



등록특허 10-2779818



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월11일  
(11) 등록번호 10-2779818  
(24) 등록일자 2025년03월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 16/28* (2006.01) *A61K 31/436* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)  
*A61P 29/00* (2023.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C07K 16/2878* (2013.01)  
*A61K 31/436* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7009524
- (22) 출원일자(국제) 2016년09월02일  
심사청구일자 2021년08월30일
- (85) 번역문제출일자 2018년04월04일
- (65) 공개번호 10-2018-0044422
- (43) 공개일자 2018년05월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/050114
- (87) 국제공개번호 WO 2017/040932  
국제공개일자 2017년03월09일
- (30) 우선권주장  
62/214,411 2015년09월04일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문현  
US20140093497 A1\*  
W02007075326 A2  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문현

(73) 특허권자  
프리마토프 테라퓨틱스 인크.  
미국 02459 매사추세츠주 뉴턴 두들리 로드 508

(72) 발명자  
유, 보  
미국 02459 매사추세츠주 뉴턴 두들리 로드 508  
프리마토프 테라퓨틱스 인크. 내  
왕, 리지안  
미국 02459 매사추세츠주 뉴턴 두들리 로드 508  
프리마토프 테라퓨틱스 인크. 내  
리만, 키스  
미국 02459 매사추세츠주 뉴턴 두들리 로드 508  
프리마토프 테라퓨틱스 인크. 내

(74) 대리인  
양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 38 항

심사관 : 문명순

## (54) 발명의 명칭 인간화 항-CD40 항체 및 그의 용도

**(57) 요약**

본 개시내용은 다양한 치료, 예방 및 진단 방법에 사용될 수 있는 항-CD40 항체, 예컨대 인간화 항-CD40 항체에 관한 것이다. 항체는 일반적으로 CD154에 결합하는 CD40의 능력을 차단하며, CD40을 발현하는 세포 (예를 들어, B 세포)를 활성화시키지 않고 그렇게 한다. 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 기관 또는 조직 이식과 연관된 합병증을 감소시키는데 사용될 수 있다.

**대 표 도** - 도1

설명: 마우스 항-CD40 클론 2C10  
증례 (신호 케이드 + V-영역)  
ATGGAAAGGCACGGATCTTCTCTTCTCTCTGTGAGTAACTCAGGGTGTCCAC  
TCCCAAGTCCAGCTGCAAAGCTGTGGGGCTGAACTGCGAAACCTGGGGCT  
CAGTGAAGATGTCCTGTAAGCCTCTGGCTACACCTTTACTAACTCTGGATGC  
ACTGGGTTAAACAGAGGGCTGGACAGGCTCTGGAAATGGATTGGATACATTAAT  
CTCTAGCAAAATGATTACTAACTGAAATCAAAAGTTAAAGGACAGGCACATTG  
ACTCGAGACAAATCTCCAAACAGCTCATGCAACTGGGTACCCCTGACATCT  
GAGGACTCTGCACTCTATTATGTCAGACAGACAGGGGTTCTCTTACTGGGGCA  
AGGGACTCTGGTCACTGTCCT  
단백질  
MERHWFLELLSVTAGVHSQVQLQQSAELAKPGASVKMSCKASGYTFNYW  
MHWVKRPQQLEWIGYINPSNDYTKYNOKFKOKATLTADKSNTAYMQLGSL  
TSEDSAVYYCARQGPYWGQGLTVTVS

증례 (신호 케이드 + V-영역)  
DNA  
ATGGGATTTCAAGTGCAGATTTCAAGCTTCTGCTTAATCAGTGCTCTAGTCATAA  
TATCCAGGGCAAATTTGTTCTCAGCCAGCTCTCCAGCAATCATGTCGATCTC  
AGGGGAGAGGTACCATGACTGCTGAGTCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATC  
ACTGTTACACAGAGGGTCAAGGACACTCCCTTAAAGATGGATTATGACACA  
TCCTAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTCTGCTCTGAGTGGCAGTGGCTGGCTGGAC  
CTCTTACTCTGTCACAAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCACTTATTAC  
TGCCACAGTTGAGTAGTGACCCATTACAGTTCGGCTGGGGGAGAAGTTGG  
AATTTAA  
단백질  
MDFOVQJESFLLIISASVIIISR6QIVLTSQSPAIMSASPGEKVMTCSASSSVSYMHH  
YHQRSGTSPKRWYDTSKLSQGVPARFSGSGTYSLSLTISSMEAEDATYYCHQL  
SSDPFTFGSGTKEIK

(52) CPC특허분류

*A61K 39/39558* (2013.01)

*A61K 45/06* (2013.01)

*A61P 29/00* (2023.02)

*A61P 35/00* (2018.01)

*A61K 2300/00* (2023.05)

*C07K 2317/24* (2013.01)

*C07K 2317/76* (2013.01)

*C07K 2317/92* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열식별번호: 21에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 23에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 각각 서열식별번호: 13, 14 및 15에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 각각 서열식별번호: 16, 17 및 18에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 것인, 인간화 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 해리 상수 ( $K_D$ )가  $1 \times 10^{-9}$  M 미만인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, (a) 전체 이뮤노글로불린 분자; (b) scFv; (c) Fab 단편; (d) F(ab')2; 및 (e) 디슬퍼드 연결된 Fv로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, a) IgG 불변 도메인; 및 (b) IgA 불변 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1개의 불변 도메인을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 적어도 1개의 인간 불변 도메인을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, CD40 세포외 도메인에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, CD40이 인간 또는 레서스 CD40인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 시험관내에서 CD154-발현 Jurkat 세포에 의한 B 림프구 활성화를 차단하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, B 림프구 CD23, CD80, 또는 CD86 발현을 억제하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

#### 청구항 10

제1항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 11

제10항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

#### 청구항 12

제11항의 벡터를 포함하는 단리된 세포.

### 청구항 13

제1항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 질환 또는 장애를 갖는 대상체에서 CD40-CD154 상호작용을 차단하기 위한 제약 조성물: 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 석회증, 레이노 증후군, 식도 운동장애, 수지경화증, 및 모세혈관확장증으로 이루어진 CREST 증후군, 안진전, 염증성 근병증, 전신 경피증, 원발성 담즙성 간경변증, 포진성 피부염, 밀리-피셔 증후군, 급성 운동신경 축삭 신경병증 (AMAN), 전도 차단을 갖는 다초점 운동신경 신경병증, 자가면역 간염, 항인지질 증후군, 베게너 육아종증, 현미경적 다발혈관염, 처크-스트라우스 증후군, 류마티스 관절염, 만성 자가면역 간염, 공막근염, 중증 근무력증, 램버트-이튼 근무력 증후군, 하시모토 갑상선염, 그레이브스병, 부신생물성 소뇌 변성, 강직 인간 증후군, 변연 뇌염, 이삭 증후군, 시데남 무도병, 스트렙토코쿠스와 연관된 소아 자가면역 신경정신 질환 (PANDAS), 뇌염, 제1형 당뇨병, 시신경 척수염, 악성 빈혈, 애디슨병, 건선, 염증성 장 질환, 건선성 관절염, 쇼그렌 증후군, 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 반응성 관절염, 다발근염, 피부근염, 다발성 내분비 부전, 슈미트 증후군, 자가면역 포도막염, 부신염, 갑상선염, 자가면역 갑상선 질환, 위 위축증, 만성 간염, 루푸스양 간염, 아테롬성동맥경화증, 초로기 치매, 탈수초성 질환, 아급성 피부 홍반성 루푸스, 부갑상선기능저하증, 드레슬러 증후군, 자가면역 혈소판감소증, 특발성 혈소판감소성 자반증, 용혈성 빈혈, 심상성 천포창, 천포창, 원형 탈모증, 유천포창, 경피증, 진행성 전신 경화증, 성인 발병 당뇨병, 남성 및 여성 자가면역 불임, 강직성 척추염, 케양성 결장염, 크론병, 혼합 결합 조직 질환, 결절성 다발동맥염, 전신 피사성 혈관염, 소아 발병 류마티스 관절염, 사구체신염, 아토피성 피부염, 아토피성 비염, 굿페스쳐 증후군, 샤파스병, 사르코이드증, 류마티스 성 열, 천식, 반복 유산, 항-인지질 증후군, 농부 폐, 다형성 홍반, 심장질개술후 증후군, 쿠싱 증후군, 자가면역 만성 활동성 간염, 조류 사육자 폐, 알레르기성 질환, 알레르기성 뇌척수염, 독성 표피 피사용해, 탈모증, 알포트 증후군, 폐포염, 알레르기성 폐포염, 섬유화 폐포염, 간질성 폐 질환, 결절성 홍반, 괴저성 농피증, 수혈 반응, 나병, 말라리아, 리슈마니아증, 트리파노소마증, 다카야스 동맥염, 류마티스성 다발근육통, 측두 동맥염, 주혈흡증증, 거대 세포 동맥염, 회충증, 아스페르길루스증, 샘터 증후군, 습진, 림프종성 육아종증, 베체트 병, 카풀란 증후군, 가와사키병, 뎅기, 심내막염, 심내막심근 섬유증, 안내염, 장기 융기성 홍반, 태아 적모구증, 호산구성 근막염, 술만 증후군, 펠티 증후군, 사상증증, 모양체염, 만성 모양체염, 이색성 모양체염, 푸크스 모양체염, IgA 신병증, 헤노흐-쉔라인 자반증, 이식편 대 숙주 질환, 이식 거부, 인간 면역결핍 바이러스 감염, 에코바이러스 감염, 심근병증, 알츠하이머병, 파르보바이러스 감염, 풍진 바이러스 감염, 백신접종후 증후군, 선천성 풍진 감염, 호지킨 및 비-호지킨 림프종, 신세포 암종, 다발성 골수종, 이튼-램버트 증후군, 재발성 다발연골염, 악성 흑색종, 한랭글로불린혈증, 발텐스트롬 마크로글로불린혈증, 앱스타인-바르 바이러스 감염, 볼거리, 예반 증후군, 및 자가면역 생식선 부전.

### 청구항 14

제1항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이며, 이식 거부의 치료 또는 예방적 치료를 필요로 하는 대상체에서 이식 거부를 치료하거나 예방적으로 치료하거나, 또는 이식 거부가 발생하기 전의 시간의 기간을 증가시킬 것을 필요로 하는 대상체에서 이식 거부가 발생하기 전의 시간의 기간을 증가시키는데 사용하기 위한 제약 조성물.

### 청구항 15

제14항에 있어서, 대상체가 기관 이식을 받았거나 또는 그를 필요로 하는 대상체인 제약 조성물.

### 청구항 16

제15항에 있어서, 기관이 심장, 신장, 폐, 간, 췌장, 장, 및 흉선, 또는 그의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

### 청구항 17

제14항에 있어서, 대상체가 조직 이식을 받았거나 또는 그를 필요로 하는 대상체인 제약 조성물.

### 청구항 18

제17항에 있어서, 조직이 골, 건, 각막, 피부, 심장 판막, 정맥, 또는 골수인 제약 조성물.

### 청구항 19

제14항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 투여가 조직 또는 기관 이식 전에 개시되는 것인 제약 조성물.

### 청구항 20

제14항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 투여가 조직 또는 기관 이식 후 적어도 1개월 동안 계속되는 것인 제약 조성물.

### 청구항 21

제20항에 있어서, 투여가 조직 또는 기관 이식 후 적어도 6개월 동안 계속되는 것인 제약 조성물.

### 청구항 22

제1항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이며, 이식편-대-숙주 질환의 치료 또는 예방적 치료를 필요로 하는 대상체에서 이식편-대-숙주 질환을 치료하거나 예방적으로 치료하는데 사용하기 위한 제약 조성물.

### 청구항 23

제1항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이며, 자가면역 장애의 치료 또는 예방적 치료를 필요로 하는 대상체에서 자가면역 장애를 치료하거나 예방적으로 치료하는데 사용하기 위한 제약 조성물.

### 청구항 24

제23항에 있어서, 자가면역 장애가 자가항체의 존재와 연관되거나 또는 그에 의해 유발되는 것인 제약 조성물.

### 청구항 25

제1항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 질환 또는 장애를 치료하는데 사용하기 위한 제약 조성물: 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 석회증, 레이노 증후군, 식도 운동장애, 수지경화증, 및 모세혈관화장증으로 이루어진 CREST 증후군, 안진전, 염증성 근병증, 전신 경피증, 원발성 담즙성 간경변증, 포진성 피부염, 밀러-피셔 증후군, 급성 운동신경 축삭 신경병증 (AMAN), 전도 차단을 갖는 다초점 운동신경 신경병증, 자가면역 간염, 항인지질 증후군, 베게너 육아종증, 혈미경적 다발혈관염, 체크-스트라우스 증후군, 류마티스 관절염, 만성 자가면역 간염, 공막근염, 중증 근무력증, 램버트-이튼 근무력 증후군, 하시모토 갑상선염, 그레이브스병, 부신생물성 소뇌 변성, 강직 인간 증후군, 변연 뇌염, 이삭 증후군, 시데남 무도병, 스트렙토코쿠스와 연관된 소아 자가면역 신경정신 질환 (PANDAS), 뇌염, 제1형 당뇨병, 및 시신경 척수염.

### 청구항 26

제25항에 있어서, 염증성 근병증이 다발근염, 피부근염, 또는 봉입체 근염인 제약 조성물.

### 청구항 27

제1항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 질환 또는 장애를 치료하는데 사용하기 위한 제약 조성물: 악성 빈혈, 애디슨병, 건선, 염증성 장 질환, 건선성 관절염, 쇼그렌 증후군, 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 및 반응성 관절염.

### 청구항 28

제27항에 있어서, 홍반성 루푸스가 원판상 홍반성 루푸스, 약물-유발 홍반성 루푸스, 또는 신생아 홍반성 루푸스인 제약 조성물.

### 청구항 29

제1항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 하기로 이루어진 군으로부터 선

택된 질환 또는 장애를 치료하는데 사용하기 위한 제약 조성물: 다발근염, 피부근염, 다발성 내분비 부전, 슈미트 증후군, 자가면역 포도막염, 부신염, 갑상선염, 자가면역 갑상선 질환, 위 위축증, 만성 간염, 루푸스양 간염, 아테롬성동맥경화증, 초로기 치매, 탈수초성 질환, 아급성 피부 홍반성 루푸스, 부갑상선기능저하증, 드레슬러 증후군, 자가면역 혈소판감소증, 특발성 혈소판감소성 자반증, 용혈성 빈혈, 심상성 천포창, 천포창, 원형 탈모증, 유천포창, 경피증, 진행성 전신 경화증, 성인 발병 당뇨병, 남성 및 여성 자가면역 불임, 강직성 척추염, 궤양성 결장염, 크론병, 혼합 결합 조직 질환, 결절성 다발동맥염, 전신 피사성 혈관염, 소아 발병 류마티스 관절염, 사구체신염, 아토피성 피부염, 아토피성 비염, 굿페스쳐 증후군, 샤가스병, 사르코이드증, 류마티스 성 열, 천식, 반복 유산, 항-인지질 증후군, 농부 폐, 다형성 홍반, 심장질개술후 증후군, 쿠싱 증후군, 자가면역 만성 활동성 간염, 조류 사육자 폐, 알레르기성 질환, 알레르기성 뇌척수염, 독성 표피 피사용해, 탈모증, 알포트 증후군, 폐포염, 알레르기성 폐포염, 섬유화 폐포염, 간질성 폐 질환, 결절성 홍반, 고저성 농피증, 수혈 반응, 나병, 말라리아, 리슈마니아증, 트리파노소마증, 다카야스 동맥염, 류마티스성 다발근육통, 측두 동맥염, 주혈흡충증, 거대 세포 동맥염, 회충증, 아스페르길루스증, 샘터 증후군, 습진, 림프종성 육아종증, 베체트 병, 카플란 증후군, 가와사키병, 뎅기, 심내막염, 심내막심근 섬유증, 안내염, 장기 융기성 홍반, 태아 적모구 증, 호산구성 근막염, 슬만 증후군, 펠티 증후군, 사상충증, 모양체염, 만성 모양체염, 이색성 모양체염, 푸크스 모양체염, IgA 신병증, 헤노흐-쉔라인 자반증, 이식편 대 속주 질환, 이식 거부, 인간 면역결핍 바이러스 감염, 에코바이러스 감염, 심근병증, 알츠하이머병, 파르보바이러스 감염, 풍진 바이러스 감염, 백신접종후 증후군, 선천성 풍진 감염, 호지킨 및 비-호지킨 림프종, 신세포 암종, 다발성 골수종, 이튼-램버트 증후군, 재발성 다발연골염, 악성 흑색종, 한랭글로불린혈증, 발렌스트롬 마크로글로불린혈증, 앱스타인-바르 바이러스 감염, 볼거리, 에반 증후군, 및 자가면역 생식선 부전으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

### 청구항 30

제29항에 있어서, 성인 발병 당뇨병이 제II형 당뇨병인 제약 조성물.

### 청구항 31

제14항, 제22항 및 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 제약 조성물.

### 청구항 32

제14항, 제22항 및 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 투여가 비경구, 정맥내, 피하, 근육내, 경피, 경구, 국소, 경막내, 또는 국부인 제약 조성물.

### 청구항 33

제14항, 제22항 및 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 사용이 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 투여의 6개월 내에 면역억제제의 투여를 추가로 포함하는 것인 제약 조성물이며,

여기서 면역억제제가 시클로스포린 A 또는 시클로스포린 G를 포함하는 칼시뉴린 억제제, 타크롤리무스, 시롤리무스, 템시롤리무스, 조타롤리무스, 또는 에베롤리무스를 포함하는 mTor 억제제, 평골리모드, 미리오신, 알렘투주맙, 리툭시맙, 항-CD4 모노클로날 항체, 항-LFA1 모노클로날 항체, 항-LFA3 모노클로날 항체, 항-CD45 항체, 항-CD19 항체, 모나바타셉트, 벨라타셉트, 인돌릴-ASC; 아자티오프린, 림프구 면역 글로불린 및 말(equine) 항-흉선세포 글로불린, 미코페놀레이트 모페틸, 미코페놀레이트 나트륨, 다클리주맙, 바실릭시맙, 시클로포스파미드, 프레드니손, 프레드니솔론, 레플루노미드, FK778, FK779, 15-데옥시스페르구알린, 부술판, 플루다라빈, 메토트렉세이트, 6-메르캅토피린, 15-데옥시스페르구알린, LF15-0195, 브레디닌, 브레퀴나르, 및 무로모납-CD3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

### 청구항 34

제33항에 있어서, 항-CD45 항체가 항-CD45RB 항체인 제약 조성물.

### 청구항 35

제33항에 있어서, 면역억제제가 벨라타셉트인 제약 조성물.

### 청구항 36

제33항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 면역억제제가 서로의 1개월 내에 투여되는 것인 제약 조성물.

**청구항 37**

제36항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 면역억제제가 서로의 1주 내에 투여되는 것인 제약 조성물.

**청구항 38**

(a) 제1항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 단리된 세포를 배양 배지에서 상기 폴리뉴클레오티드가 발현되는 조건 하에서 배양하는 단계; 및

(b) 상기 세포 또는 배양 배지로부터 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 회수하는 단계  
를 포함하는, 제1항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제조하는 방법.

**청구항 39**

삭제

**청구항 40**

삭제

**청구항 41**

삭제

**청구항 42**

삭제

**청구항 43**

삭제

**청구항 44**

삭제

**청구항 45**

삭제

**청구항 46**

삭제

**청구항 47**

삭제

**청구항 48**

삭제

**청구항 49**

삭제

**청구항 50**

삭제

**청구항 51**

삭제

**청구항 52**

삭제

**발명의 설명****기술 분야**

[0001]

**관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002]

이 출원은 2015년 9월 4일에 출원된 미국 출원 번호 62/214,411에 대해 우선권 주장을 하며, 그의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003]

**서열 목록**

[0004]

본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출되었으며, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 서열 목록을 함유한다. 2016년 9월 1일에 생성된 상기 ASCII 사본은 11212-005211-W00\_SL.txt로 명명되며, 33,948 바이트 크기이다.

[0005]

**분야**

[0006]

본 발명은 인간화 항-CD40 항체, 및 예를 들어, 이식 거부의 가능성을 감소시키거나, 이식 거부를 치료하거나, 면역억제를 유도하거나, 자가면역 장애를 치료하기 위한 이러한 항체의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0007]

면역계, 특히 체액성 면역계의 억제는 기관 이식 및 자가면역 장애의 치료에 유익하다. 기관 이식은 기관 손상을 수반하는 많은 형태의 삶을 위협하는 질환에 대한 바람직한 치료 방법으로서 알려져 있다. 그러나, 이식 거부는 이식된 세포 또는 조직을 받는 유기체가 그 조직에 대해 바람직하지 않은 면역 반응을 시작하는 경우에 발생할 수 있다. 이식 거부는 조직-유형 매칭에 의해 최소화될 수 있지만, 심지어 매칭된 조직도 공여자에 의해 거부될 수 있다. 따라서, 면역억제 요법은 현재 사실상 모든 경우의 조직 이식에 대해 사용된다.

[0008]

임상적 이식에서의 개선된 결과는 일차적으로 거부 반응을 억제하는 증가적으로 강력한 비-특이적 면역억제 약물의 개발을 통해 달성되었다. 단기적 결과는 개선된 반면, 장기적 결과는 부적당하게 남아 있다. 평생 면역 억제제는 이식된 기관의 만성 거부를 퇴치하기 위해 요구될 수 있으며, 이들 작용제의 사용은 심혈관 질환, 감염, 및 악성종양의 위험을 극적으로 증가시킨다.

[0009]

이식 거부를 감소시키기 위한 한 가지 잠재적 표적은 CD40/CD154 상호작용이다. CD40은 일차적으로 B 림프구 및 다른 항원-제시 세포 (APC), 예컨대 수지상 세포 및 대식세포의 표면 상에 발현된다. CD154는 일차적으로 T 세포의 표면 상에 발현된다. 이들 2가지 단백질 사이의 상호작용은 시토카인 발현 뿐만 아니라 CD23, CD80, 및 CD86을 포함한 세포 표면 마커의 발현을 촉발시키는 B 세포 활성화와 연관된다. 문헌 [Kehry M. R., CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death. J. Immunol. 1996; 156: 2345-2348]. 항-CD154 항체를 사용한 이 상호작용의 차단은 비-인간 영장류에서 이식된 조직의 거부를 감소시키거나 제거하는 것으로 제시된 바 있다.

[0010]

임의의 유형의 면역억제에 대해 (예를 들어, 이식 절차에서), 효능 및 독성 사이의 균형은 그의 임상적 수용성을 위한 핵심 인자이다. 따라서, 예를 들어, 이식 거부 및 자가면역 장애에 수반되는 면역학적 경로를 특이적으로 표적화하는 요법에 대한 필요가 있다.

**발명의 내용**

[0011]

본 개시내용은 중쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 각각 서열식별번호(SEQ ID NO): 13, 14 및 15에 제시된 아미노산 서열과 약 80% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 3개의 CDR, CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 것인 인간화 항-CD40 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다.

[0012]

본 개시내용은 또한 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 경쇄 가변 영역은 각각 서열식별번호: 16, 17 및 18에 제시된 아미노산 서열과 약 80% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 3개의 CDR, CDR1, CDR2 및 CDR3을

포함하는 것인 인간화 항-CD40 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다.

[0013] 또한, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 각각 서열식별번호: 13, 14 및 15에 제시된 아미노산 서열과 약 80% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 3개의 상보성 결정 영역(CDR), CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 여기서 경쇄 가변 영역은 각각 서열식별번호: 16, 17 및 18에 제시된 아미노산 서열과 약 80% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 3개의 CDR, CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 것인 인간화 항-CD40 항체, 또는 그의 항원-결합 부분이 본 개시내용에 의해 포함된다.

[0014] 본 개시내용은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 11, 19, 20, 21, 24, 25 및 26에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나와 약 80% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 인간화 항-CD40 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다.

[0015] 본 개시내용은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 12, 22, 23, 27, 28 및 29에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나와 약 80% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 인간화 항-CD40 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다.

[0016] 본 개시내용은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 11, 19, 20, 21, 24, 25 및 26에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나와 약 80% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 12, 22, 23, 27, 28 및 29에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나와 약 80% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 인간화 항-CD40 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다.

[0017] 본 개시내용은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 19, 20 및 21에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나와 약 80% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 22 및 23에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나와 약 80% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 인간화 항-CD40 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다.

[0018] 본 개시내용은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 24, 25 및 26에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나와 약 80% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 27, 28 및 29에 제시된 아미노산 서열 중 어느 하나와 약 80% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 인간화 항-CD40 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다.

[0019] 본 개시내용은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 21에 제시된 아미노산 서열과 약 80% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 23에 제시된 아미노산 서열과 약 80% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 인간화 항-CD40 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 제공한다.

[0020] 항체, 또는 그의 항원-결합 부분의 해리 상수 ( $K_b$ )는 약  $1 \times 10^{-9}$  M 미만, 또는 약  $1 \times 10^{-8}$  M 미만일 수 있다.

[0021] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 (a) 전체 이뮤노글로불린 분자; (b) scFv; (c) Fab 단편; (d) F(ab')2; 및/또는 (e) 디슬퍼드 연결된 Fv일 수 있다.

[0022] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 a) IgG 불변 도메인; 및 (b) IgA 불변 도메인으로부터 선택되는 적어도 1개의 불변 도메인을 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 적어도 1개의 인간 불변 도메인을 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 CD40 세포와 도메인에 결합할 수 있다.

[0025] CD40은 인간 또는 레서스 CD40일 수 있다.

[0026] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 시험관내에서 CD154-발현 Jurkat 세포에 의한 B 림프구 활성화를 차단할 수 있다.

[0027] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 B 림프구 CD23, CD80, 또는 CD86 발현을 억제할 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분, 및 적어도 1종의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물이 본 개시내용에 의해 포함된다.

[0029] 본 개시내용은 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 본 개시내

용은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 및 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

[0030] 본 개시내용은 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 제공한다.

[0031] 또한, 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 제조하는 방법이 본 개시내용에 의해 포함된다. 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다: (a) 본 발명의 세포를 배양 배지에서 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 발현되는 조건 하에서 배양함으로써, 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 적어도 1종의 폴리펩티드를 제조하는 단계; 및 (b) 폴리펩티드를 세포 또는 배양 배지로부터 회수하는 단계.

[0032] 본 개시내용은 또한 유효량의 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 면역계를 억제하는 방법을 제공한다.

[0033] 본 개시내용은 유효량의 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 이식 거부를 치료하거나 예방적으로 치료하거나, 또는 이식 거부가 발생하기 전의 시간의 기간을 증가시킬 것을 필요로 하는 대상체에서, 이식 거부를 치료하거나 예방적으로 치료하거나, 또는 이식 거부가 발생하기 전의 시간의 기간을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0034] 본 개시내용은 유효량의 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 이식편-대-숙주 질환을 치료하거나 예방적으로 치료할 것을 필요로 하는 대상체에서 이식편-대-숙주 질환을 치료하거나 예방적으로 치료하는 방법을 제공한다.

[0035] 본 개시내용은 유효량의 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 자가면역 장애를 치료하거나 예방적으로 치료할 것을 필요로 하는 대상체에서 자가면역 장애를 치료하거나 예방적으로 치료하는 방법을 제공한다.

[0036] 대상체는 기관 이식, 및/또는 조직 이식을 받았을 수 있거나 또는 그를 필요로 한다. 기관은 심장, 신장, 폐, 간, 췌장, 장, 및 흉선, 또는 그의 부분일 수 있다. 조직은 골, 건, 각막, 피부, 심장 판막, 정맥, 또는 골수일 수 있다.

[0037] 대상체는 인간 또는 포유동물일 수 있다.

[0038] 투여는 이식 전에 개시될 수 있다. 투여는 이식 후 적어도 1개월 동안 계속될 수 있다. 투여는 이식편의 이식 후 적어도 6개월 동안 계속될 수 있다.

[0039] 자가면역 장애는 자가항체의 존재와 연관되거나 또는 그에 의해 유발될 수 있다.

[0040] 자가면역 장애는 전신 홍반성 루푸스 (SLE), CREST 증후군 (석회증, 레이노 증후군, 식도 운동장애, 수지경화증, 및 모세혈관확장증), 안진전, 염증성 근병증 (예를 들어, 다발근염, 피부근염, 및 봉입체 근염), 전신 경피증, 원발성 담즙성 간경변증, 복강 질환 (예를 들어, 글루텐 민감성 장병증), 포진성 피부염, 밀러-피셔 증후군, 급성 운동신경 축삭 신경병증 (AMAN), 전도 차단을 갖는 다초점 운동신경 신경병증, 자가면역 간염, 항인지질 증후군, 베게너 육아종증, 현미경적 다발혈관염, 치크-스트라우스 증후군, 류마티스 관절염, 만성 자가면역 간염, 공막근염, 중증 근무력증, 램버트-이튼 근무력 증후군, 하시모토 갑상선염, 그레이브스병, 부신생물성 소뇌 변성, 강직 인간 증후군, 변연 뇌염, 이삭 증후군, 시데남 무도병, 스트렙토코코스와 연관된 소아 자가면역 신경정신 질환 (PANDAS), 뇌염, 제1형 당뇨병, 및/또는 시신경 척수염일 수 있다.

[0041] 자가면역 장애는 악성 빈혈, 애디슨병, 건선, 염증성 장 질환, 건선성 관절염, 쇼그렌 증후군, 홍반성 루푸스 (예를 들어, 원판상 홍반성 루푸스, 약물-유발 홍반성 루푸스, 및 신생아 홍반성 루푸스), 다발성 경화증, 및/또는 반응성 관절염일 수 있다.

[0042] 자가면역 장애는 다발근염, 피부근염, 다발성 내분비 부전, 슈미트 증후군, 자가면역 포도막염, 부신염, 갑상선염, 자가면역 갑상선 질환, 위 위축증, 만성 간염, 루푸스양 간염, 아테롬성동맥경화증, 초로기 치매, 탈수초성 질환, 아급성 피부 홍반성 루푸스, 부갑상선기능저하증, 드레슬러 증후군, 자가면역 혈소판감소증, 특발성 혈소판감소성 자반증, 용혈성 빈혈, 심상성 천포창, 천포창, 원형 탈모증, 유천포창, 경피증, 진행성 전신 경화증, 성인 발병 당뇨병 (예를 들어, 제II형 당뇨병), 남성 및 여성 자가면역 불임, 강직성 척추염, 케양성 결장염, 크론병, 혼합 결합 조직 질환, 결절성 다발동맥염, 전신 괴사성 혈관염, 소아 발병 류마티스 관절염, 사구체신염, 아토피성 피부염, 아토피성 비염, 굿페스처 증후군, 샤가스병, 사르코이드증, 류마티스성 열, 천식, 반복 유산, 항-인지질 증후군, 농부 폐, 다형성 홍반, 심장질개술후 증후군, 쿠싱 증후군, 자가면역 만성 활동성 간염, 조류 사육자 폐, 알레르기성 질환, 알레르기성 뇌척수염, 독성 표피 괴사용해, 탈모증, 알포트 증후군, 폐

포염, 알레르기성 폐포염, 섬유화 폐포염, 간질성 폐 질환, 결절성 홍반, 피저성 농피증, 수혈 반응, 나병, 말라리아, 리슈마니아증, 트리파노소마증, 다카야스 동맥염, 류마티스성 다발근육통, 측두 동맥염, 주혈흡증증, 거대 세포 동맥염, 회충증, 아스페르길루스증, 샘터 증후군, 습진, 림프종성 육아종증, 베체트병, 카플란 증후군, 가와사키병, 맹기, 심내막염, 심내막심근 섬유증, 안내염, 장기 용기성 홍반, 태아 적모구증, 호산구성 근막염, 슬만 증후군, 펠티 증후군, 사상충증, 모양체염, 만성 모양체염, 이색성 모양체염, 푸크스 모양체염, IgA 신병증, 헤노흐-웬라인 자반증, 이식편 대 숙주 질환, 이식 거부, 인간 면역결핍 바이러스 감염, 에코바이러스 감염, 심근병증, 알츠하이머병, 파르보바이러스 감염, 풍진 바이러스 감염, 백신접종후 증후군, 선천성 풍진 감염, 호지킨 및 비-호지킨 림프종, 신세포 암종, 다발성 골수종, 이튼-램버트 증후군, 재발성 다발연골염, 악성 흑색종, 한랭글로불린혈증, 발텐스트롬 마크로글로불린혈증, 앱스타인-바르 바이러스 감염, 볼거리, 에반 증후군, 및/또는 자가면역 생식선 부전일 수 있다.

[0043] 투여는 비경구, 정맥내, 피하, 근육내, 경피, 경구, 국소, 경막내, 또는 국부일 수 있다.

[0044] 본 발명의 방법은 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 투여의 6개월 내에 면역억제제의 투여를 추가로 포함할 수 있다.

[0045] 면역억제제는 칼시뉴린 억제제, 타크롤리무스, mTor 억제제, 평골리모드, 미리오신, 알렘투주맙, 리툭시맙, 항-CD4 모노클로날 항체, 항-LFA1 모노클로날 항체, 항-LFA3 모노클로날 항체, 항-CD45 항체, 항-CD19 항체, 모나바타셉트, 벨라타셉트, 인돌릴-ASC; 아자티오프린, 림프구 면역 글로불린 및 항-흉선세포 글로불린 [말], 미코페놀레이트 모페틸, 미코페놀레이트 나트륨, 다클리주맙, 바실릭시맙, 시클로포스파미드, 프레드니손, 프레드니솔론, 레플루노미드, FK778, FK779, 15-데옥시스페르구알린, 부술판, 플루다라빈, 메토트렉세이트, 6-메르캅토퓨린, 15-데옥시스페르구알린, LF15-0195, 브레디닌, 브레퀴나르, 및/또는 무로모납-CD3일 수 있다. 칼시뉴린 억제제는 시클로스포린 A 또는 시클로스포린 G일 수 있다. mTor 억제제는 시롤리무스, 템시롤리무스, 조타롤리무스, 또는 에베롤리무스일 수 있다. 항-CD45 항체는 항-CD45RB 항체일 수 있다. 한 실시양태에서, 면역억제제는 벨라타셉트이다.

[0046] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분 및 면역억제제는 서로의 1개월 내에, 또는 1주 내에 투여될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 2C10 항체의 중쇄 및 경쇄로부터의 가변 영역을 제시한다. 중쇄에 대해 제시된 뉴클레오티드 서열 (서열식별번호: 1)은 신호 펩티드 (뉴클레오티드 1-57; 밑줄침) 및 중쇄 가변 서열 (뉴클레오티드 58-396)을 포함한다. 상응하는 아미노산 서열은 하기에 제시되며 (서열식별번호: 2), 여기서 아미노산 1-19는 신호 서열 (밑줄침)에 상응하고, 아미노산 20-132는 중쇄 가변 영역에 상응한다.

경쇄에 대해 제시된 뉴클레오티드 서열 (서열식별번호: 3)은 신호 펩티드 (뉴클레오티드 1-66; 밑줄침) 및 경쇄 가변 서열 (뉴클레오티드 67-384)을 포함한다. 상응하는 아미노산 서열은 하기에 제시되며 (서열식별번호: 4), 여기서 아미노산 1-22는 신호 펩티드 (밑줄침)에 상응하고, 아미노산 23-128은 경쇄 가변 영역에 상응한다.

도 2a는 인간 및 레서스 CD20+ B 세포에의 2C10의 결합을 확인하는 유동 세포측정법 데이터를 제시하는 플롯이다.

도 2b는 염소 항-마우스 IgG-HRP를 사용하여 검출된 바와 같은 인간 및 레서스 CD40에의 2C10의 결합을 확인하는 다양한 농도의 2C10을 사용한 ELISA 검정으로부터의 CD40 흡착 데이터를 제시하는 플롯이다.

도 3은 2C10에 의한 인간 B 세포에의 CD154 결합의 용량-의존적 억제를 제시하는 그래프이다. B 세포를 히스티딘-태그부착된 가용성 CD154와 함께 인큐베이션하고, 히스티딘 발현에 대해 분석함으로써 CD154 결합에 대해 분석하였다. 결과는 실험의 다수 반복의 대표이다.

도 4는 레서스 또는 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 Jurkat 세포를 수반하는 검정의 원리를 제시하는 개략도 및 그래프이다.

도 5는 다양한 농도의 3A8, 5C8, 또는 2C10 항체의 존재 하에서 레서스 PBMC 및 Jurkat 세포의 공동-배양으로부터 취해진 CD20<sup>+</sup> 세포에서의 CD23 발현을 제시하는 그래프의 세트이다.

도 6은 다양한 농도의 3A8, 5C8, 또는 2C10 항체의 존재 하에서 인간 PBMC 및 Jurkat 세포의 공동-배양으로부터 취해진 CD20<sup>+</sup> 세포에서의 CD86 발현을 제시하는 그래프의 세트이다.

도 7은 3A8 또는 2C10 항체 중 어느 하나의 존재 하에서 Jurkat 세포 없이 배양된 인간 또는 레서스 PBMC 중 어느 하나로부터의 CD23 발현 CD20<sup>+</sup> 세포를 제시하는 그래프의 세트이다.

도 8은 레서스 IgG1 (2C10R1) 또는 IgG4 (2C10R4) 중쇄 불변 영역 중 어느 하나, 및 항-CD40 3A8 (3A8R1) 또는 항-CD40 Chi220 (Chi220)의 키메라 IgG1 형태를 함유하도록 조작된 2C10의 마우스-레서스 키메라 형태로 처리된 레서스 마카크의 말초 B 세포 카운트를 제시하는 그래프이다.

도 9는 2C10R1, 2C10R4, 또는 3A8R1 항체로 처리된 마카크 원숭이에서의 T 세포-의존적 항체 반응을 제시하는 그래프이다. 모든 동물을 제1 항체 처리 후 4-히드록시-3-니트로페닐아세틸-접합된 키홀 립팻 혈모시아닌 (KLH)으로 면역화하였다.

도 10은 동종이형 섬 이식의 표준 마카크 모델을 제시하는 도해이다. 당뇨병을 마카크 원숭이에서 스트렙토조토신을 사용하여 유도하였다. 당뇨병 원숭이를 동종이형 섬으로 이식하고, 면역억제를 바실릭시맙 및 시롤리무스로 개시하였다. 실험 동물은 이식후 제0일 및 제7일에 2C10R4 처리를 받았다.

도 11a는 섬 이식, 배경 면역억제, 및 2C10R4로의 처리 후 4마리의 마카크에서의 유리 혈액 글루코스 수준 (FBG)을 제시하는 플롯이다. 플롯 상의 실선은 혈장 중의 2C10의 수준을 나타낸다.

도 11b는 단지 배경 면역억제만을 받은 마카크에서의 FBG를 제시하는 플롯이다.

도 12는 증가하는 농도의 2C10, 3A8, 또는 Chi220 항체와 함께 인큐베이션하고, APC-접합된 2C10으로 염색한 인간 PBMC를 사용하여 2C10을 교차-차단하는 각각의 항체의 능력을 평가하는 비교 차단 검정으로부터의 결과를 제시하는 그래프이다.

도 13a 및 13b는 인간화 2C10 가변 영역의 서열 정렬을 제시한다. 도 13a: 뮤린 2C10 VH 서열을 인간 생식계열 VH1-3 및 3개의 인간화 서열 2C10\_h1, 2C10\_h2, 및 2C10\_h3에 대해 정렬하였다. 도 13b: 뮤린 2C10 VL 서열을 인간 생식계열 VH3-11 및 2개의 인간화 서열 2C10\_11 및 2C10\_12에 대해 정렬하였다. 2C10 CDR은 볼드체이다. 인간화 서열에서 뮤린 잔기는 밑줄친다.

도 14는 2C10HP 및 2C10HB1, 뿐만 아니라 2C10HB2 구축물 사이의 프레임워크 3에서의 아미노산 변화를 제시한다.

도 15는 인간화 2C10 항체에 대한 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 서열을 제시한다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 2C10HP, 2C10HB1, 2C10HB2, 2C10KP, 2C10KB1, 및 2C10KB2를 포함한다.

도 16은 상이한 영장류 종으로부터의 CD40에 대한 인간화 2C10 항체의 결합 친화도를 제시한다. 인간화 2C10 항체 (h2C10)를 아민 커플링에 의해 CM5 침의 표면에 고정화하였다. 인간, 레서스, 및 비비의 상이한 농도의 CD40-MBP 융합물을 비아코어 (BIACore) 3000 상에서 친화도에 대해 분석하였다. 결합 친화도를 비아이밸류에이션 (BIAevaluation) 소프트웨어 버전 4.1.1로 계산하였다.

도 17은 항-KLH 항체 반응 (IgM 및 IgG)의 유도를 염수, 10 또는 25 mg/kg h2C10 중 어느 하나를 받은 후 3시간에 KLH로 면역화된 원숭이에서 측정한 것을 제시한다. 모든 대조군 동물은 KLH 항원에 대해 IgG 또는 IgM 항체 반응을 나타내었다. 10 mg/kg 2C10으로 처리된 개별적 원숭이는 KLH에 대해 IgG 또는 IgM 항체 반응 중 어느 하나를 발달시켰지만, 25 mg/kg 2C10으로 처리된 동물은 그렇지 않았다.

도 18. 전혈을 25 mg/kg h2C10 (상부 행) 또는 10 mg/kg h2C10 (중간 행), 또는 대조군 동물 (하부 행)으로 처리한 후 B 및 T 림프구 하위세트를 표현형분석하는데 사용하였다. h2C10의 어떤 용량도 림프구 집단에서 명백한 효과를 갖지 않았다. 주목할 만한 B 세포 고갈의 부재는 또한 성숙 및 미성숙 B 세포 집단의 상세한 분석을 포함한 영장류 키메라 형태의 보다 초기, 용량-반응 평가에서 명백하였다.

도 19. 제28일 인간화 2C10은 B 세포 상의 CD40 결합 부위를 완전히 포화시켰다. 생체내에서 투여된 H2C10은 B 세포에 결합하는 형광 표지된 2C10의 결합을 완전히 차단하였다. 데이터는 25 mg/kg (상부 행), 10 mg/kg (중간 행) 또는 0 mg/kg (대조군; 하부 행)의 단일 용량 후 28일에 인간화 2C10-처리된 및 대조군 원숭이로부터의 결과를 예시한다. 유사한 결과가 주입후 제3일, 제7일, 제14일, 및 제21일에 얻어졌다.

도 20. 10 또는 25 mg/kg 중 어느 하나로의 원숭이의 처리 후 28일까지 동안의 h2C10의 평균 혈청 농도. 2C10의 농도는 시간 경과에 따라 서서히 감소하며, 수준은 연구의 전체 기간에 걸쳐 검출된다.

도 21a 및 21b는 안정화된 IgG4 형식의 인간화 2C10 (h2C10)의 DNA 및 아미노산 서열을 제시한다. 도 21a는

중쇄의 DNA 및 아미노산 서열을 제시한다. **도 21b**는 경쇄의 DNA 및 아미노산 서열을 제시한다. 서열식별번호: 32: 중쇄의 DNA 서열; 서열식별번호: 33: 중쇄의 아미노산 서열; 서열식별번호: 34: 경쇄의 DNA 서열; 서열식별번호: 35: 경쇄의 아미노산 서열.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048]

본 개시내용은 다양한 치료, 예방, 진단 및 다른 방법에 사용될 수 있는 항-CD40 항체 및 항체 단편 (예를 들어, 항체의 항원-결합 부분)에 관한 것이다. 항체는 CD154에 결합하는 CD40의 능력을 차단할 수 있으며, CD40을 발현하는 세포 (예를 들어, B 세포)를 활성화시키지 않고 그렇게 한다. 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 기관 또는 조직 이식과 연관된 합병증을 감소시키는데 사용될 수 있다.

[0049]

항체, 또는 그의 항원-결합 부분은 인간화 항체, 인간 항체, 모노클로날 항체, 키메라 항체, 폴리클로날 항체, 재조합적으로 발현된 항체, 뿐만 아니라 상기의 항원-결합 부분을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 항체의 항원-결합 부분은 CD40에 특이적으로 결합하는 항체의 부분을 포함할 수 있다.

[0050]

본 개시내용은 또한 이식 거부의 가능성을 감소시키고/거나, 이식 거부를 치료하고/거나, 면역억제를 유도하고/거나, 자가면역 장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 조성물은 CD40에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 함유한다.

[0051]

한 실시양태에서, 본 개시내용은 본 발명의 항체 (또는 그의 단편)를 포함하는 조성물을 대상체에서 이식편-대-숙주 질환 및/또는 이식 거부의 증상 중 하나 이상을 감소시키기에 충분한 양으로 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 이식편-대-숙주 질환 및/또는 이식 거부를 치료하거나 개선시키는 방법을 제공한다.

[0052]

또 다른 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 염증성 질환 또는 면역 장애, 예컨대 자가면역 질환을 갖는 대상체에게 투여된다. 염증성 질환 또는 자가면역 질환은 CD40-발현 세포와 연관될 수 있다.

[0053]

본 발명은 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 유효량으로 대상체에게 투여함으로써, 대상체에서 이식 거부의 가능성을 감소시키고/거나, 이식 거부를 치료하고/거나, 면역억제를 유도하고/거나, 자가면역 장애를 치료하는 방법을 특색으로 한다.

[0054]

또한, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 조성물을 포유동물에서의 CD40-매개된 면역 반응을 차단하기에 충분한 양으로 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서의 CD40의 기능을 차단하는 방법이 본 개시내용에 의해 포함된다.

[0055]

본 개시내용의 또 다른 방법은 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편을 세포에 투여하는 것을 포함하며, CD40에의 항체 또는 항원-결합 단편의 결합이 세포의 성장 및/또는 분화를 억제하는 것인 CD40을 발현하는 세포의 성장 및/또는 분화를 억제하는 것에 관한 것이다.

[0056]

본 개시내용은 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편을 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, CD40에의 항체 또는 항원-결합 단편의 결합이 CD40-연관된 장애의 세포의 성장 및/또는 분화를 억제하는 것인 CD40-연관된 장애를 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 세포는 B 림프모구양 세포, 혈장, 폐 세포, 유방 세포, 난소 세포, 결장 세포, 전립선 세포, 피부 세포, 두경부 세포, 방광 세포, 골 세포 또는 신장 세포일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0057]

본 발명의 방법은 만성 림프구성 백혈병, 베켓 림프종, 다발성 골수종, T 세포 림프종, 비-호지킨 림프종, 호지킨병, 밸렌스트롬 마크로글로불린혈증 또는 카포시 육종을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0058]

본 개시내용의 추가의 방법은 유효량의 본 개시내용의 항-CD40 항체 또는 그의 단편을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 B 세포에 의한 항체 생산을 억제하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 대상체에서 B 세포 분화 및 항체 이소형 스위칭을 억제하는 유효량으로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 시토카인 및 케모카인 생산을 억제하고/거나, 대상체에서 T-세포 및 대식세포에서의 부착 분자의 상향-조절을 억제하는 유효량으로 투여된다. 제3 실시양태에서, 항체는 대상체에서 수지상 세포의 활성화를 억제하는 유효량으로 투여된다.

[0059]

본 발명의 항체 또는 그의 단편 외에, 본 발명의 방법은 제2 치료제, 예컨대 면역억제제, 종양 괴사 인자 길항제 (TNF-길항제), CTLA4-길항제, 항-IL-6 수용체 항체, 항-CD20 항체, 또는 이들의 조합을 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0060]

본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분은 재조합 및 천연 인간 CD40을 포함한 인간 CD40 및/또는 레서스

CD40에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0061] 본원에 사용된 바와 같이, CD40을 발현하는 세포는 정상 및 신생물 B 세포, 수지양 세포, 기저 상피 세포, 암종 세포, 대식세포, 내피 세포, 소포성 수지상 세포, 편도 세포, 및 골수-유래된 혈장 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는, CD40의 표면 발현을 특징으로 하는 임의의 세포이다.

## 인간화 항체

[0063] 본 개시내용의 인간화 항체는 비-항원 결합 영역 (및/또는 항원-결합 영역)에서의 아미노산 서열이, 항체가 인간 항체를 보다 가깝게 닮도록 변경되었지만, 그의 원래의 결합 능력을 여전히 보유하는 비-인간 종으로부터의 항체이다.

[0064] 항체 경쇄 또는 중쇄 가변 영역은 상보성 결정 영역 (CDR)으로 지칭되는 3개의 초가변 영역으로 이루어진다. CDR은 프레임워크 영역 (FR)에 의해 가변 영역 내에서 지지된다. 한 실시양태에서, 중쇄 가변 영역 (또는 경쇄 가변 영역)은 아미노-말단에서 카르복실-말단으로 하기 순서: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 프레임워크 영역 (FR)을 함유한다. 문헌 [Kabat, E. A., et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991. Chothia, C. et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987].

[0065] 특정 실시양태에서, 인간화 항체는 비-인간 종으로부터의 1, 2, 3개 또는 모든 CDR, 및 인간 이谬노글로불린 분자로부터의 1, 2, 3, 4개 또는 모든 프레임워크 영역을 갖는 비-인간 종으로부터의 항체 분자이다.

[0066] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 CDR은 비-인간 또는 인간 공급원으로부터의 것일 수 있다. 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 프레임워크는 인간, 인간화, 비-인간 (예를 들어, 인간에서의 항원성을 감소시키도록 변형된 뮤린 프레임워크), 또는 합성 프레임워크 (예를 들어, 컨센서스 서열)일 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분은 적어도 1개의 중쇄 가변 영역 및/또는 적어도 1개의 경쇄 가변 영역을 함유한다.

[0067] 본 개시내용의 인간화 항체는 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 인간화 항체는 비-인간인 공급원으로부터 그 내로 도입된 1개 이상의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 이를 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "유입" 잔기로 지칭되며, 이는 전형적으로 "유입" 가변 도메인으로부터 취해진다. 인간화는 원터 (Winter) 및 공동-연구자들의 방법에 따라 (Jones et al., *Nature* 321:522-5, 1986; Riechmann et al., *Nature* 332:323-7, 1988; Verhoeven et al., *Science* 239:1534-6, 1988), 초가변 영역 서열로 인간 항체의 상응하는 서열을 치환함으로써 수행될 수 있다. 따라서, 이러한 인간화 항체에서, 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 적은 것이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 치환되었다. 특정 실시양태에서, 인간화 항체는 적어도 일부의 초가변 영역 잔기 뿐만 아니라 다른 가변 영역 잔기가 비-인간 항체에서의 유사한 부위로부터의 잔기에 의해 치환된 인간 항체이다.

[0068] 인간화 항체를 제조하는데 사용되는 경쇄 및 중쇄 둘 다의 인간 가변 도메인의 선택은 항원성을 감소시킬 수 있다. "최적-적합" 방법에 따르면, 비-인간 (예를 들어, 설치류, 예컨대 마우스) 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 그 후, 비-인간의 것과 가장 가까운 인간 서열을 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크로서 수용한다. 예를 들어, 문헌 [Sims et al., *J. Immunol.* 151:2296-308, 1993]; [Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-17, 1987]을 참조한다. 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 프레임워크를 사용한다. 동일한 프레임워크는 몇몇 상이한 인간화 항체에 대해 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-9, 1992]; [Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623-32, 1993]을 참조한다.

[0069] 인간화 항체는 항원 결합에 직접적으로 수반되지 않는 가변 영역의 서열을 인간 가변 영역으로부터의 등가의 서열로 대체함으로써 생성될 수 있다. 그러한 방법은 중쇄 또는 경쇄 중 적어도 하나로부터의 가변 영역의 전부 또는 일부를 코딩하는 핵산 서열을 단리하고, 조작하고, 발현시키는 것을 포함한다. 이러한 핵산의 공급원은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, CD40에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마로부터 얻어질 수 있다. 그 후, 인간화 항체, 또는 그의 단편을 코딩하는 재조합 DNA를 적절한 발현 벡터 내로 클로닝할 수 있다.

[0070] 또 다른 예에서, 일단 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체가 얻어지면, 가변 영역을 시퀀싱하고, CDR 및 프레임워크 잔기의 위치를 결정할 수 있다. 문헌 [Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication

No. 91-3242. Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.*, 196:901-917]. 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 임의로 상응하는 불변 영역에 라이게이션될 수 있다. CDR-이식된 항체 분자는 CDR-이식 또는 CDR 치환에 의해 생성될 수 있다. 이뮤노글로불린 쇄의 1, 2, 3개 또는 모든 CDR은 대체될 수 있다. 예를 들어, 특정 항체의 CDR의 전부는 비-인간 동물 (예를 들어, 마우스, 예컨대 표 1에 제시된 CDR)의 적어도 일부로부터 것일 수 있거나, CDR의 단지 일부가 대체될 수 있다. 미리 결정된 항원 (예를 들어, CD40)에의 항체의 결합에 요구되는 CDR을 유지하는 것이 단지 필요하다. 문헌 [Morrison, S. L., 1985, *Science*, 229:1202-1207. Oi et al., 1986, *BioTechniques*, 4:214. 미국 특허 번호 5,585,089; 5,225,539; 5,693,761 및 5,693,762. EP 519596. Jones et al., 1986, *Nature*, 321:552-525. Verhoeyan et al., 1988, *Science*, 239:1534. Beidler et al., 1988, *J. Immunol.*, 141:4053-4060].

[0071] 항원에 대한 높은 친화도의 보유 및 다른 바람직한 생물학적 특성을 갖는 항체가 인간화되는 것이 바람직할 수 있다. 이 목표를 달성하기 위해, 한 방법에 따르면, 인간화 항체는 모 및 인간화 서열의 3-차원 모델을 사용하여 모 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석의 과정에 의해 제조된다. 3-차원 이뮤노글로불린 모델은 시판되며, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 익숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3-차원 형태적 구조를 예시하고 나타내는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이를 디스플레이의 검토는 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능화에서 잔기의 가능성 있는 역할의 분석, 즉, 그의 항원에 결합하는 후보 이뮤노글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석을 허용한다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 바람직한 항체 특징, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도가 달성되도록 수용자 및 유입 서열로부터 선택되고, 조합될 수 있다.

[0072] 일부 실시양태에서, 인간화 항-CD40 항체는 또한 이뮤노글로불린 불변 영역의 적어도 일부, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 그것을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 경쇄 뿐만 아니라 중쇄의 적어도 가변 도메인 둘다를 함유할 것이다. 항체는 또한 적절할 경우에, 중쇄의 불변 도메인 CH1, 힌지, CH2, CH3, 및/또는 CH4 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0073] 본 개시내용의 일부 측면에서, 인간화 항체의 1개 이상의 도메인은 재조합적으로 발현될 것이다. 이러한 재조합 발현은 1개 이상의 제어 서열, 즉, 특정 숙주 유기체에서 작동적으로 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 폴리뉴클레오티드 서열을 채용할 수 있다. 원핵생물 세포에 사용하기에 적합한 제어 서열은, 예를 들어, 프로모터, 오퍼레이터, 및 리보솜 결합 부위 서열을 포함한다. 진핵생물 제어 서열은 프로모터, 폴리아데닐화 신호, 및 인핸서를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이를 제어 서열은 원핵생물 및 진핵생물 숙주 세포에서 인간화 항-CD40 항체의 발현 및 제조에 이용될 수 있다.

[0074] 또한, 인간, 토끼, 양, 개, 고양이, 소, 말, 염소, 돼지, 원숭이, 유인원, 고릴라, 침팬지, 오리, 거위, 닭, 양서류, 파충류 및 다른 동물을 포함하나 이에 제한되지 않는 적어도 1종의 상이한 종으로부터의 서열에 의해 대체된 다른 영역을 갖는, 본원에 개시된 바와 같은 1, 2개, 또는 모든 CDR을 함유하는 항체, 또는 그의 항원-결합 부분이 본 개시내용에 의해 포함된다.

### 인간 항체

[0075] 본 개시내용의 인간 항체는 인간-유래된 파지 제시 라이브러리로부터 선택되는 Fv 클론 가변 도메인 서열(들)을 공지된 인간 불변 도메인 서열(들)과 조합함으로써 구축될 수 있다 (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.* 227:381-8, 1992; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-97, 1991). 대안적으로, 인간 항체는 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 제조를 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 예를 들어, 문헌 [Kozbor, *J. Immunol.* 133:3001-5, 1984]; [Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]; 및 [Boerner et al., *J. Immunol.* 147: 86-95, 1991]에 의해 기재되었다.

[0076] 면역화 시, 내인성 이뮤노글로불린 생성의 부재 하에서 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제너 동물 (예를 들어, 마우스)을 제조할 수 있다. 예를 들어, 키메라 및 생식-계열 돌연변이체 마우스에서의 항체 중쇄 결합 영역 (JH) 유전자의 동형접합 결실은 내인성 항체 생산의 완전한 억제를 초래함이 기재되었다. 이러한 생식-계열 돌연변이체 마우스에서의 인간 생식-계열 이뮤노글로불린 유전자 어레이의 전달은 항원 챠린지 시 인간 항체의 생산을 초래할 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551-5, 1993]; [Jakobovits et al., *Nature* 362:255-8, 1993]; [Brueggemann et al., *Year Immunol.* 7:33-40, 1993]을 참조한다.

[0077] 유전자 셀플링은 또한 인간 항체를 비-인간, 예를 들어, 설치류 항체로부터 유도하는데 사용될 수 있으며, 여기

서 인간 항체는 출발 비-인간 항체와 유사한 친화도 및 특이성을 갖는다. "에피토프 각인"으로도 지칭되는 이 방법에 따르면, 본원에 기재된 바와 같은 과지 제시 기술에 의해 얻어진 비-인간 항체 단편의 중쇄 또는 경쇄가변 영역 중 어느 하나는 인간 V 도메인 유전자의 레퍼토리로 대체되어, 비-인간 쇄/인간 쇄 scFv 또는 Fab 키메라의 집단을 생성한다. 항원으로의 선택은 인간 쇄가 1차 과지 제시 클론에서의 상응하는 비-인간 쇄의 제거 시 과괴되는 항원 결합 부위를 복구하는 비-인간 쇄/인간 쇄 키메라 scFv 또는 Fab의 단리를 초래하며, 즉, 에피토프는 인간 쇄 상대의 선택을 지배한다 (각인시킨다). 나머지 비-인간 쇄를 대체하기 위해 프로세스가 반복될 경우에, 인간 항체가 얻어진다 (PCT 공개 WO 93/06213 참조). CDR 이식에 의한 비-인간 항체의 전통적인 인간화와는 달리, 이 기술은 비-인간 기원의 FR 또는 CDR 잔기를 갖지 않는 완전하게 인간 항체를 제공한다.

#### [0079] 키메라 항체

키메라 항체는 상이한 부분이 상이한 동물 종으로부터 유래된 분자이다. 예를 들어, 항체는 뮤린 항체로부터 유래된 가변 영역 및 인간 이뮤노글로불린 불변 영역을 함유할 수 있다. 키메라 항체는 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다. 문헌 [Morrison, et al., Proc Natl Acad Sci, 81:6851-6855 (1984)]. 예를 들어, 뮤린 (또는 다른 종) 모노클로날 항체 분자를 코딩하는 유전자를 제한 효소로 소화시켜 뮤린 Fc를 코딩하는 영역을 제거하고, 인간 Fc 불변 영역을 코딩하는 유전자의 등가의 부분을 치환한다. 키메라 항체는 또한 뮤린 V 영역을 코딩하는 DNA가 인간 불변 영역을 코딩하는 DNA에 라이제이션될 수 있는 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있다. 문헌 [Better et al., Science, 1988, 240:1041-1043. Liu et al. PNAS, 1987 84:3439-3443. Liu et al., J. Immunol., 1987, 139:3521-3526. Sun et al. PNAS, 1987, 84:214-218. Nishimura et al., Canc. Res., 1987, 47:999-1005. Wood et al. Nature, 1985, 314:446-449. Shaw et al., J. Natl. Cancer Inst., 1988, 80:1553-1559. 국제 특허 공개 번호 WO1987002671 및 WO 86/01533. 유럽 특허 출원 번호 184,187; 171,496; 125,023; 및 173,494. 미국 특허 번호 4,816,567].

#### [0081] 가변 영역 및 CDR

뮤린 2C10 항체 및 특정 인간화 항-CD40 항체의 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역 및 CDR을 표 1에 제시된다.

[0083]

표 1 서열식별번호: 11 ~ 31

명칭	쇄, 영역	서열	SEQ ID NO.
2C10 (뮤린 항체)	중쇄, 가변 영역	QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFT <u>NYWMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSNDYTKY</u> <u>NQKFKDKATLTADKSSNTAYMQLGSLTSEDS</u> <u>AVYYCARQGFPYWGQGTLTVSA</u>	11
2C10	경쇄, 가변 영역	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTC <u>SASSSVSYM</u> <u>HWYHQRSGTSPKRWYDTSKLASGVPARFSG</u> <u>SGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQLSSDPF</u> <u>TFGSGTKLEIK</u>	12
2C10	중쇄, CDR1	YTFTNYWMH	13
2C10	중쇄, CDR2	YINPSNDYTKYNQFKD	14
2C10	중쇄, CDR3	QGFPY	15
2C10	경쇄, CDR1	SASSSVSYM	16
2C10	경쇄, CDR2	DTSKLAS	17
2C10	경쇄, CDR3	HQLSSDPFT	18
2C10_h1	중쇄, 가변 영역	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT <u>NYWMHWVRQAPGQRLEWMGYINPSNDYTK</u> <u>YNQKFKDRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDT</u> <u>AVYYCARQGFPYWGQGTLTVSS</u>	19

[0084]

2C10_h2	중쇄, 가변 영역	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG <u>YTFTNYWMH</u> WVRQAPGQRLEWMG <u>YINPSNDYTKYNQKFKD</u> RVTITADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCA R <u>QGFPY</u> WGQGTLTVSS	20
2C10_h3	중쇄, 가변 영역	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG <u>YTFTNYWMH</u> WVRQAPGQRLEWIG <u>YINPSNDYTKYNQKFKD</u> RATLTADKSANTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAR <u>QGFPY</u> WGQGTLTVSS	21
2C10_11	경쇄, 가변 영역	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>SASSSVS</u> <u>YMH</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>DTSKLAS</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFAVYYC <u>HQLSSDPFT</u> FGGGTKEIK	22
2C10_12	경쇄, 가변 영역	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>SASSSVSYM</u> <u>YMH</u> WYQQKPGQAPRRWIY <u>DTSKLAS</u> GVPARFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFAVYYC <u>HQLSSDPFT</u> FGGGTKEIK	23
2C10HP	중쇄, 가변 영역	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG <u>YTF</u> <u>NYWMH</u> WVRQAPGQRLEWIG <u>YINPSNDY</u> <u>TKY</u> <u>NQKFKD</u> RATLTADKSANTAYMELSSLRSEDT AVYYCAR <u>QGFPY</u> WGQGTLTVSS	24
2C10HB1	중쇄, 가변 영역	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG <u>YTF</u> <u>NYWMH</u> WVRQAPGQRLEWIG <u>YINPSNDY</u> <u>TKY</u> <u>NQKFKD</u> RATLTAD <u>T</u> <u>S</u> <u>T</u> NTAYMELSSLRSEDT AVYYCAR <u>QGFPY</u> WGQGTLTVSS	25
2C10HB2	중쇄,	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG <u>YTF</u> <u>NYWMH</u> WVRQAPGQGLEWIG <u>YINPSNDY</u> <u>TKY</u>	26

	가변 영역	<u>QKFKD</u> <u>KAT</u> <u>IT</u> <u>ADE</u> <u>ST</u> <u>NTA</u> <u>YME</u> <u>LSL</u> <u>RSE</u> <u>DTA</u> <u>VYY</u> <u>CAR</u> <u>QG</u> <u>FPY</u> <u>WG</u> <u>QGT</u> <u>LV</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>S</u>	
2C10KP	경쇄, 가변 영역	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <u>SASSSVSYM</u> WYQQKPGQAPRR <u>WIYDT</u> <u>SKLASG</u> <u>VPARFSG</u> GSGTDYTLT <u>ISSLE</u> <u>PEDFAVYYC</u> <u>HQLSSDPFT</u> GGGTKVEIK	27
2C10KB1	경쇄, 가변 영역	DIQMTQSPSTLSASVGDRV <u>TI</u> <u>CS</u> <u>SASSSVSYM</u> <u>HWYQQKPGKAPK</u> <u>L</u> <u>IYDT</u> <u>SKLASG</u> <u>VPARFSG</u> SGSGTEFTL <u>TISSL</u> <u>QPDDFATYYC</u> <u>HQLSSDPFT</u> FGQGTKVEVK	28
2C10KB2	경쇄, 가변 영역	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <u>SASSSVSYM</u> WYQQKPGQAPR <u>L</u> <u>IYDT</u> <u>SKLASG</u> <u>I</u> <u>PARFSG</u> SGTDF <u>TLT</u> <u>ISSLE</u> <u>PEDFAVYYC</u> <u>HQLSSDPFT</u> QGTKLEIK	29
VH1-3	중쇄, 가변 영역	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <u>SCKA</u> <u>SGYT</u> <u>F</u> <u>T</u> YAMHWV <u>RQAPG</u> <u>QR</u> <u>LEWMG</u> <u>WINAG</u> <u>NGNT</u> YSQKF <u>QGR</u> <u>VT</u> <u>IR</u> <u>DT</u> <u>S</u> <u>ASTAY</u> <u>MEL</u> <u>SSLR</u> <u>SE</u> <u>DT</u> AVYYCARWG <u>QGT</u> <u>LV</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>S</u>	30
VK3-11	경쇄, 가변 영역	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASQ</u> <u>SVSSY</u> AWYQQKPGQAPR <u>L</u> <u>IYD</u> <u>ASRN</u> <u>RATG</u> <u>I</u> <u>PARFSG</u> SGSGTDF <u>TLT</u> <u>ISSLE</u> <u>PEDFAVYYC</u> <u>FGGG</u> <u>TK</u> <u>VEI</u> K	31

[0086]

[0087]

특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 11, 19, 20, 21, 24, 25 및 26 중 임의의 것에 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 아미노산 서열과 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 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% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0088]

특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 서열식별번호: 12, 22, 23, 27, 28 및 29 중 임의의 것에 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역 아미노산 서열과 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 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% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0089]

특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 부분 각각은 서열식별번호: 11, 19, 20, 21, 24, 25 및 26 중 임의의 것에 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 아미노산 서열과 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 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% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 12, 22, 23, 27, 28 및 29에 제시된 바와 같은 가변 경쇄 아미노산 서열과 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 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% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 둘 다를 포함한다.

[0090]

항체 또는 그의 항원-결합 부분의 중쇄 가변 영역은 2C10 항체의 중쇄 가변 영역의 CDR (각각 서열식별번호:



92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항체가 본 개시내용에 의해 포함된다.

[0098] 관련된 실시양태에서, 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 예를 들어, 2C10의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역의 CDR을 포함한다.

[0099] 한 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 2C10 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 (각각 서열식별번호: 11 및 서열식별번호: 12)과 동일한 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 함유한다.

[0100] 다양한 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 2C10 항체에 의해 결합된 에피토프와 중첩하는 에피토프에 특이적으로 결합하거나, 그와 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 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% 동일하다. 에피토프는 서열식별번호: 6의 서열 내에 존재할 수 있거나, 서열식별번호: 6의 아미노산 8-40의 서열 내에 존재할 수 있다.

[0101] 특정 실시양태에서, 표 1에서의 CDR에 상응하는 CDR은 서열 변이를 갖는다. 예를 들어, CDR에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 잔기, 또는 총 잔기의 20% 미만, 30% 미만, 또는 약 40% 미만이 치환되거나 결실된 CDR은 CD40에 결합하는 항체 (또는 그의 항원-결합 부분)에 존재할 수 있다.

[0102] 또한, 특이적 아미노산이 치환되거나, 결실되거나, 부가된 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 본 개시내용의 범위 내에 있다. 이를 변경은 웨티드의 생물학적 특성, 예컨대 결합 친화도에 대해 실질적인 효과를 갖지 않는다. 예를 들어, 항체는 예컨대 항원에의 결합을 개선시키기 위해 프레임워크 영역에 아미노산 치환을 가질 수 있다. 또 다른 예에서, 선택된, 소수의 억셉터 프레임워크 잔기는 상응하는 공여자 아미노산에 의해 대체될 수 있다. 공여자 프레임워크는 성숙 또는 생식계열 인간 항체 프레임워크 서열 또는 컨센서스 서열일 수 있다. 표현형적 침묵 아미노산 치환을 어떻게 만드는지에 관한 안내는 문헌 [Bowie *et al.*, *Science*, 247: 1306-1310 (1990)]에 제공되어 있다. 문헌 [Cunningham *et al.*, *Science*, 244: 1081-1085 (1989). Ausubel (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (1994). T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243:307-31 (1994). Gonnet *et al.*, *Science* 256:1443-45 (1992)].

[0103] 본 발명의 웨티드는 예를 들어, 치환되거나 결실된 약 30%, 약 25%, 약 20%, 약 15%, 약 10%, 약 5% 또는 약 1% 미만의 아미노산 잔기를 갖지만, CD40에의 결합을 포함하나 이에 제한되지 않는 본질적으로 동일한 면역학적 특성을 보유하는, 본원에 개시된 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 기능적 활성 변이체일 수 있다.

[0104] 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 또한 생물학적 활성, 예를 들어, 항원, 예컨대 CD40의 결합을 나타내는 웨티드의 변이체, 유사체, 오르토로그, 동족체 및 유도체를 포함할 수 있다. 웨티드는 아미노산 (예를 들어, 비-천연 발생 아미노산, 비관련된 생물학적 계에서 단지 천연적으로 발생하는 아미노산, 포유동물 계로부터의 변형된 아미노산 등을 포함함)의 1종 이상의 유사체, 치환된 연결을 갖는 웨티드, 뿐만 아니라 관련 기술분야에 공지된 다른 변형을 함유할 수 있다.

[0105] 항체, 또는 그의 항원-결합 부분은 또 다른 기능적 분자에 유도체화되거나 연결될 수 있다. 예를 들어, 항체는 1종 이상의 다른 문자적 실체, 예컨대 또 다른 항체, 검출제, 면역억제제, 세포독성제, 제약 작용제, 또 다른 문자 (예컨대 스트렙타비딘 코어 영역 또는 폴리히스티딘 태그)와의 회합을 매개할 수 있는 단백질 또는 웨티드, 아미노산 링커, 신호 서열, 면역원성 운반체, 또는 단백질 정제에 유용한 리간드, 예컨대 글루타티온-S-트랜스퍼라제, 히스티딘 태그, 및 스타필로코쿠스 단백질 A에 기능적으로 연결될 수 있다 (화학적 커플링, 유전적 융합, 비공유 상호작용 등에 의해). 세포독성제는 방사성 동위원소, 화학치료제, 및 독소, 예컨대 박테리아, 진균, 식물, 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소, 및 그의 단편을 포함할 수 있다. 이러한 세포독성제는 표준 절차를 사용하여 본 개시내용의 인간화 항체에 커플링되고, 예를 들어, 항체로의 요법을 위해 지시되는 환자를 치료하는데 사용될 수 있다.

[0106] 유도체화된 단백질의 한 가지 유형은 (동일한 유형의 또는 상이한 유형의) 2종 이상의 단백질을 가교시킴으로써 제조된다. 적합한 가교제는 적절한 스페이서에 의해 분리된 2개의 별개의 반응성 기를 갖는 이종이관능성 (예를 들어, *m*-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르), 또는 동종이관능성 (예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트)의 것들을 포함한다. 단백질이 유도체화될 (또는 표지될) 수 있는 유용한 검출제는 형광제, 다양한

효소, 보결기, 발광 물질, 생체발광 물질, 및 방사성 물질을 포함한다. 비-제한적인, 예시적인 형광 검출제로는 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 및 피코에리트린을 들 수 있다. 단백질 또는 항체는 또한 검출가능한 효소, 예컨대 알칼리성 포스파타제, 서양고추냉이 폐록시다제, 베타-갈락토시다제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코스 옥시다제 등으로 유도체화될 수 있다. 단백질은 또한 보결기 (예를 들어, 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴)로 유도체화될 수 있다.

[0107] 또 다른 실시양태에서, 인간화 항-CD40 항체 또는 그의 단편은 비표지되어 사용되고, 인간화 항-CD40 항체 또는 그의 단편에 결합하는 표지된 항체로 검출된다.

### 항체 단편

[0109] 항체는 전장일 수 있거나, Fab, F(ab')2, Fab', F(ab)', Fv, 단일 쇄 Fv (scFv), 2가 scFv (비-scFv), 3가 scFv (트리-scFv), Fd, dAb 단편 (예를 들어, 문헌 [Ward et al., *Nature*, 341:544-546 (1989)]), 단리된 CDR, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하나 이에 제한되지 않는 항원-결합 부분을 갖는 항체의 단편 (또는 단편들)을 포함할 수 있다. 재조합 방법, 또는 협성 링커를 사용하여 항체 단편을 결합시킴으로써 제조된 단일 쇄 항체는 또한 본 개시내용에 의해 포함된다. 문헌 [Bird et al. *Science*, 1988, 242:423-426. Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85:5879-5883].

[0110] 항체의 파파인 소화는 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는 "Fab" 단편, 및 그의 명칭이 용이하게 결정화되는 그의 능력을 반영하는 잔여의 "Fc" 단편으로 지칭되는 2개의 동일한 항원-결합 단편을 생성한다. 펩신 처리는 2개의 항원-조합 부위를 갖고, 여전히 항원을 가교할 수 있는 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 생성한다.

[0111] Fv는 완전한 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 한 실시양태에서, 2-쇄 Fv 종은 긴밀한, 비-공유 회합에서 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 이루어진다. 단일-쇄 Fv (scFv) 종에서, 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인은 경쇄 및 중쇄가 2-쇄 Fv 종에서의 그것과 유사한 "이량체성" 구조에서 회합될 수 있도록 유연성 펩티드 링커에 의해 공유적으로 연결될 수 있다. 각각의 가변 도메인의 3개의 CDR이 상호작용하여 V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> 이량체의 표면 상의 항원-결합 부위를 한정하는 것은 이 배치에서이다. 집합적으로, 6개의 CDR은 항체에 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 항원에 대해 특이적인 단지 3개의 CDR을 포함하는 Fv의 절반)은 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화도에서이지만, 항원을 인식하고, 그에 결합하는 능력을 갖는다.

[0112] Fab 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 함유하며, 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 1개 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복실 말단에서 약간의 잔기의 첨가에 의해 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 기를 갖는 Fab'에 대한 명칭이다. F(ab')<sub>2</sub> 항체 단편은 원래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링은 또한 공지되어 있다.

[0113] 단일-쇄 Fv 또는 scFv 항체 단편은 항체의 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인을 포함하며, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇄에 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합에 바람직한 구조를 형성하는 것을 가능하게 하는 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 검토를 위해서는, 예를 들어, 문헌 [Pluckthuen, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315]을 참조한다.

[0114] 디아바디는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편이며, 그의 단편은 동일한 폴리펩티드 쇄 (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)에서 경쇄 가변 도메인 (V<sub>L</sub>)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V<sub>H</sub>)을 포함한다. 너무 짧아서 동일한 쇄 상의 2개의 도메인 사이에 쌍형성을 허용할 수 없는 링커를 사용함으로써, 도메인은 또 다른 쇄의 상보적 도메인과 쌍형성하고, 2개의 항원-결합 부위를 생성하게 된다. 디아바디는 2가이거나, 이중특이적일 수 있다. 디아바디는 예를 들어, 유럽 특허 번호 404,097; PCT 공개 WO 1993/01161; 문헌 [Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-34, 2003]; 및 [Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-8, 1993]에 보다 충분히 기재되어 있다. 트리아바디 및 테트라바디는 또한 문헌 [Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-34, 2003]에 기재되어 있다.

[0115] 항체 단편은 전통적인 수단, 예컨대 효소적 소화에 의해, 또는 재조합 기술에 의해 생성될 수 있다. 특정 상황에서, 전체 항체보다는 항체 단편을 사용하는 것의 이점이 있다. 보다 작은 크기의 단편은 급속한 청소를 허용

하며, 고형 종양에의 개선된 접근을 초래할 수 있다. 특정 항체 단편의 검토를 위해서는, 문헌 [Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134, 2003]을 참조한다.

[0116] 항체 단편의 제조를 위한 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백질분해적 소화를 통해 유래되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., *J. Biochem. Biophys. Methods* 24:107-17, 1992]; 및 [Brennan et al., *Science* 229:81-3, 1985] 참조). 그러나, 이들 단편은 이제 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 제조될 수 있다. Fab, Fv, 및 ScFv 항체 단편은 모두 이. 콜라이 (*E. coli*)에서 발현되고, 그로부터 분비될 수 있으며, 따라서, 대량의 이들 단편의 손쉬운 제조를 허용한다. 항체 단편은 항체 과자 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편을 이. 콜라이로부터 직접적으로 회수하고, 화학적으로 커플링 시켜  $F(ab')_2$  단편을 형성할 수 있다 (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-7, 1992). 또 다른 접근법에서,  $F(ab')_2$  단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접적으로 단리된다. 에피토프 잔기에 결합하는 구체 수용체를 포함하는 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및  $F(ab')_2$  단편은 미국 특허 번호 5,869,046에 기재되어 있다. 항체 단편의 제조를 위한 다른 기술은 통상의 실시자에게 명백할 것이다.

[0117] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 적어도 1개의 불변 도메인, 예컨대, (a) IgG 불변 도메인; (b) IgA 불변 도메인 등을 포함할 수 있다.

[0118] IgG (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (IgA1, IgA2), IgD 또는 IgE를 포함한 모든 항체 이소형은 본 개시내용에 의해 포함된다. 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 포유동물 (예를 들어, 마우스, 인간) 항체 또는 그의 항원-결합 부분일 수 있다. 항체의 경쇄는 카파 또는 람다 유형의 것일 수 있다. 대안적인 인간화 항-CD40 항체는 1종 초과의 이뮤노글로불린 부류 또는 이소형으로부터의 서열을 포함할 수 있으며, 바람직한 이펙터 기능을 최적화하기 위해 특정 불변 도메인을 선택하는 것은 관련 기술분야의 통상의 기술 내에 있다.

[0119] 본 개시내용의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 단일특이적, 이중-특이적 또는 다중-특이적일 수 있다. 다중-특이적 또는 이중-특이적 항체 또는 그의 단편은 1종의 표적 폴리펩티드 (예를 들어, CD40)의 상이한 에피토프에 대해 특이적일 수 있거나, 1종 초과의 표적 폴리펩티드에 대해 특이적인 항원-결합 도메인 (예를 들어, CD40 및 이식 거부 또는 자가면역 질환과 관련된 다른 항원에 대해 특이적인 항원-결합 도메인)을 함유할 수 있다. 한 실시양태에서, 다중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 적어도 2개의 상이한 가변 도메인을 포함하며, 여기서 각각의 가변 도메인은 별개의 항원에 또는 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 문헌 [Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60-69. Kufer et al., 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244]. 본 발명의 항체는 또 다른 기능적 분자, 예를 들어, 또 다른 웨პ티드 또는 단백질에 연결되거나, 그와 공동-발현될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 그의 단편은 1종 이상의 다른 분자적 실체, 예컨대 또 다른 항체 또는 항체 단편에 기능적으로 연결되어 (예를 들어, 화학적 커플링, 유전적 융합, 비공유 회합에 의해 또는 다른 식으로) 제2 결합 특이성을 갖는 이중-특이적 또는 다중특이적 항체를 생성할 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용은 이뮤노글로불린의 1개의 아암은 CD40에 대해 특이적이고, 이뮤노글로불린의 다른 아암은 제2 치료제에 대해 특이적이거나, 치료 모이어티, 예컨대 면역억제제에 접합된 이중-특이적 항체를 포함한다.

#### 항체의 제조

[0120] 본 개시내용은 CD40에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 제조하는 방법을 제공한다.

[0121] 예를 들어, 비-인간 동물을 CD40을 포함하는 조성물로 면역화한 후, 특이적 항체를 동물로부터 단리한다. 방법은 CD40에의 항체의 결합을 평가하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0122] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 CD40에 특이적으로 결합하는 항체를 발현하는 하이브리도마를 제조하는 방법을 제공한다. 방법은 하기 단계를 함유한다: 동물을 CD40 또는 그의 단편을 포함하는 조성물로 면역화하는 단계; 동물로부터 비장세포를 단리하는 단계; 비장세포로부터 하이브리도마를 생성하는 단계; 및 CD40에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는 하이브리도마를 선별하는 단계. 문헌 [Kohler and Milstein, *Nature*, 256: 495, 1975. Harlow, E. and Lane, D. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988].

[0123] 한 실시양태에서, CD40은 마우스를 복강내로 또는 정맥내로 면역화하는데 사용된다. 1개 이상의 부스트가 주어질 수 있거나, 그렇지 않을 수 있다. 혈장에서의 항체의 역가는 예를 들어, ELISA (효소-결합 면역흡착 검정) 또는 유동 세포측정법에 의해 모니터링될 수 있다. 충분한 역가의 항-CD40 항체를 갖는 마우스는 융합에 사용된다. 마우스는 희생 및 비장의 제거 전 3일에 항원으로 부스팅될 수 있거나, 그렇지 않을 수 있다. 마우스

비장세포를 단리하고, PEG로 마우스 골수종 세포주에 융합시킨다. 그 후, 생성된 하이브리도마를 항원-특이적 항체의 생산에 대해 스크리닝한다. 세포를 플레이팅한 후, 선택적 배지에서 인큐베이션한다. 그 후, 개별적 웰로부터의 상청액을 ELISA에 의해 인간 항-CD40 모노클로날 항체에 대해 스크리닝한다. 항체 분비 하이브리도마를 재플레이팅하고, 다시 스크리닝하고, 항-CD40 모노클로날 항체에 대해 여전히 양성인 경우에, 제한 희석에 의해 서브클로닝할 수 있다.

[0125] CD40의 면역원성을 증가시키는데 사용될 수 있는 아주반트는 웨티드 또는 웨티드의 조합물에 대한 면역 반응을 증가시키도록 작용하는 임의의 작용제 또는 작용제들을 포함한다. 아주반트의 비-제한적 예는 백반, 인산알루미늄, 수산화알루미늄, MF59 (4.3% w/v 스쿠알렌, 0.5% w/v 폴리소르베이트 80 (트윈 (Tween) 80), 0.5% w/v 소르비탄 트리올레이트 (스판 (Span) 85)), CpG-함유 핵산, QS21 (사포닌 아주반트), MPL (모노포스포릴 지질 (Monophosphoryl Lipid) A), 3DMPL (3-O-데아세틸화된 MPL), 아퀼라 (Aquilla)로부터의 추출물, ISCOMS (예를 들어, 문헌 [Sjolander *et al.* (1998) *J. Leukocyte Biol.* 64:713]; WO90/03184; WO96/11711; WO 00/48630; WO98/36772; WO00/41720; WO06/134423 및 WO07/026190 참조), LT/CT 돌연변이체, 폴리(D,L-락티드-코-글리콜리드) (PLG) 미세입자, 퀄 (Quil) A, 인터루킨, 프로인트 (Freund), N-아세틸-무라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민 (thr-MDP), N-아세틸-노르-무라밀-L-알라닐-D-이소글루타민 (CGP 11637, 노르-MDP로 지칭됨), N-아세틸무라밀-L-알라닐-D-이소글루타민-2-(1'-2'-디팔미토일-sn-글리세로-3-히드록시포스포릴옥시)-에틸아민 (CGP 19835A, MTP-PE로 지칭됨), 및 RIBI (이는 2% 스쿠알렌/트윈 80 에멀젼 중 박테리아, 모노포스포릴 지질 A, 트레할로스 디미콜레이트 및 세포벽 골격으로부터 추출된 3가지 성분 (MPL+TDM+CWS)을 함유함)를 포함한다.

[0126] 면역화된 동물은 면역원, 예컨대, 토끼, 마우스, 래트, 햄스터, 염소, 말, 원숭이, 비비 및 인간 (이에 제한되지 않음)에게 투여되는 경우에 회수 가능한 항체를 생산할 수 있는 임의의 동물일 수 있다. 한 측면에서, 숙주, 예를 들어, 인간 이뮤노글로불린 유전자 절편을 발현하는 마우스는 트랜스제닉이며, 인간 항체를 생산한다. 문헌 [미국 특허 번호 8,236,311; 7,625,559 및 5,770,429 (이들 각각의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨). Lonberg *et al.*, *Nature* 368(6474): 856-859, 1994. Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101, 1994. Lonberg, N. and Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93, 1995. Harding, F. and Lonberg, N., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 764:536-546, 1995].

[0127] 본 발명의 항체 또는 그의 부분은 바람직한 항체의 경쇄 및 중쇄 (또는 그의 부분)를 코딩하는 DNA로 형질전환된 숙주 세포에 의해 생산될 수 있다. 항체 (또는 그의 부분)는 표준 기술을 사용하여 이를 배양 상청액 및/또는 세포로부터 단리되고, 정제될 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포는 항체의 경쇄, 중쇄, 또는 둘 다를 코딩하는 DNA로 형질전환될 수 있다. 재조합 DNA 기술은 또한 결합에 필요하지 않은 경쇄 및 중쇄 중 어느 하나 또는 둘 다의 적어도 일부, 예를 들어, 불변 영역을 코딩하는 DNA의 일부 또는 전부를 제거하는데 사용될 수 있다.

[0128] 본 발명은 또한 CD40에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 적어도 1종을 코딩하는 핵산 또는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 핵산은 세포에서 발현되어 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 생성할 수 있다. 본 개시내용의 단리된 핵산 또는 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 11 - 29 중 임의의 것과 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 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% 동일한 웨티드를 코딩하는 적어도 1개의 서열을 포함한다.

[0129] 본 발명은 또한 서열식별번호: 11 - 29 중 임의의 것과 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 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% 동일한 웨티드를 코딩하는 적어도 1개의 핵산 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 특색으로 한다.

[0130] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 기능적 활성 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 또한 본 개시내용에 의해 포함된다. 이들 핵산 분자는 중간 염격성, 높은 염격성, 또는 매우 높은 염격성 조건 하에서 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분 중 임의의 것을 코딩하는 핵산과 혼성화할 수 있다. 혼성화 반응을 수행하기 위한 안내는 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. 6.3.1-6.3.6, 1989]에서 발견될 수 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다. 본원에 언급된 특이적 혼성화 조건은 하기와 같다: (1) 중간 염격성 혼성화 조건: 약 45°C에서 6XSSC, 그 후 60°C에서 0.2XSSC, 0.1% SDS에서 1회 이상 세척; (2) 높은 염격성 혼성화 조건: 약 45°C에서 6XSSC, 그 후 65°C에서 0.2XSSC, 0.1% SDS에서 1회 이상 세척; 및 (3) 매

우 높은 업격성 혼성화 조건: 65°C에서 0.5 M 인산나트륨, 7% SDS, 그 후 65°C에서 0.2XSSC, 1% SDS에서 1회 이상 세척.

[0131] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 코딩하는 핵산 또는 폴리뉴클레오티드를 적합한 발현 시스템에서 발현될 수 있는 발현 벡터 내로 도입한 후, 발현된 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 단리 또는 정제를 할 수 있다. 임의로, 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 코딩하는 핵산은 무세포 번역 시스템에서 변역될 수 있다. 문헌 [미국 특허 번호 4,816,567. Queen *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 86:10029-10033 (1989)].

[0132] 본 발명의 핵산은 원핵생물 및 진핵생물 세포, 예를 들어, 박테리아 세포 (예를 들어, 이. 콜라이), 효모 세포, 식물 세포, 곤충 세포, 및 포유동물 세포를 포함한 다양한 적합한 세포에서 발현될 수 있다. 다수의 포유동물 세포주는 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (American Type Culture Collection) (ATCC)으로부터 이용가능한 불멸화 세포주를 포함한다. 세포의 비-제한적 예는 원숭이 신장 세포의 모 세포, 유도체 및/또는 조작된 변이체 (COS, 예를 들어, COS-1, COS-7), HEK293, 아기 햄스터 신장 (BHK, 예를 들어, BHK21), 차이니스 햄스터 난소 (CHO), NS0, PerC6, BSC-1, 인간 간세포 암종 세포 (예를 들어, Hep G2), SP2/0, HeLa, 마딘-다비 (Madin-Darby) 소 신장 (MDBK), 골수종 및 럼프종 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는 포유동물 기원 또는 포유동물-유사 특징의 모든 세포주를 포함한다. 조작된 변이체는 예를 들어, 글리칸 프로파일 변형된 및/또는 부위-특이적 통합 부위 유도체를 포함한다.

[0133] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 핵산을 포함하는 세포를 제공한다. 세포는 하이브리도마 또는 형질감염체일 수 있다. 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 다양한 세포에서 발현될 수 있다. 세포의 유형은 본원에서 논의된다.

[0134] 재조합 기술을 사용하여 예를 들어, 인간화 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 제조하는 경우에, 항체 또는 그의 부분은 세포내적으로, 원형질막주위 공간에서 생성되거나, 배지 내로 직접적으로 분비될 수 있다. 항체가 세포 내적으로 생성되는 경우에, 세포는 첫번째 단계로서 파괴되어 단백질을 방출할 수 있다. 미립자 데브리스, 숙주 세포 또는 용해된 단편 중 어느 하나는 예를 들어, 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거될 수 있다. 문헌 [Carter *et al.*, 1992, Bio/Technology 10:163-167]에는 이. 콜라이의 원형질막주위 공간으로 분비되는 항체를 단리하는 절차가 기재되어 있다. 간략하게, 세포 페이스트를 아세트산나트륨 (pH 3.5), EDTA, 및 페닐메틸су포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재 하에서 약 30분에 걸쳐 해동한다. 세포 데브리스는 원심분리에 의해 제거될 수 있다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우에, 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 우선 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어, 아미콘 (Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘 (Millipore Pellicon) 한외여과 유닛을 사용하여 농축 시킬 수 있다. 다양한 방법이 항체를 숙주 세포로부터 단리하는데 사용될 수 있다.

[0135] 세포로부터 제조된 항체 또는 그의 부분은 예를 들어, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있으며, 친화성 크로마토그래피가 전형적인 정제 기술이다. 친화성 리간드로서 단백질 A의 적합성은 항체에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 종 및 이소형에 의존한다. 단백질 A는 인간 감마1, 감마2, 또는 감마4 중쇄에 기초한 항체를 정제하는데 사용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Lindmark *et al.*, 1983 J. Immunol. Meth. 62:1-13] 참조). 단백질 G는 모든 마우스 이소형에 대해 및 인간 감마3에 대해 권고된다 (예를 들어, 문헌 [Guss *et al.*, 1986 EMBO J. 5:1567-1575] 참조). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔히 아가로스이지만, 다른 매트릭스가 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 제어된 기공 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스로 달성될 수 있는 것보다 더 빠른 유속 및 더 짧은 프로세싱 시간을 허용한다. 항체가 C.sub.H3 도메인을 포함하는 경우에, 백그라운드 (Bakerbond) ABX.TM. 수지 (제이. 티. 베이커 (J. T. Baker), 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예컨대 이온-교환 칼럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스 (SEPHAROSE).TM. 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예컨대 폴리아스파르트산 칼럼) 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전이 또한 회수되는 항체에 따라 이용가능하다.

[0136] 임의의 예비 정제 단계(들) 후, 관심의 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물을 전형적으로 낮은 염 농도 (예를 들어, 약 0-0.25 M 염)에서 수행되는, 약 2.5-4.5의 pH에서 용리 완충제를 사용하여 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피로 처리할 수 있다.

[0137] 그 후, 바람직하게는 높은 친화도로 CD40에 결합하는 항체를 생산하는 하이브리도마 또는 다른 세포를 서브클로닝하고, 추가로 특징화할 수 있다. 그 후, 모 세포의 반응성을 보유하는 (ELISA에 의해) 각각의 하이브리도마 또는 세포로부터의 하나의 클론을 세포 은행을 제조하기 위해, 및 항체 정제를 위해 선택할 수 있다.

- [0138] 대안적으로, 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 관련 기술분야에 널리 공지된 고상 절차에 의해 합성될 수 있다. 문헌 [Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach by E. Atherton and R. C. Sheppard, published by IRL at Oxford University Press (1989). Methods in Molecular Biology, Vol. 35: Peptide Synthesis Protocols (ed. M. W. Pennington and B. M. Dunn), chapter 7. Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984). G. Barany and R. B. Merrifield, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, editors E. Gross and J. Meienhofer, Vol. 1 and Vol. 2, Academic Press, New York, (1980), pp. 3-254. M. Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berlin (1984)].
- [0139] 2C10에 의해 인식되는 CD40 에피토프에 대한 추가의 항체 (예를 들어, 모노클로날, 폴리클로날, 다중-특이적, 또는 단일-특이적 항체)는 예를 들어, 항체를 제조하기 위한 적합한 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 한 예에서, 2C10 항체에 의해 인식되는 에피토프에 대한 코딩 서열은 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (GST)를 갖는 C-말단 용합물로서 발현된다 (Smith et al., *Gene* 67:31-40, 1988). 용합 단백질을 글루타티온-세파로스 비드 상에서 정제하고, 글루타티온으로 용리하고, 트롬빈으로 절단하고 (조작된 절단 부위에서), 토끼의 면역화를 위해 정제한다. 1차 면역화는 프로인트 완전 아주반트로 수행되고, 후속 면역화는 프로인트 불완전 아주반트로 수행된다. 항체 역가를 GST 용합 단백질의 트롬빈-절단된 단백질 단편을 사용한 웨스턴 블롯 및 면역침전 분석에 의해 모니터링한다. 면역 혈청을 CNBr-세파로스-커플링된 단백질을 사용하여 친화성 정제한다. 항혈청 특이성은 비관련된 GST 단백질의 패널을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0140] GST 용합 단백질에 대한 대안적 또는 부속 면역원으로서, 본 발명의 폴리펩티드의 상대적으로 고유한 면역원성 영역에 상응하는 웨프티드가 생성되고, 도입된 C-말단 리신을 통해 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH)에 커플링될 수 있다. 이들 웨프티드 각각에 대한 항혈청을 BSA에 접합된 웨프티드 상에서 유사하게 친화성 정제하고, 특이성을 웨프티드 접합체를 사용한 ELISA 또는 웨스턴 블롯 분석에 의해, 또는 GST 용합 단백질로서 발현되는 폴리펩티드를 사용한 웨스턴 블롯 또는 면역침전에 의해 시험한다.
- [0141] 대안적으로, 2C10 항체에 의해 인식되는 CD40 에피토프에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체는 표준 하이브리도마 기술을 사용하여 제조될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Kohler et al., *Nature* 256:495-7, 1975]; [Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* 6:511-9, 1976]; [Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* 6:292-5, 1976]; [Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier, NY, 1981] 참조). 일단 제조되면, 모노클로날 항체는 또한 웨스턴 블롯 또는 면역침전 분석에 의해 특이적 인식에 대해 시험될 수 있다. 대안적으로, 모노클로날 항체는 상기 기재된 본 발명의 폴리펩티드 및 파지 제시 라이브러리를 사용하여 제조될 수 있다 (Vaughan et al., *Nat. Biotechnol.* 14:309-14, 1996).
- [0142] 에피토프 단편은 표준 기술에 의해, 예를 들어, PCR을 사용하고 단편을 pGEX 발현 벡터 내로 클로닝함으로써 생성될 수 있다. 용합 단백질을 이. 콜라이에서 발현시키고, 글루타티온 아가로스 친화성 매트릭스를 사용하여 정제한다. 항혈청의 낮은 친화도 또는 특이성의 잠재적 문제점을 최소화하기 위해, 2개 또는 3개의 이러한 용합물을 각각의 단백질에 대해 생성하고, 각각의 용합물을 적어도 2마리의 토끼 내로 주사한다. 항혈청은 일련으로의 주사에 의해 발생되며, 예를 들어, 적어도 3개의 부스터 주사를 포함할 수 있다.
- [0143] 폴리클로날 항체를 대규모로 및 저 비용으로 생성하기 위해, 적절한 동물 종이 선택될 수 있다. 폴리클로날 항체는 예를 들어, 면역화된 소의 우유 또는 초유로부터 단리될 수 있다. 소 초유는 리터당 28 g의 IgG를 함유하는 반면, 소 우유는 리터당 1.5 g의 IgG를 함유한다 (Ontsouka et al., *J. Dairy Sci.* 86:2005-11, 2003). 폴리클로날 항체는 또한 면역화된 닭으로부터의 난황으로부터 단리될 수 있다 (Sarker et al., *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 32:19-25, 2001).
- [0144] **검정**
- [0145] 관심의 항원에 대한 그들의 특이성을 확인하기 위한 및/또는 그들의 특성을 연구하기 위한 다양한 방법이 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 검정하는데 사용될 수 있다. 이러한 검정을 수행하는 한 가지 방법은 미국 특허 공개 번호 2004/0126829에 기재된 바와 같은 혈청 스크린 검정이다. 항-CD40 항체는 다양한 공지된 기술에 의해 CD40에의 결합에 대해 특징화될 수 있다. 예를 들어, ELISA에서, 미세역가 플레이트를 PBS 중에서 CD40 또는 CD40의 단편으로 코팅한 후, PBS에 희석된 무관한 단백질, 예컨대 소 혈청 알부민 (BSA)으로 차단한다. CD40-면역화된 마우스로부터의 혈장의 희석액 (또는 항-CD40 항체를 함유하는 용액)을 각각의 웰에 첨가하고, 인큐베이션한다. 플레이트를 세척한 후, 효소 (예를 들어, 알칼리성 포스파타제)에 접합된 제2 항체와 함께 인큐베이션한다. 세척 후, 플레이트를 효소의 기질 (예를 들어, ABTS)로 전개시키고, 특정 OD에서 분석한다. 다

른 실시양태에서, 선택된 모노클로날 항체가 고유한 에피토프에 결합하는지를 측정하기 위해, 항체를 비오티닐화할 수 있고, 그 후 이를 스트렙타비딘 표지된 프로브로 검출할 수 있다. 항-CD40 항체를 웨스턴 블로팅에 의해 CD40과의 반응성에 대해 시험할 수 있다.

[0146] 본 개시내용의 항체, 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 또한 항원에 대한 그들의 결합 친화도의 관점에서 기재되거나 구체화될 수 있다. 항원에 대한 항체의 친화도는 임의의 적합한 방법을 사용하여 실험적으로 측정될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Berzofsky *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions," In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984)]; [Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992)]; 및 본원에 기재된 방법 참조). 특정 항체-항원 상호작용의 측정된 친화도는 상이한 조건 (예를 들어, 염 농도, pH) 하에서 측정되는 경우에 다양할 수 있다. 따라서, 친화도 및 다른 항원-결합 파라미터 (예를 들어,  $K_D$ ,  $K_a$ ,  $K_d$ )의 측정은 바람직하게는 항체 및 항원의 표준화된 용액, 및 표준화된 완충제로 수행된다.

[0147] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 약  $10^{-7}$  M 미만, 약  $10^{-8}$  M 미만, 약  $10^{-9}$  M 미만, 약  $10^{-10}$  M 미만, 약  $10^{-11}$  M 미만, 약  $10^{-12}$  M 미만, 약  $10^{-7}$  M 내지 약  $10^{-12}$  M, 약  $10^{-8}$  M 내지 약  $10^{-11}$  M, 약  $10^{-9}$  M 내지 약  $10^{-10}$  M, 또는 약  $10^{-8}$  M 내지 약  $10^{-12}$  M의 해리 상수 ( $K_D$ )로 CD40에 특이적으로 결합한다.

[0148] 측정은 또한 CD154에의 CD40 결합을 차단하거나, CD40-매개된 반응을 억제하거나 감소시키는 항체 (또는 그의 단편)의 능력을 시험하는데 사용될 수 있다.

[0149] 본원에 사용된 용어 "결합을 억제한다" 및 "결합을 차단한다" (예를 들어, CD40에의 CD154의 결합의 억제/차단)는 호환적으로 사용되며, 부분적 및 완전한 억제/차단 둘 다를 포함한다. 억제 및 차단은 또한 항-CD40 항체와 접촉하지 않는 리간드에 비해 본원에 개시된 바와 같은 항-CD40 항체 또는 그의 부분과 접촉하는 경우에 CD40에의 CD154의 결합의 임의의 측정가능한 감소, 예를 들어, CD40에의 CD154의 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 차단을 포함하는 것으로 의도된다.

[0150] 한 실시양태에서, B 세포의 활성화, 또는 그의 억제는 CD23, CD80, CD86, 및 CD20+ 세포 상의 임의의 적합한 마커로부터 선택되는 1종 이상의 마커의 발현을 측정함으로써 측정될 수 있다.

[0151] 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 T 세포-매개된 항체 반응에 대한 그들의 효과에 의해 특징화될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 그의 단편은 항체, 또는 그의 항원-결합 부분이 약 1 mg/kg 체중 내지 약 50 mg/kg 체중, 약 2 mg/kg 체중 내지 약 40 mg/kg 체중, 약 3 mg/kg 체중 내지 약 30 mg/kg 체중, 약 5 mg/kg 체중 내지 약 20 mg/kg 체중, 약 8 mg/kg 체중 내지 약 13 mg/kg 체중, 약 1 mg/kg 체중, 약 2 mg/kg 체중, 약 5 mg/kg 체중, 약 10 mg/kg 체중, 약 15 mg/kg 체중, 약 20 mg/kg 체중, 약 25 mg/kg 체중, 약 30 mg/kg 체중, 약 35 mg/kg 체중, 약 40 mg/kg 체중, 약 50 mg/kg 체중, 약 60 mg/kg 체중, 약 70 mg/kg 체중, 또는 약 80 mg/kg 체중의 범위의 투여량으로 포유동물에게 투여되는 경우에, 포유동물에서 IgM 및/또는 IgG 생산을 억제할 수 있다.

[0152] 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 이식 후 이식편 생존을 연장시키는 것에 대한 그들의 효과에 의해 특징될 수 있다. 본 발명의 항체 또는 그의 단편은, 단독으로 또는 1종 이상의 면역억제제와 조합으로, 이식편 생존을 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 2배, 약 5배, 약 10배, 약 15배, 약 20배, 약 25배, 약 30배, 약 35배, 약 40배, 약 45배, 약 50배, 약 55배, 약 40% 초과, 약 50% 초과, 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 또는 약 90% 초과, 약 2배 초과, 약 5배 초과, 약 10배 초과, 약 20배 초과, 약 30배 초과, 또는 약 40배 초과 연장시킬 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 섬 동종이식편 생존을 연장시킬 수 있다.

[0153] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 단편은 a) CD154에의 CD40의 결합을 차단할 수 있고/거나; c) 항원 제시 세포 (예를 들어, B 세포, 수지상 세포, 대식세포 등)의 활성화를 차단할 수 있고/거나; d) B 세포의 고갈을 유도할 수 있거나, 그렇지 않을 수 있고/거나; e) 항원 제시 세포로부터의 시토카인 방출을 억제하거나 감소시킬 수 있거나, 그렇지 않을 수 있고/거나; f) 종양 세포 아폽토시스를 유도할 수 있거나, 그렇지 않을 수 있고/거나; g) 종양 세포 증식을 억제할 수 있거나, 그렇지 않을 수 있고/거나; h) 종양 세포를 살해할 수 있거나, 그렇지 않을 수 있고/거나; i) 항-종양 T 세포 반응을 자극할 수 있거나, 그렇지 않을 수 있고/거나; j) 확립된 종양을 감소시킬 수 있거나, 그렇지 않을 수 있다. 본원에 기재된 항체는 이를 속성 또는 활성 중 임의의 하나 이상의 조합을 갖거나 유도할 수 있다. 문헌 [Tai, *et al.*, *Cancer Res.* 2005, 1;

65(13):5898-906; Luqman et al., Blood 112:711-720, 2008]. 본원에 기재된 항체 또는 그의 부분은 또한 시험관내 및 생체내 효능 등에서 CD40 내재화에 대한 효과에 대해 시험될 수 있다. 이러한 검정은 통상의 기술자에게 공지된 널리 확립된 프로토콜 (예를 들어, 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y.)]; [Current Protocols in Immunology (Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, N.Y.)] 참조); 또는 시판되는 키트를 사용하여 수행될 수 있다.

#### [0154] 치료될 상태

본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 시험관내 및 생체내 치료, 예방, 및/또는 진단 유용성을 갖는다. 예를 들어, 세포는 시험관내에서 배양 배지에서 배양되고, 항-CD40 항체 또는 그의 단편에 의해 접촉될 수 있다. 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 생체내 (예를 들어, 치료 또는 예방) 프로토콜의 일부로서 대상체에서 투여될 수 있다. 생체내 실시양태를 위해, 접촉 단계는 대상체에서 수행되고, 항-CD40 항체 또는 그의 부분을, 대상체에서 CD40에의 항체, 또는 그의 부분의 결합을 허용하기에 유효한 조건 하에서 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 이식 거부의 가능성을 감소시키거나, 이식 거부 전의 기간을 증가시키거나, 면역억제를 유도하거나, 자가면역 장애를 치료하기 위해 투여될 수 있다.

본원에 기재된 항체 또는 항체 단편은 면역억제가 바람직한 임의의 상황 (예를 들어, 이식 거부 또는 자가면역 장애)에서 사용될 수 있다. 이들 항체는 이식 거부를 치료하는데, 예를 들어, 특정 이식물이 숙주에 의해 거부될 가능성을 감소시키거나, 거부가 일어나기 전의 시간을 증가시키는데 특히 유용하다. 본원에 기재된 항체 또는 항체 단편은 이식에 적합한 임의의 기관 또는 임의의 조직의 이식과 함께 사용될 수 있다. 비-제한적인 예시적인 기관은 심장, 신장, 폐, 간, 흉장, 장, 및 흉선을 포함하며; 비-제한적인 예시적인 조직은 콜, 건, 각막, 피부, 심장 판막, 정맥, 및 골수를 포함한다. 항체 및 항체 단편은 또한 자가면역 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 자가면역 장애는 자가항체와 연관되거나 또는 그의 존재에 의해 유발될 수 있다. 본 발명의 항체 또는 그의 단편으로 치료될 수 있는 자가면역 질환은 전신 홍반성 루푸스 (SLE), CREST 증후군 (석회증, 레이노 증후군, 식도 운동장애, 수지경화증, 및 모세혈관화장증), 안진전, 염증성 근병증 (예를 들어, 다발근염, 피부근염, 및 봉입체 근염), 전신 경피증, 원발성 담즙성 간경변증, 복강 질환 (예를 들어, 글루텐 민감성 장병증), 포진성 피부염, 밀러-피셔 증후군, 급성 운동신경 축삭 신경병증 (AMAN), 전도 차단을 갖는 다초점 운동신경 신경병증, 자가면역 간염, 항인지질 증후군, 베게너 육아종증, 현미경적 다발혈관염, 쳐크-스트라우스 증후군, 류마티스 관절염, 만성 자가면역 간염, 공막근염, 중증 근무력증, 램버트-이튼 근무력 증후군, 하시모토 갑상선염, 그레이브스병, 부신생물성 소뇌 변성, 강직 인간 증후군, 변연 뇌염, 이식 증후군, 시데남 무도병, 스트랩토코쿠스와 연관된 소아 자가면역 신경정신 질환 (PANDAS), 뇌염, 제1형 당뇨병, 및 시신경 척수염을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 다른 자가면역 장애는 악성 빈혈, 애디슨병, 건선, 염증성 장 질환, 건선성 관절염, 쇼그렌 증후군, 홍반성 루푸스 (예를 들어, 원판상 홍반성 루푸스, 약물-유발 홍반성 루푸스, 및 신생아 홍반성 루푸스), 다발성 경화증, 및 반응성 관절염을 포함한다.

본 개시내용의 방법을 사용하여 치료될 수 있는 추가의 장애는, 예를 들어, 다발근염, 피부근염, 다발성 내분비부전, 슈미트 증후군, 자가면역 포도막염, 부신염, 갑상선염, 자가면역 갑상선 질환, 위 위축증, 만성 간염, 루푸스양 간염, 아테롬성동맥경화증, 초로기 치매, 탈수초성 질환, 아급성 피부 홍반성 루푸스, 부갑상선기능저하증, 드레슬러 증후군, 자가면역 혈소판감소증, 특발성 혈소판감소성 자반증, 용혈성 빈혈, 심상성 천포창, 천포창, 원형 탈모증, 유천포창, 경피증, 진행성 전신 경화증, 성인 발병 당뇨병 (예를 들어, 제II형 당뇨병), 남성 및 여성 자가면역 불임, 강직성 척추염, 궤양성 결장염, 크론병, 혼합 결합 조직 질환, 결절성 다발동맥염, 전신 피사성 혈관염, 소아 발병 류마티스 관절염, 사구체신염, 아토피성 피부염, 아토피성 비염, 굿페스처 증후군, 샤가스병, 사르코이드증, 류마티스성 열, 천식, 반복 유산, 항-인지질 증후군, 농부 폐, 다형성 홍반, 심장질개술후 증후군, 쿠싱 증후군, 자가면역 만성 활동성 간염, 조류 사육자 폐, 알레르기성 질환, 알레르기성 뇌척수염, 독성 표피 피사용해, 탈모증, 알포트 증후군, 폐포염, 알레르기성 폐포염, 섬유화 폐포염, 간질성 폐질환, 결절성 홍반, 괴저성 농폐증, 수혈 반응, 나병, 말라리아, 리슈마니아증, 트리파노소마증, 다카야스 동맥염, 류마티스성 다발근육통, 측두 동맥염, 주혈흡증증, 거대 세포 동맥염, 회충증, 아스페르길루스증, 샘터 증후군, 습진, 림프종성 육아종증, 베체트병, 카풀란 증후군, 가와사키병, 뎅기, 심내막염, 심내막심근 섬유증, 안내염, 장기 용기성 홍반, 태아 적모구증, 호산구성 근막염, 술만 증후군, 펠티 증후군, 사상충증, 모양체염, 만성 모양체염, 이색성 모양체염, 푸크스 모양체염, IgA 신병증, 헤노흐-쉔라인 자반증, 이식편 대 숙주 질환, 이식 거부, 인간 면역결핍 바이러스 감염, 에코바이러스 감염, 심근병증, 알츠하이머병, 파르보바이러스 감염, 풍진 바이러스 감염, 백신접종후 증후군, 선천성 풍진 감염, 호지킨 및 비-호지킨 림프종, 신세포 암종, 다발성

골수종, 이튼-램버트 증후군, 재발성 다발연골염, 악성 흑색종, 한랭글로불린혈증, 발렌스트롬 마크로글로불린 혈증, 앱스타인-바르 바이러스 감염, 볼거리, 예반 증후군, 및 자가면역 생식선 부전을 포함한다.

[0158] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 CD40의 발현과 연관된 다양한 장애의 치료에 사용될 수 있다.

[0159] 장애는 본 발명의 항체 또는 그의 단편으로의 치료로부터 유익을 받을 임의의 상태일 수 있다. 이는 포유동물을 해당 장애에 취약하게 하는 병리학적 상태를 포함한 만성 및 급성 장애 또는 질환을 포함한다. 본원에서 치료되는 장애의 비-제한적 예는 자가면역 질환, 면역학적 장애, 염증성 장애, 암, 혈액학적 악성종양, 양성 및 악성 종양, 백혈병, 림프구 악성종양, 및 혈관신생 장애를 포함한다.

[0160] 본원에 사용된 용어 "CD40-연관된 장애" 또는 "CD40-연관된 질환"은 CD40을 발현하는 세포의 변형 또는 제거가 지시되는 상태를 지칭한다. 이들은 비정상적 증식을 입증하는 CD40-발현 세포 또는 암성 또는 악성 성장과 연관된 CD40-발현 세포를 포함한다. CD40-연관된 장애는 면역계의 질환 및 장애, 예컨대 자가면역 장애 및 염증성 장애를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 상태는 류마티스 관절염 (RA), 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 경피증, 쇼그伦 증후군, 다발성 경화증, 건선, 염증성 장 질환 (예를 들어, 궤양성 결장염 및 크론병), 폐 염증, 천식, 및 특발성 혈소판감소성 자반증 (ITP)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. CD40 항원의 비정상적 발현을 입증하는 암의 보다 특정 예는 B 림프모구양 세포, 버킷 림프종, 다발성 골수종, T 세포 림프종, 카포시 육종, 골육종, 표피 및 내피 종양, 혀장, 폐, 유방, 난소, 결장, 전립선, 두경부, 피부 (흑색종), 방광, 및 신장 암을 포함한다. 이러한 장애는 또한 백혈병, B 세포 림프종 및 비-호지킨 림프종을 포함한 림프종, 다발성 골수종, 발렌스트롬 마크로글로불린혈증; 육종, 예컨대 골육종, 유잉 육종, 악성 흑색종, 난소 선암종을 포함한 선암종, 카포시 육종/카포시 종양 및 편평 세포 암종을 포함한 고형 종양을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 미국 특허 번호 9,090,696.

[0161] 본 발명의 항체 또는 그의 단편에 의해 치료되거나 예방될 수 있는 CD40-발현 암은 또한 예를 들어, 백혈병, 예컨대 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병 (예를 들어, 골수모구성, 전골수성, 골수단핵구성, 단핵구성, 또는 적백혈병), 만성 백혈병, 만성 골수구성 (과립구성) 백혈병, 또는 만성 림프구성 백혈병; 진성 적혈구증가증; 림프종 (예를 들어, 호지킨병 또는 비-호지킨병); 다발성 골수종, 발렌스트롬 마크로글로불린혈증; 중쇄 질환; 고형 종양, 예컨대 육종 및 암종 (예를 들어, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 골육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관내피육종, 활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 결장직장 암종, 혀장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평 세포 암종, 기저세포 암종, 선암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 낭선암종, 수질성 암종, 기관지원성 암종, 신세포 암종, 간암, 담관 암종, 융모막암종, 고환종, 배아 암종, 월름스 종양, 자궁경부암, 자궁암, 고환종양, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 비-소세포 폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경아교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송파체종, 혈관모세포종, 청신경종, 펩지교종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종, 망막모세포종, 비인두 암종, 또는 식도 암종)을 포함한다.

[0162] 또한, B 림프구의 (예를 들어, 전신 홍반성 루푸스, 굿페스처 증후군, 류마티스 관절염, 및 제I형 당뇨병), Th1-림프구의 (예를 들어, 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 건선, 쇼그伦 증후군, 하시모토 갑상선염, 그레이브스병, 원발성 담즙성 간경변증, 베게너 육아종증, 결핵, 또는 이식편 대 숙주 질환), 또는 Th2-림프구의 (예를 들어, 아토피성 피부염, 전신 홍반성 루푸스, 아토피성 천식, 비결막염, 알레르기성 비염, 오멘 증후군, 전신 경화증, 또는 만성 이식편 대 숙주 질환) 장애를 치료하는 방법이 포함된다.

[0163] 일부 실시양태에서, 면역학적 장애는 T 세포-매개된 면역학적 장애, 예컨대 장애와 연관된 활성화된 T 세포가 CD40을 발현하는 T 세포 장애이다. 항-CD40 항체 또는 작용체는 이러한 CD40-발현 활현된 T 세포를 고갈시키기 위해 투여될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 항-CD40 항체 또는 작용체의 투여는 CD40-발현 활성화된 T 세포를 고갈시킬 수 있는 반면, 휴지 T 세포는 항-CD40 또는 작용체에 의해 실질적으로 고갈되지 않는다. 이 맥락에서, "실질적으로 고갈되지 않는"은 휴지 T 세포의 약 60% 미만, 또는 약 70% 미만 또는 약 80% 미만이 고갈되지 않음을 의미한다.

#### 조합 요법

[0164] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 단독으로 또는 1종 이상의 다른 치료제 (예를 들어, 제2 치료제)와 조합으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-CD40 항체 또는 그의 단편을 포함하는 제약 조성물은 항체 또는 그의 단편에 접합된 또는 비접합된 제2 치료제를 추가로 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 제2 작용체는

또 다른 모노클로날 또는 폴리클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분이다. 또 다른 실시양태에서, 제2 작용제는 면역억제제이다. 제3 실시양태에서, 제2 작용제는 세포독성제 또는 세포증식억제제이다. 제4 실시양태에서, 제2 작용제는 활성화된 림프구, 수지상 세포 또는 CD40-발현 암 세포의 표면 상의 CD40 외의 수용체 또는 수용체 복합체를 표적화할 수 있다.

[0166] 이러한 조합 요법은 상태 파라미터 (예를 들어, 증상의 증증도, 증상의 수, 또는 재발의 빈도)에 대한 상가적 또는 상승적 효과를 가질 수 있다.

[0167] 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그의 단편은 제2 치료제와 공동으로 투여될 수 있다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제2 치료제는 항-CD40 항체 또는 그의 단편의 투여 전에 또는 후속으로 투여된다.

[0168] 본원에 기재된 항체 및 항체 단편은 면역억제제와 조합으로 제제화되거나 투여될 수 있다. 면역억제제의 예로는 칼시뉴린 억제제 (예를 들어, 시클로스포린 A (샌디뮨 (Sandimmune)<sup>®</sup>), 시클로스포린 G 타크롤리무스 (프로그라프 (Prograf)<sup>®</sup>, 프로토픽 (Protopic)<sup>®</sup>)), mTor 억제제 (예를 들어, 시롤리무스 (라파뮨 (Rapamune)<sup>®</sup>, 네오랄 (Neoral)<sup>®</sup>), 템시롤리무스 (토리셀 (Torisel)<sup>®</sup>), 조타롤리무스, 및 에베롤리무스 (세르티칸 (Certican)<sup>®</sup>)), 평골리모드 (길렌니아 (Gilenya)<sup>TM</sup>), 미리오신, 알렘투주맙 (캄파트 (Campath)<sup>®</sup>, 맵캄파트 (MabCampath)<sup>®</sup>, 캄파트-1H<sup>®</sup>), 리툭시맙 (리툭산 (Rituxan)<sup>®</sup>, 맘테라 (MabThera)<sup>®</sup>), 항-CD4 모노클로날 항체 (예를 들어, HuMax-CD4), 항-LFA1 모노클로날 항체 (예를 들어, CD11a), 항-LFA3 모노클로날 항체, 항-CD45 항체 (예를 들어, 항-CD45RB 항체), 항-CD19 항체 (예를 들어, 미국 특허 공개 2006/0280738 참조), 모나바타셉트 (오렌시아 (Orencia)<sup>®</sup>), 벨라타셉트, 인돌릴-ASC (타크롤리무스 및 아스코마이신의 32-인돌 에테르 유도체), 아자티오프린 (아자산 (Azasan)<sup>®</sup>, 이무란 (Imuran)<sup>®</sup>), 림프구 면역 글로불린 및 항-흉선세포 글로불린 [말] (아트감 (Atgam)<sup>®</sup>), 미코페놀레이트 모페틸 (셀셉트 (Cellcept)<sup>®</sup>), 미코페놀레이트 나트륨 (미포르티크 (myfortic)<sup>®</sup>), 다클리주맙 (제나팍스 (Zenapax)<sup>®</sup>), 바실릭시맙 (시뮬렉트 (Simulect)<sup>®</sup>), 시클로포스파미드 (엔독산 (Endoxan)<sup>®</sup>, 시톡산 (Cytoxan)<sup>®</sup>, 네오사르 (Neosar)<sup>TM</sup>, 프로시톡스 (Procytox)<sup>TM</sup>, 레비뮨 (Revimmune)<sup>TM</sup>), 프레드니손, 프레드니솔론, 레플루노미드 (아라바 (Arava)<sup>®</sup>), FK778, FK779, 15-데옥시스페르구알린 (DSG), 부술판 (밀레란 (Myleran)<sup>®</sup>, 부술페스 (Busulfex)<sup>®</sup>), 플루다라빈 (플루다라 (Fludara)<sup>®</sup>), 메토트렉세이트 (류마트렉스 (Rheumatrex)<sup>®</sup>, 트렉살 (Trexall)<sup>®</sup>), 에타네르셉트 (엔브렐 (Enbrel)<sup>®</sup>), 아달리무맙 (후미라 (Humira)<sup>®</sup>), 6-메르캅토퓨린 (퓨린톨 (Purinethol)<sup>®</sup>), 15-데옥시스페르구알린 (구스페리무스 (Gusperimus)), LF15-0195, 브레디닌, 브레퀴나르, 및 무로모납-CD3 (오르토클론 (Orthoclone)<sup>®</sup>)을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0169] 작용제의 면역억제 활성을 평가하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 약리학적 개입이 있거나 없는 생체내에서의 이식된 기관의 생존 시간의 길이는 면역 반응의 억제에 대한 정량적 측정으로서 기능한다. 시험관내 검정, 예를 들어 혼합 림프구 반응 (MLR) 검정 (예를 들어, 문헌 [Fathman et al., *J. Immunol.* 118:1232-8, 1977] 참조); CD3 검정 (항-CD3 항체 (예를 들어, OKT3)를 통한 면역 세포의 특이적 활성화) (예를 들어, 문헌 [Khanna et al., *Transplantation* 67:882-9, 1999]; [Khanna et al. (1999) *Transplantation* 67:S58]) 참조); 및 IL-2R 검정 (외인적으로 첨가된 시토카인 IL-2로의 면역 세포의 특이적 활성화) (예를 들어, 문헌 [Farrar et al., *J. Immunol.* 126:1120-5, 1981] 참조)은 또한 사용될 수 있다.

[0170] 시클로스포린 A (CsA; CAS 번호 59865-13-3; 미국 특허 번호 3,737,433) 및 그의 유사체는 면역억제제로서 사용될 수 있다. 면역억제 활성을 나타내는 다수의 다른 시클로스포린 및 그들의 유도체 및 유사체가 공지되어 있다. 시클로스포린 및 그들의 제제는 예를 들어, 문헌 [2004 Physicians' Desk Reference<sup>®</sup> (2003) Thomson Healthcare, 58th ed.], 및 미국 특허 번호 5,766,629; 5,827,822; 4,220,641; 4,639,434; 4,289,851; 4,384,996; 5,047,396; 4,388,307; 4,970,076; 4,990,337; 4,822,618; 4,576,284; 5,120,710; 및 4,894,235에 기재되어 있다.

[0171] 타크롤리무스 (FK506)는 그의 분자적 작용 방식 및 그의 임상적 효능 둘 다에 관해 CsA와 크게 유사한 효과를 발휘하는 마크롤리드이지만 (Liu, *Immunol. Today* 14:290-5, 1993; Schreiber et al., *Immunol. Today*, 13:136-42, 1992); 그러나, 이들 효과는 CsA보다 20 내지 100배 더 낮은 용량에서 나타난다 (Peters et al.,

Drugs 46:746-94, 1993). 타크롤리무스 및 그의 제제는 예를 들어, 문헌 [2004 Physicians' Desk Reference<sup>®</sup> (2003) Thomson Healthcare, 58th ed.], 및 미국 특허 번호 4,894,366; 4,929,611; 및 5,164,495에 기재되어 있다.

[0172] 시롤리무스 (라파마이신)는 예를 들어, 스트렙토미세스 히그로스코피쿠스 (*Streptomyces hygroscopicus*)에 의해 생성 가능한 면역억제 락탐 마크롤리드이다. 다수의 시롤리무스의 유도체 및 그의 유사체 및 그들의 제제가 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌 [2004 Physicians' Desk Reference<sup>®</sup> (2003) Thomson Healthcare, 58th ed.], 유럽 특허 EP 0467606; PCT 공개 번호 WO 94/02136, WO 94/09010, WO 92/05179, WO 93/11130, WO 94/02385, WO 95/14023, 및 WO 94/02136, 및 미국 특허 번호 5,023,262; 5,120,725; 5,120,727; 5,177,203; 5,258,389; 5,118,677; 5,118,678; 5,100,883; 5,151,413; 5,120,842; 및 5,256,790에 기재되어 있다.

[0173] 일부 실시양태에서, 제2 작용제는 통상적인 화학치료제, 예컨대, 예를 들어, 독소루비신, 파클리탁셀, 멜팔란, 빈카 알칼로이드, 메토트렉세이트, 미토마이신 C 또는 에토포시드일 수 있는 세포독성제이다. 또한, 강력한 작용제, 예컨대 CC-1065 유사체, 칼리케아미신, 마이탄신, 돌라스타틴 10의 유사체, 리족신, 및 팔리톡신은 항-CD40 항체 또는 그의 작용제에 연결될 수 있다.

[0174] 추가의 실시양태에서, 제2 작용제는 인간화 항-HER2 모노클로날 항체; 리툭신 (RITUXAN) (리툭시맙; 제넨테크, 인크. (Genentech, Inc.), 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코); 키메라 항-CD20 모노클로날 항체; 오바렉스 (OVAREX) (알타렉스 코포레이션 (AltaRex Corporation), 매사추세츠주); 파노렉스 (PANOREX) (글락소 웰컴 (Glaxo Wellcome), 노쓰 캐롤라이나주; 뮤린 IgG2a 항체); 에르비툭스 (ERBITUX) (세툭시맙) (임클론 시스템스 인크. (Imclone Systems Inc.), 뉴욕주; 항-EGFR IgG 키메라 항체); 비탁신 (VITAXIN) (메드아뮨, 인크. (MedImmune, Inc.), 메릴랜드주); 캄파트 I/H (류코사이트 (Leukosite), 매사추세츠주; 인간화 IgG1 항체); 스마트 (Smart) MI95 (프로테인 디자인 랩스, 인크. (Protein Design Labs, Inc.), 캘리포니아주; 인간화 항-CD33 IgG 항체); 림포시드 (LymphoCide) (이뮤노메딕스, 인크. (Immunomedics, Inc.), 뉴저지주; 인간화 항-CD22 IgG 항체); 스마트 ID10 (프로테인 디자인 랩스, 인크., 캘리포니아주; 인간화 항-HLA-DR 항체); 온콜림 (Oncolym) (테크니클론, 인크. (Technicclone, Inc.), 캘리포니아주; 방사성표지된 뮤린 항-HLA-Dr10 항체); 알로뮨 (ALLOMUNE) (바이오틴스플란트 (BioTransplant), 캘리포니아주; 인간화 항-CD2 mAb); 아바스틴 (AVASTIN) (제넨테크, 인크., 캘리포니아주; 항-VEGF 인간화 항체); 에프라투주맙 (이뮤노메딕스, 인크., 뉴저지주 및 암젠 (Amgen), 캘리포니아주; 항-CD22 항체); 및 CEA사이드 (CEAcide) (이뮤노메딕스, 뉴저지주; 인간화 항-CEA 항체)이다.

[0175] 제2 작용제로서 사용될 수 있는 다른 적합한 항체로는 하기 항원에 대한 항체를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다: CA125, CA15-3, CA19-9, L6, 루이스 (Lewis) Y, 루이스 X, 알파 폐토단백질, CA 242, 태반 알칼리성 포스파타제, 전립선 특이적 항원, 전립선산 포스파타제, 표피 성장 인자, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, 항-트랜스페린 수용체, p97, MUC1-KLH, CEA, gp100, MART1, 전립선 특이적 항원, IL-2 수용체, CD20, CD52, CD33, CD22, 인간 용모막 생식선자극호르몬, CD38, 뮤신, P21, MPG, 및 Neu 종양유전자 생성물.

#### 비-치료 용도

[0177] 본원에 기재된 항체는 친화성 정제제로서 유용하다. 이 공정에서, 항체 또는 그의 단편을 관련 기술분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 고상, 예컨대 단백질 A 수지 상에 고정화한다. 고정화된 항체 또는 그의 단편을 정제되는 CD40 단백질 (또는 그의 단편)을 함유하는 샘플과 접촉시키고, 그 후 지지체를, 고정화된 항체에 결합된 CD40 단백질을 제외한 샘플 중의 실질적으로 모든 물질을 제거할 적합한 용매로 세척한다. 마지막으로, 지지체를 항체로부터 CD40 단백질을 방출할 또 다른 적합한 용매로 세척한다.

[0178] 본 발명의 항-CD40 항체는 또한 CD40 단백질을 검출하고/거나, 정량화하는 진단 검정, 예를 들어 특이적 세포, 조직, 또는 혈청에서 CD40 발현을 검출하는 것에 유용하다.

[0179] 본원에 기재된 항체는 임의의 공지된 검정 방법, 예컨대 경쟁적 결합 검정, 직접 및 간접 샌드위치 검정, 및 면역침전 검정에서 채용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987)]을 참조한다.

#### 제약 조성물

[0181] 본 개시내용은 제약상 허용되는 담체와 함께 제제화된, 본 개시내용의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분(들)을 함유하는 조성물, 예를 들어, 제약 조성물을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 본 발명의 항체 또는

그의 항원-결합 부분을 코딩하는 단리된 핵산, 및 제약상 허용되는 담체를 함유할 수 있다. 조성물은 대상체에서 이식 거부의 가능성을 감소시키거나, 이식 거부 전의 기간을 증가시키거나, 면역억제를 유도하거나, 자가면역 장애를 치료하는데 유효할 수 있다. 본 발명의 조성물은 본원에 기재된 방법 중 임의의 것에 유효할 수 있다.

[0182] 제약상 허용되는 담체는 생리학적으로 혼화성인 임의의 및 모든 적합한 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 투여 경로에 따라, 본 발명의 항체 (또는 그의 항원-결합 부분(들))는 항체 (또는 그의 항원-결합 부분(들))를 불활성화시킬 수 있는 산 및 다른 자연 조건의 작용으로부터 항체 (또는 그의 항원-결합 부분(들))를 보호하는 물질에 코팅될 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 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어, 코팅, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우에 요구되는 입도의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 조성물 중에 등장성제, 예를 들어, 당, 다가알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 포함할 수 있다. 주사가능한 조성물의 연장된 흡수는 조성물에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시킴으로써 야기될 수 있다.

[0183] 본 발명의 제약 조성물은 본 발명의 항체 또는 그의 단편, 및 본원에 기재된 바와 같은 제2 치료제 (예를 들어, 1종 이상의 면역억제제)를 함유할 수 있다.

[0184] 조성물은 용액, 혼탁액, 에멀젼, 주입 장치, 또는 삽입용 전달 장치의 형태일 수 있거나, 이는 사용 전에 물 또는 또 다른 적합한 비허클로 재구성되는 고체 형태 (예를 들어, 건조 분말)로서 제시될 수 있다. 조성물은 백신의 지속된 방출을 허용하는, 오일 에멀젼, 유중수 에멀젼, 수중유중수 에멀젼, 부위-특이적 에멀젼, 기관-체류 에멀젼, 점성에멀젼, 마이크로에멀젼, 나노에멀젼, 리포좀, 미세입자, 미소구, 나노구, 나노입자 및 다양한 천연 또는 합성 중합체, 예컨대 비재흡수성 불투과성 중합체, 예컨대 에틸렌비닐 아세테이트 공중합체 및 하이트렐 (Hytrel)® 공중합체, 팽윤성 중합체, 예컨대 히드로겔, 또는 재흡수성 중합체, 예컨대 콜라겐 및 특정 폴리산 또는 폴리에스테르, 예컨대 재흡수성 봉합을 생성하는데 사용되는 것들의 형태일 수 있다.

[0185] 조성물은 경구 투여용 환제, 정제, 캡슐, 액체, 또는 서방형 정제; 또는 정맥내, 경막내, 피하 또는 비경구 투여용 액체; 또는 국부 투여용 중합체 또는 다른 서방형 비허클의 형태일 수 있다.

[0186] 한 측면에서, 조성물의 용액은 제약상 허용되는 담체, 예를 들어, 조성물이 수용성인 경우에 수성 담체에 용해된다. 수용액의 예로는 예를 들어, 물, 염수, 포스페이트 완충 염수, 헹크 용액, 링거 용액, 엑스트로스/염수, 글루코스 용액 등을 들 수 있다. 제제는 대략적인 생리학적 조건에 요구되는 바와 같은 제약상 허용되는 보조물질, 예컨대 완충제, 긴장성 조정제, 습윤화제, 세정제 등을 함유할 수 있다. 첨가제는 또한 추가의 활성 성분, 예컨대 살균제, 또는 안정화제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 용액은 아세트산나트륨, 락트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 소르비탄 모노라우레이트 또는 트리에탄올아민 올레아이트를 함유할 수 있다. 고체 제제는 본 개시내용에서 사용될 수 있다. 이들은 예를 들어, 환제, 정제, 분말 또는 캡슐로서 제제화될 수 있다. 고체 조성물에 대해, 예를 들어, 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 나트륨 사카린, 탈콤, 셀룰로스, 글루코스, 수크로스, 탄산마그네슘 등을 포함하는 통상적인 고체 담체가 사용될 수 있다. 적합한 제약부형제로는 예를 들어, 전분, 셀룰로스, 활석, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀, 백악, 실리카겔, 스테아르산마그네슘, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 염화나트륨, 건조된 탈지유, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물, 에탄올을 들 수 있다.

[0187] 제제를 제조하는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법은 예를 들어, 문헌 ["Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20th ed., ed. A.R. Gennaro AR., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)]에서 발견된다.

[0188] 한 측면에서, 본 발명의 조성물 또는 핵산, 폴리펩티드, 또는 항체를 포함하는 제약 제제는 지질 단층 또는 이중층, 예를 들어, 리포좀에 혼입된다. 문헌 [미국 특허 번호 6,110,490; 6,096,716; 5,283,185 및 5,279,833]. 본 발명의 측면은 또한 본 발명의 수용성 핵산, 펩티드 또는 폴리펩티드가 단층 또는 이중층의 표면에 부착된 제제를 제공한다. 예를 들어, 펩티드는 히드라지드-PEG-(디스테아로일포스파티딜) 에탄올아민-함유 리포좀에 부착될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Zalipsky, Bioconjug. Chem. 6: 705-708, 1995] 참조). 리포좀 또는 지질막, 예컨대 평면 지질막 또는 무손상 세포, 예를 들어, 적혈구 세포의 세포막의 임의의 형태가 사용될 수 있다. 리포좀성 제제는 정맥내로, 경피로 (예를 들어, 문헌 [Vutla, J. Pharm. Sci. 85: 5-8, 1996] 참조), 경점막으로, 또는 경구로의 투여를 포함한 임의의 수단에 의할 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 핵

산, 펩티드 및/또는 폴리펩티드가 미셀 및/또는 리포좀 내에 혼입된 제약 제조물을 제공한다 (예를 들어, 문헌 [Suntres, J. Pharm. Pharmacol. 46: 23-28, 1994]; [Woodle, Pharm. Res. 9: 260-265, 1992] 참조). 리포좀 및 리포좀성 제제는 표준 방법에 따라 제조될 수 있으며, 또한 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 문헌 [Akimaru, Cytokines Mol. Ther. 1: 197-210, 1995. Alving, Immunol. Rev. 145: 5-31, 1995. Szoka, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467, 1980. 미국 특허 번호 4, 235,871; 4,501,728 및 4,837,028].

[0189] 한 측면에서, 조성물은 신체로부터의 급속한 제거에 대해 펩티드를 보호할 담체, 예컨대 삽입물 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 포함한 제어 방출 제제로 제조된다. 생체분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제제의 제조 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 리포좀성 혼탁액은 또한 제약상 허용되는 담체로서 사용될 수 있다. 문헌 [미국 특허 번호 4,522,811].

[0190] 본 개시내용의 조성물은 관련 기술분야에 공지된 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 통상의 기술자에 의해 인식될 것인 바와 같이, 투여의 경로 및/또는 방식은 바람직한 결과에 따라 다양할 것이다. 투여는 비경구, 정맥내, 경막내, 피하, 경구, 국소, 국부, 근육내, 진피내, 경피, 진피하, 직장, 척추, 또는 표피일 수 있다. 연속 주입에 의한 정맥내 전달은 본 발명의 항체를 투여하는 한 예시적인 방법이다.

[0191] 특정 투여 경로에 의해 본 발명의 작용제를 투여하기 위해, 작용제를 그의 불활성화를 방지하는 물질로 코팅하거나, 작용제를 그와 함께 공동-투여하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들어, 작용제는 적절한 담체, 예를 들어, 리포좀, 또는 희석제 중에서 대상체에게 투여될 수 있다. 제약상 허용되는 희석제는 염수 및 수성 완충제 용액을 포함한다. 리포좀은 수중유중수 CGF 에밀전 뿐만 아니라 통상적인 리포좀을 포함한다 (Strejan et al., J. Neuroimmunol. 7:27-41, 1984).

[0192] 비경구 투여는 통상적으로 주사에 의한 장 및 국소 투여 외의 투여 방식을 포함할 수 있으며, 제한 없이, 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 관절낭내, 안와내, 심장내, 진피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척주내, 경막외 및 골간내 주사 및 주입을 들 수 있다. 본 발명의 제약 조성물에 채용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예로는 물, 에탄올, 폴리올 (예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물, 식물유, 예컨대 올리브유, 및 주사가능한 유기 에스테르, 예컨대 에틸올레아이트를 들 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어, 코팅 물질, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우에 요구되는 입도의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0193] 비경구로 투여가능한 조성물을 제조하는 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있거나 명백할 것이며, 상세하게 기재되어 있다. 문헌 [Bai, J. Neuroimmunol. 80: 65-75, 1997. Warren, J. Neurol. Sci. 152: 31-38, 1997. Tonegawa, J. Exp. Med. 186: 507-515, 1997]. 비경구 투여용 제제는 예를 들어, 부형제, 멸균수, 염수, 폴리알킬렌 글리콜, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 기원의 오일, 또는 수소화된 나프탈렌을 함유할 수 있다. 생체적합성, 생체분해성 락티드 중합체, 락티드/글리콜리드 공중합체, 또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체는 본 발명의 작용제의 방출을 제어하는데 사용될 수 있다. 나노미립자 제제 (예를 들어, 생체분해성 나노입자, 고체 지질 나노입자, 리포좀)는 본 발명의 작용제의 생체분포를 제어하는데 사용될 수 있다. 다른 잠재적으로 유용한 전달 시스템으로는 에틸렌-비닐 아세테이트 공중합체 입자, 삼투성 펌프, 경막내 펌프, 삽입가능한 주입 시스템, 및 리포좀을 들 수 있다. 제제 중의 작용제의 농도는 투여되는 약물의 투여량, 및 투여 경로를 포함한 다수의 인자에 따라 다양하다.

[0194] 멸균 주사가능한 용액은 본 발명의 작용제를 요구되는 양으로 적절한 용매에 상기 열거된 성분 중 1종 또는 조합과 함께 혼입시킨 후, 필요에 따라 멸균 미세여과함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 본 발명의 작용제를 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터의 요구되는 다른 성분을 함유하는 멸균 비허를 내로 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 제조 방법은 활성 성분 플러스 그의 이전에 멸균-여과된 용액으로부터의 임의의 추가의 바람직한 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 동결-건조 (동결건조)를 포함한다. 투여량 레지멘은 최적의 바람직한 반응 (예를 들어, 치료 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 볼루스가 투여될 수 있거나, 몇몇 분할된 용량이 시간 경과에 따라 투여될 수 있거나, 용량은 치료 상황의 긴급성에 의해 지시된 바와 같이 비례적으로 감소되거나 증가될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 매주 1회 또는 2회 피하 주사에 의해 또는 매월 1회 또는 2회 피하 주사에 의해 투여될 수 있다. 비경구 조성물은 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 제제화될 수 있다. 본 원에 사용된 바와 같은 투여 단위 형태는 치료되는 대상체에 대한 단일의 투여량으로서 적합화된 물리적으로 별개의 단위를 지칭하며; 각각의 단위는 요구되는 제약 담체와 함께 바람직한 치료 효과를 생성하도록 계산된 미

리 결정된 양의 활성제를 함유한다. 본 발명의 투여 단위 형태에 대한 명세는 (a) 활성제의 고유한 특징 및 달성되는 특정 치료 효과, 및 (b) 개체에서 민감성의 치료를 위해 이러한 활성제를 작용화하는 관련 기술분야에 고유한 제한에 의해 영향을 받으며, 이에 직접적으로 의존한다.

[0195] 경구로 투여되는 경우에, 본 발명의 조성물은 소화로부터 보호될 수 있다. 이는 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 조성물과 복합체화하여, 이를 산성 및 효소적 가수분해에 내성이 되게 함으로써, 또는 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 적절하게 내성인 담체, 예컨대 리포좀에 패키징함으로써 달성될 수 있다. 작용제를 소화로부터 보호하는 수단은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 문헌 [Fix, Pharm Res. 13: 1760-1764, 1996. Samanen, J. Pharm. Pharmacol. 48: 119-135, 1996. 미국 특허 번호 5,391,377].

[0196] 경점막 또는 경피 투여를 위해, 침투되는 장벽에 적절한 침투제가 제제에 사용될 수 있다. 이러한 침투제는 일반적으로 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 경점막 투여를 위해, 담즙 염 및 푸시드산 유도체를 들 수 있다. 또한, 세정제는 침투를 용이하게 하기 위해 사용될 수 있다. 경점막 투여는 비내 스프레이 또는 좌제를 사용하는 것을 통해서일 수 있다. 문헌 [Sayani, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 13: 85-184, 1996]. 국소, 경피 투여를 위해, 작용제는 연고, 크림, 살브, 분말 및 젤로 제제화된다. 경피 전달 시스템으로는 또한 예를 들어 패치를 들 수 있다.

[0197] 본 발명의 조성물은 또한 지속 전달 또는 지속 방출 메카니즘에서 투여될 수 있다. 예를 들어, 펩티드의 지속 전달을 가능하게 하는 생체분해성 미소구 또는 캡슐 또는 다른 생체분해성 중합체 형태는 본 발명의 제제에 포함될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Putney, Nat. Biotechnol. 16: 153-157, 1998] 참조).

[0198] 흡입을 위해, 본 발명의 조성물은 건조 분말 에어로졸, 액체 전달 시스템, 에어 젯 네뷸라이저, 추진제 시스템 등을 포함한 관련 기술분야에 공지된 임의의 시스템을 사용하여 전달될 수 있다. 문헌 [Patton, Biotechniques 16: 141-143, 1998]. 또한, 예를 들어, 듀라 파마슈티칼스 (Dura Pharmaceuticals) (캘리포니아주 샌 디에고), 아라다임 (Aradigm) (캘리포니아주 헤이워드), 에어로젠 (Aerogen) (캘리포니아주 산타 클라라), 인해일 테라퓨틱 시스템즈 (Inhale Therapeutic Systems) (캘리포니아주 샌 카를로스) 등에 의한 폴리펩티드 거대분자용 제품 및 흡입 전달 시스템이 본 개시내용에 사용될 수 있다. 예를 들어, 제약 제제는 에어로졸 또는 미스트의 형태로 투여될 수 있다. 에어로졸 투여를 위해, 제제는 계면활성제 및 추진제와 함께 미세하게 분할된 형태로 공급될 수 있다. 또 다른 측면에서, 호흡 조직에 제제를 전달하기 위한 장치는 제제가 기화하는 흡입기이다. 다른 액체 전달 시스템으로는 예를 들어, 에어 젯 네뷸라이저를 들 수 있다.

[0199] 조성물은 대상체의 연령, 중량 및 상태, 사용되는 특정 조성물, 및 투여 경로에 적절한 일정으로 및 기간에 걸쳐 단일 용량 치료로 또는 다중 용량 치료로 투여될 수 있다. 투여의 빈도는 임의의 다양한 인자, 예를 들어, 증상의 중증도, 바람직한 면역보호의 정도, 조성물이 예방적 또는 치유적 목적으로 사용되는지 여부 등에 따라 다양할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 조성물은 1개월당 1회, 1개월당 2회, 1개월당 3회, 격주로 (qow), 1주당 1회 (qw), 1주당 2회 (biw), 1주당 3회 (tiw), 1주당 4회, 1주당 5회, 1주당 6회, 격일로 (qod), 매일 (qd), 1일 2회 (qid), 또는 1일 3회 (tid) 투여된다.

[0200] 본 발명에 따른 폴리펩티드의 투여의 기간, 예를 들어, 조성물이 투여되는 기간은 임의의 다양한 인자, 예를 들어, 대상체 반응 등에 따라 다양할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 약 1일 내지 약 1주, 약 2주 내지 약 4주, 약 1개월 내지 약 2개월, 약 2개월 내지 약 4개월, 약 4개월 내지 약 6개월, 약 6개월 내지 약 8개월, 약 8개월 내지 약 1년, 약 1년 내지 약 2년, 또는 약 2년 내지 약 4년, 또는 그보다 많은 범위의 기간에 걸쳐 투여될 수 있다.

[0201] 경구 또는 비경구 조성물을 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 제제화하는 것이 유리하다. 본원에 사용된 바와 같은 투여 단위 형태는 치료되는 대상체에 대해 단일의 투여량으로서 적합화된 물리적으로 별개의 단위를 지칭하며; 각각의 단위는 요구되는 제약 담체와 함께 바람직한 치료 효과를 생성하도록 계산된 미리 결정된 양의 활성제를 함유한다.

[0202] 본 개시내용의 제약 조성물 중의 활성 성분의 실제 투여량 수준은 환자에게 독성이 되지 않고, 특정 환자, 조성물, 및 투여 방식에 대해 바람직한 치료 반응을 달성하는데 유효한 활성 성분의 양을 얻도록 다양화될 수 있다. 선택되는 투여량 수준은 채용되는 본 개시내용의 특정 조성물, 또는 그의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 채용되는 특정 작용제의 배설 속도, 치료의 기간, 채용되는 특정 조성물과 조합으로 사용되는 다른 약물, 작용제 및/또는 물질, 치료되는 환자의 연령, 성별, 중량, 상태, 일반적 건강 및 이전의 의학적 병력, 및 의학 기술분야에 널리 공지된 유사 인자를 포함한 다양한 약동학적 인자에 의존할 것이다. 관련

기술분야의 통상의 기술을 갖는 의사 또는 수의사는 요구되는 제약 조성물의 유효량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 제약 조성물에 채용되는 본 발명의 작용제의 용량을 바람직한 치료 효과를 달성하기 위해 요구되는 것보다 더 낮은 수준에서 시작하고, 바람직한 효과가 달성될 때까지 투여량을 점차적으로 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 조성물의 적합한 일일 용량은 치료 효과를 생성하는데 유효한 최저 용량인 작용제의 양일 것이다. 이러한 유효 용량은 일반적으로 상기 기재된 인자에 의존할 것이다. 바람직한 경우에, 치료 조성물의 유효 일일 용량은 하루 전반에 걸쳐 적절한 간격으로 분리하여, 임의로 단위 투여 형태로 투여되는 2, 3, 4, 5, 6개 또는 그 초과의 하위-용량으로서 투여될 수 있다.

[0203] 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 얻어진 데이터는 인간에서 사용하기 위한 투여량의 범위를 수립하는데 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 이러한 작용제의 투여량은 독성이 거의 없거나 전혀 없는 ED<sub>50</sub>을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있다. 투여량은 채용되는 투여 형태 및 이용되는 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 다양할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 치료학적 유효 용량은 세포 배양 검정으로부터 초기에 추정될 수 있다. 용량은 동물 모델에서 세포 배양에서 측정된 바와 같은 IC<sub>50</sub> (즉, 증상의 반-최대 억제를 달성하는 시험 작용제의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하도록 제제화될 수 있다. 문헌 [Sonderstrup, Springer, Sem. Immunopathol. 25: 35-45, 2003. Nikula *et al.*, Inhal. Toxicol. 4(12): 123-53, 2000].

[0204] 본 발명의 항체 또는 항원-결합 부분의 치료학적 또는 예방학적 유효량에 대한 예시적인, 비-제한적 범위는 약 0.001 내지 약 100 mg/kg 체중 이상, 약 0.1 내지 약 100 mg/kg 체중, 약 0.01 내지 약 80 mg/kg 체중, 약 0.001 내지 약 60 mg/kg 체중, 약 0.01 내지 약 30 mg/kg 체중, 약 0.01 내지 약 25 mg/kg 체중, 약 0.5 내지 약 25 mg/kg 체중, 약 0.1 내지 약 15 mg/kg 체중, 약 0.1 내지 약 20 mg/kg 체중, 약 10 내지 약 20 mg/kg 체중, 약 0.75 내지 약 10 mg/kg 체중, 약 1 내지 약 10 mg/kg 체중, 약 2 내지 약 9 mg/kg 체중, 약 1 내지 약 2 mg/kg 체중, 약 3 내지 약 8 mg/kg 체중, 약 4 내지 약 7 mg/kg 체중, 약 5 내지 약 6 mg/kg 체중, 약 8 내지 약 13 mg/kg 체중, 약 8.3 내지 약 12.5 mg/kg 체중, 약 4 내지 약 6 mg/kg 체중, 약 4.2 내지 약 6.3 mg/kg 체중, 약 1.6 내지 약 2.5 mg/kg 체중, 약 2 내지 약 3 mg/kg 체중, 또는 약 10 mg/kg 체중이다. 대상체에게 투여되는 투여량은 또한 약 0.1 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 15 mg/kg, 또는 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 대상체의 체중일 수 있다. 예시적인 용량으로는 1 ng/kg 내지 100 mg/kg을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 용량은 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 4 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 6 mg/kg, 약 7 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 9 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 11 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 13 mg/kg, 약 14 mg/kg, 약 15 mg/kg 또는 약 16 mg/kg의 대상체의 체중이다. 문헌 [WO 94/04188].

[0205] 조성물은 유효량의 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 함유하도록 제제화되며, 여기서 양은 치료되는 동물 및 치료될 상태에 의존한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 약 0.01 mg 내지 약 10 g, 약 0.1 mg 내지 약 9 g, 약 1 mg 내지 약 8 g, 약 1 mg 내지 약 7 g, 약 5 mg 내지 약 6 g, 약 10 mg 내지 약 5 g, 약 20 mg 내지 약 1 g, 약 50 mg 내지 약 800 mg, 약 100 mg 내지 약 500 mg, 약 0.01 mg 내지 약 10 g, 약 0.05 μg 내지 약 1.5 mg, 약 10 μg 내지 약 1 mg 단백질, 약 30 μg 내지 약 500 μg, 약 40 pg 내지 약 300 pg, 약 0.1 μg 내지 약 200 mg, 약 0.1 μg 내지 약 5 μg, 약 5 μg 내지 약 10 μg, 약 10 μg 내지 약 25 μg, 약 25 μg 내지 약 50 μg, 약 50 μg 내지 약 100 μg, 약 100 μg 내지 약 500 μg, 약 500 μg 내지 약 1 mg, 약 1 mg 내지 약 2 mg의 범위의 용량으로 투여된다. 임의의 특정 대상체에 대한 구체적인 용량 수준은 특정 펩티드, 연령, 체중, 일반적 건강, 성별, 식이, 투여 시간, 투여 경로, 및 배설 속도, 약물 조합 및 요법을 받는 특정 질환의 중증도를 포함한 다양한 인자에 의존한다.

## 제조 물품

[0206] 또 다른 측면에서, 본원에 기재된 상태 또는 장애의 치료에 유용한 물질을 함유하는 제조 물품이 포함된다. 제조 물품은 용기 및 라벨을 포함한다. 적합한 용기로는 예를 들어, 병, 바이알, 시린지, 및 시험 튜브를 들 수 있다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다. 용기는 상태를 치료하는데 유효한 조성물을 보유하며, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다. 예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘에 의해 천공가능한 스토퍼를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다. 조성물 중의 활성제는 본원에 기재된 바와 같은 인간화 항-CD40 항체 또는 그의 단편, 또는 임의의 다른 항체 또는 그의 단편일 수 있다. 용기 상의 또는 그와 결합된 라벨은 조성물이 선택의 상태를 치료하는데 사용됨을 지시한다. 제조 물품은 제약상-허용되는 완충제, 예컨대 포스페이트-완충 염수, 릴거 용액, 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 시린지, 및 사용을 위한 지시서를 갖는 패키지 삽입물을 포함한, 상업적 및

사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0208] 한 실시양태에서, 본 발명은 항-CD40 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 함유하는 키트를 제공한다. 키트의 추가의 성분은 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 사용을 위한 지시서; 항체를 라벨 또는 치료제에 커플링하는데 유용한 다른 시약, 치료제, 또는 작용제, 또는 투여용 항체를 제조하기 위한 다른 물질; 제약상 허용되는 담체; 및 대상체에의 투여를 위한 장치 또는 다른 물질.

[0209] 키트는 본원에 기재된 바와 같은 제2 치료제를 함유할 수 있거나, 그렇지 않을 수 있다. 작용제는 키트와 함께 혼합되거나, 키트 내에 별개로 패키징될 수 있다.

[0210] 키트는 항-CD40 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 적어도 1개의 핵산, 및 핵산의 발현을 위한 지시서를 함유할 수 있거나, 그렇지 않을 수 있다. 키트의 다른 가능한 성분으로는 발현 벡터 및 세포를 들 수 있다.

[0211] 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 진단 키트, 즉, 진단 검정을 수행하기 위한 지시서와 함께 미리 결정된 양의 시약의 패키징된 조합물에서 사용될 수 있다. 항체가 효소로 표지되는 경우에, 키트는 효소에 의해 요구되는 기질 및 조인자, 예컨대 검출가능한 발색단 또는 형광단을 제공하는 기질 전구체를 포함할 수 있다. 또한, 다른 첨가제, 예컨대 안정화제, 완충제 (예를 들어 차단 완충제 또는 용해 완충제) 등이 포함될 수 있다. 다양한 시약의 상대량은 검정의 민감성을 실질적으로 최적화하는 시약의 용액 중의 농도를 제공하도록 폭넓게 다양화될 수 있다. 시약은 용해 시 적절한 농도를 갖는 시약 용액을 제공할 부형제를 포함한, 통상적으로 동결건조된 건조 분말로서 제공될 수 있다.

## 에피토프 맵핑

[0212] 항체가 결합하는 특정 에피토프를 확인하는 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 표준 기술은 항체가 결합하는 전장 단백질로부터 유래된 중첩하는, 짧은 웨პ티드 (예를 들어, 10-30개 길이, 예를 들어, 20개의 아미노산)가 항체에 결합하는 그들의 능력에 대해 개별적으로 시험되는 웨პ티드 스캐닝을 포함한다. 이러한 실험으로부터, 항체가 결합하는 단백질의 영역이 그 후 결정될 수 있다.

[0213] 부위-지정 돌연변이유발은 또한 특정 단백질의 항원성 영역(들)을 확인하는데 사용될 수 있다. 이 접근법에서, 점 돌연변이를 표적 폴리웨პ티드 내로 조작적으로 유도하고, 다양한 위치에서 돌연변이를 갖는 웨პ티드에 결합하는 항체의 능력을 사용하여 그 단백질의 특정 영역이 항체가 결합하는 에피토프를 함유하는지 여부를 측정한다.

[0214] 항체 에피토프는 또한 표적 단백질 내의 다수의 돌연변이를 생성하는데 사용될 수 있는 고-처리량 돌연변이유발 기술, 예컨대 솟건 돌연변이유발 (Shotgun Mutagenesis) (인테그랄 몰레큘라, 인크. (Integral Molecular, Inc.), 펜실베니아주 필라델피아)을 사용하여 확인될 수 있다. 이러한 방법론은 단백질 내의 에피토프의 효과적인 확인을 허용한다.

[0215] CD40에 대한 다양한 항체가 유사한 에피토프에 결합하는지를 측정하기 위해, 시험관내 경쟁적 차단 검정이 수행될 수 있다. 한 실시양태에서, 키메라 IgG1 CD40-특이적 항체인 항체 2C10, 3A8 및 Chi220이 검정에 사용되었다. 2C10을 라이트닝 링크 (Lightning Link) 항체 표지화 키트 (노부스 바이올로직스 (Novus Biologics), 콜로라도주 리틀톤)를 사용하여 알로피코시아닌 (APC)에 접합시켰다. 인간 PBMC를 상승하는 농도의 2C10, 3A8, 또는 Chi220과 함께 인큐ベ이션한 후, APC-접합된 2C10으로 염색하여 각각의 항체가 2C10을 교차-차단하는 능력을 평가하였다. 도 12에 제시된 바와 같이, APC-접합된 2C10의 결합은 2C10의 증가하는 농도에 따라 감소하였지만, Chi220 또는 3A8은 그렇지 않았다. 결과는 2C10이 Chi220 또는 3A8 중 어느 하나와는 별개의 고유한 에피토프에 결합함을 시시한다.

## CD40 단편

[0216] 본 발명은 또한 2C10 항체에 의해 특이적으로 결합된 에피토프를 포함하는 CD40의 단편을 특색으로 한다. 2C10 항체는 CD40 폴리웨პ티드의 세포외 부분에 대해 발생하였다. 2C10 항체는 이 서열 (서열식별번호: 5 및 6)의 부분과 반응한다.

[0217] 따라서, 본 개시내용은 2C10 항체에 의해 특이적으로 결합된 길이의 CD40 단편 (예를 들어, 150, 120, 100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 18, 15, 12, 11, 10, 9, 8, 또는 7개 미만) 아미노산을 특색으로 한다. 특정 실시양태에서, 단편은 8-10, 8-12, 8-15, 8-20, 8-30, 8-40, 8-50, 8-60, 8-70, 8-80, 또는 8-100개 길이의 아미노산이다. 다른 실시양태에서, 단편은 7-10, 7-12, 7-15, 7-20, 7-30, 7-40, 7-50, 7-60, 7-70, 7-80, 또는 7-100개 길이이다. 2C10 항체는 서열식별번호: 6의 아미노산 8-10, 8-12, 8-15, 8-20, 8-30, 8-40, 8-50, 8-60, 8-70, 8-80, 8-100, 7-10, 7-12, 7-15, 7-20, 7-30, 7-40, 7-50, 7-60, 7-70, 7-80, 또는 7-100개의 서열 내에

존재하는 에피토프에 결합한다.

- [0220] 본 발명은 또한 본원에 기재된 단편 및 이종 서열을 포함하는 융합 단백질을 특색으로 한다. 특정 실시양태에서, 융합 상대 중 하나는 Fc 단백질 (예를 들어, 마우스 Fc 또는 인간 Fc)이다. 융합물은 또한 항체 생산에 유용한 서열, 예를 들어, 말토스 결합 단백질 또는 GST일 수 있다. 다른 실시양태에서, 융합 단백질은 정제 또는 검출 태그, 예를 들어, 직접적으로 또는 간접적으로 검출될 수 있는 단백질, 예컨대 녹색 형광 단백질, 헤마글루티닌, 또는 알칼리성 포스파타제, DNA 결합 도메인 (예를 들어, GAL4 또는 LexA), 유전자 활성화 도메인 (예를 들어, GAL4 또는 VP16), 정제 태그, 또는 분비 신호 펩티드 (예를 들어, 프레프로트립신 신호 서열)이다. 다른 실시양태에서, 융합 상대는 태그, 예컨대 c-myc, 폴리 히스티딘, 또는 FLAG일 수 있다. 각각의 융합 상대는 1개 이상의 도메인, 예를 들어, 프레프로트립신 신호 서열 및 FLAG 태그를 함유할 수 있다.
- [0221] 본원에 기재된 CD40 단편 및 융합 단백질은 적합한 발현 비하클에서 폴리펩티드 단편 또는 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 문자로의 적합한 숙주 세포의 형질전환에 의해 제조될 수 있다.
- [0222] 폭넓게 다양한 발현 시스템 중 임의의 것이 사용될 수 있다. 예시적인 발현 시스템으로는 원핵생물 숙주 (예를 들어, 이. 콜라이) 및 진핵생물 숙주 (예를 들어, 에스. 세레비시아에 (*S. cerevisiae*), 곤충 세포, 예를 들어, Sf21 세포, 또는 포유동물 세포, 예를 들어, NIH 3T3, HeLa, 또는 바람직하게는 COS 세포)를 들 수 있다. 이러한 세포는 폭넓은 범위의 공급원 (예를 들어, 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션, 버지니아주 마나사스)으로부터 이용 가능하다. 형질전환 또는 형질감염의 방법 및 발현 비하클의 선택은 선택되는 숙주 시스템에 의존할 것이다. 형질전환 및 형질감염 방법은 예를 들어, 문헌 [Kucherlapati et al. (*CRC Crit. Rev. Biochem.* 16:349-379, 1982)] 및 [DNA Transfer to Cultured Cells (eds., Ravid and Freshney, Wiley-Liss, 1998)]에 기재되어 있으며; 발현 비하클은 예를 들어, 문헌 [Vectors: Expression Systems: Essential Techniques (ed., Jones, Wiley & Sons Ltd., 1998)]에 제공된 것들로부터 선택될 수 있다.
- [0223] 일단 재조합 CD40 폴리펩티드 단편 또는 융합 단백질이 발현되면, 이는 예를 들어, 친화성 크로마토그래피를 사용하여 단리될 수 있다. 한 예에서, CD40에 특이적인 항체 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 단편)를 칼럼에 부착시키고, 폴리펩티드 단편 또는 융합 단백질을 단리하는데 사용할 수 있다. 친화성 크로마토그래피 전에 단편- 또는 융합 단백질-함유 세포의 용해 및 분획화는 표준 방법에 의해 수행될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Methods in Enzymology, volume 182, eds., Abelson, Simon, and Deutscher, Elsevier, 1990] 참조). 일단 단리되면, CD40 폴리펩티드 단편 또는 융합 단백질은 바람직할 경우에 예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 추가로 정제될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Fisher, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, eds., Work and Burdon, Elsevier, 1980]; 및 [Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Third Edition, ed., Cantor, Springer, 1994] 참조).
- [0224] CD40 폴리펩티드 단편 또는 융합 단백질은 또한 화학적 합성에 의해 (예를 들어, 문헌 [Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL]; 및 [Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide, ed., Kates and Albericio, Marcel Dekker Inc., 2000]에 기재된 방법에 의해) 제조될 수 있다.
- [0225] 본 발명의 항체, 그의 항원-결합 부분, 조성물 및 방법은 모든 척추동물, 예를 들어, 인간, 마우스, 래트, 기니아 퍼그, 햄스터, 개, 고양이, 소, 말, 염소, 양, 돼지, 원숭이, 유인원, 고릴라, 침팬지, 토끼, 오리, 거위, 닭, 양서류, 파충류 및 다른 동물을 포함한 포유동물 및 비-포유동물에 사용될 수 있다.
- [0226] 본 개시내용을 수행하기 위한 구체적인 측면의 하기 실시예는 단지 예시적인 목적으로 제공되며, 본 개시내용의 범위를 어떤 식으로도 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0227] **실시예 1 항-CD40 뮤린 항체의 제조 및 확인**
- [0228] 마우스 (균주 AJ)를 말토스 결합 단백질에 융합된 레서스 마카크 (엠. 몰라타 (*M. mulatta*)) CD40 (아미노산 서열: EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCSESEFLDTWNRETRCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGLHCMSESCESCV; 서열식별번호: 5)의 세포외 도메인 (CD40-MBP)으로 이루어진 융합 단백질로 면역화하였다. 레서스 마카크 CD40 단백질의 이 영역에서의 아미노산 서열은 5개의 아미노산 위치에서 인간 CD40 단백질 (인간 아미노산 서열: EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETD TICTCEEGWHCTSEACESCV; 서열식별번호: 6)과 상이하다. CD40-MBP를 완전 프로인트 아주반트 및 불완전 프로인트 아주반트로 마우스에게 다수회 투여하였다. 면역화된 마우스로부터의 비장세포를 마우스 골수종 세포주 SP2/0과 융합시키고, 혼성체를

표준 하이브리도마 기술을 사용하여 선별하였다.

[0229] 항체를 글루타민 신테타제에 융합된 동일한 레서스 CD40 도메인 (CD40-GST)으로 이루어진 제2 융합 단백질에 대한 반응성에 대해 선별하였다. ELISA에 의한 CD40-GST에 대한 항체 반응성을 유동 세포측정법에 의해 레서스 마카크 혈액 B 세포, 인간 혈액 B 세포 및 레서스 마카크 B-림프모구양 세포주 상에 발현된 천연 CD40에 대한 반응성에 대해 추가로 시험하였다. 선별의 최종 수준으로서, 항체를 CD154-발현 Jurkat D1.1 세포를 공동-발현 시킨 후 인간 또는 레서스 마카크 B 세포 활성화를 억제하는 그들의 능력에 대해 시험판내 검정에서 시험하였다. 항-CD40 항체 2C10의 안정한 서브클론을 제한 희석에 의해 얻었다. 항체는 마우스 IgG1-카파이다.

[0230] 문헌 [Lowe et al., A novel monoclonal antibody to CD40 prolongs islet allograft survival, Am. J. Transplant (2012) 12(8):2079-87].

#### 항체 클로닝

[0232] 모노클로날 항체의 가변 영역은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 클로닝할 수 있다. 하이브리도마 세포에 대한 항체 가변 영역 서열을 얻기 위한 PCR-기재 방법은 예를 들어, 문헌 [Larrick et al., *Nat. Biotechnol.* 7:934-8, 1989] 및 [Orlandi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833-7, 1989]에 기재되어 있다. 이들 기술 또는 유사한 기술을 사용하여, 모노클로날 항체의 가변 영역을 클로닝하고, 추가의 조작으로 처리할 수 있다. 본 경우에, 2C10 항체의 중쇄 및 경쇄로부터의 가변 서열을 클로닝하고, 시퀀싱하였다. 2C10 하이브리도마로부터의 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 나타내는 DNA를 하기 DNA 프라이머를 채용하여 5' RACE PCR을 사용하여 클로닝하였다:

[0233] 마우스 카파 역방향: 5' - CTA ACA CTC ATT CCT GTT GAA GCT CTTGAC (서열식별번호: 7);

[0234] 마우스 카파 전방향: 5' - GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC - 3' (서열식별번호: 8)

[0235] 마우스 IgG1 역방향: 5' - GGC AAC GTT GCA GGT CTC GC - 3' (서열식별번호: 9)

[0236] 마우스 IgG1 전방향: 5' - CTG GAT CTG CTG CCC AAA CTA ACT CC - 3' (서열식별번호: 10)

[0237] PCR 생성물을 상업적 클로닝 벡터 내로 클로닝하고, 표준 시퀀싱 기술을 사용하여 시퀀싱하였다. 생성된 서열을 도 1에 제공한다.

[0238] 이뮤노글로불린 가변 영역 유전자를 항-CD40 항체 클론 2C10을 분비하는 하이브리도마로부터 및 항-인간 CD40 클론 3A8로부터 (Kwekkeboom et al., *Immunology* 79:439-44, 1993) (아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션, ATCC, 베지니 아주 비엔나로부터 얻음) cDNA 말단-폴리머제 연쇄 반응의 5' 급속 증폭을 사용하여 클로닝하였다. 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 레서스 IgG1 또는 레서스 IgG4 중쇄 및 레서스 카파 경쇄 불변 영역 서열을 함유하는 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다.

[0239] 재조합 중쇄 및 경쇄를 발현 벡터 내로 서브클로닝하고, GPEX™ 발현 기술 (카탈렌트 파마 솔루션즈 (Catalent Pharma Solutions), 위스콘신주 미들顿)을 사용하여 차이니스 햄스터 난소 세포를 형질도입하는데 사용된 레트로바이러스 벡터에 패키징하였다. 형질도입된 세포의 풀을 혈청-무함유 배지에서 성장시키고, 분비된 항체를 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 정제된 키메라 레서스 IgG1 (2C10R1, 3A8R1) 및 IgG4 (2C10R4) 항체를 포스페이트 완충제 내로 투석여과하였으며; 내독소 수준은 1 내독소 단위/mg 미만인 것으로 확인되었다.

#### 항체 특징화

[0241] 2C10은 CD40에 결합하고, CD154의 결합을 방지한다

[0242] 레서스 및 인간 CD40 둘 다에 결합하는 2C10의 능력을 평가하기 위해, 재조합적으로 발현된 인간 또는 레서스 CD40을 ELISA 플레이트에 흡착시키고, 다양한 농도의 2C10과 반응시켰다. CD40에의 2C10의 결합을 ELISA에서 염소 항-마우스 IgG-HRP를 사용하여 검출하였다. 도 2b의 결과는 2C10이 레서스 및 인간 CD40에 대한 유사한 결합 친화도를 가짐을 제시하며, 이는 2C10의 임상적 해석에 중요하다. 그의 동족 리간드, CD154의 결합을 차단하는 2C10의 능력을 확인하기 위해, 레서스 및 인간 B 세포를 상승하는 농도의 2C10 또는 이소형 대조군과 함께 인큐베이션한 후, 히스티딘-태그부착된 가용성 CD154 (알앤디 시스템즈 (R&D Systems), 미네소타주 미네아폴리스)와 함께 인큐베이션하고, 히스티딘 발현에 대해 분석하였다. 2C10은 CD154의 결합을 용량-의존적 방식으로 차단하였으며 (도 3), 이는 2C10이 B 세포 및 항원-제시 세포 상의 CD40과의 T 세포-결합된 CD154의 상호작

용을 효과적으로 차단할 수 있음을 지시한다.

[0243] 표 2 2C10의 CD40 수용체 결합 동역학

항-CD40 항체	2C10	3A8	5D12	4D11	Chi220
$K_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$2.73 \times 10^3$	$0.223 \times 10^3$	$1.51 \times 10^3$	$1.25 \times 10^3$	$0.413 \times 10^3$
$K_{off} (s^{-1})$	$1.86 \times 10^{-6}$	$4.15 \times 10^{-6}$	$1.54 \times 10^{-5}$	$1.58 \times 10^{-6}$	$2.5 \times 10^{-5}$
$K_D (M)$	$2.73 \times 10^{-10}$	$1.86 \times 10^{-8}$	$1.02 \times 10^{-8}$	$2.28 \times 10^{-9}$	$6.07 \times 10^{-8}$

[0244]

[0245] 2C10은 레서스 원숭이 및 인간 말초 혈액 단핵 세포에서 B 세포 활성화를 차단한다

[0246]

항-CD40 항체 2C10을 레서스 원숭이 및 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 둘 다를 사용하여 B 세포 활성화에 영향을 미치는 그의 능력에 관해 특징화하였다. CD20 발현은 B 세포의 지표인 것으로서 선택되었고, CD23, CD80, 및 CD86의 발현은 B 세포 활성화와 연관된다. 2C10을 먼저 CD20에 결합하는 그의 능력에 대해 평가하였다. 레서스 또는 인간 PBMC를 형광색소-접합된 2C10 및 항-CD20 항체와 함께 인큐베이션하였다. 유동 세포측정 분석을 사용하여 인간 및 레서스 CD20+ B 세포에의 2C10의 결합을 확인하였다 (도 2a). 또 다른 세트의 실험에서, 레서스 원숭이 또는 인간 중 어느 하나로부터의 PBMC를 불멸화 T 림프구 세포주인 CD154<sup>+</sup> Jurkat D1.1 세포의 존재 또는 부재 하에서 배양하였다. B 세포의 활성화를 PBMC에 존재하는 CD20+ 세포에서의 3가지 마커 (CD23, CD80, 및 CD86)의 발현을 측정함으로써 측정하였다. 이 검정의 일반적 반응식을 도 4에 제시된다. 도 4에 제시된 바와 같이, PBMC를 Jurkat 세포의 존재 하에서 배양하는 것은 모든 3가지 마커의 증가된 발현을 초래하였으며, 이는 B 세포가 CD154<sup>+</sup> Jurkat 세포에 의해 활성화됨을 지시한다.

[0247]

B 세포 활성화를 차단하는 항체의 능력을 시험하기 위해, PBMC 및 Jurkat 세포를 3가지 항체: 3A8, 5C8, 및 2C10의 존재 또는 부재 하에서 공동-배양하였다. 3A8 항체는 마우스 항-인간 CD40 항체 (ATCC 수탁 번호 HB-12024)이고, 5C8은 항-CD154 항체 (ATCC 수탁 번호 CRL-10915)이다. 각각은 양성 대조군으로서 사용되었다. 공동-배양을 다양한 다섯 자릿수의 항체 농도 (0.001  $\mu$ g 내지 10  $\mu$ g)에 걸쳐 수행하였다. 도 5에 제시된 바와 같이, 3A8은 CD23 발현에 의해 측정된 바와 같이 레서스 PBMC에서 B 세포 활성화를 차단하지 않은 반면, 2C10 및 5C8 둘 다는 유사한 효능으로 활성화를 차단할 수 있었다. 상응하는 변화는 또한 CD80 및 CD86 발현으로 관찰되었다. 이들 결과는 2C10이 3A8과는 CD40 상의 상이한 에피토프에 결합함을 지시한다. 이들 결과는 또한 이전에 약한 자극 잠재성을 갖는 부분적 효능제로서 작용하는 것으로 제시된 바 있는 3A8과 대조적으로, 2C10은 일차적으로 CD40 길항제로서 작용함을 지시한다 (Adams et al., *J. Immunol.* 174:542-50, 2005, Bade11 et al., *Am. J. Transplant.* accepted for publication, 2011). 유사한 실험을 레서스보다는 인간 PBMC를 사용하여 수행한 경우에, 2C10 및 5C8 둘 다는 CD86 발현에 의해 측정된 바와 같이 유사한 효능으로 B 세포 활성화를 차단하는 것으로 다시 관찰되었다. 여기서 3A8 항체는 레서스 PBMC와는 달리 B 세포 활성화를 차단하였다 (도 6).

[0248]

2C10 및 3A8 항체를 또한 레서스 원숭이 또는 인간 PBMC 중 어느 하나를 사용하여 Jurkat 세포의 부재 하에서 B 세포를 활성화시키는 그들의 능력에 대해 시험하였다. 여기서 PBMC를 2C10 또는 3A8 중 어느 하나의 존재 또는 부재 하에서 배양하였다. 그 후, CD23, CD80, 및 CD86의 발현을 CD20<sup>+</sup> 세포에서 측정하였다. 도 7에 제시된 바와 같이, 레서스 세포에서의 CD23 발현은 3A8 항체의 존재 하에서 증가되었지만, 2C10 항체에서는 그렇지 않았다. 대조적으로, 3A8 또는 2C10은 어느 것도 인간 B 세포를 활성화시키지 않았다. 3A8 및 2C10 항체 사이에서 관찰된 활성의 차이는 2C10 항체가 3A8 항체의 그들과는 상이한 에피토프에 결합함을 지시한다.

[0249]

2C10은 T 세포-의존적 항체 반응을 방지한다

[0250]

2C10이 CD40 상의 고유한 에피토프에 결합하고, 항-CD154 항체와 유사하게 B 세포 활성화를 억제하고, 효능제 특성을 결여함을 확립하고, 본 발명자들은 그 후 2C10의 효과를 생체내에서 특징화하였다. 2C10의 재조합 마우스-레서스 키메라 형태를 레서스 IgG1 (2C10R1) 또는 IgG4 (2C10R4) 중쇄 및 레서스 카파 경쇄 불변 영역 서열을 사용하여 생성하였다. 3A8의 키메라 레서스 IgG1 형태 (3A8R1)를 또한 대조군으로서 사용하기 위해 생성하였다.

[0251]

레서스 마카크를 제0일에 4-히드록시-3-니트로페닐아세틸-접합된 키홀 림펫 혈모시아닌 (KLH, 10 mg IM) 항원 (바이오서치 테크놀로지즈 (Biosearch Technologies), 캘리포니아주 노바토)으로 1회 면역화하였다. 면역화 전

에 및 1주에, 3마리의 동물을 코호트는 2C10R1, 2C10R4, 3A8R1, 또는 염수의 정맥내 용량 (50 mg/kg)을 받았다. 모든 동물을 70일 동안 관찰하고, 유동 세포측정법을 매주 수행하였다. 재조합 2C10 이소형 중 어느 하나로의 처리는 3A8R1 (Badell et al., *Am. J. Transplant.* 10:214, 2010) 또는 Chi220 (Adams et al., *J. Immunol.* 174:542-50, 2005) 중 어느 하나를 받은 동물에서 발생한 말초 B 세포의 이전에 보고된 유의하고 연장된 고갈에 비해, 말초 B 세포 카운트의 보통의 변화를 초래하였다 (도 8).

[0252] KLH-NP에 대한 T 세포-의존적 항체 반응을 ELISA에 의해 시험하였다. 플레이트를 KLH (0.01 mg/ml, 시그마 (Sigma), 미주리주 세인트 루이스)로 코팅하고, 수퍼 블록 (Super Block) (써모 사이언티픽 (Thermo Scientific), 조지아주 우드스톡)으로 차단하였다. 처리전 및 처리후 혈장 샘플을 연속적으로 희석하고, 1시간 동안 플레이팅하고, 포스페이트-완충 염수/0.05% 트윈으로 세척하였다. 항-KLH 항체를 모노클로날 항-레서스 IgG-서양고추냉이 폐록시다제 (클론 1B3, NHP 리에이전트 리소스 (NHP Reagent Resource), 매사추세츠주 보스톤)와 함께 1시간 동안 인큐베이션함으로써 검출하였다. 그 후, 플레이트를 폐록시다제 기질 용액 (Peroxidase Substrate Solution) (KPL)과 함께 인큐베이션하였다. 그 후, 정지 용액 (KPL)을 첨가하고, 광학 밀도를 ELISA 플레이트 판독기 상에서 450 nm에서 판독하였다. 샘플은 처리후 혈장의 광학 밀도 판독이 동일한 희석에서 처리전 혈장의 광학 밀도를 2배 초과한 경우에, 주어진 희석에서 양성인 것으로 간주되었다. KLH 면역화 후, 대조군 동물은 고-역가 KLH-특이적 IgG를 발달시켰다 (도 9). 3A8R1을 받은 동물은 또한 항-KLH 반응을 발달시켰지만, 역가는 B 세포의 유의한 고갈에도 불구하고 대조군보다 대략 10배 더 낮았다. 대조적으로, IgG 항-KLH 항체의 생성은 2C10R1 또는 2C10R4 중 어느 하나를 받은 모든 동물에서 제56일까지 거의 완전히 차단되었다.

[0253] 2C10은 동종이형 섬 이식의 마카크 모델에서 섬 동종이식편 생존을 유의하게 연장시킨다

[0254] 본 발명자들은 추가로 비인간 영장류 동종이형 섬 이식 모델에서 CD4 정제된 키메라 레서스 IgG4 항체인 2C10R4를 시험하였다 (도 10). 중량이 10-20 kg인 레서스 마카크는 중심선 개복을 통해 이식 전 1일에 공여자 췌장절 제술을 겪었다. 동물을 말단으로 채혈한 후, 췌장을 단리하고, 얼음 상에 놓았다. 섬 단리를 콜라케나제/중성 프로테아제 (각각 950 운쉬 (Wunsch) 단위 및 63 단위; 세르바 (Serva), 독일 하이델베르크)를 사용하여 수행하였다. 소화된 췌장을 4개의 층, 불연속 유로피콜 (Euroficol) 구배 (메디아테크 (Mediatech), 베지니아주 마나사스) 및 코베 (Cobe) 2991 혈액 세포 프로세서 (카리디안 (Caridian)BCT, 콜로라도주 레이크우드) 상에서 정제하였다. 최종 섬 제조물의 샘플을 카운팅하고, 섬 당량 (IEQ)으로서 표현하였다. 단리된 섬을 밤새 배양하고, 카운팅하고, 트랜스플란트 메디아 (Transplant Media) (메디아테크)에 혼탁시켰다.

[0255] 중량이 3-5 kg인 레서스 마카크를 이식 전 4주에 스트렙토조토신 (1250 mg/m<sup>2</sup> IV; 자노사르 (Zanosar), 테바 파렌테랄 메디신즈 (Teva Parenteral Medicines), 캘리포니아주 엘바인)을 사용하여 당뇨병성이 되게 하였다. 당뇨병을 500 mg/kg 블루스의 텍스트로스를 사용한 정맥내 글루코스 내약성 시험 (IVGTT) 및 영장류 C-펩티드의 측정에 의해 확인하였다. 글루코스 수준을 모니터링하고, C-펩티드를 기준선 및 텍스트로스의 주사 후 10, 30, 60 및 90에서 측정하였다. 당뇨병을 검출가능한 혈청 C-펩티드의 부재 하에서 상승된 혈액 글루코스 수준의 측정에 의해 확인하였다. 당뇨병성 수용자는 MHC-미스매칭된 섬 동종이식을 겪었다. 평균 15,745 ( $\pm$  4,063) IEQ를 소 중심선 개복 및 장간막 정맥의 관삽입술을 통해 주입하였다.

[0256] 혈액 글루코스 수준을 이어스틱에 의해 매일 2회 측정하고; NPH (노볼린 (Novolin); 노보 노르디스크 (Novo Nordisk), 뉴저지주 프린스톤) 및 글라르긴 (란투스 (Lantus); 사노피-아벤티스 (Sanofi-Aventis), 뉴저지주 브리지워터) 인슐린을 투여하여 이식전 및 이식 거부 후 300 mg/dL 미만의 공복 혈액 글루코스 (FBG)를 유지하였다. IVGTT를 이식후 주기적으로 수행하여 이식편 기능을 모니터링하였다. 이식 수용자는 T 세포 (CD3 V450, CD4 PerCP-Cy5.5, CD8 PerCp; 비디 바이오사이언스 (BD Bioscience)) 및 B 세포 (CD20 PE, 비디 바이오사이언스) 집단을 모니터링하기 위한 유동 세포측정 분석을 매주 겪었다. 섬 접종 후 거부는 연속적 2일에 130 mg/dL 초과의 FBG로서 정의되었다. 1차 종점은 무거부 섬 이식편 생존이었다.

[0257] 이식 수용자는 2C10R4, 바실릭시맙 (시뮬렉트 (Simulect), 노파르티스 (Novartis), 스위스 바젤) 및 시롤리무스, 또는 바실릭시맙 및 시롤리무스 단독 중 어느 하나를 받았다. 2C10R4 (50 mg/kg)를 수술후 (POD) 제0일 및 제7일에 정맥내로 투여하였다. 바실릭시맙 (0.3 mg/kg)을 POD 0 및 3에 정맥내로 투여하였다. 시롤리무스를 POD 120까지 5-15 ng/ml의 저점 수준을 달성하도록 매일 근육내로 투여하였다. 바실릭시맙 및 시롤리무스 단독을 받는 모든 3마리의 동물은 병력 대조군이다 (Badell et al., *J. Clin. Invest.* 120:4520-312, 2010). 이를 병력 대조군 중 2마리 (RQz6 및 RIB7)는 췌장절 제술에 의한 당뇨병 유도를 겪었으며, 경구 시롤리무스를 받았다.

[0258]

상기 기재된 레지멘으로의 치료는 단지 바실릭시맙 유도 및 시롤리무스 유지 요법을 받은 대조군 (도 11b)에 비해 유의하게 연장된 섬 이식편 생존을 초래하였다 (도 11a). 2C10R4를 받은 동물에 대한 중앙값 무거부 이식편 생존 시간은 대조군 동물에 대한 8일에 비해 280일이다 ( $p=0.010$ , 표 3). 약동학적 데이터는 혈장 2C10R4 수준이 POD 100까지  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  미만일 것으로 예측한다. 시롤리무스는 POD 120에서 중단되었기 때문에, 최장 생존 (304일)을 갖는 수용자는 거부 전 대략 24주 동안 면역억제를 받지 않았다. 2C10R4로 처리된 동물은 임상적으로 관련된 감염성 합병증 또는 중량 감소를 발달시키지 않았다. 이들 결과는 2C10의 IgG4 이소형을 받은 동물을 반영한다. 바실릭시맙 및 시롤리무스와 조합으로 2C10의 IgG1 이소형 (2C10R1)을 받은 2마리의 추가의 동물은 220일 및 162일의 유사하게 연장된 이식편 생존을 달성하였다. 유도 요법으로서 사용된 2C10으로의 긍정적 결과를 고려하여, 다음 단계는 유지 요법으로서 2C10을 투여함으로써 이식편 생존에 대한 효과를 평가하는 것이다.

[0259]

표 3

수용자	요법	IEQ/kg	이식편		코멘트
			생존 (일)	생존 (일)	
DP4A	2C10R4/바실릭시맙/시롤리무스	21,973	296	296	거부
RAo13	2C10R4/바실릭시맙/시롤리무스	14,388	304	304	거부
RZq13	2C10R4/바실릭시맙/시롤리무스	15,881	265	265	거부
RRq13	2C10R4/바실릭시맙/시롤리무스	20,596	163	163	거부
RQz6	바실릭시맙/시롤리무스	12,980	8	8	거부
RUb7	바실릭시맙/시롤리무스	10,903	8	8	거부
RMc11	바실릭시맙/시롤리무스	13,796	10	10	거부

[0260]

CD28/B7 경로와 함께 CD40/CD154 경로의 차단

[0261]

CD40/CD154 경로의 차단은 다른 공동자극 차단제와 함께 유용한 것으로 입증될 수 있다. CD28/B7 공동자극 경로를 차단하도록 설계된 CTLA4-Ig의 고친화도 버전인 벨라타셉트는 신장 및 섬 이식의 비인간 영장류 모델에서 및 신장 이식에서 II상 및 III상 임상 시험에서 효능을 제시한 바 있다 (Larsen et al., *Transplantation* 90:1528-35, 2010, Vincenti et al., *Am. J. Transplant.* 10:535-46, 2010, Adams et al., *J. Immunol.* 174:542-50, 2005, Adams et al., *Diabetes* 51:265-70, 2002, Larsen et al., *Am. J. Transplant.* 5:443-53, 2005, Vincenti et al., *N. Engl. J. Med.* 358:770-81, 2005). BENEFIT 시험은 벨라타셉트로 치료된 환자에서 우수한 신장 기능을 밝혀내었지만; 그러나, 이들 환자는 생검-입증된 급성 거부의 보다 높은 발생 및 보다 중증 등급을 가졌다 (Larsen et al., *Transplantation* 90:1528-35, 2010, Vincenti et al. *Am. J. Transplant.* 10:535-46, 2010). 급성 거부의 이 증가된 속도, 및 CD40 및 B7 차단 사이의 상승작용의 관점에서 (Larsen et al., *Nature* 381:434-8, 1996), 본 발명자들은 다음으로 비인간 영장류 신장 이식에서 조합된 2C10 및 벨라타셉트 요법의 효능을 시험할 것이다.

[0262]

### 실시예 2 인간화 항-CD40 항체

[0263]

본 발명자들은 CD40의 완전한 기능적 길항제로서 선택된 h2C10 (인간화 2C10 항체)으로 지정되는 CD40에 대한 신규한 인간화 Ab를 개발하고, 특징화하였다. 결합 에피토프를, 이를 B 세포를 활성화 또는 고갈시키거나, 부분적 효능제로서 작용하는 경쟁자 분자로부터 구별하는 고유한 결합 특성을 부여하도록 주의깊게 설계하였다. 항체의 초기 마우스 영장류 키메라 버전을, 이식 거부를 방지하고, 동종- 및 이종이식편 생존 둘 다를 연장시키는 것에 대한 유망한 효능, 및 바람직한 비임상적 안전성 프로파일을 입증하는 비인간 영장류에서의 다중 연구를 포함한, 관련 전임상 시험관내 및 생체내 연구에서 조사하였다. 본 발명자들은 또한 탁월한 특징을 나타내는 2C10의 인간화 (h2C10)를 완료하였다.

[0264]

인간화 항-CD40 항체를 제조하기 위해, 뮤린 항체 2C10의 가변 영역 서열을 사용하여 인간 항체 데이터베이스를 조사하였다. VH는 생식계열 항체 서열 VH1-46, VH1-69, 및 VH1-3 (서열식별번호: 30)과 가장 관련된 것으로 밝혀진 반면, VL은 생식계열 항체 서열 VK3-11 (서열식별번호: 31), VK1-39, 및 VK6-21과 가장 관련되었다. 인간 VH1-3 및 VK3-11은, 인간 레퍼토리에서 상대적으로 높은 사용 및 중요한 프레임워크 위치에서의 양호한 보존 때문에 CDR 이식을 위한 억셉터 프레임워크인 것으로 선택되었다. 뮤린 2C10 항체로부터의 CDR을 인간 억셉터 프레임워크 내로 이식한 후 둘 다의 가변 영역으로 3D 모델을 만들었다. 인간 대응물과는 상이한 6개의 뮤린 VH

프레임워크 잔기는 잠재적으로 CDR에 접촉하는 것으로 확인되었다: M48, A67, L69, A71, K73, 및 N76. 모델링 후, 3개의 인간화 VH 서열 2C10\_h1, 2C10\_h2, 및 2C10\_h3을 각각 0, 2, 및 6개의 뮤린 프레임워크 잔기를 함유하도록 설계하였다 (도 13a). 유사하게, 5개의 뮤린 VK 프레임워크 잔기는 잠재적으로 CDR에 접촉하는 것으로 확인되었다: Q1, R46, W47, V58, 및 Y71. 모델링 후, 2개의 인간화 VL 서열 2C10\_11 및 2C10\_12를 각각 0개 및 4개의 뮤린 프레임워크 잔기를 함유하도록 설계하였다 (도 13b).

[0266] 모 뮤린 2C10 항체를 CDR 이식에 의해 인간화하였다. 인간 항체 VH1-3 및 VK3-11 생식계열 프레임워크는 억셉터인 것으로 선택되었다. 3개의 VH 및 2개의 VL 서열을 설계하고, 모든 6개의 인간화 항체를 제조하고, 인간 CD40 결합에 대해 시험하였다.

[0267] 2C10-중-3 (2C10\_h3) 및 2C10-경-2 (2C10\_12) 구축물은 뮤린 2C10의 그것 (0.22 nM)의 2배 내인, 0.39 nM의 CD40 결합 친화도를 갖는 가장 양호한 항체를 생산하는 것으로 밝혀졌다 (표 2). 인간화 가변 영역을 사용하여 SwiMR 발현 시스템 내로 클로닝된 IgG4 또는 안정화된 IgG4로서 임상적 후보 인간화 항체를 구축하였다.

[0268] 고 생산 안정성 CHO 세포주를 FACS에 의해 단리하고, 3 라운드의 ELISA 및 1 라운드의 공급-배치 배양에 의해 스크리닝하였다. 공급-배치 배양에서 0.8 g/L 초과의 인간화 2C10을 생산한 7개의 클론을 단리하였다. 가장 양호한 클론 3C9-I6은 비-최적화된 조건 하에서 ~1.2 g/L를 생산하였다.

#### 항체 발현 벡터의 구축

[0269] 인간화 VH 서열을 유전자 합성하고, 인간 IgG2 중쇄의 불변 영역을 함유하는 벡터 pFUSE-CHIg-hG2a (인비보젠 (Invivogen)) 내로 클로닝하여 발현 벡터 LB300-302를 제조하였다. 인간화 VK 서열을 유전자 합성하고, 인간 카파 경쇄의 불변 영역을 함유하는 발현 벡터 내로 클로닝하여 발현 벡터 LB303-304를 제조하였다. 중쇄 및 경쇄는 강하고 구성적인 포유동물 세포 발현에 대한 인간 EF1 $\alpha$  프로모터의 하류였다. 키메라 2C10 항체를 또한 뮤린 VH 및 VL을 사용함으로써 유사하게 구축하여 각각 발현 벡터 LB305 및 LB306을 제조하였다. 항체 발현 벡터를 표 4에 요약하였다.

#### 표 4 항체 발현 벡터

플라스미드	VH/VK	CH/CK	프로모터	선택
LB300	2C10_h1	hIgG <sub>2</sub> CH	hEF <sub>1</sub> $\alpha$	제오신
LB301	2C10_h2	hIgG <sub>2</sub> CH	hEF <sub>1</sub> $\alpha$	제오신
LB302	2C10_h3	hIgG <sub>2</sub> CH	hEF <sub>1</sub> $\alpha$	제오신
LB303	2C10_11	hCK	hEF <sub>1</sub> $\alpha$	네오마이신
LB304	2C10_12	hCK	hEF <sub>1</sub> $\alpha$	네오마이신
LB305	2C10_VH	hIgG <sub>2</sub> CH	hEF <sub>1</sub> $\alpha$	제오신
LB306	2C10_VK	hCK	hEF <sub>1</sub> $\alpha$	네오마이신
LB308	2C10_h3	hIgG <sub>4</sub> CH	hEF <sub>1</sub> $\alpha$	제오신
LB309	2C10_h3	hIgG <sub>4</sub> CH (S241P)	hEF <sub>1</sub> $\alpha$	제오신

#### [0272]

[0273] 표 4에서의 각각의 벡터는 인간 EF1 $\alpha$  프로모터의 제어 하에 중쇄 또는 경쇄 발현 카세트를 함유한다. 벡터 LB300-302, LB305는 인간 IgG2 중쇄의 불변 영역을 함유한다. 벡터 LB308-309는 인간 IgG4 중쇄의 불변 영역을 함유한다. 벡터 LB303-304, LB306은 인간 카파 경쇄의 불변 영역을 함유한다.

#### 인간화 IgG4 항체의 제조

[0274] 잠재적 이펙터 기능을 추가로 최소화하기 위해, 가장 양호한 결합 활성을 갖는 인간화 항체 (2C10\_h3 및 2C10\_12)를 인간 IgG4 또는 안정화된 인간 IgG4 (S241P)로 전환시켰다. 중쇄 가변 영역 2C10\_h3을 먼저 인간 IgG4 중쇄의 불변 영역을 함유하는 벡터 pFUSE-CHIg-hG4 (인비보젠) 내로 클로닝한 후, 안정화 돌연변이 S241P를 도입하였다 (표 4). 인간화 IgG4 및 IgG4 (S241P)를 일시적 형질감염 후 293F 세포로부터 정제하였다. 생

산 수율은 IgG2 항체의 그것보다 2배 높은 25-35 mg/L이었다. IgG4 항체는 소량의 반 분자를 갖는 것으로 나타났으며, 이는 안정화된 IgG4 항체에서 유의하게 감소되었다. 안정화된 IgG4 항체의 DNA 및 아미노산 서열을 도 21에 제시된다.

[0276] SwiMR 발현 벡터에서의 인간화 IgG4 (S241P) 항체의 클로닝

SwiMR 발현은 형광-활성화된 세포 분류 (FACS)를 통해 매우 생산성 세포의 단리를 용이하게 하는 스위칭 가능한 막 리포터를 이용한, 항체 생산 세포주의 손쉬운 개발을 위해 개발되었다. 막-앵커링된 GFP의 IRES-매개된 비 시스트로닉 발현 카세트를 관심의 유전자 (GOI)의 하류에 놓았다. IRES-GFP 카세트를 염색체로부터의 추후 제거를 위해 LoxP 부위에 의해 플랭킹시켰다. GFP 발현 수준을 사용하여 GOI의 발현 수준을 마킹하였다. 매우 생산성 세포를 FACS에 의해 단리한 후, Cre 리콤비나제로 처리하여 GFP 카세트를 제거하였다. 안정화된 IgG4 형식의 인간화 2C10을 SwiMR 발현 시스템에서 클로닝하여 벡터 LB312를 제조하였다. 중쇄 및 경쇄를 인간 EF1  $\alpha$  프로모터의 제어 하에서 2개의 별개의 발현 카세트에서 클로닝하였다. IRES-GFP 카세트를 중쇄 서열의 하류에 놓고, 2개의 LoxP 부위에 의해 플랭킹시켰다. 플라스미드는 포유동물 세포 선별을 위한 푸로마이신 내성 유전자 및 박테리아 중식을 위한  $\beta$ -락타마제 유전자를 운반한다.

[0278] CHO 세포의 안정한 선별 및 고 생산 세포의 단리

100 ml의 CHOS 세포 ( $1 \times 10^6$  세포/ml, 인비트로젠 (Invitrogen))를 Asc I 및 120  $\mu$ l의 프리스타일 맥스 (Freestyle Max) 시약 (인비트로젠)의 제한 소화에 의해 선형화된 120 ug의 LB312로 형질감염시켰다. 세포를 10 - 20 ug/ml의 푸로마이신으로 2주 동안 선별하였다. 안정한 풀의 GFP 발현 프로파일을 유동 세포측정법에 의해 특징화하였다. 가장 높은 GFP 신호를 갖는 세포의 상위 1%를 100,000 세포를 함유하는 풀 (Pool) #1로서 분류하였다. 2주 동안 배양한 후, 풀 #1을 유동 세포측정법에 의해 GFP 발현에 대해 다시 분석하였다. 가장 높은 GFP 신호를 갖는 세포의 상위 1%를 100,000 세포를 함유하는 풀 #2로서 다시 분류하였다. 2일 동안 배양한 후, 풀 #2를 2  $\mu$ M의 재조합 막 투과성 DNA 리콤비나제 Cre (TAT-NLS-Cre, 엑셀젠 (Excellgen))로 처리하였다. GFP 발현 프로파일을 배양 1주 후에 분석하였다. ~10%의 세포는 GFP 발현을 완전히 소실하였으며, 이는 염색체로부터 GFP 발현 카세트의 성공적인 제거를 지시한다. GFP 음성 세포를 384-웰 플레이트에서 단일 세포로서 분류하였다. 2주 후, ~800 콜로니가 10 x 384-w 플레이트로부터 성장하였다.

[0280] 추가의 인간화 항체

인간화 항체를 또한 VH1-69 및 VL1-39 인간 생식계열 프레임워크 내로 클로닝된 2개의 CDR 이식된 VH 및 2개의 CDR 이식된 VL 서열을 사용하여 생성하였다. 본 발명자들은 이를 추가의 실험에서 2개의 중쇄 (HB1 & HB2) 및 2개의 경쇄 (KB1 & KB2)를 제조하였다. 중쇄 및 경쇄 서열 HP + KP는 양성 대조군으로서 기능한다. 이를 구축물의 조합을 HEK293 세포에서 일시적으로 발현시키고, 항체를 단백질-A 크로마토그래피에 의해 정제하고, hCD40 결합에 대해 시험하였다.

도 14는 2C10HP 및 2C10HB1, 뿐만 아니라 2C10HB2 구축물 사이의 프레임워크 3에서의 아미노산 변화를 제시한다. 도 15는 인간화 2C10 항체에 대한 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 서열을 제시한다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 2C10HP, 2C10HB1, 2C10HB2, 2C10KP, 2C10KB1, 및 2C10KB2를 포함한다. 따라서, 특정 실시양태에서, 항-CD40 항체는 하기 2C10H-K 조합 중 임의의 것을 포함할 수 있다:

[0283] 1. 2C10HP + 2C10KP

[0284] 2. 2C10HB1 + 2C10KB1

[0285] 3. 2C10HB1 + 2C10KB2

[0286] 4. 2C10HB1 + 2C10KP

[0287] 5. 2C10HB2 + 2C10KB2

[0288] 6. 2C10HB2 + 2C10KB1

[0289] 7. 2C10HB2 + 2C10KP

[0290] 8. 2C10HP + 2C10KB1

[0291] 9. 2C10HP + 2C10KB2

[0292] 정제된 항체와의 CD40의 시험관내 결합

[0293] 인간화 항체 및 키메라 항체를 100 또는 200 ml의 293F 세포의 일시적 형질감염 후 정제하였다. 항체를 단백질 A 칼럼으로, 형질감염 후 4일에 수확된 조건화 배지로부터 정제하였다.

[0294] CD40 결합 동역학의 측정

[0295] CD40 결합 동역학을 포르테 바이오 (Forte Bio) (아라젠 바이오사이언스 (Aragen Bioscience)와 계약됨) 상에서 측정하였다. 정제된 CD40을 비오티닐화하고, 스트렙타비딘 바이오센서 상에 고정화하였다.

[0296] 생체내 연구를 위한 생체생산

[0297] CHO 세포의 형질감염 및 안정하게 형질감염된 세포의 선별 후, 항체를 단백질 A 칼럼에 의해 정제하고, 이어서 완충제 교환 (20 mM 시트르산나트륨, 50 mM NaCl, 5% 말토스, pH 6.0) 및 0.2  $\mu$ m 여과하였다. 풀 #1을 사용하여 CD 포르티 (Forti)CHO 배지 (인비트로젠)에 25L 웨이브 백 배양물을 설치하였다. 배양물을 10% CD 이피션트 피드 (Efficient Feed) C (인비트로젠)와 함께 제3일, 제5일, 및 제7일에 3회 공급하였다. 정제된 항체의 최종 수득량은 총 1.6 g이었다. 항체를 SDS-PAGE 및 SEC-HPLC 분석에 의해 특징화하였으며, 단량체성 항체로서 99.4% 순수하였다.

[0298] 세포주 개발

[0299] 단일 세포 콜로니를 3 라운드의 ELISA 및 1 라운드의 공급-배치 생산에 의해 스크리닝하였다. 세포를 스크리닝 공정 전반에 걸쳐 CD 포르티CHO 배지에서 유지하였다. 384-웰 플레이트로부터의 모든 콜로니를 96-웰 플레이트 내로 퍼킹하였다. 각각의 웰로부터의 1.2  $\mu$ l의 배양 배지를 사용하여 항-인간 Fc 항체로 코팅된 ELISA 플레이트에서 항체에 대해 스크리닝하였다. 상부 240 클론을 10 x 24-웰 플레이트 내로 확대하였다. 5일 동안 배양한 후, 1.2  $\mu$ l의 배양 배지를 다시 항체 수준에 대해 스크리닝하고, 상부 60 클론을 10 x 6-웰 플레이트 내로 확대하고, 진탕 인큐베이터에서 배양하였다. 5일 동안 배양한 후, 6-웰 플레이트를, 세포를 6-웰 플레이트의 새로운 세트 내로 1:10 계대함으로써 사본화하였다. 6-웰 플레이트의 원래 세트 중의 배양물을 소멸까지 성장 시킨 후, ELISA에 의해 항체 수준을 측정하였다. 6-웰 플레이트의 사본화된 세트 중의 상부 24 클론을 125 ml 진탕 플라스크 중의 30 ml 배양물 내로 확대시켰다. 클론을 30 ml 공급-배치 생산으로 처리하였다. 공급 전략은 제3일, 제5일, 제7일, 제9일, 및 제11일에 7.5%의 엑스-셀 어드밴스드 CHO 피드 (Ex-Cell Advanced CHO Feed) 1 (시그마)이었다. 상부 클론 3C9-I6은 ~1.2 g/L의 생산 역가를 나타내었다.

[0300] 영장류 키메라 2C10 및 인간화 2C10의 시험관내 약리학

[0301] 본 발명자들은 본 발명자들의 선두 후보에 대해 하기 중요한 시험관내 약리학적 속성을 확인하였다:

- [0302] · CD154-CD40 결속에 의해 유도된 B-세포 활성화의 억제
- [0303] · B 세포의 직접적 활성화 없음

[0304] · CD40의 고친화도 길항체 (예를 들어,  $K_d$ 는 약  $10^{-10}$  M 이하, 약  $10^{-10}$  M 내지 약  $10^{-9}$  M, 또는 본원에 기재된 바와 같음)

[0305] 신규한 면역화 접근법 및 광범위한 시험관내 스크리닝 접근법을 통해, 본 발명자들은 이를 기준을 충족시키며 인간 CD40에 대한 비-고갈/비-활성화 길항체 항체를 나타내는 항-CD40 항체를 확인하였다.

[0306] 시험관내 및 생체내 연구는 인간화 형태가 탁월한 특성을 보유함을 확인시켜 주었다.

[0307] 이전의 섹션에 기재된 바와 같이, 2C10 mAb는 인간 중쇄 및 경쇄 프레임워크 내로의 CDR 이식에 의해 인간화되었다. 원래 2C10 mAb의 특성을 유지하기 위해, 인간화 2C10 구축물을 비아코어에 의해 인간 CD40에 대한 친화도에 대해 스크리닝하였다. 모든 3개의 상부 인간화 2C10 항체는 모 2C10 mAb에 비해 대략 2배 친화도의 단지 약간의 감소를 나타내었다 (표 5). 가장 중요하게는, 이들은 모두 모 2C10 mAb의 이례적인 감속률을 유지하였다. 이들 항체 중에서, 390 pM에서 가장 높은 친화도를 나타낸 클론 2.189.2를 선두 인간화 mAb (h2C10)로서 선택하였다.

표 5 2C10의 인간화 버전의 CD40 수용체 결합 동역학

mAb	K <sub>D</sub> (M)	K <sub>on</sub> (1/Ms)	K <sub>off</sub> (1/s)	R <sub>max</sub>	전체 X <sup>2</sup>	전체 R <sup>2</sup>
2C10	2.22E-10	1.48E+05	6.01E-05	0.3124	0.284838	0.993451
2.189.1	5.11E-10	1.98E+05	1.85E-04	0.3917	0.490659	0.991111
<b>2.189.2</b>	<b>3.90E-10</b>	<b>1.79E+05</b>	<b>1.28E-04</b>	<b>0.3946</b>	<b>0.401784</b>	<b>0.991697</b>
2.191.1	5.61E-10	1.84E+05	1.88E-04	0.3924	0.402934	0.992955

[0309]

인간화 2C10의 결합 동역학을 경쟁자와 비교하면, h2C10의 전반적 친화도는 나노몰 범위의 친화도를 갖는 경쟁자보다 실질적으로 더 양호하게 남아 있다. 본 발명자들은 또한 인간 CD40 및 전임상 평가에 사용된 비인간 영장류 종의 것들로부터의 CD40 사이의 h2C10의 결합 친화도를 비교하였다. 도 16에 제시된 바와 같이, h2C10은 이들 영장류 종에 걸쳐 CD40에 대한 필적하는 친화도를 갖는다.

[0311]

#### 영장류 키메라 및 인간화 2C10의 생체내 특징화

[0312]

2C10의 생체내 약역학, 약동학 및 탐구 안전성 평가를 레서스 원숭이에서 2C10의 영장류 키메라 구축물 및 임상적 후보 인간화 h2C10 항체를 사용하여 수행하였다. 시험관내 결합 동역학에 기초한 2C10의 선두 인간화 버전 (mAb 2.189.2; h2C10)의 선택 후, 본 발명자들은 h2C10을 레서스 원숭이에서의 PK/PD 연구로 진행하여 그의 추가의 특성을 특징화하였다. 폭넓은 범위의 중요한 실험 종점을 커버하는 이들 연구에서 생성된 데이터는 명백하게 h2C10의 탁월한 특성을 확립한다.

[0313]

PD, PK, 및 안전성 종점을 조사하는 연구는 레서스 원숭이에서 완료되었다. 핵심 종점 및 목표를 포함한 연구 설계의 중요한 요소를 표 6 (레서스 원숭이에서 2C10의 약역학 (PD), 약동학 (PK) 및 안전성 연구)에 요약한다. 핵심 실험 종점에 대한 핵심 결과 및 관련 비교 평가는 하기를 포함하였다:

- 혈액 중의 B 및 T 림프구 수에 대한 효과

- T 세포-의존적 항원 키홀 림펫 혈모시아닌 (KLH)에의 체액성 면역 반응에 대한 효과

- 혈액 B 세포에 대한 CD40 수용체 점유 (PD)

- 약동학 (PK)

- 항-약물 항체 (ADA)의 형성에 의해 평가되는 바와 같은 면역원성

- 탐구 독성학은 CBC, 혈청 화학 및 완전 부검을 포함한다.

[0320]

표 6 레서스 원숭이에서의 2C10의 PD, PK 및 안전성 연구

실험 #	핵심 목표(들)	시험 버전	군 크기	시험 용량/ 레지멘	추적 기간	핵심 종점
1	IgG1 및 IgG4 형태, 및 경쟁자 3A8을 비교함	영장류 키메라 2C10	3	2개의 용량; 50 mg/kg, IV, 제0일 및 제7일; 염수-대조군	56일	CBC 림프구 하위세트 1차 TDAR (항-KLH)
2	용량-반응 평가	영장류 키메라 2C10 IgG4	3	1개의 용량; 5, 10, 25, 50 mg/kg, IV; 무관한 IgG 대조군	56일	CBC 림프구 하위세트 상세한 B 세포 하위세트 TDAR (KLH에 대한 1차 및 회상 반응)
3	안전성 평가/ 탐구 독성학	영장류 키메라 2C10 IgG4	2	2개의 용량; 25 mg/kg, IV, 제0일 및 제14일; 병력 대조군	제2 용량 후 14일 (총 28일)	CBC 혈청 화학 림프구 하위세트 부검 육안 & 현미경적 병리상태
4	PK, PD, 안전성	인간화 2C10 IgG4	3	1개의 용량; 10, 25 mg/kg, IV; 염수 대조군	28일	수용체 점유 CBC 혈청 화학 림프구 하위세트 1차 TDAR (항-KLH)PK ADA

[0321]

[0322] 연구 결과를 하기 섹션에 요약한다. h2C10은 B 세포 고갈의 부재 하에서 CD40 수용체 활성화의 선택적 차단이 치료 유익을 제공할 것으로 예상되는 상태의 치료에 사용될 수 있다.

[0323]

#### T 세포-매개된 면역에 대한 효과

[0324]

h2C10이 생체내에서 T-세포 의존적 항체 반응 (TDAR)을 차단함을 생체내에서 입증하기 위해, 원숭이를 h2C10의 투여 후 6시간에 KLH로 면역화하였다. 그 후, KLH에 대한 항체 역가를 매주 측정하였다.

[0325]

10 및 25 mg/kg h2C10의 용량을 원숭이에게 준 후, KLH 챌린지하였다. IgG 및 IgM 항-KLH 역가 둘 다를 처리 후 제28일까지 매주 측정하였다. 도 17은 2C10의 인간화 버전이 가장 높은 시험 용량에서, 및 대부분의 경우에 10 mg/kg 용량 수준에서 KLH 항체 반응의 완전한 억제를 달성하였음을 제시한다. IgM 및 IgG 반응 둘 다가 방지되었다.

[0326]

#### B 세포에 대한 비-고갈 효과

[0327]

길항체 CD40 항체의 개발에서의 목표가 표적화된, CD40+ 세포의 고갈을 최소화하는 것을 포함하였기 때문에, 본 발명자들은 림프구 하위집단에 대한 효과, 특히 B 세포에 대한 효과를 분석하였다.

- [0328] 10 또는 25 mg/kg의 2C10의 인간화 형태 (h2C10)로의 원숭이의 처리는 또한, 비록 CD40 표적이 이들 농도에서 항체에 의해 완전히 포화된다 하더라도 (후속 섹션 수용체 점유 참조), B 세포에 대한 주목할 만한 고갈 효과를 갖지 않았다.
- [0329] 측정된 마지막 날 (제28일)까지 지속되는 B 세포 상의 2C10 결합 부위의 포화에도 불구하고, h2C10의 어느 하나의 용량을 받은 모든 원숭이는 정상 B 및 T 림프구 하위세트를 유지하였다 (도 18). 이들 결과는 10 mg/kg 2C10만큼 낮은 용량으로의 주사가 CD40에 지속적으로 결합할 수 있음과, 원숭이에서 B 세포의 바람직하지 않은 고갈을 유발하지 않고 B 세포 (및 아마도 단핵구 및 다른 항원 제시 세포)에 대한 그의 치료 효과를 입증한다.
- [0330] 2C10이 B 세포를 고갈시키지 않음의 입증은 3A8 및 Chi220 외에 경쟁자에 비한 명백한 이점을 시사한다.
- [0331] **약역학**
- [0332] CD40 수용체 점유
- [0333] 2C10의 영장류 키메라 및 인간화 버전에 의한 CD40 표적 결속 및 점유를, 형광 표지된 2C10 및 표지된, 비-경쟁 항-CD40 항체를 사용한 유동 세포측정법에 의해 CD20+ B 세포 상의 2C10에 대한 이용가능한 결합 부위를 측정함으로써 측정하였다. 혈액 샘플을 대조군 원숭이 및 영장류 키메라 IgG4 또는 인간화 2C10 중 어느 하나로 처리된 원숭이로부터 다수 일에 수집하고, FACS에 의해 분석하였다. 표적 결속의 정도 (% 수용체 점유)를 평균 형광 강도 기록으로부터 직접적으로 계산하였다.
- [0334] 인간화 2C10 항체를 정맥내로 10 및 25 mg/kg의 단일 용량으로 투여하였다. B 세포 상의 표면 CD40은 제3일에 완전히 포화되었으며, 효과는 h2C10의 어느 하나의 용량을 받은 모든 원숭이에서 측정된 마지막 날 (제28일)까지 지속되었다. 인간화 2C10으로 처리한 후 28일에 원숭이로부터 수집된 혈액의 유동 세포측정법 분석으로부터의 대표적 데이터를 도 19에 제시된다.
- [0335] 이들 결과는 10 mg/kg만큼 낮은 용량으로의 h2C10의 단일 주사가 적어도 28일 동안 B 세포 상의 CD40 수용체를 완전히 포화시킬 수 있음을 입증한다.
- [0336] 약동학 및 항-약물 항체 반응
- [0337] 2C10의 CD40 수용체 점유 및 약동학에 기초한 CD40 2C10의 약역학적 효과 사이의 명백한 연관을 확립하기 위해, 2C10의 혈장 농도를 수용체 점유를 측정한 동일한 혈액 샘플로부터의 혈장에서 측정하였다. 혈장 농도 분석은 또한 2C10의 약동학적 프로파일, 가장 중요하게는 그의 반감기에 의해 측정된 바와 같은 혈장에서의 그의 지속성의 특징화를 가능하게 하였다. 이 측정은 유효 치료 농도를 유지하는데 필요할 투약의 빈도에 대한 안내를 제공한다.
- [0338] 10 또는 25 mg/kg 인간화 2C10 중 어느 하나로 처리된 원숭이에서 측정된 평균 혈청 농도를 도 20에 플롯팅한다. 이들 데이터는 동물이 연구의 전체 기간 동안 2C10에 노출되었으며, 인간화 2C10이 대략 15일 (9-20일 범위)의 원숭이에서 반감기를 가짐을 입증한다. 이 반감기는 영장류에서 치료 항체에 대해 예상되는 범위이며, 임상 조사에서 상대적으로 덜 빈번한 투약 스케줄 (예를 들어, 2주마다 1회 이하)을 뒷받침할 것이다. 완전한 데이터세트의 추가의 모델링은 h2C10의 초기 임상 연구에서 유효 항체 농도를 지속하는데 요구되는 용량 및 빈도의 강력한 추정을 가능하게 할 것이다.
- [0339] 인간화 2C10에 대한 또 다른 평가는 h2C10에 대한 항체 (ADA)의 잠재적 개발이었다. 이는 한 종으로부터의 에피토프의 생물학이 상이한 종 (예를 들어 영장류에 대한 인간화 mAb)에 투여되는 경우에 발생하여, 혈장으로부터의 약물의 급속한 청소를 초래할 수 있다. 이 연구에서, 어떤 동물도 연구 동안 측정가능한 항-2C10 역가를 나타내지 않았기 때문에, h2C10에 대한 항체가 생성된 시간 과정 프로파일로부터 증거가 없었다.
- [0340] 예비 안전성 평가
- [0341] 이 섹션에 기재된 실험은 면역계에 대한 h2C10의 잠재적 유해 결과 및 오프-타겟 효과에 대해 측정하기 위해 수행되었다. 생물학적 요법을 위해, 이들 평가는 약물에의 인간 노출 전의 안전성을 평가하고, 임상 시험에 대한 위험 경감 계획을 개발하는데 가장 중요한 것에 속한다. 원숭이에서의 면역 기능 또는 병리상태에 대한 임의의 예상되지 않거나 바람직하지 않은 결과의 부재는 바람직하게는 h2C10의 전반적 안전성 평가에 대해 검토된다. 또한, 혈소판 카운트를 포함한 혈액학적 파라미터의 변경, 및 2C10으로 처리된 원숭이에서의 혈청 화학 파라미터에 대한 통상적인 시험을 투약후 수 일에 수행하였으며, 키메라 및 인간화 2C10으로의 처리에 의해 영향을 받지 않았다. 25 mg/kg 영장류 키메라 2C10으로 2회 처리된 2마리의 동물을 처리 관련된 병리상태의 육안 및 현

미경적 증거에 대해 평가하였으며; 처리-관련된 병리학적 변화가 관찰되지 않았다. 또한, 혈전색전성 합병증을 배제하기 위해, 모든 조직을 피브린 침착에 대한 특수한 염색에 의해 검사하였다. 준임상적 응고 이상의 증거는 검출되지 않았다. 중요하게는, CD40 수용체를 완전히 점유하는데 요구되는 용량을 주목할 만하게 초과한 상대적으로 높은 용량을 연구에서 시험하였으며, 따라서, IND-가능 단계 동안 수행된 중심 독성학 연구에서 시험될 용량 수준에 접근한다. 이들 예비 안전성 평가는 h2C10에 대한 임의의 안전성 문제의 부재를 제시한다.

[0342] 이들 조합된 데이터는 관련 영장류 모델에서 h2C10이 환자를 치료하는 것으로 의도되는 모노클로날 항체에 대한 바람직한 약역학, 약동학 및 안전성 속성을 가짐을 입증하며, 여기서 CD40+ 표적 세포의 원하지 않는 활성화 또는 고갈을 유발하지 않고, 오프-타겟 독성의 증거 없는 CD40 활성화의 특이적 억제가 바람직하다.

[0343] 본 발명의 구체적인 측면을 기재하고 예시하였지만, 이러한 측면은 단지 본 발명의 예시인 것으로 간주되며, 첨부된 청구범위에 따라 해석되는 바와 같은 본 발명을 제한하는 것으로 간주되지 않아야 한다. 이 명세서에 인용된 모든 간행물 및 특허 출원은, 각각의 개별적 간행물 또는 특허 출원이 모든 목적을 위해 참조로 포함되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 지시된 것처럼, 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 상기 발명은 이해의 명확성의 목적으로 예시 및 실시예에 의해 일부 상세하게 기재되었지만, 첨부된 청구범위의 정신 또는 범위를 벗어나지 않고 그에 특정 변화 및 변형이 이루어질 수 있음이 이 발명의 교시사항의 관점에서 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 용이하게 명백할 것이다.

## 도면

## 도면1

설명: 마우스 항-CD40 클론 2C10

증쇄 (신호 펩티드 + V-영역)

ATGGAAAGGCACTGGATCTTCTCTCCTGTTGTAGTAAC TGCAAGGTGTCCAC  
TCCCAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGGGCTGACTGGCAAAACCTGGGGCCT  
 CAGTGAAGATGTCCTGTAAGGCTCTGGCTACACCTTACTAACTACTGGATGC  
 ACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAA  
 CCTAGCAATGATTATACTAAGTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTG  
 ACTGCAGACAAATCCTCCAACACAGCCTACATGCAACTGGGTAGCCTGACATCT  
 GAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGACAGGGTTCCCTACTGGGCCA  
 AGGGACTCTGGTCACTGTCTCT

단백질

MERHWIFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTNYW  
 MHWVKQRPGQGLEWIGYINPSNDYTKYNQKFKDATALTADKSSNTAYMQLGSL  
 TSEDSAVYYCARQGFPYWQGQTLTVVS

경쇄 (신호 펩티드 + V-영역)

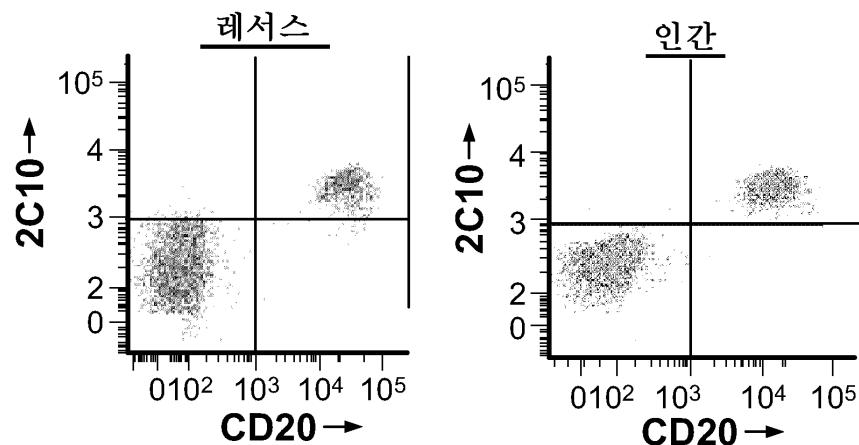
DNA

ATGGATTTCAAGTGCAGATTTCAGCTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAA  
TATCCAGAGGACAAATTGTTCTACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCC  
 AGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGC  
 ACTGGTACCACCAGAGGTCAAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTATGACACA  
 TCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGTCTGGGAC  
 CTCTTACTCTCTACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTAC  
 TGCCACCAGTTGAGTAGTGACCCATTACGTTGGCTGGGACAAAGTTGGA  
 AATAAAA

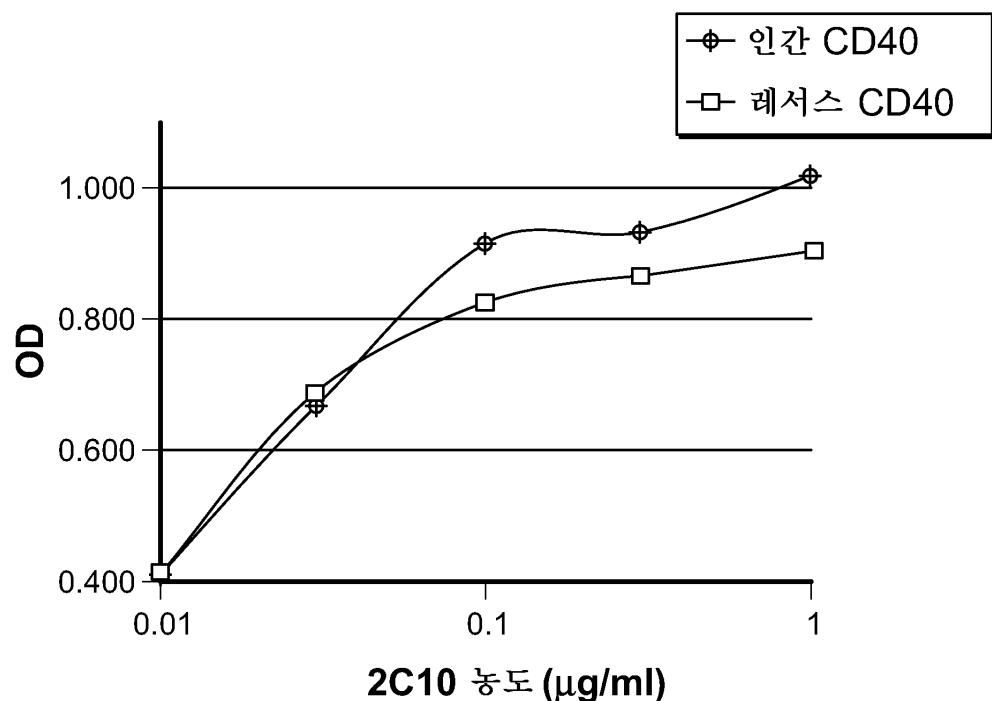
단백질

MDFQVQIFSFLLISASVIISRGQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVYMHW  
 YHQRSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQL  
 SSDPFTFGSGTKLEIK

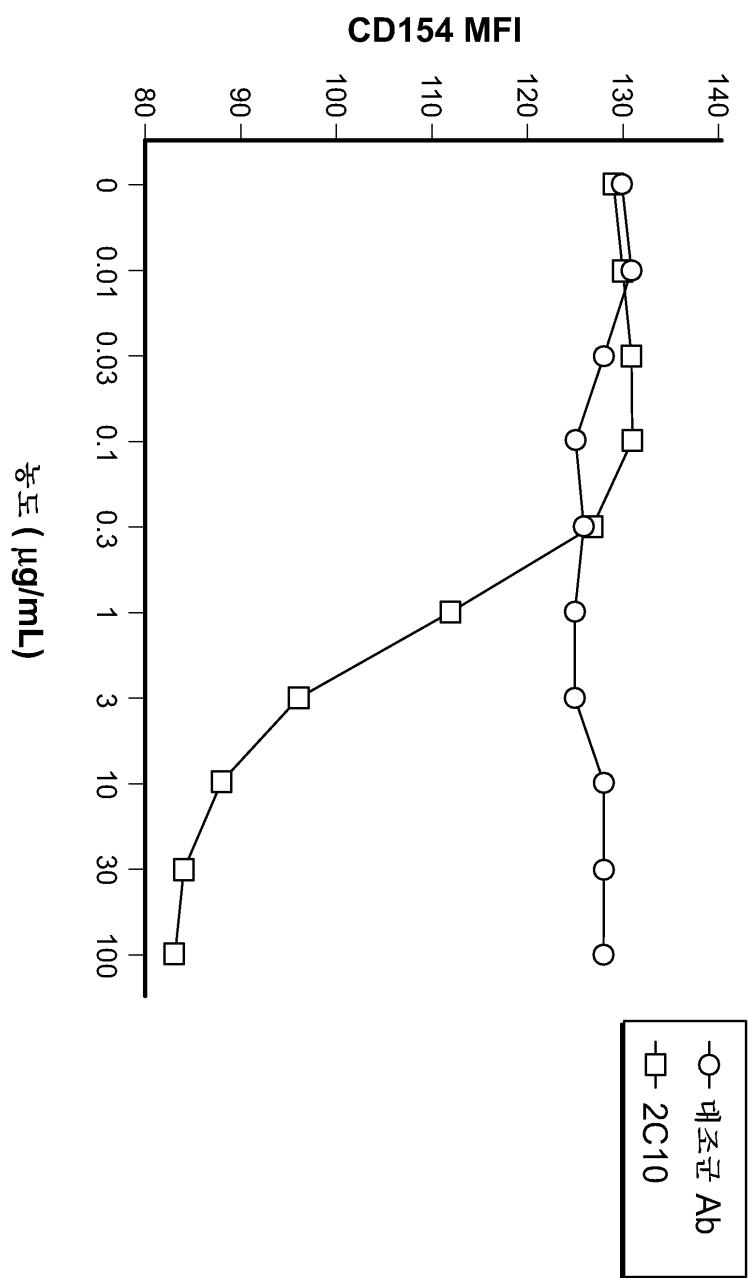
도면2a



도면2b



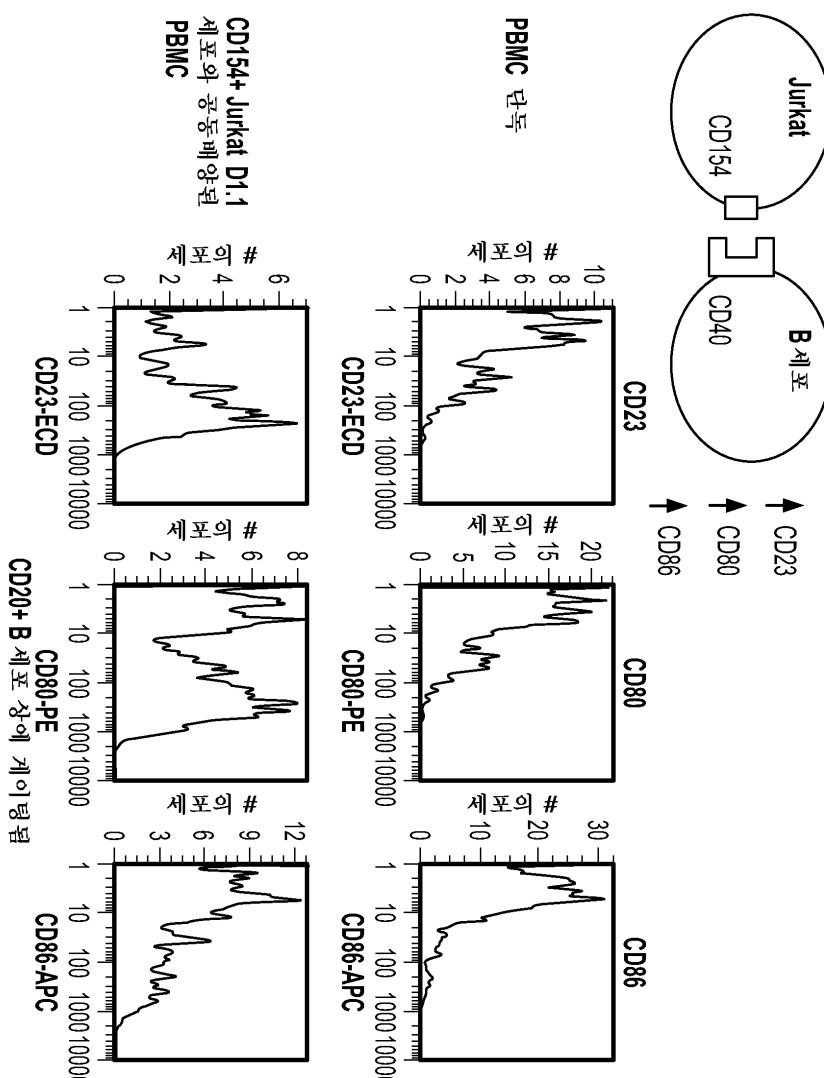
도면3



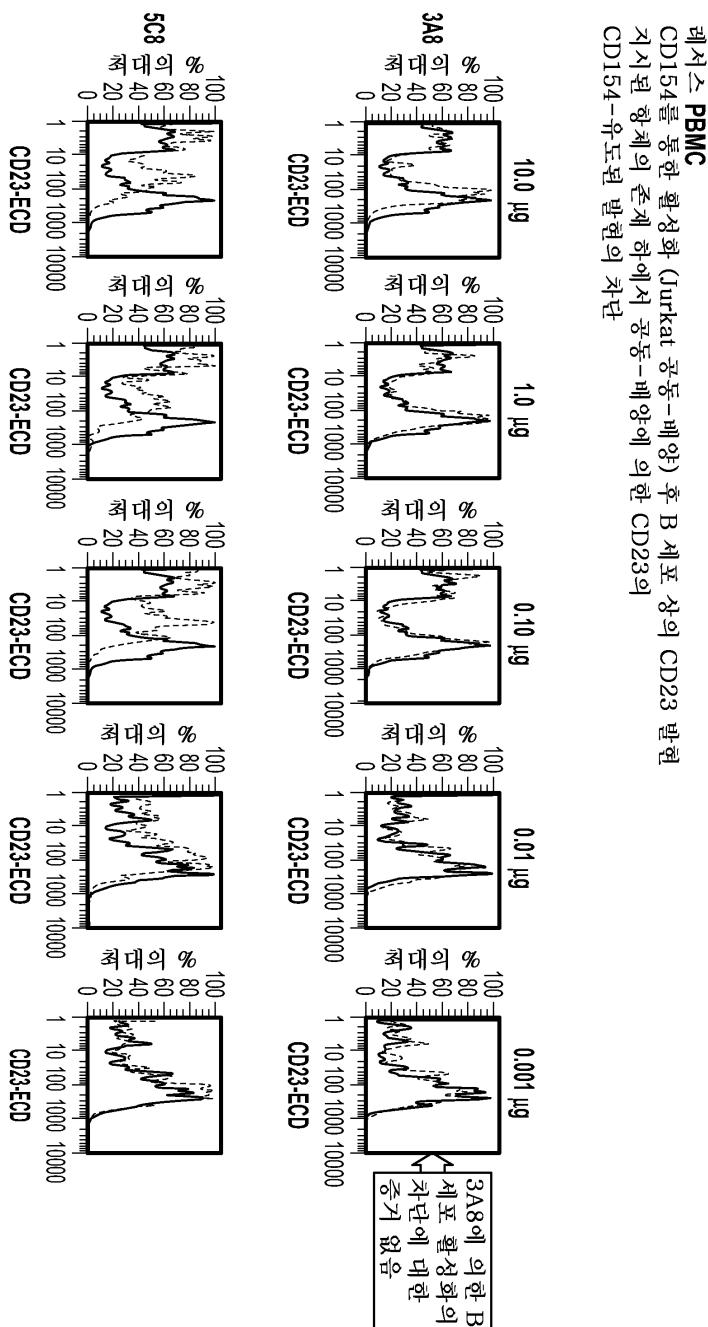
## 도면4

검정의 원리:

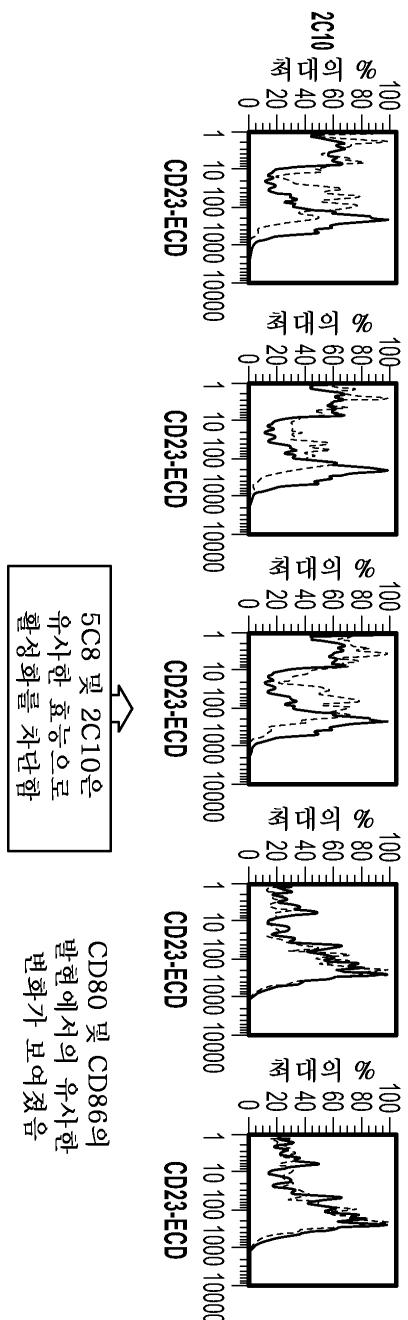
- 퀘서스 포는 인자 PBMC를 CD154+ Jurkat D1.1 세포와 공동-배양함
- CD154는 CD40을 통해 PBMC에서 B 세포를 활성화시킴
- 판독은 B 세포상의 CD23, CD80 및 CD86의 발현에서의 변화임



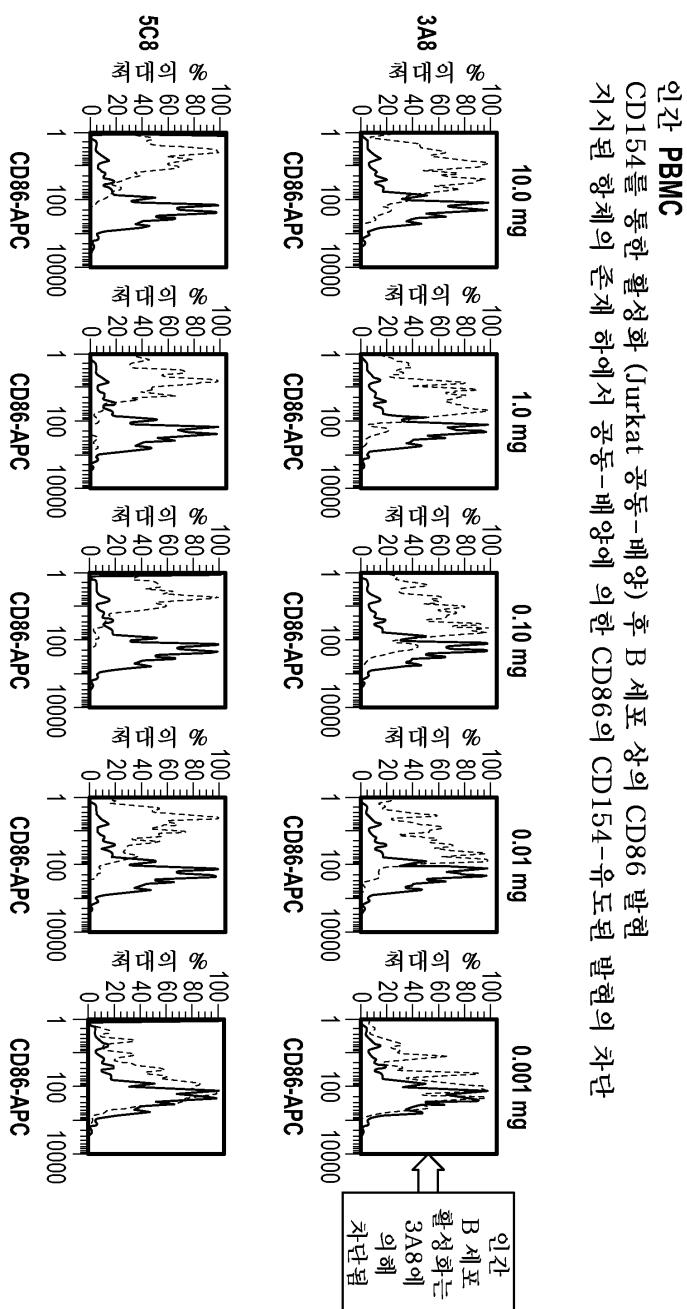
## 도면5i



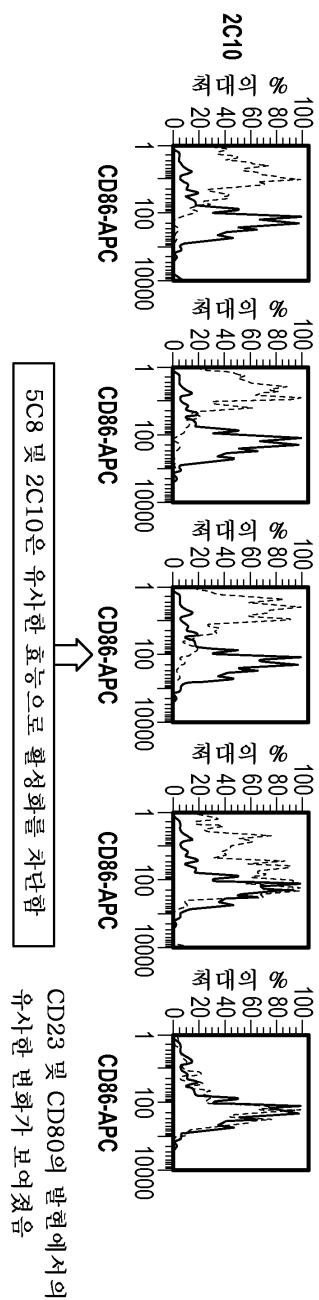
## 도면5ii



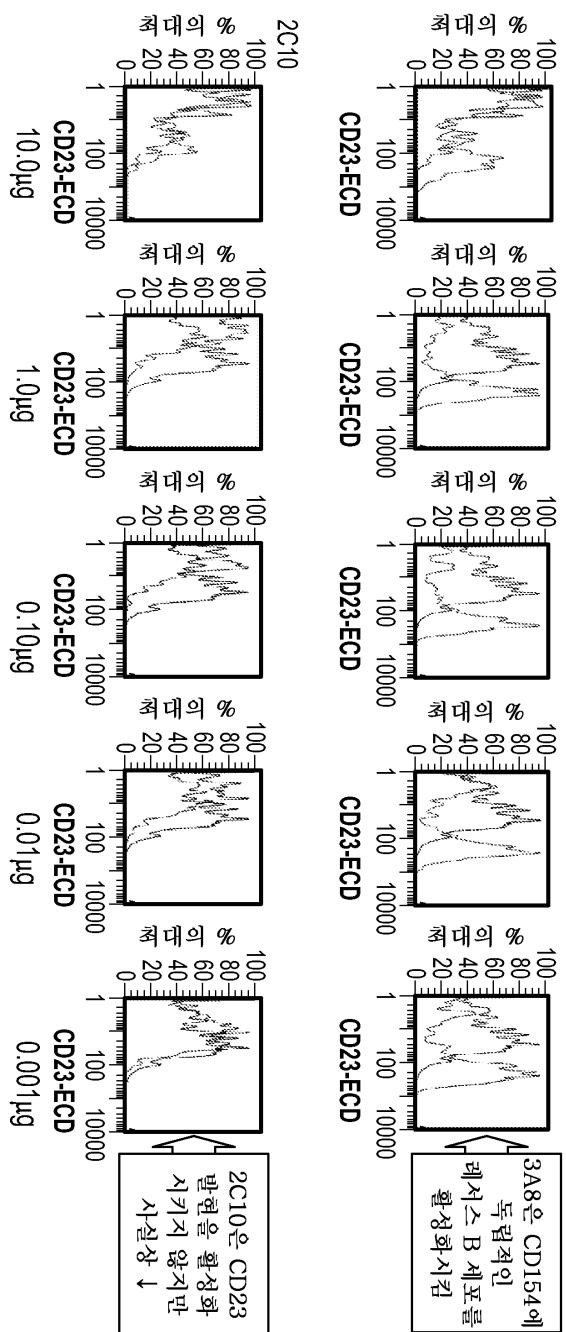
## 도면6i



도면6ii



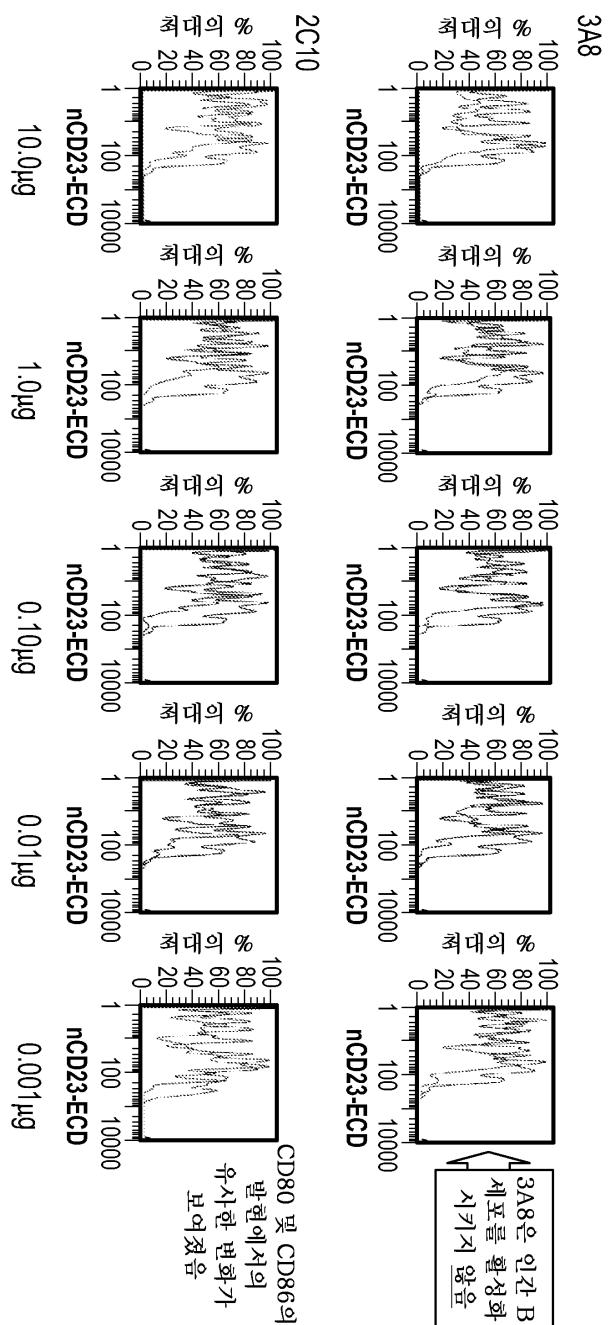
## 도면7i



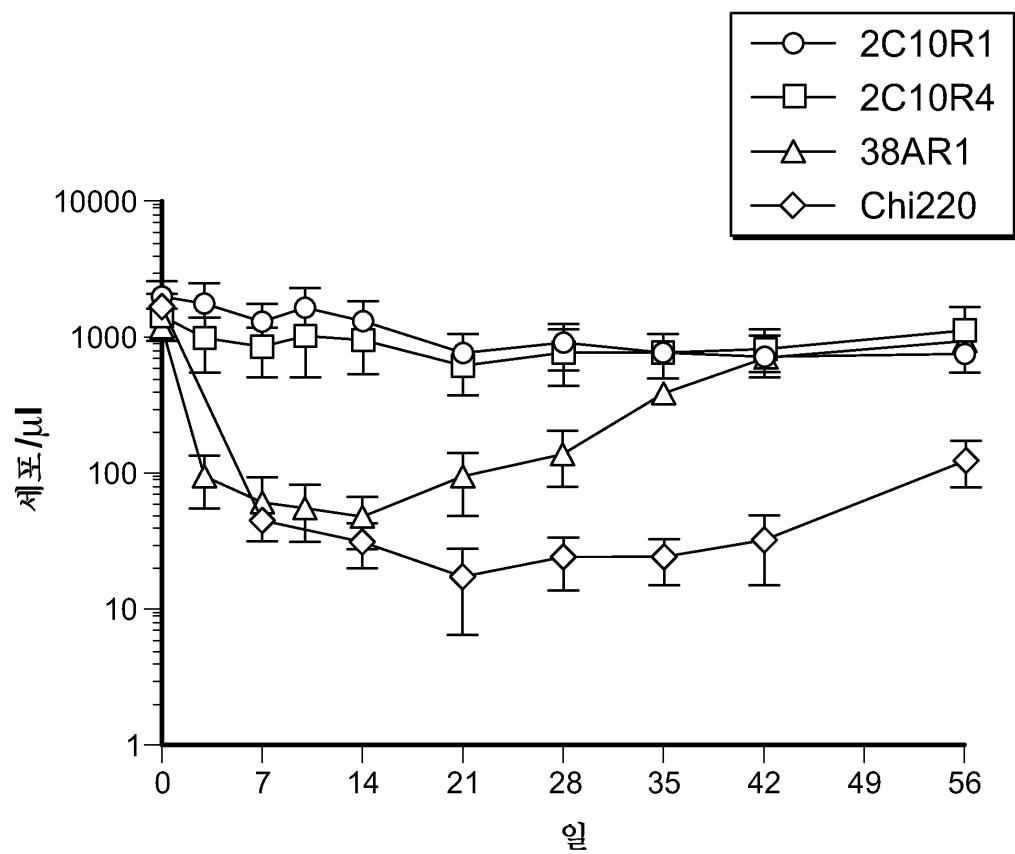
지시된 험제와 함께 인큐베이션된 B 세포 상의 CD23 발현 (Jurkat 없음)

제 3 장

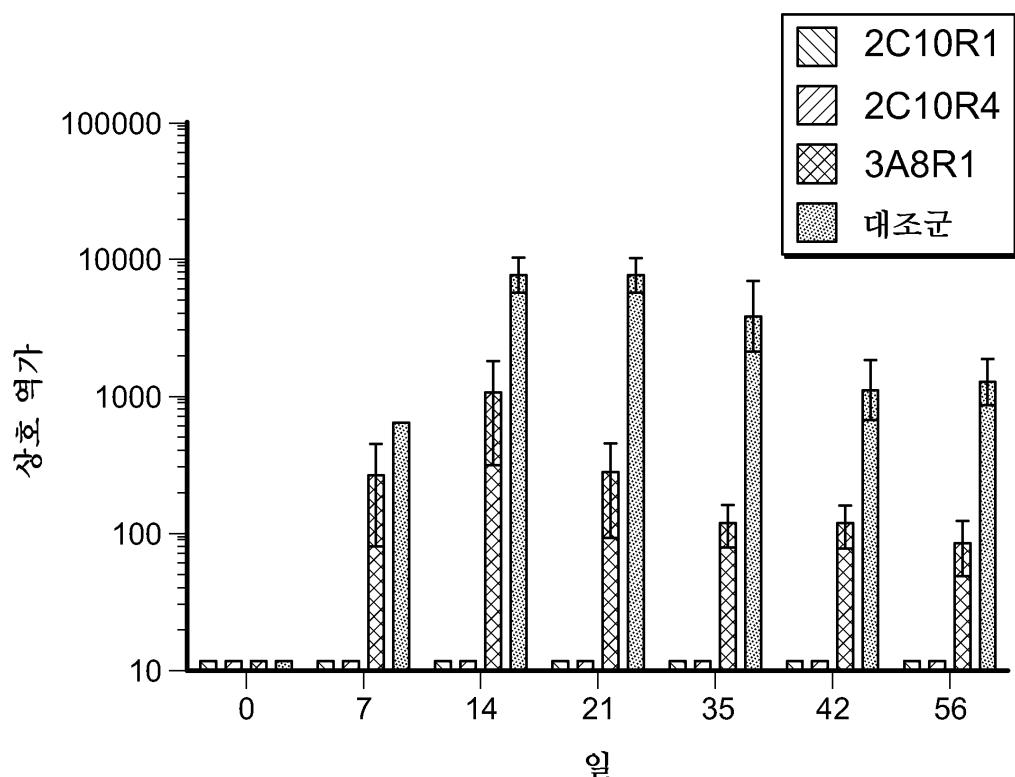
도면7ii



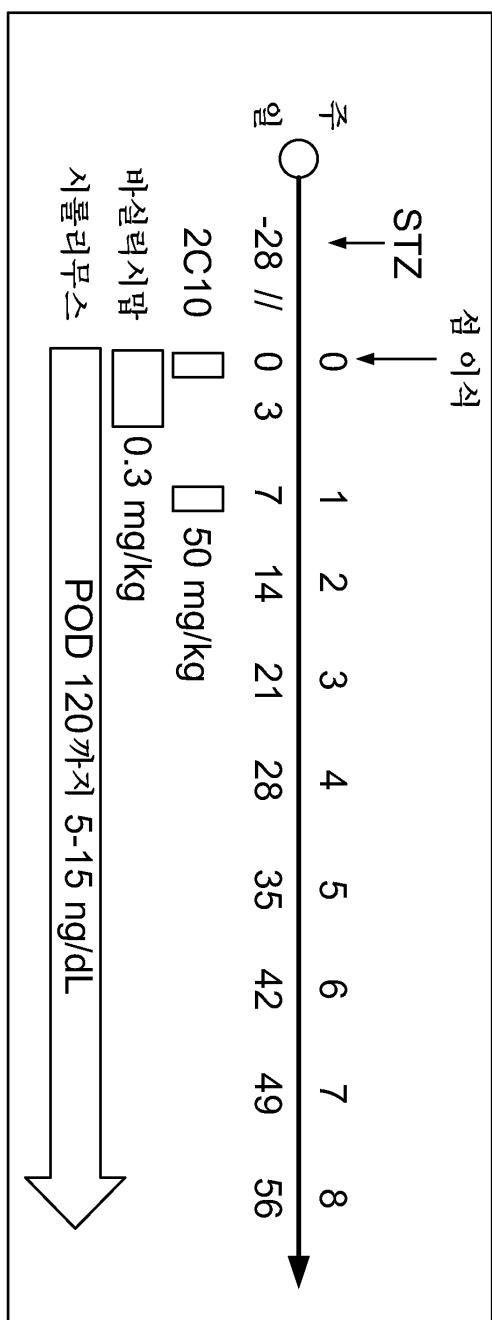
도면8



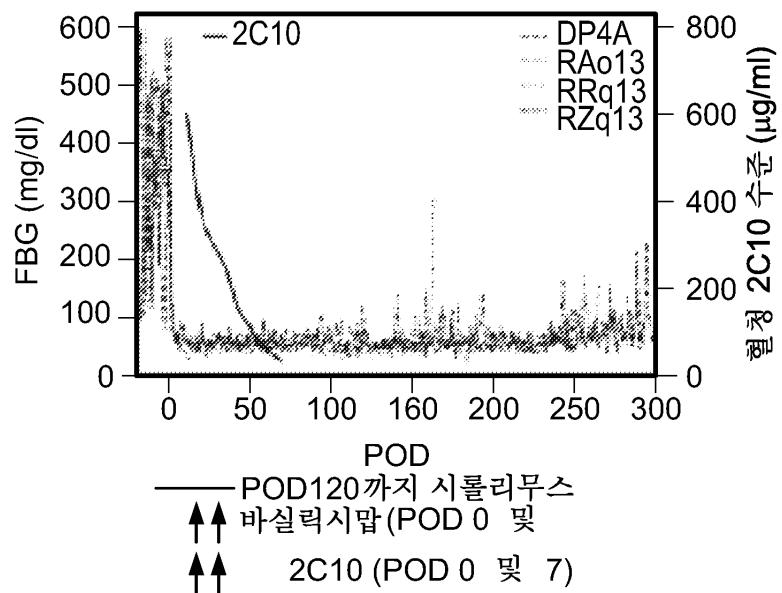
도면9



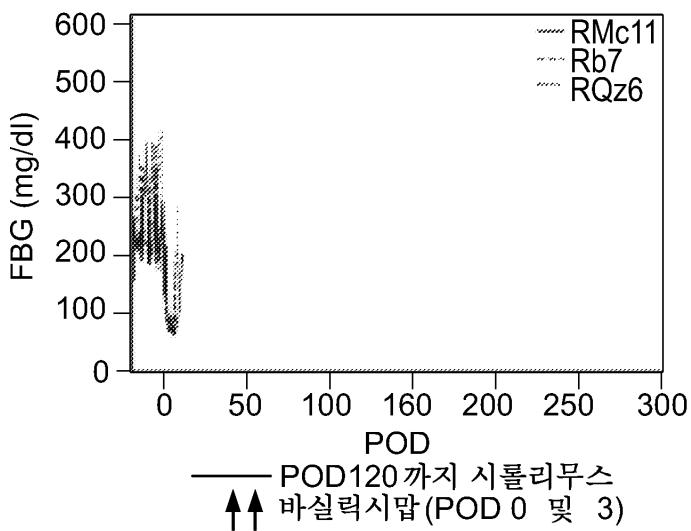
도면10



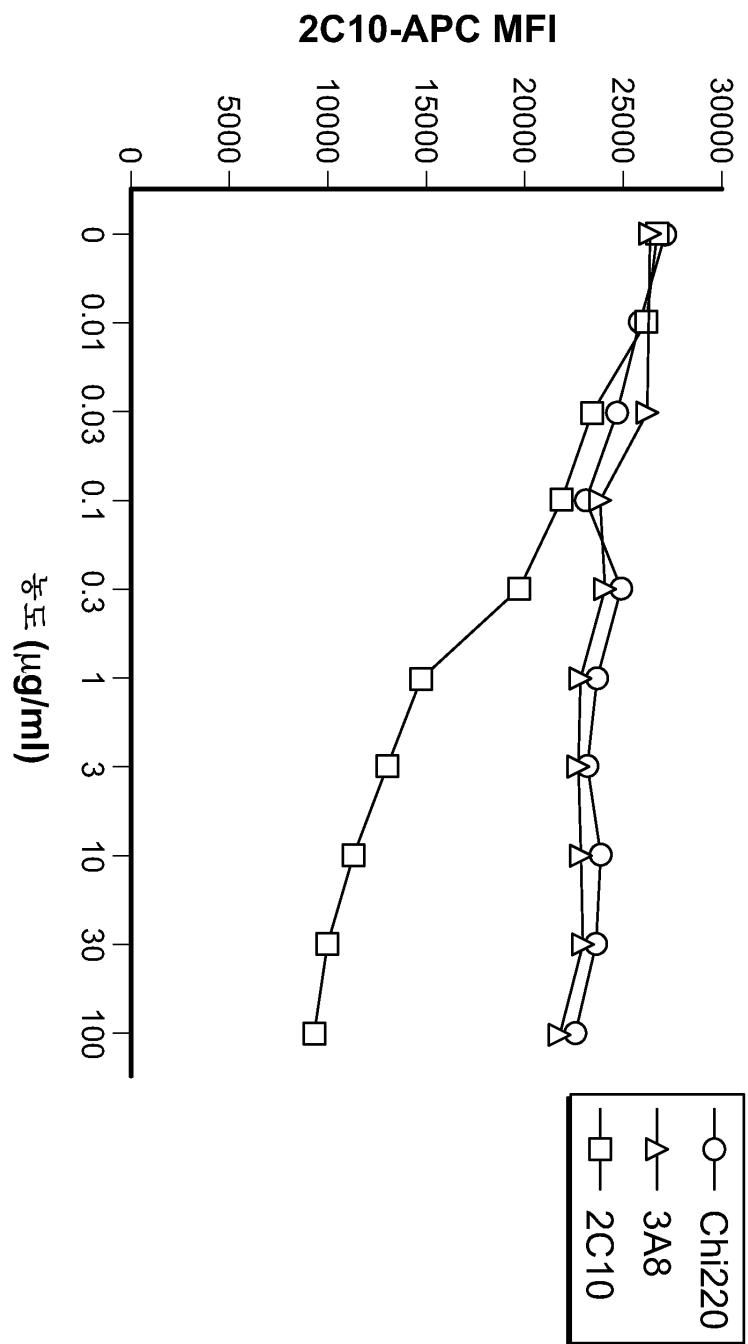
도면11a



도면11b



도면12



### 도면 13a

2C10_VH	QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASG	YTFTNYWMH	WVKQRPQGLEWIG	YINPSNDYTKYNQKFKD
VH1-3	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASG	YTFTSYAMH	WVRQRPQQRLEWMG	WINAGNGNTKYSQKFQG
2C10_h1	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASG	YTFTNYWMH	WVRQAPGQRLEWMG	YINPSNDYTKYNQKFKD
2C10_h2	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASG	YTFTNYWMH	WVRQAPGQRLEWMG	YINPSNDYTKYNQKFKD
2C10_h3	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASG	YTFTNYWMH	WVRQAPGQRLEWIG	YINPSNDYTKYNQKFKD
2C10_VH	KATLTADKSSNTAYMQLGSLTSEDAVYYCAR	QGFPY	WGQGTLTVSA	
VH-3	RTVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	-----	WGQGTLTVSS	
2C10_h1	RTVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	QGFPY	WGQGTLTVSS	
2C10_h2	RTVTITADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	QGFPY	WGQGTLTVSS	
2C10_h3	RATLTADKSANTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	QGFPY	WGQGTLTVSS	

### 도면 13b

2C10\_VL QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTC SASSSVS-YMH WYHQRSGTSPKRWIY DTSKLAS  
VWK\_11 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY DASN RAT  
2C10\_11 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC SASSSVS-YMH WYQQKPGQAPRLLIY DTSKLAS  
2C10\_12 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC SASSSVS-YMH WYQQKPGQAPRWIY DTSKLAS  
  
2C10\_VL GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC HQLSSDPFT FGSGTKLEIK  
VK3-11 GIPARFSGSGSGTDFLTISLLEAEDFAVYYC ----- FGGGTKVEIK  
2C10-11 GIPARFSGSGSGTDFLTISLLEPEDFAVYYC HQLSSDPFT FGGGTKVEIK  
2C10-12 GVPARFSGSGSGTDFLTISLLEPEDFAVYYC HQLSSDPFT FGGGTKVEIK

## 도면14

2C10HP: CDR2 R - L - K - A - ..... CDR3  
2C10HB1: CDR2 R - L - T - T - ..... CDR3  
2C10HB2: CDR2 K - I - E - T - ..... CDR3

도면15

2C10HP:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYWMHWVRQAPGQRLEWIGYIN  
PSNDYTKYNQKFDRATTADSNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQGFPYWGQGTL  
TVSS

2C10HB1:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYWMHWVRQAPGQRLEWIGYIN  
PSNDYTKYNQKFDRATTADTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQGFPYWGQGTL  
TVSS

2C10HB2:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWIGYIN  
PSNDYTKYNQKFDRKATIDESNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQGFPYWGQGTLV  
TVSS

2C10KP:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLAS  
GVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCHQLSSDPFTFGGGTKVEIK

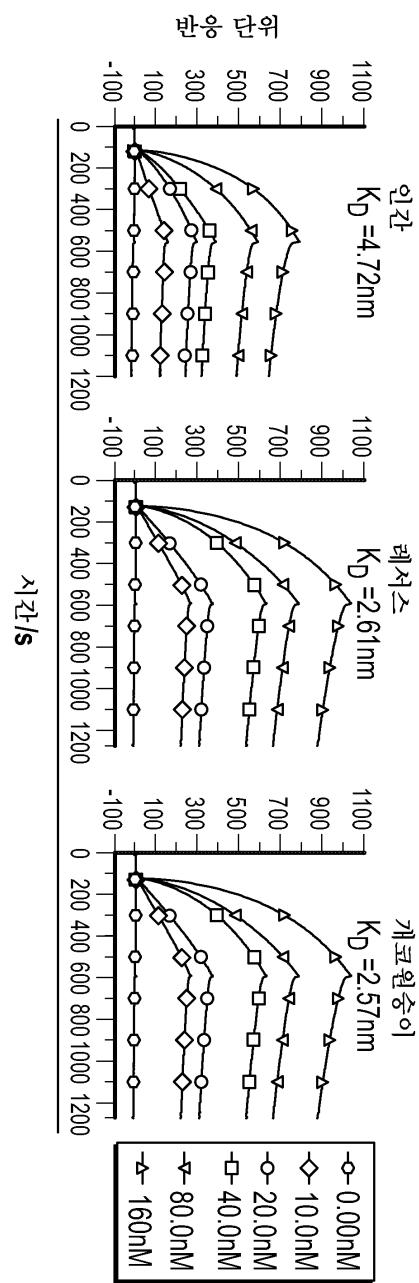
2C10KB1:

DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCSASSSVSYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLAS  
GVPARFSGSGSGTEFTLTSSLQPDFATYYCHQLSSDPFTFGQGTTKVEIK

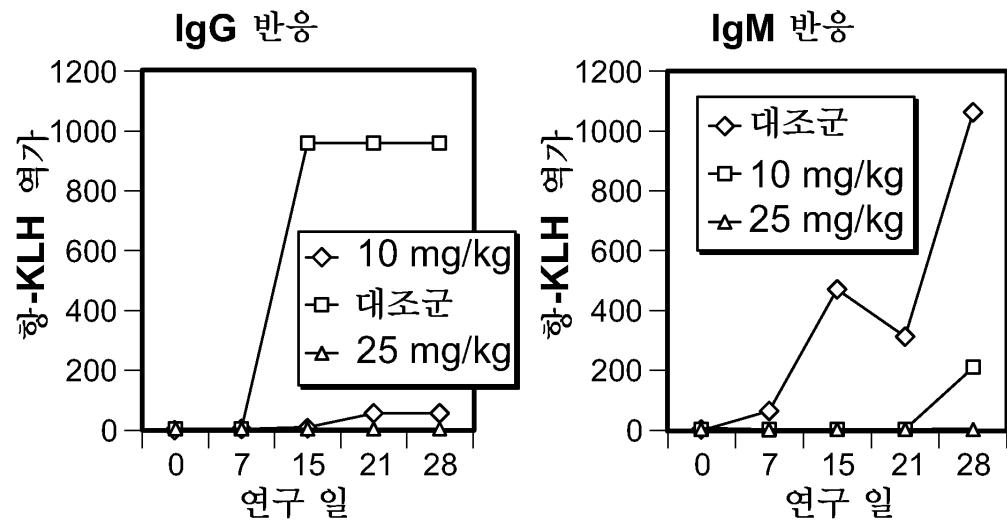
2C10KB2:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASG  
I PARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYCHQLSSDPFTFGQGTTKLEIK

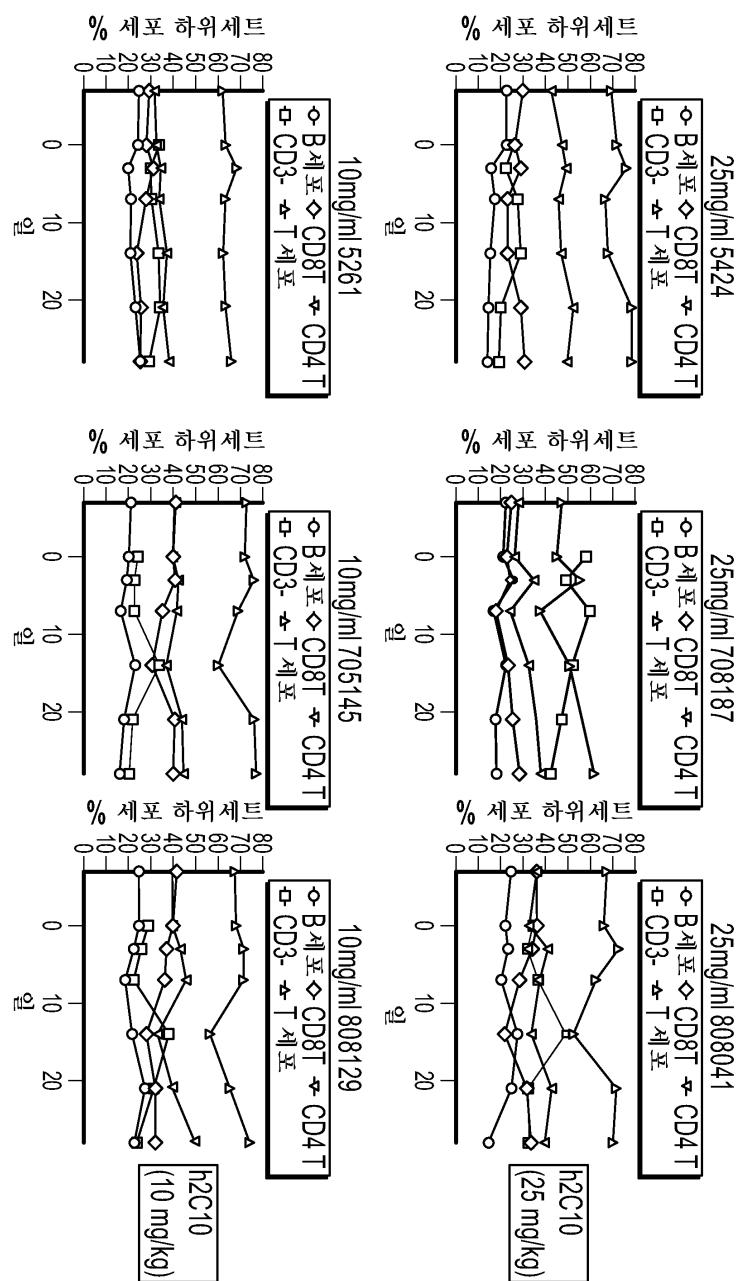
도면 16



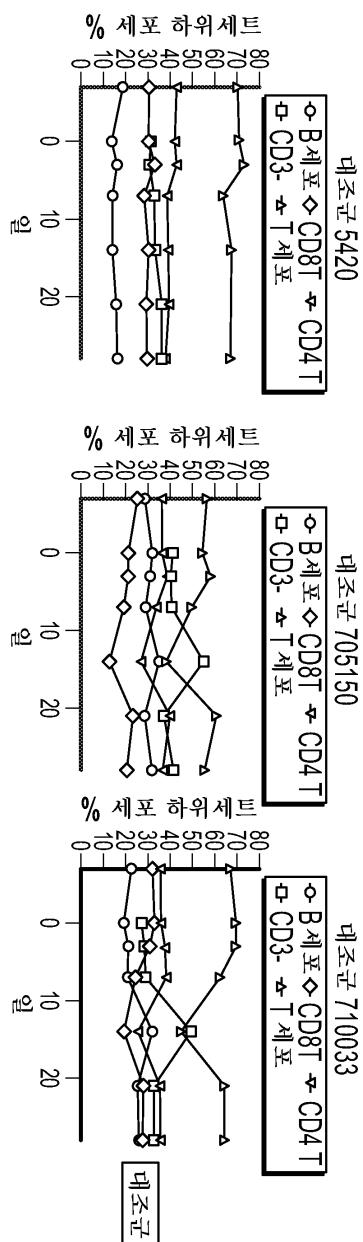
도면17



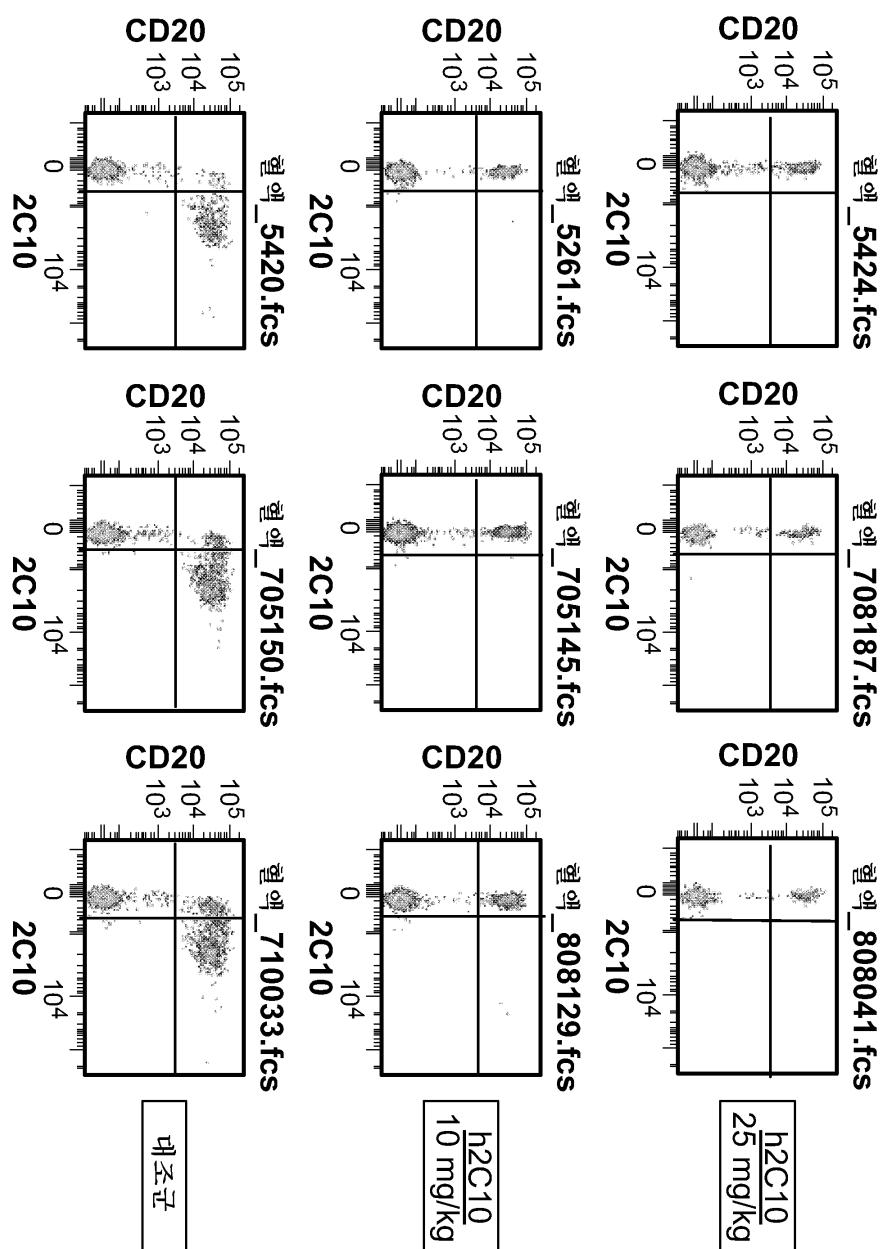
도면 18i



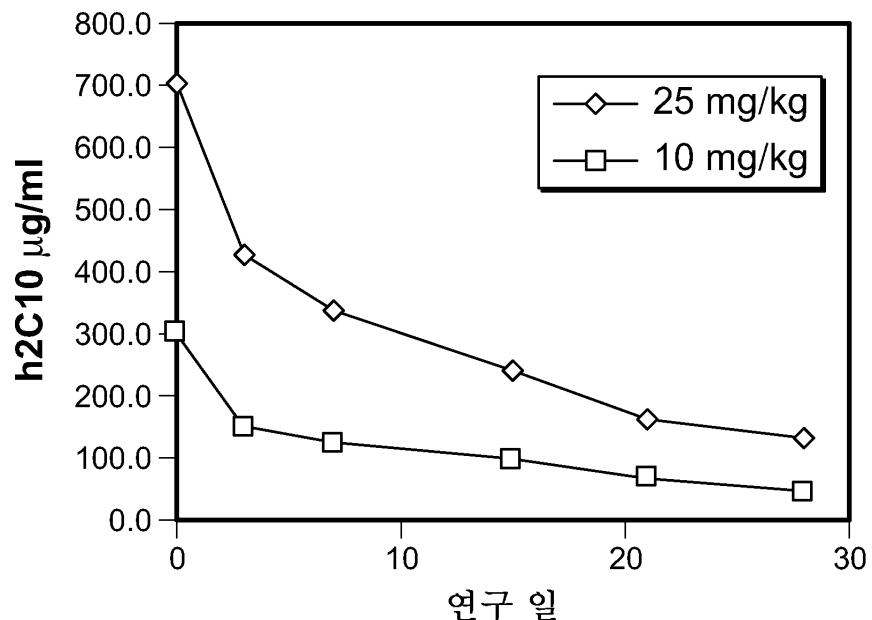
## 도면 18ii



도면19



도면20



## 도면21ai

## 종쇄 서열

1 atggactgga cctggaggat tctcttttgc gtggcagcag ccacagggtgc  
 M D W T W R I L F L V A A A T G

51 ccactccaa gtgcagcttg tccagtccgg agccgaggtg aaaaagcccg  
 A H S Q V Q L V Q S G A E V K K P

101 gtgcctcagt aaaggtctcc tgcaaggcct ctggctatac tttcaccaat  
 G A S V K V S C K A S G Y T F T N

151 tattggatgc actgggtgag gcaggctccc ggacagcgcc tcgaatggat  
 Y W M H W V R Q A P G Q R L E W

201 cggttatatac aacccatcta acgattacac caaatacaat cagaaattca  
 I G Y I N P S N D Y T K Y N Q K F

251 aggaccggc cacactgaca gctgataaaa gcgctaacac agcttacatg  
 K D R A T L T A D K S A N T A Y M

301 gaacttagct ctctgcgaag cgaggatacc gctgtatact actgcgcaag  
 E L S S L R S E D T A V Y Y C A

351 gcagggcttt ccttactggg ggcagggcac tctcgtaact gtgagtagtg  
 R Q G F P Y W G Q G T L V T V S S

401 ctagcaccaa gggcccatcg gtcttcccccc tggcgccctg ctccaggagc  
 A S T K G P S V F P L A P C S R S

451 acctccgaga gcacagccgc cctgggtgc ctggtaagg actacttccc  
 T S E S T A A L G C L V K D Y F

501 cgaaccggtg acgggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc  
 P E P V T V S W N S G A L T S G V

551 acaccttccc ggctgtcccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc  
 H T F P A V L Q S S G L Y S L S S

601 gtggtgaccg tgccctccag cagttgggc acgaagacct acacctgcaa  
 V V T V P S S S L G T K T Y T C

## 도면21ai

651 cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagtcca  
 N V D H K P S N T K V D K R V E S  
 701 aatatggtcc cccatgccca ccatgccca cacctgagtt cctgggggga  
 K Y G P P C P P C P A P E F L G G  
 751 ccatcagtct tcctgttccc cccaaaaccc aaggacactc tcatgatctc  
 P S V F L F P P K P K D T L M I  
 801 ccggacccct gaggtcacgt gcgtgggtt ggacgtgagc caggaagacc  
 S R T P E V T C V V V D V S Q E D  
 851 ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggaggt gcataatgcc  
 P E V Q F N W Y V D G V E V H N A  
 901 aagacaaagc cgccggagga gcagttcaac agcacgtacc gtgtggtcag  
 K T K P R E E Q F N S T Y R V V  
 951 cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt  
 S V L T V L H Q D W L N G K E Y K  
 1001 gcaaggtctc caacaaaggc ctccccgtcct ccatcgagaa aaccatctcc  
 C K V S N K G L P S S I E K T I S  
 1051 aaagccaaag ggcagccccc agagccacag gtgtacaccc tgccccatc  
 K A K G Q P R E P Q V Y T L P P  
 1101 ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacactgc ctggtaaaag  
 S Q E E M T K N Q V S L T C L V K  
 1151 gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg  
 G F Y P S D I A V E W E S N G Q P  
 1201 gagaacaact acaagaccac gcctccgtg ctggactccg acggctccctt  
 E N N Y K T T P P V L D S D G S  
 1251 ctccctctac agcaggctca ccgtggacaa gagcaggtgg caggagggga  
 F F L Y S R L T V D K S R W Q E G  
 1301 atgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca  
 N V F S C S V M H E A L H N H Y T  
 1351 cagaagagcc tctccctgtc tccggtaaa tga  
 Q K S L S L S P G K -

## 도면21b

## 경쇄 서열

1 atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga  
     M E A P A Q L L F L L L L W L P  
 51 taccaccgga gagattgtgc tgactcagtc accagcaaca ctgagtctct  
     D T T G E I V L T Q S P A T L S L  
 101 ctccggcga gcgtgctaca ctgtcctgtt ccgcaagcag ctcagtgtcc  
     S P G E R A T L S C S A S S S V S  
 151 tacatgcact ggtatcagca aaagcccgcc caggccccca gacgggtggat  
     Y M H W Y Q Q K P G Q A P R R W  
 201 ctatgacaca tccaagttgg cttccggcgt cccgcacgg tttcaggct  
     I Y D T S K L A S G V P A R F S G  
 251 caggaagcgg tactgattac actttgacca ttagctctct tgaacctgag  
     S G S G T D Y T L T I S S L E P E  
 301 gacttcgcag tatactactg ccaccagctg agttccgatc ctttacctt  
     D F A V Y Y C H Q L S S D P F T  
 351 tggtggtggt actaaggctg agatcaaacg tacgggtggct gcaccatctg  
     F G G G T K V E I K R T V A A P S  
 401 tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt taaaatctgg aactgcctct  
     V F I F P P S D E Q L K S G T A S  
 451 gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg  
     V V C L L N N F Y P R E A K V Q  
 501 gaagggtggat aacgcccctcc aatcgggtaa ctccaggag agtgtcacag  
     W K V D N A L Q S G N S Q E S V T  
 551 agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg  
     E Q D S K D S T Y S L S S T L T L  
 601 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgct aagtacacca  
     S K A D Y E K H K V Y A C E V T  
 651 tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt  
     H Q G L S S P V T K S F N R G E C  
 701 ag  
 -

## 서열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; PRIMATOPE THERAPEUTICS INC.

&lt;120&gt; HUMANIZED ANTI-CD40 ANTIBODIES AND USES THEREOF

&lt;130&gt; 11212/005211-W00

&lt;140&gt;&lt;141&gt;&lt;150&gt; 62/214,411

&lt;151&gt; 2015-09-04

&lt;160&gt; 35

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 396

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

construct

&lt;400&gt; 1

atggaaaggc actggatctt tctttcctg ttgtcagtaa ctgcagggtt ccactccag	60
gtccagctgc aacagtctgg ggctgaactg gcaaaacctg gggcctcagt gaagatgtcc	120

tgtaaggctt ctggctacac cttaactaact tactggatgc actggtaaa acagaggcct	180
ggacagggtc tggatggat tggatacatt aatcctagca atgattatac taagtacaat	240
caaaagttca aggacaaggc cacattgact gcagacaaat cctccaacac agcctacatg	300
caactggta gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt attgtgcaag acaggggtt	360
ccttactggg gccaagggac tctggtcaact gtctct	396

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

construct

&lt;400&gt; 2

Met Glu Arg His Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Asn Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Asn Asp Tyr Thr Lys Tyr Asn

65 70 75 80

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

85	90	95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Gly Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val		
100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
115	120	125

Val Thr Val Ser

130

<210> 3

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

construct

<400> 3

atggatttc aagtgcagat ttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataataatcc	60
agaggacaaa ttgttctcac ccagtcctca gcaatcatgt ctgcatactcc aggggagaag	120
gtcaccatga cctgcagtgc cagctcaagt gtaagttaca tgcactggta ccaccagagg	180
tcagggacct ccccaaaaag atggatttat gacacatcca aactggcttc tggagtcct	240
gctcgcttca gtggcagtgg gtctggacc tcttactctc tcacaatcag cagcatggag	300

gctgaagatg ctgccactta ttactgccac cagttgagta gtgaccatt cacgttcggc	360
tcgggacaa agttggaaat aaaa	384

<210> 4

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

construct

<400> 4

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Ile Ile Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile

20	25	30
----	----	----

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

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Leu  
 100 105 110

Ser Ser Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125

<210> 5

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 construct

<400> 5

Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln  
 1 5 10 15

Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr  
 20 25 30

Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Ser Glu Ser Glu Phe Leu  
 35 40 45

Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr Arg Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp  
 50 55 60

Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp  
 65 70 75 80

Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Leu His Cys Met Ser Glu Ser Cys  
 85 90 95  
 Glu Ser Cys Val

100

<210> 6

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

construct

<400> 6

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

1 5 10 15

Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr

20 25 30

Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu

35 40 45

Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp

50 55 60

Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp

65 70 75 80

Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys

85 90 95

Glu Ser Cys Val

100

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

construct

<400> 7

ctaacactca ttccctgttga agctcttgac 30

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
construct

<400> 8

gctgatgctg caccaactgt atcc 24

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide

<400> 9

ggcaacgttg caggctctcg 20

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
construct

<400> 10

ctggatctgc tgcccaaact aactcc 26

<210> 11

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400

> 11

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Asn Asp Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe

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

<210> 12  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.  
 <400> 12

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

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

65	70	75	80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Leu Ser Ser Asp Pro Phe Thr			
85	90	95	
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105		

<210> 13  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus sp.

&lt;400&gt; 13

Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Met His

1 5

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus sp.

&lt;400&gt; 14

Tyr Ile Asn Pro Ser Asn Asp Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus sp.

&lt;400&gt; 15

Gln Gly Phe Pro Tyr

1 5

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus sp.

&lt;400&gt; 16

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus sp.

&lt;400&gt; 17

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus sp.

&lt;400&gt; 18

His Gln Leu Ser Ser Asp Pro Phe Thr

1 5

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 114

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

&lt;400&gt; 19

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Asn Asp Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gln Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 114

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

&lt;400&gt; 20

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Asn Asp Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gln Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 114

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

&lt;400&gt; 21

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Asn Asp Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gln Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 22

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 22

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Leu Ser Ser Asp Pro Phe Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

&lt;400&gt; 23

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Leu Ser Ser Asp Pro Phe Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 114

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

&lt;400&gt; 24

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

Ser Ser

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 114

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide

&lt;400&gt; 25

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

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

100 105 110

Ser Ser

<210> 26

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

<400> 26

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Asn Asp Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gln Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 27

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

&lt;400&gt; 27

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Leu Ser Ser Asp Pro Phe Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

&lt;400&gt; 28

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp

65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Leu Ser Ser Asp Pro Phe Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys

100 105

<210> 29

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 29

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Leu Ser Ser Asp Pro Phe Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 30

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 100 105

<210> 31

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu  
 85 90 95

Ile Lys

<210> 32

&lt;211&gt; 1383

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

&lt;400&gt; 32

atggactgga cctggaggat tctttttt gtggcagcag ccacagggtgc ccactccaa	60
gtgcagctt tccagtcgg agccgaggtg aaaaagcccg gtgcctcagt aaaggctcc	120
tgcaaggcct ctggctatac tttcaccaat tattggatgc actgggtgag gcaggctccc	180

ggacagcgcc tcgaatggat cggttatatac aaccatcta acgattacac caaatacaat	240
cagaaattca aggaccggc cacactgaca gctgataaaa gcgctaacac agcttacatg	300
gaacttagct ctctgcgaag cgaggatacc gctgtatact actgcgcgaag gcaggcgtt	360
ccttactggg ggcagggcac tctcgtaact gtgagtagtg ctagcacca gggccatcg	420
gtctccccc tggcgccctg ctccaggagc acctccgaga gcacagccgc cctggcgtgc	480
ctggtaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgcctgacc	540
agcggcgtgc acacccccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc ctcagcgc	600

gtggtgaccg tgccctccag cagttggc acgaagacct acacctgcaa cgtagatcac	660
aagcccaagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagtcca aatatgtcc cccatgccca	720
ccatgccca caccctgagtt cctggggga ccatcgtct tccgttccc cccaaaaccc	780
aaggacactc tcatgatctc cggaccctt gaggtcacgt gcgtgggt ggacgtgagc	840
caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggaggt gcataatgcc	900
aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac agcactacc gtgtggtcag cgtcctcacc	960
gtcctgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggctc caacaaaggc	1020

ctcccgctt ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccc agagccacag	1080
gtgtacaccc tgccccatc ccaggaggat atgaccaaga accagggtcag cctgacccgc	1140
ctggtaaaag gttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg	1200
gagaacaact acaagaccac gcctccgtt ctggactccg acggctccctt cttccctac	1260
agcaggctca ccgtggacaa gagcagggtgg caggagggaa atgtcttctc atgctccgtg	1320
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc tccggtaaa	1380
tga	1383

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 460

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

&lt;400&gt; 33

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Asn Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Asn Asp Tyr Thr Lys Tyr Asn

65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ala Asn

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

115 120 125

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

130 135 140

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys

145 150 155 160

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

165 170 175

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

180 185 190

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

195 200 205

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn  
 210 215 220  
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro  
 225 230 235 240  
  
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 245 250 255  
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 260 265 270  
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
 275 280 285  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 290 295 300  
  
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 305 310 315 320  
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 325 330 335  
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 340 345 350  
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln  
 355 360 365  
  
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 370 375 380  
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 385 390 395 400  
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 405 410 415  
 Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu  
 420 425 430  
  
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 435 440 445  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450	455	460	
<210> 34			
<211> 702			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide			
<400> 34			
atggaagccc cagcttagct tctttcctc ctgctactct ggctccaga taccaccgga			60
gagatgtgc tgaatcgtc accagcaaca ctgagtcctc ctccggcga gcgtgctaca			120
ctgtcctgtt ccgcaaggag ctcagtgtcc tacatgcact ggtatcagca aaagccggc			
caggccccca gacgggtggat ctatgacaca tccaagttgg ctccggcgt cccgcacgg			180
tttcaggct caggaagcgg tactgattac actttgacca ttagctctc tgaacctgag			240
gacttcgcag tatactactg ccaccagctg agttccgatc ctttacctt tggtgggt			300
actaaggctg agatcaaacg tacgggtggct gcaccatctg tcttcatctt cccggcatct			360
gatgagcagt tgaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc			420
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgcctcc aatcggtaa ctcccaggag			480
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg			540
agcaaaggcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgctg aagtccatcca tcagggcctg			600
agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag			660
<210> 35			
<211> 233			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide			
<400> 35			
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro			
1	5	10	15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser			
20	25	30	
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser			

35	40	45
Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg		
50	55	60
Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg		
65	70	75
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser		
85	90	95
Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Leu Ser Ser		
100	105	110
Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr		
115	120	125
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu		
130	135	140
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro		
145	150	155
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly		
165	170	175
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr		
180	185	190
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His		
195	200	205
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val		
210	215	220
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	