



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년08월23일
(11) 등록번호 10-1299599
(24) 등록일자 2013년08월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7014089(분할)
(22) 출원일자(국제) 2004년07월23일
심사청구일자 2012년05월30일
(85) 번역문제출일자 2012년05월30일
(65) 공개번호 10-2012-0063562
(43) 공개일자 2012년06월15일
(62) 원출원 특허 10-2006-7001698
원출원일자(국제) 2004년07월23일
심사청구일자 2009년04월10일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2004/002636
(87) 국제공개번호 WO 2005/009465
국제공개일자 2005년02월03일
(30) 우선권주장
60/489,489 2003년07월24일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
expert opinion on biological therapy 2003,
vol. 3, no.2 p 237-250
전체 청구항 수 : 총 41 항

(73) 특허권자
위니베르시파 데글리 스푸디 디 페루지아
이탈리아공화국, 이-06100 페루지아, 베아차 위니
베르시파 엔.1
이나뜨 파르마
프랑스공화국, 에프-13009 마르세이유, 앙씨앵 슈
멩 드 까씨스, 121, 이피블르 그랑 프레
(72) 발명자
벨라르디, 앙드레아
이탈리아공화국, 이-06154 페루지아, 비아 베에베
디 캄뽀 73
호마뉴, 프랑수와
프랑스공화국, 에프-13600 라 씨오파, 레 오 드
퐁쎅뜨, 바띠망. 아
(74) 대리인
특허법인오리진

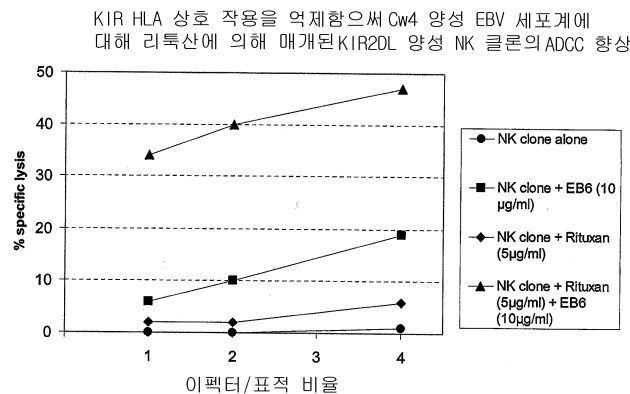
심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 NK 세포 강화 화합물을 사용하여 치료용 항체의 효율을 높이는 방법 및 조성물

(57) 요약

본 발명은 일반적으로는 치료용 항체의 효율을 향상시키는 방법 및 조성물에 관한 것이다. 그 효능은 ADCC 메카니즘을 증진시킴으로써 향상된다. 더 구체적으로, 본 발명은 치료용 항체와 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 화합물을 공동으로 인간 개체에서 그 치료용 항체의 치료 효능을 향상시키기 위해 사용하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

하기를 포함하는, 인간 개체의 암, 감염성 질환 또는 면역성 질환의 치료 또는 예방용 약제 조성물:

(a) NK 세포의 비활성화 KIR2DL 수용체에 결합하고 상기 수용체의 활성을 억제하는 항-NK 세포 수용체(NKR) 항체; 및

(b) 치료용 항체의 Fc 부위를 통해 CD16에 결합하고 항체-의존성 세포-매개성 세포독성(ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)에 의해 표적 세포를 사멸시키는 치료용 항체,

여기서, 상기 항-NKR 항체는 표적 세포에 대한 ADCC를 증가시킴으로써 상기 치료용 항체의 치료 효율을 증가시킴.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 치료용 항체는 인간 IgG1 또는 IgG3 Fc 부위를 가지는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는 항체의 항원 결합 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 치료용 항체는 단클론 항체이거나, 또는 그 항원 결합 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 치료용 항체는 방사성 또는 독성 모이어티와 접합하지 않는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는 인간, 인간화 또는 키메라 항체이거나, 또는 그 항원 결합 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 치료용 항체는 인간, 인간화 또는 키메라 항체이거나, 또는 그 항원 결합 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 치료용 항체는 리텍시맵(rituximab) 또는 알렘투주맵(alemtuzumab) 또는 다른 항-종양 치료용 항체인 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 치료용 항체는 리텍시맵이고, 주(week) 당 375 mg/m² 미만의 양이 투여되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 치료용 항체는 알렘투주맵이고, 주(week) 당 90 mg 미만의 양이 투여되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는 KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, LILRB1, NKG2A, NKG2C, NKG2E 및 LILRB5로 구성된 그룹에서 선택된 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는 KIR2DL 인간 수용체의 공통 결정자에 결합하고, KIR2DL이 매개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 억제하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는 KIR2DL1, KIR2DL2 및 KIR2DL3 인간 수용체의 공통 결정자에 결합하고, KIR2DL1, KIR2DL2 및 KIR2DL3이 매개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 억제하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는, 80 위치에 Lys 잔기를 가진 HLA-C 대립 유전자 분자의 인간 KIR2DL1 수용체에 대한 결합을 억제하고, 80 위치에 Asn 잔기를 가진 HLA-C 대립 유전자 분자의 인간 KIR2DL2 및 KIR2DL3 수용체에 대한 결합을 억제하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 18

제14항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는 융합 세포 DF200에 의해 생산된 단클론 항체 DF200 또는 단클론 항체 EB6과 동일한 에피토프에 결합하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 19

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는, 인간 NK 세포의 표면에서 KIR 수용체에 결합하기 위해, 융합 세포 DF200에 의해 생산된 단클론 항체 DF200 또는 단클론 항체 EB6과 경쟁하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 20

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는, 융합 세포 DF200에 의해 생산된 단클론 항체 DF200 또는 그 단편이거나, 단클론 항체 EB6 또는 그 단편인 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

제1항에 있어서,

상기 치료용 항체 및 상기 항-NKR 항체는 상기 개체에 동시에 투여되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 25

제1항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는 상기 치료용 항체의 투여 일주일 이내에 상기 개체에 투여되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

하기를 포함하는, 암, 감염성 질환 또는 면역성 질환의 치료 또는 예방용 약제 조성물:

(a) 치료용 항체의 Fc 부위를 통해 CD16에 결합하고 항체-의존성 세포-매개성 세포독성(ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)에 의해 표적 세포를 사멸시키는 치료용 항체;

(b) NK 세포의 비활성화 KIR2DL 수용체에 결합하고 상기 수용체의 활성을 억제하는 항-NK 세포 수용체(NKR) 항체; 및

(c) 약제학적으로 수용 가능한 담체,

여기서, 상기 항-NKR 항체는 표적 세포에 대한 ADCC를 증가시킴으로써 상기 치료용 항체의 치료 효율을 증가시킴.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 치료용 항체는 인간 또는 인간이 아닌 영장류 IgG1 또는 IgG3 Fc 부위를 가지는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는 항체의 항원 결합 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 32

제29항 또는 제30항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는 단클론 항체이거나, 또는 그 항원 결합 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 33

제29항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는 인간, 인간화 또는 키메라 항체이거나, 또는 그 항원 결합 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 34

제29항에 있어서,

상기 치료용 항체는 단클론 항체이거나, 또는 그 항원 결합 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서,

상기 치료용 항체는 인간, 인간화 또는 키메라 항체이거나, 또는 그 항원 결합 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 36

제34항에 있어서,

상기 치료용 항체는 방사성 또는 독성 모이어티와 접합하지 않는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

제29항에 있어서,

상기 치료용 항체는 리텍시맵(rituximab) 또는 알렘투주맵(alemtuzumab) 또는 다른 항-종양 항체인 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 40

제29항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는 KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, LILRB1, NKG2A, NKG2C, NKG2E 및 LILRB5로 구성된 그룹에서 선택된 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하는 것을 특징으로

로 하는 약제 조성물.

청구항 41

제29항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는 KIR2DL 인간 수용체의 공통 결정자에 결합하고, KIR2DL이 매개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 억제하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 42

제41항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는 KIR2DL1, KIR2DL2 및 KIR2DL3 인간 수용체의 공통 결정자에 결합하고, KIR2DL1, KIR2DL2 및 KIR2DL3이 매개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 억제하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 43

제41항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는, 80 위치에 Lys 잔기를 가진 HLA-C 대립 유전자 분자의 인간 KIR2DL1 수용체에 대한 결합을 억제하고, 80 위치에 Asn 잔기를 가진 HLA-C 대립 유전자 분자의 인간 KIR2DL2 및 KIR2DL3 수용체에 대한 결합을 억제하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 44

제29항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는 융합 세포 DF200에 의해 생산된 단클론 항체 DF200, 단클론 항체 NKVSF1, 또는 단클론 항체 EB6과 동일한 에피토프에 결합하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 45

제29항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는, 인간 NK 세포의 표면에서 KIR 수용체에 결합하기 위해, 융합 세포 DF200에 의해 생산된 단클론 항체 DF200, 단클론 항체 NKVSF1, 또는 단클론 항체 EB6과 경쟁하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 46

제29항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는 융합 세포 DF200에 의해 생산된 단클론 항체 DF200 또는 그 단편, 단클론 항체 NKVSF1 또는 그 단편, 또는 단클론 항체 EB6 또는 그 단편인 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 47

약제

청구항 48

치료용 항체의 Fc 부위를 통해 CD16에 결합하고 항체-의존성 세포-매개성 세포독성(ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)에 의해 표적 세포를 사멸시키는 치료용 항체와 함께 조합하여 투여하기 위한, NK 세포의 비활성화 KIR2DL 수용체에 결합하고 상기 수용체의 활성을 억제하는 항-NK 세포 수용체(NKR) 항체를 선택하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- i) NK 세포의 비활성화 KIR2DL 수용체의 활성을 억제하고 표적 세포에 대한 ADCC를 증가시킴으로써 상기 치료용 항체의 효율을 증가시키는 시험(test) 항-NKR 항체를 제공하는 단계;
- ii) 상기 시험 항-NKR 항체의 존재 또는 부재시에, NK 세포가 있는 상태에서 상기 치료용 항체와 그 치료용 항체에 의해 특정적으로 인식되는 표적 세포를 함께 배양하는 단계; 및
- iii) 상기 NK 세포의 표적 세포를 사멸시키는 능력에 대한 상기 항-NKR 항체의 효과를 평가하는 단계,

여기서, 상기 항-NKR 항체가 상기 NK 세포의 표적 세포를 사멸시키는 능력을 향상시키는 것이 검출되면, 상기 항-NKR 항체가 상기 방법에서 사용하기에 적절함을 나타내는 것임.

청구항 49

제48항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는 상기 치료용 항체의 표적 세포를 파괴하는 능력을 30% 향상시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50

제48항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는 상기 치료용 항체의 표적 세포를 파괴하는 능력을 50% 향상시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 51

제48항에 있어서,

상기 항-NKR 항체는 항체, 항체 단편, 단클론 항체, 단클론 항체 단편, 인간화 항체, 키메라 항체 및 인간 항체로 구성된 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52

제48항에 있어서,

상기 표적 세포는 암 세포, 바이러스에 감염된 세포, 또는 자가 면역 장애가 잠재된 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 53

제48항에 있어서,

상기 치료용 항체는 리텍시맵(rituximab) 또는 알렘투주맵(alemtuzumab) 또는 다른 항-종양 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 치료용 항체의 효율을 높이기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 자연살상세포(natural killer cell)의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 화합물과 함께 치료용 항체를 사용하는 방법에 관한 것으로, 특히 ADCC 메커니즘을 증가시켜 인간 개체에서 치료의 효율을 향상시키기 위하여 포유류 개체에서 자연살상세포의 세포 독성을 강화시킨다.

배경기술

[0002] 인간의 치료하는 여러 방법은 치료용 항체를 사용한다. 예를 들어, 표적 세포, 특히 바이러스에 감염된 세포, 종양 세포 또는 다른 병원성 세포와 같은 질병 세포를 사멸하도록 개발된 치료용 항체를 사용한다. 이러한 항체들은 일반적으로 인간 IgG1 또는 IgG3 Fc 부위를 가진 IgG계 단클론 항체들이다. 이러한 항체들은 순수 또는 재조합 항체일 수 있고, 종종 "인간화" 생쥐 항체(즉, 여러 중, 일반적으로 인간 또는 인간이 아닌 영장류 기원의

Fc 부위의 기능 도메인 및 생쥐 기원의 가변 부위 또는 상보성결정부위(CDR)를 포함한다)일 수 있다. 선택적으로, 단클론 항체는 인간 Ig 유전자 좌(locus)를 가진 유전자 도입 생쥐에서 면역화를 통해 완전히 인간화될 수 있고 또는 인간 세포에서 유래된 cDNA 라이브러리를 통해 획득될 수 있다.

[0003] 이러한 치료용 항체의 특정 예는 리텍시맵(rituximab)(Mabthera[®], Rituxan[®])이고, 이는 CD20 특이성을 부여하는 쥐과 가변 도메인에 연결된 인간 γ 1 및 κ 불변부위(따라서 인간 IgG1 Fc 부위)로 만들어진 키메라 항-CD20 단클론 항체이다. 지난 몇 년 동안, 리텍시맵은 B 림프세포증식성 종양, 특히 비호지킨 림프종(NHL)에 대한 치료법을 상당히 변형시켰다. 인간화된 다른 IgG1 항체의 예는 B 세포 악성 종양 치료에 사용되는 알렘투주맵(alemtuzumab)(Campath-1H[®]), 유방암 치료에 사용되는 트라스투주맵(trastuzumab)(Herceptin[®])이다. 개발 중에 있는 다른 치료용 항체의 예가 관련 분야에 알려져 있다.

[0004] 치료용 항체의 작용 메카니즘은 여전히 논쟁거리이다. 항체의 주입은 그 항체에 의해 특이적으로 인식되는 항원을 가진 세포의 사멸을 유발한다. 이러한 사멸은 적어도 세 개의 메카니즘을 통해 매개될 수 있다. 즉, 항체 매개성 세포독성(ADCC), 보체(complement) 의존성 용해, 및 항체에 의해 표적화된 항원을 통하여 주어진 신호를 통한 종양 성장의 직접적인 항종양 억제가 그것이다.

[0005] 이러한 항체들은 인간 치료, 특히 종양 치료를 위해 새롭고 효과적인 접근이지만, 그것들이 항상 높은 효율을 나타내는 것은 아니다. 예를 들어, 단독으로 또는 화학 요법과 함께 투여된 리텍시맵은 저중 및 고등 NHL 모두의 치료에 효과적인 반면, 저등 NHL을 앓는 환자의 30% 내지 50%은 리텍시맵에 어떤 치료 반응을 나타내지 않는다. 임파종 세포에서 CD20의 발현 정도, 치료 시에 종양의 상당한 존재량, 또는 낮은 혈청 리텍시맵의 농도가 일부 환자에서 리텍시맵의 효율 감소를 설명할 수 있을 것이다. 그럼에도 불구하고, 치료 실패의 실질적인 원인은 거의 알려져 있지 않다.

[0006] 또한, 치료용 항체의 사용은 그 투여에 의해 유발되는 부작용에 의해 제한될 수 있다. 예를 들어, 열, 두통, 메스꺼움, 고혈압, 호흡곤란, 발진, 감염 및 그외 수많은 부작용이 환자에게 나타날 수 있고, 이는 투여되는 항체의 양이나 빈도를 제한할 가능성이 있다.

[0007] 따라서, 치료용 항체의 효율을 증가시키거나 또는 부작용을 거의 일으킬 것 같지 않은 항체의 사용량을 줄여서 치료 효과를 달성할 수 있는 것이 매우 중요하다. 본 발명은 이러한 요구 및 여러 다른 요구를 다룬다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 치료용 항체의 효능을 향상시키는 새로운 방법에 관한 것이다. 이하의 이론에 제한됨이 없이, 본 방법을 사용하여 달성된 놀라운 효과들은 치료용 항체들을 주입할 때 생체 내에서 ADCC를 향상시키는 그 능력에 기인한다고 생각된다. 사실상, 본 발명은 치료용 항체의 효능과 관계된 현재의 어려움을 극복하는 신규한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명에서 사람의 NK 세포는 예를 들어 NK 세포의 비활성화 수용체의 비활성화에 의한 NK 세포의 활성 결핍 때문에 치료성이 좋지 않은 mAb(단클론 항체)가 매개하는 ADCC을 가질 수 있다는 것을 알게 된다. 바람직하게는, ADCC 메카니즘의 증가는 자연살상세포에서 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하여 포유류에서 자연살상세포의 세포 독성을 강화하는 화합물의 투여에 의해 달성된다. 바람직하게는 이 화합물은 항체 또는 그 단편이다.

[0009] 상기 항체들 또는 다른 화합물들은 NK 세포의 비활성화 수용체, 예를 들어 살상 비활성화 수용체(KIR 또는 NKG2A/C) 분자와 반응하거나, 또는 NK 세포의 활성화 수용체, 예를 들어 NKp30, NKp44 또는 NKp46과 같은 NCR들과 반응할 수 있어 세포의 억제를 무력화하고 그 ADCC 활성을 증가시킨다.

[0010] 더 구체적으로, 본 발명은 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편이 치료용 항체와 함께 개체에 투여되는 치료 방법을 개시한다. 본 발명자는 예를 들어 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극함으로써 NK 세포의 억제를 무력하게 하는 이러한 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편의 공동 투여, 예컨대 공동 주입에 의해 치료용 항체의 효능이 상당히 향상될 수 있음을 기술한다.

[0011] 본 발명은 또한 치료용 항체 및 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편을 포함하는 약제 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 치료용 항체 및

NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편을 포함하는 키트(kit)에 관한 것이다.

- [0012] 본 발명은 또한 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편을 치료용 항체의 치료 효능을 향상시키거나 또는 치료용 항체의 치료를 받는 개체에서 ADCC를 향상시키기 위해 사용하는 방법에 관한 것이다.
- [0013] 본 발명은 또한 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편 및 치료용 항체를 질병을 치료하기 위한 약제의 제조에 사용하는 방법에 관한 것이다. 더 구체적으로, 질병 치료는 표적 세포, 바람직하게는 바이러스에 감염된 세포, 종양 세포 또는 다른 병원성 세포와 같은 질병 세포의 사멸을 요구한다. 바람직하게는, 그 질병은 암, 전염성 또는 면역성 질병이다. 더 바람직하게는, 그 질병은 암, 자가 면역 질환, 염증성 질환 및 바이러스성 질환 중에서 선택된 하나이다. 그 질병은 또한 이식 거부반응, 더 구체적으로는 동종이식 거부반응 및 이식편대숙주질환(GVHD)에 관한 것이다.
- [0014] 본 발명은 또한 치료용 항체, 예를 들어 Fc γ 수용체, 바람직하게는 CD16(Fc γ RIIIa)에 의해 결합되는 항체의 투여량을 줄이기 위한 방법을 포함한다. 예를 들어, 치료용 항체 및 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 화합물의 공동 투여는 사용되는 치료용 항체의 투여량을 줄인다. 이러한 항체들은 그 화합물이 없을 때 제시된 투여량에 비해 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 더 적은 투여량으로 사용될 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명은 치료용 항체, 예를 들어 CD16에 의해 결합된 항체의 치료 효과가 있는 감소량을 결정하는 방법을 제공하며, 그 방법은 i) NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 화합물이 없는 상태에서 제1 농도의 치료용 항체를 표적 세포 및 NK 세포와 함께 배양하는 단계; ii) NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 화합물이 존재하는 상태에서 제2의 더 낮은 농도의 치료용 항체를 표적 세포 및 NK 세포와 함께 배양하는 단계; iii) ii) 단계에서 관찰된 표적 세포의 사멸이 i) 단계에서 관찰된 사멸만큼 많은지를 조사하는 단계;를 포함한다. 만약 ii) 단계가 i) 단계만큼 효능이 있다면, 정해진 환자에게 사용하기에 적절한 서로 다른 조건, 예를 들어 환자의 특정 필요에 따라 표적 세포 사멸의 최대화, 치료용 항체의 투여량 감축 또는 화합물의 투여량 감축을 확인하기 위하여 화합물 및 치료용 항체의 상대 농도를 변화시킬 수 있다.
- [0016] 특정 관점에서, 본 발명은 필요시에 인간 개체에서 질병의 치료 방법을 제공하며, 그 방법은 a) NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 화합물을 개체에 투여하는 단계; 및 b) CD16에 의해 결합될 수 있는 치료용 항체를 그 개체에 투여하는 단계;를 포함한다.
- [0017] 일 실시 형태에서, 치료용 항체 및 화합물은 개체에 동시에 투여된다. 다른 실시 형태에서, 화합물은 치료용 항체 투여 후 일주 내, 4일 내, 3일 내 또는 같은 날(예를 들어, 약 24시간 내)에 투여된다. 다른 실시 형태에서, 그 질병은 암, 전염성 또는 면역성 질환이다.
- [0018] 일 실시 형태에서, 본 방법은 그 화합물의 투여 전 또는 후에 개체의 NK 세포의 활성화 및 수를 측정하는 부가 단계를 더 포함한다. 다른 실시 형태에서, 그 부가 단계는 i) 투여에 앞서 개체로부터 NK 세포를 획득하는 단계; ii) 그 화합물의 존재 또는 부재시에, 치료용 항체에 의해 인식되는 하나 이상의 표적 세포가 있는 상태에서 그 NK 세포를 배양하는 단계; iii) NK 세포의 표적 세포를 사멸시키는 능력에 대한 그 화합물의 효과를 평가하는 단계;를 포함하며, 그 화합물이 NK 세포의 표적 세포를 사멸시키는 능력을 향상시키는 것이 검출되면, 이는 그 화합물이 본 방법에 사용하기에 적절하고 그 방법은 개체에 사용하기에 적절함을 나타낸다.
- [0019] 다른 관점에서, 본 발명은 예를 들어 CD16에 의해 결합될 수 있는 치료용 항체, NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 화합물 및 약제학적으로 사용 가능한 담체를 포함하는 약제 조성물에 관한 것이다. 다른 관점에서, 본 발명은 예를 들어 CD16에 의해 결합될 수 있는 치료용 항체 및 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 하나 이상의 화합물을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0020] 상기 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나에 대하여, 일 실시 형태에서 치료용 항체는 인간 IgG1 또는 IgG3 Fc 부위를 가진다. 다른 실시 형태에서, 화합물은 항체 또는 그 단편이다. 다른 실시 형태에서, 치료용 항체는 단클론 항체 또는 그 단편이다. 다른 실시 형태에서, 치료용 항체는 단클론 항체 또는 그 단편이다. 다른 실시 형태에서, 치료용 항체는 방사성 또는 독소 모이어티와 접합하지 않는다. 다른 실시 형태에서, 그 화합물은 NK 세포의 비활성화 수용체를 억제한다. 다른 실시 형태에서, 그 화합물은 NK 세포의 활성화 수용체를 자극한다. 다

른 실시 형태에서, 그 화합물은 인간, 인간화 또는 키메라 항체, 또는 그 단편이다. 일 실시 형태에서, 치료용 항체 또는 화합물은 특히 Fab 단편, Fab'2 단편, CDR 및 ScFv와 같은 항체 단편 또는 유도체일 수 있다.

[0021] 일 실시 형태에서, 치료용 항체는 인간, 인간화 또는 키메라 항체, 또는 그 단편이다. 다른 실시 형태에서, 치료용 항체는 리텍시맵 또는 캠페스(Campath)이다. 다른 실시 형태에서, 그 항체는 리텍시맵이고, 주당 375 mg/m² 미만의 양이 투여된다. 다른 실시 형태에서, 그 항체는 캠페스이고, 주당 90 mg 미만의 양이 투여된다.

[0022] 일 실시 형태에서, 화합물은 NKG2, KIR2DL 또는 KIR3DL 인간 수용체 중 적어도 어느 하나를 결합하고, 연관된 NKG2, KIR2DL 또는 KIR3DL이 매개하는 NK 세포독성의 비활성화를 억제한다. 다른 실시 형태에서, 그 화합물은 KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, LILRB1, NKG2A, NKG2C, NKG2E 및 LILRB5로 구성된 그룹에서 선택된 NK 세포 비활성화 수용체를 차단한다. 다른 실시 형태에서, 그 화합물은 KIR2DL 인간 수용체의 공통 결정자를 결합하고 KIR2DL이 매개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 억제한다. 다른 실시 형태에서, 그 화합물은 KIR2DL1, KIR2DL2, 및 KIR2DL3 인간 수용체의 공통 결정자를 결합하고 KIR2DL1, KIR2DL2, 및 KIR2DL3이 매개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 억제한다. 다른 실시 형태에서, 그 화합물은 80 위치에 Lys 잔기를 가진 HLA-C 대립유전자 분자의 인간 KIR2DL1 수용체에 대한 결합 및 80 위치에 Asn 잔기를 가진 HLA-C 대립유전자 분자의 인간 KIR2DL2 및 KIR2DL3 수용체에 대한 결합을 억제한다. 다른 실시 형태에서, 그 화합물은 융합 세포 DF200에 의해 생산된 단클론 항체 DF200와 동일한 에피토프에 결합한다. 다른 실시 형태에서, 그 화합물은 인간 NK 세포 표면의 KIR 수용체에 결합하기 위해 융합 세포 DF200에 의해 생산된 단클론 항체 DF200과 경쟁한다. 다른 실시 형태에서, 그 화합물은 융합 세포 DF200에 의해 생산된 단클론 항체 DF200 또는 그 단편이다.

[0023] 일 실시 형태에서, 그 화합물은 NKp30, NKp44, NKp46 및 NKG2D로 구성된 그룹에서 선택된 수용체에 결합한다. 다른 실시 형태에서, 그 화합물은 AZ20, A76, Z25, Z231 및 BAB281로 구성된 그룹에서 선택된 단클론 항체에서 유래하거나 또는 서로 경쟁한다.

[0024] 다른 측면에서, 본 발명은 치료용 항체와 함께 투여하는 화합물을 선택하는 방법을 제공하며, 그 방법은: i) NK 세포의 비활성화 수용체를 억제하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 시험 화합물을 제공하는 단계; ii) 시험 화합물의 존재 또는 부재시에, NK 세포가 있는 상태에서 치료용 항체를 그 치료용 항체에 의해 특정적으로 인식되는 표적 세포와 함께 배양하는 단계; 및 iii) NK 세포의 표적 세포를 사멸시키는 능력에 대한 그 화합물의 효과를 평가하는 단계;를 포함하며, 화합물이 NK 세포의 표적 세포를 사멸시키는 능력을 향상시키는 것이 검출되면, 그 화합물이 본 방법에서 사용하기 적절함을 나타낸다.

[0025] 일 실시 형태에서, 그 화합물은 치료용 항체의 표적 세포를 파괴하는 능력을 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% 또는 그 이상 향상시킨다. 다른 실시 형태에서, 그 화합물은 항체, 항체 단편, 단클론 항체, 단클론 항체의 단편, 인간화 항체, 키메라 항체 및 인간 항체 중에서 선택된 하나이다. 다른 실시 형태에서, 표적 세포는 암 세포, 바이러스에 감염된 세포, 또는 자가 면역 장애가 잠재된 세포이다. 다른 실시 형태에서, 치료용 항체는 리텍시맵(rituximab) 또는 캠페스(CAMPATH)이다.

[0026] 다른 측면에서, 본 발명은 개체에서 CD16에 의해 결합될 수 있는 치료용 항체의 투여와 연관된 치료의 효율을 높이는 방법을 제공하며, 상기 방법은 개체에 치료용 항체를 투여하기 전, 동시, 또는 후에 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 활성화 수용체를 자극하는 화합물을 치료 효과가 있을 정도의 양으로 투여하는 것을 포함한다. 일 실시 형태에서, 그 화합물은 상기 개체에서 ADCC를 향상시킴으로써 치료의 효율을 높인다.

[0027] 본 발명은 치료용 항체의 효율을 높이는 방법을 제공한다. 더 구체적으로 본 발명은 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편을 바람직하게는 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극함으로써 그 NK 세포를 강화하는데 사용하는 것이 치료용 항체의 효율을 상당히 높일 수 있다는 것을 보여준다. 사실상, 본 발명자는 복합 치료용 항체의 효율이 NK 세포 수용체, 예를 들어 비활성화 수용체로 향하는 항체의 공동 투여에 의해 상당히 향상될 수 있다는 것을 설명한다.

[0028] 따라서, 본 발명은 필요시에 개체의 질병을 치료하는 방법에 관한 것으로:

[0029] a) 상기 개체에 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편을 투여하는 단계; 및

[0030] b) 상기 개체에 치료용 항체를 투여하는 단계;를 포함한다.

- [0031] 상기 치료용 항체는 NK 세포의 CD16, 바람직하게는 그 Fc 부위를 통해 결합될 수 있다.
- [0032] 바람직하게는, 상기 치료용 항체는 인간 IgG1 또는 IgG3 Fc 부위, 특히 단클론 항체 또는 그 단편, 더 바람직하게는 인간화, 인간 또는 키메라 항체 또는 그 단편, 예를 들어 리텍시맵을 가진다.
- [0033] NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하는 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편은 치료용 항체의 투여 전, 동시 또는 후에 투여될 수 있다. 서로 다른 항체의 투여 방법은 그것들의 생활성 및 약물동력(pharmacokinetics)에 좌우된다. 바람직하게는, 치료용 항체는 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하는 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편을 투여 후 일주일 내, 더 바람직하게는 2 내지 5일 이내에 투여된다. 바람직하게는, 치료용 항체는 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하는 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편 투여 전 또는 동시에 투여된다.
- [0034] 다른 관점에서, 본 발명은 치료용 항체 치료를 받는 개체에서 ADCC를 증가시키는 방법에 관한 것으로, 그 방법은 상기 개체에 치료용 항체의 투여 전, 동시 또는 후에 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하는 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편을 ADCC를 증가시키기에 충분한 양으로 투여하는 것을 포함한다. 상기 치료용 항체는 NK 세포의 CD16, 바람직하게는 그 Fc 부위를 통해 결합될 수 있다. 바람직하게는, 상기 치료용 항체는 인간 IgG1 또는 IgG3 Fc 부위, 특히 단클론 항체 또는 그 단편, 더 바람직하게는 인간, 인간화 또는 키메라 항체 또는 그 단편, 예를 들어 리텍시맵을 가진다.
- [0035] 또 다른 관점에서, 본 발명은 개체에서 치료용 항체의 치료 효율을 높이는 방법에 관한 것으로, 이 방법은 그 개체에 치료용 항체의 투여 전, 동시 또는 후에 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하는 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편을 치료용 항체의 효율을 높이기 위해 충분한 양만큼 투여하는 단계를 포함한다. 상기 치료용 항체는 CD16, 바람직하게는 Fc 부위를 통해 결합될 수 있다. 바람직하게는, 상기 치료용 항체는 인간 IgG1 또는 IgG3 Fc 부위, 특히 단클론 항체 또는 그 단편, 더 바람직하게는 인간, 인간화 또는 키메라 항체 또는 그 단편, 예를 들어 리텍시맵을 가진다.
- [0036] 정의
- [0037] 여기서 사용되는 용어들은 다른 특별한 언급이 없는 한 이하에서 정의되는 의미를 가진다.
- [0038] 여기서 사용되는 "NK" 세포는 비정형적인 면역에 관계된 림프구의 하부 집단을 말한다. NK 세포는 어떤 특징 및 생물학적 특성, 즉 CD16, CD56 및/또는 CD57을 포함하여 특정의 표면 항원의 발현, 세포 표면에 알파/베타 또는 감마/델타 TCR 복합체의 부재, 특정의 세포 독성 효소의 활성화에 의해 "자기" MHC/HLA 항원을 발현하지 못하는 세포에 결합하여 살상하는 능력, NK 활성화 수용체를 위한 리간드를 발현하는 종양 세포 또는 다른 질병 세포를 살상하는 능력, 및 면역 반응을 자극하거나 또는 억제하는 시토킨이라고 불리는 단백질 분자를 방출하는 능력 등에 의하여 확인될 수 있다. 이러한 특징 및 활성들 중 어떤 것은 관련 분야에서 잘 알려진 방법을 사용하여 NK 세포를 확인하는데 사용될 수 있다.
- [0039] 여기서 사용되는 "항체"라는 용어는 다클론 및 단클론 항체를 말한다. 중연쇄(heavy chain)의 불변 도메인의 형태에 따라, 항체들은 다섯 개의 주요한 부류: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM 중 하나로 분류된다. 그 중 몇몇은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 등의 하위부류 또는 아이소타입(isotype)로 분류된다. 대표적인 면역글로블린(항체) 구조 단위는 4위체(tetramer)를 포함한다. 각 4위체는 두 개의 동일한 폴리펩티드 사슬의 쌍으로 구성되고, 각 쌍은 하나의 "경쇄(light chain)"(약 25kDa) 및 하나의 "중연쇄(heavy chain)"(약 50-70kDa)를 가진다. 각 사슬의 N-말단은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100 내지 110 또는 그 이상의 아미노산의 가변부위를 결정한다. 가변성 경쇄(V_L) 및 가변성 중연쇄(V_H)라는 용어는 각각 이러한 경쇄 및 중연쇄를 말한다. 면역글로블린의 서로 다른 부류에 대응하는 중연쇄 불변 도메인은 "알파", "델타", "엡실론", "감마" 및 "뮤"로 각각 언급된다. 면역글로블린의 다른 부류의 서브유닛 구조 및 3차원 형상은 잘 알려져 있다. IgG 및/또는 IgM은 본 발명에서 사용되는 바람직한 항체 부류이고, IgG가 특히 바람직한데, 이는 생리학적인 상황에서 가장 일반적인 항체이고, 실험실 조건에서 가장 쉽게 만들어질 수 있으며, IgG들은 Fc 감마 수용체에 의해 특징적으로 인식되기 때문이다. 바람직하게는 본 발명의 항체는 단클론 항체이다. 특히 바람직한 항체는 인간화, 키메라, 인간 또는 인간에게 적합한 항체이다.
- [0040] 본 발명의 내용에서, "치료용 항체 또는 항체들"이라는 용어는 환자의 표적 세포를 사멸시키는 기능을 하는 임의의 항체를 더 특정적으로 지시한다. 특히, 치료용 항체는 표적 세포의 표면에 존재하는 항원, 예를 들어 종양

세포에 지배적이거나 독점적으로 존재하는 종양 특이 항원에 특정적으로 결합한다. 바람직하게는, 치료용 항체는 인간 Fc 부위를 포함하거나, 또는 인간 Fc 수용체와 상호작용할 수 있다. 치료용 항체는 어떤 수단, 예를 들어 ADCC 또는 다른 수단으로 세포를 목표로 할 수 있고, "나체(naked)", 즉 접합된 모이어티가 없을 수 있으며, 또는 방사성 표지 또는 독소와 같은 화합물과 접합될 수도 있다.

[0041] "특정적으로 결합하다"라는 용어는 항체가 바람직하게는 경쟁 결합 분석법에서 결합 파트너, 예를 들어 NKp30, NKp44 또는 NKp46과 같은 활성화 NK 수용체 또는 인간 Fc 감마 수용체에 결합할 수 있다는 것을 의미하며, 단백질의 재조합 형태, 그것의 에피토프 또는 분리된 NK 세포 또는 연관된 표적 세포의 표면에 존재하는 순수 단백질을 사용하여 평가한다. 경쟁 결합 분석법 및 특정 결합을 결정하기 위한 다른 방법은 이하에서 더 기술될 것이며, 이는 관련 분야에 잘 알려져 있다.

[0042] "인간에 적절한" 항체는 예를 들어 여기서 기술한 치료 방법을 위해 인간에게 안전하게 사용될 수 있는 어떤 항체, 유도된 항체, 또는 항체 단편을 말한다. 인간에 적절한 항체는 모든 형태의 인간화, 키메라, 또는 완전 인간 항체, 또는 항체들 중 적어도 일부가 인간으로부터 유도되거나 또는 그렇지 않으면 순수 비-인간 항체가 사용될 때 발생하는 면역 반응을 방지하기 위하여 변형된 어떤 항체를 포함한다.

[0043] 여기서, "면역성 단편"은 (i) 그 단편 및/또는 막에 결합한 수용체 및 그 돌연변이를 포함하여 상기 단편을 포함하는 어떤 형태의 분자를 결합하는 항체의 생성; (ii) 어떤 MHC 분자 및 상기 단편에서 유래된 펩티드를 포함하는 이-분자 복합체에 반응하는 T-세포와 연관된 T-세포 반응의 자극; (iii) 박테리오파지 또는 포유류 면역글로블린을 인코딩하는 유전자를 발현하는 박테리아와 같은 감염된 매체의 결합;과 같은 면역 반응을 유도할 수 있는 폴리펩티드성 또는 펩티드성 단편을 의미한다. 달리, 면역성 단편은 또한, 공유 결합에 의해 담체 단백질에 접합된 펩티드성 단편, 아미노산 서열에 상기 펩티드 단편을 포함하는 키메라 재조합 폴리펩티드 구조와 같은 상기한 바와 같은 면역 반응을 유도할 수 있는 어떤 구조를 의미하며, 특히 그 서열이 상기 단편을 인코딩하는 부위를 포함하는 cDNA로 이식된 세포를 포함한다.

[0044] 본 발명의 목적을 위하여, "인간화" 항체는 하나 이상의 인간 면역글로블린의 불변 및 가변 구조 부위가 동물 면역 글로블린의 결합부위, 예를 들어 CDR과 융합된 항체를 말한다. 이러한 인간화 항체는 결합 구역이 유래하는 비-인간 항체의 결합 특이성을 유지하면서, 비-인간 항체에 대한 면역 반응을 방지하도록 형성된다.

[0045] "키메라 항체"는 (a) 불변부위, 또는 그 일부가 변경, 치환 또는 교환되어 항원 결합 자리(가변부위)가 다른 또는 변경된 부위, 이펙터 기능 및/또는 중, 또는 새로운 특성을 키메라 항체에 전하는 전체적으로 다른 분자, 예를 들어 효소, 독소, 호르몬, 성장 인자, 약제 등에 연결되고; 또는 (b) 가변부위, 또는 그 일부가 다른 또는 변경된 항원 특이성을 가진 가변부위로 변경, 치환 또는 교환된 항체 분자이다. 그러나, 본 발명의 바람직한 실시 형태에서, 키메라 항체는 면역 글로블린의 Fc 부위, 바람직하게는 인간 Fc 부위를 유지하여, 표적 세포 표면의 인간 Fc 수용체와 상호 작용을 하게 한다.

[0046] 본 발명의 내용에서, "강화된(potentiated)", "활성", 또는 "활성화된" NK 세포는 생물학적 활성 NK 세포, 더 구체적으로는 표적 세포를 용해하는 능력을 가진 NK 세포를 나타낸다. 예를 들어, "활성" NK 세포는 NK 활성화 수용체-리간드를 발현시키고 "자기" MHC/HLA 항원(KIR-양립할 수 없는 세포)을 발현시키지 못하는 세포를 살상할 수 있다. 재정립된 살상 분석법에서 사용하기 적절한 표적 세포의 예로는 P815 및 K562 세포가 있으나, 다수의 세포 유형이 사용될 수 있고 관련 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, Sivori 등(1997) J. Exp. Med. 186:1129-1136; Vitale 등(1998) J. Exp. Med. 187:2065-2072; Pessino 등(1998) J. Exp. Med. 188: 953-960; Neri 등(2001). Clin. Diag. Lab. Immun. 8:1131-1135). "강화된(potentiated)", "활성", 또는 "활성화된" NK 세포는 또한 자유 세포내 칼슘 수준에서 시토키닌(예를 들어, IFN- γ 및 TNF- α) 생산 증가와 같은 NK 활성화와 연관된 것처럼 관련 분야에 잘 알려진 어떤 다른 특성 또는 활성으로 확인될 수 있다. 본 발명의 목적을 위하여, "강화된(potentiated)", "활성", 또는 "활성화된" NK 세포는 특히 비활성화 수용체의 자극을 통해 억제되지 않고, 또는 이러한 억제가 예를 들어 활성화 수용체의 자극을 통해 극복되는 생체 내의 NK 세포를 말한다.

[0047] 여기서 사용되는, "활성화 NK 수용체"라는 용어는 자극을 받았을 때 시토키닌(예를 들어, IFN- γ 및 TNF- α) 생산, 세포내 자유 칼슘의 증가, 예를 들어 상세한 설명에 기술된 것처럼 재정립된 살상 분석법에서 표적 세포에 대한 능력 또는 NK 세포 증식을 자극하는 능력과 같은 NK 활성화와 연관된 것처럼, 관련 분야에 알려진 어떤 특성 및 활성에서 측정 가능한 증가를 유발하는 NK 세포 표면의 어떤 분자를 말한다. "활성화 KIR 수용체"라는 용어는 NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, IL-12R, IL-15R, IL-18R 및 IL-21R을 포함한다(이에 제한되지 않음). 여기서 사용되는 "활성화 NK 수용체"라는 용어는 IL-2 수용체(IL-2R)를 배제한다. NK 세포가 활성 또는 증식적인

지 그렇지 않은지를 결정하는 방법은 이하에서 더 상세히 기술될 것이며, 관련 분야의 숙련된 자에게 잘 알려져 있다.

[0048] 여기서 사용되는, "비활성화" 또는 "비활성화 NK 수용체"라는 용어는 자극 받았을 때 시토키닌(예를 들어, IFN- γ 및 TNF- α) 생산, 세포내 자유 칼슘의 증가, 예를 들어 상세한 설명에 기술된 것처럼 제정립된 살상 분석법에서 표적 세포를 용해하는 능력과 같은 NK 활성화와 연관된 관련 분야에 잘 알려진 어떤 특성 또는 활성을 측정 가능하게 감소시키는 NK 세포 표면의 어떤 분자를 말한다. 이러한 수용체의 예로는 KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, LILRB1, NKG2A, NKG2C, NKG2E 및 LILRB5를 들 수 있다. NK 세포가 활성화인지 어떤지를 결정하는 방법은 이하에서 더 상세하게 기술될 것이며, 관련 분야의 숙련된 자에게 잘 알려져 있다.

[0049] 본 발명에서, "NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극한다"라는 용어는, 적어도 하나의 비활성화 또는 활성화 NK 세포 수용체, 예를 들어 KIR, NKG2A/C, Nkp30, Nkp44, Nkp46 및 여기서 열거된 다른 것과 바람직하게는 직접적으로 상호 작용하여, (비활성화의 수용체의 경우) 그 수용체의 비활성화 신호를 무효화하고 또는 (활성화 수용체의 경우) 그 수용체의 신호를 촉진하는 화합물, 바람직하게는 항체, 단편 또는 유도체의 능력을 말한다. 비활성화 수용체에서, 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편은 HLA와 수용체 간의 상호 작용을 차단할 수 있다. 그 화합물이 항체일 때, 그 항체는 다클론, 또는 바람직하게는 단클론일 수 있다. 그 화합물은 필요한 가변 및 불변 도메인을 발현하도록 조작된 융합 세포 또는 재조합 세포에 의해 생산될 수 있다. 항체들은 단일 사슬 항체 또는 항원 특이성 및 더 낮은 경첩 부위를 보유하는 다른 항체 유도체 또는 Fab 단편, Fab'2 단편, CDR 및 ScFv와 같은 그 변형일 수 있다. 이는 다기능 항체, 재조합 항체, 인간화 항체, 또는 그 변형일 수 있다.

[0050] 본 발명의 내용에서 "공통 결정자(common determinant)"는 연관된 수용체 그룹, 예를 들어 인간 KIR2DL 수용체 그룹의 여러 구성원에 의해 공유되는 결정자 또는 에피토프를 지시한다. 결정자 또는 에피토프는 상기 구성원에 의해 공유되는 펩티드 단편 또는 조직 에피토프를 나타낼 수 있다. 특정 실시 형태에서, 공통 결정자는 단클론 항체 DF200, NKVSF1 또는 EB6에 의해 인식되는 에피토프를 포함한다.

[0051] 본 발명의 내용에서 공통 결정자를 "결합하는" 항체라는 용어는 상기 결정자를 특이적 및/또는 친화적으로 결합하는, 즉 예를 들어 인간 NK 세포의 표면에서 어떤 다른 관련이 없는 모티프 또는 결정자 또는 구조와 고 친화적이거나 특이적으로 결합하지 않는 항체를 나타낸다. 더 구체적으로, 상기 결정자에 대한 본 발명에 따른 단클론 항체의 결합은 다른 에피토프 또는 결정자에 대한 상기 항체의 결합과 구별될 수 있다.

[0052] NK 세포 비활성화 수용체에 결합하여 그 자극을 방지할 수 있는 화합물, 바람직하게는 항체는, "무력화" 또는 "비활성화" 화합물, 바람직하게는 항체이고, 이러한 의미에서 그것은 NK 세포 비활성화 수용체, 예를 들어 KIR 또는 NKG2A/C 수용체에 의해 매개되는 비활성화 신호 통로를 적어도 부분적으로 차단한다. 더 중요하게는, 이러한 억제 활성화는 여러 형태의 KIR 또는 NKG2A/C 수용체에 대하여 나타날 수 있고, 따라서 이러한 화합물, 바람직하게는 항체들은 높은 효율로 여러 개체에 사용될 수 있다.

[0053] 예를 들어, 세포, 핵산, 단백질, 또는 벡터에 사용될 때 "재조합"이라는 용어는 이중 핵산 또는 단백질의 도입 또는 순수 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형된 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터를 나타내고, 또는 그렇게 변형된 세포에서 유래된 세포를 나타낸다. 따라서, 예를 들어 재조합 세포는 발현되거나 전혀 발현되지 않은 경우, 세포의 순수(재조합되지 않은) 형태에서 발견되지 않는 세포를 발현시키고 또는 그렇지 않으면 비정상적으로 발현될 순수 유전자를 발현시킨다.

[0054] 본 발명의 내용에서, 개체 또는 환자는 임의의 포유류 개체 또는 환자, 더 바람직하게는 인간 개체 또는 환자를 포함한다.

[0055] 치료용 항체

[0056] 본 발명은 치료용 항체와 함께 NK 세포를 강화시키는 화합물의 사용 방법을 다룬다. 상당히 다양한 치료용 항체가 본 발명에서 사용될 수 있다. 본질적으로, "나체이거나(naked)" 또는 방사성 표지, 독소 또는 다른 모이어티가 접합된, 또는 전체 길이어거나 단편인; 또는 진성 항체이거나 또는 항체의 변형된 유도체이든지 간에 어떤 치료용 항체도 사용될 수 있다. 바람직하게는 본 방법은 NK 세포 활성화가 투여된 치료용 항체의 효능에 절대적이지는 않지만 중요한 역할을 하는 치료의 효능을 향상시키는데 사용되고, 바람직하게는 항체 또는 단편은 인간

Fc 수용체, 예를 들어 Fc 감마 수용체에 의해 항체를 특징적으로 인식하게 하는 인간 Fc 부위 또는 다른 도메인을 원래 포함하거나 포함하도록 변형될 것이다.

- [0057] 본 화합물은 치료용 항체에 의해 특징적으로 인식되는 항원을 발현하는 표적 세포를 사멸시키는 치료용 항체의 능력을 향상시키기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 치료용 항체의 목표가 될 수 있는 세포에 의해 적어도 부분적으로 유발되거나 악화되는 질병 또는 증상은 이하의 방법을 사용하여 치료될 수 있다. 표적 세포의 특정 예는 종양 세포, 바이러스에 감염된 세포, 동종(allogenic) 세포, 알레르기 및 연관된 병리학적 면역능(immunocompetent) 세포(예를 들어, B 림프구, T 림프구, 항원제시세포(antigen presenting cell) 등), 자가 면역 질환, 동종 반응 등, 또는 심지어 건강한 세포(예를 들어, 항혈관신생치료에서 혈관내피세포(endothelial cell))를 포함한다. 본 발명에서 가장 바람직한 표적 세포는 종양 세포와 바이러스에 감염된 세포이다. 예를 들어, 치료용 항체들은 특히 항체-의존성 세포-매개성-세포독성(ADCC)에 의해 세포독성 효과 또는 세포 용해를 매개할 수 있다.
- [0058] ADCC는 IgG(Fc γ R)의 Fc 부위를 위한 백혈구 수용체를 필요로 하고, 그 기능은 IgG에 민감한 항원을 Fc γ R을 품고 있는 세포 독성 세포에 연결하고 세포 활성화 수단을 이끌어 내는 것이다. 따라서, 치료용 항체는 면역 복합체를 형성할 수 있다. 예를 들어, 면역 복합체는 치료용 항체로 뒤덮힌 종양 표적일 수 있다. 더 구체적으로, 그 항체는 CD16, 바람직하게는 그 Fc 부위를 통해서 결합될 수 있다. 치료용 항체가 CD16과 같은 Fc γ 수용체를 결합하는지 여부를 결정하는 것은 어떤 적절한 방법, 예를 들어 임의적으로 지지체에 부동화된 재조합 제조된 CD16 폴리펩티드 또는 그 단편에 대한 결합을 측정함으로써, 또는 예를 들어 CD16을 발현시키는 것으로 알려지거나 그렇게 생각되는 세포에 치료용 항체의 결합을 측정함으로써 평가될 수 있다.
- [0059] 치료용 항체들은 단클론 또는 바람직하게는 단클론일 수 있다. 그 항체들은 원하는 가변 및 불변 도메인을 발현하도록 조작된 융합 세포 또는 재조합 세포에 의해 생산될 수 있다. 항체들은 단일 사슬 항체 또는 항원 특이성 및 낮은 경첩 부위 또는 그 변형을 보유하는 다른 항체 유도체일 수 있다. 그 항체들은 다기능 항체, 재조합 항체, 인간화 항체, 그 단편 또는 변형일 수 있다. 상기 단편 또는 유도체는 바람직하게는 Fab 단편, Fab'2 단편, CDR 및 ScFv이다. 바람직하게는 단편은 항원 결합성 단편이다. 항체 단편을 포함하는 치료용 항체들은 또한 제한적이지는 않지만 이중 특이성 항체들을 포함할 수 있다; 적절한 이중 특이성 항체의 일 예는 CD16에 특이한 항원 결합 구역 및 종양 항원에 특이한 항원 결합 구역을 포함한다. 단편을 포함하는 다른 항체형은 단일 폴리펩티드 사슬에서 두 개의 서로 다른 항체의 결합 구역을 결합하는 재조합 이중 특이성 항체 유도체를 포함하고, 이는 BiTETM으로 언급된다(Kufer P. 외 TRENDS in Biotechnology 2004;22(5):238-244; 및 Baeuerle 외, Current Opinion in Molecular Therapeutics 2003;5(4):413-419).
- [0060] 치료용 항체는 일반적으로 표면 항원, 예를 들어 막 항원에 특이적이다. 가장 바람직한 치료용 항체는 CD20, CD52, ErbB2(또는 HER2/Neu), CD33, CD22, CD25, MUC-1, CEA, KDR, $\alpha V\beta 3$ 등, 특히 림프종 항원(예를 들어, CD20)과 같은 종양 항원(예를 들어, 종양 세포에 의해 특이적으로 발현되는 세포)에 특이적이다. 치료용 항체는 바람직하게는 인간 또는 인간이 아닌 영장류 IgG1 또는 IgG3 Fc 부위, 더 바람직하게는 인간 IgG1를 가진다.
- [0061] 일 실시 형태에서, 항체들은 ADCC 동안에 NK 세포와 항체의 상호 작용을 향상시키는 그 Fc 부위에서의 변형을 포함할 것이다. 이러한 변형된 치료용 항체들("변경된 항체들")은 일반적으로 하나 이상의 Fc γ R에 대한 항체의 결합 친화력을 변형하는 바람직하게는 Fc 부위에서 변형물을 포함한다. 하나 이상의 Fc γ R에 대한 변형된 결합을 가진 항체를 변형하는 방법은 관련 분야에 알려져 있고, 예를 들어 PCR 공개물, 즉 WO 2004/016750(국제 출원 PCT/US2003/025399), WO 99/158572, WO 99/151642, WO 98/123289, WO 89/107142, WO 88/107089 및 미국 특허 No. 5,843,597 및 5,642,821을 참조하라.
- [0062] 류머티즘성 관절염 치료를 위해 사용되는 D2E7(Cambridge Antibody Technology Group, plc(Cambridge, UK)/BASF(Ludwigshafen, Germany)), 또는 인플릭시맵(Infliximab)(Centocor, Inc., Malvern, PA; 크론 병(Crohn's disease) 및 류머티즘성 관절염 치료를 위해 사용됨), 또는 국제 특허 출원 PCT/US2003/025399(전체가 참조로 위해 통합됨)에 공개된 항체와 같은 치료용 항체는 상기 및 이하의 확인된 적용에서처럼 변형될 수 있고 이러한 항체들이 일반적으로 사용되는 질병 치료를 위해 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 발명은 활성 Fc γ R, 예를 들어 Fc γ RIII을 위해 높거나 낮게 변경된 친화력을 가진 변경된 항체를 제공한다. 어떤 실시 형태에서, Fc γ R에 대해 높은 친화력을 가진 변경된 항체가 제공된다. 바람직하게는 이러한 변형은 또한 변경된 Fc가 매개하는 이펙터 기능을 가진다.

- [0063] Fc가 매개하는 이펙터 기능에 영향을 미치는 변형은 관련 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 6,194,351 참조). 변형될 수 있는 아미노산은 제한적이지는 않지만 프롤린 329, 프롤린 331 및 리신 322를 포함한다. 프롤린 329 및/또는 331 및 리신 322는 바람직하게는 알라닌으로 치환될 수 있다. 그러나, 어떤 다른 아미노산으로의 치환이 예상된다. 국제 공개 WO 00/142072 및 미국 특허 6,194,551을 참조하라.
- [0064] 따라서, Fc 부위의 변형은 항체 Fc 부위에서 발견되는 아미노산에 대한 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 이러한 변형은 변경된 항체가 매개하는 이펙터 기능, 다른 Fc 수용체(예를 들어, Fc 활성 수용체)에 대한 변경된 결합, 변경된 ADCC 활성, 변경된 Clq 결합 활성, 변경된 보체 의존성 세포독성 활성, 또는 그것들의 조합을 가진 항체를 초래할 수 있다.
- [0065] 일 실시 형태에서, 항체는 FCGR3A(CD16, FCGR3, 면역글로블린 G Fc 수용체 III라고 불림; IGF3, IgG의 Fc 단편을 위한 수용체, 낮은 친화력 IIIa; OMIM 146740을 참조하라), FCGR2A(CD32, CDw32, IgG의 Fc 단편을 위한 수용체, 낮은 친화력 IIa, FCGR2, 면역글로블린 G Fc 수용체 II; OMIM 146790을 참조하라); FCGR2B(CD32라고 불림, IgG의 Fc 단편을 위한 수용체, 낮은 친화력 IIb; FCGR2B, FC-감마-RIIB; OMIM 604590을 참조하라), FCGR1A(CD64라고 불림; IgG의 Fc 단편을 위한 수용체, 높은 친화력 Ia; IGF1; OMIM 146760을 참조하라); FCGR1 IgG의 단편, 높은 친화력 Ic, 면역글로블린 G Fc 수용체 IC, IGFRC; OMIM 601503을 참조하라); 또는 FCGR1B(CD64라고 불림, IgG의 Fc 단편을 위한 수용체, 높은 친화력 Ib; 면역글로블린 G Fc 수용체 IB, IGFRC; OMIM 601502를 참조하라)와 같은 Fc 감마 수용체에 의해 특징적으로 인식된다.
- [0066] 본 발명의 치료용 항체의 전형적인 예는 리텍시맵(rituximab), 알렘투주맵(alemtuzumab), 트라스투주맵(trastuzumab)이다. 이러한 항체들은 인간에 대해 사용 승인을 받은 치료 프로토콜에 따라 사용될 수 있다. 치료용 항체의 다른 특정 예는 에프라투주맵(epratuzumab), 바실릭시맵(basiliximab), 다클리주맵(daclizumab), 세특시맵(cetuximab), 라벤투주맵(labetuzumab), 세비루맵(sevirumab), 투부리맵(tuvurimab), 팔리비주맵(palivizumab), 인플릭시맵(infliximab), 오말리주맵(omalizumab), 에팔리주맵(efalizumab), 나타리주맵(natalizumab), 클레노릭시맵(clenoliximab) 등이다. 임의적으로, NK 세포의 활성화 수용체를 자극하는 화합물이 시토키닌일 때, 치료용 항체는 리텍시맵 또는 허셉틴, 또는 임의적으로 항-CD20 또는 항-HER2/neu 항체를 제외한 항체이다. 본 발명에 따라 사용하기 위한 바람직한 치료용 항체의 다른 예는 항-페리틴 항체(미국 특허 공개 no. 2002/0106324), 항-p140 및 항-sc5 항체(WO 02/50122) 및 항-KIR(살상 비활성화 수용체) 항체(KIR 수용체는 Carrington and Norman, The KIR Gene Cluster, 2003년, 5월, 3일, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>에서 이용할 수 있음)를 포함한다. 치료용 항체의 다른 예들은 이하의 표 1에 있으며, 본 발명에서 어떤 것도 사용할 수 있다. 이하의 표 또는 본 명세서에 기술되었는지 여부와 관계없이, 바람직하게는 ADCC에 의해 표적 세포를 사멸할 수 있는 어떤 항체도 본 발명에서 사용될 수 있으며, 이하의 표 1은 항체 뿐만 아니라 기술된 항체의 표적 또는 증상에 관하여 모두 설명하는 것은 아니다.

표 1

치료용 항체들

[0067]

Ab 특이성	DCI	상표명	전형적인 증상
항-CD20	리텍시맵	MabThera®, Rituxan®	비호지킨 림프종(NHL)B
항-CD20		Zevalin	NHL
항-CD20		Bexocar	NHL
항-CD52	알렘투주맵	CAMPATH-1H®	만성림프구성백혈병 (CLL), 동종이식
항-CD33		SMART-M195	급성골수성백혈병(AML)
항-CD33		Zamy1™	급성 골수성 백혈병
항-HLA-DR		SMART-ID10	NHL
항원			
항-HLA-DR		Remitogen™	NHL B
항-CD22	에프라투주맵	LymphoCide™	NHL B
항-HER2		MDX-210	전립선 및 다른 암
항-erbB2 (HER-2/neu)	트라스투주맵	Herceptin®	전이 유방암
항-CA125		OvaRex	난소암
항-MUC1		TriAb	전이 유방암

항-MUC1		BravaRex	전이암
항-PEM 항원		Theragyn, Therex	난소암, 유방암
항-CD44	비바투즈맵		머리 및 목암
항-gp72	MAb, 이디오타입성 105AD7		결장암
항-EpCAM	항-EpCAM; MT201	IS-IL2	암
항-VEGF	MAb-VEGF		전이 NSCLC, 결장암
항-CD18	AMD Fab		나이관련 시력감퇴
항-CD18	항-CD18		심근암
항-VEGF 수용체	IMC-1c1 I		결장암
항-nuC242	nuC242-DMI		결장, 위 및 췌장암
항-EGFR	MAB425		암
항-EGFR	ABX-EGF		암
항-EGFR (HER-1, erbB1)	세톡시맵		ENT 및 결장암
항-MUC-1		Therex®	유방암 및 상피암
항-CEA		CEAVac	결장암
항-CEA	라베투주맵	CEA-Cide™	고형 종양
항- $\alpha V \beta 3$		Vitaxin	평활근육종, 결장 및 다른 암(항혈관신생)
항-KDR (VEGFR2)			암(항혈관신생)
항-VRS 융합 단백질	팔리비주맵	Synagis®	바이러스성 질환
Idem		Numax™	Idem
CMV	세비루맵	Protovir	CMV 감염
HBs	투부리맵	Ostavir™	B 형 간염
항-CD25	바실릭시맵	Simulect®	동종이식 거부반응 방지/치료
항-CD25	다솔리주맵	Zenapax®	동종이식 거부반응 방지/치료
항-TNF- α	인플릭시맵	Remicade™	크론병, 류머티스성관절염
항-CD80	IDEC-114		건선
항-IgE		E-26	알레르기성 천식 및 비염
항-IgE	오말리주맵	Xolair™	천식
항-IgE	Rhu-mAb E25		알레르기/천식
항-인테그린 αL (CD11a, LFA-1)	에팔리주맵	Xanelim™	건선
항-베타 2 인테그린	LDP-01		발작, 동종이식 거부
항-인테그린 αL (CD11a, LFA-1)	항-CD11a		건선
항-CD4	켈릭시맵 시플리주맵 MEDI-507		GVHD, 건선
항-CD4	OKT4A		동종이식 거부
항-CD3	OKT3		동종이식 거부
항-CD3	SMART-aCD3		자가면역질환, 동종이식거 부, 건선
항-CD64			빈혈증
항-CD147			GvHD
항-인테그린 $\alpha 4$ ($\alpha 4 \beta 1 - \alpha 4 \beta 7$)	나탈리주맵	Antegren®	복합 경화증, 크론병
항-인테그린 $\beta 7$			크론병, 궤양성 대장염
알파 4 베타 7	LDP-02		궤양성 대장염

항-HLA-DR10 베타		Oncolym	NHL
항-CD3		Nuvion	T 세포 악성종양
항-GD2 갱글리오사이드		Trigem	전이 흑색종 및 소세포 폐암
항-SK-1 항원			결장 및 췌장암
항-CD4※	클레노릭시맵		
항-IL-8	ABX-IL8		건선
항-VLA-4		Antegren	MS
항-CD40L		Antova	SLE, 동종이식 거부
항-CD40L	IDEC-131		MS, SLE
항-E-선택	CDP850		건선
항-CD11/CD18	Hu23F2G		MS, 발작
항-ICAM-3	ICM3		건선
항-CBL	ABX-CBL		GVHD
항-CD147			
항-CD23	IDEC-152		천식, 알레르기
항-CD25		Simulect	동종이식 거부
항-T1-ACY	ACY-110		유방암
항-TTS	TTS-CD2		췌장, 신장암
항-TAG72	AR54		유방, 난소, 폐암
항-CA19.9	GivaRex		결장, 췌장, 위암
항-PSA	ProstaRex		전립선암
항-HMFGI	R1550		유방암, 위암
	웹투모맵	Theragyn	위암, 난소암
항-hCG	CTP-16, CTP-21		복합암
항 콜라겐 타입 1-V	HU177; HUIV26; XL313		복합암
항-CD46		Crucell/J&J	복합암
항-17A-1	에드레코로맵	Panorex	결장암
항-HM1.24	AHM		복합 골수종
항-CD38	항-CD38		복합 골수종
항-IL15 수용체	HuMax 림프종		림프종
항-IL-6	B-E8		림프종
항-TRAIL-R1	TRM-1		복합암
항-VEGF2			복합암
항-BlyS	Lymphostat		복합암
항-SCLS, CEA 및 DTPA	Pentacea		폐암
항-CD52	CAMPATH		백혈병, 림프종
항-루이스 Y 항원	IGN311		상피암
항-VE cadherin	E4G10		복합암
항-CD56	BB10901, huN901DC1		결장, 폐암
항- mertansine/mucine	칸투즈맵		결장, 폐, 췌장암
항-AFP	AFP-cide		간암
항-CSAp	Mu-9		결장암
항-CD30	MDX-060		흑색종, 호지킨병
항-PSMA	MDX-070		전립선암
항-CD15	MDX-11		백혈병
항-TAG72	MDX-020		결장암

항-CD19, CD3 이중 특이성	MT103		림프종
항-mesothelin 항원	SS1-PE38		뇌 및 난소암, 중피종
항-DNA 및 히스톤	Cotara		결장암, 췌장암, 육종, 뇌 암 및 다른 암
항-a5B1 인테그린	항-a5B1		복합암
항-p97	SGN17/19		흑색종
항-CD5	Genimune		백혈병, 림프종

[0068] NK 세포 활성을 조절하는 화합물

[0069] NK 세포 활성은 활성 및 비활성 신호 모두와 관련된 복잡한 메카니즘에 의해 조절된다. 따라서, NK 세포에 의해 매개된 효율적인 치료는 이러한 세포를 활성화 시키고 또는 비활성화 신호를 무효화함으로써 달성될 수 있다. NK 세포의 비활성화 수용체를 차단, 억제 또는 하향조절하는 효과를 가지거나 또는 NK 세포의 활성화 수용체의 활성 또는 발현을 활성, 자극 또는 촉진하는 효과를 가진 어떤 화합물도 사용될 수 있다. 이러한 화합물은 시토키닌 뿐만 아니라 NK 세포 수용체에 결합하여 그것을 직접적으로 억제 또는 촉진하는 저분자(small molecule), 폴리펩티드 및 항체와 같은 화합물을 포함한다. 수용체가 차단되거나 자극되는 메카니즘은 본 발명이 제공하는 장점에 중요하지는 않다. 예를 들어, 화합물은 활성화 수용체의 발현을 증가시키거나 비활성화 수용체의 발현을 억제할 수 있고, 그 화합물은 리간드와 비활성화 수용체 사이의 상호 작용을 방지하거나 또는 리간드와 활성화 수용체 사이의 상호 작용을 향상시킬 수 있으며, 또는 그 화합물은 (비활성화 수용체의 경우) 그 수용체에 직접적으로 결합하여 억제하거나 또는 (활성화 수용체의 경우) 그 수용체에 직접적으로 결합하여 활성화시킬 수 있다. 중요한 변수는 그 화합물이 생체 내에서 표적 세포를 사멸시키는 치료용 항체의 능력에 대해 가지는 효과이다.

[0070] NK 세포 표면의 비활성화 수용체는 본 화합물의 표적이 될 수 있다. NK 세포는 주조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex)(MHC) class I-특정의 비활성화 수용체에 의해 부정적으로 조절된다(Karre 외, 1986; Ohlen 외, 1989). 이러한 특성의 수용체는 주조직 적합성 복합체(MHC) class I 분자 또는 HLA의 다형 결정자에 결합하고 자연 살해(NK) 세포 용해를 비활성화시킨다. 사람의 경우, killer Ig-like receptors(KIRs)라는 용어의 수용체 군의 어떤 구성원은 HLA class I 대립 유전자 그룹을 인식한다.

[0071] KIR2DL, KIR2DS, KIR3DL 및 KIR3DS를 포함하여 여러 그룹의 KIR 수용체가 있다. 두 Ig 도메인을 가진 KIR 수용체(KIR2D)는 HLA-C 알로타입(allo type)을 확인한다: KIR2DL2(전에 p58.1로 지시됨) 또는 상당히 연관된 유전자 생성물 KIR2DL3은 그룹 2 HLA-C 알로타입(Cw1,3,7,8)에 의해 공유된 에피토프를 인식하는 반면, KIR2DL1(p58.2)은 상보적인 그룹 1 HLA-C 알로타입(Cw2,4,5,6)에 의해 공유되는 에피토프를 인식한다. KIR2DL1에 의한 인식은 HLA-C 대립 유전자의 80 위치에 Lys(리신) 잔기의 존재에 의해 지시된다. KIR2DL2 및 KIR2DL3 인식은 80 위치에 Asn(아스파라긴) 잔기의 존재에 의해 지시된다. 중요하게도 상당한 양의 HLA-C 대립 유전자는 80 위치에 Asn 또는 Lys를 가진다. 세 개의 Ig 도메인을 가진 하나의 KIR인 KIR3DL1(p70)은 HLA-Bw4 대립 유전자에 의해 공유된 에피토프를 인식한다. 마지막으로, 세 개의 Ig 도메인을 가진 동중복합체(homodimer)인 KIR3DL2(p140)는 HLA-A3 및 HLA-A11을 인식한다.

[0072] 비록 KIRs 및 다른 class-I 비활성화 수용체(Moretta 외, 1997; Valiante 외 1997; Lanier, 1998)는 어떤 주어진 개인의 NK 레퍼토리에서 NK 세포에 의해 공동 발현될 수 있지만, 단일 KIR을 발현시키는 세포들이 있고, 상응하는 NK 세포는 단지 특정 class I 대립 유전자 그룹을 발현시키는 세포에 의해 차단된다. 따라서, 이하에서 기술된 것처럼, 비활성화 수용체가 표적이 될 때, 본 방법은 복합 비활성화 수용체를 목표로 하여 NK 세포의 최대 범위에 달하는 화합물을 투여할 것이다.

[0073] 어떤 실시 형태에서, 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편은 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하고, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL1, KIR3DL1, KIR3DL2, NKG2A 및 NKG2C 중에서 선택된 적어도 하나의 비활성화 수용체의 비활성화 신호를 무효화한다. 더 바람직하게는, NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하는 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편은 KIR2DL2, KIR2DL3 및/또는 KIR2DL1의 비활성화 신호를 무효화한다.

[0074] 본 발명은 또한 NK 세포의 서로 다른 비활성화 수용체를 차단하는 여러 가지 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편의 조합의 사용 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하는 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편은 KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2, NKG2A 및 NKG2C에서 선택된

비활성화 수용체에 특정적이고 관련된 KIR- 또는 NKG2A/C가 매개하는 NK 세포독성의 비활성화를 억제할 수 있다. 예를 들어, NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하는 화합물은 KIR2DL1에 특이성을 가진 항체 및 KIR2DL2 및/또는 KIR2DL3에 특이성을 가진 다른 항체를 포함할 수 있다. 더 바람직하게는, NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하는 화합물의 조합은 KIR2DL1, KIR2DL2 및 KIR2DL3가 매개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 억제할 수 있다. 다른 실시 형태에서, 하나 이상의 비활성화 수용체를 표적으로 하는 하나 이상의 화합물 뿐만 아니라 하나 이상의 활성화 수용체를 표적으로 하는 하나 이상의 화합물의 혼합물은 투여될 것이다.

[0075] 예를 들어, KIR2DL에 특정한 단클론 항체는 KIR2DL1 Cw4(또는 이와 비슷한 것) 대립 유전자를 차단하였다 (Moretta 외, 1993). 다른 실시 형태에서, KIR2DL2/3에 대한 단클론 항체는 또한 KIR2DL2/3 HLA-Cw3(또는 비슷한 것) 대립 유전자(Moretta 외, 1993)를 차단하였다. 항-NKG2A 항체는 NKG2A와 HLA-E 사이의 비활성화 상호작용을 차단하였다.

[0076] 임의적으로, 항체는 GL183(KIR2DL2, L3, Immunotech에서 이용할 수 있음, France 및 Beckton Dickinson, USA); EB6(KIR2DL1, Immunotech에서 이용할 수 있음, France 및 Beckton Dickinson, USA); AZ138(KIR3DL1, Moretta 외에서 이용할 수 있음, 제노바 대학, 이탈리아); Q66(KIR3DL2, Immunotech에서 이용할 수 있음, France); Z270(NKG2A, Immunotech에서 이용할 수 있음, France); P25(NKG2A/C, Moretta 외에서 이용할 수 있음, 제노바 대학, 이탈리아); 및 DX9, Z27(KIR3DL1, Immunotech에서 이용할 수 있음, France 및 Beckton Dickinson, USA) 중에서 선택될 수 있다.

[0077] 바람직하게는, 본 발명은 단클론 항체 뿐만 아니라 그 단편 및 유도체를 사용하며, 상기 항체, 단편 또는 유도체는 NK 세포의 여러 KIR 또는 NKG2A/C 수용체와 교차 반응하고 그것들의 비활성화 신호를 무효화 한다.

[0078] 일 실시 형태에서, 본 발명은 인간 KIR2DL 수용체의 공통 결정자를 결합하여 상응하는 비활성화 경로를 억제하는 단클론 항체를 사용한다. 바람직하게는, 본 발명은 인간 NK 세포의 표면의 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 수용체를 결합하여 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3이 매개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 억제한다. 그 항체는 HLA-c 분자가 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 수용체에 결합하는 것을 억제한다. 더 바람직하게는, 그 항체는 생체 내에서 NK 세포 활성을 촉진한다. KIR2DL1 및 KIR2DL3(또는 KIR2DL2)는 대부분의 HLA-C 알로타이프, 즉 그룹 1 HLA-C 알로타이프 및 그룹 2 HLA-C 알로타이프를 가리기에 충분하기 때문에, 이러한 항체들은 대부분의 사람들, 일반적으로 약 90% 이상의 사람에게서 치료용 항체의 효율을 상승시키기 위해 사용될 수 있다. 이러한 실시 형태에서, 2004년 7월 1일, "NK 세포 활성을 조절하기 위한 조성물 및 방법(Composition and methods for regulating NK cell activity)"이라는 제목으로 출원된 PCR 특허 출원 no. PCT/FR 04/01702에 기술된 어떤 항체들도 본 발명에 사용될 수 있다.

[0079] 본 발명의 특정 목적에 따르면, NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하는 항체는 단클론 항체이고, 상기 항체는 KIR2DL 인간 수용체의 공통 결정자를 결합하여 KIR2DL이 매개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 억제한다. 그 항체는 더 특정적으로 융합 세포 DF200 및 NKVSF1 각각에 의해 생산된 단클론 항체 DF200 또는 NKVSF1와 동일한 에피토프에 결합하고 및/또는 NK 세포 표면의 KIR 수용체에 결합하기 위하여 융합 세포 DF200 및 NKVSF1 각각에 의해 생산된 단클론 항체 DF200 또는 NKVSF1와 경쟁한다. 이미 논의된 것처럼, 항체들의 예, 기능 평가 및 항체들이 상기 항체들과 경쟁하는지 여부에 대한 평가는 PCT 특허 출원 no. PCR/FR 04/01702에 기술되어 있다.

[0080] 특정 실시 형태에서, 상기 단클론 항체는 융합 세포 DF200에 의해 생산된 단클론 항체 DF200이다. 다른 실시 형태에서, 그 단클론 항체는 EB6이고, 또는 그 항체는 단클론 항체 EB6와 동일한 에피토프에 결합하거나, 또는 결합하기 위해 단클론 항체 EB6와 경쟁한다. 다른 실시 형태에서, 그 항체는 항체 DF200 또는 EB6의 단편 또는 유도체이다. 항체 DF200을 생산하는 융합 세포는 프랑스, 파스퇴르 연구소, Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25, Rue Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, CNCM 배양 컬렉션에 확인 번호 "DF200", 등록 번호 CNCM I-3224로서 2004년 6월 10일 등록되어 기탁되었다. 항체 NKVSF1는 Serotec(Cergy Sainte-Christophe, France), Catalog 참조 번호 MCA2243에서 이용할 수 있다.

[0081] 본 발명의 다른 실시 형태에서, 치료용 항체의 효능을 향상시키기 위해 사용되는 화합물은 NK 세포의 활성화 수용체를 자극한다. 어떤 활성화 수용체, 예를 들어 NKp30(예를 들어, PCT WO 01/36630 참조), NKp44(예를 들어, Vitale 외(1998) J. Exp. Med. 187:2065-2072 참조), NKp46(예를 들어, Sivori 외(1997) J. Exp. Med. 186:1129-1136; Pessino 외(1998) J. Exp. Med. 188: 953-960 참조), NKG2D(예를 들어, OMIM 602893 참조), IL-12R, IL-15R, IL-18R, IL-21R 또는 활성화 KIR 수용체, 예를 들어 KIR2DS4 수용체(Carrington and Norman, The KIR Gene Cluster, 2003년, 5월, 3일, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>에서 이용할 수 있음), 또는 NK 세포의 실질부에 존재하는 어떤 다른 수용체가 사용될 수 있고, 그 수용체의 활성화는 바람직하게는 세포가 비

활성화 KIR 수용체와 같은 비활성화 수용체를 통해 이미 비활성이 된 경우라도 세포의 활성화 또는 증식을 유도한다. 화합물은 폴리펩티드, 저분자 및 항체를 포함하여 어떤 분자 실체일 수 있다. 대표적인 화합물은 활성화 수용체와 상호 작용하는 천연, 재조합 또는 합성 리간드를 포함하는 어떤 리간드를 포함한다. 예를 들어, NK 세포의 활성화 수용체를 자극하는 화합물은 IL-12 수용체(IL-12R)와 반응하는 IL-12, IL-15 수용체(IL-15R)와 반응하는 IL-15, IL-18 수용체(IL-18R)와 반응하는 IL-18, IL-21 수용체(IL-21R)와 반응하는 IL-21과 같은 시토킨일 수 있다. 이러한 화합물은 예를 들어 IL-12(Research Diagnostics, NJ, DI-212), IL-15(Research Diagnostics, NJ, RDI-215), IL-21(Asano 외, FEBS Lett.2002;528:70-6)로부터 알려져 있다. 바람직하게는, NK 세포의 활성화 수용체를 자극하는 화합물은 IL-2를 제외한 화합물이다. NK 세포의 활성화 수용체를 자극하는 다른 대표적인 화합물은 NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, KIR2DS4 및 다른 활성화 KIR 수용체로 구성된 그룹에서 선택된 NK 세포 수용체를 결합하는 항체를 포함한다.

[0082] 어떤 바람직한 실시 형태에서, 활성화 수용체는 NK 세포에서 발견되는 자연 세포독성 수용체(NCR), 바람직하게는 NKp30, NKp44, NKp46 중에서 선택된 NCR이고, 활성화 수용체를 자극하는 화합물은 AZ20, A76, Z25, Z231 및 BAB281 중에서 선택된 어느 단클론 항체와 동일한 에피토프에 결합하거나, 또는 결합을 위해 서로 경쟁한다.

[0083] 기술한 어느 NK 세포 수용체에 대한 어떤 화합물의 결합은 다양한 표준 방법을 사용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, 면역 침강(immunoprecipitation) 및 표지 면역 검증법(radioimmunoassay)이 사용될 수 있듯이, 측색 병소 감염 진단 테스트(ELISA) 분석법이 사용될 수 있다. 경쟁 분석법은 예를 들어 시험 화합물의 결합을 NK 세포 수용체에 결합하는 것으로 알려진 화합물과 비교하기 위하여 사용될 수 있는데, 대조 화합물(예를 들어, NKp46에 특정적으로 결합하는 BAB281) 및 시험 화합물은 혼합되고(또는 미리 흡착됨) 에피토프를 포함하는 단백질, 예를 들어 BAB281의 경우에 NKp46을 포함하는 샘플에 적용된다.

[0084] ELISAs에 기초한 프로토콜, 표지 면역 검정법, 웨스턴블롯팅(western blotting), 및 BIACORE 분석법의 사용은 이러한 간단한 경쟁 분석 연구에서 사용하기에 적절하고 관련 분야에 잘 알려져 있다.

[0085] KIR- 또는 NKG2A/C가 매개하는 NK 세포 독성의 비활성화의 억제, 또는 NKp30, NKp44, NKp46, 또는 NKG2D가 매개하는 NK 세포의 활성화는 결합, 세포독성, 또는 다른 분자 또는 세포 평가법과 같은 여러 가지 분석법 또는 테스트에 의해 평가될 수 있다.

[0086] 특정 변형예에서, 억제성 활성화는 HLA-C 또는 HLA-E 양성 세포에서 KIR 또는 NKG2A/C 양성 NK 클론 각각의 용해를 재구성하는 상기 화합물, 바람직하게는 항체의 능력에 의해 설명된다. 다른 특정 실시예에서, 그 화합물, 바람직하게는 항체는 HLA-C 분자의 KIR2DL1 및 KIR2DL3(또는 상당히 연관된 KIR2DL2) 수용체에 대한 결합을 억제하는 것으로 정의되고, 더 바람직하게는 Cw1, Cw3, Cw7 및 Cw8(또는 80 위치에 Asn 잔기를 가진 HLA-c 분자)에서 선택된 HLA-C 분자의 KIR2DL2/3에 대한 결합; 및 Cw2, Cw4, Cw5 및 Cw6(또는 80 위치에 Lys 잔기를 가진 HLA-c 분자)에서 선택된 HLA-C 분자의 KIR2DL1에 대한 결합을 변경하는 능력으로 정의된다.

[0087] 본 발명의 억제성 또는 강화성(potentiating) 활성화 화합물, 바람직하게는 항체는 여러 가지 방법, 예를 들어 Sivorì 외(1997) J. Exp. Med. 186:1129-1136에 기술된 것처럼 세포내 자유 칼슘에 대한 그 효과에 의해 평가될 수 있다. NK 세포 활성화는 세포 독성 평가법에 기초한 세포 사용, 예를 들어 P815, K562 세포, 또는 Sivorì 외(1997) J. Exp. Med. 186:1129-1136; Vitale 외(1998) J. Exp. Med. 187:2065-2072; Pessino 외(1998) J. Exp. Med. 188: 953-960; Neri 외(2001). Clin. Diag. Lab. Immun. 8:1131-1135; Pende 외(1999) J. Exp. Med. 190:1505-1516에 기술된 것처럼 적절한 중앙 세포와 같은 표적 세포를 살상하는 NK 세포를 자극하는 항체의 능력을 평가하는 것과 같은 크롬 방출의 측정에 의해 평가될 수 있다. 적절한 세포 독성 평가법은 본 명세서의 실시예에 제공된다. 바람직한 실시 형태에서, 항체들은 NK 세포 독성을 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 40% 또는 50%, 더 바람직하게는 적어도 70% 상승시킨다.

[0088] NK 세포 활성화는 또한 시토킨-방출 평가법으로 나타낼 수 있는데, NK 세포는 NK 세포의 시토킨 생산(예를 들어, IFN- γ 및 TNF- α 생산)을 촉진하는 항체와 함께 배양된다. 대표적인 프로토콜에서, PBMC로부터 IFN- γ 생산은 세포 표면 및 세포질내 염색 및 배지에서 4일 후 흐름 혈구 계산에 의해 평가될 수 있다. 간략히 말해서, Brefeldin A(Sigma Aldrich)는 최소 약 4일간의 배양 동안에 약 5 μ g/ml 농도로 첨가될 수 있다. 그런 다음 세포들은 투과(IntraPrep™; Beckman Coulter) 및 PE-항-IFN- γ 또는 PE-IgG1(Pharmingen)을 사용한 염색 전에 항-CD3 및 항-CD56와 함께 배양될 수 있다. 다클론 활성화된 NK 세포로부터의 GM-CSF 및 IFN- γ 생산은 ELISA를 사용하여 상등액에서 측정될 수 있다(GM-CSF: DuoSet Elisa, R&D Systems, Minneapolis, MN; IFN- γ : OpE1A

set, Pharmingen).

[0089] 바람직한 실시 형태에서, 인간 NK 세포를 활성화시키는 항체의 능력은 평가되는데, 인간 NK 세포 및 비-인간 NK 세포를 활성화시키는 활성은 그 화합물이 본 발명에서 사용하기에 적절함을 나타낸다. 특히, 생체 외 또는 생체 내에서 NK 세포에 의해 적절한 표적 세포를 사멸시키는 치료용 항체의 능력을 향상시키는 화합물의 능력도 평가될 수 있다. 본 발명의 화합물, 바람직하게 항체는 부분적인 억제성 또는 자극성 활성을 나타낼 수 있는데, 예를 들어 부분적으로 KIR2DL이 매개하는 NK 세포 독성의 비활성을 줄이거나 또는 NCR 또는 다른 수용체의 어느 정도의 자극을 통해 NK 세포를 부분적으로 활성화시킨다. 가장 바람직한 화합물은 그 화합물이 없을 때와 비교하여 예를 들어 세포 독성 평가에서 측정된 것처럼 NK 세포의 활성을 적어도 20%, 바람직하게는 30%, 40% 또는 50% 또는 더 이상 억제(또는 활성화 수용체의 경우에는 자극)할 수 있다. 또한 바람직하게는, 그 화합물은 그 화합물이 없을 때와 비교하여 표적 세포의 사멸을 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% 또는 더 이상 증가시킬 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 바람직한 화합물, 바람직하게 항체는 짝지어진 또는 HLA 양립할 수 있는 또는 자가 조직 표적 세포 집단, 즉 상기 항체 부재시에 NK 세포에 의해 효과적으로 용해되지 않는 세포 집단의 용해를 유발할 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물은 생체 내에서 NK 세포 활성을 촉진하는 것으로 정의될 수 있다.

[0090] 본 발명은 또한 활성화 수용체를 자극하거나, 또는 바람직하게는 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하는 화합물이 제한 없이 Fab 단편, Fab'2 단편, CDR 및 ScFv를 포함하여 실질적으로 같은 항원 특이성을 가진 단클론 항체의 단편인 실시 형태에 관한 것이다. 또한, 단클론 항체는 인간화, 인간 또는 키메라(예를 들어, 이중 특이성 또는 기능화된 항체) 항체일 수 있다. 활성화 수용체를 자극하는 항체는 또한 단편일 수 있지만, 바람직하게는 그 항체는 전체 길이이다. 예를 들어, 변형된 서열 또는 접합된 이중 조직 기능기 또는 다른 화합물을 가진 유도체들은 여기서 기술된 어느 항체를 위해 사용될 수 있다.

[0091] NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 본 발명에 따른 항체는 관련 분야에 알려진 여러 기술로 생산될 수 있다. 일반적으로, 그 항체는 인간이 아닌 동물을 KIR, NKG2A/C, NCR(예를 들어, NKp30, NKp44, NKp46), 또는 NKG2D 폴리펩티드를 포함하는 면역원, 또는 어떤 폴리펩티드의 면역성 단편 및 비장 세포 집단(적절한 세포계와 혼합으로 융합세포를 생산하기 위함)으로 인간이 아닌 동물을 면역화 시킴으로써 생산된다. 여러 종들로부터 단클론 항체를 생산하는 방법은 관련 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, Harlow 외, "항체들: 실험 매뉴얼(Antibodies: A laboratory Manual", CSH Press, 1988; Goding, "단클론 항체: 원리 및 실제(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", Academic Press, 1986). 더 구체적으로, 이러한 방법은 인간이 아닌 동물을 항원으로 면역화시키고, 비장 세포를 회수하여 골수종 세포와 같은 불멸화 세포와 융합하는 것을 포함한다. 그 융합 세포는 단클론 항체를 생산하고 각각의 클론을 분리하기 위한 제한된 희석에 의해 선택될 수 있다. 항체들은 예를 들어 Ward 외(1989)에 개시된 것처럼 면역 글로블린의 조합 라이브러리의 선택에 의해 생산될 수 있다.

[0092] NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 본 발명에 따른 항체는 활성화 또는 비활성화 NK 세포 수용체, 예를 들어 KIR2DL 폴리펩티드, 더 바람직하게는 인간 KIR2DL 폴리펩티드를 포함하는 면역원으로 면역화함으로써 제조된다. KIR2DL1 폴리펩티드는 인간 KIR2DL 폴리펩티드의 전체 서열, 또는 면역성 단편인 그 단편 또는 유도체, 즉 에피토프, 바람직하게는 T 또는 B 세포 에피토프를 포함하는 폴리펩티드의 일부를 포함할 수 있다. 이러한 단편은 일반적으로 성숙한 폴리펩티드 서열의 적어도 7개의 연속적인 아미노산, 더 바람직하게는 적어도 10개의 연속적인 아미노산을 포함한다. 단편들은 본질적으로 수용체의 세포 외 도메인에서 유래된다. 바람직한 실시 형태에서, 면역원은 액체 막, 일반적으로 세포의 표면에서 와일드 형태(wild-type) 인간 KIR2DL, NCR 또는 다른 폴리펩티드를 포함한다. 특정 실시 형태에서, 면역원은 완전한 NK 세포, 특히 완전한 인간 NK 세포, 임의적으로는 처리되거나 용해된 인간 NK 세포를 포함한다.

[0093] 치료용 항체는 CD16과 같은 수용체에 의한 결합을 향상시키기 위하여 변형된 Fc 부위를 가질 수 있지만, 어떤 실시 형태에서 NK 세포를 강화하는 항체는 Fc 수용체에 대한 그 친화력을 줄이기 위하여 변경된 Fc 부위를 가질 것이며, 따라서 항체와 의해 결합된 NK 세포가 결합되어 용해되는 가능성을 줄인다.

[0094] NK 세포의 KIR2DL 수용체를 차단하는 항체는 이하의 단계: i) KIR2DL 폴리펩티드를 포함하는 면역원으로 인간이 아닌 포유류를 면역화시키는 단계; ii) 상기 KIR2DL 폴리펩티드를 결합하는 단클론 항체를 상기 면역화된 동물로부터 제조하는 단계; iii) KIR2DL 폴리펩티드의 적어도 두 개의 서로 다른 혈청형(serotypes)과 교차 반응하는 단클론 항체를 ii) 단계로부터 선택하는 단계; 및 iv) KIR2DL이 매개하는 NK 세포의 비활성화를 억제하는 iii)의 단클론 항체를 선택하는 단계;를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.

- [0095] (iii) 및 (iv) 단계의 순서는 바뀔 수 있다. 임의적으로, 본 방법은 이하에서 개시된 것처럼, 단클론 항체의 단편 또는 유도체를 만드는 부가 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0096] 다른 변형예에서, 본 방법은 i) 라이브리리 또는 레퍼토리에서, KIR2DL 폴리펩티드의 적어도 두 개의 서로 다른 혈청형(serotypes)과 교차 반응하는 단클론 항체 또는 그 단편 또는 유도체를 선택하는 단계; 및 i) 단계로부터 KIR2DL이 매개하는 NK 세포의 비활성화를 억제하는 항체를 선택하는 단계;를 포함한다.
- [0097] 이러한 방법은 하나 이상의 에피토프를 공유하는 (비활성화 또는 활성화) NK 세포 수용체의 어떤 그룹에 특이적인 어떤 항체 또는 항체 단편을 선택하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 유사한 방법은 NK 세포의 KIR3DL 또는 NKG2A/C 수용체를 차단하거나 또는 NK 세포의 활성화 수용체를 자극하는 항체 제조를 위해 사용될 수 있다.
- [0098] 바람직한 실시 형태에서, 이러한 방법에 사용되거나 또는 여기서 기술된 어떤 항체의 제조에 사용되는 인간이 아닌 동물은 설치류(예를 들어, 마우스, 쥐 등), 소, 돼지, 말, 토끼, 염소, 양 등과 같은 포유류이다
- [0099] 또한, 여기서 기술된 항체들 중 어떤 항체는 인간에게 적절하도록 유전적으로 변형되거나 처리될 수 있다. 예를 들어, 인간화, 키메라, 또는 인간 항체. 항체를 인간화하는 방법은 관련 분야에 잘 알려져 있다. 일반적으로, 본 발명에 따른 인간화 항체는 초기 항체로부터 주입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 가진다. 이러한 쥐과 동물 또는 다른 사람이 아닌 동물의 아미노산 잔기는 종종 "유입" 잔기로 언급되고, 이는 일반적으로 "유입" 가변 도메인에서 인용된다. 인간화(humanization)는 Winter 및 공동 연구자들의 방법을 따라 실행될 수 있다(Jones 외(1986), Nature, 321:522; Riechmann 외(1988), Nature, 332:323; Verhoeyen 외(1988), Science, 239:1534(1988)). 따라서, 이러한 "인간화" 항체들은 키메라 항체(Cabilly 외, U.S. Pat.No.4,816,567)이고, 실질적으로 완전한 사람의 가변 도메인보다 작은 것이 최초 항체의 대응하는 서열로 치환되었다. 실질적으로, 본 발명에 따른 인간화 항체는 일반적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 최초 항체에서 유사한 자리의 잔기로 치환된 사람 항체이다.
- [0100] "인간화" 단클론 항체를 만드는 다른 방법은 면역화를 위해 사용되는 마우스로서 XenoMouse® (Abgenix, Fremont, CA)를 사용하는 것이다. XenoMouse는 기능적인 사람 면역 글로블린 유전자로 치환된 면역 글로블린 유전자를 가진 본 발명에 따른 쥐과 숙주이다. 따라서, 이러한 마우스 또는 이러한 마우스의 B 세포로부터 만들어진 융합 세포에서 생산된 항체들은 이미 인간화된다. 상기 XenoMouse는 여기서 참조를 위해 통합된 미국 특허 No. 6,162,963에 기술되어 있다. 유사한 방법은 HuMAb-Mouse™(Medarex)를 사용하여 달성될 수 있다.
- [0101] 사람 항체는 면역화를 위해 사람 항체 레퍼토리를 발현시키도록 유전적으로 변형된 다른 유전자 도입 동물을 사용하거나(Jakobovitz 외, Nature 362(1993)255), 또는 파지 전사 방법을 사용하여 항체 레퍼토리의 선택에 의존하여 여러 가지 다른 기술에 따라 제조될 수 있다. 이러한 기술들은 숙련된 자에게 알려져 있고 본 명세서에 개시된 단클론 항체로부터 시작하여 실행될 수 있다.
- [0102] 본 발명의 항체는 중연쇄 및/또는 경쇄의 일부가 최초 항체와 동일하거나 또는 대응하는 서열에 이형 동형이고, 상기 체인의 나머지는 다른 중 또는 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에서 유도된 항체와 동일하거나 또는 대응하는 서열에 이형 동형인 "키메라" 항체(면역 글로블린) 뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체의 단편으로 유도될 수 있다(Cabilly 외, supra; Morrison 외(1984), Proc.Natl.Acad.Sci.81:6851).
- [0103] NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 NK 세포의 활성화 수용체를 자극하는 화합물은 항체이고, 이러한 항체는 다클론, 또는 바람직하게는 단클론일 수 있다. 항체는 원하는 가변 및 불변 도메인을 발현하도록 처리된 융합 세포 또는 재조합 세포에 의해 생산될 수 있다. 항체는 항원 특이성 및 낮은 경첩 부위를 보유하는 단일 사슬 항체 또는 다른 항체 유도체이거나 그 변형일 수 있다. 그 항체는 다기능 항체, 재조합 항체, 인간화 항체 또는 그 단편 또는 유도체일 수 있다. 상기 단편 또는 유도체는 바람직하게는 Fab 단편, Fab'2 단편, CDR 및 ScFv에서 선택된다. 바람직하게는 단편은 항원-결합 단편이다. 항체 단편을 포함하는 항체는 또한 제한적이지는 않지만 이중 특이성 항체를 포함할 수 있다. 일 예는 활성화 수용체 에 특이한 항원 결합 부위 및 종양 항원에 특이한 항원 결합 구역을 포함하는 이중 특이성 항체이다(PCT 공개 no. WO 01/71005 참조).
- [0104] **조성물 및 투여**
- [0105] 본 발명은 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 적어도 하나의 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편 및 치료용 항체를 포함하는 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물의 용도는 치료용 항체의 효율을 높이고, 치료용 항체가 투여된 개체에서 ADCC를 증가시키며, 또는 더 구체적으로 표적 세포의 사

멸을 필요로 하는 질병, 바람직하게는 바이러스에 감염된 세포, 종양 세포 또는 다른 병원성 세포와 같은 질병에 걸린 세포를 가진 개체를 치료하는 것이다. 바람직하게는, 그 질병은 암, 자가 면역 질환, 염증성 질환, 바이러스성 질환 중에서 선택되는 하나이다. 그 질병은 또한 이식 거부반응, 더 구체적으로 동종 이식 거부반응, 및 이식편대숙주질환(GVHD)에 관한 것이다.

[0106] 더 구체적으로, 질병 치료는 표적 세포, 바람직하게는 바이러스에 감염된 세포, 종양 세포 또는 다른 병원성 세포의 사멸을 필요로 한다. 바람직하게는, 그 질환은 암, 전염성 또는 면역성 질환이다. 더 바람직하게는, 질환은 암, 자가 면역 질환, 염증성 질환, 바이러스성 질환 중에서 선택되는 하나이다. 그 질환은 또한 이식 거부반응, 더 구체적으로 동종 이식 거부반응, 및 이식편대숙주질환(GVHD)에 관한 것이다.

[0107] 상기 질환은 조혈 세포의 종양 증식을 포함한다. 임의적으로, 상기 질환은 림프구성백혈병, 급성 또는 만성 골수성 백혈병, 호지킨 임파종, 비호지킨 임파종, 골수형성이상증후군, 다발성 골수종 및 만성 림프구성 백혈병 중에서 선택된 하나이다. 상기 질환은 또한 ENT 암, 결장암, 유방암, 상피암을 포함한다. 상기 질환은 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus:CMV) 감염 및 B형 간염을 포함한다. 상기 질환은 크론병, 류머티스성 관절염, 천식, 건식, 다발성 경화증 또는 당뇨병을 포함한다. 특히, 상기 표에 기술된 질병이 치료될 수 있다.

[0108] 상기 치료용 항체는 CD16, 바람직하게는 그 Fc 부위를 통해 결합될 수 있다. 바람직하게는 상기 치료용 항체는 인간 IgG1 또는 IgG3 Fc 부위, 특히 그 단클론 항체 또는 단편, 더 바람직하게는 인간, 인간화 또는 키메라 항체 또는 그 단편을 가지며, 예를 들어 리텍시맵이다.

[0109] NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 상기 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편은 KIR, NKG2A/C, NCR 또는 NKG2D 인간 수용체 중 적어도 하나를 결합하고, 연관된 KIR2DL, KIR3DL 및/또는 NKG2A/C가 매개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 억제하거나 또는 연관된 NCR 또는 NKG2D가 매개하는 NK 세포 독성의 활성화를 촉진한다. 바람직한 일 실시 형태에서, 예를 들어 KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 인간 수용체 중에서 선택된 KIR2DL 인간 수용체 또는 KIR3DL1, KIR3DL2 인간 수용체 중에서 선택된 KIR3DL 인간 수용체가 사용된다.

[0110] 바람직한 일 실시 형태에서, NK 세포를 강화시키는 화합물은 적어도 하나의 KIR2DL 인간 수용체를 결합하고 KIR2DL이 매개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 억제한다. 바람직하게는, KIR2DL 인간 수용체는 KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 인간 수용체 중에서 선택된다. 바람직한 실시 형태에서, 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편은 KIR2DL 인간 수용체의 공통 결정자를 결합하고 IR2DL이 매개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 억제한다. 더 바람직하게는, 상기 화합물, 바람직하게 항체는 KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 인간 수용체의 공통 결정자를 결합하고 KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 인간 수용체가 매개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 억제한다. 특정 실시 형태에서, 상기 화합물, 바람직하게 항체는 80 위치에 Lys 잔기를 가진 HLA-C 대립 유전자 분자가 인간 KIR2DL1 수용체 결합하는 것을 억제하고, 80 위치에 Asn 잔기를 가진 HLA-C 대립 유전자 분자가 인간 KIR2DL2 및 KIR2DL3 수용체 결합하는 것을 억제한다. 다른 특정 실시 형태에서, 상기 항체는 융합 세포 DF200에 의해 생성된 단클론 항체 DF200과 동일한 에피토프에 결합한다. 임의적으로, 그 항체는 인간 NK 세포의 KIR 수용체에 결합하기 위하여 융합 세포 DF200에 의해 생성된 단클론 항체 DF200과 경쟁한다. 바람직한 일 실시 형태에서, 그 항체는 융합 세포 DF200에 의해 생성된 단클론 항체 DF200이다. 다른 실시 형태에서, 그 항체는 단클론 항체 EB6이고, 단클론 항체 EB6과 경쟁하며 또는 단클론 항체 EB6와 동일한 에피토프에 결합한다.

[0111] 본 발명에 따른 조성물은 NK 세포의 서로 다른 비활성화 수용체를 차단하거나 및/또는 NK 세포의 하나 이상의 활성화 수용체를 자극하는 여러 가지 화합물, 바람직하게는 항체 또는 단편의 조합을 포함할 수 있다. 바람직하게는, NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하는 화합물, 바람직하게는 항체 또는 단편은 KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2, NKG2A 및 NKG2C에서 선택된 비활성화 수용체에 특이적이고, 연관된 KIR 또는 NKG2A/C가 매개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 억제할 수 있다. 더 바람직하게는, "무효화" 화합물의 조합은 KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3가 매개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 억제할 수 있다. 화합물들의 조합을 제공함으로써, 최대수의 환자에서 서로 다른 최대수의 비활성화 수용체가 차단될 것이다. 또한, 서로 다른 활성화 화합물을 자극하는 화합물(또는 비활성화 수용체처럼 단일 수용체 내의 서로 다른 에피토프에 결합함), 예를 들어 NKp30, NKp44, NKp46 및 NKG2D 중에서 선택되는 둘 이상의 수용체의 조합의 활성화를 유도하는 화합물의 조합이 사용될 수 있다. 또한, 비활성화 수용체를 차단하는 하나 이상의 화합물 및 활성화 수용체를 자극하는 하나 이상의 화합물을 포함하는 조합이 사용될 수 있다. 이하에 기술된 것처럼, 바람직한 실시 형태에서, NK 세포의 샘플은 본 방법을 적용하기 전에 환자로부터 획득할 수 있고, 서로 다른 화합물의 조합에 대한 NK 세포의 반응은 예를 들어 표적 세포 및 치료용 항체 존재시에 평가될 수 있다.

- [0112] 본 발명의 조성물은 어떤 약제학적으로 수용 가능한 담체 또는 첨가제, 일반적으로 완충 용액, 등장액, 수성 서스펜션을 포함할 수 있고, 임의적으로 안정제, 방부제 등이 보충될 수 있다. 일반적인 제제는 염수 및 임의적으로 고분자량 단백질(예를 들어, 인간 혈청 알부민)과 같은 보호 또는 안정화 분자를 포함한다.
- [0113] 하나 이상의 치료용 항체, 하나 이상의 NK 세포 강화 화합물 및 바람직하게는 그 사용 지시의 어떤 조합을 포함하는 키트가 제공된다.
- [0114] 본 발명의 방법 및 조성물에 따르면, NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편 및 치료용 항체는 "효과적인" 또는 "치료에 효과가 있는" 양만큼 투여된다.
- [0115] 수용체에 투여되는 치료용 항체의 효과적인 양은 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg 사이일 수 있다. 그러나 항체의 효과적인 양은 항체의 형태(전체 Ig, 또는 단편), mAb의 친화력 및 각각의 특정 항체에 정해져야 하는 약동학적 변수에 의해 좌우된다.
- [0116] 수용체에 투여된 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편의 효과적인 양은 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg 사이일 수 있다. 그러나 항체의 효과적인 양은 항체의 형태(전체 Ig, 또는 단편), mAb의 친화력 및 각각의 특정 항체에 정해져야 하는 약동학적 변수에 의해 좌우된다.
- [0117] 본 발명의 중요 실시 형태에서, 본 화합물을 사용하는 것은 치료용 항체의 투여량을 줄여도 치료 효능이 달성되게 할 수 있다. 치료용 항체의 사용(예를 들어, 투여량, 처방 계획)은 예를 들어 리터시맷의 경우 발열, 두통, 혈떡거림, 혈압강하 및 다른 부작용에 의해 제한될 수 있다. 따라서, 많은 환자에게 치료용 항체의 표준 투여량이 여기서 기술한 NK 세포 강화 화합물(예를 들어, 어떤 다른 화합물 부재시에 추천된 양)과 함께 투여될 것이고, 더 큰 치료 효율을 필요로 하는 환자, 또는 예를 들어 부작용에 심하게 영향을 받은 다른 환자의 경우 표준 투여량의 효율을 향상시킬 것이며, 따라서 본 화합물의 투여는 치료용 항체의 투여량이 줄어든 경우에도 치료 효율이 달성되게 할 것이고, 부작용을 방지할 것이다. 실질적으로, 숙련된 의사는 환자를 위해 치료용 항체 및 NK 세포 강화 화합물의 이상적인 투여량 및 투여 계획, 예를 들어 특정 필요 및 환자의 전체적인 조건의 관점에서 가장 적절한 치료 전략을 정할 수 있을 것이다. 치료용 항체 및 NK 세포 강화 화합물 둘 다에 대하여, 적절한 투여량을 결정하는데 수 많은 참조 문헌을 참조할 수 있다. 예를 들어, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro(2003), ISBN:0781750253; Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Hardman, Limbird & Gilman(2001), ISBN:0071354697; Rawlins E.A., editor, "Bentley's Textbook of Pharmaceutics", London:Bailliere, Tindall 및 Cox, (1977); 및 다른 것들이 있다.
- [0118] 일 실시 형태에서, 의사는 본 발명의 어떤 NK 세포 강화 화합물을 투여하면서 주어진 치료 항체의 양을 점차로 줄일 수 있다; 투여량 또는 투여 빈도의 관점에서, 치료용 항체의 효율을 관찰하고; NK 세포 활성을 관찰하며; 환자의 표적 세포의 존재를 관찰하고; 여러 가지 치료 징후를 관찰하며, 또는 관측 결과의 관점에서, 치료 효율을 최적화하고 부작용을 제한하기 위하여 치료용 항체 및/또는 NK 강화 화합물의 상대적 농도 또는 투여 형태를 조절한다.
- [0119] 다른 실시 형태에서, NK 세포는 치료용 항체 및 NK 세포 강화 화합물(만약 적절하다면, 치료 동안에)의 투여 전에 환자로부터 획득될 것이고, 이상적인 화합물 또는 최대 효율을 위해 사용될 화합물 짝을 정하기 위하여 평가될 것이다. 예를 들어, NK 세포에 존재하는 비활성 또는 활성화 수용체의 정체는 결정될 수 있고, 화합물은 가장 지배적인 수용체를 특이적으로 목표로 하여 투여된다. 선택적으로, 획득된 NK 세포는 치료용 항체 및 표적 세포와 함께 배양될 수 있고, 표적 세포 사멸을 향상시키는 하나 이상의 화합물의 능력은 평가될 수 있다. 생체 밖에서 하나 이상의 화합물 중에서 어떤 것이 사멸을 향상시키기에 가장 효과적인지는 본 치료 방법에서 그 사용을 위해 평가될 수 있다.
- [0120] 화합물 및/또는 치료용 항체의 적절한 투여량은 또한 시험관 내 또는 동물 모델에서 일반적으로 결정될 수 있는데, 예를 들어 시험관 내에서 표적 세포, NK 세포(바람직하게는 인간 NK 세포), 임의적으로 다른 면역 세포 존재시에 여러 농도의 치료용 항체를 배양하고, 하나 이상의 NK 세포 강화 화합물의 농도를 변화시키며, 표준 평가법(예를 들어, 실시예 부분에 기술됨)을 사용하여 여러 농도 조건하에 표적 세포 사멸을 또는 정도를 평가한다. 선택적으로, 본 발명의 화합물의 투여량을 달리하면서, 치료용 항체의 양을 달리하여 그 항체로 치료될 수 있는 질병에 걸린 동물 모델(예를 들어, 리터시맷의 경우 NHL이 걸린 동물)에 투여할 수 있고, 동물 치료에서 항체들의 효능(예를 들어, 어떤 적절한 치료, 세포 또는 분자 평가법 또는 기준에 의해 결정됨)은 평가될 수 있

다.

- [0121] 본 발명에 따른 조성물은 일반적으로 정맥내 주사, 복강내 주사, 동맥내 주사, 근육내 주사 또는 피부 경로에 의해 개체에 직접적으로 주입될 수 있다. 리툭산(리텍시맵) 또는 졸레어(오말리주맵)과 같은 여러 단클론 항체들은 임상 치료에서 효과적이었고, 비슷한 처방 계획(즉, 제형 및/또는 투여량 및/또는 투여 프로토콜)이 본 발명의 조성물에도 사용될 수 있다.
- [0122] 또한, 본 발명의 조성물은 화학 요법 또는 다른 면역 치료법과 같은 다른 활성제 또는 치료 프로그램을 동시에 또는 연속해서 더 포함하거나 또는 함께 사용될 수 있다.
- [0123] 어떤 바람직한 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 하나 이상의 화합물의 한 번 이상의 주입을 더 포함한다. 따라서, 이러한 둘 이상의 화합물은 공동으로 사용될 수 있다. 이는 ADCC 및 치료용 항체의 효능을 더 증가시키는 역할을 하고, 및/또는 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 특정 화합물의 투여량을 더 줄이는 역할을 할 수 있다. 예를 들어, IL-2와 같은 화합물은 투여량이 증가하였을 때 유독한 것으로 알려져 있다. 따라서 본 발명은 바람직하게는: a) 개체에 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편을 투여하는 단계; 및 b) 상기 개체에 치료용 항체를 투여하는 단계;를 포함하는 질병 치료 방법을 제공한다. 예를 들어, 바람직한 처방 계획에서 상기 두 화합물은 (i) NCR 또는 NKG2D 수용체 또는 활성화 KIR 수용체를 자극하는 항체 및 비활성화 KIR 수용체 또는 NKG2A를 차단하는 항체로 구성된 그룹에서 선택된 첫 번째 화합물, 및 (ii) IL-12, IL-15, IL-18 및 IL-21로 구성된 그룹에서 선택된 두 번째 화합물이다. 따라서 본 발명은 a) 개체에 NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 본 발명에 따른 화합물, 바람직하게는 항체 또는 그 단편을 투여하는 단계; b) 상기 개체에 치료용 항체를 투여하는 단계; 및 (c) 상기 개체에 IL-2를 투여하는 단계를 포함하는 질병 치료 방법을 제공한다. IL-2는 Research Diagnostics, NJ, RDI-202, 또는 Chiron Corp.(Emeryville, CA)에서 이용할 수 있다.
- [0124] 시토키닌은 어떤 적절한 처방 계획에 따라 처방될 수 있고, NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 화합물의 투여 전, 동시 및/또는 후에 투여될 수 있으며, 치료용 항체의 투여 전, 동시 및/또는 후에 투여될 수 있다. 일반적으로, 시토키닌은 5-10일의 기간 동안 날마다 투여되고, NK 세포의 비활성화 수용체를 차단하거나 또는 활성화 수용체를 자극하는 화합물의 첫 번째 주입과 같은 날에 첫 번째 주입된다. 상기 방법은 바람직하게는 피하 경로를 통해 시토키닌의 한 번 또는 두 번 주입/일(day)을 포함한다.
- [0125] 시토키닌의 투여량은 치료를 받을 환자의 상태에 따라 선택될 것이다. 바람직하게는, 상대적으로 낮은 투여량의 시토키닌이 사용될 수 있다. 예를 들어, 시토키닌의 효과적인 투여량은 시토키닌을 포함하는 약제 조성물이 일일 피하 주입을 위해 사용될 때, 1 백만 단위/ m^2 /일보다 더 낮다. 바람직한 실시 형태에서, IL-2는 5 내지 10일 동안 매일 1 백만 단위/ m^2 이하의 양으로 피하에 주입된다. 시토키닌의 사용에 대한 더욱 더 자세한 사항은 국제 특허 공개 no. PCT/EP/0314716 및 미국 특허 출원 no. 60/435,344, "NK 세포 증식에 효과가 있는 약제 조성물 및 사용 방법(Pharmaceutical compositions having an effect on the proliferation of NK cells and a method using the same)"에 기술되어 있다.
- [0126] 치료용 항체 및 NK 세포 강화 화합물은 공동 투여, 예를 들어 공동 주입될 수 있고, 또는 다른 제제로 피하에 주입될 수 있으며, 또는 독립적으로 투여될 수 있다. 즉 예를 들어 화합물은 그 화합물 투여 전 또는 후 시간(hour), 일(day) 또는 주(week) 단위로 투여될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0127] 도 1은 단클론 항체 DF200이 여러 가지 인간 KIR2DL 수용체의 공통 인자를 결합하는 것을 도시한 도면;
- 도 2는 4/1의 작동자/표적 비율에서 C1R Cw4 표적에 대한 항-KIR2DL mAb(단클론 항체)의 용해의 재구성을 도시한 것으로, 단클론 항체 DF200은 Cw4 양성 표적 세포에 대하여 KIR2DL이 매개하는 KIR2DL1 양성 NK 세포 독성(용해를 구성함)의 비활성화를 억제함을 도시한 도면;
- 도 3은 KIR/HLA 상호 작용을 차단함으로써 Cw4 양성 EBV 세포계에 대해 리툭산(Rituxan)에 의해 매개된 KIR2DL1 양성 NK 클론의 ADCC의 향상을 도시한 것으로, KIR2DL1을 품고 있는 NK 클론 세포 용해는 항 CD20 항체(리툭산) 5 μ g/ml 및 EB6 항체(항 KIR2DL1) 10 μ g/ml; 단지 리툭산; 단지 EB6이 존재하는 경우에; 또는 어떤 항체도 존재하지 않는 경우에 여러 가지 이펙터/표적 비율(1에서 4)에서 Cw4 양성 EBV 변형된 (CD200 양성) 표적 세포계에 대하여 시험되었으며, ADCC는 항 KIR2DL1 항체(EB6) 존재시에 상당히 향상되었음을 도시한 도면; 및

도 4는 KIR/HLA 상호 작용을 차단함으로써 Cw4 양성 EBV 세포계에 대해 캠페스(Campath)에 의해 매개된 KIR2DL1 양성 NK 클론의 ADCC의 향상을 도시킨 것으로, KIR2DL1을 품고 있는 NK 클론 세포 용해는 캠페스 및 EB6 항체(항 KIR2DL1) 100 μ g/ml; 단지 캠페스; 단지 EB6이 존재하는 경우에; 또는 어떤 항체도 존재하지 않는 경우에 Cw4 양성 EBV 변형된(CD200 양성) 표적 세포계에 대하여 시험되었으며, ADCC는 항 KIR2DL1 항체(EB6) 존재시에 상당히 향상되었음을 도시킨 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0128] 본 발명의 다른 관점 및 장점들은 본 출원의 범위를 제한하는 것이 아니라 예시하기 위한 이하의 실험예에 기술된다.

[0129] 예 1 : pan KIR2DL 항체의 제조.

[0130] PBLs의 정제 및 다클론 또는 클론 NK 세포계의 제조.

[0131] PBLs를 Ficoll Hypaque 경사 및 가소성의 점착성 세포의 겔실에 의해 건강한 공여체로부터 획득하였다. 풍부한 NK 세포를 얻기 위하여, PBLs를 항 CD3, 항 CD4 및 항 HLA-DR mAbs와 함께 배양하였고(4℃에서 30분), 이어서 관련 분야의 알려진 방법에 따라 염소 항 마우스 자석 비드와 함께 배양하였고(Dynal)(4℃에서 30분) 면역 자기 선택(Pende 외, 1999)을 실행하였다. CD3 마이너스, CD4 마이너스, CR 마이너스 세포들을 다클론 NK 세포 집단을 얻기 위하여 방사선을 조사한 공급 세포 및 인터루킨 2 100 U/ml(프로루킨, Chiron Corporation) 및 피토헤마글루티닌(Phytohemagglutinin) A(Gibco BRL) 1.5 ng/ml와 함께 배양하였다. NK 세포들은 희석을 제한함으로써 클론화 되었고 NK 세포의 클론은 세포 표면 수용체의 발현을 위한 흐름 혈구 계산에 의해 특징지어진다.

[0132] 이하의 클론들을 본 연구에 사용하였다:

[0133] CP11, CN5 및 CN505는 KIR2DL1 양성 클론이고 EB6 또는 XA-141 항체로 염색되었다. CN12 및 CP502는 KIR2DL3 양성 클론이고 GL183 항체로 염색되었다.

[0134] 플로우사이토메트리 분석(Flow cytometry analysis)

[0135] 사용된 mAb는 실험용 JT3A(IgG2a, 항 CD3), EB6 및 GL183(IgG1 항 KIR2DL1 및 KIR2DL3 각각), XA-141IgM 항 KIR2DL1(EB6과 비교하여 같은 특이성), 항CD4(HP2.6), 항DR(D1.12, IgG2a)에서 제조되었다. JT3A, HP2.6 및 DR1.12 대신에, 같은 특이성의 상업적으로 이용할 수 있는 mAb가 예를 들어 Beckman coulter Inc, Fullerton, CA로부터 사용될 수 있다. EB6 및 GL183은 Beckman coulter Inc, Fullerton, CA에서 상업적으로 이용할 수 있다. XA-141은 상업적으로 이용할 수 없지만 EB6은 (Moretta 외, 1993)에 기술된 것처럼 용해의 대조 재구성을 위해 사용될 수 있다.

[0136] 플로우사이토메트리(Flow cytometry)

[0137] 세포들을 적절한 항체(4℃에서 30분)로 염색하였고 이어서 PE 또는 FITC 접합된 다클론 항마우스 항체(Southern Biotechnology Associates Inc)로 염색하였다. 샘플들을 FACSAN 장치(Becton Dickinson, Mountain View, CA)에서 사이토플루오로메트릭(cytofluorometric) 분석법으로 분석하였다.

[0138] 세포 독성 실험

[0139] NK 클론의 세포 용해 활성은 표준 4시간 ⁵¹Cr 방출 분석에 의해 평가되었다. 이펙터 NK 세포는 NK 세포 용해에 그 민감성이 알려진 Cw3 또는 Cw4 양성 세포계에서 시험되었다. 모든 표적 세포는 미세적정 판에서 한 웰(well)당 5000 세포로 사용되었고 이펙터:표적 세포 비율은 도면에서 지시된다(대개 한 표적 세포당 4 이펙터). 세포 용해 분석은 1/2로 희석한 지시된 단클론 항체의 상등액이 있는 경우 또는 없는 경우 실행하였다. 그 과정은 이미 기술된 것(Moretta 외., 1993)과 본질적으로 같다.

[0140] 새로운 mAbs의 제조

[0141] 5주 동안 늙은 Bald C 마우스를 (Moretta 외., 1990)에 기술된 것처럼 활성화된 다클론 또는 단클론 NK 세포계로 면역화시킴으로써 mAbs가 제조되었다. 다른 세포 융합 후에, 우선 상기 mAbs는 EB6 및 GL183 양성 NK 세포계 및 클론과 교차 반응하는 능력으로 선택되었다. 양성 단클론 항체는 또한 각각 Cw4 또는 Cw3 양성 표적 세포의 EB6 또는 GL183 양성 NK 클론에 의해 용해를 재구성하는 능력으로 식별되었다.

[0142] DF200, KIR2DL 인간 NK 수용체의 공통 결정자에 대한 신규한 단클론 항체

- [0143] 단클론 항체들 중 하나인 DF200은 KIR2DL1, KIR2DL2/3을 포함하는 KIR 그룹의 여러 가지들과 반응하는 것이 밝혀졌다. DF200mAb로 NK 세포를 염색하는 경우, KIR2DL1+ 및 KIR2DL2/3+ 둘 모두가 밝게 염색되었다(도 1).
- [0144] 이러한 HLAclass I-특이적인 비활성화 수용체의 하나 또는 다른 것(또는 심지어 둘 다)을 발현하는 NK 클론은 하나 이상의 HLA-C 대립유전자를 발현하는 표적 세포에 대하여 이펙터 세포로서 사용된다. 예상했던 것처럼, KIR2DL1+NK 클론은 HLA-Cw4를 발현하는 표적 세포에 대하여 어떤 세포 용해 활성을 거의 나타내지 않았고 KIR2DL3+NK 클론은 Cw3 양성 표적에 대하여 거의 또는 전혀 활성을 나타내지 않았다. 그러나, DF200mAb(KIR2DL 수용체를 가림)의 존재시에 NK 클론은 HLA-C 리간드를 인식할 수 없었고 Cw3 또는 Cw4 표적에 대하여 강한 세포 용해 활성을 나타내었다.
- [0145] 예를 들어, C1R 세포계(CW4+EBV 세포계, ATCC n° CRL 1993)는 KIR2DL1+NK 클론(CN5/CN505)에 의해 살상되지 않았지만, 비활성화는 DF200 또는 종래의 항 KIR2DL1 mAb의 사용에 의해 효과적으로 반전될 수 있었다. 다른 한편, KIR2DL2/3+KIR2DL1-페노타이프(CN12)을 발현하는 NK 클론은 C1R을 효율적으로 살상하였고 이러한 살상은 DF200mAb에 영향을 받지 않았다(도 2). 비슷한 결과를 Cw3 양성 표적에 대한 KIR2DL2- 또는 KIR2DL3-양성 NK 클론으로 획득할 수 있다.
- [0146] **DF200 mAb/KIR2DL1 및 DF200 mAb/KIR2DL2/3 상호 작용의 비아코어(Biacore) 분석**
- [0147] **물질 및 방법**
- [0148] **재조합 단백질의 생산 및 정제.** KIR2DL1 및 KIR2DL3 재조합 단백질은 대장균에서 제조되었다. KIR2DL1 및 KIR2DL3의 전체 세포 외 도메인을 암호화하는 cDNA는 이하의 프라이머(primer)를 사용하여 pCDM8 클론 47.11 벡터(Biassoni 외, 1993) 및 RSVS(gpt)183 클론 6 벡터(Wagtmann 외, 1995) 각각으로부터 PCR에 의해 증폭되었다:
- [0149] **센스(sense):** 5'-GGAATCCAGGAGGAATTAAATGCATGAGGGAGTCCACAG-3'
- [0150] **안티센스(anti-sense):** 5'-CCCAAGCTTGGGTTATGTGACAGAAACAAGCAGTGG-3'
- [0151] 상기 재조합 단백질들은 비오틴일레이션(biotinylation) 신호를 암호화하는 서열을 구비한 구조(Saulquin 외, 2003)에서 pML1 발현 벡터로 클론화되었다.
- [0152] 단백질 발현은 BL21(DE3) 박테리아성 스트레인(Invitrogen)에서 실행되었다. 이식된 박테리아는 앰피실린(100 µg/ml)이 공급된 배지에서 37°C에서 OD₆₀₀=0.6으로 배양되었고 발현은 1 mM IPTG로 유도되었다.
- [0153] 단백질을 변성 조건하(8 M 요소)에서 세포 함유물로부터 회수하였다. 재조합 단백질의 리폴딩(refolding)은 여섯 단계 투석(각각 4, 3, 2, 1, 0.5 및 0 M 요소)에서 요소의 농도를 감소시킴으로써, 실온에서 L-아르기닌(400 mM, Sigma) 및 β-메르캅토에탄올(1 mM)을 포함하는 Tris 20 mM, pH 7.8, NaCl 150 mM 완충 용액에서 실행되었다. 환원 및 산화된 글루타티온(각각 5 mM 및 0.5 mM, Sigma)은 0.5 및 0 M 요소 투석 단계 동안에 첨가되었다. 마지막으로, 상기 단백질을 10 mM Tris, pH 7.5, NaCl 150 mM 완충 용액에서 상당히 투석하였다. 수용성이고 리폴드된(refolded) 단백질을 농축하였고 그런 다음 Superdex 200 크기 배제 컬럼(Pharmacia;AKTA 시스템)에서 정제하였다.
- [0154] **비아코어 분석.** 표면 플라스몬 공명 측정은 비아코어(Biacore) 장치(Biacore)에서 실행하였다. 모든 비아코어(Biacore) 실험에서 HSB 완충 용액은 흐르는 완충 용액으로 역할을 하는 계면 활성제 P20 0.05%가 공급되었다.
- [0155] **단백질 부동화.** 재조합 KIR2DL1 및 KIR2DL3 단백질은 Sensor Chip CM5(Biacore) 상의 텍스트란 층의 카르복실기에 공유적으로 부동화되었다. 센서 칩 표면은 EDC/NHS(N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)카르보다이미드하이드로클로라이드 및 N-하이드록시숙신이미드, 비아코어)로 활성화 되었다. 완충 용액(10 mM 아세트이트, pH 4.5)와 혼합된 단백질은 주입되었다. 남아있는 활성화된 그룹의 불활성화는 pH8인 100 mM 에탄올아민을 사용하여 실행되었다(Biacore).
- [0156] **친화력 측정.** 동역학적 측정을 위해, 여러 농도의 수용성 항체(1×10^{-7} 에서 4×10^{-10} M)을 부동화된 샘플에 적용하였다. 측정은 20 µl/분의 연속 흐름 속도에서 이루어졌다. 각 주기마다, 센서 칩의 표면을 10 mM NaOH pH11을 5 µl 주입하여 재생시켰다. 자료 분석을 위하여 BIAlogue Kinetics Evaluation 프로그램(BIAevaluation 3.1, Biacore)을 사용하였다.
- [0157] **결과.**

[0158] 부동화된 KIR2DL1 및 KIR2DL3에 대한 DF200 mAb 결합의 BIAcore 분석

	KD(10^{-9} M)
KIR2DL1	10.9+/-3.8
KIR2DL3	2.0+/-1.9

[0159]

[0160] KD: 해리 정수

[0161] 수용성 분석물(여러 농도에서 $40\mu\text{l}$)은 각각 KIR2DL1 및 KIR2DL3의 1000 또는 700 반사율 단위(RU) 및 500 또는 540 RU를 포함하는 텍스트란 층에서 HBS 완충 용액에 $20\mu\text{l}$ /분의 흐름 속도로 주입되었다. 실험 결과는 6번의 독립적인 실험을 대표한다.

[0162] 예 2: 리톡산 및 항 KIR mAb의 공동 사용에 의한 ADCC의 향상.

[0163] **인간 NK 클론의 제조.** 음성 항-CD3 면역-자석 선택(Miltenyi)에 의해 T 세포가 사멸된 혈액 단핵 세포를 제한된 희석 조건하에서 평판 배양하고, 화이토헤마글루티닌(PHA)(Biochrom KG, 베를린, 독일)으로 활성화시켰으며, 인터루킨(IL)-2(Chiron B.V., 암스테르담, 네덜란드)및 조사된 피더(feeder) 세포로 배양하였다. 클로닝 효율은 5 개 평판 배양된 NK 세포에서 1 내지 10개 평판 배양된 NK 세포에서 1 범위로 모든 공여자에서 비슷하였다. 클론화된 NK 세포들은 10:1의 표적에 대한 이펙터의 비율에서 HLA 형태의 알려진 Epstein-Barr 바이러스 변형된 B 림프구성 세포계에 대하여 표준 ^{51}Cr 방출 세포 독성에 의해 동종 반응이 식별되었다. $\geq 30\%$ 용해를 나타내는 클론은 동종 반응성으로 기록되었다. 일반적으로, 클론들은 $<5\%$ 또는 $>40\%$ 를 나타내었다.

[0164] KIR2DL1 양성 NK 세포 클론과 리톡산에 의해 매개된 ADCC의 향상

[0165] NK 클론의 세포 용해 활성은 표준 4시간 ^{51}Cr 방출 분석에 의해 평가되었고, 이펙터 NK 세포는 NK 세포 용해에 그 민감성이 알려진 Cw3 또는 Cw4 양성 EBV 세포계(CD20 양성)에서 시험되었다. 모든 표적 세포는 미세적정 판에서 한 웰(well)당 5000 세포로 사용되었고, 표적 세포에 대한 이펙터(NK 세포 클론) 비율은 도 3에서 지시된다. 어느 실험에서, $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 치료용 키메라 항CD20 리텍시맵(리톡산, Idec)이 이펙터 표적 혼합물에 첨가되었다. 어떤 실험에서는, $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 EB6 항체(항 KIR2DL1)가 이펙터 표적 혼합물에 첨가되었다.

[0166] 이러한 실험은 본질적으로 리톡산만으로는 Cw4 양성 표적에 대한 KIR2DL1 양성 NK 클론에 의한 어떤 ADCC도 매개하지 않는다는 것을 보여준다. KIR2DL1 양성 클론의 ADCC는 항 KIR2DL1 항체의 존재시에 상당히 향상된다.

[0167] 예 3- KIR2DL1 양성 NK 세포 클론과 캠퍼스(Campath)에 의해 매개된 ADCC의 향상

[0168] 예 2에 기술된 유사한 실험에서, 자가 조직 Cw4+ PHA 배(胚)를 NK 세포에 알렘투주맵(Campath, Berlex), EB6 항체($100\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 캠퍼스 및 EB6 존재시에 배양하였다. 도 4에 도시된 그 결과는 EB6가 존재하면 자가 조직 세포를 사멸하는 NK 세포의 능력을 상당히 향상시킴을 보여준다: 캠퍼스만 있을 경우 표적 세포의 약 4%가 용해되었고, 반면 캠퍼스 및 EB6가 존재할 때 세포의 30% 이상이 용해되었다.

참고 문헌

Biassoni R, Verdiani S, Cambiaggi A, Romeo PH, Ferrini S, Moretta L. Human CD3-CD16+ natural killer cells express the hGATA-3 T cell transcription factor and an unrearranged 2.3-kb TcR delta transcript. *Eur J Immunol.* 1993 May;23(5):1083-7.

Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R, (1986) "Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy" *Nature* 319:675-8

Lanier LL (1998) « NK cell receptors" *Annu Rev Immunol* 16:359-93

Moretta, A., Bottino, C., Pende, D., Tripodi, G., Tambussi, G., Viale, O., Orengo, A., Barbaresi, M., Merli, A., Ciccone, E., and et al. (1990). Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med* 172, 1589-1598.

Moretta, A., Vitale, M., Bottino, C., Orengo, A. M., Morelli, L., Augugliaro, R., Barbaresi, M., Ciccone, E., and Moretta, L. (1993). P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med* 178, 597-604.

Moretta A, Moretta L (1997) « HLA class I specific inhibitory receptors" *Curr Opin Immunol* 9:694-701

[0169]

Ohlen C, Kling G, Hoglund P, Hansson M, Scangos G, Bieberich C, Jay G, Karre K (1989)“
Prevention of allogeneic bone marrow graft rejection by H-2 transgene in donor mice” Science
246:666-8

Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame,
L., Malaspina, A., Biassoni, R., *et al.* (1999). Identification and molecular characterization of
NKP30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural
killer cells. J Exp Med 190, 1505-1516.

Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S.,
Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., *et al.* (2002). Effectiveness of donor natural killer cell
alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. Science 295, 2097-2100.

Saulquin X, Gastinel LN, Vivier E. Crystal structure of the human natural killer cell activating
receptor KIR2DS2 (CD158j) J Exp Med. 2003 Apr 7;197(7):933-8.

Valiante NM, Lienert K, Shilling HG, Smits BJ, Parham P (1997) « Killer cell receptors: keeping
pace with MHC class I evolution” Immunol Rev 155:155-64

Wagtmann N, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Malnati MS, Vitale M, Bottino C, Moretta L,
Moretta A, Long EO. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related
molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. Immunity. 1995
May;2(5):439-49.

Ward et al (Nature 341 (1989) 544

[0170]

[0171] 본 명세서에 인용된 모든 간행물 및 특허 출원은 참조 문헌이 개별적으로 그리고 특정적으로 참조를 위해 통합
된 것처럼 전체가 참조를 위해 모두 인용되었다.

[0172] 비록 선행 발명이 이해를 명확히 하기 위하여 예시적으로 일부 세부사항이 기술되었지만, 어떤 변화 및 변형들
이 첨부된 청구항의 개념 및 범위로부터 벗어나지 않았음을 관련 분야의 숙련된 자는 알 수 있을 것이다.

[0173] 모든 가능한 변형예에서 상기한 구성 성분들의 어떠한 조합은 본 명세서에서 특별히 지적되거나 본 발명에 명백
히 모순되지 않는 한 본 발명에 포함된다.

[0174] 본 발명을 설명하기 위하여 사용되는 "a" 및 "an" 및 "the" 및 이와 유사한 지시사는 만약 본 명세서에서 다른
식으로 지시되거나 또는 본 발명에 명백히 모순되지 않는다면 단수 및 복수 모두를 포함하는 것이다.

[0175] 본 명세서에서 범위값의 설명은 특별한 설명이 없으면 이 범위 내에 포함되는 각각의 독립적인 값을 개별적으로
언급하기 위한 간략화 방법으로서 역할을 하고, 각각의 독립적인 값들은 상세한 설명에서 설명된다. 만약 다른
설명 없이 있다면, 여기서 제공된 모든 정확한 값들은 상응하는 대략적인 값들을 대표한다(예를 들어, 특정 요소
및 특성에 관해 제공되는 모든 정확한 예시적인 값들은 또한 상응하는 대략적인 측정치, 즉 "약"으로 표현되는
측정치를 제공하는 것으로 간주된다).

[0176] 여기서 기술된 모든 방법들은 만약 특별한 지시가 없거나 본 발명의 내용에 특별히 반하지 않으면 어떤 적절한
순서로 실행될 수 있다.

[0177] 본 명세서에서 사용되는 어떤 및 모든 실시예, 또는 예시적인 언어(예를 들어, "와 같은")들은 단지 본 발명을
더 잘 설명하기 위한 것이고 특별한 지시가 없으면 본 발명의 범위를 한정하기 위함이 아니다. 본 명세서에서
어떠한 표현도 명백히 기술되어 있지 않는 한, 어떤 성분이 본 발명의 실행을 위해 필수적임을 지시하는 것으로
해석되지 않아야 한다.

[0178] 본 명세서에서 특허 문서의 인용하여 포함시킨 것은 단지 편의를 위한 것이고 각 특허 문서의 유효성, 특허성

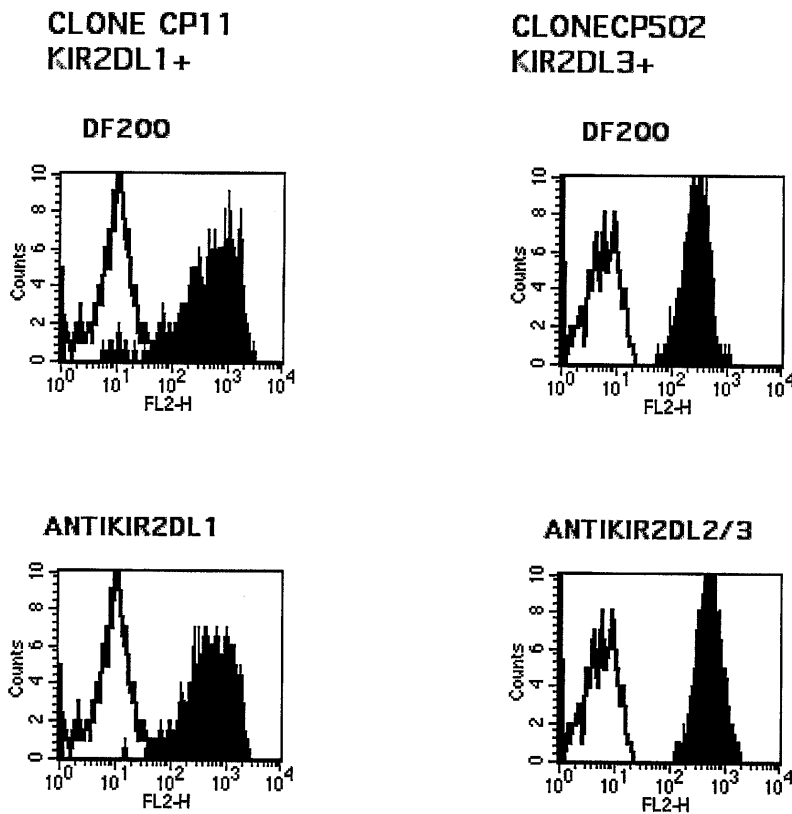
및/또는 실시성(enforceability)의 어떤 관점을 반영하지는 않는다.

[0179] 구성 성분 및 성분들에 관하여 "포함하는(comprising)", "가진(having)", "포함하는(including)" 또는 "포함하는(containing)"과 같은 용어를 사용하여 본 발명의 어떤 측면 또는 실시예에 대한 설명은 만약 다른 설명이 없거나 특히 본 발명의 내용에 대조적이지 않으면, 특정 성분 및 성분들로 "구성된(consists of)", "본질적으로 구성된(consists essentially of)" 또는 "본질적으로 포함하는(substantially comprises)" 본 발명의 유사한 관점 또는 실시예를 지지하기 위해 제공된다(예를 들어, 여기서 특정 성분을 포함하는 것으로 기술된 조성물은 만약 다른 설명 또는 본 발명에 명백히 대조되지 않는다면 그 성분들로 구성된 조성물을 설명하는 것으로 이해되어야 한다).

[0180] 본 발명은 적용 법률이 허용하는 최대한의 범위까지 본 명세서에서 표현된 관점 또는 청구항에서 인용된 주제의 모든 변형 및 등가물을 포함한다.

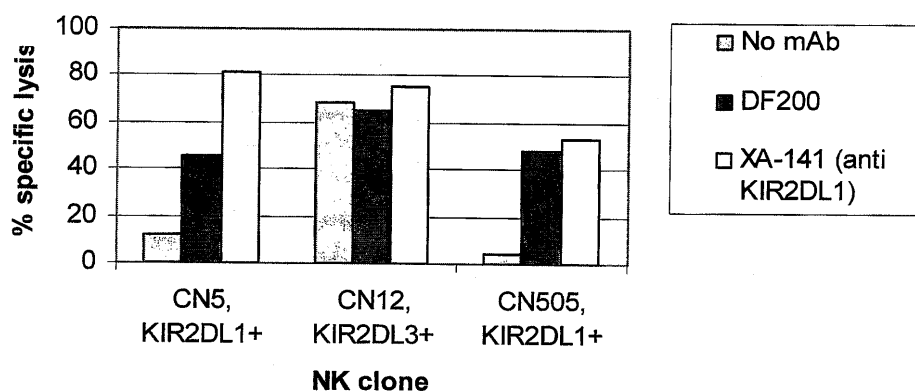
도면

도면1



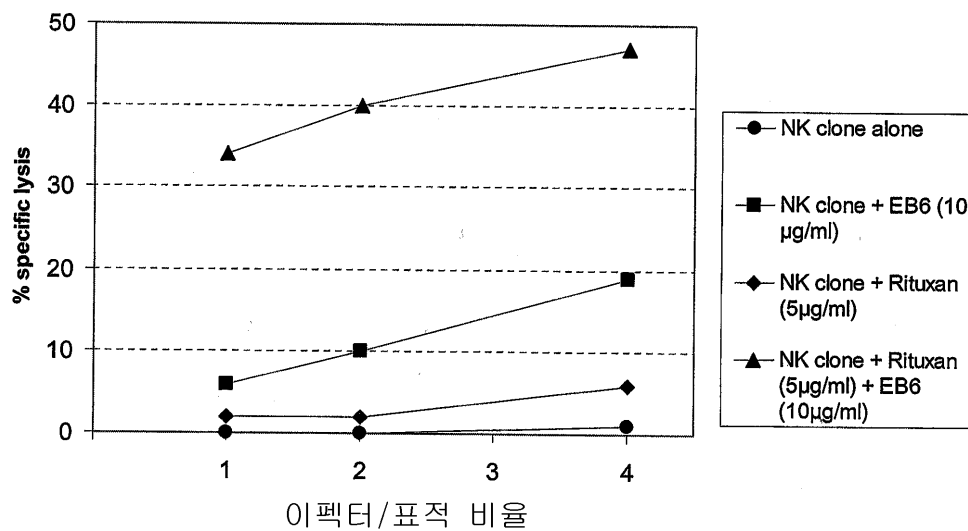
도면2

이펙터/표적세포비율이 4/1에서
C1R Cw4 표적에 대한 항 KIR2D mAb의 용해의 재구성



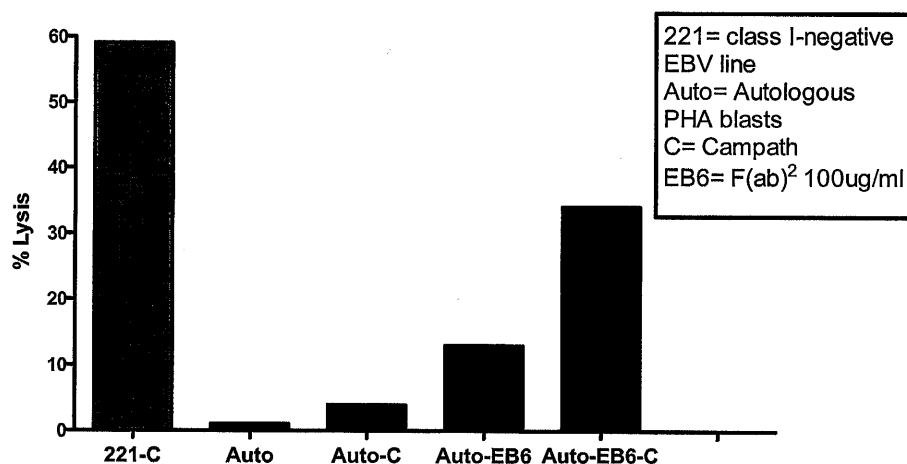
도면3

KIR HLA 상호 작용을 억제함으로써 Cw4 양성 EBV 세포계에
대해 리툭산에 의해 매개된 KIR2DL 양성 NK 클론의 ADCC 향상



도면4

캠페스 ADCC의 재구성



EB6+NK 세포 VS 자가조직 Cw4+ 세포
 E/T 2.5:1

서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)