



- (51) 국제특허분류:
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/006589
- (22) 국제출원일: 2016년 6월 22일 (22.06.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0088819 2015년 6월 23일 (23.06.2015) KR
10-2016-0077311 2016년 6월 21일 (21.06.2016) KR
- (71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR];
08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 박성희 (PARK, SeongHoe); 04595 서울시 중구
다산로 32, 33-304, Seoul (KR). 정경천 (JUNG, Kyeong
Cheon); 01723 서울시 노원구 중계로 14 나길 25, 107-
1701, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 박원미 (PARK, Weonmee); 06224 서울시 강남
구 논현로 412, 603호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA,
LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

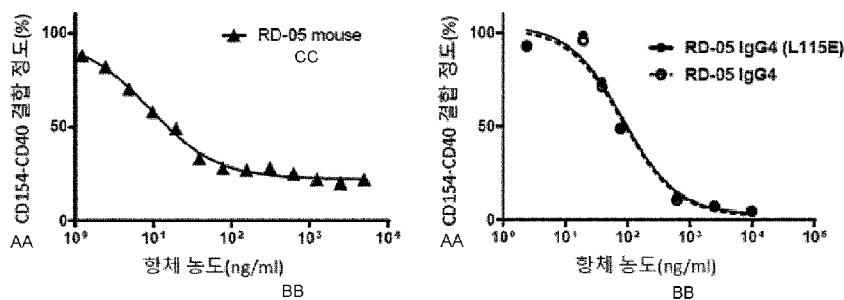
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접
수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: CD154 BINDING POLYPEPTIDE AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : CD154 결합 폴리펩타이드 및 그 용도



AA ... CD154-CD40 binding degree (%)
BB ... Antibody concentration (ng/ml)
CC ... RD-05 mouse

(57) Abstract: Disclosed is a CD154 binding polypeptide specifically recognizing CD154. The polypeptide according to the present application does not activate blood platelets while effectively inhibiting the CD154-CD40 interaction, and thus can be effectively used in the prevention or treatment of various T-cell or antibody-mediated diseases or symptoms in need of inhibition of the interaction.

(57) 요약서: 본원은 CD154를 특이적으로 인식하는 CD154 결합 폴리펩타이드를 개시한다. 본원에 따른 폴리펩타이드는 CD154-CD40의 상호작용을 효과적으로 억제하면서도 혈소판을 활성화시키지 않아, 상기 상호작용의 억제가 필요한 T-세포 또는 항체 매개된 다양한 질환 또는 증상의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: CD154 결합 폴리펩타이드 및 그 용도

기술분야

- [1] 본원은 CD154에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드 및 이를 포함하는 약학 조성물 및 이를 이용한 질환의 치료방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 세포성 면역반응 및 체액 면역 반응은 활성화된 T 세포와 항원제시세포의 상호작용을 통해 발생된다. T 세포의 활성화는 항원 특이적 T 세포 수용체(TCR)와 이의 cognate 펩타이드-MHC 복합체는 물론 다양한 세포 부착분자 및 공자극 분자에 의한 조화된(coordinated) 결합 및 활성화를 필요로 한다.
- [3] 이러한 공자극 분자 중의 하나가 CD154로, T 세포의 활성화는 이러한 CD154를 통한 보조자극신호(costimulatory signal) 전달이 필수적이다. 또한 B 세포 활성화 후 항체 생산을 위해서도 CD154가 결합하는 CD40을 통한 신호전달이 필요하다. 따라서 CD154-CD40의 상호작용을 억제하면 T 세포 활성화 및 항체 생성이 모두 억제되어 세포성 면역반응 및 체액 면역 반응을 모두 억제할 수 있다. 특히, B 세포 활성화 및 항체 생산 과정에서 항-CD154 항체는 다음 세단계에서 반응을 억제할 수 있다(J Clin Invest. 2003;112:1480-2): 활성화된 T 세포에 의한 B 세포 도움, 종자중심(germinal center) 생성; 및 종자중심내에서 T 세포-B 세포 상호작용.
- [4] 또한 CD154-CD40 항체의 상호작용을 억제하는 항-CD154 항체의 효과가 보고된 질환으로는 전신홍반루푸스 (Boumpas et al. (2003) Arthritis Rheum. 48:719-727, Kelsoe (2003) J Clin Invest. 112:1480-1482), 면역성저혈소판자색반증 (Kuwana et al. (2004) Blood 103:1229-1236), 류마티스관절염 (Durie et al. (1993) Science 261:1328-1330), 다발경화증 (Nagelkerken et al. (2004) J Immunol. 173:993-999) 등의 자가면역질환의 치료 혹은 예방과, 신장 (Kirk et al. (1999) Nat Med. 5:686-689, Schuler et al. (2004) Transplantation 77:717-726), 피부, 심장, 체도 (Kirk et al. (2001) Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 356:691-702) 이식 거부반응 및 이식편대숙주반응 (Seung et al. (2000) Blood 95:2175)의 억제 등이 있다. 특히, 전신홍반루푸스 (Boumpas et al. (2003) Arthritis Rheum. 48:719-727, Kelsoe (2003) J Clin Invest. 112:1480-1482), 면역성저혈소판자색반증 (Kuwana et al. (2004) Blood 103:1229-1236)은 대표적인 항체 매개 자가면역질환으로서, 환자에서 항-CD154 항체의 치료 효능이 입증되었다. 또한 Rhesus 및 Cynomolgus 원숭이 신장이식 개체에서 항-CD154 항체의 이식거부반응 억제 효능이 입증되었다 (Kirk et al. (1999) Nat Med. 5:686-689, Schuler et al. (2004) Transplantation 77:717-726).
- [5] 따라서 이를 바탕으로 항-CD154 항체들이 개발되었다. 미국 공개공보

2004-0038293호는 인간 CD154에 대한 항체를 개시한다.

- [6] 하지만 개발된 항체는 혈소판 자극에 의한 혈전 생성 부작용으로 임상에 쓰이지 못 하고 있는 것이 현실이다. 즉 기존에 개발된 항체들의 Fc 부분은 혈소판에 있는 Fc γ 수용체 (Fc γ R)에 결합하여 혈소판을 활성화 시키고, 이로 인해서 혈전이 생성되는 문제점이 있었다.

- [7] 따라서 혈소판을 활성화시키는 부작용이 없으면서도 효과적으로 CD40와의 상호작용을 억제할 수 있는 물질의 개발이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본원은 상기 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, Fc γ 수용체에 대한 친화도가 감소되어 혈소판 활성화 및 혈전 생성 부작용이 발생하지 않는 새로운 CD154 결합 단백질을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [9] 한 양태에서 본원은 면역글로블린 중쇄 가변영역(VH)의 상보성결정부위(HCDR) 서열로서 서열번호 1의 HCDR1, 서열번호 2의 HCDR2 및 서열번호 3의 HCDR3의 아미노산 서열; 및 면역글로블린 경쇄 가변영역(VL)의 상보성결정부위(LCDR) 서열로서 서열번호 4의 LCDR1, 서열번호 5의 LCDR2 및 서열번호 6의 LCDR3의 아미노산 서열을 포함하는 CD154를 특이적으로 인식하는, CD154 결합 폴리펩타이드를 제공한다.
- [10] 본원에 개시된 폴리펩타이드는 CD154 단백질을 특이적으로 인식하며, CD154와 상호작용하는 단백질 즉 CD40와 CD154와의 상호작용을 효과적으로 억제할 수 있다.
- [11] 본원에 개시된 폴리펩타이드는 일 구현예에서 CD154의 서열번호 12 또는 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열을 특이적으로 인식한다.
- [12] 이런 측면에서 본원에 따른 CD154 결합 폴리펩타이드는 항-CD154 항체 또는 그 항원 결합 단편이다.
- [13] 본원에 개시된 항-CD154 항체는 일 구현예에서 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열의 중쇄 가변영역 및 서열번호 8로 개시된 아미노산 서열의 경쇄 가변영역을 포함한다. 상기 가변영역에 추가하여, 일 구현예에서 본원에 따른 항체는 서열번호 9 또는 서열번호 10의 중쇄 불변영역 및 서열번호 11의 경쇄 불변영역을 포함한다.
- [14] 일 구현예에서 본원은 또한 상기 본원에 따른 CD154를 특이적으로 인식하는 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [15] 본원에 개시된 항-CD154 항체는 다양한 형태로 제공될 수 있으며, 예를 들면 단클론 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체를 포함한다.
- [16] 일 구현예에서 본원에 따른 항-CD154 항체는 키메라 항체로, 상기 키메라

항체는 비인간 유래의 가변영역 및 인간 유래의 Fc 영역을 포함하며, 상기 인간 유래 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc로부터 선택되며, 상기 키메라 항체는 Fc γ 수용체 (Fc γ R)에 대한 결합이 감소되고, 이로 인해 혈소판 자극이 감소된다.

- [17] 일 구현예에서 본원에 따른 키메라 항체에 포함되는 Fc 영역은 IgG4 Fc이고, 상기 IgG4 Fc는 아미노산 잔기 치환 돌연변이를 포함하며, 상기 돌연변이는 서열번호 9의 서열을 기준으로 115번째 아미노산 잔기가 루이신에서 글루탐산(L115E)으로 치환되며, 상기 치환에 의해 Fc γ 수용체 (Fc γ R)에 대한 결합이 감소되고, 이로 인해 혈소판 자극이 감소된다.
- [18] 본원에 따른 항체는 구체적 목적에 따라 치료제, 프로드럭, 펩타이드, 단백질, 효소, 바이러스, 지질, 생물학적제제, 약물 및 PEG로 구성되는 군으로부터 선택되는 물질과 컨쥬게이션되어 제공될 수 있다.
- [19] 본원에 따른 항체는 CD514와 CD40의 상호작용을 효과적으로 억제할 수 있어, T 세포 활성화 및 항체 생성이 모두 억제되어 세포성 면역반응 및 체액 면역 반응을 모두 억제할 수 있다. 따라서 본원에 따른 CD154를 특이적으로 인식하여 이의 CD40와의 상호작용을 억제하는 폴리펩타이드는 항체 매개 증상 또는 질환의 치료, 예방 또는 조절에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [20] 따라서 한 양태에서 본원은 T-세포 또는 항체 매개된 면역 질환 또는 증상 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.
- [21] 또 다른 양태에서 본원은 본원에 따른 CD154 결합 폴리펩타이드를 포함하는 항-약물 항체 생성 억제용 조성물을 제공하며, 예를 들면 엔브렐, 휴미라와 같은 항체기반 약물 투여로 인한 항체 생성의 억제에 유용하게 사용될 수 있다.
- [22] T-세포 또는 항체 매개된 면역 질환 또는 증상은 항-약물 항체 생성 반응, 전신홍반루푸스, 면역성저혈소판자색반증, 류마티스관절염, 다발경화증을 포함하는 자가면역질환, 췌도, 신장, 심장, 피부를 포함하는 장기 또는 조직 이식에 대한 거부 반응, 또는 이식편대숙주 질환인, T-세포 또는 항체 매개된 면역 질환 또는 증상 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [23] 다른 양태에서 본원은 CD154 단백질에서 CD40와 상호작용하는 부위인 서열번호 22로 표시되는 CD40 리간드에서 199번 잔기 Gly, 200번 잔기 Arg, 및 203번 잔기 Arg을 포함하는 5개 내지 50개 아미노산의 CD40 리간드 부위를 에피토프로 하며, CD40와의 상호작용을 방해하는, 항 CD154 항체 또는 그 항원 결합 단편을 제공한다. 상기 에피토프는 207번 잔기, 230번 잔기 Glu 또는 232번 Qln 중 하나 이상을 추가로 포함하는 9 내지 50개 아미노산의 폴리펩타이드일 수 있다.
- [24] 상기 본원에 따른 에피토프는 상기 조건을 참고로 하여 당업자 수준에서 용이하게 결정될 수 있으며, 191번 잔기부터 240번 잔기 사이에 존재할 수 있다. 일 구현예에서는 197번 잔기부터 240번 잔기, 더욱 특히 197번 잔기부터 232번 잔기 사이에 존재하는 GRFER, PGRFER, SPGRFER, GRFERILLRA,

PGRFERILLR, SPGRFERILLR, SPGRFERILLRA,
 GRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFE,
 GRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQ,
 GRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFN,
 SPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFN를 포함하나,
 상기 조건에 부합하는 한 이로 제한하는 것은 아니다.

- [25] 본원에 따른 CD154를 특이적으로 인식하는 폴리펩타이드는 이의 CD40와의 상호작용 부위를 특이적으로 인식하여 상기 CD40와의 상호작용을 방해한다. 이런 측면에서 본원은 또한 CD154 단백질에서 CD40와 상호작용하는 부위로서 상기 CD40와의 제2 친수성 접촉부위 및/또는 전하 상호작용 부위를 특이적으로 인식하는 항 CD154 항체 또는 그 항원 결합 단편을 제공한다.
- [26] 상술한 바와 같이 본원에 따른 CD154를 특이적으로 인식하는 폴리펩타이드는 T 세포 활성화 및 항체 생성이 모두 억제되어 세포성 면역반응 및 체액 면역 반응을 모두 억제할 수 있다.
- [27] 이러한 측면에서 본원은 본원에 따른 CD154를 특이적으로 인식하는 폴리펩타이드, 또는 항체 또는 그 항원 결합단편, 또는 키메라 항체를 포함하는 항-약물 항체 생성 억제용 키트 또는 항체 매개된 면역 반응 억제용 키트 또는 CD154 의존 T 세포 매개된 면역반응 억제용 키트를 제공한다.
- [28] 본원은 또한 본원에 따른 CD154 결합 폴리펩타이드, 항체 또는 그 항원 결합단편, 또는 키메라 항체의 용도를 제공한다.
- [29] 본원은 또한 본원에 따른 CD154 결합 폴리펩타이드, 항체 또는 그 항원 결합단편, 또는 키메라 항체를 항-약물 항체 생성 억제, 항체 매개된 면역 반응 억제 또는 CD154 의존 T 세포 매개된 면역반응 억제 또는 상술한 바와 같은 이와 관련된 질환의 예방 또는 치료용으로 사용되는 용도를 개시한다.
- [30] 본원은 또한 본원에 따른 CD154 결합 폴리펩타이드, 항체 또는 그 항원 결합단편, 또는 키메라 항체를 세포에 처리하는 단계를 포함하는 항-약물 항체 생성 억제 방법, 항체 매개된 면역 반응 억제 방법 또는 CD154 의존 T 세포 매개된 면역반응 억제 방법을 제공하며, 상기 방법은 인비트로, 인비보 또는 엑스비보에서 수행될 수 있다.
- [31] 본원은 또한 본원에 따른 치료적으로 유효한 양의 CD154 결합 폴리펩타이드, 항체 또는 그 항원 결합단편, 또는 키메라 항체를 대상자에게 투여하는 단계를 포함하는 항-약물 항체 생성 억제 방법, 항체 매개된 면역 반응 억제 방법 또는 CD154 의존 T 세포 매개된 면역반응 억제 방법, 또는 상술한 바와 같은 이와 관련된 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [32]
- [33] 본원에 따른 CD154를 특이적으로 인식하는 항체는 CD154-CD40의 상호작용을 효과적으로 억제하면서도 혈소판을 활성화시키지 않아, 상기 상호작용의 억제가 필요한 다양한 질환 또는 증상의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수

있다. 예를 들면 본원에 따른 항체는 항-약물 항체 형성을 효과적으로 억제할 수 있으며, 전신홍반루프스, 면역성저혈소판자색반증, 류마티스 관절염 또는 다발경화증 등을 포함하는 자가면역질환 치료에도 효과적으로 사용될 수 있으며, 면역거부반응 없이 동종 및 이종 장기 이식, 세포이식, 골수이식, 줄기세포이식을 가능하게 하여, 면역 억제제의 사용을 필요 없게 하거나, 또는 면역억제제가 함께 사용되는 복합치료에 있어서도, 면역억제제의 종류, 사용량을 최소화할 수 있다.

[34]

도면의 간단한 설명

[35] 도 1은 본원의 일 구현예에 따른 항-인간 CD154 항체의 항원에 대한 결합을 유세포측정으로 분석한 결과이다.

[36] 도 2는 항-CD154 항체가 인지하는 항원의 에피토프를 Western blotting으로 확인한 결과이다.

[37] 도 3은 본원의 일 구현예에 따른 인간 IgG4 및 IgG4(L115E) 항-인간 CD154 키메라항체의 항원에 대한 결합을 유세포측정으로 분석한 결과이다.

[38] 도 4는 본원의 일 구현예에 따른 인간 IgG4 키메라 항-CD154 항체의 제조에 사용된 벡터의 개열지도이다.

[39] 도 5는 본원의 일 구현예에 따른 인간 IgG4 및 IgG4(L115E) 항-인간 CD154 키메라항체의 CD154-CD40 결합에 대한 억제 효과를 분석한 결과이다.

[40] 도 6은 본원의 일 구현예에 따른 IgG4(L115E) 항-인간 CD154 키메라항체에 의한 T 세포 의존형 면역반응 억제 효과를 분석한 결과로, 휴미라에 대한 항-약물 항체 형성을 효과적으로 억제할 수 있음을 나타낸다.

[41] 도 7은 본원의 일 구현예에 따른 인간 IgG4 및 IgG4(L115E) 항-인간 CD154 키메라항체가 혈소판 활성화에 미치는 영향을 분석한 결과로, IgG4 키메라항체는 혈소판 수가 감소하였으나, IgG4(L115E) 키메라항체는 정상 대조군에 비하여 혈소판 수가 감소하지 않았다.

발명의 실시를 위한 형태

[42] 본원은 CD154 분자를 특이적으로 인식하는 폴리펩타이드에 관한 것이다.

[43] 일 구현예에서 본원은 면역글로블린 중쇄 가변영역(VH)의 상보성결정부위(HCDR) 서열로서 서열번호 1의 HCDR1, 서열번호 2의 HCDR2 및 서열번호 3의 HCDR3의 아미노산 서열; 및 면역글로블린 경쇄 가변영역(VL)의 상보성결정부위(LCDR) 서열로서 서열번호 4의 LCDR1, 서열번호 5의 LCDR2 및 서열번호 6의 LCDR3의 아미노산 서열을 포함하는 CD154 결합 폴리펩타이드에 관한 것이다.

[44] 본원에 따른 폴리펩타이드가 특이적으로 인식하는 CD154 분자는 CD40 리간드, CD40L 또는 gp39로 불리는 약 32-39kDa의 활성화된 T 세포에서 일차적으로 발현되는 단백질이며, 그 외 혈소판, 비만세포, 대식세포, 호염구,

자연살해세포, B 림프구, 그리고 비조혈세포(non-haematopoietic cells) (예를 들어 평활근, 상피세포, 그리고 내피세포 등)등의 다양한 세포에서도 발현되는 것으로 알려져 있는 TNF 분자 계열의 한 종류이다. 타입 II 막관통 단백질로 구조는 N 말단부터 세포질영역, 세포막관통영역 및 세포외영역으로 구성되어 있으나 14, 18 및 29 kDa의 용해성(soluble) 분자로도 발견된다. 이는 항원제시세포(antigen presenting cell, APC)에서 발현되는 CD40에 결합하여 그 효과를 나타내며, 공동자극분자로서, MHC 분자에 의한 T 세포 수용체 자극과 함께 T 세포의 활성화를 유도할 뿐만 아니라, APC의 활성화에도 관여한다.

- [45] 본원의 폴리펩타이드가 인식하는 CD154는 포유류 유래이며, 특히 인간, 인간 아닌 영장류 예를 들면 붉은털원숭이(rhesus), 개먹이원숭이(Cynomolgus) 또는 침팬지 유래의 CD154를 인식한다. 이러한 CD154 유전자 및 단백질 서열은 공지되어 있으며, 예를 들면 사람의 경우 GenBank Accession No.: NM-000074.2 및 NP-000065.1로 공지되어 있다. 한 구현예에서는 인간 또는 비인간 영장류 유래의 CD154를 특이적으로 인식한다.
- [46] 본원의 폴리펩타이드는 전장 CD154는 물론 그 단편 예를 들면 용해성(soluble) CD154를 인식할 수 있다.
- [47] 본원에 따른 폴리펩타이드는 CD154를 특이적으로 인식하며, 특히 CD154의 CD40와의 상호작용 부위, 즉 CD40 리간드 (예를 들면 서열번호 22)를 특이적으로 인식한다. CD40 리간드에서 CD40와의 상호작용 잔기는 3D 결정구조 분석을 통해 종전에 알려진 것으로, An *et al* (THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286, NO. 13, pp. 11226-11235, 2011)을 참조할 수 있다.
- [48] 따라서 이런 측면에서 본원에 따른 폴리펩타이드는 CD154 단백질에서 CD40와 상호작용하는 부위인 서열번호 22로 표시되는 CD40 리간드에서 199번 잔기 Gly, 200번 잔기 Arg, 및 203번 잔기 Arg을 포함하는 5개 내지 50개 아미노산의 CD40 리간드 부위를 에피토프로 하며, CD40와의 상호작용을 방해하는, 항 CD154 항체 또는 그 항원 결합 단편을 제공한다. 상기 에피토프는 207번 잔기, 230번 잔기 Glu 또는 232번 Qln 중 하나 이상을 추가로 포함하는 9 내지 50개 아미노산의 폴리펩타이드일 수 있다.
- [49] 상기 본원에 따른 에피토프는 상기 조건을 참고로 하여 당업자 수준에서 용이하게 결정될 수 있으며, 서열번호 22의 서열을 기준으로 191번 잔기부터 240번 잔기 사이에 존재할 수 있다. 일 구현예에서는 197번 잔기부터 240번 잔기, 더욱 특히 197번 잔기부터 232번 잔기 사이에 존재하는 GRFER, PGRFER, SPGRFER, GRFERILLR, GRFERILLRA, PGRFERILLR, SPGRFERILLR, SPGRFERILLRA, GRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQ, GRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFN, SPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFN를 포함하나,

상기 조건에 부합하는 한 이로 제한하는 것은 아니다.

- [50] 상술한 바와 같이 본원에 따른 CD154를 특이적으로 인식하는 폴리펩타이드는 이의 CD40와의 상호작용 부위, 특히 제2 친수성(hydrophilic 2 contact) 접촉 부위 및 전하 상호작용(Charge interaction) 부위 (An et al., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286, NO. 13, pp. 11226-11235, 2011)를 특이적으로 인식하여 상기 CD40와의 상호작용을 방해한다. 상기 문헌에 따르면 CD154에는 CD40와 상호작용하는 3개의 부위, 즉 소수성 접촉부위, 제1 친수성 접촉부위 및 서열번호 22의 서열을 기준으로 G199, R200, R203, Q232 잔기를 포함하는 제2 친수성 접촉 부위 및 전하 상호작용 부위 (R200, R203, R207, E230)가 존재하며, 본원에 따른 CD154를 특이적으로 인식하는 폴리펩타이드는 제2 접촉성 부위 및/또는 전하 상호작용 부위를 특이적으로 인식한다.
- [51] 이런 측면에서 본원은 또한 CD154 단백질에서 CD40와 상호작용하는 부위로서 상기 CD40와의 제2 친수성 접촉부위 및/또는 전하 상호작용 부위를 특이적으로 인식하는 항 CD154 항체 또는 그 항원 결합 단편을 제공한다.
- [52] 본원에 따른 CD154를 특이적으로 인식하는 폴리펩타이드의 에피토프는 상기 잔기를 포함하는 약 5개 내지 71개의 아미노산으로 그 예로는 상술한 바를 참고할 수 있다.
- [53] 일 구현예에서 본원에 따른 CD154 결합 폴리펩타이드는 본원에 기술된 특징을 갖는 한 다양한 형태로 제공될 수 있으며, 특히 항-CD154 항체 또는 그 항원 결합 단편으로 제공될 수 있다.
- [54] 본원에서 사용된 용어 "항체"란 경쇄 및 중쇄의 가변영역을 통해 다른 분자(항원)에 결합하는 단백질을 일컫는 것으로, IgG, IgD, IgA 및 IgE 타입을 포함한다. 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 다특이성 항체를 포함한다. 또한 본원의 항체는 다양한 형태의 구조를 갖는 모노클론 항체를 포함하는 것으로, 예를 들면, 두 개의 전장 중쇄 및 두 개의 전장 경쇄를 포함하는 온전한 항체(intact Ab)는 물론 불변영역을 포함하거나 또는 포함하지 않는 이의 단편, 키메라 항체, 인간항체, 인간화항체, 또는 본원에 따른 특징을 갖는 기타 유전공학적으로 변형된 항체를 일컫는 것이다.
- [55] 본원에서 사용된 용어 "항원결합 단편"은 상술한 온전한 항체의 일부를 일컫는 것으로, 길이면에서 온전한 항체의 아미노산 서열보다 하나 이상의 서열이 짧은 서열이다. 기능적인 면에서는 온전한 항체 또는 모(parent) 항체의 적어도 일부 활성 또는 기능을 포함하는 것으로 그 종류는 예를 들면 Fab(Fragment for antigen binding), Fab', F(ab')₂, Fv 또는 단쇄항체(Single Chain Antibody, SCA)(예를 들면 scFv 또는 dsFv), bispecific scFv 및 diabody를 들 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다.
- [56] 본원에서 사용된 용어 "가변영역"은 중쇄와 경쇄의 일부에 의해 형성되는 항원 결합부위로, 각 가변영역은 서열이 보존된 4개의 골격(FR)과 서열의 변이가 심한 3개의 상보성결정부위(CDR, Complementary Determining Region)로 이루어져

- 있다. 면역글로블린 중쇄 가변영역(VH)의 CDR은 HCDR1 내지 HCDR3, 면역글로블린 경쇄 가변영역(VL)의 CDR은 LCDR1 내지 LCDR3로 칭한다.
- [57] 본원에서 사용된 용어 "상보성결정부위"는 항체의 항원에 대한 특이성과 결합력을 결정하는 부위로, 항체간 서열변이가 가장 많이 발견된다. 이들 중 CDR3 부위의 변이가 가장 심하며, 짧게는 2개의 아미노산 많게는 26개 이상을 아미노산 잔기로 구성되어 있다. VH 및 VL에서 CDR 이외의 부분은 골격잔기이다. 본원의 항원 결합 폴리펩타이드의 골격은 자연에 존재하는 인간 항체에서 발견되는 서열, 또는 다양한 항체에서 발견되는 서열을 공통서열로 하여 사용할 수도 있다.
- [58] 기술분야의 당업자라면 상기와 같은 서열번호 1 내지 6의 서열을 갖는 가변영역을 이용하여 불변영역을 포함하는 항체의 구성요소를 포함하는 항체를 구축할 수 있을 것이다. 본원에 따른 일 구현예에서 본원의 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 7의 아미노산 서열, 경쇄의 가변영역은 서열번호 8의 아미노산 서열을 가진다. 다른 구현예에서 본원에 따른 항체는 중쇄 불변 영역은 서열번호 9 또는 10, 경쇄 불변영역은 서열번호 11의 아미노산 서열로 표시된다.
- [59] 본원은 또한 상기 서열번호 1 내지 11에서 아미노산에 보존적 치환이 일어난 것을 포함한다. 본원에 따른 일 구현예에서는 10개 미만, 9개 미만, 8개 미만, 7개 미만, 6개 미만, 5개 미만, 4개 미만, 3개 미만, 2개 미만 또는 1개의 아미노산에서 치환이 일어난 것이다. 본원에서 용어 "보존적 치환(conservative substitution)"은 하나의 아미노산이 유사한 특징의 다른 아미노산으로 치환되는 것을 일컫는 당업계에서 널리 통용되는 용어이다. 유사한 특징이란, 예를 들면 크기, 소수성, 또는 전하(Charge)를 포함한다. 아미노산은 통상적으로 측쇄의 전기적 특징에 따라 양으로 하전된 측쇄, 음으로 하전된 측쇄, 비하전 측쇄 또는 소수성 측쇄를 갖는 아미노산으로 분류된다. 예를 들면 보존적 치환은 루이신(Leu)에서 아이소루이신(ile), 알지닌(Arg)에서 라이신(Lys), 페닐알라닌(Phe)에서 트립토판(Trp), 아스파르트산(Asp)에서 글루탐산(Glu), 또는 세린(Ser)에서 트레오닌(Thr), 또는 그 역으로의 치환을 포함한다. 일반적으로 CDR 서열의 보존적 치환은 CDR의 기능에 본질적인 영향을 미치지 않는다.
- [60] 이러한 서열의 치환 방법은 당업계에 공지된 것으로 예를 들면 Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual (Fourth Edition), Cold Spring Harbor Laboratory (2012) N.Y. 를 참조할 수 있다.
- [61] 본원에 따른 항체는 항원결합 단편, 변이체 또는 그 유도체를 포함하는 것으로, 폴리클로날, 모노클로날, 다특이성, 인간, 인간화, 영장류화, 또는 키메라 항체, 단쇄 항체, 에피토프 결합 단편, 예를 들면 Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, Fd, Fvs, 단쇄 Fvs (scFV), 이황화 연결된 Fvs (sdFv), VL 또는 VH 영역을 포함하는 단편을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다. 본원에 따른 항체는 임의의 유형 예를 들면 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY일 수 있으며, 또한 임의의 클래스 예를 들면 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 또는 IgA2일 수 있거나 또는 그 서브클래스일

수 있다.

- [62] 본원의 항체 또는 항체 단편은 키메라 항체일 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "키메라항체"는 가변영역 즉 항원 결합부위와 항체의 불변영역 (경쇄의 경우 CL1, 중쇄의 경우, CH1, CH2, 및 CH3 영역을 포함)의 적어도 일부가 다른 종(species)로부터 유래한 것을 말한다. 예를 들면 가변영역은 마우스유래이고, 불변영역은 인간 유래의 것을 포함할 수 있다. 또는 클래스전환(class switch)된 항체 예를 들면 IgG 유형에서 IgE 유형으로 전환된 항체를 또한 의미한다. 키메라 항체는 통상적으로 재조합 DNA 기술을 통해 제조되며, 예를 들면 Moriison et al. PNAS USA 81 (1984) 6851-6885; 및 미국 특허 제5202238호에 기재된 것을 참조할 수 있다.
- [63] 본원에 따른 일 구현예에서 본원의 항체는 키메라 항체이며, 예를 들면 본원에서 생산된 마우스 항체 유래의 경쇄 및 중쇄 가변영역 부위를 가진 인간 항체로 예를 들면 마우스 중쇄 및 카파 경쇄 가변영역을 인간 IgG4 중쇄 불변영역 및 인간 카파 경쇄 불변영역에 이식(graft)한 것일 수 있다.
- [64] 본원에 따른 일 구현예에서 키메라 항체는 인간유래 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc로부터 선택되는 Fc 영역, 특히 IgG4 Fc를 포함하며, 더욱 특히 Fc 영역에 돌연변이가 도입된 것이다. 돌연변이는 본원의 일 구현예에 따른 IgG4 항체의 중쇄 불변영역의 서열인 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 기준으로 115번째 잔기가 소수성 아미노산에서 산성(acidic) 아미노산으로 치환된 것을 포함하며, 특히 루이신에서 글루탐산으로 치환된 것을 포함하며, 이는 서열번호 10으로 표시된다. Fc(Fragment crystalizable)은 중쇄의 CH2 및 CH3 영역을 일컫는 것이다. 본원에 따른 키메라 항체, 특히 인간 IgG4의 Fc를 포함하는 항체는 Fc가 치환되지 않은 항체와 비교하여 Fcγ 수용체(FcγR)에 대한 결합이 감소되고, 이로 인해 혈소판 자극이 현저히 감소되었다.
- [65] 일 구현예에서 본원에 따른 키메라 항체는 중쇄 가변영역 서열 (서열번호 7) 및 중쇄 불변영역 서열 (서열번호 9 또는 서열번호 10)을 포함하는 중쇄, 및 카파 경쇄 가변영역 서열 (서열번호 8) 및 카파 경쇄 불변영역 서열 (서열번호 11)을 포함하는 경쇄로 이루어진다.
- [66] 본원의 항체 또는 항체 단편은 인간화 항체일 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "인간화 항체"는 항체의 골격은 인간의 항체이고 CDR 영역의 일부는 원래 항체분자가 유래된 종의 CDR 중 항원에 대한 특이적 결합에 필수적인 부분만을 포함하도록 변형된 것을 의미한다. 예를 들면 원숭이, 또는 마우스 유래 항체의 CDR 중 항원에 대한 특이적 결합에 필수적인 부위를 제외한 나머지 CDR 부위와 경쇄 및 중쇄 골격은 인간의 항체로 대체된다. 제조방법은 예를 들면 Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327을 참조할 수 있다.
- [67] 본원의 항체 또는 항체 단편은 모노클론 항체일 수 있다. 모노클론 항체는 골수종 세포를 면역화된 포유류 유래의 비장세포와 융합하여 제조하는 것을 기본으로 하는 것으로 당업계에 다양한 공지된 방법으로 제조될 수 있다. 다른

구현예에서, 본원의 항체는 상술한 하이브리도마에 생산된 항체의 경쇄유래의 하나 이상의 CDR, 및/또는 중쇄유래의 하나 이상의 CDR을 포함하는 항체 단편을 포함한다.

- [68] 나아가 본원에 따른 항체, 항원결합 단편, 변이체 또는 그 유도체는 다양한 목적을 위해 치료제, 프로드럭, 펩타이드, 단백질, 효소, 바이러스, 지질, 생물학적 반응조절제 또는 PEG(polyethylene glycol)와 같은 기능적 물질과 컨쥬게이션 될 수 있다. 컨쥬게이션 되는 물질의 종류에 따라 다양한 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들면 하기의 문헌을 참조할 수 있다: Amon et al. "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al. "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987).
- [69] 항체의 단편은 펩신 또는 파파인으로 처리하여 수득될 수 있다. $F(ab')_2$ 단편은 온전한 항체를 펩신으로 처리하여 수득할 수 있으며, 이를 티올 환원제로 후속 처리하면, 경쇄 및 중쇄 일부를 포함하는 Fab 단편을 수득할 수 있다. Fab 단편은 또한 온전한 항체를 파파인으로 처리하여 수득될 수 있다. 예를 들면 본원 하이브리도마에서 생산된 항체를 펩신 또는 파파인으로 처리하여 $F(ab')_2$ 또는 Fab와 같은 CD154를 특이적으로 인식하는 항체 단편을 제작할 수 있다.
- [70] Fv 단편은 중쇄 및 경쇄의 가변영역만으로 구성된 항체 단편으로 두 가변영역은 화학적가교제 또는 분자간 이황화결합 같은 비공유 또는 공유 결합으로 연결될 수 있으며 (Inbar et al. (1972) PNAS 69:2659-2662), 예를 들면 본원 하이브리도마에서 생산된 항체를 효소 처리하여 중쇄 및 경쇄의 가변영역만을 분리하거나 또는 재조합 DNA 기술을 사용하여, CD154를 특이적으로 인식하는 항체를 제작할 수 있다.
- [71] SCA 단편은 효소 처리 또는 유전공학적으로 제조될 수 있으며, 경쇄의 가변영역 및 중쇄의 가변영역이 폴리펩타이드와 같은 링커에 의해 연결되어 있는 항체 단편이다. ScFv의 제조방법은 예를 들면 US 특허 제4,936,778호 또는 US 특허 제5,892,019호에 기재된 것을 참조할 수 있으며, 본원 하이브리도마에서 생산된 항체를 효소처리하거나 또는 재조합 DNA 기술 예를 들면 상기 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 가변영역을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 벡터를 제작하여, 이를 적절한 세포에서 발현함으로써, CD154를 특이적으로 인식하는 항체를 제작할 수 있다.
- [72] 본원에서 사용된 용어 "결합" 또는 "특이적 결합"은 본원 항체 또는 항체 조성물의 항원에 대한 친화도를 나타내는 것이다. 항원 항체 결합에서 "특이적 결합"은 전형적으로 해리상수(dissociation constant, K_d)가 $1 \times 10^{-6} M$ 미만 또는 $1 \times 10^{-6} M$ 미만 또는 $1 \times 10^{-7} M$ 미만인 경우 비특이적인 배경 결합과 구분될 수 있다. 특이적 결합은 당업계의 공지된 방법, 예를 들면 ELISA, SPR(Surface plasmon

resonance), 면역침전(immunoprecipitation), 공침전(coprecipitation) 등의 방법으로 검출될 수 있으며, 비특이적 결합과 특이적 결합을 구분할 수 있는 적절한 대조군을 포함한다.

- [73] 상술한 바와 같은 온전한 항체 또는 그 단편을 포함하는 본원의 항체는 단량체의 항원 결합능의 적어도 일부를 포함하는 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체 등의 다량체로 존재할 수 있다. 이러한 다량체는 또한 동종다량체, 또는 이종다량체를 포함하는 것이다. 항체 다량체는 다수의 항원 결합 부위를 포함하기 때문에 단량체와 비교하여 항원에 대한 결합능이 우수하다. 항체의 다량체는 또한 다기능성(bifunctional, trifunctional, tetrafunctional) 항체 제작에도 용이하다.
- [74] 본원에서 사용된 용어 "다기능성"이란, 두 가지 이상의 활성 또는 기능 (예를 들면 항원결합능, 효소 활성, 리간드 또는 수용체 결합능)을 갖는 항체 또는 항체 조성물을 일컫는 것으로, 예를 들면 본원의 항체는 효소 활성을 갖는 폴리펩타이드 예를 들면 루시페라제, 아세틸트랜스퍼라제, 갈락토시다제 등과 결합될 수 있다.
- [75] 다기능성 항체는 또한 다가성(multivalent) 또는 다특이성(bispecific, trispecific, 등) 형태의 항체를 포함한다. "다특이성"이라는 용어는 두 개 이상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 가변영역을 포함하는 것이다. 상기 두 가지 이상의 에피토프는 한 가지 항원에 존재할 수 있거나 또는 다른 항원에 존재할 수 있다.
- [76] 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 폴리펩타이드의 전부 또는 일부를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산분자(nucleic acid molecule), 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 형질전환체에 관한 것이다.
- [77] 핵산은 예를 DNA, cDNA, RNA, 또는 재조합 또는 합성된 DNA 또는 RNA를 포함한다. 한 구현예에서, 핵산 분자는 cDNA이다. 핵산은 또한 상응하는 유전체(genomic DNA) 또는 그 단편일 수 있다. 본원에 따른 항체 또는 그 일부 또는 그 단편을 코딩하는 핵산 서열을 아미노산을 코딩하는 핵산서열의 중복성(redundancy)으로 인하여 상이할 수 있으며, 이러한 서열도 본원에 포함된다. 본원에 따른 일구현예에서, 본원에 따른 항체의 중쇄의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 폴리뉴클레오타이드 서열은 각각 서열번호 14, 15 및 16로 나타내고, 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 서열은 서열번호 17로 나타낸다. 또한 본원에 따른 항체 경쇄의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 폴리뉴클레오타이드 서열은 각각 서열번호 18, 19 및 20으로 나타내고, 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 서열은 서열번호 21로 나타낸다.
- [78] 다른 양태에서 본원은 또한 상기 핵산 분자를 발현할 수 있는, 이를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 본원에 사용될 수 있는 벡터는 예를 들면, 파이지, 플라스미드, 복제 가능 또는 복제 불능의 바이러스 또는 레트로바이러스 벡터를 포함한다. 본원에 따른 핵산 분자는 공지된 다양한 벡터에 도입될 수 있다. 예를

들면 원핵세포용 벡터로서 pUC 계열 벡터, pBluescript (Stratagene), pET 계열 벡터(Novagen) 또는 pCRTOPO (Invitrogen) 벡터 등을 포함하며, 진핵세포용 벡터로서, pREP (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMCI neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pdBPVMMTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, plZD35, pLXIN, pSIR (Clontech), pIRES-EGFP (Clontech), pEAK-10 (Edge Biosystems) pTriEx-Hygro (Novagen) 및 pCINeo (Promega) 벡터 등을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.

- [79] 본원에 따른 벡터는 공지된 다양한 원핵 또는 진핵세포에 공지된 형질전환 또는 전달입 방법으로 도입될 수 있다. 세포에 도입시, 숙주세포의 유전체로 삽입될 수 있거나, 또는 엑스트라 크로모솜 형태로 존재할 수 있다.
- [80] 사용될 수 있는 원핵 세포로는 *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces* 및 *Salmonella* 계열에 속하는 세포를 포함하며, 진핵 세포로는 포유류 세포 예를 들면 Hela, HEK293, H9, Jurkat, 마우스 NIH3T3, C127, Cos1, Cos7 및 CV1, 마우스 C2C12, BHK, CHO 세포; *Saccharomyces cerevisiae* 또는 *Pichia pastoris* 와 같은 진균 세포, 초파리 S2 및 *Spodoptera Sf9*와 같은 곤충세포를 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다.
- [81] 본원의 항체는 제조합 방법을 이용하여 공지된 방법대로 생산될 수 있다. 제조합 방법의 경우 본원에 따른 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 서열 및 상기 항체의 경쇄를 코딩하는 항체를 하나 또는 두 개의 발현벡터에 클로닝한 후 진핵 숙주세포에 전달입하여 항체를 발현한 후, 숙주세포 또는 배지로부터 항체를 수득할 수 있다. 이러한 벡터의 제작, 제작된 벡터로부터 세포에서의 단백질의 발현 및 단백질의 분리를 포함하는 제조합 방법은 당업계에 공지되어 있으며 예를 들면 Kaufman, R.J., Mol. (2000) Biotechnol. 16:151-160에 기재된 것 등을 참조할 수 있다. 본원의 항체를 코딩하는 벡터는 적절한 숙주세포 예를 들면 CHO 세포, NS0 세포, SP2/0 세포, HEK293 세포, COS 세포, 이스트 또는 대장균에서 발현될 수 있으며, 항체는 세포의 용해물 또는 배지로부터 수득될 수 있다.
- [82] 본원의 항체 전부 또는 그 단편을 코딩하는 핵산 서열은 본원에 개시된 하이브리도마 세포로부터 통상의 방법대로 분리된 후 그 서열이 분석될 수 있다. 이어 분리된 핵산 서열을 상술한 바와 같은 적절한 발현벡터에 클로닝 한 후 항체를 생산하지 않는 HEK293 세포, CHO 세포 또는 NS0 세포에 전달입하여 숙주세포에서 제조합 항체를 생산할 수 있다. 본원의 항체 또는 그 단편을 코딩하는 핵산은 프로모터, 번역개시부위, 3' 비번역부위, 폴리아데닐화 신호 및 전사 종결 신호를 포함하는 발현벡터로 도입된다. 경쇄 및 중쇄는 하나의 벡터 또는 별도의 벡터에 도입될 수 있다.
- [83] NS0 세포에서의 항체의 발현은 예를 들면 Barnes et al. (2000) Cytotechnology 32:109-123 및 Norderhaug et al. (1997) J. Immunol. Methods 204:77-87 등에 기재된 것을 참조할 수 있다. HEK 세포에서의 발현은 Schlaeger, E.-J. (1996) J. Immunol.

Methods 194:191-199 등에 기재된 것을 참조할 수 있다.

- [84] 본원의 항체는 하이브리도마를 포함하는 온전한 세포, 또는 그 세포 용해물(lysate)이나 배지에 존재할 수 있으며, 이로부터 일부 또는 실질적으로 순수한 형태로 정제 분리될 수 있다. 정제는 항체 이외의 세포의 다른 부산물 예를 들면 세포구성물, 핵산, 단백질 등을 제거하기 위한 것으로, 알칼라인/SDS 처리, CsCl 분리, 컬럼크로마토그래피, 아가로스전기영동과 같은 공지된 방법을 이용하여 수행될 수 있으며, 예를 들면 Ausubel et al.(eds), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York 최근판을 참조할 수 있다.
- [85] 모노클론 항체는 예를 들면 본원에 개시된 하이브리도마 세포를 배양한 후, 이의 배지로부터 통상의 방법 예를 들면 단백질 A-세파로즈, 하이드록시아파타이드 크로마토그래피, 투석, 또는 친화 크로마토그래피와 같은 방법을 사용하여 분리될 수 있다.
- [86] 다른 양태에서 본원은 본원에 기술된 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 약학조성물에 관한 것으로, 약학적으로 허용 가능한 담체, 선택적으로 부형제 또는 안정화제와 함께 제형화된다.
- [87] 본원에서 사용된 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 생리적으로 적합한 물질로, 예를 들면 임의의 용매, 분산매질, 코팅제 항박테리아 및 항진균제, 등장액, 흡수/재흡수 지연제, 등과 같은 물질을 포함한다. 한 구현예에서, 담체는 특히 주사 및 주입에 적합한 물질이 사용된다. 예를 들면 약학적으로 허용 가능한 담체는 멸균수용액 또는 등장 완충 식염수 또는 분산액 및 멸균 주사액 제조용 멸균 분말을 포함할 수 있으며, 당업자라면 조성물에 포함되는 활성성분의 종류에 따라 적절한 제제를 선택할 수 있을 것이다.
- [88] 본원의 조성물은 당업계에 공지된 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 목적하는 효과에 따라 투여 방식 및 경로가 상이할 수 있음은 당업자에게 자명한 것이다. 본원의 항체 또는 그 단편 또는 이를 포함하는 조성물은 예를 들면 정맥 주입, 일시주사(bolus injection) 방식의 비경구 투여, 근육 또는 피하 주사의 경로로 투여될 수 있다. 또한 본원 조성물은 투여 경로와 상관없이 약학적으로 허용가능한 적절한 투약 형태, 예를 들면, 수화된 형태 예를 들면 수용액, 또는 동결건조된 형태로 제형화될 수 있다.
- [89] 본원에 개시된 CD154를 특이적으로 인식하는 폴리펩타이드는 CD154의 CD40와의 상호작용을 효과적으로 억제한다. 그리고 CD154-CD40의 상호작용을 억제하면 T 세포 활성화 및 항체 생성이 모두 억제되어 세포성 면역반응 및 체액 면역 반응을 모두 억제할 수 있다. T 세포 활성화를 위해서는 CD154를 통한 보조자극신호(costimulatory signal) 전달이 필수적이며, 또한 B 세포 활성화를 위해서는 CD40을 통한 신호전달이 필요하다.
- [90] 특히, B 세포 활성화 및 항체 생산 과정에서 항-CD154 항체는 다음 세 단계에서 반응을 억제할 수 있다(J Clin Invest. 2003;112:1480-2): 활성화된 T 세포에 의한 B

세포 도움; 종자중심(germinal center) 생성; 및 종자중심내에서 T 세포-B 세포 상호작용.

- [91] 또한 CD154-CD40의 상호작용을 억제하는 항-CD154 항체의 효과가 보고된 질환으로는 전신홍반루푸스 (Boumpas et al. (2003) *Arthritis Rheum.* 48:719-727, Kelsoe (2003) *J Clin Invest.* 112:1480-1482), 면역성저혈소판자색반증 (Kuwana et al. (2004) *Blood* 103:1229-1236), 류마티스관절염 (Durie et al. (1993) *Science* 261:1328-1330), 다발경화증 (Nagelkerken et al. (2004) *J Immunol.* 173:993-999) 등의 자가면역질환의 치료 혹은 예방과, 신장 (Kirk et al. (1999) *Nat Med.* 5:686-689, Schuler et al. (2004) *Transplantation* 77:717-726), 피부, 심장, 췌도 (Kirk et al. (2001) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 356:691-702) 이식 거부반응 및 이식편대숙주반응 (Seung et al. (2000) *Blood* 95:2175)의 억제 등이 있다. 특히, 전신홍반루푸스 (Boumpas et al. (2003) *Arthritis Rheum.* 48:719-727, Kelsoe (2003) *J Clin Invest.* 112:1480-1482), 면역성저혈소판자색반증 (Kuwana et al. (2004) *Blood* 103:1229-1236)은 대표적인 항체 매개 자가면역질환으로서, 환자에서 항-CD154 항체의 치료 효능이 입증되었다. 또한 Rhesus 및 *Cynomolgus* 원숭이 신장이식 개체에서 항-CD154 항체의 이식거부반응 억제 효능이 입증되었다 (Kirk et al. (1999) *Nat Med.* 5:686-689, Schuler et al. (2004) *Transplantation* 77:717-726). 또한, 본원에서 항-CD154 항체가 휴미라에 대한 항-약물항체 생성 반응도 억제할 수 있음을 확인하였다.
- [92] 따라서, 본원에 따른 항체는 CD154-CD40 상호작용을 효과적으로 억제할 수 있어, T 세포 활성화 및 항체 생성이 모두 억제되어 상술한 항-약물 항체 생성 반응, 자가면역질환, 이식거부반응 및 이식편대숙주 질환의 억제에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [93] 나아가 본원에 따른 CD154를 특이적으로 인식하는 폴리펩타이드는, 기존의 항체가 혈소판 자극에 의한 혈전 생성 부작용으로 임상에 적용되지 못 하고 있는 것과 달리, 본원에 따른 항-CD154 항체는, Fc 부분의 특정 잔기 치환을 통해 FcγR에 대한 친화도를 떨어뜨림으로써 혈소판 활성화 및 혈전 생성 부작용이 발생하지 않는 장점이 있어, 임상 적용에 매우 유리하다.
- [94] 따라서 본원에 기술된 폴리펩타이드, 항체 또는 그 항원 결합 단편, 또는 이를 포함하는 약학조성물은 T-세포 또는 항체 매개된 면역질환의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다.
- [95] 이런 측면에서 본원에서 사용된 용어, T-세포 또는 항체 매개된 면역질환 또는 증상은 전신홍반루푸스, 면역성저혈소판자색반증, 류마티스 관절염 또는 다발경화증 등을 포함하는 자가면역질환, 자가 또는 타가를 포함하는 동종 또는 이종의 장기, 조직 또는 세포 이식에 대한 거부 반응, 이식편대숙주 질환, 및 항-약물 항체 반응 및 을 포함한다.
- [96] 본원에 따른 다른 구현예에서는 항-약물 항체 형성을 억제한다. 항-약물 항체 반응이란 특정 약물, 예를 들면 치료용 항체 예를 들면 휴미라(Humira, Abbott

사)와 같은 치료용 항체 투여시 대상자에서 약물에 대한 항체(anti drug antibody, ADA)가 생성되는 현상으로, 치료용 항체의 약효를 약화 또는 소멸시킨다.

휴미라를 환자에게 투여하면 약 28%에서 ADA가 생기고, ADA-음성 환자의 34%에서 Humira의 치료 효과가 있지만, ADA-양성 환자는 4%에서만 Humira의 효과가 있는 것으로 나타났다 (Bartelds et al. (2011) JAMA 305:1460-1468).

- [97] 따라서 본원에 따른 항체는 이러한 치료용 항체와 함께 사용시 항체의 발생을 억제하여, 치료용 항체의 치료 효과를 증대시킬 수 있다. 또한 Darbepoetin alpha, Interferons, Anakinra, Recombinant FVIII 또는 IX, Alglucosidase alfa 등과 같은 생물약품에서도 ADA의 발생율이 3~89% (Chirmule et al. (2012) AAPS J. 14:296-302) 에 이르며, 이런 약물의 치료효과 증대를 위해서도 효과적으로 사용될 수 있다.
- [98] 본원에 따른 일구현예에서 항체 매개된 면역반응에 의존성이 높은 증상 또는 질환의 치료에 특히 효과가 높다. 이러한 항체 매개된 면역반응에 의존성이 높은 것으로 알려진 예를 들면 엔브렐 또는 휴미라와 같은 항체 약물에 대한 항체 생성의 억제에 유용하게 사용될 수 있다.
- [99] 또 다른 구현예에서는 항체 매개된 면역반응에 의존성이 높은 질환으로 알려진, 전신홍반루푸스, 면역성저혈소판자색반증 등과 같은 자가면역 질환의 조절, 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다.
- [100] 본원에서 사용된 용어 "치료"는 본원의 항체 또는 조성물을 포유동물에 투여하여 T-세포 또는 항체 매개된 면역질환 또는 질병의 진행을 늦추거나 이로 인한 생리적 변화 또는 증상을 억제, 경감 또는 제거하는 것을 의미한다.
- [101] 본원에 사용된 용어 "예방"은 본원의 항체 또는 조성물을 포유동물에 투여하여 T-세포 또는 항체 매개된 면역질환 또는 질병이 발병되지 않도록 하거나, 투여되지 않은 경우와 비교하여 발병을 늦추는 것을 의미한다.
- [102] 따라서 본원의 항체 또는 그 단편 또는 이를 포함하는 조성물은 질환이 이미 발생한 대상자는 물론, 질환이 발병할 가능성이 높은 대상자, 이러한 질환의 예방이 필요한 대상자에게 투여될 수 있다.
- [103] 본원에서 사용된 용어 "대상자"는 인간, 비인간 영장류, 기타 포유류를 포함하는 것으로, 특히 T-세포 또는 항체 매개된 면역질환의 치료 또는 예방이 필요한 대상자 또는 환자를 의미한다.
- [104] 본원에 따른 폴리펩타이드 또는 그 단편 또는 이를 유효성분으로 포함하는 약학조성물의 유효 투여량 및 투여기간은 특정 환자, 조성물에 포함된 항체의 종류 및 투여방식 등을 고려하여 목적하는 치료효과에 따라 변할 수 있으며, 환자에게 독성을 유발하지 않아야 한다. 환자별 실제 투여량은 사용되는 조성물의 활성도, 투여경로, 투여시간, 분비속도, 함께 사용하는 다른 약물, 성별, 나이, 몸무게, 전반적 건강상태, 기저질환 등과 같은 다양한 요인을 고려하여 선별해야 한다. 한 구현예에서 본원의 항체는 질환의 치료 또는 예방을 위해 약 1 내지 100 mg/kg 체중, 예를 들면 약 10, 20, 30, 40, 또는 50 mg/kg 체중의 양으로

- 투여될 수 있으나, 경우에 따라 많게는 약 100 mg/kg의 양으로 투여될 수 있다.
- [105] 본원에 따른 항체 또는 그 단편 또는 이를 유효성분으로 포함하는 약학조성물의 투여간격은 투여되는 항체의 반감기를 고려하여 적절한 간격 일단위, 주단위, 달단위로 투여될 수 있다.
- [106] T-세포 또는 항체 매개된 면역질환의 조절을 위해 당업계에서 공지된 기존의 면역조절제와 함께 병합 사용될 수 있다. 예를 들면 체도이식, 또는 장기이식에는 MD-3 (ICAM-1에 대한 항체, 대한민국 등록특허 제1434029호에 개시된 것을 참고), Tacrolimus, Rapamycin, 또는 Mycophenolate mofetil 등과 병합 사용될 수 있다.
- [107] 이런 측면에서 본원은 또한 본원의 항체 또는 그 단편 또는 이를 포함하는 조성물을 T-세포 또는 항체 매개된 면역질환의 치료 또는 예방이 필요한 대상자에게 투여하는 단계를 포함하는 전신홍반루푸스, 면역성저혈소판자색반증, 류마티스관절염, 다발경화증을 포함하는 자가면역질환, 체도, 신장, 심장, 피부를 포함하는 장기 또는 조직 이식에 대한 거부 반응, 또는 이식편대숙주 질환을 포함하는 T-세포 또는 항체 매개된 면역질환 또는 증상 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다.
- [108] 또 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 CD154를 특이적으로 인식하는 폴리펩타이드, 항체 또는 항원결합단편, 또는 키메라 항체를 치료적으로 유효한 양으로 대상체, 또는 세포 또는 조직에 투여하는 단계를 포함하는 항-약물 항체 생성 억제방법, 또는 항체 매개된 면역 반응 조절 또는 억제 방법, 또는 CD154 의존 T 세포 매개된 면역반응 억제 방법에 관한 것이다.
- [109] 본 방법에 사용되는 항체 또는 조성물, T-세포 또는 항체 매개된 면역질환, 투여방법, 투여량 및 대상자는 상술한 바와 같다.
- [110] 본 방법에는 다른 항체는 T-세포 또는 항체 매개된 면역질환의 치료 또는 예방을 위해 면역억제제와 함께 사용될 수 있다.
- [111] 즉, 본원에 따른 방법은 본원의 항체 또는 그 단편 이외에, 추가로 T-세포 또는 항체 매개된 면역질환의 치료 또는 예방에 필요한 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [112] 하지만 상기 면역조절제가 함께 사용되는 경우라 하더라도, 본원에 따른 항체는 사용되는 면역조절제의 종류 및 사용량이 감소되거나 또는 일정 기간 경과 후에 면역조절제의 사용이 필요하지 않을 수 있다.
- [113] 상술한 바와 같이 본원에 따른 CD154를 특이적으로 인식하는 폴리펩타이드는 이의 CD40와의 상호작용을 효과적으로 억제하여, T 세포 활성화 및 항체 생성을 모두 억제할 수 있다.
- [114] 따라서 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 CD154를 특이적으로 인식하는 폴리펩타이드, 항체 또는 항원결합단편, 또는 키메라 항체를 포함하는 항-약물 항체 생성 억제용 키트, 또는 항체 매개된 면역 반응 억제용 키트 또는 CD154 의존 T 세포 매개된 면역반응 억제용 키트를 제공한다. 본원에 따른 키트에

포함되는 구성은 상술한 바를 참고할 수 있으며, 상술한 작용이 필요한 항-약물 항체 생성 억제와 같은 항체 매개된 면역 반응의 억제, CD154 의존 T 세포 매개된 면역반응의 억제가 필요한 다양한 용도로 사용될 수 있다.

[115] 본원에 따른 방법에 사용되는 CD154 결합 폴리펩타이드 및 투여방법 등은 앞서 기재한 바를 참고할 수 있다.

[116] 이하, 실시예를 통하여 본원을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본원을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본원의 요지에 따라 본원의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본원이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[117] 실시예

[118] 실시예 1. 동물실험

[119] *Cynomolgus macaque*(*Macaca fascicularis*)는 서울대학교병원의 비인간 영장류 센터 혹은 안정성평가연구소(전라북도 정읍시)에서 사육되었다. 실험에 사용한 원숭이는 30 내지 40개월령이었으며, 체중은 2.5 내지 3.5kg이었다. 본 연구의 일부는 서울대학교 병원 동물실험윤리위원회(IACUC)의 승인을 받아 국립건강원의 지침에 따라 수행되었으며, 일부는 서울대학교에서 안정성평가연구소에 연구를 위탁하여 국립건강원의 지침에 따라 수행되었다.

[120] 실시예 2. 항-인간 CD154 항체의 제조

[121] 항-인간 CD154 항체를 제조하기 위하여 인간 유전자 재조합 용해성 CD154 단백질 (sCD40L, Catalog Number:310-02 Peprotech, NJ, USA)을 BALAB/c마우스에 면역하였다. 암컷 Balb/c 마우스 (6~8주, 17~25g; KOATECH)에게 상기 단백질 100 μ g을 애주번트 (1차 complete Freund, 2차 및 3차는 incomplete Freund)에 유화하여 2주 간격으로 3회 복강투여 하였다. 2주 후에, 면역화된 마우스 복강에 100mg의 CD154 단백질을 주사한 후, 3일 후에 비장을 적출하여 비장세포를 분리하였다.

[122] 단클론 항체의 제조를 위해 상기 10⁸개의 비장세포를 9-아자구아닌에 저항성이 있는 10⁷개의 SP2/0-Ag14 마우스 골수종 세포 (ATCC CRL-1581)와 50% 폴리에틸렌글리콜 4000 (Roche)을 이용하여 융합하였다 (Koeler & Milstein, 1975, Nature 256: 495-497).

[123] 융합 후 세포를 PBS로 1회 세척한 후 20% 소태아혈청, 100 μ M 하이포잔틴, 0.44 μ M 아미노프테린 및 16 μ M 타이미딘 (HAT 배지, Sigma)을 포함하는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 재현탁한 후 4개의 96웰 플레이트에 접종한 후 37°C 5% CO₂ 조건에서 콜로니가 형성되도록 2주간 배양하였다. 이어 각 웰의 배지를 채취하여 인간 CD154 유전자가 전달 이입된 Jurkat D1.1 세포(ATCC CRL-10915; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 이용하여 항체 발현여부를 스크리닝 하였다. 채취한 배양배지를 Jurkat D1.1 세포와 4°C에서 30분간 반응시킨 후, 0.05% Tween을 포함하는 PBS로 세척한 후 FITC-접합된 항-마우스 IgG 항체(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)로 4°C에서

30분간 반응시키고 염색된 세포 콜로니를 선별하였다.

- [124] 음성대조군으로는 FITC-접합된 항-마우스 IgG 항체만 염색하였다. 선별된 콜로니를 한계희석법을 이용하여 웰당 0.5개의 세포가 되도록 각 웰에 분주하여 서브클로닝을 수행하여 항체를 생산하는 하이브리도마 클론을 수득하였다. 생성된 하이브리도마 중 인간 CD154에 결합하는 마우스 항체를 생산하는 클론을 수득하여 RD-05라 명명하였다 (도 1 참조).
- [125] 상기와 같이 제조된 항체의 결합력은 CD154 전달이입된 Jurkat D1.1 세포를 사용하여 제조사의 방법대로 FACS Aria(Becton Dickinson)를 사용하여 유세포분석으로 측정하였다. 도 1에 기재된 바와 같이 FITC 결합된 항-마우스 면역글로불린 이차항체로만 염색한 음성대조군에 비해서, RD-05 마우스 항체와 반응 후, 이차항체로 염색한 실험군에서는 양성 반응을 나타나는 것을 알 수 있다.
- [126] 실시예 3. 항-인간 CD154 항체의 가변영역 서열 결정
- [127] 상술한 RD-05 항체의 중쇄 가변영역(V_H)과 경쇄 가변영역(V_L)을 포함하는 중쇄 및 경쇄의 CDR 서열을 결정하기 위해, 그 유전자를 다음과 같이 클로닝 하였다.
- [128] 유전자의 클로닝을 위해 RNA 미니프랩 키트(Qiagen)를 제조사의 방법대로 사용하여 RD-05 하이브리도마 세포에서 RNA를 추출한 후, PCR (Novagen Mouse Ig primer set #69831, MuIgV_H5'-F, MuIgGV_H3'-2 and MuIgkV_L5'-B, MuIgkV_L3'-1)을 수행하여 cDNA를 합성하였다.
- [129] 중쇄 cDNA를 합성을 위한 프라이머 및 PCR 조건은 다음과 같다: forward MuIgVH5'-F: 5'-ACTAGTCGACATGAACCTTYGGGYTSAGMTTGRTTT-3'(Y: C 또는 T; S: C 또는 G; M: A 또는 C; 및 R: A 또는 G); reverse MuIgGVH3'-2: 5'-CCCAAGCTTCCAGGGR4CCAR4K5GGATAR4ACI6GR4TGG-3'(R: A 또는 G; K:G,T 및 I:INOSINE); PCR 조건: 94°C 4min; 94°C 45sec, 52°C 45sec, 72°C 1min, 35회; 72°C 7min; 4°C 정지.
- [130] 이어 TA 클로닝 키트(Promega)인 pGEM-T easy vector를 제조사의 방법대로 사용하여 상기 PCR 산물을 클로닝 한 후 마우스 중쇄 가변영역을 찾기 위해 IMGT (THE INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS INFORMATION SYSTEM <http://imgt.cines.fr>)의 IMGT Repertoire(IG and TR)를 이용한 단백질 디스플레이를 하여 RD-05의 중쇄 가변영역이 시작되는 프레임워크 1을 찾아낸 다음 RD-05 중쇄 전체의 유전자 서열을 결정하기 위한 표준 PCR (어닐링 온도 55°C 1 min: 95°C 5min, 95°C 1min, 55°C 1min, 72°C 1min, 2번부터 37회; 72°C 5min, 4°C 정지)을 수행하였다. 사용된 프라이머는 forward 5'-CTCGAGATGAGGGTGTAAATTCTTTTGTGGCTGTTTACA-3'와 reverse 5'-GCCCTTGGTGAAGCAGATGAGACGGTAACCGTGGTCCC-3'이고 다시 서열 분석을 위해 TA 클로닝 키트 pGEM-T easy vector를 사용하여 클로닝 한 후 IMGT/V-QUEST를 이용하여 확인한 CDR 영역의 서열을 결정하였으며, 중쇄

가변영역 CDRH1, 2 및 3의 서열은 각각 서열번호 1 내지 3으로 나타낸다.
 서열번호 1: GYSITSDYA; 서열번호 2: ITYSGTT; 서열번호 3:
 ARSPYYGPWYFDV. 중쇄 가변영역 아미노산 서열 및 핵산서열은 각각
 서열번호 7 및 17로 개시된다.

- [131] 경쇄 cDNA를 합성을 위한 프라이머 및 PCR 조건은 다음과 같다: forward
 MuIgkVL5'-B: 5'-GGGAATTCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT- 3'; reverse
 MuIgkVL3'-1: 5'-CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA-3'; PCR 조건:
 94°C 4min, 94°C 45sec, 52°C 45sec, 72°C 1min, 2번부터 35회; 72°C 7min, 4°C 정지.
- [132] RD-05 경쇄 유전자는 pGEM-T easy vector를 사용하여 클로닝 한 후 마우스
 면역글로불린 가변영역을 찾기 위해 IMGT Repertoire(IG 및 TR)에서 단백질
 디스플레이를 하여 RD-05의 경쇄 가변영역이 시작되는 프레임워크 1을
 찾아내고 RD-05경쇄 전체의 유전자 서열 결정을 위한 표준 PCR (95°C 5min, 95°C
 1min, 55°C 1min, 72°C 1min, 2번부터 37회; 72°C 5min, 4°C 정지)을 수행하였다.
 사용된 프라이머는 forward
 5'-CTCGAGATGGAGACAGATACACTTTTGCTATGGGTTCTG -3' reverse
 5'-CTGGTGCCGCCACAGTCCGTTTAATTTCCAGCTTAGTCCC -3'이고 다시
 TA 클로닝 키트 pGEM-T easy vector를 사용하여 클로닝 한 후 IMGT/V-QUEST를
 이용하여 확인한 CDR 영역의 서열을 결정하였으며, 경쇄 가변영역 CDRL1, 2 및
 3의 서열은 각각 서열번호 4 내지 6으로 나타낸다. 서열번호 4: QSVDYDGDSY;
 서열번호 5: AAS; 서열번호 6: QQSNEPD. 경쇄 가변영역 아미노산 서열 및
 핵산서열은 각각 서열번호 8 및 21로 개시된다.
- [133] 실시예 4. 항-인간 CD154 항체가 인지하는 CD154 항원 에피토프 결정
- [134] 총 3종의 CD154 항원의 일부 펩티드와 ovalbumin의 접합체(conjugate)를
 펩트론(대전)에서 제작하였다. 양성대조군으로 인간 유전자 재조합 CD154-Fc
 융합 단백질(Adipogen)을 사용하였다. 펩티드-ovalbumin 접합체와 CD154 항원을
 10% SDS-PAGE한 후, 마우스 RD-05 항체로 웨스턴 블롯을 실시하였다. 도 2는
 웨스턴 블롯 결과로, 레인1은 재조합 CD154 단백질, 레인2는
 Ovalbumin-SPGRFERILLRA 이고, 레인3은 Ovalbumin-GRFERILLRA 이고,
 레인4는 Ovalbumin-SPGRFERILLR 이다. 본 실시예에서 결정된 에피토프는
 CD40 리간드 부위로서 서열번호 22의 서열을 기준으로 197번 내지 208번 잔기에
 해당하는 것으로, 앞서 언급한 바와 같이 CD40와 접촉하는 제2 친수성 부위,
 그리고 CD40와 전하 상호작용이 일어나는 부위에 포함된다. 따라서 본원에서
 제작된 항체가 인식하는 에피토프는 제2 친수성 부위 및 전하 상호작용 부위의
 전부 또는 일부를 포함하는 것이라 할 수 있고, 이런 측면에서 본원에 따른
 에피토프는 상기 제2 친수성 부위 중 본원에서 규명된 에피토프에 포함된 G199,
 R200 및 R203을 포함하며, 여기에 추가로, 제2 친수성 부위 Q232, 전하
 상호작용부위 R207 또는 E230 중 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [135] 실시예 5. 인간 IgG4 키메라 항-인간 CD154 항체 제작

- [136] 상기 제조된 항체의 가변영역 유전자의 클로닝을 위해 RNA 미니프렙 키트 (Qiagen)를 제조자의 방법대로 사용하여 RD-05 하이브리도마 세포에서 RNA를 추출한 후, PCR (Novagen Mouse Ig primer set #69831, MuIgV_H5'-F, MuIgGV_H3'-2 및 MuIgκV_L5'-B, MuIgκV_L3'-1)을 수행하여 가변영역 cDNA를 합성하였다. 중쇄 가변영역 cDNA를 합성을 위한 프라이머 및 PCR 조건은 다음과 같다: forward MuIgVH5'-F: 5'-ACTAGTCGACATGAACCTTYGGGYTSAGMTTGRTTT-3'(Y: C 또는 T; S: C 또는 G; M: A 또는 C; R: A 또는 G); reverse MuIgGVH3'-2: 5'-CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACIGR4TGG-3'(R: A 또는 G; K: G 또는 T; I: INOSINE); PCR 조건: 94°C 4min; 94°C 45sec, 52°C 45sec, 72°C 1min, 35회; 72°C 7min; 4°C 정지. 경쇄 가변영역 cDNA를 합성을 위한 프라이머 및 PCR 조건은 다음과 같다: forward MuIgκVL5'-B: 5'-GGGAATTCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT-3'; reverse MuIgκVL3'-1: 5'-CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA-3'; PCR 조건: 94°C 4min; 94°C 45sec, 52°C 45sec, 72°C 1min, 35회; 72°C 7min; 4°C 정지.
- [137] 상기와 같이 1차로 PCR을 수행하여 cDNA를 찾은 후, IMGT에서 VH영역이 시작되는 서열을 확인 후 다음의 프라이머를 사용하여 RD-05의 가변영역을 증폭하였다:
- [138] RD-05 V_H 영역 Forward: 5'-CTCGAGATGAGGGTGTTAATTCTTTTGTGGCTGTTTACA-3'; RD-05 V_H 영역 Reverse: 5'-GCCCTTGGTGGAAGCAGATGAGACGGTAACCGTGGTCCC-3'; RD-05 V_L 영역 Forward: 5'-CTCGAGATGGAGACAGATACTTTTGCTATGGGTCTCTG-3', RD-05 V_L 영역 Reverse: 5'-TGGTGCCGCCACAGTCCGTTTAATTTCCAGCTTAGTCCC-3'. PCR 조건은 다음과 같다: 94°C 4min; 94°C 45sec, 52°C 45sec, 72°C 1min, 35회; 72°C 7min; 4°C 정지.
- [139] 인간 IgG4 유전자의 클로닝을 위해 우선 총 RNA를 RNeasy 포유류 총 RNA 미니프렙 키트 (Qiagen)를 제조자의 방법대로 사용하여 말초혈액단핵구에서 추출한 후, 다음과 같이 염기서열 특이적 프라이머와 역전사효소를 이용하여 역전사 PCR를 수행하여 불변영역 cDNA를 합성하였다. cDNA를 합성을 위한 프라이머는 인간 IgG4 중쇄 염기서열에 특이적인 프라이머 (Forward : 5'-GTTACCGTCTCATCTGCTTCCACCAAGGGCCCCCTCCGTG-3' ; Reverse : 5'-GAATTCTCATTTGCCCAGGCTCAGGGACAGGGACTTCTG-3') 또는 인간 경쇄 카파 염기서열에 특이적인 프라이머 (Forward: 5'-CTGGAAATTAACGGACTGTGGCGGCACCATCCGTTTTT-3', Reverse: 5'-GAATTCTCAACATTCGCCCCGTGTTAAAGCTTTTTGTGAC-3')를 사용하였다. PCR 조건은 다음과 같다: 94°C 4min; 94°C 45sec, 52°C 45sec, 72°C 1min, 35회; 72°C 7min; 4°C 정지.

- [140] 중쇄 가변영역과 인간 IgG4 불변영역을 잇는 겹침 PCR, 경쇄 가변영역과 인간 경쇄 카파영역을 잇는 겹침 PCR은 다음의 프라이머를 사용하였다.
- [141] RD-05 V_H 영역 Forward:
 5'-CTCGAGATGAGGGTGTAAATTCTTTTGTGGCTGTTTACA-3'; 인간 IgG4 불변영역 C_H 영역 Reverse:
 5'-GAATTCTCATTTGCCCAGGCTCAGGGACAGGGACTTCTG-3'; RD-05 V_L 영역 Forward: 5'-CTCGAGATGGAGACAGATACTTTTGCTATGGGTCTG-3', 인간 경쇄 카파 C_L 영역 Reverse: 5'-GAATTCTCAACATTCGCCCCTGTAAAGCTTTTGTGAC-3'. 겹침 PCR 조건은 다음과 같다: 94°C 4min; 94°C 1min, 61°C min, 72°C 1min, 35회; 72°C 5min; 4°C 정지.
- [142] 또한 인간 IgG4의 중쇄 불변영역(constant region)의 115번 잔기가 루이신에서 글루탐산(L115E)으로 치환된 RD-05 항체(RD-05(L115E))를 다음과 같이 제조하였다. 이를 위해 중쇄 가변영역을 포함하여 인간 IgG4 불변영역 115번 잔기까지에 해당하는 유전자를 PCR로 증폭시키고, 115번째 잔기에 해당하는 핵산부터 나머지 중쇄 불변영역을 PCR로 증폭시킨 다음 겹침 PCR을 시행하였다. PCR 증폭 프라이머로는 RD-05 V_H 영역 Forward:
 5'-CTCGAGATGAGGGTGTAAATTCTTTTGTGGCTGTTTACA-3'; 인간 IgG4 불변 115 영역 C_H Reverse:
 5'-CAGGAACACGGAAGGTCCGCCTTCAAATTCAGGGGCAGG-3' 인간 IgG4 불변 115 영역 C_H Forward:
 5'-CCCTGCCCTGCCCCTGAATTTGAAGGCGGACCTTCCGTG-3' 인간 IgG4 불변영역 C_H Reverse:
 5'-GAATTCTCATTTGCCCAGGCTCAGGGACAGGGACTTCTG-3'을 사용하였고 PCR 조건은 다음과 같다: 94°C 4min; 94°C 1min, 61°C min, 72°C 1min, 35회; 72°C 5min; 4°C 정지.
- [143] 겹침 PCR 프라이머는 RD-05 V_H 영역 Forward:
 5'-CTCGAGATGAGGGTGTAAATTCTTTTGTGGCTGTTTACA-3'; 인간 IgG4 불변영역 C_H Reverse:
 5'-GAATTCTCATTTGCCCAGGCTCAGGGACAGGGACTTCTG-3'를 사용하였으며, 겹침 PCR 조건은 증폭 PCR 조건과 같다.
- [144] 중쇄 및 경쇄 키메라 유전자는 pGEM®-T easy vector에 TA 클로닝 키트(Promega)를 사용하여 클로닝 한 후 서열을 분석하였다.
- [145] pCDNA3.3™ 포유류 발현 벡터(Invitrogen)에 삽입된 중쇄 키메라 유전자의 경우 클로닝 산물을 XhoI/EcoRI으로 절단하고, pOptiVEC™ (Life Technology, USA) 벡터에 클로닝된 경쇄 키메라 유전자는 XhoI/EcoRI으로 절단하여 벡터 구축물의 염기서열을 확인하였다(도 4).
- [146] DHFR 음성인 CHO-DG44 세포는 구입하여 사용하였다 (Invitrogen). 상기

세포는 7% 소태아혈청 (GIBCO), 리보뉴클레오사이드 및 데옥시리보뉴클레오사이드를 포함하는 α -MEM 배지에서 배양하였다. CHO-DG44 세포에 Effectene (Qiagen) 전달이입 시약을 사용하여 pCDNA3.3™, pOptiVEC™ 벡터의 전달이입을 수행하였다. 전달이입 하루 전에 CHO-DG44 세포를 2ml 배지를 포함하는 6웰 플레이트에 2×10^5 세포/ml의 농도로 파종하였다. 전달이입 시, 10 μ l Effectene™ 전달이입 시약을 DNA-enhancer 혼합물 (100 μ l EC 완충액 및 3.2 μ l enhancer 중에 0.4 μ g 플라스미드)에 추가하였다. 상기 플라스미드 DNA와 Effectene™ 전달이입 시약 용액의 혼합물을 상기와 같이 하룻밤 배양된 CHO-DG44 세포에 추가한 후 37°C에서 배양하였다. 3일 후에 상층액에 대하여 ELISA 분석을 수행하였다.

- [147] 안정적으로 전달이입된 세포는 리보뉴클레오사이드 및 데옥시리보뉴클레오사이드를 포함하지 않는 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 보충된 α -MEM 배지에서 선별하였다. 리보뉴클레오사이드 및 데옥시리보뉴클레오사이드를 포함하지 않는 배지는 DHFR이 없는 세포의 성장을 막는다. 선별된 세포는 중쇄발현 세포의 경우 400 μ g/ml G418의 존재하에서, 경쇄발현 세포의 경우 1,000nM 메토티리세이트 (MTX)의 존재하에서 FBS를 포함하지 않는 PowerCHO2 배지 (Lonza, USA)에서 적응하였다. 이어 100mm dish에서 10일 이상 배양한 후, 단일 콜로니를 수확하여 FBS를 포함하지 않는 PowerCHO2 배지를 포함하는 96웰 플레이트로 옮겼다. 항체를 생산하는 세포를 스크리닝 한 후, 1차, 2차 3차 서브클로닝하고 항체 생산 농도가 높은 세포를 PowerCHO2™ (Lonza) 배지에서 4×10^5 생세포/ml의 농도로 엘렌마이어 플라스크에서 배양하였다. 적응 후 상층액으로부터 단백질을 사용하여 항체를 분리 정제하였다.

- [148] 상기와 같이 제조된 IgG4 및 IgG4(L115E) RD-05 키메라 항체의 결합력은 CD154 전달이입된 Jurkat D1.1 세포를 사용하여 제조사의 방법대로 FACS Aria(Becton Dickinson)를 사용하여 유세포분석으로 측정하였다. 도 5에 기재된 바와 같이 FITC 결합된 항-인간 면역글로불린 이차항체로만 염색한 음성대조군에 비해서, IgG4 혹은 IgG4(L115E) RD-05 키메라 항체와 반응 후, 이차항체로 염색한 실험군에서는 양성 반응을 확인할 수 있었다.

- [149] 실시예 6. 항-인간 CD154 항체의 항원에 대한 친화력(affinity) 결정

- [150] 상기와 같이 제조한 RD-05 마우스 항체와 IgG4 및 IgG4(L115E) RD-05 키메라항체가 인간 CD154 항원에 대한 부착 친화력(K_D)을 우정 BSC(경기도 수원)에 의뢰하여 SPR 방법으로 측정하였다. 10mM sodium acetate pH 6.0 immobilization buffer에 17.5 μ g/ml로 녹인 재조합 인간 CD154 단백질을, CMDH gold chip(Cat# 13206066, Reichert Technologies, Depew, NY)에 2300 RU(resonance unit; 1 RU = 1 pg/mm² 표면적) 밀도로 부착시킨 후, 3.125 μ g/ml의 우혈청알부민을 650 RU 밀도로 부착시켰다. RD-05 항체는 PBS에 0.3125, 0.65, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 2560, 5120 nM로 희석한 후, 30 μ l/분 속도로 association time 5분,

dissociation time 5분을 흘려보내면서 Reichert SR7500DC 시스템으로 데이터를 읽고, Scrubber 2 소프트웨어로 분석하여 K_a 와 K_d 를 구한 후, K_D 값을 계산하였다. RD-05 마우스 항체와 IgG4 및 IgG4(L115E) RD-05 키메라항체의 K_D 값은 각각 $3.7 \times 10^{-8}M$, $4.5 \times 10^{-8}M$ 과 $3.3 \times 10^{-8}M$ 로 나타났으며, 이는 기존 5C8 클론의 $1.0 \times 10^{-8}M$ (Schuler et al. (2004) Transplantation 77:717-726)과 큰 차이가 없는 우수한 값이다.

[151] 실시예 7. 항-인간 **CD154** 항체의 **CD40-CD154** 상호작용 억제능

[152] ELISA 캡처용으로 CD40 fragment (abcam ab155710, UK)를 ELISA plate(NUNC-IMMUNO PLATE, #439454)에 웰당 500ng씩 4°C 하룻밤 동안 코팅한 다음, 1x blocking buffer(SIGMA B6429)를 100 μ l/well씩 37°C 인큐베이터에서 1시간 반응시켰다. 상기 실시예에서 제조한 RD-05 마우스 항체와 IgG4 및 IgG4(L115E) RD-05 키메라항체를 1,000ng/ml의 농도를 시작으로 2.43ng/ml 농도까지 단계 희석하고, CD154-biotin(abcam ab24966) 500ng을 각각의 희석한 항체와 동일한 양으로 실온에서 20분간 미리 반응시킨 다음, 상기와 같이 블락킹한 ELISA 플레이트에 100 μ l/well씩 37°C 인큐베이터에서 1시간 반응시켰다. 다시 반응된 플레이트를 auto strip washer를 이용하여 3회 세척하고, streptavidin-horseradish peroxidase(Thermo, #21126)를 5000배 희석하여 웰당 100 μ l씩 37°C 인큐베이터에서 40분간 반응시킨 후 auto strip washer로 3회 세척하였다. 반응된 플레이트에 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine(TMB) ELISA 기질 100 μ l씩을 각 well에 20분간 반응시킨 후 2N H₂SO₄ Stop solution 100 μ l를 넣어 정지시키고 450nm에서 마이크로리더플레이트 판독기를 이용하여 판독하였다. 결과는 도 3에 제시된 바와 같이, RD-05 항체는 농도의존적으로 CD154-CD40 결합을 특이적으로 억제할 수 있었다.

[153] 실시예 8. 인간 **IgG4 RD-05** 키메라 항체의 항-약물 항체 형성 반응 억제 효과

[154] 인간 IgG4(L115E) RD-05 키메라항체의 항체 형성 반응 억제 효과를 평가하기 위하여 휴미라(Humira)를 Cynomolgus 원숭이에 주사하였다. 휴미라 5mg/kg을 2주마다 반복하여 피하 투여하였고, 매주 혈청을 채취하여 항-휴미라 항체 농도를 K9651/TNFB blocker ADA 키트(Immune Diagnostik)로 측정하였다. 실험군은 휴미라 최초 투여일을 기준으로 -1, 6일에 IgG4(L115E) RD-05 키메라항체(20mg/kg)를 투여하였다. 휴미라만을 투여한 대조군에서는 높은 농도의 항-휴미라 항체가 생성되었지만, IgG4(L115E) RD-05 키메라항체를 투여한 실험군에서는 항-약물 항체가 생성되지 않았다(도 6; cut-off 10 AU/ml). 이는 본원에 따른 IgG4(L115E) RD-05 키메라항체가 항-약물 항체 형성을 매우 효과적으로 억제할 수 있음을 나타내는 것이다.

[155] 실시예 9. 인간 **IgG4 RD-05** 키메라항체가 혈소판 활성화에 미치는 영향

[156] 인간 IgG4 RD-05 키메라항체가 혈소판 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 인간 CD32a 형질전환마우스를 이용하였다. 이 마우스에 인간 CD154 항원과 항-인간 CD154 항체 복합체를 주사하면 10분 이내에 혈소판 수치가 크게

감소함으로써 항-CD154 항체의 혈소판 활성화에 의한 혈전생성 부작용을 평가할 수 있다(Robles-Carrillo et al. (2010) J Immunol. 185:1577-1583). 인간 유전자 재조합 용해성 CD154 단백질 50 μ M과 인간 IgG4 혹은 IgG4(L115E) RD-05 키메라항체를 혼합하여 인간 CD32a 형질전환마우스 꼬리 정맥에 주사 후 10분 뒤 심장에서 채혈하여 혈액내 혈소판 수치를 측정하였다. 도 7에 제시된 바와 같이 IgG4 RD-05 항체를 투여한 마우스에서는 혈소판 수치가 정상대조군에 비하여 감소하였다. 반면에 IgG4(L115E) RD-05 키메라항체를 투여한 마우스에서는 혈소판 수치가 정상대조군과 차이가 없었다. 이는 인간 IgG4(L115E) RD-05 키메라항체가 혈소판 활성화 부작용이 없음을 나타낸다.

- [157] 정리하면 본원에서는 인간 CD154 단백질에 결합하여 CD154-CD40 상호작용을 억제할 수 있는 항체(RD-05)를 개발하였으며, 인간 CD154 항원에 대한 친화력이 기존의 항-CD154 항체(5C8 클론)와 비교하였을 때 큰 차이가 없음을 확인하였다.
- [158] 또한 *Cynomolgus* 원숭이에서 IgG4(L115E) RD-05 키메라항체를 투여하였을 때 휴미라에 대한 항-약물 항체 형성을 매우 효과적으로 억제하여, 항체 매개 면역반응을 억제할 수 있음을 확인하였다.
- [159] 또한 CD32A 형질전환 마우스에 인간 CD154와 항-CD154 항체의 면역복합체(immune complex)를 정맥 주사후 10분에 심장에서 채혈하여 혈액내 혈소판 수치를 비교한 결과, IgG4 RD-05 키메라항체를 투여한 마우스에서 혈소판 수치가 감소하였다. 반면에 IgG4(L115E) RD-05 키메라항체를 투여한 마우스에서는 혈소판 수치가 정상 대조군과 차이가 없었다. 이는 본원의 인간 IgG4(L115E) RD-05 키메라항체가 혈소판 활성화 부작용이 없음을 나타낸다.
- [160] 이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다.
- [161] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

청구범위

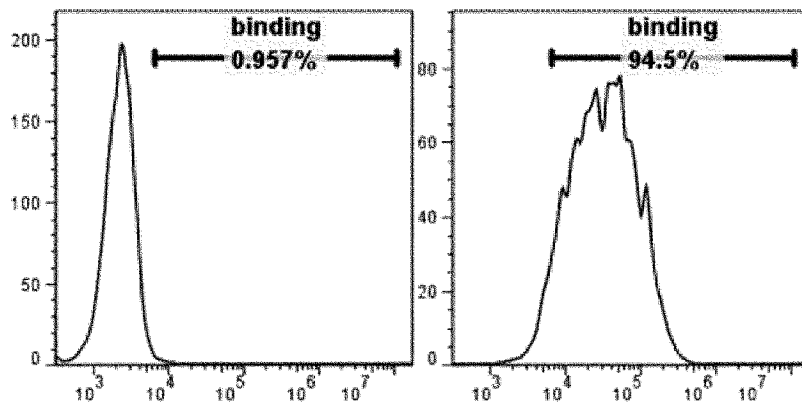
- [청구항 1] 면역글로블린 중쇄 가변영역(VH)의 상보성결정부위(HCDR) 서열로서 서열번호 1의 HCDR1, 서열번호 2의 HCDR2 및 서열번호 3의 HCDR3의 아미노산 서열; 및
면역글로블린 경쇄 가변영역(VL)의 상보성결정부위(LCDR) 서열로서 서열번호 4의 LCDR1, 서열번호 5의 LCDR2 및 서열번호 6의 LCDR3의 아미노산 서열을 포함하는 CD154를 특이적으로 인식하는, CD154 결합 폴리펩타이드.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 CD154는 인간, 붉은털원숭이(Rhesus) 또는
게막이원숭이(Cynomolgus)의 CD154인, CD154 결합 폴리펩타이드.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 폴리펩타이드는 CD154의 서열번호 12 또는 서열번호 13으로
표시되는 아미노산 서열을 특이적으로 인식하는, CD154 결합
폴리펩타이드.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 CD154 결합 폴리펩타이드는 항-CD154 항체 또는 그 항원 결합
단편인, CD154 결합 폴리펩타이드.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 항-CD154 항체는 서열번호 7로 표시되는
아미노산 서열의 중쇄 가변영역 및 서열번호 8로 개시된 아미노산 서열의
경쇄 가변영역을 포함하는 것인, CD154 결합 폴리펩타이드.
- [청구항 6] 제 4 항에 있어서,
상기 항-CD154 항체는 단클론 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간
항체인, CD154 결합 폴리펩타이드.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서,
상기 항-CD154 항체는 키메라 항체로, 상기 키메라 항체는 비인간 유래의
가변영역 및 인간 유래의 Fc 영역을 포함하는 것인 CD154 결합
폴리펩타이드.
- [청구항 8] 제 7 항에 있어서,
상기 인간 유래 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc로부터 선택되며,
상기 키메라 항체는 Fc γ 수용체(Fc γ R)에 대한 결합이 감소되고, 이로 인해
혈소판 자극이 감소된 것인, CD154 결합 폴리펩타이드.
- [청구항 9] 제 8 항에 있어서,
상기 Fc 영역은 IgG4 Fc이고, 상기 IgG4 Fc는 아미노산 잔기 치환
돌연변이를 포함하며, 상기 돌연변이는 서열번호 9의 서열을 기준으로
115번째 아미노산 잔기가 루이신에서 글루탐산(L115E)으로 치환된 것인,
CD154 결합 폴리펩타이드.

- [청구항 10] 제 4 항에 있어서,
상기 항-CD154 항체는 다중(multimeric) 항체, 이종이량(heterodimeric) 항체, 헤미이량(hemidimeric) 항체, 다가(multivalent) 항체 또는 단쇄(Single chain) 항체인, CD154 결합 폴리펩타이드.
- [청구항 11] 제 4 항에 있어서,
상기 항체는 치료제, 프로드럭, 펩타이드, 단백질, 효소, 바이러스, 지질, 생물학적개질제, 약물 및 PEG로 구성되는 군으로부터 선택되는 물질과 컨쥬게이션된 것인, CD154 결합 폴리펩타이드.
- [청구항 12] 제 5 항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 9 또는 서열번호 10의 중쇄 불변영역 및 서열번호 11의 경쇄 불변영역을 추가로 포함하는 것인, CD154 결합 폴리펩타이드.
- [청구항 13] 제 5 항 또는 제 12 항에 따른 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.
- [청구항 14] 제 13 항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.
- [청구항 15] 제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 따른 CD154 결합 폴리펩타이드를 포함하는 항-약물 항체 생성 억제용 조성물.
- [청구항 16] 제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 따른 CD154 결합 폴리펩타이드를 포함하는, T-세포 또는 항체 매개된 면역 질환 또는 증상 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [청구항 17] 제 16 항에 있어서,
상기 T-세포 또는 항체 매개된 면역 질환 또는 증상은 항-약물 항체 생성 반응, 전신홍반루푸스, 면역성저혈소판자색반증, 류마티스관절염, 다발경화증을 포함하는 자가면역질환, 췌도, 신장, 심장, 피부를 포함하는 장기 또는 조직 이식에 대한 거부 반응, 또는 이식편대숙주 질환인, T-세포 또는 항체 매개된 면역 질환 또는 증상 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [청구항 18] 제 17 항에 있어서,
상기 약학 조성물은 항체 매개된 면역 질환 또는 증상 예방 또는 치료용으로, 상기 항체 매개된 면역 질환은 항-약물 항체 생성 반응, 전신홍반루푸스, 또는 면역성저혈소판자색반증인, 항체 매개된 면역 질환 또는 증상 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [청구항 19] CD154 단백질에서 CD40와 상호작용하는 부위인 서열번호 22로 표시되는 CD40 리간드에서 199번 잔기 Gly, 200번 잔기 Arg, 및 203번 잔기 Arg을 포함하는 5개 내지 50개 아미노산의 CD40 리간드 부위를 에피토프로 하며, CD40와의 상호작용을 방해하는, 항 CD154 항체 또는 그 항원 결합 단편.
- [청구항 20] 제 20 항에 있어서,
상기 에피토프는 207번 잔기, 230번 잔기 Glu 또는 232번 Qln 중 하나

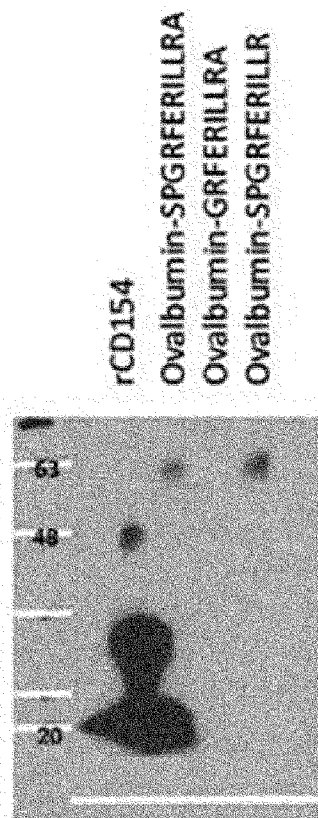
- 이상을 추가로 포함하는 9개 내지 50개 아미노산의 폴리펩타이드인, 항 CD154 항체 또는 그 항원 결합 단편.
- [청구항 21] 제 20 항에 있어서,
상기 에피토프는 서열번호 12 또는 서열번호 13으로 표시되는 것인, 항 CD154 항체 또는 그 항원 결합 단편.
- [청구항 22] 제 20 항에 있어서,
상기 항체 또는 항원 결합단편은 면역글로블린 중쇄 가변영역(VH)의 상보성결정부위(HCDR) 서열로서 서열번호 1의 HCDR1, 서열번호 2의 HCDR2 및 서열번호 3의 HCDR3의 아미노산 서열; 및 면역글로블린 경쇄 가변영역(VL)의 상보성결정부위(LCDR) 서열로서 서열번호 4의 LCDR1, 서열번호 5의 LCDR2 및 서열번호 6의 LCDR3의 아미노산 서열로 표시되는 서열을 갖는 것인, 항 CD154 항체 또는 그 항원 결합 단편.
- [청구항 23] 제 23 항에 있어서,
상기 항-CD154 항체는 단클론 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체인, 항 CD154 항체 또는 그 항원 결합 단편.
- [청구항 24] 제 23 항에 있어서,
상기 항-CD154 항체는 키메라 항체로, 상기 키메라 항체는 비인간 유래의 가변영역 및 인간 유래의 Fc 영역 또는 서열번호 9의 서열을 기준으로 115번째 아미노산 잔기가 루이신에서 글루탐산(L115E)으로 치환된 Fc를 포함하는 것인 항 CD154 항체 또는 그 항원 결합 단편.
- [청구항 25] CD154 단백질에서 CD40와 상호작용하는 부위로서 상기 CD40와의 제2 친수성 접촉부위 및 전하 상호작용 부위를 특이적으로 인식하며, 상기 CD40와의 상호작용을 방해하는, 항 CD154 항체 또는 그 항원 결합 단편.
- [청구항 26] 면역글로블린 중쇄 가변영역(VH)의 상보성결정부위(HCDR) 서열로서 서열번호 1의 HCDR1, 서열번호 2의 HCDR2 및 서열번호 3의 HCDR3의 아미노산 서열; 및 면역글로블린 경쇄 가변영역(VL)의 상보성결정부위(LCDR) 서열로서 서열번호 4의 LCDR1, 서열번호 5의 LCDR2 및 서열번호 6의 LCDR3의 아미노산 서열을 포함하는 CD154를 특이적으로 인식하는, CD154 결합 폴리펩타이드를 포함하는 항-약물 항체 생성 억제용 키트.
- [청구항 27] 면역글로블린 중쇄 가변영역(VH)의 상보성결정부위(HCDR) 서열로서 서열번호 1의 HCDR1, 서열번호 2의 HCDR2 및 서열번호 3의 HCDR3의 아미노산 서열; 및 면역글로블린 경쇄 가변영역(VL)의 상보성결정부위(LCDR) 서열로서 서열번호 4의 LCDR1, 서열번호 5의 LCDR2 및 서열번호 6의 LCDR3의 아미노산 서열을 포함하는 CD154를 특이적으로 인식하는, CD154 결합 폴리펩타이드를 포함하는 항체 매개된 면역 반응 억제용 키트.
- [청구항 28] 면역글로블린 중쇄 가변영역(VH)의 상보성결정부위(HCDR) 서열로서

서열번호 1의 HCDR1, 서열번호 2의 HCDR2 및 서열번호 3의 HCDR3의 아미노산 서열; 및 면역글로블린 경쇄 가변영역(VL)의 상보성결정부위(LCDR) 서열로서 서열번호 4의 LCDR1, 서열번호 5의 LCDR2 및 서열번호 6의 LCDR3의 아미노산 서열을 포함하는 CD154를 특이적으로 인식하는, CD154 결합 폴리펩타이드를 포함하는 CD154 의존 T 세포 매개된 면역반응 억제용 키트.

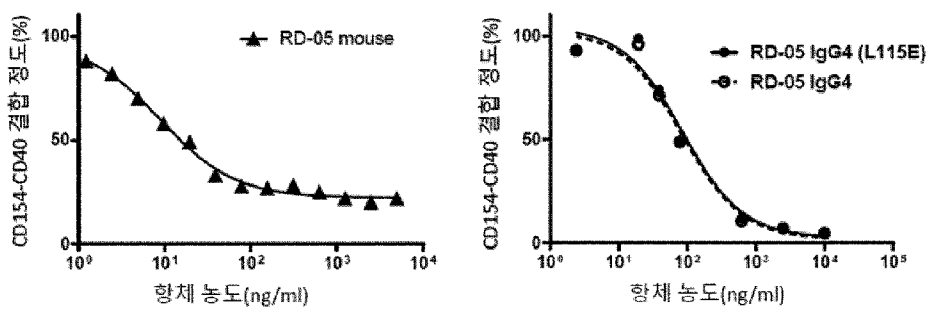
[도1]



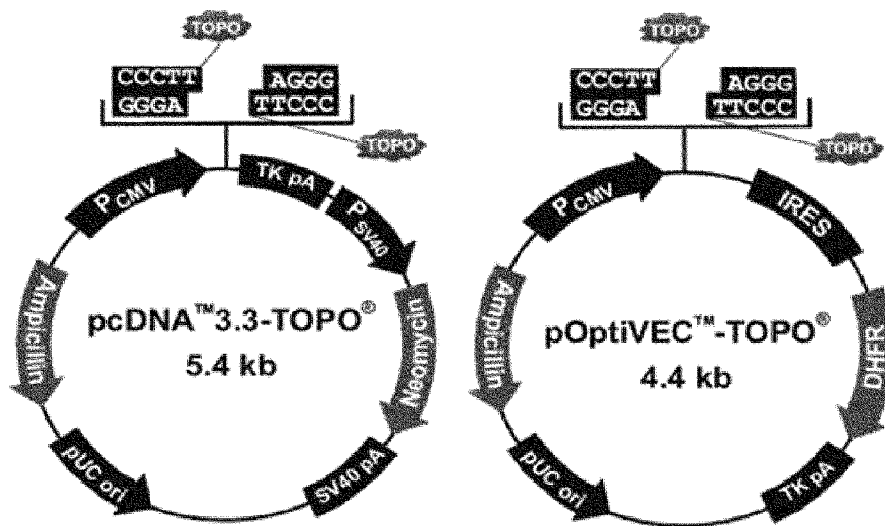
[도2]



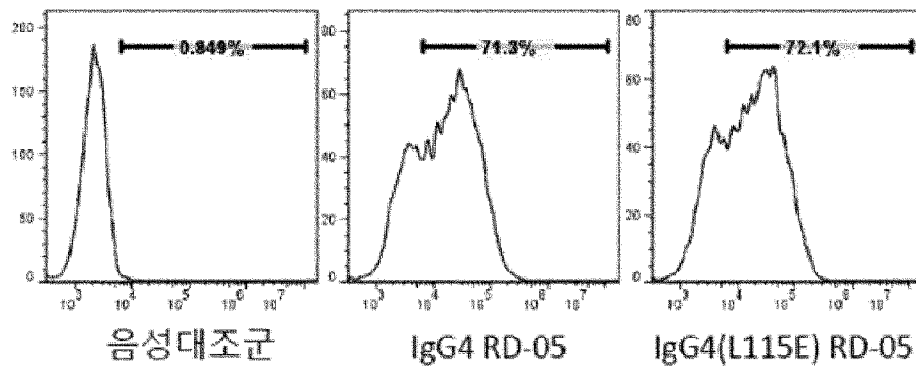
[도3]



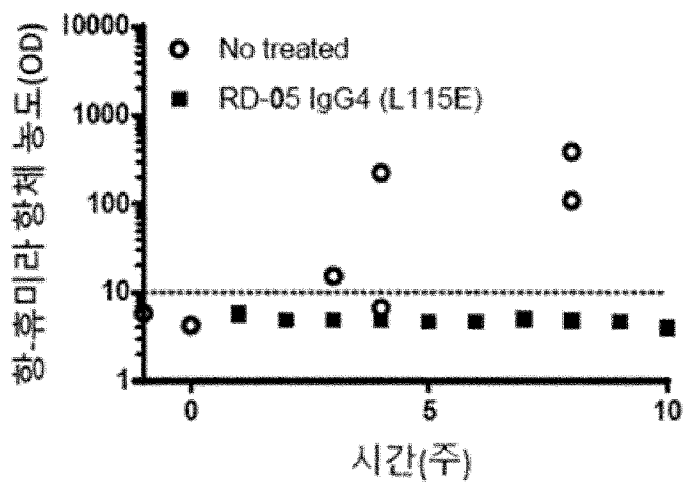
[도4]



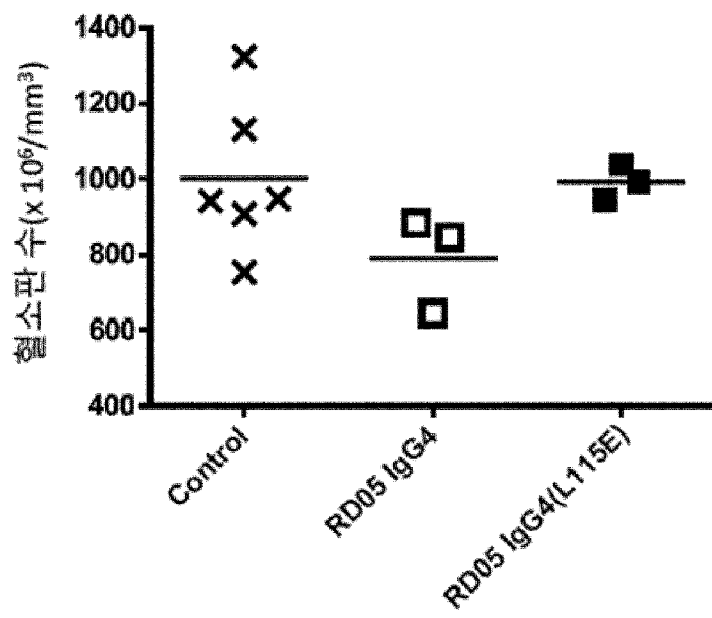
[도5]



[도6]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/006589**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07K 16/28(2006.01)i, C07K 16/46(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/28; A61K 39/395; A61K 49/00; G01N 33/68; C07K 16/46

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: CD154, CD40, chimeric antibody, IgG4Fc, FcγR

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2010-0015804 A (BIOGEN IDEC MA INC. et al.) 12 February 2010 See abstract; paragraphs [0019], [0053], [0112]-[0134], [0216]-[0228], [0285]-[0315], [0334]-[0346]; example 1; claims 1-84.	1-18,26-28
Y		19-25
Y	AN et al., "Crystallographic and Mutational Analysis of the CD40-CD154 Complex and its Implications for Receptor Activation", Journal of Biological Chemistry, vol. 286, no. 13, pp. 11226-11235 (2011) See abstract; figure 2.	19-25
X	US 2014-0220031 A1 (VLIJMEN, Van et al.) 07 August 2014 See abstract; paragraphs [0299]-[0300]; claims 98-126.	1-18,26-28
Y		19-25
A	US 2008-0124278 A1 (TAYLOR et al.) 29 May 2008 See the entire document.	1-28
A	US 2013-0189713 A1 (BIOGEN IDEC MA INC.) 25 July 2013 See the entire document.	1-28



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 OCTOBER 2016 (20.10.2016)

Date of mailing of the international search report

20 OCTOBER 2016 (20.10.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/006589

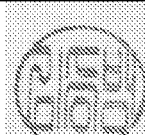
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2010-0015804 A	12/02/2010	AU 2008-232409 A1	02/10/2008
		AU 2008-232409 B2	20/06/2013
		AU 2008-232409 C1	05/12/2013
		CA 2681530 A1	02/10/2008
		CN 101679521 A	24/03/2010
		CN 101679521 B	12/03/2014
		CN 103214577 A	24/07/2013
		CN 103214577 B	02/09/2015
		EP 2125894 A2	02/12/2009
		JP 2010-521967 A	01/07/2010
		JP 5721951 B2	20/05/2015
		US 2010-0104573 A1	29/04/2010
		US 8293237 B2	23/10/2012
		WO 2008-118356 A2	02/10/2008
		WO 2008-118356 A3	20/11/2008
US 2014-0220031 A1	07/08/2014	AU 2005-287406 A1	30/03/2006
		AU 2005-287406 B2	18/08/2011
		CA 2575838 A1	30/03/2006
		CN 101072587 A	14/11/2007
		CN 101072587 B	26/12/2012
		EP 1791563 A2	06/06/2007
		EP 1791563 A4	08/07/2009
		EP 2399936 A2	28/12/2011
		EP 2399936 A3	22/02/2012
		JP 2008-056676 A	13/03/2008
		JP 2008-511290 A	17/04/2008
		JP 2012-100660 A	31/05/2012
		JP 5102028 B2	19/12/2012
		KR 10-2007-0047327 A	04/05/2007
		US 2008-0305116 A1	11/12/2008
		US 8647625 B2	11/02/2014
		US 8961976 B2	24/02/2015
US 2008-0124278 A1	29/05/2008	WO 2006-033702 A2	30/03/2006
		WO 2006-033702 A3	04/01/2007
		AU 2004-253868 A1	13/01/2005
		AU 2004-253868 B2	16/06/2011
		CA 2528551 A1	13/01/2005
		CN 1835976 A	20/09/2006
		CN 1835976 B	13/06/2012
		EP 1639014 A2	29/03/2006
		EP 1639014 B1	22/09/2010
		EP 2239271 A1	13/10/2010
		JP 2007-211022 A	23/08/2007
		JP 2008-500012 A	10/01/2008
		JP 2011-137022 A	14/07/2011
		JP 2011-231119 A	17/11/2011
		JP 4667383 B2	13/04/2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/006589

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2013-0189713 A1	25/07/2013	KR 10-1262374 B1	09/05/2013
		KR 10-2006-0022267 A	09/03/2006
		KR 10-2012-0090094 A	16/08/2012
		US 2006-0193856 A1	31/08/2006
		US 2015-0017155 A1	15/01/2015
		WO 2005-003175 A2	13/01/2005
		WO 2005-003175 A3	17/03/2005
		AU 2006-315274 A1	24/05/2007
		AU 2006-315274 B2	05/07/2012
		CA 2629647 A1	24/05/2007
		CA 2629647 C	21/05/2013
		EP 1955078 A2	13/08/2008
		EP 1955078 A4	02/09/2009
		EP 1955078 B1	17/07/2013
		EP 2431746 A1	21/03/2012
		JP 2009-516201 A	16/04/2009
		JP 2012-073273 A	12/04/2012
		JP 2014-112114 A	19/06/2014
		JP 5396083 B2	22/01/2014
		JP 5639993 B2	10/12/2014
		US 2009-220998 A1	03/09/2009
		US 8409810 B2	02/04/2013
		US 9297810 B2	29/03/2016
		WO 2007-059332 A2	24/05/2007
		WO 2007-059332 A3	24/01/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 16/28(2006.01)i, C07K 16/46(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i																										
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 16/28; A61K 39/395; A61K 49/00; G01N 33/68; C07K 16/46 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: CD154, CD40, 키메라 항체, IgG4Fc, FcγR																										
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>KR 10-2010-0015804 A (바이오젠 아이렉 엠에이 인코포레이티드 등) 2010.02.12 요약; 단락 [0019], [0053], [0112]-[0134], [0216]-[0228], [0285]-[0315], [0334]-[0346]; 실시예 1; 청구항 1-84 참조.</td> <td>1-18, 26-28</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>19-25</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>AN 등, 'Crystallographic and mutational analysis of the CD40-CD154 complex and its implications for receptor activation' Journal of Biological Chemistry, Vol.286, No.13, pp.11226-11235 (2011) 요약; 도면 2 참조.</td> <td>19-25</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 2014-0220031 A1 (VAN VLIJMEN 등) 2014.08.07 요약; 단락 [0299]-[0300]; 청구항 98-126 참조.</td> <td>1-18, 26-28</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>19-25</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2008-0124278 A1 (TAYLOR 등) 2008.05.29 전체 문헌 참조.</td> <td>1-28</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2013-0189713 A1 (BIOGEN IDEC MA INC.) 2013.07.25 전체 문헌 참조.</td> <td>1-28</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	KR 10-2010-0015804 A (바이오젠 아이렉 엠에이 인코포레이티드 등) 2010.02.12 요약; 단락 [0019], [0053], [0112]-[0134], [0216]-[0228], [0285]-[0315], [0334]-[0346]; 실시예 1; 청구항 1-84 참조.	1-18, 26-28	Y		19-25	Y	AN 등, 'Crystallographic and mutational analysis of the CD40-CD154 complex and its implications for receptor activation' Journal of Biological Chemistry, Vol.286, No.13, pp.11226-11235 (2011) 요약; 도면 2 참조.	19-25	X	US 2014-0220031 A1 (VAN VLIJMEN 등) 2014.08.07 요약; 단락 [0299]-[0300]; 청구항 98-126 참조.	1-18, 26-28	Y		19-25	A	US 2008-0124278 A1 (TAYLOR 등) 2008.05.29 전체 문헌 참조.	1-28	A	US 2013-0189713 A1 (BIOGEN IDEC MA INC.) 2013.07.25 전체 문헌 참조.	1-28
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																								
X	KR 10-2010-0015804 A (바이오젠 아이렉 엠에이 인코포레이티드 등) 2010.02.12 요약; 단락 [0019], [0053], [0112]-[0134], [0216]-[0228], [0285]-[0315], [0334]-[0346]; 실시예 1; 청구항 1-84 참조.	1-18, 26-28																								
Y		19-25																								
Y	AN 등, 'Crystallographic and mutational analysis of the CD40-CD154 complex and its implications for receptor activation' Journal of Biological Chemistry, Vol.286, No.13, pp.11226-11235 (2011) 요약; 도면 2 참조.	19-25																								
X	US 2014-0220031 A1 (VAN VLIJMEN 등) 2014.08.07 요약; 단락 [0299]-[0300]; 청구항 98-126 참조.	1-18, 26-28																								
Y		19-25																								
A	US 2008-0124278 A1 (TAYLOR 등) 2008.05.29 전체 문헌 참조.	1-28																								
A	US 2013-0189713 A1 (BIOGEN IDEC MA INC.) 2013.07.25 전체 문헌 참조.	1-28																								
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																										
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																										
국제조사의 실제 완료일 2016년 10월 20일 (20.10.2016)		국제조사보고서 발송일 2016년 10월 20일 (20.10.2016)																								
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371 																								

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2010-0015804 A	2010/02/12	AU 2008-232409 A1	2008/10/02
		AU 2008-232409 B2	2013/06/20
		AU 2008-232409 C1	2013/12/05
		CA 2681530 A1	2008/10/02
		CN 101679521 A	2010/03/24
		CN 101679521 B	2014/03/12
		CN 103214577 A	2013/07/24
		CN 103214577 B	2015/09/02
		EP 2125894 A2	2009/12/02
		JP 2010-521967 A	2010/07/01
		JP 5721951 B2	2015/05/20
		US 2010-0104573 A1	2010/04/29
		US 8293237 B2	2012/10/23
		WO 2008-118356 A2	2008/10/02
		WO 2008-118356 A3	2008/11/20
US 2014-0220031 A1	2014/08/07	AU 2005-287406 A1	2006/03/30
		AU 2005-287406 B2	2011/08/18
		CA 2575838 A1	2006/03/30
		CN 101072587 A	2007/11/14
		CN 101072587 B	2012/12/26
		EP 1791563 A2	2007/06/06
		EP 1791563 A4	2009/07/08
		EP 2399936 A2	2011/12/28
		EP 2399936 A3	2012/02/22
		JP 2008-056676 A	2008/03/13
		JP 2008-511290 A	2008/04/17
		JP 2012-100660 A	2012/05/31
		JP 5102028 B2	2012/12/19
		KR 10-2007-0047327 A	2007/05/04
		US 2008-0305116 A1	2008/12/11
		US 8647625 B2	2014/02/11
US 2008-0124278 A1	2008/05/29	US 8961976 B2	2015/02/24
		WO 2006-033702 A2	2006/03/30
		WO 2006-033702 A3	2007/01/04
		AU 2004-253868 A1	2005/01/13
		AU 2004-253868 B2	2011/06/16
		CA 2528551 A1	2005/01/13
		CN 1835976 A	2006/09/20
		CN 1835976 B	2012/06/13
		EP 1639014 A2	2006/03/29
		EP 1639014 B1	2010/09/22
		EP 2239271 A1	2010/10/13
		JP 2007-211022 A	2007/08/23
		JP 2008-500012 A	2008/01/10
		JP 2011-137022 A	2011/07/14
		JP 2011-231119 A	2011/11/17
		JP 4667383 B2	2011/04/13

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		KR 10-1262374 B1	2013/05/09
		KR 10-2006-0022267 A	2006/03/09
		KR 10-2012-0090094 A	2012/08/16
		US 2006-0193856 A1	2006/08/31
		US 2015-0017155 A1	2015/01/15
		WO 2005-003175 A2	2005/01/13
		WO 2005-003175 A3	2005/03/17
US 2013-0189713 A1	2013/07/25	AU 2006-315274 A1	2007/05/24
		AU 2006-315274 B2	2012/07/05
		CA 2629647 A1	2007/05/24
		CA 2629647 C	2013/05/21
		EP 1955078 A2	2008/08/13
		EP 1955078 A4	2009/09/02
		EP 1955078 B1	2013/07/17
		EP 2431746 A1	2012/03/21
		JP 2009-516201 A	2009/04/16
		JP 2012-073273 A	2012/04/12
		JP 2014-112114 A	2014/06/19
		JP 5396083 B2	2014/01/22
		JP 5639993 B2	2014/12/10
		US 2009-220998 A1	2009/09/03
		US 8409810 B2	2013/04/02
		US 9297810 B2	2016/03/29
		WO 2007-059332 A2	2007/05/24
		WO 2007-059332 A3	2008/01/24