



등록특허 10-2823683



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월23일
(11) 등록번호 10-2823683
(24) 등록일자 2025년06월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 31/4245* (2006.01)
A61K 31/498 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/39558 (2013.01)
A61K 31/4245 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7001434
- (22) 출원일자(국제) 2016년07월14일
심사청구일자 2021년07월13일
- (85) 번역문제출일자 2018년01월16일
- (65) 공개번호 10-2018-0025897
- (43) 공개일자 2018년03월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2016/003337
- (87) 국제공개번호 WO 2017/010106
국제공개일자 2017년01월19일
- (30) 우선권주장
62/192,173 2015년07월14일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2014186035 A1*
US20130065905 A1*
- *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

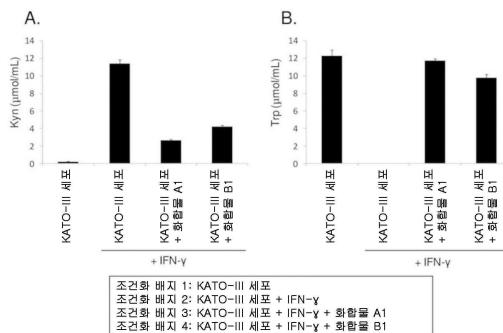
전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 항체와 조합 투여되는IDO 억제제를 포함하는 종양 치료제

(57) 요약

본 발명은 유효량의 인간CC 케모카인 수용체 4, 인간표피 성장 인자 수용체 2, 인간CD20 또는 표피 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체, 및 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제를 이를 필요로 하는 인간에게 투여하는 것을 포함하는 종양의 치료 방법 등을 제공한다.

대표도

(52) CPC특허분류

A61K 31/498 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/28 (2013.01)

C07K 16/2803 (2013.01)

C07K 16/2863 (2013.01)

C07K 16/2866 (2013.01)

C07K 16/32 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

미에 모토야

일본 100-8185 도쿄도 치요다쿠 오테마치 1-6-1 교

와 핫꼬 기린 가부시키가이샤 혼샤 나이

안도 무네토시

일본 100-8185 도쿄도 치요다쿠 오테마치 1-6-1 교

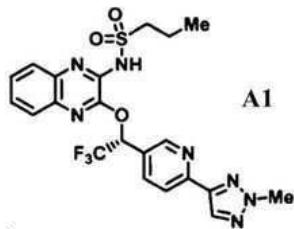
와 핫꼬 기린 가부시키가이샤 혼샤 나이

명세서

청구범위

청구항 1

항체 의존성 세포독성 활성을 갖는 항체와 조합하여 투여하기 위한, 인돌아민 2,3-디옥시게나제(IDO) 억제제를 포함하는, 종양 치료용 약학 조성물로서, 상기 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 식

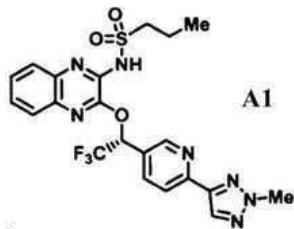


으로 나타내어지는 화합물 A1 또는 그의 약학적으로 허용되는 염이며,

상기 항체 의존성 세포독성 활성을 갖는 항체가 모가물리주맙, 트라스투주맙, 리툭시맙, 또는 세툭시맙인, 약학 조성물.

청구항 2

종양 치료에 사용하기 위한, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와, 항체 의존성 세포독성 활성을 갖는 항체를 조합하여 포함하는 약학 조성물로서, 상기 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 식



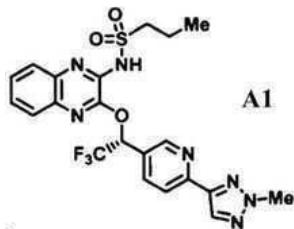
으로 나타내어지는 화합물 A1 또는 그의 약학적으로 허용되는 염이며,

상기 항체 의존성 세포독성 활성을 갖는 항체가 모가물리주맙, 트라스투주맙, 리툭시맙, 또는 세툭시맙인, 약학 조성물.

청구항 3

인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와 조합하여 투여하기 위한, 항체 의존성 세포독성 활성을 갖는 항체를 포함하는 종양 치료용 약학 조성물로서,

상기 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 식



으로 나타내어지는 화합물 A1 또는 그의 약학적으로 허용되는 염이며,

상기 항체 의존성 세포독성 활성을 갖는 항체가 모가물리주맙, 트라스투주맙, 리툭시맙, 또는 세툭시맙인, 약학 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, IDO 활성에 의해 발생하는 상기 항체의 항체 의존성 세포독성 활성의 저하 억제를 위해 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 사용되는 약학 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체와 조성물, 또는 항체와 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 동시에, 순차적으로, 또는 축차적으로 사용되는 것인 약학 조성물.

청구항 6

약제

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 모가물리주맙인 약학 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 리툭시맙인, 약학 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 종양의 치료 또는 치료용 의약의 제조에 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 종양이 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 종양인 약학 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4를 발현하는 종양이 T 세포 림프종인 약학 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서, 인간 표피 성장 인자 수용체 2를 발현하는 종양이 유방암, 위암, 난소암, 골육종 또는 자궁내막암인 약학 조성물.

청구항 13

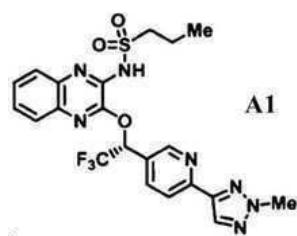
제10항에 있어서, 인간 CD20을 발현하는 종양이 만성 백혈병 또는 비호지킨 림프종인 약학 조성물.

청구항 14

제10항에 있어서, 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 종양이 대장암, 두경부암, 위암 또는 간암인 약학 조성물.

청구항 15

종양 치료에 사용하기 위한, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와, 항체 의존성 세포독성 활성을 갖는 항체를 조합하여 포함하는 약학 조성물로서, 상기 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 식



으로 나타내어지는 화합물 A1 또는 그의 약학적으로 허용되는 염이며,

상기 항체 의존성 세포독성 활성을 갖는 항체가 모가물리주맙, 트라스투주맙, 리툭시맙, 또는 세툭시맙이고,

IDO 활성에 의한 상기 항체의 항체 의존성 세포독성 활성의 저하가, 상기 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제에 의해 억제되는, 약학 조성물.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

청구항 162

삭제

청구항 163

삭제

청구항 164

삭제

청구항 165

삭제

청구항 166

삭제

청구항 167

삭제

청구항 168

삭제

청구항 169

삭제

청구항 170

삭제

청구항 171

삭제

청구항 172

삭제

청구항 173

삭제

청구항 174

삭제

청구항 175

삭제

청구항 176

삭제

청구항 177

삭제

청구항 178

삭제

청구항 179

삭제

청구항 180

삭제

청구항 181

삭제

청구항 182

삭제

청구항 183

삭제

청구항 184

삭제

청구항 185

삭제

청구항 186

삭제

청구항 187

삭제

청구항 188

삭제

청구항 189

삭제

청구항 190

삭제

청구항 191

삭제

청구항 192

삭제

청구항 193

삭제

청구항 194

삭제

청구항 195

삭제

청구항 196

삭제

청구항 197

삭제

청구항 198

삭제

청구항 199

삭제

청구항 200

삭제

청구항 201

삭제

청구항 202

삭제

청구항 203

삭제

청구항 204

삭제

청구항 205

삭제

청구항 206

삭제

청구항 207

삭제

청구항 208

삭제

청구항 209

삭제

청구항 210

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항체 등과 조합 투여되는 IDO 억제제를 포함하는 종양 치료제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근에 트립토판 대사 효소인 인돌아민 2,3-디옥시게나제(IDO)가 T 세포 및 자연 살해 세포(NK 세포)의 증식을 억제하고 조절 T 세포를 활성화함으로써 숙주 면역계의 저하를 유발한다고 보고되었다. IDO의 발현은 종양 조직에서 증가하고, 암세포 및 수지상 세포에서 IFN- γ 자극에 의해 유도된다(예를 들어, 문헌 [J. Clin. Invest., vol. 117, No. 5, pp. 1147-1154 (2007)] 참조). 인체에서, 필수 아미노산인 트립토판의 90%는 키누레닌으로, 이어서 키누레닌 경로에서 3OH-키누레닌, 퀴놀린산 등으로 대사되고, 그 개시 단계는 IDO를 수반한다.

[0003] IDO의 활성화는 트립토판 농도를 감소시키고, 키누레닌 농도를 국소 또는 전신 방식으로 증가시키고, 키누레닌을 포함하는 트립토판 대사산물은 T 세포 및 NK 세포의 사멸을 유도한다(예를 들어, 문헌 [J. Exp. Med., 196, No. 4, pp. 447-457 (2002)] 참조). 트립토판 대사는 또한 CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ T 세포의 조절 T 세포로의 전환을 유도한다(예를 들어, 문헌 [Blood, vol. 109, No. 7, pp. 2871-2877 (2007)] 참조). IDO의 발현이 INF- γ 에 의해 유도된 수지상 세포의 배양 상청액에서, 트립토판 농도는 감소되고, 키누레닌 농도는 증가한다. T 세포를 이러한 수지상 세포와 동시 배양하면, 비자극된 수지상 세포와의 동시 배양에 비해 T 세포의 증식이 억제된다(예를 들면, 문헌 [J. Exp. Med., vol. 196, No. 4, pp. 447-457 (2002)] 참조).

[0004] 이상으로부터, IDO의 발현이 증가된 종양 환경에서, 트립토판 대사에 의해 유도된 키누레닌 농도 증가는 종양에서의 면역 회피 메커니즘 중의 하나로 간주되는 항종양 이펙터 세포를 억제한다(예를 들면, 문헌 [J. Clin. Invest., vol. 117, No. 5, pp. 1147-1154 (2007)] 참조).

[0005] 결장직장암 및 전립선암의 종양 조직에서 IDO 발현의 증가가 보고되었다(예를 들어, 문헌 [Clin. Cancer Res., vol. 12, No. 4, pp. 1144-1151 (2006)]; 및 [Eur. J. Cancer, vol. 44, No. 15, pp. 2266-2275 (2008)] 참조). 급성 골수성 백혈병 세포에서, IDO는 지속적으로 발현된다(예를 들어, 문헌 [Leukemia, vol. 21, pp. 353-355 (2007)] 참조). 또한, 자궁내막암, 흑색종 또는 난소암 환자의 IDO 발현이 증가하면 환자의 예후가 불량할 것이라고 보고되었다(예를 들어, 문헌 [Br. J. Cancer, vol. 95, No. 11, pp. 1555-1561 (2006)]; [J. Clin. Invest., vol. 114, No. 2, pp. 280-290 (2004)]; 및 [Clin. Cancer Res., vol. 11, No. 16, pp. 6030-6039 (2005)] 참조). 성인 T 세포 백혈병 림프종 및 급성 골수성 백혈병에서, 혈액 내의 키누레닌/트립토판 비율이 증가한다(예를 들어, 문헌 [Leuk. Res., vol. 33, No. 1, pp. 39-45 (2009)]; 및 [Leuk. Res., vol. 33, No. 3, pp. 490-494 (2009)] 참조). 또한, 혈액 내의 키누레닌/트립토판 비율이 증가된 흑색종 환자는 예후가 불량할 것으로 보고되었다(예를 들어, 문헌 [Dermatology, vol. 214, No. 1, pp. 8-14 (2007)] 참조). 상기한 바와 같이, IDO 및/또는 키누레닌은 다양한 유형의 고형 암 및 혈액암에 관여하는 것으로 여겨진다.

[0006] 트립토판 유도체, 1-메틸트립토판(1-MT)은 트립토판을 길항하여 키누레닌의 생성을 억제한다(예를 들어, 문헌 [Cancer Res., vol. 67, No. 2, pp. 792-800 (2007)] 참조). 1-MT는 IDO를 발현하는 암세포 또는 IDO를 발현하

는 수지상 세포의 존재 하에서의 T 세포 증식의 억제를 상쇄한다(예를 들어, 문헌 [Cancer Res., vol. 67, No. 2, pp. 792-800 (2007)] 참조). 또한, 1-MT는 동종이계 임신 마우스에서 주조직적합성 복합체(MHC) 제한 거부를 유도한다(예를 들어, 문헌 [Nat. Immunol., vol. 2, No. 1, pp. 64-68 (2001)] 참조). 이러한 결과는 IDO의 억제가 키누레닌의 생산을 억제하고 면역을 유도함을 시사한다.

[0007] 1-MT는 마우스 흑색종 세포를 가진 종양 보유 마우스에서 항종양 효과를 나타낸다. 이 효과는 면역 결핍 마우스에서 사라진다(예를 들어, 문헌 [Cancer Res., vol. 67, No. 2, pp. 792-800 (2007)] 참조). 이러한 결과는 1-MT의 항종양 효과가 키누레닌 생산에 대한 IDO 억제 매개 억제 효과에 의한 면역자극에 기초한다는 것을 시사한다.

[0008] 또한, 키누레닌의 생산 및/또는 IDO에 억제 효과를 나타내는 화합물은 면역자극 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(예를 들어, 문헌 [Nat. Immunol., vol. 2, pp. 64-68 (2001)] 참조).

[0009] IDO 억제제의 예는 W099/29310에 기재된 1-MT를 포함하는 상기한 트립토판 유도체, W02010/053182, W02011/142316 및 W02013/069765에 기재된 퀴녹살린 유도체, W02006/122150 및 W02010/005958에 기재된 1,2,5-옥사디아졸 유도체, W02015/002918에 기재된 우레아 유도체 및 W02015/002918에 기재된 아닐리드 유도체를 포함한다.

[0010] IDO1은 종양 또는 미세 환경에서 발현되는 것으로 알려져 있고, 숙주 면역 감시로부터 종양의 회피를 책임지는 면역억제 메커니즘에서 중요한 조절 역할을 수행한다. 키누레닌(Kyn)과 같은 트립토판(Trp) 대사산물이 NK 세포 사멸을 유도하고 NK 세포 수용체의 발현을 억제하여 NK 세포 매개 세포독성을 약화하는 것으로 보고되었다. 따라서, IDO1 활성은 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)에 영향을 미칠 가능성이 있다.

[0011] 레날리도마이드는 다발성 골수종의 표준 치료제이고, 항-CD20 항체 및 항-CD40 항체와 같은 치료 항체의 ADCC 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(비특허 문헌 1 및 2 참조).

[0012] 이마티닙은 c-kit(줄기세포 인자 수용체) 및 혈소판 유래 성장 인자 수용체를 억제하고, 또한 수지상 세포를 통해 NK 세포를 활성화하여 항종양 효과를 나타낸다(비특허 문헌 3 참조).

[0013] 또한, 흑색종의 치료제인 다카르바진 및 신장 세포 암종 및 간암종의 치료제인 소라페닙은 NK 세포를 활성화하는 것으로 알려져 있다(비특허 문헌 4 및 5 참조).

0014] 인용 목록

0015] 비특허 문헌

[0016] 비특허 문헌 1: [Clin. Cancer Res. vol. 11, p5984, 2005],

[0017] 비특허 문헌 2: [Br. J. Hematol. vol. 144, p848, 2009],

[0018] 비특허 문헌 3: [J Clin Invest. 2004 Aug 1; 114(3): 379-388],

[0019] 비특허 문헌 4: [Journal of Investigative Dermatology (2013) 133, 499-508],

[0020] 비특허 문헌 5: [HEPATOLOGY, Vol. 57, No. 6, 2013, 2358-2368].

발명의 내용

0021] 발명의 요약

0022] 기술적 문제

[0023] 본 발명의 목적은 항체 등과 조합 투여되는 IDO 억제제를 포함하는 종양 치료제를 제공하는 것이다.

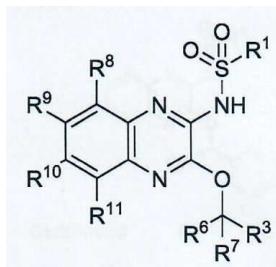
0024] 문제의 해결책

[0025] 본 발명은 하기 (1) 내지 (210)에 관한 것이다.

[0026] (1) 종양의 치료 방법으로서, 유효량의 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체, 및 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제를 이를 필요로 하는 인간에게 투여하는 단계를 포함하는 종양의 치료 방법.

[0027] (2) (1)에 있어서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 화학식 (I)로 표시되는 화합물 (I) 또는 그의 약

학적으로 허용되는 염, 또는 하기 화학식 (II)로 표시되는 화합물 (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염인 방법.



(I)

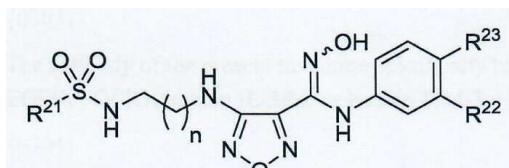
[0028] 여기서,

[0030] R⁶ 및 R⁷은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자 또는 임의로 치환된 저급 알킬을 나타내고,

[0031] R⁸, R⁹, R¹⁰ 및 R¹¹은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자, 할로겐, 시아노 또는 저급 알킬을 나타내고,

[0032] R¹은 저급 알콕시로 치환될 수 있는 저급 알킬을 나타내고,

[0033] R³은 임의로 치환된 방향족 헤테로시클릭 기를 나타내고,



(II)

[0035] 여기서,

[0036] R²¹은 아미노 또는 메틸을 나타내고,

[0037] R²²는 할로겐, 시아노, 트리플루오로메틸 또는 저급 알킬을 나타내고,

[0038] R²³은 수소 원자 또는 할로겐을 나타내고,

[0039] n은 1 또는 2를 나타낸다.

[0040] (3) (1) 또는 (2)에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체가 각각 모가물리주맙, 트라스투주맙, 리툭시맙 또는 세툭시맙인 방법.

[0041] (4) (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 있어서, 항체 및 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 동시적으로 또는 순차적으로 투여되는 것인 방법.

[0042] (5) (1) 내지 (4) 중 어느 하나에 있어서, 종양이 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 종양인 방법.

[0043] (6) (5)에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4를 발현하는 종양이 T 세포 림프종인 방법.

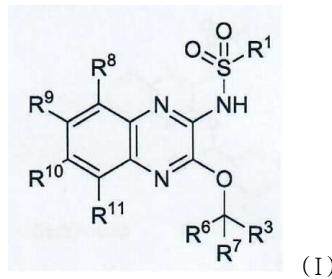
[0044] (7) (5)에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4를 발현하는 종양이 말초 T 세포 림프종, 피부 T 세포 림프종 또는 성인 T 세포 백혈병 림프종인 방법.

[0045] (8) (5)에 있어서, 인간 표피 성장 인자 수용체 2를 발현하는 종양이 유방암, 위암, 난소암, 골육종 또는 자궁 내막암인 방법.

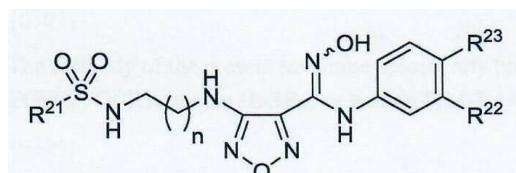
[0046] (9) (5)에 있어서, 인간 표피 성장 인자 수용체 2를 발현하는 종양이 유방암인 방법.

[0047] (10) (5)에 있어서, 인간 CD20을 발현하는 종양이 만성 백혈병 또는 비호지킨(Hodgkin) 림프종인 방법.

- [0048] (11) (10)에 있어서, 만성 백혈병이 만성 림프구성 백혈병인 방법.
- [0049] (12) (10)에 있어서, 비호지킨 림프종이 B 세포 림프종인 방법.
- [0050] (13) (12)에 있어서, B 세포 림프종이 외투 (mantle) 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종 또는 버킷 (Burkitt) 림프종인 방법.
- [0051] (14) (12)에 있어서, B 세포 림프종이 버킷 림프종인 방법.
- [0052] (15) (5)에 있어서, 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 종양이 결장암, 두경부암, 위암 또는 간암인 방법.
- [0053] (16) 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체의 항체 의존성 세포 매개 세포독성 활성의 감소를 억제하는 방법.
- [0054] (17) (16)에 있어서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 화학식 (I)로 표시되는 화합물 (I) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 또는 하기 화학식 (II)로 표시되는 화합물 (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염인 방법.

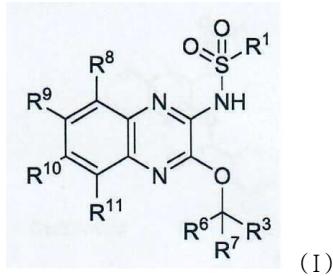


- [0055] 여기서,
- [0056] R^6 및 R^7 은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자 또는 임의로 치환된 저급 알킬을 나타내고,
- [0057] R^8 , R^9 , R^{10} 및 R^{11} 은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자, 할로겐, 시아노 또는 저급 알킬을 나타내고,
- [0058] R^1 은 저급 알콕시로 치환될 수 있는 저급 알킬을 나타내고,
- [0059] R^3 은 임의로 치환된 방향족 헤테로시클릭 기를 나타내고,



- [0060] 여기서,
- [0061] R^{21} 은 아미노 또는 메틸을 나타내고,
- [0062] R^{22} 은 할로겐, 시아노, 트리플루오로메틸 또는 저급 알킬을 나타내고,
- [0063] R^{23} 은 수소 원자 또는 할로겐을 나타내고,
- [0064] n은 1 또는 2를 나타낸다.
- [0065] (18) 유효량의 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체, 및 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제를 투여하는 데 사용하기 위한 약학 조성물.
- [0066] (19) (18)에 있어서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 화학식 (I)로 표시되는 화합물 (I) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 또는 하기 화학식 (II)로 표시되는 화합물 (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염인

약학 조성물.



[0069]

여기서,

[0071]

R^6 및 R^7 은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자 또는 임의로 치환된 저급 알킬을 나타내고,

[0072]

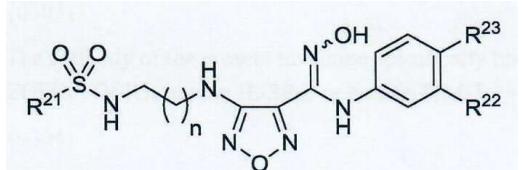
R^8 , R^9 , R^{10} 및 R^{11} 은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자, 할로겐, 시아노 또는 저급 알킬을 나타내고,

[0073]

R^1 은 저급 알콕시로 치환될 수 있는 저급 알킬을 나타내고,

[0074]

R^3 은 임의로 치환된 방향족 헤테로시클릭 기를 나타내고,



[0075]

여기서,

[0077]

R^{21} 은 아미노 또는 메틸을 나타내고,

[0078]

R^{22} 은 할로겐, 시아노, 트리플루오로메틸 또는 저급 알킬을 나타내고,

[0079]

R^{23} 은 수소 원자 또는 할로겐을 나타내고,

[0080]

n 은 1 또는 2를 나타낸다.

[0081]

(20) (18) 또는 (19)에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체가 각각 모가물리주맙, 트라스투주맙, 리툭시맙 또는 세툭시맙인 약학 조성물.

[0082]

(21) (18) 내지 (20) 중 어느 하나에 있어서, 항체 및 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제를 동시적으로 또는 순차적으로 투여하는 것을 포함하는 약학 조성물.

[0083]

(22) (18) 내지 (21) 중 어느 하나에 있어서, 종양이 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 종양인 약학 조성물.

[0084]

(23) (22)에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4를 발현하는 종양이 T 세포 림프종인 약학 조성물.

[0085]

(24) (22)에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4를 발현하는 종양이 말초 T 세포 림프종, 피부 T 세포 림프종 또는 성인 T 세포 백혈병 림프종인 약학 조성물.

[0086]

(25) (22)에 있어서, 인간 표피 성장 인자 수용체 2를 발현하는 종양이 유방암, 위암, 난소암, 골육종 또는 자궁내막암인 약학 조성물.

[0087]

(26) (22)에 있어서, 인간 표피 성장 인자 수용체 2를 발현하는 종양이 유방암인 약학 조성물.

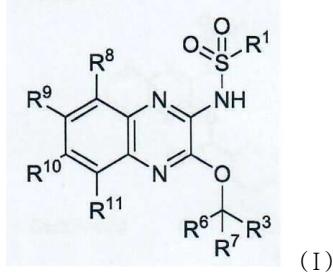
[0088]

(27) (22)에 있어서, 인간 CD20을 발현하는 종양이 만성 백혈병 또는 비호지킨 림프종인 약학 조성물.

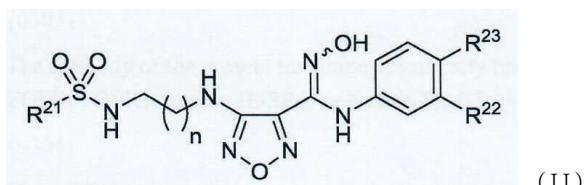
[0089]

(28) (27)에 있어서, 만성 백혈병이 만성 림프구성 백혈병인 약학 조성물.

- [0090] (29) (27)에 있어서, 비호지킨 림프종이 B 세포 림프종인 약학 조성물.
- [0091] (30) (29)에 있어서, B 세포 림프종이 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종 또는 베켓 림프종인 약학 조성물.
- [0092] (31) (29)에 있어서, B 세포 림프종이 베켓 림프종인 약학 조성물.
- [0093] (32) (22)에 있어서, 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 종양이 결장암, 두경부암, 위암 또는 간암인 약학 조성물.
- [0094] (33) 종양 치료에 사용하기 위한, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와, 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체의 조합제.
- [0095] (34) (33)에 있어서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 화학식 (I)로 표시되는 화합물 (I) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 또는 하기 화학식 (II)로 표시되는 화합물 (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와 항체의 조합제.



- [0096]
- [0097] 여기서,
- [0098] R⁶ 및 R⁷은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자 또는 임의로 치환된 저급 알킬을 나타내고,
- [0099] R⁸, R⁹, R¹⁰ 및 R¹¹은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자, 할로겐, 시아노 또는 저급 알킬을 나타내고,
- [0100] R¹은 저급 알콕시로 치환될 수 있는 저급 알킬을 나타내고,
- [0101] R³은 임의로 치환된 방향족 헤테로시클릭 기기를 나타내고,



- [0102]
- [0103] 여기서,
- [0104] R²¹은 아미노 또는 메틸을 나타내고,
- [0105] R²²은 할로겐, 시아노, 트리플루오로메틸 또는 저급 알킬을 나타내고,
- [0106] R²³은 수소 원자 또는 할로겐을 나타내고,
- [0107] n은 1 또는 2를 나타낸다.
- [0108] (35) (33) 또는 (34)에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체가 각각 모가물리주맙, 트라스투주맙, 리툭시맙 또는 세툭시맙인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와 항체의 조합제.
- [0109] (36) (33) 내지 (35) 중 어느 하나에 있어서, 항체 및 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 동시적으로 또는 순차적으로 투여되는 것인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와 항체의 조합제.
- [0110] (37) (33) 내지 (36) 중 어느 하나에 있어서, 종양이 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체

2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 종양인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와 항체의 조합제.

[0111] (38) (37)에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4를 발현하는 종양이 T 세포 림프종인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와 항체의 조합제.

[0112] (39) (37)에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4를 발현하는 종양이 말초 T 세포 림프종, 피부 T 세포 림프종 또는 성인 T 세포 백혈병 림프종인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와 항체의 조합제.

[0113] (40) (37)에 있어서, 인간 표피 성장 인자 수용체 2를 발현하는 종양이 유방암, 위암, 난소암, 골육종 또는 자궁내막암인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와 항체의 조합제.

[0114] (41) (37)에 있어서, 인간 표피 성장 인자 수용체 2를 발현하는 종양이 유방암인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와 항체의 조합제.

[0115] (42) (37)에 있어서, 인간 CD20을 발현하는 종양이 만성 백혈병 또는 비호지킨 림프종인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와 항체의 조합제.

[0116] (43) (42)에 있어서, 만성 백혈병이 만성 림프구성 백혈병인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와 항체의 조합제.

[0117] (44) (42)에 있어서, 비호지킨 림프종이 B 세포 림프종인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와 항체의 조합제.

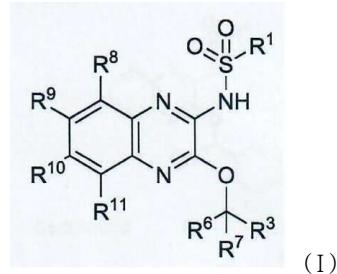
[0118] (45) (44)에 있어서, B 세포 림프종이 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종 또는 버킷 림프종인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와 항체의 조합제.

[0119] (46) (44)에 있어서, B 세포 림프종이 버킷 림프종인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와 항체의 조합제.

[0120] (47) (37)에 있어서, 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 종양이 결장암, 두경부암, 위암 또는 간암인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와 항체의 조합제.

[0121] (48) 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체의 항체의 의존성 세포 매개 세포독성 활성의 감소를 억제하는데 사용하기 위한 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제.

[0122] (49) (48)에 있어서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 화학식 (I)로 표시되는 화합물 (I) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 또는 하기 화학식 (II)로 표시되는 화합물 (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제.



[0123] 여기서,

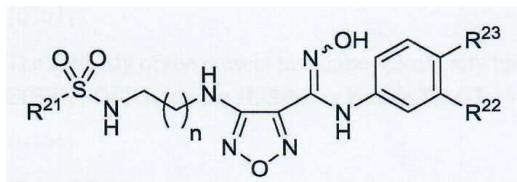
[0124] R⁶ 및 R⁷은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자 또는 임의로 치환된 저급 알킬을 나타내고,

[0125] R⁸, R⁹, R¹⁰ 및 R¹¹은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자, 할로겐, 시아노 또는 저급 알킬을 나타내고,

[0126] R¹은 저급 알콕시로 치환될 수 있는 저급 알킬을 나타내고,

[0127] R³은 임의로 치환된 방향족 헤테로시클릭 기를 나타내고,

[0128] R^{1'}은 임의로 치환된 방향족 헤테로시클릭 기를 나타내고,



(II)

[0129]

여기서,

[0130]

R²¹은 아미노 또는 메틸을 나타내고,

[0131]

R²²는 할로겐, 시아노, 트리플루오로메틸 또는 저급 알킬을 나타내고,

[0132]

R²³은 수소 원자 또는 할로겐을 나타내고,

[0133]

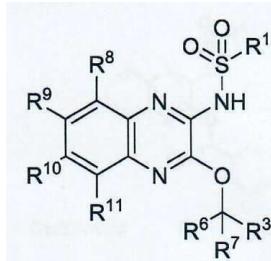
n은 1 또는 2를 나타낸다.

[0134]

(50) 종양 치료제로서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제를 활성 성분으로 포함하고, 유효량의 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체와 조합 투여되는 것인 종양 치료제.

[0135]

(51) (50)에 있어서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 화학식 (I)로 표시되는 화합물 (I) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 또는 하기 화학식 (II)로 표시되는 화합물 (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염인 종양 치료제.



(I)

[0136]

여기서,

[0137]

R⁶ 및 R⁷은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자 또는 임의로 치환된 저급 알킬을 나타내고,

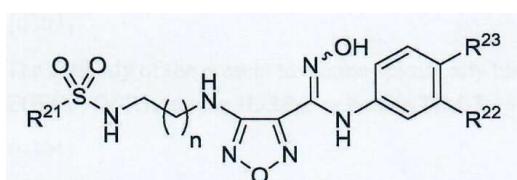
[0138]

R⁸, R⁹, R¹⁰ 및 R¹¹은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자, 할로겐, 시아노 또는 저급 알킬을 나타내고,

[0139]

R¹은 저급 알콕시로 치환될 수 있는 저급 알킬을 나타내고,

[0140]

R³은 임의로 치환된 방향족 헤테로시클릭 기를 나타내고,

(II)

[0141]

여기서,

[0142]

R²¹은 아미노 또는 메틸을 나타내고,

[0143]

R²²는 할로겐, 시아노, 트리플루오로메틸 또는 저급 알킬을 나타내고,

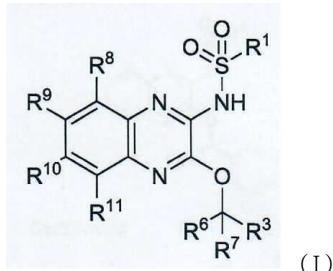
[0144]

R²³은 수소 원자 또는 할로겐을 나타내고,

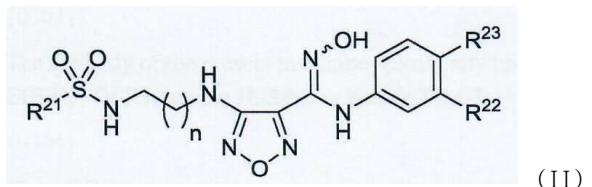
[0145]

n은 1 또는 2를 나타낸다.

- [0149] (52) (50) 또는 (51)에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체가 각각 모가물리주맙, 트拉斯투주맙, 리툭시맙 또는 세툭시맙인 종양 치료제.
- [0150] (53) (50) 내지 (52) 중 어느 하나에 있어서, 치료제 및 항체가 동시적으로 또는 순차적으로 투여되는 것인 종양 치료제.
- [0151] (54) (50) 내지 (53) 중 어느 하나에 있어서, 종양이 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 종양인 종양 치료제.
- [0152] (55) (54)에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4를 발현하는 종양이 T 세포 림프종인 종양 치료제.
- [0153] (56) (54)에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4를 발현하는 종양이 말초 T 세포 림프종, 피부 T 세포 림프종 또는 성인 T 세포 백혈병 림프종인 종양 치료제.
- [0154] (57) (54)에 있어서, 인간 표피 성장 인자 수용체 2를 발현하는 종양이 유방암, 위암, 난소암, 골육종 또는 자궁내막암인 종양 치료제.
- [0155] (58) (54)에 있어서, 인간 표피 성장 인자 수용체 2를 발현하는 종양이 유방암인 종양 치료제.
- [0156] (59) (54)에 있어서, 인간 CD20을 발현하는 종양이 만성 백혈병 또는 비호지킨 림프종인 종양 치료제.
- [0157] (60) (59)에 있어서, 만성 백혈병이 만성 림프구성 백혈병인 종양 치료제.
- [0158] (61) (59)에 있어서, 비호지킨 림프종이 B 세포 림프종인 종양 치료제.
- [0159] (62) (61)에 있어서, B 세포 림프종이 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종 또는 버켓 림프종인 종양 치료제.
- [0160] (63) (61)에 있어서, B 세포 림프종이 버켓 림프종인 종양 치료제.
- [0161] (64) (54)에 있어서, 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 종양이 결장암, 두경부암, 위암 또는 간암인 종양 치료제.
- [0162] (65) 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제를 활성 성분으로서 포함하는, 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체의 항체 의존성 세포 매개 세포독성 활성의 감소를 위한 억제제.
- [0163] (66) (65)에 있어서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 화학식 (I)로 표시되는 화합물 (I) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 또는 하기 화학식 (II)로 표시되는 화합물 (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염인 억제제.



- [0164] 여기서,
- [0165] R^6 및 R^7 은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자 또는 임의로 치환된 저급 알킬을 나타내고,
- [0166] R^8 , R^9 , R^{10} 및 R^{11} 은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자, 할로겐, 시아노 또는 저급 알킬을 나타내고,
- [0167] R^1 은 저급 알콕시로 치환될 수 있는 저급 알킬을 나타내고,
- [0168] R^3 은 임의로 치환된 방향족 헤테로시클릭 기를 나타내고,



[0170]

여기서

[0172]

P^{22} 는 핵으로 α 를 방출하는 트리튬 를 유클레티 또는 질크 안티온 나트륨과

R^{23} 은 수소 원자 또는 할로제을 나타내고

[0175]

n은 1 또는 2를 나타낸다.

[0176]

(67) (16) 또는 (17)에 있어서, 항체 몇 인돌아민 2,3-디옥시케나제 억제제가 동시에 또는 순차적으로 투여되는 것인 방법.

[0177]

(68) (16) 또는 (17)에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체가 각각 모가물리주맙, 트라스투주맙, 리툭시맙 또는 세툭시맙인 방법.

[0178]

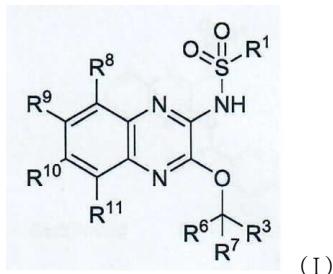
(69) (48) 또는 (49)에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체가 각각 모가물리주맙, 트라스투주맙, 리툭시맙 또는 세툭시맙인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제.

[0179]

(70) 종양 치료제로서, 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체를 활성 성분으로 포함하고, 유효량의 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와 조합 투여되는 것인 종양 치료제.

[0180]

(71) (70)에 있어서, 인돌아민 2,3-디옥시케나제 억제제가 하기 화학식 (I)로 표시되는 화합물 (I) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 또는 하기 화학식 (II)로 표시되는 화합물 (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염인 종양 치료제.



[0181]

여기서

501827

R^6 및 R^7 은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자 또는 임의로 치환된 저급 알킬을 나타내고

E01043

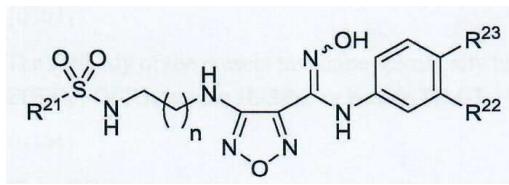
⁸ ⁹ ¹⁰ ¹¹ $R^8 R^9 R^{10}$ 를 둘 R^{11} 을 둘 익하거나 삼아할 수 있고 각각 수소 원자 핵로에 시아노 또는 전금 악기를 나타내고

[0185]

P^1 을 절근 악코시로 치환되어 습 이는 절근 악키을 나타내고

E01967

P^3 은 외의로 치환되어 박향종 혜테로 시클린 기를 나타내고



(II)

[0187]

여기서,

[0188]

 R^{21} 은 아미노 또는 메틸을 나타내고,

[0189]

 R^{22} 는 할로겐, 시아노, 트리플루오로메틸 또는 저급 알킬을 나타내고,

[0190]

 R^{23} 은 수소 원자 또는 할로겐을 나타내고,

[0191]

 n 은 1 또는 2를 나타낸다.

[0192]

(72) (70) 또는 (71)에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체가 각각 모가물리주맙, 트라스투주맙, 리툭시맙 또는 세툭시맙인 종양 치료제.

[0193]

(73) (70) 내지 (72) 중 어느 하나에 있어서, 치료제 및 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 동시적으로 또는 순차적으로 투여되는 것인 종양 치료제.

[0194]

(74) (70) 내지 (73) 중 어느 하나에 있어서, 종양이 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 종양인 종양 치료제.

[0195]

(75) (74)에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4를 발현하는 종양이 T 세포 림프종인 종양 치료제.

[0196]

(76) (74)에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4를 발현하는 종양이 말초 T 세포 림프종, 피부 T 세포 림프종 또는 성인 T 세포 백혈병 림프종인 종양 치료제.

[0197]

(77) (74)에 있어서, 인간 표피 성장 인자 수용체 2를 발현하는 종양이 유방암, 위암, 난소암, 골육종 또는 자궁내막암인 종양 치료제.

[0198]

(78) (74)에 있어서, 인간 표피 성장 인자 수용체 2를 발현하는 종양이 유방암인 종양 치료제.

[0199]

(79) (74)에 있어서, 인간 CD20을 발현하는 종양이 만성 백혈병 또는 비호지킨 림프종인 종양 치료제.

[0200]

(80) (79)에 있어서, 만성 백혈병이 만성 림프구성 백혈병인 종양 치료제.

[0201]

(81) (79)에 있어서, 비호지킨 림프종이 B 세포 림프종인 종양 치료제.

[0202]

(82) (81)에 있어서, B 세포 림프종이 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종 또는 버킷 림프종인 종양 치료제.

[0203]

(83) (81)에 있어서, B 세포 림프종이 버킷 림프종인 종양 치료제.

[0204]

(84) (74)에 있어서, 표피 성장 인자 수용체를 발현하는 종양이 결장암, 두경부암, 위암 또는 간암인 종양 치료제.

[0205]

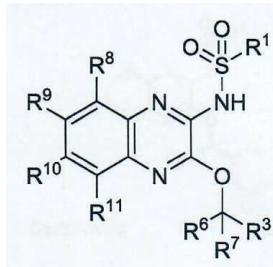
(85) (65) 또는 (66)에 있어서, 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체가 각각 모가물리주맙, 트라스투주맙, 리툭시맙 또는 세툭시맙인 억제제.

[0206]

(86) 종양의 치료 방법으로서, 유효량의 인간 폴레이트 수용체 1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체 및 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제를 이를 필요로 하는 인간에게 투여하는 단계를 포함하는 종양의 치료 방법.

[0207]

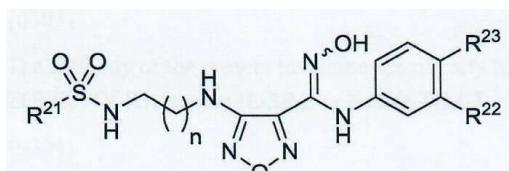
(87) (86)에 있어서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 화학식 (I)로 표시되는 화합물 (I) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 또는 하기 화학식 (II)로 표시되는 화합물 (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염인 방법.



[0209]

(I)

여기서,

[0211] R^6 및 R^7 은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자 또는 임의로 치환된 저급 알킬을 나타내고,[0212] R^8 , R^9 , R^{10} 및 R^{11} 은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자, 할로겐, 시아노 또는 저급 알킬을 나타내고,[0213] R^1 은 저급 알콕시로 치환될 수 있는 저급 알킬을 나타내고,[0214] R^3 은 임의로 치환된 방향족 헤테로시클릭 기를 나타내고,

(II)

[0215]

여기서,

[0216] R^{21} 은 아미노 또는 메틸을 나타내고,[0218] R^{22} 은 할로겐, 시아노, 트리플루오로메틸 또는 저급 알킬을 나타내고,[0219] R^{23} 은 수소 원자 또는 할로겐을 나타내고,

[0220]

n은 1 또는 2를 나타낸다.

[0221]

(88) (86) 또는 (87)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체가 모노클로날 항체인 방법.

[0222]

(89) (86) 또는 (87)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체가 하기 (a1)-(c1)로부터 선택되는 모노클로날 항체인 방법:

[0223]

(a1) 항체의 H쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 1, 2 및 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 4, 5 및 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 모노클로날 항체;

[0224]

(b1) 항체의 H쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 1, 2 및 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 4, 5 및 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열(항체 H쇄의 CDR3) 내의 시스테인이 트레오닌, 메티오닌, 이소류신, 발린, 페닐알라닌 또는 글루타민으로 치환되는 것인 모노클로날 항체; 및

[0225]

(c1) 항체의 H쇄가 서열 번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄가 서열 번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 모노클로날 항체.

[0226]

(90) (86) 또는 (87)에 있어서, 인간 IL-3R α 에 특이적으로 결합하는 항체가, IL-3 신호전달을 억제하지 않고 인간 IL-3R α 쇄의 B 도메인에 결합하지만 인간 IL-3R α 쇄의 C 도메인에는 결합하지 않는 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체인 방법.

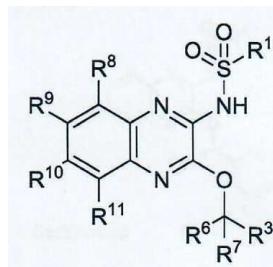
[0227]

(91) (90)에 있어서, 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체가 하기 (a2) 내지 (e2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄의 CDR 및 경쇄의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법:

- [0228] (a2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 9 내지 11의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 24 내지 26의 아미노산 서열이고,
- [0229] (b2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 12 내지 14의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 27 내지 29의 아미노산 서열이고,
- [0230] (c2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 15 내지 17의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 30 내지 32의 아미노산 서열이고,
- [0231] (d2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 18 내지 20의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 33 내지 35의 아미노산 서열이고,
- [0232] (e2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 21 내지 23의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 36 내지 38의 아미노산 서열이다.
- [0233] (92) (90)에 있어서, 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체가 하기 (e2)로 이루어지는 중쇄의 CDR 및 경쇄의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법:
- [0234] (e2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 21 내지 23의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 36 내지 38의 아미노산 서열이다.
- [0235] (93) (86) 또는 (87)에 있어서, 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체가 인간 TIM-3의 세포외 영역에 결합하는 모노클로날 항체인 방법.
- [0236] (94) (93)에 있어서, 모노클로날 항체가 하기 (i) 내지 (iii)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법:
- [0237] (i) 각각 서열 번호 39 내지 41로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 42 내지 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체,
- [0238] (ii) 각각 서열 번호 45 내지 47로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 48 내지 50으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체, 및
- [0239] (iii) 각각 서열 번호 51 내지 53으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 54 내지 56으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체.
- [0240] (95) (93)에 있어서, 모노클로날 항체가 하기 (a3) 및 (b3)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법:
- [0241] (a3) 서열 번호 57로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VH를 포함하고 서열 번호 58로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VL을 포함하는 모노클로날 항체, 및
- [0242] (b3) 서열 번호 59로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VH를 포함하고 서열 번호 60으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VL을 포함하는 모노클로날 항체.
- [0243] (96) (86) 내지 (95) 중 어느 하나에 있어서, 항체 및 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 동시적으로 또는 순차적으로 투여되는 것인 방법.
- [0244] (97) (86) 중 어느 하나에 있어서, 종양이 인간 폴레이트 수용체 1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3과 관련된 종양인 방법.
- [0245] (98) (97)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1과 관련된 종양이 혈액암, 유방암, 자궁암, 결장직장암, 쇠도암, 위암, 난소암, 폐암, 신장암, 직장암, 갑상선암, 자궁경부암, 소장암, 전립선암, 중피종 또는 췌장암인 방법.
- [0246] (99) (97)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1과 관련된 종양이 난소암인 방법.
- [0247] (100) (97)에 있어서, 인간 IL-3R α 와 관련된 종양이 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병, 비정형 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 성인 T 세포 백혈병, NK/T 세포 림프종, 과립 림프구증가증(LGL 백혈병), 진성 적혈구증가증, 본태성 혈소판혈증, 과호산구 증후군, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 여포성 림프종, MALT 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 버켓 림프종, 림프모구성 림프종 또는 캐슬만병

(Castleman disease)인 방법.

- [0248] (101) (97)에 있어서, 인간 IL-3R α 와 관련된 종양이 급성 골수성 백혈병(AML)인 방법.
- [0249] (102) (97)에 있어서, 인간 TIM-3과 관련된 종양이 혈액암, 유방암, 자궁암, 결장직장암, 식도암, 위암, 난소암, 폐암, 신장암, 직장암, 갑상선암, 자궁경부암, 소장암, 전립선암 및 췌장암인 방법.
- [0250] (103) (97)에 있어서, 인간 TIM-3과 관련된 종양이 급성 골수성 백혈병(AML)인 방법.
- [0251] (104) 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 인간 폴레이트 수용체 1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체의 항체 의존성 세포 매개 세포독성 활성의 감소를 억제하는 방법.
- [0252] (105) (104)에 있어서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 화학식 (I)로 표시되는 화합물 (I) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 또는 하기 화학식 (II)로 표시되는 화합물 (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염인 방법.

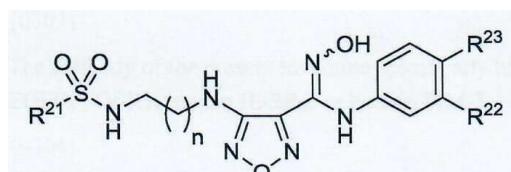


(I)

[0253]

여기서,

- [0255] R⁶ 및 R⁷은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자 또는 임의로 치환된 저급 알킬을 나타내고,
- [0256] R⁸, R⁹, R¹⁰ 및 R¹¹은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자, 할로겐, 시아노 또는 저급 알킬을 나타내고,
- [0257] R¹은 저급 알콕시로 치환될 수 있는 저급 알킬을 나타내고,
- [0258] R³은 임의로 치환된 방향족 헤테로시클릭 기를 나타내고,



(II)

[0259]

여기서,

- [0261] R²¹은 아미노 또는 메틸을 나타내고,
- [0262] R²²는 할로겐, 시아노, 트리플루오로메틸 또는 저급 알킬을 나타내고,
- [0263] R²³은 수소 원자 또는 할로겐을 나타내고,
- [0264] n은 1 또는 2를 나타낸다.

[0265] (106) (104) 또는 (105)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체가 모노클로날 항체인 방법.

[0266] (107) (104) 또는 (105)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체가 하기 (a1)-(c1)로부터 선택되는 모노클로날 항체인 방법:

- [0267] (a1) 항체의 H쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 1, 2 및 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 4, 5 및 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 모노클로날 항체;
- [0268] (b1) 항체의 H쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 1, 2 및 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄의

CDR 1-3이 각각 서열 번호 4, 5 및 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열(항체 H쇄의 CDR3) 내의 시스테인이 트레오닌, 메티오닌, 이소류신, 발린, 페닐알라닌 또는 글루타민으로 치환되는 것인 모노클로날 항체; 및

- [0269] (c1) 항체의 H쇄가 서열 번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄가 서열 번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 모노클로날 항체.
- [0270] (108) (104) 또는 (105)에 있어서, 인간 IL-3R α 에 특이적으로 결합하는 항체가, IL-3 신호전달을 억제하지 않고 인간 IL-3R α 쇄의 B 도메인에 결합하지만 인간 IL-3R α 쇄의 C 도메인에는 결합하지 않는 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체인 방법.
- [0271] (109) (108)에 있어서, 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체가 하기 (a2) 내지 (e2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄의 CDR 및 경쇄의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법:
- [0272] (a2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 9 내지 11의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 24 내지 26의 아미노산 서열이고,
- [0273] (b2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 12 내지 14의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 27 내지 29의 아미노산 서열이고,
- [0274] (c2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 15 내지 17의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 30 내지 32의 아미노산 서열이고,
- [0275] (d2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 18 내지 20의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 33 내지 35의 아미노산 서열이고,
- [0276] (e2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 21 내지 23의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 36 내지 38의 아미노산 서열이다.
- [0277] (110) (108)에 있어서, 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체가 하기 (e2)로 이루어지는 중쇄의 CDR 및 경쇄의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법:
- [0278] (e2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 21 내지 23의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 36 내지 38의 아미노산 서열이다.
- [0279] (111) (104) 또는 (105)에 있어서, 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체가 인간 TIM-3의 세포외 영역에 결합하는 모노클로날 항체인 방법.
- [0280] (112) (111)에 있어서, 모노클로날 항체가 하기 (i) 내지 (iii)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법:
- [0281] (i) 각각 서열 번호 39 내지 41로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 42 내지 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체,
- [0282] (ii) 각각 서열 번호 45 내지 47로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 48 내지 50으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체, 및
- [0283] (iii) 각각 서열 번호 51 내지 53으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 54 내지 56으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체.
- [0284] (113) (111)에 있어서, 모노클로날 항체가 하기 (a3) 및 (b3)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법:
- [0285] (a3) 서열 번호 57로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VH를 포함하고 서열 번호 58로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VL을 포함하는 모노클로날 항체, 및
- [0286] (b3) 서열 번호 59로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VH를 포함하고 서열 번호 60으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VL을 포함하는 모노클로날 항체.
- [0287] (114) (104) 내지 (113) 중 어느 하나에 있어서, 항체 및 인돌아민 2,3-디옥시제나제 억제제가 동시적으로 또는 순차적으로 투여되는 것인 방법.

[0288] (115) 유효량의 인간 폴레이트 수용체 1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체, 및 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제를 투여하는데 사용하기 위한 약학 조성물.

[0289] (116) (115)에 있어서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 화학식 (I)로 표시되는 화합물 (I) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 또는 하기 화학식 (II)로 표시되는 화합물 (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염인 약학 조성물.



(I)

[0290]

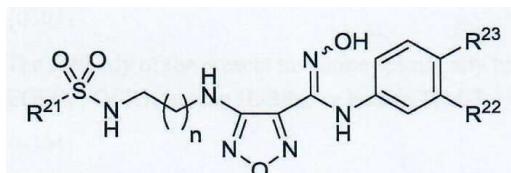
여기서,

[0292] R⁶ 및 R⁷은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자 또는 임의로 치환된 저급 알킬을 나타내고,

[0293] R⁸, R⁹, R¹⁰ 및 R¹¹은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자, 할로겐, 시아노 또는 저급 알킬을 나타내고,

[0294] R¹은 저급 알콕시로 치환될 수 있는 저급 알킬을 나타내고,

[0295] R³은 임의로 치환된 방향족 헤테로시클릭 기를 나타내고,



(II)

[0296]

여기서,

[0298] R²¹은 아미노 또는 메틸을 나타내고,

[0299] R²²은 할로겐, 시아노, 트리플루오로메틸 또는 저급 알킬을 나타내고,

[0300] R²³은 수소 원자 또는 할로겐을 나타내고,

[0301] n은 1 또는 2를 나타낸다.

[0302] (117) (115) 또는 (116)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체가 모노클로날 항체인 약학 조성물.

[0303] (118) (115) 또는 (116)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체가 하기 (a1)-(c1)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 모노클로날 항체인 약학 조성물:

[0304] (a1) 항체의 H쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 1, 2 및 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 4, 5 및 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 모노클로날 항체;

[0305] (b1) 항체의 H쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 1, 2 및 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 4, 5 및 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열(항체 H쇄의 CDR3) 내의 시스테인이 트레오닌, 메티오닌, 이소류신, 발린, 페닐알라닌 또는 글루타민으로 치환되는 것인 모노클로날 항체; 및

[0306] (c1) 항체의 H쇄가 서열 번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄가 서열 번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 모노클로날 항체.

- [0307] (119) (115) 또는 (116)에 있어서, 인간 IL-3R α 에 특이적으로 결합하는 항체가, IL-3 신호전달을 억제하지 않고 인간 IL-3R α 쇄의 B 도메인에 결합하지만 인간 IL-3R α 쇄의 C 도메인에는 결합하지 않는 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체인 약학 조성물.
- [0308] (120) (119)에 있어서, 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체가 하기 (a2) 내지 (e2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄의 CDR 및 경쇄의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는 것인 약학 조성물:
- [0309] (a2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 9 내지 11의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 24 내지 26의 아미노산 서열이고,
- [0310] (b2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 12 내지 14의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 27 내지 29의 아미노산 서열이고,
- [0311] (c2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 15 내지 17의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 30 내지 32의 아미노산 서열이고,
- [0312] (d2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 18 내지 20의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 33 내지 35의 아미노산 서열이고,
- [0313] (e2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 21 내지 23의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 36 내지 38의 아미노산 서열이다.
- [0314] (121) (119)에 있어서, 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체가 하기 (e2)로 이루어지는 중쇄의 CDR 및 경쇄의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는 것인 약학 조성물:
- [0315] (e2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 21 내지 23의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 36 내지 38의 아미노산 서열이다.
- [0316] (122) (115) 또는 (116)에 있어서, 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체가 인간 TIM-3의 세포외 영역에 결합하는 모노클로날 항체인 약학 조성물.
- [0317] (123) (122)에 있어서, 모노클로날 항체가 하기 (i) 내지 (iii)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물:
- [0318] (i) 각각 서열 번호 39 내지 41로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 42 내지 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체,
- [0319] (ii) 각각 서열 번호 45 내지 47로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 48 내지 50으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체, 및
- [0320] (iii) 각각 서열 번호 51 내지 53으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 54 내지 56으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체.
- [0321] (124) (122)에 있어서, 모노클로날 항체가 하기 (a3) 및 (b3)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물:
- [0322] (a3) 서열 번호 57로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VH를 포함하고 서열 번호 58로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VL을 포함하는 모노클로날 항체, 및
- [0323] (b3) 서열 번호 59로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VH를 포함하고 서열 번호 60으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VL을 포함하는 모노클로날 항체.
- [0324] (125) (115) 또는 (116)에 있어서, 항체 및 인돌아민 2,3-디옥시제나제 억제제를 동시적으로 또는 순차적으로 투여하는 것을 포함하는 약학 조성물.
- [0325] (126) (115) 내지 (125) 중 어느 하나에 있어서, 종양이 인간 폴레이트 수용체 1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3과 관련된 종양인 약학 조성물.
- [0326] (127) (126)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1과 관련된 종양이 혈액암, 유방암, 자궁암, 결장직장암, 식도암,

위암, 난소암, 폐암, 신장암, 직장암, 갑상선암, 자궁경부암, 소장암, 전립선암, 중피종 또는 췌장암인 약학 조성물.

[0327] (128) (126)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1과 관련된 종양이 난소암인 약학 조성물.

[0328] (129) (126)에 있어서, 인간 IL-3R α 와 관련된 종양이 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병, 비정형 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 성인 T 세포 백혈병, NK/T 세포 림프종, 과립 림프구증가증(LGL 백혈병), 진성 적혈구증가증, 본태성 혈소판혈증, 과호산구 증후군, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 여포성 림프종, MALT 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 버킷 림프종, 림프모구성 림프종 또는 캐슬만병인 약학 조성물.

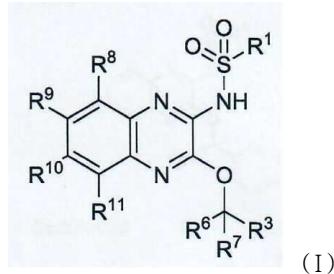
[0329] (130) (126)에 있어서, 인간 IL-3R α 와 관련된 종양이 급성 골수성 백혈병(AML)인 약학 조성물.

[0330] (131) (126)에 있어서, 인간 TIM-3과 관련된 종양이 혈액암, 유방암, 자궁암, 결장직장암, 식도암, 위암, 난소암, 폐암, 신장암, 직장암, 갑상선암, 자궁경부암, 소장암, 전립선암 및 췌장암인 약학 조성물.

[0331] (132) (126)에 있어서, 인간 TIM-3과 관련된 종양이 급성 골수성 백혈병(AML)인 약학 조성물.

[0332] (133) 종양 치료에 사용하기 위한, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와, 인간 폴레이트 수용체 1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체의 조합제.

[0333] (134) (133)에 있어서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 화학식 (I)로 표시되는 화합물 (I) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 또는 하기 화학식 (II)로 표시되는 화합물 (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염인 조합제.



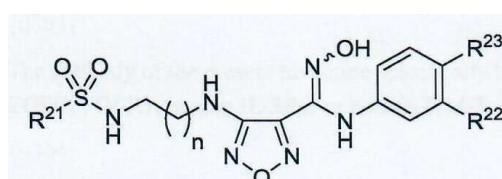
[0335] 여기서,

[0336] R⁶ 및 R⁷은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자 또는 임의로 치환된 저급 알킬을 나타내고,

[0337] R⁸, R⁹, R¹⁰ 및 R¹¹은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자, 할로겐, 시아노 또는 저급 알킬을 나타내고,

[0338] R¹은 저급 알콕시로 치환될 수 있는 저급 알킬을 나타내고,

[0339] R³은 임의로 치환된 방향족 헤테로시클릭 기를 나타내고,



(II)

[0341] 여기서,

[0342] R²¹은 아미노 또는 메틸을 나타내고,

[0343] R²²은 할로겐, 시아노, 트리플루오로메틸 또는 저급 알킬을 나타내고,

[0344] R²³은 수소 원자 또는 할로겐을 나타내고,

[0345] n은 1 또는 2를 나타낸다.

- [0346] (135) (133) 또는 (134)에 있어서, 인간 플레이트 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체가 모노클로날 항체인 조합제.
- [0347] (136) (133) 또는 (134)에 있어서, 인간 플레이트 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체가 하기 (a1)-(c1)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 모노클로날 항체인 조합제:
- [0348] (a1) 항체의 H쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 1, 2 및 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 4, 5 및 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 모노클로날 항체;
- [0349] (b1) 항체의 H쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 1, 2 및 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 4, 5 및 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열(항체 H쇄의 CDR3) 내의 시스테인이 트레오닌, 메티오닌, 이소류신, 발린, 페닐알라닌 또는 글루타민으로 치환되는 것인 모노클로날 항체; 및
- [0350] (c1) 항체의 H쇄가 서열 번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄가 서열 번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 모노클로날 항체.
- [0351] (137) (133) 또는 (134)에 있어서, 인간 IL-3R α 에 특이적으로 결합하는 항체가, IL-3 신호전달을 억제하지 않고 인간 IL-3R α 쇄의 B 도메인에 결합하지만 인간 IL-3R α 쇄의 C 도메인에는 결합하지 않는 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체인 조합제.
- [0352] (138) (137)에 있어서, 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체가 하기 (a2) 내지 (e2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄의 CDR 및 경쇄의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는 것인 조합제:
- [0353] (a2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 9 내지 11의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 24 내지 26의 아미노산 서열이고,
- [0354] (b2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 12 내지 14의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 27 내지 29의 아미노산 서열이고,
- [0355] (c2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 15 내지 17의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 30 내지 32의 아미노산 서열이고,
- [0356] (d2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 18 내지 20의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 33 내지 35의 아미노산 서열이고,
- [0357] (e2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 21 내지 23의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 36 내지 38의 아미노산 서열이다.
- [0358] (139) (137)에 있어서, 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체가 하기 (e2)로 이루어지는 중쇄의 CDR 및 경쇄의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는 것인 조합제:
- [0359] (e2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 21 내지 23의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 36 내지 38의 아미노산 서열이다.
- [0360] (140) (133) 또는 (134)에 있어서, 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체가 인간 TIM-3의 세포외 영역에 결합하는 모노클로날 항체인 조합제.
- [0361] (141) (140)에 있어서, 모노클로날 항체가 하기 (i) 내지 (iii)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조합제:
- [0362] (i) 각각 서열 번호 39 내지 41로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 42 내지 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체,
- [0363] (ii) 각각 서열 번호 45 내지 47로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 48 내지 50으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체, 및
- [0364] (iii) 각각 서열 번호 51 내지 53으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 54 내지 56으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체

의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체.

[0365] (142) (140)에 있어서, 모노클로날 항체가 하기 (a3) 및 (b3)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조합제:

[0366] (a3) 서열 번호 57로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VH를 포함하고 서열 번호 58로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VL을 포함하는 모노클로날 항체, 및

[0367] (b3) 서열 번호 59로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VH를 포함하고 서열 번호 60으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VL을 포함하는 모노클로날 항체.

[0368] (143) (133) 내지 (142) 중 어느 하나에 있어서, 항체 및 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 동시적으로 또는 순차적으로 투여되는 것인 조합제.

[0369] (144) (133) 내지 (143) 중 어느 하나에 있어서, 종양이 인간 폴레이트 수용체 1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3과 관련된 종양인 조합제.

[0370] (145) (144)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1과 관련된 종양이 혈액암, 유방암, 자궁암, 결장직장암, 식도암, 위암, 난소암, 폐암, 신장암, 직장암, 갑상선암, 자궁경부암, 소장암, 전립선암, 중피종 또는 췌장암인 조합제.

[0371] (146) (144)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1과 관련된 종양이 난소암인 조합제.

[0372] (147) (144)에 있어서, 인간 IL-3R α 와 관련된 종양이 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병, 비정형 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 성인 T 세포 백혈병, NK/T 세포 림프종, 과립 림프구증가증(LGL 백혈병), 진성 적혈구증가증, 본태성 혈소판혈증, 과호산구 증후군, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 여포성 림프종, MALT 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 버킷 림프종, 림프모구성 림프종 또는 캐슬만병인 조합제.

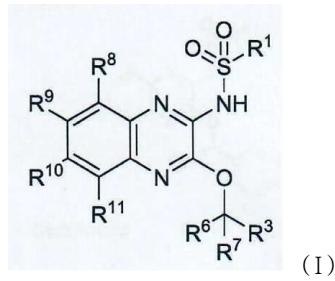
[0373] (148) (144)에 있어서, 인간 IL-3R α 와 관련된 종양이 급성 골수성 백혈병(AML)인 조합제.

[0374] (149) (144)에 있어서, 인간 TIM-3과 관련된 종양이 혈액암, 유방암, 자궁암, 결장직장암, 식도암, 위암, 난소암, 폐암, 신장암, 직장암, 갑상선암, 자궁경부암, 소장암, 전립선암 및 췌장암인 조합제.

[0375] (150) (144)에 있어서, 인간 TIM-3과 관련된 종양이 급성 골수성 백혈병(AML)인 조합제.

[0376] (151) 인간 폴레이트 수용체 1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체의 항체 의존성 세포 매개 세포독성 활성의 감소를 억제하는데 사용하기 위한 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제.

[0377] (152) (151)에 있어서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 화학식 (I)로 표시되는 화합물 (I) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 또는 하기 화학식 (II)로 표시되는 화합물 (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제.



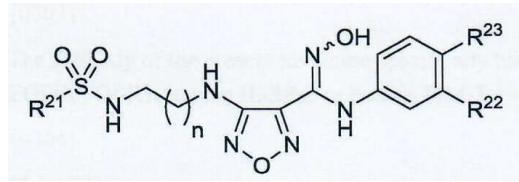
[0378] 여기서,

[0380] R⁶ 및 R⁷은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자 또는 임의로 치환된 저급 알킬을 나타내고,

[0381] R⁸, R⁹, R¹⁰ 및 R¹¹은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자, 할로겐, 시아노 또는 저급 알킬을 나타내고,

[0382] R¹은 저급 알콕시로 치환될 수 있는 저급 알킬을 나타내고,

[0383] R³은 임의로 치환된 방향족 헤테로시클릭 기를 나타내고,



(II)

[0384]

여기서,

[0385]

R²¹은 아미노 또는 메틸을 나타내고,

[0386]

R²²는 할로겐, 시아노, 트리플루오로메틸 또는 저급 알킬을 나타내고,

[0387]

R²³은 수소 원자 또는 할로겐을 나타내고,

[0388]

n은 1 또는 2를 나타낸다.

[0389]

(153) (151) 또는 (152)에 있어서, 항체 및 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 동시적으로 또는 순차적으로 투여되는 것인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제.

[0390]

(154) (151) 내지 (153) 중 어느 하나에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체가 모노클로날 항체인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제.

[0391]

(155) (151) 내지 (153) 중 어느 하나에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체가 하기 (a1)-(c1)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 모노클로날 항체인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제:

[0392]

(a1) 항체의 H쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 1, 2 및 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 4, 5 및 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 모노클로날 항체;

[0393]

(b1) 항체의 H쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 1, 2 및 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 4, 5 및 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열(항체 H쇄의 CDR3) 내의 시스테인이 트레오닌, 메티오닌, 이소류신, 발린, 페닐알라닌 또는 글루타민으로 치환되는 것인 모노클로날 항체; 및

[0394]

(c1) 항체의 H쇄가 서열 번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄가 서열 번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 모노클로날 항체.

[0395]

(156) (151) 내지 (153) 중 어느 하나에 있어서, 인간 IL-3R α 에 특이적으로 결합하는 항체가, IL-3 신호전달을 억제하지 않고 인간 IL-3R α 쇄의 B 도메인에 결합하지만 인간 IL-3R α 쇄의 C 도메인에는 결합하지 않는 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제.

[0396]

(157) (156)에 있어서, 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체가 하기 (a2) 내지 (e2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄의 CDR 및 경쇄의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는 것인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제:

[0397]

(a2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 9 내지 11의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 24 내지 26의 아미노산 서열이고,

[0398]

(b2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 12 내지 14의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 27 내지 29의 아미노산 서열이고,

[0399]

(c2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 15 내지 17의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 30 내지 32의 아미노산 서열이고,

[0400]

(d2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 18 내지 20의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 33 내지 35의 아미노산 서열이고,

[0401]

(e2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 21 내지 23의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 36 내지 38의 아미노산 서열이다.

[0402]

(158) (156)에 있어서, 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체가 하기 (e2)로 이루어지는 중쇄의 CDR 및 경쇄의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는 것인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제:

- [0404] (e2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 21 내지 23의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 36 내지 38의 아미노산 서열이다.

[0405] (159) (151) 내지 (153) 중 어느 하나에 있어서, 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체가 인간 TIM-3의 세포 외 영역에 결합하는 모노클로날 항체인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제.

[0406] (160) (159)에 있어서, 모노클로날 항체가 하기 (i) 내지 (iii)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제:

[0407] (i) 각각 서열 번호 39 내지 41로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 42 내지 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체,

[0408] (ii) 각각 서열 번호 45 내지 47로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 48 내지 50으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체, 및

[0409] (iii) 각각 서열 번호 51 내지 53으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 54 내지 56으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체.

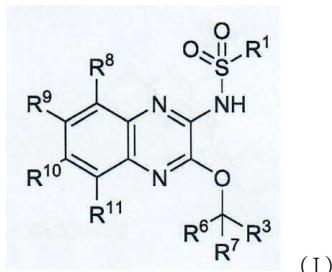
[0410] (161) (159)에 있어서, 모노클로날 항체가 하기 (a3) 및 (b3)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제:

[0411] (a3) 서열 번호 57로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VH를 포함하고 서열 번호 58로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VL을 포함하는 모노클로날 항체, 및

[0412] (b3) 서열 번호 59로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VH를 포함하고 서열 번호 60으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VL을 포함하는 모노클로날 항체.

[0413] (162) 종양 치료제로서, 인간 폴레이트 수용체 1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체를 활성 성분으로 포함하고, 유효량의 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와 조합 투여되는 것인 종양 치료제.

[0414] (163) (162)에 있어서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 화학식 (I)로 표시되는 화합물 (I) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 또는 하기 화학식 (II)로 표시되는 화합물 (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염인 종양 치료제.



- [0415] R^7 (I)

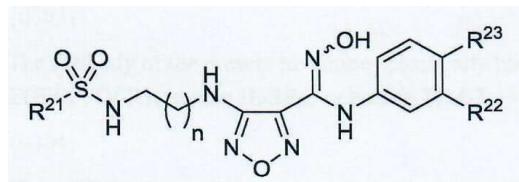
[0416] 여기서,

[0417] R^6 및 R^7 은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자 또는 임의로 치환된 저급 알킬을 나타내고,

[0418] R^8 , R^9 , R^{10} 및 R^{11} 은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자, 할로젠, 시아노 또는 저급 알킬을 나타내고,

[0419] R^1 은 저급 알콕시로 치환될 수 있는 저급 알킬을 나타내고,

[0420] R^3 은 임의로 치환된 방향족 헤테로시클릭 기를 나타내고.



(II)

[0421] 여기서,

[0423] R²¹은 아미노 또는 메틸을 나타내고,

[0424] R²²는 할로겐, 시아노, 트리플루오로메틸 또는 저급 알킬을 나타내고,

[0425] R²³은 수소 원자 또는 할로겐을 나타내고,

[0426] n은 1 또는 2를 나타낸다.

[0427] (164) (162) 또는 (163)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체가 모노클로날 항체인 종양 치료제.

[0428] (165) (162) 또는 (163)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체가 하기 (a1)-(c1)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 모노클로날 항체인 종양 치료제:

[0429] (a1) 항체의 H쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 1, 2 및 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 4, 5 및 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 모노클로날 항체;

[0430] (b1) 항체의 H쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 1, 2 및 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 4, 5 및 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열(항체 H쇄의 CDR3) 내의 시스테인이 트레오닌, 메티오닌, 이소류신, 발린, 페닐알라닌 또는 글루타민으로 치환되는 것인 모노클로날 항체; 및

[0431] (c1) 항체의 H쇄가 서열 번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄가 서열 번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 모노클로날 항체.

[0432] (166) (162) 또는 (163)에 있어서, 인간 IL-3R α 에 특이적으로 결합하는 항체가, IL-3 신호전달을 억제하지 않고 인간 IL-3R α 쇄의 B 도메인에 결합하지만 인간 IL-3R α 쇄의 C 도메인에는 결합하지 않는 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체인 종양 치료제.

[0433] (167) (166)에 있어서, 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체가 하기 (a2) 내지 (e2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄의 CDR 및 경쇄의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는 것인 종양 치료제:

[0434] (a2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 9 내지 11의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 24 내지 26의 아미노산 서열이고,

[0435] (b2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 12 내지 14의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 27 내지 29의 아미노산 서열이고,

[0436] (c2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 15 내지 17의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 30 내지 32의 아미노산 서열이고,

[0437] (d2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 18 내지 20의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 33 내지 35의 아미노산 서열이고,

[0438] (e2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 21 내지 23의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 36 내지 38의 아미노산 서열이다.

[0439] (168) (166)에 있어서, 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체가 하기 (e2)로 이루어지는 중쇄의 CDR 및 경쇄의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는 것인 종양 치료제:

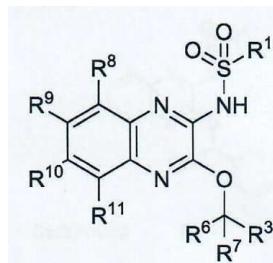
[0440] (e2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 21 내지 23의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 36 내지 38의 아미노산 서열이다.

- [0441] (169) (162) 또는 (163)에 있어서, 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체가 인간 TIM-3의 세포외 영역에 결합하는 모노클로날 항체인 종양 치료제.
- [0442] (170) (169)에 있어서, 모노클로날 항체가 하기 (i) 내지 (iii)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 종양 치료제:
- [0443] (i) 각각 서열 번호 39 내지 41로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 42 내지 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체,
- [0444] (ii) 각각 서열 번호 45 내지 47로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 48 내지 50으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체, 및
- [0445] (iii) 각각 서열 번호 51 내지 53으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 54 내지 56으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체.
- [0446] (171) (169)에 있어서, 모노클로날 항체가 하기 (a3) 및 (b3)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 종양 치료제:
- [0447] (a3) 서열 번호 57로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VH를 포함하고 서열 번호 58로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VL을 포함하는 모노클로날 항체, 및
- [0448] (b3) 서열 번호 59로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VH를 포함하고 서열 번호 60으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VL을 포함하는 모노클로날 항체.
- [0449] (172) (162) 내지 (171) 중 어느 하나에 있어서, 치료제 및 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 동시에 또는 순차적으로 투여되는 것인 종양 치료제.
- [0450] (173) (162) 내지 (172) 중 어느 하나에 있어서, 종양이 인간 폴레이트 수용체 1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3과 관련된 종양인 종양 치료제.
- [0451] (174) (173)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1과 관련된 종양이 혈액암, 유방암, 자궁암, 결장직장암, 식도암, 위암, 난소암, 폐암, 신장암, 직장암, 갑상선암, 자궁경부암, 소장암, 전립선암, 중피종 또는 췌장암인 종양 치료제.
- [0452] (175) (173)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1과 관련된 종양이 난소암인 종양 치료제.
- [0453] (176) (173)에 있어서, 인간 IL-3R α 와 관련된 종양이 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병, 비정형 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 성인 T 세포 백혈병, NK/T 세포 림프종, 과립 림프구증가증(LGL 백혈병), 진성 적혈구증가증, 본태성 혈소판혈증, 과호산구 증후군, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 여포성 림프종, MALT 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 버켓 림프종, 림프모구성 림프종 또는 캐슬만병인 종양 치료제.
- [0454] (177) (173)에 있어서, 인간 IL-3R α 와 관련된 종양이 급성 골수성 백혈병(AML)인 종양 치료제.
- [0455] (178) (173)에 있어서, 인간 TIM-3과 관련된 종양이 혈액암, 유방암, 자궁암, 결장직장암, 식도암, 위암, 난소암, 폐암, 신장암, 직장암, 갑상선암, 자궁경부암, 소장암, 전립선암 및 췌장암인 종양 치료제.
- [0456] (179) (173)에 있어서, 인간 TIM-3과 관련된 종양이 급성 골수성 백혈병(AML)인 종양 치료제.
- [0457] (180) 종양 치료제로서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제를 활성 성분으로 포함하고, 유효량의 인간 폴레이트 수용체 1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체와 조합 투여되는 것인 종양 치료제.
- [0458] (181) (180)에 있어서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 화학식 (I)로 표시되는 화합물 (I) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 또는 하기 화학식 (II)로 표시되는 화합물 (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염인 종양 치료제.

- [0478] (a2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 9 내지 11의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 24 내지 26의 아미노산 서열이고,
- [0479] (b2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 12 내지 14의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 27 내지 29의 아미노산 서열이고,
- [0480] (c2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 15 내지 17의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 30 내지 32의 아미노산 서열이고,
- [0481] (d2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 18 내지 20의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 33 내지 35의 아미노산 서열이고,
- [0482] (e2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 21 내지 23의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 36 내지 38의 아미노산 서열이다.
- [0483] (186) (184)에 있어서, 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체가 하기 (e2)로 이루어지는 중쇄의 CDR 및 경쇄의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는 것인 종양 치료제:
- [0484] (e2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 21 내지 23의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 36 내지 38의 아미노산 서열이다.
- [0485] (187) (180) 또는 (181)에 있어서, 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체가 인간 TIM-3의 세포외 영역에 결합하는 모노클로날 항체인 종양 치료제.
- [0486] (188) (187)에 있어서, 모노클로날 항체가 하기 (i) 내지 (iii)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 종양 치료제:
- [0487] (i) 각각 서열 번호 39 내지 41로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 42 내지 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체,
- [0488] (ii) 각각 서열 번호 45 내지 47로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 48 내지 50으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체, 및
- [0489] (iii) 각각 서열 번호 51 내지 53으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 54 내지 56으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체.
- [0490] (189) (187)에 있어서, 모노클로날 항체가 하기 (a3) 및 (b3)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 종양 치료제:
- [0491] (a3) 서열 번호 57로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VH를 포함하고 서열 번호 58로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VL을 포함하는 모노클로날 항체, 및
- [0492] (b3) 서열 번호 59로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VH를 포함하고 서열 번호 60으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VL을 포함하는 모노클로날 항체.
- [0493] (190) (180) 내지 (189) 중 어느 하나에 있어서, 치료제 및 항체가 동시적으로 또는 순차적으로 투여되는 것인 종양 치료제.
- [0494] (191) (180) 내지 (190) 중 어느 하나에 있어서, 종양이 인간 폴레이트 수용체 1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3과 관련된 종양인 종양 치료제.
- [0495] (192) (191)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1과 관련된 종양이 혈액암, 유방암, 자궁암, 결장직장암, 식도암, 위암, 난소암, 폐암, 신장암, 직장암, 갑상선암, 자궁경부암, 소장암, 전립선암, 중피종 또는 췌장암인 종양 치료제.
- [0496] (193) (191)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1과 관련된 종양이 난소암인 종양 치료제.
- [0497] (194) (191)에 있어서, 인간 IL-3R α 와 관련된 종양이 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병, 비정형 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 성인 T 세포 백혈병, NK/T 세포 림프종, 과립 림프구증가증(LGL 백혈병), 진성

적혈구증가증, 본태성 혈소판증, 과호산구 증후군, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 여포성 림프종, MALT 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 베켓 림프종, 림프모구성 림프종 또는 캐슬만병인 종양 치료제.

- [0498] (195) (191)에 있어서, 인간 IL-3R α 와 관련된 종양이 급성 골수성 백혈병(AML)인 종양 치료제.
- [0499] (196) (191)에 있어서, 인간 TIM-3과 관련된 종양이 혈액암, 유방암, 자궁암, 결장직장암, 식도암, 위암, 난소암, 폐암, 신장암, 직장암, 갑상선암, 자궁경부암, 소장암, 전립선암 및 췌장암인 종양 치료제.
- [0500] (197) (191)에 있어서, 인간 TIM-3과 관련된 종양이 급성 골수성 백혈병(AML)인 종양 치료제.
- [0501] (198) 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제를 활성 성분으로서 포함하는, 인간 폴레이트 수용체 1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체의 항체 의존성 세포 매개 세포독성 활성의 감소를 위한 억제제.
- [0502] (199) (198)에 있어서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제가 하기 화학식 (I)로 표시되는 화합물 (I) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 또는 하기 화학식 (II)로 표시되는 화합물 (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염인 억제제.



(I)

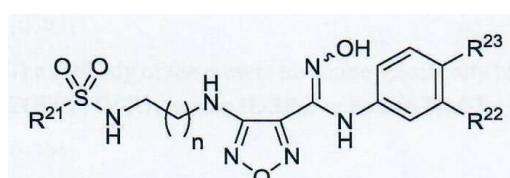
[0503] 여기서,

[0504] R⁶ 및 R⁷은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자 또는 임의로 치환된 저급 알킬을 나타내고,

[0505] R⁸, R⁹, R¹⁰ 및 R¹¹은 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자, 할로겐, 시아노 또는 저급 알킬을 나타내고,

[0506] R¹은 저급 알콕시로 치환될 수 있는 저급 알킬을 나타내고,

[0507] R³은 임의로 치환된 방향족 헤테로시클릭 기를 나타내고,



(II)

[0508] 여기서,

[0509] R²¹은 아미노 또는 메틸을 나타내고,

[0510] R²²는 할로겐, 시아노, 트리플루오로메틸 또는 저급 알킬을 나타내고,

[0511] R²³은 수소 원자 또는 할로겐을 나타내고,

[0512] n은 1 또는 2를 나타낸다.

[0513] (200) (198) 또는 (199)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체가 모노클로날 항체인 억제제.

[0514] (201) (198) 또는 (199)에 있어서, 인간 폴레이트 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체가 하기 (a1)-(c1)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 모노클로날 항체인 억제제:

[0515] (a1) 항체의 H쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 1, 2 및 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄의

CDR 1-3이 각각 서열 번호 4, 5 및 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 모노클로날 항체;

[0518] (b1) 항체의 H쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 1, 2 및 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 4, 5 및 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열(항체 H쇄의 CDR3) 내의 시스테인이 트레오닌, 메티오닌, 이소류신, 발린, 페닐알라닌 또는 글루타민으로 치환되는 것인 모노클로날 항체; 및

[0519] (c1) 항체의 H쇄가 서열 번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄가 서열 번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 모노클로날 항체.

[0520] (202) (198) 또는 (199)에 있어서, 인간 IL-3R α 에 특이적으로 결합하는 항체가, IL-3 신호전달을 억제하지 않고 인간 IL-3R α 쇄의 B 도메인에 결합하지만 인간 IL-3R α 쇄의 C 도메인에는 결합하지 않는 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체인 억제제.

[0521] (203) (202)에 있어서, 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체가 하기 (a2) 내지 (e2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄의 CDR 및 경쇄의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는 것인 억제제:

[0522] (a2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 9 내지 11의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 24 내지 26의 아미노산 서열이고,

[0523] (b2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 12 내지 14의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 27 내지 29의 아미노산 서열이고,

[0524] (c2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 15 내지 17의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 30 내지 32의 아미노산 서열이고,

[0525] (d2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 18 내지 20의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 33 내지 35의 아미노산 서열이고,

[0526] (e2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 21 내지 23의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 36 내지 38의 아미노산 서열이다.

[0527] (204) (202)에 있어서, 인간 IL-3R α 쇄에 대한 항체가 하기 (e2)로 이루어지는 중쇄의 CDR 및 경쇄의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는 것인 억제제:

[0528] (e2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 21 내지 23의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 36 내지 38의 아미노산 서열이다.

[0529] (205) (198) 또는 (199)에 있어서, 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체가 인간 TIM-3의 세포외 영역에 결합하는 모노클로날 항체인 억제제.

[0530] (206) (205)에 있어서, 모노클로날 항체가 하기 (i) 내지 (iii)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 억제제:

[0531] (i) 각각 서열 번호 39 내지 41로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 42 내지 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체,

[0532] (ii) 각각 서열 번호 45 내지 47로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 48 내지 50으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체, 및

[0533] (iii) 각각 서열 번호 51 내지 53으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 54 내지 56으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체.

[0534] (207) (205)에 있어서, 모노클로날 항체가 하기 (a3) 및 (b3)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 억제제:

[0535] (a3) 서열 번호 57로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VH를 포함하고 서열 번호 58로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VL을 포함하는 모노클로날 항체, 및

[0536] (b3) 서열 번호 59로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VH를 포함하고 서열 번호 60으로 표시되는 아

미노산 서열을 포함하는 항체의 VL을 포함하는 모노클로날 항체.

[0537] (208) (198) 내지 (207) 중 어느 하나에 있어서, 억제제 및 항체가 동시에 또는 순차적으로 투여되는 것인 억제제.

[0538] (209) (48) 또는 (49)에 있어서, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제 및 항체가 동시에 또는 순차적으로 투여되는 것인 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제.

[0539] (210) (65) 또는 (66)에 있어서, 억제제 및 항체가 동시에 또는 순차적으로 투여되는 것인 억제제.

발명의 유익한 효과

[0541] 본 발명에 따르면, 항체 등과 조합 투여되는 IDO 억제제를 포함하는 종양 치료제가 제공된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 키누레닌 생산 및 트립토판 소비에 대한 화합물 A1 및 화합물 B1의 효과를 보여준다. KATO-III 세포를 25 ng/mL 재조합 인간 IFN- γ 로 처리하였다. 세포를 화합물 A1(100 nmol/L) 또는 화합물 B1(100 nmol/L)로 처리하였다. 3일 후, 상청액 내의 키누레닌(Kyn) 및 트립토판(Trp)의 농도를 LC/MS/MS로 측정하였다. (그래프 A) 세로축은 키누레닌(Kyn)의 농도를 나타낸다. 각각의 컬럼은 좌측으로부터 조건화 배지 1(KATO-III 세포), 조건화 배지 2(KATO-III 세포 + IFN- γ), 조건화 배지 3(KATO-III 세포 + IFN- γ + 화합물 A1), 또는 조건화 배지 4(KATO-III 세포 + IFN- γ + 화합물 B1) 내의 Kyn 농도를 나타낸다. 각각의 컬럼은 평균 + SD를 나타낸다. (그래프 B) 세로축은 트립토판(Trp)의 농도를 나타낸다. 각각의 컬럼은 좌측으로부터 조건화 배지 1(KATO-III 세포), 조건화 배지 2(KATO-III 세포 + IFN- γ), 조건화 배지 3(KATO-III 세포 + IFN- γ + 화합물 A1) 또는 조건화 배지 4(KATO-III 세포 + IFN- γ + 화합물 B1) 내의 Trp 농도를 나타낸다. 각각의 컬럼은 평균 + SD를 나타낸다.

도 2는 NK 세포의 검출을 보여준다. (A) 조건화 배지 1, (B) 조건화 배지 2, (C) 조건화 배지 3 또는 (D) 조건화 배지 4에서 7일 동안 인큐베이팅된 인간 PBMC. 도 2의 A, B, C 및 D 내의 숫자는 CD3- 세포(NK 세포) 내의 CD16+ CD56+ 세포를 나타낸다.

도 3은 다양한 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 인간 말초 혈액 단핵세포(A: 공여자 1, B: C: 공여자 2)에 의한 TL-0m1 세포(A, B) 또는 HH 세포(C)에 대한 모가물리주맙의 항체 의존성 세포 매개 세포독성을 보여준다. 모든 실험을 3회 실시하였고, 세포독성의 백분율은 평균으로 제시한다. 그래프 A, B 및 C의 세로축은 모가물리주맙의 세포독성의 백분율을 나타내고, 그래프 A, B 및 C의 가로축은 모가물리주맙의 농도(좌측으로부터 0, 0.1, 1 및 10 μ g/mL)를 나타낸다. 백색 원은 KATO-III에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 흑색 원은 KATO-III, IFN- γ 및 화합물 A1에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 흑색 삼각형 표시는 KATO-III, IFN- γ 및 화합물 B1에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다.

도 4는 다양한 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 인간 말초 혈액 단핵세포(A: 공여자 1, B: 공여자 2)에 의한 SK-BR3 세포에 대한 트라스투주맙의 항체 의존성 세포 매개 세포독성을 보여준다. 모든 실험을 3회 실시하였고, 세포독성의 백분율은 평균으로 제시한다. 그래프 A 및 B의 세로축은 트라스투주맙의 세포독성의 백분율을 나타내고, 그래프 A 및 B의 가로축은 트라스투주맙의 농도(좌측으로부터 0, 0.1, 1 및 10 μ g/mL)를 나타낸다. 백색 원은 KATO-III에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 백색 삼각형 표시는 KATO-III 및 IFN- γ 에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 흑색 원은 KATO-III, IFN- γ 및 화합물 A1에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 흑색 삼각형 표시는 KATO-III, IFN- γ 및 화합물 B1에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다.

도 5는 다양한 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 인간 말초 혈액 단핵세포에 의한 Raji 세포에 대한 리툭시맙의 항체 의존성 세포 매개 세포독성을 보여준다. 모든 실험을 3회 실시하였고, 세포독성의 백분율은 평균으로 제시한다. 그래프의 세로축은 리툭시맙의 세포독성의 백분율을 나타내고, 그래프의 가로축은 리툭시맙의 농도(좌측으로부터 0, 0.1, 1 및 10 μ g/mL)를 나타낸다. 백색 원은 KATO-III에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 백색 삼각형 표시는 KATO-III 및 IFN- γ 에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 흑색 원은 KATO-III, IFN- γ 및 화합물 A1에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 흑색 삼각형 표시는 KATO-III, IFN- γ 및 화합물 B1에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다.

도 6은 다양한 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 인간 말초 혈액 단핵세포에 의한 A431 세포에 대한 세특시맙의 항체 의존성 세포 매개 세포독성을 보여준다. 모든 실험을 3회 실시하였고, 세포독성의 백분율은 평균으로 제시한다. 그래프의 세로축은 세특시맙의 세포독성의 백분율을 나타내고, 그래프의 가로축은 세특시맙의 농도(좌측으로부터 0, 0.1, 1 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 나타낸다. 백색 원은 KATO-III에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 흑색 원은 KATO-III, IFN- γ 및 화합물 A1에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 흑색 삼각형 표시는 KATO-III, IFN- γ 및 화합물 B1에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다.

도 7은 다양한 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 인간 NK 세포에 대한 TL-0m1 세포에 대한 모가물리주맙의 항체 의존성 세포 매개 세포독성을 보여준다. 모든 실험을 3회 실시하였고, 세포독성의 백분율은 평균으로 제시한다. 그래프의 세로축은 모가물리주맙의 세포독성의 백분율을 나타내고, 그래프의 가로축은 모가물리주맙의 농도(좌측으로부터 0, 0.1, 1 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 나타낸다. 백색 원은 KATO-III에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 백색 삼각형 표시는 KATO-III 및 IFN- γ 에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 흑색 원은 KATO-III, IFN- γ 및 화합물 A1에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 흑색 삼각형 표시는 KATO-III, IFN- γ 및 화합물 B1에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다.

도 8은 다양한 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 인간 NK 세포에 대한 Raji 세포에 대한 리특시맙의 항체 의존성 세포 매개 세포독성을 보여준다. 모든 실험을 3회 실시하였고, 세포독성의 백분율은 평균으로 제시한다. 그래프의 세로축은 리특시맙의 세포독성의 백분율을 나타내고, 그래프의 가로축은 리특시맙의 농도(좌측으로부터 0, 0.1, 1 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 나타낸다. 백색 원은 KATO-III에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 백색 삼각형 표시는 KATO-III 및 IFN- γ 에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 흑색 원은 KATO-III, IFN- γ 및 화합물 A1에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 흑색 삼각형 표시는 KATO-III, IFN- γ 및 화합물 B1에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다.

도 9는 화합물 A1 또는 화합물 B1을 함유하는 배지에서 예비 인큐베이팅된 인간 말초 혈액 단핵세포에 의한 TL-0m1 세포에 대한 모가물리주맙의 항체 의존성 세포 매개 세포독성을 보여준다. 모든 실험을 3회 실시하였고, 세포독성의 백분율은 평균으로 제시한다. 그래프의 세로축은 모가물리주맙의 세포독성의 백분율을 나타내고, 그래프의 가로축은 모가물리주맙의 농도(좌측으로부터 0, 0.1, 1 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 나타낸다. 백색 원은 배지에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 백색 삼각형 표시는 배지 및 화합물 A1에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 백색 직사각형 표시는 배지 및 화합물 B1에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다.

도 10은 IDO1 shRNA를 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포에서의 IDO 발현을 보여준다. (그래프 A) 그래프 A의 세로축은 qPCR 분석에 의해 검출된 모 KATO-III 세포에 대해 IFN- γ 로 처리된 IDO1 mRNA 발현 수준을 보여준다. 각각의 컬럼은 좌측으로부터 IDO1 shRNA #44, #45, #46, #47, 벡터, NegaCTRL shRNA가 도입된 KATO-III 세포 또는 도입되지 않은 (모) 세포 내의 IDO1 mRNA 수준을 보여준다. (그래프 B) 그래프 B의 상부는 웨스턴 블로트 분석에 의해 검출된 IDO1 단백질 발현 수준을 보여주고, 그래프 B의 하부는 웨스턴 블로트 분석에 의해 검출된 모 (β -액틴) 단백질 발현 수준을 보여준다.

도 11은 키누레닌 생산 및 트립토판 소비에 대한 IDO1 낙다운(knockdown)의 효과를 보여준다. (그래프 A) 그래프 A의 세로축은 키누레닌(Kyn)의 농도($\mu\text{mol}/\text{mL}$)를 나타낸다. 각각의 컬럼은 좌측으로부터 조건화 배지 1[KATO-III 세포(모)], 조건화 배지 2[KATO-III 세포(NegaCTRL shRNA)], 조건화 배지 3[KATO-III 세포(모) + IFN- γ], 조건화 배지 4[KATO-III 세포(NegaCTRL shRNA) + IFN- γ], 조건화 배지 5[KATO-III 세포(IDO1 shRNA #44) + IFN- γ], 조건화 배지 6 [KATO-III 세포(IDO1 shRNA #45) + IFN- γ], 또는 조건화 배지 7[KATO-III 세포(IDO1 shRNA #46) + IFN- γ] 내의 Kyn의 농도를 나타낸다. (그래프 B) 그래프의 세로축은 트립토판(Trp)의 농도($\mu\text{mol}/\text{mL}$)를 나타낸다. 각각의 컬럼은 조건화 배지 1[KATO-III 세포(모)], 조건화 배지 2[KATO-III 세포(NegaCTRL shRNA)], 조건화 배지 3[KATO-III 세포(모) + IFN- γ], 조건화 배지 4[KATO-III 세포(NegaCTRL shRNA) + IFN- γ], 조건화 배지 5[KATO-III 세포(IDO1 shRNA #44) + IFN- γ], 또는 조건화 배지 6[KATO-III 세포(IDO1 shRNA #46) + IFN- γ] 내의 Trp 농도를 나타낸다. 각각의 컬럼은 평균 + SD를 나타낸다.

도 12는 NK 세포의 검출을 보여준다. 인간 PBMC는 조건화 배지 1(A), 조건화 배지 2(B), 조건화 배지 3(C), 조

건화 배지 4(D), 조건화 배지 5(E), 조건화 배지 6(G) 또는 조건화 배지(G)에서 7일 동안 인큐베이팅하였다. A, B, C, D, E, F 및 G 내의 숫자는 CD3- 세포(NK 세포) 내의 CD16+ CD56+ 세포를 나타낸다.

도 13은 다양한 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 인간 말초 혈액 단핵세포에 의한 TL-0m1 세포에 대한 모가물리주맙의 항체 의존성 세포 매개 세포독성을 보여준다. 모든 실험을 3회 실시하였고, 세포독성의 백분율은 평균으로 제시한다. 그래프의 세로축은 모가물리주맙의 세포독성의 백분율을 나타내고, 그래프의 가로축은 모가물리주맙의 농도(좌측으로부터 0, 0.1, 1 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 나타낸다. 백색 원은 모 KATO-III 세포에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 백색 삼각형 표시는 음성 대조군 shRNA를 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 백색 직사각형 표시는 모 KATO-III 세포 및 IFN- γ 에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 백색 다이아몬드 표시는 음성 대조군 shRNA 및 IFN- γ 를 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 흑색 원은 ID01 shRNA #44 및 IFN- γ 를 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 흑색 삼각형 표시는 ID01 shRNA #45 및 IFN- γ 를 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 흑색 직사각형 표시는 ID01 shRNA #46 및 IFN- γ 를 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다.

도 14는 웨스턴 블로트에 의해 검출된 난소암 세포(OVISE, SKOV3, OVCAR3 및 MCAS)에서 ID01의 발현을 보여준다.

도 15는 SKOV3 세포에 대한 PBMC의 자연 살해 활성(A) 및 세포독성(B)에 대한 화합물 A1의 효과를 보여준다. 모든 실험을 3회 실시하였고, 세포독성의 백분율은 평균 + SD으로 제시한다. (그래프 A) 그래프 A의 세로축은 PBMC의 항체 C1 부재 하의 세포독성(자연 살해 활성)의 백분율을 나타내고, 각각의 컬럼은 좌측으로부터 조건화 배지 DMSO 또는 화합물 A1에서의 세포독성을 나타낸다. (그래프 B) 그래프의 세로축은 항체 C1의 세포독성의 백분율을 나타내고, 그래프의 가로축은 항체 C1의 농도(좌측으로부터 0.033, 0.33, 3.3, 33 및 333 ng/mL)를 나타낸다. 흑색 원은 IFN- γ 자극된 SKOV3 세포 및 화합물 A1의 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 백색 원은 IFN- γ 자극된 SKOV3 세포 및 DMSO의 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다.

도 16은 SKOV3 세포에 대한 PBMC의 자연 살해 활성(A) 및 세포독성(B)에 대한 화합물 B1의 효과를 보여준다. 모든 실험을 3회 실시하였고, 세포독성의 백분율은 평균 + SD으로 제시한다. (그래프 A) 그래프 A의 세로축은 PBMC의 항체 C1 부재 하의 세포독성(자연 살해 활성)의 백분율을 나타내고, 각각의 컬럼은 좌측으로부터 조건화 배지 DMSO 또는 화합물 B1에서의 세포독성을 나타낸다. (그래프 B) 그래프의 세로축은 항체 C1의 세포독성의 백분율을 나타내고, 그래프의 가로축은 항체 C1의 농도(좌측으로부터 0.033, 0.33, 3.3, 33 및 333 ng/mL)를 나타낸다. 흑색 원은 IFN- γ 자극된 SKOV3 세포 및 화합물 B1의 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 백색 원은 IFN- γ 자극된 SKOV3 세포 및 DMSO의 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다.

도 17은 KG-1 세포(로트# A3951)에 대한 PBMC의 세포독성에 대한 화합물 A1의 효과를 보여준다. 모든 실험을 3회 실시하였고, 세포독성의 백분율은 평균 \pm SD으로 제시한다. 그래프의 세포축은 화합물 A1에 의한 PBMC의 세포독성을 나타내고, 그래프의 가로축은 항체 D1의 농도(좌측으로부터 0.3, 3, 30 및 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 나타낸다. 흑색 원은 IFN- γ 로 자극된 KATO-III 세포 및 화합물 A1의 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 백색 원은 IFN- γ 로 자극된 KATO-III 세포 및 DMSO의 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다.

도 18은 EoL-1/인간 TIM-3 세포에 대한 PBMC의 세포독성에 대한 화합물 A1의 효과를 보여준다. 모든 실험을 3회 실시하였고, 세포독성의 백분율은 평균 \pm SD으로 제시한다. 그래프의 세포축은 화합물 A1에 의한 PBMC의 세포독성을 나타내고, 그래프의 가로축은 항체 E1의 농도(좌측으로부터 0.3, 3, 30 및 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 나타낸다. 흑색 원은 IFN- γ 로 자극된 KATO-III 세포 및 화합물 A1의 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다. 백색 원은 IFN- γ 로 자극된 KATO-III 세포 및 DMSO의 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 세포의 세포독성의 백분율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0543] 본 발명에서, ADCC 활성을 생체 내의 종양 세포 상의 세포 표면 항원에 결합된 항체가 항체 Fc 영역 및 이펙터 세포 표면에 존재하는 Fc 수용체를 통해 이펙터 세포를 활성화하여 종양 세포를 방해하는 세포독성 활성이다

[Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1955)]. 이펙터 세포의 예는 살해 세포, 자연 살해 세포, 활성화된 대식세포 등을 포함한다.

[0544] ADCC 활성을 갖는 항체의 예는 모가물리주맙, 트라스투주맙, 리툭시맙, 세툭시 마브 등을 포함한다.

[0545] 인간 CC 케모카인 수용체 4, 인간 표피 성장 인자 수용체 2, 인간 CD20 또는 표피 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 항체의 ADCC 활성, 및 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제와 조합된, 본 발명의 인간 CC 케모카인 수용체 4(CCR4), HER2, 인간 CD20 또는 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체의 ADCC 활성은 문헌[Clin. Cancer Res. vol. 11, p5984, 2005], [Br. J. Hematol. vol. 144, p848, 2009] 등에 기재된 방법에 따라 조사될 수 있다.

[0546] T 세포 림프종의 예후는 매우 불량하고, 충분한 약물 효능을 나타내는 치료제는 존재하지 않는다. 인간 CC 케모카인 수용체 4(CCR4)는 성인 T 세포 백혈병/림프종 및 피부 T 세포 림프종을 포함하는 몇몇 종류의 T 세포 림프종 상에서 발현되는 것으로 알려져 있다([Clinical Cancer Research, vol. 9, p3625, 2003] 및 [J Invest Dermatol, vol. 119, p1405, 2002]). 따라서, CCR4에 특이적으로 결합하는 항체 조성물을 포함하는 약학 조성물은 CCR4를 발현하는 T 세포 종양의 치료에 효과적인 약학 조성물일 수 있다(WO01/64754, WO03/18635 및 WO 2005/057341).

[0547] CCR4에 특이적으로 결합하는 항체의 예는 모가물리주맙 등이다. 모가물리주맙은 인간화된 항 CCR4 모노클로날 항체이고, ATL, 말초 T 세포 림프종, 피부 T 세포 림프종과 같은 백혈병 및 림프종의 치료에 사용된다. 또한, 모가물리주맙은 ADCC 활성이 높다.

[0548] 모가물리주맙은 조절 T 세포의 감소를 유도하는 것으로 알려져 있다[Clin Cancer Res; 21(2) January 15, 2015]. 트립토판 대사는 CD4⁺CD25⁻ T 세포가 조절 T 세포로 전환되는 것을 유도한다(예를 들어, 문헌 [Blood, vol. 109, No. 7, pp. 2871-2877 (2007)] 참조). 따라서, 모가물리주맙과 인돌아민 2,3-디옥시게나제 억제제의 조합은 조절 T 세포의 감소에 바람직하다고 생각된다.

[0549] 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2 또는 p185neu)는 원래 화학적으로 처리된 래트의 신경모세포종으로부터의 형질전환 유전자의 산물로서 확인되었다. neu 원종양 유전자(proto-oncogene)의 활성화된 형태는 코딩되는 단백질의 막획단 영역에서의 점 돌연변이(발린에서 글루탐산으로의)에 의해 생성된다. HER2인 neu의 인간 상동체의 증폭은 유방암 및 난소암에서 관찰되고, 불량한 예후와 상관성이 있다([Slamon et al., Science, 235: 177-182(1987)], [Slamon et al., Science, 244: 707-712(1989)]; US 4,968,603). HER2에 대한 특이적 리간드가 현재까지 아직 명확하게 밝혀지지는 않았지만, HER2는 분자량이 약 185,000으로서, 표피 성장 인자 수용체(EGFR 또는 HER1)에 대한 상당한 상동성을 갖는다.

[0550] HER2 수용체에 대해 작용하는 항체 4D5는 HER2 과다발현 유방암 세포주를 TNF α 의 세포독성 효과에 대해 민감하게 만드는 것으로 추가로 밝혀졌다(US 5,677,171). 뮤린(murine) 항-ErbB2 항체 4D5의 재조합 인간화 버전(huMAb4D5-8, rhuMAb HER2 또는 트라스투주맙; US 5,821,337)은 광범위한 사전 항암 요법을 받은 HER2 과다발현 전이성 유방암 환자에서 임상적으로 활성을 보인다(Baselga et al., Clin. Oncol. 14: 737-744(1996)). 트라스투주맙은 그의 종양이 HER2 단백질을 과다발현하는 전이성 유방암 환자의 치료를 위해 1998년 판매 승인을 받았다. 임상 시험에서 높은 효능을 보인 대표적인 한 항체는 비소세포 폐암(NSCLC: non-small cell lung cancer) 적응증에 적용할 수 있는 게피티닙이다.

[0551] 트라스투주맙은 HER2 단백질에 특이적으로 결합하여 항종양 효과를 나타내고, 유방암, 위암 등의 치료에 사용된다. 또한, 트라스트주맙은 높은 ADCC 활성 때문에 항종양 효과를 발휘한다.

[0552] 림프구는 조혈 과정 동안 골수에서 생산되는 백혈구의 여러 유형 중 하나이다. 림프구에는 B 림프구(B 세포) 및 T 림프구(T 세포)라는 두 가지의 주요 집단이 있다. 본원에서 특히 관심있는 림프구는 B 세포이다.

[0553] B 세포는 골수 내에서 성숙하고 그들의 세포 표면에 항원 결합 항체를 발현하면서 골수를 떠난다. 그의 막 결합 항체가 특이적으로 작용하는 항원을 처음 만날 때, 나이브(naive) B 세포는 빠르게 분열하기 시작하고, 그의 자손체는 기억 B 세포 및 "형질 세포"로 불리는 이펙터 세포로 분화한다. 기억 B 세포는 수명이 보다 길고 원래의 모세포와 동일한 특이성을 갖는 막 결합 항체를 계속해서 발현한다.

[0554] 형질 세포는 막 결합 항체를 생산하지 않지만, 그 대신에 분비될 수 있는 형태의 항체를 생산한다.

[0555] 분비된 항체는 체액성 면역의 주요 이펙터 분자이다.

- [0556] CD20 항원(인간 B-림프구 제한 분화 항원, Bp35로도 불림)은 프리-B 및 성숙 B 림프구에 위치한, 약 35 kD의 분자량을 갖는 소수성 막횡단 단백질이다([Valentine et al., J. Biol. 264(19): 11282-11287 (1989)] 및 [Einfeld et al., EMBO J. 7(3): 711-717 (1988)]). 항원은 또한 90% 초과의 B 세포 비호지킨 림프종(NHL)에서 발현되지만(Anderson et al., Blood 63(6): 1424-1433 (1984)), 조혈 줄기세포, 프로-B 세포, 정상 형질 세포 또는 다른 정상 조직에서는 발견되지 않는다(Tedder et al., J. Immunol., 135(2): 973-979 (1985)). CD20은 세포 주기의 개시 및 분화를 위한 활성화 과정의 초기 단계(들)를 조절하고(Tedder et al., 상기 문헌), 칼슘 이온 채널로서도 기능할 가능성이 있다(Tedder et al., J. Cell. Biochem. 14D: 195 (1990)).
- [0557] 인간 CD20에 특이적으로 결합하는 항체의 예는 리툭시맙을 포함한다.
- [0558] 리툭시맙은 항 인간 CD20 키메라 인간-뮤린 항체를 포함하는 모노클로날 항체이고, 비호지킨 림프종, B 세포 림프증식성 질환, 다발혈관염을 동반한 육아종증, 미세 다발혈관염 등의 치료에 사용된다. 또한, 리툭시맙은 높은 ADCC 활성을 갖는다.
- [0559] EGFR은 상피 세포의 표면에 발현되는 170 kDa 막 결합 단백질이다. EGFR은 세포주기 조절 분자의 한 클래스인 단백질 티로신 키나제의 성장 인자 수용체 패밀리의 구성원이다(W. J. Gullick et al., 1986, Cancer Res., 46: 285-292).
- [0560] EGFR은 그의 리간드(EGF 또는 TGF- α)가 세포외 도메인에 결합할 때 활성화되어, 수용체의 세포 내 티로신 키나제 도메인의 자가인산화를 일으킨다([S. Cohen et al., 1980, J. Biol. Chem., 255: 4834-4842]; [A. B. Schreiber et al., 1983, J. Biol. Chem., 258: 846-853]).
- [0561] EGFR은 많은 인간 암의 발생 및 진행에 중추적인 역할을 수행하는 것으로 생각되는 원종양 유전자의 패밀리, 즉 ERBB 패밀리의 하나의 구성원인 성장 촉진 종양 유전자 erbB 또는 ErbB1의 단백질 산물이다. 특히, 유방암, 방광암, 폐암, 두경부암 및 위암뿐만 아니라, 아교모세포종에서 EGFR의 발현 증가가 관찰되었다. 종양 유전자의 ERBB 패밀리는 4개의 구조적으로 관련된 막횡단 수용체, 즉 EGFR, HER-2/neu(erbB2), HER-3(erbB3) 및 HER-4(erbB4)를 코딩한다.
- [0562] 임상적으로, 종양에서의 ERBB 종양 유전자 증폭 및/또는 수용체 과다발현은 질환 재발 및 환자 예후 불량, 및 요법 반응성과 상관성이 있는 것으로 보고되었다([L. Harris et al., 1999, Int. J. Biol. Markers, 14: 8-15]; 및 [J. Mendelsohn and J. Baselga, 2000, Oncogene, 19: 6550-6565]).
- [0563] EGFR은 3개의 주요 도메인, 즉 글리코실화되고 2개의 시스테인 풍부 영역을 갖는 리간드 결합 포켓을 함유하는 세포외 도메인(ECD); 짧은 막횡단 도메인, 및 고유한 티로신 키나제 활성을 갖는 세포내 도메인으로 이루어진다. 막횡단 영역은 리간드 결합 도메인을 세포내 도메인에 연결한다. 아미노산 및 DNA 서열 분석뿐만 아니라 비글리코실화된 형태의 EGFR에 대한 연구는 EGFR의 단백질 백분이 132 kDa의 질량을 갖고, 1186개의 아미노산 잔기를 갖는다는 것을 나타낸다([A. L. Ullrich et al., 1984, Nature, 307: 418-425]; [J. Downward et al., 1984, Nature, 307: 521-527]; [C. R. Carlin et al., 1986, Mol. Cell. Biol., 6: 257-264]; 및 [F. L. V. Mayes and M. D. Waterfield, 1984, The EMBO J., 3: 531-537]).
- [0564] EGFR에 대한 EGF 또는 TGF- α 의 결합은 신호 전달 경로를 활성화하고, 세포 증식을 유도한다. EGFR 분자의 이량 체화, 입체형태 변화 및 내재화는 세포 성장 조절을 유도하는 세포 내 신호를 전달하는 기능을 수행한다(G. Carpenter and S. Cohen, 1979, Ann. Rev. Biochem., 48: 193-216). 성장 인자 수용체 기능의 조절에 영향을 미치거나, 수용체 및/또는 리간드의 과다발현을 유도하는 유전적 변형은 세포 증식을 초래한다. 또한, EGFR은 세포 분화, 세포 운동성 향상, 단백질 분비, 혈관신생, 침윤, 전이 및 화학치료제 및 방사선에 대한 암세포의 저항성에서 역할을 수행하는 것으로 결정되었다(M. J. Oh et al., 2000, Clin. Cancer Res., 6: 4760-4763).
- [0565] EGFR에 특이적으로 결합하는 항체의 예는 세툭시맙 등을 포함한다. 세툭시맙은 EGFR에 결합하고 EGFR의 기능을 억제하는 모노클로날 항체이다.
- [0566] 세툭시맙은 결장암, 두경부암 등의 치료에 사용된다. 세툭시맙은 또한 ADCC 활성 때문에 항종양 효과를 나타낼 것으로 예상된다.
- [0567] 리툭시맙은 항 인간 CD20 키메라 인간-뮤린 항체를 함유하는 모노클로날 항체이고, 비호지킨 림프종, B 세포 림프증식성 질환, 다발혈관염을 동반한 육아종증, 미세 다발혈관염 등의 치료에 사용된다. 또한, 리툭시맙은 높은 ADCC 활성을 갖는다. 인간 폴레이트 수용체 1(FOLR1)은 폴레이트에 대해 높은 친화도를 갖는 GPI 고정 막 단백질이고, 세포 증식 또는 생존에 관련된 중요한 기능을 갖는다[Int J Cancer, 2006. 119(2): p. 243-50]. FOLR1

은 신장, 폐, 장 등의 정상 조직에서 제한된 발현 패턴을 보인다[Anal Biochem, 2005. 338(2): p. 284-93].

[0568] 발현 영역은 내장에 국한되어 있다. 한편, 암 조직에서의 FOLR1 발현은 내장으로 한정되지 않고, 그의 높은 발현이 난소암[Anal Biochem, 2005. 338(2): p. 284-93.], [J Thorac Oncol, 2012. 7(5): p. 833-840.], [J Thorac Cardiovasc Surg, 2001. 121(2): p. 225-33.], 신장암[Anal Biochem, 2005. 338(2): p. 284-93.], 폐암[Anal Biochem, 2005. 338(2): p. 284-93.], [J Thorac Oncol, 2012. 7(5): p. 833-840], 유방암[Anal Biochem, 2005. 338(2): p. 284-93.], 중피종[J Thorac Cardiovasc Surg, 2001. 121(2): p. 225-33]과 같은 다양한 암에서 관찰된다.

[0569] 특히, FOLR1 발현 수준은 난소암의 악성 등급, 진행 및 예후와 관련이 있다고 보고되었다([Int J Cancer, 1997. 74(2): p. 193-8.], [Int J Cancer, 1998. 79(2): p. 121-6]). 또한, 건강한 공여자의 혈청과 비교하여 난소암 환자의 혈청에서 가용성 FOLR1이 유의하게 증가한 것이 보고되었다[PLoS One, 2009. 4(7): p.e6292]. 따라서, FOLR1은 암 치료를 위한 유망한 표적 분자이다.

[0570] IL-3R α 는 IL-3 수용체의 α 쇄이고, 사이토카인 수용체 패밀리에 속하고, 그의 리간드로서 IL-3에 대해 약한 친화도를 보인다. IL-3 수용체는 그의 β 쇄(CD131, 이하에서 IL-3R β 로도 언급됨)와 이종 수용체를 형성함으로써 강한 결합력을 가지며, β 쇄의 세포내 영역을 통해 성장 및 분화 등의 신호를 세포 내로 전달한다. IL-5 수용체 α 쇄 및 GM-CSF 수용체 α 쇄는 β 쇄를 공유한다.

[0571] IL-3R α 는 단일 막 관통의 타입 I 막 단백질이고, 서열을 기초로 하여 IL-3 결합 부위 및 피브로넥틴 타입 III 부위가 막외 영역에 존재하는 것으로 알려져 있다. 막내 영역에서 신호를 전달할 수 있는 구조는 존재하지 않는 것으로 알려져 있다. IL-3R α 의 3 차원 구조는 아직 분석되지 않았지만, 구조적으로 중요한 S-S 결합을 형성하는 시스테인 잔기의 위치가 대부분의 경우에서 보존되기 때문에, 사이토카인 수용체의 구조는 패밀리 간에 유사하다고 추정할 수 있다. 동일한 사이토카인 수용체 중에서, IL-13 수용체 α 쇄, IL-4 수용체 α 쇄 및 GM-CSF 수용체 α 쇄의 결정 구조가 분석되었다. 이들 사이토카인 수용체 패밀리의 정보에 기초하여, IL-3R α 의 막외 영역은 대략 3개의 도메인(A-B-C 도메인)으로 나뉜다고 추정할 수 있다. 인간 IL-3R α 의 A 도메인을 인식하는 항체 7G3은 IL-3 신호전달을 차단하는 것으로 알려져 있다[Sun et al., Blood, 87:83(1996)]. 또한, A 도메인 결핍 IL-3R α 분자의 발현이 보고되었고(Chen et al., J Biol Chem, 284: 5763(2009)), 당연히 A 도메인을 인식하는 항체는 A 도메인 결핍 IL-3R α 를 인식할 수 없다. 또한, C 도메인은 IL-3R α 분자의 뿌리이고, IL-3R β 와 IL-3R α 의 회합을 3차원 적으로 억제할 가능성이 높다고 생각된다.

[0572] IL-3는 IL-3R α 의 리간드로 알려진 유일한 리간드이다. IL-3은 적혈구, 거핵구, 호중구, 호산구, 호염기구, 비만 세포 및 단핵구계 세포의 콜로니 형성을 촉진하는 것으로 알려진 조혈 인자이다. IL-3은 또한 다능성을 갖는 전구 세포를 자극한다고 알려져 있지만, IL-3은 오히려 자가 복제 능력을 갖는 미성숙 줄기세포가 아닌 분화가 수입된(committed) 전구 세포의 분화를 촉진한다고 언급되고 있다.

[0573] IL-3R α 는 β 쇄와 이종이량체를 형성하여 세린/트레오닌 인산화 경로를 통해 IL-3 신호를 세포 내로 전달함으로써 골수계(myeloid) 세포의 성장 및 분화와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. IL-3R α 는 조혈 전구 세포 중에서 과립구-대식세포 전구세포(GMP: Granulocyte-Macrophage Progenitor) 또는 공통 골수계 전구세포(CMP: Common Myeloid Progenitor)에서 발현되고, IL-3 신호전달을 통해 호중구 및 대식세포로의 성장 및 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다. 다른 한편으로, CMP의 하류에 존재하는 거핵 적혈구 전구세포(MEP: Megakaryocyte Erythroid Progenitor)는 역시 하류에 존재하는 GMP와 상이한 IL-3R α 를 발현하지 않는 것으로 보고되었다.

[0574] AML 줄기세포와 관련하여, 보넷(Bonnet) 및 딕(Dick)은 AML 줄기세포가 CD34 양성 CD38 음성 분획에 존재한다고 보고하였다(Bonnet et al., Nat Med, 1997; 3: 730). 또한, 정상 줄기세포의 동일한 분획(CD34 양성 CD38 음성)과 비교함으로써, 조단(Jordan) 등은 IL-3R α 가 AML 줄기세포에서 고도로 발현된다는 것을 발견하였다(Jordan et al., Leukemia, 2000; 14: 1777). AML 줄기세포뿐만 아니라 백혈병 세포의 마커로서의 IL-3R α 의 높은 잠재력은 추후에 여러 보고서에서 보고되었다([Haematologica, 2001; 86:1261], 및 [Leuk-Lymphoma, 2006;47:207]). 백혈병을 비롯한 암 치료에서, 가능한 한 많은 정상 세포를 손상시키지 않고 암세포만 제거하는 것이 중요하고, 정상 줄기세포와 백혈병 줄기세포 사이의 IL-3R α 발현의 차이는 백혈병 줄기세포를 표적으로 하는 치료에 유용하다고 생각된다.

[0575] IL-3R α 와 이종이량체를 형성하는 IL-3R β 대해서, IL-3R β 가 백혈병 줄기세포에서 고도로 발현된다는 보고는 존재하지 않고, 또한 백혈병 줄기세포 및 정상 줄기세포 내에서의 mRNA의 발현이 실제로 비교되는 마이크로어레이의 경우에, IL-3R β 는 백혈병 줄기세포에서 그의 발현이 증가하는 분자로서 확인되지 않았다(Majeti et al.,

Proc Natl Acad Sci USA, 2009; 106: 3396).

[0576] IL-3에 의존하는 백혈병 세포의 존재는 오랫동안 알려져 왔으며, 오래된 연구는 대부분의 백혈병 세포를 차지하는 모세포(blast cell)에 초점을 맞춘 연구이다. 백혈병 줄기세포에 관한 최근 연구에 따르면, 백혈병 줄기세포는 그의 성장을 철저히 억제하여 항종양제 저항성을 획득한다고 한다. 또한, IL-3 반응성 모세포는 높은 증식 능력을 갖는 것으로 고려되고, 따라서 이러한 세포는 항종양제를 사용한 일반적인 치료에서 효과적인 것으로 추정된다.

[0577] IL-3R 수용체를 표적으로 하는 작용제의 후보물질로서, IL-3 그 자체가 조혈 기능이 부족한 환자에게 오랫동안 투여되었지만, 최종적으로 약물이 되지는 못하였다. 디프테리아 독소가 IL-3에 첨가된 융합 단백질에 대한 임상 시험이 표적 질환으로서 백혈병을 대상으로 진행 중이다. IL-3 및 디프테리아 독소-IL-3 융합체는, IL-3의 특성 때문에 IL-3이 IL-3R α 의 단백질 단독에 대해서는 강하게 결합하지 않지만 IL-3R α 와 β 의 이종단백질에는 강하게 결합하기 때문에, IL-3R α 의 발현이 특이적으로 증가하는 세포를 표적으로 하는 작용제로서 적합하지 않다. 다른 한편으로, IL-3R α 를 표적으로 하는 작용제의 후보물질로서, IL-3R α 인간 마우스 키메라 항체 7G3의 1상 결과가 보고되었다(비특허 문헌 19). 7G3 키메라 항체는 AML 치료 메커니즘으로서 IL-3 신호전달을 차단하기 위해 사용되기 때문에, 이 항체는 IL-3R α 양성 세포를 제거하기 위한 작용제는 아니다. 또한, 몇몇의 다른 IL-3R α 항체(9F5(Becton Dickinson), 6H6(SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) 및 AC 145(Miltenyi-Biotech))가 알려져 있지만, 이들은 IL-3R α 를 고도로 발현하는 세포를 제거하는 능력을 갖지 않는다.

[0578] 그러나, IL-3R α 를 고도로 발현하는 세포를 제거하는 능력을 갖는 모노클로날 항체가 보고된 바 있다 (WO2010/126066).

[0579] TIM-3 유전자 패밀리는 마우스에서 8개의 유전자로, 인간에서 3개의 유전자로 이루어지고, 이들 각각의 유전자는 염색체 11 및 염색체 5q33에 각각 존재한다[Hafler DA et al., JExp Med. 205: 2699-701(2008)]. 이들 유전자 영역은 자가면역 질환 및 알레르기 질환과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. TIM 단백질은 구조적으로 보존된 면역글로불린 가변(IgV) 도메인 및 뮤신 도메인을 갖는 타입 I 막횡단 단백질이다.

[0580] TIM 단백질은 T 세포 상에 특이적으로 발현되고 T 세포 활성을 직접 조절한다고 생각되었지만, 항원 제시 세포에서 TIM-3 단백질의 발현 및 그의 기능에 대한 최근의 보고가 존재한다[Anderson AC et al., Science 318: 1141-3 (2007)]. 결정 구조 분석에 따르면, TIM 단백질은 보존된 단백질 구조를 갖고, IgV 도메인 내에 리간드 결합 부위를 갖는다.

[0581] TIM-3은 마우스 Th1 세포 상에 특이적으로 발현되지만 Th2 세포에서는 특이적으로 발현되지 않는 분자로 확인되었다[Monney L et al., Nature 415: 536-41(2002)]. TIM-3의 DNA 서열, 아미노산 서열 및 3차원 구조는 GenBank 수탁 번호 NM_032782 및 NM_134250과 같은 공개 데이터베이스에서 이용가능하다. TIM-3은 HAVCR2로도 알려져 있다.

[0582] 마우스와 유사하게 인간에서, TIM-3은 T 세포뿐만 아니라 대식세포 및 수지상 세포와 같은 포식세포에서도 발현된다. TIM-3의 단백질 리간드(예를 들어, 갈렉틴-9)에 대한 결합은 아폽토시스(apoptosis) 유도의 메커니즘을 통해 Th1 반응을 억제할 수 있고, 따라서 말초 관용(peripheral tolerance)의 유도와 같은 결과를 야기한다.

[0583] siRNA에 의한 인간 TIM-3의 발현 감소 또는 차단 항체에 의한 인간 TIM-3의 억제는 CD4 양성 T 세포로부터 인터페론 γ (IFN- γ)의 분비를 증가시켰고, 이것은 인간 T 세포에서 TIM-3의 억제 역할을 지지한다. 포식세포에서, TIM-3은 또한 아폽토시스 세포를 인식하기 위한 수용체로서 기능한다.

[0584] 자가면역 질환 환자의 임상 샘플에 대한 분석 결과, CD4 양성 세포에서 TIM-3의 발현은 보이지 않았다. 특히, 다발성 경화증 환자의 뇌척수액으로부터 유래된 T 세포 클론에서 TIM-3의 발현 수준은 정상의 건강한 사람으로부터 유래된 클론보다 더 낮았고, IFN- γ 의 분비 수준은 더 높았다[Koguchi K et al., J Exp Med. 203: 1413-8(2006)]. TIM-3와 알레르기 질환 또는 천식의 관계에 대한 보고가 존재한다(WO96/27603 및 WO2003/063792).

[0585] 급성 골수성 백혈병(이하에서 "AML"로 언급됨) 환자로부터의 조혈 줄기세포 및 정상 조혈 모세포의 마이크로어레이 분석에 따르면, TIM-3은 AML 줄기세포에서 발현되고, 따라서 TIM-3이 혈액 악성 종양에 관여한다는 것이 제시되었다([Majeti R et al., Proc Natl Acad Sci USA 2009 Mar 3; 106(9): 3396-401] 및 WO2009/091547]).

[0586] 지금까지 확립된 항-TIM-3 모노클로날 항체의 예는 항-인간 TIM-3 래트 모노클로날 항체(클론 344823, R&D Systems 제조), 항-인간 TIM-3 마우스 모노클로날 항체(클론 F38-2E2, R&D Systems 제조), 및 ADCC 활성을 갖는 항-인간 TIM-3 마우스 모노클로날 항체(WO2011/155607의 512 항체, 644 항체, 4545 항체 및 4177 항체)를

포함한다.

- [0587] 이하에서, 상기 식 (I) 또는 (II)로 표시되는 화합물은 각각 화합물 (I) 또는 화합물 (II)로 언급된다. 이것은 상이한 화학식 번호를 갖는 다른 화합물에도 동일하게 적용된다.
- [0588] 화학식 (I) 및 (II)에 있어서 각각의 기의 정의는 다음과 같다.
- [0589] (i) 저급 알콕시의 저급 알킬기 및 저급 알킬 모이어티(moiety)의 예는 1 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 칙쇄 또는 분지쇄 알킬을 포함한다. 그의 보다 구체적인 예는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, n-펜틸, 네오펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸, n-노닐, n-데실 등을 포함한다.
- [0590] (ii) 할로겐은 불소 원자, 염소 원자, 브롬 원자 및 요오드 원자의 각각의 원자를 의미한다.
- [0591] (iii) 방향족 혜테로시클릭 기의 예는 질소 원자, 산소 원자 및 황 원자로부터 선택되는 적어도 하나의 혜테로원자를 함유하는 5원 또는 6원 모노시클릭 방향족 혜테로시클릭 기; 3원 내지 8원 고리가 융합되고, 질소 원자, 산소 원자 및 황 원자로부터 선택되는 적어도 하나의 혜테로원자를 함유하는 비시클릭 방향족 혜테로시클릭 기; 3원 내지 8원 고리가 융합되고, 질소 원자, 산소 원자 및 황 원자로부터 선택되는 적어도 하나의 혜테로원자를 함유하는 트리시클릭 방향족 혜테로시클릭 기 등을 포함한다. 그의 보다 구체적인 예는 푸릴, 티에닐, 피롤릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 옥사졸릴, 이속사졸릴, 옥사디아졸릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 티아디아졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 피리딜, 피리딜-1-옥시드, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐, 트리아지닐, 벤조푸라닐, 벤조티오페닐, 벤즈옥사졸릴, 벤즈옥사디아졸릴 벤조티아졸릴, 이소인돌릴, 인돌릴, 인다졸릴, 벤즈이미다졸릴, 벤조트리아졸릴, 옥사졸로피리미디닐, 티아졸로피리미디닐, 피롤로피리딜, 피롤로피리미디닐, 이미다조피리딜, 이미다조피리미디닐, 트리아조피리딜, 트리아졸로피리미디닐, 푸리닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 시놀리닐, 프탈라지닐, 퀴나졸리닐, 퀴녹살리닐, 나프티리디닐 등을 포함한다. 이들 중에서, 비시클릭 방향족 혜테로시클릭 기로서 벤조푸라닐, 벤조티오페닐, 벤즈옥사졸릴, 벤즈옥사디아졸릴, 벤조티아졸릴, 이소인돌릴, 인돌릴, 인다졸릴, 벤즈이미다졸릴, 벤조트리아졸릴, 옥사졸로피리미디닐, 티아졸로피리미디닐, 피롤로피리딜, 피롤로피리미디닐, 이미다조피리딜, 이미다조피리미디닐, 트리아졸로피리딜, 트리아졸로피리미디닐, 푸리닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 시놀리닐, 프탈라지닐, 퀴나졸리닐, 퀴녹살리닐, 나프티리디닐 등이 바람직하다.
- [0592] (iv) 임의로 치환된 저급 알킬의 치환기는 동일하거나 상이할 수 있고, 이들 기의 치환기의 수는 1 내지 가능한 최대 치환 수, 바람직하게는 1 내지 3이고, 치환기의 예는 할로겐, 히드록시, 시아노, 카르복시, 카르바모일 등으로 이루어진 군으로부터 선택되는 치환기를 포함한다.
- [0593] (v) 임의로 치환된 방향족 혜테로시클릭 기의 치환기는 동일하거나 상이할 수 있고, 이들 기의 치환기의 수는 1 내지 가능한 최대 치환 수, 바람직하게는 1 내지 3이고, 치환기의 예는 할로겐, 히드록시, 시아노, 카르복시, 카르바모일, 임의로 치환된 아릴(임의로 치환된 아릴의 치환기의 예는 할로겐, 히드록시, 시아노, 카르복시, 카르바모일, C₁₋₁₀ 알킬 등을 포함한다), 임의로 치환된 방향족 혜테로시클릭 기(임의로 치환된 혜테로시클릭 기의 치환기의 예는 할로겐, 히드록시, 시아노, 카르복시, 카르바모일, C₁₋₁₀ 알킬 등을 포함한다)를 포함한다.
- [0594] 상기 (iv) 및 (v)에 예시된 기에서, 아릴의 예는 모노시클릭 아릴, 및 2개 이상의 고리가 융합된 융합 아릴을 포함한다. 그의 보다 구체적인 예는 페닐, 나프틸, 인데닐, 안트라닐과 같은 6 내지 14개의 고리 탄소 원자를 갖는 아릴을 포함한다. C₁₋₁₀ 알킬은 상기 저급 알킬에서 정의된 바와 동일한 의미를 갖는다. 할로겐은 상기 할로겐에서 정의된 바와 동일한 의미를 갖는다. 방향족 혜테로시클릭 기는 상기 방향족 혜테로시클릭 기에서 정의된 바와 동일한 의미를 갖는다.
- [0595] 화합물 (I) 및 (II)의 약학적으로 허용되는 염의 예는 약학적으로 허용되는 산 부가 염, 금속 염, 암모늄 염, 유기 아민 부가 염, 아미노산 부가 염 등을 포함한다. 산 부가 염은 염산염, 황산염 및 인산염과 같은 무기산 염; 및 아세테이트, 말레이이트, 푸마레이트, 타르트레이트, 시트레이트, 락테이트, 아스파르테이트 및 글루타메이트와 같은 유기산 염을 포함한다. 금속염은 나트륨 염, 칼륨 염과 같은 알칼리 금속염; 마그네슘 염 및 칼슘 염과 같은 알칼리 토금속 염; 및 알루미늄 염, 아연 염 등을 포함한다. 암모늄 염은 암모늄, 테트라메틸암모늄 등의 염을 포함한다. 유기 아민 부가 염은 모르폴린 염, 피페리딘 염 등을 포함한다. 아미노산 부가 염은 라이신 염, 글리신 염, 페닐알라닌 염 등을 포함한다.
- [0596] 화합물 (I) 및 (II)의 염을 수득하고자 할 때, 화합물 (I) 및 (II)가 염의 형태로 수득되는 경우, 염은 그 자체로 정제될 수 있고; 화합물 (I) 및 (II)가 유리 형태로 수득되는 경우, 염은 적당한 용매에 용해 또는 혼탁된 후, 여기에 산 또는 염기를 첨가하여 염을 형성시킨다.

- [0597] 화합물 (I) 및 (II)에서 위치 이성질체, 기하 이성질체 또는 광학 이성질체와 같은 이성질체가 존재할 수 있다. 이들 이성질체를 포함한 모든 가능한 이성질체, 및 임의의 비율의 이성질체의 혼합물이 본 발명의 IDO 억제제로서 사용될 수 있다.

[0598] 화합물 (I) 및 (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염은 물 또는 다양한 용매에 대한 부가물의 형태로 존재할 수 있다. 이들 부가물 역시 본 발명의 IDO 억제제로서 사용될 수 있다.

[0599] 화합물 (I), (II) 및 ADCC 활성을 갖는 항체가 단일 투여에서 충분한 치료 결과를 제공하지 않을 수 있고, 또한 상기 화합물의 고용량 투여가 부작용을 유발할 수 있다는 우려가 있다.

[0600] 상기 화합물 (I) 또는 (II)를 ADCC 활성을 갖는 항체와 함께 조합함으로써, 본 발명은 어느 한 화합물을 투여하는 것보다 더 우수한 치료 결과를 제공하고, 따라서 상기 화합물 (I) 또는 화합물 (II) 중 어느 하나 및 ADCC 활성을 갖는 항체를 낮은 투여량으로 사용할 수 있다.

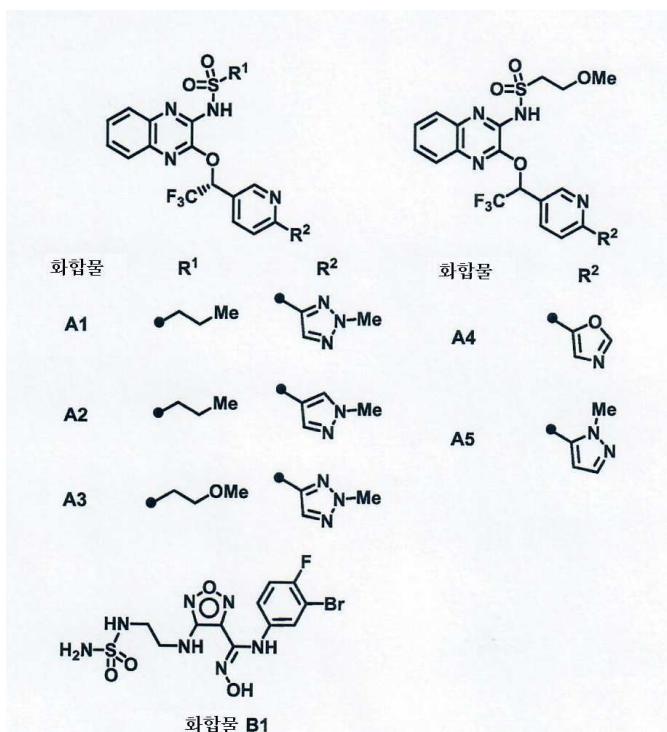
[0601] 따라서, 본 발명은 충분한 치료 효과를 제공할 뿐만 아니라 부작용을 감소시킨다.

[0602] 본 발명에서 사용되는 화합물 (I) 및 (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염은 예를 들어 WO2011/42316 및 WO2010/05958에 기재된 방법을 기초로 하여 합성될 수 있다.

[0603] 본 발명에서 사용되는 화합물 (I) 및 (II)의 예는 각각 화합물 A1 내지 A5, 화합물 B1 등을 포함한다.

[0604] 하기 표 A에서, Me는 메틸을 나타낸다.

[0605] <표 A>



- [0606] 화합물 B1

[0607] 본 발명의 항체는 CCR4, HER2, 인간 CD20, EGFR, FOLR1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3에 특이적으로 결합한다.

[0608] 본 발명에서의 ADCC 활성은 세포 표면 상의 CCR4, HER2, 인간 CD20, EGFR, FOLR1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3에 결합하는 항체가 Fc 모이어티를 통해 주로 자연 살해 세포(이하에서 NK 세포로 언급됨)의 표면 상의 Fc γ RIIIa에 결합하고, 그 결과로서 NK 세포로부터 분비되는 페르포린(perforin) 및 그랜자임(granzyme)과 같은 세포독성 분자에 의해 세포 용해 반응이 발생되는 세포용해 반응이다([Clark M, Chemical Immunology, 65, 88 1997]; [Gorter A et al., Immunol. Today, 20, 576(1999)].

[0609] 본 발명에서 사용되는 항체의 CCR4, HER2, 인간 CD20, EGFR, FOLR1, 인간 IL-3R α , 인간 TIM-3에 대한 특이적 결합은 특정 항원, 및 항체의 특정 항원에 대한 결합을 조사할 수 있는 방법, 예컨대 고상 CCR4, HER2, 인간 CD20, EGFR, FOLR1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3을 사용하는 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 웨스턴 블로

팅 또는 면역조직화학(IHC)에 의해 또는 CCR4 발현, HER2 발현, 인간 CD20 발현, EGFR 발현, FOLR1 발현, 인간 IL-3R α 발현 또는 인간 TIM-3 발현 세포에 대한 공지된 면역학적 검출 방법 또는 형광 세포 염색 방법에 의해 확인될 수 있다.

- [0610] 인간 폴레이트 수용체 1(FOLR1)에 특이적으로 결합하는 항체는 WO2014/087863 및 WO2015/186823에 기재되어 있다. 인간 IL-3R α 에 특이적으로 결합하는 항체는 WO2010/126066에 기재되어 있다. 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체는 WO2011/155607에 기재되어 있다.
- [0611] 본 발명에서 사용되는 다음 항체는 예를 들어 WO2014/087863에 기재된 방법을 기초로 하여 생산될 수 있다:
- [0612] (A1) FOLR1에 특이적으로 결합하는 항체,
- [0613] (A2) FOLR1에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체, 및
- [0614] (A3) 하기 (a1)-(c1)로부터 선택되는, FOLR1에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체:
- [0615] (a1) 항체의 H쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 1, 2 및 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 4, 5 및 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 모노클로날 항체;
- [0616] (b1) 항체의 H쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 1, 2 및 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄의 CDR 1-3이 각각 서열 번호 4, 5 및 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 서열 번호 3으로 표시되는 아미노산 서열(항체 H쇄의 CDR3) 내의 시스테인이 트레오닌, 메티오닌, 이소류신, 발린, 페닐알라닌 또는 글루타민으로 치환되는 것인 모노클로날 항체; 및
- [0617] (c1) 항체의 H쇄가 서열 번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고 항체의 L쇄가 서열 번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 모노클로날 항체.
- [0618] 본 발명에서 사용되는 다음 항체는 예를 들어 WO2010/126066에 기재된 방법을 기초로 하여 생산될 수 있다:
- [0619] (B1) 인간 IL-3R α 에 특이적으로 결합하는 항체,
- [0620] (B2) IL-3 신호전달을 억제하지 않고 인간 IL-3R α 쇄의 B 도메인에 결합하지만 인간 IL-3R α 쇄의 C 도메인에는 결합하지 않는, (B1)에 따른 항체,
- [0621] (B3) 하기 (a2) 내지 (e2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 중쇄의 CDR 및 경쇄의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는, (B2)에 따른 항체:
- [0622] (a2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 9 내지 11의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 24 내지 26의 아미노산 서열이고,
- [0623] (b2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 12 내지 14의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 27 내지 29의 아미노산 서열이고,
- [0624] (c2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 15 내지 17의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 30 내지 32의 아미노산 서열이고,
- [0625] (d2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 18 내지 20의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 33 내지 35의 아미노산 서열이고,
- [0626] (e2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 21 내지 23의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 36 내지 38의 아미노산 서열임,
- [0627] (B4) 하기 (e2)로 이루어지는 중쇄 CDR 및 경쇄 CDR의 아미노산 서열을 포함하는, (B2)에 따른 항체;
- [0628] (e2) 중쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 21 내지 23의 아미노산 서열이고, 경쇄의 CDR 1 내지 3은 각각 서열 번호 36 내지 38의 아미노산 서열임.
- [0629] 본 발명에서 사용되는 다음 항체는 예를 들어 WO2011/155607에 기재된 방법을 기초로 하여 생산될 수 있다:
- [0630] (C1) 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체,
- [0631] (C2) 인간 TIM-3의 세포의 영역에 결합하는, 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체,
- [0632] (C3) 하기 (i) 내지 (iii)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 (C2)에 따른 모노클로날 항체:

- [0633] (i) 각각 서열 번호 39 내지 41로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 42 내지 44로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체,
- [0634] (ii) 각각 서열 번호 45 내지 47로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 48 내지 50으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체, 및
- [0635] (iii) 각각 서열 번호 51 내지 53으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 H쇄를 포함하고 각각 서열 번호 54 내지 56으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR 1 내지 3을 포함하는 항체의 L쇄를 포함하는 모노클로날 항체, 및
- [0636] (C4) 하기 (a3) 및 (b3)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 (C2)에 따른 모노클로날 항체:
- [0637] (a3) 서열 번호 57로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VH를 포함하고 서열 번호 58로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VL을 포함하는 모노클로날 항체, 및
- [0638] (b3) 서열 번호 59로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VH를 포함하고 서열 번호 60으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 VL을 포함하는 모노클로날 항체.
- [0639] IDO 억제제와 본 발명의 CCR4, HER2, 인간 CD20 또는 EGFR에 특이적으로 결합하는 항체의 조합제는 CCR4, HER2, 인간 CD20 또는 EGFR를 발현하는 임의의 종양의 치료에 사용될 수 있다. 또한, IDO 억제제와 본 발명의 FOLR1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체의 조합제를 종양의 치료에 사용할 수 있다.
- [0640] FOLR1과 관련된 종양의 예는 혈액암, 유방암, 자궁암, 결장직장암, 식도암, 위암, 난소암, 폐암, 신장암, 직장암, 갑상선암, 자궁경부암, 소장암, 전립선암, 중피종, 췌장암 등을 포함한다. FOLR1과 관련된 종양의 바람직한 예는 난소암을 포함한다.
- [0641] 인간 IL-3R α 와 관련된 종양의 예는 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병, 비정형 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 성인 T 세포 백혈병, NK/T 세포 림프종, 과립 림프구증가증(LGL 백혈병), 진성 적혈구증가증, 본태성 혈소판혈증, 과호산구 증후군, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 여포성 림프종, MALT 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 버킷 림프종, 림프모구성 림프종, 캐슬만병 등을 포함한다. 인간 IL-3R α 와 관련된 종양의 바람직한 예는 급성 골수성 백혈병(AML)을 포함한다.
- [0642] 인간 TIM-3과 관련된 종양의 예는 혈액암, 유방암, 자궁암, 결장직장암, 식도암, 위암, 난소암, 폐암, 신장암, 직장암, 갑상선암, 자궁경부암, 소장암, 전립선암, 췌장암 등을 포함한다. 인간 TIM-3과 관련된 종양의 바람직한 예는 급성 골수성 백혈병(AML)을 포함한다.
- [0643] 종양의 예는 조혈 종양, 난소암, 유방암, 자궁체암, 자궁경부암, 전립선암, 방광암, 신장암, 위암, 식도암, 간암, 담도암, 결장암, 직장암, 췌장암, 폐암, 두경부암, 골육종, 흑색종 및 뇌종양을 포함한다.
- [0644] 조혈 종양의 예는 급성 백혈병, 만성 백혈병, 호지킨병(또는 호지킨 림프종), 비호지킨병(또는 비호지킨 림프종) 등을 포함한다.
- [0645] 급성 백혈병의 예는 급성 림프성 백혈병 등을 포함하고, 급성 림프성 백혈병의 예는 프리-B 세포 급성 림프성 백혈병, 프리-T 세포 급성 림프성 백혈병 등을 포함한다.
- [0646] 만성 백혈병의 예는 만성 림프성 백혈병 등을 포함한다.
- [0647] 비호지킨병의 예는 T 세포 및 NK 세포 림프종, B 세포 림프종 등을 포함하고, T 세포 및 NK 세포 림프종의 예는 전구체 T 림프모구 백혈병/림프종, 성숙 T 세포 종양 등을 포함한다.
- [0648] B 세포 림프종의 예는 버킷 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종 등을 포함한다.
- [0649] 성숙 T 세포 종양의 예는 T 세포 전립프구성 백혈병, T 세포 거대 과립 림프구성 백혈병, 세자리(Sezary) 증후군, 균상 식육종, 원발성 피부 역형성 대세포 림프종, 피하 지방층염 유사 T 세포 림프종, 장병증형 T 세포 림프종, 간비장 γ δ T 세포 림프종, 혈관면역모세포 T 세포 림프종, 말초 T 세포 림프종, 피부 T 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종, 성인 T 세포 백혈병/림프종 등을 포함한다.
- [0650] 호지킨 림프종의 예는 결절성 림프구 우세형 호지킨 림프종, 고전적 호지킨 림프종 등을 포함한다. 고전적 호지

킨 림프종의 예는 결절 경화형 호지킨 림프종, 림프구 풍부 고전적 호지킨 림프종, 혼합 세포형 호지킨 림프종, 림프구 결핍형 호지킨 림프종 등을 포함한다.

- [0651] CCR4, HER2, 인간 CD20, EGFR, FOLR1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체의 용량은 원하는 치료 효과, 투여 경로, 치료 기간, 연령, 체중 등에 따라 다르다. CCR4, HER2, 인간 CD20, EGFR, FOLR1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체의 성인에 대한 용량은 일반적으로 투여당 0.1 내지 100 mg/kg 또는 0.1 내지 400 mg/m²이다. CCR4, HER2, 인간 CD20, EGFR, FOLR1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체와 함께 투여되는IDO 억제제를 포함하는 의약은 임상 실무에서 단독으로 투여되는 것과 동일하거나 더 적은 것이 바람직하다.
- [0652] CCR4, HER2, 인간 CD20, EGFR, FOLR1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체의 투여 빈도는 2주 1회 또는 1주 1회이다.
- [0653]IDO 억제제와 본 발명의 항체의 조합제의 효과는 하기의 "2.4 시험 절차"에 따른 방법을 사용하여 조사할 수 있다. 이 방법을 사용하여IDO 억제제 단독 투여의 효과를IDO 억제제와 본 발명의 항체의 조합 효과를 비교함으로써 조합제의 효과를 평가할 수 있다.
- [0654] 사용되는 배양된 세포의 예는 TL-0m1 세포를 포함한다. TL-0m1 세포는 성인 T 세포 백혈병 환자로부터 유래된 것으로, 인간 성인 T 세포 백혈병의 모델로 사용될 수 있다.
- [0655] 사용되는 배양된 세포의 예는 HH 세포를 포함한다. HH 세포는 피부 T 세포 림프종 환자로부터 유래된 것으로, 피부 T 세포 림프종의 모델로 사용될 수 있다.
- [0656] 사용되는 배양된 세포의 예는 SK BR-3 세포를 포함한다. SK BR-3 세포는 유방암 환자로부터 유래된 것으로, 유방암 모델로 사용될 수 있다.
- [0657] 사용되는 배양된 세포의 예는 Raji 세포를 포함한다. Raji 세포는 베켓 림프종 환자로부터 유래된 것으로, 베켓 림프종의 모델로 사용될 수 있다.
- [0658] 사용되는 배양된 세포의 예는 A431 세포를 포함한다. A431 세포는 유피암 암종 환자로부터 유래된 것으로, EGFR 양성 종양의 모델로 사용될 수 있다.
- [0659] 사용되는 배양된 세포의 예는 SKOV3 세포를 포함한다. SKOV3 세포는 난소암 환자로부터 유래된 것으로, 난소암의 모델로 사용될 수 있다.
- [0660] 사용되는 배양된 세포의 예는 KG-1 세포를 포함한다. KG-1 세포는 급성 골수성 백혈병 환자로부터 유래된 것으로, 급성 골수성 백혈병의 모델로 사용될 수 있다.
- [0661] 사용되는 배양된 세포의 예는 EoL-1/인간 TIM-3의 모 세포주인 EoL-1 세포를 포함한다. EoL-1 세포는 급성 골수성 백혈병 환자로부터 유래된 것으로, EoL-1/인간 TIM-3은 급성 골수성 백혈병의 모델로 사용될 수 있다. 본 발명의 조합제가 화합물 (I), (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염과 같은IDO 억제제와, CCR4, HER2, 인간 CD20, EGFR, FOLR1, 인간 IL-3R α 또는 인간 TIM-3에 특이적으로 결합하는 항체의 조합제인 경우, 조합제는 단일 작용제(혼합물)로서 또는 복수의 제제의 조합으로서 사용, 투여 또는 제조될 수 있다.
- [0662] 단일 작용제(혼합물) 또는 제제는 바람직하게는 경구 투여 또는 비경구 투여, 예컨대 주사에 적합한 단위 투여 형태를 갖는다. 복수의 제제의 조합을 사용하거나 투여하는 경우, 제제는 함께 또는 일정 간격으로 별개로 사용될 수 있다.
- [0663] 제제는 활성 성분 이외에 약학적으로 허용되는 희석제, 부형제, 봉해제, 윤활제, 결합제, 계면활성제, 물, 생리학적 염수, 식물성 오일 가용화제, 등장화제, 보존제, 항산화제 등을 사용하여 통상의 방법으로 제조할 수 있다.
- [0664] 정제가 제조될 때, 예를 들어, 락토스와 같은 부형제, 전분과 같은 봉해제, 스테아르산마그네슘과 같은 윤활제, 허드록시프로필 셀룰로스와 같은 결합제, 지방 에스테르와 같은 계면활성제, 글리세린과 같은 가소제 등을 통상적인 방식으로 사용할 수 있다.
- [0665] 주사제가 제조될 때, 예를 들어 물, 생리학적 염수, 식물성 오일, 용매, 가용화제, 등장화제, 보존제, 항산화제 등을 통상적인 방식으로 사용할 수 있다.
- [0666] 상기 설명된 목적을 위해 화합물 (I), (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염을 사용하는 경우, 이는 경구 또

는 주사 등으로서 투여될 수 있다. 그의 유효 용량 및 투여 횟수는 투여 형태, 환자의 연령, 체중, 증상 등에 따라 달라질 수 있다. 화합물 (I), (II) 또는 그의 약학적으로 허용되는 염의 1일 용량은 대체로 0.01 내지 100 mg/kg, 바람직하게는 0.08 내지 100 mg/kg이다.

[0667] 시험예 1

[0668] 1. 요약

[0669] 본 연구에서, 본 발명자들은 인간 말초 혈액 단핵세포(PBMC) 또는 정제된 NK 세포를 이용한 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)에 대한 IDO1 활성의 효과를 조사하였다. ADCC 검정 전에, 인간 PBMC를 KATO-III 세포 배양 조건화 배지에서 인큐베이팅하였다. IDO1 활성의 효과를 조사하기 위해, IFN- γ 및/또는 IDO1 억제제(화합물 A1 및 화합물 B1)를 KATO-III 세포 배양액에 첨가하였다.

[0670] 인간 PBMC 또는 정제된 NK 세포를 IFN- γ 로 자극된 KATO-III 세포의 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅하였을 때, 모가물리주맙의 ADCC는 IFN- γ 로 자극하지 않은 경우에 비해 약화되었다. 이 약화는 화합물 A1 또는 화합물 B1에 의해 상쇄되었고, 이것은 ADCC의 약화가 IDO1 활성에 의해 유도되었음을 시사하였다. 트라스투주맙, 리툭시맙 및 세툭시맙을 ADCC 유도 항체로 사용한 경우에도 유사한 결과가 관찰되었다.

[0671] 2. 물질 및 방법

[0672] 2.1 시험 및 대조군 제품

[0673] 2.1.1 화합물 A1

[0674] 화합물 A1은 W02011/142316의 실시예 62의 화합물 64A로서 수득하고, 화합물 A1을 원액으로서 100 mmol/L의 농도로 디메틸 술폴시드(DMSO)에 용해시키고, 사용할 때까지 동결된 상태에서 유지하였다. 화합물 A1의 원액을 검정 배지(섹션 2.4.2)로 희석하였다.

[0675] 2.1.2 화합물 B1

[0676] 화합물 B1은 W02010/005958의 실시예 1의 "4-({2-[((아미노술포닐)아미노]에틸}아미노)-N-(3-브로모-4-플루오로페닐)-N'-하드록시-1,2,5-옥사디아졸-3-카르복스이미드아미드}로서 수득하였다. 화합물 B1을 원액으로서 100 mmol/L의 농도로 DMSO에 용해시키고, 사용할 때까지 동결된 상태로 유지하였다. 화합물 B1의 원액을 검정 배지(섹션 2.4.2)로 희석하였다.

[0677] 2.1.3 모가물리주맙

[0678] 모가물리주맙은 W02011030841에 기재된 KM8760의 유사한 제조 방법에 의해 제조되었다. 용액(9.7 mg/mL)을 검정 배지(섹션 2.4.2)로 희석하였다.

[0679] 2.1.4 트라스투주맙

[0680] 트라스투주맙(Herceptin(등록상표), 440 mg, 로트 No. N3566B01 B2060)은 에프. 호프만-라 로슈(F. Hoffmann-La Roche)로부터 구입하였다. 용액(9.7 mg/mL)을 검정 배지(섹션 2.4.2)로 희석하였다.

[0681] 2.1.5 리툭시맙

[0682] 리툭시맙(Mabthera(등록상표), 10 mg/mL, 로트 No. B6061B01)은 에프. 호프만-라 로슈로부터 구입하였다. 용액(10 mg/mL)을 검정 배지(섹션 2.4.2)로 희석하였다.

[0683] 2.1.6 세툭시맙

[0684] 세툭시맙(ERBITUX(등록상표), 5 mg/mL, 로트 No. MG1201)은 머크 세로노(Merck Serono)로부터 구입하였다. 용액(5 mg/mL)을 검정 배지(섹션 2.4.2)로 희석하였다.

[0685] 2.2 키누레닌 및 트립토판의 정량을 위한 표준 제품, 내부 표준물질 및 시약

[0686] 2.2.1 표준 제품

[0687] L-트립토판(Trp, 로트 No. PDQ6460)은 와코 퓨어 케미컬 인더스트리즈(Wako Pure Chemical Industries)로부터 구입하였다. L-키누레닌(Kyn, 로트 No. BCBJ6934V)은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)로부터 구입하였다.

[0688] Trp 및 Kyn을 물에 용해시켜 10 mmol/L의 농도로 원액을 제조하였다. 원액을 사용할 때까지 4°C에서

보관하였다.

[0689] 2.2.2 내부 표준물질

L-카누레닌(고리-D₄)(d₄-Kyn, 로트 No. L-KYNU-D4-005)을 부켐 비.브이.(Buchem B.V.)로부터 구입하였다. L-트립토판(인돌-D5, 98%)(d₅-Trp, 로트 No. I-15891)을 캠브리지 이소토프 래보러토리즈(Cambridge Isotope Laboratories)로부터 구입하였다. d₄-Kyn 및 d₅-Trp을 물에 용해시켜 10 mmol/L의 농도로 원액을 제조하였다. 원액을 4°C에서 보관하였다. d₄-Kyn 및 d₅-Trp의 원액을 물로 희석하고 혼합하여 IS 용액(0.6 μmol/L의 d₄-Kyn 및 2 μmol/L의 d₅-Trp 함유)을 제조하였다. IS 용액을 사용할 때까지 4°C에서 보관하였다. IS 용액을 사용 직전에 트리플루오로아세트산(TFA)과 혼합하여 IS/TFA 용액(5/1, v/v)을 제조하였다.

[0691] 2.2.3 시약

HPLC 등급의 메탄올, TFA 및 포름산을 와코 퓨어 케미컬 인더스트리즈, 엘티디.로부터 구입하였다. 사용되는 다른 모든 시약은 별도의 표시가 없는 한, 분석 등급의 것이었다.

[0693] 2.3 시험 시스템

인간 위암 세포주인 KATO-III(86093004)은 디에스 파마 바이오메디칼 코., 엘티디.(DS Pharma Biomedical Co., Ltd.)로부터 입수하였다. 인간 성인 T 세포 백혈병/림프종 세포주인 TL-0m1(TKG0289)은 셀 리소스 센터 포 바이오메디컬 리서치(Cell Resource Center for Biomedical Research)로부터 수득하였다. 인간 피부 T 세포 림프종 세포주 HH(CRL-2105), 인간 유방암 세포주 SK-BR-3(HTB30) 및 인간 림프종 세포주 Raji(CCL-86)를 ATCC로부터 수득하였다. 인간 유피피 암종 세포주 A431(JCRB0004)을 JCRB로부터 수득하였다.

[0695] 인간 위암 세포주 KATO-III(86093004)를 10 vol% 열 불활성화된 소 태아 혈청(Invitrogen, Cat. No. 10099-141, 로트 No. 1108863) 및 1 vol% 페니실린-스트렙토마이신(nacalai tesque, Cat. No. 26253-84)을 함유하는 RPMI1640(Invitrogen, Cat. No. 11875-093)으로 계대배양하였다. 인간 성인 T 세포 백혈병/림프종 세포주 TL-0m1(TKG0289)을 20 vol% 열 불활성화된 소 태아 혈청 및 1 vol% 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 RPMI1640으로 계대배양하였다. 인간 피부 T 세포 림프종 세포주 HH(CRL-2105)를 10 vol% 열 불활성화된 소 태아 혈청, 10 mmol/L HEPES(nacalai tesque, Cat. No. 17557-94), 1 mmol/L 피루브산나트륨(Invitrogen, Cat. No. 11360-070) 및 1 vol% 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 RPMI1640으로 계대배양하였다. 인간 유방암 세포주 SK-BR-3(HTB30)를 10 vol% 열 불활성화된 소 태아 혈청 및 1 vol% 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 맥코이(McCoy) 5A(Invitrogen, Cat. No. 16600-082)로 계대배양하였다. 인간 림프종 세포주 Raji(CCL-86)를 10 vol% 열 불활성화된 소 태아 혈청, 4.5 g/L D-(+)-글루코스(Sigma-Aldrich, Cat. No. G8769), 10 mmol/L HEPES 및 1 vol% 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 RPMI1640으로 계대 배양하였다. 인간 유피피 암종 세포주 A431(JCRB0004)을 1 vol% 열 불활성화된 소 태아 혈청 및 1 vol% 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 DMEM(인비트로겐, Cat. No. 11995-065)으로 계대 배양하였다.

[0696] 조건화 배지의 제조에서, 모든 세포를 10 vol% 열 불활성화된 투석된 소 태아 혈청(Invitrogen, Cat. No. 30067334)을 함유하는 RPMI1640에서 배양하였다.

[0697] 3명의 개체로부터 동결된 인간 말초 혈액 단핵세포(PBMC)를 올셀즈(Allcells)[로트 No. A3457(공여자 1) 및 로트 No. A3951(공여자 2)] 및 프리시전 바이오서비스(Precision Bioservices)[로트 No. 13096(공여자 3)]로부터 구입하고, 별개로 사용하였다.

[0698] 2.4 시험 절차

[0699] 2.4.1 조건화 배지의 제조

[0700] KATO-III 세포(1.25×10^6 세포)를 25 ng/mL 재조합 인간 IFN-γ로 처리하였다. 화합물 A1 또는 화합물 B1을 100 nmol/L의 최종 농도로 첨가하였다. 세포를 CO₂ 인큐베이터에서 인큐베이팅하였다. 3일 후에, 세포 및 상청액을 원심분리에 의해 분리하였다. 상청액을 조건화 배지로 사용하였다. 조건화 배지는 인간 PBMC 또는 NK 세포의 배양(섹션 2.4.2) 및 Kyn 및 Trp의 측정(섹션 2.4.4)을 위해 사용되었다. Kyn 및 Trp의 농도를 도 1에 도시하였다.

[0701] 조건화 배지 1: KATO-III 세포,

- [0702] 조건화 배지 2: KATO-III 세포 + IFN-γ ,
- [0703] 조건화 배지 3: KATO-III 세포 + IFN-γ + 화합물 A1,
- [0704] 조건화 배지 4: KATO-III 세포 + IFN-γ + 화합물 B1.
- [0705] 2.4.2 ADCC
- [0706] NK 단리 키트(Miltenyi Biotec, Cat. No. 130-092-657) 및 autoMACS 기기를 사용하여 NK 세포를 인간 PBMC로부터 단리하였다. 인간 PBMC 또는 NK 세포를 CO₂ 인큐베이터 내에서 조건화 배지(섹션 2.4.1)에서 배양하였다. 7일 후에, 세포를 수거하고 계수하여 이펙터 세포로 사용하였다. 이펙터 세포로서 사용된 PBMC 및 NK 세포를 5x10⁶ 세포/mL(PBMC) 또는 4x10⁵ 세포/mL(NK 세포)로 검정 배지(10 vol% 열 불활성화된 소 태아 혈청 및 1 vol% 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 RPMI1640)에 혼탁하였다. TL-0m1 세포, HH 세포, SK-BR-3 세포, Raji 세포 A431 세포(1x10⁶ 세포/각각의 세포주)를 CO₂ 인큐베이터 내에서 37°C에서 1시간 초과의 시간 동안 1.85 MBq의 Na⁵¹CrO₄ (PerkinElmer)로 표지하였다. 세포를 검정 배지로 3회 세척하였다. 표적 세포로 사용되는 방사성 표지된 세포를 2x10⁵ 세포/mL로 5 mL의 검정 배지에 혼탁하였다. 모가물리주맙, 트라스투주맙, 리툭시맙 또는 세툭시맙을 검정 배지로 30 μg/mL로부터 0.3 μg/mL(최종 농도: 10 μg/mL로부터 0.1 μg/mL)로 10배씩 연속 희석하였다. 50 μL의 표적 세포(1x10⁴ 세포)를 96웰 등근 바닥 배양 플레이트에 플레이팅하고, 상기한 바와 같이 제조된 50 μL의 항체 희석액 및 50 μL의 이펙터 세포(2.5x10⁵ 세포)와 혼합하였다. 배양 플레이트를 4°C에서 짧게 원심 분리하고, 약 4시간 동안 CO₂ 인큐베이터에서 37°C에서 인큐베이팅하였다. 4°C에서 5분 동안 원심분리한 후, 상청액을 LumaPlate(PerkinElmer)로 옮기고, 충분히 건조하였다. 방사능을 마이크로플레이트 섭광 계수기 (TopCount NXT, PerkinElmer)로 계수하였다.
- [0707] 2.4.3 NK 세포의 유동 세포 계측 분석
- [0708] 인간 PBMC는 CO₂ 인큐베이터 내의 조건화 배지에서 배양하였다. 7일 후, 세포를 수거하고, 고정가능 생존성 염료(Fixable Viability Dye) eFluor(등록상표) 506(eBioscience, Cat. No. 65-0866-14)로 염색하였다. MACS 완충제[1 w/v% BSA를 함유하는 autoMACS 세정 용액(Miltenyi Biotec, Cat. No. 130-091-222)]로 2회 세척한 후, 세포를 PerCP 항-인간 CD3 항체(Biolegend, Cat. No. 300,428), FITC 항-인간 CD16 항체(BD Pharmingen™, Cat. No. 556618) 및 PE/Cy7 항-인간 CD56 항체(BD Pharmingen™, Cat. No. 557747)로 염색하였다. MACS 완충제로 2회 세척한 후, 세포를 200 μL의 MACS 완충제에 혼탁하고, FACSuite 소프트웨어의 도움으로 FACSVerse™ (BD Biosciences)에 의해 분석하였다. CD3- 세포(NK 세포) 내의 CD16+ CD56+ 세포의 비율을 FlowJo 소프트웨어(버전 7. 6. 5, FlowJo)에 의해 결정하였다. 모든 염색 과정은 제조자의 지시에 따라 수행하였다. CD3- 세포 내의 CD16+ CD56+ 세포의 비율은 도 2의 A, B, C 및 D에 제시되었다.
- [0709] 2.4.4 샘플 내의 Kyn 및 Trp의 정량
- [0710] 2.4.4.1 샘플의 전처리
- [0711] 50 μL의 조건화 배지(섹션 2.4.1) 및 60 μL의 빙냉 IS/TFA 용액(5/1, v/v)를 혼합하고, 혼합물을 원심분리하였다(5000xg, 실온, 10분). 60 μL의 상청액 및 50 μL의 0.05 vol% 포름산/메탄올 = 75/25(v/v)를 혼합하고, 생성된 혼합물을 액체 크로마토그래피 텐덤 질량 분석(LC/MS/MS) 시스템에 주입하였다.
- [0712] 2.4.4.2 보정 표준물질 샘플의 제조
- [0713] 보정 표준물질 용액은 Trp 및 Kyn 원액을 물로 희석하여 제조하였다. 보정 표준물질 용액의 농도 범위는 0.1 내지 500(TRP), 0.05 내지 200(Kyn) μmol/L이었고, 이들을 4°C에서 보관하였다. 블랭크(blank) 샘플로서, 물을 보정 표준물질 용액 대신에 사용하였다. 50 μL의 보정 표준물질 용액 및 블랭크 샘플을 섹션 2.4.4.1에서 설명한 바와 동일한 절차에 의해 전처리하였다.
- [0714] 2.4.4.3 LC/MS/MS 분석
- [0715] <분석 시스템>
- [0716] LC: 애질런트(Agilent) 1200(Agilent Technologies)

- [0717] 오토샘플러: HTC PAL(CTC Analytics)
- [0718] MS/MS: API5000(AB SCIEX)
- [0719] 분석 소프트웨어: Analyst 1.6.1(AB SCIEX)
- [0720] 컬럼: Atlantis T3(3 μm , 4.6 mm x 75 mm, Waters)
- [0721] 프리-필터: A-103x(0.5 μm Upchurch Scientific)
- [0722] 컬럼 온도: 실온
- [0723] <LC 조건>
- [0724] 이동상 A: 0.05 vol% 포름산
- [0725] 이동상 B: 메탄올
- [0726] <LC 조건>
- [0727] 이동상 A: 0.05 vol% 포름산
- [0728] 이동상 B: 메탄올
- [0729] <표 1>

시간 (min)	유속 (mL/min)	A (vol%)	B (vol%)
0	0.6	95	5
0.2	0.6	95	5
3.5	0.6	30	70
3.51	0.6	10	90
5	0.6	10	90
5.01	0.6	95	5
7	0.6	95	5

[0730]

- [0731] 주입 부피: 10 μl
- [0732] <MS/MS 조건>
- [0733] 이온화 방식: 전기분무 이온화, 양성
- [0734] 소스 온도: 500°C
- [0735] 검출: 다중 반응 모니터링
- [0736] 모니터링 이온:
- [0737] <표 2>

	Q1 질량 (<i>m/z</i>)	Q3 질량 (<i>m/z</i>)	디클러스터링 전위 (V)	충돌 에너지 (eV)
Trp	205.1	146.4	140	40
Kyn	209.0	94.2	20	20
IS (<i>d₅</i> -Trp)	209.8	150.2	140	30
IS (<i>d₄</i> -Kyn)	212.8	98.3	20	20

[0738]

- [0739] 2.5 원 데이터의 분석 방법
- [0740] Analyst 소프트웨어(버전 1.6.1, AB SCIEX)를 사용하여 Trp 및 Kyn의 농도를 계산하였다. 보정 곡선은 최소 제곱 선형 회귀법에 의해 보정 표준물질 샘플로부터 얻은 피크 면적 비(분석물/IS)로부터 작성되었다 [$Y = aX + b$;

Y, 피크 면적 비; X, 농도; 가중 계수, $1/Y^2$]. 블랭크 샘플은 회귀 분석에 포함되지 않았다.

[0741] 샘플 내의 Kyn 및 Trp 농도를 개별적으로 계산하였다. 정량 하한 미만의 값은 0 $\mu\text{mol/L}$ 로 간주하였다.

[0742] 세포독성의 백분율은 하기 수학식에 따라 계산되었다.

[0743] <수학식 1>

[0744] 세포독성 % = $(E-S)/(M-S) \times 100$

[0745] 여기서, E는 실험적으로 방출된 방사능(cpm)이고, S는 이펙터 세포 및 항체 대신에 검정 배지를 첨가함으로써 자연 방출된 방사능(cpm)의 평균이고, M은 이펙터 세포 및 항체 대신에 10 vol%의 TritonTM X-100(Sigma-Aldrich, Cat. No. T9284-100ML)을 첨가함으로써 방출된 최대 방사능(cpm)의 평균이다. 항체의 각각의 농도에서의 세포독성은 3회 실험의 평균으로 나타내었다.

[0746] 3. 결과

[0747] 3.1 Kyn 생산 및 Trp 소비에 대한 화합물 A1 및 화합물 B1의 효과

[0748] KATO-III 세포에서 IDO1 활성을 확인하기 위해, KATO-III 세포 배양액의 조건화 배지 내의 Kyn 및 Trp의 농도를 측정하였다. 도 1a 및 1b에 도시된 바와 같이, 조건화 배지 1(KATO-III 세포)과 비교하여 조건화 배지 2(KATO-III 세포 + IFN- γ)에서 Kyn 농도의 증가 및 Trp 농도의 감소가 관찰되었다. IFN- γ 의 존재 하에 KATO-III 세포를 IDO1 억제제인 화합물 A1(조건화 배지 3) 또는 화합물 B1(조건화 배지 4)로 처리하였을 때, Kyn 생산 및 Trp 소비가 억제되었다(도 1a 및 1b).

[0749] 3.2 NK 세포의 검출

[0750] 각각의 조건화 배지를 사용한 인간 PBMC의 인큐베이팅 후에, NK 세포(CD3-/CD16+ /CD56+ 세포)의 존재가 확인되었다. 도 2에 도시된 바와 같이, 모든 조건화 배지를 사용하여 인큐베이팅한 PBMC에서 NK 세포가 검출되었다.

[0751] 3.3 ADCC에 IDO1 활성의 효과

[0752] ADCC에 대한 IDO1 활성의 효과를 조사하기 위해, 각각의 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 인간 PBMC에 의한 ADCC를 측정하였다. 공여자 1 및 공여자 2로부터의 인간 PBMC가 조건화 배지 2에서 예비 인큐베이팅되었을 때, TL-Om1 세포에 대한 모가물리주맙의 ADCC는 조건화 배지 1에 비해 약화되었다(도 3a 및 3b). 화합물 A1 또는 화합물 B1은 약화를 상쇄하였고; 조건화 배지 3 또는 4에서 예비 인큐베이팅된 공여자 1 및 공여자 2로부터의 인간 PBMC에 의한 ADCC는 조건화 배지 1에서와 거의 동일하였다. 유사한 결과가 다른 표적 세포 및 항체를 사용할 때 관찰되었고; 각각 HH 세포, SK-BR-3 세포, Raji 세포 및 A431 세포에 대한 모가물리주맙, 트라스투주맙, 리툭시맙 및 세툭시맙의 시험된 모든 ADCC는 조건화 배지 2를 사용한 인간 PBMC의 예비 인큐베이팅에 의해 약화되었고, 화합물 A1 또는 화합물 B1은 이 약화를 상쇄하였다(도 3b, 도 4, 도 5 및 도 6).

[0753] 조건화 배지 2에 의한 ADCC의 약화가 PBMC 내의 NK 세포의 비율 감소 때문이 아니라는 것을 확인하기 위해, 각각의 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 정제된 NK 세포에 의한 ADCC를 측정하였다. 도 3과 유사하게, 조건화 배지 2에서 예비 인큐베이팅된 NK 세포에 의한 모가물리주맙의 ADCC는 약화되었고, 이 약화는 화합물 A1 또는 화합물 B1에 의해 상쇄되었다(도 7). 유사한 결과가 리툭시맙, Raji 세포 및 정제된 인간 NK 세포를 사용할 때 관찰되었다(도 8).

[0754] 또한, 화합물 A1 또는 화합물 B1 자체가 ADCC에 미치는 효과를 조사하기 위해, 인간 PBMC를 100 nmol/L의 화합물 A1 또는 화합물 B1을 함유하는 배지에서 7일 동안 예비 인큐베이팅하였다. 도 9에 도시된 바와 같이, 화합물 A1 또는 화합물 B1은 모가물리주맙의 ADCC에 영향을 미치지 않았다.

[0755] 4 논의

[0756] 본 연구의 결과는 ADCC가 IDO1 활성에 의해 약화되었고 IDO1 억제제가 이 약화를 상쇄하였다는 것을 보여주었다. 이전 연구에서, Kyn과 같은 Trp 대사산물이 NK 세포수를 감소시켰다고 제안되었다[J. Exp. Med. 2002; 196(4):447-57]. 본 연구에서, 각각의 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 PBMC 내의 NK 세포는 ADCC 검정 전에 생존하였다(도 2).

[0757] 또한, 정제된 NK 세포를 사용할 때 ADCC의 약화가 관찰되었다(도 7 및 도 8). 이 경우, NK 세포수를 계수하고, 각각의 군에서 동일한 수의 NK 세포를 ADCC 측정에 사용하였다. 이러한 데이터는 IDO1 활성에 의한 ADCC 약화가

NK 세포수의 감소로 인한 것이 아니라 NK 세포 기능의 억제로 인한 것임을 시사하였다.

[0758] 트라스투주맙, 리툭시맙 및 세툭시맙을 사용했을 때 ADCC 약화가 관찰되었고, 이것은 IDO 활성에 의한 ADCC의 약화가 항체 형태, 즉 비푸코실화 IgG1 및 푸코실화 IgG1와 무관하게 일어날 것임을 시사한다.

[0759] IFN- γ 의 존재 하의 KATO-III 세포의 조건화 배지에서 Kyn 농도의 증가 및 Trp 농도의 감소가 관찰되었고(도 1), Kyn 농도의 증가 및 Trp의 감소는 화합물 A1 또는 화합물 B1에 의해 억제되었다. 또한, 화합물 A1 또는 화합물 B1 자체는 ADCC에 영향을 미치지 않았다(도 9). 종합하면, 조건화 배지에서 Kyn 생산 또는 Trp 소비는 NK 세포 기능을 약화할 것이다.

[0760] 시험예 2

[0761] 5 요약

[0762] 본 연구에서, 인간 말초 혈액 단핵세포(PBMC)를 이용하여 모가물리주맙의 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)에 대한 IDO1 활성의 효과를 조사하였다. ADCC 검정 전에, 인간 PBMC를 IFN- γ 의 부재 또는 존재 하에 모 KATO-III 세포 또는 IDO1 shRNA 또는 음성 대조군 shRNA를 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포의 조건화 배지에서 인큐베이팅하였다.

[0763] 인간 PBMC를 IFN- γ 존재 하에 모 KATO-III 세포 또는 음성 대조군 shRNA를 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포의 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅할 때, 인간 PBMC에 의한 모가물리주맙의 ADCC는 IFN- γ 의 부재 하에서와 비교할 때 약화되었다. IFN- γ 의 존재 하에서 IDO1 shRNA를 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포의 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 인간 PBMC의 경우에 ADCC는 약화되지 않았고, 이것은 ADCC의 약화가 IDO1 활성에 의해 유발되었음을 시사한다.

[0764] 6 도입

[0765] IDO1은 종양 또는 미세 환경에서 발현되는 것으로 알려져 있고, 숙주 면역 감시로부터 종양의 회피를 책임지는 면역억제 메커니즘에서 중요한 조절 역할을 수행한다[Nat Rev Cancer. 2009; 9(6):445-52]. 키누레닌(Kyn)과 같은 트립토판(Trp) 대사산물이 NK 세포 사멸을 유도하고[J Exp Med. 2002; 196(4):447-57], NK 세포 수용체의 발현을 억제하여 NK 세포 매개 세포독성을 약화하는 것으로 보고되었다[Blood. 2006; 108(13):4118-25]. 따라서, IDO1 활성은 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)에 영향을 미칠 가능성이 있다.

[0766] 본 연구에서, 본 발명자들은 IDO1 낙다운 기술을 이용하여 모가물리주맙의 ADCC에 대한 IDO1 활성의 효과를 조사하였다.

[0767] 7 물질 및 방법

[0768] 7.1 시험 및 대조군 제품

[0769] 7.1.1 모가물리주맙

[0770] 모가물리주맙은 W02011030841에 기재된 KM8760의 유사한 제조 방법에 의해 제조되었다. 용액(9.7 mg/mL)을 검정 배지(섹션 7.4.5)로 희석하였다.

[0771] 7.2 키누레닌 및 트립토판의 정량을 위한 표준 제품, 내부 표준물질 및 시약

[0772] 7.2.1 표준 제품

[0773] L-트립토판(Trp, 로트 No. PDQ6460)은 와코 퓨어 케미컬 인더스트리즈로부터 구입하였다. L-키누레닌(Kyn, 로트 No. BCBJ6934V)은 시그마-알드리치로부터 구입하였다.

[0774] Trp 및 Kyn을 물에 용해시켜 10 mmol/L의 농도로 원액을 제조하였다. 원액을 사용할 때까지 4°C에서 보관하였다.

[0775] 7.2.2 내부 표준물질

[0776] L-키누레닌(고리-D₄)(d₄-Kyn, 로트 No. L-KYNU-D4-005)을 부俭 비.브이.로부터 구입하였다. L-트립토판(인돌-D5, 98%)(d₅-Trp, 로트 No. I-15891)을 캠브리지 이소토프 래보러토리즈로부터 구입하였다. d₄-Kyn 및 d₅-Trp을 물에 용해시켜 10 mmol/L의 농도로 원액을 제조하였다. 원액을 4°C에서 보관하였다. d₄-Kyn 및 d₅-Trp의 원액을 물로 희석하고 혼합하여 IS 용액(0.6 μ mol/L의 d₄-Kyn 및 2 μ mol/L의 d₅-Trp 함유)을 제조하였다. IS 용액을

사용할 때까지 4°C에서 보관하였다. IS 용액을 사용 직전에 트리플루오로아세트산(TFA)과 혼합하여 IS/TFA 용액(5/1, v/v)을 제조하였다.

[0777] 7.2.3 시약

HPLC 등급의 메탄올, TFA 및 포름산을 와코 퓨어 케미컬 인더스트리즈, 엘티디.로부터 구입하였다. 사용되는 다른 모든 시약은 별도의 표시가 없는 한, 분석 등급의 것이었다.

[0779] 7.3 시험 시스템

인간 위암 세포주인 KATO-III(86093004)은 디에스 파마 바이오메디칼 코., 엘티디.로부터 입수하였다. TL-0m1(TKG0289)은 셀 리소스 센터 포 바이오메디컬 리서치로부터 수득하였다.

인간 위암 세포주 KATO-III(86093004)를 10 vol% 열 불활성화된 소 태아 혈청(Invitrogen, Cat. No. 10099-141, 로트 No. 1108863) 및 1 vol% 폐니실린-스트렙토마이신(nacalai tesque, Cat. No. 26253-84)을 함유하는 RPMI1640(Invitrogen, Cat. No. 11875-093)으로 계대배양하였다. 인간 성인 T 세포 백혈병/림프종 세포주 TL-0m1(TKG0289)을 20 vol% 열 불활성화된 소 태아 혈청 및 1 vol% 폐니실린-스트렙토마이신을 함유하는 RPMI1640으로 계대배양하였다.

조건화 배지의 제조에서, 세포를 10 vol% 열 불활성화된 투석된 소 태아 혈청(Invitrogen, Cat. No. 3006733-4)을 함유하는 RPMI1640에 혼탁하였다. 동결된 인간 말초 혈액 단핵세포(PBMC)를 올셀즈(로트 No. A3457)로부터 구입하였다.

[0783] 7.4 시험 절차

[0784] 7.4.1 렌티바이러스 감염

인간 ID01을 표적으로 하는 4개의 상이한 shRNA 렌티바이러스 입자[IDO1 shRNA #44, #45, #46 및 #47(Sigma-Aldrich, Cat. No. SHCLNV)], 빈(empty) 벡터 대조군 렌티바이러스 입자(Sigma-Aldrich, Cat. No. SHC001) 또는 음성 대조군 shRNA 렌티바이러스 입자[NegaCTRL shRNA(Sigma-Aldrich, Cat. No. SHC202)]를 RetroNectin^R 접시(TAKARA BIO, Cat. No. T110A)에 씌딩하였다. KATO-III 세포(1×10^5 세포)를 각각의 접시에 첨가하고, CO₂ 인큐베이터에서 인큐베이팅하였다. 감염된 세포는 퓨로마이신(0.25 μ g/mL) 함유 배양 배지에서 1주일 동안 선택하였다. ID01의 낙다운은 실시간 정량 PCR(qPCR, 섹션 7.4.2) 및 웨스턴 블롯 분석(섹션 7.4.3)에 의해 평가되었다.

[0786] 7.4.2 qPCR 분석

모 KATO-III 세포 또는 ID01 shRNA, 벡터 또는 NegaCTRL shRNA를 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포(9×10^3 세포)를 25 ng/mL의 재조합 인간 IFN- γ 로 처리하였다.

세포를 CO₂ 인큐베이터에서 약 24시간 동안 인큐베이팅하였다. 총 RNA 추출 및 cDNA 합성은 제조사의 지시에 따라 TaqMan(R) Gene Expression Cells-to-CTTM 키트(Applied Biosystems, Cat. No. AM1728)를 사용하여 수행하였다. 이어서, cDNA 샘플은 인간 ID01(Applied Biosystems, Cat. No. 4331182) 및 HPRT1(Applied Biosystems, Cat. No. 4448489)에 특이적인 프라이머를 사용하여 qPCR 분석에 의해 분석되었다.

[0789] 7.4.3 웨스턴 블롯 분석

모 KATO-III 세포 또는 ID01 shRNA, 벡터 또는 NegaCTRL shRNA를 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포(5.4×10^5 세포)를 25 ng/mL의 재조합 인간 IFN- γ 로 처리하였다.

세포를 CO₂ 인큐베이터에서 인큐베이팅하였다. 3일 후, 세포를 수거하고, 30분 이상 동안 빙상에서 100 μ l의 용해 완충제[1 vol% 폐닐메탄술포닐 플루오라이드 용액(Sigma-Aldrich, Cat. No. 93482) 및 1 vol% 프로테아제 억제제 칙테일(Sigma-Aldrich, Cat. No. P8340)을 함유하는 NP40 세포 용해 완충제(Invitrogen, Cat. No. FNN0221)] 내에 용해시켰다. 용해물을 4°C에서 약 14000x rpm으로 10분 동안 원심분리하였다. 상청액의 단백질 농도는 PierceTM TMBCA 단백질 검정 키트(Pierce, Cat. No. 23225)를 사용하여 측정하였다. SDS-PAGE 샘플의 준비를 위해, 각각의 용해액을 동일한 농도로 용해 완충제로 희석하고, 5x 샘플 완충제(Thermo Fisher, Cat. No. 39000)과 혼합하여 단백질 농도를 1.5 μ g/ μ l로 만든 다음, 95°C에서 5분 동안 가열하였다. 각각의 샘플 내

의 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 막으로 옮겼다. PVDF 차단 완충제 [IDO1에 대해(TOYOB0, Cat. No. NYPBR01)] 또는 차단 완충제[β -액틴에 대해(0.05 vol% Tween 20을 함유하는 50 mmol/L 트리스 완충 염수(pH 8.0)(TBST), 5 w/v% 탈지유)]로 차단한 후, 막을 Can Get Signal 용액 1 (TOYOB0, Cat. No. NKB-201) 내에 1/100으로 희석된 항-IDO 항체(Upstate Biotechnology, Cat. No. 05-840) 또는 차단 완충제 내에 1/3000으로 희석된 항- β -액틴 항체(Sigma-Aldrich, Cat. No. 061M4808)와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이팅하였다. 약 10분 동안 TBST로 3회 세척한 후, 막을 차단 완충제 내에 1/2000으로 희석된 양고추 냉이 퍼옥시다제 연결 항-마우스 항체(GE Healthcare, Cat# NA931V)와 함께 약 1시간 동안 인큐베이팅하였다. TBST로 약 10분 동안 3회 세척한 후, 막을 SuperSignal(R) West Pico 화학발광 기질(Pierce Biotechnology, Cat. No. 34080)에 침지시켰다. 화학발광 검출은 제조사의 지시에 따라 발광 이미지 분석기 LAS3000으로 수행하였다.

[0792]

7.4.4 조건화 배지의 제조

[0793]

모 KATO-III 세포 또는 IDO1 shRNA 또는 NegaCTRL shRNA를 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포(1.25×10^6 세포)를 25 ng/mL의 재조합 인간 IFN- γ 로 처리하였다. 세포를 CO_2 인큐베이터에서 인큐베이팅하였다. 3일 후, 세포 및 상청액을 원심분리에 의해 분리하였다. 상청액을 조건화 배지로 사용하였다. 조건화 배지는 인간 PBMC의 인큐베이팅(섹션 7.4.5) 및 Kyn 및 Trp의 측정(섹션 7.4.7)을 위해 사용되었다.

[0794]

조건화 배지 1: KATO-III 세포(모 세포)

[0795]

조건화 배지 2: KATO-III 세포(NegaCTRL shRNA)

[0796]

조건화 배지 3: KATO-III 세포(모 세포) + IFN- γ

[0797]

조건화 배지 4: KATO-III 세포(NegaCTRL shRNA) + IFN- γ

[0798]

조건화 배지 5: KATO-III 세포(IDO1 shRNA #44) + IFN- γ

[0799]

조건화 배지 6: KATO-III 세포(IDO1 shRNA #45) + IFN- γ

[0800]

조건화 배지 7: KATO-III 세포(IDO1 shRNA #46) + IFN- γ

[0801]

7.4.5 ADCC

[0802]

인간 PBMC는 CO_2 인큐베이터에서 각각의 조건화 배지(섹션 7.4.4)에서 배양하였다. 7일 후, 세포를 수거하고 계수하여 이펙터 세포로 사용하였다. 이펙터 세포로서 사용된 PBMC를 5×10^6 세포/mL로 검정 배지(10 vol% 열 불활성화된 소 태아 혈청 및 1 vol% 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 RPMI1640)에 혼탁하였다. TL-0m1 세포(1×10^6 세포)를 CO_2 인큐베이터 내에서 37°C에서 1시간 초과의 시간 동안 1.85 MBq의 $Na_2^{51}CrO_4$ (PerkinElmer)로 표지하였다. 세포를 검정 배지로 3회 세척하였다. 표적 세포로 사용되는 방사성 표지된 세포를 2×10^5 세포/mL로 5 mL의 검정 배지에 혼탁하였다. 모가물리주맙을 검정 배지로 30 μ g/mL로부터 0.3 μ g/mL(최종 농도: 10 μ g/mL로부터 0.1 μ g/mL)로 10배씩 연속 희석하였다. 50 μ l의 표적 세포(1×10^4 세포)를 96웰 둥근 바닥 배양 플레이트에 흘리고, 상기한 바와 같이 제조된 50 μ l의 항체 희석액 및 50 μ l의 이펙터 세포(2.5×10^5 세포)와 혼합하였다. 배양 플레이트를 4°C에서 짧게 원심분리하고, 약 4시간 동안 CO_2 인큐베이터에서 37°C에서 인큐베이팅하였다. 4°C에서 5분 동안 원심분리한 후, 상청액을 LumaPlate(PerkinElmer)로 옮기고, 충분히 건조하였다. 방사능을 마이크로플레이트 섬광 계수기(TopCount NXT, PerkinElmer)로 계수하였다.

[0803]

7.4.6 NK 세포의 유동 세포 계측 분석

[0804]

인간 PBMC는 각각의 조건화 배지에서 배양하고, CO_2 인큐베이터에서 인큐베이팅하였다. 7일 후, 세포를 수거하고, 고정가능 생존성 염료 eFluor(등록상표) 506(eBioscience, Cat. No. 65-0866-14)로 염색하였다. MACS 완충제[1 w/v% BSA를 함유하는 autoMACS 세정 용액(Miltenyi Biotec, Cat. No. 130-091-222)]로 2회 세척한 후, 세포를 PerCP 항-인간 CD3 항체(Biolegend, Cat. No. 300,428), FITC 항-인간 CD16 항체(BD Pharmingen™, Cat. No. 556618) 및 PE/Cy7 항-인간 CD56 항체(BD Pharmingen™, Cat. No. 557747)로 염색하였다. MACS 완충제로 2회 세척한 후, 세포를 200 μ l의 MACS 완충제에 혼탁하고, FACSuite 소프트웨어의 도움으로 FACSVerse™(BD Biosciences)에 의해 분석하였다. CD3- 세포(NK 세포) 내의 CD16+ CD56+ 세포의 비율을 FlowJo 소프트웨어(버

전 7. 6. 5, FlowJo)에 의해 결정하였다. 모든 염색 과정은 제조자의 지시에 따라 수행하였다.

[0805] 7.4.7 샘플 내의 Kyn 및 Trp의 정량

[0806] 7.4.7.1 샘플의 전처리

[0807] 50 μl 의 조건화 배지(섹션 7.4.4) 및 60 μl 의 빙냉 IS/TFA 용액(5/1, v/v)를 혼합하고, 혼합물을 원심분리하였다(5000xg, 실온, 10분). 60 μl 의 상청액 및 50 μl 의 0.05 vol% 포름산/메탄올 = 75/25(v/v)를 혼합하고, 생성된 혼합물을 액체 크로마토그래피 텐덤 질량 분석(LC/MS/MS) 시스템에 주입하였다.

[0808] 7.4.7.2 보정 표준물질 샘플의 제조

[0809] 보정 표준물질 용액은 Trp 및 Kyn 원액을 물로 회석하여 제조하였다. 보정 표준물질 용액의 농도 범위는 1 내지 500(TRP) 및 0.05 내지 200(Kyn) $\mu\text{mol/L}$ 이었고, 이들을 4°C에서 보관하였다. 블랭크 샘플로서, 물을 보정 표준물질 용액 대신에 사용하였다. 50 μl 의 보정 표준물질 용액 및 블랭크 샘플을 섹션 7.4.7.1에서 설명한 바와 동일한 절차에 의해 전처리하였다.

[0810] 7.4.7.3 LC/MS/MS 분석

[0811] <분석 시스템>

[0812] LC: 애질런트 1200(Agilent Technologies)

[0813] 오토샘플러: HTC PAL(CTC Analytics)

[0814] MS/MS: API5000(AB SCIEX)

[0815] 분석 소프트웨어: Analyst 1.6.1(AB SCIEX)

[0816] 컬럼: Atlantis(3 μm , 4.6 mm x 75 mm, Waters)

[0817] 프리-필터: A-103x(0.5 μm Upchurch Scientific)

[0818] 컬럼 온도: 실온

[0819] <LC 조건>

[0820] 이동상 A: 0.05 vol% 포름산

[0821] 이동상 B: 메탄올

[0822] <표 3>

시간 (min)	유속 (mL/min)	A (vol%)	B (vol%)
0	0.6	95	5
0.2	0.6	95	5
3.5	0.6	30	70
3.51	0.6	10	90
5	0.6	10	90
5.01	0.6	95	5
7	0.6	95	5

[0823]

[0824] 주입 부피: 10 μl

[0825] <MS/MS 조건>

[0826] 이온화 방식: 전기분무 이온화, 양성

[0827] 소스 온도: 500°C

[0828] 검출: 다중 반응 모니터링

[0829] 모니터링 이온:

[0830]

<표 4>

	Q1 질량 (m/z)	Q3 질량 (m/z)	디클러스터링 전위 (V)	충돌 에너지 (eV)
Trp	205.1	146.4	140	40
Kyn	209.0	94.2	20	20
IS (<i>d</i> ₅ -Trp)	209.8	150.2	140	30
IS (<i>d</i> ₄ -Kyn)	212.8	98.3	20	20

[0831]

7.5 원 데이터 분석 방법

[0832]

Analyst 소프트웨어(버전 1.6.1, AB SCIEX)를 사용하여 Trp 및 Kyn의 농도를 계산하였다. 보정 곡선은 최소 제곱 선형 회귀법에 의해 보정 표준물질 샘플로부터 얻은 피크 면적 비(분석물/IS)로부터 작성되었다 [$Y = aX + b$; Y , 피크 면적 비; X , 농도; a , 기울기; b ,截距; $1/Y^2$]. 블랭크 샘플은 회귀 분석에 포함되지 않았다.

[0833]

샘플 내의 Kyn 및 Trp 농도를 개별적으로 계산하였다. 정량 하한 미만의 값은 0 $\mu\text{mol/L}$ 로 간주하였다.

[0834]

모 KATO-III 세포 및 IDO1 shRNA, 벡터 또는 NegaCTRL shRNA를 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포 사이의 IDO1의 전사 수준의 상대적인 변화를 비교 Ct 방법(2^{-ddCt})을 이용하여 측정하였다 [Methods. 2001;25(4):402-8]

[0835]

세포독성의 백분율은 하기 수학식에 따라 계산되었다.

[0836]

<수학식 2>

[0837]

세포독성 % = $(E-S)/(M-S) \times 100$

[0838]

여기서, E 는 실험적으로 방출된 방사능(cpm)이고, S 는 이펙터 세포 및 항체 대신에 검정 배지를 첨가함으로써 자연 방출된 방사능(cpm)의 평균이고, M 은 이펙터 세포 및 항체 대신에 10 vol%의 TritonTM X-100(Sigma-Aldrich, Cat. No. T9284-100ML)을 첨가함으로써 방출된 최대 방사능(cpm)의 평균이다. 항체의 각각의 농도에서의 세포독성은 3회 실험의 평균으로 나타내었다.

[0839]

8 결과

[0840]

8.1 KATO-III 세포에서 IDO1 낙다운의 확인

[0841]

IDO1 shRNA를 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포에서 IDO1 mRNA의 낙다운을 확인하기 위해, IFN- γ 로 처리된 KATO-III 세포 내의 IDO1 mRNA 수준을 qPCR 분석에 의해 검출하였다. IDO1 shRNA가 도입된 세포에서, IDO1의 mRNA 발현은 모 KATO-III 세포와 비교하여 4개의 상이한 shRNA 도입 세포 모두에서 약 80%로 감소하였다(도 10a). IDO1 mRNA 수준은 벡터 또는 NegaCTRL shRNA의 도입에 영향을 받지 않았다(도 10a). 다음으로, IDO1 단백질 수준에 대한 shRNA 침묵화(silencing)의 효과를 웨스턴 블로트 분석에 의해 측정하였다. IDO1 단백질 발현은 모 KATO-III 세포와 비교하여 IDO1 shRNA #44, #45 및 #46을 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포에서 현저하게 감소하였다(도 10b). IDO1 shRNA #47을 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포에서의 IDO1 단백질 발현은 부분적으로 감소되었다(도 10b). IDO1 단백질 수준은 벡터 또는 NegaCTRL shRNA의 도입에 영향을 받지 않았다(도 10b).

[0842]

후속 실험에서, 본 발명자들은 IDO1 shRNA #44, #45 및 #46, 및 NegaCTRL shRNA를 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포를 사용하여 ADCC에 대한 IDO1 활성의 효과를 조사하였다.

[0843]

8.2 KATO-III 세포에서의 IDO1 낙다운의 Kyn 생산 및 Trp 소비에 대한 효과

[0844]

KATO-III 세포에서의 IDO1 낙다운의 Kyn 생산 및 Trp 소비에 대한 효과를 조사하기 위해, IFN- γ 의 부재 또는 존재 하에서 모 KATO-III 세포 또는 IDO1 shRNA 또는 NegaCTRL shRNA를 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포의 조건화 배지 내의 Kyn 및 Trp의 농도를 측정하였다.

[0845]

도 11에 도시된 바와 같이, Kyn 농도의 증가 및 TRP 농도의 감소는 IFN- γ 의 부재 하에 모 KATO-III 세포 또는 NegaCTRL shRNA를 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포에서 관찰되지 않았다. 모 KATO-III 세포 또는 NegaCTRL shRNA를 안정적으로 발현하는 KATO-III 세포를 IFN- γ 로 처리하면, Kyn 농도의 증가 및 Trp 농도의 감소가 관찰되었다. 다른 한편으로, Kyn 농도의 증가 및 Trp 농도의 감소는 IFN- γ 의 존재 하에서도 3개의 상이한 IDO1 shRNA 도입 세포 모두에서 억제되었다.

[0846]

8.3 NK 세포의 검출

- [0848] 각각의 조건화 배지를 사용한 인간 PBMC의 인큐베이팅 후, NK 세포(CD3-/CD16+ /CD56+ 세포)의 존재가 확인되었다. 도 12에 도시된 바와 같이, NK 세포는 모든 조건화 배지를 사용하여 인큐베이팅된 PBMC에서 검출되었다.
- [0849] 8.4 ADCC에 대한 IDO1 활성의 효과
- [0850] ADCC에 대한 IDO1 활성의 효과를 조사하기 위해, 각각의 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅된 인간 PBMC에 의한 ADCC 활성을 측정하였다. 인간 PBMC를 조건화 배지 3[KATO-III 세포(모) + IFN- γ] 또는 4[KATO-III 세포(NegaCTRL shRNA) + IFN- γ]에서 예비 인큐베이팅한 경우, 모가물리주맙의 ADCC는 조건화 배지 1[KATO-III 세포(모)] 또는 2[KATO-III 세포(NegaCTRL shRNA)]에 비해 약화되었다(도 13). 조건화 배지 5[KATO-III 세포(IDO1 shRNA #44) + IFN- γ], 6[KATO-III 세포(IDO1 shRNA #45) + IFN- γ] 또는 7[KATO-III 세포(IDO1 shRNA #46) + IFN- γ] 내의 인간 PBMC의 경우, ADCC는 약화되지 않았고, 이것은 조건화 배지 1 또는 2와 비교하여 거의 동일한 ADCC를 나타내었다(도 13).
- [0851] 9 논의
- [0852] 이 연구는 ADCC가 IDO1 활성에 의해 감소됨을 입증하였다. 이전 연구에서, Kyn과 같은 Trp 대사산물이 NK 세포 수를 감소시킨다고 제안되었다[Exp Med. 2002; 196(4):447-57]. 그러나, 본 연구에서, Kyn 농도의 증가를 유도하는 IFN- γ 로 처리된 KATO-III 세포의 조건화 배지에서 인큐베이팅된 PBMC에서 NK 세포의 비율은 현저히 감소하지 않았다(도 12). 이것은 IDO1 활성에 의한 ADCC의 감소가 NK 세포수의 감소가 아니라 NK 세포 기능의 억제로 인한 것임을 시사하였다. IFN- γ 존재 하에 IDO1 shRNA 발현 KATO-III 세포의 조건화 배지에서 Kyn 농도의 증가 및 Trp 농도의 감소가 억제되었고, 이것은 Kyn 생산 또는 Trp 소비가 NK 세포 기능을 감소시키는 원인일 수 있음을 시사하였다.
- [0853] 시험예 3
- [0854] 요약
- [0855] 본 연구에서, 본 발명자들은 난소암 세포에 대한 항-플레이트 수용체 알파(인간 폴레이트 수용체 1, FOLR1) 항체인 Hura15-7CTAcc(항체 C1)의 존재 또는 부재 하에서 인간 말초 혈액 단핵세포(PBMC)의 세포독성에 대한 IDO1 억제제의 효과를 조사하였다. 먼저, 본 발명자들은 4가지 유형의 난소암 세포에서 IDO1 발현을 웨스턴 블로트에 의해 조사하였다. 그 결과, IDO1 발현은 IFN γ 처리 후에 SKOV3, OVCAR3 및 MCAS 세포에서 관찰되었지만, 동일한 조건에서 OVISE 세포에서는 관찰되지 않았다(도 14). SKOV3 세포를 사용하여, 본 발명자들은 조건화 배지를 제조하였다. SKOV3 세포를 IDO1 억제제인 화합물 A1 또는 화합물 B1의 존재 또는 부재 하에 IFN γ 로 자극한 후, 상청액을 PBMC 예비 인큐베이팅을 위한 조건화 배지로서 회수하였다. PBMC를 IDO1 억제제의 존재 하에 제조된 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅할 때, PBMC의 자연 살해 활성 및 항체 C1 매개 세포독성은 상향 조절되었다(도 15 및 도 16).
- [0856] 10 도입
- [0857] FOLR1은 진행 중인 조사에서 암 요법의 유망한 표적으로 생각된다(Ann Oncol. 2015 Jun 30). 본 발명자들은 종래의 항-FOLR1 항체와 비교하여 더 강력한 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 및 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 갖는 새로운 항-FOLR1 항체로서 HuRA15-7CTAcc(항체 C1)를 만들었다.
- [0858] 난소암에서 인돌아민 2,3-디옥시게나제 1(IDO1)의 높은 발현은 이전에 보고되었고, 난소암 환자의 불량한 예후 인자 중 하나로 알려졌다(Gynecologic Oncology 2009; 115:185-192). IDO1은 숙주 면역 감시로부터 종양의 회피를 책임지는 면역억제 메커니즘에서 중요한 조절 역할을 수행한다(Nat Rev Cancer. 2009; 9:445-52). 키누레닌과 같은 트립토판 대사산물이 NK 세포 사멸을 유도하고(J Exp Med. 2002; 196:447-57), NK 세포 수용체의 발현을 억제하여 NK 세포 매개 세포독성을 약화하는 것으로 보고되었다(Blood. 2006; 108:4118-25). 따라서, IDO1 활성은 ADCC 활성에 영향을 미칠 가능성이 있다.
- [0859] 실제로, 본 발명자들은 트라스투주맙, 리툭시맙, 세툭시맙 및 모가물리주맙에 의해 유도된 인간 말초 혈액 단핵세포(PBMC)의 세포독성이 도 3 내지 도 8에서 KATO-III 세포의 IDO1 활성에 의해 감소되었음을 입증하였다.
- [0860] 따라서, 본 연구에서 본 발명자들은 항-FOLR1 항체인 항체 C1의 존재 또는 부재 하에서 난소암 세포에 대한 인간의 PBMC의 세포독성에 대한 화합물 A1 및 화합물 B1의 효과를 조사하였다.
- [0861] 11 물질 및 방법

- [0862] 11.1 물질
- [0863] 11.1.1 항-FOLR1 항체
- [0864] 항체 C1(HuRA15-7CTAcc)은 WO2014/087863의 실시예에 기재된 "HuRA15-7CTAcc 항체"로서 수득되었다. 항체 C1은 AccretaMab(R) 기술로 제조된 항-FOLR1 인간화 및 CDR 변형 항체이다.
- [0865] 11.1.2 IDO1 억제제
- [0866] 화합물 A1 및 화합물 B1은 IDO1 억제제이다. 화합물 A1은 WO2011/142316의 실시예 62의 화합물 64A로서 수득하고, 화합물 B1은 WO2010/005958의 실시예 1의 "4-({2-[아미노슬포닐]아미노}에틸}아미노)-N-(3-브로모-4-플루오로페닐)-N'-히드록시-1,2,5-옥사디아졸-3-카르복스이미드아미드}로서 수득하였다.
- [0867] 화합물 A1 및 B1을 원액으로서 디메틸 슬록시드(DMSO)에 10 nmol/L의 농도로 용해시켰다. 이 용액은 사용할 때까지 동결된 상태로 유지하였다. 상기 원액을 검정을 위해 농도를 조정하기 위해 배양 배지[10 vol% 열 불활성화된 소 태아 혈청(FCS, GIBCO) 및 페니실린-스트렙토마이신(GIBCO)을 함유하는 RPMI1640(GIBCO)]로 희석하였다.
- [0868] 11.1.3 인간 PBMC
- [0869] 동결된 인간 PBMC는 프리시젼 바이오서비스(로트 2500113169)로부터 구입하였다. 해동 후, PBMC를 1 mg/mL DNase(Roche)를 함유하는 배양 배지로 세척하고, 검정에 사용하였다.
- [0870] 11.1.4 세포 및 배지
- [0871] JCRB로부터 난소암 세포인 OVISE(JCRB1043) 및 MCAS(JCRB0240)를 얻었고, ATCC로부터 난소암 세포인 SKOV3(HTB-77) 및 OVCAR3(HTB-161)을 얻었다. 이들 세포를 배양 배지를 사용하여 배양하였다.
- [0872] 11.2 방법
- [0873] 11.2.1 웨스턴 블로트
- [0874] 난소암 세포(OVISE, SKOV3, OVCAR3 또는 MCAS)를 IFN γ (R&D systems)가 포함된 배양 배지(50 또는 100 ng/mL) 또는 포함하지 않는 배양 배지에 의해 4일 동안 배양하였다. 이어서, 이들 세포를 SDS 샘플 완충제(Thermo)에 의해 용해시키고, 끓였다(100°C, 5분). 각각의 샘플의 IDO1 또는 β -액틴 단백질 발현은 각각 항-IDO1 항체(클론 10.1, Millipore), 이어서 항-마우스 항체-양고추냉이 퍼옥시다제(HRP, Zymed) 또는 항- β -액틴 항체(토끼 폴리클로날, abcam), 이어서 항-토끼 항체-HRP(DAKO)를 사용하여 웨스턴 블로트 방법에 의해 검출하였다.
- [0875] 11.2.2 조건화 배지의 제조
- [0876] SKOV3 세포(1.0×10^6 세포)를 3일 동안 100 nmol/L IDO1 억제제(화합물 A1 또는 화합물 B1) 또는 DMSO와 함께 50 ng/mL IFN γ (PeproTech)를 포함하는 25 mL의 배양 배지에서 배양하였다. 각각의 배양액의 상청액을 PBMC의 예비 인큐베이팅을 위한 조건화 배지로서 사용하였다.
- [0877] 조건화 배지의 목록은 아래에서 설명된다.
- 조건화 배지 DMSO: 50 ng/mL IFN γ 및 0.1 vol% DMSO로 배양된 SKOV3 세포,
 - 조건화 배지 화합물 A1: 50 ng/mL IFN γ 및 100 nmol/L 화합물 A1로 배양된 SKOV3 세포,
 - 조건화 배지 화합물 B1: 50 ng/mL IFN γ 및 100 nmol/L 화합물 B1로 배양된 SKOV3 세포.
- [0881] 11.2.3 세포독성 검정
- [0882] 11.2.3.1 표적 세포의 제조
- [0883] SKOV3 세포를 TrypLE Express(GIBCO)에 의해 배양 플라스크로부터 분리하였다. 살아있는 세포를 ADCC 검정 배지[10 vol%의 투석되고 열 불활성화된 FCS(GIBCO)를 함유하고 페놀 레드(GIBCO)가 없는 RPMI1640]에 의해 1.0×10^6 세포로 조정하였다. 이어서, 세포를 CO_2 인큐베이터 내에서 37°C에서 1시간 초과의 시간 동안 약 3.7 MBq의 $^{51}CrO_4$ (PerkinElmer)로 표지하였다. 세포를 3회 세척하고, ADCC 검정 배지를 사용하여 표적 세포로서 2.0×10^5 세포/mL(1×10^4 세포/50 μ L)로 조정하였다.

[0884] 11.2.3.2. 이펙터 세포의 제조

[0885] 인간 PBMC를 25 mL의 조건화 배지에서 7일 동안 배양하였다. 2.8 또는 2.4×10^7 세포를 각각 조건화 배지 화합물 A1 또는 조건화 배지 화합물 B1에서 예비 인큐베이팅하였다. ADCC 검정 배지로 세척한 후, 세포를 ADCC 검정 배지를 사용하여 이펙터 세포로서 5.0×10^6 세포/mL(2.5×10^5 세포/50 μl)로 조정하였다.

[0886] 11.2.3.3 항체 용액의 제조

[0887] 항체 C1 용액을 ADCC 검정 배지를 사용하여 제조하고, ADCC 검정에서 0.033, 0.33, 3.3, 33 및 333 ng/mL의 최종 농도로 사용하였다.

[0888] 11.2.3.4 세포독성 검정

[0889] 세포독성은 각각의 검정 웰의 상청액에서 방사능을 측정하여 정량하였다. 각각의 웰의 총 부피는 U 바닥 96웰 플레이트에서 150 μl 이었다.

[0890] 총(Total), T spo, M, 또는 검정 샘플은 다음과 같이 정의되고 제조되었다.

[0891] 총: 표적 세포 총 방사능 대조군. 이 샘플은 50 μl 의 표적 세포, 15 μl 의 세제(10x 용해 용액, Promega) 및 85 μl 의 ADCC 검정 배지를 혼합하여 제조하였다.

[0892] -T spo: 표적 세포 자연 방사능 대조군. 이 샘플은 50 μl 의 표적 세포와 100 μl 의 ADCC 검정 배지를 혼합하여 제조하였다.

[0893] -M: ADCC 검정 배지에 대한 참조 대조군. 이 샘플은 150 μl 의 ADCC 검정 배지로서 제조되었다.

[0894] - 검정 샘플: 이 샘플은 50 μl 의 표적 세포, 이펙터 세포 및 항체 용액을 혼합하여 제조하였다.

[0895] 각각의 샘플은 3중으로 제조하였다. 샘플 플레이트는 CO_2 인큐베이터에서 4시간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트의 원심분리 후, 50 μl 의 각각의 상청액을 LumaPlate(PerkinElmer)에 옮기고 충분히 건조하였다. 방사능(cpm)을 마이크로플레이트 섬광 계수기(TopCount NXT, PerkinElmer)로 계수하였다.

[0896] 세포독성(%)은 각각의 웰의 cpm을 사용하여 하기 수학식에 의해 계산하였다. 우선, 각각의 웰의 cpm 보정 값을 하기 수학식에 의해 계산하였다.

[0897] <수학식 3>

[0898] 각각의 웰의 cpm 보정 값 = 각각의 웰의 cpm - M의 평균 cpm

[0899] 이어서, 각각의 검정 샘플의 세포독성을 하기 수학식에 의해 계산하였다.

[0900] <수학식 4>

[0901] 세포독성(%) = $100 \times [(검정 샘플의 cpm 보정 값) - (T spo의 평균 cpm 보정 값)] / [(총의 평균 cpm 보정 값) - (T spo의 평균 cpm 보정 값)]$

[0902] 각각의 검정 샘플의 세포독성은 3회 실험의 평균 + 표준 편차(SD)로 제시되었다.

[0903] 12 결과 및 논의

[0904] 12.1 난소암 세포에서 ID01의 발현

[0905] 본 발명자들은 4가지 유형의 난소암 세포(OVISE, SKOV3, OVCAR3 및 MCAS 세포)를 사용하여 IFN γ 자극에 의해 난소암 세포에서 ID01이 유도되는지의 여부를 평가하였다. 도 14에 도시된 바와 같이, 50 또는 100 ng/mL의 IFN γ 로 자극된 SKOV3, OVCAR3 및 MCAS 세포에서 ID01이 검출되었다. 이와 대조적으로, ID01의 발현은 IFN γ 로 자극된 OVISE 세포에서 관찰되지 않았다. 모든 시험된 난소암 세포는 IFN γ 자극이 없으면 ID01을 발현하지 않았다.

[0906] 12.2 SKOV3 세포에 대한 PBMC의 세포독성에 대한 화합물 A1 또는 화합물 B1의 효과

[0907] PBMC의 세포독성에 대한 ID01 억제제 활성의 효과를 평가하기 위해, PBMC를 9.2.2("조건화 배지의 제조")에서 설명된 바와 같이 제조된 SKOV3 세포의 조건화 배지에서 7일 동안 예비 인큐베이팅하였다. 이어서, 이들 예비 인큐베이팅된 PBMC의 방사성 표지된 SKOV3 세포에 대한 세포독성을 다양한 농도의 항체 C1로 평가하였다. 그 결

과, 조건화 배지 화합물 A1 또는 화합물 B1에서 예비 인큐베이팅된 PBMC의 항체 C1(자연 살해 활성) 부재 하의 세포독성은 조건화 배지 DMSO에서의 세포독성보다 더 높았다(도 15a 및 도 16a). 또한, 항체 C1의 존재 하에서, 조건화 배지 화합물 A1 또는 화합물 B1에서 예비 인큐베이팅된 PBMC의 세포독성은 또한 조건화 배지 DMSO에서의 세포독성보다 더 높았다(도 15b 및 도 16b).

[0908] 요약하면, 본 발명자들은 SKOV3 세포를 포함한 여러 난소암 세포가 IFN- γ 자극 후에 ID01을 발현한다는 것을 입증하였다. 또한, PBMC의 자연 살해 활성 및 항체 C1 매개 세포독성은 ID01 억제제인 화합물 A1 또는 화합물 B1에 의해 상향 조절되었다. 종합하면, 항체 C1과 화합물 A1 또는 화합물 B1의 조합은 난소암 세포에 대해 상승적 세포독성 효과를 나타낼 것으로 예상되었다.

[0909] 시험예 4

[0910] 요약

[0911] 본 연구에서, 본 발명자들은 급성 골수성 백혈병(AML) 세포에 대한 항-인간 인터루킨-3 수용체 알파 쇄(IL-3R α) 항체인 항체 D1의 부재 또는 존재 하에서 인간 말초 혈액 단핵세포(PBMC)의 세포독성에 대한 인돌아민-2,3-디옥시게나제(IDO1) 억제제인 화합물 A1의 효과를 조사하였다.

[0912] ID01 발현 세포(KATO-III 세포)를 사용하여, 본 발명자들은 조건화 배지를 제조하였다. KATO-III 세포를 화합물 A1의 존재 또는 부재 하에 IFN- γ 로 자극한 후, 상청액을 PBMC 예비 인큐베이팅을 위한 조건화 배지로서 회수하였다. PBMC를 본 연구에 사용하였다. 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅한 지 7일 후에, AML 세포에 대한 PBMC의 세포독성을 측정하였다. 화합물 A1에 의한 세포독성의 명확한 상향 조절이 관찰되었고; 화합물 A1 함유 조건화 배지에서 인큐베이팅된 PBMC는 항체 D1의 부재 또는 존재 하의 DMSO 함유 배지에서의 세포독성보다 더 높은 세포독성을 유도하였다.

[0913] 13 도입

[0914] 항체 D1은 인간 인터루킨-3 수용체 알파 쇄(IL-3R α)에 대한 비푸코실화된 완전 인간 모노클로날 항체이다. 화합물 A1은 인돌아민-2,3-디옥시게나제(IDO) 1의 소분자 억제제이다.

[0915] 본 연구에서, 본 발명자들은 항체 D1의 존재 또는 부재 하에 급성 골수성 백혈병(AML) 세포에 대한 PBMC의 세포독성에 대한 화합물 A1의 효과를 조사하였다.

[0916] 14 물질 및 방법

[0917] 14.1 물질

[0918] 14.1.1 항체 D1

[0919] 항체 D1(19.59 mg/mL)은 WO2010/126066의 실시예에 기재된 "New102 항체"로서 얻었다.

[0920] 14.1.2 ID01 억제제

[0921] WO2011/142316의 실시예 62의 화합물 64A로서 화합물 A1을 얻었고, 디메틸 술폴시드(DMSO)에 원액으로서 10 mmol/L의 농도로 용해시켰다. 용액을 사용할 때까지 동결된 상태로 유지하였다. 상기 원액을 검정을 위해 농도를 조정하기 위해 배양 배지[10 vol% 열 불활성화된 소 태아 혈청 및 1 vol%의 페니실린-스트렙토마이신 용액을 함유하는 RPMI1640]로 희석하였다.

[0922] 14.1.3 인간 PBMC

[0923] 동결된 PBMC는 프리시젼 바이오서비스(로트# 13096) 및 올셀즈(로트# A3951)로부터 구입하였다. 해동 후, PBMC를 배양 배지로 세척하고, 검정에 사용하였다.

[0924] 14.1.4 세포 및 배지

[0925] 인간 위암 세포인 KATO-III(86093004)은 디에스 파마 바이오메디칼 코. 엘티디.로부터 얻었고, 인간 AML 세포인 KG-1(CRL-8031)은 ATCC로부터 얻었다. 세포를 배양 배지를 사용하여 배양하였다.

[0926] 14.2 방법

[0927] 14.2.1 조건화 배지의 제조

[0928] KATO-III 세포(1.25×10^6 세포)를 3일 동안 50 ng/mL IFN- γ (PeproTech) 및 100 nmol/L 화합물 A1 또는 DMSO를

포함하는 25 mL의 배양 배지(10 vol% FBS를 함유하는 RPMI1640 배지)에서 배양하였다. 각각의 배양액의 상청액을 PBMC의 예비 인큐베이팅을 위한 조건화 배지로서 사용하였다.

[0929] 조건화 배지는 다음과 같다.

- 조건화 배지 DMSO: 50 ng/mL IFN- γ 및 0.1 vol% DMSO로 배양된 KATO-III 세포,

- 조건화 배지 화합물 A1: 50 ng/mL IFN- γ 및 100 nmol/L 화합물 A1로 배양된 KATO-III 세포.

[0932] 14.2.2 세포독성 검정

[0933] 14.2.2.1 표적 세포의 제조

[0934] KG-1 세포(1×10^6 세포)를 CO_2 인큐베이터 내에서 37°C에서 1시간 동안 약 3.7 MBq의 $Na_2^{51}CrO_4$ (PerkinElmer)로 표지하였다. 세포를 2회 세척하고, ADCC 검정 배지를 사용하여 표적 세포로서 1.0×10^5 세포/mL(0.5×10^4 세포/ $50 \mu\ell$)로 조정하였다.

[0935] 14.2.2.2. 이펙터 세포의 제조

[0936] 2 로트의 PBMC를 5×10^5 세포/mL로 7일 동안 조건화 배지에서 배양하였다. 검정 배지로 세척한 후, 세포를 검정 배지를 사용하여 이펙터 세포로서 2.5×10^6 세포/mL(12.5×10^4 세포/ $50 \mu\ell$)로 조정하였다.

[0937] 14.2.2.3 항체 용액의 제조

[0938] 항체 D1 용액을 검정 배지로 0, 0.3, 3 또는 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 희석하였다.

[0939] 14.2.2.4 세포독성 검정

[0940] 세포독성 검정을 위해 PBMC를 사용하였다. 세포독성은 각각의 검정 웰의 상청액에서 방사능을 측정하여 정량하였다. 각각의 웰의 총 부피는 V 바닥 96웰 플레이트에서 $150 \mu\ell$ 이었다.

[0941] 총, T spo, M, 또는 검정 샘플은 다음과 같이 정의되고 제조되었다.

[0942] 총: 표적 세포 총 방사능 대조군. 이 샘플은 $50 \mu\ell$ 의 표적 세포와 $100 \mu\ell$ 의 1 vol% NP-40(검정 배지로 희석된)을 혼합하여 제조하였다.

[0943] -T spo: 표적 세포 자연 방사능 대조군. 이 샘플은 $50 \mu\ell$ 의 표적 세포와 $100 \mu\ell$ 의 검정 배지를 혼합하여 제조하였다.

[0944] - 검정 샘플: 이 샘플은 $50 \mu\ell$ 의 표적 세포, 이펙터 세포 및 항체 용액을 혼합하여 제조하였다.

[0945] 검정 샘플 내의 항체 D1의 최종 농도는 0, 0.1, 1 및 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다.

[0946] 각각의 샘플은 3중으로 제조하였다. 짧은 원심분리 후에, 샘플 플레이트는 CO_2 인큐베이터에서 4시간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트의 원심분리 후, $50 \mu\ell$ 의 각각의 상청액을 LumaPlate(PerkinElmer)에 옮기고 충분히 건조하였다. 방사능(cpm)을 마이크로플레이트 섬광 계수기(TopCount NXT, PerkinElmer)로 계수하였다.

[0947] 세포독성(%)은 하기 수학식에 의해 계산하였다.

[0948] <수학식 5>

[0949] 세포독성(%) = $100 \times [\text{검정 샘플의 cpm} - \text{T spo의 평균 cpm}] / [\text{총의 평균 cpm} - \text{T spo의 평균 cpm}]$

[0950] 각각의 검정 샘플의 세포독성은 3회 실험의 평균 \pm 표준 편차(SD)로 제시되었다.

[0951] 15 결과 및 논의

[0952] PBMC의 세포독성에 대한 화합물 A1의 효과를 평가하기 위해, PBMC(로트# A3951)를 9.2.2에서 설명된 바와 같이 제조된 KATO-III 세포의 조건화 배지에서 7일 동안 예비 인큐베이팅하였다. 인큐베이팅 후, 방사성 표지된 KG-1 세포에 대한 예비 인큐베이팅된 PBMC의 세포독성을 다양한 농도의 항체 D1의 부재 또는 존재 하에서 평가하였다.

[0953] 화합물 A1에 의한 세포독성의 명확한 상향 조절이 관찰되었고; 화합물 A1 함유 조건화 배지에서 인큐베이팅된

PBMC는 항체 D1의 부재 또는 존재 하의 DMSO 함유 배지에서의 세포독성보다 더 높은 세포독성을 유도하였다(도 17).

[0954] 시험예 5

[0955] 16 요약

본 연구에서, 본 발명자들은 TIM-3 감염된 급성 골수성 백혈병(AML) 세포에 대한 항-인간 T 세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인 3(TIM-3) 항체인 항체 E1의 부재 또는 존재 하에서 인돌아민-2,3-디옥시게나제(IDO1) 억제제인 화합물 A1의 인간 말초 혈액 단핵세포(PBMC)의 세포독성에 대한 효과를 조사하였다.

[0957] IDO1 발현 세포(KATO-III 세포)를 사용하여, 본 발명자들은 조건화 배지를 제조하였다. 화합물 A1의 존재 또는 부재 하에 KATO-III 세포를 IFN- γ 로 자극한 후, 상청액을 PBMC 예비 인큐베이팅을 위한 조건화 배지로서 회수하였다. 조건화 배지에서 예비 인큐베이팅한 지 7일 후에, TIM-3으로 형질감염된 AML 세포에 대한 PBMC의 세포독성을 측정하였다. 화합물 A1에 의한 세포독성의 명확한 상향 조절이 관찰되었고; 화합물 A1 함유 조건화 배지에서 인큐베이팅된 PBMC는 항체 E1의 부재 또는 존재 하의 DMSO 함유 배지에서의 세포독성보다 더 높은 세포독성을 유도하였다.

[0958] 17 도입

항체 E1은 인간 T 세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인 3(TIM-3)에 대한 비푸코실화된 완전 인간 모노클로날 항체이다. 화합물 A1은 인돌아민-2,3-디옥시게나제(IDO) 1의 소분자 억제제이다.

[0960] 본 연구에서, 본 발명자들은 항체 E1의 존재 또는 부재 하에 TIM-3으로 형질감염된 급성 골수성 백혈병(AML) 세포에 대한 PBMC의 세포독성에 대한 화합물 A1의 효과를 조사하였다.

[0961] 18 물질 및 방법

[0962] 18.1 물질

[0963] 18.1.1 항체 E1

[0964] 항체 E1(82.31 mg/mL)은 WO2011/155607의 실시예에 기재된 "4545 항체"로서 수득되었다.

[0965] 18.1.2 IDO1 억제제

[0966] WO2011/142316의 실시예 62의 화합물 64A로서 화합물 A1을 얻고, 디메틸 술록시드(DMSO)에 원액으로서 10 mmol/L의 농도로 용해시켰다. 용액을 사용할 때까지 동결된 상태로 유지하였다. 상기 원액을 검정을 위해 농도를 조정하기 위해 배양 배지[10 vol% 열 불활성화된 소 태아 혈청 및 1 vol%의 페니실린-스트렙토마이신 용액을 함유하는 RPMI1640]로 희석하였다.

[0967] 18.1.3 인간 PBMC

[0968] 동결된 PBMC는 프리시젼 바이오서비스(로트# 13096)로부터 구입하였다. 해동 후, PBMC를 배양 배지로 세척하고, 검정에 사용하였다.

[0969] 18.1.4 세포 및 배지

[0970] 인간 위암 세포인 KATO-III(86093004)은 디에스 파마 바이오메디칼 코. 엘티디.로부터 얻었다. EoL-1(RCB0641)은 리켄 바이오 리소스 센터(Riken Bio Resource Center)의 셀 엔지니어링 디비전(Cell Engineering Division)으로부터 얻었다. 인간 TIM-3 유전자를 EoL-1 세포에 형질감염시켜 EoL-1/인간 TIM-3 세포를 얻었다. 세포를 배양 배지와 함께 배양하였다.

[0971] 18.2 방법

[0972] 18.2.1 조건화 배지의 제조

[0973] KATO-III 세포(1.25×10^6 세포)를 3일 동안 50 ng/mL IFN- γ (PeproTech) 및 100 nmol/L 화합물 A1 또는 DMSO를 포함하는 25 mL의 배양 배지(10 vol% FBS를 함유하는 RPMI1640 배지)에서 배양하였다. 각각의 배양액의 상청액을 PBMC의 예비 인큐베이팅을 위한 조건화 배지로서 사용하였다.

[0974] 조건화 배지는 다음과 같다.

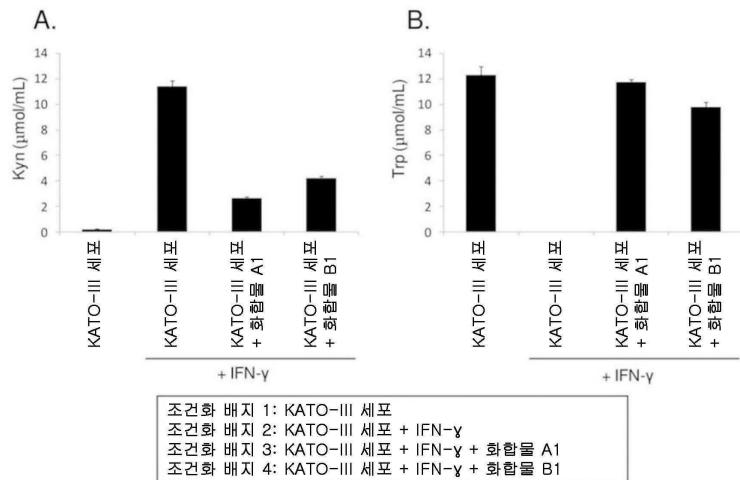
- [0975] - 조건화 배지 DMSO: 50 ng/mL IFN- γ 및 0.1 vol% DMSO로 배양된 KATO-III 세포,
- [0976] - 조건화 배지 화합물 A1: 50 ng/mL IFN- γ 및 100 nmol/L 화합물 A1로 배양된 KATO-III 세포.
- [0977] 18.2.2 세포독성 검정
- [0978] 18.2.2.1 표적 세포의 제조
- [0979] EoL-1/인간 TIM-3 세포(1×10^6 세포)를 CO_2 인큐베이터 내에서 $37^\circ C$ 에서 1시간 동안 약 3.7 MBq의 $Na_2^{51}CrO_4$ (PerkinElmer)로 표지하였다. 세포를 2회 세척하고, 검정 배지를 사용하여 표적 세포로서 1.0×10^5 세포 /mL(0.5×10^4 세포/50 μL)로 조정하였다.
- [0980] 18.2.2.2. 이팩터 세포의 제조
- [0981] 인간 PBMC를 5×10^5 세포/mL로 7일 동안 조건화 배지에서 배양하였다. 검정 배지로 세척한 후, 세포를 검정 배지로 사용하여 이팩터 세포로서 2.5×10^6 세포/mL(12.5×10^4 세포/50 μL)로 조정하였다.
- [0982] 18.2.2.3 항체 용액의 제조
- [0983] 항체 E1 용액을 검정 배지로 0, 0.3, 3 또는 $30 \mu g/mL$ 의 농도로 희석하였다.
- [0984] 18.2.2.4 세포독성 검정
- [0985] 세포독성은 각각의 검정 웰의 상청액에서 방사능을 측정하여 정량하였다. 각각의 웰의 총 부피는 V 바닥 96웰 플레이트에서 $150 \mu L$ 이었다.
- [0986] 총, T spo, M, 또는 검정 샘플은 다음과 같이 정의되고 제조되었다.
- [0987] 총: 표적 세포 총 방사능 대조군. 이 샘플은 $50 \mu L$ 의 표적 세포와 $100 \mu L$ 의 1 vol% NP-40(검정 배지로 희석된)을 혼합하여 제조하였다.
- [0988] -T spo: 표적 세포 자연 방사능 대조군. 이 샘플은 $50 \mu L$ 의 표적 세포와 $100 \mu L$ 의 검정 배지를 혼합하여 제조하였다.
- [0989] - 검정 샘플: 이 샘플은 $50 \mu L$ 의 표적 세포, 이팩터 세포 및 항체 용액을 혼합하여 제조하였다.
- [0990] 검정 샘플 내의 항체 E1의 최종 농도는 0, 0.1, 1 및 $10 \mu g/mL$ 이었다.
- [0991] 각각의 샘플은 3중으로 제조하였다. 짧은 원심분리 후에, 샘플 플레이트는 CO_2 인큐베이터에서 4시간 동안 인큐베이팅하였다. 플레이트의 원심분리 후, $50 \mu L$ 의 각각의 상청액을 LumaPlate(PerkinElmer)에 옮기고 충분히 건조하였다. 방사능(cpm)을 마이크로플레이트 섬광 계수기(TopCount NXT, PerkinElmer)로 계수하였다.
- [0992] 세포독성(%)은 하기 수학식에 의해 계산하였다.
- [0993] <수학식 6>
- [0994] 세포독성(%) = $100 \times [\text{검정 샘플의 cpm 값} - \text{T spo의 평균 cpm 값}] / [\text{총의 평균 cpm 값} - \text{T spo의 평균 cpm 값}]$
- [0995] 각각의 검정 샘플의 세포독성은 3회 실험의 평균 \pm 표준 편차(SD)로 제시되었다.
- [0996] 19 결과 및 논의
- [0997] PBMC의 세포독성에 대한 화합물 A1의 효과를 평가하기 위해, PBMC를 9.2.2에서 설명된 바와 같이 제조된 KATO-III 세포의 조건화 배지에서 7일 동안 예비 인큐베이팅하였다. 인큐베이팅 후, 방사성 표지된 EoL-1/인간 TIM-3 세포에 대한 예비 인큐베이팅된 PBMC의 세포독성을 다양한 농도의 항체 E1의 부재 또는 존재 하에서 평가하였다.
- [0998] 화합물 A1에 의한 세포독성의 명확한 상향 조절이 관찰되었고; 화합물 A1 함유 조건화 배지에서 인큐베이팅된 PBMC는 항체 E1의 부재 또는 존재 하의 DMSO 함유 배지에서의 세포독성보다 더 높은 세포독성을 유도하였다(도 18).
- [0999] 서열 목록 프리 텍스트

- [1000] 서열 번호 1: 항체 C1 HCDR1의 아미노산 서열
- [1001] 서열 번호 2: 항체 C1 HCDR2의 아미노산 서열
- [1002] 서열 번호 3: 항체 C1 HCDR3의 아미노산 서열
- [1003] 서열 번호 4: 항체 C1 LCDR1의 아미노산 서열
- [1004] 서열 번호 5: 항체 C1 LCDR2의 아미노산 서열
- [1005] 서열 번호 6: 항체 C1 LCDR3의 아미노산 서열
- [1006] 서열 번호 7: 항체 C1 H쇄의 아미노산 서열
- [1007] 서열 번호 8: 항체 C1 L쇄의 아미노산 서열
- [1008] 서열 번호 9: 항체 D1-1 HCDR1의 아미노산 서열
- [1009] 서열 번호 10: 항체 D1-1 HCDR2의 아미노산 서열
- [1010] 서열 번호 11: 항체 D1-1 HCDR3의 아미노산 서열
- [1011] 서열 번호 12: 항체 D1-2 HCDR1의 아미노산 서열
- [1012] 서열 번호 13: 항체 D1-2 HCDR2의 아미노산 서열
- [1013] 서열 번호 14: 항체 D1-2 HCDR3의 아미노산 서열
- [1014] 서열 번호 15: 항체 D1-3 HCDR1의 아미노산 서열
- [1015] 서열 번호 16: 항체 D1-3 HCDR2의 아미노산 서열
- [1016] 서열 번호 17: 항체 D1-3 HCDR3의 아미노산 서열
- [1017] 서열 번호 18: 항체 D1-4 HCDR1의 아미노산 서열
- [1018] 서열 번호 19: 항체 D1-4 HCDR2의 아미노산 서열
- [1019] 서열 번호 20: 항체 D1-4 HCDR3의 아미노산 서열
- [1020] 서열 번호 21: 항체 D1-5 HCDR1의 아미노산 서열
- [1021] 서열 번호 22: 항체 D1-5 HCDR2의 아미노산 서열
- [1022] 서열 번호 23: 항체 D1-5 HCDR3의 아미노산 서열
- [1023] 서열 번호 24: 항체 D1-1 LCDR1의 아미노산 서열
- [1024] 서열 번호 25: 항체 D1-1 LCDR2의 아미노산 서열
- [1025] 서열 번호 26: 항체 D1-1 LCDR3의 아미노산 서열
- [1026] 서열 번호 27: 항체 D1-2 LCDR1의 아미노산 서열
- [1027] 서열 번호 28: 항체 D1-2 LCDR2의 아미노산 서열
- [1028] 서열 번호 29: 항체 D1-2 LCDR3의 아미노산 서열
- [1029] 서열 번호 30: 항체 D1-3 LCDR1의 아미노산 서열
- [1030] 서열 번호 31: 항체 D1-3 LCDR2의 아미노산 서열
- [1031] 서열 번호 32: 항체 D1-3 LCDR3의 아미노산 서열
- [1032] 서열 번호 33: 항체 D1-4 LCDR1의 아미노산 서열
- [1033] 서열 번호 34: 항체 D1-4 LCDR2의 아미노산 서열
- [1034] 서열 번호 35: 항체 D1-4 LCDR3의 아미노산 서열
- [1035] 서열 번호 36: 항체 D1-5 LCDR1의 아미노산 서열

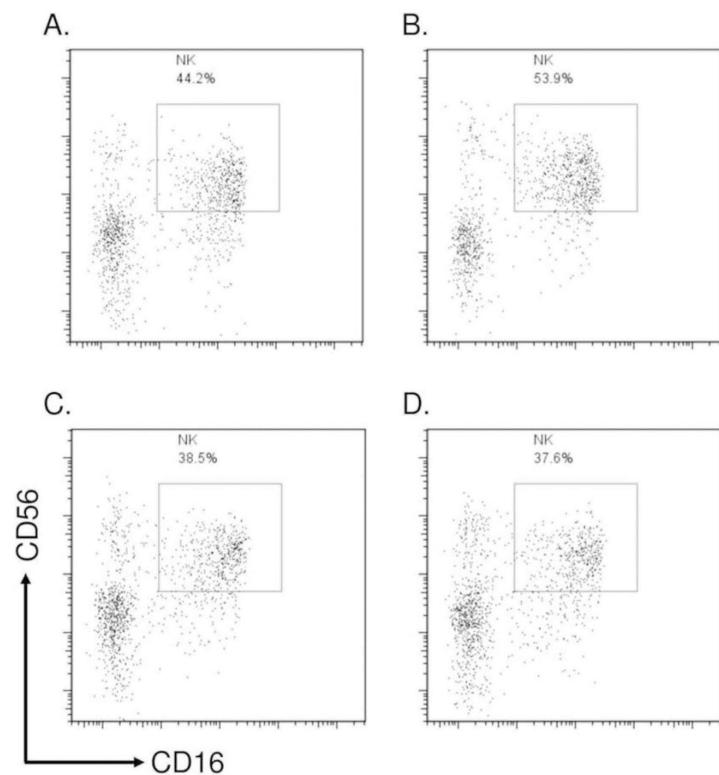
- [1036] 서열 번호 37: 항체 D1-5 LCDR2의 아미노산 서열
- [1037] 서열 번호 38: 항체 D1-5 LCDR3의 아미노산 서열
- [1038] 서열 번호 39: 항체 E1-1 HCDR1의 아미노산 서열
- [1039] 서열 번호 40: 항체 E1-1 HCDR2의 아미노산 서열
- [1040] 서열 번호 41: 항체 E1-1 HCDR3의 아미노산 서열
- [1041] 서열 번호 42: 항체 E1-1 LCDR1의 아미노산 서열
- [1042] 서열 번호 43: 항체 E1-1 LCDR2의 아미노산 서열
- [1043] 서열 번호 44: 항체 E1-1 LCDR3의 아미노산 서열
- [1044] 서열 번호 45: 항체 E1-2 HCDR1의 아미노산 서열
- [1045] 서열 번호 46: 항체 E1-2 HCDR2의 아미노산 서열
- [1046] 서열 번호 47: 항체 E1-2 HCDR3의 아미노산 서열
- [1047] 서열 번호 48: 항체 E1-2 LCDR1의 아미노산 서열
- [1048] 서열 번호 49: 항체 E1-2 LCDR2의 아미노산 서열
- [1049] 서열 번호 50: 항체 E1-2 LCDR3의 아미노산 서열
- [1050] 서열 번호 51: 항체 E1-3 HCDR1의 아미노산 서열
- [1051] 서열 번호 52: 항체 E1-3 HCDR2의 아미노산 서열
- [1052] 서열 번호 53: 항체 E1-3 HCDR3의 아미노산 서열
- [1053] 서열 번호 54: 항체 E1-3 LCDR1의 아미노산 서열
- [1054] 서열 번호 55: 항체 E1-3 LCDR2의 아미노산 서열
- [1055] 서열 번호 56: 항체 E1-3 LCDR3의 아미노산 서열
- [1056] 서열 번호 57: 항체 E1-4 VH의 아미노산 서열
- [1057] 서열 번호 58: 항체 E1-4 VL의 아미노산 서열
- [1058] 서열 번호 59: 항체 E1-5 VH의 아미노산 서열
- [1059] 서열 번호 60: 항체 E1-5 VL의 아미노산 서열

도면

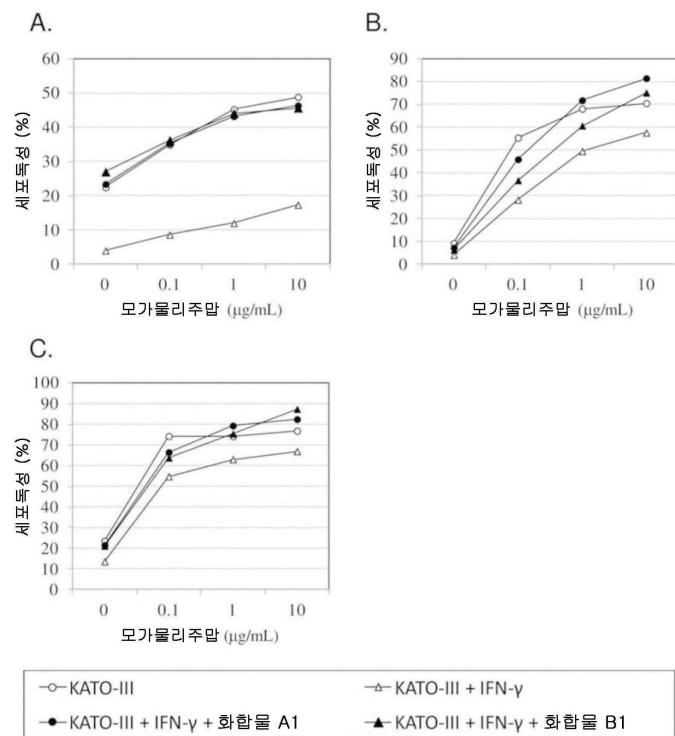
도면1



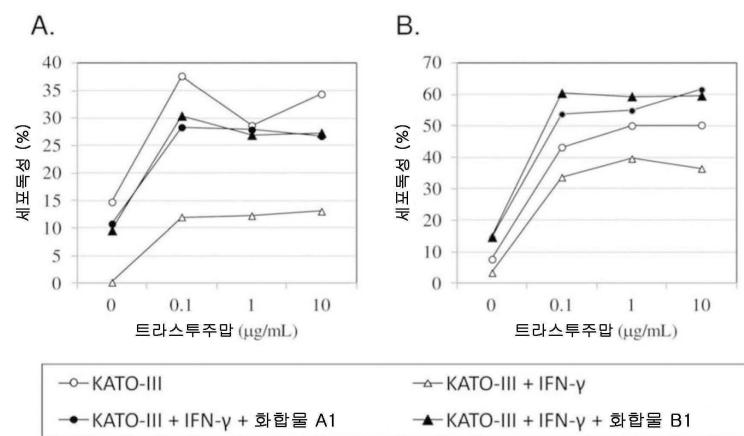
도면2



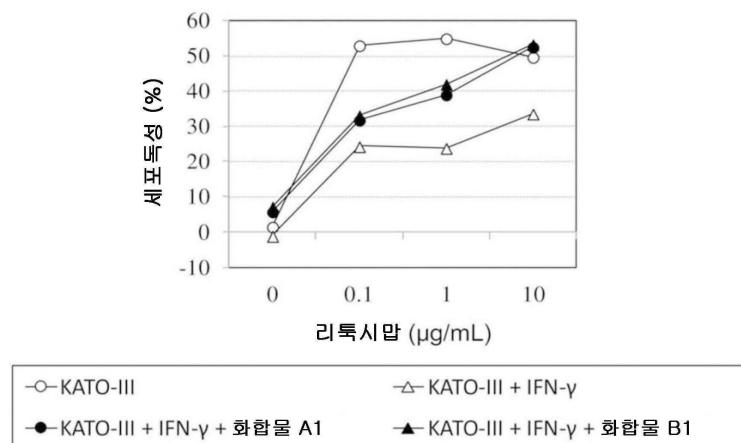
도면3



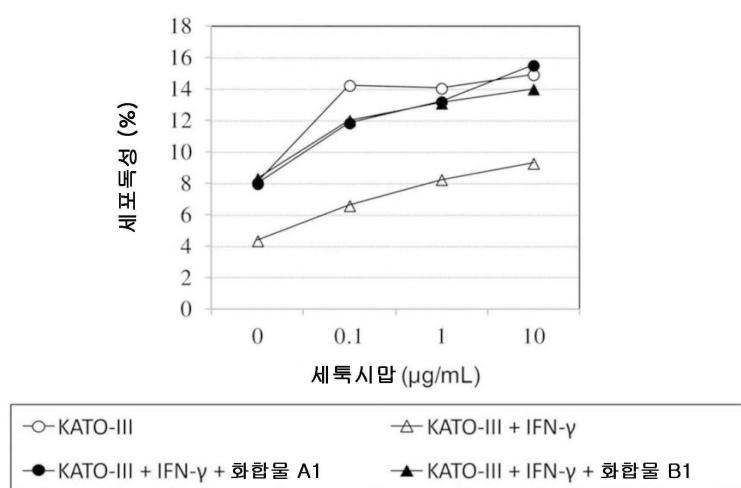
도면4



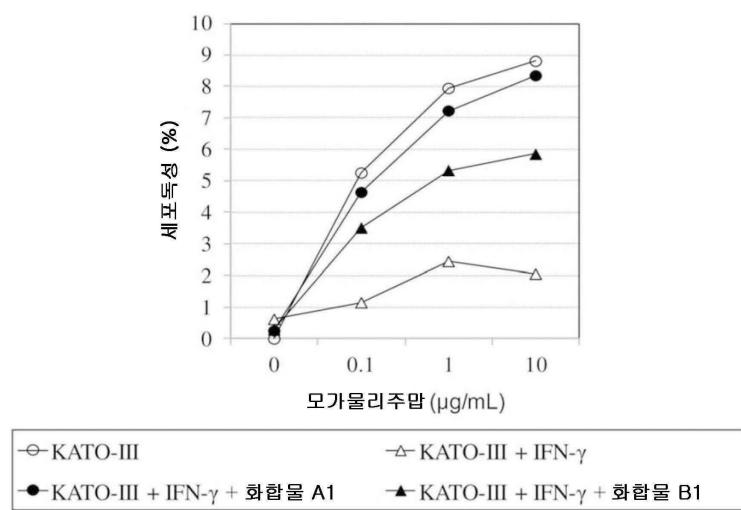
도면5



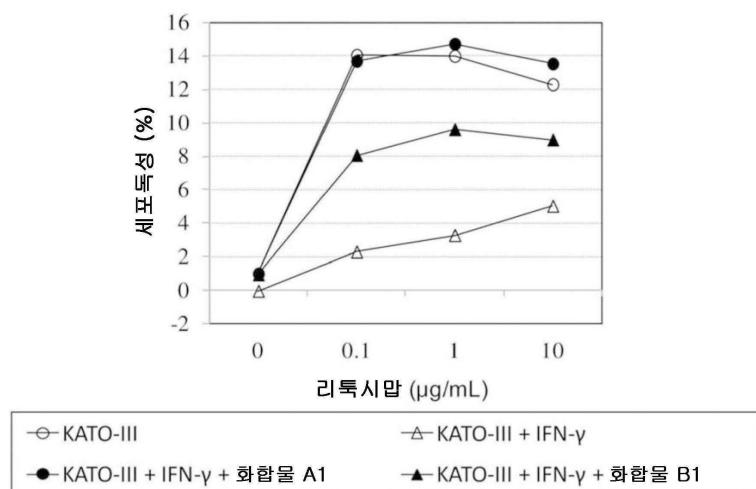
도면6



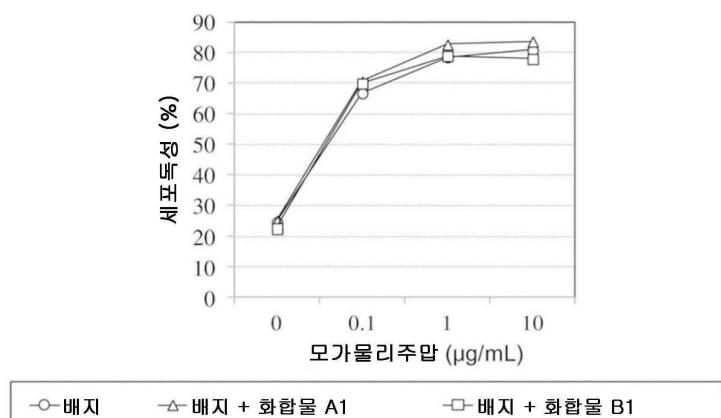
도면7



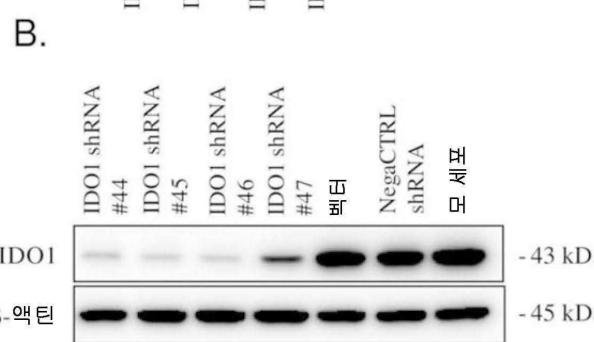
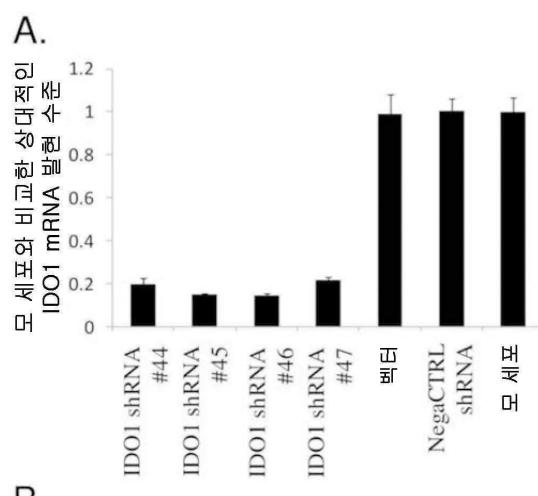
도면8



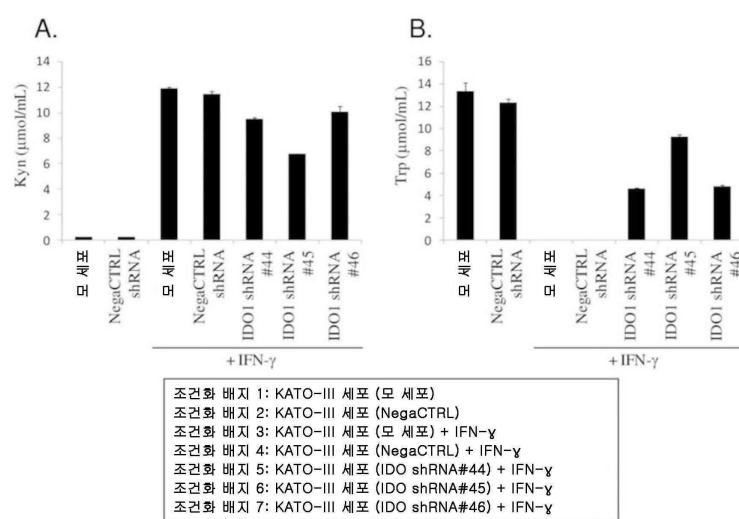
도면9



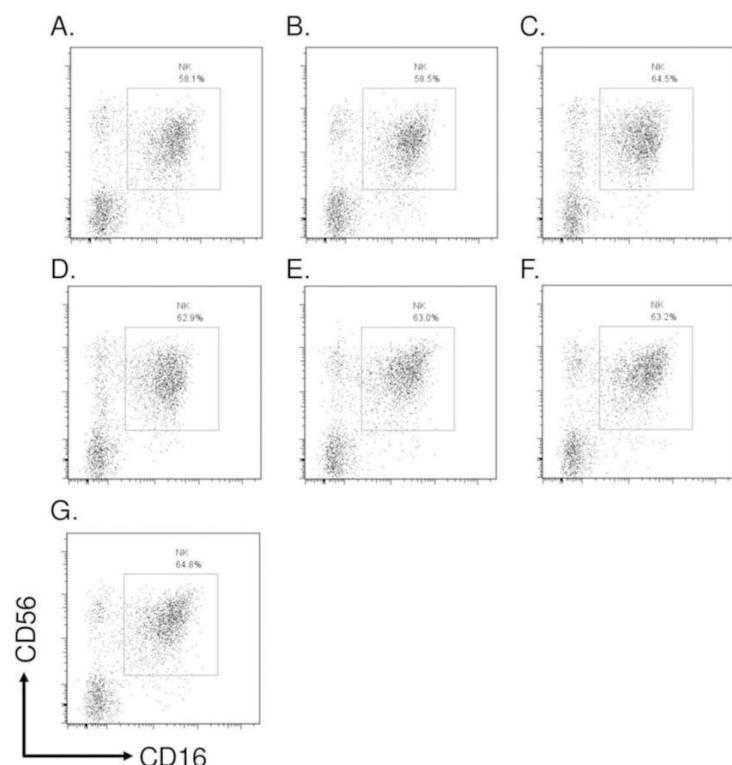
도면 10



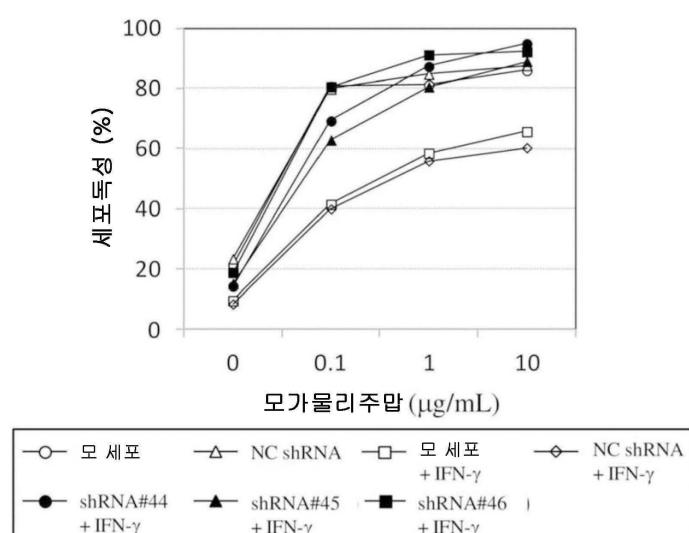
도면 11



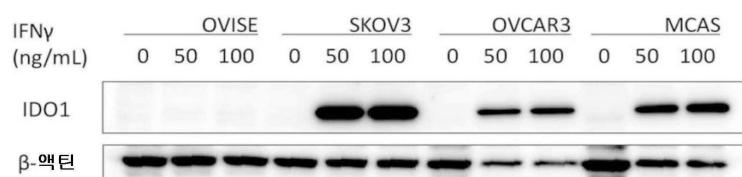
도면12



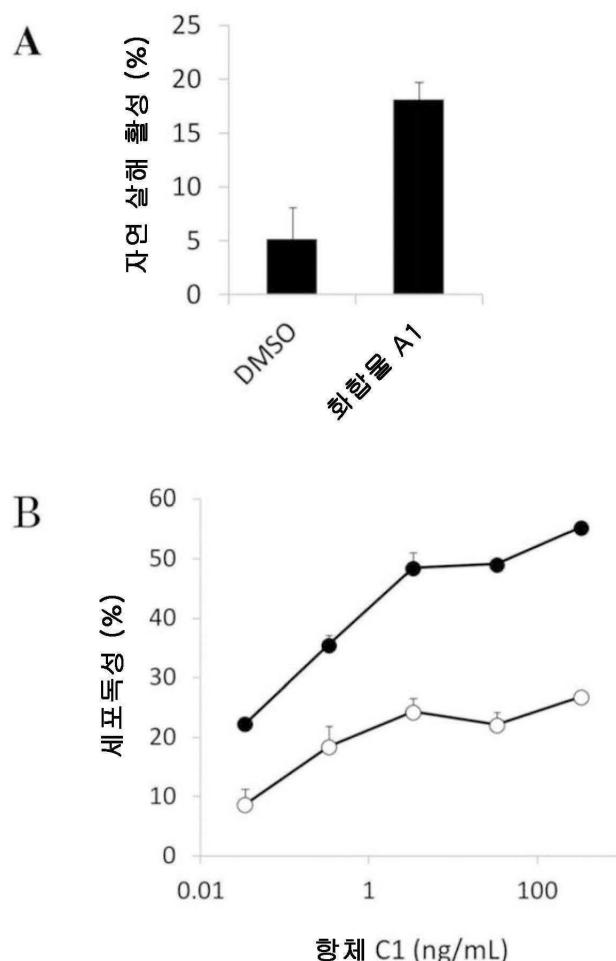
도면13



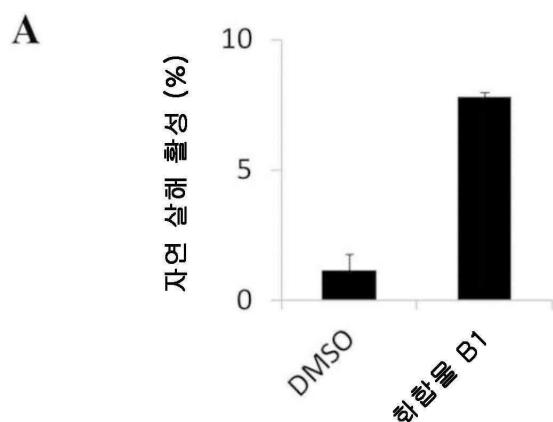
도면14



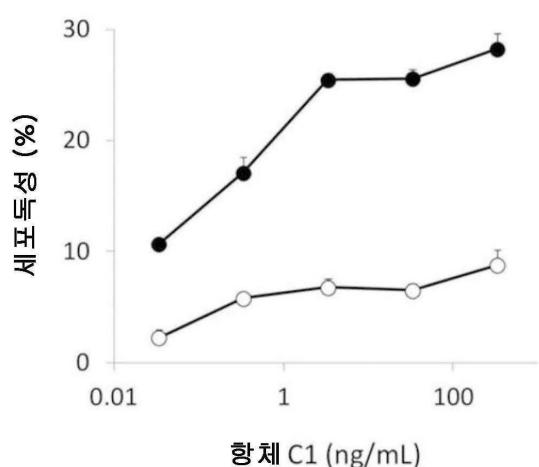
도면 15



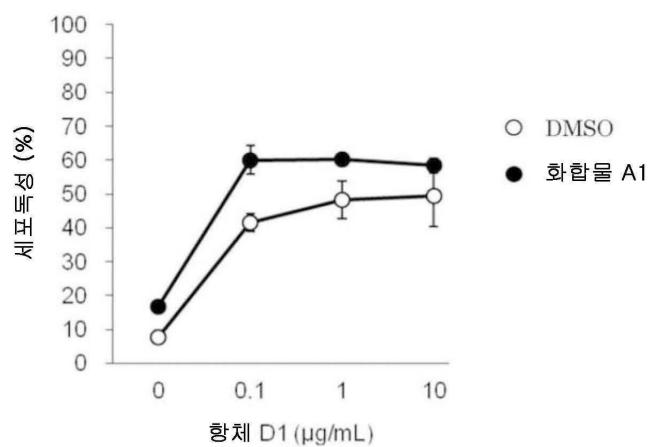
도면16



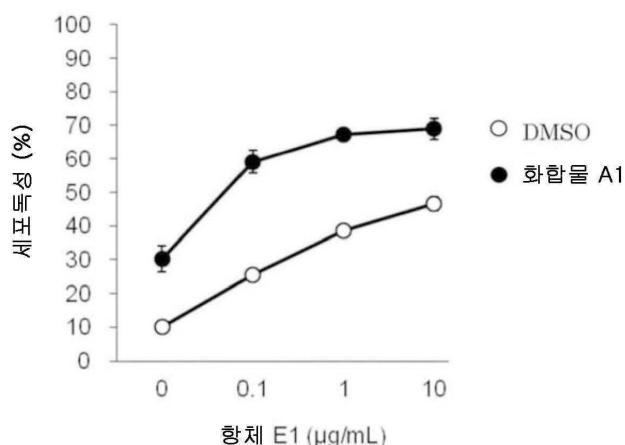
B



도면17



도면18



서 열 목록

<110> Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.

<120> A therapeutic agent for a tumor comprising an IDO inhibitor administered in combination with an antibody

<130> 1001P12350W0

<150> US62/192173

<151> 2015-07-14

<160> 60

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody C1 HCDR1

<400> 1

Asp Phe Tyr Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody C1 HCDR2

<400> 2

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

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody C1 HCDR3

<400> 3

Cys Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Tyr Val Met Asp Ala

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody C1 LCDR1

<400> 4

Arg Thr Ser Glu Asp Ile Phe Arg Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody C1 LCDR2

<400> 5

Asp Thr Asn Arg Leu Ala Asp

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody C1 LCDR3

<400> 6

Gln Gln Tyr Asp Asn Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody C1 H chain

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Pro Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Phe Asn Pro

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Thr Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Tyr Val Met Asp

100 105 110

Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody C1 L chain

<400> 8

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asp Ile Phe Arg Asn

20	25	30	
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Asp Thr Asn Arg Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Tyr Pro Leu			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105		
<210> 9			
<211> 5			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<220><223> Antibody D1-1 HCDR1			
<400> 9			
Thr Tyr Ala Ile Ser			
1	5		
<210> 10			
<211> 17			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<220><223> Antibody D1-1 HCDR2			
<400> 10			
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln			
1	5	10	15
Gly			
<210> 11			
<211> 11			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			

<220><223> Antibody D1-1 HCDR3

<400> 11

Gly Gly Gly Ser Gly Pro Asp Val Leu Asp Ile

1 5 10

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-2 HCDR1

<400> 12

Thr Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-2 HCDR2

<400> 13

Gly Leu Ile Pro Ile Phe Asp Ile Glu Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-2 HCDR3

<400> 14

Gly Gly Gly Ser Gly Pro Asp Val Leu Asp Ile

1 5 10

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-3 HCDR1

<400> 15

Asn Phe Ala Ile Ser

1 5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-3 HCDR2

<400> 16

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

1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-3 HCDR3

<400> 17

Gly Asp Lys Tyr Gly Pro Tyr Tyr Phe His Tyr

1 5 10

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-4 HCDR1

<400> 18

Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-4 HCDR2

<400> 19

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-4 HCDR3

<400> 20

Gly His Lys Tyr Gly Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-5 HCDR1

<400> 21

Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-5 HCDR2

<400> 22

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

1 5 10 15

Gly

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223>

> Antibody D1-5 HCDR3

<400> 23

Glu Thr Ala Val Ala Gly Ile Leu Gly Tyr

1 5 10

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-1 LCDR1

<400> 24

Arg Met Ser Gln Gly Ile Arg Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-1 LCDR2

<400> 25

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 26

<211> 9

<212>

PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-1 LCDR3

<400> 26

Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-2 LCDR1

<400> 27

Arg Met Ser Gln Gly Ile Arg Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-2 LCDR2

<400> 28

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-2 LCDR3

<400> 29

Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-3 LCDR1

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-3 LCDR2

<400> 31

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-3 LCDR3

<400> 32

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-4 LCDR1

<400> 33

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-4 LCDR2

<400> 34

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-4 LCDR3

<400> 35

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-5 LCDR1

<400> 36

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-5 LCDR2

<400> 37

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody D1-5 LCDR3

<400> 38

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody E1-1 HCDR1

<400> 39

Arg Gly Gly Tyr Tyr Trp Asn

1 5

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody E1-1 HCDR2

<400>

40

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody E1-1 HCDR3

<400> 41

Asp His Tyr Ser Ser Ser Trp Thr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody E1-1 LCDR1

<400> 42

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody E1-1 LCDR2

<400> 43

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody E1-1 LCDR3

<400> 44

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr

1 5

<210> 45

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody E1-2 HCDR1

<400> 45

Ser Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 46

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody E1-2 HCDR2

<400> 46

Tyr Ile Phe His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody E1-2 HCDR3

<400> 47

Asp Gly Glu Tyr Phe Asp Met Leu Thr Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody E1-2 LCDR1

<400> 48

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody E1-2 LCDR2

<400> 49

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody E1-2 LCDR3

<400> 50

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223>

Antibody E1-3 HCDR1

<400> 51

Ser Tyr Trp Met His

1 5

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody E1-3 HCDR2

<400> 52

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

1 5 10 15

Thr

<210> 53

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody E1-3 HCDR3

<400> 53

Gly Tyr Tyr Leu Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody E1-3 LCDR1

<400> 54

His Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ile Asn Ile Gly

1 5 10

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody E1-3 LCDR2

<400> 55

His Gly Thr Asn Leu Glu Asp

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Antibody E1-3 LCDR3

<400> 56

Val Gln Tyr Gly Gln Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 57

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody E1-4 VH

<400> 57

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Ala Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Arg Gly Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr

65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys

85 90 95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala

100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp His Tyr Ser Ser Trp Thr Phe Asp

115 120 125

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

130 135 140

<210> 58

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody E1-4 VL

<400> 58

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asn Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

<210> 59

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> Antibody E1-5 VH

<400> 59

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gly Leu

50	55	60
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Phe His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro		
65	70	75
Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln		
85	90	95
Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr		
100	105	110
Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Glu Tyr Phe Asp Met Leu Thr Gly Phe Asp		
115	120	125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
130	135	140
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser		
20	25	30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser		
35	40	45
Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro		
50	55	60
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala		
65	70	75
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
85	90	95
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser		
100	105	110
Asn Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
115	120	125
<210> 60		
<211> 129		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<220><223> Antibody E1-5 VL		
<400> 60		
Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Cys		

1 5 10 15
Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45
Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys
50 55 60
Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
65 70 75 80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110
Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125
Lys