



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월07일

(11) 등록번호 10-1517251

(24) 등록일자 2015년04월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/519 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7012906

(22) 출원일자(국제) 2007년11월21일

심사청구일자 2012년11월09일

(85) 번역문제출일자 2009년06월19일

(65) 공개번호 10-2009-0110827

(43) 공개일자 2009년10월22일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/085402

(87) 국제공개번호 WO 2008/064321

국제공개일자 2008년05월29일

(30) 우선권주장

60/860,780 2006년11월21일 미국(US)

60/902,742 2007년02월21일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

JP2006500905 A

(73) 특허권자

칼로바이오스 파마슈티컬스, 아이엔씨.

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌 프란시스코 이.
그랜드 애비뉴 260

(72) 발명자

베빙턴 크리스토퍼 알

미국 94402 캘리포니아주 샌 마테오 아빌라 로드
132

야란턴 제프리 티

미국 94010 캘리포니아주 버링엄 발보아 애비뉴
1148

(74) 대리인

김진희

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 박제현

(54) 발명의 명칭 GM-CSF 길항제를 사용한 만성 염증성 질환의 치료 방법

(57) 요약

본 발명은 GM-CSF 길항제가 류마티스 관절염(RA)과 같은 만성 염증성 질환의 치료에 사용될 수 있다는 발견에 기초한 것이다. 따라서, 본 발명은 GM-CSF 길항제(예를 들어, GM-CSF 항체)와 항염산 화합물(예를 들어, 메토틱세이트)를 RA 환자에게 투여하는 방법 및 상기 길항제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

명세서

청구범위

청구항 1

주당 7.5~25 mg의 메토틱렉세이트로 치료를 받고 있는 환자에서 류마티스 관절염을 치료하기 위한, 항 GM-CSF 항체를 0.1~25 mg/kg의 치료적 유효량으로 포함하는 약학 조성물로서, 상기 항 GM-CSF 항체는 GM-CSF 길항제이고, 상기 치료적 유효량은 만성 염증성 질환의 증상을 경감하는 데 충분하지만 호중구 감소증을 유발하지 않는 것인 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항 GM-CSF 항체가 단일클론 항체인 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항 GM-CSF 항체가 재조합 또는 키메라 항체인 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항 GM-CSF 항체가 인간 가변 영역 서열을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항 GM-CSF 항체가 인간 경쇄 불변 영역을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항 GM-CSF 항체가 인간 중쇄 불변 영역을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 인간 중쇄 불변 영역이 감마 영역인 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 항 GM-CSF 항체가 두 개의 펩티드, 즉, GM-CSF의 88번~121번 잔기 사이의 다이설파이드 결합에 의해 연결된, 86~93번 잔기 및 112~127번 잔기를 갖는 에피토프에 결합하는 것인 약학 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 항체가 V_H 영역 CDR1으로 아미노산 서열 DYNIH, V_H 영역 CDR2으로 아미노산 서열 YIAPYSGGTGYNQEFKN, V_H 영역 CDR3으로 아미노산 서열 RDRFPYYFDY, V_L 영역 CDR1으로 아미노산 서열 KASQNVGSNVA, V_L 영역 CDR2로 아미노산 서열 SASYRSG, 및 V_L 영역 CDR3으로 아미노산 서열 QQFNRSPLT를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 항 GM-CSF 항체가 항체 단편으로서, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv 또는 dAB인 약학 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 항 GM-CSF 항체가 1~100 pM의 친화도를 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 항 GM-CSF 항체가 인간 항체인 약학 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 항 GM-CSF 항체가 중화 항체인 약학 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 항 GM-CSF 항체의 양이 0.2~10 mg/kg인 약학 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] [관련 출원에 대한 상호 참조]

[0002] 본 출원은 2006년 11월 21일에 출원된 미국 가출원 제60/860,780호 및 2007년 2월 21일에 출원된 미국 가출원 제60/902,742호를 기초로 우선권을 주장하며, 상기 가출원은 각각 본원에서 참고로 인용된다.

배경 기술

[0003] 류마티스 관절염(RA)은 유병률이 전세계 성인 인구의 1%에 달하는 만성 질환으로서 일반적으로 진행성인 염증 질환이다[Gabriel, Rheum Dis Clin North Am 27:269-81, 2001]. RA의 치료를 위해 현재 권장되고 있는 것으로는 진단이 확정된 후 질환 변경 항류마티스제(disease modifying anti-rheumatic drug; DMARD)로 조기에 치료하는 것을 들 수 있다. 진단 확정을 기다리는 동안에 또는 질병이 진행된 후에도 비스테로이드성 항염증제(non-steroidal anti-inflammatory drug; NSAID)와 최근까지 COX-2 억제제가 DMARD와 함께 널리 사용되어 왔다. 메토티렉세이트가 가장 널리 사용되는 DMARD이나, 하이드록시클로로퀸, 설파살라진, 금, 미노사이클린 및 레플루노마이드를 비롯한 다른 제제도 처방된다. 코르티코스테로이드가 DMARD와 병용될 수 있으나, 일반적으로, 부작용을 최소화하기 위해 소량만이 사용된다[O'Dell, New Engl. J. Med. 350:2591-2603, 2004].

[0004] 최근 몇 종의 신규 생물의약품이 RA 치료용으로 승인되었다. 에타너셉트(Enbrel®)는 중양 피사 인자 알파(TNF- α)를 차단하고; 인플릭시맵 및 아달리무맵(각각, Remicade® 및 Humira®)은 TNF- α 및 TNF- β 를 차단하며; 아나킨라(Kineret®)는 IL-1의 억제제이다. 이러한 제제들은 신속히 작용하여 질환을 변경하는 것(관절/골 미란을 늦추는 것)으로 확인되었다[Olsen & Stein, New Engl. J. Med 350:2167- 2179, 2004]. 그러나, 이들 요법에는 몇 가지 문제점이 남아 있다. 일부 환자들은 TNF 억제제에 대한 적절한 반응을 얻지 못한다. 또한, 일부 환자에 있어서는, TNF 억제제의 치료 이익이 시간이 경과함에 사라진다. TNF 경로를 차단하는 것은 또한 결핵의 재발뿐만 아니라 중증 감염, 탈수초화 및 림프종(RA 환자들이 일반 집단보다 림프종에 걸릴 위험이 더 높긴 하다)의 위험 증가와 연관되어 있다. 아나킨라는 반감기가 짧아서 날마다 주사해야 하기 때문에, 작용 시간이 더 긴 TNF 억제제보다 일차 생물학적 요법으로서 사용되는 빈도가 적다.

[0005] RA 환자에 대해 메토티렉세이트와 함께 단일클론 항CD20 항체인 리툽시맵(Mabthera®)을 사용하는 것에 관한 최근의 데이터는, 항체의 2회 주입 후 장시간에 걸쳐 이익을 얻을 수 있음을 입증하였다[Edwards et al., New Engl. J. Med 350:2572-2581, 2004].

[0006] 메토티렉세이트는 RA 및 다른 염증성 관절 질환과, 건선 및 전신성 홍반성 루푸스를 비롯한 자가면역 질환을 치료하기 위해 DMARD로서 사용된다. 메토티렉세이트는 건선형 관절염 및 소아 특발성 관절염의 치료에 특히 유효하다. 이 약제는 또한 염증성 관절염의 치료에 권장되는 양보다 고용량으로 암의 화학요법에 사용된다. 화학요법에 사용될 경우, 특히 코르티코스테로이드, 비스테로이드성 항염증제, 사이클로스포린, 트리메토프림 및 특정 항생제를 비롯한 다수의 다른 임의의 약제와 함께 사용될 경우, 메토티렉세이트는 골수 억제를 유발하여 모든 유형의 혈액 세포의 생산 감소를 초래할 수 있다. 메토티렉세이트는 일반적으로 관절염(또는 건선)의 치료에 이

용되는 투여법에서는 내성이 좋지않, 이러한 저용량에서도 골수 억제, 특히 호중구 감소증을 유발할 수 있다. 예를 들어, 사례 보고서[Sosin & Handa, Brit. Med. J. 326:266-267, 2003]에 의하면, 주당 5 mg~17.5 mg의 메토틱렉세이트를 투여하여 치료한 환자에서 호중구 감소증이 보고되었다. 영국 류마티스 협회 가이드라인(2000년 7월)에서와 같이 RA에 대한 메토틱렉세이트의 권장 투여량은 주당 7.5 mg의 메토틱렉세이트를 투여하고 주당 최대 투여량을 25 mg으로 하여 6주마다 2.5 mg씩 늘리는 것이다. 따라서 이들 환자에게서는 특히 병용 요법을 행한 경우 최대 권장량보다 훨씬 적은 투여량에서도 호중구 감소증이 발병하였다.

[0007] 메토틱렉세이트를 포함한 화학요법에서는, 낮은 혈중 호중구 수치를 교정함으로써 호중구 감소증의 지속 기간과 심각성을 줄이기 위해 GM-CSF를 처방할 수 있다[Am. Soc. Clin. Onc. 2006, J. Clin. Oncol. 24: July 1st 2006]. 이러한 임상 세팅에서, GM-CSF는 과립구(호중구 포함) 및 대식세포의 생산을 증대시키는 조혈 성장 인자로서 사용된다. 예를 들어, 암 환자에게 GM-CSF를 단기 투여하는 것은, 메토틱렉세이트를 포함하는 화학요법으로 치료한 환자에 있어서 호중구 수치의 신속한 증가를 유도할 수 있고 호중구 감소증을 경감할 수 있다 [Aglietta et al., Cancer 72:2970-2973, 1993]. 메토틱렉세이트로 인한 호중구 감소증을 치료함에 있어서의 GM-CSF의 확립된 효능은, GM-CSF의 길항작용이 반대 효과를 유발할 수 있다는 것, 즉, GM-CSF 길항작용이, 특히 메토틱렉세이트로 병용 치료 중이거나 이전에 메토틱렉세이트로 치료한 적이 있는 환자에 있어서 호중구 감소증에 기여할 수 있다는 우려를 제기한다.

[0008] 호중구 감소증은 사이토카인 길항제를 포함하는 염증성 관절염의 현행 몇 가지 치료법에 있어서 현저하고 심각한 부작용이다. IL-1 길항제인 아나킨라는 단독으로, 또한, 특히 TNF 길항제와 병용될 때, 호중구 감소증의 위험 증가를 초래한다[Fleischmann et al., Expert Opinion Biol Ther. 4:1333, 2004]. 인플릭시맵 역시 호중구 감소증 위험 증가와 관련되어 있다.

[0009] 따라서 현재, 특히 메토틱렉세이트와 같은 항엽산(anti-folate) 화합물을 투여받고 있는 환자에 대한 RA의 추가 치료법이 필요한 실정이다. 본 발명은 이러한 요구사항을 해결한다.

발명의 상세한 설명

[0010] [발명의 개요]

[0011] 본 발명은 염증성 관절염 병증(예를 들어, RA)과 같은 만성 염증성 병증을 앓고 있는 환자를 GM-CSF 길항제로 치료하는 방법을 제공한다. 대표적인 실시형태에 있어서, 상기 GM-CSF 길항제는 호중구 감소증을 유발하지 않는 양으로 항엽산 화합물, 예를 들어 메토틱렉세이트와 함께 투여된다. 일부 실시형태에서는, 상기 GM-CSF 길항제는 재조합적으로 제조된 것, 예를 들어 재조합 단일클론 항체이다. 다른 실시형태에서는, 상기 GM-CSF 길항제는, 천연 공급원으로부터, 예를 들어 인간 혈장으로부터 정제된 항 GM-CSF이다.

[0012] 일 양태에 있어서, 본 발명은 만성 염증성 질환, 예를 들어 류마티스 관절염을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 상기 환자에게 항엽산 화합물, 예를 들어 메토틱렉세이트를 투여하는 것과 GM-CSF 길항제를 투여하는 것을 포함하며, 이때 상기 항엽산 화합물, 예를 들어 메토틱렉세이트 및 상기 GM-CSF 길항제는 만성 염증성 질환의 증상을 경감하는 데 충분한 양이지만 호중구 감소증을 유발하지 않는 양으로 투여된다. GM-CSF 길항제는, 예를 들어 항 GM-CSF 항체, 항 GM-CSF 수용체 항체; 가용성 GM-CSF 수용체; 사이토크롬 b562 항체 모방체(mimetic); 어드넥틴(adnectin), 리포칼린(lipocalin) 골격 항체 모방체; 칼릭사렌 항체 모방체, 또는 항체 유사 결합성 펩티드 모방체일 수 있다.

[0013] 다수의 실시형태에 있어서, 상기 GM-CSF 길항제는 GM-CSF에 대한 항체, 즉, 항 GM-CSF 항체이다. 다양한 실시형태에 있어서, 상기 항체는 다클론 항체, 단일클론 항체, 또는 나노바디 또는 카멜리드(camelid) 항체와 같은 항체일 수 있다. 일부 실시형태에서는, 상기 항체는 항체 단편, 예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, scFv 또는 도메인 항체(dAB)이다. 상기 항체는 또한, 예를 들어 안정성을 향상시키기 위해 변형시킨 항체일 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서는, 상기 항체는 폴리에틸렌 글리콜에 접합된다.

[0014] 일부 실시형태에 있어서, 상기 항체는 약 100 pM~약 10 nM, 예를 들어, 약 100 pM, 약 200 pM, 약 300 pM, 약 400 pM, 약 500 pM, 약 600 pM, 약 700 pM, 약 800 pM, 약 900 pM, 또는 약 1 nM~약 10 nM의 친화도를 갖는다. 또 다른 실시형태에 있어서, 상기 항체는 약 1 pM~약 100 pM의 친화도, 예를 들어, 약 1 pM, 약 5 pM, 약 10 pM, 약 15 pM, 약 20 pM, 약 25 pM, 약 30 pM, 약 40 pM, 약 50 pM, 약 60 pM, 약 70 pM, 약 80 pM, 또는 약 90 pM~약 100 pM의 친화도를 갖는다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 항체는 약 10 pM~약 30 pM의 친화도를 갖는다.

- [0015] 일부 실시형태에 있어서, 상기 항체는 중화 항체이다. 또 다른 실시형태에 있어서, 상기 항체는 제조합 또는 키메라 항체이다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 항체는 인간 항체이다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 항체는 인간 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 항체는 인간 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 항체는 인간 중쇄 불변 영역, 예컨대 감마쇄를 포함한다.
- [0016] 또 다른 실시형태에 있어서, 상기 항체는 키메라 19/2 항체와 동일한 에피토프에 결합한다. 상기 항체는, 예를 들어 키메라 19/2의 V_H 영역 및 V_L 영역을 포함할 수 있다. 상기 항체는 또한 인간 중쇄 불변 영역, 예컨대 감마 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 항체는 키메라 19/2의 V_H 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 또 다른 실시형태에 있어서, 상기 항체는 키메라 19/2의 V_L 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 또 다른 실시형태에 있어서, 상기 항체는 키메라 19/2 항체의 V_H 영역 및 V_L 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 항체는 키메라 19/2의 V_H 영역 CDR3 및 V_L 영역 CDR3을 포함한다.
- [0017] 일부 실시형태에 있어서, 상기 항체는 반감기가 약 7일~약 25일이다.
- [0018] 본 발명 방법의 일부 실시형태에서는, 상기 GM-CSF 길항제, 예를 들어 항 GM-CSF 항체는 주입 또는 주사에 의해 투여된다. 예를 들어, 상기 GM-CSF 길항제는 약 15 분~약 2 시간의 시간에 걸쳐 정맥내 투여될 수 있다.
- [0019] 다른 실시형태에 있어서, 상기 GM-CSF 길항제는 볼러스 주사에 의해 피하 투여된다.
- [0020] 또 다른 실시형태에 있어서, 상기 GM-CSF 길항제는 근육내 투여된다.
- [0021] GM-CSF 항체는, 예를 들어 체중 1 kg당 약 1 mg~약 10 mg의 용량으로 투여될 수 있다.
- [0022] 일부 실시형태에 있어서, 상기 GM-CSF 길항제를 사용한 치료는 상기 GM-CSF 길항제의 2차 투여를 포함한다.
- [0023] 본 발명은 또한, 만성 염증성 질환, 예를 들어 류마티스 관절염을 치료하는 방법으로서, 본원에 기재된 항 GM-CSF 항체를 치료적 유효량으로 투여하는 것을 포함하는 치료 방법을 제공한다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 항 GM-CSF 길항제, 예를 들어 항 GM-CSF 항체는 알츠하이머병과 같은 신경퇴행성 질환을 앓고 있는 환자에게 투여된다.
- [0024] [상세한 설명]
- [0025] **정의**
- [0026] 본원에서 사용될 때, "만성 염증성 질환"이란 오랜 기간 지속되는 염증성 반응과 관련된 질환을 의미한다. 일부 경우에 있어서, 상기 염증성 반응은 몇주, 몇달 또는 심지어 무기한 지속될 수 있다. 염증성 반응의 장기 지속은 대개 염증성 반응에 대한 지속적인 자극에 의해 유발된다. 염증성 반응은 조직 손상을 유발한다. 만성 염증은 급성 염증이 진행된 결과일 수 있다. 만성 염증은 반복된 급성 염증 발병 후에 뒤이어 발생할 수도 있고 새로이 발생할 수도 있다. 다수의 염증성 질환이 지속적인 병원균 감염, 효소 분해 또는 식균 작용에 의해 제거가 안되는 자극성 무생물 이물질, 또는 비자가로서 인식되는 "정상적인" 조직 성분(대부분 자가면역 질환과 관련됨)과 관련이 있는 것으로 확인되었다. 만성 염증의 조직학적 양상은 대개 대식세포, 림프구 및 혈장 세포의 존재가 대부분 관련되어 있는 혼합 염증성 세포 침윤물을 수반하며, 이때 호중구와 호산구 다형 핵구가 부성분으로 존재할 수도 있다(호중구와 호산구 다형 핵구는 상당수가 급성 염증과 관련됨). 염증성 질환의 예로는 관절염, 예를 들어 RA, 건선형 관절염, 강직성 척추염, 소아 특발성 관절염 및 그 밖의 염증성 관절 질환; 염증성 장 질환, 예를 들어 궤양성 대장염, 크론병, 바렛 증후군, 회장염, 장염 및 글루텐 과민성 장질환; 호흡계의 염증성 질환, 예컨대 천식, 성인 호흡 장애 증후군, 알레르기성 비염, 기폐증, 만성 폐쇄성 기도 질환, 과민성 폐 질환, 기관지 확장증; 건선, 경피증과, 습진, 아토피 피부염 및 소양증과 같은 염증성 피부병을 비롯한 염증성 피부 질환; 다발성 경화증, 특발성 탈수초성 다발성 신경병증, 길랭-바레 증후군, 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증 및 알츠하이머병과 같은 신경퇴행성 질환을 비롯한 중추 신경계 및 말초 신경계의 염증을 수반하는 질환을 들 수 있다. 본 발명의 방법을 이용하여 그 밖의 다양한 염증성 질환을 치료할 수 있다. 그러한 질환에는 전신성 홍반성 루푸스, 면역성 신장 질환, 예를 들어 사구체신염 및 척추관절증과; 바람직하지 않은 만성 염증성 성분을 수반한 질환, 예컨대 전신성 경화증, 특발성 염증성 근병증, 쇼그렌 증후군, 혈관염, 유육종증, 갑상선염, 통풍, 이염, 결막염, 부비강염, 유육종증, 베켓 증후군, 간담도 질환, 예컨대 간염, 원발성 담즙성 간경변, 육아종성 간염 및 경화성 담관염; 심혈관계에 발생하는 염증 및 허혈 손상, 예컨대 허혈성 심질환, 뇌졸중 및 아테롬성 동맥경화증; 동종이식편 거부 반응 및 이식편 대 숙주 반응을 비롯한 이식 거부 반응이 포함된다. 기타 다양한 염증성 질환으로는 결핵 및 만성 담낭염을 들 수 있다. 그 밖의 만성 염증 질환은, 예를 들

어 문헌[Harrison's Principles of Internal Medicine, 12th Edition, Wilson, et al., eds., McGraw-Hill, Inc.]에 기재되어 있다.

[0027] "류마티스 관절염(RA)"이란 용어는 자가면역 질환으로서 발달하며 관절의 만성 염증과 관련되어 있는 만성 염증성 질환을 의미한다. 흔히, 염증은 관절 주변의 조직과 다른 기관으로 퍼진다. 일반적으로, RA는 관절 파괴 및 기능 장애를 유발할 수 있는 진행성 질환이다. RA와 관련된 관절 염증은 관절의 부종, 통증, 강직 및 발적을 유발한다. 류마티스 질환의 염증은 관절 주변의 조직, 예컨대 건, 인대 및 근육에서도 발생할 수 있다. 일부 RA 환자의 경우, 만성 염증이 연골, 골 및 인대를 파괴하여 관절의 변형이 유발된다. 관절의 손상은 질병 초기에 발생할 수 있고 진행성일 수 있다. 관절의 진행성 손상은 관절에 발생한 통증, 강직 또는 부종의 정도에 반드시 상관관계가 있는 것은 아니다.

[0028] 본원에서 사용될 때, "과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF)"는 분자량이 약 23 kDa인 내부 다이설파이드 결합을 갖는 작은 천연 당단백질을 의미한다. 인간의 경우, 이것은 인간 염색체 5번 상의 사이토카인 클러스터 내에 위치하는 유전자에 의해 코딩된다. 인간 유전자 및 단백질의 서열은 알려져 있다. 이 단백질은 N 말단 신호 서열과 C 말단 수용체 결합 도메인을 갖는다[Rasko and Gough In: The Cytokine Handbook, A. Thomson, et al., Academic Press, New York (1994), 349-369면]. 이것의 3차원 구조는 인터루킨의 구조와 유사하나, 그 아미노산 서열은 유사하지 않다. GM-CSF는 조혈 환경하에 말초 염증 부위에 존재하는 간엽 세포에 의해 다수의 염증성 매개인자에 반응하여 생산된다. GM-CSF는 골수 세포로부터의 호중성 과립구, 대식세포 및 혼합 과립구-대식세포 콜로니의 생산을 자극할 수 있고, 태아 간 전구 세포로부터의 호산구 콜로니의 형성을 자극할 수 있다. GM-CSF는 또한 성숙한 과립구 및 대식세포에서 몇 가지 기능적 활성을 자극할 수 있다.

[0029] "과립구 대식세포-콜로니 자극 인자 수용체(GM-CSFR)"란 용어는 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF)에 결합될 때 신호를 전달하는 세포 상에 발현되는 막 결합형 수용체를 의미한다. GM-CSFR은 리간드 특이적인 저친화성 결합 사슬(GM-CSFR 알파)과 고친화성 결합 및 신호 전달에 필요한 제2의 사슬로 구성된다. 상기 제2의 사슬은 인터루킨 3(IL-3) 및 IL-5 수용체에 대한 리간드 특이적 알파 사슬에 의해 공유되며, 따라서 베타 커먼(beta common; beta c)이라 불린다. GM-CSFR 알파의 세포질 영역은 알파 1 및 알파 2 동형체(isoform)에 의해 공유되는 막 근위 보존 영역과 알파 1과 알파 2 사이에서 달라지는 C 말단 가변 영역으로 구성된다. 베타-c의 세포질 영역은 GM-CSF에 의해 유도된 증식 반응에 중요한 막 근위 세린 및 산성 도메인을 포함한다.

[0030] "가용성 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자 수용체(sGM-CSFR)"란 용어는 GM-CSF에 결합하지만 리간드에 결합될 때 신호를 전달하지 않는 비 막결합형 수용체를 의미한다.

[0031] 본원에서 사용될 때, "펩티드 GM-CSF 길항제"란 GM-CSF 또는 그 수용체와 상호작용하여, 그렇지 않으면 GM-CSF가 세포 표면 상에 발현된 동족 수용체에 결합하는 것로부터 유도되는 신호 전달을 감소 또는 차단(부분적으로 또는 완전히)하는 펩티드를 의미한다. GM-CSF 길항제는 수용체에 결합하는 데 이용될 수 있는 GM-CSF 리간드의 양을 줄이거나(예를 들어, GM-CSF에 일단 결합된 항체는 GM-CSF의 제거율을 증가시킴), GM-CSF 또는 수용체에 결합하여 리간드가 그 수용체에 결합하는 것을 막음으로써(예를 들어, 중화 항체) 작용할 수 있다. GM-CSF 길항제는, GM-CSF 또는 그 수용체에 결합하여 신호 전달을 부분적으로 또는 완전히 억제하는 폴리펩티드를 포함할 수 있는 다른 펩티드 억제제도 포함할 수 있다. 펩티드 GM-CSF 길항제는, 예를 들어, 항체; GM-CSF에 길항하는 천연 또는 합성 GM-CSF 수용체 리간드, 또는 다른 폴리펩티드일 수 있다. GM-CSF 길항제 활성을 검출하기 위한 대표적인 분석법이 실시예 1에 제시되어 있다. 일반적으로, 중화 항체와 같은 펩티드 GM-CSF 길항제는 EC₅₀이 10 nM 이하이다.

[0032] 본원에서 사용될 때 "정제된" GM-CSF 길항제는 천연 상태로 발견될 때 일반적으로 동반되는 성분들을 실질적으로 또는 본질적으로 포함하지 않는 GM-CSF 길항제를 의미한다. 예를 들어, 혈액 또는 혈장으로부터 정제된 항 GM-CSF 항체와 같은 GM-CSF 길항제는 다른 면역글로불린 분자와 같은 다른 혈액 또는 혈장 성분을 실질적으로 포함하지 않는다. 순도 및 균질도는 일반적으로 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피와 같은 분석 화학 기법을 이용하여 측정한다. 조제물 중에 존재하는 주된 종이 단백질이라면 이 단백질은 실질적으로 정제된 것이다. 일반적으로, "정제된"이란 단백질이, 이 단백질이 천연 상태에서 함께 존재하는 성분들에 대하여 85% 이상, 더 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상 순수한 것을 의미한다.

[0033] 본원에서 사용될 때, "항체"란 기능적으로는 결합성 단백질로서 정의되고, 구조적으로는 항체를 생산하는 동물의 면역글로불린 코딩 유전자의 골격구조(framework) 영역으로부터 유래되는 것으로서 당업자가 이해하고 있는 아미노산 서열을 포함하는 것으로 정의되는 단백질을 의미한다. 항체는 실질적으로 면역글로불린 유전자 또는 면역글로불린 유전자의 단편에 의해 코딩되는 하나 이상의 폴리펩티드로 구성될 수 있다. 인정되는 면역글로불

린 유전자로는 카파, 람다, 알파, 감마, 델타, 엡실론 및 뮤 불변 영역 유전자뿐만 아니라 수많은 면역글로불린 가변 영역 유전자를 포함한다. 경쇄는 카파 또는 람다로 분류된다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 엡실론으로 분류되며, 이는 다시 각각 면역글로불린 클래스 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 정의된다.

[0034] 전형적인 면역글로불린(항체) 구조 단위는 사량체를 포함하는 것으로 알려져 있다. 각각의 사량체는 동일한 두 쌍의 폴리펩티드쇄로 이루어지며, 각각의 쌍은 하나의 "경쇄"(약 25 kD)와 하나의 "중쇄"(약 50~70 kD)를 갖는다. 각각의 쇄의 N 말단은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100~110개 또는 그 이상의 아미노산으로 이루어진 가변 영역을 정의한다. 가변 경쇄(V_L) 및 가변 중쇄(V_H)란 용어는 각각 이러한 경쇄와 중쇄를 의미한다.

[0035] 본원에서 사용될 때 "항체"란 용어는 결합 특이성을 보유하는 항체 단편을 포함한다. 예를 들어, 잘 규명된 항체 단편이 다수 존재한다. 예를 들면, 펩신은 힌지 영역의 다이설파이드 결합 아래에서 항체를 분해하여, Fab(이것 자체가 다이설파이드 결합에 의해 V_H -CH1에 연결되는 경쇄임)의 이량체인 $F(ab)'$ 을 생성한다. 상기 $F(ab)'$ 은 온화한 조건하에서 환원되어 힌지 영역의 다이설파이드 결합을 분해할 수 있으며, 이로써 $(Fab)'$ 이 이량체가 Fab' 단량체로 전환된다. 상기 Fab' 단량체는 실질적으로 힌지 영역의 일부를 갖는 Fab이다(다른 항체 단편에 관한 보다 상세한 설명은 문헌[Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993)] 참조). 온전한 항체의 분해와 관련하여 다양한 항체 단편들이 정의되어 있지만, 당업자라면 화학적으로 또는 재조합 DNA 기법을 이용하여 새로이 단편을 합성할 수 있다는 것을 알 것이다. 따라서, 본원에서 사용되는 항체란 용어는 또한 완전 항체의 변형에 의해 제조되거나 재조합 DNA 기법을 이용하여 합성한 항체 단편을 포함한다.

[0036] 항체는 가변 중쇄와 가변 경쇄가 서로 연결되어(직접 또는 펩티드 링커를 통해) 연속된 폴리펩티드를 형성하는 단일쇄 Fv 항체(sFv 또는 scFv)와 같은 단일쇄 항체(단일 폴리펩티드쇄로서 존재하는 항체)를 비롯한 V_H - V_L 이량체, V_H 이량체 또는 V_L 이량체 등의 이량체를 포함한다. 단일쇄 Fv 항체는, 직접 연결되거나 펩티드 코딩 링커에 의해 연결된 V_H 코딩 서열과 V_L 코딩 서열을 포함하는 핵산으로부터 발현될 수 있는, 공유 결합된 V_H - V_L 이형이량체이다(예를 들어, 문헌[Huston, et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988] 참조). V_H 와 V_L 은 단일 폴리펩티드쇄로서 서로에 결합하지만, V_H 도메인과 V_L 도메인은 비공유적으로 회합한다. 그 밖에도, 상기 항체는 다이설파이드 안정화 Fv(dsFv)와 같은 또 다른 단편일 수 있다. 재조합 기법을 이용하는 것을 포함하여 다른 단편도 생성할 수 있다. 상기 scFv 항체와, 항체 V 영역 유래의 자연적으로는 회합하지만 화학적으로 분리된 경쇄 및 중쇄 폴리펩티드를 항원 결합 부위의 구조와 실질적으로 유사한 3차원 구조로 폴딩되는 분자로 전환시키는 다른 수많은 구조도 당업자에게 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,091,513호, 제5,132,405호 및 제4,956,778호 참조). 일부 실시형태에 있어서, 항체는, 파지 상에 디스플레이되는 것, 또는 사슬이 가용성 단백질, 예를 들어 scFv, Fv, Fab, $(Fab)'$ 으로서 분비되는, 벡터를 사용한 재조합 기법에 의해 생성되는 것, 또는 사슬이 가용성 단백질로서 분비되는, 벡터를 사용한 재조합 기법에 의해 생성된 것을 포함한다. 본 발명에 사용하기 위한 항체는 또한 이중 항체(diantibody) 및 미니 항체를 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명의 항체는 카멜리드 유래의 항체와 같은 중쇄 이량체도 포함한다. 카멜리드의 중쇄 이량체 IgG의 V_H 영역은 경쇄와 소수성 상호작용을 할 필요가 없기 때문에, 일반적으로 경쇄와 접촉하는 중쇄 내 영역은 카멜리드에서 친수성 아미노산 잔기로 바뀐다. 중쇄 이량체 IgG의 V_H 도메인은 VHH 도메인이라 칭한다. 본 발명에 사용하기 위한 항체는 단일 도메인 항체(dAb) 및 나노바디를 포함한다(예를 들어, 문헌[Cortez-Retamozo, et al., Cancer Res. 64:2853-2857, 2004] 참조).

[0038] 본원에서 사용될 때, "V 영역"이란 골격구조 1, CDR1, 골격구조 2, CDR2, 골격구조 3, CDR 3 및 골격구조 4의 분절들(이 분절들은 B 세포 분화 과정에서 중쇄 및 경쇄 V 영역 유전자의 재배열로 인하여 V 분절에 추가됨)을 포함하는 항체 가변 영역 도메인을 의미한다. 본원에서 사용되는 "V 분절"이란 V 유전자에 의해 코딩되는 V 영역(중쇄 또는 경쇄)을 의미한다.

[0039] 본원에서 사용될 때, "상보성 결정 영역(CDR)"이란 경쇄 및 중쇄 가변 영역에 의해 확립된 4개의 "골격구조" 영역에 개재되는 각각의 사슬 내의 3개의 초가변 영역을 의미한다. CDR은 주로 항원의 에피토프에 결합하는 데 관여한다. 각각의 사슬의 CDR은 일반적으로 N 말단에서 순차적으로 순번을 매겨서 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 불리고, 또한 일반적으로, 특정 CDR이 위치하는 사슬에 의해 확인된다. 따라서, 예를 들어, V_H CDR3은 이것이 발견되는 항체의 중쇄의 가변 도메인에 위치하는 반면, V_L CDR1은 이것이 발견되는 항체의 경쇄의 가변 도메인

유래의 CDR1이다.

- [0040] 상이한 경쇄 또는 중쇄의 골격구조 영역의 서열은 종 내에서 비교적 보존되어 있다. 구성 성분인 경쇄와 중쇄의 통합 골격구조 영역인 항체의 골격구조 영역은, 3차원 공간 내에 CDR을 배치하여 정렬하는 역할을 한다.
- [0041] CDR 및 골격구조 영역의 아미노산 서열은 당업계에서 잘 알려져 있는 다양한 정의, 예를 들어 카바트(Kabat), 코티아(Chothia), 국제 면역유전학(international ImmunoGeneTics; IMGT) 데이터베이스 및 AbM을 이용하여 결정할 수 있다(예를 들어, 문헌[Johnson et al., supra; Chothia & Lesk, 1987, Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J. Mol. Biol. 196, 901-917; Chothia C. et al., 1989, Conformations of immunoglobulins hypervariable regions. Nature 342, 877-883; Chothia C. et al., 1992, structural repertoire of the human VH segments J. Mol. Biol. 227, 799-817; Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 1997, 273(4)] 참조). 또한, 항원 통합 부위의 정의는 하기 문헌들에 기재되어 있다[Ruiz et al., IMGT, the international ImmunoGeneTics database. Nucleic Acids Res., 28, 219-221 (2000); and Lefranc, M.-P. IMGT, the international ImmunoGeneTics database. Nucleic Acids Res. Jan 1; 29(1):207-9 (2001); MacCallum et al., Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography, J. Mol. Biol. 262(5), 732-745 (1996); and Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9268-9272 (1989); Martin, et al., Methods Enzymol, 203, 121-153, (1991); Pedersen et al., Immunomethods, 1, 126, (1992); and Rees et al., In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction. Oxford University Press, Oxford, 141-172, 1996].
- [0042] "에피토프" 또는 "항원성 결정 부위"란 항원 상의 항체 결합 부위를 의미한다. 에피토프는 단백질의 3차 폴딩에 의해 병치된 인접 아미노산 또는 비인접 아미노산 둘 다로부터 형성될 수 있다. 인접 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 변성 용매에 노출되어도 일반적으로 유지되는 반면, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 변성 용매로 처리하면 일반적으로 상실된다. 에피토프는 독특한 공간적 입체구조로 일반적으로 3개 이상, 더 일반적으로는 적어도 5개 또는 8~10개의 아미노산을 포함한다. 에피토프의 공간적 입체구조를 결정하는 방법으로는, 예를 들어 x선 결정학적 분석법 및 2차원 핵 자기 공명법을 들 수 있다. 예를 들어, 문헌[Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996)]을 참조할 수 있다.
- [0043] 본원에서 사용될 때, "중화 항체"란 GM-CSF에 결합하여 GM-CSF 수용체에 의한 신호 전달을 차단하거나 또는 GM-CSF가 그 수용체에 결합하는 것을 방지하는 항체를 의미한다.
- [0044] 본원에서 사용될 때, "키메라 항체"란 (a) 불변 영역 또는 그 일부분이 변경, 대체 또는 치환되어, 항원 결합 부위(가변 영역)가 상이한 또는 변경된 클래스, 이펙터 기능 및/또는 종의 불변 영역에 연결되거나 또는 키메라 항체에 새로운 특성을 부여하는 완전히 상이한 분자(예를 들어, 효소, 독소, 호르몬, 성장 인자, 약물 등)에 연결되거나; 또는 (b) 가변 영역 또는 그 일부분이 상이한 또는 변경된 항원 특이성을 갖는 가변 영역 또는 그 일부분으로, 또는 다른 중 유래 또는 다른 항체 클래스 또는 서브클래스 유래의 상응하는 서열로 교환, 대체 또는 변경되는 면역글로불린 분자를 의미한다.
- [0045] 본원에서 사용될 때, "인간화 항체(humanized antibody)"란 수용자 인간 항체의 CDR이 공여자 항체 유래의 CDR로 대체된 면역글로불린 분자를 의미한다. 인간화 항체는 또한 골격구조 서열 내에 공여자 유래의 잔기를 포함할 수 있다. 인간화 항체는 또한 인간 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부분을 포함할 수 있다. 인간화 항체는 또한 수용자 항체에서도 발견되지 않고 도입된 CDR 또는 골격구조 서열에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. "초인간화(superhumanizing)" 항체 기법[Tan et al., J. Immunol. 169:1119, 2002] 및 "리서페이싱(resurfacing)"(예를 들어, 문헌[Staelens et al., Mol. Immunol. 43:1243, 2006]; 및 문헌[Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 91:969, 1994] 참조)과 같은 기법을 비롯한 인간화는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 행할 수 있다(예를 들어, 문헌[Jones et al., Nature 321:522-525; 1986]; 문헌[Riechmann et al., Nature 332:323-327, 1988]; 문헌[Verhoeven et al., Science 239:1534-1536, 1988]; 문헌[Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992]; 미국 특허 제4,816,567호 참조).
- [0046] 본 발명에 있어서 "인간화 조작(humaneered)" 항체란 참조 항체의 결합 특이성을 갖는 조작된 인간 항체를 의미한다. 본 발명에서 사용하기 위한 "인간화 조작" 항체는 비인간 면역글로불린 유래의 서열을 최소한으로 포함하는 면역글로불린 분자를 갖는다. 일반적으로, 항체는, 참조 항체의 중쇄의 CDR3 영역 유래의 결합 특이성 결정 인자(binding specificity determinant; BSD)를 코딩하는 DNA 서열을 인간 V_H 분절 서열에 연결하고 참조 항체 유래의 경쇄 CDR3 BSD를 인간 V_L 분절 서열에 연결함으로써 "인간화 조작"한다. "BSD"는 CDR3-FR4 영역, 또는

결합 특이성을 매개하는 상기 영역의 일부분을 의미한다. 따라서 결합 특이성 결정인자는 CDR3-FR4, CDR3, CDR3의 최소 필수 결합 특이성 결정인자(이것은 항체의 V 영역에 존재할 때 결합 특이성을 부여하는 CDR3보다 더 작은 임의의 영역을 말함), D 분절(중쇄 영역에 대하여), 또는 참조 항체의 결합 특이성을 부여하는 CDR3-FR4의 다른 영역일 수 있다. 인간화 조작 방법은 미국 특허 출원 공개 공보 제2005-0255552호 및 미국 특허 출원 공개 공보 제2006-0134098호에 기재되어 있다.

[0047] 핵산의 일부분과 관련하여 사용될 때 "이종성"이란 용어는, 핵산이 일반적으로 자연에서 서로에 대해 동일한 관계로 존재하지 않는 2개 이상의 부분 서열을 포함하는 것을 나타낸다. 예를 들어, 핵산은 일반적으로, 예를 들어, 새로운 기능성 핵산이 만들어지도록 배열된 비관련 유전자 유래의 2개 이상의 서열을 갖도록 재조합적으로 생산된다. 유사하게, 이종성 단백질은 대개 자연에서 서로에 대해 동일한 관계로 발견되지 않는 2개 이상의 부분 서열을 의미한다.

[0048] 예를 들어 세포 또는 핵산, 단백질 또는 벡터와 관련하여 사용되는 "재조합"이란 용어는 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이종성 핵산 또는 단백질의 도입, 또는 천연 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되는 것 또는 세포가 그렇게 변형된 세포로부터 유래되는 것을 나타낸다. 따라서, 예를 들어, 재조합 세포는 세포의 천연(비재조합) 형태에서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나, 그렇지 않으면 비정상적으로 발현되거나 적게 발현되거나 전혀 발현되지 않는 천연 유전자를 발현한다. 본원에서 "재조합 핵산"이란 용어는, 일반적으로 예를 들어 폴리머라제 및 엔도뉴클레아제를 사용하여 핵산의 재조합에 의해 시험관내에서 최초로 형성한, 자연에서 정상적으로는 발견되지 않는 형태의 핵산을 의미한다. 이러한 방식으로, 상이한 서열을 작동 가능하게 연결할 수 있다. 따라서, 선형 형태의 단리된 핵산 또는 정상적으로는 연결되지 않은 DNA 분자를 결합시켜 시험관내에서 형성한 발현 벡터 둘 다 본 발명의 목적에 있어서 재조합으로 간주된다. 일단, 재조합 핵산이 제조되어 숙주 세포 또는 유기체로 재도입되면, 이것은 비재조합적으로, 즉 시험관내 조작이 아니라 숙주 세포의 생체내 세포 소기관을 이용하여 복제한다. 그러나, 일단 재조합적으로 제조된 이같은 핵산은, 비록 나중에 비재조합적으로 복제하더라도, 여전히 본 발명의 목적상 재조합인 것으로 간주된다. 마찬가지로, "재조합 단백질"은 재조합 기법을 이용하여, 즉, 전술한 바와 같은 재조합 핵산의 발현에 의해 제조된 단백질이다.

[0049] 단백질 또는 펩티드를 말할 때, 항체에 "특이적으로(또는 선택적으로) 결합하는" 또는 ~과 "특이적으로(또는 선택적으로) 면역 반응성을 나타내는"이란 어구는 단백질 및 기타 생물학적 물질의 불균질 집단 중에 단백질이 존재함을 확인시키는 결합 반응을 의미한다. 따라서, 지정된 면역분석 조건하에, 특정 항체는 백그라운드의 2배 이상, 더 일반적으로는 백그라운드의 10~100배 이상으로 특정 단백질 서열에 결합한다.

[0050] 이같은 조건하에서의 항체에 대한 특이적 결합에는 특정 단백질에 대한 그 특이성으로 선택된 항체가 필요하다. 예를 들어, 특정 단백질, 다형 변이체, 대립유전자 변이체, 상동체(ortholog) 및 보존적으로 변형된 변이체 또는 스플라이스 변이체, 또는 그 일부에 대해 생성된 다클론 항체를 선별하여, GM-CSF 단백질과는 특이적으로 면역 반응성을 나타내고 다른 단백질과는 면역 반응성을 나타내지 않는 다클론 항체만을 얻을 수 있다. 이러한 선별은 다른 분자와 교차 반응하는 항체를 배제시킴으로써 수행할 수 있다.

[0051] 본원에서 사용될 때, "만성 염증성 질환에 대한 치료제"란 만성 염증성 질환을 앓고 있는 환자에게 치료적 유효량으로 투여될 때 상기 만성 염증성 질환 및 이 질환과 관련된 합병증의 증상을 치유하거나 적어도 부분적으로 저지하는 제제를 의미한다.

[0052] 2개 이상의 폴리펩티드(또는 핵산) 서열과 관련하여 "동일한" 또는 "동일성(%)"이란 용어는, 후술하는 디폴트 파라미터를 갖는 BLAST 또는 BLAST 2.0 서열 비교 알고리즘을 이용하여 측정하거나 수동 정렬 및 시각적 조사로 측정하였을 때 동일하거나 또는 특정 비율(%)의 동일한 아미노산 잔기(또는 뉴클레오타이드)를 갖는(즉, 비교 윈도우 또는 지정된 영역에 대하여 최대 대응도로 비교 및 정렬될 경우, 특정 영역에 대하여 약 60%의 동일성, 바람직하게는 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 동일성을 나타내는) 2개 이상의 서열 또는 부분 서열을 의미한다(예를 들어, NCBI 웹 사이트 참조). 이때, 이러한 서열을 "실질적으로 동일한" 서열이라고 한다. "실질적으로 동일한" 서열은 또한 결실 및/또는 부가를 갖는 서열뿐만 아니라, 치환을 갖는 서열과, 자연 발생, 예를 들어 다형성 또는 대립유전자 변이체 및 인공 변이체를 포함한다. 후술하는 바와 같이, 바람직한 알고리즘은 갭 등을 설명할 수 있다. 바람직하게는, 단백질 서열 동일성은 약 25개 아미노산 길이의 영역에 대하여, 또는 더 바람직하게는 50~100개 아미노산 길이의 영역에 대하여, 또는 단백질의 길이에 대하여 나타난다.

[0053] 본원에서 사용될 때, "비교 윈도우"란 전형적으로 20~600개, 일반적으로 약 50개~약 200개, 더 일반적으로 약 100개~약 150개로 구성된 군에서 선택되는 연속된 위치의 수 중 하나로 된 분절을 지칭하는 것을 포함하며, 여

기에서 2개의 서열이 최적으로 정렬된 후 한 서열이 동일한 수의 연속된 위치의 참조 서열과 비교될 수 있다. 비교를 위한 서열 정렬 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은, 예를 들어 Smith 및 Waterman의 국부적 상동성 알고리즘[Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)], Needleman 및 Wunsch의 상동성 정렬 알고리즘[J. Mol. Biol. 48:443 (1970)], Pearson 및 Lipman의 유사성 조사 방법[Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)], 이러한 알고리즘의 전산화 실행(미국 위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575 소재의 Genetics Computer Group의 Wisconsin Genetics Software Package의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA), 또는 수동 정렬 및 시각적 조사(예를 들어, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement) 참조]를 이용하여 수행할 수 있다.

[0054] 서열 동일성(%) 및 서열 유사성(%)을 측정하는 데 적합한 알고리즘의 바람직한 예로는 문헌[Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1977)] 및 문헌[Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]에 기재되어 있는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘을 들 수 있다. BLAST 및 BLAST 2.0은, 본원에 기재된 파라미터와 함께, 본 발명의 핵산 및 단백질에 대한 서열 동일성(%)을 측정하는 데 사용된다. BLASTN 프로그램(뉴클레오타이드 서열에 대한 것)은 워드 길이(W) = 11, 기대값(E) = 10, M = 5, N = -4 및 두 가닥의 비교를 디폴트로서 사용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 워드 길이 = 3 및 기대값(E) = 10과, BLOSUM62 점수 행렬(문헌[Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989) 참조], 정렬(B) = 50, 기대값(E) = 10, M = 5, N = -4 및 두 가닥의 비교를 사용한다.

[0055] 두 폴리펩티드가 실질적으로 동일하다는 것은, 제1 폴리펩티드가 제2 폴리펩티드에 대해 생성된 항체와 면역학적으로 교차 반응성을 갖는다는 것이다. 따라서, 예를 들어, 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드가 보존적 치환에 의해서만 다를 경우, 제1 폴리펩티드는 제2 폴리펩티드와 일반적으로 실질적으로 동일한 것이다.

[0056] "단리된", "정제된" 또는 "생물학적으로 순수한"이란 용어는 천연 상태로 발견될 때 일반적으로 동반되는 성분들을 실질적으로 또는 본질적으로 포함하지 않는 물질을 의미한다. 순도 및 균질도는 일반적으로 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피 등의 분석 화학 기법을 이용하여 측정한다. 단백질이 조제물 중에 주된 종으로서 존재하면, 이 단백질은 실질적으로 정제된 것이다. 일부 실시형태에서는, "정제된"이란 용어는 단백질이 전기영동 겔에서 실질적으로 하나의 밴드를 형성하는 것을 나타낸다. 바람직하게는, 이 용어는 단백질의 순도가 85% 이상, 더 바람직하게는 95% 이상, 가장 바람직하게는 99% 이상임을 의미한다.

[0057] 본원에서 상호 교환적으로 사용되는 용어인 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 의미한다. 이 용어는, 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연 아미노산의 인공적인 화학적 모방체인 아미노산 중합체뿐만 아니라, 천연 아미노산 중합체, 변형된 잔기를 포함하는 아미노산 중합체 및 비천연 아미노산 중합체에도 적용된다.

[0058] "아미노산"이란 용어는 천연 아미노산 및 합성 아미노산뿐만 아니라, 천연 아미노산과 유사한 기능을 하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 의미한다. 천연 아미노산은 유전자 코드에 의해 코딩되는 아미노산뿐만 아니라, 후에 변형되는 아미노산, 예를 들어, 하이드록시프롤린, γ -카복시글루타메이트 및 O-포스포세린이다. 아미노산 유사체는 천연 아미노산과 동일한 기본 화학 구조, 예를 들어, 수소에 결합되는 α 탄소, 카복시기, 아미노기 및 R 기를 갖는 화합물, 예를 들어 호모세린, 노르루신, 메티오닌 설폭시드, 메티오닌 메틸 설포늄을 의미한다. 이러한 유사체는 변형된 R 기(예를 들어, 노르루신) 또는 변형된 펩티드 골격을 가질 수 있으나, 천연 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 보유한다. 아미노산 모방체란 아미노산의 일반 화학 구조와 상이한 구조를 지니나 천연 아미노산과 유사한 기능을 갖는 화학적 화합물을 의미한다.

[0059] 본원에서 아미노산은 일반적으로 알려진 3문자 기호 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명 위원회에서 권장하는 1문자 기호로 언급된다. 뉴클레오타이드 역시 일반적으로 인정되는 1문자 코드로 지칭될 수 있다.

[0060] "보존적으로 변형된 변이체"는 아미노산 서열과 핵산 서열 둘 다에 적용된다. 특정 핵산 서열에 대해서, 보존적으로 변형된 변이체란 동일한 또는 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산, 또는 핵산이 아미노산 서열을 코딩하지 않는 경우, 실질적으로 동일하거나 관련된(예를 들어, 자연적으로 연속한) 서열을 의미한다. 유전자 코드의 축퇴성으로 인하여, 기능상 동일한 다수의 핵산이 대부분의 단백질을 코딩한다. 예를 들어, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU 모두 아미노산 알라닌을 코딩한다. 따라서, 알라닌이 코돈으로 지정되는 모든 위치에서, 그 코돈은 코딩된 폴리펩티드를 변경하지 않으면서 지정된 해당 코돈 중 또 다른 것으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이가 "침묵 변이"이며, 이것은 보존적으로 변형된 변이의 한 종류이다. 폴리펩티드를 코딩하는 본원의 모든 핵산 서열은 또한 그 핵산의 침묵 변이를 포함한다. 당업자라면, 특정 문맥에 있어서, 핵산의 각각의 코돈(통상적으로 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG과 통상적으로 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG는 제

외)은 기능상 동일한 분자를 생성하도록 변형될 수 있다는 것을 알 것이다. 따라서, 대개, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 침묵 변이는, 기재된 서열에 있어서 발현 생성물에 대해서는 함축적이지만, 실제 프로브 서열에 대해서는 그렇지 않다.

[0061]

당업자라면, 아미노산 서열과 관련하여, 코딩된 서열에 단일 아미노산 또는 작은 비율의 아미노산을 변경, 부가 또는 결실시키는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 서열에 대한 개개의 치환, 결실 또는 부가가, 그 변경이 아미노산을 화학적으로 유사한 아미노산으로 치환시키는 결과를 초래하는 "보존적으로 변형된 변이체"라는 것을 알 것이다. 기능상 유사한 아미노산을 제공하는 BLOSUM과 같은 보존적 치환표 및 치환 행렬이 당업계에 잘 알려져 있다. 이러한 보존적으로 변형된 변이체는 추가적인 것으로 본 발명의 다형성 변이체, 중간 동족체 및 대립유전자 변이체를 배제하지 않는다. 한 아미노산에서 다른 아미노산으로의 전형적인 보존적 치환의 예로는 다음을 들 수 있다: 1) 알라닌(A), 글리신(G); 2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E); 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q); 4) 아르기닌(R), 리신(K); 5) 이소루신(I), 루신(L), 메티오닌(M), 발린(V); 6) 페닐알라닌(F), 타이로신(Y), 트립토판(W); 7) 세린(S), 트레오닌(T); 및 8) 시스테인(C), 메티오닌(M)(예를 들어, 문헌[Creighton, Proteins (1984)] 참조).

[0062]

I. 서론

[0063]

본 발명은 만성 염증성 질환으로 진단받은 환자를 치료하기 위해 GM-CSF 길항제를 투여하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 환자는 메토티렉세이트와 같은 항엽산 화합물로 치료받고 있는 환자이다. 일부 실시형태에서, GM-CSF 길항제, 예를 들어 항 GM-CSF 항체로 치료되는 만성 염증성 질환은 염증성 관절염 질환, 예컨대 RA, 건선형 관절염, 강직성 척추염 및 소아 특발성 관절염; 및 기타 염증성 질환, 예컨대 다발성 근염 및 전신성 홍반성 루푸스를 포함한다. 일부 실시형태에서는, 상기 질환을 앓고 있는 환자는 또한 메토티렉세이트와 같은 항엽산 화합물로 치료받고 있는 환자이다. GM-CSF 길항제가 메토티렉세이트와 같은 항엽산 화합물과 함께 투여되는 실시형태에서, 상기 GM-CSF 및 항엽산 화합물, 예를 들어 메토티렉세이트는 호중구 감소증을 유발하지 않는 양으로 투여된다. GM-CSF 길항제는 항 GM-CSF 항체, 항 GM-CSF 수용체 항체, 또는 정상적으로는 GM-CSF가 그 동족 수용체에 결합하는 것으로부터 유도되는 신호 전달을 방지하는 다른 억제제를 포함할 수 있다.

[0064]

일부 실시형태에 있어서, 본 발명은 본원에 기재된 것과 같은 항 GM-CSF 항체를 투여함으로써 만성 염증성 질환(예를 들어, 류마티스 관절염)을 치료하는 방법을 제공한다. GM-CSF 길항제, 예를 들어 항 GM-CSF 항체로 치료될 수 있는 그 밖의 만성 염증성 질환으로는 알츠하이머병과 같은 신경퇴행성 질환을 들 수 있다.

[0065]

본 발명에 사용하기에 적합한 항체, 예를 들어 항 GM-CSF 또는 항 GM-CSF 수용체 항체는 단일클론, 다클론, 키메라, 인간화, 인간화 조작 또는 인간 항체일 수 있다. 본 발명에 사용하기에 적합한 다른 GM-CSF 길항제로는 수용체와의 결합을 위해 GM-CSF와 경쟁하지만 수용체에 결합될 때 신호 전달을 유도하지는 않는 천연 또는 합성 리간드(또는 그 단편)를 들 수 있다. 그 밖의 비항원적인 GM-CSF 길항제로는, 본래는 GM-CSF 길항제 부재하에 GM-CSF가 그 수용체에 결합하는 것으로부터 유도되는 신호 전달을 부분적으로 또는 완전히 차단하는 폴리펩티드, 핵산, 소분자 등을 들 수 있다.

[0066]

II. 환자

[0067]

GM-CSF 길항제로 치료되는 대표적인 환자는 호중구 감소증이 발병하지 않은 자로서 메토티렉세이트 치료도 받고 있는 만성 염증성 질환 환자이다. 환자는 확립된 임상 지침에 따라 메토티렉세이트로 치료되며, 주간 메토티렉세이트 투여량을 주당 약 5 mg~약 25 mg의 메토티렉세이트로 하여 치료를 받는다. 일부 환자의 경우, 더 적은 용량의 메토티렉세이트가 적합할 수 있으며, 약 0.1 mg~약 5 mg의 메토티렉세이트에 해당하는 주간 투여 계획을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서는, 메토티렉세이트 투여량은 약 5 mg/wk~약 25 mg/wk이다.

[0068]

일부 실시형태에 있어서, 항 GM-CSF 항체와 같은 GM-CSF 길항제로 치료되는 환자는 메토티렉세이트의 유사체 또는 다른 항엽산 치료제로 치료받고 있는 환자이다. 메토티렉세이트는 엽산(폴레이트)과 구조적으로 유사하며, DNA의 퓨린 및 피리미딘 뉴클레오타이드 전구체의 생합성과 단백질 생합성 중의 아미노산의 상호 전환을 위한 조효소로서 일반적으로 엽산을 사용하는 다수의 효소의 활성 부위에 결합할 수 있다. 메토티렉세이트는 효소 결합 부위에 대해 엽산 보조 인자와 경쟁함으로써 효소 활성을 억제한다. "메토티렉세이트 유사체"는 메토티렉세이트와 구조적 유사성을 가지며 또한 항엽산 활성을 갖는 화합물이다. 따라서, 메토티렉세이트 유사체는 또한 본 발명의 실시에서 사용될 수 있는 유도제 및 전구약물을 가르킨다. 예를 들어, 전구약물은 선택적 생물학적 변환을 통해 생체이용률을 증가시키는 데 이용될 수 있다. 메토티렉세이트 유사체는, 예를 들어, 파라-아미노벤조 부분

상에 할로젠 치환을 갖는 4-아미노 유도체, 예컨대 디클로로메토티렉세이트(예를 들어, 문헌[Frei et al., Clin. Pharmacol. Therap., 6:160-71 (1965)] 참조); 7-메틸 치환 메토티렉세이트(예를 들어, 문헌[Rosowsky et al., J. Med. Chem., 17:1308-11 (1974)] 참조); 3',5'-디플루오로 메토티렉세이트(예를 들어, 문헌[Tomcuf, J. Organic Chem., 26:3351 (1961)] 참조); 아미노프테린의 2' 및 3' 모노플루오르화 유도체(예를 들어, 문헌[Henkin et al., J. Med. Chem., 26:1193-1196 (1983)] 참조); 및 7,8-디하이드로-8-메틸-메토티렉세이트(예를 들어, 문헌[Chaykovsky, J. Org. Chem., 40:145-146 (1975)] 참조)를 포함한다.

[0069] 본원에서 사용될 때, "항염산 화합물"이란 용어는 염산과 구조적 유사성을 지니고 1종 이상의 염산 의존적 효소에 대해 염산 길항제로서의 활성을 갖는 화합물을 의미한다. 항염산 화합물의 예로는, 예를 들어 아미노프테린, 랄티트렉세드, 로메트렉솔, 다중 표적 항염산(MTA), AQA, 메토티렉세이트 및 이들의 유사체를 들 수 있다. 예를 들어 아미노프테린은 메토티렉세이트의 구조와 비교해서 N-10 위치에 메틸기 대신에 수소를 보유한다. 랄티트렉세드(ZD 1694)는 티미딜레이트 신타제의 선택적 억제제이다. 로메트렉솔은 신규 퓨린 합성 경로에 관여하는 제1 효소인 글리신아미드 리보뉴클레오타이드 포르밀트랜스퍼라제를 선택적으로 억제한다. 그 밖의 항염산 화합물로는, 예를 들어 트리메트렉세이트, 에데트렉세이트 등(예를 들어, 대표적인 항염산 화합물 목록에 대해서는 문헌[Takimoto, Oncologist 1:68-81, 1996] 참조)을 들 수 있다. 특정 경우에 있어서, 메토티렉세이트는 1종 이상의 메토티렉세이트 유사체 및/또는 다른 항염산 화합물 및 항 GM-CSF 길항제와의 병용 요법으로 사용될 수 있다. 항염산제는 호중구 감소증을 유발하지 않는 양으로 투여된다. 일부 실시형태에서는, 상기 투여량은 주당 약 0.1 mg, 예를 들어, 약 0.5 mg, 약 1 mg, 약 2 mg, 약 3 mg, 약 4 mg, 약 5 mg, 약 7.5 mg, 약 10 mg, 약 12.5 mg, 약 15 mg, 약 20 mg~약 25 mg이다. 항염증제로서 투여되는 항염산 화합물의 양은 대개 암 치료에 사용되는 항염산 화합물의 양보다 로그 차수로 2~3배 적은 양이다.

[0070] 일부 실시형태에서는, 본 발명에 따른 방법으로 염증성 관절염을 앓고 있는 환자를 치료할 수 있다. 이러한 환자에는 RA, 건선형 관절염, 강직성 척추염 또는 소아 특발성 관절염 환자가 포함된다.

[0071] 환자가 호중구 감소증이 있는지를 확인하기 위해 당업계에서 잘 알려져 있는 방법을 이용할 수 있다. 환자가 호중구 감소증이 있는지를 확인하기 위해 절대 호중구 수치(ANC)를 이용한다. 호중구 수치와 백혈구 수치(WBC)가 정상 범위 내에 있다면 그 환자는 호중구 감소증이 없는 것으로 간주된다. 호중구 수치의 정상 범위는 $1 \times 10^9/L$ 초과에 해당하는 것으로 이해되고 있으며, 백혈구 수치의 정상 범위는 $3.5 \times 10^9/L$ 초과에 해당하는 것으로 이해되고 있다. 호중구 감소증은, ANC가 $0.5 \times 10^9/L$ 미만일 경우 임상적으로 유의한 것으로 간주된다. 일부 실시형태에 있어서, 본 발명의 방법에 따라 치료된 환자에서 임상적으로 유의한 호중구 감소증이 유발되지 않는다. 또 다른 일부 실시형태에 있어서, 상기 치료는 검출 가능한 호중구 감소증을 유발하지 않는다.

[0072] 일부 실시형태에서는, 활성 RA 환자가 본 발명의 방법에 따라 치료된다. 치료법 및/또는 질환 진행도에 대한 RA 환자의 반응은 RA와 관련된 임상 파라미터 중 어느 하나를 모니터링하여 평가할 수 있다. 일반적으로, 치료에 대해 치료 반응을 나타내는 환자를 약리학적 파라미터를 비롯한 다수의 파라미터로 확인한다. 예를 들어, RA에 대한 미국 류마티스 학회(ACR) 평가(ACR 20, ACR 50 및 ACR 70)를 이용할 수 있다. RA에 대한 ACR 종합 엔드포인트(composite end-point)는 조조 강직, 압통 관절수, 종창 관절수, 환자의 통증 평가, 환자의 종합적 평가, 의사의 종합적 평가, 적혈구 침강 속도(ESR), 혈장내 C 반응성 단백질(CRP) 수치 및 류마티스 인자 측정 수치를 포함한다. 환자 반응을 평가하는 데 이용될 수 있는 다른 약리학적 마커로는 혈액 또는 뇨 중의 네오프테린 수치의 평가, 전신적(혈액중) 또는 국소적(예를 들어, 관절 등의 국소 염증 부위) 항염증성 사이토카인 수치의 평가를 들 수 있다. 항염증성 사이토카인은 당업계에 잘 알려져 있다. 본 발명의 치료법에 대한 환자 반응을 평가하는 데 이용될 수 있는 항염증성 사이토카인의 예로는 TNF- α , GM-CSF, 인터루킨-1, 인터루킨-6, 인터루킨-8 및 인터루킨-17을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0073] GM-CSF 길항제를 메토티렉세이트와 같은 항염산 화합물과 함께 투여하는 것은 (전술한 예시적 파라미터와 같은 파라미터로 평가하였을 때) 질병의 진행을 적어도 부분적으로 저지하거나 질병의 증상을 경감한다. 따라서, GM-CSF 길항제와 메토티렉세이트의 투여는 관절 미란이 진행을 늦출 수 있다. 관절 미란의 진행은 오토래디오그래피와 같은 공지된 기법을 이용하여 관절의 골 및 연골을 평가함으로써 측정할 수 있다.

[0074] 다른 실시형태에서는, GM-CSF 길항제가 메토티렉세이트와 같은 항염산 화합물로 치료받고 있는, 건선형 관절염, 소아 특발성 관절염 또는 강직성 척추염 등의 또 다른 염증성 관절염을 앓고 있는 환자에게 투여된다. 이러한 환자는 RA를 평가하는 데 사용되는 것과 같은 공지된 방법 또는 다른 적절한 질환 평가 기준을 이용하여 치료법에 대한 반응성 및/또는 질환 진행도를 평가할 수 있다. 예를 들어, 강직성 척추염인 경우, 강직성 척추염 반응

기준 평가(Assessment on Ankylosing Spondylitis Response Criteria; ASAS 20)를 이용할 수 있다(ASAS는 전체 요통, 환자의 질병 활동도 평가, 염증 및 신체 기능을 포함하는 AS 증상의 개선에 대한 종합적 척도임). 마찬가지로, 건선형 관절염 평가의 경우, 건선형 관절염 반응 기준(Psoriatic Arthritis Response Criteria; PsARC) 지수를 이용할 수 있다.

[0075] 본 발명의 또 다른 실시형태에서는, 치료를 위해 메토티렉세이트와 같은 항염산 화합물을 투여받고 있는 전신성 홍반성 루푸스 환자도 GM-CSF 길항제로 치료된다. 예를 들어 확립된 기준(예를 들어, 문헌[Hochberg, Arthritis Rheum 40:1725, 1997; Tan et al., Arthritis Rheum 25:1271-7, 1982] 참조)을 이용하여 치료법에 대한 반응 및/또는 질병 진행도를 측정함으로써, 본 발명의 방법으로 치료받고 있는 환자의 전신성 홍반성 루푸스 질환 활성 지수(Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; SLEDAI)를 평가할 수 있다.

[0076] 일부 실시형태에서는, 류마티스 관절염, 건선형 관절염, 소아 특발성 관절염, 강직성 척추염 및 전신성 홍반성 루푸스 등의 만성 염증성 질환, 또는 알츠하이머병 등의 신경퇴행성 질환을 앓고 있는 환자를 항염산 치료제 투여없이 GM-CSF 길항제로 치료한다. 대개, 상기 환자에게 투여되는 GM-CSF 길항제는 항 GM-CSF 항체이다.

[0077] III. GM-CSF 길항제

[0078] 전술한 바와 같이, 본 발명은 만성 염증성 질환(예를 들어, RA)을 앓고 있는 환자에게 GM-CSF 길항제 및 메토티렉세이트를 투여함으로써 상기 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 GM-CSF 길항제는 GM-CSF가 수용체에 결합하는 것을 감소시킴으로써 GM-CSF 수용체에 의한 신호 전달의 유도를 선택적으로 방해한다. 이러한 길항제는 GM-CSF 수용체에 결합하는 항체, GM-CSF에 결합하는 항체 및 GM-CSF가 그 수용체에 결합하는 것과 경쟁하거나 정상적으로는 리간드의 수용체에의 결합으로부터 유도되는 신호 전달을 억제하는 다른 단백질 또는 소분자를 포함할 수 있다.

[0079] 다수의 실시형태에 있어서, 본 발명에 사용되는 GM-CSF 길항제는 수용체에 대한 결합에 대해 GM-CSF와 경쟁하지만 비활성인 단백질, 예를 들어 항 GM-CSF 항체, 항 GM-CSF 수용체 항체, 가용성 GM-CSF 수용체 또는 변형된 GM-CSF 폴리펩티드이다. 이러한 단백질은 대개 재조합 발현 기법을 이용하여 제조한다. 이러한 방법들은 당업계에 널리 알려져 있다. 발현 방법을 비롯하여 일반적인 분자 생물학 방법에 대해서는, 예를 들어 문헌[Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Current Protocols in Molecular Biology (2006) John Wiley and Sons ISBN: 0-471-50338-X]와 같은 참고 문헌을 참조할 수 있다.

[0080] GM-CSF 길항제 단백질을 제조하기 위해 다양한 원핵 및/또는 진핵 생물계 단백질 발현 시스템을 이용할 수 있다. 이같은 다수의 시스템은 상업적 공급업체로부터 널리 입수가 가능하다. 이것은 원핵 발현 시스템과 진핵 발현 시스템을 둘 다 포함한다.

[0081] GM-CSF 항체

[0082] 일부 실시형태에 있어서, 상기 GM-CSF 길항제는 GM-CSF에 결합하는 항체 또는 GM-CSF 수용체 α 또는 β 서브유닛에 결합하는 항체이다. 상기 항체는 GM-CSF(또는 GM-CSF 수용체) 단백질 또는 그 단편에 대해 생성될 수도 있고, 재조합적으로 제조될 수도 있다. 본 발명에 사용하기 위한 GM-CSF에 대한 항체는 GM-CSF에 결합하는 중화 또는 비중화 항체일 수 있으며, GM-CSF의 생체내 제거 속도를 증가시켜 순환 GM-CSF 수치가 감소되도록 한다. 많은 경우, 상기 GM-CSF 항체는 중화 항체이다.

[0083] 다클론 항체를 제조하는 방법은 당업자에게 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory manual (1988); Methods in Immunology] 참조). 다클론 항체는 면역제와, 필요에 따라 면역 보조제를 함께 1회 이상 주사하여 포유동물에서 생성할 수 있다. 상기 면역제는 GM-CSF 또는 GM-CSF 수용체 단백질, 예를 들어 인간 GM-CSF 또는 GM-CSF 수용체 단백질, 또는 그 단편을 포함한다.

[0084] 일부 실시형태에 있어서, 본 발명에 사용하기 위한 GM-CSF 항체는 인간 혈장으로부터 정제된 것이다. 이러한 실시형태에 있어서, 상기 GM-CSF 항체는 일반적으로 인간 혈장 중에 존재하는 다른 항체로부터 분리된 다클론 항체이다. 이러한 분리 방법은, 예를 들어, 친화성 크로마토그래피와 같은 공지된 기법을 이용하여 수행할 수 있다.

[0085] 일부 실시형태에 있어서, 상기 GM-CSF 길항제는 단일클론 항체이다. 단일클론 항체는 문헌[Kohler & Milstein, Nature 256:495 (1975)]에 기재된 방법과 같은 하이브리도마 기법을 이용하여 제조할 수 있다. 하이브리도마 기법에서는, 마우스, 햄스터 또는 다른 적절한 숙주 동물을 일반적으로 인간 GM-CSF와 같은 면역제로 면역화하여,

상기 면역체에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구의 생산을 유도한다. 대안으로, 상기 림프구를 시험관내에서 면역화할 수도 있다. 상기 면역체는 바람직하게는 인간 GM-CSF 단백질, 이의 단편, 또는 이의 융합 단백질을 포함한다.

[0086] 인간 단일클론 항체는 파지 디스플레이 라이브러리를 비롯하여 당업계에 공지된 다양한 기법을 이용하여 제조할 수 있다[Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581 (1991)]. Cole 등과 Boerner 등의 기법 역시 인간 단일클론 항체를 제조하는 데 이용 가능한 기법이다[Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, p. 77 (1985) and Boerner et al., J. Immunol. 147(1):86-95 (1991)]. 마찬가지로, 인간 항체는 인간 면역글로불린 유전자좌를 형질전환 동물, 예를 들어, 내인성 면역글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 마우스로 도입함으로써 제조할 수 있다. 항원 투여 후, 인간 항체 생산이 관찰되며, 이것은 유전자 재배열, 어셈블리 및 항체 레퍼토리를 비롯하여 모든 점에서 인간에서 관찰되는 것과 매우 유사하다. 이러한 접근법은, 예를 들어 미국 특허 제5,545,807호; 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 제5,661,016호 및 과학 출판물[Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); Lonberg & Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)]에 기재되어 있다.

[0087] 일부 실시형태에 있어서, 상기 항 GM-CSF 항체는 키메라 또는 인간화 단일클론 항체이다. 전술한 바와 같이, 항체의 인간화 형태는 인간 항체의 상보성 결정 영역(CDR) 유래의 잔기가 원하는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 비인간 중, 예컨대 마우스, 래트 또는 토끼의 CDR 유래의 잔기로 치환된 키메라 면역글로불린이다.

[0088] 본 발명에서 이용되는 항체는 임의의 포맷(format)일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에 있어서, 상기 항체는 불변 영역, 예를 들어 인간 불변 영역을 포함하는 완전 항체이거나, 또는 완전 항체의 단편 또는 유도체, 예를 들어 Fd, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv 단편이거나, 또는 단일 도메인 항체, 예컨대 나노바디 또는 카멜리드 항체일 수 있다. 이러한 항체를 추가로 당업자에게 잘 알려져 있는 방법으로 재조합적으로 조작할 수 있다. 전술한 바와 같이, 이러한 항체는 공지된 기법을 이용하여 제조할 수 있다.

[0089] 본 발명의 일부 실시형태에서는, 상기 항체를, 예를 들어 이 항체가 반복 투여에 적합하도록 감소된 면역원성을 갖도록 추가로 조작한다. 감소된 면역원성을 갖는 항체를 생성하는 방법으로는 인간화(humanization)/인간화 조작(humaneering) 기법 및 T 세포 에피토프가 제거되도록, 예를 들어 하나 이상의 골격구조 영역에 대해 항체를 추가로 조작하는 변형 기법, 예컨대 탈면역화 기법을 들 수 있다.

[0090] 일부 실시형태에서, 상기 항체는 인간화 조작 항체이다. 인간화 조작 항체는, 참조 항체의 중쇄의 CDR3 영역 유래의 결합 특이성 결정인자(BSD)를 코딩하는 DNA 서열을 인간 VH 분절 서열에 연결하고 참조 항체 유래의 경쇄 CDR3 BSD를 인간 VL 분절 서열에 연결하여 얻은, 참조 항체의 결합 특이성을 갖는 조작된 인간 항체이다. 인간화 조작 방법은 미국 특허 출원 공개 공보 제2006-0255552호 및 제2006-0134098호에 기재되어 있다.

[0091] 항체는 항체의 V 영역으로부터 하나 이상의 예상되는 T 세포 에피토프가 제거되도록 추가로 탈면역화할 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어 WO 00/34317에 기재되어 있다.

[0092] 일부 실시형태에 있어서, 상기 가변 영역은 인간 V 유전자 서열로 이루어진다. 예를 들어, 가변 영역 서열은 인간 생식세포 V 유전자 서열과 80% 이상의 동일성, 또는 85% 이상의 동일성, 90% 이상의 동일성, 95% 이상의 동일성, 96% 이상의 동일성, 97% 이상의 동일성, 98% 이상의 동일성, 또는 99% 이상의 동일성, 또는 그 이상의 동일성을 가질 수 있다.

[0093] 본 발명에서 사용되는 항체는 인간 불변 영역을 포함할 수 있다. 상기 경쇄의 불변 영역은 인간 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있다. 상기 중쇄 불변 영역은 대개 감마쇄 불변 영역, 예를 들어 감마-1, 감마-2, 감마-3 또는 감마-4 불변 영역이다.

[0094] 일부 실시형태에서는, 예를 들어, 상기 항체가 단편인 경우, 예를 들어 생체내 반감기를 연장시키기 위해, 이 항체를 다른 분자, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG화) 또는 혈청 알부민에 접합시킬 수 있다. 항체 단편의 PEG화의 예는 문헌[Knight et al., (2004) Platelets 15:409(압식시뮬에 대해); Pedley et al., (1994) Br. J. Cancer 70:1126(항CEA 항체에 대해); Chapman et al., (1999) Nature Biotech. 17:780]에 제공된다.

[0095] 항체 특이성

[0096] 본 발명에 사용하기 위한 항체는 GM-CSF 또는 GM-CSF 수용체에 결합한다. 항체 결합 특이성을 측정하는 데 임의

의 수많은 기법이 이용될 수 있다. 항체의 특이적 면역 반응성을 측정하는 데 이용될 수 있는 면역분석법 형식 및 조건에 관한 설명은, 예를 들어, 문헌[Harlow & Lane, Antibodies, Laboratory Manual (1988)]을 참조할 수 있다.

[0097]

본 발명에 사용하기에 적합한 대표적인 항체는 c19/2이다. 일부 실시형태에서는, c19/2와 동일한 에피토프에 결합하기 위해 경쟁하거나 c19/2와 동일한 에피토프에 결합하는 단일클론 항체가 사용된다. 특정 항체가 다른 항체와 동일한 에피토프를 인식하는 능력은 통상, 제2 항체가 항원에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제하는 제1 항체의 능력에 의해 측정된다. 동일한 항원에 대한 2종의 항체 간의 경쟁을 측정하는 데에는 임의의 수많은 경쟁적 결합 분석법이 이용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 목적에는 샌드위치 ELISA 분석법이 이용될 수 있다. 이는 웰 표면을 코팅하기 위해 캡처 항원을 이용하여 수행한다. 그 후, 태그가 부착된 포화 농도 이하의 농도의 항원을 캡처 표면에 첨가한다. 이 단백질은 특이적 항원:에피토프 상호작용을 통해 항체에 결합하게 된다. 세척 후, 검출 가능한 부분(예를 들어, HRP, 여기서 표지된 항체는 검출 항체로서 정의됨)에 공유 결합된 2차 항체를 ELISA에 첨가한다. 이 항체가 캡처 항체와 동일한 에피토프를 인식한다면, 이것은 그 특정 에피토프가 더 이상 결합에 가용될 수 없기 때문에 표적 단백질에 결합하지 못하게 된다. 그러나, 이 2차 항체가 표적 단백질 상의 상이한 에피토프를 인식한다면, 이 항체는 결합할 수 있을 것이고, 이 결합은 관련 기질을 이용하여 활성 수준(즉, 결합된 항체)을 정량함으로써 검출할 수 있다. 백그라운드는 캡처 항체와 검출 항체 양자로서 단일 항체를 사용함으로써 정의하는 반면, 최대 시그널은 항원 특이적 항체로 캡처하고 항원 상의 태그에 대한 항체로 검출함으로써 확인할 수 있다. 백그라운드와 최대 시그널을 참조로서 이용하여, 에피토프 특이성을 측정하기 위해 페어와이즈(pair-wise) 방식으로 항체를 평가할 수 있다.

[0098]

전술한 임의의 분석법을 이용할 때 1차 항체 존재하에 2차 항체의 항원에 대한 결합이 적어도 30%, 일반적으로 적어도 약 40%, 50%, 60% 또는 75%, 종종 적어도 약 90% 감소할 경우, 1차 항체는 2차 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 것으로 간주된다.

[0099]

에피토프 맵핑

[0100]

본 발명의 일부 실시형태에서는, 공지된 항체, 예를 들어 c19/2와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 이용된다. 에피토프를 맵핑하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 인간 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(hGM-CSF)의 기능적 활성 영역의 위치 지정을 위한 한 접근법은 중화 항 hGM-CSF 단일클론 항체에 의해 인식되는 에피토프를 맵핑하는 것이다. 예를 들어, c19/2(중화 항체 LMM102와 동일한 가변 영역을 가짐)가 결합하는 에피토프는 박테리아에서 합성된 hGM-CSF의 효소 분해에 의해 얻은 단백질 분해 단편을 이용하여 확인된 것이다[Dempsey, et al., Hybridoma 9:545-558, 1990]. 트립신 분해의 RP-HPLC 분별화는 66개의 아미노산을 포함하는 면역 반응성 "트립신 코어(tryptic core)" 펩티드(단백질의 52%)를 확인시켜 주었다. 에스 아우레우스(*S. aureus*) V8 프로테아제를 사용한 상기 "트립신 코어"의 추가 분해는 두 개의 펩티드, 즉, 88번~121번 잔기 사이의 다이설파이드 결합에 의해 연결된, 86~93번 잔기 및 112~127번 잔기를 포함하는 독특한 면역 반응성 hGM-CSF 생성물을 산출하였다. 상기 개별 펩티드는 항체에 의해 인식되지 않았다.

[0101]

결합 친화도 측정

[0102]

일부 실시형태에 있어서, 본 발명에 사용하기에 적합한 항체는 인간 GM-CSF 또는 GM-CSF 수용체에 대해 고친화성 결합을 나타낸다. 항체의 해리 상수(K_D)가 < 1 nM, 바람직하게는 바람직하게는 < 100 pM인 경우, 항체와 항원 간의 고친화성 결합이 존재한다. 표적 항원에 대한 항체의 결합 친화도를 측정하는 데에는 당업자에게 잘 알려져 있는 표면 플라즈몬 공명 분석법, 포화 분석법, 또는 ELISA 또는 RIA와 같은 면역분석법 등 다양한 방법들이 이용될 수 있다. 결합 친화도를 측정하기 위한 대표적인 방법은 문헌[Krinner et al., (2007) Mol. Immunol. Feb; 44(5):916-25. (Epub 2006 May 11)]에 기재된 것과 같이 CM5 센서 칩을 사용하여 BIAcore™ 2000 장치(Biacore AB, 독일 프라이부르크 소재) 상에서 표면 플라즈몬 공명 분석을 이용하는 것이다.

[0103]

중화 항체를 확인하기 위한 세포 증식 분석법

[0104]

일부 실시형태에 있어서, 상기 GM-CSF 길항제는 GM-CSF의 결합을 방해하는 방식으로 결합하는 GM-CSF 또는 그 수용체에 대한 중화 항체이다. 중화 항체 및 기타 GM-CSF 길항제는 GM-CSF 기능을 평가하는 임의의 수많은 분석법을 이용하여 확인할 수 있다. 예를 들어, 세포에 기초한 GM-CSF 수용체 신호 전달 분석법, 예컨대 제한된 양의 GM-CSF에 반응하여 GM-CSF 의존적 세포주의 증식 속도를 측정하는 분석법이 편리하게 이용된다. 인간 TF-1 세포주가 이러한 분석에 사용하기에 적합하다(예를 들어, 문헌[Krinner et al., (2007) Mol. Immunol.] 참조). 일부 실시형태에 있어서, 본 발명의 중화 항체는, 90%의 최대 TF-1 세포 증식을 자극하는 GM-CSF 농도가 사용될

경우, GM-CSF 자극 TF-1 세포 증식을 50% 이상 억제한다. 다른 실시형태에 있어서, 상기 중화 항체는 GM-CSF 자극 증식을 90% 이상 억제한다. 따라서, 일반적으로, 본 발명에 사용하기 위한 중화 항체 또는 다른 GM-CSF 길항제는 EC_{50} 이 10 nM 미만이다(예를 들어, 표 1 참조). 중화 항체를 확인하는 데 사용하기에 적합한 그 밖의 분석법은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0105] 예시적 항체

[0106] 본 발명에 사용하기 위한 항체는 당업계에 공지되어 있으며 통상의 기법을 이용하여 제조할 수 있다. 예시적 항체를 기재하였다. 이 예시적 항체는 당업계에 공지되어 있고 본원에 요약된 방법에 따라 화학적 기법 또는 재조합 기법에 의해 항체 단편, 키메라 등을 생산하기 위해 조작될 수 있는 것으로 이해된다.

[0107] GM-CSF 길항제로서 사용하기에 적합한 예시적 키메라 항체는 c19/2이다. 이 c19/2 항체는 표면 플라스몬 공명 분석으로 측정시 약 10 pM의 1가 결합 친화도로 GM-CSF에 결합한다. 서열 번호 1 및 2는 c19/2의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 제시한다(예를 들어, WO 03/068920 참조). 카바트(Kabat)에 의거하여 정의되는 CDR은 다음과 같다:

CDRH1	DYNIH
CDRH2	YIAPYSGGTGYNQEFKN
CDRH3	RDRFPYYFDY
CDRL1	KASQNVGSNVA
CDRL2	SASYRSG
CDRL3	QQFNRSPLT.

[0108]

[0109] CDR은 당업계에 잘 알려져 있는 다른 정의, 예를 들어 코티아(Chothia), 국제 면역유전학(international ImmunoGeneTics; IMGT) 데이터베이스 및 AbM을 이용하여 결정할 수도 있다.

[0110]

일부 실시형태에 있어서, 본 발명에 사용되는 항체는 c19/2와 동일한 에피토프에 결합하기 위해 경쟁하거나 c19/2와 동일한 에피토프에 결합한다. c19/2에 의해 인식되는 GM-CSF 에피토프는 두 개의 펩티드, 즉, 88번~121번 잔기 사이의 다이설파이드 결합에 의해 연결된, 86~93번 잔기 및 112~127번 잔기를 포함하는 생성물로서 확인되었다. 인간 TF-1 백혈병 세포주를 0.5 ng/ml의 GM-CSF로 자극할 경우 상기 c19/2 항체는 30 pM의 EC_{50} 으로 상기 세포주의 GM-CSF 의존적 증식을 억제한다. 일부 실시형태에서는, 본 발명에 사용되는 항체가 c19/2와 동일한 에피토프에 결합한다.

[0111]

c19/2와 같은 투여용 항체는 추가적으로 인간화 조작될 수 있다. 예를 들어, 상기 c19/2 항체는 인간 V 유전자 분절을 포함하도록 추가로 조작될 수 있다.

[0112]

또 다른 예시적인 중화 항 GM-CSF 항체는 문헌[Li et al., (2006) PNAS 103(10):3557-3562]에 기재되어 있는 E10 항체이다. E10은 GM-CSF에 대한 결합 친화도가 870 pM인 IgG 클래스 항체이다. 상기 항체는 ELISA 분석에서 확인되는 바와 같이 인간 GM-CSF에 대한 결합에 특이적이며, TF1 세포 증식 분석법으로 측정시 강력한 중화 활성을 나타낸다.

[0113]

그 밖의 예시적 중화 항 GM-CSF 항체는 문헌[Krinner et al., (Mol. Immunol. 44:916-25, 2007; Epub 2006 May 11, 2006]에 기재되어 있는 MT203 항체이다. MT203은 피코몰 수준의 친화도로 GM-CSF에 결합하는 IgG1 클래스 항체이다. 이 항체는 TF-1 세포 증식 분석법으로 측정시 강력한 억제 활성을 나타내며 U937 세포에서 IL-8의 생산을 차단하는 능력을 나타낸다.

[0114]

본 발명에 사용하기에 적합한 그 밖의 항체들은 당업자에게 알려져 있다.

[0115]

항 GM-CSF 수용체 항체인 GM-CSF 길항제 역시 본 발명에 사용될 수 있다. 그러한 GM-CSF 길항제로는 GM-CSF 수용체 알파쇄 또는 베타쇄에 대한 항체를 포함한다. 본 발명에서 사용되는 항 GM-CSF 수용체 항체는 전술한 것과 같은 임의의 항체 포맷, 예를 들어 온전한 항체, 키메라 항체, 단일클론 항체, 다클론 항체, 항체 단편, 인간화 항체, 인간화 조작 항체 등일 수 있다. 본 발명에 사용하기에 적합한 항 GM-CSF 수용체 항체, 예를 들어 중화 고친화성 항체의 예는 공지되어 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,747,032호 및 문헌[Nicola et al., Blood 82:1724, 1993] 참조).

[0116]

항체가 아닌 GM-CSF 길항제

[0117]

GM-CSF와 그 수용체 간의 생산적 상호작용을 방해할 수 있는 다른 단백질로는, 돌연변이 GM-CSF 단백질과, GM-

CSF에 결합하여 세포 표면 수용체와의 결합을 위해 경쟁하는 GM-CSF 수용체 사슬 중 하나 또는 둘 다의 세포의 부분 중 적어도 일부를 포함하는 분비 단백질을 들 수 있다. 예를 들어, 가용성 GM-CSF 수용체 길항제는 sGM-CSFR α 의 코딩 영역을 쥐와 IgG2a의 CH2-CH3 영역과 융합하여 제조할 수 있다. 대표적인 가용성 GM-CSF 수용체는 문헌[Raines et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8203]에 기재되어 있다. GM-CSFR α -Fc 융합 단백질의 예가, 예를 들어 문헌[Brown et al., (1995) Blood 85:1488]에 제공된다. 일부 실시형태에 있어서, 그러한 융합체의 Fc 성분은, 예를 들어 Fc 수용체와의 결합을 증가시키기 위해 결합을 조절하도록 조작할 수 있다.

[0118] 그 밖의 GM-CSF 길항제로는 GM-CSF 돌연변이체를 들 수 있다. 예를 들어, 문헌[Hercus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5838, 1994]에 기재된, GM-CSF의 21번 아미노산 잔기가 아르기닌 또는 리신으로 돌연변이(E21R 또는 E221K)된 GM-CSF는 마우스 이중이식 모델에서 GM-CSF 의존적 백혈병 세포의 확산을 방지하는 데 있어서 생체내 활성을 갖는 것으로 확인되었다[Iversen et al., Blood 90:4910, 1997]. 당업자가 이해하는 바와 같이, 그러한 길항제는 21번 아미노산 잔기에 표시된 치환과 같은 치환을 갖는 GM-CSF의 보존적으로 변형된 변이체, 또는 예를 들어 반감기를 연장시키기 위해 아미노산 유사체를 갖는 GM-CSF 변이체를 포함할 수 있다.

[0119] 다른 실시형태에 있어서, 상기 GM-CSF 길항제는 항원을 표적으로 하여 항체와 유사한 방식으로 항원에 결합하는 "항체 모방체"이다. 이러한 "항체 모방체" 중 일부는 항체의 가변 영역에 대한 대안적인 단백질 골격구조로서 비면역글로불린 단백질 골격을 이용한다. 예를 들어, 문헌[Ku et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92(14):6552-6556 (1995)]은 사이토크린 b562의 루프 중 2개가 무작위로 추출되어 소 혈청 알부민에 대한 결합을 위해 선택되는 사이토크린 b562에 기초한 항체의 대용물을 개시한다. 개개의 돌연변이체는 항BSA 항체와 유사하게 BSA에 선택적으로 결합하는 것으로 확인되었다.

[0120] 미국 특허 제6,818,418호 및 제7,115,396호는 피브로넥틴 또는 피브로넥틴 유사 단백질 골격과 하나 이상의 가변 루프를 특징으로 하는 항체 모방체를 개시한다. 어드넥틴(adnectin)으로 알려진 이러한 피브로넥틴 기반 항체 모방체는 임의의 표적 리간드에 대한 높은 친화성 및 특이성을 비롯하여 천연 또는 조작 항체와 동일한 특성을 다수 나타낸다. 이러한 피브로넥틴 기반 항체 모방체의 구조는 IgG 중쇄의 가변 영역의 구조와 유사하다. 따라서, 이러한 모방체는 천연 항체의 것과 성질 및 친화성 면에서 유사한 항원 결합 특성을 나타낸다. 또한, 이러한 피브로넥틴 기반 항체 모방체는 항체 및 항체 단편에 비해 특정한 이점들을 나타낸다. 예를 들어, 이러한 항체 모방체는 고유의 폴딩 안정성을 위해 다이설파이드 결합에 의존하지 않기 때문에, 일반적으로 항체를 파괴하는 조건하에서도 안정하다. 게다가, 이러한 피브로넥틴 기반 항체 모방체의 구조는 IgG 중쇄의 구조와 유사하기 때문에, 생체내에서의 항체의 친화성 성숙 과정과 유사한 루프 무작위화 및 서플링 과정을 시험관내에서 이용할 수 있다.

[0121] 문헌[Beste et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96(5):1898-1903 (1999)]은 리포칼린 골격을 기반으로 하는 항체 모방체(Anticalin®)를 개시한다. 리포칼린은 단백질 말단에 4개의 추가변 루프를 갖는 β -배럴로 이루어진다. 이 루프는 무작위 돌연변이 유발에 노출되어, 예를 들어 플루오레세인과의 결합에 대해 선택되었다. 3개의 변이체는 플루오레세인과 특이적 결합을 나타내었고, 1개의 변이체는 항플루오레세인 항체의 결합과 유사한 결합을 나타내었다. 후속 분석을 통해 무작위 선별된 위치 전부가 가변적이라는 것을 밝혀졌는데, 이는 Anticalin®이 항체의 대용물로서 사용되기에 적합하다는 것을 나타낸다. 따라서, Anticalin®은 일반적으로 160~180개 잔기로 이루어진 작은 단일쇄 펩티드로서, 생산 비용 절감, 저장 안정성 증가 및 면역학적 반응 감소를 비롯하여 항체에 비해 여러 가지 이점을 제공한다.

[0122] 미국 특허 제5,770,380호는, 결합 부위로서 이용되는 복수개의 가변 펩티드 루프에 의해 부착된, 경질의 칼릭사렌의 비펩티드 유기 골격을 이용한 합성 항체 모방체를 개시한다. 이 펩티드 루프는 모두 서로에 대해 칼릭사렌으로부터 기하학적으로 동일한 측면으로부터 돌출된다. 이러한 기하학적 입체구조로 인하여, 모든 루프가 결합에 이용될 수 있음으로 해서 리간드에 대한 결합 친화도가 증가한다. 그러나, 다른 항체 모방체와 비교할 때, 칼릭사렌 기반 항체 모방체는 펩티드만으로 구성된 것이 아니어서, 프로테아제 효소에 의한 공격에 덜 취약하다. 골격이 순전히 펩티드, DNA 또는 RNA만으로 구성된 것이 아니며, 이는 이 항체 모방체가 극한의 환경 조건에서도 비교적 안정하며 수명이 길다는 것을 의미한다. 또한, 칼릭사렌 기반 항체 모방체는 비교적 작아서 면역학적 반응을 유발할 가능성이 적다.

[0123] 문헌[Murali et al., Cell Mol. Biol 49(2):209-216 (2003)]은 항체를 더 작은 펩티드 모방체로 축소시키는 방법을 개시하며, 항체의 대용물로서 유용할 수도 있는 "항체 유사 결합성 펩티드 모방체(antibody-like binding peptidomimetic; ABiP)"라는 용어를 언급하고 있다.

- [0124] 항체 특성은, 비면역글로불린 단백질 골격구조 이외에도, RNA 분자 및 비천연 올리고머를 포함하는 화합물(예를 들어, 프로테아제 억제제, 벤조디아제핀, 퓨린 유도제 및 β -턴(β -turn) 모방체)에서도 모방되었다. 따라서, 비항체 GM-CSF 길항제는 또한 그러한 화합물들을 포함할 수 있다.
- [0125] **III. 치료적 투여**
- [0126] 본 발명의 방법은 일반적으로 만성 염증성 질환, 예를 들어 RA를 앓고 있는 환자에게 질환의 치료에 적합한 투여 계획을 이용하여 치료적 유효량으로 메토틀렉세이트와 GM-CSF 길항제(예를 들어, 항 GM-CSF 항체)를 약학 조성물로서 투여하는 것을 포함한다.
- [0127] 본 발명의 일부 실시형태에 있어서, 만성 염증성 질환, 예를 들어 RA를 앓고 있는 환자를, 주당 투여량 최대 약 25 mg의 메토틀렉세이트와 임상적으로 유의한 호중구 감소증을 유발하지 않고 하나 이상의 염증의 지표를 개선시키는 용량으로 GM-CSF 길항제, 예를 들어 GM-CSF에 특이적인 항체를 사용하여 치료한다. 일부 실시형태에서는, 적혈구 침강 속도(ESR)의 정상 범위 내로의 유의한 감소를 보이는 것에 의해 치료에 대한 환자의 반응을 확인한다. 정상 ESR 범위는 연령 및 성별에 따라 달라진다. 남성의 경우, 정상 ESR은 식: $0.5 \times (\text{연령})$ 에 따라 계산할 수 있다. 여성의 경우, 정상 ESR은 식: $0.5 \times (\text{연령} + 10)$ 에 따라 계산할 수 있다 [Wallach J. Interpretation of Laboratory Tests, 6판, Little Brown and Company, 1996].
- [0128] 상기 조성물은 다양한 약물 전달 시스템에 사용할 수 있도록 제제화할 수 있다. 적절한 제제화를 위해 조성물에 1종 이상의 생리학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 포함시킬 수도 있다. 본 발명에 사용하기 위한 적절한 제제에 대해서는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17판 (1985)]을 참조할 수 있다. 약물 전달 방법의 간략한 재고찰에 대해서는, 문헌[Langer, Science 249:1527-1533 (1990)]을 참조할 수 있다.
- [0129] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 GM-CSF 길항제는 주사용 멸균 등장성 수용액과 같이 환자에게 주사하기에 적합한 용액으로 제공된다. 상기 GM-CSF 길항제는 허용 가능한 담체 중에 적절한 농도로 용해 또는 현탁된다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 담체는 수성으로서, 예를 들어 물, 염수, 인산염 완충 염수 등이다. 이 조성물은 생리학적인 조건에 가깝게 하는 데 필요한 약학적 보조 물질, 예컨대 pH 조절제 및 완충제, 장성 조절제 등을 포함할 수 있다.
- [0130] 본 발명의 약학 조성물은 만성 염증성 질환, 예를 들어 RA를 앓고 있는 환자에게 상기 질환 또는 상기 질환의 증상 및 그 합병증을 치유하거나 적어도 부분적으로 저지하기에 충분한 양으로 투여된다. 이를 위한 적정량을 "치료적 유효량"으로 정의한다. 치료적 유효량은 치료에 대한 환자의 반응을 모니터링하여 결정한다. 질환마다의 치료 유효량을 표시하는 전형적인 기준(benchmark)은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, RA의 경우, 기준으로는 CRP, ESR의 혈장 수치, 네오프테린의 혈액 또는 뇨 수치, 항염증성 사이토카인(예를 들어, TNF- α , GM-CSF, 인터루킨-1, 인터루킨-6, 인터루킨-8 및 인터루킨-17)의 수치 또는 다른 약리학적인 마커의 수치 변화를 들 수 있다. 예를 들어, 관절의 압통 및 종창의 수 및/또는 심각도, 통증 정도 등을 평가함으로써, 치료 반응을 평가하기 위한 다른 기준을 이용할 수도 있다.
- [0131] 유효한 투여량은 연령, 체중, 성별, 투여 경로 등의 다른 요인들을 포함하여 질병의 중증도 및 환자 건강의 전반적인 상태에 따라 달라진다. 환자가 필요로 하고 허용되는 투여량 및 빈도에 따라 길항제를 단위 또는 다회 투여로 투여할 수 있다. 어떤 경우에도, 이 방법은 환자를 효과적으로 치료할 수 있도록 메토틀렉세이트와 병용되는 GM-CSF 길항제를 충분한량 제공한다.
- [0132] 본 발명의 또 다른 실시형태에서는, RA와 같은 만성 염증성 질환을 앓고 있는 환자를 치료하기 위해 사용되는 항 GM-CSF 길항제가 메토틀렉세이트 및 1종 이상의 추가 제제, 예를 들어 비스테로이드성 항염증제와의 병용 방법으로 제공된다. 따라서, 환자는 질병의 치료를 위해 추가 치료제를 투여받을 수 있다. 이러한 치료제로는 하이드록시클로로퀸, 설파살라진, 금, 미노사이클린, 레플루노마이드, 코르티코스테로이드, TNF 길항제(예를 들어, 에타네셉트, 인플릭시맵 또는 아달리무맵), IL-1 길항제(예를 들어, 아나킨라) 또는 항CD20 항체(예를 들어, 리툽시맵)을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다. 환자는 병용 치료제로서 1종 이상의 이러한 추가 치료제를 투여받을 수 있다. 대안으로, 환자는 추가 치료제로 순차로 치료될 수 있다.
- [0133] 일부 실시형태에서는, RA와 같은 만성 염증성 질환을 앓고 있는 환자를 GM-CSF 길항제를 사용한 치료와 병행하여 메토틀렉세이트 이외의 항염산 화합물로 치료한다. 상기 항염산 화합물 및 GM-CSF 길항제는 질병의 치료에 적합한 투여 계획법을 이용하여 임상적으로 유의한 호중구 감소증을 유발하지 않는 양으로 투여된다.

[0134]

A. 투여법

[0135]

본 발명은 메토티렉세이트와 함께 GM-CSF 길항제를 투여함으로써 RA와 같은 만성 염증성 질환을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서는, 상기 GM-CSF 길항제는 정맥내, 피하, 근육내 또는 복강내 경로를 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 적절한 경로를 통해 주사 또는 주입에 의해 투여된다. 예시적 실시형태에 있어서, 상기 GM-CSF 길항제는 환자에게 투여하기 전에 주사용 생리 식염수 용액에 희석시킨다. 이러한 길항제는, 예를 들어 정맥내 주입에 의해 15 분~12 시간의 시간에 걸쳐 투여된다. 또 다른 실시형태에 있어서, 상기 투여 절차는 피하 주사 또는 근육내 주사를 통해 이루어진다.

[0136]

상기 GM-CSF 길항제는 환자가 메토티렉세이트로 치료받고 있는 동안에 투여된다. 본 발명에 있어서, "메토티렉세이트로 치료받고 있는" 또는 "메토티렉세이트를 사용한 치료를 받고 있는" 환자란 환자가 메토티렉세이트를 처방받아서 일정량의 메토티렉세이트를 투여받고 있거나 최근에 투여받았음을 의미한다. 일반적으로, 메토티렉세이트는 주 1회 투여된다. 따라서, 예를 들어, GM-CSF 길항제는 주중에 임의의 투여 시간 간격을 두고 투여될 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 상기 GM-CSF 길항제는, 환자가 메토티렉세이트를 투여받았으나, 예를 들어 마지막 메토티렉세이트 투여 후 1 주일 동안 다음 분량의 메토티렉세이트를 투여받지 않은 상태에서 투여될 수 있다. 이러한 환자 역시, 메토티렉세이트 치료가 그 환자에게 여전히 처방된다면 메토티렉세이트를 사용한 치료를 받고 있는 환자로 간주된다.

[0137]

B. 투여량

[0138]

GM-CSF 길항제의 투여량은 만성 염증성 질환을 앓고 있는 환자에게 유효한 치료를 제공하도록 선택된다. 투여량은 일반적으로 체중 1 kg당 약 0.1 mg~약 25 mg 또는 환자 1 인당 약 1 mg~약 2 g이다. 투여량은 대개 환자 1 인당 약 1 mg~약 10 mg 또는 대략 약 50 mg~약 1,000 mg이다. 투여는, 길항제의 약동학적 특성(예를 들어, 항체의 순환 반감기) 및 약력학적 반응(예를 들어, 항체의 치료 효과 지속 시간)에 따라 1일 1회~3 개월에 1회에 해당하는 적절한 빈도로 반복할 수 있다. 길항제가 항체 또는 변형된 항체 단편인 일부 실시형태에서는, 항체의 생체내 반감기가 약 7일~약 25일이고, 항체 투여는 주 1회~3 개월에 1회의 빈도로 반복된다. 다른 실시형태에서, 상기 항체는 대략 월 1회 투여된다.

[0139]

메토티렉세이트를 투여하기 위한 치료 프로토콜 및 투여량은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 영국 류마티스 협회 가이드라인(2000년 7월)에서와 같이, RA의 경우 메토티렉세이트의 권장 투여량은 주당 7.5 mg에서 시작하여, 6주마다 2.5 mg씩 주당 최대 25 mg까지 늘리는 것이다. 다른 항염산 화합물의 투여량도 잘 알려진 방법을 이용하여 결정할 수 있다.

[0140]

상기 항염산 화합물, 예를 들어 메토티렉세이트 및 GM-CSF 길항제는 호중구 감소증을 유발하지 않는 범위 내에서 투여된다. 예를 들어, 환자는 주당 최대 약 25 mg의 메토티렉세이트와 약 0.2 mg~약 10 mg/kg의 GM-CSF 길항제를 투여받는다.

실시예

[0141]

실시예 1 - GM-CSF에 대한 대표적인 인간화 조작 항체

[0142]

미국 특허 출원 제2006-0134098호에 기재된, 에피토프 포커스 인간 V 분절 라이브러리로부터 c19/2의 특이성을 갖는 인간화 조작 Fab' 분자의 집합체를 제조하였다.

[0143]

Fab' 단편은 이 콜라이(*E. coli*)로부터 발현시켰다. 세포를 2xYT 배지에서 OD₆₀₀ 0.6까지 배양하였다. 발현은 IPTG를 사용하여 33℃에서 3 시간 동안 유도하였다. 주변세포질 분획으로부터 조립된 Fab'을 회수하여, 표준 방법에 따라 스트렙타코커스 단백질 G를 이용한 친화성 크로마토그래피(HiTrap Protein G HP 컬럼; GE Healthcare)로 정제하였다. Fab'은 pH 2.0의 완충액으로 용리시키고, 바로 pH 7.0으로 조정하여 PBS(pH 7.4)에 대해 투석하였다.

[0144]

Biacore 3000 표면 플라스몬 공명(SPR)을 이용하여 결합 역학을 분석하였다. 재조합 인간 GM-CSF 항원을 비오티닐화하여 스트렙타비딘 CM5 센서 칩 상에 고정화하였다. Fab 샘플을 출발 농도 3 nM로 희석시켜 3배 계열 희석을 행하였다. 분석은 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1 mg/mL BSA 및 0.005% p20에서 pH 7.4 및 37℃로 실시하였다. 각각의 농도에 대해 2회씩 테스트하였다. Fab' 결합 분석은 2중 데이터 세트를 제공하는 2개의 항원 밀도 표면 상에서 실시하였다. 1:1 랭뮤어 결합 모델을 이용하여 계산한, 6종의 인간화 조작된 항 GM-CSF Fab 클론 각각에 대한 평균 친화도(K_D)를 표 1에 기재하였다.

[0145] TF-1 세포 증식 분석을 이용하여 GM-CSF 중화에 대해 Fab를 테스트하였다. 0.5 ng/ml의 GM-CSF와 함께 4일 동안 항온처리한 후 생존 세포를 측정하기 위한 MTS 분석(Cell titer 96, Promega)을 이용하여 인간 TF-1 세포의 GM-CSF 의존적 증식을 측정하였다. 이 분석에서 모든 Fab는 세포 증식을 억제하였으며, 이는 이들이 중화 항체임을 나타낸다. 세포 기반 분석법에서는 항 GM-CSF Fab의 상대 친화도와 EC_{50} 간에 우수한 상관관계가 있다. 18 pM~104 pM 범위의 1가 친화도를 갖는 항 GM-CSF 항체는 세포 기반 분석법에서 GM-CSF를 효과적으로 중화시킨다.

[0146] [표 1]

[0147] GM-CSF 의존적 TF-1 세포 증식 분석법에서의 활성(EC_{50})과 비교한, 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 측정된 항 GM-CSF Fab의 친화도

[0148]

Fab	SPR에 의해 측정된 1가 결합 친화도(pM)	TF-1 세포 증식 분석법에서의 EC_{50} (pM)
94	18	165
104	19	239
77	29	404
92	58	539
42	104	3200
44	81	7000

[0149] 실시예 2 - 항 GM-CSF 항체의 전달을 위한 예시적 임상 프로토콜

[0150] 항 GM-CSF 항체를 주사용 멸균 등장성 염수 수용액에 10 mg/ml의 농도로 용해하여 4℃에 저장하고, 환자에게 투여하기 전에 0.9% 주사용 염화나트륨 100 ml 또는 200 ml에 희석한다. 이 항체를, 0.2~10 mg/kg의 투여량으로 1 시간에 걸쳐 정맥내 주입에 의해 RA 환자에게 투여한다.

[0151] 이 치료 프로토콜에 포함된 환자들은 하기 기준에 기초하여 선별한다: 활성 RA의 징후를 보이는 환자, 6주 이상 동안 안정한 용량의 DMARD를 투여받았고 현재 메토티렉세이트 치료를 받고 있는 환자. 또한, 본 연구에 포함된 환자들은 하기 증상을 나타낸다: 중창 관절수 6 이상(66의 관절수 이용), 압통 관절수 6 이상(68의 관절수 이용). 또한, 하기 기준 중 적어도 2 가지를 채택 기준에 포함시킨다: ESR \geq 20 mm/hr, CRP \geq 15 mg/L, 조조 강직 \geq 45 분.

[0152] 환자에게 1일째 하기 투여량 중 하나로 위약(0.9% 주사용 염화나트륨) 또는 항 GM-CSF 항체를 투여한다: 0.2 mg/kg, 1.0 mg/kg, 5.0 mg/kg 또는 10 mg/kg. 환자는 29일 동안 모니터링한다. 모든 환자들에게 DMARD, 최대 투여량 25 mg/wk의 메토티렉세이트, 최대 투여량 10 mg/day의 프레드니솔론 및 NSAID를 임의의 다른 의학적 증상에 대한 약물 투약과 함께 임상적으로 적절하게 투여한다. 연구 기간 전반에 걸쳐서, 연구 안전성 평가로서 하기 테스트를 수행한다: 신체 검사, 바이탈 사인 측정, 12 유도 심전도(ECG) 검사, 혈액학적 분석, 생화학적 분석 및 검뇨를 포함한 실험실 검사, 폐 기능 검사 및 실금 및 유해 사례(AE)의 강도.

[0153] 치료 효능은 두 단계로 평가한다. 1차 평가는 치료 전 임의의 시점 또는 치료 29일째의 ACR 20 반응을 포함한다. 2차 평가는 ACR 20까지의 시간 측정, ACR 50 및 70 반응에 도달한 환자의 비율과, 8일, 15일 및 29일째 측정된 ESR 및 CRP를 포함한다.

[0154] 유해 사례, 심각한 유해 사례 및 실험실 검사 이상을 치료군에 따라 표로 만들어, 취합된 위약군의 것과 비교한다. 항 GM-CSF 항체의 효능은, 비공개 시험 절차를 이용하여 치료 목적에 따라 ACR 20/50/70 반응을 계산하여 분석한다. 취합된 활성군을 위약으로 치료한 환자와 비교한다.

[0155] 실시예 3 - 메토티렉세이트와 항 GM-CSF 항체를 사용한 환자의 치료

[0156] 활성 RA 환자를 실시예 2에 기재된 임상 프로토콜에 따라 메토티렉세이트와 항 GM-CSF 항체로 치료하였다. 이 환자에게 0.2 mg/kg의 항 GM-CSF 항체를 투여하였다. 이 환자는 또한 주당 25 mg의 메토티렉세이트로 치료받고 있는 환자였다.

[0157] 표준 방법으로 혈구 수치를 측정하고, 헤모글로빈(HGB) 수치; 총 백혈구(WBCC) 수치; 혈소판(PLT) 수치; 호중구

수치[Neut; 절대 호중구 수치(Absolute Neutrophil Count; ANC)라고도 함]; 림프구(LYMPH) 수치; 단핵구(MONO) 수치; 호산구(EOSIN) 수치; 호염구(BASO) 수치; 적혈구 용적률(HCT)의 측정을 포함시켰다. 또한, 적혈구 침강 속도(ESR), C 반응성 단백질(CRP)을 측정하였다. 치료 전과 치료 후 2주까지의 혈구 수치 ESR 및 CRP는 표 2에 기재되어 있다. 이 표로부터 알 수 있는 바와 같이, 2주 후 ESR은 이상 수치 40에서, 치료된 환자와 동일한 성별 및 연령의 개체에 대한 정상 범위 내인 18까지 떨어진 반면, 호중구 수치는 변화가 없었다.

[0158] 따라서, 메토티렉세이트 치료와 항 GM-CSF 길항제(이 경우, 항 GM-CSF 항체)를 이용한 치료를 포함하는 병용 치료는 류마티스 관절염의 치료에 치료 이익을 제공하였다.

[0159] 표 2에서 "1"일이란 항 GM-CSF 길항제가 투여된 날을 나타낸다. 환자는 이전에 메토티렉세이트 치료를 받은 적이 있으며, 항 GM-CSF 길항제 치료와 함께 메토티렉세이트 치료를 계속 받고 있었다.

[0160] [표 2]

[0161] 주 1회씩 메토티렉세이트로 치료받고 있으며, 1일째 1회 투여량의 항 GM-CSF 항체를 투여받은 환자로부터의 혈액 수치 및 ESR. 각종 세포(혈소판, 호중구, 림프구 등)의 수는 $\times 10^9/L$ 에 해당한다. ESR은 mm/hr로 나타낸다.

[0162]

치료후 일수	HGB	WBCC	PLT	NEUT	LYMPH	HCT	MONO	EOSIN	BASE	ESR
-2	133	5.0	202	3.04	1.26	0.4	0.52	0.16	0.02	40
1	127	4.4	208	2.64	1.23	0.38	0.36	0.15	0.03	
8	129	5.4	189	3.01	1.41	0.39	0.76	0.17	0.04	23
15	131	4.8	193	2.76	1.39	0.39	0.46	0.15	0.04	18
28	130	5.0	180	2.79	1.71	0.4	0.25	0.21	0.04	20

[0163] 상기 실시예들은 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서 한정을 의도한 것이 아니다. 당업자라면 본질적으로 유사한 결과를 산출하도록 수정 또는 변경될 수 있는 다양한 결정적이지 않은 파라미터를 용이하게 알 수 있을 것이다.

[0164] 본 명세서에서 인용된 모든 간행물, 특허 출원, 수탁 번호 및 기타 참고 문헌은 각각의 개별 간행물 또는 특허 출원이 특이적이고 개별적으로 참고 문헌으로 포함된 것으로 표시된 것과 같은 정도로 본원에 참고 문헌으로서 포함된다.

[0165] 예시적인 서열

[0166] 서열 번호 1: 쥐과 19/2 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열

```

Met Glu Leu Ile Met Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val His
Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
Tyr Asn Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Asp Trp
Ile Gly Tyr Ile Ala Pro Tyr Ser Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Glu
Phe Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
Cys Ala Arg Arg Asp Arg Phe Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Thr Leu Arg Val Ser Ser Val Ser Gly Ser
    
```

[0167]

[0168] 서열 번호 2: 쥐과 19/2 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열

Met Gly Phe Lys Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Tyr Met Leu
 Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Ile Gln Ser Gln
 Lys Phe Val Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys
 Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asn Val Ala Trp Leu Gln Gln Lys Pro
 Gly Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Ser Gly
 Arg Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile
 Leu Thr Ile Thr Thr Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys
 Gln Gln Phe Asn Arg Ser Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 Ser Ser Lys Gly Glu Phe

[0169]