(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0094527
(43) 공개일자 2010년08월26일

(51) Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-7013653
(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년12월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2010년06월21일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2008/001797
(87) 국제공개번호 WO 2009/070844
국제공개일자 2009년06월11일
(30) 우선권주장
60/996,819 2007년12월06일 미국(US)

(71) 출원인
씨에스엘 리미티드
오스트레일리아 빅토리아 3052 파크빌 포플라 로드 45
유니버시티 헬스 네트워크
캐나다 온타리오 엠5쥐 2씨4 토론토 엘리자베쓰 스트리트 190 알 프레이져 엘리엇 빌딩 - 룸 1 에스-417
(72) 발명자
딕 존 에드가
캐나다 엠4이2제트8 온타리오주 토론토 맥린 애비뉴 57
진 리칭
캐나다 엠6피4비2 온타리오주 토론토 아파트먼트 # 1609 던다스 스트리트 웨스트 2360
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

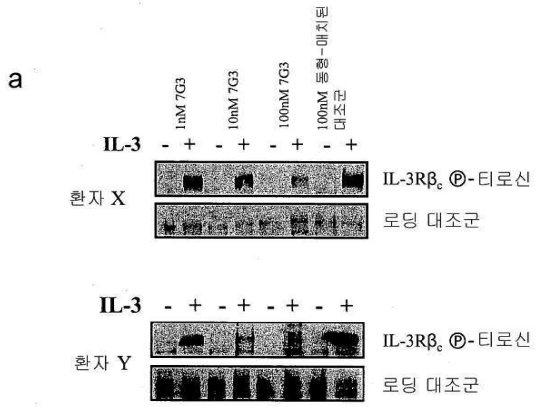
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 백혈병 줄기세포의 억제 방법

(57) 요 약

IL-3R알파(CD123)을 발현하는 백혈병 줄기세포의 억제 방법은 세포를 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자와 접촉시키는 단계를 포함하며, 이때 항원 결합 분자는 IL-3R알파(CD123)에 선택적으로 결합한다. 본 발명은 항원 결합 분자의 유효량을 환자에게 투여함에 의한 환자에서 혈액암 상태의 치료를 포함한다.

대 표 도 - 도1a



(72) 발명자

바이로 지노 루이지

오스트레일리아 3070 빅토리아주 노스코트 타너 그로브 23

기어링 데이비드 폴

오스트레일리아 3124 빅토리아주 캠버웰 브로드웨이 83

버스필드 사만다 제인

오스트레일리아 3056 빅토리아주 브런즈윅 브런즈윅 로드 4/185

특허청구의 범위

청구항 1

IL-3R알파(CD123)를 발현하는 백혈병 줄기세포의 억제 방법으로서, 상기 방법은 상기 세포를 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자와 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 상기 항원 결합 분자는 IL-3R알파(CD123)에 선택적으로 결합하는 방법.

청구항 2

환자에서 혈액암 상태의 치료 방법으로서, 상기 방법은 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자의 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하고, 이때 상기 항원 결합 분자는 IL-3R알파(CD123)에 선택적으로 결합하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 환자는 사람인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 항원 결합 분자는 Fc 영역을 포함하는 단클론성 항체 또는 항체 단편인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 항원 결합 분자는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 단클론성 항체 또는 항체 단편인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 항체 또는 항체 단편의 Fc 영역에서 변형은 Fc 영역에 적어도 1개 아미노산, 바람직하게는 2개 또는 3개 아미노산의 치환을 포함하며, 이로써 Fc 영역과 관련 Fc 수용체 및 보체의 상호작용을 증진시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 변형된 Fc 영역을 포함하는 항체 또는 항체 단편은 푸코스 제거된 항체 또는 항체 단편인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 5 항에 있어서, 항체 또는 항체 단편의 Fc 영역에서 변형은 Fc 영역에 있는 보존된 Asn^{297}에 부착된 올리고당의 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 4 항 또는 제 5 항에 있어서, 항원 결합 분자는 키메라, 인간화 또는 인간 단클론성 항체 또는 항체 단편인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 항원 결합 분자는 인간 불변영역 위에 접목된 마우스 항-CD123 단클론성 항체의 경쇄 가변영역과 중쇄 가변영역을 포함하는 키메라 항체 또는 항체 단편인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 9 항에 있어서, 항원 결합 분자는 인간 프레임워크 영역 위에 접목된 마우스 항-CD123 단클론성 항체의 상보성-결정 영역(CDR)을 포함하는 인간화 항체 또는 항체 단편인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 2 항에 있어서, 상기 혈액암 상태는 백혈병 또는 악성 림프구증식성 장애인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 백혈병은 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 및 골수 이형성 증후군으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 12 항에 있어서, 상기 악성 림프구증식성 장애는 림프종인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 림프종은 다발성 골수종, 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종, 및 소세포- 및 대세포-여포성 림프종으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 2 항에 있어서, 상기 환자에게 화학치료제를 투여하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 화학치료제의 투여는 항원 결합 분자의 투여 이전에, 동시에, 또는 이후에 행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 16 항에 있어서, 상기 화학치료제는 하기 (a)-(x)로 구성되는 군으로부터 선택된 세포독성제인 것을 특징으로 하는 방법:

(a) 머스타드 가스 유도체류: 메클로레타민, 시클로포스파미드, 클로람부실, 멜팔란, 및 이포스파미드

(b) 에틸렌이민류: 티오테파 및 헥사메틸멜라민

(c) 알킬술포네이트류: 부술판

(d) 히드라진류 및 트리아진류: 알트레타민, 프로카르바진, 다카르바진 및 테모졸로마이드

(e) 니트로스유레아류: 카르뮤스틴, 로뮤스틴 및 스트렙토조신

(f) 금속염류: 카르보플라틴, 시스플라틴 및 옥살리플라틴

(g) 빈카 알칼로이드류: 빈크리스틴, 빈블라스틴 및 빈오렐빈

(h) 탁산류: 파클리탁셀 및 도세탁셀

(i) 포도필로톡신류: 에토포시드 및 테니소피드

(j) 캄프토테칸 유사체류: 이리노테칸 및 토포테칸

(k) 안트라시클린류: 독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신, 미톡산트론 및 이다루비신

(l) 크로모마이신류: 닥티노마이신 및 플리카마이신

(m) 여러 가지 항종양 항생제류: 미토마이신 및 블레오마이신

(n) 엽산 길항제류: 메토트렉세이트

(o) 피리미딘 길항제류: 5-플루오로우라실, 폭수리딘, 시타라빈, 카페시타빈 및 젬시타빈

(p) 퓨린 길항제류: 6-메르캅토퓨린 및 6-티오구아닌

(q) 아데노신 디아미나제 억제제류: 클라드리빈, 플루다라빈, 넬라라빈 및 펜토스타틴

(r) 토포이소머라제 I 억제제류: 이로노테칸 및 토포테칸

(s) 토포이소머라제 II 억제제류: 암사크린, 에토포시드, 에토포시드 포스페이트 및 테니포시드

(t) 리보뉴클레오티드 환원효소 억제제류: 히드록시유레아

(u) 아드레노코르티칼 스테로이드 억제제류: 미토탄

(v) 효소류: 아스파라기나제 및 페가스파르가제

(w) 항미소관제류: 에스트라뮤스틴

(x) 레티노이드류: 벡사로텐, 이소트레티노인 및 트레티노인(ATRA).

청구항 19

제 18 항에 있어서, 상기 세포독성제가 시타라빈인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

IL-3R알파(CD123)를 발현하는 백혈병 줄기세포의 억제에서, 또는 억제를 위한 의약의 제조에서 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자의 사용으로서, 이때 상기 항원 결합 분자가 IL-3R알파(CD123)에 선택적으로 결합하는 사용.

청구항 21

환자에서 혈액암 상태의 치료에서, 또는 치료를 위한 의약의 제조에서 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자의 사용으로서, 이때 상기 항원 결합 분자가 IL-3R알파(CD123)에 선택적으로 결합하는 사용.

청구항 22

Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자를 포함하는 IL-3R알파(CD123)를 발현하는 백혈병 줄기세포의 억제를 위한 제제로서, 이때 상기 항원 결합 분자가 IL-3R알파(CD123)에 선택적으로 결합하는 제제.

청구항 23

Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자를 포함하는 환자에서 혈액암 상태의 치료를 위한 제제로서, 이때 상기 항원 결합 분자가 IL-3R알파(CD123)에 선택적으로 결합하는 제제.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 백혈병 줄기세포의 억제 방법에 관한 것이며, 특히 혈액암 상태에 대항하는 효과적인 요법으로서 급성 골수성 백혈병(AML) 및 다른 혈액암 상태와 관련된 백혈병 줄기세포의 억제 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 혈액암 상태는 혈액, 골수 및 림프계를 침범하는 백혈병 및 악성 림프구증식성 상태와 같은 암의 유형이다.

[0003] 백혈병은 급성 백혈병과 만성 백혈병으로 분류될 수 있다. 급성 백혈병은 급성 골수성 백혈병(AML)과 급성 림프구성 백혈병(ALL)으로 더 분류될 수 있다. 만성 백혈병은 만성 골수성 백혈병(CML)과 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함한다. 다른 관련된 상태로는 골수 이형성 증후군(MDS, 이전에는 "전백혈병"으로 알려짐)이 있는데, 이것은 골수혈 세포의 비효과적인 생산(또는 이형성증)과 AML로의 변형 위험에 의해 결집되는 혈액학적 상태들의 다양한 집합이다.

[0004] 백혈병 줄기세포(LSC)는 정상 줄기세포와 관련된 특징들, 즉 자기 재생성과 다계통 발생 능력을 지닌 암세포이다. 이러한 세포들은 별개의 집단으로서 AML과 같은 혈액암들에 존속된다고 제안된다.[1]

[0005] 급성 골수성 백혈병(AML)은 이종성 미분화 골수 아세포의 증가된 증식으로서 임상적으로 나타나는 클론성 장애이다. 백혈병 계층은 확실한 자기 재생 능력을 가지며 백혈병 선조로 분화될 수 있는 LSC들의 소 집단에 의해 유지된다[1]. 이들 선조들은 진단 및 재발 시 환자에서 쉽게 검출될 수 있는 다수의 백혈병 아세포를 생성하며, 궁극적으로는 사망을 초래한다[2-4]. AML-LSC는 빠르게 분열하는 클론형성 선조들과는 달리 휴지 세포로서 통상 보고되었다[3,5,6]. LSC의 이런 특성은 증식중인 세포를 표적으로 하는 종래의 화학치료제를 덜 효과적으로 만드는데, 이것은 잠재적으로 높은 비율의 AML 환자들이 완전한 소강상태에 진입하지만, 4년 이상 생존한 성인 중 30% 미만은 거의 일정하게 재발된다는 현재의 경험을 설명할 수 있다[7]. 이에 더하여, 미소잔존질환 발생과 불량한 생존율은 AML 환자의 진단 시 높은 LSC 빈도로 인한 것이었다[8]. 결론적으로, AML(및 유사하게는 다른 상기 언급된 혈액암 상태)의 장기적 관리가 반드시 필요하며, LSC를 특이적으로 제거할 수 있는 새로운 치료가 개발되어야 한다[9-14].

[0006] AML-LSC와 정상 조혈줄기세포(HSC)는 느린 분열, 자기 재생 능력, 및 표면 마커, 예를 들어 $CD34^{+}CD38^{-}$ 표현형의 공통된 특성을 공유한다. 그렇지만, LSC는 다른 세포 표면 마커들의 변경된 발현에 더하여, 증진된 자기 재생 활성을 지니는 것으로 보고되었으며, 이들 둘 다 치료적 이용을 위한 표적을 제시한다. 인터류킨-3(IL-3)은 2개의 서브유닛, 즉 알파 서브유닛(CD123)과 베타 공통(베타$_c$) 사슬(CD131)로 구성된 세포 표면 수용체와의 상호작용을 통해서 그것의 작용을 매개한다. 알파 사슬과 베타 사슬의 상호작용은 IL-3에 대한 고 친화성 수용체를 형성하고, 베타$_c$ 사슬은 이후의 신호 변환을 매개한다[15,16]. 정상 조혈세포에 비하여 AML 아세포, $CD34^{+}$ 백혈병 선조 및 LSC 상에서 CD123의 과발현이 광범하게 보고되었으며[17-23], 일부 연구에서는 LSC의 마커로서 제안되었다[24,25]. CD131은 또한 AML 세포에서 발현된다고 보고되었지만[21,25], AML-LSC 상에서의 발현에 대해서는 상충되는 보고서도 있다[23,25].

[0007] AML 세포 상에서 CD123의 과발현은 정상 조혈세포를 능가하는 성장 이점을 어느 정도 부여하며, 높은 비율의 AML 아세포가 IL-3에 반응하여 배양물에서 증식한다고 보고되었다[26-31]. 또, AML 세포 상에서 높은 수준의 CD123 발현은 IL-3-자극된 STAT-5 활성화 수준; 순환중인 세포의 비율; 더 원시적인 세포 표면 표현형; 및 세포자멸(apoptosis)에 대한 저항성과 상호 관련되어 있다. 임상적으로 AML에서 높은 CD123 발현은 낮아진 생존 기간, 낮아진 완전 소강율 및 진단 시 높아진 아세포 수와 관련된다[19,21,32].

[0008] HSC와 비교하여 LSC 상에서 CD123의 증가된 발현은 AML-LSC의 치료적 표적화의 기회를 제공한다. CD123에 대해 생긴 단클론성 항체(MAb) 7G3이 IL-3 매개된 증식 및 백혈병 셀라인과 1차 세포 모두의 활성화를 억제한다는 것이 이미 알려져 있다[33]. 그러나, CD123의 표적화가 AML-LSC를 기능적으로 손상시킬 수 있는지의 여부와 AML-LSC의 골수 틈새로의 귀소, 거주 및 증식을 억제할 수 있는지의 여부는 여전히 불명확하다. 또한, AML-LSC를 표적화하는 7G3의 능력에 있어서 IL-3 매개된 신호화의 직접적인 억제 대 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)의 상대적 기여도도 여전히 풀리지 않은 문제이다.

[0009] 미국특허번호 6,177,078(Lopez)은 항-IL-3 수용체 알파 사슬(IL-3R알파) 단클론성 항체 7G3, 및 IL-3R알파의 N-말단 도메인, 구체적으로 아미노산 잔기 19-49에 결합하는 7G3의 능력을 개시한다. 따라서, 이 특허는 IL-3의 기능을 길항함으로써 환자에서 IL-3의 과생산에 기인하는 상태(골수성 백혈병, 림프종 및 알러지를 포함함)의 치료에 있어서 IL-3R알파의 아미노산 잔기 19-49에 대한 결합 특이성을 가진 7G3과 같은 단클론성 항체 또는 그것의 항체 단편의 사용을 개시한다.

[0010] 미국특허번호 6,733,743(Jordan)은 항체와 세포독성제(화학치료제, 독소 또는 알파-방출 방사선동위원소로부터 선택됨)의 조성물과 세포를 접촉시킴으로써, CD123은 발현하지만 CD131은 유의하게 발현하지 않는 혈액암 선조세포를 손상시키는 방법을 개시하며, 이때 조성물은 세포사를 야기하는 데 효과적인 양으로 CD123에 선택적으로 결합한다. 혈액암은 백혈병 또는 림프종과 같은 악성 림프구증가성 장애일 수 있다.

[0011] 본 발명을 이끌어낸 연구에서, 본 발명자들은 AML-LSC와 HSC 간의 CD123 발현과 기능에 있어서의 명백한 차이를 활용하는 MAb 7G3의 능력을 시험했다. MAb 7G3은 IL-3 신호화 경로 및 1차 AML 세포의 증식을 억제했다. 또한, 자연발증 당뇨병/중증 복합형 면역결핍(NOD/SCID) 이종이식 모델에서 AML 아세포의 귀소 및 생착이 MAb 7G3에

의해 상당히 감소되었고, LSC 기능이 억제되었다.

발명의 내용

[0012] 발명의 개요

[0013] 한 양태로서, 본 발명은 IL-3R알파(CD123)를 발현하는 백혈병 줄기세포의 억제 방법을 제공하며, 상기 방법은 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터(effector) 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자와 상기 세포를 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 상기 항원 결합 분자는 IL-3R알파(CD123)에 선택적으로 결합한다.

[0014] 또한, 본 발명은 환자에서 혈액암 상태의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자의 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하고, 이때 상기 항원 결합 분자는 IL-3R알파(CD123)에 선택적으로 결합한다.

[0015] 다른 양태에서, 본 발명은 또한 IL-3R알파(CD123)를 발현하는 백혈병 줄기세포의 억제에서, 또는 억제를 위한 의약의 제조에서 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자의 사용을 제공하며, 이때 상기 항원 결합 분자는 IL-3R알파(CD123)에 선택적으로 결합한다.

[0016] 이 양태에서, 본 발명은 또한 환자에서 혈액암 상태의 치료에서, 또는 치료를 위한 의약의 제조에서 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자의 사용을 제공하며, 이때 상기 항원 결합 분자는 IL-3R알파(CD123)에 선택적으로 결합한다.

[0017] 또한, 본 발명은 IL-3R알파(CD123)를 발현하는 백혈병 줄기세포의 억제를 위한 제제를 제공하며, 상기 제제는 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자를 포함하고, 이때 상기 항원 결합 분자는 IL-3R알파(CD123)에 선택적으로 결합한다.

[0018] 이 양태에서, 본 발명은 또한 환자에서 혈액암 상태의 치료를 위한 제제를 제공하며, 상기 제제는 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자를 포함하고, 이때 상기 항원 결합 분자는 IL-3R알파(CD123)에 선택적으로 결합한다.

도면의 간단한 설명

[0019] **도 1**은 MAb 7G3이 CD131의 IL-3-자극된 인산화, 및 1차 AML 세포의 증식을 억제한다는 것을 보여준다. (a) 2명의 환자로부터의 1차 AML 세포를 얼음 위에서 30분간 도면에 나타낸 농도의 항체와 함께 인큐베이션했다. 세척하지 않고 세포를 IL-3로 자극했다(37℃에서 10분간, 1nM). 자극 직후 세포를 용해시켰다. 세포 용해물을 SDS-PAGE 상에 전개시키고, MAb 4G10을 사용하여 면역블롯팅한 다음, 블롯을 벗겨내고, 로딩 대조군으로서 MAb 1C1로 다시 프로브했다. (b-e) 1차 AML 세포의 증식을 TCA 불용성 물질에 ^{3}H-티미딘을 혼입시켜 평가했다. (b-d) 3명의 AML 환자에서 분리한 신선한 단핵세포를 사이토카인 IL-3, 1ng/mL(◇, 점선) 또는 GM-CSF, 0.1ng/mL(■, 실선)의 존재하에 또는 부재하에(△, 파선) 48시간 동안 역가의 MAb 7G3와 함께 인큐베이션했다. 데이터 포인트는 3회 중복 포인트의 평균±s.e.m.으로 나타낸다. (e) 35명의 AML 환자로부터의 해동된 세포를 IL-3(1ng/mL)의 존재 또는 부재하에 MAb 7G3(1㎍/mL)에 의한 증식 억제에 대해 분석했다. 시험된 35명의 환자 중 32명에서 억제가 나타났다. 이들 환자 중 9명에서는 증식 수준이 IL-3(구성적 증식)이 부재할 때의 수준 이하로 떨어졌다. ^{3}H-티미딘 혼입 및 액체 섬광계수법을 이용하여 증식을 정량했다.

도 2는 CD123 중화가 NOD/SCID 마우스에서 1차 AML 세포의 귀소 및 생착을 억제하는 것을 보여준다. 7G3(회색 막대) 또는 IgG2a(검은색 막대)에 생체외 노출 후(10㎍/mL, 2시간), 10명의 환자로부터의 1차 AML 세포(a), 또는 5명의 개인으로부터의 정상 골수(NBM) 또는 제대혈(CB)(b)의 생착. 항체 치료 후 세포를 치사량 이하의 방사선 조사된 NOD/ SCID 마우스에 이식하고, 4-8(a) 또는 4-11(b) 주에 도태시켜, 대퇴골 골수 내 인간 CD45^{+} 세포의 비율을 유세포분석에 의해 평가했다. 각 샘플에 대하여, 치료군 당 3 내지 10마리의 마우스가 사용되었다. AML-8 및 AML-8-rel은 진단 및 재발 시 각각 동일한 환자로부터 수거된 백혈병 세포에 해당한다. NBM-4 및 CB-1은 합쳐진 샘플을 기원으로 했다. (c) IgG2a(n = 10, 실선) 또는 7G3(n = 10, 점선)으로 생체외 치료된 AML-9 세포를 이식한 마우스의 Kaplan-Meier 무재발 생존율 곡선. (d) IgG2a(검은색 막대), 7G3(회색 막대)로 생체외 치료된 AML-8-rel 또는 AML-9 세포의 골수 및 비장을 향한 귀소 효율, 이식 24시간 후에 평가. (e) 정맥내 주입(IV) 또는 대퇴골내 주사(IF) 후, IgG2a(흰색 막대) 또는 7G3(검은색 막대)로 생체외 치료된 세포를 이식한 마우스에서 AML-8-rel 세포의 생착 수준. IF 이식된 마우스에서, AML 세포가 이식된 오른쪽 대퇴골(RF)에서의 생

착 수준과 이식되지 않은 뼈(WBM)에서의 생착 수준을 나타낸다. (d)와 (e)에 대하여, 치료군 당 4-5마리의 마우스가 사용되었다. 이식 후 5주째에 마우스를 죽였다. 수치는 평균±s.e.m.으로 표시한다. 대조군 IgG2a와 치료된 마우스 간에 유의한 차이가 나타난다: *, $P < 0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P \leq 0.0001$. (f) 절대적인 수의 $CD34^{+}38^{-}$ AML 세포가 생체외 7G3-치료된 백혈병 세포가 주사된 NOD/SCID 마우스의 BM 및 비장으로 돌아갔다. AML-8에 대하여 그룹 당 n = 2-3 마우스, AML-9에 대하여 그룹당 n = 5 마우스. 수치는 평균± SEM으로 표시한다. (g) 생체외 치료 후 분별된 $CD34^{+}CD38^{-}$ AML-9 세포의 마우스의 BM과 비장으로의 귀소 효율. 치료군 당 n = 3 마우스.

도 3은 NOD/SCID 마우스에 7G3의 투여가 AML 생착을 감소시킨다는 것을 보여준다. (a) 이식 6시간 전에 IgG2a 대조군 또는 7G3(300㎍)의 단일 용량을 받은 방사선 조사된 NOD/SCID 마우스의 대퇴골 골수에서 AML-1 세포의 생착 수준. 이식 5주 후에 마우스를 도태시켰다. (b) IgG2a(검은색 막대) 또는 7G3(회색 막대)로 치료된 NOD/SCID 마우스에서 AML-1, 2, 및 3의 생착. 치료는 수술 24시간 후에 개시되었고, 1회 용량당 300㎍, 격일로 4회 용량이었다. 이식 5주 후에 마우스를 도태시켰다. (c) 골수-유래된 세포 상에서의 CD123 발현, 및 (d) 마우스에 접종된 다음, 이식 4일 후에 IgG2a 또는 7G3 치료를 개시하여 주 3회 총 12회의 주사를 투여한 경우, AML-1 세포의 말초혈 및 비장에서의 생착 수준. 이식 5주 후에 마우스를 도태시켰다. (e) 이식 28일 후에 IgG2a(점선) 또는 7G3(실선) 치료를 개시하여 죽일 때까지 주 3회 투여를 계속한 경우, 골수에서 AML-2 세포의 생착 수준. 치료군 당 3마리 내지 10마리의 마우스가 사용되었다. 수치는 평균±s.e.m.으로 표시한다. (f) 이식 28일 후에 시작하여 주 3회 300㎍/용량으로 7G3 또는 IgG2a 대조군 4회 용량을 투여한 후, NOD/SCID 마우스의 BM 내 인간 AML-1 세포의 퍼센트. 각 기호는 단일 마우스로부터 획득된 값을 표시한다. IgG2a 대조군과 7G3 치료군 마우스 간에 유의한 차이가 나타난다: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$.

도 4a(파트 I)은 AML 질환이 확립된 마우스에 7G3과 Ara-C의 투여가 2차 수여자 마우스에서 LSC 재증식을 차단한다는 것을 보여준다. (a) 도면에 도시된 대로 IgG2a 또는 7G3과 조합된 Ara-C로 치료된 1차 마우스의 골수 및 비장에서 AML-10의 생착 수준, (b) 골수 및 비장을 향한 귀소 효율, (c) 생착 수준, 및 (d) (a)에서 치료된 마우스의 골수로부터 수거하여 2차 수여자 마우스에 이식한 백혈병 세포의 2차 이식편에서 $CD34^{+}38^{-}$ 세포의 비율. 수평 막대는 평균값을 표시한다. IgG2a + Ara-C 대조군과 7G3 + Ara-C 치료군 간에 유의한 차이가 나타난다: *, $P < 0.05$; ** $P< 0.01$.

파트 II(도 4b)는 (A) 7G3 또는 대조군 IgG2a 치료 10주 후에 BM 및 비장에서 AML-10 세포의 생착 수준을 보여준다. 항체 치료는 이식 28일 후에 개시되었고, 도면에 간략히 나타낸 대로 주 3회 마우스 당 300㎍ 이었다. (B-D) 귀소 효율 (B), BM 및 비장에서의 생착 수준 (C), 및 2차 수여자 마우스의 BM 내 $CD34^{+}CD38^{-}$ 세포의 퍼센트 (D). C 및 D에서 마우스는 이식 12주 후에 분석되었다. 각 기호는 단일 마우스를 표시하고, 수평 막대는 평균값을 표시한다. 대조군 IgG2a와 7G3 치료군; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

파트 III(도 4c)은 (A) 7G3 또는 대조군 IgG2a 치료 10주 후 BM 및 비장에서 AML-9 세포의 생착 수준을 보여준다. 항체 치료는 이식 28일 후에 개시되었고, 도면에 간략히 나타낸 대로 주 3회 마우스 당 300㎍이었다. (B) 2차 수여자 마우스의 BM에서의 생착 수준. 2차 마우스는 이식 8주 후에 분석되었다. 각 기호는 단일 마우스를 표시하고, 수평 막대는 평균값을 표시한다. 대조군 IgG2a와 7G3 치료군; **, $P < 0.01$.

도 5는 자연 킬러(NK) 림프구 세포가 AML 생착의 7G3-매개된 억제에 기여한다는 것을 보여준다. (a) 생착 수준, 및 (b) IgG2a(흰색 막대) 또는 7G3(검은색 막대)(10㎍/mL, 2시간)으로 생체외 치료되어, 선행 $CD122^{+}$ NK 세포 고갈을 행하거나(+) 행하지 않은(-) NOD/SCID 마우스에 이식한, AML-8-rel 세포의 귀소 효율. 각 치료군 당 4마리 마우스가 사용되었다. 수치는 평균±s.e.m.으로 표시한다. 유의한 차이가 나타난다: *, $P < 0.05$ 및 ** $P< 0.01$.

도 6은 6H6도 아니고 9F5도 아닌, MAb 7G3이 IL-3 의존성 셀라인 및 AML 세포에서 CD131(베타$_c$), STAT-5 및 Akt의 IL-3 자극된 인산화를 억제한다는 것을 보여준다. (a) 얼음 위에서 30분 동안 7G3, 9F5 또는 6H6의 다양한 농도와 함께 TF-1 세포를 인큐베이션했다. 세척하지 않고 세포를 IL-3으로 자극했다(37℃에서 10분, 1nM). 자극 직후 세포를 용해시키고, 방법에서 설명한 대로 CD131 면역침전시켰다. 면역침전물을 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 인산화된 티로신 잔기(4G10), 인산화된 STAT-5 또는 인산화된 Akt에 대한 항체로 면역블롯팅했다. 블롯을 벗겨내고, 로딩 대조군으로서 베타c(1C1)에 대한 항체로 다시 프로브했다. (b) 또한, STAT-5의 IL-3 유도된 활성화의 7G3 억제를 TF-1 및 M07e 셀라인과 1차 AML-9 세포의 세포내 FACS 염색에 의해서 확인했다. 모의

치료(점선), IL-3 단독(10ng/mL, 2시간, 실선), IL-3 + 7G3(10ng/mL, 파선).

도 7은 $CD34^+/CD38^-$ 세포 상에서 CD123 발현의 강도가 NOD/SCID 마우스에서 생착을 억제하는 7G3의 능력과 역으로 상호 관련된다는 것을 보여준다. Y-축은 각 환자 또는 공여자 견본에 대한 $CD34^+/CD38^-$ 분획 상에서의 CD123 발현의 RFI를 로그로 표시한 것이다. X-축은 각 환자 또는 공여자 샘플에 대한 100%로 정한 IgG2a 대조군의 %에 대해 표준화된 7G3 생체외 치료군의 생착 수준을 로그로 표시한 것이다. 각 포인트는 치료군 당 3-10마리 마우스로부터의 평균값을 반영한 개별 실험을 표시하며, 각 실험은 상이한 AML 환자(검은색 기호) 또는 정상 BM 샘플(흰색 기호)를 사용하여 수행했다. 모든 마우스는 생착 4-6주 후에 분석되었다. 각 생착 데이터 포인트는 도 2a에 나타낸 3-10마리의 마우스로부터의 측정에 기초했다.

도 8은 표적 세포로서 AML 세포를 사용한 경우 NK 세포에서의 CD107a 발현을 보여준다. 건강한 정상 공여자로부터의 말초혈 단핵세포(PBMC)를 37℃에서 3시간 동안 IgG1 대조군(10㎍/mL)(A & C) 또는 CSL360(10㎍/mL)(B & D)과 함께 1:1의 비율로 1차 인간 AML 세포(RMH003)(A & B)와 함께 인큐베이션했다. CD107a의 비특이적 발현을 평가하기 위하여 PBMC를 표적 세포는 없이 항체와 함께 인큐베이션했다(1:0)(C & D).

도 9는 도 8에 나타낸 실험에서 얻은 데이터의 히스토그램 플롯을 보여주며, 이것은 나타낸 대로 항체를 첨가하지 않은 샘플도 포함한다.

도 10은 NOD/SCID 마우스에 접종하기 전에 10㎍/mL IgG2a, 무손상 7G3, 6H6 또는 9F5 항체 및 7G3의 F(ab)' 2 단편(7G3 Fab) 및 6H6의 F(ab)' 2 단편(6H6 Fab)으로 생체외 치료된 AML-8-rel 샘플의 귀소 효율을 보여준다. 인간 단핵세포의 골수로의 귀소 효율은 16시간 후 측정되었다. 각 샘플에 대하여 치료군 당 3마리 마우스가 사용되었다.

도 11은 10㎍/mL IgG2a, 무손상 7G3 또는 9F5 항체 및 7G3의 F(ab)' 2 단편(7G3 Fab) 및 9F5의 F(ab)' 2 단편(9F5 Fab)에 생체외 노출 후 치사량 이하의 방사선 조사된 NOD/SCID 마우스에서 두 환자(AML-9 및 AML-10)로부터의 1차 AML 세포의 생착을 보여준다. AML 생착은 유세포분석에 의해 추정된 대퇴골 골수 내 인간 CD45+세포의 비율로서 접종 4주 후에 평가되었다. 각 샘플에 대하여 치료군 당 5마리 마우스가 사용되었다.

도 12는 키메라 CSL360, 인간 CSL360 및 그것의 Fc 변이체의 ADCC 활성을 비교한 것을 보여준다. 칼세인 AM 표지된 CTLEN 세포를 상이한 항체들 및 정상 인간 공여자로부터 분리된 신선한 PBMC와 함께 인큐베이션했다. PBMC 대 CTLEN 세포의 비는 100:1이었다. 세포를 5% 이산화탄소가 있는 인큐베이터에서 37℃에서 4시간 동안 인큐베이션했다. 인큐베이션 후, 세포를 원심분리하고, 상청액 100㎕를 새 플레이트로 옮겼다. Wallac 마이크로플레이트 리더(여기 필터 485nm, 방출 필터 535nm)를 사용하여 상청액 중의 형광물질을 측정했다. 사용된 항체는 키메라 CSL360(흰색 막대), 인간화된 CSL360(검은색 막대), 아미노산 2개가 변화된 인간화 CSL360(사선) 또는 아미노산 3개가 변화된 인간화 CSL360(점선)이었다. 인간 IgG1(수평선)과 항체가 없는 웰(수직선)이 대조군으로서 포함되었다.

도 13은 (a) FcR에 결합하는 hCSL360, 및 그것의 3개 변이체의 Biacore 분석을 보여준다. huCSL 360 및 그것의 3개 변이체를 CD123과 커플링된 BIAcore CM5 칩 상에 개별적으로 포착시켰다. 0.4nM 내지 800nM 범위의 농도로 huFcγRI, huFcγRIIb/c 및 huFcγRIIIa를 각 표면 위를 흐르게 하고, 반응을 이용하여 KA를 결정했다. 1의 상대값을 배정한 hCSL360을 넘은 증가 배수로서 친화성을 기록한다. (b) 각 4개 항체에 대한 huFcγRIIIa 대 huFcγRIIb/c의 A/I 비로서 KA 값을 표시했다.

도 14는 이펙터 세포로서 정상 PBMC를 사용하여 칼세인 방출 분석에서 시험된 Raji- CD123 양성 세포의 ADCC 매개된 세포용해를 보여준다. Raji-CD123 저 및 고 발현인자에서 발현된 CD123 분자의 대략적인 수는 각각 4,815 및 24,432였다. (a) E:T = 25:1에서 Raji-CD123 저의 ADCC-매개 세포용해, (b) E:T = 50:1에서 Raji-CD123 저의 ADCC 매개 세포용해, (c) E:T = 25:1에서 Raji-CD123 고의 ADCC 매개 세포용해, (d) E:T = 50:1에서 Raji-CD123 고의 ADCC 매개 세포용해. 검은색 삼각형은 hCSL360Fc3, 원은 hCSL360kif, 검은색 원은 CSL360, 사각형은 hCSL360, 별표는 항체 없음을 표시한다.

도 15는 표적 세포로서 TF-1을 사용한 경우 CSL360 및 변이체들의 증진된 ADCC 활성을 보여준다. 항체의 ADCC 활성은 LDH 분석을 사용하여 시험했다. (a) 검은색 삼각형은 hCSL360Fc3, 검은색 사각형은 hCSL360Fc2, 흰색 원은 hCSL360kif, 검은색 원은 CSL360, 및 별표는 항체 없음을 표시한다. (b) 검은색 삼각형은 168-26Fc3, 검은색 사각형은 168-26Fc2, 검은색 원은 168-26을 표시하고, 별표는 항체 없음을 표시한다.

도 16은 표적 세포로서 1차 인간 백혈병 세포를 사용한 경우 CSL360 및 변이체들의 증진된 ADCC 활성을 보여준

다. (a) RMH003 AML, (b) RMH011 AML, (c) RMH010 AML, (d) RMH008 AML, (e) WMH007 AML, (f) RMH009 B-ALL, (g) RMH007 B-ALL. ADCC 활성은 LDH 분석을 사용하여 측정했다.

도 17은 백혈병 이식일부터 무재발 생존율(EFS)의 Kaplan-Meier 곡선으로서 나타낸, 대조군 MAb(뮤린 IgG2a), 7G3, 168-26 및 168-26Fc3에 대한 ALL이 사전 생착된 마우스의 생체내 민감성을 보여준다. 재발사건은 말초혈 중 25% hCD45+ 부하로서 정의된다. 각 그룹의 동물 수는 각각 7, 6, 6 및 7마리였다. 백혈병 성장 지연(LGD)은 중간값 EFS 비교에 기초하여 대조군 MAb 군보다 더 오래 생존한 치료군의 일수로서 정의되며, 7G3, 168-26 및 168-26Fc3에 대하여 각각 2.9일(P=0.54), 6.4일(P=0.13) 및 12.2일(P=0.044)이었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 발명의 상세한 설명

[0021] 한 양태에서, 본 발명은 IL-3R알파(CD123)를 발현하는 백혈병 줄기세포의 억제 방법을 제공하며, 상기 방법은 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자와 상기 세포를 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 상기 항원은 IL-3R알파(CD123)에 선택적으로 결합한다.

[0022] 이 양태에서, 본 발명은 또 환자에서 혈액암 상태의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자의 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 항원 결합 분자는 IL-3R알파(CD123)에 선택적으로 결합한다.

[0023] 바람직하게, 환자는 사람이다.

[0024] 바람직하게, 항원 결합 분자는 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 단클론성 항체 또는 항체 단편이다.

[0025] 항체는 가장 풍부한 혈청 면역글로불린인 IgG를 가지고 체액성 면역 시스템과 세포성 면역 시스템 사이에 연결을 제공한다. 항체의 Fab 영역이 항원을 인식하는 동안, Fc 부분은 자연 킬러(NK) 세포, 호중구, 단핵 포식세포 또는 수지상 세포와 같은 모든 면역 부속 세포들에 의해 차등적으로 발현되는 Fc γ 수용체(Fc γR)에 결합한다. 이러한 결합은 이들 세포 상에서 FcR을 가교연결시키고, 결과적으로 세포가 활성화된다. 이들 세포의 활성화는 몇 가지 결과를 가지는데, 예를 들어 NK 세포가 암세포를 죽이고, 또한 세포 증식 및 종양-관련 혈관형성을 억제할 수 있는 사이토카인과 케모카인을 방출하며, 주요 조직적합성 항원(MHC)의 증가된 세포 표면 발현을 통해 종양 면역원성을 증가시킨다. 다가 항원/항체 복합체에 의한 수용체 가교연결 시, 이펙터 세포 탈과립화와 사이토카인-암호화 유전자의 전사-활성화가 촉발되고, 표적 세포의 세포용해 또는 포식작용이 이어진다.

[0026] 항체 Fc 영역에 의해 매개되는 이펙터 기능은 두 가지 범주로 나눠질 수 있는데, (1) 항체와 항원의 결합 후 작동되는 이펙터 기능(이런 기능은, 예를 들어 보체 연쇄단계의 참여 또는 Fc 수용체(FcR)-보유 세포를 수반한다); 및 (2) 항원 결합과는 독립적으로 작동하는 이펙터 기능(이런 기능은, 예를 들어 순환계에서의 지속성 및 트랜스 세포용해에 의해 세포 장벽을 가로질러 전달되는 능력을 부여한다)이다. 예를 들어, 보체의 C1 성분과 항체의 결합은 보체 시스템을 활성화시킨다. 보체의 활성화는 옵소닌화(opsonisation) 및 병원체의 세포 용해에 중요하다. 또한, 보체의 활성화는 염증 반응을 자극하며, 자가면역 과민반응에 연관될 수도 있다. 더 나아가, 항체는 Fc 영역을 통해 세포에 결합하는데, 항체 Fc 영역 상의 Fc 수용체 결합 부위가 세포 상의 Fc 수용체(FcR)에 결합한다. 항체와 세포 표면의 Fc 수용체의 결합은 항체-코팅된 입자의 탐식 및 파괴, 면역 복합체의 청소, 킬러 세포에 의한 항체-코팅된 표적 세포의 세포용해(항체-의존성 세포-매개 세포독성, 또는 ADCC로서 알려짐), 염증 매개인자의 방출, 태반 전달 및 면역글로불린 생산의 통제를 포함하여 많은 여러 가지 중요한 생물학적 반응을 촉발시킨다.

[0027] 본 발명자들은 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역의 항원 결합 분자의 존재가 CD123을 발현하는 백혈병 줄기세포의 억제에 중요하며, 따라서 백혈병 줄기세포와 관련된 혈액암 상태의 치료에서도 중요하다는 것을 밝혔다.

[0028] 본 발명에 따라서 치료될 수 있는 백혈병 줄기세포(LSC)와 관련된 혈액암 상태는 백혈병(급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 및 골수 이형성 증후군 등) 및 림프종(다발성 골수종, 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종, 및 소세포- 및 대세포-여포성 림프종 등)을 비롯한 악성 림프구증식성 상태를 포함한다.

[0029] 본원에서 사용된 용어 "항원 결합 분자"는 키메라, 인간화 또는 인간 단클론성 항체와 같은 단클론성 항체를 포함하는 무손상 면역글로불린, 또는 면역글로불린의 결합 파트너, 예를 들어 숙주세포 단백질과의 특이적 결합에 대해 무손상 면역글로불린과 경합하는 면역글로불린의 항원-결합 및/또는 가변-도메인-포함 단편을 말한다. 구조와는 무관하게 항원-결합 단편은 무손상 면역글로불린에 의해 인식되는 것과 동일한 항원과 결합한다. 항원-결합 단편은 합성에 의해 또는 무손상 면역글로불린의 효소 또는 화학적 절단에 의해 생산될 수 있거나, 아니면 재조합 DNA 기술에 의해 유전 조작될 수 있다. 항원 결합 분자 및 이들의 단편의 생산 방법은 당업계에 잘 공지되어 있으며, 예를 들어 본원에 참고자료로 포함되는 *Antibodies: A Laboratory Manual*, Edited by E. Harlow 및 D, Lane (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York에 설명된다.

[0030] 백혈병 줄기세포를 언급할 때 본원에서 사용된 용어 "억제"는 LSC의 기능성 또는 활성(성장 또는 증식 및 생존 활성을 포함)의 감소, 특히 생존, 증식 및/또는 백혈병의 선조나 다른 악성 초증식성 혈액암세포로 분화하는 LSC의 능력에 있어서의 감소 또는 제한을 포함한다.

[0031] 결합 분자, 예를 들어 항체와 그것의 결합 파트너, 예를 들어 항원의 상호작용을 언급할 때 본원에서 사용된 용어 "선택적으로 결합한다"는 그 상호작용이 결합 파트너 상의 특정 구조, 예를 들어 항원성 결정소 또는 에피토프의 존재에 의존한다는 것을 의미한다. 다시 말해서, 항체는 결합 파트너가 다른 분자들이나 유기물들의 혼합물 중에 존재하는 경우에도 결합 파트너와 우선적으로 결합하거나 인식한다.

[0032] 용어 "유효량"은 혈액암 상태의 치료에 효과적인 본원에 정의된 결합 분자의 양을 말한다.

[0033] 용어 "치료"는 상태를 치유하거나, 또는 상태의 진행을 정지시키거나 아니면 적어도 지연시킬 수 있는 치료적 처치뿐만 아니라 예방적 또는 방어적 수단을 말한다. 치료가 필요한 대상은 이미 혈액암 상태에 걸린 대상뿐만 아니라 이러한 상태가 예방되어야 하는 대상도 포함한다. 이런 상태로부터 부분적으로 또는 완전히 회복된 대상도 치료가 필요할 수 있다. 예방은 혈액암 상태와 관련된 증상 중 하나 이상의 개시, 발전 또는 진행의 억제 또는 감소를 포함한다.

[0034] 본 발명의 방법에서, 환자에게 화학치료제의 투여가 항원 결합 분자의 투여와 조합될 수 있으며, 이때 화학치료제는 항원 결합 분자의 투여 이전에, 동시에, 또는 이후에 투여된다.

[0035] 바람직하게, 화학치료제는 세포독성제, 예를 들어 하기 물질로 구성되는 군으로부터 선택된 세포독성제이다:

[0036] (a) 머스타드 가스 유도체류: 메클로레타민, 시클로포스파미드, 클로람부실, 멜팔란, 및 이포스파미드

[0037] (b) 에틸렌이민류: 티오테파 및 헥사메틸멜라민

[0038] (c) 알킬술포네이트류: 부술판

[0039] (d) 히드라진류 및 트리아진류: 알트레타민, 프로카르바진, 다카르바진 및 테모졸로마이드

[0040] (e) 니트로스유레아류: 카르뮤스틴, 로뮤스틴 및 스트렙토조신

[0041] (f) 금속염류: 카르보플라틴, 시스플라틴 및 옥살리플라틴

[0042] (g) 빈카 알칼로이드류: 빈크리스틴, 빈블라스틴 및 빈오렐빈

[0043] (h) 탁산류: 파클리탁셀 및 도세탁셀

[0044] (i) 포도필로톡신류: 에토포시드 및 테니소피드.

[0045] (j) 캄프토테칸 유사체류: 이리노테칸 및 토포테칸

[0046] (k) 안트라시클린류: 독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신, 미톡산트론 및 이다루비신

[0047] (l) 크로모마이신류: 닥티노마이신 및 플리카마이신

[0048] (m) 여러 가지 항종양 항생제류: 미토마이신 및 블레오마이신

[0049] (n) 엽산 길항제류: 메토트렉세이트

[0050] (o) 피리미딘 길항제류: 5-플루오로우라실, 폭수리딘, 시타라빈, 카페시타빈 및 젬시타빈

[0051] (p) 퓨린 길항제류: 6-메르캅토퓨린 및 6-티오구아닌

[0052] (q) 아데노신 디아미나제 억제제류: 클라드리빈, 플루다라빈, 넬라라빈 및 펜토스타틴

[0053] (r) 토포이소머라제 I 억제제류: 이로노테칸 및 토포테칸

[0054] (s) 토포이소머라제 II 억제제류: 암사크린, 에토포시드, 에토포시드 포스페이트 및 테니포시드

[0055] (t) 리보뉴클레오티드 환원효소 억제제류: 히드록시유레아

[0056] (u) 아드레노코르티칼 스테로이드 억제제류: 미토탄

[0057] (v) 효소류: 아스파라기나제 및 페가스파르가제

[0058] (w) 항미소관제류: 에스트라뮤스틴

[0059] (x) 레티노이드류: 벡사로텐, 이소트레티노인 및 트레티노인(ATRA).

[0060] 화학치료제의 다른 예로는, 제한되는 것은 아니지만, 아시비신; 아클라루비신; 아코다졸 염산염; 아크로닌; 아도젤레신; 알데스류킨; 알트레타민; 암보마이신; 아메탄트론 아세테이트; 아미노글루테티미드; 아나스트로졸; 안트라시클린; 안트라마이신; 아스페르린; 아자시티딘(Vidaza); 아제테파; 아조토마이신; 바티마스타트; 벤조데파; 비칼루타미드; 비산트렌 염산염; 비스나피드 디메실레이트; 비스포스포네이트류(예를 들어, 파미드로네이트(Aredria), 나트륨 클론드로네이트(Bonefos), 졸레드론산(Zometa), 알렌드로네이트(Fosamax), 에티드로네이트, 이반도르네이트, 시마드로네이트, 리세드로메이트, 및 틸루드로메이트); 비젤레신; 브레퀴나르 나트륨; 브로피리민; 칵티노마이신; 칼루스테론; 카라세미드; 카르베티메르; 카르누스틴; 카루비신 염산염; 카르젤레신; 세데핀골; 시롤레마이신; 크리스나톨 메실레이트; 데시타빈(Dacogen); 탈메틸화제; 덱소르마플라틴; 데자구아닌; 데자구아닌 메실레이트; 디아지쿠온; 드롤록시펜; 드롤록시펜 시트레이트; 드로모스타놀론 프로피오네이트; 두아조마이신; 에다트렉세이트; 에플로르니틴 염산염; EphA2 억제제; 엘사미트루신; 엔로플라틴; 엔프로메이트; 에피프로피딘; 에르불로졸; 에소루비신 염산염; 에타니다졸; 에토프린; 파드로졸 염산염; 파자라빈; 펜레티니드; 플록수리딘; 플루로시타빈; 포스퀴돈; 포스트리에신 나트륨; 히스톤 디아세틸라제 억제제류(HDAC-I); 일모포신; 이마티닙 메실레이트(Gleevec, Glivec); 이프로플라틴; 란레오티드 아세테이트; 레날리도미드(Revlimid); 레트로졸; 류프롤리드 아세테이트; 리아로졸 염산염; 로메트렉솔 나트륨; 로뮤스틴; 로속산트론 염산염; 마소프로콜; 마이탄신; 메제스트롤 아세테이트; 멜렌제스트롤 아세테이트; 메노가릴; 메토프린; 메튜레데파; 미틴도미드; 미토카르신; 미토크로민; 미토질린; 미토말신; 미토스퍼; 미코페놀산; 노코다졸; 노갈라마이신; 오르마플라틴; 옥시수란; 펠리오마이신; 펜타뮤스틴; 페플로마이신 술페이트; 페르포스파미드; 피포브로만; 피포술판; 피록산트론 염산염; 플로메스탄; 포르피머 나트륨; 포르피로마이신; 프레드니뮤스틴; 퓨로마이신; 퓨로마이신 염산염; 피라조퓨린; 리보프린; 로글레티미드; 사핀골; 사핀골 염산염; 세뮤스틴; 심트라젠; 스파르포세이트 나트륨; 스파르소마이신; 스피로게르마늄 염산염; 스피로뮤스틴; 스피로플라틴; 스트렙토니그린; 스트렙토조신; 술로페뉴르; 탈리소마이신; 테코갈란 나트륨; 테가퓨르; 텔록산트론 염산염; 테모포르핀; 테록시론; 테스톨락톤; 티아미프린; 티아조퓨린; 티라파자민; 토레미펜 시트레이트; 트레스톨론 아세테이트; 트리시리빈 포스페이트; 트리메트렉세이트; 트리메트렉세이트 글루쿠로네이트; 트리프토렐린; 튜불로졸 염산염; 유라실 머스타드; 유레데파; 바프레오티드; 베르테포르핀; 빈데신; 빈데신 술페이트; 비네피딘 술페이트; 빈글리시네이트 술페이트; 빈레우로신 술페이트; 빈로시딘 술페이트; 빈졸리딘 술페이트; 보로졸; 제니플라틴; 지노스타틴; 조루비신 염산염; 20-에피-1,25 디히드록시비타민 D3; 5-에티닐우라실; 아비라테론; 아클라루비신; 아실풀벤; 아데시페놀; 아도젤레신; 알데스류킨; ALL-TK 길항제류; 알트레타민; 암바뮤스틴; 아미독스; 아미포스틴; 아미노레불린산; 암루비신; 아나그렐리드; 아나스트로졸; 안드로그라폴리드; 혈관형성 억제제류; 길항제 D; 길항제 G; 안타레릭스; 항안드로겐, 전립선 암종; 항에스트로겐; 항네오플라스톤; 안티센스 올리고뉴클레오티드류; 아피디콜린 글리시네이트; 세포자멸 유전자 조정제; 세포자멸 조절제; 아퓨린산; ara-CDP-D L-PTBA; 아술라크린; 아타메스탄; 아트리뮤스틴; 악시나스타틴 1; 악시나스타틴 2; 악시나스타틴 3; 아자세트론; 아자톡신; 아자티로신; 바카틴 III 유도체류; 발라놀; 바티마스타트; BCR/ABL 길항제류; 벤조클로린류; 벤조일스타우로스포린; 베타 락탐 유도체류; 베타-알레틴; 베타클라마이신 B; 베튤린산; bFGF 억제제; 비칼루타미드; 비산트렌; 비사지리디닐스페르민; 비스나피드; 비스트라텐 A; 비젤레신; 브레플레이트; 브로피리민; 부도티탄; 부티오닌 술폭시민; 칼시포트리올; 칼포스틴 C; 캄프토테신 유도체류; 카나리폭스 IL-2; 카르복사미드-아미노-트리아졸; 카르복시아미도트리아졸; CaRest M3; CARN 700; 연골 유래 억제제; 카르젤레신; 카세인 키나제 억제제류(ICOS); 카스타노스페르민; 세크로핀 B; 세트로렐릭스; 클로린류; 클로로퀴녹살린 술폰아미드; 시카프로스트; 시스-포르피린; 클로미펜 유사체류; 클로트리마졸; 콜리스마이신 A; 콜리스마이신 B; 콤브레타스타틴 A4; 콤브레타스타틴 유사체; 코나제닌; 크람베스시딘 816; 크리스나톨; 크립토피신 8; 크립토피신 A 유도체류; 쿠라신 A; 시클로펜탄트라퀴논류; 시클로플라탐; 시페마이신; 세포용해 인자; 시토스타틴; 다클릭시맙; 데시타빈; 데히드로디뎀닌 B; 데슬로렐린; 덱사메타손; 덱시포스파미드; 덱스라족산; 덱스베르파밀; 디아지쿠온; 디뎀닌 B; 디독스; 디에틸노르스

페르민; 디히드로-5-아자시티딘; 디히드로탁솔, 디옥사마이신; 디페닐 스피로뮤스틴; 도코사놀; 돌라세트론; 독시플루리딘; 드롤록시펜; 드로나비놀; 두오카르마이신 SA; 에브셀렌; 에코뮤스틴; 에델포신; 에드레콜로맙; 에플로르니틴; 엘레멘; 에미테푸르; 에프리스테리드; 에스트라뮤스틴 유사체; 에스트로겐 효현제류; 에스트로겐 길항제류; 에타니다졸; 엑세메스탄; 파드로졸; 파자라빈; 펜레티니드; 필그라스팀; 피나스테리드; 플라보피리돌; 플레젤라스틴; 플루아스테론; 플루오로다우노루니신 염산염; 포르페니멕스; 포르메스탄; 포스트리에신; 포테뮤스틴; 가돌리늄 텍사피린; 갈륨 니트레이트; 갈로시타빈; 가니렐릭스; 젤라티나제 억제제류; 글루타티온 억제제류; HMG CoA 환원효소 억제제류(예를 들어, 아토르바스타틴, 세리바스타틴, 플루바스타틴, 레스콜, 루피토르, 로바스타틴, 로수바스타틴, 및 심바스타틴); 헵술팜; 헤레굴린; 헥사메틸렌 비스아세타미드; 하이페리신; 이반드론산; 이독시펜; 이드라만톤; 일모포신; 일로마스타트; 이미다조아크리돈류; 이미퀴모드; 인슐린-유사 성장인자-1 수용체 억제제; 인터페론 효현제류; 인터페론류; 인터류킨류; 이오벤구안; 이오도독소루비신; 이포메아놀, 4-이로플락트; 이르소글라딘; 이소벤가졸; 이소호모할리콘드린 B; 이타세트론; 자스플라키놀리드; 카할랄리드 F; 라멜라린-N 트리아세테이트; 란레오티드; 레이나마이신; 레노그라스팀; 렌티난 술페이트; 렙톨스타틴; 레트로졸; 류프롤리드 및 에스트로겐 및 프로게스테론; 류프로렐린; 레바미졸; LFA-3TIP(Biogen, Cambridge, MA; 국제공개번호 WO 93/0686 및 미국특허번호 6,162,432); 리아로졸; 선형 폴리아민 유사체; 친유성 이당 펩티드; 친유성 백금 화합물류; 리소클린아미드 7; 로바플라틴; 롬브리신; 로메트렉솔; 로니다민; 로속산트론; 로바스타틴; 록소리빈; 루르토테칸; 루테튬 텍사피린; 리소필린; 세포용해 펩티드류; 마이탄신; 만노스타틴 A; 마리마스타트; 마소프로콜; 마트릴리신 억제제류; 매트릭스 금속 로프로테이나제 억제제류; 메노가릴; 메르바론; 메테렐린; 메토클로프라미드; MIF 억제제; 미페프리스톤; 밀테포신; 미리모스팀; 미스매치 이중가닥 RNA; 미토구아존; 미토락톨; 미토나피드; 미토톡신 섬유아세포 성장인자-사포린; 모파로텐; 몰그라모스팀; 모노포스포릴 리피드 A+미오박테리아 세포벽 sk; 모피다몰; 다중 약물 내성 유전자 억제제; 다중 종양 억제인자 1-기반 요법; 머스타드 항암제; 미카페록시드 B; 미코박테리아 세포벽 추출물; 미리아포론; N-아세틸디날린; N-치환 벤자미드류; 나파렐린; 나그레스팁; 날록손+펜타조신; 나파빈; 나프테르핀; 나르토그라스팀; 네다플라틴; 네모루비신; 네리드론산; 닐루타미드; 니사마이신; 산화질소 조정제류; 니트록시드 항산화제; 니트률린; O6-벤질구아닌; 옥트레오티드; 오키세논; 올리고뉴클레오티드류; 오나프리스톤; 오라신; 경구 사이토카인 유도제; 오르마플라틴; 오사테론; 옥사우노마이신; 파클리탁셀; 파클리탁셀 유사체류; 파클리탁셀 유도체류; 팔라우아민; 팔미토일리족신; 파미드론산; 파낙실트리올; 파노미펜; 파라박틴; 파젤립틴; 펠데신; 펜토산 폴리술페이트 나트륨; 펜트로졸; 퍼플루브론; 퍼포스파미드; 페릴릴 알코올; 페나지오마이신; 페닐아세테이트; 포스파타제 억제제류; 피시바닐; 필로카인 염산염; 피라루비신; 피리트렉심; 플라세틴 A; 플라세틴 B; 백금 복합체; 백금 화합물류; 백금-트리아민 복합체; 포르피메르 나트륨; 포르피로마이신; 프레드니손; 프로필 비스-아크리돈; 프로스타글란딘 J2; 프로테아솜 억제제류; 단백질 A-기반 면역 조정제; 단백질 키나제 C 억제제류, 미크로알갈; 단백질 티로신 포스파타제 억제제류; 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 억제제류; 퓨르퓨린류; 피라졸로아크리딘; 피리독실화 헤모글로빈 폴리옥시에틸렌 콘쥬게이트; raf 길항제류; 랄티트렉세드; 라모세트론; ras 파르네실 단백질 트랜스페라제 억제제류; ras 억제제류; ras-GAP 억제제; 레텔립틴 디메틸화; 레늄 Re 186 에티드로네이트; 리족신; RII 레틴아미드; 로글레티미드; 로히튜킨; 로뮤르티드; 로퀴니멕스; 루비기논 B1; 루복실; 사핀골; 사인토핀; SarCNU; 사르코피톨 A; 사르그라모스팀; Sdi 1 의태체류; 세뮤스틴; 세네센스 유래 억제제 1; 센스 올리고뉴클레오티드류; 신호 변환 억제제류; 신호 변환 조정제류; 감마 분비효소 억제제류, 시조피란; 소부족산; 나트륨 보로캅테이트; 나트륨 페닐아세테이트; 솔베롤; 소네르민; 스파르포스산; 스피카마이신 D; 스피로뮤스틴; 스플레노펜틴; 스폰지스타틴 1; 스쿠알라민; 줄기세포 억제제; 줄기세포 분열 억제제류; 스티피아미드; 스트로멜리신 억제제류; 술피노신; 초활성 바소활성 장 펩티드 길항제; 수라디스타; 수라민; 스와인소닌; 합성 글리코사미노글리칸류; 탈리뮤스틴; 류코보린; 타목시펜 메티오디드; 타우로뮤스틴; 타자로텐; 테코갈란 나트륨; 테가푸르; 텔루라피릴륨; 텔로머라제 억제제류; 테모포르핀; 테트라클로로데카옥시드; 테트라조민; 탈리블라스틴; 티오코랄린; 트롬보포이에틴; 트롬보포이에틴 의태체; 티말파신; 티모포이에틴 수용체 효현제; 티모트리난; 주석에틸 에티오퓨르퓨린; 티라파자민; 티타노신 비클로라이드; 톱센틴; 토레미펜; 토티포텐트 줄기세포 인자; 번역 억제제류; 트리아세틸우리딘; 트리시리빈; 트리메트렉세이트; 트립토렐린; 트로피세트론; 투로스테리드; 티로신 키나제 억제제류; 티르포스틴; UBC 억제제류; 유베니멕스; 유로키나제 수용체 길항제류; 바프레오티드; 바리올린 B; 벡터 시스템, 적혈구 유전자 요법; 탈리도미드; 벨라레솔; 베라민; 베르딘류; 베르테포르핀; 빈잘틴; 보로졸; 자노테론; 제니플라틴; 질라스코르브; 및 지노스타틴 스티말라메르를 포함한다.

[0061] 본 발명에 따라서, Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자는 바람직하게는 비경구 투여 경로에 의해 환자에게 투여된다. 비경구 투여는 주사, 주입 등에 의한 투여를 포함해서, 소화관을 통한 것이 아닌(즉, 장관이 아닌) 투여 경로를 포함한다. 주사에 의한 투여는, 예를 들어 정맥(정

맥내), 동맥(동맥내), 근육(근육내) 및 피부밑(피하)에 주사하는 것을 포함한다. 또한, 항원 결합 분자는 원하는 약리학적 효과를 획득하는데 충분한 용량으로, 데포(depot) 또는 서방형 제제로, 예를 들어 피하, 피내 또는 근육내 투여될 수 있다.

[0062] 본 발명의 한 구체예에서, 항원 결합 분자는 변형된 Fc 영역, 더 구체적으로는 증진된 이펙터 기능, 예를 들어 Fc 수용체에 대한 증진된 결합 친화성, 항체-의존성 세포 세포독성(ADCC) 및 보체-의존성 세포독성(CDC)을 제공하도록 변형된 Fc 영역을 포함한다. 항체의 IgG 부류에 대하여, 이런 이펙터 기능들은 다양한 면역세포에서 발현되는 Fcγ수용체(FcγR)라고 하는 수용체 패밀리와 Fc 영역의 맞물림에 의해서 관장된다. Fc/FcγR 복합체의 형성은 이들 세포를 결합된 항원의 부위로 동원하며, 그 결과 전형적으로 신호화와 면역반응이 이어진다. 이펙터 기능을 증진시키기 위하여, 특히 "모" Fc 영역에 비해 ADCC 및/또는 CDC 활성을 변경하기 위하여 항체 Fc 영역에 대한 FcγR의 결합 친화성을 최적화하는 방법은 당업자에게 잘 공지되어 있다. 예를 들어, Fc 영역의 결합 친화성의 최적화 과정이 Niwa *et al.*[34], Lazar *et al.*[35], Shields *et al.*[36] 및 Desjarlais *et al.*[37]에 의해 설명된다. 이들 방법은 관련 Fc 수용체와의 상호작용이 증진되고 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 및 항체-의존성 세포-매개 포식작용(ADCP)을 촉진할 수 있는 가능성이 증가하도록 하는 항체의 Fc 영역의 변형을 포함할 수 있다[34]. 또한, Fc 영역의 보존된 Asn^{297}에서 IgG1 항체에 공유 부착된 올리고당의 변형 후 ADCC 활성의 증진이 설명되었다[35,36]. 다른 방법은 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 항체를 본래 생산하는 셀라인의 사용을 포함한다(예를 들어, 바이러스 백신 생산을 위한 Duck 배아 유래 줄기세포, WO/2008/129058; 조류 EBX® 세포에서 재조합 단백질 생산, WO/2008/142124). CDC 활성을 증진시키는 방법은 IgG3 하위부류의 일부분들을 IgG1 하위부류의 상응하는 영역에 도입하는 동형 키메라화를 포함할 수 있다(예를 들어, 재조합 항체 조성물, US2007148165).

[0063] 다른 양태로서, 본 발명은 IL-3Rα(CD123)를 발현하는 백혈병 줄기세포의 억제에서, 또는 억제를 위한 의약의 제조에서 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자의 사용을 제공하며, 이때 상기 항원 결합 분자는 IL-3Rα(CD123)에 선택적으로 결합한다.

[0064] 이 양태에서, 본 발명은 또 환자에서 혈액암 상태의 치료에서, 또는 치료를 위한 의약의 제조에서 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자의 사용을 제공하며, 이때 상기 항원 결합 분자는 IL-3Rα(CD123)에 선택적으로 결합한다.

[0065] 또 다른 양태에서, 본 발명은 IL-3Rα(CD123)를 발현하는 백혈병 줄기세포의 억제를 위한 제제를 제공하며, 상기 제제는 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자를 포함하고, 이때 상기 항원 결합 분자는 IL-3Rα(CD123)에 선택적으로 결합한다.

[0066] 이 양태에서, 본 발명은 또 환자에서 혈액암 상태의 치료를 위한 제제를 제공하며, 상기 제제는 Fc 영역 또는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 변형된 Fc 영역을 포함하는 항원 결합 분자를 포함하고, 이때 상기 항원 결합 분자는 IL-3Rα(CD123)에 선택적으로 결합한다.

[0067] 본 발명의 이 양태의 제제는 하나 이상의 제약학적으로 허용되는 부형제 및/또는 희석제와 함께 항원 결합 분자를 포함하는 제약 조성물일 수 있다.

[0068] 비경구 투여에 적합한 조성물은 편의상 활성 성분의 멸균 수성 조제물을 포함하며, 이것은 수여자의 혈액과 등장성인 것이 바람직하다. 이런 수성 조제물은 적합한 분산제 또는 습윤제와 현탁제를 사용하여 공지된 방법에 따라서 조제될 수 있다. 또한, 멸균 주사 조제물은 비독성 비경구 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액일 수 있으며, 예를 들어 폴리에틸렌글리콜 및 락트산에 용해된 용액일 수 있다. 허용되는 비히클 및 용매 중에서도 특히 물, 링거 용액, 적합한 탄수화물(예를 들어, 수크로스, 말토스, 트레할로스, 글루코스) 및 등장 염화나트륨 용액이 사용될 수 있다. 이에 더하여, 멸균된 고정유가 용매 또는 현탁 매질로서 편리하게 사용된다. 이 목적을 위하여, 합성 모노- 또는 디-글리세리드를 포함하는 어떤 저자극성 고정유가 사용될 수 있다. 이에 더하여, 올레산 등과 같은 지방산도 주사제의 조제에서 사용된다.

[0069] 이러한 치료 조성물의 제제는 당업자에게 잘 공지되어 있다. 적합한 제약학적으로 허용되는 담체 및/또는 희석제는 종래의 용매, 분산 매질, 필러, 고형 담체, 수성 용액, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수지연제 등 중 어느 것 및 이들 모두를 포함한다. 제약학적 활성 물질에 맞는 이러한 매질 및 제제의 사용은 본 분야에 잘 공지되어 있으며, 예를 들어 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Mack Publishing Company, Pennsylvania, USA에 설명된다. 종래의 매질이나 제제가 활성 성분과 양립될 수 없는 경우를 제외하면, 본 발명의 제약 조성물에서 이들의 사용이 고려된다. 또한, 보충적인 활성 성분이 조성물에 혼입될

수도 있다.

[0070] 본 명세서 및 그 후의 청구범위를 통틀어서, 문맥상 다른 의미가 필요하지 않다면, 단어 "들을 포함하다" 또는 "을 포함하다" 또는 "포함하는"과 같은 변형들은 서술된 정수 또는 단계나 정수들 또는 단계들의 군을 포함한다는 의미이고, 어떤 다른 정수 또는 단계나 정수들 또는 단계들의 군을 배제하지 않는 것으로 이해될 것이다.

[0071] 본 명세서에서 어떤 선행 간행물(또는 그로부터 유래하는 정보), 또는 공지된 어떤 내용에 대한 언급은 그 선행 간행물(또는 그로부터 유래하는 정보) 또는 공지된 내용이 본 명세서가 관련된 연구 분야에서의 일반적인 공통된 지식의 부분을 형성한다는 승인 또는 인정 또는 어떤 형태의 제안으로서 해석되지 않으며, 해석되어서도 안 된다.

[0072] 본 발명은 다음의 비제한적 실시예에 의해 더 예시된다.

[0073] **실시예 1**

[0074] 이 실시예는 AML-LSC와 HSC 간의 CD123 발현과 기능에 있어서의 명백한 차이를 이용하는 MAb 7G3의 능력을 증명한다. MAb 7G3은 1차 AML 세포의 IL-3 신호화 경로 및 증식을 억제한다. 이에 더하여, NOD/SCID 이종이식 모델에서 AML 아세포의 귀소 및 생착이 MAb 7G3에 의해 상당히 감소되며, LSC 기능이 억제된다.

[0075] **방법**

[0076] **AML 환자 샘플, 정상 조혈세포, 및 셀라인**

[0077] 성분채집 제품, 골수 또는 말초혈 샘플을 새로 진단된 AML 환자와 재발된 AML 환자로부터 얻었다. 협회 가이드라인에 따라 서면동의서 작성 후 환자 샘플을 수집했고, 연구들은 Royal Adelaide Hospital 인도적 윤리위원회, Melbourne Health 인도적 연구 윤리위원회, University Health Network 연구 윤리위원회, 그리고 South Eastern Sydney & Illawarra Area Health Service 인도적 연구 윤리위원회에 의해 승인되었다. 진단은 세포형태학, 세포유전학, 백혈구 항원 발현을 사용하여 수행하였고, 프랑스인-미국인-영국인(FAB) 분류에 따라서 평가하였다. Lymphoprep 또는 Ficoll 밀도 구배 분리에 의해 단핵세포를 부화시키고, 액체 질소에서 냉동시켰다. 인간 제대혈과 BM 세포를 각각 정상분만 환자 또는 고관절치환술을 받은 동의한 환자로부터, 또는 Cambrex(US)로부터 상업적으로 얻은 다음, 이전에 설명된 대로 가공했다[38].

[0078] **증식 분석**

[0079] IL-3 또는 GM-CSF에 대한 AML 세포 성장 반응을 이전에 설명된 대로 [^{3}H]-티미딘 분석에 의해 측정하였다[39]. 간단히 말해서, 96웰 플레이트에서 웰 당 $2x10^{4}$ 단핵세포를 37℃, 5% 이산화탄소에서 48시간 동안 200㎕ IMDM + 10% 열 불활성화 태아 소 혈청(HI-FCS)(Hyclone, 유타) 중에서 0.001-10nM 7G3 또는 동형-매치된 대조군 BM4(IgG2a)의 존재하에 IL-3(1nM) 또는 GM-CSF(0.1nM)로 자극하고, 배양 마지막 6시간 동안에는 0.5μCi의 ^{3}H-티미딘(MP Biomedicals, 호주 뉴사우스웨스트)을 첨가했다. 세포를 Packard Filtermate 세포 수거기(Perkin Elmer, 호주 빅토리아)를 사용하여 유리섬유 종이 위에 부착시킨 다음, Top Count(Perkin Elmer)를 사용하여 계수했다. 모든 사이토카인 및 항체는 상업적으로 얻거나(R&D Systems, 미네아폴리스, MN), CSL Limited(호주 멜버른)에서 제공되었다.

[0080] **사이토카인 신호화**

[0081] 신호화 단백질의 인산화를 면역침전 및 면역블롯에 의해 검출했다. TF-1 세포와 AML MNC 세포를 세척하고, 18시간 동안 성장인자의 부재하에 0.5% HI-FCS(Hyclone, 유타) 또는 0.5% 인간 알부민(CSL, 호주 멜버른)과 함께 IMDM 배지 중에서 휴지상태로 만들었다. 100백만 개의 세포를 얼음 위에서 30분 동안 IgG2a(100nM), 9F5, 6H6(비-차단 항-CD123 항체), 또는 7G3(0.0001-100nM)과 함께 인큐베이션한 다음, 37℃에서 15분 동안 50ng/mL

IL-3로 자극했다. 세포를 NP-40 세포용해 버퍼[40]에서 용해시키고, 인간 베타$_c$(CD131)를 Sepharose 비드에 콘쥬게이트된 1C1 및 8E4 항체를 사용하여 면역침전시켰다. 면역침전물에 이전에 설명된 대로[41] SDS-PAGE 및 면역블롯팅을 수행하였다. 면역블롯의 프로브에 사용된 항체는 4G10, 항포스포티로신 MAb(Upstate Biotech, 레이크플래시드, NY); 항-포스포-Akt Ser473(Cell Signaling, 비버리, MA); 및 항-포스포릴화 신호 변환제 및 전사 5(STAT-5) MAb의 활성제(Zymed, 샌프란시스코, CA)였다. 모든 항체는 제조자의 지시에 따라서 사용하였다. 신호는 강화된 화학발광(ECL; Amersham Pharmacia 또는 West Dura, Pierce)을 사용하여 발생시켰다.

[0082] 또한, STAT-5 활성화를 백혈병 셀라인 MO7e과 TF1 그리고 1차 AML 세포 상에서 세포내 FACS에 의해 검출했다. 세포를 60분 동안 MEDM + 10% FCS 및 10ng/mL huIL-3(CSL, 호주 멜버른) 중에서 인큐베이션하고, BD Cytofix™ 버퍼(Becton- Dickinson)로 고정시킨 다음, 메탄올 투과화시켰다. 다음에, 항-포스포 STAT-5(Becton-Dickinson)로 세포를 염색하고, FACSCalibur(Becton-Dickinson) 기기를 사용하여 분석했다.

[0083] **생체외 항체 치료**

[0084] 해동된 AML 또는 정상 조혈세포를 37℃에서 15-20% BIT(Stem Cell Technologies, 캐나다 밴쿠버)로 보충된 X-VIVO 10(Cambrex BioScience) 중에서 2시간 동안 대조군 IgG2a 또는 7G3(10㎍/mL)과 함께 인큐베이션하고, 이것을 치사량 이하의 방사선 조사된 NOD/SCID 마우스에 정맥내 이식한 다음, 재증식 분석을 수행하였다(아래 참조). 4-10주째에 두 상이한 시간 포인트에서 생착을 측정하였다.

[0085] **AML의 생체내 항체 치료**

[0086] 생체내 시험을 위하여, 대조군 IgG2a 또는 7G3(주사 당 300-500㎍)을 각 도면 설명에 설명된 일정대로 주 3회 마우스에 복강내(i.p.) 주사했다. 7G3과 시타라빈(Ara-C) 병용의 가능한 상승적 효과를 조사하기 위하여, 이식 후 35일째에 항체 500㎍을 3일 연속하여 하루 한번 주사하고, 이어서 5일 연속하여 40mg/kg/d로 Ara-C를 복강내 주사했다. 다시 4주 동안 주 3회씩 주사 당 500㎍으로 항체 치료를 다시 재개했고, 이후 마지막 항체 주사 후 3일 뒤에 생착을 측정하였다.

[0087] **NOD/SCID 마우스에 인간 세포의 이종이식**

[0088] University Health Network/Princess Margaret Hospital의 동물관리위원회 또는 University of New South Wales의 동물관리 윤리위원회에 의해 승인된 협회 가이드라인에 따라서 동물 연구를 수행하였다. NOD/SCID 마우스에 인간 세포의 이종이식을 이전에 설명된 대로 수행하였다[38]. 간단히 말해서, 모든 마우스에 치사량 이하의 방사선 조사(250-350cGy)를 행하고, 24시간 뒤에 마우스 당 5-10백만 개의 인간 세포를 정맥내(i.v.) 또는 대퇴골내 이식했다. 하이브리도마 셀라인 TM-베타1(Hyogo University of Health Sciences의 T. Tanaka 교수에 의해 풍부하게 제공됨)[42]로부터 항-CD122 항체를 정제하고, 이전에 설명된 대로[43] 자연 킬러 세포 고갈을 위해 조사 직후 200㎍을 마우스에 복강내 주사했다. 유사하게, 마우스 당 8백만 개의 정상 골수세포, 또는 백만 개의 분별된 $CD34^+$ 정상 골수 세포, 또는 $3x10^5$ 계통 고갈된 $CD34^+$ 정상 제대혈 세포를 정맥내 이식했다. 뮤린 골수, 말초혈, 간 및 비장에서 인간 AML과 정상 조혈세포의 생착 수준을 유세포분석에 의해 $hCD45^+$ 세포의 퍼센트에 기초하여 평가했다. 또한, LSC 활성에 대한 7G3 효과를 측정하기 위해, IgG2a 또는 7G3 치료군에 속한 이미 생착된 마우스의 골수로부터 분리된 동일한 수의 인간 세포(9백만 개 세포/마우스)를 정맥내 이식하여 2차 이식을 수행하였다.

[0089] **귀소 분석**

[0090] 1차 환자 샘플로부터 또는 생착된 마우스로부터 수거된 동일한 수의 인간 세포를 치사량 이하의 방사선 조사된 NOD/SCID 마우스에 정맥내 주사했다. 주사 후 16-24시간 뒤에 수여자 마우스의 골수, 비장 및 말초혈로부터의 단핵화된 세포를 유세포 분석에 의해 분석했으며, 인간 세포에 대해서는 $5x10^4$ - $1x10^5$ 수집된 사건을 이용한다.

특정 기관에서 발견된 주사된 세포의 퍼센트를 측정하고, 식에 따라 계산하여 인간 세포의 마우스 조직으로의 귀소 효율을 측정했고: 식은 조직에서 평가된 $huCD45^+$ 세포의 % x 특정 조직 내 세포의 총수/주사된 인간 세포의 총수 x 100이다[44-46].

[0091] **세포 염색 및 유세포분석**

[0092] 치료된 마우스의 골수, 비장, 간 및 말초혈로부터의 세포를 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)-콘쥬게이트 항뮤린 및 피코에리트린-시아닌 5(PC5, Beckman-Coulter) 또는 알로피코시아닌(APC, BioLegend 및 Becton-Dickinson) 콘쥬게이트 항-인간 항체로 이전에 설명된 대로 염색했다[2]. 피코에리트린(PE) 콘쥬게이트 항-인간 CD123 항체(클론 9F5)를 사용하여 CD123 발현을 측정했다. 7G3 치료된 마우스로부터 회수된 인간 세포 상의 7G3 결합을 9F5-PE 또는 7G3-PE로 샘플을 중복 염색하여 측정했는데, 이것은 2개의 클론이 완전히 별개의 에피토프와 결합하여 미치료 1차 세포(데이터 도시하지 않음)에 대해서 유사한 수준의 형광을 생성하기 때문이다. 식: [(9F5-PE 검출된 CD123의 RFI) - (7G3-PE 검출된 CD123의 RFI)] ÷(9F5-PE 검출된 CD123의 RFI) x 100에 의해 7G3 결합 수준을 계산했다. 면역표현형 및 줄기세포 집단을 일군의 항-인간 항체, 즉 항-CD15-FITC, PE에 콘쥬게이트된 항-CD14, 항-CD19-PE, 항-CD33-PE, 항-CD34-FITC 또는 항-CD34-PC5, 그리고 항-CD38-PE 또는 PE-시아닌 7(다른 말이 없으면 모든 항체는 Becton-Dickinson에서 입수)을 사용하여 확인했다. 동형 대조군 항체를 사용하여 음성 세포의 99.9%를 배제시키고, FACScan 또는 FACS Calibur 유세포분석기(Becton-Dickinson)를 사용하여 세포를 분석했다.

[0093]

[0094] **통계 분석**

[0095] 데이터는 평균±s.e.m.으로 표시된다. 그룹 간 차이의 유의성은 스튜던트 티-테스트를 사용하여 결정했다.

[0096] **결과**

[0097] **단클론성 항체 7G3은 IL-3-의존성 셀라인과 1차 AML 세포에서 IL-3-매개된 신호화를 차단한다.**

[0098] IL-3 수용체 알파 서브유닛(IL-3R알파, CD123)에 대해 생긴 단클론성 항체 7G3은 CD123에 대한 IL-3 결합을 억제할 뿐만 아니라, 백혈병 셀라인(TF-1)의 증식, 인간 호염기구로부터 히스타민 방출, 및 내피세포 활성화를 포함하여 시험관내 IL-3-매개된 효과들을 억제한다고 이미 알려져 있다[33]. 이런 발견들과 일치하여 MAb 7G3이 TF-1 세포 및 1차 인간 AML 세포에서 세포내 신호화를 억제한다는 것이 이제 밝혀졌다. 성장인자-고갈된 TF-1 세포를 IL-3(1nM)으로 자극하면 수용체 베타 서브유닛(CD131)의 티로신 인산화, 및 세포 증식과 생존에서 역할을 하는 STAT-5 및 Akt 하류 신호화 분자의 활성화가 초래된다**(도 6a)**. CD131 티로신 인산화와 STAT-5 및 Akt 활성화가 세포를 1nM의 7G3과 함께 인큐베이션함으로써 억제되었으며, 10nM에서는 더 감소되었고, 100nM 농도에서는 완전히 차단되었는데, 이것은 7G3에 대해 보고된 900pM의 Kd와 일치한다[33]. IL-3 결합을 차단하지 않는 CD123에 대한 2개의 불량한 중화 항체, 즉 9F5와 6H6은 IL-3-매개된 신호화를 억제하는데 비효과적이었다(**도 6a**). 또, IL-3-의존성 백혈병 셀라인 TF-1 및 M07e에서 7G3에 의한 STAT-5의 IL-3-자극된 인산화의 억제가 유세포분석에 의해 증명되었다(**도 6b**). 중요한 것은 MAb 7G3이 농도-의존적 방식으로 1차 AML 세포에서 세포 생존을 촉진하는데 연관된 신호[40]인 CD131의 티로신 577의 IL-3-의존성 인산화를 선택적으로 억제했다는 점이다(**도 6a**). 유사하게, 7G3은 또한 유세포분석에 의해 측정된 대로, 1차 AML 세포에서 IL-3-자극된 STAT-5 인산화를 감소시켰다(**도 6b**). MAb 7G3에 의한 IL-3 신호화의 이런 선택적 억제는 IL-3 결합을 차단하는 능력과 일치하며, CD131(베타 사슬)을 발현하지 않는다고 이전에 보고된[25] 백혈병 줄기세포가 CD123(알파 사슬)을 통해 배타적으로 신호화될 수 있는지의 여부에 관한 중요한 문제를 낳았다.

[0099] **CD123(IL-3 수용체 알파 사슬)은 AML 백혈병 줄기세포 상에서 CD131(수용체 베타 사슬)과 함께 발현된다**

[0100] AML 환자로부터의 $CD34^+/CD38^-$ 세포에서 CD123의 과발현이 광범하게 보고되었으며[17-21], 일부 연구들에서는 백혈

병 $CD34^+/CD38^-$ 줄기세포(LSC)의 마커로서 제안되었다[24,25]. 본 연구에서는 다수의 AML 샘플에서 CD123 발현을 두 상이한 연구실에서 독립적으로 측정하였다. AML $CD34^+/CD38^-$ 세포(RFI 67.7±24.2, n = 9) 상에서 CD123 발현은 정상 조혈 $CD34^+/CD38^-$ 세포(RFI 17.1±8.6, n = 4, P = 0.21)(아래 표 1에 데이터 요약)에서보다 상당히 더 높았으며, 이것은 다른 보고서들과도 일치한다[17-21,24,25]. 이런 과발현은, GM-CSF 수용체 알파 사슬(CD116)은 유세포분석에 의해 측정했을 때, AML 샘플의 동등한 집단에서 발현되지 않았다는 점에서 선택적인 듯 보인다. 대신에, GM-CSF 수용체 알파 사슬은 $CD34^-$ 아세포에서 풍부하게 발현되었다(데이터 도시하지 않음). 또한, 유세포분석 및 PCR 분석은 CD123을 발현하는 $CD34^+$ 세포는 CD131도 발현한다는 것을 증명했는데(데이터 도시하지 않음), 이는 신호 변환이 CD123만을 통해서가 아니라 종래의 이종이량체 IL-3 수용체를 통해서 발생된다는 것을 시사하며, 이것은 또한 CD131 인산화 데이터에 의해서도 뒷받침된다(**도 1a**). 또, 정상 및 악성 $CD34^+/CD38^-$ 선조세포 간의 CD123 발현 수준에 있어서의 차이는 7G3이 정상 조혈줄기세포가 아니라 LSC를 선택적으로 표적화하는 기초를 제공한다.

[0101] **7G3은 시험관내에서 1차 AML 샘플의 자발적 및 IL-3-유도된 증식을 억제한다**

[0102] IL-3-유도된 증식을 억제하는 7G3의 능력을 38개의 1차 AML 환자 샘플을 사용하여 조사했다. 3개의 1차 샘플에 대한 대표 플롯이 **도 1b-d**에 도시된다. 7G3은 35개 샘플 중 32개에서 IL-3-유도된 증식을 억제했지만(**도 1e**), GM-CSF-자극된 성장은 억제하지 않았다(**도 1b-d**). 외인성 추가된 성장인자의 부재하에 7G3은 또한 일부 AML 샘플 유래 세포의 성장을 억제했다. 시험된 1차 샘플 중 9개에서 7G3 및 IL-3의 존재는 50-75%의 범위에서 내인성 수준의 약 60%까지 증식을 감소시켰는데(**도 1e**), 이는 자가분비 경로를 시사한다. 6H6 항체의 불량한 차단은 IL-3-유도된 증식을 억제하지 않았다(데이터 도시하지 않음). 7G3 항체의 Kd(약 900pM)[33]는 증식을 억제하는데 필요한 농도와 잘 일치했다(**도 1b-d**). 전체적으로, 7G3는 대부분의 1차 AML 샘플에서 IL-3-매개된 성장뿐만 아니라 자발적 성장(IL-3 미첨가)을 억제하는데 효과적이었는데, 이는 일부 AML 세포들이 IL-3를 구성적으로 생산한다는 것을 시사하거나, 또는 7G3이 이들 세포에서 음성 신호를 촉발한다는 것을 시사한다.

[0103] **7G3을 사용한 사전 치료는 NOD/SCID 마우스에서 AML 생착은 억제하지만 정상조혈세포 생착은 억제하지 않는다**

[0104] 면역-결핍 마우스에서 재증식되는 정상 및 악성 세포의 능력에 대한 7G3의 효과를 평가하기 위하여, 1차 AML 및 정상 골수(NBM) 또는 탯줄 제대혈(CB) 세포를 7G3 또는 관련 없는 IgG2a(10㎍/mL, 2시간)와 함께 생체외 인큐베이션한 다음, 치사량 이하의 방사선 조사된 NOD/SCID 마우스에 이식했다. 생체외 7G3 인큐베이션은 10개의 1차 AML 샘플 중 9개의 생착을 현저히 감소시켰으며, 대조군은 접종 후 4-8주 뒤에 골수 생착의 증거를 나타냈다(대조군에 비해 평균 89.7±1.9% 감소, P = 0.013, **도 2a** 및 **표 1**). 이런 생착 감소는 접종 8 내지 12주 후에 평가되었을 때 샘플의 6/7에서 지속되었다. 반대로, 접종 후 4-11주 뒤에 7G3은 5개의 정상 샘플 중 3개의 생착에 대해서는 유의한 억제 효과가 없었고, 2개의 NBM에 대한 적은 효과는 통계적 유의성에는 미쳤지만, 그 억제는 AML 세포와 비교했을 때 훨씬 덜 두드러졌다(**도 2b** 및 **표 1**). 생체외 7G3 치료는 IgG2a 대조군에 비하여 평균 23.5±8.9%(P = 0.078)까지 정상 조혈세포 생착을 감소시켰다. NBM 중 3개에 대한 다계통 생착을 CD33, CD19 및 CD3 발현을 모니터하여 측정했는데, IgG2a와 7G3 치료군 간에 유의한 차이는 발견되지 않았다(데이터 도시하지 않음).

[0105] 생체외 7G3 치료는 진단과 재발의 두 경우 수거된 AML-8의 생착을 유사한 정도로 억제했는데, 이는 진단 및 재발 샘플이 모두 7G3 치료에 대해 비슷한 민감도를 가질 수 있다는 것을 나타낸다. AML-5는 생착이 생체외 7G3 치료에 의해 감소되지 않은 유일한 AML 샘플인데, 이것은 이 샘플이 높은 비율의 LSC($CD34^+/CD38^-$)와 평가된 모든 AML 샘플 중 가장 낮은 CD123 발현을 나타낸 것에 원인이 있을 수 있다(**표 1**). 전체적으로, 이런 결과는 AML LSC와 비교하여 7G3 치료에 대한 정상 조혈줄기세포의 감소된 민감도를 증명한다.

[0106] 또한, 생체외 7G3 치료에 의해 야기된 AML 생착의 감소는 개선된 생존과도 관련되었다. IgG2a 또는 7G3 치료된 AML-9 세포가 이식된 마우스는 각각 11.5 및 24주의 생존 중간값을 나타냈으며(P = 0.0188, n = 10, 각 그룹에 대해, **도 2c**), 20주를 넘어 생존한 마우스가 없는 대조군과는 달리, 7G3 그룹의 40%는 실험 종점(25주)을 지나서도 생존했다.

[0107] AML 또는 정상 조혈세포의 생착에 대한 생체외 7G3 치료의 억제 효과는 $CD34^+$/ $CD38^-$ 집단 상에서의 CD123 발현의 강도와 역으로 관련되며, 유의한 관계성을 가진다(**도 7**; R = -0.68, P = 0.0051). 이원 패턴이 보이는데, 이는 7G3에 의해 생착이 엄격히 억제되었던 AML 샘플에 대해서 CD123 발현이 일반적으로 높았음을 증명한다. 반대로, 7G3에 의해서 생착에 그다지 영향 받지 않은 하나의 AML 샘플(AML-5)과 정상 조혈 샘플은 일반적으로 CD123을 낮은 수준으로 발현했다.

[0108] **7G3은 NOD/SCID 마우스에서 AML 귀소 능력을 억제한다**

[0109] 골수 및 비장으로 돌아가는 정맥내 접종된 AML 세포의 능력에 대한 7G3의 효과를 측정하기 위하여, 생체외 치료된 AML-8-rel 및 AML-9 세포를 이식하고, 24시간 뒤에 마우스를 안락사 시키고 시험했다. 7G3은 동형 치료된 대조군과 비교하여 46-93%까지 골수로의 귀소를 유의하게 감소시켰고($P < 0.05$), 한편 비장으로의 귀소는 대조군의 35-90%까지 감소되었지만, 차이는 통계적으로 유의하지 않았다($P > 0.05$)(**도 2d**). 접종 24시간 후에 골수와 비장에 자리잡은 백혈병 세포는 주로 $CD34^+$ 원시 세포였고, 7G3은 골수 내 세포의 수를 감소시켰지만, 거주중인 세포의 세포 표면 표현형을 변경하지는 않았다(데이터 도시하지 않음).

[0110] 골수로의 AML 귀소에 대한 7G3의 효과를 더욱 특정하기 위하여, AML-8-rel 세포를 7G3 또는 동형 대조군 항체에 노출시킨 후, 꼬리 정맥(IV)을 통해서, 아니면 우측 대퇴골(RF)에 직접 이식하고, 5주 후에 동물을 안락사 시켰다. **도 2e**는 대퇴골 주사와 비대퇴골 주사 모두에서 생착을 유의하게 감소시키는데 7G3이 여전히 효과적이었지만, 대퇴골내 접종은 IV 접종에 비해 생착에 대한 7G3의 억제 효과가 약화되었음을 보여준다. AML-LSC의 7G3 억제를 더 직접적으로 증명하기 위하여, 우리는 $CD34^+CD38^-$ 세포에 대한 7G3 치료의 영향을 조사했는데, 이는 AML-LSC(NOD/SCID 마우스에서 인간 질환을 재현하는 능력에 의해서 정의된 대로)가 이 부분에서 유의하게 부화되기 때문이다[2,3]. BM으로 돌아간 AML-8-rel 및 AML-9로부터 $CD34^+CD38^-$ 세포의 수는 생체외 7G3 치료에 의해서 각각 대조군의 8.4±0.018% 및 12.0±4.3%까지 감소되었다(P = 0.16 및 0.013, **도 2f**). 유사하게, 비장으로 돌아간 AML-9 $CD34^+CD38^-$ 세포의 수는 대조군의 3.8±1.5%까지 감소되었다($P = 0.019$). 이런 발견을 더 확인하기 위하여, AML-9로부터 분별된 다음, IgG2a 또는 7G3으로 생체외 치료하여 NOD/SCID 마우스에 주사한 $CD34^+CD38^-$ 세포를 사용하여 귀소 실험을 반복하였다. 7G3 치료군에서 인간 세포의 귀소 효율은 BM에서 IgG2a 대조군의 7.8±1.7%까지, 비장에서 11.2±0.84%까지 감소되었다($P = 0.09$)(**도 2g**). 따라서, CD123은 뒷받침되는 미소환경에 따라 AML NOD/SCID 백혈병-개시 세포(SL-IC)의 귀소에 있어서 그리고 NOD/SCID 마우스에서 질환의 확립 및 전파에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

[0111] **7G3의 조기 투여는 NOD/SCID 마우스에서 AML 생착을 감소시킨다**

[0112] NOD/SCID 마우스의 7G3 치료가 AML 세포 생착에 영향을 미쳤는지의 여부를 결정하기 위해, 마우스에 7G3 또는 동형 대조군 항체(300㎍)를 한번 복강내 주사하여 투여한 후, 6시간 후에 AML-1 세포를 IV 이식했다. 7G3 치료는 골수에서 생착을 거의 완전히 제거하였고, 이식 5주 후에는 대조군의 1.3±0.9%까지 제거되었다(P = 0.0006, n = 5, **도 3a**)

[0113] 또한, NOD/SCID 마우스에서 AML의 진행을 제어하는데 있어서 7G3의 효능을 이식 후 24시간 또는 4일째에 치료를 개시하여 시험했는데, 치료 개시 전에는 SL-IC가 골수 미소환경으로 돌아가는 것이 허용된다고 가정한다[44-46]. 이식 후 24시간째에 치료를 개시한 경우에는 3개의 AML 샘플 중 2개에서 생착이 감소되었다. 4회 용량을 격일로 투여한 이 치료 섭생에서는 AML-2 및 AML-3의 생착이 각각 대조군의 41.1±27.1%(P = 0.096) 및 39.6±10.0%(P = 0.026)까지 감소되었지만, AML-1의 생착에는 영향이 없었다(**도 3b**).

[0114] 이식 후의 두 치료 섭생에서 7G3의 효과는 비교적 온건했지만, 마우스 골수로부터 수거된 AML 세포 상의 7G3 코팅은 의심할 여지 없이 분명했다(데이터 도시하지 않음). 더욱이, 7G3 치료는 시험된 모든 치료 섭생에서 AML-1 세포에서의 CD123 발현을 감소시켰다. 예를 들어, 이식 4일 후에 개시된 7G3 치료는 9F5 항체를 사용하여 평가했을 때, BM으로부터 수거된 AML-1의 CD123 발현을 대조군의 51.3±4.0%까지 감소시켰다(**도 3c**, P < 0.0001). 같은 실험에서, 7G3은 또한 AML-1의 마우스 말초혈과 비장으로의 전파를 각각 대조군의 27.8±7.5%(P = 0.0029) 및 23.5±5.3%(P = 0.0009)까지 감소시켰다(**도 3d**).

[0115] **7G3은 NOD/SCID 마우스에서 확립된 AML 질환의 부하를 감소시킬 수 있다**

[0116] 이번 연구의 주된 목표는 AML 줄기세포 상의 CD123을 표적화하는 것의 효과를 시험하는 것이었지만, 백혈병 줄기세포 생착에 대한 효과를 넘어서, 확립된 백혈병 질환에 대해서 단일 제제 치료 활성을 나타내는 7G3의 능력을, 확립된 질환 모델에서 이식 후 28일째에 연속 7G3 또는 대조군 IgG2a 치료를 개시하고, 죽이는 시점까지 치료를 계속함으로써 평가했다. 이 모델에서 환자 샘플 간에 7G3 치료에 대한 반응의 변화가 있었는데, 이것은 임상적으로 보이는 AML의 이종성을 반영하는 것 같다. AML의 BM 부하의 유의한 감소가 5개 샘플 중 2개에서 보였다(**도 3e** 및 **f**에 도시됨). AML-2는 7G3에 반응했으며, 이식 9주 및 14주 후에 BM 생착에 있어서 유의한 감소를 나타냈고(**도 3e**), 8일에 걸쳐서 단지 4회 용량의 7G3을 사용한 마우스의 치료는 AML-1의 생착을 IgG2a 대조군의 18.9±4.1%(P = 0.001, **도 3f**)까지 유의하게 감소시켰다. 또한, 많은 AML 샘플은 이식 후 4일 또는 28일째에 7G3 치료를 개시한 경우 BM에서 백혈병 부하에 유의한 감소를 나타내지 않았지만, 말초 조혈 기관(비장, 말초혈, 및 간)에서의 백혈병 부하는 7G3 치료군에서 저하되었다는 것이 일반적으로 관찰되었다(**도 3d** 및 데이터 도시하지 않음). 이와 함께, 이들 데이터는 7G3이 생체내에서 생물학적으로 활성이며, 단일 제제로서 사용되었을 때 NOD/SCID 모델에서 AML의 성장을 억제할 수 있다는 것을 시사한다.

[0117] **7G3은 SL-IC 자기 재생 능력을 표적화한다**

[0118] 일련의 이식 실험은 모든 암 줄기세포(CSC)-지정 요법에 대한 중요한 문제를 다루며, CSC가 생체내에서 실제로 표적화된다는 증거를 제공한다. AML의 경우, AML-LSC가 1차 NOD/SCID 마우스에서 재증식될 때, 이들이 자기 재생되어야 한다는 것이 알려져 있고[3]; 자기 재생은 모든 줄기세포의 중요한 특성이며, 2차 이식에 의해 가장 잘 평가된다.

[0119] 더욱 빠르게 증식중인 AML 아세포를 표적화하는 종래 요법에 대한 애쥬번트로서 7G3을 자기 재생 능력을 지닌 LSC를 표적화하는데 사용할 수 있는지의 여부를 시험하기 위하여, 7G3 또는 IgG2a를 시타라빈(Ara-C)과 조합하고, SL-IC 및 백혈병 부하에 대한 이들의 효과를 측정했다. AML-10 세포를 이식하고 35일 후에 마우스를 3일 동안 매일 7G3 또는 IgG2a 대조군(500μg/d)으로 치료하고, 이어서 5일 연속하여 Ara-C (40mg/kg/d)로 치료했다. Ara-C 치료 후, 7G3을 4주간 더 투여했다. 7G3과 Ara-C로 치료된 마우스의 골수와 비장에서의 백혈병 생착은 IgG2a와 Ara-C로 치료된 마우스와 비교하여 감소되지 않았다(**도 4 파트 Ia**). 그러나, 치료된 마우스의 골수로부터 세포를 수거하고, 동일한 수의 인간 세포를 2차 수여자 마우스에 이식했을 때, 7G3/Ara-C-치료된 공여자 마우스로부터 수거된 세포의 골수 및 비장으로의 귀소가 각각 IgG2a/Ara-C-치료 대조군의 33.6±5.0%(P = 0.014) 및 10.9±4.6%(P = 0.15)까지 억제되었다(**도 4 파트 Ib**). 또한, 2차 수여자 마우스의 골수와 비장의 재증식 역시 7G3/Ara-C에 의해서 각각 IgG2a/Ara-C-치료 대조군의 21.0±15.2%(P = 0.024) 및 35.8±31.8%(P = 0.31)까지 감소되었다(**도 4 파트 Ic**). 공여자 마우스의 골수에서 나타난 $CD34^+/CD38^-$ LSC의 집단은 IgG2a/Ara-C 치료에 비해 7G3/Ara-C에 의해서 감소되지 않았지만(데이터 도시하지 않음), **도 4 파트 Id**는 IgG2a/Ara-C로 치료된 공여자와 비교하여 7G3/Ara-C 공여자로부터의 2차 수여자 마우스의 골수와 비장에서는 이 세포 집단이 유의하게 감소했음을 보여준다. 이들 데이터는 생체내 7G3 투여가 NOD/ SCID 마우스에서 AML-LSC를 특이적으로 표적화하며, 그 결과 2차 수여자 마우스에서는 귀소 및 생착이 감소된다는 것을 증명한다.

[0120] 7G3이 단일 제제로서 작용할 수 있는지의 여부를 확립하기 위하여, Ara-C의 부재하에 생체내 7G3 치료 후 일련의 이식을 수행하였다. **도 4 파트 II A**에 도시된 대로, 10주간의 7G3 치료는 1차 생착된 마우스의 BM이나 비장에서 AML-10의 생착을 명백히 감소시키지는 않았지만, 7G3 치료된 마우스로부터 수거된 AML 세포는 IgG2a 치료된 대조군과 비교하여 2차 수여자 마우스의 BM(28.2±2.9%, P = 0.0083) 및 비장(18.3±4.8%, P = 0.0021)으로의 귀소 능력이 유의하게 손상되었다(**도 4 파트 II B**). 재증식 능력도 역시 유의하게 손상되었는데, 미치료 대조군 세포를 이식한 9마리의 2차 수여자 마우스 중에서는 8마리에서 생착되었지만, 7G3 치료된 마우스로부터의 세포를 접종한 8마리 마우스 중에서는 단지 3마리만이 생착의 증거를 나타냈다(**도 4, 파트 II C**). 7G3 치료된 마우스에서 평균 생착 수준은 IgG2a 치료된 대조군과 비교하여 유의하게 감소되었다(BM, 34.6±18.6%, P = 0.039; 비장, 33.7±20.4%, P = 0.19)(**도 4 파트 II C**). 이 환자 샘플은 높은 수준의 $CD34^+CD38^-$ 원시 세포를 가졌으며, 이것은 7G3 치료된 1차 마우스에서 감소되지 않았다. 그러나, IgG2a로 치료된 공여자와 비교하여 7G3 치료된 공여자로부터 이식된 2차 수여자 마우스의 BM에서는 이 원시 세포 집단이 유의하게 감소되었다(대조군의 56.6±15.0%, P = 0.031) (**도 4 파트 II D**). AML-9 세포를 사용한 독립적 실험에서도 유사한 결과가 얻어졌으

며, 이는 7G3이 대조군의 19.3% ± 9.8%까지 평균 생착 수준을 감소시켰음을 나타낸다(**도 4 파트 III**).

[0121] 종합적으로, 도 4에 나타낸 3개의 독립된 실험으로부터의 데이터를 모두 조합하면, 27마리의 2차 마우스 중 1마리(3.7%)만이 IgG2a 또는 IgG2a + Ara-C 치료된 대조군 마우스로부터 수거된 세포에 의해 생착되지 않았다. 대조적으로, 23마리의 2차 마우스 중 11마리(48%)가 7G3 또는 7G3 + Ara-C 치료된 마우스로부터 수거된 세포에 의해 생착될 수 없었다. 이들 결과는 생체내 7G3 투여가 NOD/SCID 마우스에서 AML-LSC를 특이적으로 표적화하며, 그 결과 2차 수여자에서 귀소 및 생착이 감소된다는 것을 증명한다.

[0122] **$CD122^+$ NK 세포는 NOD/SCID 마우스에서 AML 재증식의 7G3-매개된 억제에 기여한다**

[0123] NK 세포, 대식세포, 호중구 및 수지상 세포는 면역 시스템의 이펙터 세포 중에서도 특히 Fc-의존성, 항체-의존성 세포 세포독성(ADCC)을 촉진한다. AML의 생착을 억제하는 7G3의 능력에 대한 이들의 기여를 생체외 7G3 치료된 AML 세포의 백혈병 세포 이식 전에 CD122라고도 알려진 뮤린 IL-2R 베타-사슬(IL-2R베타)에 대한 단클론성 항체를 방사선 조사된 NOD/SCID 마우스에 주사하여 평가했다. IL-2R베타는 NK 세포, T 세포, 및 대식세포에서 광범하게 발현되며, mAb에 의해 IL-2R베타를 차단함으로써 NOD/SCID 이종이식 시스템에서 인간 조혈세포의 생착을 개선할 수 있다.

[0124] 이식 4주 후에, IgG2a 대조군으로 생체외 치료된 AML-8-rel 세포를 이식한 NK 세포 고갈된 마우스에서의 백혈병 생착이 비-고갈된 마우스의 113.3±2.8%(P = 0.023)까지 증가했으며(**도 5a**), 이는 $CD122^+$ NK 세포가 NOD/SCID 마우스에서 AML 생착을 온건하게 감소시킨다는 것을 시사한다. 또한, $CD122^+$ 세포의 고갈은 유의하지만 부분적으로 AML 세포의 생착을 감소시키는 7G3의 능력을 약화시켰는데, 이는 CD122 양성 세포가 부분적으로 7G3 억제 효과를 매개한다는 것을 시사한다(**도 5a**). NOD/SCID 재증식에 대한 효과와는 달리, 7G3은 항-CD122 치료된 마우스에서 IgG 대조군의 85%를 넘는 정도까지 백혈병 세포의 귀소를 여전히 강하게 억제했다(**도 5b**). 이들 결과는 NOD/SCID 마우스에서 AML 세포의 생착 및 귀소를 억제하는 7G3의 능력이 적어도 2개의 협조적인 경로에 의해, 즉 NK 및/또는 다른 CD122-의존성 세포에 의해 야기되는 ADCC와 IL-3/CD123 신호화 경로를 차단하는 7G3의 특이적 억제 효과에 의해 매개된다는 것을 나타낸다.

표 1

[0125] 인간 정상 세포 및 백혈병 세포에 대한 7G3 치료의 생체외 유효성은 CD34+/CD38- 세포 상에서의 CD123 발현과 관련된다.

이식된 세포	*AML 서브타입* [a]	*CD34+ CD38-*	*CD34+/CD38- CD123 발현*	*CD34+ CD123+ 발현*	*CD123 발현*	*7G3 치료된 세포의 생착* [b]
		(%)	(RFI)	(RFI)	(RFI)	(생착, % 대조군)
AML						
1	M0	2.9	52.1	85.3	76.3	3.6
2	M1	2.2	26.1	20.8	34.6	5.3
3	M5b	0.048	[c]9.9	[c]27.4	29.4	19.5
4	M5[a]	3.5	36.5	47.0	18.8	6.6
5	M2	6.2	13.8	12.2	11.2	97.1
6	M2	0.18	[c]51.7	[c]52.4	21.8	NE
7	M5b	0.010	[c]20	[c]86	54.3	NE
8	M4eo	4.9	24.2	18.6	16.7	1.5
정상 세포						
NBM-1	NA	0.42	12.0	17.1	3.0	139.9
NBM-2	NA	2.3	6.7	8.8	3.0	34.8
NBM-3 (CD34+)	NA	0.40	7.0	6.5	6.5	50.4

[0126] CD34, CD38 및 CD123 항원을 플루오로크롬-콘쥬게이트 항체로 염색했다. CD34 및 CD38 발현에 기초하여, 원 AML 환자 또는 NBM 공여자의 특정 아집단 및 전 샘플 상에서의 CD123 발현을 염색된 샘플 대 동형 대조군의 형광 강도의 기하 평균의 비로부터 측정된 상대 형광 지수(RFI)로서 측정했다. NBM-3은 CD34+ 분별된 정상 골수 샘플이었다. 높은 CD123 발현은 7G3 치료된 세포의 생착 감소와 관련된다.

[0127] a FAB 기준

[0128] b 7G3 치료된 세포의 생착을 도 1에 기초하여 IgG2a 인큐베이션된 그룹에서의 평균 생착 수준의 퍼센트로서 7G3 생체외 인큐베이션된 j 그룹의 평균 생착으로서 표시한다.

[0129] c 샘플은 매우 낮은 CD34 발현이나 많은 CD34+ 세포를 가졌다.

[0130] NE = 대조군에서 생착 없음 NA = 적용 불가

[0131] **고찰**

[0132] AML 아세포 및 LSC에 대한 CD123의 일관된 과발현은 특히 재발한 경우나 미소잔존질환에서, 단독으로 또는 확립된 요법과 조합하여, AML의 치료를 위한 유망한 치료 표적을 제공한다. CD123에 기초한 몇 가지 치료제가 고안되었으며, 다양한 분석에서 항-AML 효과가 증명되었다[23,47-49]. 본 연구에서는 7G3이 IL-3 매개된 신호화 경로를 일관되게 특이적으로 억제한다는 것을 증명했고, 이어서 시험관내에서 상이한 AML 샘플의 증식을 유도했다. 또한, 7G3 치료는 AML-LSC 생착을 상당히 감소시켰고, 마우스 생존을 개선했다. 사전 확립된 질환을 가진 마우스는 BM 및 말초에서 감소된 AML 부하를 나타냈으며, 치료된 마우스에서 AML-LSC가 직접 표적화되도록 확립하는 치료에 의해 손상된 2차 이식을 나타냈다. 이들 결과는 AML-LSC의 치료적 항-CD123 단클론성 항체 표적화, 및 잠재적 임상 용도를 향한 생체내 전임상 연구 발견의 해석에 대한 분명한 타당성을 제공한다.

[0133] **실시예 2**

[0134] CSL360은 인간 IgG1 불변영역 위에 마우스 단클론성 항체 7G3의 경쇄 가변영역과 중쇄 가변영역을 접목하여 얻은 키메라 항체이다. 7G3과 같이, CSL360은 CD123(인간 IL-3R알파)과 높은 친화성으로 결합하고, 수용체와의 결합에서 IL-3와 경합하여 그것의 생물학적 활성을 차단한다[33]. 따라서, 대부분의 인간 키메라 항체 CSL360도 잠재적으로 AML LSC 세포를 표적화하여 제거하는데 사용될 수 있다. 또한, CSL360은 인체 환경에서 이펙터 활성을 개시할 수 있는 인간 IgG1 Fc 영역으로 인해 인체 치료제로서 활용 가능성이 있다는 이점을 가진다. 더욱이, 인체에서 그것은 마우스 7G3 등가물에 비해 감소된 청소율을 나타내는 듯하고, 면역원성도 더 낮은 것 같다. CD123 발현 백혈병의 치료에서 CSL360의 작용 메커니즘은 1) IL-3이 수용체와 결합하는 것을 차단함에 의한 IL-3 신호화의 억제, 2) 항체가 표적 세포에 결합하여 보체-의존성 세포독성(CDC)을 야기한 이후 보체의 모집, 또는 3) 항체가 표적 세포에 결합하여 항체 의존성 세포 세포독성(ADCC)을 야기한 이후 이펙터 세포의 모집을 수반할 수 있다.

[0135] 항체 의존성 세포 세포독성(ADCC)을 연구하기 위해 개발된 방법이 아래 설명되며, 이것은 분석 시에 (1) 표적 세포 집단을 분석하는 방법, 또는 (2) 이펙터 세포 집단을 분석하는 방법으로 분류될 수 있다. 표적 세포의 분석에 수반되는 방법은 ADCC에 의해 야기되는 표적 세포 세포용해나 표적 세포의 조기 세포자멸을 측정한다. 이펙터 집단을 시험하는 방법은 NK 세포-유도된 세포용해에 대한 마커로서 NK 세포와 같은 이펙터 세포 상에서 막 과립의 유도를 측정한다.

[0136] **방법**

[0137] **[51]크롬 방출 분석을 사용한 ADCC 측정**

[0138] Jenkins *et al*[50]에 의해 설명된 CD123을 발현하도록 조작된 뮤린 림프성 셀라인 CTL-EN 또는 해동된 신선한 백

혈병 세포($5x10^6$)를 37℃에서 1시간 동안 250μCi의 ^{51}Cr-나트륨 크로메이트와 함께 인큐베이션했다. 세포를 RPMI-10% FCS 배지로 3번 세척하여 유리된 ^{51}Cr-나트륨 크로메이트를 제거했다. 크롬 표지된 표적 세포를 둥근 바닥 96-웰 플레이트에 10,000세포/웰씩 분배했다. CSL360 또는 동형 대조군 항체(MonoRho, 재조합 항-Rhesus D 인간 면역글로불린 G1)를 10㎍/mL씩 첨가했다.

[0139] 분리된 신선한 PBMC를 3번 중복하여 상이한 비율로 이펙터 세포로서 첨가하고, 5% 이산화탄소 인큐베이터에서 37℃에서 4시간 동안 인큐베이션했다. 전체 샘플 부피는 200㎕/웰이었다. 인큐베이션 후에 플레이트를 600x g에서 5분간 원심분리하고, 상청액 100㎕를 제거하여, Wallace ν-계수기에서 방출된 ^{51}Cr을 측정했다.

[0140] 식: % 세포용해 = 100 x [(항체에 의한 평균 cpm - 평균 자발적 cmp)/(평균 최대 cpm - 평균 자발적 cpm)]을 사용하여 특이적 세포용해를 측정했다. 자발적 방출은 항체와 이펙터 세포가 없는 표적 세포를 가진 샘플로부터 얻었다. 최대 방출은 1%(v/v) Triton X-100으로 처리된 표적 세포로부터 측정했다.

[0141] **칼세인 AM-표지된 표적 세포 분석을 사용한 ADCC 측정**

[0142] CSL360에 의해 유도된 ADCC를 Neri *et al* [52]에 의해 설명된 방법에 의해 측정했다. 이 방법은 ^{51}크롬 대신에 칼세인 AM으로 표적 세포를 표지하는 것을 포함했다. 표적 세포를 5% 이산화탄소 인큐베이터에서 37℃에서 30분 동안 10μM 칼세인 AM(Invitrogen, cat. no. C3099)과 함께 인큐베이션했다. 표지된 세포를 세척하여 유리된 칼세인 AM을 제거한 다음, 둥근 바닥 플레이트에 5,000세포/웰씩 분배했다. 이펙터 세포를 상이한 비율로 첨가했다. 관련 항체들을 10㎍/mL의 최종 농도로 첨가하고, 항체를 첨가하지 않은 세포를 음성 대조군으로 사용했다. 플레이트를 5% 이산화탄소 인큐베이터에서 37℃에서 4시간 동안 인큐베이션했다. 인큐베이션 후 플레이트를 5분간 600x g에서 원심분리했다. 상청액 100㎕를 제거하여 Envision 마이크로플레이트 리더(여기 필터 485nm, 방출 필터 535nm)에서 형광을 측정했다. 식: % 세포용해 = 100 x [(항체에 의한 평균 형광 - 평균 자발적 형광)/(평균 최대 형광 - 평균 자발적 형광)]을 이용하여 특이적 세포용해를 계산했다. 최대 형광은 3% Extran에 의한 세포의 세포용해에 의해 측정했고, 자발적 세포용해는 항체 또는 이펙터 세포를 첨가하지 않은 표적 세포에서 얻어진 형광이었다.

[0143] **세포용해의 대용 마커로서 막 과립 단백질 CD107a의 이펙터 세포 발현으로서 ADCC의 측정**

[0144] Fisher *et al.* [51]은 NK 세포에 의한 막-결합 세포용해 과립 단백질인 CD107a의 발현 수준이 표적 세포 세포독성과 상호 관련된다는 것을 증명했다. 이 방법을 사용하여 CSL360의 ADCC 활성을 평가했다. 이 방법은 연막에서 분리된 신선한 인간 PBMC를 표적 세포와 함께 인큐베이션하는 것을 포함했다. 사용된 표적 세포는 CD123-발현 셀라인 또는 1차 인간 AML 세포였다. 표적 세포를 항체의 존재 또는 부재하에 1:1 비율로 인간 PBMC에 첨가했다. CD107a의 비특이적 또는 자발적 발현을 항체나 표적 세포를 첨가하지 않은 인간 PBMC에서 평가했다. PE-Cy5 콘쥬게이트된 CD107a 단클론성 항체(BD Pharmingen, cat. no. 555802)를 모든 샘플에 첨가하고, 세포를 5% 이산화탄소 인큐베이터에서 37℃에서 3시간 동안 인큐베이션했다. 처음 1시간 인큐베이션 후, Brefeldin A(BFA)를 첨가했다. 인큐베이션이 종료되면, 세포를 세척하고 항-CD56-PE(BD Pharmingen, cat. no. 347747) 및 항-CD16-FITC(BD Pharmingen, cat. no. 555406) 단클론성 항체로 염색했다. 다음에, 세포를 FACS Calibur(Flow Jo Software Tree Star, Inc.)를 사용하여 유세포분석에 의해 분석했고, 막 결합 세포용해 과립 단백질을 발현했던 FcRνIIIA 수용체를 발현하는 NK 세포를 나타내는 CD56dimCD16 + CD107a 세포에 대해서 분석했다(Flow Jo Software Tree Star, Inc.).

[0145] **결과**

[0146] **^{51}크롬-방출 분석에 의해 평가했을 때 AML 샘플 및 CD123-발현 셀라인에서 CSL360은 ADCC를 유도한다**

[0147] CTLEN 세포에 의한 ^{51}크롬의 총 흡수는, 세제 세포용해에 의한 최대 크롬 방출에 의해 측정했을 때, AML 세포에 의한 단지 약 400-200cpm과 비교하여 2000-1500cpm이었다. AML(SL) 세포의 15% 세포용해는 이펙터 세포 대 표적 세포의 비가 100:1일 때 CSL360에서 관찰되었으며, 이것은 음성 대조군 항체인 MonoRho에서의 1.9% 세포용해

와 비교된다. CTLEN 세포의 51% 세포용해는 이펙터 세포 대 표적 세포의 비가 100:1일 때 CSL360에서 관찰되었으며, 이것은 음성 대조군 항체인 MonoRho에서의 5% 세포용해와 비교된다(**표 2**). 이들 결과는 AML 세포가 높은 수준의 CD123의 표면 발현을 가졌던 경우에도 AML 세포에 비하여 CTLEN 세포가 CSL360-매개 ADCC 세포용해에 더 민감했다는 것을 시사했다.

[0148] **이펙터 NK 세포에서의 CD107a 발현에 의해 평가했을 때 CSL360은 AML 샘플과 CD123-발현 셀라인에서 ADCC를 유도한다**

[0149] **도 8**은 CSL360 또는 동형 대조군 항체의 존재하에 AML 환자 샘플 RMH003과 함께 인큐베이션된 정상 공여자로부터의 혼합된 PBMC로부터 유래하는 NK 세포 상에서 막 세포용해 과립 CD107a의 유도를 증명하는 유세포기 분석을 나타낸다. 이 혼합된 집단 내에서 NK 세포는 CD56(NK 마커) 및 CD16(FcRⅴIIIA)을 발현한 림프구 집단으로부터 거부되었다. 이 데이터는 CSL360으로 코팅된 AML 세포에 노출된 NK가 동형 대조군 항체(**도 8A**에서 약 3% CD107a 양성 세포)와 함께 인큐베이션된 동일한 공여자 및 환자 샘플로부터의 NK에 비해 CD107a(**도 8B**에서 약 39% CD107a 양성 세포)를 유의하게 상승시켰다는 것을 증명했다. 공여자 NK 세포 상에서 CD107a의 유도는, 표적 AML 환자 세포의 부재하에 CSL360이 이펙터 세포에 첨가된 경우에는 CD107a가 검출되지 않았기 때문에 표적 세포-의존성이다(도 **8D**). **도 9**는 같은 실험 데이터를 히스토그램 그래프로 나타낸 것이다.

[0150] 인간 CD123(CTLEN, EL4) 또는 인간 백혈병 셀라인 발현 내인성 CD123(TF-1)을 발현하도록 조작된 다수의 셀라인 및 표적 세포인 백혈병 환자로부터의 1차 샘플을 3개 이하의 상이한 공여자로부터 유래하는 이펙터 세포와 함께 인큐베이션함으로써 상기와 유사한 방식으로 생성된 데이터가 **표 3**에 포함된다. 이 데이터는 CSL360의 존재하에 또는 항체를 첨가하지 않고 상이한 샘플과 인큐베이션되었을 때 CD107a를 발현한 NK 세포의 퍼센트로서 표시된다. 인간 CD123을 발현한 2개의 마우스 셀라인은 CSL360의 존재하에 NK 세포에서 CD107a 발현을 유도했다. 8개의 1차 백혈병 샘플 중 4개에서 NK 세포에서의 CD107a의 CSL360-매개 발현이 증명되었다. RMH007은 CSL360이 부재할 때에도 NK 세포에서 CD107a의 발현을 유도했다. 한 공여자로부터의 PBMC에서는 RBH013이 유사한 결과를 제공했지만, 상이한 공여자에서는 CD107a 발현이 CSL360에 특이적이었으며, 이는 이 경우에 있어서 CSL360에 의해 유도된 NK-매개된 ADCC에 대한 공여자-특이적 민감성을 나타냈다.

[0151] 8개의 1차 백혈병 샘플 중 6개를 상이한 공여자를 이펙터 세포 출처로 사용하여 ADCC 효과에 대해 시험했다. ADCC에 민감했던 샘플이 공여자와는 무관하게 이펙터 세포에서 일반적으로 CD107a를 유도했다는 것이 중요한 점으로서 관찰되었다. 유사하게, ADCC에 내성이었던 샘플은 역시 공여자 세포와 무관하게 일반적으로 음성을 유지하였다.

[0152] **칼세인-AM 방출 분석에 의해 평가했을 때 CSL360은 AML 샘플에서 ADCC를 유도한다**

[0153] 용해된 세포에 의해 배지 중에 방출된 칼세인은 ADCC-매개 세포용해의 지표이다. 이 분석에서 환자 RMH003 및 RMH008은 ADCC에 대해서 민감성을 나타냈지만, RMH009, RMH010 및 RBH013은 세포용해에 내성인 것으로 드러났다(**표 4**). 이 5명의 환자를 모두 이 분석에서 사용된 것과 동일한 이펙터 세포를 사용하여 NK 세포 CD107a 발현 분석에서 CSL360-매개 ADCC에 대한 민감성에 대해 시험하였으며, 비교 결과를 **표 5**에 나타낸다. 6개의 환자 샘플 중 3개에서 ADCC의 상태가 두 상이한 분석에서 일치하였다.

표 2

[0154] ^{51}크롬 방출 분석에서 ADCC 매개된 세포용해

샘플	E:T에서 CSL360에 의한 세포용해 %		E:T에서 MonoRho에 의한 세포용해 %	
	100:1	10:1	100:1	10:1
CTLEN	51	10	5	1
SL (AML)	15	2.4	1.9	4.5

표 3

[0155] ADCC 활성의 척도로서 CD107a의 표면 발현

샘플	CD107a를 발현하는 NK 세포의 %			
	E:T에서 CSL360		E:T에서 항체 없음	
	1:1	1:0	1:1	1:0
CTLEN-001	6.7	0.7	0.6	0.6
CTLEN-008	24	1.0	2.6	0.6
CTLEN-010	5.7	2.2	2.7	-
CTLEN-011-PBMC-1	8.1	0.8	2.7	0.6
CTLEN-011-PBMC-2	10.5	1.3	0.25	0.28
EL4hi/lo-001	2.8	0.8	0.6	0.6
EL4hi-002	2.9	0.7	0.5	0.5
EL4hi-003	15.0	1.1	6.7	0.6
EL4hi-004	16	0.46	0.04	-
EL4hi-005	21	1.5	7.0	0.6
EL4hi-010	34	1.2	2	2
EL4hi-011-PBMC-1	15.5	0.18	5.7	0.45
EL4hi-011-PBMC-2	23.5	0.6	0.12	0.18
TF-1 (IL-3)	1.45	0.7	1.4	0.5
TF-1 (GM-CSF)	0.7	0.7	0.6	0.5
RMH003[a] (AML)	30	nd	3.5	nd
RMH003[b] (AML)	33	1.4	0.8	0.6
RMH003[c] (AML)	38.0	1.2	3.7	0.4
RMH007 (B-ALL)	16.4	8.9	16.7	4.0
RMH008[a] (AML)	9	nd	4	nd
RMH008[b] (AML)	16	1.8	1.6	0.6
RMH008[c] (AML)	8.7	1	0.9	0.4
RMH009[a] (B-ALL)	3.0	nd	1.8	nd
RMH009[b] (B-ALL)	1.7	1.0	0.9	0.55
RMH009[c] (B-ALL)	7.4	8.6	4.2	3.6
RMH010[a] (AML)	14	nd	6	nd
RMH010[b] (AML)	25.5	7.8	5.2	3.6
RMH011 (AML)	6.6	6.6	3.4	2.2
RBH009[a] (AML)	8.5	nd	4.5	nd
RBH009[b] (AML)	8.0	6.7	3.8	2.8
RBH013[a] (AML)	10.0	nd	10.0	nd
RBH013[b] (AML)	22.0	5.9	3.3	2.7

[0156] [a, b, c]는 샘플이 이펙터 세포의 출처로서 상이한 공여자를 사용하여 ADCC에 대해 시험되었음을 나타낸다.

표 4

[0157] 칼세인 방출 분석에서 ADCC의 평가

샘플	세포용해 %			
	E:T에서 CSL360		E:T에서 항체 없음	
	100:1	10:1	100:1	10:1
RMH003 (AML)	82.6	39.2	19.9	7.1
RMH008 (AML)	100	59.5	58.2	0

RMH009 (B-ALL)	0	0	0	0
RMH009* (B-ALL)	0	0	0	0
RMH010 (AML)	0	4	4	8
RBH013 (AML)	0	0	0	0

[0158] *이펙터 세포로서 다른 출처의 PBMC를 사용하여 샘플 RMH009를 가지고 분석을 반복한다.

표 5

[0159] 유세포분석 기초 분석과 세포용해 분석의 비교

샘플	CD 107a 상태	칼세인 방출	^{51}크롬 방출
CTLEN	양성	nd	양성
EL4hi	양성	nd	nd
RMH003[a] (AML)	양성	양성	nd
RMH008[a] (AML)	양성	양성	nd
RMH007 (B-ALL)	음성	nd	nd
RMH009 [a] (B-ALL)	음성	음성	nd
RMH010 [a] (AML)	양성	음성	nd
RBH013 [a] (AML)	양성	음성	nd
SL (AML)	Nd	nd	양성

[0160] [a] 이들 샘플은 CD107a 및 칼세인 방출 분석을 사용하여 ADCC에 대해 시험되었으며, 두 분석에서 동일한 이펙터 세포를 사용했다.

[0161] * 수행 불가

[0162] **고찰**

[0163] 감도가 다양하기는 하지만, 모두 ADCC 활성을 측정할 수 있다고 인정된 몇 가지 분석을 이용하여 CSL360이 이소성 인간 CD123을 발현하는 배양물에 유지된 마우스 셀라인에서 ADCC 반응을 유도할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 중요한 것은 CSL360이 정상 공여자로부터의 기능적 이펙터 세포의 존재하에 1차 인간 AML 환자 샘플에 대해서도 ADCC 반응을 유도할 수 있었다는 점이다. 이 데이터는 LSC를 비롯한 백혈병 세포가 충분한 수준의 CD123을 발현하는 일부 백혈병 환자에서, 특히 환자가 그들의 순환계에, 경감 상황에서나 미세잔존질환시 보유되는 것들과 같은, 어떤 기능적 이펙터 세포를 보유하고 있을 경우, 치료적으로 투여된 CSL360이 백혈병 세포의 ADCC-지정 제거를 유도할 수 있다는 것을 시사한다.

[0164] **실시예 3**

[0165] LSC를 비롯한 AML 세포 상에서 CD123의 편재성 발현과 AML의 병인에서 중요한 역할을 하는 IL-3의 연루 증거는 IL-3R알파 기능을 차단하는 능력이 7G3과 같은 IL-3R알파를 표적화하는 항체의 치료 활성에 중요하다는 것을 시사했다. 이 실시예에서는 다소 놀랍게도 AML 환자 샘플에 의한 NOD/SCID 마우스의 생착 또는 재증식을 억제하는 7G3의 능력이 적어도 부분적으로 7G3의 Fc 도메인에 의해 도출되는 이펙터 기능 반응에 의존한다는 것이 증명된다. 또한, IL-3R알파 기능을 유의하게 억제하지 않는 다른 IL-3R알파 항체들도 생착을 차단하며, 따라서 AML의 NOD/SCID 마우스 모델에서의 치료 활성이 증명된다.

[0166] **방법**

[0167] **F(ab)'2 단편 제조**

[0168] 6H6, 9F5 및 7G3의 F(ab)'2 단편들을 2시간 동안 37℃에서 항체와 함께 인큐베이션된 고정된 펩신-아가로스(22.5U 펩신 아가로스/mg 항체)를 이용한 펩신 절단에 의해 얻었다. 3M Tris를 사용하여 pH를 6.5로 조정해서 효소절단을 중단시켰다. 원심분리하여 얻어진 F(ab)'2로부터 고정된 비드를 분리했다.

[0169] 7G3의 F(ab)'2를 직렬 크로마토그래피 과정: 티오필성 흡착 크로마토그래피(15 칼럼 부피 이상의 40mM HEPES 중의 20-0% 황산암모늄 구배)와 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 잔류 면역글로불린과 그외 다른 오염물질로부터 정제했다. 9F5 F(ab)'2와 6H6 F(ab)'2를 이온 교환 크로마토그래피와 이어서 친화성 크로마토그래피에 의해 정제했다. 내독소 수준을 LAL 발색 분석에 의해 정량했다. 내독소 수준이 >10EU/mL였던 경우, Detoxigel을 사용하여 내독소 수준을 감소시켰다. 예상대로 7G3 F(ab)'2는 IL-3-의존성 TF-1 증식 분석에 의해 평가했을 때 CD123-중화 활성을 보유했다(데이터 도시하지 않음).

[0170] **AML 환자 샘플**

[0171] 서면동의서를 얻은 3명의 새로 진단된 환자로부터 말초혈 세포를 수집했다. AML 환자들로 진단되었고, 프랑스인-미국인-영국인(FAB) 기준에 따라서 분류하였다. AML-8-rel은 최초 진단에서 본래 M4로 분류되었고, AML-9는 M5a로 분류되었고, AML-10은 분류되지 않았다. AML 아세포를 Ficoll 밀도 구배 원심분리에 의해 분리하고, 알리쿼트로 나누어 액체 질소에서 냉동시켰다.

[0172] **시험관내 항체 치료**

[0173] IL-3 수용체 알파 사슬(CD123), 7G3, 9F5, 6H6 및 이들의 F(ab)'2 단편들에 대한 단클론성 항체를 사용하여 AML 환자로부터 수거된 세포를 치료했다. IgG2a를 대조군으로서 병행하여 사용했다. 해동된 AML 세포를 XVIVO10 + 15%BIT에 접종하고, 10㎍/mL 농도의 항체와 함께 독립적으로 인큐베이션했다. 37℃에서 2시간 인큐베이션한 후, 재증식 분석을 위해 수거된 백혈병 세포를 치사량 이하의 방사선 조사된 NOD/SCID 마우스에 정맥내 주사했다.

[0174] **NOD/SCID 마우스에 인간 세포의 이종이식**

[0175] 이종이식은 본질적으로 실시예 1에 개략된 대로 수행하였다. NOD/SCID 마우스를 University Health Network/Princess Margaret Hospital의 동물 시설에서 우리에 가두어 길렀다. 동물 연구는 University Health Network/Princess Margaret Hospital 동물관리위원회에 의해 승인된 협회 가이드라인에 따라서 수행되었다. NOD/SCID 마우스에 백혈병 세포의 이식을 이전에 설명된 대로 수행하였다[3]. 간단히 말해서, 동일한 실험을 받는 모든 마우스에 동일한 시간에 300cGy의 선량을 방사선 조사하였고, 그 다음 동일한 수의 인간 세포를 주사하였다. 정맥내 이식에 대하여, 각 그룹 당 5마리의 마우스를 사용하였고, 마우스 당 5-10백만 개의 백혈병 세포를 주사하였다. 인간 AML의 생착 수준을 뮤린 골수의 유세포분석에 의한 CD45+ 세포의 퍼센트에 기초하여 평가하였다.

[0176] **세포 염색 및 유세포분석**

[0177] 치료된 마우스 골수로부터의 세포를 APC(Beckman-Coulter)에 콘쥬게이트된 인간 CD45 (항-CD45), 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)에 콘쥬게이트된 항-CD34, 및 항-CD38-PC5(Becton-Dickinson)에 특이적인 마우스 항체로 염색했다. 동형 대조군을 사용하여 거짓 양성 세포를 피하였다. 항-CD123-PE(클론 9F5 및 7G3, Becton-Dickinson)를 사용하여 AML 세포 상에서 IL-3 수용체 알파 사슬의 발현을 시험했다. 염색된 세포를 Caliber(Becton-Dickinson)를 사용하여 분석했다.

[0178] **통계 분석**

[0179] 데이터는 평균±s.e.m.으로 표시된다. 치료군 간 차이의 유의성을 스튜던트 티-테스트를 이용하여 p 값에 의해 결정했다. $P < 0.05$인 경우 결과를 통계적으로 유의하다고 간주했다.

[0180] **결과**

[0181] **항-IL-3R알파 항체 Fc 도메인은 AML 귀소 능력을 억제하는데 유의하게 기여한다**

[0182] 실시예 1, **도 5a** 및 **b**의 데이터는 NK 및/또는 다른 CD122-의존성 세포에 의해 야기된 ADCC가 NOD/SCID 마우스의 골수로 AML 세포가 돌아가 재증식하는 것을 억제하는 7G3의 능력에 기여하며, 이것이 IL-3/CD123 신호화 경로를 차단하는 7G3의 효과에 더해진다는 것을 나타낸다. 이것을 직접 시험하기 위해, 생체외 치료된 AML 샘플의 귀소에 대한 다른 불량한 중화 항-IL-3R알파 항체인 6H6 및 9F5의 효과를 시험했다. 6H6과 9F5는 모두 CD123에 특이적으로 결합하지만, 7G3과는 달리 IL-3R알파 기능을 차단하지 못한다[33]. 이것은 **도 6a**에서도 증명되는데, 도 6a는 7G3과는 달리 6H6과 9F5가 모두 시험된 최고 용량에서도 CD131(베타c) 티로신 인산화, STAT-5 인산화 및 Akt 인산화를 포함하는 IL-3-유도 신호화를 억제하는데 실패했다는 것을 보여준다. **도 10**은 그렇지만 6H6과 9F5가 이 실험에서 7G3과 마찬가지로 적어도 BM으로의 AML 세포의 귀소를 강하게 억제했음을 보여준다.

[0183] 귀소의 억제에 대한 7G3의 효과에 있어서 Fc 도메인의 기여를 7G3과 6H6의 F(ab)'2 단편을 시험하여 평가했다. 항체 F(ab)'2 단편은 Fc 이펙터 면역글로불린 도메인을 결여하므로 ADCC 또는 CDC 반응을 도출할 수 없다. **도 10**은 역시 7G3과 6H6의 F(ab)'2 단편이 이 실험에서 AML 세포 귀소를 억제하지 못했음을 보여주며, 이것은 두 항체의 Fc 도메인이 모두 골수로의 AML 세포의 귀소를 억제하는데 중요하다는 것을 나타낸다.

[0184] **항-IL-3R알파 항체 Fc 도메인은 AML 세포의 골수 생착 및 재증식 능력을 억제하는데 유의하게 기여한다**

[0185] 다음에, 수여자 마우스의 골수에 AML 세포가 생착되는 것을 억제하는데 있어서 IL-3R알파 중화 및 이펙터 활성의 기여를 평가하는 데까지 실험을 확장시켰다. 2명의 AML 환자 샘플을 2시간 동안 37℃에서 10㎍/mL 농도의 다양한 무손상 항체 및 항체 단편으로 생체외 치료했다. 인큐베이션 후, 세포를 원심분리하여 미결합 항체를 제거하고, 치사량 이하의 방사선 조사된 NOD/SCID 마우스에 이식했다. 이식 4주 후에 마우스의 골수에서 huCD45 양성 세포의 퍼센트를 평가하여 인간 AML의 생착 수준을 분석했다. **도 11a** 및 **b**에 나타낸 대로, 예상대로 7G3은 두 AML 환자 샘플의 NOD/SCID 마우스에의 생착을 유의하게 억제했다. 귀소에 대한 효과와 일치하여, 9F5도 역시 두 환자 샘플의 AML 세포 생착을 강하게 억제했다. 흥미롭게도 **도 11a**는 환자 샘플 AML-9에 대하여 7G3과 9F5의 F(ab)'2 단편이 억제 능력을 유의하게 감소시켰지만, 대조군 항체에서 보이는 수준으로 생착이 회복되도록 완전히 허용하지는 않았음을 나타낸다. 반면에, 샘플 AML-10에 대해서는 두 F(ab)'2 단편의 억제 효과가 없었다.

[0186] **고찰**

[0187] 종합하면, 이들 결과는 IL-3R알파 기능을 중화하는 7G3의 능력에 더하여, 7G3의 Fc 도메인이 AML 세포의 귀소 및 생착 능력의 억제에서도 중요하다는 것을 나타낸다. Fc 도메인이 없는 CD123에 대한 항체는 NOD/SCID 마우스에서 AML-LSC의 귀소, 거주, 및 재증식을 억제하는 능력을 현저히 잃었다.

[0188] **실시예 4**

[0189] 항체의 이펙터 기능 활성을 증가시키기 위한 많은 방법이 설명되었다. 이런 방법들은 관련 Fc 수용체와의 상호작용을 증진시키고 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)과 항체-의존성 세포-매개 포식작용(ADCP)을 촉진하는 가능성을 증가시키기 위한 항체의 Fc 영역의 아미노산 변형을 포함할 수 있다[34, 35]. 또한, Fc 영역에 있는 보존된 Asn[297]에서 IgG1 항체에 공유 부착된 올리고당의 변형 후에 ADCC 활성의 증진이 설명되었다[34]. 추가의 연구[36]에서, 다른 정상 올리고당에 푸코스를 부가하는 능력에 결함이 있는 중국 햄스터 난소 셀라인 변이체인 Lec13 세포에서 인간 IgG1 항체의 발현은 푸코스-결함 항체를 생성했으며, 이 항체는 인간 FcγRIIIA에 대한 결합이 최대 50배 개선되고, ADCC 활성이 개선되었다.

[0190] 또한, 어떤 글리코시다제 억제제의 존재하에 항체-발현 세포를 배양하는 것을 통하여 푸코스 제거된 항체를 생성하기 위한 또 다른 접근법이 설명되었다[53]. 이 연구에서는 관심의 항체를 발현하는 CHO 세포를 강력한 알파-만노시다제 I 억제제인 키푸넨신(kifunensine)의 존재하에 배양하였는데, 그 결과 푸코스를 함유하지 않는 올리고

만노스-타입 글리칸을 가진 IgG가 분비되었다. 이들 항체는 FcR에 대해 증가된 친화성과 증진된 ADCC 활성을 나타냈다.

[0191] 이 실시예에서는 Fc-조작 또는 푸코실 제거를 통한 증진된 ADCC 활성을 가진 CSL360 변이체의 생성 및 시험이 설명된다.

[0192] **방법**

[0193] **CSL360 및 Fc-최적화된 CSL360의 일시 발현을 위한 포유류 발현 벡터 구성**

[0194] 뮤린 항-CD123 항체 7G3의 경쇄와 중쇄 가변영역의 유전자를 제조자의 지시에 따라서 NucleoSpin RNA II 키트(BD Bioscience)를 사용하여 분리된 전체 7G3.1B8 하이브리도마 RNA로부터 클로닝했다. 첫 번째 가닥 cDNA를 SMART RACE 증폭 키트(Clontech)를 사용하여 합성하고, 교정 DNA 중합효소인 Plantinum® Pfx DNA 중합효소(Invitrogen)를 사용하여 RACE-PCR에 의해 가변영역을 증폭시켰다. 프라이머 UPM(범용 프라이머 A 믹스, DB Bioscience)과 MH2a(5'AATAACCCTTGACCAGGCATCCTA3')를 중쇄 가변영역에 사용했다. 유사하게, UPM과 MK(5'CTGAGGCACCTCCAGATGTTAACT3')를 경쇄 가변영역에 사용하여 증폭시켰다. 표준 분자생물학 기술을 이용하여, 중쇄 가변영역을 a) 인간 IgG1 불변영역을 포함하도록 변형된 pcDNA3.1(+) 발현 벡터(Invitrogen)에 기초한 포유류 발현 벡터 pcDNA3.1(+)-hIgG1, 또는 b) pcDNA3.1(+)-hIgG1$_{S239D/A330L/I332E}$, 또는 c) pcDNA3.1(+)-hIgG1$_{S239D/I332E}$에서 클로닝했다. b)와 c)에서 사용된 벡터는 상당히 개선된 ADCC 활성을 가진 항체를 가져온다고 보고된[35] 아미노산 돌연변이가 통합된 단백질을 암호화한다. 이들 돌연변이를 QuikChange 돌연변이유발 기술(Stratagene)을 사용하여 도입하였다. 경쇄 가변영역은 인간 kappa 불변영역을 포함하도록 변형된 pcDNA3.1(+) 발현 벡터에 기초한 발현 벡터 pcDNA3.1(+)-hκ에서 클로닝했다.

[0195] **세포 배양**

[0196] FreeStyle™ 293-F 세포를 Invitrogen에서 입수했다. 세포를 페니실린/스트렙토마이신/펀지존 시약(Invitrogen)으로 보충한 FreeStyle™ 발현 배지(Invitrogen)에서 배양했다. 트랜스펙션 전에 세포는 8% 이산화탄소 분위기에서 37℃에서 유지했다.

[0197] **일시 트랜스펙션**

[0198] FreeStyle™ 293-F 세포를 사용한 발현 플라스미드의 일시 트랜스펙션을 293펙틴 트랜스펙션 시약(Invitrogen)을 사용하여 제조자의 지시에 따라서 수행하였다. 경쇄 발현 벡터와 중쇄 발현 벡터를 조합하고, FreeStyle™ 293-F 세포에 동시 트랜스펙션했다. 1x10^6 생육성 세포/mL의 최종 농도로 세포(1000mL)를 트랜스펙션하고, 2/10 Wave Bioreactor 시스템 2/10 또는 20/50(Wave Biotech/GE Healthcare)에서, 8% 이산화탄소 분위기에서 37℃에서 5일 동안 Cellbag 2L(Wave Biotech/GE Healthcare) 중에서 인큐베이션했다. 트랜스펙션 4시간 후에 Pluronic® F-68(Invitrogen)을 0.1% v/v의 최종 농도로 첨가했다. 트랜스펙션 24시간 후에 세포 배양물에 Tryptone N1(Organotechnie, 프랑스)을 0.5% v/v의 최종 농도로 보충했다. 다음에, Millistak+ POD 필터(Millipore)를 통해 여과하여 세포 배양물 상청액을 수거하고 정제했다.

[0199] **키푸넨신 처리**

[0200] 푸코스 제거된 항체를 생산하기 위해, 설명된 대로[53], 나타낸 키푸넨신(Toronto Research Chemicals)을 0.5㎍/mL의 최종 농도로 일시적으로 트랜스펙션된 FreeStyle™ 293-F 세포의 배양 배지에 첨가했다(트랜스펙션 24시간 후에).

[0201] **단백질 발현의 분석**

[0202] 5일 후에 배양 상청액 20㎕를 4-20% Tris-글리신 SDS 폴리아크릴아미드 겔 상에서 전기영동하고, Coomassie Blue 시약으로 염색하여 시각화했다.

[0203] **항체 정제**

[0204] 실시예 2에 설명된 키메라 CSL360에 더하여, 이 실시예에서는 CSL360의 인간화 변이체(hCSL360)의 사용이 설명된다. 이것은 표준 CDR 접목 기술에 의해서 생성되었는데, 7G3으로부터의 뮤린 CDR 영역을 적합한 인간 가변 프레임워크 영역에 접목시켰다[54]. 얻어진 인간화 항체는 전체 인간 프레임워크 서열을 함유한다. 인간화 과정의 결과로서, CD123의 MAb 친화성은 온건하게 감소되었지만(KD 지표, CSL360 및 hCSL360에 대해 각각 1.06nM 대 12.8nM), 결합 특이성은 변하지 않고 그대로였으며, IL-3-의존성 TF-1 세포 증식에 의해 측정했을 때 hCSL360은 강한 CD123-중화 활성을 보유했다(지표 IC_{50}, CSL360 및 hCSL360에 대해 각각 5nM 대 19nM). 표준 리보솜 디스플레이-기초 돌연변이유발[55]을 이용한 친화성 최적화를 사용하여 hCSL360의 결합 친화성을 모 마우스 MAb 7G3 및 키메라 CSL360과 적어도 동등한 수준까지 회복시켰다. 비슷한 CD123 결합 활성 및 모 MAb에 대한 CD123 활성의 중화를 나타내는 친화성 최적화된 MAb 클론을 만들었다(168-26)(지표 KD, CD123과의 결합에 대해 0.6nM 및 IL-3 중화 IC_{50} 6nM). 또, 3개 아미노산 치환 S239D/A330L/I332E(168-26Fc3) 또는 2개 아미노산 치환 S239D/I332E(168-26Fc2)를 가진 IgG1 Fc 도메인을 함유하는 이 클론의 Fc 조작된 유도체들을 hCSL360에 대해 상기 설명한 대로 만들었다.

[0205] 미변형 키메라 CSL360, 인간화 변이체(hCSL360) 및 ADCC-최적화된 인간화 CSL360 $_{S239D/I332E}$(hCSL360Fc2) 및 $CSL360_{S239D/A330L/I332E}$(hCSL360Fc3), 그리고 키푸넨신 처리된 세포로부터 유래된 물질을 30mL Poly-Prep 빈 칼럼(Bio-Rad, CA)에 충전된 MabSelect 수지(5mL, GE Healthcare, UK)를 사용하여 4℃에서 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 정제했다. 수지를 먼저 발열원이 없는 GIBCO 증류수(Invitrogen, CA) 10 칼럼 부피로 세척하여 저장 에탄올을 제거하고, 발열원이 없는 포스페이트 완충 식염수(PBS)(GIBCO PBS, Invitrogen, CA)를 5 칼럼 부피를 사용하여 평형으로 만들었다. 다음에, 여과하여 컨디셔닝된 세포 배양 배지(1L)를 중력을 이용하여 수지 위에 로딩했다. 다음에, 수지를 발열원이 없는 PBS 5 칼럼 부피로 세척하여 비-특이적 단백질을 제거했다. 결합된 항체를 2 칼럼 부피의 0.1M 글리신 pH 2.8(Sigma, MO)을 사용하여 용출시켰는데, 이때 0.2 칼럼 부피의 2M Tris-HCl pH 8.0(Sigma, MO)을 함유하는 분획 안으로 용출시켜 낮은 pH를 중화시켰다. 용출된 항체를 12mL Slide-A-Lyzer 카세트 MW 컷오프 3.5 kD(Pierce, IL)에 넣어 4℃에서 18시간 동안 5L PBS에 대해 투석하였다. Ultraspec 3000(GE Healthcare, UK) 분광광도계를 사용하여 280nm에서 흡광도를 측정하여 항체 농도를 결정하였다. SDS-PAGE에 의해 항체의 순도를 분석하였으며, 이때 환원 샘플 버퍼(Invitrogen, CA) 중의 2㎍ 단백질을 Novex 10-20% Tris 글리신 겔(Invitrogen, CA) 위에 로딩하고, Tris 글리신 SDS 러닝 버퍼를 사용하여 XCell *SureLock* Mini-Cell(Invitrogen, CA)에서 150V의 일정 전압을 90분 동안 인가한 다음, 제조자의 지시에 따라서 Coomassie 염색에 의해 시각화하였다.

[0206] **결과**

[0207] **야생형 CSL360 및 Fc-조작된 CSL360 변이체의 ADCC 시험**

[0208] 다양한 변이체 항체들의 이펙터 활성을 시험하기 위하여, CD123-발현 CTLEN 셀라인을 표적 셀라인으로서 사용했고, 이펙터 세포의 출처로서 정상 PBMC의 존재하에 실시예 2에 개략된 대로 칼세인 AM 방출 분석을 사용하여 ADCC 활성을 평가했다. **도 12**는 키메라 CSL360과 인간화 변이체(hCSL360) 항체뿐만 아니라 Fc-변형된 변이체 hCSL360Fc2 및 hCSL360Fc3에 대해 CTLEN 표적 셀라인의 ADCC-지정 세포용해를 유도하는 이들의 능력을 비교한 것을 보여준다. 데이터는 Fc 도메인의 변형이 없는 키메라 CSL360과 인간화 변이체가 모두 CTLEN 셀라인에 대한 ADCC(5-10% 표적 세포 세포용해)를 유도하는데 있어서 검출될 수는 있지만 온건한 능력을 가졌음을 나타내며, 이것은 실시예 2에 개략된 발견과 일치한다. Fc 도메인이 변형된 두 변이체, 즉 hCSL360Fc2와 hCSL360Fc3은 CTLEN 표적 세포의 ADCC-지정 세포용해를 도출하는데 있어서 상당히 증진된 능력을 나타냈으며, Fc 미변형된 항체와 동일한 농도에서 시험했을 때 50-60% 표적 세포 세포용해가 관찰되었다.

[0209] **Fc 수용체와의 결합에 대한 CSL360, Fc-조작된 CSL360 변이체 및 푸코스 제거된 CSL360의 시험**

[0210] 이미 언급한 대로, 항체 Fc 이펙터 기능은 무손상 면역 시스템의 다양한 이펙터 세포에서 발현되는 Fc 감마 수용체(FcγR)와의 결합을 통해서 매개된다[37]. **FcγR'과의 증진된 결합을 위한 항체의 최적화는 더 큰 이펙터 세포 활성화와 항체-코팅 종양세포의 더 많은 사멸을 가져온다.**

[0211] hCSL360, Fc 조작된 변이체 hCSL360Fc2 및 hCSL360Fc3, 그리고 키푸넨신 처리에 의해 생산된 푸코스 제거된 hCSL360(hCSL360kif)에 대한 다양한 인간 FcγR'의 상대적 친화성을 BIAcore A100 바이오센서를 사용하여 측정했다. 다양한 항체를 CD123과 결합된 CM5 BIAcore 칩 상에 개별적으로 포착시켰다. 가용성 FcγR'들(huFcγRI, huFcγRIIb/c 및 huFcγRIIIa)(R & D Systems에서 입수)를 0.3nM 내지 800nM 범위의 농도로 각 표면 위로 흘려보내고, 반응속도학 및/또는 정류상태 모델에 데이터를 피팅하여 친화성 값을 결정했다.

[0212] **도 13A**는 huFcγRI, huFcγRIIb/c 및 huFcγRIIIa와의 결합에 대해서 hCSL360에 상대적인 hCSL360Fc2, hCSL360Fc3 및 hCSL360kif의 친화성(KA)을 비교한다. 결과는 hCSL360Fc2와 hCSL360Fc3에 대해 광범하게 유사하며, huFcγRI 및 huFcγRIIb/c와의 결합에 대해서는 hCSL360에 비해 KA가 약 15-35배 증가한다. 가장 두드러진 결합 증가는 huFcγRIIIa에 대해 나타났으며, 이때 친화성은 약 100배 증가했다. hCSL360kif에서 친화성의 증가 배수의 절대값은 Fc-조작된 변이체보다 낮았지만, huFcγRIIIa의 경우에는 유사한 패턴이 관찰되었으며, huFcγRI(0.75배) 및 huFcγRIIb/c(2.6배)와 비교하여 최대 배수의 개선(약 5배)이 다시 한번 나타난다.

[0213]

[0214] 최근 연구들은 절대적 친화성보다는 오히려 IgG 친화성에 있어서 높은 활성화/억제(A/I)(FcγRIII:huFcγRIIb) 비가 최대 항체-매개 이펙터 활성에 중요하다는 것을 나타내고 있다[56]. **도 13B**는 FcγRIII:huFcγRII에 대해 hCSL360 변이체 친화성의 비로서 표현된 데이터를 보여준다. 모든 변이체는 hCSL360에 비해 증가된 A/I 비를 나타냈으며, hCSL360kif, hCSL360Fc2 및 hCSL360Fc3에서 A/I는 각각 약 2배, 약 4배 및 약 3배 증가했다.

[0215] 이들 데이터는 예상대로 다양한 hCSL360 Fc 증진된 변이체들이 활성화 대 억제 FcγR'의 효과가 클수록 FcγR'에 대해 증가된 친화성을 나타낸다는 것을 확인한다.

[0216] **고찰**

[0217] 여기서는 Fc-조작된 CSL360 변이체와 푸코스 제거된 CSL360 변이체가 FcR에 대한 유의하게 증가된 친화성 및 A/I 결합비와 개선된 시험관내 ADCC 이펙터 활성을 나타낸다는 것을 보였다. 이 결과를, AML의 마우스 모델에서 항-CD123 항체의 치료 효능을 위한 이펙터 기능 활성의 중요한 역할을 증명한 실시예 1과 3에서 제공된 데이터와 종합해 보면, 이펙터 기능이 증진된 변이체 항-CD123 항체 치료제가 인간 환자의 AML 및 다른 CD123-양성 백혈병의 치료에서 개선된 치료 활성을 나타낼 가능성이 있다는 것이 강하게 시사된다.

[0218] **실시예 5**

[0219] 이 실시예에서는 다양한 Fc-증진된 항체를 CD123을 발현하도록 조작된 셀라인과 본래 CD123을 발현하는 인간 백혈병 셀라인에 대한 증진된 ADCC 활성에 대해 시험했다. 또한, Fc-증진된 MAb를 AML 및 ALL 환자로부터의 일단의 1차 백혈병 샘플에 대해 생체외 ADCC 분석을 사용하여 시험했다.

[0220] **방법**

[0221] **락테이트 탈수소효소 방출 분석을 이용한 ADCC 측정**

[0222] 설명된 대로 락테이트 탈수소효소(LDH) 방출 분석을 이용하여 ADCC를 측정했다[35]. LDH는 세포용해시 방출되는 안정한 시토졸 효소이다. 배양 배지로 방출된 LDH를 LDH가 특이적 기질을 적색 착색된 산물로 전환시키는 측색 분석을 이용하여 측정한다. 세포용해는 방출된 LDH로서 측정되며, 형성된 색에 정비례한다. CD123을 발현하는 표적 세포를 ADCC의 이펙터 세포로서 사용된 NK 세포의 존재하에 다양한 양의 항-CD123 항체와 함께 인큐베이션했다. NK 세포는 Miltenyi Biotec NK 분리 키트(Cat#130-092-657)를 사용하여 정상 버피 팩으로부터 정제했다. 세포를 5% 이산화탄소의 존재하에 37℃에서 4시간 동안 인큐베이션했다. 항체나 NK 세포가 없는 표적 세포를 자발적 LDH 방출(바탕) 대조군으로 사용했고, 세포용해 버퍼로 용해한 표적 세포를 최대 세포용해 대조군으로 사용했다. 배양 배지로 방출된 LDH를 Promega CytoTox 96® 비-방사선활성 세포독성 분석 키트(Cat# G1780)를 사용하여 제조자의 지시에 따라서 측정했다.

[0223] 모든 다른 방법은 앞선 실시예에 설명한 대로이다.

[0224] **결과**

[0225] **도 14**는 CD123을 발현하도록 조작된 인간 림프아세포성 Raji 세포에 대한 ADCC 활성에 대한 다양한 CSL360 유도체 항체의 효과를 시험한 것이다. 낮은 수준의 CD123(약 4,800 수용체/세포)을 발현하는 안정한 클론(Raji-CD123 저)(**도 14a** 및 **b**) 또는 높은 수준의 CD123 (약 24,400 수용체/세포)을 발현하는 독립적 클론(Raji-CD123 고)(**도 14c** 및 **d**)을 실험에 사용했다. 25:1 및 50:1의 이펙터 대 표적 세포 비를 사용했다. 일관되게도 hCSL360Fc3과 CSL360kif는 모 hCSL360 항체와 비교하여 Raji-CD123 저와 Raji-CD123 고에 대해 모두 상당히 개선된 ADCC 활성을 나타냈다. 50:1의 E:T 비에서는 hCSL360Fc3과 hCSL360kif가 모두 낮은 농도(약 1ng/mL)의 항체에서 Raji-CD123 고 표적 세포의 거의 완전한 세포용해를 달성했다. Raji-CD123 저 세포에서 동등한 효과를 얻기 위해서는 대략 한 차수 더 많은 항체가 필요했다. 흥미롭게도 키메라 CSL360-유도된 ADCC가 hCSL360에 비하여 약간 더 두드러졌다(비록 Fc 증진된 변이체보다는 낮은 수준이지만). 이것은 조기에 논의되는 인간화 과정으로 인하여 키메라 MAb에 비해 CD123 결합에 대한 인간화 변이체의 친화성이 약 10배 감소했기 때문일 수 있다.

[0226] **도 15a**는 상기 실험을 반복한 것을 나타내는데, 이번에는 표적 세포로서 CD123을 본래 발현하는 TF-1 인간 백혈병 세포를 사용한다. 덜 강력하기는 하지만, hCSL360Fc3 변이체는 hCSL360Fc2와 hCSL360kif에서 상당히 개선된 ADCC를 다시 한번 나타냈고, Fc 비최적화된 hCSL360과 비교하여 증가된 활성도 나타냈다.

[0227] **도 15b**는 TF-1 세포에서 인간화되고 친화성 최적화된 항-CD123 항체 변이체 168-26과 그것의 Fc-증진된 유도체 168-26Fc3와 168-26Fc2의 활성을 비교한 것이다. 이 도면의 데이터는 Fc 조작이 단지 인간화만 된 변이체(hCSL360)에서 보이는 것과 유사하게 인간화되고 친화성 최적화된 168-26 변이체의 ADCC 활성을 개선했다는 것을 증명한다.

[0228] 다음에, 다양한 Fc-증진된 hCSL360 변이체들의 활성을 5명의 AML 환자(**도 16a-e**)와 2명의 ALL 환자(**도 16f-g**)로부터 얻은 일단의 1차 백혈병 세포 샘플에 대해 비교했다. 이들 1차 환자 샘플에서의 결과는 셀라인을 사용하여 얻어진 것들과 유사했으며, ADCC 활성의 효능의 순위는 hCSL360Fc3 = 168-26Fc3 > hCSL360Fc2 = hCSL360kif >> CSL360 = 168-26 = hCSL360이다. 중요한 것은 Fc-최적화된 변이체가 시험된 모든 1차 환자 샘플에서 일관되게 ADCC를 유도했다는 점이다. 5개의 AML 샘플과 2개의 ALL 샘플은 모두 Fc 최적화된 변이체에 의해 상당히 높아진 ADCC 수준을 나타냈지만, Fc 최적화되지 않은 변이체에서는 AML 샘플 중 단지 3개만이 약한 반응을 나타냈을 뿐이다. ALL 샘플은 어느 것도 Fc 비최적화 변이체 MAb에 대해서는 유의한 ADCC 반응을 나타내지 않았다.

[0229] 이들 데이터는 다양한 ADCC 방법에 의해 평가했을 때 CSL360 처리가 6개의 AML 샘플 중 4개와 2개의 ALL 샘플 중 0개에서 온건한 ADCC 활성을 유도했던 실시예 2에 나타낸 결과와 일치한다.

[0230] **고찰**

[0231] 실시예 5의 데이터는 CD123 MAb의 Fc 최적화가 생체외 분석에서 시험된 모든 1차 백혈병 샘플에 대해 유의한 이펙터 기능 반응을 초래했다는 것을 증명하며, Fc 비최적화 항-CD123 MAb와 비교하여 유의한 개선을 나타낸다.

[0232] CD123을 발현하는 ALL 종양에서의 이런 발견은 AML에 더하여 CD123을 발현하는 다른 악성 질환들도 증진된 Fc

이펙터 기능을 가진 항-CD123 MAb 치료제에 감응하게 될 가능성이 있다는 견해와 일치한다[57-61].

[0233] **실시예 6**

[0234] 실시예 4와 5에 설명된 결과는 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 CSL360 변이체가 일단의 CD123을 발현하도록 조작된 셀라인, 본래 CD123을 발현하는 인간 백혈병 셀라인에 대해 시험관내에서, 그리고 또한 중요한 것은 AML 또는 ALL 환자로부터 채취한 1차 백혈병 샘플을 사용한 생체외 분석에서도 증진된 ADCC 활성을 나타낸다는 것을 시사한다. AML과 ALL 환자의 1차 샘플 모두에 대한 생체외 ADCC 데이터는 이런 생체외 환경에서의 시험이 인체 질환 상황에서 효능에 대한 잠재력의 어떤 추정을 허용하기 때문에 특히 중요하다.

[0235] 이 실시예에서, 이 실험은 인간 ALL의 NOD/SCID 마우스 이종이식편 모델에서의 치료 효능에 대하여 CSL360의 Fc-조작된 변이체(168-26Fc3)를 시험하는 데까지 확장된다. 이것은 ALL 임상 질환을 정확하게 반영하며, 환자의 치료성과와 유의하게 상호 관련된다고 증명된 전임상 모델이다[62]. 이 모델의 임상 관련성은 잘 인식되고 있고, 현재 National Cancer Institute가 발의한 소아 전임상 시험 프로그램의 일환으로 포함되어 있다[63].

[0236] **방법**

[0237] 소아 ALL 환자로부터 유래된 인간 ALL 백혈병 세포(ALL-2)를 이전에 설명된 대로[62] 암컷비-비만 당뇨병(NOD)/sicd-/- 마우스에 정맥내 접종하여 증식시켰다. 이 이종이식편은 공통 $CD10^{+}$ B-세포 전구체 ALL로 진단된 65개월령 암컷의 세 번째 재발로부터 유래되었다. 환자는 그후 질환으로 인해 사망했고, 이 이종이식편은 종래의 화학요법에 내성이다[62]. 마우스를 6-7마리씩 치료군과 대조군에 무작위로 배정하고, 치료를 개시할 때 모든 그룹의 각 마우스에 대략 동일한 중간값으로 백혈병 부하를 제공했다. 모든 마우스는 장벽 조건에서 유지했으며, University of New South Wales의 동물관리 윤리위원회에 의해 승인된 프로토콜 및 조건을 사용하여 실험을 수행하였다. 인간 CD45-양성(hCD45+) 세포의 퍼센트를 이전에 설명된 대로[62] 결정했다.

[0238] GraphPad Prism 4.0a를 사용하여 실시된 대로, 정확한 로그-순위 시험을 사용하여 치료군과 대조군 간에 무재발 생존율 분포를 비교했다. *P* 값은 양측 P 값이었고, 조사성 연구의 경우에는 다중 비교에 맞게 조정하지 않았다.

[0239] 이식 후 34일째에 치료를 시작하였고, 마우스는 100 $\mu\ell$ 당 300 μg의 포스페이트 완충 식염수에 용해된 항체 치료를 받았다. 매주 3회 복강내 주사에 의해 항체를 투여했다(2-3일마다). 매주 마우스의 꼬리 정맥에서 채혈하여 백혈병 부하를 모니터했다. 재발사건에 도달할 때까지 치료를 계속했으며, 재발사건은 말초혈 중 25% hCD45+ 부하로서 정의하였다.

[0240] **결과**

[0241] **도 17**은 관련 없는 MAb 대조군(뮤린 IgG2a), 뮤린 MAb 7G3, 인간화되고 친화성 최적화된 변이체 168-26 및 후자의 Fc-조작된 변이체 168-26Fc3을 포함하여 다양한 항체들의 ALL-생착된 마우스에 대한 효과를 시험한다. 이 도면은 각 치료군에 대한 무재발 생존율(EFS)의 Kaplan-Meier 곡선을 도시하며, 각 수직선은 재발사건을 표시한다. 대조군 MAb로 치료된 마우스는 7G3, 168-26 및 168-26Fc3의 경우의 각 56.3, 59.9 및 65.7일과 비교하여 53.5일의 중간 EFS를 나타냈다. 이 결과는 7G3과 168-26이 각각 2.9일 및 6.4일까지 백혈병의 성장을 지연시켰지만, 그 효과는 대조군 MAb와 비교하여 통계적으로 유의하지 않았다는 것을 보여준다($P > 0.05$). 168-26Fc3이 ALL의 성장에 대해 가장 두드러진 효과를 나타냈으며, 대조군 치료된 동물과 비교하여 12.2일의 백혈병 성장 지연은 통계적으로 유의했다($P = 0.044$). 중요한 것은 Fc-조작된 변이체 168-26Fc3 대 168-26(Fc 변형이 없는 동일한 MAb)의 증가된 EFS 효과가 5.9일의 백혈병 성장 지연을 나타내어 통계적으로 유의했다는 점이다($P = 0.037$). 이것은 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 항-CD123 항체가 생체내에서 개선된 치료 효능을 나타낸다는 것을 증명한다.

[0242] **결론**

[0243] 이들 데이터는, 이 데이터가 증진된 Fc 이펙터 기능을 가진 항-CD123 MAb가 Fc-미변형된 MAb와 비교하여 사전 확립된 백혈병을 가진 마우스에서 개선된 치료 효능을 가진다는 것을 증명한다는 점에서 앞선 실시예들에 제시된 데이터를 유의하게 확장시킨다. 중요한 것은 인간 질환의 경과를 예측할 수 있다고 증명된 ALL의 전임상 확증 모델[62]의 사용이 이러한 Fc 최적화된 항 CD123 MAb가 또한 백혈병 환자에서 개선된 임상 효능을 나타낼 수 있다는 것을 강하게 뒷받침한다는 점이다.

[0244] 참고문헌

[0245] 1. Wang, J.C. & Dick, J.E. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol* (2005).

[0246] 2. Bonnet, D. & Dick, J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med,* **3**, 730-737 (1997).

[0247] 3. Hope, K.J., Jin, L. & Dick, J.E. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol.* **5**, 738-743 (2004).

[0248] 4. Lapidot, T., *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645-648 (1994).

[0249] 5. Guan, Y. & Hogge, D.E. Proliferative status of primitive hematopoietic progenitors from patients with acute myelogenous leukemia (AML). *Leukemia* **14**, 2135-2141 (2000).

[0250] 6. Guzman, M.L., *et al.* Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* **98**, 2301-2307 (2001).

[0251] 7. Lowenberg, B., Griffin, J.D. & Tallman, M.S. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 82-101 (2003).

[0252] 8. van Rhenen, A., *et al.* High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. *Clin Cancer Res* **11**, 6520-6527 (2005).

[0253] 9. Morgan, M.A. & Reuter, C.W. Molecularly targeted therapies in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Ann Hematol* **85**, 139-163 (2006).

[0254] 10. Tallman, M.S. New agents for the treatment of acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* **19**, 311-320 (2006).

[0255] 11. Aribi, A., Ravandi, F. & Giles, F. Novel agents in acute myeloid leukemia. *Cancer J.* **12**, 77-91 (2006).

[0256] 12. Abutalib, S.A. & Tallman, M.S. Monoclonal antibodies for the treatment of acute myeloid leukemia. *Curr Pharm Biotechnol.* **7**, 343-369 (2006).

[0257] 13. Stone, R.M. Novel therapeutic agents in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol.* **35**, 163-166 (2007).

[0258] 14. Krug, U., *et al.* New molecular therapy targets in acute myeloid leukemia. *Recent Results Cancer Res.* **176**, 243-262 (2007).

[0259] 15. Miyajima, A., Mui, A.L., Ogorochi, T. & Sakamaki, K. Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5. *Blood* **82**, 1960-1974 (1993).

[0260] 16. Bagley, C.J., Woodcock, J.M., Stomski, F.C. & Lopez, A.F. The structural and functional basis of cytokine receptor activation: lessons from the common beta subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3 (IL-3), and IL-5 receptors. *Blood* **89**, 1471-1482 (1997).

[0261] 17. Munoz, L., *et al.* Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica* **86**, 1261-1269 (2001).

[0262] 18. Sperr, W.R., *et al.* Human leukaemic stem cells: a novel target of therapy. *Eur J Clin Invest.* **34** Suppl 2, 31-40 (2004).

[0263] 19. Graf, M., *et al.* Expression and prognostic value of hemopoietic cytokine receptors in acute myeloid leukemia (AML): implications for future therapeutical strategies. *Eur J Haematol.* **72**, 89-106 (2004).

[0264] 20. Florian, S., *et al.* Detection of molecular targets on the surface of CD34+/CD38-- stem cells in various myeloid malignancies. *Leuk Lymphoma* **47**, 207-222 (2006).

[0265] 21. Testa, U., *et al.* Elevated expression of IL-3Ralpha in acute myelogenous leukemia is associated with enhanced blast proliferation, increased cellularity, and poor prognosis. *Blood* **100**, 2980-2988 (2002).

[0266] 22. Riccioni, R., *et al.* Immunophenotypic features of acute myeloid leukemias overexpressing the interleukin 3 receptor alpha chain. *Leuk Lymphoma* **45**, 1511-1517 (2004).

[0267] 23. Yalcintepe, L., Frankel, A.E. & Hogge, D.E. Expression of interleukin-3 receptor subunits on defined subpopulations of acute myeloid leukemia blasts predicts the cytotoxicity of diphtheria toxin interleukin-3 fusion protein against malignant progenitors that engraft in immunodeficient mice. *Blood* **108**, 3530-3537 (2006).

[0268] 24. Hauswirth, A.W., *et al.* Expression of the target receptor CD33 in CD34+/CD38-/CD123+ AML stem cells. *Eur J Clin Invest.* **37**, 73-82 (2007).

[0269] 25. Jordan, C.T., *et al.* The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* **14**, 1777-1784 (2000).

[0270] 26. Budel, L.M., Touw, I.P., Delwel, R., Clark, S.C. & Lowenberg, B. Interleukin-3 and granulocyte-monocyte colony-stimulating factor receptors on human acute myelocytic leukemia cells and relationship to the proliferative response. *Blood* **74**, 565-571 (1989).

[0271] 27. Salem, M., *et al.* Maturation of human acute myeloid leukaemia in vitro: the response to five recombinant haematopoietic factors in a serum-free system. *Br J Haematol.* **71**, 363-370 (1989).

[0272] 28. Delwel, R., *et al.* Growth regulation of human acute myeloid leukemia: effects of five recombinant hematopoietic factors in a serum-free culture system. *Blood* **72**, 1944-1949 (1988).

[0273] 29. Miyauchi, J., *et al.* The effects of three recombinant growth factors, IL-3, GM-CSF, and G-CSF, on the blast cells of acute myeloblastic leukemia maintained in short-term suspension culture. *Blood* **70**, 657-663 (1987).

[0274] 30. Pebusque, M.J., *et al.* Recombinant human IL-3 and G-CSF act synergistically in stimulating the growth of acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* **3**, 200-205 (1989).

[0275] 31. Vellenga, E., Ostapovicz, D., O'Rourke, B. & Griffin, J.D. Effects of recombinant IL-3, GM-CSF, and G-CSF on proliferation of leukemic clonogenic cells in short-term and long-term cultures. *Leukemia* **1**, 584-589 (1987).

[0276] 32. Testa, U., *et al.* Interleukin-3 receptor in acute leukemia. *Leukemia* **18**, 219-226 (2004).

[0277] 33. Sun, Q., *et al.* Monoclonal antibody 7G3 recognizes the N-terminal domain of the human interleukin-3 (IL-3) receptor alpha-chain and functions as a specific IL-3 receptor antagonist. *Blood* **87**, 83-92 (1996).

[0278] 34. Niwa, R., *et al* . IgG subclass-independent improvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by fucose removal from Asn^{297}-linked oligo saccharides. *J. Immunol. Methods*, **306**, 151-160 (2005).

[0279] 35. Lazar, G.A., *et al.* Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, **103**, 4005-4010 (2006).

[0280] 36. Shields, R.L., *et al.*. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody dependent cellular toxicity. *J. Biol. Chem.*, **277**:26733-26740 (2002).

[0281] 37. Desjarlais *et al* Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective. *Drug Discov Today*. 2007 Nov; 12(21-22):898-910).

[0282] 38. Mazurier, F., Doedens, M., Gan, O.I. & Dick, J.E. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat Med.* **9**, 959-963 (2003).

[0283] 39. Lopez, A.F., *et al.* Recombinant human interleukin-3 stimulation of hematopoiesis in humans: loss of responsiveness with differentiation in the neutrophilic myeloid series. *Blood* **72**, 1797-1804 (1988).

[0284] 40. Guthridge, M.A., *et al.* The phosphoserine-585-dependent pathway of the GM-CSF/IL-3/IL-5 receptors mediates hematopoietic cell survival through activation of NF-kappaB and induction of bcl-2. *Blood* **103**, 820-827 (2004).

[0285] 41. Guthridge, M.A., *et al.* Site-specific serine phosphorylation of the IL-3 receptor is required for hemopoietic cell survival. *Mol Cell* **6**, 99-108 (2000).

[0286] 42. Tanaka, T., *et al.* Selective long-term elimination of natural killer cells in vivo by an anti-interleukin 2 receptor beta chain monoclonal antibody in mice. *J Exp Med.* **178**, 1103-1107 (1993).

[0287] 43. McKenzie, J.L., Gan, O.I., Doedens, M. & Dick, J.E. Human short-term repopulating stem cells are efficiently detected following intrafemoral transplantation into NOD/SCID recipients depleted of CD122+ cells. *Blood* **106**, 1259-1261 (2005).

[0288] 44. Dick, J.E. & Lapidot, T. Biology of normal and acute myeloid leukemia stem cells. *Int J Hematol.* **82**, 389-396 (2005).

[0289] 45. Kollet, O., *et al.* Rapid and efficient homing of human CD34(+)CD38(-/low)CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Blood* **97**, 3283-3291 (2001).

[0290] 46. Lapidot, T., Dar, A. & Kollet, O. How do stem cells find their way home℃ *Blood* **106**, 1901-1910 (2005).

[0291] 47. Hogge, D.E., Feuring-Buske, M., Gerhard, B. & Frankel, A.E. The efficacy of diphtheria-growth factor fusion proteins is enhanced by co-administration of cytosine arabinoside in an immunodeficient mouse model of human acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* **28**, 1221-1226 (2004).

[0292] 48. Feuring-Buske, M., Frankel, A.E., Alexander, R.L., Gerhard, B. & Hogge, D.E. A diphtheria toxin-interleukin 3 fusion protein is cytotoxic to primitive acute myeloid leukemia progenitors but spares normal progenitors. *Cancer Res.* **62**, 1730-1736 (2002).

[0293] 49. Du, X., Ho, M. & Pastan, I. New immunotoxins targeting CD123, a stem cell antigen on acute myeloid leukemia cells. *J Immunother (1997)* **30**, 607-613 (2007).

[0294] 50. Jenkins *et al.*, A Cell Type-specific Constitutive Point Mutant of the Common -Subunit of the Human Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor (GM-CSF), Interleukin (IL)-3, and IL-5 Receptors Requires the GM-CSF Receptor -Subunit for Activation. *J Biol Chem*, 1999 274:13, 8669-8677)

[0295] 51. Fischer, Lars, Olaf Penack, Chiara Gentilini, Axel Nogai, Arne Muessig, Eckhard Thiel and Lutz Uharek. The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells. *Exp Hematol.* **34**: 753-759 (2006)

[0296] 52. Neri S, Mariani E, Meneghetti A, Cattini L and Facchini A. Calcein-Acetoxymethyl cytotoxicity assay: standardisation of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clinical and Diagnostic Lab Immunol*. **8**:1131-1135 (2001)

[0297] 53. Zhou *et al*, Development of a simple and rapid method for producing non-fucosylated oligomannose containing antibodies with increased effector function. *Biotechnol Bioeng*. 2008 99(3):652-65)

[0298] 54. Tan, P., *et al*, "Superhumanized" Antibodies: reduction of immunogenic potential by complementarity-determining region grafting with human germline sequences: application to an anti-CD28. 2002 *J Immunol.* **169**, 1119-1125)

[0299] 55. Kopsidas, G., *et al*, RNA mutagenesis yields highly diverse mRNA libraries for in vitro protein evolution. 2007 BMC *Biotechnol*. **7**, 18)

[0300] 56. Nimmerjahn and& Ravetch, Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 2005 310(5753):1510-2).

[0301] 57. Feuillard *et al*, Clinical and biologic features of CD4(+)CD56(+) malignancies *Blood* 2002 99(5):1556-63

[0302] 58. Munoz *et al*, Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies *Haematologica* 2001 86(12):1261-9

[0303] 59. Lhermitte *et al*, Most immature T-ALLs express Ra-IL3 (CD123): possible target for DT-IL3 therapy. *Leukemia* 2006 20(10):1908-10

[0304] 60. Aldinucci *et al*, The role of interleukin-3 in classical Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 2005 46(3):303-11

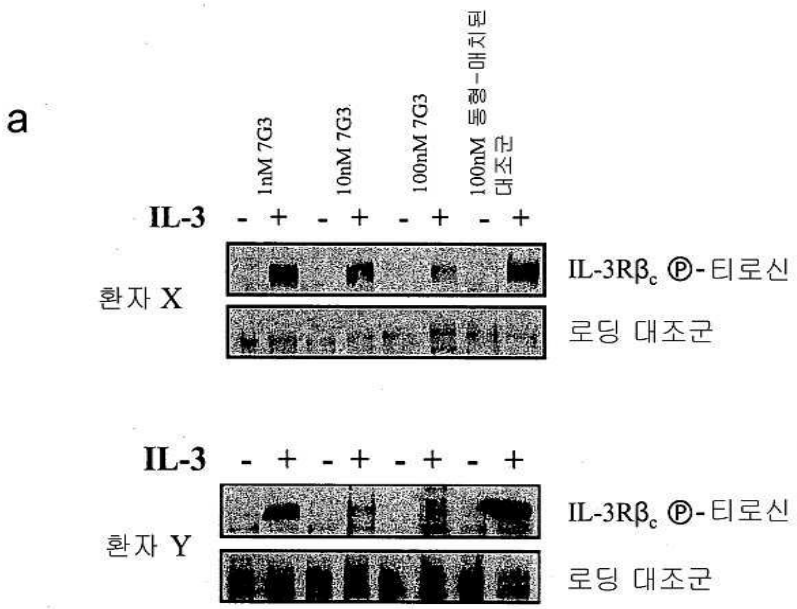
[0305] 61. Jiang *et al*, Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 26;96(22):12804-9)

[0306] 62. Liem *et al*, Characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia xenograft models for the preclinical evaluation of new therapies *Blood* 2004;103(10):3905-14)

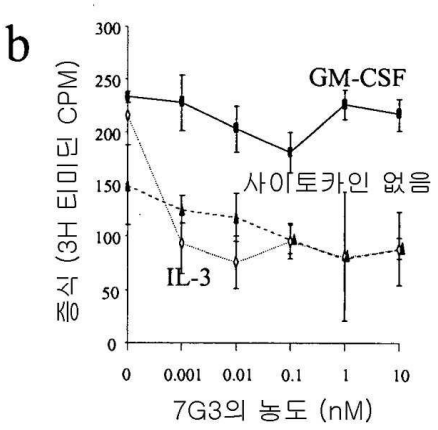
[0307] 63. Houghton *et al*, Testing of New Agents in Childhood Cancer Preclinical Models. Clinical Cancer Research. 2002; 8:3646-3657)

도면

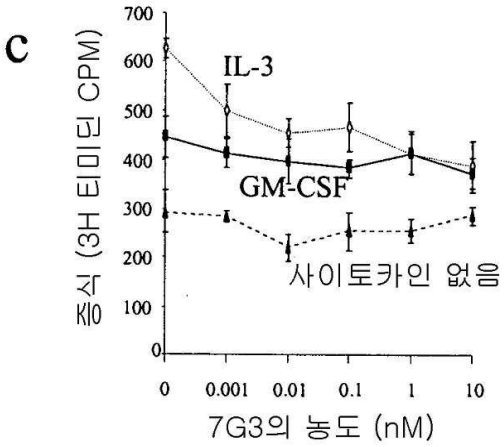
도면1a



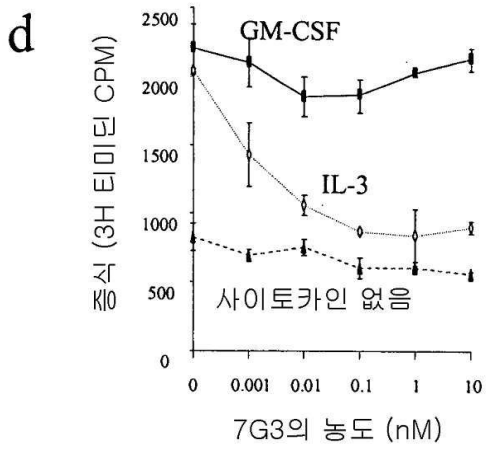
도면1b



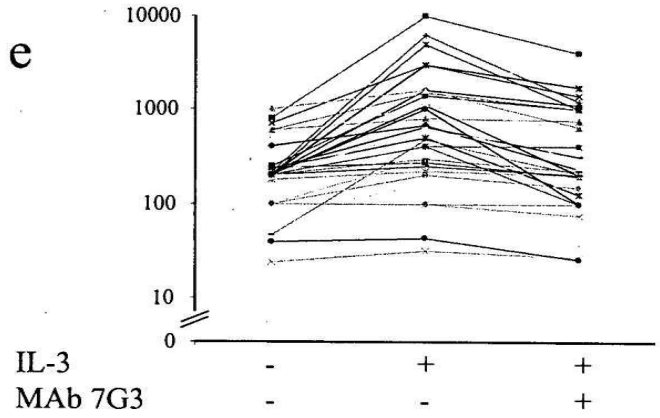
도면1c



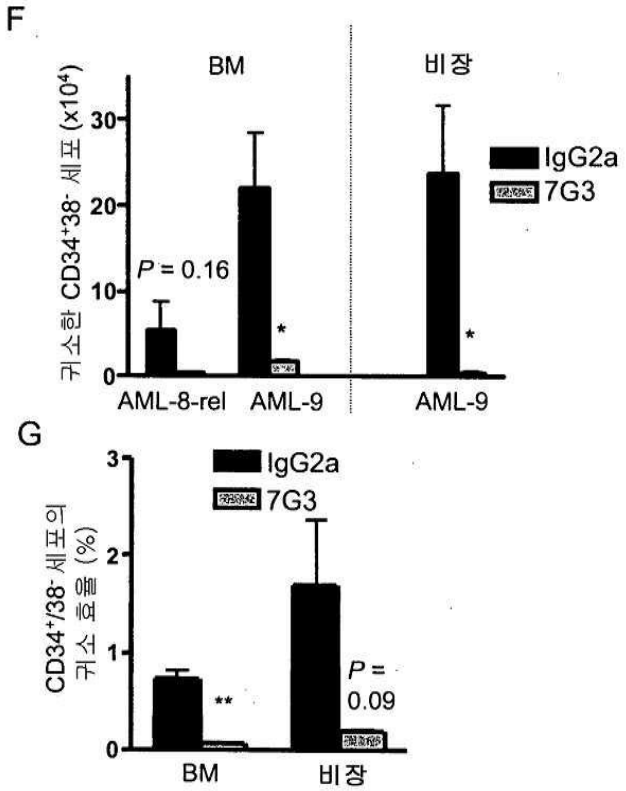
도면1d



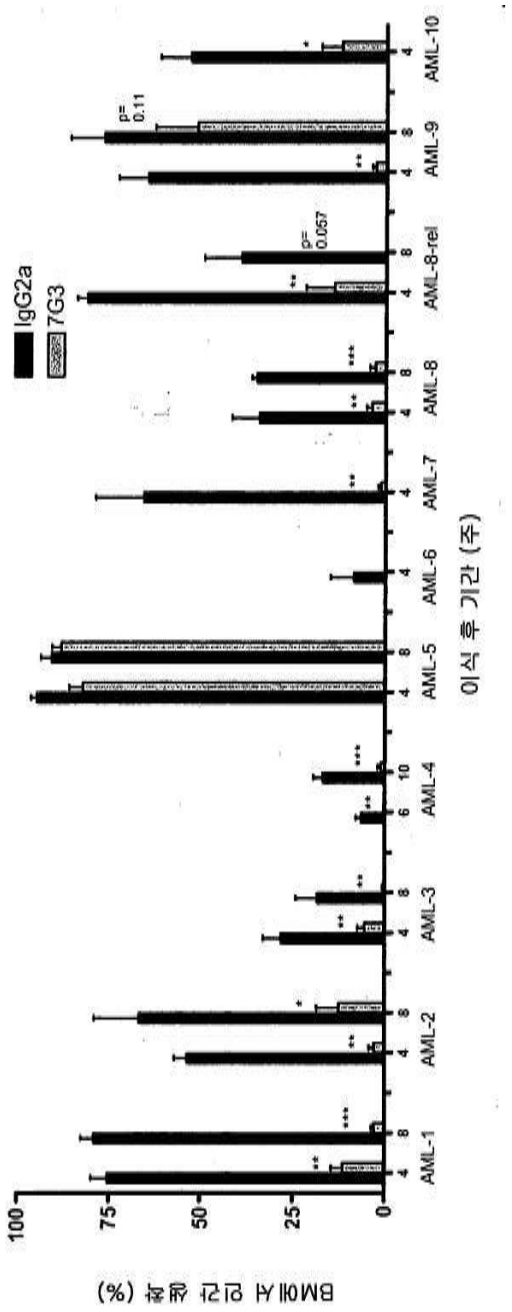
도면1e


e
10000
1000
100
10
0
IL-3 - + +
MAb 7G3 - - +

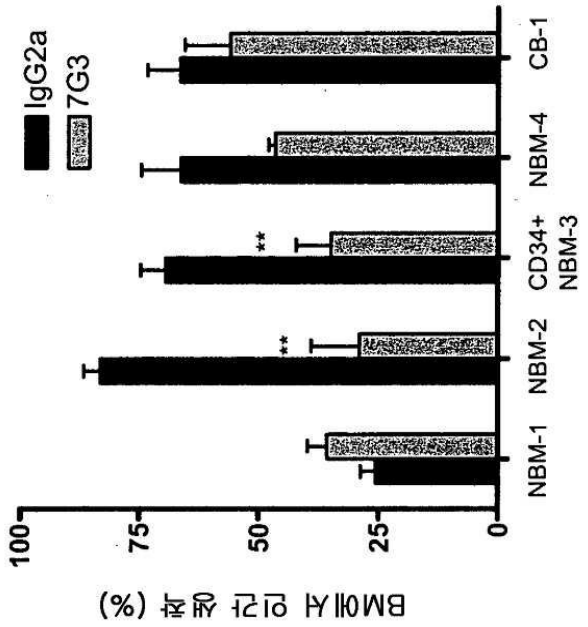
도면2


F
BM
비장
귀소한 CD34+38- 세포 (x10⁴)
30
20
10
0
P = 0.16
*
*
IgG2a
7G3
AML-8-rel
AML-9
AML-9
G
IgG2a
7G3
CD34+/38- 세포의 귀소 효율 (%)
3
2
1
0
**
P = 0.09
BM
비장

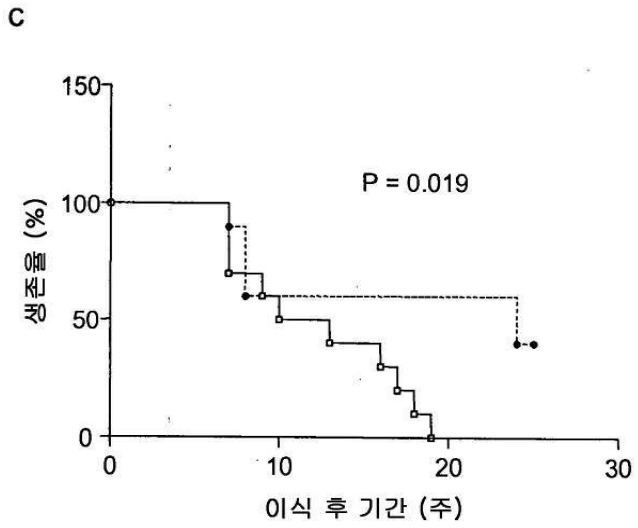
도면2a


IgG2a
7G3
p= 0.11
p= 0.057
AML-1
AML-2
AML-3
AML-4
AML-5
AML-6
AML-7
AML-8
AML-8-rel
AML-9
AML-10
이식 후 기간 (주)
BM에서 인간 생착 (%)
0
25
50
75
100

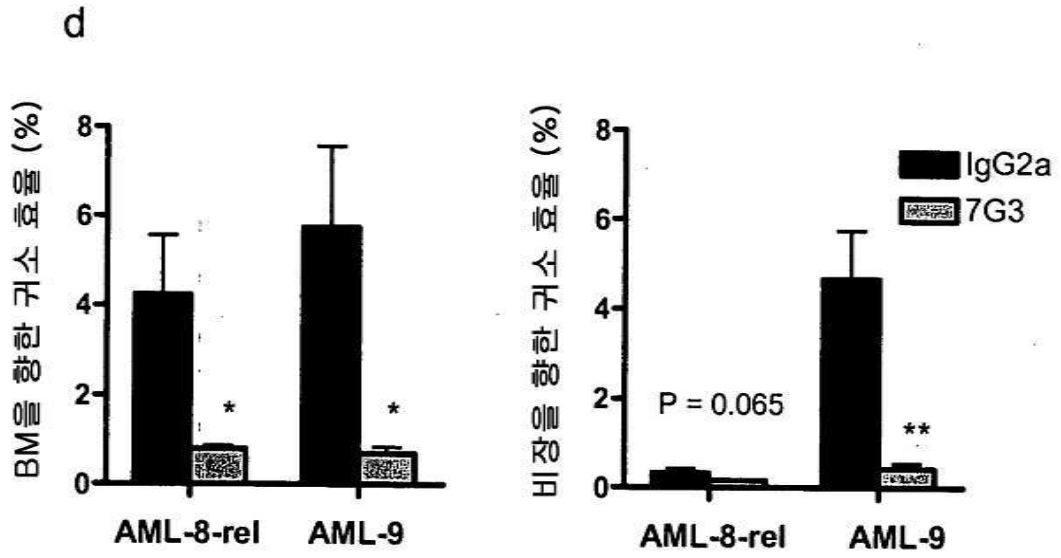
도면2b


IgG2a
7G3
CB-1
NBM-4
CD34+ NBM-3
NBM-2
NBM-1
**
**
100
75
50
25
0
BM에서 인간 생착 (%)

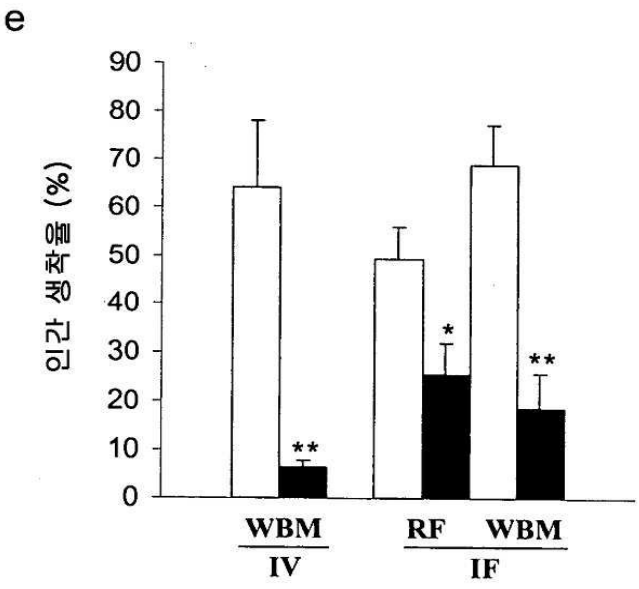
도면2c


c
150
100
50
0
생존율 (%)
P = 0.019
0
10
20
30
이식 후 기간 (주)

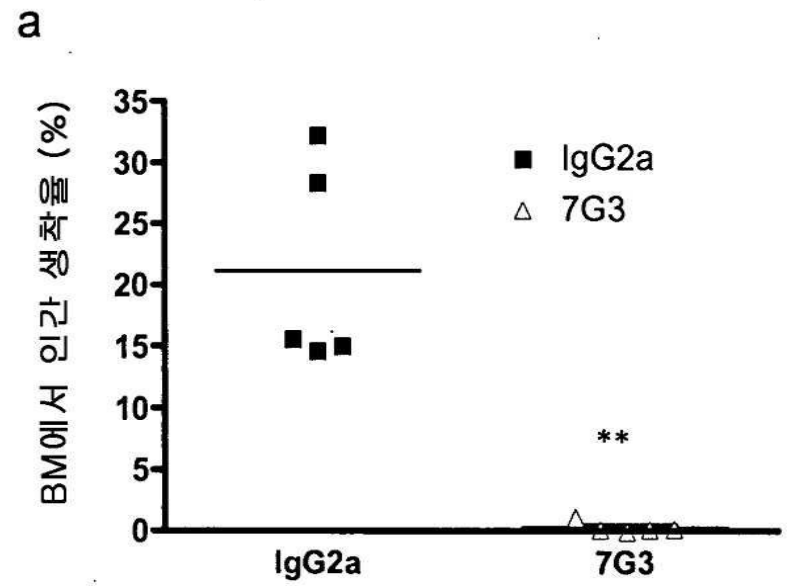
도면2d


d
BM을 향한 귀소 효율 (%)
8
6
4
2
0
*
*
AML-8-rel
AML-9
비장을 향한 귀소 효율 (%)
IgG2a
7G3
P = 0.065
**
AML-8-rel
AML-9

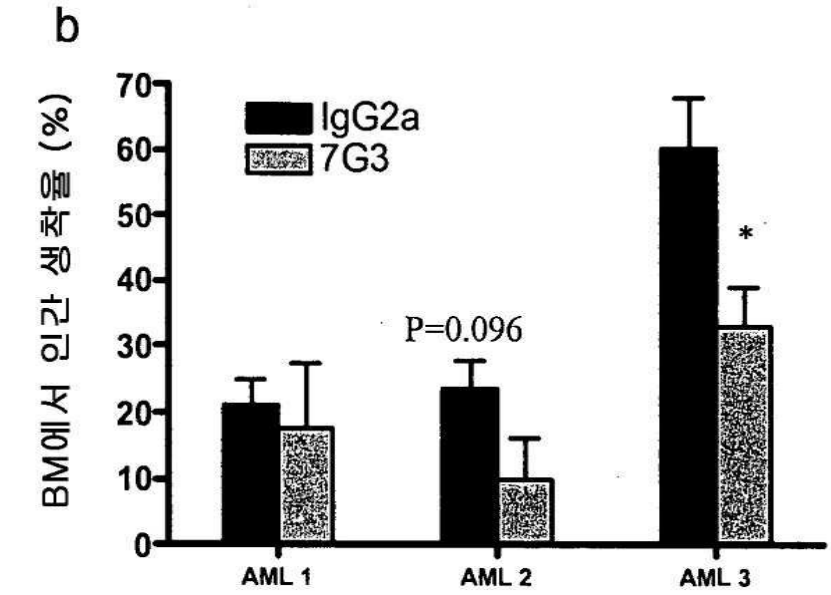
도면2e


e
인간 생착율 (%)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
**
*
**
WBM
IV
RF
WBM
IF

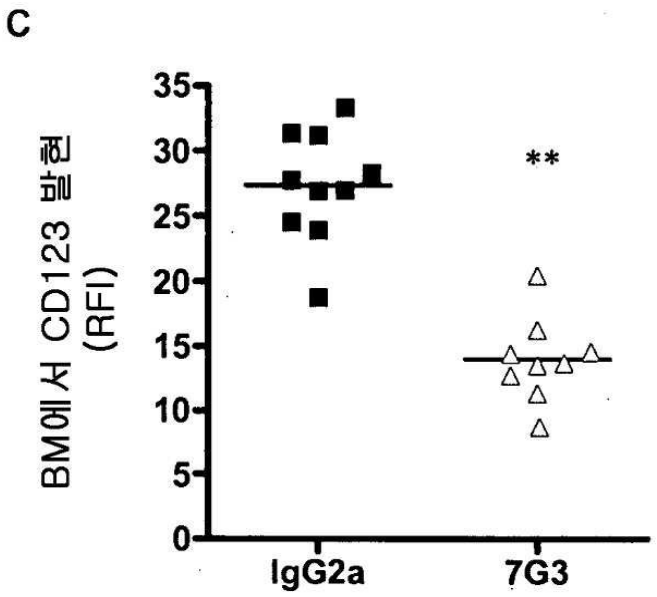
도면3a


a
BM에서 인간 생착율 (%)
35
30
25
20
15
10
5
0
IgG2a
7G3
**
IgG2a
7G3

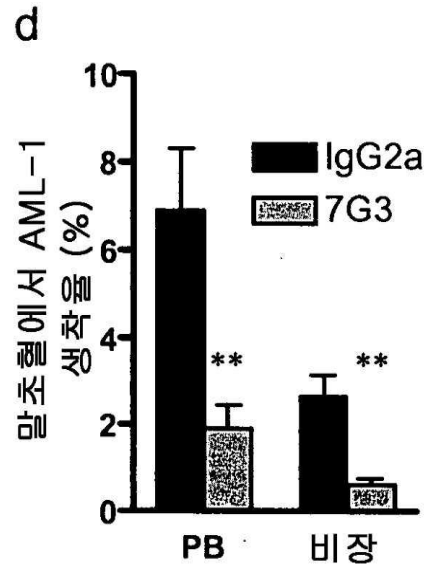
도면3b


b
BM에서 인간 생착율 (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
IgG2a
7G3
P=0.096
*
AML 1
AML 2
AML 3

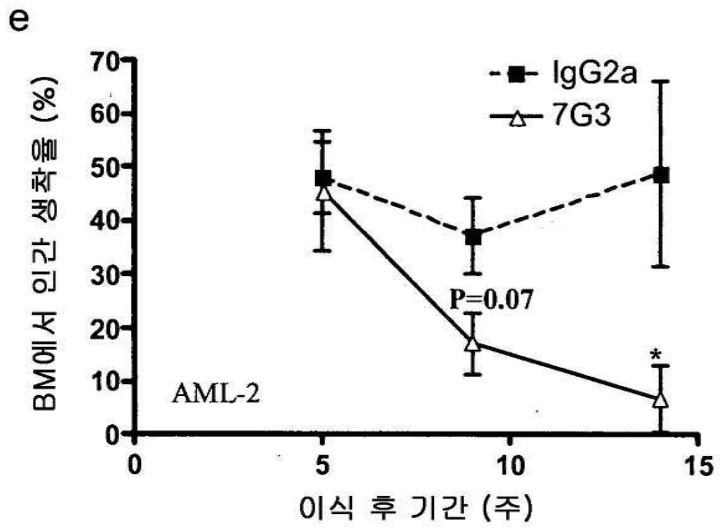
도면3c


c
BM에서 CD123 발현 (RFI)
35
30
25
20
15
10
5
0
**
IgG2a
7G3

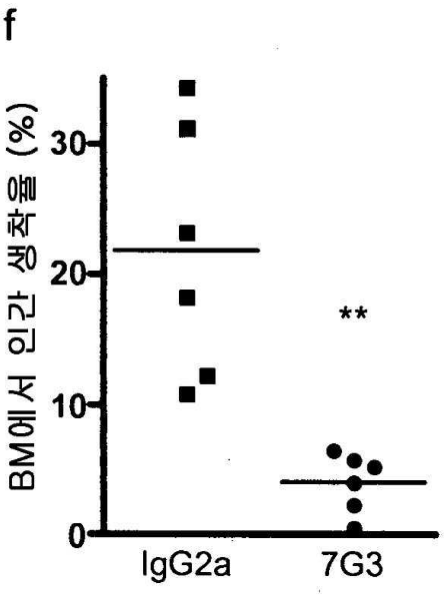
도면3d


d
말초혈에서 AML-1 생착율 (%)
10
8
6
4
2
0
IgG2a
7G3
**
**
PB
비장

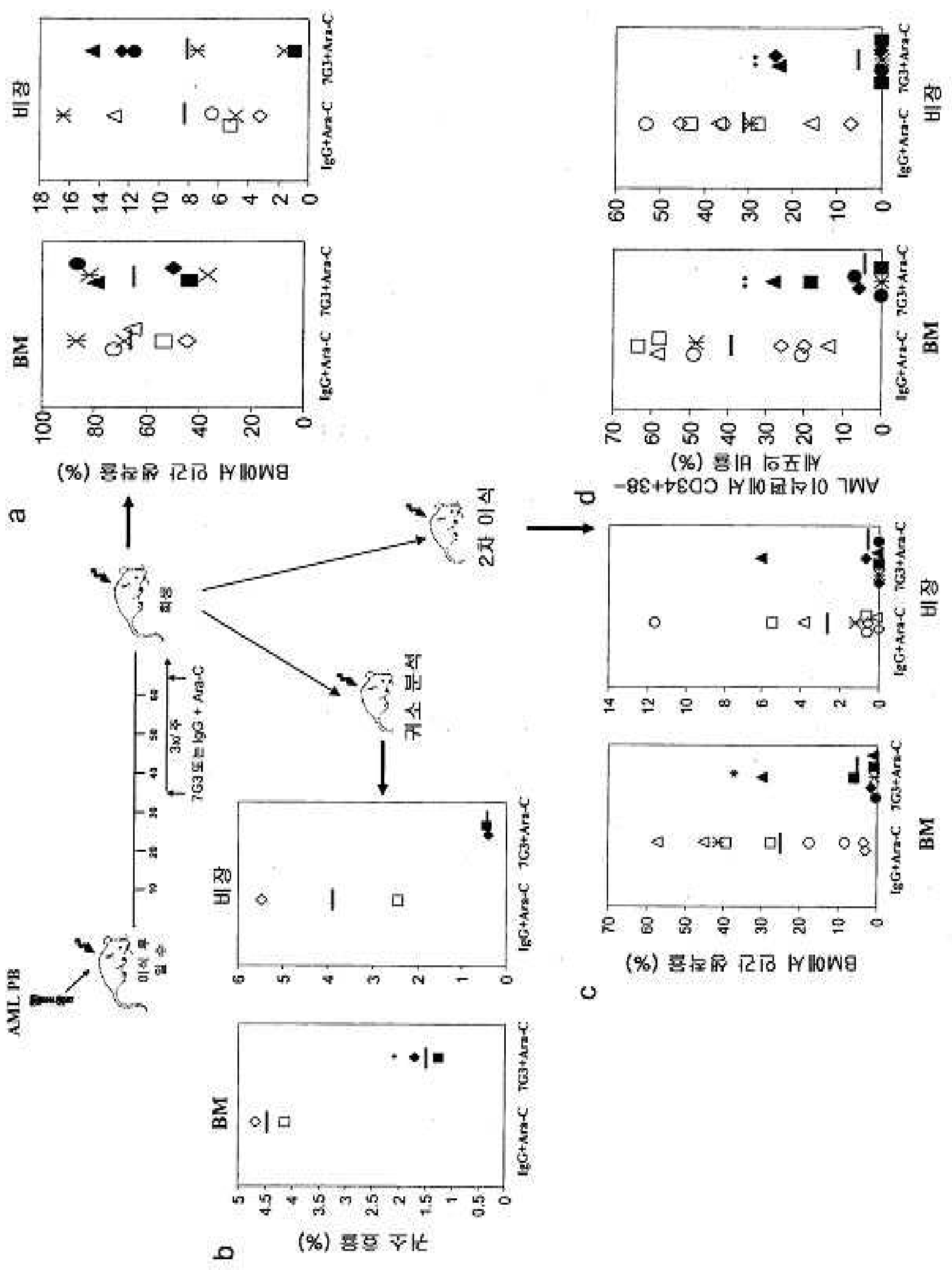
도면3e


e
BM에서 인간 생착율 (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
IgG2a
7G3
P=0.07
*
AML-2
0
5
10
15
이식 후 기간 (주)

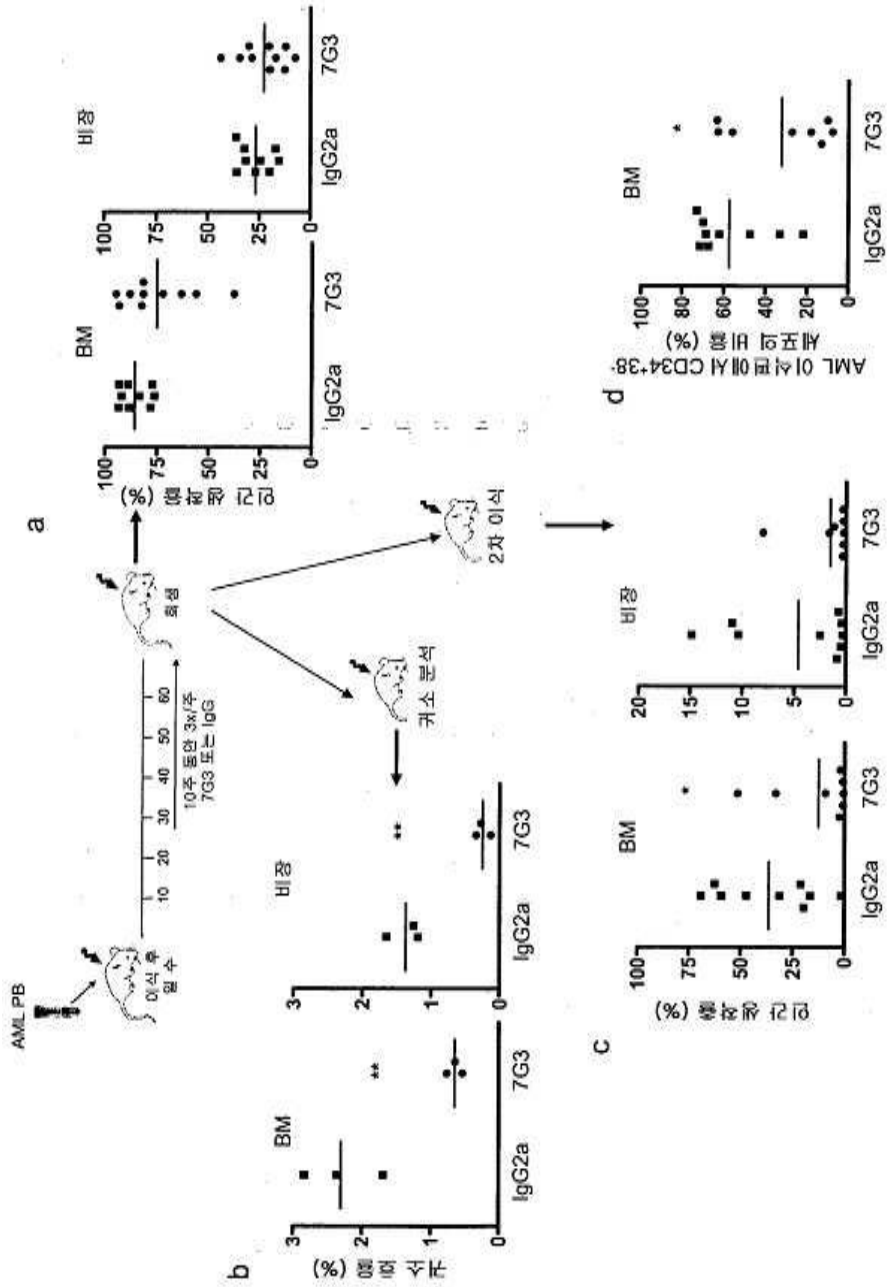
도면3f


f
BM에서 인간 생착율 (%)
30
20
10
0
**
IgG2a
7G3

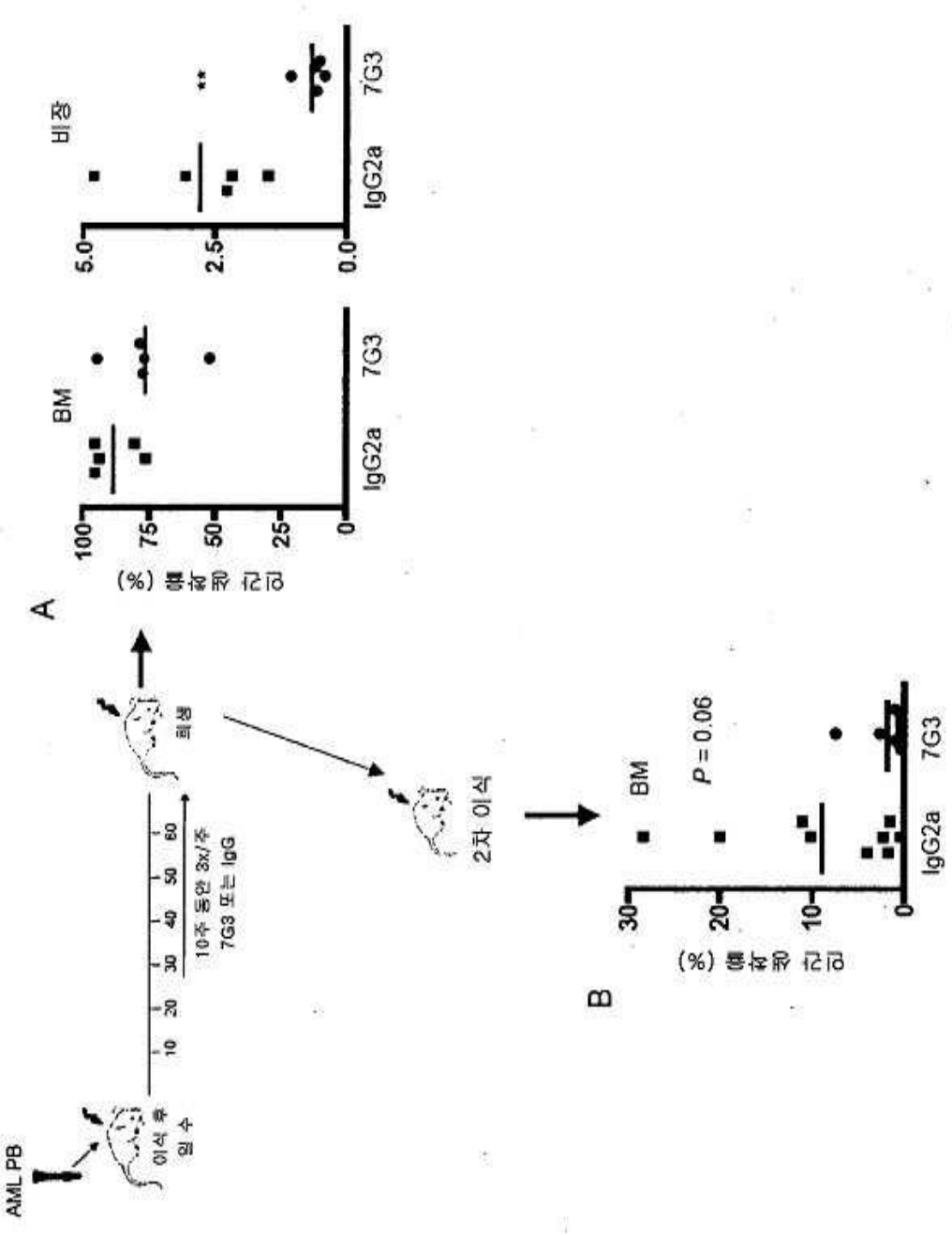
도면4a


a
b
c
d
AML PB
BM
비장
IgG+Ara-C
7G3+Ara-C
BM에서 인간 생착률 (%)
AML 이식편에서 CD34+38- 세포의 비율 (%)
2차 이식
계소 분석
7G3 또는 IgG + Ara-C

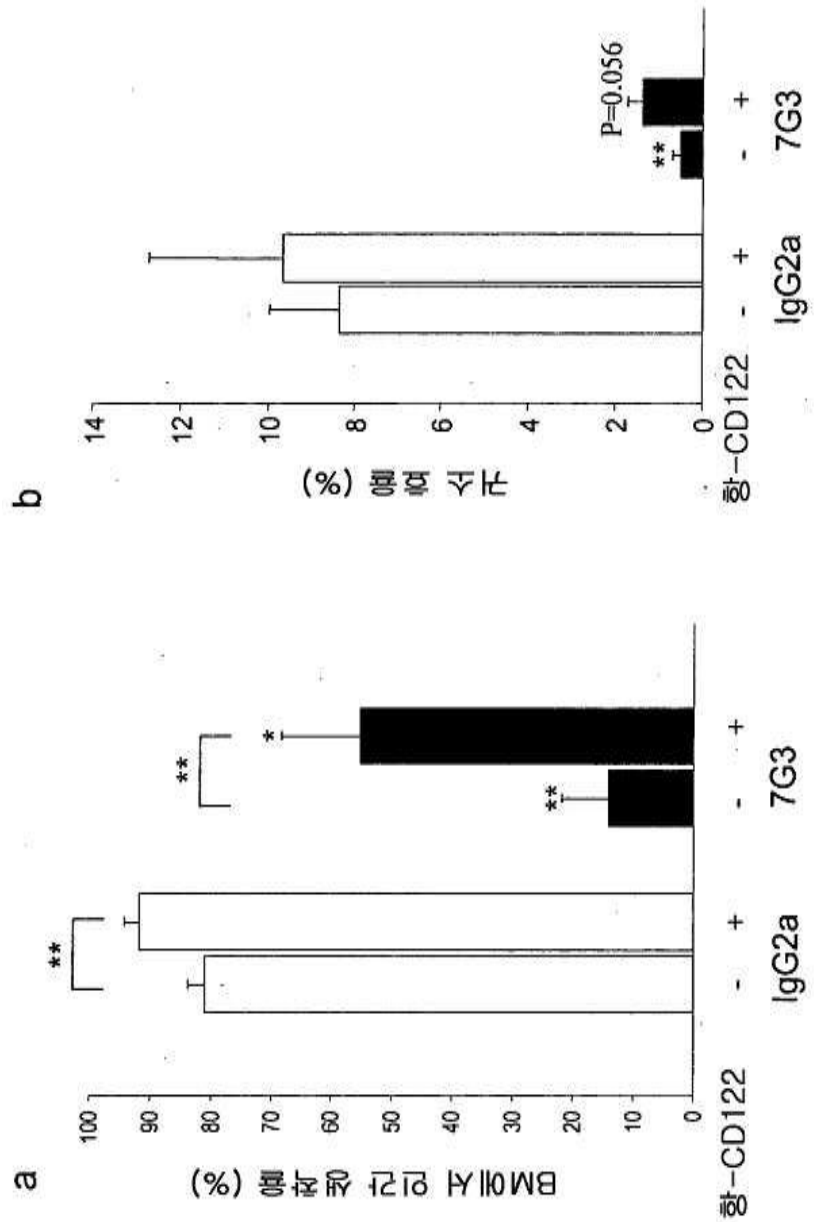
도면4b


a
b
c
d
AML PB
이식 후 일수
10주 동안 3x/주 7G3 또는 IgG
희생
2차 이식
귀소 분석
BM
비장
IgG2a
7G3
인간 성장률 (%)
AML 이식편에서 CD34+38-세포의 비율 (%)

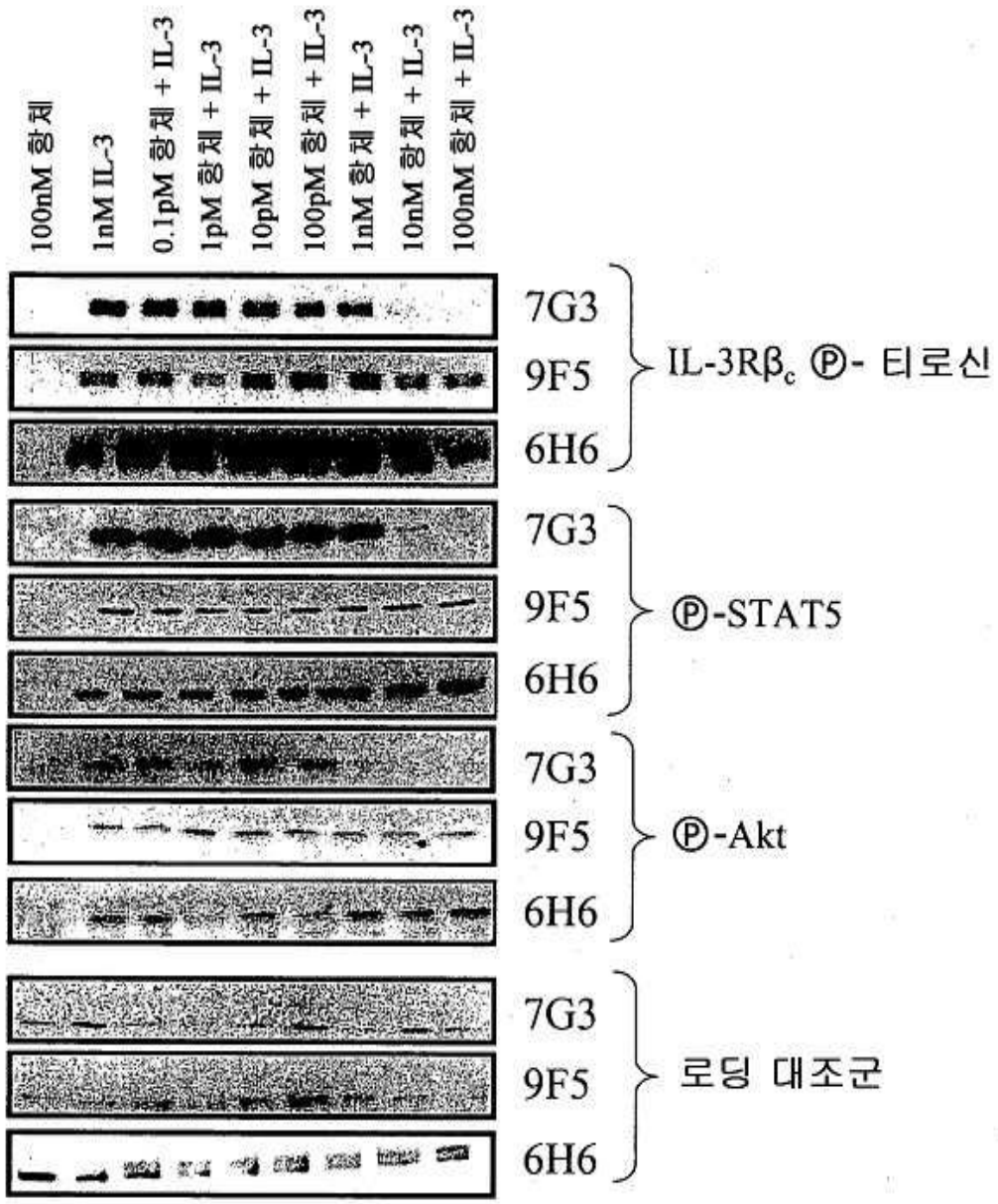
도면4c


AML PB
이식 후 일 수
10주 동안 3x/주
7G3 또는 IgG
희생
2차 이식
A
BM
비장
(%) 백혈병 진행
IgG2a
7G3
B
P = 0.06

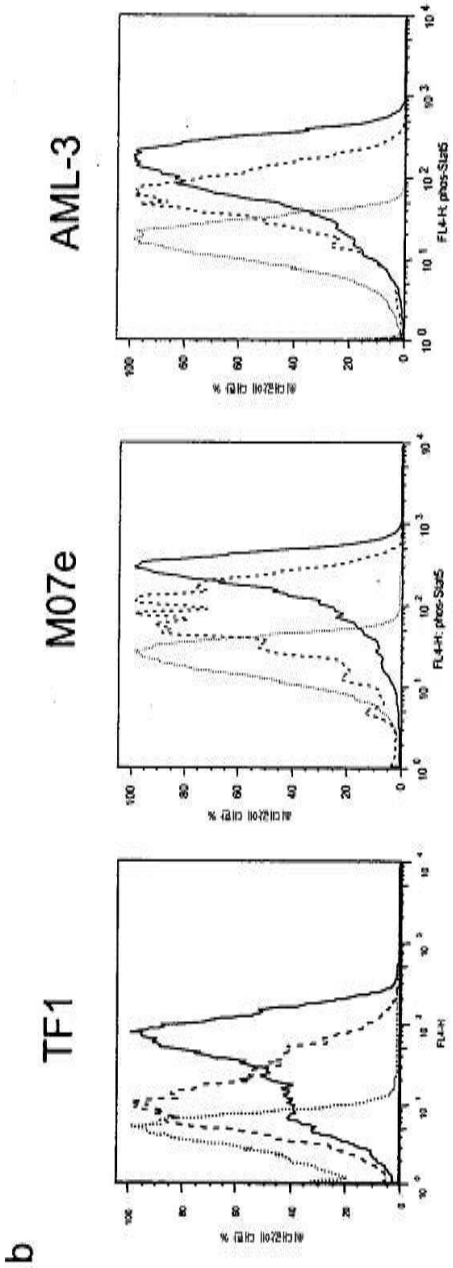
도면5


a
BM에서 인간 생착률 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
**
**
*
항-CD122 - + - +
IgG2a 7G3
b
귀사 팽윤 (%)
14
12
10
8
6
4
2
0
P=0.056
**
항-CD122 - + - +
IgG2a 7G3

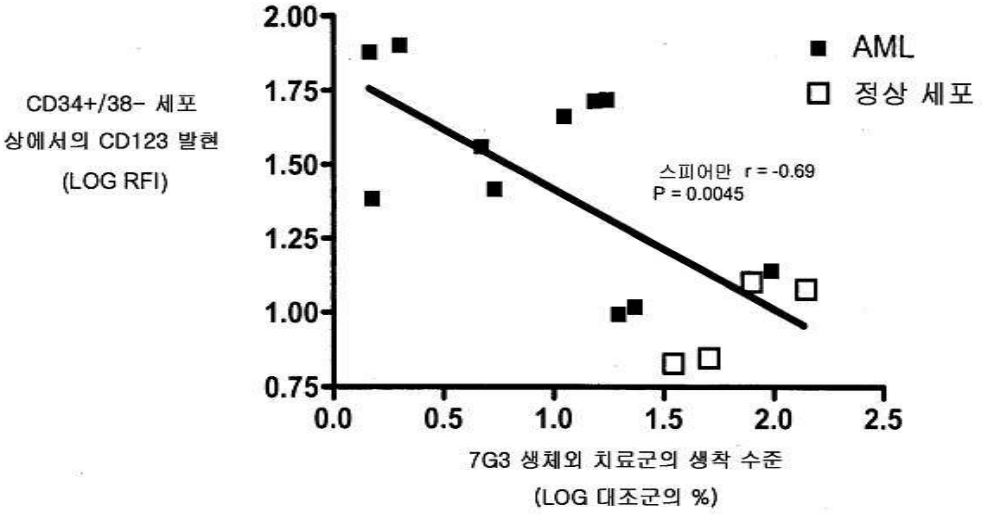
도면6a


100nM 항체
1nM IL-3
0.1pM 항체 + IL-3
1pM 항체 + IL-3
10pM 항체 + IL-3
100pM 항체 + IL-3
1nM 항체 + IL-3
10nM 항체 + IL-3
100nM 항체 + IL-3
7G3
9F5
6H6
IL-3Rβc Ⓟ- 티로신
7G3
9F5
6H6
Ⓟ-STAT5
7G3
9F5
6H6
Ⓟ-Akt
7G3
9F5
6H6
로딩 대조군

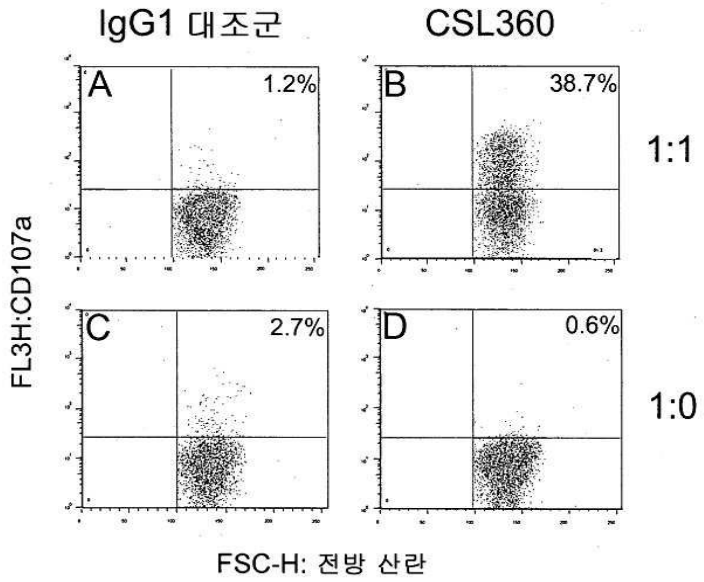
도면6b



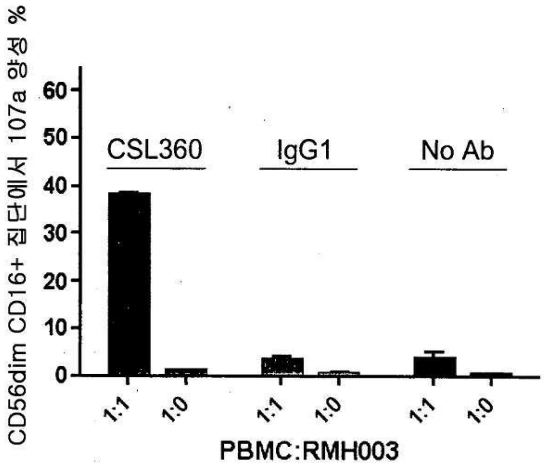
도면7


CD34+/38- 세포
상에서의 CD123 발현
(LOG RFI)
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
AML
정상 세포
스피어만 r = -0.69
P = 0.0045
7G3 생체외 치료군의 생착 수준
(LOG 대조군의 %)

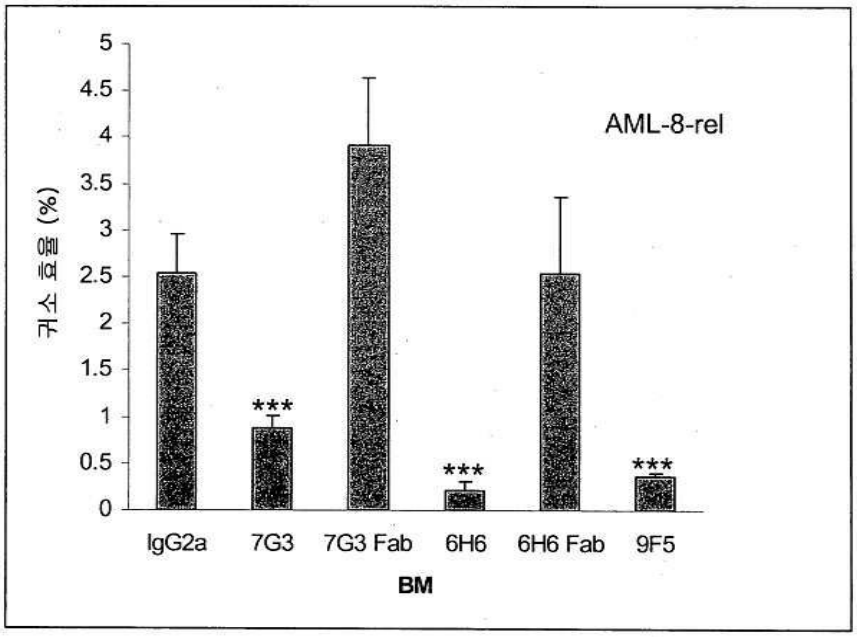
도면8


IgG1 대조군
CSL360
A
1.2%
B
38.7%
1:1
C
2.7%
D
0.6%
1:0
FL3H:CD107a
FSC-H: 전방 산란

도면9

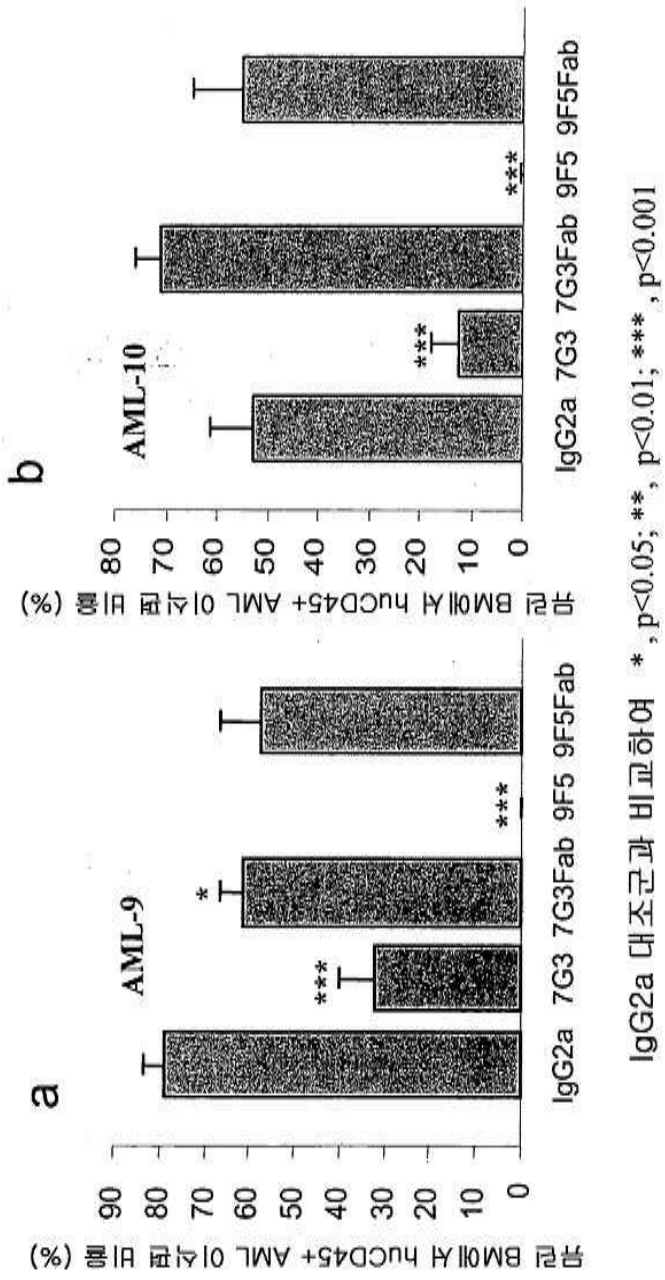


도면10



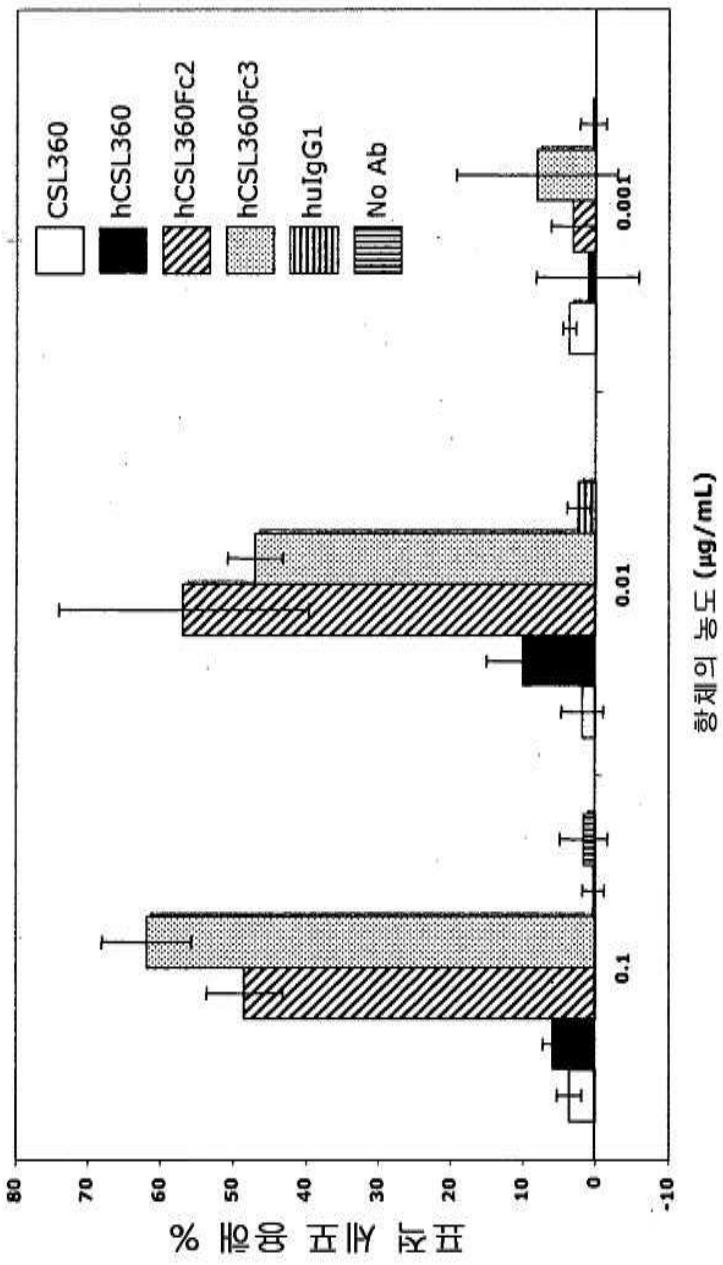
***, IgG2a 대조군과 비교하여 p<0.001

도면11

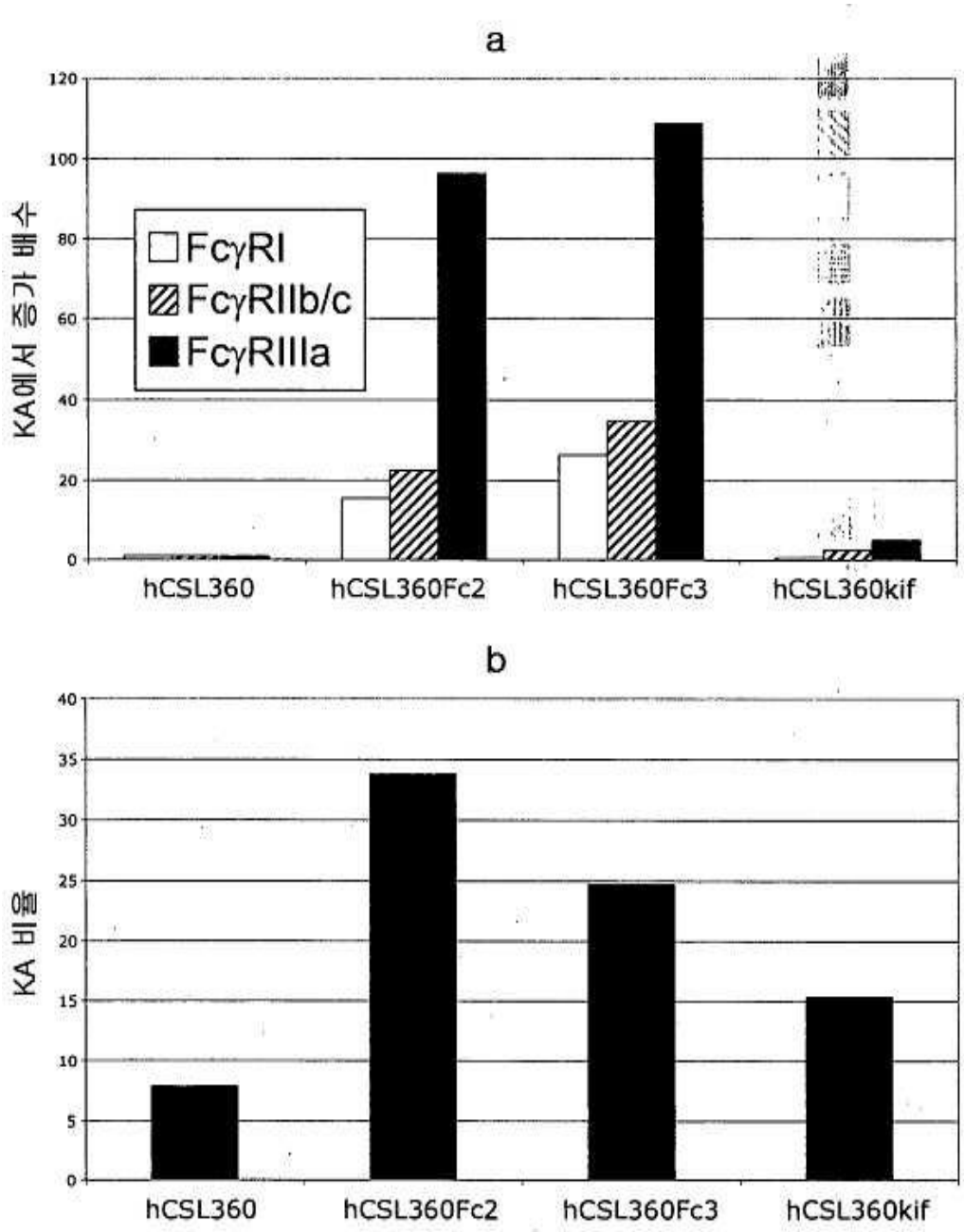


IgG2a 대조군과 비교하여 *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$

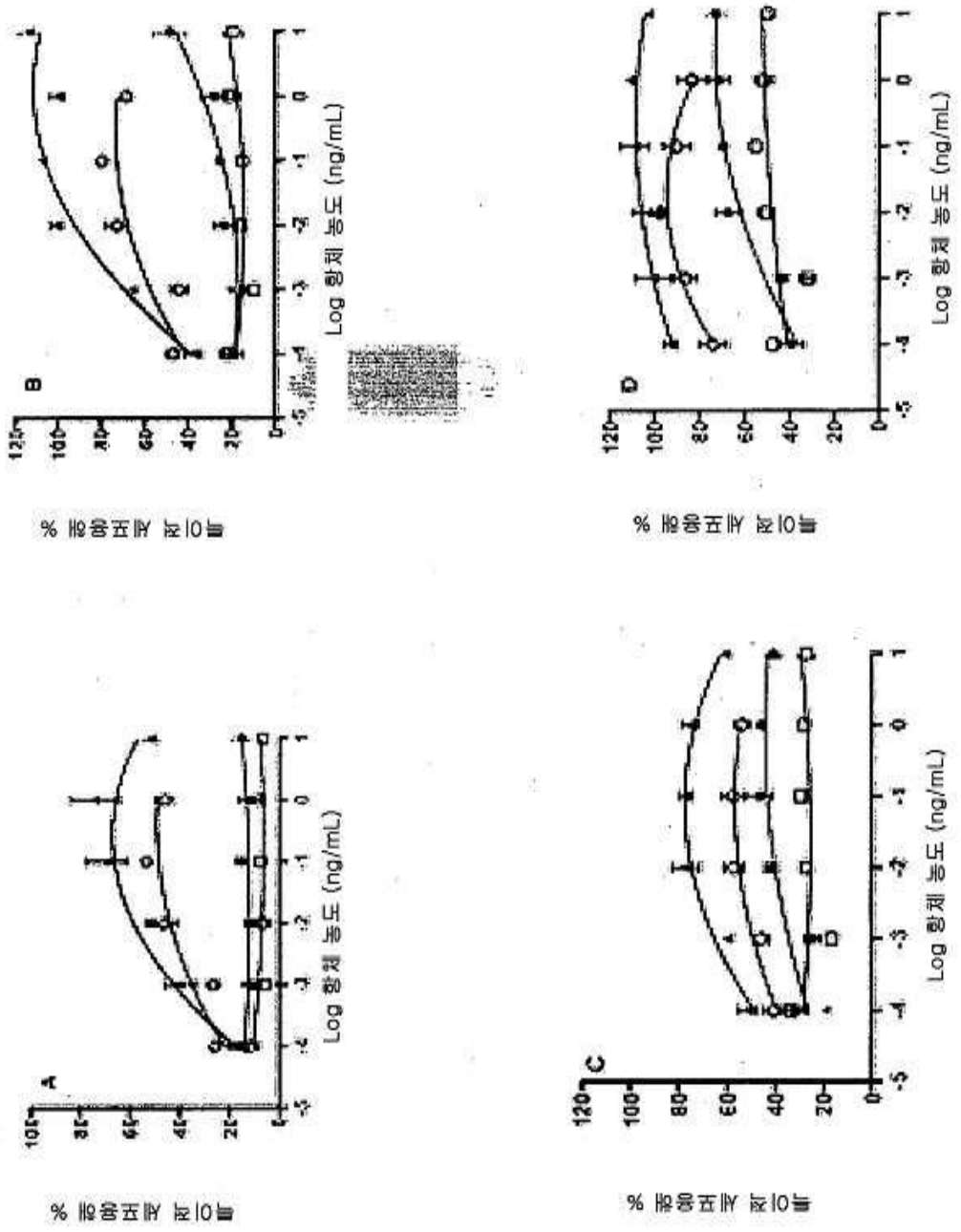
도면12


CSL360
hCSL360
hCSL360Fc2
hCSL360Fc3
huIgG1
No Ab
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
% 특이적 세포 용해
0.1
0.01
0.001
항체의 농도 (μg/mL)

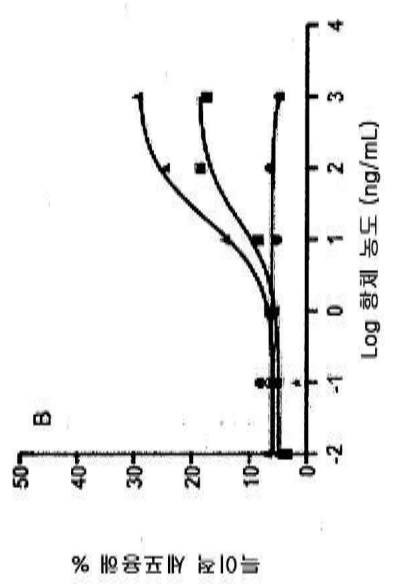
도면13

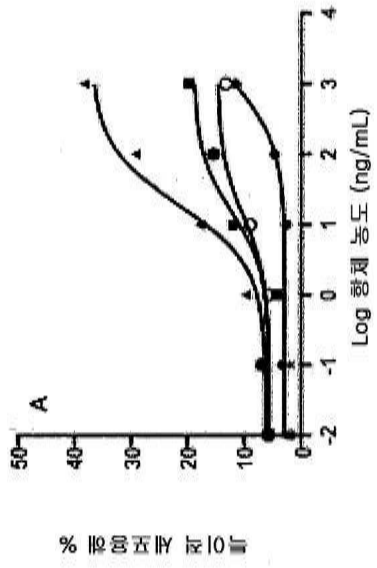

a
KA에서 증가 배수
120
100
80
60
40
20
0
FcγRI
FcγRIIb/c
FcγRIIIa
hCSL360
hCSL360Fc2
hCSL360Fc3
hCSL360kif
b
KA 비율
40
35
30
25
20
15
10
5
0
hCSL360
hCSL360Fc2
hCSL360Fc3
hCSL360kif

도면14

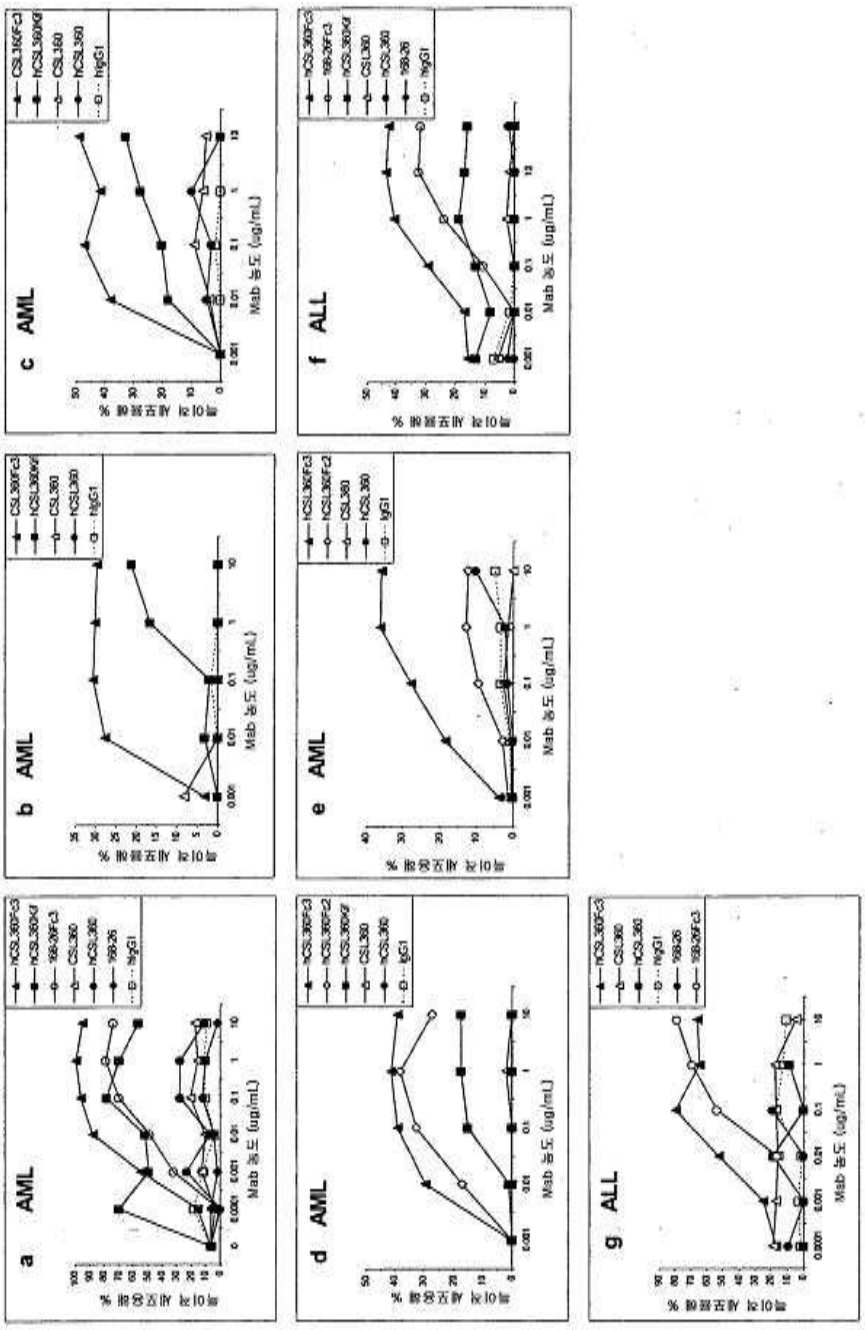


도면15

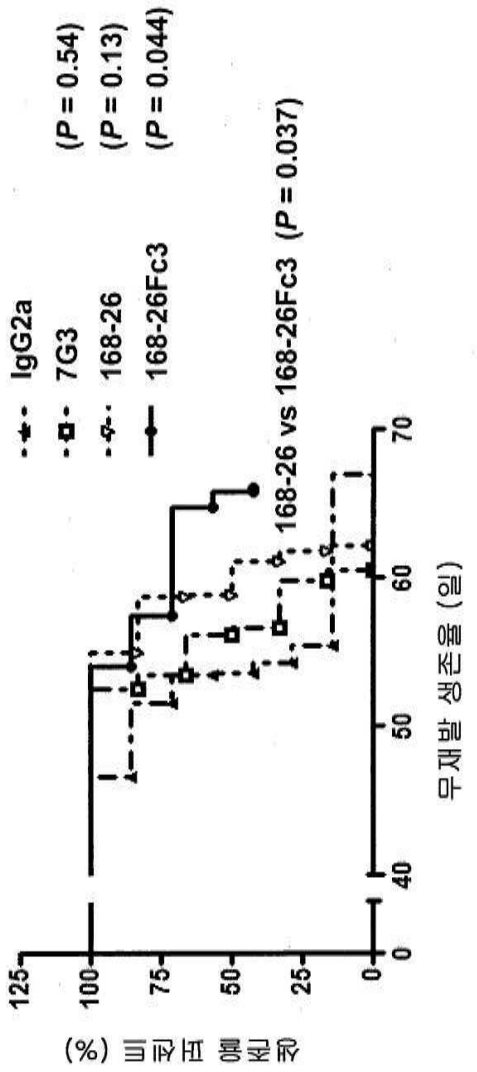

B
50
40
30
20
10
0
-2
-1
0
1
2
3
4
Log 항체 농도 (ng/mL)
백인적 세포용해 %


A
50
40
30
20
10
0
-2
-1
0
1
2
3
4
Log 항체 농도 (ng/mL)
백인적 세포용해 %

도면16



도면17


IgG2a
7G3 (P = 0.54)
168-26 (P = 0.13)
168-26Fc3 (P = 0.044)
168-26 vs 168-26Fc3 (P = 0.037)
생존율 퍼센트 (%)
무재발 생존율 (일)
125
100
75
50
25
0
0
40
50
60
70