNQKNFLTWYQQKPGKAPKLLIY WASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS SLQPEDIATYYCQNDYSYPYTFGQGTTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTQDSDKDSTYSLSSTTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC |
| SEQ ID NO: 19 | DNA LC | GAGATCGTCCTGACTCAGTCACCCGC TACCTCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGC GGGCTACACTGAGCTGTAATCTAGT CAGTCACTGCTGGATAGCGGTAAATCA GAAGAACCTCCTGACCTGGTATCAGC AGAAGCCCCGTTAAAGCCCCTAAGCTG CTGATCTACTGGGCCTACTAGAGA ATCAGGGGTGCCCCTAGGTTAGCG GTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACC TTCACTATCTCTAGCCTGCAGCCCGA GGATATCGCTACCTACTACTGTCA ACGACTATAGCTACCCCTACACCTTC GGTCAAGGCACTAAGGTCGAGATTAA GCGTACGGTGGCGCTCCAGCGTG TTCATCTCCCCCCCCAGCGACGAGCA GCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACCTCTACCC CCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAG GTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCA ACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCA GGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCC TGAGCAGCACCCCTGACCCCTGAGCAAG GCCGACTACGAGAAGCATAAAGGTGTA CGCCTGCGAGGTGACCCACCAAGAGCTT CTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTT CAACAGGGCGAGTGC |
| BAP049- 클론 - E HC | | |
| SEQ ID NO: 1 (Kabat) | HCDR1 | TYWMH |
| SEQ ID NO: 2 (Kabat) | HCDR2 | NIYPGTGGSNFDEKFKN |
| SEQ ID NO: 3 (Kabat) | HCDR3 | WTTGTGAY |
| SEQ ID NO: 4 (Chothia) | HCDR1 | GYTFTTY |
| SEQ ID NO: 5 (Chothia) | HCDR2 | YPGTGG |
| SEQ ID NO: 3 (Chothia) | HCDR3 | WTTGTGAY |
| SEQ ID NO: 6 | VH | EVQLVQSGAEVKPGESLRISCKGSGY |

[0159]

| | | |
|--------------|--------|---|
| | | TFTTYWMHWVRQATGQGLEWMGNIYP GTGGSNFDEKFKNRVTITADKSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCTRWTGTGAY WGQGTTVTVSS |
| SEQ ID NO: 7 | DNA VH | GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCG CCGAAGTGAAGAAGCCCGGCCAGTC ACTGAGAATTAGCTGTAAAGGTTAG GCTACACCTTCACTACCTACTGGATG CACTGGGTCCGCCAGGCTACCGGTCA AGGCCTCGAGTGGATGGTAATATCT ACCCCGCACCAGGCGGCTTAACCTTC GACGAGAAGTTAAGAATAGAGTGAC TATCACCAGCCGATAAGTCTACTAGCA CCGCCTATATGGAACGTGCTAGCCTG AGATCAGAGGACACCGCCGTACTA CTGCACTAGGTGGACTACCGGCACAG GCGCCTACTGGGTCAAGGCACCTACC GTGACCGTGTCTAGC |
| SEQ ID NO: 8 | HC | EVQLVQSGAEVKPGESLRISCKGSY TFTTYWMHWVRQATGQGLEWMGNIYP GTGGSNFDEKFKNRVTITADKSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCTRWTGTGAY WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTKTTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPCCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYWDGVVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLG |
| SEQ ID NO: 9 | DNA HC | GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCG CCGAAGTGAAGAAGCCCGGCCAGTC ACTGAGAATTAGCTGTAAAGGTTAG GCTACACCTTCACTACCTACTGGATG CACTGGGTCCGCCAGGCTACCGGTCA AGGCCTCGAGTGGATGGTAATATCT ACCCCGCACCAGGCGGCTTAACCTTC GACGAGAAGTTAAGAATAGAGTGAC TATCACCAGCCGATAAGTCTACTAGCA CCGCCTATATGGAACGTGCTAGCCTG AGATCAGAGGACACCGCCGTACTA CTGCACTAGGTGGACTACCGGCACAG |

[0160]

| | | |
|--------------------------|-------|---|
| | | GCGCCTACTGGGGTCAAGGCCTACCC GTGACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAA GGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCA CCTTGTAGCCGGAGCACTAGCGAATC CACCGCTGCCCTCGGCTGCCTGGTCA AGGATTACTTCCCGAGCCCGTGACC GTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGAC CTCCGGAGTGACACACCTCCCGCTG TGCTGCAGAGCTCCGGGCTGTACTCG CTGTCGTCGGTGGTCACGGTGCCTTC ATCTAGCCTGGGTACCAAGACCTACA CTTGCAACGTGGACCACAAGCCTCC AACACTAAGGTGGACAAGCGCGTCGA ATCGAAGTACGGCCCACCGTGCCCCG CTTGTCCC CGCCGGAGTTCTCGGC GGTCCTCGGTCTTCTGTTCCCACC GAAGCCCAAGGACACTTGATGATTT CCCGCACCCCTGAAGTGACATGGTG GTCGTGGACGTGTCACAGGAAGATCC GGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGG ATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAA ACCAAGCCGAGGGAGGGAGCAGTTCAA CTCCACTTACCGCGTCGTGTCCTG TGACGGTGCTGCATCAGGACTGGCTG AACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGT GTCCAACAAGGGACTTCTAGCTCAA TCGAAAAGACCATCTCGAAAGCCAAG GGACAGCCCCGGGAACCCCAAGTGT ATACCCCTGCCACCGAGCCAGGAAGAA ATGACTAAGAACCAAGTCTCATTGACT TGCCTTGTGAAGGGCTTCTACCCATC GGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCA ACGGCCAGCCGGAAAACACTACAAG ACCACCCCTCCGGTGCTGGACTCAGA CGGATCCTTCTCCCTCTACTCGCGGC TGACCGTGGATAAGAGCAGATGGCAG GAGGGAAATGTGTTCAGCTGTTCTGT GATGCATGAAGGCCCTGCACAACCACT ACACTCAGAAGTCCCTGTCCCTCTCC CTGGGA |
| BAP049- 클론 - E LC | | |
| SEQ ID NO: 10 (Kabat) | LCDR1 | KSSQSLDSGNQNKF |
| SEQ ID NO: 11 (Kabat) | LCDR2 | WASTRES |
| SEQ ID NO: 12 (Kabat) | LCDR3 | QNDYSYPY |
| SEQ ID NO: 13 (Chothia) | LCDR1 | SQSLLDSGNQKNF |
| SEQ ID NO: 14 (Chothia) | LCDR2 | WAS |
| SEQ ID NO: 15 (Chothia) | LCDR3 | DYSYPY |

| | | |
|---------------|--------|--|
| SEQ ID NO: 20 | VL | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQS LLDSGNQKNFLTWYQQKPGQAPRLLIY WASTRESGVPSRFSGSGSGTDFITFTIS SLEAEDAATYYCQNDYSYPYTFGQGTKEIK |
| SEQ ID NO: 21 | DNA VL | GAGATCGTCCTGACTCAGTCACCCGC TACCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGC GGGCTACACTGAGCTGAAATCTAGT CAGTCACTGCTGGATAGCGGTAATCA GAAGAACCTCCTGACCTGGTATCAGC AGAACGCCGGTCAAGCCCCTAGACTG CTGATCTACTGGGCCTCTACTAGAGA ATCAGGCGTGCCCTCTAGGTTAGCG GTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACC TTCACTATCTCTAGCCTGGAAAGCCGA GGACGCCGCTACCTACTACTGTCAGA ACGACTATAGCTACCCCTACACCTTC GGTCAAGGCACTAAGGTGAGATTAA G |
| SEQ ID NO: 22 | LC | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQS LLDSGNQKNFLTWYQQKPGQAPRLLIY WASTRESGVPSRFSGSGSGTDFITFTIS SLEAEDAATYYCQNDYSYPYTFGQGTKEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC |
| SEQ ID NO: 23 | DNA LC | GAGATCGTCCTGACTCAGTCACCCGC TACCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGC GGGCTACACTGAGCTGAAATCTAGT CAGTCACTGCTGGATAGCGGTAATCA GAAGAACCTCCTGACCTGGTATCAGC AGAACGCCGGTCAAGCCCCTAGACTG CTGATCTACTGGGCCTCTACTAGAGA ATCAGGCGTGCCCTCTAGGTTAGCG GTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACC TTCACTATCTCTAGCCTGGAAAGCCGA GGACGCCGCTACCTACTACTGTCAGA ACGACTATAGCTACCCCTACACCTTC GGTCAAGGCACTAAGGTGAGATTAA GCGTACGGTGGCGCTCCAGCGTG TTCATCTCCCCCCCAGCGACGAGCA GCTGAAGAGCGGGCACCGCAGCGTG GTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCC CCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAG GTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCA |

[0162]

| | | |
|--------------------------|-------|--|
| | | ACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCA GGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCC TGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAG GCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTA CGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGC CTGTCAGCCCCGTGACCAAGAGCTT CAACAGGGGCGAGTGC |
| BAP049- 클론 - B HC | | |
| SEQ ID NO: 24 (Kabat) | HCDR1 | ACCTACTGGATGCAC |
| SEQ ID NO: 25 (Kabat) | HCDR2 | AATATCTACCCGGCACCGGCGGCTC TAACTTCGACGAGAAGTTAAGAAT |
| SEQ ID NO: 26 (Kabat) | HCDR3 | TGGACTACCGGCACAGGCGCCTAC |
| SEQ ID NO: 27 (Chothia) | HCDR1 | GGCTACACCTTCACTACCTAC |
| SEQ ID NO: 28 (Chothia) | HCDR2 | TACCCGGCACCCGGCGGC |
| SEQ ID NO: 26 (Chothia) | HCDR3 | TGGACTACCGGCACAGGCGCCTAC |
| BAP049- 클론 - B LC | | |
| SEQ ID NO: 29 (Kabat) | LCDR1 | AAATCTAGTCAGTCACTGCTGGATAG CGGTAATCAGAAGAACTTCCTGACC |
| SEQ ID NO: 30 (Kabat) | LCDR2 | TGGGCCTCTACTAGAGAATCA |
| SEQ ID NO: 31 (Kabat) | LCDR3 | CAGAACGACTATAGCTACCCCTACAC C |
| SEQ ID NO: 32 (Chothia) | LCDR1 | AGTCAGTCACTGCTGGATAGCGGTAA TCAGAAGAACTTC |
| SEQ ID NO: 33 (Chothia) | LCDR2 | TGGGCCTCT |
| SEQ ID NO: 34 (Chothia) | LCDR3 | GACTATAGCTACCCCTAC |
| BAP049- 클론 - E HC | | |
| SEQ ID NO: 24 (Kabat) | HCDR1 | ACCTACTGGATGCAC |
| SEQ ID NO: 25 (Kabat) | HCDR2 | AATATCTACCCGGCACCGGCGGCTC TAACTTCGACGAGAAGTTAAGAAT |
| SEQ ID NO: 26 (Kabat) | HCDR3 | TGGACTACCGGCACAGGCGCCTAC |
| SEQ ID NO: 27 (Chothia) | HCDR1 | GGCTACACCTTCACTACCTAC |
| SEQ ID NO: 28 (Chothia) | HCDR2 | TACCCGGCACCCGGCGGC |
| SEQ ID NO: 26 (Chothia) | HCDR3 | TGGACTACCGGCACAGGCGCCTAC |
| BAP049- 클론 - E LC | | |
| SEQ ID NO: 29 (Kabat) | LCDR1 | AAATCTAGTCAGTCACTGCTGGATAG CGGTAATCAGAAGAACTTCCTGACC |
| SEQ ID NO: 30 (Kabat) | LCDR2 | TGGGCCTCTACTAGAGAATCA |
| SEQ ID NO: 31 (Kabat) | LCDR3 | CAGAACGACTATAGCTACCCCTACAC C |
| SEQ ID NO: 32 (Chothia) | LCDR1 | AGTCAGTCACTGCTGGATAGCGGTAA TCAGAAGAACTTC |
| SEQ ID NO: 33 (Chothia) | LCDR2 | TGGGCCTCT |
| SEQ ID NO: 34 (Chothia) | LCDR3 | GACTATAGCTACCCCTAC |

[0163]

다른 예시적인 PD-1 억제제

[0164]

일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 니볼루맙(Bristol-Myers Squibb)이며, 또한 MDX-1106, MDX-1106-04, ONO-4538, BMS-936558, 또는 OPDIVO®로도 알려져 있다. 니볼루맙(클론 5C4) 및 다른 항-PD-1 항체는 그들의 전문이 참조로 포함되는 US 8,008,449호 및 WO 2006/121168호에 개시되어 있다. 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 예를 들어, 표 B에 개시된 니볼루맙의 CDR 서열(또는 집합적으로 모든 CDR 서열), 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열 또는 중쇄 또는 경쇄 서열 중 하나 이상을 포함한다.

[0165]

일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 펨브롤리주맙(Merck & Co)이며, 또한 람브롤리주맙, MK-3475, MK03475, SCH-900475, 또는 KEYTRUDA®로도 알려져 있다. 펨브롤리주맙 및 다른 항-PD-1 항체는 본 명세서에 전문이 참조로 포함된 문헌[Hamid, O. 등 (2013) *New England Journal of Medicine* 369 (2): 134-44], US 8,354,509호, 및 WO 2009/114335에 개시되어 있다. 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 예를 들어, 표 B에 개시된 펨브롤리주맙의 CDR 서열(또는 집합적으로 모든 CDR 서열), 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열 또는 중쇄 또는 경쇄 서열 중 하나 이상을 포함한다.

[0167] 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 CT-011로도 알려져 있는 퍼딜리주맙(CureTech)이다. 퍼딜리주맙 및 다른 항-PD-1 항체는 본 명세서에 전문이 참조로 포함되는 문헌[Rosenblatt, J. 등 (2011) *J Immunotherapy* 34(5): 409-18], US 7,695,715호, US 7,332,582호, 및 US 8,686,119호에 개시되어 있다. 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 예를 들어, 표 B에 개시된 퍼딜리주맙의 CDR 서열(또는 집합적으로 모든 CDR 서열), 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열 또는 중쇄 또는 경쇄 서열 중 하나 이상을 포함한다.

[0168] 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 AMP-514로도 알려져 있는 MEDI0680(Medimmune)이다. MEDI0680 및 다른 항-PD-1 항체는 그들의 전문이 참조로 포함되는 US 9,205,148호 및 WO 2012/145493호에 개시되어 있다. 일 실시 형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 MEDI0680의 CDR 서열(또는 집합적으로 모든 CDR 서열), 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열, 또는 중쇄 또는 경쇄 서열 중 하나 이상을 포함한다.

[0169] 추가의 알려져 있는 항-PD-1 항체는 예를 들어 전문이 참조로 포함되는 WO 2015/112800호, WO 2016/092419호, WO 2015/085847호, WO 2014/179664호, WO 2014/194302호, WO 2014/209804호, WO 2015/200119호, US 8,735,553호, US 7,488,802호, US 8,927,697호, US 8,993,731호 및 US 9,102,727호에 기재된 것들을 포함한다.

[0170] 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체는 본원에 기재된 항-PD-1 항체 중 하나와 동일한, PD-1 상의 에피토프에 결합하기 위해 경쟁하고/거나 이에 결합하는 항체이다.

[0171] 일 실시형태에서, PD-1 억제제는 예를 들어 전문이 참조로 포함되는 US 8,907,053호에 기재된 바와 같이, PD-1 신호전달 경로를 억제하는 웹타이드이다. 일 실시형태에서, PD-1 억제제는 면역부착소(예를 들어, 불변 영역(예를 들어, 면역글로불린 서열의 Fc 영역)에 융합된 PD-L1 또는 PD-L2의 세포외 또는 PD-1 결합 부분을 포함하는 면역부착소)이다. 일 실시형태에서, PD-1 억제제는 예를 들어, 전문이 참조로 포함되는 WO 2010/027827 및 WO 2011/066342에 개시된, AMP-224(B7-DC Ig(Ampl immune))이다.

[0172] [표 B]

다른 예시적인 항-PD-1 항체 분자의 아미노산 서열

| 니볼루맙 | | |
|---------------|----|---|
| SEQ ID NO: 35 | HC | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDKASGI TFSNSGMHWVRQAPGKGLEWAVIWIY DGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFL QMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVVDHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK |
| SEQ ID NO: 36 | LC | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQS VSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLPEPDF AVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTV AAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 펨브롤리주맙 | | |
| SEQ ID NO: 37 | HC | QVQLVQSGVEVKPGASVKVSCKASG YTFTNYYMYWWRQAPGQGLEWMGGIN PSNGGTFNEKFKNRVTLLTDSSTTA YMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDM GFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA |

[0173]

| | | |
|---------------|----|--|
| | | PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK VDKRVESKGPPCPCPAPEFLGGPSV FLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK |
| SEQ ID NO: 38 | LC | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKG VSTSGSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLA SYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLE PEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 피밀리주맙 | | |
| SEQ ID NO: 39 | HC | QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGY TFTNYGMNWRQAPGQGLQWMGWIN TDSGESTYAEFKGRFVFSLDTSVNTA YLQITSLTAEDTGMYFCVRVGYDALDY WGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPCCPAPELLGGPSVFL FPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE PEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ ID NO: 40 | LC | EIVLTQSPSSLSASVGDRVITCSARSS VSYMHWFQQKPGKAPKLWYRTSNLAS GVPSRFSGSGSGTSYCLTINSLQPEDF ATYYCQQQRSSFPFLTGGGTKEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |

[0174]

항 PD-L1 항체 분자의 예

[0175]

일 실시형태에서, 조합 생성물은 화학식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 공-결정, 및 항-PD-L1 항체 분자 예컨대, 본 명세서에 기재된 것들을 포함한다.

[0176]

예정사 리간드 1(PD-L1)은 면역억제 수용체 예정사 1(Pd-1)에 대한 리간드로서 기재되어 있다. PD-1에 대한 PD-L1의 결합으로 인해, T 세포 수용체-매개된 림프구 증식 및 사이토카인 분비의 억제가 유도된다(Freeman 등 (2000) *J Exp Med* 192:1027-34). 따라서, PD-L1의 차단은 항 종양 면역의 증진을 유도할 수 있다.

[0177]

여러 세포 유형은 PD-L1을 발현한다. 예를 들어 PD-L1은 활성화된 T 세포, 수지상 세포(DC), 자연 살해(NK) 세포, 대식세포, B 세포, 단핵구 및 혈관 내피 세포에서 발현된다. PD-L1은 인간 폐암, 난소암 및 결장암을 포함하는 많은 암 및 다양한 골수종에서 발현된다(Iwai 등 (2002) *PNAS* 99:12293-7; Ohigashi 등 (2005) *Clin Cancer Res* 11:2947-53; Okazaki 등 (2007) *Intern. Immun.* 19:813-24]; Thompson 등 2006 *Cancer Res*. 66:3381-5). PD-L1 발현은 신장암, 난소암, 방광암, 유방암, 위암 및 췌장암을 포함하는 다양한 유형의 암에서

불리한 예후와 강한 상관 관계가 있다.

[0179] 대부분의 종양 침윤 T 림프구는 정상 조직의 T 림프구 및 말초 혈액 T 림프구와 비교하여 PD-1을 우세하게 발현 한다. 이는 종양-반응성 T 세포에서 PD-1의 상향-조절이 손상된 항종양 면역 반응의 원인이 될 수 있음을 나타낸다(Ahmadzadeh 등 (2009) *Blood* 114:1537-44). 따라서, PD-1 발현 T 세포와 상호작용하는 PD-L1 발현 종양 세포에 의해 매개되는 PD-L1 신호전달은 T 세포 활성화의 감쇠 및 면역 감시의 회피를 유도할 수 있다(Sharpe 등 (2002) *Nat Rev Immunol.* 2:116-26]; Keir 등 (2008) *Annu Rev Immunol.* 26:677-704). PD-1 차단은 이펙터 T 세포의 강화된 동원에 의해 면역원성이 낮은 종양 세포의 혈행 전파를 억제할 수 있다(Iwai 등 (2005) *Int. Immunol.* 17:133-144).

[0180] 항-PD-L1은 예를 들어 PD-1 및 B7-1과의 억제성 상호작용을 차단함으로써 T-세포 면역을 증진시킬 수 있다. 항-PD-1은 또한 PD-L2/PD-1을 통한 면역 조절을 허용할 수 있다. PD-1과 B7-1은 모두 T 세포, B 세포, DC 및 대식 세포에서 발현되며, 이 세포 유형에서 B7-1과 PD-L1 사이의 양방향 상호작용이 가능하다. 비-조혈 세포상의 PD-L1은 T 세포 상의 PD-1 뿐만 아니라 B7-1과 상호작용할 수 있다.

[0181] 일부 실시형태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C, 또는 MDX-1105로부터 선택된다.

[0182] 일부 실시형태에서, 항-PD-L1 항체는 MSB0010718C이다. MSB0010718C(A09-246-2로도 지칭됨; Merck Serono)는 PD-L1에 결합하는 모노클로널 항체이다. MSB0010718C 및 다른 인간화 항-PD-L1 항체는 WO2013/079174호에 개시되어 있으며, 본원에 개시된 서열(또는 이와 실질적으로 동일하거나 유사한 서열, 예를 들어 특정된 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 이상 동일한 서열)을 갖는다. MSB0010718C의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은 적어도 하기를 포함한다:

[0183] 중쇄(WO2013/079174호에 개시된 SEQ ID NO: 24)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITF
YADKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTVDYWGQGTLTVSS

(SEQ ID NO: 42)

[0184] 경쇄(WO2013/079174호에 개시된 SEQ ID NO: 25)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGNYVSWYQQHPGKAPKLMIVDVSN
RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDAYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVL (SEQ

[0185] ID NO: 43)

[0186] 일 실시형태에서, PD-L1 억제제는 YW243.55.S70이다. YW243.55.S70 항체는 WO 2010/077634에 기재된 항-PD-L1(각각 SEQ ID NO: 20 및 21에 개시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열)이고, 본 명세서에 개시된 서열(또는 실질적으로 동일하거나 유사한 서열, 예를 들어, 명시된 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 이상 동일한 서열)을 갖는다.

[0187] 일 실시형태에서, PD-L1 억제제는 MDX-1105이다. BMS-936559로도 알려져 있는 MDX-1105는 WO2007/005874호에 개시된 항-PD-L1 항체이며, 본원에 개시된 서열(또는 이와 실질적으로 동일하거나 유사한 서열, 예를 들어 특정된 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 이상 동일한 서열)을 갖는다.

[0188] 일 실시형태에서, PD-L1 억제제는 MDPL3280A(Genentech/Roche)이다. MDPL3280A는 PD-L1에 결합하는 인간 Fc 최적화된 IgG1 모노클로널 항체이다. MDPL3280A 및 PD-L1에 대한 다른 인간 모노클로널 항체는 미국 특허 7,943,743호 및 미국 특허 출원 공개 20120039906호에 개시되어 있다.

[0189] 또 다른 실시형태에서, PD-L1 억제제는 전문이 참조로 포함되는 표 제 "PD-L1에 대한 항체 분자 및 이의 용도"의 2015년 10월 13일자 공개된 US 2016/0108123호에 개시된 항-PD-L1 항체 분자이다.

[0190] 일 실시형태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 BAP058-hum01, BAP058-hum02, BAP058-hum03, BAP058-hum04, BAP058-hum05, BAP058-hum06, BAP058-hum07, BAP058-hum08, BAP058-hum09, BAP058-hum10, BAP058-hum11, BAP058-hum12, BAP058-hum13, BAP058-hum14, BAP058-hum15, BAP058-hum16, BAP058-hum17, BAP058-클론-K, BAP058-클론-L, BAP058-클론-M, BAP058-클론-N, 또는 BAP058-클론-O 중 임의의 것의 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 US 2016/0108123호의 표 1에 기재된 바와 같거나 표 1의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 적어도 하나 또는 두개의 중쇄 가변 도메인(선택적으로 불변 영역 포함), 적어도 하나 또는 두개의 경쇄 가변 도메인(선택적으

로 불변 영역 포함), 또는 둘다, 또는 상기 서열 중 임의의 것과 실질적으로 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한) 서열을 포함한다.

[0192] 또 다른 실시형태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 본원에 기재된 항체, 예를 들어 BAP058-hum01, BAP058-hum02, BAP058-hum03, BAP058-hum04, BAP058-hum05, BAP058-hum06, BAP058-hum07, BAP058-hum08, BAP058-hum09, BAP058-hum10, BAP058-hum11, BAP058-hum12, BAP058-hum13, BAP058-hum14, BAP058-hum15, BAP058-hum16, BAP058-hum17, BAP058-클론-K, BAP058-클론-L, BAP058-클론-M, BAP058-클론-N, 또는 BAP058-클론-O 중 임의의 것으로부터 선택되거나; US 2016/0108123호의 표 1에 기재된 바와 같거나, 또는 US 2016/0108123호의 표 1의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역으로부터의 적어도 1, 2 또는 3개의 상보성 결정 영역(CDR); 또는 상기 서열 중 임의의 것과 실질적으로 동일한(예를 들어 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한) 서열을 포함한다.

[0193] 또 다른 실시형태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 US 2016/0108123호의 표 1에 나타나 있거나, US 2016/0108123의 표 1에 나타낸 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역으로부터의 적어도 1, 2 또는 3개의 CDR(또는 집합적으로 모든 CDR)을 포함한다. 일 실시형태에서, CDR 중 하나 이상(또는 집합적으로 모든 CDR)은 US 2016/0108123호의 표 1에 나타내거나, US 2016/0108123호의 표 1에 나타낸 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 아미노산 서열에 비하여, 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 변경, 예를 들어 아미노산 치환 또는 결실을 갖는다.

[0194] 또 다른 실시형태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 US 2016/0108123호의 표 1에 나타내거나, 표 1에 나타낸 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역으로부터의 적어도 1, 2 또는 3개의 CDR(또는 집합적으로 모든 CDR)을 포함한다. 일 실시형태에서, CDR 중 하나 이상(또는 집합적으로 모든 CDR)은 US 2016/0108123호의 표 1에 나타내거나, US 2016/0108123호의 표 1에 나타낸 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 아미노산 서열에 비하여, 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 변경, 예를 들어 아미노산 치환 또는 결실을 갖는다. 특정 실시형태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 경쇄 CDR 내의 치환, 예를 들어 경쇄의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 내의 하나 이상의 치환을 포함한다.

[0195] 또 다른 실시형태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 표 1에 나타내거나, US 2016/0108123호의 표 1에 나타낸 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로부터의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 CDR(또는 집합적으로 모든 CDR)을 포함한다. 일 실시형태에서, CDR 중 하나 이상(또는 집합적으로 모든 CDR)은 US 2016/0108123호의 표 1에 나타내거나, US 2016/0108123호의 표 1에 나타낸 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 아미노산 서열에 비하여, 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 변경, 예를 들어 아미노산 치환 또는 결실을 갖는다.

[0196] 일 실시형태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 본원에 기재된 항체, 예를 들어 Kabat 및 Chothia 정의에 따른 BAP058-hum01, BAP058-hum02, BAP058-hum03, BAP058-hum04, BAP058-hum05, BAP058-hum06, BAP058-hum07, BAP058-hum08, BAP058-hum09, BAP058-hum10, BAP058-hum11, BAP058-hum12, BAP058-hum13, BAP058-hum14, BAP058-hum15, BAP058-hum16, BAP058-hum17, BAP058-클론-K, BAP058-클론-L, BAP058-클론-M, BAP058-클론-N, 또는 BAP058-클론-O 중 임의의 것으로부터 선택되거나; 또는 US 2016/0108123호의 표 1의 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 항체의 중쇄 가변 영역으로부터의 적어도 1, 2 또는 3개의 CDR 또는 초가변 루프(예를 들어 US 2016/0108123호의 표 1에 기재된 Kabat 및 Chothia 정의에 따른 적어도 1, 2 또는 3개의 CDR 또는 초가변 루프); 또는 상기 서열 중 임의의 것과 실질적으로 동일한(예를 들어 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한) 서열; 또는 US 2016/0108123호의 표 1에 나타낸 Kabat 및/또는 Chothia에 따른 1, 2 또는 3개의 CDR 또는 초가변 루프에 비하여, 적어도 하나의 아미노산 변경을 갖지만, 2, 3 또는 4개 이하의 변경(예를 들어 치환, 결실 또는 삽입, 예를 들어 보존적 치환)을 갖는 서열을 포함한다.

[0197] 일 실시형태에서, 항-PD-L1 항체 분자는 예를 들어 US 2016/0108123호의 표 1에 개시된 바와 같이, Kabat 등 ((1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md)에 따른 VH CDR1 또는 문헌 [Chothia 등 (1992) J. Mol. Biol. 227:799-817]에 따른 VH 초가변 루프 1, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, VH CDR1의 Kabat 및 Chothia CDR의 조합은 아미노산 서열 GYTFTTYWMH(SEQ ID NO: 63) 또는 이와 실질적으로 동일한(예를 들어 적어도 하나의 아미노산 변경을 갖지만, 2, 3 또는 4개 이하의 변경(예를 들어 치환, 결실 또는 삽입, 예를 들어 보존적 치환)을 갖는) 아미노산 서열을 포함한다. 항-PD-L1 항체 분자는 예를 들어, US 2016/0108123호의 표 1에 제시된 바와 같이, 예를 들어 Kabat 등에 따른 VH CDR 2~3 및 Kabat 등에 따른 VL CDR 1~3을 추가로 포함할 수

있다.

[0198] 바람직한 실시형태에서, 본 발명에 사용하기 위한 항 PD-L1 항체 분자는 하기를 포함한다:

[0199] (a) SEQ ID NO: 47의 VHCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 48의 VHCDR2 아미노산 서열; 및 SEQ ID NO: 46의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH); 및 SEQ ID NO: 52의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 53의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 54의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL);

[0200] (b) SEQ ID NO: 44의 VHCDR1 아미노산 서열; SEQ ID NO: 45의 VHCDR2 아미노산 서열; 및 SEQ ID NO: 46의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VH; 및 SEQ ID NO: 49의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 50의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 51의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VL;

[0201] (c) SEQ ID NO: 63의 VHCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 48의 VHCDR2 아미노산 서열, 및 SEQ ID NO: 46의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VH; 및 SEQ ID NO: 52의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 53의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 54의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VL; 또는

[0202] (d) SEQ ID NO: 63의 VHCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 45의 VHCDR2 아미노산 서열, 및 SEQ ID NO: 46의 VHCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VH; 및 SEQ ID NO: 52의 VLCDR1 아미노산 서열, SEQ ID NO: 53의 VLCDR2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 54의 VLCDR3 아미노산 서열을 포함하는 VL.

[0203] 이전 실시형태의 일 양태에서, 본 발명에 사용하기 위한 항-PD-L1 항체 분자는 SEQ ID NO: 55의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 SEQ ID NO: 58의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0204] 이전 실시형태의 일 양태에서, 본 발명에 사용하기 위한 항-PD-L1 항체 분자는 SEQ ID NO: 62의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO: 60의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0205] [표 C]

인간화된 항-PD-L1 mAb BAP058-hum013에 대한 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열. 중쇄 및 경쇄 CDR, 중쇄 및 경쇄 가변 영역, 및 중쇄 및 경쇄의 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열이 제시된다.

| BAP058-hum13-HC | | |
|--------------------------------------|-------|------------|
| SEQ ID NO: 63 (조합된 Chothia 및 Kabat) | HCDR1 | GYTFTSYWMY |
| SEQ ID NO: 44 (Kabat) | HCDR1 | SYWMY |

[0206]

| | | |
|-------------------------|--------|---|
| SEQ ID NO: 45 (Kabat) | HCDR2 | RIDPNSGSTKYNEKFKN |
| SEQ ID NO: 46 (Kabat) | HCDR3 | DYRKGLYAMDY |
| SEQ ID NO: 47 (Chothia) | HCDR1 | GYTFTSY |
| SEQ ID NO: 48 (Chothia) | HCDR2 | DPNSGS |
| SEQ ID NO: 46 (Chothia) | HCDR3 | DYRKGLYAMDY |
| SEQ ID NO: 55 | VH | EVQLVQSGAEVKPGATVKISCKVSGYTFT SYWMYWVRQARGQRLEWIGRIDPNSGSTK YNEKFKNRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDYRKGLYAMDYWGQQTTVT SS |
| SEQ ID NO: 56 | DNA VH | GAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGCTG AGGTGAAGAAGCCTGGGCTACAGTGAAA ATCTCCTGCAAGGTTCTGGCTACACCTTC ACCAGTTACTGGATGTACTGGGTGCGACA GGCTCGTGGACAACGCCTGAGTGGATAG GTAAGGATTGATCCTAATAGTGGGAGTACT AAGTACAATGAGAAGTTCAAGAACAGATT ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC GCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAGGACACGGCCGTATTACTGTGCA AGGGACTATAGAAAGGGCTATGCTAT GGACTACTGGGCCAGGGCACCAACCGTG ACCGTGTCCCTCC |
| SEQ ID NO: 62 | 중쇄 | EVQLVQSGAEVKPGATVKISCKVSGYTFT SYWMYWVRQARGQRLEWIGRIDPNSGSTK YNEKFKNRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDYRKGLYAMDYWGQQTTVT SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYPPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSVVTPVSSSLGTKYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPS VFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN |

[0207]

| | | |
|---------------|--------|--|
| | | YKTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGK |
| SEQ ID NO: 57 | DNA 종쇄 | GAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTG AGGTGAAGAAGCCTGGGGCTACAGTGAAA ATCTCCTGCAAGGTTCTGGCTACACCTTC ACCAGTTACTGGATGTACTGGGTGCGACA GGCTCGTGGACAACGCCTTGAGTGGATAG TAGGATTGATCCTAATAGTGGAGTACT AAGTACAATGAGAAGTTCAAGAACAGATT ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC GCTGTATCTTCAAATGAACACGCTGAGAG CCGAGGACACGGCCGTATTACTGTGCA AGGGACTATAGAAAGGGCTATGCTAT GGACTACTGGGCCAGGGCACCAAGGGCCC ACCGTGTCCCTCCGCTTCCACCAAGGGCCC ATCCGTCTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCA GGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG AACCGGTGACGGTGTGTAAGGACTCAGG CGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTC CCGGCTGTCCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT CCAGCAGCTTGGCACGAAGACCTACACC TGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCAAAT ATGGTCCCCATGCCACCGTGCCAGCA CCTGAGTTCTGGGGGACCATCAGTCTT CCTGTTCCCCAAAACCAAGGACACTC TCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACG TGCCTGGTGGTGACGTGAGCCAGGAAG ACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGT GATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTCAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAACGGTACCGT CCTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAG GAGTACAAGTGCAGGTGTCCAACAAAGG |

[0208]

| | | |
|-------------------------|--------|--|
| | | CCTCCCGTCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCC ACAGGTGTACACCTGCCCATCCCAGG AGGAGATGACCAAGAACAGGTCAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGTTCTACCCAG CGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC CTTCTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTG ACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAAATGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTC TCCCTGTCTCTGGTAAA |
| BAP058-hum13-LC | | |
| SEQ ID NO: 49 (Kabat) | LCDR1 | KASQDVGTAVA |
| SEQ ID NO: 50 (Kabat) | LCDR2 | WASTRHIT |
| SEQ ID NO: 51 (Kabat) | LCDR3 | QQYNSYPLT |
| SEQ ID NO:52 (Chothia) | LCDR1 | SQDVGTA |
| SEQ ID NO: 53 (Chothia) | LCDR2 | WAS |
| SEQ ID NO: 54 (Chothia) | LCDR3 | YNSYPL |
| SEQ ID NO: 58 | VL | AIQLTQSPSSLASVGDRVITCKASQDVGT AVAWYLQKPGQSPQLIYWASTRHTGVPSR FSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQY NSYPLTFGQGTKVEIK |
| SEQ ID NO: 59 | DNA VL | GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA CCATCACTGCAAGGCCAGTCAGGATGTG GGTACTGCTGTAGCCTGGTACCTGCAGAA GCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCT ATTGGGCATCCACCCGGCACACTGGGT CCCCTGAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTG GGACAGATTCACCTTACCATCAGTAGC CTGGAAGCTGAAGATGCTGCAACATATTA CTGTCAGCAGTATAACAGCTATCCTCTCAC GTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCA AA |

[0209]

| | | |
|---------------|--------|---|
| SEQ ID NO: 60 | 경쇄 | AIQLTQSPSSLSASVGDRVITCKASQDVGT AVAWYLOKPGQSPQLLIYWASTRHTGVPSR FSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQY NSYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVIFPPSD EQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC |
| SEQ ID NO: 61 | DNA 경쇄 | GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTC CCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC CCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGGATGTG GGTACTGCTGTAGCCTGGTACCTGCAGAA GCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCT ATTGGGCATCCACCCGGCACACTGGGGT CCCCTCGAGGTTCACTGGCAGTGGATCTG GGACAGATTCACCTTACCATCAGTAGC CTGGAAGCTGAAGATGCTGCAACATATTA CTGTCAGCAGTATAACAGCTATCCTCTCAC GTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCA AACGTACGGTGGCTGCACCCTGTCTTC ATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAA ATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGCGCTGC TGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA GTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAG AGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG CCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAG CAGACTACGAGAACACAAAGTCTACGCC TGCAGTCA CCCATCAGGGCCTGAGCTC GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA GAGTGT |

[0210]

면역치료제의 투여량 및 투여.

[0212]

면역치료제(예컨대 항-PD-1 항체 분자 또는 항-PD-L1 분자 항체)는 전신적으로(예를 들어, 경구, 비경구, 피하, 정맥내, 직장내, 근육내, 복강내, 비강내, 경피, 또는 흡입 또는 공동내 투여), 국소 투여, 또는 점막, 예컨대 코, 목 및 기관지로의 도포에 의해 대상체에게 투여될 수 있다.

[0213]

면역치료제(예를 들어, 항-PD-1 항체 분자 또는 항 PD-L1 항체 분자)의 투여량 및 치료 요법은 숙련자에 의해 결정될 수 있다. 특정 구현예에서, 면역치료제(예를 들어, 항-PD-1 항체 분자)는 약 1 내지 30 mg/kg, 예를 들어 약 5 내지 25 mg/kg, 약 10 내지 20 mg/kg, 약 1 내지 5 mg/kg, 또는 약 3 mg/kg의 용량으로 주사에 의해(예를 들어, 피하 또는 정맥내) 투여된다. 투여 스케줄은, 예를 들어 주 1회 내지 매 2주, 3주, 또는 4주마다 1회로 다양할 수 있다. 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 약 10 내지 20 mg/kg의 용량으로 격주 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 약 1 내지 10 mg/Kg, 또는 약 1 내지 5 mg/Kg 또는 약 3 mg/kg의 용량으로 4주마다 투여된다.

[0214]

예를 들어, 항-PD-1 항체 분자는 균일 또는 고정 용량으로 투여 또는 사용된다. 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체 분자는 약 200 mg 내지 500 mg, 예를 들어 약 250 mg 내지 450 mg, 약 300 mg 내지 400 mg, 약 250 mg 내지 350 mg, 약 350 mg 내지 450 mg, 또는 약 300 mg 또는 약 400 mg의 용량(예를 들어, 균일 용량)으로 주사에 의해(예를 들어, 피하 또는 정맥내) 투여된다. 투여 스케줄(예를 들어, 균일 투여 스케줄)은, 예를 들어 주 1회 내지 매 2주, 3주, 4주, 5주, 또는 6주마다 1회로 다양할 수 있다. 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 약 300 mg 내지 400 mg의 용량으로 3주마다 1회 또는 4주마다 1회 투여된다. 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자

는 약 300 mg의 용량으로 3주마다 1회 투여된다. 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 약 400 mg의 용량으로 4주마다 1회 투여된다. 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 약 300 mg의 용량으로 4주마다 1회 투여된다. 일 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 약 400 mg의 용량으로 3주마다 1회 투여된다.

[0215] 또 다른 실시형태에서, 항-PD-1 항체 분자는 약 300 mg 내지 400 mg의 균일 용량으로 3주마다 1회 또는 4주마다 1회 투여된다. 본 실시형태의 서브셋에서, 항-PD-1 항체 분자는 약 400 mg의 균일 용량으로 4주마다 1회 투여된다. 본 실시형태의 또 다른 서브셋에서, 항-PD-1 항체 분자는 약 300 mg의 균일 용량으로 3주마다 1회 투여된다.

[0216] 실시예

[0217] 다음 실시예는 본 발명을 예시하고자 한 것으로, 본 발명에 대한 제한인 것으로 해석되지 않는다. 온도는 섭씨 온도로 주어진다. 달리 언급되지 않는다면, 모든 증발은 감압, 바람직하게는 약 15 mmHg 내지 100 mmHg(= 20~133 mbar)에서 수행된다. 최종 생성물, 중간체 및 출발 물질의 구조는 일반적인 분석방법, 예컨대, 미세분석 및 분광학적 특징, 예를 들어, MS, IR, NMR에 의해 확인된다. 사용된 약어는 당해 분야에서 통상적인 것들이다.

[0218] 본 발명의 화합물을 합성하기 위해 이용되는 모든 출발 물질, 구성 요소, 시약, 산, 염기, 탈수제, 용매, 및 촉매는 상업적으로 이용 가능하거나 당업자에게 알려진 유기 합성 방법에 의해 생산될 수 있다(Houben-Weyl 4th Ed. 1952, Methods of Organic Synthesis, Thieme, Volume 21). 나아가, 본 발명의 화합물은 다음 실시예에 나타나 바와 같이 당업자에게 공지된 유기 합성 방법에 의해 생산될 수 있다.

[0219] 본 발명은 하기 실시예에 의해 제한되지 않으면서 설명된다.

[0220] 약어

[0221] ACN 아세토니트릴

[0222] aq 수성

[0223] br 광범위

[0224] BSA 소혈청 알부민

[0225] CPBA: 3-클로로벤조페옥소산

[0226] d 이중선

[0227] dd 이중 이중선

[0228] DCM 디클로로메탄

[0229] DMF *N,N*-디메틸포름아미드

[0230] DMSO 디메틸су록사이드

[0231] EtOAc 에틸 아세테이트

[0232] g 그램

[0233] h 시간

[0234] HPLC 고성능 액체 크로마토그래피

[0235] IS 내부 표준

[0236] LCMS 질량 분광법과 결합된 액체 크로마토그래피

[0237] M 몰

[0238] m 다중선

[0239] MeOH 메탄올

[0240] min 분

[0241] mL 밀리리터

[0242]

mmol 밀리몰

[0243]

MS 질량 분광분석

[0244]

m/z 질량 대 전하 비

[0245]

NADPH 베타-니코틴아미드 디뉴클레오타이드 포스페이트, 환원된 형태

[0246]

NMR 핵 자기 공명

[0247]

ppm 백만분율

[0248]

rt 실온

[0249]

 R_t 보존 시간

[0250]

s 단일체

[0251]

sat 포화된

[0252]

t 삼중선

[0253]

THF 테트라하이드로푸란

[0254]

UPLC 방법:

[0255]

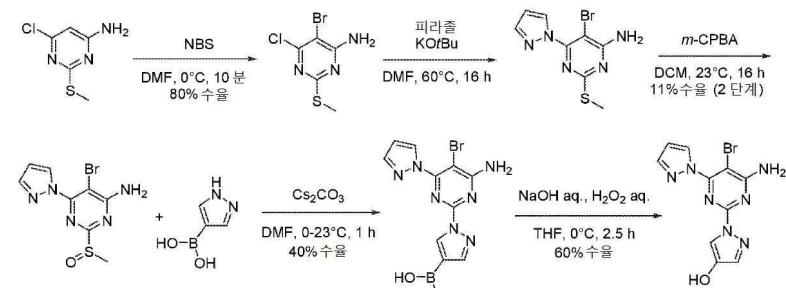
UPLC 2분: Waters UPLC Acquity; 컬럼: Acquity HSS T3, 1.8 mm, 2.1*50 mm, 60°C에서, 용리액 A: 물 + 0.05% HCOOH + 3.75 mM 암모늄 아세테이트, B: ACN + 0.04% HCOOH, 구배: 1.4분 동안 5% 내지 98% B, 유속: 1.0 mL/분.

[0256]

UPLC 10분: Waters UPLC Acquity; 컬럼: Acquity HSS T3, 1.8 mm, 2.1*50 mm, 60°C에서, 용리액 A: 물 + 0.05% HCOOH + 3.75 mM 암모늄 아세테이트, B: ACN + 0.04% HCOOH, 구배: 9.4분 동안 5% 내지 98% B, 0.4분 유지, 유속: 1 mL/분)

[0257]

실시예 1: 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-1H-피라졸-4-올의 제조



[0258]

5-브로모-6-클로로-2-(메틸티오)파리미딘-4-아민

[0260]

0°C에서 DMF(150 mL) 중 6-클로로-2-(메틸티오)파리미딘-4-아민(15.0 g, 85 mmol)의 냉각된 용액에 N-브로모숙신이미드(16.7 g, 94 mmol)를 교반하면서 조금씩 첨가하였다. 10분 후, 0°C에서 물을 첨가하여 반응물을 켄칭시켰다. 상기 반응 혼합물을 염수로 희석하고, EtOAc로 3회 추출하였다. 조합된 유기 상을 포화 NaHCO₃ 수용액, 이어서 염수로 2회 세척하고, 분리하고, Na₂SO₄와 함께 상 분리기를 통해 여과시켜 건조시켰다. 여과액을 진공하에 농축시켜, 표제 화합물(18.8 g, 74 mmol, 80% 수율, 92% 순도)을 무색 고형물로서 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. M/z = 254/256/258 [M+H]⁺, Rt = 0.95분 (UPLC 2분), 1H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 8.03 (br s, 1H), 7.25 (br s, 1H), 2.42 (s, 3H).

5-브로모-2-(메틸티오)-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-4-아민

[0262]

DMF(250 mL) 중 5-브로모-6-클로로-2-(메틸티오)파리미딘-4-아민(17.8 g, 70 mmol), 1H-피라졸(4.7 g, 69 mmol), 및 KOtBu(7.9 g, 70 mmol)의 혼합물을 60°C에서 16시간 동안 교반하였다. 용매를 진공하에 환원시키고, 잔류물을 포화 NaHCO₃ 수용액으로 희석시키고, EtOAc로 3회 추출하였다. 조합된 유기 상을 염수로 세척하고, 분

리하고, Na_2SO_4 와 함께 상 분리기를 통해 여과시켜 건조시켰다. 여과액을 진공하에 농축시켜, 표제 화합물(20 g, 64% 순도)을 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. $M/z = 286/288/290 [\text{M}+\text{H}]^+$, $Rt = 0.85$ 분 (UPLC 2분), ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.35 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 8.03 (br s, 1H), 7.81 (br s, 1H), 7.26 (br s, 1H), 6.55 (s, 1H), 2.46 (s, 3H).

[0263] **5-브로모-2-(메틸술피닐)-6-(1H-페라졸-1-일)페리미딘-4-아민**

DCM(100 mL) 중 5-브로모-2-(메틸티오)-6-(1H-페라졸-1-일)페리미딘-4-아민(20 g, 64% 순도)의 혼탁액에 DCM(100 mL) 중 3-클로로벤조페옥소산(9.3 g, 53.7 mmol)의 용액을 0°C에서 20분동안 교반하면서 적가하고, 수득한 혼합물을 23°C에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하여 침전물을 수집하고, DCM으로 세척하였다. 고형물을 진공하에 건조시켜 표제 화합물(2.4 g, 7.6 mmol, 2단계 동안 11% 수율)을 무색 고형물로서 수득하였다. $M/z = 302/304 [\text{M}+\text{H}]^+$, $Rt = 0.53$ 분 (UPLC 2분), ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.63 (br s, 1H), 8.38 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 6.60–6.61 (m, 1H), 2.86 (s, 3H).

[0265] **(1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-페라졸-1-일)페리미딘-2-일)-1H-페라졸-4-일)보론산**

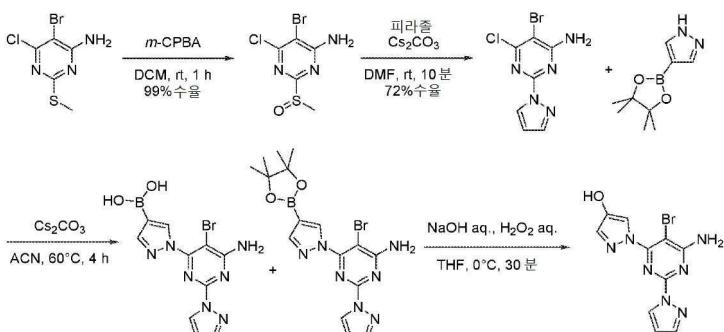
DMF(1 mL) 중 5-브로모-2-(메틸술피닐)-6-(1H-페라졸-1-일)페리미딘-4-아민(50 mg, 0.17 mmol) 및 (1H-페라졸-4-일)보론산(18 mg, 0.17 mmol)의 혼합물에 0°C에서 Cs_2CO_3 (54 mg, 0.17 mmol)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 23°C에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물로 희석하고, EtOAc 로 3회 추출하였다. 조합된 유기상을 물로 세척하고, 이어서 염수로 세척하고, 분리하고, Na_2SO_4 와 함께 상 분리기를 통해 여과시켜 건조시켰다. 여과액을 진공하에 농축시켜, 표제 화합물(30 mg, 0.066 mmol, 40% 수율)을 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. $M/z = 350/352 [\text{M}+\text{H}]^+$, $Rt = 0.55$ 분 (UPLC 2분).

[0267] **1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-페라졸-1-일)페리미딘-2-일)-1H-페라졸-4-올**

THF(1 mL) 중 (1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-페라졸-1-일)페리미딘-2-일)-1H-페라졸-4-일)보론산(30 mg, 0.066 mmol)의 격렬하게 교반된 용액에 25wt% NaOH 수용액(0.021 mL, 0.13 mmol) 및 30% H_2O_2 수용액(0.020 mL, 0.20 mmol)을 0°C에서 첨가하였다. 30분 후에 또 다른 30% H_2O_2 수용액(0.020 mL, 0.20 mmol)을 첨가하고, 그 혼합물을 동일한 온도에서 총 2.5시간 동안 교반하였다. 반응물을 포화된 NH_4Cl 수용액으로 켄칭한 다음, 물로 희석하고, DCM으로 4회 및 DCM/MeOH 4/1 혼합물로 3회 추출하였다. 조합된 유기상을 상 분리기를 통해 여과하여 건조시키고, 여과액을 진공하에 농축시켰다. 조 생성물을 분리물 상에 흡수시키고 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다(ISCO, 12 g-실리카-redisep-컬럼, 유속: 30 mL/분, 용매: $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 1:0으로부터, 3분 동안 유지, 그리고 나서 25분 동안 96:4로 유지). 생성물 분획을 조합하고, 진공하에 농축시켜 표제 화합물(14 mg, 0.040 mmol, 60% 수율)을 무색의 고형물로 수득하였다. $M/z = 322/324 [\text{M}+\text{H}]^+$, $Rt = 0.58$ 분 (UPLC 2분); $Rt = 2.27$ 분; 254 nm에서의 순도: >95% (UPLC 10분), ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 9.23 (br s, 1H), 8.44 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 8.32 (br s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.90–7.81 (m, 1H), 7.46 (br s, 2H), 6.63–6.50 (m, 1H).

[0269] 대안적으로, 6-클로로-2-(메틸티오)페리미딘-4-아민은 염기의 존재하에 페라졸과 먼저 반응하여, 2-(메틸티오)-6-(1H-페라졸-1-일)페리미딘-4-아민을 생성시키고; NBS로 처리하여 5-브로모-2-(메틸티오)-6-(1H-페라졸-1-일)페리미딘-4-아민을 생성시켰다.

[0270] **실시예 1A: 1-(6-아미노-5-브로모-2-(1H-페라졸-1-일)페리미딘-4-일)-1H-페라졸-4-올의 제조**



[0271] **5-브로모-6-클로로-2-(메틸술피닐)페리미딘-4-아민**

- [0273] 450 ml의 DCM 중 5-브로모-6-클로로-2-(메틸티오)피리미딘-4-아민 13 g(52 mmol)의 용액에, 100 ml의 DCM에 용해된 m-클로로페벤조산(77%)(Sigma-Aldrich) 13 g(57 mmol)을 천천히 적가하였다. 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 형성된 백색 침전물을 여과하고, DCM으로 수회 세척하고, 건조시켰다. 표제 화합물 14 g(99%)을 수득하였다. M/z = 270/272 [M+H]⁺, Rt = 0.56분 (UPLC 2분), 1H-NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.17 (d, 2H), 2.78 (s, 3H).
- [0274] 5-브로모-6-클로로-2-(1H-피라졸-1-일)피리미딘-4-아민
- [0275] 5-브로모-6-클로로-2-(메틸술피닐)피리미딘-4-아민 2 g(7.4 mmol)을 30 ml의 DMF에 혼탁시켰다. 이 혼탁액에 1H-피라졸 0.5 g(7.4 mmol) 및 탄산세슘 1.5 g(4.4 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 10분 동안 강하게 교반하였다. 상기 용액을 200 ml의 냉수에 부었다. 형성된 침전물을 여과하고, 냉수로 세척하고 건조시켰다. 목적하는 생성물을 백색 고체(1.5 g, 72%)로 수득하였다. M/z = 274/276 [M+H]⁺, Rt = 0.80분 (UPLC 2분), 1H-NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.44 (d, 1H), 8.15 (d, 2H), 7.81 (d, 1H), 6.56 (dd, 1H).
- [0276] (1-(6-아미노-5-브로모-2-(1H-피라졸-1-일)피리미딘-4-일)-1H-피라졸-4-일)보론산
- [0277] 10 ml의 아세토니트릴 중 5-브로모-6-클로로-2-(1H-피라졸-1-일)피리미딘-4-아민 0.10 g(0.36 mmol), 4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸 0.14 g (0.73 mmol) 및 탄산세슘 0.12 g(0.36 mmol)의 혼합물을 밀봉 유리 튜브에서 60°C에서 4시간 동안 교반하였다. 그후, 용매를 감압하에 제거하였다. 얻어진 고체를 에테르/펜탄으로 세척하고, 건조시켰다. 보론산 및 보론산 에스테르의 혼합물을 추가 정제없이 다음 단계에서 사용하였다.
- [0278] 1-(6-아미노-5-브로모-2-(1H-피라졸-1-일)피리미딘-4-일)-1H-피라졸-4-올
- [0279] 0°C로 냉각시킨, THF(2.5 ml) 중 (1-(6-아미노-5-브로모-2-(1H-피라졸-1-일)피리미딘-4-일)-1H-피라졸-4-일)보론산 또는 5-브로모-2-(1H-피라졸-1-일)-6-(4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸-1-일)피리미딘-4-아민의 용액에 2 ml의 NaOH 1N 및 H₂O₂(30%)(0.23 ml, 2.32 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 반응액을 HCl 1N의 첨가에 의해 pH 3~4로 산성화하고, 에틸 아세테이트로 추출하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 진공 농축시켰다. 조 생성물을 DCM-MeOH(2~5%)를 사용하여 실리카 젤 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. M/z = 322/324 [M+H]⁺, Rt = 0.58분 (UPLC 2분); 1H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ 9.18 (br s, 1H), 8.57-8.78 (m, 1H), 8.29 (br s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.40 (br s, 1H), 6.55 (s, 1H).
- [0280] 실시예 2 - 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)피리미딘-4-아민의 대사물의 분리/특징화: 액체 크로마토그래피 및 질량 분광분석을 이용한 랫트, 개 및 인간 마이크로솜에서의 시험관내 대사물 확인
- [0281] 약어:
- [0282] ACN: 아세토니트릴
- [0283] CC: 보정 곡선
- [0284] IS: 내부 표준
- [0285] DMSO: 디메틸су폴사이드
- [0286] MRM: 다중 반응 모니터링
- [0287] NADH: 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오타이드 포스페이트(환원됨)
- [0288] Rpm: 분당 회전 수
- [0289] 간 마이크로솜
- [0290] 랫트 간 마이크로솜(수컷, 풀링됨, 스프라그 돌리(Sprague Dawley))
- [0291] 공급원: XenoTech, LLC (Kansas, USA)
- [0292] 단백질 함량: 20 mg/ml
- [0293] 카탈로그 번호: R I 000, 로트 번호: 0710623

[0294] 개 간 마이크로솜(수컷, 풀링됨, 비글(Beagle))

[0295] 공급원: XenoTech, LLC (Kansas, USA)

[0296] 단백질 함량: 20 mg/mL

[0297] 카탈로그 번호: D I 000, 로트 번호: 0810143

[0298] 인간 간 마이크로솜(성별 혼합, 풀링됨)

[0299] 공급원: XenoTech, LLC (Kansas, USA)

[0300] 단백질 함량: 20 mg/mL

[0301] 카탈로그 번호: H061 0, 로트 번호: 101042

[0302] 스톡 용액 및 시약

[0303] 시험 항목

[0304] 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)페리민딘-4-아민의 2 mM 및 0.2 mM 스톡 용액을 시험관내 배양을 위해 DMSO에서 제조하였다. 간 마이크로솜 배양물내 최종 유기 함량은 0.5%였다.

[0305] 1-(6-아미노-5-브로모-2-(1H-피라졸-1-일)-페리미딘-4-일)-1H-피라졸-4-올 및 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-페리미딘-4-일)-1H-피라졸-6-올의 2.5 mM 스톡 용액을 DMSO에서 분리하여 제조하였다. 상기 스톡 용액을 아세토니트릴에서 추가로 희석하여, 크로마토그래피 실시를 위한 1 uM 농도의 1-(6-아미노-2-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-페리미딘-4-일)-1H-피라졸-4-올 및 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-페리미딘-4-일)-1H-피라졸-6-올을 수득하였다.

[0306] 디클로페낙 및 베라파밀의 0.1 mM 스톱 용액을 시험관내 배양을 위해 DMSO에서 제조하였다. 간 마이크로솜 배양물내 최종 유기 함량은 0.5%였다.

[0307] 시험관내 마이크로솜 배양

[0308] 간 마이크로솜 단백질(0.5 mg/mL에 대한 25 uL; 0.3 mg/mL에 대한 15 uL), NADPH(100 uL, 2 mM 최종 농도) 및 인산 완충액(0.5 mg/mL에 대한 870 uL; 0.3 mg/mL에 대한 880 uL)을 오비탈 셰이커 배양기내 미세원심분리 투브에서 10분간 배양하고, 37°C에서 유지하였다. 5 uL의 2 mM 및 0.2 mM 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)페리민딘-4-아민(0.5 mg/mL 단백질에 대한 10 uM 최종 농도; 0.3 mg/mL 단백질에 대한 1 uM 최종 농도; 0.5% 최종 DMSO 농도)을 스파이킹하여 반응을 개시하고, 샘플을 37°C에서 배양하였다. 분취액(200 uL)을 반응 투브로부터 0, 60 및 120분에 회수하고, 100 uL 아세토니트릴을 첨가하여 반응물을 켄칭하였다. 반응은 이중으로 수행하였다. 상기 켄칭된 샘플을 14000 rpm(약 21000 g)에서 10분동안 원심분리하고(Eppendorf Centrifuge 5810 R), 상층액을 LCMS/MS로 분석하였다.

[0309] 대조군 배양(NADPH가 첨가되지 않음) 및 블랭크 배양(시험 항목이 첨가되지 않음)을 각 종에 대해 단일항에서 수행하였다. 상기 샘플들을 0분 및 120분에 회수하고, 아세토니트릴을 사용하여 켄칭하였다. 상청액을 임의의 비 마이크로솜 분해 및 매트릭스 간섭에 대해 분석하였다. 랫트 및 인간 간 마이크로솜내 디클로페낙 및 개 간 마이크로솜내 베라파밀을 양성 대조군으로 사용하였다. 반응 및 대조군 실험을 단일항에서 수행하였다. 디클로페낙 및 베라파밀 대사 회전율 데이터는 사내 이력 데이터와 일치하였다.

[0310] 분석 방법 및 계측 조건

[0311] 샘플을 단백질 침전법을 사용하여 처리한 다음, 텐덤 질량 분광분석(API 4000 질량 분광분석기)과 결합된 HPLC에서 28분의 실행 시간으로 선형 구배를 사용하여 분석하였다. 각 샘플을 주사하고, Q1(MH+/MH-) 및 MS/MS에 대해 개별적으로 스캐닝하였다.

[0312] 시험 항목이 없는 블랭크 샘플을 사용하여 매트릭스 간섭을 평가한 후 Q1 스캔에서 다양한 가능한 대사물 피크를 확인하였으며, 단편화 패턴(MSIMS 스캔)으로부터 확인하였다. 분석 방법의 요약은 표 9에 제시되어 있다.

[0313]

[표 9]

크로마토그래피 및 질량 분광분석 조건

| 크로마토그래피 조건: | | | |
|---------------|---|--|---|
| 컬럼: | Kromasil C18, 150x4.6 mm, 5 μ m (크로마토그래피 서비스) | | |
| 주입 용량 | 10 μ L | | |
| 유속: 실행 시간 | 900 μ L/분 28분 | | |
| 샘플 냉각기 온도 | 6°C | | |
| 컬럼 오븐 온도 | 40°C | | |
| 선행 구배 | 시간 (분) | 5 mM 암모늄 포르메이트(0.05% 포름산) 80% + 20% ACN | 5 mM 암모늄 포르메이트(0.05% 포름산) 20% + 80% ACN |
| | 0.01 | 95 | 5 |
| | 5 | 95 | 5 |
| | 23 | 5 | 95 |
| | 24 | 95 | 5 |
| | 28 | 95 | 5 |
| 질량 분광분석 조건: | | | |
| 기기 | API 4000 LC-MS/MS | | |
| 스캐닝 모드 | Q1 | MS/MS | |
| 스캐닝 범위/생성물 이온 | 100 ~ 1000 amu | 308 | 324 |
| 탈클러스터링 포텐셜 | 60 | 60 | 60 |
| 입구 포텐셜 | 10 | 10 | 10 |
| 충돌 에너지 | - | 35 | 35 |
| 이온화 모드 | +ve | +ve | +ve |
| 충돌 가스 | - | 6 | 6 |
| 커튼 가스 | 20 | 15 | 15 |
| 이온 소스 가스 1 | 40 | 30 | 30 |
| 이온 소스 가스 2 | 50 | 60 | 60 |
| 이온 스프레이 전압 | 5500 | 5500 | 5500 |
| 온도 | 500 | 500 | 500 |

[0314]

변경된 분석 방법:

[0315]

보존 시간을 증가시키고, 확인된 M-I 대사물 이외의 다른 대사물을 평가하기 위해, 대안적인 분석 방법을 또한 개발하였다. 변경된 분석 방법을 사용하여 시험관내 배양된 샘플과 함께 1-(6-아미노-5-브로모-2-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-4-일)-1H-피라졸-4-올 및 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올 (1 μ M)의 수용액을 공-크로마토그래피하여, 동일성을 확인하였다. 변경된 방법의 요약은 표 10에 제시되어 있다.

[0317]

[표 10]

변경된 크로마토그래피 및 질량 분광분석 조건

| 크로마토그래피 조건: | | | |
|---------------|--|-----------------|----------------|
| 컬럼: | Kromasil C18, 150x4.6 mm, 5 μm (크로마토그래피 서비스) | | |
| 주입 용량 | 10 μL | | |
| 유속: 실행 시간 | 600μL/분 28분 | | |
| 샘플 냉각기 온도 | 6°C | | |
| 컬럼 오븐 온도 | 40°C | | |
| | 시간 (분) | 수 중 0.1% 포름산 | ACN 중 0.1% 포름산 |
| 선형 구배 | 0.01 | 95 | 5 |
| | 5 | 95 | 5 |
| | 23 | 5 | 95 |
| | 24 | 95 | 5 |
| | 28 | 95 | 5 |
| 질량 분광분석 조건: | | | |
| 기기 | API 4000 LC-MS/MS | | |
| 스캐닝 모드 | Q1 | MS/MS | |
| 스캐닝 범위/생성물 이온 | 100 ~ 1000 amu | 308 | 324 |
| 탈클러스터링 포텐셜 | 60 | 60 | 60 |
| 입구 포텐셜 | 10 | 10 | 10 |
| 충돌 에너지 | - | 35 | 35 |
| 이온화 모드 | +ve | +ve | +ve |
| 충돌 가스 | - | 6 | 6 |
| 커튼 가스 | 20 | 15 | 15 |
| 이온 소스 가스 1 | 40 | 30 | 30 |
| 이온 소스 가스 2 | 50 | 60 | 60 |
| 이온 스프레이 전압 | 5500 | 5500 | 5500 |
| 온도 | 500 | 500 | 500 |

[0318]

인간 간 마이크로솜에서 질량 균형 측정

[0319]

5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)페리민딘-4-아민 및 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-1H-피라졸-4-올의 스톡 용액을 DMSO에서 순차적으로 희석하여, 각각 1, 0.5 및 0.25 mM 및 0.5, 0.25 및 0.125 mM의 스파이킹 용액 농도를 수득하였다.

[0320]

5 uL의 각 스파이킹 용액을 995 uL의 배양 완충액으로 스파이킹하여, 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)페리민딘-4-아민 및 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-1H-피라졸-4-올의 보정 표준을 제조하여, 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)페리민딘-4-아민에 대한 10, 5, 2.5 및 1.25 uM 샘플 및 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-1H-피라졸-4-올에 대한 5, 2.5, 1.25 및 0.625 uM 샘플을 수득하였다.

[0321]

5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)페리민딘-4-아민 및 1-(6-아미노-5-브로모-2-(1H-피라졸-1-일)-1H-피라졸-4-올의 상기 스파이킹된 샘플의 200 uL의 분취액을 100 uL의 아세토니트릴로 희석하였다. 상기 샘플들의 분취액(25 uL)을 100 uL의 내부 표준(Haloperidol, 아세토니트릴 중 1 ug/mL)으로 추가 희석하였다.

[0322]

100 uL의 내부 표준과 함께 25 uL의 켄칭된 샘플을 첨가하여, 배양 샘플을 또한 보정 표준과 유사하게 준비하였다.

[0323]

MRM 모드에서 배양 샘플을 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)페리민딘-4-아민 및 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)-1H-피라졸-4-올에 대하여 독립적으로 정량화하였으며, 방법의 세부사항은 표 11에 제시되어 있다.

[0325]

[표 11]

크로마토그래피 및 질량 분광분석 조건-MRM 분석

| 크로마토그래피 조건: | | | |
|-------------|---|-------------|-------------|
| 컬럼: | Gemini C18, 150x4.6 mm, 5 μm (Phenomenex) | | |
| 주입 용량 | 10 μL | | |
| 유속:실행 시간 | 600μL/분 3분 | | |
| 샘플 냉각기 온도 | 8°C | | |
| 컬럼 오븐 온도 | 40°C | | |
| 이동상: | Milli-Q 물: 메탄올: ACN (10: 30:60, v/v/v), 0.1%의 암모니아수 | | |
| 질량 분광분석 조건: | | | |
| 기기 | API 4000 LC-MS/MS | | |
| 화합물 | 모체 | 대사물 | 활로페리들 |
| MRM 전환 | 308.1/94.0 | 324.0/110.1 | 376.2/165.1 |
| 탈클리스터링 포텐셜 | 70 | 70 | 50 |
| 입구 에너지 | 10 | 10 | 10 |
| 충돌 에너지 | 48 | 40 | 25 |
| 충돌 셀 출구 포텐셜 | 10 | 12 | 10 |
| 이온화 모드 | +ve | | |
| 충돌 가스 | 6 | | |
| 커튼 가스 | 30 | | |
| 이온 소스 가스 1 | 30 | | |
| 이온 소스 가스 2 | 60 | | |
| 이온 스프레이 전압 | 5500 | | |
| 온도 | 550 | | |
| 인터페이스 | ON | | |

[0326]

[0327] 결과

[0328]

대사물의 존재에 대하여 시험관내 샘플을 평가하였다. 단편화 패턴을 갖는 가능한 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)파리민딘-4-아민 대사물에 대한 상이한 유지 시간에서 MH+(Q I) 및 생성물 이온(MS/MS)을 표 1 및 하기에 제시한다.

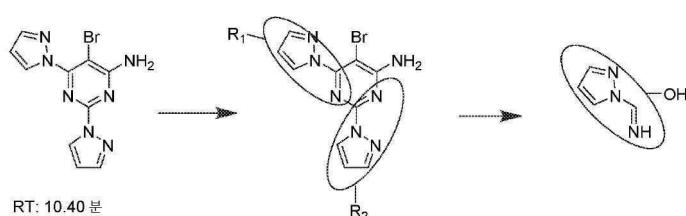
[0329]

[표 1]

모체 (5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)파리민딘-4-아민) 및 이의 대사물에 대한 단편화 패턴

| 가능한 변환 | 유지 시간 | MH+ | 생성물 이온 |
|-----------|-------|-------|--|
| 모체 | 10.36 | 308.0 | 308.0, 208.0, 240.1, 200.3, 147.0, 93.9 |
| 단일산소화 생성물 | 6.22 | 324.2 | 324.2, 266.5, 239.9, 187.0, 161.3, 109.9 |

[0330]



M-I (RT 6.2분, R1은 H이며, R2는 OH이며; R2는 OH이며, R1은 H임)

[0331]

상이한 종에 걸쳐 검출된 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)파리민딘-4-아민의 상기 추정 대사물의 요약은 표 2

에 제시되어 있다.

[0333] [표 2]

검출된 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)페리민딘-4-아민의 대사물의 요약

| 가능한 변환 | 단일산소화(M-I) | 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)페리민딘-4-아민(M) |
|-----------------|------------|-------------------------------------|
| 유지 시간 | 6.22 | 10.36 |
| MH ⁺ | 324.2 | 308.0 |
| 랫트 간 마이크로솜 | X | X |
| 개 간 마이크로솜 | X | X |
| 인간 간 마이크로솜 | X | X |

X는 존재를 나타냄

[0334] 마이크로솜 샘플에서의 모체와 그의 대사물의 상대적인 풍부는 표 3에 제시되어 있다.

[0335] [표 3]

MRM 분석을 사용하여 간 마이크로솜에서 검출된 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)페리민딘-4-아민(10uM) 및 이의 대사물의 상대적 풍부량

| 간 마이크로솜 | 분석물 | 모체(10uM)에 관한 면적 백분율 | | | | | | |
|---------|-----|---------------------|------|------|------|------|------|-------|
| | | 시간 | | 0 분 | | 60 분 | | 120 분 |
| | 복제물 | 세트 1 | 세트 2 | 세트 1 | 세트 2 | 세트 1 | 세트 2 | |
| 랫트 | 모체 | 100 | 100 | 100* | 74 | 100* | 52 | |
| | M-I | ND | ND | 0.0g | 0.06 | 0.13 | 0.14 | |
| 개 | 모체 | 100 | 100 | 84 | 94 | 88 | 100* | |
| | M-I | 0.01 | 0.01 | 0.56 | 0.67 | 0.95 | 1.52 | |
| 인간 | 모체 | 100 | 100 | 94 | 85 | 84 | 74 | |
| | M-I | 0.01 | 0.02 | 0.97 | 0.93 | 1.84 | 1.78 | |

모체는 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)페리민딘-4-아민임

ND: 검출되지 않음; 모체와 이의 대사물의 상대적 풍부량은 정량적인 값임; 이온화 효율이 모체와 이의 대사물에 대해 유사함을 고려하여 계산됨; * 100%를 초과하는 나머지 %값은 계산시 100으로 간주되었다.

[0336] 수성 표준 및 선택된 마이크로솜 샘플의 추출된 이온 크로마토그램(XIC), Q1 및 MS/MS 스펙트럼은 도 1 내지 3에 제시되어 있다.

[0337] [0339] 단일산소화 대사물(M-I, 6.22분)이 랫트, 개 및 인간 간 마이크로솜에서 생성되었다. 모체 (5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)페리민딘-4-아민)에 대한 대사물의 백분율은 균일하게 낮았다. 그러나, 이 분석은 대사물과 모체 화합물 모두에 대한 동일한 이온화 효율을 가정한다(표 3).

[0340] 독립적으로, 간 마이크로솜(0.3 mg/mL 단백질 농도) 중 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)페리민딘-4-아민(1 uM), 디클로페낙(인간 및 랫트에 대한 양성 대조군, 0.5 uM), 베라파밀(개에 대한 양성 대조군, 0.5 uM)의 시간 의존적 손실을 연구하였다. 결과는 표 4 및 표 5에 제시되어 있다.

[0341]

[표 4]

인간, 개 및 뱃트 간 마이크로솜(0.3 mg/mL) 중 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)페리민딘-4-아민(1 uM) 배양의 시간-의존적 손실

| 실험 조건 | 시간 (분) | 인간 간 마이크로솜 % 나머지 | | 개 간 마이크로솜 % 나머지 | | 뱃트 간 마이크로솜 % 나머지 | |
|--------------------|--------|----------------------|------|----------------------|------|----------------------|------|
| | | 세트-1 | 세트-2 | 세트-1 | 세트-2 | 세트-1 | 세트-2 |
| NADPH를 함유하는 반응 혼합물 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 60 | 40 | 48 | 50 | 52 | 78 | 76 |
| | 120 | 24 | 22 | 17 | 17 | 65 | 52 |
| NADPH-없는 대조군 | 0 | 100 | | 100 | | 100 | |
| | 120 | 97 | | 100 | | 100 | |
| 모체 화합물 미함유대조군(블랭크) | 0 | 모체 화합물의 유지 시간에 간섭 없음 | | 모체 화합물의 유지 시간에 간섭 없음 | | 모체 화합물의 유지 시간에 간섭 없음 | |
| | 120 | | | | | | |

모체 화합물은 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)페리민딘-4-아민임

100%를 초과하는 나머지% 값은 계산시 100으로 간주되었다.

[0342]

[표 5]

간 마이크로솜(0.3 mg/mL) 중 양성 대조군(0.5 uM) 배양의 시간-의존적 손실

| 간 마이크로솜 | 시간(분) | % 나머지 | % 나머지 | % 나머지 |
|--------------------|-------|------------|------------|------------|
| | | 종 양성 대조군-> | 인간 (디클로페낙) | 뱃트 (디클로페낙) |
| NADPH를 함유하는 반응 혼합물 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| | 60 | 100 | 12 | 9 |
| | 120 | 6 | 1 | 1 |
| NADPH-없는 대조군 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| | 120 | 98 | 100 | 94 |

[0344]

5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)페리민딘-4-아민(NADPH를 첨가하지 않음)의 대조군 배양은 120분까지 안정한 것으로 밝혀졌으며, 이는 비-CYP 매개된 대사를 나타내지 않았다. 블랭크 배양(시험 항목을 첨가하지 않음)은 임의의 매트릭스 간섭을 나타내지 않았다(표 4).

[0345]

시험된 종 전체에서 1 uM 농도 및 0.3 mg/mL 마이크로솜 단백질 농도에서의 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)페리민딘-4-아민의 상대적 대사는 DLM>HLM>RLM이었다. 결과는 표 6에 제시된다.

[0347]

[표 6]

상이한 종에서의 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)파리민딘-4-아민의 상대적 대사

| 마이크로솜 | 모체의 최종 농도(uM) | 최종 단백질 농도 (mg/mL) | 120분에 모체의 %대사율 | | 대사된 분석물의 농도(uM)* | |
|---------------|---------------|-------------------|----------------|------|------------------|------|
| | | | 세트-1 | 세트-2 | 세트-1 | 세트-2 |
| 랫트 개 인간 | 10 | 0.5 | 0 | NA | 0 | NA |
| | | | 12 | 6 | 1.2 | 0.6 |
| | | | 16 | 26 | 1.6 | 2.6 |
| 랫트개 인간 | 1 | 0.3 | 35 | 48 | 0.35 | 0.48 |
| | | | 83 | 83 | 0.83 | 0.83 |
| | | | 76 | 78 | 0.76 | 0.78 |

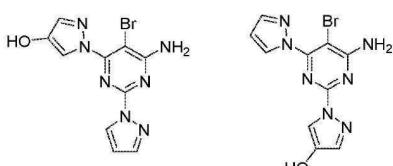
* 대사된 분석물의 농도(uM)는 하기 공식을 사용하여 계산된다:

대사된 분석물의 농도 = (120분에서의 대사율% X 모체 화합물의 최종 농도)/100.

모체 화합물은 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)파리민딘-4-아민임

[0348]

1-(6-아미노-5-브로모-2-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-4-일)-1H-피라졸-4-올 및 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올을 합성하였다. 상기 화합물의 구조는 하기에 제시되어 있다.



[0350]

이어서, 인간 마이크로솜 배양 샘플에서 검출된 대사물의 신원을 Q1 모드에서 모니터링하여 화합물, 1-(6-아미노-5-브로모-2-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-4-일)-1H-피라졸-4-올 및 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올에 의한 공-크로마토그래피에 의해 결정하였다. 공-크로마토그래피로 인해, 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올로서 마이크로솜 샘플에서 검출된 대사물(M-I)의 신원을 확인하였다. 크로마토그램은 도 4에 제시되어 있다.

[0352]

5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)파리민딘-4-아민 및 그의 대사물(M-I, 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올)을 4포인트 보정곡선 표준을 사용하여 MRM 모드에서 배양된 인간 간 마이크로솜 샘플에서 정량화하였다. 인간 간 마이크로솜에서 M-I 대사물의 비율은 모체와의 60분 배양후 약 15~20%이다. 인간 간 마이크로솜에서의 대사에 대해 약 95 내지 107%의 질량 균형이 달성되었다. 결과는 표 7에 제시된다. 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)파리민딘-4-아민 및 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1H-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1H-피라졸-4-올에 대한 보정 곡선 요약은 표 8에 제시되어 있다.

[0353]

[표 7]

MRM 분석을 이용한 인간 간 마이크로솜에서 5-브로모-2,6-디(1H-피라졸-1-일)파리민딘-4-아민 대사의 질량 균형

| 인간 간 마이크로솜에서 대사물 형성% 및 모체(10uM)의 질량 균형 | | | | | | |
|--|--------|--------------------|-------------|----------|-----------|--------|
| | 시간 (분) | 모체 농도 (uM) | M-I 농도 (uM) | % 모체 나머지 | % M-I 검출됨 | 질량 균형 |
| 세트-1 | 0 | 11.78 ^a | 0 | 100 | 0 | NA |
| | 30 | 11.34 ^a | 1.29 | 96.26 | 10.95 | 107.22 |
| | 60 | 10.47 ^a | 2.23 | 88 | 18.93 | 107.81 |
| 세트-2 | 0 | 11.54 ^a | 0 | 100 | 0 | NA |
| | 30 | 10.09 ^a | 0.92 | 87.44 | 7.97 | 95.41 |
| | 60 | 9.18 | 1.74 | 79.55 | 15.08 | 94.63 |

값들은 ULOQ(정량화의 상한선)의 20% +/- 내에 있다.

[0354]

[0355]

[표 8]

인간 간 마이크로솜의 5-브로모-2,6-디(1*H*-피라졸-1-일)파리민딘-4-아민 및 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1*H*-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1*H*-피라졸-4-올의 보정 곡선 요약

| 분석물 | 표준 | STD A | STD B | STD C | STD D | 기울기 | 절편 | 결정계수(r^2) |
|-----|-------------|-------|--------|--------|-------|-----------|----------|---------------|
| 모체 | 공정 농도(uM) | 1.25 | 2.50 | 5.00 | 10.00 | NA | | |
| | 계산치 농도 (uM) | 1.25 | 2.51 | 5.02 | 9.94 | 0.00409 | 0.0126 | 1.000 |
| | % 정확도 | 99.79 | 100.34 | 100.44 | 99.42 | | | |
| 대사물 | 공정 농도(uM) | 0.63 | 1.25 | 2.50 | 5.00 | NA | | |
| | 계산치 농도 (uM) | 0.63 | 1.22 | 2.64 | 4.82 | 0.0000189 | 0.000618 | 0.9981 |
| | % 정확도 | 100.2 | 97.62 | 105.75 | 96.43 | | | |

[0356]

[0357] 인간의 간 마이크로솜에서 형성된 M-I 대사물은 모체의 15~20%를 차지한다. 랫트 및 개에서 형성된 M-I 대사물은 정량적으로 결정되지 않으므로, 이 대사물의 생성은 인간 간 마이크로솜에서보다 높거나 낮을 수 있다.

[0358]

결론적으로, 5-브로모-2,6-디(1*H*-피라졸-1-일)파리민딘-4-아민은 시험관내에서 시험된 전임상 종과 인간 마이크로솜에서 산화 경로를 통해 대사되며, 검출된 대사물은 크로마토그래피로 확인한 바와 같이 1-(4-아미노-5-브로모-6-(1*H*-피라졸-1-일)파리미딘-2-일)-1*H*-피라졸-4-올과 동일했다.

[0359]

실시예 3: 시험관내 hA2A 방사성 리간드 결합 분석

[0360]

50 mM Tris pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA, 0.2 U/ml 아데노신 디아미나제를 분석 완충액으로 사용하여 인간 아데노신 A2A 수용체(Perkin Elmer RBHA2AM400UA)를 안정하게 발현하는 HEK-293 세포로부터 제조된 방사성 리간드 및 막으로서 [³H]-ZM241385(ARC, Cat# ART0884)를 사용한 방사성 리간드 결합(RLB) 경쟁 분석에 의해 화합물 결합 친화도를 측정하였다. 이트륨 실리케이트(YSI) 맥아 아글루티닌(WGA) SPA 비드(Perkin Elmer RPNQ0023)에 막을 사전결합시킨 후, 방사성 리간드(2nM ³H-ZM241385, 0.5 ug/웰 hA2A 막, 50 ug/웰 YSI WGA, 최종 농도) 및 100 uL의 최종 용량의 농도 범위의 시험 화합물(0.3% DMSO 최종 농도)로 평형화하였다. 비-특이적 결합(NSB)을 10 uM XAC으로 측정하였다. 백색의, 384 웰 분석 플레이트를 사용하였다(Greiner # 781207). 분석 플레이트를 원심분리 전에 평형(1.5 시간)될 때까지 실온에서 배양하고, 베타 신틸레이션 카운터(TopCount NXT)에서 카운팅하여 분당 카운트(CPM)로 측정을 기록하였다. 하기 식을 사용하여 CPM을 억제율로 전환시켰다:

$$\left(\frac{(\text{샘플} - \text{NSB}) - (\text{TB} - \text{NSB})}{(\text{TB} - \text{NSB})} \right) \times 100$$

[0361]

[0362] 경쟁 화합물의 부재하에 전체 결합(TB)이 결합하는 경우.

[0363]

농도 반응 곡선으로부터 수득된 IC₅₀은 Cheng-Prusoff 식을 사용하여 억제 상수(Ki)로 전환하였다.

[0364]

[표 11]

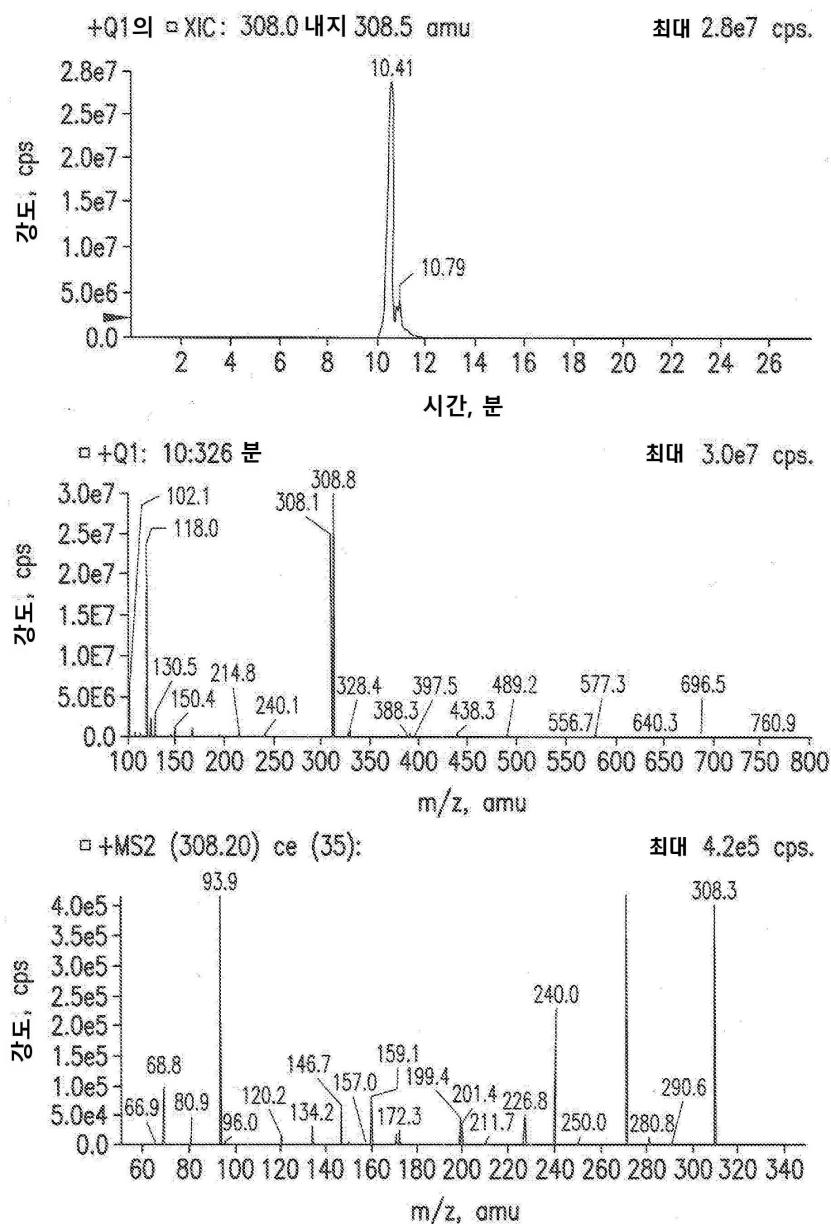
실시예 1의 경우 h A_{2A} Ki 값

| 실시예 | h A _{2A} Ki (nM) |
|-----|---------------------------|
| 1 | 50 |

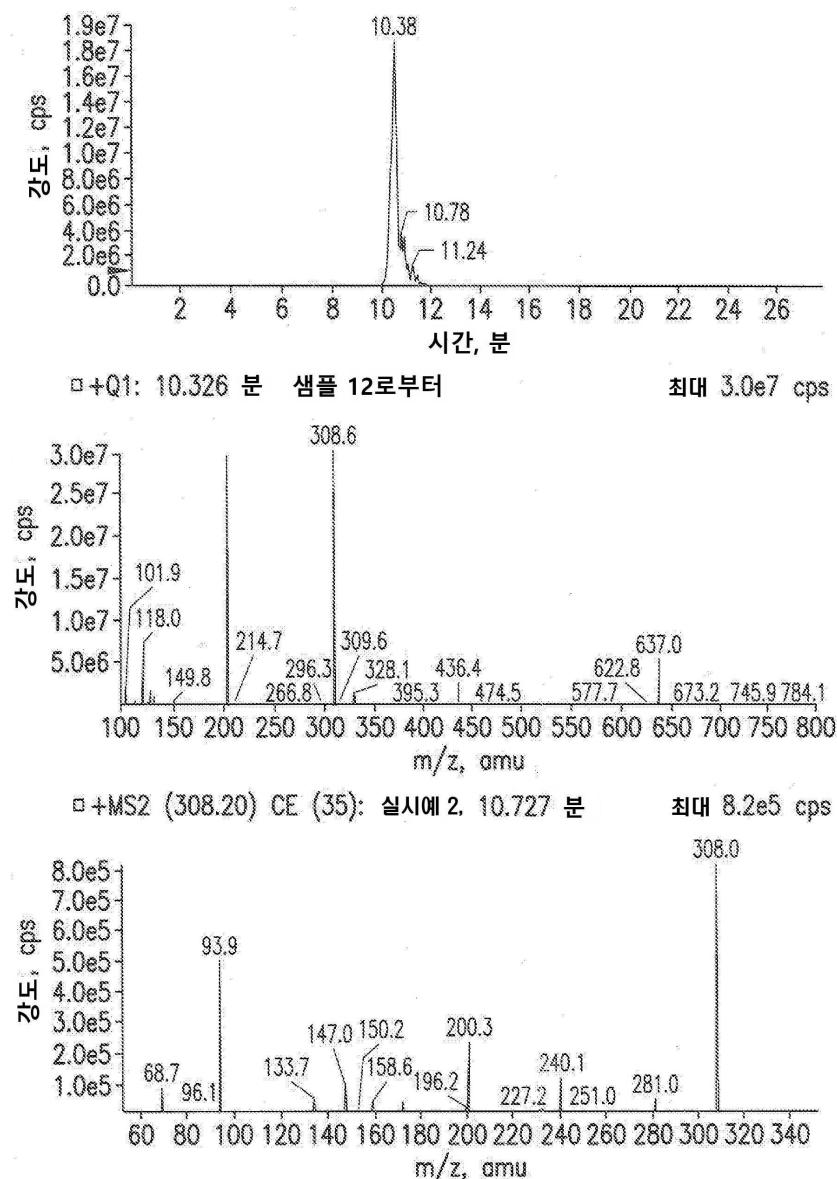
[0365]

도면

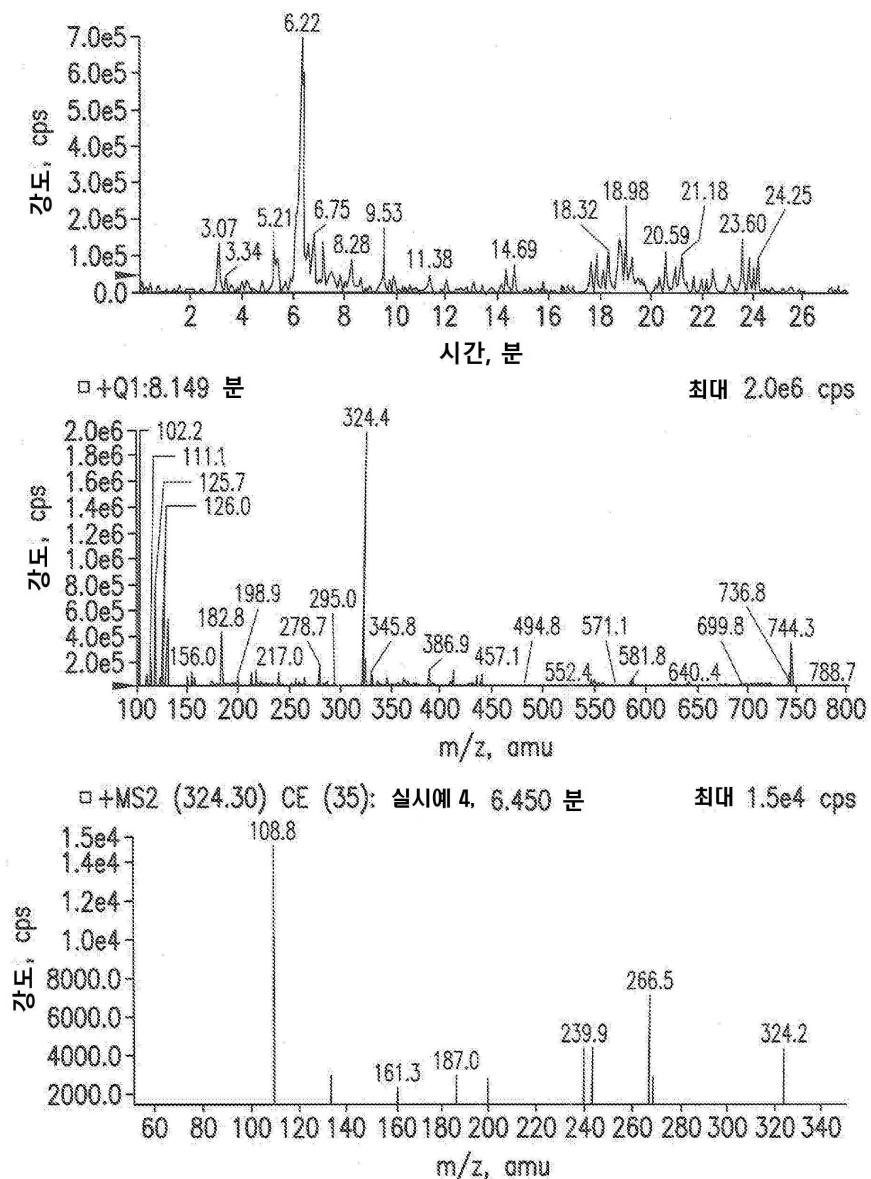
도면1



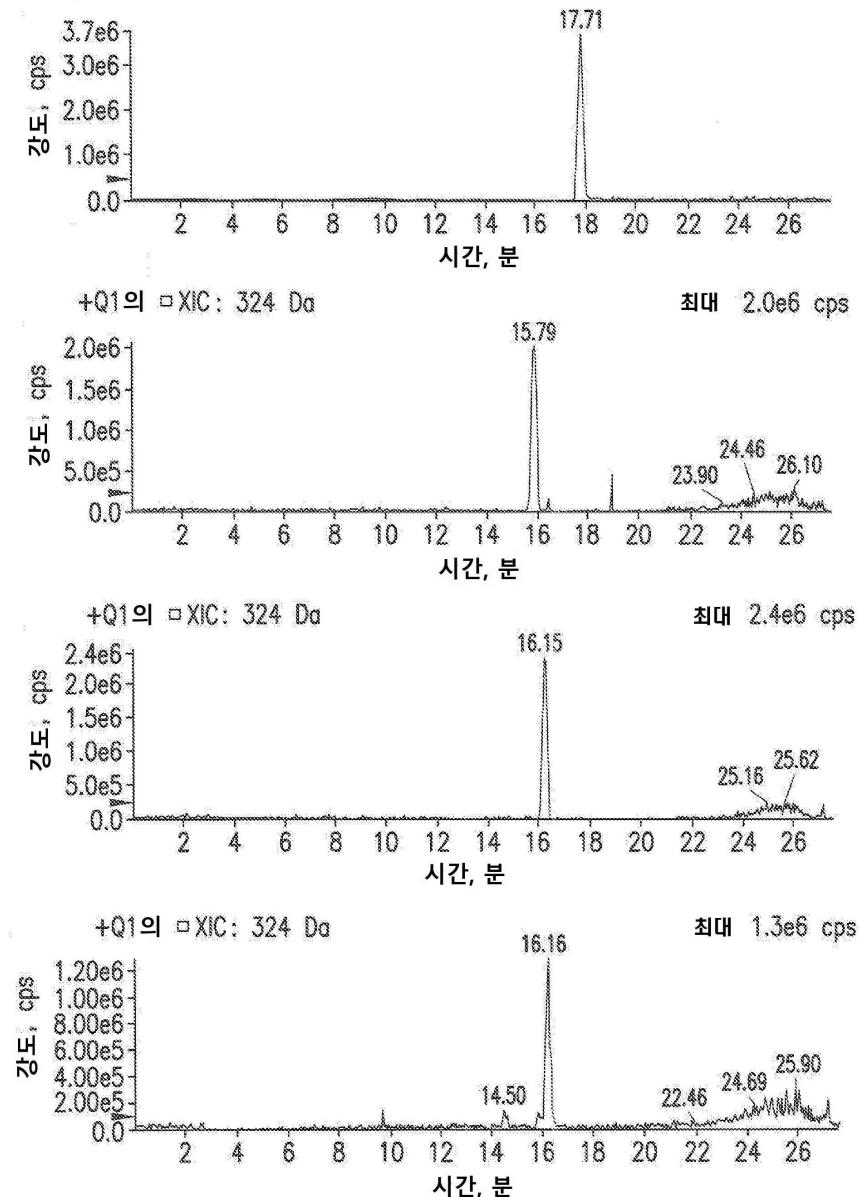
도면2



도면3



도면4



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> NOVARTIS AG

PALOBIOFARMA S.L.

<120> 1-(4-AMINO-5-BROMO-6-(1H-PYRAZOL-1-YL)PYRIMIDIN-2-YL)-1H-PYRAZOL-

4-OL AND USE THEREOF

<130> PAT057566-WO-PCT

<140> PCT/IB2018/050783

<141> 2018-02-08

<150> 62/457,219

<151> 2017-02-10

<160> 63

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 1

Thr Tyr Trp Met His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 2

Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Gly Ser Asn Phe Asp Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asn

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 3

Trp Thr Thr Gly Thr Gly Ala Tyr

1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 4

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

1 5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 5

Tyr Pro Gly Thr Gly Gly

1 5

<210> 6

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 6

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Gly Ser Asn Phe Asp Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Trp Thr Thr Gly Thr Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 7

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 7

gaggtgcagc tggcagtc aggcgccaa gtgaagaagc cggcgagtc actgagaatt 60

agctgtaaag gttcaggcta caccttcaact acctactgga tgcactgggt ccggcaggct 120

accggtaag gcctcgagtg gatggtaat atctaccccg gcaccggcgg ctctaacttc 180

gacgagaagt ttaagaatag agtgaactatc accgcccata agtctactag caccgcstat 240

atggaactgt ctggctgag atcagaggac accgcccgtct actactgcac taggtggact 300

accggcacag ggcctactg gggtaaggc actaccgtga ccgtgtctag c 351

<210> 8

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 8

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Gly Ser Asn Phe Asp Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Trp Thr Thr Gly Thr Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

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

 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln

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

 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440
 <210> 9
 <211> 1329
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 9

gaggtgcagc tggtgca gtc aggccgc gaa gtgaagaagc ccggcgagtc actgagaatt 60

| | |
|--|-----|
| agctgttaaag gttcaggcta caccttcaact acctactgga tgcaactgggt ccggccaggct | 120 |
| accggtaaag gcctcgagt gatggtaat atctaccccg gcaccggcgg ctctaaacttc | 180 |
| gacgagaagt ttaagaatag agtgaactatc accggccgata agtctactag caccgcctat | 240 |
| atggaaactgt cttagccgtatc atcaggaggac accggccgtct actactgcac taggtggact | 300 |
| accggcacag ggcgcctactg gggtaaaggc actaccgtga ccgtgtctag cgcttagcact | 360 |
| aaggccccgt ccgtgttccc cctggcacct tgttagccgga gcactagcga atccaccgct | 420 |
| gccttcggct gcctggtaa ggattacttc cccggagcccg tgaccgtgtc ctggaaacagc | 480 |

| | |
|---|-----|
| ggagccctga cctccggagt gcacacctc cccgctgtgc tgcagagctc cgggctgtac | 540 |
| tgcgtgtcgt cggtggtcac ggtgcctta tctagcctgg gtaccaagac ctacacttgc | 600 |
| aacgtggacc acaaggcttc caacactaag gtggacaagc gcgtcgaatc gaagtacggc | 660 |
| ccaccgtgcc cgccttgtcc cgccggag ttccctggcg gtccctgggt cttctgttc | 720 |
| ccaccgaagc ccaaggacac ttgtatgatt tcccgacccc ctgaagtgac atgcgtggc | 780 |
| gtggacgtgt cacaggaaga tccggaggtg cagttcaatt ggtacgtgga tggcgtcgag | 840 |
| gtgcacaacg cccaaaccaa gccgggggg gagcagttca actccactta ccggctgtg | 900 |

| | |
|--|------|
| tccgtgctga cggtgctgca tcaggactgg ctgaacggga aggagtacaa gtgcaaagt g | 960 |
| tccaacaagg gacttcctag ctcaatcgaa aagaccatct cgaaagccaa gggacagccc | 1020 |
| cggaaacccc aagtgtatac cctgccaccg agccaggaag aaatgactaa gaaccaagt c | 1080 |
| tcattgactt gccttgtaaa gggcttctac ccatcgata tcgcccgtgga atgggagttcc | 1140 |
| aacggccagc cgaaaaacaa ctacaagacc acccctccgg tgctggactc agacggatcc | 1200 |
| ttcttcctct actcgccgct gaccgtggat aagagcagat ggcaggaggg aaatgtgttc | 1260 |
| agctgttctg ttagtgcata agccctgcac aaccactaca ctcagaagtc cctgtccctc | 1320 |

tccctggga 1329

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 10

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu

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

Thr

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 11

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

| | | | |
|---|---|--|--|
| 1 | 5 | | |
|---|---|--|--|

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 12

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr

| | | | |
|---|---|--|--|
| 1 | 5 | | |
|---|---|--|--|

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 13

Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Gly Asn Gln Lys Asn Phe

1 5 10

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 14

Trp Ala Ser

1

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 15

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr

1 5

<210> 16

<211> 113

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35 40 45

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

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn

85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 17

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 17

| | |
|--|----|
| gagatcggtcc tgactcagtc acccgctacc ctgagcctga gccctggcga gcgggctaca | 60 |
|--|----|

| | |
|--|-----|
| ctgagctgtta aatctagtca gtcactgctg gatagcggtt atcagaagaa cttcctgacc | 120 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| tggtatcagc agaagccccgg taaagccccct aagctgctga tctactgggc ctctactaga | 180 |
|---|-----|

| | |
|--|-----|
| gaatcaggcg tgcctcttag gtttagcggt agcggtagtg gcaccgactt caccttact | 240 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| atctctagcc tgcagccccga ggatatcgct acctactact gtcagaacga ctatagctac | 300 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| ccctacacct tcggtcaagg cactaagggtc gagattaag | 339 |
|---|-----|

<210> 18

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

35 40 45

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

50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn

85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

<210> 19

<211

> 660

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 19

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| gagatcgta | tgactcagtc | acccgttacc | ctgagctga | gcctggcga | gcgggctaca | 60 |
| ctgagctgt | aatctagtca | gtcactgctg | gatagcgta | atcagaagaa | cttcctgacc | 120 |
| tggtatcagc | agaagccccg | taaaggccc | aagctgctga | tctactggc | ctctactaga | 180 |
| gaatcaggcg | tgcctctag | gttttagcggt | agcggttagt | gcaccgactt | cacccact | 240 |
| atctctagcc | tgcagccccg | ggatatcgct | acctactact | gtcagaacga | ctatacgac | 300 |

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|-----|
| ccctacacct | tcggtaagg | cactaaggc | gagattaagc | gtacggtggc | cgctcccagc | 360 |
| gtgttcatct | tccccccag | cgacgagcag | ctgaagagcg | gcaccgccag | cgtggtgtgc | 420 |
| ctgctgaaca | acttctaccc | ccgggaggcc | aagggtcgagt | ggaagggtgga | caacgcctg | 480 |
| cagagcggca | acagccagga | gagcgtcacc | gagcaggaca | gcaaggactc | cacccacgc | 540 |
| ctgagcagca | ccctgaccct | gagcaaggcc | gactacgaga | agcataaggt | gtacgcctgc | 600 |
| gagggtgaccc | accaggccct | gtccagcccc | gtgaccaaga | gcttcaacag | ggcgagtg | 660 |

<210> 20

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

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

Lys

<210> 21

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 21

| | |
|--|-----|
| gagatcgtcc tgactcagtc acccgctacc ctgagcctga gcccggcga gggggctaca | 60 |
| ctgagctgta aatctagtca gtcactgctg gatagcggtt atcagaagaa cttccctgacc | 120 |
| tggtatcagc agaagccccgg tcaagccccct agactgctga tctactggc ctctactaga | 180 |
| gaatcaggcg tgcctcttag gtttagcggtt agcggtatgt gcaccgactt cacccact | 240 |
| atctctagcc tggaaagccga ggacgccgtt acctactact gtcagaacga ctatagctac | 300 |

ccctacacct tcggtaagg cactaagggtc gagattaag 339

<210> 22

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 22

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 23

<211

> 660

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 23

| | |
|--|-----|
| gagatcgcc tgactcagtc acccgctacc ctgagcctga gccctggcga gcgggctaca | 60 |
| cttagctgtta aatctagtca gtcactgctg gatagcggtt atcagaagaa cttcttgacc | 120 |
| tggtatcagc agaagccccgg tcaagccccct agactgctga tctactggc ctctactaga | 180 |
| gaatcaggcg tgcctcttag gtttagcggtt agcggtatgt gcaccgactt cacccact | 240 |
| atctctagcc tggaaagccga ggacgcccgtt acctactact gtcaagaacga ctatagctac | 300 |

| | |
|---|-----|
| ccctacacct tcggtcaagg cactaaggc gagattaagc gtacggtggc cgctccacgc | 360 |
| gtgttcatct tcccccccg cgacgagcag ctgaagagcg gcaccggccag cgtggtgtgc | 420 |
| ctgctgaaca acttctaccc ccgggaggcc aaggtgcagt ggaaggtgga caacgcccgt | 480 |
| cagagcggca acagccagga gaggcgttacc gaggcaggaca gcaaggactc cacctacagc | 540 |
| ctgagcagca ccctgaccct gagcaaggcc gactacgaga agcataaggt gtacgcctgc | 600 |
| gaggtgaccc accaggccct gtccagcccc gtgaccaaga gcttcaacag gggcgagtgc | 660 |

<210> 24

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 24

| | |
|------------------|----|
| acctactgga tgcac | 15 |
|------------------|----|

<210> 25

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 25
 aatatctacc ccggcaccgg cggcttaac ttcgacgaga agtttaagaa t 51

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<
 220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 26
 tggactaccg gcacaggcgc ctac 24
<210> 27
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 27
 ggctacacct tcactaccta c 21
<210> 28
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 28
 taccccgca ccggcgcc 18
<210> 29
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 29

| | |
|---|----|
| aaatctagtc agtcaactgct ggatagcggt aatcagaaga acttcctgac c | 51 |
|---|----|

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 30

| | |
|--------------------------|----|
| tggccctcta cttagagaatc a | 21 |
|--------------------------|----|

<210> 31

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 31

| | |
|-------------------------------|----|
| cagaacgact atagctaccc ctacacc | 27 |
|-------------------------------|----|

<210> 32

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 32

| | |
|--|----|
| agt cagt cac tgctggatag cggtaatcag aagaacctc | 39 |
|--|----|

<210> 33

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 33

tgggcctct 9

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221>

> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 34

gactatagct acccctac 18

<210> 35

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

305 310 315 320
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gln Pro
 325 330 335
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr

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

 405 410 415
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440
<210> 36
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
<400> 36
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

| | | |
|---|-----|-----|
| 50 | 55 | 60 |
| Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Phe Asn Arg Gly Glu Cys | | |
| 210 | | |
| <210> 37 | | |
| <211> 447 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220><221> source | | |
| <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide" | | |
| <400> 37 | | |
| Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr | | |

| | | |
|---|-----|-----|
| 20 | 25 | 30 |
| Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met | | |
| | | |
| 35 | 40 | 45 |
| Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe | | |
| 50 | 55 | 60 |
| Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln | | |
| | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val | | |
| | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val | | |
| | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu | | |
| 260 | 265 | 270 |

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 38

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 38

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 39

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 39

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ser | Glu | Leu | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ser | Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Asn | Tyr |
| 20 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gly | Met | Asn | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Gln | Trp | Met |
| 35 | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Trp | Ile | Asn | Thr | Asp | Ser | Gly | Glu | Ser | Thr | Tyr | Ala | Glu | Glu | Phe |
| 50 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys | Gly | Arg | Phe | Val | Phe | Ser | Leu | Asp | Thr | Ser | Val | Asn | Thr | Ala | Tyr |
| 65 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | Gln | Ile | Thr | Ser | Leu | Thr | Ala | Glu | Asp | Thr | Gly | Met | Tyr | Phe | Cys |
| 85 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Val | Arg | Val | Gly | Tyr | Asp | Ala | Leu | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu |
| 100 | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu |
| 115 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys |
| 130 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser |
| 145 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser |
| 165 | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser |
| 180 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn |
| 195 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His |
| 210 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val |

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

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

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

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

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

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

| | | | |
|-----|-----|-----|--|
| 290 | 295 | 300 | |
|-----|-----|-----|--|

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

| | | | |
|-----|-----|-----|-----|
| 305 | 310 | 315 | 320 |
|-----|-----|-----|-----|

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

| | | | |
|-----|-----|-----|--|
| 325 | 330 | 335 | |
|-----|-----|-----|--|

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

| | | | |
|-----|-----|-----|--|
| 340 | 345 | 350 | |
|-----|-----|-----|--|

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

| | | | |
|-----|-----|-----|--|
| 355 | 360 | 365 | |
|-----|-----|-----|--|

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

| | | | |
|-----|-----|-----|--|
| 370 | 375 | 380 | |
|-----|-----|-----|--|

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

| | | | |
|-----|-----|-----|-----|
| 385 | 390 | 395 | 400 |
|-----|-----|-----|-----|

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

| | | | |
|-----|-----|-----|--|
| 405 | 410 | 415 | |
|-----|-----|-----|--|

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

| | | | |
|-----|-----|-----|--|
| 420 | 425 | 430 | |
|-----|-----|-----|--|

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

| | | | |
|-----|-----|-----|--|
| 435 | 440 | 445 | |
|-----|-----|-----|--|

<210> 40

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221>

> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 41

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met His

1 5 10

<210> 42

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 42

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Lys Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 43

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 43

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

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr

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

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

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

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

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

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

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

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

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

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 44

Ser Tyr Trp Met Tyr

1 5

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 45

Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asn

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 46

Asp Tyr Arg Lys Gly Leu Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 47

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

1 5

<210> 48

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 48

Asp Pro Asn Ser Gly Ser

1 5

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 49

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 50

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 51

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 52

Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala

1 5

<210> 53

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 53

Trp Ala Ser

1

<210> 54

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 54

Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu

1 5

<210> 55

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Arg Lys Gly Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 56

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 56

| | |
|--|-----|
| gagggtccagc tggtagtc tggttgcgat gtgaagaagc ctggggctac agtgaaaatc | 60 |
| tcctgcaagg ttctggcta cacccacc agttactgga tgtactgggt gcgacaggct | 120 |
| cgtggacaac gccttgatgt gataggtgg attgatccta atagtgggat tactaagtac | 180 |
| aatgagaagt tcaagaacag attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat | 240 |
| cttcaaataa acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc aaggactat | 300 |
| agaaaggggc tctatgctat ggactactgg ggccaggca ccaccgtgac cgtgtcc | 360 |

<210> 57

<211>

1341

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 57

| | |
|--|-----|
| gagggtccagc tggtagtc tggttgcgat gtgaagaagc ctggggctac agtgaaaatc | 60 |
| tcctgcaagg ttctggcta cacccacc agttactgga tgtactgggt gcgacaggct | 120 |
| cgtggacaac gccttgatgt gataggtgg attgatccta atagtgggat tactaagtac | 180 |
| aatgagaagt tcaagaacag attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat | 240 |
| cttcaaataa acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc aaggactat | 300 |

| | |
|---|-----|
| agaaaggggc tctatgctat ggactactgg ggccaggca ccaccgtgac cgtgtcc | 360 |
| gcttccacca agggccatc cgtttcccc ctggccct gtcaggag caccccgag | 420 |
| agcacagccg ccctggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccgt gacgggtcg | 480 |
| tggacttcag gcccctgac cagcggcgtg cacaccccttcc cggtgtcct acagtctca | 540 |
| ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg cacgaagacc | 600 |
| tacacctgca acgttagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgatcc | 660 |
| aaatatggtc ccccatgccc accgtgccca gcaccgtgat tccctggggg accatcagtc | 720 |

| | |
|---|-----|
| ttccgttcc cccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcag | 780 |
| tgcgtgggg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggatcc agttcaactg gtacgtggat | 840 |

| | |
|---|------|
| ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac | 900 |
| cgtgtggta gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag | 960 |
| tgcaagggtgt ccaacaaagg cctcccgtaa tccatcgaga aaaccatctc caaagccaa | 1020 |
| ggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag | 1080 |
| aaccaggtaa gcctgacctg cctggtaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag | 1140 |

| | |
|--|------|
| tggagagca atggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc | 1200 |
| gacggctct ttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggaggg | 1260 |
| aatgtttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc | 1320 |
| ctctccgtc ctctggtaa a | 1341 |

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 58

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

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

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

<210> 59

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 59

gccccatccagg tggaccaggc tccatccctcc ctgtctgcattt ctgttaggaga cagagtacc 60

atcacttgtca aggccaggta ggtatgtgggt actgtgttag cctggtagcc gcagaaggcca 120
 gggcaggcttc cacagctctt gatctattgg gcatccaccc ggcacactgg ggtcccctcg 180
 aggttcaggta gcaggatggatc tgggacaggtttt ccatttttgc cctggaaagct 240
 gaagatgctg caacatatta ctgtcagcag tataacagct atcctctcac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 60

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 60

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

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

| | | |
|---|-----|-----|
| 85 | 90 | 95 |
| Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly | | |
| 115 | 120 | 125 |

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

| | | |
|---|-----|-----|
| Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Phe Asn Arg Gly Glu Cys | | |

| | |
|--|--|
| 210 | |
| <210> 61 | |
| <211> 642 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><221> source | |
| <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide" | |

| | |
|--|-----|
| <400> 61 | |
| gccatccagt tgaccaggc tccatccctc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtacc | 60 |
| atcacttgca aggccagtca ggatgtgggt actgctgttag cctggcacct gcagaagcca | 120 |

| | |
|---|-----|
| ggcagtctc cacagtcct gatctattgg gcatccaccc ggcacactgg ggtccccctcg | 180 |
| aggttcagtgc cagtggtatc tggacagat ttcacccat ccatcgttgc cctggaaagct | 240 |
| gaagatgtcg caacatatta ctgtcagcag tataacagct atcctctcac gttcgccaa | 300 |
| gggaccaagg tggaaatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttccggcca | 360 |
| tctgtatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat | 420 |

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgcc tccaatcgga taactcccag 480
 gagagtgta cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcaggc 600
 ctgagctcgcc cggtcacaaa gagttcaac agggagagt gt 642

<210> 62

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 62

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | |

5

10

15

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys | Val | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Ser | Tyr |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

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

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Trp | Met | Tyr | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Arg | Gly | Gln | Arg | Leu | Glu | Trp | Ile |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

35

40

45

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Arg | Ile | Asp | Pro | Asn | Ser | Gly | Ser | Thr | Lys | Tyr | Asn | Glu | Lys | Phe |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

50

55

60

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Asn | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ser | Lys | Asn | Thr | Leu | Tyr |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

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

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

85

90

95

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Arg | Asp | Tyr | Arg | Lys | Gly | Leu | Tyr | Ala | Met | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

100

105

110

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

115

120

125

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Cys | Ser | Arg | Ser | Thr | Ser | Glu | Ser | Thr | Ala | Ala |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

130

135

140

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 63

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Tyr

1 5 10