(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년05월23일
(11) 등록번호 10-2661078
(24) 등록일자 2024년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
G01N 33/566 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7037215
(22) 출원일자(국제) 2016년05월27일
심사청구일자 2021년05월26일
(85) 번역문제출일자 2017년12월26일
(65) 공개번호 10-2018-0010265
(43) 공개일자 2018년01월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/034716
(87) 국제공개번호 WO 2016/196314
국제공개일자 2016년12월08일
(30) 우선권주장
62/168,425 2015년05월29일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20040120948 A1*
WO2007124299 A2
WO2011123489 A2
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
애브비 인코포레이티드
미국 일리노이주 60064 놀스 시카고 놀스 워키건 로드 1
(72) 발명자
베나툴 로렌조
미국 매사추세츠주 01532 노스버러 모호크 드라이브 33
아르기리아디 마리아 에이.
미국 매사추세츠주 01772 사우스버러 세이디 허트레인 15
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

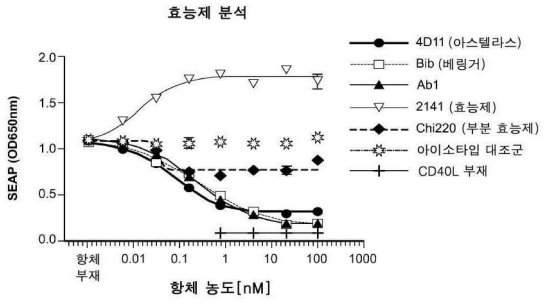
전체 청구항 수 : 총 17 항 심사관 : 한정선

(54) 발명의 명칭 **항-CD40 항체 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 길항제 항-CD40 항체 및 그의 항원-결합 부분을 포함한다. 구체적으로, 본 발명은 인간화 항-CD40 항체에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항체는 인간 CD40(hCD40) 활성을 중화시킨다. 본 발명의 항체 또는 항체 부분은 예를 들어, CD40 활성이 유해한 장애를 앓고 있는 인간 대상체에서 CD40을 검출하고, CD40 활성을 억제하는 데 유용하다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/545 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/567 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
G01N 2333/70578 (2013.01)
(72) 발명자
맥레 브래드포드 엘.
미국 매사추세츠주 01532 노스버러 플레전트 스트리트 84
시에 충-밍
미국 매사추세츠주 02459 뉴턴 올데 필드 로드 22
이건 데이비드 에이.
미국 테네시주 37774 루돈 가두시 레인 321
할란 존 이.
미국 일리노이주 60047 레이크 주리크 포트리 레인 689
저지 러셀 에이.
미국 일리노이주 60031 거니 알더 코트 5186
왕 루이
미국 매사추세츠주 02460 뉴턴 로웰 애비뉴 122
킹스버리 질리안 에이.
미국 매사추세츠주 01778 웨이랜드 아쿼덕트 로드 46

명 세 서

청구범위

청구항 1

SEQ ID NO:6의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR1, SEQ ID NO:42의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR2, SEQ ID NO:8의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 CDR3, SEQ ID NO:21의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR1, SEQ ID NO:11의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR2 및 SEQ ID NO:12의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 CDR3을 포함하는 전장 길항제 항-CD40 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체가 인간화된, 항-CD40 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체가 효능제 활성이 없는, 항-CD40 항체.

청구항 4

SEQ ID NO:28의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 도메인 및 SEQ ID NO:20의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 도메인을 포함하는 전장 길항제 항-CD40 항체.

청구항 5

SEQ ID NO:41의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 및 SEQ ID NO:40의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄를 포함하는 항-CD40 항체.

청구항 6

SEQ ID NO:39의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 및 SEQ ID NO:40의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄를 포함하는 항-CD40 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, SEQ ID NO:20의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 도메인을 포함하는, 항-CD40 항체.

청구항 8

제1항에 있어서, SEQ ID NO:28의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 도메인을 포함하는, 항-CD40 항체.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체가 IgG 아이소타입 (isotype)인, 항-CD40 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 IgG 아이소타입이 IgG1인, 항-CD40 항체.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 IgG 아이소타입이 IgG4인, 항-CD40 항체.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 항체가 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열로 이루어진 인간 IgG1 불변 도메인을 포함하는, 항-CD40 항체.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 항체가 SEQ ID NO:3의 아미노산 서열로 이루어진 인간 IgG1 불변 도메인을 포함하는, 항-CD40 항체.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 항체가 경쇄 인간 Ig 카파 불변 도메인을 포함하는, 항-CD40 항체.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 항체가 경쇄 인간 Ig 람다 불변 도메인을 포함하는, 항-CD40 항체.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 인간 Ig 카파 불변 도메인이 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열로 이루어진, 항-CD40 항체.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 인간 Ig 람다 불변 도메인이 SEQ ID NO:81의 아미노산 서열로 이루어진, 항-CD40 항체.

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

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 발명은 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 2015년 5월 29일자로 출원된 미국 가출원 제62/168,425호에 대한 우선권을 주장한다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자 제출되며, 전체가 본 명세서에 참조로 포함되는 서열 목록을 포함한다. 2016년 5월 12일자로 생성된 상기 ASCII 복사본은 명칭이 117813-10420_SL.txt이며, 크기가 91,019 바이트이다.

[0005] **기술분야**

[0006] 본 발명은 CD40(CD40) 항체 및 그의 항원-결합 부분, 및 다양한 질병의 예방 및/또는 치료에서의 그들의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] CD40은 B 세포 발생, 림프구 활성화 및 항원 제시 세포(APC) 기능에서 중요한 역할을 수행하는 종양 괴사 인자(TNF) 수용체 과 구성원이다. 상피, 백혈구 및 혈관 내피 상의 CD40 발현은 기관-특이적 자가면역 질병 및 전신 자가면역, 예를 들어, 전신 홍반성 루프스(SLE)에서 상승된다. CD40L/CD40 신호전달 경로의 방해에 의해, 만성 염증 질병, 예를 들어, 크론병이 있는 환자에서 염증촉진성(proinflammatory) 사이토카인, 예를 들어, IL-23 및 TNF의 생성이 감소되며, T 헬퍼 세포 분화 및 기능이 감소되며, 대식구 활성화가 억제된다. CD40과 CD40L의 상호작용은 체액성 및 세포-매개의 면역 반응 둘 모두를 유도한다. CD40은 이러한 리간드-수용체 쌍을 조절하여, B 세포, 및 수지상 세포(DC)를 포함하는 기타 항원-제시 세포(APC)를 활성화시킨다.

[0008] CD40은 광범위한 조혈(림프구, 단핵구, 수지상 세포) 및 비-조혈(상피, 내피, 섬유아세포) 세포 유형 상에 발현되는 48 kDa의 I형 막횡단 단백질이다(문헌[van Kooten, J Leukoc Biol. 2000 Jan;67(1):2-17]). CD40L은 주로 활성화된 T 세포, B 세포 및 혈소판 상에서 발현된다. CD40/CD40L 생물학의 많은 이해는 APC(수지상 세포(DC) 또는 B 세포 상의 CD40 발현)와 CD40L-발현 T 세포 간의 상호작용에서 비롯된다. 휴지 B 세포 상에서, CD40L 결합은 B 세포 활성화, 증식 및 기억 B 세포 발생을 유도한다(문헌[Kehry, Immunol. 1996 Apr 1;156(7):2345-8]). 또한, CD40 신호전달은 면역글로불린 부류 전환 및 배중심 형성에 필요하다. B 세포 생물학에서의 CD40/CD40L 신호전달 경로의 중요성은 배중심이 결여되고 T-의존적 항체 반응이 억제된 CD40- 또는 CD40L-결핍 마우스에서 명백하다. 그러나, T-독립적 IgG 반응은 CD40-/- 마우스에서 무손상으로 유지되며, 이는 그것이 이들 마우스에서 결여되는 세포-세포 상호작용임을 시사한다. 또한, CD40-결핍 마우스는 T 세포 구획에서 결핍을 갖는다. 수지상 세포 상의 CD40을 통한 신호전달은 MHC 부류 II 및 다양한 동시자극 분자, 예를 들어, CD80 및 CD86을 상향조절하며, DC의 성숙을 촉진시킨다. 성숙 DC는 사이토카인, 예를 들어, IL-2 및 IL-12의 생성을 통해 CD4+ T 세포의 활성화 및 생존을 자극한다. 비효율적인 T 세포 프라이밍은 CD40L-/- 마우스에서 면역약화된 T-의존적 체액성 반응의 주요 원인인 것으로 보인다(문헌[Grewal, Nature. 1995 Dec 7;378(6557):617-20]). 유사한 B 세포 표현형이 X-연관 고 IgM 증후군이 있는 인간에서 관찰될 수 있다. 이들 환자는 CD40/CD40L 신호전달을 없애는 CD40L 유전자좌 내의 돌연변이로 인한 원발성 면역결핍을 앓고 있다. 이들 개체는 상승된 IgM 수준을 가지며, IgA, IgG 및 IgE를 생성할 수 없어, 기회 감염 위험이 증가된다(문헌[Adriana, J Clin Immunol. 2008 May;28 Suppl 1:S62-6]).

[0009] CD40 신호전달 경로는 휴지 또는 나이브(naive) 림프구 및 APC의 활성화된/성숙 표현형으로의 전환에서 중심이 된다. T 세포 프라이밍 및 B 세포 활성화가 CD40/CD40L 신호전달의 부재 하에 발생할 수 있지만, 이러한 경로는 강력한 적응 면역 반응의 생성에 필요하다. CD40L에 의한 CD40의 결합은 CD40의 세포질 도메인으로의 TNF 수용체 연관 인자(TRAF)의 동원을 초래한다(문헌[Bishop, Adv Exp Med Biol. 2007;597:131-51]). 다양한 TRAF 단백질의 인산화는 정규 및 비-정규 NFkB 경로의 활성화를 초래한다. 또한, CD40 세포질 테일(tail)과의 JAK3 회합은 STAT5 활성화를 초래하며, 이는 DC의 성숙, 및 TNF 및 IFNɣ 생성을 유도한다. TRAF6-의존적 PI3K 활성화는 DC에서 중요한 생존 신호인 한편, TRAF2/TRAF6은 NFkB 활성화 및 CD80 발현의 상향조절에 중복의 기능을 갖는다(문헌[Hostager, J Biol Chem. 2003 Nov 14;278(46):45382-90]). TRAF 2, 3, 5 및 6은 모두 CD40 신호전달에 의해 매개되는 면역글로불린 부류 전환에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 나타났다(문헌[Leo, Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Feb 16; 96(4): 1421-1426]).

[0010] CD40/CD40L 신호전달 경로는 전신 홍반성 루푸스(SLE), 염증성 장 질병(IBD), 다발성 경화증, 류마티스 관절염 및 쇼그렌 증후군을 포함하는 많은 자가면역 질병의 발병에 연루된다(문헌[Law and Grewal, Adv Exp Med Biol. 2009;647:8-36]). CD40 발현은 신장, 장 및 관절을 포함하는 만성 자가면역에 의해 손상되는 조직에서 대식구, 내피, 상피 및 B 세포 상에서 상승된다(문헌[Borcherding, Am J Pathol. 2010 Apr;176(4):1816-27]; 문헌

[Sawada-Hase, Am J Gastroenterol. 2000 Jun;95(6):1516-23]). 용해성 CD40L은 SLE, IBD 및 쇼그렌 증후군을 앓고 있는 환자에서, 이들 환자에서의 염증 부하와 일치하게 상승된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 최초의 증거 중 일부에서, 만성적인 장 염증에서의 CD40/CD40L 경로는 항-CD40L mAb가 설치류를 실험적 대장염으로부터 보호하는 예비임상 모델로부터 비롯된다(문헌[de Jong, Gastroenterology. 2000 Sep;119(3):715-23]; 문헌[Liu, J Immunol. 2000 Jun 1;164(11):6005-14]; 문헌[Stuber, J Exp Med 1996 Feb 1, 183(2):693-8]). 질병 활성도 점수의 감소는 소화관 내의 감소된 염증촉진 사이토카인 생성 및 만성 체중 감소로부터의 보호와 관련이 있었다. 유전학적으로 CD40 또는 CD40L에 대하여 결핍인 동물에서 유사한 결과가 관찰되었다(문헌[de Jong, Gastroenterology. 2000 Sep;119(3):715-23]). 질병 발병 후에 항-CD40L mAb로의 마우스의 처치는 질병 활성도의 감소에 여전히 효율적이며, 이는 이러한 경로가 만성 염증성 질병의 유지에 중요한 것을 시사한다. 또한, CD40 효능제 항체는 림프구가 결여된 마우스에서 장 염증을 유도하는데 충분하다(문헌[Uhlig, Immunity. 2006 Aug;25(2):309-18]). CD40 siRNA를 사용한 더욱 최근의 데이터 또한 대장염에서의 CD40 신호전달에 대한 중요한 역할을 암시한다(문헌[Arranz, J Control Release. 2013 Feb 10;165(3):163-72]). 크론병에서, 고유층 단핵구 및 상피는 높은 수준의 CD40을 발현하며, CD40+ 단핵구는 말초 혈액에 풍부하다. 추가로, *CD40* 유전자좌의 다형성은 IBD에 대한 증가된 감수성과 연관된다. 항-TNF 항체로 처치된 크론 환자에서, 전사 프로파일링에 의해, CD40 mRNA 수준이 적당한 약물 치료 반응이 있는 환자에서 감소하는 것이 나타난다. 그러나, TNF 억제제에 대하여 불량한 반응이 있는 환자에서, CD40 mRNA 수준은 변하지 않으며, 이는 CD40-의존적, TNF-독립적 경로가 이들 환자에서 염증을 촉진시킬 수 있음을 뒷받침한다. 연구에 의해, CD40 매개의 신호전달의 억제가 IBD 및 다른 자가면역 질병의 발병에서 중요하다는 것이 뒷받침된다. 따라서, 만성 염증성 질병 및 장애, 예를 들어, 크론병을 치료하기 위한 치료적 목적을 위해 사용될 수 있는 길항제 항-CD40 항체 및 그의 항원-결합 부분이 여전히 필요하다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 관한 것이다. 본 발명의 항체는, 인간 CD40에 결합할 수 있고 효능제 활성이 실질적으로 없는 길항제 인간화 항체 및 그의 항원-결합 부분을 포함하나 이들에 한정되지 않는다.

[0013] 제1 양태에서, 본 발명은 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 특징으로 하며, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO: 1의 국소 영역(topographic region) Cys62-Phe67, Gln79-Cys83, Arg90-Thr99 및 Thr24-Cys37에 의해 정의되는 인간 CD40의 에피토프에 결합한다. 일 구현예에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 길항제 항체이다. 일 구현예에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 효능제 활성이 실질적으로 없는 길항제 항체이다.

[0014] 또 다른 구현예에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 SEQ ID NO: 8의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 12의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 추가의 구현예에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 SEQ ID NO: 111의 아미노산 서열을 갖는 CDR2를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 11의 아미노산 서열을 갖는 CDR2를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 또 다른 추가의 구현예에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 SEQ ID NO: 42의 아미노산 서열을 갖는 CDR2를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 11의 아미노산 서열을 갖는 CDR2를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR1을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 갖는 CDR1을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0015] 일 구현예에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 IgG 아이소타입(isotype)이다. 추가의 관련 구현예에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 IgG1 또는 IgG4 아이소타입이다.

[0016] 일 구현예에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 Jurkat 세포 리포터 분석에서 적어도 50 nM의 IC50을 갖는다.

[0017] 또 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 12에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역 및/또는 SEQ ID NO: 8에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 특징으로 한다. 일 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 12에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는

CDR3을 포함하며, 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 8에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 42에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CDR2를 추가로 포함한다. 또 다른 추가의 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 11에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2를 추가로 포함한다. 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 6에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CDR1을 추가로 포함한다. 또 다른 추가의 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 21에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CDR1을 추가로 포함한다.

[0018] 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 SEQ ID NO: 6, 42 및 8의 CDR 세트를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 21, 11 및 12의 CDR 세트를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0019] 일 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 인간화된다. 추가의 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 인간 수용자 프레임워크를 추가로 포함한다. 추가의 관련 구현예에서, 인간 수용자 프레임워크는 SEQ ID NO: 82 내지 106으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 인간 수용자 프레임워크는 적어도 하나의 프레임워크 영역 아미노산 치환을 포함하며, 프레임워크의 아미노산 서열은 상기 인간 수용자 프레임워크의 서열과 적어도 65% 동일하며, 상기 인간 수용자 프레임워크와 동일한 적어도 70개의 아미노산 잔기를 포함한다. 추가의 구현예에서, 인간 수용자 프레임워크는 주요 잔기에서 적어도 하나의 프레임워크 영역 아미노산 치환을 포함하며, 상기 주요 잔기는

[0020] CDR에 인접한 잔기;

[0021] 글리코실화 부위 잔기;

[0022] 희귀 잔기;

[0023] 인간 CD40과 상호작용할 수 있는 잔기;

[0024] CDR과 상호작용할 수 있는 잔기;

[0025] 정규 잔기;

[0026] 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역 간의 접촉 잔기;

[0027] 버니어(Vernier) 구역 내의 잔기; 및

[0028] 초티아(Chothia)-정의된 가변 중쇄 CDR1과 카바트(Kabat)-정의된 제1 중쇄 프레임워크 간에 중첩되는 영역 내의 잔기로부터 선택된다.

[0029] 추가의 관련 구현예에서, 주요 잔기는 48H, 49H 및 36L로부터 선택된다. 일 구현예에서, 주요 잔기 치환은 가변 중쇄 영역에서 이루어지며, V48I 또는 S49A이다. 또 다른 구현예에서, 주요 잔기 치환은 가변 경쇄 영역에서 이루어지며, Y36F이다.

[0030] 일 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 SEQ ID NO: 28에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 SEQ ID NO: 20에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0031] 일 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 효능제 활성이 실질적으로 없다. 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 CD40 리간드(CD40L) 또는 용해성 CD40 리간드(sCD40L)로의 CD40의 결합을 억제한다. 또 다른 추가의 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 사이노몰거스 CD40에 결합한다. 일 구현예에서, 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 인간 및 사이노몰거스 CD40에 결합하지만, 랫트, 토끼 또는 마우스 CD40에는 결합하지 않는다.

[0032] 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 CD40의 생물학적 기능을 조절할 수 있다. 추가의 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 CD40을 중화시킬 수 있다. 또 다른 추가의 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 NF-κB 활성화를 억제한다.

[0033] 일 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정시 적어도 약 10^2 $M^{-1}s^{-1}$; 적어도 약 10^3 $M^{-1}s^{-1}$; 적어도 약 10^4 $M^{-1}s^{-1}$; 적어도 약 10^5 $M^{-1}s^{-1}$; 및 적어도 약 10^6 $M^{-1}s^{-1}$로부터 선택

되는 CD40에 대한 온 속도(on rate) 상수(K_{on})를 갖는다.

[0034] 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 최대 약 10^{-7} M; 최대 약 10^{-8} M; 최대 약 10^{-9} M; 최대 약 10^{-10} M; 최대 약 10^{-11} M; 최대 약 10^{-12} M; 및 최대 10^{-13} M로 이루어진 군으로부터 선택되는 CD40에 대한 해리 상수(K_D)를 갖는다.

[0035] 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 인간 IgM 불변 도메인, 인간 IgG1 불변 도메인, 인간 IgG2 불변 도메인, 인간 IgG3 불변 도메인, 인간 IgG4 불변 도메인, 인간 IgA 불변 도메인 또는 인간 IgE 불변 도메인의 중쇄 면역글로불린 불변 도메인을 포함한다. 관련 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 중쇄 면역글로불린 불변 영역 도메인은 인간 IgG1 불변 도메인이다. 추가의 관련 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 인간 IgG1 불변 도메인은 SEQ ID NO: 2 또는 SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열을 포함한다.

[0036] 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 인간 Ig 카파 불변 도메인 또는 인간 Ig 람다 불변 도메인을 포함하는 경쇄 면역글로불린 불변 도메인을 추가로 포함한다. 관련 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 인간 Ig 카파 불변 도메인은 SEQ ID NO: 4의 아미노산 서열을 포함하거나, 인간 Ig 람다 불변 도메인은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 81을 포함한다.

[0037] 또한, 본 발명은 특정 구현예에서, 본 명세서에 기재된 양태 및 구현예 중 임의의 것에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 경쟁하는 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 특징으로 한다.

[0038] 또 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 6에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, SEQ ID NO: 42에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, SEQ ID NO: 8에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, SEQ ID NO: 21에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, SEQ ID NO: 11에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 및 SEQ ID NO: 12에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 특징으로 한다.

[0039] 또 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 28에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 SEQ ID NO: 20에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 특징으로 한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 28과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및/또는 SEQ ID NO: 20과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 특징으로 한다.

[0040] 또 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 41에 기재된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 41과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 SEQ ID NO: 40에 기재된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 40과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 특징으로 한다. 일 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 중쇄는 SEQ ID NO: 41에 기재된 아미노산 서열을 포함하며, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 경쇄는 SEQ ID NO: 40에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0041] 또 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 41에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO: 40에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항-CD40 항체를 특징으로 한다.

[0042] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 재조합이다.

[0043] 또한, 본 발명은 특정 구현예에서, 본 명세서에 기재된 양태 및 구현예 중 임의의 것에 기재된 바와 같은 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 특징으로 한다.

[0044] 또한, 본 발명은 다른 특정 구현예에서, 본 명세서에 기재된 양태 및 구현예 중 임의의 것에 기재된 바와 같은 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분, 및 폴리소르베이트를 포함하는 약제학적 조성물을 특징으로 한다. 추가의 관련 구현예에서, 폴리소르베이트는 폴리소르베이트 80이다.

[0045] 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 히스티딘 완충제를 포함한다.

[0046] 또 다른 추가의 구현예에서, 약제학적 조성물은 폴리올을 포함한다. 관련 구현예에서, 폴리올은 만니톨, 소르비

톨, 트레할로스 또는 수크로스로부터 선택된다.

[0047] 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 4 내지 약 8의 pH를 갖는다. 관련 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 5 내지 약 7의 pH를 갖는다.

[0048] 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 동결건조된다.

[0049] 또한, 본 발명은 다른 구현예에서, 본 명세서에 기재된 양태 및 구현예 중 어느 하나의 길항제 항-CD40 항체 아미노산 서열을 인코딩하는 분리된 핵산을 특징으로 한다. 추가의 구현예에서, 본 발명은 분리된 핵산을 포함하는 벡터를 특징으로 한다. 관련 구현예에서, 벡터는 pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV 및 pBJ 벡터로부터 선택된다.

[0050] 또 다른 구현예에서, 숙주 세포는 벡터를 포함한다. 관련 구현예에서, 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포이다. 추가의 구현예에서, 진핵 세포는 원생생물 세포, 동물 세포, 식물 세포, 진균 세포, 효모 세포, 포유동물 세포, 조류 세포 또는 곤충 세포이다. 또 다른 추가의 구현예에서, 포유동물 세포는 CHO 세포 또는 COS 세포이다.

[0051] 또한, 본 발명은 특정 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 생성 방법을 특징으로 하며, 당해 방법은 본 명세서에 기재된 양태 및 구현예 중 어느 하나의 숙주 세포를 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 생성하기에 충분한 조건 하에 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함한다. 추가의 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 상기 방법에 의해 생성된다.

[0052] 또한, 본 발명은 다른 구현예에서, 인간 CD40 활성의 감소 방법을 특징으로 하며, 당해 방법은 인간 CD40을 본 명세서에 기재된 양태 및 구현예 중 어느 하나의 항체 또는 그의 항원-결합 부분과 접촉시켜, 인간 CD40 활성을 감소시키는 단계를 포함한다. 추가의 구현예에서, 상기 방법은 시험관내 방법이다.

[0053] 또한, 본 발명은 다른 특정 구현예에서, 유효량의, 본 명세서에 기재된 양태 및 구현예 중 어느 하나의 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 CD40이 유해한 장애를 갖는 인간 대상체의 치료 방법을 특징으로 한다.

[0054] 또한, 본 발명은 다른 구현예에서, CD40 활성이 유해한 장애를 갖는 인간 대상체에서의 인간 CD40 활성의 감소 방법을 특징으로 하며, 당해 방법은 본 명세서에 기재된 양태 및 구현예 중 어느 하나의 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 인간 대상체에게 투여하여, 인간 대상체에서 인간 CD40 활성을 감소시키는 단계를 포함한다.

[0055] 추가의 구현예에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 제2 작용제의 투여 이전에, 그와 동시에, 또는 그 이후에 대상체에게 투여된다. 추가의 관련 구현예에서, 제2 작용제는 인간 IL-12에 결합할 수 있는 항체 또는 그의 단편; PGE2; LPA; NGF; CGRP; SubP; RAGE; 히스타민; 히스타민 수용체 차단제; 브래디키닌(bradykinin); IL-1 알파; IL-1 베타; VEGF; PLGF; 메토트렉세이트(methotrexate); 코르티코스테로이드, 글루코코르티코이드 수용체 조절제; 사이클로스포린(cyclosporin), 라파마이신(rapamycin), FK506, 비-스테로이드성 항염증제, 흡입형 스테로이드; 베타-효능제; 단기-작용 또는 장기-작용 베타-효능제; 류코트리엔 또는 류코트리엔 수용체의 길항제; ADVAIR; IgE 억제제; 항-IgE 항체; XOLAIR; 포스포디에스테라제 억제제; PDE4 억제제; 잔틴(xanthine); 항콜린 약물; 비만 세포-안정화제; 크로몰린(Cromolyn); IL-4 억제제; IL-5 억제제; H1, H2, H3 및 H4를 포함하는 히스티민 또는 그의 수용체의 에오탁신(eotaxin)/CCR3 억제제 길항제; 프로스타글란딘(prostaglandin) D 또는 그의 수용체 DP1 및 CRTH2의 길항제; TNF 길항제; TNF 수용체의 용해성 단편; ENBREL; TNF 효소 길항제; TNF 전환 효소(TACE) 억제제; 무스카린성 수용체 길항제; TGF-베타 길항제; 인터페론 감마; 퍼페니돈(pirfenidone); 화학치료제, 메토트렉세이트; 레플루노미드(leflunomide); 시롤리무스(sirolimus)(라파마이신(rapamycin)) 또는 그의 유사체, CCI-779; COX2 또는 cPLA2 억제제; NSAID; 면역조절제; p38 억제제; TPL-2, MK-2 및 NFkB 억제제; 부데노시드(budenoside); 상피 성장 인자; 코르티코스테로이드; 사이클로스포린; 설파살라진(sulfasalazine); 아미노살리실레이트; 6-머캅토퓨린; 아자티오프린(azathioprine); 메트로니다졸(metronidazole); 리폭시게나제 억제제; 메살라민(mesalamine); 올살라진(olsalazine); 발살라지드(balsalazide); 항산화제; 트롬복산(thromboxane) 억제제; IL-1 수용체 길항제; 항-IL-1β 항체; 항-IL-6 항체; 성장 인자; 엘라스타제(elastase) 억제제; 피리디닐-이미다졸 화합물; LT, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, EMAP-II, GM-CSF, FGF 또는 PDGF의 항체 또는 효능제; CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 또는 그들의 리간드의 항체; FK506; 라파마이신; 미코페놀레이트 모페틸(mycophenolate mofetil); 이부프로펜

(ibuprofen); 프레드니솔론(prednisolone); 포스포디에스테라제 억제제; 아데노신 효능제; 항혈전제; 보체 억제제; 아드레날린성 작용제; IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제; IL-1β 전환 효소 억제제; TNF-α.쿼드러쳐(quadrature). 전환 효소 억제제; T-세포 신호전달 억제제; 메탈로프로테이나제 억제제; 6-머캅토퓨린; 안지오텐신 전환 효소 억제제; 용해성 사이토카인 수용체; 용해성 p55 TNF 수용체; 용해성 p75 TNF 수용체; sIL-1RI; sIL-1RII; sIL-6R; 항-염증성 사이토카인; IL-4; IL-10; IL-11; 또는 TGF-β로부터 선택된다.

[0056] 추가의 구현예에서, 장애는 호흡기 장애; 천식; 알러지성 및 비알러지성 천식; 감염으로 인한 천식; 호흡기 세포융합 바이러스(RSV)로의 감염으로 인한 천식; 만성 폐쇄성 폐병(COPD); 기도 염증을 수반하는 질환(condition); 호산구 증가증; 섬유증 및 과량의 점액 생성; 낭성 섬유증; 폐섬유증; 아토피 장애; 아토피 피부염; 두드러기; 습진; 알러지성 비염; 알러지성 위장염; 피부의 염증 및/또는 자가면역 질환; 위장 기관의 염증 및/또는 자가면역 질환; 염증성 장 질병(IBD); 궤양성 대장염; 크론병; 간의 염증 및/또는 자가면역 질환; 간경변증; 간 섬유증; B형 간염 및/또는 C형 간염 바이러스에 의해 야기되는 간 섬유증; 경피증; 종양 또는 암; 간세포 암종; 교모세포종; 림프종; 호지킨 림프종; 바이러스 감염; 박테리아 감염; 기생충 감염; HTLV-1 감염; 보호적 1형 면역 반응 발현의 억제 및 백신접종 동안 보호적 1형 면역 반응 발현의 억제로부터 선택된다.

[0057] 또 다른 추가의 구현예에서, 장애는 자가면역 또는 염증성 질병, 예를 들어, 전신 홍반성 루푸스(SLE), 원판성 루푸스, 루푸스 신장염, 유육종증, 연소성 관절염, 류마티스성 관절염, 건선성 관절염, 라이터 증후군, 강직성 척추염, 및 통풍성 관절염을 포함하는 염증성 관절염, 기관 또는 조직 이식의 거부, 초급성, 급성, 또는 만성 거부 및/또는 이식편 대 숙주병, 다발성 경화증, 고 IgE 증후군, 결절성 다발성 동맥염, 원발성 담즙성 간경변증, 염증성 장 질병, 크론병, 셀리악병(글루텐-민감성 장병증), 자가면역 간염, 악성 빈혈, 자가면역 용혈성 빈혈, 건선, 경피증, 중증 근무력증, 자가면역 혈소판 감소성 자반증, 자가면역 갑상선염, 그레이브스병(Grave's disease), 하시모토(Hashimoto) 갑상선염, 면역 복합체 질병, 만성 피로 면역 기능이상 증후군(CFIDS), 다발성 근염 및 피부 근염, 한랭 글로불린혈증, 혈전용해, 심근병증, 심상성 천포창, 간질성 폐 섬유증, 유육종증, I형 및 II형 진성 당뇨병, 1, 2, 3, 및 4형 지연형 과민증, 알러지 또는 알러지성 장애, 치료 단백질에 대한 원치 않은/의도하지 않은 면역 반응, 천식, 처그-스트라우스 증후군(Churg-Strauss syndrome)(알러지성 육아종증), 아토피 피부염, 알러지성 및 자극성 접촉 피부염, 두드러기, IgE-매개의 알러지, 죽상동맥경화증, 혈관염, 특발성 염증성 근육병증, 용혈병, 알츠하이머병, 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증, 쇼그렌 및 건선으로부터 선택된다.

[0058] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 염증성 장 질병(IBD)을 치료하기 위해 사용된다.

[0059] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 궤양성 대장염을 치료하기 위해 사용된다.

[0060] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 크론병을 치료하기 위해 사용된다.

[0061] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 전신 홍반성 루푸스(SLE)를 치료하기 위해 사용된다.

[0062] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 유육종증을 치료하기 위해 사용된다.

[0063] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 연소성 관절염을 치료하기 위해 사용된다.

[0064] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 류마티스 관절염을 치료하기 위해 사용된다.

[0065] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 건선성 관절염을 치료하기 위해 사용된다.

[0066] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 강직성 척추염을 치료하기 위해 사용된다.

[0067] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 화농성 한선염을 치료

하기 위해 사용된다.

[0068] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 포도막염을 치료하기 위해 사용된다.

[0069] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 쇼그렌을 치료하기 위해 사용된다.

[0070] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 건선을 치료하기 위해 사용된다.

[0071] 또 다른 추가의 구현예에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 관절내, 기관지내, 복부내(intraabdominal), 낭내(intracapsular), 연골내, 강내(intracavitary), 복내(intracelial), 소뇌내, 대뇌실내(intracerebroventricular), 결장내, 자궁경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심막내, 복강내(intraperitoneal), 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척추내, 활막내, 흉내, 자궁내, 방광내, 볼루스(bolus), 질, 직장, 협측(buccal), 설하, 비강내 및 경피로부터 선택되는 적어도 하나의 방식에 의해 투여된다.

[0072] 또한, 본 발명은 다른 특정 구현예에서, 면역분석에 의한 시험 시료에서의 CD40 또는 그의 단편의 존재의 결정 방법을 특징으로 하며, 면역분석은 시험 시료를 본 명세서에 기재된 양태 및 구현예 중 임의의 것의 적어도 하나의 항체 또는 그의 항원-결합 부분 및 적어도 하나의 검출 가능한 표지와 접촉시키는 단계를 포함한다. 추가의 구현예에서, 상기 방법은 (i) 시험 시료를 적어도 하나의 항체 또는 그의 항원-결합 부분과 접촉시켜 제1 복합체를 형성하는 단계로서, 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 CD40 또는 그의 단편 상의 에피토프에 결합하는 단계; (ii) 복합체를 적어도 하나의 검출 가능한 표지와 접촉시켜 제2 복합체를 형성하는 단계로서, 검출 가능한 표지가 제1 복합체 상의, 또는 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 의해 결합되지 않은 CD40 또는 그의 단편 상의 에피토프에 결합하는 단계; 및 (iii) 제2 복합체에서 검출 가능한 표지에 의해 생성되는 신호에 기반하여, 시험 시료에서 CD40 또는 그의 단편의 존재를 검출하는 단계로서, CD40 또는 그의 단편의 존재가 검출 가능한 표지에 의해 생성되는 신호와 직접적으로 상호연관되는 단계를 추가로 포함한다. 추가의 관련 구현예에서, 상기 방법은 (i) 시험 시료를 적어도 하나의 항체 또는 그의 항원-결합 부분과 접촉시켜 제1 복합체를 형성하는 단계로서, 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 CD40 또는 그의 단편 상의 에피토프에 결합하는 단계; (ii) 복합체를 적어도 하나의 검출 가능한 표지와 접촉시켜 제2 복합체를 형성하는 단계로서, 검출 가능한 표지가 항체 또는 그의 항원-결합 부분으로의 결합을 위하여 CD40 또는 그의 단편과 경쟁하는 단계; 및 (iii) 제2 복합체에서 검출 가능한 표지에 의해 생성되는 신호에 기반하여, 시험 시료에서 CD40 또는 그의 단편의 존재를 검출하는 단계로서, CD40 또는 그의 단편의 존재가 검출 가능한 표지에 의해 생성되는 신호와 간접적으로 상호연관되는 단계를 추가로 포함한다.

[0073] 일 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 결합 영역, 예를 들어, CDR을 포함하는 DVD-Ig를 제공한다. 일 구현예에서, 본 발명의 DVD-Ig는 4개의 폴리펩티드 쇄를 포함하며, 2개의 폴리펩티드 쇄는 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n을 포함하며, VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이며, VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이며, C는 중쇄 불변 도메인이며, X1은 링커이되, 단, 그것은 CH1이 아니며, X2는 Fc 영역이며; 2개의 폴리펩티드 쇄는 VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n을 포함하며, VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이며, VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이며, C는 경쇄 불변 도메인이며, X1은 링커이되, 단, 그것은 CH1이 아니며, X2는 Fc 영역을 포함하지 않으며; n은 0 또는 1이며; 상기 결합 단백질의 상기 4개의 폴리펩티든 쇄는 4개의 기능성 항원 결합 부위를 형성한다. 일 구현예에서, DVD의 제1(및/또는 제2) 중쇄는 SEQ ID NO: 6, 42 및 8에 기재된 바와 같은 CDR 세트를 포함한다. 일 구현예에서, 제1(및/또는 제2) 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 21, 11 및 12에 기재된 바와 같은 CDR 세트를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 DVD-Ig는 단일특이적이며, huCD40에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 DVD-Ig는 다중특이적이며, CD40 및 제2 분자 표적에 결합한다.

도면의 간단한 설명

[0074] **도 1a**는 효능제 대조군 및 알려져 있는 길항제 항체(4D11(아스텔라스(Astellas)) 및 Bib(베링거(Boehringer)))에 비한 키메라 항체(항체 1(Ab1))의 길항 활성을 그래프로 도시한 것이다. **도 1b**는 도 1a와 동일한 효능제 및 길항제 대조군을 사용한 효능제 분석에서 동일한 키메라 항체 Ab1의 활성을 그래프로 도시한 것이다.

도 2는 항체 4D11, 항체 B1b, IgG 항체(대조군) 및 효능제 대조군 항체(2141)에 비한 인간화 항체 Ab101의 효능

제 활성(도 2a) 및 길항제 활성(도 2b)을 그래프로 도시한 것이다.

도 3은 인간화 항체 Ab101의 생체내 연구로부터의 결과를 그래프로 도시한 것이다. 도 3a는 Ig 대조군, CTLA4-Ig 융합체 또는 Ab101 항체와 함께 인간 PBMC를 제공한 hu*scid* 마우스에서의 IgG 생성을 그래프로 도시한 것이다. 도 3b는 도 3a와 동일한 작용제를 투여한 동일한 마우스 모델에서의 B 세포 생존을 그래프로 도시한 것이다.

도 4는 항-인간 CD40 쥣과 항체 길항제의 아미노산 서열 정렬 및 정렬 공통 서열을 보여준다. **도 4a**는 항체 3(Ab3)의 가변 경쇄(SEQ ID NO: 48), Ab1의 가변 경쇄(SEQ ID NO: 9) 및 항체 2(Ab2)의 가변 경쇄(SEQ ID NO: 76) 및 가변 경쇄 공통 서열(SEQ ID NO: 116)의 서열 정렬을 보여준다. **도 4b**는 Ab3의 가변 중쇄(SEQ ID NO: 44), Ab1의 가변 중쇄(SEQ ID NO: 5) 및 Ab2의 가변 중쇄(SEQ ID NO: 75)의 서열 정렬 및 가변 중쇄 공통 서열(SEQ ID NO: 117)의 서열 정렬을 보여준다.

도 5a 및 도 5b는 실시예 7에 기재된 단핵구 활성화 분석에서 인간 CD40 상의 Ab102의 대표 중화 효력(길항제 활성)(도 5a) 및 효능제 활성(도 5b)을 그래프로 도시한 것이다. 단핵구 활성화는 각 분석 내의 TNF 농도의 증가와 부합한다.

도 6은 항체 138(Ab138)의 예방적 투여와 함께, 내시경 점수의 용량 반응성 억제를 그래프로 도시한 것이다. 항체 138을 15, 5, 1.5 및 0.5 mg/kg의 용량에서 시험하였다. IgG 음성 대조군을 사용하였다. 항 p40IL-12/23 처치를 양성 대조군으로 사용하였다. 질병은 동물로 전달되는 CD45Rbhi 세포에 의해 매개된다. RBlow는 음성 대조군을 지칭한다. CD45RBlow 세포는 질병을 매개하지 않는다.

도 7은 항체 138(Ab138)의 투여와 함께, 결장에서의 IBA1+ 대식구를 결정하기 위한 면역조직화학적 분석의 결과를 그래프로 도시한 것이다. 결장 섹션의 조직학적 분석에 의해, 대식구의 감소(일반적인 염증의 척도)가 나타났다. IgG 음성 대조군을 사용하였다. 항 p40IL-12/23 처치를 양성 대조군으로서 사용하였다.

도 8은 대장염의 T-세포 전달 모델에서 마지막 투여 96시간 후의 순환 항체 138(Ab138)의 혈청 수준(C_{trough}와 동일)을 그래프로 도시한 것이다. 혈청 수준은 용량 반응성인 것으로 나타났다. 항 p40IL-12/23 처치를 양성 대조군으로서 사용하였다. 0.5 mg/kg 그룹에서 오직 1마리의 동물만이 측정 가능한 수준의 Ab138을 가졌다.

도 9a는 대장염 마우스 모델에서 항체 138의 투여 후의 내시경 결과를 그래프로 도시한 것이다. 항체 138(Ab138) 처치를 내시경 질병 확인 후에, 세포 주입 3주 후 개시하고, MEDAI 합계 점수의 용량 반응성 억제를 기록하였다. 가장 높은 용량(15 mg/kg)은 통계적 유의성에 도달하였다(도 9a).

도 9b는 항체 138의 투여 후의 조직학 결과를 그래프로 도시한 것이다. 골수 염증의 척도로서의 결장 내의 IBA1+ 대식구의 조직학적 분석은 도 9b에 나타나 있다.

도 10은 Ab102가 오직 비히클만으로 처치된 대조군 동물(실선)에 비하여 항 KLH IgM 및 항 KLH IgG(파선)를 억제하는 것을 보여주는 결과를 그래프로 도시한 것이다. 사이노몰거스 원숭이(2마리/성별/그룹)에 5주 동안 0(오직 비히클만) 또는 10 mg/kg의 투여량으로 Ab102를 피하(SC) 투여하였다. 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH)을 제8일에 모든 동물에게 투여하였다. 혈청 시료를 KLH 투여(KLH 일)에 비하여 -11일, -7일, 0일, 4일, 7일, 10일, 14일 및 21일에 각 동물로부터 수집하였다.

도 11a는 항-CD40 항체 138 처치가 MRL/lpr 마우스에서 단백뇨를 예방하는 것을 보여주는 그래프이다. 마우스에 15 mg/kg의 항체를 2x/주로, 5 mg/kg의 항체를 2x/주로, 1.5 mg.kg의 항체를 2x/주로 또는 15 mg/kg의 항체를 1x/주로 투여하였다. 단독의 인산염 완충 식염수(PBS) 비히클의 투여를 대조군으로서 사용하였다. 단백뇨를 300 mg/dℓ 미만의 요단백 백분율로서 결정하였다.

도 11b는 항-CD40 항체 138 처치가 MRL/lpr 마우스의 생존을 연장시켰음을 보여주는 결과를 도시한 그래프이다. 동물에 15 mg/kg의 항체를 2x/주로, 5 mg/kg의 항체를 2x/주로, 1.5 mg.kg의 항체를 2x/주로 또는 15 mg/kg의 항체를 1x/주로 투여하였다. 단독의 비히클의 투여를 대조군으로서 사용하였다. 시간에 따른 생존 백분율이 나타나 있다.

도 12a는 항-CD40 항체 138 처치가 신장염의 발생을 예방하는 것을 보여주는 결과를 도시한 그래프이다. 도 12a는 15 mg/kg의 항체를 2x/주로, 5 mg/kg의 항체를 2x/주로, 1.5 mg.kg의 항체를 2x/주로 또는 15 mg/kg의 항체를 1x/주로 투여한 마우스에서, 제29일 및 제63일의 사구체 질병에 대한 항체 138의 효과를 보여준다. 단독의 PBS 비히클의 투여를 대조군으로서 사용하였다. 사구체 질병을 0 내지 4의 척도로 평가하였다. 사구체 질병 중

증도가 노화 MRL 마우스에서 악화되기 때문에, 항체 138은 5 및 15 mg/kg에서 사구체 질병을 최소화하는데 효능을 유지하였다. 혈관 주위 염증을 하기의 기준에 기반하여, 척도 0 내지 4로 점수화하였다: 0 - 최대 몇개의 희귀 림프구; 1 - 성긴 응집물을 형성하는 소수의 림프구; 2 - 분리된 작은 응집물을 형성하는 림프구; 3 - 인접 정맥의 내강 내로 가득차지만, 궁상 동맥을 완전히 둘러싸지 못하는 림프구의 양극화 응집물; 4 - 궁상 동맥을 완전히 둘러싸고 궁상 동맥의 외피 내로 연장되는 림프구 응집물.

도 12b는 항-CD40 항체 처치가 신장염의 발생을 예방하는 것을 보여주는 결과를 도시한 그래프이다. 도 12b는 15 mg/kg의 항체를 2x/주로, 5 mg/kg의 항체를 2x/주로, 1.5 mg.kg의 항체를 2x/주로 또는 15 mg/kg의 항체를 1x/주로 투여한 마우스에서 제29일 및 제63일의 신장 혈관주위(PV) 염증에 대한 항체 138의 효과를 보여주는 결과를 도시한 것이다. 단독의 PBS 비히클의 투여를 대조군으로서 사용하였다. 5 및 15 mg/kg의 항-CD40 항체는 제29일 및 제63일에 신장 내의 혈관주위(PV) 침윤물을 감소시키는데 효과적이었다.

도 12c는 항-CD40 항체 138 처치가 신장염의 발생을 예방하는 것을 보여주는 그래프이다. 도 12c는 15 mg/kg의 항체를 2x/주로, 5 mg/kg의 항체를 2x/주로, 1.5 mg.kg의 항체를 2x/주로 또는 15 mg/kg의 항체를 1x/주로 투여한 마우스에서, 제29일 및 제60일의 요세관사이질 염증(TI)에 대한 항체 138의 효과를 보여준다. 단독의 PBS 비히클의 투여를 대조군으로서 사용하였다. TI는 질병 초기에 감소하였다.

도 13a는 항-CD40 항체 138 처치가 타액선 염증을 예방하는 것을 보여주는 그래프이다. 도 13a는 15 mg/kg의 항체를 2x/주로, 5 mg/kg의 항체를 2x/주로, 1.5 mg.kg의 항체를 2x/주로 또는 15 mg/kg의 항체를 1x/주로 투여한 마우스에서, 제29일 및 제60일의 타액선 염증에 대한 항체 138의 효과를 보여준다. 단독의 PBS 비히클의 투여를 대조군으로서 사용하였다. 세관주위 염증을 하기의 기준에 기반하여, 척도 0 내지 4로 점수화하였다: 0 - 최대 몇개의 희귀 백혈구; 1 - 성긴 응집물을 형성하는 소수의 백혈구; 2 - 분리된 작은 응집물을 형성하는 백혈구; 3 - 도관을 완전히 둘러싸는 백혈구의 양극화 응집물; 4 - 타액선의 유선 실질 내로 연장되는 백혈구 응집물.

도 13b는 항-CD40 항체 138 처치가 관절 염증을 예방하는 것을 보여주는 그래프이다. 도 13b는 15 mg/kg의 항체를 2x/주로, 5 mg/kg의 항체를 2x/주로, 1.5 mg.kg의 항체를 2x/주로 또는 15 mg/kg의 항체를 1x/주로 투여한 마우스에서 제29일 및 제60일의 관절 염증에 대한 항체 138의 효과를 보여준다. 단독의 PBS 비히클의 투여를 대조군으로서 사용하였다. 관절 염증을 하기의 기준에 기반하여, 마우스마다 2개의 발의 각각에 대하여 0 내지 4의 척도로 점수화하였다: 0 - 염증 부재; 1 - 관절 공간 내의 소수의 백혈구; 2 - 경증의 활액 증식과 함께 관절 공간 내의 빈번한 백혈구; 3 - 중등의 활액 증식과 함께 관절 공간을 팽창시키는 백혈구; 4 - 현저한 골 미란 및/또는 증식과 함께 모든 관절 공간 내에 연장되고 합쳐지는 백혈구 및 활액 증식. 마우스마다 가능한 총 8점에 대하여 점수를 합산하였다.

도 14는 항-CD40 항체 138이 유세포분석에 의해 결정시, 비장에서 여포성 헬퍼 T 세포(Tfh) 및 배중심(GC) B 세포의 증량을 예방하는 것을 보여주는 4개의 그래프(i 내지 iv)의 패널이다. 마우스에 15 mg/kg의 항체를 2x/주로, 5 mg/kg의 항체를 2x/주로, 1.5 mg.kg의 항체를 2x/주로 또는 15 mg/kg의 항체를 1x/주로 투여하였다. 단독의 PBS 비히클의 투여를 대조군으로서 사용하였다. 패널 (i)은 제29일의 비장 내의 Tfh 세포의 수를 보여준다. 패널 (ii)는 제63일의 비장 내의 Tfh 세포의 수를 보여준다. 패널 (iii)은 제29일의 비장 내의 GC B 세포의 수를 보여준다. 패널 (iv)는 제63일의 비장 내의 GC B 세포의 수를 보여준다.

도 15a는 항-CD40 항체 138 처치가 제29일에 전체 순환 IgG 수준의 증가를 예방하는 것을 보여주는 그래프이다. 마우스에 15 mg/kg의 항체를 2x/주로, 5 mg/kg의 항체를 2x/주로, 1.5 mg.kg의 항체를 2x/주로 및 15 mg/kg의 항체를 1x/주로 투여하였다. 단독의 PBS 비히클의 투여를 대조군으로서 사용하였다.

도 15b는 항-CD40 항체 138 처치가 제63일에 전체 순환 IgG 수준의 증가를 예방하는 것을 보여주는 그래프이다. 마우스에 15 mg/kg의 항체를 2x/주로, 5 mg/kg의 항체를 2x/주로, 1.5 mg.kg의 항체를 2x/주로 및 15 mg/kg의 항체를 1x/주로 투여하였다. 단독의 PBS 비히클의 투여를 대조군으로서 사용하였다.

도 16a는 제29일의 항-이중 가닥 DNA(항-dsDNA) 역가에 대한 항-CD40 항체 138 처치의 효과를 보여주는 그래프이다. 마우스에 15 mg/kg의 항체를 2x/주로, 5 mg/kg의 항체를 2x/주로, 1.5 mg.kg의 항체를 2x/주로 또는 15 mg/kg의 항체를 1x/주로 투여하였다. 단독의 PBS 비히클의 투여를 대조군으로서 사용하였다. 제29일에, 항-dsDNA 역가를 결정하였다.

도 16b는 제63일의 항-이중 가닥 DNA(항-dsDNA) 역가에 대한 항-CD40 항체 138 처치를 보여주는 그래프이다. 마우스에 15 mg/kg의 항체를 2x/주로, 5 mg/kg의 항체를 2x/주로, 1.5 mg.kg의 항체를 2x/주로 또는 15 mg/kg의 항체를 1x/주로 투여하였다. 단독의 PBS 비히클의 투여를 대조군으로서 사용하였다. 제63일에, 항-dsDNA 역가를

결정하였다.

도 17a는 항-CD40 항체 138의 예방적 투여에 의해 단백뇨가 예방되었음을 보여주는 그래프이다. 예방적 처치를 마우스에서 26주령에 시작하고, 단백뇨 마우스를 연구로부터 배제하였다. 마우스에 15 ㎎/㎏의 항체를 2x/주로, 1.5 ㎎.㎏의 항체를 2x/주로 또는 15 ㎎/㎏의 항체를 1x/주로 투여하였다. 단독의 PBS 비히클의 투여를 대조군으로서 사용하였다. 단백뇨를 300 ㎎/㎗ 미만의 뇨단백 백분율로서 결정하였다.

도 17b는 SLE 마우스 모델을 사용하여 항-CD40 항체 138의 예방적 투여가 생존을 연장시켰음을 보여주는 그래프이다. 예방적 처치를 마우스에서 26주령에 시작하고, 단백뇨 마우스를 연구로부터 배제하였다. 마우스에 15 ㎎/㎏의 항체를 2x/주로, 1.5 ㎎.㎏의 항체를 2x/주로 또는 15 ㎎/㎏의 항체를 1x/주로 투여하였다. 단독의 PBS 비히클의 투여를 대조군으로서 사용하였다. 36주령까지 생존 백분율을 평가하였다.

도 18a는 복강내 15 ㎎/㎏, 2x/주의 용량의 항체 138로 처치된 마우스에서, 뇨단백 등급(㎎/㎗ 당량)에 의해 나타낸 바와 같이, 시간이 지남에 따라 낮은 단백뇨가 발생하는 것을 보여주는 그래프이다. 복강내, 2x/주로 투여한 비히클 PBS를 대조군으로서 사용하였다. 프레드니솔론을 10 ㎎/㎏의 용량으로 경구(PO)로 1일 1회(SID) 제공하였다. 비히클 PBS 미처리 대조군 마우스 또는 프레드니솔론 처치된 마우스 중 어느 것에서도 낮은 단백뇨가 발생하지 않았다. 단백뇨의 역치는 300 ㎎/㎗로 표시된다.

도 18b는 복강내 15 ㎎/㎏ 2x/주의 용량으로 항체 138로 처치된 마우스에서의 단백뇨로부터의 회복 속도를 보여주는 그래프이다. 정상 뇨단백 백분율에 의해 결정시 단백뇨로부터의 회복 속도에 기반하여, 단백뇨의 회복까지의 평균 시간은 23±7일이었다. 복강내, 2x/주로 투여한 비히클 PBS를 대조군으로서 사용하였다. 프레드니솔론을 10 ㎎/㎏의 용량으로 경구(PO)로 1일 1회(SID) 제공하였다.

도 18c는 복강내 15 ㎎/㎏, 2x/주의 용량으로 항-CD40 항체 138로 처치된 마우스에서, 생존 백분율에 의해 나타낸 바와 같이 생존이 유의미하게 연장되었음을 보여주는 그래프이다. 복강내, 2x/주로 투여한 비히클 PBS를 대조군으로서 사용하였다. 프레드니솔론을 경구(PO)로 1일 1회(SID) 제공하였다.

도 19a는 타액 생성이 복강내 15 ㎎/㎏ 2x/주, 1.5 ㎎/㎏ 2x/주, 15 ㎎/㎏ 1x/주의 용량의 항체 138로의 예방적 처치에 의해 유지되는 것을 보여주는 그래프이다. 비히클 PBS를 대조군으로서 사용하였다. 프레드니솔론을 10 ㎎/㎏의 용량으로 투여하였다. 더 어린 비-질병 마우스인 7주령 NZBWF-1 마우스에서의 타액 생성을 추가의 비교로서 사용하였다. 타액의 양(㎎)을 결정하였다. 항-CD40 처치된 마우스에 의한 타액 생성은 비교적 균일하였다.

도 19b는 타액 부피가 복강내 15 ㎎/㎏ 2x/주, 1.5 ㎎/㎏ 2x/주, 15 ㎎/㎏ 1x/주의 용량의 항-CD40 항체 138로의 예방적 처치에 의해 유지되는 것을 보여주는 그래프이다. 비히클 PBS를 대조군으로서 사용하였다. 프레드니솔론을 10 ㎎/㎏의 용량으로 투여하였다. 타액 부피/체중(㎎/gm)을 결정하였다. 항-CD40 항체 처치된 마우스에 의한 타액 생성은 미처치 대조군 마우스에서보다 유의미하게 더 컸다.

도 20a는 타액 생성이 15 ㎎/㎏의 용량의 항-CD40 항체 138로의 치료적 처치에 의해 유지되는 것을 보여주는 그래프이다. 프레드니솔론을 10 ㎎/㎏의 용량으로 투여하였다. 11주령 마우스에서의 타액 생성을 추가의 비교로서 사용하였다. 타액의 양(㎎)을 결정하였다.

도 20b는 타액 생성이 15 ㎎/㎏의 용량의 항-CD40 항체 138로의 치료적 처치에 의해 유지되는 것을 보여주는 그래프이다. 프레드니솔론을 10 ㎎/㎏의 용량으로 투여하였다. 11주령 마우스에서의 타액 생성을 추가의 비교로서 사용하였다. 타액 부피/체중(㎎/gm)을 결정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0075] 본 발명은 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 및 그의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 다양한 양태는 항체 및 항체 단편, 및 그의 약제학적 조성물, 및 이러한 항체 및 단편을 제조하기 위한 핵산, 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포에 관한 것이다. 시험관내 또는 생체내에서 인간 CD40을 검출하기 위한, 인간 CD40/CD40L 활성을 억제하기 위한; 그리고 질병 또는 장애, 예를 들어, 만성 염증성 질병 및 크론병을 예방하거나 치료하기 위한 본 발명의 항체의 이용 방법도 또한 본 발명에 포함된다.

[0076] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용된 과학 및 기술 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 용어의 의미와 범위는 명확해야 하지만, 임의로 잠재적으로 모호성이 있는 경우에, 본 명세서에 제공되는 정의는 임의의 사전적 또는 외부 정의보다 우선한다. 또한, 문맥에 의해 다르게 요구

되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함할 것이며, 복수 용어는 단수를 포함할 것이다. 본 출원에서 "또는"의 사용은, 달리 언급되지 않는 한, "및/또는"을 의미한다. 또한, 용어 "포함하는" 및 다른 형태, 예를 들면, "포함한다" 및 "포함된"의 사용은 비제한적인 것이다. 또한, "요소" 또는 "성분"과 같은 용어는, 달리 특별히 언급되지 않는 한, 하나의 단위를 포함하는 요소 및 성분, 및 하나 초과의 하위단위를 포함하는 요소 및 성분 모두를 포함한다.

[0077] 일반적으로, 본 명세서에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학 및 혼성화 및 그의 기술과 관련하여 사용되는 명명법은 해당 분야에 널리 공지되어 있으며 흔히 사용되는 것이다. 본 발명의 방법 및 기술은 달리 나타내지 않는 한 일반적으로 해당 분야에 널리 공지되어 있고, 본 명세서 전반에 걸쳐 인용되고 논의된 다양한 일반적 및 더욱 구체적인 참고문헌에 기재된 바와 같은 통상적인 방법에 따라 수행된다. 효소적 반응 및 정제 기술은 해당 분야에서 통상적으로 달성되거나 본 명세서에 기재된 바와 같이 제조업자의 설명서에 따라 수행된다. 본 명세서에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학 및 의학적 및 약제 화학 및 그의 실험 절차 및 그의 기술과 관련하여 사용되는 명명법은 해당 분야에 널리 공지되어 있으며 통상적으로 사용되는 것이다. 표준 기술은 화학적 합성, 화학적 분석, 약제 제조, 제형화 및 전달, 및 환자 치료를 위해 사용된다.

[0078] 본 발명이 더욱 용이하게 이해될 수 있도록, 선택 용어는 하기에 정의된다.

[0079] 본 명세서에 사용되는 용어 "폴리펩티드"는 아미노산의 임의의 폴리머 쇄를 지칭한다. 용어 "펩티드" 및 "단백질"은 용어 폴리펩티드와 상호교환 가능하게 사용되며, 아미노산의 폴리머 쇄도 지칭한다. 용어 "폴리펩티드"는 천연 또는 인공 단백질, 단백질 단편 및 단백질 서열의 폴리펩티드 유사체를 포함한다. 폴리펩티드는 단량체 또는 폴리머일 수 있다.

[0080] 용어 "분리된 단백질" 또는 "분리된 폴리펩티드"는 그의 기원 또는 유래 공급원에 의해 그의 천연 상태에서 그를 수반하는 천연적으로 회합된 성분과 회합되어 있지 않거나; 동일한 종으로부터의 다른 단백질이 실질적으로 없거나; 상이한 종으로부터의 세포에 의해 발현되거나; 천연에서 존재하지 않는 단백질 또는 폴리펩티드이다. 따라서, 화학적으로 합성되거나, 그것이 천연적으로 기원하는 세포와 상이한 세포계에서 합성되는 폴리펩티드는 그의 천연적으로 회합된 성분으로부터 "분리"될 것이다. 단백질은 또한 해당 분야에 널리 공지된 단백질 정제 기술을 이용한 분리에 의해 천연적으로 회합된 성분이 실질적으로 없게 할 수 있다. 분리된 폴리펩티드의 일 예는 분리된 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다.

[0081] 본 명세서에 사용되는 용어 "회수"는 예를 들면, 해당 분야에 널리 공지된 단백질 정제 기술을 이용한 분리에 의해 천연적으로 회합된 성분이 실질적으로 없는 폴리펩티드와 같은 화학 종이 되게 하는 과정을 지칭한다.

[0082] 본 명세서에 사용되는 용어 "인간 CD40" 및 "인간 CD40 야생형"(본 명세서에 hCD40, hCD40wt로 약칭)은 I형 막횡단 단백질을 지칭한다. 일 구현예에서, 용어 인간 CD40은 표준 재조합 발현 방법에 의해 제조될 수 있는 재조합 인간 CD40(rhCD40)을 포함하는 것으로 의도된다. 표 1은 해당 분야에 공지되어 있는 인간 CD40(즉, SEQ ID NO: 1) 및 그의 세포외 도메인(즉, SEQ ID NO: 107)의 아미노산 서열을 제공한다.

표 1

인간 CD40의 서열

[0083]

서열 식별자	단백질	서열
SEQ ID NO.:1	인간 CD40	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCC SLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETH CHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSE ACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFS NVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQD RLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKKPTNKAPH PKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDG KESRISVQERQ
SEQ ID NO.:107	인간 CD40 세포외 도메인	EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTE TECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQ QKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCV

[0084] 본 명세서에 사용되는 "생물학적 활성"은 CD40 수용체의 모든 내재적인 생물학적 특성을 지칭한다. CD40의 생물학적 특성은 CD40L 결합; B 세포 발생에 관여; 림프구 활성화에 관여; 항원 제시 세포 기능에 관여; 수지상 세포, 대식구 및 B 세포의 활성 조절; 대식구 및 수지상 세포에서의 염증성 사이토카인의 생성 유도; 항원 제시의

상향-조절; T 세포 자극의 상향-조절; 및 B 세포에서의 면역글로불린 부류 전환 촉진을 포함하나 이들에 한정되지 않는다.

[0085] 항체, 단백질 또는 펩티드와 제2 화학 종의 상호작용과 관련하여 본 명세서에 사용되는 용어 "특이적인 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"은 상호작용이 화학 종 상의 특정 구조(예를 들면, 항원 결정기 또는 에피토프)의 존재에 좌우되는 것을 의미하며; 예를 들어, 항체는 일반적으로 단백질보다는 특정 단백질 구조를 인식하고 이에 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 대해 특이적이면, 표지된 "A" 및 항체를 포함하는 반응에서 에피토프 A(또는 유리, 비표지된 A)를 포함하는 분자의 존재는 항체에 결합되는 표지된 A의 양을 감소시킬 것이다.

[0086] 본 명세서에 사용되는 용어 "효능제"는 관심 분자, 예를 들어, CD40과 접촉되는 경우, 효능제의 부재 하에 관찰되는 활성 또는 기능의 세기에 비하여 분자의 특정 활성 또는 기능의 세기의 증가를 야기하는 조절제를 지칭한다.

[0087] 본 명세서에 사용되는 용어 "길항제" 또는 "억제제"는 관심 분자와 접촉되는 경우 길항제의 부재 하에 관찰되는 활성 또는 기능의 세기에 비하여 분자의 특정 활성 또는 기능의 세기의 감소를 야기하는 조절제를 지칭한다. 특정 관심 길항제는 인간 CD40(hCD40)의 생물학적 또는 면역학적 활성을 차단하거나 조절하는 것들을 포함한다. hCD40의 길항제 항체는 예를 들어, CD40L과 함께 배양되는(예를 들어, B 세포를 CD40L-발현 인간 T 세포와 배양하는)(또는 그에 노출되는) 일차 인간 B 세포의 CD86 상향조절을 억제할 수 있다. 일 구현예에서, 효능제 활성이 실질적으로 없는 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 효능제 분석, 예를 들어, 실시예 7에 기재된 효능제 단핵구 분석에서 음성 대조군과 동등하거나, 그로부터 1 표준 편차 이내인 활성의 수준을 갖는 것으로 정의된다.

[0088] 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 부재 하의 CD40 활성 또는 기능과 비교시, CD40 활성 또는 기능의 감소를 야기하는 길항제 항체 또는 그의 항원 결합 부분이다. 특정 구현예에서, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 효능제 활성이 실질적으로 없으며, 즉, 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 부재 하의 CD40 활성 또는 기능과 비교시 CD40 활성 또는 기능의 세기의 증가를 야기하지 않는다. 또한, 효능제 및 길항제 활성은 해당 분야에 공지된 방법을 사용하여, 예를 들어, NFkB 매개의 알칼리성 포스파타제(AP)에 연결된 인간 CD40을 발현하는 CD40 발현 리포터 세포주 또는 B 세포 분석을 사용하여 평가될 수 있다. 추가로, 일 구현예에서, 효능제 및 길항제 활성은 실시예 7에 기재된 시험관내 단핵구 효능제 및 길항제 분석을 사용하여 평가될 수 있다.

[0089] 용어 "CD40L로의 결합을 억제한다"는 리간드, CD40L로의 CD40의 결합을 방지하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 능력을 지칭한다. 이러한 CD40L로의 결합의 억제는 CD40L로의 CD40의 결합에 의해 매개되는 생물학적 활성의 감소 또는 폐지를 초래할 것이다.

[0090] 본 명세서에 사용되는 용어 "항체"는 광범위하게 4개의 폴리펩티드 쇄, 2개의 중(H)쇄 및 2개의 경(L)쇄로 이루어진 임의의 면역글로불린(Ig) 분자, 또는 Ig 분자의 필수 에피토프 결합 특징을 유지하는 그의 임의의 기능성 단편, 돌연변이체, 변이체 또는 유도체를 지칭한다. 이러한 돌연변이체, 변이체 또는 유도체 항체 형식은 해당 분야에 공지되어 있다. 이의 비제한적인 구현예는 하기에 논의되어 있다.

[0091] 전장 항체에서, 각 중쇄는 중쇄 가변 영역(본 명세서에 HCVR 또는 VH로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역으로 이루어져 있다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 이루어져 있다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 LCVR 또는 VL로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역으로 이루어져 있다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, CL로 이루어져 있다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역(FR)으로 지칭되는 더욱 보존된 영역 사이에 배치된 상보성 결정 영역(CDR)으로 지칭되는 초가변성 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각 VH 및 VL은 하기의 순서로 아미노-말단으로부터 카르복시-말단까지 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어져 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 면역글로불린 분자는 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위부류의 것일 수 있다.

[0092] 본 명세서에 사용되는 용어 항체의 "항원 결합 부분" 또는 "항원 결합 단편"(또는 간단히 "항체 부분" 또는 "항체 단편")은 항원(예를 들어, hCD40)에 특이적으로 결합하는 능력을 유지하는 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원-결합 기능이 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것이 나타났다. 또한 이러한 항체 구현예는 둘 이상의 상이한 항원에 특이적으로 결합하는; 이중특이적, 이중 특이적 또는 다중-특이적 형식일 수 있다. 용어 항체의 "항원 결합 부분" 또는"항원 결합 단편"에 포함되는 결합 단편의 예에는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어져 있는 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 이황화 가교에 의해 연결되는 2개의

Fab 단편을 포함하는 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어져 있는 Fd 단편, (iv) 항체의 단일의 아암(arm)의 VL 및 VH 도메인으로 이루어져 있는 Fv 단편, (v) 단일의 가변 도메인을 포함하는 dAb 단편(본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[Ward et al., (1989) Nature 341:544-546], Winter 등의 PCT 공개 제WO 90/05144 A1호); 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역(CDR)이 포함된다. 추가로, Fv 단편의 2개의 도메인, VL 및 VH가 개별 유전자에 의해 코딩되지만, 그들은, 재조합 방법을 이용하여, 그들을 VL 및 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 분자(단쇄 Fv(scFv)로 알려져 있음)를 형성하는 단일의 단백질 쇄로 제조될 수 있도록 하는 합성 링커에 의해 연결될 수 있다(예를 들어, 문헌[Bird et al. (1988) Science 242:423-426]; 및 문헌[Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883] 참조). 또한, 이러한 단쇄 항체는 용어 항체의 "항원-결합 부분" 또는 "항원 결합 단편"에 포함되는 것으로 의도된다. 다른 형태의 단쇄 항체, 예를 들어, 디아바디도 또한 포함된다. 디아바디는, VH 및 VL 도메인이 단일의 폴리펩티드 쇄 상에서 발현되지만, 너무 짧아서 동일한 쇄 상의 2개의 도메인 간에 쌍을 이루지 못하게 하는 링커를 사용하여, 도메인이 다른 쇄의 상보성 도메인과 쌍을 이루게 하고, 2개의 항원 결합 부위를 생성하는, 2가의 이중특이적 항체이다(예를 들어, 문헌[Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448]; 문헌[Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123]). 이러한 항체 결합 부분은 해당 분야에 공지되어 있다(문헌[Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp.(ISBN 3-540-41354-5)].

[0093] 본 명세서에 사용되는 용어 "항체 작제물"은 링커 폴리펩티드 또는 면역글로불린 불변 도메인에 연결된 본 발명의 하나 이상의 항원-결합 부분을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 링커 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 연결되는 2개 이상의 아미노산 잔기를 포함하며, 하나 이상의 항원-결합 부분을 연결시키기 위해 사용된다. 이러한 링커 폴리펩티드는 해당 분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448]; 문헌[Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123] 참조). 면역글로불린 불변 도메인은 중쇄 또는 경쇄 불변 도메인을 지칭한다. 인간 IgG 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 아미노산 서열은 해당 분야에 공지되어 있으며, 표 2에 나타나 있다.

표 2

인간 IgG 중쇄 불변 도메인 및 경쇄 불변 도메인의 서열

[0094]

단백질	서열 식별자	서열
		123456789**0**123456789**0**123456789**0**12
Ig 감마-1 불변 영역	SEQ ID NO.:2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Ig 감마-1 불변 영역 돌연변이	SEQ ID NO.:3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Ig 카파 불변 영역	SEQ ID NO.:4	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
Ig 람다 불변 영역	SEQ ID NO.:81	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

[0095] 추가로, 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 항체 또는 항체 부분과 하나 이상의 다른 단백질 또는 펩티드의 공유적 또는 비공유적 회합에 의해 형성되는 더 큰 면역접착(immunoadhesion) 분자의 일부일 수 있다. 이러한 면역접착 분자의 예에는 테트라머 scFv 분자를 제조하기 위한 스트렙토아비딘 코어 영역의 이용(문헌[Kipriyanov, S.M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101]) 및 2가 및 비오티닐화 scFv 분자를 제조하기 위한 시스테인 잔기, 마커 펩티드 및 C-말단 폴리히스티딘 태그의 이용(문헌[Kipriyanov, S.M., et al.

(1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058])이 포함된다. 항체 부분, 예를 들어, Fab 및 $F(ab')_2$ 단편은 통상적인 기법, 예를 들어, 각각 전체 항체의 파파인 또는 펩신 분해를 사용하여 전체 항체로부터 제조될 수 있다. 더욱이, 항체, 항체 부분 및 면역접착 분자는 본 명세서에 기재된 바와 같이 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 수득될 수 있다.

[0096] 본 명세서에 사용되는 "분리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 지칭하는 것으로 의도된다(예를 들어, hCD40에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 hCD40 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없다). 그러나, hCD40에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 다른 항원, 예를 들어, 다른 종으로부터의 CD40 분자와 교차-반응성을 가질 수 있다. 더욱이, 분리된 항체는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다.

[0097] 용어 "키메라 항체"는 하나의 종으로부터의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열 및 다른 종으로부터의 불변 영역 서열을 포함하는 항체, 예를 들어, 인간 불변 영역에 연결된 쥣과 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 지칭한다.

[0098] 용어 "CDR-이식 항체"는 하나의 종으로부터의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하지만, VH 및/또는 VL의 CDR 영역 중 하나 이상의 서열이 다른 종의 CDR 서열로 대체된 항체, 예를 들어, 쥣과 CDR 중 하나 이상(예를 들어, CDR3)이 인간 CDR 서열로 대체된 쥣과 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 지칭한다.

[0099] 용어 "카바트(Kabat) 넘버링", "카바트 정의" 및 "카바트 표지화"는 본 명세서에 상호교환 가능하게 사용된다. 해당 분야에 인식되는 이들 용어는 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 내의 다른 아미노산 잔기보다 더욱 가변성인(즉, 초가변성인) 아미노산 잔기의 넘버링 시스템을 지칭한다(문헌[Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad, Sci. 190:382-391] 및 문헌[Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242]). 중쇄 가변 영역에 있어서, 초가변 영역은 CDR1에 대하여 아미노산 위치 31 내지 35, CDR2에 대하여 아미노산 위치 50 내지 65, 및 CDR3에 대하여 아미노산 위치 95 내지 102의 범위이다. 경쇄 가변 영역에 있어서, 초가변 영역은 CDR1에 대하여 아미노산 위치 24 내지 34, CDR2에 대하여 아미노산 위치 50 내지 56, 및 CDR3에 대하여 아미노산 위치 89 내지 97의 범위이다.

[0100] 본 명세서에 사용되는 용어 "수용자" 및 "수용자 항체"는 프레임워크 영역 중 하나 이상의 아미노산 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 100%를 제공하거나 이를 인코딩하는 항체 또는 핵산 서열을 지칭한다. 일부 구현예에서, 용어 "수용자"는 불변 영역(들)을 제공하거나 이를 인코딩하는 항체 아미노산 또는 핵산 서열을 지칭한다. 또 다른 구현예에서, 용어 "수용자"는 프레임워크 영역 및 불변 영역(들) 중 하나 이상을 제공하거나 이를 인코딩하는 항체 아미노산 또는 핵산 서열을 지칭한다. 특정 구현예에서, 용어 "수용자"는 프레임워크 영역 중 하나 이상의 아미노산 서열의 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 100%를 제공하거나 이를 인코딩하는 인간 항체 아미노산 또는 핵산 서열을 지칭한다. 이러한 구현예에 따르면, 수용자는 인간 항체의 하나 이상의 특정 위치에 존재하지 않는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 또는 적어도 10개의 아미노산 잔기를 함유할 수 있다. 수용자 프레임워크 영역 및/또는 수용자 불변 영역(들)은 예를 들어, 생식계열 항체 유전자, 성숙 항체 유전자, 기능성 항체(예를 들어, 해당 분야에 널리 알려져 있는 항체, 개발 중인 항체 또는 상업적으로 입수 가능한 항체)로부터 유래되거나 수득될 수 있다.

[0101] 본 명세서에 사용되는 용어 "CDR"은 항체 가변 서열 내의 상보성 결정 영역을 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 각각에 3개의 CDR이 존재하며, 이는 가변 영역의 각각에 대하여 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 표기된다. 본원에 사용되는 용어 "CDR 세트"는 항원에 결합할 수 있는 단일의 가변 영역에 존재하는 3개의 CDR의 군을 지칭한다. 이들 CDR의 정확한 경계는 상이한 시스템에 따라 상이하게 정의된다. 카바트에 의해 기재된 시스템(문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991)])은 항체의 임의의 가변 영역에 적용 가능한 명확한 잔기 넘버링 시스템을 제공할 뿐 아니라 3개의 CDR을 정의하는 정밀한 잔기 경계도 또한 제공한다. 이들 CDR은 카바트 CDR로 지칭될 수 있다. 초티아(Chothia) 및 동료(문헌[Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)] 및 문헌[Chothia et al., Nature 342:877-883 (1989)])는 카바트 CDR 내의 특정한 하위-부분이 아미노산 서열의 수준에서 큰 다양성을 가짐에도 불구하고 거의 동일한 펩티드 백본 입체형태를 채택한다는 것을 발견하였다. 이들 하위-부분은 L1, L2, 및 L3 또는 H1, H2, 및 H3으로 표기되었으며, 여기서 "L" 및 "H"는 각각 경쇄 및 중쇄 영역을 나타낸다. 이들 영역은 초티아 CDR로 지칭될 수 있으며, 이는 카바트 CDR과 중첩되는 경계를 갖는다. 카바트 CDR과 중첩되는 CDR을 정의하는 다른 경계는 파들란(Padlan)(문헌[FASEB J. 9:133-139 (1995)]) 및 맥칼룸(MacCallum)(문헌[J

Mol Biol 262(5):732-45 (1996)])에 의해 기재되어 있다. 또 다른 CDR 경계 정의는 상기 시스템 중 하나를 엄격하게 따르지 않을 수 있으나, 그럼에도 불구하고, 비록 특정 잔기 또는 잔기의 그룹 또는 심지어 전체 CDR이 항원 결합에 유의적으로 영향을 미치지 않는다는 예측 또는 실험적 발견의 견지에서 단축될 수 있거나 길어질 수는 있지만, 카바트 CDR과 중첩될 것이다. 본 명세서에 사용된 방법은, 비록 바람직한 구현예가 카바트 또는 초티아 정의된 CDR을 사용한다고 해도, 이들 시스템 중 임의의 것에 따라 정의된 CDR을 이용할 수 있다.

[0102] 본 명세서에 사용되는 용어 "정규" 잔기는 초티아 등(문헌[J. Mol. Biol. 196:901-907 (1987)]; 문헌[Chothia et al., J. Mol. Biol. 227:799 (1992)], 둘 모두는 본 명세서에 참조로 포함됨)에 의해 정의되는 바와 같은 특정 정규 CDR 구조를 정의하는 CDR 또는 프레임워크 내 잔기를 지칭한다. 초티아 등에 따르면, 많은 항체의 CDR의 중요 부분은 아미노산 서열의 수준에서의 큰 다양성에도 불구하고 거의 동일한 펩티드 백본 입체형태를 갖는다. 각각의 정규 구조는 주로 루프를 형성하는 아미노산 잔기의 연속 세그먼트에 대한 펩티드 백본 비틀림 각의 세트를 특정한다.

[0103] 본 명세서에 사용되는 용어 "공여자" 및 "공여자 항체"는 하나 이상의 CDR을 제공하는 항체를 지칭한다. 바람직한 구현예에서, 공여자 항체는, 프레임워크 영역이 수득되거나 유도되는 항체와 상이한 종으로부터의 항체이다. 인간화 항체의 맥락에서, 용어 "공여자 항체"는 하나 이상의 CDR을 제공하는 비-인간 항체를 지칭한다.

[0104] 본원에서 사용되는 용어 "프레임워크" 또는 "프레임워크 서열"은 가변 영역에서 CDR을 제한 나머지 서열을 지칭한다. CDR 서열의 정확한 정의는 상이한 시스템에 의해 결정될 수 있으므로, 프레임워크 서열의 의미는 상응하게 상이한 해석을 갖는다. 6개의 CDR(경쇄의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3, 및 중쇄의 CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3)은 또한 경쇄 및 중쇄 상의 프레임워크 영역을 각각의 쇄 상의 4개의 하위-영역(FR1, FR2, FR3 및 FR4)으로 나누며, 여기서 CDR1은 FR1과 FR2 사이에 위치되고, CDR2는 FR2와 FR3 사이에 위치되며, CDR3은 FR3와 FR4 사이에 위치된다. FR1, FR2, FR3 또는 FR4와 같은 특정 하위-영역을 명시하지 않고, 프레임워크 영역은 다른 것들에 의해 언급되는 바와 같이, 단일의 천연 발생 면역글로불린 쇄의 가변 영역 내의 조합된 FR을 나타낸다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 하나의 FR은 4개의 하위-영역 중 하나를 나타내고, FR들은 프레임워크 영역을 구성하는 4개의 하위-영역 중 2개 이상을 나타낸다.

[0105] 인간 중쇄 및 경쇄 수용자 서열이 해당 분야에 알려져 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 인간 중쇄 및 경쇄 수용자 서열은 표 3 및 표 4에 기재된 서열로부터 선택된다.

표 3

중쇄 수용자 서열

SEQ ID No.	단백질 영역	서열
		123456789**0**123456789**0**123456789**0**12
82	VH1-18&JH6 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
83	VH1-18&JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
84	VH1-18&JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
85	VH1-18&JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
82	21/28&JH4 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
86	21/28&JH4 FR2	WVRQAPGQRLEWMG
87	21/28&JH4 FR3	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
88	21/28&JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
89	VH2-26&JH6 FR1	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLS
90	VH2-26&JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLAH
91	VH2-26&JH6 FR3	RLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCAR
85	VH2-26&JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
92	M60&JH4 FR1	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTLYGFSLS
93	M60&JH4 FR2	WIRQPPGKALEWLA
94	M60&JH4 FR3	RLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAR
88	M60&JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
82	VH1-46&JH6 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
83	VH1-46&JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
95	VH1-46&JH6 FR3	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
85	VH1-46&JH6 FR4	WGQGTTVTVSS

[0106]

표 4

경쇄 수용자 서열

SEQ ID No.	단백질 영역	서열
		123456789**0**123456789**0**123456789**0**12
96	A20&JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
97	A20&JK4 FR2	WYQQKPGKVPKLLIY
98	A20&JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC
99	A20&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
96	III-3R&JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
114	III-3R&JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
100	III-3R&JK4 FR3	GVPSRISGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC
99	III-3R&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
101	A1&JK4 FR1	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
102	A1&JK4 FR2	WFQQRPGQSPRRLIY
103	A1&JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
99	A1&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
104	O1&JK2 FR1	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC
105	O1&JK2 FR2	WYLQKPGQSPQLLIY
103	O1&JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
106	O1&JK2 FR4	FGQGTKLEIKR

[0107]

[0108] 본 명세서에서 사용되는 용어 "생식계열 항체 유전자" 또는 "유전자 단편"은 특정 면역글로불린의 발현을 위한 유전적 재배열 및 돌연변이를 야기하는 성숙 과정을 겪지 않은 비-림프 세포에 의해 인코딩된 면역글로불린 서열을 지칭한다(예를 들어, 문헌[Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002)]; 문헌[Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001)] 참조). 본 발명의 다양한 구현예에 의해 제공되는 이점 중 하나는, 생식계열 항체 유전자가 성숙 항체 유전자보다 종 내 개체의 특징적인 필수 아미노산 서열 구조를 보존하는 가능성이 더 많아서, 이러한 종에서 치료적으로 사용되는 경우 외래 공급원으로부터의 것으로 인식될 가능성이 더 적다는 인식에 기인한다.

[0109] 본 명세서에 사용되는 용어 "주요(key)" 잔기는 항체, 특히 인간화 항체의 결합 특이성 및/또는 친화성에 보다 큰 영향을 갖는 가변 영역 내의 특정 잔기를 지칭한다. 주요 잔기는 다음 중 하나 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: CDR에 인접한 잔기, 잠재적 글리코실화 부위(N- 또는 O-글리코실화 부위일 수 있음), 희귀 잔기, 항원과 상호작용할 수 있는 잔기, CDR과 상호작용할 수 있는 잔기, 정규 잔기, 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역 간의 접촉 잔기, 버니어 구역 내의 잔기, 및 가변 중쇄 CDR1의 초티아 정의와 제1 중쇄 프레임워크의 카바트 정의 간에 중첩되는 영역 내의 잔기.

[0110] 본 명세서에 사용되는 용어 "인간화 항체"는 관심 항원(예를 들어, 인간 CD40)에 면역특이적으로 결합하며, 실질적으로 인간 항체의 아미노산 서열을 갖는 프레임워크(FR) 영역 및 실질적으로 비-인간 항체의 아미노산 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항체 또는 그의 변이체, 유도체, 유사체 또는 단편이다. CDR과 관련하여 본 명세서에 사용되는 용어 "실질적으로"는 비-인간 항체 CDR의 아미노산 서열과 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR을 지칭한다. 인간화 항체는 실질적으로 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인(Fab, Fab', F(ab')2, FabC, Fv)을 모두 포함하며, 여기서 CDR 영역 모두 또는 실질적으로 모두는 비-인간 면역글로불린(즉, 공여자 항체)의 것에 상응하며, 프레임워크 영역 모두 또는 실질적으로 모두는 인간 면역글로불린 공통 서열의 것이다. 바람직하게는, 인간화 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역(Fc), 전형적으로 인간 면역글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 인간화 항체는 경쇄 뿐만 아니라 중쇄의 적어도 가변 도메인 모두를 포함한다. 항체는 또한 중쇄의 CH1, 힌지, CH2, CH3, 및 CH4 영역을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 인간화 항체는 단지 인간화 경쇄만을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간화 항체는 단지 인간화 중쇄만을 포함한다. 특정 구현예에서, 인간화 항체는 단지 경쇄의 인간화 가변 도메인 및/또는 인간화 중쇄만을 포함한다.

[0111] 인간화 항체는 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 포함하는, 면역글로불린의 임의의 부류, 및 IgG1, IgG2, IgG3, 및

IgG4를 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 아이소타입으로부터 선택될 수 있다. 인간화 항체는 하나 초과의 부류 또는 아이소타입으로부터의 서열을 포함할 수 있으며, 특정 불변 도메인은 해당 분야에 널리 알려져 있는 기술을 사용하여 요망되는 이펙터 기능을 최적화하기 위해 선택될 수 있다.

[0112] 인간화 항체의 프레임워크 및 CDR 영역은 모 서열에 정확하게 상응할 필요는 없으며, 예를 들면, 공여자 항체 CDR 또는 공통 프레임워크는 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환, 삽입 및/또는 결실에 의해 돌연변이유발되어 이러한 부위에서 CDR 또는 프레임워크 잔기가 공여자 항체 또는 공통 프레임워크에 상응하지 않게 될 수 있다. 그러나, 바람직한 구현예에서, 이러한 돌연변이는 광범위하지 않을 것이다. 통상, 인간화 항체 잔기의 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95%는 모체 FR 및 CDR 서열의 잔기에 상응할 것이다. 본 명세서에 사용되는 용어 "공통 프레임워크"는 공통 면역글로불린 서열 내의 프레임워크 영역을 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 용어 "공통 면역글로불린 서열"은 관련 면역글로불린 서열의 과에서 가장 빈번히 존재하는 아미노산(또는 뉴클레오티드)으로부터 형성되는 서열을 지칭한다(예를 들어, 문헌[Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987] 참조). 면역글로불린의 과에서, 공통 서열 내의 각각의 위치는 과에서 이러한 위치에 가장 빈번히 존재하는 아미노산이 차지한다. 2개의 아미노산이 동등하게 빈번히 존재하는 경우, 어느 하나가 공통 서열 내에 포함될 수 있다.

[0113] 본 명세서에 사용되는 "버니어" 구역은 풋(Foote) 및 윈터(Winter)(본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[1992, J. Mol. Biol. 224:487-499])에 의해 기술되는 바와 같이 CDR 구조를 조절할 수 있고 항원에 대한 피팅을 미세-조율할 수 있는 프레임워크 잔기의 하위세트를 지칭한다. 버니어 구역 잔기는 CDR의 기초를 이루는 층을 형성하며 CDR의 구조 및 항체의 친화성에 영향을 미칠 수 있다.

[0114] 용어 "다가 결합 단백질"은 2개 이상의 항원 결합 부위를 포함하는 결합 단백질을 나타내기 위해 본 명세서에서 사용된다. 바람직하게는, 다가 결합 단백질은 3개 이상의 항원 결합 부위를 가지도록 조작되며, 일반적으로 천연 발생 항체가 아니다. 용어 "다중특이적 결합 단백질"은 2개 이상의 관련되거나 관련되지 않은 표적에 결합할 수 있는 결합 단백질을 지칭한다.

[0115] 본 명세서에서 상호교환 가능하게 사용되는 용어 "이중 가변 도메인" 또는 "DVD" 또는 "DVD-Ig"는 2개 이상의 항원 결합 부위를 포함하는 항원 결합 단백질이며 4가 또는 다가 결합 단백질이다. 이러한 DVD는 단일특이적일 수 있거나(즉, 하나의 항원에 결합할 수 있음), 다중특이적일 수 있다(즉, 2개 이상의 항원에 결합할 수 있음). 2개의 중쇄 DVD 폴리펩티드 및 2개의 경쇄 DVD 폴리펩티드를 포함하는 DVD 결합 단백질은 DVD Ig로 지칭된다. DVD Ig의 절반 각각은 중쇄 DVD 폴리펩티드 및 경쇄 DVD 폴리펩티드, 및 2개의 항원 결합 부위를 포함한다. 각각의 결합 부위는 항원 결합 부위마다 항원 결합에 관여되는 총 6개의 CDR을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 CDR(예를 들어, SEQ ID NO: 6, 42 및 8(중쇄) 및 21, 11 및 12(경쇄))은 항-CD40 DVD에 사용된다. DVD-Ig 구조의 예는 해당 분야에 알려져 있으며, 예를 들어, 본 명세서에 참조로 포함되는 미국 특허 제7,612,181호에 기재되어 있다.

[0116] 본 명세서에 사용되는 용어 "중화"는 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 사이토카인 수용체에 특이적으로 결합하는 경우 사이토카인 수용체의 생물학적 활성을 중화하는 것을 지칭한다. 바람직하게는, 중화 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 hCD40으로의 결합이 hCD40의 생물학적 활성의 억제를 초래하는 중화 항체이다. 바람직하게는, 중화 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 hCD40에 결합하고 hCD40의 생물학적 활성을 적어도 약 20%, 40%, 60%, 80%, 85% 이상 감소시킨다. 중화 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 의한 hCD40의 생물학적 활성의 억제는 해당 분야에 널리 알려져 있는 hCD40 생물학적 활성의 하나 이상의 지시자를 측정함으로써 평가될 수 있다.

[0117] 용어 "활성"은 항원에 대한 항체, 예를 들어, hCD40 항원에 결합하는 항-hCD40 항체의 결합 특이성/친화성 및/또는 항체, 예를 들어, hCD40으로의 결합이 hCD40의 생물학적 활성, 예를 들면, CD40L 결합; B 세포 발생에의 관여; 림프구 활성화에의 관여; 항원 제시 세포 기능에의 관여; 수지상 세포, 대식구 및 B 세포의 활성 조절; 대식구 및 수지상 세포에서의 염증성 사이토카인의 생성의 유도; 항원 제시의 상향-조절; T 세포 자극의 상향-조절; 및 B 세포에서의 면역글로불린 부류 전환의 촉진을 억제하는 항-hCD40 항체의 중화 효능과 같은 활성을 포함한다.

[0118] 본 발명의 항-CD40 항체의 활성을 평가하기 위한 예시적인 분석은 본 명세서에 기재된 바와 같은 시험관내 및 생체내 분석을 포함한다. 구체적으로, 분석을 사용하여, 항-CD40 항체가 효능제인지 길항제 항체인지 여부를 결정할 수 있다.

[0119] 예를 들어, 인간 CD40으로의 결합 및 CD40-CD40L 상호작용의 억제는 FACS 분석을 통해 인간 CD40-발현 세포주를

사용하여 분석할 수 있다. 길항제 및 효능제 활성을 NFkB 매개의 알칼리성 포스파타제(AP)에 연결된 인간 CD40을 발현하는 CD40-발현 리포터 세포주를 사용하여 평가할 수 있다. 신호가 CD40을 통해 수신되는 경우, NFkB 활성화는 비색 기질에 의해 측정되는 AP의 분비를 야기한다. 예시적인 길항제 분석으로서, CD40 리포터 세포주를 CD40L을 발현하는 Jurkat 세포주(생리학적 리간드 상호작용을 제공하기 위함) 또는 용해성 CD40L과 함께 배양하고, NFkB 신호를 차단하는 항-CD40 항체의 능력을 평가할 수 있다. 예시적인 효능제 분석으로서, 인간 CD40 리포터 세포주를 항-CD40 항체로 처치하고, NFkB 신호를 상기 기재된 바와 같이 측정할 수 있다.

[0120] 대안적으로, B 세포 효능제 분석이 이용될 수 있으며, 여기서, B 세포를 CD40 길항제 항체의 첨가 이전에 저 용량의 항-IgM 및 IL4로 활성화시킨다. B 세포 활성화의 증진을 CD86의 상향조절로서 측정할 수 있으며, 이는 결국 효능제 활성을 나타낸다. 유사하게, B 세포 길항제 분석이 이용될 수 있으며, 여기서, 일차 인간 B 세포를 CD40/CD40L 상호작용을 통해 B 세포 활성화 및 CD86 발현의 상향조절을 야기하는 CD40L-발현 인간 T 세포주와 배양한다. 일차 인간 B 세포의 CD86 상향조절의 억제는 길항제 활성을 나타낸다.

[0121] 용어 "에피토프"는 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 폴리펩티드 결정기를 포함한다. 특정 구현예에서, 에피토프 결정기는 분자, 예를 들어, 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 또는 술포닐의 화학적으로 활성인 표면 그룹화를 포함하며, 특정 구현예에서, 특정한 3차원 구조 특징 및/또는 특정한 전하 특징을 가질 수 있다. 다양한 구현예에서, 에피토프는 선형 또는 순차적 에피토프, 즉, 항원, 즉, CD40의 1차 구조의 아미노산의 선형 서열일 수 있다. 대안적으로, 다른 구현예에서, 에피토프는 항원이 그의 이차 구조를 취하는 경우 특정한 3차원 형상을 갖는 입체형태 에피토프일 수 있다. 예를 들어, 입체형태 에피토프는 항원의 비-선형, 즉, 비-순차적 아미노산을 포함할 수 있다.

[0122] 특정 구현예에서, 에피토프는 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 의해 결합되는 항원의 영역이다. 특정 구현예에서, 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 단백질 및/또는 마크로분자의 복합 혼합물에서 그의 표적 항원을 우선적으로 인식하는 경우 항원에 특이적으로 결합한다고 일컬어진다.

[0123] 본 명세서에 사용되는 용어 "인간 항체"는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 인간 항체는 예를 들어, CDR, 특히 CDR3에서 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 인코딩되지 않은 아미노산 잔기(예를 들어, 시험관내 무작위 또는 부위-지정 돌연변이유발 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입되는 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본 명세서에 사용되는 용어 "인간 항체"는 다른 포유동물 종, 예를 들어, 마우스의 생식계열로부터 유래되는 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상으로 이식되는 항체를 포함하는 것으로 의도되지 않는다.

[0124] 본 명세서에 사용되는 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나, 분리되는 모든 인간 항체, 예를 들어, 숙주 세포 내로 트랜스펙션되는 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현되는 항체(하기 섹션 II C에 추가로 기재됨), 재조합, 조합 인간 항체 라이브러리로부터 분리된 항체(문헌[Hoogenboom H.R., (1997) TIB Tech. 15:62-70]; 문헌[Azzazy H., and Highsmith W.E., (2002) Clin. Biochem. 35:425-445]; 문헌[Gavilondo J.V., and Larrick J.W. (2002) BioTechniques 29:128-145]; 문헌[Hoogenboom H., and Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378]), 인간 면역글로불린 유전자에 대하여 트랜스제닉인 동물(예를 들어, 마우스)로부터 분리된 항체(예를 들어, 문헌[Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295]; 문헌[Kellermann S-A., and Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597]; 문헌[Little M. et al (2000) Immunology Today 21:364-370] 참조) 또는 다른 DNA 서열로의 인간 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱을 수반하는 임의의 다른 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나, 분리되는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 재조합 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나, 특정 구현예에서, 이러한 재조합 인간 항체를 시험관내 돌연변이유발(또는 인간 Ig 서열에 대하여 트랜스제닉인 동물이 사용되는 경우, 생체내 체세포 돌연변이유발)로 처리하며, 이에 따라, 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 인간 생식계열 VH 및 VL 서열로부터 유래되고 이와 관련되지만, 생체내에서 인간 항체 생식계열 레퍼토리 내에 천연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다. 일 구현예는 해당 분야에 널리 알려져 있는 기술을 사용하여, 예를 들어, 비제한적으로 인간 Ig 파지 라이브러리, 예를 들어, Jermutus 등의 PCT 공개 제WO 2005/007699 A2호에 개시된 것들을 사용하여 생성될 수 있는 인간 CD40에 결합할 수 있는 완전 인간 항체를 제공한다.

[0125] 본 명세서에 사용되는 용어 "표면 플라스몬 공명"은, 예를 들어, 비아코어(BIAcore) 시스템(스웨덴 웁살라 및 미국 뉴저지주 피사카타웨이 소재의 파마시아 바이오센서 아베(Pharmacia Biosensor AB))을 사용하여 바이오센서 매트릭스 내에서 단백질 농도의 변화를 검출함으로써 실시간의 생물특이적 상호작용 분석을 가능하게 하는

광학 현상을 지칭한다. 추가의 설명을 위해 문헌[Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26]; 문헌[Jonsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627]; 문헌[Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131]; 및 문헌[Johnnson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277]을 참조한다.

[0126] 본 명세서에 사용되는 용어 "k_{on}"은 해당 분야에 알려져 있는 바와 같이 항체/항원 복합체를 형성하도록 항체가 항원에 회합하기 위한 온 속도 상수를 지칭하는 것으로 의도된다.

[0127] 본 명세서에 사용되는 용어 "k_{off}"는 해당 분야에 알려져 있는 바와 같이 항체/항원 복합체로부터의 항체의 해리에 대한 오프 속도 상수를 지칭하는 것으로 의도된다.

[0128] 본 명세서에 사용되는 용어 "K_D"는 해당 분야에 알려져 있는 바와 같이 특정 항체-항원 상호작용의 해리 상수를 지칭하는 것으로 의도된다.

[0129] 본 명세서에 사용되는 용어 "표지된 항체"는 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 확인을 가능하게 하는 혼입된 표지를 갖는 항체를 지칭한다. 바람직하게는, 표지는, 검출 가능한 마커, 예를 들면, 방사성표지된 아미노산의 혼입 또는 표시된 아비딘(예를 들면, 광학적 또는 비색 방법에 의해 검출될 수 있는 형광 마커 또는 효소 활성을 포함하는 스트렙트아비딘)에 의해 검출될 수 있는 비오티닐 모이어티의 폴리펩티드로의 부착이다. 폴리펩티드에 대한 표지의 예는 다음을 포함하나, 이에 제한되지 않는다: 방사성동위원소 또는 방사성핵종(예를 들면, ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho 또는 ^{153}Sm); 형광 표지(예를 들어, FITC, 로다민(rhodamine), 란탄계 인), 효소 표지(예를 들어, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 루시퍼라제, 알칼리성 포스파타제); 화학발광 마커; 비오티닐 기; 2차 리포터(예를 들어, 류신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그)에 의해 인식되는 미리 결정된 폴리펩티드 에피토프; 및 자성 작용제, 예를 들어, 가돌리늄 킬레이트.

[0130] 본 명세서에 사용되는 용어 "결정" 및 "결정화된"은 결정의 형태로 존재하는 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 지칭한다. 결정은 무정형 고체 상태 또는 액체 결정질 상태와 같은 다른 형태와 구별되는 고체 상태의 물질의 일 형태이다. 결정은 원자, 이온, 분자(예를 들면, 항체와 같은 단백질), 또는 분자 어셈블리(예를 들면, 항원/항체 복합체)의 규칙적이고, 반복되는, 3차원 어레이로 구성된다. 이들 3-차원 어레이는 해당 분야에서 잘 이해되는 특정한 수학적 관계에 따라 배열된다. 결정에서 반복되는 기본 단위, 또는 빌딩 블록은 비대칭 단위로 지칭된다. 주어진, 잘 정의된 결정학적 대칭을 따르는 배열 내 비대칭 단위의 반복은 결정의 "단위 셀"을 제공한다. 3차원 모두에서 규칙적인 번역에 의한 단위 셀의 반복은 결정을 제공한다. 문헌[Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)]을 참조한다.

[0131] 본 명세서에 사용되는 용어 "폴리뉴클레오티드"는 리보뉴클레오티드 또는 데옥시뉴클레오티드의 2개 이상의 뉴클레오티드의 폴리머 형태 또는 어느 하나의 뉴클레오티드 유형의 변형된 형태를 지칭한다. 이 용어는 DNA의 단일 및 이중 가닥 형태를 포함하나, 바람직하게는 이중-가닥 DNA이다.

[0132] 본 명세서에 사용되는 용어 "분리된 폴리뉴클레오티드"는, 그의 기원 때문에, "분리된 폴리뉴클레오티드"가 자연에서 "분리된 폴리뉴클레오티드"와 함께 발견되는 폴리뉴클레오티드의 모두 또는 일부와 회합되지 않거나; 자연에서는 연결되어 있지 않은 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되거나; 더 큰 서열의 일부로서 자연에서는 존재하지 않는 (예를 들면, 게놈, cDNA, 또는 합성 기원, 또는 이의 일부 조합의) 폴리뉴클레오티드를 의미할 것이다.

[0133] 본 명세서에 사용되는 용어 "벡터"는, 그것이 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하는 것으로 의도된다. 벡터의 하나의 유형은 추가의 DNA 세그먼트가 라이게이션될 수 있는 원형의 이중 가닥 DNA 루프를 지칭하는 "플라스미드"이다. 벡터의 또 다른 유형은 바이러스 벡터이며, 여기서 추가의 DNA 세그먼트는 바이러스 게놈 내로 라이게이션될 수 있다. 특정의 벡터는, 그들이 도입된 숙주 세포 내에서 자가 복제할 수 있다 (예를 들면, 박테리아 복제 원점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터(예를 들면, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입시 숙주 세포의 게놈내로 통합됨으로써 숙주 게놈과 함께 복제될 수 있다. 또한, 특정의 벡터는, 그들이 작동 가능하게 연결되는 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터"(또는 단순히, "발현 벡터")로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기법에서 이용되는 발현 벡터는 흔히 플라스미드의 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는, 플라스미드가 가장 일반적으로 사용되는 벡터 형태이므로 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 제공

하는, 바이러스 벡터(예를 들면, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스)와 같은 이러한 발현 벡터의 다른 형태를 포함하는 것으로 의도된다.

[0134] 용어 "작동 가능하게 연결된"은, 기술된 성분이 그들의 의도된 방식으로 기능하도록 하는 관계에 있는 병렬을 지칭한다. 코딩 서열에 "작동 가능하게 연결된" 조절 서열은, 코딩 서열의 발현이 조절 서열과 양립 가능한 조건하에서 달성되는 방식으로 라이게이션된다. "작동 가능하게 연결된" 서열은, 관심 유전자와 인접한 발현 조절 서열 및 관심 유전자를 조절하기 위해 트랜스로 작용하거나 소정의 거리에서 작용하는 발현 조절 서열 둘 다를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 용어 "발현 조절 서열"은, 그들이 라이게이션되는 코딩 서열의 발현 및 프로세싱을 수행하는데 필수적인 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 발현 조절 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호와 같은 효율적인 RNA 프로세싱 신호; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 향상시키는 서열(즉, 코작 공통 서열); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및, 목적하는 경우, 단백질 분비를 향상시키는 서열을 포함한다. 이러한 조절 서열의 특성은 숙주 유기체에 따라 상이하며; 원핵생물에서, 이러한 조절 서열은 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위, 및 전사 종결 서열을 포함하며; 진핵생물에서, 일반적으로, 이러한 조절 서열은 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함한다. 용어 "조절 서열"은, 이의 존재가 발현 및 프로세싱에 필수적인 성분을 포함하는 것으로 의도되며, 또한 이의 존재가 유리한 추가의 성분, 예를 들면, 리더(leader) 서열 및 융합 파트너 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 단백질 작제물은, 발현 카세트, 벡터, 재조합 숙주 세포를 포함한 해당 분야에 공지된 발현 벡터 및 숙주 세포, 및 단일 오픈 리딩 프레임으로부터 재조합 폴리단백질 및 프레(pre)-단백질의 재조합 발현 및 단백질분해 프로세싱을 위한 방법을 이용하여, 발현되고 정제될 수 있다(예를 들어, 본 명세서에 참조로 포함되는 WO 2007/014162호).

[0135] 본 명세서에 정의되는 "형질전환"은, 외인성 DNA가 숙주 세포로 유입되는 임의의 과정을 지칭한다. 형질전환은 해당 분야에 잘 알려져 있는 다양한 방법을 이용하여 천연 또는 인공 조건 하에서 발생할 수 있다. 형질전환은 외래 핵산 서열을 원핵 또는 진핵 숙주 세포 내로 삽입하기 위한 임의의 공지된 방법에 의존할 수 있다. 상기 방법은 형질전환되는 숙주 세포에 기반하여 선택되며, 바이러스 감염, 전기천공, 리포펙션, 및 입자 충격(particle bombardment)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 "형질전환된" 세포는, 삽입된 DNA가 자가 복제하는 플라스미드 또는 숙주 염색체의 일부로서 복제될 수 있는, 안정하게 형질전환된 세포를 포함한다. 그들은 또한 제한된 기간 동안 삽입된 DNA 또는 RNA를 일시적으로 발현하는 세포를 포함한다.

[0136] 본 명세서에 사용되는 용어 "재조합 숙주 세포"(또는 단순히 "숙주 세포")는, 외인성 DNA가 도입된 세포를 지칭하는 것으로 의도된다. 이러한 용어는 특정한 대상체 세포뿐만 아니라, 이러한 세포의 자손도 지칭하는 것으로 의도되는 것을 이해해야 한다. 특정의 변형이 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인하여 후대에서 발생할 수 있으므로, 이러한 자손은 사실상 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본 명세서에 사용되는 용어 "숙주 세포"의 범위 내에 포함된다. 바람직하게는, 숙주 세포는 임의의 생물계로부터 선택되는 원핵 및 진핵 세포를 포함한다. 바람직한 진핵 세포는 원생생물, 진균, 식물 및 동물 세포를 포함한다. 가장 바람직하게는, 숙주 세포는 원핵 세포주 이. 콜라이(*E. coli*); 포유동물 세포주 CHO, HEK 293 및 COS; 곤충 세포주 Sf9; 및 진균 세포 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0137] 표준 기술이 재조합 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성, 및 조직 배양 및 형질전환(예를 들면, 전기천공, 리포펙션)에 이용될 수 있다. 효소 반응 및 정제 기술은 제조처의 설명서에 따라 또는 해당 분야에서 통상적으로 달성되는 바와 같이 또는 본 명세서에 기재되는 바와 같이 수행될 수 있다. 상기의 기술 및 절차는 일반적으로 해당 분야에 널리 공지된 통상의 방법에 따라 및 본 명세서 전체에서 인용되고 논의되는 다양한 일반적이고 보다 구체적인 참조문헌에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 예를 들어, 임의의 목적을 위해 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))]을 참조한다.

[0138] 해당 분야에 공지되고 본 명세서에 사용되는 "유전자전이(transgenic) 유기체"는 전이유전자를 포함하는 세포를 갖는 유기체를 지칭하며, 여기서 유기체(또는 유기체의 조상) 내로 도입된 전이유전자는 유기체에서 천연적으로 발현되지 않는 폴리펩티드를 발현한다. "전이유전자"는 DNA 작제물이며, 이는 유전자전이 유기체가 발생하는 세포의 게놈 내로 안정적이면서 작동 가능하게 통합되어 유전자전이 유기체의 하나 이상의 세포 유형 또는 조직에서 인코딩된 유전자 생성물의 발현을 지시하는 DNA 작제물이다.

[0139] 용어 "조절하다(regulate/modulate)"는 상호교환 가능하게 사용되며, 본 명세서에 사용되는 바와 같이 관심 분자의 활성(예를 들면, hCD40의 생물학적 활성)에 있어서의 변화 또는 변경을 지칭한다. 조절은 관심 분자의 특정 활성 또는 기능의 세기의 증가 또는 감소일 수 있다. 분자의 예시적인 활성 및 기능은 결합 특성, 효소

활성, 세포 수용체 활성화, 및 신호 전달을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0140] 상응하게, 본 명세서에 사용되는 용어 "조절제"는 관심 분자의 활성 또는 기능(예를 들면, hCD40의 생물학적 활성)을 변화시키거나 변경시킬 수 있는 화합물이다. 예를 들면, 조절제는 조절제의 부재 하에서 관찰되는 활성 또는 기능의 세기와 비교하여 분자의 특정 활성 또는 기능의 세기의 증가 또는 감소를 유발할 수 있다. 특정 구현예에서, 조절제는 억제제이며, 이는 분자의 적어도 하나의 활성 또는 기능의 세기를 감소시키는 억제제이다. 예시적인 억제제는 단백질, 펩티드, 항체, 펩티바디(peptibody), 탄수화물 또는 작은 유기 분자를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 펩티바디는, 예를 들어, WO01/83525호에 기재되어 있다.

[0141] 본 명세서에 사용되는 용어 "유효량"은 장애 또는 그의 하나 이상의 증상의 중증도 및/또는 기간을 감소 또는 완화시키거나, 장애의 진행을 방지하거나, 장애의 퇴행을 유발하거나, 장애와 연관된 하나 이상의 증상의 재발, 발생, 발병, 또는 진행을 방지하거나, 장애를 검출하거나, 또 다른 요법(예를 들면, 예방제 또는 치료제)의 예방적 또는 치료적 효과(들)를 향상시키거나 개선시키기에 충분한 요법제의 양을 지칭한다.

[0142] 본 명세서에 사용되는 용어 "비-반응자"는 TNFα 억제제로의 처치 후에 그들의 임상 질병 상태의 개선이 없거나, 제한되거나, 부적당한 IBD(예를 들어, 크론병 또는 궤양성 대장염)(예를 들어, CDAI 점수의 감소의 결여, 코르티코스테로이드의 사용의 감소의 결여)를 갖는 대상체를 지칭하기 위해 사용된다. 일 구현예에서, TNF 비-반응자는 TNFα 억제제로의 처치 후에 그들의 크론병 활성 지수(CDAI) 점수에서 100점 이상의 감소를 달성하지 못한 IBD를 갖는 대상체이다. 일 구현예에서, 비-반응자는 TNFα 억제제로의 처치 후 특정 시간에 그들의 크론병 활성 지수(CDAI) 점수에서 100점 이상의 감소를 달성하지 못한 IBD를 갖는 대상체이다.

[0143] **I. 인간 CD40(hCD40)에 결합하는 항체**

[0144] 본 발명의 일 양태는 인간 CD40(hCD40)을 포함하는 CD40에 결합하는 길항제 인간화 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다. 본 발명의 다른 구현예는 CD40에 결합하는 쥣과 모노클로널 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 및 본 명세서에 기재된 항-CD40 쥣과 항체의 가변 영역을 포함하는 키메라 항체를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 유의미한 효능제 활성을 갖지 않는 길항제 항-CD40(예를 들어, 항-인간 CD40) 항체이다.

[0145] **1. 항체 1(Ab1)로부터 유래된 인간화 항-hCD40 길항제 항체**

[0146] 본 발명은 적어도 부분적으로 길항제 특징을 갖는, 특정 구현예에서 실질적인 효능제 활성을 갖지 않는 인간화 항-CD40 항체의 확인에 기반한다.

[0147] 실시예 1에 기재된 바와 같이, 3가지 길항제 항-hCD40 쥣과 항체, 즉, Ab1(SEQ ID NO: 9에 기재된 VL 서열 및 SEQ ID NO: 5에 기재된 VH 서열), Ab2(SEQ ID NO: 76에 기재된 VL 서열 및 SEQ ID NO: 75에 기재된 VH 서열) 및 Ab3(SEQ ID NO: 48에 기재된 VL 서열 및 SEQ ID NO: 44에 기재된 VH 서열)이 확인되었다.

[0148] 쥣과 길항제 항체 Ab1, Ab2 및 Ab3의 CDR 아미노산 서열의 정렬에 기반하여 공통 CDR 서열을 결정하였다. VH CDR1, CDR2 및 CDR3 영역에 대한 공통 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 78, 79 및 80에 기재되어 있으며, VL CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열에 대한 공통 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 108, 109 및 110에 기재되어 있다. 또한, 모든 서열은 하기 표 5 및 도 4에 기재되어 있다.

표 5

항-CD40 하이브리도마 CDR 아미노산 서열 정렬

	하이브리도마	CDR1	CDR2	CDR3
중쇄 (출현 순서로, 각각 SEQ ID NO: 45-47, 6-8, 6, 42, 8 및 78-80)	Ab3 Ab1 Ab2 **공통**	GYTFTSYTMH GFTFSDYGMN GFTFSDYGMN **GFTFSDYGMN** Y TS T H	YINPSSDYPNYNQKFKD YISSGRSNIYYADTVKG YISSGRGNIYYADTVKG **YISSGR NIYYADTVKG** NPSS YPN NQKF D	WGYSFDY SWGYFDV SWGYFDV **SWGYFDV** WGYS
경쇄 (출현 순서로, 각각 SEQ ID NO: 49-51, 10-12, 10-12 및 108-110)	Ab3 Ab1 Ab2 **공통**	RSSKSLLHS-NGNTYLY KSSQSLLNSGNQKNYLT KSSQSLLNSGNQKNYLT **KSSQSLLNSGNQKNYLT** R K H - GNT Y	RMSTLAS WASTRES WASTRES **WASTRES** RM LA	MQHLEYPLT QNDYTYPLT QNDYTYPLT **QNDYTYPLT** MQHLE

[0149]

[0150] 중쇄 CDR1 도메인의 공통 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 78(G(F/Y)TF(S/T)(D/S)Y(G/T)M(N/H))로서 기재되어 있다. 가변 중쇄 CDR2 도메인의 공통 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 79(YI(S/N)(S/P)(G/S)(R/S)(D/S/G)(N/Y)(I/P)(Y/N)Y(A/N)(D/Q)(T/K)(V/F)K(G/D))로서 기재되어 있다. 가변 중쇄 CDR3 도메인의 공통 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 80((S/W)(W/G)(G/Y)(Y/S)FDV)에 기재되어 있다.

[0151] 가변 경쇄 CDR1 도메인의 공통 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 108((K/R)SS(Q/K)SLL(N/H)S(G/-)N(Q/G)(K/N)(N/T)YL(T/Y))로서 기재되어 있다. 가변 경쇄 CDR2 도메인의 공통 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 109((W/R)(A/M)ST(R/L)(E/A)S)로서 기재되어 있다. 가변 경쇄 CDR3 도메인의 공통 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 110((Q/M)(N/Q)(D/H)(Y/L)(T/E)YPLT)으로서 기재되어 있다.

[0152] 일 구현예에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 108의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, SEQ ID NO: 109의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, SEQ ID NO: 110의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 가변 경쇄, 및 SEQ ID NO: 78의 아미노산 서열을 갖는 CDR1, SEQ ID NO: 79의 아미노산 서열을 갖는 CDR2, SEQ ID NO: 80의 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 가변 중쇄를 포함하는 항-CD40 길항제 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다.

[0153] 줫과 항체 Ab1, Ab2 및 Ab3의 확인 후에, 항체 Ab1 및 Ab3을 인간화를 위해 선택하였다(하기 실시예 2에 기재됨). 표 11 및 표 12는 각각 인간화 Ab1 및 Ab3의 CDR, VH 및 VL 영역의 아미노산 서열을 제공한다. 구체적으로, Ab3에 기반하여 9가지의 상이한 인간화 항체를 생성하였다(하기 실시예 2 및 표 12 참조). 또한, 다음을 포함하는 Ab1에 기반한 4가지 상이한 인간화 항체를 생성하였다:

[0154] A) huAb1VH.1/VL.1(SEQ ID NO: 13으로서 기재된 VH 아미노산 서열 및 각각 SEQ ID NO: 6, 7 및 8로서 기재된 VH CDR1, CDR2 및 CDR3 서열; 및 SEQ ID NO: 14로서 기재된 VL 아미노산 서열 및 각각 SEQ ID NO: 10, 11 및 12로서 기재된 VL CDR1, CDR2 및 CDR3 서열);

[0155] B) huAb1VH.1A/VL.1(SEQ ID NO: 15로서 기재된 VH 아미노산 서열 및 각각 SEQ ID NO: 6, 7 및 8로서 기재된 VH CDR1, CDR2 및 CDR3 서열; 및 SEQ ID NO: 14로서 기재된 VL 아미노산 서열 및 각각 SEQ ID NO: 10, 11 및 12로서 기재된 VL CDR1, CDR2 및 CDR3 서열);

[0156] C) huAb1VH.1/VL.1A(SEQ ID NO: 13으로서 기재된 VH 아미노산 서열 및 각각 SEQ ID NO: 6, 7 및 8로서 기재된 VH CDR1, CDR2 및 CDR3 서열; 및 SEQ ID NO: 16으로서 기재된 VL 아미노산 서열 및 각각 SEQ ID NO: 10, 11 및 12로서 기재된 VL CDR1, CDR2 및 CDR3 서열); 및

[0157] D) huAb1VH.1A/VL.1A(SEQ ID NO: 15로서 기재된 VH 아미노산 서열 및 각각 SEQ ID NO: 6, 7 및 8로서 기재된 VH CDR1, CDR2 및 CDR3 서열; SEQ ID NO: 16으로서 기재된 VL 아미노산 서열 및 각각 SEQ ID NO: 10, 11 및 12로서 기재된 VL CDR1, CDR2 및 CDR3 서열).

[0158] 인간화 버전의 Ab1을 추가로 변형시켜, 경쇄 CDR1 내의 가능한 탈아미드화 부위를 제거하였다. 6가지 변이체 huAb1 항체를 분석하고, 항체 중 4개가 CD40의 길항제인 것으로 확인되었다. 6가지 항체는 본 명세서에 Ab1v1, Ab1v2, Ab1v3, Ab1v4, Ab1v5 및 Ab1v6으로 지칭된다(CDR 및 가변 서열은 하기 표 13에 제공되어 있음). 6가지의 인간화 Ab1 변이체 중에, huAb1v1을 특히 뛰어난 길항제 활성을 갖는 것으로서 선택하였다. huAb1v1의 중쇄 가변 서열은 SEQ ID NO: 15에 제공되어 있으며, CDR1, CDR2 및 CDR3 서열은 각각 SEQ ID NO: 6, 7 및 8에 기재되어 있다. huAb1v1의 경쇄 가변 서열은 SEQ ID NO: 20에 제공되어 있으며, CDR1, CDR2 및 CDR3 서열은 각각 SEQ ID NO: 21, 11 및 12에 기재되어 있다.

[0159] 항체 huAb1v1의 중쇄 CDR2를 추가로 돌연변이유발하여, 17가지의 변이체를 초래하였다(하기 실시예 4에 기재). 이들 huAb1v1 중쇄 CDR2 변이체는 본 명세서에 huAb1v1CDR2v1 내지 huAb1v1CDR2v17로 지칭된다. huAb1v1CDR2v1 내지 huAb1v1CDR2v17 중쇄의 서열은 표 16에 제공되어 있으며, VH huAb1v1CDR2v7을 CD40에 대하여 특히 뛰어난 길항제 활성을 가지면서, 상대적으로 효능제 활성이 없게 유지하는 클론으로서 선택하였다. huAb1v1CDR2v7의 중쇄 가변 서열은 SEQ ID NO: 28에 제공되어 있으며, CDR1, CDR2 및 CDR3 서열은 각각 SEQ ID NO: 6, 42 및 8에 기재되어 있다.

[0160] huAb1v1CDR2v7 VH(CDR1, CDR2 및 CDR3 서열이 각각 SEQ ID NO: 6, 42 및 8에 기재된 SEQ ID NO: 28의 VH) 및 huAb1v1 VL(CDR1, CDR2 및 CDR3 서열이 각각 SEQ ID NO: 21, 11 및 12에 기재된 SEQ ID NO: 20의 VL)의 선택 후에, 가변 영역을 2가지 상이한 IgG 백그라운드 내로 클로닝하여 2가지 항-CD40 길항제 항체, 즉, Ab101 및 Ab102를 초래하였다. 표 6(및 표 19)은 이들 IgG 항체와 관련된 본 발명의 특정 구현예에 대한 전장 중쇄 및 경쇄 서열을 제공한다. 표 6에서, 불변 영역에 밑줄이 그어져 있으며, CDR 도메인은 볼드체이다.

표 6

인간화 항-CD40 항체 Ab101 및 Ab102 및 그의 중쇄 및 경쇄 서열

Ab	중쇄 서열	HC SEQ ID NO:	경쇄 서열	LC SEQ ID NO:
Ab101	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFS DYGMN**WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRGNIYY ADTVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR**SWGYFDV**WGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	39	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLL NRGNQKNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTR ES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYC**QNDYTYPLT**FGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	40
Ab102	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFS DYGMN**WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRGNIYY ADTVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR**SWGYFDV**WGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK	41	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLL NRGNQKNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTR ES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYC**QNDYTYPLT**FGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	40

[0161]

[0162] 따라서, 일 구현예에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 40에 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 및 SEQ ID NO: NO:39에 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함하는 길항제 항-CD40 항체(Ab101)에 관한 것이다. 대안적인 구현예에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 40에 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 및 SEQ ID NO: 41에 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함하는 길항제 항-CD40 항체(Ab102)에 관한 것이다.

[0163] 따라서, 본 발명은 길항제 활성을 갖는 쥣과, 키메라 및 인간화 항-CD40 항체를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 12에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 갖는 경쇄 가변 영역 및/또는 SEQ ID NO: 8에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다. 특정 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 SEQ ID NO: 6에 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, SEQ ID NO: 42에 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2, SEQ ID NO: 8에 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3, SEQ ID NO: 21에 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, SEQ ID NO: 11에 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 SEQ ID NO: 12에 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3을 포함한다. 특정 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 SEQ ID NO: 28에 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 SEQ ID NO: 20에 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 SEQ ID NO: 41에 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄; 및 SEQ ID NO: 40에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 SEQ ID NO: 39에 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄; 및 SEQ ID NO: 40에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0164] 표 5, 6, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18 및 19에 기재된 아미노산 서열(가변 또는 CDR)을 갖는 항체가 본 발명에 포함된다. 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 (a) SEQ ID NO: 10, 17, 19 또는 21에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 11에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 12에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 관한 것이다. 대안적으로, 또는 조합하여, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 (a) SEQ ID NO: 6에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 7 또는 42에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 8에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0165] 특정 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 (a) SEQ ID NO: 10에 기재된 아미노산 서열

을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 11에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 12에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 (a) SEQ ID NO: 6에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 7에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 8에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는다.

[0166] 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 (a) SEQ ID NO: 19에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 11에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 12에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 (a) SEQ ID NO: 6에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 7에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 8에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는다.

[0167] 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 (a) SEQ ID NO: 17에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 11에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 12에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 (a) SEQ ID NO: 6에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 7에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 8에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는다.

[0168] 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 (a) SEQ ID NO: 21에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 11에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 12에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 (a) SEQ ID NO: 6에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 7에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 8에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는다.

[0169] 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 (a) SEQ ID NO: 21에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 11에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 12에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 (a) SEQ ID NO: 6에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 42에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 8에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는다.

[0170] 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 (a) SEQ ID NO: 108에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 109에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 110에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 (a) SEQ ID NO: 78에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 79에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 80에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는다.

[0171] 본 발명의 또 다른 양태에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 SEQ ID NO: 5, 13, 15 또는 22 내지 38에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 SEQ ID NO: 9, 14, 16, 18, 20 또는 43에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0172] 특정 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 SEQ ID NO: 5에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0173] 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 SEQ ID NO: 13에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 14, 16 또는 18에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0174] 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 SEQ ID NO: 15에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20 또는 43에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0175] 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 SEQ ID NO: 28에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 20에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0176] 본 명세서에 기재된 항체, 특히 항체 Ab102는 CD40에 대한 실질적인 효능제 활성 없이 길항제 활성을 갖는다. 따라서, 항체 Ab102 및 Ab101에 의해 인식되는 에피토프에 결합하는 항체가 본 발명에 포함된다. 특정 구현예에서, 본 발명은 분리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 포함하며, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 인간 CD40에 결합하여, SEQ ID NO: 1의 국소 영역 Cys62-Phe67, Gln79-Cys83, Arg90-Thr99 및 Thr24-Cys37에 의해

정의되는 에피토프에 결합되는 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 함께 CD40이 CD40 리간드(CD40L)로 결합하는 것이 억제된다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 잔기 Cys62-Phe67(Cys62, Gly63, Glu64, Ser65, Glu66, Phe67), Gln79-Cys83(Gln79, His 80, Lys81, Tyr82, Cys83), Arg90-Thr99(Arg90, Val91, Gln92, Gln93, Lys94, Gly95, Thr96, Ser97, Glu98 및 Thr99) 및 Thr24-Cys37(Thr24, Ala25, Cys26, Arg27, Glu28, Lys29, Gln30, Tyr31, Leu32, Ile33, Asn34, Ser35, Gln36, Cys37) 중 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34개 또는 모두를 포함하는 인간 CD40 내의 에피토프에 결합하는 인간 CD40에 결합할 수 있는 항체 또는 그의 항원 결합 단편에 관한 것이다.

[0177] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 CD40에 대한 길항제 활성을 갖는 중쇄 CDR2 영역을 제공한다. 특히, VH CDR2 아미노산 서열 YISSGRXNIYYADTVKG(SEQ ID NO: 112)의 잔기 55(잔기 X)는 잔기 S55를 갖는 모체 CDR2 서열에 비하여 항체의 길항제 활성의 증가에서 역할을 수행하는 것으로 확인되었다. HC CDR2의 위치 55에서의 잔기 Thr, Asp, Val, Leu, Ile 및 Met은 위치 55에서의 다른 아미노산에 비하여 더 낮은 수준의 길항제 활성을 초래한다. 일 구현예에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 111의 아미노산 서열을 갖는 CDR2를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 11의 아미노산 서열을 갖는 CDR2를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다. 가변 항체 중쇄 및 경쇄에서 SEQ ID NO: 111과 조합될 수 있는 CDR1 및 CDR3 도메인 아미노산 서열은 예를 들어, 표 13 및 표 18을 포함하여, 도처에 기재되어 있다.

[0178] 추가의 구현예에서, 본 발명은 길항제/효능제 스위치로 확인된 잔기를 갖는 경쇄 CDR1 영역을 제공한다. 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 잔기 "S"에서 VL CDR1 영역 KSSQSLLNSGNQKNYLT(SEQ ID NO: 10)의 "NS" 모티프의 변형은 효능제 항체로의 길항제 항체 전환을 초래할 수 있다. 따라서, 일 구현예에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 113(KSSQSLLNXGNQKNYLT; 여기서 X는 아미노산 잔기 Pro이 아님)을 포함하는 CDR1 VL 영역을 갖는 길항제 항-CD40 항체를 포함한다.

[0179] 본 명세서에서 용어 "경쟁 항체"는 동일한 분자, 또는 안정하지만 비-공유적으로 결합된 슈퍼분자 엔티티, 바람직하게는 동일한 분자, 즉, CD40을 표적화하는 임의의 수의 항체를 지칭하며, 여기서 적어도 하나의 항체는, 바람직하게는, 표적 에피토프(상기 기재)에 대한 다른 항체의 접근을 입체적으로 방해하거나 다른 항체에 대한 표적의 친화성을 감소시키는 표적 엔티티의 입체형태를 유도 및/또는 안정화시키거나, 더욱 바람직하게는, 표적 에피토프와 충분히 가까이 인접하거나 표적 에피토프와 중첩되거나 이와 동일한, 가장 바람직하게는 중첩되거나 동일한, 특히, 동일한 에피토프에 결합하여 다른 항체의 표적 에피토프에 대한 접근을 직접적 차단함으로써, 또 다른 항체의 측정 가능한 결합을 특이적으로 감소시킬 수 있다. 2개의 에피토프는, 본 명세서에서 그들이 그들의 화학 구조, 바람직하게는, 그들의 아미노산 서열의 일부를 공유하는 경우, "중첩"된다고 하고, 그들의 화학 구조, 바람직하게는, 그들의 아미노산 서열이 동일한 경우, "동일"하다고 한다.

[0180] 특정 구현예에서, 경쟁 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 본 명세서에 제시된 항체 중 임의의 것과 경쟁하는 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다. 일 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, Ab101 또는 Ab102)와 경쟁할 수 있으며, 잔기 Cys62-Phe67, Gln79-Cys83, Arg90-Thr99 및 Thr24-Cys37을 포함하는 인간 CD40의 국소 에피토프에 결합하는 경쟁 항체를 제공한다.

[0181] 특정 구현예에서, 효능제 항체는 (a) SEQ ID NO: 6에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 7에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 8에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (a) SEQ ID NO: 74에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 11에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 12에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0182] 다른 특정 구현예에서, 효능제 항체는 (a) SEQ ID NO: 6에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 7에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 8에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (a) SEQ ID NO: 17에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 11에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 12에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0183] 추가의 구현예에서, 효능제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 SEQ ID NO: 15 또는 13에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 SEQ ID NO: 77 또는 43에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0184] **2. 항체 3(Ab3)으로부터 유래된 인간화 항-CD40 항체**

[0185] 쥣과 Ab3의 중쇄 및 경쇄의 인간화 버전에 대한 아미노산 서열은 하기 표 11에 제공되어 있다. 따라서, 본 발명은 추가로 항체 3(Ab3)으로부터의 가변 및/또는 CDR 서열을 포함하는 항체를 특징으로 한다.

[0186] 일 양태에서, 본 발명은 (a) SEQ ID NO: 49에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 50에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 51에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 (a) SEQ ID NO: 45에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 46에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 47에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 인간화 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0187] 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 (a) SEQ ID NO: 49에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 50에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 51에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 관한 것이다. 대안적으로, 또는 조합하여, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 (a) SEQ ID NO: 45에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 46에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 47에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0188] 본 발명의 또 다른 양태에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 SEQ ID NO: 44, 52, 54 또는 55에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 SEQ ID NO: 48, 53, 56 또는 57에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0189] 특정 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 SEQ ID NO: 44에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 48에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0190] 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 SEQ ID NO: 52에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 53, 56 또는 57에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0191] 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 SEQ ID NO: 54에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 53, 56 또는 57에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0192] 또 다른 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 SEQ ID NO: 55에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 53, 56 또는 57에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0193] **3. 항 CD40 키메라 항체**

[0194] 키메라 항체는 항체의 상이한 부분이 상이한 동물 종으로부터 유래된 분자, 예를 들어, 쥣과 모노클로널 항체로부터 유래된 가변 영역 및 인간 면역글로불린 불변 영역을 갖는 항체이다. 키메라 항체의 생성 방법은 해당 분야에 알려져 있다. 예를 들어, 그들 전체가 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[Morrison, Science 229:1202 (1985)]; 문헌[Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986)]; 문헌[Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202]; 미국 특허 제5,807,715호; 제4,816,567호; 및 제4,816,397호를 참조한다. 또한, 적절한 생물학적 활성의 인간 항체 분자로부터의 유전자와 함께, 적절한 항원 특이성의 마우스 항체 분자로부터의 유전자를 스플라이싱시킴에 의한, "키메라 항체"의 생성을 위해 개발된 기술(문헌[Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855]; 문헌[Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608]; 문헌[Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454], 각각은 그들 전체가 본 명세서에 참조로 포함됨)이 사용될 수 있다.

[0195] 또 다른 양태에서, 본 발명은 (a) SEQ ID NO: 10에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 11에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 12에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 (a) SEQ ID NO: 6에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 42에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 8에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 SEQ ID NO: 76에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 75에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는다.

[0196] 또 다른 양태에서, 본 발명은 (a) SEQ ID NO: 49에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 50에

기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 51에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 (a) SEQ ID NO: 45에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 46에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 47에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 SEQ ID NO: 48에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 44에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는다.

[0197] 또 다른 양태에서, 본 발명은 (a) SEQ ID NO: 10에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 11에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 12에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 (a) SEQ ID NO: 6에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR1; (b) SEQ ID NO: 7에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR2; 및 (c) SEQ ID NO: 8에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 SEQ ID NO: 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 5에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는다.

[0198] 전술한 분리된 항-CD40 항체 CDR 서열에 의해, 표 5, 11 내지 13 및 15 내지 18에 열거된 CDR 서열을 포함하는 항체를 포함하는 본 발명에 따라 분리된 신규한 과의 CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 확립된다. hCD40에 관하여 바람직한 CD40 결합 및/또는 중화 활성을 갖는 본 발명의 CDR을 생성하고, 이를 선택하기 위하여, 본 발명의 항체를 생성하고, 그들 항체의 CD40 결합 및/또는 중화 특징을 평가하기 위하여 해당 분야에 알려져 있는, 본 명세서에 구체적으로 기재된 것들을 포함하나 이들에 제한되지 않는 표준 방법이 사용될 수 있다.

[0199] **4. 본 발명의 항체의 특성화**

[0200] 본 발명의 항-CD40 항체는 길항제 항체이며, 예를 들어, 해당 분야에 알려져 있고, 본 명세서에 기재된 바와 같은 몇몇의 시험관내 및 생체내 분석 중 어느 하나에 의해 평가시, CD40 활성을 감소시키거나, 이를 중화시키는 높은 능력을 나타낼 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체는 길항제이며, 효능제 활성이 실질적으로 없다. 길항제 및 효능제 활성은 본 명세서에 기재된 것들을 포함하는 해당 분야에 알려져 있는 분석에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 인간 CD40으로의 결합 및 CD40-CD40L 상호작용의 억제를 FACS 분석을 통해 인간 CD40-발현 세포주를 사용하여 분석할 수 있다.

[0201] 일 구현예에서, 항-CD40 항체의 CD40 길항제 또는 효능제 활성을 리포터 세포주를 사용하여 결정한다. 예를 들어, 길항제 및 효능제 활성을 NFkB 매개의 알칼리성 포스파타제(AP)에 연결된 인간 CD40을 발현하는 CD40-발현 리포터 세포주를 사용하여 평가할 수 있다. 신호가 CD40을 통해 수신되는 경우, NFkB 활성화는 비색 기질에 의해 측정되는 AP의 분비를 야기한다. 예시적인 길항제 분석으로서, CD40 리포터 세포주를 CD40L을 발현하는 Jurkat 세포주(생리학적 리간드 상호작용을 제공하기 위함) 또는 용해성 CD40L과 함께 배양할 수 있으며, 여기서, NFkB 신호를 차단하는 항-CD40 항체의 능력(표준 방법에 의해 결정시 AP가 거의 존재하지 않거나 존재하지 않음)을 평가할 수 있다. 예시적인 효능제 분석으로서, 인간 CD40 리포터 세포주를 항-CD40 항체로 처치하고, NFkB 신호(음성 대조군 초과의 AP 존재로 관찰됨)를 상기 기재된 바와 같이 측정할 수 있다. CD40 리포터 세포주의 일 예는 HEK-Blue™ CD40L 세포(인비보겐(InvivoGen))이며, 이는 CD40 자극 후의 NF-κB 활성화 시의 배아 알칼리성 포스파타제(SEAP)의 분비를 통하여 CD40L의 생물활성을 측정하는 역할을 한다. QUANTI-Blue(인비보겐)를 사용하여 SEAP의 수준을 평가함으로써 CD40L-CD40 상호작용을 모니터링할 수 있다.

[0202] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 길항제 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 길항제 용해성 CD40L 리포터 분석에 의해 결정시, 0.4 nM 이하의 IC50을 갖는다. 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 길항제 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 Jurkat 세포주에서 길항제 CD40 리포터 분석에 의해 결정시 51 nM 이하의 IC50을 갖는다. 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 길항제 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 Jurkat 세포주에서 길항제 CD40 리포터 분석에 의해 결정시 3.4 nM 이하의 IC50을 갖는다. 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 길항제 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 Jurkat 세포주에서 길항제 CD40 리포터 분석에 의해 결정시 0.9 nM 이하의 IC50을 갖는다.

[0203] 일 구현예에서, 항-CD40 항체의 CD40 길항제 또는 효능제 활성을 B 세포 효능제 분석을 사용하여 결정한다. 예를 들어, B 세포 효능제 분석이 이용될 수 있으며, 여기서, B 세포를 CD40 길항제 항체의 첨가 이전에 저 용량의 항-IgM 및 IL4로 활성화시킨다. B 세포 활성화의 향상을 CD86의 상향조절로서 측정할 수 있으며, 이는 결국 효능제 활성을 나타낸다. 유사하게, B 세포 길항제 분석이 이용될 수 있으며, 여기서, 일차 인간 B 세포를 CD40L-발현 인간 T 세포주와 배양하며, 이는 CD40/CD40L 상호작용을 통해 B 세포 활성화 및 CD86 발현의 상향조절을 야기한다. 일차 인간 B 세포의 CD86 상향조절의 억제는 길항제 활성을 나타낸다.

[0204] 일 구현예에서, 항-CD40 항체의 CD40 길항제 또는 효능제 활성을 항체-의존적 세포-매개의 세포독성(ADCC) 매개의 분석을 사용하여 결정한다. 길항제 및 효능제 활성을 ADCC를 매개하는 항체의 능력에 의해 평가할 수 있다. 길항제 CD40 항체는 ADCC의 효율적인 매개체일 것인 한편, 효능제 항체는 ADCC 활성을 갖지 않을 것이다. 항체-의존적 세포독성(ADCC)은 표면 상에 발현되는 Fc 수용체를 통한 항체의 불변 영역으로의 결합에 의해 표적 세포를 인식하는 대식구, NK 세포, 호중구 세포 등의 활성화에 의해 유도되는 세포독성의 유형을 지칭한다. 보체-의존적 세포독성(CDC)은 항원으로의 항체의 결합을 통해 발생하는 보체계의 활성화에 의해 유도되는 세포독성의 유형을 지칭한다. ADCC 및 CDC 활성의 감소는 예를 들어, 대조군 항-CD40 길항제 항체, 예를 들어, 하이브리도마 4D11(수탁 번호 FERM BP-7758)에 의해 생성되는 모노클로널 항체와 비교시, 활성의 감소를 의미한다. 본 명세서에 전문이 참조로 포함되는 EP1707627B1호에는 ADCC 및 CDC 활성을 결정하기 위한 분석이 기재되어 있다.

[0205] 추가로, 고정화된 항-CD40 Ab로 자극되는 수지상 세포(DC)의 생물학적 활성을 사용하여 효능제 활성을 분석할 수 있다. DC는 비림프 조직에서 Ag를 발견하고, 그들을 이차 림프 기관으로 운반하여, 위험 및 도움 신호와 같은 성숙 자극에 반응하여 T 세포를 프라이밍시킬 수 있는 가장 강력한 항원 제시 세포인 것으로 여겨진다. 대조적으로, 활성화 없이 DC에 의한 Ag의 제시는 동족 TCR을 갖는 이펙터 T 세포의 제거 또는 이차 림프 조직에서의 조절 T 세포의 유도를 초래한다. 따라서, 말초 조직에서의 미성숙 DC에 대한 성숙 신호의 존재 또는 부재는 적응 면역 반응 또는 관용 중 어느 하나를 유도하기 위한 스위치로 작용한다. DC 성숙을 위한 주요 CD4+ T 세포 도움 신호는 DC 상에 발현되는 CD40과 활성화된 CD4+ T 세포 상의 CD40 리간드(L) 간의 상호작용에 의해 제공된다. 따라서, CD40 자극은 CCR7의 발현의 상향-조절에 의해 이차 림프 조직으로의 DC의 이동을 유도한다. 문헌 [Watanabe et al. 2003 J Immunol; 171:5828-5836]에는 항-CD40 항체가 효능제 및 길항제 활성을 결정하기 위하여 DC를 활성화시킬 수 있는지 여부를 결정하기 위해 사용될 수 있는 분석이 기재되어 있다. 이러한 예시적인 분석에는 고정화된 항-CD40 Ab로 자극된 BM-DC 상의 MHC 부류 I/II Ag 및 동시자극 분자의 발현, 고정화된 항-CD40 Ab로 자극된 BM-DC의 생체내 이동 활성, 고정화된 항-CD40 Ab로 자극된 BM-DC의 시험관내 이동 활성 및 CCR7 발현의 결정이 포함된다.

[0206] 일 구현예에서, 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 효능제 활성을 시험관내 단핵구 활성화 분석, 예를 들어, 하기 실시예 7에 기재된 분석을 사용하여 결정한다. 시험관내 단핵구 활성화 분석은 단핵구를 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 노출시키는 것을 포함하며, 여기서, 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 CD40의 활성화제(효능제)이면, TNF 생성의 증가가 초래된다. 시험관내 단핵구 활성화 분석을 사용하여, 효능제 활성이 실질적으로 없는 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 실시예 7에 기재된 바와 같이 TNF의 최소의 생성 또는 부재를 초래할 것이다.

[0207] 일 구현예에서, 효능제 활성이 실질적으로 없는 길항제 항-CD40 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 시험관내 CD40 효능제 분석, 예를 들어, 실시예 7에 기재된 효능제 단핵구 분석에서 음성 대조군의 1 표준 편차 이내인 활성을 갖는다.

[0208] 효능제 분석은 US 5786456호, US2011/0243932호 및 EP1707627B1호에 추가로 기재되어 있으며, 이의 각각은 전문이 본 명세서에 참조로 포함된다. 항체 기능을 시험하기 위한 길항제 분석은 US 7361345호, US2011/0243932호 및 EP1707627B1호에 추가로 기재되어 있으며, 이의 각각은 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0209] 바람직한 구현예에서, 분리된 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 인간 CD40에 결합하며, 여기서, 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 표면 플라스몬 공명에 의해 결정시 약 $0.1s^{-1}$ 이하의 k_{off} 속도 상수로 인간 CD40으로부터 해리되거나, 약 $1 \times 10^{-6}M$ 이하의 IC_{50}으로 인간 CD40 활성을 억제한다. 대안적으로, 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 표면 플라스몬 공명에 의해 결정시 약 $1 \times 10^{-2}s^{-1}$ 이하의 k_{off} 속도 상수로 인간 CD40으로부터 해리되거나, 약 $1 \times 10^{-7}M$ 이하의 IC_{50}으로 인간 CD40 활성을 억제할 수 있다. 대안적으로, 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 표면 플라스몬 공명에 의해 결정시 약 $1 \times 10^{-3}s^{-1}$ 이하의 k_{off} 속도 상수로 인간 CD40으로부터 해리되거나, 약 $1 \times 10^{-8}M$ 이하의 IC_{50}으로 인간 CD40을 억제할 수 있다. 대안적으로, 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 표면 플라스몬 공명에 의해 결정시 약 $1 \times 10^{-4}s^{-1}$ 이하의 k_{off} 속도 상수로 인간 CD40으로부터 해리되거나, 약 $1 \times 10^{-9}M$ 이하의 IC_{50}으로 CD40 활성을 억제할 수 있다. 대안적으로, 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 표면 플라스몬 공

명에 의해 결정시 약 1 x 10^{-5} s^{-1} 이하의 k_{off} 속도 상수로 인간 CD40으로부터 해리되거나, 약 1 x 10^{-10} M 이하의 IC_{50}으로 CD40을 억제할 수 있다. 대안적으로, 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 표면 플라스몬 공명에 의해 결정시 약 1 x 10^{-5} s^{-1} 이하의 k_{off} 속도 상수로 인간 CD40으로부터 해리되거나, 약 1 x 10^{-11} M 이하의 IC_{50}으로 CD40 활성을 억제할 수 있다.

[0210] 항체를 하기 실시예에 기재된 바와 같이 인간화시켰다. 프레임워크 복귀-돌연변이를 가변 도메인의 신생(de novo) 합성에 의해 또는 돌연변이유발 올리고뉴클레오티드 프라이머 및 중합효소 연쇄 반응에 의해 또는 CDR-이식물의 각각에 대한 다른 돌연변이 및 복귀 돌연변이의 상이한 조합을 둘 모두 가능하게 함으로써 CDR-이식된 항체 서열 내로 도입하였다. 쥣과 모노클로널 CD40 항체의 인간화 가변 영역을 기능적 특성화를 위하여 IgG 발현 벡터 내로 클로닝하였다.

[0211] 특정 구현예에서, 항체는 중쇄 불변 영역, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역을 포함한다. 바람직하게는 중쇄 불변 영역은 IgG1 중쇄 불변 영역 또는 IgG4 중쇄 불변 영역이다. 추가로, 항체는 카파 경쇄 불변 영역 또는 람다 경쇄 불변 영역 중 어느 하나인 경쇄 불변 영역을 포함할 수 있다. 바람직하게, 항체는 카파 경쇄 불변 영역을 포함한다. 대안적으로, 항체 부분은 예를 들어, Fab 단편 또는 단쇄 Fv 단편일 수 있다.

[0212] **5. 항-CD40 인간화 항체의 생성**

[0213] 상기 기재된 바와 같이, 인간화 항체는 비-인간 종으로부터의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR) 및 인간 면역글로불린 분자로부터의 프레임워크 영역을 갖는 요망되는 항원에 결합하는 비-인간 종 항체로부터의 항체 분자이다. 알려져 있는 인간 Ig 서열이 예를 들어, 전체가 본원에 참조로 포함되는 www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH- 05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m- ikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immuno- logy.html.www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.- html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html- ; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.acjp/.about.yasuhito- /Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP- Start.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/linksl.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/pu- blic/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOsem- inar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/h- umanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.abo- ut.fmolina/Webpages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983)]에 개시되어 있다. 이러한 가져온 서열을 사용하여, 해당 분야에 알려져 있는 바와 같이 면역원성을 감소시키거나, 결합, 친화성, 온-속도, 오프-속도, 결합력, 특이성, 반감기 또는 임의의 다른 적합한 특징을 감소시키거나, 향상시키거나, 변경시킬 수 있다.

[0214] 인간 프레임워크 영역 내의 프레임워크 잔기를 CDR 공여자 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환하여, 항원 결합을 변경시킬 수 있으며, 바람직하게는 이를 개선시킬 수 있다. 이들 프레임워크 치환은 해당 분야에 잘 알려져 있는 방법에 의해, 예를 들어, 항원 결합에 중요한 프레임워크 잔기를 확인하기 위한 CDR과 프레임워크 잔기의 상호작용의 모델링 및 특정 위치에서 비정상 프레임워크 잔기를 확인하기 위한 서열 비교에 의해 확인된다(예를 들어, 본원에 전문이 참조로 포함되는 Queen 등의 미국 특허 제5,585,089호; 문헌[Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)] 참조). 3-차원 면역글로불린 모델이 통상적으로 이용 가능하며, 당업자에게 친숙하다. 선택된

후보 면역글로불린 서열의 가능한 3-차원 입체형태 구조를 예시하고 이를 나타내는 컴퓨터 프로그램이 이용 가능하다. 이들 디스플레이의 검토에 의해, 후보 면역글로불린 서열의 기능에서의 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉, 후보 면역글로불린의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석이 가능하게 된다. 이러한 방식으로, FR 잔기를 선택하고 공통 및 가져온 서열로부터 조합하여, 요망되는 항체 특징, 예를 들어, 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화성이 달성되게 할 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 항원 결합에 영향을 미치는데 직접적으로, 그리고 가장 상당하게 연루된다. 항체는 해당 분야에 알려져 있는 다양한 기술, 예를 들어, 비제한적으로, 본 명세서에 인용되는 참고문헌을 포함하여, 전체가 각각 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[Jones et al., Nature 321:522 (1986)]; 문헌[Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988))], 문헌[Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993)]; 문헌[Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987)], 문헌[Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992)]; 문헌[Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)], 문헌[Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991)]; 문헌[Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994)]; 문헌[Roguska. et al. , PNAS 91:969-973 (1994)]; PCT 공개 WO 91/09967호, PCT/: US98/16280호, US96/18978호, US91/09630호, US91/05939호, US94/01234호, GB89/01334호, GB91/01134호, GB92/01755호; WO90/14443호, WO90/14424호, WO90/14430호, EP 229246호, EP 592,106호; EP 519,596호, EP 239,400호, 미국 특허 5,565,332호, 5,723,323호, 5,976,862호, 5,824,514호, 5,817,483호, 5814476호, 5763192호, 5723323호, 5,766886호, 5,714,352호, 6,204,023호, 6,180,370호, 5,693,762호, 5,530,101호, 5,585,089호, 5,225,539호; 4,816,567호에 기재된 것들을 사용하여 인간화될 수 있다.

[0215] 항-CD40 인간화 항체의 예는 상기 섹션 1 및 2 및 하기 실시예에 제공되어 있다.

[0216] **II. 항체 및 항체-생성 세포주의 생성**

[0217] 본 발명의 항체는 해당 분야에 알려져 있는 수많은 기술 중 임의의 것에 의해 제조될 수 있다.

[0218] **1. 하이브리도마 기술을 사용한 항-CD40 모노클로널 항체**

[0219] 모노클로널 항체를 하이브리도마, 재조합 및 파지 디스플레이 기술 또는 그들의 조합의 이용을 포함하는 해당 분야에 알려져 있는 매우 다양한 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 모노클로널 항체를 해당 분야에 알려져 있고, 예를 들어, 문헌[Harlow et al. , Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)]; 문헌[Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)](상기 참조문헌은 그들 전체가 참조로 포함됨)에 교시된 것들을 포함하는 하이브리도마 기술을 사용하여 생성할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 용어 "모노클로널 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생성되는 항체에 제한되지 않는다. 용어 "모노클로널 항체"는 임의의 진핵, 원핵 또는 파지 클론을 포함하는 단일의 클론으로부터 유래되는 항체를 지칭하며, 그것이 생성되는 방법을 지칭하지는 않는다.

[0220] 하이브리도마 기술을 이용하여 특이적인 항체를 생성하고 스크리닝하는 방법은 해당 분야에 일상적이며, 잘 알려져 있다. 일 구현예에서, 본 발명은 모노클로널 항체를 생성하는 방법 및 본 발명의 항체를 분비하는 하이브리도마 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성된 항체를 제공하며, 여기서 바람직하게는, 하이브리도마는, 본 발명의 항원으로 면역화된 마우스로부터 분리된 비장 세포를 골수종 세포와 융합시킨 후 본 발명의 폴리펩티드에 결합할 수 있는 항체를 분비하는 하이브리도마 클론에 대하여 융합으로부터 생성된 하이브리도마를 스크리닝함으로써 생성된다(실시예 1 참조). 요약하면, 마우스를 CD40 항원으로 면역화시킬 수 있다. 바람직한 구현예에서, CD40 항원을 보조제와 함께 투여하여 면역 반응을 자극한다. 이러한 보조제는 완전 또는 불완전 프로인트 보조제, RIBI(무라밀 디펩티드) 또는 ISCOM(면역자극 복합체)를 포함한다. 이러한 보조제는 폴리펩티드를 국소 저장소(local deposit)에 봉쇄함으로써 신속한 분산으로부터 보호할 수 있거나, 대식구 및 면역계의 다른 성분에 대해 화학주성인 인자를 분비하도록 숙주를 자극하는 물질을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 폴리펩티드가 투여되는 경우, 면역화 스케쥴은 수주에 걸쳐 전개되는 폴리펩티드의 2회 이상의 투여를 포함할 것이다.

[0221] CD40 항원으로의 동물의 면역화 후에, 항체 및/또는 항체-생성 세포를 동물로부터 수득할 수 있다. 항-CD40 항체-함유 혈청은 채혈하거나 동물을 희생시킴으로써 동물로부터 수득된다. 혈청은 동물로부터 수득된 그대로 사용될 수 있거나, 면역글로불린 분획이 혈청으로부터 수득될 수 있거나, 항-CD40 항체가 혈청으로부터 정제될 수 있다. 이러한 방식으로 수득된 혈청 또는 면역글로불린은 폴리클로널이므로, 이질적 어레이의 특성을 갖는다.

[0222] 면역 반응이 검출되면, 예를 들어, 항원 CD40에 대해 특이적인 항체가 마우스 혈청에서 검출되면, 마우스 비장

을 수집하고 비장 세포를 분리한다. 이어서, 비장 세포를 잘 알려져 있는 기술에 의해 임의의 적합한 골수종 세포, 예를 들면, ATCC로부터 입수 가능한 세포주 SP20으로부터의 세포에 융합시킨다. 하이브리도마를 제한 희석으로 선별하고 클로닝한다. 이어서, 하이브리도마 클론을 해당 분야에 공지된 방법에 의해 CD40에 결합할 수 있는 항체를 분비하는 세포에 대해 분석한다. 일반적으로 높은 수준의 항체를 포함하는 복수액은, 마우스를 양성 하이브리도마 클론으로 면역화시켜 생성할 수 있다.

[0223] 또 다른 구현예에서, 항체-생성 무한증식 하이브리도마를 면역화된 동물로부터 제조할 수 있다. 면역화한 후, 동물을 희생시키고 비장 B 세포를 무한증식된 골수종 세포에 해당 분야에 잘 알려져 있는 바와 같이 융합시킨다. 예를 들어, 상기 문헌[Harlow and Lane]을 참조한다. 바람직한 구현예에서, 골수종 세포는 면역글로불린 폴리펩티드를 분비하지 않는다(비-분비성 세포주). 융합 및 항생제 선택 후, 하이브리도마를 CD40, 또는 그의 부분, 또는 CD40을 발현하는 세포를 사용하여 스크리닝한다. 바람직한 구현예에서, 초기 스크리닝은 효소-연결 면역분석(ELISA) 또는 방사성면역분석(RIA), 바람직하게는 ELISA를 이용하여 수행된다. ELISA 스크리닝의 예는 본원에 참조로 포함된 WO 00/37504호에 제공된다.

[0224] 항-CD40 항체-생성 하이브리도마를, 하기에 추가로 논의되는 바와 같이, 왕성한 하이브리도마 성장, 높은 항체 생성 및 바람직한 항체 특성을 포함하는 바람직한 특성에 대해 선택하고, 클로닝하며, 추가로 스크리닝한다. 하이브리도마를 동계 동물, 면역계가 결여된 동물, 예를 들면, 누드 마우스에서 생체내에서 배양 및 증량시키거나 세포 배양물에서 시험관내에서 배양 및 증량시킬 수 있다. 하이브리도마를 선택하고, 클로닝하고, 증량시키는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0225] 바람직한 구현예에서, 하이브리도마는 상기 기재된 바와 같은 마우스 하이브리도마이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 하이브리도마는 비-인간, 비-마우스 종, 예를 들면, 랫트, 양, 돼지, 염소, 소 또는 말에서 생성된다. 또 다른 구현예에서, 하이브리도마는 인간 하이브리도마이며, 여기서 인간 비-분비성 골수종은 항-CD40 항체를 발현하는 인간 세포와 융합된다.

[0226] 특정 에피토프를 인식하는 항체 단편은 공지된 기술로 생성될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 Fab 및 F(ab')2 단편은 파파인(Fab 단편을 생성하기 위한 것) 또는 펩신(F(ab')2 단편을 생성하기 위한 것)과 같은 효소를 사용하여 면역글로불린 분자의 단백질분해적 절단에 의해 생성될 수 있다. F(ab')2 단편은 가변 영역, 경쇄 불변 영역, 및 중쇄의 CHI 도메인을 포함한다.

[0227] **2. SLAM을 이용한 항-CD40 모노클로널 항체**

[0228] 본 발명의 또 다른 양태에서, 재조합 항체는 미국 특허 제5,627,052호, PCT 공개 WO 92/02551호 및 문헌[Babcock, J.S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848]에 기술된 바와 같이 해당 분야에서 선택된 림프구 항체 방법(SLAM)으로 지칭되는 절차를 이용하여 단일의 분리된 림프구로부터 생성된다. 이 방법에서, 관심 항체를 분비하는 단일 세포, 예를 들어, 섹션 1에 기재된 면역화된 동물 중 어느 하나로부터 유래되는 림프구가 항원-특이적인 용혈 플라크 분석을 이용하여 스크리닝되며, 여기서 항원 CD40, CD40의 하위단위, 또는 그의 단편은 양 적혈구에 비오틴과 같은 링커를 사용하여 커플링되며, CD40에 대해 특이성을 갖는 항체를 분비하는 단일의 세포를 확인하는데 사용된다. 관심 항체-분비 세포의 확인에 이어서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 cDNA를 세포로부터 역 전사효소-PCR에 의해 구제하고, 이어서 이들 가변 영역을 적절한 면역글로불린 불변 영역(예를 들면, 인간 불변 영역)과 관련하여 COS 또는 CHO 세포와 같은 포유동물 숙주 세포에서 발현시킬 수 있다. 이어서, 생체내에서 선택된 림프구로부터 유도되는 증폭된 면역글로불린 서열로 트랜스펙션된 숙주 세포는, 예를 들어, CD40에 대한 항체를 발현하는 세포를 분리하기 위해 트랜스펙션된 세포를 패닝(panning)함으로써 시험관내에서 추가로 분석되고 선택될 수 있다. 증폭된 면역글로불린 서열은 추가로 PCT 공개 WO 97/29131호 및 PCT 공개 WO 00/56772호에 기재된 것들과 같은 시험관내 친화성 성숙 방법에 의해 시험관내에서 조작될 수 있다.

[0229] **3. 유전자전이 동물을 사용한 항-CD40 모노클로널 항체**

[0230] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 항체는 인간 면역글로불린 유전자좌 중 일부 또는 모두를 포함하는 비-인간 동물을 CD40 항원으로 면역화시켜 생성된다. 바람직한 구현예에서, 비-인간 동물은 XENOMOUSE 유전자전이 마우스, 인간 면역글로불린 유전자좌의 거대 단편을 포함하고 마우스 항체 생성에 결함이 있는 조작된 마우스 균주이다. 예를 들어, 문헌[Green et al. Nature Genetics 7:13-21 (1994)] 및 미국 특허 제5,916,771호, 5,939,598호, 5,985,615호, 5,998,209호, 6,075,181호, 6,091,001호, 6,114,598호 및 6,130,364호를 참조한다. 또한, 1991년 7월 25일자로 공개된 WO 91/10741호, 1994년 2월 3일자로 공개된 WO 94/02602호, 1996년 10월 31일자로 공개된 WO 96/34096호 및 WO 96/33735호, 1998년 4월 23일자로 공개된 WO 98/16654호, 1998년 6월 11일자로 공개된 WO

98/24893호, 1998년 11월 12일자로 공개된 WO 98/50433호, 1999년 9월 10일자 출원된 WO 99/45031호, 1999년 10월 21일자로 공개된 WO 99/53049호, 2000년 2월 24일자로 공개된 WO 00 09560호 및 2000년 6월 29일자로 공개된 WO 00/037504호를 참조한다. XENOMOUSE 유전자전이 마우스는 완전 인간 항체의 성인-유사 인간 레퍼토리를 생성하며, 항원-특이적인 인간 Mab를 생성한다. XENOMOUSE 유전자전이 마우스는 인간 중쇄 유전자좌 및 x 경쇄 유전자좌의 메가염기 크기의 생식계열 배열 YAC 단편의 도입을 통해 인간 항체 레퍼토리의 대략 80%를 포함한다. 개시내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997)], 문헌[Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998)]을 참조한다.

[0231] **4. 재조합 항체 라이브러리를 이용한 항-CD40 모노클로널 항체**

[0232] 또한, 요망되는 결합 특이성을 갖는 항체를 확인하기 위해 항체 라이브러리를 스크리닝하는 시험관내 방법을 이용하여 본 발명의 항체를 제조할 수 있다. 재조합 항체 라이브러리의 이러한 스크리닝 방법은 해당 분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들면, 각각의 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 Ladner 등의 미국 특허 제5,223,409호; Kang 등의 PCT 공개 WO 92/18619호; Dower 등의 PCT 공개 WO 91/17271호; Winter 등의 PCT 공개 WO 92/20791호; Markland 등의 PCT 공개 WO 92/15679호; Breitling 등의 PCT 공개 WO 93/01288호; McCafferty 등의 PCT 공개 WO 92/01047호; Garrard 등의 PCT 공개 WO 92/09690호; 문헌[Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372]; 문헌[Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85]; 문헌[Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281]; 문헌[McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554]; 문헌[Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734]; 문헌[Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889-896]; 문헌[Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628]; 문헌[Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580]; 문헌[Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377]; 문헌[Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137]; 및 문헌[Barbas et al. (1991) PNAS 88:7978-7982], 미국 특허 출원 공개 20030186374호, 및 PCT 공개 WO 97/29131호에 기재된 방법을 포함한다.

[0233] 재조합 항체 라이브러리는 CD40 또는, CD40의 일부, 예를 들어, 세포외 도메인으로 면역화된 대상체로부터의 것일 수 있다. 대안적으로, 재조합 항체 라이브러리는 나이브(naive) 대상체, 즉, 인간 CD40으로 면역화되지 않은 인간 대상체로부터의 인간 항체 라이브러리와 같은, CD40으로 면역화되지 않은 대상체로부터의 것일 수 있다. 본 발명의 항체는 재조합 항체 라이브러리를, 인간 CD40를 포함하는 펩티드를 사용하여 스크리닝함으로써 CD40을 인식하는 항체를 선택함으로써 선택된다. 이러한 스크리닝 및 선택을 수행하는 방법은 앞선 단락에서의 참조 문헌에 기재된 바와 같이 해당 분야에 널리 공지되어 있다. 특정 k_{off} 속도 상수로 인간 CD40로부터 해리되는 것과 같은 hCD40에 대한 특정 결합 친화성을 갖는 본 발명의 항체를 선택하기 위해, 해당 분야에 공지된 표면 플라스몬 공명의 방법을 이용하여 요망되는 K_{off} 속도 상수를 갖는 항체를 선택할 수 있다. 특정 IC_{50}을 갖는 것들과 같은 hCD40에 대한 특정 중화 활성을 갖는 본 발명의 항체를 선택하기 위해, hCD40 활성의 억제를 평가하기 위한 해당 분야에 공지된 표준 방법을 이용할 수 있다.

[0234] 일 양태에서, 본 발명은 인간 CD40에 결합하는 분리된 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 관한 것이다. 바람직하게는, 항체는 중화 항체이다. 다양한 구현예에서, 항체는 재조합 항체 또는 모노클로널 항체이다.

[0235] 예를 들어, 본 발명의 항체는 또한 해당 분야에 공지된 다양한 파지 디스플레이 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 파지 디스플레이 방법에서, 기능적 항체 도메인은 그들을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 파지 입자의 표면 상에 디스플레이된다. 특히, 이러한 파지를 사용하여 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리(예를 들면, 인간 또는 쥣과)로부터 발현된 항원-결합 도메인을 디스플레이할 수 있다. 관심 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 발현하는 파지는 항원, 예를 들면, 표지된 항원 또는 고체 표면 또는 비드에 결합되거나 포획된 항원을 사용하여 선택되거나 확인될 수 있다. 이들 방법에 사용되는 파지는 전형적으로 파지 유전자 III 또는 유전자 VIII 단백질에 재조합적으로 융합된 Fab, Fv, 또는 디설파이드 안정화된 Fv 항체 도메인을 지닌 파지로부터 발현된 fd 및 M13 결합 도메인을 포함하는 필라멘트성 파지이다. 본 발명의 항체를 제조하는데 사용될 수 있는 파지 디스플레이 방법의 예는 각각의 전체가 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995)]; 문헌[Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995)]; 문헌[Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994)]; 문헌[Persic et al., Gene 187 9-18 (1997)]; 문헌[Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994)]; PCT 출원 PCT/GB91/01134호; PCT 공개 WO 90/02809호; WO 91/10737호; WO 92/01047호; WO 92/18619호; WO 93/11236호; WO 95/15982호; WO 95/20401호; 및 미국 특허 제5,698,426호; 5,223,409호; 5,403,484호; 5,580,717호; 5,427,908호; 5,750,753호; 5,821,047호; 5,571,698호; 5,427,908호; 5,516,637호; 5,780,225호; 5,658,727호; 5,733,743호 및 5,969,108호에 개시

된 것들을 포함한다.

[0236] 상기 참조문헌에 기재되는 바와 같이, 파지 선택 후, 파지로부터 항체 코딩 영역을 분리하여 인간 항체 또는 임의의 다른 요망되는 항원 결합 단편을 포함하는 전체 항체를 생성하는데 사용할 수 있으며, 예를 들면, 하기 상세히 기재되는 바와 같이, 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모, 및 박테리아를 포함하는 임의의 요망되는 숙주에서 발현시킬 수 있다. 예를 들어, PCT 공개 WO 92/22324호; 문헌[Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992)]; 및 문헌[Sawai et al., AJRI 34:26-34 (1995)]; 및 문헌[Better et al., Science 240:1041-1043 (1988)](상기 참고문헌은 그들 전체가 참조로 포함됨)에 개시되는 것들과 같은 해당 분야에 공지된 방법을 이용하여, Fab, Fab' 및 F(ab')2 단편을 재조합적으로 생성하기 위한 기술이 또한 이용될 수 있다. 단쇄 Fv 및 항체를 생성하는데 이용될 수 있는 기술의 예는 미국 특허 제4,946,778호 및 5,258,498호; 문헌[Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991)]; 문헌[Shu et al., PNAS 90:7995-7999 (1993)]; 및 문헌[Skerra et al., Science 240:1038-1040 (1988)]에 기재된 것들을 포함한다.

[0237] 파지 디스플레이에 의해 재조합 항체 라이브러리를 스크리닝하는 대안으로, 대형 조합 라이브러리를 스크리닝하기 위한 해당 분야에 공지된 다른 방법을 본 발명의 이중 특이성 항체의 확인에 적용할 수 있다. 대안적인 발현 시스템의 하나의 유형은, 재조합 항체 라이브러리가 Szostak 및 Roberts에 의한 PCT 공개 WO 98/31700호 및 문헌[Roberts, R.W. and Szostak, J.W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12297-12302]에 기재되는 바와 같이 RNA-단백질 융합물로서 발현되는 것이다. 이러한 시스템에서, 공유적 융합은, mRNA와, 3' 말단에 푸로마이신, 펩티딜 수용자 항생제를 갖는 합성 mRNA의 시험관내 번역에 의해 이것이 인코딩하는 펩티드 또는 단백질 사이에서 생성된다. 따라서, 특정 mRNA는 인코딩된 펩티드 또는 단백질, 예를 들면, 항체, 또는 그의 부분의 특성, 예를 들어, 이중 특이성 항원에 대한 항체, 또는 그의 부분의 결합에 기반하여 mRNA의 복합체 혼합물(예를 들면, 조합 라이브러리)로부터 농축될 수 있다. 이러한 라이브러리의 스크리닝으로부터 회수된, 항체, 또는 그의 부분을 인코딩하는 핵산 서열은, 상기된 바와 같이(예를 들면, 포유동물 숙주 세포에서) 재조합 수단에 의해 발현될 수 있으며, 또한 상기된 바와 같이 돌연변이가 원래의 선택된 서열(들) 내로 도입된 mRNA-펩티드 융합물의 추가의 라운드의 스크리닝에 의해, 또는 재조합 항체의 시험관내 친화성 성숙을 위한 다른 방법에 의해 추가의 친화성 성숙으로 처리될 수 있다.

[0238] 또 다른 접근법에서, 본 발명의 항체는 또한 해당 분야에 공지된 효모 디스플레이 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 효모 디스플레이 방법에서, 유전적 방법을 이용하여 항체 도메인을 효모 세포벽에 테더링하고 이들을 효모 표면 상에 디스플레이한다. 특히, 이러한 효모는 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리(예를 들면, 인간 또는 쥣과)로부터 발현되는 항원-결합 도메인을 디스플레이하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 항체를 제조하는데 이용될 수 있는 효모 디스플레이 방법의 예는 본 명세서에 참조로 포함되는 Wittrup 등(미국 특허 제6,699,658호)에 개시된 것들을 포함한다.

[0239] **5. 재조합 CD40 항체의 생성**

[0240] 본 발명의 항체는 해당 분야에 공지된 다수의 기술 중 임의의 기술에 의해 생성될 수 있다. 예를 들면, 숙주 세포로부터의 발현에 의해 생성될 수 있으며, 여기서 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 발현 벡터(들)는 표준 기술에 의해 숙주 세포로 트랜스펙션된다. 용어 "트랜스펙션"의 다양한 형태는 외인성 DNA를 원핵 또는 진핵 숙주 세포로 도입하기 위해 일반적으로 이용되는 광범위한 기술, 예를 들어, 전기천공, 인산칼슘 침전, DEAE-덱스트란 트랜스펙션 등을 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 항체를 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 발현하는 것이 가능하기는 하나, 진핵 세포에서 항체를 발현하는 것이 바람직하며, 포유동물 숙주 세포에서가 가장 바람직한데, 이는, 이러한 진핵 세포(및 특히 포유동물 세포)가 원핵 세포보다 더 적절하게 폴딩되고 면역학적으로 활성인 항체를 조립하고 분비하는 경향이 있기 때문이다.

[0241] 본 발명의 재조합 항체를 발현하기에 바람직한 포유동물 숙주 세포는, 중국 햄스터 난소(CHO 세포)(예를 들어, 문헌[R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621)]에 기재되는 바와 같이, DHFR 선택 가능한 마커와 함께 사용되는 문헌[Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220]에 기재되는 dhfr- CHO 세포 포함), NSO 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 세포를 포함한다. 항체 유전자를 인코딩하는 재조합 발현 벡터를 포유동물 숙주 세포로 도입하는 경우, 항체는 숙주 세포에서 항체의 발현 또는, 보다 바람직하게는 숙주 세포가 성장하는 배양 배지로의 항체의 분비를 허용하기에 충분한 기간 동안 숙주 세포를 배양함으로써 생성된다. 항체는 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 배양 배지로부터 회수될 수 있다.

[0242] 숙주 세포는 또한 Fab 단편 또는 scFv 분자와 같은 기능성 항체 단편을 생성하는데 사용될 수 있다. 상기 절차에서의 변형이 본 발명의 범위 내에 있음이 이해될 것이다. 예를 들어, 숙주 세포를 본 발명의 항체의 경쇄 및/

또는 중쇄의 기능성 단편을 인코딩하는 DNA로 트랜스펙션시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 재조합 DNA 기술을 이용하여 관심 항원에 대한 결합에 필수적이지 않은 경쇄 및 중쇄 중의 어느 하나 또는 둘 다를 인코딩하는 DNA 중 일부 또는 모두를 제거할 수 있다. 이러한 절두된(truncated) DNA 분자로부터 발현된 분자가 또한 본 발명의 항체에 포함된다. 또한, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄가 본 발명의 항체이고, 본 발명의 항체를 표준 화학적 가교결합 방법에 의해 제2 항체에 가교결합시킴으로써 다른 중쇄 및 경쇄가 관심 항원 이외의 항원에 대해 특이적인 이기능성 항체를 생성할 수 있다.

[0243] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 재조합 발현을 위한 바람직한 시스템에서, 항체 중쇄 및 항체 경쇄 둘 다를 인코딩하는 재조합 발현 벡터는 dhfr- CHO 세포로 인산칼슘-매개된 트랜스펙션에 의해 도입된다. 재조합 발현 벡터에서, 항체 중쇄 및 경쇄 유전자는 각각 CMV 인핸서/AdMLP 프로모터 조절 성분에 작동 가능하게 연결되어 유전자의 높은 수준의 전사를 유도한다. 재조합 발현 벡터는 또한, 메토트렉세이트 선택/증폭을 이용하여 벡터로 트랜스펙션된 CHO 세포의 선택을 가능하게 하는, DHFR 유전자를 포함한다. 선택된 형질전환 숙주 세포를 배양하여, 항체 중쇄 및 경쇄의 발현을 가능하게 하고, 온전한 항체를 배양 배지로부터 회수한다. 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 재조합 발현 벡터를 제조하고, 숙주 세포를 트랜스펙션시키며, 형질전환체에 대해 선택하고, 숙주 세포를 배양하며, 항체를 배양 배지로부터 회수한다. 추가로, 본 발명은 본 발명의 숙주 세포를 적합한 배양 배지에서 본 발명의 재조합 항체가 합성될 때까지 배양함으로써 본 발명의 재조합 항체를 합성하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 배양 배지로부터 재조합 항체를 분리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0244] 본 발명의 또 다른 구현예는 항체 또는 그의 항원-결합 부분이 하나 이상의 탄수화물 잔기를 포함하는 글리코실화된 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다. 초기 생체내 단백질 생성은 번역후 변형으로 알려진 추가의 프로세싱을 겪을 수 있다. 특히, 당(글리코실) 잔기가 글리코실화로 알려진 과정에 의해 효소적으로 추가될 수 있다. 공유적으로 결합된 올리고당 측쇄류를 갖는 생성된 단백질은 글리코실화된 단백질 또는 당단백질로 알려져 있다. 항체는 Fc 도메인 및 가변 도메인에 하나 이상의 탄수화물 잔기를 갖는 당단백질이다. Fc 도메인의 탄수화물 잔기는 Fc 도메인의 이펙터 기능에 중요한 영향을 미치며, 항체의 항원 결합 또는 반감기에는 최소한의 영향을 미친다(문헌[R. Jefferis, Biotechnol. Prog. 21 (2005), pp. 11-16]). 대조적으로, 가변 도메인의 글리코실화는 항체의 항원 결합 활성에 영향을 미칠 수 있다. 가변 도메인의 글리코실화는, 아마도 입체 장애에 기인하여, 항체 결합 친화성에 부정적 효과를 주거나(문헌[Co, M.S., et al., Mol. Immunol. (1993) 30:1361-1367]), 항원에 대한 친화성을 증가시킬 수 있다(문헌[Wallick, S.C., et al., Exp. Med. (1988) 168:1099-1109]; 문헌[Wright, A., et al., EMBO J. (1991) 10:2717-2723]).

[0245] 본 발명의 일 양태는 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 O- 또는 N-결합된 글리코실화 부위가 돌연변이된 글리코실화 부위 돌연변이체의 생성에 관한 것이다. 당업자는 표준의 잘 알려진 기술을 이용하여 이러한 돌연변이체를 생성할 수 있다. 생물학적 활성은 보유하나 증가되거나 감소된 결합 활성을 갖는 글리코실화 부위 돌연변이체가 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0246] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 부분의 글리코실화가 변형된다. 예를 들어, 글리코실화되지 않은 항체(즉, 글리코실화 결여 항체)가 제조될 수 있다. 글리코실화는, 예를 들어, 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시키기 위해 변경될 수 있다. 이러한 탄수화물 변형은, 예를 들어, 항체 서열 내의 하나 이상의 글리코실화 부위를 변경함으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 가변 영역 글리코실화 부위를 제거함으로써 이러한 부위에서 글리코실화를 제거하는 하나 이상의 아미노산 치환이 이루어질 수 있다. 이러한 비글리코실화는 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시킬 수 있다. 이러한 접근법은 각각의 전문이 본 명세서에 참조로 포함되는 PCT 공개 WO2003016466A2호 및 미국 특허 제5,714,350호 및 6,350,861호에 더욱 상세히 기재된다.

[0247] 추가적으로 또는 대안적으로, 변경된 글리코실화 유형을 갖는 본 발명의 변형된 항체, 예를 들어, 감소된 양의 푸코실 잔기를 갖는 저푸코실화된 항체 또는 증가된 이분 GlcNAc 구조를 갖는 항체가 제조될 수 있다. 이러한 변경된 글리코실화 패턴은 항체의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 입증되었다. 이러한 탄수화물 변형은, 예를 들어, 변경된 글리코실화 기구를 갖는 숙주 세포에서 항체를 발현함으로써 달성될 수 있다. 변경된 글리코실화 기구를 갖는 세포는 해당 분야에 기재되어 있으며, 본 발명의 재조합 항체를 발현함으로써 변경된 글리코실화를 갖는 항체를 생성하기 위한 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 각각의 전문이 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740]; 문헌[Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1]; 유럽 특허 제EP1,176,195호; PCT 공개 WO 03/035835호; WO 99/54342 80호를 참조한다.

[0248] 단백질 글리코실화는 관심 단백질의 아미노산 서열 및 단백질이 발현되는 숙주 세포에 의존적이다. 상이한 유기체는 상이한 글리코실화 효소(예를 들어, 글리코실트랜스퍼라제 및 글리코시다제)를 생성할 수 있고, 이용 가능

한 상이한 기질(뉴클레오티드 당)을 갖는다. 이러한 인자 때문에, 단백질 글리코실화 패턴 및 글리코실 잔기의 조성은 특정 단백질이 발현되는 숙주 시스템에 따라 상이할 수 있다. 본 발명에 유용한 글리코실 잔기는, 이로 제한됨이 없이, 글루코스, 갈락토스, 만노스, 푸코스, n-아세틸글루코사민 및 시알산을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 글리코실화된 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 글리코실화 패턴이 인간의 것이도록 글리코실 잔기를 포함한다.

[0249] 상이한 단백질 글리코실화가 단백질 특성을 상이하게 할 수 있는 것이 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 미생물 숙주, 예를 들어, 효모에서 생성되고 효모 내인성 경로를 이용하여 글리코실화된 치료 단백질의 효능은 포유동물 세포, 예를 들어, CHO 세포주에서 발현된 동일한 단백질의 효능과 비교하여 감소될 수 있다. 이러한 당 단백질은 또한 인간에서 면역원성이고 투여 후 감소된 생체내 반감기를 나타낼 수 있다. 인간 및 다른 동물의 특정 수용체가 특정 글리코실 잔기를 인식하고 혈류로부터의 단백질의 신속한 제거를 촉진할 수 있다. 다른 부작용은 단백질 폴딩, 용해도, 프로테아제에 대한 민감성, 트래피킹(trafficking), 수송, 구획화, 분비, 다른 단백질 또는 인자에 의한 인식, 항원성 또는 알러지항원성의 변화를 포함할 수 있다. 따라서, 실시자는 글리코실화의 특정 조성 및 패턴, 예를 들어, 인간 세포 또는 의도되는 대상체 동물의 종-특이적 세포에서 생성되는 것과 동일하거나 적어도 유사한 글리코실화 조성 및 패턴을 갖는 치료 단백질을 선호할 수 있다.

[0250] 숙주 세포의 글리코실화 단백질과 상이한 글리코실화 단백질의 발현은 이종 글리코실화 효소를 발현하도록 숙주 세포를 유전적으로 변형시킴으로써 달성될 수 있다. 해당 분야에 공지된 기술을 이용하여, 실시자는 인간 단백질 글리코실화를 나타내는 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 생성할 수 있다. 예를 들어, 효모 균주를, 이들 효모 균주에서 생성되는 글리코실화된 단백질(당단백질)이 동물 세포, 특히, 인간 세포의 것과 동일한 단백질 글리코실화를 나타내도록, 비-천연 발생 글리코실화 효소를 발현하도록 유전적으로 변형시켰다(미국 특허 공개 제 20040018590호 및 20020137134호 및 PCT 공개 WO2005100584 A2호).

[0251] 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 더하여, 본 발명은 또한 본 발명의 이러한 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 대해 특이적인 항-이디오타입(항-Id) 항체에 관한 것이다. 항-Id 항체는 일반적으로 또 다른 항체의 항원-결합 영역과 연관된 독특한 결정자를 인식하는 항체이다. 항-Id는 동물을 항체 또는 그의 항원 결합 부분 또는 CDR 포함 영역으로 면역화시켜 제조될 수 있다. 면역화된 동물은 면역화 항체의 이디오타입 결정자를 인식하고 이에 반응하며 항-Id 항체를 생성할 것이다. 항-Id 항체는 또한 또 다른 동물에서 면역 반응을 유도하여, 소위 항-항-Id 항체를 생성하기 위한 "면역원"으로 사용될 수 있다.

[0252] 추가로, 당업자는 관심 단백질이 다양한 글리코실화 효소를 발현하도록 유전자 조작된 숙주 세포의 라이브러리를 이용하여 발현되어, 라이브러리의 숙주 세포 구성원이 다양한 글리코실 패턴을 갖는 관심 단백질을 생성할 수 있게 하는 것을 알 것이다. 그 다음, 실시자는 특정한 신규 글리코실화 패턴을 갖는 관심 단백질을 선택 및 분리할 수 있다. 바람직하게는, 특별히 선택된 신규한 글리코실화 패턴을 갖는 단백질은 개선되거나 변경된 생물학적 특성을 나타낸다.

[0253] **III. 길항제 항-CD40 항체의 용도**

[0254] 인간 CD40에 결합하는 능력을 고려해 볼 때, 본 발명의 항-인간 CD40 항체 또는 그의 부분은 통상의 면역분석, 예를 들어, 효소 연결된 면역흡착 분석(ELISA), 방사선면역분석(RIA) 또는 조직 면역조직화학을 이용하여 (예를 들어, 생물학적 시료, 예를 들어, 혈청 또는 혈장에서) 인간 CD40을 검출하는데 사용될 수 있다. 본 발명은 생물학적 시료를 본 발명의 항체 또는 항체 부분과 접촉시키는 단계 및 인간 CD40에 결합된 항체(또는 항체 부분) 또는 결합되지 않는 항체(또는 항체 부분)를 검출하여 생물학적 시료 중의 인간 CD40을 검출하는 단계를 포함하는, 생물학적 시료 중의 인간 CD40의 검출 방법을 제공한다. 항체는 결합되거나 결합되지 않은 항체의 검출을 용이하게 하도록 검출 가능한 물질로 직접적으로 또는 간접적으로 표지된다. 적합한 검출 가능한 물질은 다양한 효소, 보조군(prosthetic group), 형광 물질, 발광 물질 및 방사능 물질을 포함한다. 적합한 효소의 예는 서양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, β-갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하며; 적합한 보조군 복합체의 예는 스트렙트아비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하며; 적합한 형광 물질의 예는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린을 포함하며; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하며; 적합한 방사능 물질의 예는 ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, 또는 ^{153}Sm을 포함한다.

[0255] 항체 표지화에 대한 대안으로, 인간 CD40은 검출 가능한 물질로 표지된 rhCD40 표준물질 및 비표지된 항-인간 CD40 항체를 사용하는 경쟁적 면역분석에 의해 생물학적 유체에서 분석될 수 있다. 이러한 분석에서, 생물학적

시료, 표지된 rhCD40 표준물질 및 항-인간 CD40 항체를 조합하며, 비표지된 항체에 결합된 표지된 rhCD40 표준물질의 양을 측정한다. 생물학적 시료 중 인간 CD40의 양은 항-CD40 항체에 결합된 표지된 rhCD40 표준물질의 양에 반비례한다. 유사하게, 인간 CD40을 또한 검출 가능한 물질로 표지된 rhCD40 표준물질 및 비표지된 항-인간 CD40 항체를 이용하는 경쟁적 면역분석에 의해 생물학적 유체에서 분석할 수 있다.

[0256] 본 발명의 항체 및 항체 부분은 바람직하게는 시험관내 및 생체내 모두에서 인간 CD40 활성을 중화시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 이러한 항체 및 항체 부분은, 예를 들어, hCD40을 포함하는 세포 배양물에서, 인간 대상체에서 또는 본 발명의 항체와 교차-반응하는 CD40을 갖는 다른 포유동물 대상체에서 hCD40 활성을 억제하는데 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명은 hCD40 활성이 억제되도록 hCD40과 본 발명의 항체 또는 항체 부분을 접촉시키는 단계를 포함하는, hCD40 활성을 억제하기 위한 방법을 제공한다. 예를 들어, hCD40을 포함하거나 또는 이를 포함하는 것으로 의심되는 세포 배양물에서 본 발명의 항체 또는 항체 부분은 배양물 중의 hCD40 활성을 억제하도록 배양 배지에 첨가될 수 있다.

[0257] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 대상체에서, 유리하게는 CD40 활성이 유해한 질병 또는 장애를 앓고 있는 대상체로부터의 hCD40 활성의 감소 방법을 제공한다. 본 발명은 이러한 질병 또는 장애를 앓고 있는 대상체에서 CD40 활성을 감소시키는 방법을 제공하며, 당해 방법은 대상체에서 CD40 활성이 감소되도록 본 발명의 항체 또는 항체 부분을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, CD40은 인간 CD40이며, 대상체는 인간 대상체이다. 대안적으로, 대상체는 본 발명의 항체가 결합할 수 있는 CD40을 발현하는 포유동물일 수 있다. 추가로, 대상체는 CD40이 (예를 들어, CD40의 투여 또는 CD40 전이유전자의 발현에 의해) 도입된 포유동물일 수 있다. 본 발명의 항체는 치료 목적으로 인간 대상체에게 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 수의학적 목적으로 또는 인간 질병의 동물 모델로서 항체가 결합할 수 있는 CD40을 발현하는 비-인간 포유동물에게 투여될 수 있다. 인간 질환의 동물 모델과 관련하여, 이러한 동물 모델은 본 발명의 항체의 치료 효능의 평가(예를 들어, 투여 용량 및 시간 경과의 시험)에 유용할 수 있다.

[0258] 본 명세서에 사용되는 용어 "CD40 활성이 유해한 장애"는 장애를 앓고 있는 대상체에서 CD40의 존재가 장애의 병리생리학에 책임이 있거나 장애의 악화에 기여하는 인자인 것으로 밝혀지거나 이로 의심되는 질병 및 다른 장애를 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, CD40 활성이 유해한 장애는 CD40 활성의 감소가 장애의 증상 및/또는 진행을 완화시키는 것으로 예상되는 장애이다. 이러한 장애는, 예를 들어, 상기된 항-CD40 항체를 사용하여 검출될 수 있는, 장애를 앓고 있는 대상체의 생물학적 유체에서의 CD40 농도의 증가(예를 들어, 대상체의 혈청, 혈장, 활액 등 중의 CD40 농도 증가)에 의해 입증될 수 있다. 본 발명의 항체 및 그의 변이체, 또는 그의 항원 결합 단편으로 치료될 수 있는 장애의 비제한적 예는 본 발명의 항체의 약제학적 조성물에 관하여 하기 섹션에서 논의되는 장애를 포함한다. 예를 들어, 적합한 장애는, 비제한적으로, 전신 홍반성 루푸스(SLE), 원판성 루푸스, 루푸스 신장염, 유육종증, 연소성 관절염, 류마티스성 관절염, 건선성 관절염, 라이터 증후군, 강직성 척추염, 통풍성 관절염, 기관 또는 조직 이식의 거부, 이식편 대 숙주병, 다발성 경화증, 고 IgE 증후군, 결절성 다발성 동맥염, 원발성 담즙성 간경변증, 염증성 장 질병, 크론병, 셀리악병(글루텐-민감 장병증), 자가면역 간염, 악성 빈혈, 자가면역 용혈성 빈혈, 건선, 경피증, 중증 근무력증, 자가면역 혈소판 감소성 자반증, 자가면역 갑상선염, 그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 면역 복합체 질병, 만성 피로 면역 기능이상 증후군(CFIDS), 다발성 근염 및 피부 근염, 한랭 글로불린혈증, 혈전용해, 심근병증, 심상성 천포창, 간질성 폐 섬유증, 유육종증, I형 및 II형 진성 당뇨병, 1, 2, 3, 및 4형 지연형 과민증, 알러지 또는 알러지성 장애, 천식, 처그-스트라우스 증후군(알러지성 육아종증), 아토피 피부염, 알러지성 및 자극성 접촉 피부염, 두드러기, IgE-매개의 알러지, 죽상동맥경화증, 혈관염, 특발성 염증성 근육병증, 용혈병, 알츠하이머병 및 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증을 포함한다. 특정 구현예에서, 질병 또는 장애는 만성 염증성 장애이다. 특정 구현예에서, CD40 활성이 유해한 장애는 크론병 또는 궤양성 대장염을 포함하나 이에 제한되지 않는 염증성 장 질병(IBD)이다.

[0259] 다른 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 항원 결합 부분은 류마티스 관절염, 궤양성 대장염, 화농성 한선염, 연소성 특발성 관절염, 건선성 관절염, 건선, 강직성 척추염 및 크론병을 포함하나 이들에 한정되지 않는 TNFα 활성이 유해한 장애를 치료하기 위해 사용된다. 일 구현예에서, TNFα 활성이 유해한 장애는 포도막염이다.

[0260] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 염증성 장 질병(IBD)을 갖는 인간 대상체를 치료하기 위해 사용된다.

[0261] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 궤양성 대장염을 치료하기 위해 사용된다.

[0262] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 크론병을 치료하기 위해 사용된다.

[0263] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 전신 홍반성 루푸스(SLE)를 치료하기 위해 사용된다.

[0264] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 유육종증을 치료하기 위해 사용된다.

[0265] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 연소성 관절염을 갖는 인간 대상체를 치료하기 위해 사용된다.

[0266] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 류마티스 관절염을 치료하기 위해 사용된다.

[0267] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 건선성 관절염을 치료하기 위해 사용된다.

[0268] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 강직성 척추염을 갖는 인간 대상체를 치료하기 위해 사용된다.

[0269] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 화농성 한선염을 치료하기 위해 사용된다.

[0270] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 포도막염을 치료하기 위해 사용된다.

[0271] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 쇼그렌을 치료하기 위해 사용된다.

[0272] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 건선을 치료하기 위해 사용된다.

[0273] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 아토피 피부염을 치료하기 위해 사용된다.

[0274] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 피부경화증을 치료하기 위해 사용된다.

[0275] 본 발명의 항-CD40 mAb는 선천 및 적응 면역 반응 둘 모두에서의 CD40의 중심 역할로 인하여 생물학적 나이브 환자 및 항-TNF 부적당 반응자 집단 둘 모두를 치료할 잠재력을 가질 것이다. 본 발명에서 제공되는 CD40 신호 전달을 억제할 수 있는 치료는, 내장에서 만성 염증을 유지하는 부착/동시-자극 분자 발현 및 분자 경로, 예를 들어, TNF 및 IL-23 생성을 억제한다. 항-TNF 처치된 크론 환자의 발현 프로파일링에 기반하여, 항-CD40으로의 처치는 항-TNF 반응자 집단을 넘어서 연장되어 더 넓은 세그먼트의 크론 환자를 치료할 잠재력을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명은 항-TNF 치료법에 반응하지 못하는 IBD 환자의 하위집단의 치료 방법을 제공한다. 이러한 IBD 환자는 크론병 또는 궤양성 대장염을 가질 수 있으며, TNFα 억제제, 예를 들어, 비제한적으로, 인플릭시맙(infliximab), 아달리무맙(adalimumab), 세르톨리주맙 페골(certolizumab pegol) 또는 골리무맙(golimumab)으로의 처치에 반응하지 못하거나, 그에 대하여 제한된 반응을 갖는다. 본 명세서에 기재된 항-CD40 길항제 항체는 크론병 또는 궤양성 대장염을 갖는 TNF 비-반응자를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명은 항-TNF 비-반응자인 중등도 내지 중증 활성 크론병을 갖는 환자, 예를 들어, 성인 환자의 치료 방법을 포함한다.

[0276] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 이러한 질환을 치료하기 위해 단독으로 사용되거나 병용하여 사용될 수 있다. 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 단독으로 사용되거나 추가의 작용제, 예를 들어, 치료제와 병용하여 사용될 수 있음을 알아야 하며, 상기 추가의 작용제는 의도된 목적을 위해 당업자에 의해 선택된다. 예를 들어, 추가의 작용제는 본 발명의 항체에 의해 치료되는 질병 또는 질환을 치료하는데 유용한 것으로 해당 분야에서 인식되는 치료제일 수 있다. 추가의 작용제는 또한 치료 조성물에 유리한 특성을 부여하는 작용제, 예를 들어, 조성물의 점도에 영향을 미치는 작용제일 수 있다. 추가로, 본 발명에 포함될 조합물은 그들의 의도된 목적에 유용한 조합물로 이해되어야 한다. 하기의 작용제는 예시적인 것으로서 제한하려는 것이 아니다.

본 발명의 일부인 조합물은 본 발명의 항체 및 하기 목록으로부터 선택되는 적어도 하나의 추가의 작용제일 수 있다. 조합물은 또한 형성된 조성물이 그의 의도된 기능을 수행할 수 있도록 조합이 이루어지는 경우 하나 초과의 추가의 작용제, 예를 들어, 2개 또는 3개의 추가의 작용제를 포함할 수 있다.

[0277] 병용 요법은 하나 이상의 추가의 치료제, 예를 들어, 본 명세서에 더욱 기재되는, 하나 이상의 사이토카인 및 성장 인자 억제제, 면역억제제, 항염증제(예를 들어, 전신 항염증제), 항-섬유증제, 대사 억제제, 효소 억제제 및/또는 세포독성제 또는 세포증식억제제, 유사분열 억제제, 항종양 항생제, 면역조절제, 유전자 요법용 벡터, 알킬화제, 항혈관형성제, 항대사물질, 붕소-함유 작용제, 화학보호제, 호르몬, 항호르몬제, 코르티코스테로이드, 광활성 치료제, 올리고뉴클레오티드, 방사성핵종 작용제, 토포이소머라제 억제제, 티로신 키나제 억제제 또는 방사성민감제와 함께 제형화되고/되거나 동시-투여되는 하나 이상의 CD40 길항제, 예를 들어, 항-CD40 항체 또는 그의 단편을 포함할 수 있다.

[0278] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 염증성 장 질병(IBD)을 치료하기 위하여 제2 작용제와 병용된다. 특정 구현예에서, 제2 작용제는 메살라민, 발살라지드, 아자티오프린, 6-MP, 메토트렉세이트, 인플릭시맙, 세르톨리주맙, 아달리무맙, 골리무맙, 나탈리주맙(natalizumab), 베돌리주맙(vedolizumab), 우스테키누맙(ustekinumab) 또는 그들의 조합이다.

[0279] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 SLE를 치료하기 위하여 제2 작용제와 병용되며, 제2 작용제는 니트로페이스트(nitropaste)/니트로글리세린(nitroglycerin), 니페디핀(nifedipine), 실데나필(sildenafil), 타달라필(tadalafil) 또는 그들의 조합이다.

[0280] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 SLE를 치료하기 위하여 제2 작용제와 병용되며, 제2 작용제는 코르티코스테로이드, 내인성 스테로이드 생성자, NSAID, 항염증제, 질병-변형 항류마티스 약물(DMARD), 면역억제제, 항응고제 또는 그들의 조합이다.

[0281] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 SLE를 치료하기 위하여 코르티코스테로이드와 병용된다. 사용될 수 있는 코르티코스테로이드의 예에는 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 프레드니손 또는 그들의 조합이 포함된다.

[0282] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 SLE를 치료하기 위하여 내인성 스테로이드 생성에 영향을 미치는 작용제, 예를 들어, 코르티코트로핀(Acthar)과 병용된다.

[0283] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 SLE를 치료하기 위하여 국소 또는 주사된 요법제와 병용된다. 이러한 요법제의 예에는 코르티손, 하이드로코르티손, 피메크롤리무스(pimecrolimus) 크림, 타크롤리무스(tacrolimus) 연고, 이미퀴모드(imiquimod) 또는 그들의 조합이 포함되나 이들에 한정되지 않는다.

[0284] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 SLE를 치료하기 위하여 비스테로이드성 항-염증 약물(NSAID)과 병용된다. 병용 요법에 사용될 수 있는 NSAID의 예에는 인도메타신(indomethacin), 나부메톤(nabumetone), 셀레콕십(celecoxib), 이부프로펜, 나프록센(naproxen), 디클로페낙(diclofenac) 또는 그들의 조합이 포함되나 이들에 한정되지 않는다.

[0285] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 SLE를 치료하기 위하여 항염증 약물과 병용된다. 추가의 구현예에서, 항염증 약물은 아세트아미노펜(acetaminophen) 및/또는 살리실레이트이다.

[0286] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 SLE를 치료하기 위하여 질병-변형 항류마티스 약물(DMARD)과 병용된다. DMARD의 예에는 하이드록시클로로퀸(플라퀘닐(Plaquenil)), 클로로퀸, 메토트렉세이트(류마트렉스(Rheumatrex)), 레플루노미드(leflunomide)(아라바(Arava)), 설파살라진(sulfasalazine) 또는 그들의 조합이 포함되나 이들에 한정되지 않는다.

[0287] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 벨리무맙(Belimumab)(벤리스타(Benlysta)), 리툭시맙(Rituximab)(리툭산(Rituxan)), 정맥내 Ig 또는 그들의 조합과 병용된다.

[0288] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 SLE를 치료하기 위하여 면역억제제와 병용된다. 면역억제제의 예에는 아자티오프린(이무란(Imuran)), 사이클로포스파미드(사이톡산(Cytoxan)), 사이클로스포린, 타크롤리무스 및 마이코페놀레이트가 포함되나 이들에 한정되지 않는다.

[0289] 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 예를 들어, Ab102는 SLE를 치료하기 위하여 항응고제와 병용된다. 항응고제의 예에는 아스피린(aspirin), 헤파린(heparin), 와파린(warfarin) 및 에녹사파린(레베녹스(Lovenox))이 포함되나 이들에 한정되지 않는다.

[0290] 하나 이상의 CD40 길항제, 예를 들어, 항-CD40 항체 또는 그의 단편과 동시-투여되고/거나 제형화될 수 있는 바람직한 추가의 치료제의 추가의 예. 이러한 조합을 사용하여, 본 명세서에 기재된 CD40 관련 장애를 치료할 수 있다. 하나 이상의 항-CD40 항체 또는 그의 단편과 동시-투여되고/거나 제형화될 수 있는 치료제의 추가의 예에는 특히 TNF 길항제(예를 들어, TNF 수용체의 용해성 단편, 예를 들면, p55 또는 p75 인간 TNF 수용체 또는 이의 유도체, 예를 들어, 75 kD TNFR-IgG(75 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질, ENBREL)); TNF 효소 길항제, 예를 들어, TNF 전환 효소(TACE) 억제제; 무스카린 수용체 길항제; TNF-베타 길항제; 인터페론 감마; 퍼페니돈; 화학치료제, 예를 들어, 메토트렉세이트, 레플루노미드, 또는 시롤리무스(라파마이신) 또는 그의 유사체, 예를 들어, CCI-779; COX2 및 cPLA2 억제제; 비스테로이드성 항-염증 약물(NSAID); 면역조절제; p38 억제제, TPL-2, MK-2 및 NFkB 억제제 중 하나 이상이 포함된다.

[0291] 다른 바람직한 조합은 사이토카인 억제성 항염증 약물(들)(CSAID); 다른 인간 사이토카인 또는 성장 인자, 예를 들어, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, IL-31, 인터페론, EMAP-II, GM-CSF, FGF, EGF, PDGF, 및 엔도텔린-1뿐만 아니라 이들 사이토카인 및 성장 인자의 수용체에 대한 항체 또는 이의 길항제이다. 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 세포 표면 분자, 예를 들어, CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80(B7.1), CD86(B7.2), CD90, CTLA 또는 CD154를 포함한 그들의 리간드(gp39 또는 CD40L)에 대한 항체와 조합될 수 있다.

[0292] 치료제의 바람직한 조합은 염증 케스케이드의 상이한 지점에서 방해할 수 있으며; 바람직한 예는 키메라, 인간화된 또는 인간 TNF 항체, 아달리무맙, (HUMIRA: D2E7; PCT 공개 WO 97/29131호), CA2(REMICADE), CDP 571, 및 용해성 p55 또는 p75 TNF 수용체, 그의 유도체, (p75TNFR1gG(ENBREL) 또는 p55TNFR1gG(LENERCEPT), 및 또한 TNF 전환 효소(TACE) 억제제와 같은 TNF 길항제를 포함하고; 유사하게 IL-1 억제제(인터류킨-1 전환 효소 억제제, IL-1RA 등)가 동일한 이유로 효과적일 수 있다. 다른 바람직한 조합은 인터류킨 4를 포함한다.

[0293] 투여 섭생법은 최적의 요망되는 반응(예를 들면, 치료적 또는 예방적 반응)을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들면, 단일 볼루스가 투여될 수 있거나, 수개의 분할된 용량이 시간에 걸쳐 투여될 수 있거나, 용량은 치료적 상황의 긴급성에 의해 나타나는 바와 같이 비례하여 감소되거나 증가될 수 있다. 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위하여 용량 단위 형태로 비경구 조성물을 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본 명세서에 사용되는 용량 단위 형태는 치료되는 포유동물 대상체를 위한 단위 용량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭하며; 각 단위는 요구되는 약제학적 담체와 관련하여 요망되는 치료적 효과를 생성하도록 계산된 미리 결정된 양의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 용량 단위 형태에 관한 설명은, (a) 활성 화합물의 독특한 특징 및 달성될 특정 치료적 또는 예방적 효과, 및 (b) 개체에서 감수성 치료를 위해 이러한 활성 화합물을 화합하는 것에 대한 해당 분야에 내재된 한계에 의해 좌우되고, 이들에 직접적으로 의존한다.

[0294] 투여량 값이 완화될 질환의 유형 및 중증도에 따라 변할 수 있음을 주목해야 한다. 임의의 특정 대상체에 대해 특정 투여 섭생법은 개체의 필요 및 조성물을 투여하거나 투여를 감독하는 인간의 전문적 판단에 따라 시간에 걸쳐 조정되어야 하며, 본 명세서에 제시된 용량 범위는 단지 예시적인 것이고, 청구된 조성물의 범위 또는 실시를 제한하는 것으로 의도되는 것은 아님을 추가로 이해해야 한다.

[0295] 또 다른 양태에서, 본 출원은 대상체에서 CD40 활성이 유해한 장애를 치료(예를 들어, 치유, 억제, 개선, 이의 발병을 지연 또는 예방, 또는 이의 재발 또는 악화를 예방)하거나 예방하는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 CD40 결합제(특히, 길항제), 예를 들어, 본 명세서에 기재되는 항-CD40 항체 또는 그의 단편을 CD40-연관 장애를 치료 또는 예방하기에 충분한 양으로 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. CD40 길항제, 예를 들어, 항-CD40 항체 또는 그의 단편은 대상체에게 단독으로 투여되거나 본 명세서에 기재되는 다른 치료 양상과 병용하여 투여될 수 있다.

[0296] 또 다른 양태에서, 본 출원은 시험관내에서 시료(예를 들어, 혈청, 혈장, 조직, 생검과 같은 생물학적 시료) 중의 CD40의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 대상 방법은 장애, 예를 들어, 염증성 장애를 진단하는데 이용될 수 있다. 상기 방법은 (i) 시료 또는 대조군 시료를 본 명세서에 기재되는 항-CD40 항체 또는 그의 단편과 접촉시키는 단계; 및 (ii) 항-CD40 항체 또는 그의 단편과 시료 또는 대조군 시료 간의 복합체 형성을 검출하는 단계를 포함하며, 대조군 시료와 비교하여 시료 중 복합체 형성의 통계학적으로 유의미한 변화가 시료 중 CD40의

존재를 나타낸다.

[0297] 또 다른 양태에서, 본 출원은 생체내에서(예를 들어, 대상체에서의 생체내 영상화) CD40의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 대상 방법은 장애, 예를 들어, CD40-관련 장애를 진단하는데 이용될 수 있다. 상기 방법은 (i) 본 명세서에 기재되는 항-CD40 항체 또는 그의 단편을 CD40으로의 항체 또는 단편의 결합을 가능하게 하는 조건하에 대상체 또는 대조군 대상체에게 투여하는 단계; 및 (ii) 항체 또는 단편과 CD40 간의 복합체의 형성을 검출하는 단계를 포함하며, 대조군 대상체에 비한 대상체에서의 복합체의 형성의 통계적으로 유의미한 변화가 CD40의 존재를 나타낸다.

[0298] 항체 이펙터 기능을 변경시키기 위한 Fc 부분에서의 아미노산 잔기의 대체는 해당 분야에 공지되어 있다(Winter 등의 미국 특허 제5,648,260호; 5624821호). 항체의 Fc 부분은 몇몇의 중요한 이펙터 기능, 예를 들어, 사이토카인 유도, ADCC, 포식작용, 보체 의존적 세포독성(CDC) 및 항체 및 항원-항체 복합체의 반감기/제거 속도를 매개한다. 일부 경우에, 이들 이펙터 기능은 치료적 항체에 대해 바람직하나, 다른 경우에는, 치료 목적에 따라, 불필요하거나 심지어 해로울 수 있다. 특정 인간 IgG 아이소타입, 특히, IgG1 및 IgG3은 각각 FcγR 및 보체 C1q로의 결합을 통해 ADCC 및 CDC를 매개한다. 신생아 Fc 수용체(FcRn)는 항체의 순환 반감기를 결정하는 중요한 성분이다. 또 다른 구현예에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기가 항체의 이펙터 기능이 변경되도록 항체의 불변 영역, 예를 들어, 항체의 Fc 영역에서 대체된다.

[0299] 일 구현예는 본 발명의 항체 또는 항체 부분이 유도체화되거나 하나 이상의 기능성 분자(들)(예를 들어, 또 다른 펩티드 또는 단백질)에 결합된 표지된 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 표지된 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 본 발명의 항체 또는 항체 부분을 (화학적 커플링, 유전적 융합, 비공유적 회합 등에 의해) 하나 이상의 다른 분자 엔티티, 예를 들어, 또 다른 항체(예를 들어, 이중특이적 항체 또는 디아바디), 검출 가능한 작용제, 약제학적 작용제, 항체 또는 항체 부분과, 또 다른 분자(예를 들어, 스트렙트아비딘 코어 영역 또는 폴리히스티딘 태그)의 회합을 매개할 수 있는 단백질 또는 펩티드, 및/또는 유사분열 억제제, 항종양 항생제, 면역조절제, 유전자 요법용 벡터, 알킬화제, 항혈관형성제, 항대사물질, 붕소-함유 작용제, 화학보호제, 호르몬, 항호르몬제, 코르티코스테로이드, 광활성 치료제, 올리고뉴클레오티드, 방사성핵종 작용제, 토포이소머라제 억제제, 티로신 키나제 억제제, 방사성민감제, 및 그들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포독성제 또는 치료제에 기능적으로 결합시킴으로써 유도될 수 있다.

[0300] 본 발명의 항체 또는 항체 부분이 유도체화될 수 있는 유용한 검출 가능한 작용제는 형광 화합물을 포함한다. 예시적인 형광 검출 가능한 작용제는 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 5-디메틸아민-1-나프탈렌술포닐 클로라이드, 피코에리트린 등을 포함한다. 항체는 또한 검출 가능한 효소, 예를 들어, 알칼리성 포스파타제, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 글루코스 옥시다제 등으로 유도체화될 수 있다. 항체가 검출 가능한 효소로 유도체화되는 경우, 이는 검출 가능한 반응 생성물을 생성하도록 효소가 사용하는 추가의 시약을 첨가함으로써 검출된다. 예를 들어, 검출 가능한 작용제 서양고추냉이 퍼옥시다제가 존재하는 경우, 과산화수소 및 디아미노벤지딘의 첨가는 검출 가능한 유색 반응 생성물을 생성한다. 항체는 또한 비오틴으로 유도체화되고, 아비딘 또는 스트렙트아비딘 결합의 간접적 측정을 통해 검출될 수 있다.

[0301] 본 발명의 또 다른 구현예는 결정화된 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다. 바람직하게는, 본 발명은 본 명세서에 개시되는 전체 항-CD40 항체 및 그의 단편의 결정, 및 이러한 결정을 포함하는 제형 및 조성물에 관한 것이다. 일 구현예에서, 결정화된 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 용해성 상대물보다 더욱 긴 생체내 반감기를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 결정화 후 생물학적 활성을 보유한다.

[0302] 본 발명의 결정화된 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 해당 분야에 공지된 방법에 따라, 그리고 본 명세서에 참조로 포함되는 WO 02072636호에 개시되는 바와 같이 생성될 수 있다.

[0303] **IV. 약제학적 조성물**

[0304] 본 발명은 또한 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0305] 본 발명의 약제학적 조성물은 "치료적 유효량" 또는 "예방적 유효량"의 본 발명의 항체 또는 항체 부분를 포함할 수 있다. "치료적 유효량"은 요망되는 치료 결과를 달성하기 위해 필요한 용량에서 및 기간 동안 유효한 양을 지칭한다. 항체 또는 항체 부분의 치료적 유효량은 당업자에 의해 결정될 수 있고, 개체의 질병 상태, 연령, 성별, 및 체중과 같은 인자, 및 개체에서 요망되는 반응을 유도하는 항체 또는 항체 부분의 능력에 따라 달라질

수 있다. 또한, 치료적 유효량은, 항체 또는 항체 부분의 임의의 독성 또는 유해 효과보다 치료적으로 유리한 효과가 더 큰 양이다. "예방적 유효량"은 요망되는 예방적 결과를 달성하기 위해 필요한 용량에서 및 기간 동안 유효한 양을 지칭한다. 전형적으로, 예방적 용량은 질병 전에 또는 질병의 초기 단계에 대상체에게 사용되므로, 예방적 유효량은 치료적 유효량보다 적을 것이다.

[0306] 본 발명의 항체를 포함하는 약제학적 조성물은, 이로 제한됨이 없이, 장애의 진단, 검출 또는 모니터링, 장애 또는 그의 하나 이상의 증상의 예방, 치료, 관리 또는 개선, 및/또는 연구에 사용된다. 특정 구현예에서, 조성물은 본 발명의 하나 이상의 항체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 본 발명의 하나 이상의 항체 및 CD40 활성이 유해한 장애를 치료하기 위한 본 발명의 항체 이외의 하나 이상의 예방제 또는 치료제를 포함한다. 바람직하게는, 장애 또는 그의 하나 이상의 증상을 예방, 치료, 관리 또는 개선하는데 유용한 것으로 알려진 또는 이에 사용되어 온 또는 현재 사용되고 있는 예방제 또는 치료제를 포함한다. 이들 구현예에 따라, 조성물은 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

[0307] 본 발명의 항체 및 항체-부분은 대상체에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물 내로 혼입될 수 있다. 전형적으로, 약제학적 조성물은 본 발명의 항체 또는 항체 부분 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 "약제학적으로 허용되는 담체"는, 생리학적으로 적합한, 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅물, 항균제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 담체의 예로는, 물, 염수, 인산염 완충 염수, 덱스트로스, 글리세롤, 에탄올 등, 및 이들의 조합 중 하나 이상이 포함된다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들면, 당, 폴리알콜, 예를 들면, 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 조성물에 포함하는 것이 바람직할 것이다. 약제학적으로 허용되는 담체는 항체 또는 항체 부분의 저장 수명 또는 유효성을 향상시키는 미량의 보조 물질, 예를 들면, 습윤제 또는 유화제, 보존제 또는 완충제를 추가로 포함할 수 있다.

[0308] 다양한 전달 시스템이 공지되어 있으며, 본 발명의 하나 이상의 항체 또는 본 발명의 하나 이상의 항체의 조합 및 장애 또는 그의 하나 이상의 증상을 예방하거나 관리하거나 치료하거나 개선하는데 유용한 예방제 또는 치료제를 투여하는데 사용될 수 있고, 예를 들면, 리포솜 내의 캡슐화, 마이크로입자, 마이크로캡슐, 항체 또는 항체 단편을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체-매개된 세포내이입(예를 들어, 문헌[Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)] 참조), 레트로바이러스 또는 다른 벡터의 일부로서의 핵산 작제 등이 있다. 본 발명의 예방제 또는 치료제를 투여하는 방법으로는 비경구 투여(예를 들면, 피내, 근육내, 복강내, 정맥내 및 피하), 경막외 투여, 종양내 투여, 및 점막 투여(예를 들면, 비강내 및 경구 경로)가 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 또한, 폐 투여는, 예를 들면, 흡입기 또는 네불라이저, 및 에어로졸화제와의 제형을 사용함으로써 이용될 수 있다. 예를 들어, 각각의 전문이 본 명세서에 참조로 포함되는 미국 특허 제6,019,968호, 5,985,320호, 5,985,309호, 5,934,272호, 5,874,064호, 5,855,913호, 5,290,540호, 및 4,880,078호; 및 PCT 공개 WO 92/19244호, WO 97/32572호, WO 97/44013호, WO 98/31346호, 및 WO 99/66903호를 참조한다. 일 구현예에서, 본 발명의 항체, 병용 요법 또는 본 발명의 조성물은 Alkermes AIR 폐 약물 전달 기술(미국 매사추세츠주 캠브리지 소재의 알케르미스, 인코포레이티드(Alkermes, Inc.))을 이용하여 투여된다. 특정 구현예에서, 본 발명의 예방제 또는 치료제는 근육내, 정맥내, 종양내, 경구, 비강내, 폐 또는 피하 투여된다. 예방제 또는 치료제는 임의의 편리한 경로에 의해, 예를 들면, 주입 또는 볼루스 주사에 의해, 상피 또는 점막피부 라이닝(예를 들면, 구강 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고, 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신 또는 국소 투여일 수 있다.

[0309] 특정 구현예에서, 치료를 필요로 하는 영역에 본 발명의 예방제 또는 치료제를 국소로 투여하는 것이 바람직할 수 있고; 이것은, 예를 들면, 제한 없이, 국소 주입에 의해, 주사에 의해, 또는 임플란트 수단에 의해 달성될 수 있고, 상기 임플란트는 멤브레인 및 매트릭스, 예를 들면, 시알라스틱 멤브레인, 폴리머, 섬유상 매트릭스(예를 들면, TISSUEL) 또는 콜라겐 매트릭스를 포함하는, 다공성 또는 비-다공성 물질이다. 일 구현예에서, 본 발명의 하나 이상의 항체 길항제의 유효량을 대상체의 환부에 국소적으로 투여하여 장애 또는 그의 증상을 예방하고/하거나, 치료하고/하거나, 관리하고/하거나 개선한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 하나 이상의 항체의 유효량을, 본 발명의 항체 이외의 하나 이상의 요법제(예를 들면, 하나 이상의 예방제 또는 치료제)의 유효량과 병용하여 대상체의 환부에 국소적으로 투여하여 장애 또는 그의 하나 이상의 증상을 예방하고/하거나, 치료하고/하거나, 관리하고/하거나 개선한다.

[0310] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 예방제 또는 치료제는 제어 방출 또는 지속 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 일 구현예에서, 펌프를 사용하여 제어 방출 또는 지속 방출을 달성할 수 있다(상기 문헌[Langer]; 문헌[Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20]; 문헌[Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507]; 문헌[Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574] 참조). 또 다른 구현예에서, 폴리머 물질을 사용하여 본 발명의 요법제

의 제어 방출 또는 지속 방출을 달성할 수 있다(예를 들면, 문헌[Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974)]; 문헌[Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984)]; 문헌[Ranger and Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61] 참조; 또한, 문헌[Levy et al., 1985, Science 228:190]; 문헌[During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351]; 문헌[Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7 1:105]; 미국 특허 제5,679,377호; 미국 특허 제5,916,597호; 미국 특허 제5,912,015호; 미국 특허 제5,989,463호; 미국 특허 제5,128,326호; PCT 공개 제WO 99/15154호; 및 PCT 공개 제WO 99/20253호 참조). 지속 방출 제형에 사용되는 폴리머의 예로는 폴리(2-하이드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜라이드(PLG), 폴리안하이드라이드, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알콜), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락티드(PLA), 폴리(락티드-코-글리콜라이드)(PLGA), 및 폴리오르토에스테르가 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 바람직한 구현예에서, 지속 방출 제형에 사용되는 폴리머는 불활성이고, 여과 가능한 불순물을 포함하지 않고, 저장시 안정하고, 멸균 상태이고, 생분해성이다. 또 다른 구현예에서, 제어 또는 지속 방출 시스템은 예방 또는 치료 표적 부근에 위치될 수 있으므로, 전신 용량의 단지 소정의 분율만을 필요로 한다(예를 들면, 문헌[Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)] 참조).

[0311] 제어 방출 시스템은 랭거(Langer)에 의한 검토에서 논의된다(문헌[1990, Science 249: 1527-1533]). 당업자에게 공지되어 있는 임의의 기술을 이용하여 본 발명의 하나 이상의 치료제를 포함하는 지속 방출 제형을 생성할 수 있다. 예를 들면, 각각의 전문이 본 명세서에 참조로 포함되는 미국 특허 제4,526,938호, PCT 공개 WO 91/05548호, PCT 공개 WO 96/20698호, 문헌[Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotheraphy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189], 문헌[Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long- Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397], 문헌[Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854], 및 문헌[Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760]을 참조한다.

[0312] 특정 구현예에서, 본 발명의 조성물이 예방제 또는 치료제를 인코딩하는 핵산인 경우, 핵산은 이를 적합한 핵산 발현 벡터의 부분으로 작제하고 세포내에 있도록 이를 투여함으로써, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터의 사용에 의해(미국 특허 제4,980,286호 참조), 또는 직접 주사에 의해, 또는 마이크로입자 충격(예를 들어, 유전자 건; 바이올리스틱(Biolistic), 듀폰(Dupont))에 의해, 또는 지질 또는 세포-표면 수용체 또는 트랜스펙션제로의 코팅에 의해, 또는 이를 핵에 유입되는 것으로 알려진 호메오박스-유사 펩티드에 연결하여 투여함으로써, 인코딩된 예방제 또는 치료제의 발현을 촉진시키도록 생체내에서 투여될 수 있다(예를 들면, 문헌[Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868] 참조). 대안적으로, 핵산은 세포내로 도입되고 상동성 재조합에 의한 발현을 위해 숙주 세포 DNA 내로 혼입될 수 있다.

[0313] 본 발명의 약제학적 조성물은 의도된 투여 경로에 적합하도록 제형화한다. 투여 경로의 예로는 비경구, 예를 들면, 정맥내, 피내, 피하, 경구, 비강내(예를 들면, 흡입), 경피(예를 들면, 국소), 경점막, 및 직장 투여가 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 특정 구현예에서, 조성물은 통상적 절차에 따라 인간에게 정맥내, 피하, 근육내, 경구, 비강내 또는 국소 투여하기 위해 적당한 약제학적 조성물로서 제형화된다. 전형적으로, 정맥내 투여를 위한 조성물은 멸균 등장성 수성 완충제 중의 용액이다. 또한, 필요한 경우, 조성물은 가용화제 및 국소 마취제, 예를 들면, 리그노카인을 포함하여 주사 부위의 통증을 줄일 수 있다.

[0314] 본 발명의 조성물이 국소로 투여되는 경우, 조성물은 연고, 크림, 경피 패치, 로션, 겔, 샴푸, 스프레이, 에어로졸, 용액, 에멀젼의 형태 또는 당업자에게 널리 공지되어 있는 기타 형태로 제형화될 수 있다. 예를 들면, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)]을 참조한다. 분무-불가 국소 투여형의 경우, 국소적 적용에 적합한 담체 또는 하나 이상의 부형제를 포함하고 바람직하게는 물보다 큰 동적 점도를 갖는, 점성 내지 반-고체 또는 고체 형태가 전형적으로 사용된다. 적합한 제형으로는 제한 없이 용액, 현탁액, 에멀젼, 크림, 연고, 분말, 리니먼트, 샐브(salve) 등이 포함되고, 이들은 필요에 따라 멸균되거나 다양한 특성, 예를 들면, 삼투압에 영향을 미치기 위해 보조제(예를 들면, 보존제, 안정화제, 습윤제, 완충제 또는 염)와 혼합된다. 다른 적합한 국소 투여형으로는 분무 가능한 에어로졸 제제가 포함되고, 여기서, 활성 성분, 바람직하게는 고체 또는 액체 불활성 담체와 조합

된 활성 성분은 가압된 휘발물질(예를 들면, 기체 추진제, 예를 들면, 프레온)과의 혼합물 내에 또는 스퀴즈 바틀 내에 패키징된다. 또한, 보습제 또는 습윤제도 필요에 따라 약제학적 조성물 및 투여 형태에 첨가될 수 있다. 이러한 추가의 성분의 예는 해당 분야에 널리 공지되어 있다.

[0315] 본 발명의 방법이 조성물의 비강내 투여를 포함하는 경우, 조성물은 에어로졸 형태, 분무, 미스트로 제형화되거나 또는 점적액의 형태로 제형화될 수 있다. 특히, 본 발명에 따라 사용하기 위한 예방제 또는 치료제는, 적합한 추진제(예를 들면, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체)를 사용하여, 가압된 팩으로부터의 에어로졸 분무 프레젠테이션 또는 네불라이저의 형태로 편리하게 전달될 수 있다. 가압된 에어로졸의 경우, 용량 단위는, 계측된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공함으로써 측정될 수 있다. 흡입기 또는 취입기에서 사용하기 위한 캡슐 및 카트리지(예를 들면, 젤라틴으로 이루어짐)는 화합물의 분말 믹스 및 적합한 분말 기제, 예를 들면, 락토스 또는 전분을 함유하여 제형화될 수 있다.

[0316] 본 발명의 방법이 경구 투여를 포함하는 경우, 조성물은 정제, 캡슐제, 카쉐제, 젤 캡, 용액, 현탁액 등의 형태로 경구 제형화될 수 있다. 정제 또는 캡슐제는 약제학적으로 허용되는 부형제, 예를 들면, 결합제(예를 들면, 프리젤라틴화된 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈, 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로스); 충전제(예를 들면, 락토스, 미세결정질 셀룰로스, 또는 인산수소칼슘); 윤활제(예를 들면, 마그네슘 스테아레이트, 활석, 또는 실리카); 붕해제(예를 들면, 감자 전분 또는 나트륨 전분 글리콜레이트); 또는 습윤제(예를 들면, 나트륨 라우릴 설페이트)를 사용하는 통상의 방법에 의해 제조될 수 있다. 정제는 해당 분야에 널리 공지되어 있는 방법에 의해 코팅될 수 있다. 경구 투여를 위한 액체 제제는 용액, 시럽 또는 현탁액의 형태를 취할 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니며, 또는 그들은 사용하기 전에 물 또는 다른 적합한 비히클을 사용한 구성을 위한 건조 생성물로서 제시될 수 있다. 이러한 액체 제제는 약제학적으로 허용되는 첨가제, 예를 들면, 현탁화제(예를 들면, 소르비톨 시럽, 셀룰로스 유도체 또는 수소화된 식용 지방); 유화제(예를 들면, 레시틴 또는 아카시아); 비-수성 비히클(예를 들면, 아몬드 오일, 오일 에스테르, 에틸 알콜 또는 분획된 식물성 오일); 및 보존제(예를 들면, 메틸 또는 프로필-p-하이드록시벤조에이트 또는 소르브산)를 사용하는 통상의 방법에 의해 제조될 수 있다. 또한, 제제는 완충염, 향미제, 착색제, 및 감미제를 적절하게 포함할 수 있다. 경구 투여를 위한 제제는 예방제 또는 치료제(들)의 느린 방출, 제어 방출, 또는 지속 방출에 적합하게 제형화될 수 있다.

[0317] 본 발명의 방법은, 예를 들면, 흡입기 또는 네불라이저의 사용에 의한, 에어로졸화제로 제형화된 조성물의 폐 투여를 포함할 수 있다. 예를 들면, 각각의 전문이 본 명세서에 참조로 포함되는 미국 특허 6,019,968호, 5,985,320호, 5, 985,309호, 5,934,272호, 5,874,064호, 5,855,913호, 5,290,540호, 및 4,880,078호; 및 PCT 공개 WO 92/19244호, WO 97/32572호, WO 97/44013호, WO 98/31346호, 및 WO 99/66903호를 참조한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항체, 병용 요법, 및/또는 본 발명의 조성물은 알케르미스 AIR 폐 약물 전달 기술(미국 매사추세츠주 캠브리지 소재의 알케르미스, 인코포레이티드)을 이용하여 투여된다.

[0318] 본 발명의 방법은, 주사(예를 들면, 볼루스 주사 또는 연속 주입)에 의한 비경구 투여를 위해 제형화된 조성물의 투여를 포함할 수 있다. 주사를 위한 제형은 첨가되는 보존제와 함께 단위 투여형으로(예를 들면, 앰플로 또는 다중-용량 용기로) 제시될 수 있다. 조성물은 오일 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 에멀젼과 같은 형태를 취할 수 있고, 제형화제, 예를 들면, 현탁화제, 안정화제 및/또는 분산제를 포함할 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 사용하기 전에 적합한 비히클(예를 들면, 멸균 발열원-비함유 물)을 사용한 구성을 위한 분말 형태로 존재할 수 있다.

[0319] 본 발명의 방법은 추가로 데포(depot) 제제로서 제형화된 조성물의 투여를 포함할 수 있다. 이러한 장기 작용 제형은 이식(예를 들면, 피하 또는 근육내)에 의해 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 조성물은 적합한 폴리머 또는 소수성 물질과 함께(예를 들면, 허용되는 오일 중의 에멀젼으로서) 또는 이온 교환 수지와 함께 또는 난용성 유도체로서(예를 들면, 난용성 염으로서) 제형화될 수 있다.

[0320] 본 발명의 방법은 중성 또는 염 형태로서 제형화된 조성물의 투여를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 염으로는 음이온, 예를 들면, 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유도되는 음이온과 함께 형성된 염, 및 양이온, 예를 들면, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화철, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유도된 양이온과 함께 형성된 염이 포함된다.

[0321] 일반적으로, 조성물의 성분은 별도로 제공되거나 단위 투여형으로, 예를 들면, 활성제의 양을 표시한, 용봉된 용기, 예를 들면, 앰플 또는 카쉐제 내의 동결건조된 분말 또는 물 비함유 농축물로서 함께 혼합된다. 투여 방식이 주입인 경우, 조성물은 멸균 약제학적 등급의 물 또는 염수를 포함하는 주입병으로 제공될 수 있다. 투여

방식이 주사에 의한 경우, 주사용 멸균수 또는 염수의 앰플이 제공되어 성분이 투여 전에 혼합되게 할 수 있다.

[0322] 특히, 본 발명은 또한, 본 발명의 예방제 또는 치료제 중 하나 이상 또는 약제학적 조성물이 작용제의 양을 표시한, 용봉된 용기, 예를 들면, 앰플 또는 카쉐제에 포장되는 것을 제공한다. 일 구현예에서, 본 발명의 예방제 또는 치료제 중 하나 이상 또는 약제학적 조성물은, 용봉된 용기 내의 건조 멸균된 동결건조 분말 또는 물 비함유 농축물로서 공급되고, (예를 들면, 물 또는 염수를 사용하여) 대상체에게 투여하기 위한 적절한 농도로 재구성될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 예방제 또는 치료제 중 하나 이상 또는 약제학적 조성물은, 용봉된 용기 내의 건조 멸균 동결건조된 분말로서, 적어도 5 ㎎, 보다 바람직하게는 적어도 10 ㎎, 적어도 15 ㎎, 적어도 25 ㎎, 적어도 35 ㎎, 적어도 45 ㎎, 적어도 50 ㎎, 적어도 75 ㎎, 또는 적어도 100 ㎎의 단위 용량으로 공급된다. 본 발명의 동결건조된 예방제 또는 치료제 또는 약제학적 조성물은 이의 원래의 용기에서 2℃ 내지 8℃에서 저장되어야 하고, 본 발명의 예방제 또는 치료제 또는 약제학적 조성물은 재구성된 후 1주 내에, 바람직하게는 5일 내에, 72시간 내에, 48시간 내에, 24시간 내에, 12시간 내에, 6시간 내에, 5시간 내에, 3시간 내에 또는 1시간 내에 투여되어야 한다. 대안적인 구현예에서, 본 발명의 예방제 또는 치료제 중 하나 이상 또는 약제학적 조성물은 작용제의 양 및 농도를 표시한 용봉된 용기에 액체 형태로 공급된다. 바람직하게는, 투여되는 조성물의 액체 형태는 용봉된 용기에 적어도 0.25 ㎎/㎖, 보다 바람직하게는 적어도 0.5 ㎎/㎖, 적어도 1 ㎎/㎖, 적어도 2.5 ㎎/㎖, 적어도 5 ㎎/㎖, 적어도 8 ㎎/㎖, 적어도 10 ㎎/㎖, 적어도 15 ㎎/㎖, 적어도 25 ㎎/㎖, 적어도 50 ㎎/㎖, 적어도 75 ㎎/㎖ 또는 적어도 100 ㎎/㎖으로 공급된다. 액체 형태는 그의 원래의 용기에서 2℃ 내지 8℃에서 저장되어야 한다.

[0323] 본 발명의 항체 및 항체-부분은 비경구 투여에 적합한 약제학적 조성물 내로 혼입될 수 있다. 바람직하게는, 항체 또는 항체-부분은 0.1 내지 250 ㎎/㎖의 항체를 포함하는 주사 가능한 용액으로서 제조될 것이다. 주사 가능한 용액은 플린트 또는 앰버 바이알, 앰플 또는 사전-충전된 주사기 내의 액체 또는 동결건조된 투여형으로 구성될 수 있다. 완충제는 pH 5.0 내지 7.0(최적으로 pH 6.0)에서 최적으로 5 내지 10 mM의 L-히스티딘(1 내지 50 mM)일 수 있다. 다른 적합한 완충제로는 숙신산나트륨, 시트르산나트륨, 인산나트륨 또는 인산칼륨이 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 염화나트륨을 사용하여 0 내지 300 mM(액체 투여형에 대해 최적으로 150 mM)의 농도에서 용액의 독성을 변형시킬 수 있다. 동결보호제, 주로 0 내지 10%(최적으로는 0.5 내지 1.0%)의 수크로스가 동결건조된 투여형에 대해 포함될 수 있다. 다른 적합한 동결보호제로는 트레할로스 및 락토스가 포함된다. 증량제, 주로 1 내지 10%(최적으로는 2 내지 4%)의 만니톨이 동결건조된 투여형에 대해 포함될 수 있다. 안정화제, 주로 1 내지 50 mM(최적으로는 5 내지 10 mM)의 L-메티오닌이 액체 및 동결건조된 투여형 둘 다에 사용될 수 있다. 다른 적합한 증량제로는 글리신, 아르기닌이 포함되고, 0 내지 0.05%(최적으로는 0.005 내지 0.01%)의 폴리소르베이트-80으로서 포함될 수 있다. 추가의 계면활성제로는 폴리소르베이트 20 및 BRIJ 계면활성제가 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 비경구 투여를 위한 주사 가능한 용액으로서 제조되는 본 발명의 항체 및 항체-부분을 포함하는 약제학적 조성물은 보조제로서 유용한 작용제, 예를 들면, 치료학적 단백질(예를 들면, 항체)의 흡수 또는 분산을 증가시키기 위해 사용되는 작용제를 추가로 포함할 수 있다. 특히 유용한 보조제는 히알루로니다제, 예를 들면, HYLENEX(재조합 인간 히알루로니다제)이다. 주사 가능한 용액에의 히알루로니다제의 첨가는 비경구 투여, 특히, 피하 투여 이후의 인간 생체이용률을 향상시킨다. 또한, 이는 통증 및 불편을 감소시키고 주사 부위 반응의 발생률을 최소화시키면서 보다 큰 주사 부위 부피(즉, 1 ㎖ 초과)를 가능하게 한다(본 명세서에 참조로 포함되는 WO2004078140호, US2006104968호 참조).

[0324] 일 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 항체, 예를 들어, 항체 Ab102, 히스티딘 및 폴리소르베이트, 예를 들어, 폴리소르베이트 80을 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명은 SEQ ID NO: 41의 아미노산을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO: 40의 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체, 히스티딘 및 폴리소르베이트, 예를 들어, 폴리소르베이트 80을 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 동결건조된다.

[0325] 본 발명의 조성물은 다양한 형태로 존재할 수 있다. 이들로는, 예를 들면, 액체, 반-고체 및 고체 투여형, 예를 들면, 액체 용액(예를 들면, 주사 가능한 용액 및 주입 가능한 용액), 분산액 또는 현탁액, 정제, 환제, 분말제, 리포솜 및 좌제가 포함된다. 바람직한 형태는 의도된 투여 방식 및 치료학적 적용에 의존한다. 전형적인 바람직한 조성물은 주사 가능한 용액 또는 주입 가능한 용액의 형태로 존재하고, 예를 들면, 다른 항체로의 인간의 수동적 면역화에 사용되는 것과 유사한 조성물이다. 바람직한 투여 방식은 비경구(예를 들면, 정맥내, 피하, 복강내, 근육내)이다. 바람직한 구현예에서, 항체는 정맥내 주입 또는 주사에 의해 투여된다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 항체는 근육내 또는 피하 주사에 의해 투여된다.

[0326] 치료적 조성물은 전형적으로 멸균되어야 하고 제조 및 저장 조건 하에서 안정해야 한다. 조성물은 용액, 마이크

로에멀젼, 분산액, 리포솜 또는 고농도의 약물에 적합한 다른 정렬된 구조로서 제형화될 수 있다. 멸균 주사 가능한 용액은, 적절한 용매 중에 활성 화합물(즉, 항체 또는 항체 부분)을 필요량으로, 필요에 따라 상기 열거된 성분 중 하나 또는 조합과 함께 혼입시킨 후 여과 멸균함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은, 활성 화합물을 기초 분산 매질 및 상기 열거된 성분으로부터 필요한 다른 성분을 포함하는 멸균 비히클에 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사 가능한 용액의 제조를 위한 멸균, 동결건조된 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은, 사전에 멸균-여과된 용액으로부터 활성 성분 및 임의의 추가의 요망되는 성분의 분말을 제공하는 진공 건조 및 분무-건조이다. 용액의 적절한 유동성은, 예를 들면, 레시틴과 같은 코팅물의 사용에 의해, 분산의 경우에는 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 주사 가능한 조성물의 장기 흡수는 조성물에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들면, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시킴으로써 제조될 수 있다.

[0327] 다수의 치료적 적용의 경우 투여의 바람직한 경로/방식은 피하 주사, 정맥내 주사 또는 주입이지만, 본 발명의 항체 또는 항체-부분은 해당 분야에 공지되어 있는 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 당업자에게 이해되는 바와 같이, 투여의 경로 및/또는 방식은 요망되는 결과에 따라 달라질 것이다. 특정 구현예에서, 활성 화합물은, 신속한 방출에 대해 화합물을 보호할 담체, 예를 들면, 임플란트, 경피 패치, 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하는, 제어 방출 제형을 이용하여 제조될 수 있다. 생분해성의 생체적합성 폴리머를 사용할 수 있고, 예를 들면, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산이 있다. 이러한 제형의 다수의 제조 방법은 특허를 받았거나, 일반적으로 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들면, 문헌[Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]을 참조한다.

[0328] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 항체 부분은, 예를 들면, 불활성 희석제 또는 동화성 식용 가능한 담체와 함께 경구 투여될 수 있다. 또한, 화합물(및 필요에 따라 다른 성분)은 경질 또는 연질 쉘 젤라틴 캡슐에 밀봉되거나, 정제로 압축되거나, 또는 대상체의 식이에 직접 혼입될 수 있다. 경구 치료 투여의 경우, 화합물은 부형제와 함께 혼입되어 소화 가능한 정제, 협측 정제, 트로키제, 캡슐제, 엘릭시르제, 현탁액, 시럽제, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여 이외의 다른 방법에 의해 본 발명의 화합물을 투여하기 위해, 그의 불활성화를 방지하기 위한 물질로 화합물을 코팅하거나 이러한 물질과 화합물을 동시-투여할 필요가 있을 수 있다.

[0329] 다른 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 항체 부분은, 폴리머-기반의 종이 상기 본 발명의 항체 또는 항체 부분에 충분한 크기를 부여하여 상기 본 발명의 항체 또는 항체 부분이 증진된 투과성 및 보유 효과(EPR 효과)로부터 이익을 얻도록, 폴리머-기반의 종에 컨쥬게이트될 수 있다(또한, 각각의 전문이 모든 목적으로 본 명세서에 참조로 포함되는 PCT 공개 제WO2006/042146A2호 및 미국 공개 제2004/0028687A1호, 2009/0285757A1호, 및 2011/0217363A1호, 및 미국 특허 제7,695,719호 참조).

[0330] 보충 활성 화합물도 조성물 내에 혼입될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 항체 부분은, CD40 활성이 유해한 장애를 치료하는데 유용한 하나 이상의 추가의 치료제와 함께 제형화되고/되거나 동시-투여된다. 예를 들면, 본 발명의 항-hCD40 항체 또는 항체 부분은, 다른 표적에 결합하는 하나 이상의 추가의 항체(예를 들면, 사이토카인에 결합하는 항체 또는 세포 표면 분자에 결합하는 항체)와 함께 제형화되고/되거나 동시-투여될 수 있다. 추가로, 본 발명의 하나 이상의 항체는 상기 치료제 중 2개 이상과 병용하여 사용될 수 있다. 이러한 병용 요법은 유리하게는 투여되는 치료제의 보다 낮은 용량을 사용하므로, 다양한 단일요법과 관련된 가능한 독성 또는 합병증을 회피할 수 있다.

[0331] 특정 구현예에서, CD40에 대한 항체 또는 그의 단편은 해당 분야에 공지되어 있는 반감기 연장 비히클에 연결된다. 이러한 비히클로는 Fc 도메인, 폴리에틸렌 글리콜, 및 덱스트란이 포함되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 이러한 비히클은, 예를 들면, 임의의 목적을 위해 본 명세서에 참조로 포함되는 미국 출원 제09/428,082호 및 공개된 PCT 출원 제WO99/25044호에 기재되어 있다.

[0332] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 본 발명의 또 다른 예방제 또는 치료제를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 서열이 유전자 요법에 의해 장애 또는 그의 하나 이상의 증상을 치료, 예방, 관리 또는 개선하기 위해 투여된다. 유전자 요법은 발현되는 또는 발현 가능한 핵산을 대상체에게 투여함으로써 수행되는 치료법을 지칭한다. 본 발명의 이러한 구현예에서, 핵산은 예방 또는 치료 효과를 매개하는 본 발명의 인코딩된 항체 또는 예방제 또는 치료제를 생성한다.

[0333] 해당 분야에서 이용 가능한 유전자 요법에 대한 임의의 방법을 본 발명에 따라 이용할 수 있다. 유전자 요법의

방법에 대한 일반적 검토를 위해 문헌[Goldspiel et al., 1993, Clinical Pharmacy 12:488-505]; 문헌[Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95]; 문헌[Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596]; 문헌[Mulligan, Science 260:926- 932 (1993)]; 및 문헌[Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217]; 문헌[May, 1993, TIBTECH 11(5):155-215]을 참조한다. 이용될 수 있는 재조합 DNA 기술에 대한 해당 분야에 일반적으로 공지된 방법이 문헌[Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley &Sons, NY (1993)]; 및 문헌[Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)]에 기재되어 있다. 유전자 요법의 다양한 방법에 대한 상세한 설명이 본 명세서에 참조로 포함된 US20050042664 A1호에 제공된다.

[0334] 본 명세서에 기재되는 본 발명의 방법에 대한 다른 적합한 변형 및 조정이 명백하며 본 발명 또는 본 명세서에 개시되는 구현예의 범위로부터 벗어나지 않으면서 적합한 등가물을 이용하여 이루어질 수 있다는 것을 당업자는 용이하게 알 것이다. 이제, 본 발명을 상세히 기재하였으나, 단지 실례로 포함될 뿐 본 발명을 제한하려는 것이 아닌 하기 실시예를 참조로 하여 본 발명은 더욱 명확히 이해될 것이다.

[0335] **실시예**

[0336] **실시예 1: 길항제 항-인간 CD40(hCD40) 모노클로널 항체**

[0337] CD40 특이적 길항제 항체를 확인하기 위하여, 하이브리도마 기술을 사용하여 쥣과 모노클로널 항-CD40 항체를 분리하였다.

[0338] 요약하면, 마우스를 인간 CD40 항원 및 보조제로 면역화시켰다. 수주에 걸친 항원의 수회의 투여를 포함하는 면역화 후에, 각각의 면역화된 동물로부터 혈청을 수집하였다. 그 다음, 혈청을 표준 ELISA 및 유세포측정 분석을 사용하여 시험하여, CD40을 검출할 수 있는 항체를 갖는 혈청을 확인하였다. 일단 CD40-특이적 항체의 존재가 결합 분석에 기반하여 마우스 혈청에서 검출되면, 마우스 비장을 수집하고, 항체-생성 세포를 표준 기술에 따라 분리하였다. 그 다음, 비장세포를 알려져 있는 기술에 의해 융합시켜, 항체-생성 골수종 세포를 형성하였다. 융합 후에, 하이브리도마를 ELISA 및 유세포측정에 의해 스크리닝하여, 다양한 항체 CD40 차단 및 중화 특징을 결정하였다.

[0339] 스크리닝 후에, 대다수의 항체가 효능제 활성을 갖는 것으로 확인되었지만, 쥣과 모노클로널 항체 중 3가지(Ab1, Ab2 및 Ab3)가 실질적인 효능제 활성 없이, CD40에 대한 길항제 활성을 갖는 것으로 확인되었다. 이들 3가지 쥣과 항체의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열이 하기 표 7 내지 표 9에 기재되어 있다. 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) 내의 CDR은 볼드체 문자로 나타나 있다(각각 CDR1, CDR2 및 CDR3).

표 7

쥣과 항체 1(Ab1)의 VH 및 VL 아미노산 서열

SEQ ID NO.	클론 명칭	항체 영역	잔기 설명	아미노산 서열
5	Ab1	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLKVSCAAS**GFTFSD YGMN**WVRQAPEKGLEWIA**YISSGRSNIYYAD TVKG**RFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAM YYCAR**SWGYFDV**WGTGTTVTVSS
6	Ab1	CDR-H1	SEQ ID NO: 5의 잔기 26 내지 35	**GFTFSDYGMN**
7	Ab1	CDR-H2	SEQ ID NO: 5의 잔기 50 내지 66	**YISSGRSNIYYADTVKG**
8	Ab1	CDR-H3	SEQ ID NO: 5의 잔기 99 내지 105	**SWGYFDV**
9	Ab1	VL		DIVMTQSPSSLTVTAGEMVTMSC**KSSQSLLN SGNQKNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTRES** GVPDRFAGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYY C**QNDYTYPLT**FGAGTKLEIK
10	Ab1	CDR-L1	SEQ ID NO: 9의 잔기 24 내지 40	**KSSQSLLNSGNQKNYLT**
11	Ab1	CDR-L2	SEQ ID NO: 9의 잔기 56 내지 62	**WASTRES**
12	Ab1	CDR-L3	SEQ ID NO: 9의 잔기 95 내지 103	**QNDYTYPLT**

[0340]

표 8

쥣과 항체 3(Ab3)의 VH 및 VL 아미노산 서열

SEQ ID NO.	클론 명칭	항체 영역	잔기 설명	아미노산 서열
44	Ab3	VH		QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKAF**GYTFTS YTMH**WVKQRPGQGLEWIG**YINPSSDYPNYNQ KFKD**KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV YYCAR**WGYSFDY**WGQGTTLTVSS
45	Ab3	CDR-H1	SEQ ID NO: 44의 잔기 26 내지 35	**GYTFTSYTMH**
46	Ab3	CDR-H2	SEQ ID NO: 44의 잔기 50 내지 66	**YINPSSDYPNYNQKFKD**
47	Ab3	CDR-H3	SEQ ID NO: 44의 잔기 99 내지 105	**WGYSFDY**
48	Ab3	VL		DIVMTQAAPSVSVIPGESVSISC**RSSKSLLH SNGNTYLY**WFLQRPGQSPQYLIY**RMSTLAS**G VPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYC **MQHLEYPLT**FGAGTKLELK
49	Ab3	CDR-L1	SEQ ID NO: 48의 잔기 24 내지 39	**RSSKSLLHSNGNTYLY**
50	Ab3	CDR-L2	SEQ ID NO: 48의 잔기 55 내지 61	**RMSTLAS**
51	Ab3	CDR-L3	SEQ ID NO: 48의 잔기 94 내지 102	**MQHLEYPLT**

[0341]

표 9

쥣과 항체 2(Ab2)의 VH 및 VL 아미노산 서열

SEQ ID NO.	클론 명칭	항체 영역	잔기 설명	아미노산 서열
75	Ab2	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLKVSCAAS**GFTFSD YGMN**WVRQSPEKGLEWIA**YISSGRGNIYYAD TVKG**RFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAM YYCAR**SWGYFDV**WGTGTTVTVSS
6	Ab2	CDR-H1	SEQ ID NO: 75의 잔기 26 내지 35	**GFTFSDYGMN**
42	Ab2	CDR-H2	SEQ ID NO: 75의 잔기 50 내지 66	**YISSGRGNIYYADTVKG**
8	Ab2	CDR-H3	SEQ ID NO: 75의 잔기 99 내지 105	**SWGYFDV**
76	Ab2	VL		DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSC**KSSQSLLN SGNQKNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTRES** GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYY C**QNDYTYPLT**FGAGTKLELK
10	Ab2	CDR-L1	SEQ ID NO: 76의 잔기 24 내지 40	**KSSQSLLNSGNQKNYLT**
11	Ab2	CDR-L2	SEQ ID NO: 76의 잔기 56 내지 62	**WASTRES**

[0342]

SEQ ID NO.	클론 명칭	항체 영역	잔기 설명	아미노산 서열
12	Ab2	CDR-L3	SEQ ID NO: 76의 잔기 95 내지 103	**QNDYTYPLT**

[0343]

[0344] 3가지 항-CD40 길항제 쥣과 모노클로널 항체(Ab1, Ab2 및 Ab3)로부터의 CDR 영역의 공통 서열을 확인하였으며, 상기 표 5에 제공되어 있다. 또한, 3가지 쥣과 항체의 가변 영역 아미노산 서열의 정렬이 도 4a(경쇄) 및 도 4b(중쇄)에 제공되어 있다.

[0345] 3가지 항체의 쥣과 중쇄 및 경쇄 가변 영역(VH 및 VL)을 역전사효소-PCR(RT-PCR)을 사용하여 클로닝하였다. 이어서, 이들 VH 및 VL 영역(상기 표 7 내지 표 9에 기재됨)을 인간 면역글로불린(Ig) 불변 영역을 포함하는 벡터

내로 클로닝한 다음, 포유동물 숙주 세포에서 키메라 항체로서 발현시켰다. 그 다음, 이들 인간 키메라 항체(인간 불변 및 쥣과 가변 영역)를 시험관내 분석을 사용하여 특성화시켜, 그들이 각각 길항제 효과를 갖는지, 및/또는 효능제 효과를 갖는지 여부를 결정하였다.

[0346] FACS 분석을 사용하여, 3가지 키메라 항-CD40 항체가 인간 배아 신장(HEK) 세포 상에 발현되는 huCD40 또는 사이노몰거스 CD40에 결합할 수 있는지 여부를 결정하였다. 3가지 키메라 항체의 각각이 HEK 세포 상에 발현되는 인간 CD40에 결합할 수 있었지만, 키메라 항체 중 오직 2가지만이 사이노몰거스를 인식하였으며 - 키메라 항체 3(chAb3)은 사이노몰거스 CD40에 결합하지 않았다. FACS 결합 연구의 결과는 표 10에 요약되어 있다.

[0347] 또한, FACS 분석을 사용하여 3가지 키메라 항체가 용해성 CD40 리간드(sCD40L)의 CD40으로의 결합을 억제할 수 있었는지 여부를 결정하였다. CD40 발현 HEK 세포를 사용하여, IC50 값을 측정하였다. 표 10에 기재된 바와 같이, 키메라 항체의 각각은 CD40의 리간드로의 결합을 차단할 수 있었다.

[0348] 결합 분석에 더하여, 길항제 및 효능제 활성을 NFkB 매개의 알칼리성 포스파타제(AP)에 연결된 인간 CD40을 발현하는 CD40-발현 리포터 세포주를 사용하여 측정하였다. CD40-발현 리포터 세포주 분석에서, 신호가 CD40을 통해 수신되는 경우, NFkB 활성화는 AP의 분비를 야기하며, 이는 비색 기질에 의해 측정된다. 길항제 활성을 결정하기 위하여, CD40 리포터 세포주(HEK)를 CD40L을 발현하는 Jurkat 세포주(생리학적 리간드 상호작용을 제공하기 위함) 또는 용해성 CD40L(예를 들어, 표 10에 언급된 His-CD40L)과 함께 배양하였다. NFkB 신호를 차단하는 항-CD40 항체의 능력을 측정하였다. 효능제 활성을 측정하기 위하여, 인간 CD40 리포터 세포주를 항-CD40 항체로 직접적으로 처리하고, NFkB 신호를 측정하였다. 3가지 키메라 항체에 대한 대표적인 CD40 길항제 및 효능제 분석 데이터는 표 10 및 도 1a 및 도 1b에 요약되어 있다.

표 10

항-CD40 키메라 항체의 기능적 특징의 요약

[0349]

키메라 CD40 항체(hCg1-LALA)	HEK huCD40 FACS 결합	HEK cyCD40 FACS 결합	HEK CD40 FACS 블로킹 IC50 nM	효능제: HEK huCD40 리포터 분석	길항제: His-CD40L 리포터 분석 IC50 nM	길항제: Jurkat/ 리포터 분석 IC50 nM
키메라 Ab1(chAb1)	예	예	2.3	아니오	0.4	51
키메라 Ab3(chAb3)	예	아니오	1.4	아니오	0.2	0.9
키메라 Ab2(chAb2)	예	예	1.4	아니오	0.3	3.4

[0350] 표 10 및 도 1에 기재된 바와 같이, 항-CD40 키메라 항체는 검출 가능한 효능제 활성 없이 길항제 활성을 보였다. 상기 실험으로부터의 결과에 기반하여, 항-CD40 길항제 항체 Ab1 및 Ab3으로부터의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 인간화를 위해 선택하였다.

[0351] **실시예 2: 길항제 항-CD40 항체 Ab1 및 Ab3의 인간화**

[0352] *길항제 항-CD40 항체 Ab1의 인간화*

[0353] 인간화 항체를 Ab1의 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) CDR 서열에 기반하여 생성하였다. 구체적으로, 인간 생식계열 서열을 CDR-이식된 인간화 Ab1 항체를 작제하기 위하여 선택하였으며, Ab1의 VH 및 VL 쇄의 CDR 도메인을 상이한 인간 중쇄 및 경쇄 수용자 서열 상으로 이식하였다. 모노클로널 항체 Ab1의 VH 및 VL 서열과의 정렬에 기반하여, 하기의 인간 서열을 수용자로서 선택하였다:

[0354] 1. 중쇄 수용자 서열을 작제하기 위한 IGHV3-21*01 및 IGHJ6*01

[0355] 2. 중쇄를 작제하기 위한 대안적인 수용자로서 IGHV3-48*01 및 IGHJ6*01

[0356] 3. 경쇄 수용자 서열을 작제하기 위한 IGKV4-1*01 및 IGKJ2*01

[0357] 4. 경쇄를 작제하기 위한 대안적인 수용자로서 IGKV2-40*01 및 IGKJ2*01

[0358] 그 다음, Ab1의 상응하는 VH 및 VL CDR을 상기 1 내지 4에 기재된 수용자 서열 내로 이식함으로써 CDR-이식된 항체를 제조하였다.

[0359] 프레임워크 복귀돌연변이(들)를 갖는 인간화 항체를 생성하기 위하여, 프레임워크 돌연변이를 확인하고, CDR-이식된 항체 내로 도입하였다. 이들 돌연변이를 중합효소 연쇄 반응에서 복귀돌연변이(들) 및 돌연변이유발 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용한 가변 도메인의 신생 합성을 포함하는 표준 기술을 사용하여 도입하였다. 복귀 돌연변이 및 기타 돌연변이의 상이한 조합을 하기와 같이 CDR-이식된 항체(항체 Ab1의 CDR 함유)의 각각에 대하여 작제하였다. (주의: 하기 언급되는 돌연변이에 대한 잔기 번호는 카바트 넘버링 시스템에 기반한다.)

[0360] CDR-이식된 항체의 중쇄에 있어서, 하기의 버니어 및 VH/VL 계면 잔기 중 하나 이상을 복귀 돌연변이시켰다: V48I 및/또는 S49A.

[0361] CDR-이식된 항체의 경쇄에 있어서, 하기의 버니어 및 VH/VL 계면 잔기를 복귀 돌연변이시켰다: Y36F.

[0362] 쥣과 모노클로널 Ab1로부터 유래된 인간화 항체의 가변 영역의 설명은 하기에 제공되어 있다:

[0363] ● 인간화 Ab1(huAb1VH.1)은 IGHV3-21*01 및 IGHJ6*01 프레임워크 서열을 함유하는 CDR-이식된 Ab1 VH이며;

[0364] ● 인간화 Ab1VH.1a(huAb1VH.1A)는 하기의 2개의 프레임워크 복귀돌연변이: V48I, S49A를 갖는 huAb1VH.1의 아미노산 서열을 포함하는 인간화 중쇄이며;

[0365] ● 인간화 Ab1VL.1(huAb1VL.1)은 IGKV4-1*01 및 IGKJ2*01 프레임워크 서열을 함유하는 CDR-이식된 Ab1 VL이며;

[0366] ● 인간화 Ab1VL.1a(huAb1VL.1A)는 huAb1VL.1에 기반한 인간화 경쇄이며, 1개의 제안된 프레임워크 복귀-돌연변이: Y36F를 함유한다.

[0367] 주의: IGHV3-21_IGHJ6은 IGHV3-21*01 및 IGHJ6*01에 상응하는 가변 서열을 포함하는 항체를 지칭한다.

[0368] 그 다음, 인간화 가변 영역을 하기의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 조합에 기반하여 4가지 상이한 인간화 항체의 기능적 특성화를 위하여 IgG 발현 벡터 내로 클로닝하였다:

[0369] A. huAb1VH.1/VL.1

[0370] B. huAb1VH.1A/VL.1

[0371] C. huAb1VH.1/VL.1A

[0372] D. huAb1VH.1A/VL.1A

[0373] 전술한 인간화 항체의 가변 영역 및 CDR 아미노산 서열은 하기 표 11에 기재되어 있다.

표 11

인간화 버전의 항체 1(huAb1)의 VH 및 VL 서열

SEQ ID NO:	클론	항체 영역	잔기	아미노산 서열
13	huAb1VH.1/VL.1 VH	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFS DYGMN**WVRQAPGKGLEWVS**YISSGRSNIYY ADTVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR**SWGYFDV**WGQGTTVTVSS
6	huAb1VH.1/VL.1	CDR-H1	SEQ ID NO: 13의 잔기 26 내지 35	**GFTFSDYGMN**
7	huAb1VH.1/VL.1	CDR-H2	SEQ ID NO: 13의 잔기 50 내지 66	**YISSGRSNIYYADTVKG**
8	huAb1VH.1/VL.1	CDR-H3	SEQ ID NO: 13의 잔기 99 내지 105	**SWGYFDV**
14	huAb1VH.1/VL.1 VL	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLL NSGNQKNYLT**WYQQKPGQPPKLLIY**WASTR ES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYC**QNDYTYPLT**FGQGTKLEIK
10	huAb1VH.1/VL.1	CDR-L1	SEQ ID NO: 14의 잔기 24 내지 40	**KSSQSLLNSGNQKNYLT**
11	huAb1VH.1/VL.1	CDR-L2	SEQ ID NO: 14의 잔기 56 내지 62	**WASTRES**
12	huAb1VH.1/VL.1	CDR-L3	SEQ ID NO: 14의 잔기 95 내지 103	**QNDYTYPLT**
15	huAb1VH.1A/VL.1	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFS DYGMN**WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRSNIYY ADTVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR**SWGYFDV**WGQGTTVTVSS
6	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-H1	SEQ ID NO: 15의 잔기 26 내지 35	**GFTFSDYGMN**
7	huAb15VH.1A/VL.1	CDR-H2	SEQ ID NO: 15의 잔기 50 내지 66	**YISSGRSNIYYADTVKG**

[0374]

[0375]

SEQ ID NO:	클론	항체 영역	잔기	아미노산 서열
8	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-H3	SEQ ID NO: 15의 잔기 99 내지 105	**SWGYFDV**
14	huAb1VH.1A/VL.1	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLL NSGNQKNYLT**WYQQKPGQPPKLLIY**WASTR ES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYC**QNDYTYPLT**FGQGTKLEIK
10	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-L1	SEQ ID NO: 14의 잔기 24 내지 40	**KSSQSLLNSGNQKNYLT**
11	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-L2	SEQ ID NO: 14의 잔기 56 내지 62	**WASTRES**
12	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-L3	SEQ ID NO: 14의 잔기 95 내지 103	**QNDYTYPLT**
13	huAb1VH.1/VL.1A VH	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFS DYGMN**WVRQAPGKGLEWVS**YISSGRSNIYY ADTVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR**SWGYFDV**WGQGTTVTVSS
6	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-H1	SEQ ID NO: 13의 잔기 26 내지 35	**GFTFSDYGMN**
7	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-H2	SEQ ID NO: 13의 잔기 50 내지 66	**YISSGRSNIYYADTVKG**
8	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-H3	SEQ ID NO: 13의 잔기 99 내지 105	**SWGYFDV**
16	huAb1VH.1/VL.1A VL	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLL NSGNQKNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTR ES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYC**QNDYTYPLT**FGQGTKLEIK
10	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-L1	SEQ ID NO: 16의 잔기 24 내지 40	**KSSQSLLNSGNQKNYLT**
11	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-L2	SEQ ID NO: 16의 잔기 56 내지 62	**WASTRES**
12	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-L3	SEQ ID NO: 16의 잔기 95 내지 103	**QNDYTYPLT**
15	huAb1VH.1A/VL.1A VH	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFS DYGMN**WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRSNIYY ADTVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR**SWGYFDV**WGQGTTVTVSS
6	huAb1VH.1A/VL.1A	CDR-H1	SEQ ID NO: 15의 잔기 26 내지 35	**GFTFSDYGMN**
7	huAb1VH.1A/VL.1A	CDR-H2	SEQ ID NO: 15의 잔기 50 내지 66	**YISSGRSNIYYADTVKG**
8	huAb1VH.1A/VL.1A	CDR-H3	SEQ ID NO: 15의 잔기 99 내지 105	**SWGYFDV**
16	huAb1VH.1A/VL.1A VL	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLL NSGNQKNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTR ES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYC**QNDYTYPLT**FGQGTKLEIK

[0376]

SEQ ID NO:	클론	항체 영역	잔기	아미노산 서열
10	huAb1VH.1A/VL.1A	CDR-L1	SEQ ID NO: 16의 잔기 24 내지 40	**KSSQSLLNSGNQKNYLT**
11	huAb1VH.1A/VL.1A	CDR-L2	SEQ ID NO: 16의 잔기 56 내지 62	**WASTRES**
12	huAb1VH.1A/VL.1A	CDR-L3	SEQ ID NO: 16의 잔기 95 내지 103	**QNDYTYPLT**

[0377] 상기 기재된 바와 같이, Ab1의 VH 및 VL 영역의 인간화 버전의 CDR은 쥣과 Ab1 항체와 동일하였다.

[0378] *길항제 항-CD40 항체 3(Ab3)의 인간화*

[0379] 또한, 인간화 항체를 Ab3의 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) CDR 서열에 기반하여 생성하였다. CDR-이식된 인간화 Ab3 항체를 작제하기 위하여 인간 생식계열 서열을 선택하였으며, Ab3의 VH 및 VL 쇄의 CDR 도메인을 상이한 인간 중쇄 및 경쇄 수용자 서열 상으로 이식하였다. 모노클로널 항체 Ab3의 VH 및 VL 서열과의 정렬에 기반하여, 하기의 인간 서열을 수용자로서 선택하였다:

[0380] 1. 중쇄 수용자 서열을 작제하기 위한 IGHV3-69*06 및 IGHJ6*01

[0381] 2. 중쇄를 작제하기 위한 대안적인 수용자로서의 IGHV1-18*01 및 IGHJ6*01

[0382] 3. 경쇄 수용자 서열을 작제하기 위한 IGKV2-29*02 및 IGKJ2*01

[0383] 4. 경쇄를 작제하기 위한 대안적인 수용자로서의 IGKV2-28*01 및 IGKJ2*01

[0384] Ab3의 상응하는 VH 및 VL CDR을 상기 1 내지 4에 기재된 수용자 서열 내로 이식함으로써 CDR-이식된 항체를 제조하였다.

[0385] 프레임워크 복귀돌연변이(들)를 갖는 인간화 항체를 생성하기 위하여, 다수의 프레임워크 돌연변이를 확인하고, CDR-이식된 항체 내로 도입하였다. 이들 돌연변이를 중합효소 연쇄 반응에서 복귀돌연변이(들) 및 돌연변이유발 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용한 가변 도메인의 신생 합성을 포함하는 표준 기술을 사용하여 도입하였다. 복귀 돌연변이를 포함하는 돌연변이의 상이한 조합을 CDR-이식된 항체(항체 Ab3의 CDR 함유)의 각각에 대하여 작제하였다. (주의: 하기 언급되는 돌연변이에 대한 잔기 번호는 카바트 넘버링 시스템에 기반한다.)

[0386] 중쇄 Ab3에 있어서, 하기의 버니어 및 VH/VL 계면 잔기 중 하나 이상을 복귀 돌연변이시켰다: M48I, V67A, I69L. 또한, Q1E로의 변경이 고려되었다. Q1E 돌연변이를 도입하여, 피로글루탐산염 형성을 방지하였다.

[0387] 경쇄 Ab3에 있어서, 하기의 버니어 및 VH/VL 계면 잔기 중 하나 이상을 복귀 돌연변이시켰다: Y36F, L46Y.

[0388] 쥣과 모노클로널 Ab3으로부터 유래된 인간화 항체의 가변 영역의 설명은 하기 기재되어 있다:

[0389] ● huAb3VH.1z는 IGHV1-69*06 및 IGHJ6*01 프레임워크 서열을 함유하는 CDR-이식된, 인간화 Ab3 VH이다.

[0390] ● huAb3VH.1은 피로글루탐산염 형성을 방지하기 위하여 Q1E 변경을 갖는 huAb3VH.1z에 기반한다.

[0391] ● huAb3VH.1A는 huAb3VH.1에 기반한 인간화 설계이며, 3개의 추가의 프레임워크 복귀-돌연변이를 함유한다: M48I, V67A, I69L.

[0392] ● huAb3VH.1b는 huAb3VH.1과 huAb3VH.1A 사이의 중간체 설계이며, 1개의 제안된 프레임워크 복귀-돌연변이: I69L을 함유한다.

[0393] ● huAb3VL.1은 IGKV2-28*01 및 IGKJ2*01 프레임워크 서열을 함유하는 CDR-이식된, 인간화 Ab3 VL이다.

[0394] ● huAb3VL.1A는 huAb3VL.1에 기반한 인간화 설계이며, 2개의 프레임워크 복귀-돌연변이: Y36F, L46Y를 함유한다.

[0395] ● huAb3VL.1B는 huAb3VL.1과 huAb3VL.1A 사이의 중간체 설계이다. 그것은 2개의 제안된 프레임워크 복귀-돌연변이: L46Y를 함유한다.

[0396] 또한, *IGHV1-69_IGHJ6이 IGHV1-69*06 및 IGHJ6*01 생식계열 서열로 구성되는 것을 주목한다.

[0397] 그 다음, 인간화 가변 영역을 하기의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 조합에 기반하여, 9가지의 상이한 인간화 항체의 기능적 특성화를 위하여 IgG 발현 벡터 내로 클로닝하였다:

[0398] A. huAb3VH.1/VL.1

[0399] B. huAb3VH.1B/VL.1

[0400] C. huAb3VH.1A/VL.1

[0401] D. huAb3VH.1/VL.1A

[0402] E. huAb3VH.1B/VL.1A

[0403] F. huAb3VH.1A/VL.1A

[0404] G. huAb3VH.1/VL.1B

[0405] H. huAb3VH.1B/VL.1B

[0406] I. huAb3VH.1A/VL.1B

[0407] 전술된 인간화 항체의 가변 영역 및 CDR 아미노산 서열은 하기 표 12에 기재되어 있다.

표 12

인간화 Ab3 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열

[0408]

SEQ ID NO:	클론	항체 영역	잔기	아미노산 서열
52	huAb3VH.1/VL.1	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS**GYTFT SYTMH**WVRQAPGQGLEWMG**YINPSSDYPNY NQKFKD**RVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR**WGYSFDY**WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1/VL.1	CDR-H1	SEQ ID NO: 52의 잔기 26 내지 35	**GYTFTSYTMH**
46	huAb3VH.1/VL.1	CDR-H2	SEQ ID NO: 52의 잔기 50 내지 66	**YINPSSDYPNYNQKFKD**
47	huAb3VH.1/VL.1	CDR-H3	SEQ ID NO: 52의 잔기 99 내지 105	**WGYSFDY**
53	Ab3VH.1/VL.1	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLL HSNGNTYLY**WYLQKPGQSPQLLIY**RMSTLA S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**MQHLEYPLT**FGQGTKLEIK
49	huAb3VH.1/VL.1	CDR-L1	SEQ ID NO: 53의 잔기 24 내지 39	**RSSKSLLHSNGNTYLY**

[0409]

SEQ ID NO:	클론	항체 영역	잔기	아미노산 서열
50	huAb3VH.1/VL.1	CDR-L2	SEQ ID NO: 53의 잔기 55 내지 61	**RMSTLAS**
51	huAb3VH.1/VL.1	CDR-L3	SEQ ID NO: 53의 잔기 94 내지 102	**MQHLEYPLT**
54	huAb3VH.1B/VL.1	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS**GYTFT SYTMH**WVRQAPGQGLEWMG**YINPSSDYPNY NQKFKD**RVTLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR**WGYSFDY**WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1B/VL.1	CDR-H1	SEQ ID NO: 54의 잔기 26 내지 35	**GYTFTSYTMH**
46	huAb3VH.1B/VL.1	CDR-H2	SEQ ID NO: 54의 잔기 50 내지 66	**YINPSSDYPNYNQKFKD**
47	huAb3VH.1B/VL.1	CDR-H3	SEQ ID NO: 54의 잔기 99 내지 105	**WGYSFDY**
53	huAb3VH.1B/VL.1	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLL HSNGNTYLY**WYLQKPGQSPQLLIY**RMSTLA S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**MQHLEYPLT**FGQGTKLEIK
49	huAb3VH.1B/VL.1	CDR-L1	SEQ ID NO: 53의 잔기 24 내지 39	**RSSKSLLHSNGNTYLY**
50	huAb3VH.1B/VL.1	CDR-L2	SEQ ID NO: 53의 잔기 55 내지 61	**RMSTLAS**
51	huAb3VH.1B/VL.1	CDR-L3	SEQ ID NO: 53의 잔기 94 내지 102	**MQHLEYPLT**
55	huAb3VH.1A/VL.1	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS**GYTFT SYTMH**WVRQAPGQGLEWIG**YINPSSDYPNY NQKFKD**RATLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR**WGYSFDY**WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1A/VL.1	CDR-H1	SEQ ID NO: 55의 잔기 26 내지 35	**GYTFTSYTMH**
46	huAb3VH.1A/VL.1	CDR-H2	SEQ ID NO: 55의 잔기 50 내지 66	**YINPSSDYPNYNQKFKD**
47	huAb3VH.1A/VL.1	CDR-H3	SEQ ID NO: 55의 잔기 99 내지 105	**WGYSFDY**
53	huAb3VH.1A/VL.1	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLL HSNGNTYLY**WYLQKPGQSPQLLIY**RMSTLA S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**MQHLEYPLT**FGQGTKLEIK

[0410]

SEQ ID NO:	클론	항체 영역	잔기	아미노산 서열
49	huAb3VH.1A/VL.1	CDR-L1	SEQ ID NO: 53의 잔기 24 내지 39	**RSSKSLLHSNGNTYLY**
50	huAb37VH.1A/VL.1	CDR-L2	SEQ ID NO: 53의 잔기 55 내지 61	**RMSTLAS**
51	huAb3VH.1A/VL.1	CDR-L3	SEQ ID NO: 53의 잔기 94 내지 102	**MQHLEYPLT**
52	huAb3VH.1/VL.1A	VL		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS**GYTFT SYTMH**WVRQAPGQGLEWMG**YINPSSDYPNY NQKFKD**RVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR**WGYSFDY**WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1/VL.1A	CDR-H1	SEQ ID NO: 52의 잔기 26 내지 35	**GYTFTSYTMH**
46	huAb3VH.1/VL.1A	CDR-H2	SEQ ID NO: 52의 잔기 50 내지 66	**YINPSSDYPNYNQKFKD**
47	huAb3VH.1/VL.1A	CDR-H3	SEQ ID NO: 52의 잔기 99 내지 105	**WGYSFDY**
56	huAb3VH.1/VL.1A	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLL HSNGNTYLY**WFLQKPGQSPQYLIY**RMSTLA S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**MQHLEYPLT**FGQGTKLEIK
49	huAb3VH.1/VL.1A	CDR-L1	SEQ ID NO: 56의 잔기 24 내지 39	**RSSKSLLHSNGNTYLY**
50	huAb3VH.1/VL.1A	CDR-L2	SEQ ID NO: 56의 잔기 55 내지 61	**RMSTLAS**
51	huAb3VH.1/VL.1A	CDR-L3	SEQ ID NO: 56의 잔기 94 내지 102	**MQHLEYPLT**
54	huAb3VH.1B/VL.1A	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS**GYTFT SYTMH**WVRQAPGQGLEWMG**YINPSSDYPNY NQKFKD**RVTLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR**WGYSFDY**WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1B/VL.1A	CDR-H1	SEQ ID NO: 54의 잔기 26 내지 35	**GYTFTSYTMH**
46	huAb3VH.1B/VL.1A	CDR-H2	SEQ ID NO: 54의 잔기 50 내지 66	**YINPSSDYPNYNQKFKD**
47	huAb3VH.1B/VL.1A	CDR-H3	SEQ ID NO: 54의 잔기 99 내지 105	**WGYSFDY**
56	huAb3VH.1B/VL.1A	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLL HSNGNTYLY**WFLQKPGQSPQYLIY**RMSTLA S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**MQHLEYPLT**FGQGTKLEIK
49	huAb3VH.1B/VL.1A	CDR-L1	SEQ ID NO: 56의 잔기 24 내지 39	**RSSKSLLHSNGNTYLY**
50	huAb3VH.1B/VL.1A	CDR-L2	SEQ ID NO: 56의 잔기 55 내지 61	**RMSTLAS**
51	huAb3VH.1B/VL.1A	CDR-L3	SEQ ID NO: 56의 잔기 94 내지 102	**MQHLEYPLT**

SEQ ID NO:	클론	항체 영역	잔기	아미노산 서열
55	huAb3VH.1A/VL.1A	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS**GYTFT SYTMH**WVRQAPGQGLEWIG**YINPSSDYPNY NQKFKD**RATLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR**WGYSFDY**WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1A/VL.1A	CDR-H1	SEQ ID NO: 55의 잔기 26 내지 35	**GYTFTSYTMH**
46	huAb3VH.1A/VL.1A	CDR-H2	SEQ ID NO: 55의 잔기 50 내지 66	**YINPSSDYPNYNQKFKD**
47	huAb3VH.1A/VL.1A	CDR-H3	SEQ ID NO: 55의 잔기 99 내지 105	**WGYSFDY**
56	huAb3VH.1A/VL.1A	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLL HSNGNTYLY**WFLQKPGQSPQYLIY**RMSTLA S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**MQHLEYPLT**FGQGTKLEIK
49	huAb3VH.1A/VL.1A	CDR-L1	SEQ ID NO: 56의 잔기 24 내지 39	**RSSKSLLHSNGNTYLY**
50	huAb37VH.1A/VL.1A	CDR-L2	SEQ ID NO: 56의 잔기 55 내지 61	**RMSTLAS**
51	huAb3VH.1A/VL.1A	CDR-L3	SEQ ID NO: 56의 잔기 94 내지 102	**MQHLEYPLT**
52	huAb3VH.1/VL.1B	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS**GYTFT SYTMH**WVRQAPGQGLEWMG**YINPSSDYPNY NQKFKD**RVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR**WGYSFDY**WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1/VL.1B	CDR-H1	SEQ ID NO: 52의 잔기 26 내지 35	**GYTFTSYTMH**
46	huAb3VH.1/VL.1B	CDR-H2	SEQ ID NO: 52의 잔기 50 내지 66	**YINPSSDYPNYNQKFKD**
47	huAb3VH.1/VL.1B	CDR-H3	SEQ ID NO: 52의 잔기 99 내지 105	**WGYSFDY**
57	huAb3VH.1/VL.1B	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLL HSNGNTYLY**WYLQKPGQSPQYLIY**RMSTLA S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**MQHLEYPLT**FGQGTKLEIK
49	huAb3VH.1/VL.1B	CDR-L1	SEQ ID NO: 57의 잔기 24 내지 39	**RSSKSLLHSNGNTYLY**
50	huAb3VH.1/VL.1B	CDR-L2	SEQ ID NO: 57의 잔기 55 내지 61	**RMSTLAS**
51	huAb3VH.1/VL.1B	CDR-L3	SEQ ID NO: 57의 잔기 94 내지 102	**MQHLEYPLT**
54	huAb3VH.1B/VL.1B	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS**GYTFT SYTMH**WVRQAPGQGLEWMG**YINPSSDYPNY NQKFKD**RVTLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR**WGYSFDY**WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1B/VL.1B	CDR-H1	SEQ ID NO: 54의 잔기 26 내지 35	**GYTFTSYTMH**
46	huAb3VH.1B/VL.1B	CDR-H2	SEQ ID NO: 54의 잔기 50 내지 66	**YINPSSDYPNYNQKFKD**

[0411]

SEQ ID NO:	클론	항체 영역	잔기	아미노산 서열
47	huAb3VH.1B/VL.1B	CDR-H3	SEQ ID NO: 54의 잔기 99 내지 105	**WGYSFDY**
57	huAb3VH.1B/VL.1B	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLL HSNGNTYLY**WYLQKPGQSPQYLIY**RMSTLA S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**MQHLEYPLT**FGQGTKLEIK
49	huAb3VH.1B/VL.1B	CDR-L1	SEQ ID NO: 57의 잔기 24 내지 39	**RSSKSLLHSNGNTYLY**
50	huAb3VH.1B/VL.1B	CDR-L2	SEQ ID NO: 57의 잔기 55 내지 61	**RMSTLAS**
51	huAb3VH.1B/VL.1B	CDR-L3	SEQ ID NO: 57의 잔기 94 내지 102	**MQHLEYPLT**
55	huAb3VH.1A/VL.1B	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS**GYTFT SYTMH**WVRQAPGQGLEWIG**YINPSSDYPNY NQKFKD**RATLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR**WGYSFDY**WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1A/VL.1B	CDR-H1	SEQ ID NO: 55의 잔기 26 내지 35	**GYTFTSYTMH**
46	huAb3VH.1A/VL.1B	CDR-H2	SEQ ID NO: 55의 잔기 50 내지 66	**YINPSSDYPNYNQKFKD**
47	huAb3VH.1A/VL.1B	CDR-H3	SEQ ID NO: 55의 잔기 99 내지 105	**WGYSFDY**
57	huAb3VH.1A/VL.1B	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLL HSNGNTYLY**WYLQKPGQSPQYLIY**RMSTLA S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**MQHLEYPLT**FGQGTKLEIK
49	huAb3VH.1A/VL.1B	CDR-L1	SEQ ID NO: 57의 잔기 24 내지 39	**RSSKSLLHSNGNTYLY**
50	huAb37VH.1A/VL.1B	CDR-L2	SEQ ID NO: 57의 잔기 55 내지 61	**RMSTLAS**
51	huAb3VH.1A/VL.1B	CDR-L3	SEQ ID NO: 57의 잔기 94 내지 102	**MQHLEYPLT**

[0412]

[0413] 상기 기재된 바와 같이, Ab3의 VH 및 VL 영역의 인간화 버전의 CDR은 쥣과 Ab3 항체와 동일하였다.

[0414] Ab3이 사이노몰거스 CD40에 결합하지 않았으므로(실시예 1 참조), 인간화 버전의 Ab1을 추가의 분석을 위해 선택하였다.

[0415] **실시예 3: 인간화 Ab1 항체의 VL CDR1의 변형**

[0416] 상기 기재된 인간화 Ab1 VH 및 VL 항체 서열의 시험에 의해, 경쇄의 CDR1에 노출된 가능한 탈아미드화 서열 모티프("NS" 모티프)가 확인되었다. 확인된 "NS" 모티프 부위는 탈아미드화 및 가수분해를 야기할 수 있으며, 숙신이미드-중간체 및 아스파르틸-ASP 또는 아이소-ASP를 야기할 수 있다. 따라서, 서열 모티프를 인간화 Ab1 VL CDR1 서열로부터 조작하였다. "NS" 모티프의 제거는 개선된 항체 제조를 가능하게 할 것이다.

[0417] 인간화 Ab1의 추가의 조작에 의해 6가지의 상이한 항체를 초래하였다. 특히, 4가지는 길항제 활성을 보유하는 한편, 2개는 효능제 항체(huAb1v4 및 huAb1v3)가 되었다. 표 14에 나타낸 바와 같이, huAb1v4 및 huAb1v3은 huCD40 리포터 분석에 의해 결정시 효능제 활성을 보였지만, Jurkat/리포터 분석에서 결정시 길항제 활성을 나타내지 않았다. 변이체 인간화 Ab1 항체(huAb1v1 내지 huAb1v6)의 VH 및 VL 아미노산 서열, 및 CDR은 하기 표 13에 기재되어 있다.

표 13

인간화 Ab1 항체 변이체(huAb1v#) VH 및 VL 아미노산 서열

SEQ ID NO.:	클론	항체 영역	잔기	아미노산 서열
13	huAb1v3	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFS DYGMN**WVRQAPGKGLEWVS**YISSGRSNIYY ADTVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR**SWGYFDV**WGQGTTVTVSS
6	huAb1v3	CDR-H1	SEQ ID NO: 13의 잔기 26 내지 35	**GFTFSDYGMN**
7	huAb1v3	CDR-H2	SEQ ID NO: 13의 잔기 50 내지 66	**YISSGRSNIYYADTVKG**
8	huAb1v3	CDR-H3	SEQ ID NO: 13의 잔기 99 내지 105	**SWGYFDV**
43	huAb1v3	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLL NLGNQKNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTR ES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYC**QNDYTYPLT**FGQGTKLEIK
17	huAb1v3	CDR-L1	SEQ ID NO: 43의 잔기 24 내지 40	**KSSQSLLNLGNQKNYLT**
11	huAb1v3	CDR-L2	SEQ ID NO: 43의 잔기 56 내지 62	**WASTRES**
12	huAb1v3	CDR-L3	SEQ ID NO: 43의 잔기 95 내지 103	**QNDYTYPLT**
15	huAb1v4	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFS DYGMN**WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRSNIYY ADTVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR**SWGYFDV**WGQGTTVTVSS
6	huAb1v4	CDR-H1	SEQ ID NO: 15의 잔기 26 내지 35	**GFTFSDYGMN**
7	huAb1v4	CDR-H2	SEQ ID NO: 15의 잔기 50 내지 66	**YISSGRSNIYYADTVKG**
8	huAb1v4	CDR-H3	SEQ ID NO: 15의 잔기 99 내지 105	**SWGYFDV**

[0418]

SEQ ID NO.:	클론	항체 영역	잔기	아미노산 서열
77	huAb1v4	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLL NPGNQKNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTR ES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYC**QNDYTYPLT**FGQGTKLEIK
74	huAb1v4	CDR-L1	SEQ ID NO: 77의 잔기 24 내지 40	**KSSQSLLNPGNQKNYLT**
11	huAb1v4	CDR-L2	SEQ ID NO: 77의 잔기 56 내지 62	**WASTRES**
12	huAb1v4	CDR-L3	SEQ ID NO: 77의 잔기 95 내지 103	**QNDYTYPLT**
15	huAb1v5	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFS DYGMN**WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRSNIYY ADTVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR**SWGYFDV**WGQGTTVTVSS
6	huAb1v5	CDR-H1	SEQ ID NO: 15의 잔기 26 내지 35	**GFTFSDYGMN**
7	huAb1v5	CDR-H2	SEQ ID NO: 15의 잔기 50 내지 66	**YISSGRSNIYYADTVKG**
8	huAb1v5	CDR-H3	SEQ ID NO: 15의 잔기 99 내지 105	**SWGYFDV**
18	huAb1v5	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLL NTGNQKNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTR ES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYC**QNDYTYPLT**FGQGTKLEIK
19	huAb1v5	CDR-L1	SEQ ID NO: 18의 잔기 24 내지 40	**KSSQSLLNTGNQKNYLT**
11	huAb1v5	CDR-L2	SEQ ID NO: 18의 잔기 56 내지 62	**WASTRES**
12	huAb1v5	CDR-L3	SEQ ID NO: 18의 잔기 95 내지 103	**QNDYTYPLT**
15	huAb1v6	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFS DYGMN**WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRSNIYY ADTVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR**SWGYFDV**WGQGTTVTVSS
6	huAb1v6	CDR-H1	SEQ ID NO: 15의 잔기 26 내지 35	**GFTFSDYGMN**
7	huAb1v6	CDR-H2	SEQ ID NO: 15의 잔기 50 내지 66	**YISSGRSNIYYADTVKG**
8	huAb1v6	CDR-H3	SEQ ID NO: 15의 잔기 99 내지 105	**SWGYFDV**
43	huAb1v6	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLL NLGNQKNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTR ES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYC**QNDYTYPLT**FGQGTKLEIK
17	huAb1v6	CDR-L1	SEQ ID NO: 43의 잔기 24 내지 40	**KSSQSLLNLGNQKNYLT**
11	huAb1v6	CDR-L2	SEQ ID NO: 43의 잔기 56 내지 62	**WASTRES**

[0419]

SEQ ID NO.:	클론	항체 영역	잔기	아미노산 서열
12	huAb1v6	CDR-L3	SEQ ID NO: 43의 잔기 95 내지 103	**QNDYTYPLT**
15	huAb1v1	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFS DYGMN**WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRSNIYY ADTVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR**SWGYFDV**WGQGTTVTVSS
6	huAb1v1	CDR-H1	SEQ ID NO: 15의 잔기 26 내지 35	**GFTFSDYGMN**
7	huAb1v1	CDR-H2	SEQ ID NO: 15의 잔기 50 내지 66	**YISSGRSNIYYADTVKG**
8	huAb1v1	CDR-H3	SEQ ID NO: 15의 잔기 99 내지 105	**SWGYFDV**
20	huAb1v1	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLL NRGNQKNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTR ES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYC**QNDYTYPLT**FGQGTKLEIK
21	huAb1v1	CDR-L1	SEQ ID NO: 20의 잔기 24 내지 40	**KSSQSLLNRGNQKNYLT**
11	huAb1v1	CDR-L2	SEQ ID NO: 20의 잔기 56 내지 62	**WASTRES**
12	huAb1v1	CDR-L3	SEQ ID NO: 20의 잔기 95 내지 103	**QNDYTYPLT**
13	huAb1v2	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFS DYGMN**WVRQAPGKGLEWVS**YISSGRSNIYY ADTVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR**SWGYFDV**WGQGTTVTVSS
6	huAb1v2	CDR-H1	SEQ ID NO: 13의 잔기 26 내지 35	**GFTFSDYGMN**
7	huAb1v2	CDR-H2	SEQ ID NO: 13의 잔기 50 내지 66	**YISSGRSNIYYADTVKG**
8	huAb1v2	CDR-H3	SEQ ID NO: 13의 잔기 99 내지 105	**SWGYFDV**
18	huAb1v2	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLL NTGNQKNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTR ES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYC**QNDYTYPLT**FGQGTKLEIK
19	huAb1v2	CDR-L1	SEQ ID NO: 18의 잔기 24 내지 40	**KSSQSLLNTGNQKNYLT**
11	huAb1v2	CDR-L2	SEQ ID NO: 18의 잔기 56 내지 62	**WASTRES**
12	huAb1v2	CDR-L3	SEQ ID NO: 18의 잔기 95 내지 103	**QNDYTYPLT**

[0420]

[0421] VL CDR1 내의 "NS" 모티프의 변형에 더하여, 표 13에서 상기 기재된 변이체 huAb1v2 및 huAb1v3은 그들의 VH 도메인에 추가의 프레임워크 돌연변이를 갖는다.

[0422] 하기의 표 14는 변이체 결합, 효능제 및 길항제 활성의 요약을 제공한다. 분석의 설명은 상기 실시예 2에서 확인할 수 있다. VL CDR1에서 돌연변이된 "NS" 모티프는 하기 표 14에 밑줄이 그어져 있다. 표 14에 기재된 바와 같이, 항체 huAb1v4(VL CDR1 도메인 내에 "P" 돌연변이 함유) 및 huAb1v3(VL CDR1 도메인 내에 "L" 돌연변이 및 VH 영역 내에 프레임워크 돌연변이 함유)은 길항제 활성을 갖는 모체 항체로부터 유래됨에도 불구하고, 효능제 활성을 나타내었다.

표 14

변이체 인간화 항체에 대한 서열 및 기능적 요약

인간화 163-2.1F2.2B5 변이체	VL LCDR1 서열 (KSSQSLLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 10))	sCD40L의 블로킹	효능제: huCD40 리포터 분석 IC50 nM	길항제: Jurkat/리포터 분석 IC50 nM
huAb1v4	KSSQSLL**NP**GNQKNYLT (SEQ ID NO: 74)	예	49	아니오
huAb1v6	KSSQSLL**NL**GNQKNYLT (SEQ ID NO: 17)	예	아니오	85.0
huAb1v1	KSSQSLL**NR**GNQKNYLT (SEQ ID NO: 21)	예	아니오	55
huAb1v2*	KSSQSLL**NT**GNQKNYLT (SEQ ID NO: 19)	예	아니오	>100
huAb1v5	KSSQSLL**NT**GNQKNYLT (SEQ ID NO: 19)	예	아니오	>100
huAb1v3*	KSSQSLL**NL**GNQKNYLT (SEQ ID NO: 17)	예	79	아니오

[0423] *VH의 추가의 프레임워크 차이

[0424] 인간화 항-CD40 항체 huAb1v1을 추가의 연구 및 개선을 위해 선택하였다.

[0425] **실시예 4: 항-CD40 항체 huAb1v1의 HC CDR2의 조작**

[0426] 실시예 3에 기재된 변이체로부터, 항체 huAb1v1을 추가의 분석을 위해 선택하였다. 이러한 항체의 효력을 추가로 개선시키기 위하여, HC CDR2 도메인 내에 돌연변이를 함유하는 huAb1v1 중쇄(HC)의 변이체를 생성하였다. 17가지의 추가의 변이체를 제조하였다(huAb1v1CDR2v1 내지 v17로 지칭). 변이체 HC 영역을 활성 연구를 위하여 huAb1v1 LC(SEQ ID NO: 20)와 쌍을 형성시켜, 효능제 및 길항제 활성을 결정하였다. 17가지의 변이체 중쇄를 제조하였으며, 시험관내 활성 연구에 의해, 일반적으로 변이체가 huAb1v1에 비하여 그들의 길항제 활성 및 다양한 효력을 보유하였음이 나타났다. 표 15는 항체 변이체가 길항제 활성을 유지하는 한편, 각 변이체의 효력이 달라짐을 보여준다.

표 15

huAb1v1 CDR2 HC 변이체에 대한 기능적 요약

조작된 huAb1v1CDR2 변이체	길항제: Jurkat/ 리포터 분석 (IC50 nM)
huAb1v1CDR2v17	503.8
huAb1v1CDR2v16	30.15
huAb1v1CDR2v15	339.7
huAb1v1CDR2v14	21.86
huAb1v1CDR2v13	62.44
huAb1v1CDR2v12	236.1
huAb1v1CDR2v11	>1000
huAb1v1CDR2v10	23.04
huAb1v1CDR2v9	7.06
huAb1v1CDR2v8	>1000
huAb1v1CDR2v7	2.69
huAb1v1CDR2v6	>1000
huAb1v1CDR2v5	>1000
huAb1v1CDR2v4	563.4
huAb1v1CDR2v3	218.7
huAb1v1CDR2v2	>1000
huAb1v1CDR2v1	>1000

[0427]

[0428] 모든 huAb1v1 HC 변이체를 하기 표 16에 기재된 바와 같이 위치 S55에서 돌연변이시켰다(위치 55에 밑줄이 있음).

표 16

추가의 VH 영역(huAb1v1VH의 변이체)의 아미노산 서열

SEQ ID NO:	클론	VH
15	huAb1v1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRSNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
22	huAb1v1CDR2v1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRTNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
23	huAb1v1CDR2v2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRDNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
24	huAb1v1CDR2v3	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRENIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
25	huAb1v1CDR2v4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRRNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
26	huAb1v1CDR2v5	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRVNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
27	huAb1v1CDR2v6	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRLNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
28	huAb1v1CDR2v7	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRGNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
29	huAb1v1CDR2v8	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRINIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
30	huAb1v1CDR2v9	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRQNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
31	huAb1v1CDR2v10	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRWNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS

[0429]

SEQ ID NO:	클론	VH
32	huAb1v1CDR2v11	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRMNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
33	huAb1v1CDR2v12	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRKNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
34	huAb1v1CDR2v13	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRHNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
35	huAb1v1CDR2v14	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRFNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
36	huAb1v1CDR2v15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRYNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
37	huAb1v1CDR2v16	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRANIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS
38	huAb1v1CDR2v17	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRPNIYY ADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARSWGYFDVWGQGTTVTVSS

[0430]

[0431] 하기의 표 17은 S55 잔기(볼드체/밑줄)의 조작 후의, 상기 기재된 huAb1v1 변이체의 HC CDR2 영역의 비교를 제공한다. huAb1v1의 VH CDR2 영역은 SEQ ID NO: 15의 아미노산 잔기 50 내지 66에 상응한다.

표 17

위치 55에서의 huAb1v1 HC CDR2 변이체의 정렬

변이체 VH CDR2	HC CDR2 SEQ ID NO:	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
huAb1v1	7	Y	I	S	S	G	R	S	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v1	58	Y	I	S	S	G	R	T	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v2	59	Y	I	S	S	G	R	D	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v3	60	Y	I	S	S	G	R	E	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v4	61	Y	I	S	S	G	R	R	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v5	62	Y	I	S	S	G	R	V	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v6	63	Y	I	S	S	G	R	L	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v7	*42*	*Y*	*I*	*S*	*S*	*G*	*R*	*G*	*N*	*I*	*Y*	*Y*	*A*	*D*	*T*	*V*	*K*	*G*
huAb1v1CDR2v8	64	Y	I	S	S	G	R	I	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v9	65	Y	I	S	S	G	R	Q	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v10	66	Y	I	S	S	G	R	W	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v11	67	Y	I	S	S	G	R	M	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v12	68	Y	I	S	S	G	R	K	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v13	69	Y	I	S	S	G	R	H	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v14	70	Y	I	S	S	G	R	F	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v15	71	Y	I	S	S	G	R	Y	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v16	72	Y	I	S	S	G	R	A	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1CDR2v17	73	Y	I	S	S	G	R	P	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G

[0432]

[0433] 중쇄 가변 영역 huAb1v1CDR2v7을 생성되고 상기 표 15 내지 표 17에 기재된 다른 변이체에 비하여 특히 유리한 특성을 갖는 것으로서 선택하였다. 특히, huAb1v1CDR2v7은 S55G로서 확인된 그의 HC CDR2 내의 돌연변이를 갖는다. 구체적으로, 항체 huAb1v1의 VL(SEQ ID NO: 20; 표 13 참조) 및 VH huAb1v1CDR2v7을 함유하는 항체는 항체 huAb1v1에 비하여 20배 증가된 길항제 활성을 갖는 것으로 결정되었다.

[0434] huAbv1의 VL 및 huAb1v1CDR2v7의 VH를 2가지의 상이한 인간 IgG1 불변 영역의 맥락에서 발현시켰다. 하나의 IgG1 불변 영역을 그의 이펙터 기능이 감소되었기 때문에 선택하였으며(hCg1,z,non-a L234A, L235A 또는 LALA), 다른 IgG1 불변 영역을 그의 이펙터 기능이 감소되고, 그것이 FcRn 결합을 향상시키는 일련의 돌연변이를 갖기 때문에 선택하였다(hCg1,z,non-a L234A, L235A - T250Q, M428L 또는 LALA-QL). 하기의 표 18 및 표 19는 항-인간 CD40 항체 Ab101(VL huAbv1/VH huAb1v1CDR2v7/hCg1/k-LALA) 및 Ab102(VL huAbv1/VH huAb1v1CDR2v7/hCg1/k-LALA-QL)의 중쇄 및 경쇄에 대한 아미노산 서열 정보를 제공한다. 각각의 VH 또는 VL 서열의 개별 CDR의 아미노산 잔기는 볼드체로 나타나 있다. 불변 영역은 표 19에 밑줄이 그어져 있다.

표 18

Ab101 및 Ab102 항-hCD40 항체의 VH 및 VL 아미노산 서열

[0435]

SEQ ID NO	단백질 영역			서열
28	Ab101	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFS DYGMN**WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRGNIYY ADTVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR**SWGYFDV**WGQGTTVTVSS
6		CDR-H1	SEQ ID NO: 28의 잔기 26 내지 35	GFTFSDYGMN
42		CDR-H2	SEQ ID NO: 28의 잔기 50 내지 66	YISSGRGNIYYADTVKG
8		CDR-H3	SEQ ID NO: 28의 잔기 99 내지 105	SWGYFDV
20	Ab101	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLL NRGNQKNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTR ES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYC**QNDYTYPLT**FGQGTKLEIK
21		CDR-L1	SEQ ID NO: 20의 잔기 24 내지 40	KSSQSLLNRGNQKNYLT
11		CDR-L2	SEQ ID NO: 20의 잔기 56 내지 62	WASTRES
12		CDR-L3	SEQ ID NO: 20의 잔기 85 내지 93	QNDYTYPLT
28	Ab102	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFS DYGMN**WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRGNIYY ADTVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAR**SWGYFDV**WGQGTTVTVSS
6		CDR-H1	SEQ ID NO: 28의 잔기 26 내지 35	GFTFSDYGMN
42		CDR-H2	SEQ ID NO: 28의 잔기 50 내지 66	YISSGRGNIYYADTVKG
8		CDR-H3	SEQ ID NO: 28의 잔기 99 내지 105	SWGYFDV

[0436]

SEQ ID NO	단백질 영역			서열
20	Ab102	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLL NRGNQKNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTR ES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYC**QNDYTYPLT**FGQGTKLEIK
21		CDR-L1	SEQ ID NO: 20의 잔기 24 내지 40	KSSQSLLNRGNQKNYLT
11		CDR-L2	SEQ ID NO: 20의 잔기 56 내지 62	WASTRES
12		CDR-L3	SEQ ID NO: 20의 잔기 85 내지 93	QNDYTYPLT

표 19

중쇄(HC) 및 경쇄(LC) Ab101 및 Ab102 항-hCD40 항체의 아미노산 서열.

클론	SEQ ID NO:	VH
Ab101-HC	39	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYG MN**WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRGNIYYADTVK G**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**S WGYFDV**WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
Ab101-LC	40	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLLNRGN QKNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTRES**GVPDR FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QNDYTYP LT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC

[0437]

클론	SEQ ID NO:	VH
Ab102-HC	41	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYG MN**WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRGNIYYADTVK G**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**S WGYFDV**WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKS LSLSPGK
Ab102-LC	40	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLLNRGN QKNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTRES**GVPDR FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QNDYTYP LT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC

[0438]

[0439] **실시예 5: 인간화 길항제 항-hCD40 항체 Ab101 및 Ab102의 기능적 특성화**

[0440] *시험관내 분석*

[0441] 인간화 항-CD40 항체 Ab101 및 Ab102는 둘 모두 실시예 1에 기재된 리포터 분석에서의 관찰과 유사한 길항제 활성을 보였다. 잔류 효능제 활성이 잠재적인 위험과 관련이 있기 때문에, B 세포 효능제 분석을 개발하였다. 이러한 분석에서, 인간 B 세포에서의 CD86 상향조절의 억제에 대하여 항체를 평가하였다. 인간 B 세포는 CD40을 구성적으로 발현하며, CD40을 통한 신호전달은 표면 상의 CD86의 상향조절에 의해 측정시 B 세포의 활성화를 야기한다. B 세포를 낮은 용량의 항-IgM 및 IL4로 활성화시키고, CD40 길항제 항체를 첨가하였다. B 세포 활성화의 향상을 CD86의 상향조절로서 측정하였으며, 이는 효능제 CD40의 존재하에 관찰되지만, 길항제 CD40 Ab의 존재하에 관찰되지 않으며, 이는 시험관내에서 선도 후보물질의 검출 가능하지 않은 효능제 활성을 시사한다. 길항제 활성을 측정하기 위하여, 일차 인간 B 세포를 CD40/CD40L 상호작용을 통하여 CD86 발현의 상향조절 및 B 세포 활성화를 야기하는 CD40L-발현 인간 T 세포주와 배양하였다. 일차 인간 B 세포의 CD86 상향조절을 억제하는 길항제 CD40의 능력을 측정하였으며, 도 2b에 나타낸 바와 같이 항-CD40 항체 Ab101의 강력한 길항제 활성을

보였다. 도 2a는 항체 Ab101이 효능제 활성을 갖지 않음을 보여준다. 특히, 도 2b에 기재된 바와 같이, 항체 Ab101은 4.213의 IC_{50} 값을 가졌던 길항제 항체 Blb(베링거 인겔하임) 및 0.1906의 IC_{50} 값을 가졌던 효능제 항체 AD11(아스텔라스)과 비교하여 1.337의 IC_{50} 값을 가졌다. 따라서, 항체 Ab101(및 동일한 가변 영역을 제공하는 Ab102)은 CD40의 강력한 길항제이며, 실질적인 시험관내 효능제 활성을 보이지 않는다.

[0442] *생체내 분석*

[0443] 항체 Ab101의 생체내 활성을 시험하기 위하여, 인간 항체 생성 및 B 세포 생존의 모델을 확립하였다. 요약하면, 건강한 공여자로부터 분리된 인간 PBMC를 면역손상 *scid* 마우스 내로 전달하는 경우, 마우스 항원에 반응하는 인간 IgG의 생성이 14일 후에 측정 가능하였다. 추가로, 이들 마우스로부터의 비장세포의 FACS 분석에 의해, 인간 B 세포 생착 및 생존이 나타났다. 파상풍 톡소이드(TetTox) 백신으로의 시험접종을 포함시키고, 항-TetTox 특이적 IgG를 측정함으로써 항원 특이적 반응을 측정하였다(문헌[Naito, 2000]; 문헌[Jeurissen, 2004]).

[0444] 이들 hu*scid* 마우스의 주별 용량의 항-인간 CD40(Ab101, 5 mg/kg 복강내)으로의 처치는 인간 IgG 생성(도 3a) 및 B 세포 생존(도 3b)의 85% 초과의 억제를 초래하였으며, 이는 항체가 생체내에서 활성임을 명백하게 입증한다. 구체적으로, 도 3a는 항체 Ab101이 Ig 대조군에 비하여 IgG 생성을 억제할 수 있었음을 보여주며, 도 3b는 상기 hu*scid* 모델에서 항체 Ab101의 투여가 B 세포 생존을 억제하였음을 나타낸다.

[0445] **실시예 6: Fab Ab102의 에피토프 분석**

[0446] Fab Ab102를 사용하여, 결정학 분석을 수행하여, Fab Ab101이 결합하는 에피토프를 결정하였다. 상기 기재된 바와 같이, 항체 Ab101 및 Ab102의 VH 및 VL 서열은 동일하며, 이에 따라, 하기의 결정 구조 연구에서 Fab Ab102의 이용은 항체 Ab101 및 Ab102 둘 모두의 결합 특징을 대표한다.

[0447] 단독의 Ab102 Fab 및 CD 항원에 복합체화된 Ab101 Fab에 대하여 결정 구조를 결정하였다. 결정을 수득하고, 데이터를 IMCA-CAT 17ID 빔라인(beamline)에서 수집하였다. Ab102 Fab의 결정 구조를 1.74 Å 분해능으로 분해하고, Ab102 Fab/CD40 복합체 구조를 2.84 Å 분해능으로 분해하였다. 결정 구조에 의해, Ab102 Fab의 3차원 입체형태 에피토프의 확인이 제공되었다.

[0448] *Ab102 Fab의 3차원 입체형태 에피토프의 확인*

[0449] Ab102 Fab와 CD40 간의 접촉은 계면을 안정화시키는 결정적인 수소 결합 및 소수성 상호작용 둘 모두를 수반한다. 분자 접촉(4.0 Å 하에 측정)의 목록을 CCP4 프로그램 모음에서 프로그램 NCONT를 사용하여 생성하였다. 2가지 개별 결정학적 CD40 단량체 및 Ab102 Fab의 상응하는 결합된 경쇄 및 중쇄 간의 접촉을 측정하였다. Ab102 Fab와 결정학적 CD40 이량체(결정 접촉에 의해 생성되는 이량체) 간에 추가의 접촉이 관찰되었다. 이러한 정보에 기반하여, Ab102 Fab 결합의 에피토프는 CD40의 Cys62-Phe67, Gln79-Cys83, Arg90-Thr99, Thr24-Cys37에 의해 정의되는 국소 영역으로 이루어진다.

[0450] *재료 및 방법*

[0451] CD40 항원의 제조 및 정제:

[0452] 인간 CD40 세포외 도메인(아미노산 1 내지 193)을 인코딩하는 DNA 서열에 이어서 인-프레임 C-말단 Tev 프로테아제 절단 부위 및 헥사히스티딘 태그(SEQ ID NO: 115)를 pHybE 벡터 내로 클로닝하였다. 플라스미드를 4:1의 PEI:DNA 비로, 트랜스펙션 시약 폴리에틸렌이민(PEI, 폴리사이언스즈 인코포레이티드(Polysciences Inc))을 사용하여 1x10e6개 세포/㎖로 HEK293 6e 세포(MRL) 내로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션된 세포 배양물에 트랜스펙션 후 24시간에 트립톤-N1(0.5%까지)을 공급하였다. 트랜스펙션 후 제7일에, 트랜스펙션된 세포 배양물을 원심분리에 이어서 0.2u PES 필터(코닝(Corning))를 통한 여과에 의해 제거하였다. 제거된 배지를 10 kDa 멤브레인(지이 헬쓰케어(GE Healthcare))이 장착된 Kvick TFF 시스템을 사용하여 PBS, pH 7.4로 완충제 교환하고, PBS, pH 7.4로 평형화된 5 ㎖ HisTrap FF 컬럼(지이 헬쓰케어) 상에 로딩하였다. 컬럼을 PBS, pH 7.4 중 25 mm 이미다졸로 세척하고, 결합된 단백질을 PBS, pH 7.4 중 250 mM 이미다졸로 용리시켰다. 용리된 단백질을 10 kDa 분자량 컷-오프를 갖는 아미콘(Amicon) 울트라(Ultra)-15 원심분리 필터 장치(밀리포어(Millipore))를 사용하여 농축시키고, PBS, pH 7.4로 평형화되고 전개되는 26/60 슈퍼덱스(Superdex) 200 컬럼(지이 헬쓰케어) 상에서 SEC에 의해 추가로 정제하였다. CD40을 함유하는 분획을 풀링하고, 농도를 280 nm에서의 흡광도에 의해 측정하고, 시료를 SEC, SDS-PAGE 및 질량 분석법에 의해 분석하였다. [CD40(h)(21-193)]-Tev-His6(SEQ ID NO: 115로서 개시된 "His6")을 -80℃에서 분취물로 보관하였다.

[0453] CD40 Ab102 Fab 단편의 제조 및 정제:

[0454] CD40 Ab102의 Fab 단편을 하기 상세화된 바와 같이 모체 mAb의 파파인 절단에 의해 제조하였다. 파파인을 PBS, pH 7.4 완충제 중 50 mM 시스테인으로 활성화시켰다. PBS, pH 7.4 완충제 중 mAb CD40 Ab102[hu IgG1/k] LALA QL을 1:100의 파파인 대 mAb의 중량비로 파파인과 혼합하고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 반응을 5 mM 아이오도아세트아미드로 켄칭시켰다. 혼합물을 10 ㎖ Mab SelectSure 수지(지이 헬쓰케어) 상에서 정제하였으며, 여기서, Fab 단편을 통과액으로서 수집하였다. 통과액을 울트라프리(Ultrafree)-15 바이오맥스(Biomax) 10 kDa 분자량 컷-오프(MWCO) 원심분리 장치(밀리포어)를 사용하여 농축시켰다. 농축된 혼합물을 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.5 완충제로 미리-평형화된 2.6 cm x 60 cm 세파크릴(Sephacryl) 200 하이프렙(HiPrep) 컬럼(지이 헬쓰케어) 상에서 정제하였다. Fab 단편을 함유하는 분획(280 nm에서의 UV 흡광도에 의해 모니터링)을 풀링하고, -80℃에서 동결시켰다. 시료 순도를 분석적 SEC, SDS-PAGE 및 질량 분석법에 의해 평가하였다.

[0455] CD40/CD40 Ab102 Fab 복합체 제조:

[0456] 재조합 인간 CD40을 포유동물 발현 시스템에서 발현시키고, 이어서, 해당 분야에 널리 알려져 있는 기술을 사용하여 정제하였다. 재조합 인간 CD40 및 CD40 Ab102 Fab 단백질을 1.1:1 몰 비로 혼합하고, 4℃에서 4시간 동안 인큐베이션시켰다. 복합체 시료를 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.5 완충제로 미리-평형화된 2.6 cm x 60 cm 세파크릴 200 하이프렙 컬럼(지이 헬쓰케어) 상으로 1 ㎖/분으로 로딩하였다. 복합체를 함유하는 분획(280 nm에서의 UV 흡광도에 의해 모니터링)을 풀링하고, 울트라프리-15 바이오맥스 10 kDa 분자량 컷-오프(MWCO) 원심분리 장치(밀리포어)를 사용하여 18 ㎎/㎖로 농축시켰다. 시료 순도를 분석적 SEC 및 SDS-PAGE에 의해 평가하였다.

[0457] Ab102 Fab 결정화:

[0458] 단독의 Fab를 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.5 중에 22.5 ㎎/㎖로 공급하였다. 23℃에서의 증기 확산에 의해 결정을 성장시켰다. 저장소는 25%(w/v) PMME 550, 0.1 M MES pH 6.5, 0.01 M 황산아연을 함유하였다. 동일한 부피의 단백질 및 저장소 용액을 첨가함으로써 점적액을 만들었다. 결정은 두꺼운 프리즘으로서 성장하였으며, 10%(v/v) 프로필렌 글리콜의 첨가와 함께 저장소 용액을 사용하여 동결-보호하였다. 결정을 수집하고, 극저온 용액으로 휙 씻어 내고 액체 질소에서 직접 극저온 냉각시켰다. 1.74 Å에 대한 회절 데이터를 아르곤 국립 연구소(Argonne National Laboratories)(미국 일리노이주 아르곤)의 고등 광자 발생기(Advanced Photon Source)에서 17ID 빔라인에서 100K의 기체 질소 하에서 수집하였다.

[0459] CD40 항원에 복합체화된 Ab102 Fab 결정화:

[0460] Fab 복합체를 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.5 중 18 ㎎/㎖로 공급하였다. 사용되는 항원 작제물은 [CD40 (h) (21-193)]-TEV-6His(SEQ ID NO: 115로 개시된 "His6")이었다. 23℃에서의 증기 확산에 의해 결정을 성장시켰다. 저장소는 2 M 황산암모늄, 0.1 M 인산염-시트르산염 pH 4.2를 함유하였다. 동일한 부피의 단백질 및 저장소 용액을 첨가함으로써 점적액을 제조하였다. 결정은 얇은 막대로서 성장하였으며, 2.5 M 황산리튬을 사용하여 극저온-보호시켰다. 결정을 수집하고, 극저온 용액으로 휙 씻어 내고 액체 질소에서 직접 극저온 냉각시켰다. 2.84 Å에 대한 회절 데이터를 아르곤 국립 연구소(미국 일리노이주 아르곤)의 고등 광자 발생기에서 17ID 빔라인에서 100K의 기체 질소 하에서 수집하였다.

[0461] Ab102 Fab 및 Ab102 Fab CD40 복합체의 구조 결정

[0462] 둘 모두의 결정 구조에 대한 회절 데이터를 글로벌 페이싱 리미티드(Global Phasing Ltd)로부터의 프로그램 autoPROC을 사용하여 처리하였다.

[0463] Ab102 Fab 데이터세트를 하기의 단위 셀 치수를 사용하여 공간군 $C222_1$에서 처리하였다: a=64.65 b=130.4 c=132.6. 이전에 보고된(단백질 데이터 은행 엔트리(Protein Data Bank entry) 3QOS) Fab 검색 모델을 사용하여 프로그램 PHASER를 사용해 최대 우도 분자 대체 방법을 결정하였다. 1개의 Fab 분자에 대한 좌표를 분자 대체 방법에 기반하여 생성하였다. 초래되는 방법의 예비 정밀화를 REFMAC 및 프로그램 BUSTER를 사용하여 행하였다. 반복 단백질 모델 구축을 프로그램 COOT 및 2Fo-Fc 및 Fo-Fc 전자-밀도 지도의 시험을 사용하여 행하였다. 정밀화는 BUSTER를 사용한 물 분자의 첨가로 끝냈다. 최종 정밀화 통계학에 의해, 0.23/0.19의 R_{free}/R_{work} 값을 보고하였다.

[0464] Ab102 Fab CD40 복합체 데이터세트를 하기의 단위 셀 치수를 사용하여 공간군 $P2_12_12$에서 처리하였다: a=173.3

b=76.0 c=126.1. 상기 보고된 이전에 분해된 Ab102 Fab를 사용하여 프로그램 PHASER를 사용해 최대 우도 분자 대체 방법을 결정하였다. 2개의 Fab 분자에 대한 좌표를 분자 대체 방법에 기반하여 관찰하였다. 초래되는 방법의 예비 정밀화를 REFMAC 및 프로그램 BUSTER를 사용하여 행하였다. CD40에 대한 모델을 프로그램 COOT 및 2Fo-Fc 및 Fo-Fc 전자-밀도 지도의 시험을 사용하여 수동으로 구축하였다. 정밀화는 BUSTER를 사용한 물 분자의 첨가로 끝냈다. 최종 정밀화 통계학에 의해, 0.25/0.20의 R_{free}/R_{work} 값을 보고하였다.

[0465] **실시예 7: 단핵구 활성화 분석에서의 Ab102의 중화 효력 및 효능제 활성**

[0466] 하기의 방법을 시험관내에서 Ab102의 길항제 및 효능제 활성을 시험하는 이러한 실시예에서 사용하였다.

[0467] *길항제 분석*: CD40-매개의 단핵구 활성화를 차단하는 Ab102의 능력을 길항제 분석에서 평가하였다. 정제된 단핵구를 $2x10^6$개/㎖의 농도에서 80 ng/㎖의 GM-CSF 및 80 ng/㎖의 IFNγ의 존재 하에 1 ㎍/㎖의 MEGACD40L(엔조(Enzo))과 혼합하였다. 96-웰 U-바닥 조직 배양(TC) 플레이트에서 웰마다 50 ㎕를 첨가하였다. 시험되는 물질의 희석액을 배양 배지에서 제조하고, 50 ㎕의 희석액을 공여자로부터 수득되는 인간 단핵구에 첨가하였다. 세포를 37℃, 5% CO_2에서 2일 동안 배양한 후, 상청액을 사이토카인(TNF) 분석을 위해 메소 스케일 디스커버리(Meso Scale Discovery; MSD) 면역분석 플랫폼을 사용하여 수집하였다.

[0468] *효능제 분석*: CD40을 통해 단핵구 활성화를 유도하는 Ab102의 능력을 평가하였다. MEGACD40L(엔조)을 단핵구 활성화를 위한 양성 대조군으로서 사용하였다. 정제된 인간 단핵구를 80 ng/㎖의 GM-CSF 및 80 ng/㎖의 IFNγ의 존재 하에 배양 배지에서 $2x10^6$개/㎖로 희석하고, 50 ㎕/웰을 96-웰 U-바닥 TC 플레이트에 첨가하였다. 시험되는 물질의 희석액을 배양 배지에서 제조하고, 50 ㎕의 희석액을 단핵구에 첨가하였다. 세포를 37℃, 5% CO_2에서 2일 동안 배양한 후, 상청액을 메소 스케일 디스커버리(MSD) 면역분석 플랫폼을 사용하여 사이토카인(TNF) 분석을 위해 수집하였다.

[0469] 골수 세포는 크론병의 발병과정에 중요한 역할을 수행하기 때문에, Ab102의 기능적 활성을 평가하기 위하여 상기 언급된 단핵구-기반의 분석을 개발하였다. CD40 신호전달은 단핵구의 활성화와, 그에 의한, 염증성 사이토카인, 예를 들어, TNF의 생성을 유도한다. Ab102에 대한 대표적인 단핵구 길항제 및 효능제 분석은 각각 도 5a 및 도 5b에 나타나 있다. 도 5a에 나타낸 바와 같이, Ab102는 농도-의존적 방식으로 TNF의 발현을 차단하였다. 효능제 분석 형식에서, 용해성 CD40L은 1.9 nM의 EC_{50}으로 단핵구로부터 TNF의 생성을 유도하는 한편, Ab102는 200 nM까지의 농도로 TNF 생성을 유도하지 않았다. 도 5b에 기재된 바와 같이, TNF의 Ab102 수준은 음성 대조군(비-관련 IgG)의 것과 유사하였으며, 이는 검출 가능한 TNF 생성이 없거나, 이것이 거의 없음을 보여준다. 일치하는 결과를 하기 표 20에 나타낸 IC50 값과 함께 3명의 상이한 공여자로부터 수득하였다.

표 20

단핵구 활성화 분석에서의 Ab102의 기능적 평가의 요약

[0470]

시약	실험	길항제 IC_{50} (nM)
Ab102	1	0.06
	2	0.23
	3	0.11
	평균 ± SD	0.13 ± 0.08

[0471] 요약하면, 상기 기재된 길항제 및 효능제 분석 둘 모두에서의 Ab102의 시험으로부터의 결과는 Ab102가 측정 가능한 효능제 활성을 갖지 않는, 실질적으로 효능제 활성이 없는 길항제 항-CD40 항체임을 보여주었다.

[0472] **실시예 8: Ab102의 교차-반응성**

[0473] Ab102와 다양한 종으로부터의 CD40의 교차-반응성을 시험하였다. 표준 기술을 사용하여, 알렉사(Alexa) 647 표지된 Ab102는 B 세포의 표면 상의 인간 및 사이노몰거스 원숭이 CD40 둘 모두에 대하여 유사한 결합 반응속도를 보였으며, 하기 표 21에 나타낸 바와 같이 EC50 값은 인간 세포 상에서 0.89 ± 0.17 nM이고, 사이노몰거스 원숭이 세포 상에서 1.4 ± 0.15 nM이었다. 마우스, 랫트 및 토끼 CD40으로의 Ab102의 결합은 최대 30 ㎍/㎖(200 nM)의 농도에서 검출될 수 없었다.

표 21

B 세포의 표면 상의 다양한 CD40으로의 Ab102 결합의 요약

시약	종	EC_{50} (nM)
Ab102	인간	0.89 ± 0.17
	원숭이	1.4 + 0.15
	마우스	ND
	랫트	ND
	토끼	ND

[0474]

[0475] 요약하면, Ab102는 표준 결합 분석을 사용하여 인간 및 사이노몰거스 원숭이 CD40에 결합하였지만, 마우스, 랫트 또는 토끼 CD40으로의 검출 가능한 결합을 보이지 않았다.

[0476] **실시예 9: T-세포 전달 대장염을 치료하기 위한 마우스 항-CD40 항체 138의 용도**

[0477] 하기의 방법을 생체내 연구에 사용하여, 대장염을 치료하기 위한 마우스 항-CD40 항체(항체 138)의 능력을 결정하였다. 항-쥣과 CD40 항체 138은 Ab102와 유사한 특징을 가지며, 예를 들어, 항체 138은 Ab102와 같이 실질적인 효능제 활성을 갖지 않는 길항제 항체이다. 따라서, 항체 138은 실시예 9의 마우스 모델에서 Ab102 활성을 나타낸다. 하기에는 대장염의 생체내 T 세포 전달 모델이 기재되어 있다.

[0478] *나이브 T 세포의 분리 및 주입*

[0479] 제0일에, 비장을 balb/c 마우스로부터 수집하고, 얼음 상에 4% 우태아혈청이 보충된 RPMI 배지(완전 배지)에 두었다. 단일 세포 현탁액을 기계적 파괴 및 100 ㎛ 세포 스트레이너(strainer)를 통한 4% 우태아혈청이 보충된 RPMI 배지(완전 배지) 내로의 전달에 의해 수득하였다. 세포를 원심분리(4℃에서 10분 동안 1250 rpm) 및 Robosep 완충제(스템 셀 테크놀로지즈(Stem Cell Technologies))에서의 재현탁화에 의해 수집하였다. 세포 농도를 목시 미니(Moxi Mini) 세포 계수기(오르플로(Orflo))를 사용하여 측정하고, Robosep 완충제에서 1 x 10^8개 세포/㎖로 조정하였다. CD4+ T 세포를 제조처의 지침에 따라 음성 선택 자성 비드 키트(스템 셀 테크놀로지즈)를 사용하여 분리하였다. 세포를 FACS에 의해 추가로 정제하여, 각각 세포의 가장 밝은 42% 및 가장 흐릿한 12%로서 수집되는 $CD4^+CD45RB^{high}$ 및 $CD4^+CD45RB^{low}$의 집단을 제공하였다. 세포를 계수하고, 1 x 10^6개 세포/㎖로 조정하고, 0.5 ㎖(1 x 10^5개 세포)를 SCID 마우스 내로 복강내(IP) 주사하였다.

[0480] *처치*

[0481] 그 다음, 마우스 항-CD40 항체 138을 세포 주입시에(예방적 처치) 또는 질병을 내시경에 의해 확인한 후에(치료적 처치) 시작하여, PBS 중에 다양한 용량으로 SCID 마우스(상기 기재)에게 복강내 2회/주로 투여하였다. 또한, 다수의 대조군을 포함시켰다. 군은 1) PBS 중 15 ㎎/㎏의 항체 951(비-관련 IgG)을 복강내, 2회/주로, 또는 2) PBS 중 항체 138(CD40L을 차단하는 항체)을 복강내, 2회/주로 제공받았다. 추가로, T-세포 전달(TCT) 연구에서, 항-p40(IL-12/23) 항체 또는 항-TNF 모노클로널 항체를 임상적으로 관련된 대조군 비교자로서 투여하였다.

[0482] *내시경*

[0483] 마우스 내로의 세포 주입 후 다양한 시간에, 질병을 대장내시경에 의해 평가하였다. 이소플루란으로의 마취 후에, 유연성 위관영양 니들(gavage needle)을 항문 내로 천천히 삽입하고, 300 ㎕의 PBS를 천천히 주입하여 분립을 제거하였다. 동물이 마취에서 회복되게 하고, 걸어다니게 하여, 임의의 남겨진 분립의 통과를 용이하게 하였다(대략 5분). 마우스를 다시 이소플루란으로 마취시키고, 내시경 프로브(칼 스토즈(Karl Storz))를 3 ㎝의 깊이로 항문 내로 삽입하였다. 사진 영상을 항문피부선으로부터 3, 2 및 1 ㎝에서 캡처하였다. 하기 표 22에 상세화된 척도를 사용하여 영상을 이후에 점수화하였다. 3가지 거리의 각각에서의 각 파라미터에 대한 점수를 조합하여, 표 22에 나타낸 쥣과 내시경 질병 활성 지수(MEDAI) 합계 점수를 생성하였다. MEDAI 합계 점수를 사용하여 수득될 수 있었던 최대 점수는 24였다.

[0484] 치료적 투여의 경우에, 세포 주입 3주 후의 내시경 점수화를 사용하여 치료를 위한 질병 및 군 동물을 확인하였다.

표 22

MEDAI 내시경 점수화

파라미터	점수	설명
삼출물	0	정상
	1	결장 둘레의 50% 미만에 걸쳐 있음
	2	결장 둘레의 50% 초과에 걸쳐 있음
혈관분포상태	0	정상
	1	혈관은 연결이 끊기고, 소혈관이 보이지 않음
	2	대혈관이 눈에 보이지 않고, 무분별한(starburst) 패턴
	3	표면 출혈이 뚜렷하고, 혈관이 누출되는 것으로 보임
점막 과립상	0	정상
	1	약간 자갈돌 같은 외양
	2	명백하고 광범위한 자갈돌 같은 외양
	3	점막 돌출, 내강 감소

[0485]

[0486] *조직학*

[0487] GI 시료를 전체 결장 길이의 분석을 가능하게 하는 스트레치 분절화 전체 결장 배향으로 카세트에서 제출하고, 포르말린-고정 파라핀-포매(FFPE)를 위해 처리하였다. 블록(block)을 5 미크론으로 섹션화하고, 유리 슬라이드 상에 봉입한 후, 항-IBA1 항체(카탈로그 번호 019-19741; 와코 퓨어 케미컬 인더스트리즈, 리미티드(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.))를 사용하여 면역조직화학을 수행하여, 이온화 칼슘 결합 어댑터 분자 1(IBA1)을 검출하였다. IBA1 마커를 사용하여 조직 섹션에서 대식구를 확인하였다. 슬라이드를 메틸 그린(methyl green)으로 대비 염색하고, 탈수시키고, 유리 커버슬립으로 봉입하였다.

[0488] 그 다음, 슬라이드를 벡트라(Vectra) 영상화 시스템에 의해 4배로 스캐닝하고, 4배 저전력 모자이크 영상을 검토한 후, 20배 영상화 영역을 선택하였다.

[0489] 벡트라 영상화에 의해 슬라이드를 재스캐닝하고, 선택된 20배 고출력 고해상도 영상을 캡처하고, 이를 이어서 인폼(inForm) 소프트웨어(퍼킨 엘머(Perkin Elmer))에서 영상 분석 알고리즘으로 처리하였다. 사용되는 인폼 알고리즘 세트는 3가지 알고리즘을 갖는다: 제1 알고리즘은 스펙트럼으로 영상화된 파일에서 IBA1 및 CD3에 대한 염색의 역치를 정하여, 백그라운드/비관련 염색을 제거한다. 이후의 알고리즘은 조직을 관심 조직(점막고유층, 상피, 근육, 점막하 및 백그라운드)으로 분절화시키고, 제1 알고리즘으로부터 생성된 RGB 영상에서 CD3 또는 IBA1 중 어느 하나를 정량화한다.

[0490] 인폼 데이터를 텍스트 파일로 내보냈으며, 이를 조직 분절화 또는 세포 분절화 데이터 중 어느 하나를 위하여 단일 데이터 파일로 병합하였다.

[0491] 급성 모델에서의 길항제 활성의 입증에 기반하여, 만성 대장염의 모델을 사용하여 개념의 증거를 확립하였다. 면역손상 숙주(SCID 마우스) 내로의 나이브 T 세포의 전달 후에, 3가지 연구를 행하여, 대장염 차단 효과를 시험하였다. 단일 용량 수준을 예방적 및 치료적 처치 방식 둘 모두에서 조사하는 한편, 전체 용량 반응을 예방적 방식에서 시험하였다.

[0492] *세포 전달시에 투여되는 마우스 항-CD40 항체 138의 용량 반응*

[0493] 예방적으로 투여되는 마우스 항-CD40 항체 138의 용량 반응을 대장염의 T 세포 전달 모델을 사용하여 결정하였다. 소정의 범위의 용량(0.5, 1.5, 5 및 15 mg/kg)을 포괄하는 처치를 세포 전달시에 개시하였다. 1.5 mg/kg으로 낮춘 용량은 MEDAI 합계 점수의 최대 억제를 초래하는 한편, 0.5 mg/kg은 유의미한 효과를 갖지 않았다. 마우스 항-CD40 항체 138의 활성은 양성 대조군으로서 사용되는 표준 용량의 항-p40IL-12/23 처치와 동등하였다. 결장 섹션의 조직학적 분석에 의해, 도 6 및 도 7에 기재된 바와 같이, 대식구(염증의 일반적 척도)의 감소가 나타났으며, 이는 질병의 내시경 평가와 잘 상호연관된다. 구체적으로, 도 6에는 제39일의 마우스 항-CD40 항체 138의 예방적 투여를 사용한 내시경 점수(최종 점수)의 용량 반응 억제가 나타나 있다. 도 6에서, RBlow는 음성 대조군을 지칭한다. CD45RBlow 세포는 질병을 매개하지 않는다. 이러한 대장염 모델에서, 질병은 동물로 전달되

는 CD45RBhi 세포에 의해 매개된다. 도 7은 마우스의 결장 내의 IBA1+ 대식구의 수(조직학적으로 결정)를 보여주며, 0.5 mg/kg 초과의 용량에서 더 낮은 수준의 대식구를 보여주며, p40 양성 대조군보다 더 낮다.

[0494] 순환하는 마우스 항-CD40 항체 138의 수준을 최종 투여 96시간 후에 측정하고(C_{trough}와 동등), 도 8에 기재된 바와 같이 용량 반응성인 것으로 나타났다. 가장 낮은 용량 수준(0.5 mg/kg)은 상기 군에서 1마리를 제외한 모든 동물에서 정량화 하한(LLOQ) 미만의 농도를 초래하였다.

[0495] *세포 전달 후 3주에 투여되는 마우스 항-CD40 항체 138의 용량 반응*

[0496] 마우스 항-CD40 항체 138 처치를 세포 주입 3주 후에 개시하는 경우, 내시경으로의 질병의 확인 후에, MEDAI 합계 점수의 용량 반응성 억제가 통계적 유의성에 도달하는 가장 높은 용량(15 mg/kg)에서 관찰되었다(도 9a). 골수 염증의 척도로서의 결장 내의 $IBA1^{+}$ 대식구의 조직학적 분석에 의해, 도 9b에 기재된 바와 같이 유사한 결과가 제공되었다. 15 mg/kg을 제공한 동물에서 최종 투여 72시간 후에 측정되는 항체 138의 평균 혈청 농도는 191.9 ㎍/㎖이었다.

[0497] **실시예 10: 사이노몰거스 원숭이에서의 T-세포 의존적 항체 반응**

[0498] T-세포 의존적 항체 반응(TDAR) 분석을 사이노몰거스 원숭이에서 행하였다. 2마리/성별/군에, Ab102를 0(오직 비히클만) 또는 10 mg/kg의 투여량으로 5주 동안 피하(SC) 투여하였다. 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH)을 제8일에 모든 동물에게 투여하였다. 혈청 시료를 KLH 투여에 비하여 제-11일, 제-7일, 제0일, 제4일, 제7일, 제10일, 제14일 및 제21일에 각 동물로부터 수집하였다. 마지막으로 예정된 채혈(도 10)의 완료 후에, 모든 동물을 시험 시설 동물 거주지로 복귀시켰다.

[0499] Ab102가 도 10에 나타낸 바와 같이 오직 비히클로만 처치된 동물에 비하여, 항-KLH IgM 및 IgG 항체 T 세포 의존적 항체 반응 둘 모두를 억제하였음이 관찰되었다.

[0500] 이러한 연구에서의 관찰은 원형 외래 단백질의 비경구 투여 후의 CD40-의존적 IgM 및 IgG 항체 생성의 약리학적 억제와 일치하였다. 결과에 의해, Ab102의 이용이 자가항체 생성이 질병의 일부인 루푸스의 치료에 적절할 수 있음이 시사되었다. 또한, 이들 관찰은 예비임상 독성학 연구를 위한 적절한 종으로서 사이노몰거스 원숭이의 생물학적 타당성를 뒷받침한다. 추가로, 연구에 의해, 사이노몰거스 원숭이 CD40에 대한 교차-반응성이 입증되며, 이는 CD40을 필요로 하는 것으로 알려져 있는 메커니즘(T-의존적 항체 반응)에서의 Ab102의 생체내 활성을 보여준다.

[0501] **실시예 11: 전신 홍반성 루푸스(SLE)를 치료하기 위한 마우스 항-CD40 항체 138의 이용**

[0502] 상기 급성 모델에서, 그리고 대장염 모델에서 나타난 마우스 항-CD40 항체 138의 길항제 활성 때문에(실시예 9 참조), 이러한 마우스 항-CD40 항체의 효능을 전신 홍반성 루푸스(SLE)의 마우스 모델에서 시험하였다. 2가지의 SLE 모델을 사용하였다: MRL/lpr 및 NZB/W-F1(문헌[Theofilopoulos and Kono. 1999. Murine lupus models: gene-specific and genome-wide studies. In Lahita R. G., ed., Systemic Lupus Erythematosus, 3rd edn, p. 145]에 기재됨). MRL/lpr 및 NZB/W-F1 마우스에서 항-CD40 처치의 효능을 평가하는 근거는 2가지이다. 먼저, 모델은 그들의 SLE의 증상이 상이하다. NZB/W-F1 마우스에서는 루푸스 신장염 및 타액선염이 자발적으로 발생하는 한편, MRL/lpr 마우스에는 신장염 및 타액선염에 더하여 관절 및 피부 증상이 발생한다(문헌[Andrews et al. J. Exp. Med. 148: 1198-1215. 1978]). 환자는 그들의 SLE의 증상이 상이하기 때문에, 둘 모두의 모델의 이용은 대다수의 SLE 환자에서의 잠재적인 효능의 평가를 가능하게 한다. 두번째로, MRL/lpr 및 NZB/W-F1 마우스는 그들의 질병에 대한 유전적 기반이 상이하며(문헌[Perry et al. J. Biomed. Biotech. 2011, Article ID 271694]), 이에 따라, 모델에 걸친 효능은 유전적으로 이질적인 인간으로의 변환에서 신뢰성을 증가시킨다.

[0503] 11.1. SLE의 MRL/lpr 모델

[0504] 효능을 결정하기 위하여, 10주령에 시작하여, 하기 표 23에 나타낸 용량으로 복강내 주사(i.p.)에 의해 마우스에 마우스 항-CD40 항체 138을 투여하였다. PBS 주사를 연구에서 음성 대조군으로 사용하고, 프레드니솔론을 양성 대조군으로 사용하였다.

표 23

[0505]

그룹	n	처치	용량
1	18	PBS	2x/주 복강내
2	18	항체 138	15 mg/kg 2x/주 복강내
3	18	항체 138	5 mg/kg 2x/주 복강내
4	18	항체 138	1.5 mg/kg 2x/주 복강내
5	18	항체 138	15 mg/kg 1x/주 복강내
6	18	프레드니솔론	10 mg/kg 경구 1일 1회

[0506] 단백뇨를 알부스틱스(Albustix)(뇨단백질을 시험하기 위해 사용되는 소변 딥 스틱의 상표)에 의해 매주 모니터링하였다. 300 ㎎/dℓ 이상으로 정의되는 높은 단백뇨는 도 11a에 나타낸 바와 같이 처치를 시작한 직후에 발생하기 시작하였다. 도 11a에 기재된 바와 같이, 제63일의 연구 완료에 의해, 미처치 PBS 대조군 마우스 및 1.5 ㎎/㎏의 항-CD40 항체로 처치된 마우스의 50 내지 60%에서 높은 단백뇨가 발생하였다. 대조적으로, 다른 처리군에서 거의 모든 마우스는 연구 내내 낮은 단백뇨를 유지하였다. 매주 1회 15 ㎎/㎏ 처리군은 PBS 대조군과 유의미하게 상이하였다. 또한, 생존을 모니터링하였으며, 도 11b에 나타낸 바와 같이, 매주 1회 15 ㎎/㎏ 및 매주 2회 5 ㎎/㎏의 투여가 미처치 PBS 대조군 동물에 비하여 생존을 유의미하게 연장시켰음이 관찰되었다. 많은 마우스를, 신장염이 발생하기 이전에 Faslpr 돌연변이에 의해 야기되는 임파선염에 의해 야기되는 고통으로 인하여 안락사시켰음을 주의해야 한다. 따라서, 관찰되는 생존의 감소는 신장염만의 결과인 것으로 볼 수 없었다. 그럼에도 불구하고, 이들 데이터에 의해, 항-CD40 항체가 단백뇨를 용량 의존적으로 예방하고, 루푸스-취약 MRL/lp 마우스의 생존을 연장시켰음이 나타난다.

[0507] 또한, SLE를 치료하기 위한 항-CD40 항체의 효능을 다양한 치료군으로부터의 마우스의 신장, 타액선 및 발목 관절로부터의 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염료 염색된 포르말린-고정 파라핀-포매(FFPE) 조직 섹션에서 평가하였다. MRL 마우스가 시작시 10주령부터, 마지막 19주까지 노화되기 때문에, 대조군 미처리 PBS 마우스에서의 모든 시험 기관의 질병의 중증도가 9주의 연구에 걸쳐 증가되었다.

[0508] 신장에서, 항-CD40 항체 처치는 도 12a에 나타낸 바와 같이, 15 ㎎/㎏으로 투여되는 경우에 처치 제29일 및 제63일에 사구체 질병의 감소에 유효하였다. 사구체 질병 중증도가 노화 MRL 마우스에서 악화됨에 따라, 항-CD40 항체 처치는 5 및 15 ㎎/㎏에서 사구체 질병의 최소화에서 효능을 유지하였다. 주 1회 15 ㎎/㎏의 용량으로 제공되는 항-CD40 항체는 주 2회 투여만큼 효과적이었다. 또한, 주 2회 5 ㎎/㎏의 용량으로 제공되는 항-CD40 항체는 거의 동일한 유효성이었다. 5 및 15 ㎎/㎏의 용량으로 제공되는 항-CD40 항체는 도 12b에 나타낸 바와 같이, 제29일 및 제63일에 신장 내의 혈관주위(PV) 침윤물의 감소에 효과적이었으며, 도 12c에 나타낸 바와 같이 요세관사이질(TI) 질환을 조기에 감소시키는 경향이 있었다.

[0509] 타액선에서, 1.5, 5 및 15 ㎎/㎏의 용량으로 제공되는 항-CD40 항체는 제29일에 타액선 염증의 감소에 효과적이었던 한편, 15 ㎎/㎏은 치료법의 제63일에 효능을 유지하였다(도 13a). 타액선 침윤은 29일 후에 미처리 마우스에서 유의미하게 변경되지 않았다.

[0510] 발의 관절 조직에서, 1.5, 5 및 15 ㎎/㎏의 용량으로 투여되는 항-CD40 항체는 제29일에 관절 주위의 염증의 감소에 유효한 한편, 15 ㎎/㎏은 치료법의 제63일에 효능을 유지하였다(도 13b). 관절에서, 10주 마우스에 비하여 19주 마우스에서 염증이 더 낮은 경향이 있었다. 그럼에도 불구하고, 항-CD40 항체 처치는 치료법의 제63일에 15 ㎎/㎏에서 염증을 거의 0으로 유의미하게 감소시켰다.

[0511] 배중심(GC) 형성은 GC B 세포 상의 CD40과 여포 헬퍼 T 세포(Tfh) 상의 CD40L의 결합을 통한 B 및 T 세포 상호작용을 필요로 한다. GC는 해부학적 구조이며, 여기서, 형장 세포 및 기억 B 세포가 생성되며, 친화성 성숙 및 Ig 부류 전환이 발생한다. 그들은 SLE에서의 고 친화성 및 병원성 자가항체의 발생에 결정적이다.

[0512] 마우스 항-CD40 항체 138은 B 및 T 세포 상호작용을 파괴하고, GC 형성을 예방하였다. GC 형성이 예방되는 정도를 평가하기 위하여, 비장 내의 GC B 세포 및 Tfh 세포의 수를 유세포분석에 의해 결정하였다(도 14). Tfh 세포 수는 용량과 상관 없이, 모든 항-CD40 항체 138 처치된 마우스에서 제29일에 대조군보다 유의미하게 더 낮았다. 시험되는 용량 중에, 5 ㎎/㎏ 용량 군은 제63일에 대조군보다 유의미하게 더 낮게 유지되었다(도 14, 패널 (i)

및 (ii) 참조). 또한, GC B 세포는 모든 항-CD40 항체 용량에서 제29일에 대조군보다 더 낮았으며, 그들은 제63일에 5 및 15 ㎎/㎏의 용량으로 항-CD40 항체를 제공한 마우스에서 더 낮게 유지되었다. 그러나, 이러한 미처리 대조군과의 차이는 통계적으로 유의미하지 않았다. 상기 결과에도 불구하고, 모든 용량 군에서 치료 효과를 향한 전반적인 데이터 경향이 존재하였다. 추가로, 이들 실험에서, 쥣과 항-CD40 항체가 효능제 활성이 거의 없거나, 없는 것이 입증되었다.

[0513] 자가반응성 항체의 수준에 더하여, 순환하는 총 IgG 수준은 쥣과 및 인간 SLE에서 시간이 지남에 따라 증가한다. 따라서, 항체 생성에 대한 항-CD40 항체 138의 영향을 평가하기 위하여, 순환하는 총 IgM 및 IgG 수준을 시험하였다. 또한, 항-dsDNA 항체, 통상의 루푸스-관련 자가항체도 또한 시험하였다. 15 및 1.5 ㎎/㎏의 용량에서 항-CD40 항체로 처치된 마우스에서의 총 IgG 수준이 도 15a에 기재된 바와 같이, 제29일에 미처리 대조군에서의 것보다 유의미하게 더 낮음이 관찰되었다. 유의미하게 더 낮은 총 IgG 수준은 도 15b에 기재된 바와 같이, 15 ㎎/㎏의 항-CD40 항체 138로 처치된 마우스에서 제63일까지 지속되었다. 또한, 유의미하게 더 낮은 수준이 이러한 시점에 5 ㎎/㎏으로 항-CD40 항체 138로 처치된 마우스에서 관찰되었다. 순환하는 IgM 수준에서 차이가 발견되지 않았다.

[0514] 항-dsDNA 역가는 도 16a에 기재된 바와 같이 항-CD40 항체 138 처치된 마우스 및 미처치 대조군 마우스에서 제29일에 유의미하게 상이하지 않았다. 그러나, 도 16b에 기재된 바와 같이, 제63일까지, 항-dsDNA 역가는 미처리 대조군 마우스에서 실질적으로 증가되었으나, 15 및 5 ㎎/㎏의 항-CD40 항체 138로 처치된 마우스에서 감소되었지만, 차이는 유의미하지 않았다.

[0515] 상기 연구로부터 수득되는 결과(실시예 11.1)에 의해, 항-CD40 항체 138이 루푸스-취약 MRL/lpr 마우스에서 신장염의 발생의 예방에 유효한 것이 나타났다. 또한, 항-CD40 항체 138은 타액선 및 관절 염증의 발생을 예방하였다. 이러한 연구는 Ab102와 유사한 특성을 갖는 길항제 마우스 항-CD40 항체 138이 인간 SLE의 치료에 유효한 것을 뒷받침한다.

[0516] 11.2. SLE의 NZB/W-F_1 마우스 모델

[0517] 또한, SLE에 대한 제2 마우스 모델을 시험하여, 길항제 마우스 항-CD40 항체 138이 질병의 치료에 효과적인지 여부를 결정하였다. 구체적으로, 항-CD40 항체 138의 효능을 결정하기 위하여, 항체를 NZB/W-F1 마우스에서 시험하였으며, 여기서, 예방적 및 치료적 섭생법 둘 모두를 하기 표 24에 기재된 투여 일정에 따라 사용하였다. 연구 11.1에서와 같이, PBS를 음성 대조군으로 사용하였으며, 프레드니솔론은 양성 대조군이었다.

표 24

[0518]

예방적			
그룹	n	처치	용량
1	20	PBS	복강내 2x/주
2	20	항체 138	15 mg/kg 복강내 2x/주
3	20	항체 138	1.5 mg/kg 복강내 2x/주
4	20	항체 138	15 mg/kg 복강내 1x/주
5	20	프레드니솔론	10 mg/kg 경구 1일 1회
치료적			
6	13	PBS	i.p. 2x/주
7	12	항체 138	15 mg/kg 복강내 2x/주
8	12	프레드니솔론	10 mg/kg 경구 1일 1회

[0519] 예방적 섭생법을 위하여, 마우스는 26주령에 처치를 시작하였다. 모든 마우스는 300 ㎎/㎗ 미만의 단백질을 갖는 것으로 입증되었다. 치료적 섭생법을 위하여, 롤링 등록(rolling enrollment)을 사용하였으며; 미처리 마우스를 단백뇨에 대하여 매주 모니터링하고, 300 ㎎/㎗ 이상의 단백뇨가 발생하는 경우, 3개 군의 치료적 섭생법 중 하나로 등록시켰다.

[0520] *예방적 처치*

[0521] 단백뇨를 매주 모니터링하였으며, 도 17a에 나타낸 바와 같이, 미처리 대조군 마우스의 약 50%가 32주령까지 단백뇨였다. 대조적으로, 항-CD40 항체 138 처치된 마우스 중 오직 1마리만에서 높은 단백뇨가 발생되었으며, 프레드니솔론 처치된 마우스 중 어느 것에서도 높은 단백뇨가 발생하지 않았다. 이들 결과는 미처리 대조군으로부터 유의미하였다. 도 17b에 나타낸 바와 같은 생존은 PBS 대조군과 유의미하게 상이한 모든 처치에서의 단백뇨 결과를 반영하였다. 따라서, 15 및 1.5 ㎎/㎏ 처치 용량 둘 모두에 의해, 단백뇨가 예방되고, 생존이 연장되었다.

[0522] *치료적 처치*

[0523] 또한, 항-CD40 항체 138로의 치료적 처치는 이러한 제2 마우스 SLE 모델에서 유효하였다. 도 18a 및 도 18b에 나타낸 바와 같이, 항-CD40 항체 138로 처치된 마우스에서 시간이 지남에 따라 낮은 단백뇨가 발생하는 한편, 미처리 대조군 마우스 또는 프레드니솔론 처치된 마우스 중 어느 것에서도 낮은 단백뇨가 발생하지 않았다. 단백뇨로부터의 회복 속도에 기반하여, 도 18b에 나타낸 바와 같이, 단백뇨의 회복까지의 평균 시간이 23±7일인 것으로 추정된다. 또한, 항-CD40 항체 138 처치는 도 18c에 나타낸 바와 같이 생존을 유의미하게 연장시켰다.

[0524] *타액 생산량*

[0525] 타액 생산을 예방적 및 치료적으로 처치된 마우스 둘 모두에서 측정하여, 타액선 기능을 평가하였다. 마취된 마우스에 필로카르핀 니트레이트를 투여하고, 8분 기간에 걸쳐, 타액을 면봉으로 수집하였다. 타액 생산량을 면봉의 순 중량 증가로서 측정하였다. 도 19a 및 도 19b에 나타낸 바와 같이, 예방적 연구에서, 미처치 대조군 마우스에 의한 타액 생산이 매우 가변적이었지만, 더 어린 NZBWF-1 비-질병 마우스의 것과 유의미하게 상이하였음이 관찰되었다. 가장 낮은 타액 생산을 갖는 대다수의 비히클 대조군 마우스가 단백뇨였기 때문에, 가변성은 질병의 수준 때문일 가능성이 있었다(도 19a 및 도 19b, 비히클 군에서 흑색에 비해 보라색). 그러나, 중요한 것은, 항-CD40 항체 138 처치된 마우스에 의한 타액 생산이 비교적 균일하였으며(도 19a), 미처치 대조군 마우스에서보다 유의미하게 더 컸다. 모든 항-CD40 항체 138 처치된 코호트가 더 높은 타액 생산을 가졌지만, 체중의 함수로서 측정되는 경우 오직 1.5 ㎎/㎏ 처치된 코호트만이 유의성을 유지하였다(도 19b). 그럼에도 불구하고, 이들 데이터는 예방적 항-CD40 항체 138 처치가 타액선 기능의 소실을 예방할 수 있음을 나타낸다.

[0526] 치료적으로 처치된 마우스에서, 항-CD40 항체 138 처치된 마우스가 미처치 대조군보다 유의미하게 더 높은 타액 생산을 가졌음이 관찰되었다(도 20a 및 도 20b). 도 20a 및 도 20b는 타액 생산이 항-CD40 항체의 치료적 투여에 의해 유지되었음을 보여준다. 이것은 총 타액을 고려하든지 체중에 대하여 정규화된 타액을 고려하든지 명백하였다. 특히, 미처치 마우스는 모두 단백뇨였던 반면, 항-CD40 항체 처치된 마우스 중 어느 것도 단백뇨가 아니었다. 따라서, 효능제 활성이 실질적으로 없는 길항제 항-CD40 항체의 치료적 투여가 타액선 기능의 감소를 예방하거나, 반전시키는 것으로 결론지을 수 있다.

[0527] 이러한 연구는 길항제 항-CD40 항체 138이 루푸스-취약 NZB/W-F1 마우스에서 신장염의 발생의 예방 및 이들 마우스의 신장염으로부터의 구제에 효과적이었음을 나타낸다. 또한, 항-CD40 항체는 타액선 및 관절 염증의 발생을 예방시켰다. 이러한 연구는 효능제 활성이 실질적으로 없는 길항제 항-CD40 항체가 인간 SLE에서 효과적이라는 가설을 뒷받침한다.

[0528] 실시예 11.1 및 11.2에 사용되는 방법은 다음을 포함하였다:

[0529] *MRL/lpr 마우스*

[0530] *MRL/lpr*: 항-CD40 항체(항체 138)를 10주령 MRL/lpr 마우스에 4가지 용량 중 1가지로 복강내 투여하였다; 매주 2회의 15 ㎎/㎏, 5 ㎎/㎏ 또는 1.5 ㎎/㎏ 또는 매주 1회의 15 ㎎/㎏. 매주 2회 PBS(비히클)로 복강내 처치된 마우스를 음성 대조군으로서 포함시켰으며, 10 ㎎/㎏의 프레드니솔론으로 1일 1회 경구 처치된 마우스를 양성 대조군으로서 포함시켰다.

[0531] *NZB/W-F_1*: 항-CD40 항체 138을 예방적 및 치료적 섭생법 둘 모두에서 NZB/W-F_1 마우스에 투여하였다. 예방적 섭생법을 위하여, 26주령에 시작하여, 마우스에 항-CD40을 2가지 용량 중 어느 하나, 15 ㎎/㎏ 또는 1.5 ㎎/㎏으로 매주 2회로, 복강내로 제공하였다. 경구 1일 1회로 10 ㎎/㎏의 프레드니솔론을 제공하거나, PBS를 제공한 마우스를 각각 양성 및 음성 대조군으로서 제공하였다. 마우스를 처음에 단백뇨에 대하여 시험하고, 300 ㎎/㎗ 이상인 임의의 마우스를 예방적 연구로부터 배제하였다. 치료적 섭생법을 위하여, 마우스가 300 ㎎/㎗ 이상의 단백뇨를 발생하는 경우 마우스는 처치를 시작하였다. 마우스에 항-CD40을 주2회 15 ㎎/㎏으로 복강내

제공하였다. 경구 1일 1회로 10 ㎎/㎏의 프레드니솔론을 제공하거나, PBS를 제공한 마우스를 각각 양성 및 음성 대조군으로서 제공하였다.

[0532] *단백뇨*

[0533] 소변을 알부스틱스 시약 스트립(미국 펜실베니아주 피츠버그 소재의 시에멘스(Siemens) 2191)을 사용하여 단백질 수준에 대하여 매주 시험하였다. 뇨단백 수준이 적어도 2회의 연속 시험 동안 또는 사망 또는 안락사 이전에, 300 ㎎/㎗ 이상으로 증가되는 경우, 마우스를 단백뇨로 고려하였다.

[0534] *유세포분석*

[0535] 비장 단일 세포 현탁액을 1% 열 불활성화 우태아혈청(인비트로겐(Invitrogen)) 및 1x 페니실린/스트렙토마이신(미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마(Sigma))이 있는 행크스(Hanks) 완충 염 용액(인비트로겐)에서 제조하였다. 적혈구를 원심분리에 의해 제거하고, 세포를 염색 완충제(1.5% 열 불활성화 우태아혈청 및 0.02% 아지드화나트륨(시그마)이 있는 PBS(인비트로겐))에서 재현탁화시켰다. 세포를 CD3(145-2011, BD), CD4(GK1.5 이바이오사이언스즈), ICOS(C398.4A, 바이오레전드(Biolegend)), CXCR5(L138D7, 바이오레전드), PD-1(29F.1A12, 바이오레전드), GL7(A488, 바이오레전드), CD19(BUV395, BD), CD95(Jo2, 바이오레전드)에 대한 항체로 염색하였다. 항체를 플루오레세인 이소티오시아네이트, 피코에리트린, 피코에리트린 및 시아닌 5, 알로피코시아닌, 페리디닌 클로로필라 및 시아닌 5.5 또는 비오틴에 직접 결합시켰다. 총 B 세포가 CD19+로; GC B 세포가 CD19+, CD95+ 및 $GL7^{+}$로; Tfh 세포가 CD3+, CD4+, ICOS+, CXCR5+ 및 PD-1+로 확인되었다. 세포를 FACSCalibur(비디 바이오사이언스즈(BD Biosciences)) 유세포측정기에 의해 분석하고, FlowJo 소프트웨어(버전 8.5, 트리스타 인코포레이티드(Treestar Inc.))로 분석하였다.

[0536] *조직학*

[0537] 비히클 대조군 마우스가 빈사 상태가 되는 경우, 신장, 발목 및 타액선 조직을 수집하고, 10% 중성 완충 포르말린에서 고정시켰다. 또한, 특정 중간 시점에, 이들 동일한 조직 및 혈액을 각 군의 대표적인 마우스로부터 수집하였다. 조직을 10% 중성-완충 포르말린에서 8시간 동안 고정하고, 처리하고, H&E를 위해 파라핀-포매시켰다. 염증성 침윤물을 일상적인 H&E 염색된 포르말린-고정 파라핀 포매(FFPE) 섹션의 평가에 기반하여 신장, 타액선 및 발목에서 평가하였다. 신장에 있어서, 병리학자는 3 ㎛ H&E 섹션을 하기의 점수화 기준에 기반하여 사구체 질병, 혈관주위 침윤 및 요세관사이질 침윤에 대하여 0 내지 4 척도로 점수화하였다: 사구체 질병: 0 = 질병 부재; 1 = 간헐적인 사구체 내의 메산지움의 분절성 비후; 2 = 대부분의 사구체 내의 메산지움의 분절성 내지 광범위 비후; 3 = 메산지움의 광범위 비후, 세포과다성, 다리세포 비대, 유착 부재; 4 = 다음 중 하나 이상을 갖는 다른 것들보다 더 악화된 영역과 함께 메산지움의 광범위 비후: 응고 단백질, 섬유증, 저세포성, 다리세포 비대, 유착 및 보먼 주머니의 초승달병변(crescent). 혈관주위 신장 염증: 0 = 최대 몇개의 희귀 림프구; 1 = 성긴 응집물을 형성하는 소수의 림프구; 2 = 분리된 작은 응집물을 형성하는 림프구; 3 = 인접 정맥의 내강 내로 가득차지만, 궁상 동맥을 완전히 둘러싸지 못하는 림프구의 양극화 응집물; 4 = 양극화 없이 궁상 동맥을 완전히 둘러싸는 림프구 응집물. 요세관사이질(TI) 침윤: 0 = 침윤물 부재; 1 = 최소 내지 경증 TI 침윤물; 2 = 20% 세관의 사이의 경증 침윤물; 3 = 최대 50%의 세관의 사이의 경증 내지 중등도 침윤물; 4 = 신피질 도처의 50% 초과의 세관 사이의, 그리고 이를 둘러싸는 중등도 침윤물. 타액 및 관절 염증 점수는 0점 내지 4점의 조직 내의 침윤물의 증가를 사용한 동일한 원리에 기반하였다.

[0538] *타액 생산량*

[0539] 타액선 생산량을 측정하기 위하여, 마우스를 먼저 작은 분리 챔버에서 산소/이소플루란으로 진정시켰다. 진정 후에, 마우스에 30 ㎕(60 ㎍)의 필로카르핀 니트레이트(시그마)를 복강내 투여하였다. 주사 2분 후에, 미리-칭량된 소아 안전 면봉(약 1.5 ㎝로 잘라냄, 솜 + 막대)을 동물 입의 앞니 뒤에 배치하였다. 마우스를 측면에 배치하여, 볼 내의 타액의 풀링 및 솜 면봉에 의한 흡수를 가능하게 하였다. 8분 후에, 면봉을 제거하고, 칭량하여, 순 타액 중량을 계산하였다.

[0540] *ELISA*

[0541] 총 순환 IgG 및 IgM 수준을 제조처의 지침에 따라 이바이오사이언스 키트(카탈로그 번호 88-50400, 88-50470)를 사용하여 ELISA에 의해 결정하였다.

서열 요약

서열 식별자	단백질	서열
SEQ ID NO:1	인간 CD40	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINS QCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLDT WNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTC EEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSD TICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQ QAGTNKTDVVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILL VLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGS NTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ
SEQ ID NO:2	인간 Ig 감마-1 불변 영역	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:3	인간 Ig 감마-1 불변 영역 돌연변이	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:4	인간 Ig 카파 불변 영역	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
SEQ ID NO:5	하기의 가변 중쇄: Ab1(젖과) (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLKVSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPEKGLEWIA**YISSGRSNIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCAR**SWGYFDV** WGTGTTVTVSS
SEQ ID NO:6	하기의 중쇄 CDR1: Ab1 (젖과) Ab2(젖과) huAb1v1CDR2v1 내지 huAb1v1CDR2v17 huAb1v1 huAb1v5 huAb1v6 huAb1v4 huAb1v3 Ab101 Ab102	GFTFSDYGMN

[0542]

[0543]

서열 식별자	단백질	서열
SEQ ID NO:7	하기의 중쇄 CDR2: Ab1(짓과) huAb1VH.1/VL.1 huAb1v1 huAb1v5 huAb1v3 huAb1v4	YISSGRSNIYYADTVKG
SEQ ID NO:8	하기의 중쇄 CDR3: Ab2 (짓과) Ab1(짓과) huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1A huAb1v1 huAb1v1CDR2v1 내지 huAb1v1CDR2v17 huAb1v5 huAb1v6 huAb1v2 huAb1v3 huAb1v4 Ab101 Ab102	SWGYFDV
SEQ ID NO:9	하기의 가변 경쇄: Ab1(짓과)	DIVMTQSPSSLTVTAGEMVTMSC**KSSQSLLNSGNQ** **KNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTRES**GVPDRFAG SGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC**QNDYTYPLT**FG AGTKLEIK
SEQ ID NO:10	하기의 경쇄 CDR1: Ab2 (짓과) Ab1 (짓과) huAb1VH1/VL.1 huAb1VH1A/VL.1 huAb1VH1A/VL.1A	KSSQSLLNSGNQKNYLT

서열 식별자	단백질	서열
SEQ ID NO:11	하기의 경쇄 CDR2: Ab1 (컷과) Ab2 (컷과) huAb1VH.1A/VL.1A huAb1VH.1/VL.1A huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1 huAb1v5 huAb1v2 huAb1v6 huAb1v1 huAb1v3 huAb1v4 Ab101 Ab102	WASTRES
SEQ ID NO:12	하기의 경쇄 CDR3: Ab1 (컷과) Ab2 (컷과) huAb1VH.1A/VL.1A huAb1VH.1/VL.1A huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1 huAb1v5 huAb1v2 huAb1v6 huAb1v1 huAb1v3 huAb1v4 Ab101 Ab102	QNDYTYPLT
SEQ ID NO:13	하기의 가변 중쇄: huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1/VL.1A huAb1v2 huAb1v3	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWVSYISSGRSNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDV WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:14	하기의 가변 경쇄: huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQ KNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFG QGTKLEIK

[0544]

서열 식별자	단백질	서열
SEQ ID NO:15	하기의 가변 중쇄: huAb1VH.1A/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1A huAb1v1 huAb1v5 huAb1v4 huAb1v6	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMN WVRQAPGKGLEWIAYISSGRSNIYYADTVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDV WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:16	하기의 가변 경쇄: huAb1VH.1A/VL.1A huAb1VH.1/VL.1A	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQ KNYLTWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFG QGTKLEIK
SEQ ID NO:17	하기의 경쇄 CDR1: huAb1v6 huAb1v3	KSSQSLLNLGNQKNYLT
SEQ ID NO:18	VL huAb1v5 huAb1v2 (CDR은 볼드체)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLLNTGNQ** **KNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTRES**GVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QNDYTYPLT**FG QGTKLEIK
SEQ ID NO:19	하기의 경쇄 CDR1: huAb1v5 huAb1v2	KSSQSLLNTGNQKNYLT
SEQ ID NO:20	하기의 가변 경쇄(VL): huAb1v1 Ab101 Ab102 (CDR은 볼드체)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLLNRGNQ** **KNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTRES**GVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QNDYTYPLT**FG QGTKLEIK
SEQ ID NO:21	하기의 가변 경쇄 CDR1: huAb1v1 Ab101 Ab102	KSSQSLLNRGNQKNYLT
SEQ ID NO:22	하기의 가변 중쇄(VH): huAb1v1CDR2v1 (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRTNIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:23	하기의 가변 중쇄(VH): huAb1v1CDR2v2 (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRDNIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSS

[0545]

서열 식별자	단백질	서열
SEQ ID NO:24	하기의 가변 중쇄(VH): huAb1v1CDR2v3 (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRENIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:25	하기의 가변 중쇄(VH): huAb1v1CDR2v4 (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRRNIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:26	하기의 가변 중쇄(VH): huAb1v1CDR2v5 (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRVNIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:27	하기의 가변 중쇄(VH): huAb1v1CDR2v6 (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRLNIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:28	하기의 가변 중쇄(VH): huAb1v1CDR2v7 Ab101 Ab102 (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRGNIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:29	VH huAb1v1CDR2v8 (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRINIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:30	하기의 가변 중쇄(VH): huAb1v1CDR2v9 (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRQNIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:31	하기의 가변 중쇄(VH): huAb1v1CDR2v10 (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRWNIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:32	하기의 가변 중쇄(VH): huAb1v1CDR2v11 (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRMNIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:33	하기의 가변 중쇄(VH): huAb1v1CDR2v12 (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRKNIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:34	하기의 가변 중쇄(VH): huAb1v1CDR2v13 (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRHNIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:35	하기의 가변 중쇄(VH): huAb1v1CDR2v14 (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRFNIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSS

[0546]

[0547]

서열 식별자	단백질	서열
SEQ ID NO:36	하기의 가변 중쇄(VH): huAb1v1CDR2v15 (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRYNIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:37	하기의 가변 중쇄(VH): huAb1v1CDR2v16 (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRANIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:38	하기의 가변 중쇄(VH): huAb1v1CDR2v17 (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRPNIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:39	중쇄 서열 Ab101 (불변 영역은 밑줄; CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRGNIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:40	경쇄 서열 Ab101 경쇄 서열 Ab102 인간화 (불변 영역은 밑줄; CDR은 볼드체)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLLNRGNQ** **KNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTRES**GVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QNDYTYPLT**FG QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
SEQ ID NO:41	중쇄 서열 Ab102 인간화 (불변 영역은 밑줄; CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQAPGKGLEWIA**YISSGRGNIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SWGYFDV** WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

서열 식별자	단백질	서열
SEQ ID NO:42	하기의 중쇄 CDR2: Ab2 huAb1v1CDR2v7 Ab101 Ab102	YISSGRGNIYYADTVKG
SEQ ID NO:43	하기의 가변 경쇄: huAb1v6 huAb1v3 (CDR은 볼드체)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSLLNLGNQ KNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTRES**GVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QNDYTYPLT**FG QGTKLEIK
SEQ ID NO:44	하기의 가변 중쇄: Ab3 (칫과) (CDR은 볼드체)	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKAF**GYTFTSYTMH** WVKQRPGQGLEWIG**YINPSSDYPNYNQKFKD**KATL TADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR**WGYSFDY** WGQGTTLTVSS
SEQ ID NO:45	하기의 중쇄 CDR1: Ab3 (칫과) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B	GYTFTSYTMH
SEQ ID NO:46	하기의 중쇄 CDR2: Ab3 (칫과) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B	YINPSSDYPNYNQKFKD

[0548]

[0549]

서열 식별자	단백질	서열
SEQ ID NO:47	하기의 중쇄 CDR3: Ab3 (쥣과) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B	WGYSFDY
SEQ ID NO:48	하기의 가변 경쇄: Ab3 (쥣과) (CDR은 볼드체)	DIVMTQAAPSVSVIPGESVSISC**RSSKSLLHSNGN TYLY**WFLQRPGQSPQYLIY**RMSTLAS**GVPDRFSGS GSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYC**MQHLEYPLT**FGA GTKLELK
SEQ ID NO:49	하기의 경쇄 CDR1: Ab3 (쥣과) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B	RSSKSLLHSNGNTYLY
SEQ ID NO:50	하기의 경쇄 CDR2: Ab3 (쥣과) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B	RMSTLAS

시열 식별자	단백질	시열
SEQ ID NO:51	하기의 경쇄 CDR3: Ab3 (쥣과) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B	MQHLEYPLT
SEQ ID NO:52	하기의 가변 중쇄: huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYTMH WVRQAPGQGLEWMGYINPSSDYPNYNQKFKDRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYSFDY WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:53	하기의 가변 경쇄: huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 (CDR은 볼드체)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLLHSNGN** **TYLY**WYLQKPGQSPQLLIY**RMSTLAS**GVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQHLEYPLT**FGQ GTKLEIK
SEQ ID NO:54	하기의 가변 중쇄: huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B (CDR은 볼드체)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS**GYTFTSYTMH** WVRQAPGQGLEWMG**YINPSSDYPNYNQKFKD**RVTL TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**WGYSFDY** WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:55	하기의 가변 중쇄: huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B (CDR은 볼드체)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS**GYTFTSYTMH** WVRQAPGQGLEWIG**YINPSSDYPNYNQKFKD**RATL TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**WGYSFDY** WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:56	하기의 가변 경쇄: huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A (CDR은 볼드체)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLLHSNGN** **TYLY**WFLQKPGQSPQYLIY**RMSTLAS**GVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQHLEYPLT**FGQ GTKLEIK

[0550]

서열 식별자	단백질	서열
SEQ ID NO:57	하기의 가변 경쇄: huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B (CDR은 볼드체)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLLHSNGN TYLY**WYLQKPGQSPQYLIY**RMSTLAS**GVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQHLEYPLT**FGQ GTKLEIK
SEQ ID NO:58	하기의 중쇄 CDR2: huAb1v1CDR2v1	YISSGRTNIYYADTVKG
SEQ ID NO:59	하기의 중쇄 CDR2: huAb1v1CDR2v2	YISSGRDNIYYADTVKG
SEQ ID NO:60	하기의 중쇄 CDR2: huAb1v1CDR2v3	YISSGRENIYYADTVKG
SEQ ID NO:61	하기의 중쇄 CDR2: huAb1v1CDR2v4	YISSGRRNIYYADTVKG
SEQ ID NO:62	하기의 중쇄 CDR2: huAb1v1CDR2v5	YISSGRVNIYYADTVKG
SEQ ID NO:63	하기의 중쇄 CDR2: huAb1v1CDR2v6	YISSGRLNIYYADTVKG
SEQ ID NO:64	하기의 중쇄 CDR2: huAb1v1CDR2v8	YISSGRINIYYADTVKG
SEQ ID NO:65	하기의 중쇄 CDR2: huAb1v1CDR2v9	YISSGRQNIYYADTVKG
SEQ ID NO:66	하기의 중쇄 CDR2: huAb1v1CDR2v10	YISSGRWNIYYADTVKG
SEQ ID NO:67	하기의 중쇄 CDR2: huAb1v1CDR2v11	YISSGRMNIYYADTVKG
SEQ ID NO:68	하기의 중쇄 CDR2: huAb1v1CDR2v12	YISSGRKNIYYADTVKG
SEQ ID NO:69	하기의 중쇄 CDR2: huAb1v1CDR2v13	YISSGRHNIYYADTVKG
SEQ ID NO:70	하기의 중쇄 CDR2: huAb1v1CDR2v14	YISSGRFNIYYADTVKG
SEQ ID NO:71	하기의 중쇄 CDR2: huAb1v1CDR2v15	YISSGRYNIYYADTVKG
SEQ ID NO:72	하기의 중쇄 CDR2: huAb1v1CDR2v16	YISSGRANIYYADTVKG

[0551]

[0552]

서열 식별자	단백질	서열
SEQ ID NO:73	하기의 중쇄 CDR2: huAb1v1CDR2v17	YISSGRPNIYYADTVKG
SEQ ID NO:74	하기의 경쇄 CDR1: huAb1v4	KSSQSLLNPGNQKNYLT
SEQ ID NO:75	하기의 가변 중쇄: Ab2 (짓과) (CDR은 볼드체)	EVQLVESGGGLVKPGGSLKVSCAAS**GFTFSDYGMN** WVRQSPEKGLEWIA**YISSGRGNIYYADTVKG**RFTI SRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCAR**SWGYFDV** WGTGTTVTVSS
SEQ ID NO:76	하기의 가변 경쇄: Ab2(짓과) (CDR은 볼드체)	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSC**KSSQSLLNSGNQ** **KNYLT**WFQQKPGQPPKLLIY**WASTRES**GVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC**QNDYTYPLT**FG AGTKLELK
SEQ ID NO:77	하기의 가변 경쇄: huAb1v4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNPGNQ KNYLTWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFG QGTKLEIK
SEQ ID NO:78	가변 중쇄 CDR1의 공통 서열	G(F/Y)TF(S/T)(D/S)Y(G/T)M(N/H)
SEQ ID NO:79	가변 중쇄 CDR2의 공통 서열	YI(S/N)(S/P)(G/S)(R/S)(D/S/G)(N/Y)(I/P)(Y/N)Y(A/N)(D/Q)(T/K)(V/F)K (G/D)
SEQ ID NO:80	가변 중쇄 CDR3의 공통 서열	(S/W)(W/G)(G/Y)(Y/S)FDV
SEQ ID NO:81	인간 Ig 람다 불변 영역	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG AVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO:82	인간 중쇄 수용자 서열 VH1-18&JH6 FR1 21/28&JH4 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
SEQ ID NO:83	인간 중쇄 수용자 서열 VH1-18&JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG

[0553]

서열 식별자	단백질	서열
SEQ ID NO:84	인간 중쇄 수용자 서열 VH1-18&JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
SEQ ID NO:85	인간 중쇄 수용자 서열 VH1-18&JH6 FR4 VH2-26&JH6 FR4 VH1-46&JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:86	인간 중쇄 수용자 서열 21/28&JH4 FR2	WVRQAPGQRLEWMG
SEQ ID NO:87	인간 중쇄 수용자 서열 21/28&JH4 FR3	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
SEQ ID NO:88	인간 중쇄 수용자 서열 21/28&JH4 FR4 M60&JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:89	인간 중쇄 수용자 서열 VH2-26&JH6 FR1	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLS
SEQ ID NO:90	인간 중쇄 수용자 서열 VH2-26&JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLAH
SEQ ID NO:91	인간 중쇄 수용자 서열 VH2-26&JH6 FR3	RLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCAR
SEQ ID NO:92	인간 중쇄 수용자 서열 M60&JH4 FR1	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTLYGFSLS
SEQ ID NO:93	인간 중쇄 수용자 서열 M60&JH4 FR2	WIRQPPGKALEWLA
SEQ ID NO:94	인간 중쇄 수용자 서열 M60&JH4 FR3	RLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAR

[0554]

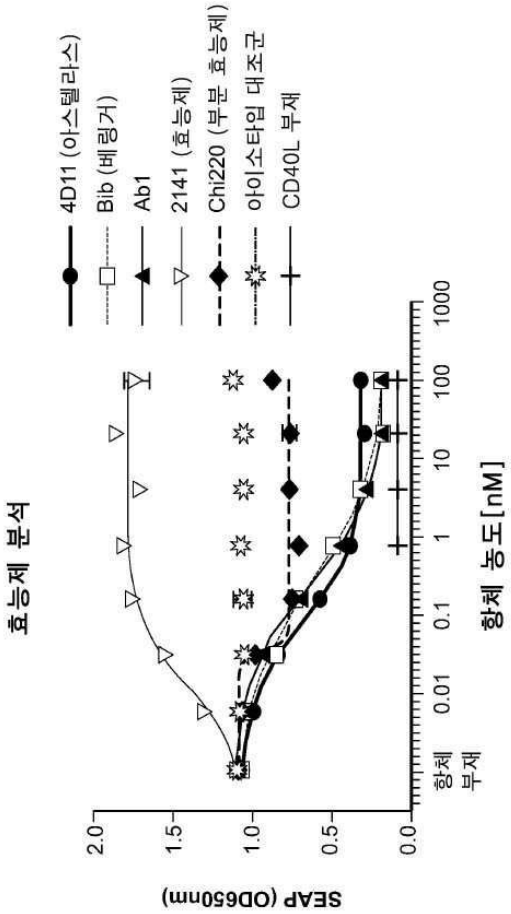
서열 식별자	단백질	서열
SEQ ID NO:95	인간 중쇄 수용자 서열 VH1-46&JH6 FR3	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
SEQ ID NO:96	인간 경쇄 수용자 서열 A20&JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
SEQ ID NO:97	인간 경쇄 수용자 서열 A20&JK4 FR2	WYQQKPGKVPKLLIY
SEQ ID NO:98	인간 경쇄 수용자 서열 A20&JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC
SEQ ID NO:99	인간 경쇄 수용자 서열 A20&JK4 FR4 III-3R&JK4 FR4 A1&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
SEQ ID NO:100	인간 경쇄 수용자 서열 III-3R&JK4 FR3	GVPSRISGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC
SEQ ID NO:101	인간 경쇄 수용자 서열 A1&JK4 FR1	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
SEQ ID NO:102	인간 경쇄 수용자 서열 A1&JK4 FR2	WFQQRPGQSPRRLIY
SEQ ID NO:103	인간 경쇄 수용자 서열 A1&JK4 FR3 01&JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
SEQ ID NO:104	인간 경쇄 수용자 서열 01&JK2 FR1	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC
SEQ ID NO:105	인간 경쇄 수용자 서열 01&JK2 FR2	WYLQKPGQSPQLLIY

[0555]

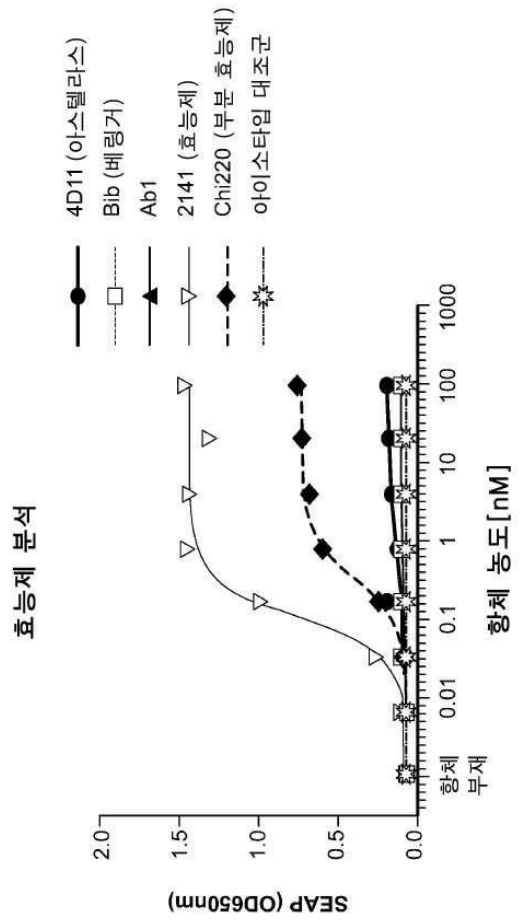
서열 식별자	단백질	서열
SEQ ID NO:106	인간 경쇄 수용자 서열 01&JK2 FR4	FGQGTKLEIKR
SEQ ID NO:107	인간 CD40 세포외 도메인	EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFT ETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLR VQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCV
SEQ ID NO:108	가변 경쇄 CDR1의 공통 서열	(K/R)SS(Q/K)SLL(N/H)S(G/-)N(Q/G) (K/N)(N/T)YL(T/Y)
SEQ ID NO:109	가변 경쇄 CDR2의 공통 서열	(W/R)(A/M)ST(R/L)(E/A)S
SEQ ID NO:110	가변 경쇄 CDR3의 공통 서열	(Q/M)(N/Q)(D/H)(Y/L)(T/E)YPLT
SEQ ID NO: 111	중쇄 CDR2	YISSGRXNIYYADTVKG 여기서 "X"는 T, D, V, L, I, M 이외의 임의의 아미노산이다
SEQ ID NO: 112	중쇄 CDR2	YISSGRXNIYYADTVKG 여기서 "X"는 임의의 아미노산이다
SEQ ID NO: 113	경쇄 CDR1	KSSQSLLNXGNQKNYLT 여기서 "X"는 아미노산 잔기 Pro이 아니다
SEQ ID NO: 114	인간 경쇄 수용자 서열 III-3R&JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
SEQ ID NO: 115	히스티딘 태그	His His His His His His

도면

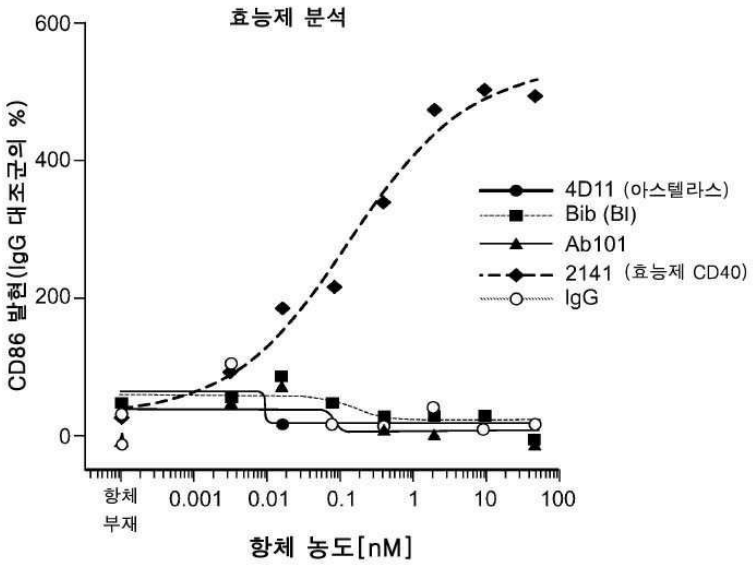
도면1a


효능제 분석
4D11 (아스텔라스)
Bib (베링거)
Ab1
2141 (효능제)
Chi220 (부분 효능제)
아이소타입 대조군
CD40L 부재
SEAP (OD650nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
항체 부재
0.01
0.1
1
10
100
1000
항체 농도[nM]

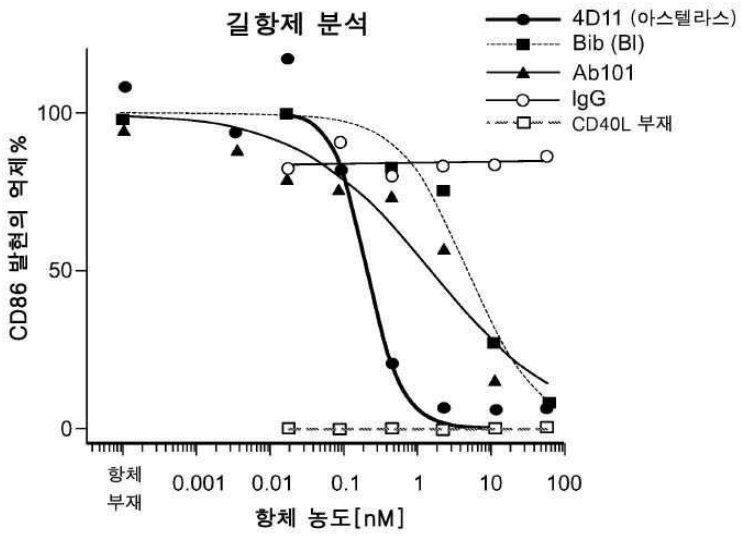
도면1b


4D11 (아스텔라스)
Bib (베링거)
Ab1
2141 (효능제)
Chi220 (부분 효능제)
아이소타입 대조군
효능제 분석
SEAP (OD650nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
항체 부재
0.01
0.1
1
10
100
1000
항체 농도[nM]

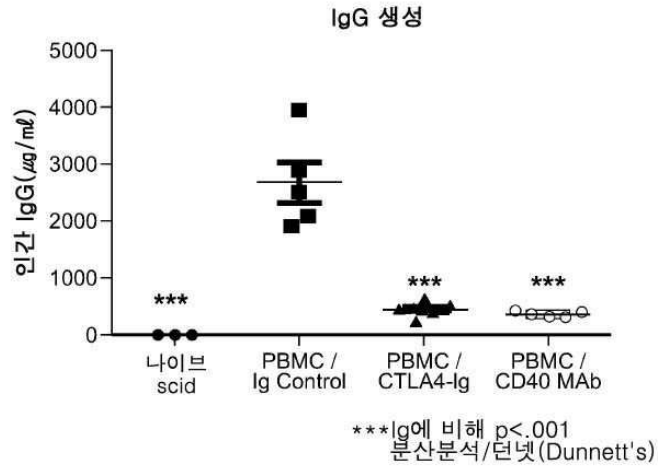
도면2a


효능제 분석
CD86 발현(IgG 대조군의 %)
600
400
200
0
항체 부재
0.001
0.01
0.1
1
10
100
항체 농도[nM]
4D11 (아스텔라스)
Bib (BI)
Ab101
2141 (효능제 CD40)
IgG

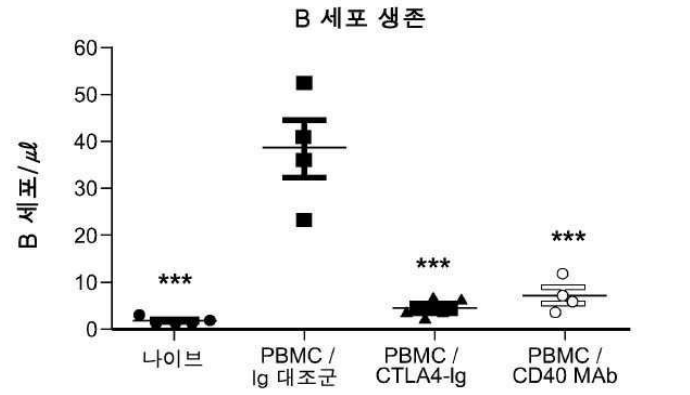
도면2b



도면3a



도면3b



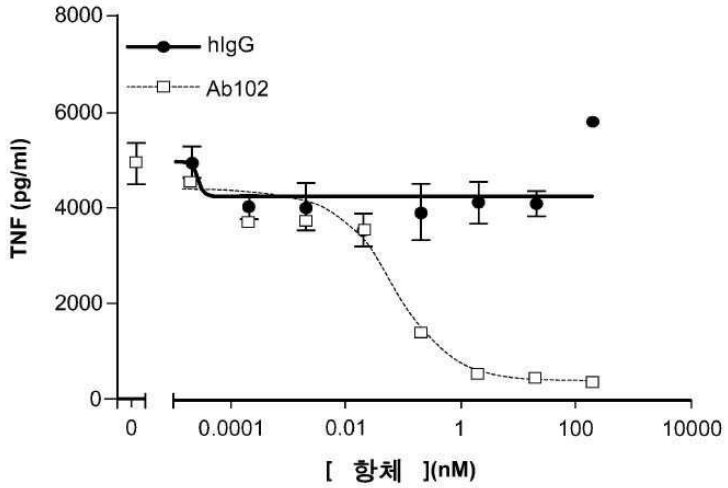
도면4a

```
                                    1                                                  50
Ab3 SEQ ID NO:48   (1) DIVMTQAAPSVSVIPGESVSISC**RSSKSLLHS-NGNTYLY**WFLQRPGQSP
Ab1 SEQ ID NO:9    (1) DIVMTQSPSSLTVTAGEMVTMSC**KSSQSLLNSGNQKNYLT**WFQQKPGQPP
Ab2 SEQ ID NO:76   (1) DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSC**KSSQSLLNSGNQKNYLT**WFQQKPGQPP
        공통               (1) DIVMTQSPSSLTVTAGE VTMSC**KSSQSLLNSGNQKNYLT**WFQQKPGQPP
                                                **R  K   H  -  GNT   Y**
                                   51                                                 100
Ab3                (50) QYLIY**RMSTLAS**GVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYC**MQHLEY**
Ab1                (51) KLLIY**WASTRES**GVPDRFAGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC**QNDYTY**
Ab2                (51) KLLIY**WASTRES**GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC**QNDYTY**
        공통               (51) KLLIY**WASTRES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC**QNDYTY**
                                                **RM  LA                    MQHLE**
                                   101
Ab3                (100) **PLT**FGAGTKLELK
Ab1                (101) **PLT**FGAGTKLEIK
Ab2                (101) **PLT**FGAGTKLELK
        공통               (101) **PLT**FGAGTKLELK
```

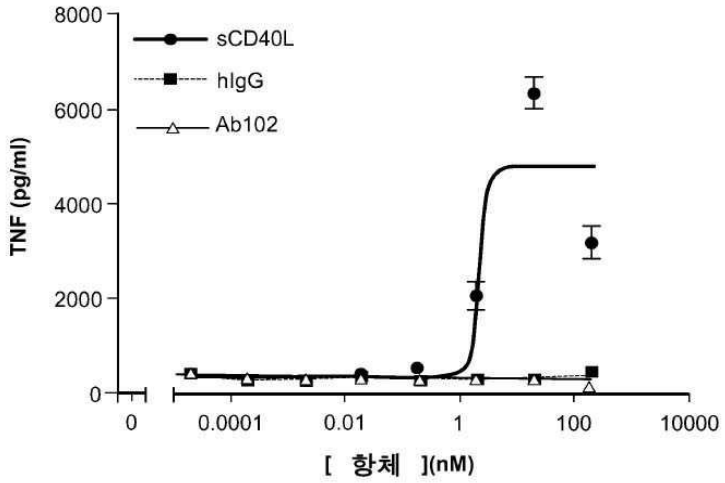
도면4b

```
                                1                                   50
Ab3 SEQ ID NO:44 (100) QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKAFGYTFTSYTMHWVKQRPGQGLEWIGY
Ab1 SEQ ID NO:5  (101) EVQLVESGGGLVKPGGSLKVSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPEKGLEWIAY
Ab2 SEQ ID NO:75 (101) EVQLVESGGGLVKPGGSLKVSCAASGFTFSDYGMNWVRQSPEKGLEWIAY
       공통       (101) EVQLVESGGGLVKPGGSLKVSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPEKGLEWIAY
                                      Y  TS T H
                                51                                  100
Ab3                (150) INPSSDYPNYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWG
Ab1                (151) ISSGRSNIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARSW
Ab2                (151) ISSGRGNIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARSW
       공통        (151) ISSGR NIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARSW
                           NPSS YPN NQKF D                          WG
                          101
Ab3                (200) YSFDYWGQGTTLTVSS
Ab1                (201) GYFDVWGTGTTVTVSS
Ab2                (201) GYFDVWGTGTTVTVSS
       공통        (201) GYFDVWGTGTTVTVSS
                           YS
```

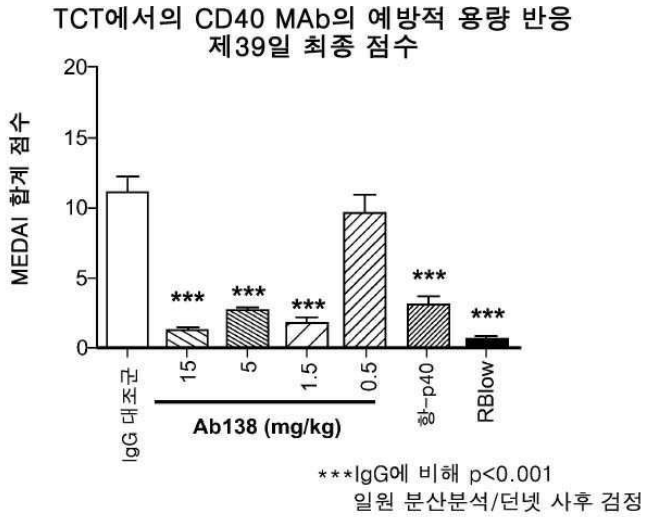
도면5a



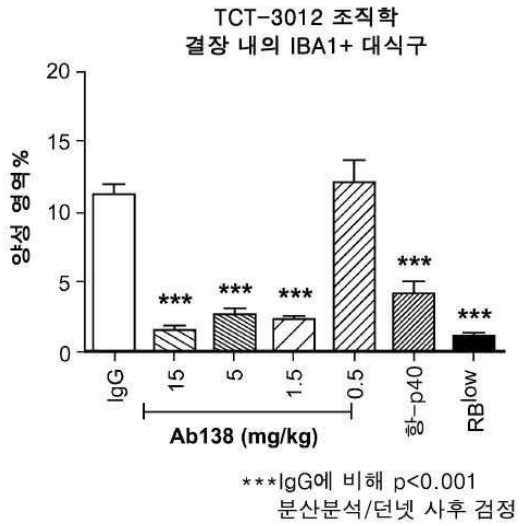
도면5b



도면6

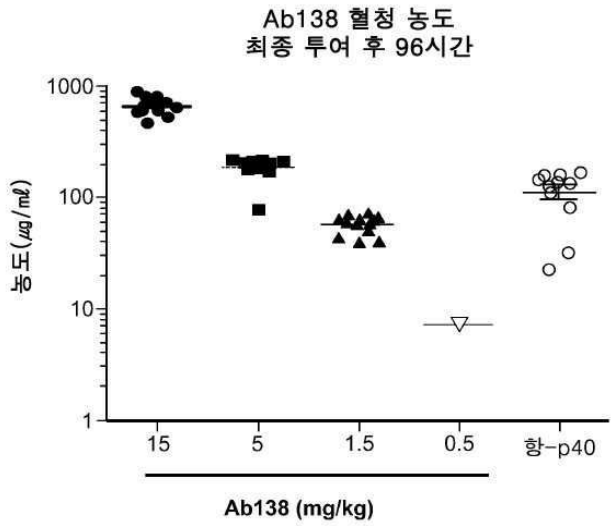


도면7



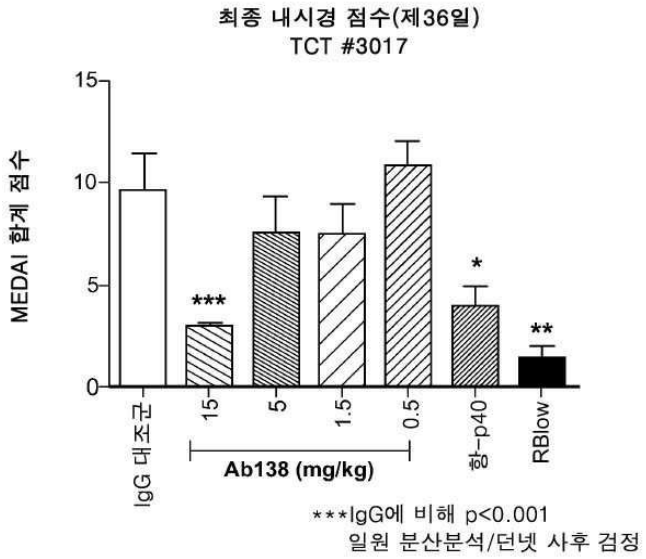
***IgG에 비해 p<0.001
분산분석/던넷 사후 검정

도면8

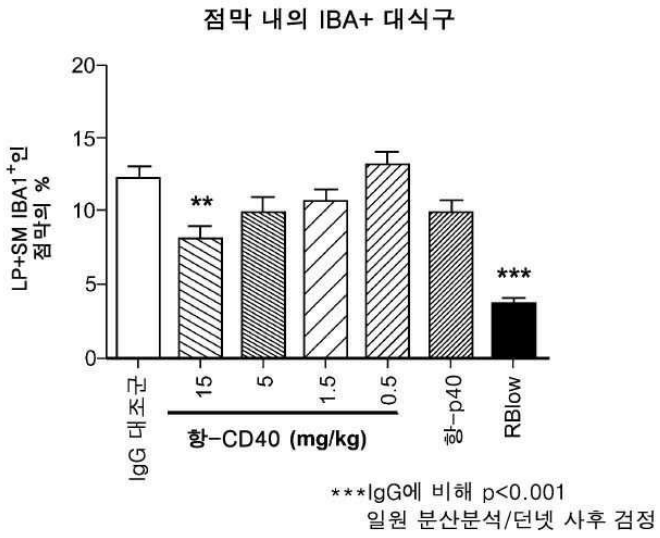


0.5 ㎎/㎏ 군에서 오직 1마리의 동물만이
측정가능한 수준의 Ab138을 가졌음

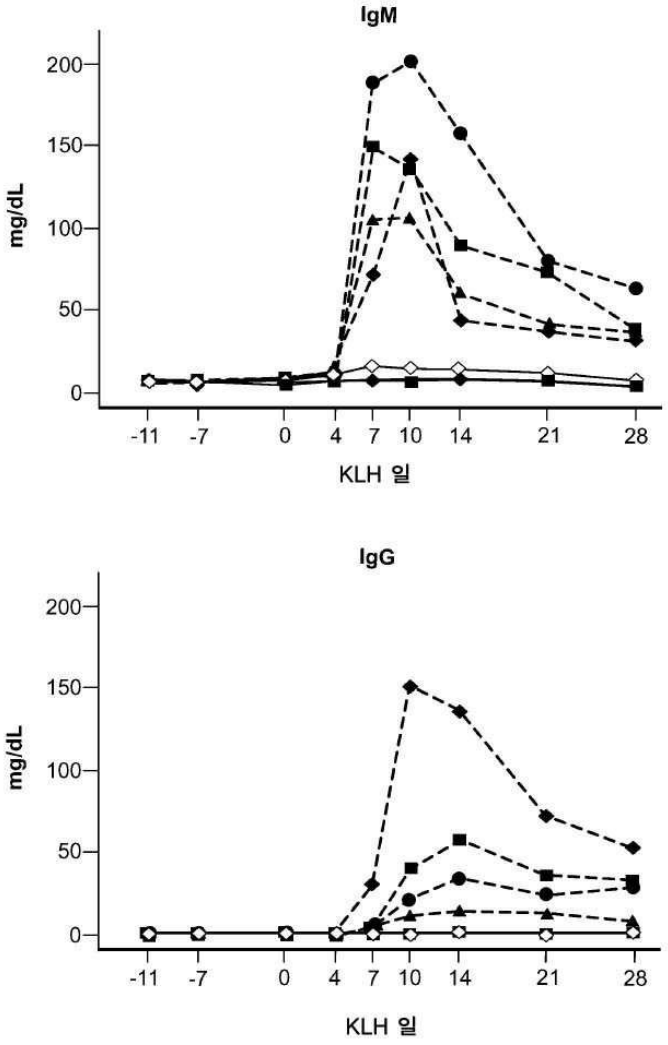
도면9a


최종 내시경 점수(제36일)
TCT #3017
MEDAI 합계 점수
15
10
5
0
***
*
**
IgG 대조군
15
5
1.5
0.5
항-p40
RBlow
Ab138 (mg/kg)
***IgG에 비해 p<0.001
일원 분산분석/던넷 사후 검정

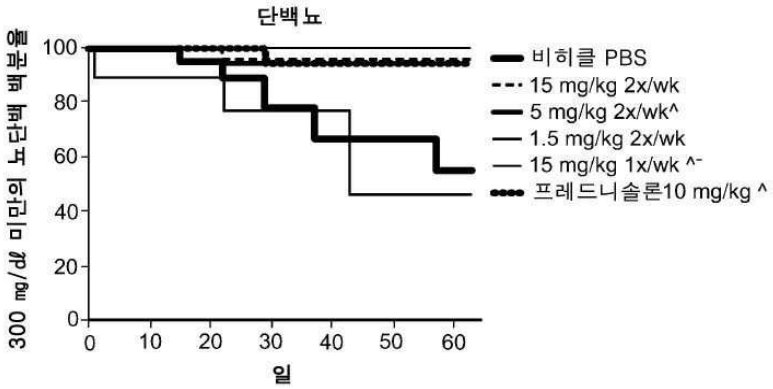
도면9b


점막 내의 IBA+ 대식구
LP+SM IBA1+인 점막의 %
20
15
10
5
0
**
***
IgG 대조군
15
5
1.5
0.5
항-p40
RBlow
항-CD40 (mg/kg)
***IgG에 비해 p<0.001
일원 분산분석/던넷 사후 검정

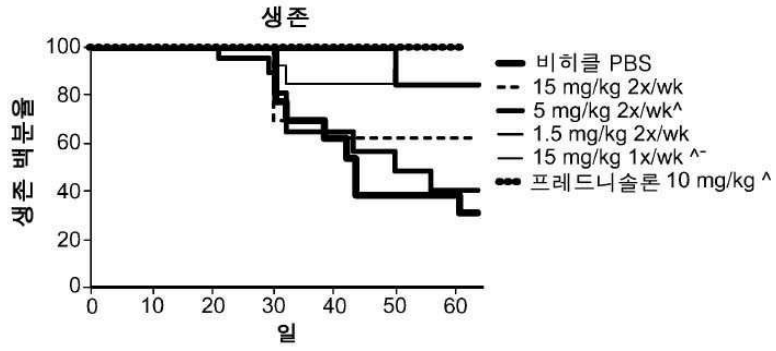
도면10


IgM
200
150
100
50
0
mg/dL
-11
-7
0
4
7
10
14
21
28
KLH 일
IgG
200
150
100
50
0
mg/dL
-11
-7
0
4
7
10
14
21
28
KLH 일

도면11a

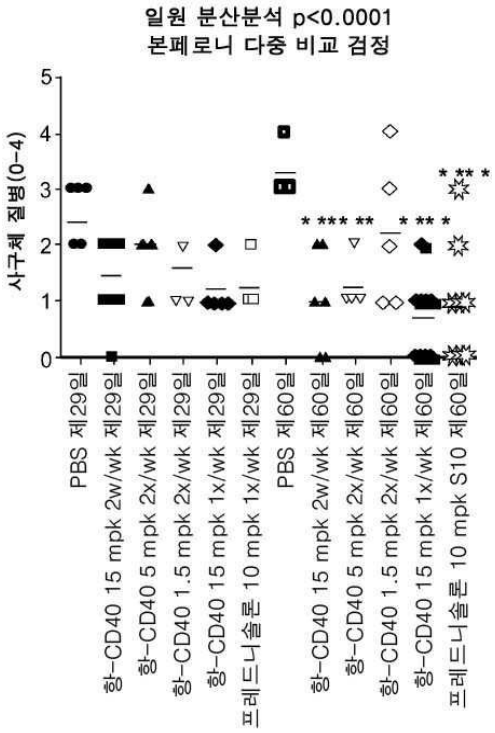

단백뇨
300 ㎎/㎗ 미만의 단백뇨 발생률
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
일
비히클 PBS
15 mg/kg 2x/wk
5 mg/kg 2x/wk^
1.5 mg/kg 2x/wk
15 mg/kg 1x/wk ^-
프레드니솔론10 mg/kg ^

도면11b

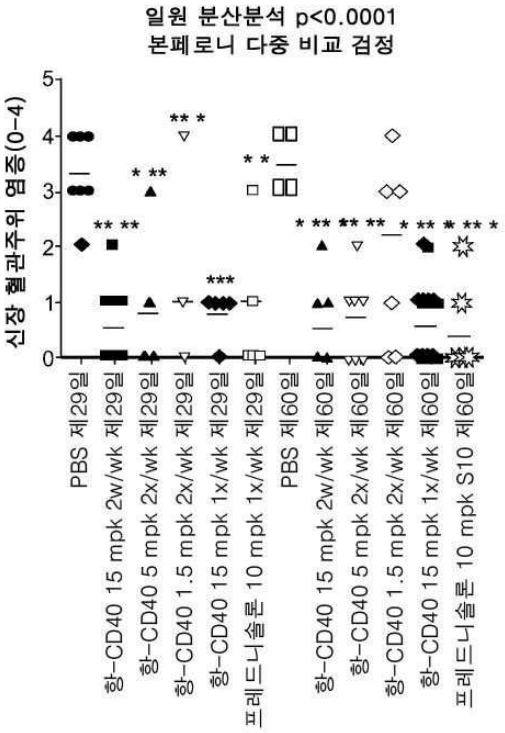


^생존 p 값 <0.05 로그 순위 맨텔 콕스 검정
-각각의 비히클 대조군에 비한 단백뇨

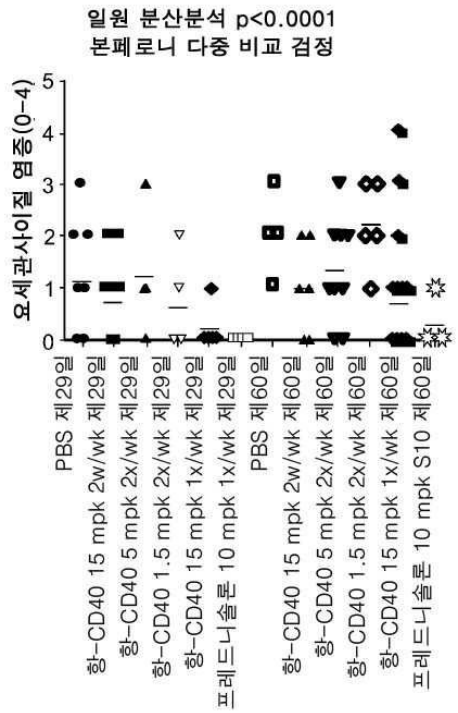
도면12a



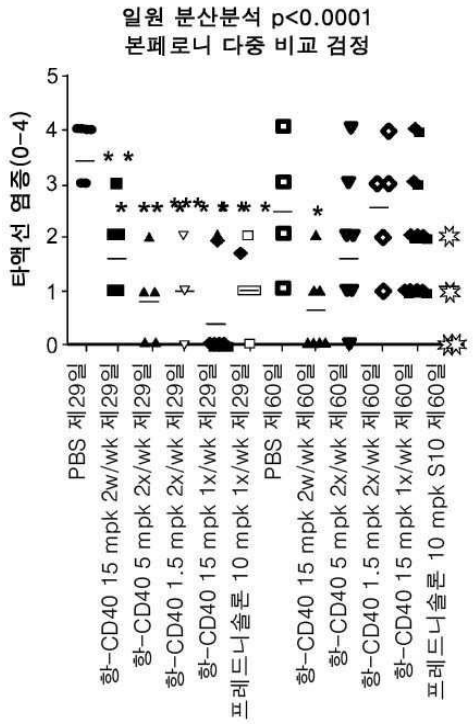
도면12b


일원 분산분석 p<0.0001
본페로니 다중 비교 검정
신장 혈관주위 염증(0-4)
PBS 제29일
항-CD40 15 mpk 2w/wk 제29일
항-CD40 5 mpk 2x/wk 제29일
항-CD40 1.5 mpk 2x/wk 제29일
항-CD40 15 mpk 1x/wk 제29일
프레드니솔론 10 mpk 1x/wk 제29일
PBS 제60일
항-CD40 15 mpk 2w/wk 제60일
항-CD40 5 mpk 2x/wk 제60일
항-CD40 1.5 mpk 2x/wk 제60일
항-CD40 15 mpk 1x/wk 제60일
프레드니솔론 10 mpk S10 제60일

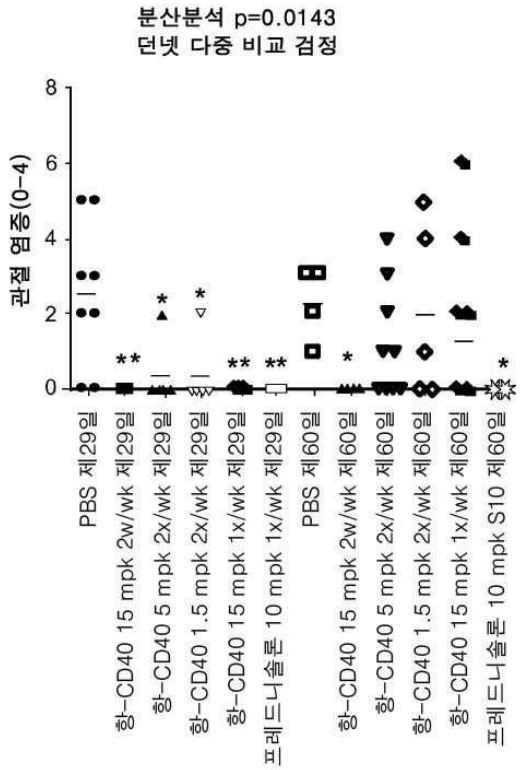
도면12c


일원 분산분석 p<0.0001
본페로니 다중 비교 검정
요세관사이질 염증(0-4)
PBS 제29일
항-CD40 15 mpk 2w/wk 제29일
항-CD40 5 mpk 2x/wk 제29일
항-CD40 1.5 mpk 2x/wk 제29일
항-CD40 15 mpk 1x/wk 제29일
프레드니솔론 10 mpk 1x/wk 제29일
PBS 제60일
항-CD40 15 mpk 2w/wk 제60일
항-CD40 5 mpk 2x/wk 제60일
항-CD40 1.5 mpk 2x/wk 제60일
항-CD40 15 mpk 1x/wk 제60일
프레드니솔론 10 mpk S10 제60일

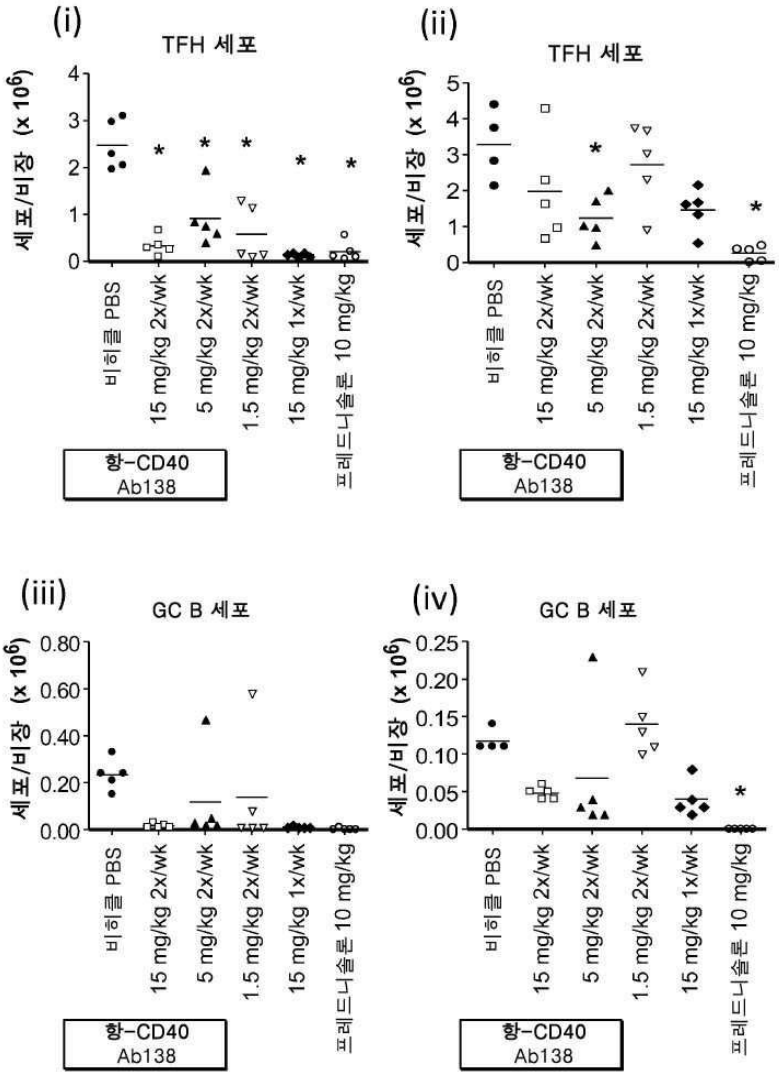
도면13a


일원 분산분석 p<0.0001
본페로니 다중 비교 검정
타액선 염증(0-4)
PBS 제29일
항-CD40 15 mpk 2w/wk 제29일
항-CD40 5 mpk 2x/wk 제29일
항-CD40 1.5 mpk 2x/wk 제29일
항-CD40 15 mpk 1x/wk 제29일
프레드니솔론 10 mpk 1x/wk 제29일
PBS 제60일
항-CD40 15 mpk 2w/wk 제60일
항-CD40 5 mpk 2x/wk 제60일
항-CD40 1.5 mpk 2x/wk 제60일
항-CD40 15 mpk 1x/wk 제60일
프레드니솔론 10 mpk S10 제60일

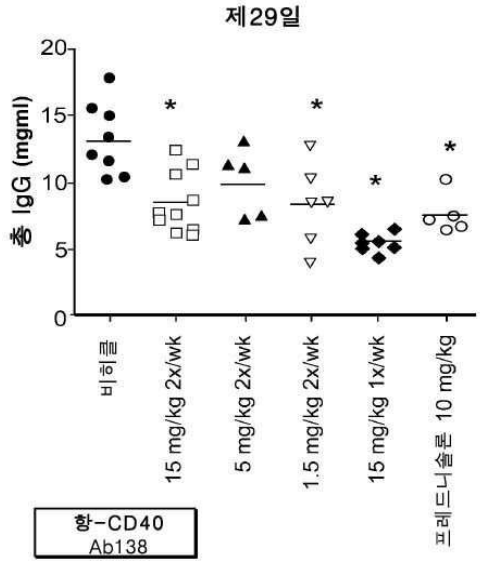
도면13b


분산분석 p=0.0143
던넷 다중 비교 검정
관절 염증(0-4)
PBS 제29일
항-CD40 15 mpk 2w/wk 제29일
항-CD40 5 mpk 2x/wk 제29일
항-CD40 1.5 mpk 2x/wk 제29일
항-CD40 15 mpk 1x/wk 제29일
프레드니솔론 10 mpk 1x/wk 제29일
PBS 제60일
항-CD40 15 mpk 2w/wk 제60일
항-CD40 5 mpk 2x/wk 제60일
항-CD40 1.5 mpk 2x/wk 제60일
항-CD40 15 mpk 1x/wk 제60일
프레드니솔론 10 mpk S10 제60일

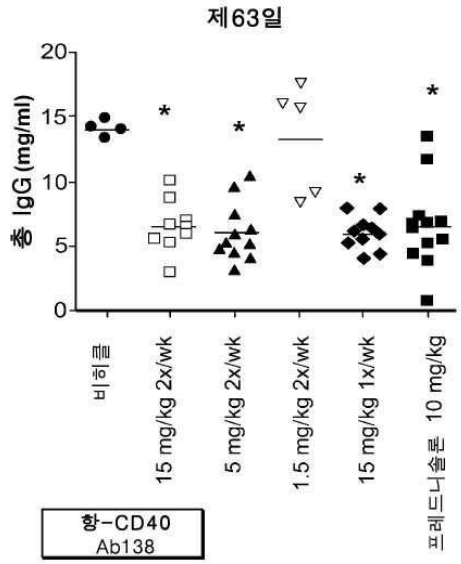
도면14


(i)
TFH 세포
세포/비장 (x 10^6)
비히클 PBS
15 mg/kg 2x/wk
5 mg/kg 2x/wk
1.5 mg/kg 2x/wk
15 mg/kg 1x/wk
프레드니솔론 10 mg/kg
항-CD40 Ab138
(ii)
TFH 세포
세포/비장 (x 10^6)
비히클 PBS
15 mg/kg 2x/wk
5 mg/kg 2x/wk
1.5 mg/kg 2x/wk
15 mg/kg 1x/wk
프레드니솔론 10 mg/kg
항-CD40 Ab138
(iii)
GC B 세포
세포/비장 (x 10^6)
비히클 PBS
15 mg/kg 2x/wk
5 mg/kg 2x/wk
1.5 mg/kg 2x/wk
15 mg/kg 1x/wk
프레드니솔론 10 mg/kg
항-CD40 Ab138
(iv)
GC B 세포
세포/비장 (x 10^6)
비히클 PBS
15 mg/kg 2x/wk
5 mg/kg 2x/wk
1.5 mg/kg 2x/wk
15 mg/kg 1x/wk
프레드니솔론 10 mg/kg
항-CD40 Ab138

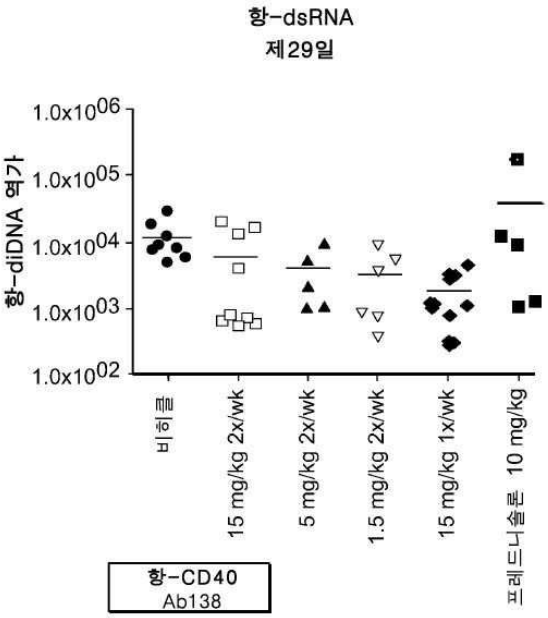
도면15a


제29일
총 IgG (mgml)
비히클
15 mg/kg 2x/wk
5 mg/kg 2x/wk
1.5 mg/kg 2x/wk
15 mg/kg 1x/wk
프레드니솔론 10 mg/kg
항-CD40 Ab138

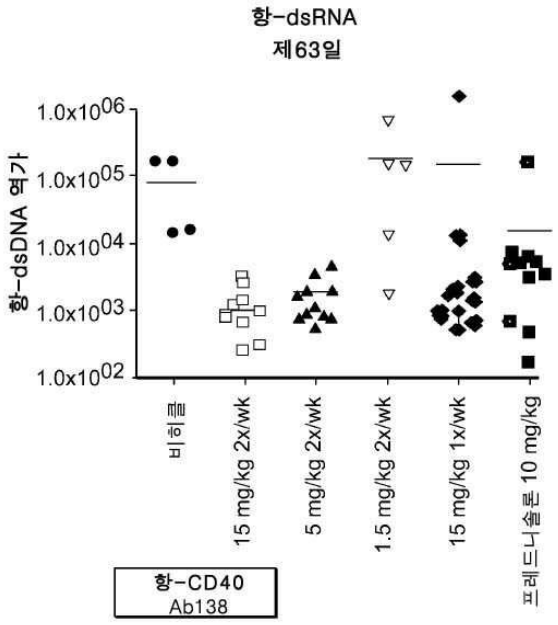
도면15b


제63일
총 IgG (mg/ml)
20
15
10
5
0
*
*
*
*
비히클
15 mg/kg 2x/wk
5 mg/kg 2x/wk
1.5 mg/kg 2x/wk
15 mg/kg 1x/wk
프레드니솔론 10 mg/kg
항-CD40
Ab138

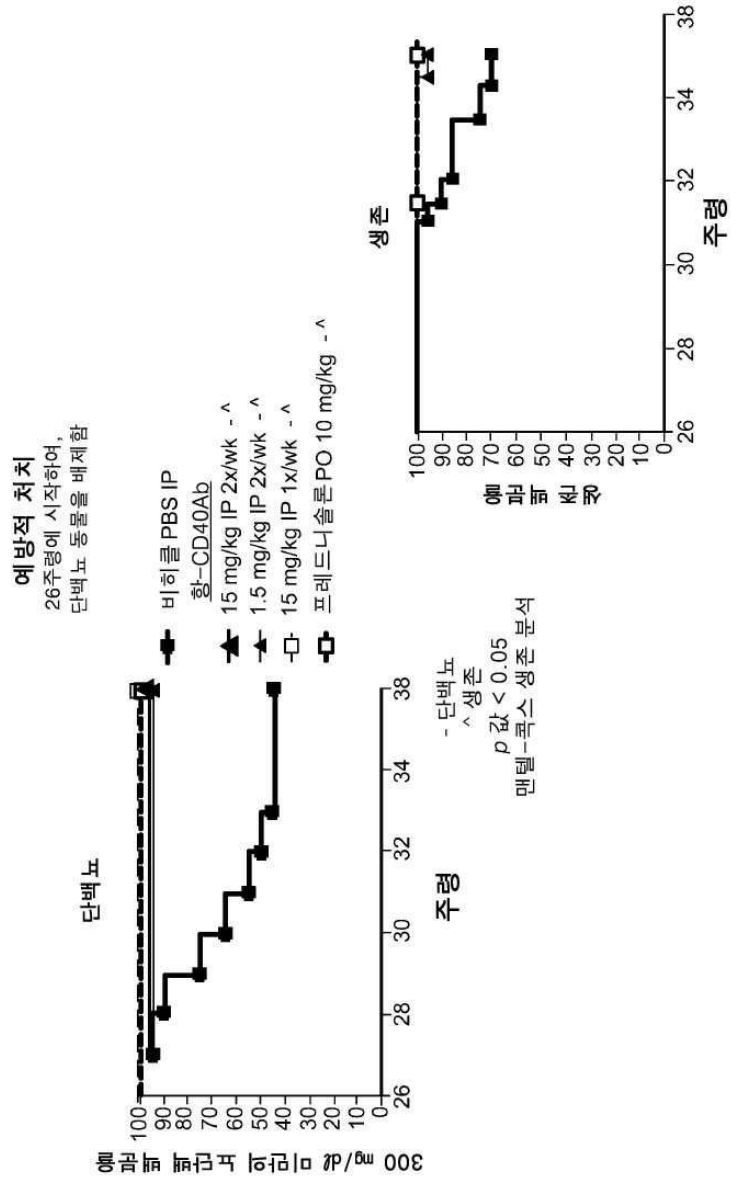
도면16a


항-dsRNA
제29일
항-dlDNA 역가
1.0x10^06
1.0x10^05
1.0x10^04
1.0x10^03
1.0x10^02
비히클
15 mg/kg 2x/wk
5 mg/kg 2x/wk
1.5 mg/kg 2x/wk
15 mg/kg 1x/wk
프레드니솔론 10 mg/kg
항-CD40
Ab138

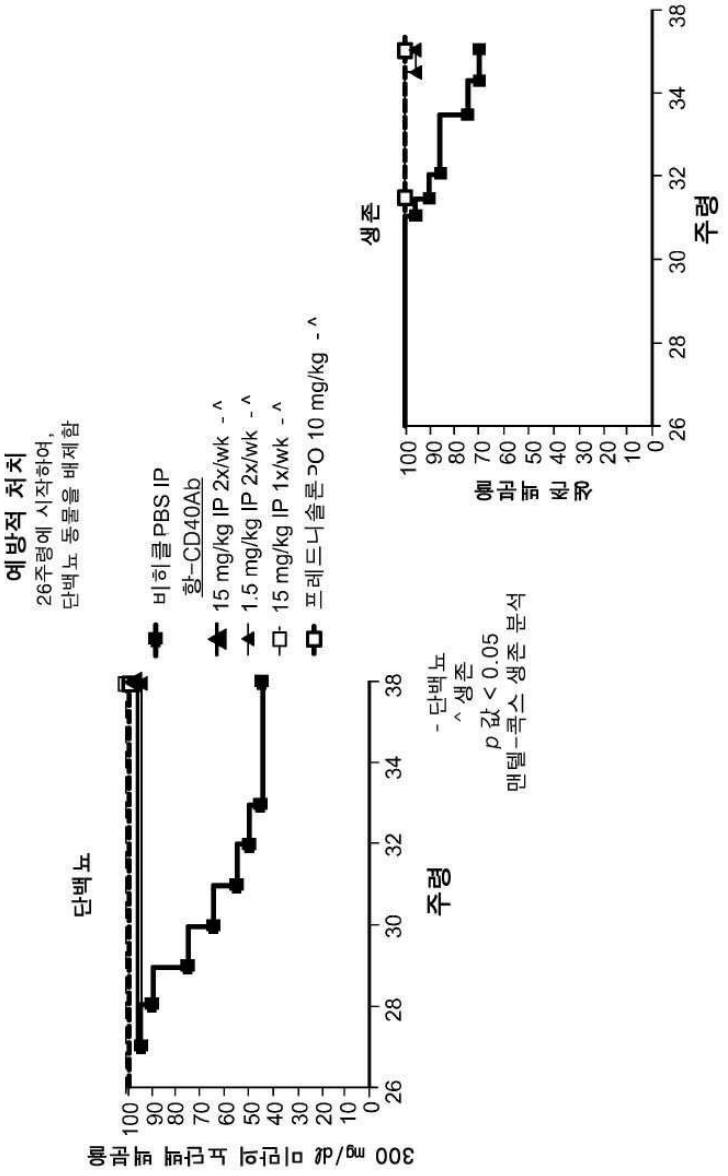
도면16b


항-dsRNA
제63일
항-dsDNA 역가
1.0x10^06
1.0x10^05
1.0x10^04
1.0x10^03
1.0x10^02
비히클
15 mg/kg 2x/wk
5 mg/kg 2x/wk
1.5 mg/kg 2x/wk
15 mg/kg 1x/wk
프레드니솔론 10 mg/kg
항-CD40
Ab138

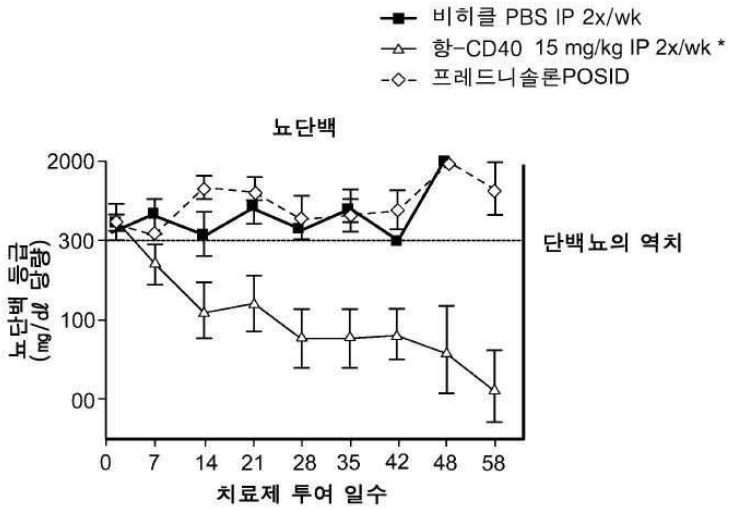
도면17a


예방적 처치
26주령에 시작하여,
단백뇨 동물을 배제함
비히클 PBS IP
항-CD40Ab
15 mg/kg IP 2x/wk - ^
1.5 mg/kg IP 2x/wk - ^
15 mg/kg IP 1x/wk - ^
프레드니솔론 PO 10 mg/kg - ^
단백뇨
300 mg/dl 미만의 요단백 백분율
주령
- 단백뇨
^ 생존
p 값 < 0.05
맨텔-콕스 생존 분석
생존
백분율 생존
주령

도면17b

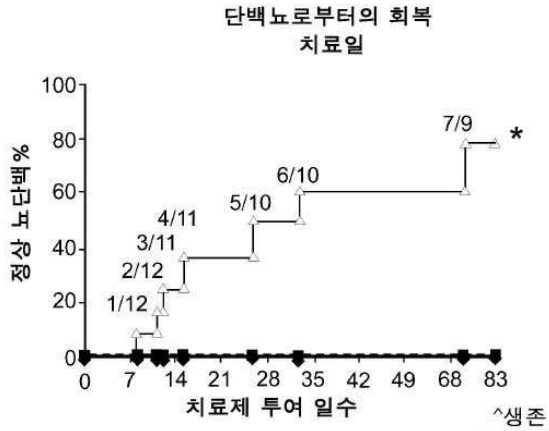

예방적 처치
26주령에 시작하여,
단백뇨 동물을 배제함
비히클 PBS IP
항-CD40Ab
15 mg/kg IP 2x/wk - ^
1.5 mg/kg IP 2x/wk - ^
15 mg/kg IP 1x/wk - ^
프레드니솔론 10 mg/kg - ^
단백뇨
300 mg/dl 미만의 단백 백분율
주령
생존
생존 백분율
주령
- 단백뇨
^ 생존
p 값 < 0.05
맨텔-콕스 생존 분석

도면18a



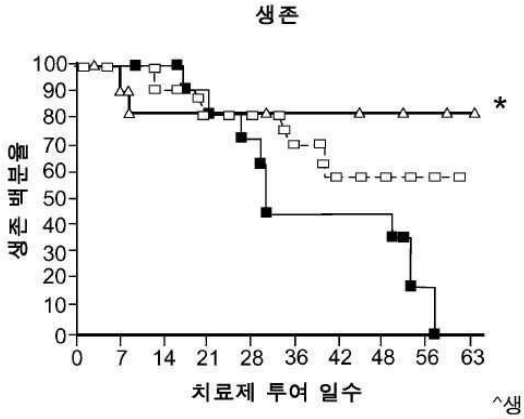
* $p<0.05$ 일원 분산분석
크루스칼-월리스 및
던넷 다중 비교 검정

도면18b



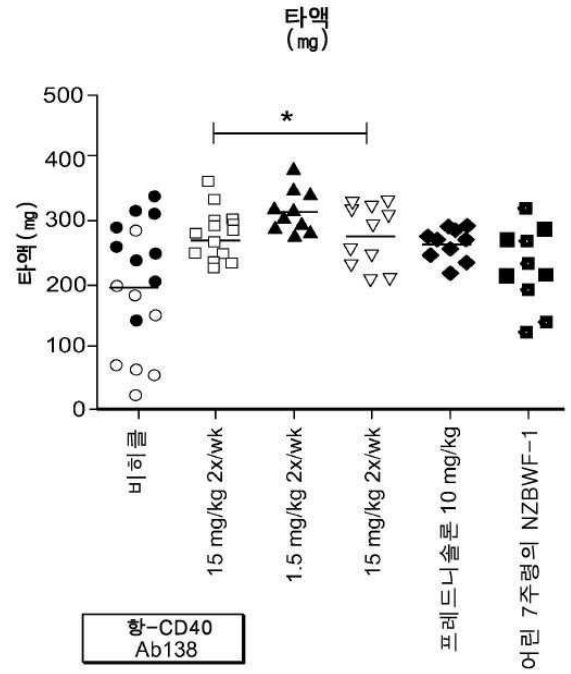
^생존 p 값 <0.05
맨텔 콕스 생존 분석

도면18c



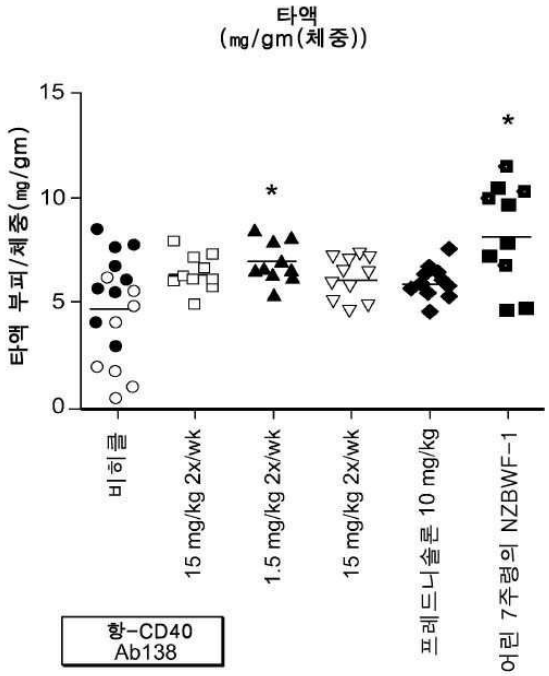
^생존 p 값 <0.05
맨텔 콕스 생존 분석

도면19a



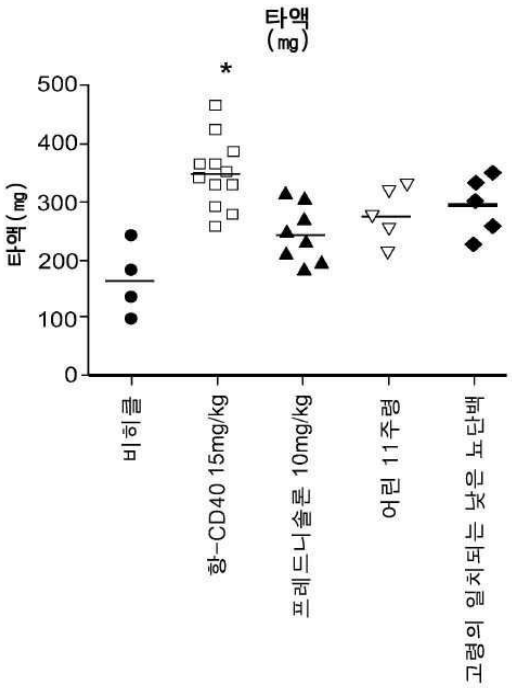
백색 비히클 원 = 단백뇨 마우스

도면19b

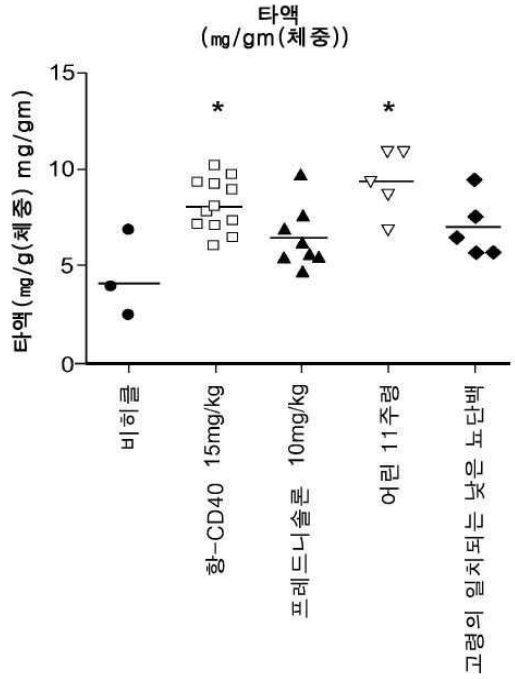


백색 비히클 원 = 단백뇨 마우스

도면20a



도면20b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ABBVIE, INC.

<120> ANTI-CD40 ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> 117813-10420

<150> US 62/168,425

<151> 2015-05-29

<160> 117

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
20 25 30

Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
35 40 45

Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
50 55 60

Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
65 70 75 80

Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
85 90 95

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
100 105 110

Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
115 120 125

Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145 150 155 160

Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln

165 170 175

Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu

180 185 190

Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile

195 200 205

Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn

210 215 220

Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp

225 230 235 240

Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His

245 250 255

Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser

260 265 270

Val Gln Glu Arg Gln

275

<210> 2

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 3

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 4
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

35 40 45
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 5
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 6

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met Asn

1 5 10

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 7

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 8

Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val

1 5

<210> 9

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 9

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

Glu Met Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ala Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn

85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 10

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Thr

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 11

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 12

Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 13

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn

85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 15

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 16

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 16

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn

85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 17

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Leu Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Thr

<210> 18

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr

20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn

85 90 95
Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 19

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 20

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 20

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 21

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 22

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 22

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Thr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 23

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 23

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Asp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 24

<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 24

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100 105 110
Thr Val Ser Ser

115

<210> 26

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Val Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 27

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Leu Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 28
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 28
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gly Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 29
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 29
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ile Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 30

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 30

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gln Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 31

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Trp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 32

<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 32
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Met Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 33
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 34

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg His Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 35

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Phe Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 36

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Tyr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 37

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ala Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 38

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Pro Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 39

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gly Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala

115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445
<210> 40
<211> 220
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 40

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95
Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

165 170 175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220
<210> 41
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gly Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 42

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gly Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 43

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 43

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Leu
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 44

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 44

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 45

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Thr Met His

1 5 10

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 46

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 47

<211> 7

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 47

Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr

1 5

<210> 48

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 48

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ser Val Ile Pro Gly

1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Tyr Leu Ile Tyr Arg Met Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95
Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 49
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 49
Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 50
Arg Met Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 51

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 52

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 52

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 53

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 53

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His

85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 54

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 54

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 55

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 55

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 56
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 56

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Tyr Leu Ile Tyr Arg Met Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His

85 90 95
Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 57

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 57

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Tyr Leu Ile Tyr Arg Met Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 58

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Thr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 59

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Asp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 60

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 61

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 61

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"
<400> 62
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Val Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 63
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 63
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Leu Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 64
<211> 17

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 64
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ile Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 65
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gln Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 66
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 66
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Trp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 67
<211> 17
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 67

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Met Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 68

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 69

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 69

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg His Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 70

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Phe Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 71

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 71

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Tyr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 72

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ala Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 73

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Pro Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 74

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Pro Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Thr

<210> 75

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 75

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gly Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe

65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 76

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 76

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95
Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110
Lys

<210> 77
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"
<400> 77
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Pro
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95
Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

consensus sequence"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Thr"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Thr"

<220><221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> /replace="His"

<400> 78

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met Asn

1 5 10

<210> 79

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

consensus sequence"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Asn"

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="Pro"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(6)

<223> /replace="Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Ser" or "Gly"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> /replace="Pro"

<220><221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> /replace="Asn"

<220><221> VARIANT

<222> (12)..(12)

<223> /replace="Asn"

<220><221> VARIANT

<222> (13)..(13)

<223> /replace="Gln"

<220><221> VARIANT

<222> (14)..(14)

<223> /replace="Lys"

<220><221> VARIANT

<222> (15)..(15)

<223> /replace="Phe"

<220><221> VARIANT

<222> (17)..(17)

<223> /replace="Asp"

<400> 79

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Asp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

consensus sequence"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Trp"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="Gly"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="Ser"

<400> 80

Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val

1 5

<210> 81

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu

1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe

20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val

35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys

50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser

65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu

85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100 105

<210> 82

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20 25 30

<210> 83

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

1 5 10

<210> 84

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 86

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly

1 5 10

<210> 87

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 88

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 89

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser

20 25 30

<210> 90

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His

1 5 10 15

<210> 91

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 92

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Tyr Gly Phe Ser Leu Ser
20 25 30

<210> 93

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 94

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 95

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 96

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 97

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 98

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 99

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 100

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Gly Val Pro Ser Arg Ile Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 101

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys

20

<210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 103

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 104

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys

20

<210> 105

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 106

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 107

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln

1 5 10 15

Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr

20 25 30

Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu

35 40 45

Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp

50 55 60

Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp
65 70 75 80
Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys
85 90 95
Glu Ser Cys Val
100

<210> 108

<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic consensus sequence"
<220><221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /replace="Arg"
<220><221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /replace="Lys"
<220><221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /replace="His"
<220><221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> /replace=" "
<220><221> VARIANT
<222> (12)..(12)
<223> /replace="Gly"
<220><221> VARIANT
<222> (13)..(13)
<223> /replace="Asn"

<220><221> VARIANT
<222> (14)..(14)

<223> /replace="Thr"

<220><221> VARIANT

<222> (17)..(17)

<223> /replace="Tyr"

<400> 108

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Thr

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

consensus sequence"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Arg"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="Met"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Leu"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Ala"

<400> 109

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

consensus sequence"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Met"

<220><221> VARIANT

<222

> (2)..(2)

<223> /replace="Gln"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="His"

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="Leu"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Glu"

<400> 110

Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 111

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Any amino acid other than Thr, Asp, Val, Leu, Ile or Met

<400> 111

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Xaa Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 112

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Any amino acid

<400> 112

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Xaa Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 113

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Any amino acid other than Pro

<400> 113

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Xaa Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Thr

<210> 114

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 115

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic 6xHis tag"

<400> 115

His His His His His His

1 5

<210> 116

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic consensus sequence"

<220><221> VARIANT

<222> (18)..(18)

<223> /replace="Met" or "Lys"

<220><221> VARIANT

<222> (24)..(24)

<223> /replace="Arg"

<220><221> VARIANT

<222> (27)..(27)

<223> /replace="Lys"

<220><221> VARIANT

<222> (31)..(31)

<223> /replace="His"

<220><221> VARIANT

<222> (33)..(33)

<223> /replace=" "

<220><221> VARIANT

<222> (35)..(35)

<223> /replace="Gly"

<220><221> VARIANT

<222> (36)..(36)

<223> /replace="Asn"

<220><221> VARIANT

<222> (37)..(37)

<223> /replace="Thr"

<220><221> VARIANT

<222> (40)..(40)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> VARIANT

<222> (56)..(56)

<223> /replace="Arg"

<220><221> VARIANT

<222> (57)..(57)

<223> /replace="Met"

<220><221> VARIANT

<222> (60)..(60)

<223> /replace="Leu"

<220><221> VARIANT

<222> (61)..(61)

<223> /replace="Ala"

<220><221> VARIANT

<222> (95)..(95)

<223> /replace="Met"

<220><221> VARIANT

<222> (96)..(96)

<223> /replace="Gln"

<220><221> VARIANT

<222> (97)..(97)

<223> /replace="His"

<220><221> VARIANT

<222> (98)..(98)

<223> /replace="Leu"

<220><221> VARIANT

<222> (99)..(99)

<223> /replace="Glu"

<400> 116

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 117

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

consensus sequence"

<220><221> VARIANT

<222> (27)..(27)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> VARIANT

<222> (30)..(30)

<223> /replace="Thr"

<220><221> VARIANT

<222> (31)..(31)

<223> /replace="Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (33)..(33)

<223> /replace="Thr"

<220><221> VARIANT

<222> (35)..(35)

<223> /replace="His"

<220><221> VARIANT

<222> (52)..(52)

<223> /replace="Asn"

<220><221> VARIANT

<222> (53)..(53)

<223> /replace="Pro"

<220><221> VARIANT

<222> (54)..(54)

<223

> /replace="Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (55)..(55)

<223> /replace="Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (56)..(56)

<223> /replace="Ser" or "Gly"

<220><221> VARIANT

<222> (57)..(57)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> VARIANT

<222> (58)..(58)

<223> /replace="Pro"

<220><221> VARIANT

<222> (59)..(59)

<223> /replace="Asn"

<220><221> VARIANT

<222> (61)..(61)

<223> /replace="Asn"

<220><221> VARIANT

<222> (62)..(62)

<223> /replace="Gln"

<220><221> VARIANT

<222> (63)..(63)

<223

> /replace="Lys"

<220><221> VARIANT

<222> (64)..(64)

<223> /replace="Phe"

<220><221> VARIANT

<222> (66)..(66)

<223> /replace="Asp"

<220><221> VARIANT

<222> (99)..(99)

<223> /replace="Trp"

<220><221> VARIANT

<222> (100)..(100)

<223> /replace="Gly"

<220><221> VARIANT

<222> (101)..(101)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> VARIANT

<222> (102)..(102)

<223> /replace="Ser"

<400> 117

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
            20                  25                  30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Asp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val
            100                 105                 110
Thr Val Ser Ser
        115
```