



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0057303
(43) 공개일자 2019년05월28일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
A61K 39/39558 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-7008828</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2017년09월26일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2019년03월27일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2017/053370</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2018/064013
국제공개일자 2018년04월05일</p> <p>(30) 우선권주장
62/400,589 2016년09월27일 미국(US)
(뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
은콜로지, 인크.
미국 02451 매사추세츠주 월섬 스위트 120 토텐
폰드 로드 400</p> <p>(72) 발명자
탕, 민
미국 92780 캘리포니아주 터스틴 프랭클린 애비뉴
14282</p> <p>산, 조셉, 에스.
미국 92780 캘리포니아주 터스틴 프랭클린 애비뉴
14282
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
양영준, 이상남</p> |
|---|--|

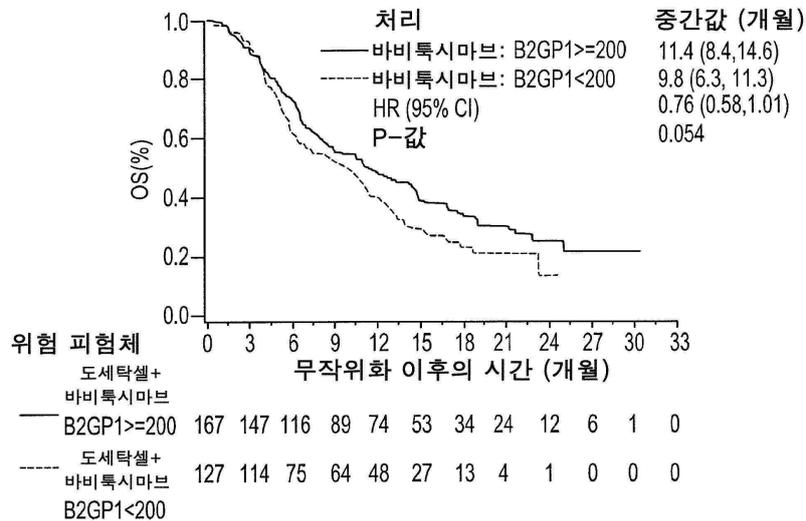
전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 β 2-당단백질 1의 수준에 기초한 바비톡시마브에 의한 암 치료 방법, 및 이를 위한 에세이

(57) 요약

본원에는 PS-표적 항체로 치료 가능한 환자를 식별 및 치료하기 위한, 특히 바비톡시마브 및 바비톡시마브 병용 치료 요법을 사용하여 암 환자를 식별 및 치료하기 위한, 놀라운 신규한 방법 및 키트가 개시된다. 상기 방법 및 키트는 β 2-당단백질 1(β 2GPI), 특히 기능성 β 2GPI의 사전-처리 혈중 농도의 범위를 정의하는 놀라운 발견에 기초하며, 더 나은 치료 결과를 갖는 환자를 정확히 예측하는 지표로서 작용한다.

대표도 - 도18a



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/2827 (2013.01)
C07K 16/44 (2013.01)
G01N 33/57488 (2013.01)
G01N 33/92 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/507 (2013.01)

(72) 발명자

킹, 스티븐, 더블유.

미국 92780 캘리포니아주 터스틴 프랭클린 애비뉴
14282

창, 코니

미국 92780 캘리포니아주 터스틴 프랭클린 애비뉴
14282

브라운, 마이클, 에이.

미국 92780 캘리포니아주 터스틴 프랭클린 애비뉴
14282

(30) 우선권주장

62/406,727	2016년10월11일	미국(US)
62/480,994	2017년04월03일	미국(US)
62/507,580	2017년05월17일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

환자에서 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 바비투시마브로서,

기능성 β 2-당단백질 1 (β 2GPI)은 환자로부터의 혈액 샘플 내에 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도로 존재하고; 여기에서, 상기 기능성 β 2GPI은 포스파티딜세린 (PS) 및 바비투시마브에 모두 결합하고; 여기에서, 바비투시마브는 제1 항암제이고, 상기 방법은 적어도 하나의 제2 항암제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 바비투시마브.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방법은:

- (a) 환자로부터의 혈액 샘플 내의 상기 기능성 β 2GPI의 농도를 식별하는 단계; 및
- (b) 기능성 β 2GPI의 혈중 농도가 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 경우, 바비투시마브 및 적어도 하나의 제2 항암제를 상기 환자에 투여하는 단계를 포함하는, 바비투시마브.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 환자는 난소암, 위암, 간세포 암종, 결장직장암, 유방암, 식도암, 악성 뇌교종, 교모세포종, 전립선암, 흑색종, 두경부암, 신장 세포 암종, 방광암, 췌장암 또는 폐암을 갖는, 바비투시마브.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 환자는 췌장암 또는 비-소세포 폐암 (NSCLC)을 갖는, 바비투시마브.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 제2 항암제는 화학치료제 또는 면역 체크포인트 항체인, 바비투시마브.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 화학치료제는 소라페니브, 파클리탁셀, 카보플라틴, 겐시타빈 또는 도세탁셀인, 바비투시마브.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 항체는 CTLA-4, PD-1 또는 PD-L1에 결합하는 차단 항체인, 바비투시마브.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 상기 면역 체크포인트 항체는 트레멜리무맙, 니볼루맙, 펨브롤리주맙, 두르발루맙 또는 아테롤리주맙인, 바비투시마브.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 제3 항암제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 바비투시마브.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기능성 β 2GPI의 혈중 농도가 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 $290\mu\text{g}/\text{ml}$ 인, 바

비특시마브.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기능성 β 2GPI는 이하의 단계를 포함하는 에세이에서 측정되는, 바비특시마브:

- (a) ELISA 플레이트를 포스파티딜세린 (PS)으로 코팅하여, PS-코팅된 ELISA 플레이트를 제조하는 단계;
- (b) 상기 혈액 샘플 내의 β 2GPI가 상기 바비특시마브 및 상기 PS-코팅된 ELISA 플레이트 모두에 결합하기에 효과적인 조건 하에서, 바비특시마브 및 상기 혈액 샘플을 상기 PS-코팅된 ELISA 플레이트에 첨가하는 단계; 및
- (c) 바비특시마브 및 β 2GPI의 상기 PS-코팅된 ELISA 플레이트에 대한 결합을 검출하고, 이에 의해 상기 혈액 샘플 내의 상기 기능성 β 2GPI를 측정하는 단계.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈액 샘플은 혈장 샘플인, 바비특시마브.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈액 샘플은 혈청 샘플인, 바비특시마브.

청구항 14

제1 항암제 및 적어도 하나의 제2 항암제로 치료할 수 있는 암 환자를 진단하는 방법으로서, 여기에서 상기 제1 항암제는 바비특시마브이고, 상기 방법은 환자로부터의 혈액 샘플 내의 기능성 β 2-당단백질 1 (β 2GPI)의 농도를 측정하는 단계를 포함하며, 여기에서 상기 기능성 β 2GPI의 혈중 농도가 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 경우, 환자는 바비특시마브 및 상기 적어도 하나의 제2 항암제로 치료할 수 있는 것으로 결정되고; 여기에서 상기 기능성 β 2GPI는 포스파티딜세린 (PS) 및 바비특시마브 모두에 결합하는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 환자는 상기 제1 항암제 및 적어도 하나의 제2 항암제 및 제3 항암제로 치료가능한, 방법.

청구항 16

인간 환자에서 암을 치료하는 방법으로서,

제1 항암제 및 적어도 하나의 제2 항암제를 상기 환자에 투여하는 단계를 포함하고, 여기에서 상기 제1 항암제는 바비특시마브이고; 상기 환자는 기능성 β 2-당단백질 1 (β 2GPI)의 사전-처리 혈중 농도가 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상이고; 여기에서 상기 기능성 β 2GPI는 포스파티딜세린 (PS) 및 바비특시마브 모두에 결합하는, 방법.

청구항 17

인간 환자에서 암을 치료하는 방법으로서,

- (a) 환자로부터 수득한 사전-처리 혈액 샘플 내의 기능성 β 2-당단백질 1 (β 2GPI)의 농도를 측정하는 단계로서, 여기에서, 상기 기능성 β 2GPI는 포스파티딜세린 (PS) 및 바비특시마브 모두에 결합되는 단계; 및
- (b) 제1 항암제 및 적어도 하나의 제2 항암제를, 기능성 β 2GPI의 사전-처리 혈중 농도가 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 환자에 투여하는 단계로서, 상기 제1 항암제는 바비특시마브인 단계;를 포함하는 방법.

청구항 18

인간 환자에서 암을 치료하는 방법으로서,

- (a) 환자로부터의 사전-처리 혈액 샘플을 수득하는 단계;
- (b) 상기 사전-처리 혈액 샘플 내의 기능성 β 2-당단백질 1 (β 2GPI)의 농도를 측정하는 단계로서, 상기 기능성 β 2GPI는 포스파티딜세린 (PS) 및 바비특시마브 모두에 결합하는 단계; 및

(c) 제1 항암제 및 적어도 하나의 제2 항암제를, 기능성 β 2GPI의 사전-처리 혈중 농도가 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 환자에 투여하는 단계로서, 상기 제1 항암제는 바비투시마브인 단계;를 포함하는 방법.

청구항 19

제1 항암제 및 적어도 하나의 제2 항암제로 치료 가능한 인간 암 환자를 식별하고 환자를 치료하는 방법으로서, 여기에서 상기 제1 항암제는 바비투시마브이며:

- (a) 환자로부터 수득한 사전-처리 혈액 샘플 내의 기능성 β 2-당단백질 1 (β 2GPI)의 농도를 측정하는 단계로서, 상기 기능성 β 2GPI는 포스파티딜세린 (PS) 및 바비투시마브 모두에 결합하는 단계;
- (b) 상기 사전-처리 혈액 샘플 내의 기능성 β 2GPI의 농도가 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 경우, 환자가 바비투시마브 및 상기 적어도 하나의 제2 항암제로 치료가능한 것으로 식별되는 단계; 및
- (c) 바비투시마브 및 상기 적어도 하나의 제2 항암제를, 기능성 β 2GPI의 사전-처리 혈중 농도가 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 환자에 투여하는 단계;를 포함하는, 방법.

청구항 20

제1 항암제 및 적어도 하나의 제2 항암제로 치료 가능한 인간 암 환자를 식별하고 환자를 치료하는 방법으로서, 여기에서 상기 제1 항암제는 바비투시마브이며:

- (a) 환자로부터의 사전-처리 혈액 샘플을 수득하는 단계;
- (b) 상기 사전-처리 혈액 샘플 내의 기능성 β 2-당단백질 1 (β 2GPI)의 농도를 측정하는 단계로서, 상기 기능성 β 2GPI는 포스파티딜세린 (PS) 및 바비투시마브 모두에 결합하는 단계;
- (c) 상기 사전-처리 혈액 샘플 내의 기능성 β 2GPI의 농도가 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 경우, 환자가 바비투시마브 및 상기 적어도 하나의 제2 항암제로 치료가능한 것으로 식별되는 단계; 및
- (d) 바비투시마브 및 상기 적어도 하나의 제2 항암제를, 기능성 β 2GPI의 사전-처리 혈중 농도가 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 환자에 투여하는 단계;를 포함하는, 방법.

청구항 21

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바비투시마브는 상기 환자에게 $3\text{mg}/\text{kg}$ 의 양으로 투여되는, 방법.

청구항 22

제16항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 제2 항암제 및 제3 항암제를 상기 환자에 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 23

제14항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 난소암, 위암, 간세포 암종, 결장직장암, 유방암, 식도암, 악성 뇌교종, 교모세포종, 전립선암, 흑색종, 두경부암, 신장 세포 암종, 방광암, 췌장암 또는 폐암을 갖는, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 환자는 췌장암 또는 비-소세포 폐암 (NSCLC)을 갖는, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 비-소세포 폐암 (NSCLC)은 비-편평, 비-소세포 폐암인, 방법.

청구항 26

제14항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 제2 항암제는 화학치료제 또는 면역 체크포인트 항체인, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 화학치료제는 소라페니브, 파클리탁셀, 카보플라틴, 겐시타빈 또는 도세탁셀인, 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 항체는 CTLA-4, PD-1 또는 PD-L1에 결합하는 차단 항체인, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 항체는 트레멜리무맙, 니볼루맙, 펌브롤리주맙, 두르발루맙 또는 아테롤리주맙인, 방법.

청구항 30

제14항 또는 제15항에 있어서, 기능성 β 2GPI의 혈중 농도가 $200\mu\text{g/ml}$ 내지 $290\mu\text{g/ml}$ 인 경우, 상기 환자는 바비투시마브 및 적어도 하나의 제2 항암제로 치료가능한 것으로 결정되는, 방법.

청구항 31

제16항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 기능성 β 2GPI의 사전-처리 혈중 농도가 $200\mu\text{g/ml}$ 내지 $290\mu\text{g/ml}$ 인, 방법.

청구항 32

제14항, 제15항, 또는 제17항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈액 샘플은 혈장 샘플인, 방법.

청구항 33

제14항, 제15항, 또는 제17항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈액 샘플은 혈청 샘플인, 방법.

청구항 34

제14항, 제15항, 또는 제17항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기능성 β 2GPI은 이하의 단계들을 포함하는 에세이에서 측정되는 방법:

- (a) ELISA 플레이트를 포스파티딜세린 (PS)로 코팅하여, PS-코팅된 ELISA 플레이트를 제조하는 단계;
- (b) 바비투시마브 및 상기 혈액 샘플을, 상기 혈액 샘플 내의 β 2GPI가 상기 바비투시마브 및 상기 PS-코팅된 ELISA 플레이트 모두에 대해 결합하기에 효과적인 조건 하에서, 상기 PS-코팅된 ELISA 플레이트에 첨가하는 단계; 및
- (c) 바비투시마브 및 β 2GPI의 상기 PS-코팅된 ELISA 플레이트에 대한 결합을 검출하고, 이에 의해 상기 혈액 샘플 내의 상기 기능성 β 2GPI를 측정하는 단계.

청구항 35

기능성 β -당단백질 1 (β 2GPI)을 측정하는 방법으로서, 상기 기능성 β 2GPI는 포스파티딜세린 (PS) 및 바비투시마브 모두에 결합하며, 상기 방법은 이하의 단계들을 포함하는 방법:

- (a) ELISA 플레이트를 포스파티딜세린 (PS)으로 코팅하여, PS-코팅된 ELISA 플레이트를 제조하는 단계;
- (b) 바비투시마브 및 β 2GPI를 함유할 것으로 의심되는 생물학적 샘플을, 상기 샘플 내의 β 2GPI가 상기 바비투시마브 및 상기 PS-코팅된 ELISA 플레이트 모두에 대해 결합하기에 효과적인 조건 하에서, 상기 PS-코팅된 ELISA 플레이트에 첨가하는 단계; 및
- (c) 바비투시마브 및 β 2GPI의 상기 PS-코팅된 ELISA 플레이트에 대한 결합을 검출하고, 이에 의해 상기 샘플 내의 상기 기능성 β 2GPI를 측정하는 단계.

청구항 36

제0항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 혈액 샘플인, 방법.

청구항 37

제34항 또는 제36항에 있어서, 상기 혈액 샘플은 혈장 샘플인, 방법.

청구항 38

제34항 또는 제36항에 있어서, 상기 혈액 샘플은 혈청 샘플인, 방법.

청구항 39

제34항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바비투시마브는 검출가능한 신호를 생성하는 검출가능한 제체에 부착되고, 여기에서 바비투시마브 및 β 2GPI의 상기 PS-코팅된 ELISA 플레이트에 대한 결합이 상기 검출가능한 신호의 검출 및 측정에 의해 검출 및 측정되는, 방법.

청구항 40

제34항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바비투시마브는 β 2GPI를 함유하는 샘플에 첨가하기 전에 상기 PS-코팅된 ELISA 플레이트에 첨가되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2017년 5월 17일자로 출원된 동시 계류중인 가출원 일련번호 62/507,580; 2017년 4월 3일자로 제출된 가출원 일련번호 62/480,994; 2016년 10월 11일자로 출원된 가출원 일련번호 62/406,727 (2016년 10월 10일은 미국 연방 연휴였음); 및 2016년 9월 27일자로 출원된 가출원 일련번호 62/400,589에 대한 우선권을 주장하며, 상기 출원들의 명세서, 청구 범위, 도면 및 서열은 포기 없이 참고로서 본원에 통합된다.

[0003] 본 발명의 분야

[0004] 본 발명은 바이오마커의 분야에 관한 것으로, 특히, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체를 사용하는 치료에 대한 성공적인 반응을 예측하기 위한 지표로서의, 사전-처리 수준의 β 2-당단백질 1 (β 2GPI), 특히 기능성 β 2GPI의 사용에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 암 및 바이러스 감염을 비롯한 모든 질병 퇴치에서, 면역계를 기능화하는 것은 치료 반응의 중요한 부분이다. 따라서, 최근 암 치료 전략으로 인정되는 면역-종양학(IO) 분야를 포함한, 면역치료법에 대한 상당한 연구가 이루어졌다. 최근 몇 년간, 면역 반응을 조작하는 새로운 표적 및 화합물이 연구자와 임상외에 의해 연구되었다. 예를 들어, 프로그램화된 세포 사멸 단백질 1 (PD-1) 및 프로그램화된 사멸 리간드 1 (PD-L1)을 표적으로 하는 IO 제제가 일부 진행된 악성 종양의 치료에 대해 이미 승인을 받았지만, 다른 IO 표적과 상호 작용하는 화합물은 개발 중이다.

[0006] 그럼에도 불구하고, 이러한 새로운 면역치료법조차도 특정 환자에게만 효과가 있다. 따라서, 오랫동안 확립된 치료법 및 새로운 면역치료법 모두에 대한 반응의 다양성 및 임상적 이점을 극대화하고자 하는 욕구에 비추어, IO 치료법을 비롯한 치료 결과를 예측할 수 있는 바이오마커의 필요성은 여전히 있다. 일부 연구자는 개별화된 예측 접근법을 개발하기 위한 치료 표적의 활용에 초점을 맞추고 있지만, 다른 사람들은 결합 및 하류 신호 전달 분자의 측정을 활용함으로써, 환자 선별 및 구별의 대안적인 수단을 모색하고 있다.

[0007] 최근, 막 인지질인 포스포글리세린 (PS)은 숙주의 면역 반응을 조절하는 상류 면역 체크포인트로 작용하는 독특하면서도 고도의 면역 억제적인 분자로 확인되었다. 이것은 PS가 암 및 바이러스 감염을 비롯한 다양한 질병에서 중요한 역할을 하여, PS를 차단하는 PS-표적 항체의 형태로 면역치료법의 새로운 영역을 열었다는 것을 의미한다.

[0008] 최선두의 PS-표적 항체는 3G4라 명명된 쥐 단클론 항체(mAb)로부터 유래된 마우스-인간 키메라 단클론 항체인 바비투시마브(bavituximab)이다 (Ran 외, 2005; Huang 외, 2005; 미국 특허 제7,247,303호). 3G4 및 바비투시마브는 β 2-당단백질 1 (β 2GPI)-의존적 방식으로 PS를 표적으로 하는 쥐, 키메라 및 완전 인간 항체 계열의 일

부이다. 즉, 바비투시마브 및 관련 PS-표적 항체는 β 2GPI 존재하에 PS에 결합하여, 고친화성의 항체- β 2GPI-PS 복합체를 형성한다 (Luster 외, 2006). 작동시, 이들 β 2GPI-의존성 PS-표적 항체는, 특히 치료법에 대한 반응을 측정 및 예측하는 것 (Gong 외, 2013; Stafford 외, 2013)을 포함하는 수많은 화상 연구 (Jennewein 외, 2008; Marconescu & Thorpe, 2008; Saha 외, 2010; Stafford & Thorpe, 2011; Zhao 외, 2011; Zhang 외, 2014; Zhou 외, 2014; 미국 특허 제7,790,860호)에서 나타난 바와 같이, *생체내* 에서 PS에 특이적이다.

[0009] 바비투시마브는 PS가 마커인 넓은 범위의 질병, 특히 암 및 바이러스 감염, 뿐만 아니라 세포내 기생충, 예컨대 기생 원생동물인 레이쉬마니아 아마조넨시스 (*Leishmania amazonensis*) (Wanderley 외, 2013), 및 세포내 박테리아 병원체, 예컨대 각각 플라크 및 야토병을 유발하는 예르시니아 페스티스 (*Yersinia pestis*) 및 프란시셀라 투라렌시스 (*Francisella tularensis*)의 감염 (Lonsdale 외, 2011)에 대한 활성이 입증되었다. 바이러스 감염과 관련하여, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체는 바이러스 복제를 억제하고, 장기의 바이러스 부하를 감소시키며, 생존을 증가시키는 것으로 나타났다 (Soares 외, 2008; Moody 외, 2010; 미국 특허 제7,906,115호). 바비투시마브 및 관련 PS-표적 항체의 항암 활성은 많은 수의 전-임상 연구 및 임상 시험에서 증명되었고 (Ran 외, 2005; 미국 특허 제7,572,448호; DeRose 외, 2011), 이들의 효과는 종양 혈관에 대항하여 매개되며, 뿐만 아니라 PS의 면역 억제적 신호 전달을 차단한다.

[0010] 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체의 항-종양 효과는, 종양 미세 환경에서 PS의 노출을 증가시키는 제제 또는 조건과 함께 사용되는 경우, 예컨대 항체가 방사선의 사용 및/또는 화학 치료제의 공동 투여에 의해 증진된다 (미국 특허 제7,422,738호, 미국 특허 제8,486,391호, 미국 특허 제7,572,448호). 예를 들어, PS-표적 항체인 바비투시마브 계열과, 유방 종양을 치료하기 위한 도세탁셀과의 병용 투여 (Huang 외, 2005); 췌장 종양을 치료하기 위한 깬시타빈과의 병용 투여 (Beck 외, 2006); 폐암 (He 외, 2007) 및 뇌암, 교모세포종 (He 외, 2009)을 치료하기 위한 방사선 조사의 병용; 전립선암을 치료하고 항-종양 면역을 재활성화시키는 도세탁셀과의 병용 투여 (Yin 외, 2013); 및 간세포성 암종을 치료하기 위한 소라페니브와의 병용 투여 (Cheng 외, 2016)의 경우, 개선된 항-종양 효과가 전-임상적으로 입증되었다. 향상된 항-종양 효과는, 또한 CTLA-4 또는 PD-1에 대한 항체의 형태로 체크포인트 저해제와 병용한 흑색종 (Freimark 외 2016) 및 삼중 음성 유방암 (Gray 외, 2016a)의 치료에서 전-임상적으로 보여지는 바와 같이, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체가 다른 IO 작용제와의 병용 요법으로 사용되는 경우 나타난다.

[0011] 바비투시마브는 또한 800명 이상의 환자에 대한 임상 시험에서도 평가되었으며, 이들 대부분은 병용 요법으로 치료되었다. 이들 임상 시험은 만성 C형 간염 바이러스 (HCV) 및 인간 면역 결핍 바이러스 (HIV)와 같은 바이러스 감염의 환자, 및 폐, 유방, 간 (간세포 암종, HCC), 췌장암, 결장직장암 및 신장 (신장 세포 암종, RCC)을 포함하는 다수의 종양 유형을 갖는 환자들을 포함한다. 유망한 항-종양 효과는 HER2 음성의 전이성 유방암 환자에서 파클리탁셀과 병용 투여되고 (Chalasan 외, 2015); 진행된 비-소세포 폐암, NSCLC에서의 파클리탁셀-카보플라틴과 병용투여되고 (Digumarti 외, 2014); 간세포 암종에서 소라페니브와 병용투여되고 (Cheng 외, 2016); 그리고 이전에 치료받은 진행성 비편평 비-소세포 폐암에서 도세탁셀과 병용 투여된 (Gerber 외 2016) 바비투시마브를 이용한 임상 시험에서 보고된 바 있다.

[0012] 전반적으로, 임상 I 상 및 II 상의 결과는 임상적으로 의미있는 바비투시마브 치료 효과를 나타냈다. 그럼에도 불구하고, 아직 바비투시마브 치료와 관련된 바이오마커가 없으므로, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체로의 치료를 최적화하기 위한 효과적인 방법이 필요하다. 관련 바이오마커 데이터의 부족을 해결하려는 시도는, 바비투시마브 항체 및 이의 생리학/병리학 표적인 PS의 독특한 성질에 의해 방해받았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 따라서, 치료가 최적화될 수 있도록, 개선된 환자 스크리닝 방법에 대한 필요성이 존재한다. 바비투시마브 치료를 위한 하나 이상의 순환하는 바이오마커를 확인하는 것이 특히 중요한 진전일 것이며, 환자를 선택하고 치료 결과를 개선하기 위한 최소 침습 시험을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0014] **발명의 개요**

[0015] 본 발명은 바비투시마브 및 유사 항체, 예컨대 1N1과 같은 PS-표적 항체로의 치료를 최적화하기 위한 새로운 바이오마커 방법, 조성물, 키트 및 에세이를 제공함으로써, 선행 기술의 상기 및 다른 필요성을 해결한다. 본

발명은 특히 바비투시마브를 사용하는 치료법에 대한 성공적인 반응을 예측하기 위한 지표 또는 "바이오마커"로서의 β 2-당단백질 1 (β 2GPI), 가장 바람직하게는 기능성 β 2GPI의 사전처리 수준의 사용에 관한 것이다.

- [0016] 이러한 놀라운 새로운 방법, 조성물, 키트 및 에세이는, 바비투시마브-함유 치료 요법 또는 병용 요법으로의 치료를 위해 β 2GPI 의존성 PS-표적 항체 치료로 치료가능한 환자, 특히 암 환자를 식별 및 치료하기 위하여, 가장 바람직하게는 바비투시마브(제1 항암제) 및 적어도 하나의 제2 또는 제3 항암제를 사용하여 암 환자를 식별 및 치료하기 위하여 제공되며, 이들 모두는 기능성 β 2GPI의 규정 범위의 사전처리 혈중 농도로 환자를 선별한다. "기능성" β 2GPI는 PS 및 β 2GPI 의존성 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브 모두에 결합하는 β 2GPI이다.
- [0017] 가장 바람직한 구현예에서, 본 발명은 $200\mu\text{g/ml}$ 이상의 β 2GPI의 사전처리 수준을 기초로 하여, 환자를 선별, 식별, 진단 및 바람직하게는 치료하는 것에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명은 인간 환자에서 PS가 마커인 질병, 특히 암의 치료 방법을 제공하며, 이는 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브를 환자에게 투여하는 단계를 포함하되, 여기에서 상기 환자는 $200\mu\text{g/ml}$ 이상의 기능성 β 2GPI의 사전처리 혈중 농도를 갖는다. 바람직하게는, 본 명세서에서 "제1 치료제" 및 "제1 항암제"로 지칭되는 PS-표적 항체, 예컨대 바비투시마브는, 적어도 하나의 제2 치료제 또는 항암제와 함께 환자에게 투여된다.
- [0019] 본 발명은 또한 인간 환자에서 PS가 마커인 질병, 특히 암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 (이하의 단계들을) 포함한다:
- [0020] (a) 환자로부터 수득한 사전처리 혈액 샘플 내의 기능성 β 2GPI의 농도를 측정하는 단계; 및
- [0021] (b) $200\mu\text{g/ml}$ 이상의 기능성 β 2GPI의 사전처리 혈중 농도를 갖는 환자에게 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브를 투여하는 단계. 바람직하게는, PS-표적 항체, 예컨대 바비투시마브는 적어도 하나의 제2 치료제 또는 항암제와 함께 환자에게 투여된다.
- [0022] 본 발명은 인간 환자에서 PS가 마커가 되는 질병, 특히 암의 치료 방법을 추가로 제공하며, 이는 (이하의 단계들을) 포함한다:
- [0023] (a) 환자로부터 사전처리 혈액 샘플을 얻는 단계;
- [0024] (b) 상기 사전처리 혈액 샘플 내의 기능성 β 2GPI의 농도를 측정하는 단계; 및
- [0025] (c) 상기 기능성 β 2GPI의 사전처리 혈중 농도가 $200\mu\text{g/ml}$ 이상인 환자에게 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브를 투여하는 단계. 바람직하게는, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체는 적어도 하나의 제2 치료제 또는 항암제와 함께 환자에게 투여된다.
- [0026] 또한, 인간 환자, PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브로 치료가능한 인간 암 환자를 식별하고, 상기 환자를 치료하는 방법도 또한 제공하는데, 이는 (이하의 단계들을) 포함한다:
- [0027] (a) 환자로부터 수득한 사전처리 혈액 샘플 내의 기능성 β 2GPI의 농도를 측정하는 단계;
- [0028] (b) 상기 사전처리 혈액 샘플 내의 기능성 β 2GPI의 농도가 $200\mu\text{g/ml}$ 이상인 경우, 상기 환자를 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브로 치료가능한 것으로 식별하는 단계; 및
- [0029] (c) $200\mu\text{g/ml}$ 이상의 기능성 β 2GPI의 사전처리 혈중 농도를 갖는 환자에게 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브를 투여하는 단계. 바람직하게는, (b) 상기 환자는 바비투시마브 및 적어도 하나의 제2 치료제 또는 항암제로 치료가능한 것으로 식별되고, 그리고 (c) 바비투시마브 및 상기 적어도 하나의 제2 치료제 또는 항암제가 상기 환자에 투여된다.
- [0030] PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브로 치료가능한 인간 환자, 바람직하게는 인간 암 환자를 식별하고, 상기 환자를 치료하는 방법을 추가로 제공하는데, 이는 (이하의 단계들을) 포함한다:
- [0031] (a) 환자로부터 사전처리 혈액 샘플을 수득하는 단계;
- [0032] (b) 상기 사전처리 혈액 샘플 내의 기능성 β 2GPI의 농도를 측정하는 단계;
- [0033] (c) 상기 사전처리 혈액 샘플 내의 기능성 β 2GPI의 농도가 $200\mu\text{g/ml}$ 이상인 경우, 상기 환자를 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브로 치료가능하다고 식별하는 단계; 및
- [0034] (d) 기능성 β 2GPI의 사전처리 혈중 농도가 $200\mu\text{g/ml}$ 이상인 환자에게 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마

브를 투여하는 단계. 바람직하게는, (c) 환자는 바비투시마브 및 적어도 하나의 제2 치료제 또는 항암제로 치료 가능한 것으로 식별되고, 그리고 (d) 바비투시마브 및 적어도 하나의 제2 치료제 또는 항암제가 환자에게 투여 된다.

- [0035] 본 발명의 또 다른 구현에는 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브로 치료가능한 환자, 바람직하게는 암 환자를 진단하는 방법이며, 상기 방법은 상기 환자로부터 수득한 혈액 샘플 내의 기능성 β 2GPI의 농도를 측정하는 단계를 포함하며, 여기에서 상기 기능성 β 2GPI의 혈중 농도가 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 경우, 환자는 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브로 치료 가능하다고 결정된다. 바람직하게는, 기능성 β 2GPI의 혈중 농도가 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 경우, 환자는 바비투시마브 및 적어도 하나의 제2 치료제 또는 항암제로 치료가능한 것으로 진단된다.
- [0036] 본 발명의 추가적인 구현에는 환자를 치료하는 방법, 바람직하게는 환자에서 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브이며, 여기에서 기능성 β 2GPI은 환자의 혈액 샘플 내에 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도로 존재한다. 바람직하게는, 이 방법은 상기 암의 치료 방법에서 사용하기 위한 바비투시마브에 관한 것으로, 적어도 하나의 제2 항암제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 구현에는 PS가 마커인 질병, 바람직하게는 암의 치료 방법에 사용하기 위한 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브로서, 상기 방법은 (이하의 단계들을) 포함한다:
- [0038] (a) 환자, 바람직하게는 암 환자로부터의 혈액 샘플 내의 기능성 β 2GPI의 농도를 확인하는 단계; 및
- [0039] (b) 기능성 β 2GPI의 혈중 농도가 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 경우, PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브를 환자에게 투여하는 단계. 바람직하게는, 암을 치료하는 방법에 사용하기 위해 바비투시마브 및 적어도 제2 치료제 또는 항암제가 제공된다.
- [0040] 특정 바람직한 구현예에서, β 2GPI의 가장 바람직한 수준이 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 점에 더하여, 본 발명은 $200\sim 290\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위의 사전처리 기능성 β 2GPI에 기초한 환자의 선별에 관한 것이다. 이 수준 내의 모든 숫자 및 범위는 각각 상기 방법 및 사용, 예컨대 200 또는 $210\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 기능성 β 2GPI의 사전 처리 수준을 기준으로 하는 환자의 선별, 식별, 진단 및 바람직하게는 치료에 포함되며; β 2GPI는 하한 200 또는 $210\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 상한 270 , 280 , 290 , 300 , 310 또는 $320\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위 내이고, 이는 $200\sim 270$, $200\sim 280$, $200\sim 290$, $200\sim 300$, $200\sim 310$, $200\sim 320$, $210\sim 270$, $210\sim 280$, $210\sim 290$, $210\sim 300$, $210\sim 310$ 및 $210\sim 320\mu\text{g}/\text{ml}$ 등을 포함하며, 최근에는 $210\sim 270$, $210\sim 280$, $210\sim 290$, $200\sim 280$ 및 $200\sim 290\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 바람직하다.
- [0041] 환자, 바람직하게는 인간 암 환자에게 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브를 투여하는 단계에서, 항체는 약 $1\sim 10$, $1\sim 6$, $3\sim 6$ 또는 $1\sim 3\text{mg}/\text{kg}$, 가장 바람직하게는 약 $3\text{mg}/\text{kg}$ 의 투여량이 주어진다.
- [0042] 전술한 방법 및 용도 각각에서, 본 발명은 고행암, 예컨대 난소암, 위암, 간암, 결장직장암, 유방암, 식도암, 뇌암 (예를 들어, 신경교종, 교모세포종), 전립선암, 피부암 (흑색종), 두경부암, 신장암, 방광암, 췌장암 또는 폐암, 바람직하게는 비편평 NSCLC를 포함하는 비-소세포 폐암(NSCLC)의 치료를 위한, PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브와 화학치료제인 제2 또는 제3 항암제, 예컨대 소라페니브, 파클리탁셀, 카보플라틴, 겐시타빈 또는 도세탁셀의 병용에 적용될 수 있다. 기능성 β 2GPI 및 PS와의 복합체에 대한 바비투시마브 결합 메커니즘 및 전체적인 바비투시마브의 면역 활성화 메커니즘은, 모든 바비투시마브 치료법에 공통적이다. 따라서, 본 발명은 병용 치료, 특히 화학 요법, 바람직하게는 면역-종양학 (IO) 요법과의 병용 치료에서 PS-표적 항체, 예컨대 바비투시마브 또는 유사 항체, 예를 들어 1N11을 사용하는 어느 치료법에서의 환자의 선별에 적용된다.
- [0043] 적합한 IO 작용제는 면역 체크 포인트 항체이며, 활성화 면역 체크 포인트, 수용체 또는 분자, 예컨대 PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3 및/또는 LAG-3에 결합하는 작용성 (활성화) 항체, 및 바람직하게는 억제성 면역 체크 포인트, 수용체 또는 분자, 예컨대 CD28, OX40 및/또는 GITR에 결합하는 길항성 (차단) 항체를 포함한다. 억제성 면역 체크 포인트, 수용체 또는 분자에 결합하는 길항성 (차단) 항체는, 본원에서 또한 "면역 체크포인트 억제제" 또는 "ICI"로 지칭되기도 한다. 면역 체크포인트 항체 (또는 면역 체크포인트 억제제)의 바람직한 예는, CTLA-4, PD-1 또는 PD-L1에 대한 차단 항체, 예컨대 이필리무마브, 트레멜리무마브, 니볼루마브, 펌브롤리주마브, 두르발루마브, 아테졸리주마브이다.
- [0044] 본 발명은 특히 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마, 및 제2 및 제3 치료제 또는 항암제에 의한 환자의 선별, 진단 및 치료를 고려한다. 예를 들어, 화학요법제와 하나의 면역 체크포인트 항체, 또는 2개의 면역 체크포인트 항체에 의한 치료는 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브에 의한 치료를 포함하는데, 이 때 화학치료제에 의한 치료 이후 면역 체크포인트 항체로 치료된다.

- [0045] 이러한 β 2GPI 바이오마커 기술과 관련하여, 그리고 다른 연구 및 임상적 용도를 갖는 것으로, 본 발명은 또한 기능성 β 2GPI의 검출 및 정량화에 특히 적합한 새로운 에세이 방법, 조성물 및 키트를 제공한다. 따라서, 전술한 방법 및 사용의 관점 모두에서, 본 발명은 새로운 에세이로서, (이하의 단계들)을 포함하는 기능성 β 2GPI의 측정 방법을 추가로 제공한다:
- [0046] (a) 선택적으로, 고체 지지체, 예컨대 ELISA 플레이트를 PS로 코팅하여, PS 코팅된 고체 지지체 또는 PS 코팅된 ELISA 플레이트를 제조하는 단계 (또는 미리 제조된 PS 코팅된 고체 지지체 또는 ELISA 플레이트가 사용될 수 있다);
- [0047] (b) PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브, 및 β 2GPI를 함유하고 있다고 의심되는 생물학적 샘플을 PS 코팅된 고체 지지체에 첨가하고, 이에 의해 샘플 내의 β 2GPI가 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브 및 상기 PS 코팅된 고체 지지체 모두에 결합하기에 효과적인 조건 하에서, 상기 항체 및 상기 샘플을 함께 배양하는 단계; 및
- [0048] (c) PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브 및 β 2GPI의 상기 PS-코팅된 고체 지지체에 대한 결합을 검출하고, 이에 의해 샘플 내의 기능성 β 2GPI를 측정하는 단계.
- [0049] β 2GPI를 함유하고 있다고 의심되는 생물학적 샘플은, 혈장 샘플 또는 혈청 샘플과 같은 혈액 샘플일 수 있다. β 2GPI를 함유하는 것으로 의심되는 다른 생물학적 유체 샘플이 사용될 수 있으며, 이는 세포 상청액 등을 포함한다.
- [0050] 본원에 개시되고 당업자에게 공지된 에세이의 많은 결합 포맷이 사용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브는 검출 가능한 신호를 생성하는 검출 가능한 제제에 그 자체로 부착되어, 검출 가능한 신호를 탐지 및 측정함으로써 PS 코팅된 고체 지지체에 대한 항체 및 β 2GPI의 결합을 검출 및 측정한다. 다른 바람직한 구현예에서, PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브는 β 2GPI를 함유하는 것으로 의심되는 샘플, 예컨대 혈액 샘플을 첨가하기 전에 PS 코팅된 고체 지지체에 첨가된다.

도면의 간단한 설명

[0051] 이하의 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고, 본 발명의 특정 양태를 추가로 예시하기 위해 포함된다. 본 발명은 본 명세서에 제시된 특정 구현예의 상세한 설명과 함께 이들 도면 중 하나 이상을 참조하여 더 잘 이해될 수 있다. 미국 특허 또는 출원 파일에는 컬러로 작성된 도면이 하나 이상 포함될 수 있다. 컬러 도면(들)을 포함하는 이러한 미국 특허 또는 특허 출원 공보의 사본은 요청 및 필요한 수수료 지불시 미국 특허청에서 제공할 것이다.

도 1a, 도 1b, 도 1c 및 도 1d는, (명백한 균질성을 갖도록 정제된) 3G4 항체 처리 마우스에서의 종양 성장 억제제를 나타낸다. 도 1a는 SCID 마우스의 유방 지방 패드에서 성장하는 (0.6-0.7 cm 직경, 140mm³ 부피의) 인간 MDA-MB-435 유방 암종을 확립하였고; 도 1b는 SCID 마우스의 유방 지방 패드에서 성장하는 (0.5-0.7cm 직경, 110mm³ 부피의) MDAMB-231 인간 유방 암종을 확립하였고; 도 1c는 동종 BALB/c 마우스에서 피하 성장하는 작은 Meth A 섬유육종에 대해 나타내었고; 도 1d는, SCID 마우스에서 피하 성장하는 큰 (0.8-1cm 직경, 370mm³ 부피의) 인간 L540 호지킨 종양에 대해 나타내었다. 화살표로 나타난 일자를 시작으로, 8-10마리의 마우스에 100 μ g의 3G4 항체 (○, 개방된 원), 또는 대조군 BBG3 항체 (●, 폐쇄된 원)을 정맥내 주사하였다. 치료는 그 후 1주당 3회 계속되었다.

도 2a 및 도 2b에서, PS 코팅된 마이크로타이터 플레이트에 결합하는 3G4 항체는 혈청 의존적이다. 도 2a에서, 소 혈청-함유 배지 (▲, SCM) 또는 무혈청 배지 (■, SFM)에서 성장한 세포로부터 3G4 항체를 정제하였다. 마이크로타이터 플레이트를 PS로 코팅하고, 1% 계란 흰자로부터의 오발부민(OVA) 중에서 블로킹하였다. 3G4의 연속 희석은 10% 소태아 혈청 (실선, FBS) 또는 계란 흰자로부터의 1% 오발부민 (점선, OVA)에서 수행하였다. 도 2b에서, 마이크로타이터 플레이트를 PS로 코팅하고, 1% OVA에서 블로킹하였다. SFM 중에서의 3G4의 연속 희석은 표시된 바와 같이, 마우스 (◆), 래트 (■), 인간 (●) 및 소 (▲) 종 유래의 10% 혈청에서 수행하였다.

도 3에서, 3G4 항체는 혈장 단백질 β 2GPI와 결합한다. 마이크로타이터 플레이트를 인간 혈장으로부터 정제된 인간 β 2GPI (h β 2GPI)로 코팅하고, 1% OVA 중에서 블로킹하였다. 시판용 마우스 항-인간 β 2GPI (◆, α - β 2GPI), SFM 유래의 3G4 항체 (■, 3G4) 및 대조 마우스 IgG (▲, 대조군 mIgG)의 연속 희석을 1% OVA 중에서 수행하였다.

도 4에서, 3G4 항체는 도메인 II에서 β2GPI에 결합한다. 마이크로타이터 플레이트의 웰을, 재조합 전장 hβ2GPI (◆, 도메인 I-V), 또는 도메인 I이 없는 hβ2GPI 펩티드 (-x-, 도메인 II-V), 도메인 I 및 II가 없는 hβ2GPI 펩티드 (■ 도메인 III-V), 도메인 I, II 및 III이 없는 hβ2GPI 펩티드 (▲, 도메인 IV-V), 도메인 I, II, III 및 IV이 없는 hβ2GPI 펩티드 (●, 도메인 V)로 코팅하였다. 플레이트를 1% OVA에서 블로킹하고, SFM으로부터의 3G4 항체의 연속 희석을 1% OVA에서 수행하였다.

도 5에서, ch3G4 항체 및 β2GPI는 함께 PS가 노출된 세포에 결합한다. 성체 소 대동맥 내피 (ABAE) 세포를 DMEM + 10% 정상 마우스 혈청 (MS) + (i) ch3G4 단독, (ii) ch3G4 + hβ2GPI 동시에, 또는 (iii) 정제된 hβ2GPI 단독 중에 에서 200 μM 리소포스파티딜콜린 (LPC)과 함께 30분 동안 배양하였다. 최종적으로, 세포를 세척, 고정 및 형광 마커로 염색하여, ch3G4의 결합을 검출하였다. ch3G4 및 hβ2GPI는 2μg/ml의 농도로 사용하였다. ch3G4 결합의 픽셀 영역을 MetaVue 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다. 값은 조건 (i) 하의 ch3G4의 결합 (1로 설정됨)에 대해 상대적이다.

도 6a 및 도 6b에서, β2GPI의 지질 결합 영역은 PS가 노출된 세포에 대한 ch3G4 항체의 결합을 매개한다. 도 6a에서, ABAE 세포를 ch3G4 항체 + (i) 비-지질 결합 형태의 β2GPI [닉이 형성된(nicked) hβ2GPI] 또는 (ii) 온전한 hβ2GPI ("hβ2GPI")와 함께 배양하였다. 배양은 DMEM + 10% MS 중에서, 200 μM LPC의 존재 또는 부재 하에 30분 동안 수행하였다. 이어서, 세포를 세척하고, 고정시키고, 형광 표지로 염색하여, ch3G4의 결합을 검출하였다. ch3G4 항체, 온전한 hβ2GPI 및 닉 형성 hβ2GPI를 2μg/ml의 농도로 사용하였다. ch3G4 결합의 픽셀 영역을 MetaVue 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다. 값은 조건 (i) (LPC가 없음) 하의 ch3G4의 결합 (1로 설정됨)에 대해 상대적이다. 도 6b에서, 마이크로타이터 플레이트의 웰을 온전한 hβ2GPI (삼각형, hβ2GPI) 또는 닉 형성된 hβ2GPI (사각형, 닉 형성)로 코팅하고, 1% OVA 중에서 블로킹시켰다. ch3G4 항체 (폐쇄) 또는 대조군 mIgG (개방)의 연속 희석을 1% OVA 중에서 수행하였다.

도 7a 및 도 7b에서, PS가 노출된 세포에 대한 β2GPI-매개 3G4 항체 결합에는 이원성(divalency)이 요구된다. 도 7a에서, ABAE 세포를 DMEM + 10% FBS 중 200 μM LPC의 존재하에 20 nM 3G4, 3G4 F(ab')₂ 또는 3G4 Fab' 단량체와 함께 30분 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 세척하고, 고정시키고, 형광 마커로 염색하여, 3G4 항체 또는 항체 단편의 결합을 검출하였다 [도 7a에서는 (3G4F(ab')₂ 및 3G4 Fab'이 도시되었다]. 항체 결합의 픽셀 영역을 MetaVue 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다. 값은 LPC 부재 하의 3G4의 결합 (1로 설정됨)에 상대적이다. 도 7b에서, ABAE 세포를 DMEM + 10% MS 중에서 200 μM LPC, 40 nM 정제된 hβ2GPI, 20 nM ch3G4 및 1 역가의 3G4 Fab' 단량체와 함께 30분 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 세척하고, 고정시키고, 형광 표지로 염색하여, ch3G4의 결합을 검출하였다. ch3G4 결합의 픽셀 영역을 MetaVue 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다. 값은 경쟁 3G4 Fab'가 없는 ch3G4의 결합 (100으로 설정됨)에 대해 상대적이다.

도 8에서, 3G4 및 바비투시마브 항체 계열은 β2GPI-의존적 방식으로 PS에 결합한다. 3G4, 바비투시마브 및 관련 치료 PS-표적 항체는 (도메인 II에서) β2GPI에 결합하고, 이어서 β2GPI는 도메인 V를 통해 PS에 결합한다. 일반적으로 β2GPI는 단량체이며, PS에 오직 약하게 결합하고, 신속히 분리된다. PS-표적 항체, 예컨대 3G4 또는 바비투시마브의 존재 하에서, 표면에 노출된 PS가 있는 경우, 2 분자의 β2GPI가 PS에 결합할 수 있고, 2가 항체에 의해 가교되어, 안정한 복합체가 형성될 수 있다. 항체-β2GPI 복합체는 (PS-표적 항체의 부재 하에) PS가 노출된 세포로부터 단량체 β2GPI에서보다 1,000 배 이상 더 천천히 분리된다.

도 9a 및 도 9b에서, 낮은 수준의 β2GPI는 3G4 항체의 전-임상 방지 항-중양 활성을 생체내에서 지원한다. 도 9a에서, 하이브리도마 세포로부터 제조될 경우 90%의 항체 3G4 순도를 가정하고, 3G4 항체로 처리된 마우스는 β2GPI 대 항체의 몰비가 0.12가 되도록 2μg/ml의 소 β2GPI를 포함한다. 도 9b에서, 80% 순도의 개시 시점에서, 3G4 항체로 처리한 마우스는 β2GPI 대 항체의 몰비가 0.25가 되도록, 4μg/ml의 소 β2GPI를 함유한다.

도 10에서, 낮은 수준의 β2GPI는 PS가 노출된 세포에 대한 결합을 시험관 내에서 지원한다. ABAE 세포를 DMEM + 10% 마우스 혈청 중에서 PS 노출을 유도하도록 200 μM LPC, 40 nM 정제된 hβ2GPI, 및 증가하는 농도의 ch3G4 항체 (바비투시마브)와 함께 30분 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 세척, 고정 및 형광 마커로 염색하여, ch3G4의 결합을 검출하였다. ch3G4 결합의 픽셀 영역을 MetaVue 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다. 값은 320pM ch3G4의 결합 (1로 설정됨)에 대해 상대적이다.

도 11에서, 낮은 수준의 β2GPI는 시험관내에서 PS 플레이트에 대한 2aG4 항체의 결합을 지원한다. 마이크로타이터 플레이트를 PS로 코팅하였다. 고정된 양의 2aG4 항체를 함유하는 용액을, (오발부민 중의) 증가하는 양

의 인간 β 2GPI의 존재 하에서 PS에 대한 결합에 대해 시험하였다. TMB를 기질로 하고, 이차 항체로서 HRP-컨주게이션된 항-인간 IgG를 사용하여 결합된 항체를 검출하였고, 파장 450nm에서 흡광도를 판독하였다.

도 12에서, PS에 대한 바비투시마브 결합은 시험관 내에서 인간 혈청 범위 내이다. 마이크로타이터 플레이트를 PS로 코팅하였다. 명목상 혈청 #3 (◆), #4 (■), #9 (▲), #11 (-x-), #13 (-x-) 및 #19 (●)로 지칭한, 6개의 상이한 개별적 인간 혈청 샘플을 얻었고, 이를 PBS로 희석하여 최소 0.1%의 인간 혈청 범위를 제공하였다. 바비투시마브-HRP를 2 μ g/ml로 각각의 인간 혈청 용액에 첨가하였다. 인간 혈청 내의 바비투시마브-HRP의 이들 혼합물을 PS 플레이트에 첨가하고, 결합시켰다. 플레이트를 세척하고, TMB 기질을 첨가하고, 450nm의 파장에서 흡광도를 판독하였다.

도 13에서, 난치성 진행성 암 환자에게 투여한 후의 평균 혈청 바비투시마브 액 농도를 나타낸다. 바비투시마브를 0일차, 28일차, 35일차 및 42일차에 0.1mg/kg (○, 개방 원) 또는 0.3mg/kg (□, 개방 사각형)으로 정맥 투여하였고; 0, 7, 14 및 28일차에는 바비투시마브를 1mg/kg (●, 폐쇄 원) 또는 3mg/kg (■, 폐쇄 사각형)으로 투여하였다. 투여 후 지정된 일자에, 평균 혈청 바비투시마브 농도를 결정하였다. 정량화 하한은 0.1 μ g/ml이었다.

도 14에서, 바비투시마브 투여 후 환자의 β 2GPI 농도를 나타내었다. 1mg/kg, 3mg/kg 및 6mg/kg의 양으로 HCV에 감염된 환자에게, (굵은 검은 색 화살표 ↓로 표시된 일자에) 반복 투여량의 바비투시마브를 투여했다. 혈청 β 2GPI 수준은 각 투여량 (1mg/kg, ▲, 상부 (점선); 3mg/kg, ■, 중간선; 6mg/kg, ◆, 하부선)의 투여 후 지정된 일자에, 사전-처리 β 2GPI 수준과 비교하여 결정되었다.

도 15에서, 1N11 (PGN635) 항체는 혈청-의존적 방식으로 PS에 결합한다. scFv 형태의 1N11의 결합은 플레이트에 첨가된 PS, 포스포티딜콜린 (PC) 및 스펅고미엘린 (SM)의 혼합물(PC/SM)에 대한 ELISA에 의해 시험되었다. 폴리스티렌 플레이트를 10 μ g/ml PS 또는 동일한 양의 PC/SM (각각 핵산에 용해)의 혼합물로 코팅하였다. 핵산이 증발한 후, PBS 중의 10% 인간 혈청 (+ 10% 혈청) 또는 1% 오발부민 (+ 1% OV)을 첨가하고 1시간 동안 배양하였다. 각 항원에 대한 6개의 웰 중 첫 번째 웰에 20mg/ml 정제된 1N11 scFv를 10% 사람 혈청 (+ 10% 혈청) 또는 1% 오발부민 (+ 1% OV)에 첨가하고, 3배 희석하여 적정하였다. 나머지 결합된 scFv는 HRP-컨주게이션된 항-c-myc 태그 마우스 단클론 항체 (Invitrogen)로 검출하였다.

도 16은 기능성 β 2GPI에 대한 표준 곡선을 도시한다. 공지된 양의 기능성 β 2GPI의 샘플을 실시예 XVI에 기술된 바와 같이 기능성 β 2GPI 에세이에서 시험하고, 이를 플로팅하여 표준 곡선을 제공하였다. 표준 곡선으로부터, 시험 샘플, 특히 희석된 혈장 또는 혈청 시험 샘플 내의, 기능성 β 2GPI의 양을 결정할 수 있다.

도 17a, 도 17b, 도 17c 및 도 17d는, 비-소세포 폐암 (NSCLC)을 치료하기 위해 바비투시마브 및 도세탁셀의 III상 시험에 참여한 환자의, 사전처리 기능성 β 2GPI 수준 (μ g/ml)의 분포를 나타낸다. 도 17a는 모두 592명의 평가 가능한 환자에 대한 기능성 β 2GPI의 분포를 나타내고; 도 17b는 동일한 환자들로부터의 β 2GPI의 박스 플롯 (Box Plot)을 도시하며, 도 17c는 바비투시마브 및 도세탁셀로 치료된 환자 (294명의 평가 가능한 환자)에 대한 β 2GPI 분포를 나타내고; 도 17d는 위약 및 도세탁셀로 치료된 환자(298명의 평가 가능한 환자)에 대한 기능성 β 2GPI의 분포를 나타낸다.

도 18a 및 도 18b는 III상 임상 시험으로부터의 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 생존 곡선을 나타내는데, 이때 200 μ g/ml 이상의 기능성 β 2GPI 수준을 갖는 NSCLC 환자가 바비투시마브로 치료된 경우, 생존률이 연장(mOS)되는 경향을 갖는다. 도 18a에서, 바비투시마브로 치료된 환자들 중에, 기능성 β 2GPI \geq 200 μ g/ml를 갖는 환자들은 ("Bavi: B2GPI \geq 200", 실선, 윗쪽 선), β 2GPI <200 μ g/ml를 갖는 환자 ("Bavi: B2GPI <200", 점선, 아래쪽 선)와는 반대로, 생존률이 연장되는 경향을 가졌다. 도 18b에서, 기능성 β 2GPI \geq 200 μ g/ml를 갖는 환자들 중에, 바비투시마브 및 위약으로 치료된 환자들 ("Bavi"; 청색, 위쪽 선)이 동일 β 2GPI 수준 (200 μ g/ml 이상)을 갖고 위약 및 도세탁셀로 치료된 환자 ("위약"; 녹색, 아래쪽 선)와는 반대로 생존률이 연장되는 경향을 보였다.

도 19에서, III 상 및 다른 임상 시험 환자의 β 2GPI에 대한 사전 임상 연구에서, 3G4 항체의 PS 결합, 기능성 및 항-종양 활성을 뒷받침하는 β 2GPI 수준을 비교하였다. III 상 임상 시험의 592명의 평가 가능한 환자에서의 사전-처리 기능성 β 2GPI 수준의 분포는, 도 17a에서 제시한 것과 동일하였다. 200 μ g/ml 이상의 기능성 β 2GPI 수준은 (어두운 오렌지색 및 밝은 오렌지색 막대 모두), III 기 임상 시험에서 바비투시마브로 치료된 NSCLC 환자 (및 또한 실시예 XVIII 및 실시예 XX에서와 같이 바비투시마브로 치료된 다른 NSCLC 및 췌장암 환자)의 생존률 연장의 경향을 제공하였다 (도 18a 및 도 18b). 200 μ g/ml 내지 290 μ g/ml 범위의 기능성 β 2GPI 수준 (어두운 오렌지색)은, III 상 임상 시험에서 바비투시마브로 치료된 NSCLC 환자에 대해 통계적으로 유의한 개선된 mOS

를 제공한다 (표 14a). 약 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상 (\rightarrow , 긴 녹색 화살표) 또는 약 $60\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상 ($>$, 짧은 화살표)의 기능성 β 2GPI 수준은, 전-임상 연구에서 바비투시마브의 PS-결합, 기능성 및 항-종양 활성에 충분하였다 (실시예 V).

도 20a, 도 20b 및 도 20c는, 실시예 XVIII, A에서 보고된 바와 같은, 실시예 XIII의 NSCLC를 치료하기 위한 바비투시마브 및 도세탁셀의 II 상 임상 시험의 환자에서의 사전처리 기능성 β 2GPI 농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 분포를 나타낸다. 도 20a는, 모든 119명의 평가가능한 환자를 위한 기능성 β 2GPI의 분포를 나타내었고; 도 20b는 3mg/kg 바비투시마브 및 도세탁셀로 치료된 환자 (40명의 평가 가능한 환자)에 대한 기능성 β 2GPI의 분포를 나타내고; 도 20c는 합쳐진 대조군 아암(arm) (위약 또는 1mg/kg 바비투시마브)의 환자 (79명의 평가가능한 환자)에 대한 기능성 β 2GPI의 분포를 나타내었다.

도 21a, 도 21b 및 도 21c는 실시예 XIII의 II 상 임상 시험으로부터의 카플란-마이어 생존 곡선을 도시하고 있는데, 이는 기능성 β 2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 갖는 NSCLC 환자가 바비투시마브로 치료된 경우, 생존률이 연장되는 경향을 갖는다는 것을 나타낸다. 도 21a에서, 바비투시마브 3 mg/kg로 치료된 환자들 중에, $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 기능성 β 2GPI 수준을 갖는 환자들("Bavi: B2GP1 ≥ 200 "; 청색, 위쪽 선)이 β 2GPI $< 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 갖는 환자들("Bavi: B2GP1 < 200 "; 노란색, 아래쪽 선)과는 반대로 생존률이 연장되는 경향을 가졌다. 도 21b에서, 기능성 β 2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 갖는 환자들 중에, 바비투시마브 3 mg/kg로 치료된 환자들 ("Bavi"; 청색, 위쪽 선)이 합쳐진 대조군 아암의 환자들 ("위약"; 녹색, 아래쪽 선)과는 반대로 생존률이 연장되는 경향을 가졌다. 도 21c에서, 합쳐진 대조군 아암의 환자들 중에, 기능성 β 2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 갖는 환자들 ("위약: B2GP1 ≥ 200 "; 청색 선)이 β 2GPI $< 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 갖는 환자들 ("위약: B2GP1 < 1200 "; 노란색 선)과 유사한 생존률을 가졌다.

도 22는 실시예 XVIII, B에서 보고된 바와 같이 실시예 XII의 폐장암을 치료하기 위한, 겐시타빈 및 바비투시마브의 II 상 임상 시험의 환자에 대한 사전-처리 기능성 β 2GPI 수준 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)을 나타낸다. 모든 31명의 평가 가능한 환자들에 대한 기능성 β 2GPI의 분포가 나타나있다.

도 23은 실시예 XII의 II 상 임상 시험으로부터의 카플란-마이어 생존 곡선을 도시하는데, 이는 겐시타빈 및 바비투시마브로 치료된 폐장암 환자는 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만의 기능성 β 2GPI 수준 (B2GP1 < 200 "; 노란색, 아래쪽 선)에서와 반대로, 기능성 β 2GPI가 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 수준으로 존재하는 경우 (B2GP1 ≥ 200 "; 청색, 위쪽 선) 생존률이 연장되는 경향을 갖는다는 것을 나타내었다.

도 24a, 도 24b 및 도 24c는 실시예 XVIII, C에서 보고된 바와 같이 NSCLC를 치료하기 위한 바비투시마브 및 파클리탁셀/카보플라틴의 II 상 임상 시험의 환자에서의 사전-처리 기능성 β 2GPI 수준 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 분포를 나타낸다. 도 24a는 모든 84명의 평가가능한 환자에 대한 기능성 β 2GPI의 분포를 나타내고; 도 24b는 바비투시마브 및 파클리탁셀/카보플라틴로 치료된 환자 (44명의 평가가능한 환자)에 대한 기능성 β 2GPI의 분포를 나타내고; 도 24c는 파클리탁셀/카보플라틴 대조군 아암의 환자 (40명의 평가가능한 환자)에서의 기능성 β 2GPI의 분포를 나타내었다.

도 25a, 도 25b 및 도 25c는 실시예 XVIII, C에 보고된 II 상 임상 시험으로부터의 카플란-마이어 생존 곡선을 도시하며, 이는 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 기능성 β 2GPI 수준을 갖는 NSCLC 환자가 바비투시마브로 치료되는 경우 생존률 연장의 경향을 갖는다는 것을 나타낸다. 도 25a에서, 바비투시마브로 치료된 환자들 중에, 기능성 β 2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 갖는 환자들 ("C/P+Bavi: B2GP1 ≥ 200 "; 청색, 위쪽 선)이 β 2GPI $< 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 갖는 환자들 ("C/P+Bavi: B2GP1 < 200 "; 노란색, 아래쪽 선)과는 반대로 생존률 연장의 경향을 가졌다. 도 25b에서, 기능성 β 2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 갖는 환자들 중에, 바비투시마브로 치료된 환자들 ("C/P+Bavi"; 청색, 위쪽 선)이 대조군 아암의 환자들 ("C/P"; 녹색, 아래쪽 선)과 반대로 생존률 연장의 경향을 가졌다. 도 25c에서, 대조군 아암의 환자들 중에, 기능성 β 2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 갖는 환자들 ("C/P: B2GP1 ≥ 200 "; 청색 선)이 β 2GPI $< 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 갖는 환자들 ("C/P: B2GP1 < 200 "; 노란색 선)에 비해 생존률이 감소하는 경향을 가졌다.

도 26는 바비투시마브 및 도세탁셀, 및 추후의 면역 치료 ("SACT-IO")로 치료된 환자들 (청색, 위쪽 선)이 도세탁셀 단독, 및 추후 면역 치료로 치료된 환자 (녹색, 아래쪽 선)들과는 반대로 통계적으로 유의한 개선된 mOS를 갖는다는 것을 나타내는, 카플란-마이어 생존 곡선을 도시한다. 치료 그룹, mOS 및 통계적 분석 후 이들 생존 곡선(실시예 XIX)을 표 16로 작성하였다.

도 27은 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 기능성 β 2GPI 수준을 갖는 NSCLC 환자는 바비투시마브, 및 추후의 면역 치료로 치료된 경우 ("SACT-IO") 통계적으로 유의한 개선된 mOS를 갖는다는 것을 나타내는, 카플란-마이어 생존 곡선을 도시하고 있다. 기능성 β 2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 갖는 환자들 중에, SACT-IO를 받은 환자들 ("SACT IO 포함", 실선)

및 SACT-IO를 받지 않은 환자들 ("SACT IO 불포함", 점선)을 포함하는, 바비투시마브로 치료된 환자들 ("Doc+Bavi", 청색 선)은 대조군 환자 ("Doc+위약", 녹색 선)와는 반대로 생존률이 연장되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 현재 시대에는 질환의 위험 및/또는 예측된 반응과 같은 요인에 기초하여 개별 환자에 대한 치료를 맞춤화하는데 점점 더 중점을 두고 있다. 이 개념은 일반적으로 "맞춤 의학"이라고 기술될 수 있다. 특정 요법의 효과에 기여하는 다양한 구성 요소에 대한 이해가 높아지면 환자를 계층화하여 연속적인 환자 집단에 대한 치료 결과를 향상시킬 수 있는 기반을 제공할 수 있다. 본 발명은 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체를 사용하여 면역요법을 최적화하기 위한 새로운 바이오마커를 제공함으로써 그러한 계통에서의 진보를 나타낸다.

[0053] **A. 치료 표적으로서의 포스파티딜세린**

[0054] 포스파티딜세린 (PS)은 상류 면역 체크포인트 (immune checkpoint)으로서 기능하고 숙주 면역 반응을 조절하는 고도의 면역 억제 분자이다. 따라서 PS는 암 및 바이러스 감염을 비롯한 다양한 질환에 관여한다. PS-표적 항체 형태의 면역요법 제제는 암을 포함한 질환에 대한 새로운 치료 옵션을 제공한다.

[0055] 보다 상세하게는, 정상 세포에서, PS는 원형질막의 내부 리플릿(leaflet)으로 분리되지만, 다양한 질환 상태, 특히 암 및 바이러스 감염에서 질환을 앓고 있는 비정상 세포에서는 원형질막의 바깥쪽 리플릿에 외부화된다. 암과 관련하여, PS 외부화를 유발하는 환경 스트레스 요인 중 일부는 저산소증/재산화, 산화 스트레스 및 특정 사이토카인에 대한 노출이다. PS 외부화는 또한 세포 사멸 및 면역 식세포 제거의 조건 하에서도 발생한다 (Birge 등, 2016). 결과적으로, PS는 선택적으로 PS가 면역 억제를 유도하고 유지하도록, 하나 이상의 가교 단백질들을 통해, 면역 세포에 대한 PS 수용체 (예: TIM 3 및 TIM 4, BAI1, 스타블린 2와 RAGE)에 의해 인식 및 결합된다. 종양 미세 환경에서, 종양 혈관 내피 세포, 종양 세포 및 종양-유래 엑소좀 표면에 PS가 노출되고 면역 억제 과정이 중복되며, 이에 따라 항-종양 및 염증 반응이 일어나는 것을 예방한다.

[0056] 노출된 PS는 죽어가는 세포의 인식 및 제거를 촉진하고, 면역억제성 사이토카인 (예: TGF-β 및 IL-10)의 방출을 유발하고, 전염증성 사이토카인 (예: TNF-α 및 IL-12)의 생성을 억제하는 식세포 신호이다. PS는 또한 대식 세포를 면역억제성 M2 표현형으로 분극시키고, 수지상 세포 (DC) 성숙 및 DC의 항원 제시 능력을 억제하면서, DC를 자극하여 T 세포 내성을 촉진시키는 면역억제 매개체를 분비하도록 한다. 요약하면, PS는 면역억제된 종양 미세 환경의 유도 및 유지에 핵심적인 요소이다.

[0057] **B. PS-표적 항체**

[0058] 종양 진행을 촉진하기 위해 종양의 미세 환경에서 PS가 노출되는 경향으로 인해, PS-표적 항체가 사용되어 면역 세포의 특정 수용체에 대한 PS의 결합을 차단하여 효과적인 암 치료를 제공할 수 있다 (Yin 외, 2013). 다수의 그러한 PS-표적 항체가 하기에 예시된 바와 같이 치료제로서 개발되었다. "PS-표적 항체"그룹은 항체가 PS에 직접 결합되거나 또는 PS와 단단히 결합 복합체를 형성하기 위해 혈청 단백질을 필요로 하는지와 무관하게, *시험관내에서* PS에 작동가능하게 결합하고, 구체적으로 생체내에서 질환 상태에 노출된 PS, 특히 종양 세포 및 종양 혈관의 PS에 국제화되어 결합된 모든 항체를 포함한다. 이러한 "직접적" 및 "간접적인" PS-표적 항체는 아래에서 보다 상세히 기술된다.

[0059] **B1. 바비투시마브**

[0060] PS-표적 항체의 전-임상 가능성을 평가하기 위해 생성된 초기 단클론 항체는 3G4라 불리는 항체, 마우스 IgG₃ mAb이다 (실시예 I; Ran 외, 2005; Huang 등, 2005). 3G4 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주의 샘플은 ATCC(American Type Culture Collection)에 기탁하여 ATCC 수탁 번호 PTA 4545를 받았다. 기탁된 하이브리도마의 유용성은 특허법에 따라 정부의 권한하에 부여된 권리에 위배되어, 발명을 실시할 수 있는 라이선스로 해석되어서는 안된다.

[0061] 바비투시마브는 쥐 가변 (항원 결합) 영역이 인간 항체 불변 영역 (실시예 III, C)에 작동가능하게 부착되는 3G4 마우스 항체의 인간 키메라 버전이다. 항체의 바비투시마브 그룹은, 수많은 미국 특허, 예를 들면, 미국 특허 제7,247,303호 및 미국 특허 제7,572,448호에 상세히 기술되어 있고, 바비투시마브는 ATCC PTA 4545로 기탁된 항체의 인간 키메라 형태를 제조함으로써 재-생성될 수 있다. 바비투시마브는 항체의 중요한 부분이 인간 유래이기 때문에, 환자에게 투여할 때 면역원성이 낮다.

[0062] 3G4 및 바비투시마브 항체는 음이온성 인지질, 특히 PS뿐만 아니라, 혈청 존재하에서 포스파티딜이노시톨 (PI),

포스파티드산 (PA), 포스파티딜글리세롤 (PG) 및 카디오리핀 (CL)에 강하게 결합한다 (Ran 외, 2005). 이러한 음이온성 인지질 중에서, PS는 생리학적으로나 병리학적으로 가장 적절하다. 3G4와 바비투시마브는 혈청의 존재와는 무관하게, 중성 인지질, 포스파티딜콜린 (PC), 스펅고미엘린 (SM) 또는 포스파티딜에탄올아민 (PE)에 대해서는 검출 가능한 결합을 나타내지 않는다.

[0063] 먼저, 3G4 및 바비투시마브 항체가 PS에 직접 결합되었다고 생각했으나, 그 후에 PS-결합은 β 2-당단백질 1 (β 2GPI)로서 식별된 혈청 단백질에 의해 매개되는 것으로 결정되었다 (실시예 IV; Luster 외, 2006). 실제로 3G4 및 바비투시마브는 β 2GPI의 존재 하에서 수행된 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays)에서 PS에 강력하게 결합하며, 이는 정제된 β 2GPI 뿐만 아니라 ELISA에 전형적으로 사용되는 10% 혈청에 존재함으로써 간단히 제공되는 β 2GPI를 포함한다.

[0064] 아포지질단백질 H라고도 알려진 β 2GPI는 I, II, III, IV 및 V (1, 2, 3, 4 및 5)의 5개의 도메인을 가지고 있으며, 도메인 구조는 포유류에서 보존되어 있다. β 2GPI는 3차 구조로서 5개의 분별 가능한 도메인으로 접히고, 폐쇄형, 원형 구조 또는 개방형, J-형 또는 후크 구조를 가질 수 있다. β 2GPI는 그의 C 말단 도메인인 도메인 V의 양전하 영역을 통해 음이온성 인지질, 특히 PS에 결합되는데, 이는 도메인 V가 (PS 결합을 파괴하는) Lys317/Thr318 절단 부위에서, 예를 들어 효소 플라스민에 의한 절단에 의해 "니키 형성(nicked)"되지 않아야 한다 (Hunt 외 1993; Hunt & Krilis, 1994). 3G4 및 바비투시마브 항체는 β 2GPI의 도메인 II에 결합한다. 이것은 치료용 항체로서 3G4 및 바비투시마브의 안전성을 강화하는데, 그 이유는 β 2GPI에 결합하는 특정 다른 항체는 병리학과 관련되지만, 이들 항체는 β 2GPI의 도메인 I에 결합하기 때문이다.

[0065] PS에 대한 3G4 및 바비투시마브 항체의 고친화성 결합은, β 2GPI과 항체의 2가 상호작용을 요한다 (실시예 IV; 도 8). 이러한 항체의 부재하에서는, β 2GPI는 단지 낮은 친화성으로 음이온성 인지질, 특히 PS에 결합한다. 이는 3G4 및 바비투시마브가 고친화성 복합체로서의 β 2GPI의 존재하에 PS에 결합됨을 보여주는 연구에서 정량화되었는데, 이때 1 μ M에서 1 nM로 PS에 대한 β 2GPI 결합을 조절한다.

[0066] PS에 대한 3G4 및 바비투시마브 항체의 β 2GPI-의존성 결합은 도 8에 도시되어 있다. 바비투시마브 계열의 항체는 β 2GPI의 도메인 II에 결합한다. 앞서 언급했듯이, 바비투시마브는 β 2GPI의 도메인 II에 결합하기 때문에, 항-인지질 증후군과 연관된 것과 같은 부작용과 관련이 없는데, 이때 β 2GPI의 도메인 I에 결합하는 항체도 존재한다 (de Laat 외, 2005; de Laat 외, 2006; Ioannou 외, 2007). 항체와 β 2GPI의 고친화성 2가 상호작용은 생성된 PS에 대한 고친화성 결합을 조율하는데, PS가 세포 표면과 세포막으로 외부화될 때를 포함한다.

[0067] 3G4 및 바비투시마브 항체는 β 2GPI에 결합하지만, 그들은 *생체내* 에서 질환 상태에 노출된 PS에 특이적으로 국재화되어 결합하기 때문에, "PS-표적 항체"라고 불린다. PS는 건강한 정상 세포에서는 내부에 유지되고 질환 상태의 세포 표면에만 노출되기 때문에, *생체내* 항체 국재화는 PS에 특이적이지만 PS가 마커인 질환, 특히 암, 뿐만 아니라 바이러스성 감염 및 특정 다른 병리학에 대해서도 특이적이다.

[0068] 도 8은 또한 *시험관내* 와 *생체내* 에서 동일하여, PS에 대한 β 2GPI-의존성 항체는 ELISA가 치료에 대한 정확한 모델이 된다는 것을 나타낸다. 특히, 플레이트가 PS로 코팅되고 ELISA가 혈청 존재하에 수행되는 ELISA에서, 3G4, 바비투시마브 및 유사 항체는 PS와 안정한 결합 복합체를 형성할 수 있다. 따라서, ELISA 분석은 중앙 미세 환경 또는 바이러스 감염 세포의 세포와 같이, PS가 질환 환경의 세포에서만 유일하게 노출되는 치료 중의 *생체내* 상황을 모방한다. ELISA와 마찬가지로, 3G4 및 바비투시마브 항체가 노출된 PS에 접하게 되면, 그들은 혈액에 존재하는 β 2GPI와 안정한 결합 복합체를 형성할 수 있다. PS가 ELISA에 존재하든 병든 세포에 존재하든지간에, 항체- β 2GPI 복합체는 단량체성 β 2GPI, 즉 PS-표적 항체없는 β 2GPI에서보다 PS에 대해 1,000 배 더 높은 친화성을 갖는다.

[0069] **B2. 직접 PS-결합 항체 (예: 11.31)**

[0070] 간접 PS-결합 또는 PS-표적 항체(예: 바비투시마브) 외에도, PS-표적 항체의 전체 그룹은 PS에 직접 결합하는 항체, 즉 직접 PS-결합 또는 PS-표적 항체를 포함한다. 이러한 "직접 PS-결합 항체"(또는 "직접 PS-표적 항체")는 PS에 대해 기능적으로 특이하고 *시험관내* 및 *생체내* 에서 (간접 결합 항체와 마찬가지로) PS를 표적으로 하고 이에 결합할뿐만 아니라, 심지어 *시험관내* 결합 분석에서도 PS와 단단한 결합 복합체를 형성하기 위해 β 2GPI와 같은 혈청 단백질이 필요하지 않은 항체이다.

[0071] 그러한 직접 PS-결합 항체의 한 특정 예는, 9D2라 불리는 마우스 단클론 항체이다 (Ran 외, 2002). 9D2 항체는 중앙 혈관으로 국재화되고 *생체내* 에서 항-중앙 효과를 발휘하는 것으로 나타났다 (Ran 외, 2002). 직접 PS-결합 항체의 다른 예는, 11.31 (PGN632)로 불리는 완전 인간 항체이다. 11.31 항체는 또한 *생체내* (예: MDA-MB-435

유방암 이중 이식편을 가진 마우스)에서 항-종양 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌고, 인상적인 항 바이러스 효과를 나타낸다 (Moody 외, 2010; 미국 특허 제7,455,833호).

[0072] 따라서, 직접 PS-결합 항체는 PS가 마커인 다양한 질환, 가장 특히 암 및 바이러스성 감염의 치료에 사용된다. 그러나, 이러한 직접 결합에 의한 치료를 최적화하기 위한 바이오마커, PS-표적 항체는 통상적으로 본 발명에서와 같이 β 2GPI 같은 혈청 단백질에 의존하는 것이 아니라 다른 요인에 의존할 것이다. 직접 결합 항체를 위해 유용한 바이오마커는, PS-표적 항체에 대한 면역 바이오마커를 포함한다.

[0073] **B3. 기타 β 2GPI-의존성 PS-표적 항체 (예: 1N11)**

[0074] 본 발명의 바람직한 구현에는 PS-표적 항체 계열의 다른 부분인 간접 PS-결합 항체에 관한 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, "간접 PS-결합 항체" 또는 "간접 PS-표적 항체"는 PS에 대해 기능적으로 특이하고, *시험관내*에서 PS에 작동가능하게 결합하며, *생체내*에서 PS를 표적으로 하여 결합하지만, PS와 단단한 결합 복합체를 형성하기 위해서는 혈청 단백질이 필요한 항체이다. 본 발명은 특히 간접 PS-결합 또는 PS-표적 항체, 즉 β 2GPI-의존성 PS-결합 또는 PS-표적 항체의 서브 세트에 관한 것이다. 본원에 사용된 " β 2GPI-의존성 PS-결합 항체" 또는 " β 2GPI-의존성 PS-표적 항체"는, 기능적으로 PS에 대해 특이적이고 *시험관내*에서 PS에 작동가능하게 결합하는 항체인데, 즉 혈청 함유 β 2GPI 또는 정제된 혈청의 존재하에 수행되는 분석에서 *시험관내*에서 PS에 결합하고, *생체내*에서 PS를 표적으로 하여 결합하지만, PS와 단단한 결합 복합체를 형성하기 위해서는 혈청 단백질, β 2GPI가 필요한 항체이다. 상기 제시된 그러한 항체의 예는, 마우스 항체, 3G4 및 키메라 항체, 바비투시마브를 포함한다.

[0075] β 2GPI-의존성 PS-표적 항체의 다른 현재 바람직한 예는, 1N11 (PGN635) 및 1G15로 명명되는 완전-인간 항체, 바람직하게는 1N11 항체이다. 1N11 항체를 사용하는 여러 연구 및 그 쥐의 키메라 버전은 이미징 및 치료를 포함하여 기재되어 있다 (Gong 외, 2013; Freimark 외, 2016; Gray 외, 2016a). 1N11 항체의 PS 결합 특성이 도 15에 제시되어 있다. 1N11은 파지 디스플레이에 의해 생성되고 혈청 존재 하에서만 (또는 β 2GPI 존재 하에서만) PS와의 결합에 대한 분석을 사용하여 선택되었다. 도 15에 제시된 바와 같이, 당업자는 추가의 PS-표적 항체 및 β 2GPI-의존성 PS-표적 항체를 제조하고 분리하기 위해 상기 연구를 일상적으로 수행할 수 있다.

[0076] **C. 광범위한 치료학적 경험**

[0077] 위에서 논의한 PS 생물학에서 예측한 대로, PS의 신호는 면역 세포가 종양을 인식하고 차단하는 능력을 억제한다. 바비투시마브 및 관련 항체는 PS와 그 수용체의 결합을 차단할뿐만 아니라, 대체 면역 활성화 신호를 전송함으로써 이 PS-매개 면역 억제 신호전달을 중단시킨다. 따라서 PS-표적 항체는 종양에서 면역 세포의 기능을 변화시켜, 면역 활성화 및 항-종양 면역 반응의 다수의 징후를 초래하였다.

[0078] 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체는 면역 활성화를 지원하기 위해 종양 미세 환경의 면역 세포를 다발성 리프로그래밍(reprogramming)함으로써 이러한 PS-매개 면역억제의 차단을 달성한다 (Yin 외, 2013). 바비투시마브 및 관련 항체는 이에 따라 종양 미세 환경에서 면역 내성을 파괴한다. 항체-매개 PS 봉쇄는 골수 유래의 억제 세포 수준 (MDSC), 형질전환 성장 인자-베타 (TGF β) 및 인터루킨-10 (IL-10)을 감소시키고, 인터페론 감마 (IFN γ), 종양 괴사 인자-알파 (TNF α) 및 인터루킨-12 (IL-12)와 같은 프로-염증성 사이토카인의 수준을 증가시킨다. 이러한 PS 봉쇄는 또한 MDSC 및 종양 관련 대식세포 (TAM)를 우세한 M2에서 우세한 M1 표현형으로 재분류시키고, 수지상 세포 (DC)의 성숙을 촉진시키고, 세포 독성 T 세포를 활성화시키며, 강력한 적응성 항-종양 T-세포 면역을 유도한다 (Yin 외, 2013).

[0079] 바비투시마브 및 관련 항체는 또한 선천성 면역 즉, NK 세포뿐만 아니라 M1 대식세포를 활성화한다. 중요한 것은 이들 항체가 PS를 특이적으로 노출시키는 기존의 종양 혈관을 선택적으로 섀다운(shut down)시키는데 (Ran 외, 2005; 미국 특허 제7,572,448호), 이 활성화는 M1 대식세포 및 NK 세포에 침투하는 종양에 의해 매개되는 항체-의존성 세포-매개 세포 독성 (ADCC)을 포함한다. 이런 방식으로 종양 혈관을 파괴하면 종양 세포가 파괴된다. 면역요법과 혈관 표적의 이들 이중 메커니즘, 특히 ADCC 작용은, 바비투시마브가 면역 활성화 또는 기존의 항-증식성 화학요법에 대해 저항성인 종양에 대해 효과적일 수 있음을 의미한다.

[0080] 다른 면역요법과 마찬가지로, PS-표적 항체의 항-종양 효과는 병용 요법으로 사용될 때 증가한다. 바비투시마브 및 관련 항체와 함께 사용하기 위한 일군의 제제는, 방사선 및/또는 화학요법과 같은 종양 미세 환경에서 PS의 노출을 증가시키는 제제 및/또는 조건이다 (미국 특허 제7,422,738호; 미국 특허 제8,486,391호; 미국 특허 제7,572,448호). 향상된 항-종양 효과는 유방 종양 (Huang 외, 2005)과 전립선암 (Yin 외, 2013)을 치료하기 위한 도세탁셀과; 췌장 종양을 치료하기 위해 겐시타빈 (Beck 외, 2006)과; 폐암 (He 외, 2007) 및 아교

모세포종 (He 외, 2009)을 치료하기 위해 방사선 조사와; 진행된 유방 종양에 대해 돌연변이 종양 억제 인자인 p53을 재활성화하는 PRIMA-1 (Liang 외, 2011)과; 아데노바이러스를 종양 혈관계로 재표적시키는 아데노 바이러스 벡터 (Hogg 외, 2011)와; 수술 후 폐암 재발을 치료하기 위해 시스플라틴 (Judy 외, 2012)과; 및 간세포성 암종을 치료하기 위해 소라페니브 (Cheng 외, 2016)와 병용하여 전-임상적으로 입증되었다.

[0081] 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체와 함께 사용하기 위한 또 다른 그룹의 제제는, 다른 IO 제제이다. PS가 상류 면역 체크포인트이기 때문에, 바비투시마브의 작용 메커니즘은 이용 가능한 치료제에 보완적이다. 따라서, CTLA-4, PD-1 및 PD-L1에 대한 항체의 형태로, 다른 체크포인트 억제제와 병용하는 항체의 바비투시마브 그룹에 대한 임상적인 병용 요법이 전-임상적으로 제시되었다 (Freemark 외, 2016; Gray 외, 2016a). 증가된 생존율을 포함하는 이러한 항-종양 활성은, 종양내 활성화된 CD8 T 세포에서의 증가, PD-L1 발현과 결합된 M2 대식 세포 및 MDSC의 감소, 및 PD-1 봉쇄 단독과 비교시 비장에서 증가된 종양 반응성 T 세포와 관련되어 있다.

[0082] 따라서, 이들과 같은 전-임상 결과는 PS-표적 항체의 바비투시마브 그룹이 PS-매개 면역 억제를 역전시키고 치료학적으로 효과적인 적응성 항-종양 면역을 개시한다는 것을 확인한다. 이에 따라, 하류 면역 체크포인트의 봉쇄와 조합된 바비투시마브에 의한 치료는, 반응 결과, 기간 및 수준을 유의하게 향상시키는 견고하고 오래 지속되는 항-종양 면역을 생성한다 (Freemark 외, 2016; Gray 외, 2016a).

[0083] 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체의 유리한 안전성 프로파일에 비추어 볼 때, 이들 항체는 또한 방사선, 화학 요법 ["화학방사선 요법(chemoradiation)"] 및/또는 면역요법과의 3가지 조합, 및 2가지 면역요법제와의 3가지 조합을 포함하는, 3가지 병용요법으로 효과적으로 조합될 수 있다. PS, PD-1 및 LAG-3을 표적으로 하는 항체를 사용하는 3가지 조합에 대한 임상적인 결과가 최근에 제시되었다 (Gray 외, 2016b).

[0084] 이러한 전-임상 데이터를 기반으로 하여, 바비투시마브는 800명 이상의 환자를 피험체으로 한 임상 연구에서, 주로 징후-승인된 치료제와 함께 평가되었다. 넓은 범위의 항 바이러스 및 항-종양 연구에서 치료 활성이 나타났다. 인체에서 광범위한 전-임상 시험 및 약물 동태 프로파일 (실시예 VI; 또한 Gerber 외, 2011; Digumarti 외, 2014 참조)에 근거하여, 정맥내 (IV) 투여된 3mg/kg 용량의 바비투시마브가, 폐암, 유방암, 간암, 췌장암, 대장암 및 신장암 환자를 포함하는 종양학의 대부분의 임상 연구에서 결정 및 선택되었다. HER2 음성 전이성 유방암 환자에서 파클리탁셀 (Chalasan 외, 2015); 진행된 비-소세포 폐암, NSCLC에서 파클리탁셀-카보플라틴 (Digumarti 외, 2014); 간세포 암종에서 소라페니브 (Cheng 외, 2016); 및 이전에 치료받은 진행성 비편평 NSCLC에서 도세탁셀 (Gerber 외, 2016)과, 바비투시마브의 병용 요법을 포함하는, 유망한 임상적 항-종양 결과가 오늘날 공개되었다.

[0085] 요약하면, I상 (Phase) 및 II상 임상 시험의 결과는 바비투시마브의 임상적으로 의미있는 치료 효과를 나타냈다. PS-표적 항체를 사용하여 다양한 질환의 성공적인 치료를 나타내는 중요한 작업 바디가 이제 존재함에도 불구하고, 지금까지, 이러한 치료를 위한 바이오마커는 알려지지 않았다. PS-표적 항체와 함께 임상적 경험은 대부분 바비투시마브 같은 β 2GPI-의존성 PS-표적 항체에 기초한다. 치료를 최적화하는 바이오마커가 가장 필요한 항체이다. 바비투시마브 치료를 위한 하나 또는 그 이상의 순환 바이오마커, 및 이와 함께 상기 바이오마커를 정량화하기 위한 민감하고 신속한 방법을 식별할 수 있다면, 이것은 개선된 치료 결과를 위한 환자 선택을 용이하게 하는 최소 침습 시험(들)을 제공하는 중요한 발전일 것이다.

[0086] **D. PS-표적 항체에 대한 바이오마커**

[0087] 암 치료제 분야에서, 바이오마커는 치료 반응에 영향을 미치는 특정 환자 특성을 확인하는데 점점 더 중요한 역할을 하고 있다. 이는 역사적으로 표적 암 치료법, 뿐만 아니라 최근에는 PD-1 및 PD-L1 억제제를 포함하는 체크포인트 억제제가 나타났다.

[0088] 바비투시마브 같은 PS-표적 항체 치료에 중요한 바이오마커가 분석되고 있다. 본원에 사용된 "바비투시마브 바이오마커(bavituximab biomarker)"는, 단독 또는 2종 이상, 또는 복수의 바이오마커중 하나로서, PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브를 치료의 적어도 일부로서 포함하는 요법에 의한 치료에서, 개선된 임상적 혜택을 받는 환자 또는 환자 집단을 선택하는데 사용하는 바이오마커이다. 따라서, β 2GPI를 포함하는 이러한 바비투시마브 바이오마커는, 치료에 앞서 (환자, 환자 집단 또는 하위 집단이 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브를 포함하는 병용 요법을 포함하는) PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브를 포함하는 치료로부터 이익을 얻는지 예측하는 방법에 사용될 수 있다.

[0089] 바비투시마브-함유 치료 요법으로부터 개선된 임상적 이익을 위해 가장 적절한 환자 집단을 확인하기 위한 다중-마커 시그니처(signature)도, 또한 고려 중이다. 이들 분석에서 확인된 제1 바이오마커는 β 2GPI (섹션 E; 섹

선 F)이다. 전반적으로, 확인된 바이오마커의 패턴은 임상 개발 및 치료를 안내하기 위한 바비투시마브 "시그니처"이다.

[0090] 바비투시마브 바이오마커의 일부로서, 바비투시마브 면역 바이오마커가 분석중이다. 이러한 데이터는 면역계를 "미리 준비시키는 (prime)", 즉 항-종양 면역 반응을 증폭시키기 위한 바비투시마브의 사용을 지원한다. 이와 관련하여, T 세포 및 다른 면역 세포가 얼마나 깊이 침범했는지에 따라, 종양이 "뜨거움(hot)" 내지 "차가움(cold)"의 수준으로 배치될 수 있음이 오늘날 알려져 있다. 면역 침투 ["열(heat)"] 수준은, 면역계가 종양을 인지하고 종양에 관여하는지 여부를 반영한다. 종양이 "뜨거운" 경우에는 환자의 예후가 좋고; "차가운" 종양의 경우 재발할 확률이 훨씬 더 높다. 중요한 것은 바비투시마브가 차가운 종양에 긍정적인 영향을 미침으로써, 다른 체크포인트 억제제의 사용을 포함하는 치료에 더 잘 적응할 수 있게 되는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 바비투시마브 면역 바이오마커는 바비투시마브 치료에 대한 환자의 선택, 뿐만 아니라, 바비투시마브 및 현명하게 선택된 제제의 병용요법을 위한 환자를 식별하는데 추가적인 용도를 갖는다.

[0091] **D1. 샘플**

[0092] β2GPI (섹션 E) 이외의 바이오마커의 경우, 하나 이상의 바이오마커를 함유하거나 함유할 것으로 의심되는 임의의 생물학적 샘플(대변을 포함하여, 동물, 피험체 또는 환자로부터의 임의의 조직 샘플 또는 생검을 포함)을 시험하는데 사용할 수 있다. 생물학적 조직 샘플로부터의 정제된 용해물이 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 바람직하게는 천연 체액과 함께 사용되어, "액체 생검 (liquid biopsies)"이라고도 하는 최소- 또는 비-침습적 기술을 사용하여 수득한 생물학적 샘플에서 수행할 수 있는 시험을 제공한다. 이것은 통상적으로 결과를 제공하는데 더 오래 걸리고 그 자체로 건강 위험을 제기할 수 있는, 생검과 같은 보다 엄격한 기술에 비해 유리하다.

[0093] 하나 이상의 바이오마커를 함유하거나 함유한다고 의심되는 생물학적 유체 (생체 유체)의 예로는, 혈액, 소변, 복수, 뇌 및 뇌척수액 (CSF), 객담, 침, 비강 분비물, 골수 흡인액, 관절 또는 활액, 수성 유모, 양수, 여포액, 장뇌, 모유 (초유 포함), 기관지 폐포 세척액, 정액, 정액 (전립선액 포함), 쿠퍼액 또는 사정액, 여성 사정, 땀, 눈물, 낭종 액, 흉막액 및 복수, 또는 세척액, 심장막액, 림프, 미즙, 유미, 담즙, 간 관류액, 간질액, 월경액, 고름, 피지, 구토물, 질 분비물, 점액 분비물, 대변 물, 대변 액, 체장액, 부비동에서 채취한 세정액, 기관지 폐 흡인 또는 기타 세척액을 포함한다. 생물학적 샘플에는 태아기 또는 모계의 기원일 수 있는 주머니배 공간, 제대혈 또는 모체 순환액이 포함될 수도 있다.

[0094] 검사를 위한 생물학적 유체의 바람직한 예는, 혈액, 소변 및 복수액, 특히 난소암이 있거나 의심되는 동물, 피험체 또는 환자로부터의 복수액이다. 소변 샘플이 사용되는 경우, 이는 바람직하게는 예를 들어, 난소, 전립선, 신장, 방광, 고환, 요도 및 음경암과 같은, 비뇨기, 비뇨 생식기 및 생식계 암과 관련하여 사용될 것이다. β2GPI와 같이, 하나 이상의 다른 바이오마커를 검출 및 정량하는 것은 말초혈액 샘플, 바람직하게는 혈장, 가장 바람직하게는 혈청으로부터 수행하는 것이 바람직하다.

[0095] **D2. PS-양성 엑소좀**

[0096] 엑소좀은 최근에 암과 관련하여 주목을 받았다. 엑소좀은 *생체내* 및 *시험관내*에서 모든 세포에 의해 지속적으로 방출되는 40-50nm 내지 100nm 크기의 막-유래 소포이다. 엑소좀은 세포 간 통신에서 중요한 역할을 하며, 많은 생리학적 및 병리학적 과정에 영향을 주는 생물학적 활성 분자 서틀이다. 암에서, 엑소좀 기능은 전이성 전파를 위해 소위 "전이성 틈새 (metastatic niche)"를 준비하는, 암세포와 종양 간질 사이의 종양 유전자 전달을 포함한다 (An 외, 2015).

[0097] 엑소좀 형성에 관여하는 다중 세포내 융합 현상으로 인해, 세포의 방출된 엑소좀의 루멘 내용물 및 프로테오믹 프로파일은 원래 세포의 내용과 동일하다. 따라서, 종양-유래된 엑소좀 ("종양 엑소좀")은 그들이 발생한 암 세포를 반영하는 프로파일을 갖는다. 실제로, 기원 세포 유래의 세포질 (특히 핵산) 및 원형질막 성분의 존재는, 순환하는 엑소좀이 바이오마커 분석을 위한 모세포의 성질을 반영하는 쉽게 접근할 수 있는 대용물이라는 것을 의미한다.

[0098] 정상 세포의 엑소좀과 달리 종양 엑소좀은 그들의 표면에 PS가 있는 것이 특징이다. 따라서, PS-양성 종양 엑소좀은 암의 진단에 사용될 수 있다. 고상 분석법을 사용하여 생물학적 유체 샘플에서 PS-양성 종양 엑소좀을 검출하고 정량함으로써 암을 진단하기 위한 새롭고 개선된 방법, 조성물 및 키트가 최근 보고되었다. 이러한 기술은 각각 2016년 6월 9일에 출원된 미국 특허 출원 제15/177,747호 및 PCT 특허 출원 제PCT/US16/036629호에 기술되어 있다.

[0099] PS가 매우 면역 억제적이기 때문에, PS-양성 종양 엑소좀의 방출은 이로 인해 종양이 면역 억제 환경을 조성하

는 또 다른 수단이 된다. 따라서, 전처리 PS-양성 종양 엑소좀 수준을 임의의 암 치료를 위한 치료법에 대한 반응 예측 마커로 사용하기 위한 제안이 있었다. 분명히, PS-표적 항체는 질환 미세 환경에서 PS에 결합할 필요가 있다. 따라서, 전처리 PS-양성 종양 엑소좀의 수준을 측정하는 것은, PS-표적 항체 (예: 바비투시마브)를 사용하는 치료법에 대한 반응의 예측 바이오마커로 사용하는데 특히 중요하다.

[0100] 따라서, 미국 일련 번호 제15/177,747호 및 PCT 출원 제PCT/US16/036629호에서와 같은 방법들이, 본 발명의 바이오마커 시험의 일부로서 사용될 수 있다. β 2GPI 및/또는 다른 바비투시마브 바이오마커의 본 정량화와 조합된 그들의 사용은, 특정 구현예에서, 예를 들어, 예측되는 전체적인 분석의 감도를 향상시키기 위해 바람직할 수 있다.

[0101] **E. 바이오마커로서의 β 2GPI**

[0102] 다르게 나타난 광범위한 데이터 (예: 실시예 V)에도 불구하고, 본 발명자들은 바비투시마브 및 관련 항체를 사용한 치료법에 대한 치료 결과를 예측하기 위해, β 2GPI의 전처리 수준이 바이오마커로서 또는 바이오마커 패널의 일부로 사용될 수 있는지를 조사하기로 결정했다.

[0103] β 2GPI는 리포단백질과 유리되거나 연결된 상태 둘 다로 발견되는, 풍부한 혈장 (혈청) 당단백질이다. 마우스, 쥐, 개, 소, 침팬지 및 인간을 포함하여 다양한 포유류 종으로부터의 β 2GPI의 DNA 및 아미노산 서열이 알려져 있다 (Steinkasserer 외, 1991). 예시적인 참고용으로, 인간 β 2GPI 아미노산 서열은 수탁 번호 1C1ZA로 제공된다. β 2GPI는 글리코실화되고, 일상적으로 50 kDa 단백질로 보고되고 있다 (실시예 IV, A4, B3; 또한 McNeil 외, 1990, 도 3; Balasubramanian 외, 1998, 도 1; Luster 외, 2006, 도 1d를 참조하라). β 2GPI가 수십 년 동안 연구되었지만, β 2GPI에 대한 정확한 생리학적 역할은 알려지지 않았다 (Prakasam & Thiagarajan, 2012). 사실, β 2GPI가 결핍된 녹아웃 마우스의 외관상 건강한 생활은 그 역할이 중요하지 않다는 것을 나타낸다 (Sheng 외, 2011).

[0104] 놀랍게도, β 2GPI, 특히 기능성 β 2GPI의 전-처리 혈중 농도는 PS-표적 항체 (예: 바비투시마브)를 사용하는 치료법에 대한 성공적인 반응을 예측하는 바이오마커로서 효과적인 것으로 판정하였다. 사실, PS 및 PS-표적 항체 (예: 바비투시마브)에 모두 결합하는 β 2GPI를 의미하는 "기능적" β 2GPI의 수준은 단독으로 바비투시마브에 대한 반응의 바이오마커로서 유용하다.

[0105] 전-처리 β 2GPI 수준이 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체에 대한 반응을 위한 바이오마커로서 단독 사용되는 본 발명의 구현예에서, 이들 β 2GPI 수준은 본원에서 정의된 바와 같이, "기능적" β 2GPI를 검출할 수 있는 에세이에서 수치적으로 정의되고 측정된다. 그러나, 전처리 β 2GPI 수준이 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체에 대한 반응을 위한 둘 이상 또는 복수의 바이오마커 중 하나로서 사용되는 본 발명의 구현예에서, β 2GPI 수준은 너무 엄격하게 수치적으로 정의될 필요는 없고, 기능적 β 2GPI에 대한 에세이에서 단독으로 측정될 필요도 없다.

[0106] 따라서, 바비투시마브-함유 치료를 위한 이중 또는 다중 마커 시그니처의 일부로서 β 2GPI 수준은, 예컨대 VeriStrat[®] 양호 (VS 양호) 및 VS 불량, 및 "뜨거운" 또는 "차가운" 종양과 같은 설명과 유사하게, " β 2GPI 높음" 대 " β 2GPI 낮음"일 수 있다. " β 2GPI 높음"인 환자가 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체에 의한 치료를 위해 선택되어야 한다. 이러한 맥락에서, " β 2GPI 높음"인 β 2GPI의 수준은, 총 β 2GPI 또는 바람직하게는 기능적 β 2GPI인 β 2GPI의 전처리 수준으로, 약 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 또는 260 μ g/ml와 동일하거나 그 이상이고, 바람직하게는 약 200 μ g/ml 이상이다. 따라서, " β 2GPI 높음"은 약 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310 또는 320 μ g/ml와 동일한, 총 β 2GPI 또는 바람직하게는 기능적 β 2GPI인 β 2GPI의 전처리 수준이다.

[0107] 본 발명은 또한 기능적 β 2GPI를 검출할 수 있는 분석법에서 측정된, 기능적 β 2GPI의 특정 수치적으로 정의된 양 및 범위의 측면에서 바이오마커를 제공한다. 가장 바람직한 구현예에서, 본 발명은 200 μ g/ml (실시예 XVII; 도 18a 및도 18b; 실시예 XVIII; 실시예 XX) 이상의 기능적 β 2GPI의 전처리 수준에 기초한, 환자의 선정과 치료에 관한 것이다. 이는 약 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310 또는 320 μ g/ml와 동일한 기능적 β 2GPI의 전처리 수준을 포함할 수 있다.

[0108] 실시예 XVII, 실시예 XVIII 및 실시예 XX의 데이터로 예시된 바와 같이, 바비투시마브는 β 2GPI 데이터가 이용 가능한 모든 임상 시험에서 200 μ g/ml 이상의 기능적 β 2GPI에 의해, 환자의 전반적인 생존율을 향상시켰다. 결과는 표 A에 요약되어 있으며, 여기서 치료 결핍은 인용된 제제와 병용된 열거된 바비투시마브 치료를 의미한다. 또한, 바비투시마브 및 후속 IO (실시예 XX)로 치료된 NSCLC 환자의 경우, mOS가 각 그룹에 대하여

아직 도달하지 않았기 때문에 $\beta 2GPI \geq 200$, 및 $\beta 2GPI < 200$ 그룹의 바비투시마브-치료 환자들간에 비교할 수 없음에도 불구하고, $200\mu g/ml$ 이상의 기능적 $\beta 2GPI$ 가 위약에 비해 바비투시마브에 대한 생존 이점을 제공하는 것으로 나타났다 (바비투시마브의 경우 mOS에 도달되지 않음 대 위약의 경우 12.3개월; $p = 0.002$; 도 27).

[0109] [표 A]

사전-처리 $\beta 2GPI \geq 200 \mu g/ml$ 는 바비투시마브 전체 생존율을 개선한다

치료	N	전체 생존율 중간값 (개월)		
		$\beta 2GPI \geq 200$	$\beta 2GPI < 200$	P-값
NSCLC 도세탁셀	294	11.4	9.8	0.054
NSCLC 도세탁셀	40	16.8	9.4	0.564
NSCLC 팍클리탁셀/카보플라틴	44	17.0	14.2	0.147
췌장암 겔시타빈	31	7.4	5.3	0.038

[0110]

[0111] 본 발명의 특정한 현재 바람직한 구현에는, 특히 NSCLC를 치료하기 위한, 200 내지 $290\mu g/ml$ (실시에 XVII; 표 14A 및 표 14B를 비교) 범위의 기능적 $\beta 2GPI$ 의 전처리 수준, 뿐만 아니라 $200\mu g/ml$ 이상의 $\beta 2GPI$ 의 적용가능한 넓은 수준을 기준으로 하는, 환자의 선정과 치료에 관한 것이다. 이는 또한 200-270, 200-280, 200-290, 200-300, 200-310, 200-320, 210-270, 210-280, 210-290, 210-300, 210-310 및 $210-320\mu g/ml$ 등의 범위인 기능적 $\beta 2GPI$ 의 전처리 수준을 포함하며, 210-270, 210-280, 210-290, 200-280 및 200-290의 범위가 현재 바람직하다.

[0112] 다른 구현예에서, 본 발명은 하한 약 190, 200, 210 또는 $220\mu g/ml$ 중 어느 하나, 내지 상한 약 260, 270, 280, 290, 300, 310 또는 $320\mu g/ml$ 중 어느 하나의 범위인 기능적 $\beta 2GPI$ 의 전처리 수준에 기초한, 환자의 선정과 치료에 관한 것이다. 이들 범위는 그 안에서 약 210-270, 210-280, 210-290, $200-280\mu g/ml$ 및 $200-290\mu g/ml$ 의 범위가 바람직한 하기의 모든 것들을 포함한다:

[0113] 약 190-260, 190-270, 190-280, 190-290, 190-300, 190-310 및 190-320;

[0114] 약 200-260, 200-270, 200-280, 200-290, 200-300, 200-310 및 200-320;

[0115] 약 210-260, 210-270, 210-280, 210-290, 210-300, 210-310 및 210-320; 및

[0116] 약 220-260, 220-270, 220-280, 220-290, 220-300, 220-310 및 220-320.

[0117] (상기 수치 또는 범위 중 어느 하나 이상이 임의의 특정 치료 또는 병용 치료를 위해 선택되는) $200\mu g/ml$ 이상의 기능적 $\beta 2GPI$ 의 전처리 수준에 기초한 환자의 가장 바람직하고 일반적으로 적용가능한 선정 및 치료에 더하여, 바이오마커로서 또는 바이오마커 패널의 일부로서의 전처리 수준의 $\beta 2GPI$, 바람직하게는 기능적 $\beta 2GPI$ 의 사용이, PS가 마커인 광범위한 질환, 가장 특히는 암 및 바이러스 감염, 뿐만 아니라 세포내 기생충 감염이 있는 환자의 선정, 및 이들의 임의의 PS-표적 항체, 예컨대 바비투시마브의 단독 또는 바람직하게는 임의의 병용 요법으로의 치료에 적용될 수 있다.

[0118] **F. $\beta 2GPI$ 에 대한 에세이**

[0119] 전처리 수준의 $\beta 2GPI$ 는 바비투시마브 및 관련 항체에 대한 바이오마커이고, $\beta 2GPI$ 에 대한 분석과 관련하여 다음 지침이 제공된다. 본 발명은 또한 기능적 $\beta 2GPI$ (섹션 G)를 정량화하기 위한 특정 바람직한 에세이를 제공한다.

[0120] **F1. $\beta 2GPI$ 샘플**

[0121] 혈청 단백질로서, $\beta 2GPI$ 는 하기 기술되는 말초 혈액 (혈장, 혈청) 샘플 내의 검출에 이상적이다. 그러나, PS가 관여하는 다양한 병리생리학적 조건 하에서, $\beta 2GPI$ 가 *생체내에서* 내피 세포에 국제화된다는 연구 결과가 있다 (Agostinis 외, 2011). 따라서, 생물학적 샘플의 전체 범위 (섹션 D1)는 잠재적으로 $\beta 2GPI$ 검출에 사용될 수

있다.

[0122] 그럼에도 불구하고, 말초 혈액, 혈장 및 혈청 샘플은 (총 β 2GPI 또는 기능적 β 2GPI든 간에) β 2GPI를 검출 및 정량화하는데 특히 바람직하다 (섹션 G). 전혈 (적혈구, 백혈구, 혈소판, 단백질 및 혈장)을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 적혈구 및 백색 세포의 침강 후에 잔류하는 액체인 혈장 (plasma)이 사용된다. 혈장은 피브리노겐 및 기타 응고 인자를 함유하여, 방치시 응고되는 경향이 있다. 응고 경향이 적은 혈장을 사용할 수 있으며 이는 선호되고; 혈소판없는 혈장이 또한 사용될 수 있다. 가장 바람직하게는, 혈청 (serum)이 β 2GPI의 검출 및 정량을 위해 사용된다. 혈청은 응고 인자, 주로 피브리노겐이 없는 혈장이므로, 혈청은 방치시 응고되지 않는다. 동물 및 인간의 혈청은 진단 목적으로 일상적으로 사용되며, 조제 기술은 널리 알려져 있다. β 2GPI 시험을 위한 혈청 샘플을 제조하는 예시적인 방법이 본원에 제시되어 있다 (실시에 XV, A).

[0123] 시험이 생물학적 샘플, 바람직하게는 혈액, 혈장 또는 혈청에서 직접 수행될 수 있다는 것이 본 발명의 이점이다. 감도로 인해, β 2GPI는 (배제되는 않지만) 사전 강화(enrichment) 또는 농축(concentration)없이 쉽게 검출될 수 있다. 시험 샘플, 바람직하게는 혈청 샘플은 신선하거나 미리 동결시킨 다음 해동시킬 수 있다. 실시에 XV, 실시에 XVI, 실시에 XVII 및 실시에 XVIII은 β 2GPI가 -70°C 에서 장기 보관에 안정하다는 것을 보여준다. 극저온 튜브 또는 바이알 및/또는 프로테아제 억제제를 사용하여 전체적으로 단백질 분해를 제한하는 것과 같이, 냉동, 저장 및/또는 해동에 대한 산업-표준 기술을 사용하는 것이 바람직하다.

[0124] **F2. β 2GPI 에세이의 범위**

[0125] β 2GPI가 "기능적" β 2GPI인지 여부에 관계없이 β 2GPI를 측정하기 위한 분석, 즉 "총" β 2GPI에 대한 분석의 범위는, 전처리 β 2GPI 수준이 바비투시마브를 위한 둘 이상의 바이오마커중 단 하나만으로 사용되는 본 발명의 구현예에 의한 사용에 적용 가능하다. β 2GPI의 수준이 바비투시마브의 바이오마커로서 단독으로 사용되는 경우, 섹션 G에 기술된 바와 같이 "기능적" β 2GPI 분석을 사용해야 한다.

[0126] 총 β 2GPI 수준은 검출될 수 있고, 바람직하게는 많은 시험관내 결합 분석 및 당업계에 공지된 키트 중 하나 이상을 사용하여 정량화될 수 있다. 적합한 결합 분석은 예를 들어 면역 블랏(immunoblot), 웨스턴 블랏(Western blot), 도트 블랏(dot blot), RIA, 면역 조직 화학, 형광 활성화 세포 분류 (FACS), 면역 침전, 친화성 크로마토그래피 등을 포함한다. 고체상 결합 분석이 통상적으로 바람직하지만, β 2GPI를 검출하는 다양한 다른 방법이 문헌에 기재되어 있으며, 이들 중 임의의 것을 사용할 수 있다. 예를 들어, β 2GPI 수준은 방사형 면역 확산에 의해 정확하게 결정될 수 있다. 실제로, 방사 면역 확산은 1960년대 후반에서 보다 현대적인 시간에 β 2GPI를 정량화하는데 사용되었다 (예: Balasubramanian 외, 1998). 웨스턴 블랏팅, 면역전기영동, 아우터로니 이중 면역확산(Ouchterlony double immunodiffusion) (Takeuchi 외, 2000)일수 있는, 등전점 전기영동(IEF)에 이은 면역블랏팅이 또한 β 2GPI를 정량화 (Kamboh 외, 1988)하기 위해 사용될 수 있다.

[0127] **F3. 고체상 β 2GPI 결합 분석**

[0128] β 2GPI에 대한 다수의 민감한 고체상 결합 분석은 당업계에 공지되어 있고, 총 β 2GPI는 바람직하게는 하나 이상의 그러한 분석법을 사용하여 검출되고 정량화될 것이다. 이러한 분석법의 바람직한 예는 효소 결합 면역흡착 분석 (ELISA)이다. 수정된 포획 ELISA (예: Mehdi 외, 1999) 및 경쟁 ELISA (예: Balasubramanian 외, 1998)를 포함하여, 총 β 2GPI에 특이적인 다양한 ELISA가 문헌에 보고되었다. 진단 라벨에 부착된 것을 포함하여, 상업적으로 이용 가능한 항- β 2GPI 항체인, 총 β 2GPI를 분석하기 위한 많은 상업 키트를 사용할 수 있다. 이러한 키트 또는 항체는 총 β 2GPI를 검출하고 정량화하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, US Biological 사로부터의 항- β 2GPI 항체가 본원에서 비교 분석에 사용된다 (실시에 XVI, A10, B2).

[0129] 일반적으로, 총 β 2GPI에 대한 ELISA는 하나 이상의 항- β 2GPI 항체를 사용한다. 항체 기술이 매우 진보했음에도 불구하고, 시판용 키트 및 시판용 항- β 2GPI 항체로는 종종 이러한 구현예에 사용하기에 완벽히 적합한 다클론 항- β 2GPI 항체를 사용한다. 총 β 2GPI에 대한 예시적 분석에서, 항- β 2GPI 항체는 96 웰 플라스틱 플레이트와 같은 고체 표면에 흡착시키고, β 2GPI를 함유하는 것으로 의심되는 생물학적 샘플 (이 경우, "항원")과 함께 배양한다. 결합된 β 2GPI (항원)는 검출 가능한 제제로 직접 또는 간접적으로 표지된 2차 결합제, 즉 검출 및 정량화될 수 있는, 색상 또는 형광과 같은 검출 가능한 신호를 생성하는 제제를 사용하여 검출한다. 바람직하게는, 2차 결합제는 검출 가능한 제제로 표지된 항- β 2GPI 항체이다.

[0130] 총 β 2GPI를 위한 이러한 ELISA는 실시에 XVI, A10, B2에서 예시되며, 고체 지지체 및 검출 가능한 제제와 같은 많은 일반적인 성분 및 단계는 본 발명의 기능적 β 2GPI 분석 (섹션 G)으로 하기에 보다 상세히 또한 기술된다. 따라서, 특정 시약 또는 단계가 기능적 β 2GPI 분석에서의 사용에만 적용된다는 것이 명백하지 않다면, 총 β

2GPI를 검출하기 위한 분석에서 이들의 적용이 본원에서 고려된다.

[0131] **G. 기능적 β2GPI에 대한 바람직한 ELISA**

[0132] 더 나은 결과를 예측하기 위한 바이오마커의 임상 시험 결과를 분석하기 위해 다양한 상업적 분석 및 연구 도구가 사용 가능하지만, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체에 유일하게 적용 가능한 것으로 알려진 것은 없다. 낮은 수준 및/또는 변화하는 수준의 혈청 β2GPI가 바비투시마브에 대한 치료 결과에 유의한 영향을 미치지 않는다는 것을 나타내는 광범위한 전-임상 모델링 및 유의한 이전의 임상 경험에도 불구하고 (실시예 V; 도 19), III 상 임상 시험 환자에서 β2GPI 농도의 분석 (실시예 XIV)이 요구되었다.

[0133] 그러나, 총 β2GPI와 달리, PS에 결합할 수 있는 β2GPI를 특이적으로 검출하기 위한 신뢰성있고 정량적인 β2GPI 분석법은 이용할 수 없었다. 특히 β2GPI의 일부 ("총" β2GPI)가 PS에 결합할 수 없으며, 따라서 질환 부위에 대한 항체 결합을 매개할 수 없는 닉이 있는(nicked) β2GPI로 존재한다는 것이 잘 알려져 있기 때문에, 그러한 분석은 바이오마커에 적용되는 가장 정확한 측정에 필요하다. 더욱이, PS뿐만 아니라 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체에도 결합할 수 있는 β2GPI를 특이적으로 검출하는 어떠한 분석도 현저히 부족했다. 이것은 예를 들어, 임의의 β2GPI의 변경이 항체 결합 및 치료 활성에 필요한 항체:β2PI:PS 복합체의 형성을 감소시키거나 무효화시키기 때문에, 다른 의미있는 변화, 특히 도메인 II에서 돌연변이 및/또는 닉 또는 절단이나 이에 충격을 가한 β2GPI가 검출되고 있었다는 가능성을 배제하기 위해 가장 높은 정확도의 바이오마커 측정을 위해 특히 중요하다.

[0134] 따라서 III 상 시험 (실시예 XIV)의 환자를 포함하여 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체로 치료 (또는 치료할) 되는 환자에서 β2GPI 농도의 최적 분석을 수행하기 위해서는, 먼저 새로운 분석법을 발명하는 것이 필요하다. 본 출원은 혈장 및 혈청과 같은 인간 혈액 샘플에서 기능적 (활성) β2GPI의 양을 검출 및 정량화하기 위한 목적으로 독특하게 적용되는 유리한 분석법을 개시하고 있고, 이 분석법은 PS와 PS-표적 항체 (예: 바비투시마브) 모두에 결합할 수 있는 β2GPI의 수준을 결정할 수 있다.

[0135] 본 발명이 바비투시마브 및 관련 PS-표적 항체에 의한 치료에 반응하기 위한 단일 바이오마커로서 사용하기 위한 전처리 β2GPI의 정의된 수준을 제공하는 것은 기능적 β2GPI에 대한 상기 분석의 사용에 의한 것이다. 특히 약 200μg/ml 이상의 기능적 β2GPI (실시예 XVII. 도면 18a 및 도 18b; 실시예 XVIII; 실시예 XX)는 200 ~ 290 μg/ml의 범위인 기능적 β2GPI로 예시된 바와 같이 (실시예 XVII; 표 14A 및 표 14B 비교), 바비투시마브에 의한 치료에 대한 반응을 광범위하게 예측한다. 본 발명에 의해 제공되는 기능적 β2GPI를 위한 바람직한 ELISA는 실시예 XVI의 상세한 교시에 의해 예시되며 하기에서보다 충분히 기술된다.

[0136] **G1. 분석 방법**

[0137] 일반적으로, 기능적 β2GPI를 위한 ELISA와 같은 고체상 분석은 PS 및 PS-표적 항체 (예: 바비투시마브)를 모두 사용하며, 이들 중 적어도 하나는 고체 지지체와 작동 가능하게 결합하고 /하거나 적어도 하나는 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 제제로 표지된다. 모든 결합 형식을 사용할 수 있다. 예를 들어, PS-표적 항체는 고체 지지체에 흡착될 수 있고, PS는 검출 가능한 제제로 표지될 수 있다. 검출 가능한 제제로 표지된 PS와 같은 많은 지질이 당 업계에 공지되어 있으며, 이들 중 임의의 것을 사용할 수 있다. 그러나, 단순화를 위해, 현재 바람직한 구현에는 PS가 96 웰 플라스틱 플레이트와 같은 고체 표면에 흡착된 것이다. 이는 바비투시마브 또는 1N1과 같은, PS-표적 항체가 바람직하게는 항체에 부착된 직접 표지인 검출 가능한 제제로 표지될 수 있음을 의미한다.

[0138] 이들 분석에서, ELISA 플레이트 (또는 그의 웰)와 같은 PS-코팅된 고체 지지체를 PS-표적 항체, 예컨대 바비투시마브 또는 1N1와 함께 배양하며, 생물학적 샘플은 β2GPI를 함유하는 것으로 의심되는 것이다. 개념적으로, PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브 및 β2GPI 샘플을 PS-코팅된 고체 지지체 또는 플레이트 상에서 "공동-배양(co-incubated)"시키는 것이 중요하다. 과학적으로, β2GPI는 (온전한) 도메인 V를 통해, 그 다음에 플레이트에 결합된 β2GPI의 도메인 II에 결합하는 바비투시마브를 통해 PS에 결합될 수 있거나; 또는 바비투시마브는 용액 중의 β2GPI의 도메인 II에 이어서, 플레이트상의 PS에 결합된 복합 바비투시마브/β2GPI (온전한 도메인 V를 가짐)에 결합될 수 있다. 두 가지 결합 현상은 배양 시간 동안 발생하므로, 공동-배양은 모든 상기 결합 메커니즘을 포함한다.

[0139] 따라서, PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브 및 PS-코팅된 지지체 상의 β2GPI 샘플을 "공동-인큐베이션 (co-incubating)"하는 것은 "유효 결합 조건"하에, 즉 PS-표적 항체 및 PS-코팅된 지지체 모두에 대해 샘플중 β2GPI의 결합을 허용하는 시간 및 조건하에 함께 인큐베이션시킴을 의미한다. "결합(Binding)"은 "특이적

결합", 즉 통상적인 세척에 의해 제거되지 않는 결합을 허용하는데 효과적인 시간 및 조건하에 있음을 의미한다. 바비톡시마브를 사용할 때, 효과적인 결합 조건은 이에 따라 β2GPI의 온전한 (닉이 없는) 도메인 V에 대한 PS의 결합 및 β2GPI의 도메인 II에 대한 바비톡시마브의 결합을 허용한다. 바비톡시마브 이외의 PS-표적 항체를 사용할 때, 유효 결합 조건은 β2GPI의 온전한 (닉이 없는) 도메인 V에 대한 PS의 결합 및 도메인 V 이외의 β2GPI의 도메인에서, 바람직하게는 도메인 I 및 II를 연결하는 힌지 영역에서 및 가장 바람직하게는 β2GPI의 도메인 II에서 β2GPI에 대한 PS-표적 항체의 결합을 허용한다.

- [0140] PS-표적 항체, 바람직하게는 바비톡시마브 및 β2GPI 샘플이 PS-코팅된 고체 지지체 또는 플레이트상에서 함께 인큐베이션되는 한, 본 발명의 분석은 다수의 상이한 포맷을 포함한다. 예를 들어, PS-표적 항체 및 β2GPI를 함유하는 것으로 의심되는 샘플은 실질적으로 동시에 PS-코팅된 지지체에 첨가될 수 있다. 바람직하게는, PS-표적 항체 및 β2GPI를 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 PS-코팅된 지지체에 순차적으로, 즉 시간 간격을 두고 첨가한다.
- [0141] 순차 분석 결합 단계를 수행함에 있어서, ELISA 웰과 같은 PS-코팅된 고체 지지체는 우선 β2GPI를 함유하는 것으로 의심되는 생물학적 샘플과 함께 배양시킨 다음, PS-표적 항체, 바람직하게는 바비톡시마브와 공동-배양시킬 수 있다. 상기 분석은 미리-제조된 PS-코팅된 지지체를 사용할 수 있으며, 이 경우 분석은 다음을 포함한다 (또는 다음 단계를 포함한다):
- [0142] (a) β2GPI의 온전한 도메인 V를 통해 PS-코팅된 지지체에 생물학적 샘플중 β2GPI의 결합을 허용함으로써 PS- 및 β2GPI-코팅된 지지체의 제조를 허용하기에 효과적인 조건하에 PS-코팅된 지지체에 β2GPI를 함유하는 것으로 의심되는 생물학적 샘플을 첨가하는 단계;
- [0143] (b) 도메인 V 이외의 β2GPI 도메인에 대한 항체 결합에 의해 PS- 및 β2GPI-코팅된 지지체에 PS-표적 항체의 결합을 허용하는, 바람직하게는 β2GPI 도메인 II에 대한 항체 결합에 의해 PS- 및 β2GPI-코팅된 지지체에 대한 바비톡시마브의 결합을 허용하기에 효과적인 조건하에서 PS- 및 β2GPI-코팅된 지지체에 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비톡시마브를 첨가하는 단계; 및
- [0144] (c) PS- 및 β2GPI-코팅된 지지체에 대한 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비톡시마브의 결합을 검출함으로써, 생물학적 샘플중 기능적 β2GPI를 측정하는 단계.
- [0145] 그러나, 순차 분석 결합 단계를 수행함에 있어서, PS-표적 항체, 바람직하게는 바비톡시마브 및 가장 바람직하게는 검출 가능하게-표지된 바비톡시마브를 먼저 PS-코팅된 고체 지지체에 적용시킨 다음, β2GPI를 함유하는 것으로 의심되는 생물학적 샘플과 공동-인큐베이션시키는 것이 바람직하다. 이러한 분석법 또는 일련의 단계는 기술상의 이유로, 예를 들어, 피펫팅 중 교차 오염을 피하기 위해 선호된다. 이러한 바람직한 분석법은 다음을 포함한다 (또는 다음 단계를 포함한다):
- [0146] (a) PS로 고체 지지체를 코팅하여, PS-코팅된 지지체를 제조하는 단계;
- [0147] (b) PS-표적 항체, 바람직하게는 바비톡시마브 및 가장 바람직하게는 검출 가능하게 표지된 바비톡시마브를 PS-코팅된 지지체에 첨가하여 항체-배워진 PS-코팅된 지지체를 제조하는 단계;
- [0148] (c) 본질적으로 세척없이, 항체-배워진 PS-코팅된 지지체에 대한 생물학적 샘플중 β2GPI의 결합을 허용하기에 효과적인 조건하에서, 즉 β2GPI의 온전한 도메인 V를 통해 PS-코팅된 지지체에 대한 β2GPI의 결합에 의해 및 도메인 V 이외의 β2GPI 도메인을 통해 PS-표적 항체에 대한 β2GPI의 결합에 의해, 바람직하게는 β2GPI 도메인 II를 통해 바비톡시마브에 대한 β2GPI의 결합에 의해 항체-배워진 PS-코팅된 지지체에 β2GPI를 함유하는 것으로 의심되는 생물학적 샘플을 첨가하는 단계; 및
- [0149] (d) PS-코팅된 지지체에 대한 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비톡시마브 (가장 바람직하게는 검출 가능하게-표지된 바비톡시마브), 및 β2GPI의 결합을 검출함으로써, 생물학적 샘플중 기능적 β2GPI를 측정하는 단계.
- [0150] 이 분석은 또한 미리 제조된 PS-코팅된 지지체를 이용할 수도 있는데, 이 경우에 분석은 다음을 포함한다 (또는 다음 단계를 포함한다):
- [0151] (a) PS-표적 항체, 바람직하게는 바비톡시마브 및 가장 바람직하게는 검출 가능하게 표지된 바비톡시마브를 PS-코팅된 지지체에 첨가하여, 항체-배워진 PS-코팅된 지지체를 제조하는 단계;
- [0152] (b) 본질적으로 세척없이, 항체-배워진 PS-코팅된 지지체에 대한 생물학적 샘플중 β2GPI의 결합을 허용하기에 효과적인 조건하에서, 즉 β2GPI의 온전한 도메인 V를 통해 PS-코팅된 지지체에 대한 β2GPI의 결합에 의해 및 도

메인 V 이외의 β 2GPI 도메인을 통해 PS-표적 항체에 대한 β 2GPI의 결합에 의해, 바람직하게는 β 2GPI 도메인 II를 통해 바비투시마브에 대한 β 2GPI의 결합에 의해 항체-배위된 PS-코팅된 지지체에 β 2GPI를 함유하는 것으로 의심되는 생물학적 샘플을 첨가하는 단계; 및

- [0153] (c) PS-코팅된 지지체에 대한 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브 (가장 바람직하게는 검출 가능하게-표지된 바비투시마브), 및 β 2GPI의 결합을 검출함으로써, 생물학적 샘플중 기능적 β 2GPI를 측정하는 단계.
- [0154] PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브 및 가장 바람직하게는 검출 가능하게 표지된 바비투시마브를 PS-코팅된 고체 지지체에 먼저 적용시킨 다음, β 2GPI를 함유하는 것으로 의심되는 생물학적 샘플과 공동-인큐베이션시키는, 순차 결합 단계를 갖는 바람직한 분석법은 간단히 다음을 포함한다 (또는 다음 단계를 포함한다):
- [0155] (a) PS로 고체 지지체를 코팅시켜 PS-코팅 지지체를 제조하는 단계;
- [0156] (b) PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브 및 가장 바람직하게는 검출 가능하게 표지된 바비투시마브, 및 β 2GPI를 함유하는 것으로 의심되는 생물학적 샘플을 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브, 및 PS-코팅된 지지체 모두에 대한 샘플중 β 2GPI의 결합을 허용하기에 효과적인 조건하에, PS-코팅된 지지체에 첨가하며; 바람직하게는 이때 PS-표적 항체는 β 2GPI를 함유하는 샘플을 첨가하기 전에 PS-코팅된 지지체에 첨가되고, 그들이 함께 공동-인큐베이션되는 단계; 및
- [0157] (c) PS-코팅된 지지체에 대한 PS-표적 항체 및 β 2GPI의 결합을 검출함으로써, 샘플중 기능적 β 2GPI를 측정하는 단계.
- [0158] 또한, 분석은 미리 제조된 PS-코팅된 지지체를 이용할 수도 있는데, 이 경우에 분석은 다음을 포함한다 (다음 단계를 포함한다):
- [0159] (a) PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브 및 가장 바람직하게는 검출 가능하게 표지된 바비투시마브, 및 β 2GPI를 함유하는 것으로 의심되는 생물학적 샘플을 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브, 및 PS-코팅된 지지체 모두에 대한 샘플중 β 2GPI의 결합을 허용하기에 효과적인 조건하에, PS-코팅된 지지체에 첨가하며; 바람직하게는 이때 PS-표적 항체는 β 2GPI를 함유하는 샘플을 첨가하기 전에 PS-코팅된 지지체에 첨가되고, 그들이 함께 공동-인큐베이션되는 단계; 및
- [0160] (b) PS-코팅된 지지체에 대한 PS-표적 항체 및 β 2GPI의 결합을 검출함으로써, 샘플중 기능적 β 2GPI를 측정하는 단계.
- [0161] 결합된 PS-표적 항체 및 β 2GPI (항원)는 검출 가능한 제제로 직접 또는 간접적으로 표지된, 적어도 1개의 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브 또는 1N11의 형태인 적어도 2차 결합제를 사용하여 검출한다. 표지되지 않은 PS-표적 항체는 3차 결합제, 바람직하게는 PS-표적 항체에 결합되고 검출 가능한 제제로 직접 표지된 다른 항체와 함께 사용될 수 있다. 이러한 3차 결합 항체는 당업계에 잘 공지되어 있고, 예를 들어, PS-표적 항체의 Fc 부분에 특이적으로 결합된다.
- [0162] 단순화를 위해, 현재 바람직한 구현에는 PS-표적 항체, 바람직하게는 바비투시마브 그 자체가 검출 가능한 제제에 직접 부착된 것이다. 검출 가능한 제제는 검출되고 측정되거나 정량화될 수 있는, 색 또는 형광과 같은 검출 가능한 신호를 생성하는 제제이다. 예시적인 검출 가능한 제제는 효소 고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)로, 상기 HRP는 기체 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB)을 절단하여 450nm에서 검출 및 측정되는 색상 신호를 생성한다. 전형적으로, 신호로부터 측정된 결합 물질의 양은 표준 곡선과 같은 "기준 신호(reference signal)"의 수준과 비교된다. 원하는 경우, 표준 곡선을 모든 분석에서 복제할 수 있다.
- [0163] 이들 분석법의 모든 형식에서, 궁극적으로 검출되는 유일한 β 2GPI는 PS와 PS-표적 항체에 결합할 수 있는 β 2GPI, 즉 일상적인 세척에 의해 전체적으로 제거되지 않는 β 2GPI이다. 따라서, 이들 분석법은 임상 치료와 가장 관련이 있는 형태로 전처리 β 2GPI, 즉 투여된 항체, 바람직하게는 바비투시마브 및 질환 부위, 바람직하게는 중앙 미세환경에 노출된 PS와 결합 복합체를 형성하도록 "기능하는" β 2GPI를 검출하는데 특히 적합하다. 따라서, 이들 분석법의 사용은 바비투시마브 요법에 대한 개선된 치료 결과를 위해 환자를 선별하는데 유리하다.
- [0164] 본 발명에 의해 제공되는 기능적 β 2GPI 분석법은 또한 최소 침습 기술, 특히 혈액 (혈청 및 혈장) 샘플에 의해 수득된 생물학적 샘플과 함께 사용하기에 간단하고, 재현성있고, 민감하며, 비용 효과적이고 이상적이다. 이 분석법의 빠른 특성은 바이오마커 검사를 신속하게 수행하고 시기적절하게 치료 결정을 내리고 구현할 수 있다는 중요한 이점을 제공한다. 그러나, 본 발명에 의해 제공되는 기능적 β 2GPI를 정량화하기 위한 새로운 분석법은 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체를 사용하는 치료법에서 바이오마커로서 사용하기 위한 β 2GPI 측정시에만 사

용되는 것으로 한정되지 않는다. β 2GPI는 기본적으로 유도된 전-임상 연구 및 임상 연구에서 중요한 분자이기 때문에, 이들 분석법은 임의의 하나 이상의 그러한 구현예에서 예를 들어, 녹아웃 마우스 또는 인간의 항인지질 증후군 (APS)과 관련하여 기능적 β 2GPI를 측정하는데 사용될 수 있다.

[0165] **G2. 고체 지지체**

[0166] 본 발명의 고체상 결합 검정은 전형적으로 고체 지지체 또는 기재 (코팅 또는 부착을 위한 적어도 1개의 표면을 가짐)과의 결합 작제물(binding construct)을 작동가능하게 결합시키는 것을 필요로 한다. 본원에서 사용되는 "결합 작제물"은 바이오마커의 검출에 유용한 성분에 결합하는 작제물을 포함한다. β 2GPI 바이오마커와 관련하여, 결합 작제물은 항- β 2GPI 항체, PS 및 PS-표적 항체, 예컨대 바비톡시마브를 포함한다.

[0167] 이러한 고체 지지체 또는 기재는 예를 들어, 플레이트, 비드 및 섬유를 포함한다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 고체 지지체 또는 기재는 표준 96- 웰 플레이트와 같은 다중 웰 플레이트이다. 고체 지지체 또는 기재는 세 파로스, 라텍스, 유리, 폴리스티렌, 폴리비닐, 니트로셀룰로오스, 실리콘, 실리카, 폴리디메틸실록산 (PDMS) 등과 같은 임의의 적합한 재료로 제조될 수 있다. 결합 작제물은 지지체 또는 기재의 적어도 1개의 표면을 결합 작제물과 효과적으로 접촉시킴으로써 고체 지지체 또는 기재와 작동가능하게 결합시킨다. 바람직하게는, 결합 작제물은 고체 지지체 또는 기재의 적어도 1개의 표면 상에 고정화된다. 결합 작제물은 또한 코팅된 유리 슬라이드에 프린팅되고, 바이오마커 어레이(array)나 마이크로어레이(microarray)에 사용될 수 있다. 비접촉식 및 접촉식 프린팅 모두 이러한 마이크로 어레이를 제조하는데 사용될 수 있으며, 접촉식 프린팅이 바람직하다.

[0168] **G3. 검출 가능한 제제**

[0169] 적합한 검출 가능한 제제는 예를 들어, 서양 고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스파타제 (AP), β -갈락토시다제 및 우레아제와 같은 효소를 포함한다. 서양 고추냉이-퍼옥시다제 검출 시스템은 예를 들어, 450nm에서 검출 가능한 과산화수소의 존재하에 가용성 생성물을 생성하는, 색원성 기재인 테트라메틸벤지딘 (TMB)과 함께 사용될 수 있다. 다른 편리한 효소-연계 시스템은 예를 들어, 405nm에서 쉽게 검출 가능한 가용성 생성물을 생성하기 위해 색원성 기재 *p*-니트로페닐 포스페이트와 함께 사용될 수 있는 알칼리성 포스파타제 검출 시스템을 포함한다. 유사하게, β -갈락토시다제 검출 시스템은 410nm에서 검출 가능한 가용성 생성물을 생성하기 위해 색원성 기재 0-니트로페닐- β -D-갈락토피라노시드 (ONPG)와 함께 사용될 수 있거나, 우레아제 검출 시스템은 우레아-브로모크레졸 퍼플과 같은 기재와 함께 사용될 수 있다.

[0170] 검출 가능한 제제의 추가의 예는 화학발광 라벨 및 형광 검출용 라벨을 포함한다. 유용한 형광 색소에는 DAPI (4',6- 디아미디노-2-페닐인돌), 플루오레세인, Hoechst 3325S, R-피코시아닌, B-피코에리트린, R-피코에리트린, 로다민, 텍사스 레드 및 리사민이 포함된다. 플루오레세인 또는 로다민 표지된 항체 또는 아넥신, 및/또는 플루오레세인 또는 로다민 표지된 2차 항체가 사용될 수 있다. 동위원소도 또한 검출 방법에 유용할 수 있으며, 이 모이어티(moieties) 및 분석은 당업계에 잘 공지되어 있다.

[0171] 검출 가능한 제제는 검출 가능한 신호를 생성한 다음, 검출되고 바람직하게는 정량화된다. 검출 가능한 신호는 예를 들어, 색원성 기재로부터 색을 검출하기 위해 분광광도계를; ¹²⁵I의 검출을 위한 감마 카운터와 같이, 방사선을 검출하기 위해 방사선 카운터(radiation counter)를; 또는 특정 파장의 빛 존재하에 형광을 검출하기 위해 형광계를 사용하여 분석할 수 있다. 효소 결합 분석법이 사용되는 경우, 검출 가능한 신호의 정량 분석은 분광광도계를 사용하여 수행될 수 있다.

[0172] **G4. 키트**

[0173] 본 발명은 또한 진단, 예후 및 예측 치료 키트를 포함하는, 일련의 바이오마커-기반 키트를 제공한다. 바이오마커 키트는 전형적으로 본원에서 교시된 바이오마커의 검출에 유용한 하나 이상의 결합 작제물을 포함할 것이다. β 2GPI 바이오마커와 관련된 키트는 일반적으로 제 1 β 2GPI 결합 작제물, 예컨대 항- β 2GPI 항체, PS 및 PS-표적 항체 (예: 바비톡시마브)를 포함할 것이다.

[0174] 다른 키트는 바이오마커 검출을 위한 결합 작제물 및 선택된 환자의 치료에 사용하기 위한 적어도 1개의 제 1 치료제, 예를 들어, PS-표적 항체 (예: 바비톡시마브 또는 IN11) 또는 이의 면역 접합체를 모두 포함할 것이다. 이러한 키트는 PS-표적 항체와의 병용 치료에 사용하기 위해 적어도 1개의 제2 또는 제3의 별개의 치료제를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 화학요법제, 방사선요법제, 항 혈관 신생제, 면역요법제 및/또는 항-바이러스 제제.

[0175] 일반적으로, 키트는 적어도 1개의 제 1의 적절한 용기 (또는 용기 수단)에 언급된 성분을 함유할 것이다. 용기

는 일반적으로 적어도 하나의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 다른 용기 또는 용기 수단을 포함하며, 여기에 원하는 제제가 배치되고, 바람직하게는 적절하게 분액된다. 또한, 키트는 전형적으로 개별 바이알을 함유하기 위한 수단, 또는 예를 들어, 주입 또는 취입-성형된 플라스틱 용기와 같은 전달을 위한 밀폐된 공간에 원하는 바이알 및 다른 장치가 배치되고 유지되는 수단을 포함할 것이다.

[0176] 키트의 성분은 수성 매질 또는 동결 건조된 형태로 함유될 수 있다. 시약 또는 성분이 건조 분말로서 제공되는 경우, 분말은 적합한 용매의 첨가에 의해 재구성될 수 있다. 용매는 키트 내의 다른 용기에 제공될 수도 있다. 임의의 치료 성분은 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 제형 내에 있거나, 그대로 재구성할 준비가 될 것이다. 키트는 또한 동물 또는 환자에게 치료제를 투여하기 위한 수단, 예를 들어, 하나 이상의 바늘 또는 주사기, 또는 점안제, 피펫 또는 이로부터 제형이 동물로 주입되거나 신체의 질환 부위로 적용되는 다른 유사 장치를 함유할 수 있다.

[0177] 키트는 바람직하게는 각각의 원하는 성분 또는 제제, 특히 바이오마커 검출 및 진단 성분에 대해 별개의 용기를 가질 것이다. 그러나, 병용 요법에서 사용하기 위해, 키트는 몰 당량 조합물 또는 다른 성분을 초과하는 하나의 성분으로; 미리 혼합된 둘 이상의 치료제를 함유하는 하나의 용기를 포함할 수 있다. 키트는 완전히 접합된 형태로 미리-표지된 항체, 또는 바람직하게는 첨부 설명서에 따라 키트 사용자에게 의해 접합되는 별도의 표지 모이 어터를 포함할 수 있다. 면역 검출을 위해, PS와 같은 하나 이상의 성분은 미리 미세역가 플레이트의 웰과 같은 고체 지지체에 결합될 수 있다.

[0178] 키트는 바람직하게는 병용 요법에서의 사용을 포함하여, 예를 들어, 정량화, 전-임상, 임상 및/또는 수의학 구현에서의 사용을 위한 서면 또는 전자 지침을 포함할 것이다. 바이오마커 기반이기 때문에, 키트는 바람직하게는 검출 분석을 위한 표준 곡선을 제조하는데 사용될 수 있는 바와 같이, 표지되거나 표지되지 않았든간에, 적절히 분류된 생물학적 조성물과 같은 대조용 제제를 추가로 포함할 것이다.

[0179] **G5. 칩(chip) 및 나노 분석 포맷**

[0180] 총 β 2GPI 및/또는 기능적 β 2GPI를 포함한, 고체상 및 ELISA 유형의 바이오마커 분석은 원할 경우 자동화 또는 로봇 식으로 수행할 수 있으며, 여러 샘플의 신호를 동시에 검출할 수 있다. 다양한 상기 분석 포맷이 본 발명과 관련은 없지만, 일반적으로 바이오마커를 검출하고 정량화하는데 사용되어 왔다. 예를 들어, 나노-플라즈몬 센서 및 "칩"이라고 하는 미세 유체 장치는 암 환자의 순환하는 바이오마커의 온-칩(on-chip) 분리, 정량화 및 특성 분석을 위해 기술되고 사용되어 왔다. 따라서, 본 발명의 특이성을 여전히 유지하면서, 이러한 미세 유체, 칩, 나노 기술 및 다른 유전형 및 자동화된 분석법을 사용하여 본 분석을 수행할 수 있다.

[0181] 예측 방법 및 바이오마커-유도 치료 방법에 더하여, 본 발명은 또한 컴퓨터-기반 하드웨어 및 시험을 제공한다. 본 발명의 이러한 컴퓨터-기반 구현예들은 총 β 2GPI 및/또는 기능적 β 2GPI 포함한, 하나 이상의 실험실 바이오마커 시험을 관독하기 위해 구성된 인터페이스 및 이러한 바이오마커 시험의 데이터를 분석하고, 분석된 데이터와 시험 데이터 세트 및 제어 데이터 세트를 포함하는 확립된 데이터 세트를 비교하기 위해 프로그램화된 컴퓨터를 포함한다. 본 발명의 컴퓨터-실행 구현예는 바람직하게는 메모리 저장, 출력 기능 및 출력에 기초한 치료법을 안내하도록 구성된 지침을 포함할 것이다.

[0182] **H. 질환 치료**

[0183] 본 발명은 동물 및 인간을 선별하고, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체로의 치료를 최적화하기 위한 바이오마커 방법, 조성물 및 키트를 제공하기 때문에, 인간 환자를 포함한, 동물, 피험체(subject) 및 환자에 관한 다음 지침은 바이오마커 검출 및 선택된 집단의 치료에 모두 적용된다.

[0184] **H1. 동물, 피험체 및 환자**

[0185] 본 발명은 가장 직접적으로 인간의 선택과 치료가 가장 바람직한 구현예가 되도록 인간 피험체 및 환자에 적용할 수 있다. 그럼에도 불구하고 생물 종 간 바이오마커의 공통성과 보전은 본 발명이 인간 이외의 동물에도 적용 가능하다는 것을 의미한다. 동물 내에서 포유 동물이 선호되지만, 가장 바람직하게는 실험용 동물이 또한 포함됨에도 불구하고, 애완동물, 경주마 및 인간의 소비를 위한 식품을 직접 생산 (예: 육류) 또는 간접적으로 생산 (예: 우유)하기 위해 사용되는 동물과 같은 소중한 가치있는 동물이다. 따라서, 본 발명은 임상, 수의학 및 연구 용도를 포함한다. 따라서 인간 이외에, 본 발명은 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 멧돼지, 양, 염소, 버팔로, 들소, 라마, 사슴, 엘크 및 다른 큰 동물뿐만 아니라, 송아지와 어린 양, 및 마우스, 래트, 토끼, 기니아피그, 원숭이와 같은 영장류 및 다른 실험 동물에 적용된다.

[0186] H2. 항체 투여량(Antibody Doses)

[0187] 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체의 "치료적으로 유효한(therapeutically effective)" 양 또는 투여량은 병용 요법의 일부로서 투여될 때를 포함하여, 그러한 치료를 필요로 하는 동물, 바람직하게는 인간 환자에게 투여될 때 유의한 치료 효과를 발휘하는 양 또는 투여량이다. 예를 들어, 치료학적으로 유효한 항암 투여량은 병용 암 치료의 일부로서 투여될 때를 포함하여, 암이 있는 동물, 바람직하게는 인간 환자에게 투여될 때 유의한 항암 효과를 발휘하는 양 또는 투여량이다. 치료학적으로 유효한 항바이러스 투여량은 병용 바이러스 치료의 일부로서 투여될 때를 포함하여, 바이러스 감염 또는 질환이 있는 동물, 바람직하게는 인간 환자에게 투여될 때 유의한 항바이러스 효과를 발휘하는 양 또는 투여량이다.

[0188] "유의한 항암 효과"는 치료까지 및 이를 포함하여, 종양 혈관 혈전증 및/또는 파괴, 종양 괴사, 종양 퇴행 및 종양 치료를 포함하는, 임의로 지속적으로 검출 가능한 항-종양 및 항암 효과를 포함한다. 유의한 항암 효과의 임상적 척도에는 예를 들어 완전 반응 (CR), 부분 반응 (PR) 및 CR+PR을 포함한 전반적인 반응속도 (ORR) 향상; 종양 진행까지의 시간 (TTP); 반응 지속기간 (DOR 또는 DR); 및 무진행 생존 기간 (PFS)의 개선 또는 확장, 무병 생존율 (DFS) 및 적용가능한 개별 환자, 환자 집단과 하위 집단에서 전체 생존 기간 중간값 (mOS)를 포함하여 전체 생존율 (OS)을 포함한다.

[0189] "유의한 항바이러스 효과"는 바이러스 감염, 복제, 성숙, 생식 및 퇴행 억제 및/또는 진행중인 추가 세포 (숙주 세포) 또는 조직으로의 감염 또는 확산의 억제를 포함하는, 임의로 지속적으로 검출 가능한 항바이러스 효과를 포함한다. 유의한 항바이러스 효과의 임상적 척도는, 예를 들면, 바이러스 감염에 의한 증상의 개선뿐만 아니라, 초기 바이러스 반응, 바이러스 부하의 감소 및 바이러스 제거율을 포함한다.

[0190] 유의한 치료 효과, 특히 항암 효과는 특히 중간 또는 장기간에 치료법이 될 수는 없지만 치료법의 유용성을 무효화하지는 않는다는 것을 이해할 것이다. 이와 관련하여, 일반적으로 "유의한" 치료학적 항암 및 항바이러스 효과는 또한 임의의 하나 이상의 안전성 척도의 향상과 함께, 비교 및/또는 적절한 치료 효과를 포함한다. "유의한" 치료학적 효과에 대한 또 다른 고려 사항은 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체가 질환 또는 종양이 추가로 치료학적 치료를 받기 쉽도록 함으로써, 후속 치료로 전반적인 개선 효과가 나타날 수 있도록 한다는 사실이다.

[0191] 바비투시마브 또는 1N11과 같은 PS-표적 항체의 치료학적으로 유효한 투여량은 동물 모델을 비롯한 광범위한 데이터를 사용하여, 특히 본원에 상세히 기술되고 문헌에 발표된 것과 같은 임상 연구에 기초하여 이제 용이하게 결정할 수 있다. 일반적으로, 정맥내 투여 (IV)되고 mg/kg 단위로 인용되는, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체의 유효 투여량 범위는 약 0.1 내지 약 13-15, 바람직하게는 약 0.1 내지 약 6-10; 바람직하게는 약 0.3 내지 약 6이고; 더욱 바람직하게는 약 0.5 내지 약 6; 더욱 바람직하게는 약 1 내지 약 6이고; 더욱 바람직하게는 약 1 내지 약 3일 것이다. IV로 투여되고mg/kg 단위로 인용된, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체의 예시적인 유효량은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 및 15; 바람직하게는 약 0.1, 0.3, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5 및 6; 더욱 바람직하게는 약 2 또는 3이고; 가장 바람직하게는 약 3mg/kg일 것이다.

[0192] 광범위한 안전성 데이터와 함께, 광범위한 임상 전 및 임상 데이터, 및 특히 인간의 약물 동태학적 프로파일 (실시예 VI)에 기초하여, 임상 치료를 위해, 특히 모든 종양학 징후에 대해, 정맥내 (IV)로 투여되는 3mg/kg 바비투시마브의 현재 바람직한 투여량이 권장된다. 그럼에도 불구하고, 0.3mg/kg의 임상적인 항바이러스 활성 (실시예 VI)을 포함하여 다양한 투여량이 유효한 것으로 나타났다. 또한, 바비투시마브는 10mg/kg, 최대 100mg/kg의 투여량으로 래트 및 원숭이에게 안전하게 투여되었다. 원숭이의 100mg/kg 용량 수준에서, 바비투시마브는 일시적으로 전신 순환에서 β2GPI를 감소시켰으므로, 그러한 초-고 투여량은 권장되지 않는다.

[0193] 따라서, 폭 넓은 데이터로부터, 바람직함에도 불구하고 3 mg/kg의 투여량이 본 발명을 제한하지 않는다는 것이 명백하다. 따라서, 본원에 제시된 파라미터 및 상세한 지침이 주어지면, 활성 또는 최적 투여량 범위 및 투여량의 추가 변화가 본 발명에 포함될 것이라는 것을 이해할 것이다. 따라서, 특정 제제와 병용하면 저용량이 더 적절할 수 있고, 특히 일반적으로 치명적인 질환을 치료할 때 고용량이 여전히 용인될 수 있음을 이해할 것이다.

[0194] 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체를 투여함에 있어서, 약제학적으로 허용되는 조성물 (무균, 발열성, 순도 및 일반적인 안전성의 FDA 표준에 따라)이 동물 또는 환자에게 전신 투여된다. 정맥 주사가 일반적으로 바람직하고, 수 시간의 기간 동안 연속 주입이 가장 바람직하다.

[0195] 투여량 자체를 변화시키는 것 이외에, 투여 요법은 또한 당업자에게 잘 공지된 바와 같이 치료 전략을 최적화하

기 위해 적용시킬 수 있다. 치료되는 피험체의 상태에 따라 용량 및 치료 요법의 일부 변형이 필요할 수 있다. 책임있는 의사 (들)는 본 개시 내용에 비추어, 개별 피험체에 대한 적절한 치료를 결정할 수 있을 것이다. 이러한 최적화 및 조정은 당해 기술 분야에서 일상적으로 수행되며, 과도한 양의 실험을 결코 반영하지 않는다.

[0196] **H3. β2GPI에 의한 보충 치료**

[0197] 단독으로 또는 다중 바이오마커 선택의 일부로서 및 총 β2GPI 또는 기능적 β2GPI가 측정되는지 여부에 관계없이, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체에 대한 반응을 위한 바이오마커로서 전처리 β2GPI 수준을 사용함에 있어서, 이 방법은 단지 치료할 환자의 하위 집합을 선택할 것이다.

[0198] 따라서, 본원의 또 다른 구현에는 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체와 함께 이들 환자에게 β2GPI를 공동 투여함으로써 임의의 비선택된 환자를 치료 적격성으로 회복시키는 것이다. 이러한 방식으로, 전체 집단은 PS-표적 항체로 치료 가능하게 된다. 예를 들어, 200μg/ml 이상의 기능적 β2GPI의 전처리 수준을 기반으로 치료할 환자를 선택함에 있어서, 150μg/ml의 기능적 β2GPI의 전처리 수준을 갖는 환자는 β2GPI 수준을 적어도 약 200μg/ml로 회복시키기에 충분한 기능적 β2GPI와 함께 바비투시마브를 공-투여함으로써 치료가능한 그룹으로 복원시킬 수 있었다. 샘플은 바이오마커 분석에서 β2GPI의 전처리 수준이 사용되는 어느 것이나 적용된다.

[0199] **I. PS가 마커인 질환 치료**

[0200] 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체가 특히 PS를 표적으로 하는 경우, 치료에 대한 최초의, 그리고 가장 중요한 지표는 암 (섹션 K), 특히 고체 종양 및 이들의 전이뿐만 아니라, 액체 종양, 예컨대 백혈병, 및 바람직하게는 호지킨 림프종이다.

[0201] 정상적이고 건강한 세포에서, PS는 세포막의 내부에 유지되고 결합에 접근할 수 없다. 질환에 속한 세포들만이, 가장 특히 종양의 미세 환경에 있는 세포 뿐만 아니라, 죽어가는 세포, 이상 세포, 부적절하게 활성화된 세포, 감염된 세포 및 병원성 유기체 자체도 세포막의 외부에 노출된 PS를 갖는다. 암에서, 종양의 미세 환경에서의 PS 노출은 "면역 억제적 (immunosuppressive)"이며, 이는 신체가 암과 적절하게 싸울 수 없음을 의미한다. PS를 차단함으로써, 바비투시마브는 PS-매개 면역 억제를 우회하여 신체가 종양을 공격하도록 돕는다.

[0202] 종양 미세 환경의 세포에서, 가장 특히는 종양의 혈관을 둘러싸고 있는 세포 (및 바이러스 감염된 세포와 바이러스)에서, PS는 상대적으로 안정한 마커이며, 이는 치료법을 위한 이상적인 표적임을 의미한다. 세포 사멸이 많이 존재하는 질환에 있어서, PS가 또한 세포의 외부에 노출되며, 이는 바비투시마브가 예를 들어, 암 및 심장 발작 (영상은 아래 참조)과 같은 상태를 포함하여, 증가 또는 부적절한 세포 사멸이 일어나는 다양한 질환들의 진단 및 특히 "이미지(imaging)"를 위해, 즉 생체내 진단에 사용될 수 있음을 의미한다.

[0203] 숙주 세포가 PS를 외부화시키는 원인이 되는 주요 병원균은 바이러스이다 (섹션 J). 실제로, 외피 바이러스 도입 및 감염의 증강 인자로서 PS 및 PS 수용체의 역할은 이제 잘 문서화되어 있으며, 광범위한 바이러스에 적용된다. 더욱이, PS와 바이러스 사이의 연결은 외피 바이러스에 국한되지 않고, 비-외피 바이러스까지 확장된다. 특히, 바이러스-감염된 세포로부터 방출된 "PS 지질 소포"는 엔테로바이러스의 효율적인 엔 블록(en bloc) 전송을 가능하게 하는 것으로 알려져 있다 (Chen 외, 2015).

[0204] 암 및 바이러스 감염 이외에도, 광범위한 질환 및 병원성 감염은 PS가 건강한 세포의 내부 위치에서 벗어나 세포외부에 노출되도록 하는데, 이는 PS-표적 항체 (예: 바비투시마브)를 그러한 세포 및 병원균으로 국제화시켜, 유익한 효과를 발휘함을 의미하는 것이다. 집합적으로, 이들은 "PS가 마커인 질환 및 장애"이다.

[0205] 암, 바이러스성 및 병원성 감염이 아닌, PS가 마커인 두드러진 질환 및 장애는 전구혈성 혈관 (응고되기 쉬운)을 갖는 질환 및 장애와 이상 혈관 신생을 포함하는 질환 및 장애를 포함한, 이상 혈관계 (혈관)가 관여하는 질환이다. 혈관 신생은 기존 혈관에서 새로운 혈관을 형성하는 과정이고; 새로운 혈관의 개발은 PS가 필요한 내피 세포 스프라우트의 형성으로 시작된다 (Weihua 외, 2005). 이상 혈관 신생은 많은 질환, 가장 두드러지게는 암에서 관여된다. 그들의 이상 혈관 구조에 비취 볼 때, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체는 양성 전립선 과형성 (BPH), 음향 신경종, 신경 섬유종, 트라코마, 화농성 육아종 및 유육종증 (sarcoïd)을 포함한 육아종, 수막종, 혈관 섬유종, 혈관종 및 혈관종의 전신 형태인 혈관 종양과 같은 양성 종양 (악성 종양과 반대로)을 치료할 수 있다.

[0206] PS-표적 항체 (예: 바비투시마브)로 치료될 수 있는 이상 혈관과 직접 연관된 상태는 직접 성형술에 따른 재협착, 정맥 폐쇄, 동맥 폐쇄 및 경동맥 폐쇄성 또는 폐색성 질환 등을 포함한, 혈관 재협착 (혈관 협착); 베체트 병(Behçet's disease) (또한 안구 질환), 결절성 다발성 동맥염 (panarteritis nodosa or PAN) 및 베게너 육

아중증 (WG) 또는 유육종증 (다발 혈관염이 있는 육아종증, GPA)을 포함한 혈관염 (염증에 의해 혈관을 파괴하는 장애); 동정맥 기형 (AVM) 및 동정맥류; 비 출혈 (코피); 혈관 유착; 과점도 증후군을 포함한다.

[0207] 그들의 이상 혈관계와의 연결로 인해, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체는 류마티스성 관절염 및 골관절염, 활막염, 혈우병 관절 및 파젯트 병을 포함한, 관절염과 같은 관절 질환; 건선, 피부염, 피부 경화증 (진신 경화증 또는 CREST 증후군), 탄력 섬유성 위황색증 (**Grönblad-Strandberg** 증후군으로 알려진 PXE), 주사, 스티븐스-존슨(Stevens-Johnson) 증후군 또는 질환 (PXE, 주사 및 스티븐스-존슨 증후군은 또한 안구 질환이다), 유천 포창, 비대성 반흔 및 케로이드 등의 피부 질환; 그레이브 병(Grave's disease); 자궁 내막증; 오슬러-웨버 (Osler-Weber) (또는 오슬러-웨버-랑디 (Osler-Weber-Rendu) 증후군 또는 질환 (유전성 출혈성 모세 혈관 확장증, HHT라고도 함)을 포함한 임상적으로 중요한 질환을 치료할 수 있다.

[0208] PS-표적 항체 (예: 바비투시마브)로 치료되는 이상 혈관계를 포함한 특히 중요한 질환의 예는 안 혈관 신생 질환이다. 이러한 질환은 망막, 맥락막 및/또는 각막과 같이, 눈의 구조에 새로운 혈관이 침범되는 것을 특징으로 한다. 그들은 실명의 가장 흔한 원인이며 약 20개의 안 질환에 관여한다. 가장 흔한 안과 신생 혈관 질환은 (증식성) 당뇨병 망막증, 연령 관련 황반변성 (AMD)을 포함한 황반변성, 미숙아 망막병증 (ROP 또는 테리 증후군, 이전에는 수포성 섬유형성증, RLF로 알려짐), 신생 혈관 녹내장, 각막 이식 신생 혈관증 및 각막 이식 거부이다. 맥락막 혈관 신생 (CNV)은 진행성 AMD 환자에서 심한 시력 상실의 경우 90%를 차지하고, 직접 및 간접 PS-표적 항체를 모두 포함한, PS-표적 항체로 효과적으로 치료되었다 (Li 외, 2015).

[0209] 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체로 치료할 수 있는 망막/맥락막 혈관 신생과 관련된 다른 질환은 매독, 마이코박테리아 및/또는 망막염 또는 맥락막염을 일으키는 기타 안구 감염; 유리체염 및 평면부염을 포함한 포도막염 (홍채섬모체염); 일스 병(Eales disease), POHS (추정 안 히스토플라즈마증 증후군, presumed ocular histoplasmosis syndrome), 베스트병(Best disease) (노른자형 황반 이영양증), 스타가르트병(Stargardt disease), 안 외상 및 레이저후 합병증을 포함한다.

[0210] 특히 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체로 치료될 수 있는 각막 혈관 신생과 관련된 추가 질환은 각막염 (단지 각막 염증)을 포함한, 결막염의 모든 형태, 및 결막염 (단지 결막 염증), 예컨대 아토피성 각막염, 상한 각막 각막염, 날개 익상 각막염 및 가장자리 각화증; 폴리덴각결막염; 무렌 궤양; 화학 화상, 박테리아 궤양, 진균 궤양, 헤르페스 감염 및 눈의 외상 및 콘택트 렌즈 오버웨어를 포함한다.

[0211] 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체로 치료할 수 있는 다른 안구 질환은 공막염, 홍채 혈관 신생 (홍채 신생 혈관 신생), 각 신생 혈관 신생 (NVA) 및 당뇨병과 관련이 있는지 여부에 관계없이 증식성 유리체 망막병증 (PVR)의 모든 형태를 포함하는, 섬유 혈관 또는 섬유 조직의 이상 증식으로 인한 질환을 포함한다.

[0212] 내피 세포 스프라우트의 형성에는 PS가 필요하므로 새로운 혈관의 개발에는 PS가 필요하다 (Weihua 외, 2005). 이 과정은 또한 특정 정상적인 생리학적 현상, 특히 상처 치유 및 생식에 관여하며, 배란 및 수정 후 배변 이식에 중요하다. 따라서, 바비투시마브를 사용한 이 공정의 예방은 무월경 (가임기 여성의 생리 기간의 부재)을 유도하고, 배란을 차단 및/또는 포배에 의한 주입을 방지하기 위해, 즉 피임과 같이 사용될 수 있다. 상처 치유에서, 과도한 회복 또는 섬유 형성은 외과 수술의 해로운 부작용이 될 수 있으며, 유착은 수술의 빈번한 합병증으로, 소장 폐쇄와 같은 문제를 일으킬 수 있다. 이들은 또한 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체에 의해 치료될 수 있다.

[0213] 만성 염증은 또한 이상하고 병리학적인 혈관계를 포함한다. 특히, 궤양성 대장염 및 크론 병과 같은 만성 염증성 질환 상태는 염증 조직으로의 새로운 혈관의 내성장과 함께 조직학적 변화를 나타낸다. 따라서 이러한 질환은 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체에 의해 치료될 수 있다.

[0214] 숙주 세포가 PS를 노출시키고/시키거나, PS-양성 세포의 미세 소포 및 엑소좀이 기재되어 있는 몇 가지 다른 질환 및 장애가 알려져 있다. 예를 들어, 겸형적혈구 병 (겸상적혈구 빈혈이라고도 함) 및 위기에서, 건강한 인간의 경우 단지 약 1%인 것과 달리, 적혈구의 30-40%는 일찍 노화되고, PS-양성 ("겸상 적혈구")이다. PS 양성 겸상적혈구는 혈액 순환을 유지하고, 내피를 준수하며, 그들의 노출된 PS는 응고 전파를 일으키는 응고 연쇄의 시작을 위한 플랫폼 역할을 한다 (Kennedy 외, 2015).

[0215] PS는 또한 죽상 동맥경화증에서 발견되며, PS-양성 세포의 미세 소포는 죽상 경화성 반점에서 방출된다 (Mallat 외, 1999). PS에 대해 양성인 혈관 내강 내에 형성된 플라크는 또한 혈관 신생 촉진 활성을 갖는 것으로 나타났다. 인간 관상 동맥 죽상 동맥경화증의 진행 및 폐쇄성 관상 동맥 질환의 재가화 과정에서 VEGF와 같은 혈관 신생 마커의 병리생리학적 중요성이 특별히 입증되고 있다. 따라서 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체는 죽상 동

맥경화증 및 폐쇄성 관상 동맥 질환에 효과적인 치료법을 제공한다.

- [0216] 제1형과 제2형 당뇨병 환자 모두 아넥신 V-양성으로 나타난 것처럼 PS-양성 세포의 미세 소포를 가지고 있다 (Sabatier 외, 2002). 알츠하이머 병에서, 뇌 엑소솜에는 PS 및 질환의 병원성 제제인, 아밀로이드 베타 펩타이드 (Aβ)가 포함되어 있다 (Yuyama 외, 2012). PS 및 PS-양성 세포의 미세 소포는 패혈증 (패혈증성 쇼크)에도 관여하며, 이때 그들은 패혈증 유발성 미세혈관 장애 및 면역 억제의 마커 및 중재자이다 (Souza 외, 2015).
- [0217] 신체의 인지질에 대해 항체가 생성되는 자가면역 질환인, 항인지질 증후군 (APS)과 전신성 홍반성 루푸스 (SLE 또는 루푸스)는 유산 및 혈소판 감소증 (저 혈소판 수)과 같은 응고 장애와 관련이 있다. 따라서, 이들 환자의 항인지질 항체는 혈전증을 일으키는 병원성 항체이다. 그러나 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체는 이러한 부작용 없이 PS를 표적으로 한다. 따라서, 바비투시마브는 또한 항인지질 증후군, 관련 질환 및 이의 합병증을 치료할 수 있다. 특히, 바비투시마브는 APS 환자에서 병원성 항체를 길항하거나 이와 경쟁할 수 있어, 병원성 항체를 인체의 인지질-단백질 표적에서 제거할 수 있다.
- [0218] 병원성 감염과 관련하여, 예를 들어 라슈마니아증(leishmaniasis)을 일으키는 기생충 원생동물, *라슈마니아 아마조네시스 (Leishmania amazonensis)* (Zandbergen 외, 2006; Wanderley 외, 2009; Wanderley 외, 2013); 말라리아를 일으키는 *플라스모디움 팔시파룸 (Plasmodium falciparum)* (Eda & Sherman, 2002; Pattanapanyasat 외, 2010); 및 트리파노소마증을 일으키는 기생충 원생동물인, *트리파노소마 크루지 (Trypanosoma cruzi)* (DaMatta 외, 2007)와 같은 세포내 기생충은 모두 PS 노출을 일으킨다. 마찬가지로, 톡소 플라즈마 발생을 유발하는 톡소플라즈마 곤디 (*Toxoplasma gondii*) (Seabra 외, 2004)와 같이, 주혈 흡충병을 유발하는 기생충 편형동물인, 주혈흡충도 또한 PS를 노출시킨다 (van der Kleij 외, 2002).
- [0219] PS 노출은 전염병과 야수증을 각각 일으키는 *후사병균 (Yersinia pestis)* 및 *야토균 (Francisella tularensis)*과 같은 세포내 박테리아 병원균에 의한 감염 후에 외부 세포 표면에 나타났다 (Lonsdale 외, 2011). 리스테리아증을 유발하는 *리스트ের리아 모노사이토젠 (Listeria monocytogenes)*도 또한 감염된 숙주 세포로부터 외엽 PS를 가진 막-유래 비히클의 방출을 촉진한다 (Czuczman 외, 2014). 유사하게, 수막염-유발 병원체인 *나이세리아 메닝기티디스 (Neisseria meningitidis)*에 감염된 내피 세포는 세포 표면으로의 PS 전좌를 나타낸다 (Schubert-Unkmeir 외, 2007). 대식세포에서 세포내 복제되고 결핵 (TB)을 일으키는 *미코박테리움 투베르쿨로시스 (Mycobacterium tuberculosis)*에 의한 감염은 결핵 병변에서 호중구의 PS 외부화와 관련이 있다 (Francis 외, 2014). 마찬가지로, 레지오넬라병을 유발하는 임의의 세포내 기생충인 *레지오넬라 뉴모필라 (Legionella pneumophila)*는 인간 단구에서 PS 외부화를 유도한다 (Hägele 외, 1998).
- [0220] 따라서, 상기에서 상세한 세포내 임의 기생충에 공통적인 PS 외부화는 장티푸스, 파라티푸스 및 식중독과 같은 브루셀라 및 병을 유발하는 부루셀라 (Brucella) 및 살모넬라 (Salmonella)와 같은 다른 병원체에서도 발생할 수 있다. 이는 또한 PS 외부화가 발병에 중요하고, 감염된 상피 세포, 내피 세포, 과립구 및 단핵구에 나타난 성적으로 전달되는 클라미디아 감염을 유발하는, *클라미디아 종 (Chlamydia spp.)*과 같은 세포내 절대 기생충에 의한 감염에 대해 입증되었다 (Goth & Stephens, 2001). 트라코마 (trachoma)를 유발할 수 있는 *클라미디아 트라코마티스 (Chlamydia trachomatis)*도 치료될 수 있다 (상기 참조).
- [0221] 사실, 숙주 세포에서의 PS 외부화는 이제 박테리아 및 병원균 범위의 감염에 대한 반응으로 일반적으로 인식되는 현상이다 (Wandler 외, 2010). 여기에는 위 상피 세포를 침범하여 (Petersen & Krogfelt, 2003), 위궤양을 유발하는, *헬리코박터 파일로리 (H. pylori)*가 추가로 포함된다. *헬리코박터 파일로리 (H. pylori)*가 위 상피 세포와 직접 접촉하면, 숙주 혈장막의 바깥 쪽 리플릿으로 PS의 외부화를 유도한다 (Murata-Kamiya 외, 2010). PS는 매독을 유발하는 트레포네마 팔리둠 (*Treponema pallidum*)에도 존재한다. 남미에서 발견되는 박테리아 감염인, 바르토넬라증은 바비투시마브로 치료할 수 있는데, 이는 특히 바르토넬라증이 혈관 내피 세포의 증식을 특징으로 하는 만성 단계를 초래하고, 암 치료에 명확하게 나타난 바와 같이 바비투시마브의 작용 메커니즘 중 하나가 혈관 내피 세포를 파괴하는 것이기 때문이다.
- [0222] *체내* 진단과 관련하여, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체는 전술한 질환, 장애 및 감염 중 임의의 것을 이미징 하는데, 가장 바람직하게는 혈관화된 종양을 이미징하는데 사용될 수 있다 (Jennewein 외, 2008; Marconescu & Thorpe, 2008; Saha 외, 2010; Stafford & Thorpe, 2011; Gong 외, 2013; Stafford 외, 2013; 미국 특허 제 7,790,860호). 바비투시마브는 또한 심부정맥 혈전증, 폐색전증, 심근 경색, 심방 세동, 인공 심혈관계 물질에 의한 문제, 뇌졸중 (뇌혈관 사고 (CVA) 또는 뇌혈관 손상 CVI)) 등과 같은, 특히 심장 내 또는 근처에서 혈관 혈전증을 이미징하는데 사용될 수 있다. 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체는 또한 예를 들어, 농양, 재협착,

관절의 염증과 같은 병태에서 및 동맥, 관상 동맥, 정맥 및 대뇌 혈전증 등과 같은 지혈 장애에서 활성화된 혈소판을 이미징하는데 사용될 수 있다.

[0223] 따라서, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체는 PS가 입증된 마커인 상기 모든 질환 및 장애를 치료 및/또는 진단하는데 적합하다.

[0224] **J. 바이러스성 감염의 치료**

[0225] 숙주 세포가 PS를 외부화하게 만드는 두드러진 병원체는 바이러스이다. PS의 존재는 바이러스 및 바이러스에 감염된 세포의 표면에서 입증되었고 및/또는 아레나비리다에 (*Arenaviridae*), 부니아비리다에 (*Bunyaviridae*), 플라비리다에 (*Flaviviridae*), 필로비리다에 (*Filoviridae*), 헤르페스비리다에 (*Herpesviridae*), 오르토믹소비리다에 (*Orthomyxoviridae*), 파라믹소비리다에 (*Paramyxoviridae*), 포스비리다에 (*Poxviridae*), 레트로비리다에 (*Retroviridae*) 및 라브도비리다에 (*Rhabdoviridae*)를 포함한 광범위한 바이러스 그룹의 감염에 중요하다고 나타났다 (또한 참조: 각각 2015년 2월 27일자로 출원된, 미국 특허 출원 제14/634,607호 및 PCT 특허 출원 제 PCT/US15/18183호의 표 2A 및 표 2B). 또한, 데이터는 바이러스 및 바이러스로 감염된 세포에 그러한 PS 노출이 단지 우발적인 것이 아니고, 바이러스성 감염에 중요한 것임을 입증하기 위해 제시되었다 (또한 참조: 미국 특허 출원 제14/634,607호의 표 2C 및 표 2D; 미국 특허 제7,906,115호; WO 2015/131153 A1). 이것은 시험관 내 및 생체내 에서 다양한 바이러스 그룹으로부터의 감염을 억제하기 위한 PS-표적 항체의 사용에 의해 제시되고 있다.

[0226] PS 및 바이러스성 감염 사이의 연관성이 또한 이제 문헌에 잘 입증되어 있다 (예: 미국 특허 제7,906,115호; Soares 외, 2008; Mercer and Helenius, 2008; Moody 외, 2010; Morizono 외, 2011; Meertens 외, 2012; Best, 2013; Bhattacharyya 외, 2013; Jemielity 외, 2013; Moller-Tank & Maury, 2014; Birge 외, 2016). 이는 내피 바이러스 도입 및 감염의 증진 인자로서의 PS 및 PS 수용체의 역할을 포함한다 (참조예: Moller-Tank & Maury, 2014의 표 1). PS, 바이러스성 감염 및 세포외 미세 소포 (예: 엑소솜) 사이의 관계도 또한 최근에 점차 명확해지고 있고 (Meckes & Raab-Traub, 2011; Sims 외, 2014), 광범위한 바이러스에 또한 적용된다 (예: Walker 외, 2009; Meckes 외, 2010; Izquierdo-Useros 외, 2010; Meckes & Raab-Traub, 2011).

[0227] 더욱이, PS와 바이러스 간의 연관성은 외피 바이러스에 국한되지 않고 외피가 없는 바이러스까지 확장된다 (Clayson 외, 1989; Chen 외, 2015). 특히 Chen 외, 2015의 세포 문서 커버 페이지의 도면을 참조하는데, 이는 "PS 지질 소포"를 (본질적으로 엑소솜) 나타내고, PS 소체가 엔테로바이러스의 효율적인 엔 블록 전송 을 가능하게 하는 것을 보여주는 데이터를 수반한다. 특정 메커니즘에 구애받지는 않지만, 하기의 근본 이유는 PS가 외피 바이러스와 비-외피 바이러스 모두의 감염에 관련되어 있다고 설명한다.

[0228] 모든 바이러스는 새로운 숙주 세포의 성공적인 감염을 보장하기 위해 숙주 세포로부터 성숙한 바이러스의 시간 초과 출구를 조율한다. 외피 바이러스는 숙주 세포 원형질막을 이용하여 다음 숙주 세포에 자손 비리온의 효율적인 진입을 매개하는 바이러스 단백질질을 삽입한다. PS는 바이러스가 방출되기 전에 바이러스에 감염된 세포의 외면에서 발견되며, 외피 바이러스는 숙주 세포가 존재하는 경우 바이러스 외피로 PS를 도입한다.

[0229] 성숙한 비리온에 외피를 포함시키지 않는 바이러스는 다른 메커니즘으로 숙주 세포를 떠나게 된다. 세포로부터 새로운 비리온을 방출하는 비-외피 바이러스 사용의 일부 방법은 감염된 세포 (T 세포 또는 대식세포)에 대한 숙주 면역 반응에 의해, 또는 숙주 세포 단백질 합성 또는 세포 구조에 대한 직접적으로 바이러스의 활성으로 인해 직접적으로 야기될 수 있는 세포의 용해를 포함한다. 세포 용해를 유도하기 위해 세포 구조를 변화시키는 바이러스의 한 예는 아데노바이러스이다. 아데노바이러스는 필라멘트 네트워크와 단백질 합성을 방해함으로써 세포의 구조적 완전성을 변화시키는 감염 중에 후기에 여러 단백질을 발현한다. 일부 비외피 바이러스는 세포병변 효과없이 비과괴적인 메커니즘을 통해 자손 바이러스를 방출할 수 있다. 폴리오바이러스는 세포 용해를 빠르게 유도하면서 (약 8시간), 새로운 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 PS 지질 소포의 세포에서도 방출된다. PS-소포의 폴리오바이러스 입자는 PS-소포에서 제거된 바이러스 입자보다 HeLa 세포와 1차 대식세포를 감염시키는데 및, 용량 의존적 방식으로 감염된 세포로부터의 소포를 억제하는 아넥신 V로 소포를 차단하는데 보다 효율적인데, 이는 PS 지질이 폴리오바이러스 감염에 대한 보조인자임을 제시하는 것이다. 폴리오바이러스 이외에, 콕사키바이러스 B3 및 리노바이러스 입자도 또한 PS 지질 소포 (Chen 외, 2015)로 방출되어, 세포의 용해없이 성숙 입자를 선택적으로 방출하기 위해 엔테로바이러스가 사용되는 일반적인 메커니즘을 나타낸다.

[0230] SV40과 관련하여, SV40이 상기 유형의 PS-지질 소포의 세포로부터 또한 방출될 가능성이 있다. 예를 들어, SV40 입자는 세포 변성 효과를 유도하기 전에 세포에서 방출되는 것으로 밝혀졌다 (Clayson 외, 1989). 또한 SV40 비

리온은 감염 후 48 시간에 세포질 평활 소포에서 관찰되었으며, SV40 입자의 방출은 지질막을 가로 지르는 양이 온 수송을 차단하여 세포내 단백질 전달을 차단하는 나트륨 이온노포어인, 모넨신에 의해 억제되었다.

[0231] 또한 많은 바이러스가 효율적으로 복제되는 환경을 만들기 위해 숙주 세포의 활성화를 유도해야 한다. 바이러스 또는 비-바이러스 활성화 제제에 의한 세포 활성화는 PS 전좌를 활성화시키는 세포내 칼슘 (Ca²⁺)의 증가를 유도한다. 따라서 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체의 잠재적 메카니즘은 세포 활성화에 필요한 단백질에 의한 방해 또는 바이러스 탈출을 매개하는 그들의 능력을 포함하여, 면역 제거 메카니즘에 의해 PS-매개 면역 억제 및 감염된 세포 또는 바이러스의 제거를 역전시킨다.

[0232] 생체내 바이러스 모델은 PS-표적 항체로 치료된 바이러스 감염 동물의 생존을 증가를 나타내고 있다. PS-표적 항체 (예: 바비투시마브)가 이러한 항바이러스 특성을 발휘하는 것으로 나타난 잠재적 메카니즘은 다음을 포함한다 : 1) 바이러스 입자에 결합; 2) 감염된 세포에 결합; 3) 바이러스 복제의 억제; 및 4) PS에 결합하는 면역 억제 세포 수용체를 차단함으로써 면역 반응의 증진. HIV-1 모델에서의 데이터는 바이러스 감염된 대식세포에 의해 생성된 비리온이 대식세포의 HIV-1 감염을 위한 보조 인자로서 작용하는 PS 수준을 상승시킨다는 것을 입증한다. PS-표적 항체로 HIV-1에서 PS를 차단하면 세포-세포 상호작용을 방지하고, 바이러스-표적 세포 융합을 차단할 수 있다. 결과는 또한 바비투시마브가 피친데 바이러스 입자에 결합하고 피친데 바이러스에 감염된 기니아 피그의 치료가 항피친데 항체와 세포 반응 모두의 발달을 향상시킨다는 것을 나타낸다.

[0233] 전체적으로, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체를 사용하는, 외피 및 비외피 바이러스를 포함하는 모든 바이러스 감염의 치료는 이러한 치료에 관한 본 개시 내용을 보충하는 미국 특허 제7,611,704호 및 미국 특허 제 7,906,115호에 교시되어있다. 특히, 이들 특허의 표 H, 표 J 및 표 G는 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체와 병용 요법으로 사용될 수 있는 통상적인 항바이러스 약물과 함께 (표 G), 동물 및 인간에서의 바이러스 감염 및 관련 질환의 치료 (표 H, 표 J)를 예시하고 있다.

[0234] **K. 암 치료**

[0235] 본 출원의 광범위한 섹션은 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체를 사용하는 종양 및 암 치료에 관한 것이다. 음향 신경종, 신경 섬유종, 트라코마, 화농성 육아종 및 BPH와 같은 양성 종양의 치료가 포함된다. 악성 종양의 치료가 선호된다. 본원에 사용된 바와 같이, "종양(tumor), 종양들, 암(cancer) 및 암들"은 달리 명시되지 않는 한 악성 종양을 나타내기 위한 것이다.

[0236] 백혈병 및 림프종과 같은 혈액-유래 종양 및 골수의 다양한 급성 또는 만성 종양성 질환의 치료가 포함된다. 바람직하게는, 치료할 종양은 혈관 신생 활성인 종양 및 혈전 생성 혈관을 갖는 종양을 포함한, 고체 또는 혈관 종양이다. "고체" 및 "혈관" 종양은 즉 종양 세포에 산소와 영양소의 공급을 위해 종양 혈관을 필요로 하는 혈관 성분을 갖는 종양이다.

[0237] 1차 또는 전이성이든 간에, 유방암, 난소암, 흉부암, 폐암, 간암(간세포 암종, HCC), 결장암, 대장암, 직장암, 전립선암, 췌장암, 뇌암(신경 교종 및 아교 모세포종), 자궁 경부암, 자궁암, 자궁내막암, 두경부암, 이하선암, 식도암, 후두암, 갑상선암, 위장관암, 위암, 신장암(신장 세포 암종, RCC), 담도계, 방광암, 고환암과, 암종 (편평세포 암종 및 비편평 세포종, 소세포 및 비-소세포), 선암 및 신경 아세포종과, 흑색종, 메르켈 세포 암종 및 혈액학적 악성 종양을 포함한, 기타 암으로 예시되는 바와 같은 모든 암이 포함된다. 특정 구현예에서, 본 발명은 특히 비-소세포 폐암 (NSCLC) 또는 유방, 췌장, 간, 신장, 직장 또는 난소 암 또는 흑색종에 적용된다. 가장 특히, 본 발명은 비-편평세포 NSCLS와 같은 NSCLS에 적용된다.

[0238] 출판된 문헌에 더하여, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체를 사용하는 모든 암의 치료는 다수의 미국 특허에서 교시되고 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,406,693호; 제7,422,738호; 제8,486,391호; 제7,247,303호; 및 제 7,572,448호는 모두 이러한 치료에 관한 본 개시 내용을 보충한다. 항암의 치료학적 유효량에 관한 위의 논의를 또한 참고하라 (섹션 H2). 모든 고체 종양에서 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체의 작용 방식이 실질적으로 또는 완전히 동일하기 때문에, 본 발명은 종양 세포 자체의 표현형 또는 유전자형에 관계없이, 모든 고체 종양의 치료에 광범위하게 적용될 수 있음을 이해할 것이다.

[0239] **L. 병용 요법(Combination Therapies)**

[0240] 본 출원, 출판된 문헌 및 다수의 미국 특허의 상당 부분도 또한 병용 요법에서 PS-표적 항체 (예: 바비투시마브)를 사용하여 암을 치료하는 것에 관한 것이다 (예: 미국 특허 제7,422,738호, 미국 특허 제 8,486,391호, 미국 특허 제7,572,448호).

- [0241] 따라서, 바이오마커 및 치료 방법은 동물 또는 환자가 나타내는 특정 질환 또는 장애, 특히 암 및 바이러스 감염과 질환의 치료에 일반적으로 사용되는 임의의 다른 방법과 병용될 수 있다. 제시된 치료학적 접근법이 그 자체로 환자의 상태에 해로울 것으로 알려져 있지 않고 PS-표적 항체 치료법을 현저히 중화시키지 않는 한, 본 발명과의 그의 병용이 고려된다. 비-악성 질환에 대한 병용 요법도 고려된다.
- [0242] 암 치료와 관련하여, 본 발명은 수술, 화학요법, 방사선요법, 사이토카인 요법, 항-혈관 신생 등과 같은 고전적 접근법 및 면역-종양학 (IO) 요법과 같은 새로운 접근법과 병용하여 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 바이오마커 및 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체가 수술 또는 방사선 치료와 동시에, 전 또는 후에 사용되거나; 또는 통상적인 화학요법 또는 방사선요법 제제, 사이토카인, 항-혈관 신생 제제, 세포 자멸-유도제, 표적 치료제, IO 제제 등과 함께, 이전 또는 이후에 환자에게 투여되는 병용 요법을 제공한다.
- [0243] 수술의 관점에서, 임의의 외과적 개입이 본 발명과 병용하여 실시될 수 있다. 방사선요법과 관련하여, γ -조사, X-선, UV-조사, 마이크로파 및 심지어 전자 방출 등과 같은 종양 세포내에서 국부적으로 DNA 손상을 유도하기 위한 임의의 메카니즘이 고려된다. 종양 세포로의 방사성 동위 원소의 직접 전달도 고려되며, 이는 표적 항체 또는 다른 표적화 수단과 관련하여 사용될 수 있다.
- [0244] 암 치료에 물질의 조합을 일반적으로 사용하는 것은 잘 알려져 있다. 하나 이상의 제제가 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체와 함께 사용될 때, 조합된 결과가 각 치료가 개별적으로 수행될 때 관찰되는 효과를 추가할 필요는 없다. 적어도 부가 효과가 일반적으로 바람직하지만, 단일 요법 중 하나 이상으로 증가된 치료 효과 또는 이점 (예: 부작용 감소)은 가치가 있다. 또한, 병용 치료가 가능하고 유리하지만, 상승 효과를 나타낼 특별한 요구 조건은 없다.
- [0245] 본원에 사용된 바와 같이, 본원에서 사용하기 위한 "1차 치료제" 또는 "1차 항암제"는 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "제2 또는 제3 치료제" 또는 "적어도 제2 또는 제3 항암제"는 제2 또는 제3 별개의 치료제, 항암제 또는 항바이러스제, 즉 1차 치료제"가 아닌 (other than)" 치료제, 항암제 또는 항바이러스제이다. 임의의 제2 또는 제3 치료제가 본 발명의 병용 요법에 사용될 수 있다. 또한, 제2 또는 제3 치료제인, "제2 또는 제3 항암제" 또는 "제2 또는 제3 항 바이러스 제제"는 본원의 지침 및 당업자의 지식에 따라, 첨가제 및 잠재적으로 상승 효과보다 큰 첨가제를 달성하기 위해 선택될 수 있다.
- [0246] 병용 요법, 항-종양 요법 또는 항바이러스 요법을 실시하기 위해, 동물 또는 환자 내에서 그들의 조합된 치료학적, 항-종양 또는 항바이러스 작용을 일으키기에 효과적인 방법으로, 동물 또는 환자에 다른 것, 즉 제2 또는 제3의 별개의 치료제, 항암 또는 항바이러스제와 병용하여 PS-표적 항체 (예: 바비투시마브)를 간단히 투여한다. 따라서, 제제는 질환 부위, 예를 들어, 종양, 종양 환경 또는 미세 환경에서 그들의 조합된 존재를 초래하고/하거나, 동물 또는 환자에서 그들의 병용된 치료학적 작용을 발휘하고, 바람직하게는 동물 또는 환자의 면역계에 대한 그들의 조합된 치료학적 작용을 발휘하기에 효과적인 양 및 기간 동안 제공될 것이다. 이러한 목적을 달성하기 위하여, 제1 치료제 및 제2 또는 제3의 별개 치료제는 단일 조성물로, 또는 상이한 투여 경로를 사용하여 2개 또는 3개의 별개의 조성물로서 실질적으로 동시에 투여될 수 있다.
- [0247] 대안적으로, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체는 제2 또는 제3의 별개의 치료제, 항암제 또는 항바이러스제를 예를 들어, 몇 분에서 수주 또는 수개월 간격으로 선행하거나 따라갈 수 있다. 제1 치료제 및 제2 또는 제3의 별개의 치료제가 동물 또는 환자에게 개별적으로 적용되는 특정 구현예에서, 각 투여 시간 사이에 작동 불능 기간이 존재하지 않도록 보장하여 각 제제가 유리하게 조합된 효과를 발휘할 수 있도록 한다. 바비투시마브에 대한 현재까지의 임상 경험을 포함한 표준 실습에서, 1~2 주간은 바비투시마브 및 제2 또는 제3의 별개의 치료제 투여 사이에 작동 불능 기간이 아니다. 사실, 약 1주 간격이 바람직할 수 있다.
- [0248] 또한, 바람직한 하나의 병용된 종양 치료법은 실질적으로 동시에 또는 바람직하게 수주 간격으로 제2의 별개의 항암제와 병용된 PS-표적 항체 (예: 바비투시마브)를 동물 또는 환자에게 투여하고, 후속 시간에 제3의 별개의 항암제를 투여하고, 이후에 유효한 시간 동안, 예를 들어 수개월 동안 제3의 별개의 항암제를 주기적으로 투여하는 것에 관련된다.
- [0249] 별개의 시간 조합 치료법을 위한 제2 또는 제3 치료제는 본원에서 논의되고 당 업계에 공지된 것을 포함하는 특정 기준에 기초하여 선택될 수 있다. 그러나, 선행 투여 또는 후속 투여를 위해 하나 이상의 제2 또는 제3의 별개의 치료제를 선택하는 것에 대한 선호도는 바람직한 경우 실질적으로 동시 투여에서 이들의 사용을 배제하지 않는다.
- [0250] 암의 측면에서, 제2 또는 제3의 별개의 항암제의 경우, 1차 치료제에 "앞서" 투여하기 위해 선택되고 증가된 잠

제적 상승 효과를 달성하도록 설계된 제2 또는 제3의 별개의 항암제는 종양 미세 환경에서 PS의 발현을 유도하는 제제를 포함한다. 예를 들어, 국제화된 칼슘 생산을 자극하고, PS를 원형질막의 외부 표면으로 이동시키는 막 전달체를 활성화하며, 종양 내피를 손상시키고, 세포 사멸 전 변화를 유발하고 및/또는 종양 내피 또는 종양 세포에서 아포토시스를 유도하는 제제는 일반적으로 PS 발현을 증가시킨다. 이러한 제제의 예는 도세탁셀 및 파클리탁셀이다. 그 다음 PS는 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체를 사용하여 표적화시킴으로써, 전반적인 치료 효과를 증폭시키고, 또한 숙주 효과기를 통한 공격을 증가시킬 수 있다 (보체, ADCC, 항체-매개 식균 작용, CDC).

[0251] 종양 혈관에 존재하지만 정상적인 휴지 혈관에 존재하지 않는 것과 같은, 혈관 신생, 재형성 또는 활성화된 내피 세포에 대한 선택성을 갖는 약물은 또한 종양 미세 환경에서 PS의 노출을 선택적으로 유발하는데 사용될 수 있다. 그러한 제제의 예는 콤브레타스타틴 및 도세탁셀이다. 이것은 다시 증가된 항체 결합 및 숙주 이펙터 메커니즘의 개시 향상을 유도할 것이다.

[0252] 1차 치료제에 "이어서" 투여하도록 선택되고 증가된 잠재적 상승 효과를 달성하도록 설계된 제2 또는 제3의 별개의 항암제는 1차 치료제의 효과로부터 이익을 얻는 제제를 포함한다. 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체는 종양 괴사를 유발한다. 따라서, 후속 투여를 위한 효과적인 제2 또는 제3의 별개의 항암제에는 전이를 억제하는 항-혈관 신생제; 생체내에서 악성 세포로부터 접근 가능한 세포내 항원에 특이적인 항체와 같은, 괴사성 종양 세포를 표적화하는 제제 (미국 특허 제5,019,368호, 제5,882,626호); 말초에서 생존할 수 있는 임의의 종양 세포를 공격하는 화학요법제 및 항-종양 세포 면역억제제가 포함된다. 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체에 이어 투여하기 위한 현재 가장 바람직한 제2 또는 제3의 항암제는 하기 기술되는 바와 같은, 면역 체크포인트 억제제이다.

[0253] 어떤 상황에서는, 치료 기간을 유의적으로 확장시키는 것이 바람직할 수 있는데, 이때 각각의 투여 사이에 몇 일 (2, 3, 4, 5, 6 또는 7), 몇 주 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8) 또는 심지어 몇 개월 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8)이 경과된다. 이것은 하나의 치료가 종양을 실질적으로 파괴하기 위한 것이고, 또 다른 치료는 항-혈관 형성제 또는 면역 체크포인트 억제제의 투여와 같이, 미세 전이 또는 종양 재성장을 방지하고 및/또는 종양에 대한 숙주 반응을 자극하거나 보조하는 것을 목적으로 하는 경우에 유리하다. 그러나 항-혈관형성제는 효과적인 상처 치유를 위해 수술 후 조심스럽게 투여해야 한다. 항-혈관형성제는 환자의 평생 동안 투여될 수 있다.

[0254] 또한 1차 치료제 또는 제2 또는 제3의 별개의 치료제 중 하나 이상의 투여가 이용될 것으로 구상된다. 1차 치료제 및 제2 또는 제3의 별개의 치료제는 격일 또는 격주에 상호 교환적으로 투여될 수 있으며; 또는 하나의 제제 치료 순서가 주어진 다음, 다른 일련의 치료 또는 치료들의 순서가 제공될 수 있다. 임의의 경우에, 병용 요법을 사용하여 치료 효과를 달성하기 위해서, 투여 시간에 관계없이, 치료 효과를 발휘하는데 효과적인 병용 용량으로 2종 이상의 제제를 전달하는 것이 필요한 전부이다.

[0255] **L1. 화학요법(Chemotherapy)**

[0256] 실질적으로 동시에 또는 순차적으로 투여되든지 간에, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체는 하나 이상의 화학요법제 또는 약물과 함께 투여될 수 있다. 화학요법 약물은 증식하는 종양 세포를 죽일 수 있어 전반적인 치료로 생긴 괴사 부위를 강화시킨다. 따라서, 약물은 본 발명의 주요 치료제의 작용을 향상시킬 수 있다.

[0257] 대부분의 암 화학요법 약물은 산소 공급된 세포를 분열시키는데 선택적이다. 화학요법 약물이 1차 치료제와 다른 표적에 작용하여 보다 완전한 항-종양 효과를 유도하므로 병합 요법에 이점이 있다. 예를 들어, 화학요법 약물은 종양 주변부에서 빠르게 분열되고 산소 공급된 종양 세포에 대해 선택적으로 활성화된다. 종양 주변부의 산소가 잘 통하는 혈관 신생 혈관에 선택적인 항-혈관 신생 약물은 병용 투여에도 효과적이다.

[0258] 종양 혈관 내 혈전 형성을 유도함으로써, 본 발명의 1차 치료제는 또한 종양 내에 약물을 보유 또는 포획함으로써 화학요법 약물의 작용을 향상시킬 수 있다. 따라서, 화학요법은 종양 내에서 유지되고, 나머지 약물은 신체에서 제거된다. 이에 따라 종양 세포는 장기간 더 고농도의 약물에 노출된다. 종양 내 약물 포획은 약물의 용량을 줄여 치료를 보다 안전하고 효과적이게 만들 수 있다.

[0259] 본 발명에서 병용되는 추가의 약물은 1차 치료제의 작용에 의해 약물에 "민감한(sensitized)"하게 되어, 제2 약물의 감소된 투여량이 그의 항-종양 효과를 달성하는데 필요한 세포에 작용하는 약물이다. 예를 들어, 이는 제2 약물 작용의 주요 성분이 종양 혈관에 가해지고, 본 발명의 항체 또는 제제가 세포를 약물에 민감하게하는 경우에 발생할 수 있다. 본 발명의 1차 치료제가 종양 세포를 직접적으로 또는 사이토킨 방출의 자극을 통해 제2 약물에 민감하게 만드는 경우도 마찬가지이다.

- [0260] 병용 요법을 위한 다른 적합한 제2 또는 제3 항암제는 예를 들어, 면역계의 면역 억제 성분의 활성을 선택적으로 억제함으로써 숙주 효과기 세포의 활성을 강화시키는 것이다. 이러한 제제는 그 메카니즘의 일부로서 효과기 세포에 의한 공격을 자극하는 본 발명의 1차 치료제가 보다 공격적으로 작용할 수 있도록 한다. 이러한 제제의 예로는 도세탁셀 및 면역 체크포인트 억제제가 있다.
- [0261] 1차 치료제의 정확한 작용 메카니즘(들)에 대한 이해가 본 발명의 치료를 수행하는데 반드시 필요한 것은 아니지만, 그러한 메카니즘에 관한 데이터 및 사리에 맞는 추론은 본 발명에서 병용하기 위한 특정 제2 또는 제3 항암제를 선택하는데 사용될 수 있다. 선택된 병용 요법의 효과는 결국 원래의 데이터 및 제안된 작용 메카니즘을 뒷받침하며, 또한 병용 요법을 실행하기 위한 제2 또는 제3 항암제의 바람직한 범주를 유도한다.
- [0262] 아포토시스를 유도하는 약물이 병용 요법에서 사용될 수 있다. 예를 들어 도세탁셀은 미세소관에 결합하고 세포 유사분열을 방해함으로써 아포토시스 및 그에 따른 PS 노출을 유도한다 (Hotchkiss 외, 2002). 종양 혈관 및 종양 세포를 막는 내피 세포를 준임상 농도의 도세탁셀로 치료하면 세포 표면에서 PS 발현이 유도되는 것으로 알려져 있다.
- [0263] 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체의 항-종양 효과는 ADCC, CDC, 사이토카인 생산의 자극 및 이와 같은 병용 메카니즘과 같은, 면역 효과기 기능의 Fc 도메인-매개된 증강을 포함한다. 다른 연구는 도세탁셀로 유방암 환자의 치료가 혈청 IFN γ , IL-2, IL-6, GM-CSF 사이토카인 수준의 증가를 유도하여, 천연 킬러 (NK) 및 림포카인 활성화 킬러 (LAK) 세포의 활성을 증진시킴으로써 이들 환자에서 항-종양 면역 반응의 증강을 제시함에 따라, 이는 또한 도세탁셀과 관련이 있다.
- [0264] 따라서, 도세탁셀은 투여된 항체의 PS 발현 및 결합을 모두 유도하고, 또한 항-종양 효과를 매개하는 면역 효과기의 활성을 향상시킬 것이다. 상기 고려 사항에 기초하여, 도세탁셀과 항체의 병용은 하기에 기술되는 바와 같이, 또한 특히 면역 체크포인트 억제제에 의한 치료와 병용되거나 이것이 이어지는 경우 바람직한 구현예이다.
- [0265] 따라서, 아포토시스를 유도하는 도세탁셀 및 다른 화학요법제는 본 발명의 병용 치료시 사용하기에 바람직한 특정 제제이다. 도세탁셀과 같은 아포토시스를 유도하는 화학요법 약물과의 병용은 종양 혈관 내피 세포 및 종양 세포 구획을 상승적으로 공격하여, 치료 효능을 크게 향상시킬뿐만 아니라 독성을 낮추어야 한다. 이들 병용, 특히 도세탁셀과 PS-표적 항체를 사용한 메트로놈 화학요법의 병용이 유방암 치료에 사용하기 위해 고려된다.
- [0266] 병용 요법에 대한 예시적인 화학요법제, 예컨대, 페메트렉스, 테모졸로미드, 타목시펜, 에블로티니브, 수니티니브, 소라페니브, 파클리탁셀, 카보플라틴, 겐시타빈 및 도세탁셀이 미국 특허 제7,572,448호 및 미국 특허 제9,421,256호에 기술되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 제7,572,448호의 표 D 및 미국 특허 제9,421,256호의 표 C에 열거된 바와 같이). 예컨대 트라스투주마브, 리투시마브 및 베바시주마브와 같은 다른 치료학적 항체가 또한 사용될 수 있다. 당해 분야에 공지된 각각의 화학요법제, 항체 및 다른 약물은 예시적이고 제한적이지 않다. 복용량의 변화는 치료된 상태에 따라 발생할 수 있다. 담당 의사는 개별 피험체에 대한 적절한 투여량을 결정할 수 있다. 특정 바람직한 구현예에서, 도세탁셀은 60mg/m²의 출발 투여량에서 시작해 투여되는 도세탁셀 또는 75mg/m²의 양으로 환자에게 투여되는 도세탁셀과 같이, 도세탁셀이 사용된다.
- [0267] **M. 면역요법 (IO) 병용**
- [0268] 효과적인 면역요법에 대한 도전은 내재성 또는 적응 면역 활성화를 억제하는 다중 경로를 극복하는 것이다. PD-1 면역 체크포인트는 주요 면역 억제 경로로 확인되어, 화학요법보다 독성이 적은 암 면역요법의 유망한 표적으로 부상했다. 활성화된 종양 특이적 T 세포를 소모하고 그들의 종양을 죽이는 활성을 억제하는 작용을 한다. PD-1은 미경험(naive) T 세포, B 세포, 대식세포, DC 및 단핵구에는 존재하지 않지만 활성 대조물에서는 고도로 발현된다. 주목할 만하게, 종양 및 관련 골수 세포는 PD-1 발현의 상향 조절을 통해 내재성 및 적응 면역 저항성을 생성하기 위해 PD-1 경로를 이용한다. 기계적 연구에 따르면 이러한 면역 체크포인트의 봉쇄는 *신생 (de novo)* 또는 기존의 항-종양 면역 반응이 있을 때 가장 효과적이다. 불행하게도, 기존 종양 특이적 면역 활동은 종종 종양 미세 환경을 지배하는 PS 및 기타 면역 억제 인자의 노출로 인해 암 환자에게 제한적이다.
- [0269] 지속적 항-종양 면역 반응이 PD-1 신호 전달을 차단하는 제제와 함께 여러 암 유형에서 관찰되었지만, 일부 환자만 반응한다; 결과적으로 아직 충족되지 못한 의학적 요구가 남아있다. 특히, 종양의 미세 환경에서 낮은 수준의 PD-1과 PD-L1 (면역 억제 바이오마커 및 T 세포 활성화의 결여)을 발현하는 환자는 체크포인트 봉쇄 요법에 덜 민감한 것으로 나타났다. 면역 활성화를 관찰한 결과, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체가 항 PD-1/PD-L1 및 다른 체크포인트 요법으로 혜택을 볼 수 있는 환자의 비율을 증가시킬 수 있음이 밝혀졌다.

- [0270] 먼저 바비투시마브 및 면역요법으로 치료한 인간 환자가 의미있는 생존 이점을 갖는다고 제시한 임상적 데이터가 본원에 존재한다. 특히, 실시예 XIX의 결과는 바비투시마브 (및 도세탁셀)에 이어 후속되는 면역요법 ("SACT-IO")으로 치료한 환자는 위약 (도세탁셀 단독)에 이어 후속되는 면역요법으로 치료한 환자와 비교시 통계학적으로 유의한 보다 양호한 전반적인 생존률을 가짐을 입증하고 있다. 연장된 생존률은 통계학적으로 유의했고 ($p=0.006$) 심지어 보다 인상적이었는데, 이는 후속되는 IO를 투여받은 바비투시마브 환자에 대한 mOS가 아직 도달되지 않았기 때문이다 (실시예 XIX; 도 26; 표 16). 이에 따라, 바비투시마브는 실제로 인간 환자에서 면역요법 제제의 활성을 향상시킨다.
- [0271] 따라서, 실시예 XIX의 데이터로 예시된 바와 같이, 본 발명의 중요한 구현에는 면역요법 또는 면역-종양학 (IO) 제제와 병용된 PS-표적 항체 (예: 바비투시마브)에 의한 암 환자 치료이다. 병용요법을 위한 예시적인 면역요법 제제는 2016년 10월 11일자로 출원된 가출원 제62/406,727호의 표 C; 및 각각 2017년 4월 3일자로 출원된 가출원 제62/480,994호 및 2017년 5월 17일자로 출원된 가출원 제62/507,580호의 표 D에 열거되어 있고, 이들 중 NK 세포 및 CAR-T 요법과의 병용이 현재 바람직하다.
- [0272] IO 제제의 특정 바람직한 예는 각각 2017년 4월 3일자로 출원된 가출원 제62/480,994호 및 2017년 5월 17일자로 출원된 가출원 제62/507,580호의 표 E에 기술된 것과 같이, 임상 치료를 위해 또는 인간 임상 시험시, 바람직하게는 후기-단계 임상 시험에서 승인된 것들이다. 치료를 위한 사용 용량 및 지시는 각각 2017년 4월 3일자로 출원된 가출원 제62/480,994호 및 2017년 5월 17일자로 출원된 가출원 제62/507,580호의 표 E에 상세히 예시된 바와 같이, 당업계의 통상의 숙련가에게 잘 알려져 있다. 예를 들면, 흑색종, 비-소세포 폐암 (NSCLC), 신 세포암종 (RCC), 고전적 호지킨 림프종, 두경부의 편평세포암 (두경부암), 방광암, 소세포 폐암, 뇌암 (예: 악성 신경교종, 역형성상세포종 (AA) 및 다형성교아종 (GBM)), 간세포암 (hepatocellular cancer, HCC), 식도암, 위암, 중피종 및 다발성 골수종을 치료하기 위해 2주 마다 240mg 또는 3mg/kg의 니볼루마브; 흑색종, NSCLC, 고전적인 호지킨 림프종, 두경부암, 위암, 유방암, 방광암, 모든 고체 종양, 대장암, RCC, 다발성 골수종, 식도암 및 HCC를 치료하기 위해 3주 마다 200mg 또는 2mg/kg의 펌브롤리주마브; 방광암, NSCLC, RCC, 대장암, 전립선암, 흑색종, 유방암, 난소암 및 소세포 폐암을 치료하기 위해 3주 마다 1200mg의 아테졸리주마브; 전이성 메켈 세포 암종, NSCLC, 난소암, 위암, 방광암, RCC, 미만성 거대 B세포 림프종 (DLBCL), 비호지킨 림프종 및 두경부암을 치료하기 위해 2주 마다 10mg/kg의 아벨루마브; 및 NSCLC, 두경부암, 방광암 및 소세포 폐암을 치료하기 위해 2주 마다 10mg/kg의 두르발루마브 (MEDI4736)를 투여하였다.
- [0273] 다른 적합한 IO 제제에는 절제불능 또는 전이성 흑색종을 치료하기 위해 3주 마다 3mg/kg 또는 10mg/kg의 이필리무마브; 흑색종 치료를 위해 3개월 마다 15mg/kg의 트레멜리무마브; NSCLC를 치료하기 위한 REGN2810; 흑색종을 치료하기 위한 PDR001; NSCLC를 치료하기 위한 라코투모마브; 진행성 고체 종양을 치료하기 위한 MEDI0562 및 GSK3174998; 흑색종을 치료하기 위한 우렐루마브; DLBCL을 치료하기 위한 우토미루마브; 및 각각 고체 종양을 치료하기 위한 BMS-986016, LAG525, JNJ-61610588, TSR-022, MBG453, MEDI1873 및 INCAGN01876이 있다.
- [0274] 실시예 XIX의 데이터에 의해 직접적으로 뒷받침되는 바와 같은, 바비투시마브와 같은 PS-표적 항체와의 병용 요법에 특히 바람직한 IO 제제는 본 명세서에서 "면역 체크포인트 항체"로 지칭되는 "체크포인트 억제제"이다. 적합한 "면역 체크포인트 항체"는 활성화 면역 체크포인트, 수용체 또는 분자에 결합하는 효능제 (활성화) 항체, 예컨대 CD28, OX40 및/또는 GITR 및 억제성 면역 체크포인트, 수용체 또는 분자에 결합하는 길항제 (차단) 항체, 예컨대 PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3 및/또는 LAG-3을 포함한다. 이러한 차단 항체는 통상적으로 본원에서 또한 사용되는 "면역 체크포인트 억제제"로 불린다. 여러 항체는 임상 치료 또는 후기-단계 임상 시험을 위해 승인된 바와 같이, 각각 2017년 4월 3일자로 출원된 가출원 제62/480,994호 및 2017년 5월 17일자로 출원된 가출원 제62/507,580호의 표 E에 기술되어 있다.
- [0275] 면역 체크포인트 항체 (면역 체크포인트 억제제)의 현재 가장 바람직한 예는 "CTLA-4, PD-1 또는 PD-L1에 결합하는 차단 항체"이다. CTLA-4, PD-1 또는 PD-L1에 결합하는 이러한 차단 항체 및 이들의 선택, 제조 및 사용을 위한 기능적 분석을 포함하는 방법은 표 B에 기술된 바와 같이, 당업계의 통상의 숙련가에게 잘 공지되어 있다. 이들은 이필리무마브 및 트레멜리무마브와 같은, CTLA-4에 대한 차단 항체; 니볼루마브 (Brahmer 외, 2015), REGN2810 및 펌브롤리주마브 (Garon 외, 2015)와 같은, PD-1에 대한 차단 항체; 두르발루마브 (MEDI4736) 및 아테졸리주마브 (Fehrenbacher 외, 2016)와 같은, PD-L1에 대한 차단 항체; 및 "IO 더블렛"으로 알려진 이러한 항체 중 임의의 하나 이상의 조합을 포함한다. 이들 중, 트레멜리무마브, 니볼루마브, 두르발루마브 및 아테졸리주마브가 현재 바람직하다. 트레멜리무마브, 니볼루마브, 두르발루마브 및 아테졸리주마브에 대한 주요 미국 특허는 각각 미국 특허 제6,682,736호, 미국 특허 제8,008,449호, 미국 특허 제8,779,108호 및 미국 특허 제

8,217,149호이다.

- [0276] **표 B** 이외에, 항-CTLA-4 항체의 다른 적합한 예는 미국 특허 제6,207,156호에 기술된 것들이고, 이는 특히 기탁된 하이브리도마로부터의 정의된 항체로부터 선택된 CDR (CDR3, CDR2 또는 CDR1)을 포함하는 항-CTLA-4 항체에 관련된다.
- [0277] **표 B** 이외에, 항-PD-L1 항체의 다른 적합한 예는 특히 화학요법 병용을 포함하는 인간 항-PD-L1 항체로 PD-L1 과발현 암을 치료하는 것에 관한 미국 특허 제8,168,179호; 특히 키메라, 인간화 및 인간 항체를 비롯한 PD-L1에 대한 항체로 종양을 치료하는 것에 관한 미국 특허 제9,402,899호; 및 특히 항-PD-L1 항체 및 화학요법으로 암을 치료하는 것에 관한 미국 특허 제9,439,962호에 기술된 것들이다. 이들 항-PD-L1 항체 조성물 및 방법은 오노 파마슈티칼즈 (Ono Pharmaceuticals) 및 공동 연구자에 의해 개발된 것들을 포함한다.
- [0278] PD-L1에 대한 또 다른 적합한 항체는 미국 특허 제7,943,743호, 제9,580,505호 및 제9,580,507호의 것들, 그의 키트 (미국 특허 제9,580,507호) 및 항체를 코딩하는 핵산 (미국 특허 제8,383,796호)이다. 이러한 항체는 PD-L1에 결합하고, 참조 항체와의 결합을 위해 경쟁하며; *VH* 및 *VL* 유전자에 의해 정의되거나; 또는 정의된 서열 또는 그의 보존적 변형물의 중쇄 및 경쇄 CDR3 (미국 특허 제7,943,743호) 또는 중쇄 CDR3 (미국 특허 제8,383,796호)에 의해 정의되며; 또는 참조 항체에 대해 90% 또는 95%의 서열 동일성을 갖는다. 이들 항-PD-L1 항체는 또한 정량적 (결합 친화성을 포함함) 및 정성적 특성, 면역 접합체 및 이중 특이적 항체를 갖는 항체를 포함한다. 이러한 항체를 사용하는 방법, 및 면역 반응을 향상시키는데 단쇄 포맷의 항체 및 분리된 CDR의 포맷으로 존재하는 항체를 포함하는, 정의된 정량적 (결합 친화성 포함) 및 정성적 특성을 갖는 방법이 추가로 포함된다 (미국 특허 제9,102,725호). 미국 특허 제9,102,725호에서와 같이, 면역 반응을 향상시키는 것은 암 또는 감염성 질환, 예컨대 바이러스, 박테리아, 진균 또는 기생충에 의한 병원성 감염을 치료하는데 사용될 수 있다. 이들 항-PD-L1 항체 조성물 및 방법은 생성물 BMS936559를 포함한다.
- [0279] PD-L1에 대한 또 다른 적합한 항체는 정의된 CDR 서열의 항체 및 경쟁 항체; 핵산, 벡터, 숙주 세포, 면역 접합체; 검출, 진단, 예후 및 바이오마커 방법; 및 치료 방법을 포함한, PD-L1상의 특정 에피토프에 대한 항체에 관한 미국 특허 출원 제2016/0009805호의 것들이다.

[0280]

[표 B]

표 B CTLA-4, PD-1 및 PD-L1에 대한 차단 항체 및 기능 에세이				
목적	대표 성분명	대표 상품명	미국 특허	교시
CTLA-4	이필리무마브	Yenvoy®	6,984,720	CTLA-4에 대한 항체 (서열, 정량적 및 정성적 특성에 의해 정의됨)
			7,605,238	CTLA-4에 대한 항체 (저해성 및 경쟁적 결합 에세이를 포함하는 결합 친화성; 서열에 의해 정의됨)
			8,318,916	CTLA-4에 대한 항체를 위한 핵산 (CDR3 서열에 의해 정의됨)
	트레멜리무마브		8,784,815	CTLA-4 항체에 의한 면역 반응 증가 및 암 치료
			8,017,114	(CDR3 서열 및 친화성, 또는 참고 항체와의 경쟁 및 친화성에 의해 정의됨)
			6,682,736	(아마도, 인간 및 영장류) CTLA-4에 대한 항체 (NH 유전자 및 이에 대한 아미노산 제한; 결합 친화성, 정량적 특성, 항체 경쟁에 의해 정의됨)
			7,109,003	CTLA-4에 대한 항체의 발현 (정량적 결합 특성 또는 VL 유전자; 친화성, 항체 경쟁에 의해 정의됨)

[0281]

[0282]

표 B CTLA-4, PD-1 및 PD-L1에 대한 차단 항체 및 기능 에세이				
목적	대표 성분명	대표 상품명	미국 특허	교시
			7,132,281	숙주 세포, CTLA-4에 대한 항체의 발현 및 정제 [항체 경쟁 (예를 들어, 침전된 항체) 및 VL 유전자, 정량적 결합 특성, 90%, 95% 시열 동일성에 의해 정의됨]
			7,411,057	핵산, 숙주 세포 및 CTLA-4에 대한 항체의 발현 (CDR 서열 및 침전된 항체에 의해 정의됨)
			7,807,797	CTLA-4에 대한 항체 [중쇄 또는 경쇄 시열 (사슬-서플링) 또는 CDR, 단쇄 및 이종특이성에 의해 정의됨], 및 암 치료
			7,824,679	
			8,143,379	
			8,491,895	
			8,883,984	
PD-1	니볼루마브	Opdivo®	8,008,449 8,779,105 9,387,247	참고 항체와의 결합에 대해 경쟁하는 PD-1에 대한 항체; 면역 키주게이트; 이종특이성; 정량적 및 정성적 특성
			9,492,539 9,492,540	참고 항체와의 결합을 경쟁하며, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 프레임워크 시열 동일성을 갖고, 암을 치료하는, PD-1에 대한 항체
			8,728,474	PD-1에 대한 항체 (키메라, 인간화 및 인간 항체 포함)에 의한 종양 치료

표 B
CTLA-4, PD-1 및 PD-L1 에 대한 차단 항체 및 기능 에세이

표적	대표 성분명	대표 상품명	미국 특허	교시
			9,067,999	PD-1 에 대한 항체 (병용 요법 포함)에 의한 폐암의 치료
			9,073,994	PD-1 에 대한 항체 (병용 요법 포함)에 의한 흑색종의 치료
			7,595,048	인간 항-PD-1 항체에 의한 PD-L1 또는 PD-L2 과발현 암의 치료 (화학 치료 병용 포함)
		팜브롤리주마브	8,354,509	PD-1 에 대한 항체의 경쟁적 결합; 정량적 및 정성적 특성
			8,900,587	CDR 또는 특정 서열에 의해 정의된, PD-1 에 대한 항체
PD-L1			8,952,136	CDR 또는 특정 서열에 의해 정의된, PD-1 에 대한 항체
		두르발루마브	8,779,108	공지의 에피토프에 결합하기 위해 침전된 항체와 경쟁하거나, 또는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인에 대해 90% 동일성을 갖는, PD-L1 에 대한 항체 (B7-H1); 돌연변이 분석을 위한 경쟁 에세이
			9,493,565	CDR 또는 서열에 의해 정의되는, PD-L1 에 대한 항체 (B7-H1)
	아테졸리주마브	Tecentriq®	8,217,149	(무-효과기 Fc 돌연변이 및 탈당화를 포함하는 시열 변이체를 갖는 CDR 에 의해 정의되는) 중쇄 가변 부위 및 PD-L1 에 결합하는 항체; 화학치료, 항-타이로스 및 백신 병용 요법

[0283]

표 B CTLA-4, PD-1 및 PD-L1 에 대한 차단 항체 및 기능 에세이				
목적	대표 성분명	대표 상품명	미국 특허	교시
복수의 표적			9,084,776 [8,728,474] [9,067,999] [9,073,994]	PD-1 및 CTLA-4 에 대한 항체에 의한 종양 치료
			9,358,289	PD-1 및 CTLA-4 에 대한 항체에 의한 종양 치료 (하위-지표 투여량 및 PD-L1 음성 종양을 포함)
			9,393,301 [9,402,899]	PD-L1 및 CTLA-4 에 대한 항체에 의한 종양 치료.

[0284]

[0285]

하기 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 설명하기 위해 포함된다. 하기 실시예에 개시된 기술은 본 발명의 실시에서 잘 기능하도록 본 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내므로, 그 실시를 위해 바람직한 모드를 구성하는 것으로 간주될 수 있다는 것을 당업자는 이해해야 한다. 그러나, 당업자는 본 개시물에 비추어 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 개시된 특정 구현예에서 많은 변화가 이루어질 수 있고, 여전히 유사하거나 유사한 결과를 얻을 수 있음을 이해해야 한다.

[0286]

실시예 I

[0287]

3G4 항체의 생성

[0288]

본 구현예는 면역화 프로토콜, 3G4로 명명된 쥐 PS-표적 항체의 생성 및 초기 특성 규명을 기술한다.

[0289]

음이온성 인지질, 주로 PS를 강한 면역원으로 면역계에 제시하므로, 그들은 세포 맥락에서, 특히 PS-양성 세포로서 표현되었다. 다른 막 성분으로 둘러싸인 막-노출된 PS는 항체를 키우기 위한 더 나은 구조를 갖는다. 그 목적은 PS를 발현하는 자가 세포로 면역 수용체 동물을 면역시키는 것이었는데, 이때 동물은 모든 자기, 표면 항원에 대한 항체를 생성하지 않을 것이지만, 막-노출된 PS를 외부 요소로 인식할 것이다.

[0290]

마우스 내피종 세포, bEnd.3 (불사성 마우스 (BALB/C 균주) 내피 세포)은 10% CO₂ 인큐베이터에서 9ml/500ml HEPES 버퍼와 10% DMEM에서 배양시켰다. bEnd.3 세포를 원하는 수의 세포가 얻어질 때까지 T175 TC 플라스크에서 증대시켰다. 통상적으로 ~70-80%의 밀집도에서 각 플라스크는 약 3×10⁶ 세포를 가지며, 각각의 마우스에 1×10⁶ 내지 20×10⁶ 세포, 최대 1×10⁷ 개의 세포를 투여해야 한다.

[0291]

bEnd.3 세포를 50 μM 내지 200 μM의 과산화수소로 37°C에서 1 또는 2시간 동안 처리하여 면역화 전에 음이온성 인지질, 특히 PS를 노출시켰다. H₂O₂의 스톡은 [9.8M]; 30% (v/v)였다. 이는 1:1000으로 희석시킨 다음, 0.4

ml를 100 μ M의 H₂O₂의 최종 농도로 40ml의 매질과 함께 T175 TC 플라스크에 첨가하였다. 세포를 37°C에서 1시간 동안 유지시켰다. 수집을 위해, 세포를 배지에서 모든 BSA 또는 혈청 단백질을 제거할 목적으로, 따뜻한 인산염 완충 식염수 (PBS) + 10mM EDTA로 3회 세척하였다. 세포를 약한 트립신 처리로 제거하였고, 세척하여, 1000rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 상층액을 흡인하였고, 세포를 적절한 부피로 첨가제없이 DMEM에 재현탁시켰고 (각 마우스는 200 μ l 중 약 1×10^7 개의 세포를 투여받았다), 얼음 위에서 유지하였다.

- [0292] 이 방식으로 처리한 세포를 1ml 주사기와 23 게이지 바늘을 사용하여 BALB/c 마우스에 IP 주사하였다 (세포 현탁액 200 μ l). 마우스를 먼저 3 내지 4주 간격으로 3-7회 면역화시켰다. 두 번째 부스팅으로부터 시작하여, 각 부스팅 후 10일차에 마우스를 출혈시킴으로써 면역 혈청을 수집하였다. PS 항체에 대한 혈청 역가를 ELISA로 시험하였다.
- [0293] 자가 PS-양성 세포에 의한 이러한 면역화는 자가 항체의 제한없는 생산을 초래하지는 않았지만, PS와 반응하는 항체, 주로 다른 음이온성 인지질과 함께 PS에 반응하는 항체의 생산으로 제한되었다. PS와 같은 음이온성 인지질과 반응하는 항체를 매우 높은 역가로 갖는 마우스를 수득하였다. 마우스는 독성의 어떠한 징후도 보이지 않았다.
- [0294] 추가 면역화에서, 다양한 마우스를 과산화수소-처리된 bEnd.3 세포로 3회 면역시켰고, 첫 번째 면역화 후 54일차 혈청을 시험하였다. 혈청 내 PS와 반응하는 IgG 항체를 항-마우스 IgG, Fc 특이적 2차 항체로 검출하였다 (및 혈청 내의 IgM 항체는 항-마우스 IgG 무 특이적 2차 항체로 검출하였다). 이 면역화 프로토콜을 사용하여 PS와 반응하는 IgG 및 IgM 항체를 가진 수많은 효과적인 항혈청을 수득하였으며, 그 중 IgG 항체가 있는 항혈청이 일반적으로 더 효과적이었다.
- [0295] 전형적으로, PS에 대한 원하는 항혈청의 IgG 역가는 > 200,000에 도달했지만, PC 역가는 < 50,000이었던 경우, 융합이 수행되어 단클론 항체가 생성되었다. 하이브리도마는 면역화된 동물로부터의 비장 세포를 골수종 파트너 P3X63AG8.653 세포 (ATCC, Rockville, MD)와 융합시킴으로써 수득하였다.
- [0296] 종양 치료에 유용한 단클론 항체를 제조하는 이 기술의 중요한 측면은, 음이온성 인지질에 결합하지만 중성 인지질에 결합하지 않는 항체를 선별하는 스크리닝을 포함하는 선택 전략이었다. 또 다른 중요한 측면은 혈청 존재하에서와 같이 혈청이 없을 때 PS-코팅된 플레이트에 강하게 결합하는 항체를 선택하는 것이었다. 이것은 PS와 혈청 단백질의 복합체를 인지하는 항체 (예: PS와 β 2GPI의 복합체)를 배제하기 위해 수행되었다.
- [0297] PS와 반응하는 단클론 항체를 분리하는 전략은, 항-마우스 IgG, Fc 감마 특이적인 2차 항체를 사용하여 PS-코팅된 플레이트 상에서 하이브리도마 상층액을 스크리닝하는 것을 포함한다. 스크리닝은 먼저 4개의 인지질 (PS, 포스파티딜세린, PE, 포스파티딜에탄올아민, CL, 카디올리핀 및 PC, 포스파티딜콜린) 뿐만 아니라 bEnd3 세포에 대해 수행되었다. 중성 인지질인 PC와 반응하는 클론은 bEnd3 세포와 비반응성인 클론에서와 같이, 폐기되었다. PS에 대한 결합능이 높은 클론을 선택하였다. PS에만 반응성이 있거나 PS에 강한 선호도를 갖는 웰을 먼저 서브-클로닝하였고, 다른 음이온성 인지질과의 결합과 함께 PS 반응성을 나타내는 웰을 두 번째로 서브-클로닝했다.
- [0298] 선택된 각 하이브리도마의 이소 타입을 결정하였다. IgG 클래스의 항체는 일반적으로 더 높은 친화성, 생체내 제거율 및 정제, 변형 및 취급의 단순성을 포함하여 IgM보다 많은 이점을 가지므로, 이들의 생성이 특히 바람직하다. 균일한 IgG 이소 타입을 갖는 웰에 초점을 맞추기 위해, IgM 또는 상이한 Ig의 혼합물을 함유하는 웰을 폐기하거나 재-클로닝하였다. 매우 양성인 클론의 서브 클로닝을 3-4 회 반복하였다.
- [0299] 처음에 "F3-G4"라고 명명되었고 3G4로 재-명명된 유익한 마우스 IgG 항체 (IgG₃ κ)가 선택되었다. 3G4 항체는 혈청의 존재 및 부재하에 ELISA에서 PS에 대한 결합에 대해 시험되었고, 초기에는 "혈청-비의존성 (serum-independent)", 즉 혈청이 없는 경우 PS에 결합하는 항체로 특징지어졌다.
- [0300] 3G4 항체는 PS 또는 다른 인지질에 대한 결합을 시험하는데 사용된 다음의 "표준 ELISA"를 사용하여 연구되었다. 인지질 항원 [2.5ml 병 내의, PS 항원, P-6641 25mg 10mg/ml (용제는 클로로포름 : MeOH 95:5)] 스톱 용액을 나누어서 -30°C의 밀폐 용기에 보관해야 한다. 바람직한 96 웰 플레이트는 Dynatech U bottom Immulon 1 (제조사: Dynatech Labs, Cat # 011-010-3550)이다.
- [0301] 사용된 표준 차단 완충액은 PBS에 용해된 10% 소 혈청이었다. 1차 항체는 시험 샘플이었다. 2차 항체는 염소, 항-마우스 IgG-HRP였다. 전개 용액은 다음과 같았다: 0.2M Na₂PO₄ 10ml, 0.1M 시트르산 10ml, OPD 중 1개의 10mg 정제, 과산화수소 10 μ l. 정지 용액은 0.18 M H₂SO₄였다.

- [0302] 프로토콜은 다음과 같이 PS로 96-웰 플레이트를 코팅시킴을 수반했다: PS 스톱 용액을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 n-헥산으로 희석하고, 잘 혼합하였다. 50 μl 를 각 웰에 첨가하여, 1시간 동안 증발시켰다. 200 μl 의 10% 혈청 (차단 완충액으로서)을 각 웰에 첨가하여 덮고, 실온에서 2시간 동안 또는 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 유지하였다. 플레이트를 PBS로 3회 세척하였다. 1차 항체 (차단 완충액으로 희석됨)를 첨가했고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 배양시켰다. 플레이트를 PBS로 3회 세척하였다. 2차 항체 (일반적으로 염소, 항-마우스 IgG-HRP) 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 을 첨가했고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 배양시켰다. 플레이트를 PBS로 3회 세척하였다. ELISA는 각 웰에 전개 용액 100 μl 를 첨가하여 전개시켰고, 10분 동안 전개시킨 다음; 정지액 100 μl 를 각 플레이트에 첨가했고, O.D.를 490nm에서 판독하였다.
- [0303] 3G4 항체는 이전 항체와 비교하여 PS에 대한 상대적 친화성이 개선되었고, 3G4 항체는 PS, CL, PI (포스파티딜 이노시톨), PA (포스파티드산) 및 PG (포스파티딜글리세롤)에 결합한다는 것이 밝혀졌다. 종양에서 차별적으로 발현되는 PS를 표적으로 하는 모델을 따르면, 3G4 항체는 중성 인지질인 PC 및 SM과 반응하지 않았다.
- [0304] 3G4 항체는 표준 단백질 A 절차를 사용하여 배양된 하이브리도마의 상층액으로부터 겔보기 균질성(apparent homogeneity)을 갖도록 정제하였다. 간략하게, 생리학적 pH에서 3G4 항체를 함유하는 샘플을 단백질 A 컬럼에 적용시켰고, IgG가 고정화된 단백질 A에 결합하도록 천천히 통과시켰다. 컬럼을 세척 완충액으로 세척하여, 비-결합된 혈청 성분을 제거하였다. 3G4 항체를 산성 용출 완충액 (약 pH 2.8)을 사용하여 컬럼으로부터 용출시켰고, 용출된 항체를 함유하는 분획을 중화 또는 투석하여 생리학적 pH로 복귀시켰다. 혈청 부재하에 실시한 ELISA에서 PS에 대한 결합을 위한 이러한 고순도 3G4 항체를 시험함에 있어서, 여전히 3G4는 직접, 즉 혈청 또는 혈청 단백질없이 PS에 결합한 것으로 생각되었다.
- [0305] **실시예 II**
- [0306] **3G4 항체의 전-임상적 항-종양 효과**
- [0307] 이 실시예에서, 데이터는 동종 및 이종 종양 모델에서 3G4 항체의 일부 항-종양 효과를 보여주는 조기 전-임상 경험을 예시하기 위해 제공된다.
- [0308] **A. 동물 종양 연구 프로토콜**
- [0309] 3G4의 효과는 먼저 동종 및 이종 종양 모델에서 검사하였다. 동물 종양 치료 연구를 위한 일반적인 프로토콜은 다음과 같다.
- [0310] 동물은 찰스 리버 래보라토리즈 (Charles Rivers Laboratories)에서 입수했다. 마우스는 4-5주, 암컷, C.B-17 SCID 또는 Fox Chase SCID 마우스였다. 마우스는 멸균 취급하에, 고압 케이지, 멸균 식품 및 물에 넣어 두었다. 모든 절차는 층류 후드에서 수행되었다. 마우스를 1주일 동안 순응시킨 다음, 귀에 태그를 달고, 꼬리 정맥에서 혈액 샘플 (약 75-100 μl)을 취하여 ELISA에 의한 누출 여부를 확인했다. 누출 ELISA 검사에 실패한 어떠한 마우스도 시험 절차에 사용되지 않았다. 마우스는 종양 세포를 유방 지방 패드 (MFP)의 같은 자리(orthotopically)에 주사되거나, 또는 귀-태그 및 혈액 샘플 제거 후 2-3일차 우측 옆구리에 피하 주사하였다.
- [0311] 동소(orthotopic) 모델에서, 0.1ml DMEM중 1×10^7 세포는 일반적으로 마취시킨 마우스의 MFP에 주사했다. 마우스에 IP 주사한 마우스 각테일 0.075ml로 마취시켰다. 마우스 각테일은 5ml 케타민 (100mg/ml); 2.5ml 자일라진 (20mg/ml); 1ml 아세프로마진 (10mg/ml); 11ml 멸균수이다. 투약량은 30분 동안 IP 경로를 통해 체중 20-30 그램 당 0.1ml였다.
- [0312] 마우스가 마취되었다면, 발가락/발 핀치에 반응이 없는 것으로 측정되는 바와 같이, 마우스를 그의 왼쪽면으로 놓고, 머리 바로 뒤 및 오른쪽 팔뚝/뒤 영역 주위의 70% 에탄올로 닦았다. 오른쪽 팔뚝 (옆쪽 흉부) 바로 뒤에 2-3mm 절개를 하였고, 이는 피부판(skin flap)을 올렸을 때 희끄무레한 지방 패드가 나타난다. 0.1ml 세포를 1ml 주사기와 27 게이지 바늘을 사용하여 지방 패드에 주입하여 지방 패드에 수포를 만들었다. 절개는 9mm의 멸균된 상처 클립을 이용하여 봉합시켰다. 마우스는 그의 케이지로 보내 마취에서 깨어나고 움직일 때까지 관찰하였다. 수술 후 건강 상태를 측정하였고, 곤란한 어떠한 징후가 관찰되었다면, 식수중 아세트아미노펜 (0.24mg/ml) + 코데인 (0.024mg/ml)을 동물에 투여했다. 상처 클립은 1주 후에 제거하였다. 이 방법은 세포가 피하 영역이 아닌 선택된 부위에 정확하게 위치하도록 사용되었다. 종양은 14-15일에 부피가 약 200 μl (L \times W \times W)였고. 흡수율(take rate)은 실질적으로 100%였다.
- [0313] 피하 모델에서, 마우스는 전형적으로 0.2ml중 1×10^7 개의 세포를 주입하였다. 마우스는 마취되지 않았으나, 고정 그립을 사용하여 오른쪽 옆구리가 노출된 마우스 피부를 고정하였다. 23 게이지 바늘을 갖는 1ml 주사기가 마우

스 피부 아래에, 200 μ l 중 1×10^7 개 세포를 주입하는데 사용되었고, 물집이 보였다. 주사 부위에서 약간의 액체가 새는 것을 관찰하는 것은 드문 일이 아니었다. 이 누출을 줄이기 위해 바늘을 피하 주사에서 빼낼 때 비트는 동작이 사용되었다. 종양 부피는 $L \times W \times W$ 에 의해 측정되었다.

[0314] 관류 프로토콜에서, 마우스는 0.2ml 식염수 중 1000 U의 헤파린을 IV 주사했다. 그 다음, 마우스 IP에 0.1ml 마우스 칼데일을 주사하여 마우스를 진정시켰다. 발가락/발이 기운이 빠지면 반사 없으므로 측정할 때, 마우스가 충분히 진정되었다면, 흉강을 열어 심장과 폐를 노출시킨다. 튜브 및 관류 펌프에 부착된 30 게이지 바늘을 좌심실에 삽입하였다. 우심실은 혈액이 흘러 내릴 수 있도록 잘라 냈다. 식염수는 분당 1ml의 속도로 12분 동안 펌핑시켰다. 관류가 끝나면 바늘과 튜브를 제거하였다. 면역조직화학 또는 병리학의 추가 연구를 위해 조직을 제거했다.

[0315] 종양 성장률의 차이는 비파라미터 검사 (만-휘트니 순위합 검증, Mann-Whitney rank sum test)를 사용하여, 통계적 유의성에 대해 시험하였다.

[0316] **B. 종양 치료 결과**

[0317] 동종 모델의 경우, Meth A 마우스 섬유육종 종양 세포를, BALB/c 마우스와 함께 사용하였다. 이종 모델에서, 인간 MDA-MB-231 유방 종양 세포 또는 MDA-MB-435 세포를 SCID 마우스의 유방 지방 패드에 분주하였다. 다른 이종 모델에서, 거대 인간 호지킨 림프종 L540 이종 이식은, 세포를 주입하고 치료 전에 종양이 500 mm³의 크기로 성장할 수 있도록 함으로써 정립되었다. 종양-함유 마우스 (군 당 8-10마리의 동물)을 3G4 항체 100 μ g으로 IP 주사하였고, 대조군 항체 (BBG3이라 칭함, ATCC로부터 23.8.34.24; HB-10113으로 수득한 하이브리도마에 의해 분비되는, *Babesia bovis* 항원에 대한 마우스 IgG₃ κ 항체)와 반대로, 겔보기 균질성을 갖도록 정제하였다. 치료는 일주일에 3회 반복하였다. 종양 측정을 위해 동물을 일주일에 2회 또는 3회 모니터링했다.

[0318] 동종 및 이종 종양의 성장은 모두 3G4 항체 치료에 의해 효과적으로 억제되었다 ($P < 0.05$). 연구 종료시, 대조군 마우스와 대조적으로, 3G4-치료된 마우스에서 종양 성장의 평균 감소는 MDA-MB-435에서 65% (도 1a), MDA-MB-231에서 75% (도 1b), Meth A에서 90% (도 1c) 및 L540에서 50% (도 1d)였다. 이소 타입 매칭된 대조군 항체인 BBG3으로 치료한 대조군 마우스에서 종양 성장의 지체는 발생하지 않았다. 동종의 Meth A 종양 세포의 치료는 특히 성공적이었다. 괴사에 내성이 있는 것으로 알려진 큰 L540 종양이 있는 마우스에서도, 3G4 항체 치료는 대조군에 비해 종양 성장을 억제했다. 3G4 항체로 처리된 마우스에서는 독성은 관찰되지 않았다.

[0319] 요약하면, 3G4 항체는 따라서 종양 혈관 손상, 국부적 혈전증, 종양 괴사 및 종양 성장을 지연시켰으며, 독성의 증거는 없었다.

[0320] **실시예 III**

[0321] **키메라 3G4 항체, 바비투시마브의 생성**

[0322] 본 실시예는 6개의 상보성 결정 영역 (CDRs)을 함께 포함하는 3G4 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 전체 서열을 제공하고, 오늘날 바비투시마브라고 칭한 마우스-인간 키메라 3G4 항체 (ch3G4)를 포함하는, 3G4 항체의 키메라 버전의 생성을 기술한다.

[0323] **A. 3G4 항체 서열**

[0324] 3G4 항체 가변 영역의 원래 서열은, 검증된 서열 및 3G4 항체를 생성하는 하이브리도마로부터의 RACE에 의해 수득되었다. 3G4 항체의 중쇄 가변 영역 (Vh)의 핵산 및 아미노산 서열을 미국 특허 제7,572,448호의 도 18a에 제시되어 있다. 중쇄 가변 영역 서열은 Kabat에 의해 예측 가능한 위치에서 VH CDR1, VH CDR2 및 VH CDR3을 포함한다 (Kabat 외, 1991). 핵산 서열 내의 BstEII 부위는 기능적 마우스 가변 영역을 제조하기 위한 편리한 위치로서, 예를 들어, 인간 불변 영역 상에 그래프팅시키는 용도로 사용될 수 있다.

[0325] 실제로, 3G4-2BVH 서열은 Lonza pEE 벡터를 사용하여 BstEII 부위에서 인간 γ 1 불변 영역에 그래프팅되었다. 결과 생성물은 마우스 리더 서열을 함유하고, 그의 VH는 미국 특허 제7,572,448호의 도 18a에 도시된 방식으로 인간 CH1 서열에 결합된다.

[0326] 3G4 항체의 경쇄 가변 영역 (Vk)의 핵산 및 아미노산 서열이 미국 특허 제7,572,448호의 도 18b에 제시되어 있다. 경쇄 가변 영역 서열은 Kabat에 의해 예측 가능한 위치에서 VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3을 포함한다 (Kabat 외, 1991). 핵산 서열의 BbsI 부위는 기능적 마우스 가변 영역을 제조하기 위한 편리한 위치로서, 예를

들어, 인간 불변 영역 상으로의 그래프팅에 사용하기 위해 사용될 수 있다.

[0327] 실제로, 3G4-2BVL 서열은 Lonza pEE 벡터를 사용하여 BbsI 부위에서 인간 κ 불변 영역에 그래프팅되었다. 결과 생성물은 마우스 리더 서열을 함유하고, 그의 VL은 미국 특허 제7,572,448호의 도 18b에 도시된 방식으로 인간 CL1 서열 내로 결합된다.

[0328] **B. 마우스 키메라 항체, 2aG4의 생성**

[0329] 바로 아래에서 설명되는 바와 같이, 쥐 3G4 항체의 인간 키메라 (ch3G4)는 인간 IgG₁ 이소 타입 (hIgG₁)이다. ch3G4의 쥐 IgG 동족체는 마우스 IgG_{2a} 이소 타입 (mIgG_{2a})에 상응한다. 이 작제물을 만들어 시험하였고, 원래 마우스 IgG₃ 항체와 본질적으로 동일하게 거동하는 것으로 나타났다.

[0330] 간략하게, 3G4 경쇄 코딩 서열은 3G4 하이브리도마 세포주로부터 분리된 전체 RNA로부터 RT-PCR에 의해 증폭되었다. RT-PCR 프라이머는 증폭된 단편이 Lonza 발현 벡터 pEE12.4 벡터에 클로닝하기 위해 증폭 산물의 양 말단에 XmaI 및 EcoRI 제한 효소 부위를 포함하도록 설계되었다. 3G4 중쇄의 가변 영역은 3G4 하이브리도마 세포주로부터 분리된 전체 RNA로부터 RT-PCR에 의해 증폭되었다. 프라이머는 증폭된 단편이 Lonza 발현 벡터 pEE6.4 벡터에 클로닝하기 위해 증폭 산물의 양 말단에 HindIII 및 XmaI 제한 효소 부위를 포함하도록 설계되었다.

[0331] 쥐의 IgG2a 불변 영역을 플라스미드 벡터로부터 PCR로 증폭시켰다. PCR 프라이머는 pEE6.4 + 3G4VH 벡터로 클로닝하기 위한 증폭 산물의 양 말단에서 BstII 및 EcoRI 제한 효소 부위를 갖도록 설계되었다. BstEII 부위는 3G4 VH 가변 영역 서열 상류와 프레임에 맞게(in-frame)으로 설계되었다. 중쇄 및 경쇄 작제물은 SalI 및 NotI로 두 벡터를 절단함으로써 단일 이중 유전자 벡터 (12.4 3G4 IgG2a)로 결합시켰다. 중쇄 및 경쇄 코딩 영역을 시퀀싱에 의해 검증하였다.

[0332] 12.4 3G4 IgG2a 벡터를 전기천공법에 의해 NS0 세포에 형질감염시켰다. 형질감염 후, NS0 세포를 희석시켰고, 글루타민이 없는 배지에서 96- 웰 플레이트에 플레이팅하였다. 작제물로 형질감염된 유일한 세포 (긍정적인 선택을 위해 글루타민 합성 효소 유전자를 포함하는)는 글루타민 부재하에 성장할 수 있다. 형질감염체를 확인했고, 실시예 I의 표준 ELISA를 사용하여 항체 분비를 스크리닝하였고, 항체를 가장 많이 분비하는 형질감염체를 정제된 항체를 생성하기 위해 커다란 배지에서 성장시켰다.

[0333] 생성된 2aG4 항체는 겔보기 균질성을 갖도록 정제하였고, 본질적으로 3G4 항체와 동일한 친화성 및 결합 프로파일을 갖는 것으로 나타났다.

[0334] **C. 인간 키메라 항체, ch3G4 (바비톡시마브)의 생성**

[0335] 쥐 가변 영역 및 인간 불변 영역을 함유하는 키메라 작제물이 생성되었고 (ch3G4), 본래의 쥐 항체와 본질적으로 동일한 특성을 갖는 것으로 나타났다.

[0336] 쥐 3G4 항체는 인간-마우스 키메라 항체로 전환되었다. 쥐의 V_H를 클로닝시켰고, Lonza 2BVH 벡터의 BstEII 부위에서 인간 γ_1 불변 영역에 그래프팅시켰다. 쥐 V_K를 클로닝시켰고, Lonza 2BVL 벡터의 BbsI 부위에서 인간 K 불변 영역에 그래프팅시켰다. 서열을 확인하였다. 전체 작제물을 CHO (차이니스 햄스터 난소) 세포에서 발현시켰고, 항체를 정제하였다. 이것은 지금 바비톡시마브라고 불리는 항체이다.

[0337] 생성된 ch3G4 뿐만 아니라 쥐 3G4가, 실시예 I의 표준 ELISA를 사용하여 적어도 인지질-코팅된 ELISA 플레이트에 결합하였다. 인지질, PS, PA, CL, PI 및 PG의 패널에 대한 키메라 3G4의 시험관내 결합 프로파일은 3G4와 같은 것으로 나타났다. 무관한 특이성의 대조군 항체에서는 결합이 관찰되지 않았기 때문에 결합은 항원-특이적이었다. 생체내에서, ch3G4는 또한 광범위한 연구에서 종양 혈관 내피에 국재화되고, 항-종양 효과 및 항 바이러스 효과를 발휘하는 것으로 나타났다.

[0338] 그러나, 키메라 3G4 작제물이 무혈청 조건하에서 CHO 세포에서 발현되었고, 정제된 항체가 혈청 부재하에 ELISA에서 PS와의 결합에 대해 시험된 경우, PS에 대한 결합은 소실되었다.

[0339] **실시예 IV**

[0340] **β2GPI-의존적 방식의 3G4 항체 및 바비톡시마브 표적 PS**

[0341] 본 실시예는 원래의 하이브리도마 및 CHO 세포에서 발현된 키메라 항체로부터의 3G4 항체의 PS 결합 프로파일에서 명백한 불일치를 해소하기 위한 데이터를 제공한다. 이때, 본 실시예에서는 3G4 항체 및 PS 사이의 상호작용

이 혈장 단백질, β 2-당단백질 I (β 2GPI)에 따라 달라짐을 보여준다.

[0342] **A. 재료 및 방법**

[0343] **1. 재료**

[0344] 돌베코 개질 이글 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium) (DMEM) 및 트립신/EDTA는 Mediatech, Inc. (Herndon, VA)로부터 입수하였다. 소 태아 혈청 (FBS), 정상 인간 혈청, 정상 래트 혈청 및 정상 마우스 혈청은 Biomeda (Foster City, CA)로부터 입수하였다. 신선한 인간 혈청은 Carter Blood Care (Dallas, TX)에서 입수하였다. 무 혈청 하이브리도마 배지, Synthechol NS0 보충제, L- α -포스포티딜세린 (PS), 소 혈청 알부민 (BSA) 및 계란 흰자위로부터의 오발부민 (OVA)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)로부터 입수하였다. DEAE 셀룰로오스, 헤파린-세파로스 및 Hybond-P 막은 Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK)로부터 입수하였다. 1-팔미토일-2-하이드록시-*sn*-글리세로-3-포스포콜린 [리소포스포티딜콜린 (LPC)]은 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)로부터 입수하였다. 96-웰의 Immulon-1B 및 -2HB 미세역가 플레이트는 Thermo Lab Systems (Franklin, MA)로부터 입수하였다. Tris-HCl 구매 SDS-PAGE 겔 및 Opti-4CN Substrate 키트는 Biorad (Hercules, CA)로부터 입수하였다. 8-웰 유리 챔버 슬라이드는 BD Biosciences (Bedford, MA)로부터 입수하였다.

[0345] **2. 항체**

[0346] 음이온성 인지질 PS에 결합시키기 위해 생성된, 3G4 마우스 단클론 항체는 실시예 I에 기술된 항체이다. 3G4는 원래 하이브리도마 상층액에서 생성되었다 (실시예 I; 실시예 II). 3G4는 또한 마우스 IgG2a 이소 타입으로 전환시켰고 (실시예 III, B), NS0 마우스 골수종 세포주에서 생산되었다. NS0 세포는 10% FBS가 보충된 DMEM 또는 Synthechol NS0 보충제가 함유된 무 혈청 하이브리도마 배지에서 배양하였다. 3G4의 인간 키메라 버전 (ch3G4; 바비투시마브)이 생성되었고 (실시예 III, C), 항체는 무 혈청 조건 하에서 CHO 세포로부터 생산되었다.

[0347] 마우스 항-인간 β 2GPI (항- β 2GPI 또는 α - β 2GPI) mAb는 US Biological (Swampscott, MA)로부터 입수하였다. 콜히친-특이적 마우스 IgG2a mAb인, C44를 분비하는 하이브리도마는 American Type Culture Collection (Rockville, MD)으로부터 입수하였고, 3G4 및 항- β 2GPI의 대조군으로 사용되었다. 리투시마브 (인간 IgG1 키메라 mAb)는 ch3G4에 대한 대조군으로 사용되었다. 모든 2차 항체는 Jackson ImmunoResearch Labs (West Grove, PA)으로부터 입수하였다.

[0348] **3. 항체 단편의 제조**

[0349] 3G4 F(ab')₂는 프로테아제 펩신과의 배양에 의해 생성되었다. 3G4 Fab 및 대조군 Fab 7H11 (항-아테노바이러 스)은 프로테아제 파파인과 항은 처리함으로써 생성되었다. 모든 항체 절단 산물을 FPLC로 정제하였고, SDS-PAGE로 확인하였다.

[0350] **4. 인간 혈장으로부터 β 2GPI의 정제**

[0351] 본 실시예에서 사용하기 위한 인간 β 2GPI (h β 2GPI)는 본질적으로 이전에 기술된 바와 같이 인간 혈장으로부터 정제되었다 (Polz 외, 1980; Wurm 외, 1984). 간단히 말하면, 과염소산 (70%)을 1.57% (v/v)의 최종 농도로 풀링된 혈장에 첨가하였다. 침전물을 버렸고, 상층액은 포화 Na₂CO₃을 사용하여 pH를 7.5로 조정한 다음, 50 mM 트리스, pH 8.0에 대해 광범위하게 투석하였다. 이 물질을 50 mM Tris, pH 8.0으로 평형화된 DEAE 셀룰로스 컬럼에 가하여 오염물을 제거하였다. 그 다음에, DEAE 컬럼 통과액을 50 mM Tris, pH 8.0으로 평형화된 헤파린-세파로스 친화성 컬럼에 적용시켰고, 1.0 M NaCl을 사용하여 결합된 단백질을 용출시켰다. 마지막으로, β 2GPI 제제를 PBS에 대하여 투석하였고, 단백질 A/G에 의해 더 정제하여 오염된 IgG를 제거하였다. 최종 제제는 비-환원성 SDS/PAGE 및 Coomassie[®] 염색에서 볼 수 있듯이, 50 kDa에서 균일한 밴드를 포함하고 있었다.

[0352] **5. β 2GPI 및 β 2GPI 도메인의 작제 및 발현**

[0353] 순수한 재조합 전장 및 작제 형태의 β 2GPI를 생성하기 위해, 효모 서플 발현 벡터 pPIC6 α A (Invitrogen) 및 숙주 균주 Mut⁺X-33 (Invitrogen)을 사용하였다. 발현 벡터는 알코올 (메탄올) 산화 효소 유전자 (*AOX1*)의 5' 프로모터 및 3' 전사 종결 서열을 함유한다. 벡터는 또한 *AOX1* 프로모터의 하류 효모 α 교배 인자 신호 서열을 갖는데, 이에 외부 cDNA가 융합되어, 배양 배지로 이중 재조합 단백질을 분비될 수 있다. 피. 파스토리스(*P. pastoris*)에서의 발현은 포유류 세포에서와 유사한 글리코실화 및 디설파이드 결합 형성을 제공한다.

[0354] 발현 작제물을 생성하기 위해, 하기 5개의 발현 작제물이 문헌 (Lustre 외, 2006) 및 미국 특허 제8,956,616호에 기술된 바와 같이 인간 β 2GPI cDNA를 사용하여 제조되었다: 그의 동족 신호 펩타이드가 없는 β 2GPI cDNA의 전체 코딩 영역 (도메인 I-V); 도메인 I 결실 (도메인 II-V); 도메인 I 및 II 결실 (도메인 III-V); 도메인 I, II 및 III 결실 (도메인 IV-V); 및 단지 도메인 V 만 (도메인 I, II, III 및 IV는 결실됨). 일반적인 3'프라이머를 모든 단편의 PCR에 사용하였다.

[0355] PCR 증폭된 단편은, α 교배 인자 신호 서열로부터 바로 하류에 pPIC α A의 EcoRI 및 XbaI 제한 부위 사이에, 프레임에 맞게 삽입하였다. C-말단에 있는 c-myc 에피토프 또는 His 태그에 대한 재조합 단백질의 용해를 방지하기 위해, 각 단편의 말단에 정지 코돈을 도입하였다. 플라스미드 작제물은 100 μ g/ml 블라스티시딘의 존재하에 대장균에서 증식시켰고, 제한 분석 및 뉴클레오타이드 시퀀싱에 의해 입증하였다. 상기 5가지 작제물에 의해 발현된 재조합 단백질은 글리코실화 전에 각각 약 36, 29, 24, 16 및 9 kDa의 단백질을 암호화하였다.

[0356] 발현 클론의 형질전환 및 스크리닝을 위해, 재조합 플라스미드 작제물은 정제된 제한 효소 SacI로 선형화시켰고, 10 μ g은 스페로플라스트 방법 (Invitrogen)에 의해 숙주 균주 X-33을 형질전환시키기 위해 사용되었다. 이들 작제물 각각의 형질전환체는 4일 동안 400 μ g/ml 블라스티시딘을 함유하는 YPD (Yeast extract Peptone Dextrose Medium; 효모 추출 펩톤 텍스트로오스 배지) 상에서 선별되었다. 이들 각각의 작제물에 대한 여러 클론을 진정한 요소를 결정하기 위해 400 μ g/ml 블라스티시딘과 함께 YPD 플레이트에 재현했다. 그 다음에, 각 작제물의 10개의 클론은 최소 텍스트로스 (MD) 및 최소 메탄올 (MM) 플레이트에 스트리킹되었다. MD와 MM 플레이트 모두에서 똑같이 잘 성장하는 각 작제물의 5개 클론을 24시간, 48시간, 72시간, 96시간 및 120시간 동안 액체 MD와 MM 배지에서 성장시켰다. 각 시점에서 각각의 클론에 대한 상층액 및 펠렛을 항-인간 β 2GPI 다클론 항체를 사용하여 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 상층액에서 단백질의 최고 발현을 보인 클론을 대규모 조제에 다시 사용하였다.

[0357] 재조합 단백질의 대규모 정제를 위해, Invitrogen에서 권장하는 배양 조건을 사용하여 재조합 단백질을 생산했다. 각 클론의 시동기 배양물은 30 $^{\circ}$ C에서 밤새 격렬하게 진탕시키면서 완충된 최소 글리세롤-복합체 배지 (BMGY) 5ml에서 배양하였다. 세포를 수집하여 BMGY 25ml에 접종하기 위해 사용하였고, 2일 동안 성장시켰다. 그 다음에, 25ml 배양물로부터의 세포를 사용하여, 1 l의 완충된 최소 메탄올-복합체 (BMMY) 배지 (1.0% 메탄올)에 접종하였다. 격렬하게 진탕하면서 30 $^{\circ}$ C에서 4일간 배양을 계속하였고, 단백질 발현을 유지하기 위해 100% 메탄올을 24시간마다 (최종 농도 1.0%) 첨가하였다. 배양 배지를 원심 분리 (4000 \times g, 15 분)에 의해 정화시켰고, 상층액은 50 mM Tris 완충액에서 4 $^{\circ}$ C에서 2일 동안 투석한 후, 50 mM Tris 완충액으로 평형화한 DEAE-세파셀 컬럼에 적용시켰다. 통과액을 수집하여 헤파린-세파로스 컬럼에 적용시켰다. β 2GPI를 1 M NaCl로 헤파린-세파로스 컬럼으로부터 용출시키고, 50 mM 트리스 완충액에 대해 투석하였고, Amicon 농축기를 사용하여 농축시켜, 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 각 단백질의 N- 말단을 시퀀싱하여 α -인자 리더 서열의 절단을 확인하였다. 단백질 생산량은 10 mg/l (전장 β 2GPI)에서 25 mg/l (β 2GPI 도메인 V)까지 다양했다.

[0358] **6. "닉이 있는 (Nicked)" h β 2GPI의 제조**

[0359] 닉이 있는 h β 2GPI는 본 실시예에서 상기 기술된 바와 같이 인간 혈장으로부터 정제된 온전한 h β 2GPI로부터 제조하였다. h β 2GPI를 37 $^{\circ}$ C에서 17시간 동안 플라스민-코팅된 비드와 함께 배양하였다. 원심 분리에 의해 비드를 제거하고 절단된 단백질을 함유하는 상층액을 회수하였다. 정제된 산물의 웨스턴 블롯팅은, 닉이 있는 β 2GPI 제제가 플라스민이 없으며, 플라스민 자가 단백질분해 생성물을 함유하지 않는다는 것을 나타냈다 (항-플라스민 또는 항-안지오스타틴 항체와의 반응성 없음). N 말단 서열 분석에서, β 2GPI의 N 말단에 상응하는 2개의 N 말단 및 Lys317/Thr318 절단 부위에서 생성된 새로운 서열을 나타냈다.

[0360] **7. PS ELISAs**

[0361] 실시예 I의 표준 ELISA는 다음과 같이 변형하여 적용되었다. PS-코팅 Immunlon 1B 미세역가 플레이트를 1% OVA (w/v)에서 하룻밤 차단하였다. 다음날, 혈청 함유 또는 무-혈청 상층액으로부터 정제된 3G4의 연속 2배 희석액을 13.33 nM의 초기 농도로부터 제조하였다. 희석은 소, 인간, 래트 또는 마우스의 1% OVA 또는 10% 비-열 비활성화 혈청 중에서 수행하였다. 플레이트를 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양하였고, 3G4의 결합이 검출되었다. 모든 ELISA 연구는 최소 3회 수행되었다.

[0362] **8. 항-h β 2GPI ELISA**

[0363] 분석은 다음과 같은 변형을 통해 상기 기술된 바와 같이 수행되었다. h β 2GPI, 닉이 있는 h β 2GPI, 또는 재조합 h β 2GPI 펩타이드를 96-웰 Immunlon 2HB 미세역가 플레이트 상에서 10 μ g/ml의 농도로 밤새 코팅시켰다. 그 다음

에, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 1% OVA에서 차단시켰다. 3G4, ch3G4 또는 항-β2GPI를 1% OVA에서 13.33 nM의 초기 농도로 희석하였고, 연속 2배 희석물을 제조하였다. 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 배양하였고, 항체 결합을 검출하였다. 모든 ELISA 연구는 최소 3회 수행되었다.

[0364] 9. 웨스턴 블롯

[0365] 단백질 샘플을 비환원성 SDS 샘플 완충액에서 5분간 95°C로 가열하였다. 샘플을 Tris-HCl 4-15% 구배 SDS-PAGE 겔에 부하시켰고, Mini Protean II 장치 (Biorad)를 사용하여 분리했다. 분리된 단백질을 PVDF 막으로 옮기고, 3% BSA (w/v)에서 밤새 차단시켰다. 막에 3% BSA중 1μg/ml로 희석한 항-β2GPI, 3G4 또는 대조군 마우스 IgG로 프로브 처리하였고, 철저히 세척하여 퍼옥시다제 표지된 염소 항-마우스 IgG와 배양하였다. 막은 Opti-4CN 기체 키트를 사용하여 전개되었다.

[0366] 10. 내피 세포 상에 PS 노출의 유도 및 검출

[0367] 성숙한 소 대동맥 내피 (ABAE) 세포는, 10% FBS 및 2 mM L-글루타민을 보충한 DMEM 중에서 유지시켰다. ABAE 세포는 0.25% 트립신/0.02% EDTA로 짧게 노출시켜 반응용 배양물에서 제거하였고, 8-웰 챔버 슬라이드에 2×10⁴ 개 세포/웰로 분주하였다. 밤새 배양한 후, 세포를 PBS로 가볍게 세척했고, 200 μM 리소포스파티딜콜린 (LPC)으로 처리하여 PS 노출을 유도하였다. LPC 처리는 10% FBS 또는 10% 정상 마우스 혈청 (MS) 중 37°C에서 30분 동안 3G4, ch3G4 또는 대조군 IgG의 존재하에 수행되었다. LPC 처리가 10% MS에서 수행되는 경우, 3G4/ch3G4는 MS에서 PS를 결합할 수 없으므로 hβ2GPI가 보조 인자로서 첨가되었다 (본 실시예에서 하기 결과 참조).

[0368] PS 노출은 면역형광 염색법으로 측정하였다. 세포를 PBS로 철저히 세척하였고, 4% 파라포름알데히드 (w/v)에 고정시켰고, 비오틴-접합된 항-마우스 2차 항체와 배양하였다. 다음으로, 세포를 FITC-접합된 스트렙타비딘 (Jackson Immunoresearch)과 함께 배양하여, 항체 결합을 검출하였다. 그 후 세포를 PBS 중의 0.1% Triton-X100으로 투과가능하게 하고, Texas Red-접합된 팔로이딘 (Molecular Probes, Eugene, OR) 및 4',6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI; Molecular Probes)로 대조 염색하였다. Nikon 현미경에 장착된 Coolsnap 디지털 카메라 (Photometrics, Tucson, AZ)를 사용하여 이미지를 캡처했고, MetaVue 소프트웨어 (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA)로 처리했다.

[0369] 11. ABAE 세포에 대한 항체 결합의 정량화

[0370] 항체 결합 영역은 이미지에서 조명된 픽셀의 수를 정량화할 수 있는 MetaVue 이미지 분석 소프트웨어를 사용하여 결정되었다. 항체 결합을 정량화하기 위해 FITC 형광 이미지가 사용되었다. DAPI 형광의 상응하는 이미지는 현장에 존재하는 세포의 수에 대한 FITC 이미지를 정상화하는데 사용되었다. 작은 FITC/DAPI 비율은 작은 항체 결합 영역을 나타내는 반면, 큰 FITC/DAPI 비율은 큰 결합 영역을 나타낸다. FITC/DAPI 비율은 선택한 조건하에 항체 결합의 기본 양에 비해 항체 결합 영역의 증가 또는 감소를 결정하는데 사용되었다. 각 분석에 200× 배율로 5개의 이미지를 사용했다. 데이터는 표준 편차로 평균 상대 FITC/DAPI 비율로 분석된다.

[0371] B. 결과

[0372] 전반적으로, 다음의 데이터는 3G4 (및 바비투시마브) 항체 및 PS 사이의 상호작용이 혈장 단백질, β2GPI에 따라 달라지는 것을 보여준다. 3G4는 도메인 II에서 β2GPI와 결합하는 것으로 나타났는데, 이는 일반적으로 β2GPI 도메인 I을 인식하는 항-인지질 증후군 (APS) 환자로부터 분리된 병원성 항체에는 연결되지 않는다. 데이터는 2가 3G4/β2GPI 복합체가 PS-양성 세포를 포함하여 향상된 PS 결합을 위해 필요하다는 것을 보여주며, 이는 3G4 Fab' 단편이 이러한 활성을 갖지 않기 때문이다.

[0373] 1. 3G4는 PS-코팅 미세역가 플레이트에 결합하는 혈청 인자가 필요하다

[0374] 연속 희석이 10% FBS에서 수행될 때, 혈청 함유 배지 (SCM) 또는 무 혈청 배지 (SFM)로부터 정제된 3G4 항체는 PS-코팅된 미세역가 플레이트에 결합한다 (도 2a, 실선). 대조적으로, 연속 희석이 1% OVA (소 혈청 단백질이 없는)에서 수행될 때, SFM으로부터 정제된 3G4는 더 이상 PS에 결합하지 않는다 (도 2a, 점선, ■). 이 발견은 소 혈청에 존재하는 인자가 3G4와 PS 사이의 상호작용을 매개한다는 것을 나타낸다.

[0375] 흥미롭게도, 연속 희석이 1% OVA에서 수행될 때, SCM으로부터 정제된 3G4는 여전히 PS에 결합한다 (도 2a, 점선, ▲). 명확하게, 혈청 함유 배지의 혈청 단백질은 3G4와 PS 사이의 상호작용을 매개한다. 이것은 SCM에서 성장한 3G4가 정제되었지만, 정제된 항체에 존재할 수 있는 저농도의 혈청 단백질이 PS 결합을 지지하기에 여전히 충분하다는 것을 나타낸다.

[0376] 이러한 결과에 비추어, 아래에 기술된 연구는 SFM으로부터 정제된 3G4를 사용하여 수행되었다.

[0377] **2. 다른 종의 혈청에서 PS에 대한 3G4 결합**

[0378] 다른 포유류 종으로부터의 혈청이 3G4 항체와 PS 사이의 상호작용을 매개할 수 있는지를 결정하기 위해, 3G4의 연속 희석이 10% 마우스, 래트, 인간 또는 다른 혈청에서 수행되었다. 3G4 항체는 소 혈청의 존재하에서와 유사하게, 래트 및 인간 혈청의 존재하에서 PS에 결합하였다 (도 2b). 그러나, 3G4는 마우스 혈청 존재하에서 PS에 결합하지 않았다 (도 2b). 관련 연구에서, 3G4는 햄스터, 흰 족제비, 기니아 피그, 토끼 및 원숭이 혈청 존재하에서 PS에 결합했다. 따라서, 3G4에 의해 인식되는 혈청 단백질 에피토프는 마우스를 제외하고 시험된 모든 포유류 종에서 보존된다.

[0379] **3. 3G4는 혈청 당단백질, β 2GPI를 결합한다**

[0380] 1990년대 초, 많은 소위 항-인지질 (aPL) 항체가 인지질을 직접 인식하지 못하고, 대신에 인지질에 또한 친화성을 갖는 혈청 단백질에 결합한다는 사실이 밝혀졌다 (Galli 외, 1990; McNeil 외, 1990). 따라서, 음이온성 인지질과 상호작용하는 것으로 알려진 인간 혈청 단백질의 패널을 3G4 항체와의 반응성에 대해 스크리닝하였다.

[0381] 예를 들어, 인간 β 2GPI (h β 2GPI)를 미세역가 플레이트 상에 코팅하였고, 마우스 항-인간 β 2GPI 항체 (항- β 2GPI), 3G4 항체 또는 무관한 특이성의 대조군 마우스 IgG2a (대조군 mIgG)와 함께 배양하였다. 예상대로, 항- β 2GPI는 h β 2GPI에 결합하고, 대조군 mIgG는 결합하지 않았다 (도 3). 3G4 항체는 또한 h β 2GPI 코팅된 플레이트에 강하게 결합하였다 (도 3).

[0382] β 2GPI가 3G4 항체에 의해 인식되는 유일한 혈청 단백질인지를 결정하기 위해, 정제된 h β 2GPI 및 10% 인간 혈청을 SDS-PAGE 겔에서 수행하였고, 면역블롯을 위한 막 지지체로 옮겼다. 3G4는 인간 혈청에서 50 kDa의 정제된 h β 2GPI 및 유사한 크기의 단일 밴드를 검출했다. 중요하게, 3G4 면역블롯은 항- β 2GPI 항체를 사용하여 생성된 얼룩과 사실상 동일하였다. 대조군 mIgG 항체는 어떠한 단백질도 검출하지 못했다.

[0383] 음이온성 인지질과 상호작용하는 것으로 알려진 기타 인간 혈청 단백질을 ELISA에서 3G4 항체와의 반응성 결핍을 확인하기 위해 시험하였다. 동량의 특정 단백질을 미세역가 플레이트에 코팅하였고, 1% OVA로 차단하였고, 3G4 항체의 연속 희석 배양액과 배양하였다. 플레이트를 철저히 세척하였고, 항체 결합을 퍼옥시다제-표지된 2차 검출 항체로 검출하였다. 모든 연구에는 양성 및 음성 대조군 항체가 포함되었고, 이는 예상대로 수행되었다. 면역블롯 및 ELISA 연구의 결과는 다음과 같다: 양성, β 2GPI; 아벡신 V, 인자 XII, 키니노젠 (저분자량 또는 고분자량), 산화 LDL, 단백질 C, 단백질 S, 프로트롬빈 및 조직 플라스미노겐 활성제 (tPA). 함께, 이러한 데이터는 3G4 항체가 혈청 단백질, β 2GPI를 결합함을 나타낸다.

[0384] **4. 3G4가 도메인 II에서 β 2GPI를 결합한다**

[0385] β 2GPI는 5개의 도메인을 가지며, 그 중 제 5 도메인은 PS와 같은 음이온성 인지질에 대한 결합을 담당한다. β 2GPI의 어느 도메인이 3G4 항체에 의해 인식되는 지를 결정하기 위해, 상이한 도메인 구조로 재조합 인간 β 2GPI 작제물을 생성하였고, 재조합 전장 h β 2GPI와 함께 시험하였다. 이들 도메인 작제물은 N-말단으로부터 연속 절단에 의해 만들어졌으며, 따라서 다음과 같이 N-말단 도메인 각각이 결여되어 있다: 재조합 전장 h β 2GPI는 도메인 I-V를 포함하고; 도메인 I이 결실된 h β 2GPI는 도메인 II-V를 함유하며; 도메인 I 및 II가 결실된 h β 2GPI는 도메인 III-V를 함유하고; 도메인 I, II 및 III이 결실된 h β 2GPI는 도메인 IV-V를 함유하며; 도메인 I, II, III 및 IV가 결실된 h β 2GPI는 도메인 V만을 함유한다.

[0386] 동일한 양의 전장 h β 2GPI 및 상기 h β 2GPI 도메인 작제물 각각을 미세역가 플레이트 상에 코팅하였고, 3G4 항체의 연속 희석물과 배양하였다. 이 연구는 β 2GPI의 도메인 II를 함유하는 h β 2GPI 작제물 만이 (도메인 I-V 및 도메인 II-V) 3G4에 의해 검출되었음을 보여 주었다 (도 4). 도메인 I이 결실되었을 때, 3G4는 도메인 II-V에 동등하게 잘 결합되었다 (도 4). 따라서, 3G4 항체는 도메인 II에서 β 2GPI에 결합된다.

[0387] 3G4 항체가 도메인 II에서 β 2GPI에 결합한다는 발견은 APS 환자로부터 분리된 병원성 항체에 대해 알려진 정보에 비추어 중요하다. APS 환자에서 분리된 병원성 항- β 2GPI 항체는 일반적으로 β 2GPI의 도메인 I을 인식한다 (de Laat 외, 2005). 도메인 II를 인식하는 APS 환자의 항- β 2GPI 항체는 병원성이 종종 없다. 이것은 본원에 기술된 것과 같은, 다양한 동물 모델에서 및 광범위한 임상 경험에서 수행된 독물학 연구에 따른 3G4와 관련된 독성의 결핍을 설명하는 것일 수 있다.

[0388] **5. PS가 노출된 세포에 대한 3G4 및 β 2GPI의 공동-결합**

- [0389] 보다 생리학적인 조건에서 위의 결과를 확인하기 위해, 살아있는 세포 결합 분석법이 개발되었다. 이 분석은 PS 노출을 유도하기 위해 막 파괴제, 리소포스파티딜콜린 (LPC)으로 처리한 후, 세포막 표면에 대한 항체 결합을 검출하고 측정한다.
- [0390] 이 분석에서, ABAE 세포는 30분 동안 200 μ M LPC의 존재 또는 부재하에 DMEM + 10% FBS 중 3G4 항체 또는 대조군 mIgG와 함께 배양하였다. 이어서, 세포를 세척, 고정 및 형광 마커로 염색하여 항체가 세포 표면에 결합하는 것을 시각화하였다. 3G4 또는 mIgG 결합의 픽셀 영역은 Meta Vue 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다. 모든 값은 비-LPC 처리된 세포에 대한 3G4의 결합에 관한 것이었고, 이는 1로 설정되었다.
- [0391] 3G4 항체를 정상 조건하에서 ABAE 세포 배양 배지에 첨가하였을 때, 세포에 대한 결합은 관찰되지 않았다. 그러나, ABAE 세포가 LPC의 존재하에 3G4와 함께 배양될 때, 3G4 항체 결합의 수많은 핀 포인트가 쉽게 검출 가능하다. LPC는 막 비대칭 및 PS 노출의 손실을 유발할 수 있는 일시적인 막 왜곡을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Kogure 외, 2003).
- [0392] 정량화는 3G4 항체 결합 영역이 LPC- 처리시 500배 이상 증가하지만, 대조군 mIgG의 결합은 검출되지 않는 것으로 나타났다. 유사한 결과가, 3G4 및 PS-결합 분자 아빅신 V가 H₂O₂에 의한 PS 노출 후 내피 세포에 결합되는 것으로 나타난 경우, 이전에 얻어졌다 (RAN 외, 2005; 미국 특허 제8,486,391호). LPC로 처리한 ABAE 세포는 막 불투과성 염료인 프로피디움 요오다이드 또는 DAPI에 의해 염색되지 않았으며, 이는 3G4이 세포 표면 상의 PS에 결합하나, 원형질막의 내부 리플릿에서는 그렇지 않다는 것을 나타낸다.
- [0393] β 2GPI가 노출된 PS를 가진 세포에 대한 3G4 항체의 결합에 필요하다는 것을 확인하기 위해, 살아있는 세포 결합 분석은 10% FBS보다는 10% 마우스 혈청을 함유하는 배지에서 수행되어, 소 β 2GPI로부터의 간섭을 방지하였다. 상기에서 입증된 바와 같이, 3G4 항체는 마우스 혈청 존재 하에서 PS에 결합하지 않는다. 또한, 3G4 항체는 면역블롯에서 10% 마우스 혈청에서 어떠한 단백질도 검출하지 못하여, 3G4가 쥐 β 2GPI를 인식하지 못함을 나타낸다.
- [0394] 이 연구에서, 인간 키메라 3G4 항체 (ch3G4)는 마우스 혈청에 존재하는 쥐 IgG 검출에 의해 야기된 백그라운드 (background)를 방지하기 위해 사용되었다. ABAE 세포를 10% 마우스 혈청 및 LPC의 존재하에 ch3G4와 함께 배양하였을 때, 항체 결합은 검출되지 않았다 (도 5). 대조적으로, 결합 반응에 대한 정제된 h β 2GPI의 첨가는 ch3G4의 광범위한 결합을 지지하였으며 (도 5), 이는 ch3G4 항체 결합이 h β 2GPI에 따라 달라지는 것을 입증하는 것이다. 모든 상황에서, ch3G4 결합은 LPC 처리에 달려있었고, 무관한 특이성의 대조군 인간 IgG를 사용하여 결합이 검출되지 않았다.
- [0395] 흥미롭게도, ABAE 세포를 10% 마우스 혈청 및 LPC의 존재하에 h β 2GPI와 함께 배양하였고, 철저히 세척한 다음, h β 2GPI의 결합을 검출하기 위해 ch3G4 항체와 함께 배양할 때, 매우 적은 ch3G4 결합이 검출되었다 (도 5). 이 발견은 h β 2GPI가 ch3G4 항체의 부재하에 노출된 PS를 갖는 세포와 결합하지 않음을 제시하고 있고, β 2GPI는 생리학적 조건하에 PS 막 표면에 대해 낮은 친화성을 갖는다는 보고와 일치한다 (Willems 외, 1996; Bevers 외, 2004; Bevers 외, 2005). 함께, 이들 데이터는 ch3G4 항체 및 h β 2GPI가 동시에 노출된 PS를 갖는 ABAE 세포를 결합하기 위해 존재해야 함을 나타내는 것으로, ch3G4 항체가 PS에 대한 β 2GPI의 친화성을 향상시킴을 제시하는 것이다.
- [0396] **6. β 2GPI의 지질 결합 영역은 3G4의 공동 결합에 필요하다**
- [0397] β 2GPI의 지질 결합 영역이 노출된 PS를 갖는 세포에 대한 β 2GPI 및 3G4와 ch3G4 항체의 동시 결합을 위해 필요한 지를 확인하기 위해, "닉이 있는" h β 2GPI를 사용하여 살아있는 세포 결합 분석을 수행하였다. 닉이 있는 h β 2GPI는 도메인 V의 지질 결합 영역 내에서 플라스민-매개 절단으로 인해 PS에 결합될 수 없다 (Hunt 외, 1993; Hunt & Krilis, 1994).
- [0398] ABAE 세포를 LPC의 부재하에 ch3G4 항체 및 h β 2GPI 또는 닉이 있는 h β 2GPI와 함께 배양하는 경우, ch3G4 결합은 검출되지 않았다 (도 6a). LPC의 존재하에, h β 2GPI는 노출된 PS를 갖는 ABAE 세포에 대한 ch3G4의 결합을 매개할 수 있지만, 닉이 있는 h β 2GPI는 결합을 매개할 수 없다 (도 6a). 살아있는 세포 분석에서 결합의 결핍은 닉이 있는 h β 2GPI에 결합하는 ch3G4 항체의 무능력 때문은 아니며, 이는 ch3G4가 동량의 단백질이 미세역가 플레이트 상에 코팅될 때, h β 2GPI 뿐만 아니라 닉이 있는 h β 2GPI에도 결합하기 때문이다 (도 6b). 이들 발견은, ch3G4/h β 2GPI 복합체가 h β 2GPI 도메인 V의 지질 결합 영역을 통해 ABAE 세포 상에 노출된 PS를 검출한다는 것을 입증하는 것이다.

[0399] **7. 항체 2가성(Divalency)은 β 2GPI의 공동 결합을 위해 필요하다**

[0400] 상기 제시된 데이터는, 3G4 항체가 음이온성 인지질에 대한 β 2GPI의 결합력을 강화시킴으로써 PS를 검출함을 암시한다. 노출된 PS를 갖는 세포에 대한 3G4/ β 2GPI 결합을 위해 2가성이 필요한지 여부를 결정하기 위해, 3G4 F(ab')₂ 및 3G4 Fab' 단량체를 생성하였고, 이를 온전한 3G4 항체에 의한 살아있는 세포 결합 분석에 사용되었다. 예상대로, 온전한 3G4 항체는 LPC 처리된 ABAE 세포에 결합하였지만, 비처리 세포에는 결합하지 않았다. 동등한 농도의 3G4F (ab')₂도 또한 LPC-처리된 ABAE 세포에 결합하였지만 (도 7a), 3G4 Fab'의 결합은 무시할 만하다 (도 7a). 3G4에 대한 3G4F(ab')₂의 결합의 명백한 감소가 검출되었고, 3G4F (ab') II 상에 결합된 Fc 에피토프에 대한 다클론 2차 항체의 결합이 소실되었기 때문인 것으로 보인다. 미세역가 플레이트 상에 코팅된 β 2GPI를 결합시키는데 필요한 농도보다 1,000배 높은 2 μ M의 농도에서도 ABAE 세포에서 3G4 Fab'의 결합은 검출되지 않았다.

[0401] 더욱이, 3G4 Fab'는 농도-의존적 방식으로 LPC-처리된 ABAE 세포에 대한 ch3G4/ β 2GPI 결합을 억제하였지만 (도 7b), 무관한 특이성의 대조군 Fab'는 그렇지 않았다. ch3G4 결합을 억제하는 3G4 Fab'의 능력은, 3G4 Fab'가 β 2GPI를 결합할 수 있고, 단량체성 3G4 Fab'/ β 2GPI 복합체는 노출된 PS를 갖는 세포를 결합할 수 없음을 확인시킨다. 이들 데이터는 세포 표면에 노출된 PS에 결합하기 위해 2가 3G4/ β 2GPI 복합체가 필요함을 보여주고 있다.

[0402] 요약하면, 도 4에 제시된 바와 같이 3G4 항체는 도메인 II에서 β 2GPI에 결합하고, 도 6a 및 도 6b에 제시된 바와 같이 β 2GPI 도메인 V의 지질 결합 영역은 세포에 노출된 PS에 3G4 (및 ch3G4) 및 β 2GPI의 공동-결합에 필요하다. 또한, 도 7a 및 도 7b에 나타낸 바와 같이, 노출된 PS에 대한 3G4 (및 ch3G4) 및 β 2GPI의 공동-결합에는 2가 항체가 필요하다. 따라서, 막 외부 표면에 노출된 PS에 대한 항체 및 β 2GPI 공동 결합의 모델이 제시되며, 이는 활성화된 내피 세포, 중앙 혈관 내피 세포 및 중앙 세포뿐만 아니라 바이러스 감염 세포에서 발생한다 (도 8).

[0403] **실시예 V**

[0404] **바비특시마브 및 β 2GPI 사이 상호작용의 전-임상 모델링**

[0405] 본 실시예는 항체의 바비특시마브 그룹, β 2GPI 및 PS 간의 상호작용에 관한 전-임상 데이터를 제공한다. 전반적으로, 데이터는 인간 집단의 전형적인 양보다 훨씬 미미인 비교적 낮은 수준의 β 2GPI로도, PS에 대한 바비특시마브의 효과적인 결합에 충분하다는 것을 보여준다.

[0406] **A. 낮은 β 2GPI는 마우스에서 항-종양 효과를 지원하다**

[0407] 쥐 3G4 항체의 초기 발달에서, 항체는 표준 단백질 A 절차를 사용하여 배양된 하이브리도마의 상층액으로부터 겔보기 균질성을 갖도록 정제되었다 (실시예 I). 마우스의 초기 연구에서, 이 정제된 항체는 몇몇 모델에서 항-종양 효과를 발휘하는 것으로 나타났다 (실시예 II).

[0408] 3G4 항체가 PS 결합을 하기 위해 β 2GPI가 필요하고 (실시예 IV), 마우스를 제외한 모든 종의 β 2GPI가 PS 결합을 지지하는 것으로 결정된 후 (도 2b), 실시예 II의 항-종양 효과는 3G4 항체의 효능을 과소평가한 것으로 추정하였다. 즉, 도 1a, 도 1b, 도 1c 및 도 1d의 3G4 항체의 항-종양 효과는, 단백질 A 컬럼을 통해 3G4 항체와 함께 정제될 수 있는 단지 낮은 수준의 소 β 2GPI에 의해서만이 지지된다. 기본적으로, 전달된 단백질의 대부분은 순수한 3G4 항체였지만, [하이브리도마 세포를 배양하기 위해 사용된 10% 소 태아 혈청 (FBS)에서 유래하는] 낮은 수준의 소 β 2GPI가 마우스에 공동-투여되었다. 따라서, 이들 초기 데이터는, 3G4 항체가 *생체내에서* 종양 성장을 억제하는데 높은 수준의 β 2GPI가 필요하지 않음을 시사한다.

[0409] 3G4 항체는 IgG에 대한 친화성에 기초하여 항체를 정제하는 단백질 A 컬럼을 사용하여 겔보기 균질성을 갖도록 정제하였다. 배양 배지로부터의 β 2GPI가 정제 과정에서 3G4 항체와 분리되는 또 다른 이유가 있다. 첫번째, 3G4 항체에 대한 β 2GPI의 친화성이 낮고 (그리고 단백질 A와 3G4 사이의 친화성보다 작아서), β 2GPI는 부하 및 세척 동안 3G4로부터 분리될 것이다. 두번째, (단백질 A로부터 3G4 항체를 분리하기 위한) 낮은 pH 용출 단계는 3G4에 결합된 β 2GPI를 제거할 것이다. 또한, 주요 항체 피크에서 용출된 단백질을 수집할 때, 더 작은 β 2GPI 단백질은 수집되지 않았을 것이다. 그럼에도 불구하고, 도 9a 및 도 9b에 제시된 바와 같이, 마우스에 전달된 겔보기 순수한 3G4 항체의 10-20%가 실제로 3G4- β 2GPI 복합체 형태인 가상 위치를 취한다고 하더라도, 이러한 소 β 2GPI 수준은 항체와 비교하여 여전히 절대적으로 매우 낮다.

[0410] 보다 상세하게는, 3G4 항체는 10% FBS에서 하이브리도마 세포로부터 생산되었다. 1 리터 부피는 일반적으로 10mg/l의 3G4 항체를 생성한다. FBS가 소 β2GPI 200μg/ml (인간 혈청 내 인간 β2GPI 수준과 유사)를 포함한다고 가정하면, 10% FBS에는 소 β2GPI 20μg/ml가 포함된다. 수집시, 1 리터의 하이브리도마 세포 상층액은 10mg의 3G4 항체 및 최대 20mg의 소 β2GPI (20μg/ml×1,000 = 20mg)를 함유할 것이다. 단백질 A로 정제할 때, 생성된 물질은 10mg의 단백질을 함유할 것이다. 80-90%의 3G4 순도를 가정하면, 나머지 10-20%는 하나의 항체가 두 개의 β2GPI에 부착된 (3G4-2×β2GPI), 3G4:β2GPI "복합체"이다.

[0411] 마우스에 이러한 단백질 100μg을 투여하였다. 순도 90%에서, 100μg의 투여 단백질중 90μg은 순수한 3G4이고, 10μg은 3G4-2×β2GPI 복합체이다. 항체의 분자량 (MW)은 145 kD, β2GPI의 분자량은 50 kD (실시에 IV, A4,B3; McNeil 외, 1990; Lustre 외, 2006)이며, 복합체중 각 항체에 대해 2개의 β2GPI를 갖는 경우, 중량비는 대략 3:2 (정확히 59.2%의 항체와 40.8%의 항체)이다. 따라서, 10μg의 복합체 중 약 6μg은 3G4이고, 4μg은 β2GPI (정확히 5.92μg은 3G4이고, 4.08μg은 β2GPI)이다.

[0412] 마우스 혈액의 부피는 2ml이다. 순수한 3G4 항체는 마우스 당 90μg, 또는 45μg/ml로 존재하다. 약 3:2의 비율로, 마우스 당 복합체 10μg에는 약 6μg의 3G4와 약 4μg의 β2GPI (3μg/ml 3G4 및 2μg/ml β2GPI)가 함유되어 있다. 항체 결합이 가능한 β2GPI 2μg/ml에서, 이것은 인간 혈청에서의 평균 β2GPI 수준의 약 1%이지만, 항-종양 활성을 지지한다 (도 1a, 도 1b, 도 1c 및 도 1d).

[0413] 마우스에서 β2GPI 2μg/ml는 0.04 μM에 해당한다. 3G4에 관해서는, 투여된 3G4-2xβ2GPI 복합체로부터 3μg/ml의 3G4를 45μg/ml의 순수한 3G4에 첨가하면, 48μg/ml의 3G4 항체가 존재한다. 이것은 0.33 μM의 항체에 해당한다. 90% 순도의 출발점에서 β2GPI가 0.04 μM이고 3G4 항체가 0.33 μM 인 경우, 이는 0.12의 β2GPI 대 항체의 몰비이다 (도 9a). 80% 순도의 출발점에서도, 같은 계산에서 β2GPI의 생체내 농도는 4μg/ml (0.08 μM)이고, β2GPI의 생체내 항체 농도는 46μg/ml (0.32 μM)임을 보여준다. 이는 여전히 단지 0.25의 β2GPI 대 항체의 몰비이다 (도 9b). 항체 제제의 민감한 웨스턴 블롯팅 (이후 겔상의 β2GPI 밴드를 확인할 수 있음)을 포함한 후속 연구는 3G4 항체가 항상 적어도 80-90% 순수하다는 것을 확인했다. 따라서 0.12와 0.25 사이의 β2GPI 대 항체의 이러한 몰비 계산은 3G4 항체를 사용하는 초기 마우스 데이터가 높은 수준의 β2GPI가 항-종양 활성에 필요하지 않다는 것을 보여주는 원래의 설명에 대해 양적인 관점을 추가하다.

[0414] **B. 낮은 β2GPI는 세포 결합을 지원한다**

[0415] 3G4-β2GPI 복합체가 세포에서 PS와 결합하는데 필요한 β2GPI 수준을 분석 한 첫 번째 연구에서, ABAE 세포를 LPC로 처리하여 PS 노출을 유도한 (실시에 IV) 다음, 40 nM의 정제된 인간 β2GPI 및 변화하는 농도의 ch3G4 항체 (바비투시마브)를 배양하였다. 그것은 상대적인 ch3G4 결합이 농도 의존적 방식으로 320 pM로부터 80 nM ch3G4의 겔보기 피크로 증가되었고, 이는 항체 대 β2GPI 비율이 2:1인 것으로 확인되었다 (도 10). 표 1 (항체 MW, 145 kD; 인간 β2GPI MW, 50 kD)에 제시된 바와 같이, 이 연구에서 겔보기 피크 결합은 β2GPI 대 항체의 몰비 0.5에 해당한다.

[0416] [표 1]

[0417] 세포 결합에서 바비투시마브 및 β2GPI

ch3G4 (nM)	ch3G4 (μM)	ch3G4 (μg/ml)	β2GPI (μg/ml)	β2GPI (μM)	β2GPI (nM)	Ab에 대한 β2GPI의 몰비
0.32	3.2 x 10 ⁻⁴	0.0464	2	0.04	40	125
1.25	1.25 x 10 ⁻³	0.1812	2	0.04	40	32
5	5 x 10 ⁻³	0.725	2	0.04	40	8
20	0.02	2.9	2	0.04	40	2
80	0.08	11.6	2	0.04	40	0.5
320	0.32	46.4	2	0.04	40	0.125
1280	1.28	185.6	2	0.04	40	0.03125
5120	5.12	742.4	2	0.04	40	0.0078125

[0418]

[0419] ch3G4의 농도 및 PS가 노출된 세포에 대한 결합 사이의 종형(bell-shaped) 관계 (도 10)는 막 표면에 2가 ch3G4-2×β2GPI 복합체의 형성을 추가로 지원하며, 1가 ch3G4-β2GPI 복합체가 매우 높은 항체 농도에서 형성됨을 제안하고 있다. 이러한 농도에서, 1가 (비-결합)와 2가 (결합) 복합체 사이의 경쟁은 세포에 결합된 ch3G4-2×β2GPI 복합체의 양을 감소시키는 것으로 여겨진다 ("후크 효과(hook effect)"라고도 함).

[0420] 본 연구에 최대 상대적 결합은 80 nM의 항체 농도에서 발생하며, 이는 단지 0.5의 β2GPI 대 항체 비율이다 (도

10; 표 1). 이것은 도 8에 도시된 바와 같이 예측된 2가 상호작용보다 낮은 비율이지만, 일반적으로 하이브리도마로부터 정제된 3G4 항체로 마우스를 치료한 경우에 대해 상기 보고된 비율과 일반적으로 일치한다. 그러나 이 연구에서 세포에 PS의 정확한 밀도가 알려져 있지 않다. 더욱 중요한 것은, 시험된 ch3G4 농도에서, 포화된 결합 (정체기)는 관찰되지 않았고, 20과 80 nM 사이 및 80과 320 nM 사이의 ch3G4 농도에서 추가 시험은 유의한 것이었을 것이다. 그럼에도 불구하고, 심지어 중간 시험없이, 최적의 항체 결합은 0.125, 0.5 내지 2의 β2GPI 대 항체 몰비로 발생한다는 결론을 내릴 수 있다. 이들 시험관내 수치는 하이브리도마-정제된 3G4 항체를 사용하여 생체내 치료에 대해 상기 보고된 것들과 잘 일치하고, 이때 β2GPI 대 항체의 몰비는 항체의 순도에 따라, 0.12 내지 0.25였다. 따라서, 이러한 첫 시험관내 연구도 또한 낮은 수준의 β2GPI가 PS 노출된 세포에 대한 바비투시마브 결합을 효과적으로 지원함을 보여주는 것이다.

[0421] C. 낮은 β2GPI는 PS 결합을 지원한다

[0422] 후속 연구에서, PS에 대한 2aG4 항체의 결합 (실시예 III)을 다양한 농도의 인간 β2GPI의 존재하에 ELISA에서 시험하였다.

[0423] 고정된 양의 2aG4 항체 및 증가량의 인간 β2GPI를 함유한 용액을 제조하였다. 간단히, 62.5ng/ml (0.4nM)의 2aG4를 오발부민에서 0.0032, 0.016, 0.08, 0.4, 2, 10 또는 50 nM의 인간 β2GPI에 첨가하였다. 상이한 2aG4-β2GPI 혼합물을 미세역가 플레이트에 첨가했고, 분자는 37°C에서 1-2시간 동안 결합시켰다. 비결합 분자는 PBS로 세척하여 제거하였다. 2차 항체는 결합 완충액중 HRP-접합된 항-인간 IgG였다. PBS로 5회 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거하기 전에, 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 방치시켰다. TMB 기재를 각 웰에 100μl의 부피로 첨가했고, 실온에서 15분 동안 방치하여 비색 반응을 일으켰다. 반응은 2M의 H₂SO₄ 100μl를 첨가하여 정지시켰다. 정지 용액을 첨가한 후 30분 이내에 450nm의 파장에서 플레이트 분광기로 흡광도 (광학 밀도, OD)를 판독했고, 이를 SoftMax Pro 소프트웨어를 사용하여 분석하였다 (시험 샘플의 평균 OD에서 β2GPI가 없는 대조군의 평균 OD를 뺀 값을 포함).

[0424] 본 연구는, PS에 대한 2aG4 항체 결합이 β2GPI 대 항체의 몰비 약 1에서 정체되기 시작했고, 이때 두 분자는 약 0.4 nM로 존재하는 것으로 나타났다 (도 11). 보다 정확하게, 표 2 (항체 MW, 145 kDa; 인간 β2GPI MW, 50 kD)에 제시된 바와 같이, β2GPI 대 항체의 몰비 0.93이 PS로 코팅된 플레이트에 대한 항체 결합을 지원하는데 효과적이다.

[0425] [표 2]

PS 결합 내의 항체 및 β2GPI

2aG4 (ng/ml)	2aG4 nM	β2GPI nM	β2GPI 대 Ab 몰비
0	0	50	--
62.5	0.43	0	--
62.5	0.43	0.0032	7.42 × 10 ⁻³
62.5	0.43	0.016	0.037
62.5	0.43	0.08	0.186
62.5	0.43	0.4	0.93
62.5	0.43	2	4.65
62.5	0.43	10	23.26
62.5	0.43	50	116.28

[0426]

[0427] 상기 첫 번째 시험관내 연구에서 관측을 연장해 보면, 본 연구는 PS에 대한 항체 결합이 이미 낮은 β2GPI 대 항체 몰비에서 포화에 도달했고, 그 후 정체기에 도달됨 (50 nM의 β2GPI에서 PS의 작은 손실이 관찰되었고 (도 11), 이는 ELISA 분석 포맷에서 흔히 검출되는 통상적인 포화 효과에 관련되는 것 같다)을 나타냈다. 본 연구에서, β2GPI 대 항체의 유효 몰비는 약 1 (0.93)이었다. β2GPI 대 항체의 비를 5 이상으로 증가시켜도 결합 개선은 초래하지 않았다 (도 11, 표 2).

[0428] 오발부민 중 다양한 농도의 인간 β2GPI의 존재하에, ELISA에서 PS에 대한 바비투시마브의 결합을 시험하는 일련의 관련 연구가 수행되었다. 바비투시마브와 β2GPI 적정 모두를 수행하였다. 이들 연구는 또한 0.5μg/ml 농도 미만을 포함하는 낮은 수준의 β2GPI가 PS로 코팅된 플레이트에 결합하는 넓은 범위의 항체 농도를 지원하는데 효과적이라는 것을 보여주었다.

[0429] **D. 희석된 인간 혈청에서 항체 결합 및 활성**

[0430] 다른 일련의 연구가 인체 혈청의 다양한 희석물에서 PS에 대한 바비투시마브의 결합 및 기능을 시험하기 위해 수행되었다. 여기에는, ELISA에서 PS에 대한 결합, PS-양성 세포를 이용한 FACS 분석, 및 NFAT 대용물 ADCC 생물 검정법의 형태인 기능 분석이 포함되었다.

[0431] **1. ELISA**

[0432] ELISA를 실시하여 6가지 상이한 개별 인간 혈청 샘플의 다양한 백분율에서 PS에 대한 바비투시마브 결합을 시험하였다. 상이한 인간 혈청 (BioReclamationIVT, North America 사)은 최하 0.1%의 인간 혈청의 범위(%)를 제조하기 위해 PBS 중에 희석하였다. 2 μ g/ml의 바비투시마브-HRP (실시에 XVI, A3)를 각% 인간 혈청 용액에 첨가하였다. 상이한 바비투시마브-HRP 혼합물을 PS 미세역가 플레이트에 가했고, 37 $^{\circ}$ C에서 1-2시간 동안 결합시켰다. 플레이트를 PBS로 세척하였다. TMB 기재를 각 웰에 100 μ l의 부피로 첨가했고, 실온에서 15분 동안 방치하여 비색 반응을 일으켰다. 반응을 2M의 H₂SO₄ 100 μ l를 첨가하여 정지시켰다. 흡광도는 정지 용액을 첨가한 후 30분 이내에, 450nm의 파장에서 플레이트 분광기로 관독하였고, SoftMax Pro 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0433] **2. FACS**

[0434] PS-양성 세포 (에피토프-처리된 HT 1080 세포)에 대한 바비투시마브 결합(HBsituximab)은 소 β 2GPI의 근원인 다른 백분율의 FBS를 사용하여 시험하였고, 유세포 측정법 (flow cytometry)으로도 알려진 형광-활성 세포 선별법 (FACS)으로 측정되었다.

[0435] PBS 용액에서 상이한 %의 FBS를 만들었고, 각 용액에 10 μ g/ml의 바비투시마브를 첨가하였다. 세포 표면에 PS 노출을 유도하기 위해, HT 1080 세포는 18시간 동안 50 μ M 에피토프로 처리하였다. 그 다음에, 세포를 상이한 바비투시마브-백분율 FBS 용액, 및 이후 바비투시마브에 대한 2차 항체와 배양하여, 유세포 측정법을 통해 세포에 결합된 항체의 시각화를 허용하도록 하였다. 음성 대조군에는 표면에 PS를 노출시키지 않는 에피토프 비처리 세포, 및 FBS가 없는 PBS 용액이 포함되었다.

[0436] **3. NFAT**

[0437] 활성화된 T-세포의 핵 인자 (Nuclear factor of activated T-cell, NFAT)는 면역 반응에 중요하다고 알려진 전사 인자의 계열에 적용되는 일반적인 명칭이다. NFAT 신호 전달 경로 및 NFAT 반응 요소 (NFAT-RE)는 배양 세포에서 NFAT 신호 전달 경로를 모니터링하기 위한 분석 및 시판용 키트의 개발에 사용되었다.

[0438] NFAT 생물 검정법은 항체의 바비투시마브 그룹과 함께 사용하기 위해 개발되었다 (Larson 외, 2013). 세포 표면 상에 Fc γ RIIIa-V158 수용체를 발현하도록 조작된 Jurkat 세포(Promega)는, 또한 다중 NFAT-RE를 함유하는 최소 TATA 프로모터의 제어 하의 루시퍼라제 유전자를 함유하는 유전 요소로 형질 감염시켰다. 이들은 PS-양성 표적 세포와 함께 배양되는 NFAT 효과기 세포이다. PS 표적 항체 (예: 바비투시마브)가 표적 세포의 표면 상에서 PS에 결합한다. 그 다음에, PS-표적 항체의 Fc 영역은 NFAT 효과기 세포상의 Fc γ RIIIa-V158 수용체에 결합하고, NFAT 경로를 통한 신호 전달이 유발된다. NFAT는 NFAT-RE에 결합하여 루시퍼라제 발현을 활성화시키며, 이는 정량화될 수 있다. 따라서, 이 NFAT 분석은 바비투시마브 및 다른 PS-표적 항체에 대한 대용 ADCC 생물 검정법이다.

[0439] **4. 결과**

[0440] 상기 기술한 ELISA 분석법의 예시적인 결과가 도 12에 제시되어 있고, 이는 또한 β 2GPI 수준이 낮은 묽은 인간 혈청이 항체 결합을 효과적으로 지지한다는 것을 보여주고 있다. 정제된 β 2GPI를 사용하는 상기 PS ELISA에 있어서 (도 11), 50% 및 100% 인간 혈청에서 PS 결합의 일부 손실이 있고, 이는 특히 희석하지 않은 혈청을 사용하는 경우에, ELISA 분석 포맷에서 흔히 검출되는 전형적인 포화 효과와 관련이 있다. 이러한 효과는 FACS 분석에서 관찰되지 않으며, PS가 노출된 세포에 대한 바비투시마브 결합은 50%, 75% 및 100% 소 태아 혈청에서와 본질적으로 동일한 것으로 나타났다.

[0441] 도 12로부터, ELISA에서 PS에 대한 바비투시마브 결합이 약 1% 인간 혈청에서 정체 상태로 시작됨을 알 수 있다. 정상적인 인간의 혈청에는 평균 200 μ g/ml의 β 2GPI가 포함되어 있기 때문에 (Steinkasserer 외, 1991; Mehdi 외, 1999; Miyakis 외, 2004), 1% 인간 혈청에는 약 2 μ g/ml 또는 0.04 μ M의 β 2GPI를 함유한다. 도 12는 PS에 대한 바비투시마브 결합이 이 농도의 β 2GPI에서 이미 포화 상태였음을 보여준다. 표 3 (항체 MW, 145 kDa; 인간 β 2GPI MW, 50 kD)에 나타난 바와 같이, ELISA에서 1% 인간 혈청은 β 2GPI 대 항체 2.86의 몰 비율

에 상응한다. 이것은 일반적 바비투시마브의 각 분자가 세포 표면에 PS와 안정한 복합체를 형성하기 위해 2개의 β 2GPI 분자에 결합할 필요가 있다는 합리적 근거와 일치한다 (도 8).

[0442] [표 3]

PS 결합을 위한 인간 혈청 내의 β 2GPI의 양

바비투시마브 ($\mu\text{g/ml}$)	바비투시마브 (μM)	인간 혈청 (%)	β 2GPI ($\mu\text{g/ml}$)	β 2GPI (μM)	β 2GPI 대 Ab 몰비
2	0.014	10	20	0.4	28.57
2	0.014	5	10	0.2	14.28
2	0.014	1	2	0.04	2.86
2	0.014	0.5	1	0.02	1.43
2	0.014	0.1	0.2	0.004	0.28
2	0.014	0	0	0	--

[0443]

도 12에 제시된 바와 같이, 심지어 0.5% 인간 혈청에서도, PS에 대한 바비투시마브 결합은 특히 혈청 샘플 번호 13의 경우, 가장 정제기에 접근하고 있고, 이는 β 2GPI 대 항체 1.43의 몰 비율에 상응한다 (표 3). NFAT 대용 ADCC 생물 검정법의 결과는 또한 이러한 일반적인 범위의 β 2GPI 대 항체 몰비가 바비투시마브 기능 지원하는데 효과적이었음을 나타냈다. 예를 들어, 상기 연구가 바비투시마브 활성에 대한 최적의 비를 확인하도록 설계되지 않았지만, (소) β 2GPI 대 항체 1.9의 몰 비율은 NFAT 분석에서 바비투시마브 활성을 효과적으로 지원하는 것으로 제시되었다.

[0445]

요약하면, 본 실시예는 0.12 내지 2.86만큼 낮은 β 2GPI 대 항체 몰비가 PS에 대한 항체 결합을 지지하였고, PS-양성 세포는 기능적 분석에서의 활성을 용이하게 하며, 종양이 있는 마우스의 효과적인 치료를 가능하게 한다는 것을 나타낸다. 상기 모든 데이터에 비추어 예방 방법을 취하면, 바비투시마브 결합과 기능을 최대화하기 위해 β 2GPI 대 항체 몰비는 약 2.86 (표 3)이어야 하지만, 이는 약 3보다 높을 필요는 없다고 추론되었다.

[0446]

실시예 VI

[0447]

임상 연구에서 바비투시마브의 약동학

[0448]

이 실시예는 PS가 마커인 질환, 특히 암 및 바이러스 감염을 갖는 인간 피험체에게 투여했을 때, 바비투시마브의 약동학에 관한 것이다. 임상 경험은 상기 기술한 바와 같이, 전-임상 모델링과 일치하는 것으로 나타났다.

[0449]

A. 초기 I 상 연구

[0450]

난치성 진행성 고체 종양이 있는 26명의 환자에 정맥내 투여시 (바비투시마브 단독 요법) 바비투시마브의 안전성, 내약성 및 약동학 (PK)을 평가하기 위해, I상, 멀티센터(multicenter), 오픈-라벨 (open-label), 용량 확대 (dose escalation) 연구가 실시되었다. 환자들은 2회 투여 일정으로 4개의 연속 용량증가시험 코호트 (cohort) (매주 0.1, 0.3, 1 또는 3mg/kg 바비투시마브)로 등록되었다. 0.1mg/kg 및 0.3mg/kg 코호트에서는, 환자에게 0일, 28일, 35일 및 42일차에 바비투시마브를 투여하였고; 1mg/kg 및 3mg/kg 코호트에서는, 환자에게 0일, 7일, 14일 및 21일차에 바비투시마브를 투여하였다.

[0451]

매주 3mg/kg의 상위 용량은 전-임상 모델링 (실시예 V) 및 다른 환자 집단의 경험을 토대로 선택되었다. 실시예 II의 것에 후속되는 광범위한 동물 모델 연구에서, 최대 효능은 매주 3회 0.5mg/kg의 투여량인 항체로 성취되었고, 48시간의 반감기와 함께 C_{max} 는 $5.5\mu\text{g/ml}$ 이고, 시뮬레이션된 평균 혈중 농도는 치료 과정에 걸쳐 $2\mu\text{g/ml}$ 가 수득되었다. 상기 용량을 벗어나면, 바비투시마브에 의한 PS 결합은 PS-양성 세포에 대한 바비투시마브 결합이 시험관내 포화되는 농도의 관측을 기반으로 아마도 포화되었다.

[0452]

연구 전 0, 1, 2, 4, 7, 10, 14일차 및 21일부터 70일까지, 7일마다 0.1 및 0.3mg/kg 용량 코호트의 환자로부터 샘플을 수집했다. 연구 전, 1일, 2일, 4일, 7일, 14일, 21일, 22일, 23일, 25일차 및 28일부터 56일까지, 7일마다 1 및 3mg/kg 용량 코호트의 환자로부터 샘플을 수집했다. 바비투시마브 혈중 농도는 유효 ELISA에 의해 결정되었다.

[0453]

표 4는 최대 농도 (C_{max}), 제거율 (CL), 반감기 ($t_{1/2}$) 및 시간 0에서 무한대까지의 혈장 농도 - 시간 곡선 아래 면적 (AUC_{inf})을 포함하여, 이러한 I상 시험에서의 단일-용량 투여량 (0일차) 및 다중-용량 투여 (21일차)에 따

른 바비투시마브의 평균 (변동 계수, CV) PK 파라미터의 요약을 나타낸다.

[0454] [표 4]

임상 I 상에서의, 바비투시마브의 약동학적 변수

투여량 (mg/kg)	0 일차				
	N =	평균 (CV %)			
		C _{max} (µg/ml)	CL (ml/h/kg)	t _{1/2} (h)	AUC _{inf} (d µg/ml)
0.1	8	2.11(27.3)	1.10 (48.7)	43.9 (48.5)	113 (50.1)
0.3	6	5.13 (42.4)	1.39 (34.3)	39.8 (34.1)	241 (39.8)
1.0	6	16.6 (30.9)	1.14 (36.7)	40.3 (20.2)	966 (30.0)
3.0	6	56.4 (25.8)	1.34 (72.2)	37.2 (34.5)	3,017 (50.3)
투여량 (mg/kg)	21 일차 (1 및 3 mg/kg 에 대해)				
	N =	평균 (CV %)			
		C _{max} (µg/ml)	CL (ml/kg/d)	t _{1/2} (h)	AUC _{inf} (d µg/ml)
1.0	6	18.7 (31.8)	1.12 (52.1)	46.8 (38.4)	1,053 (38.0)
3.0	4	59.6 (27.6)	1.51 (61.4)	46.0 (44.4)	2,672 (63.4)

[0455]

[0456]

표 4에서 볼 수 있듯이, 단일-용량 투여 후, 바비투시마브의 평균 반감기는 37.2 내지 43.9시간이었다. 0일차, 최대 혈청 농도 (T_{max})에 도달했을 때 투여 후 중간 시간에서 평균 최대 혈청 농도 (C_{max})는 2.11에서 56.4µg/ml (투여량에 따라)의 범위였다 (2.04에서 3.73시간의 범위인 값). 3mg/kg로 투여된 바비투시마브의 경우, 최대 혈청 농도 56.4µg/ml였다. 전반적인 연구에서, 바비투시마브의 반감기는 37시간에서 47시간 사이였다. 이 연구에서는 최대 내약 용량에 도달하지 않았다.

[0457]

바비투시마브는 선형 단일-용량 (0일차) 및 다중-용량 (21일차 또는 42일차) PK 특성을 나타내었다 (도 13). 바비투시마브는 다중-용량 투여 후에, 적절한 축적이나, 또는 시간-의존성 PK 차이를 나타내지 않았다. 요약하면, 이 연구는 바비투시마브가 매주 최대 3mg/kg의 투여량에서 잘 견디며, 약동학이 매주 투여 요법을 뒷받침한다는 것을 보여주었다. 특히, 1mg/kg의 투여량에서 바비투시마브 농도는 전-임상 모델링에 기초하여 예측된 치료학적 임계 2µg/ml를 6일 동안 상회하였고; 3mg/kg의 투여량에서, 바비투시마브 농도는 이러한 2µg/ml를 7일 동안 상회함이 확인되었다 (도 13). 따라서, 매주 3mg/kg의 투여량은 중양학에서 미래 사용을 위해 선택되었다.

[0458]

B. 기타 약동학적 연구

[0459]

위의 I 상 시험 이외에도, 단일 용량으로서 매주 또는 주 2회 주입 (60-90분)된 바비투시마브의 PK가 이제 암 또는 바이러스 감염 환자의 여러 다른 임상 연구에서 120명이 넘는 환자에서 평가되었다. 바비투시마브는 0.1 내지 6mg/kg 범위의 투여량에서 선형 단일-용량 및 다중-용량의 PK 특성을 나타내며, 바비투시마브의 적절한 축적 또는 시간-의존성 PK 차의 증거는 없는 것으로 확인되었다. 중앙값 T_{max}는 주입 종료 후 처음 2~3 시간 내에 발생하는 것으로 나타났다. 혈청 바비투시마브 농도는 명백한 단일 지수 또는 이중 지수의 1차 방식으로 감소하다. 보다 신속한 분배 단계는 (관찰되는 경우) 본질적으로 6시간 이내에 완료되고, 말단 제거 반감기는 약 1-2 일 (21.9 내지 46.8시간)이다.

[0460]

1. 바이러스 감염의 PK

[0461]

바비투시마브 PK 특징은 일반적으로 HIV가 있거나 없는, HCV에 만성적으로 감염된 환자에서 시험된 바와 같이, 암과 만성 바이러스 감염이 있는 환자에서 유사하다.

[0462]

I상, 오픈-라벨, 단일 센터, 용량 확대 연구는 HCV에 만성적으로 감염된 환자에서 바비투시마브의 단일 정맥내 주입을 평가했다 (실시예 VII, A). 표 5에 나타난 바와 같이, 관찰된 바비투시마브의 농도는 PK 모델링 데이터로부터의 예측과 매우 일치한다는 것을 알았다.

[0463] [표 5]

예측 및 측정된 바비투시마브 농도

변수	값				
	0.1	0.3	1	3	6
투여량(mg/kg)	0.1	0.3	1	3	6
예측 C _{max} (µg/ml)	2.2	6.5	21.8	65.4	130.8
실측 C _{max} (µg/ml)	2.5	5.7	24.3	75.8	135.0

[0464]

[0465] 만성 HCV 환자에서의 상응하는 Ib상, 다중 센터, 오픈 라벨, 비-무작위, 확대 반복-용량 연구에서, PK 데이터의 분석은 모든 투여량 수준에서 0일차의 선형 단일-용량 PK 특성, 및 10일차에 선형 다중-용량 특성을 나타냈고, 2주 투여 후 바비투시마브의 축적 또는 시간-의존성 PK 차이의 증거는 나타나지 않았다.

[0466] 만성 HCV 및 HIV에 동시 감염된 환자에서의 Ib 상 연구에서 (실시에 VII, C), 바비투시마브는 3 내지 6mg/kg 범위의 투여량으로 매주 1회 투여된 다음 0일차에 선형 단일-용량 PK 특성 및 49일차에 선형 다중-용량 PK 특성을 나타냈다. 바비투시마브는 8주 동안 매주 1회 다중-용량 투여 후 시간-의존적 PK 차이 또는 축적을 나타내지 않았다.

[0467] **2. 병용 요법에서의 PK**

[0468] 중요한 것은, 바비투시마브 및 다른 약제 (특히 화학요법제)를 병용 투여했을 때, 두 약물 중 어느 것에 대해서도 임상적으로 관련된 약동학적 상호작용이 없는 것으로 나타났다. 이것은 바비투시마브와 도세탁셀을 병용 투여한 경우를 포함하다.

[0469] 이와 관련하여, Ib 상, 멀티-센터, 오픈-라벨, 비-무작위 연구는 먼저 난치성 진행성 고체 종양인 환자에서 3mg/kg 바비투시마브를 겐시타빈, 파클리탁셀 + 카보플라틴 또는 도세탁셀과 함께 1주마다 정맥내 투여하는 경우의 안전성, 내약성 및 PK를 평가했다. 단일-용량 (0일차) 및 다중-용량 바비투시마브 투여 (21일차)에 따른 3개의 치료군들 간에는, 임의의 측정 가능한 파라미터에서 유의한 차이가 없었던 것으로 판정하였다. C_{max} 및 AUC의 평가에서, 8주 동안 매주 1회 다중-용량 투여 후 바비투시마브가 축적되지 않은 것으로 나타났다.

[0470] 이미 국부 치료된 국부 진행성 또는 전이성 비편평상피성 NSCLC (실시에 XIII)가 있는 환자에서 바비투시마브 + 도세탁셀을 평가하는 II 상, 무작위, 이중-맹검, 위약-조절된 연구에서, 전체 연구 집단의 하위 집합 (아암당 6명)도 또한 바비투시마브와 도세탁셀 사이의 임의의 약물-약물 상호작용을 조사하기 위해 PK 하위 연구에 참여했다. 특정 시점에서 사이클 1 및 2 동안 이들 환자에 대해 추가적인 혈액 공급이 수행되었다. 도세탁셀과 함께 바비투시마브에 대해 임상적으로 관련된 약동학적 약물-약물 상호작용은 관찰되지 않았다. 또한, 도세탁셀은 바비투시마브의 투여 여부와 상관없이 유사한 약동학적 특성을 나타내었다. 따라서, 이 환자들에서 바비투시마브와 함께 도세탁셀에 대한 임상적으로 관련된 약동학적 약물-약물 상호작용은 관찰되지 않았다.

[0471] **실시에 VII**

[0472] **바비투시마브를 이용한 환자의 바이러스 감염 치료**

[0473] 이 실시에에서, 데이터는 리바비린과 병용된 바비투시마브를 포함하여, 바비투시마브를 사용하는 환자에서 바이러스 감염을 치료하는 임상 경험의 일부를 예시하기 위해 제공된다. 선택된 임상 투여량에서, 바비투시마브의 투여가 인간 피험체에서 β2GPI 수준을 상당히 감소시키지 않는다는 것을 나타내는 데이터도 제시된다.

[0474] **A. HCV 환자에서 I 상 연구**

[0475] 바비투시마브는 C형 간염 바이러스 (HCV)에 만성 감염된 환자의 I 상, 오픈-라벨, 용량 확대 연구 및 Ib 상, 오픈-라벨, 확대 반복-용량 연구에서 처음 평가되었다. 이들 연구는 바비투시마브의 안전성, 내약성, PK 프로파일, 바이러스 동역학, 최대 내약 용량 (MTD) 및 최대 유효 용량 (MED)과 관련이 있다. 0.1, 0.3, 1, 3 및 6mg/kg의 투여량을 I 상 (30명의 환자, 6명 환자의 연속적인 코호트)에 투여했고, 0.3, 1, 3 및 6mg/kg의 투여량은 Ib 상(24명의 환자, 6명 환자의 4개 코호트)에 투여했다.

[0476] HCV 환자의 I 상 및 Ib 상 연구에서, 모든 투여량 수준의 바비투시마브는 내약성이 우수했다. I 상에서, 항바이러스 활성을 암시하는 바이러스 부하의 일시적인 감소가 모든 투여량 수준에서 관찰되었다. Ib 상에서는, 0.3,

1 및 6mg/kg의 투여량으로 바비투시마브 치료 후 바이러스 부하가 약간 감소했고; 그 감소는 종종 일시적이었지만, 각 코호트에서 적어도 한 명의 환자는 바이러스 부하가 지속적으로 감소했다. 특히 3mg/kg의 바비투시마브 투여량에서, 연구 치료 및 추적을 통해 HCV의 지속적인 감소가 입증되었다.

[0477] B. 바비투시마브는 β2GPI를 고갈시키지 않는다

[0478] 상기 기술한 Ib 상 연구는 또한 바비투시마브의 투여가 이들 인간 피험체에서 β2GPI 수준을 변화시키는지 여부를 결정하기 위해 환자의 β2GPI 수준을 측정했다. 그 결과를 도 14에 도시하였다. 1mg/kg 바비투시마브를 투여받은 환자에서, β2GPI 수준은 거의 변하지 않았다. 3mg/kg 바비투시마브를 투여받은 환자에서 β2GPI의 혈청 수준에 일시적인 감소 (20-25%)가 관찰되었다. 그러나, 이러한 감소는 투여 전 수준과 통계적으로 유의미하게 변화하지 않았다 (도 14). 실제로, 3mg/kg 바비투시마브 투여량에서, β2GPI 수준은 정상 범위 내에 머물렀고, 24시간 이내에 치료 전 수준으로 돌아갔다. 대조적으로, 6mg/kg 바비투시마브를 투여받은 환자에서, β2GPI 수준은 유의하게 감소되었다 ($p < 0.02$) (도 14). 6mg/kg 투여량에서, β2GPI 수준은 정상 범위의 대략 하한선인, 전처리 수준에 비해 40%까지 떨어졌다. 그럼에도 불구하고, β2GPI는 6mg/kg의 바비투시마브로 치료된 인간 피험체에서조차도 3일 안에 기준선 수준으로 회복되었다.

[0479] 따라서, 이들 데이터는 인간에서 사용하기 위해 바비투시마브 3mg/kg의 투여량의 선택을 입증하였다. 이 투여량은 최대 투여량으로 결정되었으며, 이 투여량에서 혈장 β2GPI 수준을 고갈시키지 않고 질환 부위의 세포에 노출된 PS에 대해 바비투시마브-β2GPI 복합체를 형성 및 결합시키는데 효과적인 농도로 바비투시마브 및 β2GPI가 함께 존재한다. 그러나 데이터는 또한 바비투시마브 치료 중 β2GPI의 임의 감소가 단지 일시적이며, β2GPI 수준은 3일 이내에 회복된다는 것을 보여준다.

[0480] C. HCV-HIV 환자에서 I 상 연구

[0481] 만성 HCV (대다수의 HCV 유전자형 1) 및 인간 면역결핍 바이러스 (HIV)로 동시 감염된 환자에서 바비투시마브를 평가하기 위해, 별도의 I 상b, 멀티-센터, 오픈-라벨, 비-무작위, 용량 확대, 반복-용량 연구가 수행되었다. 주요 목표는 안전성, 내약성, PK 프로파일, 바이러스 동역학, MTD 및/또는 MED를 결정하는 것이었다. 이 연구에는 약 16주 동안 16차례 방문이 포함되었다. 바비투시마브는 다음과 같은 투여량으로 환자의 연속적인 코호트에 투여되었다: 0.3mg/kg, 6명의 환자; 1mg/kg, 6명의 환자; 3mg/kg, 9명의 환자; 및 6mg/kg, 6명의 환자. 환자들은 매주 8주 동안 바비투시마브를 정맥내 투여받았다. 코호트의 모든 환자가 심각한 부작용 (SAEs)으로 분류된 혈전증 증상없이 처음 4주간 투약을 완료한 후에 용량 증가가 진행되었다.

[0482] 중앙값 기준 HCV 바이러스 부하는 $6.76 \log_{10}$ 이었고, HIV에 대한 중앙값 기준은 $3.99 \log_{10}$ 이었다. HCV 및 HIV의 혈장 바이러스 부하량은 연구 중 특정 시점에서 측정되었다. 모든 투여량 수준에서 바비투시마브로 치료할 때, 각 치료군의 여러 환자는 일시적인 항바이러스 활성을 보였다 (HCV 및/또는 HIV 바이러스 부하의 최대 감소는 기준선에서 $0.5 \geq \log_{10}$ 이상이었다).

[0483] D. HCV 환자에서 II 상 연구

[0484] 만성 HCV (유전자형 1) 감염의 초기 치료를 위해 리바비린과 병용 투여된 바비투시마브를 평가하기 위해, II 상, 멀티-센터, 무작위, 활성-조절 연구가 수행하였다. 1차 종료점은 연구 12주차 초기 바이러스 반응 (EVR)을 보인 환자의 비율이었고, EVR은 HCV RNA 수준에서 $2-\log_{10}$ 국제 단위 (IU) 감소보다 크거나 같은 것으로 정의되었다. 2차 종료점 중에 안전성이 포함되었다.

[0485] 환자들은 모두 1일 2회 경구 리바비린 1000mg (체중 < 75kg) 또는 1200mg (체중 75kg 이상) 투여와 함께, 최대 28일간의 스크리닝/워시아웃 (washout) 기간을 거친 후, 무작위 배정하여 (1:1:1 비율) 매주 0.3 또는 3mg/kg의 바비투시마브 주입 또는 12주간 폐길화된 인터페론 알파-2a (폐길화 인터페론 PEG-IFN α-2a) 피하 주사를 받았다. 12주 후에 EVR을 보인 환자는 폐길화 인터페론 플러스 리바비린과 함께 48주 동안의 오프-스터디(off-study) 치료를 받았다.

[0486] 평균 연령 39.1세의 총 66명의 환자 (남자 38명, 여자 28명)가 이 연구에 등록되었다. 각각 22명의 환자에게 0.3mg/kg의 바비투시마브, 3mg/kg의 바비투시마브 및 폐길화 인터페론을 투여했다. 투여받은 0.3 및 3mg/kg 바비투시마브 투여량의 중간값은 각각 12회 투여량이었고, 평균 치료 기간은 각각 78일 및 75일이었다.

[0487] 이 연구에서, 바비투시마브 + 리바비린으로 치료한 일부 환자에서 12주에 걸쳐 바이러스성 감량이 점차적으로 나타났다. 흥미롭게도, EVR은 3mg/kg 바비투시마브 (18% 대 9%)의 높은 용량과는 달리, 바비투시마브의 저용량

(0.3mg/kg)으로 치료된 많은 환자의 2배로 관찰되었다. EVR은 두 투여량 모두에서 바비투시마브에서보다 폐길화 된 인터페론을 투여받는 환자에서 더 높았지만, 바비투시마브는 보다 유리한 안전성 프로파일 보였는데; 폐길화 인터페론 아암 환자의 거의 2배에 달하는 환자가 바비투시마브-함유 군과 비교하여 AE를 보고했다.

[0488] **실시예 VIII**

[0489] **바비투시마브 및 파클리탁셀에 의한 유방암 환자의 치료**

[0490] 임상적 암 치료에 관해서, 본 실시예는 탁산, 파클리탁셀과 병용하여 바비투시마브를 사용한 HER2-음성 전이성 유방암 환자의 치료로부터 얻은 데이터를 제공한다.

[0491] 단일 센터, 연구자 후원 연구에서, HER2 음성 전이성 유방암 환자 14 명이 파클리탁셀 (80 mg/m²)과 병행하여 매주 3mg/kg의 바비투시마브를 4주 사이클로 1, 8 및 15일차에 투여받았다. 골통증, 피로, 두통 및 호중구 감소증이 가장 흔한 부작용 (AE)이었다. 관리 가능한 주입-관련 반응은 바비투시마브와 관련된 가장 일반적인 AE였다. 바비투시마브는 증가된 혈전 형성성에 대한 증거는 보이지 않았다. 치료 결과 전체 반응률 (ORR)은 85%였고, 2명의 환자는 완전한 반응을 보였고, PFS (progression-free survival; 무진행 생존율)는 7.3개월 (95% CI: 2.8, 10.8)이었다.

[0492] 요약하면, 이 연구는 파클리탁셀과 병용 투여된 바비투시마브가 전이성 유방암 환자의 치료에 잘 견딘다는 것을 보여 주었으며, 임상 반응률 (RRs) 및 PFS 측면에서 유망한 결과가 관찰되었다.

[0493] **실시예 IX**

[0494] **바비투시마브 및 파클리탁셀-카보플라틴에 의한 유방암 환자의 치료**

[0495] 본 실시예는 호르몬 또는 HER2 상태에 의해 제한되지 않는, 국부 진행성 또는 전이성 유방암 환자에서 바비투시마브 + 파클리탁셀과 카보플라틴의 안전성 및 효능을 평가한 II상, 오픈-라벨, 단일 아암 연구로부터의 결과를 보고하고 있다.

[0496] 이러한 II상 연구는 Simon-2 상 설계를 활용했다. 15명의 환자가 A 병기(stage)에 등록되었고, 시험은 B 병기에서 추가 31명의 환자로 확장되어 총 46명의 환자가 있었다. 주요 목표는 전체 반응 (CR) + 부분 반응 (PR), CR + PR로 정의된 전반적인 반응률 (ORR)을 결정하는 것이었다. 이차적인 목표로는 종양 진행 시간, 반응 지속 기간 (DOR 또는 DR), 전체 생존률 (OS) 및 안전성이 포함되었다.

[0497] 바비투시마브 (3mg/kg)는, 질환이 진행될 때까지 최대 6주기 동안 28일 주기로 1, 8 및 15일차에 카보플라틴 (AUC = 2의 투여량으로) 및 파클리탁셀 100mg/m²와 함께 매주 투여하였다. 46명의 환자 중 16명 (34.8%)은 처음 치료받았다.

[0498] 가장 일반적인 4등급 치료 - 응급 부작용 (TEAE)은 호중구 감소증 (12명의 환자, 26.1%)이었고, 이는 이 연구에 사용된 화학요법으로 치료받은 환자에서 예상되는 발생률이다. 가장 일반적인 3등급 TEAE는 백혈구 감소증 (11명의 환자, 23.9%), 호중구 감소증 (9명의 환자, 19.6%) 및 빈혈 (5명의 환자, 10.9%)이었다. 이들은 또한 이 연구에 사용된 화학요법으로 치료받은 환자에서 예상되는 발생률이다.

[0499] 고체 종양의 반응 평가 기준에 따른 객관적 반응 (RECIST)은 46명의 환자중 34명에서 발생했고 (73.9%); 46명의 환자중 5명 (10.9%)에서 CR이 있었고, 29명 (63.0%)에서 PR이 있었다. 중간 반응의 지속기간 (DOR)은 3.7개월 (95% 신뢰 구간[CI]: 3.1, 5.8)이고, PFS 중간값은 6.9개월 (95% CI: 5.6, 7.7)이었다. 연구 종결 시점에서, OS 중간값은 23.2개월 (95 CI: '결정되지 않음'으로 553일)로 결정되었다. 이들 결과는 특히 병용 요법에서 바비투시마브의 지속적인 개발에 매우 고무적이다.

[0500] **실시예 X**

[0501] **바비투시마브 및 도세탁셀에 의한 유방암 환자의 치료**

[0502] 본 실시예는 또 다른 II 상, 오픈-라벨, 단일군 연구의 결과를 보고하고 있는데, 이는 국부 진행성 또는 전이성 유방암 환자에서 도세탁셀과 병용 투여한 바비투시마브의 안전성 및 효능을 평가한다.

[0503] 이 시험은 Simon 2-단계 설계를 활용한 II 상, 멀티센터 시험이었다. 15명의 환자가 A 병기에 등록되었고, B 병기에서 추가로 31명의 환자로 확장되어, 총 46명의 환자가 있었다. 주요 목적은 ORR (CR + PR)을 결정하는 것이었다. 이차적인 목표로는 종양 진행 시간, DOR, OS 및 안전성이 포함되었다.

- [0504] 바비투시마브 (3mg/kg)는 질환이 진행될 때까지 최대 6주기 동안 계획된 4-주 주기의 1, 8 및 15일차에 도세탁셀 (35mg/kg)과 함께 매주 투여하였다. 모든 환자는 화학요법 요법 전에 1회 투여했다. 보고된 가장 일반적인 TEAE중, 단지 피로, 두통, 허리 통증 및 고혈압 만이 등급 ≥ 3 이었다.
- [0505] 이 연구에서, 객관적 반응은 46명의 환자중 28명에 발생하였고 (60.9%); 46명의 환자중 5명 (10.9%)에서 CR이 있었고, 46명의 환자중 23명 (50.0%)에서 PR이 있었던 것으로 확인되었다. DOR 중간값은 6.1개월 (95% CI: 5.7, 7.5)이고, PFS 중간값은 7.4개월 (95% CI: 6.1, 9.1)이었다. 최종 분석 시점에서, OS 중간값은 대략 20.7개월 (95% CI: '결정되지 않음'으로 16.1개월)이다. 이들 데이터는 도세탁셀과의 병용 요법을 포함하여, 바비투시마브의 추가 개발을 강하게 뒷받침한다.
- [0506] **실시예 XI**
- [0507] **바비투시마브 및 소라페니브에 의한 간암 환자 치료**
- [0508] 본 실시예에서, 데이터는 소라페니브와 함께 바비투시마브를 사용한 진행성 간세포 암종 (HCC) 환자의 치료로부터 제시된다.
- [0509] 진행성 간세포 암종에서 바비투시마브 및 소라페니브의 단일 기관 연구가 수행되었다. 환자에 방사선학 진행까지 3mg/kg의 바비투시마브를 1주마다 정맥내 (IV) 투여, 및 400mg 소라페니브를 1일 2회 경구로 (PO BID) 투여하였다. 2차 종료점은 전체 생존율 (OS), 질병 특이적 생존율 (disease specific survival), 4개월 무진행 생존율, 안전성 및 반응률을 포함했다. 이 연구는 38명의 환자를 추가하였다.
- [0510] 이 연구에서 6명 환자의 관련 번역 데이터에서, 평가된 환자의 절반이 여러 전-임상 암 모델에서 관련 PS-표적 항체에 대해 나타낸 것과 유사하게, 바비투시마브 치료 1주기 후에 종양 억제 면역 세포가 증가한 것으로 확인되었다. 또한, 면역 반응의 증가는 장시간 동안 연구 치료를 지속한 환자들과 관련이 있는데, 이는 임상적으로 의미있는 항-종양 면역 반응을 암시한다. 평가된 6명의 환자 중 3명은 활성화된 종양-억제 T 세포 (CD8)의 종양 미세 환경으로의 침윤이 증가하여 질환 진행에 대한 시간이 길어졌다. 또한, 이 반응 환자들은 처음에는 바비투시마브 치료 후 측정 가능한 상승 작용이 뒤따르는 요법의 개시 이전에, T 세포 활성화 및 질환 결과의 확립된 마커인 낮은 수준의 PD-1 양성 세포를 발현하였다.
- [0511] 임상적으로, 4등급 또는 5등급의 부작용이 기록되지 않았다. 가장 흔한 모든 등급 현상은 설사 (32%), 피로 (26%) 및 식욕 부진 (24%)이었다. 중간 OS (mos)는 6.2개월이었다. 2명의 환자가 부분 반응을 보였고, 4개월 PFS는 61%였다.
- [0512] 이들 결과는 바비투시마브 및 소라페니브가 다른 체크포인트 면역요법에서 나타나는 자가 면역 부작용의 징후 없이, 진행성 HCC 환자에서 내약성이 우수함을 입증했다. 진행 시간, 질환 통제율 및 4개월 무진행 생존의 임상 결과는 특히 높은 거대 혈관 침범 속도를 포함하여 그들의 불리한 질환 생물학으로 인해 예후가 매우 안좋은 이러한 전담 치료 환자 코호트에서 고무적이다.
- [0513] **실시예 XII**
- [0514] **바비투시마브 및 겐시타빈에 의한 췌장암 환자 치료**
- [0515] 본 실시예에서, 데이터는 바비투시마브와 함께 겐시타빈을 사용하는 이전에 치료되지 않은 4기 췌장암 환자의 치료로부터 제시된다.
- [0516] 이 연구 (PPHM 1002)는 이전에 치료받지 않은 4기 췌장암 환자에서 바비투시마브의 존재 또는 부재하에 투여된 겐시타빈을 평가하기 위한 II 상, 무작위, 오픈-라벨 연구였다. 일차적인 목적은 치료군 간에 환자의 OS를 비교하는 것이었다. 이차적인 목표에는 PFS, ORR, DR 및 안전성을 비교하는 것이 포함되었다.
- [0517] 등록된 환자는 1:1 비율로 무작위 배정하여 겐시타빈 단독, 또는 매주 3mg/kg의 바비투시마브와 병용한 겐시타빈의 연구 치료를 받았다. 겐시타빈 (1000 mg/m²)은 각 28일 주기 (4주)의 1일, 8일 및 15일차에 질환의 진행 또는 용납할 수 없는 독성이 나타날 때까지 투여되었다. 총 70명의 환자가 연구에 등록되었다. 일반적으로, 환자 집단은 매우 광범위한 질환 부담을 가졌고, 이는 양쪽 아암 모두에서 반응을 감소시킬 수 있다.
- [0518] 바비투시마브 + 겐시타빈 치료군의 가장 흔한 TEAE는, 메스꺼움 (44.1%), 빈혈 (35.3%) 및 피로, 변비 및 식욕 부진 (각각 환자의 32.4%에서 발생)이었다. 겐시타빈으로 무작위 추출된 3명 (9.1%)의 환자는 5등급 (치명적) 상태 (갑작스런 사망 [1명], 간농양 [1명] 및 심장 마비 [1명])가 있었다. 겐시타빈 + 바비투시마브 군에서 5등

급 (치명적) 상태는 발생하지 않았다.

- [0519] 대부분의 효능 평가 종료점이 치료 그룹에서 비교 가능했지만, 바비투시마브와 겐시타빈 그룹에서의 1년 후의 응답률 및 생존 확률이 수치적으로 더 높았다. 연구 종결 시점에서, 겐시타빈 단독 치료군에서 전체 생존률 중간값 (95% CI)은 5.2 (4.0 내지 6.3) 개월이었고, 바비투시마브 + 겐시타빈 치료군에서는 5.6 (4.7 내지 7.0) 개월이었다. 바비투시마브를 추가한 이들 결과는 특히 광범위한 질환 부담을 가진 환자 집단에서 고무적이다.
- [0520] (기능적 β 2GPI 수준이 치료 결과와 상관 관계가 있음을 보여주는) 실시예 XIV의 III 상 시험 및 실시예 XVII의 기능적 β 2GPI 분석 후, 본 II 상 시험으로부터의 저장 샘플을 기능적 β 2GPI에 대해서도 시험하였다. 실시예 XVIII에서 보고된 바와 같이, 이들 분석의 결과는 기능적 β 2GPI의 수준이 성공적인 바비투시마브 치료를 위한 바이오마커라는 사실을 강화시킨다.
- [0521] **실시예 XIII**
- [0522] **NSCLC 환자에서 바비투시마브 및 도세탁셀의 II 상 시험**
- [0523] I 상 및 단일 아암 II 상 경험을 토대로, 본 실시예는 이전에 치료받은 III 상b/IV 비-편평상피성 비-소세포 폐암 (NSCLC) 환자에서 바비투시마브와 도세탁셀을 시험하는 II 상 시험에 관한 것이다.
- [0524] 이 연구 (PPHM 0902)는 이전에 치료받은 국부 진행성 또는 전이성 비-편평 상피성 NSCLC 환자에서 바비투시마브 + 도세탁셀을 평가하는 II 상, 무작위, 이중-맹검, 위약-대조 시험이었다. 이 연구의 주요 목적은 치료 아암 간의 ORR (CR + PR)을 비교하는 것이었다. 이차적인 목적은 PFS, DR, OS, 안전성 및 PK를 비교하는 것이 포함되었다.
- [0525] 환자는 도세탁셀 + 위약, 도세탁셀 + 바비투시마브 (1mg/kg) 또는 도세탁셀 + 바비투시마브 (3mg/kg) 투여를 1:1:1의 비율로 무작위 추출하였다. 도세탁셀 75 mg/m²를 최대 6주기 동안 각 21일 주기의 1일차에 투여하였고, 위약 또는 지정된 투여량의 바비투시마브를 매주 투여하였다. 환자들은 진행성 또는 독성까지 매주 지정된 블라인드 치료 (위약, 1mg/kg 바비투시마브 또는 3mg/kg 바비투시마브)를 계속 받았다.
- [0526] 전체 연구 집단 (아암 당 6명의 환자)의 하위 그룹이 바비투시마브 및 도세탁셀 간의 약물-약물 상호작용을 연구하기 위하여 PK 하위-연구에 참여하였다. 부가의 혈액 채취는 특정 시점에서 주기 1 및 2 동안 이들 환자에 대해 수행하였다.
- [0527] 평균 연령 60.0세인 총 121명의 환자 (남자 76명 및 여자 45명)가 연구에 등록되었다. 연구 치료는 IDMC (Independent Data Monitoring Committee) 회의가 끝난 후 해제되었는데, 이때 ORR의 1차 평가 항목에 도달했고, 이에 따라 연구 치료의 비맹검(unblinding)이 권장되었음을 확인하였다. 또한 안전성 우려나 문제점이 IDMC에 의해 확인되지 못했다.
- [0528] 연구 비맹검 후, 위약 및 1mg/kg 아암을 포함하는 패키지 및 라벨링 업체의 라벨링 오류가 발견되었다. 조사 요약은 FDA (Food and Drug Administration)에 제출되었으며, 위약 또는 1mg/kg 바비투시마브 투여 환자의 데이터를 모아서 탐색 분석 및 3mg/kg 바비투시마브 그룹과의 비교를 위한 조합 대조군 아암을 형성했다.
- [0529] 전반적으로, 치료군 간에 독성 등급에 의한 AE의 발생률에 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 치료군 간에 SAEs에서 눈에 띄는 차이는 관찰되지 않았다. 조합된 대조군 3명 (3.8%) 및 도세탁셀 그룹을 갖는 3mg/kg 바비투시마브 2명 (5.0%)은 5등급 (치명적) 상태를 보였다. 치명적인 상태를 가진 조합된 대조군 환자는 패혈증있는 환자 1명, 뇌 혈관 사고인 환자 1명, 및 폐렴과 슈도모나스 패혈증을 모두 경험한 환자 1명을 포함했다. 3mg/kg 바비투시마브 + 도세탁셀 군에서는, 1명의 환자가 바비투시마브와 관련이 없는 치명적인 패혈증을 가졌고, 환자 1명은 바비투시마브와 관련이 없는 성장 실패 사례가 있었다.
- [0530] 효능 종료점의 요약이 표 6에 제시되어 있고, 이때 분석은 ITT (Intend-To-Treat) 집단 및 중앙 평가 데이터에 기초하였다. 모든 종료점 (ORR, PFS 및 OS)은 조합된 대조군 아암 (위약 또는 1mg/kg 바비투시마브)과 비교하여, 바비투시마브 3mg/kg에 대한 우월성 경향을 나타냈다. ORR은 조합된 그룹에 비해 바비투시마브 3mg/kg의 경우 약 50% 더 컸다. PFS의 중간값은 조합 군과 3mg/kg 바비투시마브 군 사이에서 유사했지만, OS 중간값은 바비투시마브 3mg/kg을 투여한 환자에서 약 60% 더 길었다. 특히, 3mg/kg 바비투시마브 + 도세탁셀로 치료한 환자는 11.7개월 MOS 대 조합된 아암의 환자 (HR = 0.66)에 대한 7.3개월 MOS를 가졌다.

[0531] [표 6]

임상 II 상에 기초한 효능 분석의 요약

효능 측정	위약 + 바비투시마브 1 mg/kg	바비투시마브 3 mg/kg
N =	80	41
총 반응을 (CR+PR)		
N (%)	9 (11.3)	7 (17.1)
95% CI	(4.3, 18.2)	(5.6, 28.6)
무진행 생존율		
중간일 (개월)	119 (3.9)	127 (4.2)
95% CI (일)	(79, 126)	(82, 197)
총 생존율		
사멸개체수 (%)	60 (75.0)	22 (53.7)
중간일 (개월)	221 (7.3)	355 (11.7)
95% CI (일)	(169, 367)	(157, 525)

[0532]

[0533]

기능적 β2GPI 수준이 치료 결과와 상관 관계가 있음을 보여준, 실시예 XIV의 III 상 시험 및 실시예 XVII에서 기능적 β2GPI의 분석에 이어서, 본 II 상 시험으로부터의 저장 샘플을 기능적 β2GPI에 대해서도 시험하였다. 실시예 XVIII에 기술되어 있는 이들 분석의 결과는 기능적 β2GPI의 수준이 성공적인 바비투시마브 치료를 위한 바이오마커임을 더욱 확인한다.

[0534]

실시예 XIV

[0535]

NSCLC 환자에서 바비투시마브 및 도세탁셀의 III 상 시험

[0536]

위의 실시예에서 보고된 바와 같이, I 상 및 II 상 연구의 전반적인 결과는 임상적으로 의미있는 바비투시마브의 치료 효과를 나타냈다. 이러한 결과 및 특히 상기 기술된 이중-맹검 II 상 시험을 기반으로 하여, III 상 시험을 실시했으며, 본 실시예는 III 상 시험 및 생성된 데이터를 기술하고 있다.

[0537]

III 상 시험 (PPHM 1202)은 이전에 치료한 III 상b/IV 비-편평 비-소세포 폐암 (NSCLC) 환자에서의, 바비투시마브 플러스 도세탁셀의 무작위, 이중 맹검, 위약-대조 멀티센터 시험이었다. 이러한 글로벌한 이중 맹검 III 상 시험은 2012 년에 시작되었다. 선택 기준은 ECOG PS 0-1 및 허용되는 이전의 면역요법과 함께, 백금-이중 화학 요법 (공지된 EGFR 또는 ALK 돌연변이라면 적절한 표적 치료가 진행되어야 함)에서 진행된 III 상b/IV 비-편평 상피암 NSCLC 환자를 피험체로 했다. 이 시험은 진행 또는 독성이 나타날 때까지, 597명의 상기 환자에게 매주 3mg/kg 바비투시마브 (바비투시마브 + 도세탁셀), 또는 위약 (도세탁셀 단독)과 병행한 도세탁셀 (75 mg/m²)을 1:1의 비율로 6회 21일 주기로 투여하였다. 1차 종료점은 전체 생존율 (OS)이었고, 2차 종료점은 객관적인 반응을 (Independent Central Review, ICR), 무-진행 생존율 (ICR), 안전성, PK, 삶의 질 (LCSS) 및 면역 상관관계를 포함한 탐색 바이오마커를 포함했다. 선택된 환자의 기준 특성이 표 7에 제시되어 있는데, 이때 '위약' 컬럼은 도세탁셀 단독 치료 환자를 칭하고, '바비투시마브' 컬럼은 바비투시마브 + 도세탁셀 치료 환자를 나타낸다.

[0538] [표 7]

임상 III 상에서의 환자의 기준 특징

	위약 n = 300	바비투시마브 n = 297
중간 연령, 세 (범위)	62 (30-82)	63 (37-85)
> 75 (%)	5	8
남성/여성 %	61/39	60/40
질병 기 (%)		
IIIb 기	5	5
IV 기	95	95
최근/이전 흡연자 (%)	75	79
유전적 돌연변이 (%)		
EGFR	8	12
ALK	2	2
기타	14	9
없음	52	52
미공지 또는 미시험	26	28
성능 상태 (%)		
0	29	32
1	70	66
이전 치료 (%)		
유지 및/또는 표적 치료	57	57
면역 치료	4	2
기준 β 2GP1 \geq 200 μ g/ml %	49	56

[0539]

[0540]

A. 안전성

[0541]

표적화된 OS 상태의 70%에 도달하면, 중간 OS (mOS)를 평가했다 (아래 참조). 연구 전반에 걸쳐, 안전성 프로파일은 그룹 사이에 일반적으로 유사했음이 확인되었다. 치료 및 안전성 요지가 최근 발표되었다 (Palmero 외, 2017). 그 안에 보고된 바와 같이, 바비투시마브와 도세탁셀의 조합의 안전성 프로파일은 위약 플러스 도세탁셀과 유사하다. 3급 이상의 부작용은 바비투시마브 + 도세탁셀 군 환자의 68% 및 도세탁셀 단독 군 환자의 60%에서 나타났다. 최근 환자의 15% 이상에서 보고된 치료 관련 AE가 보고되었다 (Palmero 외, 2017). 또한, 치료 관련 3/4급 열성 호중구 감소증은 도세탁셀 단독 (5%)에서보다 바비투시마브 + 도세탁셀 (8%)에서 다소 높았다. 표 7의 기준 특성에서, 도세탁셀 단독으로 치료한 환자의 수 (위약, n= 300)는 ITT 집단을 기반으로 한다, 즉 모든 무작위 환자를 포함하는 반면에, 문헌(Palmero 외, 2017)에 공개된 바와 같이 도세탁셀 단독으로 치료한 환자의 수 (위약, n = 299)는 안정성 집단을 기반으로 한다, 즉 치료받은 모든 무작위 환자를 포함함을 주지한다.

[0542]

B. 효능

[0543]

표적화된 OS 상태의 70%에 도달하면, mOS는 바비투시마브 + 도세탁셀 그룹의 환자 297명 중 10.7개월 (95% 신뢰 구간 [CI], 8.6-11.5)이었고, 도세탁셀 단독 치료군 환자 300명 중에는 10.8 개월 (95% CI, 9.2-12.6)이었다 (사망 위험 비 (HR), 1.10 (0.89, 1.37)). PFS (무진행 생존률)는 또한 표적화된 OS 상태의 70%에 도달할 E0 2 개의 아암에 유사했으며, 바비투시마브 + 도세탁셀 군의 PFS의 중간값은 4.1개월이었고, 도세탁셀 단독 군의 경우는 3.9개월이었다. 바비투시마브 + 도세탁셀 아암과 도세탁셀 단독 아암 간에 골고루 분포된, 이 연구에서 환자의 약 15%가 후속 면역요법을 받았다 (실시에 XIX 참조).

[0544]

마지막으로 무작위로 선정된 환자의 12개월 추적 관찰 및 표적화된 OS 증상의 약 85%에 도달한 경우, 바비투시마브 + 도세탁셀 군의 환자 297명 중 OS의 중간 값은 10.5 개월 (95% 신뢰 구간 [CI], 8.4-11.9)이었고, 도세탁셀 단독 군의 환자 300명 중에서는 10.9 개월 (95% CI, 9.2-12.1)이다 (HR 1.06; P = 0.533). 이 단계에서의 PFS는 바비투시마브 + 도세탁셀 군에서 4.2개월 (95% CI, 3.9-4.6)이었으며, 도세탁셀 단독 군에서는 4.1개월 (95% CI, 3.2-4.8)이었다 (HR, 1.02; P = 0.876). 이 단계에서의 ORR은 바비투시마브 + 도세탁셀 그룹에서 15% 대 도세탁셀 단독 군에서 11% 였다 (오즈 비율, 0.7; P = 0.15).

[0545]

이 단계에서 효능 분석 (ITT)은 표 8에 열거되어 있고, 이때 P-값은 양측화 코크란-멘텔-헨젤 (two-sided

stratified Cochran-Mantel-Haenszel) 정확한 방법에 기초한다. 계층화 요소에는 질병 임상 (IIIB 상 대 IV 상), 지역 (북미, 유럽, 기타 지역), 이전 유지 관리 및/또는 표적 치료법 (예, 아니오)이 포함된다.

[0546] [표 8]

임상 III 상, 효능 분석

효능 측정	위약 n = 300	바비투시마브 n = 297
총 생존률 (OS)	212 (70.7%)	206 (69.4%)
사망한 환자의 수 (%)	10.9 (9.2 내지 12.1)	10.5 (8.4 내지 11.9)
중간값 (개월) (95% CI)	1.06 (0.88-1.29); p=0.533	
HR (95% CI); p-값		
객관적인 반응률 (ORR) – CR+PR		
환자(%) (95% CI)	11 (7-15)	14 (11-19)
오즈 비율 (95% CI); p-값	0.7 (0.4-1.2); p=0.18	
반응 지속 기간 (DOR)		
중간값 (개월) (범위)	4.6 (0.03+ 최대 17.6)	4.2 (0.03+ 최대 21.0)
무진행 생존률 (PFS)		
발병 환자의 수 (%)	200 (66.7%)	190 (64.0%)
중간값 (개월) (95% CI)	3.9 (2.8 내지 4.4)	4.1 (3.3 내지 4.6)
HR (95% CI); p-값	1.00 (0.82-1.22); p=0.990	

[0547]

[0548]

중간값 OS에서의 이들 결과는 예상 밖으로 실시예 XIII에서 상기 기술한 II 상 데이터 및 연구 일률을 위해 사용되는 예상되는 mOS와 상이하며, 이들중 후자는 바비투시마브 + 도세탁셀의 경우 9.1개월 mOS 대 도세탁셀 단독의 경우 7.0개월 mOS였다 (80% 일률 및 1-면 2.5% 수준의 유의성, 9.1 대 7.0 개월 mOS; HR 0.77을 제공하기 위한 437 OS 상태).

[0549]

Retrospective VeriStrat[®] 단백질 테스트는 바비투시마브 + 도세탁셀 군의 80% 및 도세탁셀 단독 군의 84%에서 VS 양호한 시그니처를 보여 주었다 (실시예 XV). 이전에 치료된 비-편평 상피암 NSCLC 환자에서의 이러한 III 상 시험이 바비투시마브 + 도세탁셀 아암에서 우수한 OS의 1차 목적을 충족시키지 못했지만, 이 결과는 VS 양호한 시그니처 전체, 및 특히 도세탁셀 단독 군에서의 예상 비율보다 높은 비율로 영향을 받을 수 있다.

[0550]

실시예 XV

[0551]

바비투시마브 III 상 시험의 초기 바이오마커 분석

[0552]

상기 기술한 III 상 시험과 관련하여, 바이오마커 분석은 하나 이상의 바이오마커 또는 바이오마커의 패턴 (바비투시마브 "시그니처")을 식별하기 위한 것으로, 바비투시마브 함유 치료학적 요법으로부터 가장 많은 이익을 얻은 환자에게 실시되었다. 본 실시예는 이후의 연구에 적용되고, 초기 단백질 시그니처 분석을 기술하는 샘플 채취 방법에 관한 것이다.

[0553]

A. 샘플 수집

[0554]

환자 혈액 샘플 수집을 위해 III 상 시험을 계획하였고, 정보 동의를 얻었다. 환자의 혈액 표본은 적절한 정맥 절개 기술을 사용하여 수득하였다. 지혈대를 정맥 천자 위치보다 7-10cm 위에 놓았지만, 예비 정맥 선택을 위한 지혈대 적용은 1분을 초과해서는 안되었다. 환자는 펌프하지 말고 폐쇄하도록 요구되었고, 그들의 처음 및 정맥 천자 부위는 중앙에서 주변으로 원형 운동을 사용하여 70% 이소프로필 알콜 패드로 닦아 공기 건조시켰다.

[0555]

21 게이지 바늘을 사용하여, 환자의 혈액을 5.0ml Gold top 혈청 분리기 튜브 (Serum Separator Tube (SST))에 수집했다. 지혈대는 혈액이 흐르기 시작하고 튜브가 완전히 채워진 후 가능한 한 빨리 풀었다. 수집 후 튜브를 즉시 5회 뒤집었고, 적어도 30 분 동안 응고시켰다. 혈청을 분리하기 위해, 튜브를 30분 내지 60분 사이에 1,000 내지 1,300g에서 15분 동안 원심 분리하였다. 피펫을 사용하여 약 1.25ml의 혈청을 3.6ml의 냉동 튜브 x2 로 옮겼고, 그 샘플을 동결시켰다.

[0556]

동결된 바이오알을 시험편 백에 넣고 단단히 밀봉하였다. 드라이 아이스 하주(shipper) 바닥은 드라이 아이스 및 상자에 넣은 시험편 백으로 겹쳤다. 상자가 가득 찰 때까지 드라이 아이스를 첨가했고, 뚜껑을 제자리에 고정시켜 샘플은 -70°C에서 보관을 위해 임상검사 센터(Central Lab)로 배송시켰다.

[0557] 임상검사 센터는 샘플을 해동하여 하위 분류용 바이알을 준비했다. 피펫을 사용하여 최소 250 μ l의 혈청을 2ml 자연 캡 냉동 튜브×4에 옮겼고, -70°C에서 재냉동했다. 동일한 배송 지침을 반복하여, 하위 분류 표본 샘플을 테스트용 바이오마커를 위한 테스트 랩으로 드라이 아이스로 동결 배송했다.

[0558] **B. VeriStrat[®] 분석**

[0559] 암의 다차원 특성을 이해하는 것은 환자의 선택과 치료 계획에 중요하다. VeriStrat[®] 시험은 진행성 NSCLC 환자에 대한 시판중인 혈액-기반의 예상 및 예후적 단백질 검사이다. 예후 이외에, VeriStrat는 단일 제제 치료 옵션 사이에서 선택할 때 차등 치료 혜택이 예측된다. VeriStrat는 III 상 시험으로부터의 환자 샘플에 대해 소급해서 수행하였다.

[0560] III 상 시험 환자의 치료 전 혈청 샘플로 질량 분석을 사용하여 단백질 발현에 대해 시험하였고, 더 공격적인 질환과 상관관계가 있는, VeriStrat (VS) 불량 (VS-P), 또는 보다 유리한 예후와 관련이 있는 VS 양호 (VS-G)로서 환자를 분류하였다. OS는 Kaplan-Meier 통계 방법을 사용하여 VeriStrat 하위 그룹에 의해 분석되었다.

[0561] VeriStrat 분류는 597명의 무작위 환자중 569명의 환자를 위해 사용할 수 있었다. 바비투시마브 + 도세탁셀 그룹에서, 80%는 VS 양호하였고, 20% VS 불량이었다. 도세탁셀 단독 그룹에서, 84%는 VS 양호하였고 16%는 VS 불량이었다. 따라서, VeriStrat 양호/불량 시그니처는 III 상 시험에서 치료 그룹 사이 크게 밸런스를 맞춘 상태였다.

[0562] 모든 VS 양호에서 전체 생존율 중간값 (mOS)은 11.5개월 (95% 신뢰 구간 [CI], 10.6-12.9)이고, 모든 VA 불량에서는 5.7 (95% CI, 4.2-7.2)이며; p <0.0001이다. HR OS (VS-G 대 VS-P) 0.49 (95% CI, 0.37-0.64); p <0.001. 이들 VeriStrat 결과는 PROSE 시험 (Gregore 외, 2014)과 일치하고, PFS 및 OS에 대한 전반적인 예후이다.

[0563] VS 양호 환자 중에서, 바비투시마브 + 도세탁셀 아암의 mOS는 11.2개월 (95% CI, 10.2-12.8)이고, 도세탁셀 단독 그룹에서는 11.8개월 (95% CI, 10.4-13.5)이다; p = 0.38. VS 불량 환자 중에, 바비투시마브 + 도세탁셀 아암의 mOS는 5.8개월 (95% CI, 5.0-11.3)이고, 도세탁셀 단독 그룹에서는 4.7개월 (95% CI, 3.4-7.2)이다; p = 0.27. VS 불량 환자에서 OS를 개선하기 위한 바비투시마브의 능력은 이러한 환자 그룹에 대한 제한된 치료 옵션을 제공하여, 중요하다.

[0564] 결론적으로, III 상 시험에서 VeriStrat 결과는 PFS 및 OS에 대한 전체적인 예후이지만, 바비투시마브 치료 반응에 대해서는 예측되지 않는다. 도세탁셀 아암의 예기치 않은 OS 결과는 VeriStrat 양호 환자의 상대적으로 높은 전체 비율에 영향을 받을 수 있다. 특히, 이러한 III상 시험에서 VeriStrat 양호 환자의 퍼센트 (80% 이상)는 앞서 보고된 것 (약 67%)보다 높는데, 이는 환자가 전체적으로 더 나은 예후를 가짐으로써, 부분적으로 도세탁셀 아암의 예상되는 성능보다 양호함을 설명하는 것이다.

[0565] 앞서의 VeriStrat 분석과는 별도로, 별도의 단백질 접근법이 또한 바비투시마브에 대해 특별히 탐구되었다. 바비투시마브의 첨가로 이득을 보는 환자의 하위 그룹을 확인할 수 있는 가능한 시험을 조사하기 위해 광범위한 질량 분석 및 상관 분석이 수행되었지만, 그러한 유전자 세트 농축 분석은 임상적 이익과 관련된 어떠한 마커도 확인하지 못했고, 이에 따라 추가 작업의 필요성 및 새로운 접근 가능성이 강조되었다.

[0566] **실시에 XVI**

[0567] **기능적 β 2GPI에 대한 분석**

[0568] 본 실시예는 유체 샘플에서 기능적 (활성) β 2GPI의 검출을 위해 명시적으로 설계된 β 2GPI 분석법의 개발에 관한 것이다. 이 시험 방법은 PS 및 바비투시마브에 모두 결합할 수 있는 β 2GPI를 의미하는, 기능적 β 2GPI를 검출하고 정량하기 위해 독특하게 채택되었다. 따라서, 본 실시예는 바비투시마브 치료와 관련하여 추가의 의미있는 바이오마커 분석에 필요한 이전의 사용할 수 없었던 수단을 제공한다.

[0569] **A. 재료 및 방법**

[0570] **1. 재료 및 장비**

[0571] 아래의 특정 물질 및 장비는 섹션 B1 및 B2에 따라 본 실시예에서 제시된 결과를 생성하기 위한 분석에 사용되었다. 재료: 96-웰 배지 결합 편평한 플레이트 (Greiner BioOne, cat # 655001); 96-웰 비-결합 둥근 플레이트 (Costar, cat # 3605); 핵산 (Sigma, cat # 32293); PS 항원 (Sigma, cat # P6641); 오발부민 (Sigma, cat

A5503); 색원성 기재, 테트라메틸벤지딘 (TMB), (KPL, cat # 50-76-00); 2M H₂SO₄ (Fisher, Cat# SA818-4); 플레이트 커버 (Fisher 015-027-11); 접착 성 플레이트 실러 (VWR 232701); 시약 저장고 (VistaLab Cat # 3054-1000). 1.5ml 미세 원심분리 튜브, 50ml 원뿔 튜브 및 15ml 원뿔 튜브도 사용하였다.

[0572] 장비 : 와동 (Scientific Industries); 타이머 (VWR 62344-64); 10 내지 1,000 μ l의 피펫터 (Rainin); 100~300 μ l의 멀티 채널 피펫터 (Rainin); 450 및 650nm에서 플레이트 판독기 (EN1835). 저울, 교반 막대 및 37°C 인큐베이터도 사용되었다. SoftMax[®] Pro 소프트웨어를 분석에 사용했다.

[0573] **2. 완충액 및 기술**

[0574] 세척 완충액은 1×인산염-완충 식염수 (PBS)이고, 차단 완충액 1×PBS중 2% 오발부민이다.

[0575] 분석을 통해, 대용량 (예: $\geq 500\mu$ l)으로 작업할 때 감산 (subtractive) 피펫팅을 이용했다. 전량의 희석액을 먼저 피펫팅했다. 추가 시약을 첨가하기 전에 동 부피의 희석제를 제거하였다. 잠재적으로 위험한 모든 증기는 흡 후드에서 처리되었다.

[0576] **3. 바비투시마브-HRP**

[0577] 바비투시마브 항체는 분석에 사용하기 위한 바비투시마브-HRP 검출 체제를 제조하기 위해 서양 고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)와 결합시켰다. 접합은 활성화된 퍼옥시다제를 제조자에 의해 제공된 pH 7.2의 항체에 접합시키기 위한 절차에 따라 EZ-Link[®] Plus 활성화된 퍼옥시다제 (Thermo Scientific, Cat # 31487)를 사용하여 수행하였다. 간단히 말해서, 1mg의 바비투시마브를 PBS (pH 7.2)에서 1mg/ml으로 희석시켰다. 이것을 동결 건조된 EZ-Link Plus 활성화된 퍼 옥시다아제 1mg에 첨가하여 재구성하였다. 재구성 즉시, 5M 나트륨 시아노보로하이드라이드 용액 10 μ l를 반응물에 첨가했고, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 배양이 완료되면, 20 μ l의 켄칭 (quenchin) 완충액을 첨가했고, 실온에서 15분 동안 배양하였다. 접합된 바비투시마브-HRP (1mg/ml)를 4°C에서 최대 4주 동안 보관하였다.

[0578] **4. 코팅**

[0579] ELISA 플레이트를 다음과 같이 PS 항원으로 코팅시켰다: 5 μ g/ml PS 항원을 제조했고, 송풍기가 있는 흡 후드에서 핵산 6ml로 희석하였다. 50 μ l의 PS 용액을 12-채널 피펫을 사용하여 각 웰에 첨가하였다. 흡 후드 송풍기를 다시 켜고, 핵산을 30-45분 동안, 전형적으로 30분 동안 증발시켰다.

[0580] **5. 차단**

[0581] PS-코팅된 ELISA 플레이트는 다음과 같이 차단하였다: 차단 완충액 (1×PBS중 2% 오발부민) 플레이트당 100ml를 제조하였다. 차단 완충액 200 μ l를 12-채널 피펫을 사용하여 각 웰에 첨가하였다. 차단된 ELISA 플레이트를 37°C에서 120분 동안 배양하였다 (± 10 분, 이는 분석 성능을 변화시키지 않았음).

[0582] **6. 샘플 준비**

[0583] 분석을 위한 표준, 양성 대조군 및 샘플 제조는 하기 기술된 바와 같이 수행하였다.

[0584] 양성 대조군에 대한 β 2GPI 표준은 0.2 M 글리신, 0.15 M NaCl, pH 7.4의 완충액 중 Haematologic Technologies, Inc. (HTI; cat # B2G1-0001-C; 1.0mg/ml)로부터 입수하였다. β 2GPI의 바이알을 해동시켰고, 표준 및 양성 대조군 제조는 하기와 같이 수행하였다:

[0585] 10 μ g/ml의 β 2GPI 서브스톡 A 1ml를 차단 완충액에서 제조하였다;

[0586] 1000ng/ml의 β 2GPI 서브스톡 B 1ml는 서브스톡 A로부터 감산 피펫팅 (subtractive pipetting)하여 차단 완충액에서 제조하였다;

[0587] 250ng/ml의 β 2GPI 표준물 1ml는 서브스톡 B로부터 250 μ l를 감산 피펫팅하여 차단 완충액에서 제조하였다; 및

[0588] 200ng/ml, 75ng/ml, 30ng/ml 및 5ng/ml의 대조군 샘플은 감산 피펫팅을 사용하여 표 9에 따라 1000ng/ml 서브스톡으로부터 을 제조하였다.

[0589] [표 9]

기능성 β2GPI 에세이를 위한 양성 대조군 제조

양성 대조군 농도 (ng/ml)	서브스트레이트 B 부피 (μl)	블로킹 버퍼 희석 부피 (μl)	전체 부피 (μl)
200	200	800	1000
75	75	925	1000
30	30	970	1000
5	5	995	1000

[0590]

[0591]

미지 샘플은 다음과 같이 시험을 위해 제조하였다: 1:4000 및 1:8000의 최종 희석으로 차단 완충액에서 제조하였고; 미지 샘플의 1:100 희석액을 먼저 준비했고; 1:40 희석액을 1:100 희석액으로부터 제조하여 1:4000 희석을 달성하고; 1:80 희석액을 1:100 희석액으로부터 제조하여 1:8000 희석액을 성취하였다.

[0592]

비-결합 플레이트 제조는 다음과 같이 수행하였다: 75μl 차단 완충액을 B-H 열의 컬럼 1-3에 가했고; 250 ng/ml 표준 용액 150μl를 A 열 컬럼 1-3에 가했고; 다중채널 피펫을 사용하여, 컬럼 1-3으로부터의 75μl를 A 열로부터 G 열을 통해 연속 희석시켰고; 75μl의 양성 대조군 및 샘플을 지정된 웰에 첨가했고; 75μl의 차단 완충액을 임의의 빈 웰에 첨가했다. 플레이트 설정은 표 10에 제시되어 있다.

[0593]

[표 10]

기능성 β2GPI 에세이를 위한 플레이트 셋업

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	250 ng/ml STD			(+ 대조군 200ng/ml)			샘플 3 희석물 1			샘플 7 희석물 1		
B	125 ng/ml STD			(+ 대조군 75ng/ml)			샘플 3 희석물 2			샘플 7 희석물 2		
C	62.5 ng/ml STD			(+ 대조군 30ng/ml)			샘플 4 희석물 1			샘플 8 희석물 1		
D	31.3 ng/ml STD			(+ 대조군 5ng/ml)			샘플 4 희석물 2			샘플 8 희석물 2		
E	15.6 ng/ml STD			샘플 1 희석물 1			샘플 5 희석물 1			샘플 9 희석물 1		
F	7.8 ng/ml STD			샘플 1 희석물 2			샘플 5 희석물 2			샘플 9 희석물 2		
G	3.9 ng/ml STD			샘플 2 희석물 1			샘플 6 희석물 1			샘플 10 희석물 1		
H	0 ng/ml STD			샘플 2 희석물 2			샘플 6 희석물 2			샘플 10 희석물 2		

[0594]

[0595]

7. 검출

[0596]

차단을 마무리하기 전에, 300 ng/ml 바비톡시마브-HRP 6ml를 차단 완충액에서 제조했다. 분석 플레이트는 각 웰에 250μl를 피펫팅에 의해 1×PBS로 세척하였고, 이는 2회 이상 반복하였다. 이 경우에, 플레이트를 1×PBS로 1회 세척한 플레이트 세척기가 사용될 수 있다. 플레이트가 가능한 한 건조한 것을 확인했다.

[0597]

300ng/ml 바비톡시마브-HRP의 50μl를 분석 플레이트의 모든 웰에 첨가하였다. 50μl를 비-결합 플레이트의 상응하는 각각의 웰로부터 첨가하였다. 분석 플레이트 및 이러한 방법의 비-결합 플레이트를 사용하는 것은 검출 가능하게 표지된 바비톡시마브를 먼저 PS-코팅된 분석 플레이트에 첨가한 후, 비-결합 플레이트로부터의 β2GPI를 함유하는 샘플을 첨가함을 의미하는 것이다. 이 순서는 피펫팅 중에 교차 오염을 방지한다. 바비톡시마브-HRP 및 β2GPI 함유 샘플을 플레이트 상에서 함께 배양하고, 90분 동안 37°C에서 배양을 수행하였다.

[0598]

8. 전개

[0599]

TMB 퍼옥시다제 기체 및 TMB 퍼옥시다제 용액 B는, 사용하기 적어도 1시간 전에 냉장고에서 꺼냈다. 분석 플레이트는 각 웰에 250μl를 피펫팅에 의해 1×PBS로 세척하였고, 이는 2회 이상 반복하였다. 플레이트 세척기가 사용될 수 있는데, 이 경우에, 플레이트를 1×PBS로 1회 세척한다. 플레이트가 가능한한 건조한 것을 확인했다.

[0600]

6ml의 TMB 퍼옥시다제 기체를 6ml의 TMB 용액 B와 혼합하여, 12ml의 TMB 혼합물을 제조하였다. 100μl의 TMB 용액을 분석 플레이트의 각 웰에 첨가했고, 5-6분 동안 전개시켰다. 분석 플레이트의 각 웰에 2M H₂SO₄ 100μl를 첨

가하여 전개를 중단시켰다. 분석 플레이트를 판독했고, 광학 밀도 (OD)는 반응 정지 30분 이내에 450nm에서 측정하였다. 마이크로플레이트 판독기는 분석 데이터의 인쇄물을 제공하는 SoftMaxPro 플레이트 데이터 및 분석 템플릿과 함께 사용되었다.

[0601] **9. 닳이 있는(Nicked) β2GPI의 제조**

[0602] 인간 혈장 및 재조합 인간 β2GPI로부터 정제된 β2GPI의 샘플을 모두 플라스민 (효소 가수분해)으로 처리하여, 닳이 있는 β2GPI의 대부분을 함유하는 샘플을 제조하였다. 닳이 있는 β2GPI는 초기 연구에서 균질하게 정제되지 않았지만, 닳이 있는 β2GPI는 닳이 없거나 또는 "온전한" β2GPI보다 과잉으로 존재하는 것으로 확인되었다.

[0603] **10. 총 β2GPI에 대한 분석**

[0604] 사용된 항체에 대한 제조업체의 사양에 기초해, 총 β2GPI를 검출해야하는 분석법이 설계되었다. 이것은 플레이트가 β2GPI에 대한 포획 항체로 코팅되고, 임의의 결합된 β2GPI가 항-β2GPI-HRP 접합체를 검출 항체로 사용하여 검출되는, US Biological에서 시판되는 항체를 사용하는 분석법이다. 항체 카탈로그 번호는 다음과 같다: 포획 항체, US Biological # A2299-81A, 친화성-정제된 항-β2GPI 및 검출 항체, US Biological # A2299-81B, 퍼옥시다제-접합된 항-β2GPI.

[0605] 포획 항체의 1:100 희석물을 pH 9.6인 탄산염 완충액 (50 mM 중탄산나트륨)으로 제조하였다. 100μl를 ELISA 플레이트의 각 웰에 첨가했고, 실온에서 배양하였다. 플레이트는 Tween-20을 함유하는 1×PBS 완충액으로 세척한 후, 1% BSA를 함유하는 200μl/웰의 분석용 희석제로 차단시켜, 37°C에서 배양하였다. 정제된 β2GPI를 사용하여 분석용 희석제에서 500ng/ml에서 시작하는 2배 희석 표준 곡선을 제조하였다. 샘플은 표준 곡선의 선형 영역 내 농도를 얻기 위해 분석용 희석제로 희석시켰다. 차단 배양 후, 플레이트를 세척 한 후, 표준 곡선 100μl/웰 및 샘플을 2중 또는 3중으로 첨가하였다. 표준 곡선과 샘플을 첨가한 후, 플레이트를 37°C에서 배양하였다. 검출 항체는 분석용 희석제로 1:400으로 희석하였다. 샘플 및 표준 곡선을 배양한 후, 플레이트를 세척한 다음, 검출 항체 100μl/웰을 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 배양하였다. 2차 항체 배양 후, 플레이트를 세척한 다음, TMB로 전개시켰다. 플레이트를 450nm에서 플레이트 판독기로 판독했고, 샘플 농도를 표준 곡선으로부터 결정하였다.

[0606] **B. 결과**

[0607] **1. 닳이 있는 β2GPI와 기능적 차별화**

[0608] 인간 혈장 ("인간") 또는 이어지는 재조합 발현 ("재조합")으로부터 정제된 β2GPI를 플라스민으로 처리하여 PS에 결합하지 않는 대다수의 플라스민-절단된 (닳이 있는) β2GPI를 함유하는 β2GPI 시험 샘플을 제조하였다. 이들 샘플은 본 분석에서 (표 11B) 및 상업적으로 이용 가능한 포획 및 검출 항체 (표 11A)를 사용하여 총 β2GPI를 검출하도록 설계된 분석을 사용하여, 플라스민이 없는 (온전한) β2GPI 및 각각의 50:50 혼합물과 함께 시험하였다. 결과는 하기에 제시되어 있다.

[0609] [표 11A]

전체 β2GPI 에세이에서의 닳 형성 및 기능성 β2GPI의 시험

샘플		농도 (ng/ml)
인간	플라스민-처리 β2GPI	104.12
	50:50 혼합물	119.77
	플라스민-불포함 β2GPI	140.90
재조합	플라스민-처리 β2GPI	141.35
	50:50 혼합물	134.51
	플라스민-불포함 β2GPI	140.90

[0610]

[0611] [표 11B]

기능성 β2GPI 에세이에서의 닉 형성 및 기능성 β2GPI의 시험

샘플		농도 (ng/ml)
인간	플라스민-처리 β2GPI	32.95
	50:50 혼합물	80.86
	플라스민-불포함 β2GPI	136.42
재조합	플라스민-처리 β2GPI	33.26
	50:50 혼합물	88.29
	플라스민-불포함 β2GPI	136.42

[0612]

[0613] 먼저, 상업적으로 이용 가능한 항체 (표 11A) 및 현재의 "기능적 β2GPI 분석"(표 11B)을 사용하는 소위 "총 β2GPI 분석"이 모두 유사한 농도의 β2GPI (약 141 ng/ml 및 136 ng/ml)를 판독함을 알 수 있다. 총 β2GPI 분석을 사용하면, 플라스민-처리된 재조합 β2GPI의 검출에는 본질적으로 차이가 없고, 인간 혈장에서 플라스민-처리된 β2GPI의 양이 (141에서 104ng/ml로) 증가함에 따라, 검출시 단지 중간 정도의 감소만 있다. 대조적으로, 기능적 β2GPI 분석을 사용하면, 재조합 또는 혈장-유래된 증가량의 플라스민-처리된 β2GPI가 결합에서 (136에서 33 ng/ml로의) 유의한 감소를 가져온다.

[0614] 분석의 디자인과 일관되게, 이들 결과는 따라서 본 분석법이 닉이 있는 β2GPI와 반대로, 기능적 β2GPI, 즉 PS 및 바비투시마브 모두에 결합하는 β2GPI를 효과적으로 검출할 수 있다는 것을 보여준다. 이는 본 기능적 β2GPI 분석을 시판중인 분석 키트 (및 시판중인 항-β2GPI 항체를 사용하는 분석)와 구별하며, 이는 PS에 결합된 β2GPI와 함께 닉이 있는 β2GPI (비 PS-결합)를 검출한다.

[0615] **2. 기능적 β2GPI의 정량화**

[0616] 본 분석법은 유체 샘플에서 기능적 β2GPI의 양을 성공적으로 측정할 수 있는데, 이는 PS와 바비투시마브 모두에 결합하는 β2GPI이다. 이 분석법은 이제 재생산 가능한 β2GPI 표준 곡선을 제조하기 위해 일상적으로 수행되어 왔다. 이와 관련하여, 비선형 회귀 분석에 사용되는 통계 방정식인, 4-파라미터 로지스틱 핏 (Four-

$$y = \frac{(A - D)}{\left(1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right)} + D$$

Parameter Logistic Fit)이 사용된다. 4- 파라미터 핏 방정식은 다음과 같다:

[0617] [상기 식에서:

[0618] A는 X 축의 낮은 값에 대한 점근선(asymptote) (즉, 곡선의 평평한 부분)에 상응하는 Y 값이고;

[0619] B는 곡선이 곡선의 중심에서 점근선으로부터 얼마나 빨리 변하는지를 나타내는 계수이며, 일반적으로 경사 인수 (slope factor)로 불리우며;

[0620] C는 A와 D 사이의 중간점에 해당하는 X값이며; 일반적으로 EC₅₀이라 불리우고; 및

[0621] D는 X축의 높은 값에 대한 점근선에 상응하는 Y값이다].

[0622] 기능적 β2GPI에 대한 표준 곡선의 대표적인 예가 도 16에 제시되어 있다. 이러한 표준 곡선에서, 플라즈마 또는 혈청 샘플과 같은, 인간 혈액중 기능적 β2GPI의 농도가 결정될 수 있다. 주로 정확성을 위해서뿐만 아니라 샘플 준비의 경제성을 위해, 표준 곡선은 ng/ml (나노그램/ml)로 준비된다. 정상 인간 집단에서 β2GPI의 평균 수준이 약 200μg/ml (마이크로그램/ml)이므로 (Mehdi 외, 1999; Miyakis 외, 2004), 표준 곡선은 시험 샘플이 분석법에서 분석하기 전에 희석될 것이라는 예상으로 제조한다. 희석된 혈장 또는 혈청 시험 샘플을 분석에서 실행한 다음, 환자의 β2GPI 농도를 희석 배수에 대해 조정하여 계산한다.

[0623] 이 분석은 이제 상기 III 상 시험으로부터의 환자에서 기능적 β2GPI 수준을 결정하기 위해 사용되었고, 이의 결과는 하기 실시예 XVII 및 실시예 XVIII과 실시예 XX에 제시되어 있다.

[0624] **3. 대안적인 동등한 분석 구성 요소 및 단계**

- [0625] 섹션 A1-A8에서 본 실시예에 기술된 특정 재료, 장비 및 분석 단계 외에도, 기능적 β2GPI를 검출하고 정량하기 위한 분석의 개념을 벗어나지 않고 구성 요소 및 방법 단계의 변형을 수행할 수 있다. 다음의 결과는 관련 제제가 섹션 A1-A8에 기술된 제제를 대체할 수 있으며, 본질적으로 동일한 결과가 성취되었음을 보여준다.
- [0626] 특정 선호 ELISA 플레이트는 상기 섹션 A1의 ELISA 플레이트를 대체하기 위해 사용될 수 있는 지질 흡착을 위해 최적화된 플레이트이다. 더 우수한 지질 (PS) 결합을 제공하는 표면 화학을 갖는, 지질 흡착을 위해 최적화된 ELISA 플레이트가 공지되어 있다. 그러한 ELISA 플레이트 중 하나는 ThermoFisher PolySorp® 플레이트로, 새로운 분석 포맷으로 사용되었다.
- [0627] 상기 섹션 A4의 헥산-계 PS 코팅법은 바람직하게는 이소프로판올-계 PS 코팅법으로 대체될 수 있는데, 이는 (헥산의 사용을 피함으로써) 사용자에게 특정의 안전 효과를 제공할 수 있다. 새로운 분석 포맷에서 코팅 완충액으로서 이소프로판올을 사용함에 있어서, 상기 ELISA 플레이트는 이소프로판올로 희석한 10μg/ml의 PS 항원을 사용하여 PS 항원으로 코팅시키고, 배양 시간은 90분이다.
- [0628] 효과적인 β2GPI 보정 곡선을 생성하기 위해, β2GPI를 수득하는 임의의 공지된 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, HTI (상기 섹션 A6)와 같은 시판용 공급 업체에서 구입하는 것과 같음. 대체 β2GPI 제제도 또한 한정되고 재현성있는 보정 제어를 위해 개발될 수 있다. 하나의 바람직한 방법은 CHO 세포에서 β2GPI를 발현시키고, 발현된 β2GPI를 정제하는 것이다.
- [0629] CHO 세포로부터 β2GPI의 바람직한 정제는 다음을 포함한다: 오염물을 제거하고 정화된 수확물(harvest)이 0.2 μm 필터를 통과할 수 있게하는 수집 정화, 염색질 추출 단계; 부피를 증가시키지 않고 정화된 수확물을 완충액-교환하고 그의 전도도를 감소시키기 위해 접선 유동 여과 (Tangential Flow Filtration, TFF) 시스템의 사용; 더 많은 오염물을 제거하기 위한 음이온 흐름 방식의 캡토(capto) 부착 단계; Nuvia™ S를 사용하여 응집체 및 기타 오염 물질을 제거하고, 용출액을 농축하고 완충액 교환 단계를 용이하게하는 강력한 양이온 단계; 및 선택적으로, 정제된 β2GPI를 완충액 교환하고 농축시키기 위한 TFF 시스템의 사용. β2GPI는 이러한 방식으로 발현되고 정제되었으며, 새로운 분석 형식으로 사용되었다.
- [0630] 상기 섹션 A3에 더하여, 특정 바람직한 바비투시마브-HRP 검출제는 일반적으로 사용되는 2종의 비-독점 가교결합제인 SMCC (숙신이미딜 4-(N- 말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카복실레이트) 또는 SATA (N-숙신이미딜 S-아세틸티오아세테이트)를 사용하여 가교결합시킨 접합체이다. 다른 바람직한 바비투시마브-HRP 검출제는 HRP의 수가 바비투시마브 항체를 초과하는 접합체, 특히 2:1 또는 3:1의 HRP:바비투시마브 비를 야기하고, 본질적으로 유리된 (비접합) 항체가 없는 접합체이다. 이러한 접합체는 S-300 사이징 컬럼에 의해 정제시켜 미반응된 반응 성분을 제거한다. 이들 구성 성분 및 특성을 각각 갖는 바비투시마브-HRP 검출제는 콜롬비아 바이오사이언시스 (Columbia Biosciences, 4985 Winchester Blvd., Frederick, Maryland, 21703)로부터 입수하였고, 새로운 분석 포맷에서 600ng/ml로 사용되었다.
- [0631] 특히 기술적인 이유로 하나 이상의 대안 성분과 분석 단계가 바람직할 수 있지만, 심지어 상기 모든 대안의 병용은 본 실시예, 즉 섹션 A1-A8하에 본래 기술된 것과 동일한 결과를 제공하는 기능적 β2GPI 분석법을 제공한다. 이러한 비교 결과를 하기 표 12에 나타내었는데, 이는 샌디에고 블러드 뱅크 (San Diego Blood Bank)로부터 입수된 4개의 무작위 인간 샘플 (공여체)을 사용하여 2가지 상이한 분석 형식에서 측정된 기능적 β2GPI 수준을 나타낸다.

[0632] [표 12]

기능성 β2GPI 에세이의 필적할만한 성능

공여자	β2GPI 농도 (μg/ml)			
	에세이 포맷, 실시예 XVI, A1-A8		에세이 포맷, 실시예 XVI, B9	
	평균	SD	평균	SD
1	214	21	214	20
2	276	20	281	33
3	224	22	226	22
4	223	21	219	23

[0633]

[0634] 실시예 XVII

[0635] **바비투시마브 III 상 시험에서 β2GPI 바이오마커 분석**

[0636] 상기 기술한 기능적 β2GPI를 사용하여, 본 실시예는 실시예 XIV의 III 상 시험의 환자에서 전처리 기능적 β2GPI의 수준을 보고하고 있다. 기능적 β2GPI 수준과 치료 결과를 연관시킴으로써, 본 실시예는 또한 바비투시마브 및 도세탁셀과 다른 병용 요법으로 치료한 NSCLC 환자에서와 같이, 성공적인 바비투시마브 치료를 위한 바이오마커로서의 기능적 β2GPI에 관한 것이다.

[0637] **A. 환자의 기능적 β2GPI 수준**

[0638] 상기 기술한 III 상 시험에서 597명의 환자를 증가하였다. III 상 시험에서 환자의 혈액 샘플 수집은 실시예 XV, A에 기술되어 있다. 본 분석에서, 기능적 β2GPI에 대해 평가 가능한 환자 샘플은 592개였다. 상기 592명의 환자 혈액 샘플의 부분-분취량을 바로 위 실시예에 기술된 분석법을 사용하여 기능적 β2GPI에 대해 시험하였다.

[0639] μg/ml 단위의 전처리 기능적 β2GPI의 수준과 통계의 요약을 표 13에 나타내었으며, 여기서 '바비투시마브' 열은 바비투시마브 + 도세탁셀로 치료한 환자를 칭하고, '위약'은 도세탁셀 단독으로 치료한 환자를 칭한다.

[0640] [표 13]

임상 III 상 환자의 기능성 β2GPI 수준

	N	평균 (SD)	최소	Q1	중간	Q3	최대
바비투시마브	294	202 (57.3)	22	162	207	240	365
위약	298	195 (59.7)	0.5	159	199	238	402
모두	592	198 (58.6)	0.5	161	203	239	402

[0641]

[0642] 전처리 기능적 β2GPI의 수준은 0.5 내지 402μg/ml이고, 모든 환자에 대한 기능적 β2GPI 분포가 도 17a 및 도 17b에 제시되어 있다. 바비투시마브 + 도세탁셀로 치료한 환자에서, 기능적 β2GPI는 도 17c에 제시된 바와 같이, 22 내지 365μg/ml의 범위였다. 도세탁셀 단독으로 치료한 환자에서 기능적 β2GPI의 분포는 도 17d에 제시되어 있고, 이는 연구의 전체 범위를 커버한다 (0.5 내지 402μg/ml).

[0643] 각 치료군 (202 및 195μg/ml) 및 전반적인 연구 (198μg/ml)에 있어서, 전처리 기능적 β2GPI의 수준은 문헌 (Mehdi 외, 20 mg/dl, 1999 및 200 mg/l by Miyakis 외, 2004)에 보고된 평균 200μg/ml와 일치한다.

[0644] 200μg/ml 이상의 수준의 전처리 기능적 β2GPI를 갖는 환자의 백분율은, 바비투시마브 + 도세탁셀로 치료한 환자의 경우 56%였고, 도세탁셀 단독으로 치료한 환자의 경우 49%임이 확인되었다.

[0645] **B. 단일 컷오프(Cutoff) β2GPI 바이오마커 분석**

[0646] 바비투시마브와 도세탁셀 치료를 받는 환자에서, 기능적 β2GPI를 반응 예측 인자로 평가하기 위해 수행된 하위 집단 분석은, 장기 생존에 대한 강한 경향을 보여 주었다.

[0647] 단일 컷오프 방법은 먼저 환자 β2GPI 데이터를 평가하기 위해 사용되었다. 이러한 방식으로 최적의 컷오프를 찾는 과정에서, 1단계는 바비투시마브 + 도세탁셀 군의 환자에서 높은 β2GPI 대 낮은 β2GPI 군의 OS 분리 또는 유의한 OS 분리를 검색하는 것이고; 2단계는 높은 β2GPI 환자에 대해 바비투시마브 + 도세탁셀 군 대 도세탁셀 단독 군 (위약)의 OS 분리 또는 유의한 OS 분리를 검색하는 것이다.

[0648] 578명 환자에 대한 단일 컷오프 방법을 적용하여 실시한, 가능한 바이오마커로서의 기능적 β2GPI의 초기 분석은, 놀랍게도 높은 β2GPI를 갖는 환자들 중에, mOS는 바비투시마브 + 도세탁셀 그룹의 환자 167명의 경우 11.9개월 (95% CI, 9.0-14.7)이었고, 도세탁셀 단독 그룹의 환자 141명의 경우 9.4개월 (95% CI, 7.7-11.7)인 것으로 나타났다 (사망에 대한 HR, 0.77, P = 0.1). 이들 초기 분석에서, "높은 β2GPI"는 200μg/ml 이상 (≥ 200 μg/ml)의 기능적 β2GPI의 전처리 수준으로서 정의된다. 이들 분석은 단일 컷오프를 기반으로 하기 때문에, "높은 β2GPI"를 갖지 않은 환자는 200μg/ml 미만 (< 200μg/ml)의 기능적 β2GPI를 갖는다.

[0649] 그 다음에, 단일 컷오프 분석은 592명의 평가 가능한 환자로 확장하였다. 통계적으로 유의하지 않지만, 이들 분석은 또한 환자가 200μg/ml 이상의 기능적 β2GPI의 전처리 수준을 가졌을 때, 바비투시마브 + 도세탁셀 그룹에서 장기간 생존에 대한 놀라운 경향을 보여주었다. 이들 결과는 도 18a 및 도 18b에 ≥ 200μg/ml의 기능적 β2GPI에 대한 카플란-마이어 (Kaplan-Meier) 생존 곡선으로 나타났다. 592명의 평가 가능한 환자 중에, 도 18a는

바비특시마브로 치료한 환자의 경우, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 기능적 β 2GPI를 갖는 환자 (167명의 환자)는 mOS가 11.4개월이었고, 이에 비해 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만의 "낮은 β 2GPI"를 갖는 127명 환자의 경우는 단지 9.8개월 (사망에 대한 HR, 0.76; P = 0.054, CI (0.58, 1.01)임)이었음을 보여준다. 도 18b에 제시된 바와 같이, 무작위 환자의 대략 52%를 나타내는, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 기능적 β 2GPI의 전-처리 수준을 갖는 환자에서, mOS는 바비특시마브 + 도세탁셀 그룹의 환자 167명에 대해 11.4개월 (95% CI, 8.4-16.6)이었고, 도세탁셀 단독 그룹의 환자 146명에 경우는 10.2개월 (95% CI, 8.5-11.9)이었다 (사망에 대한 HR, 0.82; CI (0.63, 1.06)이고, P = 0.134).

[0650]

[0651] **C. 두 개의 컷오프 β 2GPI 바이오마커 분석**

[0652] 상기 기술한 단일 컷오프 분석에 이어 2개의 컷오프 방법 (Klein & Moeschberger, 2003)을 사용하여 592명의 평가 가능한 환자의 데이터를 추가로 분석했다. 2개의 컷오프 방법에서, 1단계는 바비특시마브 (+ 도세탁셀)로 치료한 환자의 경우 "범위 내(Within Range)" 대 "범위 밖(Outside of Range)"의 유의한 OS 분리를 검색하는 것이고, 2단계는 "범위 내" 환자의 경우 바비특시마브 대 위약 아암의 유의한 OS 분리를 검색하는 것이다.

[0653] 592명의 평가 가능한 환자에서 2개의 컷오프 방법을 사용한 이들 하위-그룹 분석은, 각각 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 기능적 β 2GPI에서 출발하여, 바비특시마브 대한 생존 이익을 나타내는 기능적 β 2GPI의 수많은 통계학적으로 유의한 범위를 생성했고, 이에 따라 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 기능성 β 2GPI의 전처리 수준이 바비특시마브에 의한 치료에서 유의하다는 초기의 놀라운 사실을 입증했다. 특히, 2개의 컷오프 방법은 각각 210-270, 210-280, 210-290, 200-280 및 200-290 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위 내에서 기능적 β 2GPI의 전처리 수준이, 바비특시마브 + 도세탁셀 대 도세탁셀 단독으로 치료받은 환자의 전체 생존률에 유의한 통계적으로 유의한 예측 인자라는 것을 보여 주었다. 210-270, 210-280, 210-290, 200-280 및 200-290 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 기능적 β 2GPI 범위에 대한 이들 결과는, 표 14A 및 표 14B에 제시되어 있다.

[0654] [표 14A]

사전-처리 β 2GPI의 범위들은 바비특시마브 총 생존률을 개선시킨다.

β 2GPI ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		범위 환자 (N) 내			범위 내		
낮음	높음	바비특시마브	위약	전체	위험 비율	CI	P 값
210	280	124	102	226	0.689891086	0.51,0.94	0.0184092
210	290	131	108	239	0.702335779	0.52,0.95	0.0206955
210	270	111	93	204	0.704885964	0.51,0.98	0.0356625
200	280	149	129	278	0.750114990	0.57,1.00	0.0455542
200	290	156	135	291	0.758545153	0.58,1.00	0.0486627

[0655]

[0656] [표 14B]

사전-처리 β 2GPI의 범위들은 바비특시마브 총 생존률을 개선시킨다.

β 2GPI ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		범위 환자 (N) 밖			범위 밖		
낮음	높음	바비특시마브	위약	전체	위험 비율	CI	P 값
210	280	170	196	366	1.326781940	1.03,1.70	0.0260507
210	290	163	190	353	1.350309796	1.05,1.74	0.0205255
210	270	183	205	388	1.267025810	1.00,1.61	0.0537042
200	280	145	169	314	1.366480252	1.05,1.79	0.0217840
200	290	138	163	301	1.396948670	1.06,1.84	0.0164154

[0657]

[0658] 표 14A의 결과를 요약하면, 각각 210-270, 210-280, 210-290, 200-280 및 200-290 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 기능적 β 2GPI 범위는, 적어도 1개의 위험비, 및 생존율의 향상을 나타내는 통계학적으로 유의한 P 값을 갖는다. 표 14B는 당연히 반대로, 이러한 명시된 범위 밖의 기능적 β 2GPI를 갖는 환자가 하나 이상의 위험비, 및 생존 악화 (또는 증가된 사망 기회)를 나타내는 통계학적으로 유의한 P 값을 가짐을 나타낸다. 예를 들어, 무작위 환자의 약 49%를 나타내는 200-290 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 전-처리 β 2GPI 수준을 갖는 환자는, mOS가 바비특시마브 (+ 도세탁셀)로 치료할 때

11.4개월이었고, 이에 비해 동일한 범위의 β 2GPI 수준을 갖는 대조군의 환자 경우 단지 10.1개월이었다. 이러한 11.4개월 대 10.1개월은 mOS에서 통계학적으로 유의한 개선을 반영한 것이다 (HR 0.76, P = 0.049).

[0659] 200 μ g/ml 이상의 기능적 β 2GPI의 전처리 수준은 바비투시마브 치료에 대해 장기간 생존하는 경향을 나타낼 것이라는 어떠한 제안도 문헌에 없으며, 210-270, 210-280, 210-290, 200-280 또는 200-290 μ g/ml의 기능적 β 2GPI의 전처리 수준은 바비투시마브로 치료받은 환자의 전반적인 생존율의 잇점을 예측할 수 있다는 제안도 없다. 실제로, 그러한 결과를 제시하기 위해 바비투시마브를 사용한 이전의 중요한 임상 경험에는 아무것도 없다. 더욱이, 이러한 발견은 다양한 수준의 혈청 β 2GPI가 바비투시마브에 대한 치료 결과에 유의한 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주는, 광범위한 전-임상 모델로부터 얻은 데이터와는 상당히 상반된다. 특히, 전-임상 경험은 오히려 10-20 내지 50-60 μ g/ml 정도로 매우 낮은 수준의 혈청 β 2GPI가 바비투시마브 결합 및 활성을 지원하기에 충분할 것이라는 것을 나타내었다 (실시에 V).

[0660] 특히, 상이한 분석법을 사용하여, 실시예 V에서는 β 2GPI 대 항체의 몰비가 0.12 내지 0.25 (도 9a 및 도 9b, 도 1a, 도 1b, 도 1c 및 도 1d); 0.125, 0.5 내지 2 (도 10); 0.93 (도 11); 및 1.43 내지 2.86 (도 12)인 경우, PS에 대한 바비투시마브의 결합을 지지하는데 효과적인 것으로 나타났다. 바비투시마브가 약 2.86 (표 3)의 β 2GPI 대 항체 몰비에서 효과적임을 나타내는 전-임상 데이터를 포함하는 여러 상이한 결합 및 관능 시험 시스템을 고려할 때, 3 초과인 β 2GPI 대 항체의 몰비는 필요하지 않을 것이다. 본 III 상 시험에서는 바비투시마브 3mg/kg의 투여량을 사용하며, 상기 비율은 60 μ g/ml 미만의 β 2GPI 수준에서 성취된다 (도 19). 참고로, III 상 시험을 위한 β 2GPI, 항체의 양, 및 비교가능한 β 2GPI-항체 비가 표 15에 제시되어 있고, 이때 N은 각각의 정의된 증분 내에서 (592명의 평가 가능한 환자로부터) 기능적 β 2GPI의 수준을 갖는 환자의 수이다.

[0661] [표 15]

임상 III 상 환자의 β 2GPI 및 항체 수준 및 비율

바비투시마브 (mg/kg)	Cmax (μ g/ml)	바비투시마브 (μ M)	β 2GPI (μ g/ml)	N=	β 2GPI (μ M)	β 2GPI 대 Ab 몰비
3	56.4	0.389	10	3	0.2	0.514
3	56.4	0.389	20		0.4	1.028
3	56.4	0.389	30	1	0.6	1.542
3	56.4	0.389	40		0.8	2.057
3	56.4	0.389	50	0	1.0	2.571
3	56.4	0.389	60		1.2	3.085
3	56.4	0.389	80	9	1.6	4.113
3	56.4	0.389	100	26	2.0	5.141
3	56.4	0.389	120	28	2.4	6.170
3	56.4	0.389	140	43	2.8	7.198
3	56.4	0.389	160	36	3.2	8.226
3	56.4	0.389	180	43	3.6	9.254
3	56.4	0.389	200	90	4.0	10.283
3	56.4	0.389	220	101	4.4	11.311
3	56.4	0.389	240	70	4.8	12.339
3	56.4	0.389	260	62	5.2	13.368
3	56.4	0.389	280	44	5.6	14.396
3	56.4	0.389	300	23	6.0	15.424
3	56.4	0.389	320	7	6.4	16.452
3	56.4	0.389	340	2	6.8	17.481
3	56.4	0.389	360	1	7.2	18.509
3	56.4	0.389	380	1	7.6	19.537
3	56.4	0.389	402	2	8.0	20.566

[0662] 표 15 및 도 17a와 모델링에 사용되는 데이터 (표 1, 표 2 및 표 3)를 비교할 때, III 상 시험 환자의 대다수는 심지어 바비투시마브가 혈액에서 그의 최대 농도로 존재했을 때 (C_{max} 56.4 μ g/ml; 실시예 VI; Gerber 외 2011)에도, 바비투시마브 결합을 포화시키기에 충분한 것보다 더 큰 β 2GPI 대 항체 비에 일치하는 기능적 β 2GPI 수준 (\geq 2.86)을 가졌고, 즉 60 μ g/ml 또는 1.2 μ M (표 15; 도 19)에서 시작하였다. 실제로, 592명의 평가 가능한 환

자 중 단지 4명만이 (0.68%) 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만의 기능적 β 2GPI의 전처리 수준을 가졌다. 또한, (시험에서 환자 대부분에 대한 경우였던) 기능적 β 2GPI 수준이 증가함에 따라, β 2GPI 대 바비투시마브의 몰비는 2 또는 3보다 훨씬 더 높고, 예컨대 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 10 이상이다. 이전의 전-임상 모델링이나 임상 경험에서, 바비투시마브 치료에 유의한 β 2GPI 수준 또는 비율에 대한 지적은 없었다. 오히려, 도 19에 제시된 바와 같이, 전-임상 데이터는 편리하게는 약 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 시작하는 약 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 심지어 그 이하 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 β 2GPI는 β 2GPI:Ab 몰비가 0.257임)의 낮은 수준의 혈청 β 2GPI가 바비투시마브 결합 및 활성을 지원하기에 충분할 것이라고 제시하였다 (실시예 V).

[0664] 기대하지 않았지만, 바비투시마브 결과에 대한 가능한 바이오마커로서 기능적 β 2GPI의 전처리 수준에 상세한 분석은 매우 고무적이다. 따라서, 환자에서 기능적 β 2GPI의 전처리 농도를 측정하는 것은 바비투시마브 치료에 대한 반응을 예측하는 전략, 즉 바비투시마브에 의한 치료로부터 더 많은 및 가장 혜택을 볼 수 있는 환자를 선택하는 전략을 제공한다. 이것은 특히 바비투시마브와 도세탁셀의 사용에서, 특히 NSCLC에서 관찰되었다. 그러나, 기능적 β 2GPI 및 PS와의 복합체중 바비투시마브 결합의 메카니즘, 및 전체 바비투시마브의 면역 활성화 메카니즘이 모든 바비투시마브 치료법에 공통적이기 때문에, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 기능적 β 2GPI의 전처리 수준에 기초한 환자의 선택은 이에 따라 치료 결과를 향상시킬 기대가 충분한 바비투시마브를 사용하는 모든 미래 시험 및 치료법에 포함될 수 있다. 실제로, 이것을 뒷받침하는 증거는 실시예 XVIII 및 실시예 XX에 제공된다.

[0665] **실시예 XVIII**

[0666] **추가 바비투시마브 임상 시험에서 β 2GPI 바이오마커 분석**

[0667] 실시예 XVII에서 성공적인 바비투시마브 치료를 위한 바이오마커로서 기능적 β 2GPI의 확인 이후, 본 실시예는 이전의 바비투시마브 임상 시험으로부터의 샘플에 기능적 β 2GPI 분석의 사용을 확장시킨다. 다음 결과는 동일한 수준의 기능적 β 2GPI가 바비투시마브의 성공적인 치료 결과와도 상관관계가 있다는 것을 보여 주며, 따라서 바비투시마브에 대한 바이오마커로서 기능적 β 2GPI를 확인한다.

[0668] **A. 실시예 XIII의 II 상 시험**

[0669] 실시예 XIII의 NSCLC II 상 시험으로부터의 샘플 (PPHM 0902)을 실시예 XVI의 기능적 β 2GPI 분석을 사용하여 시험하였다. 전-처리 수준의 기능적 β 2GPI를 평가할 수 있었던 119명의 환자 샘플이 있었는데, 그 중 40명이 바비투시마브 3mg/kg 아암에, 79명이 조합된 대조군 아암 (위약 또는 1mg/kg 바비투시마브)에 있었다.

[0670] 전처리 기능적 β 2GPI의 수준은 모든 환자에서 0.5 내지 266 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위였다 (도 20a). 바비투시마브 3mg/kg + 도세탁셀로 치료한 환자 내에서, 기능적 β 2GPI는 0.5 내지 266 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위였다 (도 20b). 조합된 대조군 아암의 환자에서 기능적 β 2GPI의 분포는 0.5 내지 257.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였다 (도 20c). 각 치료 그룹 (바비투시마브 3 mg/kg의 경우 169.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 조합된 대조군 아암의 경우 171.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 임) 및 전반적인 연구 (171.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 있어서, 전-처리 기능적 β 2GPI의 수준은 문헌에 보고된 평균치와 일치한다.

[0671] "높은 β 2GPI"의 컷-오프를 사용하는 것은, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상 ($\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$)의 기능적 β 2GPI의 전처리 수준으로서 정의되고, β 2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 는 바비투시마브 3mg/kg 아암에서 전체 생존율이 증가되는 경향을 갖되 (도 21a 및 도 21b), 다른 아암에서는 아닌 것 (도 21c)이 확인되었다. 예를 들어, 바비투시마브 3mg/kg으로 치료한 환자 중에, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 기능적 β 2GPI를 갖는 환자는 mOS가 16.8개월이었고, 이에 비해 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만의 "낮은 β 2GPI"의 경우는 단지 9.4개월이었다 (도 21a). 또한, 기능적 β 2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 환자 중에, 바비투시마브 3mg/kg으로 치료한 환자의 경우 16.8개월 mOS는, 조합된 대조군 아암 환자의 경우 단지 8.7개월 mOS를 초과했다 (도 21b). 도 21a 및 도 21b의 각각의 곡선과 도 21c의 포개진 (super-imposed) 곡선을 대조하라 (조합된 대조군 아암에서는, β 2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 β 2GPI $< 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 비교).

[0672]

[0673] **B. 실시예 XII의 II 상 시험**

[0674] 실시예 XII의 II 상 체장암 시험으로부터의 샘플 (PPHM 1002)을 실시예 XVI의 기능적 β 2GPI 분석을 사용하여 시험하였다. 전처리 수준의 기능적 β 2GPI를 평가할 수 있는 31명의 환자 표본이 있었다. 전처리 기능적 β 2GPI의 수준은 모든 환자의 경우 82.5에서 343.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위였다 (도 22). 이들 31명 환자의 경우, 전처리 기능적 β 2GPI (219.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 평균 수준은 문헌에 보고된 평균과 일치했다.

[0675] 샘플 크기가 작고, 질환은 매우 공격적이지만, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상 ($\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$)의 기능적 β 2GPI의 "높은 β 2GPI"의 컷오프를 사용하면, β 2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 는 바비투시마브에 대한 전체 생존율이 증가되는 경향을 갖는 것으로

확인되었다. 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 기능적 β 2GPI를 갖는 바비투시마브로 치료한 환자는 mOS가 7.4개월이었고, 이에 비해 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만의 "낮은 β 2GPI"의 경우 5.3개월이었다 (도 23).

[0676] **C. NSCLC에서 바비투시마브 및 파클리탁셀/카보플라틴의 II 상 시험**

[0677] 이전에 치료되지 않은 국부 진행성 또는 전이성 비-편평 상피성 NSCLC 환자에서, 바비투시마브의 존재 또는 부재하에 파클리탁셀/카보플라틴의 무작위, 오픈-라벨, II 상 시험 (PPHM 1001)을 수행하였다. 이 시험의 샘플을 실시예 XVI의 기능적 β 2GPI 분석을 사용하여 시험하였다. 전처리 기능적 β 2GPI의 수준을 평가할 수 있는 84명의 환자 샘플이 있었는데, 그 중 44명의 환자가 바비투시마브 아암에 있었고, 40명의 환자는 파클리탁셀/카보플라틴 아암에 있었다.

[0678] 전-처리 기능적 β 2GPI의 수준은 모든 환자에 대해 0.5 내지 326 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위였다 (도 24a). 바비투시마브로 치료받은 환자들에서, 기능적 β 2GPI는 0.5 내지 326 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위였다 (도 24b). 파클리탁셀/카보플라틴 아암의 환자에서 기능적 β 2GPI는 88.8 내지 292.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위였다 (도 24c). 각 치료 그룹의 경우 (바비투시마브의 경우 187.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 파클리탁셀/카보플라틴 아암의 경우 186.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 전체 연구를 위해 (187.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 전-처리 기능적 β 2GPI의 수준은 문헌에 보고된 평균과 다시 일치한다.

[0679] 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상 ($\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$)의 기능적 β 2GPI의 전처리 수준과 동일한 "높은 β 2GPI"의 컷-오프를 사용하는 것은, β 2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 바비투시마브 아암에서 전체 생존율이 증가되는 경향을 갖되, 대조군 (파클리탁셀/카보플라틴) 아암에서는 아닌 것이 확인되었다. 예를 들어, 바비투시마브로 치료한 환자의 경우, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 기능적 β 2GPI를 갖는 환자는 mOS가 17.개월이었고, 이에 비해 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만의 "낮은 β 2GPI"의 경우는 14.2개월이었다 (도 25a). 또한, 기능적 β 2GPI $\geq 200\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 환자에서, 바비투시마브로 치료한 환자의 경우의 17.0개월 mOS는 조합된 대조군 아암 환자의 경우의 단지 13.2개월 mOS를 초과했다 (도 25b). 도 25a 및 도 25b, 특히 도 25a의 곡선과, 대조군 아암의 환자에서 β 2GPI가 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만인 경우 더 오래 생존하는 경향이 있는 도 25c를 대조하라.

[0680] 결론적으로, 4개의 별개 임상 시험으로부터의 실시예 XVII 및 실시예 XVIII의 데이터는 기능적 β 2GPI 수준이 치료 결과와 상관관계가 있다는 것을 일관되게 보여주며, 이에 따라 성공적인 바비투시마브 치료를 위한 바이오마커로서의 기능적 β 2GPI 수준을 확인한다.

[0681] **실시예 XIX**

[0682] **후속 면역요법과 병용된 바비투시마브에 대한 생존 이점**

[0683] 실시예 XIV의 III 상 시험의 초기 분석이 도세탁셀 단독 그룹과 비교하여 바비투시마브 + 도세탁셀 아암에서 우수한 OS를 나타내지는 않았지만, 바비투시마브 치료에 대한 치료 효과의 다른 가능한 지표를 확인하기 위한 연구가 진행되었다. 본 실시예는 도세탁셀 단독으로 치료한 후 후속 면역요법으로 치료한 환자와 반대로, 바비투시마브 및 도세탁셀로 치료한 후 후속 면역요법 (SACT-I0)으로 치료한 환자가 통계적으로 유의하게 우수한 mOS를 가짐을 보여준다.

[0684] 바비투시마브와 도세탁셀, 또는 도세탁셀 단독으로 치료한 후, 환자의 약 15% (597명중 93명)는 면역 체크포인트 억제제 (ICI)를 사용하여 후속 면역-종양학 (IO) 치료법의 형태로 후속되는 항암 치료 (SACT) (SACT-I0 또는 후속 IO)를 받았다. 이들 93명의 환자들은 치료 아암간에 균등하게 균형을 이루었고, 46명의 환자는 바비투시마브 및 도세탁셀로 선행 치료를 받았고, 47명의 환자는 도세탁셀 단독으로 선행 치료를 받았다.

[0685] 놀랍게도, 바비투시마브에 의한 선행 치료를 받은 환자의 경우 후속 IO로 치료시, 위약과 반대로, mOS의 급격한 증가가 있었음이 확인되었다 (도 26). 특히, 후속 IO를 받은 환자의 경우, mOS는 바비투시마브 및 도세탁셀 그룹의 경우 아직 이에 도달되지 못한 반면 (95% CI, 15.2-NA), 도세탁셀 단독 그룹의 경우는 12.6개월이었다 (95% CI, 10.4-17.8); HR = 0.46 및 p = 0.006 (도 26; 표 16). 후속 IO를 받지 않은 환자의 경우, mOS는 바비투시마브 및 도세탁셀 그룹에서 9.2개월이었고, 도세탁셀 단독 그룹에서 10.2개월이었다; HR = 1.16 및 p = 0.172.

[0686] [표 16]

추후 면역 치료와 병용한 바비특시마브의 생존 이득

투여 그룹	변수	바비특시마브 + 도세탁셀 n = 46	위약 + 도세탁셀 n = 47
추후 IO	중간 개월 (95% CI)	N/A - 아직 도달하지 않음 (15.2-N/A)	12.6 (10.4-17.8)
	HR (95% CI)	0.46 (0.24-0.79)	
	P-값	0.006	
추후 IO 없음	중간 개월 (95% CI)	9.2 (7.2-11.0)	10.2 (8.9-11.9)
	HR (95% CI)	1.16 (0.94-1.42)	
	P-값	0.172	

[0687]

[0688]

후속 IO 그룹 내에서, "첫 번째 후속 IO"의 특정 면역요법제도 또한 확인되었다. 바비특시마브 (및 도세탁셀) 및 후속 IO로 치료된 46명의 환자에서의 면역치료제가 표 17에 제시되어 있고, 이들 모두는 CTLA-4, PD-1 또는 PD-L1에 결합하는 차단 항체의 형태인 체크포인트 억제제 항체 (면역 체크포인트 억제제)였다. 특히, 사용된 차단 항체는 CTLA-4에 결합하는 차단 항체인 트레멜리무마브; PD-1에 결합하는 차단 항체인 니볼루마브; 및 PD-L1에 결합하는 차단 항체인 두르발루마브 (MEDI4736)였다. 요약하면, 42/46명의 바비특시마브 환자는 이후에 니볼루마브를 투여받았고; 2명은 두르발루마브 단일요법을 받았고, 2명은 트레멜리무마브 + 두르발루마브를 투여받았다 (표 17).

[0689]

[표 17]

바비특시마브 및 추후 면역치료제

바비특시마브 (+ 도세탁셀)	추후 IO	환자수
	두르발루마브 (MEDI4736)	4
	니볼루마브 (Opdivo®)	41
	트레멜리무마브	2
	니볼루마브 + IL-10	1

[0690]

[0691]

4명의 환자가 1가지 이상의 IO 제제를 투여받았는데, 즉, 그들의 "첫 번째 후속 IO" 치료법은 그 자체로 "IO 병용" 즉, 첫 번째 및 두 번째 체크포인트 억제제 항체였음을 주목할 것이다. 따라서 "ITT" (Intent to Treat) 분석에서, 첫 번째 후속 IO를 받은 바비특시마브로 치료한 46명의 환자가 있지만, 표 17에는 48개의 후속 IO 제제가 있다. 이것은 두 명의 환자가 "IO 중복(doublet)"을 받았기 때문이다. 전반적으로, 4명의 환자는 1가지 이상의 후속 IO를 받았고, 이들 각각은 MEDI4736 (두르발루마브)과 트레멜리무마브의 중복 투여를 받았다. 이들 4명의 피험체 중 2명은 바비특시마브 아암에 있었고, 2명은 위약 아암에 있었다.

[0692]

후속 IO를 받은 93명 환자 중에, 도세탁셀의 단독 (위약)의 선행 치료를 받은 환자는 트레멜리무마브, 니볼루마브 또는 두르발루마브 (MEDI4736)를 투여받았다. 또한 위약 아암에서 2명의 환자는 펨브롤리주마브 (이전 MK-3475)를 투여받았고, 위약 아암에서 1명의 환자는 PD-1에 결합하는 양쪽 차단 항체인, REGN2810을 투여받았다. 전체적으로, 위약 아암의 47명 환자에서 첫 번째 후속 IO가 있었다: 트레멜리무마브 (3), 니볼루마브 (40), 두르발루마브 (3), 펨브롤리주마브 (2) 및 REGN2810 (1)이었고, 이는 47명의 환자에 대해 총 49개 제제로, 2명의 환자는 두르발루마브 (MEDI4736)-트레멜리무마브의 IO 중복 투여를 받았다. 즉, 대조군 아암에서 40/47명의 환자가 후속해서 니볼루마브를 투여받았고, 1명은 두르발루마브 단일요법을 받았고; 1명은 트레멜리무마브 단일요법을 받았고; 2명은 트레멜리무마브 + 두르발루마브를 투여받았고, 2명은 펨브롤리주마브를 투여받았고, 1명은 REGN2810을 투여받았다.

- [0693] 도 26은 무작위화 이후 시간에 있어서 후속 IO 이전에 바비투시마브를 사용한 초기 치료의 생존 이점을 나타낸다. 후속 IO 전에 초기 바비투시마브 치료의 생존 이점은 첫 후속 IO 치료 이후 시간으로서 측정했을 때 더욱더 두드러진다. 이와 관련하여, 후속 IO를 받은 환자의 경우, mOS는 바비투시마브와 도세탁셀 그룹의 경우 아직 도달되지 못한 반면 (95% CI, 10.2-NA), 도세탁셀 단독 그룹의 경우는 단지 6.2개월이었다 (95% CI, 3.9-8.7); HR = 0.42 및 p= 0.002).
- [0694] 결론적으로, 본 실시예에서의 데이터는, 최초로, 바비투시마브가 인간 환자에서 면역요법제의 활성을 향상시킨다는 것을 보여주고 있다. 따라서 이러한 결과는 바비투시마브 및 면역요법제, 특히 면역 체크포인트 억제제와 병용 투여시, 진행 중인 암 환자 및 미래의 암 환자에 대한 치료를 강력하게 뒷받침한다.
- [0695] **실시예 XX**
- [0696] **바비투시마브 및 후속 면역요법에 대한 β2GPI 바이오마커 분석**
- [0697] 실시예 XIX에 제시된 바와 같이, 바비투시마브 (+ 도세탁셀) 및 후속 IO로 치료한 환자는, 도세탁셀 단독 및 후속 IO로 치료한 환자보다 현저히 우수한 mOS를 갖는다. 본 실시예는 바비투시마브 바이오마커로서의 기능적 β2GPI의 사용을 추가로 검증하며, 이는 동일한 수준의 기능적 β2GPI가 면역요법과 병용된 바비투시마브에 의한 성공적인 치료와 또한 상관 관계가 있는 것을 보여준다.
- [0698] 실시예 XVI의 분석을 사용하면, 200μg/ml 이상의 기능적 β2GPI 수준이 III 상 시험 (구현에 XVII)을 포함하는 성공적인 바비투시마브 치료와 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 200μg/ml 이상 (≥ 200μg/ml)의 기능적 β2GPI의 전처리 수준과 동일한 "높은 β2GPI"의 컷-오프를 기반으로, β2GPI ≥ 200μg/ml는 바비투시마브 및 후속 IO로 치료된 환자에서의 전체 생존율의 증가와 상관관계가 있으나, 후속 IO를 받은 대조군 환자에서는 그렇지 않다는 것이 또한 확인되었다 (도 27).
- [0699] 특히, 200μg/ml 이상의 기능적 β2GPI를 갖는 환자에 있어서, mOS는 바비투시마브 및 후속 IO로 치료한 환자의 경우 아직 도달되지 못한 반면, 도세탁셀 및 후속 IO로 치료한 환자의 경우 mOS는 12.3개월 (10.2-17.6)이었다 (도 27; p = 0.002). 실시예 XVII의 데이터로 예측되는 바와 같이, 후속 IO를 받지 않은 환자에서는, 곡선의 분리는 후속 IO 환자에서 관찰된 것과 같이 현저하지 않지만, β2GPI ≥ 200μg/ml에서는 바비투시마브로 치료한 환자에서 전체 생존율 (10.5개월)이 대조군 (9.2개월)과 비교하여 여전히 증가하는 경향이 있었다 (도 27). 바비투시마브 치료와는 달리, 대조군 아암의 환자는 후속 IO가 있는 환자 및 후속 IO가 없는 환자 모두의 경우, β2GPI가 200μg/ml 미만일 때 더 오래 생존할 수 있는 경향이 있었다. 200μg/ml 미만인 β2GPI 그룹에 대한 데이터의 상세한 분석은, β2GPI < 200μg/ml 그룹에서 바비투시마브 (n = 12)와 위약 (n = 19) 및 후속 IO로 치료한 비교적 적은 수의 환자에 의해 저지된다.
- [0700] 따라서, 이들 임상 데이터는 기능적 β2GPI ≥ 200μg/ml가 면역요법과 병용된, 특히 면역 체크포인트 억제제 (예: 트레멜리우마브, 니볼루마브, 펠브롤리주마브, 두르발루마브 및 아테졸리주마브)와 병용된 바비투시마브에 의한 성공적인 치료를 위한 바이오마커임을 보여주고 있다.
- [0701] 본원에 개시되고 청구된 모든 조성물 및 방법은 본 개시 내용에 비추어 과도한 실험없이 제조되고 수행될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법이 바람직한 실시 태양로 기술되었지만, 당업자에게는 본 발명의 개념, 정신 및 범위를 벗어나지 않으면서, 조성물 및 방법, 단계 또는 단계의 순서로 변형이 적용될 수 있음이 명백할 것이다. 보다 구체적으로, 화학적으로 및 생리학적으로 관련있는 특정 제제가 동일하거나 유사한 결과가 달성되는 동안 본원에 기재된 제제를 대체할 수 있음은 자명한 것이다. 당업자에게 자명한 이러한 모든 유사한 대체물 및 변형은 첨부된 청구항에 의해 정의된 본 발명의 정신, 범위 및 개념 내에 있는 것으로 간주된다.
- [0702] **참고 문헌**
- [0703] 다음 참조 문헌은 여기에 설명된 내용을 보충하는 예시적인 절차 또는 기타 세부 사항을 제공하는 한도 내에서 참조된다.

- Agostinis *et al.*, "In vivo distribution of β 2GPI under pathophysiologic conditions", *Blood*, 118(15):4231-4238, 2011.
- An *et al.*, "Exosomes serve as tumour markers for personalized diagnostics owing to their important role in cancer metastasis", *J. Extracell. Vesicles*, 4:27522, 2015; <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v4.27522>.
- Balasubramanian *et al.*, "Estimation of plasma beta-2-glycoprotein levels by competitive ELISA", *Thromb. Res.*, 92:91-97, 1998.
- Beck *et al.*, "Combination of a monoclonal anti-phosphatidylserine antibody with gemcitabine strongly inhibits the growth and metastasis of orthotopic pancreatic tumors in mice", *Int. J. Cancer*, 118:2639-2643, 2006.
- Best, "Viruses play dead to TAME interferon responses", *Cell Host & Microbe*, 14(2):117-8, 2013.
- Beyers, Zwaal, Willems, "The effect of phospholipids on the formation of immune complexes between autoantibodies and β ₂-glycoprotein I or prothrombin", *Clin. Immunol.*, 112:150-160, 2004.
- Beyers *et al.*, "Quantitative determination of the binding of β ₂-glycoprotein I and prothrombin to phosphatidylserine-exposing blood platelets", *Biochem. J.*, 386:271-279, 2005.
- Bhattacharyya *et al.*, "Enveloped viruses disable innate immune responses in dendritic cells by direct activation of TAM receptors", *Cell Host & Microbe*, 14(2):136-147, 2013.
- Birge *et al.*, "Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer", *Cell Death Differ.*, 23(6):962-78, 2016.
- Brahmer *et al.*, "Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer", *N. Engl. J. Med.*, 373(2):123-135, 2015.
- Chalasanani *et al.*, "A Phase I Clinical Trial of Baviximab and Paclitaxel in Patients with HER2 Negative Metastatic Breast Cancer", *Cancer Medicine*, 4(7):1051-1059, 2015.
- Chen *et al.*, "Phosphatidylserine Vesicles Enable Efficient En Bloc Transmission of Enteroviruses", *Cell*, 160:619-630, 2015.
- Cheng *et al.*, "Antibody-Mediated Blockade of Phosphatidylserine Enhances the Antitumor Effect of Sorafenib in Hepatocellular Carcinomas Xenografts", *Ann. Surg. Oncol.*, 5107-5, DOI 10.1245/s10434-016-5107-5, 2016.

[0704]

- Clayson *et al.*, "Release of Simian Virus 40 Virions from Epithelial Cells is Polarized and Occurs without Cell Lysis", *J. Virology*, 63(5):2278-2288, 1989.
- Czuczman *et al.*, "*Listeria monocytogenes* exploits efferocytosis to promote cell-to-cell spread", *Nature*, 509:230-234, 2014.
- DaMatta *et al.*, "*Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism", *FEMS Microbiol. Lett.*, 266:29-33, 2007.
- de Laat, Derksen, Urbanus, de Groot, "IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of β_2 -glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis", *Blood*, 105(4):1540-5, 2005.
- de Laat, Derksen, van Lummel, Pennings, de Groot, "Pathogenic anti- β_2 -glycoprotein I antibodies recognize domain I of β_2 -glycoprotein I only after a conformational change", *Blood*, 107(5):1916-24, 2006.
- DeRose *et al.*, "Development of baviximab, a vascular targeting agent with immunomodulating properties, for lung cancer treatment", *Immunotherapy*, 3(8):933-944, 2011.
- Digumarti *et al.*, "Baviximab Plus Paclitaxel and Carboplatin for the Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer", *Lung Cancer*, 86:231-236, 2014.
- Eda & Sherman, "Cytadherence of Malaria-Infected Red Blood Cells Involves Exposure of Phosphatidylserine", *Cell Physiol. Biochem.*, 12:373-384, 2002.
- Fehrenbacher *et al.*, "Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial", *The Lancet*, 387(10030):1837-1846, 2016.
- Francis *et al.*, "*Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 is a leukocidin causing Ca²⁺ influx, necrosis and neutrophil extracellular trap formation", *Cell Death and Disease*, 5:e1474; doi:10.1038/cddis.2014.394, 2014.
- Freimark *et al.*, "Antibody-Mediated Phosphatidylserine Blockade Enhances the Antitumor Responses to CTLA-4 and PD-1 Antibodies in Melanoma", *Cancer Immunol. Res.*, 4(6):531-40, 2016.
- Galli *et al.*, "Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor", *Lancet*, 335(8705):1544-1547, 1990.
- Garon *et al.*, "Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer", *N. Engl. J. Med.*, 372(21):2018-2028, 2015.
- Gerber *et al.*, "Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of Baviximab, a Chimeric Phosphatidylserine-Targeting Monoclonal Antibody, in Patients with Advanced Solid Tumors", *Clin. Cancer Res.*, 17(21):1-9, 2011.

[0705]

- Gerber *et al.*, "Docetaxel Combined with Bavituximab in Previously Treated, Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer", *Clinical Lung Cancer*, 17(3):169-176, 2016.
- Gong *et al.*, "Measuring Response to Therapy by Near-Infrared Imaging of Tumors Using a Phosphatidylserine-Targeting Antibody Fragment", *Molecular Imaging*, 12(4):244-256, 2013.
- Goth & Stephens, "Rapid, Transient Phosphatidylserine Externalization Induced in Host Cells by Infection with *Chlamydia* spp", *Infect. Immun.*, 69(2):1109-1119, 2001.
- Gray *et al.*, "Phosphatidylserine-targeting antibodies augment the anti-tumorigenic activity of anti-PD-1 therapy by enhancing immune activation and downregulating pro-oncogenic factors induced by T-cell checkpoint inhibition in murine triple-negative breast cancers", *Breast Cancer Research*, 18(1):50, DOI 10.1186/s13058-016-0708-2, 2016a.
- Gray *et al.*, "LAG3 is an immunotherapeutic target in murine triple negative breast cancers whose activity is significantly enhanced in combination with phosphatidylserine targeting antibodies", Poster B019, CRI-CIMT-EATI-AACR International Cancer Immunotherapy Conference, New York, NY, September 25-28, 2016b.
- Gregorc *et al.*, "Predictive value of a proteomic signature in patients with non-small-cell lung cancer treated with second-line erlotinib or chemotherapy (PROSE): a biomarker-stratified, randomised phase 3 trial", *Lancet Oncology*, 15(7):713-721, 2014.
- Hägele *et al.*, "*Legionella pneumophila* kills human phagocytes but not protozoan host cells by inducing apoptotic cell death", *FEMS Microbiol. Lett.*, 169(1):51-58, 1998.
- He *et al.*, "Radiation-enhanced vascular targeting of human lung cancers in mice with a monoclonal antibody that binds anionic phospholipids", *Clin. Cancer Res.*, 13(17):5211-5218, 2007.
- He *et al.*, "Antiphosphatidylserine antibody combined with irradiation damages tumor blood vessels and induces tumor immunity in a rat model of glioblastoma", *Clin. Cancer Res.*, 15(22):6871-80, 2009.
- Hogg *et al.*, "Retargeting Adenoviral Vectors to Improve Gene Transfer into Tumors", *Cancer Gene Therapy*, 18:275-287, 2011.
- Hotchkiss *et al.*, "Inhibition of endothelial cell function *in vitro* and angiogenesis *in vivo* by docetaxel (Taxotere): association with impaired repositioning of the microtubule organizing center", *Mol. Cancer Ther.*, 1 (13):1191-200, 2002.
- Huang, Bennett, Thorpe, "A monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on tumor blood vessels enhances the antitumor effect of docetaxel on human breast tumors in mice", *Cancer Res.*, 65(10):4408-4416, 2005.

[0706]

- Hunt, Simpson, Krilis, "Identification of a region of β_2 -glycoprotein I critical for lipid-binding and anticardiolipin antibody cofactor activity", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2141-2145, 1993.
- Hunt and Krilis, "The fifth domain of β_2 -glycoprotein I contains a phospholipid-binding site (Cys281-Cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies", *J. Immunol.*, 152:653-659, 1994.
- Ioannou *et al.*, "Binding of antiphospholipid antibodies to discontinuous epitopes on domain I of human β_2 -glycoprotein I: mutation studies including residues R39 to R43", *Arthritis Rheum.*, 56(1):280-90, 2007.
- Izquierdo-Useros *et al.*, "HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse?", *PLoS Pathog*, 6(3):e1000740, 2010.
- Jennewein *et al.*, "Vascular Imaging of Solid Tumors in Rats with a Radioactive Arsenic-Labeled Antibody that Binds Exposed Phosphatidylserine", *Clin. Cancer Res.*, 14(5):1377-1385, 2008.
- Jemielity *et al.*, "TIM-Family Proteins Promote Infection of Multiple Enveloped Viruses through Virion-Associated Phosphatidylserine", *PLoS Pathogens*, 9(3):e1003232; 2013.
- Judy *et al.*, "Vascular Endothelial-Targeted Therapy Combined with Cytotoxic Chemotherapy Induces Inflammatory Intratumoral Infiltrates and Inhibits Tumor Relapses after Surgery", *Neoplasia*, 14:352-359, 2012.
- Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, pp 647-669 in particular.
- Kamboh *et al.*, "Genetic Studies of Human Apolipoproteins. IV. Structural Heterogeneity of Apolipoprotein H (β_2 -Glycoprotein I)", *Am. J. Hum. Genet.*, 42:452-457, 1988.
- Kennedy *et al.*, "Attenuating a sickle cell crisis with annexin V", *Medical Hypotheses*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2015.01.037>, 2015.
- Klein & Moeschberger, "Survival Analysis. Techniques for censored and truncated data", 2nd Edition, New York, 2003 (ISBN-10: 038795399X; ISBN-13: 978-0387953991).
- Kogure *et al.*, "Temporary membrane distortion of vascular smooth muscle cells is responsible for their apoptosis induced by platelet-activating factor-like oxidized phospholipids and their degradation product, lysophosphatidylcholine", *Chemistry and Physics of Lipids*, 126:29-38, 2003.
- Larson *et al.*, "Customization, Scale-Up and Qualification of an Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity (ADCC) Bioassay", *IBC's 23rd International Intensive Symposium Development, Validation and Maintenance of Biological Assays Conference*, Seattle, Washington, May 14-16, 2013; Poster Board #7.

[0707]

- Li *et al.*, "Phosphatidylserine (PS) is Exposed in Choroidal Neovascular Endothelium: PS-Targeting Antibodies Inhibit Choroidal Angiogenesis *In vivo* and *Ex Vivo*", *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 56:7137-7145, 2015.
- Liang *et al.*, "Targeting Mutant P53 Protein and the Tumor Vasculature: An Effective Combination Therapy for Advanced Breast Tumors", *Breast Cancer Res. Treat.*, 125:407-420, 2011.
- Lonsdale *et al.*, "Phosphatidylserine as a Therapeutic Target for the treatment of *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis* infections", Chemical & Biological Defense Science & Technology Conference, 2011 Las Vegas, NV Abstract W15-048.
- Luster *et al.*, "Plasma Protein β_2 -glycoprotein I Mediates Interaction between the Anti-tumor Monoclonal Antibody 3G4 and Anionic Phospholipids on Endothelial Cells", *J. Biol. Chem.*, 281(40):29863-29871, 2006.
- Mallat *et al.*, "Shed Membrane Microparticles With Procoagulant Potential in Human Atherosclerotic Plaques", *Circulation*, 99:348-353, 1999.
- Marconescu & Thorpe, "Coincident Exposure of Phosphatidylethanolamine and Anionic Phospholipids on the Surface of Irradiated Cells", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(10):2217-2224, 2008.
- McNeil, Simpson, Chesterman, Krilis, "Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H)", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(11):4120-4124, 1990.
- Meckes *et al.*, "Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(47):20370-20375, 2010.
- Meckes and Raab-Traub, "Microvesicles and Viral Infection", *J. Virology*, 85(24):12844-12854, 2011.
- Mehdi *et al.*, "Genetic variation in the apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I) gene affects plasma apolipoprotein H concentrations", *Hum. Genet.*, 105:6371, 1999.
- Meertens *et al.*, "The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry", *Cell Host & Microbe*, 12(4):544-557, 2012.
- Mercer and Helenius, "Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells", *Science*, 320:531-535, 2008.
- Miyakis *et al.*, " β_2 -glycoprotein I - function in health and disease", *Thromb. Res.*, 114:335-346, 2004.
- Moller-Tank & Maury, "Phosphatidylserine receptors: Enhancers of enveloped virus entry and infection", *Virology*, 468-470 (2014) 565-580, 2014.

[0708]

- Moody *et al.*, "Anti-phospholipid human monoclonal antibodies inhibit CCR5-tropic HIV-1 and induce β -chemokines", *J. Exp. Med.*, 207(4):763-776, 2010.
- Morizono *et al.*, "The soluble serum protein Gas6 bridges virion envelope phosphatidylserine C254 to the TAM receptor tyrosine kinase Axl to mediate viral entry", *Cell Host Microbe*, 9:286-298, 2011.
- Murata-Kamiya *et al.*, "*Helicobacter pylori* Exploits Host Membrane Phosphatidylserine for Delivery, Localization, and Pathophysiological Action of the CagA Oncoprotein", *Cell Host Microbe*, 7:399-411, 2010.
- Palmero *et al.*, "Final Clinical Results from SUNRISE: A Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Multicenter Trial of Bavituximab Plus Docetaxel in Patients with Previously Treated Stage IIIb/IV Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer", *Annals Oncol.*, 28(Suppl. 5):487, Abstract 1364P, 2017.
- Pattanapanyasat *et al.*, "Febrile temperature but not proinflammatory cytokines promotes phosphatidylserine expression on *Plasmodium falciparum* malaria-infected red blood cells during parasite maturation", *Cytometry, Part A*, 77A:515-523, 2010.
- Petersen & Kroghfelt, "*Helicobacter pylori*: an invading microorganism? A review", *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 36:117-126, 2003.
- Polz, Wurm, Kostner, "Investigations on β 2-glycoprotein-I in the rat - isolation from serum and demonstration in lipoprotein density fractions", *Int. J. Biochem.*, 11:265-270, 1980.
- Prakasam and Thiagarajan, " β 2-Glycoprotein I - A Protein in Search of Function", In *Antiphospholipid Syndrome*, Ed. Alena Bulikova, ISBN: 978-953-51-0526-8, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/antiphospholipid-syndrome/beta2-glycoprotein-i-in-search-of-function>, 2012.
- Ran *et al.*, "Antitumor effects of a monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels in mice", *Clin. Cancer Res.*, 11:1551-1562, 2005.
- Sabatier *et al.*, "Type 1 And Type 2 Diabetic Patients Display Different Patterns of Cellular Microparticles", *Diabetes*, 51:2840-2845, 2002.
- Saha *et al.*, "An Orthotopic Lung Tumor Model for Image-Guided Microirradiation in Rats", *Radiat. Res.*, 174:62-71, 2010.
- Schubert-Unkmeir *et al.*, "Gene Expression Pattern in Human Brain Endothelial Cells in Response to *Neisseria meningitidis*", *Infect. Immun.*, 75(2):899-914, 2007.
- Seabra *et al.*, "Toxoplasma gondii exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 324(2):744-752, 2004.
- Sheng *et al.*, "Impaired Thrombin Generation in β 2-Glycoprotein I Null Mice", *J. Biol. Chem.*, 276(17):13817-13821, 2011.
- Sims *et al.*, "Neural stem cell-derived exosomes mediate viral entry", *Int. J. Nanomedicine*, 9:4893-4897, 2014.
- Soares *et al.*, "Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases", *Nature Medicine*, 14(12):1357-1362, 2008.
- Souza *et al.*, "Microparticles: markers and mediators of sepsis-induced microvascular dysfunction, immunosuppression, and AKI", *Kidney Int.*, doi: 10.1038/ki.2015.26, 2015.
- Stafford & Thorpe, "Increased Exposure of Phosphatidylethanolamine on the Surface of Tumor Vascular Endothelium", *Neoplasia*, 13:299-308, 2011.
- Stafford *et al.*, "Highly Specific PET Imaging of Prostate Tumors in Mice with an Iodine-124-Labeled Antibody Fragment that Targets Phosphatidylserine", *PLoS ONE*, 8(12):e84864, 2013.
- Steinkasserer *et al.*, "Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of human β 2-glycoprotein I", *Biochem. J.*, 277:387-391, 1991.
- Takeuchi *et al.*, "Coagulation and fibrinolytic activities in 2 siblings with β 2-glycoprotein I deficiency", *Blood*, 96:1594-1595, 2000.

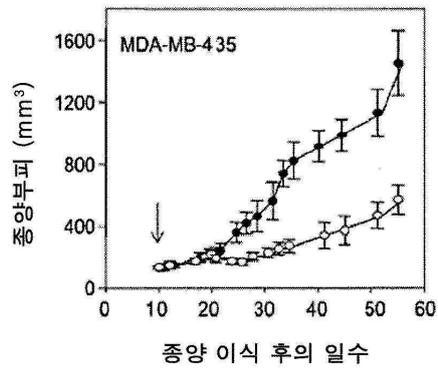
[0709]

[0710]

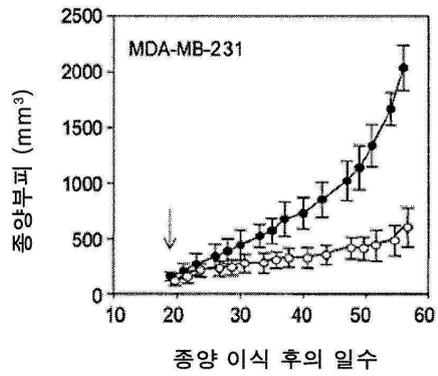
- [0711] 미국 특허 출원 제US 2016/0009805 A1호.
- [0712] 미국 특허 제5,019,368호
- [0713] 미국 특허 제5,882,626호
- [0714] 미국 특허 제7,247,303호
- [0715] 미국 특허 제7,422,738호
- [0716] 미국 특허 제7,455,833호
- [0717] 미국 특허 제7,572,448호
- [0718] 미국 특허 제7,611,704호
- [0719] 미국 특허 제7,790,860호
- [0720] 미국 특허 제7,906,115호
- [0721] 미국 특허 제8,486,391
- [0722] 미국 특허 제8,956,616
- van der Kleij *et al.*, "A Novel Host-Parasite Lipid Cross-talk: schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization", *J. Biol. Chem.*, 277(50):48122-48129, 2002.
- Walker *et al.*, "Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4+ memory T cells by releasing antigenic exosomes" *J. Immunol.*, 182(3):1548-1559, 2009.
- Wanderley *et al.*, "Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of leishmaniasis", *PLoS One*, 4(5):e5733, 2009.
- Wanderley *et al.*, "Phosphatidylserine exposure on the surface of *Leishmania amazonensis* amastigotes modulates in vivo infection and dendritic cell function", *Parasite Immunology*, 35:109-119, 2013.
- Wandler *et al.*, "A Greasy Foothold for *Helicobacter pylori*", *Cell Host Microbe*, 7:338-339, 2010.
- Weihua *et al.*, "Apoptotic Cells Initiate Endothelial Cell Sprouting via Electrostatic Signaling", *Cancer Res.*, 65(24): 11529-11535, 2005.
- Willems, Janssen, Pelsers *et al.*, "Role of divalency in the high-affinity binding of anticardiolipin antibody- β 2-glycoprotein I complexes to lipid membranes", *Biochemistry*, 35:13833-13842, 1996.
- Wurm, " β 2-glycoprotein-I (apolipoprotein H) interactions with phospholipid vesicles", *Int. J. Biochem.*, 16:511-15, 1984.
- Yin *et al.*, "Phosphatidylserine-targeting antibody induces M1 macrophage polarization and promotes myeloid-derived suppressor cell differentiation", *Cancer Immunol. Res.*, 1(4):256-268, 2013.
- Yuyama *et al.*, "Sphingolipid-modulated Exosome Secretion Promotes Clearance of Amyloid- β by Microglia", *J. Biol. Chem.*, 287(14):10977-10989, 2012.
- Zandbergen *et al.*, "Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 103(37):13837-13842, 2006.
- Zhang *et al.*, "Phosphatidylserine-Targeted Bimodal Liposomal Nanoparticles for *in vivo* Imaging of Breast Cancer in Mice", *J. Control. Release*, 183:114-123, 2014.
- Zhao *et al.*, "Near-Infrared Optical Imaging of Exposed Phosphatidylserine in a Mouse Glioma Model", *Translational Oncology*, 4:355-364, 2011.
- Zhou *et al.*, "Phosphatidylserine-Targeted Molecular Imaging of Tumor Vasculature by Magnetic Resonance Imaging", *J. Biomed. Nanotechnol.*, 10:1-10, 2014.
- [0723]

도면

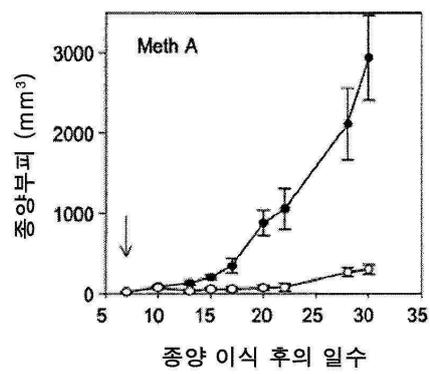
도면1a



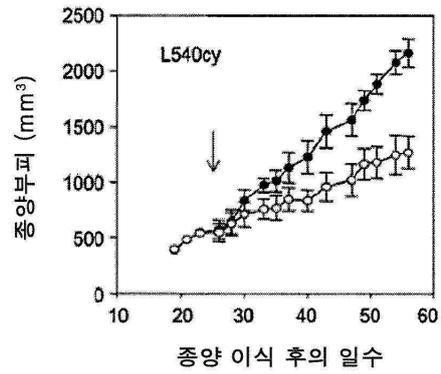
도면1b



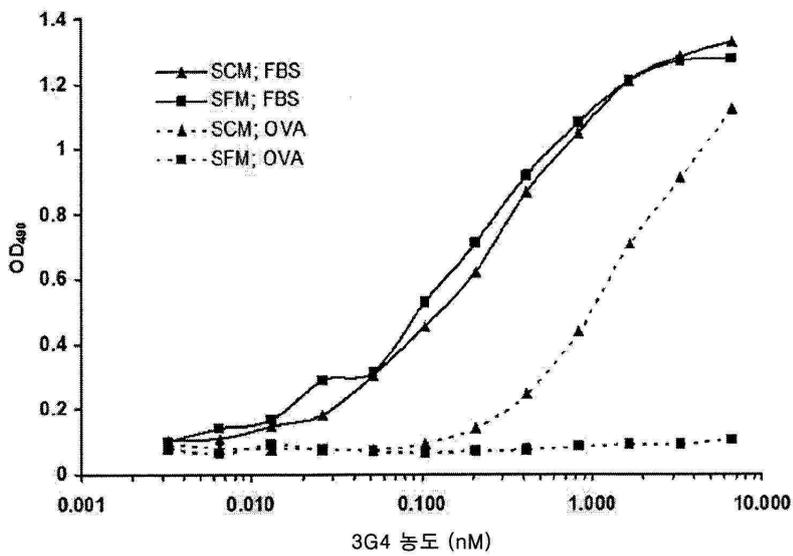
도면1c



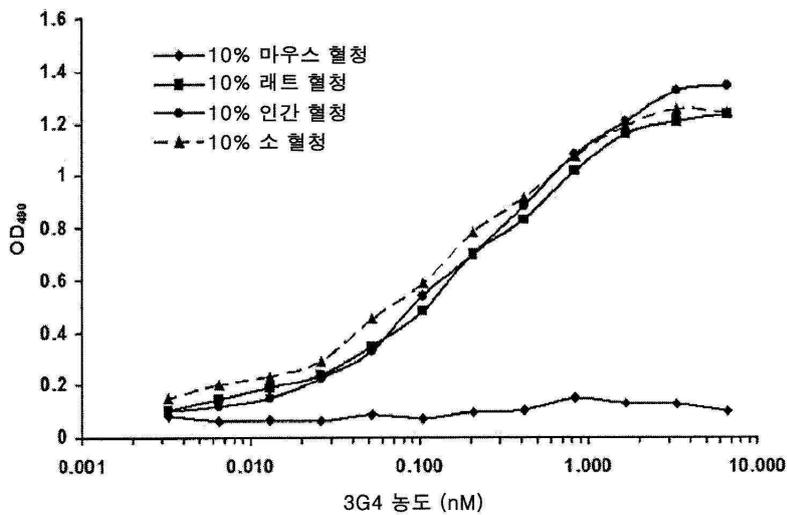
도면1d



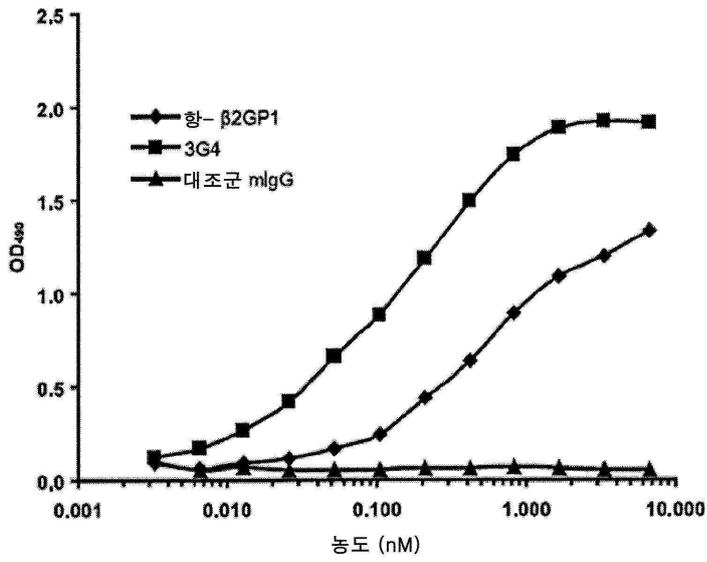
도면2a



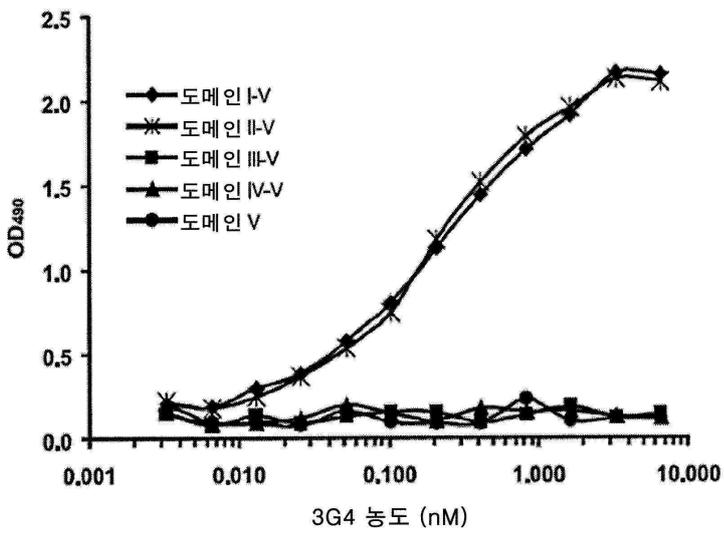
도면2b



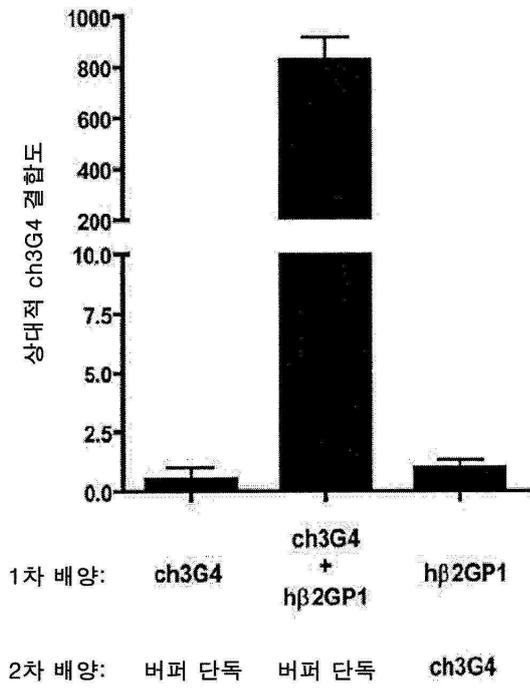
도면3



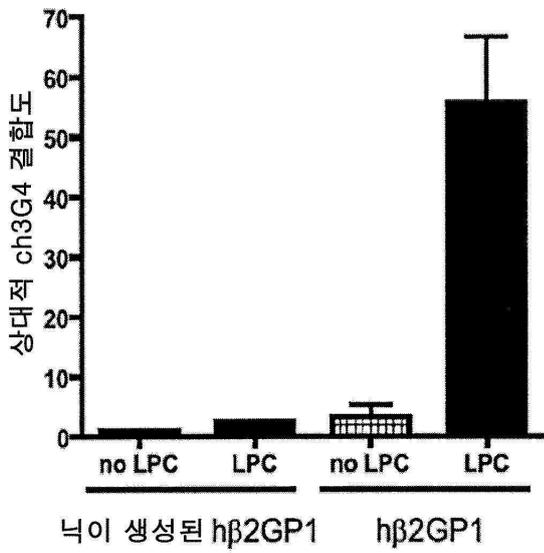
도면4



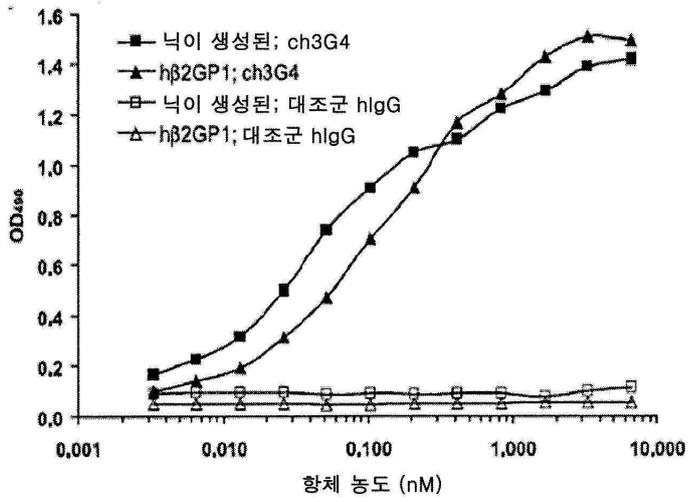
도면5



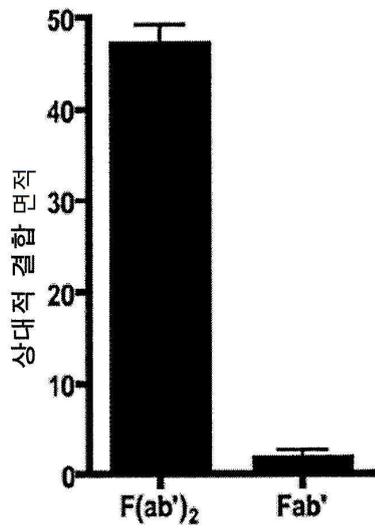
도면6a



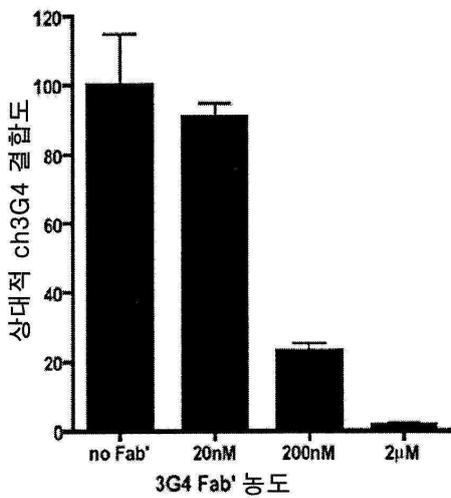
도면6b



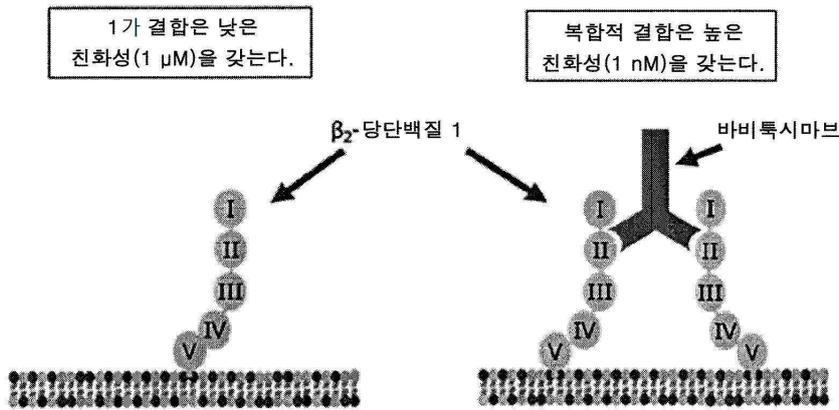
도면7a



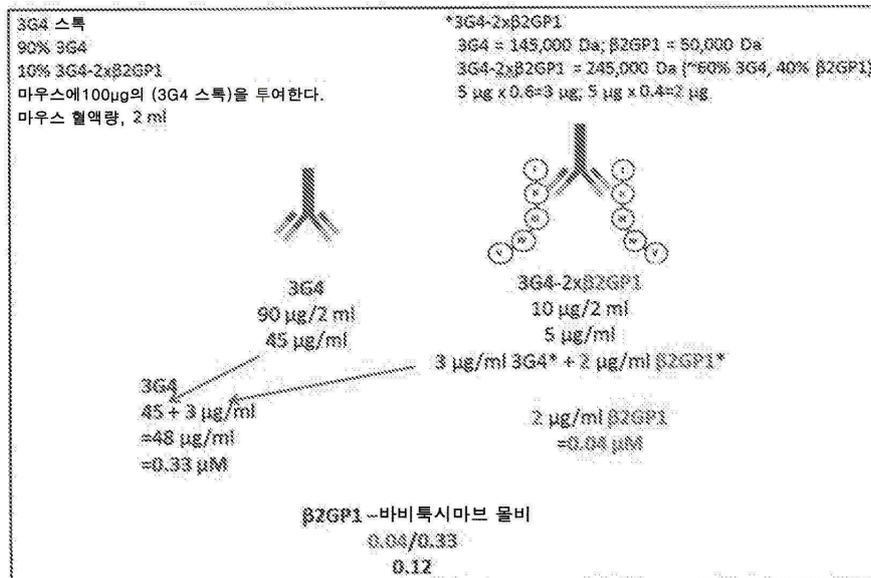
도면7b



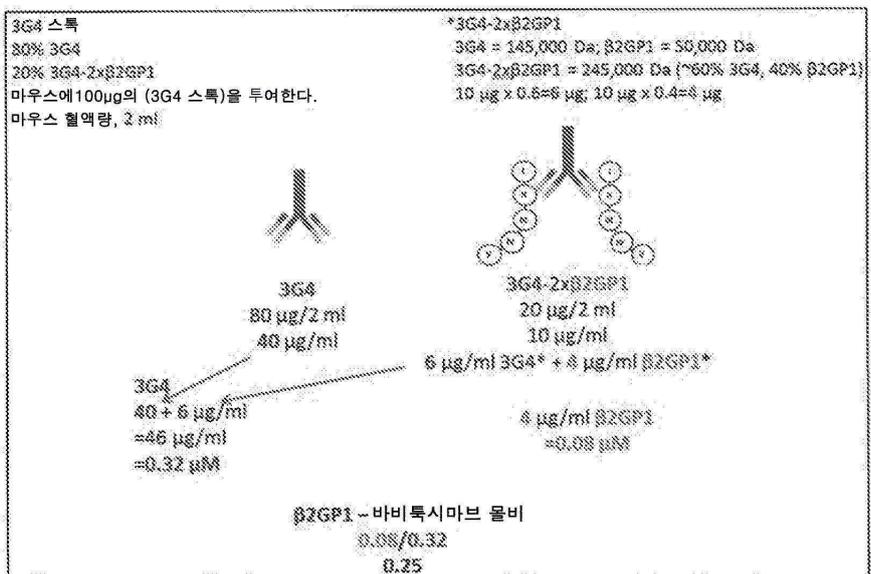
도면8



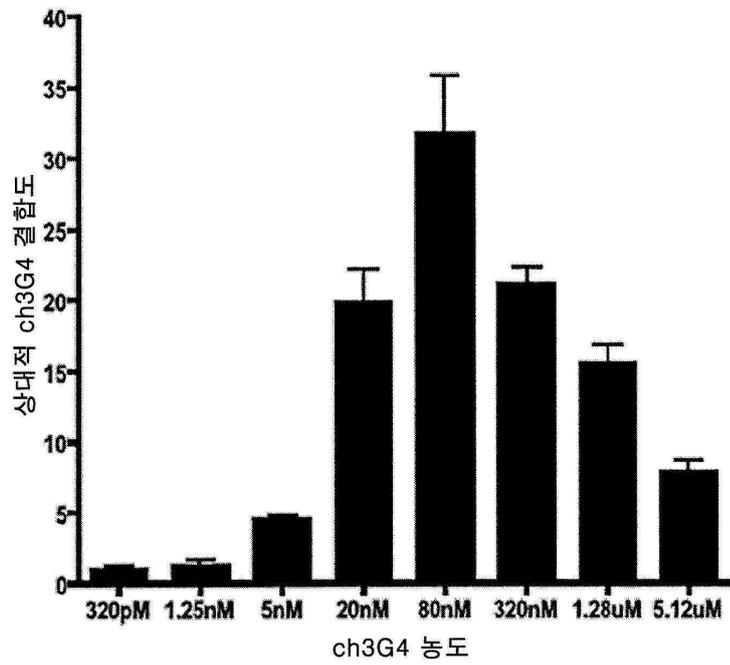
도면9a



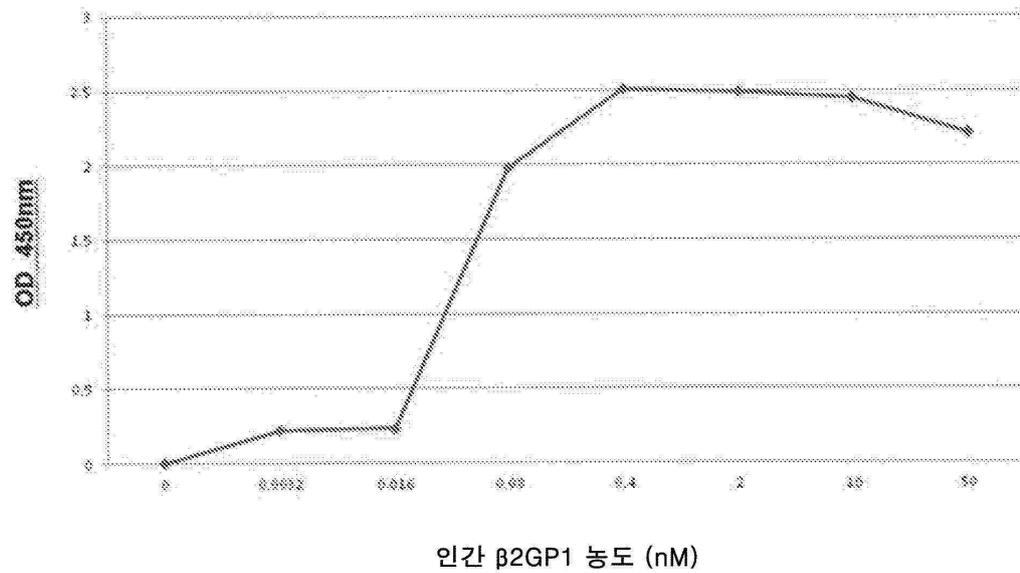
도면9b



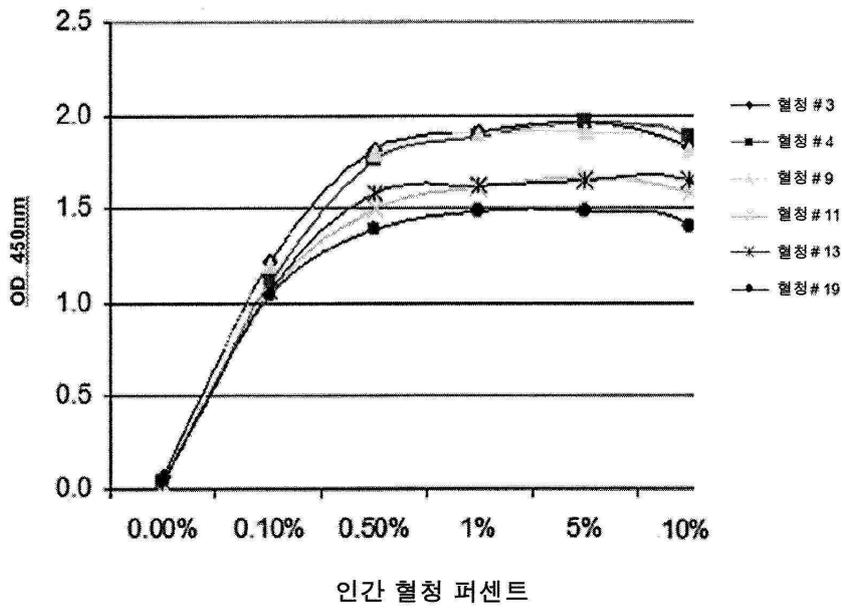
도면10



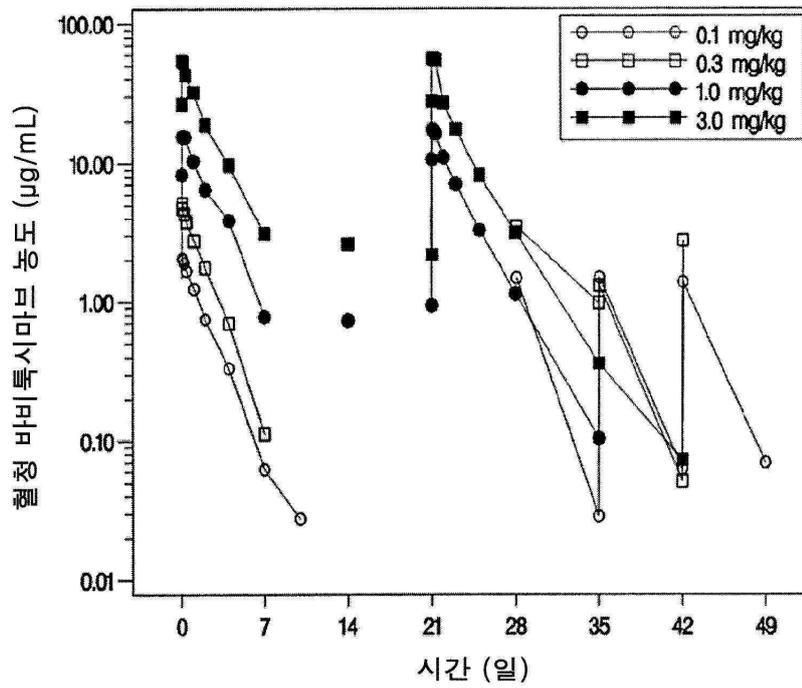
도면11



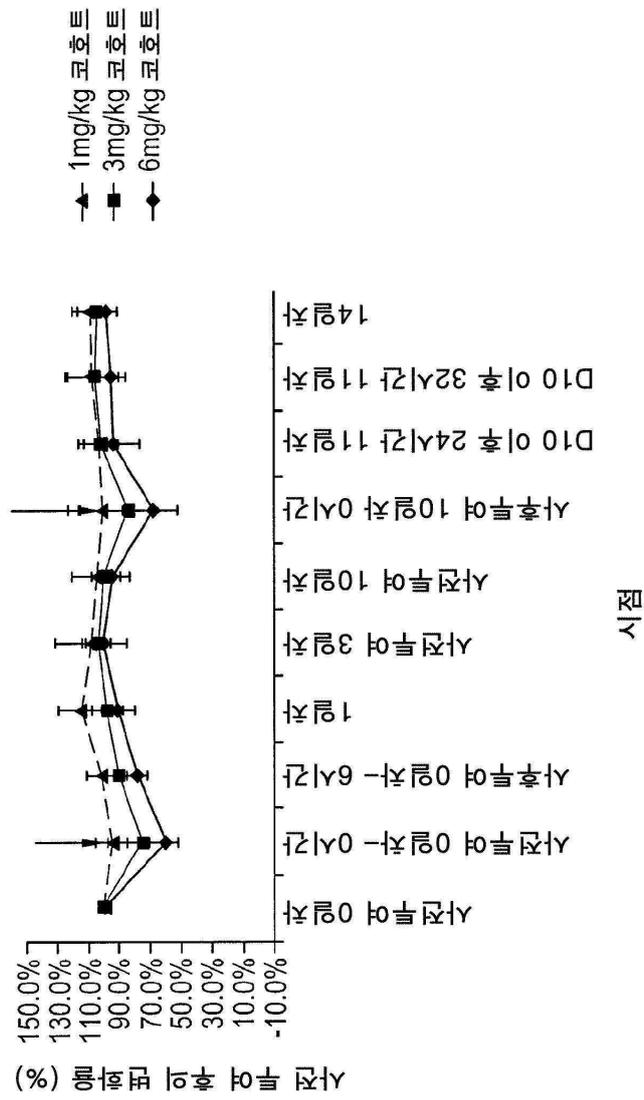
도면12



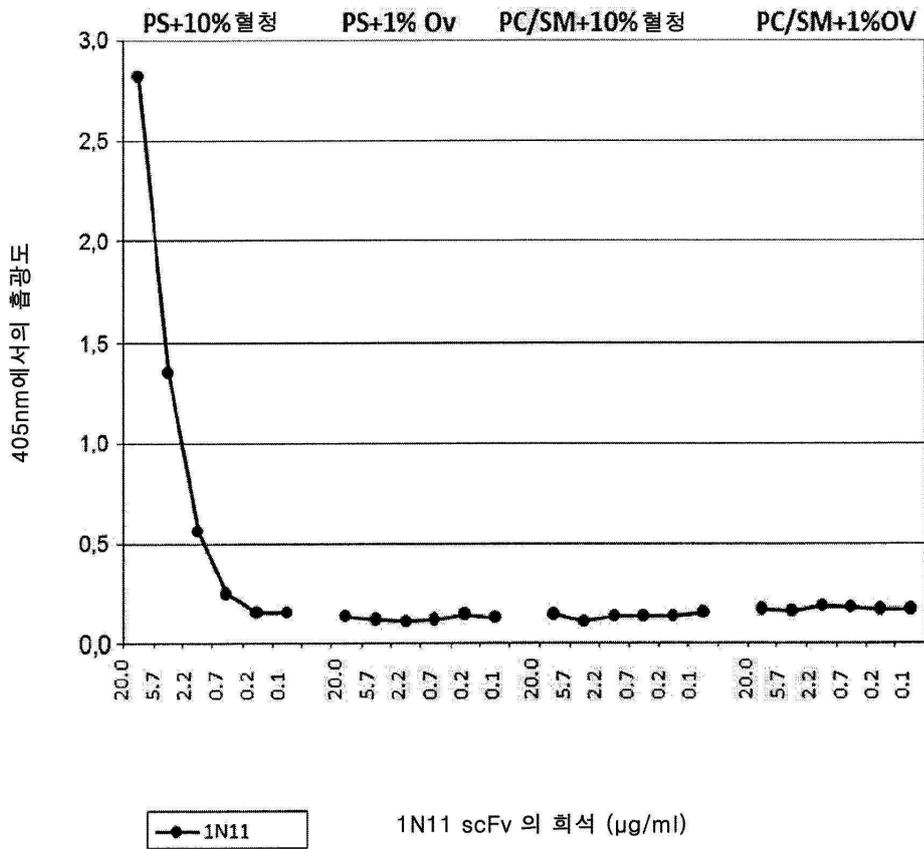
도면13



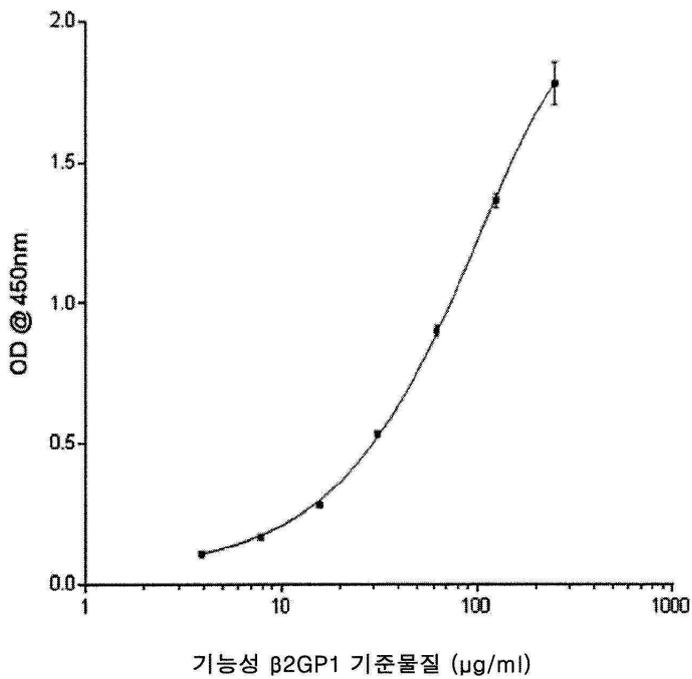
도면14



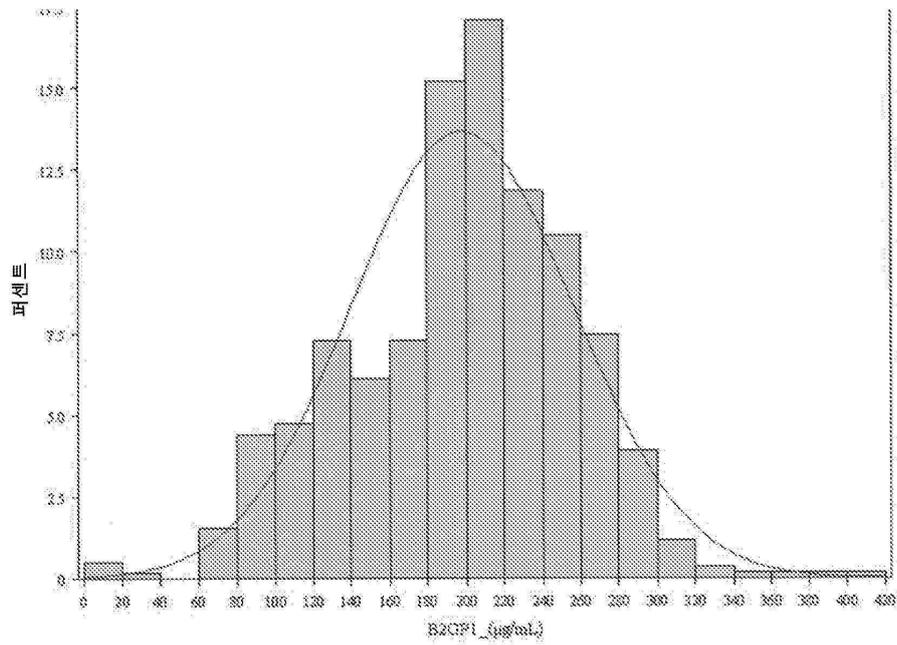
도면15



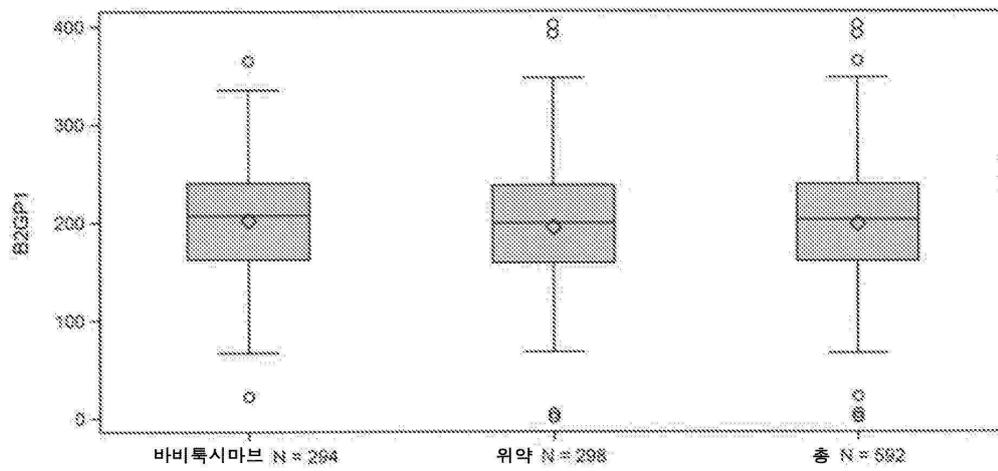
도면16



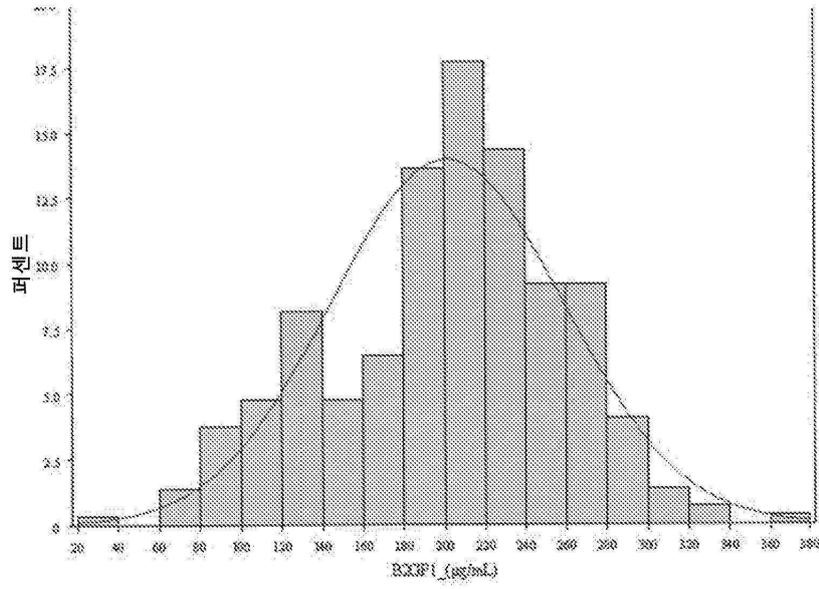
도면17a



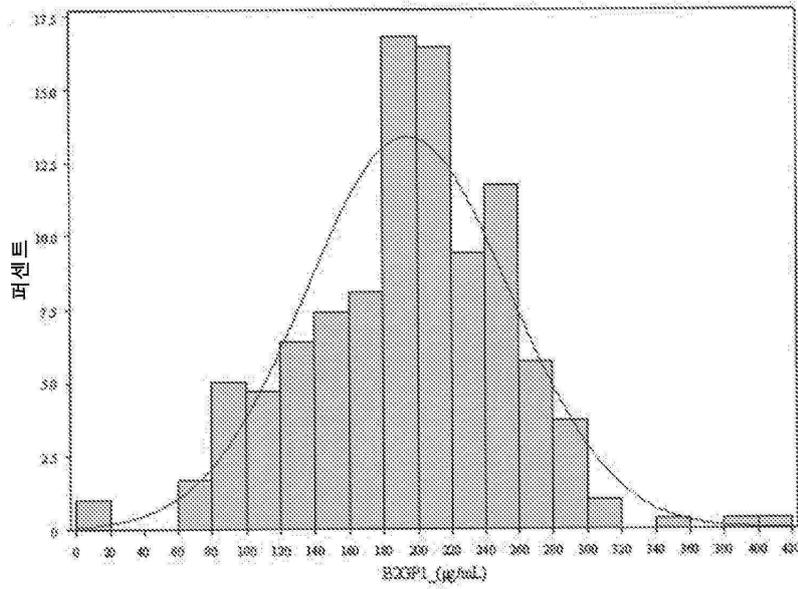
도면17b



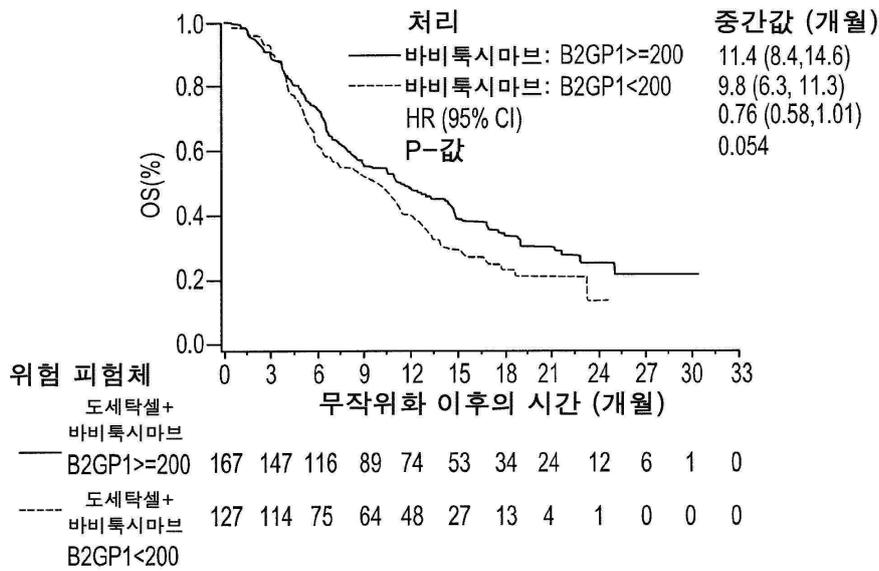
도면17c



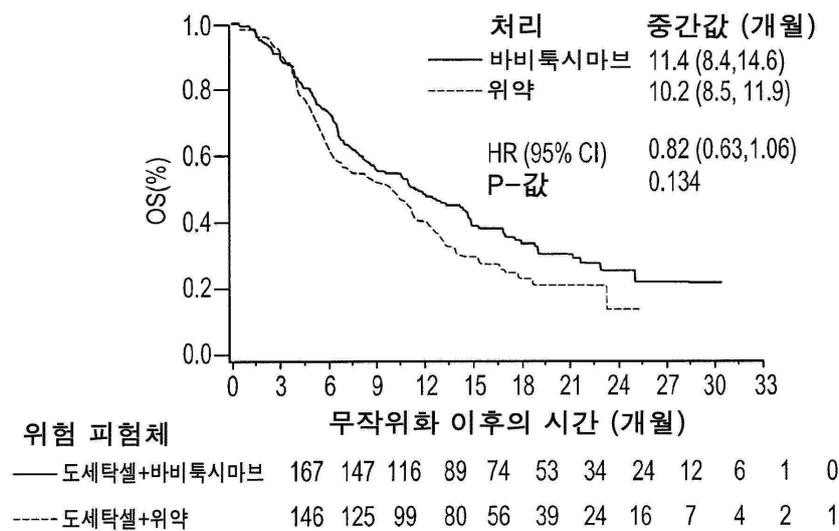
도면17d



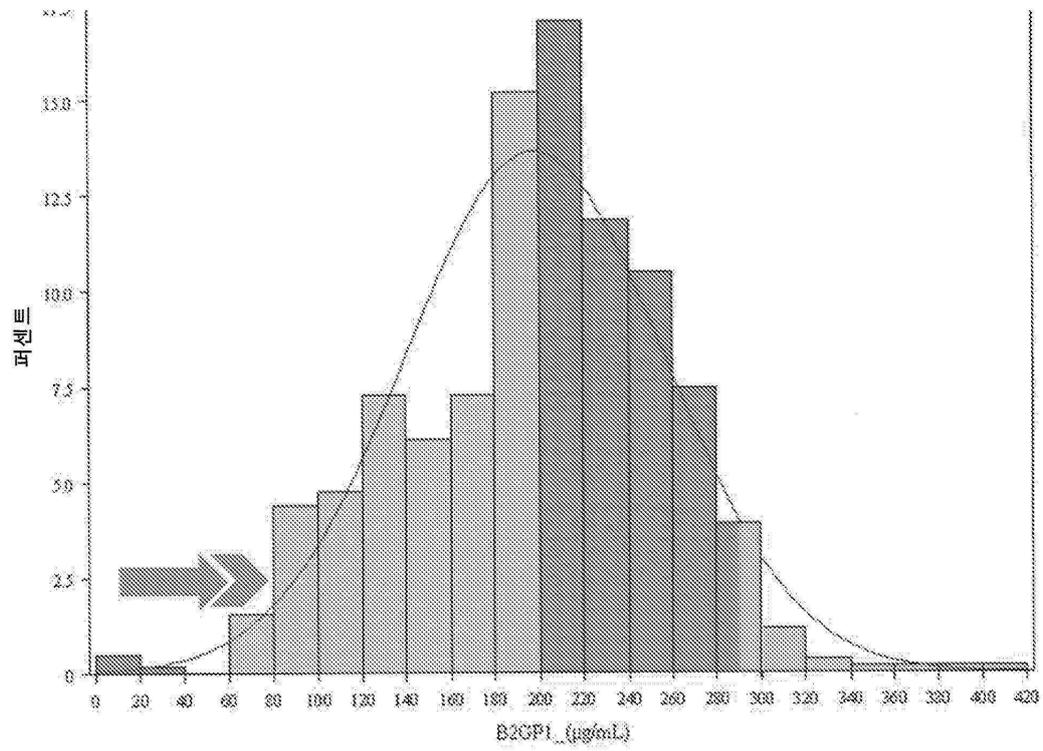
도면18a



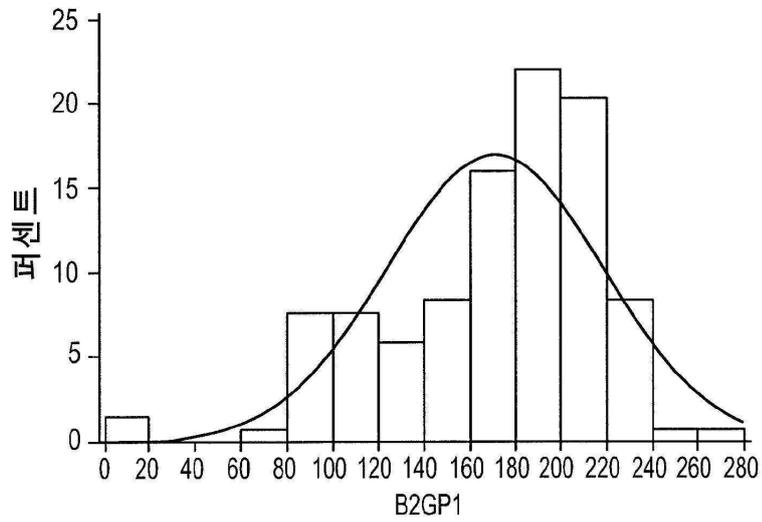
도면18b



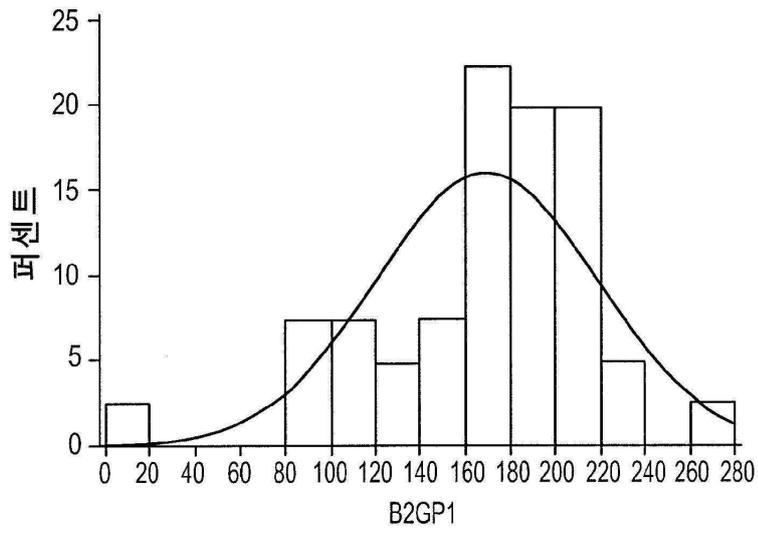
도면19



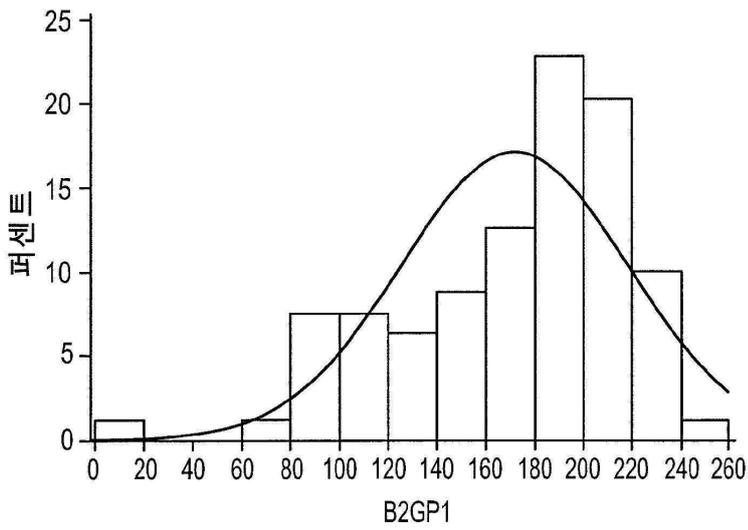
도면20a



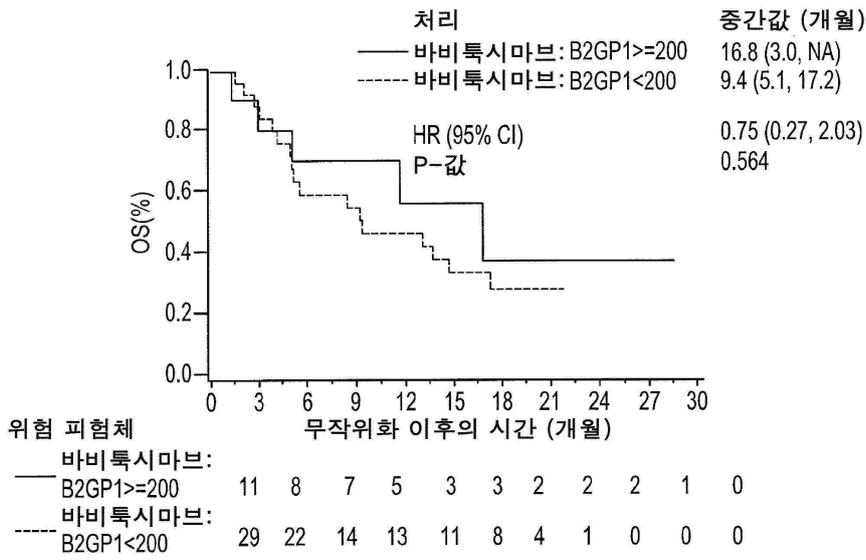
도면20b



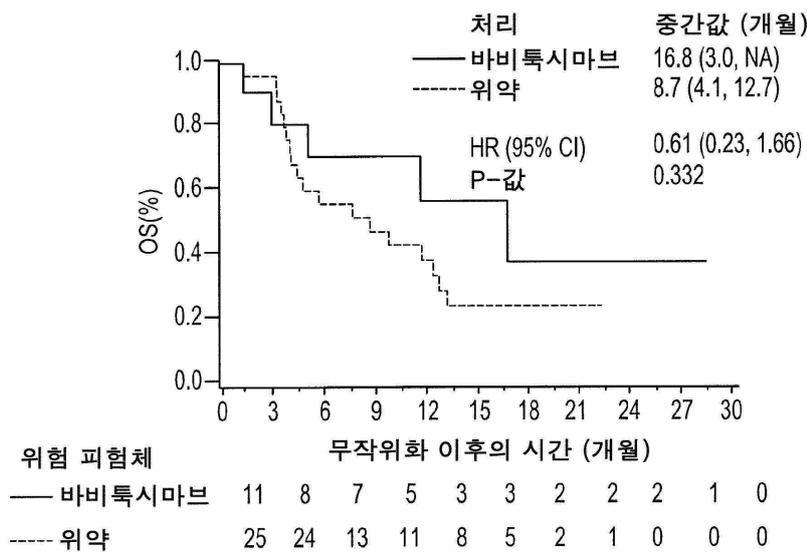
도면20c



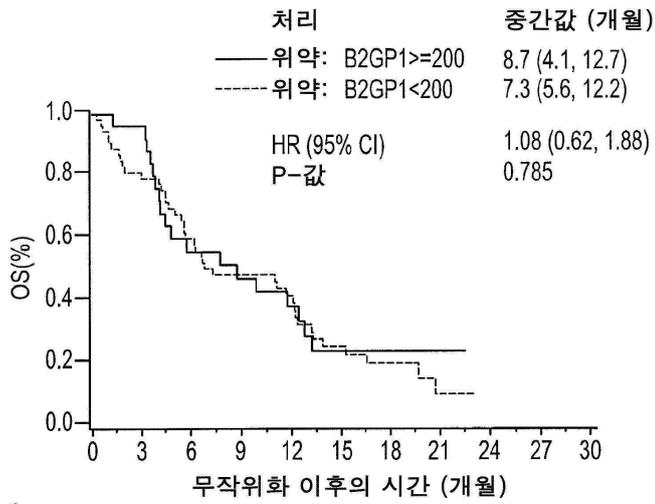
도면21a



도면21b

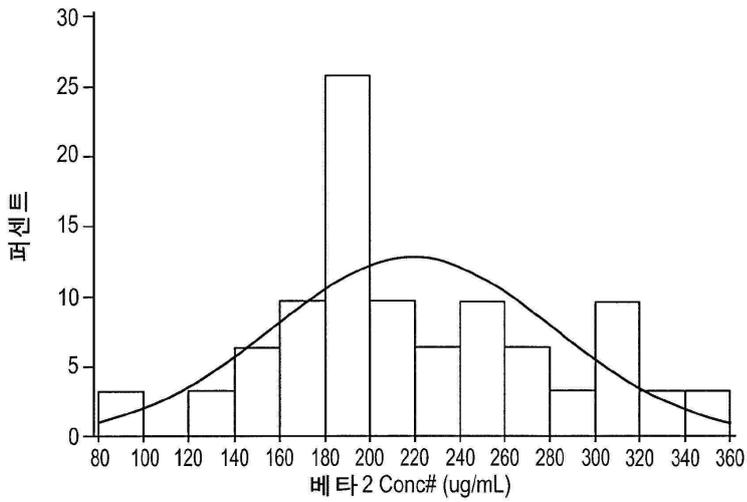


도면21c

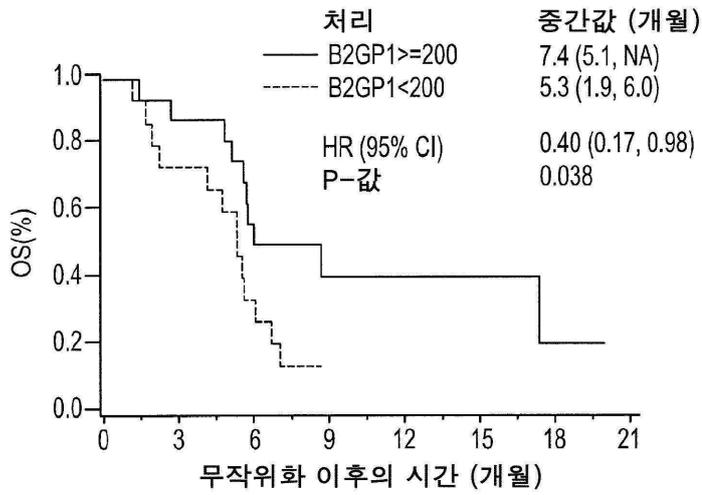


위험 피험체	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
위약 — B2GP1 ≥ 200	25	24	13	11	8	5	2	1	0	0	0
위약 - - - B2GP1 < 200	54	41	31	25	18	9	5	2	0	0	0

도면22



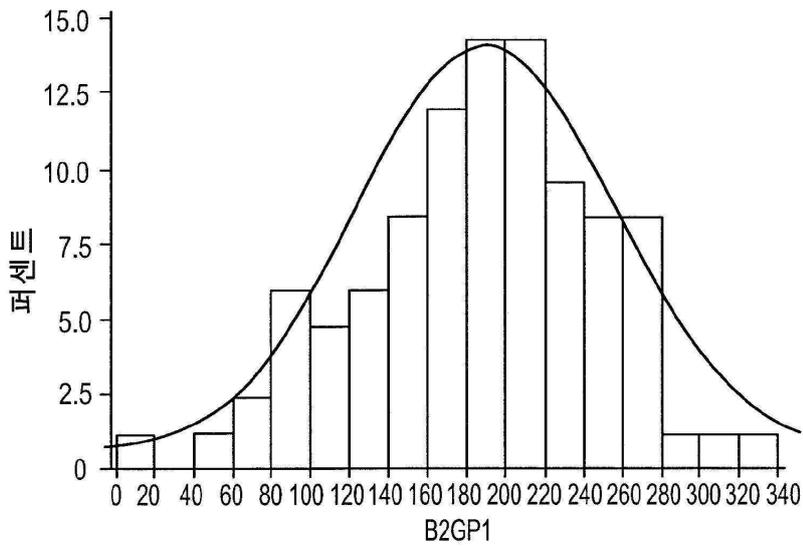
도면23



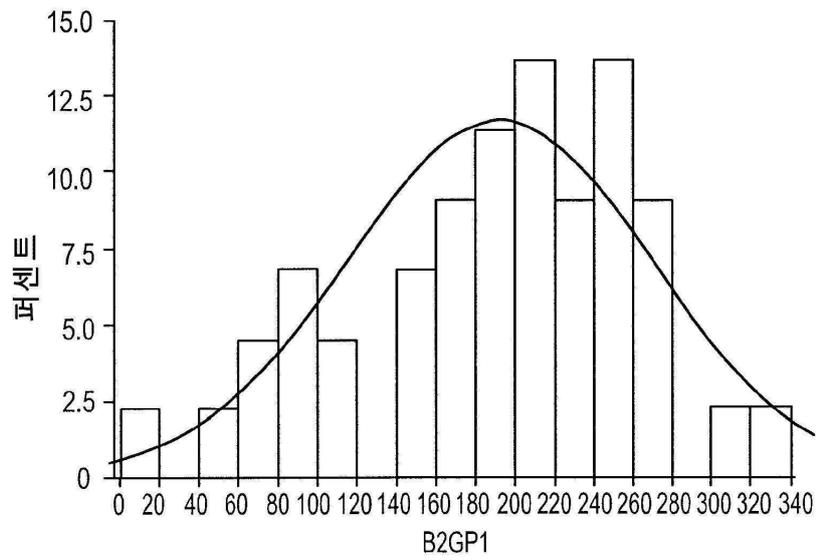
위험 피험체

— B2GP1 ≥ 200	16	14	9	4	2	2	1	0
- - - B2GP1 < 200	15	11	5	0	0	0	0	0

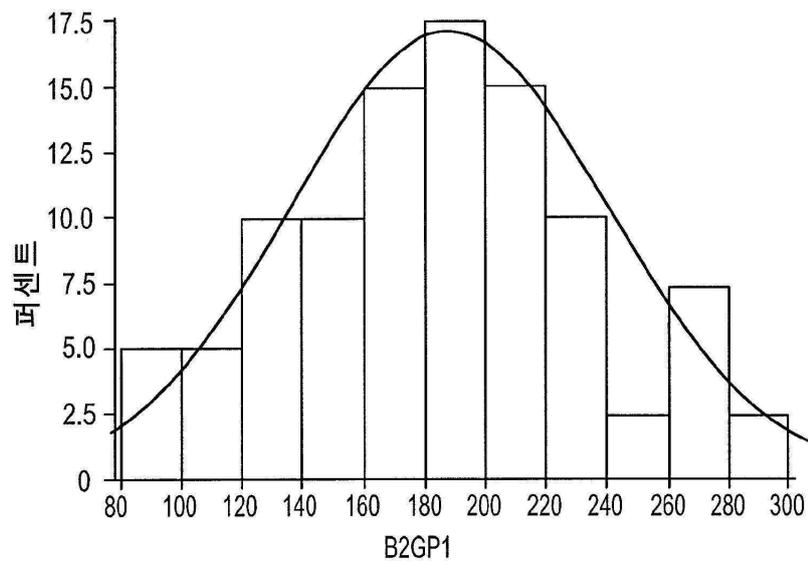
도면24a



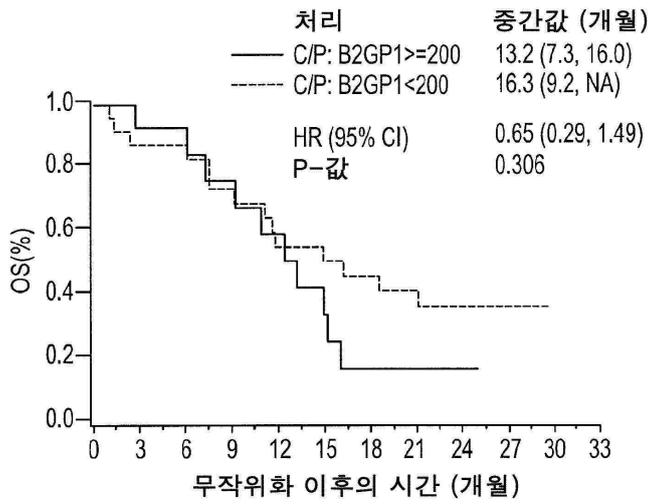
도면24b



도면24c



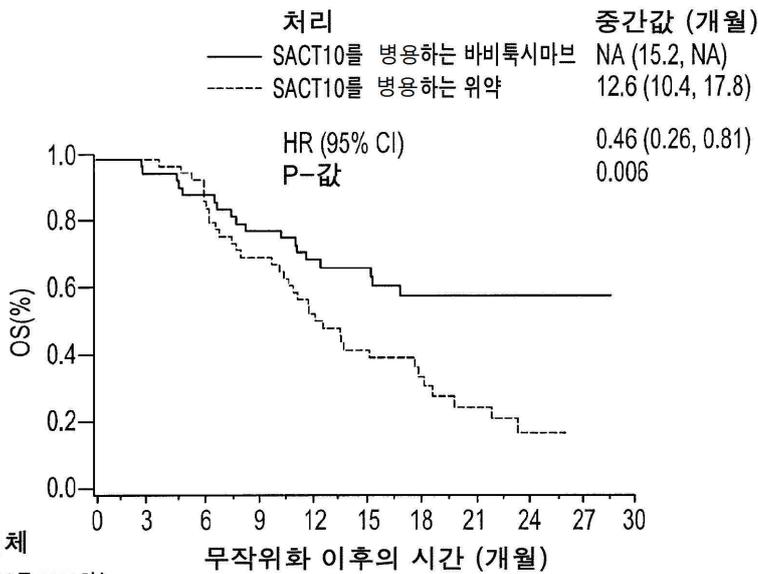
도면25c



위험 피험체

— C/P: B2GP1 ≥ 200	15	13	11	9	7	4	2	2	1	0	0	0
- - - C/P: B2GP1 < 200	25	20	19	16	12	11	10	8	5	1	0	0

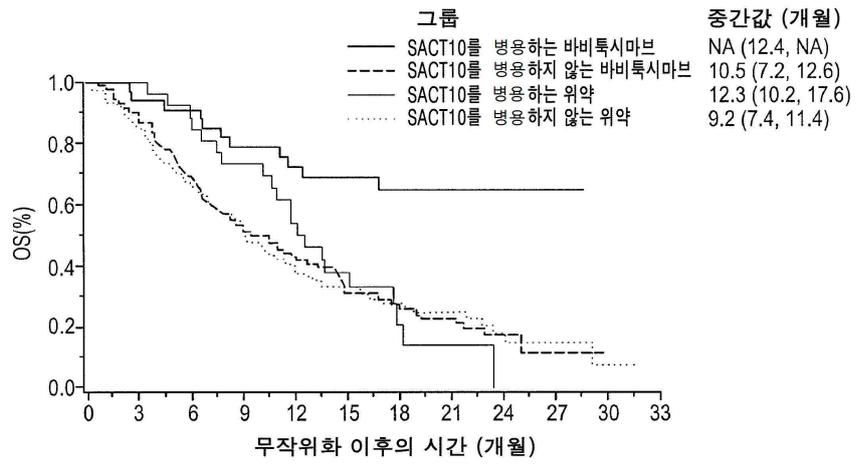
도면26



위험 피험체

— SACT10를 병용하는 바비톡시마브	46	44	41	36	30	24	17	10	4	1	0
- - - SACT10를 병용하는 위약	47	47	41	33	25	18	12	7	3	0	0

도면27



위험 피험체	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
— SACT10를 병용하는 바비투시마브	33	31	30	25	21	17	14	5	2	1	0	0
- - - SACT10를 병용하지 않는 바비투시마브	134	116	87	63	50	32	18	14	8	2	0	0
— SACT10를 병용하는 위약	26	26	23	19	14	8	3	1	0	0	0	0
..... SACT10를 병용하지 않는 위약	120	99	76	62	39	26	19	13	6	4	1	0