

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2020-0033309
(43) 공개일자 2020년03월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61P 43/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7005461
- (22) 출원일자(국제) 2018년07월24일
심사청구일자 2020년03월02일
- (85) 번역문제출일자 2020년02월25일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/043374
- (87) 국제공개번호 WO 2019/027721
국제공개일자 2019년02월07일
- (30) 우선권주장
62/539,821 2017년08월01일 미국(US)
62/637,609 2018년03월02일 미국(US)
- (71) 출원인
더 트러스티스 오브 콜롬비아 유니버시티 인 더
시티 오브 뉴욕
미국 10027 뉴욕주 뉴욕 웨스트 116 스트리트 535
로우 메모리얼 라이브러리 412
- (72) 발명자
렌츠쉬, 수잔나
미국 뉴욕 10463 브롱스 에이퍼티. 3씨 알링턴 애
비뉴 3220
- (74) 대리인
김정훈

전체 청구항 수 : 총 111 항

(54) 발명의 명칭 **아밀로이드 침착 질환의 치료를 위한 방법 및 조성물****(57) 요약**

키메라 항-아밀로이드 원섬유 항체를 포함하는 약학적 조성물을 투여함으로써 심장 침범을 갖는 아밀로이드 침착 질환을 치료하는 방법을 포함하여, 키메라(예를 들어, 마우스-인간) 항체를 사용한 아밀로이드 침착 질환의 치료를 위한 방법 및 약학적 조성물이 개시된다. 본 명세서의 방법은 심장 침범을 갖는 경쇄 아밀로이드 경쇄 아밀로이드중(ALA)으로 진단된 환자의 심근 기능을 치료 후 불과 3주 이내에 개선시킬 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

A61K 2039/55 (2013.01)

A61K 2039/57 (2013.01)

A61K 2039/58 (2013.01)

C07K 2317/14 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

아밀로이드 침착 질환의 치료가 필요한 인간 환자에서 아밀로이드 침착 질환을 치료하는 방법으로서, 서열번호 47을 포함하는 V_K 영역 및 서열번호 48을 포함하는 V_H 영역을 포함하는 키메라 마우스-인간 항체를, 약학적으로 허용되는 담체와 함께, 상기 아밀로이드 침착 질환을 치료하기에 유효한 용량으로 포함하는 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 아밀로이드 침착 질환이 원발성 아밀로이드증인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 키메라 항체가 약 500 mg/m^2 이하의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 키메라 항체의 유효 용량이 약 2,200 mg인, 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 키메라 항체의 유효 용량이 약 1 내지 50 mg/kg인, 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 원발성 아밀로이드증이 심장, 신장, 간, 폐, 위장관, 신경계, 근골격계, 연조직 및 피부로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 기관 또는 조직의 침범을 포함하는, 방법.

청구항 7

제2항에 있어서, 용량이 5주 이내에 치료 반응의 징후를 유발하는 데 유효한, 방법.

청구항 8

제2항에 있어서, 환자가 약 1주 이내에 치료 반응의 징후를 나타내는, 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 원발성 아밀로이드증이 심장의 침범을 포함하는, 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 용량이 키메라 항체의 투여 후 환자의 N-말단 프로 b형 나트륨이뇨 펩티드(N-terminal pro b-type natriuretic peptide: NT-프로BNP) 수준을 기준선 수준과 비교하여 적어도 약 30% 감소시키기에 유효한, 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 용량이 키메라 항체의 투여 후 환자의 N-말단 프로 b형 나트륨이뇨 펩티드(NT-프로BNP) 수준을 기준선 수준과 비교하여 적어도 약 40% 감소시키기에 유효한, 방법.

청구항 12

제7항에 있어서, 용량이, 항체의 투여 후 환자의 N-말단 프로 b형 나트륨이뇨 펩티드(NT-프로BNP) 수준이 약 9100 ng/L 미만인 되도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 13

제7항에 있어서, 용량이, 키메라 항체의 투여 후 환자의 N-말단 프로 b형 나트륨이뇨 펩티드(NT-프로BNP) 수준이 약 8000 ng/L 미만이 되도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 14

제7항에 있어서, 용량이, 키메라 항체의 투여 후 환자의 N-말단 프로 b형 나트륨이뇨 펩티드(NT-프로BNP) 수준이 약 7000 ng/L 미만이 되도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 15

제7항에 있어서, 용량이, 키메라 항체의 투여 후 환자의 N-말단 프로 b형 나트륨이뇨 펩티드(NT-프로BNP) 수준이 약 6000 ng/L 미만이 되도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 16

제7항에 있어서, 용량이, 키메라 항체의 투여 후 환자의 N-말단 프로 b형 나트륨이뇨 펩티드(NT-프로BNP) 수준이 약 5000 ng/L 미만이 되도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 17

제7항에 있어서, 환자가 키메라 항체의 투여 전에 뉴욕 심장 협회(New York Heart Association: NYHA) 기능 분류 클래스 II 또는 III으로 분류되고 키메라 항체의 투여 후 클래스 I로 분류되는, 방법.

청구항 18

제6항에 있어서, 원발성 아밀로이드증이 신장의 침범을 포함하는, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 용량이 환자의 뇨 단백질 수준을 항체의 투여 후 기준선 수준과 비교하여 적어도 약 30% 감소 시키기에 유효한, 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 용량이 환자의 뇨 단백질 수준을 항체의 투여 후 기준선 수준과 비교하여 적어도 약 40% 감소 시키기에 유효한, 방법.

청구항 21

제18항에 있어서, 용량이, 환자의 뇨 단백질이 항체의 투여 후 약 7000 mg/ 24시간 미만이 되도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 22

제18항에 있어서, 용량이, 환자의 뇨 단백질이 항체의 투여 후 약 6000 mg/24시간 미만이 되도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 23

제18항에 있어서, 용량이, 환자의 뇨 단백질이 항체의 투여 후 약 5000 mg/24시간 미만이 되도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 24

제18항에 있어서, 용량이, 환자의 뇨 단백질이 항체의 투여 후 약 4000 mg/24시간 미만이 되도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 25

제1항에 있어서, 항체의 투여가 어떠한 중대한 이상반응(serious adverse event)도 유발하지 않는, 방법.

청구항 26

아밀로이드 침착물을 갖는 것으로 의심되는 환자에서 아밀로이드 침착물의 존재를 검출하는 방법으로서, 서열번호 47을 포함하는 V_K 영역 및 서열번호 48을 포함하는 V_H 영역을 포함하고 검출가능한 표지가 부착된 키메라 마우스-인간 항체의 일정 양을 환자에게 투여하는 것을 포함하고, 상기 투여되는 항체의 양이 아밀로이드 침착물이 존재할 경우 아밀로이드 침착물이 검출되도록 하기에 충분한, 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 검출가능한 표지가 ^{124}I 인, 방법.

청구항 28

아밀로이드 침착 질환을 갖는 인간 환자의 치료 방법으로서, 키메라 11-1F4 항체의 치료적 유효량을 월 1회보다 덜 빈번하게 상기 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 29

제27항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체가 인간 IgG1로부터 유래된 불변 영역을 포함하는, 방법.

청구항 30

제27항에 있어서, 아밀로이드 침착 질환이 원발성 경쇄(AL) 아밀로이드증인, 방법.

청구항 31

제29항에 있어서, AL 아밀로이드증이 람다 경쇄 원섬유 응집체를 포함하는, 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 람다 경쇄 원섬유의 응집체의 존재가 키메라 11-1F4 항체의 투여 후 현저하게 감소되는, 방법.

청구항 33

제27항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체의 유효량이 500 mg/m^2 이하인, 방법.

청구항 34

제27항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체의 유효량이 약 2,200 mg인, 방법.

청구항 35

제27항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체의 유효량이 약 1 내지 50 mg/kg인, 방법.

청구항 36

제27항에 있어서, 양이, 환자가 5주 이내에 치료 반응의 징후를 나타내도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 37

제27항에 있어서, 양이, 환자가 약 1주 이내에 치료 반응의 징후를 나타내도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 38

제27항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체의 치료적 유효량이 2개월마다 1회 투여되는, 방법.

청구항 39

제27항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체의 치료적 유효량이 3개월마다 1회 투여되는, 방법.

청구항 40

제27항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체의 치료적 유효량이 4개월마다 1회 투여되는, 방법.

청구항 41

제27항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체의 치료적 유효량이 5개월마다 1회 투여되는, 방법.

청구항 42

제27항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체의 치료적 유효량이 6개월마다 1회 투여되는, 방법.

청구항 43

제27항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체의 치료적 유효량이 2년마다 1회 투여되는, 방법.

청구항 44

심장에 침범하는 원발성 경색(AL) 아밀로이드증을 갖는 환자의 치료 방법으로서, 상기 환자에 대한 N-말단 프로 b형 나트륨이노 펩티드(NT-프로BNP) 수준을 키메라 11-1F4 항체의 투여 후 처리 전 수준과 비교하여 적어도 30% 감소시키기에 충분한 용량의 키메라 11-1F4 항체를 상기 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 45

제43항에 있어서, AL 아밀로이드증이 불응성인, 방법.

청구항 46

제43항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체가 인간 IgG1로부터 유래된 불변 영역을 포함하는, 방법.

청구항 47

제43항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체가 월 1회 투여되는, 방법.

청구항 48

제43항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체가 주 1회 투여되는, 방법.

청구항 49

제43항에 있어서, 양이, 환자가 5주 이내에 치료 반응의 징후를 나타내도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 50

제43항에 있어서, 양이, 환자가 약 1주 이내에 치료 반응의 징후를 나타내도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 51

제43항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체의 유효 용량이 500 mg/m^2 이하인, 방법.

청구항 52

제43항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체의 유효 용량이 약 2,200 mg인, 방법.

청구항 53

제43항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체의 유효 용량이 약 1 내지 50 mg/kg인, 방법.

청구항 54

제43항에 있어서, 양이, 키메라 11-1F4 항체의 투여 후 적어도 약 6개월 동안 환자에서 NT-프로BNP의 감소가 지속되도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 55

신장에 침범하는 원발성 경쇄(AL) 아밀로이드증을 갖는 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 환자에 대한 단백뇨를 키메라 11-1F4 항체의 투여 후 처리 전 수준과 비교하여 적어도 40% 감소시키기에 유효한 용량의 키메라 11-1F4 항체를 상기 환자에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 56

제54항에 있어서, AL 아밀로이드증이 불응성인, 방법.

청구항 57

제55항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체가 인간 IgG1로부터 유래된 불변 영역을 포함하는, 방법.

청구항 58

제55항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체가 월 1회 투여되는, 방법.

청구항 59

제55항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체가 주 1회 투여되는, 방법.

청구항 60

제55항에 있어서, 용량이, 환자가 5주 이내에 치료 반응의 징후를 나타내도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 61

제55항에 있어서, 용량이, 환자가 약 1주 이내에 치료 반응의 징후를 나타내도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 62

제55항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체의 유효 용량이 500 mg/m^2 이하인, 방법.

청구항 63

제55항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체의 유효 용량이 약 2,200 mg인, 방법.

청구항 64

제55항에 있어서, 키메라 11-1F4 항체의 유효 용량이 약 1 내지 50 mg/kg인, 방법.

청구항 65

제55항에 있어서, 용량이 키메라 11-1F4 항체의 투여 후 적어도 약 6개월 동안 환자의 단백뇨 감소가 지속되도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 66

카파 또는 람다 경쇄 원섬유 응집체 침착물을 포함하는 원발성 아밀로이드증을 갖는 인간 환자에서 카파 및/또는 람다 경쇄 원섬유 응집체 침착물의 양을 감소시키는 방법으로서, 상기 환자에게

- a. 서열번호 47을 포함하는 V_K 영역,
- b. 서열번호 48을 포함하는 V_H 영역 및
- c. 인간 IgG1 불변 영역

을 포함하는 항체의 치료적 유효 원섬유 응집체 침착물 감소 용량을 투여하는 것을 포함하고,

상기 항체의 투여가 환자에서 카파 및/또는 람다 경쇄 원섬유 응집체 침착물의 양을 감소시키는, 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 원발성 아밀로이드증이 람다 경쇄 원섬유 응집체 침착물로 이루어지는, 방법.

청구항 68

제66항에 있어서, 원발성 아밀로이드증이 카파 경쇄 원섬유 응집체 침착물로 이루어지는, 방법.

청구항 69

제66항에 있어서, 원발성 아밀로이드증이 카파 및 람다 경쇄 원섬유 응집체 침착물로 이루어지는, 방법.

청구항 70

제66항에 있어서, 키메라 항체가 월 1회 투여되는, 방법.

청구항 71

제66항에 있어서, 키메라 항체가 주 1회 투여되는, 방법.

청구항 72

제66항에 있어서, 용량이, 환자가 5주 이내에 치료 반응의 징후를 나타내도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 73

제66항에 있어서, 용량이, 환자가 약 1주 이내에 치료 반응의 징후를 나타내도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 74

제66항에 있어서, 키메라 항체의 유효 용량이 500 mg/m^2 이하인, 방법.

청구항 75

제66항에 있어서, 키메라 항체의 유효 용량이 약 2,200 mg인, 방법.

청구항 76

제66항에 있어서, 키메라 항체의 유효 용량이 약 1 내지 50 mg/kg인, 방법.

청구항 77

제66항에 있어서, 용량이 환자의 기관 기능장애가 감소되도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 78

AL 아밀로이드증 환자에서 AL 아밀로이드증을 치료하는 방법으로서, 상기 환자에게 11-1F4 항체의 가변 영역을 포함하는 단클론 항체의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하고, 상기 항체가 뮤린 11-1F4가 아닌, 방법.

청구항 79

제77항에 있어서, 항체가 마우스-인간 키메라 항체인, 방법.

청구항 80

제77항에 있어서, 항체가 인간 IgG1 불변 영역을 포함하는, 방법.

청구항 81

심장 침범을 갖는 아밀로이드 경쇄 아밀로이드증(ALA)으로 진단된 환자에서 심근 기능을 개선시키는 방법으로서, 상기 환자에게

서열번호 53을 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) H1; 서열번호 53을 포함하는 CDRH2; 및 서열번호 54를 포함하는 CDRH3을 포함하는 가변 중쇄(V_H); 및

서열번호 49를 포함하는 CDRL1; 서열번호 50을 포함하는 CDRL2; 및 서열번호 51을 포함하는 CDRL3을 포함하는 가변 경쇄(V_K)

를 포함하는 인간화 또는 키메라 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 일정 양을 투여하는 것을 포함하고, 상기 양이 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여 후 약 3주 이내에 환자의 심근 기능을 개선시키기에 유효한, 방법.

청구항 82

제81항에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 인간화 항체인, 방법.

청구항 83

제81항에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 키메라 항체인, 방법.

청구항 84

제83항에 있어서, V_K 영역이 서열번호 47을 포함하고 V_H 영역이 서열번호 48을 포함하는, 방법.

청구항 85

제83항에 있어서, 항체가 인간 IgG1로부터 유래된 불변 영역을 포함하는, 방법.

청구항 86

제81항에 있어서, 심근 기능의 개선이 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여 후 적어도 3개월 동안 지속되는, 방법.

청구항 87

제81항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 3개월 기간 이내에 1회, 2회, 3회 또는 4회 이하로 투여되는, 방법.

청구항 88

제81항에 있어서, 심근 기능의 개선이 처리 전 포괄적 세로 압박변형률(Global Longitudinal Strain: GLS) 수준과 비교하여 GLS의 개선을 포함하는, 방법.

청구항 89

제81항에 있어서, 환자가 650pg/mL 초과와 처리 전 NT-프로BNP 수준을 나타내는, 방법.

청구항 90

제89항에 있어서, 양이, 환자가 처리 전 NT-프로BNP 수준과 비교하여 약 300 pg/mL 이상의 처리 후 NT-프로BNP 수준의 감소를 나타내도록 하기에 유효한, 방법.

청구항 91

제89항에 있어서, 심근 기능의 개선이 처리 전 NT-프로BNP 수준과 비교하여 약 30% 이상의 처리 후 NT-프로BNP 수준의 감소를 포함하는, 방법.

청구항 92

제81항에 있어서, 환자가 재발성 또는 불응성 ALA를 앓는, 방법.

청구항 93

제81항에 있어서, ALA가 추가로 경쇄 람다 아밀로이드 심장 침범을 갖는 것으로 특징지어지는, 방법.

청구항 94

제81항에 있어서, ALA가 추가로 경쇄 카파 아밀로이드 심장 침범을 갖는 것으로 특징지어지는, 방법.

청구항 95

제81항에 있어서, ALA가 혈액학적으로 제어되지 않는, 방법.

청구항 96

심장 침범을 갖는 경쇄 아밀로이드증(ALA)으로 진단된 환자에서 심근 기능의 개선을 모니터링하는 방법으로서, 심장 침범을 갖는 ALA로 진단된 환자에게 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 투여한 후 약 3주 이내에 상기 환자에서 심근 기능의 개선을 관찰하는 것을 포함하는 방법.

청구항 97

제96항에 있어서, 환자가 재발성 또는 불응성 ALA를 앓는, 방법.

청구항 98

제96항에 있어서, ALA가 추가로 경쇄 람다 아밀로이드 심장 침범을 갖는 것으로 특징지어지는, 방법.

청구항 99

제96항에 있어서, ALA가 추가로 경쇄 카파 아밀로이드 심장 침범을 갖는 것으로 특징지어지는, 방법.

청구항 100

환자에서 심장 침범을 갖는 아밀로이드 경쇄 아밀로이드증(ALA)을 치료하는 방법으로서, ALA가 혈액학적으로 제어되지 않으며, 상기 방법이 심장 침범 및 혈액학적 제어의 결여를 특징으로 하는 ALA를 갖는 상기 환자에게

서열번호 52를 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) H1; 서열번호 53을 포함하는 CDRH2; 및 서열번호 54를 포함하는 CDRH3을 포함하는 가변 중쇄(V_H); 및

서열번호 49를 포함하는 CDRL1; 서열번호 50을 포함하는 CDRL2; 및 서열번호 51을 포함하는 CDRL3을 포함하는 가변 경쇄(V_K);

를 포함하는 인간화 또는 키메라 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 101

제100항에 있어서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 인간화 항체인, 방법.

청구항 102

제100항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 키메라 항체인, 방법.

청구항 103

제102항에 있어서, V_K 영역이 서열번호 47을 포함하고 V_H 영역이 서열번호 48을 포함하는, 방법.

청구항 104

제102항에 있어서, 항체가 인간 IgG1로부터 유래된 불변 영역을 포함하는, 방법.

청구항 105

제100항에 있어서, 화학치료 화합물을 환자에게 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 106

제100항에 있어서, 혈액학적 제어의 결여가 적어도 아밀로이드 전구체 단백질의 순환 수준을 포함하고, 대상체 혈청 중의 침범된 경쇄와 침범되지 않은 유리 경쇄 간의 차이가 40 mg/L 초과인, 방법.

청구항 107

제100항에 있어서, 환자가 처리 전 포괄적 세로 압박변형률(Global Longitudinal Strain: GLS) 수준과 비교하여 GLS의 개선을 나타내는, 방법.

청구항 108

제107항에 있어서, GLS의 개선이 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 투여된 후 3주 이내에 발생하는, 방법.

청구항 109

제107항에 있어서, GLS의 개선이 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여 후 적어도 3개월 동안 지속되는, 방법.

청구항 110

제100항에 있어서, ALA가 추가로 경쇄 램다 아밀로이드 심장 침범을 갖는 것으로 특징지어지는, 방법.

청구항 111

제100항에 있어서, ALA가 추가로 경쇄 카파 아밀로이드 심장 침범을 갖는 것으로 특징지어지는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] EFS-WEB에 의해 제출된 서열목록에 대한 언급
- [0002] 크기가 17.4 kb인 "8441-0009-1-ST25"라는 명칭의 서열목록의 ASCII 텍스트 파일의 내용은 2018년 6월 15일에 작성되었으며 본 출원과 함께 EFS-Web을 통해 전자적으로 제출되었고, 본 명세서에 그 전문이 참조로 포함된다.
- [0003] 정부의 권리
- [0004] 본 발명은 미국 식품의약국에 의해 부여된 승인번호 FD-U-005110 하의 미국 정부의 지원으로 이루어졌다. 따라서, 미국 정부는 본 명세서에 설명되고 청구된 본 발명에 대한 특정 권리를 가질 수 있다.
- [0005] 우선권 청구
- [0006] 본 출원은 2017년 8월 1일자로 출원된 미국 가특허 출원 제62/539,821호 및 2018년 3월 2일자로 출원된 미국 가특허 출원 제62/637,609호의 우선권을 주장하며, 이들 둘 다는 본 명세서에 그 전문이 참조로 포함된다.
- [0007] 발명의 분야
- [0008] 본 개시내용은 아밀로이드 침착 질환, 특히 원발성(AL) 아밀로이드증을 치료하는 데 유용한 인간화 및 키메라(예: 마우스-인간) 항체 및 이의 항원-결합 단편, 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물 및 상기 항체 및 약학적 조성물을 사용하여 아밀로이드 침착 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 개시내용은 추가로 아밀로이드 원섬유(fibril)-반응성 항체를 이용하여 아밀로이드 침착 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 개시내용은 심장 침범(cardiac involvement)(즉, 심장 내 또는 주위의 아밀로이드 침착)을 포함하는 아밀로이드 경쇄 아밀로이드증(amyloid light chain amyloidosis: ALA)으로 진단된 환자에서 심근 기능을 개선시키는 방법에 관한 것이다. 이러한 환자는 경쇄 램다 아밀로이드 또는 경쇄 카파 아밀로이드를 포함하는 ALA 침착물을 가질 수 있다. 또한, 환자는 혈액학적으로 제어되거나 제어되지 않는 질환을 가질 수 있다.

배경 기술

- [0009] 하기 설명은 단순히 독자가 본 개시내용을 이해하는 것을 돕기 위해 제공되고, 본 개시내용에 대한 선행 기술을 설명하거나 구성하는 것으로 인정되지 않는다.
- [0010] 천연 항체는 일반적으로 2개의 동일한 경쇄와 2개의 동일한 중쇄로 이루어진 약 150,000달톤의 이종사량체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 이황화 결합에 의해 중쇄에 연결되는 한편, 중쇄 사이의 추가 이황화 결합의 수는 상이한 항체 이소타입(isotype)에 따라 다양하다. 가장 간단한 이소타입은 단지 2개의 경쇄와 2개의 중쇄를 포함하는 IgG로서, 여기서 2개의 중쇄는 2개의 이황화 결합에 의해 연결된다. 각각의 중쇄는 하나의 말단에 가변 도메인(V_H)과 함께 다수의 인접한 불변 도메인을 갖는다. 각각의 경쇄는 하나의 말단에 가변 도메인(V_L)을

갖고 이의 다른 말단에 불변 도메인을 갖는다. 항체 내의 경쇄 및 중쇄의 각 가변 도메인은 상보성 결정 영역 ("CDR") 또는 초가변 영역이라 불리는 3개의 세그먼트를 포함한다. 경쇄의 각 CDR은 인접한 중쇄의 상응하는 CDR과 함께 항체의 항원-결합 부위를 형성한다. 경쇄에는 이의 불변 영역에 따라 2가지 주요 유형, κ 및 λ 이 있다. κ 경쇄와 λ 경쇄 둘 다는 상이한 중쇄 유형 중 어떠한 것과도 조합될 수 있다.

[0011] 원발성 아밀로이드증으로도 불리는 아밀로이드 경쇄 아밀로이드증(AL 아밀로이드증, AL 또는 ALA)은 미국에서 가장 흔한 형태의 전신 아밀로이드증이다. "아밀로이드증"이란 용어는 공통의 특징, 즉 기관 및 조직 내의 병리학적 불용성 원섬유 단백질의 세포외 침착을 공유하는 질환의 군집을 지칭한다(Rodney, et al. - *NEJM*, 25: 898). 아밀로이드증은 응집되어 기관과 조직 내에 불용성 아밀로이드 침착물을 형성하는 비정상적인 단백질 섬유의 생성을 유발하는 사람의 항체-생산 세포의 기능장애에 의해 유발된다. 아밀로이드증의 유형은 원섬유 침착물을 형성하는 전구체 단백질의 성질에 의해 결정된다. 원발성 아밀로이드증에서 원섬유는 면역글로불린 경쇄의 단편을 포함하고, 2차 아밀로이드증에서 원섬유는 아밀로이드 A 단백질을 포함한다. 아밀로이드증의 현대적 분류는 원섬유 침착물을 형성하는 전구체 혈장 단백질의 성질에 기초한다.

[0012] 전구체 혈장 단백질들은 다양하고 관련이 없다. 그럼에도 불구하고, 모든 전구체 침착물은 공통의 전형적인 β -폴리티드 쉬트(β -pleated sheet) 입체배치를 공유하는 아밀로이드 침착물을 생성하는데, 이는 원섬유 침착물의 전형적인 염색 특성을 담당한다. 아밀로이드증 발병의 마지막 단계는 환자의 기관에 아밀로이드 원섬유가 침착되는 것이다. 아밀로이드증의 사망률은 높으며 현재 5년 생존율은 약 28%이다.

[0013] 현재까지, AL의 치료는 종래의 또는 고용량 세포독성 화학요법을 통해 기능장애 세포를 공격함으로써 아밀로이드 생성(amyloidogenic) 전구체 경쇄의 합성을 감소시키는 것을 지향하였다. 이러한 치료에는 2가지 단점이 있다. 첫째, 원섬유 침착물은 상당한 침착이 일어날 때까지 흔히 무증상성이다. 따라서, 상당량의 침착물이 이미 발생하기 전에는 치료가 수행되지 않을 수 있다. 둘째, 이러한 치료는 기껏해야 전구체 비정상 단백질의 생성을 정지시키는 데만 효과적이고 기존 침착물을 제거하지 않기 때문에, AL 환자에 대한 예후는 병리학적 침착물의 지속성(또는 진행성)으로 인해 매우 열악하게 유지된다(Solomon, et al. - *Int. J. Exp. Clin. Invest.* 2:269).

[0014] 결과적으로, 아밀로이드 침착물의 치료적 표적화 및 제거는 의학적 관심이 큰 영역이다. 그러나, FDA는 현재까지 어떠한 이러한 치료 제품도 승인하지 않았으므로, 여전히 충족되지 않은 상당한 의학적 요구가 있다. 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법은 이러한 요구를 충족시킨다.

발명의 내용

[0015] 본 명세서에서는 아밀로이드 침착 질환, 특히 원발성(AL) 아밀로이드증을 치료하기 위한 조성물 및 방법이 설명된다. 개시된 조성물 및 방법은 면역계에 의해 제거되도록 아밀로이드 원섬유를 표적화하기 위해 아밀로이드 원섬유(예를 들어, 아밀로이드 경쇄 원섬유)에 특이적으로 결합하는 인간화 또는 키메라 항체 또는 이의 단편을 사용한다.

[0016] 일 측면에서, 본 조성물 및 방법은 아밀로이드 침착 질환, 특히 원발성(ALA) 아밀로이드증의 치료에 유용한 인간화 또는 키메라 항체(예를 들어, 마우스-인간 키메라 항체)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 개시된 항체는 서열번호 47을 포함하는 V_K 영역 및 서열번호 48을 포함하는 V_H 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 인간 IgG1로부터 유래된 불변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 이의 뮤린(murine) 등가물보다 높은 친화도로 아밀로이드 원섬유에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체는 서열번호 36의 V_K 영역 및 서열번호 35의 V_H 영역을 포함하는 마우스 항체보다 더 높은 친화도로 아밀로이드 원섬유의 β -폴리티드 쉬트 입체배치에 의해 발현되는 에피토프에 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체는 생체내에서 카파 및 람다 아밀로이드 원섬유에 결합한다.

[0017] 다른 측면에서, 본 개시내용은 개시된 인간화 또는 키메라 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 방법 및 약학적 조성물에서 유용한 키메라 항체는 벡터 작제물 11-1F4VK.pKN100 및 11-F4VH.pG1D200을 포유동물 세포에서 공동형질감염시키거나 수퍼 벡터 작제물 pG1KD200-11-1F4를 포유동물 세포에서 형질감염시켜 생성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 벡터 작제물 11-1F4VK.pKN100 및 11-F4VH.pG1D200의 공동형질 감염 또는 수퍼벡터 작제물 pG1KD200-11-1F4의 형질감염은 COS 세포에서 일어난다. 생성된 항체는 "키메라 11-1F4 항체"라 지정된다.

- [0019] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 원발성(AL) 아밀로이드증과 같은 아밀로이드 침착 질환의 치료 또는 개선이 필요한 인간 환자에게 아밀로이드 침착 질환 및/또는 상기 질환의 증상을 치료하거나 개선시키기에 유효한 양으로 개시된 항체 또는 단편 중 적어도 하나의 치료적 유효량을 투여함으로써 이러한 치료가 필요한 인간에서 원발성(AL) 아밀로이드증과 같은 아밀로이드 침착 질환을 치료하거나 개선시키는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 개시된 항체는 약학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있다.
- [0020] 일부 실시형태에서, 아밀로이드 침착 질환은 원발성 아밀로이드증이다. 일부 실시형태에서, 항체는 약 500 mg/m^2 이하의 용량으로 투여되는 한편, 일부 실시형태에서 키메라 11-1F4 항체의 유효 용량은 약 2,200 mg이며, 일부 실시형태에서 유효량은 약 1 내지 50 mg/kg이다.
- [0021] 일부 실시형태에서, 원발성 아밀로이드증은 심장, 신장, 간, 폐, 위장관, 신경계, 근육골격계, 연조직 및 피부로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 기관 또는 조직의 침범을 포함한다.
- [0022] 일부 실시형태에서, 아밀로이드증이 심장에 영향을 주는 경우에, 환자의 N-말단 프로 b형 나트륨이뇨 펩티드(N-terminal pro b-type natriuretic peptide: NT-프로BNP) 수준은 항체의 투여 후 기준선 수준과 비교하여 적어도 약 30% 또는 약 40% 감소할 수 있다. 일부 실시형태에서, 환자의 N-말단 프로 b형 나트륨이뇨 펩티드(NT-프로BNP) 수준은 항체의 투여 후 약 9100, 약 8000, 약 7000, 약 6000 또는 약 5000 ng/L 미만으로 감소될 수 있다. 일부 실시형태에서, 환자는 항체의 투여 전에 뉴욕 심장 협회(New York Heart Association: NYHA) 기능 분류 클래스 II 또는 III으로 분류되고 항체의 투여 후에 클래스 I로 분류된다.
- [0023] 일부 실시형태에서, 아밀로이드증이 신장에 영향을 미치는 경우, 환자의 뇨 단백질 수준은 항체의 투여 후 기준선 수준과 비교하여 적어도 약 30% 또는 약 40% 감소할 수 있다. 일부 실시형태에서, 환자의 뇨 단백질은 항체의 투여 후 약 7000, 약 6000, 약 5000 또는 약 4000 mg/24시간 미만으로 감소할 수 있다.
- [0024] 일부 실시형태에서, 항체의 투여는 어떠한 중대한 이상반응(serious adverse event)도 유발하지 않는다.
- [0025] 본 개시내용은 심장 침범을 갖는 ALA를 치료하는 방법을 제공한다. 개시된 방법은 매우 짧은 기대 수명으로 인해 치료가 불가능한 것으로 간주되는 환자 집단에서 치료 시작 후 약 3주 이내에 유리한 임상 결과를 제공할 수 있다.
- [0026] 일 측면에서, 본 개시내용은 심장 침범을 갖는 아밀로이드 경색 아밀로이드증(ALA)으로 진단된 환자에서 심근 기능을 개선시키는 방법으로서, 심장 침범을 갖는 ALA로 진단된 환자에게 서열번호 52를 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) H1; 서열번호 53을 포함하는 CDRH2; 및 서열번호 54를 포함하는 CDRH3을 포함하는 가변 중쇄(V_H); 및 서열번호 49를 포함하는 CDRL1; 서열번호 50을 포함하는 CDRL2; 및 서열번호 51을 포함하는 CDRL3을 포함하는 가변 경쇄(V_K)를 포함하는 인간화 또는 키메라 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 투여하고, 이를 통해 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여 후 약 3주 이내에 환자의 심근 기능을 개선시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0027] 다른 측면에서, 본 개시내용은 심장 침범을 갖는 경색 아밀로이드증(ALA)으로 진단된 환자에서 심근 기능의 개선을 모니터링하는 방법으로서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 심장 침범을 갖는 ALA로 진단된 환자에게 투여한 후 약 3주 이내에 상기 환자에서 심근 기능의 개선을 관찰하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0028] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 환자에서 심장 침범을 갖는 아밀로이드 경색 아밀로이드증(ALA)을 치료하는 방법으로서, ALA가 혈액학적으로 제어되지 않으며, 상기 방법이 심장 침습 및 혈액학적 제어의 결여를 특징으로 하는 ALA를 갖는 환자에게 서열번호 52를 포함하는 상보성 결정 영역(CDR) H1; 서열번호 53을 포함하는 CDRH2; 및 서열번호 54를 포함하는 CDRH3을 포함하는 가변 중쇄(V_H); 및 서열번호 49를 포함하는 CDRL1; 서열번호 50을 포함하는 CDRL2; 및 서열번호 51을 포함하는 CDRL3을 포함하는 가변 경쇄(V_K)를 포함하는 인간화 또는 키메라 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0029] 상기 측면의 일부 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간화 항체일 수 있는 한편, 일부 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 키메라 항체일 수 있다.
- [0030] 상기 측면의 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편의 V_K 영역은 서열번호 47을 포함할 수 있고 V_H 영역은 서열번호 48을 포함할 수 있다.

- [0031] 상기 측면의 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 IgG1로부터 유래된 불변 영역을 포함할 수 있다.
- [0032] 상기 측면의 일부 실시형태에서, 방법은 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여 후 적어도 3개월 동안 지속되는 심근 기능의 개선을 제공할 수 있다. 일부 실시형태에서, 개선은 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월 또는 12개월 이상 동안 지속될 수 있다.
- [0033] 상기 측면의 일부 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 3개월 기간 이내에 1회, 2회, 3회 또는 4회 이하로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 적은 횟수로, 예를 들어 2개월마다 1회 또는 3개월마다 1회 투여될 수 있다.
- [0034] 상기 측면의 일부 실시형태에서, 방법은 처리 전 포괄적 세로 압박변형률(Global Longitudinal Strain: GLS) 수준과 비교하여 GLS의 개선을 포함할 수 있는 심근 기능의 개선을 제공한다.
- [0035] 상기 측면의 일부 실시형태에서, 환자는 650 pg/mL 초과와 처리 전 NT-프로BNP 수준을 나타낸다.
- [0036] 상기 측면의 일부 실시형태에서, 항체 또는 항체 단편의 치료적 유효 용량 또는 유효량은 처리 전 NT-프로BNP 수준과 비교하여 환자의 처리 후 NT-프로BNP 수준을 약 300 pg/mL 이상 감소시키기에 유효하다. 일부 실시형태에서, NT-프로BNP의 감소는 약 400, 약 500, 약 600, 약 700, 약 800, 약 900 또는 약 1000 pg/mL 또는 그 이상일 수 있다.
- [0037] 상기 측면의 일부 실시형태에서, 방법은 처리 전 NT-프로BNP 수준과 비교하여 약 30% 이상의 처리 후 NT-프로BNP 수준의 감소를 포함할 수 있는 심근 기능의 개선을 제공한다.
- [0038] 상기 측면의 일부 실시형태에서, 환자는 재발성 또는 불응성 ALA를 앓을 수 있다.
- [0039] 상기 측면의 일부 실시형태에서, ALA는 추가로 경쇄 람다 아밀로이드 심장 침범을 갖는 것으로 특징지어질 수 있는 한편, 일부 실시형태에서, ALA는 추가로 경쇄 카파 아밀로이드 심장 침범을 갖는 것으로 특징지어질 수 있다.
- [0040] 상기 측면의 일부 실시형태에서, ALA는 혈액학적으로 제어되지 않을 수 있다. 예를 들어, 대상체의 혈청 중 침범된 경쇄와 침범되지 않은 유리 경쇄 간의 차이는 40 mg/L 초과일 수 있거나 대상체는 그의 혈액 또는 혈청 중에 검출가능한 수준의 독성 아밀로이드 전구체 단백질을 가질 수 있다.
- [0041] 상기 측면의 일부 실시형태에서, 방법은 화학치료 화합물을 환자에게 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다.
- [0042] 다른 측면에서, 본 개시내용은 표지된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 투여하고 아밀로이드 침착 질환에 걸린 것으로 의심되는 환자에서 표지의 존재를 검출함으로써 상기 환자에서 아밀로이드 침착 질환을 검출하는 방법이다. 일부 실시형태에서, 표지는 ¹²⁴I와 같은 방사성 표지일 수 있지만, 다른 종류의 표지가 당업자에 의해 쉽게 구상될 수 있다.
- [0043] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 아밀로이드 침착 질환을 갖는 환자를 치료하는 방법으로서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 월 1회보다 덜 빈번하게 상기 환자에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 치료는 환자에게 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체 또는 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 2개월마다 1회, 3개월마다 1회, 4개월마다 1회, 5개월마다 1회, 6개월마다 1회, 7개월마다 1회, 8개월마다 1회, 9개월마다 1회, 10개월마다 1회, 11개월마다 1회 또는 1년마다 1회만 투여하도록 요구할 수 있다.
- [0044] 이러한 측면의 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체는 인간 IgG1로부터 유래된 불변 영역을 포함한다.
- [0045] 이러한 측면의 일부 실시형태에서, 아밀로이드 침착 질환은 원발성 경쇄(AL) 아밀로이드증이고, 질환은 람다 경쇄 원섬유의 응집체를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 람다 경쇄 원섬유의 응집체의 존재는 항체의 투여 후 현저하게 감소된다.
- [0046] 이러한 측면의 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체 또는 항원-결합 단편의 치료적 유효량은 500 mg/m² 이하인 한편, 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체 또는 항원-결합 항체 단편의 치료적 유효량은 약 2,200 mg이고, 일부 실시형태에서, 치료적 유효량은 약 1 내지 50 mg/kg이다.

- [0047] 이러한 측면의 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 mAb 또는 항원-결합 단편의 치료적 유효량은 2개월, 3개월, 4개월, 5개월 또는 6개월마다 1회 투여된다. 일부 실시형태에서, 키메라 11-1F4 mAb 또는 항원-결합 단편의 치료적 유효량은 2년마다 1회 또는 1년마다 1회만 투여된다.
- [0048] 다른 측면에서, 본 개시내용은 심장에 침범하는 원발성 경색(AL) 아밀로이드증을 갖는 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 환자에게 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 일정 용량을 투여하는 것을 포함하고, 상기 용량이 키메라 11-1F4 항체의 투여 후 상기 환자의 N-말단 프로 b형 나트륨이노 펩티드(NT-프로BNP) 수준을 처리 전 수준과 비교하여 적어도 30% 감소시키기에 유효한 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, AL 아밀로이드증은 불응성이다.
- [0049] 이러한 측면의 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체는 인간 IgG1로부터 유래된 불변 영역을 포함한다.
- [0050] 이러한 측면의 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체는 월 1회 투여되는 한편, 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체는 주 1회 투여된다.
- [0051] 이러한 측면의 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 치료 적 유효량은 500 mg/m^2 이하인 한편, 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 치료적 유효량은 약 2,200 mg이고, 일부 실시형태에서, 유효량은 약 1 내지 50 mg/kg이다.
- [0052] 이러한 측면의 일부 실시형태에서, NT-프로BNP의 감소는 키메라 11-1F4 항체의 투여 후 적어도 약 6개월 동안 환자에서 지속된다.
- [0053] 다른 측면에서, 본 개시내용은 신장에 침범하는 원발성 경색(AL) 아밀로이드증을 갖는 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 환자에게 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 일정 용량을 투여하는 것을 포함하고, 상기 용량이 처리 전 수준과 비교하여 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 투여 후 상기 환자의 단백뇨를 적어도 40% 감소시키는 데 효과적인 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, AL 아밀로이드증은 불응성이다.
- [0054] 이러한 측면의 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체는 인간 IgG1로부터 유래된 불변 영역을 포함한다.
- [0055] 이러한 측면의 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체는 월 1회 투여되는 한편, 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체는 주 1회 투여된다.
- [0056] 이러한 측면의 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 치료 적 유효량은 500 mg/m^2 이하인 한편, 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 치료적 유효량은 약 2,200 mg이고, 일부 실시형태에서, 치료적 유효량은 약 1 내지 50 mg/kg이다.
- [0057] 이러한 측면의 일부 실시형태에서, 단백뇨 감소는 키메라 11-1F4 항체의 투여 후 적어도 약 6개월 동안 환자에서 지속된다.
- [0058] 다른 측면에서, 본 개시내용은 카파 또는 람다 경색 원섬유 응집체 침착물의 양의 감소가 필요한 환자에서 카파 또는 람다 경색 원섬유 응집체 침착물의 양을 감소시키는 방법으로서, 상기 환자에게 (a) 서열번호 47을 포함하는 V_K 영역, (b) 서열번호 48을 포함하는 V_H 영역 및 (c) 인간 IgG1 불변 영역을 포함하는 항체의 일정 용량을 투여하는 것을 포함하고, 상기 용량이 환자에서 카파 또는 람다 경색 원섬유 응집체 침착물의 양을 감소시키기에 유효한 방법을 제공한다.
- [0059] 이러한 측면의 일부 실시형태에서, 원발성 아밀로이드증은 람다 경색 원섬유 응집체 침착물로 이루어지는 한편, 일부 실시형태에서, 원발성 아밀로이드증은 카파 경색 원섬유 응집체 침착물로 이루어지고, 또 다른 실시형태에서, 원발성 아밀로이드증은 카파 및 람다 경색 원섬유 응집체 침착물로 이루어진다.
- [0060] 이러한 측면의 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체는 월 1회 투여되는 한편, 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체는 주 1회 투여된다.
- [0061] 이러한 측면의 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 치료적 유효량은 500 mg/m^2 이하인 한편, 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 치료적 유효량은 약 2,200 mg이고, 일부 실시형태에서, 치료적 유효량은 약 1 내지 50 mg/kg이다.

- [0062] 다른 측면에서, 본 개시내용은 AL 아밀로이드증 환자에게 11-1F4 항체의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 단클론을 투여하는 것을 포함하는, AL 아밀로이드증의 치료 방법을 제공하며, 여기서 상기 항체는 뮤린 11-14F가 아니다.
- [0063] 이러한 측면의 일부 실시형태에서, 항체는 마우스-인간 키메라 항체일 수 있다.
- [0064] 이러한 측면의 일부 실시형태에서, 항체는 인간 IgG1 불변 영역을 포함한다.
- [0065] 상기 방법들 중 임의의 것의 일부 실시형태에서, 환자의 기관 기능장애는 항체의 투여 후 감소된다. 상기 방법들 중 임의의 것의 일부 실시형태에서, 환자는 치료 후 5주 이내, 때때로 치료 후 4주 이내, 때때로 치료 후 3주 이내, 때때로 치료 후 2주 이내에 치료 반응의 징후를 나타내는 한편, 일부 다른 실시형태에서, 환자는 치료 후 약 1주 이내에 치료 반응의 징후를 나타낸다.
- [0066] 상기 전반적 설명 및 하기 상세한 설명은 예시적이고 설명적인 것이며 본 발명의 추가 설명을 제공하기 위한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0067] 도 1은 하이브리도마 세포주로부터 뮤린 V_H 및 V_K 유전자를 클로닝하는데 사용된 전략을 요약한 것이다.
- 도 2는 각각 뮤린 11-1F4 항체 V_H 영역 유전자의 DNA 및 아미노산 서열의 목록인 서열번호 39 및 서열번호 35이다.
- 도 3은 각각 뮤린 11-1F4 항체 V_K 영역 유전자의 DNA 및 아미노산 서열의 목록인 서열번호 40 및 서열번호 36이다.
- 도 4는 면역글로불린 카파 경쇄 발현 벡터 pKN100의 지도이다. 이것은 SV40 초기 및 불완전(crippled) SV40 후기 프로모터, SV40 오리진 및 CoIE1 오리진을 갖는 pSV2 벡터 단편으로 이루어진다. 이것은 또한 암피실린 내성 유전자 및 neo 유전자를 갖는다. 불완전 SV40 후기 프로모터는 neo 유전자를 구동한다. 이것은 또한 HCMVi 프로모터, 면역글로불린 가변 영역 유전자의 삽입을 위한 다중 클로닝 부위(*Bam*HI 및 *Hind*III 제한 부위를 함유), 및 카파 경쇄 발현 카세트와 동일한 배향으로 있는 spaC2 종결 신호 서열("Arnie")로 종결되는 인간 카파 불변 영역 유전자에 대한 cDNA를 갖는다.
- 도 5는 면역글로불린 감마 1 중쇄 발현 벡터 pG1D200의 지도이다. 이것은 SV40 초기 및 불완전 SV40 후기 프로모터, SV40 오리진 및 CoIE1 오리진을 갖는 pSV2dhfr 벡터 단편으로 이루어진다. 이것은 또한 암피실린 내성 유전자 및 *dhfr* 유전자를 갖는다. 불완전 SV40 후기 프로모터는 *dhfr* 유전자를 구동한다. 그 결과로, 발현이 열악하여, 비교적 낮은 수준의 메토타렉세이트를 사용하여 다중 유전자/고 발현 수준 클론을 선택할 수 있다. 이것은 또한 HCMVi 프로모터 단편, 다중 클로닝 부위, 인간 감마 1 불변 영역 유전자(인트론 마이너스)에 대한 cDNA를 가지며 그 뒤에 spaC2 종결 신호 서열("Amie")이 이어진다.
- 도 6은 변형된 뮤린 11-1F4 항체 V_K 영역 유전자의 DNA 및 아미노산 서열(각각 서열번호 42 및 서열번호 47) 및 V_K 유전자를 변형시키기 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 서열(각각 서열번호 41 및 서열번호 43)의 목록이다.
- 도 7은 변형된 뮤린 11-1F4 항체 V_H 영역 유전자의 DNA 및 아미노산 서열(각각 서열번호 45 및 서열번호 48) 및 V_H 유전자를 변형시키기 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 서열(각각 서열번호 44 및 서열번호 46)의 목록이다.
- 도 8은 아밀로이드 원섬유 결합 ELISA 분석 결과의 그래프 표현이다. 키메라 11-1F4 항체를 함유하는 cos 세포상청액을 정제된 뮤린 11-1F4 항체와 함께 동일한 ELISA 플레이트에서 개별적으로 시험하였다. 흡광도는 OD405에서 판독하였다. 새로운 sv = pG1KD200-11-1F4. 새로운 공동형질감염 = 11-1F4VHpG1D200 + 11-1F4VK.pKN100.
- 도 9는 뮤린 11-1F4로 처리된 마우스에서 인간 AL κ 및 인간 AL λ 아밀로이드종의 제거를 도시한다. 마우스를 단일 용량(패널 A) 또는 다중 용량(패널 B)의 뮤린 11-1F4로 처리하였다. 본 결과는 뮤린 11-1F4가 AL κ 아밀로이드종을 신속하게 제거하지만, 대부분의 경우에 마우스로부터 AL λ 아밀로이드종을 제거하기 위해 다중 용량이 필요하다는 것을 도시한다.

도 10은 키메라 11-1F4의 1a/b상 시험의 투약/평가 계획을 도시한다. 패널 A는 1a상의 계획을 도시하고, 패널 B는 1b상의 계획을 도시한다. 패널 C는 이러한 연구들에 사용된 용량을 도시한다.

도 11은 키메라 11-1F4의 투여가 대부분의 환자에서 심장 기능의 개선을 제공한다는 것을 도시한다. 패널 A는 1a/b상 시험의 결과를 막대 그래프로 도시하고 패널 B는 결과를 상자 그림으로 도시한다.

도 12는 c11-1F4 항체의 1a/b상 임상 시험 동안 예시적인 환자에서의 심장 반응(NT-프로BNP)을 나타낸다.

도 13은 키메라 11-1F4의 투여가 대부분의 환자에서 신장 기능의 개선을 제공한다는 것을 도시한다. 패널 A는 1a/b상 시험의 결과를 막대 그래프로 도시하고, 패널 B는 결과를 상자 그림으로 도시한다.

도 14는 키메라 11-1F4 항체의 1a/b상 임상 시험 동안 예시적인 환자에서의 신장 반응(단백뇨)을 도시한다.

도 15는 키메라 11-1F4 단클론 항체에 의한 포괄적 세로 압박변형률의 변화의 그래프 표현을 도시한다.

도 16은 키메라 항체 처리 전에 기관 반응 없이 화학 요법에 대한 부분적 혈액학적 반응을 보인 환자에서 키메라 11-1F4 항체 처리시 기관 반응(NT-프로BNP)의 그래프 표현을 도시한다.

도 17은 키메라 11-1F4 mAb 처리 후 0주차 및 12주차에서의 심장 침범을 갖는 아밀로이드증 환자의 심초음파도를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 본 개시내용에 따르면, 아밀로이드 침착 질환 및 상기 질환의 증상을 치료 또는 개선하기 위해 아밀로이드 침착 질환을 앓는 인간에게 투여하기에 유용한 인간화 항체, 키메라 항체(예를 들어, 마우스-인간 항체) 또는 이의 항원-결합 단편이 제공된다. 본 발명의 항체 및 항체 단편은 아밀로이드 침착물에 결합하고 인간 항-마우스 항체(HAMA) 반응을 거의 또는 전혀 일으키지 않으면서 환자의 면역계를 활성화시켜 결합된 물질을 제거한다. 본 개시내용은 또한 상기 항체 또는 항체 단편 중 적어도 하나 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물 및 환자의 기관으로부터 아밀로이드 침착물의 적어도 일부를 제거하여 아밀로이드증 질환 및 이의 증상을 치료하거나 개선시키기에 유효한 양의 상기 항체 또는 항체 단편을 환자에게 투여함으로써 아밀로이드증 및 아밀로이드증의 증상을 치료하거나 개선하는 방법을 제공한다.

[0069] 또한, 본 개시내용에 따르면, 아밀로이드 침착 질환을 치료하기 위한 방법이 제공된다. 특히, 본 개시내용은 심장 침범을 갖는 아밀로이드 경색 아밀로이드증(ALA)으로 진단된 환자에서 심근 기능을 개선시키는 것에 관한 것이다. 본 방법은 아밀로이드 원섬유 침착물, 순환 아밀로이드 및 독성 아밀로이드 전구체 단백질에 결합하는 인간화 또는 키메라 항체(예를 들어, 마우스-인간 항체) 또는 이의 항원 결합 단편을 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 특히, 본 개시내용은 심장 침범을 갖는 ALA로 진단된 환자에게 개시된 아밀로이드 원섬유-결합 항체를 투여하면 처리 전 포괄적 세로 압박변형률(GLS) 수준과 비교하여 개선된 GLS 및/또는 처리 전 NT-프로BNP 수준과 비교하여 NT-프로BNP 수준의 감소를 초래함을 보여준다. 추가로, 환자는 그의 질환이 혈액학적으로 제어되지 않는 경우에도(즉, 환자가 순환 중 독성 아밀로이드 전구체 단백질의 검출가능한 수준을 갖거나 또는 침범된 경색과 침범되지 않은 유리 경색 간의 차이가 40 mg/L 초과일 경우에도) 질환이 카파 또는 람다 단백질의 원섬유에 침범하는지 여부와 관계 없이 효과적으로 치료될 수 있다.

[0070] 정의

[0071] 본 방법들은 설명된 특정 실시형태로 한정되지 않으며, 그 자체만으로 다양할 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 본 명세서에서 사용된 용어는 특정 실시형태를 설명하기 위한 것일뿐 이들로 한정하려는 것은 아니다. 본 발명의 기술의 범위는 첨부된 청구범위에 의해서만 한정될 것이다.

[0072] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 특정의 용어들은 하기 정의된 의미를 가질 수 있다. 본 명세서 및 청구범위에서 사용되는 단수 형태("a," "an," 및 "the")는 문맥상 명확히 달리 지시되지 않는 한 단수 및 복수의 지시대상을 포함한다. 예를 들어, "세포"란 용어는 단일 세포뿐만 아니라, 이의 혼합물을 포함하는 복수개의 세포를 포함한다.

[0073] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "포함하는"이란 용어는 조성물 및 방법이 언급된 요소들을 포함하지만, 다른 요소들을 배제하지 않는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 조성물 및 방법을 정의하기 위해 사용되는 경우 "로 필수적으로 이루어진"은 임의의 필수적인 중요한 다른 요소들을 조성물 또는 방법에서 제외시킨다는 것을 의미한다. "로 이루어진"은 청구된 조성물 및 실질적인 방법 단계에 대해 다른 성분들의 미량 원소 이상을 배제하

는 것을 의미한다. 이러한 접속 용어(transition term) 각각에 의해 정의된 실시형태는 본 개시내용의 범위 내이다. 따라서, 방법 및 조성물은 부가적인 단계 및 성분들을 포함하거나(포함하는(comprising)), 대안적으로 중요하지 않은 단계 및 조성물을 포함하거나(로 필수적으로 이루어진(consisting essentially of)), 대안적으로 명시된 방법 단계 또는 조성물만을 포함하는(로 이루어진(consisting essentially of)) 것으로 의도된다.

[0074] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "약"은 + 또는 - 10%를 의미한다.

[0075] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "임의적" 또는 "임의로"는 후속적으로 서술되는 사건 또는 상황이 일어날 수 있거나 일어나지 않을 수 있고, 상기 서술이 상기 사건 또는 상황이 일어나는 경우 및 일어나지 않는 경우를 포함함을 의미한다.

[0076] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "개체", "환자" 또는 "대상체"란 용어는 개별 유기체, 척추동물, 포유동물(예를 들어, 소, 개, 고양이 또는 말) 또는 인간일 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 개체, 환자 또는 대상체는 인간이다.

[0077] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "단리된 항체"란 용어는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 의미한다(예를 들어, 아밀로이드 원섬유에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 아밀로이드 원섬유에 결합하지 않는 항체가 실질적으로 없다). 그러나, 아밀로이드 경쇄 원섬유(예를 들어, 카파 및/또는 람다 원섬유)의 에피토프에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 아밀로이드 A 원섬유와 같은 다른 단백질에 대한 교차반응성을 가질 수 있다. 그러나, 항체는 바람직하게는 인간 아밀로이드 경쇄 원섬유와 항상 결합한다. 또한, 단리된 항체는 전형적으로 다른 세포성 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없다.

[0078] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "치료적 유효량"이란 어구는 각각 이러한 치료가 필요한 대상체에서 투여되는 항체에 대한 특정한 약리학적 효과를 제공하는, 즉, AL 아밀로이드증과 같은 아밀로이드 침착 질환의 효과 또는 증상을 감소시키거나 완화시키거나 제거하는 대상체에서의 항체 용량 또는 혈장 농도를 의미한다. 이러한 투여량이 당업자에 의해 치료적 유효량인 것으로 간주된다 하더라도, 약물의 치료적 유효량 또는 치료적 수준이 본 명세서에 설명된 병태/질환의 치료에 항상 유효한 것은 아님이 강조된다. 치료적 유효량은 투여 경로 및 투여 형태, 대상체의 연령 및 체중, 및/또는 다른 여러 요소들 중에서 치료 시작시의 아밀로이드증의 유형 및 병기를 포함하는 대상체의 상태에 기반하여 달라질 수 있다.

[0079] AL 아밀로이드증과 같은 아밀로이드 질환과 관련하여 본 명세서에서 사용되는 "치료" 또는 "치료하는"이란 용어는 아밀로이드 플라크 또는 침착물의 제거 또는 분해, 질환에 의해 영향을 받는 기관(예를 들어, 심장, 신장, 간 등)의 기관 기능의 개선 및 환자의 수명 또는 5년 생존의 증가를 포함하지만 이에 한정되지 않는 아밀로이드증의 하나 이상의 증상 또는 효과를 감소시키거나 완화시키거나 제거하는 것을 지칭한다.

[0080] "치료적 반응"은 표준 기술에 의해 측정되는 기존 아밀로이드 침착물 또는 플라크의 크기 감소, 아밀로이드 침착 속도의 감소 또는 기관 기능의 개선과 같은 아밀로이드 질환의 적어도 하나의 척도의 개선을 의미한다. 예를 들어, 심장에 아밀로이드 침착물을 갖는 환자에서, 개선된 기관 기능(즉, 치료 반응)은 환자의 N-말단 프로 b형 나트륨이노 펩티드(NT-프로BNP) 수준의 감소 또는 환자의 뉴욕 심장 협회(NYHA) 기능 분류 수준의 감소로 나타날 수 있다. 신장에 아밀로이드 침착물을 갖는 환자에서, 개선된 기관 기능(즉, 치료 반응)은 단백뇨 또는 뇨 중 단백질 산출 속도의 감소로 나타날 수 있다.

[0081] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "인간화 항체"란 용어는 인간 이외의 포유동물로부터 유래된 항체의 CDR 및 인간 항체의 프레임워크 영역(FR)과 불변 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. 인체 내의 인간화 항체의 항원성이 낮아지기 때문에 인간화 항체는 본 발명에 따른 치료제의 치료적 유효 성분으로서 유용하다.

[0082] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "심장 침범"은 아밀로이드 질환을 앓고 있는 환자가 심장 내에 아밀로이드 침착물을 갖는 것을 의미한다. 심장 내의 아밀로이드 침착물은 환자의 혈중 NT-프로BNP의 방출 및 NT-프로BNP 수준 증가를 초래한다. 본 명세서에서, NT-프로BNP가 650 pg/mL를 초과할 경우 환자는 심장 침범을 갖는다.

[0083] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, AL 아밀로이드증과 관련하여 "혈액학적으로 제어되지 않는"이란 서술은 질환이 완전 관해 또는 매우 양호한 부분 관해에 있지 않음을 의미한다. 예를 들어, 환자가 순환(즉, 혈액 또는 혈청) 중에 검출가능한 독성 아밀로이드 전구체 단백질의 수준을 갖는 경우 또는 환자의 혈액 또는 혈청 중 침범된 경쇄와 침범되지 않은 유리 경쇄의 차이가 40 mg/L 초과인 경우에 질환은 혈액학적으로 제어되지 않는다.

[0084] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "중대한 이상반응"이란 용어는 21 CFR 312.32(a)에 정의된 바와 같은, 사망을 초래하거나 생명을 위협하거나 환자 병원입원 또는 기존 병원입원의 연장을 필요로 하거나, 지속적이거나 현저

한 결합 또는 장애를 초래하는 불리한 의학적 사건을 의미한다.

[0085] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "약학적으로 허용되는 담체"는 예를 들어 문헌[Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Delivery Systems", Tenth Edition (2014)]에 설명된 바와 같이 환자에게 투여하기 위해 약학적 화합물(예를 들어, 키메라 항체)과 혼합하기 위한 물질을 의미한다.

[0086] 항-AL 항체

[0087] 무린 항-원섬유 항체

[0088] 최근의 동물 연구는 AL 원섬유에 존재하는 β -폴리티드 쉬트 구조에 공통적인 에피토프에 대해 지시된 무린 11-1F4 항체 및 다른 무린 항-인간 경쇄 특이적 항체의 투여가 인간 AL κ 및 AL λ 아밀로이드 침착물의 완전한 분해를 야기한다는 것을 보여주었다. 이들 무린 항체 중 일부는 그 전문이 본 명세서에 참조로 인용되는 미국 특허 제8,105,594호("594 특허")에 설명되어 있다.

[0089] 수용하는 종이 무린 항체를 항원성으로서 인식하고 이에 대한 항체를 생성 할 것이기 때문에, 무린 항체는 일반적으로 다른 동물 종(예컨대 인간)에 투여하기에 부적합하다. 다른 종에 주사될 때 한 종으로부터의 항체의 항원성은 정상적으로는 불변 도메인의 일부분에 의해 야기된다. 이러한 항원 반응은 무린 항체의 원하는 치료 효과를 방해하거나 방지할 것이다. 인간에서 이러한 항원 반응은 인간 항-마우스 항체(HAMA)라 불린다. '594 특허에 기재된 항체는 인간 항-마우스 항체(HAMA) 반응을 통해 인간에서 면역원성이 높을 잠재성을 갖는다. HAMA 반응은 일반적으로 인간 수용자로부터 마우스 항체의 신속한 제거를 초래하기 때문에, HAMA는 무린 항체가 가질 수 있는 임의의 잠재적인 인간 치료 이점을 심각하게 제한할 것이다. 따라서, 이들 무린 항체는 환자에서 아밀로이드 원섬유의 침착을 정지시키거나 역전시키기 위해 환자에게 투여하기에 적합하지 않다. 따라서, 본 개시내용은 투여 후 환자에서 면역원성 HAMA 반응을 일으킬 가능성이 적은, 아밀로이드 침착 질환을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

[0090] 인간화 및 키메라 항-원섬유 항체

[0091] 본 개시내용은 아밀로이드증을 치료하기 위한 인간화 및 키메라 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 전형적으로, 항체는 4개의 폴리펩티드: 중(H)쇄 폴리펩티드의 2개의 동일한 카피 및 경(L)쇄 폴리펩티드의 2개의 카피로 이루어진다. 일반적으로, 각각의 중쇄는 하나의 N-말단 가변(V_H) 영역과 3개의 C-말단 불변(CH1, CH2 및 CH3) 영역을 함유하고, 각각의 경쇄는 하나의 N-말단 가변(V_L 또는 V_K) 영역과 하나의 C-말단 불변(CL) 영역을 함유한다. 항체의 경쇄 및 중쇄의 각 가변 도메인은 또한 상보성 결정 영역("CDR) 또는 초가변 영역이라 불리는 3개의 세그먼트를 포함한다. 경쇄의 각 CDR은 인접한 중쇄 내의 상응하는 CDR과 함께 항체의 항원-결합 부위를 형성한다. 경쇄와 중쇄의 각 쌍의 가변 영역이 항체의 항원-결합 부위를 형성하는 반면에, 불변 영역은 구조적 지지를 제공하고 항원 결합에 의해 개시되는 면역 반응을 조절한다.

[0092] 키메라 항체는 비-인간 항체의 가변 영역이 인간 항체의 불변 영역에 혼입되어 있다. 키메라 11-1F4는, 예를 들어, 무린 가변 영역을 인간 IgG1과 같은 인간 항체의 Fc 영역과 함께 발현시킴으로써 생성될 수 있다.

[0093] 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 비인간(예를 들어, 무린) 항체의 인간화 형태가 수득될 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 가변 영역이 비인간 면역 글로불린으로부터 유래되고 프레임워크 영역(FR)이 인간 면역 글로불린 서열에 상응하는 1개 또는 2개 이상의 가변 도메인을 포함할 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서 인간화 항-AL 항체는 인간 항체 프레임워크 영역을 포함한다. 이러한 항체는 공지된 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0094] 무린 11-1F4 단클론 항체는 알란 솔로몬(Alan Solomon) MD(테네시주 녹스빌 소재의 테네시 대학교 의료센터) 기탁된 SP2/0 하이브리도마 세포에 의해 생산된 항-AL 항체이다. 하이브리도마 세포주는 아메리칸 타입 컬렉션(American Type Culture Collection)(ATCC 수탁번호 PTA-105)으로부터 입수가능하다. 11-1F4 항체의 V_K 영역(서열번호 36) 및 V_H 영역(서열번호 35)은 하기 표 1에 제시되어 있다. 중쇄 및 경쇄에 대한 CDR 서열은 표 2에 제공되어 있다.

[표 1]

11-1F4 단클론 항체 가변 서열

서열번호 36 V_K 영역: Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Phe Cys Phe Gln Thr Thr Tyr Val Pro Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	서열번호 35 V_H 영역: Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Pro Asn Leu Met Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ile Ser Lys Ser Gln Val Leu Phe Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Thr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser 가변 서열의 상보성 결정 영역(CDR)은 상기 표에서 볼드체로 제시되어 있다.
---	---

[0095]

[표 2]

11-1F4 단클론 항체 CDR 서열

서열	아미노산
CDRL1 (서열번호 49)	Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
CDRL2 (서열번호 50)	Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
CDRL3 (서열번호 51)	Phe Gln Thr Thr Tyr Val Pro Asn Thr
CDRH1 (서열번호 52)	Ser Tyr Gly Val Ser Trp
CDRH2 (서열번호 53)	Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Pro Asn Leu Met Ser Arg Leu Ser Ile Ser
CDRH3 (서열번호 54)	Leu Asp Tyr

[0096]

[0097]

공지된 인간 항체 서열을 사용하여 키메라 11-1F4 항체를 생성하기 위해 상기 나타난 V_H 및 V_K 영역에 대한 유전자를 클로닝할 수 있다. 키메라 11-1F4 항체는 이의 뮤린 대응물과 마찬가지로, 아밀로이드의 β-폴리머드 쉬트 입체배치에 의해 발현되는 에피토프에 결합하지만, 놀랍게도, 하기 실시예 6에 나타난 바와 같이 키메라 항체는

이것이 유래된 11-1F4 마우스 항체보다 높은 친화도로 AL 아밀로이드 원섬유에 결합한다.

- [0098] 또한, 공지된 인간 항체 서열을 사용하여 CDR 영역에 대한 유전자를 클로닝하여 인간화 형태의 항체를 생성할 수 있다. 11-1F4 항체의 키메라 형태와 마찬가지로, 인간화 형태도 아밀로이드 원섬유에 대해 무린 대응물의 결합 친화도보다 높은 결합 친화도를 가질 수 있다.
- [0099] 당업자는 개시된 인간화 및 키메라 항체가 모든 상이한 유형의 인간 불변 영역 및/또는 프레임워크 영역을 이용할 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 개시된 인간화 및 키메라 항체는 인간 IgG(IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함), IgA, IgE, IgH 또는 IgM의 불변 영역 및/또는 프레임워크 영역을 포함할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 개시된 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체는 인간 IgG1 불변 영역을 포함한다.
- [0100] 일부 실시형태에서, 개시된 항체는, 항체가 아밀로이드 원섬유(예를 들어, 카파 및/또는 람다 경쇄 원섬유)에 결합하는 능력을 유지하는 한, 하나 이상의 치환, 삽입 또는 결실을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 키메라 11-1F4 항체는, 항체가 아밀로이드 원섬유에 결합하는 능력을 유지하는 한, 본 명세서에 개시된 상응하는 중쇄 및 경쇄 서열과 비교하여 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100% 동일성을 갖는 중쇄 및 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 인간화 11-1F4 항체는, 항체가 아밀로이드 원섬유에 결합하는 능력을 유지하는 한, 본 명세서에 개시된 상응하는 CDR 서열과 비교하여 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100% 동일성을 갖는 CDR을 포함할 수 있다.
- [0101] 일부 실시형태에서, 개시된 인간화 또는 키메라 항체는 예를 들어 실시예 6에 기재된 직접 결합 ELISA 분석법으로 측정시 시험관내 및/또는 생체내에서 이의 무린 등가물보다 높은 친화도로 아밀로이드 원섬유에 결합한다. 이론으로 결부되지 않고, 개시된 인간화 및 키메라 11-1F4 항체는 침착물 또는 원섬유를 아직 형성하지 않은 독성 순환 아밀로이드 단백질에 결합하여 이를 중화시킬 수 있고, 개시된 인간화 및 키메라 항체는 아밀로이드 침착물을 용해시킬 수 있다고 사료된다. 실제로, 키메라 11-1F4 항체는 마우스에서 원섬유에 결합하고 인간 아밀로이드종을 용해시키는 것으로 입증되었다. 이는, 전구체 경쇄 단백질이 심근세포에 대해 독성인 것으로 여겨지고, 따라서 환자의 질환이 혈액학적으로 제어되지 않는 경우에도(즉, 환자가 환자의 혈액 또는 혈청 중의 검출 가능한 수준의 독성 아밀로이드 전구체 단백질을 갖거나 또는 침범된 경쇄와 침범되지 않은 유리 경쇄 간의 차이가 40 mg/L 초과일 경우에도) 순환 독성 아밀로이드 전구체 단백질뿐만 아니라 기관 내에 침착된 응집된 아밀로이드 원섬유를 표적화 할 수 있는 치료 접근법이 AL 환자에서 심혈관 결과를 개선시킬 수 있기 때문에 중요하다.
- [0102] 약어
- [0103] 돌베코 변형된 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagles Medium: DMEM), 소 태아 혈청(FBS), 리보핵산(RNA); 메신저 RNA(mRNA); 데옥시리보핵산(DNA); 카피 DNA(cDNA); 폴리머라제 연쇄 반응(PCR); 분(min); 초(sec); Tris-보레이트 완충액(TBE).
- [0104] 아미노산은 다음과 같이 IUPAC 약어로 표시된다: 알라닌 (Ala), 아르기닌 (Arg), 아스파라긴 (Asn), 아스파르트산(Asp), 시스테인(Cys), 글루타민 (Gln), 글루탐산(Glu), 글리신(Gly), 히스티딘(His), 이소류신(Ile), 류신(Leu), 리신(Lys), 메티오닌(Met), 페닐알라닌(Phe), 프롤린(Pro), 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 트립토판(Trp), 티로신(Tyr), 발린(Val). 뉴클레오타이드에 대해 유사하게: 아데닌(A), 시토신(C), 구아닌(G), 티민(T), 우라실(U), 아데닌 또는 구아닌(R), 시토신 또는 티민(Y), 구아닌 또는 시토신(S), 아데닌 또는 티민(W), 구아닌 또는 티민(K), 아데닌 또는 시토신(M), 시토신 또는 구아닌 또는 티민(B), 아데닌 또는 구아닌 또는 티민(D), 아데닌 또는 시토신 또는 티민(H), 아데닌 또는 시토신 또는 구아닌(V) 및 임의의 염기(N).
- [0105] 인간화 또는 키메라 항체
- [0106] 본 발명의 키메라 항체를 생산하기 위해, 미국 특허 8,105,594에 기재된 무린 11-1F4 단클론 항체 중쇄 및 카파 경쇄 가변 영역 유전자를 포유동물 세포에서 키메라 11-1F4 항체의 발현을 촉진시키기 위해 PCR 변형시켰다. 변형된 가변 영역 유전자의 상세한 서열 분석을 수행하였다. 변형된 가변 영역 유전자를 적절한 포유동물 발현 벡터에 클로닝하여 작제물 11-1F4VHpG1D200 및 11-1F4VK.pKN100을 생성하였다. EcoRI 제한 효소 분해 및 연결에 의해 11-1F4VHpG1D200 및 11-1F4VK.pKN100 작제물로부터 단일 슈퍼벡터 작제물 pG1KD200-11-1F4를 제조하였다. 마지막으로, 키메라 11-1F4 항체를 공동형질감염 및 단일 슈퍼벡터 형질감염 둘 다에 의해 COS 세포에서 일시적으로 발현시켰다. COS 세포가 편의상 공동형질감염 또는 형질감염을 위해 선택되었지만, 당업자는 다른 포유동

물 세포주가 사용될 수 있음을 인지할 것이다. 아밀로이드 원섬유에 대한 키메라 11-1F4 항체의 결합 능력의 특성규명은 직접 결합 ELISA에 의해 측정하였다. 예상치 못하게 그리고 유리하게도, 키메라 11-1F4 항체는 뮤린 11-1F4 항체보다 높은 친화도로 아밀로이드 원섬유에 결합하였다.

[0107] 전형적으로, 항체는 4개의 폴리펩티드: 중(H)쇄 폴리펩티드의 2개의 동일한 카피 및 경(L)쇄 폴리펩티드의 2개의 카피로 이루어진다. 전형적으로, 각각의 중쇄는 하나의 N-말단 가변(V_H) 영역과 3개의 C-말단 불변(CH1, CH2 및 CH3) 영역을 함유하고, 각각의 경쇄는 하나의 N-말단 가변(V_L 또는 V_K) 영역과 하나의 C-말단 불변(CL) 영역을 함유한다. 경쇄와 중쇄의 각 쌍의 가변 영역은 항체의 항원-결합 부위를 형성한다.

[0108] 본 발명의 조성물 및 방법에서 유용한 항체는 서열번호 47의 V_K 영역 및 서열번호 48의 V_H 영역을 포함하는 키메라 마우스-인간 단클론 항체 또는 서열번호 49 내지 54의 CDR 서열을 포함하는 인간화 단클론 항체일 수 있다. 이러한 항체들은 아밀로이드 원섬유의 β -폴리펩티드 쉬트 입체배치에 의해 발현되는 에피토프에 결합한다. 게다가, 놀랍게도 이러한 항체들은 서열번호 36의 V_K 영역 및 서열번호 35의 V_H 영역을 포함하는, 이들이 유래된 11-1F4 마우스 항체보다 더 높은 친화도로 이러한 에피토프에 결합한다. 본 발명은 아밀로이드 침착 질환의 치료가 필요한 인간 환자에서 아밀로이드 침착 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 환자에게 약학적으로 허용되는 담체 중의 상기 항체들 중 하나의 치료적 유효 용량을 투여하는 것을 포함하는 방법을 포함한다. 투여되는 항체의 양은, 예를 들어, 환자의 조직에 침착된 아밀로이드 원섬유의 양을 감소시키기에 유효해야 한다. 항체 조성물은 임의의 통상적인 투여 경로에 의해 투여될 수 있지만, 비경구 투여(예컨대 정맥내)가 바람직하다. 약학적으로 허용되는 담체는 당업계에 익히 공지되어 있으며, 적합한 것은 의료 분야의 숙련가에 의해 선택될 수 있다. 아밀로이드 침착 질환은 바람직하게는 원발성(AL) 아밀로이드증이다.

[0109] 본 명세서에서 설명되고 청구된 조성물 및 방법에 유용한 키메라 항체(및 키메라 항체의 제조 방법)는 본 명세서와 함께 동일 일자에 출원되고 그 전체가 본 명세서에 참조로 인용되는 공동 소유의 특허 협력조약 출원 _____ (2017년 6월 29일자로 출원된 미국 특허 출원 제62/526,835호에 대한 우선권을 갖는 사건번호 8441-0004WO)에 개시되어 있다. 본 발명의 항체를 제조하는 데 유용한 재료는 각각 도 5 및 6에 도시된 11-1F4VK.pKN100 및 11-F4VH.pG1D200으로 이루어진 균으로부터 선택된 벡터 작제물 및 상기 2가지 작제물로부터 제조된 슈퍼작제물(superconstruct) pG.1KD20011-1F4를 포함한다. 다른 유용한 재료는 변형된 뮤린 11-1F4 항체 V_K 영역 유전자(서열번호 42) 및 변형된 11-1F4 항체 V_H 영역 유전자(서열번호 45)뿐만 아니라 각각의 프라이머 서열번호 41, 서열번호 43, 서열번호 44 및 서열번호 46을 포함한다. 본 발명의 항체는 COS(중국 햄스터 난소) 세포와 같은 적합한 포유동물 숙주 세포에서 벡터 작제물 11-1F4VK.pKN100 및 11-F4VH.pG1D200 또는 슈퍼작제물 pG.1KD20011-1F4를 공동형질감염시켜 제조할 수 있다.

[0110] 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 제조, 시험 및 이용 방법은 하기 실시예 단락에서 더욱 상세하게 논의된다.

[0111] 약학적 제형

[0112] 본 명세서에 기술된 방법에서 사용하기에 적합한 약학적 조성물은 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체, 인간화 항체 또는 항원-결합 항체 단편 및 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함할 수 있다.

[0113] 조성물은 정맥내, 피하, 복강내, 근육내, 경구, 비강, 폐, 안구, 질 또는 직장 투여용으로 제형화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체는 용액, 현탁액, 에멀전, 리포솜 제형 등에서의와 같이 정맥내, 피하, 복강내 또는 근육내 투여용으로 제형화된다. 약학적 조성물은 당업계에 공지된 기술을 사용하여, 속방출형 조성물, 서방출형 조성물, 지연 방출형 조성물 등으로 제형화될 수 있다.

[0114] 다양한 투여 형태를 위한 약리학적으로 허용되는 담체는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 고형 제제에 대해서는 부형제, 윤활제, 결합제 및 붕해제가 알려져 있으며; 액체 제제에 대해서는 용매, 가용화제, 현탁화제, 등장제, 완충제 및 진정제가 알려져 있다. 일부 실시형태에서, 약학적 조성물은 하나 이상의 방부제, 항산화제, 안정화제 등과 같은 하나 이상의 추가 성분을 포함한다.

[0115] 부가적으로, 개시된 약학적 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 리포솜 또는 고 약물 농도에 적합한 다른 정렬된 구조로서 제형화될 수 있다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산액 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우에는 필요한 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 일부 실시형태에서, 등장제, 예를 들어, 당, 폴리알코올, 예컨대 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사가능한 조성물의 장기적인

흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 염 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 달성될 수 있다.

[0116] 멸균 주사용액은, 활성 화합물을 상기 열거된 성분들 중 하나 또는 조합물과 함께 필요한 양으로 적절한 용매에 혼입하고, 필요에 따라 이어서 멸균 미세여과를 수행함으로써 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것들 중 필요한 다른 성분들을 함유하는 멸균 비히클에 활성 화합물을 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 이전에 멸균-여과된 용액으로부터 활성 성분과 임의의 부가적인 원하는 성분이 합쳐진 분말을 생성하는 진공 건조법 및 동결 건조법(냉동 건조법)이다.

[0117] 본 개시내용의 약학적 조성물은 아밀로이드증 및 아밀로이드 질환을 위한 현재 관리 표준의 일부인 다른 치료제와 함께 투여될 수 있다. 대안적으로, 개시된 약학적 조성물은 이전에 아밀로이드증 및 아밀로이드 질환용의 통상적인 치료를 받았지만 종래의 치료에 반응하지 않은(즉, 질환은 불응성이거나 계속 진행중이다) 환자에게 투여될 수 있다.

[0118] 치료 방법

[0119] 본 발명에서, 적어도 하나의 키메라 항체, 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 항체 단편은 아밀로이드증을 앓고 있는 환자(예를 들어, 인간 환자)에게 투여되어 상기 환자의 기관에 침착된 및/또는 환자의 혈류 중에서 순환하는 아밀로이드 원섬유의 적어도 일부의 분해 및 제거를 촉진한다. 일부 실시형태에서, 항체의 치료적 유효량은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 투여된다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체는 하기 논의되는 바와 같이 당업계에 익히 공지되어 있다. 의료 분야의 숙련가들이 잘 이해하는 바와 같이, 전형적인 투여 경로는 비경구(예를 들어, 정맥내, 피하 또는 근육내) 투여이다. 다른 투여 경로도 물론 가능하다. 투여는 단일 또는 다중 용량에 의한 것일 수 있다. 투여되는 항체의 양 및 투약 빈도는 의사에 의해 특정 환자에 맞게 최적화될 수 있다.

[0120] 아밀로이드증은 상이한 사람에서 상이한 기관에 영향을 줄 수 있으며, 상이한 유형의 아밀로이드가 있다. 아밀로이드증은 흔히 심장, 신장, 간, 비장, 신경계 및 소화관에 영향을 미친다. 중증 아밀로이드증은 생명에 위협적인 기관 부전으로 이어질 수 있다.

[0121] 아밀로이드증의 징후 및 증상에는 발목 및 다리의 종창; 심각한 피로 및 약화; 호흡 곤란; 손발의 마비, 따끔거림 또는 통증, 특히 손목의 통증(수근관 증후군); 가능하게는 혈액이 섞인 설사 또는 변비; 의도하지 않은 상당한 체중 감소; 비대한 혀; 비후 또는 쉽게 멍들 및 눈 주위의 자줏빛 반점과 같은 피부 변화; 불규칙한 심박동; 또는 연하 곤란이 포함될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0122] 일반적으로 아밀로이드증은 아밀로이드라 불리는 비정상적인 단백질의 축적에 의해 유발된다. 아밀로이드는 골수에서 생성되며 어떠한 조직이나 기관에라도 침착될 수 있다. 병태의 구체적인 원인은 아밀로이드증의 유형에 따라 좌우된다.

[0123] AL 아밀로이드증, AA 아밀로이드증 및 유전성 아밀로이드증을 포함하는 몇 가지 유형의 아밀로이드증 또는 아밀로이드 질환이 있다.

[0124] AL 아밀로이드증(면역글로불린 경쇄 아밀로이드증)은 가장 흔한 유형이며 심장, 신장, 피부, 신경 및 간에 영향을 줄 수 있다. 이전에 원발성 아밀로이드증으로서 알려진 AL 아밀로이드증은 골수가 분해될 수 없는 비정상적인 항체를 생성할 때 발생한다. 항체는 조직 또는 기관의 정상적인 기능을 방해하는 아밀로이드 플라크로서 다양한 조직에 침착된다.

[0125] AA 아밀로이드증은 일반적으로 신장에 영향을 미치지만, 때로는 소화관, 간 또는 심장에도 영향을 미친다. 이것은 이전에 2차 아밀로이드증으로서 알려졌다. 이것은 흔히 류마티스 관절염 또는 염증성 장 질환과 같은 만성 감염성 또는 염증성 질환과 함께 발생한다.

[0126] 유전성 아밀로이드증(가족성 아밀로이드증)은 흔히 간, 신경, 심장 및/또는 신장에 영향을 미치는 유전성 장애이다. 출생시 존재하는 많은 상이한 유형의 유전자 이상이 아밀로이드 질환 또는 유전성 아밀로이드증의 위험 증가와 관련이 있다. 아밀로이드 유전자 이상의 유형 및 위치는 특정 합병증의 위험, 증상이 처음 나타나는 연령 및 시간 경과에 따라 질환이 진행되는 방식에 영향을 줄 수 있다.

[0127] 아밀로이드 질환이 심장에 영향을 미치는 경우에, 수많은 유형의 합병증을 유발할 수 있다. 아밀로이드 침착물 또는 플라크는 심박동 사이에 혈액으로 채우는 심장의 능력을 감소시킨다. 각 박동마다 적은 양의 혈액이 펌핑되고, 이는 호흡 곤란을 초래할 수 있다. 심장 내부 또는 주위의 아밀로이드 침착물 또는 플라크는 다른 기관

기능장애 중에서도 불규칙한 심박동 및 울혈성 심부전을 또한 유발할 수 있다

- [0128] 아밀로이드 질환이 신장에 영향을 미치는 경우에, 흔히 신장의 여과 능력을 손상시켜 단백질이 혈액으로부터 소변으로 누출될 수 있다(즉, 단백뇨). 또한, 신체로부터 노폐물을 제거하는 신장의 능력이 저하고, 이는 결국 신부전으로 이어질 수 있다.
- [0129] 본 명세서에서는 원발성(AL) 아밀로이드증과 같은 아밀로이드 침착 질환의 치료가 필요한 환자에서 아밀로이드 침착 질환을 치료하는 방법으로서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체를 약학적으로 허용되는 담체와 함께 아밀로이드 침착 질환을 치료하기에 유효한 양으로 환자에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 제공된다.
- [0130] 일부 실시형태에서, 아밀로이드 침착 질환(예를 들어, 원발성 아밀로이드증)은 심장, 신장, 간, 폐, 위장관, 신경계, 근골격계, 연조직 및 피부로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 기관 또는 조직의 침범을 포함한다.
- [0131] 질환이 환자의 심장 내의 아밀로이드 침착물 또는 플라크와 관련되는 실시형태에서, 개시된 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체로의 치료는 환자의 N-말단 프로 b형 나트륨이노 펩티드(NT-프로BNP)의 수준을 항체의 투여 전에 취한 기준선 수준과 비교하여 적어도 약 30% 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, NT-프로BNP의 감소는 항체의 투여 전에 취한 기준선 수준과 비교하여 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60% 이상일 수 있다. 일부 실시형태에서, 개시된 인간 또는 키메라 11-1F4 항체로의 치료는 항체의 투여 후 환자의 NT-프로BNP 수준이 약 9100 ng/L 미만으로 감소되게 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 환자의 NT-프로BNP 수준은 항체의 투여 후 약 8000, 7000, 6000, 5000 또는 4000 ng/L 미만으로 감소될 수 있다. 일부 실시형태에서, 환자는 항체를 투여하기 전에 처음에는 뉴욕 심장 협회(NYHA) 기능 분류 클래스 II 또는 III으로 분류될 수 있지만, 개시된 키메라 11-1F4 항체로 치료한 후에 환자는 NYHA 분류 스케일상에서 클래스 I로 분류될 수 있다.
- [0132] 본 명세서에서는, 심장 침범을 갖는 아밀로이드증을 앓고 있는 환자에서 심근 기능을 개선시키는 방법뿐만 아니라, 심장 침범을 갖고(즉, NT-프로BNP가 650 pg/mL 초과이다) 혈액학적으로 제어되지 않는 ALA를 갖는 환자와 같은 환자의 특정 하위집단을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0133] 아밀로이드 질환이 신장에 영향을 미치는 경우에, 많은 유형의 합병증을 유발할 수 있으며, 이러한 심장 침범은 예후가 불량하다. 아밀로이드 침착물 또는 플라크는 심박동 사이에 혈액으로 채우는 심장의 능력을 감소시킨다. 각 박동마다 적은 양의 혈액이 펌핑되고, 이는 다른 심각한 복합 요인 중에서 호흡 곤란을 유발할 수 있다. 심장 내부 또는 주위의 아밀로이드 침착물 또는 플라크는 다른 기관 기능장애 중에서도 불규칙한 심박동 및 울혈성 심부전을 또한 유발할 수 있다
- [0134] 본 명세서에서는, 심장 침습을 갖는 아밀로이드 경색 아밀로이드증(ALA)으로 진단된 환자에서 심근 기능을 개선시키는 방법으로서, ALA로 진단된 환자에게 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는 방법이 제공된다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 직접 결합 ELISA 분석법으로 측정시 묶인 11-1F4 항체보다 높은 높은 친화도로 아밀로이드 원섬유에 결합할 수 있다. 추가로, 심근 기능의 개선은 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 투여한 후 약 3주 이내에 명백할 수 있다. 예를 들어, 심근 기능의 다양한 척도의 개선은 치료를 시작하지 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 11주, 약 12주, 약 13주, 약 14주 또는 약 15주 내에 볼 수 있다.
- [0135] 심장 침범을 갖는 환자의 심근 기능은 N-말단 프로 b형 나트륨이노 펩티드(NT-프로BNP) 수준을 측정함으로써 결정될 수 있다. ALA 환자의 심장 내 아밀로이드 침착에 의해 야기된 조직 손상은 환자의 NT-프로BNP 수준을 증가시킨다. 일부 실시형태에서, 심장 침범을 갖는 ALA로 진단된 환자는 650 pg/mL 초과의 처리 전 NT-프로BNP 수준을 나타낸다.
- [0136] 심근 기능 및 그 개선은 문헌[Smiseth et al. - *Eur Heart J*, **37**:1196]에 설명된 바와 같이 심초음파 검사를 사용하여 포괄적 세로 압박변형률(GLS)을 측정함으로써 측정될 수 있다. 심초음파 검사는 초음파를 사용하여 심근의 세그먼트 내의 평균 변형을 측정하며, GLS는 전체 좌심실 기능의 척도로서 이러한 세그먼트들의 평균이다. 아밀로이드 침착물은 좌심실과 우심실 벽이 두꺼워지게 하고 뻣뻣하고 불량하게 순응하는 비확장성 심실을 초래하여 심장과 혈관상에 "압박변형(strain)"을 생성한다. 심초음파 검사에서, "압박변형"이란 용어는 심근의 국소적 단축, 비후 및/또는 연장을 포함할 수 있으나 이에 한정되지 않는 심근의 변형을 서술하기 위해 사용된다. 압박변형은 심실 기능의 척도로서 사용될 수 있다. 당업자는 심초음파 검사를 사용하여 GLS를 결정하는 방법을 알 것이고 GLS를 다양한 방식으로 계산할 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 라그랑지(Lagrangian) 공식(ϵ_L

$= (L - L_0)/L_0 = \Delta L/L_0$, 식 중 L_0 은 기준선 길이이고 L 은 결과 길이이다)은 원래 길이와 관련하여 압박변형을 무차원 측정으로서 정의하며, 여기서 단축은 음(-)이 될 것이며 연장은 양(+)이 될 것이다. 이것은 일반적으로 백분율로 표현된다. 대안적인 정의인 오일러(Eulerian) 압박변형은 순간 길이와 관련하여 압박변형을 정의한다: $\varepsilon_E = \Delta L/L$. 시간 경과에 따른 변화의 경우에, 라그랑지 압박변형은 $\varepsilon_L = \Sigma \Delta L/L_0$ 일 것이고, 오일러 압박변형은 $\varepsilon_E = \Sigma (\Delta L/L)$ 일 것이다. 상기 용어는 미르스키(Mirsky)와 팜리(Parmley)에 의해 정상 심근과 허혈성 심근 사이의 변형의 영역적 차이를 설명하는데 있어 최초로 사용되었다.

[0137] 따라서, 일부 실시형태에서, 현재 개시된 방법의 환자는 처리 전 포괄적 세로 압박변형률(GLS) 수준과 비교하여 GLS의 개선을 나타낸다. 예를 들어, 개시된 키메라 항체로 치료된 19명의 환자에 대한 연구에서, 이들 환자 중 10명은 스크리닝 NT-프로BNP 수준에 따라 심장 침범이 있었고, 8명의 환자는 기준선 NT-프로BNP에 따라 심장 평가가능하였으며, 여기서 심장 침범은 650 pg/mL 초과와 NT-프로BNP 수준을 갖는 것으로 정의된다. 일부 실시형태에서, 심장 침범을 갖는 ALA 환자는 적어도 650 pg/mL의 기준선 NT-프로BNP를 가질 수 있는 한편, 일부 실시형태에서, 심장 침범을 갖는 ALA 환자는 적어도 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1750, 1800, 1850, 1900, 1950, 2000, 2050, 2100, 2150, 2200, 2250 또는 2300 pg/mL 이상의 기준선 NT-프로BNP를 가질 수 있다.

[0138] 하기 실시예 9에 개시된 바와 같이, 심장 침범을 갖는 10명의 환자 중 9명은 도 15에 도시된 바와 같이 개시된 키메라 항체에 노출시 심근 기능의 개선을 나타냈다. 따라서, 일부 실시형태에서, 치료적 유효 용량의 키메라 항체로 치료된 환자는 처리 전 포괄적 세로 압박변형률(GLS) 수준과 비교하여 GLS의 개선을 나타낸다. 감소된 GLS와 함께, 개시된 항체로 치료된 환자는 감소된 NT-프로BNP 수준을 또한 나타낼 수 있다.

[0139] 일부 실시형태에서, GLS의 개선은 치료를 시작한지 약 1주, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 약 8주, 약 9주, 약 10주, 약 11주, 약 12주, 약 13주, 약 14주 또는 약 15주 이내에 발생할 수 있다. 일부 실시형태에서, GLS의 개선은 라그랑지 공식으로 계산된 기준선과 비교하여 GLS의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25% 이상의 감소로 나타낼 수 있다. 기준선과 비교하여 GLS 수준의 약 2% 이상의 백분율 감소는 임상적으로 관련된 것으로 간주된다.

[0140] 일부 실시형태에서, 개시된 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로의 치료는 환자의 N-말단 프로 b형 나트륨이뇨 펩티드(NT-프로BNP)의 수준을 항체의 투여 전에 취한 기준선 수준과 비교하여 적어도 약 30% 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, NT-프로BNP의 감소는 항체의 투여 전에 취한 기준선 수준과 비교하여 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60% 이상일 수 있다. 일부 실시형태에서, 개시된 인간 또는 키메라 11-1F4 항체로 치료는 항체의 투여 후 환자의 NT-프로BNP 수준이 약 9100 ng/L 미만으로 감소되게 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 환자의 NT-프로BNP 수준은 항체의 투여 후 약 8000, 7000, 6000, 5000 또는 4000 ng/L 미만으로 감소될 수 있다. 일부 실시형태에서, 환자는 항체를 투여하기 전에 처음에는 뉴욕 심장 협회(NYHA) 기능 분류 클래스 II 또는 III으로 분류될 수 있지만, 개시된 키메라 11-1F4 항체로 치료한 후에 환자는 NYHA 분류 스케일상에서 클래스 I로서 분류될 수 있다.

[0141] 일부 실시형태에서, 개시된 방법은 재발성 또는 불응성 ALA를 앓고 있는 환자를 치료하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 환자는 카파 ALA를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 환자는 람다 ALA를 가질 수 있다.

[0142] 면역글로불린은 4개의 단백질 사슬: 카파(κ) 경쇄 또는 람다(λ) 경쇄인 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄로 이루어지며, 이들 중에는 몇몇 유형이 존재한다. AL 아밀로이드증에서, 카파 경쇄 또는 람다 경쇄는 잘못 폴딩되어 아밀로이드 원섬유 또는 플라크를 형성할 수 있다. 따라서, 일부 환자에서는 카파 단편과 람다 단편 둘 다 잘못 폴딩될 수 있다. 하위군 분석은 람다 심장 침범과 카파 심장 침범 둘 다를 갖는 환자가 실시예 8에 나타낸 바와 같이 처리 전 수준에 비해 GLS가 감소됨으로써 개선을 나타냈음을 보여주었다. 따라서, 일부 실시형태에서 환자는 추가로 경쇄 람다 아밀로이드 심장 침범을 갖는 것으로 특징지어진다. 일부 실시형태에서, 환자는 추가로 경쇄 카파 아밀로이드 심장 침범을 갖는 것으로 특징지어진다.

[0143] 일부 실시형태에서, 개시된 치료 방법은 독성 전구체 단백질을 생성하는 기능장애 세포를 사멸시키도록 의도될 수 있는 화학치료 약물을 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 일부 경우에, 이러한 요법은 성공적일 수 있으며, 이에 따라 기능장애 세포의 감소 및 동시에 환자의 혈중 순환 독성 아밀로이드 전구체 단백질의 양의 감소가 초래된다. 그러나, 일부 경우에, 화학요법은 기능장애 세포의 수 및/또는 이들 세포가 독성 아밀로이드 전구체 단백질을 생성하는 능력을 감소시키는데 효과적이지 않을 수 있다. 이들의 혈액에서 지속적으로 검출가능한

순환 독성 아밀로이드 전구체 단백질 수준을 유지하는 환자는 혈액학적으로 제어되지 않는 ALA를 갖는 것으로 알려져 있다.

[0144] 본 명세서에 개시된 인간화 및 키메라 11-1F4 항체는 순환 중의 독성 아밀로이드 전구체 단백질이 응집되어 아밀로이드 침착물을 형성하기 전이라도 이 단백질에 결합하여 이를 중화할 수 있는 것으로 믿어지기 때문에, 개시된 치료 방법은 혈액학적으로 제어되지 않는(즉, 완전 관해 또는 매우 양호한 부분 관해에 있지 않은) 질환을 갖는 환자에게 특히 유리할 수 있다. 완전 관해는 유리 경쇄(FLC) 분석에서 음성 혈청과 뇨 면역고정 및 정상 비율로서 정의되는 한편, 매우 양호한 부분 관해는 침범된 경쇄와 침범되지 않은 유리 경쇄 간의 차이가 40 mg/L 초과인 것으로 정의된다.

[0145] *개선의 모니터링*

[0146] 심초음파 검사는 비침습적이며, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체(c11-1F4 Ab) 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량을 심장 침범을 갖는 경쇄 아밀로이드증(ALA)으로 진단된 환자에게 투여한 후 약 3주 이내에 상기 환자에서 심근 기능의 개선을 관찰하는 것을 포함하여 심장 침범을 갖는 ALA로 진단된 환자에서 심근 기능의 개선을 모니터링하는 데 사용될 수 있으며, 상기 인간화 또는 키메라 11-1F4 Ab 또는 이의 항원-결합 단편은 직접 결합 ELISA으로 측정된 무관 11-1F4 항체의 것보다 높은 아밀로이드 원섬유에 대한 결합 친화도를 갖는다. 따라서, 개선된 심근 기능은 실시예 8에 나타난 바와 같이 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 투여 후 약 3주 내에 관찰될 수 있다. 일부 실시형태에서, 심근 기능의 개선은 인간화 또는 키메라 11-1F4 Ab 또는 이의 항원-결합 단편의 투여 후 적어도 3개월 연장되는 기간 동안 지속된다.

[0147] 질환이 환자의 신장 내의 아밀로이드 침착물 또는 플라크와 관련되는 실시형태에서, 개시된 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체로의 치료는 환자의 뇨중 단백질 수준(즉, 단백뇨)을 항체의 투여 전에 측정된 기준선 수준과 비교하여 적어도 약 30% 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 환자의 뇨중 단백질의 감소는 항체의 투여 전에 측정된 기준선 수준과 비교하여 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60% 이상일 수 있다. 일부 실시형태에서, 환자의 뇨 단백질 산출은 항체의 투여 후 약 7000 mg/24시간 미만, 약 6000 mg/24시간 미만, 약 5000 mg/24시간 미만, 약 4000 mg/24시간 미만 또는 약 3000 mg/24시간 미만으로 감소될 수 있다.

[0148] *치료적 유효 용량 및 투약 용법*

[0149] 일부 실시형태에서, 항체의 치료적 유효 용량은 3개월의 기간 이내에 1회, 2 회, 3회 또는 4회 이하로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, NT-프로BNP의 감소 또는 GLS의 개선은 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 투여 후 적어도 약 3개월 동안 환자에서 지속된다.

[0150] 상기 방법들의 치료적 유효 용량 및 투약 용법은 당업자가 쉽게 이해할 수 있는 바와 같이 다양할 수 있다. 투약 용법은 최적의 원하는 반응(예를 들어, 아밀로이드 플라크의 치료적 반응 제거 또는 침착된 아밀로이드 원섬유 양의 감소)을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 단일 용량의 항체가 투여될 수 있는 반면, 일부 실시형태에서 수회의 분할 용량이 시간 경과에 따라 투여될 수 있거나, 용량이 상황에 의해 지시된 바와 같이 후속 투약에서 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 개시된 항체는 피하, 정맥내 또는 근육내 주사에 의해 주 1회 또는 2회 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 피하, 정맥내 또는 근육내 주사에 의해 월 1회 또는 2회 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 개시된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 피하, 정맥내 또는 근육내 주사에 의해 연 1회 또는 2회 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 개시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 환자의 상황 또는 상태가 지시할 수 있는 바에 따라 1주마다 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 1개월마다 1회, 2개월마다 1회, 3개월마다 1회, 4개월마다 1회, 5개월마다 1회, 6개월마다 1회, 7개월마다 1회, 8개월마다 1회, 9개월마다 1회, 10개월마다 1회, 11개월마다 1회, 1년마다 2회 또는 1년마다 1회 투여될 수 있다.

[0151] 또한, 본 명세서에 개시된 데이터는 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체로의 치료에 대한 환자 반응이 지속될뿐만 아니라 신속하다는 것을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 환자는 1주 이내, 2주 이내, 3주 이내, 4주 이내, 5주 이내, 6주 이내, 7주 이내, 8주 이내, 9주 이내, 10주 이내, 11주 이내, 12주 이내 또는 그 사이의 임의의 기간 내에 치료 반응(즉, 아밀로이드 침착물 또는 플라크의 크기 감소, 플라크 형성 속도의 감소 또는 개선된 기관 기능을) 경험할 수 있다. 예를 들어, 용량 및 투약 용법에 따라, 환자는 약 1주 또는 약 4.5주 내에 치료 반응을 경험할 수 있다.

[0152] 환자에게 투여되는 항체의 치료적 유효 용량은 (단일 용량으로 투여되든 다중 용량으로 투여되든) 환자에서 침착된 아밀로이드 원섬유의 양을 감소시키기에 충분해야 한다. 이러한 치료적 유효량은 환자의 증상 변화를 평가

하거나 침착된 아밀로이드 원섬유의 양의 변화를 평가함으로써(예를 들어, ¹²⁴I 태그된 항체를 사용하여 침착된 아밀로이드 침착물의 방사면역 검출에 의해) 결정될 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 표지된 항체는 질환을 앓는 것으로 의심되는 환자에서 아밀로이드 침착 질환의 존재를 검출할 뿐만 아니라 치료 효과를 결정하는 데 사용될 수 있다.

[0153] 예시적인 용량은 치료되는 개체의 체격 및 건강뿐만 아니라 치료되는 병태에 따라 달라질 수 있다. 일부 실시형태에서, 개시된 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 치료적 유효량은 약 500 mg/m² 이하일 수 있고; 그러나, 일부 상황에서는 용량이 더 높을 수 있다. 일부 실시형태에서, 치료적 유효 용량은 10 내지 1000 mg/m², 25 내지 900 mg/m², 50 내지 800 mg/m², 75 내지 700 mg/m², 100 내지 600 mg/m² 또는 그 사이의 임의의 값일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 치료적 유효량은 약 1000, 약 975, 약 950, 약 925, 약 900, 약 875, 약 850, 약 825, 약 800, 약 775, 약 750, 약 725, 약 700, 약 675, 약 650, 약 625, 약 600, 약 575, 약 550, 약 525, 약 500, 약 475, 약 450, 약 425, 약 400, 약 375, 약 350, 약 325, 약 300, 약 275, 약 250, 약 225, 약 200, 약 175, 약 150, 약 125, 약 100 mg/m² 이하일 수 있다.

[0154] 유사하게 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 유효량은 약 2,200 mg이고; 그러나, 일부 상황에서는 용량이 더 높거나 낮을 수 있다. 일부 실시형태에서, 치료적 유효량은 50 내지 5000 mg, 60 내지 약 4500 mg, 70 내지 4000 mg, 80 내지 3500 mg, 90 내지 3000 mg, 100 내지 2500 mg, 150 내지 2000 mg, 200 내지 1500 mg, 250 내지 1000 mg 또는 그 사이의 임의의 용량일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 치료적 유효량은 약 50 약 60, 약 70, 약 80, 약 90, 약 100, 약 150, 약 200, 약 250, 약 300, 약 350, 약 400, 약 450, 약 500, 약 550, 약 600, 약 650, 약 700, 약 750, 약 800, 약 850, 약 900, 약 950, 약 1000, 약 1100, 약 1200, 약 1300, 약 1400, 약 1500, 약 1600, 약 1700, 약 1800, 약 1900, 약 2000, 약 2100, 약 2200, 약 2300, 약 2400, 약 2500, 약 2600, 약 2700, 약 2800, 약 2900, 약 3000, 약 3100, 약 3200, 약 3300, 약 3400, 약 3500, 약 3600, 약 3700, 약 3800, 약 3900, 약 4000, 약 4100, 약 4200, 약 4300, 약 4400, 약 4500, 약 4600, 약 4700, 약 4800, 약 4900, 약 5000 mg 이상일 수 있다.

[0155] 유사하게 일부 실시형태에서, 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 유효량은 약 25 mg/kg이고; 그러나, 일부 실시형태에서는 농도가 더 높거나 낮을 수 있다. 일부 실시형태에서, 유효량은 약 1 내지 50 mg/kg, 약 5 내지 40 mg/kg, 약 10 내지 30 mg/kg 또는 약 15 내지 25 mg/kg 또는 그 사이의 임의의 값일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 유효량은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50 mg/kg 이상일 수 있다.

[0156] 개시된 치료 방법은 상황에 따라 요구될 수 있는 다른 공지된 치료 방법과 조합될 수도 있다. 예를 들어, AL 아밀로이드증에 대한 현재의 관리 표준은 일반적으로 자가 혈액 줄기세포 이식(ASCT) 또는 자가 골수 이식을 포함한다. 다발성 골수종을 치료하는 동일한 다수의 화학요법 의약이 아밀로이드/독성 아밀로이드 전구체 단백질을 생성하는 비정상 또는 기능장애 세포의 성장을 중지시키기 위해 AL 아밀로이드증에서 사용된다. 따라서, 일부 실시형태에서, 개시된 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체는 다른 공지된 치료 전, 후 또는 이와 동시에 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 개시된 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체는 다른 치료 옵션이 실패하거나 질환이 지속적으로 진행된 후에만 투여될 수 있다. 다시 말해, 일부 실시형태에서, 개시된 항체는 불응성 AL 아밀로이드증과 같은 불응성 아밀로이드 질환을 치료하는 데 사용된다.

[0157] 질환이 환자의 신장 내의 아밀로이드 침착물 또는 플라크와 관련되는 실시형태에서, 개시된 키메라 11-1F4 항체로의 치료는 환자의 뇨 중 단백질 수준(즉, 단백뇨)을 항체의 투여 전에 결정된 기준선 수준과 비교하여 적어도 약 30% 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 환자의 뇨 중 단백질의 감소는 항체의 투여 전에 결정된 기준선 수준과 비교하여 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60% 이상일 수 있다. 일부 실시형태에서, 환자의 뇨 단백질 산출은 항체의 투여 후 약 7000 mg/24시간 미만, 약 6000 mg/24시간 미만, 약 5000 mg/24시간 미만, 약 4000 mg/24시간 미만 또는 약 3000 mg/24시간 미만으로 감소될 수 있다.

[0158] 또한, 본 명세서에서는 아밀로이드 침착 질환(예를 들어, AL 아밀로이드증)을 갖는 환자의 치료 방법으로서, 이러한 치료가 필요한 환자에게 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 치료적 유효량을 월 1회보다 덜 빈번하게 투여하는 것을 포함하는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, AL 아밀로이드증은 람다 경쇄 원섬유의 응집체를 포함할 수 있으며, 이 경우에 람다 경쇄 원섬유의 응집체의 존재는 항체의 투여 후 현저하게 감소된다.

- [0159] 일부 실시형태에서, 항체의 치료적 유효 용량은 2개월마다 1회, 3개월마다 1회, 4개월마다 1회, 5개월마다 1회, 6개월마다 1회 또는 연 2회 투여될 수 있고, 보다 구체적인 투약 용법은 하기에서 논의된다.
- [0160] 또한, 본 명세서에서는 심장에 침범하는 원발성 경색(AL) 아밀로이드증을 갖는 환자의 치료 방법으로서, 상기 환자에게 인간화 키메라 11-1F4 항체의 일정 용량을 투여하는 것을 포함하고, 상기 용량이 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 투여 후 N-말단 프로 b형 나트륨이노 펩티드(NT-프로BNP) 수준을 처리 전 수준과 비교하여 적어도 30% 감소시키기에 유효한 방법이 제공된다. 또한, 신장에 침범하는 원발성 경색(AL) 아밀로이드증을 갖는 환자의 치료 방법으로서, 상기 환자에게 인간화 키메라 11-1F4 항체의 일정 용량을 투여하는 것을 포함하고, 상기 용량이 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 투여 후 단백뇨를 처리 전 수준과 비교하여 적어도 40% 감소시키기에 유효한 방법이 포함된다.
- [0161] 일부 실시형태에서, NT-프로BNP 및/또는 단백뇨의 감소는 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 투여 후 적어도 약 6개월 동안 환자에서 지속된다.
- [0162] 상기 설명한 바와 같이, 면역글로불린은 4개의 단백질 사슬: 카파(κ) 또는 람다(λ) 경쇄인 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄로 이루어지며, 이들 중 몇몇 유형이 존재한다. AL 아밀로이드증에서, 카파 경쇄 또는 람다 경쇄는 잘못 폴딩되어 아밀로이드 원섬유 또는 플라크를 형성할 수 있다. 일부 환자에서는, 카파 단편과 람다 단편 둘 다 잘못 폴딩될 수 있다. 따라서, 본 명세서에서는 카파 및/또는 람다 경쇄 원섬유 응집체 침착물 양의 감소가 필요한 환자에서 카파 및/또는 람다 경쇄 원섬유 응집체 침착물 양을 감소시키는 방법으로서, 카파 또는 람다 경쇄 원섬유 응집체 침착물을 포함하는 원발성 아밀로이드증을 갖는 환자에게 (i) 서열번호 47을 포함하는 V_{κ} 영역, 서열번호 48을 포함하는 V_{λ} 영역 또는 (ii) 서열번호 49 내지 54의 CDR 서열 및 인간 IgG1 불변 영역을 포함하는 항체의 일정 용량을 투여하는 것을 포함하고, 상기 용량이 환자에서 카파 또는 람다 경쇄 원섬유 응집체 침착물의 양을 감소시키기에 유효한 방법이 제공된다.
- [0163] 일부 실시형태에서, 원발성 아밀로이드증은 람다 경쇄 원섬유 침착물 또는 플라크로 이루어지는 한편, 일부 실시형태에서, 원발성 아밀로이드증은 카파 경쇄 원섬유 응집체 침착물로 이루어지고, 일부 실시형태에서, 원발성 아밀로이드증은 카파 및 람다 경쇄 원섬유 응집체 침착물로 이루어진다.
- [0164] 놀랍게도, 본 명세서에서는 키메라 11-1F4가 람다 경쇄 원섬유를 제거하는데 있어 예상치 못하게 유효한 것으로 발견되었다. 실제로, 실시예 7에 제공된 마우스 연구와 같은 전임상 실험은 람다 원섬유가 제거에 저항성이 있고, 침착물을 제거하기 위해 다수의 반복 치료가 요구될 수 있다고 제안하였다. 그러나, 실시예 8에 도시된 바와 같이, 키메라 11-1F4 항체가 인간에게 투여되었을 때, 치료는 오로지 단일 투여 후에만 람다 사슬 아밀로이드 침착물을 감소시켰다. 이러한 결과는 개시된 방법을 수행하기 전에는 전혀 예상치 못한 것이었다. 인간화 11-1F4 항체는 람다 경쇄 원섬유를 제거하는 유사한 능력을 나타낼 수 있는 것으로 믿어진다.
- [0165] 상기 방법들 중 임의의 것에서, 개시된 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체의 투여는 기관 기능장애를 감소시킬 것으로 예상된다. 추가로, 상기 방법들 중 임의의 것에서, 항체의 불변 영역은 인간 IgG 불변 영역일 수 있다. 보다 구체적으로, 일부 실시형태에서, 항체의 불변 영역은 인간 IgG1 불변 영역일 수 있다.
- [0166] 상기 방법들의 치료적 유효 용량 및 투약 용법은 당업자가 쉽게 이해할 수 있는 바와 같이 다양할 수 있다. 투약 용법은 최적의 원하는 반응(예를 들어, 아밀로이드 플라크의 치료적 반응 제거 또는 침착된 아밀로이드 원섬유 양의 감소)을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서는 단일 볼루스(bolus) 용량의 항체가 투여될 수 있는 반면, 일부 실시형태에서는 수회의 분할 용량이 시간 경과에 따라 투여될 수 있거나, 용량이 상황에 의해 지시된 바와 같이 후속 투약에서 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 개시된 항체는 피하, 정맥내 또는 근육내 주사에 의해 주 1회 또는 2회 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 개시된 항체 또는 기능적 단편은 피하, 정맥내 또는 근육내 주사에 의해 월 1회 또는 2회 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 개시된 항체 또는 기능적 단편은 피하, 정맥내 또는 근육내 주사에 의해 연 1회 또는 2회 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 개시된 항체는 환자의 상황 또는 상태가 지시할 수 있는 바에 따라 1주마다 1회, 격주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 1개월마다 1회, 2개월마다 1회, 3개월마다 1회, 4개월마다 1회, 5개월마다 1회, 6개월마다 1회, 7개월마다 1회, 8개월마다 1회, 9개월마다 1회, 10개월마다 1회, 11개월마다 1회, 1년마다 2회 또는 1년마다 1회 투여될 수 있다.
- [0167] 또한, 본 명세서에 개시된 데이터는 인간화 또는 키메라 11-1F4 항체로의 치료에 대한 환자 반응이 지속될뿐만 아니라 신속하다는 것을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 환자는 1주 이내, 2주 이내, 3주 이내, 4주 이내, 5주 이내, 6주 이내, 7주 이내, 8주 이내, 9주 이내, 10주 이내, 11주 이내, 12주 이내 또는 그 사이의 임의의 기간

내에 치료 반응(즉, 아밀로이드 침착물 또는 플라크의 크기 감소, 플라크 형성 속도의 감소 또는 개선된 기관 기능을) 경험할 수 있다. 예를 들어, 용량 및 투약 용법에 따라, 환자는 약 1주 또는 약 4.5주 내에 치료 반응을 경험할 수 있다.

[0168] 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위해 제공된다. 그러나, 본 발명은 이들 실시예에 설명된 특정 조건 또는 세부사항으로 한정되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서에서 인용된 모든 인쇄된 간행물은 본 명세서에 구체적으로 포함된다.

[0169] **실시예 1**

[0170] 마우스 11-1F4 항체의 PCR 클로닝 및 DNA 시퀀싱

[0171] 뮤린 11-1F4 단클론 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자를 PCR 클로닝하고 단리된 모든 가변 영역 유전자(위(pseudo) 및 기능성)의 상세한 서열 분석을 수행하였다. 뮤린 11-1F4 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자의 상세한 DNA 및 아미노산 서열을 획득하였다.

[0172] 재료

[0173] 배지 성분 및 다른 모든 조직 배양 재료는 Life Technologies(UK)로부터 입수하였다. RNA 용액 키트는 Stratagene(미국)에서 입수한 한편, 제1 가닥 cDNA 합성 키트는 Pharmacia(영국)에서 구입하였다. AmpliTaq® DNA 폴리머라제를 포함하여 RCR 반응을 위한 모든 성분과 장비는 Perkin Elmer(미국)에서 구입하였다. TOPO TA Cloning® 키트는 Invitrogen(미국)에서 구입하였다. 아가로스(UltraPure™)는 Life Technologies(영국)에서 입수하였다. ABI PRISM® Big Dye™ 터미네이터 사이클 시퀀싱 준비 반응 키트 사전혼합 사이클 시퀀싱 키트 및 ABI PRISM® 310 시퀀싱 기기는 모두 PE Applied Biosystems(미국)에서 구입하였다. 다른 모든 분자생물학적 생성물은 New England Biolabs(미국) 및 Promega(미국)에서 입수하였다.

[0174] 방법

[0175] 뮤린 단클론 항체 11-1F4를 생성하는 하이브리도마 세포주로부터 뮤린 V_H 및 V_K 유전자를 PCR 클로닝하는 데 사용된 전략은 도 1에 요약되어 있다.

[0176] α - 인간 경쇄 단클론 항체 11-1F4를 생성하는 SP2/0 하이브리도마 세포주의 2가지의 클론(B2C4 및 B2D6)은 Alan Solomon, MD(테네시주 녹스빌 대학교 테네시 메디컬 센터 대학)에 의해 친절하게 제공되었다. 하이브리도마 세포주는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection)(ATCC 수탁번호 PTA-105)으로부터 이용가능하다. 세포주는 20%(v/v) FBS, 페니실린/스트렙토마이신 및 L-글루타민이 보충된 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다. 10^8 개 세포의 총 생존 세포 계수에 도달할 때까지 세포를 배양하였다.

[0177] 세포를 다음과 같이 각 클론으로부터 개별적으로 수거하였다. 마우스 하이브리도마 세포주를 적절한 배양 배지에서 약 10^8 개 세포의 총 생존 세포 계수를 제공하기에 충분한 양으로 현탁액 중에서 성장시켰다. 배양 상청액을 수거하고 하이브리도마 세포를 벤치탑 원심분리기(250 g, 5분)에서 펠렛화하였다. 세포를 20 ml PBS에 온화하게 재현탁시키고 생존 세포 계수에 대해 100 μ l 분취량을 취하였다. 분취량 중의 세포를 1회 더 펠렛화하고, 200 μ l의 PBS 및 200 μ l의 트리판 블루를 100 μ l의 세포에 첨가하고 온화하게 혼합하였다. 이 혼합물 10 μ l를 1회용 세포-계수 슬라이드에 피펫팅하고 9개의 작은 정사각형 내의 백색 세포의 수를 현미경 하에 계수하였다. 청색 세포(즉, 사멸된 세포)는 계수하지 않았다. 계수 과정을 반복하고, 결과의 평균을 내고, 평균 결과에 9×10^5 를 곱하여 20ml PBS 중의 세포에 대한 생존 세포 계수를 획득하였다. 충분한 세포가 수거되면, 이 세포를 RNA 단리를 위해 10 ml의 용액 D에 재현탁시켰다(하기 참조, Stratagene RNA Isolation Kit).

[0178] 이어서, 제조업체의 지침서에 따라 Stratagene RNA 분리 키트를 사용하여 총 RNA를 각 클론의 세포로부터 개별적으로 단리하였다. 1 ml의 2M 나트륨 아세테이트(pH 4.0)를 샘플에 첨가하고 튜브를 반복적으로 뒤집어 튜브의 내용물을 철저히 혼합하였다. 상기 튜브에 10.0 ml의 페놀(pH 5.3 내지 5.7)을 첨가하고 내용물을 다시 뒤집어서 철저히 혼합하였다. 상기 혼합물에 2.0 ml의 클로로포름-이소아밀 알코올 혼합물을 첨가하고, 튜브를 캡핑하고 10초 동안 격렬하게 진탕시키고, 튜브를 얼음에서 15분 동안 항온배양하였다. 샘플을 얼음 위에서 미리 냉각시킨 50 ml 두께 벽의 원저 원심분리 튜브로 옮기고, 튜브를 원심분리기에서 10,000×g에서 20분 동안 4℃에서 회전시켰다. 원심분리 후 튜브에서 2개의 상이 가시적이었다. 상단 수성 상은 RNA를 함유하였고, 하단 페놀 상 및 중간상은 DNA 및 단백질을 함유하였다. 상단의 RNA-함유 수성 상을 새로운 원심분리 튜브로 옮기고 하단 페놀 상을 버렸다. 동일 용적의 이소프로판올을 수성 상에 첨가하고, 내용물을 뒤집어서 혼합한 후, 튜브를 -20

℃에서 1시간 동안 항온배양하여 RNA를 침전시켰다. 튜브를 원심분리기에서 10,000×g에서 20분 동안 4℃에서 회전시켰다. 원심분리 후, RNA를 함유하는, 튜브의 바닥에 있는 펠렛을 제거하고 상청액을 버렸다. 펠렛을 3.0 ml의 용액 D에 용해시키고, 3.0 ml의 이소프로판올을 튜브에 첨가하고 내용물을 잘 혼합 하였다. 튜브를 -20℃에서 1시간 동안 항온배양한 후, 이를 다시 원심분리기에서 10,000×g에서 10분 동안 4℃에서 회전시키고, 상청액을 튜브로부터 꺼내어 버렸다. (주: 이 시점까지 RNA는 구아니딘 이소티오시아네이트의 존재에 의해 리보뉴클레아제로부터 보호되었지만, 이제는 더 이상 보호되지 않았다.) 펠렛을 75%(v/v) 에탄올(DEPC-처리된 물 (25%))로 세척하고, 펠렛을 2 내지 3분 동안 진공하에 건조시켰다. RNA 펠릿을 0.5 내지 2 ml의 DEPC-처리된 물에 재현탁시켰다.

[0179] 제조업체의 지침서에 따라, 키트와 함께 제공된 *Not* I-d(T)¹⁸ 프라이머를 사용하여 11-1F4 하이브리도마 mRNA의 단일 가닥 DNA 카피를 생산하기 위해 Amersham Pharmacia Biotech 제1 가닥 cDNA 합성 키트를 사용하였다. 단리된 2개의 RNA 샘플 각각에 대해 다음과 같이 하나의 반응을 수행하였다. 사용된 성분은 다음과 같다: 대규모 제1 가닥 cDNA 반응 혼합물, 클로닝된 FPLCpure™ 뮤린 역전사효소, RNAGuard™, BSA, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP, 200 mM DIT 수용액, *Not* Id(T)¹⁸ 프라이머: 5'-d[AACTGGAAGAATTCGCGCCGCGAGGAA₁₈]-3' 및 DEPC 처리된 물.

[0180] 20 μl DEPC 물 중 대략 5 μg의 총 RNA를 100분 동안 65℃로 가열한 다음, 얼음 위에서 냉각시켰다. 대규모 제1 가닥 cDNA 반응 혼합물을 온화하게 피펫팅하여 균일한 현탁액을 수득하고, 반응을 하기와 같이 0.5 ml 미세원심 분리 튜브에 설정 하였다. 33 μl 총 용적에 대해 20 μl 변성 RNA 용액, 11 μl 대규모 제1 cDNA 반응 혼합물, 1 μl *Not* I-d(T)¹⁸ 프라이머 및 1 μl DTT 용액. 반응물을 피펫팅에 의해 온화하게 혼합하고 37℃에서 1시간 동안 항온배양하였다.

[0181] 이어서, 뮤린 중쇄 및 카파 경쇄 가변 영역 유전자(각각 V_H 유전자 및 V_K 유전자)를 존스(Jones) 및 벤딩(Bendig)(*Bio/Technology* 9:88)에 의해 설명된 방법을 사용하여 ssDNA 주형으로부터 PCR 증폭시켰다.

[0182] 적절한 불변 영역 프라이머(V_H의 경우 MHCI-MHC3의 등물 혼합물 및 V_K의 경우 MKC)를 사용하여 각 축퇴 리더 서열 특이적 프라이머(V_H의 경우 MHVI-MHV12 및 V_K의 경우 MKVI-MKV11)에 대해 별개의 PCR 반응물을 제조하였다. 표 1 및 2는 각각 V_H 영역 유전자 및 V_K 영역 유전자를 증폭시키기 위해 사용된 프라이머를 상세히 설명한다. 총 12개의 중쇄 반응 및 11개의 카파 경쇄 반응을 수행하였다. AmpliTaq® DNA 폴리머라제를 사용하여 모든 경우에 주형 cDNA를 다음과 같이 증폭시켰다.

[0183] 완성된 cDNA 제1 가닥 합성 반응물을 90℃에서 5분 동안 가열하여 RNA-cDNA 이중체를 변성시키고 역전사효소를 불활성화시키고 얼음 위에서 냉각시켰다. 11개의 GeneAmp™ PCR 반응 튜브는 MKV1-11로 표지하였다. 각 튜브마다 100 μl 반응 혼합물을 제조하였으며, 각각의 반응 혼합물은 69.3 μl의 멸균수, 10 μl의 10×PCR 완충액 II, 6 μl의 25 mM MgCl₂, dNTP의 10 mM 스톱 용액 각각 2 μl, 2.5μl의 10 mM MKC 프라이머, 10 mM MKV 프라이머 중 하나 2.5 μl 및 1 μl의 RNA-cDNA 주형 혼합물을 함유한다. 이어서, 각각의 튜브에 0.7 μl의 AmpliTaq® DNA 폴리머라제를 첨가하고, 완성된 반응 혼합물을 50 μl의 미네랄 오일로 덮었다.

[0184] 마우스 중쇄 가변 영역 유전자를 PCR-클로닝하기 위해 유사한 일련의 반응 혼합물을 상기 설명한 바와 같이 제조하였다. 그러나, 이번에는 12개의 반응 튜브를 표지하고 12개의 MHV 프라이머 중 하나 및 적절한 MHC 프라이머를 각각에 첨가하였다. 즉, 마우스 γ1 중쇄의 가변 도메인 유전자를 PCR 증폭시키기 위해, 예를 들어 MHC G1 프라이머를 사용하였다.

[0185] 반응 튜브를 DNA 열 사이클러에 로딩하고, 25회 사이클에 걸쳐 94℃에서 1분 동안, 50℃에서 1 분 동안 및 7℃에서 1분 동안 사이클링하였다(94℃에서 1.5분 동안 초기 용융 후). 마지막 사이클에 이어서, 4℃로 냉각하기 전에 72℃에서 10분 동안 최종 연장 단계를 수행하였다. 2.5분의 연장된 램프 시간(ramp time)이 사용된 어닐링(50℃) 단계와 연장(72℃) 단계 사이를 제외하고는 30초의 램프 시간을 사이클의 각 단계 사이에 사용하였다. 각각의 PCR 반응으로부터 10 μl 분취량을 0.5 μg/ml 에티디움 브로마이드를 함유하는 1%(w/v) 아가로스/1×TBE 완충제 겔에서 작동시켜 리더 프라이머 중 어느 것이 PCR 생성물을 생성하였는지를 결정하였다. 양성 PCR-클론의 크기는 약 420 내지 500 bp였다.

[0186] 상기 PCR-증폭 과정을 2회 더 반복하고 전장 가변 도메인 유전자를 증폭시키는 것으로 나타난 PCR-반응을 선택 하였다. 각각의 잠재적인 PCR-생성물의 6 μl 분취량을 제조업체의 지침서에 설명된 바와 같이 TA Cloning® 키트에 의해 제공된 pCR™II 벡터에 직접 클로닝하였다. 형질전환된 이. 콜라이 세포의 10.0%(v/v), 1.0%(v/v) 및

0.1%(v/v)의 분취량을 50 $\mu\text{g/ml}$ 암피실린을 함유하는 개별 90 mm 직경 LB 한천 플레이트에 피펫팅하고, 25 μl 의 X-Gal 스톱 용액 및 40 μl 의 IPTG 스톱 용액으로 덮고, 37°C에서 밤새 항온배양하였다. 양성 콜로니를 PCR-스크리닝으로 동정하였다.

표 1

[0187]

마우스 카파 경쇄 가변 영역 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머

명칭	서열 (5'→3')	서열번호
MICV1 (31량체)	ATGAAGATTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG	1
MKV2 (30량체)	ATGGAGWCAGACACTCTGTTATGGGTG	2
MKV3 (30량체)	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGSGTGTG	3
MKV4 (33량체)	ATGAGGRCCCTGCTCAGWTTTGTGMMWTCTTG	4
MKV5 (30량체)	ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTTC	5
MKV6 (29량체)	ATGAGGTCYTYTGYTSAYCTYCTCTGRGG	6
MKV7 (32량체)	ATGGGCWTCAGAGATGGAGTCACAKWYWCWG	7
MKV8 (30량체)	ATGTGGGGAYCTKTTTTCMMTTTTTCAATG	8
MKV9 (25량체)	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG	9
MKV10 (27량체)	ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT	10
MKV11 (28량체)	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC	11
MKC (20량체)	ACTGGATGGTGGGAAGATGG	12

표 2

[0188]

마우스 중쇄 가변 영역 유전자를 클로닝하기 위한 PCR 프라이머

명칭	서열 (5'→3')	서열번호
MHV1 (27량체)	ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTCTTC	13
MHV2 (26량체)	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT	14
MHV3 (27량체)	ATGAAGWTGTGGTTAACTGGGTTTTT	15
MHV4 (25량체)	ATGRACCTTGGGYTCAGCTTGRITT	16
MHV5 (32량체)	ATGGGACTCCAGGCTTCAATTTAGTTTTCTT	17
MHV6 (29량체)	ATGGCTTGTCYTTRGSGCTRCTCTCTG	18
MHV7 (27량체)	ATGGRATGGAGCKGGRGTCTTTMTCTT	19
MHV8 (23량체)	ATGAGAGTGTGATTCTTTTGTG	20
MHV9 (31량체)	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTTATTCCTG	21
MHV10 (28량체)	ATGGGCAGACTTACCATTCTCATTCTG	22
MHV11 (28량체)	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG	23
MHV12 (27량체)	ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCTG	24
MHCG1 (21량체)	CAGTGGATAGACAGATGGGGG	25
MHCG2a (21량체)	CAGTGGATAGACCGATGGGGG	26
MHCG2b (21량체)	CAGTGGATGAGCTGATGGGGG	27
MHCG3 (21량체)	CAAGGGATAGACAGATGGGGG	28

[0189]

각각의 PCR 반응으로부터의 5 μl 분취량을 1% 아가로스/TBE(pH 8.8) 겔에서 작동시켜 어느 것이 정확한 크기(약 450 bp)의 PCR 생성물을 생성했는지를 결정하였다. 이렇게 동정된 추정상의 양성 PCR 생성물을 TA Cloning® 키트에 의해 제공된 pCR2.1 벡터에 직접 클로닝하고 제조업체의 프로토콜에 설명된 바와 같이 TOP10 적격 세포로 형질전환시켰다. 정확한 크기의 삽입물을 갖는 플라스미드를 함유하는 콜로니는 귀소(Gussow) 및 클락슨(Clackson)의 방법에 따라 1212 및 1233 올리고뉴클레오타이드 프라이머(표 3)를 사용하여 콜로니를 PCR-스크리닝함으로써 동정하였다(*Nucleic Acids Res.* **17**:4000). 이렇게 동정된 추정상의 양성 클론은 ABI PRISM 310 유전자 분석기 및 ABI PRISM BigDye™ 터미네이터를 사용하여 시퀀싱된 이중 가닥 플라스미드 DNA였다. B2C4 하이브리도마 세포주 클론으로부터의 V_H 유전자 및 V_K 유전자 각각의 3개의 양성 클론을 B2D6 하이브리도마 세포주 클론으로부터의 V_K 유전자의 4개 양성 클론 및 V_H 유전자의 6개처럼 시퀀싱하였다.

표 3

[0190]

형질전환된 콜로니를 PCR 스크리닝 및 시퀀싱하기 위한 프라이머

명칭	서열 (5'→3')	서열번호
1212 (17량체)	GTTTCCCAGTCACGAC	29
1233 (21량체)	AGCGGATAATTTCACACAGGA	30

[0191]

뮤린 11-1F4 항체 중쇄 가변 영역 유전자를 증폭시키기 위해 각각의 하이브리도마 클론(B2C4 및 BCD6)에 대해 수행된 12개의 PCR 반응의 결과가 표 4(a)에 제시되어있다.

[0192]

축퇴 리더 서열 프라이머 MHV7은, MHC1-3 불변 영역 프라이머들(표 1)의 혼합물과 조합되어, B2C4 하이브리도마 세포주와 B2D6 하이브리도마 세포주 둘 다로부터 유래된 주형 cDNA로부터 약 600 bp의 PCR 생성물을 산출하였다. 이 밴드는 평균 V_H 유전자의 예상 크기(450 bp)보다 크기 때문에 더 이상 조사하지 않았다. 반대로, 축퇴 리더 서열 프라이머 MHV6은 MHC1-3 불변 영역 프라이머들(표 1)의 혼합물과 조합되어, B2C4 하이브리도마 세포주와 B2D6 하이브리도마 세포주 둘 다로부터 유래된 주형 cDNA로부터 V_H 유전자에 대해 예상되는 크기(450 bp)의 PCR 생성물을 산출하였다.

[0193]

표 4는 SP2/0 하이브리도마 세포주 B2C4 및 B2D6으로부터 뮤린 11-1F4 단클론 항체 가변 영역 중쇄(a) 및 경쇄(b) 유전자를 클로닝하기 위해 수행된 PCR 증폭의 결과를 나타낸다. 세로줄 3은 실제 PCR 결과에 대한 기록을 포함한다. 밴드가 프라이머들의 특정 조합에 대해 관찰된 경우, 이의 염기 쌍(bp)의 크기를 적절한 공간에 기록하였다.

표 4

PCR 증폭의 결과

(a)

C _H 영역 프라이머	리더 프라이머	대략적 밴드 크기 (bp)	
		B2C4	B2D6
MHCG1-3 (혼합물)	MHV1		
"	MHV2		
"	MHV3		
"	MHV4		
"	MHV5		
"	MHV6	450	450
"	MHV7	600	600
"	MHV8		
"	MHV9		
"	MHV10		
"	MHV11		
"	MHV12		

(b)

C _K 영역 프라이머	리더 프라이머	대략적 밴드 크기 (bp)	
		B2C4	B2D6
MKC	MKV1	450	450
"	MKV2	<450	<450
"	MKV3		
"	MKV4		
"	MKV5		
"	MKV6	200	
"	MKV7		
"	MKV8		
"	MKV9		
"	MKV10		
"	MKV11		

[0194]

[0195] B2C4 유래의 PCR 생성물로부터의 3개 클론 및 B2D6 유래의 PCR 생성물로부터의 5개 클론의 서열 분석은 단일 중쇄 가변 영역 서열을 나타냈다(도 2).

[0196] 사용된 클로닝 전략(이 영역에 플랭킹(f flank)된 프라이머, 즉 리더 서열 및 불변 영역 서열 특이적 프라이머를 사용한 전체 가변 영역 유전자의 증폭)은 완전한 FR1 서열이 동정될 수 있게 하였다. 시퀀싱된 8개의 클론 모두가 이 영역에 동일한 서열을 가졌다(도 2).

[0197] 뮤린 11-1F4 항체 카파 경쇄 가변 영역 유전자를 증폭시키기 위해 각각의 하이브리도마 클론(B2C4 및 BCD6)에 대해 수행된 11개의 PCR 반응의 결과가 표 4(b)에 제시되어 있다.

[0198] 축퇴 리더 서열 프라이머 MKV6은 MKC 불변 영역 프라이머(표 2)와 조합되어, B2C4 하이브리도마 세포주로부터만 유래된 주형 cDNA로부터 약 200 bp의 PCR 산물을 생성하였다. 이 밴드는 V_K 유전자의 예상 크기(450 bp)보다 훨씬 작았기 때문에, 더 조사하지 않았다.

[0199] 축퇴 리더 서열 프라이머 MKV2는 MKC 불변 영역 프라이머(표 2)와 조합되어, B2C4 하이브리도마 세포주와 B2D6 하이브리도마 세포주 둘 다로부터 유래된 주형 cDNA로부터 예상된 450 bp 밴드(아가로스 겔상에서 볼 때)보다 작은 PCR 생성물을 생성하였다. 또한, 이전의 V_K 클로닝은 MKV2 프라이머가 잘 알려진 카파 경쇄 위유전자

(pseudogene)를 증폭시켰다는 것을 밝혀냈다. 따라서, 이 생성물이 뮤린 11-1F4 항체 V_K 유전자가 아닌 위유전자임을 확인하기 위해 각 PCR 생성물의 하나의 클론의 서열 분석을 수행하였다. 이러한 서열 분석은 이 PCR 클론이 실제로 위유전자였음을 밝혀냈다.

- [0200] 마지막으로, 축퇴 리더 서열 프라이머 MKV1은 MKC 불변 영역 프라이머(표 1)와 조합되어, B2C4 및 B2D6 하이브리도마 세포주 둘 다로부터 유래된 주형 cDNA로부터 V_K 유전자에 대한 대략적 예상 크기(450 bp)의 PCR 산물을 생성하였다.
- [0201] B2C4 유래의 PCR 생성물의 3개 클론 및 B2D6 유래의 PCR 생성물의 4개 클론의 서열 분석은 위유전자로서 동정될 수 없는 단일 카파 경쇄 가변 영역 서열이 밝혀냈다.
- [0202] 따라서, 11-1F4 항체 중쇄 가변 영역 유전자를 (불변 영역 특이적 프라이머 및 리더 서열 특이적 프라이머를 사용하여) 하이브리도마 mRNA로부터 클로닝하고 시퀀싱하였다.
- [0203] 서열은 번역될 때 TVSS 펩티드 서열을 제공하였다. 카뻏(Kabat) 데이터베이스(Kabat *et al.* - *Sequences of Proteins of Immunological Interest*)에 기록된 122개의 재배열된 인간 V_H 유전자의 분석은 이들 서열의 84%가 TVSS 펩티드 서열을 가졌다는 것을 밝혀냈다. 따라서, 단리된 V_H 유전자는 정확한 11-1F4 항체 유전자 서열이었다는 결론이 내려졌다.
- [0204] 뮤린 11-1F4 항체 가변 영역 카파 경쇄 유전자도 비기능적 V_K 위유전자처럼 성공적으로 클로닝 및 시퀀싱하였다. 이러한 위유전자는 캐롤(Carroll) 등(*Molecular Immunology* (1988) 25:991)에 의해 처음 동정되었다. 서열은 원래의 MOPC-21 종양(SP2/0을 포함)으로부터 유래된 모든 표준 융합 파트너에 존재하는 비정상 mRNA 전사체로부터 발생한다. 비정상 mRNA의 결과로서, 위치 23의 불변 시스테인은 티로신 잔기로 대체되고, VJ 접합부는 프레임을 벗어나 있어서 위치 105에서 정지 코돈을 초래한다.
- [0205] 림프구 또는 하이브리도마 세포가 하나 이상의 재배열된 경쇄 면역글로불린 mRNA를 합성하는 것은 일반적이다. 이들 mRNA는 일반적으로 기능성 V_K 유전자에서 보이지 않는 종결 코돈 또는 프레임 시프트(frame shift)의 존재로 인해 비생산적이다. 이러한 가성(pseudo) 메신저들은 이들이 기능성 폴리펩티드를 암호화하지 않는다는 사실에도 불구하고 V 영역 PCR에 대한 매우 우수한 기질이기에 때문에 하이브리도마로부터 면역글로불린 유전자를 클로닝할 때 흔히 주요 문제를 나타낸다.
- [0206] 2개의 상이한 PCR 생성물로부터 단리된 7개의 별개의 PCR 클론의 상세한 서열 분석 후에 11-1F4 항체 V_K 유전자 서열이 동정되어 서열번호 36을 산출하였다. 모든 서열이 동일하였기 때문에, 이것은 정확한 11-1F4 항체 카파 경쇄 가변 영역 서열로서 받아들여졌다.
- [0207] 클로닝된 V_H 영역 유전자 및 V_K 영역 유전자를 사용하여 키메라 마우스-인간 11-1F4 단클론 항체를 제조한 다음, 이를 분석하여 AL 원섬유에 대한 특이적인 결합을 확인하였다.
- [0208] **실시예 2**
- [0209] 키메라 마우스-인간 11-1F4(c11-1F4) 항체의 작제
- [0210] 키메라 마우스-인간 항체의 일부로서 포유동물 세포에서 상기 기재된 11-1F4 V_H 및 V_K 가변 영역 유전자의 일시적인 발현을 허용하기 위해, 특수하게 설계된 PCR 프라이머(표 5)를 사용하여 5'- 및 3'-말단을 변형시킬 필요가 있었다. 올리고뉴클레오타이드 프라이머 F39836 및 F39837을 사용하여 11-1F4 V_K 유전자를 PCR 변형시키는 한편, 프라이머 F39835 및 F58933을 사용하여 11-1F4 V_H 유전자를 PCR 변형시켰다. 후방(BAK) 프라이머 F39836 및 F39835는 각각 *HindIII* 제한 부위, 코작(Kozak) 번역 개시 부위 및 면역글로불린 리더 서열을 각각 V_K 및 V_H 유전자의 5' 말단에 도입하였다. 전방(FOR) 올리고뉴클레오타이드 프라이머 F39837은 V_K 유전자의 3' 말단에 스플라이스 공여 부위 및 *BamHI* 제한 부위를 도입한 반면, 전방(FOR) 올리고뉴클레오타이드 프라이머 F58933은 V_H 유전자의 3' 말단에 *ApaI* 제한 부위를 포함하는 감마-1CH₁ 유전자의 처음 22개 염기쌍을 추가하였다.

[0211] 11-1F4 중쇄 및 카파 경쇄 가변 영역 유전자를 PCR 변형시키기 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머

명칭	서열 5'→ 3'	서열번호
F39835 VH BAK	AAGCTTGCCGCCACCATGGCTGCTCTGGGGCTGCTCITCTGC	31
F58933 VH FOR	CCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTCC	32
F39836 VK BAK	AAGCTTGCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGC	33
F39837 VK FOR	GGATCCACTCACGTTTGATTTCAGCTTGGTCCCCCTCCGA	34

[0212] 코작 컨센서스 서열은 가변 영역 서열의 효율적인 번역에 중요하다((Kozak - *J Mol Bio* 196:947). 이것은 리보솜이 번역을 시작하는 정확한 AUG 코돈을 규정하고, 가장 중요한 단일 염기는 AUG 시작의 상류 위치 -3에 있는 아데닌(또는 덜 바람직하게는 구아닌)이다.

[0213] 번역글로불린 리더 서열은 발현된 항체가 배지로 분비되고 따라서 쉽게 수거되고 정제되는 것을 보장한다. 이러한 경우에 사용된 리더 서열은 V_H 및 V_K 클로닝 과정 동안 하이브리도마 cDNA로부터 클로닝된 뮤린 11-1F4 V_K 및 V_H 리더 서열이었다.

[0214] 스플라이스 공여 서열은 경쇄 가변 영역을 이의 적절한 불변 영역에 정확하게 프레임내 부착하여 130 bp V_K:C_K 인트론을 잘라내기 위해 중요하다. 중쇄 가변 영역은 *Apal* 부위를 통해 이의 적절한 불변 영역 유전자에 직접 부착되고, 따라서 스플라이스 공여 부위의 필요성을 제거하였다.

[0215] 서브클로닝 제한 부위 *HindIII* 및 *BamHI* 및 *HindIII* 및 *Apal*은 각각 변형된 V_K 및 V_H 가변 영역 유전자를 묶어서 다루는 반면, 상이한 독특한 제한 부위의 사용은 적절한 포유동물 발현 벡터 내로의 방향성 서브클로닝을 보장하였다.

[0216] 11-1F4 경쇄 가변 영역 유전자를 먼저 조심스럽게 분석하여 임의의 원치않는 스플라이스 공여 부위, 스플라이스 수용 부위 및 코작 서열을 동정하였다(표 6 참조). 중쇄 가변 영역 유전자와 경쇄 가변 영역 유전자 둘 다를 이후에 기능적 전체 항체(whole antibody)의 서브클로닝 및/또는 발현을 방해할 수 있는 임의의 추가 서브클로닝 제한 부위의 존재에 대해 분석하였다. 어떤 것도 발견되지 않았다.

표 6

[0217] 포유동물 세포에서 번역글로불린 유전자의 효율적인 발현에 중요한 서열

명칭	컨센서스 DNA 서열
코작 해독 개시 부위	CCGCCRCCAUGG
카파 경쇄 스플라이스 공여 부위	AC::GTRAGT
중쇄 스플라이스 공여 부위	AG::GTRAGT
번역글로불린 스플라이스 수용 부위	YYYYYYYYYNCAG::G

[0218] 볼드체로 표시된 염기는 각 컨센서스 서열 내에서 불변인 것으로 간주된다.

[0219] 별개의 PCR 반응물을 각각의 가변 영역 유전자마다 하나씩, 다음과 같이 제조하였다. 상기 설명한 플라스미드 11-1F4 V_H.pCR2.1 및 11-1F4 V_K.pCR2.1을 주형으로서 사용하였다. 100μl 반응 혼합물을 각 PCR 튜브에서 제조하였으며, 각각의 혼합물은 최대 41 μl의 멸균수, 10 μl의 10×PCR 완충액 I, 10mM의 dNTP 스톡 용액 8 μl, 10mM의 5' 전방향 프라이머 1 μl, 10 mM 3' 역방향 프라이머 1 μl 및 주형 DNA의 1/10 희석액 1 μl를 함유한다. 마지막으로, 완성된 반응 혼합물을 50 μl의 미네랄 오일로 덮기 전에 0.5 μl의 AmpliTaq® DNA 폴리머라제(2.5 단위)를 첨가하였다. 반응 튜브를 DNA 열 순환기(thermal cycler)에 로딩하고, 25회 사이클에 걸쳐 94℃에서 30초 동안, 68℃에서 30초 동안 및 72℃에서 50초 동안(94℃에서 1분 동안 초기 용융 후) 사이클링하였다. 마지막 사이클을 완료한 후, 4℃로 냉각하기 전에 72℃에서 7분 동안 최종 연장 단계를 수행하였다. 각각의 PCR 반응 튜브로부터 10 μl 분취량을 0.5 μg/ml 에티디움 브로마이드를 함유하는 1.2%(w/v) 아가로스/1×TBE 완충제 겔에서

작동시켜 PCR-생성물의 크기 및 존재를 결정하였다. 양성 PCR-클론의 크기는 약 420 bp였다. 이렇게 동정된 추정상의 양성 PCR 산물을 Topo TA Cloning® 키트에 의해 제공된 pCR2.1 벡터에 직접 클로닝하고, 제조업체의 프로토콜에 설명된 바와 같이 TOP10 적격 세포로 형질전환시켰다. 정확한 크기의 삽입물을 갖는 플라스미드를 함유하는 콜로니는 귀소(Gussow) 및 클락슨(Clackson)의 방법에 따라 1212 및 1233 올리고뉴클레오타이드 프라이머(표 3)를 사용하여 콜로니를 PCR-스크리닝함으로써 동정되었다. 이렇게 동정된 추정상의 양성 클론은 ABI PRISM 310 유전자 분석기 및 ABI PRISM BigDye™ 터미네이터를 사용하여 시퀀싱된 이중 가닥 플라스미드 DNA였다. Topo TA 클로닝된 V_H 및 V_K 유전자 각각의 2개의 양성 클론을 시퀀싱하였다.

[0220] 올바르게 변형된 11-1F4 V_H 유전자 및 11-1F4 V_K 유전자를 함유하는 클론을 동정하였고, 포유동물 세포에서의 키메라 중쇄 및 카파 경쇄의 발현을 촉진하기 위해 이들 클론으로부터의 변형된 V 유전자를 이들의 각 발현 벡터에 서브클로닝하였다. 변형된 11-1F4 V_K 유전자를 *HindIII-BamHI* 단편으로서 발현 벡터 pKN100(도 4)에 서브클로닝하였다; 이 벡터는 인간 카파 불변 영역 유전자(알로타입: Km (3 Ala153, Ser191))를 함유한다. 변형된 11-1F4 V_H 유전자도 *HindIII-ApaI* 단편으로서 발현 벡터 pG1D200에 서브클로닝하였다(도 5); 이 벡터는 인간 $\gamma 1$ 불변 영역 유전자(알로타입: G1m (-1 Glu377, Met38I, -2 Ala462, 3 Arg222, Ser229))를 함유하였다. 사용된 카파 및 $\gamma 1$ 불변 영역 알로타입은 백인 집단에서 흔히 발견된다. 이어서, 연결된 발현 작제물 11-1F4VK.pKN100 및 11-1F4VH.pG1D200을 사용하여 DH5 α 적격 세포를 형질전환시키고, 원래의 PCR 변형 프라이머와 함께 상기 논의한 PCR 스크리닝 방법을 사용하여 양성 클론을 동정하였다(표 4). 발현 벡터는 쉽게 이용가능하다.

[0221] 실시예 3

[0222] COS 세포에서 키메라 11-1F4의 일시적 발현을 위한 단일 슈퍼벡터의 작제.

[0223] 키메라 11-1F4 항체의 두 면역글로불린 사슬 모두를 발현하는 단일 슈퍼벡터를 다음과 같이 작제하였다. 11-1F4 카파 경쇄 발현 카세트(HCMVi 프로모터, 11-1F4 카파 경쇄 가변 영역 유전자 및 카파 경쇄 불변 영역 유전자를 함유함)를 11-1F4VK.pKN100 작제물로부터 제한 효소 분해시키고(위치 1 및 위치 2490의 EcoRI)(도 4) 이어서 독특한 EcoRI(위치 4297, 도 5)를 통해 11-1F4VH.pG1D200 작제물에 연결시켰다. 이러한 연결로 인해 11-1F4 키메라 항체의 중쇄 및 카파 경쇄 둘 다를 함유하는 슈퍼벡터 작제물 pG1KD200-11-1F4가 생성되었다.

[0224] 실시예 4

[0225] COS 세포에서 키메라 $\gamma 1/\kappa$.11-1F4 전체 항체의 일시적 발현

[0226] 키메라 11-1F4 항체는 2가지 방식으로 유럽피언 컬렉션 오브 셀 컬처스(European Collection of Cell Cultures: ECACC)로부터의 COS 세포에서 일시적으로 발현시켰다:

[0227] (i) 벡터 작제물 11-1F4VK.pKN100 및 11-1F4VH.pG1D200 각각 10 μ g의 공동형질감염에 의해. 공동형질감염은 2반복으로 수행하였다.

[0228] (ii) 13 μ g의 단일 슈퍼벡터 작제물 pG1KD200-11-1F4의 형질감염에 의해. 슈퍼벡터 형질감염을 5회 수행하였다.

[0229] 하기 형질감염 방법을 사용하였다. COS 세포주는 융합성(confluent)이 될 때까지 150 cm² 플라스크 내의 10%(v/v) FCS, 580 μ g/ml L-글루타민 및 50 유닛/ml 페니실린/50 μ g/ml 스트렙토마이신("배지")이 보충된 DMEM에서 성장시켰다. 세포를 트립신 처리하고, 벤치 탑 원심분리기에서 회전(250 g에서 5분 동안)시킨 다음, 이들을 각각 25ml의 새로운 예열된 배지를 함유하는 3개의 150 cm² 플라스크 사이에 동일하게 분배하기 전에 6ml의 배지에 재현탁시켰다. 세포를 5% CO₂에서 37°C에서 밤새 항온배양한 다음, 세포가 여전히 지수적으로(exponentially) 성장하는 동안 다음날 수거하였다. 각각의 플라스크는 대략 1 $\times$ 10⁷ 세포를 함유하였다. 세포를 다시 트립신 처리하고, 이전과 같이 펠렛화하고, 20 ml의 PBS로 세척한 후, 1 $\times$ 10⁷ 세포/ml의 세포 농도를 생성하기 위해 충분한 PBS에 재현탁시켰다. 이러한 세척된 COS 세포 700 μ l를 Gene Pulser® 큐벳에 피펫팅한 다음, 여기에 1 μ l의 중쇄 및 카파 경쇄 발현 벡터 DNA(각각 10 μ g) 둘 다 또는 13 μ g의 슈퍼벡터 작제물을 첨가하였다. Bio-Rad Gene Pulser® 장치를 사용하여 1900V, 25 μ Farad 커패시턴스 펄스를 혼합물에 전달하였다. 각각의 실험적 형질감염 및 "DNA 부재" 대조군(COS 세포가 어떠한 DNA도 없이 전기천공되었음)에 대해 펄싱을 반복하였다. COS 세포의 효율을 시험하기 위해 이전에 발현된 항체의 양성 대조를 또한 수행하였다.

[0230] COS 세포를 실온에서 10분 동안 회복되게 한 다음, 10%(v/v) γ -글로불린 비함유 FBS, 580 μ g/ml L-글루타민 및

50 유닛/ml 페니실린 / 50 $\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신이 보충된 8 ml의 예열된 DMEM을 함유하는 10 cm 직경의 조직 배양 접시에 온화하게 피펫팅하고, 분석을 위해 COS 세포 상청액을 수거하기 전에 37°C에서 72시간 동안 5% CO_2 에서 항온배양하였다. 72시간 동안 항온배양한 후, 배지를 수집하고, 회전시켜 세포 잔사를 제거하고, 키메라 항체 생산 및 c11-1F4 항체의 항원 결합에 대해 ELISA로 분석하였다.

[0231] 실시예 5

[0232] 포획 ELISA를 통한 키메라 $\gamma 1/\kappa$ 11-1F4 항체의 정량

[0233] 발현 후, COS 세포 상청액에 존재하는 전체 IgG 분자를 포획 ELISA 분석법을 사용하여 정량하였다. IgG 분자를 Fc γ 단편-특이적 항체인 고정된 염소 항-인간 IgG를 통해 Nunc-Immuno MaxiSorb™ 플레이트상에 포획하고, 항-인간 카파 경쇄 퍼 옥시다제 접합 항체를 통해 검출하였다. 알려진 농도의 표준 IgG 항체를 다음과 같이 동일한 방식으로 동일한 플레이트에서 포획하고 검출하여 표준 곡선을 생성하였다. 96-웰 면역플레이트의 각 웰을 PBS에 희석된 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 염소 항-인간 IgG 항체의 100 μl 분취량으로 코팅하고 4°C에서 밤새 항온배양하였다. 과량의 코팅 용액을 제거하고, 플레이트를 200 μl /웰의 세척 완충액(1×PBS, 0.1% TWEEN)으로 3회 세척하였다. 세로줄 2, 가로줄 B 내지 G 내의 웰을 제외한 모든 웰에 100 μl 의 SEC 완충액을 분배하였다. SEC 완충액 중의 인간 IgG1/카파 항체의 1 $\mu\text{g/ml}$ 용액을 표준으로서 작용하도록 제조하고 200 μl /웰을 세로줄 2, 가로줄 B 및 C의 웰에 피펫팅하였다. 형질감염된 cos 세포로부터의 배지를 원심분리하여(250 g, 5분) 상청액을 모았다. "DNA 부재" 대조군(COS 세포가 DNA의 부재하에 형질감염되었음)으로부터의 상청액 200 μl 의 분취량을 세로줄 2, 가로줄 D의 웰에 피펫팅하고, 200 μl /웰의 실험적 상청액의 분취량을 세로줄 2, 가로줄 E, F 및 G의 웰에 피펫팅하였다. 세로줄 2, 가로줄 B 내지 G의 웰 내의 200 μl 분취량을 혼합한 다음, 100 μl 를 각 웰로부터 세로줄 3 내의 이웃 웰로 옮겼다. 이러한 과정을 표준, 대조군 및 실험 샘플의 2배 희석액의 시리즈를 이용하여 세로줄 11까지 지속하고, 그 후 모두를 37°C에서 1시간 동안 항온배양하고, 모든 웰을 세척 완충액의 200 μl 분취량으로 6회 행구었다. 염소 항-인간 카파 경쇄 퍼옥시다제 접합체를 SEC 완충액에 5000배 희석하고, 100 μl 의 희석된 접합체를 각 웰에 첨가한 후, 항온배양 단계 및 행구 단계를 반복하였다. 각각의 웰에 150 μl 의 K-BLUE 기질을 첨가한 후, 암실에서 25°C에서 10분 동안 항온배양하였다. 50 μl 의 RED STOP 용액을 각 웰에 첨가하여 반응을 정지시키고 광학 밀도를 655nm에서 판독하였다.

[0234] 실시예 6

[0235] 키메라 11-1F4 항체의 결합 분석

[0236] 키메라 11-1F4 항체를 직접 결합 ELISA 분석법을 사용하여 아밀로이드 원섬유에 대한 결합에 대해 시험하였다. 합성 원섬유를 면역글로불린 경쇄 단백질로부터 형성시키고, "저결합형" 폴리스티렌 플레이트(Costar, # 3474)를 사용하여 고체 상태 ELISA 기반 분석에서 항체의 반응성을 모니터링하는데 사용하였다. 플레이트를 코팅하기 직전에, 250 μg 의 원섬유 덩어리를 코팅 완충액(포스페이트 완충 식염수 pH 7.5 중의 0.1% 소 혈청 알부민)을 이용하여 1 ml로 희석시켰다. 이어서, 샘플을 전력을 최대치의 40%로 설정한 Tekmar Sonic Disruptor 초음파 프로브를 사용하여 20초 동안 초음파 처리하여, 각각 최대 2 내지 5개의 프로토피라멘트로 이루어진 짧은 원섬유 용액을 생성하였다. 이어서, 상기 용액을 5 ml로 희석하고, 볼텍스에 의해 잘 혼합하고, 플레이트의 웰에 분취하였다. 이러한 과정은 각 웰 내의 농도가 50 /ml인 원섬유 용액 50 μl 를 산출하였다. 이어서, 플레이트를 37°C 항온배양기 내에서 덮지 않은채 밤새 건조시켰다.

[0237] 이어서, 플레이트 준비 후 48시간 이내에 ELISA 분석법을 다음과 같이 수행하였다. PBS 중의 100 μl 의 1% BSA를 첨가하여 웰을 차단하고, 진탕기에서 실온에서 1시간 동안 항온배양하였다. 플레이트를 PBS, 0.05% Tween 20(v/v)로 3회 세척하였다. 플레이트의 각 웰에 c11-1F4의 용액 50 μl (0.1% BSA/PBS 중 3 $\mu\text{g/ml}$ 항체)를 첨가하고 플레이트를 진탕기에서 실온에서 1시간 동안 항온배양하였다. 플레이트를 다시 3회(이전과 같이) 세척하고 바이오티닐화된 염소 항-마우스 IgG 항체(Sigma # B-8774, 항-중쇄 및 경쇄)를 사용하여 결합된 항체의 검출을 달성하였다.

[0238] 결과

[0239] 성공적으로 변형된 V_H 및 V_K 유전자의 서열 분석은 정확한 서열이 존재하였음을 밝혀냈다. 변형된 11-1F4 V_K 및 V_H 유전자의 상세한 DNA 및 아미노산 서열은 도 3 및 도 4에 제시되어 있다. 변형된 V_K 및 V_H 유전자는 각각 포유동물 발현 벡터 pG1D200 및 pKN100에 성공적으로 클로닝되었고, 생성된 11-1F4VK.pKN100 및 11-1F4VHPG1D200 작제물은 포유동물 세포의 공동형질감염에 사용하였다.

- [0240] 11-1F4VK.pKN100 및 11-1F4VHPG1D200 작제물은 또한 포유동물 세포에서 키메라 11-1F4 항체를 발현한 단일 슈퍼백터(pG1KD200-11-1F4)를 작제하는데 사용하였다. ECACC COS 세포의 공동형질감염 및 슈퍼백터 형질감염 둘 다로부터의 키메라 11-1F4 항체 발현 수준을 분석하였다. pG1KD200-11-1F4 슈퍼백터 형질감염(10326 ng/ml)에서 관찰된 발현 수준은 11-1F4VK.pKN100 작제물 및 11-1F4VHPG1D200 작제물의 상응하는 공동형질감염에서 관찰된 수준(2820 ng/ml)보다 3.7배 높았다.
- [0241] 발현 및 정량 후, 키메라 11-1F4 항체를 직접 결합 ELISA에 의해 표적 항원(NCI에 의해 친절하게 공급된 아밀로이드 원섬유)에 대한 결합에 대해 시험하였다. 결합 ELISA의 결과는 도 8에 제시되어 있다. 2개의 최고의 개별 pG1KD200-11-1F4 슈퍼백터 형질감염으로부터의 상청액을 상응하는 공동형질감염으로부터의 하나의 상청액과 동시에 분석하였다.
- [0242] 결과는 키메라 11-1F4 항체가 이의 뮤린 등가물보다 높은 친화도로 아밀로이드 원섬유에 결합하였음을 나타냈다. 이러한 결과는 일반적으로 키메라 항체가 원래의 뮤린 항체와 유사한 결합 친화도를 가질 것으로 예상되었기 때문에 놀랍고 예상치 못한 것이다. 특정 메커니즘에 구애되지 않고, 본 발명자들은 11-1F4 뮤린 V 영역을 키메라 11-1F4 항체를 생성하는 데 사용된 인간 $\gamma 1/\kappa$ C 영역과 조합하는 것의 순 효과가 높은 친화도의 항체를 생성하였을 수 있다고 믿고 있다.
- [0243] 본 명세서에서 사용된 키메라 11-1F4 단클론 항체를 분비하는 CHO 세포(CAEL-101로서 식별)의 샘플은 부다페스트 조약에 따라 2018년 6월 27일에 아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 기탁되었다(ATCC 수탁번호 PTA-105).
- [0244] **실시예 7**
- [0245] 뮤린 11-1F4를 이용한 마우스 아밀로이드증 연구
- [0246] 아밀로이드는 인간으로부터 추출하여 특성규명하였다. 간략하게 말하면, AL 아밀로이드증 환자로부터 사후에 수득된 30 내지 40 g의 신선한 냉동(-80°C) 또는 10 g의 동결건조된 비장 또는 간을 Virtis-Tempest 장치(Virtis, 뉴욕주 가디너)를 이용하여 약 300 ml의 냉 식염수에서 균질화하였다. 균질물을 6°C에서 30분 동안 17,000 rpm으로 원심분리하고, 생성된 상청액을 A₂₈₀에서 <0.10의 OD를 가질 때까지 반복적으로 균질화 및 세척하여 잔류 식염수-가용성 물질을 제거하였다. 이어서, 펠렛을 반복적으로 균질화하고, 냉 탈이온수로 세척하고, 원심분리하고, 아밀로이드 함유 상청액을 동결건조시켰다. 회수된 단백질의 양은 출발 물질의 중량의 약 1/3 내지 1/5을 나타냈다. 아밀로이드의 경쇄 조성 및 VL 하위군은 6 mol/L 구아니딘 HCl로 수용성 물질로부터 추출된 환원 및 피리디에틸화 단백질의 트립신 분해에 의해 수득된 고성능 액체 크로마토그래피-분리된 펩티드의 아미노산 시퀀싱(Procise Protein Sequencing System; Applied Biosystems, 캘리포니아 포스터 시티) 및 이온화 질량 분광분석법(PE SCIEX API 150 EX; Perkin Elmer, 코네티컷주 노르워크)에 의해 결정하였다. 프로테오글리칸 헤파란 설페이트의 존재는 Azure Aassay를 사용하여 확립하였다.
- [0247] 아밀로이드 추출물의 조성은 화학적, 면역블롯팅, 아미노산 서열 및 이온화 질량 분광분석법에 의해 확립하였으며, 이때 주된 단백질 종은 대부분의 경우에 가변 영역(VL)과 불변 영역(CL)의 처음 약 50개 잔기로 이루어진 κ 또는 λ 경쇄-관련 분자이고 다른 경우에는 VL 단편 또는 온전한 분자인 것으로 밝혀졌다. 또한, 이들 추출물은 예상되는 아밀로이드 관련 P-성분뿐만 아니라 프로테오글리칸 헤파린 설페이트를 함유하였다.
- [0248] 동결건조된 수용성 아밀로이드 추출물을 25 ml의 멸균 식염수에 현탁하고 PCU-2 Polytron 장치(Brinkman, 스위스 루체른)를 이용하여 균질화하였다. 6°C에서 17,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 원섬유를 침전시켰다; 생성된 펠렛을 1 ml의 멸균 식염수에 재현탁시키고 균질화하였다. 상기 용액을 6-ml 주사기에 부착된 18개이지 바늘을 사용하여 BALB/c 마우스, CD-18 널(null) 마우스 및 C.B-17 SCID 마우스의 견갑골 사이에 피하 주사하였다. 생성된 아밀로이드종의 크기를 매일 촉진하여 측정하고 부검시 확인하였다. microCat 장치(Oak Ridge National Laboratory, 테네시주 오크릿지)를 사용하여 고해상도 X-선 컴퓨터 단층촬영 이미지를 획득하였다.
- [0249] 주사된 물질은 동물의 등에 쉽게 볼 수 있고 촉진가능한 덩어리를 형성하였으며, 그 크기는 주사된 물질의 양에 의존하였다(예를 들어, 최대 직경은 0.2 내지 2.5 cm). 아밀로이드종은 고해상도 X-선 컴퓨터 단층촬영으로 입증된 바와 같이 약 10일 내지 24일 동안 국소화된 상태를 유지하고 변하지 않았다; 그 후, 아밀로이드 종은 퇴행하기 시작하여 결국 약 4일의 기간에 걸쳐 사라졌다. 이러한 반응은 아밀로이드 추출물의 κ 또는 λ 성질 또는 VL 하위군에 관계없이 발생하였다; 그러나, 5가지의 상이한 κ 아밀로이드종 및 7가지의 λ 아밀로이드종을 수반하는 연구에서는, AL λ 추출물은 전형적으로 AL κ 보다 느리게 분해되었다(AL λ , 18±6일 대 AL κ , 13±3일). 12가지 사례 중 8가지에서 실험을 적어도 4회 반복하기에 충분한 재료가 이용 가능했으며, 여기서 아밀로이드의 조직 공급원에 관계없이 건강하고 어린 동물에서 이러한 효과가 재현될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 유도

된 아밀로이드종의 용해는 노화(> 18개월) 및 면역결핍 마우스에서 3개월 넘게 지속적으로 지연되었다.

[0250] 퇴행성 아밀로이드종의 운명을 결정하는 조직학적 연구는 콩고 레드 염색에 의해 입증된 바와 같이 아밀로이드가 다른 마우스 조직에 재분포되지 않았음을 입증 하였다. 또한, 아밀로이드종은 나프톨 AS-D 클로로아세테이트-양성, α-나프틸 아세테이트-음성, 다형핵 세포, 즉 호중구에 의해 침윤되었다. 대조적으로, 이러한 세포 반응은 CD-18 널 마우스에서 발생하지 않았으며, 이 마우스에서는 인간 AL 아밀로이드종의 분해가 상당히 긴 기간(즉, 3개월)을 요구하였다. 또한, 아밀로이드종 유도시 및 다시 3일차에 제공된 250 mg의 항-호중구 mAb Gr-1의 공동투여에 의해 극심하게 호중구감소된(neutropenic) 동물에서 아밀로이드 분해가 지연되었다.

[0251] 아밀로이드 제거는 인간 경쇄-함유 물질에 대한 체액성 면역 반응에도 의존적이었다. 아밀로이드종 유도 후 약 10일 내지 20일차에, 본 발명자들은 마우스 혈청이 주사된 아밀로이드 단백질의 경쇄 성분뿐만 아니라 이중성 ALκ 또는 ALλ 추출물의 성분을 인식하는 항체를 함유한다는 것을 면역블롯팅 실험에서 보여주었다. 대조적으로, 상동성 아밀로이드 전구체 단백질, 즉 벤스존스 단백질(Bence Jones protein) 또는 시험된 임의의 다른 단클론 경쇄와의 반응성은 없었다. 이들 면역화 된 동물에게 동일한 아밀로이드 제제를 재투여하였을 때, 그 소멸 속도는 대략 2배 증가하였다.

[0252] 면역 11-1F4의 치료 효능을 시험하기 위해, 인간 AL 아밀로이드종을 보유한 마우스 쌍에 100 μg 용량의 항체를 제공하는 일련의 실험을 개시하였다. ALκ의 경우에, 2가지 상이한 추출물을 수반하는 연구는 항체의 단일 주사조차도 미처리 동물과 비교하여 아밀로이드 종양을 신속하고 완전하게 소멸시켰다는 것을 밝혀냈다(표 7; 도 9). ALκλ 아밀로이드종의 질량은 항체 주사 후 대조군 동물과 비교하여 4일 이내에 >90% 감소되었다. 그러나, 특정의 ALλ 형 아밀로이드종에서 유사한 반응을 달성하기 위해, 다중 용량의 시약이 요구되었다. 이들은 아밀로이드종이 유도된 시점(0일)에 시작한 다음, 2일차, 4일차 및 6일차에 다시 일련의 100-μg 주사로서 제공되었다(도 9B). 표 7에 요약된 바와 같이, 5가지의 상이한 인간 ALλ 아밀로이드종을 마우스 모델에서 시험한 실험에서, 11-1F4로의 처리는 아밀로이드 종양이 제거되는 시간을 무려 4배나 감소시킨 것으로 밝혀졌다. 특히, AL 원섬유(예를 들어, 31-8C7)를 인식한 2가지의 다른 항-경쇄 mAb의 단일 또는 반복 용량이 아밀로이드 분해를 촉진 하였지만, 11-1F4 시약은 비록 상이한 속도라도 ALκ 아밀로이드와 ALλ 아밀로이드 둘 다의 제거를 가속화하였다는 점에서 독특하였다. 대조적으로, 시험된 3가지의 다른 항-경쇄 mAb는 이러한 활성이 결여되었다.

표 7

인간 아밀로이드종을 갖는 마우스의 면역 11-1F4로의 처리

아밀로이드종 (V _L 하위군)	단일 용량*		미처리	다중 용량†		미처리
	처리			처리		
	11-1F4‡	31-8C7‡		11-1F4	31-8C7	
ALκ(1) HIG	4§	12	14	NT¶	NT	NT
ALκ(1) GRA	4	8	15	NT	NT	NT
ALλ(6) JON	8	11	14	NT	NT	NT
ALλ(1) SHE	9	19	21	9	20	24
ALλ(1) FIE	17	24	24	9	18	26
ALλ(2) BUE	24	NT	25	6	NT	25
ALλ(3) BAL	28	NT	28	7	NT	28

* 0일차에 100 μg; [‡] 0일, 2일, 4일 및 6일차에 100 μg; [§] mAb 농도; [¶] 시간(일수); [¶] NT, 시험되지 않음

[0253]

[0254] AA-1, ATTR-, ALyS-, AApoA1- 및 Ab-함유 조직의 면역조직화학 분석에서 입증된 바와 같이 11-1F4가 다른 형태의 아밀로이드를 인식하였다는 것이 또한 판명되었다. 각각의 경우에, 11-1F4 및 이들 5가지의 상이한 유형의 아밀로이드 단백질에 특이적인 항체를 사용하였을 때 유사한 패턴의 반응성이 수득되었다.

[0255] 실시예 8

[0256] 키메라 11-1F4 항체의 1a/b상 연구

[0257] GMP 등급 아밀로이드 원섬유-반응성 키메라 IgG1 mAb 11-1F4는 불응성 AL 아밀로이드증 환자를 치료하는 1a/b상 시험에 대한 NCI의 생물자원 브랜치에 의해 생성되었다. 키메라 IgG1 mAb 11-1F4를 생산하는 CHO 세포주는 CAEL-101로서 식별한다.

[0258] 사전에 항-혈장 세포 치료를 받은 재발성 또는 불응성 AL 아밀로이드증 환자를 등록(enroll)하였다. 환자는 키메라 IgG1 mAb 11-1F4를 단일 정맥내 주입(1a상) 또는 4주 동안 일련의 주간 주입(1b상)으로서 투여 받았다. 1a상 및 1b상 둘 다를 위해 용량-상승식 "업 앤 다운(up and down)" 설계를 사용하였으며, 여기서는 0.5, 5, 10,

50, 100, 250 및 500 mg/m²의 연속적 용량을 투여하였다.

[0259] 본 연구의 1차 목적은 키메라 11-1F4의 최대 허용(tolerated) 용량을 확립하는 것이었고, 2차 목적은 다음을 포함하였다: (1) 영향을 받은 장기종대(organomegaly)의 감소 및/또는 개선된 기관 기능에 의해 입증되는 아밀로이드 부하(burden)의 감소의 입증; (2) 단일 IV 주입(1a상) 또는 일련의 주간 IV 주입(1b상)으로서 제공될 때 11-1F4의 약동학의 결정; 및 (3) 250 mg/m² 용량과 500 mg/m² 용량 간의 차이의 결정.

[0260] 주요 포함 기준은 21세 이상이고, 환자가 이전에 전신 요법을 받았으며, 환자가 혈장 세포 표적화 요법을 필요로 하지 않았으며, 환자가 3이하의 미 동부 종양학 협력 그룹(Eastern Cooperative Oncology Group: ECOG) 수행 상태를 갖는 것을 포함하였다.

[0261] 주요 배제 기준은 2.5 mm 초과인 심실내 격막, 30 cc/분 미만의 크레아틴 제거율, 정상의 제도상 상한을 3배 초과하는 알칼리성 포스파타제 및 3.0 mg/dL를 초과하는 빌리루빈을 포함하였다.

[0262] 1a상 연구의 경우, 용량 상승은 "업 앤 다운 설계"를 따랐다. 일단 허용되면, 연이은 환자들은 각각 점차적으로 더 높은 용량의 키메라 11-1F4 mAb를 투여 받았으며, 2명의 환자는 500 mg/m²의 용량에서 등록되었다. 500 mg/m² 용량을 투여받은 환자라도 어떠한 용량 제한 독성도 보고하지 않았다. 환자들은 도 9A에 도시된 바와 같이 0주차에 평가하였고 1주차에 키메라 11-1F4를 투약한 후, 2주, 3주, 4주 및 8주차에 재평가하였다.

[0263] 1b상 연구의 경우, 0.5 mg/m²에서 시작하여 4주 동안 주 1회 주입하였다. 일단 허용되면, 연이은 환자들은 각각 점차적으로 더 높은 용량의 키메라 11-1F4 mAb를 투여 받았으며, 6명의 환자는 500 mg/m²에서 등록되었다. 투약 계획은 도 9B에 도시되어 있다.

[0264] 결과

[0265] 27명의 환자를 키메라 11-1F4A 항체로 처리하였다. 26명의 환자를 반응에 대해 평가할 수 있었다. 8명의 환자는 1a상을 완료하였고, 19명의 환자는 1b상에서 처리를 완료하였다. 1a상 및 1b상의 연령 중앙값은 68세였다. 모든 환자는 1a상 및 1b상 둘 다 동안 소정의 용량의 mAb 키메라 11-1F4 및 최대 최고 용량 수준 500 mg/m²까지 허용하였다. 약물 관련 등급 4 또는 5의 이상반응(AE) 또는 용량 제한 독성은 없었다. 2명의 환자에서는 주입 후 3 내지 4일에 2등급 발진이 발병하였다. 1명의 환자에서는 1a상(용량 수준 4)에서 그리고 이 환자가 1b상에서 재처리되었을 때 피부 발진이 발병하였다. 면역조직화학 염색을 사용한 피부 생검은 수반되는 호중구 침윤물과 함께 아밀로이드 원섬유에 대한 키메라 11-1F4 결합을 나타냈다. 동일한 환자와 또 다른 환자에서는 키메라 11-1F4가 경쇄 아밀로이드 원섬유에 직접 결합하는 임상 및 상관 데이터를 추가로 제공하는 1b상에서 유사한 발진이 발병하였다. 전체적으로, 평가가능한 환자의 63%(5/8)는 1a상에서 mAb c11-1F4를 1회 주입한 후 기관 반응을 나타냈다. 1a상에서 반응까지의 시간 중앙값은 요법 완료 후 4.5주였다. 1b상에서, 평가가능한 환자의 61%(11/18)는 현저한 기관 반응과 요법을 시작한 후 1주의 반응까지의 시간 중앙값을 나타냈으며 더 높은 용량에서 더 빠른 반응의 경향이 있었다

[0266] 평가가능한 환자의 하위세트의 환자 특징은 하기 표 8에 제시한다.

표 8

1a/b상 환자 특징

[0267]

특징	중앙값	
연령 (N=21 환자)	67세 (범위: 34 - 77)	
성별		남성 N=15 (68%) 여성 N=6 (32%)
경쇄 유형		λ N=13 (52%) κ N=8 (48%)
수정된 마요 단계(Revised Mayo Stage)	II (범위: I 내지 IV)	

기관 침범 (번호)	2 (범위: 1 - 4)	심장 신장 피부/연조직 GI 신경계 간 폐 근골격	N=11 (52%) N=11 (52%) N=10 (48%) N=8 (38%) N=4 (19%) N=3 (14%) N=2 (10%) N=1 (5%)
요법에 대한 최상의 혈액학적 반응		CR VGPR PR NR	N=3 (14%) N=15 (71%) N=2 (10%) N=1 (5%)
이전의 용법 (번호)	2 (범위: 1 - 6)		
기준선 NT-프로BNP (ng/L) ^a	2359 (범위: 894 - 13,131)		
기준선 24시간 뇨 단백질 (mg/24hr) ^b	4998 (범위: 1078 - 10,170)		
화학요법에 대한 마지막 노출 이후의 시간 (mos)	6 (범위 1 - 51)		
^a 반응에 대해 평가가능한 심장 침범을 갖는 환자에서의 기준선 NT-프로BNP (기준선 NT-프로BNP ≥ 650pg/mL) ^b 반응에 대해 평가가능한 신장 침범을 갖는 환자에서의 기준선 24시간 뇨 단백질 (기준선 24시간 뇨 단백질 > 500mg/24 h)			

[0268] 1a/b상 연구의 종결시에, 18명의 환자가 평가가능한 반응을 나타냈다(N = 1명은 측정가능한 질환이 없었고, N = 2명은 치료를 완료하지 않았다). 18명 중 12명(67%)은 개선된 기관 반응을 나타냈다. 구체적으로, 1a상에서, 측정가능한 질환 부담(disease burden)을 갖는 환자의 63%(8명 중 5명)는 mAb 11-1F4의 1회 주입 후 기관 반응을 나타냈다(2명 신장, 2명 심장 및 1명 GI). 1b상 연구에서, 측정가능한 질환 부담을 갖는 환자의 70%(10명 중 7명)는 기관 반응을 나타냈다: 심장 침범을 갖는 반응에 대해 평가된 4명의 환자 중 3명은 심장 반응을 나타냈고; 신장 침범을 갖는 반응에 대해 평가된 4명의 환자 중 4명은 신장 반응을 나타냈고; GI 반응을 갖는 1명의 환자를 평가하였고; 연조직 반응을 나타낸 1명의 환자는 ° 3→° 1로부터의 관절염의 개선을 나타냈다.

[0269] 심장 반응

[0270] 8명의 환자를 심장 반응에 대해 평가하였다. 평가된 지표 중에는 NT-프로BNP 및 NYHA 클래스 기준이 있었다. 이들 환자 모두에 대한 기준선 수준은 ≥650 pg mL였다. 환자 중 5명(63%)은 유의적으로 개선된 반응을 나타냈으며(즉, NT-프로BNP의 ≥30% 감소 및/또는 NYHA 클래스 III로부터 클래스 I로의 이동), 2명의 환자는 안정한 상태를 유지하였으며, 1명만이 질환 진행의 임의의 징후를 나타냈다. 환자 군의 심장 결과는 도 11에 도시되어 있다. 1명의 예시적인 환자에 대한 NT-프로BNP의 감소는 도 12에 도시되어 있다.

[0271] 신장 반응

[0272] 8명의 환자를 신장 반응에 대해 평가하였으며, 이때 단백뇨가 반응성을 결정하기위한 주요 지표였다. 6명의 환자(75%)는 유의적으로 개선된 반응(즉, 단백뇨의 ≥30% 감소 또는 신장 진행의 부재 하에 <0.5 g/24시간으로의 감소)을 나타냈으며, 2명의 환자는 안정한 상태를 유지하였다. 어느 환자도 신장 질환 진행의 징후를 나타내지 않았다(eGFR의 >25% 악화). 환자 군에 대한 신장 결과는 도 13에 도시되어 있다. 1명의 예시적인 환자에 대한 단백뇨 감소는 도 14에 도시되어 있다.

[0273] 결과의 연구 개요

[0274] 키메라 11-1F4로의 처리는 내약성이 우수하고 안전하였다. 500 mg/m²의 MTD까지 약물 관련 등급 4 또는 5의 이상반응(AE) 또는 용량 제한 독성은 없었다. 게다가, 키메라 11-1F4는 임상적으로 효과적이다. 대부분의 환자는 단일 주입이나 4주 동안의 주간 주입으로도 조기 및 지속된 기관 반응을 나타냈다. 심장, 신장, GI, 피부 및 연

조직 반응을 포함하여 조직/기관에 걸쳐 개선된 반응이 관찰되었다. 실제로, 키메라 11-1F4는 환자의 67%에서 아밀로이드 분해를 안전하게 촉진하고 AL λ 침착물을 갖는 환자에서도 단지 단일 용량 후에 기관 기능의 개선을 초래한다. 키메라 11-1F4에 대한 환자 반응은 신속하고 지속되었다. 실제로, 1a상 시험에서의 4.5주의 반응 시간 중앙값 및 1b상 시험에서의 단지 1주의 반응 시간 중앙값과 함께, 키메라 11-1F4는 다른 공지된 치료 표적화 아밀로이드 원섬유보다 더 빠른 양성 반응을 제공한다. 키메라 11-1F4에 의한 아밀로이드 원섬유의 신속한 파괴는 기관 기능을 개선시킬 수 있으며, 더 나아가 이렇게 한결같이 치명적인 질환을 앓는 환자의 사망률을 유의적으로 개선시킬 수 있다.

[0275] 실시예 9

[0276] 포괄적 세로 압박변형률에 의한 AL 아밀로이드증 환자에서 키메라 원섬유-반응성 단클론 항체 11-1F4에 대한 심장 반응: 1b상 시험의 결과

[0277] 키메라 11-1F4 mAb의 개방 표지 1b상 임상 시험은 하기에 나타낸 바와 같이 유망한 결과로 완료되었다. 본 연구는 포괄적 세로 압박변형률(GLS)을 사용하여 mAb 투여에 대한 심근 기능의 반응을 평가하기 위해 수행되었다.

[0278] 재발성 또는 불응성 AL 아밀로이드증을 앓는 19명의 환자를 본 시험에 등록시켰다(연령 $\pm$ SD, 63 $\pm$ 12; 68% 남성). 53%는 경색 카파 아밀로이드를 가졌고, 52%는 >650 pg/ml의 NTpro-BNP 수준에 의해 정의된 바와 같이 심장 침범을 가졌다. 19명의 환자의 NTpro-BNP 스크리닝 및 기준선 수준은 하기 표 9에 제시한다. 이들 심장병 환자는 스크리닝 대 기준선 NT-프로BNP 값의 차이로 인해 심장의 평가가능한 1차 임상 분석에 포함되지 않은 2명의 환자를 포함하였다.

표 9

심초음파 분석의 NT프로-BNP 스크리닝 및 기준선 값

방문	통계	모든 1B상 환자	심장 침범	심장 평가 가능한
스크리닝	n	19	10	8
	평균 (SD)	992.81 (1067.07)	1681.4 (1067.12)	1846.9 (1127.46)
	중앙값	662.20	1186.6	1592.6
	Min, Max	39.7, 3964.0	662.2, 3964.0	850.1, 3964.0
기준선 (1주)	n	19	10	8
	평균 (SD)	897.95 (1067.81)	1560.9 (1114.99)	1796.9 (1131.27)
	중앙값	589.70	986.40	1261.0
	Min, Max	44.1, 3810.0	589.7, 3810.0	815.5, 3810.0

[0279] mAb는 용량-상승식 설계에서 0.5, 5, 10, 50, 100, 250 및 500 mg/m²의 순차적 용량으로 4주 동안 매주 투여하였다. 요법 후 기준선 및 12주차에 임상 심초음파(ECHO) 검사를 비교하였다. 좌심실 박출물(LVEF)(심슨(Simpson)의 복엽 방법을 사용하여 계산함) 및 포괄적 세로 압박변형률(GLS)을 포함하는 여러 심초음파 변수가 수득되었다. GLS는 스펙클-추적(TomTec-Arena 1.2, 독일)을 사용하여 측정하였으며 4-, 2- 및 3-챔버 기반 측정치의 평균으로서 계산하였다. 페어드 스튜던트 t-검정(paired Student's t-test)을 사용하여 기준선 및 mAb로 처리한 후 12주차에서의 심초음파 변수를 비교하였다. 심초음파 파라미터의 분석은 하기 표 10에 나타내져 있다.

표 10

심초음파 파라미터의 분석

	스크리닝	12주	P-값
환자 수	10	10	
lvidd_cm (평균 (sd))	4.38 (0.93)	4.32 (0.91)	0.319
ivss_cm (평균 (sd))	1.29 (0.22)	1.21 (0.18)	0.119
pwt_cm (평균 (sd))	1.12 (0.27)	1.14 (0.25)	0.217
lvedd_질량_g (평균 (sd))	187.86 (43.37)	179.70 (42.87)	0.197
ef_퍼센트 (평균 (sd))	51.95 (9.92)	52.28 (11.59)	0.856
mcf (평균 (sd))	0.37 (0.11)	0.38 (0.13)	0.626
mv_e_m_s (평균 (sd))	8.53 (24.18)	0.94 (0.37)	0.347
mv_a_m_s (평균 (sd))	13.45 (34.05)	0.72 (0.23)	NA
gls_퍼센트 (평균 (sd))	-15.68 (4.14)	-17.37 (3.53)	0.004

[0281]

[0282]

전체 코호트에 대해 기준선부터 12주차까지의 검사에서 LVEF($56.2 \pm 8.6\%$ 대 $56.2 \pm 9.5\%$, $p = 0.985$) 또는 GLS($-19.04 \pm 5.11\%$ 대 $-19.73 \pm 4.1\%$, $p = 0.119$) 사이에는 어떠한 유의적인 변화도 없었지만, 심장 침범을 갖는 환자들은 도 15에 가시화된 바와 같이 GLS의 개선($-15.58 \pm 4.14\%$ 전 및 $-17.37 \pm 3.53\%$ 후, $p = 0.004$)을 나타냈다. 처리 전 및 키메라 11-1F4 mAb로 처리 후 12주차에서의 심장 침범을 갖는 환자의 예시적인 심초음파도가 도 17에 도시되어 있다. 도 17에 도시된 환자는 2549 pg/mL의 NT-프로BNP의 기준선 수준 및 처리 전 -9.58 의 GLS 값을 가졌다. 12주 동안의 키메라 11-1F4 mAb 처리 후, 환자는 -13.39 로의 GLS 감소 및 1485 pg/mL로의 NT프로BNP 감소를 나타냈다. 하위군 분석은 람다 아밀로이드 심장 침범을 갖는 환자에서 GLS의 개선($-14.3 \pm 4.38\%$ 전 및 $-16.17 \pm 3.74\%$ 후, $p = 0.02$) 및 카파 아밀로이드 심장 침범을 갖는 환자에서 개선 경향($-16.60 \pm 4.10\%$ 전 및 $-18.16 \pm 3.48\%$ 후, $p = 0.07$)을 보여주었다. 또한, 연구의 임상 분석(스크리닝 값보다는 기준선 NT-프로BNP 값을 사용)에서 정의된 심장 평가가능한 집단도 통계적으로 유의적인 GLS% 감소(p -값 0.0163)와, ECHO 그룹이 제공한 분석(-1.69)과 수치적으로 유사한 감소(-1.71)를 초래하였다. 하기 표 11은 심장병 환자 대 심장병 평가가능한 환자 및 비-심장병 환자에서 GLS 감소의 분석을 보여준다.

표 11

[0283] 스크리닝 정의에 따른 심장병 환자 대 기준선 평가가능한 정의에 따른 심장병 환자 및 비-심장 환자의 비교

	환자 수	기준선	후속	P-값
GLS% 평균(표준편차)	10 (스크리닝 NT-프로BNP에 따른 심장병 환자)	-15.68 (4.14)	-17.37 (3.53)	0.004
	8 (기준선 NT-프로BNP에 따른 심장병 평가가능한 환자)	-14.95 (4.32)	-16.66 (3.55)	0.0163
	9 (스크리닝 NT-프로BNP에 따른 비-심장병 환자)	-22.77 (3.12)	-22.36 (3.02)	0.4829

[0284] 결론적으로, 본 시험은 AL 아밀로이드 심장 침범을 갖는 대상체에서 항-원섬유 특이적 mAb에 노출된 후 GLS의 유의적인 개선을 보여준다. 도 15에 도시된 바와 같이, 심장 침범을 갖는 10명의 환자 중 9명에서 GLS%가 개선되었다. 약물 효과가 없다는 귀무 가설 하에, 9명 이상의 환자가 개선될 확률은 약 0.0107이며, 이는 약물이 진정으로 효과적이지 않는 한 10명의 환자 중 9명의 개선을 관찰하는 것은 아주 가능성이 적은 결과임을 시사한다. 이러한 예비 데이터는 더 큰 규모의 임상 시험을 설계하는 데 도움이 될 것이다. 또한, 심근 기능을 평가하기 위해 GLS를 활용하는 더 큰 규모의 시험이 필요하다.

[0285] 실시예 10

[0286] 혈액학적으로 제어되지 않는 환자에서 키메라 원섬유-반응성 단클론 항체 11-1F4에 대한 기관 반응.

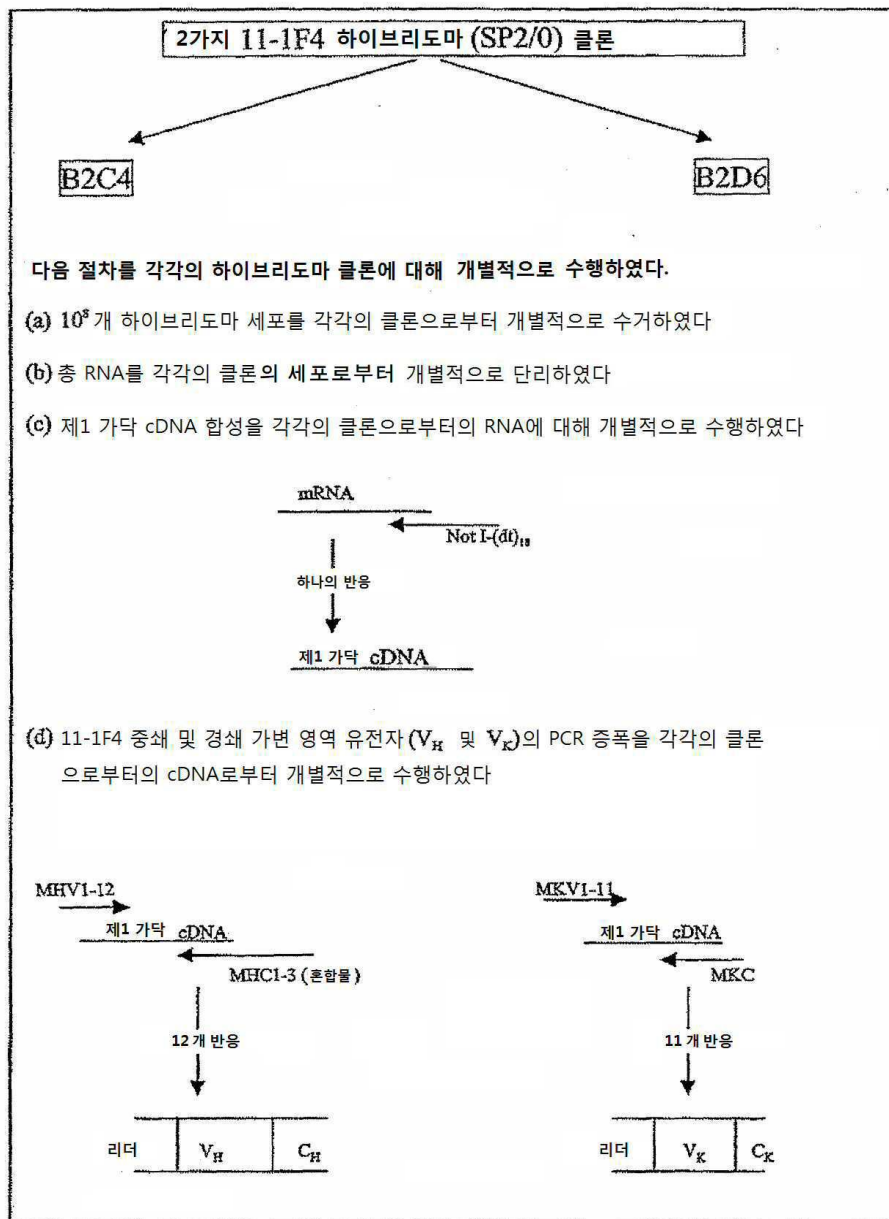
[0287] 6가지의 화학요법 치료를 받았고 기관 반응이 없이 이러한 치료에 대해 혈액학적 부분 반응을 달성한 환자에게 키메라 아밀로이드 원섬유-반응성 단클론 항체(mAb) 11-1F4를 투여하였다. 투약 후 3회 연속 기간 동안, 11-1F4를 투여한 후 NT-프로BNP가 일관되게 감소하였고, 환자는 도 16에 설명된 바와 같이 기관 반응을 달성하였다. 그러나, 항체로부터 제거될 때, 유리 경쇄가 증가하였고 환자 상태는 악화되었다. 이어서, 시험이 완료된 후 기관 진행이 관찰되었다. 이 환자의 반응 패턴은 본 연구자들로 하여금, 기관 반응이 키메라 11-1F4 항체 처리에 기인하였고 화학요법 유도된 혈액학적 반응과 무관하였다는 결론을 내리게 하였다.

[0288] 본 명세서의 설명 및 청구범위에서, "포함하다(comprise)"란 용어, 및 "포함한다(comprises)" 및 "포함하는(comprising)"과 같은 상기 용어의 변형어는 다른 특징, 첨가물, 성분, 정수 또는 단계를 배제하도록 의도된 것이 아니라, 오히려 명시적으로 달리 언급하지 않는 한, 이러한 용어들의 범위는 배타적 의미가 아니라 포괄적 의미를 갖도록 광의적으로 해석되어야 한다.

[0289] 본 발명의 조성물 및 방법이 설명적인 예에 의해 본 개시내용에서 설명되었지만, 본 발명은 이에 한정되지 않으며, 첨부된 청구범위에 의해 정의된 본 발명의 교시로부터 벗어남이 없이 당업자에 의해 알려진 바와 같이 변형이 이루어질 수 있음을 이해해야 한다.

도면

도면1



도면2

```

10          30          50
cagggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccatc
-----
gtccacgtgcgacttccctcagtcctggaccggaccaccgcgggagtggtctcggacaggtag
Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I

70          90          110
acatgcactgtctcagggttctcattaaagcagctatggtgtaagctgggttcgccagcct
-----
tgtacgtgacagagtcaccaagagtaattcgctcgataccacattcgacccaagcggtcgga
T C T V S G F S L S S Y G V S W Y R Q P

130         150         170
ccaggaaagggtctggagtggtctgggagtaatatggggtgacgggagcacaaattatcat
-----
gggtccctttccagacctcaccgacctcattataccccactgcccctcggtgtttaatagta
P G K G L E W L G V I W G D G S T N Y H

190         210         230
-----CDR2-----
ccaaatcicagtgtccagactgagttatcagcaaggatatttccaagagccaagttctcttc
-----
ggtttagagtacaggtctgactcatagtcgttccctataaagggttctcggttcaagagaag
P N L M S R L S I S K D I S K S Q V L F

250         270         290
aaactgaatagttctgcaaacctgatgacacagccacgtactactgtgtcaccttggactac
-----
tttgacttatcagacggttgactactgtgtcggtgcatgatgacacagtggaacctgatg
K L N S L Q T D D T A T Y Y C V T L D Y

310         330
tggggtcaaggaaacctcagtcaccggtctctctca
-----
accccagttccttggagtcagtggcagaggagt
W G Q G I S V T Y S S

```

도면3

```

      10              30              50
gatgittgtgatgacccaactccactctccctgcctgtcagttcttgagatcaagcctcc
-----+-----+-----+
ctacaacactacttggtttgaggtgagagggacggacagtcagaacctctagttcggagg
D V V N T Q T P L S L P V S L G D Q A S

      70              90              110
-----+-----+-----+
atctcttgcagatctagtcagagccittgtacatagaatggaaacacctatttacattgg
-----+-----+-----+
tagagaacgtctagatcagtcctcggaacatgtatctttacctttgtggataaatgtaacc
I S C R S S Q S L V H R N G N T Y L H W

      130              150              170
-----+-----+-----+
tacctgcagaagccaggccagtcctccaaagctcctgatctacaaagtttccaccgattt
-----+-----+-----+
atggacgtcttcggtcggtcagaggtttcgaggactagatgtttcaagggttgctaaa
Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F

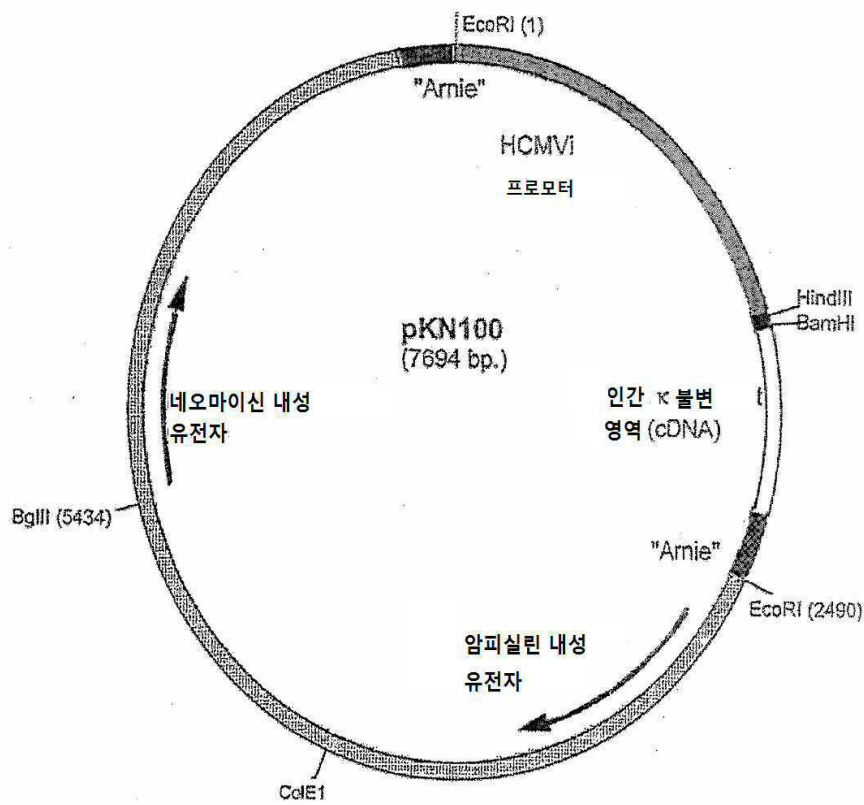
      190              210              230
-----+-----+-----+
tctggggctccagacaggttcagtggcagtggtcagggacagatttcacactcaagata
-----+-----+-----+
agaccccagggctctgtccaagtcacgcgcacctagtcctgtctaaagtgtagttctag
S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I

      250              270              290
-----+-----+-----+
agcagagtgagggtgaggatttgggacittatttctgttttcaactacatatgttccg
-----+-----+-----+
tcgtctcaccctcgaactcctaaccctgaaataaagacaaaagtttgatgtatacaaggc
S R V E A E D L G L Y F C F Q T T Y V P

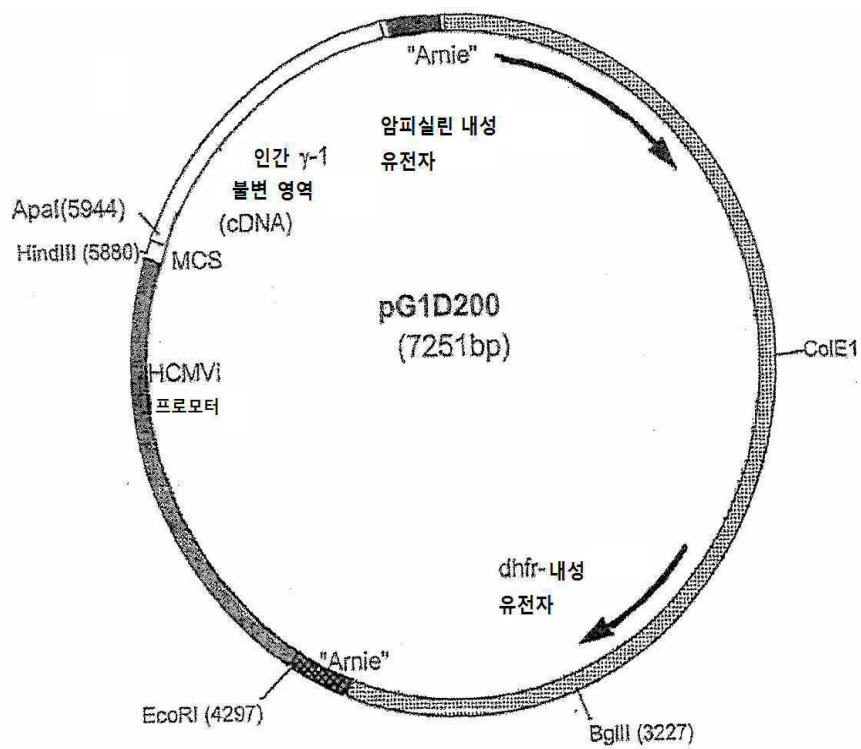
      310              330
-----+-----+-----+
aacacggttcggaggggggaccaagctgggaataaaga
-----+-----+-----+
ttgtgaagcctccccctggttcgaacctttatttt
N T F G G G T K L E I K

```

도면4



도면5



도면6

5'-aagcttgcgcgccaccatgaagttgcctgttaggctgttgggtgc-3'

*Hind*III 코작

리더

aagcttgcgcgccaccatgaagttgcctgttaggctgttgggtgtgtgtgttctggattcctgcttccagcagt
 ttcgaaacggcgggtggtacttcaacgggacaatccgacaaccacgactacaagacctaaaggacgaagggtcgtea
 M K L P V R L L V L M F W J P A S S S

10 30 50
 gatgttgtgatgacccaaactccactctccctgacctgtcagtccttggagatcaagcctcc
 ctacaacactactgggtttgaggtgagagggacggacagtcagaaacctctagttcggagg
 D V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S

70 90 110
 -----CDR1-----
 atctcttgcagatctagtcagagccttgtacatagaaatggaaacacctatttacattgg
 tagagaacgtctagatcagtcctcggaacatgtatctttacatttgggataaatgttaacc
 I S C R S S S O S L V H R N G N T Y L H W

130 150 170
 -----CDR2-----
 tacctgcagagccaggccagtcctccaaagctcctgacttacaaggtttccaaaccgattt
 atggacgtcttcggtcaggtcagaggtttcagggaactagatgtttcaaggttggctaaa
 Y L Q K P G D S P K L L I Y K V S N R F

190 210 230
 tctgggggccagacagggttcagtgccagtggtcagggacagatttcocactcaagatc
 agacccacgggtctgtccagtcacagtcacctagtcctgtctaaagtgtgagttctag
 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I

250 270 290
 -----CDR3-----
 agcagagtgggggtgaggatttgggaatttatttctgttttcaaacacacatgttccg
 tctgtctcaectccgactcctaaccctgaataaagacaaagtttgotgtatacaaggc
 S R V E A E D L G L Y F C F Q T T Y V P

310 330

 aacacgttcggaggggggaccaagctgggaatcaaacgtgagtggtatcc
 ttgtgcaagcctccccctgggttcgacctttagtttgcactcacctagg
 N T F G G G T K L E I K

*Bam*HI

3'-agcctccccctgggttcgaccttttagtttgcactcacctagg-5'

도면7

5'-aagctttccgccaccatggctgtcctggggctgctcttctgc-3'

*Hind*III 코작

리더

aagcttgccgcaccatggctgtcctggggctgctcttctgcctggtagattcccaagctgtgtcctgtcc
 ttcgaacggcgggtgtaccgacaggaccccgacgagacggacccactgttaagggttcgacacaggacagg
 M A V L G L L F C L V T F P S C V L S

10 30 50

cagggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctgggtggcgccctcacagagcctgtccat
 gtccacgtcgacttctcagtcctggaccggaccccgagggtgtctcggacaggtat
 Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I

70 90 110

-----CDR1-----
 acatgcactgtctcagggttctcatttaagcagctatgggtgaagctgggttcgacagcc
 tgcactgtgacagagtcaccaagagtaattcgtcgataccacattcgacccaagcggtcgg
 T C T V S G F S L S S Y G V S W V R Q P

130 150 170

ccagggaagggtctcggagtggtgggagtaatatggggtagcgggagcaccattatca
 ggctcctttcccgacactcaccgacccctcatttatcccccactgcctcgtgttttaagt
 P G K G L E W L G V I W G D G S T N Y H

190 210 230

-----CDR2-----
 ccaaatctcatgtccagactgagtatcagcaaggatatttccaagagccaagttctctt
 ggttttagagtacagggtcgaactcatagtcgttctctataaagggttctcgggttcaagagaa
 P N L M S R L S I S K D I S K S Q V L F

250 270 290

-----CDR3-----
 aaactgaatagctctgcaactgatgacacagccacgtactactgtgtcactctggacta
 tttgacttafcagacggttgactactgtgtcgggtgcatgatgacacagtggaactgat
 K L N S L Q T D D T A T Y Y C V T L D Y

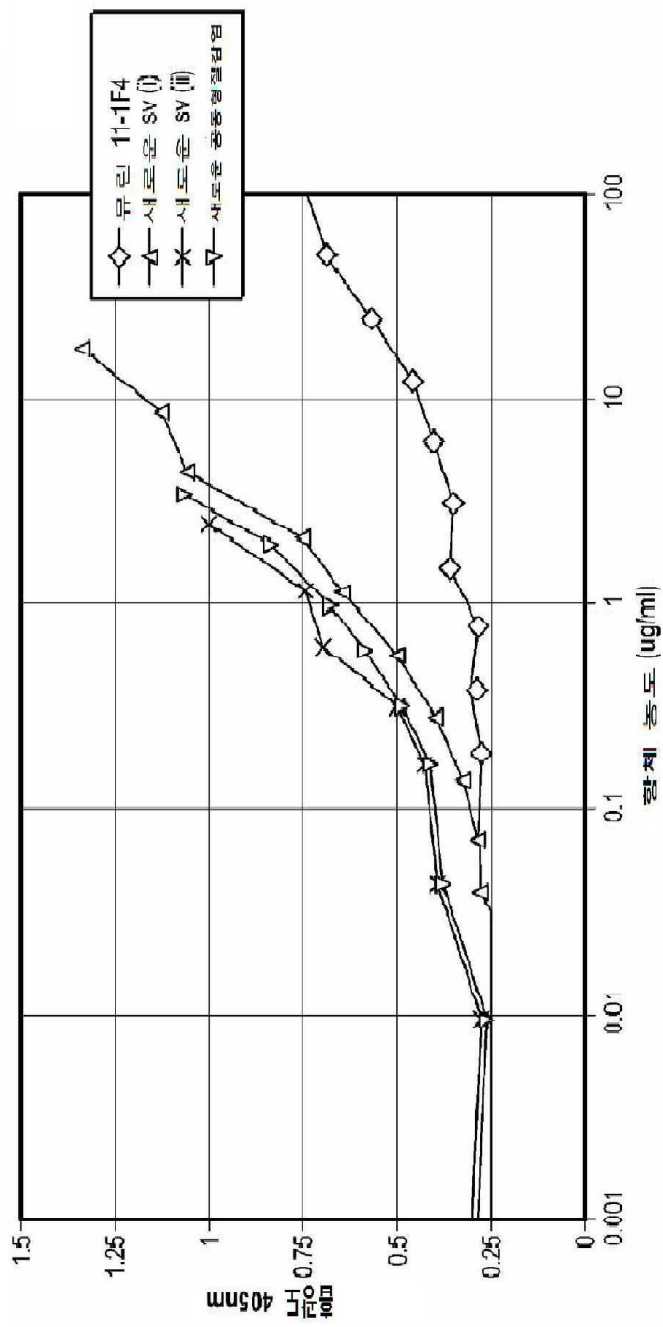
310 330

-----CH1-----
 tggggtaagggaacctcagtcacagtcctcctcagcctccaccaagggcccatcgg
 accccagttccttggagtcagtgccagaggagtcggagggtgggtccagggttagcc
 W G Q G T S V T V S S

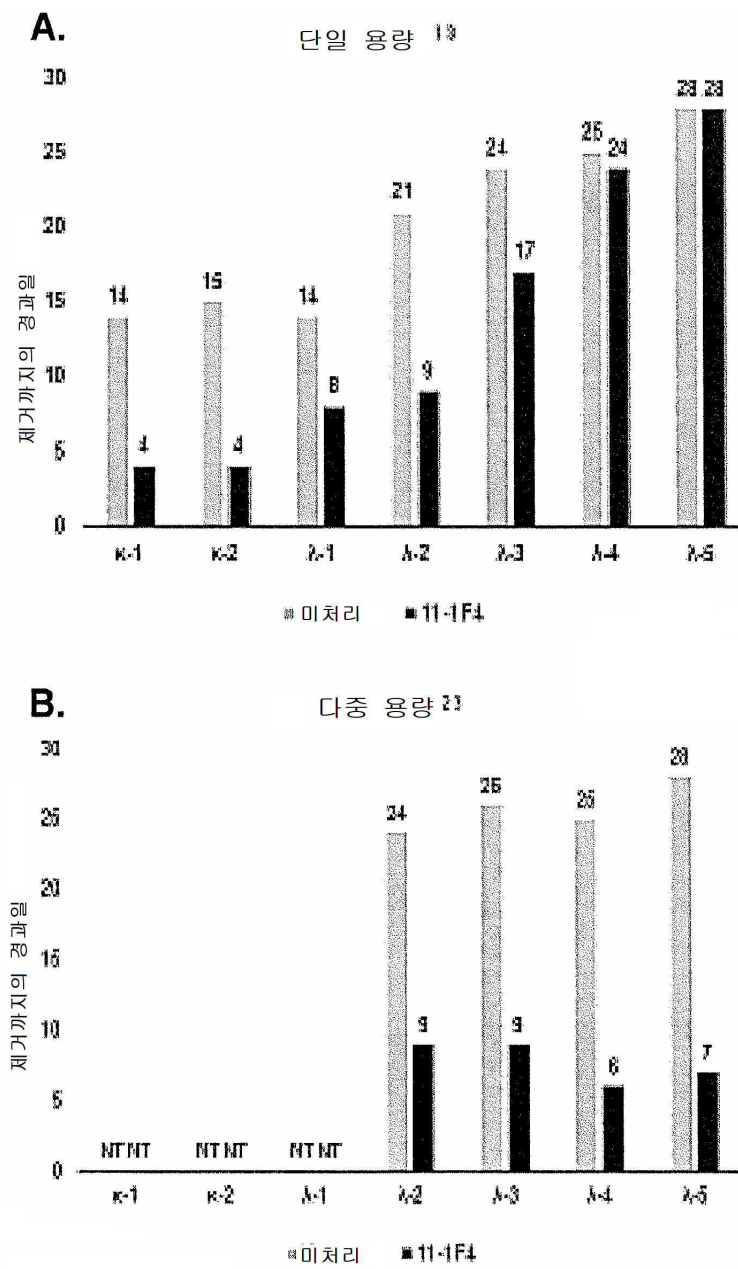
Apal

3'-ccttggagtcagtgccagaggagtcggagggtgggttcccggttagcc-5'

도면8



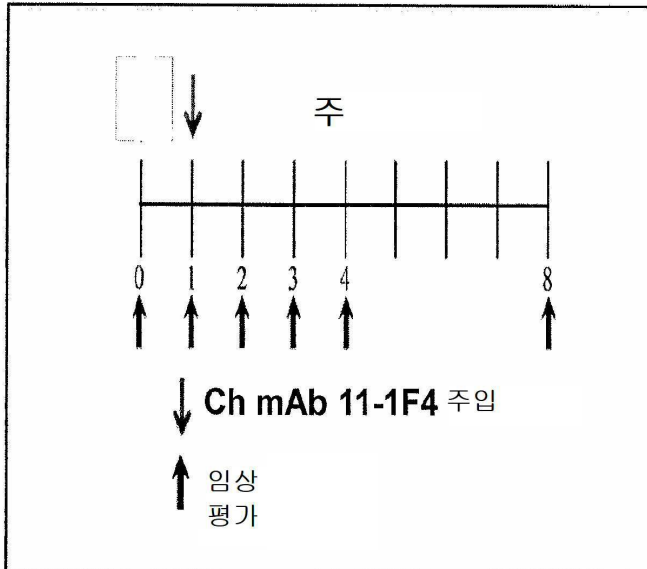
도면9



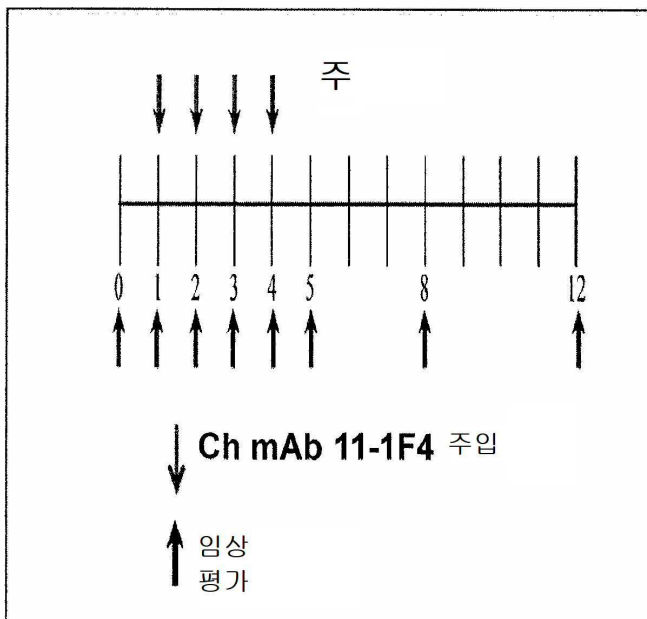
주: 마우스에 피하 주사된, 미처리된 대 11-1F4 처리된 인간 아밀로이드증 침착물의 제거까지의 경과일
1.0일차에 100 μ g 2.0일, 2일, 4일, 6일차에 100 μ g 11-1F4는 mAb 명칭이다

도면10

A.



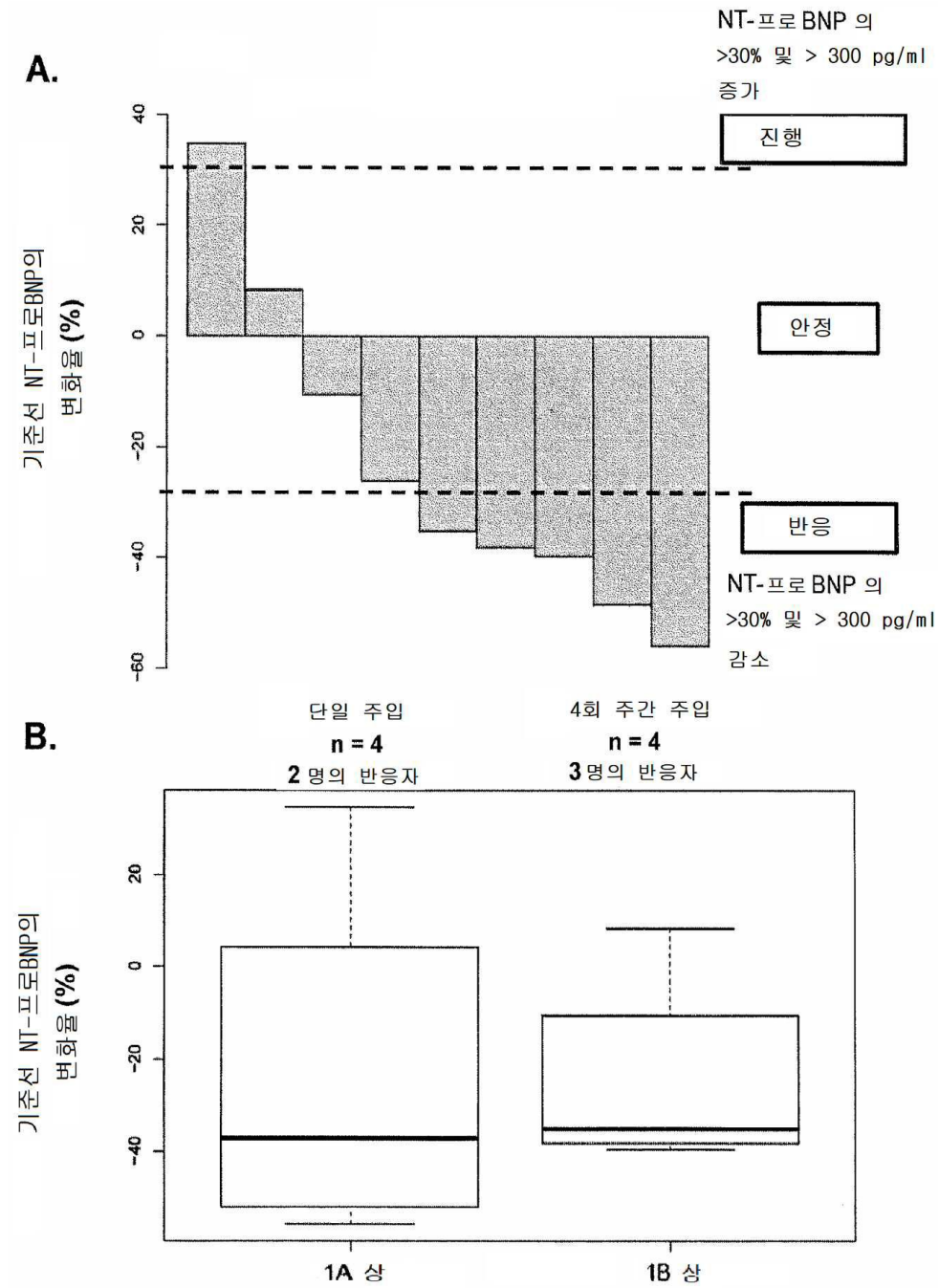
B.



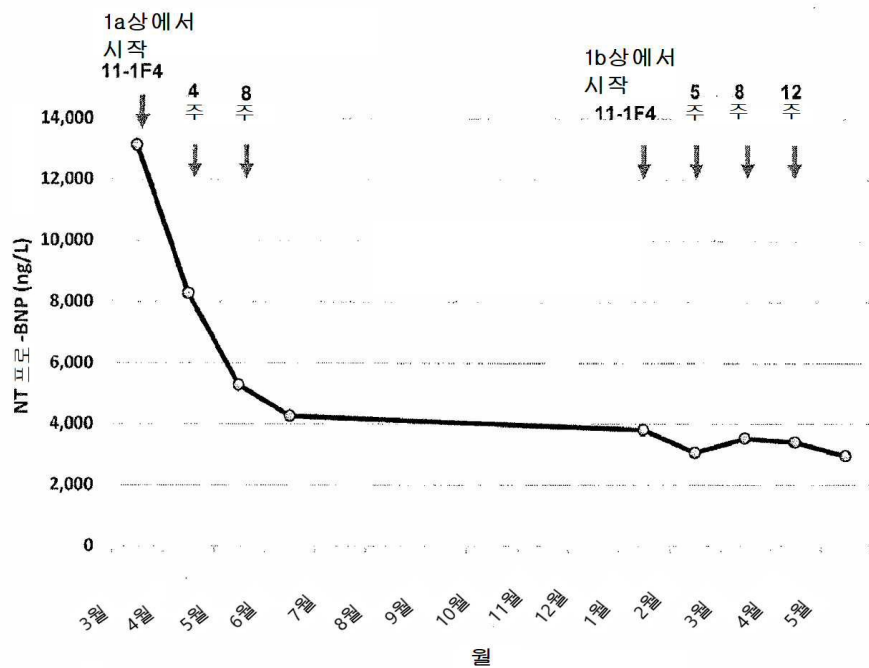
C.

수준	용량 (mg/m ²)
-2	0.125
-1	0.25
1	0.5*
2	5
3	10
4	50
5	100
6	250
7	500

도면11



도면12



환자 프로파일:

불응성 Λ AL 아밀로이드증

기준선 NT-프로BNP(ng/L)

약 13,000

이전의 치료

1

화학요법에 대한 최상의 혈액

학적 반응

VGPR

화학요법에 대한

기관 반응

기관 반응 없음

지속적으로 상승된 NT-프로BNP

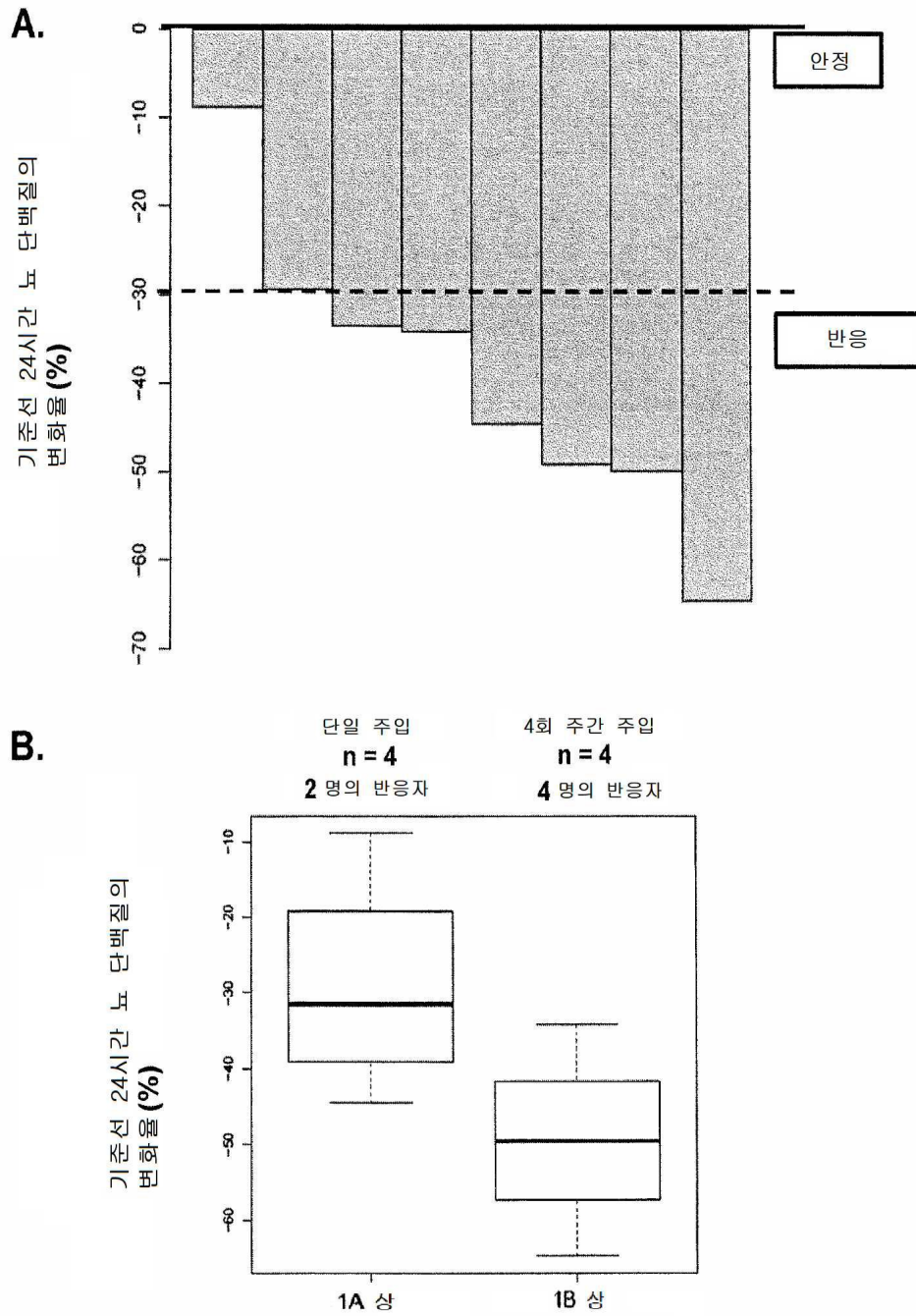
NYHA 클래스 III

11-1F4에 대한 기관 반응

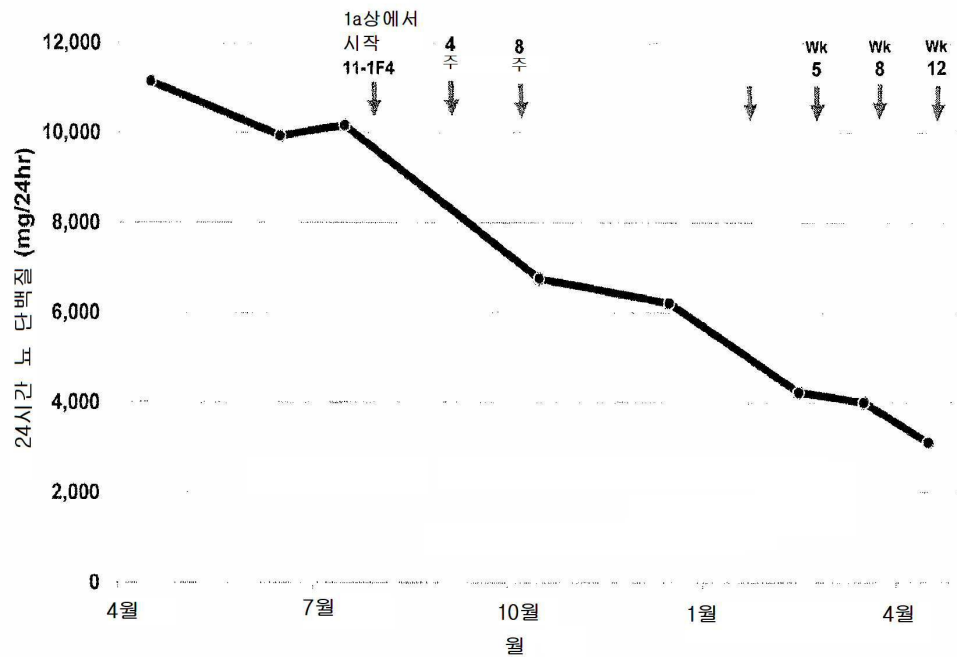
NYHA 클래스 I

NT-프로BNP

도면13



도면14



11-1F4 항체의 1a/b상 임상 시험 전 및 동안의 환자의 24시간 뇨 단백질

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Trustees of Columbia University in the City of New York
- <120> CHIMERIC ANTIBODIES FOR TREATMENT OF AMYLOID DEPOSITION DISEASES
- <130> 8441-0004W0
- <150> US 62/526835
- <151> 2017-06-29
- <160> 48
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 31
- <212> DNA
- <213> Mus musculus
- <400> 1
- atgaagattg cctgttaggc tgttggtgct g 31
- <210> 2
- <211> 31
- <212> DNA

<213> Mus musculus
 <400> 2
 atggagwcag acacactccc tgytatgggt g 31

<210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 3
 atgagtgtgc tcactcaggt cctggsgttg 30

<210> 4
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 4
 atgaggrccc ctgctcagwt tyttggmwtc ttg 33

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 5
 atggatttwc aggtgcagat twtcagcttc 30

<210> 6
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 6
 atgaggtkcy ytgysayct yctctgrgg 29

<210> 7
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 7
 atgggcwtca aagatggagt cacakwyycw gg 32

<210> 8
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 8
 atgtggggay ctktttttcm mtttttcaat g 31
 <210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 9
 atggtrtccw casctcagtt ccttg 25
 <210> 10
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 10
 atgtatatat gtttgttgtc tatttct 27
 <210> 11
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 11
 atggaagccc cagctcagct tctcttcc 28
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 12
 actggatggt gggaagatgg 20
 <210> 13
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 13
atgaaatgca gctggggcat sttcttc 27

<210> 14
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 14

atgggatgga gctrtatcat sytctt 26

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 15

atgaagwtgt ggttaaactg ggttttt 27

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 16

atgractttg ggytcagctt grttt 25

<210> 17
<211> 32
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 17

atgggactcc aggtttcaat ttagttttcc tt 32

<210> 18
<211> 29
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 18

atggcttgtc yttirsgctr ctcttctgc 29

<210> 19

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 19
 atggratgga gckggrgtct ttmtctt 27
 <210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 20
 atgagagtgc tgattctttt gtc 23
 <210> 21
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 21

 atggmttggg tgtggamctt gcttattcct g 31
 <210> 22
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 22
 atgggcagac ttaccattct cattcctg 28
 <210> 23
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 23
 atggattttg ggctgatttt ttttattg 28
 <210> 24
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 24

atgatgggtgt taagtcttct gtacctg	27
<210> 25	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Mus musculus	
<400> 25	
cagtggatag acagatgggg g	21
<210> 26	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Mus musculus	
<400> 26	
cagtggatag accgatgggg g	21
<210> 27	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Mus musculus	
<400> 27	
cagtggatga gctgatgggg g	21
<210> 28	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Mus musculus	
<400> 28	
caagggatag acagatgggg c	21
<210> 29	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> The sequence contains sequences from Homo sapiens and Mus musculus	
<400> 29	
gttttccag tcacgac	17

<210> 30
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> The sequence contains sequences from Homo sapiens and Mus musculus
 <400> 30
 agcggataat ttcacacagg a 21

<210> 31
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> The sequence contains sequences from Homo sapiens and Mus musculus
 <400> 31
 aagcttgccg ccaccatggc tgtcctgggg ctgctcttct gc 42

<210> 32
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> The sequence contains sequences from Homo sapiens and Mus musculus
 <400> 32
 ccgatgggcc ctgggtggag gctgaggaga cggctgactga ggttcc 46

<210> 33
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> The sequence contains sequences from Homo sapiens and Mus musculus
 <400> 33
 aagcttgccg ccaccatgaa gttgcctgtt aggctgttgg tgc 43

<210> 34

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> The sequence contains sequences from Homo sapiens and Mus musculus

<400> 34

ggatccactc acgtttgatt tccagcttgg tccccctcc ga 42

<210> 35

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Lys Pro Asn Leu Met

50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ile Ser Lys Ser Gln Val Leu Phe

65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val

85 90 95

Thr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 36

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

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

1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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 Leu Gly Leu Tyr Phe Cys Phe Gln Thr
 85 90 95
 Thr Tyr Val Pro Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 37

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The sequence contains sequences from Homo sapiens and Mus
 musculus

<400> 37

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala

1 5 10 15
 Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

65 70 75 80
 Gly Val Pro Arg Asp Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Phe Cys

100 105 110

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

115 120 125

Glu Ile Lys

130

<210> 38

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The sequence contains sequences from Homo sapiens and Mus

musculus

<400> 38

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu

35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Pro

65 70 75 80

Asn Leu Met Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ile Ser Lys Ser Gln

85 90 95

Val Leu Phe Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr

100 105 110

Tyr Cys Val Thr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val

115 120 125

Ser Ser

130

<210> 39

<211> 333

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 39

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc	60
acatgcactg tctcagggtt ctcatthaagc agctatgggtg taagctgggt tgcgcagcct	120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagta atatgggggtg acgggagcac aaattatcat	180
ccaaatctca tgtccagact gagtatcagc aaggatattt ccaagagcca agttctcttc	240
aaactgaata gtctgcaaac tgatgacaca gccacgtact actgtgtcac cttcgactac	300
tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tca	333

<210> 40

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 40

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc	60
atctcttgca gatctagta gagccttgta catagaaatg gaaacaccta ttacattgg	120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtctc caaccgattt	180
tctggggctc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc	240
agcagagtgg aggtctgagga ttggggactt tatttctgtt ttcaaactac atatgttccg	300
aacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa	336

<210> 41

<211> 43

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 41

aagcttgccg ccacatgaa gttgcctgtt aggtctgttg tgc	43
--	----

<210> 42

<211> 422

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> The sequence contains sequences from Homo sapiens and Mus musculus

<400> 42

aagcttgccg ccaccatgaa gttgcctgtt aggctgttgg tgctgatgtt ctggattcct 60

gcttccagca gtgatgttgt gatgacccaa actccactct cctgcctgt cagtcttga 120

gatcaagcct ccatctcttg cagatctagt cagagccttg tacatagaaa tggaaacacc 180

tatttacatt ggtacctgca gaagccaggc cagtctccaa agctcctgat ctacaaagtt 240

tccaaccgat tttctggggg cccagacagg ttcagtggca gtggatcagg gacagatttc 300

acactcaaga tcagcagagt ggaggctgag gatttgggac tttatttctg ttttcaagac 360

tacatatgtt ccgaacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaatcaaac gtgagtggat 420

cc 422

<210> 43

<211> 42

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 43

ggatccactc acgtttgatt tccagcttgg tccccctcc ga 42

<210> 44

<211> 42

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 44

aagctttccg ccaccatggc tgtcctgggg ctgctcttct gc 42

<210> 45

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> The sequence contains sequences from Homo sapiens and Mus musculus

<400> 45

aagctttccg ccaccatggc tgtcctgggg gctgctcttc tgcctggtga cattaccaag 60

ctgtgtcctg tcccaggcgc agctgaagga gtcaggacct ggctggtgg agcctcacag 120

agcctgtcca tcacatgcac tgtctcaggg ttctcattaa gcagctatgg tgtaagctgg 180

gttcgccagc ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagta atatggggtg acgggagcac 240

aaattatcat ccaaattctca tgtccagact gattatcagc aaggatattt ccaagagcaa 300
gttctcttca aactgaatag tctgcaaact gatgacacag ccagctacta ctgtgtcacc 360
ttggactact ggggtcaaag gaacctccag tcaccgtctc ctcagcctcc accacggggc 420
catcgg 426

<210> 46

<211> 46

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 46

ccgatgggcc ctgggtggag gctgaggaga cggtgactga ggttcc 46

<210> 47

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The sequence contains sequences from Homo sapiens and Mus
musculus

<400> 47

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Arg Asp 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 Leu Gly Leu Tyr Phe Cys Phe Gln Thr

85 90 95

Thr Tyr Val Pro Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 48

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> The sequence contains sequences from Homo sapiens and Mus musculus

<400> 48

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Pro Asn Leu Met

50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ile Ser Lys Ser Gln Val Leu Phe

65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val

85 90 95

Thr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

100 105 110