



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0002593
(43) 공개일자 2018년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7023477

(22) 출원일자(국제) 2016년01월26일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2017년08월23일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2016/050383

(87) 국제공개번호 WO 2016/120789
국제공개일자 2016년08월04일

(30) 우선권주장
62/108,605 2015년01월28일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
글락소스미스클라인 인텔렉추얼 프로퍼티 디벨로
프먼트 리미티드
영국 미들섹스 브렌트포드 그레이트 웨스트 로드
980 (우: 티더블유8 9지에스)
상뜨르 나시오날 드 라 리쉴르쎬 샹띠피끄
프랑스, 75794 파리 세텍스 16, 튀 미셀-앙즈 3
(뒷면에 계속)

(72) 발명자
리우, 야오-빈
미국 19426 펜실베이니아주 칼리지빌 사우쓰 칼리지
빌 로드 1250
파마, 라드하 샤
영국 하트퍼드셔 스티브니지 거늘즈 우드 로드
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
양영준, 심미성

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **효능작용 ICOS 결합 단백질**

(57) 요약

본 발명은 인간 ICOS에 대해 효능제이고 생체내에서 T 세포와 접촉되게 두었을 때 보체, ADCC, 또는 CDC를 유도하지 않는 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분 및 상기 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분을 사용하여 암, 감염성 질환 및/또는 패혈증을 치료하는 방법에 관한 것이다. 추가로 본 발명의 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분은 T 세포와 접촉되게 두었을 때 상기 T 세포를 활성화할 수 있고/거나; T 세포와 접촉되게 두었을 때 상기 T 세포 증식을 자극할 수 있고/거나 상기 T 세포와 접촉되게 두었을 때 시토카인 생산을 유도할 수 있다. 본 발명은 서열식별번호: 1; 서열식별번호: 2; 서열식별번호: 3; 서열식별번호: 4; 서열식별번호: 5; 및/또는 서열식별번호: 6 중 1종 이상을 포함하는 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C07K 16/2896 (2013.01)
C07K 16/30 (2013.01)
C07K 16/3015 (2013.01)
C07K 16/3023 (2013.01)
C07K 16/3038 (2013.01)
C07K 16/3069 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/507 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)

(71) 출원인

앵스띠뛰 장 빠울리 에 이렌느 깔메뜨

프랑스공화국, 에프-13009 마르세이유, 볼르바르
쎡뜨- 마르그리뜨 232

**인스티튜트 내셔널 드 라 쏘데 에 드 라 리셰르세
메디칼르 (인 썸)**

프랑스, 파리 75013, 퀴에 드 툴비아크 101

위니페르시떼 텍스-마르세이유

프랑스, 에프-13007 마르세이유, 볼바르 샤를르 리
봉, 58

(72) 발명자

메이즈, 패트릭

미국 19426 펜실베니아주 칼리지빌 사우스 칼리지
빌 로드 1250

올리브, 대니얼

프랑스 에프-13009 마르세유 베페 3 베테 레이 루
르 27

(30) 우선권주장

62/192,331 2015년07월14일 미국(US)

62/247,355 2015년10월28일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

서열식별번호: 1에 제시된 바와 같은 CDRH1; 서열식별번호: 2에 제시된 바와 같은 CDRH2; 서열식별번호: 3에 제시된 바와 같은 CDRH3; 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 CDRL1; 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 CDRL2 및/또는 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 CDRL3 또는 각각의 CDR의 직접 등가물 중 1종 이상을 포함하며, 여기서 직접 등가물은 상기 CDR 내에 2개 이하의 아미노산 치환을 갖는 것인, ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_H 도메인 및/또는 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_L 도메인을 포함하며, 상기 ICOS 결합 단백질은 인간 ICOS에 특이적으로 결합하는 것인 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 ICOS 결합 단백질이 ICOS 효능제인 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ICOS 결합 단백질이 인간 ICOS에

(i) 적어도 $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 의 회합률 상수 (k_{on}); 및 $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 미만의 해리율 상수 (k_{off}); 또는

(ii) 약 100 nM 미만의 해리 상수 (K_D)

로 결합하며, 여기서 친화도는 비아코어에 의해 측정된 것인, ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, ICOS 결합 단백질이 서열식별번호: 1; 서열식별번호: 2; 및 서열식별번호: 3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 ICOS 결합 단백질이 서열식별번호: 4; 서열식별번호: 5 및 서열식별번호: 6을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 도메인 및 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 V_L 도메인을 포함하는 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 IgG1 이소형 또는 그의 변이체 및 인간 IgG4 이소형 또는 그의 변이체로부터 선택된 스캐폴드를 포함하는 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, hIgG4PE 스캐폴드를 포함하는 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 모노클로날 항체인 ICOS 결합 단백질.

청구항 10

제9항에 있어서, 모노클로날 항체가 인간화 항체인 모노클로날 항체.

청구항 11

제9항에 있어서, 모노클로날 항체가 완전 인간 항체인 모노클로날 항체.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 1; 서열식별번호: 2; 및 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR 및 서열식별번호: 4; 서열식별번호: 5; 및 서열식별번호: 6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR을 포함하는 모노클로날 항체.

청구항 13

제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 ICOS에 대해 효능제이고, IgG4 이소형 스캐폴드 또는 그의 변이체를 포함하는 모노클로날 항체.

청구항 14

제13항에 있어서, hIgG4PE 스캐폴드를 포함하는 모노클로날 항체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 ICOS 결합 단백질과 비교 시 ICOS-리간드와 인간 ICOS에의 결합에 대해 교차 경쟁하는 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 ICOS 결합 단백질 또는 모노클로날 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 17

제16항의 제약 조성물을 암, 감염성 질환, 또는 폐혈증으로부터 선택된 질환의 치료를 필요로 하는 인간에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 인간에서 암, 감염성 질환, 또는 폐혈증으로부터 선택된 질환을 치료하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 인간에게 적어도 1종의 항신생물제, 적어도 1종의 제2 면역조절제, 및/또는 적어도 1종의 면역자극 아주반트를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 제2 면역조절제가 항-CTLA4 항체, 항-PD-1 항체, 항-PDL1 항체 및 항-OX40 항체로부터 선택된 것인 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, 암, 감염성 질환 및/또는 폐혈증의 치료를 필요로 하는 인간에서 암, 감염성 질환 및/또는 폐혈증의 치료에 사용하기 위한 제약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 일반적으로 인간 질환의 치료에서의 면역요법 및 그와 관련된 유해 사건의 감소에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 암, 감염성 질환 및/또는 폐혈증의 치료에서 ICOS 효능제 항체를 포함한 ICOS 결합

[0001]

단백질의 용도 및 면역조절제로서 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 항종양 T 세포 기능을 증진시키고 T 세포 증식을 유도하는 것은 암 치료를 위한 강력하고 새로운 접근법이다. 3종의 면역-종양학 항체 (예를 들어, 면역조절제)가 현재 시판되고 있다. 항-CTLA-4 (예르보이(YERVOY)/이필리무맙)는 T 세포 프라이밍의 순간에 면역 반응을 증대시키는 것으로 생각되고, 항-PD-1 항체 (옵디보(OPDIVO)/니볼루맙 및 키트루다(KEYTRUDA)/웹브롤리주맙)는 이미 프라이밍되고 활성화된 종양 특이적 T 세포에서 억제 체크포인트를 완화시킴으로써, 국부 종양 미세환경에서 작용하는 것으로 생각된다.
- [0003] ICOS는 CD28/CTLA-4-Ig 슈퍼패밀리와 구조적 및 기능적 관계를 갖는 공동-자극 T 세포 수용체이다 (Hutloff, et al., "ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28", Nature, 397: 263-266 (1999)). ICOS의 활성화는 ICOS-L (B7RP-1/B7-H2)에 의한 결합을 통해 발생한다. B7-1도 B7-2도 (CD28 및 CTLA4에 대한 리간드) ICOS에 결합하거나 활성화하지 않는다. 그러나, ICOS-L은 CD28 및 CTLA-4 둘 다에 약하게 결합하는 것으로 제시된 바 있다 (Yao S et al., "B7-H2 is a costimulatory ligand for CD28 in human", Immunity, 34(5); 729-40 (2011)). ICOS의 발현은 T 세포에 제한되는 것으로 보인다. ICOS 발현 수준은 상이한 T 세포 하위세트 사이에서 및 T 세포 활성화 상태에 따라 다르다. ICOS 발현은 휴지기 TH17, T 여포성 헬퍼 (TFH) 및 조절 T (Treg) 세포 상에서 제시된 바 있지만; CD28과 달리; 이는 나이브 T_{H1} 및 T_{H2} 이펙터 T 세포 집단 상에서는 고도로 발현되지 않는다 (Paulos CM et al., "The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human Th17 cells", Sci Transl Med, 2(55); 55ra78 (2010)). ICOS 발현은 TCR 맞물림을 통한 활성화 후 CD4+ 및 CD8+ 이펙터 T 세포 상에서 고도로 유도된다 (Wakamatsu E, et al., "Convergent and divergent effects of costimulatory molecules in conventional and regulatory CD4+ T cells", Proc Natl Acad Sci USA, 110(3); 1023-8 (2013)). ICOS 수용체를 통한 공동-자극 신호전달은 단지 공동 TCR 활성화 신호를 수신한 T 세포에서만 발생한다 (Sharpe AH and Freeman GJ. "The B7-CD28 Superfamily", Nat. Rev Immunol, 2(2); 116-26 (2002)). 활성화된 항원 특이적 T 세포에서, ICOS는 IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-4, IL-13 및 다른 것을 포함한 T_{H1} 및 T_{H2} 시토카인 둘 다의 생산을 조절한다. ICOS는 또한, CD28보다 낮은 정도이기는 하지만, 이펙터 T 세포 증식을 자극한다 (Sharpe AH and Freeman GJ. "The B7-CD28 Superfamily", Nat. Rev Immunol, 2(2); 116-26 (2002)).
- [0004] 증가하고 있는 다수의 문헌은 CD4+ 및 CD8+ 이펙터 T 세포 상의 ICOS를 활성화하는 것이 항종양 잠재력을 갖는다는 아이디어를 지지한다. ICOS-L-Fc 융합 단백질은 SA-1 (육종), Meth A (섬유육종), EMT6 (유방) 및 P815 (비만세포종) 및 EL-4 (형질세포종) 동계 종양을 갖는 마우스에서 종양 성장 지연 및 완전 종양 근절을 발생시킨 반면에, 면역원성이 불량한 것으로 공지되어 있는 B16-F10 (흑색종) 종양 모델에서는 어떠한 활성도 관찰되지 않았다 (Ara G et al., "Potent activity of soluble B7RP-1-Fc in therapy of murine tumors in syngeneic hosts", Int. J Cancer, 103(4); 501-7 (2003)). ICOS-L-Fc의 항종양 활성은, 활성이 누드 마우스에서 성장된 종양에서는 완전히 상실되었기 때문에, 무손상 면역 반응에 의존하였다. ICOS-L-Fc 처리된 마우스로부터의 종양의 분석은 치료에 반응성인 종양에서 CD4+ 및 CD8+ T 세포 침윤의 유의한 증가를 입증하였고, 이는 이들 모델에서의 ICOS-L-Fc의 면역자극 효과를 지지한다.
- [0005] ICOS^{-/-} 및 ICOS-L^{-/-} 마우스를 사용한 또 다른 보고서는 B16/B16 흑색종 동계 종양 모델에서 항-CTLA4 항체의 항종양 활성을 매개하는데 있어서의 ICOS 신호전달의 필요를 입증하였다 (Fu T et al., "The ICOS/ICOSL pathway is required for optimal antitumor responses mediated by anti-CTLA-4 therapy", Cancer Res, 71(16); 5445-54 (2011)). ICOS 또는 ICOS-L 결여 마우스는 항-CTLA4 항체 처리 후 야생형 마우스와 비교 시 유의하게 감소된 생존율을 가졌다. 별개의 연구에서, 재조합 뮤린 ICOS-L을 과다발현시키기 위해 B16/B16 종양 세포를 형질도입하였다. 이들 종양은 대조군 단백질로 형질도입된 B16/B16 종양 세포와 비교 시 항-CTLA4 처리에 유의하게 더 감수성인 것으로 발견되었다 (Allison J et al., "Combination immunotherapy for the treatment of cancer", W02011/041613 A2 (2009)). 이들 연구는 ICOS 효능제의 단독으로 및 다른 면역조절 항체와의 조합으로의, 둘 다의 항종양 잠재력의 증거를 제공한다.
- [0006] 항-CTLA4 항체로 처리된 환자로부터의 신생 데이터는 또한 항종양 면역 반응을 매개하는데 있어서의 ICOS+ 이펙터 T 세포의 긍정적 역할을 보여준다. 이필리무맙 처리 후 증가된 절대 계수의 순환 및 종양 침윤 CD4⁺ICOS⁺ 및 CD8⁺ICOS⁺ T 세포를 갖는 전이성 흑색종 (Giacomo AMD et al., "Long-term survival and immunological

parameters in metastatic melanoma patients who respond to ipilimumab 10 mg/kg within an expanded access program", *Cancer Immunol Immunother.*, 62(6); 1021-8 (2013)); 요로상피암 (Carthon BC et al., "Preoperative CTLA-4 blockade: Tolerability and immune monitoring in the setting of a presurgical clinical trial" *Clin Cancer Res.*, 16(10); 2861-71 (2010)); 유방암 (Vonderheide RH et al., "Tremelimumab in combination with exemestane in patients with advanced breast cancer and treatment-associated modulation of inducible costimulator expression on patient T cells", *Clin Cancer Res.*, 16(13); 3485-94 (2010)); 및 전립선암을 갖는 환자는 거의 또는 전혀 증가가 관찰되지 않은 환자보다 유의하게 보다 우수한 치료 관련 결과를 갖는다. 중요하게는, 이필리무맙은 ICOS⁺ T 이펙터:T_{reg} 비를 변화시켜, 치료-전 T_{reg}의 존재비를 치료 후 T 이펙터 vs. T_{reg}의 유의한 존재비로 역전시키는 것으로 제시되었다 (Liakou CI et al., "CTLA-4 blockade increases IFN-gamma producing CD4+ICOS^{hi} cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients", *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(39); 14987-92 (2008)) 및 (Vonderheide RH et al., *Clin Cancer Res.*, 16(13); 3485-94 (2010)). 따라서, ICOS 양성 T 이펙터 세포는 효능제 ICOS 항체를 사용하여 세포의 이러한 집단을 활성화시키는 것의 잠재적인 장점을 보여주는 이필리무맙 반응의 양성 예측 바이오마커이다.

[0007] 따라서, 암의 치료에서 추가의 T 세포 증식 유도 분자에 대한 필요가 존재한다.

발명의 내용

[0008] 본 발명의 한 실시양태에서, 서열식별번호(SEQ ID NO): 1에 제시된 바와 같은 CDRH1; 서열식별번호: 2에 제시된 바와 같은 CDRH2; 서열식별번호: 3에 제시된 바와 같은 CDRH3; 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 CDRL1; 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 CDRL2 및/또는 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 CDRL3 또는 각각의 CDR의 직접 등가물 중 1종 이상을 포함하며, 여기서 직접 등가물은 상기 CDR 내에 2개 이하의 아미노산 치환을 갖는 것인, ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분이 제공된다.

[0009] 본 발명의 한 실시양태에서, 인간 ICOS에 특이적으로 결합하는 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분이 제공되며, 여기서 상기 ICOS 결합 단백질은 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_H 도메인 및/또는 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_L 도메인을 포함한다.

[0010] 한 실시양태에서, 서열식별번호: 1; 서열식별번호: 2; 및 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR 및 서열식별번호: 4; 서열식별번호: 5; 및 서열식별번호: 6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR을 포함하는 인간화 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 제공된다. 한 실시양태에서, hIgG4PE 스캐폴드; 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 도메인; 및 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 도메인을 포함하는 인간화 모노클로날 항체가 제공된다. 본 발명의 항체는 T 세포와 접촉된 경우에 시토카인 생산을 자극할 수 있다.

[0011] 한 실시양태에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분 중 어느 하나와 인간 ICOS에의 결합에 대해 경쟁하는 ICOS 결합 단백질이 제공된다.

[0012] 한 실시양태에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질 또는 적어도 1종의 ICOS 결합 단백질을 포함하는 제약 조성물을 사용하여 암, 감염성 질환 및/또는 패혈증을 치료하는 방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1: CD4+CD25- T 세포로부터의 IFN- γ 생산.
- 도 2: CD4+CD25- T 세포의 증식.
- 도 3: 항-ICOS 422.2의 H2L5 인간화 변이체는 PBMC 세포에서 보다 우수한 시토카인 생산을 제시한다.
- 도 4: 422 H2L5 IgG1은 Fc-불능화 또는 hIgG4PE 이소형에 의해서는 분명하지 않았던 감소된 T 세포 생존율을 유도하였다.
- 도 5: H2L5 hIgG4PE의 용량 반응은 인간 CD4+ T 세포에서 염증유발 시토카인 유도를 유도하였다.

- 도 6: H2L5 hIgG4PE는 건강한 인간 공여자로부터의 활성화된 PBMC에서 증식, 시토카인 생산 및 증가된 세포독성 잠재력을 유도한다.
- 도 7: ICOS-L과 ICOS 상의 동일한 에피토프에 결합하고 결합에 대해 경쟁한다는 것을 나타내는, H2L5 hIgG4PE에 의한 ICOS에 대한 ICOS-L 결합의 억제를 제시하는 메소 스케일 디스커버리 (MSD) 검정.
- 도 8: 하이브리도마 클론 422.2의 RNA로부터 회수된 항체 V_H 및 V_L 유전자.
- 도 9: 신호 서열을 갖는 H2L5 hIgG4PE의 중쇄 및 경쇄의 단백질 서열.
- 도 10: 신호 서열을 갖는 H2L5 hIgG4PE 중쇄의 코딩 영역의 DNA 서열.
- 도 11: 신호 서열을 갖는 H2L5 hIgG4PE 경쇄의 코딩 영역의 DNA 서열.
- 도 12: 시노물구스 원숭이에서의 H2L5 hIgG4PE의 혈장 농도. 농도를 H2L5 hIgG4PE의 (A) 제1 또는 (B) 제2 용량 (제15일) 후에 결정하였다. 조직 샘플 수집 및 조직병리학 분석을 위해 제2 용량 48시간 후에 동물을 희생시켰다.
- 도 13: 원숭이의 비장 및 액와 림프절로부터의 CD4+ T 세포에 대한 H2L5 hIgG4PE 결합의 검출. 조직은 제2 용량 48시간 후 (제17일)에 수집하였다.
- 도 14: 시노물구스 원숭이로부터의 혈액 CD4+ T 세포에서의 H2L5 hIgG4PE의 수용체 점유율.
- (A) H2L5 hIgG4PE가 존재하지 않는 경우에만 결합하는, 유동 세포측정법에 사용된 항-ICOS 형광 표지된 항체의 양성 결합에 의해 측정된 바와 같은 ICOS "유리 수용체".
- (B) 형광 표지된 항-인간 IgG에 의해 측정된 바와 같은 말초 혈액 CD4+ 세포 상의 수용체 결합된 H2L5 hIgG4PE.
- 도 15 (a) H2L5 hIgG4PE로 처리된 Ba/F3-ICOS 세포에서의 포스포-AKT (T308) 발현 수준 - 세포내 신호전달 항체 어레이 (b) H2L5 hIgG4PE로 처리된 Ba/F3-ICOS 세포에서의 포스포-AKT (S473) 발현 수준 - 세포내 신호전달 항체 어레이.
- 도 16: 이필리무맙과 조합된 H2L5 hIgG4PE는 PBMC 사전-자극 검정에서 단일 항체 처리와 비교 시 증가된 염증유발 시토카인 생산을 발생시킨다.
- 도 17: 펨브롤리주맙과 조합된 H2L5 hIgG4PE는 PBMC 사전-자극 검정에서 단일 항체 처리와 비교 시 증가된 염증유발 시토카인 생산을 발생시킨다.
- 도 18: H2L5 hIgG4PE 플러스 이필리무맙 조합물은 CEFT 펩티드 및 사전-인큐베이션을 사용한 변형된 MLR 검정에서 증가된 염증유발 시토카인 생산을 유도한다.
- 도 19: H2L5 hIgG4PE 플러스 펨브롤리주맙 조합물은 CEFT 펩티드 및 사전-인큐베이션을 사용한 변형된 MLR 검정에서 증가된 염증유발 시토카인 생산을 유도한다.
- 도 20: H2L5 hIgG4PE 항-ICOS 효능제 mAb는 단독으로 및 펨브롤리주맙과 조합되어 인간 PBMC A2058 흑색종 마우스 종양 모델에서 종양 성장 억제를 발생시킨다.
- 도 21: 항-ICOS 무린 대용물 mAb는 CT26 마우스 종양 모델에서 항-PD1 무린 대용물 mAb와 조합되어 유의한 종양 성장 억제 및 증가된 생존을 발생시킨다.
- 도 22: 항-ICOS 무린 대용물 mAb는 EMT6 마우스 종양 모델에서 항-PD1 무린 대용물 mAb와 조합되어 유의한 종양 성장 억제 및 증가된 생존을 발생시킨다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 정의

[0015] 본원에 사용된 "ICOS"는 임의의 유도성 T-세포 공동자극제 단백질을 의미한다. ICOS (유도성 T-세포 공동자극제)에 대한 가명은 AILIM; CD278; CVID1, JTT-1 또는 JTT-2, MGC39850, 또는 8F4를 포함한다. ICOS는 활성화된 T 세포 상에서 발현된 CD28-슈퍼패밀리 공동자극 분자이다. 이러한 유전자에 의해 코딩된 단백질은 CD28 및 CTLA-4 세포-표면 수용체 패밀리에 속한다. 이는 동종이량체를 형성하고, 세포-세포 신호전달, 면역 반응, 및 세포 증식의 조절에서 중요한 역할을 한다. 인간 ICOS의 아미노산 서열은 하기에 서열식별번호: 10으로서 제시

된다.

MKSGWLWYFFFLFCLRIKVLGTGEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQLLKGQILCDLTKTKGSGNTV
 SIKSLKFCHSQSLNNSVSVFFLYNLHDHSHANYFYFCNLSIFDPPPFKVTTLTGGYLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAAF
 VVVCILGCILICWLTKKM (SEQ ID NO:10)

- [0016]
- [0017] 본원에 사용된 "ICOS-L" 및 "ICOS 리간드"는 상호교환가능하게 사용되고, 인간 ICOS의 막 결합된 천연 리간드를 지칭한다. ICOS 리간드는 인간에서 ICOSLG 유전자에 의해 코딩된 단백질이다. ICOSLG는 또한 CD275 (분화 클러스터 275)로 지정된 바 있다. ICOS-L에 대한 가명은 B7RP-1 및 B7-H2를 포함한다.
- [0018] 본원에 사용된 용어 "효능제"는 ICOS와 접촉 시 하기 (1) ICOS 수용체의 자극 또는 활성화, (2) ICOS의 활성, 기능 또는 존재의 증진, 증가 또는 촉진, 유도 또는 지속 및/또는 (3) ICOS의 발현의 증진, 증가, 촉진 또는 유도 중 1종 이상을 발생시키는 항원 결합 단백질, 예를 들어 ICOS 결합 단백질을 지칭한다. 효능제 활성은 비제한적으로 세포 신호전달, 세포 증식, 면역 세포 활성화 마커, 시토카인 생산의 측정과 같은 관련 기술분야에 공지된 다양한 검정에 의해 시험관내에서 측정될 수 있다. 효능제 활성은 또한 비제한적으로 T 세포 증식 또는 시토카인 생산의 측정과 같은 대용물 중점을 측정하는 다양한 검정에 의해 생체내에서 측정될 수 있다.
- [0019] 본원에 사용된 용어 "결합에 대해 교차 경쟁하다"는 본 발명의 ICOS 결합 단백질 중 임의의 것과 ICOS에의 결합에 대해 경쟁할 임의의 ICOS 결합 단백질을 지칭한다. ICOS에 대한 2개의 분자 사이의 결합에 대한 경쟁은 유도 세포측정법, 메소 스케일 디스커버리 및 ELISA를 포함한 관련 기술분야에 공지된 다양한 방법에 의해 시험될 수 있다. 결합은 직접적으로 측정될 수 있고, 이는 2개 이상의 결합 단백질을 ICOS와 접촉시켜 둘 수 있고 1개 또는 각각에 대해 결합을 측정할 수 있다는 것을 의미한다. 대안적으로, 관심 분자의 결합은 결합 또는 천연 리간드에 대해 시험될 수 있고 서로 정량적으로 비교될 수 있다.
- [0020] 본원에 사용된 용어 "ICOS 결합 단백질"은 ICOS에 결합할 수 있는 항체 및 다른 단백질 구축물, 예컨대 도메인을 지칭한다. 일부 경우에, ICOS는 인간 ICOS이다. 용어 "ICOS 결합 단백질"은 "ICOS 항원 결합 단백질"과 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 따라서, 관련 기술분야에서 이해되는 바와 같이, 항-ICOS 항체 및/또는 ICOS 항원 결합 단백질은 ICOS 결합 단백질로 간주될 것이다. 본원에 사용된 "항원 결합 단백질"은 항원, 예컨대 ICOS에 결합하는 본원에 기재된 항체, 도메인 및 다른 구축물을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 단백질이다. 본원에 사용된 ICOS 결합 단백질의 "항원 결합 부분"은 항원 결합 항체 단편을 포함하나 이에 제한되지 않는, ICOS에 결합할 수 있는 ICOS 결합 단백질의 임의의 부분을 포함할 것이다.
- [0021] 용어 "항체"는 본원에서 가장 넓은 의미로 이뮤노글로불린-유사 도메인 (예를 들어 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE)을 갖는 분자를 지칭하는 것으로 사용되고, 모노클로날, 재조합, 폴리클로날, 키메라, 인간, 인간화, 이중 특이적 항체를 포함한 다중특이적 항체, 및 이중접합체 항체; 단일 가변 도메인 (예를 들어, V_H, V_{HH}, VL, 도메인 항체 (dAbTM)), 항원 결합 항체 단편, Fab, F(ab')₂, Fv, 디숄피드 연결된 Fv, 단일 쇠 Fv, 디숄피드-연결된 scFv, 디아바디, TANDABSTM 등 및 상기 중 임의의 것의 변형된 버전을 포함한다.
- [0022] 대안적 항체 포맷은 항원 결합 단백질의 1개 이상의 CDR이 적합한 비-이뮤노글로불린 단백질 스캐폴드 또는 골격 상에 배열될 수 있는 대안적 스캐폴드, 예컨대 아피바디, SpA 스캐폴드, LDL 수용체 부류 A 도메인, 아비머 또는 EGF 도메인을 포함한다.
- [0023] 용어 "도메인"은 단백질의 나머지와 독립적으로 그의 3차 구조를 유지하는 폴딩된 단백질 구조를 지칭한다. 일반적으로, 도메인은 단백질의 개별적인 기능적 특성을 담당하고, 많은 경우에 단백질 및/또는 도메인의 나머지의 기능의 손실 없이 부가되거나, 제거되거나 또는 다른 단백질로 옮겨질 수 있다.
- [0024] 용어 "단일 가변 도메인"은 항체 가변 도메인의 서열 특징을 포함하는 폴딩된 폴리펩티드 도메인을 지칭한다. 따라서, 이는 완전 항체 가변 도메인 예컨대 V_H, V_{HH} 및 VL, 및 예를 들어 1개 이상의 루프가 항체 가변 도메인의 특징이 아닌 서열에 의해 대체된 변형된 항체 가변 도메인, 또는 말단절단되거나 N- 또는 C-말단 연장을 포함하는 항체 가변 도메인, 뿐만 아니라 적어도 전장 도메인의 결합 활성 및 특이성을 보유하는 가변 도메인의 폴딩된 단편을 포함한다. 단일 가변 도메인은 상이한 가변 영역 또는 도메인과 독립적으로 항원 또는 에피토프에 결합할 수 있다. "도메인 항체" 또는 "dAb^(TM)"는 "단일 가변 도메인"과 동일한 것으로 간주될 수 있다. 단일 가변 도메인은 인간 단일 가변 도메인일 수 있지만, 또한 다른 종 예컨대 설치류 너스 상어 및 낙타류 V_{HH} dAbTM로부터의 단일 가변 도메인을 포함한다. 낙타류 V_{HH}는 낙타, 라마, 알파카, 단봉낙타 및 구아나코를 포함한 종

으로부터 유래된 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 폴리펩티드이고, 이들은 자연적으로 경쇄가 결합된 중쇄 항체를 생산한다. 이러한 V_H 도메인은 관련 기술분야에서 이용가능한 표준 기술에 따라 인간화될 수 있고, 이러한 도메인은 "단일 가변 도메인"으로 간주된다. 본원에 사용된 V_H 는 낙타류 V_H 도메인을 포함한다.

- [0025] 항원 결합 단편은 비-항체 단백질 스캐폴드 상의 1개 이상의 CDR의 배열에 의해 제공될 수 있다. 본원에 사용된 "단백질 스캐폴드"는 4쇄 또는 2쇄 항체일 수 있거나, 또는 항체의 Fc 영역만을 포함할 수 있거나, 또는 항체로부터의 1개 이상의 불변 영역을 포함할 수 있고 불변 영역이 인간 또는 영장류 기원일 수 있거나, 또는 인간 및 영장류 불변 영역의 인공 키메라일 수 있는 이뮤노글로불린 (Ig) 스캐폴드, 예를 들어 IgG 스캐폴드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0026] 단백질 스캐폴드는 Ig 스캐폴드, 예를 들어 IgG 또는 IgA 스캐폴드일 수 있다. IgG 스캐폴드는 항체의 일부 또는 모든 도메인 (즉, CH1, CH2, CH3, V_H , V_L)을 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 또는 IgG4PE로부터 선택된 Ig 스캐폴드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 스캐폴드는 IgG1일 수 있다. 스캐폴드는 항체의 Fc 영역으로 이루어질 수 있거나, 또는 그를 포함할 수 있거나, 또는 그의 일부이다.
- [0027] 단백질 스캐폴드는 CTLA-4, 리포칼린, 단백질 A 유래된 분자 예컨대 단백질 A의 Z-도메인 (아피바디, SpA), A-도메인 (아비머/맥시바디); 열 쇼크 단백질 예컨대 GroE1 및 GroES; 트랜스페린 (트랜스-바디); 안키린 반복 단백질 (DARPin); 펩티드 압타머; C-유형 렉틴 도메인 (테트라렉틴); 인간 γ -결정질 및 인간 유비퀴틴 (아필린); PDZ 도메인; 인간 프로테아제 억제제의 전갈 독소 쿠니츠 유형 도메인; 및 피브로넥틴/애드넥틴으로 이루어진 군으로부터 선택된 스캐폴드의 유도체일 수 있으며; 이는 천연 리간드와 다른 항원, 예컨대 ICOS에 대한 결합을 수득하기 위해 단백질 조작에 적용된 바 있다.
- [0028] 항원 결합 부위는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 단백질 상의 부위를 지칭하며, 이는 단일 가변 도메인일 수 있거나, 또는 표준 항체 상에서 발견할 수 있는 바와 같은 쌍형성된 V_H/V_L 도메인일 수 있다. 단일 쇠 Fv (ScFv) 도메인도 또한 항원-결합 부위를 제공할 수 있다. 용어 "에피토프-결합 도메인"은 상이한 도메인과 독립적으로 에피토프로서 공지된 항원의 영역에 특이적으로 결합하는 도메인을 지칭한다.
- [0029] 용어 다중-특이적 항원 결합 단백질은 적어도 2개의 상이한 항원 결합 부위를 포함하는 항원 결합 단백질을 지칭한다. 각각의 이들 항원-결합 부위는 동일한 항원 또는 상이한 항원 상에 존재할 수 있는 상이한 에피토프에 결합할 수 있을 것이다. 다중-특이적 항원 결합 단백질은 1종 초과와 항원, 예를 들어 2종의 항원, 또는 3종의 항원, 또는 4종의 항원에 대한 특이성을 가질 것이다.
- [0030] 다중-특이적 항원 결합 단백질의 예는 결합 도메인에 직접적으로 또는 간접적으로 (예를 들어, 링커 서열을 통해) 각각의 말단에 연결된, 항체의 Fc 영역 또는 그의 일부로 이루어지거나, 또는 본질적으로 이루어진 것을 포함한다. 이러한 항원 결합 단백질은 Fc 영역 또는 그의 일부에 의해 분리된 2개의 결합 도메인을 포함할 수 있다. 분리된 결합 도메인이 서로 직접적으로 연결되지 않은 것을 의미하고, 이는 Fc 영역의 대향하는 말단 (C 및 N 말단) 또는 임의의 다른 스캐폴드 영역에 위치할 수 있다.
- [0031] 항원 결합 단백질은, 예를 들어 각각의 스캐폴드 영역의 N 및 C 말단에서, 직접적으로 또는 링커를 통해 간접적으로 2개의 결합 도메인에 각각 결합된 2개의 스캐폴드 영역을 포함할 수 있다. 각각의 결합 도메인은 상이한 항원에 결합할 수 있다.
- [0032] 본원에 사용된 용어 mAbdAb는 추가의 결합 도메인, 특히 단일 가변 도메인 예컨대 도메인 항체에 연결된 모노클로날 항체를 지칭한다. mAbdAb는 적어도 2개의 항원 결합 부위를 갖고, 이 중 적어도 1개는 도메인 항체로부터의 것이고, 적어도 1개는 쌍형성된 V_H/V_L 도메인으로부터의 것이다.
- [0033] "dAbTM 접합체"는 약물이 공유 또는 비공유 연결에 의해 화학적으로 접합된 dAb를 포함하는 조성물을 지칭한다. 바람직하게는, dAb 및 약물은 공유 결합된다. 이러한 공유 연결은 펩티드 결합을 통해 또는 다른 수단 예컨대 변형된 측쇄를 통해 이루어질 수 있다. 비공유 결합은 직접적 (예를 들어, 정전기적 상호작용, 소수성 상호작용) 또는 간접적 (예를 들어, 상보적 결합 파트너 (예를 들어, 비오틴 및 아비딘)의 비공유 결합을 포함, 여기서 1개의 파트너는 약물에 공유 결합되고 상보적 결합 파트너는 dAbTM에 공유 결합됨)일 수 있다. 상보적 결합 파트너가 사용되는 경우에, 결합 파트너 중 하나는 약물에 직접적으로 또는 적합한 링커 모이어티를 통해 공유 결합될 수 있고, 상보적 결합 파트너는 dAbTM에 직접적으로 또는 적합한 링커 모이어티를 통해 공유 결합될 수 있다.

- [0034] 본원에 사용된 "dAb™ 융합"은 dAb™ 및 폴리펩티드 약물 (dAb™ 또는 mAb일 수 있음)을 포함하는 융합 단백질을 지칭한다. dAb™ 및 폴리펩티드 약물은 단일 연속 폴리펩티드 쇄의 개별 부분 (모이어티)으로서 존재한다.
- [0035] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 항원 결합 단백질은 인간 ICOS와 다른 종으로부터의 ICOS, 예컨대 시노몰구스 ICOS 사이의 교차-반응성을 제시한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 인간 및 시노몰구스 ICOS에 특이적으로 결합한다. 인간 및 원숭이 종에 결합할 수 있는 약물의 제공은 이들 시스템에서 결과를 시험하고, 동일한 약물을 사용하여 데이터를 병렬 비교하는 것을 가능하게 한다. 질환 모델에 사용된 다른 종 예컨대 개 또는 원숭이, 특히 원숭이 사이의 교차 반응성이 고려된다.
- [0036] ICOS 결합 단백질과 참조 ICOS 결합 단백질 사이의 경쟁은 경쟁 MSD, ELISA, FMAT 또는 비아코어(BIAcore)에 의해 결정될 수 있다. 한 실시양태에서, 경쟁 검정은 ICOS 결합 단백질과 ICOS 리간드 결합의 비교에 의해 수행된다. 이러한 경쟁에 대한 여러 가능한 이유가 존재한다: 2종의 단백질은 동일 또는 중첩 에피토프에 결합할 수 있거나, 결합의 입체 역제가 존재할 수 있거나, 또는 제1 단백질의 결합이 제2 단백질의 결합을 막거나 감소시키는 항원에서의 입체형태적 변화를 유도할 수 있다.
- [0037] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 용어 "중화하다"는 ICOS 및 ICOS-L 사이의 상호작용이, 시험관내 또는 생체내에서, 본원에 기재된 바와 같은 항원 결합 단백질의 존재 하에, ICOS 결합 단백질의 부재 하의 ICOS 및 ICOS-L의 상호작용과 비교 시 감소되는 것을 의미한다. 중화는 그의 리간드에의 ICOS 결합의 차단, ICOS가 그의 리간드에 의해 활성화되는 것의 방지, ICOS 또는 그의 수용체의 하향 조절, 또는 이펙터 기능성에 영향을 미치는 것 중 1종 이상으로 인한 것일 수 있다. 예를 들어, 실시예 3 및 5에 기재된 리간드 결합 경쟁은 ICOS 결합 단백질의 중화 능력을 평가하는데 사용될 수 있다.
- [0038] ICOS와 ICOS-L 사이의 상호작용에 대한 ICOS 결합 단백질의 효과는 부분적 또는 전체적일 수 있다. ICOS 결합 단백질을 중화하는 것은 ICOS와 ICOS-L의 상호작용을 ICOS 결합 단백질의 부재 하의 ICOS - ICOS-L 상호작용에 비해 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 차단할 수 있다.
- [0039] 중화는 통상의 기술자에게 공지된 또는 본원에 기재된 바와 같은 1종 이상의 검정을 사용하여 결정 또는 측정될 수 있다.
- [0040] 친화도는 하나의 분자, 예를 들어 본 발명의 항원 결합 단백질의, 또 다른 것, 예를 들어 그의 표적 항원에 대한 단일 결합 부위에서의 결합의 강도이다. 항원 결합 단백질의 그의 표적에 대한 결합 친화도는 평형 방법 (예를 들어 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA) 또는 방사선면역검정 (RIA)) 또는 동역학 (예를 들어 비아코어™ 분석)에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 실시예 5에 기재된 비아코어™ 방법이 결합 친화도를 측정하는데 사용될 수 있다.
- [0041] 결합력은 다중 부위에서 2개의 분자의 서로에 대한 결합의 강도의 총 합이며, 예를 들어 상호작용의 결합가가 고려된다.
- [0042] 한 실시양태에서, ICOS 결합 단백질-ICOS 상호작용의 평형 해리 상수 (KD)는 100 nM 이하, 10 nM 이하, 2 nM 이하 또는 1 nM 이하이다. 대안적으로 KD는 5 내지 10 nM; 또는 1 내지 2 nM일 수 있다. KD는 1 pM 내지 500 pM; 또는 500 pM 내지 1 nM일 수 있다. 통상의 기술자는 KD 수치가 더 작을수록 결합은 더 강하다는 것을 인지할 것이다. KD의 역수 (즉 1/KD)는 단위 M⁻¹을 갖는 평형 회합 상수 (KA)이다. 통상의 기술자는 KA 수치가 더 클수록 결합은 더 강하다는 것을 인지할 것이다.
- [0043] 해리율 상수 (kd) 또는 "오프-레이트"는 ICOS 결합 단백질 ICOS 복합체의 안정성, 즉 초당 붕괴되는 복합체의 분획을 기재한다. 예를 들어, 0.01 s⁻¹의 kd는 초당 1%의 복합체 붕괴와 동등하다. 한 실시양태에서, 해리율 상수 (kd)는 1x10⁻³ s⁻¹ 이하, 1x10⁻⁴ s⁻¹ 이하, 1x10⁻⁵ s⁻¹ 이하, 또는 1x10⁻⁶ s⁻¹ 이하이다. kd는 1x10⁻⁵ s⁻¹ 내지 1x10⁻⁴ s⁻¹; 또는 1x10⁻⁴ s⁻¹ 내지 1x10⁻³ s⁻¹일 수 있다.
- [0044] 회합률 상수 (ka) 또는 "온-레이트"는 ICOS 결합 단백질-ICOS 복합체 형성의 속도를 기재한다. 한 실시양태에서, 회합률 상수 (ka)는 약 1.0 x 10⁵ M⁻¹s⁻¹이다.
- [0045] "단리된"은 분자, 예컨대 항원 결합 단백질 또는 핵산이 자연에서 발견될 수 있는 환경으로부터 제거된 것을 의도한다. 예를 들어, 분자는 정상적으로는 그와 함께 자연에 존재하는 물질로부터 정제될 수 있다. 예를 들어,

샘플 내의 분자의 질량은 총 질량의 95%일 수 있다.

[0046] 본원에 사용된 용어 "발현 벡터"는 관심 핵산을 세포, 예컨대 진핵 세포 또는 원핵 세포, 또는 관심 핵산 서열이 펩티드 쇠 예컨대 단백질로서 발현되는 무세포 발현 시스템 내로 도입하는데 사용될 수 있는 단리된 핵산을 의미한다. 이러한 발현 벡터는, 예를 들어 관심 핵산을 포함하는 코스미드, 플라스미드, 바이러스 서열, 트랜스포손, 및 선형 핵산일 수 있다. 발현 벡터가 세포 또는 무세포 발현 시스템 (예를 들어, 망상적혈구 용해물) 내로 도입되면, 관심 핵산에 의해 코딩된 단백질이 전사/번역 기구에 의해 생산된다. 본 개시내용의 범주 내의 발현 벡터는 진핵 또는 원핵 발현에 필요한 요소를 제공할 수 있고, 바이러스 프로모터 구동 벡터, 예컨대 CMV 프로모터 구동 벡터, 예를 들어 pcDNA3.1, pCEP4, 및 그의 유도체, 바큘로바이러스(Baculovirus) 발현 벡터, 드로소필라(Drosophila) 발현 벡터, 및 포유동물 유전자 프로모터, 예컨대 인간 Ig 유전자 프로모터에 의해 구동되는 발현 벡터를 포함한다. 다른 예는 원핵 발현 벡터, 예컨대 T7 프로모터 구동 벡터, 예를 들어, pET41, 락토스 프로모터 구동 벡터 및 아라비노스 유전자 프로모터 구동 벡터를 포함한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 다른 많은 적합한 발현 벡터 및 발현 시스템을 인식할 것이다.

[0047] 본원에 사용된 용어 "제조합 숙주 세포"는 세포 내로의 그의 도입 전에 단리된 관심 핵산 서열을 포함하는 세포를 의미한다. 예를 들어, 관심 핵산 서열은 발현 벡터에 존재할 수 있고, 세포는 원핵 또는 진핵일 수 있다. 예시적인 진핵 세포는 포유동물 세포, 예컨대 비제한적으로 COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, HepG2, 653, SP2/0, NS0, 293, HeLa, 골수종, 림프종 세포 또는 그의 임의의 유도체이다. 가장 바람직하게는, 진핵 세포는 HEK293, NS0, SP2/0, 또는 CHO 세포이다. 이. 콜라이(E. coli)는 예시적인 원핵 세포이다. 본 개시내용에 따른 제조합 세포는 형질감염, 세포 융합, 불멸화, 또는 관련 기술분야에 널리 공지된 다른 절차에 의해 생성될 수 있다. 세포 내로 형질감염되는 관심 핵산 서열, 예컨대 발현 벡터는 염색체 외에 존재하거나 또는 세포의 염색체 내로 안정하게 통합될 수 있다.

[0048] "키메라 항체"는 수용자 항체로부터 유래된 경쇄 및 중쇄 불변 영역과 회합된, 공여자 항체로부터 유래된 자연 발생 가변 영역 (경쇄 및 중쇄)을 함유하는 조각된 항체 유형을 지칭한다.

[0049] "인간화 항체"는 비-인간 공여자 이뮤노글로불린으로부터 유래된 그의 CDR을 갖고, 분자의 나머지 이뮤노글로불린-유래 부분은 1종 이상의 인간 이뮤노글로불린(들)으로부터 유래된 것인 조각된 항체의 유형을 지칭한다. 또한, 프레임워크 지지 잔기는 결합 친화도를 보존하기 위해 변경될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Queen et al. Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson, et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)] 참조). 적합한 인간 수용자 항체는 공여자 항체의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열에 대한 상동성에 의해 통상적인 데이터베이스, 예를 들어, 카바트(KABAT)TM 데이터베이스, 로스 알라모스 데이터베이스, 및 스위스 단백질 데이터베이스로부터 선택된 것일 수 있다. 공여자 항체의 프레임워크 영역에 대한 상동성에 의해 특징화된 인간 항체는 (아미노산 기반) 공여자 CDR의 삽입을 위한 중쇄 불변 영역 및/또는 중쇄 가변 프레임워크 영역을 제공하는데 적합할 수 있다. 경쇄 불변 또는 가변 프레임워크 영역을 공여할 수 있는 적합한 수용자 항체는 유사한 방식으로 선택될 수 있다. 수용자 항체 중쇄 및 경쇄는 동일한 수용자 항체로부터 기원할 것이 요구되지 않는다는 것을 주목한다. 선행 기술은 이러한 인간화 항체를 생산하는 여러 방식을 기재하고 - 예를 들어, EP-A-0239400 및 EP-A-054951을 참조한다.

[0050] 용어 "완전 인간 항체"는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역 (존재하는 경우에)을 갖는 항체를 포함한다. 본 발명의 인간 서열 항체는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않은 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내 임의적 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 완전 인간 항체는 궁극적으로 인간 기원이거나 또는 이러한 서열과 동일한 아미노산 서열인 폴리뉴클레오티드에 의해서만 코딩된 아미노산 서열을 포함한다. 본원에서 의도되는 바와 같이, 트랜스제닉 마우스에서 생산된 마우스 게놈 내로 삽입된 인간 이뮤노글로불린-코딩 DNA에 의해 코딩된 항체는 그들이 궁극적으로 인간 기원의 DNA에 의해 코딩되기 때문에 완전 인간 항체이다. 이러한 상황에서, 인간 이뮤노글로불린-코딩 DNA는 마우스 내에서 (항체를 코딩하기 위해) 재배열될 수 있고, 체세포 돌연변이가 또한 발생할 수 있다. 마우스에서 이러한 변화를 거친 원래 인간 DNA에 의해 코딩된 항체는 본원에서 의도되는 바와 같은 완전 인간 항체이다. 이러한 트랜스제닉 마우스의 사용은 인간 항원에 대한 완전 인간 항체를 선택하는 것을 가능하게 한다. 관련 기술분야에서 이해되는 바와 같이, 완전 인간 항체는 파지 디스플레이 기술을 사용하여 제조될 수 있으며 여기서 인간 DNA 라이브러리는 인간 배선 DNA 서열을 포함하는 항체의 생성을 위해 파지에 삽입된다.

[0051] 용어 "공여자 항체"는 제1 이뮤노글로불린 파트너에 대해 그의 가변 영역, CDR 또는 그의 다른 기능적 단편 또

는 유사체의 아미노산 서열을 제공하는 항체를 지칭한다. 따라서, 공여자는 변경된 이뮤노글로불린 코딩 영역을 제공하고, 공여자 항체의 항원 특이성 및 중화 활성 특징을 갖는 변경된 항체의 발현을 발생시킨다.

[0052] 용어 "수용자 항체"는 제1 이뮤노글로불린 파트너에 대해 그의 중쇄 및/또는 경쇄 프레임워크 영역 및/또는 그의 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 코딩하는 아미노산 서열의 전부 (또는 임의의 일부)를 제공하는 공여자 항체에 대해 이중인 항체를 지칭한다. 인간 항체는 수용자 항체일 수 있다.

[0053] 용어 "V_H" 및 "V_L"은 각각 항원 결합 단백질의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 지칭하는 것으로 본원에 사용된다.

[0054] "CDR"은 항원 결합 단백질의 상보성 결정 영역 아미노산 서열로 정의된다. 이는 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 초가변 영역이다. 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR (또는 CDR 영역)이 이뮤노글로불린의 가변 부분에 존재한다. 따라서, 본원에 사용된 "CDR"은 모든 3개의 중쇄 CDR, 모든 3개의 경쇄 CDR, 모든 중쇄 및 경쇄 CDR, 또는 적어도 2개의 CDR을 지칭한다.

[0055] 본 명세서 전체에서, 가변 도메인 서열 및 전장 항체 서열 내의 아미노산 잔기는 카바트 넘버링 규정에 따라 넘버링된다. 유사하게, 실시예에서 사용되는 용어 "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3"은 카바트 넘버링 규정을 따른다. 추가의 정보에 대해서는, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1991)]을 참조한다.

[0056] 가변 도메인 서열 및 전장 항체 서열 내의 아미노산 잔기에 대한 대안적 넘버링 규정이 존재한다는 것은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 또한, CDR 서열에 대한 대안적 넘버링 규정, 예를 들어 문헌 [Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883]에 제시된 것이 존재한다. 항체의 구조 및 단백질 폴딩은 다른 잔기가 CDR 서열의 일부로 간주된다는 것을 의미할 수 있고, 통상의 기술자에 의해 그와 같이 이해될 것이다.

[0057] 통상의 기술자에게 이용가능한 CDR 서열에 대한 다른 넘버링 규정은 "AbM" (유니버시티 오브 베쓰) 및 "접촉" (유니버시티 칼리지 런던) 방법을 포함한다. "최소 결합 단위"를 제공하기 위해, 카바트, 코티아(Chothia), AbM 및 접촉 방법 중 적어도 2종을 사용하여 최소 중첩 영역을 결정할 수 있다. 최소 결합 단위는 CDR의 하위-부분일 수 있다.

[0058] 하기 표 1은 각각의 CDR 또는 결합 단위에 대한 각각의 넘버링 규정을 사용한 하나의 정의를 나타낸다. 가변 도메인 아미노산 서열을 넘버링하기 위해 카바트 넘버링 스킴이 표 1에 사용된다. CDR 정의의 일부는 사용된 개별 공개물에 따라 달라질 수 있다는 것을 주목한다.

[0059] 표 1

	카바트 CDR	코티아 CDR	AbM CDR	접촉 CDR	최소 결합 단위
H1	31-35/35A/ 35B	26-32/33/34	26-35/35A/35B	30-35/35A/35B	31-32
H2	50-65	52-56	50-58	47-58	52-56
H3	95-102	95-102	95-102	93-101	95-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36	30-34
L2	50-56	50-56	50-56	46-55	50-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96	89-96

[0060]

[0061] 따라서, 하기 CDR 중 어느 하나 또는 그의 조합을 포함하는 ICOS 결합 단백질이 제공된다:

- CDRH1: DYAMH (SEQ ID NO:1)
- CDRH2: LISIYSDHTNYNQKFQG (SEQ ID NO:2)
- CDRH3: NNYGNYGWYFDV (SEQ ID NO:3)
- CDRL1: SASSSVSYMH (SEQ ID NO:4)
- CDRL2: DTSKLAS (SEQ ID NO:5)
- CDRL3: FQSGGYPYT (SEQ ID NO:6)

[0062]

[0063] 본 발명의 한 실시양태에서 ICOS 결합 단백질은 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영

역에서 CDRH1 (서열식별번호: 1), CDRH2 (서열식별번호: 2), 및 CDRH3 (서열식별번호: 3)을 포함한다. 서열식별번호: 7에 제시된 인간화된 중쇄 가변 영역을 포함하는 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 "H2"로 지정된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 서열식별번호: 7과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 적합하게는, 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 서열식별번호: 7과 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.

[0064] 인간화된 중쇄 (V_H) 가변 영역 (H2):

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT DYAMHWVRQA PGQGLEWMGL ISIYSDHTNY
NQKRFQGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCGRNN YGNYGWYFDV WGQGTTVTVS S
 (SEQ ID NO:7)

[0065]

[0066] 본 발명의 한 실시양태에서 ICOS 결합 단백질은 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역에서 CDRL1 (서열식별번호: 4), CDRL2 (서열식별번호: 5), 및 CDRL3 (서열식별번호: 6)을 포함한다. 서열식별번호: 8에 제시된 인간화된 경쇄 가변 영역을 포함하는 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 "L5"로 지정된다. 따라서, 서열식별번호: 7의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 8의 경쇄 가변 영역을 포함하는 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 본원에서 H2L5로 지정될 수 있다.

[0067] 적합하게는 가변 중쇄 및 경쇄 구축물에 대한 리더 서열이 도 9에 제시되고,

[0068] MGWSCIIILFLVATATGVHS (SEQ ID NO:11)

[0069] 를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0070] 일부 실시양태에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 적합하게는, 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 서열식별번호: 8과 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.

[0071] 인간화된 경쇄 (V_L) 가변 영역 (L5)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSASSSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDT SKLASGIPAR
FSGSGSGTDY TLTISSLEPE DFAVYYCFQG SGYPYTFGQG TKLEIK (SEQ ID NO:8)

[0072]

[0073] CDR 또는 최소 결합 단위는 적어도 1종의 아미노산 치환, 결실 또는 부가에 의해 변형될 수 있고, 여기서 변이체 항원 결합 단백질은 비변형된 단백질, 예컨대 클론 422.2로부터 생산된 무린 항체 또는 서열식별번호: 7 및 서열식별번호: 8을 포함하는 항체의 생물학적 특징을 실질적으로 보유한다.

[0074] 각각의 CDR H1, H2, H3, L1, L2, L3은 단독으로 또는 임의의 다른 CDR과 조합되어, 임의의 순열 또는 조합으로 변형될 수 있다는 것이 인식될 것이다. 한 실시양태에서, CDR은 최대 3개의 아미노산, 예를 들어 1 또는 2개의 아미노산, 예를 들어 1개의 아미노산의 치환, 결실 또는 부가에 의해 변형된다. 전형적으로, 변형은 치환, 특히 예를 들어 하기 표 2에 제시된 바와 같은 보존적 치환이다.

[0075] 표 2

측쇄	구성원
소수성	Met, Ala, Val, Leu, Ile
중성 친수성	Cys, Ser, Thr
산성	Asp, Glu
염기성	Asn, Gln, His, Lys, Arg
쇄 배향에 영향을 미치는 잔기	Gly, Pro
방향족	Trp, Tyr, Phe

[0076]

[0077] 예를 들어, 변이체 CDR에서, 최소 결합 단위의 아미노산 잔기는 동일하게 유지될 수 있지만, 카바트 또는 코티아 정의(들)의 일부로서 CDR을 포함하는 플랭킹 잔기는 보존적 아미노산 잔기로 치환될 수 있다.

[0078] 상기 기재된 바와 같은 변형된 CDR 또는 최소 결합 단위를 포함하는 이러한 항원 결합 단백질은 본원에서 "기능

적 CDR 변이체" 또는 "기능적 결합 단위 변이체"로 지칭될 수 있다. 적합하게는, 한 실시양태에서 서열식별번호: 1, 2, 3, 4, 5, 및/또는 6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR 및/또는 그의 기능 CDR 변이체를 포함하는 ICOS 결합 단백질이 제공된다.

- [0079] 본원에 사용된 용어 "에피토프"는 항원 결합 단백질의 특정한 결합 도메인과 접촉하는 항원의 그러한 부분을 지칭한다. 에피토프는 선형 또는 입체형태적/불연속적일 수 있다. 입체형태적 또는 불연속적 에피토프는 다른 서열에 의해 분리된, 즉, 항원의 1차 서열에서 연속적인 서열이 아닌 아미노산 잔기를 포함한다. 잔기는 펩티드 쇄의 상이한 영역으로부터의 것일 수 있지만, 이들은 항원의 3차원 구조에서 매우 근접해있다. 다량체 항원의 경우에, 입체형태적 또는 불연속적 에피토프는 상이한 펩티드 쇄로부터의 잔기를 포함할 수 있다. 에피토프 내에 포함되는 특정한 잔기는 컴퓨터 모델링 프로그램을 통해 또는 관련 기술분야에 공지된 방법, 예컨대 X선 결정학을 통해 획득된 3차원 구조를 통해 결정될 수 있다.
- [0080] CDR L1, L2, L3, H1 및 H2는 유한수의 주쇄 입체형태 중 하나를 구조적으로 나타내는 경향이 있다. CDR의 특정한 정규 구조 부류는 CDR의 길이 및 루프 패킹 둘 다에 의해 정의되고, CDR 및 프레임워크 영역 (구조적 결정 잔기 또는 SDR) 둘 다 내의 주요 위치에 위치하는 잔기에 의해 결정된다. 문헌 [Martin and Thornton (1996; J Mol Biol 263:800-815)]은 "주요 잔기" 정규 주형을 정의하기 위한 자동 방법을 생성한 바 있다. CDR의 세트에 대한 정규 부류를 정의하는데 클러스터 분석이 사용되고, 이어서 매립된 소수성, 수소-결합 잔기, 및 보존된 글리신 및 프롤린을 분석함으로써 정규 주형이 확인된다. 항체 서열의 CDR은 서열을 주요 잔기 주형과 비교하고, 동일성 또는 유사성 매트릭스를 사용하여 각각의 주형을 스코어링함으로써 정규 부류로 할당될 수 있다.
- [0081] CDR당, 상응하는 CDR당, 결합 단위당, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역당, 중쇄 또는 경쇄당, 및 항원 결합 단백질당 다중 변이체 CDR 정규 위치가 존재할 수 있고, 따라서 CDR의 정규 구조가 항원 결합 단백질이 ICOS에 특이적으로 결합할 수 있도록 유지되는 한, 치환의 임의의 조합이 본 발명의 항원 결합 단백질에 존재할 수 있다.
- [0082] 상기 논의된 바와 같이, CDR의 특정한 정규 구조 부류는 CDR의 길이 및 루프 패킹 둘 다에 의해 정의되고, CDR 및 프레임워크 영역 둘 다 내의 주요 위치에 위치하는 잔기에 의해 결정된다.
- [0083] 질의 핵산 서열과 대상 핵산 서열 사이의 "퍼센트 동일성"은 백분율로 표현되는 "동일성" 값이며, 이는 대상 핵산 서열이 쌍별 BLASTN 정렬을 수행한 후 질의 핵산 서열과 100% 질의 적용범위를 가질 때 BLASTN 알고리즘에 의해 계산된다. 질의 핵산 서열과 대상 핵산 서열 사이의 이러한 쌍별 BLASTN 정렬은 국립 생명공학 연구 센터의 웹사이트 상에서 이용가능한 BLASTN 알고리즘의 디폴트 세팅을 사용하고 낮은 복잡성 영역에 대한 필터를 턴 오프하여 수행한다. 중요하게는, 질의 핵산 서열은 본원의 하나 이상의 청구범위에서 확인되는 핵산 서열에 의해 기재될 수 있다.
- [0084] 질의 아미노산 서열과 대상 아미노산 서열 사이의 "퍼센트 동일성"은 백분율로 표현되는 "동일성" 값이며, 이는 대상 아미노산 서열이 쌍별 BLASTP 정렬을 수행한 후 질의 아미노산 서열과 100% 질의 적용범위를 가질 때 BLASTP 알고리즘에 의해 계산된다. 질의 아미노산 서열과 대상 아미노산 서열 사이의 이러한 쌍별 BLASTP 정렬은 국립 생명공학 연구 센터의 웹사이트 상에서 이용가능한 BLASTP 알고리즘의 디폴트 세팅을 사용하고 낮은 복잡성 영역에 대한 필터를 턴 오프하여 수행한다. 중요하게는, 질의 아미노산 서열은 본원의 하나 이상의 청구범위에서 확인되는 아미노산 서열에 의해 기재될 수 있다.
- [0085] 질의 서열은 대상 서열과 100% 동일할 수 있거나, 또는 % 동일성이 100% 미만이라도 하는 대상 서열과 비교 시 특정 정수 이하의 아미노산 또는 뉴클레오티드 변경을 포함할 수 있다. 예를 들어, 질의 서열은 대상 서열과 적어도 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일하다. 이러한 변경은 적어도 1개의 아미노산 결실, 치환 (보존적 및 비보존적 치환 포함), 또는 삽입을 포함하고, 여기서 상기 변경은 질의 서열의 아미노- 또는 카르복시-말단 위치에서 또는 그러한 말단 위치 사이의 임의의 곳에서 발생하며, 질의 서열 내의 아미노산 또는 뉴클레오티드 사이에 개별적으로 또는 질의 서열 내의 1개 이상의 인접한 군 내에 산재될 수 있다.
- [0086] % 동일성은 CDR(들)을 포함하는 질의 서열의 전체 길이에 걸쳐 결정될 수 있다. 대안적으로, % 동일성은 CDR(들)을 제외할 수 있으며, 예를 들어 CDR(들)은 대상 서열과 100% 동일하고, % 동일성 변이는 질의 서열의 나머지 부분에 존재하여, CDR 서열은 고정/무손상이다.
- [0087] 변이체 서열은 비변형된 단백질, 예컨대 서열식별번호: 7 또는 서열식별번호: 8의 생물학적 특징을 실질적으로 보유한다.
- [0088] V_H 또는 V_L 서열은 최대 15개 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 갖는 변이체 서열일 수 있다. 예를 들어, 변이

체 서열은 최대 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들), 부가(들) 또는 결실(들)을 가질 수 있다.

- [0089] 서열 변이는 CDR(들)을 제외할 수 있고, 예를 들어 CDR(들)은 V_H 또는 V_L (또는 HC 또는 LC) 서열과 동일하고 변이는 V_H 또는 V_L (또는 HC 또는 LC) 서열의 나머지 부분에 존재하여, CDR 서열은 고정/무손상이다.
- [0090] 통상의 기술자는, 항원 결합 단백질 예컨대 항체의 생산 시, 특히 사용되는 세포주 및 항원 결합 단백질의 특정한 아미노산 서열에 의존하여, 번역후 변형이 발생할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 예를 들어, 이는 특정 리더 서열의 절단, 다양한 당 모이어티의 다양한 글리코실화 및 인산화 패턴으로의 부가, 탈아미드화, 산화, 디설피드 결합 스크램블링, 이성질체화, C-말단 리신 클리핑, 및 N-말단 글루타민 고리화를 포함할 수 있다. 본 발명은 1회 이상의 번역후 변형에 적용된 바 있거나, 또는 이를 거친 바 있는 항원 결합 단백질의 사용을 포괄한다. 따라서 본 발명의 "항원 결합 단백질" 또는 "항체"는 본원에 기재된 바와 같은 번역후 변형을 거친 바 있는, 이전에 정의된 바와 같은 "항원 결합 단백질" 또는 "항체"를 각각 포함한다.
- [0091] 탈아미드화는 주로 아스파라긴 (N)을 이소-아스파르트산 및 아스파르트산 (D)으로 대략 3:1 비로 전환시키는 효소적 반응이다. 훨씬 더 적은 정도로, 탈아미드화는 글루타민 잔기와 함께 유사한 방식으로 일어날 수 있다. CDR에서의 탈아미드화는 분자의 전하에서의 변화를 발생시키지만, 전형적으로 항원 결합에서는 변화를 발생시키지 않고 PK/PD에도 영향을 미치지 않는다.
- [0092] 산화는 생산 및 저장 동안 발생할 수 있고 (즉, 산화 조건의 존재 하에), 반응성 산소 종에 의해 직접적으로 또는 산화성 스트레스의 2차 부산물과의 반응에 의해 간접적으로 유도되는 단백질의 공유 변형을 발생시킨다. 산화는 주로 메티오닌 잔기에서 일어나지만, 때때로 트립토판 및 유리 시스테인 잔기에서 발생할 수 있다.
- [0093] 디설피드 결합 스크램블링은 생산 및 염기성 저장 조건 동안 발생할 수 있다. 특정 상황 하에, 디설피드 결합은 파괴되거나 부정확하게 형성되어 쌍형성되지 않은 시스테인 잔기 (-SH)를 발생시킬 수 있다. 이들 유리 (쌍형성되지 않은) 술폰히드릴 (-SH)은 서플링을 촉진할 수 있다.
- [0094] 이성질화는 전형적으로 생산, 정제, 및 (산성 pH에서의) 저장 동안 발생하고, 통상적으로 아스파르트산이 화학적 공정을 통해 이소아스파르트산으로 전환될 때 발생한다.
- [0095] 중쇄 및/또는 경쇄에서 N-말단 글루타민은 피로글루타메이트 (pGlu)를 형성할 가능성이 있다. 대부분의 pGlu 형성은 생산 생물반응기에서 일어나지만, 가공 및 저장 조건의 pH 및 온도에 따라, 비-효소적으로 형성될 수 있다. pGlu 형성은 재조합 mAb에 대한 주요 분해 경로 중 하나로 간주된다.
- [0096] C-말단 리신 클리핑은 카르복시펩티다제에 의해 촉매되는 효소적 반응이고, 재조합 mAb에서 통상적으로 관찰된다. 이러한 과정의 변이체는 하나 또는 둘 다의 중쇄로부터의 리신의 제거를 포함한다. 리신 클리핑은 생물활성에 영향을 미치는 것으로 보이지 않고, mAb 이펙터 기능에 어떠한 영향도 미치지 않는다.
- [0097] 자연 발생 자가항체는 인간에 존재하며 단백질에 결합할 수 있다. 자가항체는 따라서 내인성 단백질 (나이프 대상체에 존재) 뿐만 아니라 치료를 위해 대상체에 투여된 단백질 또는 펩티드에도 결합할 수 있다. 치료 단백질-결합 자가항체 및 약물 치료에 반응하여 새롭게 형성된 항체는 집합적으로 항-약물 항체 (ADA)로 불린다. 대상체에 투여된 분자 예컨대 치료 단백질 및 펩티드에 대한 기존 항체는 그의 효능에 영향을 미칠 수 있고, 치료된 환자에서 투여 반응, 과민성, 변경된 임상 반응, 및 분자를 유지, 제거 또는 중화하는 것에 의한 변경된 생체이용률을 발생시킬 수 있다. 대상체, 특히 인간 대상체에 투여된 경우에 감소된 면역원성, 즉 기존 ADA에 결합하는 감소된 능력을 갖는 인간 이뮤노글로불린 (항체) 단일 가변 도메인 또는 dAb™을 포함하는 요법을 위한 분자를 제공하는 것은 유리할 수 있다.
- [0098] 따라서, 본 발명의 한 실시양태에서 증가의 비변형된 분자와 비교 시 기존 항체 (ADA)에 결합하는 감소된 능력을 갖는 변형된 dAb™가 제공된다. 결합하는 감소된 능력은 변형된 분자가 기존 ADA에 감소된 친화도 또는 감소된 결합력으로 결합한다는 것을 의미한다. 상기 변형된 dAb™는 (a) C-말단 부가, 연장, 결실 또는 태그 및/또는 (b) 1개 이상의 아미노산 프레임워크 치환으로부터 선택된 1종 이상의 변형을 포함한다.
- [0099] 개시내용의 폴리펩티드 및 dAb™ 및 이들을 포함하는 효능제는, 예를 들어, PEG 기, 혈청 알부민, 트랜스페린, 트랜스페린 수용체 또는 적어도 그의 트랜스페린-결합 부분, 항체 Fc 영역의 부착에 의해, 또는 항체 도메인에 대한 접합에 의해 보다 큰 유체역학적 크기를 갖도록 포맷화될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 dAb™ 및 효능제는 항체의 더 큰 항원-결합 단편으로서 또는 항체로서 포맷화될 수 있다 (예를 들어, Fab, Fab', F(ab)₂,

F(ab')₂, IgG, scFv로서 포맷화).

- [0100] 본원에 사용된 "유체역학적 크기"는 수용액을 통한 분자의 확산에 기초한 분자 (예를 들어, 항원 결합 단백질)의 겔보기 크기를 지칭한다. 단백질의 겔보기 크기를 유도하기 위해 용액을 통한 단백질의 확산 또는 이동이 프로세싱될 수 있고, 여기서 크기는 단백질 입자의 "스트로크 반경" 또는 "유체역학적 반경"에 의해 주어진다. 단백질의 "유체역학적 크기"는 질량 및 형상 (입체형태) 둘 다에 의존하므로, 동일한 분자 질량을 갖는 2종의 단백질은 단백질의 전체적인 입체형태 및 전하에 기초하여 상이한 유체역학적 크기를 가질 수 있다. 유체역학적 크기에서의 증가는 신장 클리어런스에서의 연관된 감소를 제공할 수 있고, 이는 반감기 ($t_{1/2}$)에서 관찰되는 증가로 이어질 수 있다.
- [0101] 개시내용의 항원 결합 단백질 (예를 들어, 도메인 항체 단량체 및 다량체)의 유체역학적 크기는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 항원 결합 단백질의 유체역학적 크기를 결정하는데 겔 여과 크로마토그래피가 사용될 수 있다. 항원 결합 단백질의 유체역학적 크기를 결정하는데 적합한 겔 여과 매트릭스, 예컨대 가교된 아가로스 매트릭스가 널리 공지되어 있고, 용이하게 이용가능하다.
- [0102] 항원 결합 단백질 포맷의 크기 (예를 들어, 도메인 항체 단량체에 부착된 PEG 모이어티의 크기)는 목적하는 용도에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 항원 결합 단백질이 순환을 벗어나 말초 조직 내로 진입하는 것이 의도되는 경우에, 혈류로부터의 유출을 용이하게 하기 위해 ICOS 결합 단백질의 유체역학적 크기를 낮게 유지시키는 것이 바람직하다. 대안적으로, 항원 결합 단백질이 체순환 중에 더 오랜 기간 동안 남아있도록 하는 것을 목적으로 하는 경우에, 예를 들어 Ig 유사 단백질로서 포맷화함으로써, 항원 결합 단백질의 크기를 증가시킬 수 있다.
- [0103] 제약 조성물
- [0104] 본원에 기재된 바와 같은 항원 결합 단백질은 본원에 기재된 인간 질환의 치료에 사용하기 위해 제약 조성물 내로 혼입될 수 있다. 한 실시양태에서, 제약 조성물은 임의로 1종 이상의 제약상 허용되는 담체 및/또는 부형제와 조합된 항원 결합 단백질을 포함한다.
- [0105] 이러한 조성물은 허용가능한 제약 실시예에 의해 공지되고 언급되는 제약상 허용되는 담체를 포함한다.
- [0106] 제약 조성물은 주사 또는 연속 주입에 의해 투여될 수 있다 (예는 정맥내, 복강내, 피내, 피하, 근육내 및 문맥내를 포함하나 이에 제한되지는 않음). 한 실시양태에서, 조성물은 정맥내 투여에 적합하다. 제약 조성물은 국소 투여 (표피, 흡입, 비강내 또는 안구 투여를 포함하나 이에 제한되지는 않음) 또는 경장 투여 (경구 또는 직장 투여를 포함하나 이에 제한되지는 않음)에 적합할 수 있다.
- [0107] 제약 조성물은 0.5mg 내지 10g의 ICOS 결합 단백질, 예를 들어 5mg 내지 1g의 항원 결합 단백질을 포함할 수 있다. 대안적으로, 조성물은 5mg 내지 500 mg, 예를 들어 5mg 내지 50mg을 포함할 수 있다.
- [0108] 이러한 제약 조성물의 제조 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 사용되는 투여 방식 및 특정한 단백질에 적절한 것으로서 다른 부형제가 조성물에 첨가될 수 있다. 상이한 부형제의 예 및 그의 용도가 문헌 [Lowe et al., (2011)]에 기재되어 있다.
- [0109] 항원 결합 단백질을 투여하는 것에 대한 유효 용량 및 치료 요법은 환자의 연령, 체중 및 건강 상태 및 치료될 질환과 같은 인자에 의존할 수 있다. 이러한 인자는 담당 의사의 권한 내에 있다. 적절한 용량을 선택하는데 있어서의 안내는 예를 들어 문헌 [Bai et al., (2012)]에서 찾아볼 수 있다.
- [0110] 제약 조성물은 다른 의약과 함께 항원 결합 단백질의 부분들의 키트를, 임의로 사용에 대한 지침서와 함께 포함할 수 있다. 편의상, 키트는 시약을 미리 결정된 양으로, 사용에 대한 지침서와 함께 포함할 수 있다.
- [0111] 용어 "개체", "대상체" 및 "환자"는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 한 실시양태에서, 대상체는 포유동물, 예컨대 영장류, 예를 들어 마모셋 또는 원숭이이다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0112] 본원에 기재된 항원 결합 단백질은 또한 치료 방법에 사용될 수 있다. 치료는 치유적, 예방적 또는 방지적일 수 있다. 치료는 질환의 적어도 한 측면 또는 증상의 완화, 감소 또는 방지를 포괄하고, 본원에 기재된 질환의 방지 또는 치유를 포괄한다.
- [0113] 본원에 기재된 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분은 치유적, 예방적 또는 방지적 치료를 위한 유효량으로 사용된다. 본원에 기재된 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분의 치료 유효량은 질환의 하나 이상

의 증상을 호전 또는 감소시키거나, 또는 그러한 질환을 방지 또는 치유하는데 유효한 양이다.

- [0114] 따라서, 한 실시양태에서 본 발명의 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분은 요법에 사용하기 위해 제공된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분은 암, 감염성 질환 및/또는 패혈증의 치료에 사용하기 위해 제공된다. 본 발명은 또한 암, 감염성 질환 및/또는 패혈증의 치료를 위한 의학의 제조에서의 본 발명의 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분의 용도를 제공한다.
- [0115] 따라서, 암, 감염성 질환 및/또는 패혈증의 치료에 사용하기 위한 단리된 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분 또는 상기 단리된 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분을 포함하는 제약 조성물이 본원에 제공된다.
- [0116] 생산 방법
- [0117] 항원 결합 단백질은 다수의 통상적인 기술 중 임의의 것에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 항원 결합 단백질은 그것을 자연적으로 발현하는 세포로부터 정제될 수 있거나 (예를 들어, 항체는 그것을 생산하는 하이브리도마로부터 정제될 수 있음), 또는 제조할 발현 시스템에서 생산될 수 있다.
- [0118] 수많은 상이한 발현 시스템 및 정제 요법이 본 발명의 항원 결합 단백질을 생성하는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 숙주 세포는 목적하는 항원 결합 단백질을 코딩하는 재조합 발현 벡터에 의해 형질전환된다. 원핵생물 (그램 음성 또는 그람 양성 박테리아, 예를 들어 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실루스 종, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 종 포함), 효모 (예를 들어 사카로미세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)), 진균 (예를 들어 아스페르길루스 종)을 포함한 진핵생물, 또는 곤충 세포 및 포유동물 기원의 세포주 (예를 들어, CHO, Perc6, HEK293, HeLa)를 포함한 고등 진핵생물을 포함한 광범위한 숙주 세포가 사용될 수 있다.
- [0119] 숙주 세포는 단리된 숙주 세포일 수 있다. 숙주 세포는 통상적으로 다세포 유기체 (예를 들어, 식물 또는 동물)의 부분이 아니다. 숙주 세포는 비-인간 숙주 세포일 수 있다.
- [0120] 박테리아, 진균, 효모, 및 포유동물 세포 숙주와 함께 사용하는데 적절한 클로닝 및 발현 벡터 및 클로닝 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다.
- [0121] 세포는 항원 결합 단백질의 발현을 촉진하는 조건 하에 배양될 수 있고, 통상적인 단백질 정제 절차에 의해 폴리펩티드가 회수될 수 있다. 본원에서의 사용을 위해 고려되는 항원 결합 단백질은 오염 물질이 실질적으로 부재하는 실질적으로 균질한 항원 결합 단백질을 포함한다.
- [0122] 통상의 기술자는, 항원 결합 단백질의 생산 시, 특히 사용되는 세포주 및 항원 결합 단백질의 특정한 아미노산 서열에 의존하여, 번역후 변형이 발생할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 이는 특정 리더 서열의 절단, 다양한 당 모이어티의 다양한 글리코실화 패턴으로의 부가, 탈아미드화 (예를 들어 아스파라긴 또는 글루타민 잔기에서), 산화 (예를 들어 메티오닌, 트립토판 또는 유리 시스테인 잔기에서), 디설피드 결합 스크램블링, 이성질체화 (예를 들어 아스파르트산 잔기에서), C-말단 리신 클리핑 (예를 들어 하나 또는 둘 다의 중쇄로부터) 및 N-말단 글루타민 고리화 (예를 들어 중쇄 및/또는 경쇄에서)를 포함할 수 있다. 본 발명은 1회 이상의 번역후 변형에 적용된 바 있거나, 또는 이를 거친 바 있는 항체의 사용을 포괄한다. 변형은 CDR, 가변 프레임워크 영역, 또는 불변 영역에서 발생할 수 있다. 변형은 분자의 전하에서의 변화를 발생시킬 수 있다. 변형은 전형적으로 항원 결합, 기능, 생물활성에서 변화를 발생시키지 않고, ICOS 결합 단백질의 약동학적 (PK) 또는 약역학적 (PD) 특징에도 영향을 미치지 않는다.
- [0123] 본원에 사용된 용어 "이펙터 기능"은 항체 의존성 세포 매개 세포독성 활성 (ADCC), 보체-의존성 세포독성 활성 (CDC) 매개된 반응, Fc-매개된 식세포작용 또는 항체 의존성 세포 식세포작용 (ADCP) 및 FcRn 수용체를 통한 항체 재순환 중 1종 이상을 지칭하는 것으로 의도된다.
- [0124] 항원 결합 단백질의 불변 영역과 Fc γ RI (CD64), Fc γ R II (CD32) 및 Fc γ R III (CD16)을 포함한 다양한 Fc 수용체 (FcR) 사이의 상호작용은 항원 결합 단백질의 이펙터 기능을 매개하는 것으로 여겨진다. 유의한 생물학적 효과는 이펙터 기능성의 결과일 수 있다. 통상적으로, 이펙터 기능을 매개하는 능력은 항원 결합 단백질의 항원에 대한 결합을 필요로 하고, 모든 항원 결합 단백질이 모든 이펙터 기능을 매개하지는 않을 것이다.
- [0125] 이펙터 기능은 예를 들어 ADCC/ADCP 이펙터 기능을 측정하기 위해 자연 킬러 세포 상에서의 Fc γ R III의 결합을 통하는 것 또는 단핵구/대식세포 상에서의 Fc γ RI의 결합을 통하는 것을 포함한 수많은 방식으로 측정될 수 있다. 예를 들어 본 발명의 항원 결합 단백질은 자연 킬러 세포 검정에서 ADCC 이펙터 기능에 대해 평가될 수 있다.

다. ADCC 및/또는 CDC 기능을 평가하기 위한 실제 접근법은 문헌 [Kellner C et al., "Boosting ADCC and CDC activity by Fc engineering and evaluation of antibody effector functions", *Methods*, 1;65(1):105-13 (2014)]에서 찾아볼 수 있다.

- [0126] 인간 불변 영역의 일부 이소형, 특히 IgG4 및 IgG2 이소형은 a) 전형적 경로에 의한 보체의 활성화; 및 b) 항체-의존성 세포성 세포독성의 감소된 기능을 갖는다. 항원 결합 단백질의 중쇄 불변 영역에 대한 다양한 변형이 목적하는 이펙터 특성에 따라 수행될 수 있다. Fc 수용체에 대한 결합을 감소시키고 따라서 ADCC 및 CDC를 감소시키기 위해 특정 돌연변이를 함유하는 IgG1 불변 영역이 개별적으로 기재되어 있다. (Kellner C et al., "Boosting ADCC and CDC activity by Fc engineering and evaluation of antibody effector functions", *Methods*, 1;65(1):105-13 (2014))
- [0127] 본 발명의 한 실시양태에서 항원 결합 단백질이 감소된 ADCC 및/또는 보체 활성화 또는 이펙터 기능성을 갖도록 하는 불변 영역을 포함하는 항원 결합 단백질이 제공된다. 하나의 이러한 실시양태에서 중쇄 불변 영역은 IgG2 또는 IgG4 이소형의 자연 불능화 불변 영역 또는 돌연변이된 IgG1 불변 영역을 포함할 수 있다. 한 예는 위치 235 및 237 (EU 인덱스 넘버링)에서의 알라닌 잔기의 치환을 포함한다.
- [0128] 항체의 하위부류는 부분적으로 2차 이펙터 기능, 예컨대 보체 활성화 또는 Fc 수용체 (FcR) 결합 및 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC)을 결정한다 (Huber, et al., *Nature* 229(5284): 419-20 (1971); Brunhouse, et al., *Mol Immunol* 16(11): 907-17 (1979)). 특정한 적용을 위한 항체의 최적 유형을 확인하는데 있어서, 항체의 이펙터 기능이 고려될 수 있다. 예를 들어, hIgG1 항체는 상대적으로 긴 반감기를 갖고, 보체를 고정하는데 매우 효과적이고, 이들은 Fc γ RI 및 Fc γ RII 둘 다에 결합한다. 대조적으로, 인간 IgG4 항체는 보다 짧은 반감기를 갖고, 보체를 고정하지 못하고, FcR에 대해 보다 낮은 친화도를 갖는다. IgG4의 Fc 영역에서의 세린 228의 프롤린으로의 대체 (S228P)는 hIgG4에 의해 관찰되는 불균질성을 감소시키고 혈청 반감기를 연장시킨다 (Kabat, et al., "Sequences of proteins of immunological interest" 5.sup.th Edition (1991); Angal, et al., *Mol Immunol* 30(1): 105-8 (1993)). 류신 235를 글루탐산으로 대체한 제2 돌연변이 (L235E)는 잔류 FcR 결합 및 보체 결합 활성을 제거한다 (Alegre, et al., *J Immunol* 148(11): 3461-8 (1992)). 둘 다의 돌연변이를 갖는 생성된 항체는 IgG4PE로 지칭된다. hIgG4 아미노산의 넘버링은 EU 넘버링 참고문헌: [Edelman, G.M. et al., *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969). PMID: 5257969]으로부터 유래되었다. 본 발명의 한 실시양태에서 대체 S228P 및 L235E를 포함하는 IgG4 Fc 영역을 포함하는 ICOS 항원 결합 단백질은 명칭 IgG4PE를 가질 수 있다. 따라서, 중쇄 가변 영역 H2 및 경쇄 가변 영역 L5 및 IgG4PE Fc 영역을 갖는 ICOS 결합 단백질은 H2L5 IgG4PE 또는 동의어로서 H2L5 hIgG4PE로 지정될 것이다.
- [0129] 증진된 ADCC/CDC
- [0130] 관련 기술분야에서 이해되는 바와 같이 항체의 ADCC 및/또는 CDC 활성을 증가시킬 다양한 기술이 공지되어 있다. 이들은 Fc 영역에서의 다양한 돌연변이, 컴플레젠트(Complement) 및 포텔리젠트(Potelligent) 기술을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 한 측면에서 1종 이상의 ADCC/CDC 증진 기술이 본 발명의 ICOS 결합 단백질에 적용될 수 있다.
- [0131] 돌연변이
- [0132] 잔기 Asn297에 대해 특정 돌연변이 또는 변경된 글리코실화를 함유하는 인간 IgG1 불변 영역이 또한 Fc 수용체에 대한 결합을 증진시키는 것으로 기재되어 있다. 일부 경우에 이들 돌연변이는 또한 ADCC 및 CDC를 증진시키는 것으로 제시된 바 있고, 예를 들어 문헌 [Kellner (2013)]을 참조한다.
- [0133] 본 발명의 한 실시양태에서, 이러한 돌연변이는 239, 332 및 330 (IgG1)으로부터 선택된 위치 중 1개 이상, 또는 다른 IgG 이소형 내의 등가의 위치 내에 존재한다. 적합한 돌연변이의 예는 S239D 및 I332E 및 A330L이다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 본 발명의 항원 결합 단백질은 위치 239 및 332에서, 예를 들어 S239D 및 I332E로 돌연변이되거나, 또는 추가 실시양태에서 239 및 332 및 330으로부터 선택된 3개 이상의 위치에서, 예를 들어 S239D 및 I332E 및 A330L (EU 인덱스 넘버링)로 돌연변이된다.
- [0134] 컴플레젠트
- [0135] 본 발명의 한 실시양태에서, 항원 결합 단백질이 증진된 이펙터 기능을 갖도록, 키메라 중쇄 불변 영역을 포함하는 항원 결합 단백질, 예를 들어 IgG3으로부터의 적어도 1개의 CH2 도메인을 갖는 키메라 중쇄 불변 영역을 포함하는 항원 결합 단백질이 제공되며, 예를 들어 여기서 이는 증진된 ADCC 또는 증진된 CDC, 또는 증진된 ADCC 및 CDC 기능을 갖는다. 하나의 이러한 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 IgG3으로부터의 1개의 CH2 도메

인을 포함할 수 있거나 또는 둘 다의 CH2 도메인이 IgG3으로부터 유래될 수 있다.

- [0136] 또한
- [0137] a) 본원에 기재된 바와 같은 단리된 핵산을 포함하는 발현 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포를 배양하는 단계이며, 여기서 발현 벡터는 IgG1 및 IgG3 Fc 도메인 아미노산 잔기 둘 다를 갖는 Fc 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 것인 단계; 및
- [0138] b) 항원 결합 단백질을 회수하는 단계
- [0139] 를 포함하는, 본 발명에 따른 항원 결합 단백질을 생산하는 방법이 제공된다.
- [0140] 항원 결합 단백질의 생산을 위한 이러한 방법은, 예를 들어 바이오와, 인크.(BioWa, Inc.) (뉴저지주 프린스턴) 및 교와 핫코 고교(Kyowa Hakko Kogyo) (현, 교와 핫코 키린 캄파니, 리미티드(Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.)) 캄파니, 리미티드로부터 입수가능한 컴플레젠트™ 기술 시스템을 사용하여 수행될 수 있다. 여기서 핵산 서열이 IgG1 및 IgG3 Fc 도메인 아미노산 잔기 둘 다를 갖는 키메라 Fc 도메인을 코딩하는 것인 발현 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포는 발현되어, 이러한 키메라 Fc 도메인이 결합된 달리 동일한 항원 결합 단백질에 비해 증가된 증진된 보체 의존성 세포독성 (CDC) 활성을 갖는 항원 결합 단백질을 생산한다. 컴플레젠트™ 기술 시스템의 측면은 각각 본원에 참조로 포함되는 WO2007011041 및 US20070148165에 기재되어 있다. 대안적 실시양태에서, CDC 활성은 서열 특이적 돌연변이를 IgG 쇄의 Fc 영역 내로 도입함으로써 증가될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 또한 다른 적절한 시스템을 인식할 것이다.
- [0141] 포털리젠트
- [0142] 본 발명은 또한
- [0143] a) 본원에 기재된 바와 같은 단리된 핵산을 포함하는 발현 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포를 배양하는 단계이며, 여기서 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제를 코딩하는 FUT8 유전자는 재조합 숙주 세포에서 불활성화된 것인 단계; 및
- [0144] b) 항원 결합 단백질을 회수하는 단계
- [0145] 를 포함하는, 본 발명에 따른 항원 결합 단백질의 생산 방법을 제공한다.
- [0146] 항원 결합 단백질의 생산을 위한 이러한 방법은, 예를 들어 바이오와, 인크. (뉴저지주 프린스턴)로부터 입수가능한 포털리젠트™ 기술 시스템을 사용하여 수행될 수 있으며, 여기서 FUT8 유전자의 기능적 카피가 결합된 CHOK1SV 세포는 기능적 FUT8 유전자를 갖는 세포에서 생산된 동일한 모노클로날 항체에 비해 증가된 증진된 항체 의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC) 활성을 갖는 모노클로날 항체를 생산한다. 포털리젠트™ 기술 시스템의 측면은 모두 본원에 참조로 포함되는 US7214775, US6946292, WO0061739 및 WO0231240에 기재되어 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 또한 다른 적절한 시스템을 인식할 것이다.
- [0147] 이러한 변형이 단독으로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 이펙터 기능을 추가로 증진시키기 위해 서로 조합되어 사용될 수 있다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다.
- [0148] 본 발명의 하나의 이러한 실시양태에서 돌연변이된 것을 포함하는 중쇄 불변 영역 및 키메라 중쇄 불변 영역을 포함하는 항원 결합 단백질이 제공되며, 예를 들어 여기서 항원 결합 단백질은 IgG3으로부터의 적어도 1개의 CH2 도메인 및 IgG1로부터의 1개의 CH2 도메인을 포함하고, 여기서 IgG1 CH2 도메인은 항원 결합 단백질이 증진된 이펙터 기능을 갖도록 239 및 332 및 330으로부터 선택된 위치에서 1개 이상의 돌연변이를 갖고 (예를 들어 돌연변이는 S239D 및 I332E 및 A330L로부터 선택될 수 있음), 예를 들어 여기서 이는 하기 기능, 증진된 ADCC 또는 증진된 CDC 중 1종 이상을 갖고, 예를 들어 여기서 이는 증진된 ADCC 및 증진된 CDC를 갖는다. 한 실시양태에서 IgG1 CH2 도메인은 돌연변이 S239D 및 I332E를 갖는다.
- [0149] 본 발명의 대안적 실시양태에서 키메라 중쇄 불변 영역을 포함하고 변경된 글리코실화 프로파일을 갖는 항원 결합 단백질이 제공된다. 하나의 이러한 실시양태에서 중쇄 불변 영역은 IgG3으로부터의 적어도 1개의 CH2 도메인 및 IgG1로부터의 1개의 CH2 도메인을 포함하고, 푸코스 대 만노스의 비가 0.8:3 이하이도록 변경된 글리코실화 프로파일을 가지며, 예를 들어 여기서 항원 결합 단백질은 상기 항원 결합 단백질이 상기 돌연변이 및 변경된 글리코실화 프로파일이 결합된 이뮤노글로불린 중쇄 불변 영역을 갖는 등가의 항원 결합 단백질과 비교 시 증진된 이펙터 기능을 갖도록 탈푸코실화되고, 예를 들어 여기서 이는 하기 기능, 증진된 ADCC 또는 증진된 CDC 중 1종 이상을 갖고, 예를 들어 여기서 이는 증진된 ADCC 및 증진된 CDC를 갖는다.

- [0150] 대안적 실시양태에서 항원 결합 단백질은 적어도 1개의 IgG3 CH2 도메인 및 IgG1로부터의 적어도 1개의 중쇄 불변 도메인을 가지며, 여기서 둘 다의 IgG CH2 도메인은 본원에 기재된 제한에 따라 돌연변이된다.
- [0151] 본 발명의 한 측면에서
- [0152] a) 본원에 기재된 바와 같은 단리된 핵산을 함유하는 발현 벡터를 함유하는 재조합 숙주 세포를 배양하는 단계이며, 상기 발현 벡터는 둘 다의 IgG1 및 IgG3 Fc 도메인 아미노산 잔기를 갖는 키메라 Fc 도메인을 코딩하는 Fc 핵산 서열을 추가로 포함하고, 여기서 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제를 코딩하는 FUT8 유전자는 재조합 숙주 세포에서 불활성화된 것인 단계; 및
- [0153] b) 항원 결합 단백질을 회수하는 단계
- [0154] 를 포함하는, 본원에 기재된 본 발명에 따른 항원 결합 단백질을 생산하는 방법이 제공된다.
- [0155] 항원 결합 단백질의 생산을 위한 이러한 방법은, 예를 들어 포털리젠트™ 및 컴플레젠트™ 기술 시스템을 조합한 바이오와, 인크. (뉴저지주 프린스턴)로부터 입수가 가능한 아크레타맵(ACCRETAMAB)™ 기술 시스템을 사용하여 수행되어, 키메라 Fc 도메인이 결합되고 올리고사카라이드 상에 푸코스를 갖는 달리 동일한 모노클로날 항체에 비해 증가된, ADCC 및 CDC 둘 다가 증진된 활성을 갖는 항원 결합 단백질을 생산할 수 있다.
- [0156] 본 발명의 또 다른 실시양태에서 돌연변이된 및 키메라 중쇄 불변 영역을 포함하는 항원 결합 단백질이 제공되며, 여기서 상기 항원 결합 단백질은 항원 결합 단백질이 증진된 이펙터 기능을 갖도록 하는 변경된 글리코실화 프로파일을 갖고, 예를 들어 여기서 이는 하기 기능, 증진된 ADCC 또는 증진된 CDC 중 1종 이상을 갖는다. 한 실시양태에서 돌연변이는 위치 239 및 332 및 330으로부터 선택되고, 예를 들어 돌연변이는 S239D 및 I332E 및 A330L로부터 선택된다. 추가 실시양태에서 중쇄 불변 영역은 IgG3으로부터의 적어도 1개의 CH2 도메인 및 IgG1로부터의 1개의 Ch2 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서 중쇄 불변 영역은 푸코스 대 만노스의 비가 0.8:3 이하이도록 변경된 글리코실화 프로파일을 갖고, 예를 들어 항원 결합 단백질은 탈푸코실화되어, 상기 항원 결합 단백질은 등가의 비-키메라 항원 결합 단백질 또는 상기 돌연변이 및 변경된 글리코실화 프로파일의 결합된 이뮤노글로불린 중쇄 불변 영역과 비교 시 증진된 이펙터 기능을 갖는다.
- [0157] IgG 항체의 긴 반감기는 FcRn에 대한 그의 결합에 의존성인 것으로 보고되어 있다. 따라서, 불변 영역을 조합함으로써 상호작용의 pH 의존성은 유지하면서 pH 6.0에서 FcRn에 대한 IgG의 결합 친화도를 증가시키는 치환이 문헌 [Kuo and Aveson (2011)]에서 광범위하게 연구된 바 있다.
- [0158] 본 발명의 항원 결합 단백질을 변형하는 또 다른 수단은 이뮤노글로불린 불변 도메인 또는 FcRn (Fc 수용체 신생아) 결합 도메인의 변형에 의해 이러한 단백질의 생체내 반감기를 증가시키는 것을 수반한다.
- [0159] 성체 포유동물에서, 신생아 Fc 수용체로도 공지되어 있는 FcRn은 IgG 이소형의 항체에 결합하여 이를 분해로부터 구제하는 보호 수용체의 역할을 함으로써 혈청 항체 수준을 유지시키는데 주요 역할을 한다. IgG 분자는 내피 세포에 의해 세포내이입되고, 이것이 FcRn에 결합하는 경우에, 순환으로 재순환된다. 대조적으로, FcRn에 결합하지 않은 IgG 분자는 세포에 진입하여, 그것이 분해되는 리소솜 경로로 표적화된다.
- [0160] 신생아 FcRn 수용체는 항체 클리어런스 및 조직을 가로지른 세포통과 둘 다에 수반되는 것으로 여겨진다 (Kuo and Aveson, (2011)). 인간 FcRn과 직접 상호작용하는 것으로 결정된 인간 IgG1 잔기는 Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 및 His435를 포함한다. 본 섹션에 기재된 이들 위치 중 임의의 것에서의 전환은 본 발명의 항원 결합 단백질의 혈청 반감기의 증가 및/또는 이펙터 특성의 변경을 가능하게 할 수 있다.
- [0161] FcRn에 대한 친화도를 증가시키는 것에 의해 반감기를 증가시키기 위한 돌연변이
- [0162] 본 발명의 항원 결합 단백질은 FcRn에 대한 불변 도메인 또는 그의 단편의 친화도를 증가시키는 1종 이상의 아미노산 변형을 가질 수 있다. 이들은 이들 단백질의 증가된 반감기를 발생시킬 수 있다 (Kuo and Aveson (2011)). 치료 및 진단 IgG 및 다른 생물활성 분자의 반감기를 증가시키는 것은 이들 분자의 양 및/또는 투여 빈도를 감소시키는 것을 포함한 많은 이점을 갖는다. 한 실시양태에서, 따라서 이들 아미노산 변형 중 1종 이상을 갖는 IgG 불변 도메인의 모두 또는 일부 (FcRn 결합 부분) 및 이러한 변형된 IgG 불변 도메인에 접합된 비-IgG 단백질 또는 비-단백질 분자를 포함하는 본원에 제공된 본 발명에 따른 항원 결합 또는 융합 단백질이 제공되며, 여기서 변형된 IgG 불변 도메인의 존재는 항원 결합 단백질의 생체내 반감기를 증가시킨다.
- [0163] 아미노산 변형을 포함한, 증가된 반감기를 발생시킬 수 있는 수많은 방법이 공지되어 있고 (Kuo and Aveson, (2011)), 알라닌 스캐닝 돌연변이유발, 무작위 돌연변이유발 및 FcRn에 대한 결합 및/또는 생체내 거동을 평가

하기 위한 스크리닝을 포함한 기술을 통해 생성될 수 있다. 컴퓨터 전략에 이은 돌연변이유발은 또한 돌연변이를 위한 아미노산 돌연변이 중 하나를 선택하는데 사용될 수 있다.

[0164] 본 발명은 따라서 FcRn에 대한 최적화된 결합을 갖는 항원 결합 단백질의 변이체를 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 항원 결합 단백질의 상기 변이체는 상기 항원 결합 단백질의 Fc 영역에서 적어도 1종의 아미노산 변형을 포함하며, 여기서 상기 변형은 상기 모 폴리펩티드와 비교 시 Fc 영역의 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 및 447로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 Fc 영역에서의 아미노산의 넘버링은 카바트에서의 EU 인덱스의 것이다.

[0165] 본 발명의 추가 측면에서 변형은 M252Y/S254T/T256E이다.

[0166] 추가적으로, 다양한 공개물은 반감기가 변형된 생리학상 활성 분자를 수득하는 방법을 기재하고, 예를 들어 분자 내로 FcRn-결합 폴리펩티드를 도입하는 것에 의하거나, 또는 분자를 FcRn-결합 친화도는 보존되지만 다른 Fc 수용체에 대한 친화도는 매우 감소된 항체와 융합시키거나 또는 항체의 FcRn 결합 도메인과 융합시키는 것에 의하는 문헌 [Kontermann (2009)]을 참조한다.

[0167] 반감기를 증가시키기 위한 pH 전환 기술

[0168] 불변 영역에서의 치환이 치료 IgG 항체의 기능을 유의하게 개선시킬 수 있더라도, 엄격하게 보존된 불변 영역에서의 치환은 인간에서 면역원성의 위험을 갖고, 고도로 다양한 가변 영역 서열에서의 치환이 덜 면역원성일 수 있다. 가변 영역과 관련된 보고는 항원에 대한 결합 친화도를 개선시키기 위해 CDR 잔기를 조작하는 것, 및 안정성을 개선시키고 면역원성 위험을 감소시키기 위해 CDR 및 프레임워크 잔기를 조작하는 것을 포함한다. 공지된 바와 같이, 항원에 대한 개선된 친화도는 무작위화된 라이브러리의 파지 또는 리보솜 디스플레이를 사용한 친화도 성숙에 의해 달성될 수 있다.

[0169] 개선된 안정성은 서열- 및 구조-기반 합리적 설계로부터 합리적으로 수득될 수 있다. 감소된 면역원성 위험(탈면역화)은 다양한 인간화 방법론 및 T-세포 에피토프의 제거에 의해 달성될 수 있고, 이는 인 실리코 기술을 사용하여 예측되거나 또는 시험관내 검정에 의해 결정될 수 있다. 추가적으로, 가변 영역은 pI를 낮추기 위해 조작되어 왔다. 대등한 FcRn 결합에도 불구하고, 이들 항체에 대해 야생형 항체와 비교 시 보다 긴 반감기가 관찰되었다. 항체 및/또는 항원 반감기 예를 들어 IgG2 항체 반감기를 변형하기 위해 pH 의존성 항원 결합을 갖는 항체를 조작 또는 선택하는 것은, 항원-매개 클리어런스 메커니즘이 통상적으로 항체가 항원에 결합되었을 때 이를 분해하는 경우에 단축될 수 있다. 유사하게, 항원:항체 복합체는 항원의 반감기에 영향을 미쳐, 항원을 전형적인 분해 과정으로부터 보호함으로써 반감기를 연장시키거나, 또는 항체-매개 분해를 통해 반감기를 단축시킬 수 있다. 한 실시양태는 pH5.5/ pH 7.4 또는 pH 6.0/ pH 7.4에서의 KD 비가 2 이상하도록, 엔도솜 pH(즉, pH 5.5-6.0)와 비교 시 pH 7.4에서 항원에 대해 더 높은 친화도를 갖는 항체에 관한 것이다. 예를 들어 항체의 약동학적(PK) 및 약역학적(PD) 특성을 증진시키기 위해, 히스티딘을 CDR 잔기에 도입함으로써 항체에 대해 pH-감수성 결합을 조작하는 것이 가능하다.

[0170] 추가적으로, 감소된 생물학적 반감기를 갖는 항원 결합 단백질을 생산하는 방법이 또한 제공된다. His435가 알라닌으로 돌연변이된 변이체 IgG는 FcRn 결합의 선택적 상실 및 유의하게 감소된 혈청 반감기를 발생시킨다(예를 들어 US6,165,745 참조, 이는 항원 결합 단백질을 코딩하는 DNA 절편 내에 돌연변이를 도입함으로써 감소된 생물학적 반감기를 갖는 항원 결합 단백질을 생산하는 방법을 개시함). 돌연변이는 Fc-헨지 도메인의 위치 253, 310, 311, 433 또는 434에서의 아미노산 치환을 포함한다.

[0171] 링커

[0172] 단백질 스캐폴드는 자연 발생 서열, 예컨대 Ig 서열과 동일하거나 또는 자연 발생 서열의 단편일 수 있고, 자연 발생일 수 있거나, 상이한 공급원으로부터의 것일 수 있거나 또는 합성일 수 있고, 스캐폴드의 N 또는 C 말단에 부가될 수 있는 추가의 서열을 함유할 수 있다. 이러한 추가의 서열은 이들이 에피토프 결합 도메인과 단백질 스캐폴드, 예컨대 본원에 정의된 것을 연결하는 경우에 링커인 것으로 간주될 수 있다.

[0173] 또 다른 측면에서 항원 결합 구축물은 에피토프 결합 도메인의 각각의 말단에 직접적으로 또는 간접적으로 (예

를 들어, 링커 서열을 통해) 연결된 항체의 Fc 영역 또는 그의 일부로 이루어지거나, 또는 그로 본질적으로 이루어진다. 이러한 항원 결합 구조물은 Fc 영역 또는 그의 일부에 의해 분리된 2개의 에피토프-결합 도메인을 포함할 수 있다. 분리된 에피토프-결합 도메인이 서로 직접적으로 연결되지 않은 것, 및 한 측면에서 Fc 영역의 정반대 말단 (C 및 N 말단) 또는 임의의 다른 스캐폴드 영역에 위치하는 것을 의미한다.

[0174] 한 측면에서 항원 결합 구조물은 2개의 에피토프 결합 도메인에, 예를 들어 각각의 스캐폴드 영역의 N 및 C 말단에, 직접적으로 또는 링커를 통해 간접적으로 각각 결합된 2개의 스캐폴드 영역을 포함한다.

[0175] 본 발명의 단백질 스캐폴드는 링커의 사용에 의해 에피토프-결합 도메인에 연결될 수 있다. 적합한 링커의 예는 1개 아미노산 내지 150개 아미노산 길이, 또는 1개 아미노산 내지 140개 아미노산, 예를 들어, 1개 아미노산 내지 130개 아미노산, 또는 1 내지 120개 아미노산, 또는 1 내지 80개 아미노산, 또는 1 내지 50개 아미노산, 또는 1 내지 20개 아미노산, 또는 1 내지 10개 아미노산, 또는 5 내지 18개 아미노산일 수 있는 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 서열은 그 자체의 3차 구조를 가질 수 있고, 예를 들어, 본 발명의 링커는 단일 가변 도메인을 포함할 수 있다. 링커의 크기는 한 실시양태에서 단일 가변 도메인과 등가이다. 적합한 링커는 1 내지 100 옹스트롬 크기일 수 있거나, 예를 들어 20 내지 80 옹스트롬 크기일 수 있거나, 예를 들어 20 내지 60 옹스트롬 또는 예를 들어 40 옹스트롬 미만, 또는 20 옹스트롬 미만, 또는 5 옹스트롬 미만의 길이의 크기일 수 있다.

[0176] 본 발명의 한 실시양태에서, 서열식별번호: 1에 제시된 바와 같은 CDRH1; 서열식별번호: 2에 제시된 바와 같은 CDRH2; 서열식별번호: 3에 제시된 바와 같은 CDRH3; 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 CDRL1; 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 CDRL2 및/또는 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 CDRL3 또는 각각의 CDR의 직접 등가물 중 1종 이상을 포함하며, 여기서 직접 등가물은 상기 CDR 내에 2개 이하의 아미노산 치환을 갖는 것인, ICOS 결합 단백질이 제공된다.

[0177] 본 발명의 한 실시양태에서, 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_H 도메인 및/또는 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_L 도메인을 포함하는, 인간 ICOS에 특이적으로 결합하는 ICOS 결합 단백질이 제공된다. 한 측면에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 또한 시노몰구스 ICOS에 결합한다. 한 측면에서, 그들은 무린 ICOS에는 결합하지 않는다.

[0178] 한 실시양태에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 ICOS 효능제이다. 한 측면에서, ICOS 결합 단백질은 T세포의 존재 하에 IFN-감마 생산을 증가시킨다. 또 다른 측면에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 T세포 증식을 자극한다.

[0179] 한 실시양태에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 인간 ICOS에

[0180] 적어도 1×10^5 M⁻¹s⁻¹의 회합률 상수 (kon); 및 6×10^{-5} s⁻¹ 미만의 해리율 상수 (koff); 또는

[0181] 100 nM 미만의 해리 상수 (Kd)

[0182] 로 결합하며, 여기서 높은 친화도는 비아코어에 의해 측정된다.

[0183] 한 실시양태에서 ICOS 결합 단백질은 CDRH3 (서열식별번호: 3) 또는 서열식별번호: 3의 변이체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서 ICOS 결합 단백질은 CDRH1 (서열식별번호: 1); CDRH2 (서열식별번호: 2); CDRH3 (서열식별번호: 3); CDRL1 (서열식별번호: 4); CDRL2 (서열식별번호: 5); 및/또는 CDRL3 (서열식별번호: 6) 중 1개 이상을 포함한다. 한 실시양태에서, ICOS 결합 단백질은 서열식별번호: 1; 서열식별번호: 2; 및 서열식별번호: 3에 제시된 바와 같은 중쇄 CDR 및 서열식별번호: 4; 서열식별번호: 5; 및 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 경쇄 CDR을 포함한다.

[0184] 한 실시양태에서, ICOS 결합 단백질은 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열과 90% 서열 동일성을 갖는 V_H 도메인; 및 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열과 90% 서열 동일성을 갖는 V_L 도메인을 포함한다. 한 측면에서, ICOS 결합 단백질은 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 갖는 V_H 도메인 및 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 도메인을 포함한다. 한 측면에서, ICOS 결합 단백질은 서열식별번호: 7로 이루어진 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 측면에서, ICOS 결합 단백질은 서열식별번호: 8로 이루어진 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0185] 한 실시양태에서, 본 발명은 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_H 도메인; 및 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_L 도메인을 포함하는 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분을 제공하며, 여기서 상기 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분은 인간 ICOS에 특이적으로 결합한다. 한 실시양태에서, 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_H 도메인; 및 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_L 도메인을 포함하며 인간 ICOS에 특이적으로 결합하는 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 1; 서열식별번호: 2; 및 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR 및 서열식별번호: 4; 서열식별번호: 5; 및 서열식별번호: 6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR을 추가로 포함한다. 한 측면에서, ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분은 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 도메인; 및 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분은 인간 ICOS에 대해 효능제이다. 한 실시양태에서 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분은 IgG4 이소형 스캐폴드 또는 그의 변이체를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분은 hIgG4PE 스캐폴드를 포함한다.

[0186] 한 실시양태에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 서열식별번호: 23에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 인간화 모노클로날 항체이다.

```

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGYTFFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGLISIYSDHTNYNQKFQGRVTITADKS
TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRNNYGNYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
KDYFPEFPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTTKYTCCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
PCPPCPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

```

(SEQ ID NO:23)

[0187]

[0188] 한 실시양태에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 서열식별번호: 24에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 인간화 모노클로날 항체이다.

```

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSDTYTLTIS
SLEPEDFAVYYCFQSGSYPYTFFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID

```

NO:24)

[0189]

[0190] 한 실시양태에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 서열식별번호: 23에 제시된 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 24에 제시된 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 인간화 모노클로날 항체이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 hIgGPE 스캐폴드를 추가로 포함한다.

[0191] 한 실시양태에서, ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분에서 상기 ICOS 결합 단백질은 인간화 모노클로날 항체이다. 또한 청구범위의 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 본 발명에 제공된다.

[0192] 본 발명은 본 발명의 제약 조성물을 암, 감염성 질환, 및/또는 패혈증으로부터 선택된 질환의 치료를 필요로 하는 인간에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 인간에서 암, 감염성 질환, 및/또는 패혈증으로부터 선택된 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 방법은 상기 인간에게 적어도 1종의 항신생물제, 적어도 1종의 제2 면역조정제, 및/또는 적어도 1종의 면역자극 아주반트를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 한 측면에서, 제2 면역조정제는 항-CTLA4 항체, 및 항-PD-1 항체, 항-PDL1 항체 및 항 OX40 항체로부터 선택된다. 한 측면에서 항-CTLA4 항체는 이필리무맙이다. 한 측면에서 항-PD-1 항체는 펌브롤리주맙 및/또는 니볼투맙으로부터 선택된다.

[0193] 본 발명의 한 실시양태에서, 치료상 허용되는 양의 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분을 인간에게 투

여하는 것을 포함하는, 인간에서 암을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 측면에서 암은 결장직장암 (CRC), 식도, 자궁경부, 방광, 유방, 두경부, 난소, 흑색종, 신세포 암종 (RCC), EC 편평 세포, 비소세포 폐 암종, 중피종, 및 전립선암으로부터 선택된다.

- [0194] 한 실시양태에서, 치료상 허용되는 양의 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분을 인간에게 투여하는 것을 포함하는, 인간에서 감염성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 한 측면에서, 감염성 질환은 HIV이다.
- [0195] 한 실시양태에서, 치료상 허용되는 양의 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분을 인간에게 투여하는 것을 포함하는, 인간에서 패혈증을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0196] 한 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물을 인간에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 인간에서 T 세포 증식을 자극하고/거나, T 세포 활성화를 유도하고/거나, 시토카인 생산을 유도하는 방법이 제공된다.
- [0197] 본 발명은 또한 본 발명의 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 본 발명은 또한 a) 본 발명의 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 상기 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분을 발현하는데 적합한 조건 하에 배양하는 단계; 및 b) 상기 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분을 단리하는 단계를 포함하는, ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0198] 본 발명은 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 도메인; 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 도메인; 및 hIgG4 스캐폴드 또는 그의 변이체를 포함하는 단리된 인간화 모노클로날 항체를 제공한다. 한 측면에서, hIgG4 스캐폴드는 hIgG4PE이다.
- [0199] 한 실시양태에서, ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분이 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 도메인; 및 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 도메인을 포함하는 참조 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 인간 ICOS에의 결합에 대해 교차-경쟁하는 것인, ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분이 제공된다.
- [0200] 한 실시양태에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 T 세포와 접촉되게 두었을 때 T 세포 증식을 자극한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 T 세포와 접촉되게 두었을 때 T 세포 활성화를 유도한다. T 세포 활성화를 특정 활성화 마커 예컨대 비제한적으로 CD69, CD25, 및/또는 OX40의 퍼센트 발현 수준에서의 증가에 의해 측정될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 T 세포와 접촉되게 두었을 때 시토카인 생산을 자극한다. ICOS 결합 단백질은 인간 $Fc\gamma RIIb$ 에 결합하지만 인간 $Fc\gamma RIIa$ 또는 인간 $Fc\gamma RIIa$ 에는 결합하지 않는다. 추가적으로, ICOS 결합 단백질은 적합하게는 ICOS 발현 T 세포와 접촉되었을 때 ICOS 발현 T 세포를 고갈시키지 않는다. 일부 측면에서, ICOS 결합 단백질은 T 세포와 제2 세포의 존재 하에 접촉되었을 때 상기 T 세포를 제2 세포와 가교시킨다. 이러한 가교는 제2 세포 상의 $Fc\gamma R$ 과 ICOS 결합 단백질의 맞물림을 통해 발생할 수 있다. $Fc\gamma R$ 발현 세포는 단핵구, B 림프구, 여포성 수지상 세포, 자연 킬러 세포, 대식세포, 호중구, 호산구, 호염기구, 및 비만 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 따라서, 한 실시양태에서 ICOS 결합 단백질은, ICOS 결합 단백질이 T 세포 상의 ICOS에 대해 효능계의 역할을 하고 또한 제2 세포 상의 $Fc\gamma R$ 과 맞물리게 될 포유동물에게 투여될 수 있다.
- [0201] 한 실시양태에서, ICOS 결합 단백질은 인간 IgG1 이소형 또는 그의 변이체 및 인간 IgG4 이소형 또는 그의 변이체로부터 선택된 스캐폴드를 포함한다. 적합하게는, 스캐폴드는 인간 IgG4 이소형 스캐폴드 또는 그의 변이체를 포함한다. 한 측면에서, 스캐폴드는 hIgG4PE 스캐폴드를 포함한다.
- [0202] 한 실시양태에서, ICOS 결합 단백질은 모노클로날 항체이다. 적합하게는 ICOS 결합 단백질은 인간화 모노클로날 항체이다. 한 측면에서 본 발명의 모노클로날 항체는 완전 인간일 수 있다.
- [0203] 또 다른 측면에서, ICOS 결합 단백질은 Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니항체, 미니바디, 단리된 V_H 또는 단리된 V_L 인 단편이다. 한 실시양태에서, ICOS 결합 단백질은 그의 항원 결합 부분이다.
- [0204] 일부 측면에서 ICOS 결합 단백질은 인간 ICOS에 0.6 nM보다 강한 친화도로 결합한다. 한 측면에서, 친화도는 100 nM 이상이다. 한 실시양태에서 ICOS 결합 단백질은 ICOS에 대해 100 nM의 KD를 갖는다. 적합하게는, ICOS에 대한 ICOS 결합 단백질의 KD는 100 nM 이하, 50 nM 이하, 25 nM 이하, 10 nM 이하, 2 nM 이하 또는 1 nM 이

하이다.

- [0205] 한 실시양태에서, 본 발명은 인간 ICOS에 대해 효능제인 인간화 모노클로날 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 서열식별번호: 1; 서열식별번호: 2; 및 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 CDR 및 서열식별번호: 4; 서열식별번호: 5; 및 서열식별번호: 6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 CDR을 포함하는 인간화 모노클로날 항체를 제공한다. 한 측면에서, 인간화 모노클로날 항체는 T 세포와 접촉되었을 때 보체, ADCC 또는 CDC는 유도하지 않으면서 시토카인 생산 및/또는 T 세포 증식을 자극할 수 있다. 한 실시양태에서, 인간화 모노클로날 항체는 변이체 인간 IgG1 Fc 영역을 갖는다. 한 실시양태에서, 인간화 모노클로날 항체는 인간 IgG4 Fc 영역 또는 그의 변이체를 갖는다. 한 실시양태에서, 인간화 모노클로날 항체는 hIgG4PE Fc 영역을 갖는다. 한 측면에서, 인간화 모노클로날 항체는 서열식별번호: 7에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_H 도메인; 및 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 V_L 도메인을 포함한다. 한 측면에서 인간화 모노클로날 항체는 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 도메인; 및 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 V_L 도메인을 포함한다. 한 측면에서 인간화 모노클로날 항체는 hIgG4PE 스캐폴드를 포함한다. 게다가, 본 발명의 인간화 모노클로날 항체는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포와 접촉되었을 때 T 세포 증식을 자극하는 것으로 제시된다. 본 발명의 인간화 모노클로날 항체는 T 세포 활성화를 유도하고 시토카인 생산을 자극하는 것으로 제시된다.
- [0206] 한 실시양태에서, 인간화 모노클로날 항체는 hIgG4PE 스캐폴드를 포함하고, 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 도메인 및 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 도메인을 포함한다. 본 발명의 항체는 T 세포와 접촉되었을 때 시토카인 생산을 자극할 수 있다.
- [0207] 한 실시양태에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질 중 어느 하나와 ICOS 결합에 대해 경쟁하는 ICOS 결합 단백질이 제공된다. 관련 기술분야에서 이해되고 본원에 기재된 바와 같이, 결합 경쟁은 1종 이상의 ICOS 결합 단백질의 존재 하에 ICOS에 대한 리간드 결합에 대해 경쟁을 비교함으로써 측정될 수 있다. 또한 관련 기술분야에서 이해되는 바와 같이, ICOS는 CD4+ 및 CD8+ T 세포 뿐만 아니라 Treg 세포 상에서 발현된다. 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 T 세포 상의 ICOS에 대해 효능제로서 작용한다. 이들은 또한 ICOS-L과 T 세포 및 Treg 세포 둘 다에서 발현되는 ICOS 사이의 상호작용을 차단하는 작용을 한다. 따라서, 한 실시양태에서, Treg 세포 상의 ICOS와 ICOS-L의 상호작용을 차단하는 방법이 제공된다. ICOS 발현 Treg 세포는 액상 종양 예컨대 림프종을 포함한 다양한 유형의 종양에서 발견될 수 있다. 따라서, 본 발명의 한 측면에서, 본 발명의 ICOS 결합 단백질을 투여하는 것을 포함하는 암을 치료하는 방법이 제공되며, 여기서 ICOS 결합 단백질은 Treg 세포 상의 ICOS와 ICOS-L의 상호작용을 차단한다.
- [0208] 추가로 본 발명은, 본원에 기재된 ICOS 결합 단백질 또는 모노클로날 항체를 포함하는 제약 조성물이다. 한 측면에서 본 발명의 제약 조성물은 적어도 1종의 항신생물제를 추가로 포함한다. 한 측면에서 본 발명의 제약 조성물은 적어도 1종의 제2 면역조절제를 추가로 포함한다. 한 측면에서, 본 발명의 제약 조성물은 적어도 1종의 면역자극 아주반트를 추가로 포함한다.
- [0209] 한 실시양태에서, 암 및/또는 감염성 질환의 치료를 필요로 하는 인간에게 본 발명의 제약 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 인간에서 암 및/또는 감염성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서 인간은 암을 갖는다. 한 실시양태에서 인간은 감염성 질환을 갖는다. 한 실시양태에서 인간은 HIV를 갖는다. 한 측면에서 방법은 적어도 1종의 항신생물제를 상기 인간에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 측면에서 방법은 적어도 1종의 제2 면역조절제를 상기 인간에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 측면에서 방법은 면역자극 아주반트를 상기 인간에게 투여하는 것을 추가로 포함한다.
- [0210] 한 측면에서 인간은 고형 종양을 갖는다. 한 측면에서 종양은 두경부암, 위암, 흑색종, 신세포 암종 (RCC), 식도암, 비소세포 폐 암종, 전립선암, 결장직장암, 난소암 및 췌장암으로부터 선택된다. 한 측면에서 인간은 하기: 결장직장암 (CRC), 식도, 자궁경부, 방광, 유방, 두경부, 난소, 흑색종, 신세포 암종 (RCC), EC 편평 세포, 비소세포 폐 암종, 중피종, 및 전립선암 중 1종 이상을 갖는다. 또 다른 측면에서 인간은 액상 종양 예컨대 만성 대 B 세포 림프종 (DLBCL), 다발성 골수종, 만성 림프모구성 백혈병 (CLL), 여포성 림프종, 급성 골수성 백혈병 및 만성 골수 백혈병을 갖는다.
- [0211] 본 개시내용은 또한 뇌 (신경교종), 교모세포종, 바나얀-조나나 증후군, 코우덴병, 레르미트-두크로스병, 유방, 염증성 유방암, 윌름스 종양, 유잉 육종, 횡문근육종, 상의세포종, 수모세포종, 결장, 두경부, 신장, 폐, 간,

흑색종, 난소, 췌장, 전립선, 육종, 골육종, 골의 거대 세포 종양, 갑상선, 림프모구성 T-세포 백혈병, 만성 골수 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 모발상-세포 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 호중구성 백혈병, 급성 림프모구성 T-세포 백혈병, 형질세포종, 면역모세포성 대세포 백혈병, 외투 세포 백혈병, 다발성 골수종 거핵모구성 백혈병, 다발성 골수종, 급성 거핵구성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 적백혈병, 악성 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 림프모구성 T 세포 림프종, 버킷 림프종, 여포성 림프종, 신경모세포종, 방광암, 요로상피암, 폐암, 외음부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 신암, 중피종, 식도암, 타액선암, 간세포성암, 위암, 비인두암, 협부암, 구강암, GIST (위장 기질 종양) 및 고환암으로부터 선택된 암을 치료하거나 그의 중증도를 경감시키는 방법에 관한 것이다.

[0212] 본원에 사용된 용어 "치료하는" 및 그의 문법적 변형은 치료 요법을 의미한다. 특정한 병태와 관련하여, 치료하는은 완화 기간에 걸쳐 추가의 치료 없이 그러한 징후에 대한 완화 상태인 것으로 간주되는 기간 동안 병태의 생물학적 징후 중 1종 이상을 제거하거나 또는 검출불가능한 수준으로 감소시킴으로써: (1) 병태 또는 병태의 생물학적 징후 중 1종 이상을 호전 또는 방지하는 것, (2) (a) 병태로 이어지거나 그의 원인이 되는 생물학적 캐스케이드에서의 1개 이상의 지점 또는 (b) 병태의 생물학적 징후 중 1종 이상을 방해하는 것, (3) 병태 또는 그의 치료와 연관된 증상, 효과 또는 부작용 중 1종 이상을 완화하는 것, (4) 병태 또는 병태의 생물학적 징후 중 1종 이상의 진행을 늦추는 것 및/또는 (5) 상기 병태 또는 병태의 생물학적 징후 중 1종 이상을 치유하는 것을 의미한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 특정한 질환 또는 병태에 대해 완화인 것으로 간주되는 지속 기간을 이해할 것이다. 이에 의한 예방 요법이 또한 고려된다. 통상의 기술자는 "방지"가 절대 용어가 아니라는 것을 인식할 것이다. 의학에서, "방지"는 병태 또는 그의 생물학적 징후의 가능성 또는 중증도를 실질적으로 감소시키거나, 또는 이러한 병태 또는 그의 생물학적 징후의 발병을 지연시키기 위한 약물의 예방적 투여를 지칭하는 것으로 이해된다. 예방 요법은, 예를 들어 대상체가 높은 암 발생 위험이 있는 것으로 간주되는 경우, 예컨대 대상체가 강력한 암 가족력을 갖는 경우 또는 대상체가 발암물질에 노출된 바 있는 경우에 적절하다.

[0213] 본원에 사용된 용어 "암", "신생물" 및 "종양"은 상호교환가능하게 사용되고, 단수 형태이든 또는 복수 형태이든 숙주 유기체에 병리학적 상태를 발생시키는 악성 형질전환을 겪은 세포를 지칭한다. 원발성 암 세포는 널리 확립된 기술, 특히 조직학적 검사에 의해 비-암성 세포와 용이하게 구별될 수 있다. 본원에 사용된 암 세포의 정의는 원발성 암 세포, 뿐만 아니라 암 세포 선조로부터 유래된 임의의 세포를 포함한다. 이는 전이된 암 세포, 및 암 세포로부터 유래된 시험관내 배양물 및 세포주를 포함한다. 통상적으로 고휘 종양으로서 나타내어지는 암의 유형을 언급하는 경우에, "임상적으로 검출가능한" 종양은 종양 덩이에 기초하여; 예를 들어, 컴퓨터 단층촬영 (CT) 스캔, 자기 공명 영상화 (MRI), X선, 초음파 또는 신체 검사 상 촉진과 같은 절차에 의해 검출가능한 것, 및/또는 환자로부터 수득가능한 샘플에서 1종 이상의 암-특이적 항원의 발현으로 인해 검출가능한 것이다. 종양은 조혈 (또는 혈액 또는 혈액학적 또는 혈액-관련) 암, 예를 들어, 혈액 세포 또는 면역 세포로부터 유래된 암일 수 있고, 이는 "액상 종양"으로 지칭될 수 있다. 혈액 종양에 기초한 임상 병태의 구체적 예는 백혈병 예컨대 만성 골수구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 및 급성 림프구성 백혈병; 형질 세포 악성종양 예컨대 다발성 골수종, MGUS 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증; 림프종 예컨대 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종; 등을 포함한다.

[0214] 암은 비정상적 수의 모세포 또는 원치않는 세포 증식이 존재하거나 또는 림프성 및 골수성 악성종양 둘 다를 포함한 혈액암으로 진단된 임의의 암일 수 있다. 골수성 악성종양은 급성 골수성 (또는 골수구성 또는 골수 또는 골수모구성) 백혈병 (미분화 또는 분화), 급성 전골수성 (또는 전골수구성 또는 전골수 또는 전골수모구성) 백혈병, 급성 골수단핵구성 (또는 골수단핵모구성) 백혈병, 급성 단핵구성 (또는 단핵모구성) 백혈병, 적백혈병 및 거핵구성 (또는 거핵모구성) 백혈병을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이들 백혈병은 함께 급성 골수성 (또는 골수구성 또는 골수) 백혈병 (AML)으로 지칭될 수 있다. 골수성 악성종양은 또한 만성 골수 (또는 골수성) 백혈병 (CML), 만성 골수단핵구성 백혈병 (CMML), 본태성 혈소판혈증 (또는 혈소판증가증), 및 진성 다혈구혈증 (PCV)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 골수증식성 장애 (MPD)를 포함한다. 골수성 악성종양은 또한 불응성 빈혈 (RA), 과다 모세포 동반 불응성 빈혈 (RAEB), 및 변환 중 과다 모세포 동반 불응성 빈혈 (RAEBT)로 지칭될 수 있는 골수이형성증 (또는 골수이형성 증후군 또는 MDS); 뿐만 아니라 원인불명 골수 화생을 동반하거나 동반하지 않는 골수섬유증 (MFS)을 포함한다.

[0215] 조혈암은 또한 림프절, 비장, 골수, 말초 혈액 및/또는 림프절외 부위에 영향을 미칠 수 있는 림프성 악성종양을 포함한다. 림프성 암은 B-세포 비-호지킨 림프종 (B-NHL)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 B-세포 악성종양을 포함한다. B-NHL은 무통성 (또는 저등급), 중간등급 (또는 공격성) 또는 고등급 (매우 공격성)일 수

있다. 무통성 B 세포 림프종은 여포성 림프종 (FL); 소림프구성 림프종 (SLL); 변연부 림프종 (MZL), 예컨대 결절성 MZL, 림프절의 MZL, 비장 MZL 및 용모성 림프구를 갖는 비장 MZL; 림프형질세포성 림프종 (LPL); 및 점막-연관-림프 조직 (MALT 또는 림프절의 변연부) 림프종을 포함한다. 중간등급 B-NHL은 백혈병성 관여가 있거나 없는 외투 세포 림프종 (MCL), 미만성 대세포 림프종 (DLBCL), 여포성 대세포 (또는 등급 3 또는 등급 3B) 림프종 및 원발성 중격 림프종 (PML)을 포함한다. 고등급 B-NHL은 버킷 림프종 (BL), 버킷-유사 림프종, 소형 비-분할 세포 림프종 (SNCL) 및 림프모구성 림프종을 포함한다. 다른 B-NHL은 면역모세포성 림프종 (또는 면역세포종), 원발성 삼출 림프종, HIV 연관 (또는 AIDS 관련) 림프종, 및 이식후 림프증식성 장애 (PTLD) 또는 림프종을 포함한다. B-세포 악성종양은 또한 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 전림프구성 백혈병 (PLL), 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 (WM), 모발상 세포 백혈병 (HCL), 거대 과립 림프구 (LGL) 백혈병, 급성 림프성 (또는 림프구성 또는 림프모구성) 백혈병 및 캐슬만병을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. NHL은 또한 달리 상세불명의 (NOS) T-세포 비-호지킨 림프종, 말초 T-세포 림프종 (PTCL), 역형성 대세포 림프종 (ALCL), 혈관면역모세포성 림프성 장애 (AILD), 비장 자연 킬러 (NK) 세포 / T-세포 림프종, 감마/델타 림프종, 피부 T 세포 림프종, 균상 식육종 및 세자리 증후군을 포함하나 이에 제한되지는 않는 T-세포 비-호지킨 림프종 (T-NHL)을 포함할 수 있다.

[0216] 조혈암은 또한 전형적 호지킨 림프종, 결절성 경화성 호지킨 림프종, 혼합 세포층실성 호지킨 림프종, 림프구 우세형 (LP) 호지킨 림프종, 결절성 LP 호지킨 림프종 및 림프구 고갈된 호지킨 림프종을 포함한 호지킨 림프종 (또는 질환)을 포함한다. 조혈암은 또한 형질 세포 질환 또는 암, 예컨대 다발성 골수종 (MM), 예컨대 무증상 MM, 의미 미결정 (또는 미지 또는 불명)의 모노클로날 감마글로불린병증 (MGUS), 형질세포종 (골, 골수외), 림프형질세포성 림프종 (LPL), 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 형질 세포 백혈병 및 원발성 아밀로이드증 (AL)을 포함한다. 조혈암은 또한 다형핵 백혈구 (또는 호중구), 호염기구, 호산구, 수지상 세포, 혈소판, 적혈구 및 자연 킬러 세포를 포함한 추가의 조혈 세포의 다른 암을 포함할 수 있다. 본원에서 "조혈 세포 조직"으로 지칭되는 조혈 세포를 포함하는 조직은 골수; 말초 혈액; 흉선; 및 말초 림프성 조직, 예컨대 비장, 림프절, 점막과 연관된 림프성 조직 (예컨대 장-연관 림프성 조직), 편도, 파이어 패치 및 충수, 및 다른 점막, 예를 들어 기관지 내층과 연관된 림프성 조직을 포함한다.

[0217] 본 발명의 ICOS 결합 단백질, 항체 및 항원 결합 단편은 또한 감염 및 감염성 질환을 치유, 방지 또는 치료하는데 사용될 수 있다. ICOS 결합 단백질은 병원체, 독소 및 자기-항원에 대한 면역 반응을 자극하기 위해 단독으로 또는 백신과 조합되어 사용될 수 있다. 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 인간에 대해 감염성인 바이러스, 예컨대 비제한적으로, 인간 면역결핍 바이러스, 간염 바이러스 부류 A, B 및 C, 엡스테인 바르 바이러스, 인간 시토크갈로바이러스, 인간 유두종 바이러스, 헤르페스 바이러스에 대한 면역 반응을 자극하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 박테리아 또는 진균 기생충, 및 다른 병원체에 의한 감염에 대한 면역 반응을 자극하는데 사용될 수 있다. 적합하게는, 본 발명은 특정한 독소 또는 병원체에 노출된 바 있는 인간을 치료하는 방법을 제공한다. 따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 대상체에게 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원-결합 부분을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 감염성 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0218] 본 발명의 ICOS 결합 단백질이 유용할 수 있는 감염성 질환의 예는 HIV, 간염 (A, B, & C), 인플루엔자, 헤르페스, 지아르디아, 말라리아, 리슈마니아, 스태필로코쿠스 아우레우스(Staphylococcus aureus), 슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas Aeruginosa)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 방법에 의해 치료가능한 감염을 유발하는 병원성 바이러스의 일부 예는 HIV, 간염 (A, B 또는 C), 헤르페스 바이러스 (예를 들어, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, 및 CMV, 엡스타인 바르 바이러스), 아데노바이러스, 인플루엔자 바이러스, 플라비바이러스, 에코바이러스, 리노바이러스, 콕사키 바이러스, 코로나바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 볼거리 바이러스, 로타바이러스, 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 파르보바이러스, 백시니아 바이러스, HTLV 바이러스, 뎅기 바이러스, 유두종바이러스, 연속종 바이러스, 폴리오바이러스, 광견병 바이러스, JC 바이러스 및 아르보바이러스 뇌염 바이러스를 포함한다.

[0219] 본 발명의 방법에 의해 치료가능한 감염을 유발하는 병원성 박테리아의 일부 예는 클라미디아(chlamydia), 리케치아(rickettsial) 박테리아, 미코박테리아(mycobacteria), 스태필로코쿠스(staphylococci), 스트렙토코쿠스(streptococci), 뉴모노코쿠스(pneumonococci), 메닝고코쿠스(meningococci) 및 코노코쿠스(conococci), 클레브시엘라(klebsiella), 프로테우스(proteus), 세라티아(serratia), 슈도모나스(pseudomonas), 레지오넬라(legionella), 디프테리아(diphtheria), 살모넬라(salmonella), 바실루스(bacilli), 콜레라(cholera), 과상풍, 보툴리눔독소증, 탄저병, 흑사병, 렙토스피라증, 및 라임병 박테리아를 포함한다.

[0220] 본 발명의 방법에 의해 치료가능한 감염을 유발하는 병원성 진균의 일부 예는 칸디다(Candida) (알비칸스

(albicans), 크루세이(krusei), 글라브라타(glabrata), 트로피칼리스(tropicalis) 등), 크립토코쿠스 네오포르만스(Cryptococcus neoformans), 아스페르길루스(Aspergillus) (푸미가투스(fumigatus), 니거(niger) 등), 뮤코랄레스(Mucorales) 속 (뮤코르(mucor), 압시디아(absidia), 리조푸스(rhizophus)), 스포로트릭스 쉐크키이(Sporothrix schenckii), 블라스토미세스 더마티티디스(Blastomyces dermatitidis), 파라코시디오이데스 브라실리엔시스(Paracoccidioides brasiliensis), 콕시디오이데스 임미티스(Coccidioides immitis) 및 히스토플라스마 캡슐라툼(Histoplasma capsulatum)을 포함한다.

[0221] 본 발명의 방법에 의해 치료가능한 감염을 유발하는 병원성 기생충의 일부 예는 엔트아메바 히스톨리티카(Entamoeba histolytica), 발란티디움 콜라이(Balantidium coli), 네글레리아포울렐리(Naegleria fowleri), 아칸트아메바(Acanthamoeba) 종, 지아르디아 람블리아(Giardia lamblia), 크립토스포리디움(Cryptosporidium) 종, 뉴모시스티스 카리니이(Pneumocystis carinii), 플라스모디움 비박스(Plasmodium vivax), 바베시아 미크로티(Babesia microti), 트리파노소마 브루세이(Trypanosoma brucei), 트리파노소마 크루지(Trypanosoma cruzi), 리슈마니아 도노바니(Leishmania donovani), 톡소플라스마 곤다이(Toxoplasma gondii) 및 니포스트롱길루스 브라실리엔시스(Nippostrongylus brasiliensis)를 포함한다.

[0222] 패혈증은 전신 염증성 상태 (전신 염증 반응 증후군 또는 SIRS로 불림) 및 공지되거나 의심되는 감염의 존재를 특징으로 하는 잠재적으로 치명적인 의학적 병태이다. 신체는 혈액, 소변, 폐, 피부 또는 다른 조직 내의 미생물에 대해 면역계에 의해 이러한 염증 반응을 발생시킬 수 있다. 패혈증에 대한 용어는 혈액 중독으로, 하기 균혈증에 보다 적절하게 적용된다. 중증 패혈증은 전신 염증 반응, 플러스 감염, 플러스 기관 기능장애의 존재이다.

[0223] 균혈증은 패혈증으로 이어지는, 혈류 중 병원성 유기체의 존재를 지칭하는 관련 의학 용어이다. 용어는 뚜렷하게 정의되어 있지 않다.

[0224] 패혈증 및 암은 증가된 T 조절 세포, 증가된 골수 유래 억제 세포, 증가된 음성 공동-자극 분자의 발현, 감소된 단핵구/대식세포 HLA-DR 발현을 포함하여 유사한 면역억제 메커니즘을 공유한다. 패혈증 및 암은 만성 염증의 원형 장애이다. 만성 염증은 T 조절 세포의 확장 및 이펙터 세포에 대한 PD-1 및 다른 음성 조절제의 상향조절을 포함한, 강력하고 지속적인 면역조절 반응을 자극한다. 문헌 [Barouch D.H. and Deeks S.G.; Immunologic strategies for HIV-1 remission and eradication. Science 345:169-174 2014]. 따라서, 본 발명의 한 측면에서 패혈증의 치료를 필요로 하는 인간에게 치료 유효량의 본 발명의 ICOS 항원 결합 단백질을 투여하는 것을 포함하는, 상기 인간에서 패혈증을 치료하는 방법이 제공된다. 문헌 [Boomer, et al. JAMA 306:2594-2605 (2011); Meisel, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. Am J Respir Crit Care Med 180:640-648 (2009); 및 Hall, et al. Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. Intensive Care Med 37:525-532 (2011)].

[0225] 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 다른 재조합 단백질 및/또는 펩티드 (예컨대 종양 항원 또는 암 세포)에 대한 면역 반응을 증가시키기 위해 (즉, 백신접종 프로토콜에서) 이들 단백질과 함께 사용될 수 있다.

[0226] 예를 들어, 그의 ICOS 결합 단백질은 적어도 1종의 ICOS 결합 단백질을 관심 항원 (예를 들어, 백신)과 공-투여함으로써 항원-특이적 면역 반응을 자극하는데 사용될 수 있다. 따라서, 또 다른 측면에서 본 발명은 대상체에 (i) 항원; 및 (ii) 본 발명의 ICOS 결합 단백질을 투여하여 대상체에서 항원에 대한 면역 반응을 증진시키는 것을 포함하는, 대상체에서 항원에 대한 면역 반응을 증진시키는 방법을 제공한다. 항원은, 예를 들어 종양 항원, 바이러스 항원, 박테리아 항원 또는 병원체로부터의 항원일 수 있다. 이러한 항원의 비제한적인 예는, 비제한적으로, 종양 항원, 또는 바이러스, 박테리아 또는 다른 병원체로부터의 항원을 포함한다.

[0227] HIV 근절에 대한 주요 장애물은 바이러스 항원을 발현하지 않고 면역 감시를 벗어난 잠복 감염 세포의 유지이다. "킥 및 킬" 전략으로 지칭되는 잠복 바이러스 저장소를 제거하기 위한 현행 전략은, 세포 활성화가 HIV 재활성화로 이어짐에 따라 HIV 유전자 발현을 재활성화시키고 ("킥"), 재활성화된 세포를 소거하는 것 ("킬")을 목표로 한다. 세포 활성화는 T 세포의 표면 상에 발현된 양성 및 음성 조절제의 균형에 의해 통제된다. 양성 조절제에 대한 효능작용 및 음성 조절제에 대한 길항작용에 의해 이러한 균형을 변경시키는 것은 HIV 재활성화를 용이하게 할 수 있다.

[0228] 유도성 T 세포 공동-자극제 (ICOS)는 자극 후 그의 발현이 CD4 T 세포 상에서 증가하는 양성 조절제이다. ICOS는 T 세포 증식, 시토카인 생산 및 분화를 촉진하는 기능을 한다. 높은 수준의 PD-1 및 ICOS를 발현하는 하나

의 중요한 T 세포 하위세트는 T 세포성 헬퍼 세포 (Tfh)이다. Tfh 세포는 B 세포가 분화, 부류 전환, 체성 과다돌연변이를 거치는 것을 돕고, 배 중심 형성을 위해 필요하다. Tfh 세포는 HIV/SIV 감염 후에 유의하게 확장되고 만성 렌티바이러스 감염 동안의 그의 조절이상은 손상된 B 세포 면역을 유발한다. 분류된 Tfh 세포는 다른 림프성 CD4 하위세트보다 더 높은 수준의 HIV DNA를 함유하는 것으로 제시된 바 있고 자극 후에 바이러스 생장이 관찰된다. Tfh 세포는 배 중심에 존재하고, 세포성 수지상 세포 상에 포획된 HIV 비리온에 노출되며, 이는 그의 감염을 용이하게 할 수 있다. 게다가 CD8 T 세포는 배 중심에 대해 제한된 접근을 갖고, 세포성 CD8 세포는 종종 감소된 세포독성을 입증하여, Tfh 세포를 항바이러스 감시로부터 벗어나게 한다. 따라서, Tfh 세포는 중요한 보호된 HIV 저장소이고, PD-1 및 ICOS를 표적화하는 전략은 Tfh 세포를 선택적으로 표적화할 수 있고 HIV 치유 요법의 일부로서 유용성을 갖는다. 적합하게는, 본 발명의 ICOS 결합 단백질 또는 그의 항원 결합 부분을 투여하는 것을 포함하는 HIV에 감염된 인간을 치료하는 방법이 제공된다.

[0229] 본원에 사용된 "종양 항원"은 면역 반응, 특히 T-세포 매개 면역 반응을 도출하는 종양 세포에 의해 생산된 단백질을 의미한다. 본원에 사용된 용어 "종양 항원"은 종양-특이적 항원 및 종양-연관 항원 둘 다를 포함한다. 종양-특이적 항원은 종양 세포에 대해 고유하고, 신체 내의 다른 세포에 대해서는 발생하지 않는다. 종양-연관 항원은 종양 세포에 대해 고유하지 않고, 대신 항원에 대해 면역 관용의 상태를 유도하는데 실패한 조건 하에 정상 세포 상에서 또한 발현된다. 종양 상에서의 항원의 발현은 면역계가 항원에 반응할 수 있는 조건 하에 발생할 수 있다. 종양-연관 항원은 면역계가 미성숙하고 반응할 수 없는 때인 태아 발생 동안 정상 세포 상에서 발현되는 항원일 수 있거나 또는 정상적으로는 정상 세포 상에서 극도로 낮은 수준으로 존재하지만 종양 세포 상에서는 훨씬 더 높은 수준으로 발현되는 항원일 수 있다.

[0230] 종양 항원의 비제한적 예는 하기: 분화 항원 예컨대 MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), 티로시나제, TRP-1, TRP-2 및 종양-특이적 다계열 항원 예컨대, MAGE1, MAGE3, MAGE10, MAGE11, MAGE12, MAGEA2, MAGEA3, MAGEA4, MAGEA6, MAGEA8, MAGEA9, MAGEB18, MAGEB6, MABEC1, MAGED2, MAGEE1, MAGEH1, MAGEL2, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15를 포함하나 이에 제한되지는 않는 MAGE 패밀리 항원; MEL4, 흑색종 연관 항원 100+, 흑색종 gp100, NRIP3, NYS48, OCIAD1, OFA-iLRP, OIP5, 난소 암종-연관 항원 (OV632), PAGE4, PARP9, PATE, 플라스틴 L, PRAME, 전립선-특이적 항원, 프로테이나제 3, 프로스테인, Reg3a, RHAMM, ROPN1, SART2, SDCCAG8, SEL1L, SEPT1, SLC45A2, SPANX, SSSX5, STXGALNAC1, STEAP4, 서바이빈, TBC1D2, TEM1, TRP1, 상피 기원의 종양 항원, XAGE1, XAGE2, WT-1; 과다발현된 배아 항원 예컨대 CEA; 과다발현된 종양유전자 및 돌연변이된 종양-억제 유전자 예컨대 p53, Ras, HER-2/neu; 염색체 전위로부터 발생한 고유한 종양 항원; 예컨대 BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; 및 바이러스 항원, 예컨대 엡스타인 바르 바이러스 항원 EBVA 및 인간 유두종바이러스 (HPV) 항원 E6 및 E7을 포함한다.

[0231] 다른 종양 항원은 TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, 베타-카테닌, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 알파-태아단백질, 베타-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3/CA 27.29/BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68/P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733/EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90/Mac-2 결합 단백질/시클로필린 C-연관 단백질, TAAL6, TAG72, TLP, TPS, 신경교종-연관 항원, β-인간 용모성 고나도트로핀, 알파태아단백질 (AFP), 렉틴-반응성 AFP, 티로글로불린, RAGE-1, MN-CA IX, 인간 텔로머라제 리버스 트랜스크립타제, RU1, RU2 (AS), 장 카르복실 에스테라제, mut hsp70-2, M-CSF, 프로스타제, 전립선-특이적 항원 (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, 프로스테인, PSMA, Her2/neu, 서바이빈 및 텔로머라제, 전립선-암종 종양 항원-1 (PCTA-1), ELF2M, 호중구 엘라스타제, 에프린B2, CD19, CD20, CD22, ROR1, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, 당지질 F77, EGFRvIII, GD-2, 인슐린 성장 인자 (IGF)-I, IGF-II, IGF-I 수용체 및 메소텔린을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0232] 전형적으로, 치료할 감수성 종양에 대해 활성을 갖는 임의의 항신생물체가 본 발명에서의 암의 치료에 공-투여될 수 있다. 이러한 작용제의 예는 문헌 [Cancer Principles and Practice of Oncology by V.T. Devita and S. Hellman (editors), 6th edition (February 15, 2001), Lippincott Williams & Wilkins Publishers]에서 찾아볼 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 작용제의 어떠한 조합이 약물 및 수반된 암의 특정한 특징에 기초하여 유용할 것인지 식별할 수 있을 것이다. 본 발명에 유용한 전형적인 항신생물체는 항미세관체 예컨대 디테르페노이드 및 빈카 알칼로이드; 백금 배위 착물; 알킬화제, 예컨대 질소 머스타드, 옥사자포스포린, 알킬술포네이트, 니트로소우레아 및 트리아젠; 항생제 예컨대 안트라시클린, 악티노마이신 및 블레오마이신; 토포이소머라제 II 억제제 예컨대 에피도도필로톡신; 항대사물 예컨대 퓨린 및 피리미딘 유사체 및 항-폴레이트 화합물; 토포이소머라제 I 억제제 예컨대 캄프토테신; 호르몬 및 호르몬 유사체; 신호 전달 경로 억제제; 비-수용체

티로신 혈관신생 억제제; 면역요법제; 아폽토시스 촉진제; 및 세포 주기 신호전달 억제제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

- [0233] 본 발명의 ICOS 결합 단백질과 조합하여 사용하기 위한 또는 공-투여되는 추가의 활성 성분 또는 성분들의 예는 임의의 화학요법제를 포함한 항신생물제, 면역조정 작용제 또는 면역조정제 및 면역자극 아주반트이다.
- [0234] 항미세관제 또는 항유사분열제는 세포 주기의 M 기 또는 유사분열기 동안 종양 세포의 미세관에 대해 활성인 기 특이적 작용제이다. 항미세관제의 예는 디테르페노이드 및 빈카 알칼로이드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0235] 천연 공급원으로부터 유래된 디테르페노이드는 세포 주기의 G₂/M 기에서 작동하는 기 특이적 항암제이다. 디테르페노이드는 미세관의 β-튜불린 서브유닛에 결합함으로써 이 단백질을 안정화시키는 것으로 여겨진다. 이어서, 단백질의 해체가 억제되며 유사분열이 정지되고 세포 사멸이 이어지는 것으로 보인다. 디테르페노이드의 예는 파클리탁셀 및 그의 유사체 도세탁셀을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0236] 파클리탁셀, (2R,3S)-N-벤조일-3-페닐이소세린을 갖는 5β,20-에폭시-1,2α,4,7β,10β,13α-헥사-히드록시탁스-11-엔-9-온 4,10-디아세테이트 2-벤조에이트 13-에스테르는 태평양 주목 탁수스 브레비폴리아(*Taxus brevifolia*)로부터 단리된 천연 디테르펜 생성물이고, 주사액 탁솔(TAXOL)®로서 상업적으로 입수가능하다. 이는 테르펜의 탁산 패밀리의 구성원이다. 이는 1971년에 화학적 및 X선 결정학적 방법에 의해 그의 구조를 특징화한 와니(Wani) 등에 의해 최초로 단리되었다 (J. Am. Chem. Soc., 93:2325, 1971). 그의 활성에 대한 하나의 메카니즘은 튜불린에 결합함으로써 암 세포 성장을 억제하는 파클리탁셀의 능력과 관련된다. 문헌 [Schiff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:1561-1565 (1980); Schiff et al., Nature, 277:665-667 (1979); Kumar, J. Biol. Chem, 256: 10435-10441 (1981)]. 일부 파클리탁셀 유도체의 합성 및 항암 활성의 검토에 대해서는 문헌 [D. G. I. Kingston et al., Studies in Organic Chemistry vol. 26, entitled "New trends in Natural Products Chemistry 1986", Attaur-Rahman, P.W. Le Quesne, Eds. (Elsevier, Amsterdam, 1986) pp 219-235]을 참조한다.
- [0237] 파클리탁셀은 미국에서 불응성 난소암의 치료에서의 임상 용도 (Markman et al., Yale Journal of Biology and Medicine, 64:583, 1991; McGuire et al., Ann. Intern. Med., 111:273,1989) 및 유방암의 치료 (Holmes et al., J. Nat. Cancer Inst., 83:1797,1991)에 대해 승인되었다. 이는 피부에서의 신생물 (Einzig et al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 20:46) 및 두경부 암종 (Forastire et al., Sem. Oncol., 20:56, 1990)의 치료를 위한 잠재적 후보이다. 상기 화합물은 또한 다낭성 신장 질환 (Woo et al., Nature, 368:750, 1994), 폐암 및 말라리아의 치료에 대한 잠재력을 제시한다. 파클리탁셀을 사용한 환자의 치료는 역시 농도 (50nM)를 초과하는 투여의 지속기간과 관련하여 골수 억제 (다중 세포 계통, 문헌 [Ignoff, R.J. et al., Cancer Chemotherapy Pocket Guide, 1998])를 유발한다 (Kearns, C.M. et al., Seminars in Oncology, 3(6) p.16-23, 1995).
- [0238] 도세탁셀, 5β-20-에폭시-1,2α,4,7β,10β,13α-헥사히드록시탁스-11-엔-9-온 4-아세테이트 2-벤조에이트, 3수 화물을 갖는 (2R,3S)-N-카르복시-3-페닐이소세린,N-tert-부틸 에스테르, 13-에스테르는 주사액으로서 탁소테레 (TAXOTERE)®로서 상업적으로 입수가능하다. 도세탁셀은 유방암의 치료에 대해 지시된다. 도세탁셀은 유럽 주목의 침엽으로부터 추출된 천연 전구체, 10-데아세틸-바카틴 III을 사용하여 제조된 파클리탁셀 q.v.의 반합성 유도체이다. 도세탁셀의 용량 제한 독성은 호중구감소증이다.
- [0239] 빈카 알칼로이드는 페리왕클 식물로부터 유래된 기 특이적 항신생물제이다. 빈카 알칼로이드는 튜불린에 특이적으로 결합함으로써 세포 주기의 M 기 (유사분열)에서 작용한다. 따라서, 결합된 튜불린 분자는 미세관으로 중합할 수 없다. 유사분열이 증기에서 정지되어 세포 사멸이 이어지는 것으로 여겨진다. 빈카 알칼로이드의 예는 빈블라스틴, 빈크리스틴 및 비노렐빈을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0240] 빈블라스틴, 빈카류코블라스틴 술페이트는 주사액으로서 벨반(VELBAN)®으로서 상업적으로 입수가능하다. 이것이 다양한 고형 종양의 2차 요법으로서 지시되는 것이 가능하지만, 주로 고환암 및 다양한 림프종, 예컨대 호지킨병; 및 림프구성 및 조직구성 림프종의 치료에서 지시된다. 골수억제는 빈블라스틴의 용량 제한 부작용이다.
- [0241] 빈크리스틴, 빈카류코블라스틴, 22-옥소-, 술페이트는 주사액으로서 온코빈(ONCOVIN)®으로서 상업적으로 입수가능하다. 빈크리스틴은 급성 백혈병의 치료에 대해 지시되고, 또한 호지킨 및 비-호지킨 악성 림프종을 위한 치료 요법에서 용도가 발견된 바 있다. 탈모증 및 신경계 효과는 빈크리스틴의 가장 흔한 부작용이고, 그보다

덜한 정도로 골수억제 및 위장 점막염 영향이 발생한다.

- [0242] 비노렐빈 타르트레이트 (나벨빈(NAVELBINE)®)의 주사액으로서 상업적으로 입수가 가능한 비노렐빈, 3',4'-디데히드로-4'-데옥시-C'-노르빈카리코블라스틴 [R-(R*,R*)-2,3-디히드록시부탄디오에이트 (1:2)(염)]은 반합성 빈카알칼로이드이다. 비노렐빈은 다양한 고형 종양, 특히 비소세포 폐암, 진행성 유방암 및 호르몬 불응성 전립선암의 치료에서 단일 작용제로서 또는 다른 화학요법제, 예컨대 시스플라틴과 조합되어 지시된다. 골수억제는 비노렐빈의 가장 흔한 용량 제한 부작용이다.
- [0243] 백금 배위 착물은 DNA와 상호작용하는 비-기 특이적 항암제이다. 백금 착물은 종양 세포에 진입하고, 아쿠아화를 겪고, DNA와 가닥내 및 가닥간 가교를 형성하여 종양에 유해한 생물학적 영향을 유발한다. 백금 배위 착물의 예는 시스플라틴 및 카르보플라틴을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0244] 시스플라틴, 시스-디아민디클로로백금은 주사액으로서 플라티놀(PLATINOL)®로서 상업적으로 입수가 가능하다. 시스플라틴은 주로 전이성 고환암 및 난소암 및 진행성 방광암의 치료에서 지시된다. 시스플라틴의 주요 용량 제한 부작용은 신독성 (이는 수화 및 이뇨에 의해 제어될 수 있음) 및 이독성이다.
- [0245] 카르보플라틴, 백금, 디아민 [1,1-시클로부탄-디카르복실레이트(2-)-0,0']는 주사액으로서 파라플라틴(PARAPLATIN)®으로서 상업적으로 입수가 가능하다. 카르보플라틴은 주로 진행성 난소 암종의 1차 및 2차 치료에서 지시된다. 골수 억제제는 카르보플라틴의 용량 제한 독성이다.
- [0246] 알킬화제는 비-기 항암 특이적 작용제 및 강한 친전자체이다. 전형적으로, 알킬화제는 DNA 분자의 친핵성 모이 어티, 예컨대 포스페이트, 아미노, 술프히드릴, 히드록실, 카르복실, 및 이미다졸 기를 통한 DNA에 대한 공유 연결을 알킬화에 의해 형성한다. 이러한 알킬화는 핵산 기능을 파괴하여 세포 사멸을 유발한다. 알킬화제의 예는 질소 머스타드, 예컨대 시클로포스파미드, 멜팔란, 및 클로람부실; 알킬 술포네이트, 예컨대 부술판; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴; 및 트리아젠, 예컨대 다카르바진을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0247] 시클로포스파미드, 2-[비스(2-클로로에틸)아미노]테트라히드로-2H-1,3,2-옥사자포스포린 2-옥시드 1수화물은 주사액 또는 정제로서 시톡산(CYTOXAN)®으로서 상업적으로 입수가 가능하다. 시클로포스파미드는 악성 림프종, 다발성 골수종, 및 백혈병의 치료에서 단일 작용제로서 또는 다른 화학요법제와 조합되어 지시된다. 탈모증, 오심, 구토 및 백혈구감소증은 시클로포스파미드의 가장 흔한 용량 제한 부작용이다.
- [0248] 멜팔란, 4-[비스(2-클로로에틸)아미노]-L-페닐알라닌은 주사액 또는 정제로서 알케란(ALKERAN)®으로서 상업적으로 입수가 가능하다. 멜팔란은 다발성 골수종, 및 난소의 비-절제가능한 상피 암종의 완화적 치료에 대해 지시된다. 골수 억제제는 멜팔란의 가장 흔한 용량 제한 부작용이다.
- [0249] 클로람부실, 4-[비스(2-클로로에틸)아미노]벤젠부탄산은 류케란(LEUKERAN)® 정제로서 상업적으로 입수가 가능하다. 클로람부실은 만성 림프성 백혈병, 및 악성 림프종, 예컨대 림프육종, 거대 여포성 림프종, 및 호지킨병의 완화적 치료에 대해 지시된다. 골수 억제제는 클로람부실의 가장 흔한 용량 제한 부작용이다.
- [0250] 부술판, 1,4-부탄디올 디메탄술포네이트는 밀레란(MYLERAN)® 정제로서 상업적으로 입수가 가능하다. 부술판은 만성 골수 백혈병의 완화적 치료에 대해 지시된다. 골수 억제제는 부술판의 가장 흔한 용량 제한 부작용이다.
- [0251] 카르무스틴, 1,3-[비스(2-클로로에틸)-1-니트로소우레아는 동결건조된 물질의 단일 바이알로서 비크뉴(BicNU)®로서 상업적으로 입수가 가능하다. 카르무스틴은 뇌 종양, 다발성 골수종, 호지킨병 및 비-호지킨 림프종을 위한 단일 작용제로서 또는 다른 작용제와 조합되어 완화적 치료에 대해 지시된다. 지연된 골수억제는 카르무스틴의 가장 흔한 용량 제한 부작용이다.
- [0252] 다카르바진, 5-(3,3-디메틸-1-트리아제노)-이미다졸-4-카르복사미드는 물질의 단일 바이알로서 DTIC-Dome®로서 상업적으로 입수가 가능하다. 다카르바진은 전이성 악성 흑색종의 치료에 대해 지시되고, 호지킨병의 2차 치료에 대해 다른 작용제와 조합되어 지시된다. 오심, 구토 및 식욕부진은 다카르바진의 가장 흔한 용량 제한 부작용이다.
- [0253] 항생 항신생물체는 DNA와 결합하거나 또는 그에 삽입되는 비-기 특이적 작용제이다. 전형적으로, 이러한 작용은 안정한 DNA 복합체 또는 가닥 파괴를 야기하여, 핵산의 통상의 기능을 파괴함으로써 세포 사멸을 유발한다. 항생 항신생물체의 예는 악티노마이신, 예컨대 닥티노마이신, 안트로시클린, 예컨대 다우노루비신 및 독소루비신; 및 블레오마이신을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0254] 악티노마이신 D로서 또한 공지된 닥티노마이신은 주사가 가능한 형태로 코스메겐(COSMEGEN)®으로서 상업적으로 입

수가가능하다. 닥티노마이신은 율름 종양 및 횡문근육종의 치료에 대해 지시된다. 오심, 구토 및 식욕부진은 닥티노마이신의 가장 흔한 용량 제한 부작용이다.

- [0255] 다우노루비신, (8S-시스)-8-아세틸-10-[(3-아미노-2,3,6-트리테옥시- α -L-리ixo-헥소피라노실)옥시]-7,8,9,10-테트라히드로-6,8,11-트리히드록시-1-메톡시-5,12 나프타센디온 히드로클로라이드는 리포솜 주사가 가능한 형태로서 다우녹숨(DAUNOXOME)®으로서 또는 주사가 가능한 형태로서 세루비딘(CERUBIDINE)®으로서 상업적으로 입수가가능하다. 다우노루비신은 급성 비림프구성 백혈병 및 진행성 HIV 연관 카포시 육종의 치료에서 완화 유도에 대해 지시된다. 골수억제는 다우노루비신의 가장 흔한 용량 제한 부작용이다.
- [0256] 독소루비신, (8S, 10S)-10-[(3-아미노-2,3,6-트리테옥시- α -L-리ixo-헥소피라노실)옥시]-8-글리콜로일, 7,8,9,10-테트라히드로-6,8,11-트리히드록시-1-메톡시-5,12 나프타센디온 히드로클로라이드는 주사가 가능한 형태로서 루벡스(RUBEX)®로서 또는 아드리아미신 RDF(ADRIAMYCIN RDF)®로서 상업적으로 입수가가능하다. 독소루비신은 주로 급성 림프모구성 백혈병 및 급성 골수모구성 백혈병의 치료에 대해 지시되지만, 일부 고형 종양 및 림프종의 치료에 또한 유용한 성분이다. 골수억제는 독소루비신의 가장 흔한 용량 제한 부작용이다.
- [0257] 스트렙토미세스 베르티실루스(*Streptomyces verticillus*)의 균주로부터 단리된 세포독성 당펩티드 항생제의 혼합물인 블레오마이신은 블레녹산(BLENOXANE)®으로서 상업적으로 입수가가능하다. 블레오마이신은 편평 세포 암종, 림프종 및 고환 암종의 완화적 치료로서 단일 작용제로서 또는 다른 작용제와 조합되어 지시된다. 폐 및 피부 독성은 블레오마이신의 가장 흔한 용량 제한 부작용이다.
- [0258] 토포이소머라제 II 억제제는 에피포도필로톡신을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0259] 에피포도필로톡신은 맨드레이크 식물로부터 유래된 기 특이적 항신생물제이다. 에피포도필로톡신은 전형적으로 토포이소머라제 II 및 DNA와 함께 3원 복합체를 형성하여 DNA 가닥 파괴를 야기함으로써 세포 주기의 S 및 G₂ 기에 있는 세포에 영향을 미친다. 가닥 파괴가 축적되고 세포 사멸이 이어진다. 에피포도필로톡신의 예는 에토포시드 및 테니포시드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0260] 에토포시드, 4'-데메틸-에피포도필로톡신 9[4,6-O-(R)-에틸리덴- β -D-글루코피라노시드]는 주사액 또는 캡슐로서 베페시드(VePESID)®로서 상업적으로 입수가가능하고, 통상적으로 VP-16으로서 공지되어 있다. 에토포시드는 고환암 및 비소세포 폐암의 치료에서 단일 작용제로서 또는 다른 화학요법제와 조합되어 지시된다. 골수억제는 에토포시드의 가장 흔한 부작용이다. 백혈구감소증의 발생률은 혈소판감소증보다 더 심각한 경향이 있다.
- [0261] 테니포시드, 4'-데메틸-에피포도필로톡신 9[4,6-O-(R)-테닐리덴- β -D-글루코피라노시드]는 주사액으로서 부몬(VUMON)®으로서 상업적으로 입수가가능하고, 통상적으로 VM-26으로서 공지되어 있다. 테니포시드는 소아에서 급성 백혈병의 치료에서 단일 작용제로서 또는 다른 화학요법제와 조합되어 지시된다. 골수억제는 테니포시드의 가장 흔한 용량 제한 부작용이다. 테니포시드는 백혈구감소증 및 혈소판감소증 둘 다를 유발할 수 있다.
- [0262] 항대사물 신생물제는 DNA 합성을 억제하거나, 또는 퓨린 또는 피리미딘 염기 합성을 억제하여 DNA 합성을 제한함으로써 세포 주기의 S 기 (DNA 합성)에서 작용하는 기 특이적 항신생물제이다. 따라서, S 기는 진행되지 않고, 세포 사멸이 이어진다. 항대사물 항신생물제의 예는 플루오로우라실, 메토타렉세이트, 시타라빈, 메르캅토퓨린, 티오구아닌 및 겐시타빈을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0263] 5-플루오로우라실, 5-플루오로-2,4-(1H,3H) 피리미딘디온은 플루오로우라실로서 상업적으로 입수가가능하다. 5-플루오로우라실의 투여는 티미딜레이트 합성의 억제로 이어지고, 또한 RNA 및 DNA 둘 다로 혼입된다. 그 결과는 전형적으로 세포 사멸이다. 5-플루오로우라실은 유방, 결장, 직장, 위 및 췌장 암종의 치료에서 단일 작용제로서 또는 다른 화학요법제와 조합되어 지시된다. 골수억제 및 점막염은 5-플루오로우라실의 용량 제한 부작용이다. 다른 플루오로피리미딘 유사체는 5-플루오로 데옥시우리딘 (플록수리딘) 및 5-플루오로데옥시우리딘 모노포스페이트를 포함한다.
- [0264] 시타라빈, 4-아미노-1- β -D-아라비노푸라노실-2 (1H)-피리미딘논은 시토사르-U(CYTOSAR-U)®로서 상업적으로 입수가가능하고, 통상적으로 Ara-C로 공지되어 있다. 시타라빈은 성장하는 DNA 쉘 내로의 시타라빈의 말단 혼입에 의해 DNA 쉘 신장을 억제함으로써 S-기에서 세포 기 특이성을 나타내는 것으로 여겨진다. 시타라빈은 급성 백혈병의 치료에서 단일 작용제로서 또는 다른 화학요법제와 조합되어 지시된다. 다른 시티딘 유사체는 5-아자시티딘 및 2',2'-디플루오로데옥시시티딘 (겐시타빈)을 포함한다. 시타라빈은 백혈구감소증, 혈소판감소증, 및 점막염을 유발한다.
- [0265] 메르캅토포퓨린, 1,7-디히드로-6H-퓨린-6-티온 1수화물은 퓨린톨(PURINETHOL)®로서 상업적으로 입수가가능하다.

메르캅토피린은 아직 상세불명의 메카니즘에 의해 DNA 합성을 억제함으로써 S-기에서 세포 기 특이성을 나타낸다. 메르캅토피린은 급성 백혈병의 치료에서 단일 작용제로서 또는 다른 화학요법제와 조합되어 지시된다. 골수억제 및 위장 점막염은 고용량에서의 메르캅토피린의 예상되는 부작용이다. 유용한 메르캅토피린 유사체는 아자티오프린이다.

[0266] 티오구아닌, 2-아미노-1,7-디히드로-6H-퓨린-6-티온은 타블로이드(TABLOID)®로서 상업적으로 입수가 가능하다. 티오구아닌은 아직 상세불명의 메카니즘에 의해 DNA 합성을 억제함으로써 S-기에서 세포 기 특이성을 나타낸다. 티오구아닌은 급성 백혈병의 치료에서 단일 작용제로서 또는 다른 화학요법제와 조합되어 지시된다. 백혈구감소증, 혈소판감소증 및 빈혈을 포함한 골수억제는 티오구아닌 투여의 가장 흔한 용량 제한 부작용이다. 그러나, 위장 부작용이 발생하고, 이는 용량 제한일 수 있다. 다른 퓨린 유사체는 펜토스타틴, 에리트로히드록시노닐아데닌, 플루다라빈 포스페이트 및 클라드리빈을 포함한다.

[0267] 겐시타빈, 2'-데옥시-2', 2'-디플루오로시티딘 모노히드로클로라이드 (β -이성질체)는 겐자르(GEMZAR)®로서 상업적으로 입수가 가능하다. 겐시타빈은 S-기에서 및 G1/S 경계를 통한 세포 진행의 차단에 의해 세포 기 특이성을 나타낸다. 겐시타빈은 국부 진행성 비소세포 폐암의 치료에서 시스플라틴과 조합되어 지시되고, 국부 진행성 췌장암의 치료에서 단독으로 지시된다. 백혈구감소증, 혈소판감소증 및 빈혈을 포함한 골수억제가 겐시타빈 투여의 가장 흔한 용량 제한 부작용이다.

[0268] 메토티렉세이트, N-[4[[[2,4-디아미노-6-프테리디닐) 메틸]메틸아미노] 벤조일]-L-글루탐산은 메토티렉세이트 소듐으로서 상업적으로 입수가 가능하다. 메토티렉세이트는 퓨린 뉴클레오티드 및 티미딜레이트의 합성을 위해 요구되는 디히드로폴산 리덕타제의 억제를 통해 DNA 합성, 복구 및/또는 복제를 억제함으로써 S-기에서 특이적으로 세포 기 효과를 나타낸다. 메토티렉세이트는 용모막암증, 수막 백혈병, 비-호지킨 림프종, 및 유방, 두부, 경부, 난소 및 방광의 암종의 치료에서 단일 작용제로서 또는 다른 화학요법제와 조합되어 지시된다. 골수억제 (백혈구감소증, 혈소판감소증, 및 빈혈) 및 점막염이 메토티렉세이트 투여의 예상되는 부작용이다.

[0269] 캄프토테신 및 캄프토테신 유도체를 포함하는 캄프토테신은 토포이소머라제 I 억제제로서 입수가 가능하거나 또는 개발 중에 있다. 캄프토테신 세포독성 활성은 그의 토포이소머라제 I 억제 활성과 관련된 것으로 여겨진다. 캄프토테신의 예는 이리노테칸, 토포테칸, 및 하기 기재된 7-(4-메틸피페라지노-메틸렌)-10,11-에틸렌디옥시-20-캄프토테신의 다양한 광학 형태를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0270] 이리노테칸 HCl, (4S)-4,11-디에틸-4-히드록시-9-[(4-피페리디노피페리디노) 카르보닐옥시]-1H-피라노[3',4',6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-3,14(4H,12H)-디온 히드로클로라이드는 주사액 캄프토사르(CAMPTOSAR)®로서 상업적으로 입수가 가능하다.

[0271] 이리노테칸은 그의 활성 대사물 SN-38과 함께 토포이소머라제 I - DNA 복합체에 결합하는 캄프토테신의 유도체이다. 세포독성은 토포이소머라제 I : DNA : 이리노테칸 또는 SN-38 3원 복합체와 복제 효소의 상호작용에 의해 야기되는 복구불가능한 이중 가닥 파괴의 결과로 발생하는 것으로 여겨진다. 이리노테칸은 결장 또는 직장 전이성 암의 치료에 대해 지시된다. 이리노테칸 HCl의 용량 제한 부작용은 호중구감소증을 포함한 골수억제, 및 설사를 포함한 GI 효과이다.

[0272] 토포테칸 HCl, (S)-10-[(디메틸아미노)메틸]-4-에틸-4,9-디히드록시-1H-피라노[3',4',6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-3,14-(4H,12H)-디온 모노히드로클로라이드는 주사액 하이캄틴(HYCAMTIN)®으로서 상업적으로 입수가 가능하다. 토포테칸은, 토포이소머라제 I - DNA 복합체에 결합하고 DNA 분자의 비틀림 변형에 반응하여 토포이소머라제 I에 의해 야기되는 단일 가닥 파괴의 재라이게이션을 방지하는 캄프토테신의 유도체이다. 토포테칸은 난소암 및 소세포 폐암의 전이성 암종의 2차 치료에 대해 지시된다. 토포테칸 HCl의 용량 제한 부작용은 골수억제, 주로 호중구감소증이다.

[0273] 리툽시맵은 리툽산(RITUXAN)® 및 맵테라(MABTHERA)®로서 판매되는 키메라 모노클로날 항체이다. 리툽시맵은 B 세포 상의 CD20에 결합하고, 세포 아포토시스를 야기한다. 리툽시맵은 정맥내로 투여되고, 류마티스 관절염 및 B-세포 비-호지킨 림프종의 치료에 대해 승인되었다.

[0274] 오파투무맵은 아르제라(AZERRA)®로서 판매되는 완전 인간 모노클로날 항체이다. 오파투무맵은 B 세포 상의 CD20에 결합하고, 플루다라빈 (플루다라(Fludara)) 및 알렘투무맵 (캄파트(Campath))에 의한 치료에 불응성인 성인에서 만성 림프구성 백혈병 (CLL; 백혈구의 암의 유형)을 치료하는데 사용된다.

[0275] 트라스투주맵 (헤렙틴(HEREPTIN)®)은 HER2 수용체에 결합하는 인간화 모노클로날 항체이다. 그의 원래의 적응

증은 HER2 양성 유방암이다.

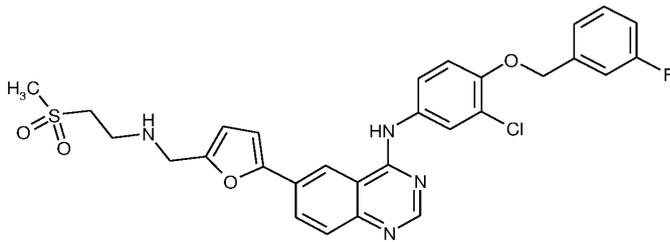
[0276] 세특시맵 (에르비투스(ERBITUX)®)은 표피 성장 인자 수용체 (EGFR)를 억제하는 키메라 마우스 인간 항체이다.

[0277] mTOR 억제제는 라파마이신 (FK506) 및 라파로그, RAD001 또는 에베롤리무스 (아피니토르(Afinitor)), CCI-779 또는 템시롤리무스, AP23573, AZD8055, WYE-354, WYE-600, WYE-687 및 Pp121을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0278] 벡사로텐은 탈그레틴(Targretin)®으로서 판매되고, 레티노이드 X 수용체 (RXR)를 선택적으로 활성화시키는 레티노이드의 하위부류의 구성원이다. 이들 레티노이드 수용체는 레티노산 수용체 (RAR)의 것과 구별되는 생물학적 활성을 갖는다. 화학 명칭은 4-[1-(5,6,7,8-테트라히드로-3,5,5,8,8-펜타메틸-2-나프탈레닐) 에테닐] 벤조산이다. 벡사로텐은 질환이 적어도 1종의 다른 의약에 의해서는 성공적으로 치료될 수 없는 인간에서 피부 T-세포 림프종 (CTCL, 피부암의 유형)을 치료하는데 사용된다.

[0279] 넥사바르(Nexavar)®로서 시판되는 소라페닙은 멀티키나제 억제제로 지칭되는 의약의 부류에 속한다. 그의 화학 명칭은 4-[4-[[4-클로로-3-(트리플루오로메틸)페닐]카르바모일아미노]페녹시]-N-메틸-피리딘-2-카르복사미드이다. 소라페닙은 진행성 신세포 암종 (신장에서 시작되는 암의 유형)을 치료하는데 사용된다. 소라페닙은 또한 절제불가능한 간세포성 암종 (수술로 치료할 수 없는 간암의 유형)을 치료하는데 사용된다.

[0280] erbB 억제제의 예는 라파티닙, 에를로티닙 및 게피티닙을 포함한다. 라파티닙, N-(3-클로로-4-[(3-플루오로페닐)메틸]옥시)페닐)-6-[5-([2-(메틸술포닐)에틸]아미노)메틸]-2-푸라닐]-4-퀴나졸린아민 (예시된 바와 같이, 화학식 II에 의해 나타내어짐)은, HER2-양성 전이성 유방암의 치료를 위해 카페시타빈과의 조합물로 승인된, erbB-1 및 erbB-2 (EGFR 및 HER2) 티로신 키나제의 강력한 경구 소분자 이중 억제제이다.

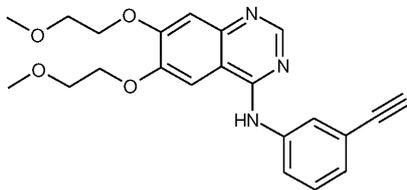


II

[0281]

[0282] 화학식 II의 화합물의 유리 염기, HCl 염, 및 디토실레이트 염은, 1999년 7월 15일에 공개된 WO 99/35146; 및 2002년 1월 10일에 공개된 WO 02/02552에 개시된 절차에 따라 제조될 수 있다.

[0283] 에를로티닙, N-(3-에틸닐페닐)-6,7-비스{[2-(메틸옥시)에틸]옥시}-4-퀴나졸린아민 (상표명 타르세바 하에 상업적으로 입수가능함)은 예시된 바와 같이, 화학식 III에 의해 나타내어진다.

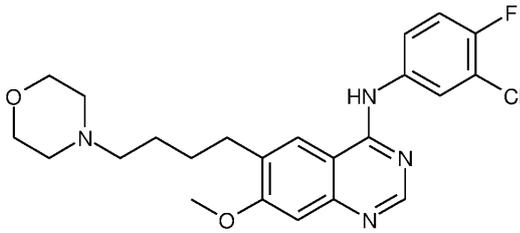


III

[0284]

[0285] 에를로티닙의 유리 염기 및 HCl 염은, 예를 들어 U.S. 5,747,498, 실시예 20에 따라 제조될 수 있다.

[0286] 게피티닙, 4-퀴나졸린아민, N-(3-클로로-4-플루오로페닐)-7-메톡시-6-[3-4-모르폴린]프로폭시]는 예시된 바와 같이, 화학식 IV에 의해 나타내어진다.



IV

[0287]

[0288]

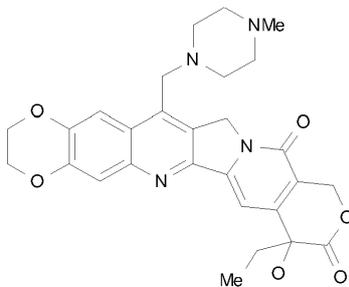
상표명 이레사(IRESSA)® (아스트라-제네카(Astra-Zeneca)) 하에 상업적으로 입수가 가능한 게피티닙은, 백금-기반 및 도세탁셀 화학요법 둘 다의 실패 후, 국부 진행성 또는 전이성 비소세포 폐암을 갖는 환자의 치료를 위해 단독요법으로서 지시되는 erbB-1 억제제이다. 게피티닙의 유리 염기, HCl 염 및 diHCl 염은 1996년 4월 23일에 출원된 국제 특허 출원 번호 PCT/GB96/00961의, 및 1996년 10월 31일의 WO 96/33980으로서 공개된 절차에 따라 제조될 수 있다.

[0289]

또한 관심대상은 현재 개발 중인, 라세미 혼합물 (R,S) 형태 뿐만 아니라 R 및 S 거울상이성질체를 포함한, 하기 화학식 A의 캄프토테신 유도체로,

[0290]

<화학식 A>



[0291]

[0292]

이는 화학 명칭 "7-(4-메틸피페라지노-메틸렌)-10,11-에틸렌디옥시-20(R,S)-캄프토테신 (라세미 혼합물) 또는 "7-(4-메틸피페라지노-메틸렌)-10,11-에틸렌디옥시-20(R)-캄프토테신 (R 거울상이성질체) 또는 "7-(4-메틸피페라지노-메틸렌)-10,11-에틸렌디옥시-20(S)-캄프토테신 (S 거울상이성질체)으로 공지되어 있다. 이러한 화합물 뿐만 아니라 관련 화합물은 미국 특허 번호 6,063,923; 5,342,947; 5,559,235; 5,491,237 및 계류중인 1997년 11월 24일에 출원된 미국 특허 출원 번호 08/977,217에서 제조 방법을 포함하여 기재되어 있다.

[0293]

호르몬 및 호르몬 유사체는 호르몬(들) 및 암의 성장 및/또는 성장의 결여 사이에 관계가 있는 암을 치료하는데 유용한 화합물이다. 암 치료에 유용한 호르몬 및 호르몬 유사체의 예는 소아에서 악성 림프종 및 급성 백혈병의 치료에 유용한 아드레노코르티코스테로이드, 예컨대 프레드니손 및 프레드니솔론; 부신피질 암종, 및 에스트로겐 수용체를 함유하는 호르몬 의존성 유방 암종의 치료에 유용한 아미노글루테티미드 및 다른 아로마타제 억제제, 예컨대 아나스트로졸, 레트라졸, 보라졸, 및 엑세메스탄; 호르몬 의존성 유방암 및 자궁내막 암종의 치료에 유용한 프로게스트린, 예컨대 메게스트롤 아세테이트; 전립선 암종 및 양성 전립선 비대의 치료에 유용한 에스트로겐, 안드로겐, 및 항안드로겐, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 시프로테론 아세테이트 및 5 α -리덕타제, 예컨대 피나스테리드 및 두타스테리드; 호르몬 의존성 유방 암종 및 다른 감수성 암의 치료에 유용한 항에스트로겐, 예컨대 타목시펜, 토레미펜, 탈록시펜, 드롤록시펜, 아이오독시펜, 뿐만 아니라 선택적 에스트로겐 수용체 조정제 (SERM), 예컨대 미국 특허 번호 5,681,835, 5,877,219, 및 6,207,716에 기재된 것; 및 전립선 암종의 치료를 위한 황체형성 호르몬 (LH) 및/또는 여포 자극 호르몬 (FSH)의 방출을 자극하는 고키나도트로핀-방출 호르몬 (GnRH) 및 그의 유사체, 예를 들어, LHRH 효능제 및 길항제, 예컨대 고세렐린 아세테이트 및 류프롤리드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0294]

신호 전달 경로 억제제는 세포내 변화를 일으키는 화학적 과정을 차단하거나 또는 억제하는 억제제이다. 본원에 사용된 이러한 변화는 세포 증식 또는 분화이다. 본 발명에 유용한 신호 전달 억제제는 수용체 티로신 키나제, 비-수용체 티로신 키나제, SH2/SH3도메인 차단제, 세린/트레오닌 키나제, 포스포티딜 이노시톨-3 키나제, 미오-이노시톨 신호전달, 및 Ras 종양유전자의 억제제를 포함한다.

- [0295] 여러 단백질 티로신 키나제는 세포 성장의 조절에 수반되는 다양한 단백질 내의 특정 티로실 잔기의 인산화를 촉매한다. 이러한 단백질 티로신 키나제는 수용체 또는 비-수용체 키나제로서 광범위하게 분류될 수 있다.
- [0296] 수용체 티로신 키나제는 세포의 리간드 결합 도메인, 막횡단 도메인, 및 티로신 키나제 도메인을 갖는 막횡단 단백질이다. 수용체 티로신 키나제는 세포 성장의 조절에 수반되고, 일반적으로 성장 인자 수용체로 지칭된다. 예를 들어 과다발현 또는 돌연변이에 의한, 많은 이들 키나제의 부적절한 또는 비제어된 활성화, 즉 비정상적 키나제 성장 인자 수용체 활성화는 비제어된 세포 성장을 유발하는 것으로 제시된 바 있다. 따라서, 이러한 키나제의 이상 활성화는 악성 조직 성장과 연결되어 왔다. 따라서, 이러한 키나제의 억제제는 암 치료 방법을 제공할 수 있다. 성장 인자 수용체는, 예를 들어, 표피 성장 인자 수용체 (EGFr), 혈소판 유래 성장 인자 수용체 (PDGFr), erbB2, erbB4, 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFr), 이뮤노글로불린-유사 및 표피 성장 인자 상동성 도메인을 갖는 티로신 키나제 (TIE-2), 인슐린 성장 인자 -I (IGFI) 수용체, 대식세포 콜로니 자극 인자 (Cfms), BTK, ckit, cmet, 섬유모세포 성장 인자 (FGF) 수용체, Trk 수용체 (TrkA, TrkB 및 TrkC), 에프린 (eph) 수용체, 및 RET 원종양유전자를 포함한다. 성장 수용체의 여러 억제제는 개발 중에 있고, 리간드 길항제, 항체, 티로신 키나제 억제제 및 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 성장 인자 수용체 및 성장 인자 수용체 기능을 억제하는 작용제는, 예를 들어, 문헌 [Kath, John C., Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10(6):803-818; Shawver et al DDT Vol 2, No. 2 February 1997; and Lofts, F. J. et al, "Growth factor receptors as targets", New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy, ed. Workman, Paul and Kerr, David, CRC press 1994, London]에 기재되어 있다.
- [0297] 성장 인자 수용체 키나제가 아닌 티로신 키나제는 비-수용체 티로신 키나제로 지칭된다. 항암 약물의 표적 또는 잠재적 표적인, 본 발명에 유용한 비-수용체 티로신 키나제는 cSrc, Lck, Fyn, Yes, Jak, cAbl, FAK (초점 부착 키나제), 브루톤 티로신 키나제, 및 Bcr-Abl을 포함한다. 이러한 비-수용체 키나제 및 비-수용체 티로신 키나제 기능을 억제하는 작용제는 문헌 [Sinh, S. and Corey, S.J., (1999) Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research 8 (5): 465 - 80; 및 Bolen, J.B., Brugge, J.S., (1997) Annual review of Immunology. 15: 371-404]에 기재되어 있다.
- [0298] SH2/SH3 도메인 차단제는, PI3-K p85 서브유닛, Src 패밀리 키나제, 어댑터 분자 (Shc, Crk, Nck, Grb2) 및 Ras-GAP를 포함한 다양한 효소 또는 어댑터 단백질에서 SH2 또는 SH3 도메인 결합을 방해하는 작용제이다. 항암 약물에 대한 표적으로서의 SH2/SH3 도메인은 문헌 [Smithgall, T.E. (1995), Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 34(3) 125-32]에 논의되어 있다.
- [0299] Raf 키나제 (rafk), 미토겐 또는 세포의 조절 키나제 (MEK), 및 세포의 조절 키나제 (ERK)의 차단제를 포함하는 MAP 키나제 캐스케이드 차단제; 및 PKC (알파, 베타, 감마, 엡실론, 뮤, 람다, 이오타, 제타)의 차단제를 포함하는 단백질 키나제 C 패밀리 구성원 차단제를 포함하는 세린/트레오닌 키나제의 억제제. IκB 키나제 패밀리 (IKKa, IKKb), PKB 패밀리 키나제, AKT 키나제 패밀리 구성원, 및 TGF 베타 수용체 키나제. 이러한 세린/트레오닌 키나제 및 그의 억제제는 문헌 [Yamamoto, T., Taya, S., Kaibuchi, K., (1999), Journal of Biochemistry. 126 (5) 799-803; Brodt, P, Samani, A., and Navab, R. (2000), Biochemical Pharmacology, 60. 1101-1107; Massague, J., Weis-Garcia, F. (1996) Cancer Surveys. 27:41-64; Philip, P.A., and Harris, A.L. (1995), Cancer Treatment and Research. 78: 3-27, Lackey, K. et al. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, (10), 2000, 223-226; 미국 특허 번호 6,268,391; 및 Martinez-Iacaci, L., et al., Int. J. Cancer (2000), 88(1), 44-52]에 기재되어 있다.
- [0300] PI3-키나제, ATM, DNA-PK, 및 Ku의 차단제를 포함하는 포스포티딜 이노시톨-3 키나제 패밀리 구성원의 억제제가 본 발명에 또한 유용하다. 이러한 키나제는 문헌 [Abraham, R.T. (1996), Current Opinion in Immunology. 8 (3) 412-8; Canman, C.E., Lim, D.S. (1998), Oncogene 17 (25) 3301-3308; Jackson, S.P. (1997), International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 29 (7):935-8; 및 Zhong, H. et al., Cancer res, (2000) 60(6), 1541-1545]에 논의되어 있다.
- [0301] 본 발명에 또한 유용한 것은 미오이노시톨 신호전달 억제제, 예컨대 포스포리파제 C 차단제 및 미오이노시톨 유사체이다. 이러한 신호 억제제는 문헌 [Powis, G., and Kozikowski A., (1994 New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy ed., Paul Workman and David Kerr, CRC press 1994, London]에 기재되어 있다.
- [0302] 신호 전달 경로 억제제의 또 다른 군은 Ras 종양유전자의 억제제이다. 이러한 억제제는 파르네실트랜스퍼라제, 게라닐-게라닐 트랜스퍼라제, 및 CAAX 프로테아제의 억제제 뿐만 아니라 안티센스 올리고뉴클레오티드, 리보자임 및 면역요법을 포함한다. 이러한 억제제는 야생형 돌연변이체 ras를 함유하는 세포에서 ras 활성화를 차단

함으로써, 항증식제로서 작용하는 것으로 제시된 바 있다. Ras 종양유전자 억제제는 문헌 [Scharovsky, O.G., Rozados, V.R., Gervasoni, S.I. Matar, P. (2000), Journal of Biomedical Science. 7(4) 292-8; Ashby, M.N. (1998), Current Opinion in Lipidology. 9 (2) 99 - 102; 및 Bennett, C.F. and Cowser, L.M. Biochim. Biophys. Acta, (1999) 1489(1):19-30]에 논의되어 있다.

[0303] 상기 언급된 바와 같이, 수용체 키나제 리간드 결합에 대한 항체 길항제는 신호 전달 억제제로서 또한 작용할 수 있다. 신호 전달 경로 억제제의 이러한 군은 수용체 티로신 키나제의 세포외 리간드 결합 도메인에 대한 인간화 항체의 사용을 포함한다. 예를 들어 임클론(Imclone) C225 EGFR 특이적 항체 (문헌 [Green, M.C. et al., Monoclonal Antibody Therapy for Solid Tumors, Cancer Treat. Rev., (2000), 26(4), 269-286]) 참조); 헤르셉틴(Herceptin)® erbB2 항체 (문헌 [Tyrosine Kinase Signalling in Breast cancer:erbB Family Receptor Tyrosine Kinases, Breast cancer Res., 2000, 2(3), 176-183] 참조); 및 2CB VEGFR2 특이적 항체 (문헌 [Brekken, R.A. et al., Selective Inhibition of VEGFR2 Activity by a monoclonal Anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice, Cancer Res. (2000) 60, 5117-5124] 참조).

[0304] 비-수용체 키나제 혈관신생 억제제가 또한 본 발명에 사용될 수 있다. 혈관신생 관련 VEGFR 및 TIE2의 억제제는 신호 전달 억제제와 관련하여 상기에 논의되어 있다 (수용체 둘 다는 수용체 티로신 키나제임). erbB2 및 EGFR의 억제제는 혈관신생, 주로 VEGF 발현을 억제하는 것으로 제시된 바 있기 때문에, 혈관신생은 일반적으로 erbB2/EGFR 신호전달과 연결된다. 따라서, 혈관신생의 억제제와 erbB2/EGFR 억제제의 조합은 타당하다. 따라서, 비-수용체 티로신 키나제 억제제는 본 발명의 EGFR/erbB2 억제제와 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, VEGFR (수용체 티로신 키나제)을 인식하지 않지만 리간드에는 결합하는 항-VEGF 항체; 혈관신생을 억제하는 인테그린 (알파_v 베타₃)의 소분자 억제제; 엔도스타틴 및 안지오스타틴 (비-RTK)은 또한 개시된 erbB 패밀리 억제제와의 조합에 유용한 것으로 입증될 수 있다. (문헌 [Bruns CJ et al. (2000), Cancer Res., 60: 2926-2935; Schreiber AB, Winkler ME, and Derynck R. (1986), Science, 232: 1250-1253; Yen L et al. (2000), Oncogene 19: 3460-3469] 참조).

[0305] 면역치료 요법에 사용되는 작용제가 또한 화학식 I의 화합물과의 조합에 유용할 수 있다. erbB2 또는 EGFR에 대한 면역 반응을 생성하는 수많은 면역학적 전략이 존재한다. 이들 전략은 일반적으로 종양 백신접종의 영역에 속한다. 면역학적 접근법의 효능은 소분자 억제제를 사용하는 erbB2/EGFR 신호전달 경로의 조합된 억제를 통해 크게 증진될 수 있다. erbB2/EGFR에 대한 면역학적/종양 백신 접근법에 대한 논의는 문헌 [Reilly RT et al. (2000), Cancer Res. 60: 3569-3576; 및 Chen Y, Hu D, Eling DJ, Robbins J, and Kipps TJ. (1998), Cancer Res. 58: 1965-1971]에서 찾아볼 수 있다.

[0306] 아포토시스촉진 요법에 사용되는 작용제 (예를 들어, bcl-2 안티센스 올리고뉴클레오티드)가 또한 본 발명의 조합물에 사용될 수 있다. 단백질의 Bcl-2 패밀리의 구성원은 아포토시스를 차단한다. 따라서, bcl-2의 상향조절은 화학요법저항성과 연결되어 왔다. 연구는 표피 성장 인자 (EGF)가 bcl-2 패밀리의 항아포토시스 구성원 (즉, mc1-1)을 자극하는 것으로 제시한 바 있다. 따라서, 종양에서 bcl-2의 발현을 하향조절하도록 설계된 전략은 임상 이익이 입증되었고, 현재 II/III상 시험 중에 있으며, 즉 이는 겐타(Genta)의 G3139 bcl-2 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. bcl-2에 대한 안티센스 올리고뉴클레오티드 전략을 사용하는 이러한 아포토시스촉진 전략은 문헌 [Water JS et al. (2000), J. Clin. Oncol. 18: 1812-1823; 및 Kitada S et al. (1994, Antisense Res. Dev. 4: 71-79]에 논의되어 있다.

[0307] 트라스투주맵 (헤르셉틴(HEREPTIN)®)은 HER2 수용체에 결합하는 인간화 모노클로날 항체이다. 그의 원래의 적응증은 HER2 양성 유방암이다.

[0308] 트라스투주맵 엠탄신 (상표명 카드실라(Kadcycla))는 세포독성제 메르탄신 (DM1)에 연결된 모노클로날 항체 트라스투주맵 (헤르셉틴)으로 이루어진 항체-약물 접합체이다. 트라스투주맵은 HER2/neu 수용체에 결합함으로써 단독으로 암 세포의 성장을 정지시키는 반면에, 메르탄신은 세포에 진입하여 튜불린에 결합함으로써 이를 파괴한다. 모노클로날 항체는 HER2를 표적화하고 HER2는 단지 암 세포에서만 과다발현되기 때문에, 접합체는 종양 세포에게 특이적으로 독소를 전달한다. 접합체는 T-DM1로 약기된다.

[0309] 세톡시맵 (에르비투스(ERBITUX)®)은 표피 성장 인자 수용체 (EGFR)를 억제하는 키메라 마우스 인간 항체이다.

[0310] 페르투주맵 (2C4로도 지칭됨, 상표명 옴니타르그(Omnitarg))은 모노클로날 항체이다. 작용제 계열에서 그의 부류 중 첫번째는 "HER 이량체화 억제제"로 지칭된다. 이는 HER2에 결합함으로써, 다른 HER 수용체와 HER2의 이량체화를 억제하며, 이는 둔화된 종양 성장을 발생시키는 것으로 가설화된다. 페르투주맵은 2001년 1월 4일에

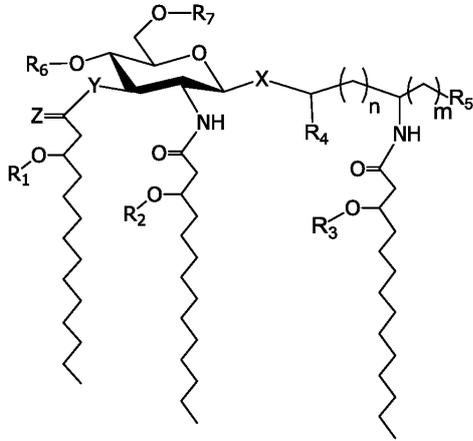
공개된 WO01/00245에 기재되어 있다.

- [0311] 리툭시맵은 리툭산(RITUXAN)® 및 맵테라(MABTHERA)®로서 판매되는 키메라 모노클로날 항체이다. 리툭시맵은 B 세포 상의 CD20에 결합하고, 세포 아포토시스를 야기한다. 리툭시맵은 정맥내로 투여되고, 류마티스 관절염 및 B-세포 비-호지킨 림프종의 치료에 대해 승인되었다.
- [0312] 오파투무맵은 아르제라(AZZEREA)®로서 판매되는 완전 인간 모노클로날 항체이다. 오파투무맵은 B 세포 상의 CD20에 결합하고, 플루다라빈 (플루다라) 및 알렘투주맵 (캄파트)을 사용한 치료에 불응성인 성인에서 만성 림프구성 백혈병 (CLL; 백혈구의 암의 유형)을 치료하는데 사용된다.
- [0313] 세포 주기 신호전달 억제제는 세포 주기의 제어에 수반되는 분자를 억제한다. 시클린 의존성 키나제 (CDK)로 지칭되는 단백질 키나제의 패밀리, 및 시클린으로 지칭되는 단백질의 패밀리와의 그의 상호작용은 진행 세포 주기를 통한 진행을 제어한다. 상이한 시클린/CDK 복합체의 협응적 활성화 및 불활성화는 세포 주기를 통한 정상적인 진행을 위해 필요하다. 세포 주기 신호전달의 여러 억제제가 개발 중에 있다. 예를 들어, CDK2, CDK4 및 CDK6을 포함한 시클린 의존성 키나제 및 이들에 대한 억제제의 예는, 예를 들어, 문헌 [Rosania et al., Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10(2):215-230]에 기재되어 있다.
- [0314] 본원에 사용된 "면역조정제"는 면역계에 영향을 미치는 모노클로날 항체를 포함한 임의의 물질을 지칭한다. 본 발명의 ICOS 결합 단백질은 면역조정제로 간주될 수 있다. 면역조정제는 암의 치료를 위한 항신생물체로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 면역조정제는 항-CTLA-4 항체 예컨대 이필리무맵 (예르보이) 및 항-PD-1 항체 (옵디보/니볼루맵 및 키트루다/췌브롤리주맵)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 다른 면역조정제는 OX-40 항체, PD-L1 항체, LAG3 항체, TIM-3 항체, 41BB 항체 및 GITR 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0315] 예르보이 (이필리무맵)는 브리스톨 마이어스 스쿼프(Bristol Myers Squibb)에 의해 시판되는 완전 인간 CTLA-4 항체이다. 이필리무맵의 단백질 구조 및 사용 방법은 미국 특허 번호 6,984,720 및 7,605,238에 기재되어 있다.
- [0316] 옵디보/니볼루맵은 면역강화 활성을 갖는, 음성 면역조절 인간 세포 표면 수용체 PD-1 (프로그램화된 사멸-1 또는 프로그램화된 세포 사멸-1/PCD-1)에 대해 지시된 브리스톨 마이어스 스쿼프에 의해 시판되는 완전 인간 모노클로날 항체이다. 니볼루맵은 PD-1, Ig 슈퍼패밀리 막횡단 단백질에 결합하고, 그의 리간드 PD-L1 및 PD-L2에 의한 활성화를 차단하여, T-세포의 활성화 및 종양 세포 또는 병인체에 대한 세포-매개 면역 반응을 발생시킨다. 활성화된 PD-1은 PI3k/Akt 경로 활성화의 억제를 통해 T-세포 활성화 및 이펙터 기능을 음성적으로 조절한다. 니볼루맵에 대한 다른 명칭은: BMS-936558, MDX-1106, 및 ONO-4538을 포함한다. 니볼루맵에 대한 아미노산 서열 및 사용 및 제조 방법은 미국 특허 번호 US 8,008,449에 개시되어 있다.
- [0317] 키트루다/췌브롤리주맵은 폐암 치료를 위해 머크(Merck)에 의해 시판되는 항-PD-1 항체이다. 췌브롤리주맵의 아미노산 서열 및 사용 방법은 미국 특허 번호 8,168,757에 개시되어 있다.
- [0318] OX40로도 공지되어 있는 CD134는, CD28과 달리, 휴지기 나이브 T 세포 상에서 구성적으로 발현되지 않는 수용체의 TNFR-슈퍼패밀리의 구성원이다. OX40는 활성화 후 24 내지 72시간 후에 발현되는 2차 공동자극 분자이고; 그의 리간드, OX40L은 또한 휴지기 항원 제시 세포 상에서 발현되지 않지만, 그의 활성화 후에는 발현된다. OX40의 발현은 T 세포의 완전 활성화에 의존적이고; CD28의 부재 하에, OX40의 발현은 지연되고 4배 더 낮은 수준이다. OX-40 항체, OX-40 융합 단백질 및 그의 사용 방법은 미국 특허 번호 US 7,504,101; US 7,758,852; US 7,858,765; US 7,550,140; US 7,960,515; WO2012027328; WO2013028231에 개시되어 있다.
- [0319] PD-L1 (또한 CD274 또는 B7-H1로도 지칭됨)에 대한 항체 및 사용 방법은 미국 특허 번호 7,943,743; 미국 특허 번호 8,383,796; US20130034559, WO2014055897, 미국 특허 번호 8,168,179; 및 미국 특허 번호 7,595,048에 개시되어 있다. PD-L1 항체는 암의 치료를 위한 면역조정제로서 개발 중에 있다.
- [0320] 본원에 사용된 "면역자극제"는 면역계를 자극할 수 있는 임의의 작용제를 지칭한다. 본원에 사용된 면역자극제는 백신 보조제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0321] 아미노알킬 글루코사미나이드 포스페이트 (AGP)는 면역화된 동물에서 시토카인 생산을 자극하고, 대식세포를 활성화하고, 선천성 면역 반응을 촉진하고, 항체 생산을 증대시키기 위한 백신 보조제 및 면역자극제로서 유용한 것으로 공지되어 있다. 아미노알킬 글루코사미나이드 포스페이트 (AGP)는 톨-유사 수용체 4 (TLR4)의 합성 리간드이다. AGP 및 TLR4를 통한 그의 면역조정 효과는 특허 공개 예컨대 WO 2006/016997, WO 2001/090129, 및/또는 미국 특허 번호 6,113,918에 개시되어 있고, 문헌에 보고된 바 있다. 추가의 AGP 유도체가 미국 특허 번호 7,129,219, 미국 특허 번호 6,525,028 및 미국 특허 번호 6,911,434에 개시되어 있다. 특정 AGP는 TLR4의 효

능제로서 작용하는 반면에, 다른 것은 TLR4 길항제로 인식된다.

[0322] 본 발명에 사용된 아미노알킬 글루코사미나이드 포스페이트 화합물은 하기와 같이 화학식 1에 제시된 구조를 갖는다:

[0323] <화학식 1>



[0324]

[0325] 여기서

[0326] m은 0 내지 6이고;

[0327] n은 0 내지 4이고;

[0328] X는 O 또는 S, 바람직하게는 O이고;

[0329] Y는 O 또는 NH이고;

[0330] Z는 O 또는 H이고;

[0331] 각각의 R₁, R₂, R₃은 C₁₋₂₀ 아실 및 C₁₋₂₀ 알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0332] R₄는 H 또는 Me이고;

[0333] R₅는 -H, -OH, -(C₁₋₄) 알콕시, -PO₃R₈R₉, -OPO₃R₈R₉, -SO₃R₈, -OSO₂R₈, -NR₈R₉, -SR₈, -CN, -NO₂, -CHO, -CO₂R₈, 및 -CONR₈R₉로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 R₈ 및 R₉는 각각 독립적으로 H 및 (C₁₋₄) 알킬로부터 선택되고;

[0334] 각각의 R₆ 및 R₇은 독립적으로 H 또는 PO₃H₂이다.

[0335] 화학식 1에서 통상적인 지방 아실 잔기 (즉, 2차 아실옥시 또는 알콕시 잔기, 예를 들어, R₁O, R₂O, 및 R₃O)가 부착된 3' 입체생성 중심의 배위는 R 또는 S, 바람직하게는 R이다 (칸-인골드-프렐로그 우선순위 규칙에 의해 지정된 바와 같음). R₄ 및 R₅가 부착된 아글리콘 입체생성 중심의 배위는 R 또는 S일 수 있다. 모든 입체이성질체, 거울상이성질체 및 부분입체이성질체 둘 다, 및 그의 혼합물은 본 발명의 범주 내에 속하는 것으로 간주된다.

[0336] 헤테로원자 X 및 아글리콘 질소 원자 사이의 탄소 원자의 수는 변수 "n"에 의해 결정되고, 이는 0 내지 4의 정수, 바람직하게는 0 내지 2의 정수일 수 있다.

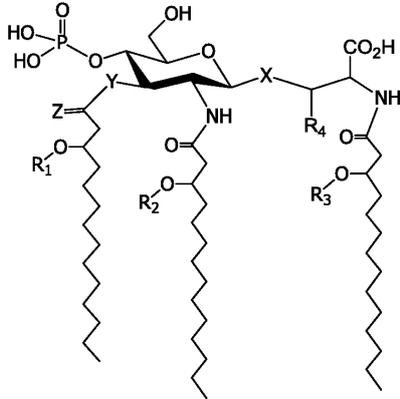
[0337] 통상적인 지방산 R₁, R₂, 및 R₃의 쇠 길이는 약 6 내지 약 16개의 탄소, 바람직하게는 약 9 내지 약 14개의 탄소일 수 있다. 쇠 길이는 동일 또는 상이할 수 있다. 일부 바람직한 실시양태는 R₁, R₂ 및 R₃이 6 또는 10 또는 12 또는 14인 쇠 길이를 포함한다.

[0338] 화학식 1은 L/D-세릴, -트레오닐, -시스테인일 에테르 및 에스테르 지질 AGP, 효능제 및 길항제 둘 다 및 그의 동족체 (n=1-4), 뿐만 아니라 다양한 카르복실산 생동배체를 포괄한다 (즉, R₅는 염 형성 가능한 산성 기이고;

포스페이트는 글루코사민 유닛의 4- 또는 6- 위치에 존재할 수 있지만, 바람직하게는 4-위치에 존재함).

[0339] 화학식 1의 AGP 화합물을 사용하는 본 발명의 바람직한 실시양태에서, n은 0이고, R₅는 CO₂H이고, R₆은 PO₃H₂이고, R₇은 H이다. 이러한 바람직한 AGP 화합물은 하기와 같은 화학식 1a의 구조로 제시된다:

[0340] <화학식 1a>



[0341]

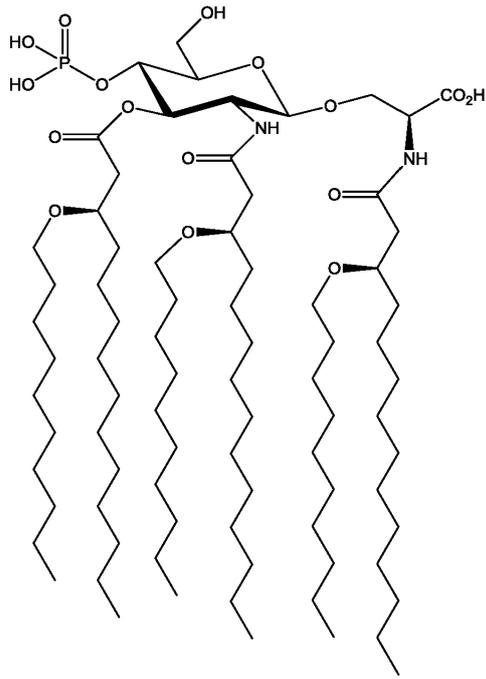
[0342] 여기서 X는 O 또는 S이고; Y는 O 또는 NH이고; Z는 O 또는 H이고; 각각의 R₁, R₂, R₃은 C₁₋₂₀ 아실 및 C₁₋₂₀ 알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; R₄는 H 또는 메틸이다.

[0343] 화학식 1a에서 통상적인 지방 아실 잔기 (즉, 2차 아실옥시 또는 알콕시 잔기, 예를 들어, R₁O, R₂O, 및 R₃O)가 부착된 3' 입체생성 중심의 배위는 R 또는 S, 바람직하게는 R이다 (칸-인골드-프렐로그 우선순위 규칙에 의해 지정된 바와 같음). R₄ 및 CO₂H가 부착된 아글리콘 입체생성 중심의 배위는 R 또는 S일 수 있다. 모든 입체이성질체, 거울상이성질체 및 부분입체이성질체 둘 다, 및 그의 혼합물은 본 발명의 범주 내에 속하는 것으로 간주된다.

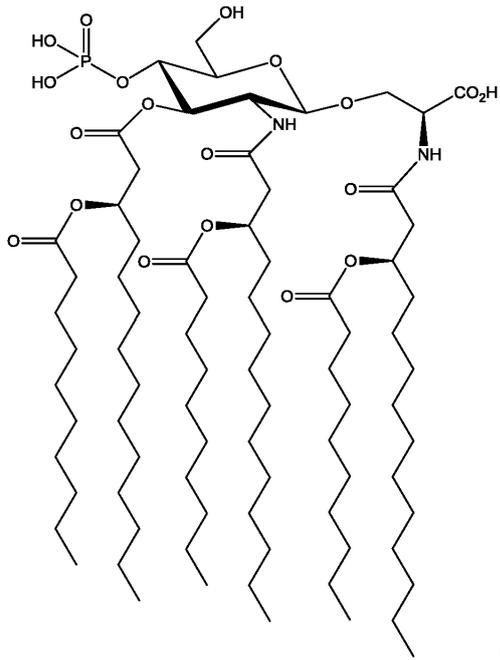
[0344] 화학식 1a는 L/D-세틸, -트레오닐, -시스테인일 에테르 또는 에스테르 지질 AGP, 효능제 및 길항제 둘 다를 포함한다.

[0345] 화학식 1 및 화학식 1a 둘 다에서, Z는 이중 결합에 의해 부착된 O 또는 각각 단일 결합에 의해 부착된 2개의 수소 원자이다. 즉, 화합물은 Z=Y=O인 경우에 에스테르-연결되고; Z =O 및 Y=NH인 경우에 아마이드-연결되고; Z=H/H 및 Y=O인 경우에 에테르-연결된다.

[0346] 화학식 1의 특히 바람직한 화합물은 CRX-601 및 CRX-527로서 지칭된다. 그의 구조는 하기와 같이 제시된다:



(CRX-601)

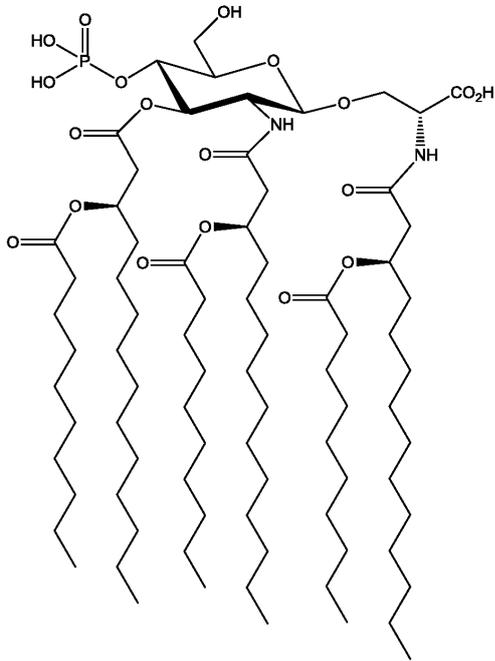


(CRX-527)

[0347]

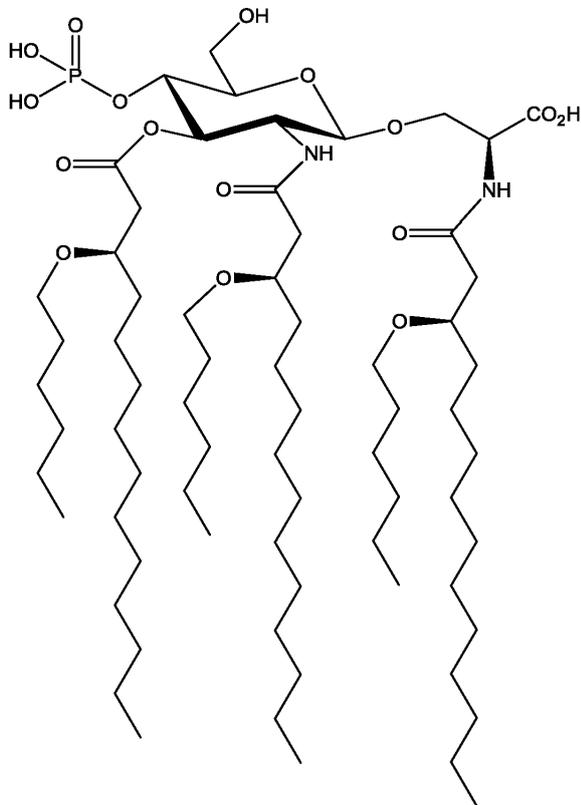
[0348] 추가적으로, 또 다른 바람직한 실시양태는 제시된 구조를 갖는 CRX 547을 사용한다.

CRX 547



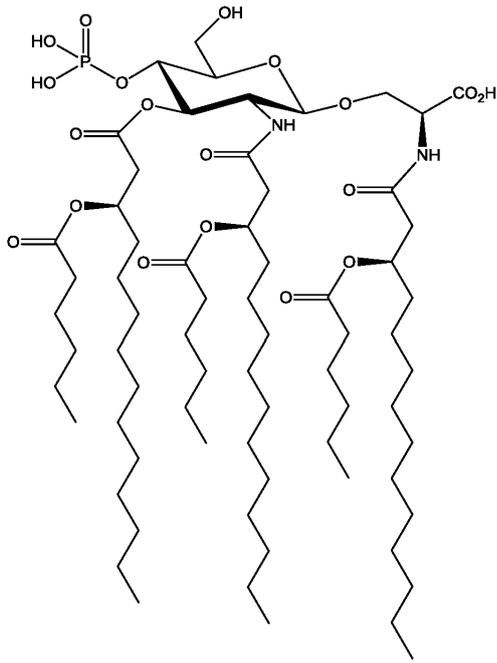
[0349]

[0350] 또 다른 실시양태는 AGP 예컨대 보다 짧은 2차 아실 또는 알킬 쇠를 갖는 AGP에 대해 증가된 안정성을 제공한 CRX 602 또는 CRX 526을 포함한다.



CRX 602

[0351]



CRX-526

- [0352]
- [0353] 한 실시양태에서 암의 치료를 필요로 하는 포유동물에게 치료 유효량의
- [0354] 본 발명의 ICOS 결합 단백질,
- [0355] 및 b) 적어도 1종의 항신생물제
- [0356] 를 투여하는 것을 포함하는, 이러한 포유동물에서 암을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0357] 한 실시양태에서 암의 치료를 필요로 하는 포유동물에게 치료 유효량의
- [0358] 본 발명의 ICOS 결합 단백질,
- [0359] 및 b) 적어도 1종의 제2 면역조절제
- [0360] 를 투여하는 것을 포함하는, 이러한 포유동물에서 암을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0361] 한 실시양태에서 상기 제2 면역조절제는 항-CTLA4 항체, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-OX40 항체, 항-GITR 항체, 및 항-41BB 항체, 항-LAG3 항체 및 항-TIM3 항체의 군으로부터 선택된다.
- [0362] 한 실시양태에서 암의 치료를 필요로 하는 포유동물에게 치료 유효량의
- [0363] 본 발명의 ICOS 결합 단백질,
- [0364] 및 b) 적어도 1종의 면역자극제
- [0365] 를 투여하는 것을 포함하는, 이러한 포유동물에서 암을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0366] 한 실시양태에서, 면역자극제는 TLR4 효능제이다. 한 실시양태에서 면역자극제는 AGP이다. 한 측면에서, 면역자극제는 화학식 I의 화합물이다. 한 측면에서, 이는 화학식 1a의 화합물이다. 한 측면에서, 면역자극제는 CRX-601, CRX-547, CRX-602, CRX-527 및 CRX-526으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0367] 실시예
- [0368] 하기 실시예는 본 발명의 다양한 비제한적 측면을 예시한다.
- [0369] 실시예 1: 암에서의 ICOS 발현
- [0370] 일반적으로, 고휘 종양은 ICOS가 항종양 면역 반응을 매개한다는 이론과 일치하게, 낮은 수준의 침윤 ICOS⁺ T 세포를 갖는 것으로 보인다. 더 캔서 게놈 아틀라스 (TCGA)로부터의 공중 이용가능한 mRNA 발현 데이터세트 및 다른 데이터세트를 사용하여 다양한 종양 조직학에 걸쳐 ICOS 발현 분석을 생성하였다. 표 3은 일부 검출가능한 수준의 ICOS mRNA 발현을 제시하는 각각의 조직학으로부터의 종양의 상대 백분율을 제시한다. 이러한 분석

은 다른 암 면역요법 접근법에 대해 감수성인 것으로 공지되어 있는 종양 조직학 (흑색종, RCC, NSCLC)은 검출 가능한 ICOS⁺ 종양 침윤 림프구 (TIL)를 갖는 종양을 상대적으로 보다 높은 백분율 (>10%)로 갖는 반면에, 불량한 면역원성인 것으로 공지되어 있는 종양 유형 (전립선, 난소, 및 췌장)은 ICOS⁺ TIL를 갖는 종양을 상대적으로 보다 낮은 백분율 (<10%)로 갖는다는 것을 확인시켜주었다 (표 3). 흥미롭게도, 바이러스 감염 및/또는 만성 염증과 연관된 것으로 공지되어 있는 종양 유형 (H&N, 위, 식도, 및 자궁경부)은 종양 유형 중에서 최고 백분율의 ICOS⁺ TIL을 제시하였다. 이들 mRNA 발현 분석으로부터 분명하지 않은 것은 각각의 종양 유형에서 ICOS를 발현하는 TIL의 하위집단이다. 일부 경우에 ICOS는 종양 침윤 T_{reg} 상에서 우세하게 발현될 수 있는 한편, 다른 경우에 이는 ICOS⁺ T 이펙터 세포 침윤의 수준을 나타낼 수 있다.

[0371] 표 3. 상이한 종양 유형에 걸친 ICOS mRNA 발현

종양 유형	총 N	ICOS+ {N}	ICOS+ {Per.}
H&N	426	157	36.9%
위	285	75	26.3%
식도	70	17	24.3%
흑색종 (M)	295	69	23.4%
NSCLC(AD)	501	112	22.4%
NSCLC(SCC)	489	85	17.4%
자궁경부	185	32	17.3%
유방	1048	162	15.5%
방광	244	35	14.3%
RCC	522	64	12.3%
흑색종 (P)	82	7	8.5%
췌장	85	7	8.2%
결장	446	34	7.6%
갑상선	498	34	6.8%
HCC	191	11	5.8%
육종	103	4	3.9%
난소	412	13	3.2%
전립선	336	10	3.0%
자궁내막	532	15	2.8%
직장	163	4	2.5%
GBM	156	0	0.0%

[0372]

[0373]

TIL의 어떠한 하위세트가 상이한 종양 유형에서 ICOS 발현과 연관되는지를 보다 잘 이해하기 위해 원발성 인간 비소세포 폐 암종 (NSCLC), 삼중-음성 유방암 (TNBC), 결장직장암 (CRC), 전립선, 췌장, 난소, 신세포암 (RCC) 및 흑색종에서 면역조직화학 (IHC)에 의한 ICOS 발현의 분석을 수행하였다 (표 4). mRNA 발현 분석에서 관찰된 것과 유사하게, ICOS⁺ TIL의 존재비는, 심지어 다수의 CD4⁺, CD8⁺ 및/또는 FoxP3⁺ TIL이 달리 존재하는 개개의 종양에서도 상대적으로 낮았다. 다시, 흑색종, 신세포 암종 (RCC) 및 비소세포 폐 암종 (NSCLC) 조직학은 약간의 수준의 검출가능한 ICOS⁺ 침윤을 갖는 종양을 최고 백분율로 가졌다 (표 4, 칼럼 2). 반대로, 전립선, 난소 및 췌장 종양은 ICOS⁺ TIL을 거의 제시하지 않았다 (표 4). 이들 분석은 고품 종양이 낮은 기저 수준의 ICOS⁺ TIL을 갖고, 이러한 세포의 집단의 확장 및 기능적 유도로부터 이익을 얻을 수 있다는 것을 분명하게 제시한다. 원발성 인간 종양을 분석하기 위해 유동 세포측정법 및 이중-색상 면역조직화학을 사용하는 향후 연구는 특정 T 세포 하위세트가 ICOS를 발현하는 것을 결정하는데 도움이 될 것이다.

[0374] 표 4

엔티티	샘플의 수	ICOS	양성 세포의 평균 수 (범위)				
			ICOS	CD3	CD4	CD8	FOXp3
NSCLC (편평)	n = 17	-	0	11 (0-74)	2 (0-0)	20 (0-147)	10 (0-28)
	n = 23	+	3 (0-25)	36 (2-143)	8 (0-26)	35 (5-188)	18 (0-75)
NSCLC (선암종)	n = 15	-	0	36 (0-197)	4 (0-20)	71 (5-238)	10 (1-41)
	n = 25	*	2 (0-7)	56 (0-181)	8 (0-39)	69 (10-201)	19 (0-56)
PANC	n = 24	-	0	14 (0-81)	9 (0-132)	17 (0-65)	8 (0-25)
	n = 11	+	5 (0-20)	85 (3-258)	13 (0-45)	113 (2-383)	38 (2-81)
CRC	n = 22	-	0	12 (0-47)	14 (0-44)	20 (0-83)	14 (2-52)
	n = 23	+	2 (0-13)	31 (5-101)	22 (5-48)	53 (4-151)	24 (5-43)
전립선암	n = 28	-	0	10 (0-78)	17 (1-98)	23 (1-176)	5 (0-25)
	n = 1	*	1	00	48	55	11
췌장암	n = 11	-	0	15 (1-32)	17 (3-71)	20 (3-61)	8 (0-21)
	n = 4	*	0 (0-1)	31 (7-85)	17 (6-31)	17 (2-61)	4 (0-8)
난소암	n = 15	-	0	13 (0-105)	14 (1-78)	13 (0-83)	2 (0-12)
	n = 5	+	1 (0-3)	18 (0-35)	13 (8-19)	32 (10-76)	7 (4-13)
HCC	n = 3	-	0	50 (14-104)	68 (38-85)	58 (24-118)	4 (0-9)
	n = 7	+	5 (1-16)	45 (10-130)	85 (28-164)	71 (12-232)	15 (3-28)
흑색종	n = 7	-	0	42 (1-155)	12 (1-31)	35 (0-158)	5 (0-16)
	n = 12	*	7 (0-21)	84 (13-222)	32 (13-79)	89 (28-179)	19 (0-46)

[0375]

실시예 2: ICOS 항체 효능제의 스크리닝

[0376]

1차 인간 PBMC의 단리

[0377]

[0378] 신선한 혈액을 혈액 공여자로부터 획득하고, 페놀 레드 무함유-10% RPMI1640 배지로 1:1 희석하였다. 희석된 혈액을 유니-셉 맥스 50ml 원추형 튜브 내의 밀도 배지 상부에 적층하고, 실온에서 20분 동안 400xg에서 브레이크 오프로 원심분리하였다. 생성된 백색 일핵 층 (백혈구 연층)을 100 μM 세포 스트레이너를 통해 새로운 50mL 원추형 튜브로 조심스럽게 추출하였다. 동등 부피의 페놀 레드 무함유-10% RPMI1640 배지를 백혈구 연층에 첨가하고, 실온에서 10분 동안 300x g에서 원심분리하였다. 세포 펠릿을 적혈구 용해 용액 (시그마 알드리치(Sigma Aldrich)) 10ml 중에 재현탁시키고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 배지로 1회 세척하고, 이전에 기재된 바와 같이 원심분리하였다. 페놀 레드 무함유-10% RPMI1640 배지를 사용하여 부피가 40ml가 되게 하고, 바이셀 세포 계수기 및 생존율 분석기 (베크만 쿨터(Beckman Coulter))를 사용하여 세포를 계수하였다.

[0379]

1차 인간 CD4+CD25- T 이펙터 세포의 단리

[0380]

인간 CD4+CD25+ 조절 T 세포 단리 키트 (밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec))를 사용하여 2-단계 자기 비드 기반 단리 절차를 통해 PBMC로부터 인간 CD4+CD25 세포를 추가로 정제하였다. 먼저, PBMC 세포를 비오틴-항체 각테일과 함께 4°C에서 5분 동안 인큐베이션한 다음, 항-비오틴 마이크로비드와 10분 동안 인큐베이션하였다. 이 단계는 비-CD4+ T 세포를 표지하기 위한 것이다. 이어서 세포를 미디맥스(MidiMACS) 분리기의 자장에서 LD 칼럼을 통해 통과시켰다. 비표지된 사전-풍부화된 CD4+ 세포 분획인 유출물을 수집하고 CD25 마이크로비드와 함께 4°C에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 표지된 세포를 미니맥스(MiniMACS) 분리기의 자장에서 MS 칼럼을 통해 통과시켰다. 비표지된 CD4-CD25- T 이펙터 세포를 함유하는 관통물을 하루 활성화 검정을 위해 수집하였다.

[0381]

1차 인간 CD4+ T 세포의 혈액으로부터의 직접 단리

[0382]

인간 CD4+ T 세포를 인간 CD4+ T 세포 풍부화 각테일 (스텝 셀 테크놀로지스(Stem Cell Technologies))를 사용하여 신선한 인간 혈액으로부터 직접 단리하였다. 로제트셉 인간 CD4+ T 세포 풍부화 각테일 (50 μL/mL)을 전혈에 첨가하고, 잘 혼합하였다. 실온에서 20분 인큐베이션 후에, 동등 부피의 PBS + 2% FBS를 온화하게 혼합하

면서 첨가하였다. 희석된 샘플을 밀도 배지의 상부에 적층하고, 실온에서 20분 동안 1200 x g에서 브레이크 오프로 원심분리하였다. 풍부화된 세포를 밀도 배지 : 혈장 계면으로부터 새로운 원추형 튜브로 조심스럽게 부었다. 다음으로 적혈구를 적혈구 적재 완충제 (시그마 알드리치)로 용해시키고, 풍부화된 세포를 PBS + 2% FBS로 2회 세척하였다. CD4+ T 세포를 PBS + 2% FBS 40ml 중에 재현탁시키고, 바이-셀 세포 계수기로 계수하였다.

[0383] 실험 프로토콜

[0384] 인간 CD4+CD25- T 이펙터 세포 시험관내 활성화 검정 - 결합 검정.

[0385] 비 조직 배양물 처리된 96 웰 편평 바닥 플레이트를 1 µg/ml 항 인간 CD3 항체 (이바이오사이언스 (eBioscience)) 및 다양한 시험 항체를 함유하는 코팅 완충제 (바이오레전드(Biolegend))로 100 µl/웰로 밤새 코팅하였다. 다음날, 사전-코팅된 플레이트를 10% FBS 함유 RPMI-1640 배지로 3회 세척하였다. 인간 CD4+CD25- T 이펙터 세포를 단리하고 기재된 바와 같이 CFSE로 표지하고 플레이트 상에 시딩하였다. 37°C에서 2.5일 동안 인큐베이션한 후, 세포를 수거하고 유동 세포측정법에 의해 증식 및 활성화 마커 발현에 대해 분석하였다. 메소 스케일 디스커버리 (MSD)에 의한 멀티플렉스 시토카인 측정을 위해 또한 세포 배양 상청액을 수집하였다.

[0386] CFSE 증식 검정

[0387] 표지할 세포를 15ml의 원추형 튜브 내의 1ml의 사전-가온된 PBS 중에 최대 1E7개 세포/mL의 최종 농도로 재현탁시켰다. 1 마이크로리터의 2 mM 스톱 CFSE 용액 (라이프 테크놀로지스(Life Technologies))을 세포에 직접 첨가한 다음 즉시 볼텍싱하여 균일하게 표지되도록 하였다. 실온에서 5분 동안 인큐베이션한 후, 14ml의 빙냉 세포 배양 배지를 첨가하여 염색을 쉐킷하였다. 표지된 세포를 빙냉 배지로 3회 세척하였다. 세포를 계수하고, IL-2 (페프로테크(PeproTech)) 100IU/ml가 보충된 RPMI1640 + 10% FBS 중 1E6개 세포/ml로 조정하고, 항 CD3 및 시험 항체 코팅된 플레이트에 시딩하였다. T 세포 활성화 후에, 세포를 수거하고 PBS+0.5% BSA로 1회 세척한 후, 유동 세포측정 분석을 위해 다중-색상 염색 단계로 진행시켰다.

[0388] 다중-색상 유동 세포측정법

[0389] 활성화된 T 세포를 수거하고 PBS로 세척하였다. 세포를 먼저 라이브/데드 픽서블 과 적혈구 생존율 염료 (라이프 테크놀로지스)를 사용하여 판매업체의 프로토콜에 따라 염색하였다. 염료를 세척한 후, 상이한 색상과 접합된 검출 항체를 세포와 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 염색된 세포를 빙냉 FACS 염색 완충제 (PBS + 0.5% BSA)로 1회 세척한 후 FACS 칸토 또는 FACS 칸토 II 유동 세포측정기 상에서 전개시켰다. 세포측정기 셋업 & 트래킹 비드 (비디 바이오사이언시스(BD Biosciences))를 사용하여 세포측정기 성능을 매일 체크하고, 비염색 세포에 기초하여 PMT 전압 및 면적 스케일링을 설정하였다. 각각의 형광색소와 접합된 검출 항체로 개별적으로 염색된 원콤프(OneComp) 또는 울트라콤프(UltraComp) 비드 (이바이오사이언스)를 사용하여 보상을 수행하였다.

[0390] MSD 시토카인 분석

[0391] 조직 배양 상청액 중 IFN-γ, IL-10, IL-2 및 TNF-α 시토카인 수준을 MSD 인간 V-플렉스 맞춤 키트를 사용하여 결정하였다. 샘플을 먼저 딜루언트2(Diluent2) 중에 1:200 희석하였다. 보정물을 또한 딜루언트2 중에서 키트 매뉴얼에 따라 제조하였다. 희석된 샘플 및 보정물을 흑색 MSD 플레이트에 첨가하고, 후속해서 이를 접착성 플레이트 실로 밀봉하고, 2시간 동안 진탕하면서 실온에서 인큐베이션하였다. 딜루언트2 중에서 새롭게 제조한 검출 항체 용액 25 µL를 각각의 웰에 첨가한 후, 플레이트를 재-밀봉하고, 다시 2시간 동안 진탕하면서 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS 플러스 0.05% 트윈-20으로 150 µL/웰로 3회 세척한 후 새롭게 희석된 2x 판독 완충제를 150 µl/웰로 첨가하고, 메소 퀵플렉스(MESO QuickPlex) 판독기 상에서 즉시 판독하였다. 데이터를 MSD 워크벤치 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0392] 인간 CD4+ T 세포 시험관내 활성화 검정 - 결합 및 가용성

[0393] 새롭게 단리한 인간 CD4+ T 세포를 항-CD3 (1 µg/ml) 및 항-CD28 (3 µg/ml)로 코팅된 24 웰 플레이트 상에서 48시간 동안 사전-자극시켰다. 세포를 수거하고, 세척하고, IL-2 (페프로테크) 100IU/ml로 보충된 AIM-V 배지 중에서 항-CD3 디나비즈 (라이프 테크놀로지스)와 1:1 비로 혼합하였다. 이어서 세포/비드 혼합물을 비-코팅되거나 (가용성 포맷의 경우) 또는 H2L5 hIgG4PE로 코팅된 (결합된 포맷의 경우) 96 웰 편평 바닥 플레이트 상에 웰당 100k로 시딩하였다. 가용성 포맷의 경우에, H2L5 hIgG4PE를 세포 시딩 시점에 웰에 첨가하였다. 37°C에서 3.5일 동안 인큐베이션한 후에, MSD에 의한 멀티플렉스 시토카인 측정을 위해 세포 배양 상청액을 수집하였

다.

- [0394] 가용성 인간 PBMC 시험관내 활성화 검정
- [0395] 새롭게 단리한 인간 PBMC를 항-CD3 (1 µg/ml) 및 항-CD28 (5 µg/ml)로 코팅된 24 웰 플레이트 상에서 48시간 동안 사전-자극시켰다. CFSE 염색된 세포를 제조하고, IL-2 (페프로테크) 100IU/ml로 보충된 AIM-V 배지 중에서 항-CD3 디나비즈 (라이프 테크놀로지스)와 1:1 비로 혼합하였다. 이어서 세포/비드 혼합물을 항 CD3 항체 1 µg/ml로 사전-코팅된 96 웰 플레이트 상에 웰당 200k로 시딩하였다. H2L5 hIgG4PE 및 대조군 항체를 그의 가용성 형태로 웰에 직접 첨가하였다. 37°C에서 3.5일 동안 인큐베이션한 후에, MSD에 의한 멀티플렉스 시토카인 측정을 위해 세포 배양 상청액을 수집하고, 유동 세포측정법에 의한 증식 및 마커 발현 분석을 위해 세포를 수거하였다.
- [0396] 데이터 분석
- [0397] 유동 세포측정법 데이터 분석
- [0398] 유동 데이터를 플로우조 소프트웨어 (플로우조 엘엘씨(FlowJo LLC))에 의해 분석하였다. 사멸 세포를 먼저 라이브/데드 세포 생존율 염료 염색에 기초하여 게이팅하였다. 이중선은 FSC-H : FSC-W 산점도에 대해 게이팅하였다. 결과로 나타난 살아있는 단세포를 상이한 T 세포 하위집단 예컨대 CD4+ 또는 CD8+ T 세포 내에서 활성화 마커 발현에 대해 분석하고, 모 집단의 백분율 또는 중앙 형광 강도 (MFI)로서 보고하였다.
- [0399] CFSE 증식 분석
- [0400] CFSE 데이터를 또한 플로우조에 의해 분석하였다. 사멸 세포 및 이중선을 제외한 후, "증식된 세포" 게이트를 비 활성화된 T 세포에 기초하여 도시하였다. 임의의 주어진 샘플에서 이러한 게이트에 속하는 임의의 세포를 증식된 세포로서 계수하였다. 데이터를 증식의 백분율로서 보고하였다.
- [0401] FACS에 의한 세포 고갈 분석
- [0402] 세포 고갈은 플로우조에 의해 분석하였다. 먼저, 살아있는 세포 게이트를 라이브/데드 세포 생존율 염료 염색에 기초하여 결정하였다. 이어서, 이중선을 이전에 기재된 바와 같이 게이팅하였다. 살아있는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포 하위집단의 백분율을 세포 고갈에 대한 지표로서 계산하였다.
- [0403] 항체 용량 반응 곡선 피팅 분석
- [0404] 용량 반응 데이터를 그래프패드 프리즘 소프트웨어로 불러들이고, 로그 스케일로 변환시켰다. 다양한 기울기 모델에 의한 효능제 용량 반응을 사용하여 데이터를 곡선 피팅하고 EC50 값을 생성하였다. 피팅 식을 하기에 열거한다:
- [0405] $Y = \text{하부} + (\text{상부} - \text{하부}) / (1 + 10^{-(\text{LogEC50} - X) * \text{힐기울기}})$
- [0406] 결과
- [0407] 리드 뮤린 항 인간 ICOS 항체 확인
- [0408] 14종의 뮤린 mAb를 인간 및 시노물구스 ICOS 결합 및 효능제 활성화에 대해 스크리닝하였다. 12종이 재-클로닝될 수 있었고, 서열분석하고, 성장시키고, 기능적 연구를 위해 충분한 양으로 정제하였다. 모두 비아코어를 사용하여 결합 특징에 대해 시험하였다. 2종은 매우 약한/비-결합체인 것으로 발견되었다. 10종의 정제된 mAb를 기능적 "효능작용" 분석에 의해 시험하였다. 다종의 건강한 인간 공여자에 걸쳐 T 세포 증식 및 IFN-γ 시토카인 생산을 유도하는 그의 능력에 기초하여 4종의 최상의 효능제 mAb (하기 표 5에서 422.2, 279.1, 314.8 및 88.2로 지정됨)를 선택하고, 인간 IgG1 키메라로 제조하였다. 314.8, 88.2, 92.17, 145.1, 및 53.3에 대한 CDR 서열은 PCT/EP2012/055735 (WO 2012/131004)에서 다른 ICOS mAb에 의해 제시되어 있다.
- [0409] 클론 88.2에 대한 중쇄 가변 영역은 하기 서열식별번호: 13으로서 제시된다:
 QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYSFSTYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSYTNYNQMFKDKATLTVDKS
 SNTAYMQLTSPTESDSAVYYCTRWNLSYYFDNYYLDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:13)
- [0410]

[0411] 클론 88.2에 대한 경쇄 가변 영역은 하기 서열식별번호: 14로서 제시된다:

[0412] QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAAL
TITGAQTEDEAIYFCALWYNNHLVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:14)

[0413] 표 5: ICOS mAb 결합 및 경쟁

ICOS mAb 클론 #	비아코어 인간 (nM)	비아코어 시노 (nM)	CD28/CTLA4 x-반응성	ICOS-L 결합 억제	314.8에 대한 경쟁	121.4에 대한 경쟁
53.3	30.4	19.7	-	++	+	+
88.2	31	23	-	+	+	+
92.17	27.5	18.8	-	++	+	+
145.1	49.5	43.5	-	++	+	+
314.8	17	9.3	-	+++	+	+
121.4	15	58	-	-	-/+	-/+
202.24	46	19	-	+	+	+
279.1	39	33	-	+	+	+
293.1	7.6	10	-	++	+	+
422.2	5.7	4.46	-	++	++	+

[0414]

[0415] 최상의 ICOS 결합체 중 8종을 용량 증량 설계의 세포 기반 검정을 사용하여 마우스 IgG1 및 EPR7114 대조군 대비 IFN- γ 생산 및 T 세포 증식에 대해 시험하였다. 이들 검정에 기초하여, 422.2로 지정된 클론을 인간화를 위해 선택하였다. 도 1 및 2를 참조한다.

[0416] 실시예 3 항체 인간화

[0417] 실험 프로토콜(들)

[0418] mRNA로부터의 항체 가변 유전자의 회수 및 키메라 Fc 야생형 항체의 생성

[0419] 422.2 하이브리도마 세포 펠릿으로부터 총 RNA를 정제하고, 역전사시켜 cDNA를 생성하고, 그로부터 가변 유전자 산물, 대략 400bp를 PCR에 의해 단리하고, 아가로스 겔 전기영동에 의해 정제하였다.

[0420] 정제된 가변 영역 단편을 인간 IgG1 불변 영역 또는 인간 카파 불변 영역을 함유하는 pTT5 벡터 내로 클로닝하고, DH5 α 적격 세포를 형질전환시켰다. 콜로니를 골라내어 암피실린을 함유하는 L-브로쓰를 접종시키는데 사용하였다. 퀵라이스 미니-프랩(QuickLyse mini-prep) 키트를 사용하여 배양물로부터 플라스미드 DNA를 단리하였다. 가변 중쇄 및 경쇄 유전자를 서열분석하고, 서열 데이터를 정보학과 정렬시켜 가변 중쇄 및 경쇄 유전자 서열을 확인하였다.

[0421] 코돈 최적화된 키메라 422.2 항체의 클로닝

[0422] 성숙한 무린 가변 영역 단백질 서열을 DNA로 역번역한 다음 코돈 최적화하였다. 이어서 V_H 및 V_L 서열이 각각의 말단에 바람직한 5개의 프라임 비번역된 영역 및 바람직한 클로닝 부위를 포함하도록 변형시켰다. PCR-기반 전략 및 증첩 올리고뉴클레오티드를 사용하여 적합화된 V_H 서열을 신생 구축한 다음 pTT 벡터 내에 존재하는 인간 IgG1 Fc 야생형 또는 Fc 불능화 hIgG1 (L235A, G237A) 또는 힌지 안정화 hIgG4 (S228P, L235E) (IgG4PE) 상에 그래프팅시켰다. 적합화된 V_L 서열은 PCR-기반 전략 및 증첩 올리고뉴클레오티드를 사용하여 신생 구축한 다음 pTT5 벡터 내에 존재하는 카파 불변 영역 상에 그래프팅시켰다.

[0423] 생성된 pTT 플라스미드를 HEK 형질감염에 사용하여 키메라 항체를 생산하였다.

[0424] 422.2의 가변 도메인의 인간화

[0425] 422.2의 인간화를 위해 BLASTP를 사용하여 CDR-차폐된 422.2 V 영역을 갖는 적절한 사내 인간 배선 중쇄 및 경쇄 데이터베이스를 검색함으로써 인간 가변 (V) 유전자 주형을 선택하였다. 최상위 BLASTP 히트로부터 422.2 인간화를 위한 V 유전자 프레임워크 주형으로서 IGHV1-69 및 IGKV3-11을 선택하였다. 422.2의 인간화를 위해 IGHJ6 및 IGKJ2 인간 배선 연결 (J) 유전자를 선택하였다.

[0426] 복귀-돌연변이 (특정 인간 프레임워크 잔기를 무린 잔기로 변화시키는 돌연변이)의 선택을 돕기 위해 선택된 인간 배선 유전자와 422.2 서열 사이의 잔기 차이를 확인하였다. 6종의 인간화 V_H 변이체 및 6종의 인간화 V_L 변이체를 설계하고, 코돈 최적화한 다음 바람직한 5' 및 3' 연장을 포함하도록 변형시켰다. 적합화된 가변 영역

서열을 PCR-기반 전략 및 증첩 올리고뉴클레오티드를 사용하여 신생 구축한 다음 각각 pTT 벡터 내로 클로닝하였다.

[0427] 생성된 pTT 플라스미드를 HEK 형질감염에 사용하여 인간화 항체를 생산하였다. HEK2936E 현탁 세포를 계수하고, 0.05% 제네티신이 보충된, 및 일부 실험의 경우에는 1% 플루로닉 F68이 보충된, 프리스타일 발현 배지 293을 사용하여 1.5×10^6 개 세포/mL 내지 2×10^6 개 세포/mL로 희석하였다. DNA 및 형질감염 시약 (제미니 (Gemini) 또는 293-펙틴(293-Fectin))을 OptiMEM에 첨가하고, 서서히 균질화한 후, 실온에서 20 내지 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 DNA-지질 복합체를 세포 현탁액과 합하고, 형질감염된 세포를 37°C, 5% CO₂, 125rpm에서 인큐베이션하였다. 일부 형질감염의 경우에, 트립톤 공급물 (1% 플루로닉 F68 및 20% w/v 카세인 트립톤이 보충된 프리스타일 발현 배지 293)을 형질감염 24 내지 48시간 후에 각각의 형질감염에 첨가하였다. 형질감염된 세포 현탁액을 생존 세포가 60% 미만으로 하락할 때까지 5 내지 8일 동안 인큐베이션한 다음 원심분리하였다 (구축물 의존). 상청액을 수거하고 여과하였다.

[0428] 항체가 포획될 수 있도록 상청액을 1mL 하이트랩 단백질 A HP 칼럼을 통해 통과시키고, 칼럼을 10mL의 PBS로 세척하고, 5mL의 IgG 용리물 (피어스(Pierce), 21009)로 용리시켜 항체를 정제하였다. 밀리포어 센트리콘 (Millipore Centricon)® 원심분리 필터 유닛 (30K 컷-오프)을 사용하여 정제된 단백질을 PBS로 완충제 교환하고, 난드롭 분광광도계 상에서 정량화하였다.

[0429] 결과

[0430] 구축된 발현 플라스미드

[0431] 하이브리도마 클론 422.2의 무린 항체 가변 유전자 서열을 성공적으로 회수하였고, 서열을 하기에 각각 서열식 번호: 19 및 20으로서 뿐만 아니라 도 8에 제시한다.

422 HC

QVQLQQSGPELVRPAGESVKISCMGSGYFTFDYAMHWVKQSHAKSLEWIGLISIIYSDHTNYNQKFQKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCGRNNYGNYGWYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:19)

422 LC

ENVLTQSPAIMSASPGKEVTMTCSASSSVSYMHWYQKKSITSPKLWIYDTSKSLASGVPGRFSGSGNSYSLTIS SMEAEDVATYYCFQSGGYPYTFGGGKLEIKR (SEQ ID NO:20)

[0432] 회수한 가변 영역을 선택된 pTT5 벡터로 클로닝하여 422.2의 키메라 경쇄 서열 및 hIgG1 Fc 야생형, hIgG1 Fc 불능화 (L235A/G237A, EU 넘버링) 또는 hIgG4 PE (S228P/L235E, EU 넘버링)에 대한 키메라 중쇄 서열을 코딩하는 플라스미드가 생성되게 하였다. 키메라 항체를 사용하여 클로닝된 마우스 V-영역의 기능성을 확인하고, 가장 적합한 이소형을 식별하였다.

[0434] 422.2의 다양한 인간화 변이체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 pTT 포유동물 발현 플라스미드의 구축을 성공적으로 수행하였다.

[0435] H2L5 hIgG4PE의 발현, 정제 및 확인

[0436] H2L5 hIgG4PE의 성숙 단백질 서열은 도 9에 추가의 표지와 함께 포함되어 있다. H2L5 hIgG4PE 중쇄 및 경쇄의 코딩 영역의 DNA 서열은 도 10 및 11에 포함되어 있다.

[0437] 실시예 4: H2L5의 기능적 분석

[0438] Fc 수용체 결합

[0439] 항원 결합 단편 (Fab) 아암 교환을 방지하기 위해 인간화 항체 H2L5를 인간 IgG1 이소형으로부터 돌연변이 S228P, L235E (EU 넘버링)가 혼입된 변형된 인간 IgG4 이소형으로 변형시켰다. 인간 IgG4PE는 mAb가 활성화 Fc γ 수용체 및 C1q에 결합하는 것을 저하시키고, 따라서, mAb가 항체-의존성 세포독성 (ADCC) 또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)에 의해 ICOS 양성 세포의 고갈을 유도할 잠재력을 감소시키기 때문에 인간 IgG1에 우선하여 선택되었다. 또한, 인간 IgG4PE (S228P, L235E)는 Fc γ RIIb (역제 Fc γ 수용체)에 대한 결합을 보유한다. Fc γ RIIb와의 상호작용은 항체 가교를 가능하게 함으로써 ICOS 항체의 효능작용 활성화에 중요할 수 있다. Fc γ

RIIb와의 상호작용은 TNF- α 패밀리 수용체 뿐만 아니라 CD28을 표적화하는 다른 면역조정 항체의 효능작용 활성화에 중요한 것으로 제시된 바 있다 (Bartholomaeus P et al., "Cell contact-dependent priming and Fc interaction with CD32+ immune cells contribute to the TGN1412-triggered cytokine response." J. Immunol., 192(5); 2091-8 (2014)).

[0440] 인간 IgG4PE는 mAb가 활성화 Fc γ 수용체 (Fc γ RI, Fc γ RIIa 및 Fc γ RIIIa) 및 C1q에 결합하는 것을 저하시키고, 따라서 mAb가 항체-의존성 세포독성 (ADCC) 또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)에 의해 ICOS 양성 세포의 고갈을 유도할 잠재력을 감소시킨다는 것이 추가로 제시되었다. 또한, 인간 IgG4PE (S228P, L235E)는 Fc γ RIIb (역제 Fc γ 수용체)에 대한 결합을 보유한다 (표 6).

[0441] 하기 표 6은 hIgG1 또는 hIgG4PE 항체로서 리드 H2L5의 인간 Fc γ 수용체에 대한 대표적인 결합 친화도를 나타낸다.

[0442] 표 6: 인간 Fc γ 수용체에 대한, hIgG1 또는 hIgG4PE로서 리드 인간화 ICOS 항체의 대표적인 친화도

항체	Fc γ R I	Fc γ R IIa H131	Fc γ R IIa R131	Fc γ R IIb	Fc γ R IIIa V158	Fc γ R IIIa F158
	KD (nM)	KD (nM)	KD (nM)	KD (nM)	KD (nM)	KD (nM)
422 H2L5 IgG1 WT	60.8	405	662	1340	281	862
422 H2L5 hIgG4PE (H2L5 IgG4PE)	645	NB	2500	1470	NB	NB

[0443] NB = 결합 없음.
 [0444]

[0445] 실험 프로토콜

[0446] 422.2 인간화 변이체의 기능적 평가

[0447] 4종의 후보 ICOS 효능제 항체를 인간화하기 위해, 마우스 V 영역 및 인간 IgG1 Fc 부분의 융합인 마우스-인간 키메라를 생성하였다. 이들 4종의 키메라 항체를 인간 전체 PBMC 활성화 검정에서 플레이트 결합된 형태로서 시험하였다. 항-ICOS 키메라 422.2는 결합된 PBMC 활성화 검정에서 최상의 효능작용 활성을 제시하였다. 결합 데이터 및 생물물리학적 특성을 합하여, 인간화를 위해 422.2 클론을 선택하였다. 4종의 인간화 422.2 변이체를 ICOS 결합 및 생물물리학적 특징에 기초하여 선택하고 (422.2 H2L0, H2L5, H5L0 및 H5L5), 결합된 인간 PBMC 활성화 검정에서 시험하였다. H2L5 변이체는 시토카인 생산에 의한 측정 시 다른 변이체에 비해 대등하거나 보다 우수한 T 세포 활성화를 입증하였다 (도 3).

[0448] H5 변이체에 대한 중쇄 (V_H) 가변 영역 및 성숙한 중쇄를 하기에 각각 서열식별번호: 15 및 16으로서 제시한다.

[0449] H5 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGYTFDYMHWVRQAPGQGLEWIGLISLISYSDHTNYNQKFKQGRATMTVDKS
 TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRNNYGNYGWYFDVWGQGTFTVTVSS (SEQ ID NO:15)

[0450] 성숙한 H5 중쇄

QVQLVQSGAEVKNPFGSSVKVSKKASGYTFDYMHWVRQAPGQGLEWIGLISLISYSDHTNYNQKFKQGRATMTVDKS
 TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRNNYGNYGWYFDVWGQGTFTVTVSSASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPEVTVSWNSGALTSVHTFFAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDKKEPKSCD
 KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKARQGPREFQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
 K (SEQ ID NO:16)

[0451] L0 변이체에 대한 경쇄 (V_L) 가변 영역 및 성숙한 경쇄를 하기에 각각 서열식별번호: 17 및 18로서 제시한다.

[0452] L0 VL

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKFGQAPPELLLIYDTSKLASGIPARESGSGSGTDFTLTIS
 SLEPEDEFAVYYCFQGGSGYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:17)

[0453]

[0456] 성숙한 L0 경쇄

```
EIVLTPQSPATLSLSLSPGERATLSCSASSSVSYMRWYQQKPGQAPRLLIYDTSKILASGIPARFSGSGSGTDFTLTIS
SLEPEDFAVYXCFQGSYGYTFEGQGTKLEIKRPTVAAPSVEIFPPSPDEQLKSGTASVTVCLLNNFYFREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:18)
```

[0457]

[0458] 이소형으로서 IgG4[PE]의 선택

[0459] 후속해서 422 H2L5 IgG1을 다양한 전체 PBMC 활성화 검정에서 가용성 형태로 시험하였다. 이러한 가용성 포맷은 전체 PBMC 검정이 동일한 웰 내에 림프구, 단핵구 및 다른 면역 세포를 함유하기 때문에 생체내 조건과 보다 더 관련될 가능성이 있다. 그러나, 422 H2L5 IgG1 mAb는 T 세포 고갈을 연상시키는 T 세포 집단의 감소된 생존율을 일관되게 제시하였다. 이러한 결과는 시험한 11명의 건강한 공여자에서 상이한 정도로 관찰되었고, CD8+ T 세포에서보다 CD4+ T 세포에서 더 우세하였다. 대조적으로, 422 H2L5 항체는 IgG4[PE] 또는 Fc-불능화 이소형으로서 발현된 경우에 T 세포 생존율에서 유의한 감소를 제시하지 않았고, 이는 감소된 생존율이 Fc γ R-매개된 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)으로 인한 것일 수 있음을 시사한다 (도 4).

[0460] CD4+ T 세포 활성화 검정에서의 H2L5 hIgG4PE의 용량 반응

[0461] H2L5 hIgG4PE의 T 세포 활성화 효과를 정량화하기 위해, 인간 1차 CD4+ T 세포를 먼저 플레이트 결합된 항-CD3 (1 μ g/ml) / 항-CD28 (3 μ g/ml)에 의해 48시간 동안 사전-자극하여 T 이펙터 세포 집단의 표면 상에서 ICOS 수용체의 수준을 유도한 다음, 항 CD3 디나비즈 및 H2L5 hIgG4PE에 의해 재-자극하였다. 사전-자극한 CD4+ T 세포를 항-CD3 디나비즈의 존재 하에 연속 농도의 결합된 또는 가용성 H2L5 hIgG4PE로 처리하여 10-지점 용량 반응 곡선을 생성하였다. 결과는 결합된 및 가용성 H2L5 hIgG4PE 둘 다가 2명의 개별적인 건강한 인간 공여자에서 IFN- γ 및 TNF- α 시토카인 생산을 용량 의존성 방식으로 증가시킨다는 것을 제시하였다 (도 5). 용량-반응 곡선 피팅 분석을 수행하여 EC50 값을 생성하였다. 흥미롭게도, H2L5 hIgG4PE 처리는 항체를 플레이트-고정시킨 경우에, T 세포 배양물의 상청액에 가용성 단백질로서 첨가한 경우와 대조적으로, 유의하게 더 큰 규모의 시토카인 유도를 발생시켰다.

[0462] 가용성 인간 PBMC 활성화 검정에서의 H2L5 hIgG4PE의 기능 시험

[0463] 전체 인간 PBMC 생체의 배양물에서 H2L5 hIgG4PE의 기능을 시험하기 위해, 건강한 인간 공여자로부터의 PBMC를 플레이트 결합된 항-CD3 및 항-CD28로 48시간 동안 제조한 다음, 항 CD3 디나비즈의 존재 하에 3.5일 동안 가용성 H2L5 hIgG4PE 처리하였다 (비드:세포 = 1:1 비). T 세포 기능에 대한 기능적 관독으로서 시토카인 생산 및 T 세포 그랜자임 B 발현을 검사하였다. 3명의 공여자로부터의 결과를 도 6에 요약하였고, 이는 H2L5 hIgG4PE가 건강한 인간 공여자로부터의 활성화된 PBMC에서 증식, 시토카인 생산 및 증가된 세포독성 잠재력을 유도한다는 것을 시사하는 증거를 제공한다 (도 6).

[0464] 사전-자극된 인간 PBMC에 대한 ICOS mAb 활성화

[0465] PBMC를 플레이트 결합된 항-CD3 (클론 OKT3, 1 μ g/ml) 및 항 CD28 (클론 CD28.2, 3 μ g/ml)에 의해 48시간 동안 사전-자극하는 PBMC 사전-자극 검정에서 H2L5 hIgG4PE의 활성을 평가하였다. 다음으로, 최적 사전-자극 조건을 확인하기 위해, 인간 CD3 디나비즈 및 CD3/CD28 디나비즈 (썬모피셔(ThermoFisher))를 상이한 비드 대 세포 비로 사용하여 PBMC를 사전-자극하였다. 48시간 사전-자극 후에, 세포를 수거하고 비드를 자기적으로 제거한 후, 가용성 ICOS mAb의 존재 또는 부재 하에 항 CD3 디나비즈로 재-자극하였다 (비드 대 세포 비 = 1:1). H2L5 hIgG4PE ICOS 효능제 mAb는 시험된 모든 사전-자극 조건에서 이소형 대조군과 비교 시 IFN γ 의 유도를 발생시켰지만; IFN γ 생산의 규모는 사전-자극의 강도와 역으로 상관되었다.

[0466] 실시예 5 - T 세포 활성화 마커

[0467] 방법

[0468] 건강한 인간 PBMC를 0.1 μ g/mL 내지 100 μ g/mL 범위의 농도의 고정된 H2L5 hIgG4PE로 0.6 μ g/mL의 항-CD3 항체 처리와 공동으로 처리함으로써 기능적 종점에서의 농도-의존성 변화를 평가하였다. T 세포 표면 활성화 마커 CD69, OX40 및 CD25의 발현에서의 변화를 유동 세포측정법에 의해 평가하고, T 세포 활성화의 척도로 간주하였다. T 세포의 증식을 Ki67 핵 염색에서의 변화에 의해 측정하였다. 다양한 Th1, Th2 및 Th17 시토카인의 수준에서의 변화를 CD3 맞물림의 존재 하에 H2L5 hIgG4PE 처리에 대한 반응으로 MSD 플랫폼에서 평가하였다. 초

기 시토카인 변화 뿐만 아니라 증식 변화 둘 다의 포획을 확실하게 하기 위해 처리 후 24- 및 48-시간 시점을 선택하였고, 후자의 시점에서 우세하게 인지되었다.

[0469] 실험 제조(들)

[0470] 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 분리

[0471] 전혈을 건강한 공여자로부터 액체 나트륨 헤파린 (사겐트(Sagent) 10 IU/mL 최종 농도)으로 코팅된 시린지로 수집한 다음, 포스페이트 완충 염수 (PBS)로 1:1 희석하였다. 희석된 혈액 (35 mL)을 15 mL 피콜 밀도 구배 배지 (지이 헬스케어(GE Healthcare))의 상부에 적층하고, 1200 x g에서 20분 동안 실온 (RT)에서 브레이크 없이 원심분리하였다. 백색 단핵 세포 층을 새로운 50 ml 튜브로 조심스럽게 옮겼다. 동등 부피의 PBS를 튜브에 첨가하고, 400 x g에서 5분 동안 RT에서 원심분리하였다. PBMC를 PBS로 1회 세척하고, 이전에 기재된 바와 같이 원심분리하였다. PBMC를 50 mL AIM-V 배지 중에 재현탁시켰다. 바이-셀 세포 계수기 및 생존율 분석기 (베크만 쿨터)를 사용하여 세포를 계수하였다.

[0472] 항체 코팅

[0473] 항-인간 CD3 항체를 코팅 완충제 중에서 0.6 µg/mL의 최종 농도로 희석하였다. 100 µL 희석된 항체를 96-웰, 편평-바닥 플레이트 상에 4°C에서 밤새 코팅하였다. 다음 날, 10.1 mg H2L5 hIgG4PE 및 7.9 mg 항-RSV IgG4 PE 이소형 대조군 항체의 원액을 코팅 완충제 중에서 1:2 연속 희석하여 100 내지 0.1 µg/mL 범위의 최종 항체 농도를 제공하였다. 100 µL 희석된 항체를 항-CD3 코팅된 플레이트 상에 실온에서 4시간 동안 코팅하였다.

[0474] 실험 프로토콜(들)

[0475] 인간 PBMC 활성화 검정

[0476] 항-CD3 항체를 통한 TCR 맞물림 및 H2L5 hIgG4PE와의 ICOS 공-자극이 공동으로 일어나는 인간 PBMC 활성화 검정에서 H2L5 hIgG4PE를 시험하고, 활성화 효과를 활성화 24 및 48시간 후에 모니터링하였다. 이러한 실험을 4명의 상이한 공여자로부터의 혈액을 사용하여 4회 (n=4) 반복하였다. AIM-V 배지 중 200 µL PBMC (1x10⁶ 개 세포/mL)를 다양한 농도의 H2L5 hIgG4PE 또는 IgG4 이소형 대조군을 갖는 항-CD3 항체-코팅된 웰에 첨가하였다. 3회의 기술적 반복을 각각의 검정 조건에 포함시켰다. PBMC를 37°C 및 5% CO₂에서 상기 나타낸 바와 같은 다양한 시간 동안 배양하였다. 상청액을 24- 및 48-시간 시점에 수집한 다음 MSD 플랫폼 상에서의 분비된 시토카인의 분석을 위해 -80°C에서 저장하였다. 세포를 24 및 48시간 둘 다에 96-딥 웰 플레이트로 옮기고, 형광단-접합된 항체 또는 이소형 대조군으로 염색된 1 mL FACS 염색 완충제로 2회 세척하였다.

[0477] 세포 표면 염색

[0478] 세포를 먼저 PBS 중 1:1000으로 사전-희석된 고정가능한 생존율 염료 이플루오르(eFluor) 506 100 µL로 암실에서 4°C에서 30분 동안 염색하였다. 세포를 세척한 다음 상이한 형광단에 접합된 세포 표면 마커에 대한 검출 항체와 병상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포 표면 항체에 의한 염색-후, 내재화 마커에 대해 염색되지 않은 샘플을 병행 FACS 염색 완충제로 1회 세척한 후 FACS 칸토 II 유동 세포측정기 상에서 전개시켰다.

[0479] 세포측정기 성능은 세포측정기 셋-업 및 트레이킹 비드를 사용하여 매일 적절하게 평가하였다. 각각의 형광색소와 접합된 검출 항체에 의해 개별적으로 염색된 AbC 항-마우스 비드 키트를 사용하여 보상을 수행하였다. 샘플을 전개시키고 상기 언급된 비드 믹스를 사용하여 적절한 보상 셋업을 확인한 후에 데이터를 획득하였다.

[0480] Foxp3 및 Ki67에 대한 세포내 염색

[0481] 세포 표면 염색 후, 세포를 고정하고, 세포내 마커에 대한 염색을 위해 투과화하였다. 전사 인자 완충제 세트를 사용하여, 이것을 희석 완충제 중에 1:3으로 희석함으로써 고정/투과화 완충제를 제조하였다. 5X 투과화/세척 완충제 스톱을 탈이온수 중에 희석함으로써 투과화 세척 완충제를 제조하였다. 1 mL의 고정/투과화 완충제를 각각의 샘플에 첨가하고, 플레이트를 진탕기 상에서 즉시 볼텍싱하였다. 플레이트를 암실에서 4°C에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 원심분리 후에, 1 mL의 투과화/세척 완충제를 첨가하고, 총 2회의 세척 동안 플레이트를 혼합 및 원심분리하였다. 마커 항체와 함께 내재화 각테일을 제조하였다. 100 µL의 내재화 항체를 적절한 샘플에 첨가하고, 플레이트를 암실에서 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 1 mL의 투과화 세척 완충제로 2회 세척하고, 250 µL의 유동 완충제 중에 재현탁시키고, FACS 칸토 II 유동 세포측정기 상에서 전개시켰다.

- [0482] 인간 스페셜 오더 9-플렉스 시토카인 검정
- [0483] MSD 인간 스페셜 오더 9-플렉스 키트를 사용하여 시토카인 수준을 측정하였다. 샘플 및 보정물을 딜루언트 43 중에 희석시켰다. 샘플을 희석제 0.250 μ L 중에 9-플렉스 검정의 경우에 1:10으로 및 기재된 IFN γ 검정의 경우에 1:200으로 희석하고, 2개의 보정물 패널 각각에 첨가하였다. 볼텍싱 후에, 보정물을 빙상에서 적어도 5분 동안 인큐베이션하였다. 200 μ L의 각각의 보정물 패널을 400 μ L의 희석제에 첨가하여 최고 농도의 보정물을 제조하고, 1:4 연속 희석을 사용하여 6개의 추가의 보정물 희석을 제조하였다. 딜루언트 43은 플레이트 배경으로서 사용하였다. 50 μ L의 희석된 샘플 (삼중으로) 및 보정물 (이중으로)을 MSD 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고, RT에서 2시간 동안 진탕하면서 인큐베이션하였다. 플레이트를 키트로부터의 희석된 MSD 세척 완충제 150 μ L로 3회 세척하였다. 각각의 플레이트에 대해, 60 μ L의 각각의 9종의 검출 항체를 딜루언트 3과 3mL가 되도록 합하여 검출 항체 용액을 제조하였다. 25 μ L의 검출 항체 용액을 첨가한 후에, 플레이트를 밀봉하고, 실온, 암실에서, 2시간 동안 진탕하면서 인큐베이션하였다. 플레이트를 상기와 같이 세척하였다. 150 μ L의 2x 판독 완충제를 플레이트에 첨가하고, 이들을 퀵플렉스(QuickPlex) 상에서 판독하였다.
- [0484] 인간 IFN γ 시토카인 검정
- [0485] 샘플 및 보정물을 딜루언트 2 중에서 희석시켰다. 희석제 1 mL를 보정물에 첨가하였다. 볼텍싱한 후에, 보정물을 빙상에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 이것은 보정물 1이다. 1:4 연속 희석을 사용하여 6종의 추가의 보정물 희석을 제조하였다. 딜루언트 2는 플레이트 배경으로서 사용하였다. 50 μ L의 희석된 샘플 (삼중으로) 및 보정물 (이중으로)을 MSD 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고, RT에서 2시간 동안 진탕하면서 인큐베이션하였다. 플레이트를 키트로부터의 희석된 MSD 세척 완충제 150 μ L로 3회 세척하였다. 검출 항체 용액을 딜루언트 3 중에서 제조하였다. 각각의 플레이트에 대해, 총 3mL의 검출 시약을 위해 60 μ L의 각각의 검출 항체를 희석제에 첨가하였다. 25 μ L의 검출 항체를 첨가한 후에, 플레이트를 밀봉하고, 실온, 암실에서, 2시간 동안 진탕하면서 인큐베이션하였다. 플레이트를 3회 세척하였다. 판독 완충제를 플레이트에 첨가하고, 이들을 퀵플렉스 상에서 판독하였다.
- [0486] 데이터 분석
- [0487] 시토카인 및 유동 세포측정법 데이터 분석
- [0488] MSD 시토카인 검정의 결과를 MSD 디스커버리 워크벤치 소프트웨어, 버전 4.0 (메소-스케일), 마이크로소프트 엑셀, 및 그래프패드 프리즘을 사용하여 분석하였다. 유동 세포측정법 데이터를 디바이에 의해 분석하고, 그래프패드 프리즘 소프트웨어에서 수를 플롯팅하였다.
- [0489] 항체 용량-반응 곡선 피팅 분석
- [0490] 용량 반응 데이터를 그래프패드 프리즘 소프트웨어로 불러들이고, 로그 스케일로 변환시켰다. 다양한 기울기 모델에 의한 효능제 용량 반응을 사용하여 데이터를 분석하고, EC50 값을 생성하였다. 피팅 식을 하기에 열거한다:
- [0491]
$$Y = \text{하부} + (\text{상부} - \text{하부}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{힐기울기}))}$$
- [0492] 통계적 분석
- [0493] 증식 연구에서의 H2L5 hIgG4PE 및 이소형 항체 대조군 값 사이의 차이를 2-대응표본 스튜던트 t 검정에 의해 통계적 유의성에 대해 분석하였다.
- [0494] 결과
- [0495] H2L5 hIgG4PE에 의한 시토카인 변화의 평가
- [0496] PBMC를 항-CD3의 존재 하에 고정된 H2L5 hIgG4PE로 처리하는 것은 Th1 시토카인 예컨대 IFN γ , TNF α , Th2 시토카인, IL-6 및 IL-10, 뿐만 아니라 Th17 시토카인 IL-17a의 분비를, 상이한 정도로, 농도-의존성 방식으로 유도하였다. 측정된 다른 시토카인 예컨대 IL-4, IL-5 및 IL-13도 또한 H2L5 hIgG4PE 자극에 대해 더 낮은 정도의 농도-의존성 반응을 제시하였다. 4명의 개별 공여자로부터의 결과를 표 7에 요약한다.
- [0497] 유동 세포측정법에 의한 T 세포 활성화의 세포 표면 마커에 대한 H2L5 hIgG4PE 활성화의 기능 평가
- [0498] 비활성화된 인간 PBMC (n=4 공여자)에서 공동 CD3 자극과 함께 H2L5 hIgG4PE 처리는 T 세포 활성화 마커에서 유의한 변화를 유도하였다 (표 7 및 8). CD25 및 OX40 양성 CD4 및 CD8 T 세포에서의 강력한 증가가 인간 IgG4

이소형 대조군 샘플과 비교하여 H2L5 hIgG4PE 처리된 샘플에서 관찰되었다. CD69 양성 CD4 및 CD8 T 세포의 퍼센트가 또한 24- 및 48-시간 시점에 농도-의존성 방식으로 증가하였다.

[0499] T 세포 증식에 대한 H2L5 hIgG4PE의 효과의 특징화

[0500] 공동 CD3 활성화와 함께 고정된 H2L5 hIgG4PE 처리는 세포내 Ki67 염색에 의한 측정 시 CD4 및 CD8 T 세포 증식률 다에서 (n=6 공여자) 농도-의존성 증가를 발생시켰다 (표 8). H2L5 hIgG4PE는 또한 CD4+CD25+Foxp3+ 조절 T 세포 증식을 농도 의존성 방식으로 증가시켰지만 총 CD4 및 CD8 T 세포에 의해 관찰된 것보다 더 적은 정도로 증가시켰다. H2L5 hIgG4PE에 의한 T 세포 증식의 증진은 단지 48시간 시점에서만 관찰되었다. 조절 T 세포의 증가된 증식은 유의하지 않은 반면에, 증식 중인 CD4+ 세포 (p < 0.05, 0.4 µg/mL 초과 농도의 H2L5 hIgG4PE의 경우) 및 CD8+ T 세포 (p < 0.05, 0.2 내지 1.6 µg/mL의 농도의 경우)에서의 농도-의존성 증가는 유의하였다 (표 7 참조).

[0501] 표 7. 인간 PBMC 활성화 검정에서 H2L5 hIgG4PE에 대한 모든 기능적 종점으로부터의 EC50 값 (µg/mL).

	공여자_1136F50		공여자_185M45		공여자_1124F36		공여자_1149M52	
	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
IL-10	1.7	1.3	0.7	0.8	0.7	0.6	0.5	0.6
IFN-γ	0.4	1.5	0.3	0.7	0.3	0.5	0.2	0.6
IL-17a	1.4	1.6	0.8	1.1	0.6	0.8	0.7	1.0
IL-6	0.7	1.1	0.7	0.8	NA	NA	0.2	0.3
TNF-α	NA	0.3	NA	0.5	NA	0.3	NA	0.2
CD4+CD69+	0.5	0.4	0.8	NA	1.1	1.1	0.5	0.4
CD4+CD25+	0.3	0.6	2.4	0.5	0.6	0.6	0.6	0.4
CD4+OX40+	0.2	0.4	1.6	NA	0.6	1.2	0.6	0.4
CD8+CD69+	0.5	0.6	1.2	0.5	0.8	1.1	0.6	0.4
CD8+CD25+	0.4	0.7	2	0.5	0.6	0.5	1.0	0.4
CD8+OX40+	0.3	0.5	1.6	NA	2.4	0.5	1.5	0.3
CD4+Ki67+	NT	NT	NA	0.6	NA	0.8	NA	0.5
CD8+Ki67+	NT	NT	NA	0.4	NA	0.7	NA	0.3

[0502] NA = 분석되지 않음 (불량한 곡선 피팅으로 인해 EC50 값이 정확하지 않음).

[0504] NT = 시험되지 않음.

[0505] 표 8. 항-CD3의 존재 하에 H2L5 hIgG4PE에 의한 48시간 동안의 자극 후 인간 PBMC에서의 CD25, Foxp3 및 Ki67 양성 CD4 또는 CD8 T 세포의 퍼센트

	항체 농도	H2LA hIgG4PE (CD4 또는 CD8 T 세포의 %)			이소형 대조군 (CD4 또는 CD8 T 세포의 %)			T검정
	µg/ml	공여자 185M45	공여자 1124F36	공여자 1149M52	공여자 185M45	공여자 1124F36	공여자 1149M52	(p 값)
%Treg CD4 T 세포	0	10.2	3.8	6.1	10.2	3.8	6.1	0.415
	0.1	12.4	4.2	7.6	8.6	3.6	6.6	0.220
	0.2	11.8	4.5	9.8	8.5	3.2	7.1	0.054
	0.4	14.3	5.2	11.3	8.6	3.4	7.4	0.076
	0.8	18.6	6.9	14.3	8.4	3.4	7.3	0.069
	1.6	21.4	7.5	15.9	7.7	3.8	7.2	0.095
	3.1	20.8	7.9	15.0	10.4	3.9	7.1	0.058
	6.3	18.7	8.3	14.7	10.3	3.6	8.3	0.026
	12.5	20.2	7.6	15.1	9.6	4.0	8.1	0.072
	25	19.5	7.6	13.9	11.5	5.1	8.3	0.079
50	20.0	7.9	13.3	9.6	5.0	9.7	0.143	
100	18.7	7.9	13.3	11.5	5.6	8.8	0.080	
%Ki67+ CD4 T 세포	0	7.2	1.2	2.3	7.2	1.2	2.3	0.693
	0.1	9.6	1.5	2.9	6.1	0.9	2.1	0.219
	0.2	9.0	2.1	4.4	5.0	0.9	2.4	0.098
	0.4	11.9	3.9	7.5	6.8	1.0	2.7	0.025
	0.8	18.2	7.1	12.4	7.6	1.3	2.5	0.028
	1.6	19.5	8.9	15.9	5.4	0.8	3.2	0.024
	3.1	21.1	10.7	14.4	9.1	1.2	2.9	0.005
	6.3	18.7	12.6	17.1	8.1	1.1	3.2	0.007
	12.5	22.2	12.2	16.5	7.4	1.5	3.4	0.008
	25	20.7	11.6	16.1	9.3	1.7	5.2	0.002
50	21.2	12.8	14.3	7.5	2.4	7.3	0.034	
100	21.8	12.0	14.0	9.4	2.8	4.7	0.010	
%Ki67+ CD8 T 세포	0	11.0	4.4	2.7	11.0	4.4	2.7	0.841
	0.1	15.2	8.3	4.8	9.6	5.3	2.3	0.061
	0.2	13.5	10.9	7.8	8.2	3.8	2.9	0.014
	0.4	17.4	14.4	11.3	10.1	3.4	4.3	0.023
	0.8	20.7	19.6	13.8	14.2	4.5	2.0	0.047
	1.6	22.2	22.8	16.1	10.7	4.0	3.7	0.025
	3.1	21.8	26.7	13.6	14.5	4.4	3.0	0.099
	6.3	20.2	29.8	16.0	10.8	3.3	5.0	0.103
	12.5	21.7	29.6	15.6	10.7	4.1	3.4	0.074
	25	20.0	28.7	14.6	10.4	6.1	5.0	0.084
50	19.0	31.4	13.5	7.6	5.1	5.5	0.114	
100	19.2	27.4	13.4	7.9	7.1	3.5	0.051	
%Ki67+ Treg 세포	0	29.7	10.2	11.3	29.7	10.2	11.3	0.920
	0.1	32.8	12.5	14.4	32.4	10.0	12.3	0.127
	0.2	33.0	14.8	19.0	30.3	8.3	13.4	0.051
	0.4	33.6	22.2	22.2	28.4	10.8	14.1	0.044
	0.8	37.0	26.3	26.3	36.7	8.5	14.4	0.191
	1.6	35.0	27.7	28.4	26.8	7.7	16.3	0.061
	3.1	38.3	30.2	27.2	33.9	9.6	17.4	0.135
	6.3	33.9	32.5	26.1	36.7	8.7	16.5	0.315
	12.5	37.3	36.8	26.2	31.2	15.1	17.2	0.125
	25	36.3	33.0	28.6	33.3	13.7	28.1	0.326
50	37.7	33.6	24.2	32.9	21.1	29.5	0.518	
100	40.1	35.8	28.6	36.3	21.5	26.4	0.216	

[0506]

[0507]

논의

[0508]

ICOS는 T 세포 활성화 및 Th1 및 Th2 시토카인 둘 다의 유도에 중요한 것으로 널리 확립되어 있다. 본 연구에서, H2L5 hIgG4PE (항-ICOS 효능제 항체)의 시험관내 활성이 T 세포 활성화 및 시토카인 유도의 다양한 척도에 의해 입증되었다. 모든 측정된 T 세포 활성화 마커, CD25 (IL-2 수용체 알파-쇄), CD69 (초기 활성화 마커) 및 OX-40 (공동-자극 마커)은 CD3 자극과 함께 H2L5 hIgG4PE에 의한 처리 시 상향조절되었다. 모니터링한 활성화 마커 중에서, CD69 및 OX40을 발현하는 T 세포의 퍼센트는 H2L5 hIgG4PE 처리에 의해 강력하게 증가하였다. CD69는 초기 활성화 마커로, 따라서 효과는 24-시간 샘플에서 우세하였다. 또 다른 중요한 T 세포 활성화 마커인 CD25는 둘 다의 시점에서 H2L5 hIgG4PE에 의한 처리 시 증가하였고, 이는 H2L5 hIgG4PE가 T 세포의 활성화를 유지시키는데 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. Ki67은 세포 증식과 연관된 핵 단백질이다. Ki67 세포내 염색에 의한 유동 세포측정 데이터는 고정된 H2L5 hIgG4PE가 TCR 맞물림과 관련하여 CD4 및 CD8 T 세포 증식 둘 다를 유의하게 증진시킨다는 것을 제시하였다. 조절 T 세포의 증식이 또한 H2L5 hIgG4PE에 의해 증가되었지만, 변화는 통계적으로 유의하지 않았다.

[0509]

인간 Th17 세포는 항종양 면역의 조절에 있어서 주요 역할자이다 [Nunez, S., et al., T helper type 17 cells

contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour. *Immunology* 2013; 139: 61-71]. 연구는 ICOS가 인간 Th17 발생 및 기능에 수반된다는 것을 제시한다 [Kimura, A., et al., Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol.* 2010; 40: 1830-1835; Paulos CM et al. The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human Th17 cells. *Sci Transl Med.* (2010) 2(55); 55ra78; Nelson, M. H., et al. The inducible costimulator augments Tc17 cell responses to self and tumor tissue. *J Immunol.* 2015; 194: 1737-1747]. H2L5 hIgG4PE의 현행 기능 평가에서, 염증 및 면역 반응과 관련된 대부분의 시토카인이 항-CD3 및 H2L5 hIgG4PE 자극 후에 세포 배양물의 상청액에서 측정되었다. H2L5 hIgG4PE는 인간 PBMC에서 Th1 시토카인, IFN- γ 및 TNF- α 및 Th17 시토카인, IL-17a의 분비를 강력하게 유도하였고, 이는 H2L5 hIgG4PE가 항종양 반응에서 중요한 역할을 하는 잠재력을 갖는다는 것을 시사한다. IL-6은, TGF- β 와 함께, 나이브 T 세포로부터 Th17 세포 발생의 유도를 위해 중요한 시토카인이다. 대조적으로, IL-6은 TGF- β 에 의해 유도되는 Treg 분화를 억제한다 [Kimura, A., 2010; Korn, T., et al., IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3⁺ regulatory T cells. *PNAS*, 2008; 105: 18460-18465]. 본 연구에서, H2L5 hIgG4PE는 Th17 세포 발생을 추가로 증진시킬 수 있는 IL-6의 분비를 증가시키는 것으로 발견되었다. T 세포 수용체 예컨대 CD28 및 TNF 수용체 패밀리를 구성원의 효능제 항체는 종형상의 용량 반응 곡선을 생성하는 것으로 제시된 바 있다 [White, A. L., et al., Conformation of the Human Immunoglobulin G2 Hinge Imparts Superagonistic Properties to Immunostimulatory Anticancer Antibodies. *Cancer Cell*, 2015, 27: 138-148; Luhder, F., et al., Topological Requirements and Signaling Properties of T Cell-activating, Anti-CD28 Antibody Superagonists. *J. Exp. Med.* 2003: 955-966; Stebbings, R., et al., "Cytokine Storm" in the Phase I Trial of Monoclonal Antibody TGN1412: Better Understanding the Causes to Improve PreClinical Testing of Immunotherapeutics *J. Immunol.*, 2007, 179: 3325-3331; Rogers PR and Croft M, CD28, Ox-40, LFA-1, and CD4 Modulation of Th1/Th2 Differentiation Is Directly Dependent on the Dose of Antigen. *J Immunol* 2000 164:2955-2963; doi:10.4049/jimmunol.164.6.2955]. H2L5 hIgG4PE는 또한 유사한 과장된 기능적 반응 곡선을 입증하였다. 이러한 정보는 최적 약역학적 반응을 위해 사용할 항체의 최상의 용량 범위를 확인하는데 있어서 중요한 사항이다.

- [0510] 전체적으로, H2L5 hIgG4PE는, CD3 자극과 함께, T 세포 공동-자극 수용체의 강력한 활성화제로서의 그의 역할에 따라 T 세포 활성화, 증식 및 염증유발 시토카인 유도를 증진시키는 것으로 제시되었다.
- [0511] 실시예 6: 항-ICOS 항체의 결합
- [0512] 인간화 프로토콜 (실시예 3)로 36종의 중쇄 및 경쇄 변이체를 생산하였고, 이것을 인간 및 시노몰구스 ICOS에의 결합에 대해 스크리닝하는 한편, 또한 인간 CD28 또는 CTLA-4에는 결합하지 않는다는 것을 확실하게 하였다. H2L5 변이체가 최소 수의 복귀 돌연변이를 함유하면서 인간 및 시노몰구스 ICOS에 대해 높은 친화도 (각각 1.34 및 0.95nM)를 갖는다는 것을 확인하였다.
- [0513] 422 H2L5의 이소형을 IgG1로부터 IgG4PE로 변화시키는 것은, H2L5 hIgG4PE가 인간 ICOS에 대해 1.3nM의 친화도를 가지므로, 항체의 항원 결합에 영향을 미치지 않는다. H2L5 hIgG4PE에 의한 ICOS/ICOS-L 결합의 농도 기반 억제도를 도 7에 제시한다.
- [0514] 실험 프로토콜
- [0515] 인간 ICOS에 대한 H2L5 hIgG4PE의 결합
- [0516] 인간화 H2L5 hIgG4PE 항체의 결합 동역학 친화도를 표면 상에 포획된 CM5 칩 항-ICOS H2L5 hIgG4PE의 Fc2에 대한 비아코어 T200항-인간 IgG를 사용하여 결정하였다. 항-인간 IgG 표면은 토끼 Fc의 비-특이적 결합을 방지하기 위해 0.1mg/mL hIgG1 대조군으로 차단하였다. 인간 및 시노 ICOS (토끼 Fc)를 포획된 항체 위로 256 nM, 64 nM, 16 nM, 4 nM 및 1 nM로 통과시켰다. 완충제를 단독으로 사용하여 참조 결합 곡선을 두 배로 만들었다. 표면을 재생시키는데 MgCl₂를 사용하였다. 25°C에서 전개시켰다. 데이터를 T200 평가 소프트웨어를 사용하여 1:1 모델에 피팅시켰다. 항체 농도: 2.5 μ g/mL
- [0517] 결과
- [0518] 인간 및 시노몰구스 ICOS에 대한 H2L5 hIgG4PE의 결합
- [0519] 인간화 H2L5 hIgG4PE 항체의 결합 동역학 친화도를 비아코어 T200을 사용하여 결정하였다.

[0520] ICOS 결합 데이터를 T200 데이터 분석 소프트웨어를 사용하여 1:1 동역학적 모델에 피팅시켰다.

[0521] 인간 ICOS에 대한 H2L5 hIgG4PE의 결합 친화도는 1.34nM이었고 시노물구스 ICOS는 0.95nM이었다 (표 9 참조). 이들 값은 대등하였고, 이는 예상된 바와 같이, 분자의 Fc 영역에 대한 변화가 ICOS 항원에 대한 결합에 영향을 미치지 않는다는 것을 제시한다.

[0522] 표 9는 인간 및 시노물구스 ICOS에 대한 인간화 422 (H2L5) IgG4PE에 대한 Ka/Kd/KD를 제시한다.

[0523] 표 9 인간 ICOS에 대한 결합

샘플	표적	Ka(1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
422 H2L5 IgG4PE	인간 ICOS -Fc	2.97E+05	3.96E-04	1.34E-09
422 H2L5 IgG4PE	시노 ICOS-Fc	3.91E+05	3.71E-04	9.49E-10

[0524]

[0525] 논의

[0526] 실시예 1에 제시된 바와 같이, 무린 클론 422-2가 리드 항-인간 ICOS 무린 항체로서 확인되었다. 이러한 항체의 인간화는 36종의 중쇄 및 경쇄 변이체를 생산하였고, 이것을 인간 및 시노물구스 ICOS에의 결합에 대해 스크리닝하는 한편, 또한 이들이 인간 CD28 또는 CTLA-4에는 결합하지 않는다는 것을 확실하게 하였다. H2L5 변이체가 최소 수의 복귀 돌연변이를 함유하면서 인간 및 시노물구스 ICOS에 대해 높은 친화도 (각각 1.34 및 0.95nM)를 갖는다는 것을 확인하였다.

[0527] 이소형을 IgG1로부터 IgG4PE로 변화시키는 것은 ICOS에 대한 항체의 결합에 영향을 미치지 않는다.

[0528] 실시예 7: 인간 활성화된 T 세포에 대한 H2L5 hIgG4PE의 결합

[0529] 방법

[0530] 실험 제조(들)

[0531] CD3 음성 단리:

[0532] CD3+ T 세포를 스텝셀 로제트 셉 인간 T 세포 풍부화 키트에 의해 음성적으로 단리하였다

[0533] 로제트 셉 인간 T 세포 풍부화: 100 mL 신선한, 전혈을 액체 나트륨 헤파린 (사젠트 10 IU/mL 최종 농도)으로 코팅된 시린지로 수집하였다. 각각의 수집 튜브로부터의 혈액을 플라스크로 합하고, 여기에 50 µL의 로제트 셉 인간 T 세포 풍부화 카테일을 혈액 ml당 첨가하였다. (5 mL/100 mL 공여자 혈액). 전혈/로제트 셉 항체 카테일을 실온 (RT)에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 혈액/로제트 셉 항체 카테일을 1x 포스페이트 완충염수 (PBS) + 2% FBS(태아 소 혈청)로 1:1 희석하였다. 200mL의 최종 부피를 위한 FBS. 다음으로, 25mL의 희석된 혈액/항체 카테일을 이어서 셉메이트 튜브 (각각의 공여자에 대해 총 8개의 튜브) 내의 15mL의 피콜 구배 상에 적층하였다. 이어서 로딩된 셉메이트 튜브를 1200 x g에서 20분 동안 RT에서 브레이크 온으로 원심분리하였다. 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 계면에 이르기까지의 혈장의 상부 층을 피펫으로 취출하여 폐기하였다. 남은 혈장 및 백혈구 연층 계면을 셉메이트 튜브로부터 50mL 원추형 원심분리 튜브 (총 4개의 튜브) 내로 가만히 따랐다. 튜브를 PBS + 2% FBS로 50mL까지 채웠다. 세포를 400 x g에서 10분 동안 RT에서 원심분리하였다. 상청액을 폐기하였다. 이어서 각각의 공여자로부터의 펠릿을 단일 50mL 원추형 튜브 내로 합하고, 펠릿을 총 부피 50mL PBS + 2% FBS 중에 재현탁시켰다. 세포를 400 x g에서 5분 동안 RT에서 원심분리하였다. 상청액을 폐기하고, 세포 펠릿을 2mL의 RPMI 완전 배지 (RPMI 1640 + 10% FCS + 1mM 피루브산나트륨 + 2mM L-글루타민 + 페니실린 100U/mL + 스트렙토마이신 100 µg/mL) 중에 재현탁시켰다. 회수된 CD3 세포를 바이셀 기기 상에서 계수하고, 추가로 1.2x10⁶개 세포/mL로 희석하였다. 1x10⁶개의 회수된 세포를 CD3 PE-Cy7에 대해 염색하여 T 세포 단리의 품질을 확인하였다.

[0534] CD3+ T 세포를 인비트로젠 무핵순 T 세포 단리 키트에 의해 음성적으로 단리하였다

[0535] PBMC 단리: 간략하게, 100mL 신선한, 전혈을 액체 나트륨 헤파린 (사젠트 10 IU/mL 최종 농도)으로 코팅된 시린지로 각각의 공여자로부터 수집하였다. 2%FBS를 함유하는 PBS로 혈액을 최종 부피 200mL로 희석하였다 (1:1). 25 mL의 희석된 혈액을 셉메이트 튜브 (각각의 공여자에 대해 총 8개의 튜브) 내의 15 mL의 피콜 구배 상에 적층하였다. 이어서 로딩된 셉메이트 튜브를 1200 x g에서 20분 동안 RT에서 브레이크 온으로 원심분리하였다.

PBMC 계면에 이르기까지의 혈장의 상부 층을 피펫으로 취출하여 폐기하였다. 남은 혈장 및 백혈구 연층 계면을 섀메이트 튜브로부터 50mL 원추형 원심분리 튜브 (총 4개의 튜브) 내로 가만히 따랐다. 튜브를 PBS + 2% FBS로 50 mL까지 채웠다. 세포를 400 x g에서 10분 동안 RT에서 원심분리하였다. 상청액을 폐기하였다. 이어서 각각의 공여자로부터의 펠릿을 단일 50mL 원추형 튜브 내로 합하고, 총 부피 50mL PBS + 2% FBS 중에 재현탁시켰다. 세포를 400 x g에서 5분 동안 RT에서 원심분리하였다. 상청액을 폐기하고, 세포 펠릿을 인비트로젠 무핵손 T 세포 키트에 제공된 단리 완충제의 임의의 부피 (세포 펠릿의 크기에 의존함)에 재현탁시켰다. 이어서 단리된 PBMC를 바이셀 기기 상에서 계수하고, 단리 완충제 중 1×10^8 개 세포/mL의 최종 농도가 되게 하였다.

[0536] 인비트로젠 디나비드 무핵손 인간 T 세포 단리: 2×10^8 개의 단리된 PBMC (2mL), 400 μ l의 FBS 및 이어서 인비트로젠 무핵손 T 세포 키트로부터의 400 μ l의 항체 믹스를 각각의 15mL 튜브에 첨가하고, 4°C에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 10mL의 단리 완충제로 세척하고, 350 x g에서 8분 동안 4°C에서 원심분리하였다. 상청액을 폐기하고, 펠릿을 2mL의 단리 완충제 중에 재-현탁시켰다. 다음으로, 2mL의 사전-세척한 고갈 디나비즈를 각각의 튜브에 첨가하였다. 세포를 비드와 함께 완만하게 기울여 회전시키면서 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 비드 인큐베이션 후, 단리 완충제 10mL를 첨가하고, 세포/비드 현탁액을 위 아래로 10회 피펫팅하였다. 튜브를 실온에서 2분 동안 자기 중에 두었다. 자화된 비드를 건드리지 않고, 무핵손 T 세포를 함유하는 상청액을 수집하였다. 비드를 10mL의 단리 완충제로 1회 세척하고, 다시 자기 중에 2분 동안 실온에서 두고, 비드-소거된 완충제를 수집하였다. 수집된 세포를 400 x g에서 5분 동안 RT에서 원심분리하였다. 상청액을 폐기하고, 세포 펠릿을 세포 펠릿 크기에 의존한 임의의 부피의 RPMI 완전 배지 (2 내지 35mL) 중에 재-현탁시켰다. 회수된 CD3+ 세포를 이어서 바이셀 상에서 계수하고, RPMI 완전 배지 중 1.2×10^6 개 세포/mL의 농도가 되게 하였다.

[0537] CD3 확인 염색: 1×10^6 개의 회수된 세포를 5 μ l 항- CD3 PE-Cy7 또는 5 μ l IgG1 Pe-Cy7 이소형으로 4°C에서 40분 동안 암실에서 염색하였다. 이어서 세포를 0.1% 트윈20을 함유하는 빙냉 PBS 중에서 2회 세척하고, 400xg에서 5분 동안 4°C에서 원심분리하였다. 염색된 세포를 1% 포르말데히드 중에 재현탁시키고, 4°C에서 20분 동안 암실에서 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 0.1% 트윈20을 함유하는 빙냉 PBS 중에서 2회 세척하고, 400xg에서 5분 동안 4°C에서 원심분리하고, 0.1% 트윈20을 함유하는 PBS 275 μ l 중에 재현탁시켰다. T 세포 단리의 품질을 확인하기 위해 유동 세포측정법을 수행할 때까지 고정된 세포를 4°C에서 암실에서 저장하였다.

[0538] 단리된 인간 T 세포의 활성화:

[0539] T75 플라스크를 PBS 중 1 μ g/ml CD3/CD28 4 mL로 37°C에서 2시간 동안 코팅하였다. 플라스크를 PBS 12 mL로 2회 세척하였다. T75 플라스크당 RPMI 완전 배지 25mL 중 30×10^6 개의 세포를 첨가하였다. 세포를 37°C, 5% CO₂ 에서 48시간 동안 인큐베이션하여 활성화가 일어나도록 하였다.

[0540] 항-ICOS (H2L5 hIgG4PE)의 결합:

[0541] H2L5 hIgG4PE의 결합을 나이브 및 활성화된 CD3+ T 세포 둘 다에서 평가하였다. 0.00128로부터 100 μ g/mL H2L5 hIgG4PE까지의 5배 희석에 의한 8-점 적정을 사용하였다.

[0542] 나이브 및/또는 활성화된 CD3+ T 세포를 인간 FcR 차단 용액을 함유하는 0.1% BSA 포함 PBS (FACS 완충제) 중에 2×10^6 개 세포/mL (1mL당 5 μ l FcR 차단 용액 + 950 μ l FACS 완충제)로 재현탁시켰다. 2×10^5 개 세포/웰의 농도에서, 100 μ l 세포를 2mL 96 웰 검정 블록에 넣고 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 동안, 결합 항체, 항-ICOS (H2L5 hIgG4PE) 또는 IgG4 이소형 대조군 항체의 적정을 2x 농도로 제조하였다. FcR 차단 인큐베이션 후에, 웰당 100 μ l의 2x 농축된 결합 항체를 웰당 100 μ l의 Fc 차단된 T 세포에 첨가하여 0.00128로부터 100 μ g/mL 최종 농도까지 항 ICOS (H2L5 hIgG4PE) 또는 IgG4 이소형 대조군 항체의 최종 1x 농도를 달성하였다. 세포를 항체와 실온에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 결합 인큐베이션 후에, 세포를 FACS 완충제 1mL 중에서 2회 세척하고, 400 x g에서 5분 동안 실온에서 원심분리하였다.

[0543] 항-ICOS (H2L5 hIgG4PE) 결합 후 나이브 또는 활성화된 T 세포의 염색:

[0544] 세포를 유동 세포측정법을 위해 하기 각테일로 염색하였다:

[0545] 염색 각테일:

항체	웰당 부피 (μl)	X 110 부피 (μl)
PE 마우스 항-인간 CD4	5	550
APC 마우스 항-인간 CD8	5	550
FITC 염소 항-인간 IgG 카파 경쇄	10	1100

[0546]

[0547] 이소형 각테일:

항체	웰당 부피 (μl)	X 110 부피 (μl)
PE 마우스 항-인간 CD4	5	550
APC 마우스 항-인간 CD8	5	550
FITC IgG1, 카파 이소형 대조군	10	1100

[0548]

[0549] 나이브 또는 활성화된, Fc-차단된 T 세포를 H2L5 hIgG4PE 또는 대조군 항체와의 결합 인큐베이션 후에 FACS 완충제 80 μl 중에 재현탁시켰다. 웰당 20 μl의 염색 또는 이소형 각테일을 웰당 첨가하였다. 세포를 실온에서 20분 동안 암실에서 염색하였다. 염색 인큐베이션 후에, 세포를 1mL의 FACS 완충제 중에서 2회 세척하고, 400 x g에서 5분 동안 실온에서 원심분리하였다.

[0550] 염색된 세포의 고정:

[0551] 세포를 1% 포름알데히드 (16x 농축된 포름알데히드 10mL + 1x PBS 150mL) 500 μl 중에 재현탁시키고, 실온에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 1mL FACS 완충제로 2회 세척하고, 400 x g에서 5분 동안 실온에서 원심분리하였다. 이어서 펠렛을 FACS 완충제 265 μl 중에 재현탁시키고, 96 웰 등근 바닥 플레이트로 옮겼다. 유동 세포측정법에 의한 분석 시까지 세포를 4℃에서 암실에서 저장하였다.

[0552] 유동 세포측정법:

[0553] 유동 세포측정법은 FACS 포르테사 X20 또는 FACS 칸토 II 상에서 FACS디바 소프트웨어 (버전 8.0)를 사용하여 수행하였다. 보상은 단일 염색된 이바리오사이언스 울트라컴프 비드 및 FACS디바 내의 보상 소프트웨어를 사용하여 획득 시점에 수행하였다.

[0554] 데이터 분석

[0555] 데이터 획득 및 보상을 BD FACS 기기, LSR 포르테사 X-20 또는 FACS 칸토 II 상에서 BD 디바 (ver. 8.0) 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 데이터 분석은 플로우 조 소프트웨어 (ver. 10.0.8r1)를 사용하였다. 결과는 MFI (중앙 형광 강도) 및 총 살아있는 세포 또는 적절한 모 집단 중 인간 IgG 카파 경쇄 FITC 염색에 대해 양성인 세포의 퍼센트 둘 다로 보고하였다. EC50은 4종의 파라미터를 갖는 가변 기울기를 사용하여 (log(효능제) vs. 반응 -- 가변 기울기) 변환된 데이터의 비-선형 회귀 (X=(log(X))를 사용하는 그래프패드 프리즘 5 소프트웨어 (ver. 5.04)를 사용하여 결정하였다.

[0556] 결과

[0557] 로제트 셉 CD3 풍부화 키트 또는 디나비드 무핵손 T 세포 단리 키트를 사용하여 신선한, 전체 인간 혈액으로부터 T 세포를 단리한 것은 항-CD3 PeCy7을 사용한 염색에 의해 확인하였다. 공여자는 CD3 세포에 대해 68% 내지 97% 양성 범위였다. 항-CD3/항-CD28 활성화된 CD4+ 및 CD8+ 세포 집단은 항-인간 IgG1 카파 경쇄 FITC 염색에 대해 평가한 경우에 H2L5 hIgG4PE-농도-의존성 곡선을 생성하였다. H2L5 hIgG4PE 결합 곡선은 퍼센트 항-인간 IgG1 카파 경쇄 FITC 양성 및 FITC 중앙 형광 강도 (MFI) 둘 다로서 제시된다. IgG4 이소형 대조군 항체와 함께 인큐베이션된 T 세포는 항-인간 IgG1 카파 경쇄 FITC 염색에 대해 평가한 경우에 농도 의존성 곡선을 생성하지 않았다. 나이브 CD4+ 또는 CD8+ 세포는 완전한 곡선은 생성하지 않았지만; 0.1 μg/mL로부터 100 μg/mL까지 관찰되는 농도-의존성 증가가 존재하였다.

[0558] 중앙 (범위) EC50 값은 각각 CD4+ FITC MFI의 경우에 1.04 μg/mL (0.628-1.31 μg/mL) 및 CD8+FITC MFI의 경우에 0.652 μg/mL (0.27-0.74 μg/mL)였다. 중앙 (범위) EC50 값은 CD4+ 퍼센트 IgG 카파 경쇄 FITC 양성의 경우에 0.834 μg/mL (0.45-0.965 μg/mL) 및 CD8+ 퍼센트 IgG 카파 경쇄 FITC의 경우에 0.583 μg/mL (0.371-1.23 μg/mL)였다. (표 10)

[0559] 표 10: 활성화된 인간 T 세포에 대한 422 H2L5 hIgG4PE 결합 EC50 값의 요약

공여자 #	활성화된 CD4 T 세포		활성화된 CD8 T 세포	
	MFI	퍼센트 양성	MFI	퍼센트 양성
1124F36	0.628	0.45	0.564	0.619
1149M52	1.31	0.882	0.74	0.547
1173F42	0.636	0.612	0.27	0.371
1123F59	1.04	0.853	수행되지 않음	수행되지 않음
1141F45	1.27	0.965	수행되지 않음	수행되지 않음
2100M39	곡선 피트 부재	0.814	곡선 피트 부재	1.23
191F39	곡선 피트 부재	곡선 피트 부재	곡선 피트 부재	곡선 피트 부재
1155F49	곡선 피트 부재	곡선 피트 부재	수행되지 않음	수행되지 않음
1156F64	곡선 피트 부재	곡선 피트 부재	수행되지 않음	수행되지 않음
중앙	1.04	0.834	0.652	0.583
평균	0.977	0.763	0.525	0.692
Std. Dev.	0.331	0.193	0.237	0.374

[0560]

[0561] 논의

[0562] 본 연구는 H2L5 hIgG4PE (항-ICOS 효능제 항체)가 건강한 인간 공여자로부터의 활성화된 T 세포 상의 ICOS 수용체에 결합한다는 것을 입증하였다. T 세포의 세포 표면에 대한 H2L5 hIgG4PE 결합은 FITC로 표지된 인간 IgG 카과 경쇄에 대한 항체를 사용하여 검출하였다.

[0563] CD3+ T 세포의 성공적인 단리는 항-CD3 Pe-Cy7 염색을 사용한 유동 세포측정법을 통해 확인하였다. 10명의 공여자 중 9명이 단리 후에 89% 초과 CD3+ T 세포를 생성하였다. 그러나, 공여자# 2100M39는 단리 후에 단지 68.6% CD3+였다. 공여자# 2100M39의 T 세포 단리에서 이러한 감소된 순도의 원인은 공지되어 있지 않다. 공여자# 2100M39로부터 게이팅된 CD4+ 및 CD8+ 집단으로부터 생성된 EC50 값은 정도를 벗어난 것으로 보이지 않았고, 요약된 중앙값에 포함시켰다.

[0564] 음성적으로 단리된 인간 T 세포에서 H2L5 hIgG4PE에 대한 결합 EC50을 결정하였다. 단리된 T 세포가 1 µg/mL 플레이트 결합된 CD3/CD28 항체에 48시간 노출에 의해 활성화된 경우에 결합 곡선을 생성하였다. CD4+ 및 CD8+ 활성화된 T 세포로부터의 퍼센트 IgG 카과 경쇄 FITC 양성 세포 및 FITC MFI 데이터 둘 다를 통계적 분석에서 고려하였다. 중앙 CD4+ EC50 값은 퍼센트 FITC 양성 세포 또는 FITC MFI로 계산한 경우에 각각 1.04 및 0.834 µg/mL로 유사하였다. 중앙 CD8+ EC50 값도 또한 퍼센트 FITC 양성 세포 또는 FITC MFI로 계산한 경우에 각각 0.652 및 0.583 µg/mL로 유사하였다.

[0565] IgG4 PE 이소형 대조군과 함께 인큐베이션된 T 세포는, 사용된 분석 방법, MFI 또는 퍼센트 양성 세포와 관계없이, 항-인간 IgG 카과 경쇄 FITC 결합에서 농도-의존성 증가를 발생시키지 않았다.

[0566] 시험된 0.00128 내지 100 µg/mL H2L5 hIgG4PE 범위에서 나이브 또는 비활성화된, 음성적으로 단리된 T 세포로부터 완전한 곡선을 획득할 수 없었다. 그러나, 0.1로부터 100 µg/mL H2L5 hIgG4PE까지 결합에서의 농도-의존성 증가가 공여자에서 관찰되었다. 나이브 T 세포로부터의 곡선은 불완전하여 EC50을 계산할 수 없었다. H2L5 hIgG4PE가 낮은 농도에서 나이브 또는 비활성화된 세포에 결합하지 못하는 것은 ICOS가 휴지기 Th17, T 여포성 헬퍼 (TFH) 및 조절 T (Treg) 세포 상에서 단지 약하게 발현되기 때문인 것으로 예상된다. TCR 맞물림 및 활성화가 ICOS 발현을 유도하는데 요구된다. 따라서, ICOS 수용체가 나이브 또는 비활성화된 세포 상에서는 거의 발현되지 않아서, H2L5 hIgG4PE의 최소 결합이 존재할 가능성이 있다.

[0567] 실시예 8: 시노 용량-범위 발견 (DRF) 연구로부터의 TK/PD 결과

[0568] 표적-관련 종에서 H2L5 hIgG4PE의 생체내 특징에 접근하기 위해, 용량-범위 발견 연구를 시노물구스 원숭이에서 수행하였다. 연구는 비히클 대조군 코호트에 더하여 3 용량 수준 (0.3, 3 및 30 mg/kg)을 시험하였다. 이는 첫번째의 14일 후에 제2 용량을 투여하는 반복 용량이었다. 코호트당 1마리의 수컷 및 1마리의 암컷을 시험하였다. H2L5 hIgG4PE는 시험한 3종의 상이한 용량에 걸쳐 C_{max} (µg/mL) 및 AUC (µg.h/mL)에서 용량-의존성 증가를 나타내었다. 모든 3종의 용량 수준에서, 제1 용량 후 2주 동안 혈장에서 항체가 검출되었다 (도 12A). 항-H2L5 hIgG4PE 항체는 단일 투여 후 원숭이 중 3마리, 둘 다의 0.3 mg/kg 투여된 동물 뿐만 아니라 3 mg/kg 으로 투여된 암컷에서 검출되었다. 항-H2L5 hIgG4PE 항체는 이들 동물에서 제2 용량의 투여 후 감소된 혈장 농도와 상관되었다 (도 12B). 제2 용량 48시간 후에 모든 동물을 희생시켜 약역학적 활성의 분석 및 조직병리학

분석을 위한 조직을 수집하였다.

- [0569] 연구 중인 모든 동물의 비장 및 액와 림프절로부터의 CD4+ T 세포에서 H2L5 hIgG4PE 수용체 점유율 (RO)을 측정하였다. 둘 다의 조직에서 시험된 용량 수준에 걸쳐 H2L5 hIgG4PE 결합에서 용량-의존성 증가가 관찰되었다 (도 13).
- [0570] 수용체 점유율을 또한 연구 중인 원숭이의 말초 혈액으로부터의 CD4+ T 세포에 대해 측정하였다. 혈액을 5개의 시점 (제1일 (용량-전), 제3일, 제8일, 제15일 (제2 용량-전) 및 제17일)에 채취하였다. 본 검정에서 2종의 상이한 척도를 사용하여 RO를 결정하였다. 제1은 유동 세포측정법 검출에 사용된 항-ICOS mAb의 결합을 ICOS 결합에 대해 경쟁하는 것으로 제시된 H2L5 hIgG4PE의 존재 또는 부재 하에 결정하는 "유리-수용체" 검정 포맷이다. 따라서, FACS에 의한 항-ICOS 신호의 부재는 H2L5 hIgG4PE 점유된 수용체에 대한 대용물이고, 반대로 항-ICOS 양성은 H2L5 hIgG4PE에 의해 결합되지 않은 "유리 수용체"를 나타낸다. 도 14-A는 ICOS 유리 수용체가 용량-의존성, 및 시간 의존성 방식으로 감소된다는 것을 제시한다. 2마리의 원숭이 (250 및 300)는 설명할 수 없는 "유리 수용체" 신호를 입증하였고, 이는 이들 원숭이에서의 항-H2L5 hIgG4PE 항체의 생산으로 인한 것일 수 있다. 또한, 상기 기재된 비장 및 림프절에 사용된 동일한 검정에 의해 말초 혈액 CD4+ 세포에서 RO를 또한 측정하였다. 예상된 바와 같이 0 mg/kg 용량은 이러한 관독에 의해 어떠한 RO도 제시하지 않았다 (도 14-B). 흥미롭게도, 일부 원숭이가 3.0 및 30 mg/kg 용량 수준에서 처리 시간-경과에 걸쳐 H2L5 hIgG4PE 결합된 CD4+ 세포 수의 시간 의존성 증가를 제시하였다. 특히, 동물 350은 제3일 내지 제17일에 약물-결합된 순환 CD4+ 세포에서 증가 (>5-배)를 나타내었다 (도 14-B). CD4+ICOS+ 세포 수에서의 이러한 증가는 이러한 집단의 H2L5 hIgG4PE-유도된 증식으로 인한 것일 수 있는 가능성이 있다.
- [0571] 실시예 9: H2L5 hIgG4PE는 결합에 대한 반응으로 세포내 신호전달 변화를 유도한다
- [0572] 실험 제조(들)
- [0573] 세포주
- [0574] Ba/F3-ICOS 세포를 INSERM (프랑스 파리)으로부터 입수하였다. 세포를 10% 태아 소 혈청 (FBS) (시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스), 10 ng/mL 제조합 무린 IL-3 (알앤디 시스템즈(R&D Systems), 미네소타주 미네아폴리스), 및 1 mg/mL 제네티신 (썬피셔, 매사추세츠주 윌섬)이 보충된 적절한 배양 배지에서 5% CO₂ 하의 가습 인큐베이터 내에서 37°C에서 배양하였다.
- [0575] 실험 프로토콜(들)
- [0576] 세포내 신호전달 항체 어레이
- [0577] 단백질 용해물을 패스스캔(PathScan)® 세포내 신호전달 어레이 키트 (셀 시그널링 테크놀로지스(Cell Signaling Technologies))를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 검정하였다. 간략하게, 1, 6, 24 및 48시간 동안 IgG4-PE (20 µg/mL) 또는 H2L5 hIgG4PE (0.2, 2 또는 20 µg/mL)로 처리된 Ba/F3-ICOS 세포로부터의 용해물을 어레이 희석제 완충제 중에서 1 µg/µL로 희석하고, 항체 어레이 상에서 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 오디세이 영상화 소프트웨어 (리-코르 바이오사이언시스(LI-COR Biosciences), 네브래스카주 링컨)를 사용하여 어레이의 영상을 포획하였다.
- [0578] 포스포-AKT 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA)
- [0579] 메소 스케일 디스커버리 (MSD) 포스포(Ser473)/총 Akt 전세포 용해물 키트 및 포스포-Akt (Thr308) 전세포 용해물 키트를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 AKT의 인산화를 측정하였다. 세포를 96-웰 U-바닥 플레이트 (BD 팔콘(BD Falcon)) 내의 적절한 배양 배지 (100 µL/웰) 중 0.25 x 10⁶개 세포/웰의 세포 농도로 시딩하였다. 세포를 대조군 항체 (IgG4 PE), 항-ICOS IgG1 Fc 불능화 항체, 또는 H2L5 hIgG4PE로 3-배 희석 스킴을 사용하여 7종의 상이한 농도에서 (용량 범위: 20.0 - 0.03 µg/mL) 이중 웰로 1, 2, 4, 6, 24, 또는 48시간 동안 처리하였다. 포스포-AKT (Thr308) 전세포 용해물 키트를 사용한 하나의 실험의 경우에, 세포를 모든 3종의 항체의 하나의 농도 (10 µg/mL)로 삼중 웰로 처리하였다. 각각의 96-웰 플레이트의 하단 열은 어떠한 세포 대조군도 함유하지 않고 (2개의 블랭크 이중 웰) 어떠한 항체로도 처리하지 않은 채로 둔 세포를 함유하였다. 처리 후에, 세포를 프로테아제 및 포스포타제 억제제를 함유하는 빙냉 용해 완충제 30 µL로 용해시키고, 빙상에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, 25 µL의 용해물을 ELISA 플레이트로 옮겨 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다.
- [0580] 데이터 분석

- [0581] 세포내 신호전달 항체 어레이의 밀도측정 분석
- [0582] 밀도측정 분석을 수행하여 항체 어레이에 걸친 스폿의 통합 강도 수준을 계산하였다. 각각의 스폿에 대한 강도를 어레이 상의 양성 대조군의 평균에 대해 정규화하고 (식 = 샘플 웰/양성 대조군의 평균) 그래프패드 프리즘 6.0 (캘리포니아주 라 줄라)을 사용하여 그래프화하였다.
- [0583] MSD ELISA 데이터의 분석
- [0584] 하기 계산을 사용하여 각각의 웰에 대해 퍼센트 인단백질을 계산하였다: % 인단백질 = ((2 x 포스포-신호)/(포스포-신호+총 단백질 신호)) x 100. 이어서 이 값을 각각의 시점에 비처리 세포 값에 대해 정규화하고, 마이크로소프트 엑셀 2007에서 "% 대조군"으로서 그래프화하였다.
- [0585] 결과
- [0586] 선행 연구는 H2L5 hIgG4PE 처리가 Ba/F3-ICOS 세포에서 포스포-AKT (S473) 수준을 증가시키고 항체 노출 후 30-40분 사이에 최대 반응이 관찰된다는 것을 입증하였다. 여기서, 증가된 인산화 수준이 수일 후에 지속되는지 여부를 관찰하기 위해 포스포-AKT 수준을 이후의 시점에 측정하였다. 추가적으로, ICOS 활성화에 의한 다른 세포내 신호전달 사건의 조절을 평가하였다. Ba/F3-ICOS 세포에서, 포스포-AKT (S473) 수준은 IgG4-PE 이소형 대조군 항체-처리된 세포와 비교 시 H2L5 HIGG4PE 처리에 의해 처리 1 및 6시간 후 증가되었지만, 이러한 효과는 24시간 후에 상실되었다 (도 15). 흥미롭게도, 세포를 항체의 Fc 영역이 불능화된 항-ICOS 항체로 처리한 경우에 유사한 효과가 관찰되었다. 포스포-AKT (T308)의 증가된 수준은 또한 IgG4-PE (도 15) 이소형 대조군 항체-처리된 세포와 비교 시 H2L5 hIgG4PE 및 항-ICOS IgG1 Fc 불능화 항체-처리된 세포에서 처리 1시간 후에 관찰되었고, 측정 마지막 시점인 최대 48시간까지 지속되었다. AKT의 2종의 다른 하류 인단백질, 글리코겐 신타제 키나제 3 알파 (GSK3 α) 및 리보솜 단백질 S6이 또한 ICOS 활성화 시 어느 정도 증가되었지만, 효과는 포스포-AKT에 의해 관찰되는 것만큼 강건하지 않았다. 단백질 용해물을 또한 세포내 신호전달에 수반되는 18종의 단백질의 인산화 또는 절단을 측정하는 항체 어레이를 사용하여 분석하였다. 이러한 접근법을 사용하여, 단지 3종의 단백질만이 ICOS 활성화 시 인산화에서 경미한 증가를 제시하였다: 포스포-AKT (S473), 포스포 S6 (S235/236), 및 포스포-SAPK/JNK (T183/Y185).
- [0587] 직접 정량화를 가능하게 할 검정 포맷을 사용하여 AKT 인산화에 대한 변화를 측정하기 위해, Ba/F3-ICOS 세포를 대조군 항체 (IgG4 PE), 항-ICOS IgG1 Fc 불능화 항체, 또는 H2L5 hIgG4PE의 용량 범위로 시간의 경과에 따라 처리하고, ELISA에 의해 모니터링하였다. 증가된 포스포-AKT (S473) 수준은 항-ICOS IgG1 Fc 불능화 항체-처리된 또는 H2L5 hIgG4PE-처리된 세포에서 용량-의존성이면서 또한 시간-의존성이었다. 이전에 관찰된 바와 같이, 최대 포스포-AKT (S473) 활성화는 처리 1시간 후에 발생하였다. 포스포 신호는 2시간 후에 경미하게 감소되었고 최대 6시간까지 지속되었지만 24시간 후에 결국 상실되었다. 포스포-AKT (T308) 수준을 측정하는 ELISA를 또한 여기서 시험하였지만 어떠한 재현가능한 활성화도 이러한 ELISA 키트에 의해 관찰할 수 없었다.
- [0588] 논의
- [0589] AKT 신호전달 캐스케이드는 수용체 티로신 키나제, 인테그린, B 및 T 세포 수용체, 시토카인 수용체, G-단백질-커플링된 수용체, 및 PI3K에 의해 포스포타이딜이노시톨 (3,4,5) 트리스포스페이트 (PIP3)의 생산을 유도하는 다른 자극에 의해 활성화될 수 있다 [Carnero, 2008]. 이들 지질은 Akt 및 그의 상류 활성화제 PDK1에 대한 형질막 도킹 부위의 역할을 한다. 막에서, PDK1은 AKT를 Thr308에서 인산화하고, 이는 Akt의 부분적 활성화로 이어진다 [Alessi, 1996]. mTORC2에 의한 Akt의 Ser473에서의 인산화는 전체적 효소적 활성을 자극한다 [Sarbassov, 2005].
- [0590] ICOS는 T 세포 생존, 증식 및 기억을 촉진함으로써 활성화된 이펙터 및 조절 CD4+ T 세포의 기능에서의 주요 역할을 한다. T-세포 활성화 및 이펙터 기능을 지속시키는데 있어서의 그의 역할로 인해, ICOS를 효능제 항체로 표적화하는 것은 항종양 면역을 증진시키기 위한 그럴듯한 접근법일 수 있다. 본 연구에서, 본 발명자들은 H2L5 hIgG4PE에 의한 ICOS의 활성화가 Ba/F3-ICOS 세포에서 AKT 인산화에 대해 변화를 유발한다는 것을 관찰하였다. 이어서, AKT의 하류 단백질, 예컨대 GSK3 α (AKT의 직접 기질) 및 리보솜 단백질 S6이 또한 인산화되었다. 이러한 데이터는 이러한 모델 시스템을 사용하여 최근에 수행된 작업과 일치하고, 외부적으로 공개된 데이터와 비슷하다 [Fos, 2008].
- [0591] 실시예 10: 인간 PBMC 검정에서 가용성 H2L5 hIgG4PE 단독 및 항-PD1 및 항-CTLA-4 항체와의 조합의 기능적 효과

- [0592] 실험 제조(들)
- [0593] 1차 인간 PBMC의 단리
- [0594] 신선한 혈액을 GSK 헬스 센터(GSK Health Center) 혈액 공여자로부터 획득하고, 페놀 레드 무함유-10% RPMI1640 배지로 1:1 희석하였다. 희석된 혈액을 유니-셉 맥스 50ml 원추형 튜브 내의 밀도 배지 상부에 적층하고, 실온에서 20분 동안 400xg에서 브레이크 오프로 원심분리하였다. 생성된 백색 일핵 층(백혈구 연층)을 100 μ M 세포 스트레이너를 통해 새로운 50mL 원추형 튜브로 조심스럽게 추출하였다. 동등 부피의 페놀 레드 무함유-10% RPMI1640 배지를 백혈구 연층에 첨가하고, 실온에서 10분 동안 300xg에서 원심분리하였다. 세포 펠릿을 적혈구 용해 용액(시그마 알드리치) 10ml 중에 재현탁시키고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 배지로 1회 세척하고, 이전에 기재된 바와 같이 원심분리하였다. 페놀 레드 무함유-10% RPMI1640 배지를 사용하여 부피가 40ml가 되게 하고, 바이셀 세포 계수기 및 생존율 분석기(베크만 쿨터)를 사용하여 세포를 계수하였다.
- [0595] 단핵구-유래 미성숙 수지상 세포(iDC)의 유도
- [0596] 인간 단핵구를 플라스틱 부착 방법을 사용하여 단리하였다. 간략하게, 2천만개의 새롭게 단리된 PBMC를 T-75 조직 배양 플라스크 내의 AIM-V 배지(쓰모 피서) 중에서 3시간 동안 배양하였다. 플라스틱에 결합하지 않은 세포를 세척해내었다. 부착 단핵구를 37°C 5% CO₂ 인큐베이터에서 인간 GM-CSF(Calt#300-03, 페프로테크) 1000U/ml 및 인간 IL-4(cat#200-04) 500 U/ml가 보충된 AIM-V 배지 중에서 배양하였다. 7-10일 후에, 동종 혼합 림프구 반응 검정에서 상이한 공여자로부터의 T 세포와의 공동-배양을 위해 iDC 세포를 수집하였다.
- [0597] 혈액으로부터의 1차 인간 T 세포의 직접 단리
- [0598] 인간 T 세포를 인간 T 세포 풍부화 각테일(스텝 셀 테크놀로지스)을 사용하여 신선한 인간 혈액으로부터 직접 단리하였다. 로제트셉 인간 T 세포 풍부화 각테일(50 μ L/mL)을 전혈에 첨가하고, 잘 혼합하였다. 실온에서 20분 인큐베이션 후에, 동등 부피의 PBS + 2% FBS를 온화하게 혼합하면서 첨가하였다. 희석된 샘플을 밀도 배지의 상부에 적층하고, 실온에서 20분 동안 1200 x g에서 브레이크 오프로 원심분리하였다. 풍부화된 세포를 밀도 배지: 혈장 계면으로부터 새로운 원추형 튜브로 조심스럽게 부었다. 다음으로 적혈구를 적혈구 적제 완충제(시그마 알드리치)로 용해시키고, 풍부화된 세포를 PBS + 2% FBS로 2회 세척하였다. 이어서 T 세포를 PBS + 2% FBS 40ml 중에 재현탁시키고, 바이-셀 세포 계수기로 계수하였다.
- [0599] 실험 프로토콜
- [0600] 인간 PBMC 사전-자극 검정
- [0601] 새롭게 단리된 인간 PBMC를 T-75 조직 배양 플라스크 내의 MCSF 100ng/ml 및 IL-2(페프로테크) 100IU/ml가 보충된 AIM-V 배지 중에서 CD3/CD28 T 세포 증량제 디나비즈를 사용하여 비드 대 세포 1:20의 비로 37°C에서 사전-자극시켰다. 48시간 후에, 사전-자극 비드를 자기적으로 제거하고, 세포를 세척하고, 계수하고, 96-웰 비-조직 배양 처리된 둥근 바닥 플레이트 내의 IL-2(페프로테크) 100IU/ml가 보충된 AIM-V 배지 중에서 항-CD3 디나비즈 및 치료 항체로 재-자극하였다. 시딩 밀도는 웰당 배지 100 μ l당 100k 세포였다. 37°C에서 3.5일 동안 인큐베이션한 후, MSD에 의한 멀티플렉스 시토카인 측정을 위해 세포 배양 상청액을 수집하였다.
- [0602] 인간 MLR 활성화 검정
- [0603] 건강한 인간 지원자로부터의 단핵구-유래 iDC를 상이한 공여자로부터 새롭게 단리한 인간 T 세포와 1:10 비(iDC: T)로 혼합하고, AIM-V 배지에서 0.02 μ g/ml의 CEFT 펩티드 혼합물의 존재 하에 24시간 동안 37°C에서 사전-인큐베이션하였다. 상이한 군의 치료 항체를 웰에 직접 첨가하고, 혼합하고, 추가의 4일 동안 추가 인큐베이션하였다. MSD 분석에 의한 멀티플렉스 시토카인 측정을 위해 세포 배양 상청액을 수집하였다.
- [0604] MSD 시토카인 분석
- [0605] 조직 배양 상청액 중 IFN- γ , IL-10, IL-2 및 TNF- α 시토카인 수준을 MSD 인간 V-플렉스 맞춤 키트를 사용하여 결정하였다. 샘플을 먼저 딜루언트 2 중에 1:200 희석하였다. 보정물을 또한 딜루언트 2 중에서 제조업체의 권고에 따라 제조하였다. 희석된 샘플 및 보정물을 흑색 MSD 플레이트에 첨가하고, 후속해서 이를 접착성 플레이트 실로 밀봉하고, 2시간 동안 진탕하면서 실온에서 인큐베이션하였다. 딜루언트 2 중에서 새롭게 제조한 검출 항체 용액 25 μ L를 각각의 웰에 첨가한 후, 플레이트를 재-밀봉하고, 다시 2시간 동안 진탕하면서 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS 플러스 0.05% 트윈-20으로 150 μ L/웰로 3회 세척한 후 새롭게 희석된 2x

판독 완충제를 150 μ l/웰로 첨가하고, 메소 킥플렉스 판독기 상에서 즉시 판독하였다. 데이터를 MSD 워크벤치 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

- [0606] 데이터 분석
- [0607] MSD 데이터 분석
- [0608] MSD 데이터를 디스커버리 워크벤치 소프트웨어 (MSD, 버전 4.0.9)를 사용하여 분석하였다. 모든 경우에서 R^2 값이 0.99 초과인 플레이트 특이적 표준 곡선을 생성하기 위해 각각의 MSD 플레이트 상에 제조업체의 키트의 보정물을 포함시켰다. 표준 곡선에 기초하여 검출된 시토카인의 양을 역산하고, 3회의 생물학적 반복으로부터의 평균 및 표준 편차를 사용하여 그래프를 생성하였다.
- [0609] 통계적 분석
- [0610] 각각의 치료 항체 자체의 이소형 대조군에 대한 로그-변환된, 배수-변화 데이터에 대해 일원 ANOVA를 수행하였다. 상이한 공여자에 걸쳐 단일-요법 vs. 조합 둘 다를 비교하기 위해 던넛 다중 비교 검정을 수행하였다. $P < 0.05$ 를 통계상 유의한 것으로 간주하였다.
- [0611] 결과
- [0612] PBMC 사전-자극 검정 개발 및 H2L5 hIgG4PE와 이필리무맙 및 켈브롤리주맙의 조합 활성화에 대한 시험
- [0613] 사전-자극을 위한 최적 조건을 결정하기 위해, 인간 항-CD3 디나비즈 및 항-CD3/CD28 디나비즈 (썬모 피셔)를 상이한 비드 대 세포 비로 시험하였다. 48시간 사전-자극 후에, 세포를 수거하고, 비드를 자기적으로 제거한 후, 항-CD3 디나비즈 (비드 대 세포 비 = 1:1)로 항-ICOS 항체 단독 또는 항-CTLA-4 또는 항-PD1과의 조합과 함께 자극하였다. H2L5 hIgG4PE 단일 작용제 처리는 시험된 모든 사전-자극 조건에서 이소형 대조군과 비교 시 IFN- γ 의 유도를 발생시켰다. H2L5 hIgG4PE에 의해 유도되는 IFN- γ 의 규모는 사전-자극의 강도와 역으로 상관되었다. 이필리무맙과 함께 H2L5 hIgG4PE의 조합은 약하게 사전-자극된 PBMC에서 H2L5 HIGG4PE 또는 이필리무맙 단독과 비교 시 증진된 시토카인 생산을 입증하였다. 조합 효과는 보다 강한 사전-자극 조건으로 생각되는 플레이트-결합된 항-CD3/항-CD28 사전-자극 조건 하에 상실되었다. 이들 결과에 기초하여, 항-CD3/항-CD28 비드를 1:20의 비드 대 세포 비로 사용하는 사전-자극 조건을 모든 향후 PBMC 검정을 위해 선택하였다. 4명의 개별 공여자로부터의 결과를 항-CTLA-4 조합에 대해서는 도 16에 및 항-PD-1과의 조합에 대해서는 도 17에 요약한다.
- [0614] H2L5 hIgG4PE는 PBMC 사전-자극 검정에서 용량-의존성 시토카인 유도를 발생시킨다
- [0615] H2L5 hIgG4PE의 용량-의존성 활성을 항-CD3/항-CD28 비드에 의해 1:20의 미리 결정된 비드 대 세포 비로 사전-자극된 인간 PBMC에서 평가하였다. 항-RSV IgG4PE 및 항-ICOS 422.2 IgG1 Fc 불능화된 것을 대조군으로서 포함시켰다. H2L5 HIGG4PE의 8종의 농도를 시험하였다 (100, 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 및 0.03 μ g/ml). PBMC 샘플의 조직 배양 상청액에서 IFN- γ , IL-10 및 TNF- α 를 MSD에 의해 평가하였다. H2L5 hIgG4PE는 IFN- γ , IL-10 및 TNF- α 생산을 용량-의존성 방식으로 유도하였지만, 이소형 대조군 IgG4 또는 Fc-불능화 422.2는 그렇지 않았다. 이들 결과를 사용하여 조합 연구에 사용할 H2L5 hIgG4PE의 농도를 결정하였다.
- [0616] 인간 MLR 검정 개발
- [0617] 상이한 공여자로부터의 인간 T 세포 및 단핵구-유래 미성숙 DC의 공동-배양에 더하여 인간 MLR 검정을 최적화하기 위한 노력으로, 세포를 프라이밍하는데 도움이 되는 기초 TCR 자극을 제공하기 위해 또한 항-CD3 비드를 웰에 첨가하였다. 결과는 항-CD3 비드가 IFN- γ 유도의 범위를 매우 증가시킨다는 것을 입증하였다. 이필리무맙 단독이 항-CD3 비드의 부재 하에 IFN- γ 생산을 유도할 수 있지만, H2L5 hIgG4PE 단독 또는 H2L5 HIGG4PE/이필리무맙 조합은 단지 항-CD3 비드의 존재 하에 상응하는 대조군보다 증진된 IFN- γ 생산을 제시하였다.
- [0618] 인간 MLR 검정에서 H2L5 HIGG4PE 및 이필리무맙의 조합 활성화
- [0619] H2L5 hIgG4PE 단독 또는 이필리무맙과의 조합의 면역자극 활성을 동종 인간 MLR 검정에서 시험하였고, 여기서 T 세포를 0.02 μ g/ml CEFT 펩티드의 존재 하에 비매칭 공여자로부터의 단핵구-유래 미성숙 DC와 함께 1일 동안 사전-인큐베이션하였다. H2L5 hIgG4PE/ 이필리무맙 조합은 어느 하나의 작용제 단독과 비교 시 IFN- γ 생산에서 유의한 증진을 발생시켰다. 결과는 시험한 3명의 공여자 쌍에 걸쳐 일관되었지만; 공여자 사이에 어느 정도의 가변성이 관찰되었다 (도 18).

- [0620] 인간 MLR 검정에서 H2L5 hIgG4PE 및 펙브롤리주맙의 조합 활성
- [0621] H2L5 hIgG4PE 및 펙브롤리주맙의 조합을 또한 상기 기재된 동종 인간 MLR 검정에서 시험하였다. H2L5 hIg G4PE 를 단독으로 및 펙브롤리주맙과 조합하여 10 µg/ml로 시험하였다. H2L5 hIg G4PE 및 펙브롤리주맙의 조합은 어느 하나의 작용제 단독과 비교 시 증가된 IFN-γ를 발생시켰다. 그러나, 높은 공여자 가변성 및 일부 공여자 에서의 단일 작용제 항-PD-1 처리의 유의한 활성으로 인해 통계적 유의성에 도달하지 못했다 (도 19).
- [0622] 논의
- [0623] ICOS는 나이브 T 세포 상에서 약하게 발현되고 활성화된 CD4+ 및 CD8+ T 세포에서 신속하게 상향조절되는 공동 자극 수용체이다. ICOS에 대한 리간드는 ICOS-L (B7h, B7RP-1, CD275)로, 이는 TNF-α 자극 후 전문 APC 및 말초 상피 및 내피 세포에 의해 발현된다. ICOS:ICOS-L 경로는 T-세포 증식 및 기능을 위한 주요 공동자극 신호를 제공한다. T-세포 활성화 및 이펙터 기능을 지속시키는데 있어서의 그의 역할로 인해, ICOS를 효능제 항체로 표적화하는 것은 항종양 면역을 증진시키기 위한 그럴듯한 접근법일 수 있다.
- [0624] 연구는 여러 암 모델에서 이필리무맙에 의한 CTLA-4 차단 후 ICOS^{hi} CD4+ 이펙터 T 세포의 빈도의 증가를 제시한 바 있다. 또한, CTLA-4 차단 시, 이러한 세포 집단은 ICOS^{lo} CD4+ T 세포보다 더 높은 수준의 INF-γ를 생산하였다. 사실, ICOS+ CD4 T 세포의 빈도에서의 증가는 암 환자에서 이필리무맙 처리의 약역학적 바이오마커로서 확인된 바 있다. 연구는 야생형 C57BL/6 마우스에서 CTLA-4 차단 요법 후에 80 내지 90% 종양 거부가 이어지지만; ICOS 또는 ICOSL 녹아웃 마우스에서는 효능이 50% 미만으로 감소된다는 것을 입증하였다. CTLA-4 차단 의 유효성에서 ICOS에 의한 중요한 역할은 항-CTLA-4 요법 동안 ICOS 경로를 자극하는 것이 치료 효능을 증가시킬 수 있다는 것을 시사한다. 따라서, 본 발명자들은 H2L5 hIgG4PE 및 이필리무맙의 조합 활성을 평가하는 것에 착수했다.
- [0625] 프로그래밍된 세포 사멸-1 (PD-1)은 또 다른 면역 체크포인트 분자인 것으로 2000년에 보고되었다. PD-1의 리간드 중 하나인 PD-L1 (B7-H1)의 발현은 T 세포, 상피 세포, 내피 세포, 및 종양 세포를 포함한 많은 세포 유형에서 발견될 수 있다. PD-1/PD-L1 축을 표적화하는 항체가 또한 다중 종양 유형에서 임상 반응을 제시한 바 있다. FDA는 최근에 펙브롤리주맙 및 니볼루맙을 암의 치료를 위한 제2 세대 면역 체크포인트 차단제로서 승인하였다. 머크(Merck)의 펙브롤리주맙은 진행성 흑색종을 갖는 환자에서 ~37 내지 38%의 반응을 발생시키는 것으로 제시되었고, 후속 연구는 선행 이필리무맙 처리 후 진행성 질환을 갖는 환자에서 26%의 전체 반응을 보고 하였다. BMS로부터의 항-PD-1 항체인 니볼루맙은 또한 전이성 흑색종을 갖는 환자에서 1년에 반응률 40% 및 전체 생존율 72.9%의 임상 이익을 제시하였다. 게다가, 니볼루맙은 또한 진행성 또는 전이성 비소세포 폐암을 위해 FDA-승인받았다. PD-1 체크포인트 차단 항체가 임상에서 지배적인 암 면역 요법이 되었기 때문에, 항-PD-1 항체와 조합된 H2L5 hIgG4PE를 그의 조합 항종양 활성에 대해 평가하는 것은 중요할 것이다.
- [0626] 이전에, PBMC 활성화 검정이 개발되었고 항-ICOS 효능제 항체의 패널의 T 세포 자극 활성을 평가하기 위해 사용되었다. 그러한 연구로부터 생성된 데이터는 H2L5 hIgG4PE와 같은 IgG4PE 이소형을 갖는 클론 422.2의 후보 선택을 지지하였다. 이전의 검정에서, PBMC 세포를 플레이트 결합된 항-CD3 항체 1 µg/ml 및 항-CD28 항체 3 µg/ml로 48시간 동안 사전-자극한 후, 이를 수거하고, 항-CD3 및 조사하고자 하는 가용성 ICOS 항체로 재-자극하였다. H2L5 hIgG4PE는 IFN-γ 생산을 용량-의존성 방식으로 유도하는 것으로 제시되었다. 사전-자극을 위한 최적 조건을 결정하기 위해, 인간 항-CD3 디나비즈 및 항-CD3/CD28 디나비즈 (썬모 피셔)를 상이한 비드 대 세포 비로 시험하였다. 비드에 의한 자극은 보다 생리학적인 것으로 간주되고, 자극의 강도는 상이한 비드 대 세포 비를 구축함으로써 보다 용이하게 제어될 수 있다. 사전-자극 48시간 후에, 세포를 수거하고, 비드를 자기적으로 제거한 후, 항-CD3 디나비즈 (비드 대 세포 비 = 1:1)로 항-ICOS 항체 단독 또는 항-CTLA-4와의 조합과 함께 자극하였다. 결과는 H2L5 hIgG4PE 단일 작용제 처리가 시험한 모든 사전-자극 조건에서 이소형 대조군에 비해 IFN-γ 유도를 발생시킨다는 것을 제시하였다. H2L5 hIgG4PE에 의해 유도되는 IFN-γ의 규모는 사전-자극의 강도와 역으로 상관되었다. 이필리무맙과 함께 H2L5 hIgG4PE의 조합은 약하게 사전-자극된 PBMC에서 H2L5 hIgG4PE 또는 이필리무맙 단독과 비교 시 증진된 시토키인 생산을 입증하였다. 조합 효과는 보다 강한 사전-자극 조건으로 생각되는 플레이트-결합된 항-CD3/항-CD28 사전-자극 조건 하에 상실되었다. 이들 결과에 기초하여, 항-CD3/항-CD28을 1:20의 비드 대 세포 비로 사용하는 사전-자극 조건을 모든 향후 PBMC 검정을 위해 선택하였다. H2L5 hIgG4PE 및 이필리무맙 조합은 어느 하나의 항체 처리 단독과 비교 시 IFN-γ 생산에서 통계적으로 유의한 증가를 제시하였다.
- [0627] 검정 최적화 노력으로, 항-CD3/항-CD28 자극 비드 대 세포 비는 1:20으로 고정하고, 재-자극 단계 동안 사용하

는 항-CD3 비드를 1:1의 비드 대 세포 비에서 1:3 및 1:10으로 하향 적정하였다. 결과는 보다 낮은 재-자극 강도가 H2L5 hIgG4PE에 의한 보다 낮은 IFN- γ 유도를 일으킨다는 것을 제시하였다. H2L5 hIgG4PE 및 이필리무맙에 의한 조합 효과는 1:3 및 1:10의 비드 대 세포 비에서의 재-자극 하에 완전히 상실되었다. 따라서, 1:1의 재-자극 항-CD3 비드 대 세포 비를 모든 향후 실험 동안 유지시켰다.

[0628] 사전-자극 및 재-자극 조건을 최적화하여, H2L5 hIgG4PE의 용량 반응을 평가하기 위해 본 검정을 사용하였다. 100, 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1 및 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 의 총 8종의 항체 농도를 시험하였다. 항-RSV IgG4PE 및 항-ICOS 422.2 IgG1 Fc 불능화, H2L5 hIgG4PE의 Fc 불능화 버전을 대조군으로서 사용하였다. 결과는 H2L5 hIgG4PE가 IFN- γ , IL-10 및 TNF- α 생산을 용량-의존성 방식으로 유도하지만, 이소형 대조군 IgG4 또는 Fc-불능화 422.2는 그렇지 않다는 것을 제시하였다. H2L5 hIg G4PE의 Fc 불능화 버전이 제한된 시토키인 유도 반응을 나타낸다는 것은 흥미로우며, 이는 Fc 수용체 맞물림이 H2L5 hIg G4PE의 T 세포 효능 기능에 중요하다는 것을 나타낸다. 이들 결과를 또한 사용하여 조합 연구를 위한 H2L5 hIg G4PE의 용량을 결정하였다.

[0629] H2L5 hIg G4PE 및 체크포인트 차단 항체의 조합 효과를 평가하기 위해 혼합 림프구 반응 (MLR) 검정이 또한 개발되었다. MLR 검정은 1차 단핵구-유래 미성숙 수지상 세포 (iDC)가 상이한 공여자로부터 단리된 T 세포와 혼합된 생체의 세포 면역 검정이다. iDC 세포의 표면 상의 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자의 미스매치는 T 세포 자극을 동종 설정으로 개시할 수 있다. 임상에서, MLR 검정은 공여자와 수용자 사이의 조직 이식의 상용성을 확인하기 위한 것으로 널리-공지되어 있다.

[0630] MLR 검정을 개발하기 위해, 신선한 인간 단핵구를 인간 재조합 GM-CSF 및 IL-4가 보충된 배지에서 1주 동안 배양하여 미성숙 DC 표현형을 유도하였다. 이어서, 상이한 공여자로부터 신선한 인간 T 세포를 단리하고, iDC 세포와 10:1 비 (T : iDC)로 혼합하였다. H2L5 hIg G4PE 및 이필리무맙 단독-요법 또는 조합 처리를 항-CD3 비드의 존재 또는 부재 하에 T 세포/iDC 공동-배양물에 첨가하였다. 항-CD3 비드의 목적은 T 세포를 프라이밍하는데 도움이 되는 기초 TCR 자극을 제공하기 위한 것이다. 결과는 항-CD3 비드가 검정에서 IFN- γ 유도의 범위를 매우 증가시킨다는 것을 제시하였다. 이필리무맙 단독이 항-CD3 비드의 부재 하에 IFN- γ 생산을 유도할 수 있지만, H2L5 hIgG4PE 단독 또는 H2L5 hIgG4PE/이필리무맙 조합은 항-CD3 비드의 존재 하에 상응하는 대조군보다 증진된 IFN- γ 생산을 제시하였다. 이러한 결과는, 본 검정에서, DC 세포 단독에 의한 TCR 자극이 PBMC로부터 새롭게 단리된 휴지기 T 세포의 표면 상에서 ICOS 발현을 유도하는데 충분하지 않을 수 있다는 것을 시사한다. 상황을 개선시키기 위해, 24시간 iDC 및 T 세포 사전-인큐베이션 단계를 치료 항체의 첨가 전에 추가하였다. T 세포를 더 잘 프라이밍되게 하고 항원-특이적 반응을 도출하기 위해 CEFT 펩티드 믹스를 또한 검정 절차에 첨가하였다. CEFT 펩티드 풀은 인간 시토크갈로바이러스 (HHV-5; CMV), 엡스타인-바르 바이러스 (HHV-4; EBV), 인플루엔자 A 및 클로스트리디움 테타니로부터의 규정된 HLA 부류 I 및 II-한정된 T-세포 에피토프로부터 선택된 27종의 펩티드로 이루어진다. 일반 인구에서의 인플루엔자 및 클로스트리디움 테타니에 대한 높은 백신 접종 빈도 및 CMV 및 EBV의 높은 유병률을 고려하여, 대부분의 인간 샘플에 대해 회상 항원 반응이 예상되었다. 결과는 T 세포를 iDC 세포와 함께 24시간 동안 사전-인큐베이션한 경우에 증가된 IFN- γ 생산이 관찰되고, IFN- γ 생산은 CEFT 펩티드를 공동-배양 시스템에 첨가한 경우에 추가로 증가된다는 것을 제시하였다. H2L5 hIgG4PE 단독 또는 이필리무맙과의 조합의 면역자극 활성을 동종 인간 MLR 검정에서 시험하였고, 여기서 T 세포를 0.02 $\mu\text{g/ml}$ CEFT 펩티드의 존재 하에 비매칭 공여자로부터의 단핵구-유래 미성숙 DC와 함께 1일 동안 사전-인큐베이션하였다. H2L5 hIgG4PE/ 이필리무맙 조합은 어느 하나의 작용제 단독과 비교 시 IFN- γ 생산에서 유의한 증진을 발생시켰다. 결과는 시험한 3명의 공여자 쌍에 걸쳐 일관되었지만; 공여자 사이에 어느 정도의 가변성이 관찰되었다.

[0631] 유사하게, H2L5 hIgG4PE 및 펙브롤리주맙의 조합을 또한 상기 기재된 인간 동종 MLR 검정에서 시험하였다. H2L5 hIgG4PE를 단독으로 및 펙브롤리주맙과 조합하여 10 $\mu\text{g/ml}$ 로 시험하였다. H2L5 hIgG4PE 및 펙브롤리주맙의 조합은 어느 하나의 작용제 단독과 비교 시 증가된 IFN- γ 를 발생시켰다. 그러나, 높은 공여자 가변성 및 일부 공여자에서의 단일 작용제 항-PD-1 처리의 유의한 활성으로 인해 통계적 유의성에 도달하지 못했다.

[0632] 요약하면, 이들 연구는 2종의 인간 면역 세포 기반 검정에서 H2L5 hIgG4PE와 2종의 FDA-승인된 체크 포인트 억제제, 이필리무맙 및 펙브롤리주맙의 단독-요법과 비교 시의 뛰어난 조합 활성을 입증하였다. 본원에 보고된 연구에서, H2L5 hIgG4PE는 생산성 항종양 면역 반응의 특징인 T 세포 활성화 및 T_H1 편향 (예를 들어 IFN- γ 생산)을 촉진한다는 것을 제시하였다.

[0633] 실시예 11: H2L5 hIgG4PE 단독 및 항-PD1 및 항-CTLA-4 항체와의 조합의 생체내 기능적 활성

- [0634] 인간 PBMC 마우스 종양 모델
- [0635] 방법
- [0636] 실험 제조
- [0637] 동물에 대한 모든 절차는 연구 프로토콜의 개시 전에 GSK 동물 실험 윤리 위원회에 의해 검토 및 승인받았다.
- [0638] 세포주의 제조:
- [0639] A2058을 ATCC 프로토콜에 따라 증식시켰다.
- [0640] 물질:
- [0641]
 - A2058 인간 흑색종 세포주: ATCC, Cat# CRL-11147, lot#59349362
- [0642]
 - DPBS: ATCC, Cat #30-2200, Lot#63357436
- [0643]
 - 돌베코 변형 이글 배지: ATCC, Cat # 30-2002, Lot# 62596471 유효기간: 2015년 10월
- [0644]
 - 태아 소 혈청: 시그마-알드리치, Cat#12176c-1000ml, lot # 13G180R0H1, 유효기간: 2018년 7월
- [0645]
 - 0.25% (w/v) 트립신- 0.53 mM EDTA: ATCC, Cat #30-2102, Lot#62420300
- [0646]
 - 항생제-항진균제 (100X): 라이프 테크놀로지스, Cat# 15240-062
- [0647]
 - T175 세포 배양 플라스크: 그라이너 바이오-원, Cat# 661175
- [0648]
 - T75 세포 배양 플라스크: 그라이너 바이오-원, Cat# 658175
- [0649] 배지:
- [0650]
 - A2058 완전 성장 배지: 돌베코 변형 이글 배지 + 10% FBS. 배양 조건: 분위기: 공기, 95%; 5% 이산화탄소 (CO₂); 온도: 37°C
- [0651]
 - 세포 수용 시:
- [0652]
 - 37°C에서 완전 배지를 사전-가온한다.
- [0653]
 - 세포를 37°C 수조에서 신속하게 해동시킨다. 튜브를 70% 에탄올로 닦고 세포를 사전가온된 완전 배지로 채워진 15ml 튜브로 옮긴다.
- [0654]
 - 1200rpm에서 5분 동안 원심분리하여 세포 펠렛을 수집한다.
- [0655]
 - 세포를 사전가온된 완전 배지로 채워진 T75 플라스크에 다시 첨가하고 37°C에서 인큐베이션한다.
- [0656] 세포의 계대배양:
- [0657]
 - 75 cm² 플라스크용 부피를 제공한다 (T175 cm² 플라스크의 경우, 필요한 헤리 및 배양 배지의 양을 비례 조정함).
- [0658]
 - 배양 배지를 제거 및 폐기한다.
- [0659]
 - 세포 층을 DPBS로 간략하게 세정하여 트립신 억제제를 함유하는 모든 미량의 혈청을 제거한다.
- [0660]
 - 플라스크에 2.0 내지 3.0 mL의 트립신-EDTA 용액을 첨가하고 세포 층이 분산될 때까지 (2-3분) 도립 현미경 하에 세포를 관찰한다.
- [0661]
 - 주: 괴형성을 피하기 위해 세포가 탈착되기를 기다리는 한편 플라스크를 치거나 진탕시켜 세포가 교반되지

않도록 한다. 탈착되기 어려운 세포는 분산을 용이하게 하기 위해 37°C에 둘 수 있다.

- [0662] • 완전 성장 배지 10 mL를 첨가하고, 온화한 피펫팅에 의해 세포를 흡인한다.
- [0663] • 1200rpm에서 5분 동안 원심분리하여 세포 펠릿을 수집하고, 완전 성장 배지 10ml를 첨가한다.
- [0664] • 세포 현탁액의 적절한 분취물을 새로운 배양 용기에 첨가한다. 배양물을 37°C에서 인큐베이션한다.
- [0665] • 배지 리뉴얼: 2 내지 3일마다
- [0666] 마우스 접종을 위한 종양 세포의 제조:
 - [0667] • 세포를 1X DPBS로 세척하고, 2-3분 동안 3ml 1X 트립신을 첨가한다.
 - [0668] • 완전 성장 배지를 첨가하고, 조직 배양 후드 내에서 멸균 원추형 원심분리 튜브에 세포 현탁액을 수집한다.
 - [0669] • 세포를 1200rpm에서 5분 동안 원심분리하여 세포 펠릿을 수득한다.
 - [0670] • 세포를 1X DPBS 용액으로 세척하고, 1200rpm에서 5분 동안 원심분리하여 세포 펠릿을 수득한다. 세척을 2회 반복한다.
 - [0671] • 세포 수 및 생존율에 대해 혈구계에 의해 세포를 계수한다.
 - [0672] • 세포를 빙냉 PBS 중 생체내 접종을 위한 농도로 재현탁시킨다 (A2058, 2.5e7/ml, 2.5e6/100 μ l/마우스).
- [0673] NSG 마우스에의 종양 세포주 접종
- [0674] 물질:
 - [0675] • 마우스: NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ. 더 잭슨 래보러토리 스톡(The Jackson Laboratory Stock): 005557 암컷 연령: 6주
 - [0676] • 바늘 25 G 5/8이 부착된 1 mL 투베르쿨린 시린지: 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson), Cat# 305554
 - [0677] • PDI™ 알콜 정제용 패드: 전문 일회용품, Cat# B339
 - [0678] • PDI™ 포비돈-아이오딘 정제용 패드: 전문 일회용품,
 - [0679] • Cat# B40600
 - [0680] • 마우스의 준비
 - [0681] • 마우스는 6주령이어야 한다.
 - [0682] • 마우스가 도착한 후 3-5일의 순응 기간이 허용된다.
 - [0683] • 마우스의 우측 뒷쪽 옆구리를 면도한다.
- [0684] 주사의 제조
 - [0685] • 아이오딘에 이어 에탄올 패드를 사용하여 마우스의 접종 영역을 깨끗이하고 멸균시킨다.
 - [0686] • 1-cc 시린지 및 25-게이지 바늘을 사용한다.
 - [0687] • 플런저를 빼내고, 세포를 혼합하고, 세포 100 μ l를 시린지 뒤로 첨가하고, 조심스럽게 플런저를 삽입한다.
 - [0688] • 세포를 마우스의 우측 뒷쪽 옆구리 내로 피하로 (s.c.) 주사한다.
 - [0689] • 종양 성장 평가

- [0690] • 종양을 측정하기 위해, 종양 경계 확인이 보다 용이해지도록 70% 에탄올로 털을 적신다. 종양 크기 및 체중을 2-3일마다 측정한다.
- [0691] • 디지털 캘리퍼를 사용하여 종양 크기를 측정하고, 부피는 다음과 같이 결정한다: 종양 부피 (mm³) = (길이) x (너비)²/2
- [0692] • 인간 PBMC 정맥내 투여
- [0693] • 종양이 대략 100 mm³의 평균 부피에 도달하고 1주 후에 인간 PBMC 투여를 시작할 수 있다.
- [0694] 물질:
- [0695] • 신선한 인간 PBMC: 올셀즈(Allcells), cat#C-PB102-3B2
- [0696] • 바늘 25 G 5/8이 부착된 1 mL 투베르쿨린 시린지: 벡톤 디킨슨, Cat# 305554
- [0697] • PDI™ 알콜 정제용 패드: 전문 일회용품, Cat# B339
- [0698] • PDI™ 포비돈-아이오딘 정제용 패드: 전문 일회용품, Cat# B40600
- [0699] • 거즈 스폰지: 코비디엔(Covidien), cat# 441211
- [0700] • 마우스 꼬리 조명 제지장치: 브레인트리 사이언티픽(Braintree scientific), cat#MTI STD
- [0701] • PBMC 제조
- [0702] • 신선한 인간 PBMC를 올셀즈로부터 밤샘 운송하여 구입한다.
- [0703] • 세포를 1400rpm에서 5분 동안 원심분리하여 세포 펠릿을 수득한다.
- [0704] • 세포를 1X DPBS 용액으로 세척하고, 1400rpm에서 5분 동안 원심분리하여 세포 펠릿을 수득한다.
- [0705] • 세포를 빙냉 PBS 중 생체내 접종을 위한 농도로 재현탁시킨다 (20e7/ml).
- [0706] • 1-cc 시린지 및 25-게이지 바늘을 사용한다.
- [0707] • 플런저를 빼내고, 세포를 혼합하고, 세포 100 μl를 시린지 뒤로 첨가하고, 조심스럽게 플런저를 삽입한다.
- [0708] • 세포를 빙상에서 유지시킨다.
- [0709] • 꼬리 정맥 주사
- [0710] • 마우스를 백열 램프로 5분 동안 가온한다.
- [0711] • 마우스를 꼬리 조명 제지장치를 사용하여 제지한다.
- [0712] • 정맥을 시각화하기 위해 꼬리를 약간 회전시킨다.
- [0713] • 아이오딘에 이어 에탄올 패드를 사용하여 주사 부위를 깨끗이하고 멸균시킨다.
- [0714] • 바늘을 정맥 내로 약간의 각도로 삽입하고 세포를 주사한다.
- [0715] • 바늘을 제거하고, 출혈이 멈출 때까지 거즈 스폰지를 사용하여 온화하게 압박한다.
- [0716] • 동물을 그의 케이지로 되돌리고, 출혈이 재개되지 않는지 확실하게 하게 위해 5-10분 동안 관찰한다.
- [0717] 치료 항체 투여

- [0718] • 인간 PBMC 주사 1-3일 후, 마우스에게 항체를 복강내 주사에 의해 투여한다.
- [0719] 물질:
- [0720] • 완전 인간 IgG1 이소형 대조군: 유레카 테라퓨틱스(Eureka therapeutics), cat#ET-901(전임상 등급) Lot#15-726 유효기간: 2017년 2월
- [0721] • 이필리무맙 (예르보이(Yervoy)): 브리스톨-마이어스 스퀴프(Bristol-Myers Squibb) NDC 0003-2327-11, lot#921873 유효기간: 2015년 4월; lot#4H69490, 유효기간 : 2016년 5월
- [0722] • 완전 인간 IgG4 이소형 대조군: 유레카 테라퓨틱스, cat#ET-904(전임상 등급) Lot#15-726 유효기간: 2017년 2월
- [0723] • 항 인간 ICOS H2L5 hIgG4PE
- [0724] • 햄브롤리주맙 (키트루다): 머크, NDC 0006-3026-02, lot# L010592, 유효기간: 2016년 4월 26일
- [0725] • 복강내 주사:
- [0726] • 투여할 100 μ l를 시린지 및 바늘 내로 끌어당긴다.
- [0727] • 바늘의 사면을 시린지 상의 숫자와 맞춘다.
- [0728] • 우세하지 않은 손으로 동물을 충분히 제지한다.
- [0729] • 바늘 진입 지점: 무릎 바로 위의 복부를 가로지르는 가상의 선을 그리고, 이 선을 따라 동물의 우측 및 정중 선 가까이에 바늘을 삽입할 것이다. 암컷이므로, 진입 지점이 두개 및 마지막 유두의 약간 내측이라는 것을 관찰할 수 있다.
- [0730] • 마우스의 머리가 그의 뒷쪽 말단보다 낮도록 그의 머리를 지면을 향해 약간 기울인다.
- [0731] • 바늘을 복부 내로 약 30-도 각도로 삽입한다.
- [0732] • 바늘의 샤프트는 약 0.5 센티미터의 깊이로 진입하여야 한다.
- [0733] • 주사 후에, 바늘을 회수하고 마우스를 그의 케이지로 되돌린다.
- [0734] • 혈액 및 종양 샘플링
- [0735] • 물질:
- [0736] • 마이크로벳 CB300 (혈청): 브레인트리 사이언티픽(Braintree Scientific), Cat# MV-CB300 16440
- [0737] • 마이크로벳 CB300 (혈액학/칼륨 EDTA): 브레인트리 사이언티픽, Cat# MV-CB300 16444
- [0738] • 혈액:
- [0739] • 마우스에서 1주 1회 꼬리 정맥 채혈하였다.
- [0740] • 유동 세포측정 분석을 위해 혈액 30 μ l를 마이크로벳 CB300 (혈액학/칼륨 EDTA)에 수집하였다.
- [0741] • 혈액의 또 다른 30 μ l를 혈청 마이크로벳 CB300에 수집하고, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하여 응고되게 한 후, 2000 x g에서 원심분리하여 혈청을 수집하였다. 혈청의 추가의 분석까지 -20에서 저장하였다.
- [0742] 종양:
- [0743] • 종양 크기가 2000mm³에 도달하면 마우스를 안락사시켰다. 종양을 수집하고, 하기 절차로 프로세싱하였다.

[0744]

실험 설계

[0745]

모든 연구는 상기 열거된 절차에 따라 제조하였다.

[0746]

H2L5 hIgG4PE 용량 반응

[0747]

본 연구는 A2058 흑색종 종양이 이식된 인간 PBMC 생착된 NSG 마우스에서 H2L5 hIgG4PE의 용량-의존성 활성을 결정하기 위해 설계되었다. 군당 10마리의 마우스가 포함된 9개의 군 및 7마리의 마우스가 포함된 1개의 대조군 (PBMC가 없는 종양만)을 각각의 연구에 배정하였다. 공여자 #7129로부터의 인간 PBMC를 사용한 용량 반응을 위한 치료 요법의 요약은 표 11에 제시한다. H2L5 hIgG4PE를 0.04, 0.4, 1.2 및 4 mg/kg으로 투여하였다. 이 필리무맙은 3 mg/kg으로 투여하고, 항-ICOS 효능제의 Fc-불능화 변이체는 1 mg/kg으로 시험하였다. 시험 군을 비히클 및 매칭되는 이소형 대조군과 관련하여 평가하였다. 생존을 분석은 제49일에 연구 종료 시에 결론지었다.

[0748]

표 11: 마우스에서의 H2L5 hIgG4PE 용량 반응을 위한 치료 요법의 요약

군	처리 1	처리 2	# 마우스 /군	투여
1	종양 + huPBMC (공여자 #7129)	비히클	10	3주 동안 매주 2회
2	종양 + huPBMC (공여자 #7129)	인간 IgG1 이소형 (3mg/kg)	10	3주 동안 매주 2회
3	종양 + huPBMC (공여자 #7129)	이필리무맙 (3mg/kg)	10	3주 동안 매주 2회
4	종양 + huPBMC (공여자 #7129)	인간 IgG4 (4 mg/kg)	10	3주 동안 매주 2회
5	종양 + huPBMC (공여자 #7129)	H2L5 hIgG4PE (0.04 mg/kg)	10	3주 동안 매주 2회
6	종양 + huPBMC (공여자 #7129)	H2L5 hIgG4PE (0.4 mg/kg)	10	3주 동안 매주 2회
7	종양 + huPBMC (공여자 #7129)	H2L5 hIgG4PE (1.2 mg/kg)	10	3주 동안 매주 2회
8	종양 + huPBMC (공여자 #7129)	H2L5 hIgG4PE (4 mg/kg)	10	3주 동안 매주 2회
9	종양 + huPBMC (공여자 #7129)	ICOS-Fc-불능화 (1mg/kg)	10	3주 동안 매주 2회
10	종양 (PBMC 없음) (공여자 #7129)	비처리	7	3주 동안 매주 2회

[0749]

이필리무맙 및 펙브롤리주맙과 조합된 H2L5 hIgG4PE에 의한 효능 및 약역학적 (PD) 활성 연구

[0750]

연구 목적:

[0751]

0.04 mg/kg 및 0.4 mg/kg으로 투여된 H2L5 hIgG4PE 단독요법의 항종양 활성을 평가하기 위함.

[0752]

[0753]

매칭되는 이소형 대조군과 함께 이필리무맙 또는 펙브롤리주맙과 조합 투여된 H2L5 hIgG4PE의 항종양 활성을 평가하기 위함.

[0754]

H2L5 hIgG4PE의 향후 약역학적 활성 연구를 위한 조직의 수집. 군당 10마리의 마우스를 포함하는 총 22개의 처리군을 본 연구에 배정하였다. 군 1-16은 효능 코호트이고, 17-22는 약역학적 활성 코호트였다.

[0755]

조합 처리를 위해, H2L5 hIgG4PE (0.04 또는 0.4 mg/kg) 및 이필리무맙 또는 IgG1 (3 mg/kg) 또는 H2L5 hIgG4PE (0.04 또는 0.4 mg/kg) 및 펙브롤리주맙 또는 IgG4 (5 mg/kg)를 투여하였다. H2L5 hIgG4PE 및 이필리무맙 뿐만 아니라 매칭되는 이소형 대조군을 6 용량 동안 매주 2회 투여하고, 펙브롤리주맙 및 이소형 대조군은 H2L5 hIgG4PE 용량의 종료 시까지 5일마다 투여하였다. 약역학적 조직 수집 코호트의 경우에, H2L5 hIgG4PE를 0.004, 0.04, 0.4 및 1.2 mg/kg으로 투여하였다. 처리군을 비히클 및 이소형 대조군과 관련하여 평가하였다. 공여자 번호 #6711로부터의 인간 PBMC를 사용한 비히클, 이소형 및 H2L5 hIgG4PE 단독 및 이필리무맙 및 펙브롤리주맙과의 조합에 대한 처리군을 표 12에 제시한다. 분석은 제59일에 연구 종료 시에 결론지었다.

[0756] 표 12: A2058 흑색종 종양 모델에서의 마우스의 처리군

군	처리 1	처리 2	# 마우스/군	투여
1	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	비히클	10	6 용량 동안 1주에 2회
2	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	이소형 대조군 (IgG1 3mg/kg + IgG4 5mg/kg)	10	IgG1 6 용량 동안 1주에 2회 IgG4 ICOS 용량 종료까지 5일마다
3	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	이필리무맙 3mg/kg + IgG4 5mg/kg	10	6 용량 동안 1주에 2회 IgG4 ICOS 용량 종료까지 5일마다
4	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	팜브롤리주맙 5mg/kg + IgG1 3mg/kg	10	IgG1 6 용량 동안 1주에 2회 팜브롤리주맙 ICOS 용량 종료까지 5일마다
5	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	H2L5 hIgG4PE 0.04 mg/kg + IgG1 3mg/kg	10	IgG1 및 ICOS 6 용량 동안 1주에 2회
6	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	H2L5 hIgG4PE 0.4 mg/kg + IgG1 3mg/kg	10	IgG1 및 ICOS 6 용량 동안 1주에 2회
7	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	이필리무맙 3mg/kg + 팜브롤리주맙 5mg/kg	10	이필리무맙 6 용량 동안 1주에 2회 팜브롤리주맙 ICOS 용량 종료까지 5일마다
8	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	H2L5 hIgG4PE 0.04 mg/kg + 이필리무맙 3mg/kg	10	이필리무맙 및 ICOS 6 용량 동안 1주에 2회
9	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	H2L5 hIgG4PE 0.4 mg/kg + 이필리무맙 3mg/kg	10	이필리무맙 및 ICOS 6 용량 동안 1주에 2회
10	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	H2L5 hIgG4PE 0.04 mg/kg + 팜브롤리주맙 5mg/kg	10	ICOS 6 용량 동안 1주에 2회 팜브롤리주맙 ICOS 용량 종료까지 5일마다
11	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	H2L5 hIgG4PE 0.4 mg/kg + 팜브롤리주맙 5mg/kg	10	ICOS 6 용량 동안 1주에 2회 팜브롤리주맙 ICOS 용량 종료까지 5일마다
12	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	IgG4 5mg/kg	10	6 용량 동안 1주에 2회
13	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	팜브롤리주맙 2.5mg/kg	10	팜브롤리주맙 ICOS 용량 종료까지 5일마다
14	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	팜브롤리주맙 5mg/kg	10	팜브롤리주맙 ICOS 용량 종료까지 5일마다
15	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	H2L5 hIgG4PE 0.4 mg/kg	10	ICOS 6 용량 동안 1주에 2회
16	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	H2L5 hIgG4PE 0.4 mg/kg + 팜브롤리주맙 5mg/kg + Ipi	10	ICOS 6 용량 동안 1주에 2회 팜브롤리주맙 ICOS 용량 종료까지 5일마다
17	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	비히클	10	약역학적 활성에 대해 1주에 2회, 제2 용량 24 hr 후 5마리의 마우스를 수거하고 제4 용량 24 hr 후 5마리의 마우스를 수거함
18	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	이소형 대조군 (IgG4) 1.2 mg/kg	10	약역학적 활성에 대해 1주에 2회, 제2 용량 24 hr 후 5마리의 마우스를 수거하고 제4 용량 24 hr 후 5마리의 마우스를 수거함
19	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	H2L5 hIgG4PE 0.004 mg/kg	10	약역학적 활성에 대해 1주에 2회, 제2 용량 24 hr 후 5마리의 마우스를 수거하고 제4 용량 24 hr 후 5마리의 마우스를 수거함
20	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	H2L5 hIgG4PE 0.04 mg/kg	10	약역학적 활성에 대해 1주에 2회, 제2 용량 24 hr 후 5마리의 마우스를 수거하고 제4 용량 24 hr 후 5마리의 마우스를 수거함
21	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	H2L5 hIgG4PE 0.4 mg/kg	10	약역학적 활성에 대해 1주에 2회, 제2 용량 24 hr 후 5마리의 마우스를 수거하고 제4 용량 24 hr 후 5마리의 마우스를 수거함
22	종양 + huPBMC (공여자 #6711)	H2L5 hIgG4PE 1.2 mg/kg	10	약역학적 활성에 대해 1주에 2회, 제2 용량 24 hr 후 5마리의 마우스를 수거하고 제4 용량 24 hr 후 5마리의 마우스를 수거함

[0757]

[0758] 이필리무맙 또는 팜브롤리주맙과 조합 투여된 H2L5 hIgG4PE를 평가하기 위한 효능 연구

[0759]

본 연구는 A2058 흑색종 종양 모델을 사용하여 인간 PBMC 생착된 NSG 마우스에서 매칭되는 이소형 대조군과 함께 이필리무맙 또는 팜브롤리주맙과 조합된 H2L5 hIgG4PE (0.01 및 0.04 mg/kg으로 투여됨)의 항종양 효능을 평가하기 위해 설계되었다. 군당 10마리의 마우스가 포함된 총 13개의 군을 연구에 배정하였다. 군 2는 인간화 IgG1 및 IgG4의 조합된 이소형 대조군이다. H2L5 hIgG4PE를 단일 작용제로서 0.01 mg/kg (군 12) 및 0.04 mg/kg (군 13)으로 투여하였다. 조합 처리를 위해, H2L5 hIgG4PE (0.01 및 0.04 mg/kg) 및 이필리무맙 또는 IgG1 (3 mg/kg) 또는 H2L5 hIgG4PE (0.01 및 0.04 mg/kg) 및 팜브롤리주맙 또는 IgG4 (5 mg/kg)를 투여하였다. H2L5 hIgG4PE 및 이필리무맙 뿐만 아니라 매칭되는 이소형 대조군을 6 용량 동안 매주 2회 투여하고, 팜브롤리주맙 및 이소형 대조군은 H2L5 hIgG4PE 용량의 종료 시까지 5일마다 투여하였다. 공여자 # 4568로부터의 인간 PBMC를 사용한 처리군의 요약을 표 13에 제시한다. 처리군을 비히클 및 이소형 대조군과 관련하여 평가하였다. 생존율 분석은 제33일에 연구 종료 시에 결론지었다.

[0760] 표 13: A2058 흑색종 종양 모델에서의 마우스의 처리군

군	처리1	처리2	# 마우스/ 군	투여
1	종양 + huPBMC (공여자 #4568)	비히클	10	6 용량 동안 1주에 2회
2	종양 + huPBMC (공여자 #4568)	이소형 대조군 (IgG1 3mg/kg+ IgG4 5mg/kg)	10	IgG1 6 용량 동안 1주에 2회 IgG4 ICOS 용량 종료까지 5일마다
3	종양 + huPBMC (공여자 #4568)	이펠리무맙 3mg/kg + IgG4 5mg/kg	10	6 용량 동안 1주에 2회 IgG4 ICOS 용량 종료까지 5일마다
4	종양 + huPBMC (공여자 #4568)	팸브롤리주맙 5mg/kg + IgG1 3mg/kg	10	IgG1 6 용량 동안 1주에 2회 팸브롤리주맙 ICOS 용량 종료까지 5일마다
5	종양 + huPBMC (공여자 #4568)	H2L5 hIgG4PE 0.01 mg/kg + IgG1 3mg/kg	10	IgG1 및 ICOS 6 용량 동안 1주에 2회
6	종양 + huPBMC (공여자 #4568)	H2L5 hIgG4PE 0.04 mg/kg + IgG1 3mg/kg	10	IgG1 및 ICOS 6 용량 동안 1주에 2회
7	종양 + huPBMC (공여자 #4568)	이펠리무맙 3mg/kg + 팸브롤리주맙 5mg/kg	10	이펠리무맙 6 용량 동안 1주에 2회 팸브롤리주맙 ICOS 용량 종료까지 5일마다
8	종양 + huPBMC (공여자 #4568)	H2L5 hIgG4PE 0.01mg/kg + 이펠리무맙 3mg/kg	10	이펠리무맙 및 ICOS 6 용량 동안 1주에 2회
9	종양 + huPBMC (공여자 #4568)	H2L5 hIgG4PE 0.04 mg/kg + 이펠리무맙 3mg/kg	10	이펠리무맙 및 ICOS 6 용량 동안 1주에 2회
10	종양 + huPBMC (공여자 #4568)	H2L5 hIgG4PE 0.01 mg/kg + 팸브롤리주맙 5mg/kg	10	ICOS 6 용량 동안 1주에 2회 팸브롤리주맙 ICOS 용량 종료까지 5일마다
11	종양 + huPBMC (공여자 #4568)	H2L5 hIgG4PE 0.04 mg/kg + 팸브롤리주맙 5mg/kg	10	ICOS 6 용량 동안 1주에 2회 팸브롤리주맙 ICOS 용량 종료까지 5일마다
12	종양 + huPBMC (공여자 #4568)	H2L5 hIgG4PE 0.01mg/kg	10	6 용량 동안 1주에 2회
13	종양 + huPBMC (공여자 #4568)	H2L5 hIgG4PE 0.04 mg/kg	10	6 용량 동안 1주에 2회

[0761]

[0762]

통계적 분석

[0763]

생존 분석을 위한 사건은 종양 부피 >2000 mm³, 종양 궤양화, 마우스 체중 감소>20%, 빈사 또는 사망 발견 중 어느 것이든 먼저 일어나는 것이다. 컷-오프 부피까지의 정확한 시간은 로그 종양 부피와 2개의 관찰 (컷-오프 부피를 초과한 제1 관찰 및 컷-오프 부피 직전의 하나의 관찰)일 사이에 선형 선을 피팅시켜 추정하였다. 카플란-마이어 (KM) 방법을 수행하여 주어진 시간에서 상이한 처리군의 생존 확률을 추정하였다. 종점까지의 중앙 시간 및 그의 상응하는 95% 신뢰 구간을 보고하였다. 이어서, 로그-순위 검정에 의해 KM 생존 곡선이 임의의 2개의 군 사이에서 통계적으로 상이한지 여부를 검정하였다.

[0764]

군당 10마리의 동물이 존재하는 (즉 임의의 동물이 안락사되기 전) 마지막 날로부터의 종양 부피 데이터를 사용하여 상이한 처리군 사이에 종양 부피 비교를 행하였다. 분석 전에, 상이한 처리군에서의 분산의 격차로 인해 종양 부피를 자연 로그 변환시켰다. 이어서 로그 변환된 데이터에 대해 ANOVA에 이어 쌍별 비교를 수행하였다.

- [0765] 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 종양 성장 및 체중 데이터를 플롯팅하였다.
- [0766] 결과
- [0767] H2L5 hIgG4PE 용량 반응 (도 20A)
- [0768] 종양 성장 억제:
- [0769] 대조군: 인간 PBMC (공여자 7129)는 NSG 마우스에서 A2058 종양 성장에 대해 어떠한 효과도 제시하지 않았다. 인간 PBMC를 함유하거나 함유하지 않는 A2058 종양 보유 마우스, 비히클 및 이소형 대조군 항체로 처리된 인간 PBMC를 함유하는 A2058 종양 보유 마우스는 예상되는 바와 같이 진행되는 종양이 발생하였다 (군 #1 vs. 군 #10, 군 #1 vs. 군 #2, 군 #1 vs. 군 #4, $p=1$).
- [0770] 3 mg/kg으로의 이필리무맙 처리는 (군 #3) 비히클 대조군 #1과 비교 시 유의한 종양 성장 억제 ($p<0.03$)를 입증하였지만, 이소형 대조군 #2와 비교 시 통계적 유의성이 상실되었다 ($p<0.22$). 이는 이소형 항체가 종양 성장에 영향을 미칠 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0771] 0.4 mg/kg으로의 H2L5 hIgG4PE 처리는 다른 용량과 비교 시 종양 성장 억제의 경향 및 마우스의 증가된 생존율을 입증하였지만, 비히클 또는 이소형 대조군과 비교 시 영향은 통계적으로 유의하지 않았다.
- [0772] 임상 관찰:
- [0773] 마우스에서 체중 감소가 연구 동안 관찰되었고, 이는 연구 종료 시 대략 20%였다. GvHD 및 종양 부담 둘 다가 마우스 체중에서 저하를 발생시킬 수 있는 것으로 보고된 바 있지만, 본 연구에서 체중 감소는 PBMC 생착이 없는 종양 보유 마우스 (군 #10)가 동일한 경향을 제시하였기 때문에 A2058 종양과 더 관련이 있는 것으로 보인다. 종양 궤양화는 연구 동안 이소형 대조군을 포함한, 다중 종양에서 관찰되었다.
- [0774] 마우스 운명:
- [0775] 대부분의 마우스는 종양이 부피 $>2000\text{mm}^3$ 에 도달하면 제거되었다. 3마리의 마우스는 종양 궤양화로 인해 안락사시키고, 3마리의 마우스는 $>20\%$ 의 체중 감소로 인해 안락사시켰다. 비히클에서 2마리 및 이소형 대조군에서 총 3마리를 포함하여, 군에 걸쳐 무작위로 9마리의 마우스가 사망한 것으로 발견되었다. 이들 사망은 이식편-대-숙주 질환 상태에 대한 모델의 감수성에 기인한 것이고, 비히클 또는 이소형 대조군과 비교 시 처리군에 의해 어떠한 패턴도 관찰되지 않았기 때문에 처리와는 관련이 없었다.
- [0776] 이필리무맙 및 펙트롤리주맙과 조합된 H2L5 hIgG4PE에 의한 효능 연구 (도 20B)
- [0777] 종양 성장 억제:
- [0778] 대조군: 비히클 또는 이소형 대조군 항체로 처리된 인간 PBMC를 갖는 A2058 종양 보유 마우스는 예상되는 바와 같은 성장하는 종양이 발생하였다.
- [0779] 단독요법:
- [0780] IgG4와 조합된 3mg/kg으로의 이필리무맙 처리 (군 #3)는 비히클 대조군 #1과 비교 시 유의한 종양 성장 억제 ($p<0.04$)를 발생시켰다. 그러나, 이소형 대조군 #2와 비교 시, 통계적 유의성은 상실되었다 ($p<0.23$).
- [0781] 2.5 또는 5mg/kg으로의 펙트롤리주맙 처리 단독 (군 #13, 14)은 비히클 또는 이소형 대조군 #12와 비교 시 통계적 유의성이 없는 관찰가능한 종양 성장 억제를 제시하였다. IgG1과 조합된 펙트롤리주맙 (군 #4)은 통계적 유의성이 없는 관찰가능한 종양 성장 억제를 제시하였지만, 비히클 대조군 #1과 비교 시 생존에서 유의한 증가가 관찰되었다 ($p<0.04$). 이소형 대조군 #2와 비교 시 통계적 유의성은 상실되었다 ($p<0.4$).
- [0782] 0.4 mg/kg으로의 H2L5 hIgG4PE 처리 단독 (군 #15)은 비히클 또는 이소형 대조군 #12와 비교 시 통계적 유의성이 없는 관찰가능한 종양 성장 억제를 제시하였다. IgG1과 조합된 0.04 또는 0.4 mg/kg으로의 H2L5 hIgG4PE (군 #5 및 6)는 종양 진행 및 마우스 생존에서 관찰가능한 지연을 제시하였지만 통계적 유의성에는 도달하지 못했다.
- [0783] 조합 치료:
- [0784] H2L5 hIgG4PE (0.04 또는 0.4 mg/kg)의 이필리무맙 (3mg/kg)과의 조합. 군 #8 및 #9는 이필리무맙 단독 (군 #3)과 비교 시 어떠한 추가의 종양 성장 억제도 제시하지 않았다. H2L5 hIgG4PE (0.04 또는 0.4 mg/kg)의 펙

브롤리주맵 (5mg/kg)과의 조합군 #10 및 #11은 웹브롤리주맵 단독요법, 군 #4, 또는 H2L5 hIgG4PE 단독요법군 #5 및 #6과 비교 시 어느 정도이기는 하지만 유의하지 않은 종양 성장 억제 및 마우스 생존을 입증하였다.

- [0785] 임상 관찰:
- [0786] 연구 동안 관찰된 마우스 체중 감소는 대략 20%였다. 대부분의 군에 걸쳐 연구 동안 다중 종양에서 종양 궤양 화가 명백하였다.
- [0787] 마우스 운명:
- [0788] 160마리의 마우스 중 총 100마리를 종양 부피가 >2000mm³에 도달하였을 때 안락사시켰다. 29마리의 마우스는 종양 궤양화로 인해 안락사시켰고, 18마리의 마우스는 사망한 것으로 발견되었고, 12마리의 마우스는 체중 감소 >20%로 인해 안락사시켰고, 1마리의 마우스는 빈사에 따라 안락사시켰다. 마우스는 이소형 대조군을 포함한 군에 걸쳐 사망한 것으로 발견되었다.
- [0789] 군 #2. 이들 사망은 이식편-대-숙주 질환 상태에 대한 모델의 감수성에 기인한 것이고, 이소형 대조군과 비교 시 처리군에 의해 어떠한 패턴도 관찰되지 않았기 때문에 처리와는 관련이 없었다.
- [0790] 이필리무맵 또는 웹브롤리주맵과 조합되어 투여된 H2L5 hIgG4PE를 평가하는 효능 연구 (도 20C)
- [0791] 종양 성장 지연:
- [0792] 대조군: 비히클 또는 이소형 대조군 항체로 처리된 인간 PBMC를 갖는 A2058 종양 보유 마우스는 예상되는 바와 같은 성장하는 종양이 발생하였다.
- [0793] 단독요법:
- [0794] IgG4와 조합된 3mg/kg으로의 이필리무맵 처리 (군 #3)는 비히클 대조군 #1과 비교 시 유의한 종양 성장 억제 ($p < 0.02$) 및 생존에서의 유의한 증가 ($p < 0.01$)를 입증하였다. 그러나, 이소형 대조군 #2와 비교 시, 마우스 생존에서의 유의한 증가는 유지되었지만 ($p < 0.04$) 종양 성장 억제는 유의성 ($p < 0.13$)에 도달하지 못했다.
- [0795] IgG1과 조합된 5mg/kg으로의 웹브롤리주맵 처리 (군 #4)는 비히클 또는 이소형 대조군 #2와 비교 시 통계적 유의성이 없는 종양 성장 억제를 제시하였다.
- [0796] 0.01 mg/kg 또는 0.04 mg/kg으로의 H2L5 hIgG4PE 처리 단독 (군 #12 및 #13)은 비히클 대조군 #1과 비교 시 유의한 종양 성장 억제 ($p < 0.03$)를 입증하였다. 0.04 mg/kg으로 투여된 H2L5 hIgG4PE도 또한 비히클 대조군 #1과 비교 시 마우스 생존에서 유의한 증가 ($p < 0.048$)를 제시하였다. 그러나, 이소형 대조군 #2와 비교 시, 종양 성장 억제 및 생존은 군 #12 및 #13의 경우에 통계적 유의성에 도달하지 못했다. IgG1과 조합된 0.01 mg/kg으로의 H2L5 hIgG4PE (군 #5)는 비히클 대조군 #1과 비교 시 유의한 종양 성장 억제 ($p < 0.03$) 및 마우스 생존 ($p < 0.03$)을 제시하였다. 그러나, 이소형 대조군 #2와 비교 시, 종양 성장은 지연되었고 생존은 통계적 유의성에 도달하지 못했다. IgG1과 조합된 0.04 mg/kg으로의 H2L5 hIgG4PE (군 #6)는 관찰가능한 종양 성장 억제 및 마우스 생존을 제시하였지만, 통계적 유의성에 도달하지 못했다.
- [0797] 조합 치료:
- [0798] H2L5 hIgG4PE의 이필리무맵과의 조합 (0.01 mg/kg 플러스 이필리무맵 3mg/kg; 군 #8)은 관찰가능한 종양 성장 억제 및 마우스 생존을 제시하였지만 통계적 유의성에 도달하는데 실패하였다. 이필리무맵과의 H2L5 hIgG4PE 조합 (0.04 mg/kg 플러스 이필리무맵 3mg/kg; 군 #9)은 비히클 대조군 #1 또는 이소형 대조군 #2 ($p < 0.02$)와 비교 시 유의한 종양 성장 억제 ($p < 0.00$) 및 마우스 생존에서의 유의한 증가 ($p < 0.04$)를 입증하였다. 그러나, 이소형 대조군과 비교 시 생존은 통계적 유의성에 도달하는데 실패하였다. 조합 활성은 단독요법 이필리무맵 군 #3 또는 H2L5 hIgG4PE 단독요법 군과 비교 시 유의성에 도달하지 못했다.
- [0799] 웹브롤리주맵 (5 mg/kg)과의 H2L5 hIgG4PE (0.01 mg/kg 또는 0.04 mg/kg) 조합, 군 #10 및 #11은, 비히클 대조군 #1과 비교 시 유의한 종양 성장 억제 ($p \leq 0.03$) 및 관찰되는 마우스 생존의 유의한 증가 ($p < 0.03$)를 제시하였다. 이소형 대조군 #2와 비교 시, 종양 성장 억제 유의성은 웹브롤리주맵과의 0.04 mg/kg H2L5 hIgG4PE 조합에서 유지되었다 ($p < 0.03$). 그러나 생존 이익은 통계적 유의성에 도달하는데 실패하였다. 조합은 단독요법 처리군 웹브롤리주맵 군 #3 또는 H2L5 hIgG4PE 군 #5 또는 #6과 비교 시 유의성에 도달하는데 실패하였다. 따라서, 웹브롤리주맵과 조합된 H2L5 hIgG4PE (0.01 또는 0.04 mg/kg 플러스 웹브롤리주맵 5mg/kg)는 종양 성장 억제 및 마우스 생존에서의 증가를 입증하였지만 이소형 대조군 또는 단독요법 대비 통계적 유의성에 도달하는데

실패하였다.

- [0800] 임상 관찰:
- [0801] 연구 동안 관찰된 마우스 체중 감소는 대략 20%였다. 대부분의 군에 걸쳐 연구 동안 종양 궤양화가 관찰되었다.
- [0802] 마우스 운명:
- [0803] 총 91마리의 마우스를 종양 크기 >2000mm³로 인해 안락사시키고, 34마리의 마우스는 종양 궤양화로 인해 안락사시켰고, 5마리의 마우스는 사망한 것으로 발견되었다. 이들 사망은 이식편-대-숙주 질환 상태에 대한 모델의 감수성에 기인한 것이었다.
- [0804] 논의
- [0805] 단독요법으로서 및 펨브롤리주맙 뿐만 아니라 이필리무맙과의 조합으로서 H2L5 hIgG4PE의 효능을 A2058 흑색종 종양을 갖는 인간 PBMC 생착된 NSG 마우스 모델에서 평가하였다. 인간 PBMC가 성체 면역결핍 NSG (NOD/SCID/IL-2R γ null) 마우스에 정맥내로 주사된 이 모델은 Hu-PBMC NSG 모델로서 공지되어 있다. 이는 이식편-대-숙주 질환 (GvHD)을 유발하고, 이펙터 및 기억 T 세포 활성을 연구하는데 사용되어 왔다. Hu-PBMC NSG 모델에 인간 암 세포주 A2058을 피하로 이식하여 종양 성장에 대한 인간 면역요법제 항체의 효과를 조사하였다. 이러한 모델의 한계는 동계 마우스 종양 모델에 의해 가능한 바와 같은 보다 긴 기간 동안의 생존 모니터링을 막는 GvHD 증상의 발병, 체중 감소, 및 빈번한 종양 궤양화를 포함한다.
- [0806] 0.04 mg/kg 내지 4 mg/kg 범위의 용량으로의 H2L5 hIgG4PE를 평가한 초기 연구는 보다 낮은 범위의 용량이 어느 정도의 종양 성장 억제에 입증한다는 것을 제시하였다. 0.04 내지 0.4mg/kg 범위의 용량 군에서, 이소형 대조군과 비교 시 통계적으로 유의하지는 않지만, 종양 진행에서의 지연 및 증가된 마우스 생존이 관찰되었다. 이들 연구에 기초하여, 0.04 내지 0.4 mg/kg의 H2L5 hIgG4PE 용량을 2명의 상이한 공여자 (공여자 번호 4568 및 6711)로부터의 PBMC 이식편을 사용한 2종의 연구에서 단독 및 펨브롤리주맙 및 이필리무맙과의 조합을 추가로 평가하기 위해 선택하였다. H2L5 hIgG4PE 단독요법 및 펨브롤리주맙과의 조합의 경우에 수행된 2종의 조합 연구 중 1종에서 어느 정도의 반응이 관찰되었다. PBMC 공여자 4568을 사용한 조합 연구 (표 13, 도 20C)는 단독요법 및 조합의 항종양 활성을 입증한 한편, PBMC 공여자 6711을 사용한 연구 (표 12, 도 20B)는 유의한 항종양 효과를 제시하지 않았고, 이는 임상에서 관찰될 수 있는 환자 반응 가변성을 반영하는, 연구 사이의 공여자 PBMC 차이의 결과일 가능성이 있다. PBMC 공여자 4568을 사용한 이러한 제2 조합 연구에서, 증진된 종양 성장 억제 및 증가된 마우스의 생존율이 어느 하나의 작용제 단독과 비교 시 조합군에서 관찰되었지만, 이러한 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 그러나 펨브롤리주맙 5 mg/kg과 조합된 H2L5 hIgG4PE 0.04 mg/kg 용량은 제1 용량 10일 후 종양 부피에서 통계적으로 유의한 감소 및 이소형 대조군 대비 증가된 생존율 ($p \leq 0.05$)을 발생시켰고 단독요법은 그렇지 않았으므로 조합 상승작용이 관찰되었다. 실제로, H2L5 hIgG4PE 및 펨브롤리주맙 조합군의 마우스 중 50%가 제33일까지 연구 중 유지되었지만, 종양 궤양화로 인해 제거되었다. 이러한 조합군에서 오직 4마리의 마우스만이 종양 부피로 인해 연구로부터 제거되었지만, 펨브롤리주맙 및 이소형 군에서는 8 내지 9마리의 마우스가 연구로부터 제거되었다.
- [0807] 항-PD1 요법은 이러한 모델에서, 이소형 처리된 코호트와 비교 시 펨브롤리주맙 처리된 코호트에 의해 관찰되는 종양 성장 및 생존에서의 제한된 변화에 의해 관찰되는 바와 같은, 통계적으로 유의한 활성을 입증하지 않았다. 이필리무맙 단독요법은 둘 다의 연구에서 펨브롤리주맙보다 어느 정도 우수한 종양 성장 억제의 경향을 제시하였고, 반응성 PBMC 공여자 4568을 사용한 제2 조합 연구에서 이소형 대비 생존에서 통계적으로 유의한 증가를 제시하였다 ($p \leq 0.04$). 이필리무맙 3 mg/kg과 조합된 H2L5 hIgG4PE 0.01 mg/kg 용량은 이필리무맙 대비 생존에서 유의한 증가를 제시하였지만 ($p \leq 0.02$), H2L5 hIgG4PE 단독요법과 대비해서는 그렇지 않았다. 이 모델에서 어느 하나의 작용제 단독과 비교 시 H2L5 hIgG4PE 및 이필리무맙의 조합에 의해 관찰되는 종양 부피에 대한 추가의 유의한 효과는 존재하지 않았다. 비히클 및 이소형 대조군을 포함한 모든 처리군에 걸쳐 마우스는 운명 표에 보고된 바와 같이 사망한 것으로 발견되었다. 이들 사망은 이식편-대-숙주 질환 상태에 대한 모델의 감수성에 기인한 것이고, 처리와는 관련이 없었다.
- [0808] 실시예 12: 항-뮤린 ICOS 효능제 항체 단독 및 항-PD1 및 항-CTLA-4 항체와의 조합의 생체내 기능적 활성
- [0809] CT26 및 EMT6 동계 마우스 종양 모델
- [0810] CT26 뮤린 결장 암종 마우스 종양 모델

- [0811] 방법
- [0812] 본 연구는 연구의 개시 전에 GSK 동물 실험 윤리 위원회에 의해 승인받은 프로토콜 하에 수행하였다.
- [0813] 동물
- [0814] 본 연구에서 164마리의 암컷 BALB/c 마우스는 하를란 스포라그 돌리로부터의 것이다. 마우스는 그들이 접종될 때인 연구 시작 시 6-8주령이었다.
- [0815] 세포 배양 및 접종
- [0816] 1 바이알의 CT-26 세포 (ATCC: CRL-2638) (3×10^6 개 세포; P-11)를 -140°C 에서 해동시켜 10% FBS를 함유하는 RPMI 중에 플레이팅하였다. 세포를 10일에 걸쳐 3회 계대배양하였다. 트립신/EDTA를 사용하여 계대배양 동안 배양 플라스크로부터의 세포 탈착을 용이하게 하였다. 세포를 수집하고, 2회 세척하고, FBS가 없는 RPMI 중에 5×10^5 개 세포/ml로 재현탁시켰다. 마우스 우측 뒷쪽 옆구리에 0.1ml 세포 (5×10^4 개 세포/마우스)를 피하로 접종하였다.
- [0817] 세포 수집 및 접종일에, 베크만 쿨터 바이-셀 XR 상에서 세포 계수를 행하고, 혈구계수기에 의해 체크하였다. 트립신/EDTA를 사용하여 세포를 플라스크로부터 탈착시키고, 제1로 RPMI +10%FBS 및 제2로 RPMI 단독으로 2회 세척하고, 10ml RPMI 중에 재현탁시켰다. 178×10^6 개의 세포를 20ml RPMI 중에 98.8% 생존율로 수집하였다. 1.685ml 세포 현탁액 (총 15×10^6 개 세포)을 28.315ml RPMI에 첨가하였다.
- [0818] 15×10^6 개 세포/30ml 배지 = 5×10^5 개 세포/ml. 이는 5×10^4 개 세포/100 μl 와 동등하다.
- [0819] 항체 제제 및 제조
- [0820] 항체를 투여일에 스톡 공급원 바이알로부터 멸균 0.9% 염수 중 목적하는 농도로 희석하였다. 항-ICOS 효능제 클론 C398.4를 0.05mg/kg 및 0.5mg/kg으로 시험하였다. 각각의 용량을 또한 항-PD1 10mg/kg 및 항-CTLA-4 1mg/kg 둘 다와 함께 시험하였다.
- [0821] 실험 프로토콜(들)
- [0822] 종양 모니터링 및 투여
- [0823] 마우스에게 제0일에 접종하였다. 제11일에 체중 및 종양 부피를 측정하였다. 마우스를 표 14에 제시된 12개의 연구군으로 종양 크기에 기초하여 10마리의 마우스/군으로 무작위화하였다. 무작위화는 스테디로그 스테디 디렉터 소프트웨어를 사용하여 행하였다. 무작위화일에 시작하여 총 6회 용량 동안 계속해서 매주 2회 연구 설계 차트에 기초하여 마우스에게 투여하였다. 투여는 100 μl 부피의 0.9% 염수 비히클 중 북막내 (IP)로 행하였다. 종양 부피 및 체중을 연구 내내 1주에 3회 측정하였다.
- [0824] 종점
- [0825] 종양 부피가 2000mm^3 를 초과하면 종양 부담으로 인해 마우스를 연구로부터 제거하였다. 종양 부피는 길이 및 너비 캘리퍼 측정을 하기 식: $TV=0.52*L*W^2$ 에 적용하여 계산하였다.
- [0826] 추가적으로 종양에서 개방성 궤양화가 발생하면 마우스를 연구로부터 제거하였다. 궤양화는 실험 내내 관찰되었지만, 궤양화 위의 가피형성만으로는 그것이 개방된 구멍을 형성하지 않는 한 종점이 아니었다.
- [0827] 비록 본 연구에서 어떠한 마우스에도 적용되지 않았지만, 연구 시작 시 확립된 제3 종점은 20% 체중의 감소였다.

[0828] 약물 및 물질

항체	판매업체	카탈로그 #	로트	클론
ICOS	바이오레전드	93108	B205973	C398.4
PD1	바이오엑셀	BE0146	5792-10/0815B	RMP1-14
CTLA-4	바이오엑셀	BE0164	5632-4/0715	9D9
마우스 IgG2b	바이오엑셀	BE0086	4700/1014	MCP-11
랫 IgG2a	바이오엑셀	BE0089	5679-6/0815	2A3
햄스터 IgG	바이오레전드	92257	B205974	HTK888

[0829]

[0830] 모든 항체를 0.9% 염수 중 목적하는 농도로 희석시켰고, 염수는 비히클 대조군으로서 사용하였다.

[0831] 데이터 분석

[0832] 생존 분석을 위한 사건은 2000 mm³의 종양 부피 또는 종양 궤양화 중 어느 것이든 먼저 일어나는 것이다. 컷-오프 부피까지의 정확한 시간은 로그 종양 부피와 2개의 관찰 (컷-오프 부피를 초과한 제1 관찰 및 컷-오프 부피 직전의 하나의 관찰)일 사이에 선형 선을 피팅시켜 추정하였다. 카플란-마이어 (KM) 방법을 수행하여 주어진 시간에서 상이한 처리군의 생존 확률을 추정하였다. 종점까지의 중앙 시간 및 그의 상응하는 95% 신뢰 구간을 보고하였다. 이어서, 로그-순위 검정에 의해 KM 생존 곡선이 임의의 2개의 군 사이에서 통계적으로 상이한지 여부를 검정하였다.

[0833] 상이한 처리군 사이에서 초기 투여 17일 후에 종양 부피를 비교하였다. 분석 전에, 상이한 처리군에서의 분산의 격차로 인해 종양 부피를 자연 로그 변환시켰다. 이어서 로그 변환된 데이터에 대해 ANOVA에 이어 쌍별 비교를 수행하였다.

[0834] 표 14: 연구군

군 번호	처리
1	염수
2	마우스 IgG2b 20 µg + 햄스터 IgG 10 µg
3	랫 IgG2a 200 µg + 햄스터 IgG 10 µg
4	햄스터 IgG 10 µg
5	ICOS 1 µg
6	ICOS 10 µg
7	CTLA-4 20 µg
8	PD1 200 µg
9	ICOS 1 µg + CTLA-4 20 µg
10	ICOS 10 µg + CTLA-4 20 µg
11	ICOS 1 µg + PD1 200 µg
12	ICOS 10 µg + PD1 200 µg

[0835]

[0836] 처리군 사이의 생존 분석에 의한 사건까지의 일수의 비교 및 제10일의 로그 변환된 종양 부피의 비교로부터의 미가공 p-값, 뿐만 아니라 오류 발견율 (FDR) 조정된 p-값을 상기 표에 제시한다. FDR 조정된 p-값 ≤ 0.05를 사용한 비교가 통계적으로 유의한 것으로 선언된다.

[0837] 결과

[0838] 마우스 운명 추적은 마우스의 수가 종양 부담 및 종양 궤양화로 인해 연구로부터 제거되었음을 제시하였다. 모든 남아있는 마우스는 579.16mm³의 종양 부피를 갖는 G7에서의 1마리의 마우스를 제외하고 연구 제61일에 종양이 부재하였다.

[0839] 생존 (종점까지의 시간)의 경우에 군 9 및 12는 비히클 대조군과 비교 시 생존에서 유의한 증가를 제시하였다 (각각 p=0.008 및 p=0.001). 군 12는 군 2, 4, 및 5와 비교 시 통계적으로 유의한 연장된 생존을 제시하였다 (p=0.006, 0.001, 0.02). 그러나, 어떠한 조합군도 단독요법에 비해 통계적으로 유의한 (p<0.05) 증가된 생존을 제시하지는 않았다. (도 21)

[0840] 논의

- [0841] 조합 요법군, 특히 고용량 항-ICOS 및 항-PD1 조합 (군 12)은, 제61일에 통계적 유의성에 도달하지는 못했지만, 단독요법 및 이소형 대조군에 비해 종양 성장 억제 및 증가된 생존을 입증하였다. 군 12에 대한 이소형 대조군은 래트 IgG2a + 햄스터 IgG 군 3이었다. 비교를 위한 단독요법군은; ICOS 10 µg (군 6) 및 PD1 200 µg (군 8)이었다. 군 3에서 1마리, 군 6에서 1마리 및 군 8에서 1마리와 비교하여 총 5마리의 마우스가 군 12에서 종양 부재로 남았다. 각각의 마우스가 미리 결정된 연구 종점 중 임의의 것에 도달한 일수를 취하여 생존 이익을 정량화하였다. 다수의 마우스를 개방성 종양 কে양화로 인해 연구로부터 제거하였고, 종양 부담으로 인해서는 제거하지 않았다.
- [0842] 고용량 ICOS + CTLA-4 조합군 (군 10)에서 제31일까지 종양 কে양화로 인해 증가된 수의 마우스가 제거되었고, 이는 이러한 조합이 제공하는 생존 및 항종양 이익을 차폐할 가능성이 있다. 이러한 군에서, 5마리의 마우스가 종양 কে양화로 인해 제거되었고 종양 부담이 2000mm³에 도달한 것은 단지 2마리였다. 모든 종양은 연구에서 제외될 때까지 여전히 어느 정도의 크기인 것이 종양 কে양화로 인해 제거되었고, 종양 কে양화는 이들 마우스에서 요법-유도된 항종양 면역 반응의 결과일 수 있는 것으로 예상된다. 제61일에 이러한 군에서 3마리의 마우스가 종양 부재로 남았다. 종양 부담으로 인해 제거된 2마리의 마우스는 모든 군의 종양 부담으로 인해 제거된 마우스 중 최저 수였다.
- [0843] EMT6 유방 암종 마우스 종양 모델
- [0844] 실험 프로토콜(들)
- [0845] 본 문헌에 기재된 모든 절차 및 안락사 기준은 IACUC 프로토콜 AUP0606에 따랐다. 동물을 칭량하고, 마우스당 100 µl의 1x10⁵개의 EMT6 종양 세포를 우측 뒷쪽 4분의 1 지점에 접종하였다. 접종된 마우스의 수는 연구에 필요한 수의 적어도 130%와 동등하였다. 30% 실패율을 가정할 때 (연구 시작 시점에 너무 크거나 또는 너무 작음), 목표는 각각의 군에 대해 n=10을 갖는 것이다. 종양 세포 접종 후, 종양 성장 및 총 체중을 파올러 "프로 맥스(ProMax)" 디지털 캘리퍼를 사용하여 4주 이상 동안 1주 3회 측정하였다. 항체를 상업적 판매업체로부터 획득하여 0.9% 염수 중 목적하는 농도로 희석하였다. 투여 (i.p.)는 총 6회 용량 동안 격주로 행하였고, 접종 후 대략 7 내지 8일인 평균 종양 부피가 100 mm³에 가까울 때, 제0일로 지정되는 무작위화일에 개시하였다. 무작위화는 스티디로그 스티디 디렉터 스위트 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 종양의 길이 및 너비를 측정하여 식 (종양 부피 = L * W² * 0.52)을 사용하여 종양 부피를 결정하였다. 개별 동물에 대한 2,000 mm³ 초과 종양 측정은 연구로부터 제거되게 하였다. 또한 체중 감소 (>20%), 종양 কে양화, 또는 이환으로 인한 정상 마우스 활성의 임의의 다른 분명한 억제로 인해 마우스를 연구로부터 제거할 수 있다.
- [0846] 본 연구에서, 표 15에 제시된 바와 같이 각각 10마리의 마우스의 13개의 군을 위해 목적하는 크기 범위의 종양을 갖는 충분한 마우스를 생성하기 위해 총 191마리의 동물에게 EMT6 세포를 접종하였다. 염수 비히클 주사된 마우스 및 이소형 대조군은 ICOS, PD1 및 CTLA-4 mAb 처리된 마우스에 대한 대조군으로서의 역할을 하였다. ICOS에 대한 이소형 대조군 (햄스터 IgG)을 10 µg으로 단독으로 및 CTLA-4 (마우스 IgG2b) 또는 PD-1 (래트 IgG2a)에 대한 이소형과 조합하여 투여하였다. 항-CTLA-4 (9D9) 및 항-PD-1 (RMP1-14)의 경우의 단독요법 처리군은 각각 마우스당 20 및 200 µg으로 투여하였고, ICOS 이소형 대조군과 조합하여 평가하였다. ICOS 효능제의 C398.4 클론을 마우스당 10 및 1 µg으로 투여하였다. ICOS 효능제의 효능을 또한 10 및 1 µg에서 항-CTLA-4 또는 항-PD-1과 조합되어 투여된 마우스당 평가하였다. 이전에 기재된 농도의 PD-1 및 CTLA-4의 추가의 군을 양성 대조 비교군으로서 포함시켰다. 종양 부피의 통계적 분석을 무작위화 후 제13일에 수행하였다. 생존을 분석은 제60일까지 연구 중인 마우스를 포함하였다.

[0847] 표 15: 연구군

투여	처리 1	처리 2	n
군 1: 당 1x10 ⁵ 개의 세포	염수		10
군 2: 당 1x10 ⁵ 개의 세포	햄스터 IgG 10 µg	mIgG2b 20 µg	10
군 3: 당 1x10 ⁵ 개의 세포	햄스터 IgG 10 µg	rlgG2a 200 µg	10
군 4: 당 1x10 ⁵ 개의 세포	햄스터 IgG 10 µg		10
군 5: 당 1x10 ⁵ 개의 세포	ICOS 10 µg		10
군 6: 당 1x10 ⁵ 개의 세포	ICOS 1 µg		10
군 7: 당 1x10 ⁵ 개의 세포	CTLA4 20 µg	햄스터 IgG 10 µg	10
군 8: 당 1x10 ⁵ 개의 세포	PD-1 200 µg	햄스터 IgG 10 µg	10
군 9: 당 1x10 ⁵ 개의 세포	ICOS 10 µg	CTLA4 20 µg	10
군 10: 당 1x10 ⁵ 개의 세포	ICOS 1 µg	CTLA4 20 µg	10
군 11: 당 1x10 ⁵ 개의 세포	ICOS 10 µg	PD-1 200 µg	10
군 12: 당 1x10 ⁵ 개의 세포	ICOS 1 µg	PD-1 200 µg	10
군 13: 당 1x10 ⁵ 개의 세포	CTLA4 20 µg	PD-1 200 µg	10

[0848]

[0849] 약물 및 물질

[0850] 동물

[0851] 6 내지 8주령의 암컷 Balb/c 마우스를 하를란 스프라그 돌리로부터 제공받아 IACUC 표준에 따라 수용하였다.

[0852] EMT6 세포

[0853] EMT6 세포를 해동시키고, 접종 전 8일 동안 세포 배양 플라스크에서 배양하였다. 세포를 이 시간 내에 3회 대배양하였다. 접종일에, 세포를 플라스크로부터 완전 배지에서 수거하였다. 세포를 원심분리하고, 웨이머스 (15% FBS 함유) 중에 재현탁시켰다. 이 단계를 FBS를 함유하지 않는 웨이머스 배지 중에서 3회 반복하였다. 트리판 블루 배제를 통해 세포 밀도 및 생존율을 체크하였다. 이어서 세포를 목적하는 밀도 (mL당 1x10⁶ 개 세포)로 희석하였다.

[0854] 면역요법제

[0855] 모든 치료제를 투여일에 0.9% 염화나트륨 중 목적하는 농도로 희석하고, 30G 바늘을 사용하여 i.p.로 주사하였다. 치료제 및 대조군 희석물을 하기 표 16에 제시한다.

[0856] 표 16: 치료제 희석물

Rx	출발 농도 mg/mL	목적 농도 mg/mL	희석 1:	용량/마우스 mg	마우스의 수	필요한 부피 mL	첨가 스톱 mL	총 희석제 mL	총 부피 mL
마우스 IgG2b	4.46	0.1	44.6	0.02	10	2	0.10	4.36	4.46
랫 IgG2a	6.92	1	6.92	0.2	10	2	0.40	2.37	2.77
햄스터 IgG	1.47	0.05	29.4	0.01	50	10	0.40	11.36	11.76
CTLA4	6.1	0.1	61	0.02	40	8	0.15	9	9.15
PD-1	7.44	1	7.44	0.2	40	8	1.30	8.372	9.672
ICOS	5	0.05	100	0.01	30	6	0.10	9.9	10
ICOS	0.05	0.005	10	0.001	30	6	1.00	9	10

[0857]

[0858] 데이터 분석

[0859] 통계적 분석

[0860] 생존 분석을 위한 사건은 종양 부피 2000 mm³ 또는 종양 궤양화 중 어느 것이든 먼저 일어나는 것이다. 컷-오프 부피까지의 정확한 시간은 로그 종양 부피와 2개의 관찰 (컷-오프 부피를 초과한 제1 관찰 및 컷-오프 부피 직전의 하나의 관찰)일 사이에 선형 선을 피팅시켜 추정하였다. 카플란-마이어 (KM) 방법을 수행하여 주어진 시간에서 상이한 처리군의 생존 확률을 추정하였다. 종점까지의 중앙 시간 및 그의 상응하는 95% 신뢰 구간을

보고하였다. 이어서, 로그-순위 검정에 의해 KM 생존 곡선이 임의의 2개의 군 사이에서 통계적으로 상이한지 여부를 검정하였다.

- [0861] 상이한 처리군 사이에서 초기 투여 13일 후의 종양 부피를 비교하였다. 분석 전에, 상이한 처리군에서의 분산의 격차로 인해 종양 부피를 자연 로그 변환시켰다. 이어서 로그 변환된 데이터에 대해 ANOVA에 이어 쌍별 비교를 수행하였다. SAS 9.3 및 R 3.0.2 분석 소프트웨어를 사용하였다.
- [0862] 결과
- [0863] Balb/c 마우스에게 접종하고, 8일 후에 처리 요법에 기초하여 10개의 군으로 무작위화하였다. 치료제 또는 대조군의 투여를 무작위화일 (제0일)에 시작하고, 3주 동안 1주 2회 계속하였다.
- [0864] 염수 처리군은 이전의 EMT-6 연구와 관련하여 예상되는 속도로 종양이 성장하였다. 염수 비히클군의 모든 마우스는 제30일에 종양 크기 또는 궤양화로 인해 안락사시켰다. 햄스터 IgG 단독 또는 래트 IgG2a 또는 마우스 IgG2b와의 조합 처리는 염수 비히클군과 비교 시 평균 종양 성장 또는 생존에서 어떠한 통계적으로 유의한 변화도 발생시키지 않았다.
- [0865] 무작위화 13일 후에, ICOS 단독요법군은 이소형 대조군과 비교 시 평균 종양 성장에서 관찰가능한 변화를 거의 입증하지 않았다. 그러나, 고용량 ICOS 처리군 (10 µg)은 저용량군보다 더 큰 종양 성장 억제에 분명한 경향을 입증하였다. CTLA-4 단독요법 활성화와 대등한 효과가 관찰되었다. PD-1 mAb를 사용한 단독요법 처리도 또한 제13일에 평균 종양 부피에서 약간 관찰가능하지만 통계적으로 유의하지 않은 감소를 발생시켰다. 그러나, ICOS 및 CTLA-4 단독요법에서와 같이, 이는 적절한 이소형군의 것과 비교 시 증가된 생존은 발생시키지 않았다. 항-PD-1 및 항-ICOS 항체 클론 C398.4의 10 µg 용량으로의 조합을 사용한 처리는 대조군 및 단독요법 처리군과 비교 시 상당한 종양 성장 억제를 발생시켰다 (도 22). 이러한 조합군에서 3마리의 마우스는 완전 종양 퇴행, 대조군 또는 단독요법 처리군보다 상당한 개선을 달성하였다. 그러나, 사용된 통계 기준으로 인해, 생존에서 통계적으로 유의한 개선에는 도달하지 못했다. 항-PD-1과 1 µg의 ICOS 효능제 항체 클론 C398.4의 조합은 1 및 10 µg의 염수 비히클 대조군 (p<0.05) 및 ICOS 단독요법군 (p<0.05)과 비교 시 제13일에 평균 종양 성장에서 통계적으로 유의한 감소를 발생시켰다. 이러한 처리 요법으로부터의 4마리의 마우스는 완전 종양 퇴행을 달성하여, 통계적 유의성에 도달하는 데에는 실패한 증가된 생존의 유의한 경향을 생성하였다.
- [0866] 항-CTLA-4와 조합된 둘 다의 용량의 ICOS 항체는 어느 하나의 항체를 사용한 단독요법 처리와 비교 시 종양 성장 억제 또는 생존에서 관찰가능한 이익을 거의 입증하지 못했다.
- [0867] 논의
- [0868] 이소형 대조군은 염수 비히클군과 비교 시 평균 종양 부피 또는 전체 생존에서 어떠한 명백한 변화도 발생시키지 않았지만, 햄스터 IgG 군 (군 4) 및 햄스터 IgG 및 래트 IgG2a (군 3) 군에서 지연된 종양 성장을 입증한 개개의 동물이 존재하였다. 햄스터 IgG & 래트 IgG2a 이소형군에서, 1마리의 마우스가 마지막 염수 비히클 마우스보다 더 생존하였고, 이는 부피가 1156.56 mm³으로 측정되는 종양을 갖는 궤양화로 인해 제36일에 희생시켰다. 햄스터 IgG 군에서 2마리의 마우스는 염수군보다 더 오래 생존하였다. 1마리의 동물은 종양 크기로 인해 제36일에 안락사시켰고, 두번째 것은 1899.28 mm³의 측정치를 갖는 궤양화로 인해 제41일에 안락사시켰다.
- [0869] 항-PD-1과 10 µg의 항-ICOS 효능제의 투여 요법은 종양 성장의 관찰가능한 억제로 이어져 이소형 대조군과 비교 시 제13일에 종양 부피에서 감소를 발생시켰지만, 이러한 차이는 항-PD-1 단독요법과 비교 시 덜 명백하였다. 그러나, 조합은 총 5마리의 동물이 항-PD-1 단독요법군에서의 어느 것보다 더 생존하게 하였고, 3마리의 마우스는 항-PD-1 단독요법군에서 어느 것도 그렇지 않았던 것과 비교하여 완전 종양 퇴행을 경험하였다.
- [0870] 항-PD-1과 1 µg 용량의 ICOS 효능제 항체의 쌍형성은 이소형 대조군 및 각각의 단독요법군과 비교 시 제13일에 평균 종양 크기에서 관찰가능한 감소로 이어졌다. 이러한 감소는 염수 비히클 대조군 (p<0.05) 및 1 µg ICOS 단독요법군 (p<0.05)과 비교 시 통계적으로 유의하였다. 4마리의 마우스는 완전 종양 퇴행을 경험하였고, PD-1 단독요법군에서의 임의의 것보다 더 생존하였다.
- [0871] ICOS + PD1 조합군에서 관찰된 생존 이익은 제60일에 대조군과 관련하여 통계적 유의성에 도달한 것으로 발견되지 않았다. 그러나, ICOS + PD1 조합 처리군의 종양 성장 억제 및 생존 이익은 본 연구에서 항종양 활성화에 대

한 양성 대조군으로 간주되는 PD1 + CTLA-4 조합군에 의해 관찰된 활성과 대등하였다. 이는 ICOS 및 PD1 항체의 조합이 일부 종양 유형에서 유의한 임상 활성을 입증한 바 있는 CTLA-4 및 PD1 조합과 유사한 이익을 가질 수 있다는 것을 시사한다.

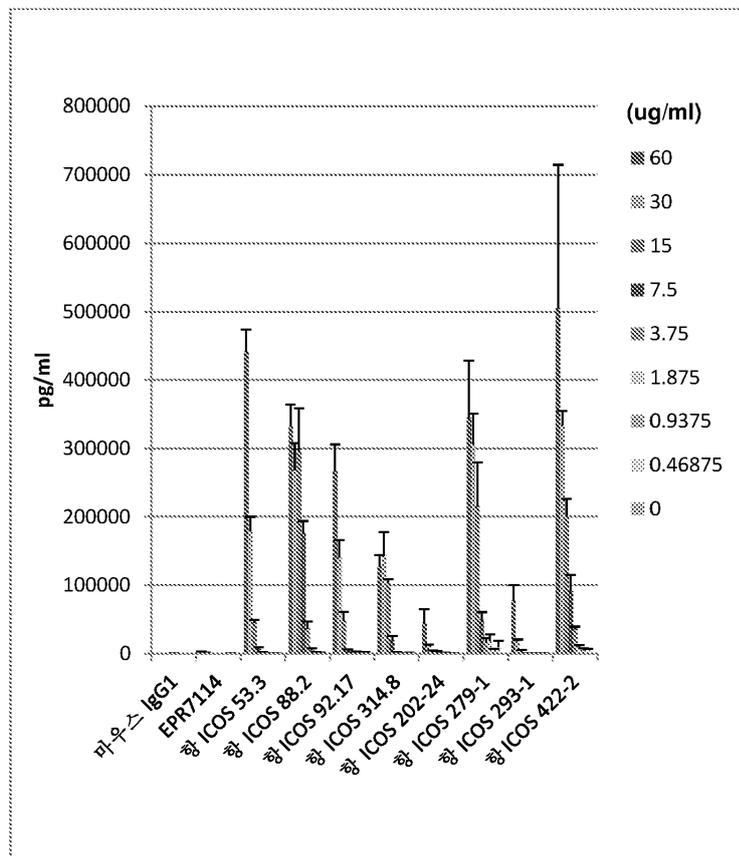
[0872]

본 연구에 등록된 130마리의 마우스 중, 12마리는 제60일에 살아있는 상태로 유지되었고, 11마리는 완전 종양 퇴행을 달성하였다. 연구 제거를 위한 종점을 충족시키는 118마리의 마우스 중, 111마리는 종양 크기가 2000 mm³에 달하여 제거되었다. 나머지 7마리의 마우스는 종양 상의 궤양화로 인해 안락사시켰다. 궤양화의 발생은 군 사이에서 만연하였다. 군 1 (염수), 3 (햄스터 IgG & 래트 IgG2a), 4 (햄스터 IgG), 6 (1 µg ICOS), 및 10 (CTLA-4, 1 µg ICOS 함유) 모두에서 1마리의 동물이 궤양화로 인해 제거되었다. 군 13 (CTLA-4 + PD-1)은 궤양화로 인해 2마리의 동물이 희생되었음을 제시하였다. 나머지 군은 어떠한 동물도 궤양화로 인해 제거되지 않았다.

도면

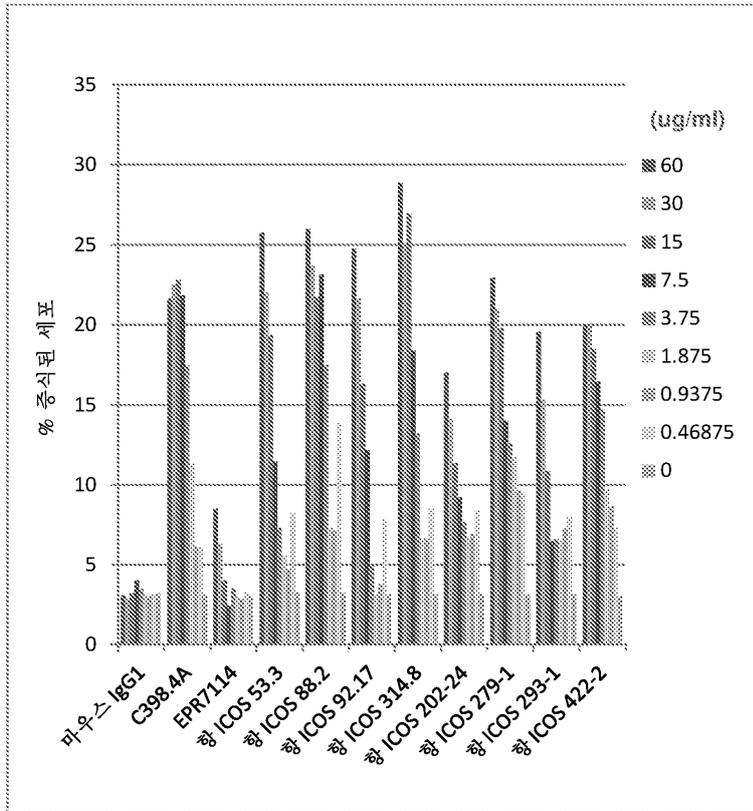
도면1

CD4+CD25- T 세포로부터의 IFN-γ 생산



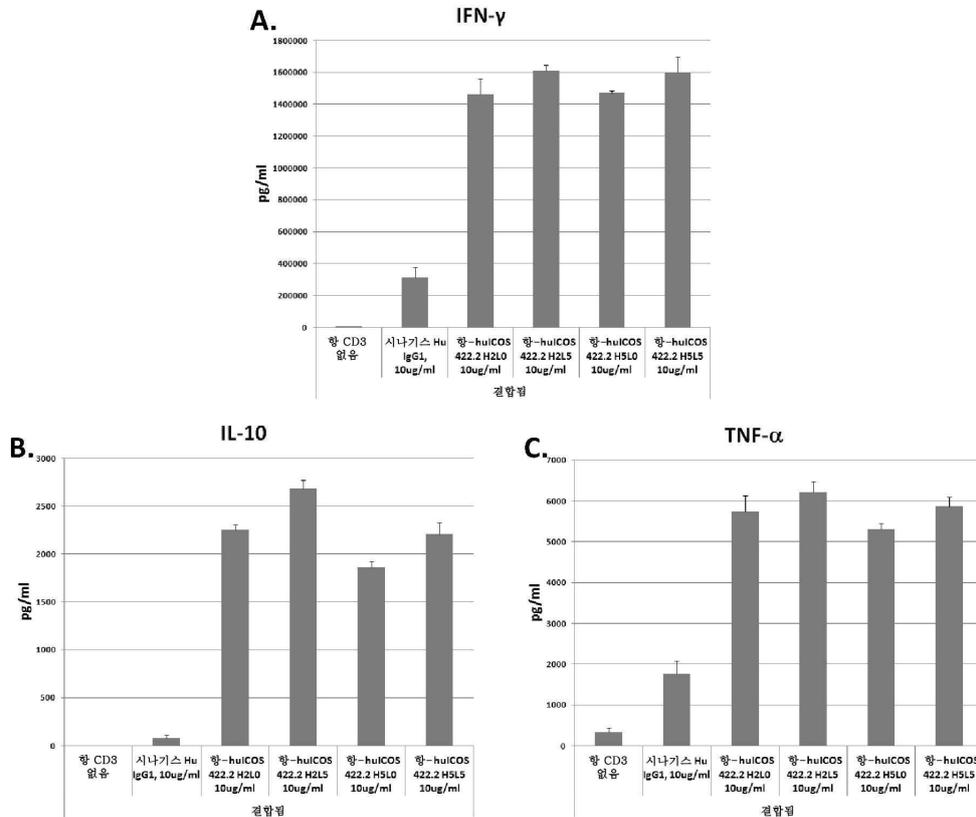
도면2

CD4+CD25- T 세포의 증식



도면3

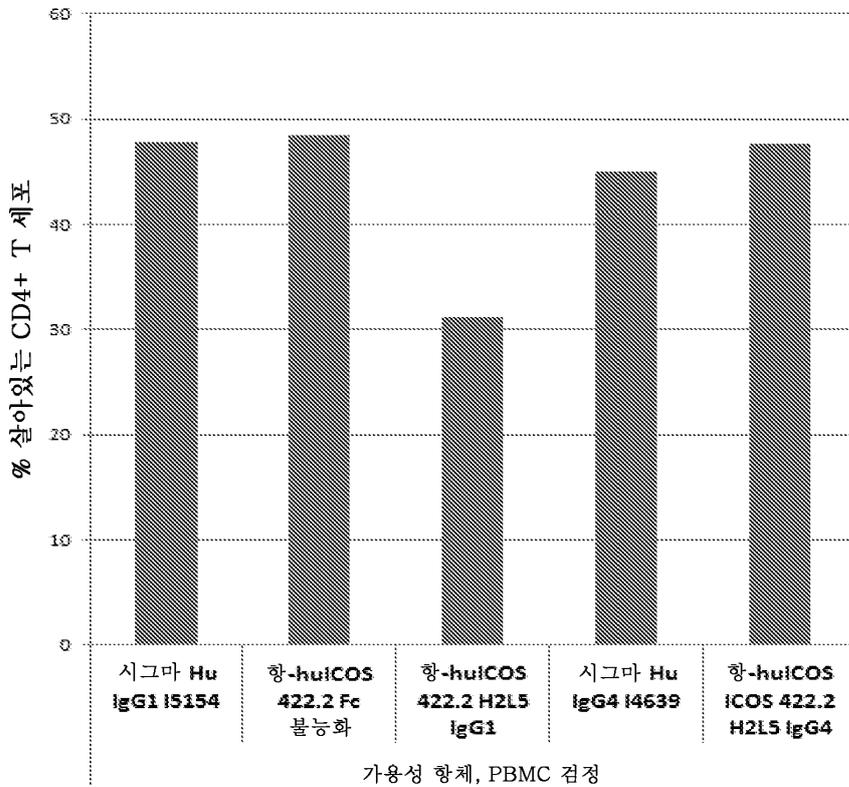
항-ICOS 422.2의 H2L5 인간화 변이체는 PBMC 세포에서 보다 우수한 시토카인 생산을 제시한다



인간 PBMC를 건강한 인간 공여자로부터 새롭게 단리하고, 항-CD3 (OKT3) 및 4종의 가용성 항 ICOS 422.2 인간화 변이체 각각으로 사전-코팅된 플레이트 상에서 활성화시켰다. 2.5일 동안 처리한 후, 상청액 중 IFN- γ (A), IL-10 (B) 및 TNF- α (C)의 양을 MSD에 의해 측정하였다.

도면4

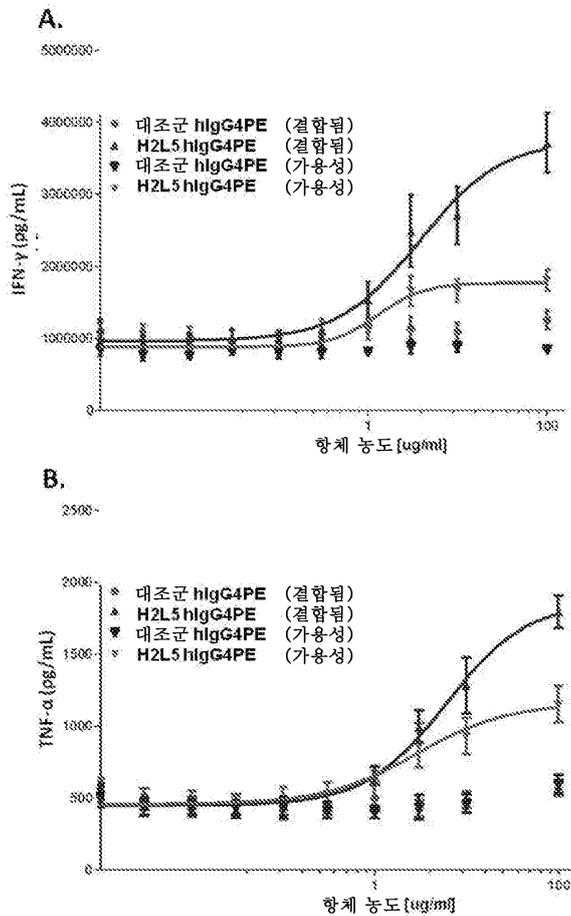
422 H2L5 IgG1은 Fc-불능화 또는 hIgG4PE 이소형에 의해서는 분명하지 않았던 감소된 T 세포 생존율을 유도하였다.



인간 PBMC를 항-CD3 (OKT3) 및 상이한 Fc 이소형을 갖는 가용성 인간화 항 ICOS 422.2로 사전-코팅된 플레이트 상에서 새롭게 활성화시켰다. 2.5일 동안 처리한 후, 살아있는 CD4+ T 세포의 백분율을 유동 세포측정법에 의해 측정하였다.

도면5

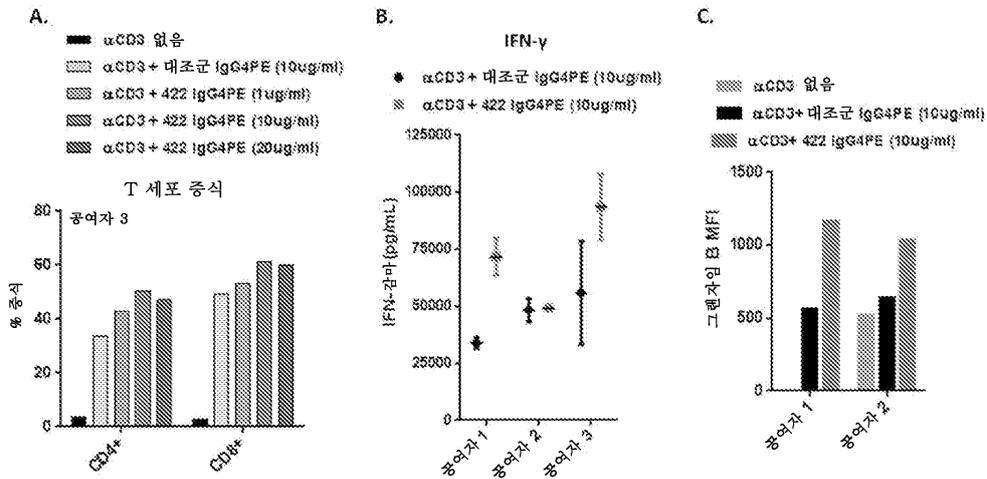
H2L5 hIgG4PE의 용량 반응은 인간 CD4+ T 세포에서 염증유발 시토카인 유도를 유도하였다.



항-CD3/CD28로 2일 동안 사전-자극한 인간 건강한 공여자 CD4+ T 세포를 항-CD3 (OKT3) 플러스 연속 농도의 이소형 대조군 (시나기스 IgG4PE) 또는 H2L5 hIgG4PE mAb에 의해 플레이트 결합된 포맷 또는 가용성 포맷으로서 재-자극하였다. 처리 3.5일 후 MSD에 의해 상청액 중 (A) IFN- γ 및 (B) TNF- α 의 농도를 측정하였다.

도면6

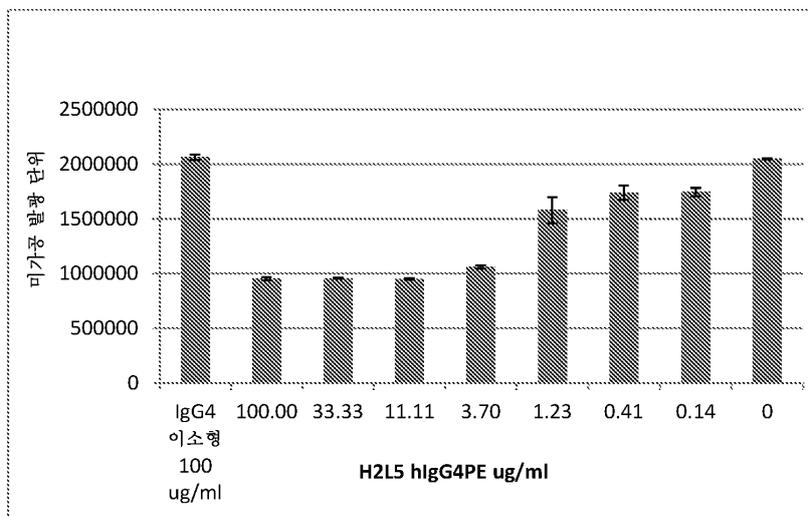
H2L5 hIgG4PE는 건강한 인간 공여자로부터의 활성화된 PBMC에서 증식, 시토카인 생산 및 증가된 세포독성 잠재력을 유도한다



항-CD3/CD28로 2일 동안 사전-자극한 인간 PBMC 세포를 항-CD3 (OKT3) 플러스 가용성 H2L5 hIgG4PE mAb 또는 이소형 대조군에 의해 재-자극하였다. 처리 2.5일 후 T 세포 증식을 CFSE FACS 검정에 의해 측정하였다 (A). 상정액 중 IFN- γ 농도는 MSD에 의해 측정하였다 (B). CD4+ T 세포의 세포내 그랜자임 B 발현은 유동 세포측정법에 의해 측정하였다.

도면7

ICOS-L과 ICOS 상의 동일한 에피토프에 결합하고 결합에 대해 경쟁한다는 것을 나타내는, H2L5 hIgG4PE에 의한 ICOS에 대한 ICOS-L 결합의 억제를 제시하는 메소스케일 디스커버리 (MSD) 검정



도면8

하이브리도마 클론 422.2의 RNA로부터 회수된 항체 V_H 및 V_L 유전자

422 HC

QVQLQQSGPELVRPGEVSVKISCMGSGYFTFDYAMHWVKQSHAKSLEWIGLISIIYSDHTNYNQKFQ GKATMTVDKS
SSTAYMELARLTSEDSAIYYCGRNNYGNYGWYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:19)

422 LC

ENVLTQSPAIMSASPGKVTMTCSASSVSYMHWYQQKSITSPKLWIYDTSKLGASGVPGRFSGSGSGNSYSLTIS
SMEAEADVATYYCFQSGSGYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:20)

도면9

신호 서열을 갖는 H2L5 hIgG4PE의 중쇄 및 경쇄의 단백질 서열

중쇄

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSCKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGLISIIYSD
HTNYNQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRNNYGNYGWYFDVWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFP
LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKTYTCNV
DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPEPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:9)

경쇄

MGWSCIILFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLGASG
IPARFSGSGSDTYTLTISSLEPEDFAVYYCFQSGSGYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC (SEQ ID NO:12)

신호 서열은 이중으로 밑줄 표시된다

CDR 서열은 밑줄 표시된다

IgG4에서의 S228P, L235E (EU 넘버링) 치환

가변 중쇄 프레임워크 내에 혼입된 뮤린 잔기 (카바트 넘버링 G27Y, S30T, A93G)

가변 경쇄 프레임워크 내에 혼입된 뮤린 잔기 (카바트 넘버링 F71Y)

도면10

신호 서열을 갖는 H2L5 hIgG4PE 중쇄의 코딩 영역의 DNA 서열

중쇄

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGCCACCGCCACCGGCGTGACAGCCAGGTGCAGCTGGTGCAG
 AGCGGAGCCGAGGTGAAAAAGCCCGGCTCAAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCCGAC
 TACGCTATGCACTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCCTGATCAGCATCTACAGCGAC
 CACACCAACTACAACCAGAAGTTCAGGGCAGGGTGACCATCACCGCCGATAAGAGCACCAGCACAGCTACATG
 GAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAAGACACCGCCGTGTACTATTGCGGCAGGAACAACCTACGGCAACTACGGCTGG
 TACTTCGACGCTGTGGGGCCAGGGAACCACTGTACCCTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCGAGCGTGTCCCC
 CTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCGAG
 CCCGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGC
 GGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTG
 GACCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTGCCCT
 GCCCCGAGTTTCGAGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGG
 ACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGATCCCGAGGTCCAGTTC AATTGGTACGTGGAC
 GCGGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCGGGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTG
 CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCAGC
 TCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAG
 GAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAG
 TGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTC
 CTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAG
 GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAG (SEQ ID NO:21)

리더 서열은 이중 밑줄에 의해 표시된다

도면11

신호 서열을 갖는 H2L5 hIg4PE 경쇄의 코딩 영역의 DNA 서열

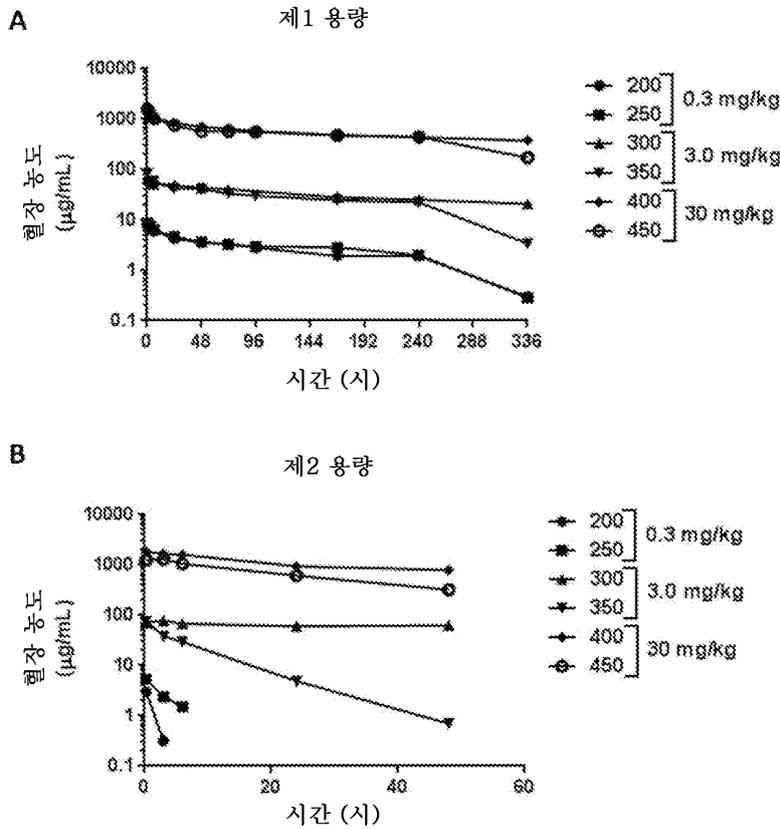
경쇄

ATGGGGCTGGTCCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGCGTGCACAGCGAGATTGTGCTGACCCAG
 AGCCCCGCCACCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGAAAGGGCAACCCTCAGCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGAGCTAC
 ATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCCGGCCAGGCCCTAGGCTGCTGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCAGCGGC
 ATCCCAGCCAGGTTCTCAGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTATACTCTGACCATCAGCAGCCTGGAGCCCCGAGGAC
 TTCGCCGTGTACTACTGCTTCCAGGGAAGCGGCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG
 CGTACGGTGGCCGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTG
 GTGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGC
 AACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCCTGAGC
 AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG
 AGCTTCAACCGGGGCGAGTGC (SEQ ID NO:22)

리더 서열은 이중 밑줄에 의해 표시된다

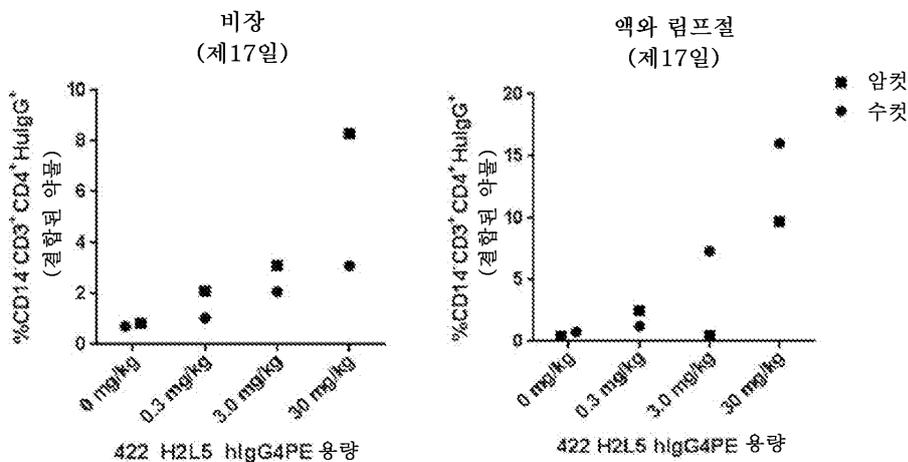
도면12

시노몰구스 원숭이에서의 H2L5 hIgG4PE의 혈장 농도. 농도를 H2L5 hIgG4PE의 (A) 제1 또는 (B) 제2 용량 (제15일) 후에 결정하였다. 조직 샘플 수집 및 조직병리 분석을 위해 제2 용량 48시간 후에 동물을 희생시켰다



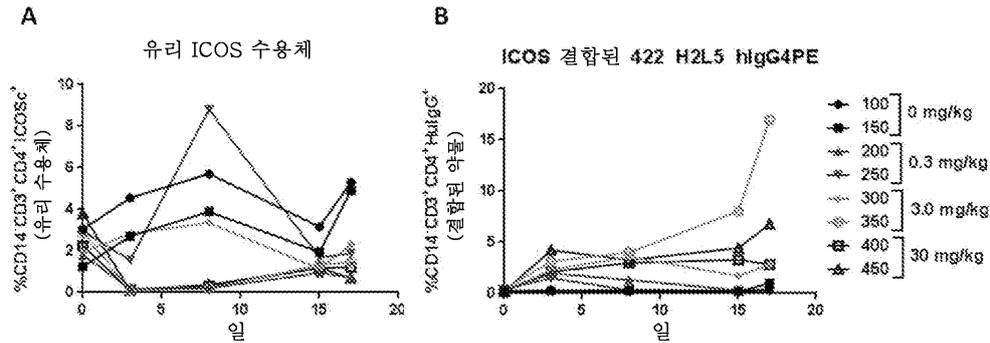
도면13

원숭이의 비장 및 액와 림프절로부터의 CD4+ T 세포에 대한 H2L5 hIgG4PE 결합의 검출. 조직은 제2 용량 48시간 후 (제17일)에 수집하였다.



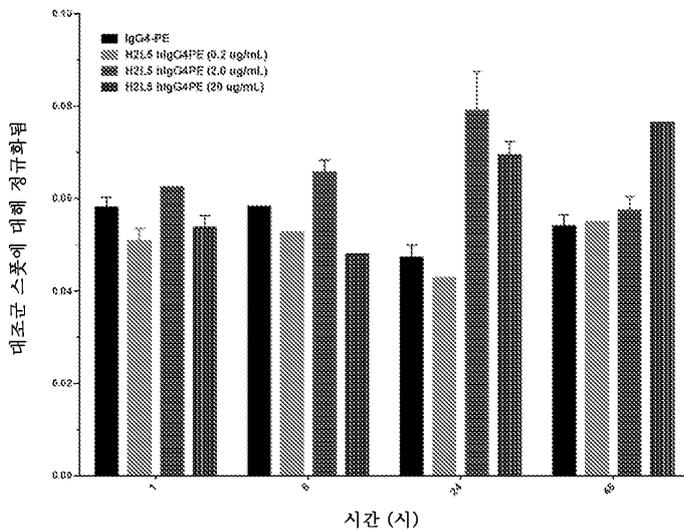
도면14

시노 원숭이로부터의 혈액 CD4+ T 세포에서의 H2L5 hIgG4PE의 수용체 점유율.
 (A) H2L5 hIgG4PE가 존재하지 않는 경우에만 결합하는, 유동 세포측정법에 사용된 항-ICOS 형광 표지된 항체의 양성 결합에 의해 측정된 바와 같은 ICOS "유리 수용체".
 (B) 형광 표지된 항-인간 IgG에 의해 측정된 바와 같은 말초 혈액 CD4+ 세포 상의 수용체 결합된 H2L5 hIgG4PE.



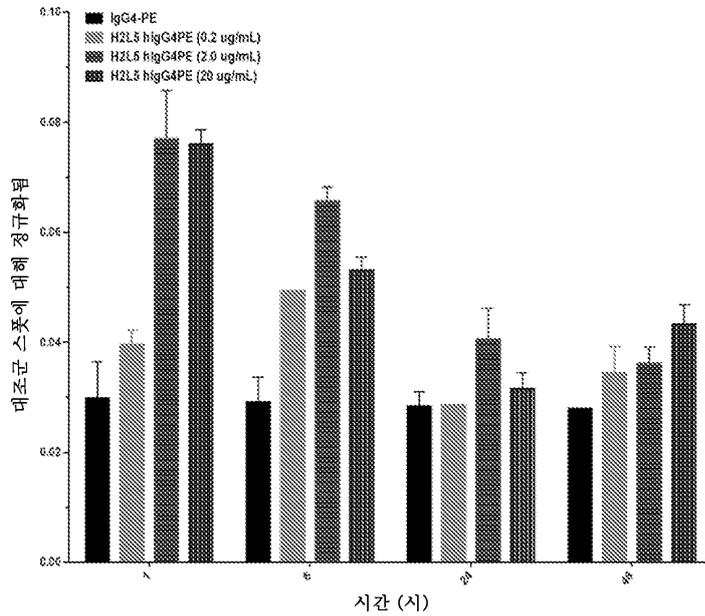
도면15a

H2L5 hIgG4PE로 처리된 Ba/F3-ICOS 세포에서의 포스포-AKT (T308) 발현 수준 - 세포내 신호전달 항체 어레이



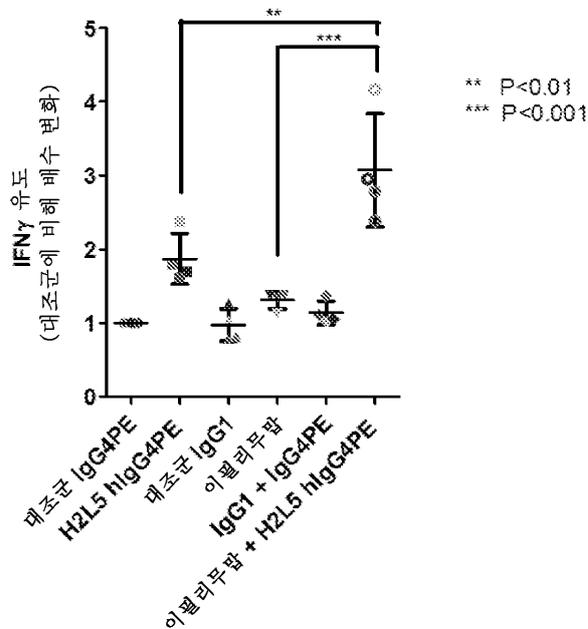
도면15b

H2L5 hIgG4PE로 처리된 Ba/F3-ICOS 세포에서의 포스포-AKT (S473) 발현 수준 - 세포내 신호전달 항체 어레이



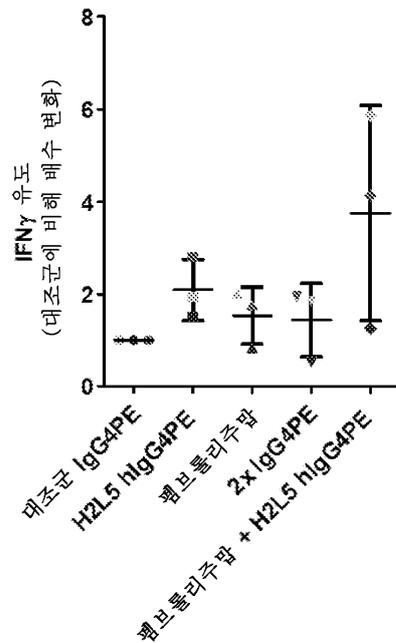
도면16

이필리무맙과 조합된 H2L5 hIgG4PE는 PBMC 사전-자극 검정에서 단일 항체 처리와 비교 시 증가된 염증유발 시토카인 생산을 발생시켰다



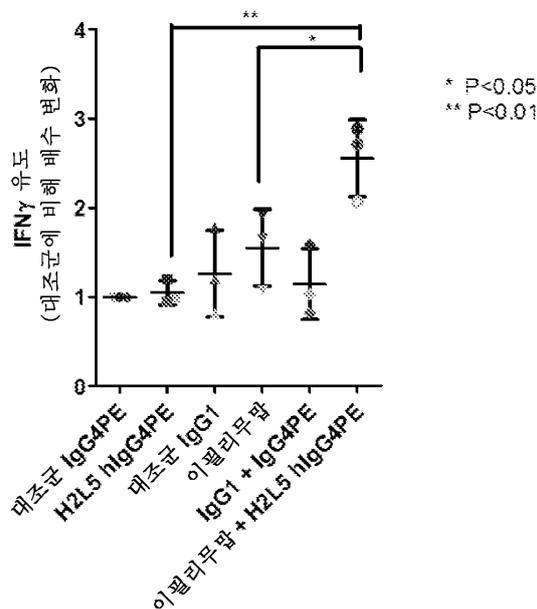
도면17

웹브롤리주맙과 조합된 H2L5 hIgG4PE는 PBMC 사전-자극 검정에서 단일 항체 처리와 비교 시 증가된 염증유발 시토카인 생산을 발생시켰다



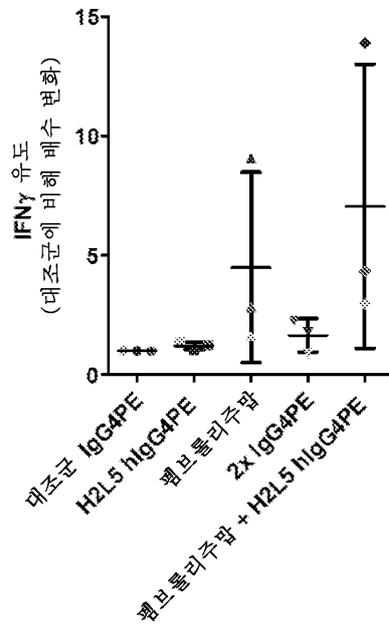
도면18

H2L5 hIgG4PE 플러스 이벨리무맙 조합물은 CEFT 펩티드 및 사전-인큐베이션을 사용한 변형된 MLR 검정에서 증가된 염증유발 시토카인 생산을 유도한다



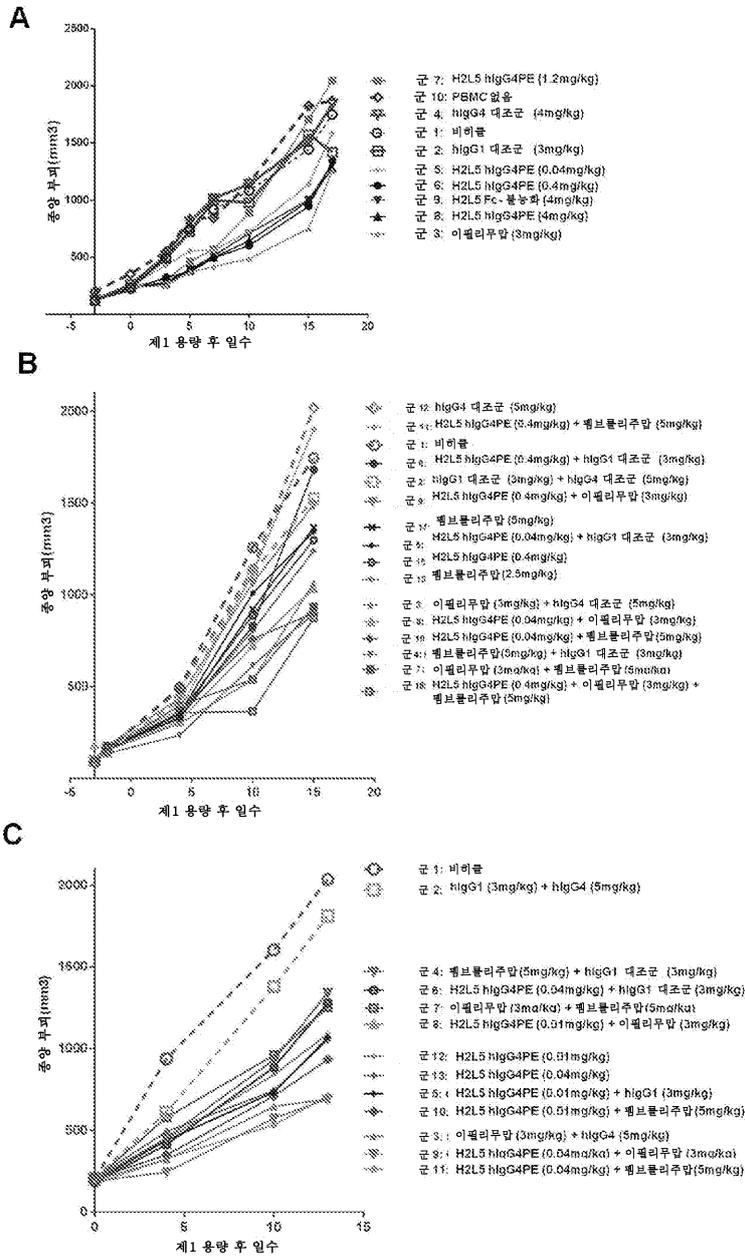
도면19

H2L5 hIgG4PE 플러스 웹브롤리주맙 조합물은 CEFT 펩티드 및 사전-인큐베이션을 사용한 변형된 MLR 검정에서 증가된 염증유발 시토카인 생산을 유도한다



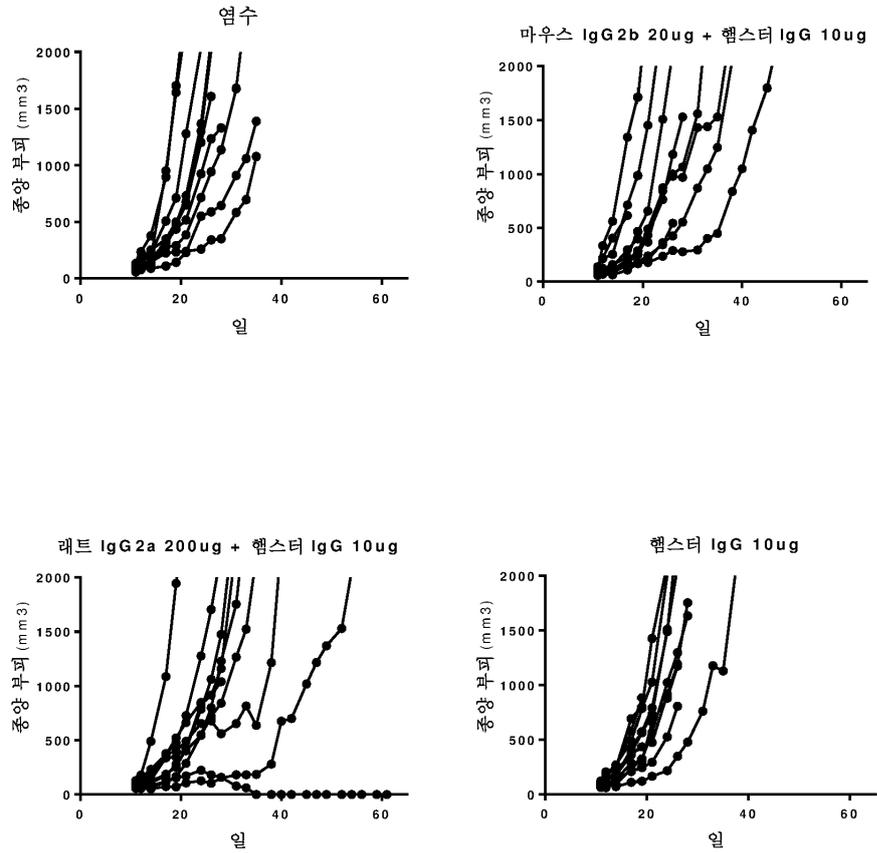
도면20

H2L5 hlgG4PE 항-ICOS 효능제 mAb는 단독으로 및 펌브롤리주맵과 조합되어 인간 PBMC A2058 흑색종 마우스 증양 모델에서 증양 성장 억제를 발생시킨다

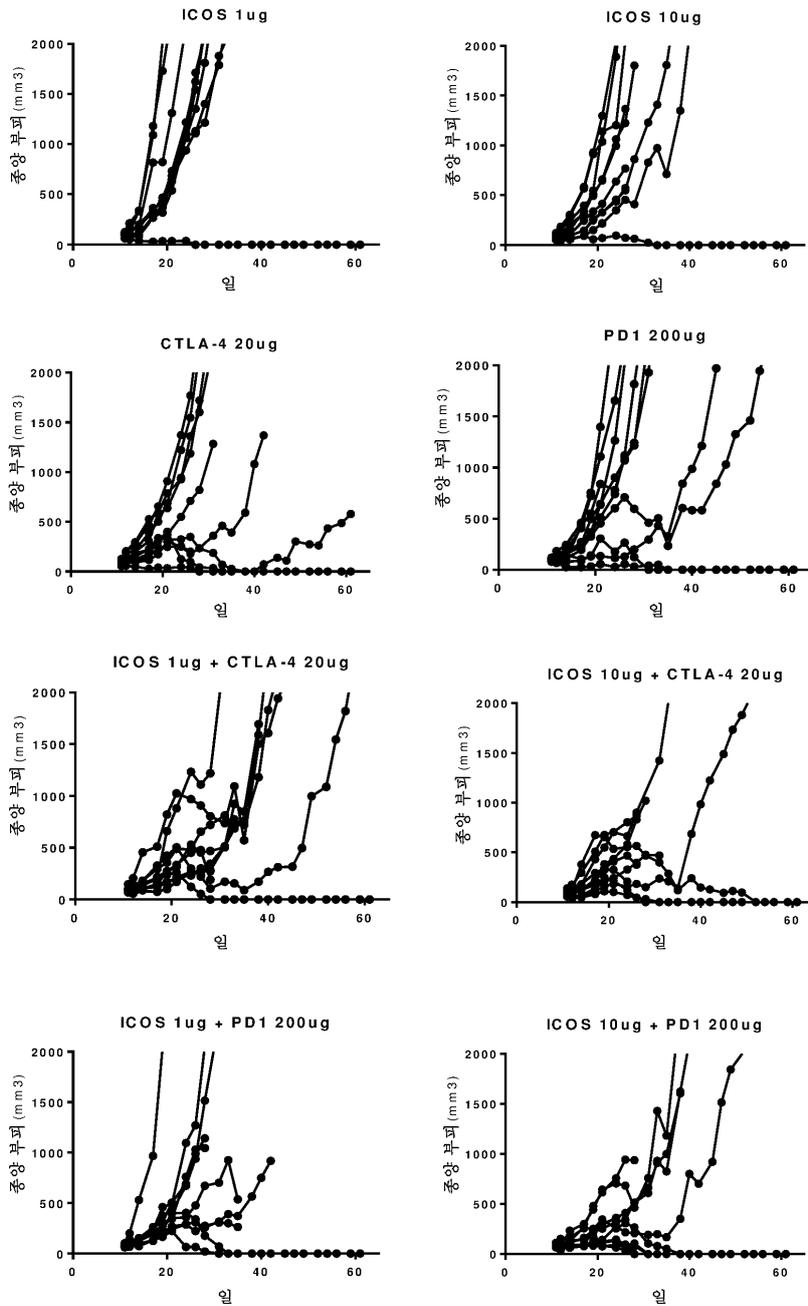


도면21a

항-ICOS 뮤린 대용물 mAb는 CT26 마우스 종양 모델에서 항-PD1 뮤린 대용물 mAb와 조합되어 유의한 종양 성장 억제 및 증가된 생존을 발생시킨다

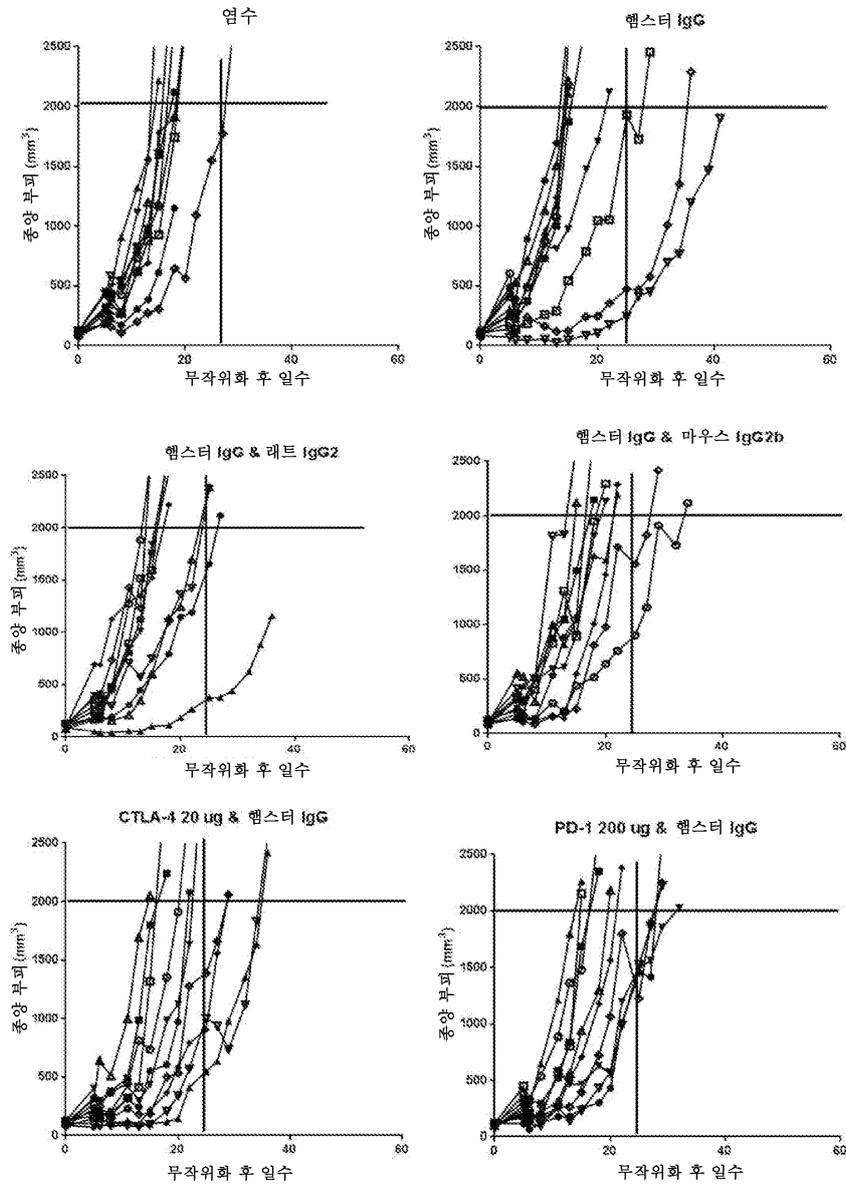


도면21b

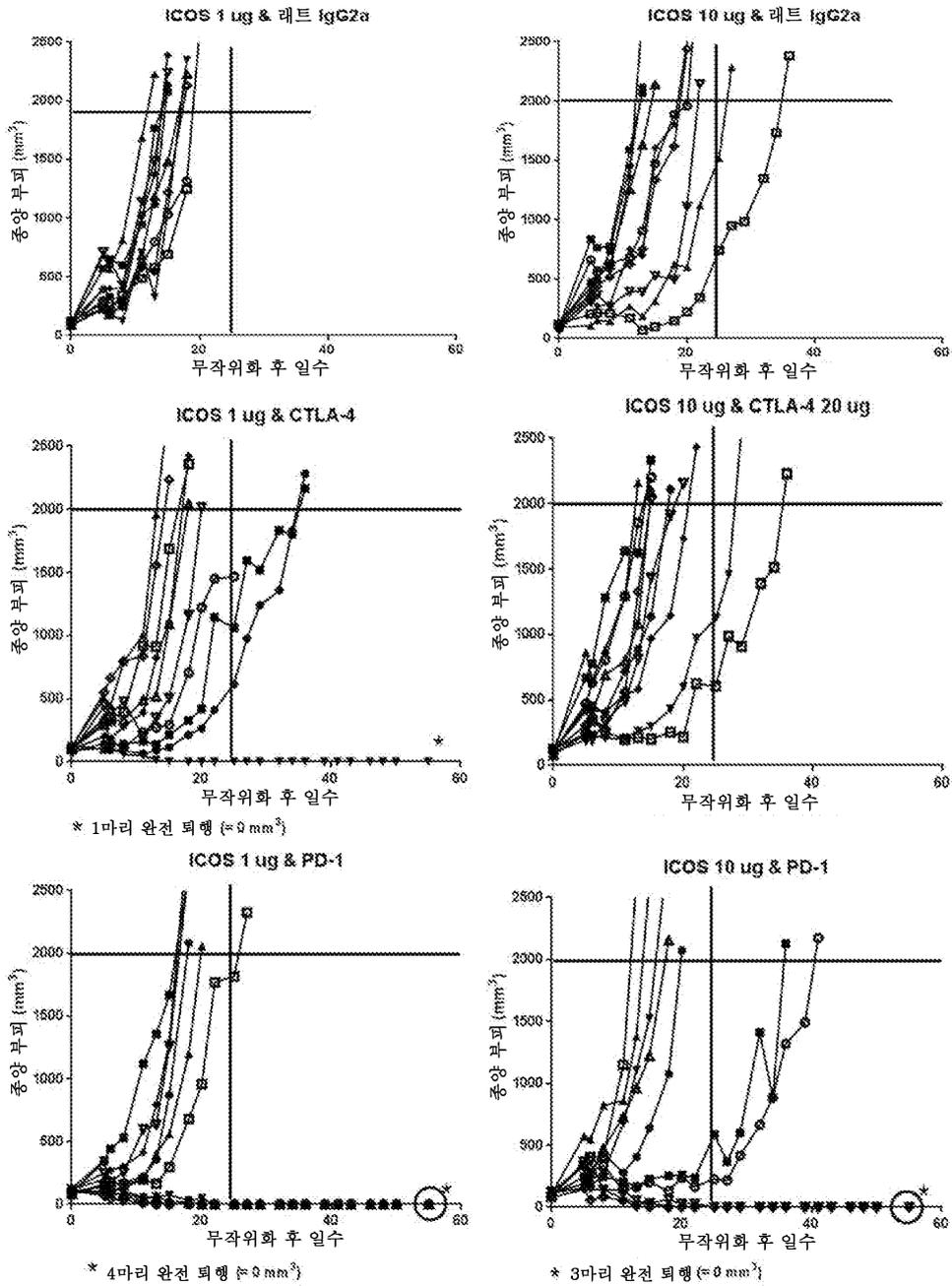


도면22a

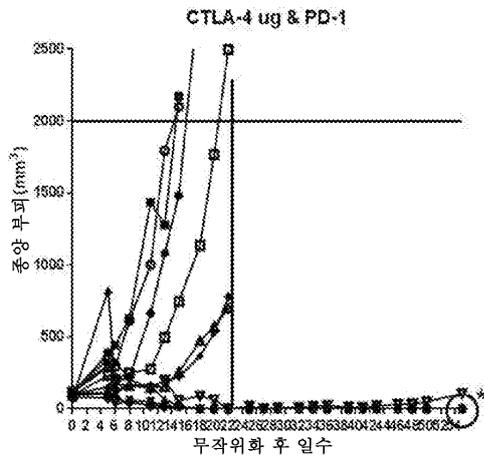
항-ICOS 뮤린 대용물 mAb는 EMT6 마우스 종양 모델에서 항-PD1 뮤린 대용물 mAb와 조합되어 유의한 종양 성장 억제 및 증가된 생존을 발생시킨다



도면22b



도면22c



* 3마리 완전 퇴행 (= 0 mm³)

서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Glaxosmithkline Intellectual Property
Development Limited
Inserm
Institut Jean Paoli & Irene Calmettes
Universite dAix-Marseille
Centre National De La Recherche Scientifique
- <120> ICOS BINDING PROTEINS
- <130> PU65846
- <150> 62/247,355
- <151> 2015-10-28
- <150> 62/192,331
- <151> 2015-07-14
- <150> 62/108,605
- <151> 2015-01-28
- <160> 24
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT

<213> Murine

<400> 1

Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Murine

<400> 2

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

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Murine

<400> 3

Asn Asn Tyr Gly Asn Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Murine

<400> 4

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Murine

<400> 5

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Murine

<400> 6

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Sequence

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Leu Ile Ser Ile Tyr Ser Asp His Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly 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

Gly Arg Asn Asn Tyr Gly Asn Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Sequence

<400> 8

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

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

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 9

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Sequence

<400> 9

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

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

 450 455 460
 Leu Gly Lys
 465
 <210> 10
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien
 <400> 10
 Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys
 1 5 10 15
 Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile
 20 25 30
 Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val

<400> 12

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
 20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
 35 40 45

Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
 50 55 60

Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe
 65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 85 90 95

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr
 100 105 110

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
 115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 13

<211> 124

<212> PRT

<213> Murine

<400> 13

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

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14

<211> 109

<212> PRT

<213> Murine

<400> 14

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

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

<210>

15

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Sequence

<400> 15

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

Gly Leu Ile Ser Ile Tyr Ser Asp His Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Ala Thr Met Thr Val 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
 Gly Arg Asn Asn Tyr Gly Asn Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Sequence

<400> 16

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Leu Ile Ser Ile Tyr Ser Asp His Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Met Thr Val 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

Gly Arg Asn Asn Tyr Gly Asn Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly

 100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

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

 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

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

 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys

450

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Sequence

<400> 17

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

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

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 18

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Sequence

<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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

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

 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Arg Asn Asn Tyr Gly Asn Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> Murine

<400> 20

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

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

 65 70 75 80
 Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 21

<211> 1401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Sequence

<400> 21

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagccag 60

gtgcagctgg tgcagagcgg agccgaggtg aaaaagcccg gctcaagcgt gaaggtgagc 120

tgcaaggcca gcggtacac cttcaccgac tacgctatgc actgggtgag gcaggccccc 180

ggccagggcc tggagtggat gggcctgatc agcatctaca gcgaccacac caactacaac 240

cagaagttec agggcagggt gaccatcacc gccgataaga gcaccagcac agcctacatg 300

gagctgagca gcctgaggag cgaagacacc gccgtgtact attgcggcag gaacaactac 360

ggcaactacg gctggtactt cgacgtgtgg ggccagggaa ccactgtcac cgtgagcagc 420

gccagcacca agggcccccg cgtgttcccc ctggccccct gcagcagaag caccagcgag 480

agcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgagc 540

tggaacagcg gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 600

ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgcccagca gcagcctggg caccaagacc 660

tacacctgca acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagcg ggtggagagc 720

aagtacggcc ctcctgccc cccctgcct gcccccagat tgcagggcgg accctccgtg 780

ttcctgttcc ccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gccggacccc cgaggtgacc 840

tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagat cccgaggtcc agttcaattg gtacgtggac 900

ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccccgggagg aacagttaa cagcacctac 960

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agaatacaag 1020

tgcaaggtgt ccaacaaggg cctgcccagc tccatcgaga aaaccatcag caaggccaag 1080

ggccagcctc gggagcccca ggtgtacacc ctgccccat cccaggaaga gatgaccaag 1140

aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1200

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggacagc 1260

gacggcagct tcttctgta cagcaggctg accgtggaca agagccggtg gcaggaaggc 1320

aacgtcttta gctgcagcgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagagc 1380

ctgagcctgt ccctgggcaa g 1401

<210> 22

<211> 696

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223

> Artificially Synthesized Sequence

<400> 22

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagcgag 60
 attgtgctga ccagagccc cgccaccctg agcctgagcc cggcgaaag ggcaaccctc 120
 agctgcagcg ccagcagcag cgtgagctac atgcaactgg accagcagaa gcccggccag 180
 gccctaggc tgctgatcta cgacacctcc aagctggcca gcggcatccc agccaggttc 240
 tcaggcagcg gcagcggcac cgactatact ctgaccatca gcagcctgga gcccaggagc 300
 ttgcgcgtgt actactgctt ccaggggaag ggctaccctt acaccttcgg ccagggcacc 360
 aagctggaga tcaagcgtac ggtggccgcc cccagcgtgt tcatttccc ccccagcgat 420

gagcagctga agagcggcac cgccagcgtg gtgtgtctgc tgaacaactt ctacccccgg 480
 gaggccaagg tgcagtggaa ggtggacaat gcctgcaga gcggcaacag ccaggagagc 540
 gtgaccgagc aggacagcaa ggactccacc tacagcctga gcagcaccct gaccctgagc 600
 aaggccgact acgagaagca caaggtgtac gcctgtgagg tgaccacca gggcctgtcc 660
 agccccgtga ccaagagctt caaccggggc gactgc 696

<210> 23

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Sequence

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

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

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 24

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Sequence

<400> 24

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

