(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0035032
(43) 공개일자 2022년03월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/00 (2006.01) *A61K 38/13* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/00 (2013.01)
A61K 38/13 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7037579
(22) 출원일자(국제) 2020년04월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년11월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/028601
(87) 국제공개번호 WO 2020/214867
국제공개일자 2020년10월22일
(30) 우선권주장
62/835,488 2019년04월17일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
알파인 이뮨 사이언시즈, 인코포레이티드
미국 워싱턴 98102 시애틀 스위트 200 이스트 블레인 스트리트 188
(72) 발명자
스완슨, 라이언
미국 워싱턴 98102 시애틀 스위트 200 이스트 블레인 스트리트 188
양, 징
미국 워싱턴 98102 시애틀 스위트 200 이스트 블레인 스트리트 188
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박장원

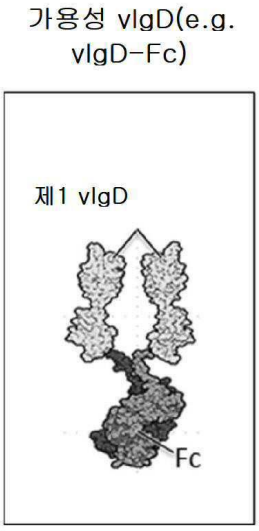
전체 청구항 수 : 총 122 항

(54) 발명의 명칭 **변이체 ICOS 리간드(ICOSL) 융합 단백질의 방법 및 용도**

(57) 요 약

ICOSL 변이체 및 이러한 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 면역조절 단백질이 본원에서 제공된다. 면역조절 단백질은 다양한 면역학적 및 종양학적 상태에 대한 치료적 유용성을 제공한다. 이러한 단백질의 제조 및 사용을 위한 조성물 및 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 38/1774 (2013.01)
A61P 1/00 (2018.01)
A61P 19/02 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
A61P 31/14 (2018.01)
A61P 37/06 (2018.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자
펭, 스탠포드
미국 워싱턴 98102 시애틀 스위트 200 이스트 블레인 스트리트 188
힐슨, 잰
미국 워싱턴 98102 시애틀 스위트 200 이스트 블레인 스트리트 188

(30) 우선권주장
62/855,830 2019년05월31일 미국(US)
62/931,212 2019년11월05일 미국(US)
62/945,071 2019년12월06일 미국(US)
62/962,832 2020년01월17일 미국(US)
62/987,854 2020년03월10일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

급성 이식편 대 숙주 질환(aGVHD)을 예방하거나 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 치료 기간 동안 대상체에게 하나 이상의 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하되, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하며; 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 하나 이상의 용량 각각은 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 것인 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 대상체가 이전에 동종이계 조혈모세포 이식(HSCT)을 받은 바 있고 aGVHD는 동종이계 HSCT를 받은 후 대상체에서 발생하는 방법.

청구항 3

청구항 7에 있어서, 바이러스는 코로나바이러스인 방법.

청구항 4

청구항 1-3 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 대상체의 aGVHD는 면역억제제를 사용한 치료에 대해 내성이거나 불응성인 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 면역억제제는 코르티코스테로이드를 포함하는 방법.

청구항 6

청구항 4 또는 청구항 52에 있어서, 면역억제제는 사이클로스포린을 포함하는 방법.

청구항 7

바이러스 감염에 이차적인 염증을 예방하거나 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 치료 기간에 하나 이상의 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하되, 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 하나 이상의 용량의 각각의 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 것인 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 바이러스는 코로나바이러스인 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2이고 감염은 COVID-19인 방법.

청구항 10

청구항 7-9 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 염증은 사이토카인 방출 증후군(CRS)과 연관된 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, CRS는 중증 CRS 또는 3등급 이상의 CRS인 방법.

청구항 12

청구항 7-11 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 투여 시점 또는 투여 직전에 대상체가 바이러스 감염과 관련되거나 이에 기인한 중증 폐렴, 급성 호흡곤란 증후군(ARDS), 패혈증 또는 패혈성 쇼크를 갖는 방법.

청구항 13

대상체에서 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태를 갖는 대상체에게 치료 기간 동안 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하되, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하며; 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 것인 방법.

청구항 14

청구항 1-13 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태는 급성 병태인 방법.

청구항 16

청구항 1-15 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 단일 용량만이 대상체에게 투여되는 방법.

청구항 17

청구항 14에 있어서, 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태는 만성 병태인 방법.

청구항 18

청구항 13, 청구항 14 또는 청구항 17에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 전신 홍반성 루푸스(SLE)인 방법.

청구항 19

청구항 13, 청구항 14 또는 청구항 17에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 쇼그렌 증후군인 방법.

청구항 20

청구항 13, 청구항 14 또는 청구항 17에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 건선성 관절염인 방법.

청구항 21

청구항 13, 청구항 14 또는 청구항 17에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 류마티스성 관절염.

청구항 22

청구항 13, 청구항 14 또는 청구항 17에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 크론병인 방법.

청구항 23

청구항 13, 청구항 14 또는 청구항 17에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 궤양성 대장염인 방법.

청구항 24

청구항 1-15 및 17-23 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 복수의 용량이 대상체에게 투여되는 방법.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 복수의 용량 각각은 주 1회 이하로 투여되는 방법.

청구항 26

청구항 24 또는 청구항 25에 있어서, 복수의 용량 각각은 주 1회(Q1W) 투여되는 방법.

청구항 27

청구항 24 또는 청구항 25에 있어서, 복수의 용량 각각은 2주마다 1회(Q2W) 투여되는 방법.

청구항 28

청구항 24 또는 청구항 25에 있어서, 복수의 용량 각각은 월 1회(Q4W) 투여되는 방법.

청구항 29

청구항 1-28 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 10mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 또는 약 6 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

청구항 30

청구항 1-29 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 또는 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

청구항 31

청구항 1-30 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 0.3 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

청구항 32

청구항 1-30 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 1 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

청구항 33

청구항 1-30 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 3 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

청구항 34

청구항 1-30 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 6 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

청구항 35

청구항 1-30 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 10 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

청구항 36

청구항 1-28 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 15 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

청구항 37

청구항 1-28 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

청구항 38

청구항 1-37 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 치료 기간은 반복되는 방법.

청구항 39

청구항 1-38 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 투여는 피하 투여를 통한 것인 방법.

청구항 40

청구항 1-38 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 투여는 정맥내 투여를 통한 것인 방법.

청구항 41

대상체에서 안구 자가면역 또는 염증성 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하는 변이체 ICOSL 융합 단백질의 용량을 유리체내로(intravitreally) 투여하는 것을 포함하되, 여기서 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 이의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO: 1에 기재된 서열을 참조로 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 방법.

청구항 42

청구항 41에 있어서, 안구 자가면역 또는 염증성 질환은 포도막염인 방법.

청구항 43

청구항 41 또는 청구항 42에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 약 0.01 mg 내지 10 mg, 약 0.05 mg 내지 10 mg, 약 0.1 mg 내지 10 mg, 약 0.5 mg 내지 10 mg, 약 1 mg 내지 10 mg, 약 1.5 mg 내지 10 mg, 약 2 mg 내지 10 mg, 약 3 mg 내지 10 mg, 약 4 mg 내지 10 mg, 약 5 mg 내지 10 mg, 약 6 mg 내지 10 mg, 약 7 mg 내지 10 mg, 약 8 mg 내지 10 mg, 약 9 mg 내지 10 mg의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 44

청구항 41-43 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 0.2 mL 미만, 선택적으로 0.1 mL 미만의 부피로 투여되는 방법.

청구항 45

청구항 41-44 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 약 0.05 mL의 부피로 투여되는 방법.

청구항 46

청구항 1-45 중 어느 하나의 청구항에 있어서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 (i) SEQ ID NO:32에 제시된 아미노산 서열, (ii) SEQ ID NO:32에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는 (iii) IgV 도메인 또는 IgC 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는, (i) 및/또는 (ii)의 일부를 포함하는 방법.

청구항 47

청구항 1-46 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적인

결합 단편을 포함하는 방법.

청구항 48

청구항 1-47 중 어느 하나의 청구항에 있어서, IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편은 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 또는 변이체 ICOSL 융합 단백질의 유일한 ICOSL 부분인 방법.

청구항 49

청구항 1-48 중 어느 하나의 청구항에 있어서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 방법.

청구항 50

청구항 1-49 중 어느 하나의 청구항에 있어서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:3에 제시된 아미노산 서열로 이루어진 방법.

청구항 51

청구항 1-50 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:36에 제시된 서열 또는 SEQ ID NO:36에 제시된 서열에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 나타내는 서열을 가지며 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 방법.

청구항 52

청구항 1-51 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:36에 제시된 서열을 갖는 방법.

청구항 53

청구항 1-52 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 멀티머화 도메인은 면역글로불린의 Fc 영역이거나 이를 포함하는 방법.

청구항 54

청구항 53에 있어서, Fc 영역은 야생형 인간 면역글로불린의 Fc와 비교하여 감소된 이펙터 기능을 나타내는 변이체 Fc 영역인 방법.

청구항 55

청구항 53 또는 청구항 54에 있어서, Fc 영역은 야생형 인간 IgG1과 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변이체 IgG1 Fc 영역인 방법.

청구항 56

청구항 54 또는 청구항 55에 있어서, 변이체 Fc 영역은 N297G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K 또는 L234A/L235E/G237A로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것인 방법.

청구항 57

청구항 54-56 중 어느 하나의 청구항에 있어서, 변이체 Fc 영역은 아미노산 치환 C220S를 더 포함하되, 상기 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것인 방법.

청구항 58

청구항 53-57 중 어느 하나의 청구항에 있어서, Fc 영역은 K447del을 포함하되 여기서 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것인 방법.

청구항 59

대상체에서 급성 이식편대숙주질환(aGVHD)을 예방하거나 감소시키는 방법에 사용하기 위한 변이체 ICOSL 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물로서, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 의약 조성물.

청구항 60

급성 이식편대숙주질환(aGVHD)을 예방하거나 감소시키는 방법에 사용하기 위한 약제의 제형화에 있어서의 변이체 ICOSL 융합 단백질의 용도로서, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 용도.

청구항 61

구현예 59의 의약 조성물 또는 구현예 60의 용도에 있어서, 상기 방법은 치료 기간 동안 하나 이상의 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 하나 이상의 용량 각각은 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 것인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 62

청구항 59 또는 청구항 61의 의약 조성물 또는 청구항 60 또는 청구항 61의 용도에 있어서, aGvHD는 등급 II-IV aGVHD인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 63

청구항 59, 61, 및 62 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 60, 61, 및 62 중 어느 하나의 용도에 있어서, aGVHD는 면역억제제 치료에 대해 내성 또는 불응성인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 64

청구항 59 및 61-63 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 또는 청구항 60 및 61-63 중 어느 하나의 용도에 있어서, 면역억제제는 코르티코스테로이드를 포함하는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 65

청구항 63 또는 청구항 64의 의약 조성물 또는 청구항 63 또는 청구항 64의 용도에 있어서, 면역억제제는 사이클로스포린을 포함하는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 66

대상체에서 바이러스 감염에 이차적인 염증을 예방하거나 감소시키는 방법에 사용하기 위한 변이체 ICOSL 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물로서, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 의약 조성물.

청구항 67

바이러스 감염에 이차적인 염증을 예방하거나 감소시키는 방법에 사용하기 위한 약제의 제형화에 있어서의 변이체 ICOSL 융합 단백질의 용도로서, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을

포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 용도.

청구항 68

청구항 66의 의약 조성물 또는 청구항 67의 용도에 있어서, 상기 방법은 치료 기간 동안 하나 이상의 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 하나 이상의 용량 각각은 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 것인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 69

청구항 66 또는 청구항 68의 의약 조성물 또는 청구항 67 또는 청구항 68의 용도에 이어서, 바이러스는 코로나바이러스인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 70

청구항 69의 의약 조성물 또는 청구항 69의 용도에 있어서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2이고 감염은 COVID-19인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 71

청구항 66, 68, 및 69 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 67-69 중 어느 하나의 용도에 있어서, 염증은 사이토카인 방출 증후군 (CRS)과 연관된 것인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 72

청구항 71의 의약 조성물 또는 청구항 71의 용도에 있어서, CRS는 중증 CRS 또는 등급 3 이상의 CRS인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 73

청구항 68, 및 69-72 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 68, 및 69-72 중 어느 하나의 용도에 있어서, 대상체는 투여 시점에 또는 투여 직전에 바이러스 감염과 관련되거나 이에 기인한 중증 폐렴, 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 패혈증 또는 패혈성 쇼크를 갖는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 74

대상체에서 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태를 치료하는 방법에 사용하기 위한 변이체 ICOSL 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물로서, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 의약 조성물.

청구항 75

자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태를 치료하는 방법에 사용하기 위한 약제의 제형화에 있어서의 변이체 ICOSL 융합 단백질의 용도로서, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 용도.

청구항 76

청구항 74의 의약 조성물 또는 청구항 75의 용도에 있어서, 상기 방법은 치료 기간 동안 하나 이상의 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 하나 이

상의 용량 각각은 약 0.001 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 것인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 77

청구항 61-65, 68-73, 및 76 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 61-65, 68-73, 및 76 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 78

청구항 77의 의약 조성물 또는 청구항 77의 용도에 있어서, 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태는 급성 병태인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 79

청구항 61-65, 68-73, 및 76-78 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 61-65, 68-73, 및 76-78 중 어느 하나의 용도에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 단일 용량 만을 대상체에 투여하는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 80

청구항 77의 의약 조성물 또는 청구항 77의 용도에 있어서, 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태는 만성 질환 또는 병태인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 81

청구항 74, 77, 및 80 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 75, 77 및 80 중 어느 하나의 용도에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 전신 홍반성 루푸스(SLE)인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 82

청구항 74, 77, 및 80 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 75, 77 및 80 중 어느 하나의 용도에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 쇼그렌 증후군인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 83

청구항 74, 77, 및 80 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 75, 77 및 80 중 어느 하나의 용도에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 건선성 관절염인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 84

청구항 74, 77, 및 80 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 75, 77 및 80 중 어느 하나의 용도에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 류마티스성 관절염인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 85

청구항 74, 77, 및 80 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 75, 77 및 80 중 어느 하나의 용도에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 크론병인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 86

청구항 74, 77, 및 80 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 75, 77 및 80 중 어느 하나의 용도에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 궤양성 대장염인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 87

청구항 61-65, 68-73, 및 76-78 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 61-65, 68-73, 및 76-78 중 어느 하나의 용도에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 복수의 용량이 대상체에게 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 88

청구항 87의 의약 조성물 또는 청구항 87의 용도에 있어서, 복수의 용량 각각은 주 1회 이하로 투여되는 의약

조성물 또는 용도.

청구항 89

청구항 87 또는 청구항 88의 의약 조성물 또는 청구항 87 또는 청구항 88의 용도에 있어서, 복수의 용량 각각은 주 1회(Q1W) 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 90

청구항 87 또는 청구항 88의 의약 조성물 또는 청구항 87 또는 청구항 88의 용도에 있어서, 복수의 용량 각각은 2주마다 1회(Q2W) 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 91

청구항 87 또는 청구항 88의 의약 조성물 또는 청구항 87 또는 청구항 88의 용도에 있어서, 복수의 용량 각각은 월 1회(Q4W) 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 92

청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-91 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-91 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 10mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 또는 약 6 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 93

청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-92 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-92 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 또는 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg의 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 94

청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 0.3 mg/kg의 양으로 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 95

청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 1 mg/kg의 양으로 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 96

청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 3 mg/kg의 양으로 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 97

청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 6 mg/kg의 양으로 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 98

청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 10 mg/kg의 양으로 투여되는 의약 조성물

또는 용도.

청구항 99

청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-91 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-91 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 15 mg/kg의 양으로 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 100

청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-91 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-91 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 101

청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-100 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-100 중 어느 하나의 용도에 있어서, 치료 기간은 반복되는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 102

청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-101 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-101 중 어느 하나의 용도에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 피하 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 103

청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-101 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-101 중 어느 하나의 용도에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 정맥내 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

청구항 104

대상체에서 안구 자가면역 또는 염증성 질환을 치료하는 방법에 사용하기 위한 변이체 ICOSL 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물로서, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 의약 조성물.

청구항 105

대상체에서 안구 자가면역 또는 염증성 질환을 치료하는 방법에 사용하기 위한 약제의 제형화에 있어서의 변이체 ICOSL 융합 단백질의 용도로서, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 용도.

청구항 106

청구항 104의 의약 조성물 또는 청구항 105의 용도에 있어서, 안구 자가면역 또는 염증성 질환은 포도막염인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 107

청구항 104 또는 청구항 106의 의약 조성물 또는 청구항 105 또는 청구항 106의 용도에 있어서, 상기 방법은 대상체에게 하나 이상의 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 단계를 포함하되, 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 하나 이상의 용량 각각은 약 0.01 mg 내지 10 mg, 약 0.05 mg 내지 10 mg, 약 0.1 mg 내지 10 mg, 약 0.5 mg 내지 10 mg, 약 1 mg 내지 10 mg, 약 1.5 mg 내지 10 mg, 약 2 mg 내지 10 mg, 약 3 mg 내지 10 mg, 약 4 mg 내지 10 mg, 약 5 mg 내지 10 mg, 약 6 mg 내지 10 mg, 약 7 mg 내지 10 mg, 약 8 mg 내지 10 mg, 약

9 mg 내지 10 mg의 용량으로 투여되는 것인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 108

청구항 107의 의약 조성물 또는 청구항 107의 용도에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 0.2 mL 미만, 선택적으로 0.1 mL 미만의 부피로 투여되는 것인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 109

청구항 107 또는 청구항 108 의약 조성물 또는 청구항 107 또는 청구항 108의 용도에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 약 0.05 mL의 부피로 투여되는 것인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 110

청구항 59, 61-65, 66, 68-73-, 74, 76-103, 104, 및 106-109 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 60, 61-65, 67, 68-73, 75, 76-103, 105, 및 106 107-109 중 어느 하나의 용도에 있어서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 (i) SEQ ID NO:32에 제시된 아미노산 서열, (ii) SEQ ID NO:32에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는 (iii) IgV 도메인 또는 IgC 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는, (i) 및/또는 (ii)의 일부를 포함하는 것인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 111

청구항 59, 61-65, 66, 68-73-, 74, 76-103, 104 및 106-110 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 60, 61-65, 67, 68-73, 75, 76-103, 및 105-110 중 어느 하나의 용도에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적인 결합 단편을 포함하는 것인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 112

청구항 59, 61-65, 66, 68-73-, 74, 76-103, 104 및 106-111 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 60, 61-65, 67, 68-73, 75, 76-103, 및 105-111 중 어느 하나의 용도에 있어서, IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편은 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 또는 변이체 ICOSL 융합 단백질의 유일한 ICOSL 부분인 것인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 113

청구항 59, 61-65, 66, 68-73-, 74, 76-103, 104 및 106-112 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 60, 61-65, 67, 68-73, 75, 76-103, 및 105-112 중 어느 하나의 용도에 있어서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 114

청구항 59, 61-65, 66, 68-73-, 74, 76-103, 104 및 106-113 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 60, 61-65, 67, 68-73, 75, 76-103, 및 105-113 중 어느 하나의 용도에 있어서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 115

청구항 59, 61-65, 66, 68-73-, 74, 76-103, 104 및 106-114 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 60, 61-65, 67, 68-73, 75, 76-103, 및 105-114 중 어느 하나의 용도에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:36에 제시된 서열 또는 SEQ ID NO:36에 제시된 서열에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 나타내는 서열을 갖고 N52H, N57Y 및 Q100R 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 116

청구항 59, 61-65, 66, 68-73-, 74, 76-103, 104 및 106-115 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 60, 61-65, 67, 68-73, 75, 76-103, 및 105-115 중 어느 하나의 용도에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID

NO:36에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 117

청구항 59, 61-65, 66, 68-73-, 74, 76-103, 104 및 106-116 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 60, 61-65, 67, 68-73, 75, 76-103, 및 105-116 중 어느 하나의 용도에 있어서, 멀티머화 도메인은 면역글로불린의 Fc 영역이거나 이를 포함하는 것인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 118

청구항 117의 의약 조성물 또는 청구항 117의 용도에 있어서, Fc 영역은 야생형 인간 면역글로불린의 Fc와 비교하여 감소된 이펙터 기능을 나타내는 변이체 Fc 영역인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 119

청구항 117 또는 청구항 118의 의약 조성물 또는 청구항 117 또는 청구항 118의 용도에 있어서, Fc 영역은 야생형 인간 IgG1에 비해 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변이체 IgG1 Fc 영역인 것인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 120

청구항 118 또는 청구항 119의 의약 조성물 또는 청구항 118 또는 청구항 119의 용도에 있어서, 변이체 Fc 영역은 N297G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K 또는 L234A/L235E/G237A로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하되, 여기서 상기 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 121

청구항 118-120 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 118-120 중 어느 하나의 용도에 있어서, 변이체 Fc 영역은 아미노산 치환 C220S을 더 포함하되, 여기서 상기 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것인 의약 조성물 또는 용도.

청구항 122

청구항 117-121 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 청구항 117-121 중 어느 하나의 용도에 있어서, Fc 영역은 K447del을 포함하되, 여기서 상기 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것인 의약 조성물 또는 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] [0001] 이 출원은 2019년 4월 17일 출원된 미국 가특허출원 No. 62/835,488, 2019년 5월 31일 출원된 미국 가특허출원 No. 62/855,830, 2019년 11월 5일 출원된 미국 가특허출원 No. 62/931,212, 2019년 12월 6일 출원된 미국 가특허출원 No. 62/945,071, 2020년 1월 17일 출원된 미국 가특허출원 No. 62/962,832, 및 2020년 3월 10일 출원된 미국 가특허출원 No. 62/987,854에 기초한 우선권 주장 출원으로, 상기 출원들의 모든 내용은 본 발명에 참조 통합되었다.

[0003] 서열목록의 참조 통합

[0004] [0002] 본원은 전자형태의 서열목록과 함께 출원된다. 이 서열목록은 파일명이 761612002240SeqList.txt 이고 크기가 1,655,996 바이트이며 2018년 10월 13일에 생성되었다. 이 전자형태의 서열목록에 담긴 정보는 그 전체가 참조 병합되었다.

[0005] 분야

[0006] [0003] 이 출원은 암 및 면역학적 질환의 치료에서 면역 반응을 조절하기 위한 치료용 조성물에 관한 것이다. 일부 측면에서, 본 발명은 ICOS 및 CD28 중 어느 하나 또는 두 가지 모두인 동족 결합 파트너 단백질(동족 결합 partner proteins)에 대해 개선된 친화성 또는 선택성과 같은, 개선된 결합을 나타내는, ICOS 리간드 (ICOSL)에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 배경

[0008] [0004] 항원-제시 세포 (APC) 또는 표적 세포와 림프구에 의해 또는 이들 간에 형성된 면역학적 시냅스(IS)에서 일어나는 프로세스에 개입함으로써 면역 반응을 조절하는 것은 의학적으로 점점 큰 관심의 대상이 되고 있다. 기계학적으로, IS 내 세포 표면 단백질은 이들이 결합하는 단일 단백질과 복수의 단백질 표적의 조화롭고도 종종 동시적인 상호반응과 연관될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] IS 상호반응은 두 세포들 간의 정션과 밀접하게 연관되어 일어나며 이 구조 내 단일 단백질은 관련 세포(트랜스) 상의 단백질 뿐만 아니라 동일 세포(시스) 상의 단백질 양자 모두와 아마도 동시에 반응할 수 있다. 비록 IS를 조절하는 치료방법이 공지이긴 하지만, 개선된 치료법이 요구되고 있다. 본 발명에 따라 이러한 요구사항을 만족하며, 세포 상에서 발현될 수 있는 가용성 단백질 또는 막관통 면역조절 단백질을 비롯한 면역조절 단백질이 제공된다.

과제의 해결 수단

[0010] 개요

[0011] [0005] 임의의 일부 구체예에서, 대상체에서 자가면역 또는 염증성 질환을 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 이 방법은 자가면역 또는 염증성 질환이 있는 대상체에게 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 투여하는 것을 포함하되, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, 자가면역 또는 염증성 질환이 있는 대상체에게 치료 기간에 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 자가면역 또는 염증성 질환을 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 이 방법은 자가면역 또는 염증성 질환이 있는 대상체에게 치료 기간 동안 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하되, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

[0012] [0006] 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여된다. 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여된다 [번역자 주: 본 국어번역문에서 "약"이라는 용어 다음에 수치가 나올 경우 "약"이라는 표현에는 그 수치 자체도 포함되는 것으로 한다. 예를 들어 "약 5"라는 표현에는 "5" 자체도 포함되는 것으로 의도된다]. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 6 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 3 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 1 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.3 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.1 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 15 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 1 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 0.3 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 15 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 3 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 1 mg/kg의 양으로 투여된

다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 1 mg/kg 내지 약 15 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 3 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 3 mg/kg 내지 약 15 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 3 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 6 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 6 mg/kg 내지 약 15 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 6 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 10 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 10 mg/kg 내지 약 15 mg/kg의 양으로 투여된다.

[0013] [0007] 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 단일 용량만이 치료 기간에 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 복수 용량(multiple number of doses)이 치료 기간에 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 복수 용량은 2, 3, 4 또는 5 용량이다. 임의의 일부 구체예에서, 치료 기간은 적어도 20일이다. 임의의 일부 구체예에서, 치료 기간은 20-40일이다.

[0014] [0008] 임의의 일부 구체예에서, 대상체에서 자가면역 또는 염증성 질환을 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 이 방법은 자가면역 또는 염증성 질환이 있는 대상체에게 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하되, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 20-40일의 치료 기간 동안 3, 4 및 5로부터 선택된 복수 용량으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각각의 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양이다.

[0015] [0009] 임의의 일부 구체예에서, 대상체에서 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태를 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 이 방법은 자가면역 또는 염증성 질환이 있는 대상체에게 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하되, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 적어도 20일의 치료 기간 동안 복수의 용량으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각각의 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양이다. 임의의 일부 구체예에서, 각각의 용량은 30일의 최대 치료 기간을 위한 양이다. 임의의 일부 구체예에서, 각각의 용량은 적어도 5일 이상 이격하여 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 21일 동안이다. 임의의 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 28일 동안이다. 임의의 일부 구체예에서, 복수의 용량 각각은 1주 1회 이하로 투여된다.

[0016] [0010] 임의의 일부 구체예에서, 대상체에서 자가면역 또는 염증성 질환을 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 이 방법은 자가면역 또는 염증성 질환이 있는 대상체에게 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하되, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 적어도 4주일의 치료 기간 동안 복수의 용량으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각각의 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양이고; 1주 1회 이하로 투여된다.

[0017] [0011] 임의의 일부 구체예에서, 급성 이식편 대 숙주 질환(aGVHD)을 예방하거나 감소시키는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 치료 기간 동안 대상체에게 하나 이상의 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하되, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하며; 여기서 변이체

ICOSL 융합 단백질의 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, aGVHD는 줄기 세포 이식과 연관되고 ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 대상체가 줄기 세포 이식을 받기 전에 대상체에게 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, aGVHD는 줄기 세포 이식과 연관되고 ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 대상체가 줄기 세포 이식을 받기 전에 대상체에게 투여되며 ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 줄기 세포 이식을 받는 대상체와 동시에 또는 그 후에 대상체에게 제공된다. 임의의 일부 구체예에서, aGVHD는 줄기 세포 이식과 연관되고 ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 대상체가 줄기 세포 이식을 받기 전에 대상체에게 투여되고 ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 줄기세포 이식을 받는 피험자와 동시에 피험자에게 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, aGVHD는 줄기 세포 이식과 연관되고 ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 대상체가 줄기 세포 이식을 받기 전에 대상체에게 투여되며 ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 대상체가 줄기 세포 이식을 받은 후 대상체에게 주어진다.

[0018] [0012] 제공된 임의의 일부 구체예에서, 대상체에서 급성 이식편 대 숙주 질환(aGVHD)을 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 대상체에게 단일 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하되, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하며; 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 단일 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여된다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, GVHD는 급성 GVHD (aGVHD)이다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, GVHD는 만성 GVHD이다.

[0019] [0013] 제공된 임의의 일부 구체예에서, 대상체에서 급성 이식편 대 숙주 질환(aGVHD)을 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 대상체에게 단일 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하되, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하며; 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 단일 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여되며, 여기서 대상체는 면역억제제에 내성이 있거나 불응성이다. 일부 구체예에서, 면역억제제는 글루코코르티코이드와 같은 코르티코스테로이드이다. 일부 구체예에서, 면역억제제는 사이클로스포린이다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, GVHD는 급성 GVHD (aGVHD)이다. 제공된 임의의 일부 구체예에서, GVHD는 만성 GVHD이다.

[0020] [0014] 임의의 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 4주 동안이다. 임의의 일부 구체예에서, 복수의 용량 각각은 주 1회(Q1W) 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 각각의 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg의 양이다. 임의의 일부 구체예에서, 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 10mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 또는 약 6 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양이다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 0.3 mg/kg의 양이다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 1 mg/kg의 양이다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 3 mg/kg의 양이다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 6 mg/kg의 양이다. 임의의 일부 구체예에서, 각 용량은 약 10 mg/kg의 양이다. 임의의 일부 구체예에서, 적어도 하나의 용량은 약 0.3 mg/kg의 양이다. 임의의 일부 구체예에서, 적어도 하나의 용량은 약 1 mg/kg의 양이다. 임의의 일부 구체예에서, 적어도 하나의 용량은 약 3 mg/kg의 양이다. 임의의 일부 구체예에서, 적어도 하나의 용량은 약 6 mg/kg의 양이다. 임의의 일부 구체예에서, 적어도 하나의 용량은 약 10 mg/kg의 양이다.

[0021] [0015] 임의의 일부 구체예에서, 투여는 피하 투여를 통해 이루어진다. 임의의 일부 구체예에서, 투여는 정맥내 투여를 통한다. 임의의 일부 구체예에서, 적어도 하나의 용량은 피하 투여를 통해 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 적어도 하나의 용량은 정맥내 투여를 통해 투여된다. 임의의 일부 구체예에서, 치료 기간은 반복된다. 임의의 일부 구체예에서, 치료 기간은 관해(remission)가 달성될 때까지, 부분 관해가 달성될 때까지 또는 대상체에서 질환 또는 병태가 진행되지 않을 때까지 반복된다.

[0022] [0016] 본원에 따라, 대상체에서 안구 자가면역 또는 염증성 질환을 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하는 변이체 ICOSL 융합 단백질의 용량을 유리체내로(intravitreally) 투여하는 것을 포함하되, 여기서 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 이의 특이적

결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO: 1에 기재된 서열을 참조로 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 본원에 따라, 대상체에서 안구 자가면역 또는 염증성 질환을 감소 또는 예방하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하는 변이체 ICOSL 융합 단백질의 용량을 유리체내로(intravitreally) 투여하는 것을 포함하되, 여기서 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 이의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO: 1에 기재된 서열을 참조로 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 CD28 및/또는 ICOS에 대한 결합을 증가시키고, Fc 도메인과 같은 멀티머화 도메인에 융합되는 하나 이상의 아미노산 변형(예를 들어, 하나 이상의 아미노산 치환)을 갖는 변이체 ICOSL 폴리펩타이드와 같은, 본원에 기재된 임의의 것을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 치환 N52H/N57Y/Q100R이다.

[0023] [0017] 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 넘버링을 참조로, 아미노산 치환 N52H/N57Y/Q100R을 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 동일한 엑토도메인(들)에 대한 ICOSL 참조 폴리펩타이드의 결합에 비해, CD28의 엑토도메인(들)에 대해 증가된 결합 친화성을 나타낸다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 동일한 엑토도메인(들)에 대한 ICOSL 참조 폴리펩타이드의 결합과 실질적으로 동일하거나 증가된 증가된, ICOS의 엑토도메인(들)에 대한 결합 친화성을 나타낸다. 임의의 일부 구체예에서, 결합 친화성은 동일한 엑토도메인(들)에 대한 ICOSL 참조 폴리펩타이드의 결합 친화성의 약 80% 이상이다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 ICOS 및 CD28의 엑토도메인(들)의 엑토도메인(들)에 대해, ICOSL 참조 폴리펩타이드이 동일한 엑토도메인(들)에 대해 나타내는 결합보다 증가된 결합을 나타낸다. 임의의 일부 구체예에서, 결합은 각기 약 1.2배, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배 또는 60배를 상회하여 증가된다.

[0024] [0018] 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 Cmax에서 약 25% 이상의 CD28에 대한 표적 결합 포화도를 달성하거나 달성할 것으로 예측되며; 및/또는 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 용량 투여 후 24시간 이내에 약 10% 초과의 CD28에 대한 표적 결합 포화도를 달성하거나 달성할 것으로 예측된다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 용량 투여 후 24시간 이내, 2일 이내 또는 7일 이내에 약 85% 초과의, CD28에 대한 표적 결합 포화도를 달성하거나 달성할 것으로 예상된다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 용량 투여 후 24시간 이내, 2일 이내 또는 7일 이내에 약 90% 초과의 CD28에 대한 표적 결합 포화도를 달성하거나 달성할 것으로 예상된다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 용량 투여 후 24시간 이내, 2일 이내 또는 7일 이내에 약 95% 초과의 CD28에 대한 표적 결합 포화도를 달성하거나 달성할 것으로 예상된다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 용량 투여 후 21일 또는 28일 이내에 약 10% 초과의 CD28에 대한 표적 결합 포화도를 달성하거나 달성할 것으로 예상된다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 용량 투여 후 21일 또는 28일 이내에 약 20% 초과의 CD28에 대한 표적 결합 포화도를 달성하거나 달성할 것으로 예상된다.

[0025] [0019] 임의의 일부 구체예에서, CD28은 인간 CD28이다. 임의의 일부 구체예에서, ICOS는 인간 ICOS이다. 임의의 일부 구체예에서, ICOSL 참조 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:1에 제시된 아미노산 서열, SEQ ID NO:1에 대해 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는 IgV 도메인 또는 IgC 도메인 또는 이의 특이적 결합 단편을 포함하는, SEQ ID NO:1에 제시된 아미노산의 서열 또는 SEQ ID NO:1에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산의 서열의 일부, 또는 양자 모두를 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, IgV 도메인 또는 이의 특이적 결합 단편은 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 또는 변이체 ICOSL 융합 단백질의 유일한 ICOSL 부분이다. 임의의 일부 구체예에서, ICOSL 참조 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:1에 제시된 ICOSL 세포외 도메인 서열을 참조로 적어도 25개 아미노산으로 된 C-말단 절단체와 아미노산 1-112를 포함하는 아미노산들의 인접(contiguous) 서열을 포함하는 절단된 ICOSL 세포외 도메인이다. 임의의 일부 구체예에서, C-말단 절단체는 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90, 적어도 100, 적어도 125개의 아미노산 잔기를 갖는다.

[0026] [0020] 임의의 일부 구체예에서, ICOSL 참조 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 204-209로서 제시된 프로테아제 절단 부위가 변경되거나 결여되어 있다. 임의의 일부 구체예에서, ICOSL 참조 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 3에 제시된 아미노산의 서열을 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, ICOSL 참조 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 3에 제시된 아미노산 서열로 이루어진다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 36에 기재된 서열 또는 SEQ ID NO: 36에 제시된 서열에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약

99%의 서열 동일성을 갖고 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환을 갖는다.

[0027] [0021] 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 36에 제시된 서열을 갖는다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 동일한 세포로부터 발현될 때 변이체 ICOSL 폴리펩타이드의 전장 세포외 도메인과 비교하여 세포로부터 발현될 때 감소된 단백질분해 절단을 나타낸다. 임의의 일부 구체예에서, 세포는 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포이다.

[0028] [0022] 임의의 일부 구체예에서, 멀티머화 도메인은 면역글로불린의 Fc 영역이거나 이를 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 링커를 통해 멀티머화 도메인에 연결된다. 임의의 일부 구체예에서, 링커는 펩타이드 링커이다. 임의의 일부 구체예에서, 링커는 1 내지 10개의 아미노산을 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, 링커는 AAA이다. 임의의 일부 구체예에서, 링커는 G4S(SEQ ID NO: 52)이다. 임의의 일부 구체예에서, 링커는 (G4S) 2 (SEQ ID NO: 53)이다. 임의의 일부 구체예에서, 링커는 GSGGGGS 링커(SEQ ID NO:.58)이다.

[0029] [0023] 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 제1 멀티머화 도메인에 연결된 제1 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 및 제2 멀티머화 도메인에 연결된 제2 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하는 멀티머이다. 임의의 일부 구체예에서, 제1 및 제2 멀티머화 도메인은 동일하다. 임의의 일부 구체예에서, 제1 및 제2 멀티머화 도메인은 면역글로불린의 Fc 영역이다. 임의의 일부 구체예에서, 멀티머는 다이머이다. 임의의 일부 구체예에서, 다이머는 동종다이머이다.

[0030] [0024] 임의의 일부 구체예에서, Fc 영역은 야생형 인간 면역글로불린의 Fc와 비교하여 하나 이상의 감소된 이펙터 기능을 나타내는 변이체 Fc 영역이다. 임의의 일부 구체예에서, Fc 영역은 야생형 인간 IgG1과 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변이체 IgG1 Fc 영역이다. 임의의 일부 구체예에서, Fc 영역은 SEQ ID NO:37에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역은 N297G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K 또는 L234A/L235E/G237A 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하되, 여기서 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것이다. 임의의 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역은 아미노산 치환 C220S를 추가로 포함하고, 여기서 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된다. 임의의 일부 구체예에서, Fc 영역은 K447del을 포함하고, 여기서 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된다. 임의의 일부 구체예에서, Fc 영역은 SEQ ID NO:43 또는 SEQ ID NO:46에 제시된 아미노산의 서열을 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, Fc 영역은 SEQ ID NO:44 또는 SEQ ID NO:47에 제시된 아미노산의 서열을 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, Fc 영역은 SEQ ID NO:40에 제시된 아미노산의 서열을 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, Fc 영역은 SEQ ID NO:39에 제시된 아미노산의 서열을 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, Fc 영역은 SEQ ID NO:41에 제시된 아미노산의 서열을 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, Fc 영역은 SEQ ID NO:42에 제시된 아미노산의 서열을 포함한다.

[0031] [0025] 임의의 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 대상체에서 면역 반응을 감소시킨다. 임의의 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 항호중구 세포질 항체(ANCA)-연관 혈관염, 혈관염, 자가면역 피부 질환, 이식, 류마티스 질환, 염증성 위장 질환, 염증성 눈 질환, 염증성 신경계 질환, 염증성 폐 질환, 염증성 내분비 질환, 또는 자가면역 혈액 질환이다. 임의의 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 상태 질환 또는 병태는 염증성 장 질환, 이식, 크론병, 궤양성 대장염, 다발성 경화증, 천식, 류마티스 관절염, 건선성 관절염 또는 건선이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 건선성 관절염이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 건선성 관절염이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 류마티스성 관절염이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 크론병이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 질환은 궤양성 대장염이다. 일부 구체예에서, 염증성 질환 또는 자가면역 질환은 포도막염이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 전신 홍반성 루푸스 (SLE)이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 쇼그렌 증후군이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 이식편 대 숙주 질환(GVHD)이다. 일부 구체예에서, GVHD는 급성 GVHD이다. 일부 구체예에서, GVHD는 만성 GVHD이다. 일부 구체예에서, GVHD는 내성 또는 불응성이다. 일부 구체예에서, GVHD는 만성 GVHD이다. 일부 구체예에서, GVHD는 면역억제제에 대해 내성 또는 불응성이다. 일부 구체예에서, 면역억제제는 코르티코스테로이드이다. 일부 구체예에서, 코르티코스테로이드는 글루코코르티코이드이다. 일부 구체예에서, 면역억제제는 사이클로스포린이다.

[0032] [0026] 임의의 일부 구체예에서, 치료 방법은 예방적 치료를 포함한다. 임의의 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태의 발병 전에 적어도 하나의 용량이 제공된다. 일부 구체예에서, ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태의 발병과 동시에 또는 발병 후에 투여된다. 일부

구체예에서, ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태의 발병 전에 투여되고, ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태의 발병과 동시에 또는 그 후에 투여된다.

[0033] [0027] 임의의 일부 구체예에서, 대상체는 인간이다.

[0034] [0028] 본 개시내용의 예시적인 구체예들에 번호를 붙여 다음에 나타내었다:

[0035] 구체예 1. 급성 이식편 대 숙주 질환(aGVHD)을 예방하거나 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 치료 기간 동안 대상체에게 하나 이상의 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하되, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하며; 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 하나 이상의 용량 각각은 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 것인 방법.

[0036] 구체예 2. 구체예 1에 있어서, 대상체가 이전에 동종이계 조혈모세포 이식(HSCT)을 받은 바 있고 aGVHD는 동종이계 HSCT를 받은 후 대상체에서 발생하는 방법.

[0037] 구체예 3. 구체예 1 또는 구체예 2에 있어서, 대상체는 등급 II-IV aGVHD를 갖는 방법.

[0038] 구체예 4. 구체예 1-3 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 대상체의 aGVHD는 면역억제제를 사용한 치료에 대해 내성이거나 불응성인 방법.

[0039] 구체예 5. 구체예 4에 있어서, 면역억제제는 코르티코스테로이드를 포함하는 방법.

[0040] 구체예 6. 구체예 4 또는 구체예 52에 있어서, 면역억제제는 사이클로스포린을 포함하는 방법.

[0041] 구체예 7. 바이러스 감염에 이차적인 염증을 예방하거나 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 치료 기간에 하나 이상의 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하되, 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 하나 이상의 용량의 각각의 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 것인 방법.

[0042] 구체예 8. 구체예 7에 있어서, 바이러스는 코로나바이러스인 방법.

[0043] 구체예 9. 구체예 8, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2이고 감염은 COVID-19인 방법.

[0044] 구체예 10. 구체예 7-9 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 염증은 사이토카인 방출 증후군(CRS)과 연관된 방법.

[0045] 구체예 11. 구체예 10에 있어서, CRS는 중증 CRS 또는 3등급 이상의 CRS인 방법.

[0046] 구체예 12. 구체예 7-11 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 투여 시점 또는 투여 직전에 대상체가 바이러스 감염과 관련되거나 이에 기인한 중증 폐렴, 급성 호흡곤란 증후군(ARDS), 패혈증 또는 패혈성 쇼크를 갖는 방법.

[0047] 구체예 13. 대상체에서 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태를 갖는 대상체에게 치료 기간 동안 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하되, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하며; 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 것인 방법.

[0048] 구체예 14. 구체예 1-13 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0049] 구체예 15. 구체예 14에 있어서, 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태는 급성 병태인 방법.

[0050] 구체예 16. 구체예 1-15 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 단일 용량만이 대상체에

게 투여되는 방법.

[0051] 구체예 17. 구체예 14에 있어서, 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태는 만성 병태인 방법.

[0052] 구체예 18. 구체예 13, 구체예 14 또는 구체예 17에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 전신 홍반성 루푸스 (SLE)인 방법.

[0053] 구체예 19. 구체예 13, 구체예 14 또는 구체예 17에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 쇼그렌 증후군인 방법.

[0054] 구체예 20. 구체예 13, 구체예 14 또는 구체예 17에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 건선성 관절염인 방법.

[0055] 구체예 21. 구체예 13, 구체예 14 또는 구체예 17에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 류마티스성 관절염.

[0056] 구체예 22. 구체예 13, 구체예 14 또는 구체예 17에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 크론병인 방법.

[0057] 구체예 23. 구체예 13, 구체예 14 또는 구체예 17에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 궤양성 대장염인 방법.

[0058] 구체예 24. 구체예 1-15 및 17-23 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 복수의 용량이 대상체에게 투여되는 방법.

[0059] 구체예 25. 구체예 24에 있어서, 복수의 용량 각각은 주 1회 이하로 투여되는 방법.

[0060] 구체예 26. 구체예 24 또는 구체예 25에 있어서, 복수의 용량 각각은 주 1회(Q1W) 투여되는 방법.

[0061] 구체예 27. 구체예 24 또는 구체예 25에 있어서, 복수의 용량 각각은 2주마다 1회(Q2W) 투여되는 방법.

[0062] 구체예 28. 구체예 24 또는 구체예 25에 있어서, 복수의 용량 각각은 월 1회(Q4W) 투여되는 방법.

[0063] 구체예 29. 구체예 1-28 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 10mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 또는 약 6 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0064] 구체예 30. 구체예 1-29 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 또는 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0065] 구체예 31. 구체예 1-30 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 0.3 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0066] 구체예 32. 구체예 1-30 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 1 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0067] 구체예 33. 구체예 1-30 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 3 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0068] 구체예 34. 구체예 1-30 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 6 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0069] 구체예 35. 구체예 1-30 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 10 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0070] 구체예 36. 구체예 1-28 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 15 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0071] 구체예 37. 구체예 1-28 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0072] 구체예 38. 구체예 1-37 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 치료 기간은 반복되는 방법.

[0073] 구체예 39. 구체예 1-38 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 투여는 피하 투여를 통한 것인 방법.

[0074] 구체예 40. 구체예 1-38 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 투여는 정맥내 투여를 통한 것인 방법.

[0075] 구체예 41. 대상체에서 안구 자가면역 또는 염증성 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하는 변이체 ICOSL 융합 단백질의 용량을 유리체내로(intravitreally) 투여하는 것을 포함하되, 여기서 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 이의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO: 1에 기재된 서열을 참조로 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 방법.

[0076] 구체예 42. 구체예 41에 있어서, 안구 자가면역 또는 염증성 질환은 포도막염인 방법.

[0077] 구체예 43. 구체예 41 또는 구체예 42에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 약 0.01 mg 내지 10 mg, 약 0.05 mg 내지 10 mg, 약 0.1 mg 내지 10 mg, 약 0.5 mg 내지 10 mg, 약 1 mg 내지 10 mg, 약 1.5 mg 내지 10 mg, 약 2 mg 내지 10 mg, 약 3 mg 내지 10 mg, 약 4 mg 내지 10 mg, 약 5 mg 내지 10 mg, 약 6 mg 내지 10 mg, 약 7 mg 내지 10 mg, 약 8 mg 내지 10 mg, 약 9 mg 내지 10 mg의 용량으로 투여되는 방법.

[0078] 구체예 44. 구체예 41-43 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 0.2 mL 미만, 선택적으로 0.1 mL 미만의 부피로 투여되는 방법.

[0079] 구체예 45. 구체예 41-44 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 약 0.05 mL의 부피로 투여되는 방법.

[0080] 구체예 46. 구체예 1-45 중 어느 하나의 구체예에 있어서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 (i) SEQ ID NO:32에 제시된 아미노산 서열, (ii) SEQ ID NO:32에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는 (iii) IgV 도메인 또는 IgC 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는, (i) 및/또는 (ii)의 일부를 포함하는 방법.

[0081] 구체예 47. 구체예 1-46 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적인 결합 단편을 포함하는 방법.

[0082] 구체예 48. 구체예 1-47 중 어느 하나의 구체예에 있어서, IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편은 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 또는 변이체 ICOSL 융합 단백질의 유일한 ICOSL 부분인 방법.

[0083] 구체예 49. 구체예 1-48 중 어느 하나의 구체예에 있어서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 방법.

[0084] 구체예 50. 구체예 1-49 중 어느 하나의 구체예에 있어서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:3에 제시된 아미노산 서열로 이루어진 방법.

[0085] 구체예 51. 구체예 1-50 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:36에 제시된 서열 또는 SEQ ID NO:36에 제시된 서열에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 나타내는 서열을 가지며 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 방법.

[0086] 구체예 52. 구체예 1-51 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:36에 제시된 서열을 갖는 방법.

[0087] 구체예 53. 구체예 1-52 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 멀티머화 도메인은 면역글로불린의 Fc 영역이거나 이를 포함하는 방법.

[0088] 구체예 54. 구체예 53에 있어서, Fc 영역은 야생형 인간 면역글로불린의 Fc와 비교하여 감소된 이펙터 기능을 나타내는 변이체 Fc 영역인 방법.

[0089] 구체예 55. 구체예 53 또는 구체예 54에 있어서, Fc 영역은 야생형 인간 IgG1과 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변이체 IgG1 Fc 영역인 방법.

[0090] 구체예 56. 구체예 54 또는 구체예 55에 있어서, 변이체 Fc 영역은 N297G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K

또는 L234A/L235E/G237A로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것인 방법.

[0091] 구체예 57. 구체예 54-56 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 Fc 영역은 아미노산 치환 C220S를 더 포함하되, 상기 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것인 방법.

[0092] 구체예 58. 구체예 53-57 중 어느 하나의 구체예에 있어서, Fc 영역은 K447del을 포함하되 여기서 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것인 방법.

[0093] 구체예 59. 대상체에서 급성 이식편대숙주질환(aGVHD)을 예방하거나 감소시키는 방법에 사용하기 위한 변이체 ICOSL 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물로서, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 의약 조성물.

[0094] 구체예 60. 급성 이식편대숙주질환(aGVHD)을 예방하거나 감소시키는 방법에 사용하기 위한 약제의 제형화에 있어서의 변이체 ICOSL 융합 단백질의 용도로서, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 용도.

[0095] 구체예 61. 구현예 59의 의약 조성물 또는 구현예 60의 용도에 있어서, 상기 방법은 치료 기간 동안 하나 이상의 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 하나 이상의 용량 각각은 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 것인 의약 조성물 또는 용도.

[0096] 구체예 62. 구체예 59 또는 구체예 61의 의약 조성물 또는 구체예 60 또는 구체예 61의 용도에 있어서, aGvHD는 등급 II-IV aGVHD인 의약 조성물 또는 용도.

[0097] 구체예 63. 구체예 59, 61, 및 62 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 60, 61, 및 62 중 어느 하나의 용도에 있어서, aGVHD는 면역억제제 치료에 대해 내성 또는 불응성인 의약 조성물 또는 용도.

[0098] 구체예 64. 구체예 59 및 61-63 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 또는 구체예 60 및 61-63 중 어느 하나의 용도에 있어서, 면역억제제는 코르티코스테로이드를 포함하는 의약 조성물 또는 용도.

[0099] 구체예 65. 구체예 63 또는 구체예 64의 의약 조성물 또는 구체예 63 또는 구체예 64의 용도에 있어서, 면역억제제는 사이클로스포린을 포함하는 의약 조성물 또는 용도.

[0100] 구체예 66. 대상체에서 바이러스 감염에 이차적인 염증을 예방하거나 감소시키는 방법에 사용하기 위한 변이체 ICOSL 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물로서, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 의약 조성물.

[0101] 구체예 67. 바이러스 감염에 이차적인 염증을 예방하거나 감소시키는 방법에 사용하기 위한 약제의 제형화에 있어서의 변이체 ICOSL 융합 단백질의 용도로서, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 용도.

[0102] 구체예 68. 구체예 66의 의약 조성물 또는 구체예 67의 용도에 있어서, 상기 방법은 치료 기간 동안 하나 이상의 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 하나 이상의 용량 각각은 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 것인 의약 조성물 또는 용도.

[0103] 구체예 69. 구체예 66 또는 구체예 68의 의약 조성물 또는 구체예 67 또는 구체예 68의 용도에 이어서, 바이러

스는 코로나바이러스인 의약 조성물 또는 용도.

[0104] 구체예 70. 구체예 69의 의약 조성물 또는 구체예 69의 용도에 있어서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2이고 감염은 COVID-19인 의약 조성물 또는 용도.

[0105] 구체예 71. 구체예 66, 68, 및 69 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 67-69 중 어느 하나의 용도에 있어서, 염증은 사이토카인 방출 증후군 (CRS)과 연관된 것인 의약 조성물 또는 용도.

[0106] 구체예 72. 구체예 71의 의약 조성물 또는 구체예 71의 용도에 있어서, CRS는 중증 CRS 또는 등급 3 이상의 CRS인 의약 조성물 또는 용도.

[0107] 구체예 73. 구체예 68, 및 69-72 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 68, 및 69-72 중 어느 하나의 용도에 있어서, 대상체는 투여 시점에 또는 투여 직전에 바이러스 감염과 관련되거나 이에 기인한 중증 폐렴, 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 패혈증 또는 패혈성 쇼크를 갖는 의약 조성물 또는 용도.

[0108] 구체예 74. 대상체에서 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태를 치료하는 방법에 사용하기 위한 변이체 ICOSL 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물로서, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 의약 조성물.

[0109] 구체예 75. 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태를 치료하는 방법에 사용하기 위한 약제의 제형화에 있어서의 변이체 ICOSL 융합 단백질의 용도로서, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 용도.

[0110] 구체예 76. 구체예 74의 의약 조성물 또는 구체예 75의 용도에 있어서, 상기 방법은 치료 기간 동안 하나 이상의 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 하나 이상의 용량 각각은 약 0.001 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 것인 의약 조성물 또는 용도.

[0111] 구체예 77. 구체예 61-65, 68-73, 및 76 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 61-65, 68-73, 및 76 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

[0112] 구체예 78. 구체예 77의 의약 조성물 또는 구체예 77의 용도에 있어서, 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태는 급성 병태인 의약 조성물 또는 용도.

[0113] 구체예 79. 구체예 61-65, 68-73, 및 76-78 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 61-65, 68-73, 및 76-78 중 어느 하나의 용도에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 단일 용량 만을 대상체에 투여하는 의약 조성물 또는 용도.

[0114] 구체예 80. 구체예 77의 의약 조성물 또는 구체예 77의 용도에 있어서, 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태는 만성 질환 또는 병태인 의약 조성물 또는 용도.

[0115] 구체예 81. 구체예 74, 77, 및 80 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 75, 77 및 80 중 어느 하나의 용도에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 전신 홍반성 루푸스(SLE)인 의약 조성물 또는 용도.

[0116] 구체예 82. 구체예 74, 77, 및 80 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 75, 77 및 80 중 어느 하나의 용도에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 쇼그렌 증후군인 의약 조성물 또는 용도.

[0117] 구체예 83. 구체예 74, 77, 및 80 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 75, 77 및 80 중 어느 하나의 용도에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 건선성 관절염인 의약 조성물 또는 용도.

[0118] 구체예 84. 구체예 74, 77, 및 80 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 75, 77 및 80 중 어느 하나의 용도에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 류마티스성 관절염인 의약 조성물 또는 용도.

[0119] 구체예 85. 구체예 74, 77, 및 80 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 75, 77 및 80 중 어느 하나의 용도에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 크론병인 의약 조성물 또는 용도.

[0120] 구체예 86. 구체예 74, 77, 및 80 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 75, 77 및 80 중 어느 하나의 용도에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 궤양성 대장염인 의약 조성물 또는 용도.

[0121] 구체예 87. 구체예 61-65, 68-73, 및 76-78 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 61-65, 68-73, 및 76-78 중 어느 하나의 용도에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 복수의 용량이 대상체에게 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

[0122] 구체예 88. 구체예 87의 의약 조성물 또는 구체예 87의 용도에 있어서, 복수의 용량 각각은 주 1회 이하로 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

[0123] 구체예 89. 구체예 87 또는 구체예 88의 의약 조성물 또는 구체예 87 또는 구체예 88의 용도에 있어서, 복수의 용량 각각은 주 1회(Q1W) 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

[0124] 구체예 90. 구체예 87 또는 구체예 88의 의약 조성물 또는 구체예 87 또는 구체예 88의 용도에 있어서, 복수의 용량 각각은 2주마다 1회(Q2W) 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

[0125] 구체예 91. 구체예 87 또는 구체예 88의 의약 조성물 또는 구체예 87 또는 구체예 88의 용도에 있어서, 복수의 용량 각각은 월 1회(Q4W) 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

[0126] 구체예 92. 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-91 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-91 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 10mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 또는 약 6 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

[0127] 구체예 93. 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-92 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-92 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 또는 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg의 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

[0128] 구체예 94. 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 0.3 mg/kg의 양으로 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

[0129] 구체예 95. 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 1 mg/kg의 양으로 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

[0130] 구체예 96. 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 3 mg/kg의 양으로 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

[0131] 구체예 97. 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 6 mg/kg의 양으로 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

[0132] 구체예 98. 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-93 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 10 mg/kg의 양으로 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

[0133] 구체예 99. 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-91 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-91 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 15 mg/kg의 양으로 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

[0134] 구체예 100. 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-91 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 61-65, 68-73,

76-78, 및 87-91 중 어느 하나의 용도에 있어서, 하나 이상의 용량의 각 용량은 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

[0135] 구체예 101. 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-100 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-100 중 어느 하나의 용도에 있어서, 치료 기간은 반복되는 의약 조성물 또는 용도.

[0136] 102. 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-101 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-101 중 어느 하나의 용도에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 피하 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

[0137] 구체예 103. 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-101 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 61-65, 68-73, 76-78, 및 87-101 중 어느 하나의 용도에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 정맥내 투여되는 의약 조성물 또는 용도.

[0138] 구체예 104. 대상체에서 안구 자가면역 또는 염증성 질환을 치료하는 방법에 사용하기 위한 변이체 ICOSL 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물로서, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 의약 조성물.

[0139] 구체예 105. 대상체에서 안구 자가면역 또는 염증성 질환을 치료하는 방법에 사용하기 위한 약제의 제형화에 있어서의 변이체 ICOSL 융합 단백질의 용도로서, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 용도.

[0140] 구체예 106. 구체예 104의 의약 조성물 또는 구체예 105의 용도에 있어서, 안구 자가면역 또는 염증성 질환은 포도막염인 의약 조성물 또는 용도.

[0141] 구체예 107. 구체예 104 또는 구체예 106의 의약 조성물 또는 구체예 105 또는 구체예 106의 용도에 있어서, 상기 방법은 대상체에게 하나 이상의 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 단계를 포함하되, 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 하나 이상의 용량 각각은 약 0.01 mg 내지 10 mg, 약 0.05 mg 내지 10 mg, 약 0.1 mg 내지 10 mg, 약 0.5 mg 내지 10 mg, 약 1 mg 내지 10 mg, 약 1.5 mg 내지 10 mg, 약 2 mg 내지 10 mg, 약 3 mg 내지 10 mg, 약 4 mg 내지 10 mg, 약 5 mg 내지 10 mg, 약 6 mg 내지 10 mg, 약 7 mg 내지 10 mg, 약 8 mg 내지 10 mg, 약 9 mg 내지 10 mg의 용량으로 투여되는 것인 의약 조성물 또는 용도.

[0142] 구체예 108. 구체예 107의 의약 조성물 또는 구체예 107의 용도에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 0.2 mL 미만, 선택적으로 0.1 mL 미만의 부피로 투여되는 것인 의약 조성물 또는 용도.

[0143] 구체예 109. 구체예 107 또는 구체예 108 의약 조성물 또는 구체예 107 또는 구체예 108의 용도에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 약 0.05 mL의 부피로 투여되는 것인 의약 조성물 또는 용도.

[0144] 구체예 110. 구체예 59, 61-65, 66, 68-73-, 74, 76-103, 104, 및 106-109 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 60, 61-65, 67, 68-73, 75, 76-103, 105, 및 106 107-109 중 어느 하나의 용도에 있어서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 (i) SEQ ID NO:32에 제시된 아미노산 서열, (ii) SEQ ID NO:32에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는 (iii) IgV 도메인 또는 IgC 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는, (i) 및/또는 (ii)의 일부를 포함하는 것인 의약 조성물 또는 용도.

[0145] 구체예 111. 구체예 59, 61-65, 66, 68-73-, 74, 76-103, 104 및 106-110 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 60, 61-65, 67, 68-73, 75, 76-103, 및 105-110 중 어느 하나의 용도에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적인 결합 단편을 포함하는 것인 의약 조성물 또는 용도.

[0146] 구체예 112. 구체예 59, 61-65, 66, 68-73-, 74, 76-103, 104 및 106-111 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 60, 61-65, 67, 68-73, 75, 76-103, 및 105-111 중 어느 하나의 용도에 있어서, IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편은 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 또는 변이체 ICOSL 융합 단백질의 유일한 ICOSL 부분인 것인 의약 조성물 또는 용도.

[0147] 구체예 113. 구체예 59, 61-65, 66, 68-73-, 74, 76-103, 104 및 106-112 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 60, 61-65, 67, 68-73, 75, 76-103, 및 105-112 중 어느 하나의 용도에 있어서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 의약 조성물 또는 용도.

[0148] 구체예 114. 구체예 59, 61-65, 66, 68-73-, 74, 76-103, 104 및 106-113 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 60, 61-65, 67, 68-73, 75, 76-103, 및 105-113 중 어느 하나의 용도에 있어서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 의약 조성물 또는 용도.

[0149] 구체예 115. 구체예 59, 61-65, 66, 68-73-, 74, 76-103, 104 및 106-114 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 60, 61-65, 67, 68-73, 75, 76-103, 및 105-114 중 어느 하나의 용도에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:36에 제시된 서열 또는 SEQ ID NO:36에 제시된 서열에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성을 나타내는 서열을 갖고 N52H, N57Y 및 Q100R 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 의약 조성물 또는 용도.

[0150] 구체예 116. 구체예 59, 61-65, 66, 68-73-, 74, 76-103, 104 및 106-115 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 60, 61-65, 67, 68-73, 75, 76-103, 및 105-115 중 어느 하나의 용도에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:36에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 의약 조성물 또는 용도.

[0151] 구체예 117. 구체예 59, 61-65, 66, 68-73-, 74, 76-103, 104 및 106-116 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 60, 61-65, 67, 68-73, 75, 76-103, 및 105-116 중 어느 하나의 용도에 있어서, 멀티머화 도메인은 면역글로불린의 Fc 영역이거나 이를 포함하는 것인 의약 조성물 또는 용도.

[0152] 구체예 118. 구체예 117의 의약 조성물 또는 구체예 117의 용도에 있어서, Fc 영역은 야생형 인간 면역글로불린의 Fc와 비교하여 감소된 이펙터 기능을 나타내는 변이체 Fc 영역인 의약 조성물 또는 용도.

[0153] 구체예 119. 구체예 117 또는 구체예 118의 의약 조성물 또는 구체예 117 또는 구체예 118의 용도에 있어서, Fc 영역은 야생형 인간 IgG1에 비해 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변이체 IgG1 Fc 영역인 것인 의약 조성물 또는 용도.

[0154] 구체예 120. 구체예 118 또는 구체예 119의 의약 조성물 또는 구체예 118 또는 구체예 119의 용도에 있어서, 변이체 Fc 영역은 N297G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K 또는 L234A/L235E/G237A로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하되, 여기서 상기 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것인 의약 조성물 또는 용도.

[0155] 구체예 121. 구체예 118-120 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 118-120 중 어느 하나의 용도에 있어서, 변이체 Fc 영역은 아미노산 치환 C220S을 더 포함하되, 여기서 상기 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것인 의약 조성물 또는 용도.

[0156] 구체예 122. 구체예 117-121 중 어느 하나의 의약 조성물 또는 구체예 117-121 중 어느 하나의 용도에 있어서, Fc 영역은 K447del을 포함하되, 여기서 상기 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것인 의약 조성물 또는 용도.

도면의 간단한 설명

[0157] [0029] 도 1A-1B는 분자의 개략도를 도시한다. 도 1A는 Fc 사슬에 융합된 변이체 IgSF 도메인(vIgD)을 함유하는 가용성 분자를 도시한다. 도 1B는 ICOSL의 IgV 도메인에서 자주 관찰되는 돌연변이를 포함하는 분자를 도시한다.

[0030] 도 2A-2B는, 항-CD3과의 공동고정시, 사이토카인 방출을 통한, 야생형 (WT) 또는 변이체 ICOSL의 공동자극 능력을 입증한다. 40 nM (화살표) 또는 10 nM WT 또는 변이체 ICOSL을 이용하여 96-웰의 평평 바닥 폴리스티렌 조직 배양플레이트의 웰에 10 nM 항-CD3을 습식 코팅시켰다. 100,000 정제된 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ (pan) T-세포를 첨가하고 사이토카인 방출에 대해 ELISA 분석하기 위해 상등액을 72 시간 후에 수확하였다. 도 2A는 pan T-세포 공동자극으로부터 분비된 IFN-감마를 나타내고 도 2B는 부비된 IL-17 단백질 수준을 나타낸다. 이들 그래프들은 pan T-세포 공동자극으로부터의 전형적인 IFN-감마 및 IL-17 응답을 나타낸다.

[0031] 도 3A-3B는 항-CD3과의 공동고정시, 증식을 통한, 야생형 (WT) 또는 변이체 ICOSL의 공동자극 능력을 입

증한다. CFSE-표지된 pan T-세포들을 전술한 바와 같은 항-CD3 및 ICOSL 코팅 플레이트에서 72 시간 인큐베이션시켰다. 세포들을 수확, 세척하고 형광 컨쥬게이트된 항-CD4 또는 항-CD8 항체로 염색한 다음, 유세포분석에 의해 검정하였다. 비자극 대조군 CFSE-표지된 T-세포를 이용하여 게이트 및 사이토미터 전압을 설정하였다. 대조군으로부터의 CFSE 희석에 의해 증식을 측정하였다. 도 3A는 40 nM ICOSL 공동자극 후 총 증식 백분율(화살표), $CD4^+$ (색칠한 막대), 및 $CD8^+$ 세포 (빗금친 막대) T-세포를 나타낸다. 도 3B는 10 nM ICOSL 공동자극 후 총 pan T-세포 증식 백분율을 나타낸다. 이들 그래프들은 pan T-세포 공동자극으로부터의 전형적인 IFN-감마 및 IL-17 응답을 나타낸다.

[0032] 도 4는 인간 림프구 혼합배양 반응 (MLR)에 있어서의 ICOSL vIgD 후보 기능을 도시한다. ICOSL 변이체 및 이들의 돌연변이를 야생형 ICOSL, 음성 대조군들인 PDL2-Fc 및 인간 IgG, 양성 대조군인 벤치마크 분자 CTLA-Ig 벨라타셉트와 함께 x축에 나타내었다. 그래프를 가로지르는 직선은 음성 대조군 배양체의 상등액에서 검출된 IFN-감마의 베이스라인 양을 나타낸다. 각각의 ICOSL 변이체 후보 또는 대조군에 있어서, 3가지 상이한 농도로 시험하되, 배양체 내 가장 높은 단백질 농도는 40 nM이었고 이를 화살표로 표시하였다. ICOSL 변이체의 대다수의 후보는 이들 배양체에서의 IFN-감마 농도가 더 낮은 것에 의해 반영되는 바와 같이 벨라타셉트(벨라타셉트)에 비해 시험된 모든 세 가지 농도에서 더 우수한 길항 활성을 나타내었다.

[0033] 도 5A-5D는 B-T 공동배양 분석에서 B 및 T 세포 반응에 대한 가용성 ICOSL Fc-융합 단백질의 억제를 나타낸 도면이다. 도 5A는 가용성 ICOSL Fc-융합 단백질 inhibition of T 세포-구동된 B 세포 증식의 가용성 ICOSL Fc-융합 단백질 억제를 나타낸다. 단일 공여자로부터 정제된 CD4+ T 세포 및 B 세포를 CFSE-표지하고, 표시된 ICOSL Fc-융합 단백질에 의해 또는 의하지 않고, 표시된 미토겐의 존재 또는 부재 하에 1:1 비율로 공동-인큐베이션하였다. 세포들을 100 ng/ml의 Staph 내독소 B (SEB), 1 mg/ml의 포크위드(Pokeweed) 미토겐 (PWM) 또는 양자 모두로 자극시켰다. ICOSL Fc-융합 단백질은 최종 농도 40 nM으로 포함시키고 배양체를 7일간 인큐베이션한 다음 FACS 분석하였다. 분열된 B 세포의 수를, 이들의 희석된 CFSE를 갖는 배양체 내 세포 수로부터 구하였다. 야생형을 제외한 시험된 모든 ICOSL Fc-융합 단백질이 B 세포 증식을 저감시켰다. 도 5B-5D는 ICOSL Fc-융합 단백질이 B-T 공동 배양체에서의 사이토카인 T 세포 사이토카인 생성을 억제함을 보여준다. 전술한 배양체로부터의 상등액을 제7일에 수확하고 LEGENDplex Human Th Cytokine Panel (Biolegend)을 이용하여 사이토카인 함량을 분석하였다. T 세포 production of IL-5(도 5B), IL-13(도 5C) 및 IL-21(도 5D)의 T 세포 생산은 ICOSL Fc-융합 단백질의 포함에 의해 약화된다.

[0034] 도 6A-6F는 인간 PBMC 세포가 면역결핍 NSG 쥐 숙주에 입양전달된, 이식편 대 숙주 질환(GVHD)의 마우스 모델에 있어서 상이한 종결점(endpoints)을 도시한다. 도 6A는 처리된 동물의 생존 곡선을 나타낸다. 식염수 대조군 동물에서는 공격적인 질병 경과 및 이어지는 사망이 관찰되었고, 야생형 ICOSL-Fc, 뿐만 아니라 N52H/I143T ICOSL 변이체로 처리된 동물에서도 이와 유사한 생존이 관찰되었다. 변이체 N52H/N57Y/Q100P는 임상 벤치마크 벨라타셉트와 필적할만한 개선된 생존율을 나타냈다. 도 6B는 체중 감량에서 유사한 추세를 나타내는데, 다른 모든 그룹에서는 급속한 체중 감량이 경험되었음에도 불구하고 ICOSL 변이체 N52H/N57Y/Q100P는 벨라타셉트로 처리된 동물과 유사한 체중 유지를 나타내었다. 도 6C는 표준화된 GVHD 질병 활동 지수 (DAI) 관측치의 임상 점수를 나타내는데, 임상 벤치마크 벨라타셉트에 필적하게, ICOSL 변이체 N52H/N57Y/Q100P로 처리된 동물에서 더 낮은 점수를 나타내는 반면, 다른 동물 그룹은 더 높은 DAI 점수를 나타냈음을 다시 한번 보여준다. 도 6D는 제14일에 측정된 실험 동물로부터의 혈중 CD4 및 CD8 백분율의 유세포분석 측정치를 나타낸다. 실험 그룹들 간의 CD8 세포 백분율은 대체로 동일하였으나, ICOSL 변이체 N52H/N57Y/Q100P 및 벨라타셉트로 처리된 동물들은 다른 실험 그룹에 비해 더 낮은 CD4 세포 백분율을 나타냈다.

[0035] 도 6E는 부가적인 ICOSL 변이체 분자를 시험하는 유사 실험으로부터의 생존 곡선을 나타낸다. 도 6F는 부가적인 ICOSL 변이체 분자를 시험하는 유사 실험으로부터의 임상 점수를 나타낸다.

[0036] 도 7은 지연형 과민성(DTH)의 표준 모델로부터의 마우스에 있어서의 귀 두께의 변화를 요약한 도면이다. 오브알부민으로 감작시킨 다음 동일한 단백질을 이용하여 귀를 챌린지한 PBS 처리 동물들은 가장 톺은 귀 부종(swelling) 측정치를 나타낸다. 임상 벤치마크인 아바타셉트로 처리된 마우스들은 귀 챌린지 후에 약간 감소된 귀 부종을 나타냈다. 5개의 모든 ICOSL 변이체 처리 그룹은 아바타셉트에 비해 귀 부종이 동등하거나 개선된 감소를 나타냈다.

[0037] 도 8은 40 nM의 Fc-대조군 단백질, 야생형 ICOSL-Fc, 야생형 CD80-Fc, 이들 양자 모두의 단백질 또는 표시된 돌연변이를 갖는 변이체 ICOSLFc-융합 단백질와 함RP 10 nM 항-CD3 인큐베이션시 일차 인간 T 세포의 나노스트링 전사 시그니처를 도시한다. 샘플로부터의 총 RNA를 수확된 세포로부터 준비하고 RNA를 나노스트링으로

옮기고 암 면역 칩을 사용하여 각 샘플에서 750의 유전자의 전사체를 정량화하였다. 변경된 전사체에는 언급된 전사체를 포함하여, 대각선 위 또는 아래의 수준의 것들도 포함된다.

[0038] 도 9는 다양한 면역조절 단백질의 존재하에 지시된 시간 동안, 도 8에 기술된 바와 같은 인큐베이션시의 예시적인 전사체의 전사 수준을 도시한다.

[0039] 도 10A-10G는 SEQ ID NO:1에 제시된 레퍼런스 ICOSL 세포외 도메인 (ECD) 서열을 참조로, 다양한 레퍼런스 서열, 예컨대 절단된(truncated) ICOSL ECD Fc-융합체, ICOSL IgV 도메인 단독 Fc-융합체, 및/또는 N207G/L208G에 돌연변이를 갖는 ICOSL 변이체 Fc 융합 단백질에서 생성된 돌연변이 N52H/N57Y/Q100R/F172S를 함유하는 변이체 ICOSL Fc-융합체 분자에서의 단백질 분해의 SEC 분석 결과를 나타낸다. ExpiCHO-S 유래 세포를 사용하여 분자를 발현시켰다. 도 10H는 CD28 및 ICOS 양자 모두에 대해 변이체 ICOSL IgV-Fc의 표적 결합을 나타낸다(대조군 단백질은 아님). 도 10I는 유세포 분석 및 IC50 수준에 의해 측정된 표적 수용체 CD28 및 ICOS에 대한 리간드 결합을 차단하는 변이체 ICOSL IgV-Fc의 능력을 나타낸다. 도 10J는 변이체 ICOSL IgV-Fc가 CD28 및 ICOS 공동자극 양자 모두를 차단함을 보여준다.

[0040] 도 11A-11E는 평균 발 점수합(mean sum paw score)(도 119A), 탐지된 CII IgG(도 119B), 혈청 사이토카인 수준(도 11C), CD44+ 활성화된 T 세포 또는 T_{FH} 세포(도 11D), 및 배출(draining) 림프절에 있어서의 B 세포 분율(도 11E)을 비롯한, 콜라겐-유도된 관절염(CIA) 모델에서의 예시적인 ICOSL IgV-Fc 융합 분자의 예방적 투약의 항염 활성을 나타낸 도면이다.

[0041] 도 12A-12D는 평균 발 점수합(mean sum paw score, 도 11A) 및 혈청 사이토카인 수준(도 11C-11D)을 비롯하여, 콜라겐-유도된 관절염(CIA) 모델에서의 예시적인 ICOSL IgV-Fc 융합 분자의 지연된 투약의 항염 활성을 나타낸 도면이다.

[0042] 도 13A-13D는 EAE 점수 (도 13A), 사타구니 림프절 T 세포의 유세포 분석 (도 13C) 및 전염증성 사이토카인 (도 13D)을 포함하여, 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE) 모델에서 예시적인 ICOSL IgV-Fc 융합 분자의 지연된 투약의 항염증 활성을 도시한다.

[0043] 도 14A-14B는 변이체 ICOSL IgV-Fc 분자의 다양한 투여량(20, 100, 또는 500 μg)으로 처치된 이식편-대-숙주 질환(GvHD) 마우스의 생존 및 DAI 점수를 나타낸다.

[0044] 도 15A-15F는 연구 말기에서 수집된 혈액(도 15A) 또는 총 T 세포 카운트 (도 15B)에서의 인간 세포/마우스 세포의 이식편-대 숙주-질환 (GvHD) 비율의 유세포 분석 결과, 및 다양한 투여량(20, 100, 또는 500 μg)의 변이체 ICOSL IgV-Fc 분자로 처리된 이식편-대 숙주-질환 (GvHD) 마우스로부터의 ICOS+ CD4+ 또는 CD8+ 세포 (도 15C-15D), 또는 CD28+ CD4+ 또는 CD8+ 세포 (도 15E-15F) 평가 결과를 나타낸 도면이다.

[0045] 도 16A-16B는 다양한 투여량(20, 100, 또는 500 μg)의 변이체 ICOSL IgV-Fc 분자로 처리된 이식편-대 숙주-질환 (GvHD) 마우스로부터의 T 세포의 활성화 또는 고갈 마커의 발현을 나타낸다.

[0046] 도 16C는 다양한 투여량(20, 100, 또는 500 μg)의 변이체 ICOSL IgV-Fc 분자로 처리된 이식편-대 숙주-질환 (GvHD) 마우스로부터의 T 조절 세포에 대한 T 이펙터 세포(Teff)의 비율을 나타낸다.

[0047] 도 17A-17D는 다양한 투여량(20, 100, 또는 500 μg)의 변이체 ICOSL IgV-Fc 분자로 처리된 이식편-대 숙주-질환 (GvHD) 마우스로부터의 혈청 전염증성 사이토카인을 나타낸다.

[0048] 도 17E는 정상적인 마우스와 비교한 GVHD에서의 변이체 ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)의 혈청 노출을 나타낸다.

[0049] 도 18A는 CD4+CD45RBhigh-유도된 대장염 모델에서 체중 및 분변(stool) 점수로부터 산출된 질병 활성 지수(DAI)에 대한, 예시적인 ICOSL IgV-Fc에 의한 치료에 따른 DAI 결과를 나타내고 도 18B는 조직학적 결과를 나타낸다.

[0050] 도 19A-19N은 Fc 대조군, 프레잘루맙(prez), 아바타셉트(Aba), 아바타셉트와 프레잘루맙과의 조합(A+P) 또는 ICOS-IgV Fc (N52H/N57Y/Q100R)의 존재 하에 인공 항원 제시 세포(aAPC)를 갖는 건강한 공여자 또는 쇼그렌 증후군(SjS)를 갖는 대상체로부터의 PBMC의 공동 배양물을 포함하는 쇼그렌 증후군(SjS) 모델에서 사이토카인 방출의 시험관내 자극을 도시한 도면이다. 도 19A 및 도 19B는 SjS PBMC 및 건강한 공여자 PBMC로부터 각각 IL-2의 생산을 도시한다. 도 19C 및 도 19D는 각각 SjS PBMC 및 건강한 공여자 PBMC로부터의 IFN-γ의 생성물을 도시한다. 도 19E 및 도 19F는 Fc 대조군, 아바타셉트 또는 ICOS-IgV Fc(N52H/N57Y/Q100R)의 존재 하에 인공

APC와 공동 배양한 후 SjS PBMC 일치 공여자로부터 각각 IL-2 및 IFN-γ를 도시한다. 도 19G 내지 19I는 사이토카인 반응에 대한 예시적인 결과를 도시한다. 도 19J는 SjS, SLE 및 PsA 환자 집단에 대한 유전자 분석을 도시한다. 도 19K는 공동-배양 동안, 나이브 T 세포의 퍼센트 증가에 의해 나타나는 바와 같은 B 세포 분화, T 세포 증식, CD40L+ T 세포 회복 및 B 세포 증식을 도시한다. 도 19L은 세포 활성화/증식에 대한 효과에 대한 IC50 값을 도시한다. 도 19M은 인간 IgG1, IgG3, IgA 및 IgM의 분비에 대한 결과를 도시한다. 도 19N은 변이체 ICOSL IgV-Fc에 의한 억제 수준에 따라 분류된 B-T 세포 협력에 관여하는 유전자에 대한 차세대 시퀀싱 결과를 나타내며, 각 유전자에 대해 빨간색 정도는 더 높은 발현 값을 나타내고 파란색 정도는 더 낮은 값을 나타낸다.

[0051] 도 20A-20H는 Fc 대조군, 아바타셉트 또는 ICOS-IgV Fc (N52H/N57Y/Q100R)으로 처리된, 항-PD-L1에 의해 유도된 시알라덴염의 NOD x 항-PDL1 마우스 모델 또는 나이브 마우스로부터 수집된 턱밑샘(SMG: submandibular glands), 장기의 조직학적 결과, 및 혈청의 결과를 나타낸 도면이다. H&E로 염색한 후의 예시적인 조직학 이미지는 도 20A 및 도 20C에 도시되어 있다. 도 20B 및 도 20D는 처리된 마우스에 있어서, 염증에 대한 점수를 0-3의 척도로 나타낸 도면이다. 도 20E는 개별적인 SMG 점수를 나타낸다. 도 20F는 제10일에 수집되어 ELISA에 의해 분석된 혈청으로부터의 혈청 자가항체를 도시한다. 도 20G는 제10일에 수집된 SMG로부터 단리된 RNA로부터의 상대적인 유전자 발현 수준을 도시한다. 도 20H는 SLE와 유사한 증상을 갖는 cGvHD 질환을 유발하는 수용자 항원 제시 세포에 의한 공여자 CD4+ T 세포의 동종활성화를 포함하는 SLE 모델에서, 비장당 GC B 및 CD4+Tfh 세포의 수준, 및 Fc 대조군과 비교하여 감소된 혈청 항-dsDNA를 도시한다.

[0052] 도 21A-21E는 Fc 대조군, 프레잘루맙(prez), 아바타셉트 (Aba), 아바타셉트와 프레잘루맙과의 조합(A+P) 또는 ICOS-IgV Fc (N52H/N57Y/Q100R)의 존재 하에, 건강한 공여자(HD) 또는 류마티스 관절염(RA) 또는 건선성 관절염(PA)이 있는 대상체로부터의 PBMC를 인공 항원 제시 세포(aAPC)와 함께 공동 배양하는 것을 포함하는 관절염 모델에서 사이토카인 방출의 시험관내 자극을 도시한 도면이다. 그 결과를 IL-2(도 21A), IFN-γ(도 21B), TNFα(도 21C) 및 IL-17A(도 21D)에 나타내었다. 도 21E는 Fc 대조군에 대한 사이토카인 분비의 억제율(%)을 도시한다.

[0053] 도 22A-22D는 Fc 대조군, 프레잘루맙(prez), 아바타셉트(Aba), 아바타셉트와 프레잘루맙과의 조합(A+P) 또는 ICOS-IgV Fc(N52H/N57Y/Q100R)의 존재 하에, 인공 항원 제시 세포(aAPC)와 건강한 공여자(HD) 또는 류마티스 관절염(RA) 또는 건선 관절염(PA)이 있는 대상체로부터의 PBMC의 공동 배양을 포함하는 관절염 모델에서 사이토카인 방출의 시험관내 자극으로부터 단리된 RNA에 대한 결과를 도시한다. 도 22A는 ICOSL IgV-Fc에 의해 하향조절된 질병 발병과 관련된 유전자를 도시한다. ICOSL IgV-Fc에 의한 유전자 감소 및/또는 조절 대 Th17-관련 이펙터 분자에 대한 비교자(도 22B), 공동자극 분자(도 22C) 및 염증성 TH1 또는 TH2-관련 이펙터 분자(도 22D)에 대한 비교 결과가 도시되어 있다.

[0054] 도 23A-23C는 편향 없음(no skewing)(K562/OKT3/CD80 + CD86 + IL-2) 또는 Th17 편향(Skewing)(K562/OKT3/ICOSL + Th17 편향 배지 조건 하에 aAPC를 사용한 1차 자극 하에 인간 PBMC에 대한 결과를 도시한다. 도 23A는 자극 4일 후 ICOS 또는 CD28의 유세포 분석 결과를 나타낸다. T 세포 증식(도 23B) 및 IL-17A 사이토카인 분비(도 23C)에 대한 결과도 나타내었다.

[0055] 도 24A-24E는 비히클(둘베코의 인산염 완충 식염수/DPBS), Fc 대조군, 아바타셉트(Orencia™), 또는 반치료 요법에서 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc 또는 아바타셉트로 총 5회 용량으로 3일마다(Q3Dx5) 복강내(IP) 처리된 마우스에 대한 콜라겐 유도 관절염(CIA) 모델에 대한 결과를 도시한다 (제18일의 콜라겐 부스트 투여 전에 시작). 도 24A는 발 염증 및 구조적 손상을 도시한다. 도 24B는 석회화된 발의 톨루이딘 블루 염색을 도시한다. 도 24C는 CD4+ 또는 살아있는 전체 세포의 퍼센트로 측정된 사이토카인의 수를 도시한다. 도 24D는 전체 항-마우스 유형 II 콜라겐 IgG 항체의 농도를 도시한다. 도 24E는 비히클(DPBS)로 처리된 마우스에 비해 Fc 대조군, 아바타셉트 또는 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc 처리된 마우스로부터 개별 마우스에 대해 결정된 사이토카인의 억제 퍼센트를 도시한다.

[0056] 도 25A는 예시적인 ICOSL IgV-Fc의 표시된 용량으로 처리된 대상체에서 28일에 걸쳐 측정된 예시적인 ICOSL IgV-Fc의 약동학을 나타낸다.

[0057] 도 25B는 예시적인 ICOSL IgV-Fc의 표시된 용량으로 치료된 대상체에서 28일에 걸쳐 측정된 바와 같은 퍼센트 CD4+ 표적 포화도를 도시한다.

[0058] 도 26A 및 26B는 인간 대상체에서 예시적인 ICOSL IgV-Fc 융합 단백질의 면역조절 활성을 도시한다. 융합 단백질은 면역자극제에 노출된 후 대상체에서 항체 반응을 억제하고(도 26A), 생체외에서 스타필로코커스 내

독소 B에 노출되었을 때 대상체의 세포에 의한 IL-2 생성을 억제하였다(도 26B).

[0059] 도 27A 및 27B는 크론병(CD) 또는 궤양성 대장염(UC) 환자로부터 단리되고 시험관내 인공 항원 제시 세포에 의해 자극된 PBMC로부터의 사이토카인 방출에 대한 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의 효과를 나타낸다. 도 27A는 인공 항원 제시 세포와 함께 인큐베이션하고 도시된 바와 같이 처리된 48시간 후 상등액 중 TNF-알파, IFNɣ, IL-6 및 IL-12p70 농도를 나타낸다. 도 27B는 도시된 바와 같은 처리에 있어서 사이토카인 방출의 Fc 대조군 처리에 대한 억제 백분율을 나타낸다.

[0060] 도 28은 대장염의 생체내 T 세포 전달 쥐 모델에서 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의 효능을 설명한다. 도 28A는 체중, 대변 점수, 및 DAI 결과를 도시한다. 도 28B는 혈액(좌측) 및 장간막 림프절(우측) 모두로부터의 유세포 분석을 통한 T 세포 억제를 나타낸다(도면 부호는 도 28A에 도시된 것과 동일함). 도 28C는 비히클 대조군(대장염 없음), Fc 대조군, 또는 본 명세서에 기재된 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc로 처리된 마우스로부터의 혈청 전염증성 사이토카인을 도시한다. 도 28D는 결장 중량:길이 비율 및 조합된 조직학 점수에 대한 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc로 처리된 조직학 결과를 도시한다. 대표적인 결장 조직 염색은 도 28E에서 볼 수 있고 도 28F에 더 높은 배율로 도시되어 있다.

[0061] 도 29A 및 29B는 포도막염의 실험 모델에서 처리된 눈과 처리되지 않은 눈 양쪽 모두에 대한 마스킹되지 않은 임상 점수의 중앙값 및 평균값을 각각 도시한다. 도 29C는 치료에 따른 양쪽 눈에 대한 제14일의 마스킹되지 않은 임상 점수 중앙값을 나타낸다. 도 29D 및 29E는 오른쪽(치료된) 눈에 대해서만 마스킹되지 않은 임상 점수의 중앙값을 일별로 나타낸 것이다 (8/10 또는 10/12는 투여일을 나타냄).

[0062] 도 30A는 포도막염의 실험 모델에서 처리된 눈과 처리되지 않은 눈에 대한 마스킹된 OCT 점수 중앙값을 보여준다. 도 30B는 치료된 눈에 대한 마스킹된 OCT 중앙값 점수를 보여준다. 도 30C는 일별 처리된 눈에 대한 마스킹된 OCT 중앙값 점수를 보여준다 (8/10 또는 10/12는 투여일을 나타냄).

[0063] 도 31은 표시된 바와 같이 처리된(오른쪽) 눈과 처리되지 않은(왼쪽) 눈 모두에 대해 제14일에 마스킹된 조직학 점수 중앙값을 보여준다 (8/10 또는 10/12는 투여일을 나타냄)

[0064] 도 32는 일자 및 치료에 따른 베이스라인으로부터의 체중 변화를 나타낸다(평균 및 표준 편차).

[0065] 도 33은 단일 투여 후 예시적인 ICOSL IgV-Fc 융합 단백질의 약동학을 나타낸다. 평균 농도를 경시적으로 나타내었다(SC = 피하, 기타는 정맥 주사(i.v.)).

[0066] 도 34는 예시적인 ICOSL IgV-Fc 융합 단백질의 단일 투여 후 시간 경과에 따른 CD4+ T 세포에 대한 평균 및 표준 편차 표적 포화도를 나타낸다. (SC = 피하, 기타는 정맥 주사(i.v.)).

[0067] 도 35는 예시적인 ICOSL IgV-Fc 융합 단백질이 단일 투여된 대상체에서 베이스라인선 대 시간에 대한 항-KLH IgG의 평균 및 표준 편차를 나타낸다. (SC = 피하, 기타는 정맥 주사(i.v.)).

[0068] 도 36은 다중 투여(i.v.) 후 예시적인 ICOSL IgV-Fc 융합 단백질의 약동학을 나타낸다. 평균 농도를 경시적으로 나타내었다.

[0069] 도 37은 예시적인 ICOSL IgV-Fc 융합 단백질의 다중 투여(i.v.) 후 시간 경과에 따른 CD4+ T 세포에 대한 평균 및 표준 편차 표적 포화도를 나타낸다.

[0070] 도 38은 예시적인 ICOSL IgV-Fc 융합 단백질이 다중 투여(i.v.)된 대상체에서 베이스라인 대 시간에 대한 항-KLH IgG의 평균 및 표준 편차를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0158] **발명의 상세한 설명**

[0159] [0071] 본원에 따라 적어도 하나의 표적 리간드 동족 결합 파트너(카운터-작제물 단백질이라고도 칭함)에 대해 결합 활성을 나타내는 ICOS 리간드(ICOSL)의 변이체 또는 돌연변이체 또는 그의 특이적 결합 단편인 또는 이들을 포함하는 면역조절 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드에 비해 하나 이상의 아미노산 변형(예컨대 아미노산 치환, 결실 또는 부가)을 함유한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형(예컨대 아미노산 치환, 결실 또는 부가)은 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드의 면역글로불린 수퍼패밀리(IgSF) 도메인(예컨대 IgV)에서 일어난다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는, 동족 결합 파트너 단백질, 예컨대 ICOS, CD28,

또는 CTLA-4 중 적어도 하나에 대해 변경된 결합 활성 또는 친화성, 예컨대 증가 또는 감소된 활성 또는 친화성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 가용성이다. 일부 구체예에서, 본원에 따라 본원에서 제공된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 및 하나 이상의 다른 모이어티 또는 폴리펩타이드를 함유하는 컨쥬게이트 또는 융합체인 하나 이상의 다른 면역조절 단백질도 제공된다.

[0160] [0072] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 및 면역조절 단백질은 면역학적 면역반응, 예컨대 증가된 또는 감소된 면역반응을 조절한다. 일부 구체예에서, 본원에서 제공된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 및 면역조절 단백질은 조절불능 면역반응과 관련된 질병 또는 병태를 치료하는데 이용될 수 있다.

[0161] [0073] 일부 구체예에서, 일부 구체예에서, 제공된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 공동자극 시그널링 분자들과의 상호작용을 통해 T 세포 활성화를 조절한다. 항원 특이적 T-세포 활성화는 대체로 2 가지 구별되는 시그널을 필요로 한다. 제1 시그널은 항원 제시 세포 (APC) 상에 존재하는 주요 조직적합 복합체(MHC) 관련 항원과 T-세포 수용체 (TCR)와의 상호작용에 의해 제공된다. 제2 시그널은 TCR 개입에 대해 공동자극성이고 T-세포 아폽토시스 또는 아네르기 (anergy)를 피하는데 필요하다.

[0162] [0074] 일부 구체예에서, 정상적인 생리 조건 하에서, T 세포-매개된 면역 반응은 T 세포 수용체 (TCR)에 의한 항원 인식에 의해 개시되며 공동-자극과 억제 시그널 (예컨대, 면역 체크포인트 수용체)의 밸런스에 의해 조절된다. 면역계는 자가면역성(즉, 자가-관용성)을 방지하고 면역 반응 동안, 예를 들어 병원체 감염에 대한 공격 동안 조직을 과도한 손상으로부터 보호하기 위해 면역 체크포인트 수용체에 의존한다. 그러나 일부 경우에서, 이들 면역조절 단백질은 면역계를 공격하는 메카니즘으로서, 종양을 비롯한 질병 및 병태에서 조절불능될 수 있다.

[0163] [0075] 일부 구체예에서, 공지된 T-세포 공동자극 수용체 중에는 APC에 존재하는 리간드 B7-1(CD80) 및 B7-2(CD86)에 대한 T 세포 공동자극 수용체인 CD28이 있다. 이들 동일한 리간드는 또한 CD28에 대한 것보다 더 큰 친화도로 억제성 T-세포 수용체 CTLA4(세포독성 T-림프구 관련 단백질 4)에 결합할 수 있다: CTLA-4에 대한 결합은 면역 반응을 하향-조절하는 작용을 한다. ICOS(유도성 공동자극기)는 APC의 ICOS 리간드(ICOSL)에 결합하는 또 다른 T-세포 공동자극 수용체이다. 일부 경우에 CD28 및 CTLA-4는 또한 ICOSL이 T 세포 공동자극 수용체 ICOS에 결합하는 것과 중복되는 결합 부위에서 ICOSL과 상호작용하는 것으로 알려져 있다(Yao et al. (2011) Immunity, 34:729-740).

[0164] [0076] CD28 및 ICOS는 밀접하게 관련된 T 세포 공동자극 분자이고 이들의 리간드 CD80과 CD86 및 ICOSL에 의한 결합은 각각 면역에 있어서 부분적으로 중복되는 역할을 초래하는 세포 신호전달을 유도한다. 그러므로, CD28과 ICOS가 비록 관련 CD28 계열 활성화 수용체이고 일부 세포내 신호전달 모티프를 공유하지만, CD28과 ICOS 간의 공동자극 효과는 일부 측면에서 다를 수 있다. 예를 들어, CD28은 활성화되지 않은 T 세포와 활성화된 T 세포 모두에서 발현되며 그 신호전달은 IL-2 생산 및 후속 T 세포 이펙터 기능에 중요하며, CD28은 천연 T 세포 활성화에 관여한다. CD28 경로의 치료 억제제(예컨대 아바타셉트, CTLA4-Ig; 및 벨라타셉트, 2세대 CTLA4-Ig)는 일부 염증성 관절염 상태(예컨대 류마티스 관절염, 청소년 특발성 관절염, 건선 관절염)의 치료 및 신장 동종이식 거부반응의 예방에 유용한 것으로 입증되었다(Wekerle et al. Transpl. Int., 2012, 25:139-50). 그러나, 주로 아바타셉트에 대해 연구된 CD28 경로의 치료적 차단은, 여러 다른 염증성 질환(예컨대 크론병, 루푸스 신염, 다발성 경화증)에 대해 성공적이지 않은 것으로 입증되었으며, 심지어 질병 발병에 T 세포의 영향을 포함하는 질병 징후에서도 마찬가지이다. 승인된 적응증 내에서도 CTLA4-Ig 화합물을 사용한 치료는 대부분의 환자에서 염증 활성의 완전한 관해 및/또는 억제를 초래하지 않는다(Masson, Cochrane Database Sys. Rev., 2014, CD010699; Singh, Cochrane Database Sys. Rev. , 2017, CD012657). 이것은 이러한 치료에 의해 해결되지 않은 추가 병원성 공동자극 경로와 일치한다.

[0165] [0077] ICOS는 일반적으로 T 세포 활성화 이후까지 T 세포의 표면에서 발현되지 않으며, 활성화된 T 세포에서 ICOS를 통한 신호전달은 전문적인 T 세포 서브세트 분화를 지원한다. 따라서 어떤 경우에는, CD28과 ICOS에 의한 공동자극이 중첩되어 보완적인 효과를 낳는다. 따라서 ICOS는 CD28만을 표적으로 하는 치료제로 해결되지 않는 대체 병원성 경로일 수 있다.

[0166] [0078] 일부 측면에서, T 세포는 항원 제시 세포(APC) 상에서 각각 CD80/CD86 및 ICOSL과 상호작용하는 공동자극 분자 CD28 및 ICOS를 발현한다. 림프 기관에서 전문적인 APC (즉, 수지상 세포, 대식세포 및 B 세포)는 CD80, CD86 및 ICOSL을 발현하고 CD28+/ICOS+ T 세포와 연관된다. ICOS는 나이브 T 세포에서는 발현되지 않지만 활성화 후에는 급속히 상향조절된다. 일부 구체예에서, 활성화된 T 세포는 이어서 CD8+ 세포독성 T 세포 (CTL), IL-17A/F-분비 CD4+ Th17 세포 또는 CD4+ 여포 헬퍼(TFH) 세포와 같은 이펙터 세포로 분화될 수 있다.

T_{FH}-발현 CD40L은 림프 모낭에서 B 세포를 관여시키고 항체 (Ab)-분비 형질 세포로의 B 세포의 분화를 유도하는 사이토카인 (예를 들어, IL-21)을 방출한다. 혈장 세포는 조직-손상 항체, 예를 들어 인간의 류마티스 인자 (RF) 및 항-시트룰린화 펩타이드 항체 (ACPA) 및 마우스의 항-콜라겐 (CII) 항체를 생 할 수 있으며, 이는 관절과 다른 조직에서 면역 복합체 및 침착물을 형성할 수 있다. ICOSL은 비전문 APC에서 발현되어, 비-림프 조직에서 T 세포 활성화를 일으켜 조직 및 관절에 대한 추가 손상을 초래할 수 있다.

[0167] [0079] ICOS는 분화된 유형 1, 2 및 17과 같은 여러 활성화된 및/또는 이펙터 T 세포 서브세트의 기능과 난포 도우미의 기능에서 역할을 하는 것으로 보이다(Wikenheiser, Front. Immunol., 2016 7: 304). 실제로, 활성화된 T 세포는 종종 CD28을 하향 조절하고/하거나 CD28 공동자극에 덜 의존하게 되며, CD28-음성 T 세포는 다양한 염증성 질환에 축적되어 질병 활성 및 아바타셉트에 대한 반응성 결여와 상관관계가 있다 (Garin et al., Eur J Haematol, 1996, 56:119-23; Schmidt et al., J. Clin. Invest., 1996, 97:2027-37; Yang et al., Chin J Microbiol Immunol, 2005, 25:248-251; Scarsi et al., J. Rheumatol., 2011, 38:2105-11; Mou et al., Am J Transplant, 2014, 14:2460-6; Zabinska et al., J Immunol Res., 2016, 2016:1058165; Piantoni et al., Lupus, 2018, 27:143-149). 본원에 제공된 분자를 통한 것과 같은, CD28 및 ICOS의 조합된 억제는 자가면역 및/또는 염증성 질환에 대한 개선된 요법을 제공할 수 있다.

[0168] [0080] 일부 측면에서, CD4+Th1-, Th9-및 Th17-세포들은, 다발성 경화증(MS) 및 실험적 자가면역 뇌척수염 양자 모두에서 CNS 내에서 염증을 증가시킴으로써 다발성 경화증에 대한 핵심 기여자로서 연루되며, CD4+ICOS+CXCR5+ T 모낭 헬퍼 세포는 재발-관해에서 PBMC에서 증가하고 2차 진행성 MS에서의 질병 진행과 상관관계가있다. 일부 구체예에서, 2차 진행성 MS에서 뇌척수액 세포에서 ICOS 유전자 발현이 유의하게 증가하고, ICOSL을 발현하는 단핵구 및 총 단핵구의 증가된 백분율이 관찰된다. ICOSL은 또한 비전문 APC에서 발현되어 비-림프 조직에서 T 세포 활성화를 야기하여 추가적인 조직 손상을 일으킨다.

[0169] [0081] 제공된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 중에, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드의 IgSF 도메인의 하나 이상의 아미노산 변형에 의해 변형될 때, CD28 및/또는 ICOS에 대해 향상된 결합 친화성을 나타내는 폴리펩타이드가 있다. 일부 경우에서, 야생형 ICOSL은 이미 CD28보다 ICOS에 대해 실질적으로 더 큰 결합 친화성을 나타낸다는 것이 입증되었으므로, 제공된 변이체에서 ICOS 결합의 전체적인 증가는 CD28에서의 결합의 증가보다 적다. 또한 제공된 변이체 폴리펩타이드의 다양한 형태 역시도 제공된다. 예를 들어, 개선된 ICOSL 단백질의 가용성 포맷으로서의 전달은 본 발명에서 CD28 및/또는 ICOS 시그널링을 억제함으로써 T 세포 활성화를 길항하는 것으로 본원에 제시되어 있다.

[0170] [0081] 특히, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는, 그의 동족 결합 파트너, 예를 들어 ICOS 및/또는 CD28의 활성을 길항 또는 차단하기 위해, 예를 들어, Fc-융합 단백질과 같은 포맷으로서 제공된다. 일부 구체예에서, CD28 또는 ICOS를 경유한 공동자극 시그널링의 차단 또는 억제는 염증 또는 자가면역 질환(예를 들어, 다발성 경화증 또는 뇌 염증) 또는 장기 이식의 치료에 유용 할 수 있는 면역 반응을 억제하는데 유용할 수 있다.

[0171] [0083] 일부 구체예에서, 제공된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 및 면역조절 폴리펩타이드에 의해 달성된 면역 시그널링은 다른 치료와 비교하여 염증성 및 자가면역 질환 및 다른 질환 및 병태의 치료에 이점을 제공한다. 일부 경우에, 두 수용체 모두의 공동자극 효과를 개재 및 변경시키기 위한 치료법은 면역학적 시냅스의 제한에 의해 부과되는 크기 제한뿐만 아니라 공간 배향 요건에 의해 제한된다. 일부 측면에서, 항체 약물을 비롯한 기존의 치료 약물은, 이들 상호작용의 조절에 관여하는 다수의 표적 단백질과 동시에 상호작용하지 못할 수 있다. 또한, 이들 2가지 수용체 중 하나 또는 다른 하나를 독립적으로 표적화하는 약물들 간의 약동학적 차이는 치료 과정 전반에 걸쳐 이러한 약물 조합의 원하는 혈중 농도를 적절히 유지하는데 어려움을 야기할 수 있다.

[0172] [0084] 일부 구체예에서, 제공된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질은 공동자극 수용체인 CD28 또는 ICOS에 의해 유도된 면역학적 활성을 조절(예컨대 증가 또는 감소)한다. 그러므로, 일부 구체예에서, 제공된 폴리펩타이드는 CD28과 ICOS 양자 모두, 그리고 일부 경우 CTLA-4에 대한 변경된(예컨대 증가된) 결합 친화성을 변이체 ICOSL(유도가능한 공동자극인자 리간드)에 제공함으로 해서 이러한 제약사항을 극복하며, 이에 따라 수용체에 의한 공동자극의 상보 효과를 길항 또는 작용한다. 이들 변이체 ICOSL의 제조 및 사용방법도 제공된다.

[0173] [0085] 일부 측면에서, 제공된 분자는 또한 다른 가용성 치료 단백질 제제보다 더 효과적일 수 있다. 예를 들어, 아바타셉트(CTLA-4-Fc)는 류마티스 관절염, 건 선성 관절염 및 소아 특발성 관절염의 치료와 같은 자가면역 질환 설정에서, 벨라타셉트, 변이체 CTLA-4-Fc 분자는 이식 거부에 있어서, T 세포 공동자극을 방해하여 T 세포 반응을 약화시키는 것으로 나타났다. 그러나, 이들 CTLA-4-Fc 단백질은 CD80 및 CD86에 결합하여 이들 공

동자극 리간드가 CD28에만 관여하여 이를 촉발하는 것을 방지한다. 본원에 제공된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 일부 경우에서, CD28 및 ICOS 양자 모두에 대해 결합 친화성 및 향상된 활성을 나타낸다.

[0174] [0086] 특허, 특허 출원, 과학기사 및 데이터베이스를 비롯한 본 명세서에 언급된 모든 간행물은 마치 이들 특허, 특허 출원, 과학기사 및 데이터베이스가 개별적으로 그리고 구체적으로 참조 병합되는 것으로 표시된 것처럼, 그 내용 전체가 본 발명에 참조 병합된다. 만일 본 명세서에 제시된 정의가 본 명세서에 참조 병합된 특허, 특허 출원, 공개된 출원 및 기타 간행물에 제시된 정의와 상반되거나 일치하지 않을 경우, 본 명세서 상의 자체 정의가 이들 참조 병합된 문헌의 정의에 우선한다.

[0175] [0087] 본 명세서에서 사용된 섹션 제목은 정리 목적을 위한 것일 뿐 설명된 주제를 한정하려는 의도로 제공된 것이 아니다.

[0176] I. 정의

[0177] [0088] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술용어, 각주, 및 기타 기술 및 과학용어들은 본 발명이 속한 기술분야의 통상의 기술자에 의해 공통적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 의도된다. 몇몇 경우, 그 의미가 널리 이해되는 용어들도 명확성 및/또는 용이한 참조를 위해 본 명세서에 정의하였고, 본 명세서에 이들 정의가 포함되었다 해서 기술 분야에서 일반적으로 이해되는 것과 실질적인 차이를 나타내는 것으로 추정되어서는 아니된다.

[0178] [00089] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용되는 용어들은 특수한 경우 달리 언급되지 않는 한 하기 정의된 의미를 갖는다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서, 단수 형태 "a," "an," 및 "the"는 문맥상 명백히 달리 지시하지 않는 한 복수 의미를 아울러 포함한다. 달리 정의하지 않는 한, 본 명세서에 언급된 모든 기술 및 과학 용어들, 두문자어 및 약어들은 본 발명이 속한 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 흔히 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 달리 명시되지 않는 한, 화학 및 생화학명의 약칭 및 심볼은 IUPAC-IUB 명명법에 따른다. 달리 지시되지 않는 한, 모든 수치 범위는 범위를 한정하는 값들은 물론 그 사이의 정수 값들을 아울러 포함한다.

[0179] [0090] 면역글로불린 수퍼패밀리 도메인의 문맥상 사용된 "변형된 친화성(affinity modified)"이라는 용어는, 포유동물 면역글로불린 수퍼패밀리(IgSF) 도메인이 변경된 아미노산 서열(대응하는 야생형의 모(母) IgSF 도메인 또는 비변형 IgSF 도메인에 비해)을 가짐으로 해서, 모(母) IgSF 도메인 또는 비변형 (즉, 비-친화성 변형된) IgSF 대조군 도메인에 비해, 그의 동족 결합 파트너들(달리, "카운터-작제물들") 중 적어도 하나에 대해 증가 또는 감소된 결합 친화성 또는 결합능(avidity)을 갖는 것을 의미한다. 문맥 상, 친화성 변형된 ICOSL IgSF 도메인도 포함된다. 일부 구체예에서, 친화성-변형된 IgSF 도메인은 레퍼런스(예컨대 변형되지 않은) 또는 야생형 IgSF 도메인에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개 또는 그 이상의 아미노산 차이, 예컨대 아미노산 치환을 함유할 수 있다. 결합 친화성 또는 결합능의 증가 또는 감소는 유세포 분석법과 같은 공지의 결합 분석법을 이용하여 알아낼 수 있다. Larsen 외, American Journal of Transplantation, Vol 5: 443-453 (2005). Linsley 외, Immunity, 1: 793-801 (1994) 참조. 어떤 단백질의 그의 동족 결합 파트너(들)에 대한 결합 친화성 또는 결합능의 증가는 야생형 IgSF 도메인 대조군의 값보다 적어도 10% 더 큰 값을 의미하며 일부 구체예에서, 야생형 IgSF 도메인 대조군 값에 비해 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1000%, 5000%, 또는 10000% 더 큰 것을 의미한다. 어떤 단백질의 그의 동족 결합 파트너(들)에 대한 결합 친화성 또는 결합능의 감소는 대조군의 90% 이하 그러나 야생형 IgSF 도메인 대조군 값의 10% 이상의 값을 의미하고, 일부 구체예에서, 야생형 IgSF 도메인 대조군 값의 80% 이하, 70% 이하, 60% 이하, 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 또는 20% 이하, 그러나 10% 이상의 값을 의미한다. 친화성 변형된 단백질은 아미노산 잔기의 치환, 부가 또는 결실에 의해 주요 아미노산 서열이 변경된 것이다. 용어 "친화성 변형된 IgSF 도메인"은 그 친화성 변형된 IgSF 도메인이 형성된 특정한 방법 또는 출발 조성물에 대해 어떠한 조건을 부과하는 것으로 상정되어서는 아니된다. 따라서, 본 발명의 친화성 변형된 IgSF 도메인들은 친화성 변형의 어떤 특정한 프로세스에 의해 친화성 변형된 IgSF 도메인으로 형질전환될 야생형 IgSF 도메인들로 한정되지 않는다. 친화성 변형된 IgSF 도메인 폴리펩타이드는, 예컨대, 야생형의 포유동물 IgSF 도메인 서열 정보로부터 출발하여 생성된 다음, 그의 동족 결합 파트너에 대한 결합에 관하여 가상적으로(in silico) 모델링된 다음 마지막으로, 친화성 변형된 IgSF 도메인 조성물의 생성을 위해 재조합적으로 또는 화학적으로 합성된다. 한 가지 별법 구체예에서, 친화성 변형된 IgSF 도메인은 야생형 IgSF 도메인의 위치-지향된(site-directed) 돌연변이에 의해 만들어질 수 있다. 따라서, 친화성 변형된 IgSF 도메인은 생성물을 가리키는 것이지, 반드시 주어진 프로세스에 의해 만들어진 생성물을 가리키는 것은 아니다. 재조합 방법, 화학적 합성법 또는 이들의 조합을 비롯한 다양한 기술을 이용할 수 있다.

[0180] [0091] 본 명세서에서 용어 "동종이계(allogeneic)"이라 함은 하나의 생물체에서 제거된 다음 동일한 종의 유전적으로 다른 생물체로 주입되거나 입양적으로 전달된 세포 또는 조직을 의미한다. 본 발명의 일부 구체예에서, 종은 쥐 또는 인간이다.

[0181] [0092] 본 명세서에서 용어 "자가 (autologous)"는 나중에 주입되거나 입양적으로 전달된 동일한 생물체로부터 제거된 세포 또는 조직을 의미한다. 자가 세포 또는 조직은 예를 들어, 재조합 DNA 방법론에 의해 변형될 수 있어, 생물체로부터 제거된 고유(native) 세포 또는 고유 조직과 유전적으로 동일하지 않게된다. 예를 들어, 고유의 자가 T 세포는 재조합 DNA 기술에 의해 유전적으로 조작되어 막관통 면역조절 단백질 및/또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 자가 조작된 세포가될 수 있는데, 이것은 몇몇 경우 T-세포 또는 TIL(종양 침윤 림프구)을 조작하는 것을 포함한다. 조작된 세포는 이어서 고유 T-세포가 분리된 환자에게 주입될 수 있다. 일부 구체예에서, 생물체는 인간 또는 쥐이다.

[0182] [0093] 본 명세서에서 "결합 친화성(binding affinity)," 및 "결합능(binding avidity)"이라는 용어는 특수한 결합 조건 하에서, 어떤 단백질의 그의 카운터-작제물에 대한 특이적인 결합 친화성 및 특이적인 결합능을 각각 의미한다. 생화학적 동력학에서 결합능이라 함은 ICOSL과 그의 카운터-작제물인 ICOS 및/또는 CD28 사이와 같이 개별적인 비공유 결합 상호 작용의 다중 친화력의 축적된 강도를 지칭한다. 따라서, 결합능은 단일 상호 작용의 강도를 나타내는 친화성과 구별된다. 친화성 변형된 ICOSL IgSF 도메인을 함유하는 변이체 ICOSL의 그의 카운터-작제물에 대한 결합 친화성의 증가 또는 약화는 IgV 도메인과 같은 고유 또는 야생형 IgSF 도메인을 함유하는 비변이체 ICOSL과 같은 비변이체 ICOSL의 결합 친화성에 상대적으로 결정된다. 결합 친화성 또는 결합능을 결정하는 방법은 기술 분야에 알려져 있다. 예컨대, 문헌 [Larsen 외, American Journal of Transplantation, Vol 5: 443-453 (2005)] 참조. 일부 구체예에서, 본 발명의 변이체 ICOSL (친화성 변형된 IgSF 도메인을 함유하는 ICOSL 단백질)은 예컨대 실시예 6에 설명된 바와 같은 결합 분석에서 야생형 ICOSL 대조군에 비해 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 더 큰 평균 형광 강도(Mean Fluorescence Intensity: MFI) 값을 나타내는 결합 친화성을 갖는 것으로 유세포 분석법으로 측정되는 바와 같이 CD28 및/또는 ICOS에 특이적으로 결합한다.

[0183] [0094] "생물학적 반감기(biological half-life)"라는 용어는 본 발명의 변이체 ICOSL을를 포함하는 면역조절 폴리펩타이드와 같은 물질이 그의 약리학적 또는 생리학적 활성 또는 농도의 절반을 잃어버리는데 걸리는 시간을 가리킨다. 생물학적 반감기는 해당 물질의 제거, 배출, 분해(예컨대 효소 분해), 또는 신체 장기 또는 조직에서의 흡수 및 농축에 의해 영향받을 수 있다. 일부 구체예에서, 생물학적 반감기는 어떤 물질의 혈장 농도가 그의 정상 상태 수준의 절반에 도달하는데 걸리는 시간("혈장 반감기")을 측정함으로써 평가될 수 있다. 본 발명의 폴리펩타이드의 생물학적 반감기를 유도 및 증가시키는데 이용될 수 있는 컨쥬게이트는 기술분야에 공지이며 이의 비제한적인 예로는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 히드록시에틸 전분(HES), XTEN (연장된 재조합 펩타이드; WO2013130683 참조), 인간 혈청 알부민(HSA), 소 혈청 알부민(BSA), 지질(아실화), 및 폴리-Pro-Ala-Ser (PAS), 폴리글루탐산(글루타밀화)을 들 수 있다.

[0184] [0095] 본 명세서에서 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 적어도 엑토도메인, 막관통, 및 엔도도메인을 포함하는 포유동물 세포 상에서 발현된 인공적인(즉, 사람이 만든) 막관통 단백질을 가리킨다. 선택적으로, CAR 단백질은 엑토도메인을 막관통 도메인에 공유적으로 링크시키는 "스페이서"를 포함한다. 스페이서는 종종 펩타이드 결합을 통해 엑토도메인을 막관통 도메인에 링크하는 폴리펩타이드이다. CAR은 일반적으로 포유동물 림프구 상에서 발현된다. 일부 구체예에서, CAR은 T-세포 또는 종양 침윤 림프구 (TIL)와 같은 포유동물 세포 상에서 발현된다. T-세포 상에서 발현된 CAR은 본 명세서에서 CAR T-세포 또는 "CAR-T"라 칭한다. 일부 구체예에서, CAR-T는 T 헬퍼 세포, 세포독성 T-세포, 내츄럴 킬러 T-세포, 메모리 T-세포, 조절 T-세포, 또는 감마 델타 T-세포이다. 예컨대 입양 세포 전달 등에서 임상적으로 사용될 경우, 환자의 종양에 대한 항원 결합 특이성이 있는 CAR-T는 일반적으로 그 환자로부터 수득된 고유 T-세포 상에서 발현되도록 조작된다. 그 다음 CAR을 발현하는 조작된 T-세포는 환자에게 다시 주입된다. 따라서 비록 동종이계 CAR-T가 본 발명의 범위 내에 포함되지만 CAR-T는 종종 자가 CAR-T이다. CAR의 엑토도메인은 생리학적 조건하에 종양 특이 항원과 같은 표적 항원과 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편 (예컨대 scFv)과 같은 항원 결합 영역을 포함한다. 특이적 결합시, 생화학적 연쇄 사건(즉, 시그널 형질도입: 시그널 transduction)은 CAR-T의 면역학적 활성의 조절을 초래한다. 따라서, 예를 들어, CAR-T의 항원 결합 영역에 의한 그의 표적 항원에 대한 특이적 결합시 세포 독성, 증식 또는 사이토카인 생성의 변화에 의해 반영되는 T-세포 활성의 면역학적 활성의 변화가 야기될 수 있다. CAR-T 활성화시 시그널 형질도입은 일부 구체예에서 고유 포유동물 T-세포에서 시그널 형질도입에 관여하는 CD3-제타 사슬 ("CD3-z")에 의해 달성된다. CAR-T는 T-세포의 면역조절 반응을 추가로 조절하기 위해, CD28, 41BB 또

는 OX40과 같은 복수개의 시그널링 도메인들을 추가로 포함할 수 있다. CD3-z은 T-세포 수용체 시그널 형질도입에 관여하는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)로서 알려진 보존적 모티프를 포함한다.

[0185] [0096] 시험관내 분석시 본 발명의 2 이상의 변이체 ICOSL의 존재 하에 유도되는 사이토카인 생산과 관련하여 사용될 경우 "집합적으로" 또는 "집합적"이라는 용어는, 개별적인 변이체 ICOSL에 의해 유도되는 사이토카인 생산과 무관하게 전체적인 사이토카인 발현 수준을 의미한다. 일부 구체예에서, 분석되는 사이토카인은 시험관내 일차 T-세포 분석에서 IFN-감마이다.

[0186] [0097] 변이체 ICOSL의 IgSF 도메인 관련에서와 같이, 폴리펩타이드와 관련된 "동족 결합 파트너" ("카운터-작제물")이라는 용어는 특정 결합 조건 하에서 문제의 폴리펩타이드가 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 분자(일반적으로 고유 포유동물 단백질)을 가리킨다. 일부 측면에서, 친화성 변형된 IgSF 도메인을 함유하는 변이체 ICOSL은 증가 또는 약화된 친화성으로 대응하는 고유 또는 야생형 ICOSL의 카운터-작제물에 특이적으로 결합한다. 특이적 결합 조건 하에서 그의 동족 수용체를 인식하여 특이적으로 결합하는 리간드 종은 그 수용체의 카운터-작제물 또는 동족 결합 파트너의 일례이다. "동족 세포 표면 결합 파트너"는 포유동물 세포 표면에서 발현된 동족 결합 파트너이다. "세포 표면 분자종"은 면역학적 시냅스를 형성하는 포유동물 세포 등의 세포에 의해 그리고 세포 상에 발현되는 면역학적 시냅스(IS)의 리간드의 동족 결합 파트너이다.

[0187] [0098] 본 명세서에서 "컨쥬게이트", "컨쥬게이션" 또는 이의 문법적 파생어는 2 이상의 화합물들이 기술분야에 알려진 임의의 결합 또는 연결 방법에 의해 한데 결합 또는 연결되어 다른 화합물이 형성되는 것을 가리킨다. 이것은 2 이상의 화합물의 결합 또는 연결에 의해 생성되는 화합물을 가리키는 것일 수도 있다. 예를 들어, 1 이상의 화학적 모이어티 또는 폴리펩타이드에 직접 또는 간접적으로 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 예시적인 컨쥬게이트이다. 이러한 컨쥬게이트들에는 융합 단백질, 화학적 컨쥬게이트에 의해 생성된 것들 및 다른 방법에 의해 생성된 것들이 포함된다.

[0188] [0099] 본 명세서에서 "경쟁적 결합(competitive binding)"이라는 용어는 어떤 단백질이 적어도 2개의 동족 결합 파트너들과 특이적으로 결합할 수 있으나 하나의 동족 결합 파트너의 그 특이적인 결합이 제2 동족 결합 파트너의 동시적인 결합을 방지 또는 배제하는 것과 같이 저해하는 것을 의미한다. 그러므로, 몇몇 경우에서, 단백질이 2개의 동족 결합 파트너에 동시에 결합할 수는 없다. 일반적으로, 경쟁적 바인더는 특이적인 결합에 대하여 동일하거나 중복적인 결합 부위를 함유하지만, 반드시 요구되는 것은 아니다. 일부 구체예에서, 경쟁적 결합은 제2 동족 결합 파트너의 특이적인 결합으로 인해, 그의 동족 결합 파트너 중 하나에 대한 단백질의 특이적 결합을 측정가능하게 억제한다(부분적 억제 또는 완전한 억제). ELISA(효소결합면역흡수 분석법)와 같이, 경쟁적 결합을 정량하는 다양한 방법이 알려져 있다.

[0189] [0100] 본 명세서에서 "보존적 아미노산 치환"이라는 용어는 어떤 아미노산 잔기가, 화학적 특성(예컨대 전하 또는 소수성)이 유사한 측쇄 R기를 갖는 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 아미노산 치환을 의미한다. 화학적 특성이 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 그룹의 예로는: 1) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신; 2) 지방족-히드록시 측쇄: 세린 및 트레오닌; 3) 아미드-함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; 4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판; 5) 염기성 측쇄: 리신, 아르기닌 및 히스티딘; 6) 산성 측쇄: 아스파트산 및 글루탐산; 및 7) 함황 측쇄: 시스테인 및 메티오닌을 들 수 있다. 보존적 아미노산 치환 그룹으로는 다음을 들 수 있다: 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 리신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루타메이트-아스파테이트 및 아스파라긴-글루타민.

[0190] [0101] 단백질 위치와 관련하여 "대응하는(corresponding to)"이라는 용어, 예컨대, 개시된 서열, 예컨대 서열 목록 내의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 위치에 "대응하는" 뉴클레오타이드 또는 아미노산 위치라 함은 구조적인 서열 정렬 또는 GAP 알고리듬과 같은 표준 정렬 알고리듬에 기초하여, 개시된 서열과의 정렬에 의해 동정된 뉴클레오타이드 또는 아미노산 위치를 가리킨다. 예를 들어, 대응하는 잔기들은 레퍼런스 서열을 본 명세서에 설명된 구조 정렬 방법에 의해 SEQ ID NO:1 (ECD 도메인) 또는 SEQ ID NO:2 또는 3(IgV 도메인)에 제시된 서열과 정렬시킴으로써 결정될 수 있다. 서열들을 정렬함으로써, 통상의 기술자는 예컨대 보존된 그리고 동일한 아미노산 잔기들을 가이드로 사용하여, 대응하는 잔기들을 동정할 수 있다.

[0191] [0102] 본 명세서에서 "감소하다(decrease)" 또는 "약화되다/감쇠하다(attenuate)" 또는 "억제하다(suppress)" 등의 용어는 통계적으로 유의한 양으로 감소한다는 의미이다. 감소는 대조군 값, 예컨대 논-제로 대조군 값의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%일 수 있다.

[0192] [0103] 포유동물 림프구의 면역학적 활성 감소와 관련하여 본원에 사용된 용어 "감소되다" 또는 "저감되다"라는

용어는 대조군, 예컨대 미처리 대조군 또는 비변형 또는 비-변이 대조군을 사용한 처리가 동일한 조건 하에서 사용된 대조군에 비해, 림프구의 하나 이상의 활성이 감소됨을 의미한다. 감소된 활성은 예컨대 통계학적으로 유의한 양의, 하나 이상의 세포 주기의 억제, 감소된 세포 생존, 감소된 세포 증식, 감소된 사이토카인 생성 또는 감소된 T-세포 세포독성을 가리키는 것일 수 있다. 일부 구체예에서, 감소된 면역학적 활성에 대한 언급은 치료 부재시와 비교하여, 예를 들어 통계적으로 유의한 양만큼 인터페론 감마 (IFN-감마) 생성을 감소시키는 것을 의미한다. 일부 구체예에서, 면역학적 활성은 혼합 림프구 반응(MLR) 분석으로 평가될 수 있다. MLR 분석을 수행하는 방법은 당업계에 공지되어있다. Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep; 2(9):846-56. 림프구의 활성을 평가하는 기타 방법은 본원에 설명된 분석법을 포함하여 이 기술분야에 알려져 있다. 일부 구체예에서, 향상(enhancement)은 대조군 값, 예컨대 미처리 대조군 값 또는 논-제로 대조군 값의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 감소일 수 있다.

[0193] [0104] "유도체" 또는 "유도되다"라는 용어는 단백질을 직접 도는 간접적으로 조성물에 공유적으로 연결시켜 변형시킴으로써 생물학적 반감기, 생체이용성, 면역원성, 가용성, 독성, 강도 또는 효능을 그의 치료학적 이점을 유지 또는 증강시키면서 변경시키는 것을 의미한다. 본 발명의 면역조절 폴리펩타이드의 유도체는 본 발명의 범위에 속하며 예를 들어 글리코실화, 페길화, 지질화 또는 Fc-융합체에 의해 만들어질 수 있다.

[0194] [0105] 본 본 명세서에서, 도메인 (일반적으로 3개 이상, 일반적으로 5개 또는 7개 또는 그 이상의 아미노산, 예컨대 10 내지 200개의 아미노산 잔기)은 단백질 또는 인코딩 핵산과 같은 어떤 분자의 다른 부분들과 구조적 및/또는 기능적으로 구별되는, 그 분자의 어떤 부분을 가리키는 것으로 동정가능한 부분을 의미한다. 예를 들어, 도메인들에는 하나 이상의 구조적 모티프로 만들어진 단백질 내에서 독립적으로 폴딩된 구조를 형성할 수 있는, 및/또는 결합 활성과 같은 기능적 활성에 의해 인식되는, 폴리펩타이드 사슬의 일부가 포함된다. 하나의 단백질은 하나 또는 복수개의 구별되는 도메인들을 가질 수 있다. 예를 들어, 주요(primary) 서열 상동성 또는 관련된 패밀리 멤버들에 대한 구조 상동성, 예컨대 모티프에 대한 상동성에 의해, 도메인을 동정, 정의 또는 구별할 수 있다. 또 다른 예에서, 도메인은 동족 결합 파트너와 같은, 바이오분자와 상호반응하는 능력과 같은, 그의 기능에 의해 구별될 수 있다. 도메인은 생물학적 기능 또는 활성을 독립적으로 나타낼 수 있으므로, 도메인은 독립적으로 또는 다른 분자에 융합되어 예컨대 결합과 같은 활동을 수행할 수 있다. 도메인은 아미노산의 선형 서열이거나 또는 아미노산의 비-선형 서열일 수 있다. 많은 폴리펩타이드들이 도메인을 복수개 함유한다. 이러한 도메인들은 공지이고, 통상의 기술자에 의해 동정될 수 있다. 예시를 위해, 도메인에 대한 정의가 제시되었지만, 통상의 기술자들에게는 특정 명칭의 도메인들이 잘 인식되어 있다. 필요한 경우, 적절한 소프트웨어를 이용하여 도메인들을 동정할 수 있다.

[0195] [0106] 본 명세서에서 "엑토도메인(ectodomain)"이라는 용어는 소포성 막(vesicular membrane)의 외부에 위치한, 막통과 단백질과 같은 막 단백질 영역을 가리키는 것이다. 엑토도메인들은 예를 들어 리간드 또는 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합하는 결합 도메인을 통해, 리간드 또는 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합하는 결합 도메인을 종종 포함한다. 세포의 막통과 단백질의 엑토도메인은 달리 세포외 도메인이라고도 칭해진다.

[0196] [0107] 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"이라 함은 단백질 조성물 또는 세포 조성물과 같은 본 발명의 치료용 조성물이 단독으로 (즉, 단독요법) 또는 부가적인 치료제와 조합적으로, 생체외(ex vivo) 투여되거나 (환자로부터의 세포와의 접촉에 의해) 또는 생체내 투여될 경우(환자 체내로의 투여에 의해), 예컨대 질병의 증상 및/또는 원인을 완화 또는 제거함으로써, 질병 진행을 통계적으로 유의하게 저감시키는 치료 조성물의 양 및/또는 농도를 의미한다. 유효량은 그 질환 또는 장애와 연관된 생물학적 반응 또는 효과 또는 적어도 하나의 증상을 감소, 경감 또는 완화시키거나, 또는 환자의 신체 기능을 향상시키는 양이다. 세포 치료법 사례에서, 유효량은 입양세포 치료에 의해 환자에게 투여된 세포의 유효한 투여량 또는 개수이다. 일부 구체예에서 환자는 비인간 영장류 또는 인간 환자와 같은 포유동물이다.

[0197] [0108] 본 명세서에서 용어 "엔도도메인(endodomanin)"은 세포 표면막에 의해 정의된 내부 공간으로 연장되는, 막관통 단백질과 같은 일부 막 단백질에서 발견되는 영역을 가리킨다. 포유동물 세포에서, 엔도도메인은 막 단백질의 세포질 영역이다. 세포에서, 엔도도메인은 세포내 구성성분들과 상호반응하여 시그널 형질도입에서 일정 역할을 할 수 있고, 그에 따라 몇몇 경우 세포내 시그널링 도메인일 수 있다. 세포성 막관통 단백질의 엔도도메인은 달리 세포질 도메인이라고도 칭해지며, 몇몇 경우, 세포질 시그널링 도메인일 수도 있다.

[0198] [0109] 본 명세서에서 포유동물 림프구의 면역학적 활성을 증가시킨다는 맥락상 용어 "증강된(enhanced)" 또는 "증가된(increased)"은 문맥상, 대조군, 예컨대 미처리 대조군 또는 비변형 또는 비-변이 대조군을 이용한 처리가 동일 조건 하에서 사용된 대조군과 비교하여, 림프구의 하나 이상의 활성을 증가시킨다는 것을 의미한다. 증

가된 활성은 예컨대 통계적 유의량만큼 세포 생존능, 세포 증식, 사이토카인 생산량 또는 T-세포 세포독성 중 하나 이상일 수 있다. 일부 구체예에서, 증가된 면역학적 활성에 대한 레퍼런스는 예컨대, 통계적으로 유의한 양으로, 인터페론 감마(IFN-감마) 생산이 증가되는 것을 의미한다. 일부 구체예에서, 면역학적 활성은 림프구 혼합 배양반응 (MLR) 분석법에 의해 평가될 수 있다. MLR 분석법의 실시 방법은 기술분야에 공지이다. Wang 외, Cancer Immunol Res. 2014 Sep; 2(9):846-56. 림프구의 활성을 평가하는 그 밖의 방법은 본 명세서에 설명된 임의의 분석법을 비롯하여 기술분야에 알려져 있다. 몇몇 구체예에서, 증강은 비-제로 대조군 값보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%,100%, 200%, 300%, 400%, 또는 500% 더 큰 증가일 수 있다.

[0199] [0110] 본 명세서에서 용어 "조작된 세포(engineered cell)"라 함은 재조합 DNA 방법 또는 바이러스 형질도입에 의한 것과 같은 인간 개재에 의해 유전적으로 변형된 포유동물 세포를 가리킨다. 일부 구체예에서, 세포는 면역세포, 예컨대 림프구 (예컨대 T 세포, B 세포, NK 세포) 또는 항원 제시 세포 (예컨대 수지상 세포)를 가리킨다. 세포는 환자로부터의 일차 세포(primary cell)일 수도 있고 세포주일 수도 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 조작된 세포는 본원에 제공된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL은 조작된 세포에서 발현되는 막관통 면역조절 단백질 (이하 "TIP"라 칭함)이다. 일부 구체예에서, TIP는 막관통 도메인 (예컨대 ICOSL 막관통 도메인)에 연결된 IgV 도메인, 및 선택적으로 세포내 시그널링 도메인을 함유하는 세포외 도메인 또는 그의 일부분이다. 일부 경우에서, TIP는 이종 세포질 시그널링 도메인 또는 엔도 도메인을 함유하는 키메라 수용체로서 포맷된다. 일부 구체예에서, 조작된 세포는 본 발명에 설명된 바와 같은 면역조절 단백질을 발현 및 분비할 수 있다. 제공된 조작된 세포들 중에는 조작된 T-세포 수용체 (TCR) 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 더 함유하는 세포도 포함된다.

[0200] [0111] 본 명세서에서 "조작된 T-세포"라 함은 재조합 DNA 방법 또는 바이러스 형질도입 방법 등 인간의 개입에 의해 유전학적으로 변형된, T 헬퍼 세포, 세포독성 T-세포 (또는, 세포독성 T 림프구 또는 CTL), 내츄럴 킬러 T-세포, 조절 T-세포, 메모리 T-세포, 또는 감마 델타 T-세포와 같은 T-세포를 가리킨다. 조작된 T-세포는 T-세포 상에서 발현되어 조작된 T-세포 자신, 또는 T-세포 상에서 발현된 변이체 ICOSL이 특이적으로 결합하는 포유동물 세포의 면역학적 활성을 조절하도록 조작되는 본 발명의 변이체 CD80 막관통 면역조절 단백질 (TIP) 또는 분비된 면역조절 단백질(SIP)를 포함한다. 조작된 T- 세포는 T- 세포에 의해 발현 및/또는 분비되고 조작된 T-세포 자체 또는 T- 세포에 의해 분비될 때 변이체 ICOSL이 특이적으로 결합하는 포유동물 세포의 면역학적 활성을 조절하도록 조작된 본 발명의 변이체 ICOSL 분비 면역조절 단백질 (SIP)을 포함할 수 있다.

[0201] [0112] 용어 "조작된 T-세포 수용체" 또는 "조작된 TCR"이라 함은 입양 면역치료법에서 종종 사용되는, T-세포 집단 내로 선택, 클로닝 및/또는 후속적으로 도입되는 주요조직적합 복합체 (MHC)/펩타이드 표적 항원에 대해 원하는 친화성으로 특이적으로 결합하도록 조작된 T-세포 수용체 (TCR)를 가리킨다. 조작된 TCR과 대조적으로, CAR은 MHC 비의존 방식으로 표적 항원에 결합하도록 조작된다.

[0202] [0113] 본 발명에서 용어 "발현되다(expressed on)"라 함은 포유동물 세포와 같은 세포 표면에서 발현되는 단백질과 관련하여 사용된다. 그러므로, 단백질은 막 단백질로서 발현된다. 일부 구체예에서, 발현된 단백질은 막관통 단백질이다. 일부 구체예에서, 단백질은 약물 또는 검출가능한 표지 등의 소형 분자 모이어티에 컨쥬게이트된다. 세포 표면에서 발현된 단백질에는 세포-표면 단백질 예컨대 포유동물 세포에서 발현되는 세포 표면 수용체가 포함된다.

[0203] [0114] 용어 "반감기 연장 모이어티"라 함은 그 모이어티에 컨쥬게이트되지 안은 단백질의 반감기에 비해, 포유동물 혈청에서 순환하는 단백질의 반감기를 연장시키는 폴리펩타이드 융합 또는 화학적 컨쥬게이트의 모이어티를 가리킨다. 일부 구체예에서, 반감기는 1.2배, 1.5배, 2.0배, 3.0배, 4.0배, 5.0배, 또는 6.0배 이상, 또는 약 1.2배, 1.5배, 2.0배, 3.0배, 4.0배, 5.0배, 또는 6.0배 이상 연장된다. 일부 구체예에서, 반감기는 반감기 연장 모이어티가 없는 단백질에 비해 생체내 투여 후 6시간 이상, 12시간 이상, 24시간 이상, 48시간 이상, 72시간 이상, 96시간 이상 또는 1주일 이상 연장된다. 반감기는 단백질이 그의 농도, 양 또는 활성의 절반을 상실하는데 걸리는 시간을 가리킨다. 반감기는 예를 들어, ELISA 분석 또는 활성 분석을 이용함으로써 구할 수 있다. 예시적인 반감기 연장 모이어티에는 Fc 도메인, 멀티머화 도메인, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 히드록시에틸 전분 (HES), XTEN (연장된 재조합 펩타이드; WO2013130683 참조), 인간 혈청 알부민 (HSA), 소혈청 알부민 (BSA), 지질 (아실화), 및 폴리-Pro-Ala-Ser (PAS), 및 폴리글루탐산 (글루타밀화)가 포함된다.

[0204] [0115] 본 명세서에서 "면역학적 시냅스(immunological synapse)" 또는 "면역 시냅스(immune synapse)"라는 용어는 항원-제시 세포 또는 종양세포와 같이 MHC I (주조직적합 복합체) 또는 MHC II을 발현하는 포유동물 세포와 이펙터 T 세포 또는 내츄럴 킬러(NK) 세포와 같은 포유동물 림프구 간의 인터페이스를 의미한다.

[0205] [0116] 면역글로불린 분자의 Fc (결정화가능한 단편: fragment crystallizable) 영역 또는 도메인 (Fc 폴리펩타이드라고도 칭함)은 대체로 면역글로불린 중쇄의 불변 영역에 대응하고, 항체의 이펙터 기능(들)을 비롯한, 다양한 기능에 책임이 있다. Fc 도메인은 CH2 및 CH3 도메인 플러스 면역글로불린 분자의 힌지 도메인의 일부 또는 전부를 함유한다. Fc 도메인은 하나 이상의 다이설파이드 결합에 의해 결합된 2개의 폴리펩타이드 사슬의 다이머를 형성할 수 있다. 일부 구체예에서, Fc는 이펙터 기능을 용이하게 하기 위해 감소된(예컨대 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 감소된) 활성을 나타내는 변이체 Fc이다. 일부 구체예에서, Fc 영역에서의 아미노산 치환은 특정한 SEQ ID NO.를 참조로 설명되지 않는 한 EU 넘버링 시스템에 따른다. EU 넘버링은 공지이며 가장 최근에 업데이트된 IMGT Scientific Chart (IMGT®, international ImMunoGeneTics information system®, http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html (생성일: 2001년 5월 17일, 마지막 업데이트일: 2013년 6월 10일) 및 Kabat, E.A. 등에서 보고된 바와 같은 EU 인덱스에 따른다 [Sequences of Proteins of Immunological interest. 제5판, US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242 (1991)].

[0206] [0117] 면역조절 Fc 융합 단백질과 같은 면역글로불린 Fc 융합체 ("Fc-융합체")는, 면역글로불린의 Fc 영역에 작동적으로 연결된 하나 이상의 폴리펩타이드(또는 하나 이상의 소분자)를 포함하는 분자이다. Fc-융합체는, 예를 들어, 항체의 Fc 영역 (이펙터 기능 및 약물동력학을 용이하게 함) 및 변이체 ICOSL를 포함할 수 있다. 면역글로불린 Fc 영역은 하나 이상의 변이체 ICOSL 또는 소분자 (융합 파트너)에 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 다양한 링커들이 기술분야에 알려져있으며 Fc-융합체를 생성하도록, 융합 파트너에 Fc를 연결하는데 이용될 수 있다. 동일 종의 Fc-융합체들은 다이머화(이량화)되어 Fc-융합체 호모다이머를 형성하거나, 또는 비-동일 종을 이용함으로써, Fc-융합체 헤테로다이머를 형성할 수도 있다. 일부 구체예에서, Fc는 쥐 또는 인간 Fc와 같은 포유동물 Fc이다. 일부 구체예에서, Fc는 이펙터가 없는 Fc이다.

[0207] [0118] 용어 "숙주 세포"는 재조합 발현 벡터에 의해 인코딩된 단백질을 발현하는데 사용될 수 있는 세포를 가리킨다. 숙주 세포는 예컨대 대장균과 같은 원핵생물일 수 있고 또는 진핵생물, 예컨대 단세포 진핵생물(예컨대 효모 또는 기타 진균류), 식물 세포 (예컨대, 담배 또는 토마토 식물 세포), 동물 세포 (예컨대, 인간 세포, 원숭이 세포, 햄스터 세포, 래트 세포, 마우스 세포, 또는 곤충 세포) 또는 하이브리도마일 수도 있다. 숙주 세포의 예로는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 이의 유도체 예컨대 Veggie CHO 및 무혈청 배지에서 성장하는 관련 세포주 또는 DHFR 결핍된 CHO 균주 DX-B11을 들 수 있다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 포유동물 세포 (예컨대, 인간 세포, 원숭이 세포, 햄스터 세포, 래트 세포, 마우스 세포, 또는 곤충 세포)일 수 있다.

[0208] [0119] 본 명세서에서 용어 "면역글로불린" ("Ig"라 약칭됨)은 5가지 임의의 인간 항체 클래스, 즉: IgA (서브클래스 IgA1 및 IgA2를 포함한다), IgD, IgE, IgG (서브클래스 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4를 포함한다), 및 IgM를 비롯한 포유동물 면역글로불린 단백질을 가리키는 것이다. 이 용어는 또한 항원 결합 단편 (Fab), 가변 단편 (Fv)을 함유하는 V_H 및 V_L, 한 사슬 내에 한데 연결된 단일 사슬 가변 단편 (scFv)을 함유하는 V_H 및 V_L, 및 그 밖의 항체 V 영역 단편, 예컨대 Fab′ , $F(ab)_2$, $F(ab')_2$, dsFv 다이아바디, Fc, 및 Fd 폴리펩타이드 단편 등, 전적으로 또는 부분적으로 합성적이거나(예컨대, 재조합 또는 화학 합성) 또는 자연적으로 생산된, 전장 길이 미만의 면역글로불린도 포함한다. 호모이중특이 항체 및 헤테로이중특이 항체와 같은 이중특이 상체도 이 용어에 포함된다.

[0209] [0120] 본 명세서에서 용어 "면역글로불린 수퍼패밀리" 또는 "IgSF"는 세포의 인식, 결합 또는 부착 프로세스에 관여하는 일군의 세포 표면 및 가용성 단백질을 의미한다. 분자들은 면역글로불린들(즉 항체들)과 공유된 구조적 속성에 기반하여 이 수퍼패밀리의 멤버로서 분류된다; 이들 모두는 면역글로불린 도메인 또는 폴드라 알려진 도메인을 갖는다. IgSF의 멤버들에는 면역계의 세포 표면 항원 수용체들, 공동-수용체들 및 공동-자극 분자들, 림프구에 대한 항원 제시와 관련된 분자, 세포 부착 분자, 특정한 사이토카인 수용체들 및 세포내 근육 단백질들이 포함된다. 이들은 면역계 내에서의 역할에 공통적으로 연관되어 있다. 면역학적 시냅스 내의 단백질들은 종종 IgSF의 멤버이다. IgSF는 기능과 같은 공유 속성에 따라 "서브패밀리"로 세분될 수 있다. 이러한 서브패밀리들은 대개 4 내지 30개의 IgSF 멤버들로 이루어진다.

[0210] [0121] 본 명세서에서 "IgSF 도메인" 또는 "면역글로불린 도메인" 또는 "Ig 도메인"이라는 용어는 IgSF 단백질들의 구조 도메인을 가리킨다. Ig 도메인들은 면역글로불린 분자들의 이름을 따서 명명된다. 이들은 약 70-110개의 아미노산을 함유하며 이들의 크기와 기능에 따라 분류된다. Ig-도메인들은 역평행 베타 스트랜드들 2개 시트에 의해 형성되는 샌드위치-유사 구조를 갖는 특징적인 Ig-폴드를 갖는다. 샌드위치의 내측의 소수성 아미노산들과 B 스트랜드와 F 스트랜드의 시스테인 잔기들 간에 형성된 고도로 보존된 디설파이드 결합 간의 상호반

응은, Ig-폴드를 안정화시킨다. Ig 도메인의 한쪽 말단은 이들의 리간드들에 대한 항체 특이성에 중요한 보체 결정 영역이라 칭해지는 섹션을 갖는다. Ig 유사 도메인들은: IgV, IgC1, IgC2, 또는 IgI로 분류될 수 있다. 대부분의 Ig 도메인들은 가변성(IgV)이거나 불변성(IgC)이다. 9개의 베타 스트랜드를 갖는 IgV 도메인들은 7개의 베타 스트랜드를 갖는 IgC 도메인들 보다 일반적으로 더 길다. IgSF의 몇몇 멤버들의 Ig 도메인들은 아미노산 서열 내 IgV 도메인들과 유사하면서도, 그 크기는 IgC 도메인들과 유사하다. 이들은 IgC2 도메인들이라 칭해지며, 표준 IgC 도메인들은 IgC1 도메인이라 칭해진다. T-세포 수용체 (TCR: T-cell receptor) 사슬은 세포외 부분에 2개의 Ig 도메인을 갖는데 구체적으로: 하나의 IgV 도메인은 N-말단에, 하나의 IgC1 도메인은 세포막 근처에 위치한다. ICOSL은 두 개의 Ig 도메인, 즉: IgV 및 IgC을 포함한다.

[0211] [0122] 본 명세서에서 "IgSF 종"이라는 용어는 동일 또는 실제로 동일한 주요 아미노산 서열을 갖는 IgSF 멤버 단백질들의 앙상블을 의미한다. 각각의 포유동물 면역글로불린 수퍼패밀리 (IgSF) 멤버는 그 IgSF 멤버에 속하는 모든 IgSF 종들의 독특한 아이덴티티를 정의한다. 그러므로, 각각의 IgSF 패밀리 멤버는 다른 IgSF 패밀리 멤버들과는 구별되며, 그에 따라, 특정한 IgSF 패밀리 멤버의 각각의 종들은 다른 IgSF 패밀리 멤버의 종들과 구별된다. 그럼에도 불구하고, 글리코실화, 인산화, 유비퀴틴화, 니트로실화, 메틸화, 아세틸화 및 지질화와 같은 번역후 변형의 차이로 인하여, 동일한 IgSF 종들의 분자들 간에도 다양성이 존재할 수 있다. 이에 더해, 유전자 다형성에 기인하는 단일 IgSF 종들 내의 마이너한 서열 차이로 인해, 예컨대 단백질 가수분해 절단에 기인하는 IgSF 종들의 야생형 트렁케이트 형태가 그러하듯 단일 IgSF 종들 내에서도 또 다른 다양성 형태가 일어난다. "세포 표면 IgSF 종들"은 세포, 일반적으로 포유동물 세포 표면에서 발현되는 IgSF 종들이다.

[0212] [0123] 본 명세서에서 T-세포와 같은 포유동물 림프구 관점에서 "면역학적 활성"이라는 용어가 사용될 경우 이는 하나 이상의 세포 생존, 세포 증식, 사이토카인 생산 (예컨대 인터페론-감마), 또는 T-세포 세포독성 활성을 가리킨다. 일부 경우에서, 면역학적 활성은 케모카인 또는 인터류킨과 같은 사이토카인의 세포 발현을 의미할 수 있다. 면역학적 활성의 증강 또는 억제를 알아내기 위한 분석법에는 배양 상등액에서 인터페론-감마 사이토카인 수준을 측정하는 MLR (림프구 혼합 배양반응) 분석법 (Wang 외, Cancer Immunol Res. 2014 Sep: 2(9):846-56), SEB (스타필로코커스 내독소 B) T 세포 자극 분석법 (Wang 외, Cancer Immunol Res. 2014 Sep: 2(9):846-56), 및 항-CD3 T 세포 자극 분석법 (Li 및 Kurlander, J Transl Med. 2010: 8: 104)이 포함된다. T 세포 활성화는 IFN-감마 사이토카인의 분비와 연관되어 있으므로, 이들 시험관내 인간 T 세포 분석에 의해 배양 상등액 내 IFN-감마 수준을 측정하는 것은 시판되는 ELISA 키트를 이용하여 분석될 수 있다 (Wu et al, Immunol Lett 2008 Apr 15; 117(1): 57-62). 면역 반응의 유도는 정지(quiescent) 림프구에 비해 면역학적 활성의 증가를 야기한다. 본 발명에 제시된 바와 같은, 친화성 변형된 IgSF 도메인을 함유하는 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 등의 면역조절 단백질은 야생형 IgSF 멤버 또는 IgSF 도메인 대조군에 대한 주요 T-세포 분석에 있어 어떤 구체예에서는 IFN-감마 (인터페론-감마)의 발현을 증가시키고, 다른 구체예에서는 그 발현을 감소시킬 수 있다. 통상의 기술자라면 IFN-감마 발현의 증가를 알아내는데 사용되는 주요 T-세포 분석법이 IFN-감마 발현의 감소를 알아내기 위한 분석법에 사용되는 것과 다르다는 것을 인식할 것이다. 본 발명의 면역조절 단백질 또는 친화성 변형된 IgSF 도메인의, 주요 T-세포 분석법에서 IFN-감마 발현을 감소시키는 능력을 분석하는데 있어서, 실시예 6에 설명된 바와 같이, 림프구 혼합 배양반응(MLR) 분석법을 이용하라 수 있다. 간편하게, 본 발명의 친화성 변형된 IgSF 도메인의 가용성 형태를 사용하여 실시예 6에 설명된 바와 같이, MLR에서 IFN-감마 발현을 길항하여 그에 따라 감소시키는 그의 능력을 알아낼 수 있다. 별법으로, 본 발명의 면역조절 단백질 또는 친화성 변형된 IgSF 도메인의, 주요 T-세포 분석법에서의 IFN-감마 발현을 증가시키는 능력을 분석함에 있어서, 공동-고정화 (co-immobilization) 분석법을 이용하라 수 있다. 공동-고정화 분석법에서는, 일부 구체예에서 항-CD3 항체에 의해 제공되는 T-세포 수용체 시그널을 공동-고정화된 친화성 변형된 IgSF 도메인, 예컨대 변이체 ICOSL과 연계 사용하여, 야생형 IgSF 도메인 대조군에 비해 IFN-감마 발현을 증가시키는 능력을 탐지한다. 변이체 ICOSL 막관통 면역조절 단백질의 활성을 평가하는 것을 포함하여, 조작된 세포의 면역학적 활성 분석법은 기술 분야에 알려져 있으며, 이의 예로는 항원 자극 후 T 세포 팽창 능력, 재-자극 부재시 T 세포 팽창 유지 능력, 및 적절한 동물 모델에서의 항암 활성 등을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 이러한 분석법에는 표준 ^{51}Cr-방출 분석법 (참조: 예컨대 Milone 외, (2009) Molecular Therapy 17: 1453-1464) 또는 흐름(flow) 기반 세포독성 분석법, 또는 임피던스 기반 세포독성 분석법 (Peper 외 (2014) Journal of Immunological Methods, 405:192-198)이 포함된다.

[0213] [0124] "면역조절 폴리펩타이드" 또는 "면역조절 단백질"은 면역학적 활성을 조절하는 폴리펩타이드 또는 단백질 분자이다. 면역 반응을 "조절" 또는 "조절하다"라 함은 면역학적 활성이 증가되거나 감소된다는 것이다. 면역조절 단백질은 단일 폴리펩타이드 사슬이거나 또는 예를 들어 사슬간 다이설파이드 결합에 의해, 서로 공유결

합된 적어도 두 개의 폴리펩타이드 사슬의 멀티머(다이머 또는 고차수의 멀티머)일 수 있다. 따라서, 모노머, 다이머 및 고차수 멀티머 폴리펩타이드는 상기 정의된 용어 범위 내에 포괄된다. 멀티머 폴리펩타이드는 호모멀티머(동일한 폴리펩타이드 사슬들의) 또는 헤테로멀티머(비-동일 폴리펩타이드 사슬들의)일 수 있다. 본 발명의 면역조절 단백질은 변이체 ICOSL을 포함할 수 있다.

[0214] [0125] 본 명세서에어 용어 "증가하다"라 함은 통계적으로 유의한 양으로 증가하는 것을 의미한다. 증가는 비-제로 대조군 값보다 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, 또는 그 이상 클 수 있다.

[0215] [0126] ICOSL의 "이소폼(isoform)" (유도가능한 공동자극인자 리간드; CD275)은 아미노산 서열을 달리하는, 복수개의 자연발생적인 ICOSL 폴리펩타이드들 중 하나이다. 이소폼은 단일 유전자에 의해 발현된 RNA 전사체의 스플라이스 변이체의 산물이거나 또는 유전자 복제로부터 일어날 수 있는 것과 같은 기능적으로 유사한 단백질을 생성하는 고도로 유사하지만 상이한 유전자들의 발현 산물일 수 있다. 본 명세서에서 ICOSL의 "이소폼"이라는 용어는 ICOSL 유전자의 상이한 대립유전자의 산물 (예컨대ICOSLG)을 가리키기도 한다.

[0216] [0127] 본 명세서에서 "림프구"라는 용어는 포유동물 면역계에서 백혈구 세포의 3가지 서브타입 중 어느 하나를 의미한다. 이들은 내츄럴 킬러 세포(NK 세포) (세포-매개된, 선천성 세포독성 면역에서 기능한다), T 세포(세포매개된, 후천성 세포독성 면역용), 및 B 세포(체액성의, 항체-구동된 후천성 면역용)를 포함한다. T 세포에는:T 헬퍼 세포, 세포독성 T-세포, 내츄럴 킬러 T-세포, 메모리 T-세포, 조절 T-세포, 또는 감마 델타 T-세포가 포함된다. 선천성 림프구 세포(ILC) 역시도 림프구 정의에 포함된다.

[0217] [0128] "포유동물", 또는 "환자"라는 용어는; 인간, 침팬지, 레수스 원숭이, 시노몰구스 원숭이, 개, 고양이, 마우스 또는 래트 중 적어도 하나를 특별히 포함한다.

[0218] [0129] 본 명세서에서 용어 "막 단백질"은 생리적 조건 하에서, 지질 이중층에 직접 또는 간접적으로 부착되는 단백질을 의미한다. 막을 형성하는 지질 이중층은 진핵세포(에컨대 포유동물) 세포막 또는 인공(즉, 사람이-만든) 막 예컨대 리포좀에서 발견되는 막과 같은 생물학적 막일 수 있다. 지질 이중층에 대한 막 단백질의 부착은 공유 결합, 또는 비-공유적 상호반응 예컨대 소수성 또는 정전기 상호반응에 의한 것일 수 있다. 막 단백질은 내재성(integral) 막 단백질 또는 외재성(peripheral) 막 단백질일 수 있다. 외재성 막 단백질인 막 단백질은 내재성 막 단백질에 비공유적으로 부착되거나 지질 이중층에 비공유적으로 부착된다. 외재성 막 단백질은 지질 이중층에 일시적으로 부착되어 포유동물의 생리적 조건 범위 하에서, 외재성 막 단백질은 지질 이중층과 회합 및/또는 해리될 수 있다. 외재성 막 단백질과 대조적으로, 내재성 막 단백질은 막의 지질 이중층에 실제로 영구적인 결합을 형성하여 포유동물의 생리적 조건 범위에서, 내재성 막 단백질은 지질 이중층에 대한 그의 결합으로부터 해리되지 않는다. 막 단백질은 지질 이중층의 한 개층(모노토픽)을 통해 막에 부착되거나, 또는 막의 두 개층 모두(폴리토픽)에 부착될 수 있다. 오직 하나의 지질 이중층과 상호반응하는 내재성 막 단백질은 "내재성 모노토픽 단백질"이다. 지질 이중층 두 개 모두와 상호반응하는 내재성 막 단백질은 "내재성 폴리토픽 단백질"이며 달리 본 명세서에서 "막관통 단백질"이라고도 칭해진다.

[0219] [0130] 본 명세서에서 포유동물의 면역 반응과 같은 면역 반응 맥락에서 "조절하는" 또는 "조절하다"라는 용어는 본 발명의 변이체 ICLSO을 포함하는 면역조절 폴리펩타이드의 투여 결과로 또는 본 발명의 변이체 ICOSL 막관통 면역조절 단백질과 같은 면역조절 단백질을 발현하는 조작된 세포의 투여 결과로 일어나는, 존재하거나 또는 잠재적인 면역 반응의 증가 또는 감소와 같은 임의의 변경을 가리킨다. 따라서, 이 용어는 변이체 ICOSL을 포함하는 면역조절 단백질 또는 이러한 면역조절 폴리펩타이드를 발현하는 세포가 투여된 경우 또는 투여되지 않은 경우 일어나거나 존재하는 면역 반응에 비해, 면역 반응의 증가 또는 감소와 같은 변경을 의미한다. 이러한 조절은 면역 세포의 면역학적 활성의 면역학적 활성의 정도나 범위의 유도, 활성화, 억제 또는 변경을 모두 포함한다. 면역 세포에는 B 세포, T 세포, NK (내츄럴 킬러) 세포, NK T 세포, 프로페셔널 항원-제시 세포(APCs), 및 비-프로페셔널 항원-제시 세포, 및 염증 세포(호중구, 대식세포, 단핵구, 호염기구)가 포함된다. 조절은 기존의 면역 반응, 발달중인 면역 반응, 잠재적인 면역 반응, 또는 면역 반응을 유도, 조절하거나 면역반응에 영향을 주거나 또는 면역반응에 응답하는 능력에 대한 여하한 변화를 모두 포함한다. 조절은 면역 반응의 일부로서 면역 세포 내 유전자, 단백질 및/또는 기타 분자들의 발현 및/또는 기능에서의 여하한 변경을 모두 포함한다. 면역학적 활성의 조절 또는 면역 반응의 조절에는 예컨대 다음이 포함된다: 면역 세포의 제거, 결실 또는 격리(sequestration); 자가반응성 림프구, 항원 제시 세포 또는 염증 세포와 같은 기타 세포들의 기능성 성능을 조절할 수 있는 면역 세포의 유도 또는 생성; 면역 세포에서의 비반응성 상태의 유도(즉, 무감작(anergy)); 비제한적인 예로서, 이들 세포에 의해 발현되는 단백질의 패턴을 변형시키는 것을 비롯한, 면역 세포의 활성 또는 기능을 증강 또는 억압하는 것. 이의 예로는 사이토카인, 케모카인, 성장 인자, 전사 인자, 키

나아제, 공동자극 분자 또는 기타 세포 표면 수용체들과 같은 특정 부류의 분자들의 변경된 생성 및/또는 분비, 또는 이들 조절 이벤트들의 여하한 조합을 들 수 있다. 조절은 예컨대 일차 T 세포 분석법에서 야생형 ICOS 대조군과 비교한 IFN-감마 (인터페론 감마)의 변경에 의해 평가될 수 있다 [참조: Zhao 및 Ji, Exp Cell Res. 2016 Jan1; 340(1) 132-138). 조절은 예를 들어, 야생형 ICOSL 막관통 단백질에 의해 조작된 세포와 비교시 조작된 세포의 사이토카인 분비의 변경 또는 조작된 세포의 세포독성 활성의 변경과 같이, 조작된 세포의 면역학적 활성의 변경에 의해 평가할 수 있다.

[0220] [0131] 본원에서 용어 "분자종(molecular species)" 이라는 용어는 1차 아미노산과 동일 또는 실질적으로 동일한 단백질들의 앙상블을 의미하는데 이용된다. 각각의 포유동물 면역글로불린 수퍼패밀리 (IgSF) 멤버는 동일 또는 실제로 동일한 분자종들의 집합을 정의한다. 그러므로, 예컨대 인간 ICOSL은 IgSF 멤버이고 각각의 인간 ICOSL 분자는 ICOSL의 분자종이다. 동일한 분자종들의 분자들 간에도, 글리코실화, 인산화, 유키퀴틴화, 니트로실화, 메틸화, 아세틸화 및 지질화와 같은 번역후 변형에서의 차이로 인해, 변이가 일어날 수 있다. 이에 더해, 예컨대, 단백질분해 절단으로 인한 단일 분자종들의 야생형 트렁케이트 형태가 그러하듯, 유전자 다형성으로 인해 단일 분자종들 간에도 마이너한 서열 차이가 있을 수 있어 단일 분자종들 사이에 또 다른 형태의 변이 형태가 나타날 수 있다. "세포 표면 분자종들"은 포유동물 세포의 표면에서 발현되는 분자종들이다. IS를 형성하는 2개의 포유동물 세포들 중 어느 한쪽에만 (두 개 모두에는 아님) 배타적으로 존재하는, 2 이상의 상이한 단백질 종들은 서로 "시스" 또는 "시스 배열" 상태에 있다고 칭해진다. 2가지 상이한 단백질 종들로서, 첫 번째 종은 IS를 형성하는 2개의 포유동물 세포들 중 하나에만 배타적으로 존재하고 두 번째 종은 IS를 형성하는 2개의 포유동물 세포들 중 다른 하나에만 배타적으로 존재하는 경우, 이들 2 가지 상이한 단백질 종들은 "트랜스" 또는 "트랜스 배열" 상태에 있다고 칭해진다. 각 단백질이 IS를 형성하는 2개의 포유동물 세포 모두에 존재하는 2개의 상이한 단백질 종들은 이들 세포에서 시스 배열과 트랜스 배열 모두로 존재하는 것이다.

[0221] [0132] "멀티머화 도메인"이라는 용어는 어떤 폴리펩타이드 분자와 하나 이상의 부가적인 폴리펩타이드 분자와의 안정한 상호작용을 촉진시키는 아미노산 서열을 가리키는 것으로 상기 부가적인 폴리펩타이드들 각각은 상보적인 멀티머화 도메인(예컨대 제1 멀티머화 도메인 및 제2 멀티머화 도메인)을 함유하되, 이들은 동일 또는 상이할 수 있는 멀티머화 도메인이다. 상보적 멀티머화 도메인들 간의 상호작용, 예컨대 제1 멀티머화 도메인과 제2 멀티머화 도메인 사이의 상호작용은 안정한 단백질-단백질 상호작용을 형성하여 추가의 폴리펩타이드 분자와 함께 폴리펩타이드 분자의 멀티머를 생성한다. 일부 경우에, 멀티머화 도메인은 동일하고 그 자체로 상호작용하여 2개의 폴리펩타이드 사슬 사이에 안정한 단백질-단백질 상호작용을 형성한다. 일반적으로, 폴리펩타이드는 멀티머화 도메인에 직접 또는 간접적으로 결합된다. 예시적인 멀티머화 도메인에는 면역글로불린 서열 또는 그의 일부, 류신 지퍼, 소수성 영역, 친수성 영역 및 호환가능한(compatible) 단백질-단백질 상호작용 도메인들이 포함된다. 멀티머화 도메인은, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서브타입을 비롯한 IgG, IgA, IgE, IgD 및 IgM 및 이들의 변형된 형태로부터의 면역글로불린 불변 영역 또는 도메인, 예컨대 Fc 도메인 또는 그의 일부일 수 있다.

[0222] [0133] 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태의 핵산 잔기 (예컨대, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드)의 폴리머를 가리키는 용어로 호환적으로 사용된다. 달리 특별히 한정하지 않는 한 이 용어들은 고유 뉴클레오타이드들의 공지 유사체를 함유하는 핵산 및 그에 대한 유사한 결합 특성을 갖고 자연발생적인 뉴클레오타이드들과 유사한 방식으로 대사되는 것들을 포괄한다. 달리 언급되지 않는 한, 특정한 핵산 서열은 명시적으로 지목된 서열("레퍼런스 서열") 뿐만 아니라 그의 보존적으로 변형된 변이체 (예컨대, 축퇴 코돈 치환) 및 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 구체적으로, 축퇴 코돈 치환은 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기들에 의해 치환된 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈들의 세 번째 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기들에 의해 치환된 서열을 생성함으로써 얻을수 있다. 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드라는 용어는 어떤 유전자에 의해 인코딩된 cDNA 또는 mRNA도 포괄한다.

[0223] [0134] 본 명세서에서 용어 "비-경쟁적 결합(비-competitive binding)"이라 함은 어떤 단백질이 적어도 2개의 동족 결합 파트너들과 동시에 특이적으로 결합하는 능력을 의미한다. 따라서, 비록 결합 반응이 동일 기간 동안 존재할 할 필요는 없으나, 적어도 2개의 상이한 동족 결합 파트너들에 대해 당해 단백질에 동시에 결합할 수 있으므로, 몇몇 경우, 당해 단백질은 동족 결합 파트너들 중 오직 하나에만 특이적으로 결합한다. 일부 구체예에서, 결합은 특이적인 결합 조건 하에 일어난다. 일부 구체예에서, 동시 결합은 하나의 동족 결합 파트너의 결합이 제2 동족 결합 파트너의 동시적인 결합을 실질적으로 저해하지 않도록 한다. 일부 구체예에서, 비-경쟁적 결합은 비-경쟁적 결합은 제2 동족 결합 파트너를 단백질 상의 그의 결합 부위에 결합시키는 것이 제1 동족체 결합 파트너의 단백질상 의 그의 결합 부위에 대한 결합을 대체하지 않는다는 것을 의미한다. 비-경쟁적 결합의

평가 방법은 예를 들어 문헌 [Perez de La Lastra et al., Immunology, 1999 Apr: 96(4): 663-670]에 설명된 바와 같이 기술분야에 잘 알려져 있다. 몇몇 경우, 비-경쟁적 상호반응에서, 제2 동족 결합 파트너가 제1 동족 결합 파트너의 결합을 직접적으로 간섭하지 않게끔, 제1 동족 결합 파트너는 제2 동족 결합 파트너의 상호반응 부위와 중복되지 않는 상호반응 부위에서 특이적으로 결합한다. 따라서, 제2 동족 결합 파트너의 결합에 의한 동족 결합 파트너의 결합에 미치는 효과는 어느 것이든 제1 동족 결합 파트너의 결합을 직접적으로 간섭하는 것을 제외한 메카니즘을 통한 것이다. 예를 들어, 효소-기질 상호반응 맥락에서, 비-경쟁적 억제제는 효소의 활성 부위 이외의 부위에 결합한다. 비-경쟁적 결합은, 제2 동족 결합 파트너가 제1 동족 결합 파트너의 결합과 중복되지 않는 상호반응 부위에 특이적으로 결합하지만 제1 상호반응 부위가 제1 동족 결합 파트너에 의해 점령된 경우에 한해 제2 상호반응 부위에 결합하는, 비경쟁적(uncompetitive) 결합 상호반응을 포괄한다.

[0224] [0135] "의약 조성물"이라는 용어는 포유동물 대상자, 종종 인간에 있어서 의약 요도로 적합한 조성물을 가리킨다. 의약 조성물은 일반적으로 유효량의 활성물질 (예컨대, 변이체 ICOSL 막관통 면역조절 단백질을 발현하는 조작된 세포 또는 변이체 ICOSL을 포함하는 면역조절 폴리펩타이드) 및 담체, 부형제 또는 희석제를 포함한다. 담체, 부형제, 또는 희석제는 일반적으로 각각 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 말한다.

[0225] [0136] "폴리펩타이드" 및 "단백질"라는 용어는 본 명세서에서 호환적으로 사용되며 펩타이드 결합을 통해 2 이상의 아미노산들이 연결되어 있는 분자쇄를 가리킨다. 이 용어는 생성물의 특정 길이를 지칭하는 것이 아니다. 그러므로, "펩타이드" 및 "올리고펩타이드"는 폴리펩타이드 정의에 포함된다. 이 용어는 예컨대 글리코실화, 아세틸화, 인산화 등과 같은 폴리펩타이드의 번역후 변형을 포함한다. 이 용어는 또한 하나 이상의 아미노산 유사체 또는 비정규적인 또는 비고유 아미노산들이 공지의 단백질 조작 기술을 이용하여 합성되거나 재조합적으로 발현되는 분자들도 포괄한다. 이에 더해, 단백질은 유도화될 수 있다.

[0226] [0137] 본 명세서에서 "일차 T-세포 분석(primary T-cell assay)"이라 함은 인터페론 감마("IFN-감마") 발현을 측정하기 위한 시험관내 분석법을 가리킨다. 사용된 분석법은 항-CD3 공동고정화 분석법일 수 있다. 이 분석법에서, 일차 T 세포는 부가적인 재조합 단백질 존재 또는 부재 하에 고정된 항-CD3에 의해 자극된다. 배양 상등액을 대개 24-72시간 경화 시점에서 수확한다. 또 다른 구체예에서, 사용된 분석법은 MLR이다. 이 분석법에서 일차 T 세포들은 동종이계(allogenic) APC에 의해 자극된다. 배양 상등액은 대개 24-72 시간 경과 시점에서 수확된다. 배양 상등액 중 인간의 IFN-감마 수준을 표준 ELISA 기술로 측정한다. 납품업자들로부터 상업용 키트를 구입할 수 있으며 제조업자의 권장 지침에 따라 분석을 수행하면된다.

[0227] [0138] 본 발명의 면역조절 단백질을 인코딩하는 것과 같은 핵산에 적용되는 바와 같은 "정제된(purified)"이라는 용어는 일반적으로 기술 분야에 잘 알려진 분석 기술에 의해 탐지되는 다른 성분들이 실제로 없는 핵산 또는 폴리펩타이드를 의미한다 (예컨대, 정제된 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드는 전기영동 겔, 크로마토그래피 유출물, 및/또는 밀도구배 원심분리 처리되는 매질에서 불연속 밴드를 형성한다). 예컨대, 전기영동 겔에서 기본적으로 하나의 밴드로 나타나는 핵산 또는 폴리펩타이드는 "정제"된 것이다. 본 발명의 정제된 핵산 또는 단백질은 적어도 약 50% 순수하고, 대체로 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 99% 또는 그 이상 순수한 것이다 (예컨대 중량 백분율 또는 몰 기준임).

[0228] [0139] "재조합(recombinant)"이라는 용어는 물질(예컨대 핵산 또는 폴리펩타이드)이 인간의 개재로 인해 인공적으로(즉, 비-자연적으로) 변경되었음을 가리킨다. 이러한 변경은 그의 자연 환경 또는 상태 내의 물질에 대해 수행되거나 또는 자연 환경 또는 상태로부터 제거될 수 있다. 예를 들어, "재조합 핵산"은 예컨대 클로닝, 친화성 변형, DNA 셔플링 또는 기타 공지의 분자생물학적 과정이 일어나는 동안 핵산을 재조합적으로 조작함으로써 만들어지는 것이다. "재조합 DNA 분자"는 이러한 분자생물학적 기술 수단에 의해 함께 연결된 DNA의 세그먼트들로 이루어진다. 본 명세서에서 "재조합 단백질" 또는 "재조합 폴리펩타이드"라 함은 재조합 DNA 분자를 이용하여 발현되는 단백질 분자이다. "재조합 숙주 세포"는 재조합 핵산을 함유 및/또는 발현하는 세포이거나 또는 예컨대 세포 내로 본원에서 제공된 막관통 면역조절 단백질과 같은 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 도입하는 것과 같은 유전자 조작에 의해 달리 변경된 세포이다. 진핵생물 중의 전사 조절 시그널은 "프로모터"와 "인핸서" 요소를 포함한다. 프로모터 및 인핸서는 전사에 관여하는 세포상 단백질과 특이적으로 상호반응하는 DNA 서열들의 짧은 어레이로 구성된다. 프로모터 및 인핸서 요소들은 효모, 곤충 및 포유동물 세포를 비롯한 다양한 진핵생물 소스 및 바이러스로부터 분리된 바 있다(유사 조절 요소, 즉 프로모터들은 원핵세포에서도 발견된다). 특정한 프로모터 및 인핸서의 선택은 목적하는 단백질을 발현시키기 위해 어떤 세포 유형을 이용할 것인지에 의해 좌우된다. 본 명세서에서 "작동가능한 조합으로(in operable combination)," "작동가능한 순서로(in operable order)" 및 "작동가능하게 연결된(operably linked)"이라는 용어들은 목적하는 단백질 분자의 합성 및/또는 주어진 유전자의 전사를 지시할 수 있는 핵산 분자가 생산되는 방식으로 또는 그러한 배열로 이루어진 핵

산 서열의 결합(linkage)을 가리킨다.

[0229] [0140] 본 명세서에서 용어 "재조합 발현 벡터"라 함은 목적하는 특정 숙주 세포에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 적절한 핵산 서열 및 코딩 서열을 함유하는 DNA 분자를 가리킨다. 원핵세포에서의 발현에 필요한 핵산 서열들에는 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열, 리보좀 결합 부위 및 가능하게는 기타 서열들이 포함된다. 진핵 세포들은 프로모터, 인핸서 그리고 종결 및 폴리아데닐화 시그널을 이용하는 것으로 알려져 있다. 소망될 경우, 세포로부터의 보다 용이한 융합 단백질의 분리를 위해, 분비 시그널 펩타이드 서열은 또한, 임의로 재조합 융합 단백질과 같은 재조합 단백질에 대한 코딩 서열에 작동적으로 연결된 재조합 발현 벡터에 의해 인코딩되어, 발현된 융합 단백질이 재조합 숙주 세포에 의해 분비될 수 있다. 이 용어는 이것이 도입된 숙주 세포의 게놈 내로 병합된 벡터 뿐만 아니라 자가-복제 핵산 작제물로서의 벡터도 포함한다. 벡터에는 렌티바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 들 수 있다.

[0230] [0141] 용어 "선택성"은 다른 동족 결합 결합 파트너와 같은 다른 기질에 대한 특이적 결합과 비교하여 하나의 동족 결합 결합 파트너와 같은 하나의 기질의 특이적 결합에 대한 대상 단백질 또는 폴리펩타이드의 선호를 지칭한다. 선택성은 제1 동족 결합 파트너 (예컨대, K_{d1})와 같은 제1 기질과 대상 단백질의 결합 활성 (예컨대 결합 친화성)과, 제2 동족 결합 파트너 (예컨대, K_{d2})와 동일한 대상 단백질의 결합 활성 (예컨대 결합 친화성)과의 비율로서 반영될 수 있다.

[0231] [0142] 본 명세서에서 "서열 동일성(sequence identity)"이라는 용어는 각각 뉴클레오타이드 또는 아미노산 수준에서 유전자들 또는 단백질들 간의 서열 동일성을 가리킨다. "서열 동일성"은 뉴클레오타이드 수준에서 핵산들 간의 동일성의 척도이자 아미노산 수준에서의 단백질들 간의 동일성의 척도이다. 단백질 서열 동일성은 아미노산 서열들이 정렬된 경우 각 서열들에 있어서의 주어진 위치에서 아미노산 서열을 비교함으로써 알아낼 수 있다. 마찬가지로, 핵산 서열 동일성은 뉴클레오타이드 서열들이 정렬된 경우 각 서열에서의 주어진 위치에서 뉴클레오타이드 서열을 비교함으로써 알아낼 수 있다. 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 이러한 방법으로는 GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA 및 TFASTA를 들 수 있다. BLAST 알고리듬은 퍼센트 서열 동일성을 산출하는데 2개의 서열들 간의 유사성을 통계적으로 분석한다. BALST 분석법을 수행하는 소프트웨어는 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 웹사이트를 통해 공공연히 입수가능하다.

[0232] [0143] 명세서에서 단백질과 관련하여 "가용성(soluble)"이라 함은, 그 단백질이 막 단백질이 아님을 의미한다. 일반적으로, 가용성 단백질은 IgSF 패밀리 멤버 수용체의 세포외 도메인만을, 또는 IgSF 도메인 또는 도메인들을 함유하는 그의 일부 또는 그의 특이적-결합 단편만을 독점적으로 함유할 뿐 막관통 도메인은 함유하지 않거나 및/또는 세포 표면에서 발현되지 못한다. 일부 경우에서, 단백질의 가용성은 Fc 도메인에 대한 직접 또는 링커를 통한 간접적 연결 또는 결합에 의해 향상될 수 있고, 몇몇 경우에서는 이러한 연결 또는 결합은 단백질의 안정성 및/또는 반감기도 향상시킬 수 있다. 일부 측면에서, 가용성 단백질은 Fc 융합 단백질이다.

[0233] [0144] 본 명세서에서 폴리펩타이드 또는 핵산과 관련하여 사용될 경우 용어 "종(species)"은 동일하거나 실제로 동일한 서열들을 갖는 분자들의 앙상블을 의미한다. 동일한 종의 폴리펩타이드들 사이에서 변이는 글리코실화, 포스포릴화, 유비퀴틴화, 니트로실화, 메틸화, 아세틸화 및 지질화와 같은 후-번역 변형의 차이로 인해 일어날 수 있다. 아미노-말단 또는 카르복실-말단의 전장 종이 1, 2, 또는 3 아미노산 미만만큼 다른(또는 이러한 차이를 인코딩하는) 폴리펩타이드의 약하게 트렁크화된 서열은 단일 종의 것으로 간주된다. 이러한 마이크로이질성은 제조된 단백질들의 공통적인 속성이다.

[0234] [0145] 본 명세서에서 전장 야생형 포유동물 ICOSL 폴리펩타이드 또는 그의 IgV 또는 IgC 도메인과 관련하여 사용될 경우 용어 "특이적 결합 단편"은 IgV 및/또는 IgC 도메인의 서브서열을 갖고 시험관내 및/또는 생체내에서 포유동물 ICOS 및/또는 포유동물 CD28, 예컨대 인간 또는 쥐의 ICOS 또는 CD28에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드를 의미한다. 일부 구체예에서, ICOSL IgV 또는 ICOSL IgC의 특이적 결합 단편은 전장 야생형 길이의 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 길이를 갖는다. 특이적 결합 단편은 서열 변경에 의해 본 발명의 변이체 ICOSL을 형성할 수 있다.

[0235] [0146] 본 명세서에서 "특이적으로 결합하다"라는 표현은, 특이적인 결합 조건 하에서, 충분한 통계적 크기를 갖는 무작위적인 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 집합체에 대한 동일 단백질의 평균적인 친화성이나 결합능에 비해, 그의 친화성 또는 결합능이 적어도 5배, 그러나 임의로 10, 20, 30, 40, 50, 100, 250 또는 500배, 심지어 적어도 1000배 더 커지는, 표적 단백질에 대한 단백질의 결합 능력을 의미한다. 특이적으로 결합하는 단백질은 단일 표적 분자에만 결합할 필요는 없으며 표적과 비-표적 (예컨대 파라로그(유사체:paralogs) 또는 오솔로그

(이종상동체: orthologs)) 사이의 구조적 배열의 유사성으로 인해, 비-표적 분자에도 특이적으로 결합할 수 있다. 통상의 기술자라면 상이한 동물종에서 동일한 기능을 갖는 분자에 대한 특이적 결합(즉 오솔로그) 또는 표적 분자와 실질적으로 유사한 에피토프를 갖는 비-표적 분자에 대한 특이적 결합 (예컨대, 파라로그)이 가능함과 독특한 비-표적(예컨대 무작위적인 폴리펩타이드)의 통계적으로 합당한 집합에 대해 상대적으로 구해지는 결합의 특이성과 상충하지 않는다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 폴리펩타이드는 교차-반응성으로 인해, 표적 분자의 두 개 이상의 상이한 종들과 특이적으로 결합할 수도 있다. 2개의 단백질들 간의 특이적 결합을 알아내기 위해 고체상 ELISA 면역분석법 또는 Biacore 측정을 이용할 수 있다. 일반적으로, 2개의 결합 단백질들 간의 상호반응들의 해리 상수(Kd)는 $1x10^{-5}$ M 미만이고, 흔히 1×10^{-12} M 정도로 낮다. 본 발명의 특정 구체예에서, 2개의 결합 단백질들 간의 상호반응의 해리 상수는 $1x10^{-6}$ M, $1x10^{-7}$ M, $1x10^{-8}$ M, $1x10^{-9}$ M, $1x10^{-10}$ M 또는 $1x10^{-11}$ M이다.

[0236] [0147] 폴리펩타이드를 발현하는 포유동물 세포와 관련하여 "표면 발현하다", "표면 발현" 또는 "표면에서 발현하다"라는 용어는 그 폴리펩타이드가 막 단백질로서 발현됨을 의미한다. 일부 구체예에서, 막 단백질은 막관통 단백질이다.

[0237] [0148] 예컨대 합성 핵산 분자 또는 합성 유전자 또는 합성 펩이드와 관련한 "합성"이라는 용어는 재조합 방법 및/또는 화학적 합성 방법에 의해 생산된 핵산 분자 또는 폴리펩타이드 분자를 가리킨다.

[0238] [02149 본 명세서에서 "표적화 모이어티(targeting moiety)"라 함은 본 발명의 변이체 ICOSL을 포함하는 폴리펩타이드에 공유적 또는 비공유적으로 결합하거나 또는 이를 물리적으로 내포하는 조성물을 가리킨다. 일부 구체예에서, 표적화 모이어티는 세포에서 발현되는 표적 분자와 같은 표적 분자에 대해 특이적 친화성을 갖는다. 일반적으로, 표적 분자는 특이적인 조직 또는 세포-유형 상에 위치한다. 표적화 모이어티에는: 항체, 항원 결합 단편(Fab), V_H 및 V_L를 함유하는 가변 단편(Fv), 하나의 사슬 내에 V_H 및 V_L을 함께 연결한 채로 함유하는 단일 사슬 가변 단편(scFv) 및 그 밖의 항체 V 영역 단편들, 예컨대 Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$, dsFv 다이아바디, 나노바디, 가용성 수용체들, 수용체 리간드들, 성숙한 친화성 수용체들 또는 리간드들, 그리고 소형 분자 (<500 dalton) 조성물 (예컨대, 특이 결합 수용체 조성물)이 포함된다. 표적화 모이어티는 또한 본 발명의 폴리펩타이드를 내포하는 리포좀의 지질 막에 공유적으로 또는 비공유적으로 결합할 수도 있다.

[0239] [0150] 본 명세서에서 용어 "막관통 단백질(transmembrane protein)"은 포유동물 세포와 같은 생물학적 막 또는 리포좀과 같은 인공 작제물에서 발견되는 지질 이중층과 같은 지질 이중층에 실질적으로 또는 완전히 걸쳐있는 (span) 막 단백질을 의미한다. 막관통 단백질은 이를 통해 지질 이중층에 통합되고 생리학적 조건 하에서 열역학적으로 안정한 막관통 도메인(transmembrane domain) ("transmembrane domain")을 포함한다. 막관통 도메인은 일반적으로 수성 환경(예컨대 세포질, 세포외 유액)과 상호반응하는 단백질 영역에 비해 높은 그의 소수성에 기초하여, 임의의 수의 상업적으로 이용 가능한 생물정보학 소프트웨어 적용을 통해 그들의 아미노산 서열로부터 예측 가능하다. 막관통 도메인은 종종 흔히 막을 통해 뻗어있는 소수성 알파 나선이다. 막관통 단백질은 지질 이중층의 두 층을 한 번 또는 여러 번 통과할 수 있다. 막관통 단백질은 본 명세서에 기술된 본원에서 제공된 막관통 면역조절 단백질을 포함한다. 막관통 도메인에 더해, 본 발명의 막관통 면역조절 단백질은 엑토도메인 및 일부 구체예에서 엔도도메인을 추가로 포함한다.

[0240] [0151] 본 명세서에서 질병 또는 장애와 관련하여 "치료하는", "치료" 또는 "치료법"이라는 용어는 치료 조성물 (예컨대, 면역조절 단백질 또는 조작된 세포를 함유하는)을 단독으로 또는 본 명세서에 설명된 다른 화합물과 조합 투여함으로써 임상적 또는 진단적 증상의 감소, 중단 또는 제거에 의해 입증되는 바와 같이 질병 또는 장애의 진행을 둔화, 중단 또는 역전시키는 것을 의미한다. "치료하는", "치료" 또는 "치료법"은 또한 급성 또는 만성 질병 또는 장애에 있어서 증상의 위중도의 감소 또는 자가면역 질환의 염증 측면에서 염증의 감소 또는 자가면역 질환 경과의 재발 또는 감퇴(remitting)의 경우 재발율의 감소를 의미하기도 한다. 본 명세서에서 암과 관련하여 암을 "치료" 또는 "억제하다", "억제하는" 또는 "억제"라는 의미는: 종양 성장 속도의 통계적으로 유의한 감소, 종양 성장의 중단, 또는 Response Evaluation Criteria for Solid Tumors(RECIST)와 같은 표준 기준법(그러나 이에 한정되지 않음)에 의해 측정되는 바와 같은, 종양의 크기, 질량, 대사 활성 또는 볼륨의 감소, 또는 무진행 생존(PFS: progression free survival) 또는 전체적인 생존(OS: overall survival)의 통계적으로 유의적인 증가 중 적어도 하나를 가리킨다. 본 발명의 문맥 상 본 명세서에서 질병 또는 장애와 관련하여 "예방하다", "예방 (prophylaxis, 또는 prevention)"의 의미는 본 발명의 폴리펩타이드 또는 조작된 세포를 단독으로 또는 다른 화합물과 조합하여, 투여하는 것을 의미한다. 질병 또는 장애 또는 질병 또는 장애의 증상

의 일부 또는 전부의 개시 또는 발생을 방지하거나 또는 질병 또는 장애의 개시 가능성을 경감시키는 것을 의미한다.

[0241] [0152] 본 명세서에서 "종양 특이 항원(tumor specific antigen)" 또는 "TSA"라 함은 포유동물 대상자의 종양 세포에 주로 존재하지만 포유동물 대상자의 정상 세포에서는 일반적으로 발견되지 않는 카운터 작제물을 가리킨다. 종양 특이 항원은 종양 세포에 대해서만 배타적일 필요는 없으나 종양 특이 항원을 갖는 특정 포유동물 세포의 백분율은 충분히 높거나 또는 종양 표면에 대한 종양 특이 항원의 수준은 충분히 높아서 본 발명의 면역조절 폴리펩타이드와 같은 항-종양 요법에 의해 표적화될 수 있고, 종양의 효과로부터 포유동물의 예방 또는 치료가 제공된다. 일부 구체예에서, 종양이 있는 포유동물로부터의 세포의 무작위 통계 표본에서, TSA를 나타내는 세포들의 적어도 50%는 암세포이다. 또 다른 구체예에서, TSA를 나타내는 세포들의 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%는 암세포이다.

[0242] [0153] 본 명세서에서 변이체 ICOSL과 관련하여 사용된 용어 "변이체" ("변형된" 또는 돌연변이"라는 용어도)는 인간의 개입에 의해 생성된 포유동물 (예컨대, 인간 또는 쥐) ICOSL과 같은 ICOSL을 의미한다. 변이체 ICOSL은 레퍼런스 (예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL에 상대적으로 변경된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드이다. 변이체 ICOSL은 하나 이상의 변형, 예컨대 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 부가, 또는 이의 조합에 의해 레퍼런스 ICOSL, 예컨대 야생형 ICOSL 이소폼 서열과 상이한 폴리펩타이드이다. 본 발명의 목적 상, 변이체 ICOSL은 적어도 하나의 친화성 변형된 도메인을 함유하여, 이에 의해 하나 이상의 아미노산 차이가 IgSF 도메인 (예컨대 IgV 도메인)에서 발생한다. 변이체 ICOSL은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 또는 그 이상의 아미노산 차이, 예컨대 아미노산 치환을 포함한다. 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 일반적으로 대응하는 레퍼런스(예컨대 비변이체 ICOSL) 또는 야생형, 예컨대 SEQ ID NO:4의 서열, 그의 성숙한 서열 또는 그의 세포외 도메인 또는 IgSF 도메인을 함유하는 그의 일부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:1, 또는 SEQ ID NO:2 또는 3에 제시된 레퍼런스 ICOSL과 같은, 대응하는 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타낸다. 자연발생적인 아미노산 뿐만 아니라 비-자연발생적인 아미노산도 허용가능한 치환 또는 부가 범위 내에 포함된다. 변이체 ICOSL은 예를 들어, 드 노보 화학 합성, 드 노보 재조합 DNA 기술, 또는 이의 조합과 같은 임의의 특정 제조방법으로 한정되지 않는다. 본 발명의 변이체 ICOSL은 포유동물 종의 CD28, ICOS 및/또는 CTLA-4에 특이적으로 결합한다. 일부 구체예에서, 변경된 아미노산 서열은 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 단백질에 비해 ICOS 및/또는 CD28에 대해 변경된(즉, 증가 또는 감소된) 결합 친화성 또는 결합능을 결과시킨다. 결합 친화성 또는 결합능의 증가 또는 감소는 유세포 분석법 등 잘 알려진 결합 분석법을 이용하여 알아낼 수 있다. Larsen 외, American Journal of Transplantation, Vol 5: 443-453 (2005). Linsley 외, Immunity, Vol 1(9): 793-801 (1994)도 참조할 것. ICOS 및/또는 CD28에 대한 변이체 ICOSL 결합 친화성 또는 결합능의 증가는 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL의 그것에 대해 적어도 5% 더 큰 값일 수 있고 일부 구체예에서, 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 대조군 값의 그것보다 적어도 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100% 더 큰 것일 수 있다. ICOS 및/또는 CD28에 대한 ICOSL 결합 친화성 또는 결합능의 감소는 야생형 대조군 값의 95% 이하의 값이고, 일부 구체예에서, 야생형 ICOS 및/또는 CD28 대조군 값의 결합 친화성 또는 결합능의 80%, 70% 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% 이하 또는 검출 불가능한 것일 수 있다. 변이체 ICOSL은 아미노산 잔기의 치환, 부가 또는 결실에 의해 일차 아미노산 서열이 변경된다. 변이체 ICOSL과 관련하여 용어 "변이체"는 어떠한 특정 출발 조성물에 대한 조건이나 변이체 CD80을 생성하는 방법에 대한 어떠한 조건을 부과하는 것으로 여겨져서는 아니된다. 변이체 ICOSL은 레퍼런스 ICOSL 또는 야생형 포유동물 ICOSL 서열 정보로부터 출발하여 ICOS 및/또는 CD28에 결합하기 위해 인 실리코(in silico) 모델링된 다음 최종적으로 재조합 또는 화학적으로 합성에 의해 본 발명의변이체 ICOSL을 수득할 수 있다. 한 가지 별법 사례에서, 변이체 ICOSL은 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL의 부위-지향된 돌연변이생성에 의해 생성될 수 있다. 그러므로, 변이체 ICOSL은 조성물(composition)일 수 있고 반드시 임의의 주어진 방법에 의해 생산되는 생성물이어야 할 필요는 없다. 재조합 방법, 화학적 합성 또는 이들의 조합을 포함하는 다양한 기술이 사용될 수 있다.

[0243] [0154] 본 명세서에서 용어 "야생형" 또는 "고유 또는 자연 (natural 또는 native)"은 핵산 분자, 단백질 (예 : ICOSL), IgSF 구성원, 숙주 세포 등과 같은 생물학적 물질과 관련하여 사용되고, 자연에서 발견되고 인간의 개입에 의해 변형되지 않는 것들을 지칭한다.

[0244] [0155] 또한, 이하에 설명되는 바와 같은 본 발명의 다양한 구체예는 위에 개시된 바와 같이 정의된 용어의 의미 내에서 제공된다. 따라서, 특정 정의에 설명된 구체예들은 정의된 용어가 본 명세서에서 설명된 다양한 양상 및 속성을 설명하는데 이용될 때 참조로서 포함되는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, 표제, 다양한 양태 및 구체예의 제시 순서, 및 각각의 독립적인 속성의 개별적인 개시는 본 개시의 범위에 대한 제한을 의미하지 않는다.

[0245] **II. 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 융합 단백질**

[0246] [0156] 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 및 멀티머화 도메인, 예컨대 Fc 도메인을 함유하는 융합 단백질이 본원에서 제공된다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 함유하는 융합 단백질은 ICOSL 동족 결합 파트너 중 하나 이상에 대해 변경된(예를 들어 증가된) 결합 활성 또는 친화도를 나타낸다. 일부 구체예에서, ICOSL 동족 결합 파트너는 CD28 또는 ICOS 중 어느 하나 또는 양자 모두이다.

[0247] A. 변이체 ICOSL 폴리펩타이드

[0248] [0157] 본 발명에 따라 하나 이상의 ICOSL 동족 결합 파트너에 대해 변경된 (증가 또는 감소된) 결합 활성 또는 친화성을 나타내는 변이체 ICOSL 폴리펩타이드가 제공된다. 일부 구체예에서, ICOSL 동족 결합 파트너는 CD28, ICOSL, 또는 CTLA-4이다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 야생형 또는 비변이체 ICOSL 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 수퍼패밀리 (IgSF) 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 함유하는 야생형 또는 비변이체 ICOSL의 일부에 비해 면역글로불린 수퍼패밀리 (IgSF) 도메인 (IgD)에 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 하나 이상의 치환 (또는 "돌연변이" 또는 "교체"), 결실 또는 부가를 포함한다. 따라서, 제공된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형 (예컨대, 치환)이 IgD에 있는 것인 변이체 IgD (이하 "vIgD"라 칭함)이거나 또는 이를 포함한다.

[0249] [0158] 일부 구체예에서, IgD는 IgV 도메인 또는 IgC (예컨대 IgC2) 도메인 또는 IgV 도메인 또는 IgC (예컨대 IgC2) 도메인의 특이적 결합 단편, 또는 이의 조합을 포함한다. 일부 구체예에서, IgD는 ICOSL의 Ig 도메인의 임의 조합 또는 전체적인 세포외 도메인(ECD)를 포함하여, IgV 및 IgC의 조합 또는 IgV 단독일 수 있다. 표 1은 ICOSL의 IgV 또는 IgC 영역에 대응하는 예시적인 잔기를 나타낸다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 IgC 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편에 적어도 하나의 아미노산 변형(예컨대 치환)이 존재하는 IgV 도메인, 또는 IgC 도메인, 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 CD80 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 IgC 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편에 적어도 하나의 아미노산 변형(예컨대 치환)이 존재하는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함한다. 일부 구체예에서 변경된 결합 활성 또는 친화성으로 인해, IgV 도메인 또는 IgC 도메인은 친화성 변형된 IgSF 도메인이다.

[0250] [0159] 레퍼런스(예컨대 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드에 함유된 IgSF 도메인에 비해 적어도 하나의 친화성-변형된 IgSF 도메인 (예컨대 IgV 또는 IgC) 또는 그의 특이적 결합 단편을 함유하는 변이체 ICOSL 폴리펩타이드가 제공되며 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 레퍼런스(예컨대 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드에 비해 리간드 ICOS 및/또는 CD28 중 하나 이상에 대해 변경된 (예컨대, 증가된) 결합 활성 또는 친화성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 예를 들어, 고상 ELISA 면역분석법, 유세포 분석법 또는 Biacore 분석법에 의해 측정되는 바와 같이 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드 대조군 서열의 그것과는 다른, CD28 및/또는 ICOS에 대한 결합 친화성을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 CD28 및/또는 ICOS에 대해 증가된 결합 친화성을 갖는다. CD28 및/또는 ICOS는 인간 단백질 또는 쥐의 단백질과 같은 포유동물 단백질일 수 있다.

[0251] [0160] 동족 결합 파트너 각각에 대한 결합 친화도는 독립적이며; 즉, 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 레퍼런스(예를 들어, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드에 비해 CD28 및/또는 ICOS 중 하나 또는 양자 모두에 대해 증가된 결합 친화도를 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 레퍼런스(예를 들어, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드에 비해 CD28 및 ICOS 모두에 대해 증가된 결합 친화도를 갖는다.

[0252] [0161] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드에 비해, CD28에 대해 증가된 결합 친화성을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드에 비해, ICOS에 대해 증가된 결합 친화성을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드에 비해 CTLA-4에 대해 증가된 결합 친화성을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 레퍼런스(예컨

대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드에 비해 CTLA-4에 대해 증가된 결합 친화성을 갖는다.

[0253] [0162] 일부 구체예에서, CD28 및/또는 ICOS에 대해 증가 또는 감소된 결합 친화성을 갖는 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드 대조군에 비해 CD28 및/또는 ICOS에 대해 적어도 약 5%, 예컨대 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 35%, 또는 50% 증가된 결합 친화성을 가질 것이다. 일부 구체예에서, 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드과 비교시 결합 친화성 증가는 1.2배, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배 40배 또는 50배 이상이다. 그러한 예에서, 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드는 하나 이상의 아미노산 변형 (예컨대, 치환)을 포함하지 않는 것을 제외하고 변이체 ICOSL 폴리펩타이드와 동일한 서열을 갖는다.

[0254] [0163] 일부 구체예에서, CD28 및/또는 ICOS에 대한 전술한 구체예들 중 어느 하나의 평형 해리 상수 (K_d)는 $1x10^{-5}$ M 미만, $1x10^{-6}$ M 미만, $1x10^{-7}$ M 미만, $1x10^{-8}$ M 미만, $1x10^{-9}$ M 미만, $1x10^{-10}$ M 미만 또는 $1x10^{-11}$ M 미만, 또는 $1x10^{-12}$ M 미만일 수 있다.

[0255] [0164] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 CD28에 대해 증가된 또는 더 큰 결합 친화성을 갖는다. 일부 구체예에서, CD28에 대해 증가된 또는 더 큰 결합 친화성을 갖는 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드 대조군에 비해 적어도 약 25%, 예컨대 적어도 약 30%, 40%, 50%, 또는 60% 더 큰 CD28에 대한 결합 친화성의 증가를 가질 것이다. 일부 구체예에서, CD28에 대해 증가된 또는 더 큰 결합 친화성을 갖는 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 CD28에 대한 평형 해리 상수 (K_d)가 200 pM, 300 pM, 400 pM, 500 pM, 또는 600 pM 미만이다. 일부 구체예에서, 변이체 폴리펩타이드는 비변이체 ICOSL에 비해 증가된 선택성으로 엑토도메인 ICOS, CD28 또는 CTLA4 중 어느 하나의 엑토도메인과 특이적으로 결합한다. 일부 구체예에서, 증가된 선택성은 CD28에 대한 것이다. 일부 구체예에서, 증가된 선택성은 ICOS, CD28, 및 CTLA-4로부터 선택된 하나의 동족 결합 파트너 대 또 다른 동족 결합 파트너에 대한 변이체 ICOSL 폴리펩타이드의 결합 비율이, 하나의 동족 결합 파트너 대 또 다른 동족 결합 파트너에 대한 비변형 CD80 폴리펩타이드의 결합 비율에 비해 더 큰 것을 포함한다. 일부 경우에서, 상기 비율은 적어도 또는 적어도 약 1.5배, 2.0배, 3.0배, 4.0배. 5배, 10배, 15배, 20배, 30배, 40배, 50배 또는 그 이상 더 크다.

[0256] [0165] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 ICOS에 대해 증가되거나 또는 더 큰 결합 친화성을 갖는다. 일부 구체예에서, ICOS에 대한 증가된 또는 더 큰 결합 친화성을 갖는 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드 대조군에 비해 적어도 약 10%의 결합 친화성 증가, 예를 들어 CD28에 대해 적어도 약 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 또는 60%의 결합 친화성을 가질 것이다. 일부 구체예에서, ICOS에 대해 증가되거나 더 큰 결합 친화성을 갖는 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 ICOS에 대해 200pM, 300pM, 400pM, 500pM, 또는 600pM 미만의 평형 해리 상수(Kd)를 갖는다.

[0257] [0166] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 서열에 하나 이상의 아미노산 변형, 예를 들어 치환을 갖는다. 하나 이상의 아미노산 변형, 예를 들어 치환은 레퍼런스(예컨대 비변형) 또는 야생형 ICOSL 서열의 엑토도메인(세포외 도메인)에 있을 수 있다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형, 예를 들어, 치환은 IgV 도메인 또는 이의 특이적 결합 단편에 있다.

[0258] [0167] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:1의 넘버링을 참조로 위치(들) 52, 57, 및/또는 100에 상응하는 레퍼런스 ICOSL 또는 그의 특이적 결합 단편에서 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:1의 넘버링을 참조로, 예를 들어, N52H, N57Y 및/또는 Q100R로부터 선택되는 것과 같은 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환, 또는 보존적 아미노산 변형, 예를 들어, 그의 치환을 갖는다.

[0259] [0168] 보존적 아미노산 변형, 예컨대 치환은 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 아미노산 이외의 치환된 아미노산과 동일한 클래스의 아미노산에 속하는 임의의 아미노산이다. 아미노산 클래스로는 지방족 (글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신), 히드록실 또는 황-함유 (세린, 시스테인, 트레오닌, 및 메티오닌), 시클릭 (프롤린), 방향족 (페닐알라닌, 티로신, 트립토판), 염기성 (히스티딘, 리신, 및 아르기닌), 및 산성/아미드 (아스파테이트, 글루타메이트, 아스파라긴, 및 글루타민)을 들 수 있다.

[0260] [0169] 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환은 SEQ ID NO:1의 넘버링을 참조로 N52H/N57Y/Q100R이다.

[0261] [0170] 달리 언급되지 않는 한, 본 명세서의 전 개시를 통해 나타난 바와 같이, 아미노산 변형(들)은 SEQ ID

NO:1에 제시된 비변형 ECD 서열의 위치 넘버링에 상응하는 아미노산 위치 번호에 의해 지정된다. 레퍼런스 서열(예컨대, SEQ ID NO: 2, 3, 5-33)을 SEQ ID NO:32과 정렬시키는 등에 의해, 그의 IgSF 도메인 (예컨대 IgV)을 함유하는 그의 단편을 비롯하여, ICOSL 폴리펩타이드에서의 예컨대 아미노산 치환과 같은 변형에 상응하는 위치를 동정하는 것은 통상의 기술자의 기술 수준 범위 내이다. 본 명세서 전반에 걸쳐 변형 목록에서, 아미노산 위치는 중간에, 대응하는 레퍼런스(예컨대 비변형 또는 야생형) 아미노산은 그 번호 앞에 그리고 동정된 변이체 아미노산 치환은 그 번호 뒤에 위치한다. 만일 변형이 해당 위치의 결실이면 "del"로 표시되고 변형이 그 위치에서의 삽입이면 "ins"로 표시된다. 일부 경우에서, 삽입의 경우 가운데에 아미노산 위치가 표시되고, 그 번호 전후로 대응하는 아미노산 목록을 나타내며 동정된 변이체 아미노산 삽입은 비변형(예컨대 야생형) 아미노산 다음에 나타낸다.

[0262] [0171] 일부 구체예에서, 변이체는 레퍼런스(예컨대 비변형) ICOSL 서열의 서열에 비해 하나 이상의 IgSF 도메인에서 변형된다. 일부 구체예에서, 레퍼런스(예컨대 비변형) ICOSL 서열은 야생형 ICOSL이다. 일부 구체예에서, 레퍼런스(예컨대 비변형) 또는 야생형 ICOSL은 천연 ICOSL 또는 이의 오솔로그(이종상동체: orthologs))의 서열을 갖는다. 일부 구체예에서, 레퍼런스(예컨대 비변형) 또는 야생형 ICOSL은 ICOSL의 세포외 도메인(ECD) 또는 하나 이상의 IgSF 도메인을 함유하는 이의 일부이거나 이를 포함한다(표 1 참조). 일부 구체예에서, 레퍼런스(예컨대 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드의 세포외 도메인은 IgV 도메인 및 IgC 도메인 또는 도메인들을 포함한다. 그러나, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 및 IgC 도메인 또는 도메인들 양자 모두를 포함할 필요는 없다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하거나 본질적으로 이들로 이루어진다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL은 가용성이고 막관통 도메인을 결여한다.

[0263] [0172] 일부 구체예에서, 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 서열은 포유동물 ICOSL 서열이다. 일부 구체예에서, 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 서열은 인간, 마우스, 사이노몰구스 원숭이 또는 래트를 포함하나 이에 제한되지 않는 포유동물 ICOSL일 수 있다. 일부 구체예에서, 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 서열은 인간이다.

[0264] [0173] 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 서열의 다양한 특징들을 표 1에 나타내었다. 표 1의 첫 번째 열은 명칭 및 선택적으로 그 특정 IgSF 멤버에 대한 가능한 어떤 동의어의 명칭을 나타낸다. 두 번째 열은 uniprot.org에서 인터넷을 통해 접근가능한 공개적으로 이용가능한 데이터베이스인 UniProtKB 데이터베이스의 단백질 동정자, 또는, 일부 경우 GenBank Number를 나타낸다. Universal Protein Resource (UniProt)는 단백질 서열 및 주석이 달린 데이터의 포괄적인 리소스이다. UniProt 데이터베이스는 UniProt Knowledgebase (UniProtKB)를 포함한다. UniProt은 UniProt은 유럽 생물 정보학 연구소 (EMBL-EBI), SIB 스위스 생물 정보학 연구소 및 PIR (Protein Information Resource) 간의 공동 작업으로 미국 국립 보건원 (NIH)의 보조금으로 주로 지원되고 있다. GenBank는 공개적으로 이용 가능한 모든 DNA 서열의 주석이 달린 컬렉션인 NIH 유전자 서열 데이터베이스이다 (Nucleic Acids Research, 2013 Jan; 41 (D1):D36-42). 세 번째 열은 표시된 IgSF 도메인이 있는 영역을 나타낸다. 이 영역은 도메인이 범위를 정의하는 잔기를 포함하는 범위로 지정된다. 3열은 지정된 IgSF 영역에 대한 IgSF 도메인 클래스를 나타내기도 한다. 4열은 표시된 추가 도메인이 있는 영역을 나타낸다. (신호 펩타이드, S; 세포외 도메인, E; 막관통 도메인, T; 세포질 도메인, C). 도메인의 설명은 도메인을 식별하거나 분류하는데 사용되는 방법에 따라 달라질 수 있으며, 서로 다른 출처와 다르게 식별될 수 있다. 표 2의 도메인에 상응하는 잔기에 대한 설명은 단지 예시를 위한 것이며 수 개의 아미노산 (예컨대, 1, 2, 3 또는 4개)만큼 길거나 짧을 수 있다. 5열은 그의 동족 세포 표면 결합 파트너 중 일부를 나타낸다.

표 1. 본 발명에 따른 IgSF 멤버.

IgSF 멤버 (동의어)	NCBI 단백질 수탁번호/ UniProtKB 단백질 식별자	IgSF 영역 & 도메인 클래스	다른 도메인	동족 세포 표면 결합 파트너	IgSF 멤버 아미노산 서열 (SEQ ID NO)		
					전구체 (성숙 잔기)	성숙	ECD
ICOSLG (B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2)	O75144.2	19-129 IgV, 141-227 IgC2	S: 1-18, E: 19-256, T: 257-277, C: 278-302	ICOS, CD28, CTLA4	SEQ ID NO: 4 (19-302)	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 1

[0265]

[0266] [0174] 일부 구체예에서, 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 서열은 (i) SEQ ID NO: 4에 제시된 아미노산 서열 또는 신호 서열이 결여된 그의 성숙 형태, (ii) SEQ ID NO: 4에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖거나, 또는 (iii) IgV 도메인 또는 IgC 도메인 또는 이의 특이적 결합 단편을 함유하는 (i) 또는 (ii)의 일부이다.

[0267] [0175] 일부 구체예에서, 레퍼런스 ICOSL 서열은 ICOSL 또는 그의 일부의 세포외 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 레퍼런스 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:1에 제시된 아미노산 서열 또는 그의 오솔로그를 포함한다.

[0268] DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSSLENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSL GFQEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLL QQNLTVGSQTGNDIGERDKITENPVSTGEKNAAT (SEQ ID NO:1)

[0269] [0176] 일부 경우에서, 레퍼런스 (예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드는 (i) SEQ ID NO:1에 제시된 아미노산 서열, (ii) SEQ ID NO: 1에 대해 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 (iii) IgV 도메인 또는 IgC 도메인을 포함하는 (i) 또는 (ii)의 서열의 특이적 결합 단편이다.

[0270] [0177] 일부 구체예에서, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:1에 제시된 레퍼런스 ICOSL 세포외 도메인 서열을 참조로 C-말단 절단을 포함하는 절단형(truncated) 세포외 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, C-말단 절단은 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90, 적어도 100, 적어도 125 아미노산 잔기의 절단이다. 일부 구체예에서, C-말단 절단은 적어도 1, 적어도 5 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 35 아미노산 잔기의 절단이다. 일부 구체예에서, C-말단 절단을 포함하는 ICOSL 폴리펩타이드는 절단 지점의 C-말단 너머로는, 야생형 ICOSL의 인접 아미노산 잔기를 함유하지 않는다. 따라서, 제공된 ICOSL 레퍼런스 서열들 중에는, 예컨대 SEQ ID NO: 1에 제시된 것과 같은 야생형 ICOSL의 완전한(full) 세포외 도메인보다 짧은 것들이 있다. 일부 구체예에서, C-말단 절단을 포함하는 ICOSL 폴리펩타이드는 세포외 도메인 외의 ICOSL 도메인의 아미노산 잔기를 함유하지 않거나 이에 융합하지 않는다.

[0271] [0178] 일부 구체예에서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 하나 이상의 프로테아제 절단 부위에서 변경, 예컨대 돌연변이되거나 또는 결실된다. 본원에서 밝혀진 바와 같이, 야생형 ICOSL 폴리펩타이드는 일부 경우, 세포, 예컨대 차이니즈 햄스터 난소 세포에서 발현시 단백질의 절단을 초래하는 프로테아제 절단 부위를 함유함으로 해서, 상이한 길이 또는 크기의 종을 포함하여 다수 종의 이종 생성물을 결과시킨다. 예를 들어, ICOSL 폴리펩타이드의 절단은 SEQ ID NO: 1의 잔기 207과 208 사이의 LQQN/LT 프로테아제 절단 부위에서 발생할 수 있다 ("/"는 잠재적 절단 부위를 나타낸다). 일부 구체예에서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 204-209로 제시된 프로테아제 절단 부위에서 변경되거나 결핍된다. 일부 구체예에서, 절단형 ICOSL 폴리펩타이드는 야생형 또는 비-절단형 ICOSL 폴리펩타이드에 비해 프로테아제 절단에 대해 내성이 더 크다. LQQN/LT 프로테아제 절단 부위의 전부 또는 일부가 결핍된 예시적인 절단형 ICOSL 폴리펩타이드 ECD 절단 (절단 #2, #3, #4, #5, #6, #7, 또는 #8라 칭함)을 SEQ ID NOs: 5-11에 제시하였다.

[0272] 절단 #2:

[0273] DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSSLENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSL GFQEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLL QQNL (SEQ ID NO: 5)

[0274] 절단 #3:

[0275] DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSSLENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSL GFQEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLL QQNLTVGSQ (SEQ ID NO: 6)

[0276] 절단 #4:

[0277] DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSSLENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSL GFQEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLL QQN (SEQ ID NO: 7)

[0278] 절단 #5:

[0279] DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSSLENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSL GFQEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLL QQ (SEQ ID NO: 8)

[0280] 절단 #6:

[0281] DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSSLENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSL GFQEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLL (SEQ ID NO: 9)

[0282] 절단 #7:

[0283] DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSSLENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSL GFQEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIEN (SEQ ID NO: 10)

[0284] 절단 #8:

[0285] DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSSLENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSL GFQEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLL QQNLT (SEQ ID NO: 11)

[0286] [0179] 일부 구체예에서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:1을 참조로 아미노산 204-209에 상응하는 하나 이상의 아미노산에서 변경된다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:1의 넘버링을 참조로 위치(들) 207 및/또는 208에 상응하는 레퍼런스 ICOSL 또는 그의 특이적 결합 단편에서 하나 이상의 아미노산 변형, 예를 들어 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 N207A, N207G, L208G, 또는 보존적 아미노산 변형, 예컨대 그의 치환으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형, 예를 들어 치환은 N207A/L208G 또는 N207G/L208G이다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드의 전장 레퍼런스 ECD 또는 절단된 레퍼런스 ECD는 N207A, N207G, L208G, 또는 보존적 아미노산 변형으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 변형, 예를 들어 치환을 함유하도록 변형된다. 하나 이상의 변형이 있는 예시적인 전장 또는 절단된 레퍼런스 ECD가 SEQ ID NOs: 12-33에 제시되어 있다. 위치와 관련하여 절단 부위 N207 및/또는 L208에서 돌연변이를 함유하는 예시적인 레퍼런스 서열이 SEQ ID NO: 1에 제시되어 있으며 SEQ ID NO: 29-33에 기재되어 있다. 일부 경우에, 제공된 변형은 LQQN/LT 프로테아제 절단 부위에서 일어날 수 있는 절단과 같은 ICOSL 폴리펩타이드의 프로테아제 절단을 감소시킬 수 있다.

[0287] [0180] 일부 구체예에서, 상기 절단 및 변형 전략의 조합이 레퍼런스 ICOSL ECD 서열에서 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 변형, 예를 들어 치환은 SEQ ID NOs: 5-11에 제시된 예시적인 레퍼런스 ICOSL 서열과 같은 절단된 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 이루어진다. 잠재적인 프로테아제 절단 부위(들) N207 및/또는 L208에 변형을 갖는 예시적인 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 서열들을 SEQ ID NOs: 12-33에 나타내었다. 일부 구체예에서,

변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:1에 제시된 ECD 서열을 함유하는 것과 같은, 야생형 ICOSL 폴리펩타이드와 비교하여 감소된 프로테아제 절단을 나타낸다.

[0288] [0181] 일부 구체예에서, 레퍼런스(예컨대 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 IgC 도메인, 또는 그의 특이적인 결합 단편을 포함한다. 일부 구체예에서, IgV 도메인을 함유하는 ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2에 제시된 아미노산 서열(SEQ ID NO: 4의 아미노산 잔기 19-129에 상응), 또는 이의 오솔로그를 포함한다.

[0289] DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSSLENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSL GFQEVLSVE (SEQ ID NO:2)

[0290] [0182] 일부 구체예에서, IgV 도메인을 함유하는 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:1에 제시된 넘버링을 참조로 적어도 아미노산 1-112, 1-113, 1-114, 1-115, 1-116, 1-117, 1-118, 1-119, 1-120, 1-121, 1-122를 함유한다. 일부 구체예에서, IgV 도메인을 함유하는 ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 3(SEQ ID NO: 4의 아미노산 잔기 19-140에 상응)에 제시된 아미노산 서열, 또는 이의 오솔로그를 포함한다. 일부 구체예에서, IgV 도메인은 ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드의 유일한 IgSF 도메인이다.

[0291] DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSSLENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSL GFQEVLSVEVTLHVAANFSV (SEQ ID NO: 3)

[0292] [0183] 일부 구체예에서, 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드의 IgV 도메인은 (i) SEQ ID NO: 2에 제시된 아미노산 서열, (ii) SEQ ID NO: 2에 대해 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 (iii) SEQ ID NO: 2에 제시된 아미노산 서열의 특이적 결합 단편 또는 (i) 또는 (ii)의 서열의 특이적 결합 단편을 함유할 수 있다. 일부 구체예에서, 레퍼런스(예컨대 비변형) IgV 도메인은 하나 이상의 ICOSL 동족 결합 파트너, 예컨대 CD28 및 ICOS 중 어느 하나 또는 양자 모두에 결합할 수 있다.

[0293] [0184] 일부 구체예에서, 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드의 IgV 도메인은 (i) SEQ ID NO: 3에 제시된 아미노산 서열, (ii) SEQ ID NO: 3에 대해 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 (iii) SEQ ID NO: 3에 제시된 아미노산 서열의 특이적 결합 단편 또는 (i) 또는 (ii)의 서열의 특이적 결합 단편을 함유할 수 있다. 일부 구체예에서, 레퍼런스(예컨대 비변형) IgV 도메인은 하나 이상의 ICOSL 동족 결합 파트너, 예컨대 CD28 및 ICOS 중 어느 하나 또는 양자 모두에 결합할 수 있다.

[0294] [0185] 일부 구체예에서, 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드는 ICOSL의 특이적 결합 단편, 예컨대 IgV 도메인의 특이적 결합 단편을 함유한다. 일부 구체예에서, 특이적 결합 단편은 CD28 및/또는 ICOS에 결합할 수 있다. 특이적 결합 단편은 적어도 50개 아미노산, 예컨대 적어도 60, 70, 80, 90, 100, 또는 110개 아미노산의 아미노산 길이를 가질 수 있다. 일부 구체예에서, IgV 도메인의 특이적 결합 단편은 SEQ ID NO: 4의 아미노산 19-129에 제시된 IgV 도메인의 길이의 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%인 아미노산 서열을 함유한다.

[0295] [0186] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 하나 이상의 친화성 변형된 IgSF 도메인을 포함하는 ECD 도메인, 절단형 ECD 도메인, 또는 그의 일부를 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인을 포함할 수 있고 여기서 IgV 도메인 또는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편은 하나 이상의 아미노산 변형(예컨대 치환)을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 및 IgC 도메인, 또는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편 및 IgC 도메인의 특이적 결합 단편을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 전장 IgV 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 전장 IgC 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgC 도메인의 특이적 결합 단편을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 전장 IgV 도메인 및 전장 IgC 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 전장 IgV 도메인 및 IgC 도메인의 특이적 결합 단편을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편인 및 전장 IgC 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편인 및 IgC 도메인의 특이적 결합 단편을 포함한다.

[0296] [0187] 이러한 임의의 구체예들에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드의 하나 이상의 아미노산 치환은 ICOSL 폴리펩

타이드 도메인들 중 임의의 어느 하나 이상에 위치할 수 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형 (예컨대, 치환)은 예컨대 SEQ ID NO: 1에 제시된 것과 같은, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드의 세포외 도메인(ECD)에 위치한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 IgV 도메인 또는 IgV 도메인의 특이적 결합 단편에 위치한다.

[0297] [0188] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 아미노산 변형(들), 예컨대 치환을 갖는다. 변형, 예컨대 치환은 IgV 도메인 또는 IgC 도메인에 있을 수 있다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편에 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 아미노산 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgC 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편에 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 아미노산 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드 또는 그의 특이적 결합 단편, 예컨대 SEQ ID NO: 1, 2 또는 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 85%, 86%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.

[0298] [0189] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:1의 넘버링을 참조로 상응하는 위치(들) 10, 11, 13, 16, 18, 20, 25, 27, 30, 33, 37, 42, 43, 47, 52, 54, 57, 61, 62, 67, 71, 72, 74, 77, 78, 75, 80, 84, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 107, 109, 110, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 126, 129, 130, 132, 133, 135, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 146, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 161, 166, 168, 172, 173, 175, 190, 192, 193, 194, 198, 201, 203, 207, 208, 210, 212, 217, 218, 220, 221, 224, 225, 또는 227의 레퍼런스 ICOSL 또는 그의 특이적 결합 단편에서 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:1의 넘버링을 참조로 상응하는 위치(들) 10, 11, 13, 16, 18, 20, 25, 26, 27, 30, 33, 37, 38, 42, 43, 47, 52, 54, 57, 61, 62, 67, 71, 72, 74, 75, 77, 78, 80, 84, 89, 90, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 107, 109, 110, 111, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 121, 122, 126, 129, 130, 132, 133, 135, 137, 138, 139, 140, 142, 143, 144, 146, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 161, 164, 166, 168, 172, 173, 175, 190, 192, 193, 194, 198, 201, 203, 207, 208, 210, 212, 217, 218, 220, 221, 224, 225, 또는 227의 레퍼런스 ICOSL 또는 그의 특이적 결합 단편에서 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 갖는다.

[0299] [0190] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20V, S25G, F27S, F27C, N30D, Y33del, Q37R, K42E, Y47H, T43A, N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52L, N52K, N52M, N52P, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, S54A, S54P, N57A, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, N57Y, R61S, R61C, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, D89G, E90A, K92R, F93L, H94E, H94D, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100A, Q100D, Q100E, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100R, Q100P, Q100S, Q100T, Q100V, L102R, G103E, V107A, V107I, S109G, S109N, V110D, V110N, V110A, E111del, T113E, H115R, H115Q, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122M, S126T, S126R, H129P, S130G,S132F, Q133H, E135K, F138L, T139S, C140D, C140del, S142F,I143V, I143T, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H,W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161P, L161M, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190S, T190A, S192G, V193M, N194D, C198R, N201S, L203P, L203F, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217V, I218T, I218N, E220G, R221G, R221I, I224V, T225A, N227K 또는 보존적 아미노산 변형, 예컨대 그의 치환으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20T, A20V, S25G, R26S, F27C, F27S, N30D, Y33del, Q37R, T38P, K42E, T43A, Y47H, N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52P, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, S54A, S54F, S54P, N57A, N57D, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, N57Y, R61C, R61S, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, D89G, E90A, K92R, F93L, H94D, H94E, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100A, Q100D, Q100E, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100P, Q100R, Q100S, Q100T, Q100V, L102R, G103E, V107A, V107I, S109G, S109N, V110A, V110D, V110N, E111del, T113E, H115Q, H115R, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122M, S126R,S126T, H129P, S130G, S132F, Q133H, E135K, T137A, F138L, T139S, C140del, C140D, S142F, I143T, I143V, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161M, L161P, Q164L, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T190S, S192G, V193A, V193M, N194D, C198R, N201S, L203F, L203P, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217G, D217V, I218N, I218T, E220G, R221G, R221I, R221K, I224V, T225A, T225S, N227K, 또는 그의 보존적 아미노산 치환으로부터

선택된 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 갖는다.

[0300] [0191] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20V, S25G, F27S, F27C, N30D, Y33del, Q37R, K42E, T43A, Y47H, N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52L, N52K, N52M, N52P, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, S54A, S54P, N57A, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, N57Y,R61S, R61C, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, D89G, E90A, K92R, F93L, H94E, H94D, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100A, Q100D, Q100E, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100R, Q100P, Q100S, Q100T, Q100V, G103E, L102R, V107A, V107I, S109G, S109N, V110D, V110N, V110A, E111del, T113E, H115R, H115Q, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122M, S126T, S126R, H129P, S130G,S132F, Q133H, E135K, F138L, T139S, C140D, C140del, S142F, I143V, I143T, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H,W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161P, L161M, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T190S, S192G, V193M, N194D, C198R, N201S, L203P, L203F, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217V, I218T, I218N, E220G, R221G, R221I, I224V, T225A, 또는 N227K 로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 갖는다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 M10V, M10I, V11E, S13G, E16V, S18R, A20T, A20V, S25G, R26S, F27C, F27S, N30D, Y33del, Q37R, T38P, K42E, T43A, Y47H, N52A, N52C, N52D, N52G, N52H, N52K, N52L, N52M, N52P, N52Q, N52R, N52S, N52T, N52V, N52Y, S54A, S54F, S54P, N57A, N57D, N57E, N57F, N57H, N57K, N57L, N57M, N57P, N57Q, N57S, N57T, N57V, N57W, N57Y, R61C, R61S, Y62F, L67P, A71T, G72R, L74Q, R75Q, D77G, F78L, L80P, N84Q, D89G, E90A, K92R, F93L, H94D, H94E, L96F, L96I, V97A, L98F, S99G, Q100A, Q100D, Q100E, Q100G, Q100K, Q100L, Q100M, Q100N, Q100P, Q100R, Q100S, Q100T, Q100V, L102R, G103E, V107A, V107I, S109G, S109N, V110A, V110D, V110N, E111del, T113E, H115Q, H115R, V116A, A117T, N119Q, F120I, F120S, S121G, V122A, V122M, S126R,S126T, H129P, S130G, S132F, Q133H, E135K, T137A, F138L, T139S, C140del, C140D, S142F, I143T, I143V, N144D, Y146C, V151A, Y152C, Y152H, W153R, I154F, N155H, N155Q, K156M, D158G, L161M, L161P, Q164L, L166Q, N168Q, F172S, L173S, M175T, T190A, T190S, S192G, V193A, V193M, N194D, C198R, N201S, L203F, L203P, N207Q, L208P, V210A, S212G, D217G, D217V, I218N, I218T, E220G, R221G, R221I, R221K, I224V, T225A, T225S, N227K, 또는 그의 보존적 아미노산 치환으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환을 갖는다.

[0301] [0192] 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환은 N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140D/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N52H/S99G, N57Y/Q100P, N52S/G103E, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, N52D/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52D/V151A, N52H/I143T, N52S/L80P, F120S/Y152H/N201S, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S, N52H/F78L/Q100R, N52H/N57Y/Q100R/V110D, N52H/N57Y/R75Q/Q100R/V110D, N52H/N57Y/Q100R, N52H/N57Y/L74Q/Q100R/V110D, N52H/Q100R, N52H/S121G, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/Q100P, N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y, N52S/F120S, N52S/V97A, N52S/G72R, N52S/A71T/A117T, N52S/E220G, Y47H/N52S/V107A/F120S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/V116A/L161M/F172S/S192G/C198R, F27S/N52H/N57Y/V110N, N52S/H94E/L96I/S109N/L166Q, S18R/N52S/F93L/I143V/R221G, A20T/N52D/Y146C/Q164L, V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52S/H94E/L96I/V122M, N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N, M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F, S25G/N30D/N52S/F120S/N227K, N30D/N52S/L67P/Q100K/D217G/R221K/T225S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/A117T/T190S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R, S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R, N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I, M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M,C198R, N52H/N57Y/R61C/Y62F/Q100R/V110N/F120S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R, N52S/H94E/L98F/Q100R, N52S/E90A, N30D/K42E/N52S, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N52S/N57D, N52H/C140del/T225A,

N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D, N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K, N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G, Q100R, F138L/L203P, N57Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, Q100R/F138L, L203P, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R, N52H/V122A/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E N52S/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52S/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115Q/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R /F172S/C198R, N52Q/N207Q, N168Q/N207Q, N52Q/N168Q, N84Q/N207Q, N155Q/N207Q, N119Q/N168Q, N119Q/N207Q, N119Q/N155Q, N52Q/N84Q, N52Q/N119Q, N84Q/N119Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N207Q, N84Q/N155Q/N168Q, N84Q/N168Q/N207Q, N84Q/N155H/N207Q, N155Q/N168Q/N207Q, N119Q/N155Q/N168Q, N119Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N207Q, N119Q/N155H/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N119Q/N155Q, N52H/N84Q/N119Q, N52H/N84Q, N52H/N84Q/N168Q, N52H/N84Q/N207Q, N52H/N84Q/N168Q/N207Q, N52Q/N84Q/N155Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N155Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N168Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q, N84Q/N155Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q/N207Q, N52A/N57F/Q100S, N52A/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/N57A/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52H/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57F, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52R/N57Y/Q100P, N52R/N57Y/Q100S, N52S/N57A/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52S/N57Y/Q100V, N52T/N57H/Q100S, N52T/N57H/Q100A, N52T/N57Y/Q100A, N52V/N57L/Q100A, N52H/N57Y/Q100K, N52K/N57Y/Q100R, N52L/N57H/Q100R, N52R/N57F/Q100N, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100R, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57H/Q100K, N52R/N57L/Q100S, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52R/N57Y/Q100R, N52C/N57E/Q100S, N52G/N57P/Q100D, N52G/N57V/Q100G, N52G/N57V, N52L/N57V, N52P/N57P, N52P/N57S/Q100G, N52S/N57L/Q100G, N52T/N57K/Q100P, N52V/N57T/Q100L, 또는 N57Q/Q100P이다.

[0302] [0193] 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 N52Y/N57Y/F138L/L203P, N52H/N57Y/Q100P, N52S/Y146C/Y152C, N52H/C198R, N52H/C140D/T225A, N52H/C198R/T225A, N52H/K92R, N52H/S99G, N57Y/Q100P, N52S/S130G/Y152C, N52S/Y152C, N52S/C198R, N52Y/N57Y/Y152C, N52Y/N57Y/H129P/C198R, N52H/L161P/C198R, N52S/T113E, N52D/S54P, N52K/L208P, N52S/Y152H, N52D/V151A, N52H/I143T, N52S/L80P, F120S/Y152H/N201S, N52S/R75Q/L203P, N52S/D158G, N52D/Q133H, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R, N52S/N57Y/H94D/L96F/L98F/Q100R/G103E/F120S, N52S/G103E, N52H/F78L/Q100R, N52H/N57Y/Q100R/V110D, N52H/N57Y/R75Q/Q100R/V110D, N52H/N57Y/Q100R, N52H/N57Y/L74Q/Q100R/V110D, N52H/Q100R, N52H/S121G, A20V/N52H/N57Y/Q100R/S109G, N52H/N57Y/R61S/Q100R/V110D/L173S, N52H/N57Y/Q100R/V122A, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/N57Y, N52S/F120S, N52S/V97A, N52S/G72R, N52S/A71T/A117T, N52S/E220G, Y47H/N52S/V107A/F120S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R, Q37R/N52H/N57Y/Q100R/V110N/S142F/C198R/D217V/R221G, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/V116A/L161M/F172S/S192G/C198R, F27S/N52H/N57Y/V110N, N52S/H94E/L96I/S109N/L166Q, S18R/N52S/F93L/I143V/R221G, A20T/N52D/Y146C/Q164L, V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L96I/L98F/N194D/V210A/I218T, N52S/H94E/L96I/V122M, N52H/N57Y/H94E/L96I/F120I/S126T/W153R/I218N, M10V/S18R/N30D/N52S/S126R/T139S/L203F, S25G/N30D/N52S/F120S/N227K, N30D/N52S/L67P/Q100K/D217G/R221K/T225S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/A117T/T190S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/F172S/C198R, S25G/F27C/N52H/N57Y/Q100R/V110D/E135K/L173S/C198R, N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I,

M10I/S13G/N52H/N57Y/D77G/V110A/H129P/I143V/F172S/V193M,C198R, N52H/N57Y/R61C/Y62F/Q100R/V110N/F120S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/N144D/F172S/C198R, N52S/H94E/L98F/Q100R, N52S/E90A, N30D/K42E/N52S, N52S/F120S/I143V/I224V, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/V110D/C198R/S212G, N52H/N57Y/Q100R/C198R, N52S/N194D, N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R, N52S/S54P, T38P/N52S/N57D, N52H/C140del/T225A, N52H/F78L/Q100R/C198R, N52H/N57Y/R75Q/Q100P/V110D, N52H/N57Y/L74Q/V110D/S192G, N52H/S121G/C198R, N52S/F120S/N227K, N52S/A71T/A117T/T190A/C198R, T43A/N52H/N57Y/L74Q/D89G/V110D/F172S, N52H/N57Y/Q100R/V110D/S132F/M175T, N52H/N57Y/Q100R/V107I/V110D/I154F/C198R/R221G, N52Q/N207Q, N168Q/N207Q, N52Q/N168Q, N84Q/N207Q, N155Q/N207Q, N119Q/N168Q, N119Q/N207Q, N119Q/N155Q, N52Q/N84Q, N52Q/N119Q, N84Q/N119Q, N52Q/N84Q/N168Q, N52Q/N84Q/N207Q, N84Q/N155Q/N168Q, N84Q/N168Q/N207Q, N84Q/N155H/N207Q, N155Q/N168Q/N207Q, N119Q N155Q/N168Q, N119Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N207Q, N119Q/N155H/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N119Q/N155Q, N52H/N84Q/N119Q, N52H/N84Q, N52H/N84Q/N168Q/N207Q, N52Q/N84Q/N155Q/N168Q, N52Q/N84Q/N119Q/N168Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q, N84Q/N155Q/N168Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N207Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q, N52Q/N84Q/N119Q/N155Q/N207Q, N84Q/N119Q/N155Q/N168Q/N207Q, F138L/L203P, N52Y/F138L/L203P, N57Y/Q100R/C198R, N57Y/F138L/L203P, Q100R/F138L, N52H/N57Y/Q100R/H115R/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/I143V/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/L102R/H115R/F172S/C198R, N52H/V122A/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/N194D, N52H/N57Y/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S/I224V, N52H/N57Y/Q100R/H115R/F172S, N52H/N57Y/Q100R/F172S, N52H/Q100R/H115R/I143T/F172S, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S, N52Y/N57Y/Q100P/F172S, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/C198R, E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/F172S/C198R, N52S/E90A/H115R, N30D/K42E N52S/H115R, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R/R221I, N30D/K42E/N52S/H115R/C198R, N30D/K42E/N52S/H115R/F172S/N194D, N52S/H115R/F120S/I143V/C198R, N52S/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100P/H115R, N52H/N57Y/Q100P/H115R/C198R, N52H/Q100R/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S, N52H/Q100R/F172S/C198R, N52H/Q100R/H115R/F172S/C198R, N52H/N57Y/Q100R/F172S/C198R, N52A/N57F/Q100S, N52A/N57H/Q100S, N52A/N57Y/Q100A, N52D/N57A/Q100A, N52D/Q100S, N52G/Q100A, N52H/Q100A, N52M/N57H/Q100S, N52M/N57W/Q100P, N52Q/N57F, N52Q/N57S/Q100A, N52R/N57L/Q100A, N52R/N57Y/Q100P, N52R/N57Y/Q100S, N52S/N57A/Q100A, N52S/N57H/Q100E, N52S/N57L/Q100S, N52S/N57M/Q100S, N52S/N57Y/Q100S, N52S/N57Y/Q100M, N52S/N57Y/Q100V, N52T/N57H/Q100S, N52T/N57H/Q100A, N52T/N57Y/Q100A, N52V/N57L/Q100A, N52H/N57Y/Q100K, N52K/N57Y/Q100R, N52L/N57H/Q100R, N52R/N57F/Q100N, N52R/N57F/Q100P, N52R/N57F/Q100R, N52R/N57F/Q100T, N52R/N57H/Q100K, N52R/N57L/Q100S, N52R/N57W/Q100K, N52R/N57W, N52R/N57Y/Q100R, N52C/N57E/Q100S, N52G/N57P/Q100D, N52G/N57V/Q100G, N52G/N57V, N52L/N57V, N52P/N57P, N52P/N57S/Q100G, N52S/N57L/Q100G, N52T/N57K/Q100P, N52V/N57T/Q100L, N57Q/Q100P, S54F/V193A 또는 R26S/N52H/N57Y/V110D/T137A/C198R로부터 선택된다.

[0303] [0194] 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형, 예를 들어, 치환은 SEQ ID NO:1의 넘버링을 참조로 N52H/N57Y/Q100R이다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환은, SEQ ID NO:1의 넘버링을 참조로 N52L/N57H/Q100R이다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환은 SEQ ID NO:1의 넘버링을 참조로, N52H/Q100R이다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 치환은, SEQ ID NO:1의 넘버링을 참조 N52D이다.

[0304] [0195] 일반적으로, 폴리펩타이드들의 다양한 각 속성들을 개별적으로 개시한다 (예컨대, CD28 및/또는 ICOS에 대한 ICOSL의 친화성, 폴리펩타이드 사슬 당 변이 갯수, 연결된 폴리펩타이드 사슬 갯수, 변이체 ICOSL 당 아미노산 변경의 갯수 및 성질, 등). 그러나, 통상의 기술자에게는, 임의의 특정한 폴리펩타이드가 이들 독립적인 속성들의 조합을 포함할 수 있다는 것이 명확히 이해될 것이다. IgSF 도메인의 도메인 조직을 설명하는데 사용된 SEQ ID NO로서 제시된 특정 서열에 대한 것을 비롯하여 아미노산을 참조로 한 것은 어디까지나 설명 목적을 위한 것일 뿐 제공된 구체예 범위로 본 발명이 한정되는 것은 아닌 것으로 이해되어야 한다. 폴리펩타이드 및 그의 도메인 설명은 상동성 분석 및 유사 분자의 정렬에 기초하여 이론적으로 유도된 것이다. 그러므로, 정확한

위치는 달라질 수 있고, 각 단백질에 대해 반드시 동일할 필요는 없다. 따라서, 특이적 IgSF 도메인, 예컨대 특이적 IgV 도메인 또는 IgC 도메인은 수 개의 아미노산 (예컨대 1, 2, 3 또는 4개)만큼 짧거나 길 수 있다.

[0305] [0196] 레퍼런스 (예컨대 비변형) 또는 야생형 ICOSL 서열이 반드시 본 명세서에 개시된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 제조를 위한 출발 조성물로서 사용될 필요는 없다. 그러므로, "변형", 예컨대 "치환"이라는 용어의 사용은 제공된 구체에가 변이체 ICOSL 폴리펩타이드의 특정 제조방법으로 한정됨을 시사하는 것은 아니다. 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 예를 들어, 드 노보 펩타이드 합성에 의해 만들어질 수 있고 따라서 그 변형, 예컨대 치환을 인코딩하기 위해 코던을 변경시키는 의미의 변형 예컨대 "치환"이 반드시 요구되지 않는다. 이 원리는 아미노산 잔기의 "부가" 및 "결실" 등의 용어에도 적용되며 마찬가지로 특정 제조 방법을 시사하는 것이 아니다. 변이체 ICOSL 폴리펩타이드가 설계 또는 생성되는 수단은 어떤 특정한 방법으로 한정되지 않는다. 그러나 일부 구체예에서, 야생형 또는 비변이체 ICOSL 인코딩 핵산은 야생형 또는 비변이체 ICOSL 유전자 물질로부터 돌연변이되어 소망되는 특이적 결합 친화성 및/또는 IFN-감마 발현 또는 기타 활성의 조절에 대해 스크리닝된다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 임의의 수의 공개적으로 이용 가능한 데이터베이스에서 이용 가능한 단백질 또는 핵산 서열을 이용하여 새롭게 합성된 다음 스크리닝된다. National Center for Biotechnology Information은 그러한 정보를 제공하며, 그의 웹 사이트는 이전에 논의된 UniProtKB 데이터베이스와 마찬가지로 인터넷을 통해 공개적으로 액세스할 수 있다.

[0306] [0197] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 표 2에 열거된 돌연변이를 포함한다. 표 2는 또한 야생형 ICOSL (즉, 레퍼런스(예컨대 비변형)) 또는 예시적인 변이체 ICOSL 폴리펩타이드의 세포외 도메인(ECD) 또는 IgV 도메인에 대한 SEQ ID NO를 참조로 예시적인 서열을 제공한다. 나타난 바와 같이, 주어진 도메인에 상응하는 정확한 유전자좌 또는 잔기는, 도메인을 확인하거나 분류하는 데 사용되는 방법에 따라 달라질 수 있다. 또한, 일부 경우에, 주어진 도메인(예를 들어, IgV)의 인접한 N- 및/또는 C-말단 아미노산 역시도, 발현될 때 도메인의 적절한 폴딩을 보장하기 위해 변이체 IgSF 폴리펩타이드의 서열에 포함될 수 있다. 따라서, 표 2의 SEQ ID NOs의 예시는 제한적인 것으로 해석되어서는 아니된다. 예를 들어, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드의 특정 도메인, 예를 들어 ECD 도메인은, 각각의 SEQ ID NO.에 제시된 아미노산 서열에 비해 1-10개, 예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개 아미노산 만큼 더 길거나 다 짧을 수 있다.

[0307]

표 2: 예시적인 변이체 CD80 폴리펩타이드		
돌연변이(들)	돌연변이(들)	돌연변이(들)
야생형	1	2, 3
N52H/N57Y/Q100R	34	35, 36

[0308] [0198] 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 본원에 기재된 아미노산 치환(돌연변이) 중 임의의 것을 함유할 수 있다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 표 2에 열거된 돌연변이 중 임의의 것을 포함한다. 일부 예에서, 돌연변이는 SEQ ID NO: 1에 제시된 아미노산 서열을 함유하는 레퍼런스 ICOSL, SEQ ID NOs: 2 또는 3에 제시된 ICOSL의 IgV 도메인, 또는 SEQ ID NOs: 5-33 중 어느 하나에 제시된 아미노산의 서열을 포함하는 절단 및/또는 변형된 레퍼런스 ICOS에서 만들어진다.

[0309] [0199] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 34에 제시된 세포외 도메인(ECD) 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:34에 제시된 세포외 도메인 (ECD) 서열에 대해 적어도 90% 동일성, 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 예컨대 적어도 96% 동일성, 97% 동일성, 98% 동일성, 또는 99% 동일성을 나타내고, 예컨대 N52H/N57Y/Q100R과 같이, 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL에는 존재하지 않는 아미노산 변형(들), 예컨대 치환(들)을 함유하는 폴리펩타이드 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 34에 제시된 세포외 도메인(ECD) 서열의 특이적 결합 단편을 포함하고 예컨대 N52H/N57Y/Q100R과 같이, 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL에는 존재하지 않는 아미노산 변형(들), 예컨대 치환(들)을 함유한다.

[0310] [0200] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 35에 제시된 IgV 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:35에 제시된 IgV 서열에 대해 적어도 90% 동일성, 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 예컨대 적어도 96% 동일성, 97% 동일성, 98% 동일성, 또는 99% 동일성을 나타내고, 예컨대 N52H/N57Y/Q100R과 같이, 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL에는 존재하지 않는 아미노산 변형(들), 예컨대 치환(들)을 함유하는 폴리펩타이드 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 35에 제시된 IgV 서열의 특이적 결합 단편을 포함하고 예컨대 N52H/N57Y/Q100R과 같이, 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL에

는 존재하지 않는 아미노산 치환(들)을 함유한다.

[0311] [0201] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 36에 제시된 IgV 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:36에 제시된 IgV 서열에 대해 적어도 90% 동일성, 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 예컨대 적어도 96% 동일성, 97% 동일성, 98% 동일성, 또는 99% 동일성을 나타내고, 예컨대 N52H/N57Y/Q100R과 같이, 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL에는 존재하지 않는 아미노산 변형(들), 예컨대 치환(들)을 함유하는 폴리펩타이드 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 36에 제시된 IgV 서열의 특이적 결합 단편을 포함하고 예컨대 N52H/N57Y/Q100R과 같이, 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL에는 존재하지 않는 아미노산 치환(들)을 함유한다.

[0312] [0202] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드에 비해, 예컨대 SEQ ID NO: 1, 2, 또는 3에 제시된 서열을 포함하는 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드에 비해, CD28의 엑토도메인에 대해 증가된 친화성을 나타낸다. 일부 구체예에서, ICOSL 폴리펩타이드는 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL에 비해, 예컨대 예컨대 SEQ ID NO: 1, 2, 또는 3에 제시된 서열을 포함하는 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드에 비해, ICOS의 엑토도메인에 대해 증가된 친화성을 나타낸다. 일부 구체예에서, ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1, 2, 또는 3에 제시된 서열을 포함하는.레퍼런스 (예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 폴리펩타이드에 비해, CD28의 엑토도메인 및 ICOS의 엑토도메인에 대해 증가된 친화성을 나타낸다.

[0313] **B. 멀티머화 도메인**

[0314] [0203] vIgD를 함유하는 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하는 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 융합 단백질은 가용성 단백질로서 다양한 방식으로 포맷될 수 있다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인을 함유한다. 일부 경우에서 변이체 ICOSL 융합 단백질은 동족 결합 파트너, 예컨대 CD28 및/또는 ICOSL의 활성을 길항하거나 차단할 수 있다. 일부 구체예에서, CD28 및/또는 ICOSL의 길항작용은 염증 또는 자가면역을 치료하는 데 유용할 수 있다. 당업자는 세포 표면 단백질이 전형적으로 세포내, 막관통 및 세포외 도메인(ECD)을 가진다는 것과, 이러한 단백질의 가용성 형태가 세포외 도메인 또는 이의 면역학적으로 활성인 서브서열을 이용하여 제조될 수 있음을 이해할 것이다. 그러므로, 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 함유하는 면역조절 단백질은 막관통 도메인 또는 막관통 도메인의 일부가 결여되어 있다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL을 함유하는 면역조절 단백질은 세포내(세포질) 도메인 또는 세포내 도메인의 일부가 결여되어 있다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 함유하는 면역조절 단백질은 ECD 도메인 또는 vIgD 부분 또는 IgV 도메인 및/또는 IgC(예컨대, IgC2) 도메인 또는 도메인들 또는 아미노산 변형(들)을 함유하는 이의 특이적 결합 단편을 함유하는 이의 일부를 함유하는 vIgD 부분만을 함유한다.

[0315] [0204] 일부 구체예에서, 컨쥬게이트는 직접 또는 링커를 통해 또 다른 단백질 또는 폴리펩타이드 모이어티에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드의 융합 단백질이다. 일부 구체예에서 융합 단백질은 ICOSL-Fc 변이체 융합체이며, 여기서, 전 술한 변이체 폴리펩타이드 2개 이상이 Fc에 부착될 수 있다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 도 1에 제시된 가용성 단백질의 구조를 갖는다.

[0316] [0205] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL을 포함하는 융합 단백질은 본 발명의 하나 이상의 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서 본 발명의 폴리펩타이드는 정확히 1, 2, 3, 4, 5개의 변이체 ICOSL 서열을 포함할 것이다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 서열 중 적어도 두 개는 동일한 변이체 ICOSL 서열이다.

[0317] [0206] 일부 구체예에서, 제공된 면역조절 폴리펩타이드는 ICOSL의 2 이상의 vIgD 서열을 갖는다. 폴리펩타이드 사슬 내의 다수의 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 서로 동일하거나(즉, 동일한 종) 동일하지 않은(즉, 다른 종) 변이체 ICOSL 서열일 수 있다. 단일 폴리펩타이드 사슬의 구체예에 더해, 일부 구체예에서 본 발명의 폴리펩타이드 2, 3, 4개 또는 그 이상은 서로 공유 또는 비공유적으로 부착될 수 있다. 따라서, 모노머, 다이머 및 고차(예를 들어, 3, 4, 5 이상) 멀티머 단백질이 본원에 제공된다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 본 발명의 정확히 2개의 폴리펩타이드는 서로 공유적으로 또는 비공유적으로 부착되어 다이머를 형성할 수 있다. 일부 구체예에서, 부착은 사슬간 시스테인 다이설파이드 결합을 통해 이루어진다. 본 발명의 2 이상의 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 동일한 종 또는 실질적으로 동일한 종의 폴리펩타이드 (예를 들어, 호모다이머) 또는 동일하지 않은 종의 폴리펩타이드 (예를 들어, 헤테로다이머)일 수 있다. 전술한 바와 같이, 본 발명의 복수의 연결된 폴리펩타이드를 갖는 조성물은, 각 폴리펩타이드 사슬에 본 발명의 동일하거나 동일하지 않은 하나 이상의 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 가질 수 있다.

[0318] [0207] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL을 포함하는 면역조절 단백질은 다가, 예컨대 2가이다. 관련하여, 면역조절 단백질은 직접 또는 링커를 통해 간접적으로, 멀티머화 도메인에 연결된다. 일부 측면에서, 멀티머화 도메인은 분자의 반감기를 증가시킨다.

[0319] [0208] 2개 이상의 변이체 ICOSL 폴리펩타이드의 상호작용은 그들 자신이 안정한 구조를 형성하기 위해 상호작용할 수 있는 임의의 모이어티 또는 다른 폴리펩타이드에 대한 직접 또는 간접적인 그들의 연결에 의해 촉진될 수 있다. 예를 들어, 별개의 인코딩된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 사슬은 멀티머화에 의해 연결될 수 있으며, 이에 의해 폴리펩타이드의 멀티머화는 멀티머화 도메인에 의해 매개된다. 일반적으로, 멀티머화 도메인은 제1 변이체 ICOSL 폴리펩타이드과 제2 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 간에 안정한 단백질-단백질 상호작용을 형성시킨다. 별개의 변이체 ICOSL 폴리펩타이드들을 공동-발현시킴으로써 호모- 또는 헤테로멀티머 폴리펩타이드를 생성시킬 수 있다. 제1 및 제2 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 서로 동일 또는 상이할 수 있다.

[0320] [0209] 일부 구체예에서, 멀티머화 도메인은 안정한 단백질-단백질 상호작용을 형성할 수 있는 것이면 어느 것이든 무방하다. 멀티머화 도메인은 면역글로불린 서열 (예를 들어, Fc 도메인; 국제특허공개번호 WO 93/10151 및 WO 2005/063816 미국; 미국 공개 번호 2006/0024298; 미국 특허번호 5,457,035 참조); 류신 지퍼 (예컨대 핵 형질전환 단백질 fos 및 jun 또는 프로토-종양 유전자 c-myc 또는 질소의 일반 제어 (GCN4)로부터)(ee 예컨대, Busch 및 Sassone-Corsi (1990) Trends Genetics, 6:36-40; Gentz et al., (1989) Science, 243:1695-1699); 소수성 영역; 친수성 영역; 또는 호모멀티머 또는 헤테로멀티머의 키메라 분자들 간에 분자간 다이설파이드 결합을 형성하는 유리 티올을 통해 상호작용할 수 있다. 이에 더해, 멀티머화 도메인은 예를 들어, 미국특허 No. 5,731,168; 국제특허공개 Nos. WO 98/50431 및 WO 2005/063816; Ridgway et al. (1996) Protein Engineering, 9:617-621에 설명된 바와 같은, 구멍(hole)을 포함하는 아미노산 서열에 상보적인 돌기(protuberance)를 포함하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이러한 멀티머화 영역은 입체 상호작용이 안정한 상호작용을 촉진할 뿐만 아니라 키메라 모노머의 혼합물로부터 호모다이머에 비해 헤테로다이머의 형성을 더 촉진하도록 조작될 수 있다. 일반적으로, 돌기는 제1 폴리펩타이드의 인터페이스으로부터 작은 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체함으로써 만들어진다. 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 것 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써 돌기와 동일하거나 유사한 크기의 보상 공동을 제2 폴리펩타이드의 인터페이스 상에 선택적으로 생성한다. 예시적인 멀티머화 도메인에 대해 이하에 설명한다.

[0321] [0210] 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 키메라 폴리펩타이드를 형성하기 위해 임의의 위치에, 그러나 전형적으로는 이의 N- 또는 C- 말단을 통해 멀티머화 도메인의 N- 또는 C- 말단에 결합될 수 있다. 결합은 직접적이거나 링커를 통한 간접적인 것일 수 있다. 또한, 키메라 폴리펩타이드는 융합 단백질 일 수 있거나, 또는 공유 또는 비공유 상호작용을 통한 것과 같은 화학적 결합에 의해 형성될 수 있다. 예를 들어, 멀티머화 도메인을 함유하는 키메라 폴리펩타이드를 제조할 때, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드의 전부 또는 일부를 인코딩하는 핵산은 멀티머화 도메인 서열을 인코딩하는 핵산에 직접적으로 또는 간접적으로 또는 임의로 링커 도메인을 통해 작동 가능하게 연결될 수 있다. 작제물은 변이체 ICOSL 폴리펩타이드의 N-말단이 멀티머화 도메인의 N- 또는 C-말단에 결합된 키메라 단백질을 인코딩할 수 있다.

[0322] [0211] 폴리펩타이드 멀티머는 2 개의 동일하거나 상이한 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 직접 또는 간접적으로 멀티머화 도메인에 직접 또는 간접적으로 연결함으로써 생성된 2 개의 키메라 단백질을 함유한다. 일부 예에서, 멀티머화 도메인이 폴리펩타이드 인 경우, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 및 멀티머화 도메인을 인코딩하는 유전자 융합이 적절한 발현 벡터에 삽입된다. 생성된 키메라 또는 융합 단백질은 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포에서 발현될 수 있고, 멀티머로 조립될 수 있으며, 여기서 멀티머화 도메인은 상호작용하여 다가 폴리펩타이드를 형성한다. 변이체 ICOSL 폴리펩타이드에 대한 멀티머화 도메인의 화학적 결합은 이종이기능성 링커를 사용하여 수행될 수 있다.

[0323] [0212] 융합 단백질과 같은 생성된 키메라 폴리펩타이드 및 이로부터 생성된 멀티머는 임의의 적합한 방법, 예를 들어 단백질 A 또는 단백질 G 컬럼에 대한 친 화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 상이한 폴리펩타이드를 인코딩하는 2 개의 핵산 분자가 세포로 형질전환되는 경우, 호모다이머 및 헤테로다이머체의 형성이 일어날 것이다. 헤테로다이머 형성이 호모다이머 형성보다 우선하도록 발현 조건을 조정할 수 있다.

[0324] [0213] 일부 구체예에서, 면역조절 단백질은 면역글로불린의 Fc 영역에 부착된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드(ICOSL vIgD-Fc 융합체라고도 불리는 "ICOSL-Fc 변이체 융합체"와 같은 "면역조절 Fc 융합체"를 생성함)를 포함한다. 일부 구체예에서, ICOSL-Fc 변이체 융합체는 또한 하나 이상의 부가적인 IgSF 도메인(들), 예컨대 ICOSL의 vIgD에 연결된 하나 이상의 부가적인 vIgD 역시도 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드

또는 부가적인 IgSF 도메인의 부착은 Fc의 N-말단에서 일어난다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 또는 부가적인 IgSF 도메인의 부착은 Fc의 C-말단에서 일어난다. 일부 구체예에서, 2개 이상의 ICOSL 또는 부가적인 IgSF 도메인 변이체 폴리펩타이드 (동일하거나 상이함)는 N-말단 및 C-말단에 독립적으로 부착된다.

[0325] [0214] 일부 구체예에서, Fc는 쥐 또는 인간 Fc이다. 일부 구체예에서, Fc는 포유동물 또는 인간 IgG1, lgG2, lgG3, 또는 lgG4 Fc 영역이다. 일부 구체예에서, Fc는 IgG1, 예컨대 인간 IgG1으로부터 유래된다. 일부 구체예에서, Fc는 SEQ ID NO: 37에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 37에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0326] [0215] 일부 구체예에서, Fc 영역은 그의 정상적인 기능 중 하나 이상을 변경(예컨대 감소)시키기 위해 하나 이상의 변형을 함유한다. 일반적으로, Fc 영역은 면역글로불린의 주요 기능인, 항원-결합능에 더해, 보체-의존성 세포독성 (CDC) 및 항체-의존성 세포 세포독성 (ADCC)과 같은 이펙터 기능에 책임이 있다. 또한, Fc 영역 내에 존재하는 FcRn 서열은 생체내에서 FcRn 수용체에 대한 컨쥬게이션에 의해 생체내 반감기를 증가시킴으로써 혈청 내 IgG 수준을 조절하는 역할을 한다. 일부 구체예에서, 이러한 기능들은 제공된 Fc 융합 단백질들과의 사용을 위해 Fc에서 감소 또는 변경될 수 있다.

[0327] [0216] 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 본 발명에서 제공된 ICOSL-Fc 변이체 융합체의 Fc 영역에 도입되어, Fc 영역 변이체가 생성될 수 있다. 일부 구체예에서, Fc 영역 변이체는 감소된 이펙터 기능을 갖는다. 이펙터 기능을 변경시킬 수 있는 Fc 서열에 대한 변화 또는 돌연변이에는 많은 예가 있다. 예를 들어, WO 2000/42072, WO2006/019447, WO2012/125850, WO2015/107026, US2016/0017041 및 Shields 외 *J Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)에는 FcR에 대해 증강 또는 저감된 결합을 나타내는 예시적인 Fc 변이체들이 설명되어 있다. 이들 문헌의 내용은 본 명세서에 상세히 참조 병합된다.

[0328] [0217] 일부 구체예에서, 제공된 변이체 ICOSL-Fc 융합체는 감소된 이펙터 기능 (불활성 Fc 또는 무이펙터 (effectorless) Fc라고도 칭함)을 나타내는 Fc 영역을 포함하는데, 이로 인해, 생체내에서의 ICOSL-Fc 변이체 융합체의 반감기가 중요하면서도 특정 이펙터 기능(예컨대 CDC 및 ADCC)은 불필요하거나 해롭기까지 한 적용예에 있어서 바람직한 후보가 된다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 분석을 수행할 수 있다. ICOSL-Fc 변이체 융합체가 FcγR 결합능을 결여하지만(따라서 ADCC 활성을 결여할 가능성이 높음), FcRn 결합능은 보유한다는 것을 확인하기 위해 예컨대, Fc 수용체 (FcR) 결합 분석을 수행할 수 있다. ADCC를 매개하기 위한 일차 세포, NK 세포는 FcγRIII만을 발현하는 반면, 단구(monocytes)는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII를 발현한다. 조혈세포 상에서의 FcR 발현이 문헌[Ravetch 및 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)의 464 페이지 표 3]에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 분석법의 비제한적인 예가 미국특허 No. 5,500,362 (*예컨대* Hellstrom, I. 외 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986) 참조) 및 Hellstrom, I 외, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 미국특허 No. 5,821,337 (Bruggemann, M. 외, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)참조)에 설명되어 있다. 별법으로 비방사능 분석법도 사용가능하다 (예를 들어, 유세포 분석을 위한 ACTI™ 비방사능 세포독성 분석법 (CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif.; 및 CytoTox 96™ 비방사능 세포독성 분석법 (Promega, Madison, Wis.). 이러한 분석을 위한 유용한 이펙터 세포들에는 말초혈액 단핵구 세포(PBMC) 및 내추럴 킬러 (NK) 세포가 포함된다. 별법으로 또는 이에 더해, 관심 분자의 ADCC 활성은 예컨대 문헌 [Clynes 외*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998)]에 설명된 바와 같은 동물 모델에서 생체내 평가될 수도 있다. ICOSL-Fc 변이체 융합체가 C1q에 결합하지 못함으로 해서 CDC 활성을 결여한다는 것을 확인하기 위해 C1q 결합 분석법 역시도 수행가능하다. 예컨대, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402에서 C1q 및 C3c 결합 ELISA 부분 참조. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 분석을 수행할 수도 있다 (예를 들어, Gazzano-Santoro 외, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M. S. 외, *Blood* 101:1045-1052 (2003); 및 Cragg, M. S. 및 M. J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004) 참조). FcRn 결합 및 생체내 소거/반감기 산정 역시도 기술분야의 공지 방법에 의해 수행가능하다 (*예컨대*, Petkova, S. B. 외, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006) 참조).

[0329] [0218] 이펙터 기능이 감소된 ICOSL-Fc 변이체 융합체들에는 EU 넘버링에 의한 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329들 중 하나 이상이 치환되어 있는 것들이 포함된다 (미국특허 No. 6,737,056). 이러한 Fc 돌연변이체에는 잔기 265 및 297가 알라닌으로 치환된 소위 "DANA" Fc 돌연변이체를 비롯하여, EU 넘버링에 의한 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2 이상이 치환된 Fc 돌연변이체가 포함된다 (미국특허 No. 7,332,581).

[0330] [0219] 일부 구체예에서, ICOSL-Fv 변이체 융합체의 Fc 영역은 위치 234, 235, 236, 237, 238, 239, 270, 297, 298, 325, 및 329 (EU 넘버링에 따름) 중 1 이상의 임의의 아미노산이 고유 Fc 영역에 비해 상이한 아미노산으로 치환되어 있는 Fc 영역을 갖는다. Fc 영역의 이러한 변경은 전술한 변경에 국한되지 않으며, 예를 들어 Current Opinion in Biotechnology (2009) 20 (6), 685-691에 설명된, 탈글리코실화된 사슬 (N297A 및 N297Q), IgG1-N297G, IgG1-L234A/L235A, IgG1-L234A/L235E/G237A, IgG1-A325A/A330S/P331S, IgG1-C226S/C229S, IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A, IgG1-E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, IgG1-L234F/L235E/P331S, IgG1-S267E/L328F, IgG2-V234A/G237A, IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S, IgG4-L235A/G237A/E318A, 및 IgG4-L236E 등의 변경; WO 2008/092117에 설명되어 있는 G236R/L328R, L235G/G236R, N325A/L328R, 및 N325LL328R 등의 변경; 위치 233, 234, 235, 및 237 (EU 넘버링에 의함)에서의 아미노산 삽입; 및 WO 2000/042072에 설명된 위치에서의 변경 등이 포함된다.

[0331] [0220] FcRs에 대해 증강 또는 저감된 결합능을 갖는 어떤 Fc 변이체들이 설명된다 (*예컨대*, 미국특허 No. 6,737,056; WO 2004/056312, WO2006/019447 및 Shields 외, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001) 참조.)

[0332] [0221] 일부 구체예에서, 반감기를 증가시키거나 및/또는 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 결합을 향상시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변이체 Fc 영역을 포함하는 ICOSL-Fc 변이체 융합체가 제공된다. 반감기가 증가되고 FcRndp 대해 개선된 결합을 나타내는 항체들이 US2005/0014934A1 (Hinton 외) 또는 WO2015107026에 설명되어 있다. 이 항체들은 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 향상시키는 치환이 Fc 영역에 하나 이상 포함되어 있다. 이러한 Fc 변이체에는 Fc 영역 잔기들: EU 넘버링에 의할 때 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434 중 하나 이상이 치환된, 예컨대 Fc 영역 잔기 434가 치환된 것들이 포함된다 (미국특허 No. 7,371,826).

[0333] [0222] 일부 구체예에서, ICOSL-Fc 변이체 융합체의 Fc 영역은 EU 넘버링 기준으로 하나 이상의 아미노산 치환 E356D 및 M358L을 포함한다. 일부 구체예에서, ICOSL-Fc 변이체 융합체의 Fc 영역은 EU 넘버링 기준으로 하나 이상의 아미노산 치환 C220S, C226S 및/또는 C229S를 포함한다. 일부 구체예에서, ICOSL 변이체 융합체의 Fc 영역은 하나 이상의 아미노산 치환 R292C 및 V302C을 포함한다. 그 밖의 Fc 영역 변이체에 대하여는 Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); 미국특허 No. 5,648,260; 미국특허 No. 5,624,821; 및 WO 94/29351을 참조할 것.

[0334] [0223] 일부 구체예에서, 야생형 IgG1 Fc는 EU 넘버링에 의해 위치 356 및 358에 잔기 Glu (E) 및 Met (M)을 함유하는 알로타입(allotype)을 갖는 SEQ ID NO: 37에 제시된 Fc일 수 있다(예컨대, f 알로타입). 다른 구체 예에서, 야생형 IgG1 Fc는 예컨대 SEQ ID NO: 38에 제시된 바와 같은, 위치 356 및 358에 Asp (D) 및 Leu (L)를 함유하는 잔기와 같은 인간 G1m1 알로타입의 아미노산을 함유한다. 따라서, 일부 경우에서, 본원에 제공된 Fc는 알로타입 G1 m1 (예를 들어, 알파 알로타입)의 잔기를 재구성하기 위해 아미노산 치환 E356D 및 M358L을 함유할 수 있다. 일부 측면에서, 야생형 Fc는 하나 이상의 아미노산 치환에 의해 변형되어 이펙터 활성을 감소시키거나 Fc를 Fc 이펙터 기능에 대해 불활성으로 만든다. 예시적인 무이펙터 또는 불활성 돌연변이는 본원에 기재된 것들을 포함한다. 본원에 제공된 작제물의 Fc에 포함될 수 있는 무이펙터 돌연변이 중에는 EU 넘버링 기준으로 L234A, L235E 및 G237A가 있다. 일부 구체예에서, 야생형 Fc는 하나 이상의 시스테인 잔기를 제거함으로써, 예컨대 시스테인 잔기를 EU 넘버링 기준으로 위치 220에서 세린 잔기로 대체함으로써 (C220S) 추가로 변형된다. 감소된 이펙터 기능을 갖는 예시적인 불활성 Fc 영역은 각각 SEQ ID NO: 37 또는 SEQ ID NO: 38에 제시된 알로타입에 기초한, SEQ ID NO: 39 또는 40 및 SEQ ID NO: 41 또는 42에 제시되어있다. 일부 구체예에서, 본원에 제공된 작제물에 사용된 Fc 영역은 C-말단 리신 잔기를 추가로 결여할 수 있다.

[0335] [0224] 일부 구체예에서, 예컨대 미국특허 No. 6,194,551, WO 99/51642, 및 Idusogie 외, *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)에 설명된 바와 같이, 감소된 C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC)을 결과시키는 변경이 Fc 영역에서 만들어진다.

[0336] [0225] 일부 구체예에서, 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하되, IgG1, 예컨대 인간 IgG1으로부터 유래된 변이체 Fc 영역을 포함하는, ICOSL-Fc 변이체 융합체가 제공된다. 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역은 SEQ ID NO: 37에 제시된 아미노산 서열로부터 유래된다. 일부 구체예에서, Fc는 감소된 이펙터 기능을 나타낸다. 일부 구체예에서, Fc는 SEQ ID NO: 37의 넘버링에 의할 경우 N82G(EU 넘버링의 N297G에 대응)인 적어도 하나의 아미노산 치환을 함유한다. 일부 구체예에서, Fc는 SEQ ID NO: 37의 넘버링에 의할 경우 R77C 또는 V87C(EU 넘버링의 R292C 또는 V302C에 대응)인 적어도 하나의 아미노산 치환을 함유한다. 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역은 SEQ ID NO: 37의 넘버링에 의할 경우 C5S 아미노산 변형(EU 넘버링의 C220S에 대응)을 함유한다. 예를 들어, 일부

구체예에서, 변이체 Fc 영역은 다음의 아미노산 변형을 포함한다: EU 넘버링에 의해 V297G 및 다음 아미노산 변형 중 하나 이상 C220S, R292C 또는 V302C (SEQ ID NO:37을 참조로 N82G 및 C5S, R77C 또는 V87C 중 하나 이상의 아미노산 변형에 대응)을 포함하며, 예컨대 Fc 영역은 SEQ ID NO:43에 제시된 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역은 C220S, L234A, L235E 또는 G237A 중 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하며, 예컨대 Fc 영역은 SEQ ID NO:40에 제시된 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 Fc 영역은 C220S, E233P, L234V, L235A, G236del 또는 S267K 중 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하며, 예컨대 Fc 영역은SEQ ID NO:44에 제시된 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 변이체 Fc는 C220S, L234A, L235E, G237A, E356D 또는 M358L 중 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하며, 예컨대 Fc 영역은 SEQ ID NO:41에 제시된 서열을 포함한다.

[0337] [0226] 일부 구체예에서, Fc 영역은 SEQ ID NO: 45에 제시된 레퍼런스 (예컨대, 비변형) 또는 야생형 Fc의 위치 232에 대응하는 C-말단 리신을 결여한다(EU 넘버링에 의해 K447del에 대응). 일부 구체예에서, C-말단 리신은 생합성이 일어나는 동안 차등적으로 제거될 수 있기 때문에, C-말단 리신 잔기의 제거는 단백질이 세포에서 발현될 때 보다 균질한 생성물을 결과시킨다. 일부 측면에서, 이러한 Fc 영역은 하나 이상의 부가적인 변형, 예컨대 본원에서 설명된 바와 같인 아미노산 치환을 부가적으로 포함할 수 있다. 이러한 Fc 영역의 예가 SEQ ID NO: 46, 39, 47, 또는 42에 제시되어 있다.

[0338] [0227] 일부 구체예에서, SEQ ID NOS: 41, 43, 40, 44, 48, 46, 39, 47 또는 42 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NOS: 41, 43, 40, 44, 48, 46, 39, 47 또는 42 중 어느 하나에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 변이체 Fc를 포함하는 ICOSL-Fc 변이체 융합체가 제공된다. 일부 구체에에서, Fc는 감소된 이펙터 기능을 나타낸다.

[0339] [0228] 일부 구체예에서, Fc는 IgG2, 예컨대 인간 IgG2로부터 유래한다. 일부 구체예에서, Fc는 SEQ ID NO: 49에 제시된 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 49에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0340] [0229] 일부 구체예에서, Fc는 SEQ ID NO: 50에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 50에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, IgG4 Fc는 인간 IgG4의 CH3 도메인이 인간 IgG1의 CH3 도메인으로 치환되고 억제된 응집체 형성을 나타내는 안정화된 Fc, 인간 IgG4의 CH3 및 CH2 도메인이 인간 IgG1의 CH3 및 CH2 도메인으로 각각 치환되어 있는 항체, 또는 Kabat 등에 의해 제안된 EU 인덱스로 표시할 경우 위치 409의 아르기닌이 리신으로 치환되고 억제된 응집체 형성을 나타내는 항체이다 (예컨대 미국특허 No. 8,911,726 참조). 일부 구체예에서, Fc는 Fab-아암(Fab-arm) 교환에 의해 내인성 IgG4와 치료용 항체 간의 재조합을 방지하는 것으로 나타난, S228P 돌연변이를 함유하는 IgG4이다(예컨대 Labrijin 외 (2009) Nat. Biotechnol., 27(8)767-71 참조). 일부 구체예에서, Fc는 SEQ ID NO: 51에 제시된 서열 또는 SEQ ID NO: 51에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0341] [0230] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 Fc 서열에 직접 연결된다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 링커를 경유하는 등에 의해 Fc 서열에 간접적으로 연결된다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 "펩타이드 링커들"이 변이체 ICOSL 폴리펩타이드와 Fc 도메인을 연결한다. 일부 구체예에서, 펩타이드 링커는 단일 아미노산 잔기이거나 또는 더 긴 길이일 수 있다. 일부 구체예에서, 펩타이드 링커는 적어도 하나의 아미노산 잔기를 갖지만 그 길이는 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 아미노산 잔기 이하이다. 일부 구체예에서, 링커는 3개의 알라닌 (AAA)이다. 일부 구체예에서, 링커는 (1 문자 아미노산 코드로) : GGGGS ("4GS"; SEQ ID NO:52) 또는 4GS 링커의 멀티머, 예컨대 SEQ ID NO: 53 (2xGGGGS) 또는 SEQ ID NO: 54 (3xGGGGS)에 제시된 바와 같은 2, 3, 4, 5 또는 6 4GS 링커의 반복체이다. 일부 구체 예에서, 링커는 강성 링커이다. 예를 들어, 링커는 α- 나선형 링커이다. 일부 구체예에서, 링커는(1-문자 아미노산 코드로): SEQ ID NO: 55 (EAAAK) 또는 SEQ ID NO: 56 (3xEAAAK) 또는 SEQ ID NO: 57 (5xEAAAK)에 제시된 바와 같은, EAAAK 또는 EAAAK 링커의 멀티머, 예컨대 2, 3, 4, 또는 5 4GS 링커의 반복체이다. 일부 구체예에서, 링커는하나 이상의 EAAAK 유닛으로 출발하여 A, AA, AAA, AAAA, EAAAA 및 EAAAK 서열의 부가에 의해 연장될 수 있다. 일부 구체예에서, 링커는 클로닝에 의해 및/또는 제한 부위로부터 도입된 아미노산을 추가로 포함 할 수 있고, 예를 들어 링커는 제한효소 부위 BAMHI의 사용에 의해 도입된 아미노산 GS(1-문자 아미노산 코드로)를 포함 할 수 있다. 일부 구체예에서, 링커 (1 문자 아미노산 코드)는 GSGGGGS (SEQ ID NO: 58)이다.

일부 예에서, 링커는 2xGGGGS에 이어서 3 개의 알라닌 (GGGGSGGGGSAAA; SEQ ID NO: 59)이다.

[0342] [0231] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL-Fc 융합 단백질은 Fc 도메인에 연결된 2개의 변이체 ICOSL Fc 폴리펩타이드에 의해 형성된 다이머이다. 일부 특정 구체예에서, ICOSL-Fc 변이체 융합 폴리펩타이드의 동일하거나 실질적으로 동일한 종들(3개 미만의 N-말단 또는 C-말단 아미노산 서열 차이가 허용됨)이 다이머화되어 호모다이머를 형성한다. 일부 구체예에서, 다이머는 그의 2 변이체 ICOSL Fc 폴리펩타이드가 동일한 호모다이머이다. 별법으로, 상이한 종들의 ICOSL-Fc 변이체 융합 폴리펩타이드가 다이머화되어 헤테로다이머를 형성할 수 있다. 따라서, 일부 구체예에서, 다이머는 그의 2 변이체 ICOSL Fc 폴리펩타이드가 상이한 헤테로다이머이다.

[0343] [0232] 일부 구체예에서, 여기에 설명된 바와 같이 레퍼런스 ICOSL 중 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 변이체 ICOSL 폴리펩타이드가, Fc 영역에 직접 또는 간접적으로 연결되어 있는, 변이체 ICOSL-Fc 융합 단백질이 제공된다. 일부 경우에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드의 C-말단은 Fc 영역의 N-말단에 결합된다. 일부 구체예에서, ICOSL-Fc 융합체의 변이체 ICOSL은 SEQ ID NO:3에 제시된 레퍼런스 IgV 도메인의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산 변형을 함유한다. 특수한 경우, 이러한 면역조절 단백질은 IgV 도메인, 예컨대 SEQ ID NO: 35에 제시된 IgV 도메인, 또는 SEQ ID NO: 35에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖고, 각각의 SEQ ID NO의 하나 이상의 아미노산 변형, 예컨대 N52H/N57Y/Q100R을 함유한다. 특수한 경우, 이러한 면역조절 단백질은 SEQ ID NO: 36에 제시된 IgV 도메인, 또는 SEQ ID NO: 36에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 IgV 도메인과 같은, IgV 도메인을 함유하는 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 함유한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 아미노산 변형 N52H/N57Y/Q100R (예컨대 SEQ ID NO: 36에 제시된 IgV 도메인이거나 이를 포함한다)

[0344] [0233] 이러한 변이체 ICOSL-Fc 융합 단백질의 특정 구체예에서, Fc 폴리펩타이드는 본 발명에 설명된 것과 같은, 감소된 이펙터 기능을 나타내는 인간 IgG1 Fc 영역의 변이체이다. 일부 구체예에서, Fc 영역은 아미노산 변형 N297G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K 또는 L234A/L235E/G237A을 함유하는 인간 IgG1으로서, 여기서 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것이다. 일부 구체예에서, 변이체 IgG1 Fc 영역은 아미노산 치환 C220S을 추가로 포함하되, 여기서 잔기들은 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것이다. 일부 구체예에서, Fc 영역은 K447del을 추가로 포함하되, 여기서 잔기들은 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것이다. 일부 측면에서, Fc 영역은 SEQ ID NOS: 41, 43, 40, 44, 39 또는 42 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NOS: 41, 43, 40, 44, 39 또는 42 중 어느 하나에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내고 대응하는 각 SEQ ID NO의 아미노산 치환을 함유하는 아미노산 서열을 함유한다. 변이체 ICOSL IgSF (예컨대 IgV) 폴리펩타이드와 Fc 간의 연결(linkage)은 본 발명에 설명된 바와 같은, 펩타이드 링커를 통해 이루어질 수 있다. 일부 구체예에서, 링커는 GGGGS ("4GS"; SEQ ID NO: 52), SEQ ID NO: 53 (2xGGGGS) 또는 SEQ ID NO: 54 (3xGGGGS)이다. 특정 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드의 C-말단은 Fc 영역의 N-말단에 연결되어, 그 성분 순서가 변이체 ICOSL-링커-Fc일 수 있다.

[0345] [0234] 일부 구체예에서, 예컨대 SEQ ID NO: 36에 제시된 변이체 ICOSL IgV 도메인, SEQ ID NO: 52에 제시된 링커 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 Fc 폴리펩타이드를 함유하는, 변이체 ICOSL-링커-Fc와 같은 변이체 ICOSL-Fc 융합 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서, 예컨대 SEQ ID NO: 36에 제시된 변이체 ICOSL IgV 도메인, SEQ ID NO: 52에 제시된 링커 및 SEQ ID NO: 41에 제시된 Fc 폴리펩타이드를 포함하는, 변이체 ICOSL-링커-Fc와 같은 변이체 ICOSL-Fc 융합 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서, 예컨대 SEQ ID NO: 36에 제시된 변이체 ICOSL IgV 도메인, SEQ ID NO: 52에 제시된 링커 및 SEQ ID NO: 40에 제시된 Fc 폴리펩타이드를 포함하는, 변이체 ICOSL-링커-Fc와 같은 변이체 ICOSL-Fc 융합 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서, 예컨대 SEQ ID NO: 36에 제시된 변이체 ICOSL IgV 도메인, SEQ ID NO: 52에 제시된 링커 및 SEQ ID NO: 39에 제시된 Fc 폴리펩타이드를 포함하는, 변이체 ICOSL-링커-Fc와 같은 변이체 ICOSL-Fc 융합 단백질이 제공된다.

[0346] [0235] 일부 구체예에서, 예컨대 SEQ ID NO: 36에 제시된 변이체 ICOSL IgV 도메인, SEQ ID NO: 53에 제시된 링커 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 Fc 폴리펩타이드를 포함하는, 변이체 ICOSL-링커-Fc와 같은 변이체 ICOSL-Fc 융합 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서, 예컨대 SEQ ID NO: 36에 제시된 변이체 ICOSL IgV 도메인, SEQ ID NO: 53에 제시된 링커 및 SEQ ID NO: 41에 제시된 Fc 폴리펩타이드를 포함하는, 변이체 ICOSL-링커-Fc와 같은 변이체 ICOSL-Fc 융합 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서, 예컨대 SEQ ID NO: 36에 제시된 변이체 ICOSL IgV 도메인, SEQ ID NO: 53에 제시된 링커 및 SEQ ID NO: 40에 제시된 Fc 폴리펩타이드를 포함하는, 변이체 ICOSL-링커-Fc와 같은 변이체 ICOSL-Fc 융합 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서, 예컨대 SEQ ID NO: 36에 제시된 변이체 ICOSL IgV 도메인, SEQ ID NO: 53에 제시된 링커 및 SEQ ID NO: 39에 제시된 Fc 폴리펩타이드를

포함하는, 변이체 ICOSL-링커-Fc와 같은 변이체 ICOSL-Fc 융합 단백질이 제공된다.

[0347] [0236] 일부 구체예에서, 예컨대 SEQ ID NO: 36에 제시된 변이체 ICOSL IgV 도메인, SEQ ID NO: 54에 제시된 링커 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 Fc 폴리펩타이드를 포함하는, 변이체 ICOSL-링커-Fc와 같은 변이체 ICOSL-Fc 융합 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서, 예컨대 SEQ ID NO: 36에 제시된 변이체 ICOSL IgV 도메인, SEQ ID NO: 54에 제시된 링커 및 SEQ ID NO: 41에 제시된 Fc 폴리펩타이드를 포함하는, 변이체 ICOSL-링커-Fc와 같은 변이체 ICOSL-Fc 융합 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서, 예컨대 SEQ ID NO: 36에 제시된 변이체 ICOSL IgV 도메인, SEQ ID NO: 54에 제시된 링커 및 SEQ ID NO: 40에 제시된 Fc 폴리펩타이드를 포함하는, 변이체 ICOSL-링커-Fc와 같은 변이체 ICOSL-Fc 융합 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서, 예컨대 SEQ ID NO: 36에 제시된 변이체 ICOSL IgV 도메인, SEQ ID NO: 54에 제시된 링커 및 SEQ ID NO: 39에 제시된 Fc 폴리펩타이드를 포함하는, 변이체 ICOSL-링커-Fc와 같은 변이체 ICOSL-Fc 융합 단백질이 제공된다.

[0348] [0237] 일부 구체예에서, SEQ ID NO: 60에 제시된 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 60에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는, 변이체 ICOSL IgSF Fc 융합 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL IgSF Fc 융합 단백질은 레퍼런스 (야생형) ICOSL-Fc 융합 단백질에 대한 결합에 비해 CD28 및 ICOS에 대해, 더 증가된 결합 친화성으로 결합한다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL IgSF Fc 융합체는 야생형 인간 IgG1의 Fc와의 융합체에 비해 감소된 Fc 이펙터 기능을 나타낸다.

[0349] **III. 폴리펩타이드 또는 세포 생산을 위한 핵산, 벡터 및 방법**

[0350] [0238] 본 발명에 따라 본 발명에서 제공된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 또는 면역조절 융합 폴리펩타이드의 다양한 임의의 구체예들을 인코딩하는, "핵산"이라 통칭되는 단리된 핵한 또는 재조합 핵산이 제공된다. 일부 구체예에서, 본 발명에서 제공된 핵산은 후술하는 것들을 비롯하여, 본 발명에서 제공된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 또는 면역조절 융합 폴리펩타이드의 재조합적 생산(예컨대, 발현)에 유용하다. 본 발명에 따라 제공되는 핵산은 RNA 형태 또는 DNA 형태일 수 있고, 여기에는 mRNA, cRNA, 재조합 또는 합성 RNA 및 DNA, 및 cDNA가 포함된다. 본원에서 제공된 핵산은 일반적으로 DNA 분자이고 대체로 이중-가닥 DNA 분자이다. 그러나, 단일-가닥 DNA, 단일-가닥 RNA, 이중-가닥 RNA 및 하이브리드 DNA/RNA 핵산 또는 본 발명의 임의의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이의 조합 역시도 제공된다.

[0351] [0239] 또한 본원에서 제공된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 또는 면역조절 융합 폴리펩타이드를 생산하는데 유용한 재조합 발현 벡터 및 재조합 숙주 세포도 제공된다.

[0352] [0240] 전술한 임의의 구체예에서, 본 발명에 제공된 면역조절 융합 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산은 재조합 DNA 및 클로닝 기술을 이용하여 세포 내로 도입될 수 있다. 이를 위해, 면역조절 폴리펩타이드를 인코딩하는 재조합 DNA 분자를 작제한다. 이러한 DNA 분자를 제조하는 방법은 기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 펩타이드를 코딩하는 서열을 적절한 제한 효소를 이용하여 DNA로부터 잘라낼 수 있다. 별법으로, DNA 분자는 포스포르아미다이트법과 같은 화학 합성 기술을 이용하여 합성될 수 있다. 또한, 이러한 기술들을 조합 사용할 수도 있다. 일부 사례에서, 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 통해 재조합 또는 합성 핵산을 생성할 수 있다. 일부 구체예에서, 제공된 설명에 따라 적어도 하나의 친화성-변형된 IgSF 도메인을 함유하는 하나 이상의 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 인코딩하는 DNA 삽입물이 생성될 수 있다. 이 DNA 삽입물은 당업자에게 공지된 바와 같이 적절한 형질도입/형질감염 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 또한, 이들 핵산 분자를 함유하는 발현 벡터도 제공된다.

[0353] [0241] 일부 구체예에서, 발현 벡터는 단백질의 발현에 적합한 조건 하에서 적절한 세포내에서 면역조절 단백질을 발현할 수 있다. 일부 측면에서, 핵산 분자 또는 발현 벡터는 적절한 발현 조저러 서열에 작동적으로 연결된 면역조절 단백질을 인코딩하는 DNA 분자를 포함한다. DNA 분자 벡터 내 삽입 전 또는 후에 이러한 작동 연결을 수행하는 방법은 잘 알려져 있다. 발현 조절 서열에는 프로모터, 액티베이터, 인핸서, 오퍼레이터, 리보좀 결합 부위, 개시 시그널, 종결 시그널, 캡(cap) 시그널, 폴리아데닐화 시그널 및 전사 또는 번역 제어와 관련된 시그널이 포함된다.

[0354] [0242] 일부 구체예에서, 면역조절 단백질의 발현은 발현을 제어 도는 조절하기 위해 프로모터 또는 인핸서에 의해 조절된다. 프로모터는 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산 분자의 일부분에 작동적으로 연결된다. 일부 구체예에서, 유도가능한 프로모터는 변이체 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질을 인코딩하는 핵산 분자에 작동적으로 연결되어 적절한 전사 인듀서의 존재 또는 부재를 조절함으로써 핵산의 발현을 제어할 수 있다. 예를 들어, 프로모터는 예컨대 공개된 테트라사이클린-조절된 시스템 또는 기타 조절가능한

시스템 (예컨대 공개된 국제 PCT Appl. No. WO 01/30843)에서와 같은 조절된 프로모터 및 전사인자 발현 시스템일 수 있어, 인코딩된 폴리펩타이드의 발현을 제어하는 것이 가능하다. 예시적인 조절가능한 프로모터 시스템은 예를 들어, Clontech사 (Palo Alto, CA)로부터 입수가능한 Tet-On (및 Tet-Off) 시스템이다. 이 프로모터 시스템은 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 유도체 예컨대 독시사이클린에 의해 조절되는 형질전환 유전자의 조절된 발현을 허용한다. 다른 조절 가능한 프로모터 시스템이 공지되어 있다 (예를 들어, 리간드 결합 도메인 및 전사 조절 도메인 (예컨대 호르몬 수용체의 도메인)을 함유하는 유전자 스위치에 대해 설명하고 있는, 공개된 미국특허출원 No. 2002-0168714, 명칭: "단일 사슬, 모노머, 리간드 의존성 폴리펩타이드 스위치를 이용한 유전자 발현의 조절" 참조).

[0355] [0243] DNA 분자를 갖는 결과적인 재조합 발현 벡터를 이용하여 적절한 숙주를 형질전환한다. 이 형질전환은 기술분야에 공지인 방법을 이용하여 수행가능하다. 일부 구체예에서, 본원에서 제공된 핵산은 면역조절 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산에 작동적으로 연결된 분비 또는 시그널 펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하여, 결과적인 가용성 면역조절 폴리펩타이드를 배양 배지, 숙주 세포, 또는 숙주 세포 페리플라즘 (periplasm)으로부터 회수할 수 있다. 또한, 상업적으로 입수가능한 키트 및 계약 제조사를 이용하여 본원에서 제공된 조작된 세포 또는 재조합 숙주 세포를 제조할 수 있다.

[0356] [0244] 일부 구체예에서, DNA 분자를 갖는 결과적인 발현 벡터를 이용하여 적절한 세포를 형질전환, 예컨대 형질도입한다. 도입은 공지 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 예시적인 방법에는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스와 같은 바이러스를 경유하거나, 형질도입, 트랜스포존 및 전기천공을 포함하여, 수용체들을 인코딩하는 핵산을 전달하기 위한 방법들이 포함된다. 일부 구체예에서, 발현 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 구체예에서, 핵산은 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 형질도입 방법에 의해 세포 내로 전달된다.

[0357] [0245] 공개적으로 입수 가능한 다수의 공지된 포유동물 숙주 세포 중 임의의 것을 폴리펩타이드의 제조에 사용할 수 있다. 세포의 선택은 당해 기술 분야에서 인정되는 다수의 인자에 의존한다. 여기에는 예를 들어, 선택된 발현 벡터와의 호환성, DNA 분자에 의해 인코딩된 펩타이드의 독성, 형질전환 속도, 펩타이드 회수 용이성, 발현 특성, 생물-안전성 및 비용 등이 포함된다. 이러한 인자들의 균형은 모든 세포가 특정 DNA 서열의 발현에 동등하게 효과적일 수는 없다는 이해와 맞물려야 한다.

[0358] [0246] 일부 구체예에서, 숙주 세포는 효모 세포와 같은 다양한 진핵 세포 또는 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 또는 HEK293 세포와 같은 포유동물 세포일 수 있다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 현탁 세포이고 폴리펩타이드는 배양된 현탁액, 예를 들어 배양된 현탁액 CHO 세포, 예컨대 CHO-S 세포에서 조작되거나 제조된다. 일부 예에서, 세포주는 DG44 및 DUXB11과 같은 DHFR (DHFR-)이 결핍된 CHO 세포주이다. 일부 구체예에서, 세포는 글루타민 신타제(GS), 예를 들어 CHO-S 세포, CHOK1 SV 세포, 및 및 CHOZN((R)) GS-/- 세포를 결여한다. 일부 구체예에서, 현탁 CHO 세포와 같은 CHO 세포는 CHO-S-2H2 세포, CHO-S- 클론 14 세포 또는 ExpiCHO-S 세포일 수 있다.

[0359] [0247] 일부 구체예에서, CHO 세포로부터 제공된 ICOSL 폴리펩타이드를 발현 시키면 생성된 단백질의 보다 균질한 조성물이 생성된다. 일부 구체예에서, 제공된 ICOSL 폴리펩타이드는 단백질이 완전한 ECD 참조 서열을 함유하고/하거나 프로테아제 절단 부위 (예를 들어, LQQN/LT)를 함유하는 ICOSL 폴리펩타이드에 비해, CHO 세포로부터 발현될 때 보다 균질한 생성물을 초래한다. 일부 구체예에서, 본원에서 생성된 ICOSL 변이체 폴리펩타이드를 함유하는 생성된 단백질의 조성물의 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%는 동일한 아미노산 길이를 갖거나 또는 같은 크기이다. 크기의 균일성을 평가하는 기술에는 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC), 크기 배제 크로마토그래피, SDS 페이지 또는 시퀀싱이 포함된다.

[0360] [0248] 일부 구체예에서, 숙주 세포는 예컨대 효모 세포, 또는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 또는 HEK293 세포 등의 포유동물 세포와 같은 다양한 진핵 세포일 수 있다. 숙주 세포는 또한 예컨대 대장균(*E. coli*)과 같은 원핵세포일 수도 있다. 형질전환된 재조합 숙주를 폴리펩타이드 발현 조건에서 배양한 다음 정제하여 가용성 단백질을 얻는다. 재조합 숙주 세포는 바람직한 폴리펩타이드가 발현되도록 통상적인 발효 조건에서 배양할 수 있다. 이러한 발효 조건은 기술분야에 잘 알려져 있다. 마지막으로, 본원에서 제공된 폴리펩타이드는 황산 암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 및 친 화성 크로마토 그래피를 비롯한, 당업계에 널리 공지된 다수의 방법 중 임의의 방법에 의해 재조합 세포 배양물로부터 회수 및 정제될 수 있다, 단백질 재폴딩(refolding) 단계는 필요에 따라 성숙한 단백질의 구성을 완료하는 데 사용할 수 있다. 최종적으로, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)가 최종 정제 단계에서 사용될 수 있다.

[0361] [0249] 일부 구체예에서, 재조합 벡터는 바이러스 벡터이다. 예시적인 재조합 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡

터 게놈, 폭스바이러스 벡터 게놈, 백시니아 바이러스 벡터 게놈, 아데노바이러스 벡터 게놈, 아데노바이러스-관련 바이러스 벡터 게놈, 헤르페스 바이러스 벡터 게놈, 및 알파 바이러스 벡터 게놈을 포함한다. 바이러스 벡터는 살아있거나, 약독화되거나, 복제 조건적 또는 복제 결핍적, 비-병원성(결여), 복제 경쟁 바이러스 벡터일 수 있고 및/또는 예컨대 본 발명에서 제공된 변이체 면역조절 폴리펩타이드와 같은 이종 유전자 산물을 발현하도록 변형된다. 바이러스 생성을 위한 벡터 역시도 바이러스의 약화를 변경하기 위해 변형될 수 있고 여기에는 전사 또는 번역 로드를 증가 또는 감소시키는 방법이 포함된다.

[0362] [0250] 사용가능한 예시적인 바이러스 벡터로는 변형된 백시니아 바이러스 벡터 (예컨대, Guerra 외, J. Virol. 80:985-98 (2006); Tartaglia 외, AIDS Research and Human Retroviruses 8: 1445-47 (1992); Gheradi 외, J. Gen. Virol. 86:2925-36 (2005); Mayr 외, Infection 3:6-14 (1975); Hu 외, J. Virol. 75: 10300-308 (2001); 미국특허 Nos. 5,698,530, 6,998,252, 5,443,964, 7,247,615 및 7,368,116 참조); 아데노바이러스 벡터 또는 아데노바이러스-관련 바이러스 벡터 (예컨대, Molin 외, J. Virol. 72:8358-61 (1998); Narumi 외, Am J. Respir. Cell Mol. Biol. 19:936-41 (1998); Mercier 외, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:6188-93 (2004); 미국특허 Nos. 6,143,290; 6,596,535; 6,855,317; 6,936,257; 7,125,717; 7,378,087; 7,550,296 참조); 쥐의 백혈병 바이러스(MuLV)에 기초한 것, 기본 원숭이 백혈병 바이러스 (GaLV), 에코트로픽(ecotropic) 레트로바이러스es, 원숭이 면역결핍 바이러스 (SIV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 및 이의 조합을 비롯한 레트로바이러스 벡터 (예컨대, Buchscher 외, J. Virol. 66:2731-39 (1992); Johann 외, J. Virol. 66: 1635-40 (1992); Sommerfelt 외, Virology 176:58-59 (1990); Wilson 외, J. Virol. 63:2374-78 (1989) ; Miller 외, J. Virol. 65:2220-24 (1991); Miller 외, Mol. Cell Biol. 10:4239 (1990) ; Kolberg, NIH Res. 4:43 1992; Cornetta 외, Hum. Gene Ther. 2:215 (1991) 참조); 인간 면역결핍 바이러스(HIV-1), HIV-2, 고양이의 면역결핍 바이러스 (FIV), 말의 감염성 빈혈 바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스 (SIV), 및 마에디/비스나 (maedi/visna) 바이러스에 기초한 것과 같은 렌티바이러스 벡터 (예컨대, Pfeifer 외, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2: 177-211 (2001); Zufferey 외, J. Virol. 72: 9873, 1998; Miyoshi 외, J. Virol. 72:8150, 1998; Philpott 및 Thrasher, Human Gene Therapy 18:483, 2007; Engelman 외, J. Virol. 69: 2729, 1995; Nightingale 외, Mol. Therapy, 13: 1121, 2006; Brown 외, J. Virol. 73:9011 (1999); WO 2009/076524; WO 2012/141984; WO 2016/011083; McWilliams 외, J. Virol. 77: 11150, 2003; Powell 외, J. Virol. 70:5288, 1996 참조) 또는 이들의 임의의 변이체, 및/또는 전술한 임의의 바이러스를 생성하는데 사용가능한 벡터를 들 수 있다. 일부 구체예에서, 재조합 벡터는 패키징 세포주에서와 같이 RNA 바이러스에 대한 경우처럼, 바이러스 게놈의 발현을 조절할 수 있는 프로모터 또는 인핸서 서열과 같은 조절 사열을 포함할 수 있다 (예컨대, 미국특허 Nos.5,385,839 및 5,168,062 참조).

[0363] [0251] 일부 구체예에서, 본원에서 제공된 폴리펩타이드는 합성법에 의해서도 만들어질 수 있다. 고상 합성법이 개별적인 펩타이드를 만드는 바람직한 기술인데 이는 이 기술이 소형 펩타이드 제조시 비용면에서 가장 효율적인 방법이기 때문이다. 예컨대, 잘 알려진 고상 합성 기술에는 보호기, 링커, 및 고상 지지체의 사용, 그리고 특이적인 보호 및 탈보호 반응 조건, 링커 절단 조건, 스캐빈저의 사용, 및 고상 펩타이드 합성의 기타 측면을 이용하는 것이 포함된다. 이어서 펩타이드를 본원에 제공된 바와 같은 폴리펩타이드 내로 조립할 수 있다.

[0364] **IV. 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 및 면역조절 단백질의 활성 면역조절을 평가하는 방법**

[0365] [0252] 일부 구체예에서, 본원에서 제공된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 (예컨대 전장 및/또는 특이적 결합 단편 또는 그의 면역조절 융합체)는 T 세포 활성화를 조절하는 면역조절 활성을 나타낸다. 일부 구체예에서, ICOSL 폴리펩타이드는 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 대조군에 상대적으로 일차 T 세포 분석시 IFN-감마 발현을 조절한다. 일부 경우에서, IFN-감마 발현의 조절은 대조군에 상대적으로 IFN-감마 발현을 증가 또는 감소시킬 수 있다. 특이적인 결합 및 IFN-감마 발현을 알아내기 위한 분석법은 기술분야에 잘 알려져 있고 여기에는 배양 상등액에서 인터페론-감마 사이토카인 수준을 측정하는 MLR (림프구 혼합 배양반응) 분석법 (Wang 외, Cancer Immunol Res. 2014 Sep: 2(9):846-56), SEB (스타필로코커스 내독소 B) T 세포 자극 분석법(Wang 외, Cancer Immunol Res. 2014 Sep: 2(9):846-56), 및 항-CD3 T 세포 자극 분석법 (Li 및 Kurlander, J Transl Med. 2010: 8: 104) 등이 포함된다

[0366] [0253] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 일부 구체예에서, 야생형 ICOSL 대조군에 비해 일차 T-세포 분석에서 IFN-감마 (인터페론-감마) 발현을 증가시키거나 또는 별법 실시예에서 감소시킬 수 있다. 가용성 변이체 ICOSL 서열을 함유하는 본원에서 제공된 폴리펩타이드의 일부 구체예에서, 상기 폴리펩타이드는 IFN-감마 발현을 증가시킬 수 있고, 또 다른 구체예에서는 야생형 ICOSL 대조군과 비교하여 일차 T-세포 분석에서 IFN-감마 발현을 감소시킬 수 있다. 다중 변이체 ICOSL 서열을 함유하는 제공된 폴리펩타이드의 일부 구체예에

서, 상기 폴리펩타이드는 IFN-감마 발현을 증가시킬 수 있고, 별도 구체예에서는 야생형 ICOSL 대조군과 비교하여 일차 T-세포 분석에서 IFN-감마 발현을 감소시킬 수 있다.

[0367] [0254] 통상의 기술자라면 IFN-감마 발현의 증가를 결정하는데 사용되는 일차 T-세포 분석의 포맷이 IFN-감마 발현의 감소를 분석하기 위해 사용된 것과 다를 수 있다는 것을 인식할 것이다. 일차 T-세포 분석에서 IFN-감마 발현을 감소시키는 변이체 ICOSL의 능력을 분석함에 있어서, 림프구 혼합 배양 반응 (MLR) 분석을 사용할 수 있다. 어떤 경우에는, 변이체 ICOSL의 가용성 형태를 이용하여 변이체 ICOSL이 MLR에서 IFN-감마 발현을 길항 및 그에 따라 감소시키는 능력을 알아볼 수 있다. 별법으로, 일차 T-세포 분석에서 IFN-감마 발현을 증가시키는 변이체 ICOSL의 능력을 분석할 때, 공동-고정화 분석을 사용할 수 있다. 공동-고정화 분석에서, 항-CD3 항체에 의해 일부 구체예에서 제공되는, TCR 시그널은 공동-고정된 변이체 ICOSL과 함께 사용되어 ICOSL 대조군에 상대적으로 IFN-감마 발현을 증가시키는 능력을 결정한다.

[0368] [0255] 일부 구체예에서, IFN- 감마 발현의 증가 또는 감소를 조절하는 변이체 ICOSL의 능력에 대한 검정에서 T 세포 리포터 검정이 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, T 세포는 Jurkat T 세포주이거나 Jurkat T 세포주로부터 유래된다. 리포터 분석에서, 리포터 세포주 (예를 들어, Jurkat 리포터 세포) 역시도 변이체 IgSF 도메인 폴리펩타이드의 동족 결합 파트너를 과발현시키기 위해 생성된다. 일부 구체예에서, 리포터 T 세포는 또한 리포터에 작동 가능하게 연결된 T 세포 활성화에 반응하는 유도성 프로모터를 함유하는 리포터 작제물을 함유한다. 일부 구체예에서, 리포터는 형광 또는 발광 리포터이다. 일부 구체예에서, 리포터는 루시페라제이다. 일부 구체예에서, 프로모터는 CD3 시그널링에 대해 반응성이다. 일부 구체예에서, 프로모터는 NFAT 프로모터이다. 일부 구체예에서, 프로모터는 공동자극 시그널링, 예컨대 CD28 공동자극 시그널링에 대해 반응한다. 일부 구체예에서, 프로모터는 IL-2 프로모터이다.

[0369] [0256] 리포터 분석 측면에서, 리포터 세포주는 예를 들어 억제 수용체의 야생형 리간드를 발현하는 항원 제시 세포(APC)와의 공동-인큐베이션에 의해 자극된다. ICOSL. 일부 구체예에서, APC는 인공 APC이다. 인공 APC는 당업자에게 잘 알려져 있다. 일부 구체예에서, 인공 APC는 하나 이상의 포유동물 세포주, 예컨대 K562, CHO 또는 293 세포로부터 유래된다.

[0370] [0257] 일부 구체예에서, Jurkat 리포터 세포는 변이체 IgSF 도메인 분자 또는 면역조절 단백질, 예를 들어 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질의 존재하에 억제 리간드를 과발현하는 인공 APC와 함께 인큐베이션된다. 일부 구체예에서, 세포의 발광 또는 형광을 측정함으로써 리포터 발현이 모니터링된다. 일부 구체예에서, 그의 수용체와 리간드 사이의 정상적인 상호작용은, 수용체와 리간드의 상호작용이 존재하지 않는, 예컨대 ICOSL을 과발현하지 않는 APC 및 대조군 T 세포의 공동-인큐베이션에 의한 리포터 발현과 같은, 대조군에 비해, 리포터 시그널의 감소 또는 그의 억제를 일으킨다. 일부 구체예에서, 본원에서 제공된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질은, 변이체 ICOSL-Fc로서 가용성 형태로 제공되는 경우, 길항 또는 상호작용함으로써, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 또는 면역조절 단백질의 부재 시에 비해 리포터 시그널을 증가시키는 결과를 초래한다.

[0371] [0258] 통상의 기술자에게는 적절한 대조군의 사용에 관하여 알려져 있지만, 전술한 구체예에서, 대조군은 전형적으로, 그 변이체 ICOSL이 유래 또는 발달된 동일한 포유동물 종으로부터의 고유 ICOSL 이소폼의 야생형과 같은, 비변이체 ICOSL의 사용을 포함한다. ICOS 및 CD28 중 어느 일방 또는 양방 모두에 대한 결합 친화성이 증가 또는 감소되는지와 무관하게, 일부 구체예에서 변이체 ICOSL은 야생형 ICOSL 대조군에 비해 일차 T-세포에서 IFN-감마 발현을 증가시키고, 또 다른 구체예에서는 IFN-감마 발현을 감소시킨다.

[0372] [0259] 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL은 레퍼런스(예컨대, 비변형) 또는 야생형 ICOSL 대조군에 비해 IFN-감마 발현 (즉, 단백질 발현)을 적어도: 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 이상 증가시킨다. 또 다른 구체예에서, 변이체 ICOSL은 야생형 또는 비변이체 ICOSL 대조군에 비해 IFN-감마 발현 (즉 단백질 발현)을 적어도: 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 이상 감소시킨다. 일부 구체예에서, 야생형 ICOSL 대조군은 야생형 쥐의 ICOSL 서열이 변경된 변이체 ICOSL에 대해 전형적으로 사용되는 쥐의 ICOSL이다. 일부 구체예에서, 야생형 ICOSL 대조군은 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2 또는 3의 아미노산 서열을 포함하는 ICOSL 서열과 같은 야생형 인간 ICOSL 서열과는 다른 변경된 서열을 갖는 변이체 ICOSL에 전형적으로 사용되는 것과 같은 인간 ICOSL이다.

[0373] **V. 의약 제형(pharmaceutical formulations)**

[0374] [0260] 본원에 따라 본 명세서에 설명된 임의의 변이체 ICOSL 폴리펩타이드, 예컨대 면역조절 융합 단백질을 함

유하는 조성물이 제공된다. 의약 조성물은 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 의약 조성물은 예컨대 조성물의 pH, 삼투압, 점도, 투명도, 색상, 등장성, 냄새, 멸균성, 안정성, 용해 속도 또는 방출 속도, 흡착성 또는 침투성을 변형, 유지 또는 보존하기 위한 부형제를 1종 이상 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 통상의 기술자는 세포를 함유하는 의약 조성물과 단백질을 함유하는 의약 조성물이 상이하다는 것을 이해할 것이다.

[0375] [0261] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 분말, 캡슐 또는 정제와 같은 고체이다. 예를 들어, 의약 조성물의 성분들은 동결건조될 수 있다. 일부 구체예에서, 고체 의약 조성물은 투여 전에 액체에 용해 또는 재조성된다.

[0376] [0262] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 액체, 예를 들어 수용액(예컨대 생리식염수 또는 링거액)에 용해된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드이다. 일부 구체예에서, 의약 조성물의 pH는 약 4.0 내지 약 8.5 (예컨대 약 4.0 내지 약 5.0, 약 4.5 내지 약 5.5, 약 5.0 내지 약 6.0, 약 5.5 내지 약 6.5, 약 6.0 내지 약 7.0, 약 6.5 내지 약 7.5, 약 7.0 내지 약 8.0, 또는 약 7.5 내지 약 8.5)이다.

[0377] [0263] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 약학적으로 허용가능한 부형제, 예컨대 충전제, 바인더, 피복제, 보존제, 윤활제, 향료, 감미료, 색소, 용매, 완충제, 킬레이트화제 또는 안정화제를 포함한다. 약학적으로 허용가능한 충전제의 예로는 셀룰로스, 이염기성 인산칼슘, 탄산칼슘, 미정질 셀룰로스, 수크로스, 락토스, 글루코스, 만니톨, 소르비톨, 말톨, 예비호화 전분, 옥수수 전분 또는 감자 전분을 들 수 있다. 약학적으로 허용가능한 바인더의 예로는 폴리비닐피롤리돈, 전분, 락토스, 자일리톨, 소르비톨, 말티톨, 젤라틴, 수크로스, 폴리에틸렌 글리콜, 메틸 셀룰로스, 또는 셀룰로스를 들 수 있다. 약학적으로 허용가능한 피복제의 예로는 히드록시프로필 메틸셀룰로스(HPMC), 쉘락, 옥수수 단백질 제인 또는 젤라틴을 들 수 있다. 약학적으로 허용가능한 붕괴제의 예로는 폴리비닐피롤리돈, 카르복시메틸 셀룰로스, 또는 글리콜산나트륨 전분을 들 수 있다. 약학적으로 허용가능한 윤활제의 예로는 폴리에틸렌 글리콜, 스테아르산 마그네슘 또는 스테아르산을 들 수 있다. 약학적으로 허용가능한 보존제의 예로는 메틸 파라벤, 에틸 파라벤, 프로필 파라벤, 벤조산 또는 소르브산을 들 수 있다. 약학적으로 허용가능한 감미료의 예로는 수크로스, 사카린, 아스파탐, 또는 소르비톨을 들 수 있다. 약학적으로 허용가능한 완충제의 예로는 카보네이트, 시트레이트, 글루코네이트, 아세테이트, 포스페이트 또는 타르트레이트를 들 수 있다.

[0378] [0264] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 주사가능한 마이크로스피어, 생체-침식성 입자, 폴리머 화합물(폴리락트산, 폴리글리콜산), 비드 또는 리포좀과 같이, 제품의 지속 방출 또는 조절 방출을 위한 물질을 더 포함한다.

[0379] [0529] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 멸균된 것이다. 멸균은 멸균 여과막 또는 주사를 통해 여과에 의해 달성될 수 있다. 조성물이 동결건조되는 경우, 이 방법을 이용한 멸균은 동결건조 전 또는 후에 수행될 수 있다. 비경구 투여용 조성물은 동결건조 형태 또는 용액으로 보관될 수 있다. 이에 더해, 비경구용 조성물은 일반적으로 예컨대 피하주사용침에 의해 침투가능한 스토퍼를 구비한 정맥 용액 백 또는 바이알과 같이, 멸균 억세스 포트를 갖는 용기 내로 투입된다.

[0380] [0265] 일부 구체예에서, 본 발명에 따라 막관통 면역조절 단백질을 발현하는 조작된 세포를 비롯한, 막관통 면역조절 단백질을 함유하는 의약 조성물이 제공된다. 일부 구체예에서, 의약 조성물s 및 제형은 1종 이상의 선택적인 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함한다. 이러한 조성물은 완충제 예컨대 중성 완충된 식염수, 포스페이트 완충 염수 등; 탄수화물 예컨대 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 덱스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩타이드 또는 아미노산 예컨대 글리신; 항산화제; 킬레이트화제 예컨대 EDTA 또는 글루타치온; 아쥬반트 (예컨대, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 좋기로는 정맥 투여용으로 조성되는 것이 바람직하다.

[0381] [0266] 이러한 제형은 예컨대 정맥 주입에 적합한 형태일 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 체내 어느 조직, 장기 또는 신체 부분으로부터의 관심 세포를 체내 다른 조직, 장기 또는 신체 부분으로 전달 또는 운반하는 데 관련된 약학적으로 허용가능한 물질, 조성물, 또는 비히클일 수 있다. 예를 들어, 담체는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 재료, 또는 이의 조합일 수 있다. 담체의 각 성분은 제형내 다른 성분들과 공용성(compatible)이어야 한다는 점에서 "약학적으로 허용가능"하여야 한다. 담체는 또한 그것과 마주치게 되는 체내의 어느 조직, 장기 또는 신체 일부와의 접촉에도 적합하여야 하며, 이는 담체가 그의 치료적 장점을 과도하게 상회하는 독성, 자극, 알레르기 반응, 면역원성과 같은 위험성 또는 이들의 임의의 조합을 지녀서는 아니됨을 의미한다.

[0382] [0267] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 변이체 ICOSL 폴리펩타이드, 예컨대 변이체 ICOSL IgSF-Fc를, 약 1 mg

내지 약 100 mg, 예컨대 약 1 mg 내지 약 75 mg, 약 1 mg 내지 약 50 mg, 약 1 mg 내지 약 25 mg, 약 1 mg 내지 약 10 mg, 약 1 mg 내지 약 5 mg, 약 5 mg 내지 약 100 mg, 약 5 mg 내지 약 75 mg, 약 5 mg 내지 약 50 mg, 약 5 mg 내지 약 25 mg, 약 5 mg 내지 약 10 mg, 약 10 mg 내지 약 100 mg, 약 10 mg 내지 약 75 mg, 약 10 mg 내지 약 50 mg, 약 10 mg 내지 약 25 mg, 약 25 mg 내지 약 100 mg, 약 25 mg 내지 약 75 mg, 약 25 mg 내지 약 50 mg, 약 50 mg 내지 약 100 mg, 약 50 mg 내지 약 75 mg 또는 약 75 mg 내지 약 100 mg의 양으로 함유하도록 제제화된다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 변이체 ICOSL 폴리펩타이드, 예컨대 변이체 ICOSL IgSF-Fc를, 약 10 mg, 약 25 mg, 약 50 mg, 약 75 mg 또는 약 100 mg의 양으로 함유하도록 제제화된다.

[0383] [0268] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 약 0.5 mL 내지 약 10 mL, 예컨대 약 0.5 mL 내지 약 5 mL, 약 0.5 mL 내지 약 2 mL, 약 0.5 mL 내지 약 1 mL, 약 1 mL 내지 약 10 mL, 약 1 mL 내지 약 5 mL 또는 약 5 mL 내지 약 10 mL의 부피로 제제화된다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 약 0.5 mL, 약 1 mL, 약 2 mL, 약 2.5 mL, 약 3 mL, 약 4 mL, 약 5 mL, 약 6 mL, 약 7 mL, 약 8 mL, 약 9 mL 또는 약 10 mL의 부피로 제제화된다. 일부 구체예에서, 조성물의 농도는 약 1 mg/mL 내지 약 50 mg/mL, 예컨대 약 1 mg/mL 내지 약 25 mg/mL, 약 1 mg/mL 내지 약 15 mg/mL, 약 1 mg mL 내지 약 5 mg/mL, 약 5 mg/mL 내지 약 50 mg/mL, 약 5 mg/mL 내지 약 25 mg/mL, 약 5 mg/mL 내지 약 15 mg/mL, 약 15 mg/mL 내지 약 50 mg/mL, 약 15 mg/mL 내지 약 25 mg/mL 또는 약 25 mg/mL 내지 약 50 mg/mL이다. 일부 구체예에서, 조성물의 농도는 약 1 mg/mL, 약 5 mg/mL, 약 10 mg/mL, 약 15 mg/mL, 약 20 mg/mL, 약 25 mg/mL, 약 30 mg/mL, 약 40 mg/mL 또는 약 50 mg/mL이다. 본원에 따라 이러한 임의의 조성물이 바이알과 같은 용기에 제공된다. 특정 태양에서, 바이알 등의 용기는 멸균된 것이다.

[0384] [0269] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 대상자에게 투여된다. 일반적으로, 의약 조성물의 투여량 및 투여 경로는 표준 의약 실무에 따라 대상자의 크기와 상태에 따라 결정한다. 예를 들어, 치료적으로 유효한 투여량은 세포 배양 분석을 통해 또는 마우스, 래트, 토끼, 개, 돼지 또는 원숭이와 같은 동물 모델에서 초기에 평가될 수 있다. 동물 모델은 또한 적절한 농도 범위 및 투여 경로를 결정하는데도 이용될 수 있다. 이러한 정보는 다시 인간에 사용되기에 유용한 투여량과 투여 경로를 결정하는데 이용될 수 있다. 정확한 투여량은 치료를 요하는 대상자와 관련된 여러 인자들을 고려하여 결정된다. 투여량 및 투여의 제반사항은 활성 화합물을 충분한 수준으로 제공하고 목적하는 효과를 유지하도록 조정된다. 고려하여야 할 인자에는 대상자의 질병 상태의 위중도, 전반적인 건강 상태, 연령, 체중 및 성별, 투여 시기 및 투여 빈도, 약물 조합(들), 반응 민감도 및 치료법에 대한 응답성이 포함된다.

[0385] [0270] 장기적으로 작용하는 의약 조성물을, 특정 제형의 반감기 및 소거율에 따라 3 내지 4일마다, 매주, 또는 2주마다 투여할 수 있다. 투여 빈도는 사용된 제형 내 분자들의 약력학적 파라미터에 따라 달라진다. 전형적으로, 조성물은 소망되는 효과가 투여량에 의해 달성될 때까지 투여된다. 조성물은 따라서 경시적으로 단일 용량 또는 다중 용량(동일 또는 상이한 농도/용법용량으로)를 통해 투여되거나 또는 연속 주입에 의해 투여될 수 있다. 또한 적절한 투여량의 강화가 일상적으로 이루어진다. 적절한 투여량은 적절한 투여량-반응 데이터를 사용함으로써 확인할 수 있다. 예컨대 T 세포 활성화 또는 증식, 사이토카인 합성 또는 생산(예컨대, TNF-α, IFN-γ, IL-2의 생산), 다양한 활성화 마커(예컨대, CD25, IL-2 수용체)의 유도, 염증, 관절 부종 또는 압통, C-반응성 단백질의 혈청 수준, 항-콜라겐 항체 생산, 및/또는 T 세포-의존성 항체 응답성(들)을 비롯한, 치료 효과를 가늠하기 위한 몇몇 바이오마커 또는 생리 마커를 모니터링할 수 있다.

[0386] [0271] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 대상자에게 경구, 경피(transdermally), 흡입, 정맥내, 동맥내, 근육내, 상처부위로의 직접 적용, 외과수술 부위로의 적용, 복강내, 좌약, 피하, 피내, 경피(transcutaneously), 분무, 흉강내, 뇌실내(intraventricularly), 관절내, 안내 또는 척수강내(intraspinally)를 비롯한 임의 경로를 통해 대상자에게 투여된다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 대상체의 유리체내로 투여된다.

[0387] [0272] 일부 구체예에서, 의약 조성물의 투여량은 단일 용량 또는 반복되는 용량이다. 일부 구체예에서, 상기 투여량은 대상자에게 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회 또는 1일 4회 또는 그 이상 주어진다. 일부 구체예에서는, 1주일에 약 1회 이상(예컨대 약 2 또는 more, 약 3회 이상, 약 4회 이상, 약 5회 이상, 약 6회 이상, 또는 약 7회 이상) 투여된다. 일부 구체예에서, 수일, 수주일, 수개월 또는 수년의 기간에 걸쳐 복수회로 투여된다. 일부 구체예에서, 치료 코스는 약 1회 이상의 투여 (예컨대 약 2회 이상의 투여, 약 3회 이상의 투여, 약 4회 이상의 투여, 약 5회 이상의 투여, 약 7회 이상의 투여, 약 10회 이상의 투여, 약 15회 이상의 투여, 약 25회 이상의 투여, 약 40회 이상의 투여, 약 50회 이상의 투여, 또는 약 100회 이상의 투여)이다.

[0388] [0273] 일부 구체예에서, 의약 조성물의 투여량은 대상자 체중 1 kg 당 약 1 ㎍ 이상의 단백질(예컨대 대상자

체중 1 kg 당 약 2 ㎍ 이상의 단백질, 대상자 체중 1 kg 당 약 5 ㎍ 이상의 단백질, 대상자 체중 1 kg 당 약 10 ㎍ 이상의 단백질, 대상자 체중 1 kg 당 약 25 ㎍ 이상의 단백질, 대상자 체중 1 kg 당 약 50 ㎍ 이상의 단백질, 대상자 체중 1 kg 당 약 100 ㎍ 이상의 단백질, 대상자 체중 1 kg 당 약 250 ㎍ 이상의 단백질, 대상자 체중 1 kg 당 약 500 ㎍ 이상의 단백질, 대상자 체중 1 kg 당 약 1 mg 이상의 단백질, 대상자 체중 1 kg 당 약 2 mg 이상의 단백질, 또는 대상자 체중 1 kg 당 약 5 mg 이상의 단백질)이다. 일부 구체예에서, 의약 조성물의 투여 용량은 투여 용량은 대상체 체중 kg당 단백질 약 0.3 mg이다. 일부 구체예에서, 의약 조성물의 투여 용량은 투여 용량은 대상체 체중 kg당 단백질 약 1 mg이다. 일부 구체예에서, 의약 조성물의 투여 용량은 투여 용량은 대상체 체중 kg당 단백질 약 3 mg이다. 일부 구체예에서, 의약 조성물의 투여 용량은 투여 용량은 대상체 체중 kg당 단백질 약 6 mg이다. 의약 조성물의 투여 용량은 투여 용량은 대상체 체중 kg당 단백질 약 10 mg이다. 의약 조성물의 투여 용량은 투여 용량은 대상체 체중 kg당 단백질 약 15 mg이다. 의약 조성물의 투여 용량은 투여 용량은 대상체 체중 kg당 단백질 약 20 mg이다.

[0389] [0274] 본 발명의 치료 조성물의 투여가, 바람직하지 못한 면역 반응을 매개하거나 또는 매개할 수 있는 면역 세포를 제거, 격리 또는 불활성화시키거나; 보호적 면역 반응을 매개하거나 또는 매개할 수 있는 면역 세포를 유도, 생성 또는 턴온시키거나; 면역 세포의 물리적 또는 기능적 특징을 변화시키거나; 또는 이러한 효과들의 조합에 의해 면역학적 활성을 충분히 조절할 수 있는지를 알아보기 위한 다양한 수단이 알려져 있다. 이러한 면역학적 활성 조절의 측정 사례에는 면역세포 집단의 존부 검사(유세포분석법, 면역조직화학법, 조직학, 전자현미경, 폴리머라제 연쇄반응(PCR)을 이용); 시그널에 반응하여 증식 또는 분열하는 능력 또는 이에 대한 내성을 비롯한 면역 세포의 기능적 능력의 측정 (예컨대 항-CD3 항체, 항-T 세포수용체 항체, 항-CD28 항체, 칼슘 이오노포어, PMA (포볼 12-미리스테이트 13-아세테이트), 펩타이드 또는 단백질 항원이 로딩된 항원제시세포를 이용한 자극 후 T 세포 증식 분석법 및 3H-티미딘 인코포레이션에 기초한 펩스캔 분석; B 세포 증식 분석법); 다른 세포를 살해 또는 용해시키는 능력의 측정(예컨대 세포독성 T 세포 분석법); 사이토카인, 케모카인, 세포 표면 분자, 항체 및 세포의 기타 생성물의 측정(예컨대, 유세포 분석법, 효소-결합 면역흡착 분석법, 웨스턴 블롯 분석법, 단백질 마이크로어레이 분석법, 면역침전 분석법); 면역 세포 내 시그널링 경로 또는 면역 세포의 활성화의 생화학적 마커의 측정(예컨대, 티로신, 세린 또는 트레오닌 인산화의 면역침전 분석법 및 웨스턴 블롯, 폴리펩타이드 절단, 및 단백질 복합체의 형성 또는 해리; 단백질 어레이 분석법; DNA 전사, DNA 어레이 또는 분해성(subtractive) 혼성화); 아폽토시스, 괴사, 또는 기타 메카니즘에 의한 세포 사멸의 측정(예컨대, 어넥신 V 염색, TUNEL 분석법, DNA 래더링을 측정하기 위한 겔 전기영동법, 조직학; 형광발생 카스파제 분석법, 카스파제 기질의 웨스턴 블롯 분석법); 면역 세포에 의해 생산된 유전자, 단백질 및 기타 분자의 측정(예컨대 노던 블롯 분석법, 폴리머라제 연쇄반응, DNA 마이크로어레이, 단백질 마이크로어레이, 2-차원 겔 전기영동,웨스턴 블롯 분석법, 효소결합 면역흡착분석법, 유세포 분석법); 및 자가면역, 신경퇴행성 및 자가 단백질 또는 자가 폴리펩타이드와 연관된 기타 질환의 개선과 같은 임상적 증상 또는 결과의 측정(임상 점수, 부가적 치료의 사용에 대한 필요성, 기능 상태, 조영 연구), 예컨대 다발경화증의 경우 재발률 또는 질병 위중도의 측정(통상의 기술자에게 알려진 임상 점수를 이용), I형 당뇨병의 경우 혈당 측정 또는 류마티스성 관절염의 경우 관절 염증을 측정하는 것을 들 수 있다.

[0390] **VI. 제조 물품 및 키트**

[0391] [0275] 또한, 적합한 패키징에 본원에 기재된 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)을 포함하는 제조 물품(articles of manufacture)이 본원에 제공된다. 제조 물품에 적합한 패키징에는 하나 이상의 용기, 일반적으로 복수의 용기, 포장 재료, 및 대상체로의 조성물 투여 지침을 나타내는, 용기 또는 용기들 및/또는 패키징 상에 또는 내부에 포함된 라벨 또는 패키지 삽입물이 포함된다. 본원에 기재된 조성물을 위한 패키징에 적합한 용기는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 바이알(예컨대 밀봉된 바이알), 용기, 앰플, 병, 단지, 가요성 패키징(예컨대 밀봉된 Mylar 또는 플라스틱 백) 등이 이에 포함된다. 이들 제조 물품은 추가로 멸균 및/또는 밀봉될 수 있다.

[0392] [0276] 제조 물품은 하나 이상의 식별 정보 및/또는 사용 지침이 있는 패키지 삽입물 또는 라벨을 추가로 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 정보 또는 지침은 내용물이 특정 병태 또는 질병을 치료하고/하거나 그에 대한 지침을 제공하는 데 사용될 수 있거나 사용해야 함을 나타낸다. 라벨 또는 패키지 삽입물은 제조 물품의 내용물이 질병 또는 병태를 치료하는 데 사용되어야 한다고 표시할 수 있다. 일부 구체예에서, 라벨 또는 패키지 삽입물은 예를 들어 제공된 방법의 구체예 중 임의의 것에 따라 대상을 치료하기 위한 지침을 제공한다. 일부 구체예에서, 지침은 하나 이상의 단위 용량을 대상체에게 투여하는 것을 명시한다.

[0393] [0277] 또한 본원에 따라 본원에 설명된 의약 조성물 (또는 제조 물품)을 포함하는 키트 역시도 제공되며, 이것

은 예컨대 본원에 설명된 용도와 같은, 조성물의 사용 방법에 대한 지침(들)을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 설명된 키트는 또한 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 시린지 및 포장 삽입물을 비롯하여 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 그 밖의 물질을, 본원에 설명된 임의의 방법을 수행하기 위한 지침과 함께 포함할 수도 있다.

[0394] **VII. 치료적 적용**

[0395] [0278] 본원에 기재된 변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 함유하는 제공된 분자 및 이를 함유하는 의약 조성물의 사용 방법 및 용도가 본원에 제공된다. 이러한 방법 및 용도는 인간 환자와 같은 대상에서 질병 또는 상태를 치료하는 것과 관련하여 포함하는 면역 반응을 조절하는 방법을 포함한다. 본원의 방법 및 용도에 사용되는 이러한 분자 중에는 친화성 변형된 IgSF 도메인(예컨대 IgV)을 함유하는 ICOSL 변이체 폴리펩타이드의 세포외 도메인 또는 그의 일부가 멀티머화 도메인, 예컨대 Fc 도메인 또는 영역에 직접 또는 간접적으로 연결된 면역조절 융합 단백질 형식이 포함된다. 일부 구체예에서, 이러한 치료제는 변이체 ICOSL-Fc 융합 단백질, 예를 들어 변이체 ICOSL IgV-Fv 융합 단백질이다. 일부 구체예에서 의약 조성물은 포유동물에서 장기 이식과 관련하여 또는 염증성 또는 자가면역 장애를 치료하는데 사용된다.

[0396] [0279] 일부 태양에서, 의약 조성물은 질병을 치료하기 위해 면역 반응을 조절(예를 들어, 감소)시킬 수 있다. 본 발명의 치료 조성물의 투여가, 면역 세포를 감소 또는 저하시키거나; 면역 세포의 물리적 또는 기능적 특징을 변화시키거나; 또는 이러한 효과들의 조합에 의해 면역학적 활성을 충분히 조절할 수 있는지를 알아보기 위한 다양한 수단이 알려져 있다. 이러한 면역학적 활성 조절의 측정 사례에는 면역세포 집단의 존부 검사(유세포 분석법, 면역조직화학법, 조직학, 전자현미경, 폴리머라제 연쇄반응(PCR)을 이용); 시그널에 반응하여 증식 또는 분열하는 능력 또는 이에 대한 내성을 비롯한 면역 세포의 기능적 능력의 측정 (예컨대 항-CD3 항체, 항-T 세포수용체 항체, 항-CD28 항체, 칼슘 이오노포어, PMA (포볼 12-미리스테이트 13-아세테이트), 펩타이드 또는 단백질 항원이 로딩된 항원제시세포를 이용한 자극 후 T 세포 증식 분석법 및 3H-티미딘 인코포레이션에 기초한 펩스캔 분석; B 세포 증식 분석법); 다른 세포를 살해 또는 용해시키는 능력의 측정(예컨대 세포독성 T 세포 분석법); 사이토카인, 케모카인, 세포 표면 분자, 항체 및 세포의 기타 생성물의 측정(예컨대, 유세포 분석법, 효소-결합 면역흡착 분석법, 웨스턴 블롯 분석법, 단백질 마이크로어레이 분석법, 면역침전 분석법); 면역 세포 내 시그널링 경로 또는 면역 세포의 활성화의 생화학적 마커의 측정(예컨대, 티로신, 세린 또는 트레오닌 인산화의 면역침전 분석법 및 웨스턴 블롯, 폴리펩타이드 절단, 및 단백질 복합체의 형성 또는 해리; 단백질 어레이 분석법; DNA 전사, DNA 어레이 또는 분해성(subtractive) 혼성화); 아폽토시스, 괴사, 또는 기타 메카니즘에 의한 세포 사멸의 측정(예컨대, 어넥신 V 염색, TUNEL 분석법, DNA 래더링을 측정하기 위한 겔 전기영동법, 조직학; 형광발생 카스파제 분석법, 카스파제 기질의 웨스턴 블롯 분석법); 면역 세포에 의해 생산된 유전자, 단백질 및 기타 분자의 측정(예컨대 노던 블롯 분석법, 폴리머라제 연쇄반응, DNA 마이크로어레이, 단백질 마이크로어레이, 2-차원 겔 전기영동,웨스턴 블롯 분석법, 효소결합 면역흡착분석법, 유세포 분석법); 및 예컨대 재발률 또는 질병 위중도의 측정(통상의 기술자에게 알려진 임상 점수를 이용)에 의해, 임상적 증상 또는 결과를 측정하는 것을 들 수 있다.

[0397] [0280] 제공된 방법 및 용도 중에는 치료 방법 및 용도가 포함되며, 예를 들어 분자 또는 이를 함유하는 조성물을 치료가 필요한 질병, 상태 또는 장애를 가진 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 제공된 방법은 또한 질병, 병태 또는 장애의 발병 또는 발병 가능성이 있는 발병 전에 대상체에게 분자 또는 이를 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 예방적 치료를 포함한다. 본원에 기재된 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)은 자가면역 또는 염증성 질환 또는 장애의 치료를 포함하여 기재된 바와 같은 다양한 치료 또는 예방 치료 적용에 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 분자는 질병 또는 장애의 치료에 영향을 미치는 유효량으로 투여된다. 용도는 면역조절 융합 단백질과 같은 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 함유하는 분자를 이러한 방법 및 치료에서, 그리고 이러한 치료 방법을 수행하기 위한 의약 제조에 사용하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 이들 방법은 변이체 ICOSL 폴리펩타이드, 예컨대 면역조절 융합 단백질, 또는 이를 포함하는 조성물을, 질환 또는 병태를 갖거나 갖는 것으로 의심되는 대상체에게 투여함으로써 수행된다. 일부 구체예에서, 이러한 방법은 이에 의해 대상체의 질환 또는 병태 또는 장애를 치료한다.

[0398] [0281] 일부 구체예에서, 제공된 방법은 본원에 설명된 면역조절 융합 단백질과 같은 변이체 ICOSL 폴리펩타이드의 치료적 투여에 적용가능하다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 면역 반응을 억제하는데, 이것은 염증 또는 자가면역 질환 또는 장기이식 치료시 유용할 수 있다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 그의 동족 결합 파트너 CD28 또는 ICOS의 길항 활성을 나타내는 포맷 및/또는 CD28 또는 ICOS를 통해 공동자극 시그널링을 차단 또는 억제하는 포맷으로 함유한다. 이러한 치료적 용도와 관련하여 사용되기 위한 ICOSL 폴리펩타이드의 예시적인 포맷은, 예를 들어, 가용성인 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 (예컨대 변이체

ICOSL-Fc 융합 단백질)를 포함한다.

[0399] [0282] 제공된 방법 및 용도는 CD28 및/또는 ICOS 경로가 관련된 질병 또는 상태의 치료를 포함한다. 일부 구체예에서, 제공된 방법 및 용도는 CD28 및 ICOS 경로가 관련된 질병 또는 상태의 치료를 포함한다. CD28 및 ICOS는 각각의 리간드인 CD80(B7-1)와 CD86(B7-2) 및 ICOSL에 결합될 때 최적의 T 세포 활성화에 필요한 공동자극 신호를 제공한다. CD28은 이식편 대 숙주 질환(GVHD)과 같은 특정 염증성 질환에서 병원성 과정의 시작에 관여한다. 일부 태양에서, CD28 경로 억제제의 사용에 의한 CD28의 표적화는 예방 및/또는 치료를 포함하여, 이러한 질병 및 상태에 대한 치료적 유용성을 제공할 수 있다. 그러나, 어떤 경우에는 CD28 경로 억제만으로는 많은 환자에서 확립된 질병을 제어하는데 충분하지 않을 수 있다. 이러한 맥락에서 초기 활성화 후, CD28은 종종 하향 조절되는 반면, 가장 밀접하게 관련된 패밀리 멤버인 ICOS는 상향 조절되어, 위장 증상을 비롯한 GVHD와 같은 질병을 유지할 수 있는 추가적인 T 세포 공동 자극을 제공한다는 것이 인식되고 있다(Adom et al. Blood 2018; 132-355). 제공된 구체예는, CD28 또는 ICOS 경로만을 차단하는 제제에 비해, CD28 및 ICOS의 조합된 차단을 나타내는 변이체 ICOSL 분자, 예를 들어, 변이체 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 탁월한 유용성에 기초한다. 본원에 기재된 바와 같이, 변이체 ICOSL 분자, 예를 들어, 변이체 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질은 CD28 및 ICOS에 대한 높은 친화도 결합, 강력한 T 세포 활성화 및 다양한 염증성 동물 모델, 그 중에서도 특히 마우스에서 GVHD의 인간 이종 모델에서 질병 활성 억제를 나타내는 것으로 제공된다. 이러한 예에서 이러한 효과는 변이체 ICOSL 분자를 단지 단일 용량 투여한 후에도 볼 수 있다.

[0400] **A. 질병 또는 병태**

[0401] [0283] 일부 구체예에서, 제공된 방법은 본원에 기재된 모든 염증성 또는 자가면역 장애를 치료하기 위한 것이다. 일부 구체예에서, 치료는 장애의 증상의 발병 시점 또는 대략 그 시점에 투여된다. 일부 구체예에서, 치료는 질병의 발병 및/또는 증상의 발병에 비해 지연된 시간에 투여된다. 치료 투여의 지연은 또한 이식, 예를 들어 본원에 기술된 이식과 관련될 수 있음을 이해하여야 한다. 일부 구체예에서, 지연의 양은 질병 및/또는 증상 개시로부터 약 또는 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주 또는 그 이상이거나, 대략 또는 그 이상이다. 일부 구체예에서, 지연의 양은 질병 및/또는 증상 개시로부터 2주이다. 일부 구체예에서, 지연의 양은 질병 및/또는 증상 발병 후 대략 또는 적어도 3개월, 6개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년 이상이다. 일부 구체예에서, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 임의의 시간 지연 후에 투여되는 치료는 본원에 기재된 임의의 치료 요법, 투여량, 또는 계획된 투여량에 따라 투여된다.

[0402] *1. 염증성 또는 자가면역 질환*

[0403] [0284] 일부 구체예에서, 제공된 방법은 본원에 기재된 임의의 것과 같은 염증성 또는 자가면역 장애를 발병할 가능성이 있거나 발병할 것으로 의심되는 대상체의 예방적 치료를 포함한다. 예를 들어, 급성 GVHD와 같은 특정 자가면역 또는 염증성 질환의 발달은, 조혈 세포 이식과 관련되거나 조혈 세포 이식 후에 발병할 수 있다. 일부 경우에, 본 명세서에 기재된 바와 같은 예방적 치료는 염증성 또는 자가면역 장애가 발병하는 대상체의 위험을 최소화하거나 감소시킨다.

[0404] [0285] 일부 구체예에서, 염증 또는 자가면역 질환은 항호중구 세포질 항체 (ANCA)-관련 혈관염, 혈관염, 자가면역 피부 질환, 이식, 류마티스성 질환, 염증상 위장관 질환, 염증상 안질환, 염증상 신경 질환, 염증상 폐질환, 염증성 내분비 질환, 또는 자가면역 혈액학적 질환이다.

[0405] [0286] 일부 구체예에서, 본원의 의약 조성물에 의해 치료될 수 있는 염증 또는 자가면역 질환은 애디슨병, 알레르기, 탈모증, 알츠하이머, 항-호중구 세포질 항체 (ANCA)-관련 혈관염, 강직성 척추염, 항인지질 증후군 (휴증후군), 천식, 죽상동맥경화증, 류마티스성 관절염, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 내이질환, 자가면역 림프구증식 증후군, 자가면역 심근염, 자가면역 난소염, 무정자증, 베체트병, 버거병, 수포성 천포창, 심근병증, 심혈관 질환, 셀리악 스프루/셀리악 병, 만성피로 면역부전 증후군(CFIDS), 만성특발성 다발신경염, 만성염증성 탈수초증, 다발성 신경병증(CIPD), 만성 재발 성 다발성 신경병증 (길랭-바레 증후군), 척크-스트라우스 증후군 (CSS), 간질성 천포창, 저온응집소병(CAD), COPD (만성폐쇄성 폐질환), CREST 증후군, 크론병, 피부염, 포진피부염, 피부근육염, 당뇨병, 원반 낭창, 습진, 증식물집표피박리증, 필수 혼합형 저온 글로블린혈증, 에반 증후군, 외전 발작, 섬유근통, 굿파스쳐 증후군, 그레이브병, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유증, 특발성 혈소판 감소증 자반병 ITP), IgA 신증, 면역증식성 질환 또는 장애, 염증성 장질환 (IBD), 간질성 폐질환, 청소년 관절염, 청소년 특발성 관절염 (JIA), 가와사키병, 램버트-이튼 근무력 증후군, 편평태선, 루푸스 신장염, 림프구성 리포피시티스, 메니에르병, 밀러 피쉬 증후군/급성 파종뇌척수염, 혼합 연결조직 질환, 다발경화증(MS), 근육 류마티즘, 근육통성 뇌척수염 (ME), 중증 근무력증, 눈의 염증, 낙엽천포창, 보통

천포창, 악성빈혈, 결절다발동맥염, 다발연골염, 다분비성 증후군(휘태커 증후군), 류마티스성 다발근육통, 다발근육염, 프라이머리 아감마글루불린혈증, 일차담관경화증/자가면역 담도감염병증, 건선, 건선 관절염, 레이노 현상, 라이터 증후군/반응성 관절염, 재협착, 류마티스성 발열, 류마티스 질환, 사코이드증, 슈미트 증후군, 공피증, 쉐그렌 증후군, 강직증후군, 전신홍반루푸스(SLE), 전신 공피증, 타카야스 관절염, 일시적 관절염/자이언트 세포 동맥염, 갑상선염, I형 당뇨병, 궤양성 대장염, 포도막염, 혈관염, 백반증, 간질성 장질화나 또는 베게너 육아종증이다. 일부 구체예에서, 염증 또는 자가면역 질환은 간질성 장질환, 이식, 크론병, 궤양성 대장염, 다발경화증, 천식, 류마티스성 관절염 및 건선으로부터 선택된다.

[0406] [0287] 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 결합 조직 질환이다. 결합 조직 질환은 일반적으로 결합 조직의 광범위한 면역 및 염증 변화를 갖는 질병을 포함한다. 흔한 소견으로는 관절염 또는 활막염, 흉막염, 심근염, 심내막염, 심낭염, 복막염, 혈관염, 근염, 피부염, 신염 및 결합 조직의 변형이 있다. 결합 조직 질환은 거의 모든 장기 시스템과 연관되어 있다. 특히, 제공된 방법에는 류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 진행성 전신 경화증, 쇼그렌 증후군, 피부근염 및 혼합 결합 조직 질환과 같은 면역 조절 패턴의 변화로 인한 피부, 관절 및 연조직의 염증을 포함하는, 결합 조직 질환을 치료하는 방법이 포함된다.

[0407] [0288] 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 감염에 이차적인 장애이다. 일부 구체예에서, 감염은 바이러스 감염이다. 일부 구체예에서, 감염은 세균 감염이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 약물 또는 요법을 사용한 치료에 반응하여 발생하는 장애이다. 일부 구체예에서, 치료는 면역요법이다. 일부 구체예에서, 면역요법은 키메라 항원 수용체를 발현하도록 조작된 자가 T 세포의 입양 세포 전달, 예를 들어 CAR-T 세포 요법이다. 일부 구체예에서, 면역요법은 체크포인트 억제제를 사용한 치료이다. 감염, 예를 들어 바이러스 감염 또는 약물 치료 또는 요법에 이차적인 염증 또는 자가면역 장애의 예로는 사이토카인 폭풍, 사이토카인 방출 증후군, 전신 염증 반응 증후군, 대식세포 활성화 증후군(MAS) 및 혈구포식성 림프조직구증(예를 들어, 속발성 혈구포식성 림프조직구증)을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0408] [0289] 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 사이토카인 폭풍이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 사이토카인 방출 증후군(CRS)이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 전신 염증 반응 증후군이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 대식세포 활성화 증후군(MAS)이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 혈구포식성 림프조직구증이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 속발성 혈구포식성 림프조직구증이다. 일부 구체예에서, 사이토카인 방출 증후군, 전신 염증 반응 증후군, 대식세포 활성화 증후군(MAS), 및 혈구포식성 림프조직구증(예를 들어, 속발성 혈구탐식성 림프조직구증)은 사이토카인 폭풍의 서브세트이다.

[0409] [0290] 사이토카인 폭풍, 예를 들어 사이토카인 방출 증후군(CRS)과 관련된 예시적인 결과는 발열, 경직, 오한, 저혈압, 호흡곤란, 급성 호흡곤란 증후군(ARDS), 뇌병증, ALT/AST 상승, 신부전, 심장 장애, 저산소증, 신경학적 장애 및 사망을 포함한다. 신경학적 합병증에는 섬망, 발작과 같은 활동, 혼란, 단어 찾기 어려움, 실어증 및/또는 둔해짐이 포함된다. 그 밖의 결과로는 피로, 메스꺼움, 두통, 발작, 빈맥, 근육통, 발진, 급성 혈관 누출 증후군, 간 기능 손상 및 신부전을 들 수 있다. 일부 태양에서, 사이토카인 폭풍, 예를 들어 CRS는 혈청-페리틴, d-다이머, 아미노트랜스퍼라제, 젖산 탈수소효소 및 트리글리세리드와 같은 하나 이상의 인자의 증가, 또는 저섬유소원혈증 또는 간비장종대와 관련이 있다. 예컨대 CRS 등 사이토카인 폭풍과 관련된 EH 다른 예시적인 징후 또는 증상에는 혈역학적 불안정성, 열성 호중구감소증, 혈청 C-반응성 단백질(CRP) 증가, 응고 매개변수(예컨대 국제 표준화 비율(INR), 프로트롬빈 시간(PTI) 및/또는 피브리노겐)의 변화, 심장 및 기타 기관 기능의 변화, 및/또는 절대 호중구 수(ANC)가 포함된다.

[0410] [0291] 일부 구체예에서, 사이토카인 폭풍, 예를 들어 CRS와 관련된 결과는 다음 중 하나 이상을 포함한다: 지속적인 발열, 예를 들어, 2일 이상, 예를 들어, 3일 이상, 예를 들어, 4일 이상 또는 적어도 연속하여 3일 동안, 특정 온도, 예를 들어, 약 38℃ 이상의 발열이 지속되는 것; 섭씨 약 38도 이상의 발열; 적어도 2종의 사이토카인(예컨대 인터페론 감마(IFNɣ), GM -CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, 프랙트알킨, 및 IL-5, 및/또는 종양괴사 인자 알파(TNFα))의 전처리 수준에 비해 예컨대 적어도 약 75배의 최대 배수 변화, 또는 예를 들어, 적어도 1종의 이러한 사이토카인의 적어도 약 250배의 최대 배수 변화; 및/또는 적어도 하나의 독성 임상 징후, 예를 들어, 저혈압(예를 들어, 적어도 하나의 정맥내 혈관활성 승압기에 의해 측정됨); 저산소증(예를 들어, 약 90% 이하의 혈장 산소(PO2) 수준); 및/또는 하나 이상의 신경학적 장애(정신 상태 변화, 둔함 및 발작 포함).

[0411] [0292] 예시적인 사이토카인 폭풍 관련, 예를 들어, CRS와 관련된 결과는 사이토카인 및 케모카인 및 사이토카인 폭풍과 관련된 다른 인자를 포함하는 하나 이상의 인자의 증가된 또는 높은 혈청 수준을 포함한다. 예시적인

결과는 이러한 인자 중 하나 이상의 합성 또는 분비의 증가를 추가로 포함한다. 이러한 합성 또는 분비는 T 세포 또는 T 세포와 상호작용하는 세포, 예를 들어 선천성 면역 세포 또는 B 세포에 의한 것일 수 있다.

[0412] [0293] 일부 구체예에서, 사이토카인 폭풍-관련, 예를 들어 CRS, 혈청 인자 또는 관련 결과는 염증성 사이토카인 및/또는 케모카인, 예를 들어 인터페론 감마(IFN-γ), TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, sIL-2Ra, 과립구 대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF), 대식세포 염증 단백질(MIP)-1, 종양 괴사 인자 알파(TNFα), IL-6 및 IL-10, IL-1β, IL-8, IL-2, MIP-1, Flt-3L, 프랙트알킨 및/또는 IL-5를 포함한다. 일부 구체예에서, 인자 또는 결과는 C 반응성 단백질(CRP)을 포함한다. CRP는 초기에 쉽게 측정할 수 있는 위험 인자일 뿐만 아니라 세포 확장의 지표이기도 한다. 일부 구체예에서, ≥ 15 mg/dL와 같은 높은 수준의 CRP를 갖는 것으로 측정된 대상체는 사이토카인 폭풍, 예를 들어 CRS를 갖는다. 일부 구체예에서, 높은 수준의 CRP를 갖는 것으로 측정된 대상체는 사이토카인 폭풍, 예를 들어 CRS를 갖지 않는다. 일부 구체예에서, 사이토카인 폭풍의 척도는 CRP의 척도 및 사이토카인 폭풍을 나타내는 또 다른 인자, 예를 들어 CRS를 포함한다.

[0413] [0294] 일부 구체예에서, 하나 이상의 염증성 사이토카인 또는 케모카인을 모니터링하여 사이토카인 폭풍을 평가한다. 일부 태양에서, 하나 이상의 사이토카인 또는 케모카인으로는 IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-1β, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, sIL-2Rα, 과립구 대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF) 또는 대식세포 염증 단백질(MIP)을 들 수 있다. 일부 구체예에서, IFN-γ, TNF-α, 및 IL-6이 모니터링된다.

[0414] [0295] 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 CRS이다. 일부 구체예에서, 염증은 CRS와 연관된다. CRS 발병 위험이 더 높은 환자를 예측하기 위해 CRS 발병과 상관관계가 있는 것으로 보이는 CRS 기준이 개발되었다. 요인으로는 발열, 저산소증, 저혈압, 신경학적 변화, 7가지 사이토카인(IFNγ, IL-5, IL-6, IL-10, Flt-3L, 프랙트알킨 및 GM-CSF)과 같은 염증성 사이토카인의 혈청 수준 상승이 있다. 일부 구체예에서, CRS 등급을 반영하는 기준은 하기 표 A에 설명된 기준이다.

[0415]

표 A: CRS에 대한 예시적인 등급 기준

등급	증상 설명
1 경도	생명에 위협이 되지 않으며, 해열제, 항구토제 등의 대증요법만 필요(예: 발열, 메스꺼움, 피로, 두통, 근육통, 권태감)
2 중등도	중간 개입 요구 및 대응: • 산소 요구량 < 40%, 또는 • 체액에 반응하는 저혈압 또는 단일 승압제 저용량, 또는 • 2 등급 장기 독성(CTCAE v4.0 기준)
3 중증	적극적인 개입 요구 및 대응: • 산소 요구량 ≥ 40%, 또는 • 단일 혈압상승제를 고용량으로 사용해야 하는 저혈압(예: 노르에피네프린 ≥ 20 μg/kg/min, 도파민 ≥ 10 μg/kg/min, 페닐에프린 ≥ 200 μg/kg/min 또는 에피네프린 ≥ 10 μg/kg/min), 또는 • 다중 승압제를 필요로 하는 저혈압(예: 바소프레신 + 위 제제 중 하나, 또는 ≥ 20 μg/kg/min 노르에피네프린과 동등한 복합 승압제), 또는 • 3 등급 장기 독성 또는 4 등급 아미노트랜스퍼라제 증가 (CTCAE v4.0 기준)
4 생명 위협	생명 위협 : • 인공호흡기 지원 필요, 또는 • 4 등급 장기 독성(아미노트랜스퍼라제 증가 제외)
5 치명	사망

[0416] [0296] 일부 구체예에서, CRS는 중증 CRS 또는 3등급 이상의 CRS이다. 일부 구체예에서, 중증 CRS 또는 3등급 이상, 예컨대 4 등급 이상의 CRS와 관련된 결과는 다음 중 하나 이상을 포함한다: 지속적인 발열, 예를 들어, 2일 이상, 예를 들어, 3일 이상, 예를 들어, 4일 이상 또는 적어도 연속하여 3일 동안, 특정 온도, 예를 들어, 약 38℃ 이상의 발열이 지속되는 것; 섭씨 약 38도 이상의 발열; 적어도 2종의 사이토카인(예컨대 인터페론 감마(IFNγ), GM -CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, 프랙트알킨, 및 IL-5, 및/또는 종양 괴사 인자 알파(TNFα))의 베이스라인 수준에 비해 예컨대 적어도 약 75배의 최대 배수 변화, 또는 예를 들어, 적어도 1종의 이러한 사이토카인의 적어도 약 250배의 최대 배수 변화; 및/또는 적어도 하나의 독성 임상 징후, 예를 들어, 저혈압(예를 들어, 적어도 하나의 정맥내 혈관활성 승압기에 의해 측정됨); 저산소증(예를 들어, 약 90% 이하의 혈장 산소

(PO2) 수준); 및/또는 하나 이상의 신경학적 장애(정신 상태 변화, 둔함 및 발작 포함). 일부 구체예에서, 중증 CRS는 중환자실(ICU)에서의 관리 또는 치료를 필요로 하는 CRS를 포함한다.

[0417] [0297] 일부 구체예에서, 중증 CRS 또는 3등급 CRS는 알라닌 아미노트랜스퍼라제의 증가, 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제의 증가, 오한, 발열성 호중구감소증, 두통, 좌심실 기능장애, 뇌병증, 수두증 및/또는 경련을 포함한다.

[0418] [0298] 일부 구체예에서, 사이토카인 폭풍, 예를 들어 CRS는 감염에 반응하여 발생하거나 감염에 이차적이다. 일부 구체예에서, 감염은 바이러스 감염 또는 세균 감염이다. 일부 구체예에서, 바이러스 감염은 코로나바이러스 감염이다. 일부 구체예에서, 바이러스 감염은 SARS-CoV-2 감염이다. 일부 구체예에서, 바이러스 감염은 SARS-CoV 감염이다. 일부 구체예에서, 바이러스 감염은 MERS-CoV 감염이다.

[0419] [0299] 일부 구체예에서, 사이토카인 폭풍은 감염, 병태 또는 질병에서 발생하거나 이차적으로 발생한다. 예를 들어, CRS와 같은 사이토카인 폭풍은 감염, 상태 또는 질병의 진행 중에 발생할 수 있다. 일부 구체예에서, 사이토카인 폭풍, 예를 들어 CRS는 코로나바이러스 2019에서 발생한다. 일부 구체예에서, 사이토카인 폭풍은 폐렴에서 발생한다. 일부 구체예에서, 사이토카인 폭풍은 쇼크에서 발생한다. 일부 구체예에서, 사이토카인 폭풍은 패혈증에서 발생한다. 일부 구체예에서, 사이토카인 폭풍은 다발성 장기부전에서 발생한다. 일부 구체예에서, 사이토카인 폭풍은 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)에서 발생한다.

[0420] [0300] 일부 구체예에서, 사이토카인 폭풍은 약물 또는 요법을 사용한 치료에 대한 반응으로 발생한다. 일부 구체예에서, 사이토카인 폭풍은 면역요법에 의한 치료에 대한 반응으로 발생한다. 예를 들어, 일부 경우에 사이토카인 폭풍은 키메라 항원 수용체를 발현하도록 조작된 자가 T 세포의 입양 세포 전달(예컨대 CAR-T 세포 요법) 후에 발생한다. 일부 구체예에서, 사이토카인 폭풍은 체크포인트 억제제를 사용한 치료 후에 발생한다.

[0421] [0301] 일부 구체예에서, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물은, 사이토카인 폭풍을 치료하는데 사용된다. 일부 구체예에서, 치료될 사이토카인 폭풍은 SARS-CoV-2 감염에 이차적이다. 일부 구체예에서, SARS-CoV-2에 의한 감염은 양성 RT-PCR 시험에 의해 확인된다. 일부 구체예에서, 치료될 SARS-CoV-2에 대해 양성인 대상체는 중증 폐렴, 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 패혈증, 패혈성 쇼크, 또는 SARS-CoV-2 감염에 기인하는 다발성 장기부전을 추가로 나타낸다.

[0422] [0302] 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 만성 자가면역 질환이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 쇼그렌 증후군(pSS) 또는 전신성 홍반성 루푸스(SLE)이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 염증성 장 질환(IBD)이다. 일부 구체예에서, IBD는 만성 IBD이다. 일부 예에서 염증성 또는 자가면역 질환은 크론병이다. 일부 예에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 궤양성 대장염이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 IBD-관련 질환 또는 장애, 예를 들어, 간질성 폐질환(ILD)이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 건선성 관절염 또는 류마티스성 관절염이다.

[0423] [0303] 일부 구체예에서, 의약 조성물은 자가면역 상태를 조절하기 위해 투여된다. 예를 들어, 공여자로부터의 조직, 세포 또는 장기이식을 수혜자가 거부하는 것을 억제하는 방법에 있어서 면역 반응을 억제하는 것이 이로울 수 있다. 그러므로, 일부 구체예에서, 본원에 설명된 의약 조성물은 이식편 대 숙주 질환(GVHD)와 같은 이식편-관련 또는 이식 관련 질병 또는 장애를 제한 또는 예방하는데 사용된다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 이식 또는 식립된(transplanted, grafted) 골수, 장기, 피부, 신경, 아일렛 또는 실질 세포(parenchymal cells)의 자가면역 거부를 억제하는데 이용된다.

[0424] [0304] 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 시알라덴염과 연관된다. 어떤 경우, 시알라덴염은 바이러스나 박테리아에 의한 침샘의 감염이다. 일부 구체예에서, 이하선 또는 턱밑샘은 시알라덴염에 의해 영향을 받는다. 일부 구체예에서, 시알라덴염은 환부의 통증, 압통, 발적 및 점진적인 국소 반점과 관련이 있다.

[0425] [0305] 일부 구체예에서, 염증성 또는 면역 장애는 췌도염과 관련된다. 일부 구체예에서, 췌도염은 췌장의 랑게르한스 섬의 염증을 수반한다. 일부 구체예에서, 췌장 β-세포를 함유하는 섬은 B 및 T 림프구, 대식세포 또는 수지상 세포에 의해 침윤된다.

[0426] [0306] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF (예를 들어, IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에 제공된 의약 조성물은 건선성 관절염 (PsA)을 치료하는데 사용된다. 일부 경우에, PsA는 팔꿈치, 손목, 손 및 발, 또는 시술 관절을 포함하여 손가락, 발가락, 팔 또는 다리와 같은 하나 이상의 관절에 영향을 미친다. 어떤 경우에는, PsA가 경미하거나 및/또는 4개 이하의 관절에 영향을 미친다. 어떤 경우에는 PsA가 보통이거나 4개 이상의 관절에 영향을 미친다. 일부 경우에, PsA를 갖는 대상자는 척추 또는 목 또는 하나 이상의 관절에 통증,

뻣뻣함 또는 염증을 나타낼 수 있다.

[0427] [0307] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF (예를 들어, IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에 제공된 의약 조성물은 류마티스 관절염(RA)을 치료하는데 사용된다. 일부 경우, RA는 신체의 관절, 관절의 라이닝 및/또는 비 관절 구조(예컨대, 피부, 눈, 폐, 심장, 신장, 타액선, 신경 조직, 골수 또는 혈관)에 영향을 미친다. 일부 구체예에서, RA 또는 RA 증상은 만성적이다.

[0428] [0308] 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 만성 장애이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애는 급성 장애이다.

[0429] [0309] 일부 경우에서, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물은 만성 염증성 또는 자가면역 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물을 사용한 만성 염증성 또는 자가면역 장애의 치료는 대상체에 대한 연속 투여를 포함한다. 일부 구체예에서, 연속 투여는 반복 투여이다. 일부 경우에서, 치료 요법을 포함한 치료 기간이 반복된다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 일부 구체예에서, 치료 기간은 반복된다. 일부 구체예에서, 반복 치료 기간은 이전 치료 기간 직후에 발생한다. 일부 구체예에서, 투여는 숙련된 의사가 원하는 임의의 시간까지 반복된다. 예를 들어, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물을 이용하는 만성 염증성 또는 자가면역 장애의 치료는, 대상체에게 무기한으로 치료제를 투여하는 것을 포함할 수 있다.

[0430] [0310] 일부 경우에, 만성 염증성 또는 자가면역 장애를 치료하기 위해 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 의약 조성물을 사용한 치료는 간헐적 투여를 포함한다. 예를 들어, 만성 염증성 또는 자가면역 장애의 치료, 예를 들어 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물은 특정 치료 요법, 예를 들어 치료 기간의 치료 요법은 대상에게 임의의 횟수로 반복적으로 투여된다. 일부 구체예에서, 치료 기간 및 치료 요법은 치료 기간 사이에 지연을 두고 반복된다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 무기한 반복된다. 일부 구체예에서, 치료는 숙련된 의사에 의해 원하는 만큼 대상에게 임의의 횟수로 투여된다.

[0431] [0311] 일부 구체예에서, 치료는 원하는 효과를 유지하기 위해 대상체에게 투여된다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애가 만성 염증성 또는 자가면역 질환인 경우, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물을 사용한 치료는, 예컨대 만성 염증성 또는 자가면역 장애를 갖는 대상체에서 염증의 하나 이상의 징후의 감소와 같은, 질병의 징후 및/또는 증상의 감소 또는 개선 및/또는 질병의 관해 또는 부분적 관해 후에 계속된다. 일부 구체예에서, 치료는 증상의 재발을 방지하고/하거나 만성 염증성 또는 자가면역 장애의 증상의 관해 또는 감소를 유지하도록 계속될 수 있다. 일부 구체예에서, 투여는 숙련된 의사가 원하는 임의의 시간까지 계속된다. 일부 구체예에서, 계속된 투여는 본원에 기재된 바와 같은 반복된 치료 기간의 형태이다.

[0432] [0312] 본원에 기재된 임의의 만성 염증성 또는 자가면역 장애, 예를 들어 만성 GvHD, 만성 염증성 장 질환, 쇼그렌 증후군(pSS) 또는 전신 홍반성 루푸스(SLE), COPD, 크론병, 궤양성 대장염, 간질성 폐 질환(ILD), 건선성 관절염, 류마티스 관절염, 또는 본원에 기재된 모든 만성 형태의 염증성 또는 자가면역 질환 또는 장애는 상기 기재된 만성 치료에 따른 치료를 투여함으로써 치료될 수 있다.

[0433] [0313] 일부 경우에, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물은, 급성 염증성 또는 자가면역 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 급성 염증성 또는 자가면역 장애의 치료, 예를 들어 본원에 제공된 의약 조성물, 예컨대 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF (예컨대 IgV) Fc 융합 단백질을 이용하는 치료는, 정의된 또는 제한된 기간 동안 대상체에게 치료를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 투여는 반복되지 않는 단일 치료 기간 동안 이루어진다. 일부 구체예에서, 투여는 단일 용량(single dose)이다. 일부 구체예에서, 기간 또는 치료 기간은 숙련된 의사가 원하는 대로 설정된다.

[0434] [0314] 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애가 급성 염증성 또는 자가면역 장애인 경우, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물을 사용한 치료는, 예컨대 급성 염증성 또는 자가면역 장애를 갖는 대상체에서 염증의 하나 이상의 징후의 감소와 같은, 질병의 징후 및/또는 증상의 감소 또는 개선 및/또는 질병의 관해 또는 부분적 관해 후에 중단된다. 일부 구체예에서, 투여는 숙련된 의사가 원하면 언제든지 중단된다.

[0435] [0315] 본원에 기재된 임의의 급성 염증성 또는 자가면역 장애, 예를 들어, 급성 GvHD, 또는 본원에 기재된 임의의 급성 형태의 염증성 또는 자가면역 장애는 상기에 따른 치료를 투여함으로써 치료될 수 있다. 일부 구체예에서, 사이토카인 폭풍은 급성 염증성 또는 자가면역 질환이다. 일부 구체예에서, CRS는 급성 염증성 또는 자가면역 질환이다.

[0436] [0316] 일부 구체예에서, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물은 GVHD를 치료하는 데 사용된다.

[0437] [0317] 일부 구체예에서, GVHD는 만성 GVHD이다. 일부 구체예에서, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물은 GVHD를 치료하는 데 사용된다. 일부 구체예에서, GVHD는 만성 GVHD이다. 일부 경우에 만성 GVHD는 동종이계 조혈모세포 이식(HSCT) 및/또는 숙주 조직에 대한 공여자 면역 세포의 반응 후에 발생한다. 어떤 경우, 만성 GVHD는 피부, 간 또는 위장관에서 나타난다. 일부 구체예에서, 만성 GVHD는 내성 또는 불응성이다. 일부 구체예에서, 만성 GVHD는 면역억제제에 대해 내성 또는 불응성이다. 일부 경우 면역억제제는 코르티코스테로이드 및/또는 사이클로스포린이다. 어떤 경우 코르티코스테로이드는 글루코코르티코이드이다.

[0438] [0318] 일부 구체예에서, GVHD는 급성 GVHD(aGVHD)이다. 일부 경우에, aGVHD는 동종이계 조혈모세포 이식(HSCT) 및/또는 숙주 조직에 대한 공여자 면역 세포의 반응 후에 발생한다. 일부 구체예에서, aGVHD는 내성 또는 불응성이다. 일부 구체예에서, aGVHD는 면역억제제에 대해 내성 또는 불응성이다. 어떤 경우 aGVHD가 피부, 간 또는 위장관에서 나타난다.

[0439] [0319] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에 제공된 의약 조성물은 GVHD를 치료하는 데 사용된다. 일부 구체예에서, GVHD는 급성 GVHD(aGVHD)이다. 일부 경우에, aGVHD는 동종이계 조혈모세포 이식(HSCT) 및/또는 숙주 조직에 대한 공여자 면역 세포의 반응 후에 발생한다. 어떤 경우에는 aGVHD가 피부, 간 또는 위장관에서 나타난다. 일부 구체예에서, aGVHD는 내성 또는 불응성이다. 일부 구체예에서, aGVHD는 면역억제제에 대해 내성 또는 불응성이다. 어떤 경우에는 면역억제제가 코르티코스테로이드 및/또는 사이클로스포린이다. 어떤 경우에는 코르티코스테로이드가 글루코코르티코이드이다.

[0440] [0320] 일부 구체예에서, 내성 또는 불응성 aGvHD는 ≥2 mg/kg/일의 프레드니손 또는 그의 등가물을 사용한 치료 개시 후 5일 이내에 aGVHD의 진행을 포함한다. 일부 구체예에서, 진행은 임의의 장기에서 개선이 있거나 없는 상태에서 적어도 하나의 장기에서 GVHD가 악화하는 것이거나 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 내성 또는 불응성 aGVHD는 ≥ 2 mg/kg/일의 프레드니손 또는 그의 등가물로 치료를 시작한 후 7일 이내에 개선되지 않는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 개선 실패는 임의의 장기에서 개선이 있거나 없는 상태에서 적어도 하나의 장기에서 GVHD의 악화 또는 동일한 등급의 GVHD의 유지 또는 임의의 장기에서의 GVHD의 진행 또는 사망, 또는 계획된 구제 요법을 넘어 2차 GVHD 치료를 추가하는 것이거나 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 내성 또는 불응성 aGVHD는 스테로이드를 포함하는 면역억제 치료, 예를 들어 ≥ 2 mg/kg/일의 프레드니손 또는 그의 등가물을 사용한 치료를 포함하는 면역억제 치료의 28일 후 불완전 반응을 포함한다. 일부 구체예에서, 불완전 반응은 계획된 구제 요법을 넘어 2차 GVHD 요법 없이 모든 장기에서 aGVHD 증상의 완전한 해결에 도달하지 못한 것이거나 이를 포함한다. 일부 구체예에서, 내성 또는 불응성 GVHD는 본원에 기재된 임의의 병태를 포함한다.

[0441] [0321] 일부 경우에, aGVHD는 마운트 시나이 급성 GVHD 국제 컨소시엄(MAGIC) 가이드라인(Mount Sinai Acute GVHD International Consortium (MAGIC) Guideline)에 따라 등급화되거나 단계화된다. 표 B는 예시적인 GVHD 표적 장기의 병기(staging) 결정을 나타낸다. 일부 구체예에서, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물은 II-IV 등급 aGVHD를 치료하는 데 이용된다.

[0442] [0322] **표 B:** GVHD 표적 장기 병기 결정

병기	피부 (활동성 홍반만)	간 (빌리루빈)	상부 GI	하부 GI (배변량/일)
0	비활동성 (홍반성) GVHD 발진	< 2 mg/dL	메스꺼움, 구토 또는 식욕 부진이 없거나 간헐적임	성인: < 500 ml/일 또는 <3 회/일 유아: < 10 ml/kg/일 또는 <4 회/일
1	반구진 발진 <25% BSA	2-3 mg/dL	지속적인 메스꺼움, 구토 또는 식욕 부진	성인: 500-999 ml/일 또는 3-4 회/일 유아: 10-19.9 ml/kg/일 또는 4-6 회/일
2	반구진 발진 25 - 50% BSA	3.1-6 mg/dL		성인: 1000-1500 ml/일 또는 5-7 회/일 유아: 20-30 ml/kg/일 또는 7-10 회/일
3	반구진 발진 > 50% BSA	6.1-15 mg/dL		성인: >1500 ml/일 또는 >7 회/일 유아: >30 ml/kg/일 또는 >10 회/일
4	전신적 홍피증(> 5 0% BSA) + 수포 형성 및 박리 >5% BSA	>15 mg/dL		장폐색이 있거나 없는 심한 복통 또는 심한 혈변(대변량에 관계 없음).

[0443]

전체 임상 등급(가장 심각한 표적 장기 침범을 기준):

- 0 등급: 모든 장기의 1-4 기 없음
- I 등급: 간, 상부 GI 또는 하부 GI 침범이 없는 1-2 기의 피부
- II 등급: 3 기의 발진 및/또는 1 기의 간 및/또는 1 기의 상부 GI 및/또는 1 기의 하부 GI
- III 등급: 2-3 기의 장기 및/또는 2-3 기 하부 GI, 0-3 기의 피부 및/또는 0-1 기의 상부 GI
- IV 등급: 0-1 기의 상부 GI 를 포함한, 4 기의 피부, 간 또는 하부 GI 침범,

[0444]

[0445] [0323] 일부 구체예에서, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물은, 치료 개시시, 카르노프스키(Karnofsky) 등급이 40 이상인 aGVHD를 갖는 대상체를 치료하는 데 사용된다. 표 C는 카르노프스키 등급 체계를 나타낸다.

[0446] [0324] **표 C:** 카르노프스키 척도

카르노프스키 척도	카르코프스키 등급	기준 ECOG 등급
정상적이며, 불평 없음	100	0
정상적인 활동 수행 가능. 질병의 경미한 징후 또는 증상	90	1
노력으로 정상 활동 가능	80	1
자가 돌봄. 정상적인 활동 수행 또는 활동적인 작업은 불가능	70	2
종종 도움이 필요하지만, 대부분의 자가 돌봄 가능	60	2
상당한 도움과 빈번한 의료가 필요	50	3
장애가 있으며, 특별한 주의와 도움이 필요	40	3
중증도의 장애. 사망이 임박하여 입원 필요	30	4
매우 아픔. 입원 필요. 적극적인 지지적 치료 필요	20	4
빈사	10	4
사망	0	5

[0447]

[0448] [0325] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에 제공된 의약 조성물은, 치료 시작, 예를 들어 일차 투여시 40 이상의 카르노프스키 등급을 갖고, 본원에 기재된 바와 같은 II-IV 등급dml 내성 또는 불응성 aGvHD를 갖는 대상체를 치료하는데 사용된다. 일부 구체예에서, 대상체는 18세 이상이어야 한다. 일부 구체예에서, 대상체는 구제 요법으로 추가 치료될 수 있다. 일부 구체예에서, 구제 요법은 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물을 투여하기 적어도 2일 전에 개시된다. 일부 구체예에서, 구제 요법을 받는 대상체는 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물의 투여 전에 적어도 2일 동안 안정한 용량으로 투여받아야 한다. 일부 구체예에서, 구제 요법은 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF (예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물의 투여 후에 개시되지 않을 수 있다.

[0449] [0326] 일부 구체예에서, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물은, 예를 들어 예방적 치료로서, 줄기 세포 이식(예를 들어 동종이계 공여자로부터와 같은

조혈 줄기 세포 이식)과 관련된 염증성 또는 자가면역 질환의 위험을 방지하거나 저하시키는데 사용된다. 일부 구체예에서, 예방적 치료는 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질의 적어도 하나의 용량을, 대상체가 줄기 세포 이식을 받기 전에 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 예방적 치료는 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질의 적어도 하나의 용량을, 대상체가 줄기 세포 이식을 받기 전에 투여하고 적어도 하나의 용량을 대상체가 줄기 세포 이식을 받는 것과 동시에 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 줄기 세포 이식과 관련된 염증성 또는 자가면역 병태는 급성 GVHD이다. 일부 구체예에서, 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에 제공된 의약 조성물은 중등도(modrate) aGVHD를 예방적으로 치료하는 데 사용된다. 일부 구체예에서, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물은 중증 aGVHD를 예방적으로 치료하거나 예방하기 위해 사용된다. 일부 구체예에서, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물을 사용한 예방적 치료는 중등도 또는 중증 aGVHD를 예방하거나 제한한다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 의약 조성물은 코르티코스테로이드(예를 들어, 글루코코르티코이드) 또는 사이클로스포린과 같은 면역억제제에 내성 또는 불응성인 aGVHD와 같은 이식편 관련 또는 이식 관련 질병 또는 장애를 제한하거나 예방하는데 사용된다.

[0450] [0327] 일부 구체예에서, 줄기 세포 이식(예를 들어, 동종이계 공여자로부터의 것과 같은 조혈 줄기 세포 이식)과 관련된 염증성 또는 자가면역 병태를 치료하는 것은 병태의 예방적 치료(예를 들어, 예방)를 포함한다. 일부 구체예에서, 예방적 치료는 이식-주위(peri-transplant) 치료를 포함한다. 어떤 경우에는 이식 전후 치료가 줄기 세포 이식과 관련된 GVHD의 위험을 예방하거나 저하시켜준다. 일부 구체예에서, 이식-주위 치료는 줄기 세포 이식에 앞서 치료를 투여하는 것 및 줄기 세포 이식과 동시에 또는 그 후에 치료를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 치료 투여는 이식에 비해 지연된다. 일부 구체예에서, 지연의 양은 이식 시점으로부터 적어도 또는 약 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주 또는 그 이상이거나 대략이거나 또는 그 이상이다. 일부 구체예에서, 지연의 양은 이식으로부터 100일 미만이다. 일부 구체예에서, GVHD는 급성 이식편 대 숙주 질환(aGVHD)이다.

[0451] [0328] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF (예를 들어, IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에 제공된 의약 조성물은 장기 이식과 관련된 자가면역 상태를 치료하는데 사용된다. 일부 경우에, 장기 이식과 관련된 자가면역 상태를 치료함으로써 숙주 및 이식된 기관의 생존을 연장시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 장기 이식과 관련된 자가면역 병태의 치료는 장기 이식의 수혜자인 대상체에 의한 이식 거부의 예방 또는 억제 또는 예방을 포함한다.

[0452] [0329] 일부 구체예에서, 장기 이식과 관련된 염증성 또는 자가면역 상태를 치료하는 것은 이식-주위 치료를 포함한다. 일부 경우에, 이식-주위 치료는 장기 이식을 받는 대상체에 의한 이식 거부 위험을 예방하거나 낮춘다. 일부 구체예에서, 이식-주위 치료는 이식 전에 치료를 투여하고 이식과 동시에 또는 이식 후에 치료를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 치료 투여는 이식에 비해 지연된다. 일부 구체예에서, 지연의 양은 이식 시점으로부터 적어도 또는 약 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주 또는 그 이상이다. 일부 구체예에서, 지연의 양은 이식으로부터 100일 미만이다.

[0453] [0330] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF (예를 들어, IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에 제공된 의약 조성물은 염증성 장질환(IBD)을 치료하는데 사용된다. 일부 구체예에서, 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF (예를 들어, IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에 제공된 의약 조성물은 크론병을 치료하는데 사용된다. 일부 구체예에서, 크론병은 크론성 대장염, 크론성 장염, 크론성 장골 또는 크론성 장염으로부터의 아형을 포함할 수 있다.

[0454] [0331] 일부 구체예에서, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물로 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 염증성 장 질환(IBD)이다. 어떤 경우에는 IBD가 소화관 전체 또는 일부의 만성 염증과 관련된 장애를 포함한다. 일부 구체예에서, IBD는 만성 IBD이다. 일부 구체예에서, IBD의 유형(예를 들어, 만성 IBD)은 궤양성 대장염 및 크론병을 포함한다. 일부 구체예에서, 만성 IBD는 크론병 및 궤양성 대장염을 포함한다. 일부 구체예에서, IBD(예를 들어, 만성 IBD)의 증상은 설사, 발열 및 피로, 복통 및 경련, 혈변, 식욕 감퇴, 및 의도하지 않은 체중 감소를 포함한다. 일부 구체예에서, IBD의 증상은 크론병 및 궤양성 대장염 양자 모두에 공통적이다.

[0455] [0332] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에 제공된 의약 조성물은 크론병(CD)을 치료하는 데 사용된다. 어떤 경우에는 CD가 입에서 항문에 이르는 위장관의 일부

또는 전체에 염증을 유발한다. 어떤 경우에는 CD가 소화관 내막에 영향을 미치는 만성 염증성 장 질환이다. 어떤 경우에는 CD가 지속적인 설사, 절박, 불완전 배변의 감각 및/또는 변비를 포함한 배변에 영향을 미친다. 어떤 경우에는 CD 환자가 복부 경련과 통증을 경험한다. 어떤 경우에는 CD 환자가 직장 출혈을 경험한다. 어떤 경우에는 CD의 증상이 환자마다 다르나. 어떤 경우에는 CD 환자에게 균열, 누공 및 협착과 같은 합병증이 발생한다. 일부 경우에서 CD의 전신 증상으로는 눈의 발적 또는 통증, 시력 변화, 구강 궤양, 관절 부종 및/또는 통증, 피부 합병증(예컨대 발진, 융기, 궤양), 발열, 식욕 부진, 체중 감소, 빈혈, 피로, 야간 발한, 정상적인 월경 주기 상실, 골다공증, 신장 결석 및 간 합병증(예컨대 원발성 경화성 담관염, 간경변)을 들 수 있다.

[0456] [0333] 일부 구체예에서, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물은 궤양성 대장염(UC)을 치료하는 데 사용된다. 어떤 경우에는 UC로 인해 소화관에 염증 및/또는 궤양이 오래 지속된다. 어떤 경우에는 UC가 대장(결장)과 직장의 최내측 라이닝에 영향을 미친다. 어떤 경우에는 UC의 증상이 시간이 지남에 따라 발생한다. 어떤 경우에는 UC가 혈액이나 고름을 수반하는 설사, 절박성 및/또는 절박성에도 불구한 배변 불능을 포함하여 배변에 영향을 미친다. 어떤 경우에는 UC 환자는 직장 출혈 체중 감소, 피로, 발열을 경험하고 어린이의 경우 성장 실패를 경험한다. 어떤 경우에는 증상이 경미하거나 중등도이다. 어떤 경우에는 UC 환자가 장기간 관해를 경험할 수 있다. 일부 구체예에서, UC는 궤양성 직장염이다. 일부 구체예에서, 궤양성 직장염은 항문(직장)에 가장 가까운 영역에 국한된다. 어떤 경우에는 궤양성 직장염 환자가 직장 출혈을 경험한다. 일부 구체예에서, UC는 직장상결장염(proctosigmoiditis)이다. 어떤 경우에는 직장상결장염이 직장과 S상 결장에 영향을 미친다. 어떤 경우에 직장상결장염 환자는 혈변, 복부 경련 및 통증, 절박성에도 불구하고 장을 움직일 수 없는 것(tenesmus)을 경험한다. 어떤 경우에는 UC가 좌측 대장염이다. 일부 구체예에서, 좌측 대장염은 직장에서 S상 결장 및 하행 결장으로 확장되는 염증을 야기한다. 어떤 경우에는 좌측 대장염이 있는 환자는 혈변성 설사, 왼쪽 복통 및 경련, 의도하지 않은 체중 감소를 경험한다. 어떤 경우에는 UC가 췌장염이다. 일부 구체예에서, 췌장염은 전체 결장에 영향을 미친다. 어떤 경우에는 췌장염 환자가 혈성 설사, 복부 경련 및 통증, 피로 및 상당한 체중 감소를 경험한다. 어떤 경우에는 UC가 급성 중증 UC이다. 일부 구체예에서, 급성 중증 UC는 전체 결장에 영향을 미치는 드문 형태의 UC이다. 어떤 경우에는 급성 중증 궤양성 대장염 환자는 심한 통증, 심한 설사, 출혈, 발열 및 섭식불능을 경험한다.

[0457] [0334] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF (예를 들어, IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에 제공된 의약 조성물은 전신 홍반성 루푸스(SLE)를 치료하기 위해 사용된다. 일부 구체예에서, 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF (예를 들어, IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에 제공된 의약 조성물은 쇼그렌 증후군을 치료하는데 사용된다.

[0458] **투여량 및 투여**

[0459] [0335] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)은 대상체에게 투여된다. 일반적으로, 의약 조성물의 투여량 및 투여 경로는 표준 약제학적 관행에 따라 대상체의 크기 및 상태에 따라 결정된다. 일부 구체예에서, 대상체의 상태는 치료되는 장애가 만성 또는 급성 장애인지를 포함한다. 예를 들어, 치료적 유효 용량은 세포 배양 분석 또는 마우스, 래트, 토끼, 개, 돼지 또는 원숭이와 같은 동물 모델에서 초기에 추정될 수 있다. 동물 모델을 사용하여 적절한 농도 범위와 투여 경로를 결정할 수도 있다. 그런 다음 이러한 정보는 사람에게 투여하기 위한 유용한 용량 및 경로를 결정하는 데 사용할 수 있다. 정확한 투여량은 치료가 필요한 대상체와 관련된 인자를 고려하여 결정될 수 있다. 투여량 및 투여는 활성 화합물의 충분한 수준을 제공하거나 원하는 효과를 유지하도록 조정될 수 있다. 고려할 수 있는 요인에는 질병 상태의 중증도, 대상체의 일반적인 건강, 피험자의 연령, 체중 및 성별, 투여 시간 및 빈도, 약물 조합(들), 치료에 대한 반응 민감도 및 반응이 포함된다.

[0460] [0336] 일부 구체예에서, 대조군 동물 및 질병의 동물 모델(예를 들어, 암 모델)에서 관찰된 약동학(PK) 및 약력학(PD) 프로파일의 모델링 및 시뮬레이션을 사용하여 환자 투여량을 예측하거나 결정할 수 있다. 예를 들어, 비인간 영장류(예컨대 시노몰구스 원숭이)의 PK 데이터를 사용하여 인간 PK를 추정할 수 있다. 마찬가지로, 마우스 PK 및 PD 데이터를 사용하여 인간 투여량을 예측할 수 있다. 관찰된 동물 데이터는 인간 용량 반응을 시뮬레이션하는 데 사용할 수 있는 계산 모델을 알려주는 데 사용할 수 있다.

[0461] [0337] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 방법은 예컨대 CD28 및/또는 ICOS와 같은, 그의 동족 리간드에 대한 표적 결합 포화를 달성하는 것으로 공지되거나 예측되는 양으로, 본원에 기재된 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)을 투여하는 것을 포함한다. 동족 리간드에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화도는 실험적으로 또는 경험적으로 결정할 수 있다. 일부 구체예에서, 표적 결합 포화는 인간

CD28 또는 인간 ICOS와 같은 동족 리간드를 발현하는 포유동물 세포에 대한 시험관내 결합 데이터로부터 결정될 수 있다.

[0462] [0338] 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 다음과 같이 Cmax에서 약 25% 이상, 예컨대 Cmax에서 약 30% 이상, Cmax에서 약 35% 이상, Cmax에서 약 40% 이상, Cmax에서 약 50% 이상의 CD28에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 Cmax에서 약 85% 이상의 CD28에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 투여 후 24시간 이내에 약 10% 이상 초과, 예컨대 약 15% 초과, 약 20% 초과, 약 25% 초과, 약 30% 초과, 약 50% 초과, 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의, CD28에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화도를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 투여 후 2일 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 CD28에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 7일(1주) 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 CD28에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 14일(2주) 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 CD28에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 투여 후 21일 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 CD28에 대한 결합 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 투여 후 28일 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 CD28에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다.

[0463] [0339] 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 다음과 같이 Cmax에서 약 25% 초과, 예컨대 Cmax에서 약 30% 초과, Cmax에서 약 35% 초과, Cmax에서 약 40% 초과, Cmax에서 약 50% 초과의의 ICOS 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 투여 후 24시간 이내에 약 10% 초과, 예컨대 약 15% 초과, 약 20% 초과, 약 25% 초과, 약 30%, greater than 약 50% 초과, 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 ICOS에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화도를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 투여 후 2일 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 ICOS에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 7일(1주) 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 ICOS 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 14일(2주) 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 ICOS에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화도를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 투여 후 21일 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 ICOS에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 투여 후 28일 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 ICOS에 대한 결합 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다.

[0464] [0340] 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 적어도 또는 약 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간 또는 그 이상의 기간 동안, 약 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 초과의 ICOS에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화도를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 적어도 또는 약 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간 또는 그 이상의 기간 동안, 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 초과의 ICOS에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화도를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량

은 약 24시간 동안 약 50% 초과의 ICOS에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다.

[0465] [0341] 본 명세서에 기재된 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)은 특정 제형의 반감기, 수명 및 소거율에 따라 3 내지 4일마다, 매주, 격주, 3주마다, 한 달에 한 번 등으로 투여될 수 있다. 투여 빈도는 사용된 제형에서 분자의 약동학적 매개변수에 따라 달라질 것이다. 전형적으로, 조성물은 원하는 효과를 달성하는 용량에 도달할 때까지 투여된다. 따라서, 조성물은 단일 용량으로서, 또는 시간 경과에 따른 다중 용량(동일하거나 상이한 농도/용법용량으로)으로, 또는 연속 주입으로서 투여될 수 있다. 적절한 투여량의 추가 개선이 일상적으로 이루어진다. 적절한 용량-반응 데이터를 사용하여 적절한 용량을 확인할 수 있다. 일부 경우에, 예를 들어 만성 염증성 또는 자가면역 장애가 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물로 치료되는 경우, 조성물은 시간이 지남에 따라 연속적으로, 예를 들어 반복적으로 또는 시간이 지남에 따라 간헐적으로 투여된다. 예를 들어, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물을 사용한 만성 염증성 또는 자가면역 장애의 치료는 대상체에게 무기한으로 치료를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애가 만성 염증성 또는 자가면역 장애인 경우, 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에 제공된 의약 조성물을 사용한 치료는, 예컨대 만성 염증성 또는 자가면역 장애를 갖는 대상체에서 염증의 하나 이상의 징후의 감소와 같은, 질병의 징후 및/또는 증상의 감소 또는 개선 및/또는 질병의 관해 또는 부분적 관해 후에 지속된다. 일부 경우에서, 예를 들어 급성 염증성 또는 자가면역 장애가 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물로 치료되는 경우, 조성물은 정의된 또는 제한된 기간 동안 투여된다 . 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애가 급성 염증성 또는 자가면역 장애인 경우, 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에 제공된 의약 조성물을 사용한 치료는 예컨대 급성 염증성 또는 자가면역 장애를 갖는 대상체에서 염증의 하나 이상의 징후의 감소와 같은, 질병의 징후 및/또는 증상의 감소 또는 개선 및/또는 질병의 관해 또는 부분적 관해 후에 중단된다. 일부 구체예에서, 투여는 숙련된 의사가 원하는 대로 언제든지 중단된다.

[0466] [0342] 전형적으로, 투여될 본원에 제공된 조성물의 정확한 양은 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 전이의 정도, 및 환자(대상체)의 상태의 개인차를 고려하여 의사에 의해 결정될 수 있다. 일부 구체예에서, 대상체의 mg/kg을 기준으로 하는 투여량을 언급할 때, 평균 인간 대상체는 약 70kg 내지 75kg의 체중, 예를 들어 70kg 및 1.73㎡의 체표면적(BSA)을 갖는 것으로 간주된다.

[0467] [0343] 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 약학 조성물 포함)의 치료 유효량을 달성하기 위한 투여량은 단일 용량이거나 또는 치료 기간 동안 여러 번 투여하는 것과 같이, 치료 기간 동안 반복 용량이다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 함유하는 본원에 제공된 의약 조성물의 단일 용량이 치료 기간 동안 투여된다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 함유하는 본원에 제공된 의약 조성물의 다중 반복 투여량이 치료 기간 동안 투여된다.

[0468] [0344] 일부 구체예에서, 치료 기간은 반복된다. 예를 들어, 치료될 장애가 만성 염증성 또는 자가면역 장애인 경우, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 특정 치료 요법을 포함하는 치료 기간은 임의의 횟수로 반복될 수 있다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 무기한 반복된다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 2년, 3년, 4년, 5년, 6년 또는 그 이상 동안 반복된다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 6년 동안 반복된다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 3년 동안 반복된다. 일부 구체예에서, 치료 기간의 반복 횟수는 숙련된 의사가 원하는 임의의 횟수이다. 일부 구체예에서, 반복 치료 기간은 연속 치료로 간주될 수 있다. 예를 들어, 4주의 치료 기간 중 주 1회 투여하고, 이전 치료 기간 종료 직후에 치료 기간이 반복되어, 치료 기간이 무기한 반복되는 경우, 반복 치료는 연속적일 수 있다. 일부 구체예에서, 반복된 치료 기간은 간헐적 치료로 간주될 수 있다. 예를 들어, 4주의 치료 기간 중 주 1회 투여하고, 치료 기간이 1차 치료 기간 종료 후 2주 동안 반복되고, 이러한 사이클이 예를 들어 무기한 반복되면, 반복 치료는 간헐적 치료인 것으로 간주될 수 있다. 일부 구체예에서, 간헐적 치료는 연속적 치료이다.

[0469] [0345] 일부 구체예에서, 약 1회 이상(예컨대 약 2회 이상, 약 3회 이상, 약 4회 이상, 약 5회 이상, 약 6회 이상, 또는 약 7회 이상)의 다중 용량이 치료 기간 동안 주어진다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 20일 초과, 예컨대 20일 내지 40일 동안, 예컨대 약 21 일, 22 일, 23 일, 24 일, 25 일, 26 일, 27 일, 28 일, 29 일, 30 일, 31 일, 32 일, 33 일, 34 일, 35 일, 36 일, 37 일, 38 일, 39 일 또는 40 일이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 적어도 또는 약 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50일이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은

약 28일 내지 약 42일이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 42일(또는 약 6주)이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 21일 내지 약 28일이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 21일이다. 일부 구체예에서 치료 기간은 약 28일(4주)이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 6개월 이상이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10년 또는 그 이상이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 1년 내지 약 3년이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 3년 내지 약 6년이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 반복된다. 일부 구체예에서, 치료 기간이 반복된다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 반복된다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 무기한 반복된다. 예를 들어, 무기한 치료는 만성 염증성 또는 자가면역 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 이전 치료 기간 직후에 반복된다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 이전 치료 기간 후에 시간 지연을 두고 반복된다. 일부 구체예에서, 지연은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8주이거나 적어도 1주이다. 일부 구체예에서, 지연은 적어도 또는 약 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 또는 1년 이하이다.

[0470] [0346] 일부 구체예에서, 두 가지 이상의 치료 기간 및/또는 요법이 조합될 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 초기 치료 기간은 4주가 될 수 있고 2주마다 투여를 포함할 수 있고, 두 번째 치료 기간은 4주로 하고 4주마다 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 제1 또는 제2 치료 기간이 반복될 수 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 4주마다 투여되는 4주간의 제2 치료 기간은, 예를 들어 숙련된 의사가 원하는 만큼 반복될 수 있다.

[0471] [0347] 일부 구체예에서, 복수의 용량의 각 용량은 치료 기간 동안 주 2회 투여된다. 특정 구체예에서, 복수의 용량의 각 용량은 치료 기간 동안 주 1회 이하로 투여된다. 일부 구체예에서, 복수의 용량의 각 용량은 치료 기간 동안 주 1회(Q1W) 투여된다. 일부 구체예에서, 투여 요법은 4주 동안 주 1회 제공되는 4회 용량의 투여를 포함한다. 일부 구체예에서, 투여 요법은 초기 투여, 초기 투여 후 2주 및 4주째 투여 및 그 후 4주마다 투여를 포함한다.

[0472] [0348] 일부 구체예에서, 복수의 용량의 각 용량은 매일 투여된다. 이것은 예를 들어 염증성 또는 자가면역 질환이 급성 질환이고 대상체가 병원 또는 기타 의료 시설에서 치료되는 경우에 일어날 수 있다.

[0473] [0349] 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)의 투여 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양이다. 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)의 투여 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양이다. 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)의 투여 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양이다. 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)의 투여 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양이다. 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)의 투여 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg이다. 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)의 투여 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 6 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 6 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 10 mg/kg 내지 약 20 mg/kg이다. 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)의 투여 용량은 약 0.3 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 3 mg/kg 또는 약 6 mg/kg이다. 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)의 투여 용량은 약 10 mg/kg의 양이다.

[0474] [0350] 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)은 경구, 경피, 흡입, 정맥내, 동맥내, 근육내, 상처 부위에의 직접 적용, 수술 부위에의 적용, 복강내, 좌약, 피하, 피내, 경피, 분무, 흉막내, 심실내, 관절내, 안내, 척수내, 종양내 또는 전신을 비롯한 임의의 경로를 통해 대상체에게 투여된다.

[0475] [0351] 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)은 비경구적으로 투여된다. 본원에 제공된 예는 특히 적합한 투여 경로가 정맥내, 피하 또는 종양내 투여를 포함함을 입증한다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 주사, 예를 들어 일시 주사에 의한 투여에 적합한 형태이다. 일부 구체예에서, 의약 조성물은 예를 들어 정맥내 주사에 의한 주입 주사에 적합한 형태이다. 일부 구체예에서, 주입 지속 시간은 약 30분, 40분, 50분, 1시간, 1.5시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간 또는 6시간이거나, 적어도, 또는 약 6시간이다. 일부 구체예에서, 주입 지속시간은 약 30분 내지 6시간이다. 일부 구체예에서, 주입 지

속시간은 약 30분 내지 5시간이다. 일부 구체예에서, 주입 지속 시간은 약 30분 내지 4시간이다. 일부 구체예에서, 주입 지속 시간은 약 30분 내지 3시간이다. 일부 구체예에서, 주입 지속 시간은 약 30분 내지 2시간이다. 일부 구체예에서, 주입 지속 시간은 약 30분 내지 1시간이다. 일부 구체예에서, 주입 기간은 약 30분이다.

[0476] [0352] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 용량 요법은 치료 유효량을 달성하기 위해 투여된다.

[0477] [0353] 투여(예를 들어, 다중 투여)는 숙련된 의사가 원하는 임의의 시간까지 계속될 수 있는 것으로 고려된다. 예를 들어, 투약은 질병의 관해 또는 부분 관해와 같은 바람직한 질병 반응이 달성될 때까지 및/또는 질병의 징후 및/또는 증상의 감소 또는 개선, 예를 들어 대상체에서 염증의 하나 이상의 징후의 감소가 달성될 때까지 계속될 수 있다. 일부 구체예에서, 투여는 질병의 관해 또는 부분 관해 및/또는 질병의 징후 및/또는 증상의 감소 또는 개선, 예컨대 대상체에서 하나 이상의 염증 징후의 감소 후에 계속된다.

[0478] [0354] 방법의 일부 구체예에서, 치료는 임상적 관해를 초래할 수 있다. 일부 태양에서, 치료는 1차 투여로부터 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 9주, 약 10주, 약 11주, 약 12주, 약 14주, 약 16주, 약 18주, 약 20주, 약 22주, 약 24주, 약 26주, 약 28주, 약 30주, 약 32주, 약 34주, 약 36주, 약 38주, 약 40주, 약 42주, 약 44주, 약 46주, 약 48주, 약 50주, 약 52주, 약 54주, 약 56주, 약 58주, 약 60주, 약 62주, 약 64주, 약 66주, 약 68주, 약 70주, 약 72주, 약 74주, 약 76주, 약 78주, 또는 약 80주 없이 임상적 관해를 유도할 수 있다. 일부 구체예에서, 치료는 1차 투여로부터 약 10주 이내에 임상적 관해를 초래한다. 일부 구체예에서, 치료는 1차 투여로부터 약 6주 이내에 임상적 관해를 초래한다. 일부 구체예에서, 치료는 1차 투여으로부터 약 6주째 및 1차 투여로부터 약 10주째에 임상적 관해를 초래한다.

[0479] [0355] 전술한 임의의 방법들 중 일부 구체예에서, 임상적 관해는 지속적인 관해이다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 지속적인 관해는 1차 투여로부터 약 10주, 약 15주, 약 20주, 약 25주, 약 30주, 약 35주, 약 40주, 약 45주, 약 50주, 약 52주, 약 55주, 약 60주, 약 65주, 약 70주, 약 72주, 약 75주, 약 80주, 약 85주, 약 90주, 약 95주, 약 100주, 약 102주, 약 105주, 또는 약 110주 동안 지속된다. 일부 구체예에서, 지속적인 관해는 1차 투여로부터 약 10주 동안 및 1차 투여로부터 약 30주 동안이다. 일부 구체예에서, 지속적 관해 기간은 적어도 약 30주, 또는 적어도 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 또는 약 12개월이다. 전술한 임의의 태양들 중 일부 구체예에서, 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상의 개선, 임상적 관해 및/또는 임상 반응은 치료 종료 후 적어도 1개월(예를 들어, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 최소 3개월, 최소 4개월, 최소 5개월, 최소 6개월, 최소 7개월, 최소 8개월, 최소 9개월, 최소 10개월, 최소 11개월, 최소 12개월 이상) 동안 유지된다.

[0480] 2. *안구 염증 또는 자가면역 질환*

[0481] [0356] 일부 구체예에서, 제공된 조성물 및 방법은 눈에 영향을 미치는 염증성 또는 자가면역 장애를 치료하기 위해 사용된다. 일부 구체예에서, 전신성 자가면역 질환, 예컨대 류마티스 관절염, 소아 류마티스 관절염, 쇼그렌 증후군, 장병증성 관절염, 건선성 관절염, 다발성 경화증, 거대 세포 동맥염, 그레이브스병, 중증 근무력증, 사르코이드증, 타카야수 동맥염, 전신성 피부근염, 결절다발동맥염, 재발성 다발연골염, 다발혈관염을 동반한 육아종증(이전에는 베게너병이라고 함), 경피증, 베체트병, 반응성 관절염(이전에는 라이터 증후군이라고 함), 염증성 장질환(궤양성 대장염 및 크론병), 쇼그렌 증후군, 및 및 강직성 척추염은 예를 들어 백혈구에 의한 면역 염증 공격의 표적으로 눈을 포함한다. 어떤 경우에는 전신성 염증성 또는 자가면역질환의 안구증상은 건성각결막염, 공막염, 상공막염, 각막염, 궤양성 각막염, 맥락막염, 망막혈관염, 상공막결절, 망막박리, 황반부종포막염, 상공막염, 말초궤양성 각막염, 결막염, 포도막염, 망막출혈, 증식성 망막병증, 허혈성 시신경병증, 반맹, 아마증, 핵안근마비, 동공이상, 안구운동 이상, 환시, 안구후신경염, 시야결손, 핵간 안근마비, 측정이상, 안진, 뇌신경마비, 일시적 흑내장, 복시, 시력상실, 안구돌출/안검지체, 눈꺼풀 지체 및 수축, 시력 저하, 시야 감소, 상대 구심성 동공 결손, 색각 상실, 복시, 안검하수, 결막 결절, 두개신경 마비, 눈물샘 비재, 안와 봉와직염, 각막 궤양, 전 방축 고름, 혈관 폐색 망막증, 백내장 및/또는 눈꺼풀/결막의 부종이다. 어떤 경우에는 안구 증상은 전신 염증성 또는 자가면역 질환에 특이적이다.

[0482] [0357] 일부 경우에, 눈은 자가면역 질환에 의해 영향을 받는 특이적이고 유일한 표적, 예를 들어 눈 특이적 표적이다. 안구 특이적 자가면역 질환의 예에는 안구 반점 천포창, 무렌 각막 궤양 및 포도막염이 포함되지만 이에 국한되지는 않는다.

[0483] [0358] 예를 들어 유리체내 주사에 의한 코르티코스테로이드의 국소 안구 투여는 일반적으로 포도막염과 같이 눈에 영향을 미치는 염증성 또는 자가면역 질환에 대한 치료의 표준으로 간주된다. 그러나 코르티코스테로이드를 사용하면 백내장 및 녹내장과 같은 부작용의 위험이 있다. 본원에 제공된 조성물 및 방법은 눈에 영향을 미

치는 염증성 또는 자가면역 질환을 치료하는데 사용하도록 고려된다. 일부 구체예에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법은 스테로이드의 사용과 관련된 부작용 없이 눈에 영향을 미치는 전신성 자가면역 질환 또는 눈 특이적 자가면역 질환을 치료한다. 일부 구체예에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법은 예를 들어 눈-특이적 염증성 또는 자가면역 질환을 예방하기 위한 예방제로서 투여된다. 일부 구체예에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법은 예를 들어 전신 염증성 또는 자가면역 질환의 안구 징후를 예방하기 한해 예방제로서 투여된다. 일부 구체예에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법은 예를 들어 눈-특이적 염증성 또는 자가면역 질환을 치료하기 위한 치료적 치료제로서 투여된다. 일부 구체예에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법은 예를 들어 전신 염증성 또는 자가면역 질환의 안구 징후를 치료하기 위한 치료적 치료제로서 투여된다. 일부 구체예에서, 치료는 눈에 영향을 미치는 자가면역 또는 염증성 질환의 증상을 감소 또는 개선하는 것을 포함한다.

[0484] [0359] 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 눈에 영향을 미치는, 예를 들어 안구 징후를 초래하는 전신성 자가면역 질환이다. 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 눈에 영향을 미치는 류마티스 관절염이다. 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 눈에 영향을 미치는 소아 류마티스 관절염이다. 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 눈에 영향을 미치는 쇼그렌 증후군이다. 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 눈에 영향을 미치는 건선성 관절염이다. 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 눈에 영향을 미치는 전신 홍반성 루푸스이다. 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 눈에 영향을 미치는 유육종증이다. 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 눈에 영향을 미치는 피부근염이다. 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 눈에 영향을 미치는 결절성 다발동맥염이다. 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 눈에 영향을 미치는 재발성 다발연골염이다. 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 눈에 영향을 미치는 다발혈관염을 동반한 육아종증이다. 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 눈에 영향을 미치는 경피증이다. 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 눈에 영향을 미치는 베체트병이다. 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 눈에 영향을 미치는 반응성 관절염이다. 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 눈에 영향을 미치는 염증성 장 질환(궤양성 대장염 및 크론병)이다. 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 눈에 영향을 미치는 강직성 척추염이다. 일부 구체예에서, 전신성 자가면역 또는 염증성 질환은 눈에 영향을 미쳐서 예를 들어 상기 기재된 바와 같이 안구 징후를 초래한다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 질환은 눈에서 염증 반응을 생성함으로써 눈에 영향을 미친다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 질환은 면역 세포의 눈으로의 침윤을 유발함으로써 눈에 영향을 미친다. 일부 구체예에서, 치료는 예방적 치료이다. 예를 들어, 전신성 자가면역 또는 염증성 질환을 앓는 대상체는 안구 염증(예를 들어, 안구 징후)의 증상을 나타내기 전에 본원에 제공된 조성물로 치료될 수 있다. 일부 구체예에서, 전신성 자가면역 질환 또는 염증성 질환을 갖는 대상체는 안구 징후, 예를 들어 염증 반응의 발병이 의심될 수 있다. 일부 구체예에서, 치료는 눈 증상의 발병 이후에 전달되는 치료적 치료이다.

[0485] [0360] 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 안구 반흔 천포창이다. 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 무렌 각막 궤양이다. 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 포도막염 또는 그의 특정 유형이다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 질환은 눈에서 염증 반응을 생성함으로써 눈에 영향을 미친다. 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 질환은 면역 세포의 눈으로의 침윤을 유발함으로써 눈에 영향을 미친다. 일부 구체예에서, 치료는 예방적 치료이다. 예를 들어, 눈 특이적 자가면역 또는 염증성 질환을 갖는 것으로 의심되는 대상체, 예를 들어 눈 특이적 자가면역 또는 염증성 질환의 하나 이상의 바이오마커에 대해 양성인 대상체는 증상, 예를 들어, 눈에 염증이 나타나기 전에 본원에 제공된 조성물로 치료될 수 있다. 일부 구체예에서, 치료는 눈 증상, 예를 들어 염증의 발병 후에 전달되는 치료적 치료이다.

[0486] [0361] 일부 구체예에서, 치료될 염증성 또는 자가면역 질환은 포도막염이다. 어떤 경우에는 포도막염으로 인해 안구 조직의 중간층(포도막)에 염증이 발생한다. 어떤 경우에는 포도막염이 홍채의 염증과 관련이 있다. 일부 구체예에서, 포도막염은 모양체의 염증을 수반한다. 일부 구체예에서, 포도막염은 맥락막의 염증을 수반한다. 일부 구체예에서, 포도막염은 망막의 염증을 수반한다. 일부 구체예에서, 포도막염은 포도막의 모든 층의 염증을 수반한다. 일부 구체예에서, 포도막염은 염증이 있는 유리체 및/또는 염증 세포로의 유리체 침윤과 관련이 있다. 일부 구체예에서, 포도막염은 한쪽 또는 양쪽 눈에 영향을 미친다.

[0487] [0362] 일부 구체예에서, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물은 포도막염을 치료하는데 사용된다. 일부 구체예에서, 포도막염은 홍채염(전방 포도막염)이다. 일부 구체예에서, 포도막염은 고리염(중간 포도막염)이다. 일부 구체예에서, 포도막염은 맥락막염이다. 일부 구체예에서, 포도막염은 망막염이다. 일부 구체예에서, 포도막염은 미만성 포도막염(범포도

막염)이다. 일부 구체예에서, 포도막염은 염증이 있는 유리체와 관련된다. 일부 구체예에서, 포도막염은 유리체 내로의 염증 세포의 침윤과 관련된다. 일부 구체예에서, 포도막염은 한쪽 또는 양쪽 눈에 영향을 미친다. 일부 구체예에서, 포도막염은 눈의 충혈, 눈 통증, 광 민감성, 뿌연 시야, 시야의 어둡고 및/또는 떠다니는 반점, 및/또는 감소된 시력과 관련이 있다. 일부 구체예에서, 포도막염은 사르코이드증에 의해 유발된다. 일부 구체예에서, 포도막염은 강직성 척추염에 의해 유발된다. 일부 구체예에서, 포도막염은 크론병에 의해 유발된다. 일부 구체예에서, 포도막염은 궤양성 대장염에 의해 유발된다. 일부 구체예에서, 포도막염은 류마티스 관절염에 의해 유발된다. 일부 구체예에서, 포도막염은 소아 류마티스 관절염에 의해 유발된다. 일부 구체예에서, 포도막염은 반응성 관절염에 의해 유발된다. 일부 구체예에서, 포도막염은 장병성 관절염에 의해 유발된다. 일부 구체예에서, 포도막염은 건선성 관절염에 의해 유발된다. 일부 구체예에서, 포도막염은 전신 홍반성 루푸스에 의해 유발된다. 일부 구체예에서, 포도막염은 베체트 증후군에 의해 유발된다. 일부 구체예에서, 포도막염은 피부근염에 의해 유발된다. 일부 구체예에서, 포도막염은 다발혈관염을 동반한 육아종증에 의해 유발된다. 일부 구체예에서, 포도막염은 고양이 긁힘병, 대상포진, 매독, 톡소플라스마증, 결핵, 라임병 또는 웨스트 나일 바이러스와 같은 감염에 의해 유발된다. 일부 구체예에서, 포도막염은 림프종과 같이 눈에 영향을 미치는 암에 의해 유발된다. 일부 구체예에서, 포도막염은 예를 들어 전신성 자가면역 또는 염증성 질환에 의해 유발되지 않는 눈 특이적 자가면역 또는 염증성 질환이다.

[0488] [0363] 일부 경우에서, 안구 염증성 또는 자가면역 질환은 만성 질환이다. 예를 들어, 안구 염증성 또는 자가면역 질환은 이 질환이 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 만성 염증성 또는 자가면역 질환의 안구 징후인 경우, 예컨대 본원에 설명된 바와 같이(예를 들어, 섹션 VII-A-1 참조), 또는 위에서 설명한 안구 특이적 염증성 질환의 만성 형태인 경우 만성 질환으로 간주될 수 있다. 어떤 경우에는 안구 염증성 또는 자가면역 질환은 급성 질환이다. 예를 들어, 안구 염증성 또는 자가면역 질환은 이 질환이 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 급성 염증성 또는 자가면역 질환의 안구 징후일 때(예를 들어, 섹션 VII-A-1 참조) 또는 위에서 설명한 안구 특이적 염증성 질환의 급성 형태인 경우 급성 질환으로 간주될 수 있다.

[0489] [0364] 일부 경우에서, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예를 들어, IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물은 만성 안구 염증 또는 자가면역 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예를 들어, IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물을 사용한 만성 안구 염증성 또는 자가면역 질환의 치료는 대상체에 대한 연속 투여를 포함한다. 일부 구체예에서, 연속 투여는 반복 투여이다. 어떤 경우에는 치료 요법을 포함한 치료 기간이 반복된다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 일부 구체예에서, 치료 기간이 반복된다. 일부 구체예에서, 반복 치료 기간은 이전 치료 기간 직후에 발생한다. 일부 구체예에서, 투여는 숙련된 의사가 원하는 임의의 시간까지 반복된다. 예를 들어, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물을 사용한 만성 안구 염증성 또는 자가면역 질환의 치료는 대상체에게 무기한으로 치료를 투여하는 것을 포함할 수 있다.

[0490] [0365] 일부 경우에서, 만성 안구 염증성 또는 자가면역 질환을 치료하기 위해 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF(예를 들어, IgV) Fc 융합 단백질과 같은 의약 조성물을 사용한 치료는 간헐적 투여를 포함한다. 예를 들어, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물을 사용한 만성 안구 염증성 또는 자가면역 질환의 치료는, 특정 치료 요법, 예를 들어 치료 기간 동안 치료법이 대상체에게 임의의 횟수로 반복적으로 투여되는, 순환 방식으로 치료를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 치료 기간 및 치료 요법은 치료 기간 사이에 지연을 두고 반복된다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 무기한 반복된다. 일부 구체예에서, 치료는 숙련된 의사에 의해 원하는 만큼 대상에게 임의의 횟수로 투여된다.

[0491] [0366] 일부 구체예에서, 치료는 원하는 효과를 유지하기 위해 대상체에게 투여된다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 안구 염증성 또는 자가면역 질환이 만성 안구 염증성 또는 자가면역 질환인 경우, 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에 제공된 의약 조성물을 사용한 치료는 예컨대 만성 안구 염증 또는 자가면역 장애를 갖는 대상체에서 염증의 하나 이상의 징후 및/또는 증상의 감소 또는 개선, 및/또는 질병의 관해 또는 부분 관해 후에 계속된다. 일부 구체예에서, 치료는 증상의 재발을 방지하고/하거나 만성 안구 염증성 또는 자가면역 장애의 증상의 완화 또는 감소를 유지하도록 계속될 수 있다. 일부 구체예에서, 투여는 숙련된 의사가 원하는 임의의 시간까지 계속된다. 일부 구체예에서, 계속된 투여는 본원에 기재된 바와 같은 반복된 치료 기간의 형태이다.

[0492] [0367] 일부 경우에, 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에 제공된 의약 조성물은, 급성 안구 염증성 또는 자가면역 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에서 제공되는

변이체 ICOSL IgSF(예를 들어, IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물을 사용한 급성 안구 염증성 또는 자가면역 질환의 치료는, 정의된 또는 제한된 기간 동안 대상체에게 치료를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 투여는 반복되지 않는 단일 치료 기간 동안이다. 일부 구체예에서, 기간 또는 치료 기간은 숙련된 의사가 원하는 대로 설정된다.

[0493] [0368] 일부 구체예에서, 염증성 또는 자가면역 장애가 급성 안구 염증성 또는 자가면역 질환인 경우, 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에 제공된 의약 조성물을 사용한 치료는, 예를 들어 급성 질병 또는 장애가 있는 대상체에서 염증의 하나 이상의 징후의 감소와 같은 질병의 징후 및/또는 증상의 감소 또는 개선 및/또는 질병의 관해 또는 부분 관해 후에 중단된다. 일부 구체예에서, 투여는 숙련된 의사가 원하는 대로 언제든지 중단된다.

[0494] **투여량 및 투여**

[0495] [0369] 본원에 기재된 바와 같은 안구 염증성 및 자가면역 질환의 치료 방법은 전신 투여, 국소 투여 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 나타나는 증상 및/또는 눈 질환의 기저의 원인은 투여 방법에 관한 정보를 줄 수 있다. 일부 구체예에서, 제시된 증상 및/또는 눈 질환의 기저의 원인은 급성 치료를 할지 만성 치료를 할지에 대한 정보를 줄 수 있다.

[0496] [0370] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)은 안구 염증성 또는 자가면역 질환을 갖는 대상체에게 전신적으로 투여된다. 예를 들어, 전신 투여는 본원에 기재된 임의의 구체예에 따라 수행할 수 있다. 일부 구체예에서, 전신 투여는 섹션 VII-A-1에 기재된 방법에 따라 달성된다. 일부 구체예에서, 전신 투여는 대상체가 예를 들어, 눈 징후, 예를 들어, 눈 염증을 나타낼 수 있거나 나타낼 수 있는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 전신성 자가면역 또는 염증성 질환을 가질 때 사용된다. 일부 구체예에서, 예를 들어, 상기 기재된 바와 같이 대상체가 눈 특이적 자가면역 또는 염증성 질환을 가질 때 전신 투여가 사용된다.

[0497] [0371] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)은 안구 염증성 또는 자가면역 질환이 있는 대상체에게 국소적으로, 예를 들어 안구내로 투여된다. 일부 구체예에서, 투여는 유리체내 투여이다.

[0498] [0372] 일부 구체예에서, 유리체내 투여 후 대조군 동물 및 질병의 동물 모델(예를 들어, 포도막염 모델)에서 관찰된 약동학(PK) 및 약력학(PD) 프로파일의 모델링 및 시뮬레이션을 사용하여 환자 투여량을 예측하거나 결정할 수 있다. 예를 들어, 비인간 영장류(예컨대 시노몰구스 원숭이)의 PK 데이터를 사용하여 인간 PK를 추정할 수 있다. 마찬가지로, 마우스 및/또는 래트의 PK 및 PD 데이터를 사용하여 인간 투여량을 예측할 수 있다. 관찰된 동물 데이터는 인간 용량 반응을 시뮬레이션하는 데 사용할 수 있는 계산 모델을 알려주는 데 사용할 수 있다.

[0499] [0373] 일부 구체예에서, 본원에 제공된 방법은 예컨대 CD28 및/또는 ICOS와 같은, 그의 동족 리간드에 대한 표적 결합 포화를 달성하는 것으로 공지되거나 예측되는 양으로, 본원에 기재된 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)을 투여하는 것을 포함한다. 동족 리간드에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화도는 실험적으로 또는 경험적으로 결정할 수 있다. 일부 구체예에서, 표적 결합 포화는 인간 CD28 또는 인간 ICOS와 같은 동족 리간드를 발현하는 포유동물 세포에 대한 시험관내 결합 데이터로부터 결정될 수 있다.

[0500] [0374] 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 다음과 같이 Cmax에서 약 25% 이상, 예컨대 Cmax에서 약 30% 이상, Cmax에서 약 35% 이상, Cmax에서 약 40% 이상, Cmax에서 약 50% 이상의 CD28에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 Cmax에서 약 85% 이상의 CD28에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 투여 후 24시간 이내에 약 10% 이상 초과, 예컨대 약 15% 초과, 약 20% 초과, 약 25% 초과, 약 30% 초과, 약 50% 초과, 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의, CD28에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화도를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 투여 후 2일 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 CD28에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL

IgSF 융합 단백질의 용량은 7일(1주) 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 CD28에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 14일(2주) 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 CD28에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 투여 후 21일 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 CD28에 대한 결합 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 투여 후 28일 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 CD28에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다.

[0501] [0375] 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 다음과 같이 Cmax에서 약 25% 초과, 예컨대 Cmax에서 약 30% 초과, Cmax에서 약 35% 초과, Cmax에서 약 40% 초과, Cmax에서 약 50% 초과의의 ICOS 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 투여 후 24시간 이내에 약 10% 초과, 예컨대 약 15% 초과, 약 20% 초과, 약 25% 초과, 약 30%, greater than 약 50% 초과, 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 ICOS에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화도를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 투여 후 2일 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 ICOS에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 7일(1주) 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 ICOS 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 14일(2주) 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 ICOS에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화도를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 투여 후 21일 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 ICOS에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 투여 후 28일 이내에 약 50% 초과, 예컨대 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 85% 초과, 약 90% 초과, 약 95%, 또는 약 100%의 ICOS에 대한 결합 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다.

[0502] [0376] 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 적어도 또는 약 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간 또는 그 이상의 기간 동안, 약 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 초과의 ICOS에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화도를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 적어도 또는 약 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간 또는 그 이상의 기간 동안, 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 초과의 ICOS에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화도를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다. 일부 구체예에서, 투여되는 변이체 ICOSL IgSF 융합 단백질의 용량은 약 24시간 동안 약 50% 초과의 ICOS에 대한 결합에 대한 표적 결합 포화를 나타내거나 나타낼 것으로 예측되는 양이다.

[0503] [0377] 본 명세서에 기재된 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)은 특정 제형의 반감기, 수명 및 소거율에 따라 3 내지 4일마다, 매주, 격주, 3주마다, 한 달에 한 번 등으로 투여될 수 있다. 투여 빈도는 사용된 제형에서 분자의 약동학적 매개변수에 따라 달라질 것이다. 전형적으로, 조성물은 원하는 효과를 달성하는 용량에 도달할 때까지 투여된다. 따라서, 조성물은 단일 용량으로서, 또는 시간 경과에 따른 다중 용량(동일하거나 상이한 농도/용법용량으로)으로 투여될 수 있다. 적절한 투여량의 추가 개선이 일상적으로 이루어진다. 적절한 용량-반응 데이터를 사용하여 적절한 용량을 확인할 수 있다. 일부 경우에, 예를 들어 만성 안구 염증성 또는 자가면역 질환이 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물로 치료되는 경우, 조성물은 시간이 지남에 따라 연속적으로, 예를 들어 반복적으로 또는 시간이 지남에 따라 간헐적으로 투여된다. 예를 들어, 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물을 사용한 만성 안구 염증성 또는 자가면역 질환의 치료는 대상체에게 무기한으로 치료를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구체

예에서, 안구 염증성 또는 자가면역 질환이 만성 안구 염증성 또는 자가면역 질환인 경우, 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에 제공된 의약 조성물을 사용한 치료는, 예컨대 만성 안구 염증성 또는 자가면역 질환을 갖는 대상체에서 염증의 하나 이상의 징후의 감소와 같은, 질병의 징후 및/또는 증상의 감소 또는 개선 및/또는 질병의 관해 또는 부분적 관해 후에 지속된다. 일부 경우에서, 예를 들어 급성 안구 염증성 또는 자가면역 질환이 본원에서 제공되는 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에서 제공되는 의약 조성물로 치료되는 경우, 조성물은 정의된 또는 제한된 기간 동안 투여된다 . 일부 구체예에서, 안구 염증성 또는 자가면역 질환이 급성 안구 염증성 또는 자가면역 질환인 경우, 본원에 제공된 변이체 ICOSL IgSF(예컨대 IgV) Fc 융합 단백질과 같은 본원에 제공된 의약 조성물을 사용한 치료는 예컨대 급성 질환을 앓는 대상체에서 염증의 하나 이상의 징후의 감소와 같은, 질병의 징후 및/또는 증상의 감소 또는 개선 및/또는 질병의 관해 또는 부분적 관해 후에 중단된다. 일부 구체예에서, 투여는 숙련된 의사가 원하는 대로 언제든지 중단된다.

[0504] [0378] 전형적으로, 투여될 본원에 제공된 조성물의 정확한 양은 환자(대상체)의 상태의 개인차를 고려하여 의사, 예컨대 안과의에 의해 결정될 수 있다.

[0505] [0379] 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 약학 조성물 포함)의 치료 유효량을 달성하기 위한 투여량은 단일 용량이거나 또는 치료 기간 동안 여러 번 투여하는 것과 같이, 치료 기간 동안 반복 용량이다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 함유하는 본원에 제공된 의약 조성물의 단일 용량이 치료 기간 동안 투여된다. 일부 구체예에서, 변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 함유하는 본원에 제공된 의약 조성물의 다중 반복 투여량이 치료 기간 동안 투여된다.

[0506] [0380] 일부 구체예에서, 치료 기간은 반복된다. 예를 들어, 치료될 장애가 만성 안구 염증성 또는 자가면역 질환인 경우, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 특정 치료 요법을 포함하는 치료 기간은 임의의 횟수로 반복될 수 있다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 무기한 반복된다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 2년, 3년, 4년, 5년, 6년 또는 그 이상 동안 반복된다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 6년 동안 반복된다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 3년 동안 반복된다. 일부 구체예에서, 치료 기간의 반복 횟수는 숙련된 의사가 원하는 임의의 횟수이다. 일부 구체예에서, 반복 치료 기간은 연속 치료로 간주될 수 있다. 예를 들어, 4주의 치료 기간 중 주 1회 투여하고, 이전 치료 기간 종료 직후에 치료 기간이 반복되어, 치료 기간이 무기한 반복되는 경우, 반복 치료는 연속적일 수 있다. 일부 구체예에서, 반복된 치료 기간은 간헐적 치료로 간주될 수 있다. 예를 들어, 4주의 치료 기간 중 주 1회 투여하고, 치료 기간이 1차 치료 기간 종료 후 2주 동안 반복되고, 이러한 사이클이 예를 들어 무기한 반복되면, 반복 치료는 간헐적 치료인 것으로 간주될 수 있다. 일부 구체예에서, 간헐적 치료는 연속적 치료이다.

[0507] [0381] 일부 구체예에서, 약 1회 이상(예컨대 약 2회 이상, 약 3회 이상, 약 4회 이상, 약 5회 이상, 약 6회 이상, 또는 약 7회 이상)의 다중 용량이 치료 기간 동안 주어진다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 20일 초과, 예컨대 20일 내지 40일 동안, 예컨대 약 21 일, 22 일, 23 일, 24 일, 25 일, 26 일, 27 일, 28 일, 29 일, 30 일, 31 일, 32 일, 33 일, 34 일, 35 일, 36 일, 37 일, 38 일, 39 일 또는 40 일이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 적어도 또는 약 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50일이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 28일 내지 약 42일이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 42일(또는 약 6주)이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 21일 내지 약 28일이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 21일이다. 일부 구체예에서 치료 기간은 약 28일(4주)이다. 일부 구체예에서, 복수의 용량의 각 용량은 치료 기간 동안 주 2회 투여된다. 특정 구체예에서, 복수의 용량의 각 용량은 치료 기간 동안 주 1회 이하로 투여된다. 일부 구체예에서, 복수의 용량의 각 용량은 치료 기간 동안 주 1회(Q1W) 투여된다. 일부 구체예에서, 투여 요법은 4주 동안 주 1회 제공되는 4회 용량의 투여를 포함한다. 일부 구체예에서, 복수의 용량의 각 용량은 주 2회(BIW) 투여된다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 6개월 이상이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10년 또는 그 이상이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 1년 내지 약 3년이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 약 3년 내지 약 6년이다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 반복된다. 일부 구체예에서, 치료 기간이 반복된다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 반복된다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 무기한 반복된다. 예를 들어, 무기한 치료는 만성 안구 염증성 또는 자가면역 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 이전 치료 기간 직후에 반복된다. 일부 구체예에서, 치료 기간은 이전 치료 기간 후에 시간 지연을 두고 반복된다. 일부 구체예에서, 지연은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8주이거나 적어도 1주이다. 일부 구체예에서, 지연은 적어도 또는 약 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 또는 1년 이하이다.

[0508] [0382] 일부 구체예에서, 두 가지 이상의 치료 기간 및/또는 요법이 조합될 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에,

초기 치료 기간은 4주가 될 수 있고 2주마다 투여를 포함할 수 있고, 두 번째 치료 기간은 4주로 하고 4주마다 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 제1 또는 제2 치료 기간이 반복될 수 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 4주마다 투여되는 4주간의 제2 치료 기간은, 예를 들어 숙련된 의사가 원하는 만큼 반복될 수 있다.

[0509] [0383] 일부 구체예에서, 복수의 용량의 각 용량은 치료 기간 동안 주 2회 투여된다. 특정 구체예에서, 복수의 용량의 각 용량은 치료 기간 동안 주 1회 이하로 투여된다. 일부 구체예에서, 복수의 용량의 각 용량은 치료 기간 동안 주 1회(Q1W) 투여된다. 일부 구체예에서, 투여 요법은 4주 동안 주 1회 제공되는 4회 용량의 투여를 포함한다. 일부 구체예에서, 투여 요법은 초기 투여, 초기 투여 후 2주 및 4주째 투여 및 그 후 4주마다 투여를 포함한다.

[0510] [0384] 일부 구체예에서, 복수의 용량의 각 용량은 매일 투여된다. 이것은 예를 들어 염증성 또는 자가면역 질환이 급성 질환이고 대상체가 병원 또는 기타 의료 시설에서 치료되는 경우에 일어날 수 있다.

[0511] [0385] 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)의 투여 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 6 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 6 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 10 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양이다. 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)의 투여 용량은 약 0.3 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 3 mg/kg 또는 약 6 mg/kg이다. 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)의 투여 용량은 약 10 mg/kg이다.

[0512] [0386] 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)의 투여 용량은 적어도 약 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 또는 50 mg의 양이다. 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)의 투여 용량은 적어도 약 0.01 mg 내지 10 mg, 약 0.05 mg 내지 10 mg, 약 0.1 mg 내지 10 mg, 약 0.5 mg 내지 10 mg, 약 1 mg 내지 10 mg, 약 1.5 mg 내지 10 mg, 약 2 mg 내지 10 mg, 약 3 mg 내지 10 mg, 약 4 mg 내지 10 mg, 약 5 mg 내지 10 mg, 약 6 mg 내지 10 mg, 약 7 mg 내지 10 mg, 약 8 mg 내지 10 mg, 약 9 mg 내지 10 mg의 양이다. 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)의 투여 용량은적어도 약 0.5, 1, 2, 3, 4, 또는 5 mg의 양이다.

[0513] [0387] 일부 구체예에서, 투여되는 용량은 눈의 부피와 직접적으로 또는 간접적으로 관련된다. 일부 구체예에서, 투여되는 용량은 눈의 표면적, 예를 들어 내부 표면적과 직접적으로 또는 간접적으로 관련된다.

[0514] [0388] 일부 구체예에서, 의약 조성물(변이체 ICOSL IgSF 도메인 융합 단백질을 포함하는 의약 조성물 포함)의 용량은 안압에 최소로 및/또는 일시적으로 영향을 미치는 부피로 투여된다. 일부 구체예에서, 투여되는 부피는 눈의 부피에 의해 결정된다. 일부 구체예에서, 투여되는 부피는 약 0.05 mL이다. 일부 구체예에서, 투여되는 부피는 약 0.1 mL 이하이다. 일부 구체예에서, 투여되는 부피는 약 0.2 mL 이하이다.

[0515] [0389] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 용량 요법은 치료 유효량을 달성하기 위해 투여된다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 용량 요법은 예방적 유효량을 달성하기 위해 투여된다.

[0516] [0390] 투여(예를 들어, 다중 투여)는 숙련된 의사가 원하는 임의의 시간까지 계속될 수 있는 것으로 고려된다. 예를 들어, 투약은 질병의 관해 또는 부분 관해와 같은 바람직한 질병 반응이 달성될 때까지 및/또는 질병의 징후 및/또는 증상의 감소 또는 개선, 예를 들어 대상체에서 염증의 하나 이상의 징후의 감소가 달성될 때까지 계속될 수 있다. 일부 구체예에서, 투여는 질병의 관해 또는 부분 관해 및/또는 질병의 징후 및/또는 증상의 감소 또는 개선, 예컨대 대상체에서 하나 이상의 염증 징후의 감소 후에 계속된다.

[0517] [0391] 방법의 일부 구체예에서, 치료는 임상적 관해를 초래할 수 있다. 일부 태양에서, 치료는 1차 투여로부터 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 9주, 약 10주, 약 11주, 약 12주, 약 14주, 약 16주, 약 18주, 약 20주, 약 22주, 약 24주, 약 26주, 약 28주, 약 30주, 약 32주, 약 34주, 약 36주, 약 38주, 약 40주, 약 42주, 약 44주, 약 46주, 약 48주, 약 50주, 약 52주, 약 54주, 약 56주, 약 58주, 약 60주, 약 62주, 약 64주, 약 66주, 약 68주, 약 70주, 약 72주, 약 74주, 약 76주, 약 78주, 또는 약 80주 없이 임상적 관해를 유도할 수 있다. 일부 구체예에서, 치료는 1차 투여로부터 약 10주 이내에 임상적 관해를 초래한다. 일부 구체예에서, 치료는 1차 투여로부터 약 6주 이내에 임상적 관해를 초래한다. 일부 구체예에서, 치

료는 1차 투여으로부터 약 6주째 및 1차 투여로부터 약 10주째에 임상적 관해를 초래한다.

[0518] [0392] 전술한 임의의 방법들 중 일부 구체예에서, 임상적 관해는 지속적인 관해이다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 지속적인 관해는 1차 투여로부터 약 10주, 약 15주, 약 20주, 약 25주, 약 30주, 약 35주, 약 40주, 약 45주, 약 50주, 약 52주, 약 55주, 약 60주, 약 65주, 약 70주, 약 72주, 약 75주, 약 80주, 약 85주, 약 90주, 약 95주, 약 100주, 약 102주, 약 105주, 또는 약 110주 동안 지속된다. 일부 구체예에서, 지속적인 관해는 1차 투여로부터 약 10주 동안 및 1차 투여로부터 약 30주 동안이다. 일부 구체예에서, 지속적 관해 기간은 적어도 약 30주, 또는 적어도 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 또는 약 12개월이다. 전술한 임의의 태양들 중 일부 구체예에서, 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상의 개선, 임상적 관해 및/또는 임상 반응은 치료 종료 후 적어도 1개월(예를 들어, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 최소 3개월, 최소 4개월, 최소 5개월, 최소 6개월, 최소 7개월, 최소 8개월, 최소 9개월, 최소 10개월, 최소 11개월, 최소 12개월 이상) 동안 유지된다.

[0519] [0391] 방법의 일부 구체예에서, 치료는 임상적 관해를 초래할 수 있다. 일부 태양에서, 치료는 1차 투여로부터 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 9주, 약 10주, 약 11주, 약 12주, 약 14주, 약 16주, 약 18주, 약 20주, 약 22주, 약 24주, 약 26주, 약 28주, 약 30주, 약 32주, 약 34주, 약 36주, 약 38주, 약 40주, 약 42주, 약 44주, 약 46주, 약 48주, 약 50주, 약 52주, 약 54주, 약 56주, 약 58주, 약 60주, 약 62주, 약 64주, 약 66주, 약 68주, 약 70주, 약 72주, 약 74주, 약 76주, 약 78주, 또는 약 80주 없이 임상적 관해를 초래할 수 있다. 일부 구체예에서, 치료는 1차 투여로부터 약 10주 이내에 임상적 관해를 초래한다. 일부 구체예에서, 치료는 1차 투여로부터 약 6주 이내에 임상적 관해를 초래한다. 일부 구체예에서, 치료는 1차 투여로부터 약 6주째 및 1차 투여로부터 약 10주째에 임상적 관해를 초래한다.

[0520] [0392] 전술한 임의의 방법들의 일부 구체예에서, 임상적 관해는 지속적인 관해이다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 지속적인 관해는 1차 투여로부터 약 10주, 약 15주, 약 20주, 약 25주, 약 30주, 약 35주, 약 40주, 약 45주, 약 50주, 약 52주, 약 55주, 약 60주, 약 65주, 약 70주, 약 72주, 약 75주, 약 80주, 약 85주, 약 90주, 약 95주, 약 100주, 약 102주, 약 105주, 또는 약 110주째의 임상적 관해이다. 일부 구체예에서, 지속적 관해는 1차 투여로부터 약 10주 및 1차 투여로부터 약 30주째의 임상적 관해이다. 일부 구체예에서, 지속적 관해는 적어도 약 30주, 또는 적어도 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 또는 약 12개월의 길이를 갖는다. 전술한 임의의 태양들의 일부 구체예에서, 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상의 개선, 임상적 관해 및/또는 임상 반응은 치료 종료 후 적어도 1개월(예를 들어, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월, 적어도 7개월, 적어도 8개월, 적어도 9개월, 적어도 10개월, 적어도 11개월, 적어도 12개월, 또는 그 이상) 동안 유지된다.

[0521] **B. 치료 유효성의 결정 또는 예측**

[0522] [0393] 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 반응 및/또는 결과를 예측하기 위해 질병 또는 병태가 있는 대상체를 검정하는 것을 포함한다. 특정 구체예는 샘플의 하나 이상의 유전자 산물, 예를 들어 유전자 발현 프로파일의 발현이 변이체 ICOSL 폴리펩타이드(예를 들어 변이체 ICOSL IgV-Fc)에 대한 반응 유효성과 상관이 있거나 및/또는 연관되어 있음을 상정한다.

[0523] [0394] 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 ICOS 및 CD28의 활성을 억제하거나 감소시키기 위해 제공된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드(예를 들어, 변이체 ICOSL IgV-Fc)의 활성과 관련된 하나 이상의 바이오마커의 평가를 포함한다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 바이오마커는 CCL17, CXCR5, GATA3, IL12RB2, IL18R1, IL18RAP, KITLG, TTA, PVR, SOCS3, TFRC, TNFRSF8, BATF3, CTLA4, FLT1, FOSL1, IL12, IL17F, IL1R2, IL23R, IL4, IL5 또는 VEGFA, CCL20, CD40LG, CSF2, ICOS, ID2, IFNG, IGSF3, IL17A, IL1R1, IL2, IL21, IL24, IL3, IL31, IL6, IL9, LIF, NFKBID, PDCD1 또는 TNF, 또는 전술한 임의의 것들의 조합인 유전자 산물이다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 바이오마커는 CCL17, CXCR5, GATA3, IL12RB2, IL18R1, IL18RAP, KITLG, TTA, PVR, SOCS3, TFRC 또는 TNFRSF8, 또는 전술한 것들의 임의의 조합인 유전자 산물이다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 바이오마커는 BATF3, CTLA4, FLT1, FOSL1, IL12, IL17F, IL1R2, IL23R, IL4, IL5 또는 VEGFA, 또는 전술한 것들의 임의의 조합인 유전자 산물이다. 일부 구체예에서, 하나 이상의 바이오마커는 CCL20, CD40LG, CSF2, ICOS, ID2, IFNG, IGSF3, IL17A, IL1R1, IL2, IL21, IL24, IL3, IL31, IL6, IL9, LIF, NFKBID, PDCD1 또는 TNF, 또는 전술한 것들의 임의의 조합인 유전자 산물이다. 임의의 일부 구체예에서, 바이오마커는 단백질이다. 일부 구체예에서, 바이오마커는 핵산, 예컨대 RNA, 예컨대 mRNA이다.

[0524] [0395] 일부 구체예에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 34, 25 또는 그 이상의 임의의 상기 유전자 산물이 평가, 측정, 검출 및/또는 정량화된다. 일부

구체예에서, 샘플에서 상기 유전자 산물 중 임의의 하나 이상의 측정, 평가 및/또는 결정에 사용하기 위한 패널, 프로파일, 및/또는 어레이가 본원에 제공된다. 특정 구체예에서, 패널, 프로파일, 및/또는 어레이는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10 초과, 또는 20개 초과의 유전자 산물의 측정치, 평가치, 및/또는 정량값을 포함한다.

[0525] [0396] 특정 구체예에서, 하나 이상의 바이오마커 또는 유전자의 발현은 샘플에서 측정, 평가 및/또는 결정된다. 일부 구체예에서, 유전자 산물은 유전자에 의해 코딩되는 정보로 조립, 생성 및/또는 합성되는 임의의 생체분자이며, 폴리뉴클레오타이드 및/또는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 유전자 발현을 평가, 측정 및/또는 결정하는 것은 유전자 산물의 수준, 양 또는 농도를 결정하거나 측정하는 것 또는 이를 포함한다. 특정 구체예에서, 유전자 산물의 수준, 양 또는 농도는 형질전환(예를 들어, 정규화)되거나 직접 분석(예를 들어, 미가공)될 수 있다. 일부 구체예에서, 유전자 산물은 유전자에 의해 코딩되는 단백질이다. 특정 구체예에서, 유전자 산물은 유전자에 의해 코딩되는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 mRNA 또는 단백질이다.

[0526] [0397] 일부 구체예에서, 유전자 산물은 유전자에 의해 발현되고/되거나 유전자에 의해 코딩되는 폴리뉴클레오타이드이다. 특정 구체예에서, 폴리뉴클레오타이드는 RNA이다. 일부 구체예에서, 유전자 산물은 메신저 RNA(mRNA), 전달 RNA(tRNA), 리보솜 RNA, 작은 핵 RNA, 작은 핵소체 RNA, 안티센스 RNA, 긴 비-코딩 RNA, 마이크로RNA, Piwi-상호작용 RNA, 작은 간섭 RNA 및/또는 짧은 머리핀 RNA. 특정 구체예에서, 유전자 산물은 mRNA이다.

[0527] [0398] 샘플 내 폴리뉴클레오타이드의 양 또는 수준은 당업계에 공지된 임의의 적합한 수단에 의해 평가, 측정, 결정 및/또는 정량화될 수 있다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오타이드 유전자 산물의 양 또는 수준은 역전사효소(rt) PCR, 액적 디지털 PCR, 실시간 및 정량적 PCR(qPCR) 방법(예를 들어, TAQMAN®, 분자 표지, LIGHTUP™, SCORPION™, SIMPLEPROBES® 포함; 예를 들어, 미국 특허 번호 5,538,848; 5,925,517; 6,174,670; 6,329,514 참조); 노던 블로팅; 예를 들어, 역전사 산물 및 유도체의 서던 블롯팅(Southern blotting); 블롯팅 어레이, 마이크로어레이 또는 제자리 합성 어레이를 포함하는 어레이 기반 방법; 및 시퀀싱, 예를 들어 합성에 의한 시퀀싱, 파이로시퀀싱, 디데옥시 시퀀싱 또는 라이게이션에 의한 시퀀싱, 기술분야에 알려진 방법(예컨대 Shendure et al., Nat. Rev. Genet. 5:335-44 (2004) 또는 Nowrousian, Euk. Cell 9(9): 1300-1310 (2010)에 기재된 방법), (HELICOS®, ROCHE® 454, ILLUMINA®/SOLEXA®, ABI SOLiD® 및 POLONATOR® 시퀀싱과 같은 특정 플랫폼을 포함한다)에 의해 평가, 측정, 결정 및/또는 정량화될 수 있다. 특정 구체예에서, 핵산 유전자 산물의 수준은 정량적 PCR (qPCR) 방법, 예컨대 qRT-PCR에 의해 측정된다. 일부 구체예에서, qRT-PCR은 각 유전자에 대해 3개의 핵산 세트를 사용하며, 여기서 3개의 핵산은 프라이머가 결합하는 표적 핵산의 영역 사이에 결합하는 프로브와 함께 프라이머 쌍을 포함한다(상업적으로 TAQMAN® 분석법으로 알려짐).

[0528] [0399] 특정 구체예에서, RNA 유전자 산물의 양 또는 수준을 평가, 측정, 결정 및/또는 정량화하는 단계는 RNA 유전자 산물로부터 cDNA 폴리뉴클레오타이드 및/또는 cDNA 올리고뉴클레오타이드를 생성, 중합 및/또는 유도하는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, RNA 유전자 산물은 RNA 유전자 산물로부터 유래된 cDNA 폴리뉴클레오타이드 및/또는 cDNA 올리고뉴클레오타이드를 직접 평가, 측정, 결정 및/또는 정량화함으로써 평가, 측정, 결정 및/또는 정량화된다.

[0529] [0400] 일부 구체예에서, 하나 이상의 유전자 산물, 예를 들어 폴리뉴클레오타이드 유전자 산물의 발현은, 유전자 산물을 시퀀싱함으로써 및/또는 유전자 산물로부터 유래된 cDNA 폴리뉴클레오타이드를 시퀀싱함으로써 결정된다. 일부 구체예에서, 시퀀싱은 비-생거(non-Sanger) 시퀀싱 방법 및/또는 차세대 시퀀싱(NGS) 기술에 의해 수행된다. 차세대 시퀀싱 기술의 비제한적인 예로는 MPSS(대량 병렬 서명 시퀀싱), 폴로니 시퀀싱, 파이로시퀀싱, 가역적 염료 종결자 시퀀싱, SOLiD 시퀀싱, 이온 반도체 시퀀싱, DNA 나노볼 시퀀싱, Helioscope 단일 분자 시퀀싱, 단일 분자 실시간(SMRT) 시퀀싱, 단일 분자 실시간(RNAP) 시퀀싱 및 Nanopore DNA 시퀀싱을 들 수 있다.

[0530] [0401] 일부 구체예에서, NGS 기술은 RNA 시퀀싱(RNA-Seq)이다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 유전자 산물의 발현은 RNA-Seq에 의해 측정, 결정 및/또는 정량화된다. 전체 전사체 샷건 시퀀싱이라고도 하는 RNA-Seq는 샘플 내 RNA의 존재와 양을 결정한다. RNA 시퀀싱 방법은 가장 일반적인 DNA 시퀀싱 플랫폼[HiSeq 시스템(Illumina), 454 Genome Sequencer FLX System(Roche), Applied Biosystems SOLiD(Life Technologies), IonTorrent(Life Technologies)]에 맞게 조정되었다. 이들 플랫폼은 RNA의 cDNA로의 초기 역전사를 필요로 한다. 반대로, 단일 분자 시퀀서 HeliScope(Helicos BioSciences)는 시퀀싱을 위한 주형으로서 RNA를 사용할 수 있다. PacBio RS 플랫폼에서 직접 RNA 시퀀싱에 대한 원리 증명도 입증되었다(Pacific

Bioscience). 일부 구체예에서, 하나 이상의 RNA 유전자 산물은 RNA-seq에 의해 평가, 측정, 결정 및/또는 정량화된다.

[0531] [0402] 일부 구체예에서, 유전자 산물은 유전자에 의해 인코딩되고/되거나 유전자에 의해 발현되는 단백질, 즉 폴리펩타이드이거나 이를 포함한다. 특정 구체예에서, 유전자 산물은 세포의 표면 상에 국재화 및/또는 노출된 단백질을 인코딩한다. 일부 구체예에서, 단백질은 가용성 단백질이다. 특정 구체예에서, 단백질은 세포에 의해 분비된다.

[0532] [0403] 특정 구체예에서, 유전자 발현은 유전자에 의해 인코딩되는 단백질의 양, 수준 및/또는 농도이다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 단백질 유전자 산물은 당업계에 공지된 임의의 적합한 수단에 의해 측정된다. 하나 이상의 단백질 유전자 산물의 수준, 양 또는 농도를 평가, 측정, 결정 및/또는 정량화하는 데 적합한 방법의 비제한적인 예로는 면역분석, 핵산 기반 또는 단백질 기반 앱타머 기술, HPLC(고정밀 액체 크로마토그래피), 펩타이드 시퀀싱(예컨대 Edman 분해 시퀀싱 또는 질량 분석법(예컨대 MS/MS), 선택적으로 HPLC에 결합됨), 및 전술한 것 중 임의의 것의 마이크로어레이 적응법(핵산, 항체 또는 단백질-단백질(즉, 비-항체) 어레이 포함)을 들 수 있다. 일부 구체예에서, 면역검정법은 예를 들어, 유전자 산물에 대한 항체 또는 항원 결합 항체 단편의 결합을 검출함으로써 면역학적 반응에 기초하여 단백질을 검출하는 방법 또는 검정이거나 이를 포함한다. 면역검정법에는 정량적 면역세포화학 또는 면역조직화학, ELISA(직접, 간접, 샌드위치, 경쟁, 다중 및 휴대용 ELISA 포함)(예컨대 미국특허 제7,510,687호 참조), 웨스턴 블로팅(1차원, 2차원 또는 그 이상의 고차원 블로팅 또는 기타 크로마토그래피 수단, 선택적으로 펩타이드 시퀀싱 포함), 효소 면역분석(EIA), RIA(방사면역분석) 및 SPR(표면 플라스몬 공명)이 포함되나 이에 한정되지 않는다.

[0533] [0404] 제공된 구체예에서, 샘플은 변이체 ICOSL 폴리펩타이드(예컨대 변이체 ICOSL IgV -FC)를 투여받았거나 투여받을 것이거나, 또는 투여받을 후보인 대상체로부터 채취, 수집 및/또는 수득된 생물학적 샘플이다. 일부 구체예에서, 대상체는 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 (예컨대 변이체 ICOSL IgV-Fc)를 받았거나 투여받은 대상체이다. 특정 구체예에서, 샘플은 혈액 또는 혈청 샘플이다. 특정 구체예에서, 샘플은 혈액 샘플이다. 특정 구체예에서, 샘플은 치료 또는 요법에 의한 투여 전에 채취, 수집 및/또는 수득된다. 일부 구체예에서, 샘플은 치료 또는 요법에 의한 투여 후에 채취, 수집 및/또는 수득된다. 일부 구체예에서, 샘플은 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 (예컨대 변이체 ICOSL IgV-Fc)의 투여 개시 후 약 1시간, 2시간, 6시간, 12시간, 24시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 2주, 3주, 1개월 또는 그 이상 이내에 수집된다.

[0534] [0405] 일부 구체예에서, 상기 방법은 유전자 산물의 역치 값에 대한 샘플 내 하나 이상의 유전자 산물의 수준, 양 또는 농도의 평가를 포함한다. 일부 구체예에서, 역치 값은 건강한 대상체에서 유전자 산물의 수준, 양 또는 농도이거나, 다수의 건강한 대상체에서 유전자 산물의 중앙값 또는 평균 수준, 양 또는 농도이며, 여기서 이러한 건강한 대상체는 처치되지 않은 대상체이다. 일부 구체예에서, 역치 값은 질병에 걸린 대상체에서 유전자 산물의 수준, 양 또는 농도이거나, 또는 동일한 질병을 앓지만 처치된 바 없는, 질병에 걸린 복수의 대상체에서의 수준, 양 또는 농도의 중앙값 또는 평균값이다. 일부 구체예에서, 역치 값과 비교하여 유전자 산물의 수준, 양 또는 농도의 감소는 변이체 ICOSL 폴리펩타이드(예를 들어 변이체 ICOSL IgV-Fc)를 사용한 치료가 효과적임을 나타내거나 예측한다.

[0535] [0406] 일부 구체예에서, 유전자 산물의 수준, 양 또는 농도의 평가는 베이스라인 값과 비교된다. 일부 구체예에서, 베이스라인 값은 치료 1일, 2일, 3일, 4일 또는 5일 전에 동일한 환자로부터 유래된다. 일부 구체예에서, 베이스라인 값은 치료 개시 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간 또는 24시간 전에 동일한 환자로부터 유래한 값이다. 일부 구체예에서, 베이스라인 값과 비교하여 유전자 산물의 수준, 양 또는 농도의 감소는 변이체 ICOSL 폴리펩타이드(예를 들어 변이체 ICOSL IgV-Fc)를 사용한 치료가 효과적임을 나타내거나 예측한다.

[0536] [0407] 일부 구체예에서, 반응은 유전자 산물의 감소가 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배 또는 그 이상인 경우 효과적인 것으로 예측된다. 일부 구체예에서, 반응은 유전자 발현의 감소가 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배 또는 그 이상인 경우 효과적인 것으로 예측된다..

[0537] **VIII. 예시적인 구체예들**

[0538] [0408] 본 발명에 따라 다음의 구체예들이 제공된다:

[0539] 1. 대상체에서 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태를 갖는 대상체에게 치료 기간 동안 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하되, 상

기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하며; 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 것인 방법.

[0540] 2. 구체예 1에 있어서, 투여되는 각 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 0.001 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.001 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 0.001 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.001 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.1 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 6 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 6 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 10 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양인 방법.

[0541] 3. 구체예 1 또는 구체예 2에 있어서, 각 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0542] 4.. 구체예 1-3 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 각 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0543] 5. 구체예 1-4 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 치료 기간 동안 변이체 ICOSL 융합 단백질이 단일 용량만으로 투여되는 방법.

[0544] 6. 구체예 1-4 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 복수의 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질이 치료 기간 동안 투여되되, 선택적으로 여기서 복수의 용량은 2, 3, 4 또는 5 용량인 방법.

[0545] 7. 구체예 1-6 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 치료 기간은 적어도 20일인 방법.

[0546] 8. 구체예 1-7 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 치료 기간은 20-40 일인 방법.

[0547] 9. 대상체에서 자가면역 또는 염증성 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 자가면역 또는 염증성 질환이 있는 대상체에게 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하되, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하며,

[0548] 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 20-40일의 치료 기간 동안 3, 4 및 5로부터 선택된 복수 용량으로 투여되고, 각각의 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0549] 10. 대상체에서 자가면역 또는 염증성 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 자가면역 또는 염증성 질환이 있는 대상체에게 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하되, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하며,

[0550] 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 적어도 20일의 치료 기간 동안 복수의 용량으로 투여되고, 여기서 각각의 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여되며, 선택적으로 최대 치료 기간은 30일이고, 추가 선택적으로 복수의 용량 각각은 서로 적어도 5일 이상 이격하여 투여되는 방법.

[0551] 11. 구체예 1-10 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 치료 기간은 약 21일인 방법.

[0552] 12. 구체예 1-10 중 어느 하나의 구체예에 있어서,치료 기간은 약 28일인 방법.

[0553] 13. 구체예 6-12 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 복수의 용량 각각은 1주 1회 이하로 투여되는 방법.

[0554] 14. 대상체에서 자가면역 또는 염증성 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 자가면역 또는 염증성 질환이 있는 대상체에게 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하되, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메

인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하며,

[0555] 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 적어도 4주의 치료 기간 동안 복수 용량으로 투여되고, 각각의 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양으로 투여되되, 1주에 1회 이하로 투여되는 방법.

[0556] 15. 구체예 14에 있어서, 치료 기간은 약 4주인 방법.

[0557] 16. 구체예 6-15 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 복수의 용량 각각은 주 1회(Q1W) 투여되는 방법.

[0558] 17. 급성 이식편 대 숙주 질환(aGVHD)을 예방하거나 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 치료 기간 동안 대상체에게 하나 이상의 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하되, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하며; 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0559] 18. 구체예 17에 있어서, aGVHD는 줄기 세포 이식과 연관되고 ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 대상체가 줄기 세포 이식을 받기 전에 대상체에게 투여되는 방법.

[0560] 19. 구체예 17 또는 구체예 18에 있어서, aGVHD는 줄기 세포 이식과 연관되고 ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 대상체가 줄기 세포 이식을 받기 전에 대상체에게 투여되고 ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 대상체가 줄기 세포 이식을 받는 것과 동시에 또는 받은 후에 대상체에게 제공되는 방법.

[0561] 20. 구체예 17-19 중 어느 하나의 구체예에 있어서, aGVHD는 줄기 세포 이식과 연관되고 ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 대상체가 줄기 세포 이식을 받기 전에 대상체에게 투여되고 ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 대상체가 줄기 세포 이식을 받는 것과 동시에 대상체에게 제공되는 방법.

[0562] 21. 구체예 17-19 중 어느 하나의 구체예에 있어서, aGVHD는 줄기 세포 이식과 연관되고 ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 대상체가 줄기 세포 이식을 받기 전에 대상체에게 투여되고 ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 대상체가 줄기 세포 이식을 받은 후 대상체에게 주어지는 방법.

[0563] 22. 대상체에서 이식편 대 숙주 질환(aGVHD)을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 대상체에게 단일 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하되, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하며; 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 단일 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0564] 23. 대상체에서 이식편 대 숙주 질환(aGVHD)을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 대상체에게 단일 용량의 변이체 ICOSL 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하되, 상기 변이체 ICOSL 융합 단백질은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO:1에 제시된 서열을 참조로, 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하며; 여기서 변이체 ICOSL 융합 단백질의 단일 용량은 약 0.001 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 양으로 투여되고, 여기서 대상체는 면역억제제, 선택적으로 코르티코스테로이드 및/또는 사이클로스포린에 대해 내성 또는 불응성인 방법.

[0565] 24. 구체예 22 또는 구체예 23에 있어서, GVHD는 급성 GVHD (aGVHD)인 방법.

[0566] 25. 구체예 22 또는 구체예 23에 있어서, GVHD는 만성 GVHD인 방법.

[0567] 26. 구체예 1-25 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 각 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 10mg/kg, 약 3 mg/kg

내지 약 6 mg/kg, 또는 약 6 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 양인 방법.

[0568] 27. 구체예 1-26 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 각 용량은 약 0.3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 1 mg/kg,약 1 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 또는 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg의 양인 방법.

[0569] 28. 구체예 1-27 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 각 용량은 약 0.3 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0570] 29. 구체예 1-27 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 각 용량은 약 1 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0571] 30. 구체예 1-27 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 각 용량은 약 3 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0572] 31. 구체예 1-27 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 각 용량은 약 6 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0573] 32. 구체예 1-27 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 각 용량은 약 10 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0574] 33. 구체예 1-27 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 적어도 하나의 용량은 약 0.3 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0575] 34. 구체예 1-27 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 적어도 하나의 용량은 약 1 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0576] 35. 구체예 1-7 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 적어도 하나의 용량은 약 3 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0577] 36. 구체예 1-27 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 적어도 하나의 용량은 약 6 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0578] 37. 구체예 1-27 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 적어도 하나의 용량은 약 10 mg/kg의 양으로 투여되는 방법.

[0579] 38. 구체예 1-37 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 적어도 하나의 용량은 피하 투여를 통해 투여되는 방법.

[0580] 39. 구체예 1-37 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 적어도 하나의 용량은 정맥내 투여를 통해 투여되는 방법.

[0581] 40. 구체예 1-37 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 투여는 피하 투여를 통하는 방법.

[0582] 41. 구체예 1-37 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 투여는 정맥내 투여를 통하는 방법.

[0583] 42. 구체예 1-16 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 자가면역 또는 염증성 질환은 안구 자가면역 또는 염증성 병태인 방법.

[0584] 43. 구체예 42에 있어서, 투여는 유리체내 투여를 통하는 방법.

[0585] 44. 구체예 1-43 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 치료 기간은 반복되며, 선택적으로 치료 기간은 관해(remission)가 달성될 때까지, 부분 관해가 달성될 때까지 또는 대상체에서 질환 또는 병태가 진행되지 않을 때까지 반복되는 방법.

[0586] 45. 대상체에서 안구 자가면역 또는 염증성 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하는 변이체 ICOSL 융합 단백질의 용량을 유리체내로(intravitreally) 투여하는 것을 포함하되, 여기서 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 이의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO: 1에 기재된 서열을 참조로 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 방법.

[0587] 46. 대상체에서 안구 자가면역 또는 염증성 질환을 감소 또는 예방하는 방법으로서, 상기 방법은 멀티머화 도메인에 연결된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하는 변이체 ICOSL 융합 단백질의 용량을 유리체내로(intravitreally) 투여하는 것을 포함하되, 여기서 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 이의 특이적 결합 단편을 포함하는 ICOSL 세포외 도메인 또는 그의 일부이고, SEQ ID NO: 1에 기재된 서열을 참조로 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것인 방법.

[0588] 47. 구체예 42 또는 44에 있어서, 안구 자가면역 또는 염증성 질환은 포도막염인 방법.

[0589] 48. 구체예 42-47 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 안구 자가면역 또는 염증성 질환은 염증성 질환의 전신성 자가면역에 기인하는 방법.

[0590] 49. 구체예 48에 있어서, 전신성 자가면역 또는 염증성 질환은 강직성 척추염, 크론병, 궤양성 대장염, 류마티스성 관절염, 소아 류마티스 관절염, 반응성 관절염, 장병증성 관절염, 건선성 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 베체트 증후군, 전신성 피부근염, 다발혈관염을 동반한 육아종증인 방법.

[0591] 50. 구체예 42-47 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 안구 자가면역 또는 염증성 질환은 눈에 특이적인 자가면역 또는 염증성 질환인 방법.

[0592] 51. 구체예 42-47 및 50 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 눈에 특이적인 자가면역 또는 염증성 질환은 안구 반점 천포창, 무렌 각막 궤양 또는 포도막염인 방법.

[0593] 52. 구체예 42-51 중 어느 하나의 구체예에 있어서, ICOSL 융합 단백질은 적어도 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 또는 50 mg의 용량, 선택적으로 1, 2, 3, 4, 또는 5 mg의 용량으로 투여되는 방법.

[0594] 53. 구체예 42-51 중 어느 하나의 구체예에 있어서, ICOSL 융합 단백질은 약 0.01 mg 내지 10 mg, 약 0.05 mg 내지 10 mg, 약 0.1 mg 내지 10 mg, 약 0.5 mg 내지 10 mg, 약 1 mg 내지 10 mg, 약 1.5 mg 내지 10 mg, 약 2 mg 내지 10 mg, 약 3 mg 내지 10 mg, 약 4 mg 내지 10 mg, 약 5 mg 내지 10 mg, 약 6 mg 내지 10 mg, 약 7 mg 내지 10 mg, 약 8 mg 내지 10 mg, 약 9 mg 내지 10 mg의 용량으로 투여되는 방법.

[0595] 54. 구체예 42-53 중 어느 하나의 구체예에 있어서, ICOSL 융합 단백질은 0.2 mL 미만의 부피, 선택적으로 0.1 mL 미만의 부피로 투여되는 방법.

[0596] 55. 구체예 42-54 중 어느 하나의 구체예에 있어서, ICOSL 융합 단백질은 약 0.05 mL의 부피로 투여되는 방법.

[0597] 56. 구체예 1-55 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:1의 넘버링을 참조로 아미노산 치환 N52H/N57Y/Q100R을 포함하는 방법.

[0598] 57. 구체예 1-56 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 CD28의 엑토도메인(들)에 대해, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드가 동일한 엑토도메인(들)에 대해 나타내는 결합보다 증가된 결합 친화성을 나타내는 것인 방법.

[0599] 58. 구체예 1-57 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 ICOS의 엑토도메인(들)에 대해, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드가 동일한 엑토도메인(들)에 대해 나타내는 결합과 실질적으로 동일하거나 증가된 결합 친화성을 나타내고, 선택적으로, 상기 결합 친화성은 ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드가 동일한 엑토도메인(들)에 대해 나타내는 결합 친화성의 약 80% 이상인 방법.

[0600] 59. 구체예 1-58 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 ICOS 및 CD28의 엑토도메인(들)에 대해, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드가 동일한 엑토도메인(들)에 대해 나타내는 결합보다 증가된 결합을 나타내는 방법.

[0601] 60. 구체예 58 또는 구체예 59에 있어서, 결합은 약 1.2배, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배 또는 60배 이상 증가되는 방법.

[0602] 61. 구체예 1-60 중 어느 하나의 구체예에 있어서:

[0603] 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 Cmax에서 약 25% 이상의 CD28에 대한 표적 결합 포화도를 달성하거나 달성할 것으로 예측되며; 및/또는

[0604] 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 용량 투여 후 24시간 이내에 약 10% 초과의 CD28에 대한 표적 결합 포화도를 달성하거나 달성할 것으로 예측되는 방법.

[0605] 62. 구체예 1-61 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 용량 투여 후 24시간 이내, 2일 이내 또는 7일 이내에 약 85% 초과의, CD28에 대한 표적 결합 포화도를 달성하거나 달성할 것으로 예상되는 방법.

[0606] 63. 구체예 1-62 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 용량 투여 후 24시간 이내, 2일 이내 또는 7일 이내에 약 90% 초과의 CD28에 대한 표적 결합 포화도를 달성하거나 달성할 것으로 예상되는 방법.

[0607] 64. 구체예 1-63 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 용량 투여 후 24시간 이내, 2일 이내 또는 7일 이내에 약 95% 초과의 CD28에 대한 표적 결합 포화도를 달성하거나 달성할 것으로 예상되는 방법.

[0608] 65. 구체예 1-64 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 용량 투여 후 21일

이내 또는 28일 이내에 약 10% 초과의 CD28에 대한 표적 결합 포화도를 달성하거나 달성할 것으로 예상되는 방법.

[0609] 66. 구체예 1-65 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질의 각 용량은 용량 투여 후 21일 이내 또는 28일 이내에 약 20% 초과의 CD28에 대한 표적 결합 포화도를 달성하거나 달성할 것으로 예상되는 방법.

[0610] 67. 구체예 57-66 중 어느 하나의 구체예에 있어서, CD28은 인간 CD28인 방법.

[0611] 68. 구체예 58-67 중 어느 하나의 구체예에 있어서, ICOS는 인간 ICOS인 방법.

[0612] 69. 구체예 1-68 중 어느 하나의 구체예에 있어서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 (i) 서열 of 아미노산 set forth in SEQ ID NO:32에 제시된 아미노산 서열, (ii) SEQ ID NO:32에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 또는 (iii) IgV 도메인 또는 IgC 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편을 포함하는(i) 및/또는 (ii)의 일부를 포함하는 방법.

[0613] 70. 구체예 1-69 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 IgV 도메인 또는 그의 특이적인 결합 단편을 포함하는 방법.

[0614] 71. 구체예 1-70 중 어느 하나의 구체예에 있어서, IgV 도메인 또는 그의 특이적 결합 단편은 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 또는 변이체 ICOSL 융합 단백질의 유일한 ICOSL 부분인 방법.

[0615] 72. 구체예 1-71 중 어느 하나의 구체예에 있어서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:1에 제시된 ICOSL 세포외 도메인 서열을 참조로 적어도 25개 아미노산으로 된 C-말단 절단체와 아미노산 1-112를 포함하는 아미노산들의 인접(contiguous) 서열을 포함하는 절단된 ICOSL 세포외 도메인인 방법.

[0616] 73. 구체예 72에 있어서, C-말단 절단체는 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90, 적어도 100, 또는 적어도 125개의 아미노산 잔기를 갖는 것인 방법.

[0617] 74. 구체예 1-73 중 어느 하나의 구체예에 있어서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 204-209로서 제시된 프로테아제 절단 부위가 변경되거나 결여되어 있는 것인 방법.

[0618] 75. 구체예 1-74 중 어느 하나의 구체예에 있어서, ICOSL 레퍼런스 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:3에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 방법.

[0619] 76. 구체예 1-75 중 어느 하나의 구체예에 있어서, ICOSL 참조 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 3에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 방법.

[0620] 77. 구체예 1-76 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 36에 기재된 서열 또는 SEQ ID NO: 36에 제시된 서열에 대해 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%의 서열 동일성을 갖고 N52H, N57Y 및 Q100R로부터 선택된 아미노산 치환을 갖는 것인 방법.

[0621] 78. 구체예 1-77 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 36에 제시된 서열을 갖는 방법.

[0622] 79. 구체예 1-78 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 세포로부터 발현시, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드의 전장 세포외 도메인이 동일한 세포로부터 발현될 때에 비해 감소된 단백질분해 절단을 나타내고, 선택적으로 상기 세포는 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포인 방법.

[0623] 80. 구체예 1-79 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 멀티머화 도메인은 면역글로불린의 Fc 영역이거나 이를 포함하는 방법.

[0624] 81. 구체예 1-80 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 링커를 통해 멀티머화 도메인에 연결되고, 선택적으로 상기 링커는 펩타이드 링커인 방법.

[0625] 82. 구체예 81에 있어서, 링커는 1 내지 10개의 아미노산을 포함하는 방법.

[0626] 83. 구체예 81 또는 구체예 82에 있어서, 링커는 AAA인 방법.

[0627] 84. 구체예 81 또는 구체예 82에 있어서, 링커는 G4S (SEQ ID NO:52)인 방법.

[0628] 85. 구체예 81 또는 구체예 82에 있어서, 링커는 (G4S)2 (SEQ ID NO:53)인 방법.

[0629] 86. 구체예 81 또는 구체예 82에 있어서, 링커는 GSGGGGS 링커 (SEQ ID NO: 58)인 방법.

[0630] 87. 구체예 1-86 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 ICOSL 융합 단백질은 제1 멀티머화 도메인에 연결된 제1 변이체 ICOSL 폴리펩타이드 및 제2 멀티머화 도메인에 연결된 제2 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 포함하는 멀티머이고, 선택적으로 상기 제1 및 제2 멀티머화 도메인은 동일하며, 선택적으로 상기 제1 및 제2 멀티머화 도메인은 면역글로불린의 Fc 영역인 방법.

[0631] 88. 구체예 87에 있어서, 멀티머는 다이머인 방법.

[0632] 89. 구체예 88에 있어서, 다이머는 호모다이머인 방법.

[0633] 90. 구체예 80-89 중 어느 하나의 구체예에 있어서, Fc 영역은 야생형 인간 면역글로불린의 Fc와 비교하여 하나 이상의 감소된 이펙터 기능을 나타내는 변이체 Fc 영역인 방법.

[0634] 91. 구체예 80-90 중 어느 하나의 구체예에 있어서, Fc 영역은 야생형 인간 IgG1과 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변이체 IgG1 Fc 영역인 방법.

[0635] 92. 구체예 80-91 중 어느 하나의 구체예에 있어서, Fc 영역은 SEQ ID NO:37에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함하는 방법.

[0636] 93. 구체예 80-92 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 변이체 Fc 영역은 N297G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K 또는 L234A/L235E/G237A 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하되, 여기서 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것인 방법.

[0637] 94. 구체예 93에 있어서, 변이체 Fc 영역은 아미노산 치환 C220S를 더 포함하되, 여기서 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것인 방법.

[0638] 95. 구체예 93 또는 구체예 94에 있어서, Fc 영역은 K447del을 포함하되, 여기서 잔기는 Kabat의 EU 인덱스에 따라 넘버링된 것인 방법.

[0639] 96. 구체예 93-95 중 어느 하나의 구체예에 있어서, Fc 영역은 SEQ ID NO:43 또는 SEQ ID NO:46에 제시된 아미노산의 서열을 포함하는 방법.

[0640] 97. 구체예 93-95 중 어느 하나의 구체예에 있어서, Fc 영역은 SEQ ID NO:44 또는 SEQ ID NO:47에 제시된 아미노산의 서열을 포함하는 방법.

[0641] 98. 구체예 93-95 중 어느 하나의 구체예에 있어서, Fc 영역은 SEQ ID NO:40에 제시된 아미노산의 서열을 포함하는 방법.

[0642] 99. 구체예 93-95 중 어느 하나의 구체예에 있어서, Fc 영역은 SEQ ID NO:39에 제시된 아미노산의 서열을 포함하는 방법.

[0643] 100. 구체예 93-95 중 어느 하나의 구체예에 있어서, Fc 영역은 SEQ ID NO:41에 제시된 아미노산의 서열을 포함하는 방법.

[0644] 101. 구체예 93-95 중 어느 하나의 구체예에 있어서, Fc 영역은 SEQ ID NO:42에 제시된 아미노산의 서열을 포함하는 방법.

[0645] 102. 구체예 1-101, 변이체 ICOSL 융합 단백질 decreases immune response in 대상체.

[0646] 103. 구체예 1-16, 26-41, 및 56-102 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 항호중구 세포질 항체(ANCA)-연관 혈관염, 혈관염, 자가면역 피부 질환, 이식, 류마티스 질환, 염증성 위장 질환, 염증성 눈 질환, 염증성 신경계 질환, 염증성 폐 질환, 염증성 내분비 질환, 또는 자가면역 혈액 질환인 방법.

[0647] 104. 구체예 1-16, 26-41, 및 56-103 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 염증성 장질환, 선택적으로 크론병 또는 궤양성 대장염; 이식; 다발성 경화증; 천식; 류머티스성 관절염; 건선성 관절염 또는 건선인 방법.

[0648] 105. 구체예 104에 있어서, 염증성 장질환은 만성 염증성 장질환인 방법.

[0649] 106. 구체예 1-16, 26-41, 및 56-104 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 건선성 관절염인 방법.

[0650] 107. 구체예 1-16, 26-41, 및 56-104 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 류마티스성 관절염인 방법.

[0651] 108. 구체예 1-16, 26-41, 및 56-105 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 크론병인 방법.

[0652] 109. 구체예 1-16, 26-41, 및 56-105 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 궤양성 대장염인 방법.

[0653] 110. 구체예 1-15, 26-41, 및 56-102 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 안구 염증성 질환, 선택적으로 포도막염인 방법.

[0654] 111. 구체예 1-16, 26-41, 및 56-103 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 전신 홍반성 루푸스 (SLE)인 방법.

[0655] 112. 구체예 1-16, 26-41, 및 56-103 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 쇼그렌 증후군인 방법.

[0656] 113. 구체예 1-16, 26-41, 및 56-103 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태는 이식편 대 숙주 질환(GVHD)인 방법.

[0657] 114. 구체예 113, GVHD는 급성 GVHD(aGVHD)인 방법.

[0658] 115. 구체예 113, GVHD는 만성 GVHD인 방법.

[0659] 116. 구체예 113-115 중 어느 하나의 구체예에 있어서, GVHD는 면역억제제, 선택적으로 코르티코스테로이드 및/또는 사이클로스포린에 대해 내성 또는 불응성인 방법.

[0660] 117. 구체예 1-114 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 치료 방법은 예방적 치료를 포함하는 방법.

[0661] 118. 구체예 1-16, 26-103, 116, 및 117 중 어느 하나의 구체예에 있어서, ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태의 발병에 앞서 투여되는 방법.

[0662] 119. 구체예 1-16, 및 26-118 중 어느 하나의 구체예에 있어서, ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태의 발병과 동시에 또는 발병 후에 투여되는 방법.

[0663] 120. 구체예 1-16, 26-114, 및 116-119 중 어느 하나의 구체예에 있어서, ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태의 발병에 앞서 투여되고 ICOSL 융합 단백질의 적어도 하나의 용량은 염증성 또는 자가면역 질환 또는 병태의 발병과 동시에 또는 발병 후에 투여되는 방법.

[0664] 121. 구체예 1-120 중 어느 하나의 구체예에 있어서, 대상체는 인간인 방법.

[0665] **IX. 실시예**

[0666] [0409] 다음의 실시예들은 오직 설명 목적을 위해 포함된 것으로 본 발명의 범위가 이에 한정되도록 의도되는 것은 아니다.

[0667] **실시예 1**

[0668] 도메인 변이체의 결합 및 활성 평가

[0669] [0410] 결합 파트너 ICOSL, CD28 및/또는 CTLA-4에 대한 결합이 변경된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 선택하였다. 변이체 ICOSL 폴리펩타이드는 하기와 같이 ECD 도메인을 함유하는 SEQ ID NO: 1에 기재된 야생형 인간 ICOSL 서열에 기초하여 생성된 축퇴 효모 디스플레이 라이브러리를 스크리닝함으로써 선택되었다:

[0670] DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPEGSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVTYHIPQNSSLENVDSRYRNRALMSPAGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKFHCLVLSQSL
GFQEVLSVEVTLHVAANFSVPVVSAPHSPSQDELTFTCTSINGYPRPNVYWINKTDNSLLDQALQNDTVFLNMRGLYDVVSVLRIARTPSVNIGCCIENVLL
QQNLTVGSQTGNDIGERDKITENPVSTGEKNAAT

[0671] [0411] 돌연변이된 라이브러리 구성원을 인코딩하는 벡터 DNA를 전기천공법에 의해 효모 적격 세포에 도입하였

다. 라이브러리의 효모 세포를 해동한 다음 유도 배지(5.4 그램 Na_2HPO_4, 8.56 그램 of NaH_2PO_4●H_2O, 20 그램 갈락토스, 2.0 그램 덱스트로스, 6.7 그램 Difco 효모 질소 베이스, 및 류신이 없는 1.6 그램의 효소 합성 드롭 아웃 보충물이 용해되어 있는 배지로서, 0.22 μm 막 필터 디바이스를 통해 여과됨)의 존재하에 성장시키고 배양물을 20℃에서 2일간 성장시켜 효모 세포 표면에서 라이브러리 단백질의 발현을 유도하였다. 비-바인더를 감소시키고 그의 외인성 재조합 카운터-구조 단백질 결합능을 갖는 모든 ICOSL 변이체들을 농축하기 위해 세포들을 자석 비드로 프로세싱하였다. 표적 리간드 단백질은 인간 rCD28.Fc(즉, 재조합 CD28-Fc 융합 단백질), rCTLA4.Fc 및 rICOS.Fc와 같이 R&D Systems(미국)로부터 공급받았다. 이어서 개선된 바인더 기능을 나타내는 효모 세포의 분획을 농축하기 위해 외인성 카운터-구조 단백질 염색을 이용하여 2 내지 3 라운드의 유세포분석 소팅을 실시하였다. 자석 비드 농축 및 유세포 분석에 의한 선택은 기본적으로 문헌 [Miller, K.D. Current Protocols in Cytometry 4.7.1-4.7.30, July 2008]에 설명되어 있다.

[0672] [0412] 유세포 분석 분류로부터의 효모 산출물을 보다 높은 특이적 결합 친화도에 대해 분석하였다. 분류 출력 효모는 확장되고 다시 유도되어 그들이 인코딩하는 특정 IgSF 친화성 변형 도메인 변이체를 발현한다. 그런 다음 이 집단을 모체의 야생형 효모 균주 또는 유세포 분석에 의해 비드 산출 효모 집단과 같은 다른 선택된 산출물과 비교하였다.

[0673] [0413] 선택된 변이체 ICOSL ECD 도메인을 융합 단백질로서 추가로 포맷하고 하기에 기재된 바와 같이 결합 및 기능적 활성에 대해 시험하였다. 유세포 분석 분류의 각 출력 세포에서 플라스미드 DNA를 효모 플라스미드 DNA 분리 키트(Zymo Research, USA)를 사용하여 분리하였다. Fc 융합의 경우 Fc 융합 벡터에 클로닝하기에 적합한 제한 부위가 추가된 PCR 프라이머를 사용하여 돌연변이 표적 ECD에 대한 코딩 DNA를 플라스미드 DNA 준비물에서 뱃치-증폭시켰다. 제한효소 분해 후 PCR 산물을 적절한 Fc 융합 벡터에 연결한 다음 공급업체의 지시에 따라 균주 *E. coli* XL1 Blue(Agilent, USA) 또는 NEB5alpha(New England Biolabs, USA)로 화학적 형질전환시켰다. 모든 클론에서 돌연변이(들)를 확인하기 위해 형질전환된 샘플의 분취량을 ECD 삽입물의 DNA 시퀀싱에 제출하였다. 어떤 경우에는 돌연변이를 확인하기 위해 재시퀀싱을 수행하였다. Genewiz에서 생성한 DNA 시퀀싱 데이터를 분석한 후 마스터 플레이트에서 관심 클론을 회수하였다. 이어서 목적하는 클론들을 다음 기준에 따라 동정하였다: 1.) 동일한 클론은 정렬 중 적어도 2회 나타나고 및 2.) 돌연변이는 정렬 중 적어도 2회 나타나며 좋기로는 서로 다른 클론들에서 나타난다. 이들 기준 중 적어도 하나를 만족하는 클론들은 개선된 결합으로 인해, 소팅 프로세스에 의해 농축된 클론들이었다.

[0674] [0414] 적어도 하나의 친화성-변형된 도메인(예컨대 변이체 ICOSL ECD-Fc)을 갖는 ICOSL의 ECD를 함유하는 Fc 융합 단백질인 재조합 면역조절 단백질을 생성하기 위해, 인코딩 핵산 분자를 생성하여 다음과 같이 디자인된 단백질을 인코딩하였다: 시그널 펩타이드 이어서 변이체(돌연변이) ICOSL ECD 다음에 3개 알라닌(AAA) 링커 다음에 SEQ ID NO: 37에 제시된 야생형 인간 IgG1 Fc에 대해 돌연변이 N82G를 함유하는 인간 IgG1 Fc (EU 넘버링에 의할 때 N297G에 대응함). 이 예시적인 Fc는 안정화 시스테인 돌연변이 R77C 및 V87C 및 위치 5에 시스테인 잔기의 세린 잔기로의 대체(C5S)도 함유하였는데, 이들 각각은 SEQ ID NO: 37에 제시된 야생형 인간 IgG1 Fc를 참조한 것이다 (EU 넘버링에 의할 때 각각 R292C, V302C 및 C220S에 대응함). 일부 경우에서, AAA 링커 서열에 기여하는 NotI 클로닝 부위를 결실시켜 Fc의 개시부와 ICOSL ECD의 직접적인 융합체를 생성시켰다. 상기 작제물은 시스테인과 공유 결합을 형성할 수 있는 항체 경쇄를 일절 포함하지 않으므로, 인간 IgG1 Fc는 SEQ ID NO: 37에 제시된 야생형 또는 변형되지 않은 Fc에 비해 5 위치의 시스테인 잔기가 세린 잔기로 치환된 (C5S) 것이다.

[0675] [0415] Expi293 발현 시스템 (Invitrogen, USA)을 이용하여, 재조합 변이체 Fc 융합 단백질들을 현탁액-적응된 인간 배아 신장(HEK) 293 세포로부터 만들었다. 제조업체 프로토콜(카탈로그 넘버 45202, Life Technologies, USA)을 이용하여 고처리량 96 웰 단백질 A 정제 키트를 이용함으로써 단백질을 정제하였다. 예시적인 재조합 변이체 Fc 융합 단백질의 개략도를 도 1A에 나타내었다.

[0676] **A. 결합 및 기능적 특징화**

[0677] [0416] 동족 결합 파트너에 대한 ICOSL 도메인 변이체 면역조절 단백질의 특이성 및 친화도를 평가하기 위해 결합 연구를 수행하였다. 일시적 형질감염 시스템(Life Technologies, USA)을 사용하여 전장 포유동물(인간) 표면 리간드, CD28, ICOS 또는 CTLA-4를 발현하도록 생성된 형질감염된 HEK293 세포에 대해 결합 연구를 수행하였다. 대조군으로서, 모의(mock: 형질감염되지 않은) 세포에 대한 결합도 평가하였다. 유세포 분석법에 의한 염색을 위해 적절한 일시적 형질감염 또는 음성 대조군(모의)의 200,000개 세포를 96웰 둥근 바닥 플레이트에 플레이팅한 다음 염색 완충액(PBS, 인산염 완충 식염수, 1% BSA, 소 혈청 알부민; 및 0.1% 아지드화나트륨)에서 20분 동

안 인큐베이션하여 비특이적 결합을 차단한다. 세포를 50μL에 100nM ~ 1nM 변이 면역조절 단백질을 함유하는 염색 완충액에 재현탁시켰다. Cell Quest Pro 소프트웨어(Becton Dickinson, USA) 또는 Hypercyt 유세포 분석기(Intellicyte, USA)를 사용하여 각 형질감염체 및 음성 모주에 대해 평균 형광 강도(MFI)를 계산하였다.

[0678] [0417] ECD ICOSL 변이체의 생물활성 역시도 또한 항-CD3 동시 고정화 분석 또는 인간 혼합 림프구 반응(MLR)에서 평가하였다. MLR 분석의 경우, 약 10,000개의 성숙된 1차 인간 수지상 세포를 100,000개의 정제된 동종이계 CD4+ T 세포(BenTech Bio, USA)와 함께, Ex-Vivo 15 배지의 200㎕ 최종 부피 내 96웰 둥근 바닥 플레이트의 대조군 및 ICOSL 변이체 Fc 융합 단백질의 존재 하에 공동-배양하였다. 4-5일째에 Human IFN-감마 Duoset ELISA 키트(R&D Systems, USA)를 사용하여 배양 상등액에서 IFN-감마 분비를 분석하였다.

[0679] [0418] 항-CD3 공동고정화(coimmobilization) 분석을 위해, 10nM 마우스 항-인간 CD3 (OKT3, Biolegends, USA)을 40nM rICOSL.Fc 변이체 단백질들과 함께 PBS에 희석하였다. 이 혼합물을 조직 배양체로 처리된 평평한 바닥 96 웰 플레이트(Corning, USA)에 밤새 첨가하여 플레이트의 웰에 대한 자극성 단백질이 부착을 용이하게 하였다. 다음 날, 미결합 단백질을 플레이트로부터 씻어내고 100,000개의 정제된 인간 범(pan) T 세포들 (BenTech Bio, US) 또는 인간 T 세포클론 BC3 (Astarte Biologics, USA)을 최종 부피 200㎕의 Ex-Vivo 15 배지 (Lonza, Switzerland) 내로 각 웰에 첨가하였다. 일부 사례에서, 인간 T 세포들을 0.25 uM 카르복시플루오레신 숙신이미딜 에스테르 (CFSE, ThermoFisher Scientific, USA)로 표지하였다. 배양 상등액을 수확하기 전에 세포들을 3일간 배양하고 인간 IFN-감마 수준을 Duoset ELISA 키트 (R&D Systems, USA)를 이용하여 측정하였다. 세포 증식은, 형광 결합된 형광-컨쥬게이트된 항-CD4, 항-CD8 항체(BD, USA) 또는 전체 T 세포로 염색된 세포에서 LSR II (BD, USA)에서 유세포 분석을 통해, CFSE 희석에 의해 측정된 바와 같이 분열에 들어선 인풋 세포들의 백분율로 구하였다.

[0680] [0419] 표 3은 항-CD3 동시고정화 검정 또는 MLR 검정에서 세포-발현된 카운터 구조 및 생물활성에 대한 결합에 대한 선택된 ICOSL IgSF 도메인 변이체에 대한 예시적인 결과를 도시한다. 표 3에 도시된 예시적인 아미노산 치환은 SEQ ID NO: 1에 제시된 각각의 레퍼런스(예를 들어, 비변형) ICOSL ECD 서열에 상응하는 아미노산 위치 번호로 지정된다. 아미노산 위치는 중간에 표시되며 해당 비변형(예컨대 야생형) 아미노산은 번호 앞에 나열되고 확인된 변이체 아미노산 치환은 번호 뒤에 나타낸다.

[0681] [0420] 표 3의 결과는 동족 카운터 구조 리간드를 발현하도록 조작된 세포에 대한 각 변이체 Fc-융합 분자의 결합에 대한 평균 형광 강도(MFI) 값에 의해 측정된 결합 활성 및 동일한 세포-발현된 카운터 구조 리간드에 대한 아미노산 치환(들)을 함유하지 않는 상응하는 레퍼런스(예를 들어, 비변형) ECD-Fc 융합 분자의 결합과 비교한 MFI의 비율을 나타낸다. T 세포의 활성을 조절하는 변이체 Fc-융합 분자의 기능적 활성 역시도, i) 항-CD3과 함께 공동고정된 표시된 변이체 ECD-Fc 융합 분자 또는 ii) MLR 검정에서 표시된 변이체 ECD-Fc 융합 분자를 이용하여 생성된 배양 상청액(pg/mL)에서 계산된 IFN-감마 수준을 기반으로 표시하였다. 이 표는 또한 두 가지 기능적 검정에서 상응하는 비변형(모) ECD-Fc와 비교하여 각 변이체 ECD-Fc에 의해 생성된 IFN-감마의 비율을 나타낸다.

[0682] [0421] 이들 결과는 적어도 하나의 동족 카운터 구조 리간드 및/또는 개선된 면역학적 활성에 대한 친화도-변형된 ICOSL IgSF 도메인 변이체의 결합 친화도 증가를 포함하여 변경된 것을 보여준다. 적어도 하나, 일부 경우 두 개 이상의 동족 카운터 구조 리간드에 대해 증가된 결합을 나타내도록 친화성-변형된 다수의 ICOSL IgSF 도메인 변이체들이 선택을 통해 식별되었다. ICOS에 대한 천연 ICOSL의 친화도는 CD28에 대한 천연 ICOSL의 친화도에 비해 상대적으로 높기 때문에, 선별 라운드당 증가된 결합 친화도의 차이는 초기에 야생형 ICOSL에 매우 불량하게 결합한 CD28 결합의 증가보다 더 완만하였다. 상승된 CD28 결합에 대한 선택은 이 상호작용에 유리한 특정 선택이 없었다는 사실에도 불구하고 CTLA4에 대한 상승된 결합을 동시에 산출하였다. 이러한 관찰은 ICOSL 관련 단백질 CD80 및 CD86에 대한 결합을 담당하는 CTLA4 및 CD28에서 고도로 보존된 서열과 보다 효과적으로 상호작용하는 변이체를 선택할 것을 제안하는 것이다.

표 3: ICOSL 변이체: 결합 데이터 및 공동자극 바이오활성 데이터.

ICOSL 돌연변이(들)	ICOS tfxn MFI (모 비율)	CD28 tfxn MFI (모 비율)	CTLA-4 tfxn MFI (모 비율)	항-CD3 IFN-감마 공동고정 분석 pg/mL (모 비율)	MLR IFN-감마 pg/mL (모 비율)
N52H, F78L, Q100R, C198R	9568 (0.12)	1966 (0.24)	1454 (0.12)	130 (0.31)	5927 (1.84)
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	9418 (1.16)	136665 (16.55)	115352 (9.59)	944 (2.21)	821 (0.25)
N52H, N57Y, R75Q, Q100P, V110D	5558 (0.07)	7465 (0.90)	4689 (0.39)	122 (0.28)	1136 (0.35)
N52H, N57Y, Q100R, C198R	9148 (1.13)	134923 (16.33)	83241 (6.92)	1060 (2.48)	375 (0.12)
N52H, N57Y, L74Q, V110D, S192G	9448 (1.17)	128342 (15.54)	123510 (10.26)	1137 (2.66)	889 (0.28)
N52H, Q100R	9478 (1.17)	151977 (18.40)	133929 (11.13)	972 (2.28)	794 (0.25)
N52H, S121G, C198R	9128 (1.13)	124732 (15.10)	182607 (15.18)	827 (1.94)	1257 (0.39)
A20V, N52H, N57Y, Q100R, S109G	5828 (0.72)	76973 (9.32)	73640 (6.12)	447 (1.05)	2283 (0.71)
N52H, N57Y, Q100P, C198R	9548 (1.18)	130676 (15.82)	81966 (6.81)	1125 (2.64)	643 (0.20)
N52H, N57Y, R61S, Q100R, V110D, L173S	1018 (0.13)	9129 (1.11)	5790 (0.48)	109 (0.25)	5094 (1.58)
N52H, N57Y, Q100R, V122A	9978 (1.23)	137372 (16.63)	70764 (5.88)	1316 (3.08)	473 (0.15)
N52H, N57Y, Q100R, F172S	1028 (1.27)	135821 (16.44)	73320 (6.09)	1561 (3.66)	486 (0.15)
N52H, N57Y, Q100R	9858 (1.22)	140612 (17.02)	75106 (6.24)	1648 (3.86)	778 (0.24)
N52S, F120S, N227K	9438 (1.17)	67796 (8.21)	82370 (6.85)	1157 (2.71)	1626 (0.50)
N52S, N194D	9798 (1.21)	59431 (7.19)	74502 (6.19)	1671 (3.91)	1690 (0.52)
N52S, V97A	3138 (0.04)	1733 (0.21)	1541 (0.13)	84 (0.20)	3858 (1.20)
N52S, F120S	9068 (1.12)	67233 (8.14)	97880 (8.13)	1178 (2.76)	2814 (0.87)
N52S, G72R	9288 (1.15)	51638 (6.25)	62339 (5.18)	1161 (2.72)	2947 (0.91)
N52S, A71T, A117T, T190A, C198R	8918 (1.10)	44044 (5.33)	56646 (4.71)	1076 (2.52)	4031 (1.25)
N52S, E220G	3878 (0.05)	2047 (0.25)	1796 (0.15)	122 (0.29)	1927 (0.60)
Y47H, N52S, V107A, F120S	3268 (0.04)	2562 (0.31)	2104 (0.17)	334 (0.78)	4390 (1.36)
WT ICOSL	8088 (1.00)	8260 (1.00)	12033 (1.00)	427 (1.00)	3226 (1.00)

[0683]

표 3: ICOSL 변이체: 결합 데이터 및 공동자극 바이오활성 데이터.

ICOSL 돌연변이(들)	ICOS tfxn MFI (모 비율)	CD28 tfxn MFI (모 비율)	CTLA-4 tfxn MFI (모 비율)	항-CD3 IFN-감마 공동고정 분석 pg/mL (모 비율)	MLR IFN-감마 pg/mL (모 비율)
T43A, N52H, N57Y, L74Q, D89G, V110D, F172S	2821 (0.02)	2180 (0.49)	2051 (0.12)	184 (0.75)	
N52H, N57Y, Q100R, V107I, V110D, S132F, I154F, C198R, R221G	174586 (0.97)	122383 (27.24)	76202 (4.31)	985 (4.01)	1037 (0.36)
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	190765 (1.05)	129070 (28.73)	68488 (3.87)	4288 (17.46)	1225 (0.43)
Q37R, N52H, N57Y, Q100R, V110N, S142F, C198R, D217V, R221G	148638 (0.82)	91104 (20.28)	13498 (0.76)	62 (0.25)	7643 (2.68)
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R	179194 (0.99)	123312 (27.45)	84136 (4.76)	762 (3.10)	1342 (0.47)
N52H, N57Y, Q100R, V110D, V116A, L161M, F172S, S192G, C198R	5236 (0.03)	4160 (0.93)	3305 (0.19)	49 (0.20)	2039 (0.72)
F27S, N52H, N57Y, V110N	20154 (0.11)	8613 (1.92)	3903 (0.22)	83 (0.34)	7522 (2.64)
F27S, N52H, N57Y, V110N	5236 (0.03)	4160 (0.93)	2957 (0.17)	40 (0.16)	-
N52S, H94E, L96I, S109N, L166Q,	198604 (1.10)	100361 (22.34)	102892 (5.82)	1253 (5.10)	5645 (1.98)
S18R, N52S, F93L, I143V, R221G	154561 (0.85)	7625 (1.70)	4254 (0.24)	203 (0.83)	5239 (1.84)
A20T, N52D, Y146C, Q164L	149661 (0.83)	9073 (2.02)	6901 (0.39)	287 (1.17)	4829 (1.69)
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	180016 (1.00)	120230 (26.76)	62809 (3.55)	2218 (9.03)	7283 (2.56)
N52S, H94E, L96I, V122M	198717 (1.10)	88901 (19.79)	94231 (5.33)	590 (2.40)	618 (0.22)
N52H, N57Y, H94E, L96I, F120I, S126T, W153R, I218N	87711 (0.48)	42035 (9.36)	31798 (1.80)	67 (0.27)	2500 (0.88)
M10V, S18R, N30D, N52S, S126R, T139S, L203F	180665 (1.00)	64929 (14.45)	48362 (2.73)	1193 (4.86)	13647 (4.79)
S25G, N30D, N52S, F120S, N227K	178834 (0.99)	66127 (14.72)	46631 (2.64)	1246 (5.07)	2202 (0.77)
N30D, N52S, L67P, Q100K, D217G, R221K, T225S	18630 (0.10)	1986 (0.44)	1940 (0.11)	54 (0.22)	2752 (0.97)
WT ICOSL	180900 (1.00)	4493 (1.00)	17685 (1.00)	246 (1.00)	2850 (1.00)
R26S, N52H, N57Y, V110D, T137A, C198R	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

[0684]

표 3: ICOSL 변이체: 결합 데이터 및 공동자극 바이오활성 데이터.

ICOSL 돌연변이(들)	ICOS tfxn MFI (모 비율)	CD28 tfxn MFI (모 비율)	CTLA-4 tfxn MFI (모 비율)	항-CD3 IFN-감마 공동고정 분석 pg/mL (모 비율)	MLR IFN-감마 pg/mL (모 비율)
N52H, N57Y, Q100R, V110D, A117T, T190S, C198R	2831 (0.04)	2881 (0.57)	2464 (0.23)	59 (0.08)	-
N52H, N57Y, Q100R, V110D, F172S, C198R	58478 (0.79)	74031 (14.75)	56850 (5.33)	712 (0.96)	1093 (0.23)
S25G, F27C, N52H, N57Y, Q100R, V110D, E135K, L173S, C198R	22514 (0.30)	21320 (4.25)	20450 (1.92)	353 (0.48)	5765 (1.21)
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	84236 (1.14)	81842 (16.31)	121519 (11.39)	4593 (6.18)	1137 (0.24)
M10I, S13G, N52H, N57Y, D77G, V110A, H129P, I143V, F172S, V193M, C198R	6362 (0.09)	6001 (1.20)	4834 (0.45)	141 (0.19)	4326 (0.91)
N52H, N57Y, R61C, Y62F, Q100R, V110N, F120S, C198R	4355 (0.06)	4316 (0.86)	3430 (0.32)	110 (0.15)	6854 (1.44)
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	96736 (1.31)	77881 (15.52)	148012 (13.88)	8765 (11.79)	630 (0.13)
N52H, N57Y, Q100R, V110D, N144D, F172S, C198R	67578 (0.91)	64953 (12.94)	95731 (8.98)	1672 (2.52)	1490 (0.31)
N52S, H94E, L98F, Q100R,	80690 (1.09)	78750 (15.69)	148160 (13.89)	3564 (4.80)	1497 (0.32)
N52S, E90A	108908 (1.47)	31086 (6.19)	108866 (10.21)	4564 (6.14)	3927 (0.83)
N30D, K42E, N52S	85726 (1.16)	4293 (0.86)	10755 (1.01)	5211 (7.01)	5656 (1.19)
N52S, F120S, I143V, I224V	90862 (1.23)	28443 (5.67)	105229 (9.87)	4803 (6.46)	4357 (0.92)
WT ICOSL	73964 (1.00)	5018 (1.00)	10665 (1.00)	743 (1.00)	4748 (1.00)

[0685]

[0686] B. 돌연변이를 갖는 ICOSL 단백질 구조

[0687] [0422] 예를 들어, 표 3에 나타낸 바와 같은, ICOS 및 CD28 양자 모두에 대해 친화도가 증가된 ICOSL 변이체의 선택 결과, 다수의 클론에 걸쳐 보존된 것으로 보이고 ICOSL의 ICOS/CD28 결합 IgV 도메인에 존재하는 것으로 보이는 몇 개의 아미노산 치환이 나타났다. 이러한 잔기의 역할을 추가로 설명하기 위해 반복되는 돌연변이를 ICOSL의 구조에 매핑하였다. SWISS-MODEL 서버를 사용하여 상동성 모델링을 위한 템플릿으로 CD80-CTLA4 X선 결정 구조(PDB 1D:118L)를 사용하여 ICOSL-ICOS 복합체의 구조를 모델링하였다(Biasini et al., 2014 Nucleic Acids Res. 42:p.W252-8). ICOSL 및 ICOS의 서열를 각각 CD80 및 CTLA4 구조에 정렬시켰다. 두 가지 모델이 독립적으로 생성되었다: (1) ICOSL에 대한 호모-다이머 모델, (2) 단일 ICOSL 유닛과 ICOS 사이에 결합된 헤테로-복합체. 이어서, PyMOL Molecular Graphics System을 사용하여 호모-다이머 ICOSL 모델의 각 모노머 유닛에 헤테로-복합체의 ICOSL을 중첩하여 전체 상동성 모델을 구성하였다. 이에 의해 ICOS에 결합된 완전한 ICOSL 호모-다이머가 생성되었고, 이것을 Swiss-PDB Viewer를 사용하여 최종 상동성 모델을 생성하기 위해 에너지 최소화의 최종 라운드에 부쳤다.

[0688] [0423] 도 1B에 도시된 바와 같이 C198을 제외하고, 자주 관찰되는 돌연변이는 ICOSL의 IgV 도메인에 국한되었다(ICOS의 위치에 대한 프록시로서 CTLA4의 위치에 대한 왼쪽 패널 참조 및 오른쪽 패널과 비교). 이와 대조적으로, 선택된 변이체에서 덜 빈번하게 돌연변이되는 것으로 발견된 잔기는 IgC 도메인에 대한 약간의 편향과 함께 ICOSL IgV 및 IgC 도메인에 걸쳐 분포되었다. 이러한 결과는 IgV 도메인의 반복적으로 돌연변이된 잔기가 ICOSL/ICOS 인터페이스에 영향을 미치는 반면, IgC 도메인의 돌연변이는 다른 클론에서 덜 빈번하다는 관찰과 일치하며, 따라서 무작위 돌연변이 유발에 의한 라이브러리 생성의 산물인 비기능적 "방관자" 돌연변이일 가능성이 더 높을 수 있다. 위치 98에서의 재발성 돌연변이만이 ICOS와 상호작용하는 예측된 ICOS 부위의 5 옹스트

롬 내의 ICOSL 아미노산 잔기에 영향을 미쳤다. ICOS 결합 부위의 5 옹스트롬 내의 다른 돌연변이 잔기는 위치 96에 있으며 클론 전체에서 드물게 관찰된다. 그러나, 잔기 96 및 98의 근접성은 잔기 96이 결합 인터페이스의 일부인 또 다른 잔기일 수 있음을 시사한다. 이 개념과 일관되게, 잔기 96 및 98과 구조적으로 등가인 CD80 잔기는 CTLA4에 대한 접촉 잔기이다(Peach et al. 1994 J Exp Med, 180:2049-58). ICOSL의 위치 96(및 아마도 98) 이외의 위치에서 강력하게 선택된 돌연변이는 예측된 ICOS 결합 인터페이스에 있을 것으로 예측되지 않는다. 결합 인터페이스 외부의 돌연변이는 모델링된 구조로부터 예측된 바와 같이 IgV 도메인을 통해 ICOS와의 인터페이스으로 전달되는 알로스테릭 효과를 통해 간접적으로 리간드 결합을 조절할 수 있을 것이나, 특정 이론에 구애되는 것은 아니다. 특히, 잔기 52는 글리코실화될 것으로 예측되고 아스파라긴의 돌연변이를 통한 글리칸의 제거는 ICOSL 3차 구조의 변경을 통해 결합에 영향을 미칠 수 있다.

[0689] [0424] 이러한 결과는 강력하게 선택된 돌연변이가 ICOS 인터페이스에 직접적으로 또는 간접적으로 영향을 미친다는 관찰과 일치한다. 이 인터페이스는 CD80의 CD28 결합 에피토프가 CTLA4 결합 에피토프와 겹치고 두 리간드 모두가 CD80과 접촉하는데 유사한 서열 특징을 이용하는 CD80/CTLA4 인터페이스(Chattopadhyay et al. 2006 J Immunol, 177:3920-9e)와 유사하다(Peach et al. 1994). 이러한 구조/기능 분석의 결과, 선택 제제로서 ICOS-Fc 또는 CD28-Fc를 사용하여 돌연변이가 선택되었음에도 불구하고, 어째서 ICOS의 개선된 결합이 CD28에 대한 개선된 결합과 연관지어질 수 있는지에 대한 이유가 확립되었다.

[0690] **B. 항-CD3 공동자극 분석에서의 사이토카인 생산**

[0691] [0425] 전술한 예시적인 변이체 ECD ICOSL Fc-융합 분자를 상기 기술된 항-CD3 공동자극(공동고정) 바이오활성 분석에서 사이토카인 IL-17의 자극에 대해 추가로 평가하였다. 10 nM 플레이트-결합된 항-CD3 및 40 nM ICOSL Fc 변이체 단백질의 혼합물을 인간 T 세포와 배양하였다. 상등액을 수집하고 ELISA에 의해 IL-17 수준을 구하였다. 지시된 변이체 ECD-Fc 융합 분자 및 상응하는 비변형(모) ECD-Fc 공동고정 항-CD3을 이용하여 생성된 배양 상등액 중 IL-17의 양(pg/ml)을 측정하였다. 비교를 위해, 예시적인 변이체들에 대해 표 3에 설명된 동일 분석법에서 IFN-감마 생산 결과도 표에 나타내었다.

[0692] [0426] 표 4의 결과는 상등액에서 측정된 IL-17의 pg/mL 및 대응하는 비변형 (야생형) ECD-Fc와 비교된 각 변이체 ECD-Fc에 의해 생산된 IL-17의 비율(폴드 증가)을 나타낸다. 유사한 결과가 IFN-감마에 대해 나타나 있다. 또한 세포에 의해 생산된 총 IL-17 또는 IFN-감마 사이토카인의 백분율도 표시되어 있다. 이들 결과는 변이체 분자의 친화성 변형이 기능성 T 세포 활성을 변경시켜 공동자극 분석에서 IFN-감마에 더해 IL-17도 증가시켰음을 보여준다.

표 4: ICOSL IgSF 도메인 변이체에 대한 공동자극 바이오활성 데이터

ICOSL 돌연변이(들)	IL-17A [pg/mL]	IL-17A 폴드 ↑WT	IFN-g [pg/mL]	IFN-g 폴드 ↑WT	총 폴드 ↑WT	생성된 총 사이토카인 %		% 총 IL-17 + IFN-g
						% IL-17	% IFN-g	
N52H, N57Y, Q100R, C198R	617	7.93	1060	2.48	10.42	5.51	0.77	6.28
N52H, N57Y, Q100R, V122A	647	8.33	1316	3.08	11.41	5.79	0.96	6.75
N52H, N57Y, Q100R, F172S	549	7.06	1561	3.66	10.72	4.91	1.14	6.05
N52Y, N57Y, F138L, L203P	90	1.05	1999	2.69	3.74	0.81	2.91	3.72
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	319	3.16	2218	9.03	12.19	2.85	3.23	6.08
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	510	5.90	8765	11.79	17.70	4.56	12.78	17.33
N52H, N57Y, Q100R	473	6.08	1648	3.86	9.94	4.23	1.20	5.43
N52H, Q100R	358	4.60	972	7.01	11.62	3.20	0.71	3.91
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	124	1.60	944	2.21	3.81	1.11	0.69	1.80
N52H, N57Y, Q100P	127	1.47	4922	6.62	8.09	1.14	7.17	8.31
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	22	7.11	130	17.46	24.57	6.41	6.25	12.66
N30D, K42E, N52S	349	4.04	5211	7.01	11.05	3.12	7.60	10.71
N52S, F120S, I143V, I224V	292	3.39	4803	6.46	9.85	2.61	7.00	9.62
N52S, E90A	306	3.54	4564	6.14	9.68	2.73	6.65	9.39
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	290	3.35	4593	6.18	9.53	2.59	6.69	9.28
N52S, N194D	428	5.50	1671	3.90	9.4	1.52	5.19	5.40
N52H, I143T	84	-	1727	-	3.30	0.75	2.52	3.27
N52D	126	-	1447	-	3.41	1.13	2.11	3.23

[0693]

[0694] **실시예 2**

[0695] **ICOSL IgSF 도메인 변이체의 정제 및 정제 평가**

[0696] [0427] 정제 전략을 상기 설명된 예시적인 후보 히트에 대해 사용하였다. 293 세포주로부터 유래된 인간 세포(Expi293)를 발현 작제물로 일시적으로 형질감염시키고 ECD ICOSL Fc 융합 분자를 세포에서 발현시켰다. 이어서 Fc 융합 단백질을 친화성 크로마토그래피 (MabSelect SuRe)에 의해 단백질 A를 갖는 상등액으로부터 정제하였다. 이 초기 정제 단계에 이어서 예비 크기배제 크로마토그래피(SEC) 단계를 수행하여 단백질을 추가정제하였다 (Superdex200 16x60). 이들 두 가지 정제로부터 샘플을 수집하고 분석 SEC에 의해 비교하였다. 단백질 A 정제 후 단백질 농도를 구하였다. 결과적인 정제된 단백질 역시도 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 상에서 분석 SEC에 의해 분석하여 그 순도를 평가하였다.

[0697] [0428] 정제된 샘플 중 퍼센트 주 피크를 구하고 초기 A 단계에서 정제된 단백질(% Main Peak Prot A pool) 대 예비 SEC를 수반하여 단백질 A로 정제된 단백질(% Main Peak SEC pool T=D0)을 비교하였다. 표 17에 나타난 바와 같이, 부가적인 SEC 단계는 정제된 단백질의 단백질 순도를 실제로 증가시켰다. 단백질의 안정성을 더 평가하기 위해, 예비 SEC에 의해 정제된 단백질을 실온에서 24 시간 방치시킨 다음 HPLC에 의한 % 주 피크 (% Main Peak SEC pool T=D24)를 평가하고 D0 샘플과 비교하였다. D0 대 D24에서의 % 주 피크 변화를 구하였다 (▲% Main Peak Peak SEC pool). 표 5에서와 같이, 시험된 대부분의 예시적인 변이체 ECD ICOSL Fc 융합 분자들은 이 시기에서 % Main peak 변화를 거의 나타내지 않았는데, 이는 단백질 변이체의 최소 응집이 일어났음을 가리킨다.

표 5: ICOSL 단백질 변이체의 정제

ICOSL 돌연변이(들)	Expi293 Prod. Prot A mg/L	% 주요 피크 Prot A 풀	% 주요 피크 SEC 풀 T=D0	% 주요 피크 SEC 풀 T=D24	▲% 주요 피크 SEC 풀
N52S, N194D	120	87.9	93.5	92	1.5
N52H, N57Y, Q100R, F172S	217	86.9	97.4	95.6	1.8
N52S, E90A	128	86.5	89.5	88.3	1.2
N52H, Q100R	176	85.9	97.5	96.1	1.4
N52H, N57Y, Q100R	186	85.1	97.6	95.7	1.9
N52S, F120S, I143V, I224V	87	83.2	88.9	88.3	0.6
N52H, N57Y, Q100R, C198R	204	82.9	95.8	92.3	3.5
N52H, N57Y, Q100P	63	80.5	94.5	88.5	6
N30D, K42E, N52S	81	80	95.4	91.3	4.1
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	141	78.9	96	92.9	3.1
N52H, N57Y, Q100R, V122A	260	77.6	96.4	95.2	1.2
N52Y/N57Y/F138L/L203P	40	75.6	96.8	94.8	2
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	60	73.8	97.1	95.8	1.3
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	95	65.4	90.9	86	4.9
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	73	50.6	87.9	78.6	9.3
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	58	-	-	-	-
N52H, I143T	134	93.2	96	92.7	3.3
N52D	136	90.4	95.5	93.3	2.2

[0698]

[0699] **실시예 3**

[0700] **정제된 ICOSL IgSF 도메인 변이체 히트의 공동자극 바이오활성 평가**

[0701] [0429] 실시예 2에 설명된 바와 같이 정제된 ECD ICOSL Fc 융합 분자들을 실질적으로 실시예 1에 설명된 바와 같이 MLR에 의해 바이오활성에 대해 평가하였다. 10 nM 또는 40nM ICOSL Fc 변이체 단백질 혼합물을 10nM 항-CD3 존재 하에 96-웰 플레이트에 밤새 결합시켰다. 플레이트를 세척하고 100,000 CFSE 표지된 pan T 세포를 96 시간에 걸쳐 부가하였다. 상등액을 수집하고 IFN-감마 및 IL-17 수준을 ELISA에 의해 측정하였다.

[0702] [0430] 예시적인 시험된 변이체 (10nM 및 40nM ICOSL Fc)를 이용한 항-CD3 공동자극에 의해 유도된 사이토카인 분비에 대한 결과를 도 2A 및 2B에 나타내었는데, 여기에는 ICOSL의 ECD 에서의 예시적인 IgSF 도메인 아미노산 치환 (대체)가 도시되어 있다. 도 2A 및 2B의 막대 그래프는 ELISA 분석시 상등액 중에 분비된 IFN-감마 및 IL-17의 양(pg/mL)을 각각 나타낸다. WT ICOSL과 항-CD3 공동자극에 의해 유도된 수준에 비해, 시험된 변이체와 항-CD3 공동자극에 의해 유도된 사이토카인 방출 수준을 수평선으로 표시하였다. 결과는 변이체 분자의 친화성 변형이 공동자극 분석에서 IFN-감마 및 IL-17 분비를 실질적으로 증가시키는 것을 포함하여, 기능성 T 세포 활성을 조절하는 활성을 나타냈음을 보여준다. 증가된 면역학적 활성이 일부 변이체에서 관찰되었다.

[0703] **실시예 4**

[0704] **정제된 ICOSL IgSF 도메인 변이체 히트의 정제 평가**

[0705] [0431] 실시예 12에 설명된 바와 같이 정제된 예시적인 변이체 ECD ICOSL Fc 융합 분자들을 T 세포의 항-CD3-유도된 증식을 공동자극하는 능력에 대해 평가하였다.

[0706] [0432] 일차 T 세포들을 카르복시플루오레신 숙신이미딜 에스테르 (CFSE)로 표지시켰다. 10 nM 또는 40nM 변이체 ECD ICOSL Fc 또는 야생형 ECD ICOSL 단백질의 혼합물을 10nM 항-CD3의 존재 하에 96-웰 플레이트에 밤새 결합시킨 다음 표지된 T 세포를 첨가하고 3일간 인큐베이션시켰다. 대조군으로서, 결합된 항-CD3 및 IgG 또는 IgG 단독의 존재 하에 증식도 평가하였다. 세포를 CD4 또는 CD8 표면 마커로 염색하고 유세포 분석에 의해 CFSE 희석을 평가함으로서 총 T 세포, CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포의 증식을 결정하였다.

[0707] [0433] 각각 40nM 및 10nM ICOSL에서 시험된 예시적인 변이체들에 대한 결과를 도 3A 및 도 3B에 나타내었다. 도 3A에 도시된 바와 같이, 시험된 거의 모든 변이체 ECD ICOSL Fc 융합 분자들은 WT 대조군보다 더 높은 증식을 유도하였다. 도 3B에 도시된 바와 같이, 증식 차이는 10 nM에서 더욱 명백하였고 어떤 변이체들은 이보다 더

낮은 농도에서도 최대 증식을 제공하였다.

[0708] **실시예 5**

[0709] **정제된 ICOSL IgSF 도메인 변이체 히트의 결합 및 활성 평가**

[0710] [0434] 실시예 2에 설명된 바와 같이 정제된 예시적인 변이체 ECD ICOSL Fc 융합 분자들을 실제로 실시예 1에 설명된 바와 같은 방법을 사용하여 결합 및 기능적 활성에 대해 평가하였다.

[0711] **A. 유세포 분석 결합 검정법**

[0712] [0435] 293 세포주 (Expi293)로부터 유래된 인간 세포들을 CD28, CTLA-4, 또는 ICOS로 형질감염시키거나 모의(mock) 형질감염시켰다. 이어서 세포들을 100,000 pM 내지 46 pM으로 적정된 야생형 ECD ICOSL-Fc 분자 또는 ECD ICOSL Fc 융합 분자와 함께 인큐베이션한 다음 실시예 1에 설명된 바와 같이 유세포 분석을 이용하여 결합을 관찰하였다. 평균 형광강도(MFI) 및 유세포 분석에 의해 결합을 평가하고 양성 시그널 세포 백분율(%)을 Cell Quest Pro 소프트웨어(Becton Dickinson, USA)를 이용하여 구하였다. 절반-최대(half-maximal) MFI 반응(MFI EC50) 또는 % 양성 세포(% (+) EC50)를 나타내는 ICOSL-Fc의 농도를 구하였다.

[0713] [0436] 표 6에 결과를 나타내었다. 표 6에 나타낸 ICOSL 아미노산 치환은 SEQ ID NO:1에 제시된 각 레퍼런스(예컨대, 비변형) ICOSL ECD 서열에 대응하는 아미노산 위치 번호로 표시한 것이다. 일부 값 (예컨대 CD28에 대한 WT 결합)의 경우 EC50을 구할 수 없었기 때문에, 데이터 포맷 목적상 1,000,000 pM을 임의로 피싱하였다. 상기 실시예 1에 기재된 바와 같은 이전의 결합 검정으로부터 얻은 결과와 유사하게, 적어도 하나의 동족체 카운터 구조 리간드에 대한 변이체 ICOSL ECD-Fc 융합 분자의 변경된 결합 친화성이 관찰되었다.

표 6: ICOSL 변이체에 대한 유세포 분석 EC50

ICOSL 돌연변이(들)	CD28 MFI EC50 [pM]	CD28 % (+) EC50 [pM]	CTLA-4 MFI EC50 [pM]	CTLA-4 % (+) EC50 [pM]	ICOS MFI EC50 [pM]	ICOS % (+) EC50 [pM]
WT ICOSL	1000000	1000000	1000000	1000000	10543	762
N52H, I143T	19147	567	20259	1891	2666	286
N52H, N57Y, Q100R, C198R	950	159	73548	422	1032	179
N52H, N57Y, Q100R, V122A	29701	152	1008	293	302	64
N52H, N57Y, Q100R, F172S	1006	231	1332	396	779	130
N52Y/N57Y/F138L/L203P	7844	386	7457	994	3104	408
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	5961	595	6909	1026	5514	852
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	1034	307	23328	579	3172	347
N52H, N57Y, Q100R	1665	238	11002	533	383	131
N52H, Q100R	1305	274	8593	1997	702	167
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	4987	594	30382	922	50219	814
N52H, N57Y, Q100P	21137	402	22651	758	4090	320
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	2508	387	5399	806	2381	421
N30D, K42E, N52S	-	3683800	8593	1997	3251	558
N52S, F120S, I143V, I224V	902400	9060	28126	2948	4366	245
N52S, E90A	1339700	31302	31419	5828	5225	473
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	1809	426	7201	841	1293	433
N52S, N194D	944669	11876	1254880	5170	473	206
N52D	288617	17793	396841	3891	2642	137

[0714]

[0715] **B. ForteBio 결합 분석**

[0716] [0437] 수용체와 ICOSL 도메인 변이체 면역조절 단백질 간의 단백질-단백질 상호작용을 Fortebio 결합 분석을 이용하여 추가로 평가하였다. ICOS, CD28, 및 CTLA-4 수용체들을 개별적으로 항-인간 포획 센서 (ForteBio Octet AHC)에 로딩하고 야생형 비변이체 ICOSL ECD-Fc 융합 분자, 야생형 PD-L2 ED-Fc 융합 분자 또는 변이체 ICOSL Fc-융합체 분자를 4 포인트 적정으로 수용체에 결합시켰다. 각각의 적정은 각 단백질의 회합(k_{on}) 및 해리(K_{dis})를 계산하는데 전체적으로 적합하였다. 변이체 ICOSL ECD-Fc 융합 분자로 시험된 각 수용체의 항-인간 포

획 센서의 로딩 반응을 측정하였다. 해리 상수(KD)를 계산하고 야생형과 비교하여 폴드 개선 값 (fold imp.)을 구하였다.

[0717] [0438] ICOS에 대한 결합 결과를 표 7에, CD28에 대한 결과를 표 8에, 그리고 CTLA-4를 표 9에 나타내었다. 표 7-9에 나타낸 예시적인 아미노산 치환은 SEQ ID NO:1에 제시된 각각의 레퍼런스 비변이체 ICOSL ECD 서열에 상응하는 아미노산 위치 번호로 표시된 것이다.

표 7: ICOS ForteBio 결합 분석

ICOSL 돌연변이(들)	반응성	KD (M)	K_{on} (1/Ms)	K_{dis} (1/s)	전체 R^2	폴드 Imp.
WT ICOSL	0.73	8.83E-10	1.78E+05	1.58E-04	0.9908	-
N52H, I143T	0.87	3.32E-10	3.13E+05	1.04E-04	0.9683	2.7
N52H, N57Y, Q100R, C198R	0.74	4.92E-10	3.85E+05	1.89E-04	0.9882	1.8
N52H, N57Y, Q100R, V122A	0.67	4.72E-10	3.77E+05	1.78E-04	0.9775	1.9
N52H, N57Y, Q100R, F172S	0.68	4.20E-10	4.34E+05	1.82E-04	0.9545	2.1
N52Y/N57Y/F138L/L203P	0.64	7.69E-10	2.22E+05	1.71E-04	0.9782	1.1
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	0.67	3.62E-10	3.55E+05	1.29E-04	0.9687	2.4
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	0.76	4.77E-10	3.29E+05	1.57E-04	0.9616	1.9
N52H, N57Y, Q100R	0.74	3.69E-10	2.87E+05	1.06E-04	0.9817	2.4
N52H, Q100R	0.79	3.73E-10	4.45E+05	1.66E-04	0.968	2.4
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	0.60	1.29E-09	1.66E+05	2.15E-04	0.9846	0.7
N52H, N57Y, Q100P	0.73	3.82E-10	3.71 E+05	1.42E-04	0.9729	2.3
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	0.75	5.43E-10	2.65E+05	1.44E-04	0.9848	1.6
N30D, K42E, N52S	0.80	3.71E-10	4.48E+05	1.66E-04	0.9651	2.4
N52S, F120S, I143V, I224V	0.80	3.11E-10	5.03E+05	1.56E-04	0.9673	2.8
N52S, E90A	0.88	3.40E-10	4.85E+05	1.65E-04	0.9792	2.6
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	0.68	4.77E-10	3.15E+05	1.50E-04	0.976	1.9
N52S, N194D	0.88	3.37E-10	3.38E+05	1.14E-04	0.9723	2.6
N52D	0.87	3.38E-10	3.91E+ 05	1.32E-04	0.9792	2.6
야생형 PD-L2 ED-Fc	0.03					

[0718]

표 8: CD28 ForteBio 결합 분석

ICOSL 돌연변이(들)	반응성	KD (M)	K_{on} (1/Ms)	K_{dis} (1/s)	전체 R^2	폴드 Imp.
WT ICOSL	0.33	1.39E-08	6.69E+04	9.29E-04	0.9715	-
N52H, I143T	0.95	5.25E-10	4.27E+05	2.24E-04	0.9877	26.5
N52H, N57Y, Q100R, C198R	1.14	4.47E-10	4.12E+05	1.84E-04	0.9877	31.0
N52H, N57Y, Q100R, V122A	1.04	3.90E-10	4.07E+05	1.59E-04	0.9878	35.6
N52H, N57Y, Q100R, F172S	1.06	2.93E-10	4.26E+05	1.25E-04	0.9836	47.3
N52Y/N57Y/F138L/L203P	0.86	7.83E-10	1.79E+05	1.40E-04	0.993	17.7
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	0.92	5.53E-10	2.54E+05	1.40E-04	0.9906	25.1
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	1.10	3.66E-10	3.41 E+05	1.25E-04	0.986	37.9
N52H, N57Y, Q100R	1.04	3.68E-10	3.72E+05	1.37E-04	0.983	37.7
N52H, Q100R	1.09	4.01E-10	5.0SE+05	2.02E-04	0.9938	34.7
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	0.94	8.96E-10	1.78E+05	1.60E-04	0.9961	15.5
N52H, N57Y, Q100P	0.99	4.36E-10	3.29E+05	1.43E-04	0.9835	31.8
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	1.06	5.03E-10	3.06E+05	1.54E-04	0.9872	27.6
N30D, K42E, N52S	0.54	1.95E-09	2.74E+05	5.33E-04	0.9772	7.1
N52S, F120S, I143V, I224V	0.84	9.10E-10	4.51 E+05	4.10E-04	0.9742	15.3
N52S, E90A	0.94	9.69E-10	4.74E+05	4.59E-04	0.978	14.3
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	0.94	5.63E-10	2.63E+05	1.48E-04	0.9781	24.7
N52S, N194D	0.82	1.04E-09	3.53E+05	3.68E-04	0.9887	13.3
N52D	0.86	1.16E-09	3.36E+05	3.90E-04	0.989	11.9
야생형 PD-L2 ED-Fc	-0.04					

[0719]

표 9: CTLA-4 ForteBio 결합 분석

ICOSL 돌연변이(들)	반응성	KD (M)	K_{on} (1/Ms)	K_{dis} (1/s)	전체 R^2	폴드 Imp.
WT ICOSL	0.21	7.71E-08	1.92E+04	1.48E-03	0.8919	-
N52H, I143T	0.96	6.78E-10	7.26E+05	4.92E-04	0.9641	113.8
N52H, N57Y, Q100R, C198R	1.57	6.45E-10	4.79E+05	3.09E-04	0.9875	119.6
N52H, N57Y, Q100R, V122A	1.43	5.76E-10	4.73E+05	2.72E-04	0.9926	133.9
N52H, N57Y, Q100R, F172S	1.47	5.36E-10	5.13E+05	2.75E-04	0.9924	144.0
N52Y/N57Y/F138L/L203P	1.33	8.33E-10	3.45E+05	2.87E-04	0.9943	92.6
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	1.50	6.48E-10	3.12E+05	2.02E-04	0.9943	119.0
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	1.60	8.64E-10	4.79E+05	4.14E-04	0.9825	89.2
N52H, N57Y, Q100R	1.65	7.19E-10	4.28E+05	3.08E-04	0.9895	107.2
N52H, Q100R	1.17	5.92E-10	8.37E+05	4.96E-04	0.9629	130.3
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	1.32	1.47E-09	2.34E+05	3.44E-04	0.9937	52.6
N52H, N57Y, Q100P	1.51	6.47E-10	3.61 E+05	2.33E-04	0.9911	119.2
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	1.58	1.06E-09	4.24E+05	4.49E-04	0.9779	72.8
N30D, K42E, N52S	0.42	2.81E-09	2.42E+05	6.81E-04	0.9676	27.4
N52S, F120S, I143V, I224V	0.58	1.20E-09	3.10E+05	3.72E-04	0.9283	64.3
N52S, E90A	0.64	1.12E-09	3.28E+05	3.68E-04	0.9184	68.7
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	1.44	1.07E-09	4.0SE+05	4.32E-04	0.9811	72.3
N52S, N194D	0.59	2.52E-09	2.66E+05	6.69E-04	0.9643	30.6
N52D	0.62	1.52E-09	4.16E+05	6.32E-04	0.9234	50.7
야생형 PD-L2 ED-Fc	0.00					

[0720]

[0721] C. 공동고정 분석 (Coimmobilization Assay)

[0722] [0439] 실제로 실시예 1에 설명된 바와 같이 항-CD3 공동고정 분석으로 ICOSL 융합 변이체의 공동자극 바이오활성을 결정하였다. 약 0.37nM, 1.3nM 또는 10nM 마우스 항-인간 CD3 (OKT3, Biolegend, USA)을 10nM 또는 40nM 변이체 ICOSL ECD Fc vor 야생형 ICOSL ECD-Fc와 함께 PBS에 희석하였다. 이 혼합물을 조직 배양체 처리된 평평 바닥 96 웰 플레이트에 밤새 첨가하여 플레이트 웰에 대한 자극 단백질의 부착을 용이하게 하였다. 다음 날, 미결합 단백질을 세척하고 100,000개의 정제된 인간 pan T 세포를 각 웰에 첨가하였다. 세포들을 3일간 배양한 다음 배양 상등액을 수확하고 ELISA 키트를 이용하여 인간 IFN-감마 수준을 측정하였다.

[0723] [0440] 표 10에 항-CD3 공동고정 분석시 다양한 조건 하에 세포에 의해 생산된 IFN-감마 (pg/mL)의 양을 나타내었다. 이 표에서, 예시적인 변이체 ECD ICOSL-Fc 융합체의 아미노산 치환은 SEQ ID NO: 1에 제시된 비변이체 ICOSL ECD 서열에 대응하는 아미노산 위치로 나타내었다. 대응하는 비변형 (야생형) ECD-Fc의 존재시 측정값과 비교한 기능성 분석에 있어서 각 변이체 ICOSL ECD-Fc의 존재하에 생산된 IFN-감마 비율을 나타내었다 (폴드 ↑ WT). 나타난 바와 같이, 변이체 ICOSL-ECD-Fc 분자의 공동자극 시그널링은 야생형 ICOSLdp 비해 실질적으로 더 컸다.

표 10: 공동자극 분석에 있어서 IFN-감마 반응성의 평가

ICOSL 돌연변이(들)	IFN-감마 [pg/mL]						
	40nM 리간드		10nM 리간드		40nM 리간드		
	10mM OKT3	폴드 ↑WT	10mM OKT3	폴드 ↑WT	10mM OKT3	1.1 nM OKT3	0.37 nM OKT3
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	14372	17.3	4903	29.9	8379.2	7422.8	2893.7
N52H, N57Y, Q100R, V122A	10640	12.8	6456	39.4	5636.2	4724.2	2246.3
N52H, N57Y, Q100R, F172S	10379	12.5	3741	22.8	3979.7	4067.7	1415.5
N52H, N57Y, Q100R, C198R	9590	11.5	4048	24.7	4215.8	2787.1	1072.4
N52H, N57Y, Q100R	9568	11.5	3270	19.9	4412.3	3862.0	1820.0
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	6939	8.4	3234	19.7	5495.2	4081.6	1442.8
N52S, F120S, I143V, I224V	6567	7.9	717	4.4	2145.4	2185.7	646.1
N52S, N194D	5690	6.8	272	1.7	2315.1	1485.0	1140.6
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	5345	6.4	1152	7.0	2747.0	3383.4	1701.2
N52S, E90A	5097	6.1	706	4.3	5019.8	3036.4	1482.4
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	4737	5.7	520	3.2	2501.5	1632.1	937.5
N52H, Q100R	4122	5.0	1466	8.9	5782.1	2861.4	967.5
N30D, K42E, N52S	4080	4.9	273	1.7	1336.8	1260.7	541.1
N52H, N57Y, Q100P	3344	4.0	229	1.4	2525.4	2439.5	1233.9
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	3064	3.7	1471	9.0	2699.5	2629.9	678.2
N52Y, N57Y, F138L, L203P	2177	2.6	200	1.2	1889.5	1757.9	808.8
N52H, I143T	1906	2.3	138	0.8	1417.1	1367.9	275.2
WT ICOSL	831	1.0	164	1.0	558.8	377.7	152.0
N52D	88	0.1	231	1.4	1288.9	1737.9	289.0

[0724]

[0725] **D. 바이오활성 억제 평가를 위한 림프구 혼합배양 반응**

[0726] [0441] 실제로 실시예 1에 설명된 바와 같이 융합 변이체에 의한 T 세포 활성을 림프구 혼합배양 반응 (MLR)으로 측정하였다. 인간 단핵구를 IL-4 및 GM-CSF의 존재 하에 6일간 인큐베이션하고 최종 24 시간 동안 부가적인 LPS와 함께 수지상 세포로 성숙시켰다. $1x10^4$ 수지상 세포 및 $1x10^5$ 인간 CFSE-표지된 T 세포들을 웰 마다 플레이팅하고, PBS에 희석한 3가지 상이한 농도(40 nM, 13.3 nM 또는 4.4 nM)의 야생형 또는 재조합 변이체 ICOSL ECD-Fc 분자의 존재 하에 4일간 인큐베이션하였다. 동일한 농도의 인간 IgG, PD-L2-Fc 또는 벨라타셉트 (CTLA4-Fc 함유 L104E 및 A29Y 돌연변이)를 대조군으로서 사용하였다. 상등액을 수확하고 IFN-감마 반응을 ELISA로 특징화시켰다.

[0727] [0442] 도 4는 다양한 조건 하에서의 IFN-감마 생산을 도시한다. 야생형 ICOSL 존재 하에 세포에 의해 생산된 IFN-감마의 수준을 수평선으로 나타내었다. 음성 대조군 단백질 PD-L2-Fc의 존재 하에서는 IFN-감마 생산이 억제되지 않은 것으로 관찰되었다. 이와 대조적으로, 시험된 대부분의 ICOSL 변이체들은 MLF에서 IFN-감마 생산을 어느 정도 억제한 것으로 나타났다. 어떤 변이체들은 IFN-감마를 실질적으로 억제한 것으로 나타났는데 심지어 시험된 가장 낮은 농도인 4.4 nM에서 배양체 중에 생산된 IFN-감마가 거의 검출불가하거나 극히 낮았다. 4.4nM의 변이체 ECD ICOSL-Fc의 존재 하에서 MLR 억제 백분율을 표 11에 나타내었다. 이 표에서, 음의 값은 분석에서의 염증 효과를 가리킨다.

[0728]

표 11: MLR 에서 ICOSL 에 대한 공동자극 바이오활성 데이터	
ICOSL 돌연변이(들)	**% MLR 억제 (4.4nM)**
N52H, N57Y, Q100R, C198R	93.6
N52H, N57Y, Q100R, V122A	94.4
N52H, N57Y, Q100R, F172S	100.0
N52Y/N57Y/F138L/L203P	100.0
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	100.0
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	100.0
N52H, N57Y, Q100R	98.2
N52H, Q100R	97.5
N52H, N57Y, Q100R, V110D, C198R, S212G	90.4
N52H, N57Y, Q100P	100.0
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	100.0
N30D, K42E, N52S	-38.8
N52S, F120S, I143V, I224V	-44.2
N52S, E90A	-30.4
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	100.0
N52S, N194D	-22.3
N52H, I143T	-78.0
N52D	0.5

[0729] **E. 증식 평가 및 유세포 분석법에 의한 세포내 사이토카인 마커**

[0730] [0443] 야생형 또는 재조합 변이체 ICOSL ECD-Fc 분자들의 존재 하에 4일간 인큐베이션된, 전술한 바와 같은 MLR 연구로부터의 카르복시플루오레신 숙신이미딜 에스테르 (CFSE) 표지된 T 세포들을, 골지 억제제 (Golgi/Block/Plug) 존재 하에 6 시간 동안 포볼 미리스테이트 아세테이트(PMA)/이오노마이신을 이용하여 재자극함으로써 사이토카인 수준에 대해 추가 시험하였다. 인간 IgG, 항-CD28, 항-ICOSL, PD-L2-Fc, 또는 벨라타셉트 (L104E 및 A29Y 돌연변이 함유 CTLA4-Fc)와 함께 인큐베이션된 MLR 연구로부터의 T 세포들 역시도 재자극시켰다. T 세포들을 CD4 또는 CD8 표면 마커에 대해 염색하고, 고정 및 침투시킨 다음 표 12 및 13에 제시된 다양한 사이토카인에 대해 세포내 염색하였다.

[0731] [0444] 특이적인 세포내 사이토카인에 대해 양성인 CD4+ 및 CD8+ T 세포 백분율 (%)을 각각 표 12 및 표 13에 나타내었다. 이에 대한 결과는 몇몇 변이체 ICOSL ECD-Fc 분자들이 하나 이상, 몇몇 경우 다수의 사이토카인을 억제할 수 있음을 보여준다. 총 점수와 평균 점수를 산정하여 이 분석에서 시험된 파라미터에 대해 시험된 개별 분자들의 합계 효과를 평가하였다. 증식에 대해서도 평가하고 CFSE 분석에 의해 결정된 바에 따라 분열되니 세포 백분율도 표 12 및 13에 나타내었다. 제공된 결과는, 어떤 변이체들, 특히 CD8+ 세포로부터의 변이체들이 벨라타셉트에 비해 필적할만하거나 더 우수한 활성을 나타냈음을 보여준다.

표 12. CD4+ T 세포의 증식 및 세포내 사이토카인 수준 평가

		% 사이토카인 +									
변이체 (ECD) 또는 단백질 돌연변이	증식	% IFNg+	%IL4+	% IL21+	% IL22+	%TNF+	%IL2+	%IL10+	% IL17A+	총 점수	평균 점수
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	3.0	9.9	3.0	1.0	1.3	34.9	31.3	0.1	0.2	41.0	4.6
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	2.7	11.1	3.4	1.1	1.4	38.0	35.0	0.0	0.1	63.0	7.0
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	2.9	10.9	3.3	1.1	1.5	37.3	34.1	0.1	0.2	65.0	7.2
N52H, N57Y, Q100R, F172S	3.2	8.1	2.5	0.6	1.1	27.9	24.1	0.9	1.3	66.0	7.3
N52H, N57Y, Q100R	3.3	9.2	3.0	0.8	1.4	31.1	26.3	0.8	1.3	70.0	7.8
N52H, N57Y, Q100R,V110D, C198R, S212G	3.4	10.9	3.3	1.0	1.6	36.5	32.3	0.5	0.9	89.0	9.9
N207Q	3.6	9.5	3.1	0.9	1.5	33.8	29.4	0.8	1.4	92.0	10.2
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	2.8	12.0	3.5	1.1	1.6	40.9	38.5	0.1	0.3	92.0	10.2
CTLA-4-Ig: L104E, A29Y (벨라타셉트)	10.7	10.5	2.7	2.4	2.0	24.5	19.6	0.6	1.4	99.0	11.0
N52Y/N57Y/ F138L/L203P	3.5	12.0	3.8	1.3	1.6	41.3	36.7	0.2	0.4	109.0	12.1
N52H, Q100R	4.4	9.8	3.2	1.2	1.7	32.7	29.3	0.9	1.4	114.0	12.7
N52H/N57Y/Q100P	3.0	13.2	4.1	1.2	1.8	43.2	39.8	0.1	0.2	115.0	12.8
N52H, N57Y, Q100R, C198R	3.6	11.3	3.9	1.0	2.0	39.1	34.6	0.8	1.3	118.0	13.1
WT ICOSL	12.7	16.7	5.8	4.9	4.7	36.2	29.2	0.2	0.4	127.0	14.1
N52H/N57Y/Q100P	3.5	12.3	3.9	1.1	1.8	39.2	37.5	0.4	0.6	127.0	14.1
N52S, N194D	10.9	16.0	7.2	4.9	5.4	40.6	33.0	0.1	0.2	135.0	15.0
N52H, N57Y, Q100R, V110D, N144D, F172S, C198R	10.6	16.7	6.0	4.3	5.0	41.3	37.3	0.2	0.3	146.0	16.2
mIgG ctl	15.5	15.6	5.9	5.2	4.6	31.7	26.0	0.4	1.7	146.0	16.2
PDL2	12.3	17.9	5.7	4.7	5.2	41.4	36.0	0.3	0.6	163.0	18.1
N52S, E90A	11.9	17.7	6.2	5.2	5.3	42.4	37.5	0.2	0.4	167.0	18.6
WT ICOSL	12.8	17.4	6.3	5.4	5.6	38.9	32.1	0.3	0.6	167.0	18.6
Anti-ICOSL	15.5	16.3	6.5	5.2	5.5	35.1	29.1	0.7	2.0	168.0	18.7
N52H/I143T	12.6	17.4	6.5	5.4	4.9	44.3	37.2	0.4	0.5	179.0	19.9
HuIgG	12.7	17.1	6.3	5.9	4.9	41.1	32.4	0.7	1.3	181.0	20.1
Anti-CD28	88.2	42.9	5.0	5.8	5.4	43.5	25.5	0.4	1.4	183.0	20.3
N52S, F120S, I143V, I224V	12.7	18.7	6.5	5.4	5.6	44.2	40.0	0.1	0.3	186.0	20.7
N52D	13.7	18.3	6.8	5.9	6.1	42.1	35.2	0.3	0.5	194.0	21.6

[0732]

표 13. CD8+ T 세포의 증식 및 세포내 사이토카인 수준 평가

		% 사이토카인 +									
변이체 (ECD) 또는 단백질 돌연변이	증식	% IFNg+	%IL4+	% IL21+	% IL22+	%TNF+	%IL2+	%IL10+	% IL17A+	총 점수	평균 점수
V11E, N30D, N52H, N57Y, H94E, L96I, L98F, N194D, V210A, I218T	4.2	8.4	1.6	2.2	47.2	7.6	8.0	0.2	0.1	67.0	7.4
E16V, N52H, N57Y, Q100R, V110D, H115R, Y152C, K156M, C198R	3.8	8.5	2.0	2.2	47.2	8.1	9.1	0.1	0.0	69.0	7.7
N52H, N57Y, V110A, C198R, R221I	3.9	8.8	2.0	1.7	45.6	8.4	9.0	0.1	0.1	64.0	7.1
N52H, N57Y, Q100R, F172S	3.8	7.0	1.4	1.8	46.6	5.9	5.9	1.1	1.1	78.0	8.7
N52H, N57Y, Q100R	4.3	8.4	1.9	1.7	50.2	7.1	6.6	1.1	1.1	98.0	10.9
N52H, N57Y, Q100R,V110D, C198R, S212G	4.1	9.0	1.8	1.8	46.4	8.2	8.5	0.7	0.8	87.0	9.7
N207Q	4.1	7.9	1.8	1.8	49.8	7.3	7.2	1.0	1.2	93.0	10.3
N52H, N57Y, Q100R, L102R, V110D, H115R, C198R	3.5	9.0	1.7	2.0	47.3	8.6	10.4	0.2	0.2	78.0	8.7
CTLA-4-Ig: L104E, A29Y (벨라타셉트)	12.3	14.5	2.0	3.2	38.1	11.2	8.8	0.9	1.6	121.0	13.4
N52Y/N57Y/ F138L/L203P	4.2	9.6	1.9	1.8	40.4	9.4	9.9	0.3	0.3	81.0	9.0
N52H, Q100R	5.4	9.5	2.0	2.7	44.2	7.8	8.4	1.2	1.3	112.0	12.4
N52H/N57Y/Q100P	3.7	9.5	1.9	1.3	44.4	9.4	10.5	0.1	0.1	62.0	6.9
N52H, N57Y, Q100R, C198R	4.1	9.6	2.3	1.8	46.8	9.0	9.3	0.9	1.0	122.0	13.6
ICOSL	17.2	22.3	4.9	6.4	46.4	22.0	15.7	0.4	0.7	181.0	20.1
N52H/N57Y/Q100P	4.2	9.5	2.0	2.1	45.6	8.9	10.7	0.5	0.5	110.0	12.2
N52S, N194D	14.5	19.4	5.6	4.8	48.4	19.2	13.8	0.1	0.2	142.0	15.8
N52H, N57Y, Q100R, V110D, N144D, F172S, C198R	13.4	18.9	4.3	5.0	46.3	18.4	15.4	0.3	0.6	138.0	15.3
mIgG ctl	20.2	25.0	4.4	4.1	35.5	24.6	15.8	0.7	1.8	174.0	19.3
PDL2	15.6	21.2	4.1	4.8	44.1	20.7	15.6	0.5	0.8	147.0	16.3
N52S, E90A	15.4	20.8	4.7	5.6	44.9	20.6	17.1	0.2	0.5	149.0	16.6
WT ICOSL	17.5	22.1	5.5	4.6	45.0	21.0	12.8	0.2	0.4	148.0	16.4
Anti-ICOSL	21.5	26.4	4.8	5.3	33.4	26.9	19.0	1.0	2.3	198.0	22.0
N52H/I143T	17.2	22.2	4.7	6.7	39.4	22.5	18.1	0.8	0.9	178.0	19.8
HuIgG	15.9	21.5	4.4	6.4	41.6	21.4	15.1	1.4	1.7	179.0	19.9
Anti-CD28	60.6	44.3	3.5	2.1	38.6	32.5	16.0	1.2	1.6	182.0	20.2
N52S, F120S, I143V, I224V	16.5	22.0	4.9	5.4	44.0	21.9	18.5	0.2	0.6	161.0	17.9
N52D	17.7	22.8	5.3	6.1	45.4	22.9	16.7	0.4	0.6	183.0	20.3

[0733]

[0734] **실시예 6**

[0735] **B-T 세포 공동 배양시 사이토카인 생산 평가**

[0736] [0445] B 세포 및 CD4+ T 세포들을 동일한 공여자로부터 정제하여 CSFE로 표지하고 각 웰에 대해 5 x 10^4 세포로 1:1 세포 비율로 96웰 플레이트에 플레이팅하였다. 변이체 ICOSL ECD-Fc 융합 분자 또는 벨라타셉트를 웰 당 40 nM의 최종 농도로 첨가하였다. 세포들은 자극되지 않거나 또는 100 ng/ml의 스타필로코커스 내독소 B (SEB), 1 μg/ml의 Pokeweed Mitogen (PWM) 또는 양자 모두와 200 μl/웰의 최종 부피로 37℃에서 인큐베이션되었다.

[0737] [0446] 세포들을 수확하고 다음의 B 및 T 세포 계통 마커(IgM, IgD, CD38, CD138, CD27, CD19, CD4, CD3)로 표면 염색하였다. 유세포 분석에 의해 증식을 평가하고 LEGENDplex 인간 Th 사이토카인 검출 키트 (Biolegend, USA)를 이용하여 배양 상등액을 IL-5, IL-13 또는 IL-21 사이토카인에 대해 분석하였다.

[0738] [0447] 도 5A에 도시된 바와 같이, 분열하는 B 세포의 수는 무단백질 대조군에 비해 변이체 ICOSL ECD Fc-융합체 분자 존재 하에 인큐베이션된 경우 B/T 세포 공동-배양체에서 감소하였다. 시험된 예시적인 변이체들에 대한 길항 효과 정도는 CTLA-4-Ig 벨라타셉트 (L104E, A29Y)와 유사하였다. 마찬가지로, 도 5B-5D에 도시된 바와 같이, 변이체 ICOSL ECD Fc-융합체 분자는 야생형 ICOSL 대조군을 함유하는 배양체 뿐만 아니라 무단백질 대조군에 비해 시험관내 일차 인간 B 세포/T 세포 공동배양시 사이토카인 생산을 억제하였다. 벨라타셉트에 비해, 시험된 예시적인 변이체 ICOSL ECD Fc-융합체 분자들은 어떤 경우 사이토카인 생산을 차단하는데 있어 더 효과적

이었다.

[0739] **실시예 7**

[0740] **이식편-대-숙주 질환(GvHD) 모델에 있어서 생존 및 질병 활성 평가**

[0741] [0448] 이식편-대-숙주-질환 (GvHD) 모델에 있어서 예시적인 ICOSL 변이체 ECD-Fc 단백질을 활성에 대해 평가하였다. 암컷 NSG 마우스 (그룹 당 n = 10 마리)를 조사하고 (100 rad)-1일에 10 mg의 감마 글로불린을 피하 투여하였다. 제0일에, 마우스에게 천만개의 인간 말초혈액 단핵 세포(PBMCs) 및 100㎍의 WT-ICOSL ECD Fc, 변이체 ICOSL ECD Fc 분자 N52H/I143T (SEQ ID NO: 61에 제시된 ECD), 변이체 ICOSL ECD Fc 분자 N52H/N57Y/Q100P (SEQ ID NO: 62에 제시된 ECD), 75㎍의 벨라타셉트 (CTLA-4-Ig L104E/A29Y; 미국특허출원공개 번호 US20160271218) 또는 대조군으로서 식염수를 복강 주사하였다. 제15일에, 내이식된(engrafted) 인간 CD45+ 세포들을 유세포분석에 의해 표현형 분류하였다. 제35일에 연구 종결 후, 생존 종결점 측정, 체중 손실 및 질병 활성을 평가하였다.

[0742] [0449] 도 6A는 식염수, WT ICOSL-ECD Fc, 변이체 ICOSL ECD-Fc 분자, 또는 벨라타셉트로 처리된 GVHD 마우스들의 생존을 도시한다. 식염수 또는 WT ICSOL ECD-Fc가 투여된 마우스에 비해 변이체 ICOSL ECD- Fc N52H/N57Y/Q100P (SEQ ID NO: 62에 제시된 ECD)가 투여된 마우스들에 있어서 생존과 관련하여 유의차가 관찰되었다 (p <0.0001, Mantel-Cox 및 Gehan-Breslow-Wilcoxon 검정에 의함). 도 6B는 연구 경과에 걸쳐, 식염수, WT ICOSL ECD- Fc, 변이체 ICOSL ECD- Fc 분자, 또는 벨라타셉트로 처리된 마우스들의 체중 손실 간에 마찬가지로 차이가 있음을 보여준다.

[0743] [0450] 연구기간 중 질병 활성 지수 (DAI)를 주 3회 구하고 마우스의 체중 손실, 자세(posture), 활성, 모질(hair coat) 외관 및 피부에 대해 점수를 매겨 평가하였다. 연구 경과 중 질병 등급을 도 6C에 나타내었다. ICOSL Fc 변이체 N52H/N57Y/Q100P (SEQ ID NO: 62에 제시된 ECD) 또는 벨라타셉트가 투여된 처리 그룹은 현저히 향상된 DAI 점수를 나타내었다. 연구 제14일 말초혈액 중 인간 T 세포의 백분율도 유세포 분석법으로 평가하였다. 측정치를 처리군에 의해 평균 내고 오차 막대는 평균의 표준오차(SEM)를 나타낸다. 도 6D는 혈액 중 살아있는 CD3+/CD4+ 또는 CD3+/CD8+ 세포를 나타낸다. N52H/N57Y/Q100P (SEQ ID NO: 62에 제시된 ECD)를 갖는 변이체 ICOSL ECD Fc 또는 벨라타셉트가 투여된 처리 그룹들은 식염수 대조군에 비해 CD4+ T 세포 수준에 있어 현저한 차이를 나타냈다 (비평형 t-검정법에 의할 경우 각각 p = 0.008 및 0.006). 이 연구는 생체내 모델링 동안 GVHD 및 인간 일차 T 세포에 대한 변이체 ICOSL Fc 변이체 단백질의 치료 효과를 입증하는 것이다.

[0744] [0451] 변이체 ICOSL ECD-Fc N52H/N57Y/Q100R/C198R (SEQ ID NO: 63에 제시된 ECD), N52H/N57Y/Q100R/F172S를 포함하는 추가 변이체 ICOSL ECD-Fc 융합 분자에 대한 유사한 연구가 수행되었다. (SEQ ID NO: 64에 제시된 ECD) 및 N52H/N57Y/Q100P (SEQ ID NO: 65에 제시된 ECD). 상기에 나타낸 바와 같이 시험 관내 MLR 연구에서 활성이 감소된 N52H/Q100R (SEQ ID NO: 66에 제시된 ECD)도 시험 하였다. NSG 마우스 (n = 9/그룹)를 상기 한 바와 같이 처리 하였다. 이 연구에서, ICOSL-Fc 또는 벨라타셉트를 사용한 투약은 0일부터 37일까지 주 3회 지속되었고 생존 마우스는 49 일에 종료시켰다. 그룹 간 생존 비율의 통계적 차이를 결정하기 위해, 데이터는 Mantel-Cox(로그 순위) 테스트를 사용하여 분석하였다. 결과적인 생존 곡선이 도 6E에 도시되어있다. 벨라타셉트 및 ICOSL-Fc 변이체 N52H/N57Y/Q100R/C198R(SEQ ID NO: 63에 제시된 ECD), N52H/N57Y/Q100R/F172S (SEQ ID NO: 64에 제시된 ECD), 및 N52H/N57Y/Q100P (SEQ ID NO: 65에 제시된 ECD)는 식염수 및 WT ICOSL-Fc와 비교하여 생존을 상당히 연장시켰다 (p <0.001). 평균 DAI 점수를 실험의 시간 경과에 대해 플롯팅하였으며, 최종 계획된 연구일 (49일) 이전에 종결된 그룹에 대한 마지막 관찰 (즉, 종결일에 수집된 평균 점수) 결과를 그래프에 나타내었다. 경시적인 데이터 (즉, DAI 점수)에 대한 그룹 간의 유의미한 차이는 '치료' 효과에 대한 2-way 반복 측정 분석을 사용하여 결정되었다. 결과적인 DAI 점수를 도 6F에 나타내었다. 벨라타셉트 및 ICOSL-Fc 변이체s N52H/N57Y/Q100R/C198R (SEQ ID NO: 63에 제시된 ECD), N52H/N57Y/Q100R/F172S (SEQ ID NO: 64에 제시된 ECD), 및 N52H/N57Y/Q100P (SEQ ID NO: 65에 제시된 ECD)는 식염수 및 WT ICOSL-Fc (p <0.001)와 비교하여 DAI 점수를 유의하게 감소시켰고 (p<0.001), 벨라타셉트와 N52H/N57Y/Q100R/C198R를 갖는 ICOSL-Fc 변이체 간의 이원분산분석(2-way ANOVA)에 의해 DIA 점수 (p = 0.035).

[0745] [0452] 일부 경우에서, 변이체 ICOSL-Fc의 활성은 벨라타셉트 처리에 비해 개선되었다. ICOSL-Fc 변이체의 투여는 벨라타셉트에 필적하거나 그보다 더 나은 수준에서, 향상된 생존 및 약화된 질병 발생에 의해 입증되는 바와 같이 GVHD의 영향으로부터 보호하였다. WT ICOSL-Fc 및 돌연변이 N52H/Q100R (SEQ ID NO: 66에 제시된 ECD)을 갖는 변이체 ICOSL-Fc는 이 모델에서만큼 효과적이지 않았으므로, 이 모델에서의 활성은 시험관내 활성과 상관관계가 있었다.

[0746] **실시예 8**

[0747] **생체내(*in vivo*) 지연형 과민반응의 평가**

[0748] [0453] 마우스 지연형 과민성(DTH) 모델에서 변이체 ICOSL ECD-Fc 융합 분자를 생체내 항-염증 활성에 대해 평가하였다. 오브알부민(OVA)-감작 마우스에서 지연형 과민성 면역 반응을 유도하고 챌린지 후의 반응을 평가하였다. 시험된 변이체 ICOSL ECD-Fc 융합 분자들은 다음의 아미노산 치환을 갖는 변이체 ECD를 함유하였다: N52H/N57Y/Q100P (SEQ ID NO: 62에 제시된 ECD), N52H/Q100R (SEQ ID NO: 66에 제시된 ECD), 또는 N52H/N57Y/Q100R/F172S (SEQ ID NO: 64에 제시된 ECD). 변이체들을 EU 넘버링에 의할 경우 돌연변이 C220S/L234A/L235E/G237A를 함유하는 Fc 백본 (Fc 중 어느 하나의 구체예에 있어서1) SEQ ID NO:40에 제시됨) 또는, EU 넘버링에 의할 경우 돌연변이 C220S/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K를 함유하는 Fc 백본 (Fc 중 어느 하나의 구체예에 있어서2) SEQ ID NO:44에 제시됨) (이들은 G4S (GGGGS; SEQ ID NO: 52) 링커를 갖거나 갖지 않음)에 융합시켰다. 표 14에 시험된 작제물들을 나타내었다:

[0749]

표 14: ICOSL ECD-Fc 융합 작제물

	G4S 링커	Fc (SEQ ID NO)
N52H/N57Y/Q100P (G4S)-Fc #1	+	40
N52H/Q100R (G4S)-Fc #1	+	40
N52H/N57Y/Q100R/F172S (G4S)-Fc	+	44
N52H/N57Y/Q100R/F172S (G4S)-Fc	+	40
N52H/N57Y/Q100R/F172S-Fc	-	40

[0750] [0454] 감작을 위해, 제0일에 8주령의 암컷 BALB/c 마우스들의 꼬리 기부에 Sigma Adjuvant (100 μL; 카탈로그 번호 S6322-1VL) 내에 유화된 OVA 100 μg을 피하주사하였다. 제1일과 제4일에, 마우스들에게 변이체 ICOSL ECD-Fc 융합 단백질, 75 μg의 CTLA-4 Fc (아바타셉트), 또는 음성 대조군으로서 PBS를 복강 주사하였다. 제7일에 OVA 챌린지 수행 2 내지 3시간 전에, 마우스들에게 대조군으로서 PBS, 75 μg의 CTLA-4 Fc (Orencia사의 아바타셉트), 또는 표시된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 복강 주사하였다. 아바타셉트 및 변이체 ICOSL-Fc 융합 분자들은 동 몰량으로 투여하였다.

[0751] [0455] OVA 챌린지를 위해, 왼쪽 귀의 귓바퀴에 10 μg OVA를 10 μL 부피의 PBS 중에 첨가하여 피내 주사로서 전달하고 치료적 처치 2-3 시간 후에 이소플루란 가스 마취시켰다. 귀의 기부 두께를 OVA 챌린지에 앞서 측정해 두었다.

[0752] [0456] 제8일에, 미투토요(Mitutoyo) 캘리퍼를 이용하여 이소플루란 마취 하에 귀 두께를 측정하고 OVA 챌린지 전후의 귀 두께 변화를 구하였다. 도 7에 도시된 바와 같이, 표시된 변이체 ICOSL ECD-Fc 융합 분자들로 처리된 마우스들은 PBS 대조군에 비해 훨씬 낮은 OVA-유도 귀 부종을 나타내었다 (< 0.0001 일원분산분석(1-way ANOVA)에 의함). 아바타셉트로 처리된 마우스들과 시험된 표시된 변이체 ICOSL ECD-Fc 융합 분자 또는 변이체 ICOSL 처리군들 간에는 귀 두께 사이에 유의차가 없었다. 이러한 결과는 변이체 ICOSL 분자가 생체내 변역반응을 감소시킬 수 있음을 입증한다.

[0753] **실시예 9**

[0754] **일차 인간 T 세포들의 나노스트링 전사 시그니처**

[0755] [0457] 조직 배양 플레이트를 40 nM의 Fc-대조군 단백질, 야생형 ICOSL-Fc, 야생형 CD80-Fc, 이들 두 가지 모두의 단백질, 또는 표시된 돌연변이를 갖는 변이체 ICOSL Fc-융합 단백질과 함께 10 nM 항-CD3으로 코팅하였다. 이어서 정제된 인간 T 세포를 상기 단백질 코팅된 플레이트 상에 플레이팅하고 37℃에서 인큐베이션하였다. 전술한 각 처리군으로부터의 배양체들을 제24, 48 및 72시간에 수확하고 각 세포 샘플로부터 총 RNA를 준비하였다. RNA를 Nanostring에 전달하고 Cancer Immune 칩을 이용하여 각 샘플 내 유전자 전사체를 정량하였다. 다양한 시점에서 처리군들 간의 전사 수준을 비교하는 것을 가능케 해주는 Nanostring의 독자적인 소프트웨어를 이용하여 전사 값들을 정규화하였다. 도 8 및 도 9에 도시된 바와 같이, 시험된 변이체 ICOSL ECD-Fc 폴리펩타이드들은 야생형 CD80 ECD-Fc, 야생형 ICOSL ECD-Fc, 또는 이들 두 가지의 조합에 비해 변경된 염증 활성을 나타낸다.

[0756] **실시예 10**

[0757] **Fc-융합 면역조절 단백질의 생성 및 평가**

[0758] [0458] 다양한 링커와 Fc 분자를 사용한 것을 제외하고, 실제로 실시예 4에 설명된 바와 같이, 변이체 ICOSL IgSF (예컨대 ECD) 도메인-함유 분자를 Fc-융합 단백질로서 포맷하였다. 적어도 하나의 친화성-변형된 도메인을 갖는 ICOSL의 ECD를 함유하는 Fc 융합 단백질(예컨대 변이체 ICOSL ECD-Fc)인 면역조절 단백질을 생성하기 위해, 다음과 같이 설계된 단백질을 인코딩하는 인코딩 핵산 분자를 생성하였다: 변이체(돌연변이체) 불활성 인간 IgG1 Fc에 직접 또는 링커를 통해 간접적으로 연결된 ECD. 구체적으로, 생성된 면역조절 단백질은 링커를 함유하지 않았거나(없음) 또는 AAA 또는 G4S(SEQ ID NO: 52) 링커를 함유하지 않았다. 불활성 인간 IgG1 Fc는 다음과 같이 EU 넘버링에 의한 돌연변이를 함유하였다: C220S/R292C/N297G/V302C (SEQ ID NO: 43), C220S/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K (SEQ ID NO: 44), C220S/L234A/L235E/G237A (SEQ ID NO: 40) 또는 이의 동종 이형. 생성된 단백질이 시스테인과 공유 결합을 형성할 수 있는 항체 경쇄를 포함하지 않기 때문에 대체 C220S가 포함되었다. 재조합 변이체 Fc 융합 단백질을 293 세포에서 제조하고 실질적으로 실시예 1에 기재된 바와 같이 단백질 A로 정제하였다.

[0759] [0459] 변이체 ICOSL Fc-융합 면역조절 단백질을, 결합 연구에서 동족 결합 파트너에 대한 결합을 평가하기 위해 평가하였다. 동족 결합 파트너, 인간 CD28, ICOS 및 CTLA4로 형질감염된 Expi293 세포를 결합 연구에서 표적 세포로 사용하였다. 각각의 결합 파트너를 발현하는 표적 세포에 대한 변이체 ICOSL Fc 융합 면역조절 단백질의 결합의 MFI를 결정하고, 이를 동일한 표적 세포에 대한 대응하는 비변형(야생형) ICOSL ECD-Fc의 결합과 비교하였다. 변이체 ICOSL Fc-융합 면역조절 단백질에 의한 T 세포 활성의 조절도 실제로 실시예 6에 설명된 바와 같이 혼합 림프구 반응 (MLR)에 의해 측정하였다.

[0760] [0460] 다양한 링커 및 Fc 영역을 함유하는 예시적인 변이체 ICOSL ECD-Fc 융합 면역조절 단백질의 결합 결과를 표 15에 나타내었다. 이 표는 SEQ ID NO:1에 제시된 각각의 레퍼런스 (예컨대, 비변형) ICOSL 세포외 도메인 (ECD) 서열에서의 아미노산 위치에 대응하는 아미노산 위치 넘버에 의해 변이체 ICOSL의 ECD에서의 아미노산 치환을 나타낸다. 컬럼 2는 Fc 융합 단백질에 사용된 링커 및 링커에 대한 SEQ ID NO 식별자를 나타낸다. 칼럼 3은 변이체 ICOSL Fc 융합 단백질에 함유된 Fc에 대한 EU 넘버링에 의한 Fc 내의 돌연변이 및 Fc에 대한 SEQ ID NO 식별자를 나타낸다.

[0761] [0461] 표 15에 나타낸 바와 같이, 시험된 변이체 ICOSL Fc 융합 단백질 중에서 동족 결합 파트너에 대한 결합에 대해 유사한 결과가 관찰되었다. 이들 결과는 상이한 Fc 분자 또는 상이한 링커와의 Fc 융합의 포맷이 그들의 동족 결합 파트너에 대한 ICOSL IgSF 도메인 변이체의 결합에 영향을 미치지 않았다는 것을 나타낸다. 또한, 모든 Fc 융합 포맷은, MLR 반응에서 용액 중에 2가 Fc 분자로서 제공될 경우, 아미노산 치환을 함유하지 않는 레퍼런스 (예컨대 비변형 또는 야생형) ECD-Fc 분자에 비해, T 세포 활성화를 감소시키는 길항 활성을 나타내었다. 일부 경우에서, IFN- 감마 분비를 유도하기 위해 공동자극 리간드 동족 결합 파트너와 그들의 리간드와의 상호작용의 완전한 차단과 일치하는 검출 가능한 IFN- 감마는 상등액에서 측정되지 않았다.

표 15: 변이체 ICOSL ECD-Fc 분자의 분자 서열, 결합 데이터, 및 공동자극 바이오활성 데이터

ICOSL 돌연변이(들)	링커 (SEQ ID NO)	Fc 돌연변이 (SEQ ID NO)	결합			MLR
			CD28	CTLA-4	ICOS	IFN-감마
			MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	pg/mL (ΔWT)
N52H/N57Y/Q100R/F172S	AAA	C220S/R292C/N297G/V302C (43)	67870 (13.0)	213333 (22.7)	120042 (1.5)	3 (0.02)
N52H/N57Y/Q100R/F172S)	AAA	C220S/E233P/L234V/L235A/G236del /S267K (44)	57272 (10.9)	192595 (20.5)	103983 (1.3)	0 (0.00)
N52H/N57Y/Q100R/F172S	AAA	C220S/L234A/L235E/G237A (40)	65506 (12.5)	193704 (20.6)	105432 (1.3)	0 (0.00)
N52H/N57Y/Q100R/F172S	G4S (52)	C220S/E233P/L234V/L235A/G236del /S267K (44)				
N52H/N57Y/Q100R/F172S	G4S (52)	C220S/L234A/L235E/G237A (40)	67596 (12.9)	212875 (22.7)	106576 (1.4)	0 (0.00)
N52H/N57Y/Q100R/F172S	없음	C220S/E233P/L234V/L235A/G236del /S267K (44)	-	-	-	-
N52H/N57Y/Q100R/F172S	없음	C220S/L234A/L235E/G237A (40)	59987 (11.5)	210061 (22.4)	106405 (1.4)	0 (0.00)
N52H/Q100R	AAA	C220S/R292C/N297G/V302C (43)	57419 (11.0)	190012 (20.2)	86522 (1.1)	30 (0.26)
N52H/Q100R	AAA	C220S/E233P/L234V/L235A/G236del /S267K (44)				
N52H/Q100R	AAA	C220S/L234A/L235E/G237A (40)	58772 (11.2)	211494 (22.5)	88969 (1.1)	25 (0.22)
N52H/Q100R	G4S (52)	C220S/E233P/L234V/L235A/G236del /S267K (44)	62331 (11.9)	207285 (22.1)	110512 (1.4)	31 (0.28)
N52H/Q100R	G4S (52)	C220S/L234A/L235E/G237A (40)	70142 (13.4)	187699 (20.0)	125505 (1.6)	49 (0.44)
N52H/Q100R	없음	C220S/E233P/L234V/L235A/G236del /S267K (44)	58726 (11.2)	206110 (21.9)	110721 (1.4)	54 (0.48)
N52H/Q100R	없음	C220S/L234A/L235E/G237A (40)	62746 (12.0)	198281 (21.1)	96948 (1.2)	16 (0.14)
N52H/N57Y/Q100P	AAA	C220S/R292C/N297G/V302C (43)	79792 (15.3)	193633 (20.6)	91384 (1.2)	1 (0.01)
N52H/N57Y/Q100P	AAA	C220S/E233P/L234V/L235A/G236del /S267K (44)	69603 (13.3)	314593 (33.5)	103387 (1.3)	0 (0.00)
N52H/N57Y/Q100P	AAA	C220S/L234A/L235E/G237A (40)	68729 (13.1)	171223 (18.2)	97068 (1.2)	0 (0.00)
N52H/N57Y/Q100P	G4S (52)	C220S/E233P/L234V/L235A/G236del /S267K (44)	67753 (13.0)	188192 (20.0)	93424 (1.2)	1 (0.01)
N52H/N57Y/Q100P	G4S (52)	C220S/L234A/L235E/G237A (40)	69887 (13.4)	160705 (17.1)	104124 (1.3)	0 (0.00)
N52H/N57Y/Q100P	없음	C220S/E233P/L234V/L235A/G236del /S267K (44)	68979 (13.2)	184726 (19.7)	98512 (1.3)	0 (0.00)
N52H/N57Y/Q100P	없음	C220S/L234A/L235E/G237A (40)	67863 (13.0)	154563 (16.5)	97714 (1.2)	0 (0.00)
WT	AAA	C220S/R292C/N297G/V302C (43)	5232 (1.0)	9394 (1.0)	78795 (1.0)	113 (1.00)

[0762]

[0763] **실시예 11**

[0764] **CHO 세포에서 변이체 ICOSL 분자의 발현**

[0765] [0462] 실시예 2에 기재된 Expi293 세포에서 변이체 ICOSL Fc 융합 단백질을 발현시키는 것에 대한 대안으로서, 현탁 차이니즈 햄스터 난소 세포(ExpiCHO-S) 세포를 사용하여 다양한 ICOSL 분자를 제조하였다. SEQ ID NO: 40에 제시된, EU 넘버링에 의한 돌연변이 C220S/L234A/L235E/G237A를 함유하거나 또는 GSGGGGS 링커 (SEQ ID NO: 58)와 함께 SEQ ID NO: 42에 제시된 그의 동종이형(allotype)을 함유하는 불활성 Fc에 연결된 변이체(돌연변이) ECD N52H/N57Y/Q100R/F172S (SEQ ID NO:64)를 함유하는 예시적인 변이체 ICOSL IgSF (예컨대 ECD) Fc-융합 단백질을 인코딩하는 DNA 작제물을 이용하여 세포를 형질감염시켰다.

[0766] [0463] ExpiCHO-S 세포, 및 ExpiCHO™ Expression System을 이용한 형질감염을 위한 시약들을 ThermoFisher Scientific (Cat #A29133)로부터 구입하였다. 세포들을 해동하고 제조사의 권장 프로토콜에 따라 팽창시켰다. 적어도 2 계대 후에, 세포들을 형질감염 24 시간 전에 분할시켜 고밀도로 팽창시켰다. 이어서 세포들을 형질감염을 위한 세포 수로 희석하였다. DNA 복합체를 ExpiFectamine™ CHO 시약을 이용하여 형성시켜 이를 세포에 첨가하였다. DNA 복합체 첨가 1일 후 ExpiCHO™ 피드(feed) 및 ExpiFectamine™ CHO Enhancer를 배양물에 첨가한 다음, 32℃ 인큐베이터에 넣었다. 세포 생존능과 세포 질량을 모니터링하고 생존능이 80% 미만으로 하락하면 배양체를 수확하였다. 이어서 배양체를 저속으로 원심분리하여 세포 펠렛을 제거하고, 맑은 상등액을 0.2 μm 멸균 여과하였다. 단백질을 실시예 1에 설명된 바와 같이 정제하였다.

[0767] A. 단백질 분석

[0768] [0464] 정제된 변이체 ICOSL Fc 융합 단백질을 SDS-PAGE를 이용하여 단백질 염색으로 분석하였다. 293 세포가 아닌 CHO 세포로부터 생성된 세포에서 다중 밴드가 관찰되었는데, 이는 CHO 세포에서 발현될 때 ICOSL의 단백질

분해 클리핑이 발생한다는 관찰과 일치한다. 표 16A는 SDS-PAGE에 의해 관찰된 아미노산 서열 및 잠재적 탄수화물에 기초하여 계산된 온전한, 단일-클리핑된 및 이중-클리핑된 단백질의 분자량을 나타낸다. 저분자량 (단일 및 이중 클리핑)을 갖는 환원/비환원 클리핑된 종 양자 모두의 존재가 가리키는 바와 같이, ExpiCHO-S 유래 세포에서 발현된 ICOSL Fc- 융합 단백질의 단백질 분해가 관찰되었다. 관찰된 밴드의 크기 및 질량 스펙트럼 분석에 기초할 때, 이들 결과는 서열 LQQN/LT ("/"는 잠재적 절단 부위를 나타냄)에 상응하는 ICOSL ECD의 잠재적 절단 부위와 일치하며, 이에 따라, Fc 융합 단백질의 한 사슬 또는 두 사슬 모두의 서열에서 Fc 영역의 제거 및 ECD의 스토킹 영역 이전의 절단이 결과된다. 관찰된 프로테아제 절단은 CHO 세포에서 생산될 때 이종 단백질 생성물을 초래할 수 있다. 또한, 막관통 면역조절 단백질로서 발현된 포맷의 경우, 특정 세포에서 발생하는 프로테아제 절단은 세포로부터 가용성 단백질의 방출을 초래하여 조작된 세포에서 변이체 단백질의 세포 표면-발현 형태를 감소시킬 수 있다.

표 16: 단백질분해를 분석하기 위해 **SDS-PAGE**를 이용한 단백질 **A** 컬럼 크로마토그래피로부터의 포획 및 용리 후 탐지된 환원/비-환원 종들

	계산된 MW		관찰된 (겉보기) MW[1]	
	비환원	환원	비환원	환원
무손상(Intact)	105.6 kD aa ~29 kD carb 135 kD total	52.8 kD aa ~14.5 kD carb 67.3 kD total	150 kD	80 kD
단일 클립	78.8 kD aa ~16.5 kD carb 95.3 kD total	52.8 kD aa ~14.5 kD carb 67.3 kD total 26 kD aa ~2 kd carb 28 kD total	100 kD	80 kD 37 kD
이중 클립	52.1 kD aa ~4 kD carb 56.1 kdD 총	26 kD aa ~2 kd carb 28 kD total	65 Kd	37 kD

[1] 단백질 MW 마커에 상대적인 SDS-PAGE로부터의 평가된 MW

[0769]

[0770] **실시예 12**

[0771] **ICOSL IgSF 도메인-함유 분자의 단백질분해-내성 변이체의 생성**

[0772] [0465] CHO 세포에서와 같은 세포에서 발현시 변이체 ICOSL 폴리펩타이드가 단백질 분해에 내성을 갖도록 하기 위해, 다양한 추가 형태의 변이체 ICOSL 폴리펩타이드를 생성하였다. ICOSL ECD의 다음의 부가적인 변형된 레퍼런스 서열들이 생성되었다: (1) LQQN/LT 프로테아제 절단 부위의 전부 또는 일부가 결여된 다양한 ECD 절단체 (ECD truncations: Trunc #4, #5, #6, #7, 또는 #8라 칭함); (2) SEQ ID NO: 1에 제시된 위치들을 참조로 절단 부위 N207 및/또는 L208에서 돌연변이를 포함하는 ICOSL 변이체 레퍼런스 서열; 또는 분자의 유일한 IgSF 도메인으로서 IgV 도메인을 함유하는 ICOSL 단독 IgV 레퍼런스 서열(SEQ ID NO: 3에 제시됨, SEQ ID NO: 1의 아미노산 1-122에 대응). 일부 경우에서, 전술한 전략의 조합이 ICOSL ECD 레퍼런스 서열에 사용되었다. 하기 표 17는 생성된 다양한 레퍼런스 서열들을 수록한다.

[0773] [0466] SEQ ID NO: 1에 제시된 넘버링을 참조로, 예시적인 돌연변이들 N52H/N57Y/Q100R/F172S를, 다양한 레퍼런스 서열들에 도입하였다. SEQ ID NO: 3에 제시된 레퍼런스 ICOSL IgV는 F172S에 대응하는 위치를 함유하지 않으므로, 변이체 ICOSL IgV는 돌연변이 F172S를 함유하지 않았다. 생성된 변이체 ICOSL 폴리펩타이드들이, SEQ ID NO: 39에 제시된, EU 넘버링에 따른 돌연변이 C220S/L234A/L235E/G237A/K447del 또는 SEQ ID NO: 42에 제시된 그의 동종이형을 함유하는 불활성 Fc에, (G4S)2 링커 (SEQ ID NO: 53)를 통해 연결된 상기 레퍼런스 ICOSL IgSF 도메인을 함유하는 Fc 융합 단백질로서 포맷되었다.

표 17: 예시적인 ICOSL IgSF-함유 도메인 레퍼런스 서열	
레퍼런스 ICOSL 서열 (SEQ ID NO)	…--------- **ECD** ----------|-------- *Stalk* ----------
전체 ECD (1)	**...VNIGCCIENVLLQQNLT***VGSQTGNDIGERDKITENPVSTGEKNAAT*
절단체 #2 (5)	**...VNIGCCIENVLLQQNL**
절단체 #3 (6)	**...VNIGCCIENVLLQQNLT***VGSQ*
절단체 #4 (7)	**...VNIGCCIENVLLQQN**
절단체 #5 (8)	**...VNIGCCIENVLLQQ**
절단체 #6 (9)	**...VNIGCCIENVLL**
절단체 #7 (10)	**...VNIGCCIEN**
N207G/L208G 를 갖는 절단체 #8 (28)	**...VNIGCCIENVLLQQGGT**
N207A 를 갖는 ECD (29)	**...VNIGCCIENVLLQQALTV***GSQTGNDIGERDKITENPVSTGEKNAAT*
N207G/L208G 를 갖는 ECD (33)	**...VNIGCCIENVLLQQGGTV***GSQTGNDIGERDKITENPVSTGEKNAAT*
IgV (3)	**...HVAANFSV**

[0774]

[0775] **A. 단백질분해 평가**

[0776] [0467] 상기 기재된 변이체 ICOSL Fc-융합 분자를 인코딩하는 DNA 작제물을 차이니즈 햄스터 난소 세포(ExpiCHO-S)로 형질감염시켰다. 이어서, ICOSL Fc- 융합 단백질을 실시예 2에 기재된 바와 같이 친화성 크로마토그래피에 의해 단백질 A를 이용하여 상등액으로부터 정제하였다. 정제된 단백질을 분석 SEC에 의해 분석 하였다.

[0777] [0468] SEC에 의해, 온전한 단백질은 단일 피크로 표시되고, 클리핑된 단백질은 저분자량 종을 포함하여 다수의 피크로 표시된다. 실시예 11에 기술된 SDS-PAGE 결과와 일치되게, 도 10A에 나타난 다수의 피크가 가리키는 바와 같이, 변이체 ICOSL ECD Fc-융합 단백질이 ExpiCHO-S 유래 세포에서 발현될 때, SEC에 의해 평가된 단백질 분해가 관찰되었다. 도 10B-10G에 도시된 바와 같이, 추정 ECD 프로테아제 절단 부위가 제거되거나 돌연변이된, 변형된 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드를 사용하여 생성된 변이체 ICOSL Fc 융합 단백질의 SEC 분석에 의해 단일 피크가 관찰되었는데, 이는 단백질의 절단이 감소되었음을 나타낸다. 그러나, 하나의 정제 로트에서, SEQ ID NO: 9 (Trunc. #5)에 제시된 레퍼런스 ICOSL 폴리펩타이드를 이용하여 생성된 변이체 ICOSL Fc 융합 단백질의 SEC 분석에 의해 저 분자량 종이 관찰되었는데, 이 로트에서 이들 종의 존재 이유는 명확하지 않았다. 도 10G에 도시된 바와 같이, 저 분자량 종의 생성 및 그에 따른 단백질분해 역시도 ICOSL IgV 단독 레퍼런스 서열을 사용하여 생성된 변이체 ICOSL Fc-융합 단백질의 SEC 분석에 의해 관찰되지 않았다.

[0778] **B. 결합 및 활성**

[0779] [0469] 상기 기재된 다양한 레퍼런스 서열에서 변이체 ICOSL Fc- 융합 면역조절 단백질을 인코딩하는 DNA 작제물의 형질감염 후 CHO 세포에서 생성 및 정제된 단백질의 결합 및 활성을 비교하였다. 일부 경우에, 하기 평가된 정제된 클론은 후에 상기 기재된 것 말고도 추가 돌연변이를 함유하는 것으로 밝혀졌는데, 이들은 시험된 단백질의 면역조절 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 여겨졌다.

[0780] [0470] 생성된 정제된 변이체 ICOSL Fc- 융합 면역조절 단백질을 실질적으로 상기 기재된 바와 같이 동족 결합 파트너에 대한 결합 및 혼합 림프구 반응 (MLR)을 이용한 T 세포 활성의 조정에 대해 평가하였다. 표 18은 SEQ ID NO: 32에 제시된 각각의 레퍼런스(예컨대, 비변형) ICOSL 세포외 도메인(ECD) 서열의 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치 번호로 지정된 ICOSL 레퍼런스 서열의 아미노산 치환을 나타내며 각 ICOSL 레퍼런스 서열에 대한 SEQ ID NO 식별자를 나타낸다. 나타난 바와 같이, 결합 및 MLR 길항제 활성은 모든 시험된 포맷에 있어서 대체로 유사하였다.

표 18: 변이체 ICOSL 분자의 분자 서열, 결합 데이터, 및 공동자극 바이오활성 데이터

설명	레퍼런스 서열 SEQ ID NO	결합			MLR
		CD28	CTLA-4	ICOS	IFN-감마
		MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	pg/mL (ΔWT)
N52H/N57Y/Q100R/F172S 및 F83S 를 갖는 ICOSL ECD 절단체 #7	10	88329 (51.1)	206566 (27.3)	106493 (1.1)	12 (0.02)
N52H/N57Y/Q100R/F172S 를 갖는 ICOSL ECD 절단체 #6	9	91273 (52.8)	239746 (31.6)	90074 (0.9)	14 (0.02)
N52H/N57Y/Q100R/F172S 및 E200G 를 갖는 ICOSL ECD 절단체 #4	7	80555 (46.6)	320229 (42.3)	107957 (1.1)	9 (0.01)
N52H/N57Y/Q100R/F172S 를 갖는 ICOSL ECD 절단체 #4	7	68599 (39.7)	377254 (49.8)	132880 (1.3)	2 (0.00)
N207G/L208G 및 N52H/N57Y/Q100R/F172S 를 갖는 ICOSL ECD 절단체 #8	11	107837 (62.4)	308427 (40.7)	132654 (1.3)	8 (0.01)
N52H/N57Y/Q100R 및 H48R/S54P 를 갖는 ICOSL IgV	3	75304 (43.6)	321613 (42.4)	143141 (1.4)	995 (1.31)
N52H/N57Y/Q100R/F172S 를 갖는 ICOSL ECD	1	110407 (63.9)	323219 (42.6)	136060 (1.4)	0 (0.00)
N52H/N57Y/Q100R/C198R 및 E90K/E111G 를 갖는 ICOSL ECD 절단체 #7	10	38876 (22.5)	83695 (11.0)	54596 (0.5)	761 (1.00)
N52H/N57Y/Q100R/C198R 를 갖는 ICOSL ECD 절단체 #6	9	84566 (49.0)	236011 (31.1)	91357 (0.9)	7 (0.01)
N52H/N57Y/Q100R/C198R 를 갖는 ICOSL ECD 절단체 #5	8	86289 (50.0)	216071 (28.5)	110188 (1.1)	9 (0.01)
N207G/L208G 및 N52H/N57Y/Q100R/C198R 및 Y151H 를 갖는 ICOSL ECD 절단체 #8	11	94156 (54.5)	368471 (48.6)	142900 (1.4)	2 (0.00)
N52H/N57Y/Q100R 를 갖는 ICOSL IgV	3	84594 (49.0)	204840 (27.0)	117707 (1.2)	0 (0.00)
N52H/N57Y/Q100R/C198R 를 갖는 ICOSL ECD	1	59179 (34.3)	132894 (17.5)	138555 (1.4)	0 (0.00)
야생형 ICOSL ECD	1	1727 (1.0)	7579 (1.0)	100466 (1.0)	757 (1.00)

[0781]

[0782] C. 293(Expi293) 또는 CHO 세포에서 발현된 단백질의 결합 및 활성

[0783] [0471] 전술한 ICOSL 레퍼런스 서열에 기초하여 생성된, 변이체 ICOSL Fc 융합 단백질들을 293(Expi293) 또는 CHO 세포에서 발현 후, 결합 및 활성에 대해 평가하였다. 또한, 표 19A에 제시된 바와 같은 예시적인 ICOSL 레퍼런스 서열에서, 예시적인 IgSF 도메인 ICOSL 변이체 N52H/N57Y/Q100R/C198R 또는 N52H/Q100R를 인코딩하는 DNA 작제물도, SEQ ID NO: 40에 제시된 EU 넘버링 기준 돌연변이들 C220S/L234A/L235E/G237A를 함유하는 불활성 Fc에 연결시켜, 상기 DNA 작제물에 의해 293 또는 CHO 세포를 형질감염시킨 후에 제조 및 정제하였다. 또한, 변이체 ICOSL ECD 레퍼런스 서열에서 변이체를 인코딩하지만 Fc 서열과는 융합되지 않은 DNA 작제물로 형질감염시킨 세포에서, 예시적인 변이체 면역조절 단백질을 모노머로서 생성하였다.

[0784] [0472] 얻어진 정제된 변이체 ICOSL Fc- 융합 단백질 또는 변이체 ICOSL 모노머를, 실질적으로 상기 기재된 바와 같이 혼합 림프구 반응(MLR)을 사용한 T 세포 활성 조절 및 동족 결합 파트너에 대한 결합에 대해 평가하였다. 표 19A는 SEQ ID NO: 1에 제시된 각각의 레퍼런스(예컨대, 비변형) ICOSL 세포외 도메인(ECD) 서열의 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 위치 번호로 지정된 ICOSL 레퍼런스 서열의 아미노산 치환을 나타내며 각 레퍼런스 ICOSL 서열에 대한 SEQ ID NO 식별자를 나타낸다. 표 19A에 나타나 있는 바와 같이, 결과는 변이체 ICOSL 면역조절 단백질이 CHO 또는 293 세포에서 생성되었는지 여부와 관계 없이 실질적으로 유사한 결합 및 활성을 나타냄을 보여준다

표 19A: 다양한 세포를 이용하여 생산된 변이체 ICOSL ECD Fc-융합 분자의 분자 서열, 결합 데이터, 및 공동자극 바이오활성 데이터

설명	레퍼런스 서열 SEQ ID NO	CHO 또는 293 물질	결합			MLR
			CD28	CTLA-4	ICOS	IFN-감마
			MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	MFI (ΔWT)	pg/mL (ΔWT)
N52H/N57Y/Q100R/C198R 를 갖는 ICOSL ECD	1	293	13710 (3.9)	8715 (0.7)	16746 (1.4)	20 (0.02)
N52H/N57Y/Q100R/C198R 를 갖는 ICOSL ECD	1	CHO	12876 (3.6)	8750 (0.7)	7700 (0.7)	16 (0.02)
N52H/Q100R 를 갖는 ICOSCL ECD	1	293	11664 (3.3)	13429 (1.1)	10284 (0.9)	168 (0.19)
N52H/N57Y/Q100R/F172S 를 갖는 ICOSCL ECD	1	293	12900 (3.6)	8179 (0.7)	15956 (1.4)	14 (0.02)
N52H/N57Y/Q100R/F172S 를 갖는 ICOSCL ECD	1	CHO	14437 (4.1)	8708 (0.7)	12610 (1.1)	21 (0.02)
N52H/N57Y/Q100R 를 갖는 ICOSCL IgV	3	293	16618 (4.7)	9674 (0.8)	9377 (0.8)	10 (0.01)
N52H/N57Y/Q100R 를 갖는 ICOSCL IgV	3	CHO	17343 (4.9)	9039 (0.7)	8673 (0.7)	14 (0.01)
N52H/N57Y/Q100R/F172S 를 갖는 ICOSL ECD 절단체 #4	7	293	14710 (4.1)	8841 (0.7)	6893 (0.6)	21 (0.02)
N52H/N57Y/Q100R/F172S 를 갖는 ICOSL ECD 절단체 #4	7	CHO	12743 (3.6)	9000 (0.7)	7606 (0.7)	21 (0.02)
N52H/N57Y/Q100R/F172S 를 갖는 ICOSL ECD 절단체 #7	10	293	12017 (3.4)	9674 (0.8)	7599 (0.7)	15 (0.02)
N52H/N57Y/Q100R/F172S 를 갖는 ICOSL ECD 절단체 #7	10	CHO	13043 (3.7)	9039 (0.7)	8077 (0.7)	7 (0.01)
N52H/N57Y/Q100R 를 갖는 ICOSL ECD 모노머 no Fc	1	293	20575 (5.8)	19978 (1.6)	11989 (1.0)	133 (0.15)
N52H/N57Y/Q100R 를 갖는 ICOSL ECD 다이머 no Fc	1	293	18477 (5.2)	22361 (1.8)	12913 (1.1)	119 (0.13)
야생형 ICOSL ECD	1	293	3556 (1.0)	12121 (1.0)	11690 (1.0)	905 (1.00)

[0785]

[0786] **D. 리간드 결합 및 차단**

[0787] [0473] 리간드 결합은 AlexaFluor-647로 표지된 고정된 양의 CD86 또는 ICOSL과 함께 인큐베이션된 CD28 또는 ICOS를 발현하는 CHO 세포와 증가하는 농도(100pM 내지 1,000,000pM)의 야생형 ICOSL-Fc, 변이체 ICOSL IgV-Fc(예를 들어 SEQ ID NO:42에 제시된, 인간 IgG1 Fc에서 돌연변이 L234A, L235E 및 G237A 함유하는, 불활성 Fc에 융합된, SEQ ID NO: 36에 기재된 N52H/N57Y/Q100R를 갖는 변이체 ICOSL IgV 함유) 또는 비교를 위해 CD28 단독 억제제, 아바타셉트, ICOS 경로 억제제, 프레잘루맙(AMG-557; 항-ICOSL, Creative Biolabs) 또는 벨라타셉트의 존재 하에 평가되었다. 결합된 단백질은 항-인간 IgG-PE로 검출되었고 유동 세포측정법에 의해 측정되었는데(도 10H), 이는 CD28 및 ICOS 양자 모두에 있어서 변이체 ICOSL IgV-Fc의 높은 표적 결합을 나타내지만 대조군 단백질은 그렇지 않다. 리간드 결합에 대한 IC50을 표 19B.1에 나타내었다. 변이체 ICOSL IgV-Fc는 유세포 분석에 의해 측정된 바와 같이 표적 수용체 CD28 및 ICOS 양자 모두에 대한 리간드 결합을 차단하고 그래프패드 프리즘으로 결정된 IC50 수준을 차단하는 것으로 확인되었다(도 10I).

[0788] [0474] 공동자극 활성에 대한 영향을 평가하기 위해, 건강한 공여자 및 쇼그렌 증후군(SjS)을 앓는 대상체로부터의 PBMC를, 100 nM의 변이체 ICOSL IgV-Fc 또는 비교를 위해, CD28-단독 억제제, 아바타셉트, ICOS 경로 억제제, 프레잘루맙 (AMG-557; 항-ICOSL, Creative Biolabs), 또는 아바타셉트와 프레잘루맙과의 조합의 존재 하에, 인공 항원 제시 세포(CD80, CD86, ICOS 리간드 및 항-CD3(OKT3)를 발현하는 K562 세포)(인공 APC에 대한 세포의 비율을 20:1로 함)로 자극하였다. Fc 단독을 대조군으로 사용하였다.

[0789] [0475] CD28 공동자극 활성에 대한 효과를 평가하기 위해, IL-2 촉진제(Promega)에서 구동된 IL-2-루시페라제 리포터를 발현하는 Jurkat 이펙터 세포를 항-CD3 OKT3 + 인간 CD86(CD28)을 발현하는 인공 APC(aAPC)와 공동 배양하였다. 공동 자극 봉쇄). ICOS 공동자극 활성에 대한 효과를 평가하기 위해 Jurkat/IL-2 리포터 세포를 인간 ICOS의 세포외 도메인 및 CD28의 세포내 도메인으로 추가 형질도입하고 항-CD3 OKT3 + 인간 ICOSL(ICOS 공동자극 차단)을 발현하는 aAPC와 공동 배양하였다. ICOSL IgV-Fc 변이체의 적정량(100 pM 내지 1,000,000 pM)을

공동 배양물에 첨가하였다. CD28 공동자극 활성에 대한 차단 효과의 비교를 위해 아바타셉트 또는 벨라타셉트를 대조군으로 추가하였다. ICOS 공동자극 활성에 대한 차단 효과 비교를 위해 프레잘루맙을 대조군으로 추가하였다. 공동 자극 활성은 인큐베이션 시작 후 상대 발광 신호를 모니터링하여 평가되었다. 도 10J에 도시된 바와 같이, 변이체 ICOSL IgV-Fc는 CD28 및 ICOS 공동 자극을 모두 차단하였다.

	표 19B.1. 리간드 결합 IC50 (nM).			
	세포 표면에 발현된 표적	CD28		ICOS
	리간드	CD80	CD86	ICOSL
억제제	WT	-	-	17.2
	프레잘루맙	-	-	23.3
	아바타셉트	5.4	12.9	-
	벨라타셉트	2.5	2.8	-
	변이체 ICOSL IgV-Fc	1.0	0.7	4.3

[0790]

[0791] **E. 표적 결합의 비교**

[0792] [0476] 불활성 Fc(인간 IgG1 Fc에 돌연변이 L234A, L235E 및 G237A를 함유함, 예를 들어 SEQ ID NO:42에 제시됨)를 상이한 종에 걸쳐 평가하였다. 인간, 시노몰구스 원숭이, 래트 또는 마우스로부터 전장 표면 리간드 CD28, ICOS 또는 CTLA-4를 발현하도록 생성된 형질감염된 HEK293 세포에 대해 실시예 1에 기재된 바와 같이 결합을 실질적으로 평가하였다. 형질감염은 Transient transfection system(Life Technologies, USA)을 이용하여 수행하였다. 대조군으로서, 모의(형질감염되지 않은) 세포에 대한 결합도 평가하였다. 결과를 표 19B.2에 나타내었다. 나타낸 바와 같이, 예시적인 변이체 ICOSL vIgD-Fc 융합 분자는 높은 친화도로 인간 ICOS 및 CD28 둘 모두에 대한 결합을 나타냈다. 사이노몰구스 원숭이에 대해 유사한 결합이 관찰되었지만 설치류 카운터파트에 대해서는 보다 낮은 친화도가 관찰되었다. CTLA-4 결합과 관련하여, 사이노몰구스 원숭이와 래트는 인간에 필적하는 반면, 마우스는 친화도가 더 낮다. 이와 대조적으로, 야생형 ICOSL-Fc는 ICOS에 대한 검출가능한 결합을 나타내었지만, CD28에 대한 검출가능하거나 정량가능한 결합은 거의 관찰되지 않았다(데이터는 나타내지 않음).

표 19B.2. 종에 걸친 표적 결합의 비교.			
종	CD28 EC_{50} (pM)	ICOS EC_{50} (pM)	CTLA-4 EC_{50} (pM)
인간	648	633	680
사이노몰구스 원숭이	440	579	704
래트	1,064	1,028	793
마우스	1,153	1,428	1,112

[0793]

[0794] **실시예 13**

[0795] **CIA 모델에 있어서의 ICOSL IgV-Fc 융합 분자의 투약 및 생체내(*in vivo*) 효과 평가**

[0796] [0477] 콜라겐 유발 관절염(CIA) 모델에서 변이체 ICOSL IgV-Fc 융합 분자를 예방적 또는 치료적 투여량으로 하여 항염증 활성에 대해 평가하였다. 변이체 ICOSL IgV-Fc 융합 분자를 질병 발병 전 또는 직후에 최대 4회 투여하였다. 시험된 변이체 ICOSL IgV-Fc 융합 분자는 불활성 Fc(예컨대 SEQ ID NO:42에 제시된 돌연변이 L234A, L235E 및 G237A를 함유함)에 융합된, SEQ ID NO: 67에 제시된 바와 같은 N52H/N57Y/Q100P 또는 SEQ ID NO: 36에 제시된 바와 같은 N52H/N57Y/Q100R를 함유하였다.

[0797] [0478] 관절 염증의 유도를 위해,-18 또는-21일에 닭 또는 소의 콜라겐 II/CFA 에멀젼을, 제0일에 닭 또는 소의 콜라겐 II/IFA 에멀젼 ('부스트')을 마우스 꼬리에 주사하였다. 예방적 투여를 위해, 질병 발병 전, 부스트 당일에 시작하여, 변이체 ICOSL IgV-Fc 융합 분자 (N52H/N57Y/Q100P)를 4회 용량으로 투여하였다. 치료/지연 처치

를 위해, 관찰된 발 점수(paw score)가 1보다 클 때 시작하여, 마우스에게 변이체 ICOSL IgV-Fc 융합 분자(N52H/N57Y/Q100R)를 투여하고, 총 4회 용량에 대해 2일마다 한번 투약하였다. 대조군으로서, Fc 단독 분자 및 CTLA-4-Fc (아바타셉트) 분자도 시험하였다. 발적 또는 붓기를 기반으로 발 점수를 정하였다. 또한 항-콜라겐(CII IgG) 항체 및 IL-6 및 TNFα 전염증성 사이토카인을 측정하기 위해 혈청도 수집하였다. 배출 림프절로부터의 세포를 수집하고, CD4, CD8, CD44 또는 T 모낭 헬퍼(TFH) 세포의 마커 (CD25-CD4+ PD-1+ CXCR5+)에 대해 염색하였다. 도 11A-11D는 예방적 투여에 대한 결과를 보여준다. 예방적 투여 치료에서 변이체 ICOSL IgV-Fc 융합 분자로 처리된 마우스들은 더 낮은 평균 합계 발 점수가 더 낮은 것(도 11A), 그리고 탐지된 CII IgG가 감소된 것(도 11B)으로부터 알 수 있는 바와 같이 질병을 억제하였다. ICOSL IgV-Fc vs. 아바타셉트의 경우 * $p<0.05$, ICOSL IgV-Fc vs. PBS의 경우 ** $p<0.001$ (반복-측정 이원분산분석(2-way ANOVA)). Fc 대조군과 비교하여 변이체 ICOSL IgV-Fc 융합 분자로 처리된 마우스에서 더 낮은 수준의 혈청 사이토카인(도 11C) 및 CD44+ 활성화된 T 세포 또는 TFH 세포(도 11D)가 관찰되었다; * $p< 0.05$, ** $p< 0.01$, *** $p< 0.001$, **** $p< 0.0001$ (일원분산분석(1-way ANOVA)에 의함). 배출 림프절에서 B 세포의 분율은 ICOSL IgV-Fc 처리군 대 Fc 대조군 ($p <0.05$)에서 유의하게 감소되었다 (도 11E).

[0798] [0479] 도 12A-12D는 지연된 투약 결과를 보여준다. 변이체 ICOSL-IgV Fc는 아바타셉트 대조군을 포함하는 다른 그룹과 비교하여 최저 평균 합계 발 점수 (도 12A) 및 가장 높은 체중 변화 백분율(도 12B)을 결과시켰다. 도 12C 및 도 12D에 도시된 바와 같이. 변이체 ICOS IgV-Fc로 처리된 마우스에서 치료적 CIA 모델에서 혈청 사이토카인 역시도 억제되었다. 그룹들 간의 통계적 유의성: Student's 언페어드 t-검정에 의해 *$p<0.05$; **$p<0.01$; ***$p<0.001$. 도 12C 및 도 12D에서, 점선 수평선은 각각의 사이토카인에 대한 최저정량한계(LLOQ)를 나타낸다.

[0799] [0480] 이와 함께, 이들 데이터는 CD28 및 ICOS 경로가 염증성 관절염에서 중요한 역할을 한다는 것을 입증한다. 특히, 변이체 ICOSL 듀얼 CD28/ICOS 길항제의 우수한 활성은 두 경로 모두의 차단이 필요하다는 것과 단일 경로 차단에 의해서는 오직 부분적인 이점만이 달성된다는 관찰과 일치한다.

[0800] **실시예 14**

[0801] **EAE 모델에서 ICOSL IgV-Fc 융합 분자의 생체내 효과 평가**

[0802] [0481] 입양 전달 실험 자가면역 뇌척수염 (EAE) 모델에서 항염증 활성에 대해 변이체 ICOSL IgV-Fc 융합 분자를 평가하였다. 불활성 Fc (인간 IgG1 Fc에서 돌연변이 L234A, L235E 및 G237A 함유)에 융합된 변이체 ICOSL IgV (N52H/N57Y/Q100R; SEQ ID NO: 36)를 함유하는 시험된 변이체 ICOSL IgV-Fc 융합 분자.

[0803] [0482] 암컷 C57BL/6 마우스에 MOG35-55/CFA 에멀젼을 피하주사하였다. 11일 후, 비장 세포를 수득하고 MOG35-55 펩타이드, IL-12 및 항-IFNγ와 함께 배양하였다. 배양 3일 후 뇌척수염 T 세포를 복강내 주사를 통해 전달하였다(제0일). 마우스에 제0일에 시작하여 격일마다 변이체 ICOSL IgV-Fc 융합 분자를 총 5회 용량으로 투여하였다. 대조군으로서, Fc 단독 분자 및 CTLA-4-Fc 분자(아바타셉트)도 시험하였다. T 세포의 주사 후 20일 동안, 마우스를 칭량하고, 모니터링하고, 표 20에 기재된 바와 같이 EAE 점수를 평가하였다. 연구 종료시, 전 염증성 사이토카인의 분석을 위해 혈청을 수집하고, 유세포 분석을 위해 배출 림프절로부터의 세포를 수집하였다.

표 20. EAE 점수

점수	임상 관찰
0	운동 기능에 뚜렷한 변화 없음
1	저는 꼬리
2	저는 꼬리 및 뒷다리 약화
3	저는 꼬리 및 뒷다리의 완전한 마비, 또는 한쪽 앞다리와 한쪽 뒷다리의 마비가 동반된 저는 꼬리, 또는 다음의 모든 것: 1) 심각한 머리 기울임, 2) 케이지 가장자리만 따라 걷기, 3) 케이지 벽을 향해 밀기, 4) 꼬리로 들어올릴 때 돌기.
4	저는 꼬리, 완전한 뒷다리 및 부분적인 앞다리 마비
5	완전한 뒷다리 및 완전한 앞다리 마비, 운동성 없음; 또는 마우스가 케이지 안에서 자발적으로 구름; 또는 마비로 인한 마우스 절명.

[0804]

[0805] [0483] 도 13A에 도시된 바와 같이. 변이체 ICOSL IgV-Fc 융합 분자로 처리된 마우스들은 EAE 마우스 모델에서 더 낮은 EAE 점수가 나타내는 바와 같이 질환을 억제하였다: 일원분산분석(1-way ANOVA)에 의한 곡선하 면적(AUC)에 의해 *$p<0.0001$; 대조군과 비교한 변이체 ICOSL IgV-Fc 융합 분자. 도 13B는 경시적인 평균 체중 변화

를 나타낸다.

[0806] [0484] 사타구니 림프절 T 세포의 유세포 분석을 위해, 세포를 생존능 염료로 염색하고, 항-CD44, 항-CD62L, 항-CD4, 항-CD8 항체로 분석하고, 생존가능한 나이브(CD62L+CD44-) 및 T 이펙터 메모리 Tem) (CD62L- CD44+) CD4+ 및 CD8+ T 세포의 백분율을 평가하였다. 도 13C에 도시된 바와 같이, CD4+ 및 CD8+ Tem 세포는 변이체 ICOSL IgV-Fc 융합 분자에 의한 처리에 의해 감소되었다(**** $p<0.0001$; *** $p<0.001$, 일원분산분석(1-way ANOVA)에 의함).

[0807] [0485] 혈청 사이토카인을 제0일(1차 투약으로부터 2 시간 후) 및 제6일(4차 투약 1시간 전)에 평가하였다. 도 13D에 도시된 바와 같이, 시험된 변이체 ICOSL IgV-Fc 융합 분자는 IL-5, IL-10, IL-12p70 및 TNFα를 포함하여 제0일에 혈청에서 전 염증성 사이토카인의 감소를 초래하였다. 제6일에, IFN-감마 및 IL-6의 혈청 수준은 Fc 대조군과 비교하여 변이체 ICOSL IgV-Fc 융합 분자 처리에 의해 감소되었다.

[0808] **실시예 15**

[0809] **이식편-대-숙주-질병(GvHD) 모델에서 변이체 ICOSL-IgV Fc의 용량 범위 연구**

[0810] [0486] 이식편-대-숙주-질병(GVHD) 모델에서, 활성 Fc(예컨대 SEQ ID NO: 42에 제시된, 인간 IgG1 Fc 중 돌연변이들 L234A, L235E 및 G237A 함유)에 융합된 변이체 ICOSL IgV (N52H/N57Y/Q100R; SEQ ID NO: 36)를 함유하는 변이체 ICOSL IgV-Fc 분자를 20, 100 또는 500 μg의 용량 범위로 이용하여 용량 연구를 수행하였다. 변이체 ICOSL IgV-Fc 분자의 활성을 벨라타셉트 (CTLA-4-FcL104E/A29Y; 미국 특허출원 공개 번호 US2016/0271218)와 비교하였다.

[0811] [0487] 암컷 NSG 마우스 (그룹 1의 경우 그룹당 n = 5, 무처리; 그룹 2 내지 처리의 경우 그룹당 n = 10)에게 10 mg의 감마 글로불린을 피하투여한 다음,-1일에 조사하였다(100 cGy/rad). 제0일 (조사 후 24 시간 이내)에, 그룹 2-7의 마우스에게 표 21에 제시된 바와 같은 시험 물품을 투여한 다음, 모든 마우스에게 투여 후 꼬리 정맥을 통해 $1x10^7$ 인간 PBMC를 IV 주사하였다.

[0812] [0488] 연구 기간 동안 마우스를 일주일에 3회 평가하고 체중 감량, 자세, 활동성, 마우스의 모질 및 마우스 피부에 기초하여 질병을 점수 매김으로써 질병 활동 지수(DAI)를 결정하였다. 42일에 연구를 종료한 후, 생존, 체중 감소 및 질병 활성의 종말점 측정을 평가하였다. 연구 종료 시점에 생존한 동물의 백분율을 나타내는 카플란-마이어 생존 플롯을 작성하고 Mantel-Cox 및 Gehan-Breslow-Wilcox 테스트 (95% CI)를 이용하여 생존 곡선을 비교 분석하였다. 연구 말기(제42일)에 생존 마우스로부터 혈액/혈청 샘플을 수집하고 마우스 또는 인간 마커, CD4, CD8, CD28, ICOS, 활성화 또는 피로 마커(PD-1, Ki67) 및 FoxP3 (Tregs의 마커)를 비롯한 T 세포의 마커에 대해 세포를 유세포 분석법으로 평가하였다. 혈청의 전 염증성 사이토카인(예컨대 IFN-감마, IL-10, IL-12(p70), IL-17A, IL-4, IL-5 및 TNFα)의 수준도 평가하였다.

[0813]

표 21: 투약 스케줄							
그룹	N	시험 물품	용량 (μg)	용량 부피 (μl)	경로	스케쥴	투약 개시
1	5	무처리	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
생존/DAI							
2	10	식염수	n/a	100	IP	주 3 회 4 주	제 0 일
3	10	변이체 ICOSL IgV-Fc	500	100	IP	주 3 회 4 주	제 0 일
4	10	변이체 ICOSL IgV-Fc	100	100	IP	주 3 회 4 주	제 0 일
5	10	변이체 ICOSL IgV-Fc	20	100	IP	주 3 회 4 주	제 0 일
6	10	벨라타셉트	100	100	IP	주 3 회 4 주	제 0 일
PK/생존//DAI							
7	9	변이체 ICOSL IgV-Fc	100	100	IP	단일 제 1 일	제 1 일

[0814] [0489] 도 14A-14B는 각각의 투여 스케줄에 따라 처리된 GVHD 마우스의 생존 및 DAI 점수를 보여준다. 도시된 바와 같이, 시험된 변이체 ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)는 모든 용량 수준에서, 벨라타셉트로 처리된 마우스에 비해 생존을 유의하게 향상시키고(도 14A) 질병 점수를 감소시켰다(도 14B)(즉 제42일에 각각 100% vs. 40% 생존; Mantel-Cox 로그 순위 테스트에 의해 $p < 0.01$). 특히, 변이체 ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)의 단일 용량 (100 μg) 투여는 100 μg 벨라타셉트의 반복 투여와 유사하게 질병으로부터의 보호를 제공하였다.

[0815] [0490] 연구 말미에서 수집된 혈액의 유세포 분석 결과, 인간 세포/마우스 세포의 감소된 비율(도 15A) 및 대폭 감소된 총 T 세포 카운트(도 15B)에 의해 관찰되는 바와 같이, 시험된 변이체 ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)가 전달된 인간 T 세포의 팽창을 효과적으로 억제하는 것으로 입증되었다. 도 15C-33F에 도시된 바와 같이, ICOS (도 15C-33D) 및 CD28 (도 15E-33F)에 대해 공동-염색된 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 연구 말기에 수집된 혈액의 유세포 염색 결과, 비록 ICOS를 발현하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포들이 벨라타셉트-처리된 마우스에서 쉽게 탐지 가능하긴 했지만, 변이체 ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)로 처리된 그룹에서는 기본적으로 염색이 되지 않은 것으로 입증되었다. 이러한 결과는 ICOSL IgV-Fc- 처리된 마우스에 잔류하는 T 세포가 없다는 것(lack)과 변이체 ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)의 그의 표적 분자 CD28 및 ICOS에 대한 결합 능력 및 유세포 분석 항체에 의한 그들의 탐지 차단 능력과 일치한다. 얼마 남지 않은 인간 T 세포 상에서의 변이체 ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)의 결합은 항-인간 IgG Fc를 이용한 탐지에 의해 확인되었다. 전이된 인간 T 세포의 대부분은 초기에 CD28을 발현하고 단지 10-20%가 ICOS+인 반면, 연구 종결/종료시 식염수 또는 벨라타셉트로 처리된 마우스에 남아있는 활성화된 T 세포는 >80% ICOS+라는 점은 주목할만하다.

[0816] [0491] CD4+ 및 CD8+ T 세포에서 PD1의 낮은 발현 및 CD4+ T 세포에서의 감소된 Ki67 발현에 의해 입증되는 바와 같이, T 세포의 활성화 또는 고갈 마커의 존재 역시도, 변이체 ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)로 처리된 그룹에서 억제되었다(도 16A-16B). 변이체 ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)로 처리된 그룹에서 안정하게 유지된 이펙터 T 세포 대 Treg의 비율을 벨라타셉트와 비교하였다 (도 16C). 혈청의 전 염증성 사이토카인 역시도 벨라타셉트에 비해 변이체 ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)로 처리된 그룹에서 억제되었다 (도 17A-17D).

[0817] [0492] 변이체 ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)의 혈청 노출을 모니터링하기 위해 약동학(PK) 분석 역시도 수행하였다. 검출 시약으로서 항-인간 ICOSL mAb 포획 항체 및 Fc- 특이적 마우스 항-인간 IgG를 사용하여 정량적 PK ELISA를 사용하여 마우스 혈청 샘플에서 시험 물품 농도를 측정하였다.

[0818] [0493] GVHD 모델에서 변이체 ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)의 관찰된 혈청 노출은 별도의 연구에서 증정된 정상 마우스의 것보다 45% 낮았다(도 17E). GVHD 모델에서 변이체 ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)의 더 긴 말단 반감기는 GVHD의 나중 시점에서 표적 (CD28, ICOS) 감소에 기인하거나(인간 T 세포가 사라짐에 따라) 및/또는 약물 노출을 방해할 수 있는, 정상 마우스에서의 항-약물 항체 (ADA) 형성에 기인한 것일 수 있다. 변이체 ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)가 정상 마우스와 비교하여 혈청 노출이 낮다는 관찰은 GVHD 모델에서 표적 매

개된 약물 처리(TMDD)에 기인한 것이거나(즉, 마우스 오솔로그에 비해 인간 CD28 및 ICOS에 대한 그의 더 높은 친화력), 및/또는 이 모델에서 사용된 NOD/SCID (NSG) 마우스에서 FcRn의 결여에 기인한 것일 수 있다.

[0819] [0494] 이와 함께, 이들 결과는 변이체 ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)가 단일 투여로도 강력한 길항 활성을 나타내고, 벨라타셉트에 비해 우수한 활성을 나타낸다는 관찰과 일치한다. 이러한 관찰은 변이체 ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)가 나타내는 ICOS+ T 세포의 탁월한 제어에 기인하는 것일 수 있는데, 그렇지 않다면 CD28 경로 길항제인 벨라타셉트에서 얻어지는 것과 같은 단일 ICOS 또는 CD28 경로 차단을 탈출한다.

[0820] **실시예 16**

[0821] **CD4+CD45RB고도(high)-유도된 대장염 모델에서 변이체 ICOSL-IgV Fc의 평가**

[0822] [0495] CD4+CD45RB고도(high)-유도된 대장염 모델에서의 질병 발달에 미치는, 불활성 Fc(예컨대 SEQ ID NO: 42에 제시된, 인간 IgG1 Fc 중 돌연변이들 L234A, L235E 및 G237A를 함유)에 융합된 변이체 ICOSL IgV (N52H/N57Y/Q100R; SEQ ID NO: 36)를 함유하는 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의 효과를 평가하였다.

[0823] [0496] 15 마리의 수컷 BALB/C 공여자 마우스로부터 얻은 비장 세포 현탁액으로부터의 음성 선택에 의해 CD4+CD45RB고도(high) 공여자 세포를 풍부화(enriched)시켰다. 제0일에, 30만개의 CD4+CD45RB고도(high)(Treg 고갈) 공여자 세포를 면역결핍 C.B17(SCID) 마우스 (그룹당 n=12 또는 21 마리)에게 정맥 주사하여 대장염을 유도하였다. 대조군으로서, 이 모델에서 대장염의 발생을 유발하지 않는 30만개의 CD4+ 세포(Treg 세포 함유)를 SCID 마우스 수혜자 (n=12)에게 주사하였다. 세포 이동일에, 각 그룹의 마우스들에게 변이체 ICOSL-IgV Fc 또는 Fc 단독 또는 비히클 대조군을 투여하였다. 표 22는 시험군에 대한 치료 요법을 요약한 것이다.

[0824]

표 22: 치료 요법

그룹	# 마우스	주사된 세포	처리	용량	경로	빈도
1	12	CD4+	PBS (멸균)	-	i.p.	주 3 회 (M,W,F)
2	12	CD4+CD45RBhigh	PBS (멸균)	-	i.p.	주 3 회 (M,W,F)
3	21	CD4+CD45RBhigh	Fc 대조군	300 μg	i.p.	주 3 회 (M,W,F)
5	12	CD4+CD45RBhigh	변이체 ICOSL IgV-Fc	400 μg	i.p.	주 3 회 (M,W,F)

[0825] [0497] 무게(제0일에 칭량 시작) 및 대변 점도(consistency) 점수 (제10일에 채변 시작)를 주 3회 평가하였다. 이 무게 및 대변 점수로부터 일일 질병 활동 지수(DAI)를 계산하였다. 제42일에 연구가 종료된 후, 대장을 취하여 길이 및 무게를 재고 조직학적 분석을 행하였다. 양측 Student t-검정을 이용하여 변이체 ICOSL-IgV Fc 처리 그룹 대 비히클 그룹의 최종 무게 및 최종 대장 무게를 통계적으로 분석 평가하였다. Wilcoxon의 비모수적 T 검정법을 이용하여 대변 점수와 DAI 점수를 비교하였다.

[0826] [0498] DAI 결과를 표 23(DAI) 및 도 18A에 나타내고, 대장 측정치는 표 24에, 대장 조직학 결과는 표 25 및 도 18B에 나타내었다. 나타난 바와 같이, 시험된 변이체 ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)는 이 모델에서 유의적으로 감소된 대장염을 나타냈는데, 이는 염증성 장질환(IBD)을 효과적으로 치료하는데 있어서의 이 이중 CD28/ICOS 길항제의 유용성과 일치한다.

표 23: 질병 활성 점수

처리	최종 % 체중 +/- SD	p 값	최종 대변 점수 +/- SD	p 값	최종 DAI 점수 +/- SD	p 값
대장염 유도되지 않음/비히클	112.3% +/- 3.9%		0.3 +/- 0.5		0.3 +/- 0.5	
비히클	92.7% +/- 11.7%	<0.0001^	1.3 +/- 1.3	0.0016^	3.2 +/- 2.6	0.0003^
Fc 대조군, 300 μg	96.2% +/- 5.4%	0.2656*	1.4 +/- 1.4	0.8836*	2.5 +/- 1.7	0.6948*
ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R), 400 μg	109.6% +/- 4.0%	<0.0001~	0.1 +/- 0.3	0.0014~	0.1 +/- 0.3	<0.0001~

^ 대장염 미유도/비히클과 비교

* 비히클과 비교

[0827] ~ Fc 대조군, 300 μg 과 비교

표 24: 대장 측정

처리	최종 대장 무게 (mg) +/- SD	p 값	최종 대장 길이(mm) +/- SD	p 값	최종 대장 무게/길이 +/- SD	p 값
대장염 유도되지 않음/비히클	175.3 +/- 16.9		82.8 +/- 5.2		2.1 +/- 0.2	
비히클	323.1 +/- 78.0	<0.0001^	77.7 +/- 7.5	0.0668^	4.2 +/- 1.2	<0.0001^
Fc 대조군, 300 μg	276.7 +/- 92.4	0.1602*	77.6 +/- 8.9	0.9911*	3.6 +/- 1.2	0.1843*
ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R), 400 μg	160.8 +/- 24.4	0.0004~	79.4 +/- 6.1	0.5738~	2.0 +/- 0.3	0.0003~

^ 대장염 미유도/비히클과 비교

* 비히클과 비교

[0828] ~ Fc 대조군, 300 μg 과 비교

표 25: 조직학적 결과

				결장 (스위스 롤)			
그룹	케이지 #	마우스 #	마우스 ID#	점막	점막하	근육	총 점수
대장염 유도되지 않음/비히클	1	1	1-1	0	0	0	0.0
		2	1-2	0	0	0	0.0
		3	1-3	0	0	0	0.0
		4	1-4	0	0	0	0.0
	2	1	2-1	1	1	0	2.0
		2	2-2	0	0	0	0.0
		3	2-3	-	-	-	-
		4	2-4	-	-	-	-
	3	1	3-1	-	-	-	-
		2	3-2	-	-	-	-
		3	3-3	-	-	-	-
		4	3-4	-	-	-	-
평균				0.2	0.2	0.0	0.3
표준편차				0.4	0.4	0.0	0.8
SEM				0.2	0.2	0.0	0.3
비히클	4	1	4-1	3	3	1	7.0
		2	4-2	1	1	0	2.0
		3	4-3	2	2	0	4.0
		4	4-4	2	2	0	4.0
	5	1	5-1	2	3	0	5.0
		2	5-2	2	2	0	4.0
		3	5-3	-	-	-	-
		4	5-4	-	-	-	-
	6a	1	6a-1	-	-	-	-
		2	6a-2	-	-	-	-
		3	6a-3	-	-	-	-
	6b	1	6b-1	-	-	-	-
평균				2.0	2.2	0.2	4.3
표준편차				0.6	0.8	0.4	1.6
SEM				0.3	0.3	0.2	0.7
대장염 미유도/비히클에 대한 T-검정				0.0001	0.0002	0.3409	0.0003
Fc 대조군, 300 μg	6b	2	6b-2	2	1	0	3.0
		3	6b-3	3	3	1	7.0
	6c	1	6c-1	3	3	0	6.0
		2	6c-2	2	2	2	6.0
		3	6c-3	3	2	1	6.0
	7	1	7-1	-	-	-	-
		2	7-2	2	2	1	5.0
		3	7-3	2	1	0	3.0
		4	7-4	2	3	0	5.0
	8	1	8-1	2	1	0	3.0

[0829]

		2	8-2	2	1	0	3.0
		3	8-3	-	-	-	-
		4	8-4	1	1	0	2.0
	9	1	9-1	-	-	-	-
		2	9-2	-	-	-	-
		3	9-3	-	-	-	-
		4	9-4	-	-	-	-
	10	1	10-1	-	-	-	-
		2	10-2	-	-	-	-
		3	10-3	-	-	-	-
		4	10-4	-	-	-	-
평균				2.2	1.8	0.5	4.5
표준편차				0.6	0.9	0.7	1.7
SEM				0.2	0.3	0.2	0.5
비히클에 대한 T-검정				0.5676	0.4240	0.3663	0.8885
ICOSL IgV -Fc (N52H/N57Y/Q100R) , 400 μg	14	1	14-1	0	0	0	0.0
		2	14-2	0	0	0	0.0
		3	14-3	0	0	0	0.0
		4	14-4	0	0	0	0.0
	15	1	15-1	0	0	0	0.0
		2	15-2	0	0	0	0.0
		3	15-3	-	-	-	-
		4	15-4	-	-	-	-
	16	1	16-1	-	-	-	-
		2	16-2	-	-	-	-
		3	16-3	-	-	-	-
		4	16-4	-	-	-	-
평균				0.0	0.0	0.0	0.0
표준편차				0.0	0.0	0.0	0.0
SEM				0.0	0.0	0.0	0.0
Fc 대조군에 대한 T-검정				0.0000	0.0002	0.1315	0.0000

[0830]

[0831] **실시예 17**

[0832] **ICOSL IgV-fc 융합 단백질 독성학 및 독성동태학적 프로필의 생체내 평가**

[0833] [0499] 4-5주의 기간에 걸쳐 반복 용량으로 일주일에 한 번 예시적인 ICOSL IgV-Fc 융합 단백질을 정맥내(IV) 또는 피하(SC) 주사한 래트 및 시노몰구스 원숭이에서 독성 및 독성 동태학적 프로파일(TK)을 평가하였다. 4개월에 걸친 동물의 회복도 모니터링하였다.

[0834] [0500] 예시적인 재조합 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질은 실질적으로 실시예 11에 기재된 바와 같이 현탁 적응된 차이니즈 햄스터 난소 세포(ExpiCHO-S) 세포로부터 생성되었다. 불활성 Fc (예컨대 SEQ ID NO:42에 제시된 바와 같이, 인간 IgG1 Fc에서 돌연변이 L234A, L235E 및 G237A를 함유함)에 융합되고, SEQ ID NO: 67에 제시된 N52H/N57Y/Q100P 또는 SEQ ID NO: 36에 제시된 N52H/N57Y/Q100R를 갖는 변이체 ICOSL IgV를 함유하는 예시적인 변이체 ICOSL vIgD-Fc 융합체 분자를 인코딩하는 DNA 작제물로, ExpiCHO-S 세포를 형질감염시켰다.

[0835] [0501] Sprague-Dawley 래트에게 예시적인 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질을 주1회, 1개월 동안(5회 용량, 예를 들어 1일, 8일, 15일, 22일 및 29일) 10, 100 또는 200 mg/kg 피하(SC), 또는 200 mg/kg을 정맥내(IV) 볼루스로 투여하고 이후 4개월 동안 회복시켰다.

[0836] [0502] 사이노몰구스 원숭이에게 예시적인 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질을 주1회, 1개월 동안(5회 용량, 예를 들어 1일, 8일, 15일, 22일 및 29일) 10, 100 또는 150 mg/kg SC, 또는 150 mg/kg을 IV 볼루스로 투여하고 이후 4개월 동안 회복시켰다.

[0837] [0503] 임상 징후(케이지 측, 상세한 및 투여 후 관찰에 의해 결정됨), 체중, 정성적 식품 평가, 임상 병리학 파라미터(혈액학, 응고, 임상 화학 및 소변검사), 육안 부검 소견, 장기 중량, 조직병리학적 검사, 독성동태학(TK) 평가 및 항체 분석을 포함하는 표준 독성학적 평가를 투여 단계의 종료(30일차)까지 평가하였다. 사이노몰구스 원숭이에서, 추가 평가에는 안과 검사, 심전도, 유세포 분석 면역표현형, 생체외 스타필로코커스 내독소 B(SEB) 및 혈청 사이토카인 분석 검정이 포함되었다. Tmax, Cmax, AUC0-7d 및 t1/2와 같은 독성동태학(TK) 매개변수는 비구획 분석 방법을 사용하여 추정되었다.

[0838] **A. 스프라그 다울리 래트**

[0839] [0504] 스프라그 다울리 래트에 대한 연구에서, 100 및 200 mg/kg SC 및 200 mg/kg IV 볼루스로 매주 1회 투여한 후, 노출은 30일까지 유지되었다(표 26). 10 mg/kg 용량 수준에서는 많은 동물에서 반복 투여 후 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질 노출이 감소하거나 손실되었다. SC 투여 후, 평균 Cmax 및 AUC0-7일에 기초한 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질 노출은 10, 100 및 200mg/kg 용량 수준들 간에 용량 비례보다 적은 방식으로 증가하였다. 200mg/kg 용량 수준에서의 생체이용률은 약 18%였다. 제22일에 평균 ARCmax 및 ARAUC 값의 범위는 0.856 내지 1.52이다. 매주 1회 SC 및 IV 투여를 반복하여 관찰된 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 축적은 거의 또는 전혀 없었다. 측정할 수 있는 경우, 투여 간격 내에서 추정된 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 t1/2는 대략 1 내지 3일이었다.

[0840] [0505] 모든 용량 수준에서 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 투여는 잘 관용되었다. 본 발명자들이 관찰한 바로는 체중, 정량적 음식 소비, 안과 또는 장기 무게 측면에서 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질과 관련된 징후 또는 변화는 없었다. 관련 발견에는 모든 용량 수준에서 림프절의 림프구 세포도(cellularity) 감소가 포함되었는데, 이는 예상되는 약리학과 일치하며; 뿐만 아니라 경미하고 유해하지 않은 주사 부위 변화(적색 변색, 현미경적 출혈, 혼합 세포 침윤)도 관찰되었다. 호중구, 림프구, 단핵구, 및 염색되지 않은 큰 세포, 빌리루빈 및 피브리노겐의 최소 증가; 및 알부민의 최소 감소를 포함하여 경미하고 일시적이며 비이상적인 임상 병리학 변화가 관찰되었다. 임상 화학 또는 현미경적 상관관계 없이 최소 감소된 소변량 및 증가된 소변 비중이 주목되었다.

[0841] [0506] 200 mg/kg SC 및 IV ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질에 대해 평가된 최고 용량에서 결정된 관찰되지 않은 유해 효과 수준(NOAEL: no-observed adverse effect level)은 각각 219 ㎍·일/mL의 AUC0-7d 및 53.4㎍/mL의 Cmax; 및 1250㎍·hr/mL의 AUC0-7d 및 4120㎍/mL의 Cmax에 해당한다.

표 26: 스프라그 다울리 래트에서 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 반복-투여 평균 독성 동태학적 파라미터의 요약.

투여량 (mg/kg)	경로	제 1 일 (투여 1)				제 22 일 (투여 4)					
		T_{max} (일)	C_{max} (μg/mL)	AUC_{0-7d} (μg*일/mL)	$t_{1/2}$ (일)	T_{max} (일)	C_{max} (μg/mL)	AUC_{0-7d} (μg*일/mL)	$t_{1/2}$ (일)	AR_{Cmax}	AR_{AUC}
10	SC	1.40	6.48	26.2	NA	0.9	10.2	24.8	0.623	1.5	0.856
100	SC	1.00	33.7	133	1.01	0.8	50.9	188	0.892	1.52	1.42
200	SC	1.19	53.4	219	2.77	0.875	67.9	252	1.3	1.29	1.16
	IV	0.00412	4120	1250	3.2	0.00346	4810	1630	2.83	1.18	1.32

[0842]

[0843] B. 사이노몰구스 원숭이

[0844] [0507] 사이노몰구스 원숭이에 대한 연구에서, 10 mg/kg, 100 및 150 mg/kg SC 및 150 mg/kg IV 볼루스로 매주 1회 투여한 후, 노출은 30일까지 유지되었다(표 27). SC 투여 후, 평균 최대 관찰 농도에 기초한 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질 노출은 10, 100 및 150 mg/kg 용량 사이에서 대략 용량 비례 방식으로 증가하였다. 평균 Cmax 값은 1:9.33:16.8의 비율로 증가했고, 평균 AUC0-7day 값은 1:7.36:10.4의 비율로 증가하였다. 150 mg/kg에서 SC 생체이용률은 약 39%였다. 매주 1회 SC 또는 IV 투여를 반복하면 축적이 거의 또는 전혀 없었다. 투여 간격 내에서 추정된 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 겉보기 최종 제거 반감기(t1/2)는 모든 투여 수준에 대해 대략 2일이었다.

[0845] [0508] 사이노몰구스 원숭이에서, 모든 동물은 연구 제30일에 예정된 부검까지 생존하였다. ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 투여는 모든 용량 수준에서 잘 관용되었다. ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질 관련 변화에는 모든 용량에서 림프절 및 비장의 림프구 세포성 감소가 포함되었으며, 이는 일부 동물의 비장 중량 감소와 관련이 있다. 사망률, 임상 관찰, 체중, 음식 섭취, 안과 검사, 심전도, 활력 징후, 임상 병리학 매개변수, 육안(macroscopic) 평가 또는 혈청 사이토카인(IL-1β, IL- 1ra, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 IL-12/23(p40), IL-13, IL-17A, MCP-1, MIP-1β, IFN-ɣ, TNF-α, G-CSF 및 GM-CSF)의 경우, ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질 관련된 다른 효과는 관찰되지 않았다.

[0846] [0509] NOAEL은 평가된 최고 용량인 150 mg/kg SC 및 IV로 간주되었으며, 이는 각각 480㎍·hr/mL의 AUC0-7d 및 204㎍/mL의 Cma; 및 1320㎍·hr/mL의 AUC0-7d 및 3040㎍/mL의 Cmaxx에 상응한다.

표 27. 사이노몰구스 원숭이에서 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 그룹 평균 반복투여 독성 동태학적 파라미터의 요약

투여량 (mg/kg)	경로	제 1 일 (투여 1)				제 22 일 (투여 4)					
		T_{max} (일)	C_{max} (μg/mL)	AUC_{0-7d} (μg*일/mL)	$t_{1/2}$ (일)	T_{max} (일)	C_{max} (μg/mL)	AUC_{0-7d} (μg*일/mL)	$t_{1/2}$ (일)	AR_{Cmax}	AR_{AUC}
10	SC (N=6)	0.750	14.9	49.7	2.13	0.611	17.2	61.0	2.29	1.21	1.24
100	SC (N=6)	0.778	139	366	2.01	0.750	132	381	2.10	0.950	1.05
150	SC (N=10)	0.667	250	516	1.89	0.800	204	480	2.12	0.819	0.923
	IV (N=10)	0.0208	2950	1310	1.96	0.0292	3040	1320	2.14	1.03	1.01

[0847]

[0848] C. 요약

[0849] [0510] 종합하면, 이들 데이터는 시간 경과에 따른 혈청 농도에 대한 2상 제거 프로파일에 따르며, 이는 모노클로날 항체 또는 항체-유사 약물에 대한 프로파일과 일치한다.

[0850] 실시예 18

[0851] ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질에 대한 인간 약동학 모델링에 의한 투여량 및 치료 결정

[0852] [0511] 불활성 Fc (예컨대 SEQ ID NO:42에 제시된 바와 같이, 인간 IgG1 Fc에서 돌연변이 L234A, L235E 및 G237A를 함유함)에 융합되고, SEQ ID NO: 36에 제시된 N52H/N57Y/Q100R을 함유하는 예시적인 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질에 대한 인간 약동학 모델(PK)을, 실시예 17에 기재된 바와 같이 사이노몰구스 원숭이 연구 및 스프라그 다울리 래트 연구로부터의 모델링 PK 데이터 및 상대 척도법에 기초하여 작제하였다. 상이한 용량 수준에서의 선형 PK는 인간의 노출을 예측하는 것으로 가정되었다. CD28 수용체 점유가 면역 억제 활성과 양의 상관관계가 있다는 관찰과 일치하는 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 시험관내 결합 데이터를 기반으로 선택된 용량 수준을 모델링하였다.

[0853] A. PK 모델링

[0854] [0512] 0.001 mg/kg의 더 낮은 시작 용량 수준은 투여 후 24시간까지 10% 미만으로 급격히 감소하는 Cmax에서 26%의 예측된 표적 포화도를 기반으로 하는 최소 예상 생물학적 효과 수준(MABEL: Minimum Anticipated Biological Effect Level)인 것으로 결정되었다. 사이노몰구스 원숭이에서 150mg/kg 및 래트에서 200mg/kg의 NOAEL 용량에서의 노출을 비교하는 안전 한계를 기반으로, 최대 용량 수준은 10mg/kg으로 결정되었다. 10 mg/mkg IV 용량에서 예측된 인간 Cmax 및 AUC는 150 mg/kg에서의 원숭이 NOAEL 용량에서 관찰된 Cmax 및 AUC보다 9배 및 18배 더 낮은 것으로 예측되었다. 10 mg/kg IV 용량에서 예측된 인간 Cmax 및 AUC는 200 mg/kg의 래트 NOAEL 용량에서 관찰된 Cmax 및 AUC보다 9배 및 26배 더 낮은 것으로 예측되었다.

[0855] [0513] 표 28은 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 단일 용량 후 예측된 표적 포화도를 예시한다. 표 29는 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 단일 IV 투여 후 예측된 인간 노출 및 안전 한계를 설명한다. SC 용량(단일 및 다중 용량)에 대한 목표 포화도 및 예상 노출은 70% 생체이용률을 가정하여 IV 용량 수준 범위 내에 있을 것으로 예상된다.

표 28: 단일 IV 투여 후 예측된 표적 포화도 (%)[a, b]										
투여후 시간 경과 (일)	0.001 mg/kg	0.003 mg/kg	0.01 mg/kg	0.03 mg/kg	0.1 mg/kg	0.3 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg	6 mg/kg	10 mg/kg
주입 종료	26	52	78	91	97	99	100	100	100	100
0.5	15	34	63	84	95	98	99	100	100	100
1	7	18	43	69	88	96	99	100	100	100
2	2	6	18	39	68	86	96	98	99	100
7	0	1	5	13	32	59	83	93	97	98
14	0	0	1	3	11	26	54	78	88	92
21	0	0	0	1	3	8	23	47	64	74
28	0	0	0	0	1	2	7	18	30	42

[a] 표적 포화도는 인간 CD28 결합 친화도 EC_{50} = 648 pM (52 ng/mL)에 기초하여 계산.

[b] 예측된 PK 및 표적 포화도는 30 분에 걸친 IV 주입에 기초.

EC_{50} - 50% 유효 농도

[0856]

표 29: 단일 IV 투여 후 예측된 인간 노출 및 안전 한계								
	예측된 인간 노출[1]		원숭이 NOAEL (1 개월간 매주 150 mg/kg IV)[2]			래트 NOAEL (1 개월간 매주 200 mg/kg IV)[3]		
제안된 IV 투여 수준 (mg/kg)	AUC_{0-7d} (μg•일/mL)	C_{max} (μg/mL)	AUC 에 의한 안전 한계	C_{max}에 의한 안전 한계	투여량에 의한 안전 한계	AUC 에 의한 안전 한계	C_{max}에 의한 안전 한계	투여량에 의한 안전 한계
0.001	0.0146	0.0209	89818	140861	150000	85704	196727	200000
0.003	0.0438	0.0628	29939	46954	50000	28568	65576	66667
0.01	0.146	0.209	8982	14086	15000	8570	19673	20000
0.03	0.438	0.605	2994	4874	5000	2857	6807	6667
0.1	1.46	1.94	898	1518	1500	857	2120	2000
0.3	4.38	5.62	299	525	500	286	733	667
1	14.6	18.0	90	163	150	86	228	200
3	43.8	52.2	30	57	50	29	79	67
6	87.5	100.5	15	29	25	14	41	33
10	146	161	9	18	15	9	26	20

1. 보수적 접근으로 인체 노출 예측을 위해 선형 PK를 가정.
2. 원숭이 NOAEL (1개월간 매주 150 mg/kg IV): AUC_{0-7d} = 1310 μg•일/mL, C_{max} = 2950 μg/mL
3. 래트 NOAEL (1개월간 매주 200 mg/kg IV): AUC_{0-7d} = 1250 μg•일/mL, C_{max} = 4120 μg/mL

약어: NOAEL-부작용이 관찰되지 않는 수준; AUC-곡선 아래 면적; AUC_{0-7d}-제0일부터 제7일의 곡선 아래 면적; C_{max} - 관찰된 최대 약물 농도

[0857]

[0858] **B. 인간 투여량 결정**

[0859] [0514] 인간 대상체에 대한 정맥내 및 피하 투여를 위해, 상기 기재된 바와 같은 CD28 표적 포화도 및 NOAEL 안전 한계를 고려하는 예시적인 인간 단일상승 용량(SAD: single-ascending doses) 및 다중상승 용량(MAD: multiple-ascending doses)을 설계하였다. 인간에서 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 SC 투여의 흡수를 조사하기 위해 1 및 6 mg/kg의 두 가지 단일 SC 용량을 인간 대상체에 투여한다.

[0860] [0515] 단일상승 용량 프로토콜에서는, 인간 대상체에게 불활성 Fc(예컨대 SEQ ID NO:42에 제시된 바와 같이, 인간 IgG1 Fc에서 돌연변이 L234A, L235E 및 G237A를 함유함)에 융합되고, SEQ ID NO: 36에 제시된 바와 같은 N52H/N57Y/Q100R를 함유하는 예시적인 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질, 또는 위약을 정맥내(IV) 또는 피하(SC)로, 표 30에 예시된 투여계획에 따라 단일 용량으로 투여한다. 면역 반응에 대한 예시적인 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 효과를 평가하기 위해 1 mg/kg 이상의 용량 수준으로, 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH)의 단일 SC 용량이 추가된다.

표 30. SAD 제안 투여 단계적 확대			
코호트	ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질 투여량 (mg/kg)	ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질 투여 경로	KLH 투여
A1	0.001	IV	-
A2	0.003	IV	-
A3	0.01	IV	-
A4	0.03	IV	-
A5	0.1	IV	-
A6	0.3	IV	-
A7	1	IV	1 mg
A8	1	SC	1 mg
A9	3	IV	1 mg
A10	6	IV	1 mg
A11	6	SC	1 mg
A12	10	IV	1 mg

[0861]

[0862] [0516] 다중상승 용량 프로토콜의 경우, 대상체는 표 31에 요약된 바와 같이 예시적인 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질 또는 위약을 4주 동안 4주 단위 용량(총 4회 용량)으로 투여받는다. 면역 반응에 대한 예시적인 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 효과를 평가하기 위해, 제2일에 KLH의 단일 용량이 제안된다.

표 31. MAD 제안 투여 단계적 확대			
코호트	ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질 (mg/kg)	ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질 (투여 경로)	KLH 고정화
B1	0.3	SC	1 mg
B2	1	SC	1 mg
B3	3	SC	1 mg
B4	6	SC	1 mg

[0863]

[0864] **실시예 19**

[0865] **결합 조직 질병 모델, 예컨대 쇼그렌 증후군 모델에서 변이체 ICOSL-IgV Fc의 평가,**

[0866] [0517] 불활성 Fc (예컨대 SEQ ID NO:42에 제시된 바와 같이, 인간 IgG1 Fc에서 돌연변이 L234A, L235E 및 G237A를 함유함)에 융합된 변이체 ICOSL IgV(N52H/N57Y/Q100R; SEQ ID NO:: 36)를 함유하는 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc를, 쇼그렌 증후군(SjS) 및 전신 홍반성 루푸스(SLE)를 포함한 기타 결합 조직 질환의 기저에 있는 이펙터 메카니즘을 평가하는 모델에서 그 활성에 대해 평가하였다.

[0867] **A. PBMC 자극 분석**

[0868] [0518] 시험관내 1차 세포 검정을 위해, 건강한 공여자 및 SjS가 있는 대상체로부터의 PBMC를 100 nM의 변이체 ICOSL IgV-Fc의 존재 하, 또는 비교를 위해 CD28-단독 억제제, 아바타셉트, ICOS 경로 억제제, 프레잘루맙(AMG-557; 항-ICOSL, Creative Biolabs), 또는 아바타셉트과 프레잘루맙의 조합의 존재 하에, 인공 항원 제시 세포(CD80, CD86, ICOS 리간드, 및 항-CD3 (OKT3)을 발현하는 K562 세포)로 자극하였다(세포 대 인공 APC의 비율 20:1). Fc 단독을 대조군으로 사용하였다. 48시간 인큐베이션 후에 상청액을 수집하고, IFN-γ 및 IL-2를 포함하는 전염증성 사이토카인의 생산에 대해 분석하였다. 아바타셉트, 프레잘루맙 또는 아바타셉트 + 프레잘루맙 조합과 비교하여 변이체 ICOSL IgV-Fc는 자극된 건강한 공여자 또는 SjS 환자 PBMC에서 방출된 전염증성 사이토카인(예컨대 TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-17A, GM-CSF)을 탁월하게 억제하는 것으로 입증되었다. IL-2 반응에 대한 예시적인 결과를 도 19A에 도시하였다. 도 19A(SjS PBMC) 및 도 19B(건강한 공여자)에 IL-2반응에 대한 예시적인 결과를, 도 19c(SjS PBMC) 및 도 19D(건강한 공여자)에 IFN-γ 반응에 대한 예시적인 결과를 나타내었다. 도 19E(IFN-γ) 및 19F(IL-2)에 도시된 바와 같이, 맷칭된 공여자의 결과는 변이체 ICOSL IgV-Fc가 아바타셉트보다 더 큰 정도로 사이토카인 생성을 일관되게 억제한다는 것을 보여주었다.

[0869] [0519] 상기 기재된 바와 유사한 연구로, 건강한 공여자 및 SjS 또는 SLE를 갖는 대상체로부터의 PBMC를 100 nM의 변이체 ICOSL IgV-Fc 존재 하, 또는 비교를 위해 CD28 단독 억제제 아바타셉트, ICOS 경로 억제제 프레잘루맙, 또는 아바타셉트 + 프레잘루맙의 조합의 존재 하에서와 같은 전술한 일반적인 조건 하에, 인공 항원 제시 세포(CD80, CD86, ICOS 리간드 및 항-CD3(OKT3)를 발현하는 K562 세포)로 자극하고, IFN-γ, IL-6 및 IL-17A를 포함하는 전염증성 사이토카인의 생성에 대해 분석하였다. IFN-γ, IL-6 및 IL-17A 반응에 대한 예시적인 결과가 도 19G에 제시되어 있으며, 측정된 모든 사이토카인에 대해 유사한 경향이 관찰되었다(도 19H 및 도 19I의 우측 패널에 도시된 도 19H 및 도 19I 건강한 공여자 PBMC). 종합하면, 이들 결과는 테스트한 대부분의 공여자 및 분석물에 대해 프레잘루맙, 아바타셉트 또는 프레잘루맙+아바타셉트 조합에 비해 통계적으로 유의한 우월성을 입증하였다. 종합적으로, 이들 결과는 변이체 ICOSL IgV-Fc가 인간 SjS 및 SLE 환자의 PBMC로부터의 사이토카인 생성을 단일 CD28 또는 ICOS 경로 억제제보다 시험관 내에서 더 강력하게 억제한다는 것을 입증한다.

[0870] 상기 기재된 검정에서 생성된 환자 PBMC 샘플로부터 RNA를 단리하고, 유전자 발현을 평가하였다. 비교를 위해, RNA를 또한 건선성 관절염(PsA; 실시예 20 참조)이 있는 환자의 PBMC 샘플에서 분리하였다. SjS, SLE 및 PsA에 걸쳐 유의하게 하향조절된 유전자를 도 19J에 나타내었다. PsA, SjS 및 SLE로 자극된 환자 집단에서 ICOSL IgV-Fc의 유전자 분석은 ICOSL IgV-Fc가 많은 자가면역 질환에 걸쳐 연루된 병원성 유전자 및/또는 경로를 상당히 하향조절할 수 있음을 나타낸다. PsA, SjS 및 SLE로 자극된 환자 집단에 걸쳐 변이체 ICOSL IgV-Fc에 대한 반응으로 상당히 하향조절된 유전자는 변이 분자의 활성에 대한 유전자 시그니처를 제공한다.

[0871] **B. 인간 여포 B 헬퍼 T(B-Tfh) 세포 공동 배양체**

[0872] [0521] 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의 효과를 인간 B 및 Tfh 세포에서 증식 및 항체 반응을 억제하는 능력에 대해 추가로 평가하였다. 건강한 공여자의 PBMC에서 분리된 자가 순환 인간 B 및 Tfh 세포를 인공 APC(K562/CD80) 및 가용성 OKT3와 혼합하고, 변이체 ICOSL IgV-Fc의 적정 존재 하에 또는 비교를 위해 아바타셉트, 프레잘루맙, 프레잘루맙,아바타셉트 + 프레잘루맙의 조합, 또는 벨라타셉트의 존재 하에. 공동 배양물은 세포 활성화/증식에 대해 제7일에 평가하였다.

[0873] [0522] 도 19K에 도시된 바와 같이, 변이체 ICOSL IgV-Fc는 T 세포 증식, CD40L+ T 세포 회복 및 B 세포 증식을 억제하고, 공동 배양 동안, 나이브 B 세포의 백분율 증가 및 활성화된 B 세포의 병렬 감소에 의해 반영되는 바와 같이 B 세포 분화에 관여한다. 세포 활성화/증식에 대한 효과에 대한 IC50 값을 도 19L에 요약하였다.

[0874] [0523] 상기와 유사한 연구에서, 공동 배양물로부터의 상청액을 8일째에 수집하여 1:10으로 희석하고, 면역글로불린 분비에 대해 분석하였다. 인간 IgG1, IgG3, IgA 및 IgM의 분비는 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의 존재 하에 실질적으로 감소되었다(도 19M). 데이터는 8명의 공여자의 결과를 나타낸다.

[0875] [0524] 일반적으로 상기 기재된 바와 같은 B 및 Tfh 세포 공동-배양물로부터 단리된 RNA를 B-T 세포 콜라보레이션에 관여하는 유전자에 대한 차세대 시퀀싱에 의해 상대적인 유전자 발현 수준에 대해 분석하였다. 백만 매핑된 리드 당, 전사체의 킬로베이스당 리드(RPKM)의 발현 값을 처리군 사이의 각 유전자에 대해 0에서 1까지의 상대적 척도로 표시하였으며, 빨간색 정도는 더 높은 발현 값을 나타내고 파란색 정도는 더 낮은 값을 나타낸다. 유전자(도 19N). 도 19N에서, 변이체 ICOSL IgV-Fc에 의한 억제 수준에 따라 유전자 목을 분류하였다(왼쪽에서 오른쪽으로).

[0876] **C. 쇼그렌 증후군의 생체내 모델**

[0877] [0525] 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH) 또는 양의 적혈구 세포(SRBC)가 복강내(IP) 투여된 마우스 면역화 모델에서 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의 효과를, 투여 후 생체내 항체 반응 억제에 대한 아바타셉트와 비교하였다. KLH 면역화를 위해, 0.25 mg KLH가 1일째에, 그리고 13일째에 부스트로서 투여되었다. SRBC 면역화를 위해 100 μL의 세척된 시트르산 SRBC를 0일에 투여하고 부스트 그룹을 14일에 다시 투여하였다. 변이체 ICOSL IgV-Fc 또는 아바타셉트 존재하의 항체 생산도 인간 B 세포/T 세포 공동 배양체에서 비교하였다. 변이체 ICOSL IgV-Fc는 두 가지 마우스 면역화 모델 모두에서 항체 생산을 억제하였다. 억제된 증식 및 항체 생산은 인간 B 세포/T 세포 공동 배양체에서도 관찰되었다.

[0878] [0526] 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의 효과 역시도 NOD 마우스에서 시알라덴염의 항-PD-L1 항체-매개가속을 포함하는 SjS의 마우스 모델에서 평가하였다. PD-L1 차단은 턱밑샘(SMG)에서 백혈구 침윤 및 카스파제-3 활성화, 항핵 및 항-M3 무스카린성 아세틸콜린 수용체(M3R) 자가항체 생성 및 타액 분비 장애를 가속화하며, 이는 SjS의 가속화된 발달 및 발병을 가리키는 것이다. (예컨대 Zhou et al. (2016) Sci. Rep. 6:39105 참조). 6주령 NOD/ShiLtJ 마우스는 Fc 대조군(0.3mg), 아바타셉트(abatacept), 또는 변이체 ICOSL IgV-Fc (0.5 mg) 테

스트 물품과 함께 0, 2, 4 및 6일에 0.1mg의 차단 항-마우스 PD-L1 항체(Zhou et al.에 설명된 대로 침샘에서 염증을 유도하기 위해)로 복강내 처리하였다. 제8일에 턱밑샘을 수집하여, 절제하고, 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색으로 염색하여 0에서 3점으로 염증 점수를 매겼다. 이 연구에서 항-PD-L1 처리된 NOD 마우스에서 변이체 ICOSL IgV-Fc는 SMG 조직학에 의해 평가된 바와 같이 아바타셉트 단독보다 시알라덴염을 더 크게 억제하였다(도 20A-20B).

[0879] [0527] 턱밑샘, 췌장 및 혈액/혈청을 제10일에 수확한 점을 제외하고, 전술한 바와 같이 쇼그렌 증후군의 항-PD-L1 mAb 유도 NOD 마우스 모델을 사용한 유사한 연구를 수행하였다. 이 연구에서는 야생형 ICOSL -Fc(0.5mg) 도 비교를 위한 테스트 물품으로서 투여되었다. 대표적인 조직학 H&E 이미지가 도 20C에 도시되어 있다. 시알라덴염의 발병 백분율을 도 20D에 나타내었는데, 이 도면은 변이체 ICOSL IgV-Fc가 시알라덴염의 발병률과 중증도를 감소시켰음을 입증한다. 개별 SMG 점수는 도 20E에 도시되어 있다(통계적 유의성은 Kruskal-Wallis 테스트를 사용하여 결정되었다(* p.05, ** p<0.01, ****p.0001. 나이브 그룹은 통계적 비교를 위해 검증되지 않았다). 제10일에 수집된 췌장의 조직학에 의해 입증된 바와 같이, 변이체는 또한 이 모델에서 췌도염의 중증도를 감소시켰다. 제10일에 수집된 혈액/혈청의 포도당 측정 결과는 변이체 ICOSL IgV-Fc가 혈당 수준을 감소시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 변이체 ICOSL IgV-Fc가 시알라덴염 및 췌도염의 발병률과 중증도를 감소시킴을 증명해 주었다.

[0880] [0528] 제10일에 수집된 희석된 혈청에서 ELISA(Signosis, Santa Clara, CA)에 의해 항-Ro-52 및 항-La 항체를 평가하였다. 도 20F에서, 변이체 ICOSL IgV-Fc는 혈청 자가항체 항-RO 52 및 항-La의 생성을 억제하였다. 수정되지 않은 비모수 Dunn's test를 사용하여 결정된 바와 같이 변이체 ICOSL IgV-Fc 그룹과 비교 치료군 간에는 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다.

[0881] [0529] 제10일에 수집된 SMG에서 RNA를 분리하고며 차세대 시퀀싱에 의해 상대적 유전자 발현 수준에 대해 분석하였다. 도 20G는 예시적인 유전자에 대한 RPKM을 제시한다. 비모수적 Kruskal-Wallis 테스트(*p<0.05, **p<0.01)를 사용하여 결정된 바와 같이, 유전자의 RNA 발현의 통계적 차이가 변이체 ICOSL IgV-Fc와 Fc 대조군 사이에 인지되었다 (*p<0.05, **p<0.01)

[0882] **D. 전신 홍반성 루푸스(SLE)의 생체내 모델**

[0883] [0530] 또한 SLE와 유사한 증상을 갖는 cGvHD 질환을 유발하는 수용자 항원 제시 세포에 의한 공여자 CD4+ T 세포의 동종활성화를 포함하는 SLE의 마우스 모델에서도 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의 효과를 평가하였다(Klarquist & Jansse, 2015, J. Vis. Exp. (105):e53319)). 암컷 I-A^{bm12}B6(C)-*H2*-$Ab1^{bm12}$/KhEgJ ('bm12') 마우스의 비장세포 현탁액을 제0일에 9주령 암컷 C57BL/6NJ 수혜자 마우스에게 동등한 수(1:1)로 IP 주사하였다. H2-$Ab1^{bm12}$는 3개의 뉴클레오타이드만큼 H2-$Ab1^{b}$ 와 H2-Ab1b와 상이하므로, MHC I-A 분자의 β-사슬에서 3개의 아미노산이 변경된다. 제0일부터 수혜자 마우스를 400μg 변이체 ICOSL IgV 또는 아바타셉트 또는 Fc 대조군 단백질의 몰-맷칭량(250μg)으로 11주 동안 주 2회 처리하였다. 제82일에 연구 종료 시, 배(germinal) 중심(B220+CD19+GL7+CD95+) B 세포 및 여포 헬퍼(CD4+CD45+CD3+PD1+CD185+) T 세포를 유세포 분석에 의해 계수하였다. Chondrex(Redmond WA)의 마우스 항-dsDNA IgG 항체 분석 키트를 사용하여 항-이중 가닥 DNA IgG 역가를 제14일에 측정하였다.

[0884] [0531] 도 20H에 도시된 바와 같이, 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc 처리된 마우스는 비장당 감소된 수준의 GC B 및 CD4+Tfh 세포, 및 Fc 대조군과 비교하여 감소된 혈청 항-dsDNA를 입증하였다. 변이체 ICOSL IgV-Fc와 GC B 및 Tfh에 대한 대조군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었으며, 항-dsDNA 농도에 대해서는 보정되지 않은 Fisher의 최소 유의차 검정을 사용하여 관찰되었다(*p<0.05, **p<0.01, 및 ****p<0.0001).

[0885] [0532] 이들 결과는 이중 CD28/ICOS 길항제, 예를 들어 예시적인 시험된 변이체 ICOSL IgV-Fc가 인간 시험관내 및/ 또는 마우스 생체내 번역 연구에서, CD28 또는 ICOS 공동자극 경로 억제에 비해 더 우수함을 추가로 뒷받침하는 것이다.

[0886] **실시예 20**

[0887] **관절염 모델에서 변이체 ICOSL-IgV Fc의 평가**

[0888] [0533] 불활성 Fc(예컨대 SEQ ID NO:42에 제시된 바와 같이, 인간 IgG1 Fc에서 돌연변이 L234A, L235E 및 G237A를 함유함)에 융합된 변이체 ICOSL IgV(N52H/N57Y/Q100R; SEQ ID NO: 36)를 함유하는 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc를, 류마티스 관절염(RA) 또는 건선 관절염(PsA)의 기저에 있는 이펙터 메카니즘을 모델에서 그 활

성에 대해 평가하였다.

[0889] **A. PBMC 자극 분석**

[0890] [0534] 시험관내 1차 세포 검정을 위해, 건강한 공여자(HD), RA 및 PsA 대상체로부터의 PBMC 또는 Th17-스큐(skewed) T 세포 배양물을, 100nM의 변이체 ICOSL IgV-Fc 또는 비교를 위해 CD28-단독 억제제, 아바타셉트, ICOS 경로 억제제, 프레잘루맙 (AMG-557; 항-ICOSL, Creative Biolabs), 및 아바타셉트과 프레잘루맙의 조합의 존재 하에 인공 항원 제시 세포(CD80, CD86, ICOSL, 및 항-CD3 (OKT3)을 발현하는 K562 세포)로, 세포 대 인공 APC의 비율을 20:1로 하여 자극하였다. Fc 단독을 대조군으로 사용하였다.

[0891] [0535] 사이토카인 생산의 평가를 위해 48시간 인큐베이션 후에 상청액을 수집하였다. 변이체 ICOSL IgV-Fc는 자극받은 건강한 공여자 및 환자 PBMC로부터 분비된 전염증성 사이토카인(예컨대 TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-17A, GM-CSF, RANKL)을 우수하게 억제하는 것으로 입증되었고, 아바타셉트, 프레잘루맙, 및 아바타셉트와 프레잘루맙의 조합에 비해 Th17-스큐 배양체에서 T 세포 증식을 억제하였다. RA, PsA 또는 HD로부터의 PBMC와의 공동 배양물로부터 얻어진 예시적인 결과를 IFN-γ (도 21A), IL-2 (도 21B), TNF-α (도 21C) 및 IL-17A (도 21D)에 도시하였다. Fc 대조군에 대한 사이토카인 분비 억제 백분율을 공식((Fc 대조군 값 - Exp 값)/Fc 대조군 값)*100으로 구하고, 이를 도21E에 나타내었다. 이러한 결과는 변이체 ICOSL IgV-Fc가 아바타셉트 또는 프레잘루맙 단독 또는 조합으로 관찰된 것보다 사이토카인을 더 크게 억제함을 입증하였따.

[0892] [0536] RNA는 상기 기재된 검정에서 생성된 환자 PBMC 샘플로부터 단리되었고, 유전자 발현은 RNA 시퀀싱에 의해 평가되었다. 변이체 ICOSL IgV-Fc에 의해 차등적으로 감소된 유전자 평가의 경우 컷오프 기준은 FDR<0.05, LOG FC<-0.5였다. 아바타셉트에 의해 차등적으로 감소된 유전자의 평가를 위한 컷오프 기준은 FDR<0.3, LOG FC<-0.5였다. 도 22A에 도시된 바와 같이, 질병 발병과 관련된 더 많은 유전자가 아바타셉트 단독 또는 프레잘루맙과의 조합보다 ICOSL IgV-Fc에 의해 유의하게 하향조절되었다. IL-17A 및 IL-17F의 하향 조절에는 ICOS 억제(ICOSL IgV-Fc 또는 아바타셉트 플러스 프레잘루맙)가 필요하였다. 이 연구에서 ICOSL IgV-Fc 대 비교군에 의한 유의한 유전자 감소 및/또는 조절이 Th17 관련 이펙터 분자(도 22B), 공동자극 분자(도 22C) 및 염증성 TH1 또는 TH2 관련 이펙터 분자(도 22B)에 대해 관찰되었다(도 22D).

[0893] **B. TH17-스큐(Skewed) 활성**

[0894] [0537] ICOSL IgV-Fc에 의한 Th17-스큐 세포의 억제를 추가로 평가하고 CD28 또는 ICOS 단독 억제제와 비교하였다. 인간 PBMC를, 스큐가 없는 조건(K562/OKT3/CD80 + CD86 + IL-2) 또는 Th17 스큐(K562/OKT3/ICOSL + Th17 스큐 배지(Cat#CDK003, R&D System))를 제외하고 대체로 전술한 바와 같이, aAPC로 1차 자극하고, 그런 다음 사이토카인을 다시 공급하고 약 10-14일 동안 휴지시켰다. 이어서 휴지된 세포를, 3,200pM 변이체 ICOSL IgV-Fc 또는 비교 단백질이 있는 10,000개의 동이계종 LPS 활성화 단핵구 유래 수지상 세포와 함께 최대 100,000개의 T 세포를 사용하여 혼합 림프구 반응(MLR)에서 2차 자극하였다.

[0895] [0538] 자극 후 4일째에, (도 23A)에 나타낸 바와 같이 ICOS 또는 CD28 발현에 대해 유세포 분석에 의해 세포를 분석하였고, 이는 다음 재자극을 포함하여 TH17-스큐 세포에서 변경된 CD28 및 ICOS 발현을 나타낸다. T 세포 증식(도 23B) 및 IL-17A 사이토카인 분비의 평가를 자극된 세포에서 ELISA(도 23C)로 측정한 결과, 변이체 ICOSL IgV-Fc가 CD218 또는 ICOS 단독 억제제에 비해 TH17-왜곡된 세포의 더 큰 억제를 나타냄을 보여주었다.

[0896] **C. 콜라겐 유도 관절염(CIA)의 생체내 모델**

[0897] [0539] 제0일과 제18일에 프로인트 아쥬반트 중 소의 콜라겐으로 수컷 DBA/1 마우스를 면역화시킨 콜라겐-유도 관절염(CIA) 모델에서, 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의 효과를 투여 후 아바타셉트와 생체내에서 비교하였다. 제18일에 콜라겐 부스트 시점 또는 이후에 시작하는 변이체 ICOSL IgV-Fc의 투여는 마우스 CIA 모델(발 염증, 혈청 사이토카인 및 항-콜라겐 항체 포함)에서 일관되게 유의한 질병 감소를 초래했으며, 아바타셉트의 활성과 맷칭도거나 이를 초과하였다.

[0898] [0540] 유사한 연구에서, 마우스를 비히클(둘베코의 인산염 완충 식염수/DPBS), Fc 대조군, 아바타셉트(Orencia™), 또는 예시적 변이체 ICOSL IgV-Fc 또는 반치료 요법의 아바타셉트로 총 5회 용량(Q3Dx5)에 대해 3일마다 복강내(IP) 처리하였다(제18일에 콜라겐 부스트 투여 전 시작). PBS 및 Fc 단독을 대조군으로 사용하였다. ICOSL IgV-Fc의 투여는 발 염증 및 구조적 손상을 유의하게 감소시켰다(도 24A). 탈회된 발의 톨루이딘 블루 염색은 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc로 처리될 때 염증, 판누스, 연골 손상 및 골 흡수의 부재를 입증하였다(도 24B). 구체적으로, PBS 처리 동물(상단, 왼쪽 패널)에서는, 염색 결과, 관절 구조의 전체인 파괴 또는 거의 완전한 파괴와 함께 심한 부종, 그리고 심각한 확산 염증 침윤을 보여주었으며, 관절 구조의 파괴와 함께 다초점

연골세포 손실 및 피질골의 전체 두께 결함이 나타났다. Fc 대조군 처리 동물(상단, 우측 패널)에서, 염색은 심한 부종과 함께 관절 구조의 광범위한 파괴, 현저한 연골 세포 손실 및 피질 표면의 왜곡과 함께 피질골의 전체 두께 결함과 함께 심한 확산 염증 침윤을 보여주었다. 아바타셉트-처리 동물(하단, 왼쪽 패널)에서, 염색은 관절 구조의 현저한 파괴와 함께 중등도에서 중증 염증 침윤, 구조의 최소 내지 경미한 파괴 및 골 흡수의 일부 영역을 보여주었다. 변이체 ICOSL IgV-Fc(하단, 우측 패널)로 처리된 동물에서, 염색은 염증, 판누스, 연골 손상 또는 골 흡수의 부재를 나타내었다.

[0899] [0541] 슬와 LN을 수확하고 단일 세포 현탁액으로 처리한 다음 T_{FH} 세포(CD3, CD4, CXCR5 및 PD-1); 배 중심(GC) B-세포(CD19, GL-7, CD95)를 비롯한 다양한 마커에 대해 표면 염색하였다. 세포내 사이토카인 염색을 위해, 세포들을 Golgi Stop 및 Golgi Plug의 존재 하에 PMA/Ionomycin으로 5시간 동안 자극하였다. 그런 다음 세포를 CD3, CD4에 대해 표면 염색하고, 고정하고, 투과화하고, IFN-감마 또는 IL-17A에 대해 염색하고, 유세포 분석에 의해 분석하였다. 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의 투여는 CD4+ 또는 전체 살아있는 세포의 퍼센트로 측정한 바와 같이 사이토카인의 수를 유의하게 감소시켰다(도 24C). 총 항-마우스 유형 II 콜라겐 IgG 항체의 농도는 ELISA(Chondrex, Cat#2036T)에 의해 측정된 바와 같이 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc로 면역화된 마우스의 혈청에서 유의하게 감소하였다(도 24D).

[0900] [0542] Fc 대조군, 아바타셉트 또는 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc 처리된 마우스로부터 비히클(DPBS)로 처리된 마우스에 비해 사이토카인의 억제율을 다음 식을 사용하여 개별 마우스에 대해 결정하였다: ((Ave DPBS - Exp 동물)/Ave DPBS))*100. 혈청에 존재하는 사이토카인의 수는 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc로 면역화된 마우스에서 유의하게 감소하였다(도 24E).

[0901] [0543] 이들 결과는 시험된 변이체 ICOSL IgV-Fc와 같은 이중 CD28/ICOS 길항제의 면역억제 활성이 시험관내 인간 및/또는 생체내 마우스 번역 연구에서, 인간에서 개별적으로 또는 조합하여 투여된 CD28 또는 ICOS 공동자극 경로 억제제보다 우수하다는 관찰과 일치하고, 류마티스, 건선 및 소아 특발성 관절염을 포함한 염증성 질환 치료에 있어서의 이들의 용도를 뒷받침한다.

[0902] **실시예 21**

[0903] **건강한 대상체에서 변이체 ICOSL-IgV Fc의 투여**

[0904] [0544] 건강한 성인 대상체에게, 불활성 Fc (예컨대 SEQ ID NO:42에 제시된 바와 같이, 인간 IgG1 Fc에서 돌연변이 L234A, L235E 및 G237A를 함유함)에 융합되고, SEQ ID NO: 36에 제시된 N52H/N57Y/Q100R을 함유하는 예시적인 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질을 투여하였다. 단일 상승용량 연구(SAD) 및 다중상승 용량(MAD) 연구가 모두 수행되었다. 안전성, 내약성, 약동학(PK) 및 약력학(PD)에 대해 분석하였다

[0905] *A. 단일상승 용량 연구(SAD)*

[0906] [0545] 대상체(n=72)를 10개의 정맥내(IV) 코호트 및 2개의 피하(SC) 코호트로 나누었다. IV 코호트의 피험자들에게 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 단일 용량으로 투여하고(1 μg/kg, 3 μg/kg, 6 μg/kg, 12 μg/kg, 30 μg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 또는 10 mg/kg으로 투여됨)) 또는 위약을 제1일에 단일일 정맥내 주입하고 추가 28일 동안 모니터링하였다. SC 코호트의 대상체에게는 제1일에 단일 용량 융합 단백질 (1 mg/kg 또는 3 mg/kg) 또는 위약을 피하 주사로 투여하고 추가 28일 동안 모니터링하였다.

[0907] [0546] ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 PK는 28일에 걸쳐 다양한 시점에서 혈청 내 변이체 ICOSL vIgD-Fc의 농도를 모니터링함으로써 모든 코호트에서 평가되었다. 혈청 내 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 농도는 포획된 항원을 검출하기 위해 항-인간 ICOSL 포획 항체 및 마우스 항-인간 IgG-HRP 항체 접합체를 사용하여 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA)에 의해 측정하였다. 모든 용량 코호트에 대해, 예시적인 융합 단백질의 평균 농도를 각 시점에서 결정하고 시간 경과에 따라 플롯팅하였다(IV 코호트는 도 25A에 도시됨; 모든 코호트는 도 33에 도시됨). 평균 추정 반감기는 10 mg/kg에서 4.3일-8.6일이었고, SC 생체이용률은 3 mg/kg에서 ~60%였다.

[0908] [0547] CD4+ 표적 포화도 역시도 28일에 걸쳐 모든 코호트에서 평가하였다

[0909] [0548] 일련의 전혈 샘플(1mL)을 투여전, 그리고 투여 종료 후 10분, 2시간, 24시간(1일), 3, 7, 14, 21 및 28일에 수집하였다. 전혈 샘플을 용해시키고 세포 펠릿을 3개의 분취물로 나누었다. 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의 포화 농도(400ng/mL)를 분취액 중 하나에 첨가한 후 인간 Fc 블록과 함께 인큐베이션하여 비특이적 결합을 감소시켰다. 순환 림프구의 표적 결합 및 하위 집단은 유세포 계측법을 사용하여 정량화하였다.

[0910] [0549] 표적 포화도의 계산을 위해, 항-인간 IgG(vs. FMO 대조군)에 대해 양성으로 염색된 CD4+ 세포의 중앙 형광 강도(MFI)가 보고되었다. 목표 포화도는 다음 공식을 사용하여 구하였다:

[0911] $$\%\ Target\ Saturation = \left(\frac{MFI_{test\ sample}}{MFI_{\ saturated\ sample}}\right) \times 100\%$$

.

[0912] [0550] 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc를 투여받은 모든 대상체에서, 각 혈액 샘플의 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포에 대한 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의 표적 포화도는 SAD 용량 그룹에 걸쳐 일관되게 유사하였다.

[0913] [00551] CD4+ 세포에 대한 변이체 ICOSL vIgD-Fc의 결합은 세포를 항-CD4 항체 및 항-인간 IgG Fc 항체로 공동 염색함으로써 검출하였다(IV 코호트는 도 25B에 도시됨; 모든 SAD 코호트는 도 34에 도시됨)

[0914] [0552] 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의 단일 IV 용량 투여 후, CD4+ T 세포에서 변이체 ICOSL IgV-Fc의 표적 포화도는 주입 말기에 정점에 이르렀다. 평균 최대 목표 포화도는 0.001mg/kg에서 22.9%로부터 0.1mg/kg에서 99.2%로 증가하였다.

[0915] [0553] 높은 표적 포화도의 평균 지속 기간(>95%)은 용량 의존적 방식으로 0.03 mg/kg에서 1.39일에서 10 mg/kg에서 적어도 28일까지 증가하였다. 28일 후, 평균 표적 포화도는 1mg/kg 미만의 용량에서 낮았고(< 10%) 1mg/kg에서 58.1%로부터 10mg/kg에서 99.4%의 범위였다.

[0916] [0554] 1 mg/kg 및 3 mg/kg 피하 용량 투여 후, 높은 표적 포화도(> 95%)에 도달하는 평균 시간은 각각 1일 및 0.083일이었다. 높은 목표 포화도(> 95%)는 평균 14.7일 및 적어도 28일 동안 유지되었으며, 투여 후 28일의 평균 목표 포화도는 각각 1 mg/kg 및 3mg/kg에 대해 35.8% 및 97.7%로 계산되었다.

[0917] [0555] 이들 결과는 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 IV 주입이 지속적으로 높은 수준의 표적 포화를 달성했음을 보여주었다.

[0918] [0556] 건강한 대상체에서 용량 의존적 면역조절을 발휘하는 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 능력을 평가하였다. 피험자의 체액 반응을 측정하기 위해 연구 1일차(IV 코호트) 또는 2일차(SC 코호트)에 강력한 면역 자극제인 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH) 1mg을 피하(SC)주사하였다. 항체 반응은 KLH 노출 전후에 혈청 내 항-KLH IgG 및 IgM 항체의 비율을 측정하여 평가하였다. 항-KLH 항체를 검출하기 위한 혈액 샘플을 투여 전, 투여 후 14, 21 및 28일에 수집하였다. IgG 및 IgM 항체의 혈청 수준은 항-KLH 항체를 포획하기 위한 KLH 및 IgG 또는 IgM에 특이적인 HRP-접합 이차 항체를 사용하여 ELISA에 의해 정량적으로 측정되었다. 항-KLH IgG 및 IgM 반응률은 베이스라인 수준보다 2배 이상 높은 항체 농도 증가를 나타내는 대상체의 백분율로 계산되었으며 위약군에서 각각 100% 및 69%였다.

[0919] [0557] 항-KLH IgG 반응률은 위약군보다 변이체 ICOSL vIgD-Fc 처리군에서 더 낮았다. 항-KLH IgM 반응률은 또한 변이체 ICOSL vIgD-Fc 처리군에서 감소하였다. 하기 표 34는 치료에 의한 상승된 항-KLH 항체 반응의 발생률을 나타낸다. 도 35에 도시된 바와 같이, 모든 변이체 ICOSL IgV-Fc 처리군에서 항-KLH IgG 또는 IgM의 변화는 위약군보다 낮았으며, 이는 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc에 의한 항원-특이적 항체 반응의 억제를 나타낸다.

[0920] [0558] 표 34: SAD 치료에 의한 상승된 항-KLH 항체 반응(베이스라인의 >2배)의 발생률.

[0921]

처리 (전체 N)	임의의 시점에 항-KLG IgG 상승	임의의 시점에 항-KLG IgM 상승
위약 (N=16)	16 (100%)	11 (69%)
1 mg/kg (N=4)	2 (50%)	2 (50%)
3 mg/kg (N=4)	1 (25%)	1 (25%)
10 mg/kg (N=4)	0 (0%)	1 (25%)
1 mg/kg, SC (N=4)	1 (25%)	0 (0%)
3 mg/kg, SC (N=4)	1 (25%)	1 (25%)

[0922] [0559] 이들 결과는 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질이 IV 및 SC 코호트에서 1 mg/kg, 3 mg/kg, 및 10 mg/kg의 용량에서 KLH에 대한 항체 반응을 억제할 수 있음을 보여주었다(IV 코호트가 도 26A에 도시됨).

[0923] [0560] 대상체의 항원-의존성 T 세포 반응을 측정하기 위해 별도의 검정을 수행하였다.

[0924] [0561] 생체외 *스타필로코커스 내독소* B 자극을 위한 일련의 전혈 샘플을 투여 전 및 투여 종료 후 2시간, 24시간(1일), 3, 7, 14 및 28일에 수집하였다. 피험자의 T 세포를 생체외에서 배양하고 스타필로코커스 내독소 B(SEB)에 노출 및 예시적인 융합 단백질로 처리한지 3일 후에 세포에 의한 IL-2 생산을 측정하였다.

[0925] [0562] 이들 결과는 T 세포에 의한 IL-2 생성이 0.03 mg/kg 이상의 용량에서 융합 단백질에 의해 억제되었음을 나타내었다(도 26B). 베이스라인-조정된 SEB 유도 IL-2는 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc 용량이 증가함에 따라 회복 시간이 증가하면서, 투여 후 2시간만큼 일찍 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc 처리에 의해 감소되었다. 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc에 의한 억제 기간 및 크기는 용량 의존적이었다. 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc에 의한 IL-2의 최대 억제는 용량이 0.001 mg/kg(-13%)에서 0.03 mg/kg(-49.5%)으로 증가함에 따라 증가했으며 0.03 mg/kg 초과의 용량에서 대략 -50%로 유지되었다. 마찬가지로, 억제 기간(시간 ≤ -25%로 정의됨) 역시도 용량이 0.003 mg/kg에서 1.08일에서 10 mg/kg에서 19.9일로 증가함에 따라 증가하였다. 이러한 결과는 변이체 ICOSL vIgD-Fc가 인간 피험자에게 단일 용량 IV 투여 후 용량 의존적 면역조절을 매개한다는 관찰과 일치한다.

[0926] [0563] 이들 결과는 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질이 최고 10 mg/kg 용량 수준까지를 포함하는 모든 용량 수준에서 대상체에서 잘 관용됨을 보여주었다. 3등급 또는 4등급 부작용은 발생하지 않았다. 또한 이 연구에서는 용량과 관련된 실험실 변화, 주입 반응, 사이토카인 방출 증후군(CRS) 또는 아나필락시스가 관찰되지 않았다.

[0927] [0564] 이들 결과는 예시적인 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질이 건강한 대상에서 잘 관용되고, 용량 의존적 면역조절 활성을 나타내며, 시험된 용량에서 CRS 또는 면역원성을 초래하지 않는다는 관찰과 일치한다.

[0928] **B. 다중상승 용량 연구(MAD)**

[0929] [0565] MAD 연구는 2개의 반복된 매주 IV 용량 코호트(0.3 또는 1mg/kg Q1W, 총 4 용량) 및 1개의 격주로 반복되는 IV 용량 코호트(1mg/kg Q2W, 총 2 용량)를 포함하였다. 총 24명의 피험자(용량 코호트당 8명의 피험자)를 무작위화하여 6:2 비율로 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc 또는 위약을 투여하였다.

[0930] [0566] 대상체를 49일(MAD) 동안 추적하여 안전성, PK, T 세포에 대한 표적 포화도, 순환 사이토카인 및 PD를 평가했으며, 후자는 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH)에 대한 IgG 반응의 억제를 기반으로 하였다.

[0931] [0567] ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 PK는 28일 또는 49일에 걸쳐 다양한 시점에서 혈청 내 변이체 ICOSL vIgD-Fc의 농도를 모니터링함으로써 모든 MAD 코호트에서 평가되었다. 혈청 내 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 농도는 포획된 항원을 검출하기 위해 항-인간 ICOSL 포획 항체 및 마우스 항-인간 IgG-HRP 항체 접합체를 사용하여 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA)에 의해 측정하였다. 도 36은 각 MAD 코호트의 약력학을 보여준다. 반복적인 IV 투여로 최소에서 중간 정도의 축적이 관찰되었다.

[0932] [0568] 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의 표적 포화도를 평가하기 위해, 순환하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포에 대한 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의 양을 SAD 연구에 대해 전술한 바와 같이 구하였으나, 단, 일련의 전혈 샘플(1mL)은 투여전 및 각 용량의 주입 종료 후 4시간, 24시간(1일), 2일 후에, 7 및 28 일 Q1W 코호트는 4차 용량 주입 종료 후 7일 및 28일에, 그리고 Q2W 코호트의 경우 2차 용량의 주입 종료 후 8, 9, 14 및 35일 후에 수집하였다.

[0933] [0569] 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc를 받은 모든 대상체에서, CD4+ T 세포 및 각 혈액 샘플의 CD8+ T 세포에 대한 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의 표적 포화는 용량 그룹에 걸쳐 일관되게 유사하였다. 도 37은 시간 경과에 따른 CD4+ T 세포의 표적 포화도를 요약한 것이다.

[0934] [0570] 0.3 및 1 mg/kg으로 4회(Q1W, 4주 동안) 정맥내 용량 투여 또는 1mg/kg으로 2회(Q2W, 4주 동안) 투여 후, 높은 표적 포화도(>95%)가 용량 투여 후에 달성되었고 일반적으로 26.8일 내지 39일 동안 유지합되었다. 마지막 예정된 시점(1차 투여 후 49일)에서 평균 목표 포화도는 0.3 mg/kg Q1W, 1 mg/kg Q2W, 및 1 mg/kg Q1W의 경우 각각 19.5, 26.6, 및 91.7%로 감소하였다.

[0935] [0571] 이들 결과는 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 다중 IV 주입이 지속적으로 높은 수준의 표적 포화도를 달성함을 나타낸다.

[0936] [0572] 다중 용량의 융합 단백질을 받은 건강한 대상체에서 용량 의존적 면역조절을 발휘하는 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 능력을 평가하였다.

[0937] [0573] 모든 MAD 코호트는 제1일에 변이체 ICOSL IgV-Fc 또는 위약 투여 후 2시간 이내에 1 mg 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH)을 피하 투여받았다. 항-KLH 항체에 대한 혈액 샘플은 투여 전, 그리고 1차 투여로부터 21일, 28일 및 49일 후에 수집하였다.

[0938] [0574] 도 38에 도시된 바와 같이, 모든 변이체 ICOSL IgV-Fc 처리군에서 항-KLH IgG 또는 IgM의 변화는 위약군보다 낮았으며, 이는 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc에 의한 항원-특이적 항체 반응의 억제를 나타낸다. 하기

표 35는 치료에 의한 상승된 항-KLH 항체 반응의 발생률을 나타낸다.

[0939] [0575] 표 35: MAD 치료에 의한 상승된 항-KLH 항체 반응(기준선의 >2배)의 발생률.

처리 (전체 N)	임의의 시점에 항-KLG IgG 상승	임의의 시점에 항-KLG IgM 상승
0.3 mg/kg, Q1W (N=5)	4 (75%)	1 (20%)
1 mg/kg, Q1W (N=4)	2 (50%)	1 (25%)
1 mg/kg, Q2W (N=5)	1 (20%)	3 (60%)

[0940] 참고: 4마리의 대상체 (0.3 mg/kg Q1W 1마리, 1 mg/kg Q1W 2마리, 1 mg/kg Q2W 1마리)은 전체 계획된 투여량을 투여받지 못하여 제외

[0941] [0576] 이들 결과는 다중 용량의 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질이 KLH에 대한 항체 반응을 억제할 수 있음을 나타내었다.

[0942] [0577] MAD 코호트에서 항원-의존성 T 세포 반응을 측정하기 위한 검정을 수행하였다.

[0943] [0578] 생체외 *스타필로코커스 내독소* B(SEB) 자극을 위한 일련의 전혈 샘플을 각각 투여 전(0, 7, 14, 21일), 1차 및 4차 투여로부터 2일 후(3일 및 23일), 28일 및 49일 후에 수집하였다. 생체외에서 배양하고 세포에 의한 IL-2 생산을 *스타필로코커스 내독소* B(SEB)에 노출시키고 예시적인 융합 단백질로 처리한 후 대상체의 T 세포를 3일 동안 측정하였다.

[0944] [0579] 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의 4주간 투여 후, 억제 지속 기간은 0.3 mg/kg에서 25.1일에서 1 mg/kg에서 44.5일로 증가하였다. 이러한 결과는 변이체 ICOSL vIgD-Fc가 인간 피험자에 대한 다중 IV 투여 후 용량 의존적 면역조절을 매개한다는 관찰과 일치한다.

[0945] [0580] 종합적으로, 이들 결과는 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc 융합 단백질이 건강한 대상체에서 잘 관용되고, 용량 의존적 면역조절 활성을 나타내며, 다중 용량으로 투여될 때 CRS 또는 면역원성을 초래하지 않는다는 관찰과 일치한다.

[0946] **실시예 22**

[0947] [0581] **스테로이드-내성 또는 스테로이드-불응성 급성 이식편 대 숙주 질환(aGVHD)이 있는 대상체에서 변이체 ICOSL-IgV Fc의 투여**

[0948] [0582] 마운트 시나이 급성 GVHD 국제 컨소시엄(MAGIC) 기준(Harris et al. 2016)에 따라, 예를 들어 코르티코스테로이드(예컨대 글루코코르티코이드) 또는 사이클로스포린과 같은 면역억제제에 대해 내성 또는 불응성인 등급 II-IV aGVHD로 동종이계 줄기 세포 이식(예컨대 첫 번째 동종 줄기 세포 이식)을 받는 성인에게, 불활성 Fc(예컨대 SEQ ID NO:42에 제시된 바와 같이, 인간 IgG1 Fc에서 돌연변이 L234A, L235E 및 G237A를 함유함)에 융합되고 SEQ ID NO: 36에 제시된 바와 같은 N52H/N57Y/Q100R을 갖는 변이체 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질을, 구제 요법과 조합하여, 단일 정맥 용량으로 투여한다. 투여는 용량 증량 및 용량 확장을 포함하여 두 부분으로 수행되는 임상 연구의 일부이다. 용량 증량은 가속 적정 설계를 사용하여 진행된다. 피험자에게 다음 용량 중 하나를 단일 정맥내 주입하고 용량 증량 연구의 일환으로 평가한다: 1 μg/kg, 10 μg/kg, 30 μg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 6 mg/kg, 10 mg/kg, 및 20 mg/kg. 그 후, 선택된 용량 수준(들)을 10명의 대상체의 확장 코호트에서 평가한다; ≥ 25%(n=3) 피험자가 반응을 달성하면 15명의 추가 피험자가 등록된다(Simon 2단계 설계). 일부 경우에, 피험자는 예방을 위해 투여된 요법을 계속할 수 있고, 글루코코르티코이드를 계속 또는 증가시키거나 및/또는 다른 구제 요법을 추가할 수 있다. 반응자에 대해서는 글루코코르티코이드 테이퍼를 고려한다.

[0949] [0583] 전술한 투여 프로토콜은 비임상 데이터로부터 예측된 인간 PK 프로파일 및 CD28 표적 포화도, 및 NOAEL 독성 연구에 기초한 예측된 인간 노출에 대한 안전 한계를 기반으로 한다.

[0950] [0584] 추가 투여 프로토콜은 실시예 21에 기재된 바와 같이 건강한 인간 대상체에서의 연구를 기반으로 설계되었다. 0.3 mg/kg의 시작 용량은 단일 또는 다중 투여 후 관찰된 임상 안전성 데이터, PK 및 표적 포화도에 기반할 때 실행 가능한 것으로 간주된다. 실시예 21의 연구에서 건강한 피험자의 IV 용량. 용량 증량은 가속 적정 설계를 사용하여 위에서 설명한 대로 진행된다. 피험자에게 다음 용량 중 하나 또는 다음 용량 중 임의의 용량들 간의 중간 용량(최대 20 mg/kg)을 단일 정맥내 주입하고 용량 증량 연구의 일환으로 평가한다: 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 및 20 mg/kg. 그 후, 선택된 용량 수준(들)을 10명의 대상체의 확장 코호트에서 평가한다; ≥ 25%(n=3) 피험자가 반응을 달성하면 15명의 추가 피험자가 등록된다(Simon 2단계

설계). 일부 경우에, 피험자는 예방을 위해 투여된 요법을 계속할 수 있고, 글루코코르티코이드를 계속 또는 증가시키거나 및/또는 다른 구제 요법을 추가할 수 있다. 반응자에 대해서는 글루코코르티코이드 테이퍼를 고려한다.

[0951] [0585] 안전성은 유해 사례의 발생률, 중증도 및 심각성을 기준으로 28일에 걸쳐 평가된다. 객관적 반응률, 반응 기간, 무재발 생존, 무 실패 생존, 무사건 생존, 비재발 사망률, 악성 재발/진행, 전체 생존 및 글루코코르티코이드 사용을 포함하여 종점에 대해 효능이 평가된다.

[0952] [0586] 항-약물 항체의 발생률 및 역가를 평가한다. 변이체 ICOSL vIgD-Fc의 혈청 농도를 측정하고 약동학(PK) 매개변수를 추정한다. 약력학(PD) 종점이 평가되며, 순환 백혈구의 표적 포화도 및 면역표현형을 포함하며 순환 사이토카인, 면역글로불린, 활성화기 반응물 및 표적 경로 수용체의 가용성 형태의 정량화, 순환 백혈구에서 mRNA 발현의 변화 평가, 위험 대립 유전자 평가 및 반응 상관 관계가 포함될 수 있다.

[0953] **실시예 23**

[0954] **환자 유래 PBMC를 통한 변이체 ICOSL-IgV Fc의 시험관내 평가**

[0955] [0587] 불활성 Fc (예컨대 SEQ ID NO:42에 제시된 바와 같이, 인간 IgG1 Fc에서 돌연변이 L234A, L235E 및 G237A를 함유함)에 융합되고 변이체 ICOSL IgV (N52H/ N57Y/Q100R; SEQ ID NO: 36)를 함유하는 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc를, 사이토카인 방출에 대한 효과에 대해 평가하였다.

[0956] [0588] 크론병(CD) 또는 궤양성 대장염(UC) 환자로부터 단리된 PBMC를, 100 nM의 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc, 단일 경로 길항제 프레잘루맙 또는 아바타셉트, 또는 프레잘루맙 또는 아바타셉트 양자 모두의 조합의 존재하에, 인공 항원 제시 세포(세포 표면 항-CD3 (OKT3), CD80, CD86, 및 ICOSL을 발현하는 K562 세포)로 20:1의 비율로 자극시켰다. 48시간 후에 상청액을 수집하고 사이토카인 농도를 도 27A에 도시된 바와 같이 분석하였다. 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc로 처리된 환자 세포로부터의 TNF-알파, IFNɣ, IL-6 및 IL-12p70 방출은 단일 경로 길항제, 둘 모두의 조합 또는 Fc 대조군 항체로 처리된 세포와 비교하여 하향조절되었다.

[0957] [0589] 하기 공식을 사용하여 사이토카인 방출 억제율을 Fc 대조군 처리에 대해 계산하였다: ((Fc 대조군 값 - 실험값)/Fc 대조군 값))*100. 도 27B에 도시된 바와 같이. 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc는 아바타셉트 또는 프레잘루맙으로 치료한 후 관찰된 것보다 더 큰 사이토카인 억제를 나타내었다.

[0958] **실시예 24**

[0959] **T 세포 유도된 변이체 ICOSL-IgV Fc의 다중 투여 평가**

[0960] **대장염의 마우스 모델**

[0961] [0590] 불활성 Fc (예컨대 SEQ ID NO:42에 제시된 바와 같이, 인간 IgG1 Fc에서 돌연변이 L234A, L235E 및 G237A를 함유함)에 융합되고 변이체 ICOSL IgV (N52H/ N57Y/Q100R; SEQ ID NO: 36)를 함유하는 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의, CD4+CD45RBhigh T 세포 유도된 대장염 쥐 모델에서의 질병 진행 및 중증도에 대한 에 대한 효과에 대해 평가하였다.

[0962] [0591] 수컷 BALB/C 공여자 마우스로부터 얻은 비장 세포 현탁액으로부터 음성 선택에 의해 CD4+CD45RBhigh 공여자 세포를 농축하였다. 제0일에 CD4+CD45RBhigh Treg가 고갈된 공여자 세포 또는 CD4+ 세포 30만 개를 면역결핍 C.B17(SCID) 수컷 마우스에 정맥 주사하여 각각 대장염을 유도하거나 대조군으로 사용하였다. 마우스를 6개의 처리 그룹으로 나누고 표 32에 나타낸 바와 같이 0일째 및/또는 연구 전반에 걸쳐 예시적인 변이체 ICOSL-IgV Fc, Fc 단독, 또는 비히클 대조군으로 처리하였다.

표 32: 치료 요법

그룹	# 마우스	주입된 세포	처리	투여	경로	빈도
1	12	CD4+	비히클	-	0.1 mL, i.p.	주 2 회 (제 0-41 일)
2	16	CD4+CD45RBhigh	Fc 대조군	260 μg	0.1 mL, i.p.	주 2 회 (제 0-41 일)
3	12	CD4+CD45RBhigh	변이체 ICOSL IgV-Fc	400 μg	0.1 mL, i.p.	주 2 회 (제 0-41 일)
4	12	CD4+CD45RBhigh	변이체 ICOSL IgV-Fc	400 μg	0.1 mL, i.p.	주 1 회 (제 0 일)
5	12	CD4+CD45RBhigh	변이체 ICOSL IgV-Fc	400 μg	0.1 mL, i.p.	주 1 회 (제 14 일)
6	12	CD4+CD45RBhigh	변이체 ICOSL IgV-Fc	400 μg	0.1 mL, i.p.	주 2 회 (제 14-41 일)

[0963]

[0964] [0592] 체중 및 대변 점수 측정은 0일째부터 매일 수행되었다. 제13일, 제20일 및 제27일에 분석을 위해 혈액을 수집하였다. 연구가 제42일 또는 제43일에 종료된 후, 세포 측정 분석, 길이 및 무게 측정, 조직학적 분석을 위해 장간막 림프절, 결장 및 소장을 수집하였다. 결장의 원위 1/3은 혈청에서 취한 사이토카인 측정과 함께 보완적으로 사이토카인 분비를 평가하기 위해 생체외 배양으로 유지시켰다. 질병 활성 지수(DAI)는 실시예 16에서 이전에 기술된 바와 같이 체중 및 대변 점수(체중 점수 + 대변 점수)로부터 계산되었다. Fc 대조군과 함께 예시적인 변이체 ICOSL-IgV Fc 처리된 그룹의 DAI의 통계적 분석을 평가하였다 양방향 ANOVA를 사용한다.

[0965] [0593] 체중, 대변 점수 및 DAI 결과의 변화를 도 59에 나타내었다. 도 28A에 도시된 바와 같이, 제0일 또는 제14일에 단일 용량을 사용한 치료를 포함하는 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc(N52H/N57Y/Q100R) 치료에서 전반적인 DAI 뿐만 아니라 체중 및 대변 점수의 개선이 관찰되었다.

[0966] [0594] 도 28B는 T 세포 수에 대한 유세포 분석 결과를 나타낸다. 도시된 바와 같이, 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc를 사용한 치료는 또한 혈액 및 장간막 림프절 양자 모두에서 이펙터 기억 T 세포(Tem)의 억제에 기여하는 것으로 나타났다.

[0967] [0595] 전염증성 사이토카인인 TNFα, IL-6, IFNɣ 및 IL-12p70의 혈청 농도 감소 역시도 예시적인 변이체 ICOSL-IgV-Fc로 처리한 후에 관찰되었다(도 28C).

[0968] [0596] 결장의 거시적 및 미시적 평가는 각각 28D 및 도 28E-28에서 볼 수 있다. 도 28D에 도시된 바와 같이, 분석 결과, 모든 치료적 치료 조건은 감소된 체중:길이 비율을 나타내었고 Fc 대조군 치료군과 비교하여 더 낮은 결합 조직학적 점수를 갖는 것으로 나타내었다. 조직학적 분석은 대장염을 감소시키는 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의 효능을 확인시켜 주었다. 변이체 ICOSL IgV-Fc의 반복 투여량으로 처리된 마우스의 조직학적 분석이 도 28E의 2개의 우측 패널에 도시되어 있으며, 비히클 단독, 결장염 치료되지 않은 그룹(상부 좌측 패널) 또는 Fc 대조군 처리된 그룹(하부 좌측 패널)과 비교 도시되어 있다. 제0일부터 연구 종료까지 반복 투여로 처리된 마우스는 병리학적 결장 소견이 없었고(상부 우측 패널), 14일부터 연구 종료까지 지연된 반복 투여로 처리된 4/12 마우스는 대장염의 징후가 없었다(하부 우측 패널). 도 28F는 도 28E의 조직학적 이미지의 고배율 조직학적 이미지를 보여준다. 치료군의 마우스들은 어느 것도 염증에 의해 영향을 받는 결장의 근육층을 갖고 있지 않았다. 이러한 결과는 변이체 ICOSL IgV-Fc가 지연된 반복 용량으로 투여되어도 대장염의 발병을 완전히 예방한다는 발견과 일치한다. 제0일 또는 제14일에 단일 용량 변이체 ICOSL IgV-Fc로 처리된 마우스 역시도 Fc 대조군 처리된 마우스보다 더 약한 대장염을 나타냈다.

[0969] [0597] 이들 데이터는 대장염과 같은 염증성 장 장애의 치료를 위한 치료 후보로서의 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc를 뒷받침한다.

[0970] **실시예 25**

[0971] **실험적 자가면역 포도막염에서 변이체 ICOSL-IgV Fc의 유리체내 투여 평가**

[0972] [0598] 불활성 Fc (예컨대 SEQ ID NO:42에 제시된 바와 같이, 인간 IgG1 Fc에서 돌연변이 L234A, L235E 및 G237A를 함유함)에 융합되고 변이체 ICOSL IgV (N52H/ N57Y/Q100R; SEQ ID NO: 36)를 함유하는 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc의, 실험적 자가면역 포도막염(EAU)에 대한 유리체내 주사 효과를 평가하였다.

[0973] [0599] 20마리의 암컷 루이스 래트를 각각 4마리의 동물로 이루어진 5개의 처리군으로 나누었다. 라운드당 처리

당 2마리의 동물을 사용하여 2회의 실험 라운드를 수행하였다. 제0일에 200μl 완전 프로인트 보조제(각 엉덩이에 100μl) 중 30μg의 소 광수용체 간 레티노이드 결합 단백질(IRBP) 펩타이드 R16을 피하 주사하여 EAU를 모든 동물에서 유도시켰다. 그룹 1-4의 동물(그룹당 n = 4마리, 총 n = 16)에 PBS, Fc 대조군, 스테로이드 또는 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc를 10일 및 12일에 오른쪽 유리체로 안내 주사하여 처리하였다. 동물 그룹 5(n = 4)에서 8일 및 10일에 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc로 처리하였다. 치료 요법은 표 33에 요약되어 있다.

표 33: 치료 요법

그룹	처리	투여	경로	빈도
1	비히클	1x PBS	3-3.5 μL, 유리체내 주사	2 회 (제 10/12 일)
2	Fc 대조군 (SEQ ID NO: 42)	40 μg	3-3.5 μL, 유리체내 주사	2 회 (제 10/12 일)
3	트리암시놀론 아세토니드 (스테로이드)	120 μg	3-3.5 μL, 유리체내 주사	2 회 (제 10/12 일)
4	변이체 ICOSL IgV-Fc (SEQ ID NO: 36)	80 μg	3-3.5 μL, 유리체내 주사	2 회 (제 10/12 일)
5	변이체 ICOSL IgV-Fc (SEQ ID NO: 36)	80 μg	3-3.5 μL, 유리체내 주사	2 회 (일 s 8/10)

[0974]

[0975] [0600] 마취 하에 주사를 수행하였다(i.p. 케타민/자일라진 및 국소 테트라카인). 5% 베타딘으로 눈을 세척하고 2.5% 페닐에프린으로 동공을 확장시켰다. 주사는 유리 바늘과 해부 현미경을 사용하여 직접 시각화 하에 수행되었다. 연구 화합물의 유리체내 배치를 각 주사에 대해 확인하였다.

[0976] [0601] 베이스라인 및 마취제가 투여된 모든 날에 동물의 체중을 칭량하였다. 제0, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 및 14일에 마스킹되지 않는 양쪽 눈의 임상 점수를 얻었다. 점수는 확립된 점수 시스템(Agarwal and Caspi, 2004)을 사용하여 마취되지 않은 동물을 관찰하여 매겼다. 제7일, 11일 및 14일에 광간섭 단층촬영(OCT) 이미지를 얻었다. 이미지는 치료 및 날짜에 마스크된 그레이더에 의해 점수가 매겨졌다. 점수는 (Pepple and Wang 2016)에서 채택한 이미지 분석 프로토콜을 사용하여 할당되었다. 제14일에 쥐를 안락사시키고 조직학을 위해 눈을 적출하였다. 확립된 점수 시스템(Dick and Forrester, 1994)을 사용하여 눈 및 치료 조건에 마스크된 채점자가 조직학적 섹션(눈당 n = 3)의 점수를 매겼다. 각 처리 그룹에 대해 처리된 눈(오른쪽) 및 처리되지 않은 눈(왼쪽)에 대해 중간 또는 평균 임상 점수(마스킹 또는 비마스킹), 마스크된 OCT 점수 및 조직학 점수를 구하였다.

[0977] [0602] Fc 대조군 치료와 비교하여, 제8일에 시작하는 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc를 사용한 치료는 제10, 11, 12($p<0.05$), 및 13($p< 0.01$)일의 일일 비마스크 임상 점수에 의해, 염증을 유의하게 억제하였다 (도 29A 29E). 8/10일에 변이체 ICOSL IgV-Fc를 사용한 치료는 마지막 투여 후 4일인 최종 시점(14일)을 제외한 모든 날에 임상 점수의 차이에 의해 나타난 바와 같이, 질병 발병을 지연시켰다. 추가로, 마스킹된 OCT에 의해 스코어링된 임상 염증은 제11일($p<0.05$) 및 제14일($p<0.01$) 양일 모두에 Fc 대조군 눈과 비교하여 변이체 ICOSL IgV-Fc 처리된 눈에서 유의하게 더 낮았다(도 30A-30C). 변이체 ICOSL IgV-Fc 처리된 눈에서 염증의 조직학적 점수는 또한 Fc 대조군 처리된 눈보다 유의하게 낮았다($p<0.01$)(도 31).

[0978] [0603] 제10일에 시작하는 변이체 ICOSL IgV-Fc를 사용한 치료는 PBS 및 대조군 치료와 비교할 때 포도막염 점수의 진행을 예방하고 최종 염증 점수를 감소시켰다(도 29A-31). 유리체내 주사 다음날 ICOSL IgV-Fc 10/12 처리된 눈에서 마스킹되지 않은 임상 점수가 감소하였다.

[0979] [0604] 처리되지 않은 동료 눈(왼쪽 눈)에서의 전신 효과 역시도 변이체 ICOSL IgV-Fc 8/10일 및 10/12일 처리된 동물에서 관찰되었다. 유사한 전신 효과가 스테로이드 처리된 동물의 처리되지 않은 동료 눈에서도 관찰되었다(도 29A-29B, 30A 및 31). 8/10일에 변이체 ICOSL IgV-Fc를 사용한 치료는 EAU를 억제하는데 있어서 Fc 대조군보다 더 효과적이었다.

[0980] [0605] 스테로이드 처리된 동물은 제14일에 12.7%의 평균 체중 감소를 나타냈다(도 32). 변이체 ICOSL IgV-Fc 또는 대조군(비히클, Fc 대조군)을 사용한 치료는 체중 감소를 초래하지 않았다(각각 3% 및 2% 평균 체중 증

가).

[0981] [0606] 이중 CD28/ICOS 길항제 변이체 ICOSL IgV-Fc를 사용한 국소 치료는 루이스 래트에서 EAU를 억제하였다. 더욱이, 변이체 ICOSL IgV-Fc의 유리체내 주사는 스테로이드 치료시 나타나는 체중 감소 없이 잘 관용되었다. 이러한 데이터는 포도막염과 같은 염증성 안 질환의 치료를 위한 치료 후보로서 변이체 ICOSL IgV-Fc를 뒷받침한다.

[0982] **실시예 26**

[0983] **SARS-CoV-2 감염(COVID-19) 피험자에서 변이체 ICOSL-IgV Fc의 투여**

[0984] [0607] 확진된 SAR-CoV-2 감염(COVID-19) 및 COVID-19 감염에 기인한 중증 폐렴, 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 패혈증, 또는 패혈성 쇼크가 있는 13세 이상의 대상체에게, 불활성 Fc (예컨대 set forth in SEQ ID NO:42에 제시된 바와 같이, 인간 IgG1 Fc에 L234A, L235E 및 G237A를 함유함)에 융합되고, SEQ ID NO: 36에 제시된 N52H/N57Y/Q100R을 함유하는 변이체 ICOSL vIgD-Fc 융합 단백질의 하나 이상의 정맥 용량을 투여한다. 피험자에게 용량당 최대 10mg/kg의 정맥내 주입(들)을 투여하고 마지막 용량 후 최대 56일 동안 관찰한다.

[0985] [0608] 임상 결과 및 평가에 비제한적인 예로서 다음 항목을 포함하여 기록한다: (1) 7-카테고리 서수 척도에 기초한 상태(7 - 사망, 6 - 입원, ECMO, 침습적 기계 환기 또는 둘 다 필요, 5 - 입원, 비강 고유량 O_2 요법, 비침습적 기계 환기 또는 둘 다 필요); 4 - 산소 공급이 필요한 입원, 3 - 산소 공급이 필요하지 않은 입원, 2 - 입원은 하지 않았지만 정상적인 활동을 재개할 수 없음, 1 - 입원하지 않고 정상 활동을 재개함) (2) 호흡 상태(산소 공급 수준(L/min), PaO_2(산소 분압)/FiO_2(흡기 산소 비율), SaO_2(말초 산소 포화도), 방사선 사진 이상), (3) 전반적인 상태(SOFA(패혈증 관련 장기 부전)에 기초한 점수, NEWS2(국가 조기 경보 점수 2), 혈관 활성제 사용 및/또는 장기-특이적 실험실 이상을 기반으로 평가됨); (4) 예를 들어 혈청 페리틴, 프로칼시토닌, D-다이머, C-반응성 단백질(CRP), 총 백혈구 수, 차등 림프구 수 및 호중구 대 림프구 비율을 포함하는 질병 중증도와 잠재적으로 연관되는 관련된 실험실 값; 및 (5) 예시적인 변이체 ICOSL IgV-Fc 융합 단백질을 사용한 치료와 관련된 심각한 유해 사례. 약동학(PK) 및 약력학(PD)을 평가하기 위한 혈액 샘플은 실용적인 경우 간격을 두고 수집된다. PD는 순환하는 사이토카인 및/또는 SARS-CoV-2에 대한 항체 수준을 포함할 수 있지만 이에 국한되지 않는다.

[0986] [0609] 본 발명은, 예를 들어 본 발명의 다양한 양태를 예시하기 위해 제공되는 특정 개시된 구체예로 범위를 제한하도록 의도되지 않는다. 기재된 조성물 및 방법에 대한 다양한 변형은 본원의 설명 및 교시로부터 명백해질 것이다. 이러한 변형은 본 개시의 진정한 범위 및 정신을 벗어나지 않고 실시될 수 있고 본 개시의 범위 내에 속하는 것으로 의도된다.

[0987]

SEQ ID NO	서열	설명
1	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQNLTV GSQTGNDIGE RDKITENPVS TGEKNAAT	ICOSLG(B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2) ECD
2	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV E	ICOSL WT IgV
3	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SV	IgV 도메인
4	MRLGSPGLLF LLFSSLRADT QEKEVRAMVG SDVELSCACP EGSRFDLNDV YVYWQTSESK TVVTYHIPQN SSLENVDSRY RNRALMSPAG MLRGDFSLRL FNVTPQDEQK FHCLVLSQSL GFQEVLSVEV TLHVAANFSV PVVSAPHSPS QDELTFTCTS INGYPRPNVY WINKTDNSLL DQALQNDTVF LNMRGLYDVV SVLRIARTPS VNIGCCIENV LLQQNLTVGS QTGNDIGERD KITENPVSTG EKNAATWSIL AVLCLLVVVA VAIGWVCRDR CLQHSYAGAW AVSPETELTG HV	ICOSLG(B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2)
5	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQNL	ICOSL WT ECD 절단체 2
6	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQNLTV GSQ	ICOSL WT ECD 절단체 3
7	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQN	ICOSL WT ECD 절단체 4

[0988]

8	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQ	ICOSL WT ECD 절단체 5
9	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLL	ICOSL WT ECD 절단체 6
10	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE N	ICOSL WT ECD 절단체 7
11	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQNLT	ICOSL WT ECD 절단체 8
12	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQAL	ICOSL N207A ECD 절단체 2
13	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQGL	ICOSL N207G ECD 절단체 2
14	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQNG	ICOSL L208G ECD 절단체 2
15	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF	ICOSL N207A ECD 절단체 3

	SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQALTV GSQ	
16	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQGLTV GSQ	ICOSL N207G ECD 절단체 3
17	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQNGTV GSQ	ICOSL L208G ECD 절단체 3
18	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQA	ICOSL N207A ECD 절단체 4
19	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQG	ICOSL N207G ECD 절단체 4
20	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQALT	ICOSL N207A ECD 절단체 8
21	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQGLT	ICOSL N207G ECD 절단체 8
22	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQNGT	ICOSL L208G ECD 절단체 8

[0989]

23	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQAG	ICOSL N207A/L208G ECD 절단체 2
24	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQGG	ICOSL N207G/L208G ECD 절단체 2
25	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQAGTV GSQ	ICOSL N207A/L208G ECD 절단체 3
26	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQGGTV GSQ	ICOSL N207G/L208G ECD 절단체 3
27	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQAGT	ICOSL N207A/L208G ECD 절단체 8
28	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQGGT	ICOSL N207G/L208G ECD 절단체 8
29	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQALTV GSQTGNDIGE RDKITENPVS TGEKNAAT	ICOSL N207A 전체 ECD
30	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ	ICOSL N207G 전체 ECD

[0990]

	SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQGLTV GSQTGNDIGE RDKITENPVS TGEKNAAT	
31	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQNGTV GSQTGNDIGE RDKITENPVS TGEKNAAT	ICOSL L208G 전체 ECD
32	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQAGTV GSQTGNDIGE RDKITENPVS TGEKNAAT	ICOSL N207A/L208G 전체 ECD
33	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQGGTV GSQTGNDIGE RDKITENPVS TGEKNAAT	ICOSL N207G/L208G 전체 ECD
34	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QHSSLEYVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSR SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQNLTV GSQTGNDIGE RDKITENPVS TGEKNAAT	ICOSL v39 ECD
35	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QHSSLEYVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSR SLGFQEVLSV E	ICOSL v39 IgV
36	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QHSSLEYVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSR SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SV	ICOSL v39 IgV
37	EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK	IgG1 Fc

[0991]

[0992]

38	EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G	C220S/E356D/M358L/K447del 를 갖는 Fc
39	EPKSSDKTHT CPPCPAPEAE GAPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G	C220S/L234A/L235E/G237A/K447del 를 갖는 Fc
40	EPKSSDKTHT CPPCPAPEAE GAPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK	C220S/L234A/L235E/G237A 를 갖는 Fc
41	EPKSSDKTHT CPPCPAPEAE GAPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK	Fc 영역
42	EPKSSDKTHT CPPCPAPEAE GAPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G	Fc 영역
43	EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPCEEQ YGSTYRCVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK	Fc (C5S (C220S), R77C, (R292C), N82G (N297G), V87C (V302C))
44	EPKSSDKTHT CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV KHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD	C220S/E233P/L234V/L235A/G236del/S267K 를 갖는 Fc

	IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	
45	VIHVTKEVKE VATLSCGHNV SVEELAQTRI YWQKEKKMVL TMMSGDMNIW PEYKNRTIFD ITNNLSIVIQ ALRPSDEGTY ECVVLKYEKD GFKREHLAEV TLSVKADFPT PSISDFEIPT SNIRRIICSA SGGFPEPHLS WLENGEELNA INTTVSQDPE TELYAVSSKL DFNMTTNHSF MCLIKYGHLR VNQTFNWNTT KQEHFPDN	CD80 v2 ECD
46	EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPCEEQ YGSTYRCVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G	Fc (C5S (C220S), R77C, (R292C), N82G (N297G), V87C (V302C), L232del (K447del))
47	EPKSSDKTHT CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV KHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG	C220S/E233P/L234V/L235A/ G236del/S267K/K447del 를 갖는 Fc
48	EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK	IgG1 Fc C220S
49	TKVDKTVERK CCVECPPCPA PPVAGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTFRV VSVLTVVHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPAPI EKTISKTKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPMLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK	IgG2 Fc
50	ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK	IgG4 Fc
51	ESKYGPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE	IgG4 Fc S228P

[0993]

	YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK	
52	GGGGS	4GS 링커
53	GGGGSGGGGS	IgV-Fc 링커 1
54	GGGGSGGGGS GGGGS	IgV-IgV 링커
55	EAAAK	EAAAK 링커
56	EAAAKEAAAK EAAAK	3x EAAAK 링커
57	EAAAKEAAAK EAAAKEAAAK EAAAK	5x EAAAK 링커
58	GSGGGGS	링커
59	GGGGSGGGGS AAA	IgV-Fc 링커 2
60	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QHSSLEYVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSR SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	변이체 ICOSL IgV-Fc
61	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QHSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSTNGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQNLTV GSQTGNDIGE RDKITENPVS TGEKNAAT	ICOSL v27 ECD
62	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QHSSLEYVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSP SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQNLTV GSQTGNDIGE RDKITENPVS TGEKNAAT	ICOSL v5 ECD
63	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QHSSLEYVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSR SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCRIE NVLLQQNLTV GSQTGNDIGE RDKITENPVS TGEKNAAT	ICOSL v82 ECD

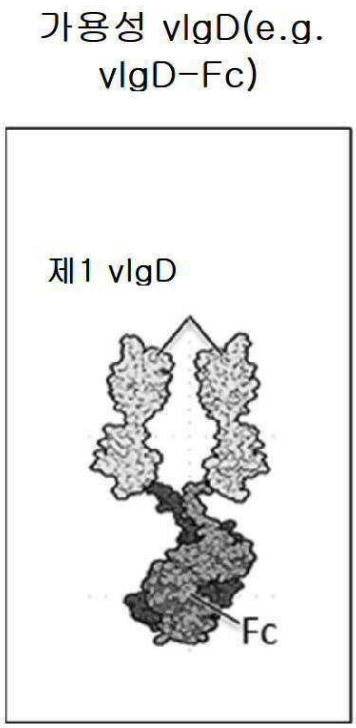
[0994]

64	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QHSSLEYVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSR SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VSLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQNLTV GSQTGNDIGE RDKITENPVS TGEKNAAT	ICOSL v47 ECD
65	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QHSSLEYVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSP SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQNLTV GSQTGNDIGE RDKITENPVS TGEKNAAT	ICOSL v44 ECD
66	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QHSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSR SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQNLTV GSQTGNDIGE RDKITENPVS TGEKNAAT	ICOSL v41 ECD
67	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QHSSLEYVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSP SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SV	ICOSL v44 IgV
68	DTQEKEVRAM VGSDVELSCA CPEGSRFDLN DVYVYWQTSE SKTVVTYHIP QNSSLENVDS RYRNRALMSP AGMLRGDFSL RLFNVTPQDE QKFHCLVLSQ SLGFQEVLSV EVTLHVAANF SVPVVSAPHS PSQDELTFTC TSINGYPRPN VYWINKTDNS LLDQALQNDT VFLNMRGLYD VVSVLRIART PSVNIGCCIE NVLLQQNLTV GSQTGNDIGE RDKITENPVS TGEKNAATWS ILAVLCLLVV VAVAIGWVCR DRCLQHSYAG AWAVSPETEL TGHV	성숙 ICOSLG(B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2)

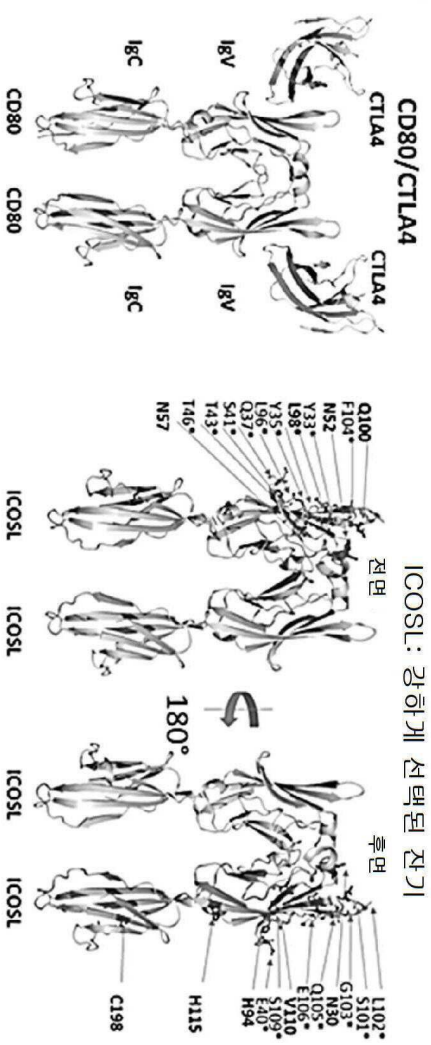
[0995]

도면

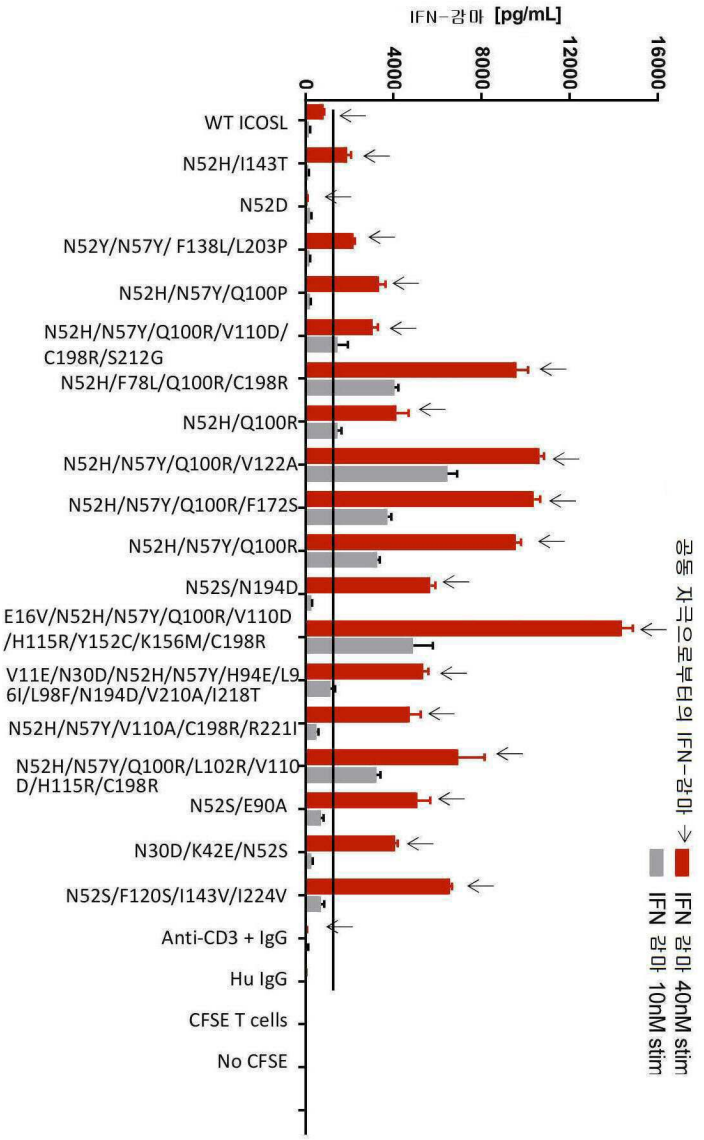
도면1a



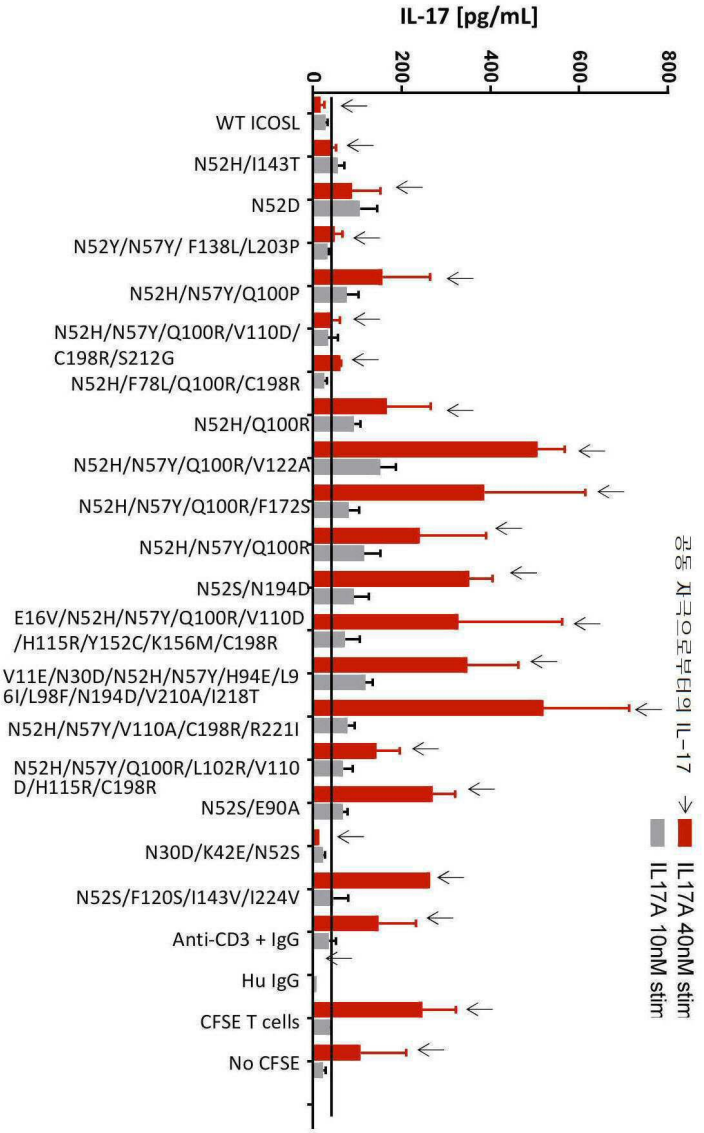
도면1b


CD80/CTLA4
CTLA4
IgV
IgC
CD80
CD80
IgC
IgV
CTLA4
ICOSL: 강하게 선택된 잔기
전면
후면
180°
ICOSL
ICOSL
ICOSL
ICOSL
Q100
F104*
N52
Y33*
L98*
Y35*
L96*
Q37*
S41*
T43*
T46*
N57
L102*
S101*
G103*
N30*
Q105*
E106*
Y110*
S109*
E40*
H94
H115
C198

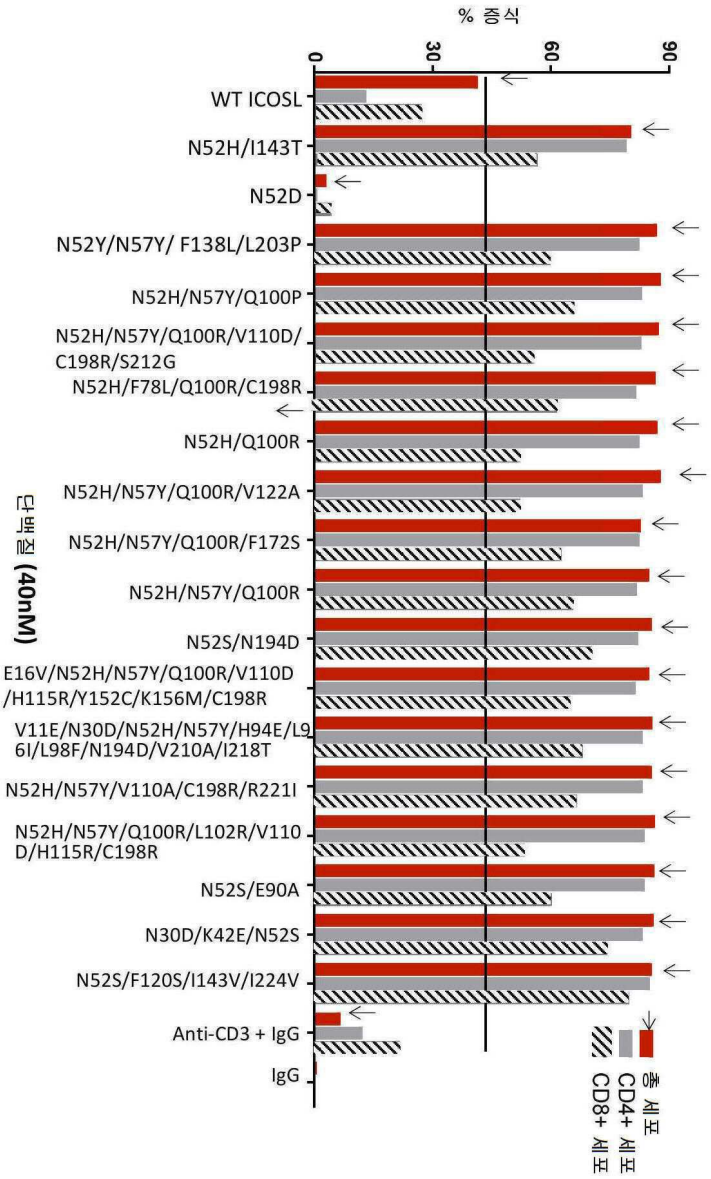
도면2a


IFN-감마 [pg/mL]
0
4000
8000
12000
16000
WT ICOSL
N52H/I143T
N52D
N52Y/N57Y/ F138L/L203P
N52H/N57Y/Q100P
N52H/N57Y/Q100R/V110D/
C198R/S212G
N52H/F78L/Q100R/C198R
N52H/Q100R
N52H/N57Y/Q100R/V122A
N52H/N57Y/Q100R/F172S
N52H/N57Y/Q100R
N52S/N194D
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D
/H115R/Y152C/K156M/C198R
V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L9
6I/L98F/N194D/V210A/I218T
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110
D/H115R/C198R
N52S/E90A
N30D/K42E/N52S
N52S/F120S/I143V/I224V
Anti-CD3 + IgG
Hu IgG
CFSE T cells
No CFSE
공동 자극 오로부터의 IFN-감마
IFN 감마 40nM stim
IFN 감마 10nM stim

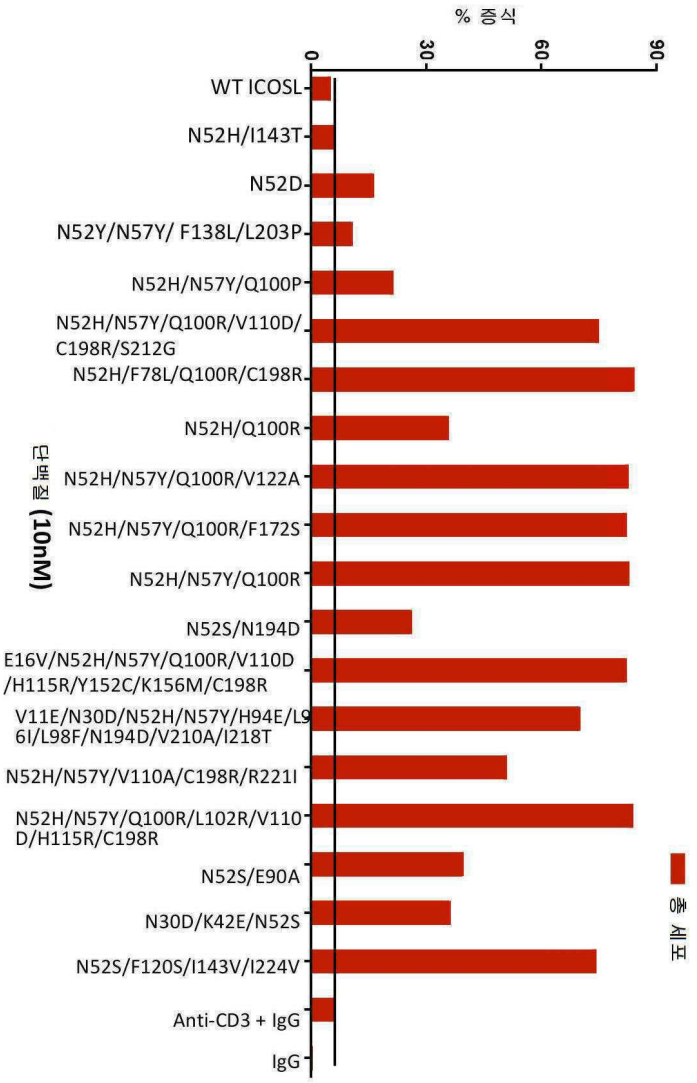
도면2b


IL-17 [pg/mL]
0
200
400
600
800
WT ICOSL
N52H/I143T
N52D
N52Y/N57Y/ F138L/L203P
N52H/N57Y/Q100P
N52H/N57Y/Q100R/V110D/
C198R/S212G
N52H/F78L/Q100R/C198R
N52H/Q100R
N52H/N57Y/Q100R/V122A
N52H/N57Y/Q100R/F172S
N52H/N57Y/Q100R
N52S/N194D
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D
/H115R/Y152C/K156M/C198R
V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L9
6I/L98F/N194D/V210A/I218T
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110
D/H115R/C198R
N52S/E90A
N30D/K42E/N52S
N52S/F120S/I143V/I224V
Anti-CD3 + IgG
Hu IgG
CFSE T cells
No CFSE
공동 자극으로부터의 IL-17
IL17A 40nM stim
IL17A 10nM stim

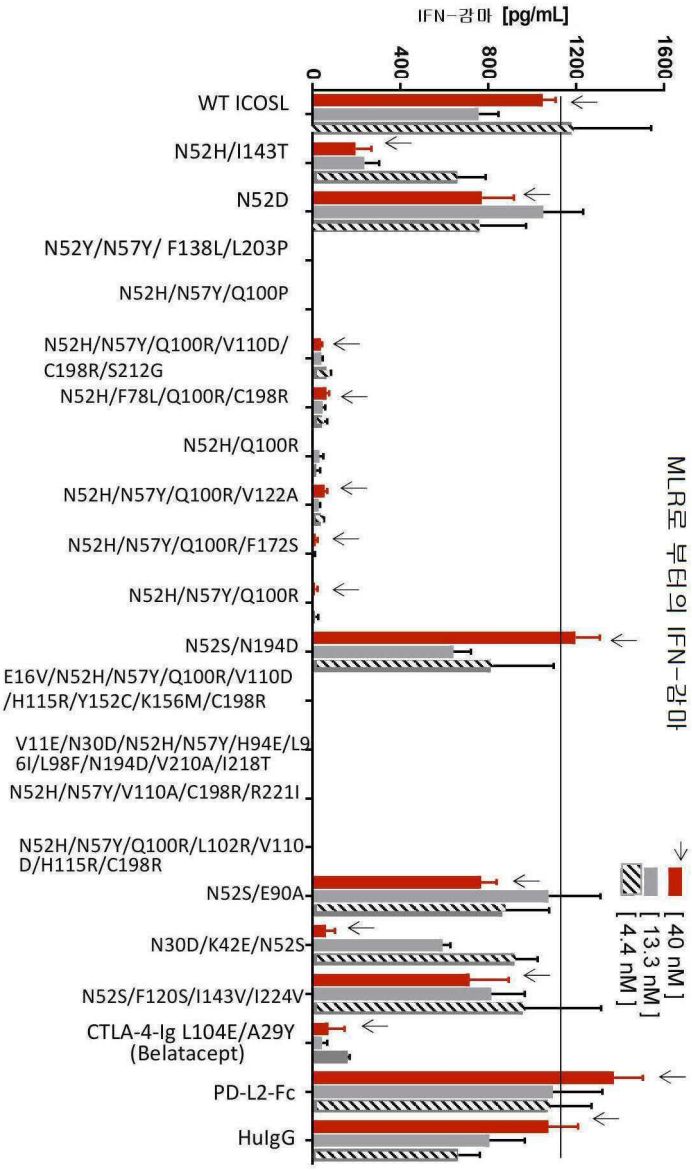
도면3a


% 증식
0
30
60
90
WT ICOSL
N52H/I143T
N52D
N52Y/N57Y/ F138L/L203P
N52H/N57Y/Q100P
N52H/N57Y/Q100R/V110D/
C198R/S212G
N52H/F78L/Q100R/C198R
N52H/Q100R
N52H/N57Y/Q100R/V122A
N52H/N57Y/Q100R/F172S
N52H/N57Y/Q100R
N52S/N194D
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D
/H115R/Y152C/K156M/C198R
V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L9
6I/L98F/N194D/V210A/I218T
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110
D/H115R/C198R
N52S/E90A
N30D/K42E/N52S
N52S/F120S/I143V/I224V
Anti-CD3 + IgG
IgG
단백질 (40nM)
CD8+ 세포
CD4+ 세포
총 세포

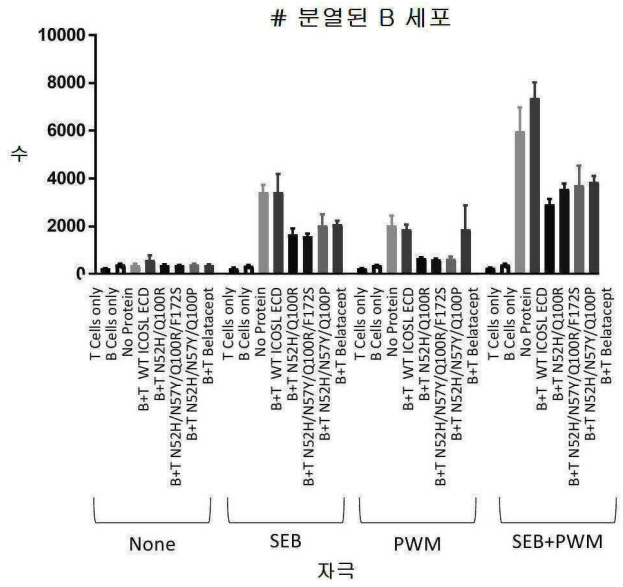
도면3b


% 증식
0
30
60
90
WT ICOSL
N52H/I143T
N52D
N52Y/N57Y/ F138L/L203P
N52H/N57Y/Q100P
N52H/N57Y/Q100R/V110D/
C198R/S212G
N52H/F78L/Q100R/C198R
N52H/Q100R
N52H/N57Y/Q100R/V122A
N52H/N57Y/Q100R/F172S
N52H/N57Y/Q100R
N52S/N194D
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D
/H115R/Y152C/K156M/C198R
V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L9
6I/L98F/N194D/V210A/I218T
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110
D/H115R/C198R
N52S/E90A
N30D/K42E/N52S
N52S/F120S/I143V/I224V
Anti-CD3 + IgG
IgG
단백질 (10nM)
표출세포

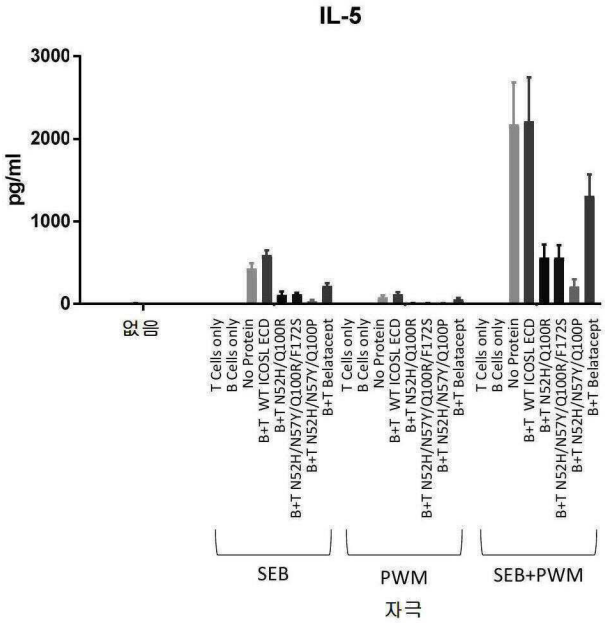
도면4


IFN-감마 [pg/mL]
0
400
800
1200
1600
WT ICOSL
N52H/I143T
N52D
N52Y/N57Y/ F138L/L203P
N52H/N57Y/Q100P
N52H/N57Y/Q100R/V110D/
C198R/S212G
N52H/F78L/Q100R/C198R
N52H/Q100R
N52H/N57Y/Q100R/V122A
N52H/N57Y/Q100R/F172S
N52H/N57Y/Q100R
N52S/N194D
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D
/H115R/Y152C/K156M/C198R
V11E/N30D/N52H/N57Y/H94E/L9
6I/L98F/N194D/V210A/I218T
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110-
D/H115R/C198R
N52S/E90A
N30D/K42E/N52S
N52S/F120S/I143V/I224V
CTLA-4-Ig L104E/A29Y
(Belatacept)
PD-L2-Fc
HuIgG
MLR로 부터의 IFN-감마
[40 nM]
[13.3 nM]
[4.4 nM]

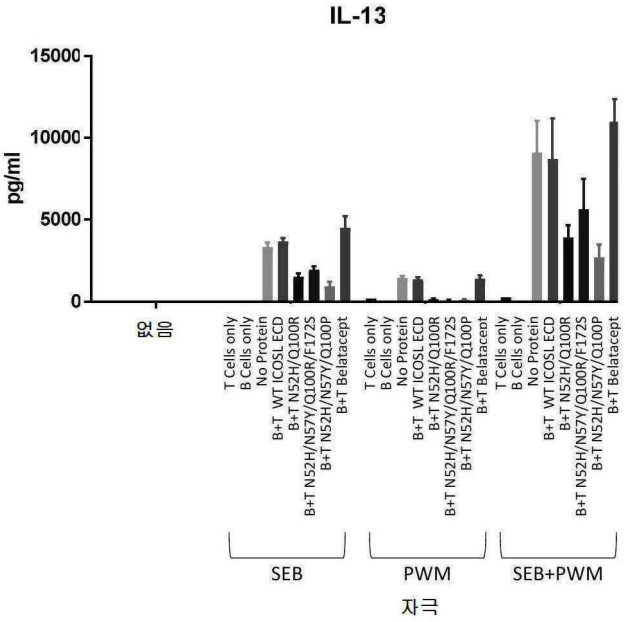
도면5a


분열된 B 세포
수
10000
8000
6000
4000
2000
0
T Cells only
B Cells only
No Protein
B+T WT ICOSL ECD
B+T N52H/Q100R
B+T N52H/N57Y/Q100R/F172S
B+T N52H/N57Y/Q100P
B+T Belatacept
None
SEB
PWM
SEB+PWM
자극

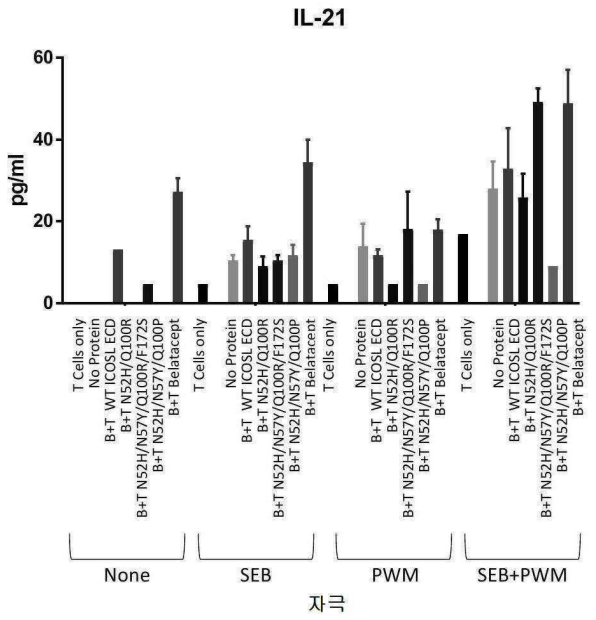
도면5b


IL-5
pg/ml
3000
2000
1000
0
없음
T Cells only
B Cells only
No Protein
B+T WT ICOSL ECD
B+T N52H/Q100R
B+T N52H/N57Y/Q100R/F172S
B+T N52H/N57Y/Q100P
B+T Belatacept
SEB
PWM
SEB+PWM
자극

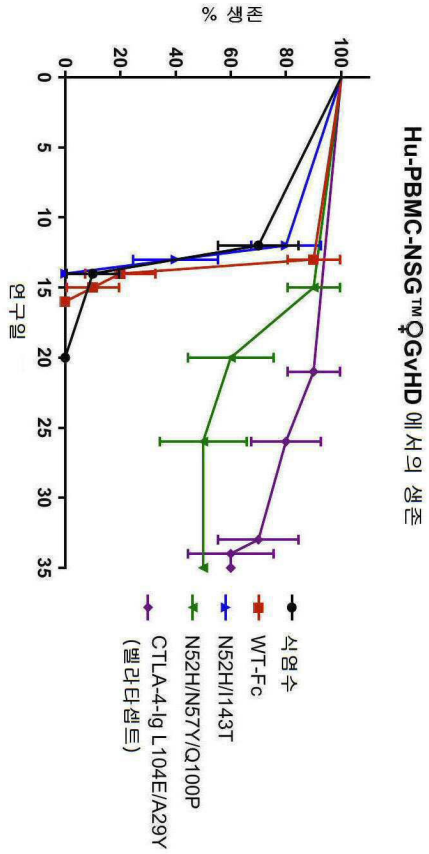
도면5c


IL-13
15000
10000
5000
0
pg/ml
없음
T Cells only
B Cells only
No Protein
B+T WT ICOSL ECD
B+T N52H/Q100R
B+T N52H/N57Y/Q100R/F172S
B+T N52H/N57Y/Q100P
B+T Belatacept
SEB
PWM
SEB+PWM
자극

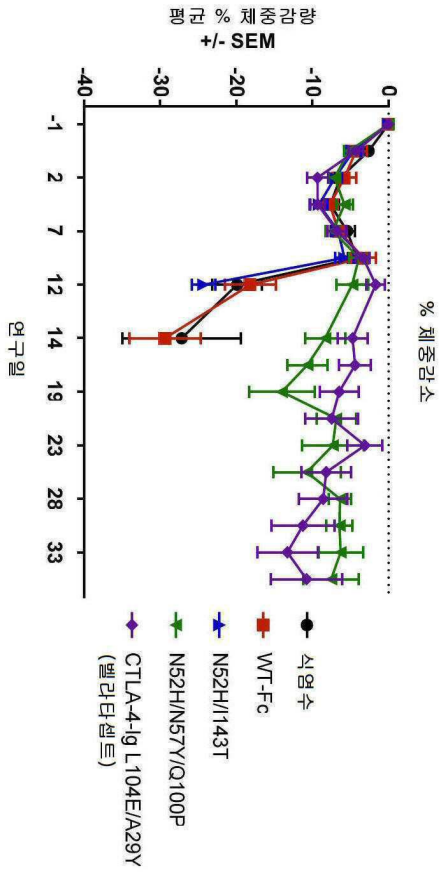
도면5d


IL-21
60
40
20
0
pg/ml
T Cells only
No Protein
B+T WT ICOSL ECD
B+T N52H/Q100R
B+T N52H/N57Y/Q100R/F172S
B+T N52H/N57Y/Q100P
B+T Belatacept
None
SEB
PWM
SEB+PWM
자극

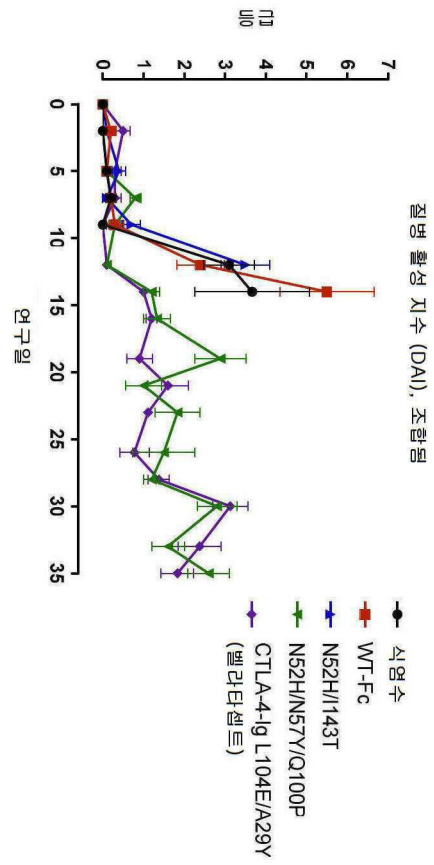
도면6a


Hu-PBMC-NSG™에서의 GvHD 에서의 생존
% 생존
0
20
40
60
80
100
연구일
0
5
10
15
20
25
30
35
식염수
WT-Fc
N52H/I143T
N52H/N57Y/Q100P
CTLA-4-Ig L104E/A29Y
(벨라타셉트)

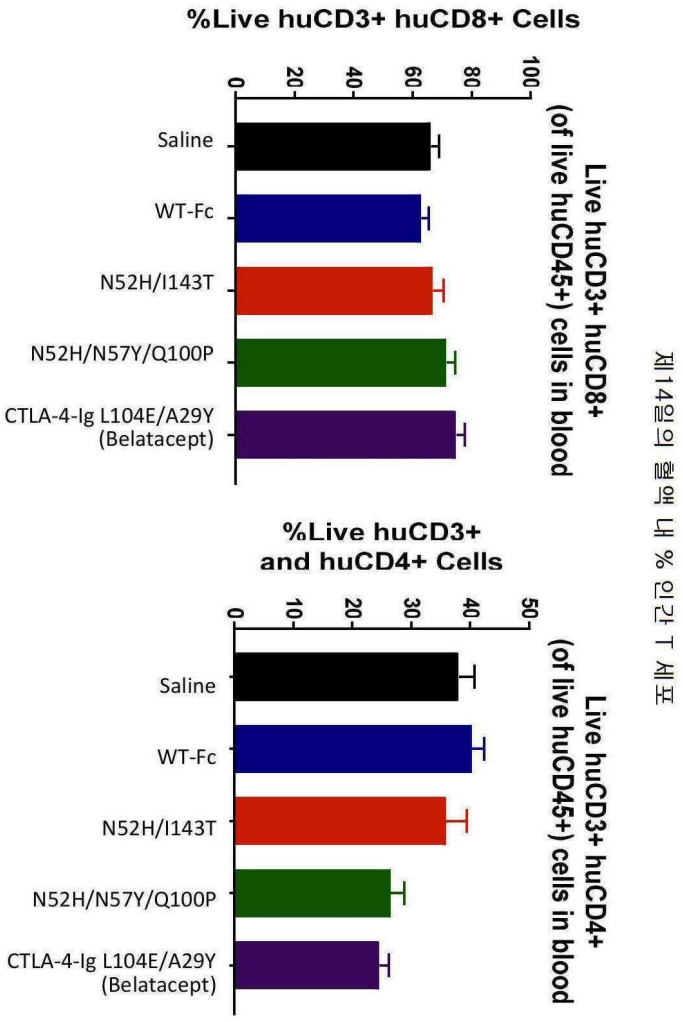
도면6b


평균 % 체중감량
+/- SEM
-40
-30
-20
-10
0
% 체중감소
-1
2
7
12
14
19
23
28
33
연구일
식염수
WT-Fc
N52H/I143T
N52H/N57Y/Q100P
CTLA-4-Ig L104E/A29Y
(벨라타셉트)

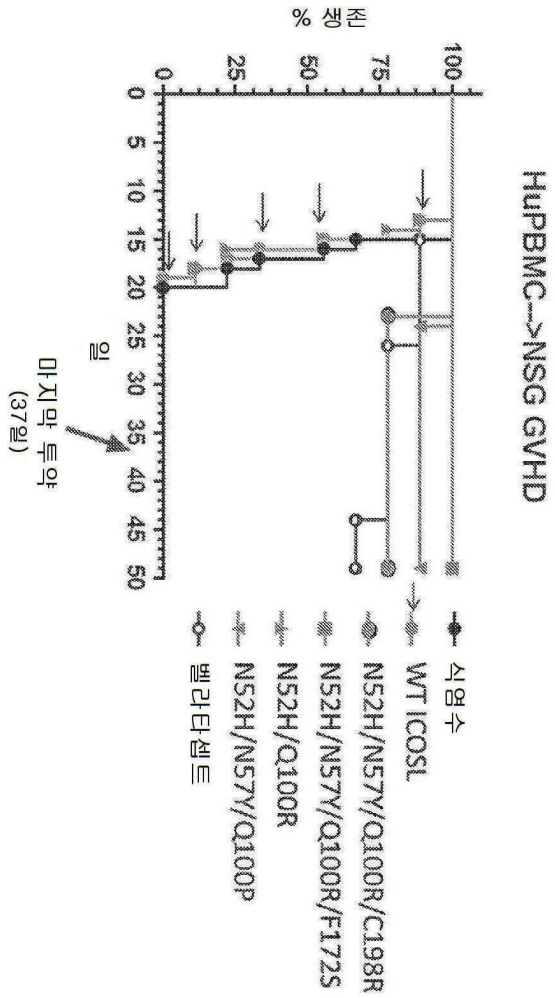
도면6c


질병 활성 지수 (DAI), 조합됨
0
1
2
3
4
5
6
7
0
5
10
15
20
25
30
35
연구일
식염수
WT-Fc
N52H/I143T
N52H/N57Y/Q100P
CTLA-4-Ig L104E/A29Y
(벨라타셉트)

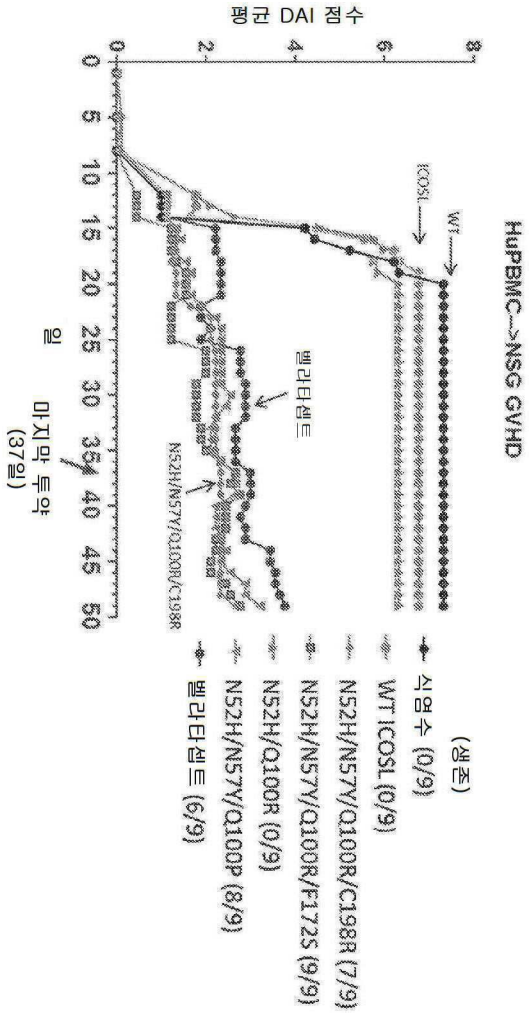
도면6d


%Live huCD3+ huCD8+ Cells
0
20
40
60
80
100
Saline
WT-Fc
N52H/I143T
N52H/N57Y/Q100P
CTLA-4-Ig L104E/A29Y
(Belatacept)
Live huCD3+ huCD8+
(of live huCD45+) cells in blood
%Live huCD3+
and huCD4+ Cells
0
10
20
30
40
50
Saline
WT-Fc
N52H/I143T
N52H/N57Y/Q100P
CTLA-4-Ig L104E/A29Y
(Belatacept)
Live huCD3+ huCD4+
(of live huCD45+) cells in blood
제14일의 혈액 내 % 인간 T 세포

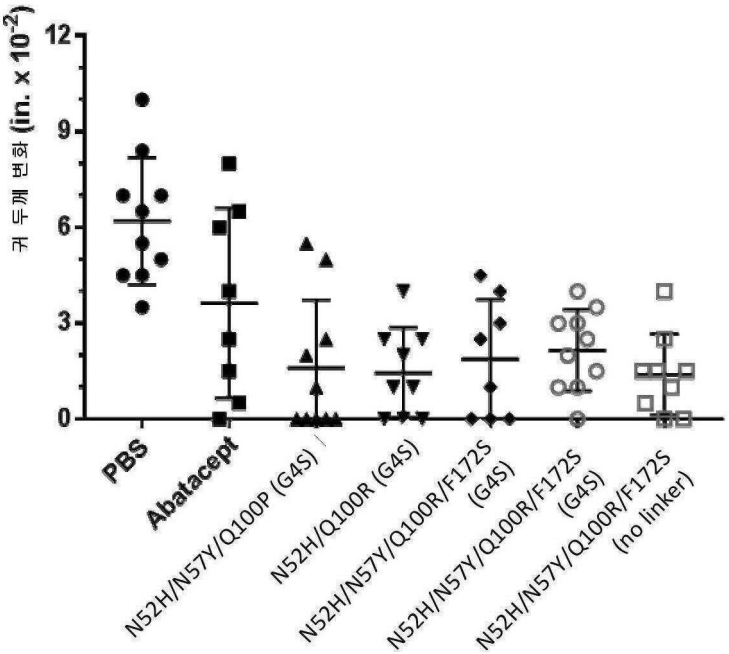
도면6e


HuPBMC->NSG GVHD
% 생존
100
75
50
25
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50
일
마지막 투약
(37일)
식염수
WT ICOSL
N52H/N57Y/Q100R/C198R
N52H/N57Y/Q100R/F172S
N52H/Q100R
N52H/N57Y/Q100P
벨라타셉트

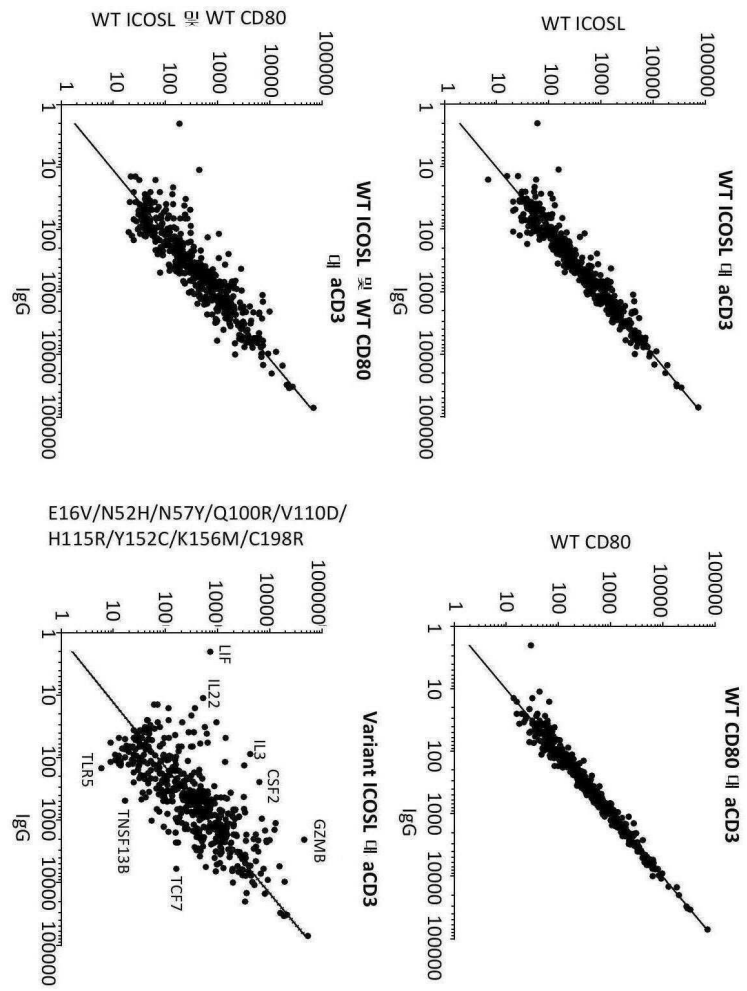
도면6f


평균 DAI 점수
0
2
4
6
8
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
일
마지막 눈금
(37일)
HuPBMC->NSG GVHD
ICOSL
WT
N52H/N57Y/Q100R/C198R
빨간타원
N52H/N57Y/Q100R/F172S (9/9)
N52H/Q100R (0/9)
N52H/N57Y/Q100P (8/9)
빨간타원 (9/9)
N52H/N57Y/Q100R/C198R (7/9)
WT ICOSL (0/9)
식염수 (0/9)
(평균)

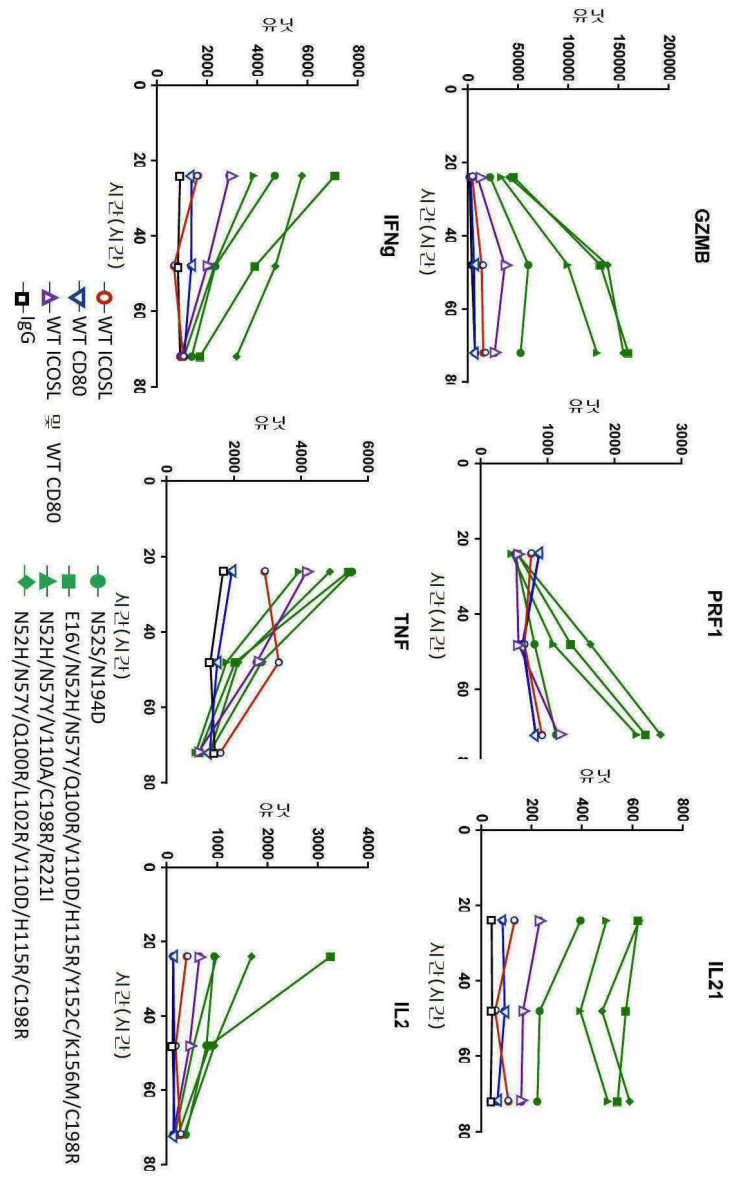
도면7


귀 두께 변화 (in. x 10-2)
12
9
6
3
0
PBS
Abatacept
N52H/N57Y/Q100P (G4S)
N52H/Q100R (G4S)
N52H/N57Y/Q100R/F172S (G4S)
N52H/N57Y/Q100R/F172S (G4S)
N52H/N57Y/Q100R/F172S (no linker)

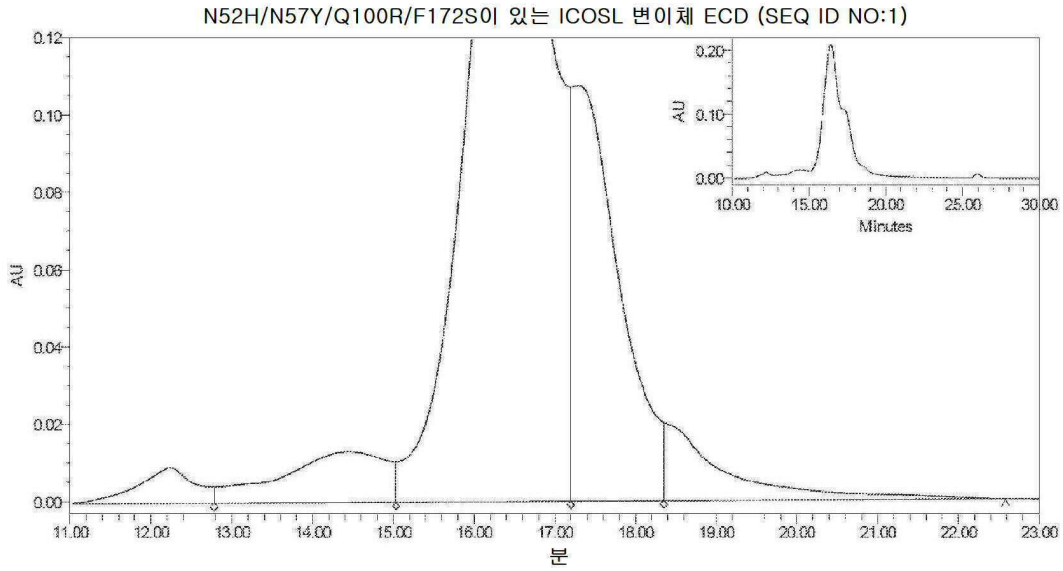
도면8


WT ICOSL
WT ICOSL 대 aCD3
WT ICOSL 및 WT CD80
WT ICOSL 및 WT CD80 대 aCD3
WT CD80
WT CD80 대 aCD3
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/
H115R/Y152C/K156M/C198R
Variant ICOSL 대 aCD3
LIF
IL22
IL3
CSF2
GZMB
TLR5
TNSF13B
TCF7
IgG
1
10
100
1000
10000
100000

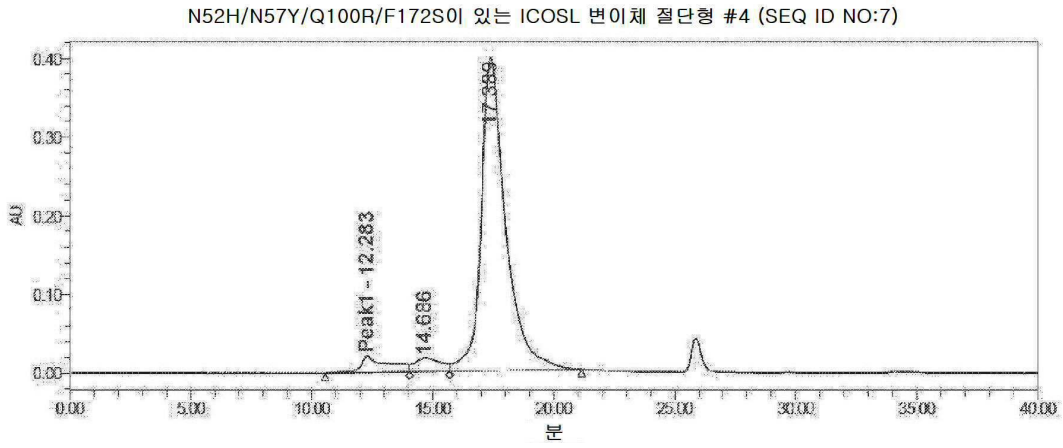
도면9


GZMB
IFNg
PRF1
TNF
IL21
IL2
시간(시간)
WT ICOSL
WT CD80
WT ICOSL 및 WT CD80
IgG
N52S/N194D
E16V/N52H/N57Y/Q100R/V110D/H115R/Y152C/K156M/C198R
N52H/N57Y/V110A/C198R/R221I
N52H/N57Y/Q100R/L102R/V110D/H115R/C198R

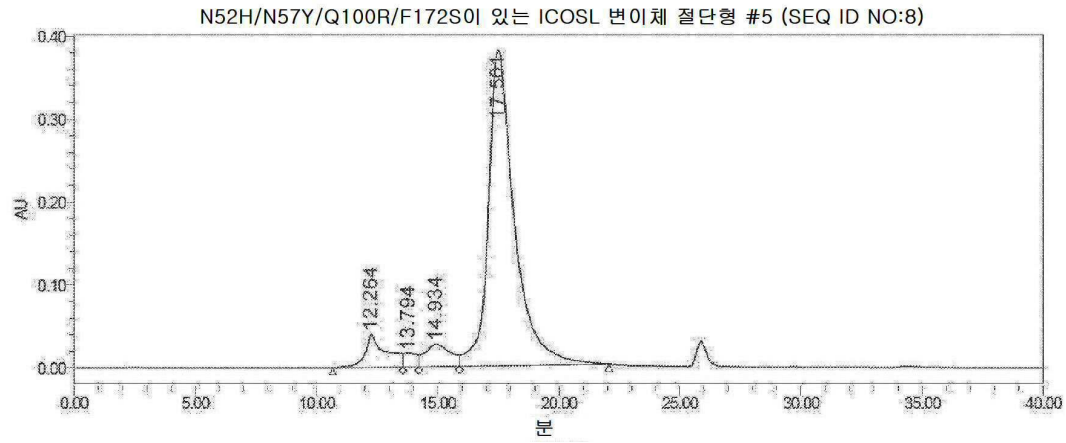
도면10a



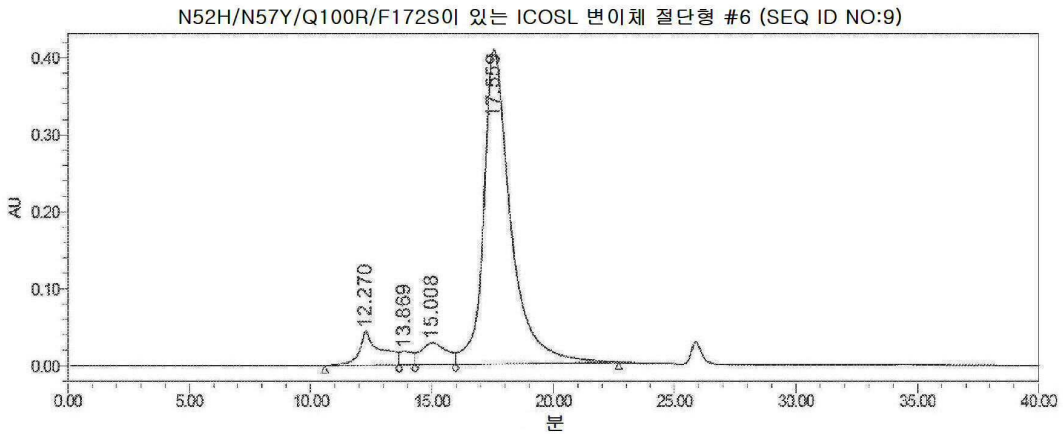
도면10b



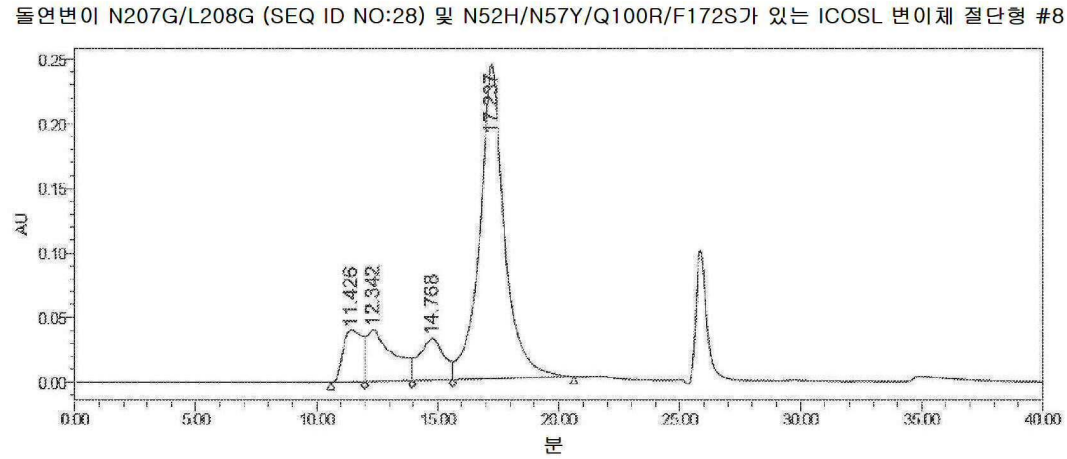
도면10c



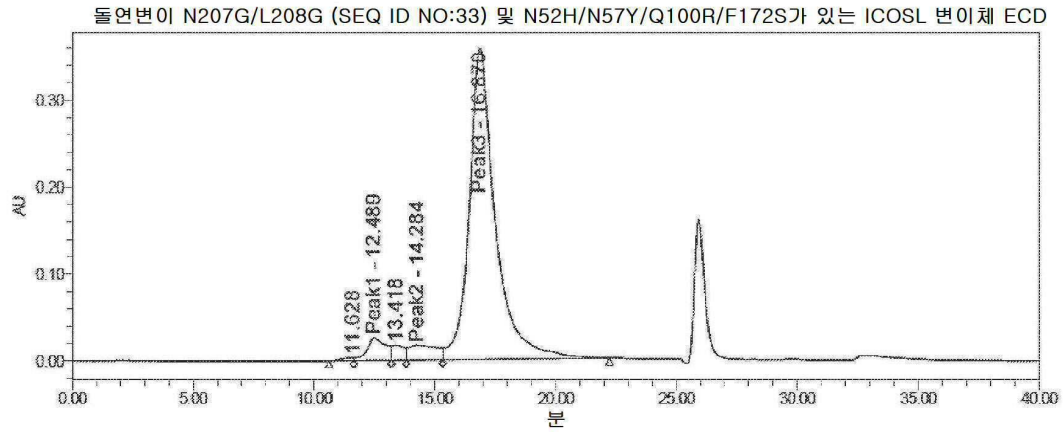
도면10d



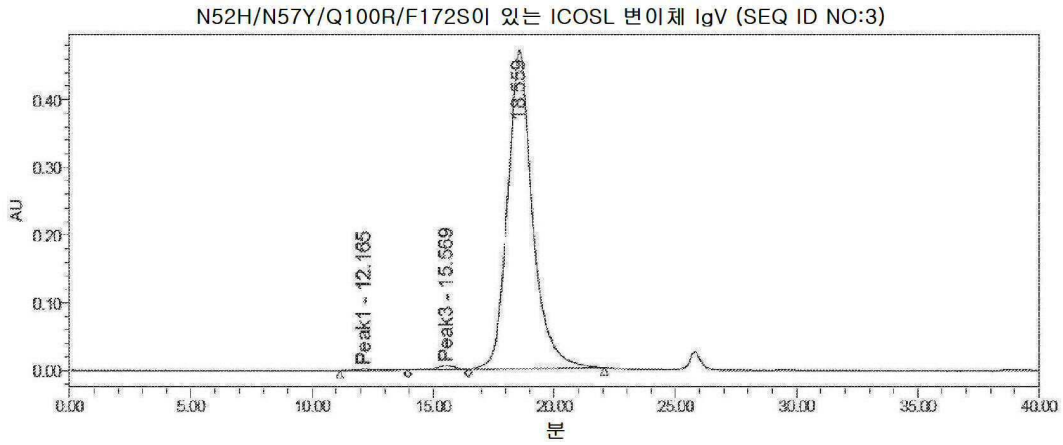
도면10e



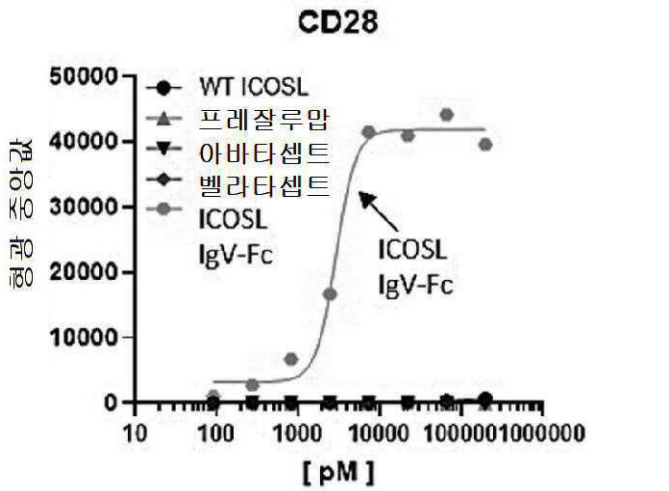
도면10f

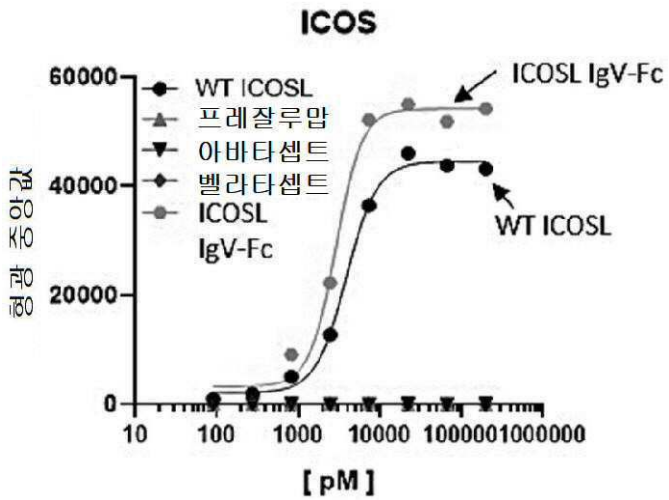


도면10g

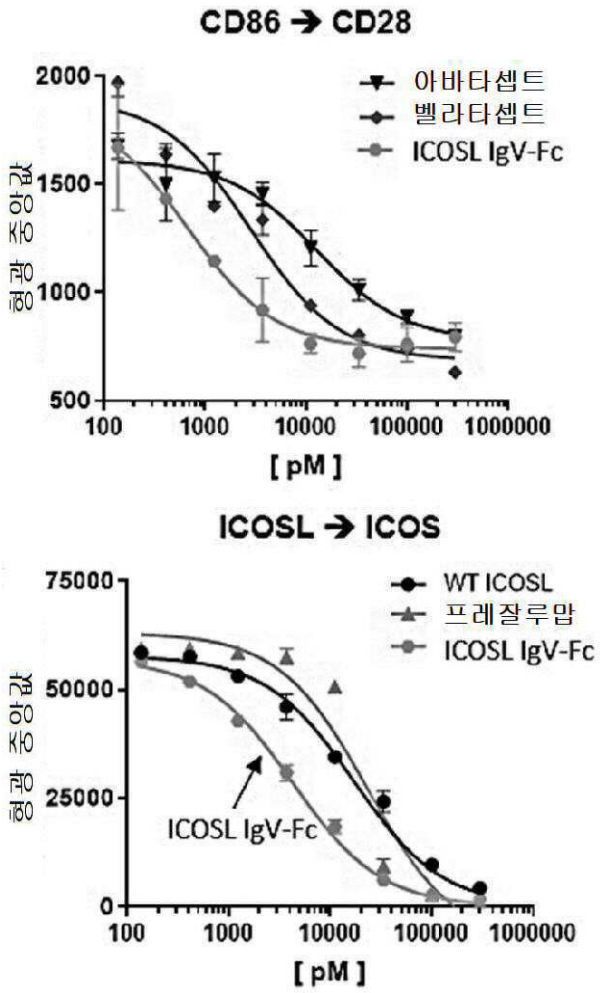

N52H/N57Y/Q100R/F172S이 있는 ICOSL 변이체 IgV (SEQ ID NO:3)
AU
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
Peak1 - 12.165
Peak3 - 15.569
18.559
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
분

도면10h

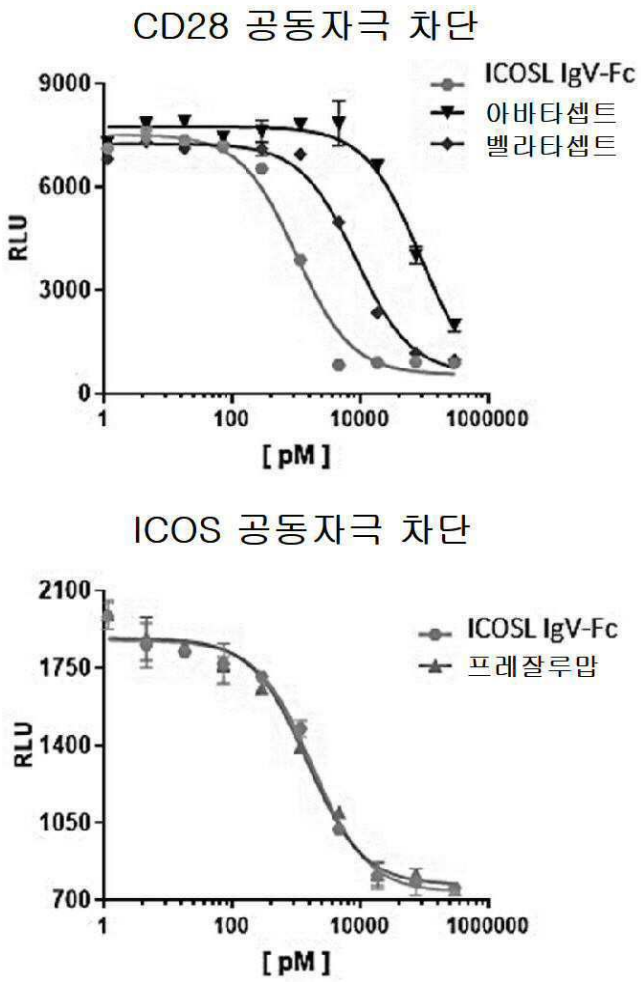

CD28
형광 중앙값
50000
40000
30000
20000
10000
0
WT ICOSL
프레잘루맙
아바타셉트
벨라타셉트
ICOSL
IgV-Fc
ICOSL
IgV-Fc
10
100
1000
10000
1000001000000
[pM]


ICOS
형광 중앙값
60000
40000
20000
0
WT ICOSL
프레잘루맙
아바타셉트
벨라타셉트
ICOSL
IgV-Fc
ICOSL IgV-Fc
WT ICOSL
10
100
1000
10000
1000001000000
[pM]

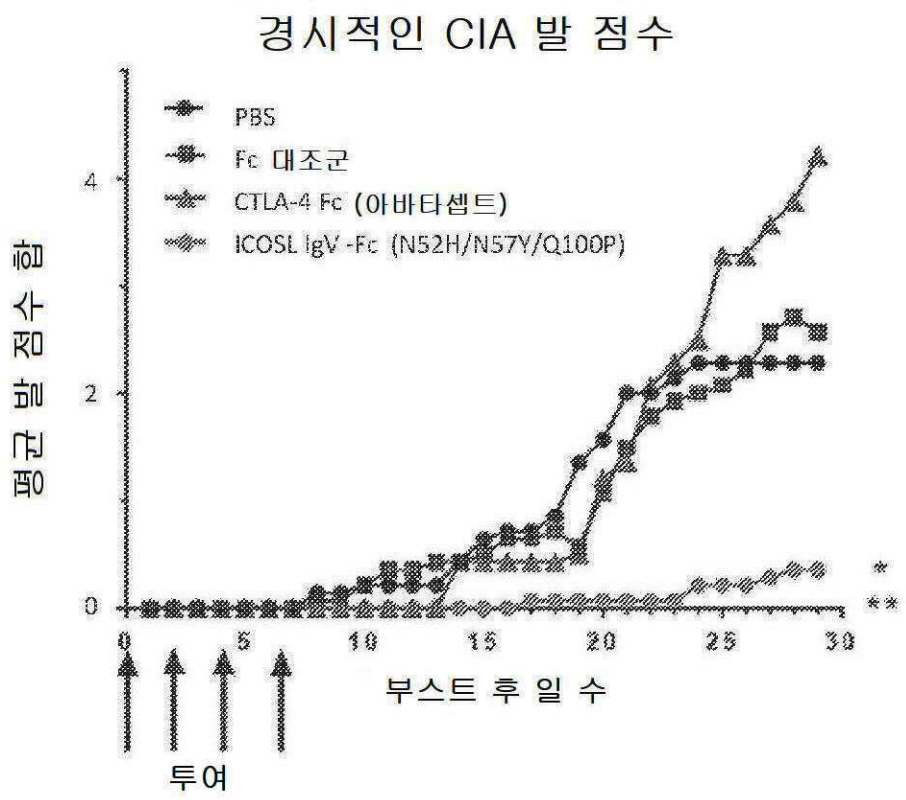
도면10i


CD86 → CD28
아바타셉트
벨라타셉트
ICOSL IgV-Fc
형광 중앙값
2000
1500
1000
500
100
1000
10000
100000
1000000
[pM]
ICOSL → ICOS
WT ICOSL
프레잘루맙
ICOSL IgV-Fc
형광 중앙값
75000
50000
25000
0
ICOSL IgV-Fc
100
1000
10000
100000
1000000
[pM]

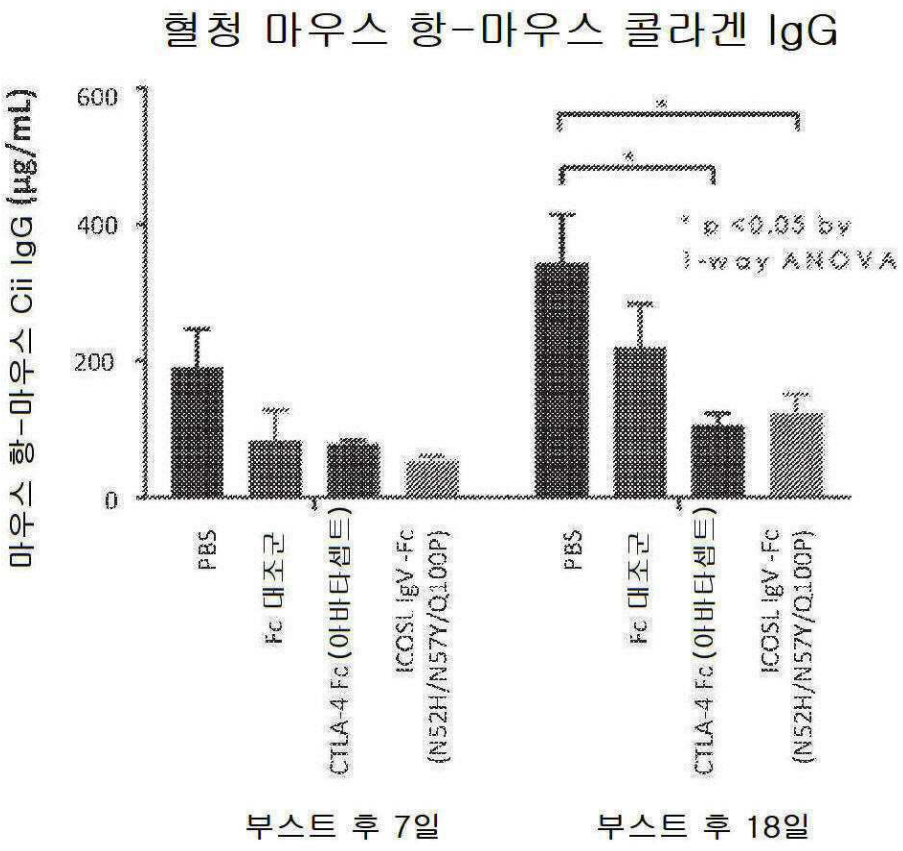
도면10j


CD28 공동자극 차단
ICOSL IgV-Fc
아바타셉트
벨라타셉트
RLU
9000
6000
3000
0
1
100
10000
1000000
[pM]
ICOS 공동자극 차단
ICOSL IgV-Fc
프레잘루맙
RLU
2100
1750
1400
1050
700
1
100
10000
1000000
[pM]

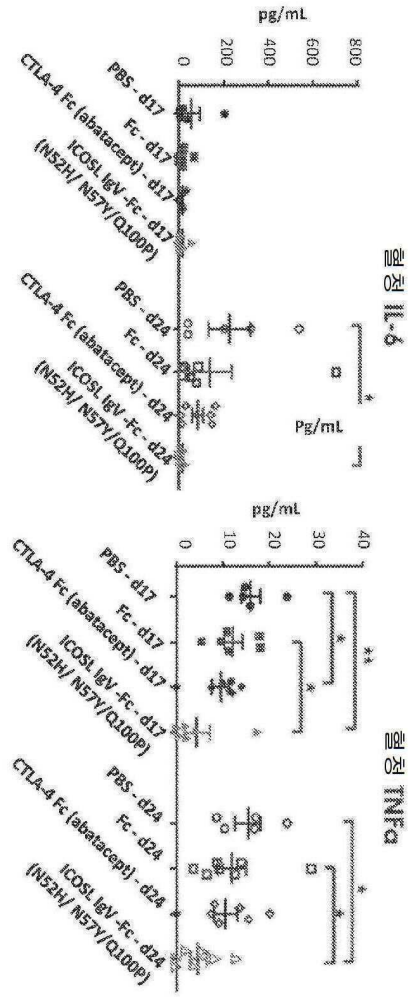
도면11a


경시적인 CIA 발 점수
PBS
Fc 대조군
CTLA-4 Fc (아바타셉트)
ICOSL IgV -Fc (N52H/N57Y/Q100P)
평균 발 점수 합
부스트 후 일 수
투여
*
**

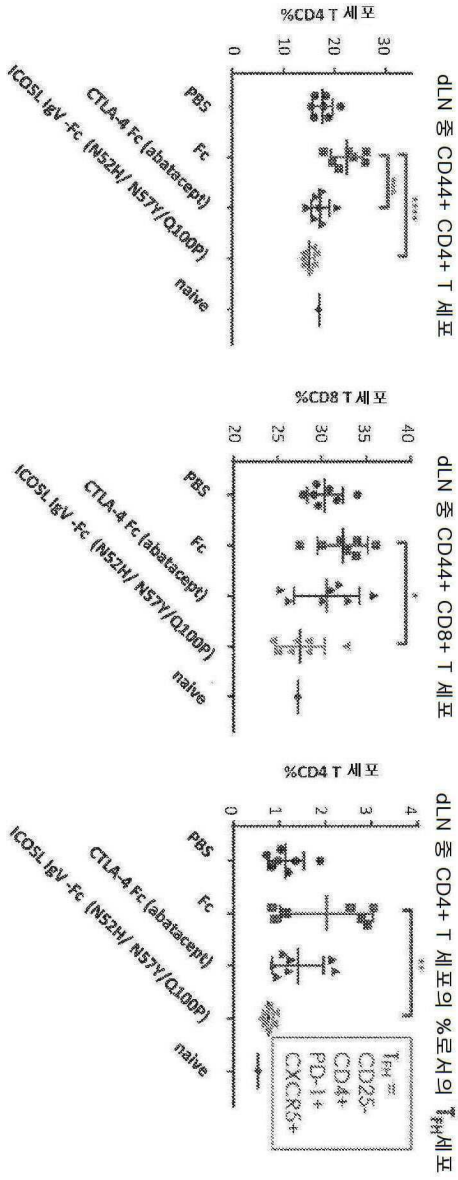
도면11b


혈청 마우스 항-마우스 콜라겐 IgG
마우스 항-마우스 Cii IgG (μg/mL)
* p <0.05 by 1-way ANOVA
PBS
Fc 대조군
CTLA-4 Fc (아바타셉트)
ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100P)
부스트 후 7일
부스트 후 18일

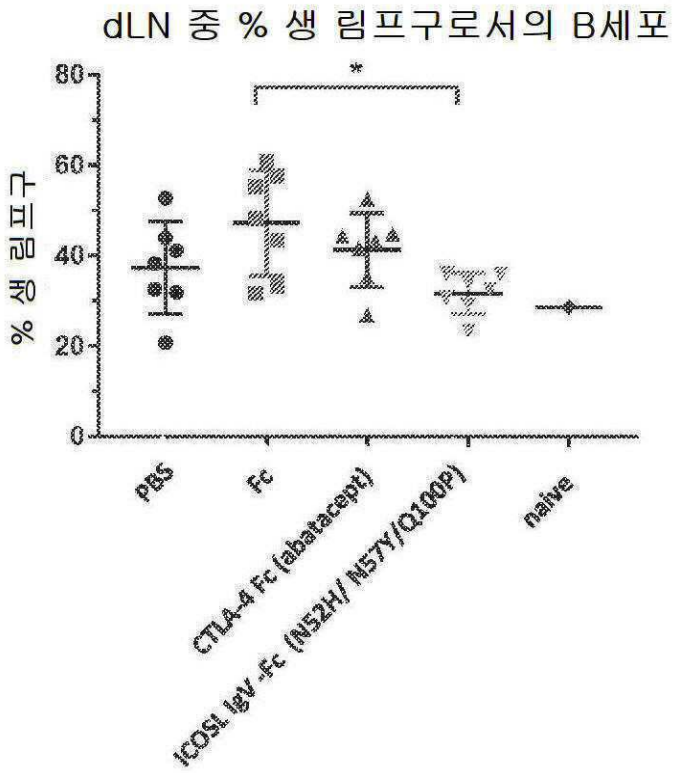
도면11c


혈청 IL-6
pg/mL
0
200
400
600
800
PBS - d17
Fc - d17
CTLA-4 Fc (abatacept) - d17
ICOSL IgV -Fc - d17 (N52H/ N57Y/Q100P)
PBS - d24
Fc - d24
CTLA-4 Fc (abatacept) - d24
ICOSL IgV -Fc - d24 (N52H/ N57Y/Q100P)
Pg/mL
혈청 TNFα
pg/mL
0
10
20
30
40
PBS - d17
Fc - d17
CTLA-4 Fc (abatacept) - d17
ICOSL IgV -Fc - d17 (N52H/ N57Y/Q100P)
PBS - d24
Fc - d24
CTLA-4 Fc (abatacept) - d24
ICOSL IgV -Fc - d24 (N52H/ N57Y/Q100P)

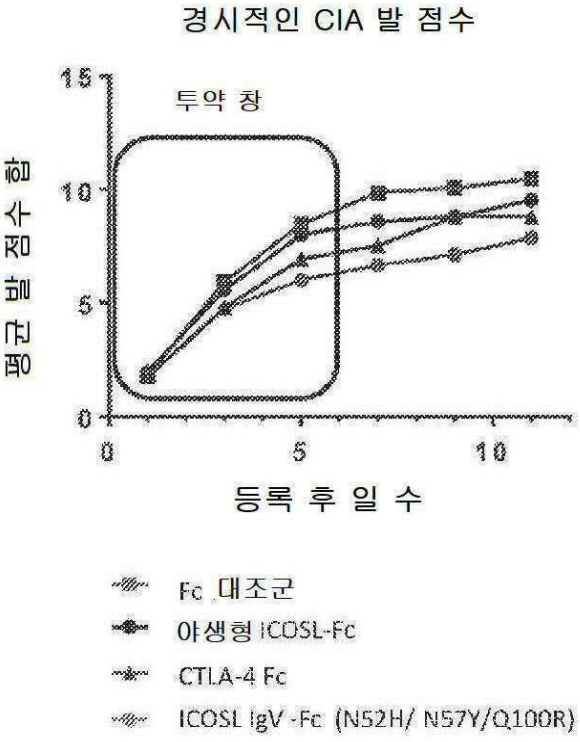
도면11d


dLN 중 CD44+ CD4+ T 세포
%CD4 T 세포
0
10
20
30
PBS
Fc
CTLA-4 Fc (abatacept)
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100P)
naive
dLN 중 CD44+ CD8+ T 세포
%CD8 T 세포
20
25
30
35
40
dLN 중 CD4+ T 세포의 %로서의 TFH 세포
%CD4 T 세포
0
1
2
3
4
TFH = CD25- CD4+ PD-1+ CXCR5+

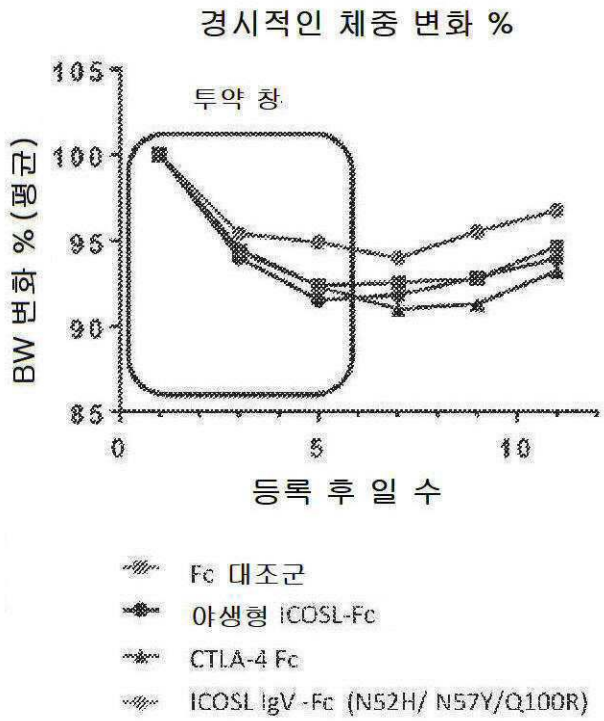
도면11e


dLN 중 % 생 림프구로서의 B세포
% 생 림프구
80
60
40
20
0
*
PBS
Fc
CTLA-4 Fc (abatacept)
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100P)
naive

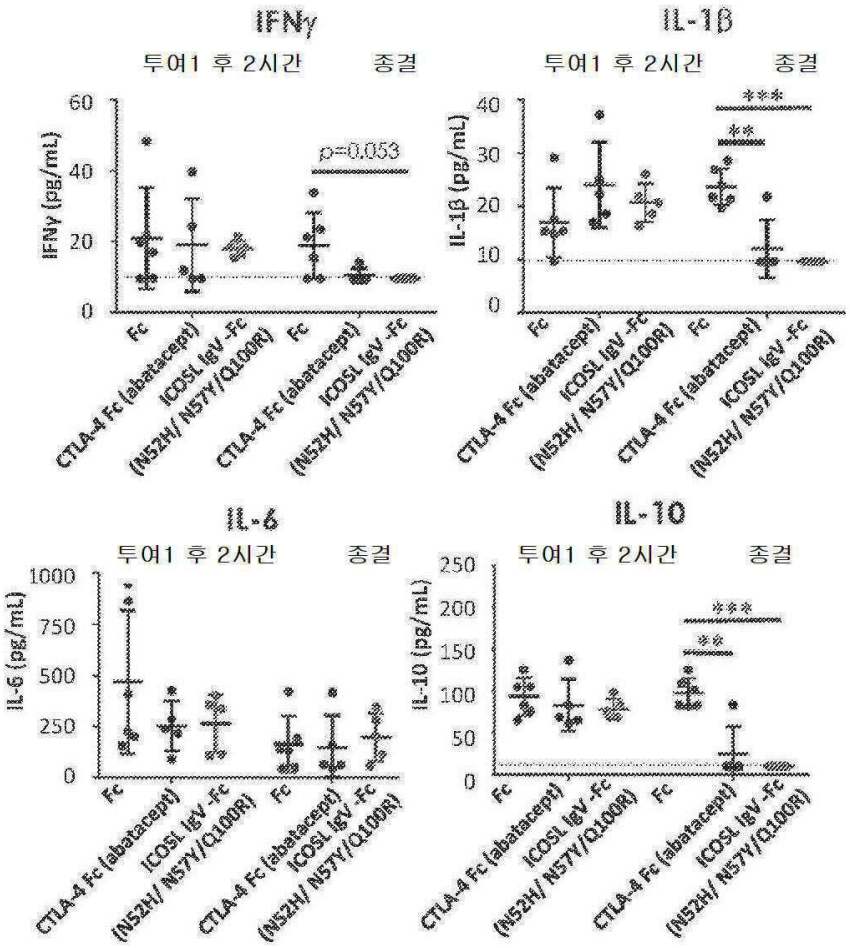
도면12a


경시적인 CIA 발 점수
평균 발 점수 합
15
10
5
0
투약 창
0
5
10
등록 후 일 수
Fc 대조군
야생형 ICOSL-Fc
CTLA-4 Fc
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R)

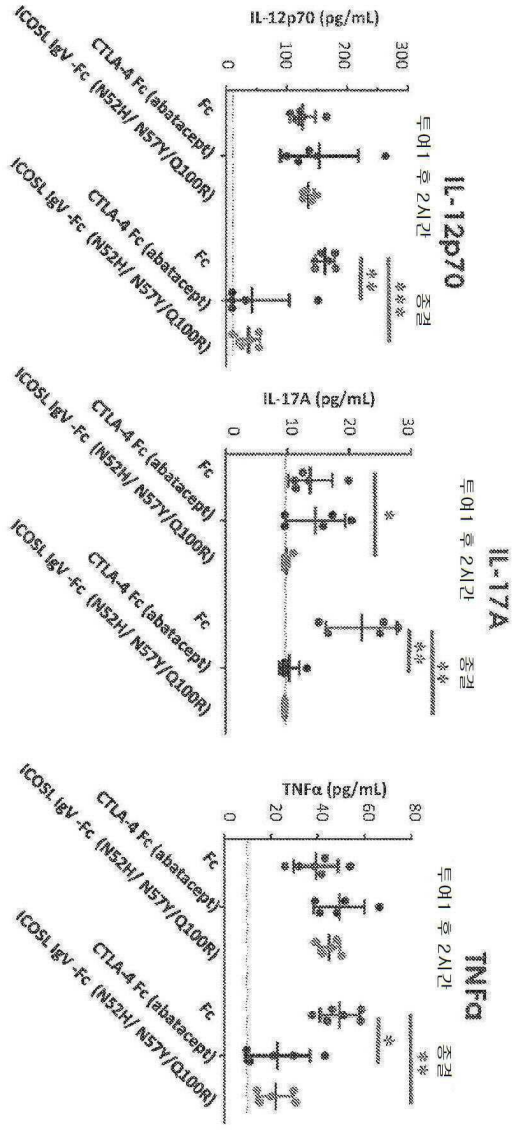
도면12b


경시적인 체중 변화 %
투약 창
BW 변화 % (평균)
105
100
95
90
85
0
5
10
등록 후 일 수
Fc 대조군
야생형 ICOSL-Fc
CTLA-4 Fc
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R)

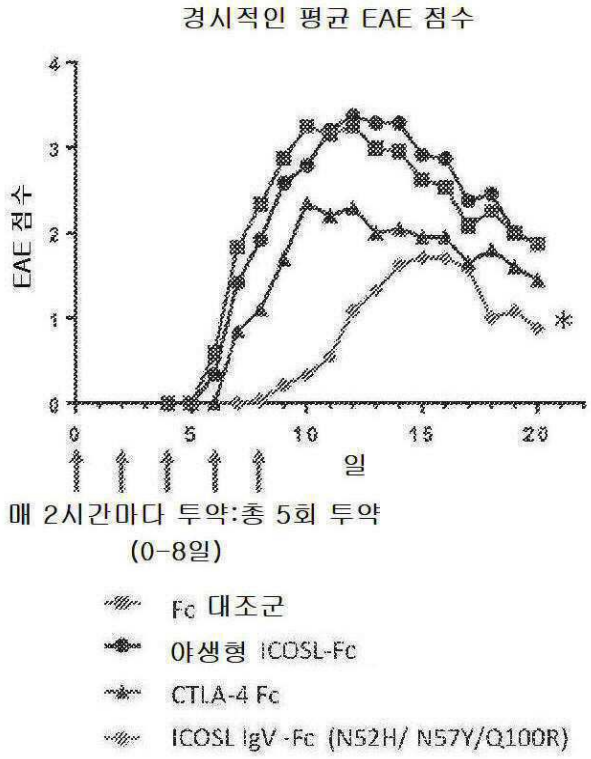
도면12c


IFNγ
투여1 후 2시간 종결
IFNγ (pg/mL)
p=0.053
IL-1β
투여1 후 2시간 종결
IL-1β (pg/mL)
***
**
IL-6
투여1 후 2시간 종결
IL-6 (pg/mL)
IL-10
투여1 후 2시간 종결
IL-10 (pg/mL)
***
**
Fc
CTLA-4 Fc (abatacept)
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R)

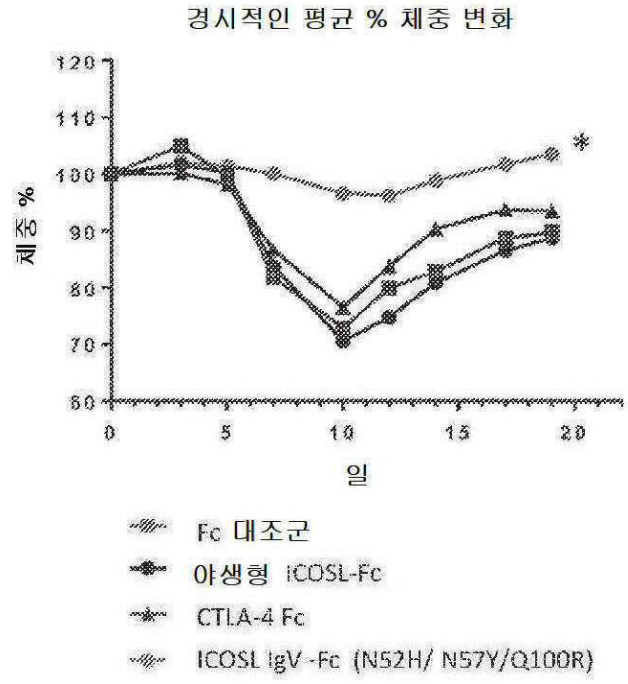
도면12d


IL-12p70 (pg/mL)
0
100
200
300
Fc
CTLA-4 Fc (abatacept)
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R)
Fc
CTLA-4 Fc (abatacept)
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R)
IL-12p70
트에1 후 2시간
혼합
IL-17A (pg/mL)
0
10
20
30
IL-17A
TNFα (pg/mL)
0
20
40
60
80
TNFα

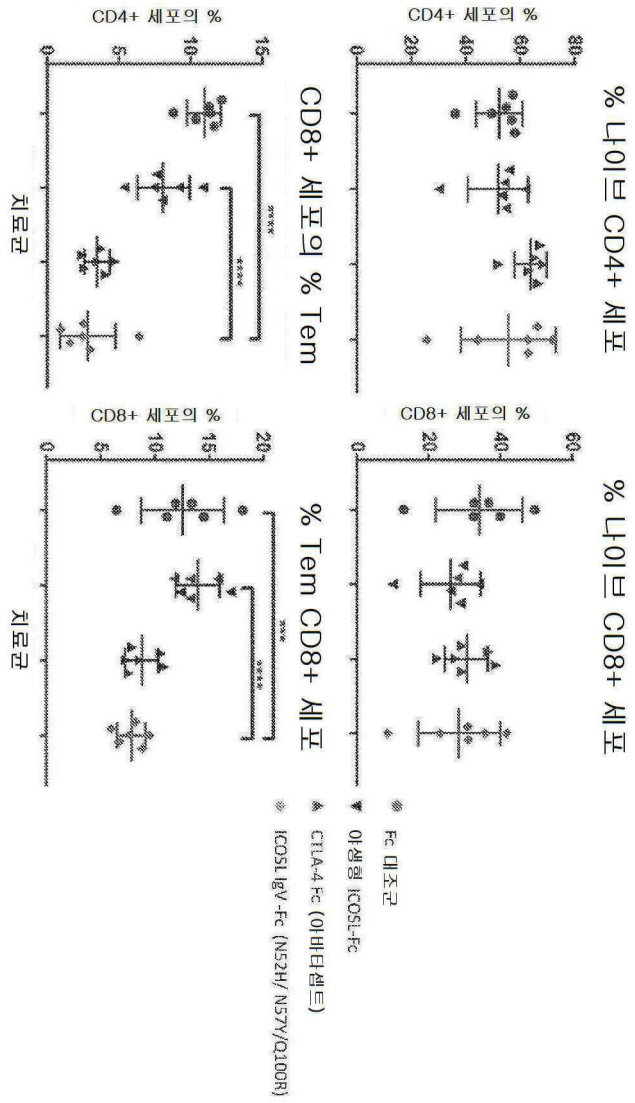
도면13a


경시적인 평균 EAE 점수
EAE 점수
0
1
2
3
4
0
5
10
15
20
일
*
매 2시간마다 투약:총 5회 투약
(0-8일)
Fc 대조군
야생형 ICOSL-Fc
CTLA-4 Fc
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R)

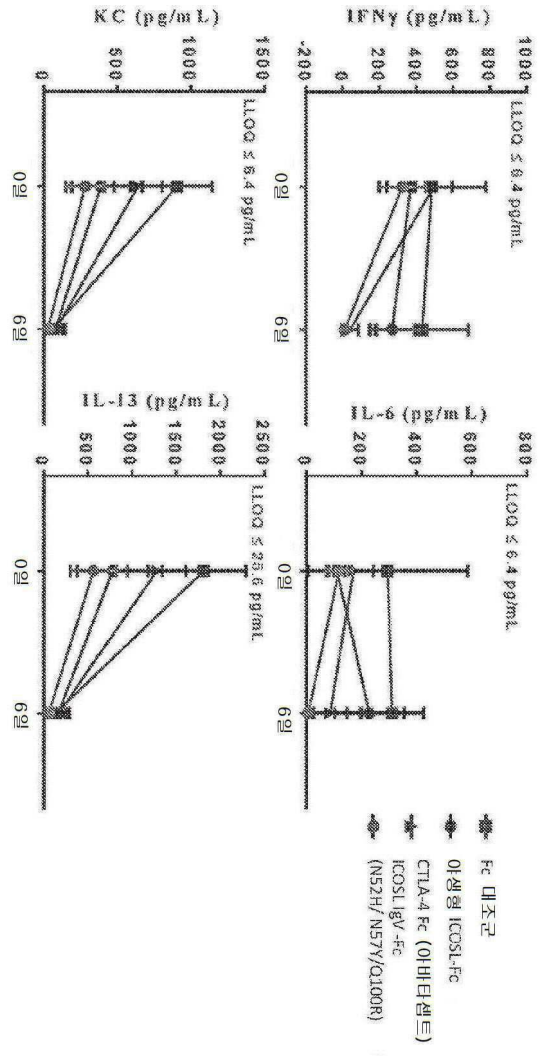
도면13b


경시적인 평균 % 체중 변화
체중 %
60
70
80
90
100
110
120
0
5
10
15
20
일
*
Fc 대조군
야생형 ICOSL-Fc
CTLA-4 Fc
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R)

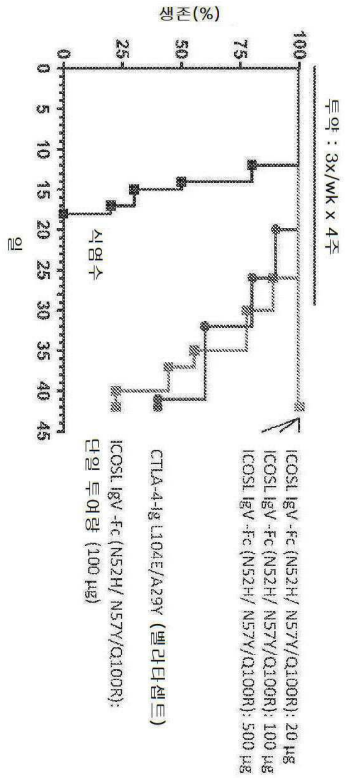
도면13c


% 나이브 CD4+ 세포
% 나이브 CD8+ 세포
CD8+ 세포의 % Tem
% Tem CD8+ 세포
CD4+ 세포의 %
CD8+ 세포의 %
치료군
Fc 대조군
야생형 ICOSL-Fc
CTLA-4 Fc (아바타셉트)
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R)

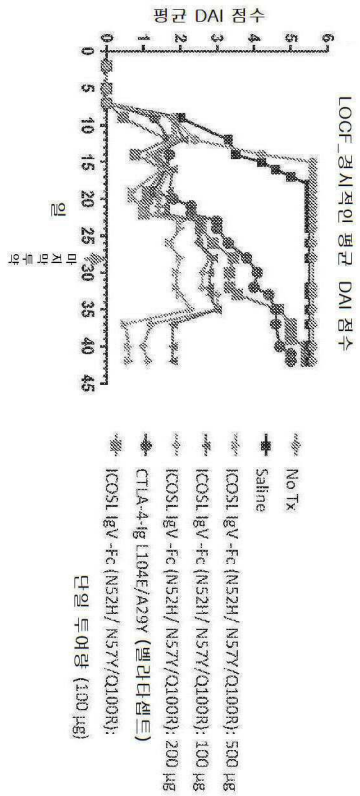
도면13d


KC (pg/mL)
IFNγ (pg/mL)
IL-13 (pg/mL)
IL-6 (pg/mL)
LLOQ ≤ 5.4 pg/mL
LLOQ ≤ 6.4 pg/mL
LLOQ ≤ 25.6 pg/mL
0일
6일
Fc 대조군
야생형 ICOSL-Fc
CTLA-4 Fc (아바타셉트)
ICOSL IgV -Fc
(N52H/N57Y/Q100R)

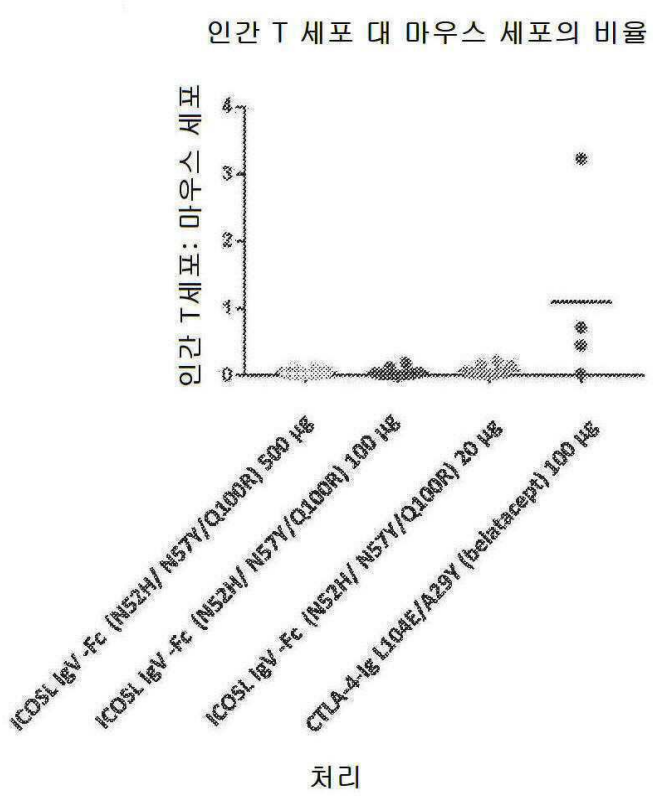
도면14a


생존(%)
0
25
50
75
100
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45
일
실험수
투약 : 3x/wk x 4주
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R): 20 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R): 100 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R): 500 μg
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (벨라타셉트)
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R):
단일 투여량 (100 μg)

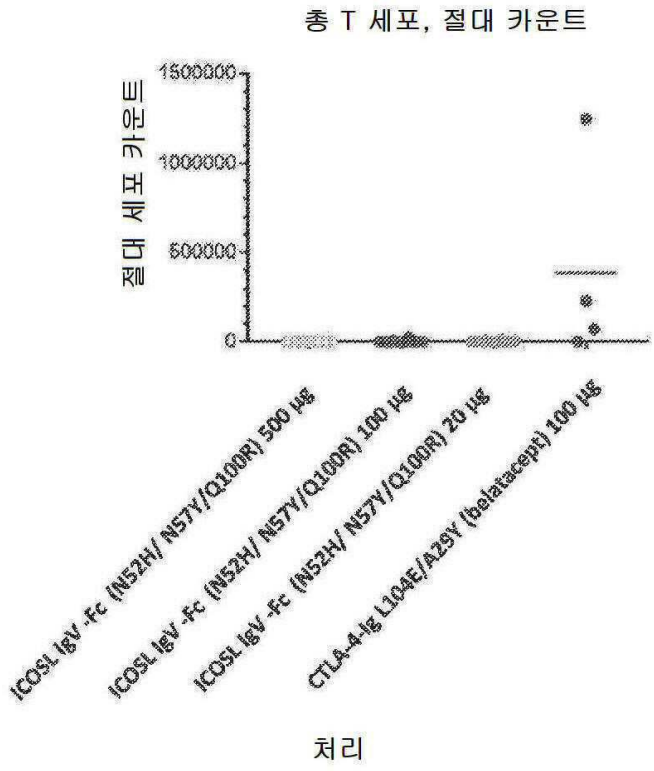
도면14b


평균 DAI 점수
0
1
2
3
4
5
6
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45
일
마지막 투약
LOCF_경시적인 평균 DAI 점수
No Tx
Saline
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R): 500 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R): 100 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R): 200 μg
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (벨라타셉트)
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R):
단일 투여량 (100 μg)

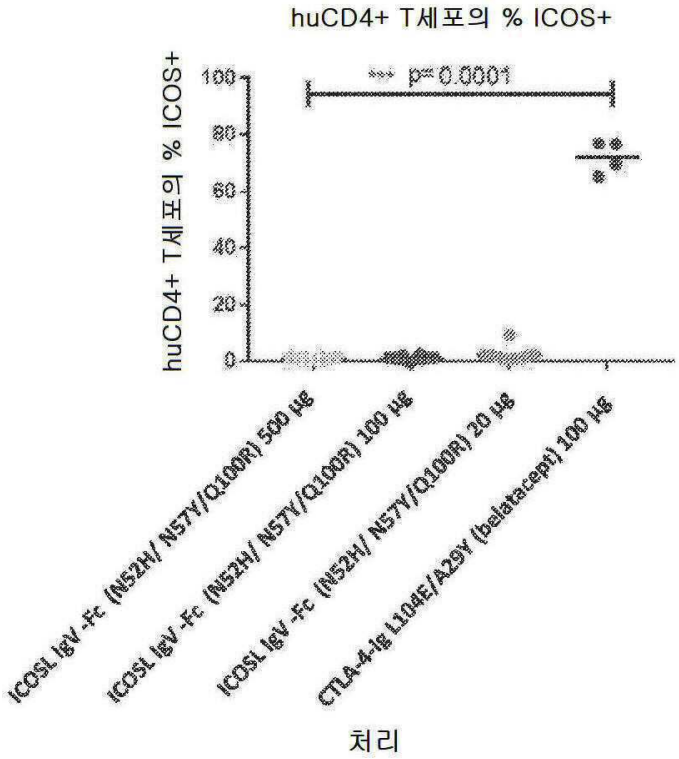
도면15a


인간 T 세포 대 마우스 세포의 비율
인간 T세포: 마우스 세포
0
1
2
3
4
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 μg
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (belatacept) 100 μg
처리

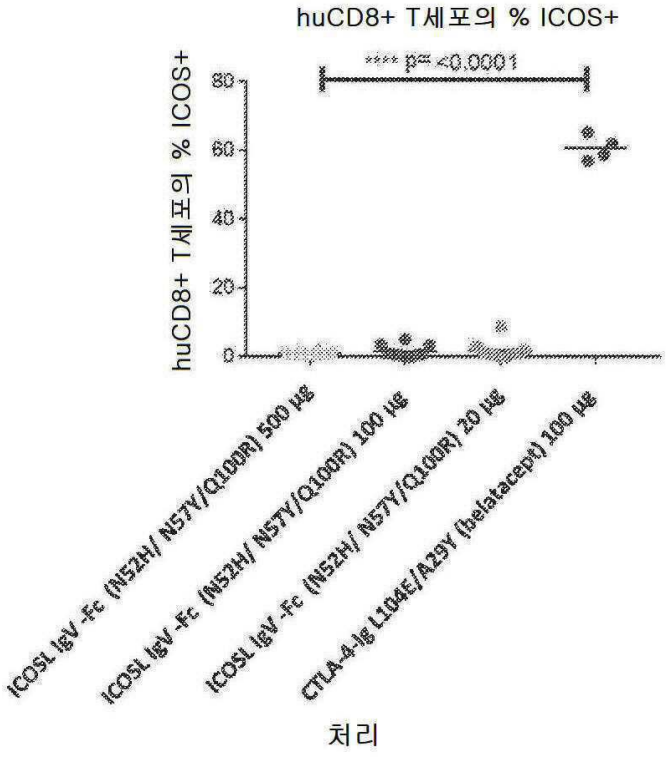
도면15b


총 T 세포, 절대 카운트
절대 세포 카운트
0
500000
1000000
1500000
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 μg
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (belatacept) 100 μg
처리

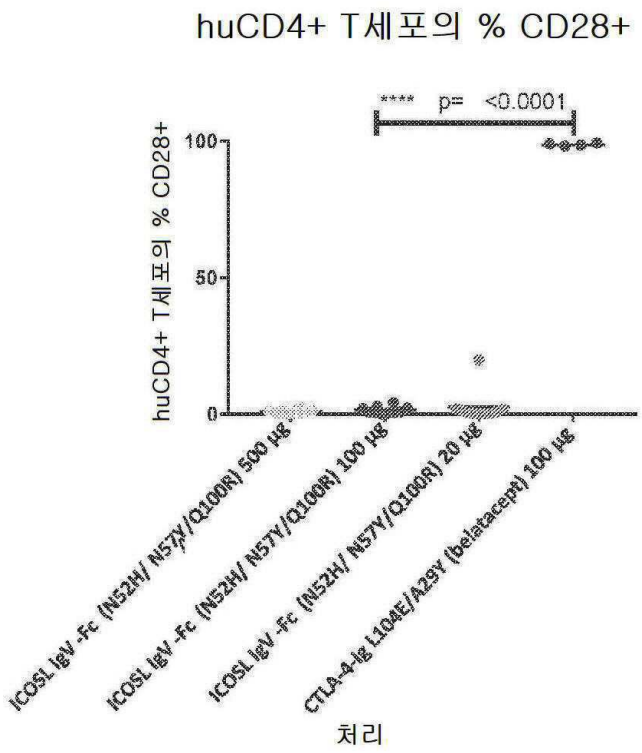
도면15c


huCD4+ T세포의 % ICOS+
**** p<0.0001
huCD4+ T세포의 % ICOS+
100
80
60
40
20
0
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 μg
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (belatacept) 100 μg
처리

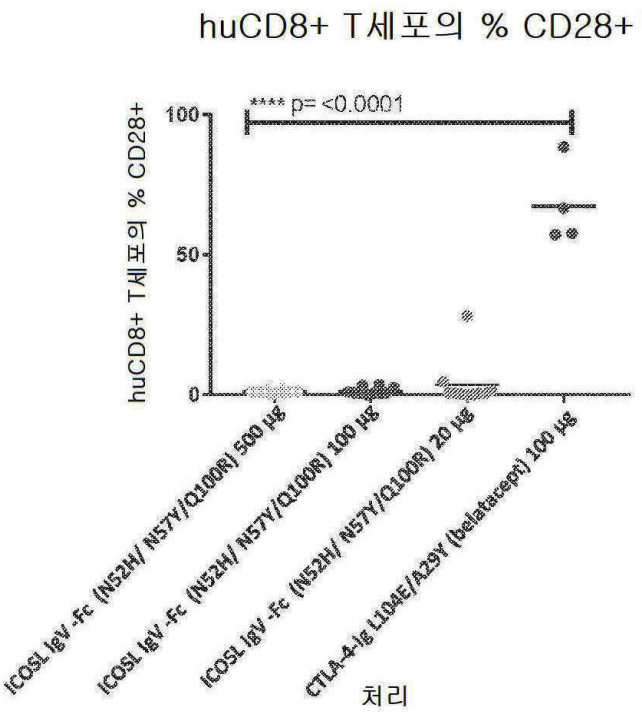
도면15d


huCD8+ T세포의 % ICOS+
**** p<0.0001
huCD8+ T세포의 % ICOS+
80
60
40
20
0
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 μg
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (belatacept) 100 μg
처리

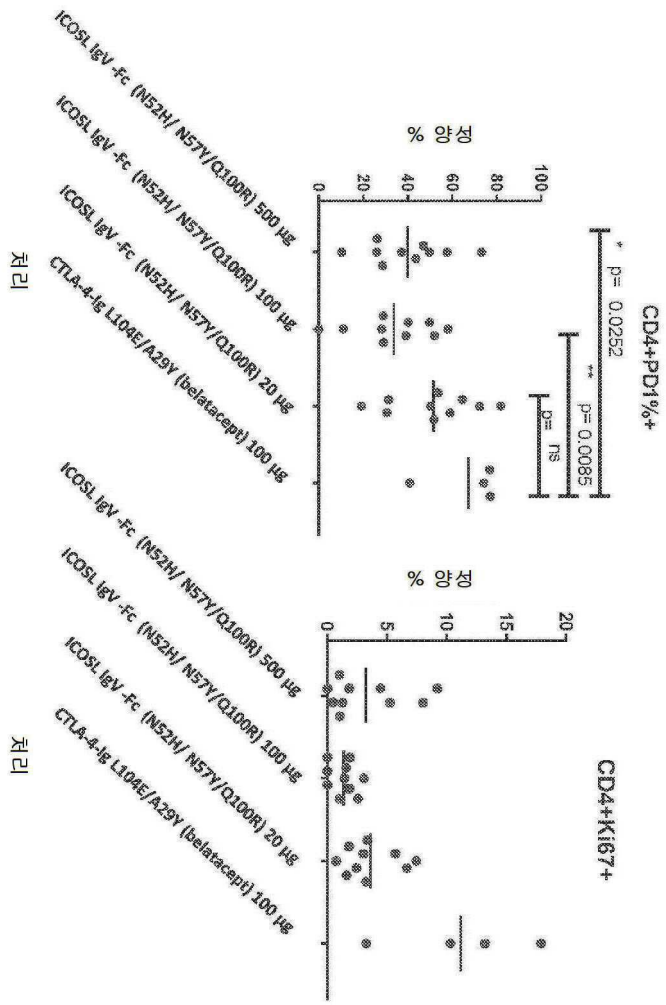
도면15e


huCD4+ T세포의 % CD28+
**** p= <0.0001
huCD4+ T세포의 % CD28+
100
50
0
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 µg
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 µg
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 µg
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (belatacept) 100 µg
처리

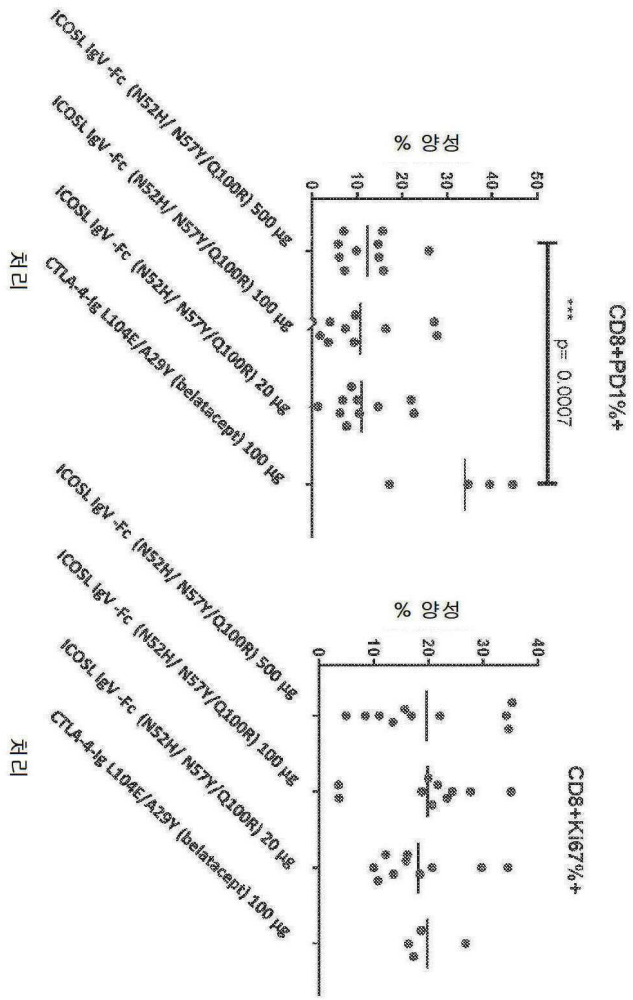
도면15f


huCD8+ T세포의 % CD28+
**** p= <0.0001
huCD8+ T세포의 % CD28+
100
50
0
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 µg
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 µg
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 µg
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (belatacept) 100 µg
처리

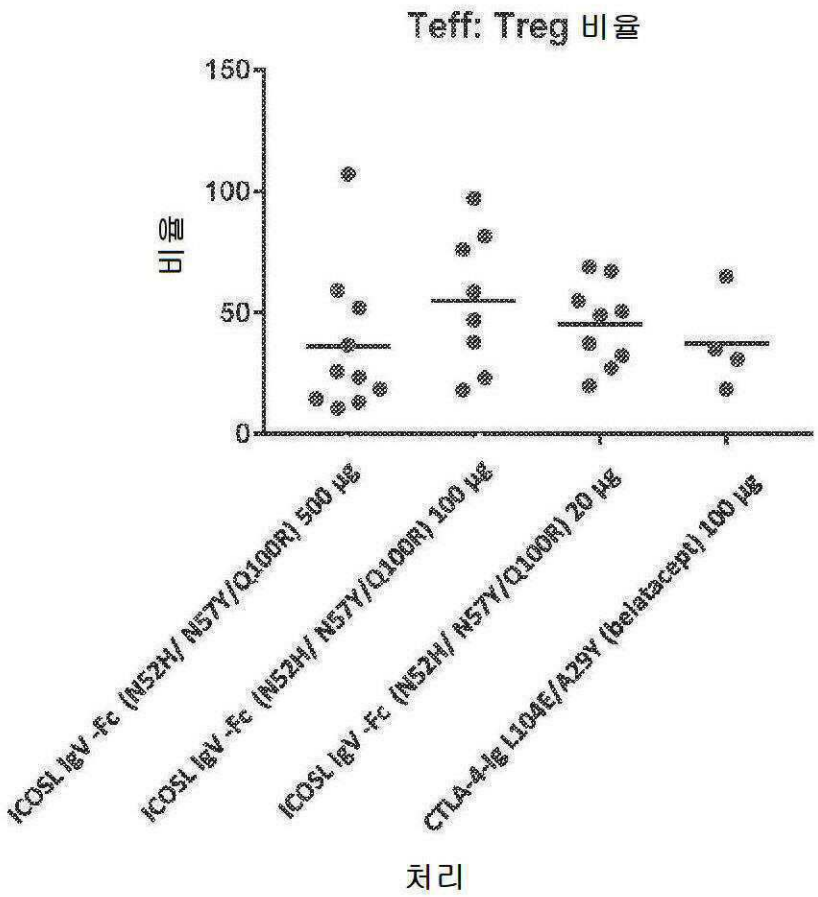
도면16a


CD4+PD1%+
% 양성
0
20
40
60
80
100
* p= 0.0252
** p= 0.0085
p= ns
처리
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 μg
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 μg
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 μg
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (belatacept) 100 μg
CD4+Ki67+
% 양성
0
5
10
15
20
처리
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 μg
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 μg
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 μg
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (belatacept) 100 μg

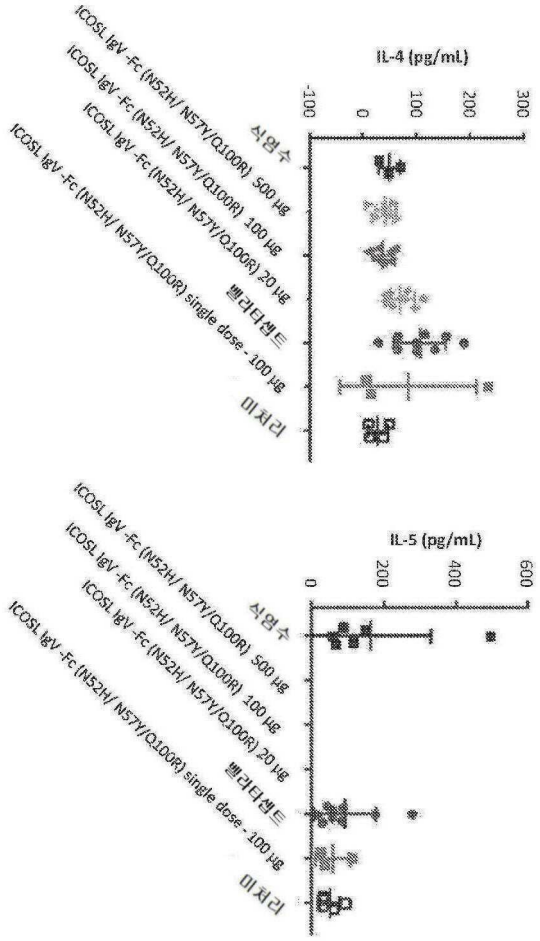
도면16b


CD8+PD1%+
% 양성
0
10
20
30
40
50
*** p= 0.0007
처리
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 µg
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 µg
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 µg
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (belatacept) 100 µg
CD8+KI67%+
% 양성
0
10
20
30
40
처리
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 µg
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 µg
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 µg
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (belatacept) 100 µg

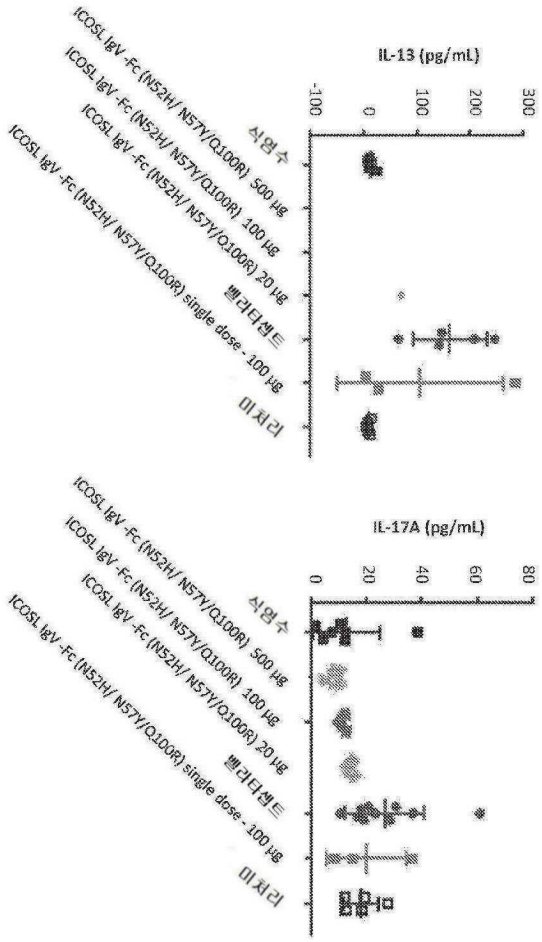
도면16c


Teff: Treg 비율
150
100
50
0
비율
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 μg
CTLA-4-Ig L104E/A29Y (belatacept) 100 μg
처리

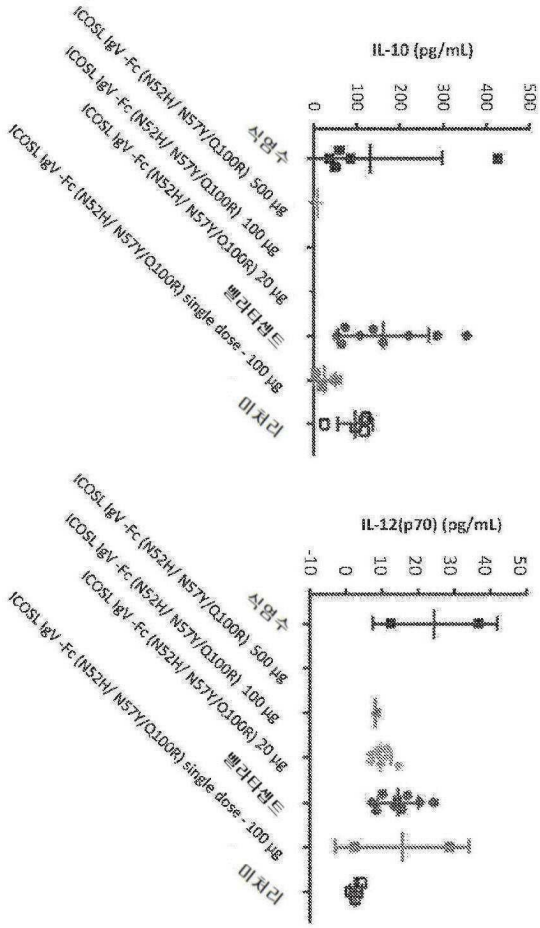
도면17a


IL-4 (pg/mL)
-100
0
100
200
300
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 μg
베리티셉트
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) single dose - 100 μg
미지근
IL-5 (pg/mL)
0
200
400
600
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 μg
베리티셉트
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) single dose - 100 μg
미지근

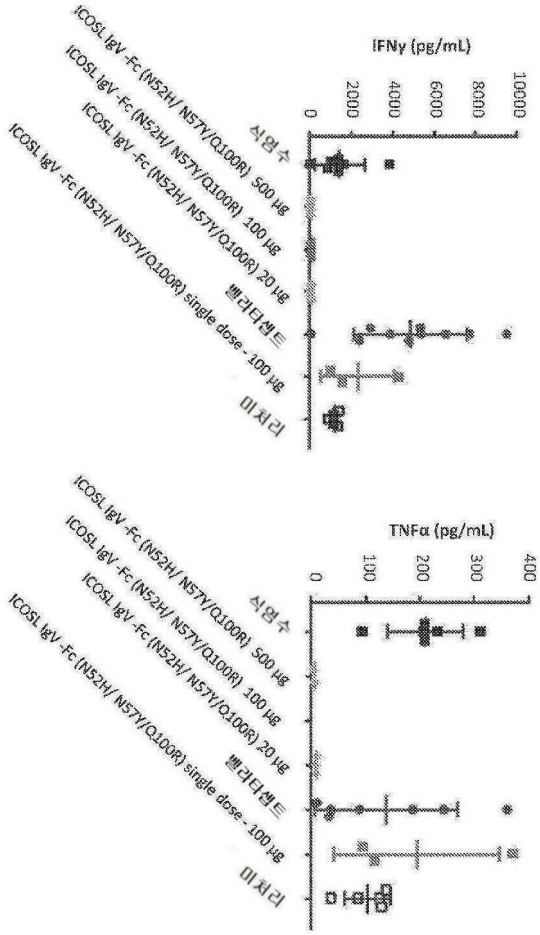
도면17b


IL-13 (pg/mL)
-100
0
100
200
300
식염수
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 μg
벨리티셉트
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) single dose - 100 μg
미처리
IL-17A (pg/mL)
0
20
40
60
80
식염수
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 μg
벨리티셉트
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) single dose - 100 μg
미처리

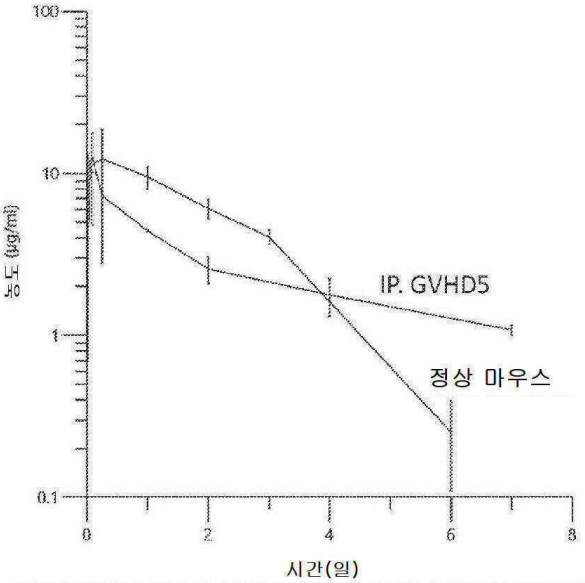
도면17c


IL-10 (pg/mL)
0
100
200
300
400
500
시험수
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 μg
플라시보
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) single dose - 100 μg
미처리
IL-12(p70) (pg/mL)
-10
0
10
20
30
40
50
시험수
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 500 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 100 μg
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 20 μg
플라시보
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R) single dose - 100 μg
미처리

도면17d

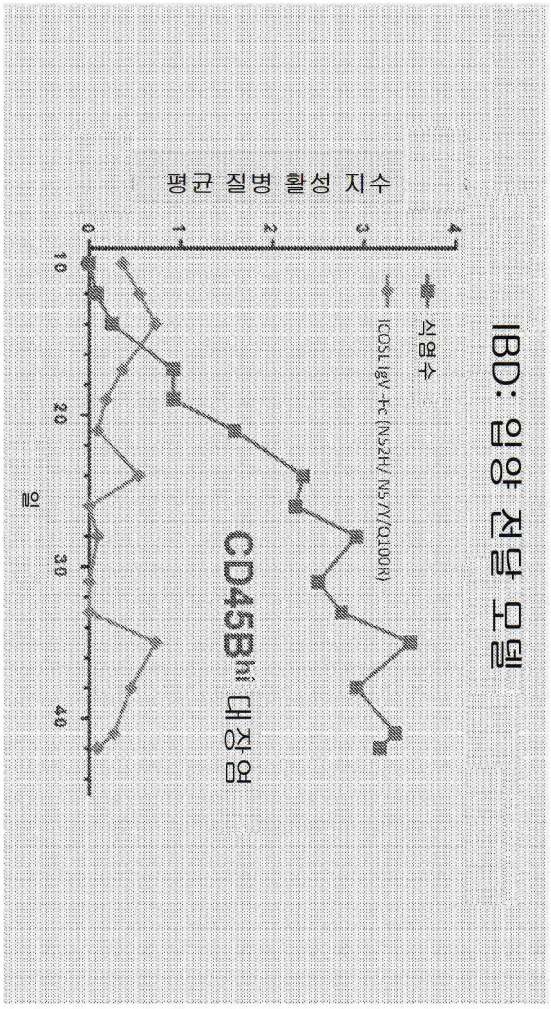


도면17e

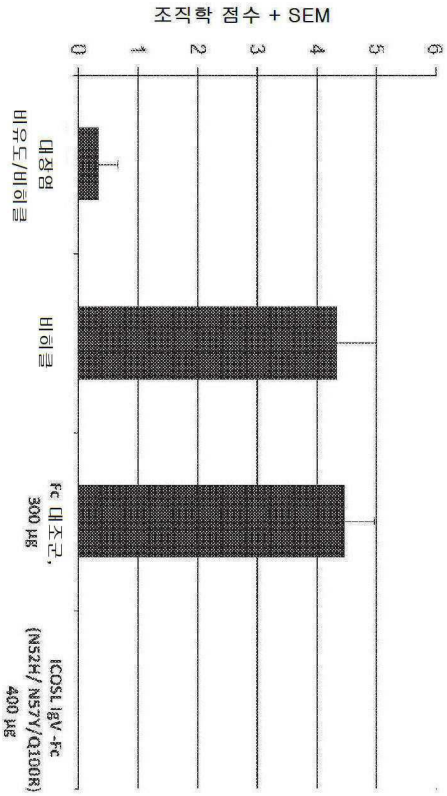


연구	Dose (μg)	Cmax (μg/mL)	T1/2 (day)	AUC (day*μg/mL)
GVHD5	100	12.94	4.02	18.97
정상 마우스	100	12.30	0.84	30.04

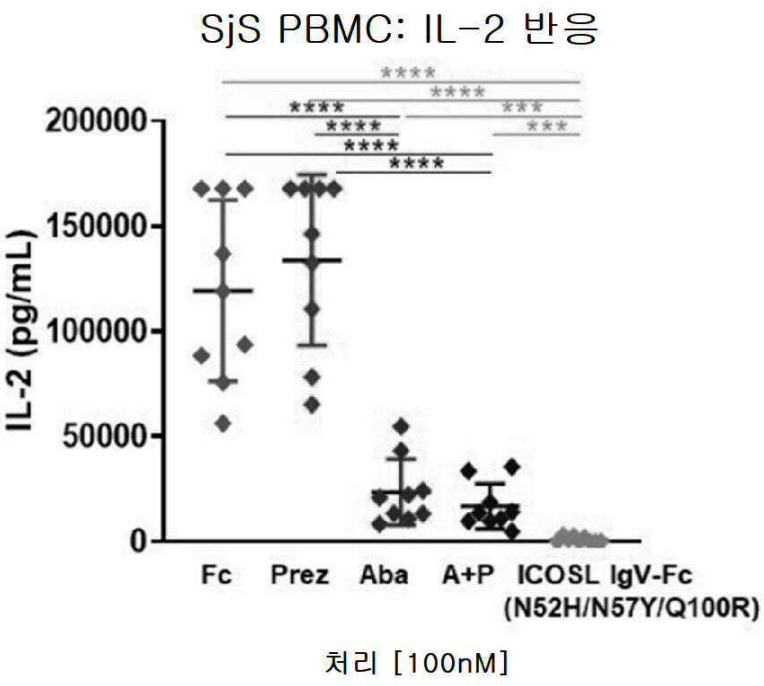
도면18a


IBD: 임상 전달 모델
CD45Rbhi 대장염
식염수
ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q100R)
평균 질병 활성 지수
0
1
2
3
4
10
20
30
40
일

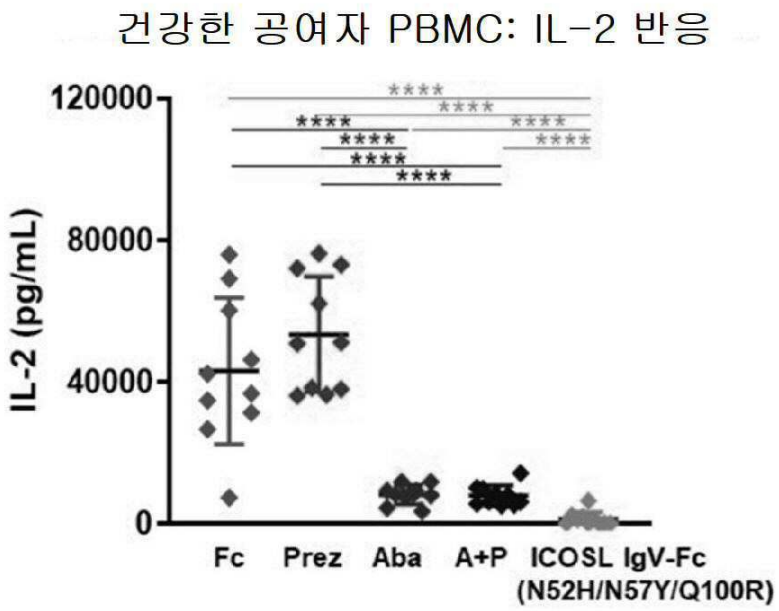
도면18b


조직학 점수 + SEM
0
1
2
3
4
5
6
비히클/대조군
비히클
Fc 대조군, 360 μg
ICOSL IgV -Fc (N52H/ N57Y/Q100R) 400 μg

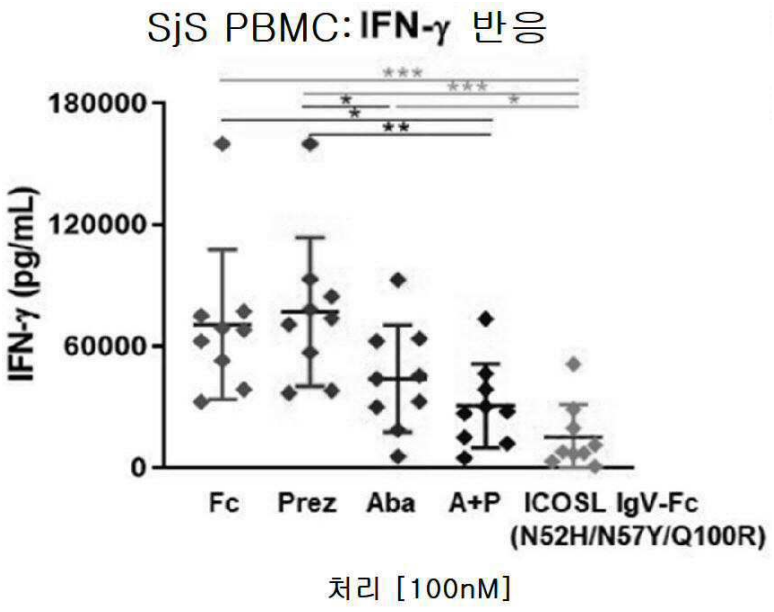
도면19a


SjS PBMC: IL-2 반응
IL-2 (pg/mL)
200000
150000
100000
50000
0
****
***
Fc
Prez
Aba
A+P
ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)
처리 [100nM]

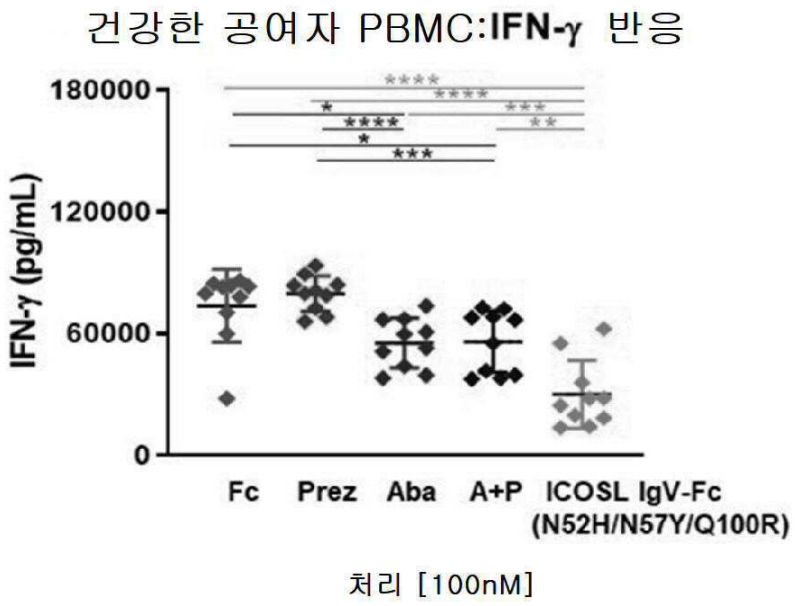
도면19b


건강한 공여자 PBMC: IL-2 반응
IL-2 (pg/mL)
120000
80000
40000
0
****
Fc
Prez
Aba
A+P
ICOSL IgV-Fc
(N52H/N57Y/Q100R)
처리 [100nM]

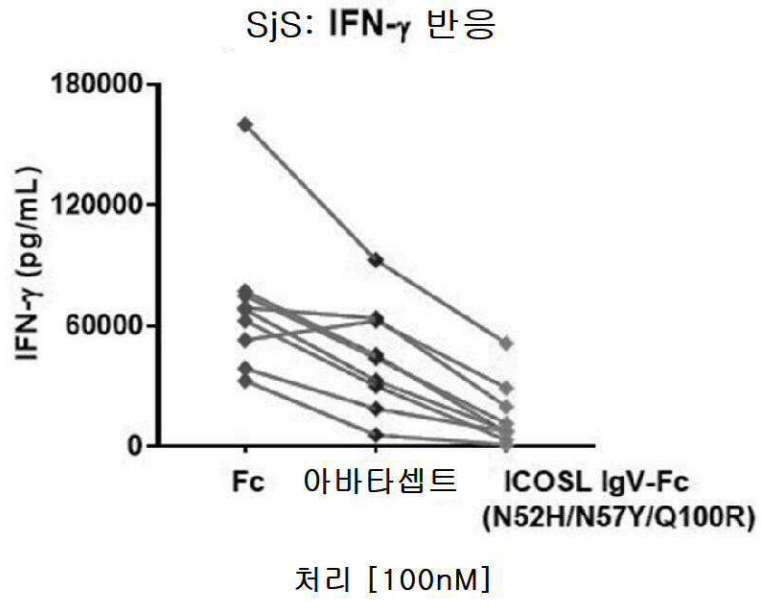
도면19c


SjS PBMC: IFN-γ 반응
IFN-γ (pg/mL)
180000
120000
60000
0
***
**
*
Fc
Prez
Aba
A+P
ICOSL IgV-Fc
(N52H/N57Y/Q100R)
처리 [100nM]

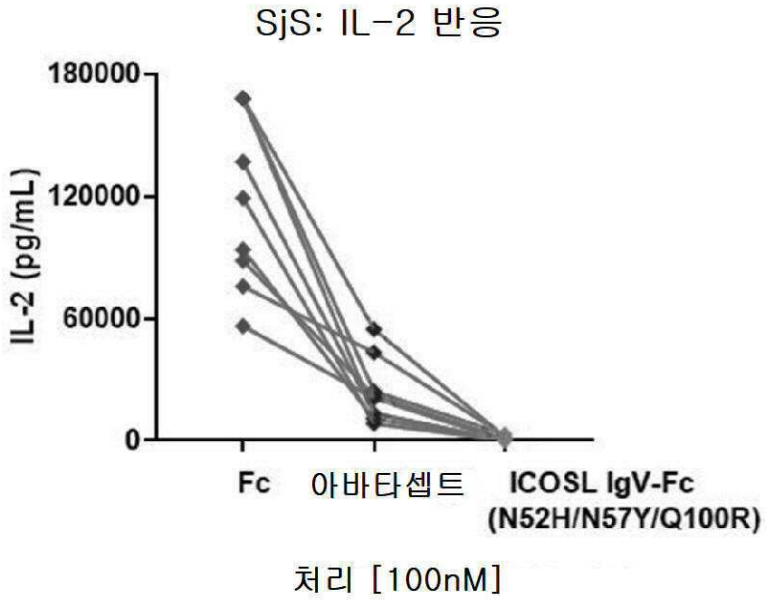
도면19d


건강한 공여자 PBMC:IFN-γ 반응
IFN-γ (pg/mL)
180000
120000
60000
0
Fc
Prez
Aba
A+P
ICOSL IgV-Fc
(N52H/N57Y/Q100R)
처리 [100nM]

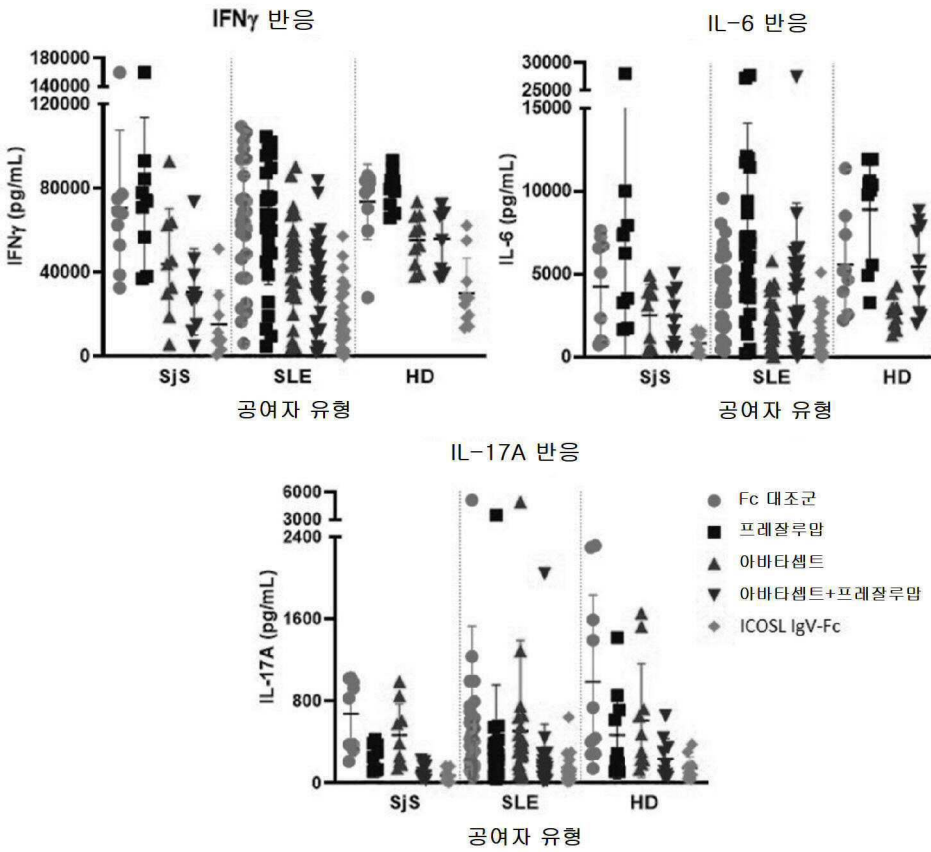
도면19e


SjS: IFN-γ 반응
IFN-γ (pg/mL)
180000
120000
60000
0
Fc
아바타셉트
ICOSL IgV-Fc
(N52H/N57Y/Q100R)
처리 [100nM]

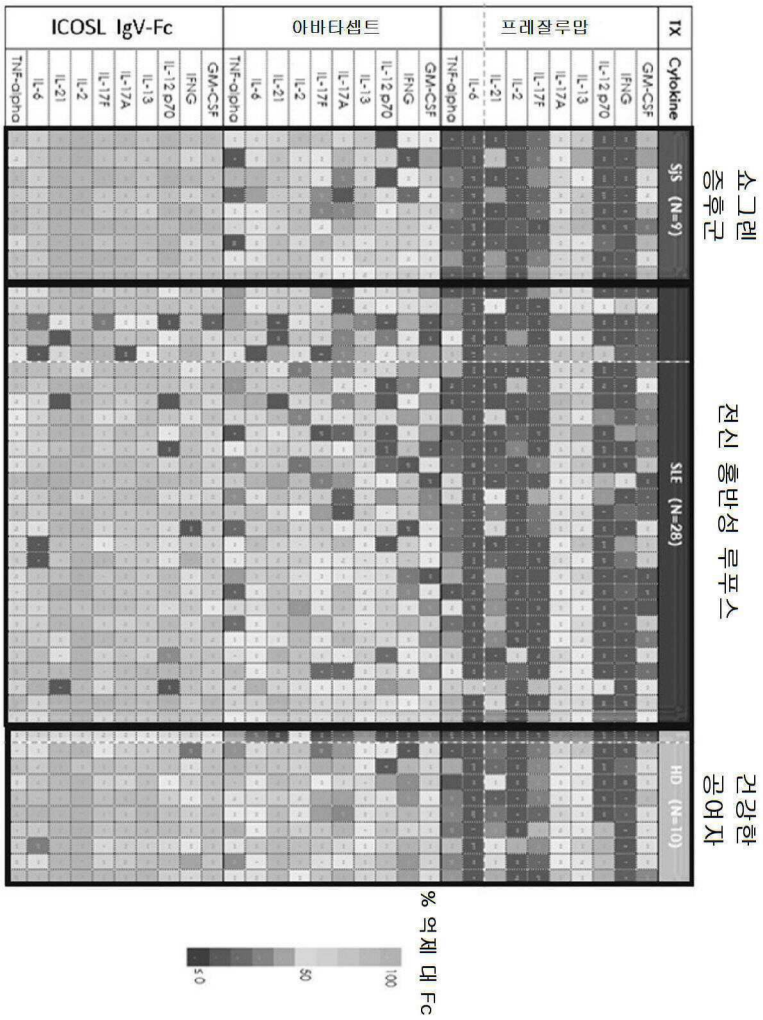
도면19f


SjS: IL-2 반응
180000
120000
60000
0
IL-2 (pg/mL)
Fc
아바타셉트
ICOSL IgV-Fc
(N52H/N57Y/Q100R)
처리 [100nM]

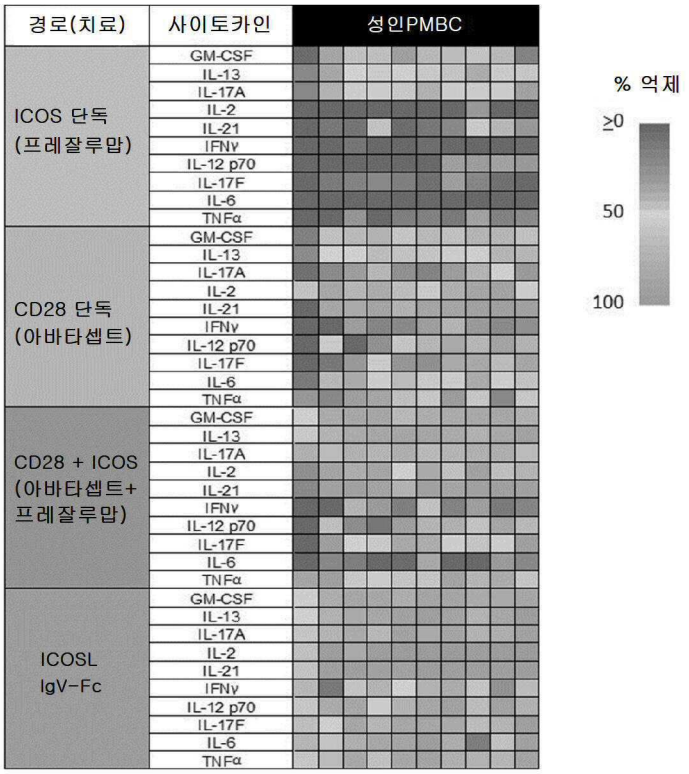
도면19g


IFNγ 반응
180000
140000
120000
80000
40000
0
IFNγ (pg/mL)
SjS
SLE
HD
공여자 유형
IL-6 반응
30000
25000
15000
10000
5000
0
IL-6 (pg/mL)
SjS
SLE
HD
공여자 유형
IL-17A 반응
6000
3000
2400
1600
800
0
IL-17A (pg/mL)
SjS
SLE
HD
공여자 유형
Fc 대조군
프레잘루맙
아바타셉트
아바타셉트+프레잘루맙
ICOSL IgV-Fc

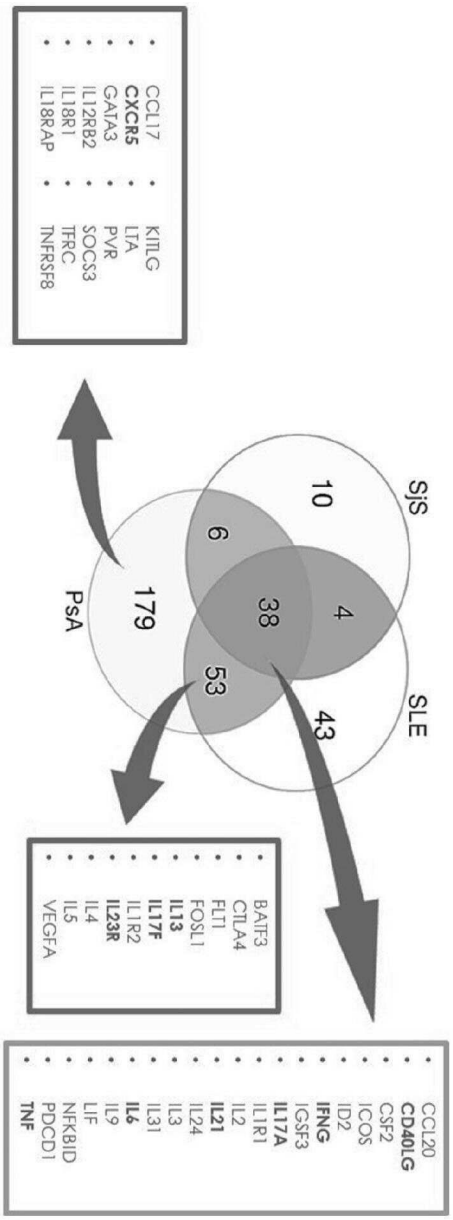
도면19h


항-ICOSL mAb (프레잘루맙); ICOS 단독
아바타셉트 (CTLA4-Fc); CD28 단독
ICOSL IgV-Fc 단독요법 (ICOS+CD28)
TX
Cytokine
프레잘루맙
아바타셉트
ICOSL IgV-Fc
GM-CSF
IFNG
IL-12 p70
IL-13
IL-17A
IL-17F
IL-2
IL-21
IL-6
TNF-alpha
SjS (N=9)
SLE (N=28)
HD (N=10)
쇼그렌 증후군
전신 홍반성 루푸스
건강한 공여자
% 억제 대 Fc
50
100

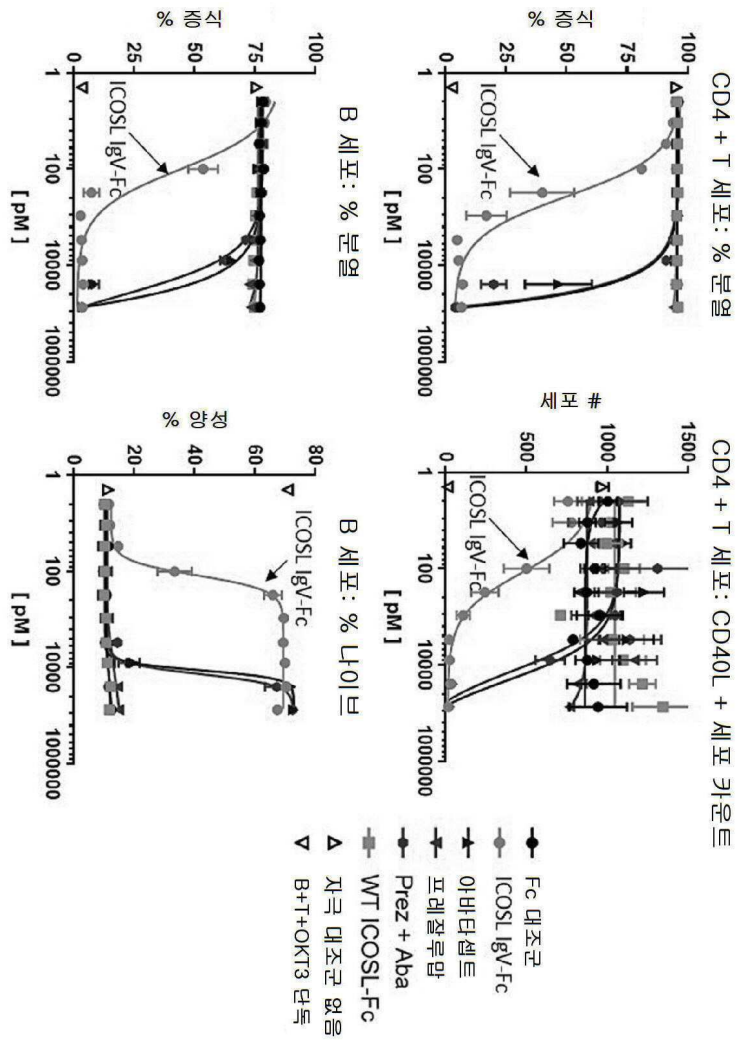
도면19i


경로(치료)
사이토카인
성인PMBC
ICOS 단독 (프레잘루맙)
CD28 단독 (아바타셉트)
CD28 + ICOS (아바타셉트+ 프레잘루맙)
ICOSL IgV-Fc
GM-CSF
IL-13
IL-17A
IL-2
IL-21
IFNγ
IL-12 p70
IL-17F
IL-6
TNFα
% 억제
≥0
50
100

도면19j


CCL17
CXCR5
GATA3
IL12RB2
IL18R1
IL18RAP
KITLG
LTA
PVR
SOCS3
TFRC
TNFRSF8
SjS
SLE
PsA
10
6
4
38
179
53
43
BATF3
CTLA4
FLT1
FOSL1
IL13
IL17F
IL1R2
IL23R
IL4
IL5
VEGFA
CCL20
CD40LG
CSF2
ICOS
ID2
IFNG
IGSF3
IL17A
IL1R1
IL2
IL21
IL24
IL3
IL31
IL6
IL9
LIF
NFKBID
PDCD1
TNF

도면19k


CD4 + T 세포: % 분열
% 증식
ICOSL IgV-Fc
[pM]
CD4 + T 세포: CD40L + 세포 카운트
세포
B 세포: % 분열
B 세포: % 나이브
% 양성
Fc 대조군
ICOSL IgV-Fc
아바타셉트
프레졸루맙
Prez + Aba
WT ICOSL-Fc
자극 대조군 없음
B+T+OKT3 단독

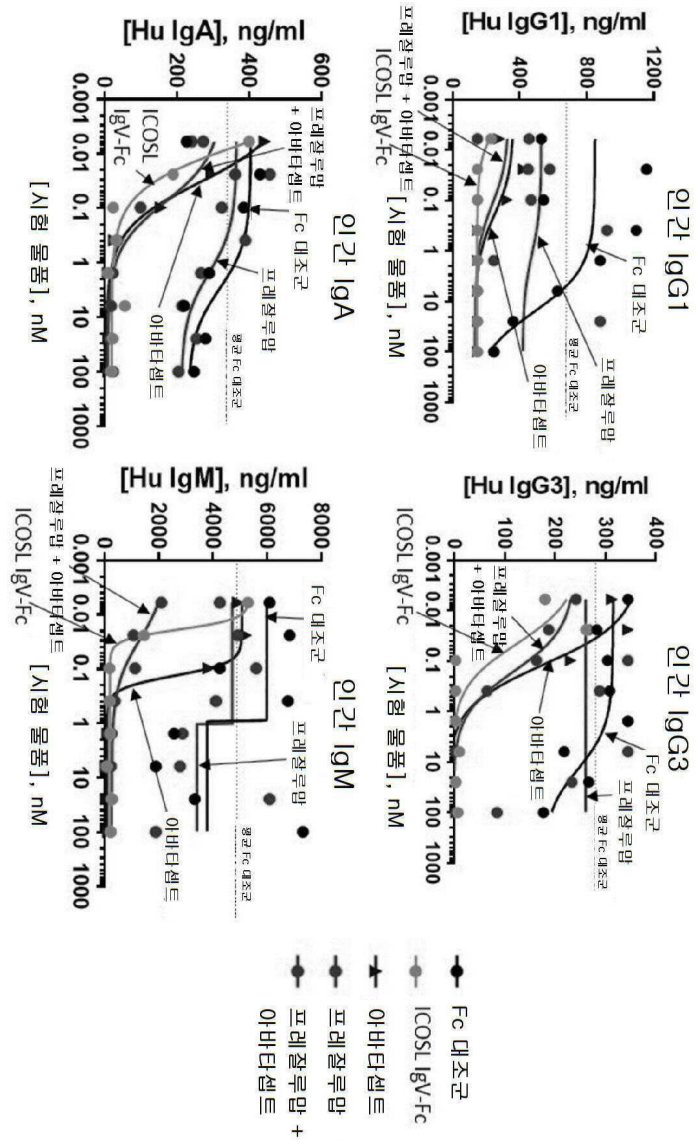
도면191

파라미터	D#	B-세포	IC50s (pM) Fc1.1	WT ICOSL	Preza	Aba	Aba + Prez	Bela	ICOSL IgV-Fc
T 세포 % 증식	A	Naïve	ND	ND	>75000	>75000	>75000	3789	364
	B	Naïve	ND	-	ND	1912	1978	586	36
	D	Total	-	-	-	5.3	-	-	1.2
	E	Total	ND	-	ND	ND	ND	8.6	1.6
T 세포 회수	A	Naïve	ND	>75000	ND	52377	17275	974	71
	B	Naïve	ND	-	36873	527	571	148	11
	D	Total	-	-	-	1.21	-	-	1.04
	E	Total	ND	-	ND	1317	987	6.9	1.4
CD40L+ T 세포 회수	A	Naïve	ND	ND	ND	21511	13115	660	122
	B	Naïve	2181	-	9078	130	90	54	17
	D	Total	-	-	-	1.38	-	-	1.05
	E	Total	ND	-	ND	ND	ND	3.8	1.3
B 세포 % 증식	A	Naïve	ND	>75000	ND	>75000	43219	1898	103
	B	Naïve	ND	-	ND	1912	1978	586	36
	D	Total	-	-	-	1.32	-	-	1.15
	E	Total	ND	-	ND	1067	83	3.6	1.6
B 세포 % 나이브	A	Naïve	14518	7413	12218	11269	13546	1021	121
	B	Naïve	ND	-	9619	671	714	332	35
	D	Total	-	-	-	14.7	-	-	1.3
	E	Total	ND	-	5	1390	132	4	1.8
활성화된 B 세포 % (Non-Class-Switched)	A	Naïve	ND	7088	526	29381	44841	1772	113
	B	Naïve	ND	-	12843	532	616	232	24
	D	Total	-	-	-	1.09	-	-	1.07
	E	Total	ND	-	8.6	154	25	2.4	1.4

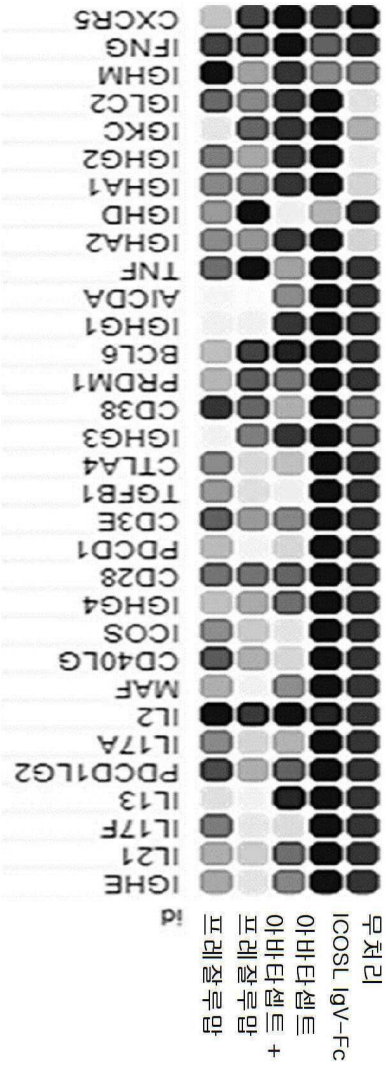
(ND) 무측정 (-) 무분석

Worse ← → Better

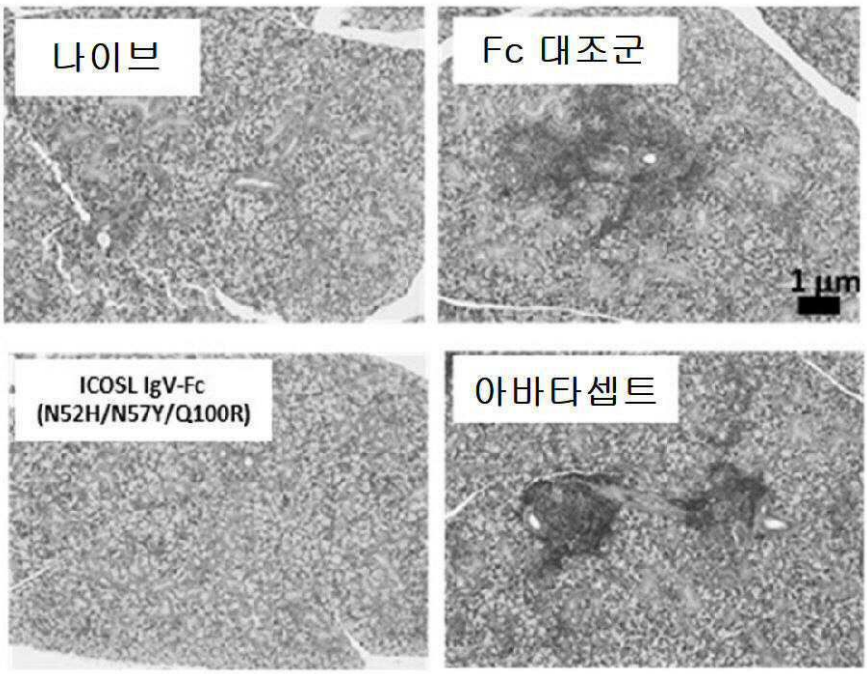
도면19m


인간 IgG1
[Hu IgG1], ng/ml
Fc 대조군
프레절루맙
아바타셉트
용균 Fc 대조군
프레절루맙 + 아바타셉트 ICOSL IgV-Fc
[시험 물품], nM
인간 IgA
[Hu IgA], ng/ml
ICOSL IgV-Fc
인간 IgG3
[Hu IgG3], ng/ml
인간 IgM
[Hu IgM], ng/ml
Fc 대조군
ICOSL IgV-Fc
아바타셉트
프레절루맙
프레절루맙 + 아바타셉트

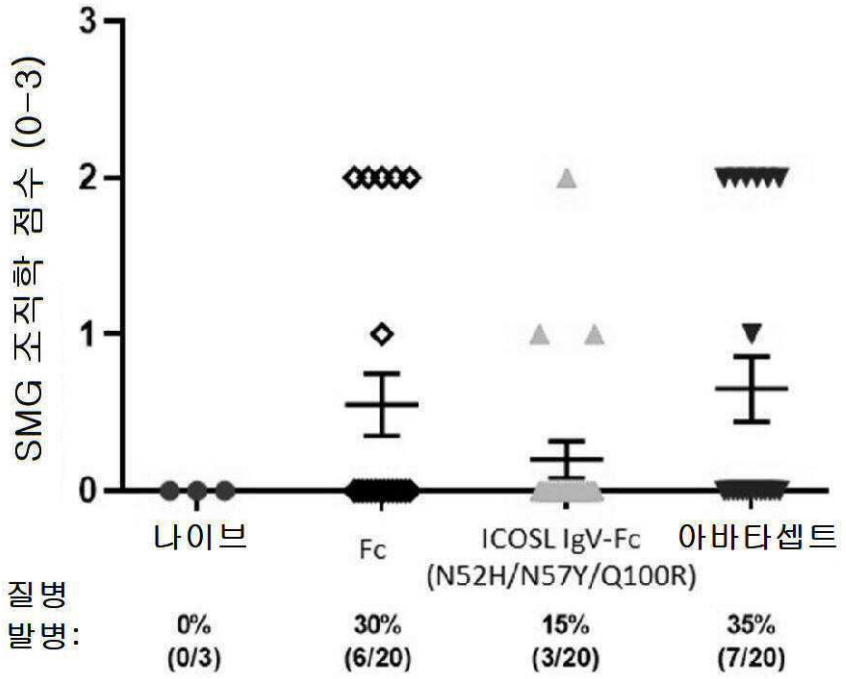
도면19n


무처리
ICOSL IgV-Fc
아바타셉트
아바타셉트 + 프레졸루맙
프레졸루맙
id
IGHE
IL21
IL17F
IL13
PDCD1LG2
IL17A
IL2
MAF
CD40LG
ICOS
IGHG4
CD28
PDCD1
CD3E
TGFB1
CTLA4
IGHG3
CD38
PRDM1
BCL6
IGHG1
AICDA
TNF
IGHA2
IGHD
IGHA1
IGHG2
IGKC
IGLC2
IGHM
IFNG
CXCR5

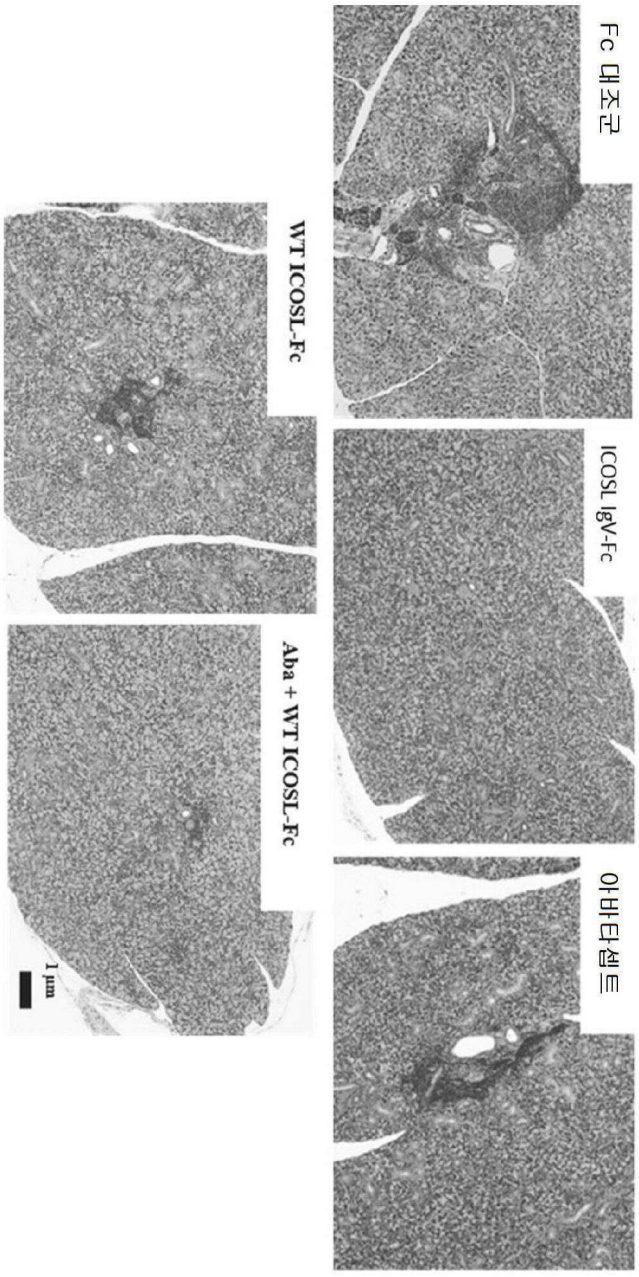
도면20a


나이브
Fc 대조군
1 μm
ICOSL IgV-Fc
(N52H/N57Y/Q100R)
아바타셉트

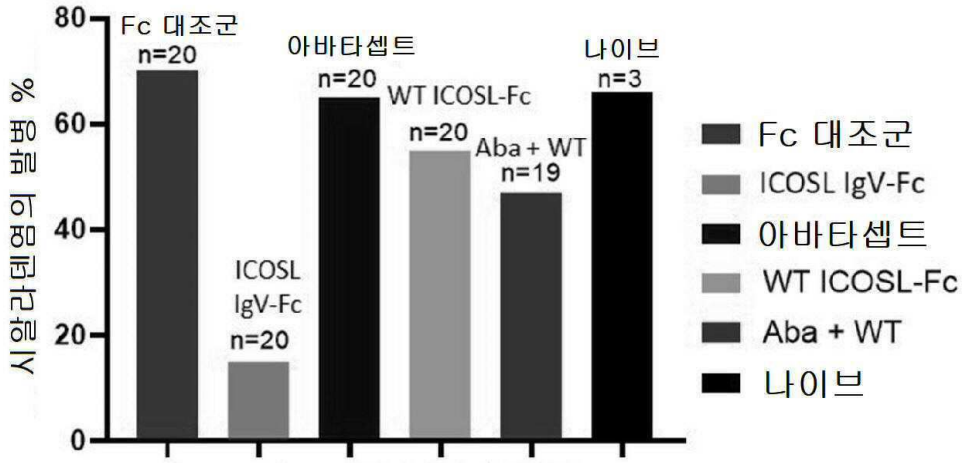
도면20b


SMG 조직학 점수 (0-3)
3
2
1
0
나이브
Fc
ICOSL IgV-Fc
(N52H/N57Y/Q100R)
아바타셉트
질병
발병:
0%
(0/3)
30%
(6/20)
15%
(3/20)
35%
(7/20)

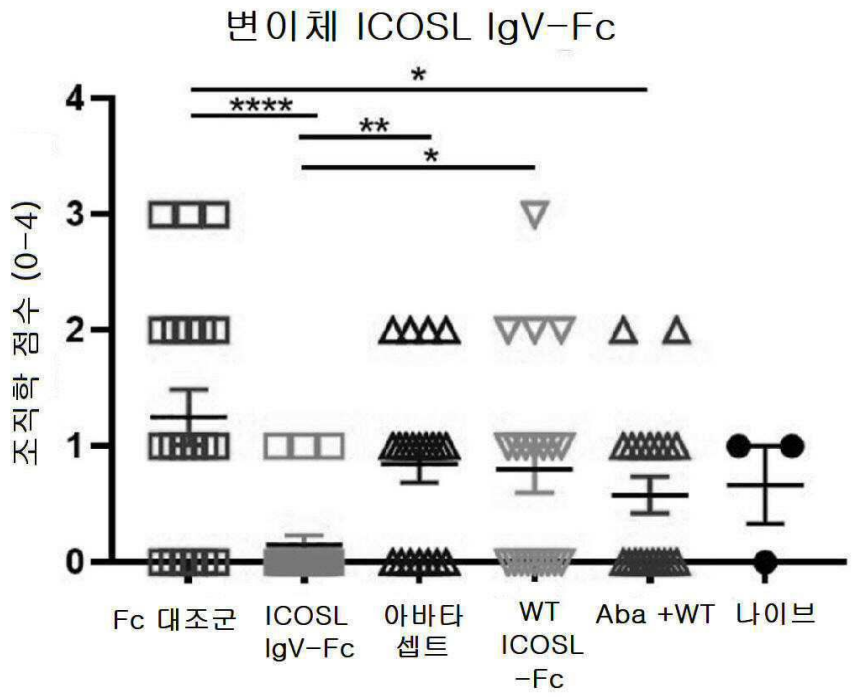
도면20c



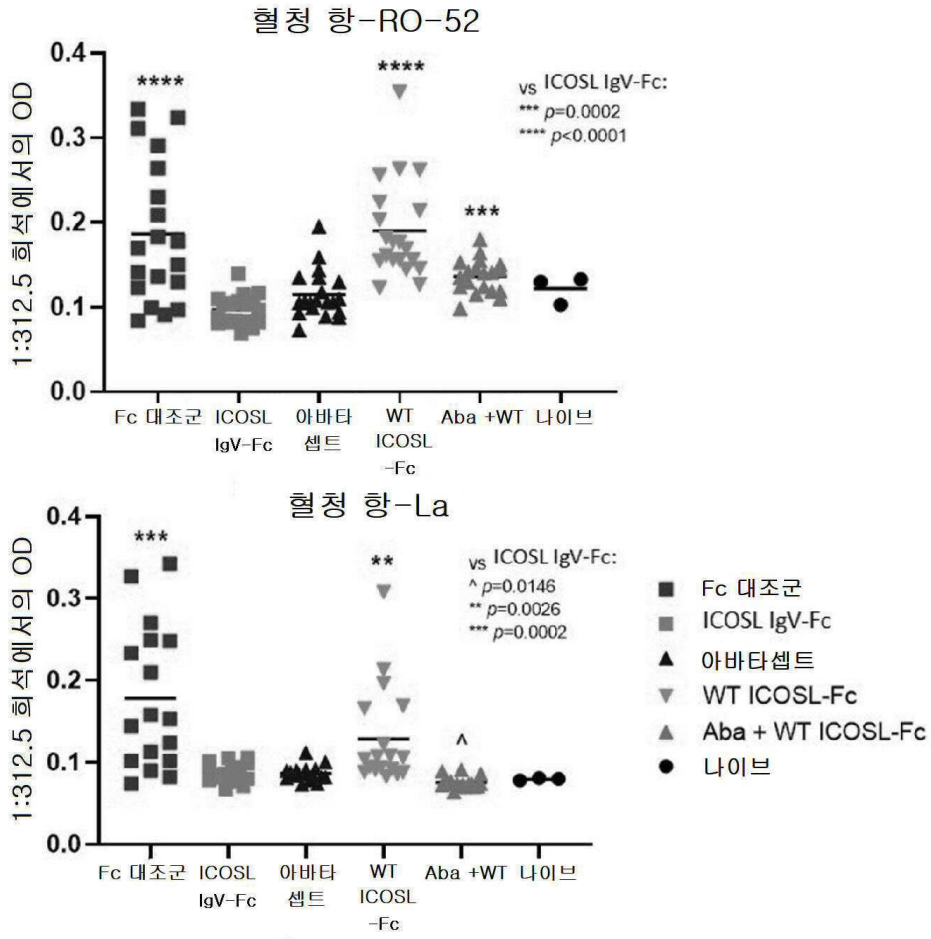
도면20d


80
60
40
20
0
시알라덴염의 발병 %
Fc 대조군
n=20
ICOSL
IgV-Fc
n=20
아바타셉트
n=20
WT ICOSL-Fc
n=20
Aba + WT
n=19
나이브
n=3
Fc 대조군
ICOSL IgV-Fc
아바타셉트
WT ICOSL-Fc
Aba + WT
나이브

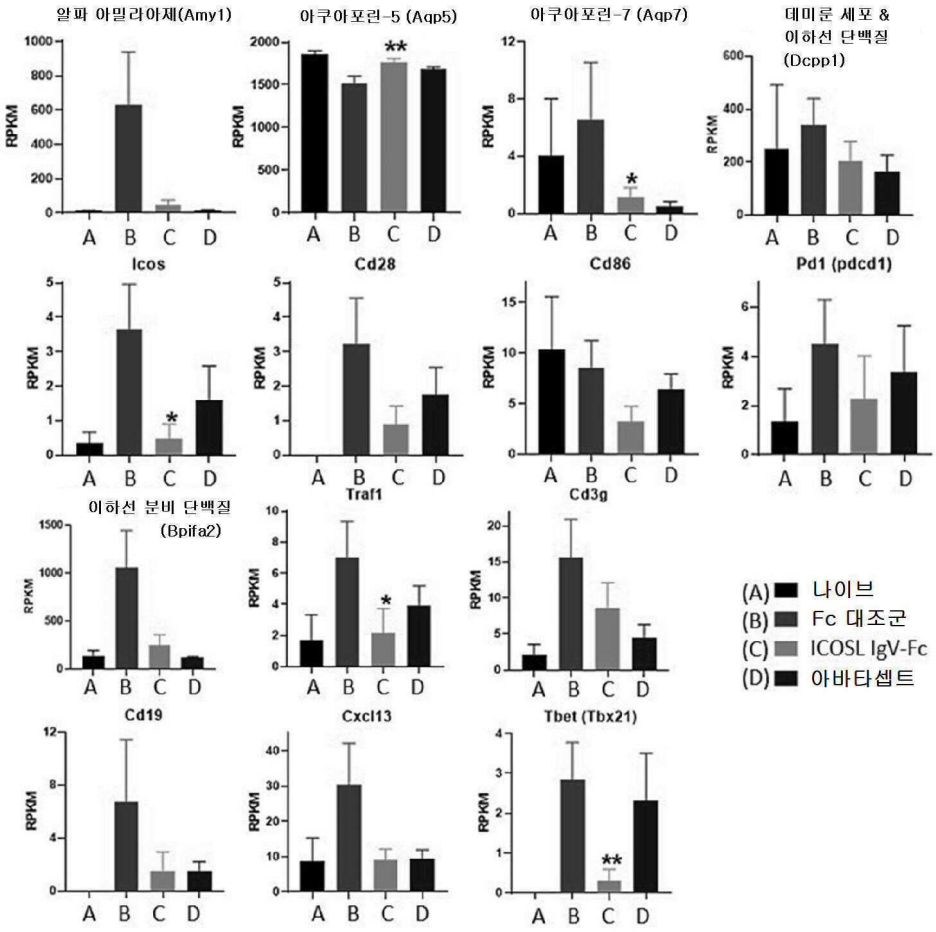
도면20e


변이체 ICOSL IgV-Fc
*
****
**
*
4
3
2
1
0
조직학 점수 (0-4)
Fc 대조군
ICOSL IgV-Fc
아바타셉트
WT ICOSL-Fc
Aba +WT
나이브

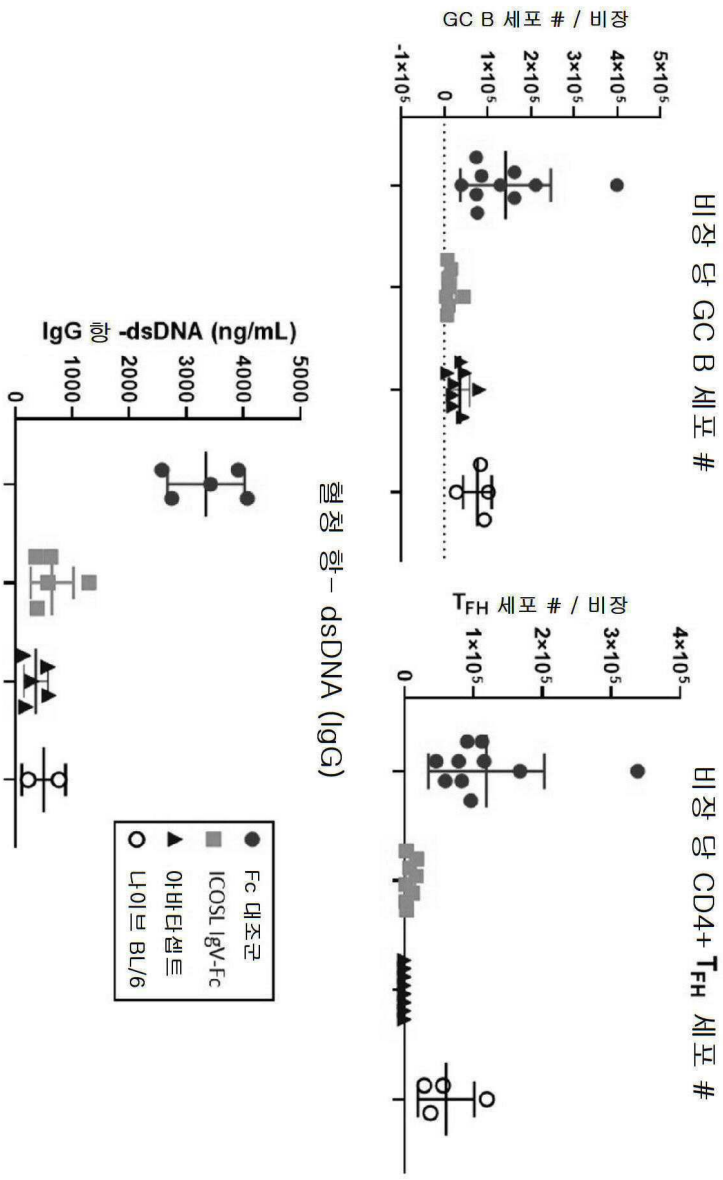
도면20f


혈청 항-RO-52
1:312.5 희석에서의 OD
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
****
****
***
vs ICOSL IgV-Fc:
*** p=0.0002
**** p<0.0001
Fc 대조군
ICOSL IgV-Fc
아바타 셉트
WT ICOSL -Fc
Aba +WT
나이브
혈청 항-La
1:312.5 희석에서의 OD
***
**
^
vs ICOSL IgV-Fc:
^ p=0.0146
** p=0.0026
*** p=0.0002
Fc 대조군
ICOSL IgV-Fc
아바타 셉트
WT ICOSL -Fc
Aba +WT
나이브
Fc 대조군
ICOSL IgV-Fc
아바타셉트
WT ICOSL-Fc
Aba + WT ICOSL-Fc
나이브

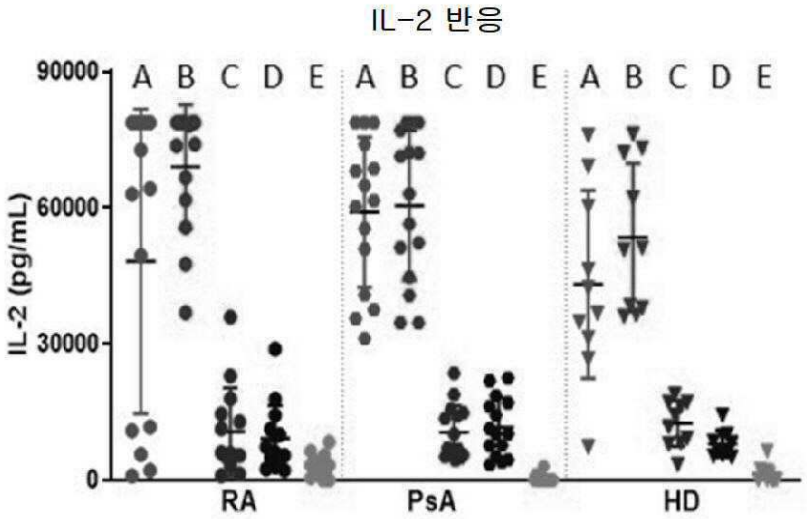
도면20g


알파 아밀라아제(Amy1)
아쿠아포린-5 (Aqp5)
아쿠아포린-7 (Aqp7)
데미룬 세포 & 이하선 단백질 (Dcpp1)
Icos
Cd28
Cd86
Pd1 (pdcd1)
이하선 분비 단백질 (Bpifa2)
Traf1
Cd3g
Cd19
Cxcl13
Tbet (Tbx21)
RPKM
A B C D
(A) 나이브
(B) Fc 대조군
(C) ICOSL IgV-Fc
(D) 아바타셉트

도면20h

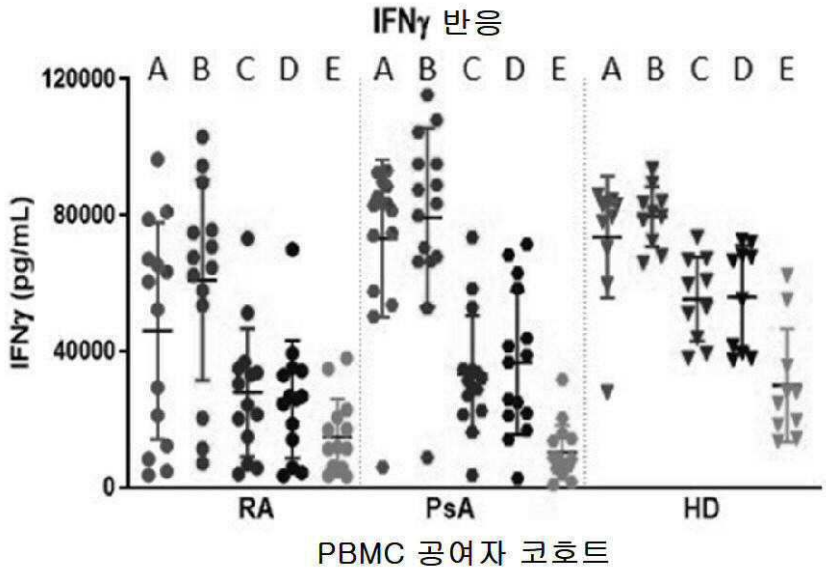

GC B 세포 # / 비장
5×10^5
4×10^5
3×10^5
2×10^5
1×10^5
0
-1×10^5
비장 당 GC B 세포 #
TFH 세포 # / 비장
4×10^5
3×10^5
2×10^5
1×10^5
0
비장 당 CD4+ TFH 세포 #
IgG 항 -dsDNA (ng/mL)
5000
4000
3000
2000
1000
0
혈청 항- dsDNA (IgG)
Fc 대조군
ICOSL IgV-Fc
아바타셉트
나이브 BL/6

도면21a



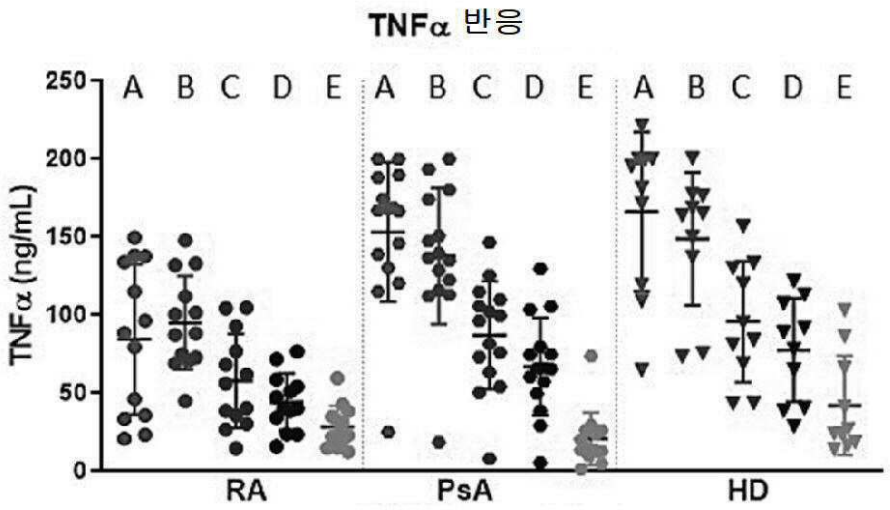
(A) Fc 대조군
(B) 프레잘루맙
(C) 아바타셉트
(D) 아바타셉트 + 프레잘루맙
(E) ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)

도면21b



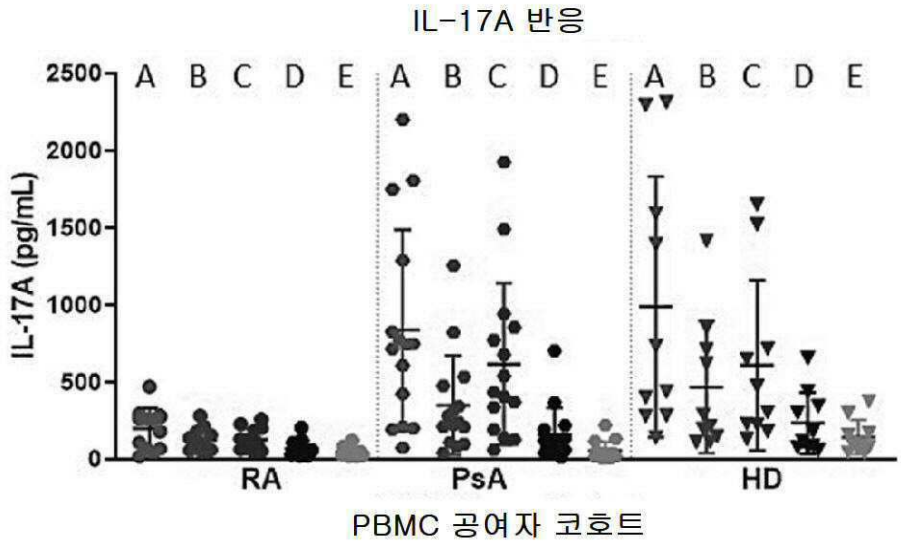
(A) Fc 대조군
(B) 프레잘루맙
(C) 아바타셉트
(D) 아바타셉트 + 프레잘루맙
(E) ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)

도면21c



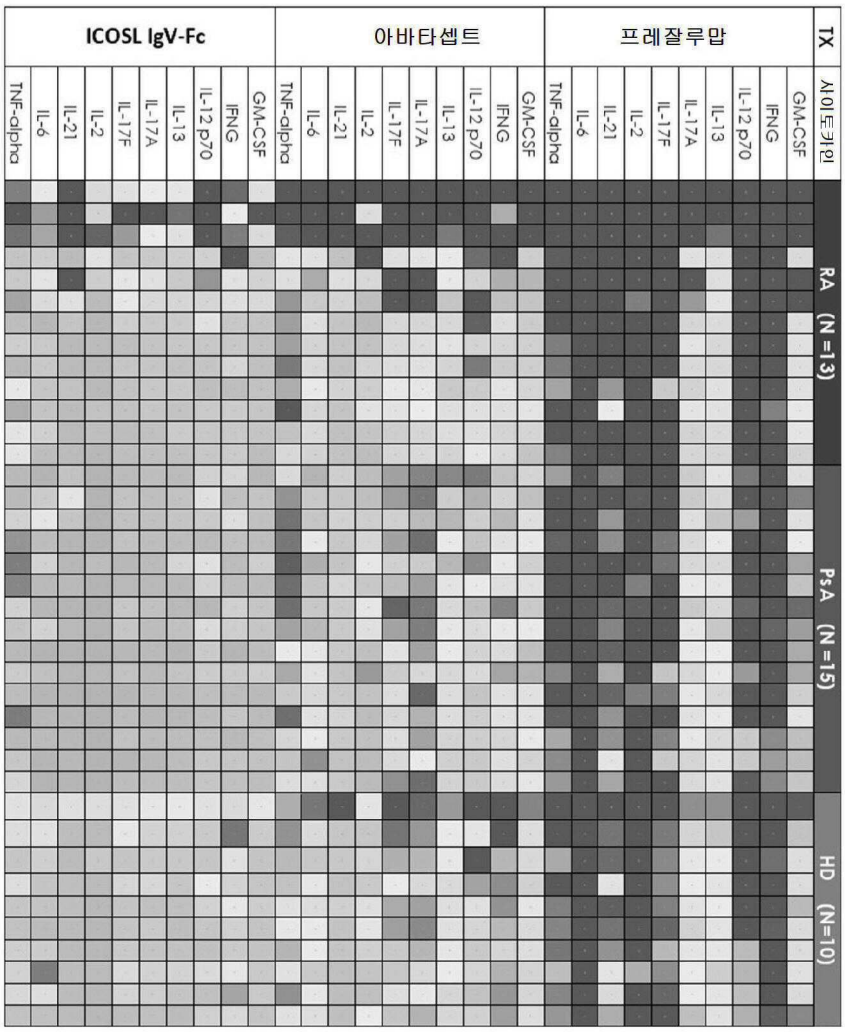
(A) Fc 대조군
(B) 프레잘루맙
(C) 아바타셉트
(D) 아바타셉트 + 프레잘루맙
(E) ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)

도면21d

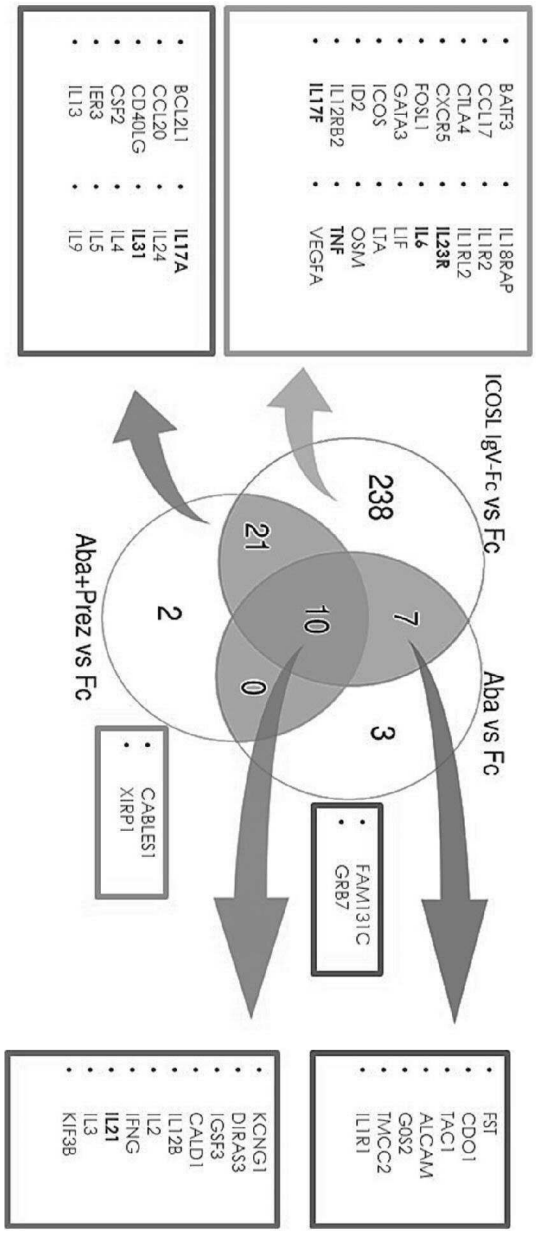


(A) Fc 대조군
(B) 프레잘루맙
(C) 아바타셉트
(D) 아바타셉트 + 프레잘루맙
(E) ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)

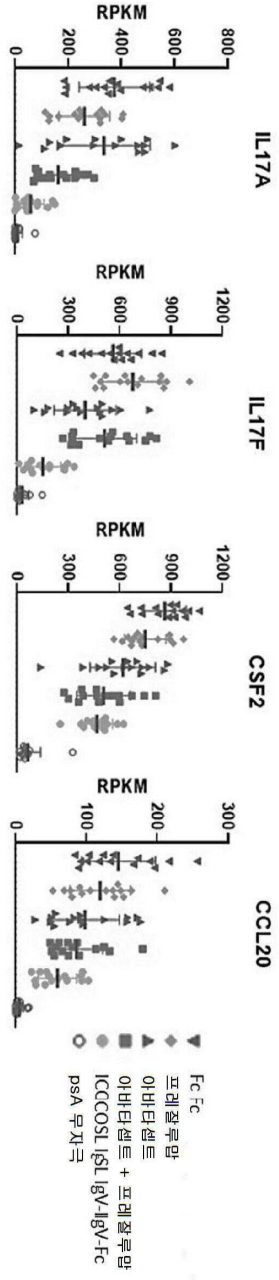
도면21e


% 억제
(Fc 대조군에 대함)
≥0
50
100
TX
사이토카인
프레잘루맙
아바타셉트
ICOSL IgV-Fc
GM-CSF
IFNG
IL-12 p70
IL-13
IL-17A
IL-17F
IL-2
IL-21
IL-6
TNF-alpha
RA (N=13)
PsA (N=15)
HD (N=10)

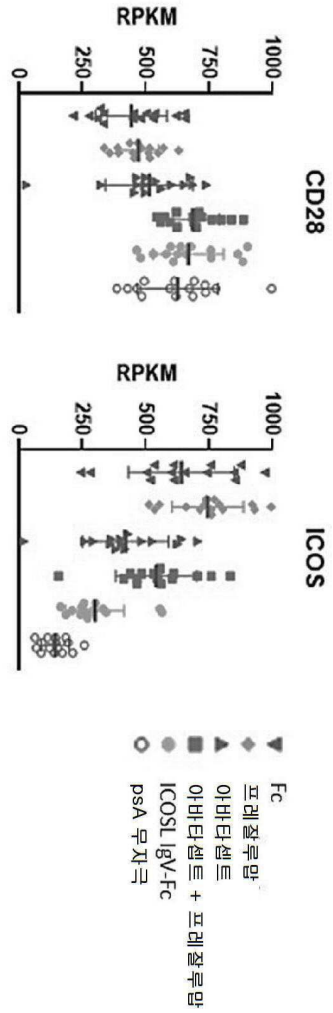
도면22a


ICOSL IgV-Fc vs Fc
Aba+Prez vs Fc
Aba vs Fc
238
21
10
7
2
0
3
BATF3
CCL17
CTLA4
CXCR5
FOSL1
GATA3
ICOS
ID2
IL12RB2
IL17F
IL18RAP
IL1R2
IL1RL2
IL23R
IL6
LIF
LTA
OSM
TNF
VEGFA
BCL2L1
CCL20
CD40LG
CSF2
IER3
IL13
IL17A
IL24
IL31
IL4
IL5
IL9
CABLES1
XIRP1
FAM131C
GRB7
FST
CDO1
TAC1
ALCAM
G0S2
TMCC2
IL1R1
KCNG1
DIRAS3
IGSF3
CALD1
IL12B
IL2
IFNG
IL21
IL3
KIF3B

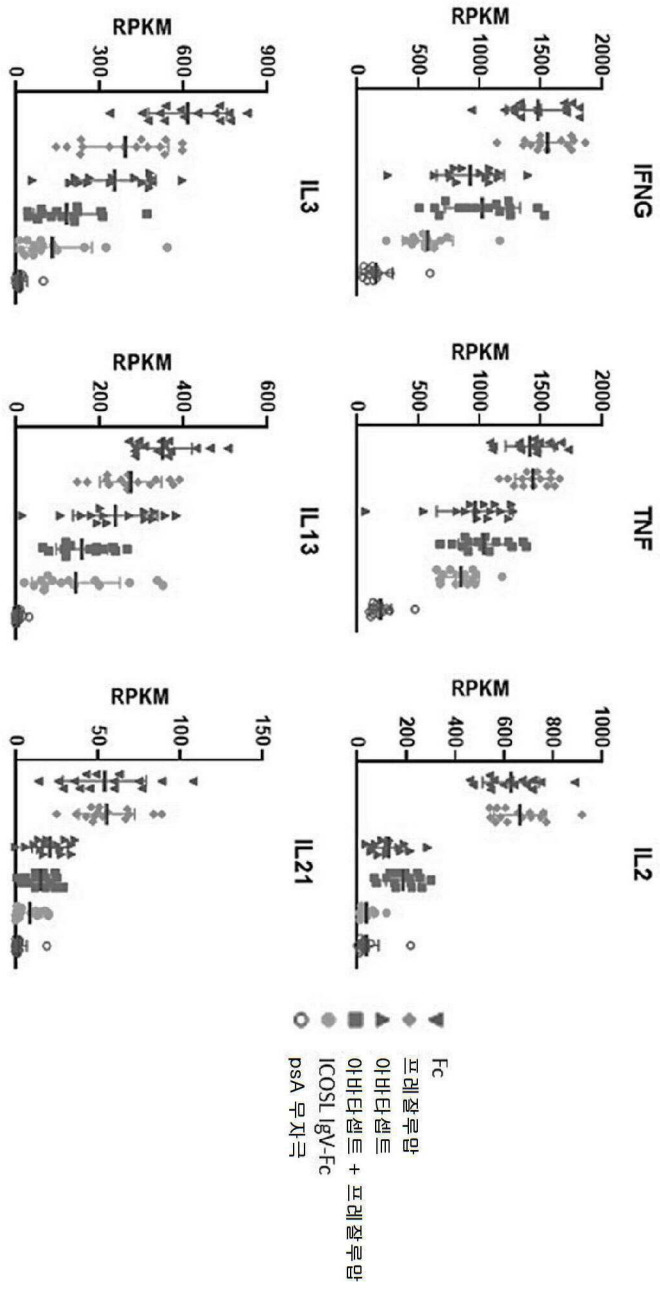
도면22b


RPKM
0
200
400
600
800
IL17A
RPKM
0
300
600
900
1200
IL17F
RPKM
0
300
600
900
1200
CSF2
RPKM
0
100
200
300
CCL20
Fc Fc
프레졸루맙
아바타셉트
아바타셉트 + 프레졸루맙
ICCCOSL IβSL IgV-IIgV-Fc
psA 무자극

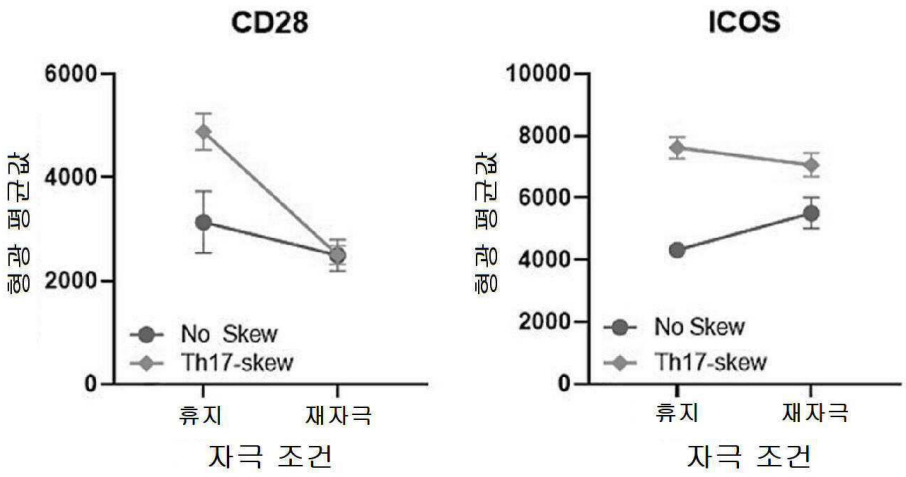
도면22c


RPKM
0
250
500
750
1000
CD28
RPKM
0
250
500
750
1000
ICOS
Fc
프레젤루맙
아바타셉트
아바타셉트 + 프레젤루맙
ICOSL IgV-Fc
psA 무자극

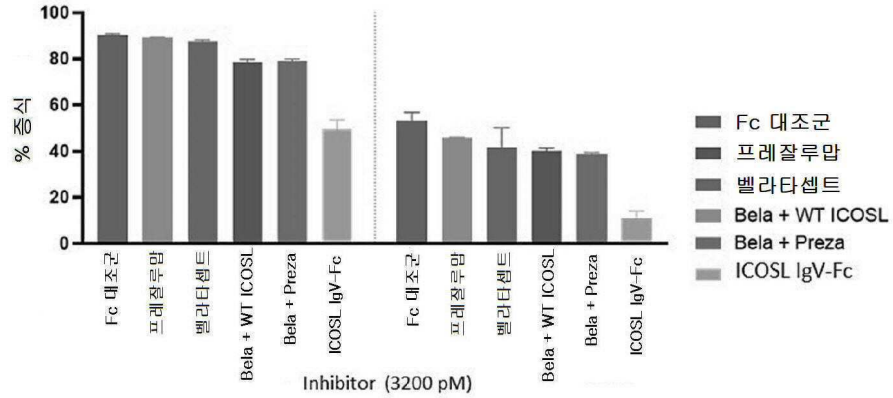
도면22d


RPKM
IFNG
IL3
TNF
IL13
IL2
IL21
Fc
프레젤루맙
아바타셉트
아바타셉트 + 프레젤루맙
ICOSL IgV-Fc
psA 무자극

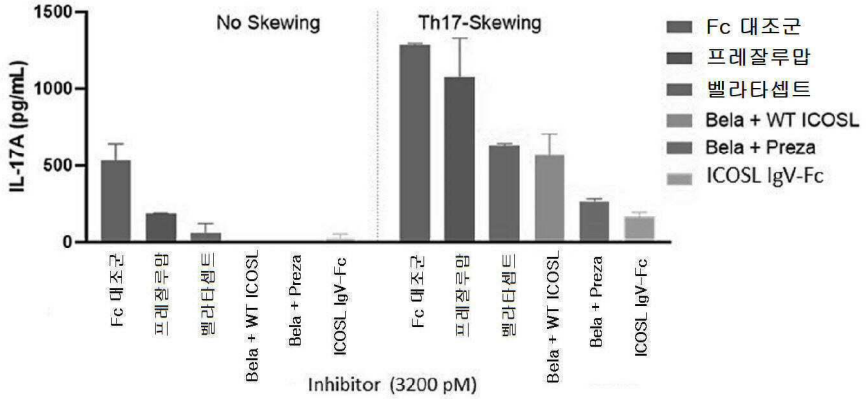
도면23a



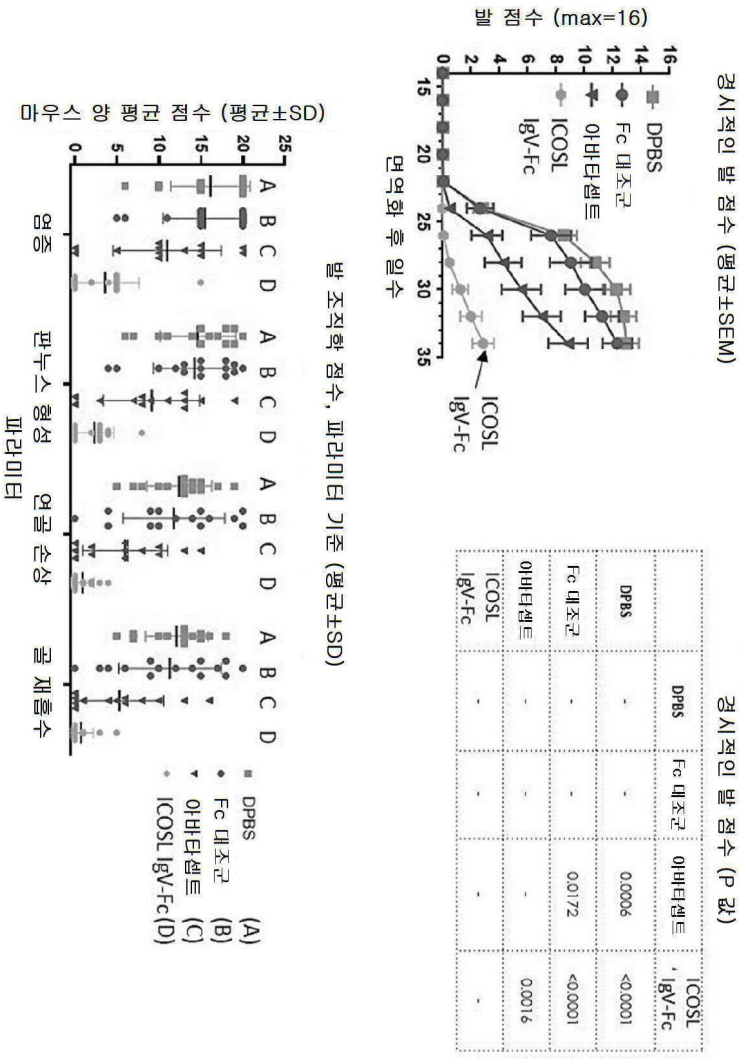
도면23b



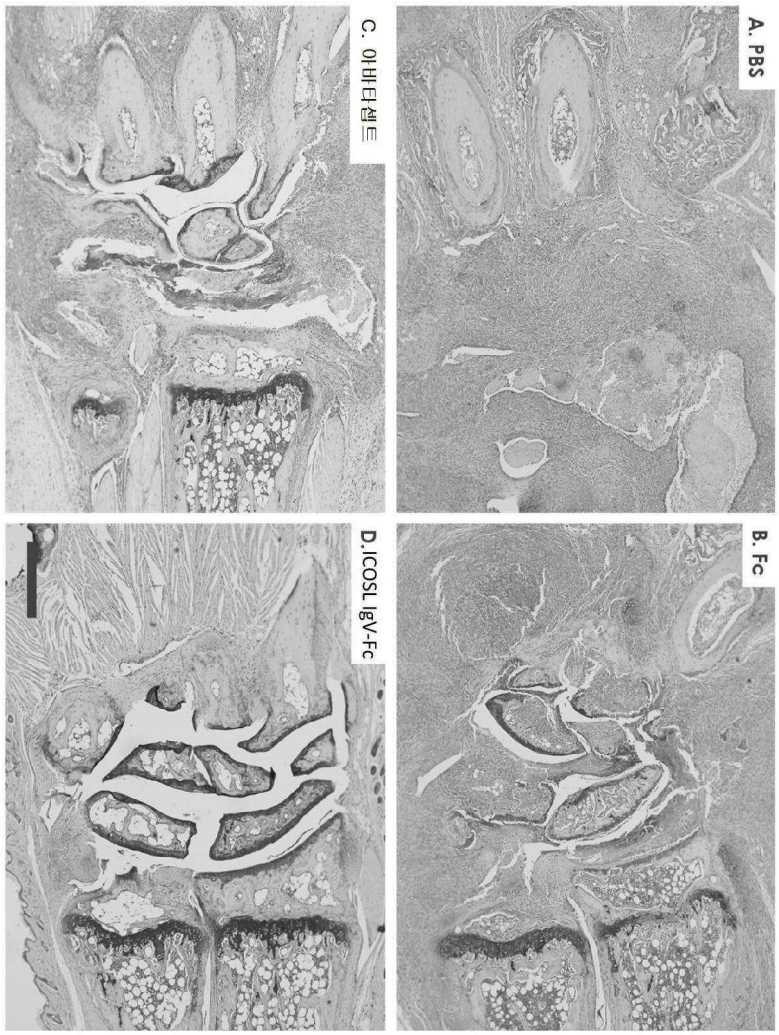
도면23c



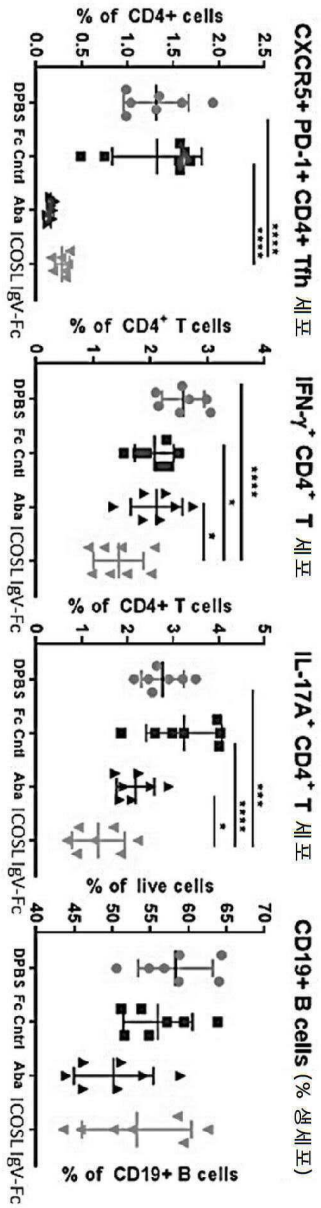
도면24a


경시적인 발 점수 (평균±SEM)
발 점수 (max=16)
DPBS
Fc 대조군
아바타셉트
ICOSL IgV-Fc
면역화 후 일수
ICOSL IgV-Fc
경시적인 발 점수 (P 값)
DPBS
Fc 대조군
아바타셉트
ICOSL IgV-Fc
0.0006
<0.0001
0.0172
<0.0001
0.0016
발 조직학 점수, 파라미터 기준 (평균±SD)
마우스 양 평균 점수 (평균±SD)
염증
판누스 형성
연골 손상
골 재흡수
파라미터
(A) DPBS
(B) Fc 대조군
(C) 아바타셉트
(D) ICOSL IgV-Fc

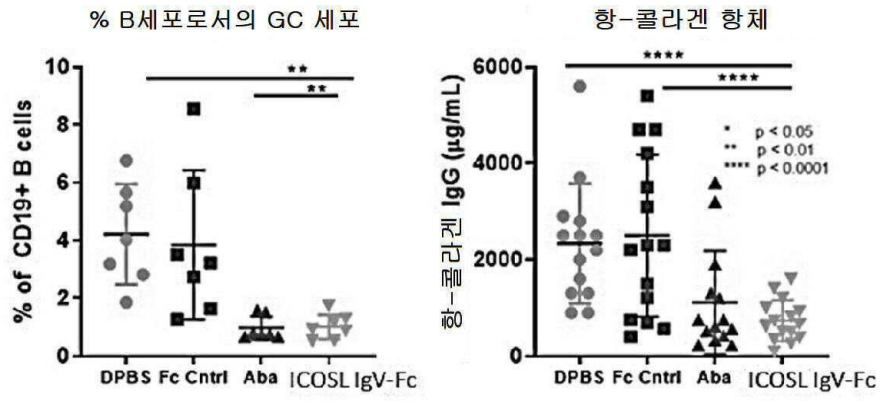
도면24b



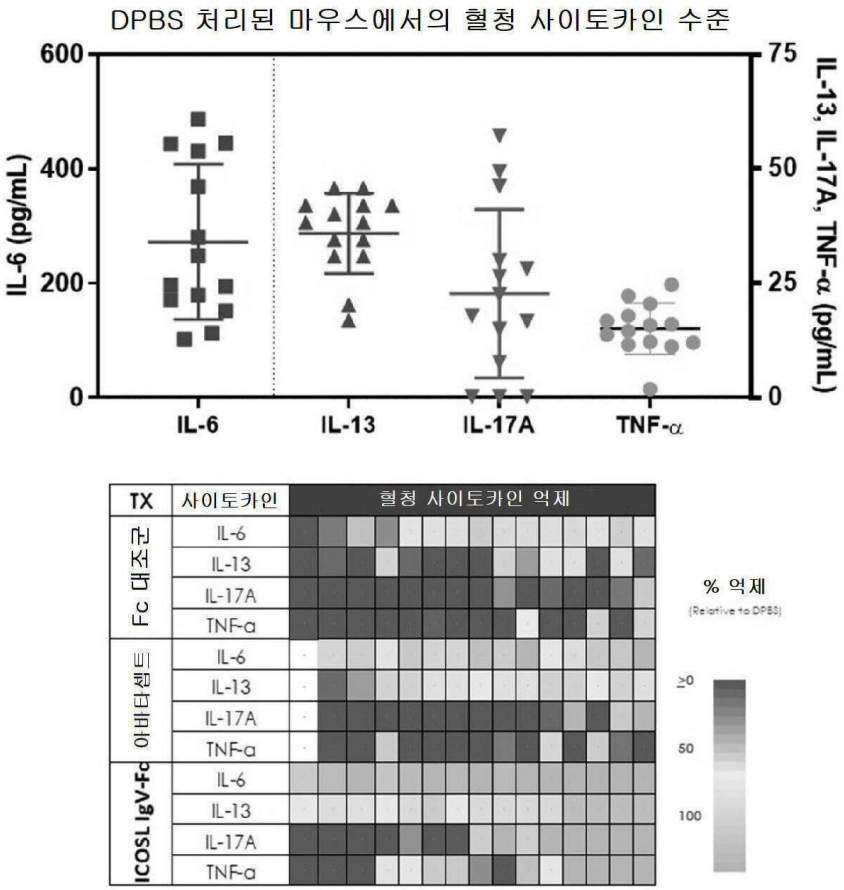
도면24c


CXCR5+ PD-1+ CD4+ Tfh 세포
% of CD4+ cells
IFN-γ+ CD4+ T 세포
% of CD4+ T cells
IL-17A+ CD4+ T 세포
% of CD4+ T cells
CD19+ B cells (% 생세포)
% of live cells
% of CD19+ B cells
DPBS
Fc Cntrl
Aba
ICOSL IgV-Fc

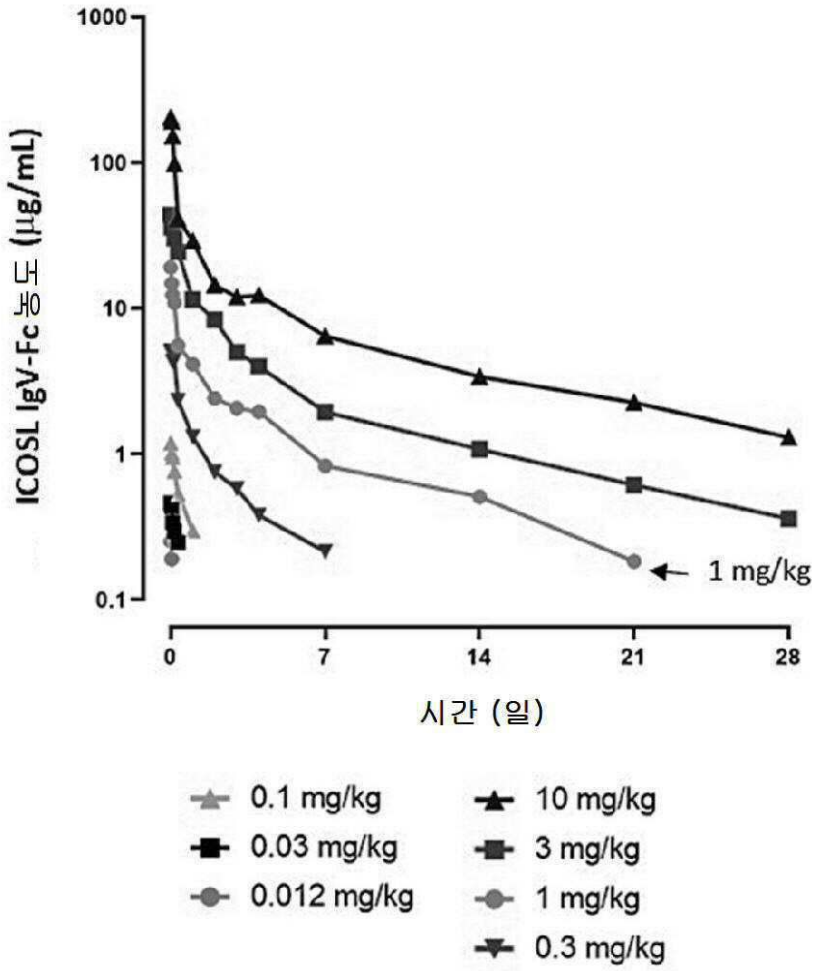
도면24d


% B세포로서의 GC 세포
% of CD19+ B cells
항-콜라겐 항체
항-콜라겐 IgG (μg/mL)
p < 0.05
p < 0.01
p < 0.0001
DPBS
Fc Cntrl
Aba
ICOSL IgV-Fc

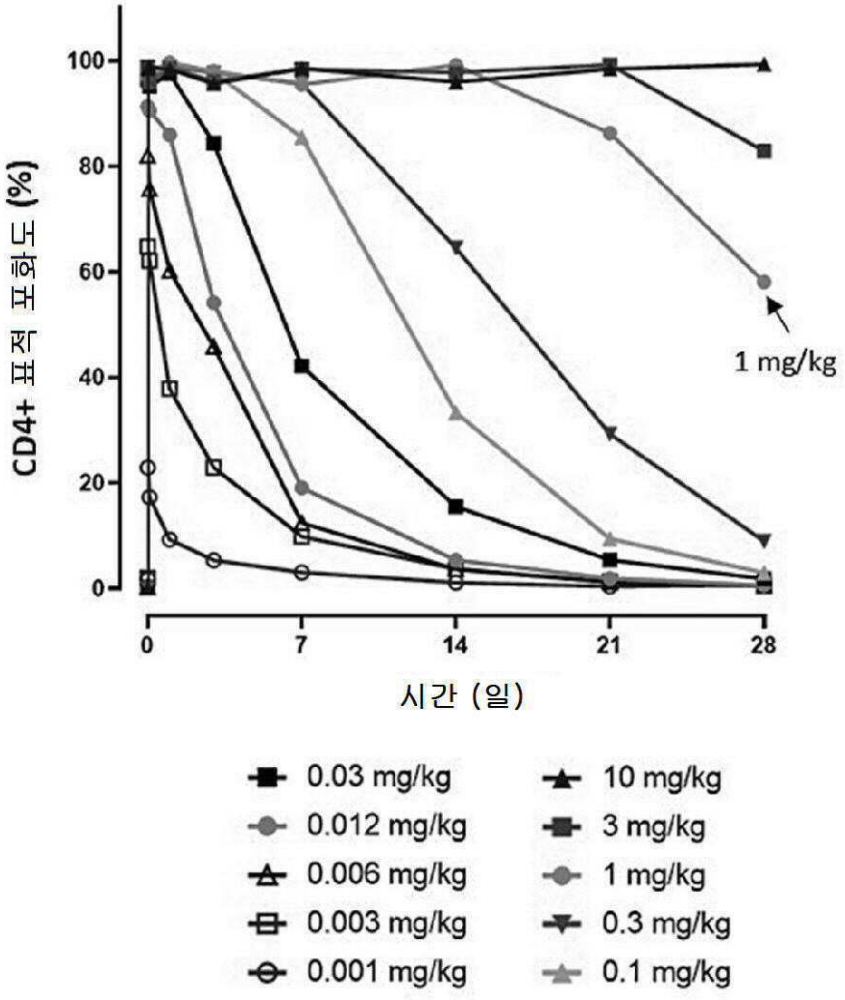
도면24e


DPBS 처리된 마우스에서의 혈청 사이토카인 수준
IL-6 (pg/mL)
IL-13, IL-17A, TNF-α (pg/mL)
600
400
200
0
75
50
25
0
IL-6
IL-13
IL-17A
TNF-α
TX
사이토카인
혈청 사이토카인 억제
Fc 대조군
아바타셉트
ICOSL IgV-Fc
IL-6
IL-13
IL-17A
TNF-α
% 억제
(Relative to DPBS)
≥0
50
100

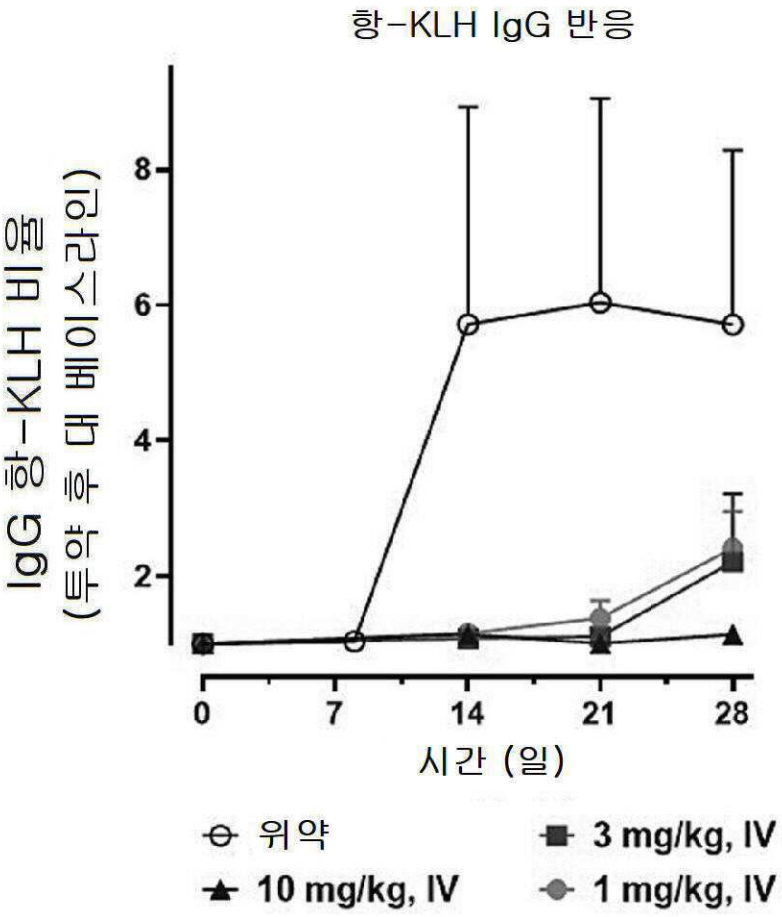
도면25a


1000
100
10
1
0.1
ICOSL IgV-Fc 농도 (μg/mL)
1 mg/kg
0
7
14
21
28
시간 (일)
0.1 mg/kg
0.03 mg/kg
0.012 mg/kg
10 mg/kg
3 mg/kg
1 mg/kg
0.3 mg/kg

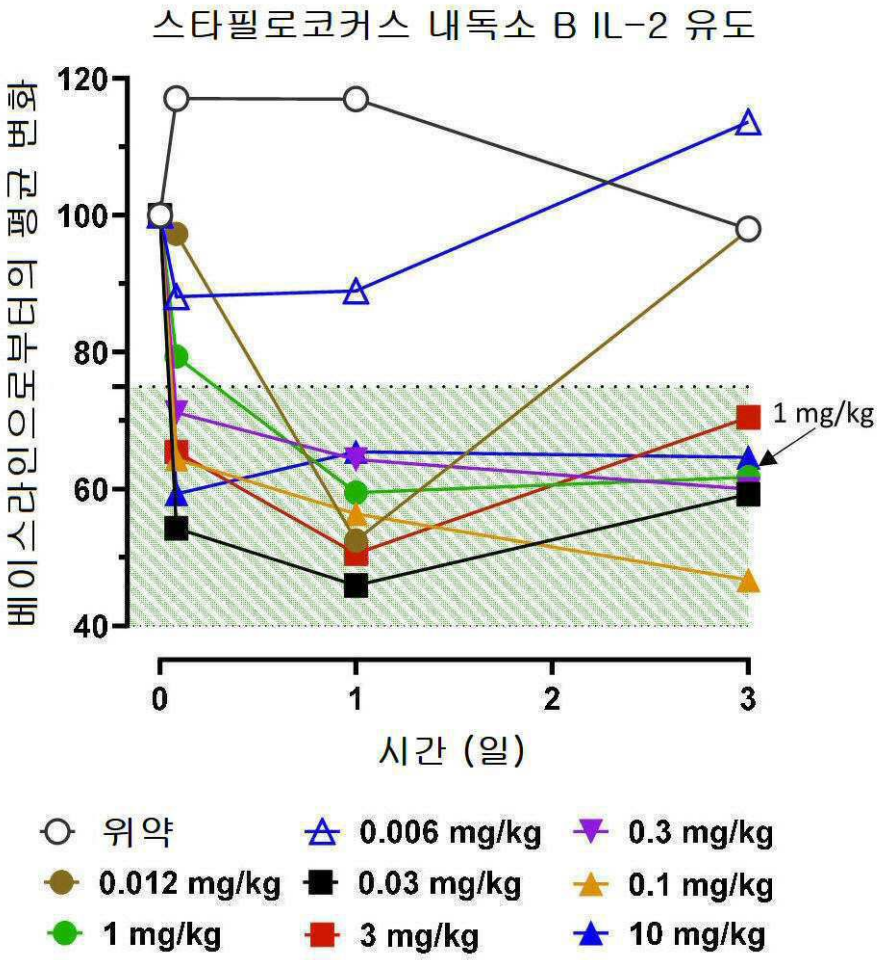
도면25b


CD4+ 표적 포화도 (%)
100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
시간 (일)
1 mg/kg
0.03 mg/kg
0.012 mg/kg
0.006 mg/kg
0.003 mg/kg
0.001 mg/kg
10 mg/kg
3 mg/kg
1 mg/kg
0.3 mg/kg
0.1 mg/kg

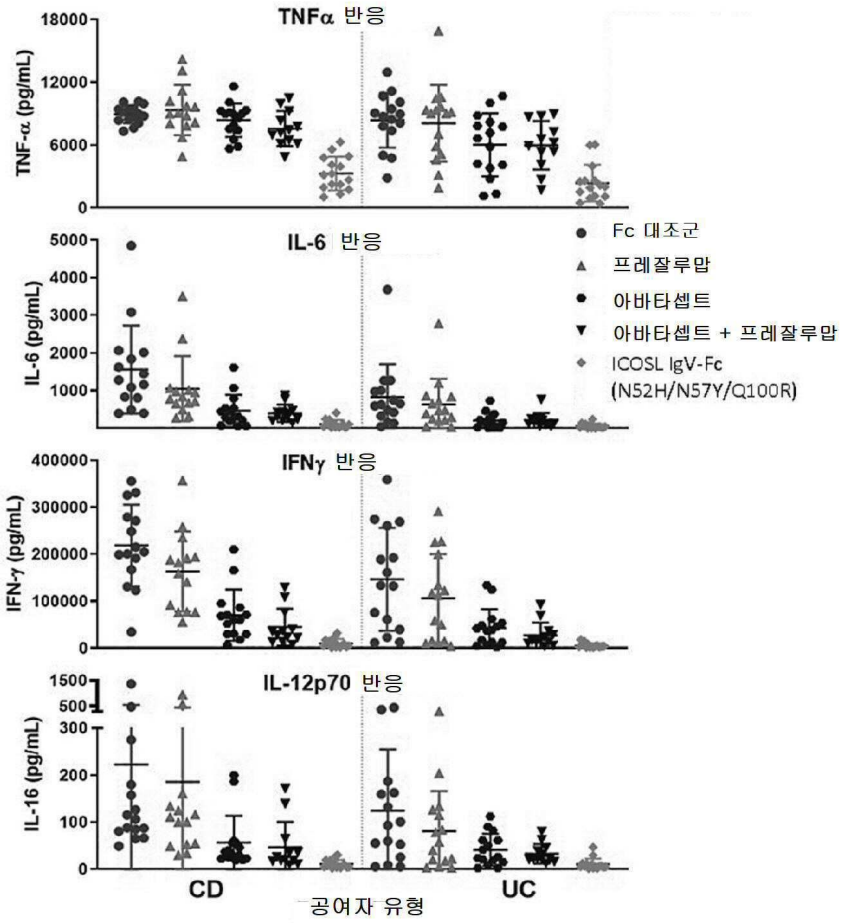
도면26a


항-KLH IgG 반응
IgG 항-KLH 비율
(투약 후 대 베이스라인)
8
6
4
2
0
7
14
21
28
시간 (일)
위약
3 mg/kg, IV
10 mg/kg, IV
1 mg/kg, IV

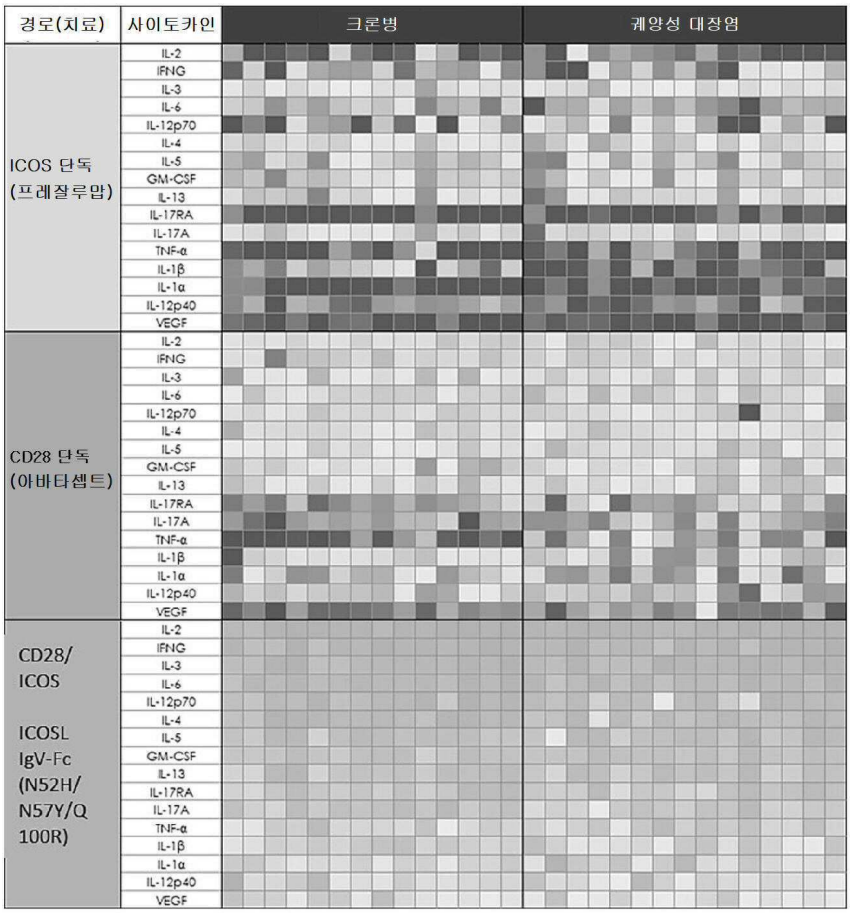
도면26b


스타필로코커스 내독소 B IL-2 유도
베이스라인으로부터의 평균 변화
120
100
80
60
40
0
1
2
3
시간 (일)
1 mg/kg
위약
0.006 mg/kg
0.3 mg/kg
0.012 mg/kg
0.03 mg/kg
0.1 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
10 mg/kg

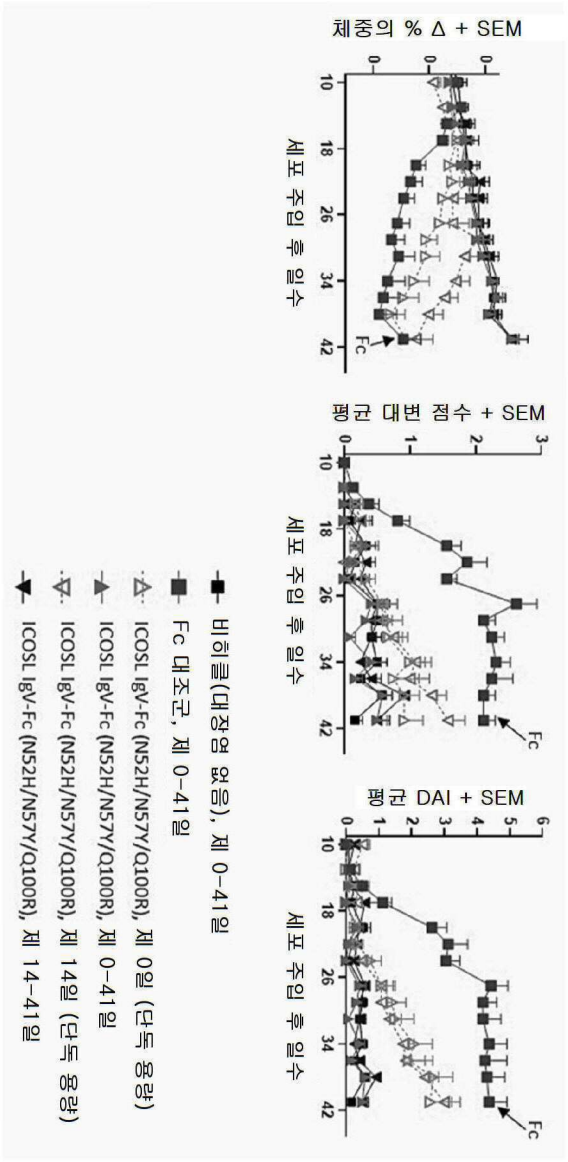
도면27a


TNFα 반응
TNF-α (pg/mL)
18000
12000
6000
0
IL-6 반응
IL-6 (pg/mL)
5000
4000
3000
2000
1000
IFNγ 반응
IFN-γ (pg/mL)
400000
300000
200000
100000
0
IL-12p70 반응
IL-16 (pg/mL)
1500
500
300
200
100
0
CD
UC
공여자 유형
Fc 대조군
프레잘루맙
아바타셉트
아바타셉트 + 프레잘루맙
ICOSL IgV-Fc
(N52H/N57Y/Q100R)

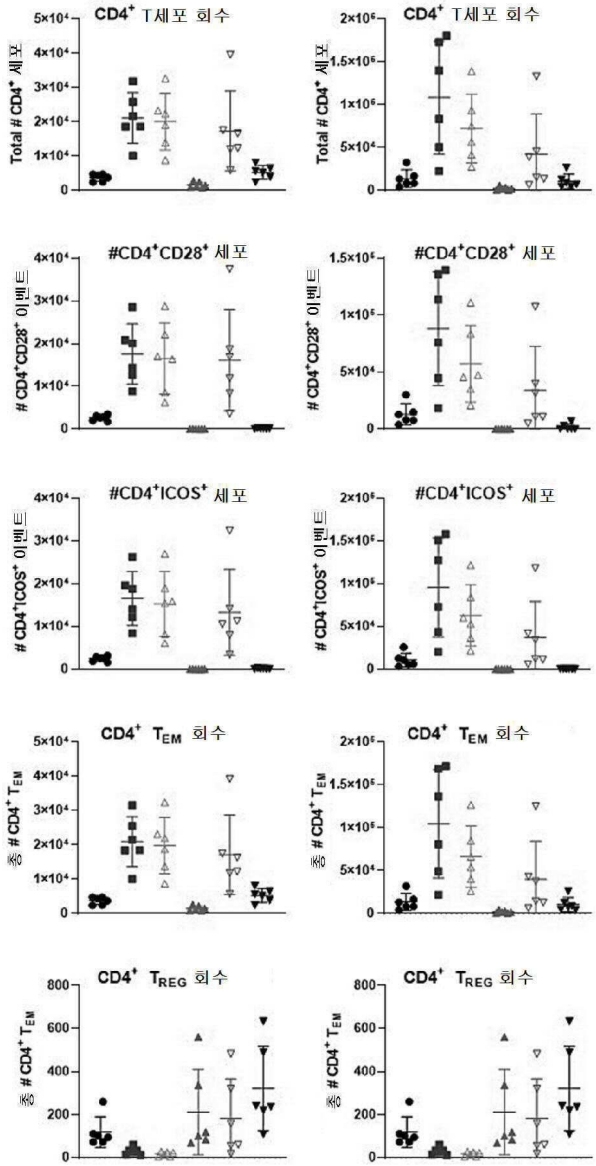
도면27b


경로(치료)
사이토카인
크론병
궤양성 대장염
ICOS 단독 (프레잘루맙)
CD28 단독 (아바타셉트)
CD28/ ICOS ICOSL IgV-Fc (N52H/ N57Y/Q 100R)
IL-2
IFNG
IL-3
IL-6
IL-12p70
IL-4
IL-5
GM-CSF
IL-13
IL-17RA
IL-17A
TNF-α
IL-1β
IL-1α
IL-12p40
VEGF

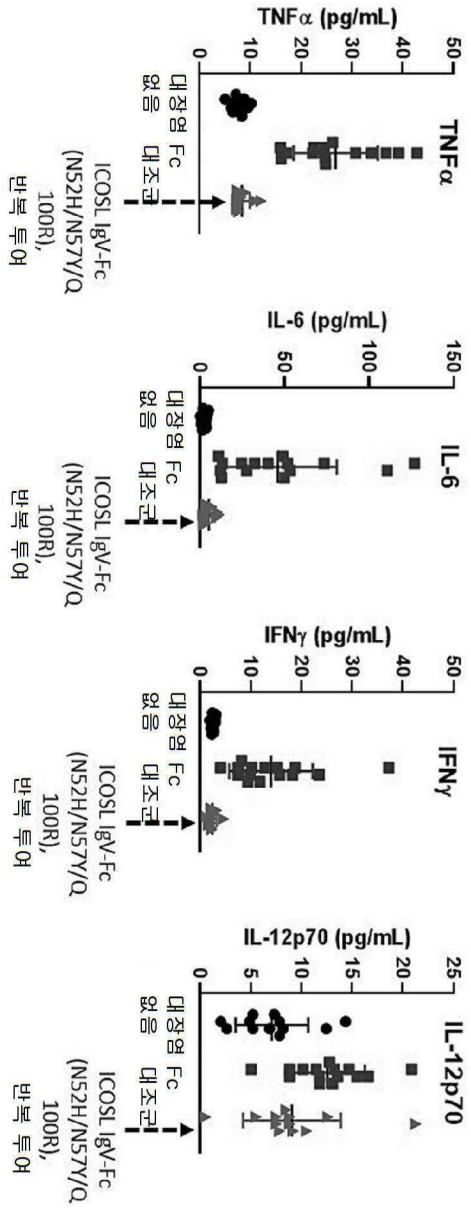
도면28a


체중의 % Δ + SEM
평균 대변 점수 + SEM
평균 DAI + SEM
세포 주입 후 일수
Fc
비히클(대장염 없음), 제 0-41일
Fc 대조군, 제 0-41일
ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R), 제 0일 (단독 용량)
ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R), 제 0-41일
ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R), 제 14일 (단독 용량)
ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R), 제 14-41일

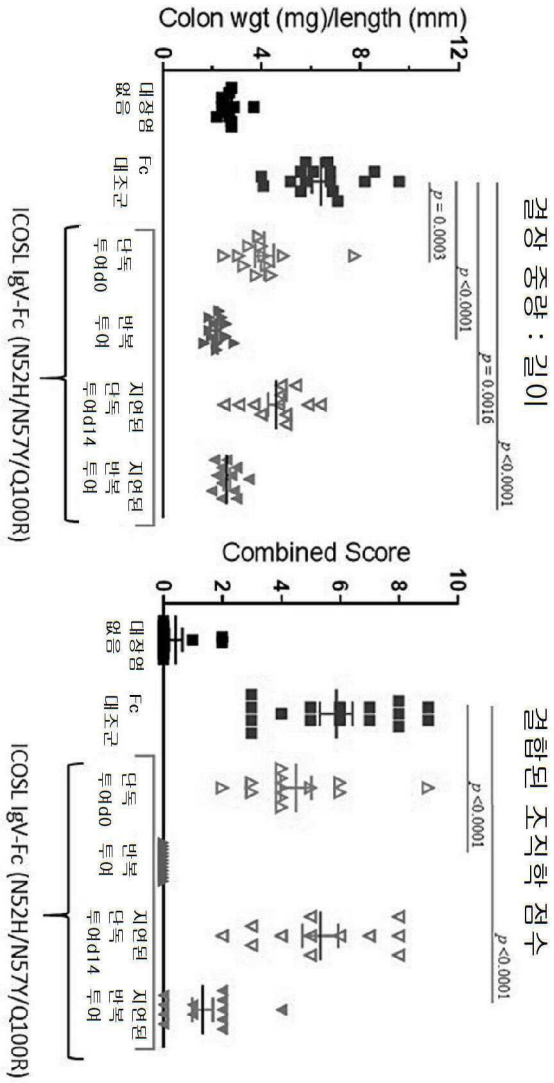
도면28b


CD4+ T세포 회수
Total # CD4+ 세포
CD4+ T세포 회수
Total # CD4+ 세포
#CD4+CD28+ 세포
CD4+CD28+ 이벤트
#CD4+CD28+ 세포
CD4+CD28+ 이벤트
#CD4+ICOS+ 세포
CD4+ICOS+ 이벤트
#CD4+ICOS+ 세포
CD4+ICOS+ 이벤트
CD4+ TEM 회수
총 # CD4+ TEM
CD4+ TEM 회수
총 # CD4+ TEM
CD4+ TREG 회수
총 # CD4+ TEM
CD4+ TREG 회수
총 # CD4+ TEM

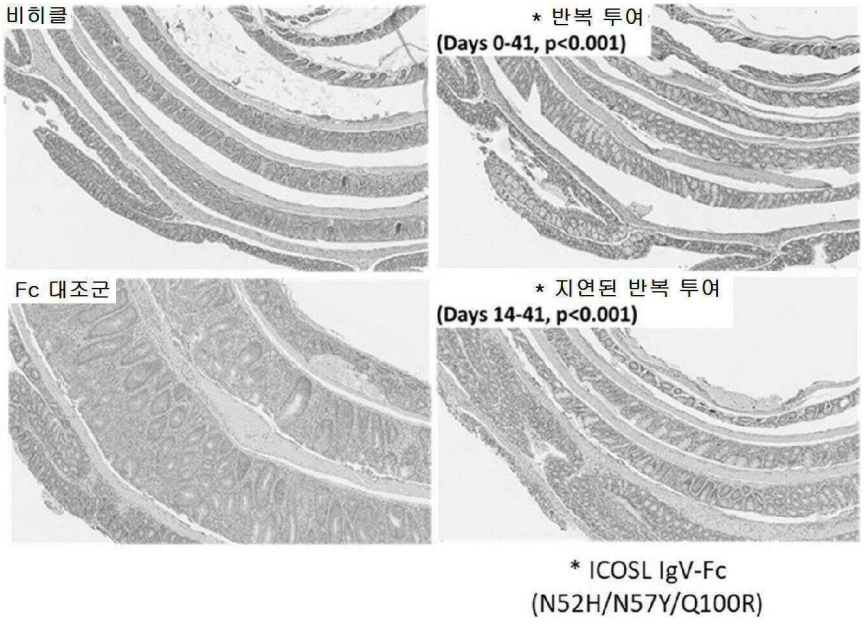
도면28c


TNFα (pg/mL)
TNFα
IL-6 (pg/mL)
IL-6
IFNγ (pg/mL)
IFNγ
IL-12p70 (pg/mL)
IL-12p70
대장염 없음 대조군
대장염 Fc
ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q 100R), 반복 투여

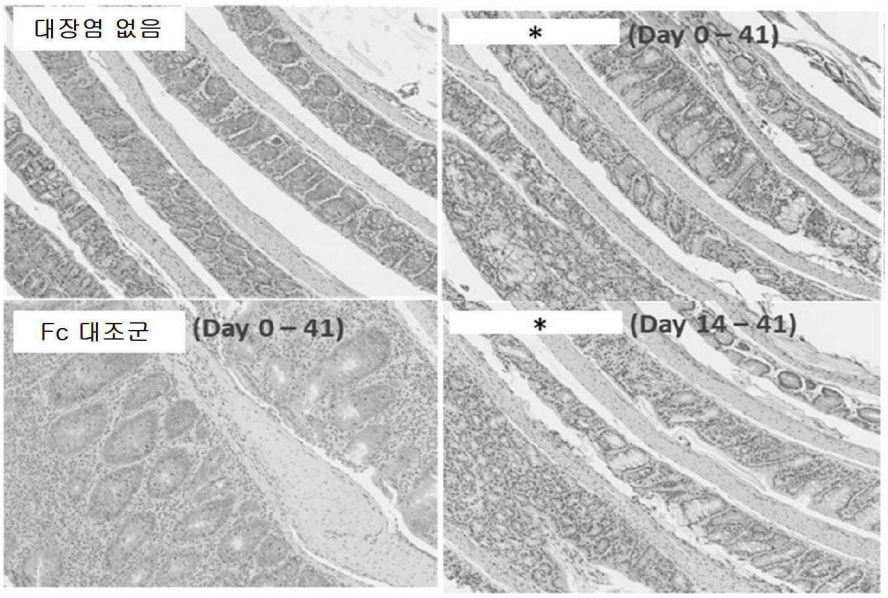
도면28d


결장 중량 : 길이
Colon wgt (mg)/length (mm)
0
4
8
12
대장염 없음
대조군 Fc
ICOSL IgV-Fc (N52H/N57Y/Q100R)
단독 투여d0
반복 투여
지연된 단독 투여d14
지연된 반복 투여
p = 0.0003
p<0.0001
p = 0.0016
p<0.0001
결합된 조직학 점수
Combined Score
0
2
4
6
8
10
p<0.0001
p<0.0001

도면28e

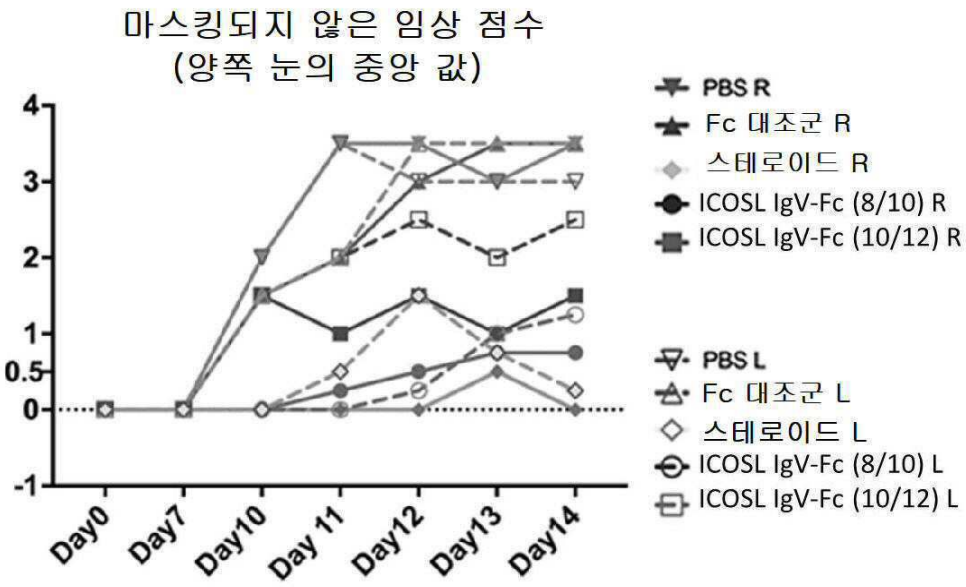

비히클
* 반복 투여
(Days 0-41, p<0.001)
Fc 대조군
* 지연된 반복 투여
(Days 14-41, p<0.001)
* ICOSL IgV-Fc
(N52H/N57Y/Q100R)

도면28f

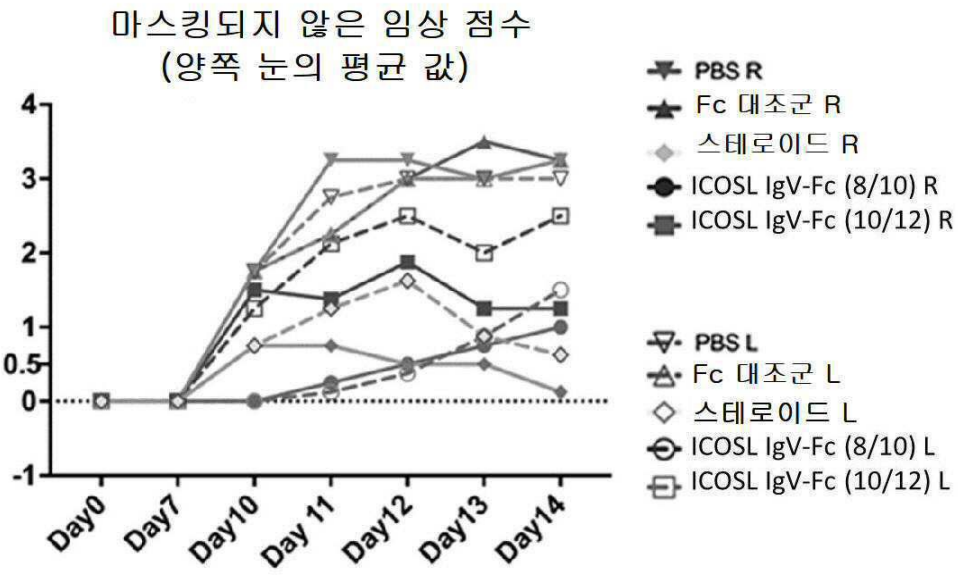


* ICOSL IgV-Fc
(N52H/N57Y/Q100R)

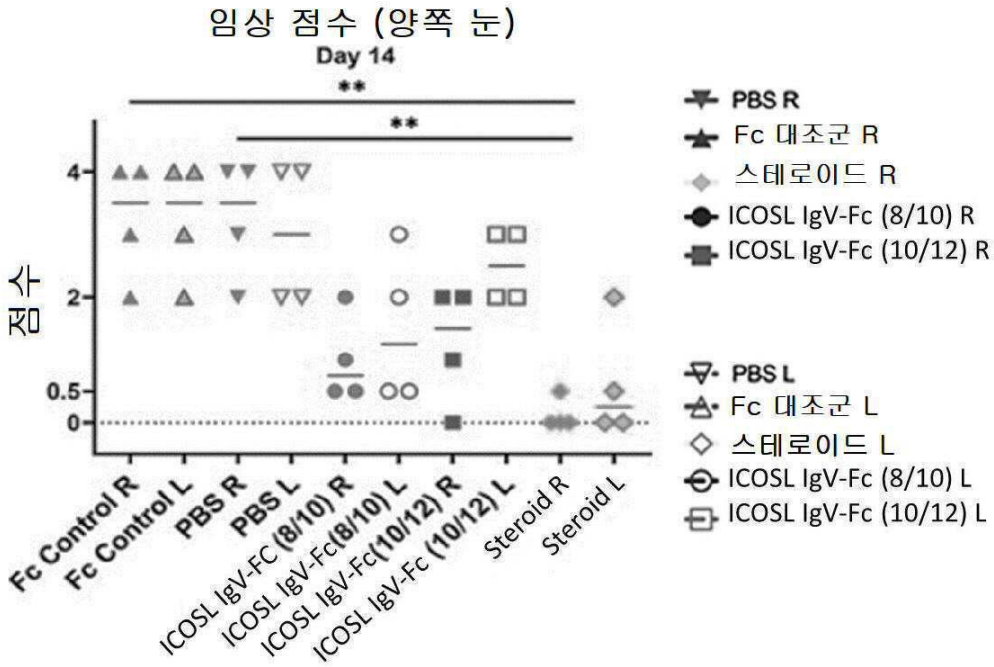
도면29a



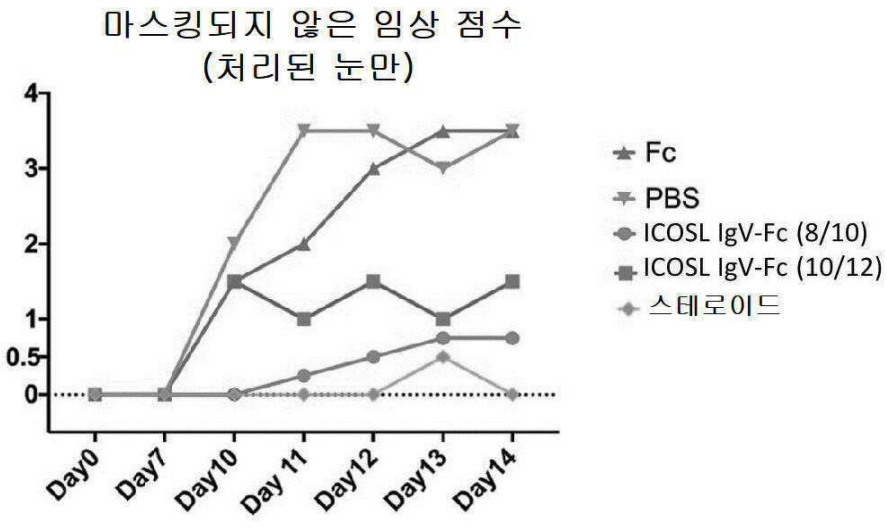
도면29b


마스킹되지 않은 임상 점수
(양쪽 눈의 평균 값)
4
3
2
1
0.5
0
-1
Day0
Day7
Day10
Day 11
Day12
Day13
Day14
PBS R
Fc 대조군 R
스테로이드 R
ICOSL IgV-Fc (8/10) R
ICOSL IgV-Fc (10/12) R
PBS L
Fc 대조군 L
스테로이드 L
ICOSL IgV-Fc (8/10) L
ICOSL IgV-Fc (10/12) L

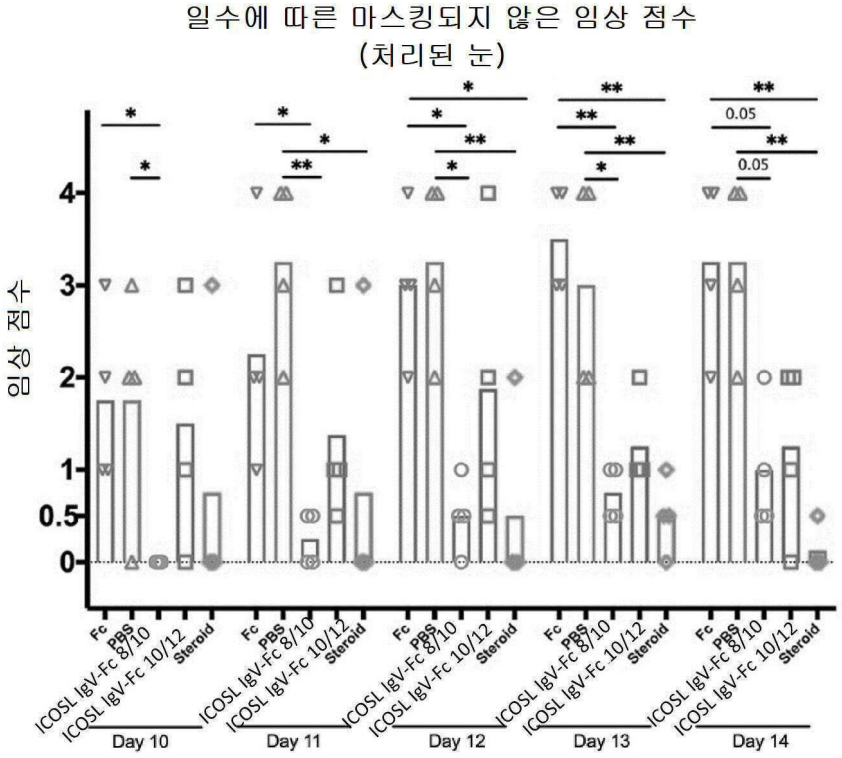
도면29c


임상 점수 (양쪽 눈)
Day 14
**
**
점수
4
2
0.5
0
Fc Control R
Fc Control L
PBS R
PBS L
ICOSL IgV-FC (8/10) R
ICOSL IgV-Fc(8/10) L
ICOSL IgV-Fc(10/12) R
ICOSL IgV-Fc (10/12) L
Steroid R
Steroid L
PBS R
Fc 대조군 R
스테로이드 R
ICOSL IgV-Fc (8/10) R
ICOSL IgV-Fc (10/12) R
PBS L
Fc 대조군 L
스테로이드 L
ICOSL IgV-Fc (8/10) L
ICOSL IgV-Fc (10/12) L

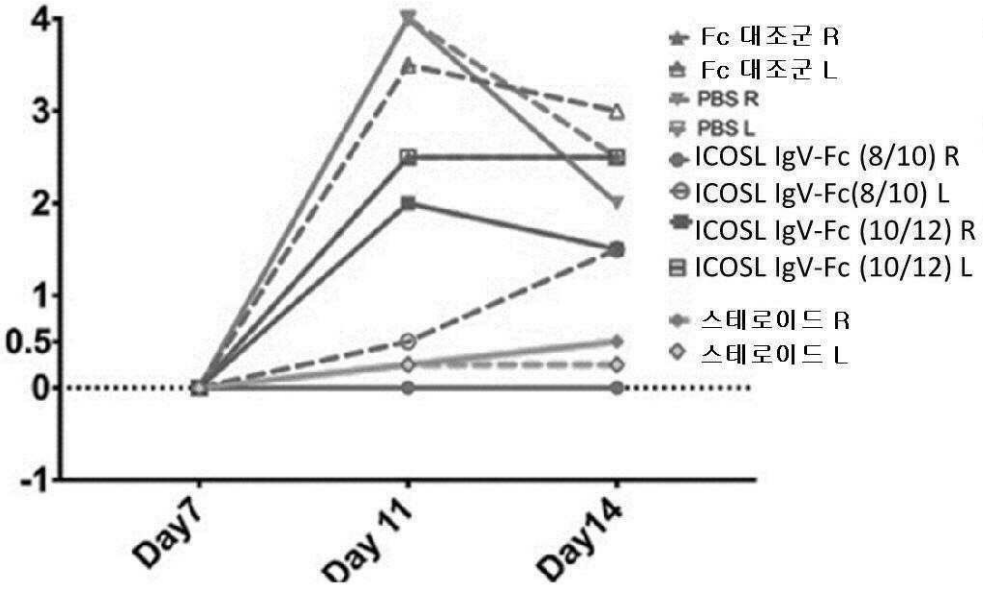
도면29d


마스킹되지 않은 임상 점수
(처리된 눈만)
4
3
2
1
0.5
0
Day0
Day7
Day10
Day 11
Day12
Day13
Day14
Fc
PBS
ICOSL IgV-Fc (8/10)
ICOSL IgV-Fc (10/12)
스테로이드

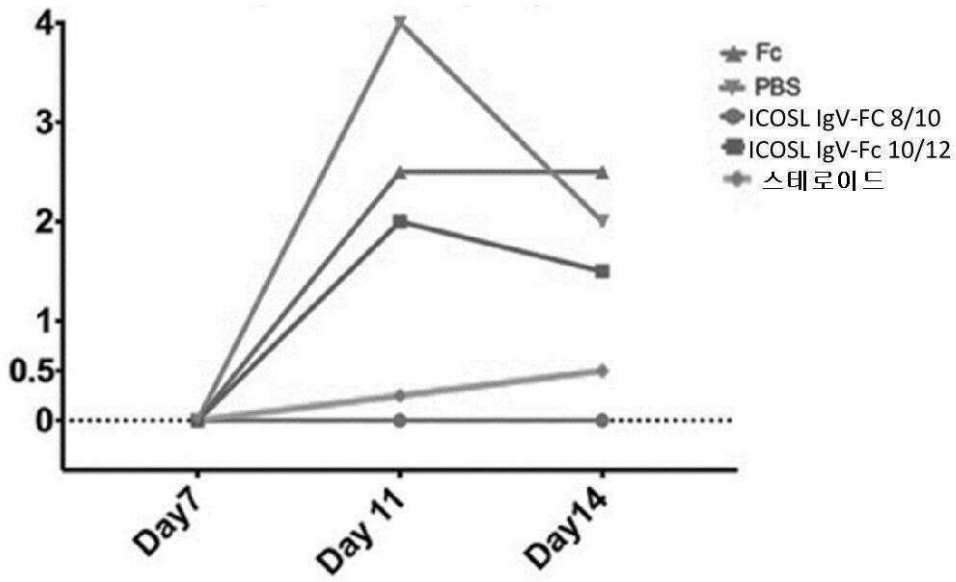
도면29e


일수에 따른 마스킹되지 않은 임상 점수
(처리된 눈)
임상 점수
4
3
2
1
0.5
0
0.05
0.05
Fc
PBS
ICOSL IgV-Fc 8/10
ICOSL IgV-Fc 10/12
Steroid
Day 10
Day 11
Day 12
Day 13
Day 14

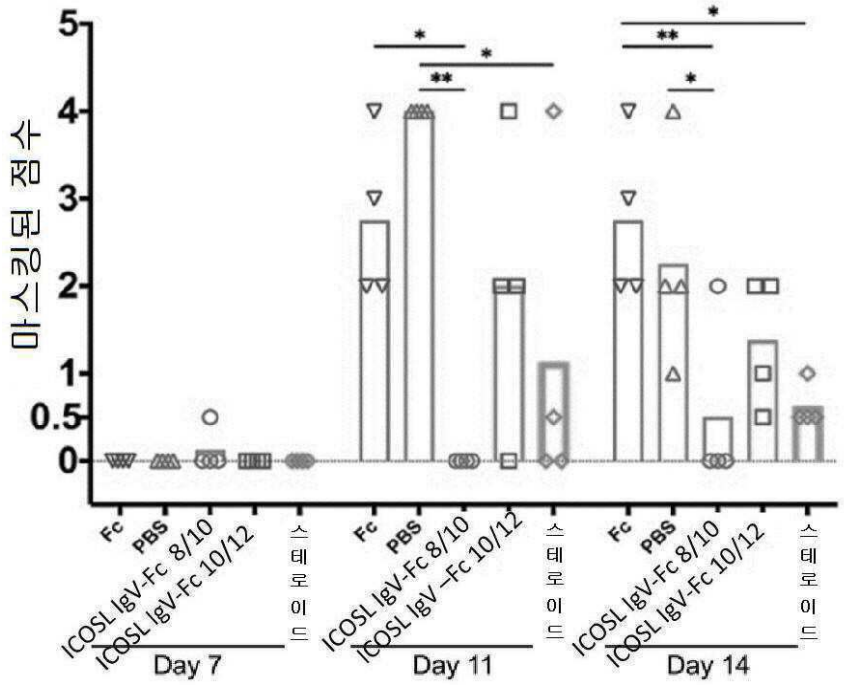
도면30a


4
3
2
1
0.5
0
-1
Day7
Day 11
Day14
Fc 대조군 R
Fc 대조군 L
PBS R
PBS L
ICOSL IgV-Fc (8/10) R
ICOSL IgV-Fc(8/10) L
ICOSL IgV-Fc (10/12) R
ICOSL IgV-Fc (10/12) L
스테로이드 R
스테로이드 L

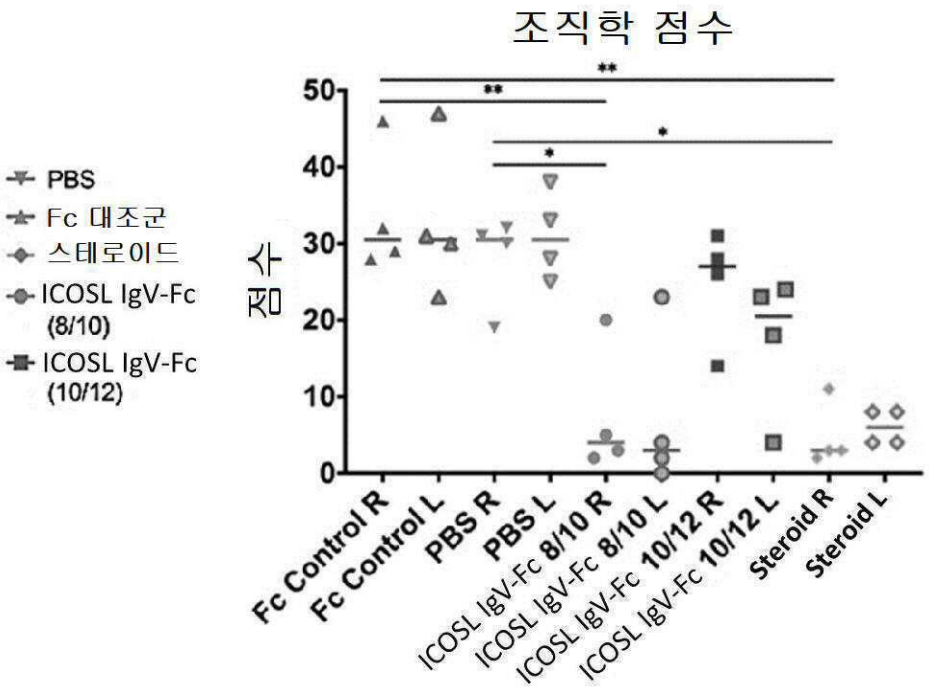
도면30b


4
3
2
1
0.5
0
Day7
Day 11
Day14
Fc
PBS
ICOSL IgV-FC 8/10
ICOSL IgV-Fc 10/12
스테로이드

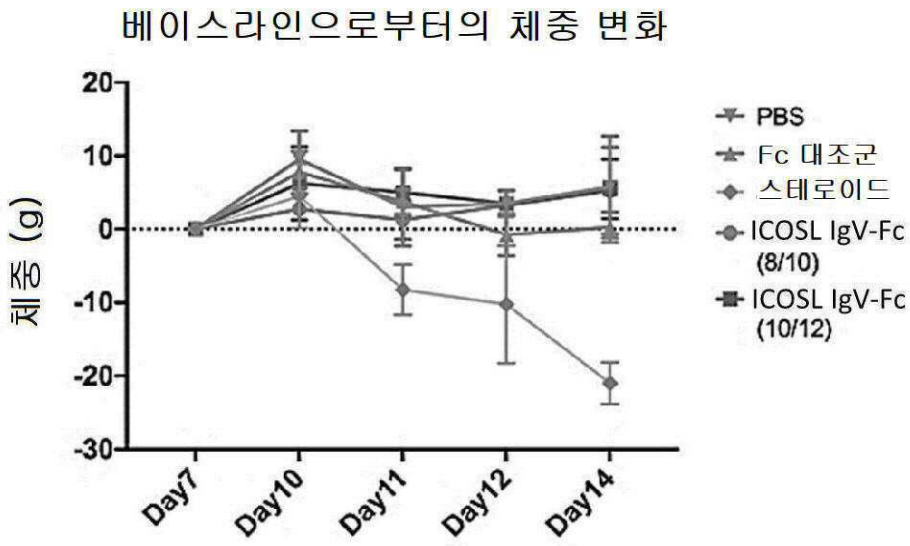
도면30c


마스킹된 점수
5
4
3
2
1
0.5
0
Fc
PBS
ICOSL IgV-Fc 8/10
ICOSL IgV-Fc 10/12
스테로이드
Day 7
Day 11
Day 14

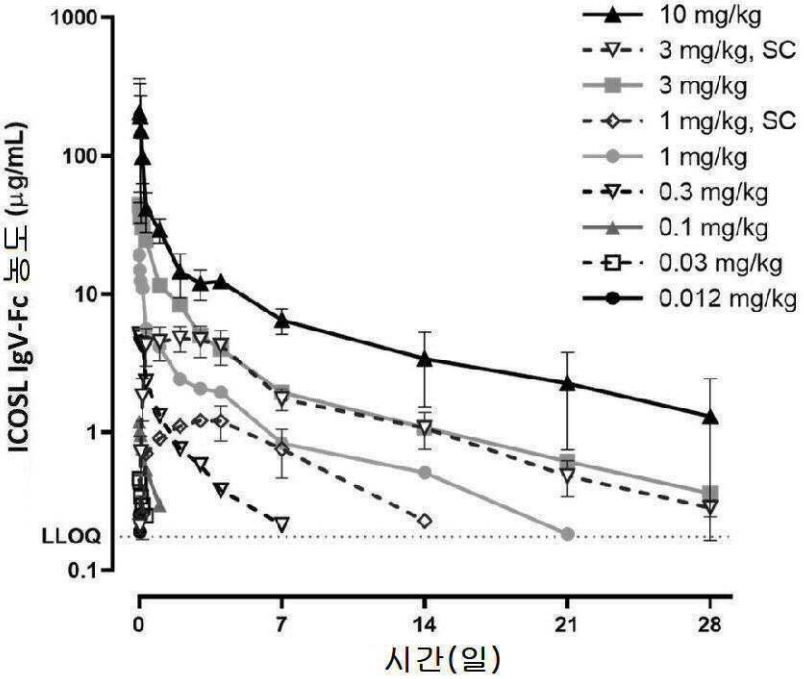
도면31


조직학 점수
PBS
Fc 대조군
스테로이드
ICOSL IgV-Fc (8/10)
ICOSL IgV-Fc (10/12)
점수
50
40
30
20
10
0
Fc Control R
Fc Control L
PBS R
PBS L
ICOSL IgV-Fc 8/10 R
ICOSL IgV-Fc 8/10 L
ICOSL IgV-Fc 10/12 R
ICOSL IgV-Fc 10/12 L
Steroid R
Steroid L

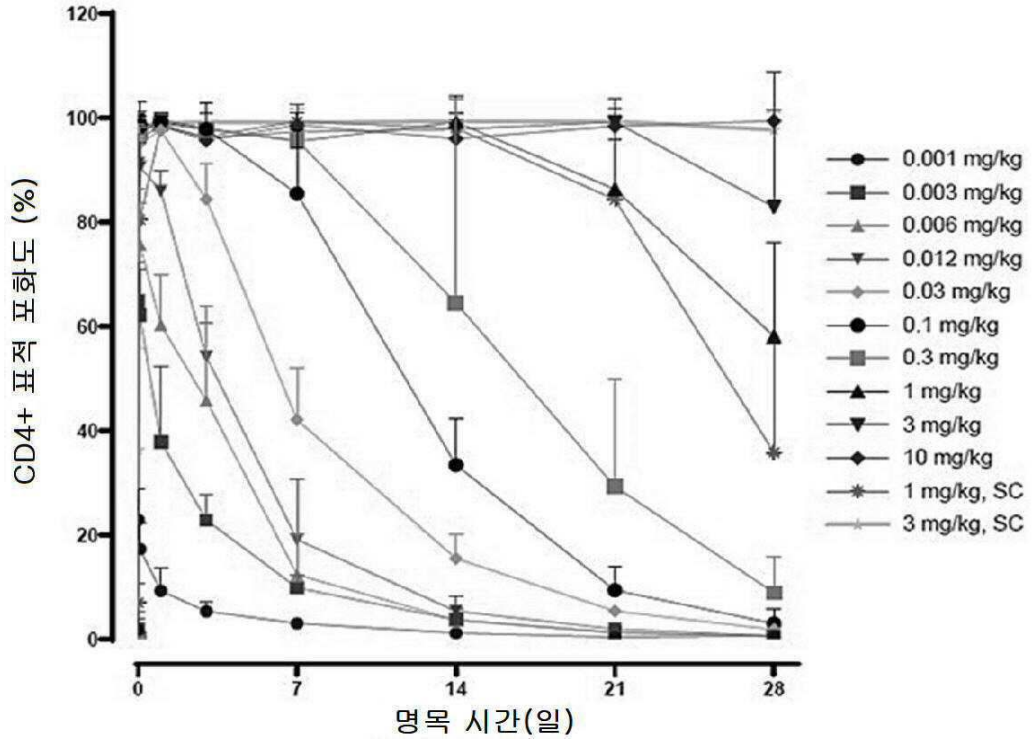
도면32


베이스라인으로부터의 체중 변화
체중 (g)
20
10
0
-10
-20
-30
Day7
Day10
Day11
Day12
Day14
PBS
Fc 대조군
스테로이드
ICOSL IgV-Fc (8/10)
ICOSL IgV-Fc (10/12)

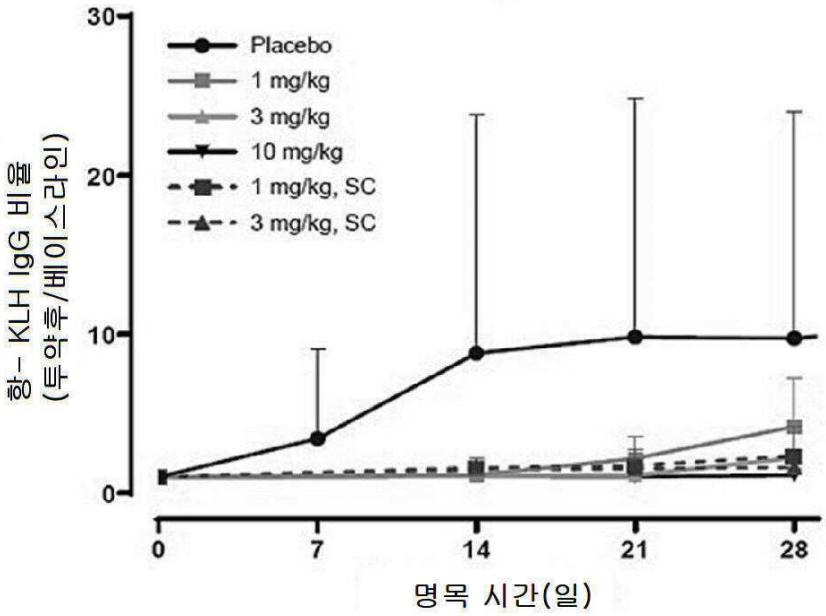
도면33


ICOSL IgV-Fc 농도 (μg/mL)
1000
100
10
1
LLOQ
0.1
0
7
14
21
28
시간(일)
10 mg/kg
3 mg/kg, SC
3 mg/kg
1 mg/kg, SC
1 mg/kg
0.3 mg/kg
0.1 mg/kg
0.03 mg/kg
0.012 mg/kg

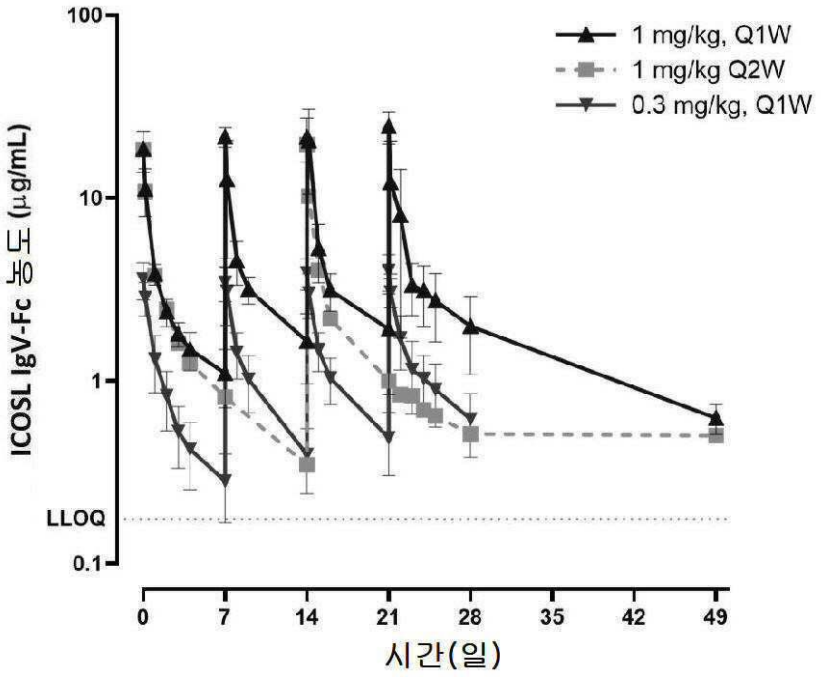
도면34


CD4+ 표적 포화도 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
명목 시간(일)
0.001 mg/kg
0.003 mg/kg
0.006 mg/kg
0.012 mg/kg
0.03 mg/kg
0.1 mg/kg
0.3 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
10 mg/kg
1 mg/kg, SC
3 mg/kg, SC

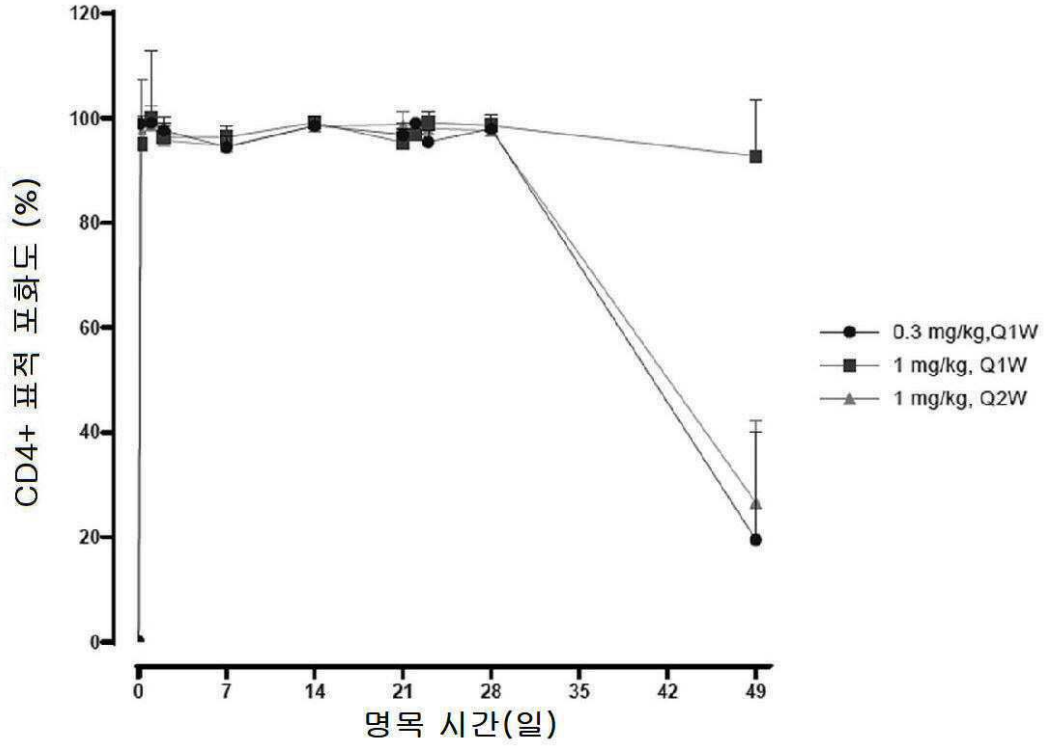
도면35


항- KLH IgG 비율
(투약후/베이스라인)
30
20
10
0
0
7
14
21
28
명목 시간(일)
Placebo
1 mg/kg
3 mg/kg
10 mg/kg
1 mg/kg, SC
3 mg/kg, SC

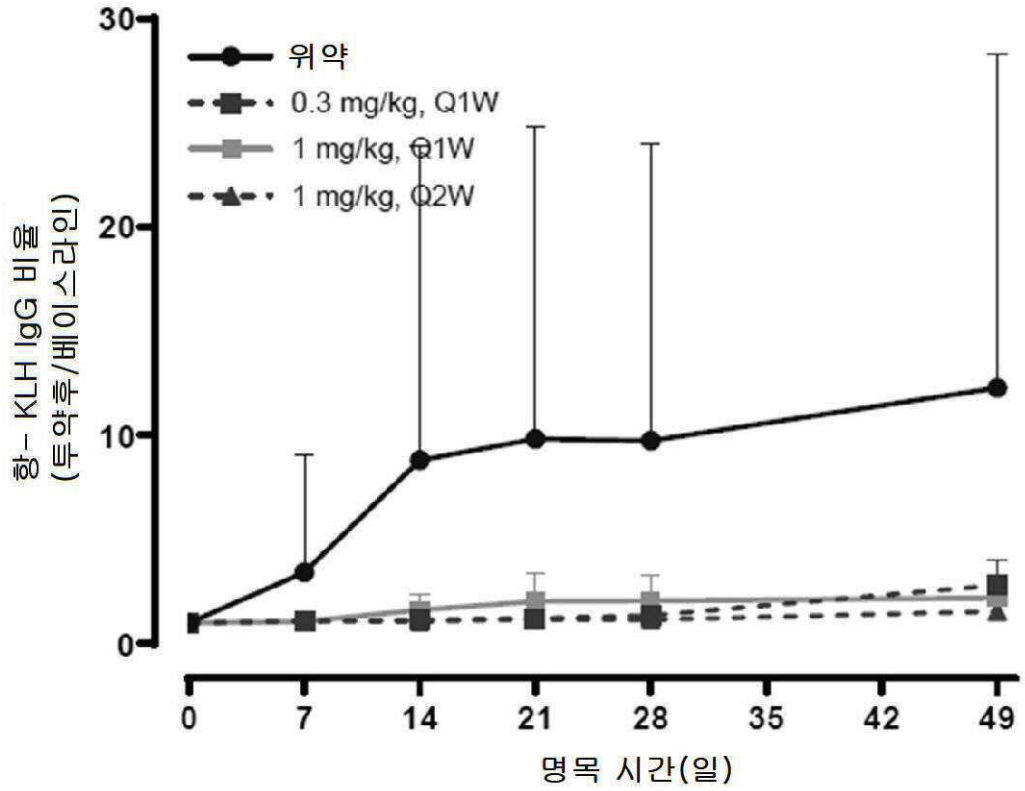
도면36


1 mg/kg, Q1W
1 mg/kg Q2W
0.3 mg/kg, Q1W
ICOSL IgV-Fc 농도 (μg/mL)
100
10
1
LLOQ
0.1
0
7
14
21
28
35
42
49
시간(일)

도면37


CD4+ 표적 포화도 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
35
42
49
명목 시간(일)
0.3 mg/kg,Q1W
1 mg/kg, Q1W
1 mg/kg, Q2W

도면38



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Alpine Immune Sciences, Inc.

<120> METHODS AND USES OF VARIANT ICOS LIGAND (ICOSL) FUSION PROTEINS

<130> 76161-20032.40

<140> Not yet assigned

<141> Concurrently herewith

<150> 62/835,488

<151> 2019-04-17

<150> 62/855,830

<151> 2019-05-31

<150> 62/931,212

<151> 2019-11-05

<150> 62/945,071

<151> 2019-12-06

<150> 62/962,832

<151> 2020-01-17

<150> 62/987,854

<151> 2020-03-10

<160> 68

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSLG(B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2) ECD

<400> 1

```
Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
 1               5                  10                  15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
            20                  25                  30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
        35                  40                  45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
    50                  55                  60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
                85                  90                  95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
            100                 105                 110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
        115                 120                 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
    130                 135                 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145                 150                 155                 160
```

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175

Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
180 185 190
Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
195 200 205
Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
210 215 220
Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
225 230 235

<210> 2
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> ICOSL WT IGV
<400> 2
Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15
Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
20 25 30
Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45
Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60
Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80
Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95
Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu
100 105 110
<210> 3

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IgV domain

<400> 3

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val
115 120

<210> 4

<211> 302

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSLG(B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2)

<400> 4

Met Arg Leu Gly Ser Pro Gly Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Ser Leu
1 5 10 15

Arg Ala Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp

20 25 30

Val Glu Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn

35 40 45

Asp Val Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr

50 55 60

Tyr His Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr

65 70 75 80

Arg Asn Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe

85 90 95

Ser Leu Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His

100 105 110

Cys Leu Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val

115 120 125

Glu Val Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser

130 135 140

Ala Pro His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser

145 150 155 160

Ile Asn Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp

165 170 175

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

180 185 190

Met Arg Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr

195 200 205

Pro Ser Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln

210 215 220

Asn Leu Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp

225 230 235 240

Lys Ile Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr

245 250 255

Trp Ser Ile Leu Ala Val Leu Cys Leu Leu Val Val Val Ala Val Ala

260 265 270

Ile Gly Trp Val Cys Arg Asp Arg Cys Leu Gln His Ser Tyr Ala Gly
275 280 285

Ala Trp Ala Val Ser Pro Glu Thr Glu Leu Thr Gly His Val
290 295 300

<210> 5

<211> 208

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220>

<223> ICOSL WT ECD TRUNCATION 2

<400> 5

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110

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

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg

165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu

195 200 205

<210> 6

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL WT ECD TRUNCATION 3

<400> 6

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu

65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

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

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn

130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg

165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu

195 200 205

Thr Val Gly Ser Gln

210

<210

> 7

<211> 207

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL WT ECD TRUNCATION 4

<400> 7

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu

65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

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

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140
Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145 150 155 160
Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175
Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser

180 185 190
Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn
195 200 205
<210> 8
<211> 206
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> ICOSL WT ECD TRUNCATION 5
<400> 8
Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15
Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45
Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
50 55 60
Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80
Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110
Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn

130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg

165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln

195 200 205

<210> 9

<211> 204

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL WT ECD TRUNCATION 6

<400> 9

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu

65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn

130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175

Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu

195 200

<210> 10

<211> 201

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL WT ECD TRUNCATION 7

<400> 10

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
115 120 125
His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140
Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145 150 155 160
Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175

Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
180 185 190
Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn
195 200

<210> 11
<211> 209
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> ICOSL WT ECD TRUNCATION 8
<400> 11
Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15
Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30
Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45
Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
50 55 60
Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80
Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

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

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn

130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg

165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu

195 200 205

Thr

<210> 12

<211> 208

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL N207A ECD TRUNCATION 2

<400> 12

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80
Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95
Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110
Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro

115 120 125
His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140
Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145 150 155 160
Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175
Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser

180 185 190
Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Ala Leu
195 200 205
<210> 13
<211> 208
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> ICOSL N207G ECD TRUNCATION 2
<400> 13
Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15
Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30
Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45
Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu

65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

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

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn

130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg

165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Gly Leu

195 200 205

<210> 14

<211> 208

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL L208G ECD TRUNCATION 2

<400> 14

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110

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

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Gly
195 200 205

<210> 15

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL N207A ECD TRUNCATION 3

<400> 15

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45
Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
50 55 60
Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80
Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95
Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110
Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
115 120 125
His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140
Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160
Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175
Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
180 185 190
Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Ala Leu
195 200 205
Thr Val Gly Ser Gln
210
<210
> 16
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> ICOSL N207G ECD TRUNCATION 3
<400> 16
Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175

Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Gly Leu
195 200 205

Thr Val Gly Ser Gln
210

<210> 17

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL L208G ECD TRUNCATION 3

<400> 17

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175

Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Gly
195 200 205

Thr Val Gly Ser Gln
210

<210> 18

<211> 207

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL N207A ECD TRUNCATION 4

<400> 18

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175

Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Ala
195 200 205

<210> 19

<211> 207

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL N207G ECD TRUNCATION 4

<400> 19

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg

165 170 175

Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Gly

195 200 205

<210> 20

<211> 209

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL N207A ECD TRUNCATION 8

<400> 20

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110

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

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Ala Leu

195 200 205

Thr

<210> 21

<211> 209

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL N207G ECD TRUNCATION 8

<400> 21

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu

65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

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

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn

130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175
Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
180 185 190
Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Gly Leu
195 200 205
Thr

<210> 22
<211> 209
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> ICOSL L208G ECD TRUNCATION 8
<400> 22
Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15
Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
20 25 30
Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45
Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

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

115 120 125
His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn

130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg

165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Gly

195 200 205

Thr

<210> 23

<211> 208

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL N207A/L208G ECD TRUNCATION 2

<400> 23

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu

65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175

Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Ala Gly
195 200 205

<210> 24

<211> 208

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL N207G/L208G ECD TRUNCATION 2

<400> 24

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

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

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn

130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg

165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Gly Gly

195 200 205

<210> 25

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL N207A/L208G ECD TRUNCATION 3

<400> 25

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu

65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

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

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn

130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg

165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Ala Gly

195 200 205

Thr Val Gly Ser Gln

210

<210

> 26

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL N207G/L208G ECD TRUNCATION 3

<400> 26

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80
Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95
Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
115 120 125
His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140
Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145 150 155 160
Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175

Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
180 185 190
Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Gly Gly
195 200 205
Thr Val Gly Ser Gln
210

<210> 27
<211> 209
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> ICOSL N207A/L208G ECD TRUNCATION 8
<400> 27
Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
20 25 30
Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu

65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

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

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn

130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg

165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Ala Gly

195 200 205

Thr

<210> 28

<211> 209

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL N207G/L208G ECD TRUNCATION 8

<400> 28

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

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

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

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
115 120 125
His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140
Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145 150 155 160
Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175

Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
180 185 190
Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Gly Gly
195 200 205
Thr

<210> 29
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> ICOSL N207A FULL ECD

<400> 29

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175

Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Ala Leu
195 200 205

Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
210 215 220

Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
225 230 235

<210> 30

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL N207G FULL ECD

<400> 30

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175

Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Gly Leu

195 200 205

Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile

210 215 220

Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr

225 230 235

<210> 31

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL L208G FULL ECD

<400> 31

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu

65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

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

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn

130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175
Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
180 185 190
Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Gly
195 200 205
Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
210 215 220

Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
225 230 235

<210> 32
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> ICOSL N207A/L208G FULL ECD
<400> 32

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

35 40 45
Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
50 55 60
Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80
Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95
Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

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

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn

130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg

165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Ala Gly

195 200 205

Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile

210 215 220

Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr

225 230 235

<210> 33

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL N207G/L208G FULL ECD

<400> 33

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45

Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80
Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95
Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
115 120 125
His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140
Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145 150 155 160
Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175

Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
180 185 190
Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Gly Gly
195 200 205
Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
210 215 220
Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
225 230 235

<210> 34
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> ICOSL V39 ECD
<400> 34
Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15
Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45

Ile Pro Gln His Ser Ser Leu Glu Tyr Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu

65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

Val Leu Ser Arg Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

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

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn

130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg

165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu

195 200 205

Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile

210 215 220

Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr

225 230 235

<210> 35

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL V39 IGV

<400> 35

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

 20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

 35 40 45

Ile Pro Gln His Ser Ser Leu Glu Tyr Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

 50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu

65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

 85 90 95

Val Leu Ser Arg Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu

 100 105 110

<210> 36

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL V39 IGV

<400> 36

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

 20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

 35 40 45

Ile Pro Gln His Ser Ser Leu Glu Tyr Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

 50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu

65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

Val Leu Ser Arg Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val

115 120

<210> 37

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IGG1 FC

<400> 37

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130 135 140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 38
<211> 231
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> FC WITH C220S/E356D/M358L/K447DEL
<400> 38

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

65 70 75 80
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

225 230

<210> 39

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FC WITH C220S/L234A/L235E/G237A/K447DEL

<400> 39

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
225 230

<210> 40

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FC WITH C220S/L234A/L235E/G237A

<400> 40

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr

130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 41

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FC REGION

<400> 41

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 42

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FC REGION

<400> 42

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr

130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

225 230

<210> 43

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FC (C5S (C220S), R77C, (R292C), N82G (N297G),

V87C (V302C))

<400> 43

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln

65 70 75 80

Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130 135 140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 44
<211> 231
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> FC WITH C220S/E233P/L234V/L235A/G236DEL/S267K
<400> 44

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

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

65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys

130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

165 170 175

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

180 185 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 45

<211> 208

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD80 V2 ECD

<400> 45

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys

1 5 10 15

Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp

20 25 30

Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
35 40 45
Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
50 55 60
Leu Ser Ile Val Ile Gln Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
65 70 75 80
Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Gly Phe Lys Arg Glu His

85 90 95
Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
100 105 110
Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
115 120 125
Ser Ala Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
130 135 140
Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu

145 150 155 160
Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
165 170 175
Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
180 185 190
Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
195 200 205

<210> 46
<211> 231
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> FC (C5S (C220S), R77C, (R292C), N82G (N297G),
V87C (V302C), L232DEL (K447DEL))

<400> 46
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

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

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130 135 140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
225 230
<210> 47
<211> 230
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FC WITH
C220S/E233P/L234V/L235A/G236DEL/S267K/K447DEL

<400> 47

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45

Asp Val Lys His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
180 185 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly

225 230

<210> 48

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IGG1 FC C220S

<400> 48

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr

130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 49

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IGG2 FC

<400> 49

Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro

1 5 10 15

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro

20 25 30

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

35 40 45

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn

50 55 60

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg

65 70 75 80

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val

85 90 95

Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser

100 105 110

Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys

115 120 125

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu

130 135 140

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

145 150 155 160

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

165 170 175

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

180 185 190

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

195 200 205

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

210 215 220

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230 235

<210> 50

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IGG4 FC

<400> 50

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225

<210> 51
<211> 229
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> IGG4 FC S228P
<400> 51

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

35 40 45

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

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220
Leu Ser Leu Gly Lys
225

<210> 52
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> 4GS LINKER

<400> 52

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IGV-FC LINKER 1

<400> 53

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IGV-IGV LINKER

<400> 54

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 55

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EAAAK LINKER

<400> 55

Glu Ala Ala Ala Lys

1 5

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3X EAAAK LINKER

<400> 56

Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1 5 10 15

<210> 57

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5X EAAAK LINKER

<400> 57

Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu

1 5 10 15

Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

20 25

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LINKER

<400> 58

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 59

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IGV-FC LINKER 2

<400> 59

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ala Ala

1 5 10

<210> 60

<211> 363

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VARIANT ICOSL IGV-FC

<400> 60

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45

Ile Pro Gln His Ser Ser Leu Glu Tyr Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu

65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

Val Leu Ser Arg Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

165 170 175

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe

180 185 190

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

195 200 205

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

210 215 220

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

225 230 235 240

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

245 250 255

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

260 265 270

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

275 280 285

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

290 295 300

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

305 310 315 320

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

325 330 335

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

340 345 350

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

355 360

<210> 61

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL V27 ECD

<400> 61

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

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

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80
Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95
Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110
Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Thr Asn
130 135 140
Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145 150 155 160
Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175
Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
195 200 205
Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
210 215 220
Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
225 230 235
<210> 62
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL V5 ECD

<400> 62

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45

Ile Pro Gln His Ser Ser Leu Glu Tyr Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu

65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn

130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg

165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu

195 200 205

Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile

210 215 220

Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
225 230 235

<210> 63

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL V82 ECD

<400> 63

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His
35 40 45

Ile Pro Gln His Ser Ser Leu Glu Tyr Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu
85 90 95

Val Leu Ser Arg Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Arg Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu

195 200 205

Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile

210 215 220

Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr

225 230 235

<210> 64

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL V47 ECD

<400> 64

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45

Ile Pro Gln His Ser Ser Leu Glu Tyr Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu

65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

Val Leu Ser Arg Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

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

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn

130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Ser Leu Asn Met Arg

165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu

195 200 205

Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile

210 215 220

Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr

225 230 235

<210> 65

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL V44 ECD

<400> 65

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val

20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45

Ile Pro Gln His Ser Ser Leu Glu Tyr Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu

65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

Val Leu Ser Pro Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val
100 105 110
Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser Ala Pro
115 120 125
His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn
130 135 140
Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser
145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg
165 170 175
Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr Pro Ser
180 185 190
Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu
195 200 205
Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile
210 215 220

Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr
225 230 235
<210> 66
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> ICOSL V41 ECD
<400> 66
Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15
Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
20 25 30
Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45
Ile Pro Gln His Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn

50 55 60

Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu

65 70 75 80

Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

Val Leu Ser Arg Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

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

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn

130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg

165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu

195 200 205

Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile

210 215 220

Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr

225 230 235

<210> 67

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ICOSL v44 IgV

<400> 67

Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu

1 5 10 15

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

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

Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val
115 120

<210> 68
<211> 284
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Mature ICOSLG(B7RP1, CD275, ICOSL, B7-H2)
<400> 68
Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp Val Glu
1 5 10 15
Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn Asp Val
20 25 30
Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr Tyr His

35 40 45
Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr Arg Asn
50 55 60
Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe Ser Leu
65 70 75 80
Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His Cys Leu

85 90 95

Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Val Glu Val

100 105 110

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

115 120 125

His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser Ile Asn

130 135 140

Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp Asn Ser

145 150 155 160

Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn Met Arg

165 170 175

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

180 185 190

Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln Asn Leu

195 200 205

Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp Lys Ile

210 215 220

Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr Trp Ser

225 230 235 240

Ile Leu Ala Val Leu Cys Leu Leu Val Val Val Ala Val Ala Ile Gly

245 250 255

Trp Val Cys Arg Asp Arg Cys Leu Gln His Ser Tyr Ala Gly Ala Trp

260 265 270

Ala Val Ser Pro Glu Thr Glu Leu Thr Gly His Val

275 280