



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0055818
(43) 공개일자 2016년05월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/3955 (2013.01)
A61K 31/704 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7007431
(22) 출원일자(국제) 2013년10월03일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2016년03월21일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2013/001132
(87) 국제공개번호 WO 2015/024042
국제공개일자 2015년02월26일
(30) 우선권주장
2013903189 2013년08월22일 오스트레일리아(AU)
- (71) 출원인
더 카운실 오브 더 퀸즐랜드 인스티튜트 오브 메디컬 리서치
오스트레일리아 4006 퀸즐랜드 허스턴 허스턴 로드 300
- (72) 발명자
스미드 마크
오스트레일리아 퀸즐랜드 4029 허스턴 허스턴 로드 300 더 반크로프트 센터
- (74) 대리인
리엔목특허법인

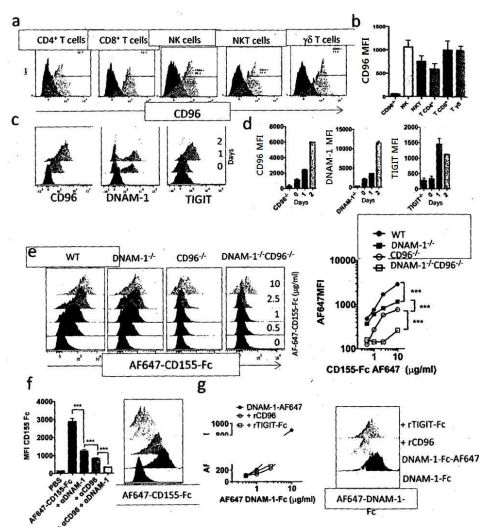
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 암 및 바이러스 감염을 치료하기 위한 면역수용체 조절

(57) 요약

포유동물에서 면역 저해를 감소 또는 완화시키는 방법은 상기 포유동물의 하나 이상의 세포에서 CD96 활성을 적어도 부분적으로 저해 또는 감소시켜 상기 포유동물에서 면역 저해를 완화 및/또는 면역감시를 증진 또는 회복시키는 단계를 포함한다. 통상적으로, CD96 활성을 저해 또는 감소시키는 것은 상기 포유동물에서 CD96-발현 세포의 살해를 포함하지 않거나 또는 그에 의존하지 않는다. 상기 방법은 상기 포유동물에서 면역 저해를 완화 및/또는 면역감시를 증진 또는 회복시켜 상기 포유동물에서 암 또는 암 전이 및/또는 바이러스 감염을 치료 또는 예방한다. 또한 포유동물에서 면역 저해를 완화시키고 및/또는 면역감시를 증진 또는 회복시키는 CD96-저해제를 스크리닝, 설계, 엔지니어링 또는 생산하는 방법이 제공된다. 통상적으로, 상기 CD96-저해제는 항체 또는 항체 단편이고 상기 포유동물은 인간이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

C07K 16/2803 (2013.01)

C07K 16/2818 (2013.01)

C07K 16/2896 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/507 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

포유동물에서 면역 저해를 감소 또는 완화시키는 방법으로서, 상기 방법은 상기 포유동물의 하나 이상의 세포에서 CD96 활성을 적어도 부분적으로 저해 또는 감소시켜서 상기 포유동물에서 면역 저해를 완화시키고 및/또는 면역감시를 증진 또는 회복시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 포유동물에서 CD96 활성을 적어도 부분적으로 저해 또는 감소시키는 단계는 상기 포유동물에서 CD96-발현 세포의 살해를 포함하지 않거나, 또는 그에 의존하지 않는 것인 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 포유동물에서 CD96 활성을 적어도 부분적으로 저해 또는 감소시키는 단계는 CD96-저해제를 상기 포유동물에 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 CD96-저해제는 CD96의 CD155로의 결합 및/또는 CD96에 의한 세포 내 신호전달을 적어도 부분적으로 차단 또는 저해하는 것인 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 CD96-저해제는 항-CD96 항체 또는 항체 단편인 것인 방법.

청구항 6

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 다른 치료제를 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 하나 이상의 다른 치료제는 화학치료제, 및 PD1 및/또는 CTLA4에 결합하는 하나 이상의 항체 또는 항체 단편을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 포유동물에서 하나 이상의 세포에 의한 시토킨 및/또는 케모킨의 발현 및/또는 분비를 증가시키거나 또는 증진시키는 것인 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 시토킨 및/또는 케모킨은 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF- α 및 IFN- γ 를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 시토킨은 인터페론-감마 (IFN- γ)인 것인 방법.

청구항 11

청구항 8, 9, 또는 10에 있어서, 상기 하나 이상의 세포는 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포, γ δ T 세포 및 NK T 세포를 포함하는 T 세포 및 자연 살해(natural killer: NK) 세포인 방법.

청구항 12

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 포유동물에서 암 또는 암 전이를 치료 또는 예방하는 것인 방법.

청구항 13

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 포유동물에서 바이러스 감염을 치료 또는 예방하는 것인 방법.

청구항 14

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물은 인간인 것인 방법.

청구항 15

CD96-저해제를 스크리닝, 설계, 엔지니어링 또는 생산하는 방법으로서, 상기 방법은 후보 분자가 CD96 활성을 적어도 부분적으로 저해 또는 감소시켜서 포유동물에서 면역 저해를 완화 및/또는 면역감시를 증진 또는 회복시킬 수 있는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 CD96-저해제는 항체 또는 항체 단편인 것인 방법.

청구항 17

청구항 15 또는 16에 있어서, 상기 CD96-저해제는 항암제인 것인 방법.

청구항 18

청구항 15, 16, 또는 17에 있어서, 상기 CD96-저해제는 항바이러스제인 것인 방법.

청구항 19

청구항 15 내지 18 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물은 사람인 것인 방법.

청구항 20

청구항 15 내지 19 중 어느 한 항의 방법에 따라 스크리닝되거나, 설계되거나, 엔지니어링되거나 또는 생산된 CD96-저해제.

청구항 21

청구항 20에 있어서 청구항 1 내지 14 중 어느 한 항의 방법에 따라 사용하기 위한 것인 CD96-저해제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역수용체 CD96과 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 면역계를 피할 수 있는 종양 및 기타 질병 또는 질환 (condition)을 표적화하는 면역계의 능력을 증진시키는 CD96의 억제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생산적인 면역 반응의 진행은 다수의 면역 체크포인트를 통과할 것을 요구한다. 통과는 흥분성 공동-자극 신호의 존재 또는 면역 활성을 저해 또는 종료하는 역할을 하는 음성 (negative) 또는 공동-억제 신호의 회피를 요구할 수 있다. 면역글로불린 슈퍼패밀리라는 이러한 면역 반응의 조화에서 중심적 중요성을 차지하고, CD28/세포독성 T-림프구 항원 4 (CD28/cytotoxic T-lymphocyte antigen-4: CTLA-4):B7.1/B7.2 수용체/리간드 그룹화가 이러한 면역 조절자의 전형적인 예를 나타낸다. 부분적으로, 이러한 체크포인트의 역할은 원치 않는 및 유해한 자기-지향적 활성의 가능성을 예방하는 것이다. 이것은 자기면역의 예방을 보조하나, 그것은 주로 자신이 유해한 세포와 표면 분자의 동일한 배열을 제시하는 악성 자기-세포 (self-cell)를 표적화 하는 것을 목표로 하는 성공적인 면역치료에 장벽으로서 작용할 수 있다. 이러한 말초 내성 (peripheral tolerance)의 메커니즘을, 특

히 T 세포의 저해 체크포인트를 차단함으로써 단독요법으로서 또는 직접적으로 또는 간접적으로 면역계에 종양 에피토프의 제시를 증진시키는 다른 치료와의 상승작용으로 항종양 활성을 생성할 가능성을 제공한다. 이러한 항-T 세포 체크포인트 항체는 진행된 인간 암의 초기 임상 시험에서 장래성을 보여주고 있다.

[0003] 게다가, 자연 살해 (NK) 세포는 초기 종양 성장 및 전이를 제한하기 위해 중요한 선천성 림프구이다¹. NK 세포 기능은 또한 광범위한 활성화 수용체 및 저해 수용체에 의해 전송되는 신호의 통합에 의해 조절된다². 예를 들면, NCR, NKG2D 또는 DNAM-1과 같은 수용체를 활성화시키는 것에 의한 병원체-유래된 또는 스트레스-유도된 리간드의 인식이 NK 세포 세포독성 및 인터페론-감마 (IFN- γ)와 같은 전-염증성 (pro-inflammatory) 매개체의 분비를 자극한다³. 반대로, 저해 수용체는 NK 세포-매개된 살해로부터 표적 세포를 보호한다⁴. 이러한 수용체는 대부분 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 I-관련된 분자를 인식하고 KIR (살해 세포 면역글로불린-유사 수용체 (killer cell immunoglobulin-like receptors)) 및 마우스에서의 LIR (백혈구 면역글로불린-유사 수용체 (leukocyte immunoglobulin-like receptors)) 패밀리, 마우스에서의 Ly49 패밀리 및 두 종 모두에서 CD94/NKG2 이형이량체(heterodimers)를 포함한다.

[0004] 넥틴 (nectin) 및 넥틴-유사 (necl) 패밀리의 리간드와 상호작용하는 면역글로불린 수퍼패밀리 구성원의 새로운 이 최근 NK 세포 및 T 세포의 기능에 영향을 미친다고 최근에 개시되었다⁵. 이들은 CD226 (DNAM-1)⁶, CD96 (TACTILE)⁷, TIGIT (T cell immunoglobulin and ITIM domain)^{8,9}, 및 CRTAM (class I restricted T cell-associated molecule)을 포함한다¹⁰. DNAM-1 및 TIGIT은 이 패밀리의 가장 광범위하게 연구된 구성원이고 그들은 공통의 리간드, CD155 (necl-5; PVR) 및 CD112 (nectin-2; PVRL2)를 공유한다^{8,11}. TIGIT은 또한 추가적인 리간드 CD113 (PVRL3)에 결합한다⁸. NK 세포 상의 DNAM-1 및 TIGIT의 기능은 전하는 바에 따르면 대항된다 (counter-balancing)¹². 인비트로에서, DNAM-1은 광범위한 종양 세포에 대한 NK 세포의 세포독성을 강력하게 하고^{13,14} 인비보에서 종양 면역감시를 위해 중요하다^{13,15,16}. 반대로, TIGIT는 ITIM 모티프를 갖고있으며 MHC 클래스 I 과 저해적 LY49 또는 KIR의 상호 작용과 유사한 자기-조직 손상을 예방하는 것으로 제안되었다¹⁷. 실제로, CD155에 의한 TIGIT의 결합 (engagement)이 인비트로에서 NK 세포에 의한 IFN- γ 생산 및 세포 독성을 제한하는 것으로 나타났다^{18,19}. 그러나, 다른 넥틴 수용체인 DNAM-1 및 CD96 대비 NK 세포 생물학에서 TIGIT의 역할은 여전히 인비보에서 평가되어야 한다.

[0005] 20 년 전에 클로닝 되었음에도 불구하고⁷, CD96, DNAM-1과 CD155 리간드를 공유하는 나머지 Ig 패밀리 구성원, 및 TIGIT 대해 알려진 바가 거의 없다^{20,21}. 인간에서, CD96 발현은 주로 NK 세포, CD8 T 세포, 및 CD4 T 세포에 한정된다⁷. CD96의 주요한 리간드는 CD155지만, CD96이 또한 CD111 (넥틴-1)과 연관되고 NK 및 T 세포 접착을 촉진시키는데 역할을 하는 것으로 보고되었다^{21,22}.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 놀랍게도, 본 발명자들은 CD96이 T 세포 및 NK 세포 항-종양 기능의 음성 조절자로서 작용한다는 것을 발견했다. 따라서, 본 발명은 광범위하게 포유동물에 있어서 CD96을 적어도 부분적으로 차단 또는 저해하여 CD96-매개된 면역 저해를 감소 또는 경감시키거나 면역감시를 증진 또는 회복시키는 작용제의 사용에 관한 것이다. 특정 구체예에 있어서, 이는 암 및/또는 바이러스 감염과 같은, CD96의 적어도 부분적인 차단 또는 저해에 반응하는 질병 또는 증상의 치료를 촉진시킬수 있다.

[0007] 제 1 양태에 있어서, 본 발명은 포유동물에서 면역 저해를 감소 또는 완화시키는 방법으로서, 상기 방법은 상기 포유동물의 하나 이상의 세포에서 CD96 활성을 적어도 부분적으로 저해 또는 감소시켜 상기 포유동물에서 면역 저해를 완화시키고 및/또는 면역감시를 증진 또는 회복시키는 단계를 포함하는 것인 방법을 제공한다.

[0008] 적절하게는, 상기 포유동물에서 CD96 활성을 저해 또는 감소시키는 단계는 상기 포유동물에서 CD96-발현 세포의 살해를 포함하지 않거나, 또는 그에 적어도 의존하지 않는다. 바람직하게는, 상기 동물세포에 CD96 활성을 저해 또는 감소시키는 단계는 CD96을 발현시키는 포유동물의 하나 이상의 세포에서 CD96이 CD155에 결합하는 것 및/

또는 세포 내 신호전달하는 것을 저해 또는 감소시키는 것을 포함한다.

- [0009] 하나의 특정 구체예에서, 상기 포유동물에서 CD96 활성을 저해 또는 감소시키는 단계는 하나 이상의 시토킨 또는 케모킨의 발현, 생산 및/또는 분비를 증가 또는 증진시키는 것을 포함한다. 바람직하게는, 상기 시토킨은 인터페론 감마(interferon γ : IFN- γ)이다. 통상적으로, 상기 포유동물의 하나 이상의 세포는 CD4+ 및 CD8+ T 세포, γ δ T 세포, NKT 세포를 포함하는 T 세포 및 자연 살해(natural killer: NK) 세포이다.
- [0010] 바람직한 구체예에서, 상기 방법은 상기 포유동물에서 암 또는 암 전이를 치료 또는 예방하기 위하여 상기 포유동물에 있어서 면역 저해를 완화 및/또는 면역감시를 증진 또는 회복시키킨다.
- [0011] 다른 구체예에 있어서, 상기 방법은 상기 포유동물에서 면역 저해를 완화시키고 및/또는 면역감시를 증진 또는 회복시켜 상기 포유동물에서 바이러스 감염을 치료 또는 예방한다.
- [0012] 제 2 양태에서, 본 발명은 CD96-저해제를 스크리닝, 설계, 엔지니어링(engineering) 또는 생산하는 방법으로서, 상기 방법은 후보 분자가 CD96 활성을 적어도 부분적으로 저해 또는 감소시켜 포유동물에서 면역 저해를 완화시키고 및/또는 면역감시를 증진 또는 회복시킬 수 있는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는 것인 방법을 제공한다.
- [0013] 제 3 양태에서, 본 발명은 제 2 양태의 방법에 따라 스크리닝되거나, 설계되거나, 엔지니어되거나, 또는 생산된 CD96-저해제를 제공한다.
- [0014] 일 구체예에 있어서, 상기 CD96-저해제는 항체 또는 항체 단편이다.
- [0015] 하나의 특별한 구체예에 있어서, 상기 CD96-저해제는 항암제이다.
- [0016] 다른 특별한 구체예에 있어서, 상기 CD96-저해제는 항바이러스제이다.
- [0017] 제 4 양태에서, 본 발명은 제 1 양태의 방법에 따른 사용을 위한 제 3 양태에 따른 CD96-저해제를 제공한다.
- [0018] 적절하게는, 전술한 양태에 따라 상기 포유동물은 인간이다.
- [0019] 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 용어 “포함하다(*comprise*)”, “포함한다(*comprises*)”, 및 “포함하는(*comprising*)”, 또는 비슷한 용어들은 구성요소 또는 특징의 기재된 목록이 언급 또는 열거된 것들만을 포함하는 것이 아니라, 열거 또는 기재되지 않은 다른 구성요소 또는 특징을 포함할 수 있도록, 비-배타적 포함을 뜻하는 것으로 의도된다.
- [0020] 부정관사 'a' 및 'an'은 여기서 단수 또는 복수의 구성요소 또는 특징을 언급 또는 포함하기 위해 사용되었고, “하나” 또는 “단일” 구성요소 또는 특징을 의미하는 것 또는 정의하는 것으로서 받아들여서는 안된다.

과제의 해결 수단

- [0021] 본 발명은 적어도 부분적으로, CD96이 NK 세포 및 T 세포 서브셋을 휴면시킴으로써 높게 발현되고 휴면 NK 세포 상의 CD155의 결합을 위해서 DNAM-1과 경쟁한다는 예상치 않은 발견을 전제로 한다. CD96^{-/-} 마우스를 사용하여, CD155 결합을 위한 DNAM-1과의 경쟁 및 또한 직접적인 저해를 통해, CD96이 인비트로 및 인비보에서 NK 세포의 IFN- γ 의 생산을 약화 또는 억제한다는 것이 입증된다. 게다가, CD96^{-/-} 마우스는 발암, 또는 B16F10 (흑색종), RM-1 (전립선 암), 3LL (폐암) 실험적 전이의 지표로서 3'-메틸콜란트렌(3'-methylcholanthrene: MCA)-유도된 종양 형성에 대해 보다 저항적인 것으로 확인되었다. 이러한 관찰에 기초하여, CD96이, 특히 전적으로 IFN- γ 생성 및/또는 분비의 억제를 통한 것은 아닐지라도, 일반적으로 T 및 NK 세포 항-종양 기능의 음성 조절체로서 작용하는 것으로 제안된다. 따라서, 본 발명은 CD96의 음성 면역조절 기능을 완화 또는 감소시켜서, 면역 감시, 특히 T 세포 및 NK 세포에 의한, 면역감시를 촉진 또는 회복시키고 암, 암 세포 전이 및/또는 바이러스 감염을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0022] 따라서 본 발명의 일 양태는 포유동물에서 면역 저해를 감소 또는 완화시키는 방법으로서, 상기 방법은 상기 포유동물의 하나 이상의 세포에서 CD96 활성을 적어도 부분적으로 저해 또는 감소시켜서 상기 포유동물에서 면역 저해를 완화 및/또는 면역 감시를 증진 또는 회복시키는 단계를 포함하는 것인 방법을 제공한다.
- [0023] CD96과 관련하여 “면역 저해를 완화시킴(*relieving immune inhibition*)”은 정상적으로 CD96을 발현하는 세포의 하나 이상의 면역 기능을 억제하거나 또는 저해하는데 있어 CD96의 정상적 활성 또는 기능을 적어도 부분적으로 없애거나, 제거하거나, 또는 극복하는 것을 의미한다. 통상적으로, 상기 CD96을 정상적으로 발현하는 하

나 이상의 세포는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포, $\gamma \delta$ T 세포, 및 NKT 세포를 포함하는 T 세포 및 자연 살해 (NK) 세포이다. 일부 구체예에 있어서, 면역 억제를 완화시키는 것은 외래 병원체, 외래 병원체를 표시하는 숙주 세포 (예를 들어, 자기-MHC와 관련하여 외래 병원체-유래 펩티드를 표시하는 것) 및/또는 상기 숙주의 암에 걸린 세포 또는 조직에 대한 말초 내성을 없애는 것을 포함하거나 그와 관련될 수 있다.

[0024] "면역감시를 증진 또는 회복시킨다(*enhance or restore immune surveillance*)"는 것은 외래 병원체, 외래 병원체를 표시하는 숙주 세포 (예를 들어, 자기-MHC와 관련하여 외래 병원체-유래 펩티드를 표시하는 것), 및/또는 상기 숙주의 암에 걸린 세포 또는 조직에 대해 모니터링, 탐지 및/또는 반응하는 면역계의 하나 이상의 구성요소의 능력을 적어도 부분적으로 개선시키거나 또는 촉진시키는 것을 의미한다. 적절하게는, 상기 면역계의 구성요소는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포, $\gamma \delta$ T 세포, 및 NKT 세포를 포함하는 T 세포 및 자연 살해 (NK) 세포와 같은, 정상적으로 CD96을 발현시키는 하나 이상의 세포이다.

[0025] 상기 포유동물의 하나 이상의 세포에서 CD96 활성을 적어도 부분적으로 저해 또는 촉진시키는 것은 상기 포유동물에게 "CD96-저해제 (*CD96-inhibitory agent*)"를 투여하는 것에 의해서 수행되거나, 촉진되거나, 달성될 수 있다. CD96-저해제는 CD96의 생물학적 활성을 적어도 부분적으로 저해하거나 또는 감소시키는 능력을 소유하거나 또는 보이는 임의의 분자일 수 있다. CD96의 생물학적 활성은 CD155 결합, 세포 내 신호전달을 유도, 및 시토킨 및/또는 케모킨의 발현 및/또는 분비를 촉진하거나 유도하는 것 중 하나 이상을 포함한다. 바람직하게는, 상기 시토킨 또는 케모킨은 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF- α 및 IFN- γ 를 포함하는 임의의 전-염증성 (pro-inflammatory) 시토킨 또는 케모킨을 포함하고, 이들에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 시토킨은 IFN- γ 이다. 하나 이상의 시토킨 또는 케모킨, 또는 이들을 코딩하는 핵산의 발현, 생산 및/또는 분비의 측정은, 이에서 보다 상세하게 기술될 것이다.

[0026] 일 구체예에 있어서, 상기 CD96-저해제는 CD96 및 CD155 간의 결합 상호작용을 저해, 차단 또는 길항한다. 단지예로서, 상기 CD96-저해제는 CD96이 CD155에 결합하는 것을 적어도 부분적으로 저해 또는 차단시키기 위하여 CD155와 상호작용 할 수 있는 (예를 들어, CD155에 결합하거나 또는 CD155에 의해 결합되는 것) CD96의 세포 내 도메인, 또는 이들의 부분에 결합할 수 있다.

[0027] 다른 구체예에 있어서, 상기 CD96-저해제는 CD96 신호전달 (signaling) 활성을 저해시키거나 또는 감소시키는 능력을 소유하거나 나타내는 분자이다. CD96 신호전달 활성의 저해 또는 감소는 CD155와의 결합 상호작용을 저해, 차단 또는 길항하는 것을 통할 수 있거나 또는 CD155 결합에 반응하여 일반적으로 발생하는 CD96-개시 신호전달을 차단하는 것을 통할 수 있다. 예로서, CD96는 면역수용체 티로신-기반 억제 모티프 (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif: ITIM)를 포함한다. ITIM은 부분적으로 보존된 N-말단 (Y-2) 및 C 말단 (Y+3) 잔기와 함께 티로신 (Y) 잔기를 포함하는 6-아미노산 서열로서 구조적으로 정의된다. 일반적이지만 비제한적인 모티프는 (S/I/V/LYXXI/V/L)이고, 상기 X는 임의의 아미노산이다. 예를 들어, CD96의 이소형 1은 ITIM 서열 IKYTCI를 포함하고 상기 Y는 잔기 566 번이다.

[0028] 활성화 수용체 (activating receptor)와 공동-집약되면, Src-패밀리 티로신 키나제에 의해서 ITIM이 인산화되어 활성화 신호를 길항하는 Src 상동 2 도메인-포함 포스파타제 (PTPase)를 동원할 수 있다는 것이 제안되었다. 따라서, 일 구체예에 있어서, 상기 CD96-저해제는 상기 CD96 ITIM에 의해서 매개되는 CD96 신호전달 활성을 저해 또는 감소시키는 능력을 소유하거나 또는 나타낸다. 바람직하게는, ITIM CD96에 의해서 매개되는 CD96 신호전달 활성의 저해 또는 감소는 CD96을 발현하는 세포에 의한 증가 또는 증진된 케모킨 및/또는 시토킨 (예를 들어, IFN- γ)의 발현, 생산 및/또는 분비를 가능하게 한다.

[0029] 상기 CD96-저해제 (펩티드, 항체 및 항체 단편을 포함한) 단백질, 핵산 (이들에 한정되지 않으나, 리보자임 (ribozyme), RNAi, miRNA, 및 siRNA와 같은 저해적 RNA 분자를 포함한), 지질, 탄수화물, 작은 유기 분자 또는 이들의 조합 (예를 들어, 당단백질, 지단백질, 및 펩티드-핵산 등)일 수 있다.

[0030] 하나의 특정한 구체예에 있어서, 상기 CD96-저해제는 CD96에 결합하는 항체 또는 항체 단편이다. 한 형태에서, 상기 항체는 CD96에 결합하고 CD96이 CD155에 결합하는 것을 적어도 부분적으로 차단 또는 저해한다.

[0031] 항체는 폴리클론 또는 모노클론, 천연 또는 재조합일 수 있다. 항체 단편은 Fab 및 Fab'2 단편, 디아바디 (diabody) 및 단쇄 항체 단편 (예를 들어, scV)를 포함하고, 이들에 제한되지 않는다. 다른 종으로부터 생산되거나, 또는 유래한 항체 및 항체 단편은 "외래(foreign)" 항체에 대한 해로운 면역 반응을 유도하지 않으면서 한 종에 투여되도록 변형될 수 있다. 인간과 관련하여, 이는 다른 종으로부터 생산되거나, 또는 유래한 항체의 "인간화(humanization)"이다. 이러한 방법은 당 업계에 잘 알려져 있고 인간 항체 스카폴드 (scaffold) 또는 백

본 (backbone)으로의 비-인간 항체 상보성 결정 영역 (complementarity determining region: CDRs)의 재조합 "그래프팅(grafting)"을 일반적으로 포함한다.

- [0032] 적절하게는, 상기 포유동물에서 CD96 활성을 저해 또는 감소시키는 단계는 상기 포유동물에서 CD96 발현 세포를 살해하는 것을 포함하지 않는다. 이와 관련하여, "살해(killing)"는 보체-매개 세포용해 및 항체-매개 세포-매개 세포독성 (antibody-mediated cell-mediated cytotoxicity: ADCC)와 같은, 항체-매개 세포독성 기전을 의미할 수 있고, 후자는 통상적으로 자연 살해 (NK) 세포, 대식세포, 호중구 및 호산구에 의해 매개된다. 따라서, Fc 부분을 결여하거나 또는 돌연변이된 Fc 부분을 갖는 항체를 사용하는 것이 유리할 수 있다.
- [0033] 상기 포유동물에서 CD96 활성을 저해 또는 감소시키는 단계는 상기 포유동물에 CD96-저해제를 투여함으로써 달성 또는 촉진될 수 있다.
- [0034] "투여(administering)"는 특정 경로에 의해 상기 포유동물에 CD96-저해제를 도입하는 것을 의미한다. 적절하게는, 상기 CD96-저해제의 치료적 유효량이 상기 포유동물에 투여된다.
- [0035] 용어 "치료적 유효량(therapeutically effective amount)"은 특정된 작용제로 처리되는 포유동물에서 원하는 효과를 달성하기에 충분한 작용제의 양을 의미한다.
- [0036] 일반적으로, 본 발명의 방법은 CD96-매개 면역 저해, 억제 또는 말초 내성을 감소 또는 완화시키는데 있어서 유용할 수 있다. 적절하게는, 상기 방법은 CD96-매개 면역 저해, 억제 또는 말초 내성을 적어도 부분적으로 차단하는 것에 대해 반응하는 하나 이상의 질병 또는 질환의 치료 또는 예방을 촉진한다.
- [0037] 본 명세서에서 사용하는, "치료하는 것 (treating)" 또는 "치료하다 (treat)", 또는 "치료 (treatment)"는 CD96-매개 면역 저해, 억제 또는 말초 내성을 적어도 부분적으로 차단하는 것에 대해 반응하는 질병 또는 질환의 하나 이상의 기존 또는 이전에 확인된 증상을 적어도 부분적으로 없애거나 또는 개선하는 치료 개입을 의미한다.
- [0038] 본 명세서에서 사용된, "예방하는 것 (preventing)" 또는 "예방하다 (prevent)", 또는 "예방 (prevention)"은 적어도 부분적으로 또는 일시적으로 증상의 발생을 예방할 수 있도록, CD96-매개 면역 저해, 억제 또는 말초 내성을 적어도 부분적으로 차단하는 것에 대해 반응하는 질병 또는 질환의 증상의 발생 전에 개시되는 예방적 처치를 의미한다.
- [0039] 통상적으로, CD96-매개 면역 저해, 억제, 또는 말초 내성을 적어도 부분적으로 차단하는 것에 대해 반응하는 질병 또는 질환은 증진 또는 회복된 면역감시가 상기 질병 또는 질환으로 고통 받고 있는 개체에게 이익이 될 수 있는 임의의 질병 또는 질환이다. 이러한 질병 및 질환은 상기 질병이나 질환의 지속성이 세포-매개 면역에 의해서 제어 또는 억제될 수 있는 것들을 포함할 수 있다. 비제한적인 예로는 암 및 바이러스 감염을 포함한다. 본 발명에 의해 고려된 특정 바이러스 감염은 인간 면역결핍 바이러스 (human immunodeficiency virus: HIV), 엡스타인 바 바이러스 (Epstein Barr Virus: EBV), 수두 대상포진 바이러스 (HSV1 및 HSV2를 포함하는 HSV(Herpes Simplex Virus)), 인간 유두종 바이러스 (Human Papillomavirus: HPV), 단순 포진 바이러스 (Varicella zoster virus: VSV), 및 시토크갈로바이러스 (Cytomegalovirus: CMV)에 의해 발생하는 것과 같은 지속성 바이러스 감염 (persistent viral infection)을 포함하나, 이들에 제한되지 않는다.
- [0040] 바람직한 구체예에 있어서, 상기 방법은 상기 포유동물에서 암 또는 암의 전이를 치료 또는 예방하기에 충분한 상기 포유동물에서 면역 억제를 감소 또는 경감시킨다. 적절하게는, 상기 암은 CD96-매개 면역 저해, 억제 또는 말초 내성을 적어도 부분적으로 차단하는 것에 대해 반응하는 것일 수 있다. 암은 고형 종양, 육종, 림프종, 골수종, 암종, 흑색종, 세포종 및 수막종의 형태일 수 있으나, 이들에 제한되지 않는다. 암의 비제한적인 예는 부신, 방광, 뼈, 골수, 뇌, 유방, 자궁경부, 담낭, 신경절, 위장관, 심장, 신장, 간, 폐, 근육, 난소, 췌장, 뇌하수체, 부갑상선, 전립선, 침샘, 피부, 비장, 고환, 갑상선, 및 자궁의 암을 포함한다. 암의 특정 비제한적인 예는 결장암, 폐암 및 전립선 암을 포함한다. 일부 구체예에 있어서, 상기 암은 신체의 다른 부위, 조직 또는 기관으로 이동하여 그 해당 부위, 조직 또는 기관에서 종양을 형성할 수 있는, 전이성 암이다. 이는 시간의 경과에 따라 반복적으로 발생할 수 있다. 본 발명에 의해 고려되는 특별히 공격적인 전이성 암은 전이성 흑색종이다.
- [0041] 또한, 상기 암의 치료 또는 예방의 방법은 암 치료 또는 예방을 촉진하는 하나 이상의 다른 치료제의 공동-투여를 더 포함할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 단지 예로서, 이들은: 파클리탁셀 (paclitaxel), 독소루비신, 메토트렉세이트 (methotrexate) 및 시스플라틴 (cisplatin)을 포함하고, 이들에 제한되지 않는 것과 같은 화학치료제; 및/또는 항-PD-1 항체 (예를 들어, 니볼루맵 (Nivolumab)) 및 항-CTLA4 항체 (예를 들어, 이필리무맵

(Ipilimumab))을 포함한, 생물적치료제를 포함하나 이들에 제한되지 않는다. 또한 CD96 과 PD-1 및 CTLA4을 포함하여, 이에 제한되지 않는 하나 이상의 다른 분자 모두에 결합하는 이중-특이적 항체가 고려된다.

- [0042] 당해 기술 분야에서 잘 이해되는 바와 같이, 암 치료 또는 예방을 촉진하는 상기 하나 이상의 다른 작용제는 CD96-저해제와의 조합으로 투여되거나, 개별적으로 투여될 수 있다.
- [0043] 일부 구체예에 있어서, 상기 CD96-저해제는 단독으로 제형화될 수 있고, 또는 하나 이상의 다른 제제와 함께 약학적 조성물의 형태로 존재한다.
- [0044] 인간으로의 투여를 포함한, 포유동물로의 투여를 위해, 단독이거나, 다른 치료제와 함께 CD96-저해제의 적절한 용법은 당 업계의 숙련된 자에 의해 쉽게 결정될 수 있다.
- [0045] 적절하게는, 상기 약학적 조성물은 적합한 약학적으로-허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.
- [0046] 바람직하게는, 약학적으로-허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제는 포유동물에게, 및 보다 바람직하게는 인간에게 투여하기에 적합하다.
- [0047] “약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제 (*pharmaceutically-acceptable carrier, diluent or excipient*)”는 전신 투여를 안전하게 사용될 수 있는 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질을 의미한다. 특정 투여 경로에 따라, 당 업계에서 잘 알려진 다양한 담체, 희석제 및 부형제가 사용될 수 있다. 이러한 담체, 희석제 및 부형제는 당, 전분, 셀룰로스 및 그의 유도체, 맥아, 젤라틴, 활석, 칼슘 셀레이트, 식물성 오일, 합성 오일, 폴리올, 알긴산, 포스페이트 완충 용액, 유화제, 등장성 염수 및 히드로클로리드, 브로미드 및 황산염을 포함하는 무기산 염과 같은 염, 아세테이트, 프로피오네이트 및 말로네이트와 같은 유기산 및 무발열원 물 (pyrogen-free water)을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0048] 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및 부형제를 설명하는 유용한 참고 문헌은 Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. NJ USA, 1991)이다.
- [0049] 투여의 임의의 안전한 경로가 상기 CD96-저해제를 포함하는 조성물을 개체에게 제공하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 경구, 직장, 비경구, 설하, 구강, 정맥 내, 관절 내, 근육 내, 피내 (intradermal), 피하, 흡입, 안구 내, 복강 내, 뇌실 내, 경피 등이 이용될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 양태는 CD96-저해제를 스크리닝하거나, 설계하거나, 엔지니어링하거나 또는 생산하는 방법으로서, 상기 방법은 후보 분자가 CD96 활성을 적어도 부분적으로 저해 또는 감소시켜 포유동물에서 면역 저해를 완화 및/또는 면역 감시를 증진 또는 회복시키는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는 것인 방법을 제공한다.
- [0051] 본 발명은 또한 상술한 양태에 따라 스크리닝된, 설계된, 엔지니어링된 또는 생산된 CD96-저해제를 제공한다.
- [0052] 후보 분자는 (펩티드, 항체 및 항체 단편을 포함한) 단백질, (예를 들어, 리보자임, RNAi, miRNA 및 siRNA와 같은 저해성 RNA 분자를 포함하나, 이들에 제한되지 않는) 핵산, 지질, 탄수화물, 작은 유기 분자 또는 이들의 임의의 조합 (예를 들어, 당단백질, 지질단백질, 펩티드-핵산 등)일 수 있다.
- [0053] 일부 구체예에 있어서, 후보 조절자 (modulator)가 CD155의 결합, 세포 내 신호, 및/또는 IFN- γ 생산 및/또는 분비와 같은 CD96의 하나 이상의 생물학적 활성을 차단 또는 저해할 수 있다는 것을 나타내는 원하거나 또는 예상되는 구조적 특징 또는 특성에 기반하여 후보 조절자가 새로이 (de novo) 합리적으로 설계 또는 엔지니어링될 수 있다. 다른 구체예에 있어서, 상기 후보 조절자가 CD96의 하나 이상의 생물학적 활성을 차단 또는 저해할 수 있다는 것을 나타내는 원하거나 또는 예상되는 구조적 특징 또는 특성에 기반하여 초기 선택 없이 분자의 라이브러리를 스크리닝 함으로써 확인될 수 있다. 이러한 라이브러리는 단백질, 펩티드, 핵산, 재조합 항체 또는 항체 단편 (예를 들면, 파지 표시 라이브러리), 탄수화물 및/또는 지질의 무작위로 생성된, 또는 지시된 (directed) 라이브러리, 자연 발생 분자 라이브러리 및/또는 합성 유기 분자의 조합 라이브러리를 포함할 수 있다.
- [0054] 후보 조절자의 설계 및/또는 스크리닝에 적용가능한 기법의 비제한적 예는 당 업계에 잘 알려진 바와 같은 X-선 결정학, NMR 분광법, 구조 데이터베이스의 컴퓨터-보조 스크리닝, 컴퓨터-보조 모델링 (computer-assisted modelling) 또는 분자 결합 상호 작용을 검출하는 생화학 또는 생물물리학적 기술을 이용할 수 있다.
- [0055] 분자 상호작용을 확인하는 생물물리학적 및 생화학적 기법은 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan *et al.*, (John Wiley & Sons, 1997)의 제 20 장에 제공된 것과 같은, 경쟁 방사성 리간드 결합 분석 (competitive radioligand binding assays), 공동-면역침전 (co-immunoprecipitation), 형광 공명 에너지 전달

(fluorescence resonance energy transfer: FRET) 결합 분석을 포함하는 형광-기반 분석, 전기생리학 (electrophysiology), 분석적 초원심분리 (analytical ultracentrifugation), 라벨 이송 (label transfer), 화학적 가교 (chemical cross-linking), 질량 분석, 미세 열량계 (microcalorimetry), 표면 플라스몬 공명 (surface plasmon resonance) 및 광학 바이오 센서-기반의 방법 (optical biosensor-based methods)을 포함한다. 2-하이브리드 (two-hybrid) 및 파지 표시 스크리닝 방법과 같은 생화학 기법은 CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan *et al.*, (John Wiley & Sons, 1997)의 제 19 장에 제공된다.

[0056] 따라서, 상기 방법의 개시 단계는 CD96에 결합하는 능력과 같은, 광범위한 구조적 및/또는 기능적 특성에 따라 선택되는 복수의 후보 분자를 식별하는 단계를 포함할 수 있다.

[0057] 상기 방법은 후보 분자(들)에 대한 반응으로 CD96의 하나 이상의 생물학적 활성에 있어서 변화를 측정 또는 검출하는 추가 단계를 포함할 수 있다. 이들은 인비보 모델에서의 CD155 결합, 세포 내 신호전달, 시토킨 및/또는 케모킨 생산 또는 분비 및/또는 종양 유발 (tumor challenge)로부터의 보호를 포함할 수 있다.

[0058] 후보 분자에 의한 CD155의 CD96으로의 결합의 저해는 CD155가 CD96에 결합하는 것을 차단하는 후보 저해제의 능력의 경쟁 방사성 리간드 결합 분석, 표면 플라스몬 공명 (예를 들어, BIAcore™ 분석), 동시-면역 침전 및 형광-기반 분석 (예를 들어: CD155가 형광체로 표지된 곳에서 유속 세포계수법에 의한 것과 같은)을 포함하는 당 업계에서 공지된 여러 기법에 의해서 결정될 수 있다. 형광체의 비제한적인 예는 형광 이소티오시아네이트 (fluorescein isothiocyanate: FITC), 알로피코시아닌 (allophycocyanin: APC), FAM 및 ROX와 같은 형광 유도체, 텍사스 레드, 테트라메틸로다민 이소티오시아네이트 (tetramethylrhodamine isothiocyanate: TRITL), R-피코에리트린 (R-Phycoerythrin: RPE), 알렉사 (Alexa) 및 보디피 (Bodipy) 형광체를 포함하나, 이들에 제한되지 않는다.

[0059] 대안적으로, 이 형광-기반 분석은 FRET 분석 (예를 들면, 공여 형광체 (donor fluorescein)에 커플링된 하나의 단백질, 수용 형광체에 커플링된 다른 것)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0060] 일부 구체예에 있어서, 세포 내 신호전달은 CD96의 수준에서 직접적으로, 예를 들면, NK 세포, 또는 T 세포의 서브셋에 의해 발현된 CD96에 의한 SH2 도메인-포함 PTPase의 동원 (recruitment)을 측정하는 것에 의해 측정될 수 있다. 본 발명의 후보 분자는 CD155의 존재 하에 CD96에 의한 SH2 도메인-포함 PTPase 동원을 적절하게 예방하거나 감소시킨다. 이 구체예에 따라, 상기 후보 분자는 CD96과 CD155 간의 결합을 적어도 부분적으로 저해하거나 또는 예방하여, CD96에 의한 세포내 신호전달을 적어도 부분적으로 저해 또는 예방하고 및/또는 CD155의 결합에도 불구하고 CD96에 의한 세포 내 신호전달을 적어도 저해 또는 예방할 수 있다.

[0061] 다른 구체예에 있어서, CD96에 대한 후보 분자의 효과는 CD96을 발현하는 세포에 의한 하나 이상의 시토킨 또는 케모킨의 발현, 생산 및/또는 분비를 측정함으로써 결정될 수 있다. 일반적으로, 시토킨 또는 케모킨의 발현, 생산 및/또는 분비에 있어서 변화는 유전자 발현 수준 (예를 들면, 시토킨 mRNA의 RT-PCR에 의해), 세포내에 위치한 시토킨 또는 케모킨의 측정 (예를 들면, 시토킨- 또는 케모킨- 특이적 항체를 이용한 면역세포화학에 의해), 및/또는 유속 세포계수적 시토킨 비드 어레이 (flow cytometric Cytokine Bead Array) (BD Biosciences로부터 상업적으로 이용가능한 것과 같은)에 의해서, 시토킨- 또는 케모킨-특이적 항체를 이용한 ELISA에 의해서 및 세포 상층액에 분비되는 시토킨 및/또는 케모킨을 측정하기 위하여 시토킨- 또는 케모킨-반응성 세포주를 사용하는 생물분석에 의해서와 같이 분비된 시토킨 또는 케모킨의 측정에 의해 측정될 수 있다. 상기 시토킨은 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF- α 및 IFN- γ 를 포함하는 임의의 전-염증성 시토킨 또는 케모킨일 수 있으나, 이들에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 시토킨은 IFN- γ 이다.

[0062] 바람직하게는, 후보 분자의 CD96-저해 효과는 인비보 종양 시험 모델을 이용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, CD96-발현 마우스를 사용한 마우스 모델이 메틸콜란트렌 (MCA)과 같은 투여된 발암제에 반응한 종양 형성 및/또는 성장을 저해하거나 예방하는 후보 분자의 능력을 결정하는데 사용될 수 있다. 다른 예에 있어서, CD96-발현 마우스를 이용한 마우스 모델이 흑색종, 대장 암종, 전립선 암 및 유방 암종을 포함하나, 이에 한정되지 않는 종양 세포의 투여에 반응한 종양 형성 및/또는 성장을 억제 또는 예방하는 후보 분자의 능력을 결정하는데 사용될 수 있다. 다른 마우스 모델이 MMTV-폴리오마, MT 유방암, DMBA/TPA 유도 피부암, p53의 손실 림프종/육종 및 TRAMP Tg 전립선 암을 포함하나, 이에 제한되지 않는 종양을 자발적으로 형성하는 성향을 갖는 마우스를 활용할 수 있다.

[0063] 이 양태의 방법은 반복적으로 수행될 수 있고, 그에 의해 여러 차례의 스크리닝, 설계, 및 생물학적 시험이 수행된다는 것을 이해될 것이다. 후보 분자는 각 수행 (round) 전에 구조적으로 변형되어, 후보 분자의 "미세-조

정 (fine-tuning)"이 가능한 경우를 포함할 수 있다.

- [0064] 또한 상기 방법 “고효율 (high throughput)”, “자동 (automated)”, 또는 “반자동 (semi-automated)” 방식으로, 특히 후보 분자 확인 및 선택의 초기 단계 동안 수행될 수 있음이 인식될 것이다.
- [0065] 바람직한 구체예에 있어서, 상기 후보 분자는 항체 또는 항체 단편이다. 본 명세서에서 전술된 바와 같이, 항체는 폴리클론 또는 모노클론, 천연의 또는 재조합일 수 있다. 항체 단편은 Fab 및 Fab'2 단편, 디아바디 및 단쇄 항체 단편 (예를 들어, scV)를 포함하나, 이들에 제한되지 않는다. 항체의 생산, 선택, 정제 및 사용에 적용가능한 잘-알려진 프로토콜을, 예를 들어, 본 명세서에서 모두 참조로 포함된, Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley & Sons NY, 1991-1994)의 제 2장, 및 Harlow, E. & Lane, D. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988에서 찾을 수 있다.
- [0066] 폴리클론항체는 폴리클론 항혈청을 얻기 위하여, 예를 들어 CD96 또는 그의 단편(예를 들어, 펩티드)을 마우스, 또는 토끼를 포함하는 생산 중에 주사함으로써 준비될 수 있다. 폴리클론 항체를 생산하는 방법은 당 업계의 숙련된 자에게 잘 알려져 있다. 사용될 수 있는 예시적 프로토콜이 예를 들어, Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY의 상술한 부분, 및 Harlow & Lane, 1988의 상술한 부분에 설명되어 있다.
- [0067] 모노클론 항체는 예를 들어, 본 참조에 의해 본 명세서에 포함된, Kohler & Milstein, 1975, Nature **256**, 495에 의한 논문에 기술된 대로, 또는 그의 보다 최근의 수정본에 의해 예를 들어 Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY의 상술한 부분에 기술된 대로, 본 발명의 단리된 단백질, 단편, 변이체, 또는 유도체의 하나 이상으로 접종된 생산 종으로부터 유래된 비장 또는 다른 항체 생산 세포를 불멸화하는 것에 의한 표준 방법을 이용하여 생산될 수 있다. 적절하게는, 상기 항체 또는 항체 단편은 인간에게 투여하기 위하여 적절할 수 있다. 이와 관련하여, 전술된 바와 같이 상기 항체 또는 항체 단편은 다른 종으로부터 생산된, 또는 유래한 항체 또는 항체 단편의 “인간화 (humanized)” 형태일 수 있다. 그러한 방법은 당 업계에 잘 알려져 있고 일반적으로 인간 항체 스카폴드 또는 백본에 비-인간 항체 상보성 결정 영역 (complementarity determining regions: CDRs)의 재조합적 “그래프팅 (grafting)”을 포함한다.
- [0068] 바람직한 구체예에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 인간으로 투여시, CD96-발현 세포를 살해하지 않는다. 이러한 맥락에서, “살해 (killing)”는 보체-매개 세포용해 또는 항체-매개 세포-매개 세포독성 (ADCC)과 같은 항체-매개 시토킨 기전을 의미하고, 후자는 통상적으로 자연 살해 (NK) 세포, 대식세포, 호중구 및 호산구에 의해 매개된다. 이와 관련하여, Fc 부분이 결합되거나 또는 인간 Fc 부분(예를 들어, 인간화된 항체)을 갖는 항체 단편을 사용하는 것이 유리할 수 있다.
- [0069] 상술한 양태에 따라 스크리닝, 설계, 엔지니어링 또는 생산된 CD96-저해제가 제 1 양태의 방법에 따라 (예를 들어, 항암제 및/또는 항 바이러스제로서), 바람직하게는 전술된 바와 같은 약학적 조성물의 형태로 사용될 수 있다.
- [0070] 본 발명이 쉽게 이해되고 실용적인 효과에 투입될 수 있도록, 하기의 비제한적 실시예들을 참조한다.

도면의 간단한 설명

- [0071] 도 1: CD96는 CD155 결합을 위해서 DNAM-1과 경쟁한다. **a**, **b** CD96의 발현은 표시된 C57BL/6 WT (밝은 회색) 및 $CD96^{-/-}$ 마우스 (어두운 회색)로부터의 비장 백혈구 집단에 대한 유동 세포계수법에 의해서 분석하였다. 3회 중 하나의 대표 실험으로부터 3마리의 마우스의 대표적인 FACS 히스토그램 (**a**) 및 그 평균 \pm SD (**b**)가 표시된다. **c**, **d** 상기 CD96, DNAM-1 및 TIGIT의 발현은 갓 분리되거나 또는 인터루킨-2 (IL-2) (1000 U/ml)로 48시간 동안 활성화된 WT 비장 NK 세포에서 결정하였다. **e**. AF-647과 커플링 된 마우스 CD155-Fc의 WT, $CD96^{-/-}$, $DNAM-1^{-/-}$ 또는 $DNAM-1^{-/-}CD96^{-/-}$ 마우스로부터 갓 분리된 정제된 NK 세포에 대한 결합은 표시된 농도에서 유동 세포계수법에 의하여 평가하였다. **f**. AF-647 (10 μ g/ml)과 커플링된 CD155-Fc의 결합은 항-CD96 및 또는 항-DNAM-1 mAbs의 존재 하에 정제된 WT NK 세포에서 분석하였다. **g**. BMDC의 세포 표면에서 AF-647 (0.5-10 μ g/ml)로 표지된 DNAM-1-Fc의 결합은 대조군 Ig, 재조합 CD96 또는 TIGIT-Fc의 50 μ g/ml의 존재하에 분석하였다. **c-g**. 3회 이상의 실험 중 하나의 대표 실험으로부터의 3배수 웰 (triplicate wells)의 대표 FACS 히스토그램 및 그 평균 \pm SD가 표시된다. *** $p < 0.001$ 스튜던트 T 검정.

도 2: CD155에 의한 CD96의 결합 (engagement)이 NK 세포의 인터페론-감마 (IFN- γ)의 생산을 조절한다. CD96

의 CD155-Fc로의 결합은 외인성 시토킨(**a, b, d**) 및 NK 세포 수용체(**c**)에 의하여 유도된 NK 세포에 의한 IFN- γ 의 생산을 제한한다. **a, b, d**. 우리는 CD155-Fc (0.5 μ g/웰)로 코팅되거나 또는 코팅되지 않은 플레이트를 사용하여 IL-12 (25-100 pg/ml) 및 IL-18 (50 ng/ml)에 대한 반응에서 항-CD96 (50 μ g/ml)의 존재 또는 부재 하에 갓 정제된 $CD96^{-/-}$, $TIGIT^{-/-}$ 및 WT NK 세포에 의한 IFN- γ 의 세포 내 생산을 분석하였다. **c**. 본 발명자들은 항-NK1.1 (2.5 μ g/웰) 및 CD155-Fc (0.5 μ g/웰)로 코팅된 플레이트를 사용하여 $CD96^{-/-}$ 및 WT 마우스로부터의 IL-2-활성화된 NK 세포에 의한 IFN- γ 의 세포 내 생산을 분석하였다. 3회 중 하나의 대표 실험으로부터 3배수 웰의 대표 FACS 히스토그램 (**a**) 및 그 평균 \pm SD (**b, c, d**)가 표시된다. *p <0.05, ** p <0.01, *** p<0.001, 스튜덴트 T 검정.

도 3: CD96는 NK 세포-의존적 종양 면역감시를 제한한다. **a, b**. CD96과 DNAM-1은 B16F10 전이의 조절에서 반대의 역할을 갖는다. **a**. 2×10^5 개의 B16F10 세포가 WT , $CD96^{-/-}$, $DNAM-1^{-/-}$ 및 $DNAM-1^{-/-}CD96^{-/-}$ 마우스에 정맥하고 전이 정도 (metastatic burden)를 14일 후 폐에서 정량하였다. 3회 중 대표 실험. **b**. 2×10^5 및 5×10^5 개의 B16F10 세포의 주사 2주 후 WT 및 $CD96^{-/-}$ 마우스의 폐를 보여주는 사진. 2회 중 대표적인 실험. **c**. CD96 및 TIGIT는 B16F10의 세포 표면에서 CD155의 결합을 위해 DNAM-1과 경쟁한다. B16F10 세포의 세포 표면에서 AF-647 (0.5-20 μ g/ml)로 표지된 DNAM-Fc-1의 결합은 대조군 Ig, 재조합 CD96 또는 TIGIT-Fc의 50 μ g/ml의 존재 하에 분석하였다. 3회 중 하나의 대표 실험으로부터 3부 웰의 FACS 히스토그램 및 그 평균 + SD가 표시된다. **d**. 표시된 이펙터 표적 비율 (effector target ratio)에서 WT , $DNAM-1^{-/-}$ 및 $CD96^{-/-}$ 마우스로부터의 B16F10 세포 및 IL-2-활성화된 NK 세포 간에 4 시간 ^{51}Cr 방출 분석을 수행하였다. 흑색 원 (solid circle)은 WT NK 세포, 백색 원 (open circle)은 $CD96^{-/-}$ NK 세포를 나타내고 흑색 사각형 (solid square)은 $DNAM-1^{-/-}$ NK 세포를 나타낸다. **e-h**. CD96 및 DNAM-1은 NK 세포에 의해서 매개된 MCA 유도된 섬유육종의 면역감사에서 반대 역할을 한다. **e-h**. 15 내지 30 마리 수컷, WT , $DNAM-1^{-/-}$ 및 $CD96^{-/-}$ 및 $DNAM-1^{-/-}CD96^{-/-}$ 마우스의 그룹은 MCA(100 μ g/마우스)로 주사되었다. 육종이 있는 개별 마우스의 생존 (**e-g**) 및 성장곡선 (**h**)이 보여진다. **f**. WT 마우스를 재료 및 방법에 정의된 바대로 항-CD96, 항-DNAM-1 또는 항-CD155 mAb로 처리하였다. **g**. WT 및 $CD96^{-/-}$ 마우스에 100 μ g MCA를 주사하고 대조군 항체, 항-IFN- γ 항체, 또는 항-아시알로GM1을 처리하였다. * P <0.05 만텔-콕스 검정 (Mantel-Cox test).

도 4: 항-CD96 mAb는 단일 작용제 활성을 갖고 항-PD1의 항-종양 반응을 증진시킨다. C57BL/6 야생형 (WT) 마우스에 AT3-OVA^{dim} 종양 세포 (10^6 개 세포)를 피하 주사하고 16, 20, 및 24 일차에 항 CD96 mAb (3.3, 250 μ g i.p) 또는 항-PD-1 (RMP1-14, 250 μ g i.p)의 복강 내 주사로 처리하였다. 그룹 당 5마리 마우스의 평균 \pm SEM (mm^2)이 표시된다 (*: 만-휘트니 검정 (Mann-Whitney test)에 의한 cIg 단독대비 P <0.05).

도 5: 항-CD96 mAb는 독소루비신 (DOX) 화학치료에 의해 생성된 항-종양 반응을 증진시킨다. C57BL/6 야생형 (WT), $DNAM-1^{-/-}$, 및 $CD96^{-/-}$ 마우스에 AT3-OVA^{dim} 종양 세포 (10^6 개 세포)를 피하 주사하고 대조군 PBS 또는 DOX (50 마이크로리터, 2mM, 종양내)로 14 일차에 처리하였다. WT 마우스의 일부 그룹은 또한 12, 14, 18, 21, 24 및 28 일차에 항-CD96 mAb(3.3, 250 μ g i.p) 또는 항-DNAM-1 (480.1 250 μ g i.p)의 복강내 주사를 받았다. 그룹 당 5마리 마우스의 평균 \pm SEM (mm^2)이 표시된다.

도 6: 숙주 CD96 결손 (deficiency)을 동반한 독소루비신 (DOX) 화학치료의 증진된 항-종양 반응. C57BL/6 야생형 (WT), $DNAM-1^{-/-}$, 및 $CD96^{-/-}$ 마우스에 AT3-OVA^{dim} 종양 세포 (10^6 개 세포)를 피하 주사하고 대조군 PBS 또는 DOX (50 마이크로리터, 2mM, 종양 내)로 16 일차에 처리하였다. 그룹 당 5마리 마우스의 평균 \pm SEM (mm^2)이 표시된다.

도 7: 항-CD96 mAb는 독소루비신 (DOX) 화학치료에 의해 생성된 항-종양 반응을 증진시킨다. C57BL/6 야생형 (WT) 마우스에 AT3-OVA^{dim} 종양 세포 (10^6 개 세포)를 피하 주사하고 대조군 PBS 또는 DOX (50 마이크로 리터, 2 mM, 종양 내)로 16 일차에 처리하였다. WT 마우스의 일부 그룹은 또한 16, 20, 및 23 일차에 항-CD96 mAb (3.3, 250 μ g i.p)의 복강 내 주사를 받았다. 그룹 당 5마리 마우스의 평균 \pm SEM (mm^2)이 표시된다 (*: 만-휘트니 검정에 의한 cIg 단독 대비 P <0.05).

도 8: 초기 항-CD96 mAb는 항-PD-1, 및 항-CTLA-4 mAb에 의해 생성된 항-종양 반응을 증진시킨다. C57BL/6 야생형 (WT) 마우스에 B16-OVA 흑색종 세포 (10^5 개 세포)를 피하 주사하고, 1, 5, 및 9 일차에 항-CD96 mAb (3.3, 250 μ g i.p), 항-PD-1 mAb (RMP1-14, 250 μ g i.p), 항-CTLA-4 (UC10-4F10, 250 μ g i.p), 항-CD96 mAb/항-PD-1 mAb (각각 250 μ g i.p), 항-CD96 mAb/항-CTLA-4 mAb (각각 250 μ g i.p) 또는 대조군 Ig (cIg) (2A3, 250 μ g i.p)의 복강 내 주사로 처리하였다. 그룹 당 5마리 마우스의 평균 \pm SEM (mm^2)이 표시된다 (*: 만-휘트니 검정에 의한 항-CD96 단독 대비 $P < 0.05$).

도 9: 후기 항-CD96 mAb는 항-PD-1 mAb에 의해 생성된 항-종양 반응을 증진시킨다. C57BL/6 야생형 (WT) 마우스에 B16-OVA 흑색종 세포 (10^5 개 세포)를 피하 주사하고, 16, 20, 및 24 일차에 항-CD96 mAb (3.3, 250 μ g i.p), 항-PD-1 mAb (RMP1-14, 250 μ g i.p), 항-CTLA-4 (UC10-4F10, 250 μ g i.p), 항-CD96/-PD-1 mAbs (각각 250 μ g i.p), 항-CD96/anti-CTLA-4 mAbs (각각 250 μ g i.p) 또는 대조군 Ig (cIg) (2A3, 250 μ g i.p)의 복강 내 주사로 처리하였다. 그룹 당 5마리 마우스의 평균 \pm SEM (mm^2)이 표시된다 (*: 만-휘트니 검정에 의한 항-CD96 단독 대비 $P < 0.05$).

도 10: 숙주 CD96이 B16F10 폐 전이를 촉진한다. C57BL/6 야생형 (WT), DNAM-1^{-/-}, CD96^{-/-}, 및 DNAM-1^{-/-}CD96^{-/-} 마우스에 B16F10 흑색종 세포 (10^5 개 세포)를 정맥 주사하고 전이 정도를 14일 후에 폐 표면에서 콜로니를 계수하는 것에 의해 폐에서 정량하였다. 그룹당 9 내지 17마리 마우스의 평균 \pm SEM이 표시된다 (*: 만-휘트니 검정에 의한 WT 대비 $P < 0.05$).

도 11: 숙주 CD96이 RM-1 폐 전이를 촉진한다. C57BL/6 야생형 (WT), DNAM-1^{-/-}, CD96^{-/-}, 및 DNAM-1^{-/-}CD96^{-/-} 마우스에 RM1 전립선 암 세포 (10^4 개 세포)를 정맥 주사하고 전이 정도는 14일 후에 폐 표면에 콜로니를 계수하는 것에 의해 폐에서 정량하였다. 그룹 당 10 내지 15마리 마우스의 평균 \pm SEM이 표시된다 (*: 만-휘트니 검정에 의한 WT 대비 $P < 0.05$).

도 12 : 숙주 CD96이 3LL 폐 전이를 촉진시킨다. C57BL/6 야생형 (WT), DNAM-1^{-/-}, CD96^{-/-}, 및 DNAM-1^{-/-}CD96^{-/-} 마우스에 3LL 폐 암종 세포 (10^5 개 세포)를 정맥 주사하고 전이 정도를 14일 후에 폐 표면에 콜로니를 계수하는 것에 의해 폐에서 정량하였다. 그룹 당 5마리 마우스의 평균 \pm SEM이 표시된다 (*: 만-휘트니 검정에 의한 WT 대비 $P < 0.05$).

도 13: 항-CD96은 단독으로 및 T 세포 체크포인트 차단과의 조합에서, B16F10 폐 전이를 억제한다. C57BL/6 야생형 (WT) 마우스에 B16F10 흑색종 세포 (10^5 개 세포)를 정맥 주사하였다. 종양 접종 후 0 일 및 3 일차에, 마우스를 항 CD96 mAb (3.3, 250 μ g i.p), 항-PD-1 mAb (RMP1-14, 250 μ g i.p), 항-CTLA-4 (UC10-4F10, 250 μ g i.p), 항-CD96/항-PD-1 mAbs (각각 250 μ g i.p), 항-CD96/항-CTLA-4 mAbs (각각 250 μ g i.p) 또는 대조군 Ig (cIg) (2A3, 250 μ g i.p)의 복강 내 주사로 처리하였다. 전이 정도는 14 일 후 폐 표면의 콜로니를 계수하는 것에 의해 폐에서 정량하였다. 그룹 당 5마리 마우스의 평균 \pm SEM이 표시된다 (*: 만-휘트니 검정에 의한 항-CD96 단독 대비 $P < 0.05$).

도 14: 항-CD96은 단독 및 T 세포 체크포인트 차단과의 조합에서, RM-1 폐 전이를 억제한다. C57BL/6 야생형 (WT) 마우스에 RM-1 전립선 암 세포 (10^4 개 세포)를 정맥 주사하였다. 종양 접종 후 0 일 및 3 일차에, 마우스를 항-CD96 mAb (3.3, 250 μ g i.p), 항-PD-1 mAb (RMP1-14, 250 μ g i.p), 항-CTLA-4 (UC10-4F10, 250 μ g i.p), 항-CD96/항-PD-1 mAbs (각각 250 μ g i.p), 항-CD96/항-CTLA-4 mAb(각각 250 μ g i.p) 또는 대조군 Ig (cIg) (2A3, 250 μ g i.p)의 복강 내 주사로 처리되었다. 전이 정도는 폐 표면에서 14 일 후에 콜로니를 계수하는 것에 의해 폐에서 정량하였다. 그룹 당 5마리 마우스의 평균 \pm SEM이 표시된다 (*: 만-휘트니 검정에 의한 항-CD96 단독 대비 $P < 0.05$).

도 15: 후기 항-CD96 mAb는 항-PD-1 mAb에 의해 생성된 항-종양 반응을 증진시킨다. C57BL/6 야생형 (WT) 마우스에 MC38-OVA^{dim} 대장 선암 세포 (10^6 개 세포)를 피하 주사하고 14, 18, 22 및 26 일차에 항-CD96 mAb (3.3, 250 μ g i.p), 항-PD-1 mAb (RMP1-14, 250 μ g i.p), 항-CTLA-4 (UC10-4F10, 250 μ g i.p), 항-CD96/항-PD-1 mAbs (각각 250 μ g i.p), 항-CD96/항-CTLA-4 mAbs (각각 250 μ g i.p) 또는 대조군 Ig (cIg) (2A3, 250 μ g i.p)를 복강 내 주사로 처리하였다. 그룹 당 5마리 마우스의 평균 \pm SEM (mm^2)이 표시된다 (*: 만-휘트니 검정에

의한 항-CD96 단독 대비 $P < 0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0072] 실시예
- [0073] 실시예 1
- [0074] CD96의 CD155로의 결합 및 마우스 종양 모델에서 CD96 저해 및
- [0075] 마우스 뇌아웃
- [0076] 재료 및 방법
- [0077] 마우스
- [0078] 야생형 C57BL/6 마우스는 메디컬 연구를 위한 왈터 및 엘리자 홀 기구 (Walter and Eliza Hall Institute for Medical Research) 또는 동물 실험 센터(Animal Resource Centre: ARC)로부터 구입하였다. C57BL/6 CD96^{-/-} 마우스는 워싱턴 의과대학 (Washington University School of Medicine) (St Louis, MO, USA)에서 Marco Colonna 박사 및 Susan Gilfillan 박사에 의해서 하기와 같이 생성되었다. 시작 지점을 포함하여, CD96의 엑손 1 및 2가, loxP 부위로 플랭킹 (flank)된 MC1-neor 유전자로 교체하도록 설계된, 표적화 구조체 (targeting construct)를 E14.1 (129P2/OlaHsd) 배아 줄기세포로 전기천공시켰다 (도. S1). 표적 대립 유전자를 전달하는 키메라는 C57BL/6 포배로 주사한 다음 두 클론으로부터 얻었다. 표적 대립 유전자를 운반하는 마우스는 상기 MC1-neor 유전자를 결실시키기 위해 CMV 프로모터 하에 Cre 형질전환유전자를 발현하는 C57BL/6 마우스와 교배시켰다 (Schwenk et al., 1995). CD96 결실을 C57BL/6 배경에 역교배시키고, 각 세대에서 10 centiMorgan 간격의 다형성 마이크로세틸라이트 (microsatellite) 표지자의 게놈-전체의 스크리닝에 의해 촉진하였다. CD96^{-/-} 마우스를 생성하기 위해 CD96^{+/-} >99% C57BL/6 마우스를 이종교배시켰다. DNAM-1^{-/-} 마우스는 이미 설명되었다. DNAM-1^{-/-} CD96^{-/-}는 DNAM-1^{-/-} 마우스와 CD96^{-/-}를 이종교배함으로써 생성되었다. 마우스는 사육되고 6 내지 14 주령에 사용되었다. 모든 실험은 동물 윤리 위원회에 의해 승인되었다.
- [0079] 세포 배양
- [0080] B16F10, RM-1, 3LL, AT3, MC38 및 YAC-1 세포주를 10% FBS (Thermo Scientific), L-글루타민 (Gibco), 비-필수 아미노산, 피루브산 나트륨, HEPES (Gibco) 및 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco)으로 보충된, 완전 RPMI 배지 (Gibco, Invitrogen)에서, 5% CO₂ 중 37 °C에서 증식시켰다. 세포 독성 분석 및 IL-12/IL-18 적정 실험을 위해, 일차 NK 세포를 비장으로부터 수집하고 마우스 NK 세포 분리 키트 (Miltenyi Biotec) 및 AutoMACS (Miltenyi Biotec)을 사용하여 분류하고, 뒤이어 10 % FCS, L-글루타민, 페니실린/스트렙토마이신, 비-필수 아미노산 (Gibco), 피루브산 나트륨(Gibco), HEPES (Gibco), β-2-머캅토에탄올 (Calbiochem), 및 1000 IU/ml의 제조합 인간 IL-2 (Chiron Corporation)로 보충된 RPMI 배지에서 5 일간 배양하였다. 모든 세포는 5% CO₂ 중 37 °C에서 인큐베이션 시켰다.
- [0081] 인비보 LPS 유발 (challenge)
- [0082] PBS에 현탁된 LPS (대장균 0127:B8 유래, Sigma)를 기술된 용량으로 마우스에 복강 내로 주사하였다. 생존 곡선을 위해, 마우스를 패혈증 증상에 대해 시간당 체크하였다. 이 마우스로부터의 혈청을 시토킨 분석을 위해 안구-뒤 (retro-orbital) 또는 심장 채혈에 의해 다양한 시점에 채취하였다. 비장도 NK 세포로부터의 수용체 및 리간드의 발현, 및 세포 내 IFN-γ의 발현을 분석하기 위해 다양한 시점에 마우스로부터 채취하였다.
- [0083] 인비보 종양 유발
- [0084] 마우스 B16F10 또는 B16-OVA 흑색종, RM-1 전립선 암종, 3LL 폐 암종, MC38-OVA^{dim} 대장 선암종 또는 AT3-OVA^{dim} 유방 암종을 각각 WT, DNAM-1^{-/-}, CD96^{-/-}, 또는 DNAM-1^{-/-}CD96^{-/-} 마우스에 표시된 용량으로 피하 또는 정맥으로 주사하고, 고형암 성장 또는 전이에 대해 모니터링하였다. 처리는 상기 도면 설명 (legend)에 표시된 대로 적용하였다. 고형 종양의 성장을 모니터링하기 위하여, 결과로 나타나는 종양의 면적을 만져지는 종양의 길이 및 폭을 캘리퍼스에 의해 측정함으로써 계산하고 시간에 대해 도시되었다. 전이 형성을 모니터링하기 위해, 세포를 주사한 후 14일 후에, 폐를 수집하고, Bouin 고정액에 넣고, 및 해부 현미경을 이용하여 전이를 계수하였다.

[0085] MCA-유도 섬유육종

[0086] WT, DNAM-1^{-/-}, CD96^{-/-} 및 DNAM-1^{-/-}CD96^{-/-} 마우스에 MCA의 다양한 용량 (5-400 μ g, 예를 들면, 100 μ g MCA)을 오른쪽 측면에 피하 주사하고, 섬유육종 형성을 시간의 경과에 따라 모니터링하였다. 게다가, 일부 마우스를 대조군 항체로 처리하고, 항-아시알로GM1으로 처리 (Wako Chemicals; -1, 0 일 및 그 후 8 주까지 매주마다 100 μ g i.p.로 주사됨)하여 NK 세포를 고갈시키고, IFN- γ (H22, -1, 0 일 및 그 후 8 주까지 매주마다 250 μ g i.p.로 주사됨), CD155, DNAM-1 또는 CD96에 대해 중성화시켰다.

[0087] 수지상 세포 (BMDc): NK 세포 공동배양 분석

[0088] BMDc는 전술한 바와 같이 생성하였다. 요약하면, 본 발명자들은 마우스의 대퇴골 및 경골로부터 골수 세포를 수집하고 이들을 10% FCS, L-글루타민, 페니실린/스트렙토마이신, 비필수 아미노산, 피루브산 나트륨, β -2-머캅토에탄올, 및 250 ng/ml GM-CSF (eBioscience)로 보충된 DMEM에서 6일간 배양하였다. WT 또는 CD96^{-/-} NK 세포를 비장으로부터 수집하고 NK1.1 (PK136) 및 TCR β (H57-597) 및 CD3 (17A2) 항체로 염색함으로써 순도로 FACS 분류하였다. NK 세포는 분석 당일에 수집하였다. 분석 설정을 위해, 5 x 10⁴ BMDc를 96 웰 U 바닥 플레이트에 도말하였다. NK 세포를 다양한 적정 (2:1, 1:1, 0.5:1, 및 0.25:1)으로 상기 BMDc에 첨가하였다. BMDc 단독 및 NK 단독을 대조군으로서 분석에 항상 포함시켰다. 모든 세포를 도말한 후, 각 웰을 웰 간에 동등한 양을 갖도록 배지의 적당량으로 충전시켰다. LPS 100ng/ml를 2 시간 동안 웰에 첨가하고, 뒤이어 5 mM의 정제된 ATP (Sigma)를 30 분 동안 첨가했다. 이를 5% CO₂, 37 °C에서 수행하였다. LPS 단독 및 ATP 단독 대조군을 대조군으로서 상기 분석에 또한 포함시켰다. ATP에 의한 30 분간 후, 상층액을 수집하고, 분석할 때까지 -20 °C에서 보관하였다.

[0089] ⁵¹Cr 세포독성 분석

[0090] 표적을 살해하는 WT 및 CD96^{-/-} NK 세포의 능력을 분석하기 위해 표준 ⁵¹Cr 세포독성 분석을 이용하였다. 요약하면, ⁵¹Cr 100 μ Ci로 표지된 20,000 개의 표적을 V 바닥 플레이트에 첨가하고 NK 세포를 정의된 이펙터 대 표적 비율로 상기 표적에 첨가하였다. 5% CO₂, 37 °C에서 4시간 후, 상층액을 수집하고, ⁵¹Cr의 수준을 감마 카운터 (Wallac Wizard)로 정량하였다. 특이적 살해 퍼센트 (percentage specific killing)는 공식((시료의 Cr 방출-자발적인 Cr 방출)/(총 Cr 방출-자발적인 Cr 방출) × 100)을 사용하여 결정하였다.

[0091] 시토킨 검출

[0092] 혈청 또는 상층액의 IL-18을 제외한 모든 시토킨 검출은 세포계수적 비드 어레이 (Cytometric Bead Array: CBA) 기술 (BD Biosciences)을 이용하여 달성되었다. 획득 (acquisition)은 Canto II 또는 LSRII 유동 세포계수적 분석기 (Flow Cytometric Analyser) (BD Biosciences)를 사용하여 완료하였다. 분석은 FCAP 어레이 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. IL-18은 제조사 (MRL)의 설명서에 따라 ELISA에 의해 검출하였다. 세포 내 시토킨의 검출을 위해, 간으로부터 단리된 림프구를 얻었고, 표면 마커에 대해 염색하고, 고정시키고 및 투과성화되고(BD Biosciences), 및 항-IFN- γ 항체 (XMG1.2)로 염색하였다.

[0093] 유동 세포계수법 분석 및 분류

[0094] 면역 세포 항상성 및 CD96/CD155 발현의 분석: 각종 기관 (림프절, 폐, 비장, 골수 및 간)을 적혈구 세포 용해를 포함하는 하나의 림프구 현탁액으로 가공하였다. 특이적 항체를 활용하기 전에 비특이적 Fc 항체의 결합을 차단하기 위해 1 x 10⁶ 내지 5 x 10⁶ 개의 세포를 먼저 2.4G2와의 인큐베이션에 적용시켰다. NK 세포 항상성 및 IFN- γ 생산을 분석하기 위해, 다음의 항체를 사용하였다: 항 마우스- NK1.1, -TCR β , -CD27 (LG.7F9), -CD11b (M1/70) 및 -IFN- γ . T 세포의 경우: 항 마우스-TCR β , -CD8 (53-6.7), 및 -CD4 (RM4-5). B 세포의 경우: 항 마우스-B220 (RA3-6B2), -CD19 (1D3). NKT 세포의 경우: α -갈락토실세라미드가 로딩된 마우스 CD1d 사탕채 (멜버른 대학의 Dale Godfrey 교수에 의해 친절히 제공됨), 항 마우스-TCR β 또는 -CD3, -CD4 및 -NK1.1. 대식 세포의 경우: 항 마우스-F4/80 (BM8) 및 -CD11b. 호중구의 경우: 항 마우스-Ly6G (1A8)과 -CD11b. 통상적인 DC의 경우: 항 마우스-MHC II (M5/114.15.2) 및 -CD11c (N418). γ δ T 세포의 경우: 항 마우스- γ δ TCR (GL3) 및 -CD3. CD96 및 CD155의 발현을 분석하기 위해, 특정한 목적 세포 유형을 항 마우스-CD96 (3.3.3) 또는 항 마우스-CD155 (4.24.3)와 함께 전술된 항체 콤보를 사용하여 게이팅(gate)하였다. 습득은 LSR II, 또는 Canto

II 유동 세포계수적 분석기 (BD Biosciences)를 사용하여 수행하였다. Flowjo (Treestar)을 사용하여 분석을 달성하였다.

[0095] 세포 분류

[0096] 비장으로부터의 천연의 (native) NK 세포 및 대식세포를 상술한 바와 같이 준비하고 및 염색시켰다. 이러한 세포들을 그 후 Aria II FACS sorter (BD Biosciences)를 사용하여 순수하게(to purity) 분류하였다

[0097] 통계적 분석

[0098] 통계적 분석은 Graphpad Prism Software를 이용하여 수행하였다. 데이터는 p 값이 0.05보다 같거나 또는 작은 경우 통계적으로 유의하다고 간주하였다. 생존의 경우 사용된 통계적 검정은 비대칭 스튜넨트 검정, 만 휘트니 검정, 및 만텔-콕스 검정이었다. 사용된 적절한 검정이 도면 설명에 명시되어 있다.

[0099] 결과

[0100] CD96은 CD155 결합에 대해 DNAM-1과 경쟁하고 (도 1), CD155에 의한 CD96 모집 (engagement)은 NK 세포의 IFN- γ 의 생산을 하향-조절한다 (도 2). CD96은 MCA-처리된 마우스에서 NK 세포-의존성 종양 면역감시를 제한하고 및 실험적 B16F10 폐 전이를 촉진한다 (도 3).

[0101] 도 4의 데이터는 항-CD96 mAb가 항-PD1의 항-종양 반응을 또한 증진시키면서 단일 작용제 활성화 (즉, 항-PD1 처리 없이)를 가지고 있음을 보여준다. 항-CD96 mAb 치료는 또한 CD96 결손 숙주에서 독소루비신 (DOX) 화학치료에 대한 증진된 항-종양 반응이 관찰된 도 6과 일치하게, 독소루비신 (DOX) 화학치료에 의해 생성된 항-종양 반응을 증진시킨다 (도 5 및 7). 도 8 및 도 9를 참조하면, 초기 또는 후기에 주어질 때, 항-CD96 mAb는 항-PD-1 및 항-CTLA-4 mAb에 의해 생성된 항-종양 반응을 증진시키고 항-PD-1과 함께 특별히 강한 시너지를 보인다.

[0102] 종양 전이의 촉진에서 CD96의 효과도 또한 조사하였다. 도 10에서, B16F10 폐 전이의 조절을 C57BL/6 야생형 (WT), DNAM-1^{-/-}, CD96^{-/-}, 및 DNAM-1^{-/-} CD96^{-/-} 마우스에서 조사하였다. 도 11에서, 숙주 CD96은 RM-1 폐 전이를 촉진하고 도 12에 있어서, 숙주 CD96은 3LL 폐 전이를 촉진한다. 도 13은 항-CD96 mAb는 단독으로 및 T 세포 체크포인트 차단과의 조합으로, B16F10 폐 전이를 억제한다는 것을 보여준다. 도 14에서, 항-CD96 mAb는 단독으로 및 T 세포 체크포인트 차단과 조합으로 RM-1 폐 전이를 억제한다. 도 15에서, 항-CD96 mAb는 MC38 결장 종양에 대해서 항-PD-1 및 항-CTLA-4 mAb에 의해 생성된 항-종양 반응을 증진시키고 항-PD-1과 함께 특별히 강한 시너지를 보인다.

[0103] 실시예 2

[0104] 항-CD96 항체 확인을 위한 스크리닝 분석

[0105] 도입

[0106] 하기의 분석은 본 발명에서 유용한 항체를 확인하기 위해 이용될 수 있다. 첫번째 분석은 인간 CD96과 인간 CD155 간의 결합을 차단하거나 또는 저해할 수 있는 인간 항체를 확인하기 위해 사용될 것이다. 두번째 분석은 확인된 항체가 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)를 유발하는지 여부를 테스트하는데 사용될 수 있다. 세번째 분석은 유력한 후보에 적용될 수 있고, 인간 CD96 항체가 인간 림프구 이펙터 기능을 조절할 수 있는지 여부를 결정하는 것을 포함한다.

[0107] 재료 및 방법

[0108] 분석 1: CD96의 CD155로의 결합

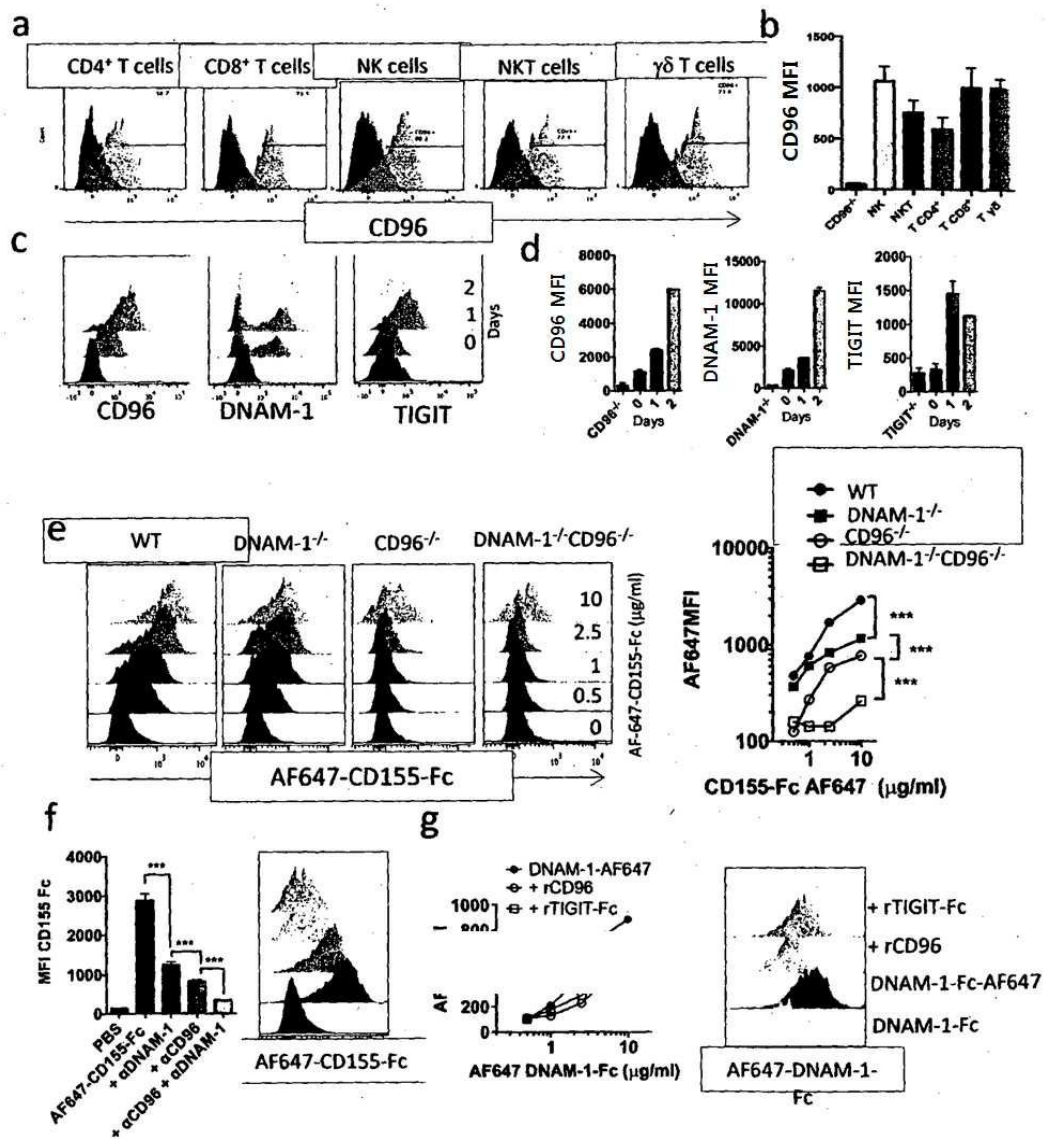
[0109] CD96 발현 세포 (예를 들면, NK 세포)의 세포 표면에 CD155가 결합하는 것을 예방하는 후보 항-CD96 항체의 능력은 다음과 같이 시험될 것이다. 인간 IgG1 (예를 들면, Sino Biological로부터 입수가 가능한 CD155-Fc)의 C-말단 Fc 영역에 융합된 제조한 인간 CD155를 제조사의 설명서에 따라 Zenon Human IgG 표지 키트 (Molecular Probe)를 사용하여 Alexa Fluor 647 (AF647)과 같은 형광체로 표지할 것이다. 건강한 공여자의 말초 혈액으로부터 갓 분리된 NK 세포 또는 다른 CD96-발현 세포를 상이한 농도의 항-CD96 또는 대조군 Ig의 존재하에 AF647 표지된 CD155-Fc와 함께 인큐베이션할 것이다 (상기 세포를 수집하고 AF647-CD155-Fc의 세포 표면 결합을 유동 세포계수기에 의해 테스트할 것이다). CD96-발현 세포로의 CD155 세포의 결합을 예방하는 항체는 CD96-발현 세포로의 CD155-Fc의 결합을 예방하는 그들의 능력에 의해서 확인할 것이다.

- [0110] 분석 2: ADCC 분석
- [0111] 항-CD96 항체의 존재 하에 면역 세포 (예를 들면, NK 세포 및/또는 T 세포)의 생존을 하기와 같이 분석할 것이다. 건강한 공여자로부터의 말초 혈액 면역 세포를 피콜 구배 분리(Ficoll gradient separation)에 의해 분리할 것이다. 면역 세포를 항-CD96 mAb의 증가되는 농도 및 적절한 용량의 인간 IL-2의 존재하에 96 웰 플레이트에 도달할 것이다. 생존 뿐만 CD96 발현 세포 (예를 들면, NK 세포 및/또는 T 세포)의 비율을 유동 세포계수법에 의해 시간이 지남에 따라 분석할 것이다. 이 분석에 적합한 상업적으로 사용가능한 키트의 비제한적인 예는 Annexin V Apoptosis Detection Kit 이다.
- [0112] 분석 3: 인간 CD96 항체의 인간 백혈구 이펙터 기능의 조절 (modulation)을 위한 분석
- [0113] 신선한 혈액 샘플을 건강한 공여자로부터 수집할 것이다. 말초 혈액 단핵 세포 (peripheral blood mononuclear cell: PBMC)를 원심분리에 의해서 Ficoll-Paque 밀도 구배로 준비할 것이다. 고순도 CD3-CD56+ NK 세포는 자기 활성화 세포 분류 (magnetically activated cell sorting)에 의해서 PBMC으로부터 얻을 것이다. 인간 NK 세포의 IFN- γ 생산에 영향을 주는 CD96의 능력을 분석하기 위해, 96 웰 U 바닥 플레이트를 제조한 인간 CD155-FC 키메라 (Sino Biological Inc.; 0.5 μ g/웰) 또는 무관한 (non-relevant) 인간의 IgG1 항체로 4 °C 에서 밤새 코팅할 것이다. 갓 정제된 인간 NK 세포를 이어서 24 시간 동안 인간 IL-12 및 IL-18로 보충된 완전 RPMI 배지에 도달하고 IFN- γ 의 세포 내 함량 및 상층액 중 수준을 상이한 배양물 중에서 분석할 것이다. 대안적으로, 인간 NK 세포를 다른 NK 세포 수용체와 상호작용하는 CD96 신호전달의 능력을 분석하기 위해 항-NKG2D, 항-NKp46, 항-NKp30 또는 항-CD16 항체로 코팅된 웰에서 24 시간 동안 자극할 것이다. 인간 NK 세포의 IFN- γ 생산을 증진시키는, 이러한 테스트 항-인간 CD96 항체의 능력을 확인하기 위해, 테스트될 항-인간 CD96 항체 또는 대조군 항체를 상기 시토킨 또는 항체에 앞서 배양물에 첨가할 것이다. 상기 대조군을 넘는 IFN- γ 생산의 통계적 증가가 유의한 것으로 간주될 수 있다.
- [0114] 본 명세서 전체에 걸쳐 목표는 본 발명을 임의의 하나의 구체에 또는 특징들의 특정 집합에 한정하지 않으면서, 본 발명의 바람직한 구체예를 설명하는 것이다. 따라서 본 개시를 고려하여, 본 발명의 범위를 벗어나지 않고, 다양한 수정 및 변화가 예시된 특정 구체예에서 이루어질 수 있다는 것이 당 업계에 숙련된 자에 의해 이해될 것이다.
- [0115] 본 명세서에 언급된 모든 컴퓨터 프로그램, 알고리즘, 특허 및 과학 문헌은 본 명세서에 참고에 의해 포함된다.
- [0116] 참조문헌
- [0117] 1.Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nature immunology* **9**, 503-510 (2008).
- [0118] 2.Lanier, L.L. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nature immunology* **9**, 495-502 (2008).
- [0119] 3.Chan, C.J., Smyth, M.J. & Martinet, L. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell death and differentiation* (2013).
- [0120] 4.Raulet, D.H. & Vance, R.E. Self-tolerance of natural killer cells. *Nature reviews* **6**, 520-531 (2006).
- [0121] 5.Fuchs, A. & Colonna, M. The role of NK cell recognition of nectin and nectin-like proteins in tumor immunosurveillance. *Seminars in cancer biology* **16**, 359-366 (2006).
- [0122] 6.Shibuya, A., et al. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* **4**, 573-581 (1996).
- [0123] 7.Wang, P.L., O'Farrell, S., Clayberger, C. & Krensky, A.M. Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. *J Immunol* **148**, 2600-2608 (1992).
- [0124] 8.Yu, X., et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature immunology* **10**, 48-57 (2009).
- [0125] 9.Boles, K.S., et al. A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC. *European journal of immunology* **39**, 695-703 (2009).

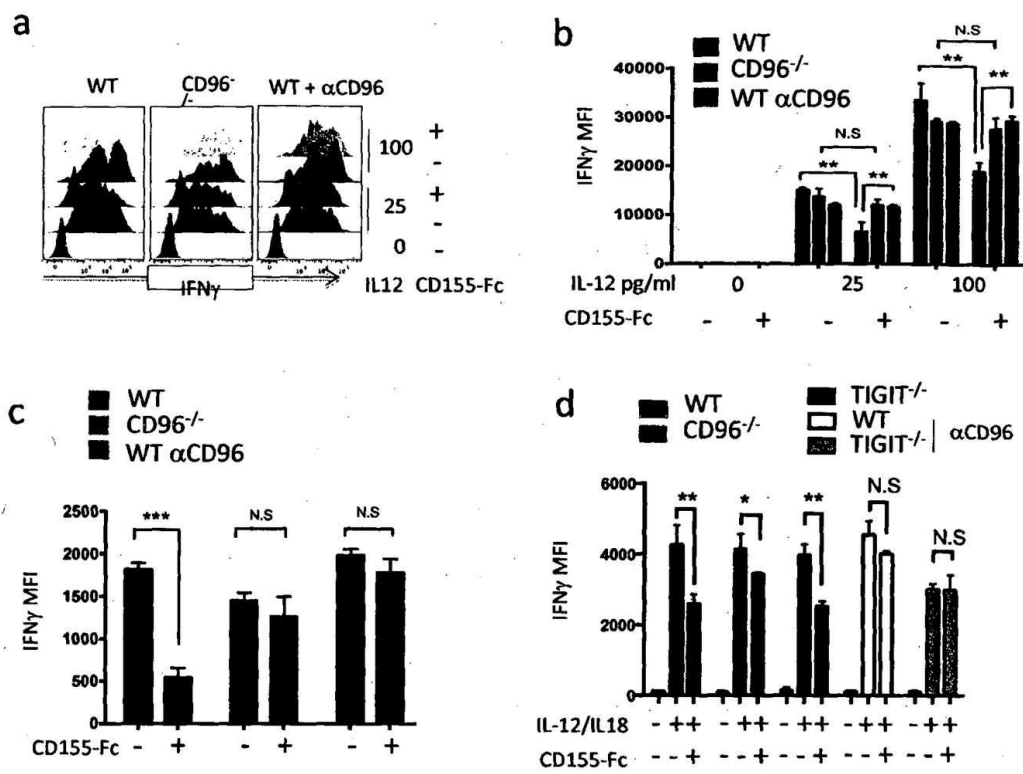
- [0126] 10.Kennedy, J., et al. A molecular analysis of NKT cells: identification of a class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM). *Journal of leukocyte biology* **67**, 725-734 (2000).
- [0127] 11.Bottino, C., et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *The Journal of experimental medicine* **198**, 557-567 (2003).
- [0128] 12.Lozano, E., Dominguez-Villar, M., Kuchroo, V. & Hafler, D.A. The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function. *Journal of immunology* **188**, 3869-3875 (2012).
- [0129] 13.Lakshmikanth, T., et al. NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *The Journal of clinical investigation* **119**, 1251-1263 (2009).
- [0130] 14.Chan, C.J., et al. DNAM-1/CD155 interactions promote cytokine and NK cell-mediated suppression of poorly immunogenic melanoma metastases. *J Immunol* **184**, 902-911 (2010).
- [0131] 15.Gilfillan, S., et al. DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *The Journal of experimental medicine* **205**, 2965-2973 (2008).
- [0132] 16.Iguchi-Manaka, A., et al. Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *The Journal of experimental medicine* **205**, 2959-2964 (2008).
- [0133] 17.Stanietsky, N., et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 17858-17863 (2009).
- [0134] 18.Stanietsky, N., et al. Mouse TIGIT inhibits NK-cell cytotoxicity upon interaction with PVR. *European journal of immunology* (2013).
- [0135] 19.Liu, S., et al. Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells. *Cell death and differentiation* **20**, 456-464 (2013).
- [0136] 20.Fuchs, A., Cella, M., Kondo, T. & Colonna, M. Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44. *Blood* **106**, 2076-2082 (2005).
- [0137] 21.Seth, S., et al. The murine pan T cell marker CD96 is an adhesion receptor for CD155 and nectin-1. *Biochemical and biophysical research communications* **364**, 959-965 (2007).
- [0138] 22.Fuchs, A., Cella, M., Giurisato, E., Shaw, A.S. & Colonna, M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J Immunol* **172**, 3994-3998 (2004).

도면

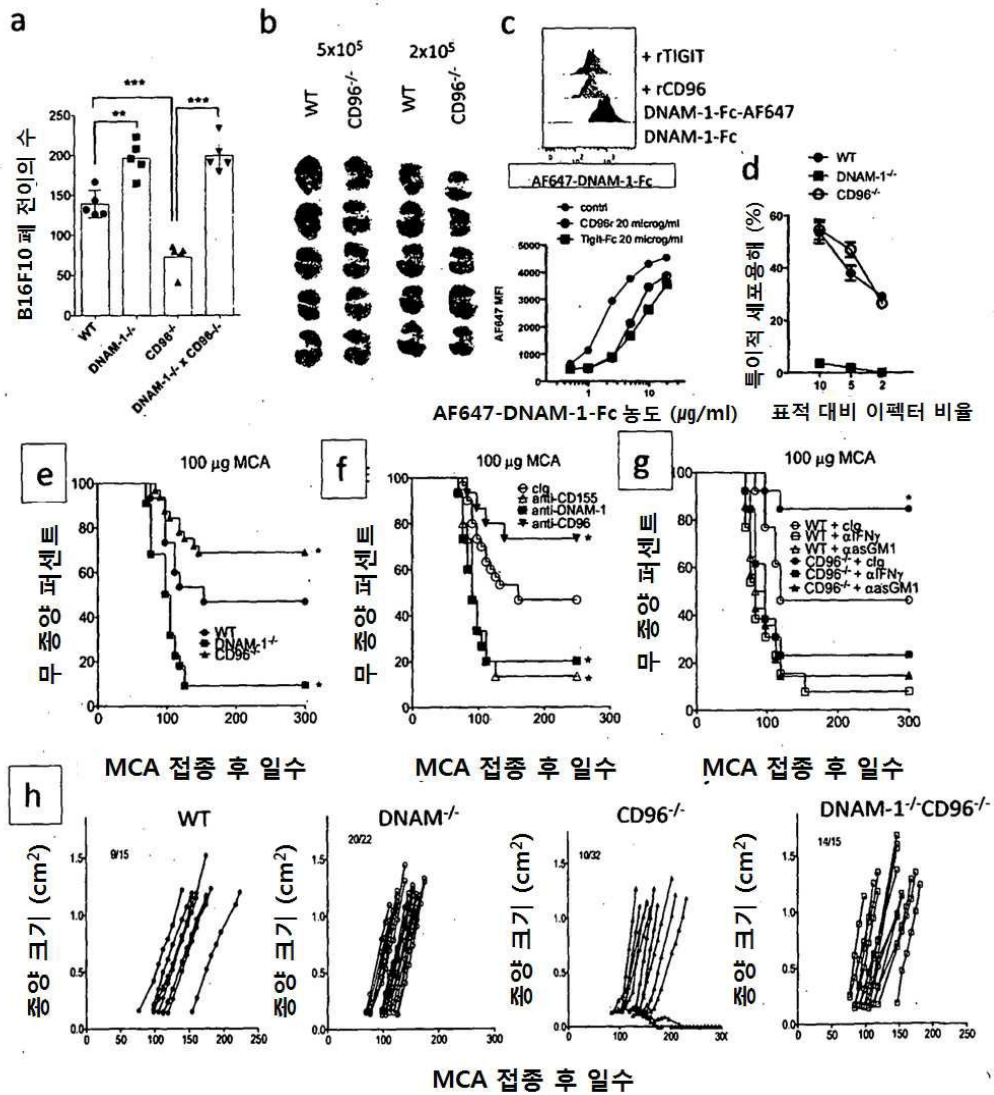
도면1



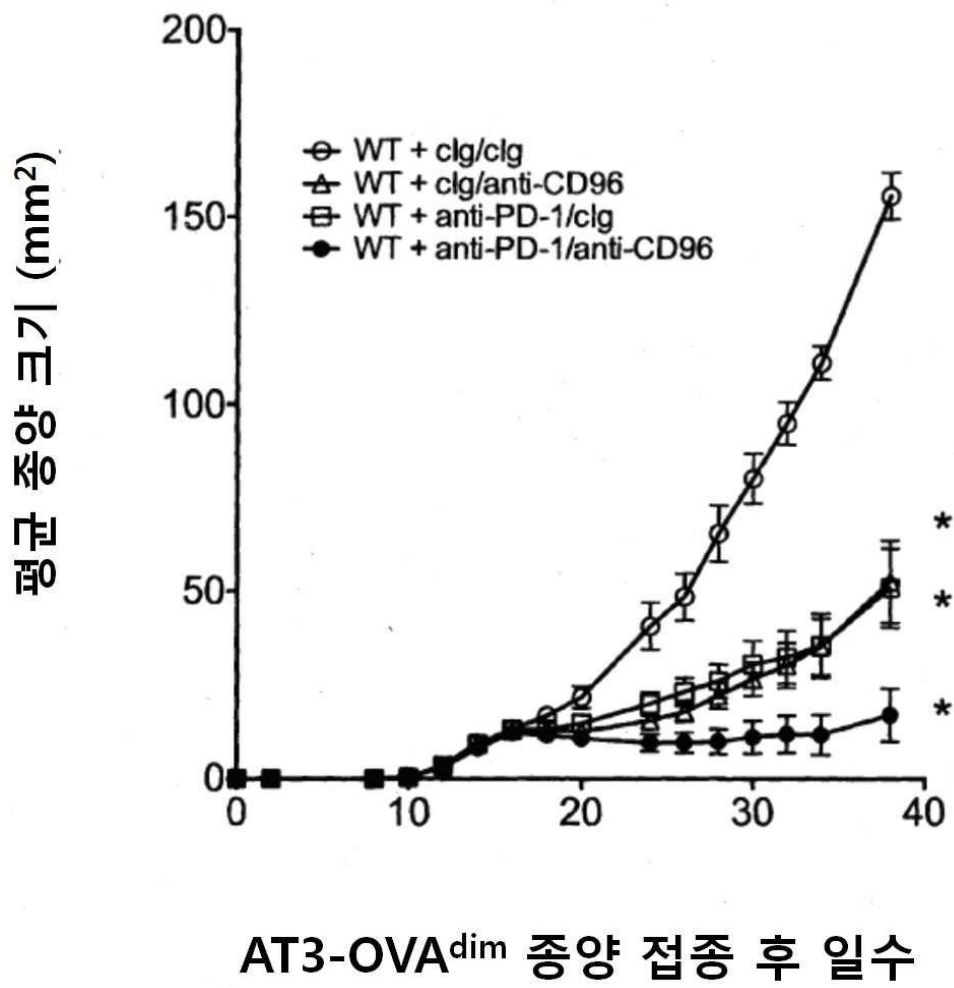
도면2



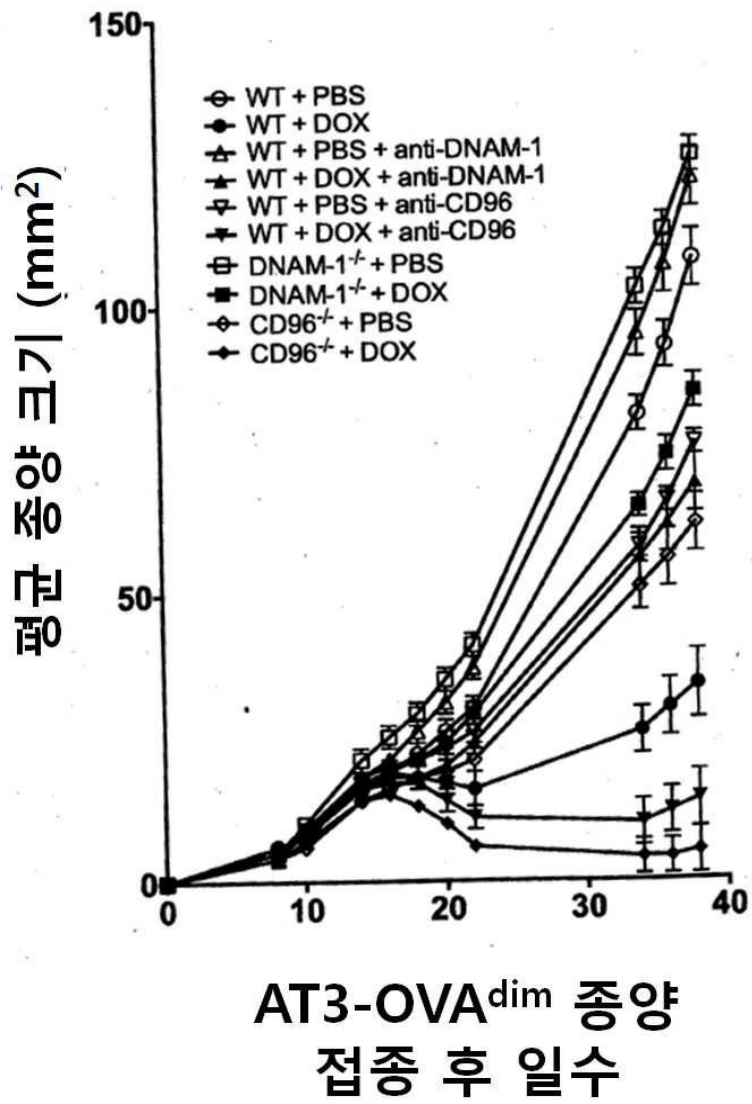
도면3



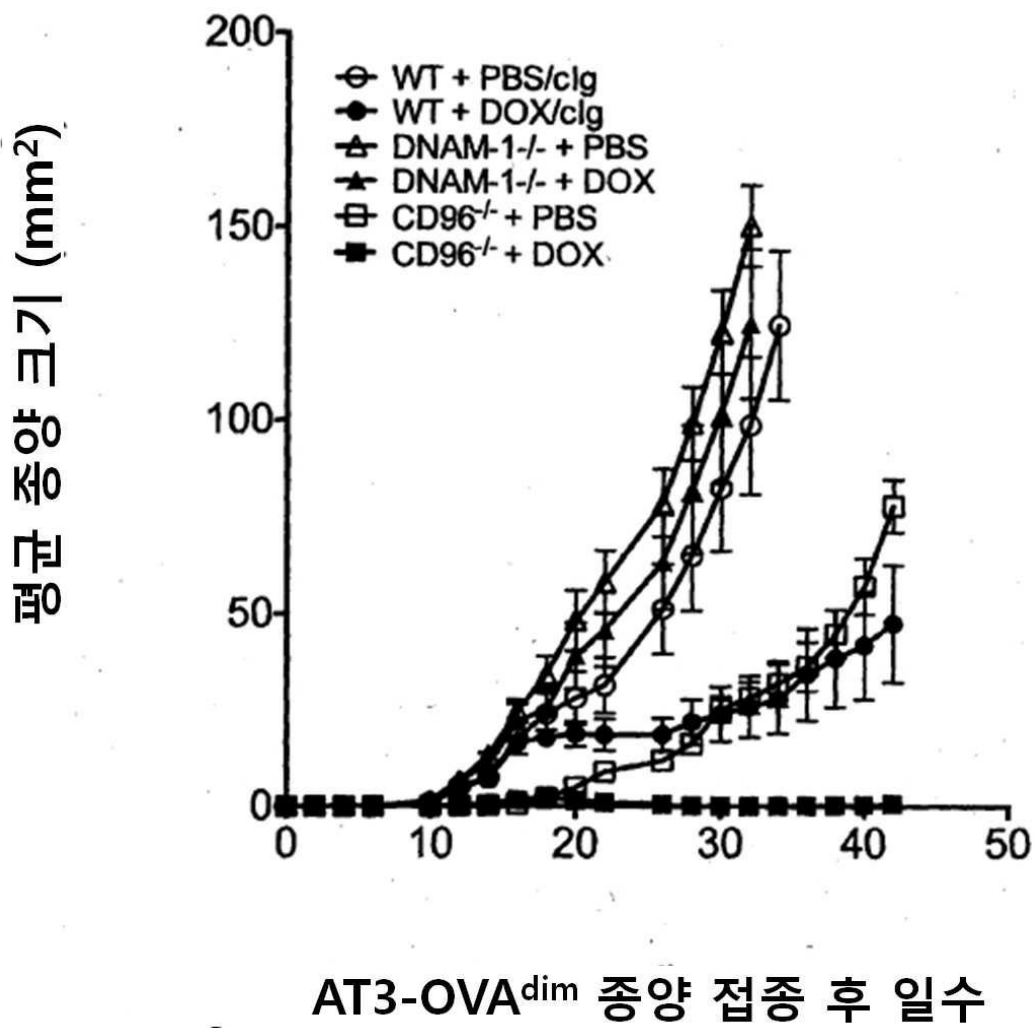
도면4



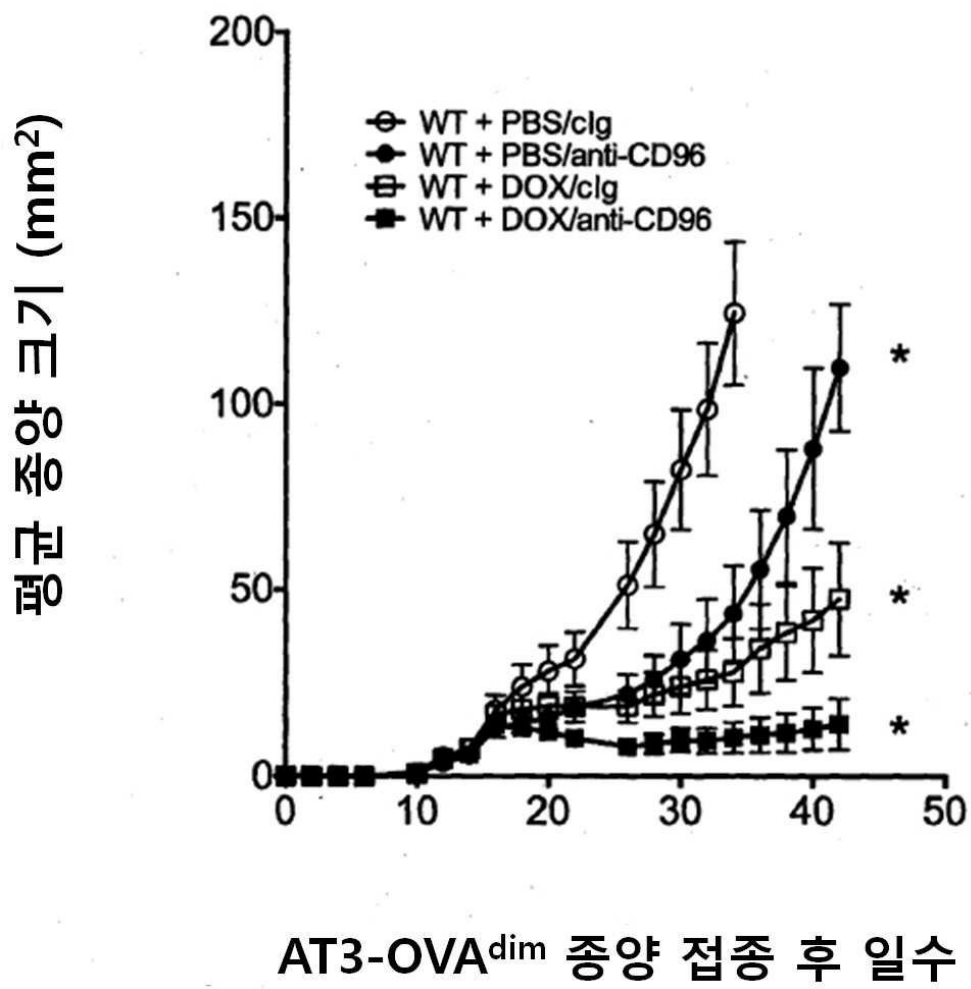
도면5



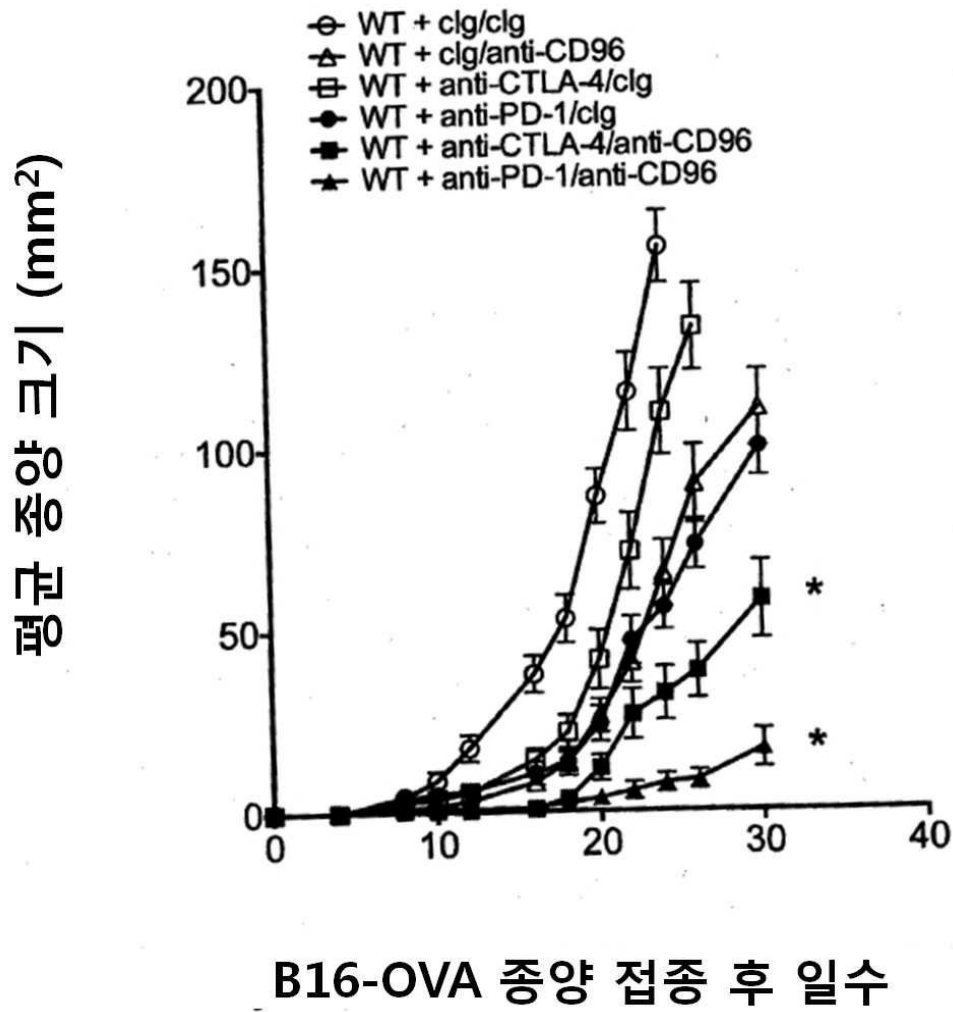
도면6



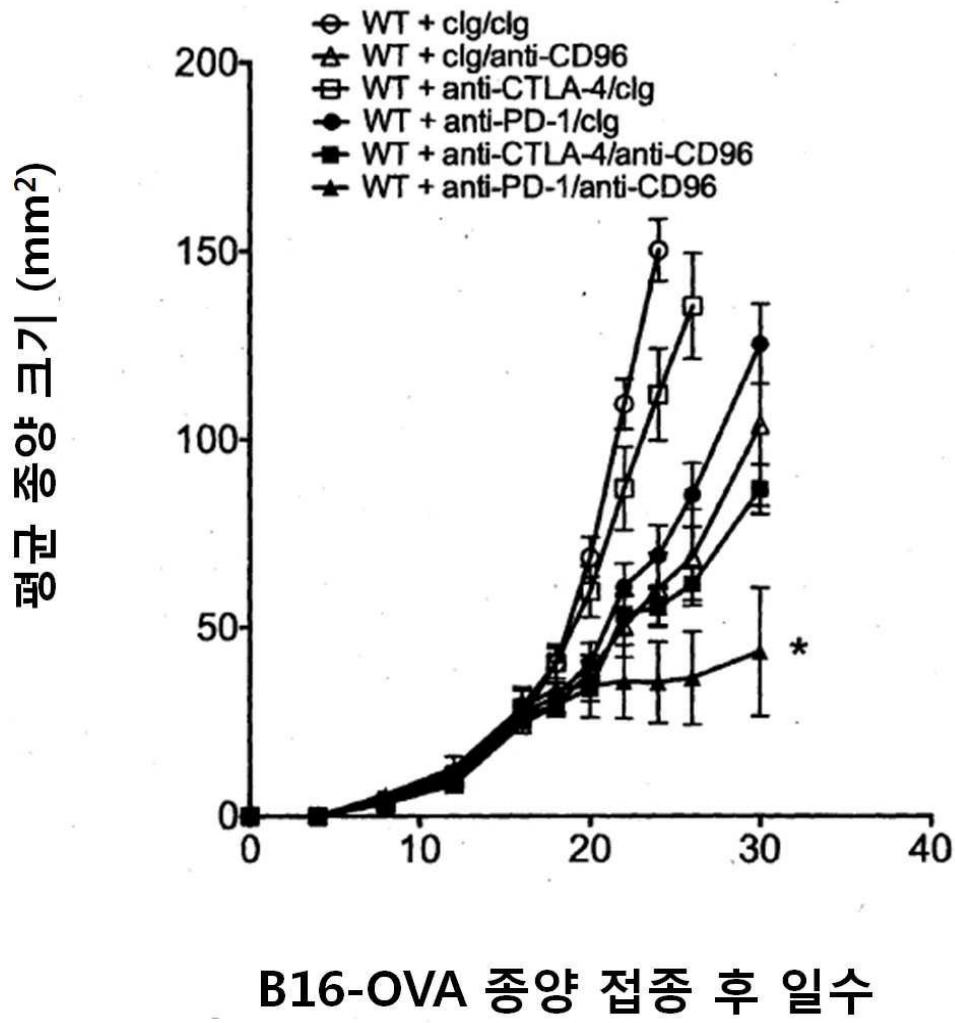
도면7



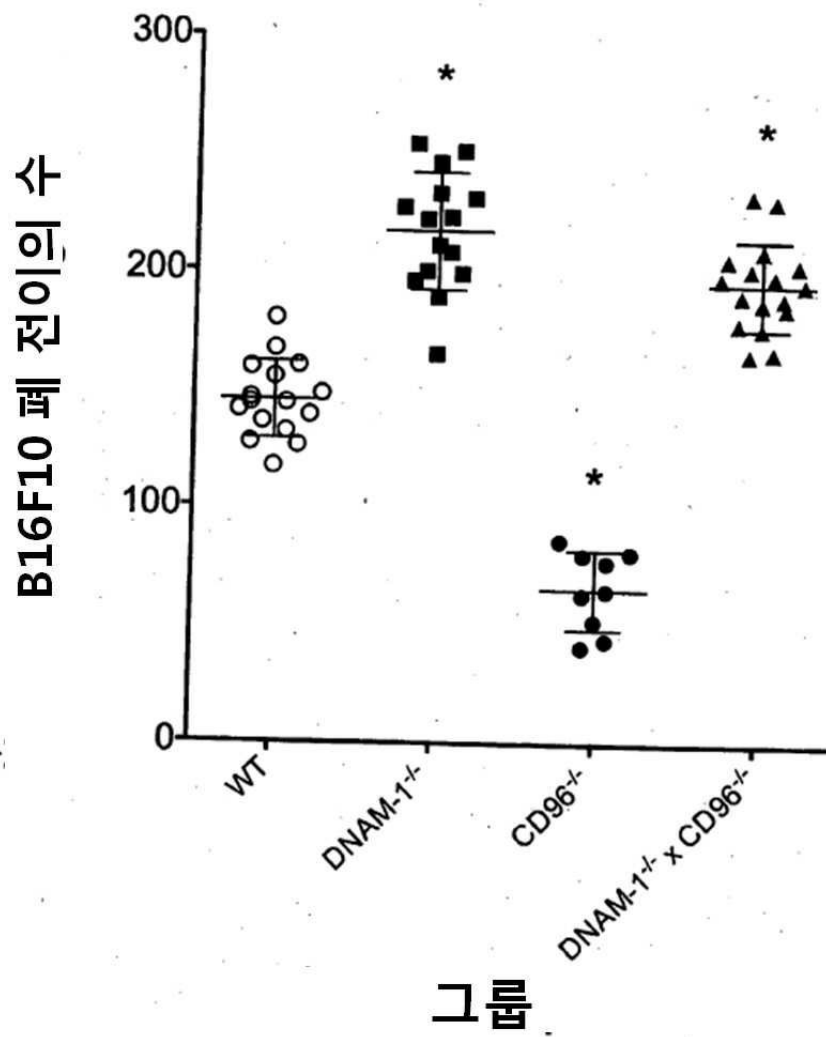
도면8



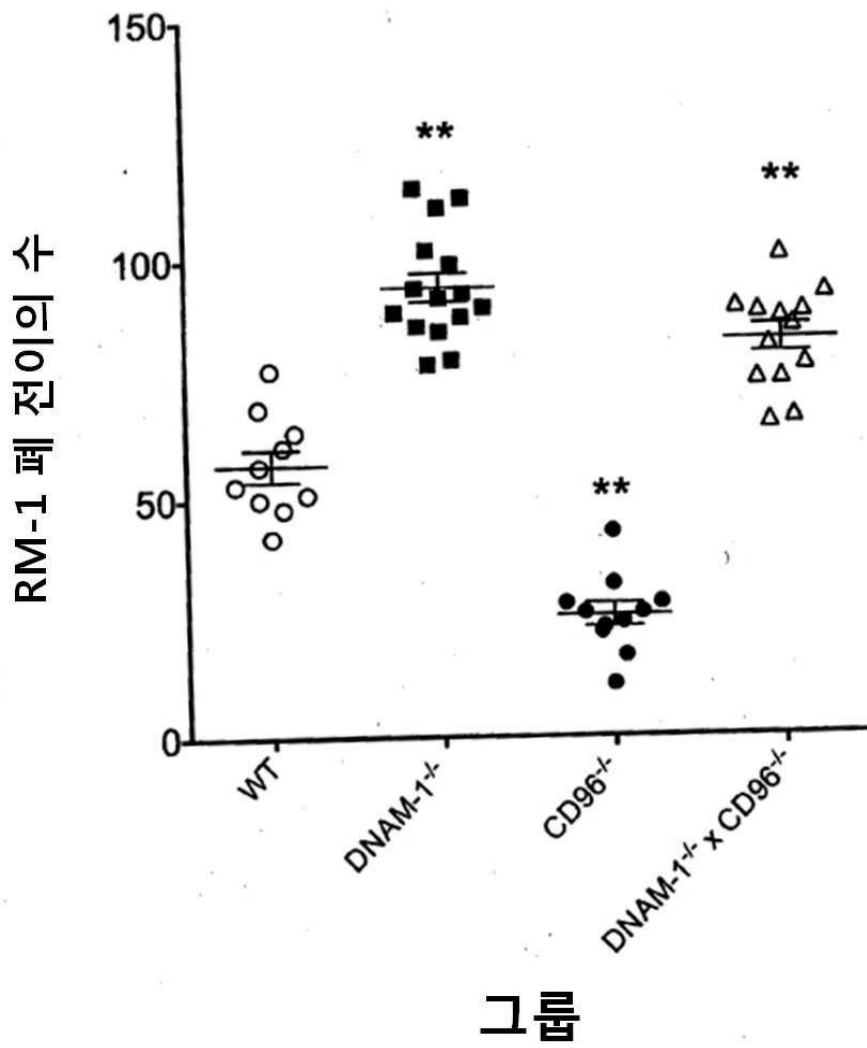
도면9



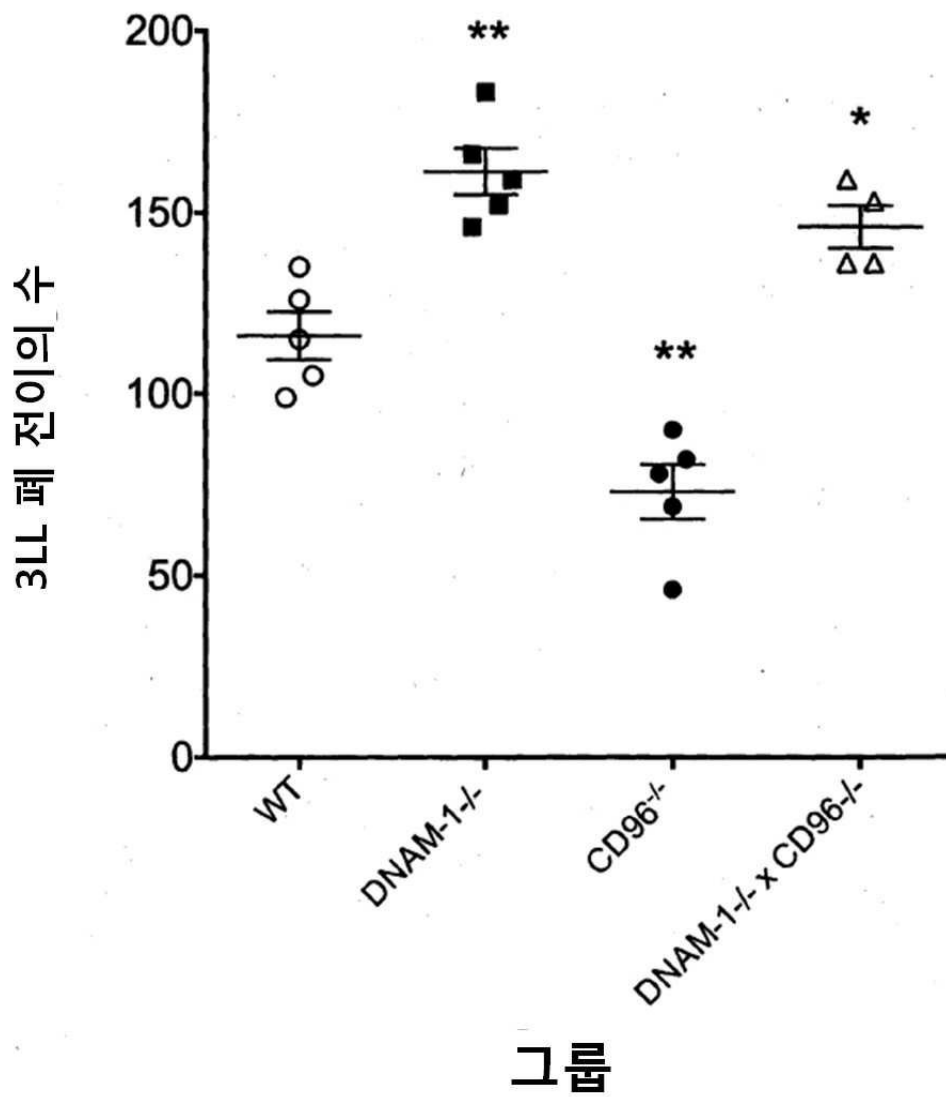
도면10



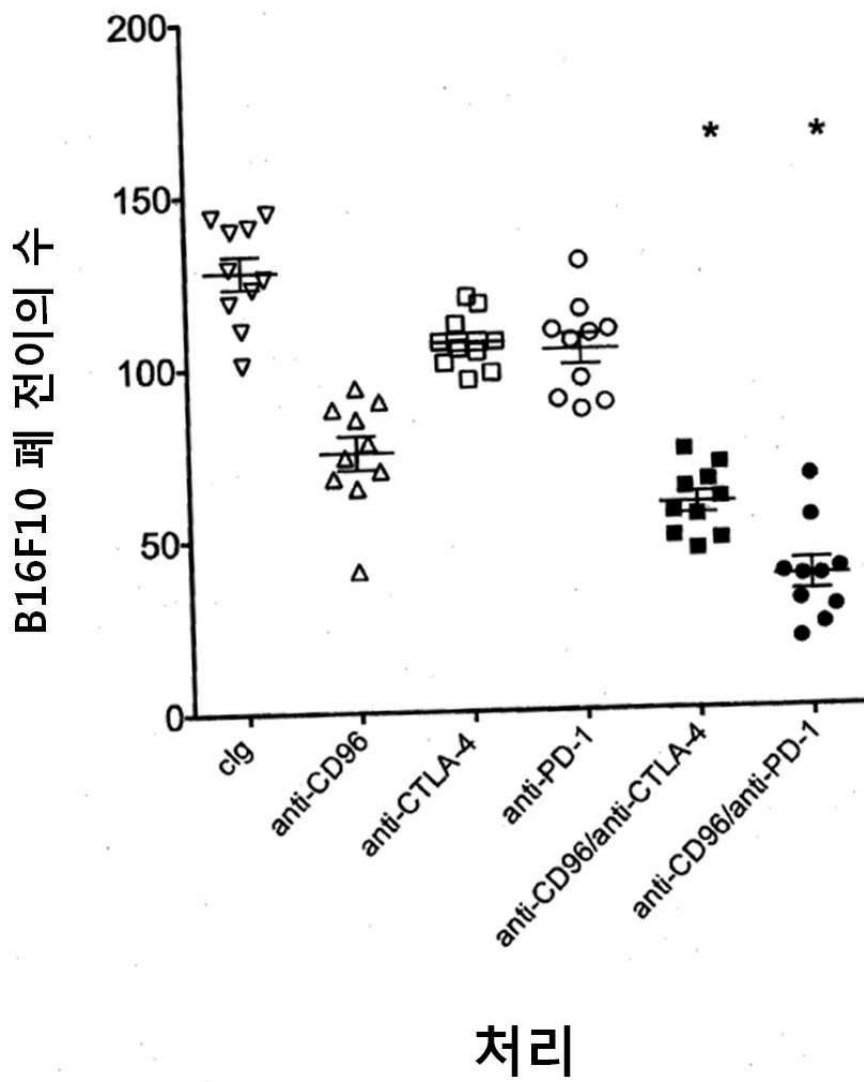
도면11



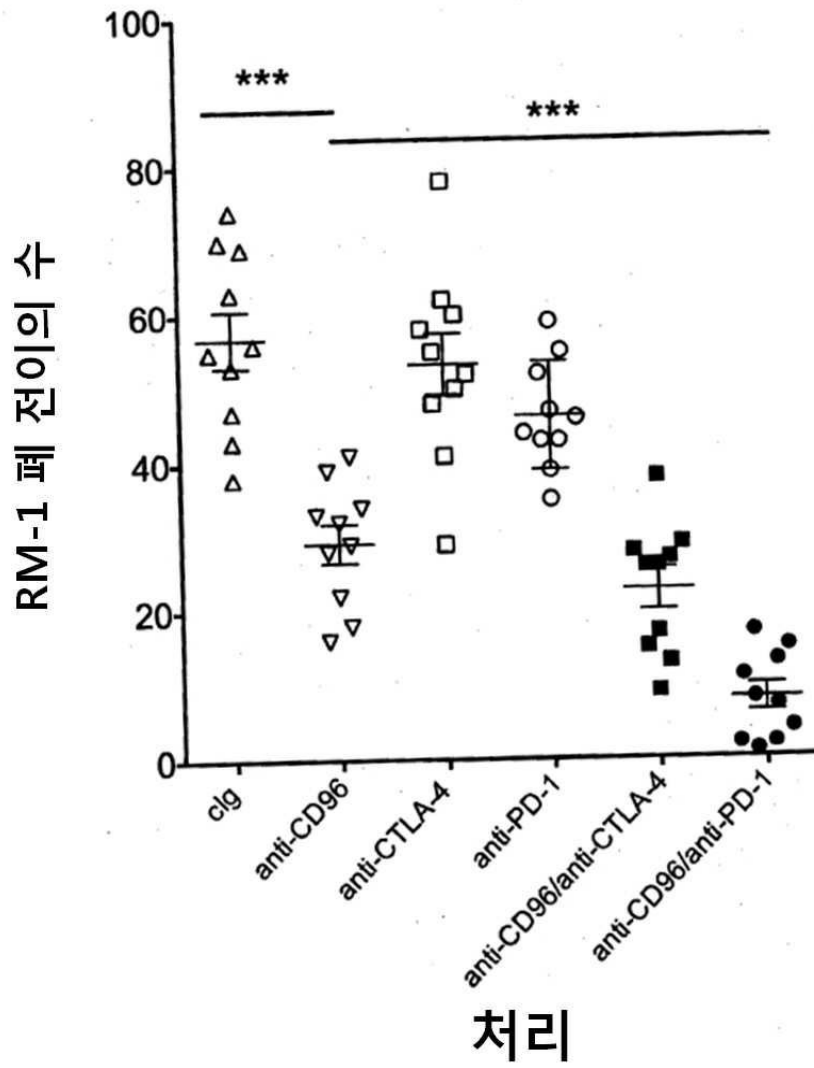
도면12



도면13



도면14



도면15

