



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0130138
(43) 공개일자 2024년08월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/245 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7026383
(22) 출원일자(국제) 2023년01월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년08월06일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2023/050106
(87) 국제공개번호 WO 2023/131901
국제공개일자 2023년07월13일
(30) 우선권주장
63/297,436 2022년01월07일 미국(US)

(71) 출원인
존슨 앤드 존슨 엔터프라이즈 이노베이션 인코포레이티드
미국 뉴저지주 08933 뉴 브런스윅 원 존슨 앤드 존슨 플라자
(72) 발명자
파스쿠알 가브리엘
미국 캘리포니아주 92122 샌 디에고 메리필드 로우 3210
힌디 사지트
미국 펜실베이니아주 19477 스프링 하우스 맥킨 로드 1400
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

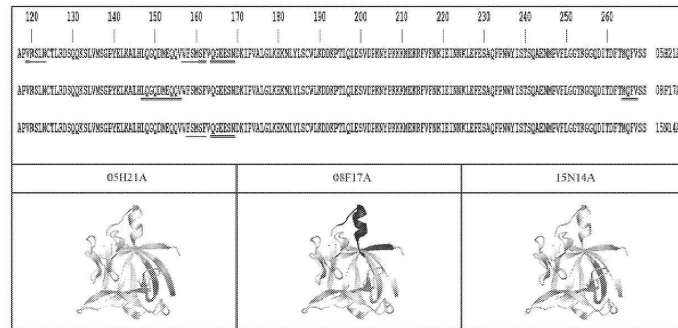
전체 청구항 수 : 총 47 항

(54) 발명의 명칭 IL-1 베타 결합 단백질의 재료 및 방법

(57) 요약

소정 태양에서 본 명세서에는, IL-1 β 에 결합하는 항체, 및 항체를 포함하는 조성물이 제공된다. 항체를 제조하고 사용하는 방법도 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

스와미나탄 슈레쉬 쿠마르

미국 펜실베이니아주 19477 스프링 하우스 맥킨 로드
1400

에드워즈 매튜 제이.

영국 런던 엔더블유1 0엔에이치 로얄 컬리지 스트
리트 2 더 런던 바이오사이언스 이노베이션 센터
내

스티븐슨 크리스토퍼 스콧

영국 런던 엔더블유1 0엔에이치 로얄 컬리지 스트
리트 2 더 런던 바이오사이언스 이노베이션 센터
내

명세서

청구범위

청구항 1

IL-1 β 에 결합하는 항체로서,

(1) (i) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는 VH의, VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3의 아미노산 서열을 각각 갖는 VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3을 포함하는 VH; 및 (ii) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 갖는 VL의, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3의 아미노산 서열을 각각 갖는 VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는 VL;

(2) (i) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 VH의, VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3의 아미노산 서열을 각각 갖는 VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3을 포함하는 VH; 및 (ii) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 갖는 VL의, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3의 아미노산 서열을 각각 갖는 VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는 VL; 또는

(3) (i) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 갖는 VH의, VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3의 아미노산 서열을 각각 갖는 VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3을 포함하는 VH; 및 (ii) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 갖는 VL의, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3의 아미노산 서열을 각각 갖는 VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는 VL을 포함하는, 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, (i) 상기 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3 아미노산 서열은 카바트(Kabat) 넘버링 시스템에 따르고/따르거나; (ii) 상기 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3 아미노산 서열은 초티아(Chothia) 넘버링 시스템에 따르고/따르거나; (iii) 상기 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3 아미노산 서열은 AbM 넘버링 시스템에 따르고/따르거나; (iv) 상기 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3 아미노산 서열은 콘택트(Contact) 넘버링 시스템에 따르고/따르거나; (v) 상기 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3 아미노산 서열은 IMGT 넘버링 시스템에 따르는, 항체.

청구항 3

IL-1 β 에 결합하는 항체로서,

(1) (i) 서열 번호 13, 서열 번호 31, 서열 번호 49, 서열 번호 67, 및 서열 번호 85로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 14, 서열 번호 32, 서열 번호 50, 서열 번호 68, 및 서열 번호 86으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 15, 서열 번호 33, 서열 번호 51, 서열 번호 69, 및 서열 번호 87로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 16, 서열 번호 34, 서열 번호 52, 서열 번호 70, 및 서열 번호 88로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 17, 서열 번호 35, 서열 번호 53, 서열 번호 71, 및 서열 번호 89로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 18, 서열 번호 36, 서열 번호 54, 서열 번호 72, 및 서열 번호 90으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

(2) (i) 서열 번호 19, 서열 번호 37, 서열 번호 55, 서열 번호 73, 및 서열 번호 91로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 20, 서열 번호 38, 서열 번호 56, 서열 번호 74, 및 서열 번호 92로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 21, 서열 번호 39, 서열 번호 57, 서열 번호 75, 및 서열 번호 93으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 22, 서열 번호 40, 서열 번호 58, 서열 번호 76, 및 서열 번호 94로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 23, 서열 번호 41, 서열 번호 59, 서열 번호 77, 및 서열 번호 95로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 24, 서열 번호 42, 서열 번호 60, 서열 번호 78, 및 서열 번호 96으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL; 또는

(3) (i) 서열 번호 25, 서열 번호 43, 서열 번호 61, 서열 번호 79, 및 서열 번호 97로부터 선택된 아미노

산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 26, 서열 번호 44, 서열 번호 62, 서열 번호 80, 및 서열 번호 98로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 27, 서열 번호 45, 서열 번호 63, 서열 번호 81, 및 서열 번호 99로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 28, 서열 번호 46, 서열 번호 64, 서열 번호 82, 및 서열 번호 100으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 29, 서열 번호 47, 서열 번호 65, 서열 번호 83, 및 서열 번호 101로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 30, 서열 번호 48, 서열 번호 66, 서열 번호 84, 및 서열 번호 102로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL을 포함하는, 항체.

청구항 4

IL-1 β 에 결합하는 항체로서,

(1) (i) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 14의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 15의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 17의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 18의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

(2) (i) 서열 번호 19의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 20의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 21의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 22의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 23의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 24의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

(3) (i) 서열 번호 25의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 26의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 27의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 28의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 29의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 30의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

(4) (i) 서열 번호 31의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 32의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 33의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 34의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 35의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 36의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

(5) (i) 서열 번호 37의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 38의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 39의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 40의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 41의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 42의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

(6) (i) 서열 번호 43의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 44의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 45의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 46의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 47의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 48의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

(7) (i) 서열 번호 49의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 50의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 51의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 52의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 53의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 54의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

(8) (i) 서열 번호 55의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 56의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 57의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 58의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 59의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 60의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

(9) (i) 서열 번호 61의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 62의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서

열 번호 63의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 64의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 65의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 66의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

(10) (i) 서열 번호 67의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 68의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 69의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 70의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 71의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 72의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

(11) (i) 서열 번호 73의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 74의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 75의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 76의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 77의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 78의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

(12) (i) 서열 번호 79의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 80의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 81의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 82의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 83의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 84의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

(13) (i) 서열 번호 85의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 86의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 87의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 88의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 89의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 90의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

(14) (i) 서열 번호 91의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 92의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 93의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 94의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 95의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 96의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL; 또는

(15) (i) 서열 번호 97의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 98의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 99의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 100의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 101의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 102의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL을 포함하는, 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 서열 번호 7, 서열 번호 8, 서열 번호 9, 서열 번호 10, 서열 번호 11, 및/또는 서열 번호 12에 제시된 바와 같은 하나 이상의 프레임워크 영역을 추가로 포함하는, 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 상기 항체는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는 VH, 및 서열 번호 8의 아미노산 서열을 갖는 VL을 포함하거나; (ii) 상기 항체는 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 VH, 및 서열 번호 10의 아미노산 서열을 갖는 VL을 포함하거나; (iii) 상기 항체는 서열 번호 11의 아미노산 서열을 갖는 VH, 및 서열 번호 12의 아미노산 서열을 갖는 VL을 포함하는, 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 인간화 항체인, 항체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 IgG 항체인, 항체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 IgG 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 항체인, 항체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 카파 경쇄를 포함하는, 항체.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 람다 경쇄를 포함하는, 항체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 돌연변이체 Fc 영역을 포함하는, 항체.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 돌연변이체 Fc 영역은 M252Y/S254T/T256E(YTE) 돌연변이를 포함하는, 항체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 단일클론 항체인, 항체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 IL-1 β 항원에 결합하는, 항체.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 IL-1 β 에피토프에 결합하는, 항체.

청구항 17

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 IL-1 β 에 특이적으로 결합하는, 항체.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3 은 IL-1 β 의 항원에 대한 결합 부위를 형성하는, 항체.

청구항 19

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3 은 IL-1 β 의 에피토프에 대한 결합 부위를 형성하는, 항체.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 다중특이성인, 항체.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 항체는 2개 이상의 항원에 결합할 수 있는, 항체.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 항체는 3개 이상의 항원에 결합할 수 있는, 항체.

청구항 23

제20항에 있어서, 상기 항체는 4개 이상의 항원에 결합할 수 있는, 항체.

청구항 24

제20항에 있어서, 상기 항체는 5개 이상의 항원에 결합할 수 있는, 항체.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체를 포함하며, 여기서 상기 항체는 제제에 유전자 융합되거나 화학적으로 접합되는, 결합 분자.

청구항 26

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체를 인코딩하는, 핵산.

청구항 27

제26항의 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 28

제27항의 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 29

제27항의 벡터 및 이를 위한 패키징을 포함하는, 키트.

청구항 30

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체 및 이를 위한 패키징을 포함하는, 키트.

청구항 31

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체 및 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 32

제31항의 약제학적 조성물을 생성하는 방법으로서, 상기 항체를 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제와 조합하여 상기 약제학적 조성물을 수득하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 33

세포에서 IL-1 β 또는 IL-1 β 매개 신호전달을 억제하는 방법으로서, 상기 세포를 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 34

세포에서 IL-6, ENA-78(CXCL5), 및/또는 G-CSF의 IL-1 β 유도 생성을 억제하는 방법으로서, 상기 세포를 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 35

세포에서 IL-6, ENA-78(CXCL5), 및/또는 G-CSF의 생성을 감소시키는 방법으로서, 상기 세포를 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 36

IL-1 β 발현 세포의 성장 또는 증식을 억제하는 방법으로서,
상기 세포를 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 37

제33항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 또는 상기 세포들은 질환 또는 장애를 갖는 대상체에

존재하는, 방법.

청구항 38

대상체에서 IL-1 β 를 억제하는 방법으로서, 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 39

대상체에서 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법으로서, 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 40

제37항 또는 제39항에 있어서, 상기 질환 또는 장애는 IL-1 β 관련 질환 또는 장애인, 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 IL-1 β 관련 질환 또는 장애는 염증성 질환 또는 장애인, 방법.

청구항 42

제40항에 있어서, 상기 IL-1 β 관련 질환 또는 장애는 암인, 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 암은 폐암인, 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 폐암은 비-소세포 폐암이며, 여기서 임의로 상기 비-소세포 폐암은 0기, 1기, 2기, 3기, 또는 4기에 도달한, 방법.

청구항 45

제42항에 있어서, 상기 암은 신장암인, 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 신장암은 신세포암(renal cell cancer)인, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 신세포암은 1기, 2기, 또는 3기에 도달한, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2022년 1월 7일자로 출원된 미국 가특허 출원 제63/297,436호의 이익을 주장하며, 그의 개시내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 본 출원과 함께 XML 파일 형식으로 제출된 컴퓨터 판독 가능 서열목록을 포함하며, 그 전체 내용이 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 출원과 함께 제출된 서열 목록 XML 파일은 파일명이 "14620-563-228_SEQ_LISTING.xml"이고, 2022년 12월 1일자로 생성되었으며, 크기가 123,349 바이트이다.

[0005] 기술분야

[0006] 본 개시내용은 항-IL-1 β 항체, 항체를 인코딩하는 핵산 및 발현 벡터, 벡터를 함유하는 재조합 세포, 및 항체

를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 항체를 제조하는 방법, 및 암을 포함하는 질환을 치료하기 위해 항체를 사용하는 방법이 또한 제공된다.

배경 기술

- [0007] IL-1 β 는 생리학적인 상태 및 병리학적인 상태 둘 모두에서 다수의 역할을 갖는 다면발현성 사이토카인이다. 암에서, IL-1 β 는 다양한 메커니즘을 통해 종양-지지 미세환경을 촉진한다. 예를 들어, IL-1 β 는 종양 발달로 이어질 수 있는 돌연변이 유발 활성 산소 종의 생성을 촉진하는 것으로 제시되었다. (문헌[Taniguchi K *et al*, Nat Rev Immunol. 2018;18(5):309-324.]) 또한, IL-1 경로는, 종양 진행의 홀마크이며 종양 침습성 및 전이에 필수적인, 모세혈관의 신생-형성으로 이어지는 2가지 주요 혈관신생 인자, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및 섬유아세포 성장 인자(FGF)의 발현을 촉진한다. (문헌[Voronov E *et al*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(5):2645-2650]; 문헌[Voronov E *et al*, Front Physiol. 2014;5:114.]) IL-1 β 는 또한 시험관 내에서 상피로부터 중간엽으로의 전이(EMT)를 촉진하며, 이는 전이 캐스케이드의 초기 단계에서 중요한 단계이다. (문헌[Li R *et al*, Sci Rep. 2020;10(1):377.]) TME 내에, IL-1 β 는 다종의 세포 유형을 동원하고 재프로그래밍할 수 있으며; 예를 들어, IL-1 β 는 대식세포 및 호중구 침윤을 촉진하고, 면역억제성 골수성 집단(예를 들어, MDSC, TAM, 및 TAN)을 이동시키고, 항-종양 T 세포 침윤 및 활성화를 약화시키는 것으로 나타났다(문헌[Bunt SK *et al*, J Immunol. 2006;176(1):284-290.])
- [0008] 추가로, 임상 데이터는 암에서 IL-1 경로의 중요한 역할에 대한 증거를 제공하였다. (문헌[Ridker PM *et al*, Lancet. 2017;390(10105):1833-1842.]) 따라서, 암 치료를 위해 IL-1 β 신호전달 경로를 중화시킬 수 있는 고-친화도 및 강력한 항-IL-1 β 항체 분자에 대한 필요성이 당업계에 존재한다.

발명의 내용

- [0009] 일 태양에서 본 명세서에는,
- [0010] (1) (i) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는 VH의, VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3의 아미노산 서열을 각각 갖는 VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3을 포함하는 VH; 및 (ii) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 갖는 VL의, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3의 아미노산 서열을 각각 갖는 VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는 VL;
- [0011] (2) (i) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 VH의, VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3의 아미노산 서열을 각각 갖는 VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3을 포함하는 VH; 및 (ii) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 갖는 VL의, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3의 아미노산 서열을 각각 갖는 VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는 VL; 또는
- [0012] (3) (i) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 갖는 VH의, VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3의 아미노산 서열을 각각 갖는 VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3을 포함하는 VH; 및 (ii) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 갖는 VL의, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3의 아미노산 서열을 각각 갖는 VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는 VL을 포함하는, IL-1 β 에 결합하는 항체가 제공된다.
- [0013] 일부 실시 형태에서, (i) VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3 아미노산 서열은 카바트(Kabat) 넘버링 시스템에 따르고/따르거나; (ii) VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3 아미노산 서열은 초티아(Chothia) 넘버링 시스템에 따르고/따르거나; (Iii) VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3 아미노산 서열은 AbM 넘버링 시스템에 따르고/따르거나; (iv) VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3 아미노산 서열은 콘택트(Contact) 넘버링 시스템에 따르고/따르거나; (v) VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3 아미노산 서열은 IMGT 넘버링 시스템에 따른다.
- [0014] 다른 태양에서 본 명세서에는,
- [0015] (1) (i) 서열 번호 13, 서열 번호 31, 서열 번호 49, 서열 번호 67, 및 서열 번호 85로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 14, 서열 번호 32, 서열 번호 50, 서열 번호 68, 및 서열 번호 86으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 15, 서열 번호 33, 서열 번호 51, 서열 번호 69, 및 서열 번호 87로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및
- [0016] (ii) 서열 번호 16, 서열 번호 34, 서열 번호 52, 서열 번호 70, 및 서열 번호 88로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 17, 서열 번호 35, 서열 번호 53, 서열 번호 71, 및 서열 번호 89로부터 선택된 아

미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 18, 서열 번호 36, 서열 번호 54, 서열 번호 72, 및 서열 번호 90으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

[0017] (2) (i) 서열 번호 19, 서열 번호 37, 서열 번호 55, 서열 번호 73, 및 서열 번호 91로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 20, 서열 번호 38, 서열 번호 56, 서열 번호 74, 및 서열 번호 92로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 21, 서열 번호 39, 서열 번호 57, 서열 번호 75, 및 서열 번호 93으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

[0018] (ii) 서열 번호 22, 서열 번호 40, 서열 번호 58, 서열 번호 76, 및 서열 번호 94로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 23, 서열 번호 41, 서열 번호 59, 서열 번호 77, 및 서열 번호 95로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 24, 서열 번호 42, 서열 번호 60, 서열 번호 78, 및 서열 번호 96으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL; 또는

[0019] (3) (i) 서열 번호 25, 서열 번호 43, 서열 번호 61, 서열 번호 79, 및 서열 번호 97로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 26, 서열 번호 44, 서열 번호 62, 서열 번호 80, 및 서열 번호 98로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 27, 서열 번호 45, 서열 번호 63, 서열 번호 81, 및 서열 번호 99로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

[0020] (ii) 서열 번호 28, 서열 번호 46, 서열 번호 64, 서열 번호 82, 및 서열 번호 100으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 29, 서열 번호 47, 서열 번호 65, 서열 번호 83, 및 서열 번호 101로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 30, 서열 번호 48, 서열 번호 66, 서열 번호 84, 및 서열 번호 102로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL을 포함하는, IL-1 β 에 결합하는 항체가 제공된다.

[0021] 다른 태양에서 본 명세서에는,

[0022] (1) (i) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 14의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 15의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

[0023] (ii) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 17의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 18의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

[0024] (2) (i) 서열 번호 19의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 20의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 21의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

[0025] (ii) 서열 번호 22의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 23의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 24의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

[0026] (3) (i) 서열 번호 25의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 26의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 27의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

[0027] (ii) 서열 번호 28의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 29의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 30의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

[0028] (4) (i) 서열 번호 31의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 32의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 33의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

[0029] (ii) 서열 번호 34의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 35의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 36의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

[0030] (5) (i) 서열 번호 37의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 38의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 39의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

[0031] (ii) 서열 번호 40의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 41의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 42의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

[0032] (6) (i) 서열 번호 43의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 44의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 45의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

[0033] (ii) 서열 번호 46의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 47의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 48의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

- [0034] (7) (i) 서열 번호 49의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 50의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 51의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및
- [0035] (ii) 서열 번호 52의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 53의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 54의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;
- [0036] (8) (i) 서열 번호 55의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 56의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 57의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및
- [0037] (ii) 서열 번호 58의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 59의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 60의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;
- [0038] (9) (i) 서열 번호 61의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 62의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 63의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및
- [0039] (ii) 서열 번호 64의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 65의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 66의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;
- [0040] (10) (i) 서열 번호 67의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 68의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 69의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및
- [0041] (ii) 서열 번호 70의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 71의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 72의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;
- [0042] (11) (i) 서열 번호 73의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 74의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 75의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및
- [0043] (ii) 서열 번호 76의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 77의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 78의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;
- [0044] (12) (i) 서열 번호 79의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 80의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 81의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및
- [0045] (ii) 서열 번호 82의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 83의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 84의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;
- [0046] (13) (i) 서열 번호 85의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 86의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 87의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및
- [0047] (ii) 서열 번호 88의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 89의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 90의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;
- [0048] (14) (i) 서열 번호 91의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 92의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 93의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및
- [0049] (ii) 서열 번호 94의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 95의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 96의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL; 또는
- [0050] (15) (i) 서열 번호 97의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 98의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 99의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및
- [0051] (ii) 서열 번호 100의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 101의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 102의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL을 포함하는, IL-1 β 에 결합하는 항체가 제공된다.
- [0052] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 서열 번호 7, 서열 번호 8, 서열 번호 9, 서열 번호 10, 서열 번호 11, 및/또는 서열 번호 12에 제시된 바와 같은 하나 이상의 프레임워크 영역을 추가로 포함한다.
- [0053] 일부 실시 형태에서, (i) 항체는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는 VH, 및 서열 번호 8의 아미노산 서열을 갖는 VL을 포함하거나; (ii) 항체는 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 VH, 및 서열 번호 10의 아미노산 서열을 갖는 VL을 포함하거나; (iii) 항체는 서열 번호 11의 아미노산 서열을 갖는 VH, 및 서열 번호 12의 아미노산

서열을 갖는 VL을 포함한다.

- [0054] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 인간화 항체이다.
- [0055] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IgG 항체이다. 일부 실시 형태에서, IgG 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 항체이다.
- [0056] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 카파 경쇄를 포함한다.
- [0057] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 람다 경쇄를 포함한다.
- [0058] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 돌연변이체 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이체 Fc 영역은 M252Y/S254T/T256E(YTE) 돌연변이를 포함한다.
- [0059] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 단일클론 항체이다.
- [0060] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1 β 항원에 결합한다.
- [0061] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1 β 에피토프에 결합한다.
- [0062] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1 β 에 특이적으로 결합한다.
- [0063] 일부 실시 형태에서, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3은 IL-1 β 의 항원에 대한 결합 부위를 형성한다.
- [0064] 일부 실시 형태에서, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3은 IL-1 β 의 에피토프에 대한 결합 부위를 형성한다.
- [0065] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 다중특이성이다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 2개 이상의 항원에 결합할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 3개 이상의 항원에 결합할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 4개 이상의 항원에 결합할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 5개 이상의 항원에 결합할 수 있다.
- [0066] 다른 태양에서 본 명세서에는, 본 명세서에 제공된 항체를 포함하는 결합 분자가 제공된다. 일부 실시 형태에서, 항체는 제제에 유전자 융합되거나 화학적으로 접합된다.
- [0067] 다른 태양에서 본 명세서에는, 본 명세서에 제공된 항체를 인코딩하는 핵산이 제공된다.
- [0068] 다른 태양에서 본 명세서에는, 본 명세서에 제공된 핵산을 포함하는 벡터가 제공된다.
- [0069] 다른 태양에서 본 명세서에는, 본 명세서에 제공된 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.
- [0070] 다른 태양에서 본 명세서에는, 본 명세서에 제공된 벡터 및 이를 위한 패키징을 포함하는 키트가 제공된다.
- [0071] 다른 태양에서 본 명세서에는, 본 명세서에 제공된 항체 및 이를 위한 패키징을 포함하는 키트가 제공된다.
- [0072] 다른 태양에서 본 명세서에는, 본 명세서에 제공된 항체, 및 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.
- [0073] 다른 태양에서 본 명세서에는, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물을 생성하는 방법으로서, 항체를 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제와 조합하여 약제학적 조성물을 수득하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0074] 다른 태양에서 본 명세서에는, 세포에서 IL-1 β 또는 IL-1 β 매개 신호전달을 억제하는 방법으로서, 세포를 본 명세서에 제공된 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0075] 다른 태양에서 본 명세서에는, 세포에서 IL-6, ENA-78(CXCL5), 및/또는 G-CSF의 IL-1 β 유도 생성을 억제하는 방법으로서, 세포를 본 명세서에 제공된 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0076] 다른 태양에서 본 명세서에는, 세포에서 IL-6, ENA-78(CXCL5), 및/또는 G-CSF의 생성을 감소시키는 방법으로서, 세포를 본 명세서에 제공된 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0077] 다른 태양에서 본 명세서에는, IL-1 β 발현 세포의 성장 또는 증식을 억제하는 방법으로서, 세포를 본 명세서에 제공된 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0078] 일부 실시 형태에서, 세포 또는 세포들은 질환 또는 장애를 갖는 대상체에 존재한다.

- [0079] 다른 태양에서 본 명세서에는, 대상체에서 IL-1 β 를 억제하는 방법으로서, 본 명세서에 제공된 항체를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0080] 다른 태양에서 본 명세서에는, 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법으로서, 본 명세서에 제공된 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0081] 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 IL-1 β 관련 질환 또는 장애이다. 일부 실시 형태에서, IL-1 β 관련 질환 또는 장애는 염증성 질환 또는 장애이다. 일부 실시 형태에서, IL-1 β 관련 질환 또는 장애는 암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 비-소세포 폐암은 0기, 1기, 2기, 3기, 또는 4기에 도달하였다. 일부 실시 형태에서, 암은 신장암이다. 일부 실시 형태에서, 신장암은 신세포암(renal cell cancer)이다. 일부 실시 형태에서, 신세포암은 1기, 2기, 또는 3기에 도달하였다.

도면의 간단한 설명

- [0082] **도 1.** 수소-중수소 교환-기반 LC-MS를 사용하는 IL-1 β 상의 선택된 항체들의 에피토프 맵핑. 상단에서, 나타낸 서열은 성숙 IL-1 β 단백질(서열 번호 110)의 서열에 상응하는 **서열 번호 109**, 잔기 117 내지 269의 단편이다. 이중 밑줄은 강한 에피토프(-2 kcal/mol 이하인 결합 시의 $\Delta \Delta G$)를 나타내고, 단일 밑줄은 약한 에피토프(-2 kcal/mol 초과이고 -1 kcal/mol 이하인 결합 시의 $\Delta \Delta G$)를 나타낸다. 하단에서, 에피토프는 IL-1 β (PDB ID 1I1B)의 X-선 결정 구조 상에 오버레이된다. 흑색은 강한 에피토프를 나타내고 회색은 약한 에피토프를 나타낸다.
- 도 2:** NF- κ B/AP-1 리포터 시스템에서 05H21A, 08F17A, 및 15N14A (모두 Fc 영역 내에 YTE 돌연변이를 가짐)의 효력. 선도 항-IL-1 β 항체 패널의 중화 활성을 HEK-Blue 리포터 세포에서 평가하였다. 선도 항-IL-1 β mAb 패널의 용량-반응 곡선 및 IC50 값을 나타낸다.
- 도 3:** 항-IL-1 β 선도 항체 패널의 억제 활성을 MRC5 인간 폐 섬유아세포에서 평가하였다. 도면은 선도 항-IL-1 β mAb 패널의 용량-반응 곡선 및 상응하는 IC50 결정을 나타낸다.
- 도 4:** 인간 폐 섬유아세포에서 05H21A, 08F17A, 및 15N14A의 효력. 선도 항-IL-1 β 항체 패널의 중화 활성을 정상 인간 폐 섬유아세포(NHLE 공여자 34325 및 35234)에서 평가하였다. 도면은 IL-6(A) 및 CXCL5(B) 방출 측정값에 기초하는 공여자 34325로부터의 용량-반응 곡선을 나타내며, 상응하는 IC50 결정이 보고된다.
- 도 5:** 인간 공여자 PBMC 샘플에서 05H21A, 08F17A, 및 15N14A의 효력. 하나의 건강한 인간 공여자 PBMC(공여자 TS235)에서 선도 항-IL-1 β 항체 패널의 중화 활성을 평가하였다. (A) 및 (B) 선도 패널의 IL-6 방출 및 계산된 IC50 값을 측정하는 용량-반응 곡선.
- 도 6:** 인간 혈액 검정에서 05H21A, 08F17A, 및 15N14A의 효력. 선도 항-IL-1 β 항체 패널의 중화 활성을 인간 전혈 샘플에서 평가하였다(시험된 공여자: CC00448, M3767, M5988, M7286, 및 M7370). MSD에 의한 IL-6, CXCL-5, 및 G-CSF 방출 측정값에 기초하여 nM 단위로 IC50 값을 플로팅한다.
- 도 7:** 사이노몰구스 마카크(cynomolgus macaque) 섬유아세포 샘플에서 05H21A, 08F17A, 및 15N14A의 효력. 선도 항-IL-1 β 항체 패널의 중화 활성을 1차 사이노몰구스 진피 및 폐 섬유아세포(각각 CDF 및 CLF)에서 평가하였다. (A) 및 (B) 각각 CDF 및 CLF에서 선도 패널의 IL-6 방출을 측정하는 용량-반응 곡선. 항-IL-1 β 항체 패널에 대해 계산된 IC50 값을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0083] 본 개시내용은 IL-1 β 에 결합하는 신규한 항체 및 이의 우수한 특성에 부분적으로 기초한다.
- [0084] **5.1. 정의**
- [0085] 본 명세서에 기재되거나 언급된 기술 및 절차는, 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3d ed. 2001)]; 문헌[Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al. eds., 2003)]; 문헌[Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic (An ed. 2009)]; 문헌[Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols (Albitar ed. 2010)]; 및 문헌[Antibody Engineering Vols 1 and 2 (Kontermann and Düb el eds., 2d ed. 2010)]에 기재된 광범위하게 이용되는 방법론과 같은, 일반적으로 당업자에 의해 잘 이해되고/되거나 관용적인 방법론을 사용하여 통상적으로 사용되는 것들을 포함한다. 본원에 달

리 정의되지 않는 한, 상세한 설명에 사용된 기술 용어 및 과학 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 본원을 해석하려는 목적으로, 하기의 용어 설명이 적용될 것이며, 적절한 경우에는 언제든지, 단수로 사용되는 용어는 또한 복수형을 포함할 것이고, 역으로도 성립할 것이다. 제시된 용어의 임의의 설명이 본원에 참고로 포함된 임의의 문헌과 상충되는 경우에는, 하기에 제시된 용어의 설명이 우선할 것이다.

[0086] 용어 "항체", "면역글로불린", 또는 "Ig"는 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용되며, 가장 넓은 의미로 사용되고, 하기 기재된 바와 같이 2개 이상의 온전한 항체, 단일 사슬 항체, 및 이들의 단편(예를 들어, 도메인 항체)으로부터 형성된, 예를 들어, 단일클론 항체(작용제, 길항제, 중화 항체, 전장 또는 온전한 단일클론 항체를 포함함), 폴리에피토프 또는 모노에피토프 특이성을 갖는 항체 조성물, 다클론 또는 1가 항체, 다가 항체, 다중 특이성 항체(예를 들어, 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이중특이성 항체)를 구체적으로 망라한다. 항체는 인간, 인간화, 키메라, 및/또는 친화도 성숙된 항체 뿐만 아니라 다른 종, 예를 들어, 마우스, 토끼, 라마 등으로부터의 항체일 수 있다. 용어 "항체"는 특이적 분자 항원에 결합할 수 있고 2개의 동일한 폴리펩티드 사슬의 쌍으로 구성된 폴리펩티드의 면역글로불린 부류 내의 B 세포의 폴리펩티드 생성물을 포함하도록 의도되며, 여기서 각각의 쌍은 하나의 중쇄(약 50 내지 70 kDa) 및 하나의 경쇄(약 25 kDa)를 갖고, 각각의 사슬의 각각의 아미노-말단 부분은 약 100 내지 약 130개 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함하며, 각각의 사슬의 각각의 카르복시-말단 부분은 불변 영역을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Antibody Engineering (Borrebaeck, ed., 2d ed. 1995)]; 및 문헌[Kuby, Immunology (3d ed. 1997)]을 참조한다. 항체는 또한 합성 항체, 재조합적으로 생성된 항체, 낙타과 종(예를 들어, 라마 또는 알파카)으로부터의 것 또는 이들의 인간화 변이체를 포함하는 항체, 인트라바디, 항-이디오타입(항-Id) 항체, 및 상기 중 임의의 것의 기능성 단편(예를 들어, 항원 결합 단편)(이는 그 단편이 유래된 항체의 결합 활성의 일부 또는 전부를 유지하는 항체 중쇄 또는 경쇄 폴리펩티드의 일부를 지칭함)을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 기능성 단편(예를 들어, 항원-결합 단편)의 비제한적인 예는 단일-사슬 Fv(scFv)(예를 들어, 단일특이성, 이중특이성 등을 포함함), Fab 단편, F(ab') 단편, F(ab)₂ 단편, F(ab')₂ 단편, 다이설파이드-연결된 Fv(dsFv), Fd 단편, Fv 단편, 다이아바디, 트라이아바디, 테트라바디, 및 미니바디를 포함한다. 특히, 본원에 제공된 항체는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적으로 활성인 부분, 예를 들어, 항원에 결합하는 항원-결합 부위를 함유하는 항원-결합 도메인 또는 분자(예를 들어, 항체의 하나 이상의 CDR)를 포함한다. 그러한 항체 단편은, 예를 들어, 문헌[Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1989)]; 문헌[Mol. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers ed., 1995)]; 문헌[Huston *et al.*, 1993, Cell Biophysics 22:189-224]; 문헌[Plückthun and Skerra, 1989, Meth. Enzymol. 178:497-515]; 및 문헌[Day, Advanced Immunochimistry (2d ed. 1990)]에서 확인할 수 있다. 본원에 제공된 항체는 임의의 클래스(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, 및 IgA), 또는 임의의 하위클래스(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2)의 면역글로불린 분자일 수 있다. 항체는 작용성 항체 또는 길항성 항체일 수 있다. 항체는 작용성도 아니고 길항성도 아닐 수 있다.

[0087] "항원"은 항체가 선택적으로 결합할 수 있는 구조이다. 표적 항원은 폴리펩티드, 탄수화물, 핵산, 지질, 합텐, 또는 다른 자연 발생 또는 합성 화합물일 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 항원은 폴리펩티드이다. 특정 실시형태에서, 항원은 세포와 회합되며, 예를 들어, 세포 상에 또는 세포 내에 존재한다.

[0088] "온전한" 항체는 항원-결합 부위뿐만 아니라 CL 및 적어도 중쇄 불변 영역, CH1, CH2, 및 CH3을 포함하는 것이다. 불변 영역은 인간 불변 영역 또는 이의 아미노산 서열 변이체를 포함할 수 있다. 소정 실시 형태에서, 온전한 항체는 하나 이상의 이펙터 기능을 갖는다.

[0089] 용어 "결합한다" 또는 "결합하는"은, 예를 들어 복합체를 형성하는 것을 포함한 분자들 사이의 상호작용을 지칭한다. 상호작용은, 예를 들어 비공유 상호작용일 수 있으며, 이에겐 수소 결합, 이온 결합, 소수성 상호작용, 및/또는 반데르 발스 상호작용이 포함된다. 복합체는 또한 공유 또는 비공유 결합, 상호작용, 또는 힘에 의해 함께 유지된 2개 이상의 분자의 결합을 포함할 수 있다. 항체 상의 단일 항원-결합 부위와 표적 분자, 예컨대 항원의 단일 에피토프 사이의 총 비공유 상호작용의 강도는 그 에피토프에 대한 항체 또는 기능성 단편의 친화도이다. 1가 항원에 대한 결합 분자(예를 들어, 항체)의 해리 속도(k_{off}) 대 결합 속도(k_{on})의 비(k_{off}/k_{on})는 해리 상수 K_D 이며, 이는 친화도와 역상관된다. K_D 값이 낮을수록, 항체의 친화도는 더 높다. K_D 의 값은 항체와 항원의 상이한 복합체들에 대해 달라지며, k_{on} 및 k_{off} 둘 모두에 좌우된다. 본 명세서에 제공된 항체에 대한 해리 상수 K_D 는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 또는 당업자에게 잘 알려진 임의의 다른 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 하나의 결합 부위에서의 친화도는 항체와 항원 사이의 상호작용의 진정한 강도(true strength)를 항

상 반영하는 것은 아니다. 다수의 반복되는 항원 결정기를 함유하는 복합 항원, 예컨대 다가 항원이 다수의 결합 부위를 함유하는 항체와 접촉되는 경우, 하나의 부위에서의 항원과 항체의 상호작용은 제2 부위에서의 반응의 확률을 증가시킬 것이다. 다가 항체와 항원 사이의 그러한 다수의 상호작용의 강도를 결합력이라 칭한다.

[0090] 본 명세서에 기재된 결합 분자와 관련하여, "~에 결합하다", "~에 특이적으로 결합하는"과 같은 용어, 및 유사한 용어는 또한 본 명세서에서 상호교환 가능하게 사용되며, 항원에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인의 결합 분자, 예컨대 폴리펩티드를 지칭한다. 항원에 결합하거나 특이적으로 결합하는 결합 분자 또는 항원-결합 도메인은, 예를 들어 면역검정, Octet[®], Biacore[®], 또는 당업자에게 알려진 다른 기법에 의해 확인될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 방사면역검정(RIA) 및 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA)과 같은 실험 기법을 사용하여 결정되는 바와 같이 임의의 교차-반응성 항원에 대한 것보다 더 높은 친화도로 항원에 결합하는 경우에, 결합 분자 또는 항원 결합 도메인은 항원에 결합하거나 특이적으로 결합한다. 전형적으로, 특이적이거나 선택적인 반응은 백그라운드 신호 또는 노이즈의 적어도 2배일 것이며 백그라운드의 10배 초과일 수 있다. 결합 특이성에 관한 논의에 대해서는, 예를 들어 문헌[Fundamental Immunology 332-36 (Paul, ed., 2d ed. 1989)]을 참조한다. 소정 실시 형태에서, 예를 들어 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석 또는 RIA에 의해 결정될 때, "비표적" 단백질에 대한 결합 분자 또는 항원-결합 도메인의 결합의 정도는 그의 특정 표적 항원에 대한 결합 분자 또는 항원-결합 도메인의 결합의 약 10% 미만이다. 항원에 결합하는 결합 분자 또는 항원 결합 도메인은, 예를 들어, 항원을 표적화하는 데 치료제 및/또는 진단제로서 결합 분자가 유용하도록, 충분한 친화도로 항원에 결합할 수 있는 것을 포함한다. 소정 실시 형태에서, 항원에 결합하는 결합 분자 또는 항원 결합 도메인은 1 μ M, 800 nM, 600 nM, 550 nM, 500 nM, 300 nM, 250 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0.9 nM, 0.8 nM, 0.7 nM, 0.6 nM, 0.5 nM, 0.4 nM, 0.3 nM, 0.2 nM, 또는 0.1 nM 이하의 해리 상수(K_D)를 갖는다. 특정 실시 형태에서, 결합 분자 또는 항원 결합 도메인은 상이한 종으로부터의 항원 사이에서 보존된 항원의 에피토프에 결합한다.

[0091] 특정 실시 형태에서, 결합 분자 또는 항원 결합 도메인은, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체뿐만 아니라 그러한 항체의 단편 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라"서열을 포함할 수 있는 반면에, 사슬(들)들의 나머지는, 이들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 다른 종으로부터 유래되거나 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이다(미국 특허 제4,816,567호; 및 문헌[Morrison *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-55] 참조). 키메라 서열은 인간화 서열을 포함할 수 있다.

[0092] 소정 실시 형태에서, 결합 분자 또는 항원-결합 도메인은, 천연 CDR 잔기가, 원하는 특이성, 친화도, 및 능력(capacity)을 갖는 낙타과, 마우스, 래트, 토끼, 또는 비인간 영장류와 같은 비인간 종의 상응하는 CDR(예를 들어, 공여자 항체)로부터의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린(예를 들어, 수용자 항체)로부터의 서열을 포함하는 비인간(예를 들어, 낙타과, 뮤린, 비인간 영장류) 항체의 "인간화" 형태의 부분을 포함할 수 있다. 일부 경우에는, 인간 면역글로불린 서열의 하나 이상의 FR 영역 잔기가 상응하는 비인간 잔기로 대체된다. 더욱이, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서는 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 개선하도록 이루어진다. 인간화 항체의 중쇄 또는 경쇄는 적어도 하나 이상의 가변 영역의 실질적으로 전부를 포함할 수 있으며, 여기서 CDR의 전부 또는 실질적으로 전부는 비인간 면역글로불린의 것들에 상응하고, FR의 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 면역글로불린 서열의 것들이다. 소정 실시 형태에서, 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역(Fc), 전형적으로는 인간 면역글로불린의 불변 영역의 적어도 일부분을 포함할 것이다. 추가의 세부 사항에 대해서는, 문헌[Jones *et al.*, Nature 321:522-25 (1986)]; 문헌[Riechmann *et al.*, Nature 332:323-29 (1988)]; 문헌[Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-96 (1992)]; 문헌[Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-89 (1992)]; 미국 특허 제6,800,738호; 제6,719,971호; 제6,639,055호; 제6,407,213호; 및 제6,054,297호를 참조한다.

[0093] 특정 실시 형태에서, 결합 분자 또는 항원 결합 도메인은 "완전 인간 항체" 또는 "인간 항체"의 일부를 포함할 수 있으며, 여기서 이 용어들은 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용되고 인간 가변 영역 및, 예를 들어, 인간 불변 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. 결합 분자는 항체 서열을 포함할 수 있다. 구체적인 실시 형태에서, 이들 용어는 인간 기원의 가변 영역 및 불변 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. 소정 실시 형태에서, "완전 인간" 항체는 또한, 폴리펩티드에 결합하고 인간 생식세포계열 면역글로불린 핵산 서열의 자연 발생 체세포 변이 체인 핵산 서열에 의해 인코딩되는 항체를 포함할 수 있다. 용어 "완전 인간 항체"는 카밧(Kabat) 등에 의해 기재된 바와 같은 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열에 상응하는 가변 영역 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함한다(문헌[Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S.

Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] 참조). "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체의 것에 상응하고/하거나 인간 항체를 제조하기 위한 기법 중 임의의 것을 사용하여 제조된 것에 상응하는 아미노산 서열을 보유하는 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 비인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 명확히 배제한다. 인간 항체는 파지-디스플레이 라이브러리(문헌[Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381 (1991)]; 문헌[Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581 (1991)]) 및 효모 디스플레이 라이브러리(문헌[Chao *et al.*, Nature Protocols 1: 755-68 (2006)])를 포함하는 당업계에 알려진 다양한 기법을 사용하여 생성될 수 있다. 또한, 인간 단일클론 항체의 제조를 위해, 문헌[Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 77 (1985)]; 문헌[Boerner *et al.*, J. Immunol. 147(1):86-95 (1991)]; 및 문헌[van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001)]에 기재된 방법이 이용가능하다. 인간 항체는, 항원 시험접종(antigenic challenge)에 반응하여 그러한 항체를 생성하도록 변형되었지만 그의 내인성 유전자좌가 불능화된 유전자이식 동물, 예를 들어, 마우스에 항원을 투여함으로써 제조할 수 있다(예를 들어, 문헌[Jakobovits, Curr. Opin. Biotechnol. 6(5):561-66 (1995)]; 문헌[Brüggenmann and Taussing, Curr. Opin. Biotechnol. 8(4):455-58 (1997)]; 및 XENOMOUSE™ 기법에 관한 미국 특허 제 6,075,181호 및 제6,150,584호 참조). 또한, 예를 들어, 인간 B-세포 하이브리도마 기법을 통해 생성된 인간 항체에 관한 문헌[Li *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3557-62 (2006)]을 참조한다.

[0094] 소정 실시 형태에서, 결합 분자 또는 항원 결합 도메인은 "재조합 인간 항체"의 일부를 포함할 수 있으며, 여기서 이 구문은 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나, 단리된 인간 항체, 예컨대 숙주 세포 내로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체, 재조합, 조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자이식되고/되거나 염색체이식된 동물(예를 들어, 마우스 또는 소)로부터 단리된 항체(예를 들어, 문헌[Taylor, L. D. *et al.*, Nucl. Acids Res. 20:6287-6295 (1992)] 참조) 또는 인간 면역글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열에 스플라이싱하는 것이 연관된 임의의 다른 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나, 단리된 항체를 포함한다. 그러한 재조합 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역 및 불변 영역을 가질 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] 참조). 그러나, 소정 실시 형태에서는, 그러한 재조합 인간 항체에 시험관내 돌연변이생성(또는 인간 Ig 서열에 대해 유전자도입된 동물이 사용되는 경우, 생체내(*in vivo*) 체세포 돌연변이생성)를 적용하며, 따라서 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은, 인간 생식세포계열 VH 및 VL 서열로부터 유래되고 이에 관련되지만 생체내에서 인간 항체 생식세포계열 레퍼토리 내에 천연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0095] 특정 실시 형태에서, 결합 분자 또는 항원 결합 도메인은 "단일클론 항체"의 일부를 포함할 수 있으며, 여기서 이 용어는 본 명세서에 사용되는 바와 같이 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 얻어진 항체를 지칭하고, 예를 들어, 집단을 포함하는 개별 항체는 미량으로 존재하거나 잘 알려진 변이후 변형일 수 있는 가능한 천연 발생 돌연변이, 예컨대 아미노산 이성체화 또는 탈아미드화, 메티오닌 산화 또는 아스파라긴 또는 글루타민 탈아미드화를 제외하고는 동일하며, 각각의 단일클론 항체는 전형적으로 항원 상의 단일 에피토프를 인식할 것이다. 구체적인 실시 형태에서, 본 명세서에 사용되는 바와 같이 "단일클론 항체"는 단일 하이브리도마 또는 다른 세포에 의해 생성된 항체이다. 용어 "단일클론"은 항체를 제조하기 위한 임의의 특정 방법으로 제한되지 않는다. 예를 들어, 본 개시내용에 유용한 단일클론 항체는 문헌[Kohler *et al.*, Nature 256:495 (1975)]에 의해 최초로 기재된 하이브리도마 방법론에 의해 제조될 수 있거나, 박테리아 또는 진핵 동물 또는 식물 세포에서 재조합 DNA 방법을 사용하여 제조될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조). "단일클론 항체"는 또한, 예를 들어, 문헌[Clackson *et al.*, Nature 352:624-28 (1991)] 및 문헌[Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-97 (1991)]에 기재된 기법을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 클론 세포주의 제조 및 이에 의해 발현되는 단일클론 항체의 제조를 위한 다른 방법이 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.* eds., 5th ed. 2002)]을 참조한다.

[0096] 전형적인 4-사슬 항체 단위는 2개의 동일한 경쇄(L 사슬) 및 2개의 동일한 중쇄(H 사슬)로 구성된 이종사량체성(heterotetrameric) 당단백질이다. IgG의 경우에, 4-사슬 단위는 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각각의 L 사슬은 하나의 공유적 이황화물 결합에 의해 H 사슬에 연결되는 반면에, 2개의 H 사슬은 H 사슬 동종형에 따라 하나 이상의 이황화물 결합에 의해 서로 연결된다. 각각의 H 사슬 및 L 사슬은 또한 규칙적으로 이격된 사슬내 이황화물 가교를 갖는다. 각각의 H 사슬은 N-말단에 가변 도메인(VH)에 이어서 α 및 γ 사슬 각각에 대한 3개의 불변 도메인(CH) 및 μ 및 ε 동종형에 대한 4개의 CH 도메인을 갖는다. 각각의 L 사슬은 N-말단에 가변 도

메인(VL)에 이어서 불변 도메인(CL)을 그의 다른 단부에 갖는다. VL은 VH와 정렬되고, CL은 중쇄(CH1)의 제1 불변 도메인과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기가 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 사이에 계면을 형성하는 것으로 여겨진다. VH와 VL이 함께 쌍을 이루는 것은 단일 항원-결합 부위를 형성한다. 상이한 부류의 항체의 구조 및 특성에 대해서는, 예를 들어, 문헌[Basic and Clinical Immunology 71 (Stites *et al.* eds., 8th ed. 1994)]; 및 문헌[Immunobiology (Janeway *et al.* eds., 5th ed. 2001)]을 참조한다.

[0097] 용어 "Fab" 또는 "Fab 영역"은 항원에 결합하는 항체 영역을 지칭한다. 통상적인 IgG는 통상적으로 2개의 Fab 영역을 포함하며, 각각은 Y형 IgG 구조의 2개의 아암 중 하나 상에 존재한다. 각각의 Fab 영역은 전형적으로 중쇄 및 경쇄 각각의 하나의 가변 영역 및 하나의 불변 영역으로 구성된다. 더 구체적으로는, Fab 영역 내의 중쇄의 가변 영역 및 불변 영역은 VH 및 CH1 영역이고, Fab 영역 내의 경쇄의 가변 영역 및 불변 영역은 VL 및 CL 영역이다. Fab 영역 내의 VH, CH1, VL, 및 CL은 본 발명에 따른 항원 결합 능력을 부여하도록 다양한 방식으로 배열될 수 있다. 예를 들어, 통상적인 IgG의 Fab 영역과 유사하게, VH 및 CH1 영역은 하나의 폴리펩티드 상에 존재할 수 있고, VL 및 CL 영역은 별도의 폴리펩티드 상에 존재할 수 있다. 대안적으로, VH, CH1, VL, 및 CL 영역은 모두 동일한 폴리펩티드 상에 존재할 수 있고, 하기 섹션에 더 상세히 기재된 바와 같이 상이한 순서로 배열될 수 있다.

[0098] 용어 "가변 영역", "가변 도메인", "V 영역", 또는 "V 도메인"은, 경쇄 또는 중쇄의 아미노-말단에 일반적으로 위치하며 길이가 중쇄에서는 약 120 내지 130개의 아미노산이고 경쇄에서는 약 100 내지 110개의 아미노산이고, 그의 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용되는, 항체의 경쇄 또는 중쇄 부분을 지칭한다. 중쇄의 가변 영역은 "VH"로 지칭될 수 있다. 경쇄의 가변 영역은 "VL"로 지칭될 수 있다. 용어 "가변"은 가변 영역의 소정 세그먼트가 항체들 사이에서 서열이 광범위하게 상이하다는 사실을 지칭한다. V 영역은 항원 결합을 매개하고 특정 항체의 그의 특정 항원에 대한 특이성을 한정한다. 그러나, 가변성은 가변 영역의 110-아미노산 스펠에 걸쳐 균일하게 분포되지 않는다. 그 대신에, V 영역은 길이가 각각 약 9 내지 12개의 아미노산인 "초가변 영역"이라고 칭하는 더 큰 가변성(예를 들어, 극단적 가변성)의 더 짧은 영역에 의해 분리된 약 15 내지 30개의 아미노산의 프레임워크 영역(FR)이라고 칭하는 덜 가변성인(예를 들어, 비교적 불변성) 구간으로 이루어진다. 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 영역은, 대체로 β -시트 입체구조를 채택하는 4개의 FR 영역을 포함하며, 이들 FR 영역은 3개의 초가변 영역에 의해 연결되며, 이들 초가변 영역은 β -시트 구조를 연결하는 루프를 형성하고, 일부 경우에는 이의 일부를 형성한다. 각각의 사슬 내의 초가변 영역은 FR에 의해 매우 근접하여 함께 유지되며, 다른 사슬로부터의 초가변 영역은 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다(예를 들어, 문헌 [Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th ed. 1991)] 참조). 불변 영역은 항체를 항원에 결합하는 데에는 직접 관여하지 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC) 및 보체-의존성 세포독성(CDC)에 있어서의 항체의 참여를 나타낸다. 가변 영역은 상이한 항체들 사이에서 서열이 광범위하게 상이하다. 구체적인 실시 형태에서, 가변 영역은 인간 가변 영역이다.

[0099] 용어 "카바트에 따른 가변 영역 잔기 넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산 위치 넘버링", 및 이의 변형은, 문헌[Kabat *et al.*, 상기 문헌]에서 항체 편집의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역에 사용되는 넘버링 시스템을 지칭한다. 이러한 넘버링 체계를 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축, 또는 이들 내로의 삽입에 상응하는 더 적거나 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 잔기 52 뒤에 단일 아미노산 삽입(카바트에 따른 잔기 52a) 및 잔기 82 뒤에 삽입된 3개의 잔기(예를 들어, 카바트에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 주어진 항체에 대해 "표준" 카바트 넘버링 서열과 해당 항체 서열의 상동성 영역에서의 정렬에 의해 결정될 수 있다. 카바트 넘버링 시스템은 일반적으로 가변 도메인 내의 잔기(대략 경쇄의 잔기 1 내지 107 및 중쇄의 잔기 1 내지 113)를 지칭하는 경우에 사용된다(예를 들어, 문헌[Kabat *et al.*, 상기 문헌]). "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 인덱스"는 일반적으로 번역글로불린 중쇄 불변 영역 내의 잔기를 지칭하는 경우에 사용된다(예를 들어, 문헌[Kabat *et al.*, 상기 문헌]에 보고된 EU 인덱스). "카바트에서와 같은 EU 인덱스"는 인간 IgG 1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다. 다른 넘버링 체계는, 예를 들어, AbM, 초티아(Chothia), 콘택트(Contact), IMGT, 및 AHon에 의해 기재되어 있다.

[0100] 항체에 관련하여 사용될 경우에, 용어 "중쇄"는 약 50 내지 70 kDa의 폴리펩티드 사슬을 지칭하며, 여기서 아미노-말단 부분은 약 120 내지 130개 또는 그 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함하고, 카르복시-말단 부분은 불변 영역을 포함한다. 불변 영역은 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열에 기초하여 알파(α), 델타(δ), 엡실론(ϵ), 감마(γ), 및 뮤(μ)로 지칭되는 5개의 별개의 유형(예를 들어, 동종형) 중 하나일 수 있다. 별개의 중쇄들은 크기가 상이하다: α , δ , 및 γ 는 대략 450개의 아미노산을 함유하는 반면에, μ 및 ϵ 는 대략

550개의 아미노산을 함유한다. 경쇄와 조합되는 경우에, 이러한 별개의 유형의 중쇄는, IgG의 4개의 하위부류, 즉, IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4를 포함하는 5개의 잘 알려진 부류(예를 들어, 동종형)의 항체, IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM을 각각 생성한다.

[0101] 항체에 관련하여 사용될 경우에, 용어 "경쇄"는 약 25 kDa의 폴리펩티드 사슬을 지칭하며, 여기서 아미노-말단 부분은 약 100 내지 약 110개 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함하고, 카르복시-말단 부분은 불변 영역을 포함한다. 경쇄의 대략적인 길이는 211 내지 217개의 아미노산이다. 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 카파(κ) 또는 람다(λ)로 지칭되는 2개의 별개의 유형이 존재한다.

[0102] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "초가변 영역", "HVR", "상보성 결정 영역", 및 "CDR"은 상호교환 가능하게 사용된다. "CDR"은 면역글로불린(Ig 또는 항체) VH β -시트 프레임워크의 비-프레임워크 영역 내의 3개의 초가변 영역(H1, H2, 또는 H3) 중 하나, 또는 항체 VL β -시트 프레임워크의 비-프레임워크 영역 내의 3개의 초가변 영역(L1, L2, 또는 L3) 중 하나를 지칭한다. VH 도메인 내의 CDR1, CDR2, 및 CDR3은 또한 각각 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3으로 지칭된다. VL 도메인 내의 CDR1, CDR2, 및 CDR3은 또한 각각 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3으로 지칭된다. 따라서, CDR은 프레임워크 영역 서열 내에 산재된 가변 영역 서열이다.

[0103] CDR 영역은 당업자에게 잘 알려져 있고, 잘 알려진 넘버링 체계에 의해 정의되어 있다. 예를 들어, 카바트 상보성 결정 영역(CDR)은 서열 가변성에 기초하며 가장 통상적으로 사용된다(예를 들어, 문헌[Kabat et al., 상기 문헌]; 문헌[Nick Deschacht et al., J Immunol 2010; 184:5696-5704] 참조). 대신에 초티아는 구조적 루프의 위치를 지칭한다(예를 들어, 문헌[Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-17 (1987)] 참조). 카바트 넘버링 체계를 사용하여 넘버링될 경우에 초티아 CDR-H1 루프의 단부는 루프의 길이에 따라 H32와 H34 사이에서 변동된다(이는 카바트 넘버링 체계가 H35A 및 H35B에 삽입을 배치하기 때문이고; 35A 및 35B 중 어느 것도 존재하지 않는 경우에, 루프는 32에서 종결되며; 35A만 존재하는 경우에, 루프는 33에서 종결되고; 35A 및 35B 둘 모두가 존재하는 경우에, 루프는 34에서 종결된다). AbM 초가변 영역은 카바트 CDR과 초티아 구조적 루프 사이의 절충을 나타내며, Oxford Molecular의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다(예를 들어, 문헌[Antibody Engineering Vol. 2 (Kontermann and Dübbel eds., 2d ed. 2010)] 참조). "콘택트" 초가변 영역은 이용가능한 복합체 결정 구조의 분석에 기초한다. 개발되고 광범위하게 채택된 다른 보편적 넘버링 시스템은 ImmunoGeneTics(IGT) Information System[®]이다(문헌[Lafranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27(1):55-77 (2003)]). IGT는 인간 및 다른 척추동물의 면역글로불린(IG), T-세포 수용체(TCR) 및 주요 조직적합성 복합체(MHC)에 특화된 통합 정보 시스템이다. 여기서, CDR은 아미노산 서열과 경쇄 또는 중쇄 내의 위치 둘 모두의 관점에서 나타난다. 면역글로불린 가변 도메인의 구조 내의 CDR의 "위치"는 종들 사이에서 보존되고 루프로 불리는 구조에 존재하기 때문에, 구조적 특징에 따라 가변 도메인 서열들을 정렬하는 넘버링 체계를 사용함으로써, CDR 및 프레임워크 잔기가 용이하게 확인된다. 이러한 정보는 하나의 종의 면역글로불린으로부터의 CDR 잔기를 전형적으로 인간 항체로부터의 수용체 프레임워크 내로 그래프팅 및 대체하는 데 사용될 수 있다. 추가의 넘버링 체계(AHon)가 Honegger 및 Plückthun(문헌[Honegger and Plückthun, J. Mol. Biol. 309: 657-70 (2001)])에 의해 개발되어 있다. 예를 들어, 카바트 넘버링 및 IGT 고유 넘버링 시스템을 포함하는 넘버링 시스템 사이의 상응성은 당업자에게 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Kabat, 상기 문헌]; 문헌[Chothia and Lesk, 상기 문헌]; 문헌[Martin, 상기 문헌]; 문헌[Lefranc et al., 상기 문헌] 참조). 이들 초가변 영역 또는 CDR 각각으로부터의 잔기는 하기 표 1에 예시되어 있다.

[0104] [표 1]

다양한 넘버링 시스템에 따른 예시적인 CDR

루프	카바트	AbM	초티아	콘택트	IMGT
CDR L1	L24--L34	L24--L34	L26--L32 또는 L24--L34	L30--L36	L27--L38
CDR L2	L50--L56	L50--L56	L50--L52 또는 L50--L56	L46--L55	L56--L65
CDR L3	L89--L97	L89--L97	L91--L96 또는 L89--L97	L89--L96	L105--L117
CDR H1	H31--H35B (카바트 넘버링)	H26--H35B	H26--H32..34	H30--H35B	H27--H38
CDR H1	H31--H35 (초티아 넘버링)	H26--H35	H26--H32	H30--H35	
CDR H2	H50--H65	H50--H58	H53--H55 또는 H52--H56	H47--H58	H56--H65
CDR H3	H95--H102	H95--H102	H96--H101 또는 H95--H102	H93--H101	H105--H117

[0105]

[0106]

주어진 CDR의 경계는 확인에 사용되는 체계(scheme)에 따라 변동될 수 있다. 따라서, 달리 명시되지 않는 한, 주어진 항체 또는 이의 영역, 예컨대 가변 영역의 용어 "CDR" 및 "상보성 결정 영역"뿐만 아니라 항체 또는 이의 영역의 개별 CDR(예를 들어, CDR-H1, CDR-H2)은 상기 본 명세서에 기재된 알려진 체계 중 임의의 것에 의해 한정된 바와 같은 상보성 결정 영역을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 일부 경우에는, IMGT, 카바트, 초티아, 또는 콘택트 방법에 의해 정의되는 바와 같은 CDR과 같은, 특정 CDR 또는 CDR들의 식별을 위한 체계가 명시된다. 다른 경우에는, CDR의 특정 아미노산 서열이 주어진다. CDR 영역은 또한 다양한 넘버링 시스템의 조합, 예를 들어 카바트와 초티아 넘버링 시스템의 조합, 또는 카바트와 IMGT 넘버링 시스템의 조합에 의해 정의될 수 있음에 유의해야 한다. 따라서, "특이적 VH에 제시된 바와 같은 CDR1"과 같은 용어는 상기 기재된 예시적인 CDR 넘버링 시스템에 의해 정의된 바와 같은 임의의 CDR1을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 가변 영역(예를 들어, VH 또는 VL)이 주어지면, 당업자는 영역 내의 CDR이 상이한 넘버링 시스템 또는 이들의 조합에 의해 정의될 수 있음을 이해할 것이다.

[0107]

초가변 영역은 다음과 같은 "연장된 초가변 영역"을 포함할 수 있다: VL 내의 24 내지 36 또는 24 내지 34(L1), 46 내지 56 또는 50 내지 56(L2) 및 89 내지 97 또는 89 내지 96(L3) 및 VH 내의 26 내지 35 또는 26 내지 35A(H1), 50 내지 65 또는 49 내지 65(H2) 및 93 내지 102, 94 내지 102, 또는 95 내지 102(H3).

[0108]

용어 "불변 영역" 또는 "불변 도메인"은, 항원에 대한 항체의 결합에 직접적으로 관여하지는 않지만 Fc 수용체와의 상호작용과 같은 다양한 이펙터 기능을 나타내는 경쇄 및 중쇄의 카르복시 말단부를 지칭한다. 이 용어는 항원-결합 부위를 함유하는 면역글로불린의 다른 부분, 즉 가변 영역에 비하여 더 보존된 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 분자의 일부분을 지칭한다. 불변 영역은 중쇄의 CH1, CH2, 및 CH3 영역 및 경쇄의 CL 영역을 함유할 수 있다.

[0109]

용어 "프레임워크" 또는 "FR"은 CDR을 플랭킹하는 가변 영역 잔기이다. FR 잔기는, 예를 들어 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 도메인 항체, 다이아바디, 선형 항체, 및 이중특이성 항체 내에 존재한다. FR 잔기는 초가변 영역 잔기 또는 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0110]

본 명세서에서, 용어 "Fc 영역"은, 예를 들어 천연 서열 Fc 영역, 재조합 Fc 영역, 및 변이체 Fc 영역을 포함한, 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 한정하는 데 사용된다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 변동될 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 종종 위치 Cys226에서의 아미노산 잔기로부터, 또는 Pro230으로부터 이의 카르복실-말단까지 신장되도록 한정된다. Fc 영역의 C-말단 라이신(EU 넘버링 체계에 따라 잔기 447)은, 예를 들어 항체의 생성 또는 정제 동안에, 또는 항체의 중쇄를 인코딩하는 핵산을 재조합적으로 조작함으로써 제거될 수 있다. 따라서, 온전한 항체의 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 항체 집단, K447 잔기가 제거되지 않은 항체 집단, 및 K447 잔기가 있거나 없는 항체의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다. "기능성 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 "이펙터 기능"을 갖는다. 예시적인 "이펙터 기능"은 C1q 결합; CDC; Fc 수용체 결합; ADCC; 식세포작용; 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체)의 하향조절 등을 포함한다. 그러한 이펙터 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 영역 또는 결합 도메인(예를 들어, 항체 가변 영역 또는 도메인)과 조

합되는 것을 필요로 하며, 당업자에게 알려진 다양한 검정을 사용하여 평가할 수 있다. "변이체 Fc 영역"은 하나 이상의 아미노산 변형(예를 들어, 치환, 부가, 또는 결실)에 의해 천연 서열 Fc 영역의 것과는 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 소정 실시 형태에서, 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 모(parent) 폴리펩티드의 Fc 영역과 대비하여 적어도 하나의 아미노산 치환, 예를 들어, 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역 내에 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환, 또는 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본 명세서의 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 적어도 약 80%의 상동성, 또는 이들과 적어도 약 90%의 상동성, 예를 들어, 이들과 적어도 약 95%의 상동성을 보유할 수 있다.

[0111] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "에피토프"는 당업계의 용어이며, 결합 분자(예를 들어, 항체)가 특이적으로 결합할 수 있는 항원의 국소화된 영역을 지칭한다. 에피토프는 선형 에피토프 또는 입체형태, 비선형, 또는 불연속 에피토프일 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 항원의 경우에, 에피토프는 폴리펩티드의 인접한 아미노산일 수 있거나("선형" 에피토프), 에피토프는 폴리펩티드의 2개 이상의 비인접 영역으로부터의 아미노산을 포함할 수 있다("입체형태", "비선형", 또는 "불연속" 에피토프). 일반적으로, 선형 에피토프는 2차, 3차, 또는 4차 구조에 의존하거나 의존하지 않을 수 있음을 당업자는 인정할 것이다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, 결합 분자는 아미노산의 군이 천연 3차원 단백질 구조로 폴딩되어 있는지 여부에 무관하게 아미노산의 군에 결합한다. 다른 실시 형태에서, 에피토프를 인식하고 결합하기 위해 결합 분자는 에피토프를 이루는 아미노산 잔기가 특정 입체형태를 나타낼 것(예를 들어, 구부러지거나, 비틀리거나, 방향전환되거나, 폴딩됨)을 필요로 한다.

[0112] 펩티드, 폴리펩티드 또는 항체 서열에 대한 "퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성" 및 "상동성"은, 필요한 경우에 서열을 정렬하고 갭을 도입하여 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성한 후에, 그리고 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로 간주하지 않으면서, 특이적 펩티드 또는 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하는 목적을 위한 정렬은, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN, 또는 MEGALIGN™ (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 입수가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여, 당업계의 기술범위 내에 있는 다양한 방식으로 달성할 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 정렬 측정을 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다.

[0113] 용어 "특이성"은 항원의 특정 에피토프에 대한 항원 결합 단백질의 선택적 인식을 지칭한다. 천연 항체는, 예를 들어 단일특이성이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "다중특이성"은 항원 결합 단백질이 2개 이상의 항원-결합 부위를 가지며, 이들 중에서 2개 이상이 상이한 항원에 결합함을 나타낸다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "이중특이성"은 항원-결합 단백질이 2개의 상이한 항원-결합 특이성을 가짐을 나타낸다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "단일특이성" 항체는 하나 이상의 결합 부위를 가지며, 이들 각각은 동일한 항원에 결합하는 항원 결합 단백질을 나타낸다.

[0114] 본원에서 사용되는 용어 "가(valent)"는 항원 결합 단백질에서 특정된 수의 결합 부위의 존재를 나타낸다. 예를 들어 천연 항체, 또는 전장 항체는 2개의 결합 부위를 가지며 2가이다. 이와 같이, 용어 "3가", "4가", "5가" 및 "6가"는 항원 결합 단백질에서 2개의 결합 부위, 3개의 결합 부위, 4개의 결합 부위, 5개의 결합 부위, 및 6개의 결합 부위의 존재를 각각 의미한다.

[0115] 용어 "폴리펩티드" 및 "펩티드" 및 "단백질"은 본 명세서에서 상호교환 가능하게 사용되며, 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 지칭한다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있으며, 그것은 변형된 아미노산을 포함할 수 있고, 그것에는 비-아미노산이 개재될 수 있다. 상기 용어는 또한 천연적으로 또는 개입; 예를 들어, 이항화물 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 다른 조작 또는 변형에 의해 변형된 아미노산 중합체를 포함한다. 예를 들어, 아미노산의 하나 이상의 유사체 - 이는 비천연 아미노산을 포함하지만 이로 한정되지 않음 - 를 함유하는 폴리펩티드뿐만 아니라 당업계에 알려진 다른 변형이 정의 내에 또한 포함된다. 본 발명의 폴리펩티드는 면역글로불린 슈퍼패밀리의 항체 또는 다른 구성원에 기반할 수 있기 때문에, 소정 실시 형태에서, "폴리펩티드"는 단일체로서 또는 2개 이상의 회합된 사슬로서 발생할 수 있음이 이해된다.

[0116] 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되는 바와 같이, "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 지칭하며, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 이들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 의해, 또는 합성 반응에 의해 중합체 내로 도입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화된 뉴클레오티드 및 이들의 유사체를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "올리고

뉴클레오타이드"는 일반적으로 길이가 약 200개 미만의 뉴클레오타이드이지만 반드시 그러하지는 않은, 일반적으로 단일-가닥인 짧은 합성 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 용어 "올리고뉴클레오타이드"와 "폴리뉴클레오타이드"는 상호 배타적이지 않다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 상기 설명은 올리고뉴클레오타이드에 동일하고 완전하게 적용가능하다. 본 발명의 결합 분자를 생성하는 세포는 모 하이브리도마 세포뿐만 아니라, 항체를 인코딩하는 핵산이 도입된 박테리아 및 진핵 숙주 세포를 포함할 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 본 명세서에 개시된 임의의 단일-가닥 폴리뉴클레오타이드 서열의 좌측 단부는 5' 단부이고; 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드 서열의 좌측 방향은 5' 방향으로 지칭된다. 신생(nascent) RNA 전사체의 5' 으로부터 3' 으로의 부가의 방향은 전사 방향으로 지칭되고; RNA 전사체의 5' 단부에 대해 5'에 있는 RNA 전사체와 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥 상의 서열 영역은 "상류 서열"로 지칭되며; RNA 전사체의 3' 단부에 대해 3'에 있는 RNA 전사체와 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥 상의 서열 영역은 "하류 서열"로 지칭된다.

[0117] "단리된 핵산"은 다른 계통 DNA 서열로부터 실질적으로 분리된 핵산, 예를 들어, RNA, DNA, 또는 혼합 핵산뿐만 아니라, 천연 서열을 천연적으로 수반하는 리보솜 및 폴리머라제와 같은 단백질 또는 복합체이다. "단리된" 핵산 분자는 핵산 분자의 천연 공급원 내에 존재하는 다른 핵산 분자로부터 분리된 것이다. 더욱이, "단리된" 핵산 분자, 예컨대 cDNA 분자에는, 재조합 기법에 의해 생성될 때에는 다른 세포 물질, 또는 배양 배지가 실질적으로 없을 수 있거나, 화학적으로 합성될 때에는 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다. 구체적인 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 분자는 단리되거나 정제된다. 이 용어는 자연 발생 환경으로부터 제거된 핵산 서열을 포함하며, 재조합 또는 클로닝된 DNA 단리물 및 화학적으로 합성된 유사체 또는 이중성 시스템에 의해 생물학적으로 합성된 유사체를 포함한다. 실질적으로 순수한 분자는 단리된 형태의 분자를 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 명세서에 기재된 항체를 인코딩하는 "단리된" 핵산 분자는 그것이 생성된 환경에서 그것이 통상적으로 관련되는 하나 이상의 오염 핵산 분자로부터 식별되고 분리되는 핵산 분자이다.

[0118] 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열"은 서로의 축퇴된 버전인 그리고 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는 모든 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 단백질 또는 RNA를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열이라는 어구는 또한 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 어떤 버전에서 인트론(들)을 함유할 수 있는 정도까지 인트론을 포함할 수 있다.

[0119] 용어 "대조 서열"은 특정 숙주 유기체에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 지칭한다. 예를 들어, 원핵생물에 적합한 대조 서열은 프로모터, 선택적으로 조작자 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서를 이용하는 것으로 알려져 있다.

[0120] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "작동가능하게 연결된" 및 유사한 구문(예를 들어, 유전자 융합된)은, 핵산 또는 아미노산에 관련하여 사용될 경우에, 서로 기능적 관계로 배치된 핵산 서열 또는 아미노산 서열의 작동적 연결을 각각 지칭한다. 예를 들어, 작동가능하게 연결된 프로모터, 인핸서 요소, 개방 판독 프레임(open reading frame), 5' 및 3' UTR, 및 종결자 서열은 핵산 분자(예를 들어, RNA)의 정확한 생성을 유발한다. 일부 실시 형태에서, 작동가능하게 연결된 핵산 요소는 개방 판독 프레임의 전사, 그리고 궁극적으로는 폴리펩티드의 생성(즉, 개방 판독 프레임의 발현)을 유발한다. 다른 예로서, 작동가능하게 연결된 펩티드는 기능성 도메인들이 서로 적절한 거리를 두고 위치하여 각각의 도메인의 의도된 기능을 부여하는 것이다.

[0121] 용어 "벡터"는 핵산 서열을 숙주 세포 내로 도입하기 위해, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 결합 분자(예를 들어, 항체)를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 서열을 담지하거나 포함하기 위해 사용되는 물질을 지칭한다. 사용에 적용가능한 벡터는, 예를 들어, 발현 벡터, 플라스미드, 파지 벡터, 바이러스 벡터, 에피솜, 및 인공 염색체를 포함하며, 이들은 숙주 세포의 염색체 내로의 안정적인 통합을 위해 작동가능한 선택 서열 또는 마커를 포함할 수 있다. 또한, 벡터는 하나 이상의 선택가능한 마커 유전자 및 적절한 발현 제어 서열을 포함할 수 있다. 포함될 수 있는 선택가능한 마커 유전자는, 예를 들어, 항생제 또는 독소에 대한 저항성을 제공하거나, 영양요구성 결핍을 보충하거나, 배양 배지 내에 없는 중요한 영양소를 공급한다. 발현 제어 서열은 당업계에 잘 알려진 구성적 및 유도성 프로모터, 전사 인핸서, 전사 종결자 등을 포함할 수 있다. 2개 이상의 핵산 분자가 공발현되어야 하는 경우에(예를 들어, 항체 중쇄 및 경쇄 또는 항체 VH 및 VL 둘 모두), 예를 들어, 단일 발현 벡터 내로, 또는 별도의 발현 벡터 내에 둘 모두의 핵산 분자가 삽입될 수 있다. 단일 벡터 발현의 경우에, 인코딩 핵산은 하나의 공통 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결되거나, 상이한 발현 제어 서열, 예컨대 하나의 유도성 프로모터 및 하나의 구성적 프로모터에 연결될 수 있다. 숙주 세포 내로의 핵산 분자의 도입은 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 확인할 수 있다. 그러한 방법은, 예를 들어, mRNA의 노던 블롯 또는 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 증폭과 같은 핵산 분석, 유전자 생성물의 발현에 대한 면역블로팅, 또는 도입된 핵산 서

열의 발현 또는 그의 상응하는 유전자 생성물을 시험하기 위한 다른 적합한 분석 방법을 포함한다. 당업자는 핵산 분자가 원하는 생성물을 생성하기에 충분한 양으로 발현됨을 이해하며, 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 충분한 발현을 얻기 위해 발현 수준을 최적화할 수 있음을 추가로 이해한다.

[0122] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "숙주"는 포유류(예를 들어, 인간)와 같은 동물을 지칭한다.

[0123] 본원에서 사용되는, 용어 "숙주 세포"는 핵산 분자로 형질감염될 수 있는 특정 대상 세포 및 그러한 세포의 자손 또는 잠재적 자손을 지칭한다. 이러한 세포의 자손은 후속 세대에서 발생할 수 있는 돌연변이 또는 환경적 영향 또는 숙주 세포 게놈 내로의 핵산 분자의 통합으로 인해 핵산 분자로 형질감염된 모세포와 동일하지 않을 수 있다.

[0124] 본원에서 사용되는 용어 "형질감염된" 또는 "형질변형된" 또는 "형질도입된"은 외인성 핵산이 숙주 세포 내로 전이되거나 도입되는 과정을 지칭한다. "형질감염된" 또는 "형질변형된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염된 또는 형질변형된 또는 형질도입된 것이다. 세포는 1차 대상 세포 및 이의 자손을 포함한다.

[0125] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "약제학적으로 허용되는"은 미연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되어 있거나 미국 약전, 유럽 약전, 또는 동물에서의, 그리고 더 구체적으로는 인간에서의 사용에 대해 일반적으로 승인된 기타 약전에 열거되어 있음을 의미한다.

[0126] "부형제"는 약제학적으로 허용되는 물질, 조성물, 또는 비히클, 예컨대 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 용매, 또는 캡슐화 재료를 의미한다. 부형제는, 예를 들어, 캡슐화 재료 또는 첨가제, 예컨대 흡수 촉진제, 산화방지제, 결합제, 완충제, 담체, 코팅제, 착색제, 희석제, 봉해제, 유화제, 증량제, 충전제, 향미제, 보습제, 윤활제, 향료, 보존제, 추진제, 이형제, 살균제, 감미제, 가용화제, 습윤제, 및 이들의 혼합물을 포함한다. 용어 "부형제"는 또한 희석제, 아췌반트(예를 들어, 프로인트 아췌반트(완전 또는 불완전)), 또는 비히클을 지칭할 수 있다.

[0127] 일부 실시 형태에서, 부형제는 약제학적으로 허용되는 부형제이다. 약제학적으로 허용되는 부형제의 예는 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 산화방지제; 저분자량(예를 들어, 약 10개 미만의 아미노산 잔기) 폴리펩티드; 단백질; 친수성 중합체; 아미노산; 당류, 이당류, 및 다른 탄수화물; 킬레이팅제: 당알코올; 염-형성 반대이온; 및/또는 비이온성 계면활성제를 포함한다. 약제학적으로 허용가능한 부형제의 비제한적인 예는 문헌[Remington and Gennaro, Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed. 1990)]에 기재되어 있다.

[0128] 일 실시형태에서, 약학적 제형의 다른 성분과 상용성이고, 과도한 독성, 자극, 알레르기성 반응, 면역원성, 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직 또는 장기와 접촉되어 사용하기에 적합하며, 합리적인 이익/위험 비에 상응한다는 의미에서, 각각의 성분은 "약학적으로 허용가능"하다. 예를 들어, 문헌[Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2005; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th ed.; Rowe et al., Eds.]; 문헌[The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association: 2009; Handbook of Pharmaceutical Additives, 3rd ed.; Ash and Ash Eds.]; 문헌[Gower Publishing Company: 2007]; 문헌[Pharmaceutical Preformulation and Formulation, 2nd ed.; Gibson Ed.; CRC Press LLC: Boca Raton, FL, 2009]을 참조한다. 일부 실시형태에서, 약학적으로 허용가능한 부형제는 사용된 투여량 및 농도에서 이에 노출되는 세포 또는 포유류에 대해 비독성이다. 일부 실시형태에서, 약학적으로 허용가능한 부형제는 수성 pH 완충용액이다.

[0129] 일부 실시 형태에서, 부형제는 석유, 동물, 식물, 또는 합성 기원의 것들을 포함하는 물 및 오일과 같은 멸균 액체이다. 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)이 정맥내 투여되는 경우에 물이 예시적인 부형제이다. 식염수 용액, 및 텍스트로스와 글리세롤 수용액이 또한, 특히 주사 용액을 위한 액체 부형제로서 사용될 수 있다. 조성물은, 필요하다면, 미량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 또한 함유할 수 있다. 조성물은 용액, 현탁액, 에멀전, 정제, 환제, 캡슐, 분말 등의 형태를 취할 수 있다.

[0130] 약제학적 조성물을 포함하는 조성물은, 적합한 양의 부형제와 함께, 예를 들어, 단리되거나 정제된 형태로, 결합 분자(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체)를 함유할 수 있다.

[0131] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 원하는 결과를 유발하기에 충분한 본 명세서에 제공된 약제 및 항체 또는 약제학적 조성물을 포함하는 항체 또는 치료 분자의 양을 지칭한다.

[0132] 용어 "대상체"와 "환자"는 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본원에서 사용되는 대상체

는 포유류, 예컨대 비-영장류 또는 영장류(예를 들어, 인간)이다. 특정 실시형태에서, 대상체는 인간이다. 일 실시형태에서, 대상체는 질환 또는 장애로 진단된 포유동물, 예를 들어, 인간이다. 다른 실시형태에서, 대상체는 질환 또는 장애가 발생할 위험이 있는 포유동물, 예를 들어, 인간이다.

[0133] "투여하다" 또는 "투여"는, 예컨대 점막, 피내, 정맥내, 근육내 전달, 및/또는 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 다른 물리적 전달 방법에 의해, 신체 외부에 존재하는 물질을 환자에게 주사하거나 달리 물리적으로 전달하는 작용을 지칭한다.

[0134] 본원에서 사용되는 용어 "치료하다", "치료", 및 "치료하는"은, 하나 이상의 요법의 투여로부터 발생하는, 질환 또는 병태의 진행, 중증도, 및/또는 지속기간의 감소 또는 호전을 지칭한다. 환자가 여전히 기저 장애를 앓고 있을 수 있음에도 불구하고, 환자에게 개선이 관찰되도록 기저 장애와 관련된 하나 이상의 증상의 감소, 경감, 및/또는 완화가 있었는지의 여부를 평가함으로써 치료를 결정할 수 있다. 용어 "치료"는 질환을 관리 및 호전시키는 것 둘 모두를 포함한다. 용어 "관리하다", "관리하는", 및 "관리"는 대상체가 요법으로부터 얻는 유익한 효과를 지칭하며, 이는 반드시 질환의 치유를 가져오지는 않는다.

[0135] 용어 "예방하다", "예방하는", 및 "예방"은 질환, 장애, 병태, 또는 관련 증상(들)(예를 들어, 당뇨병 또는 암)의 발병(또는 재발)의 가능성을 감소시키는 것을 지칭한다.

[0136] 용어 "차단하다", "차단하는", 및 "차단"은 질환 진행을 예방하거나, 억제하거나, 지연시키기 위해(예를 들어, 악성 암과 같은 말기 암으로의 진행을 예방하거나, 억제하거나, 지연시키기 위해) 질환 과정의 초기에(예를 들어, 증상-전 및/또는 악성전 질환) 요법을 투여하는 것을 지칭한다.

[0137] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 암의 발생을 "지연시키는" 것은 질환의 발생을 지연, 방해, 둔화, 지체, 안정화, 및/또는 유예하는 것을 의미한다. 이러한 지연은 치료되는 질환 및/또는 개체의 이력에 따라 다양한 기간이 될 수 있다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 충분하거나 유의한 지연은, 개체가 질환을 발생시키지 않는다는 점에서 예방을 사실상 포함할 수 있다. 암의 발생을 "지연"시키는 방법은, 그 방법을 사용하지 않는 것에 비교할 때, 주어진 시간 프레임에서 질환 발생의 확률을 감소시키고/시키거나 주어진 시간 프레임에서 질환의 정도를 감소시키는 방법이다. 그러한 비교는 통계적으로 유의한 개체수를 사용하는 임상 연구에 전형적으로 기초한다. 암 발생은 전산화 축 단층촬영(CAT 스캔), 자기 공명 영상(MRI), 복부 초음파, 응고 검사, 동맥조영술, 또는 생검을 포함하지만 이로 제한되지 않는 표준 방법을 사용하여 검출할 수 있다. 발생은 또한 초기에 검출 불가능할 수 있는 암 진행을 지칭할 수 있으며, 발생, 재발, 및 발병을 포함한다.

[0138] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "IL-1 β 관련 질환 또는 장애"는 IL-1 β 가 발현되거나 과발현되는 세포 또는 조직을 포함하는 질환 또는 장애를 지칭한다. 일부 실시 형태에서, IL-1 β 관련 질환 또는 장애는 IL-1 β 가 비정상적으로 발현되는 세포를 포함한다. 다른 실시 형태에서, IL-1 β 관련 질환 또는 장애는 IL-1 β 가 그의 활성 중 하나 이상에 있어서 결핍된 세포를 포함한다.

[0139] 용어 "약" 및 "대략"은 소정의 값 또는 범위의 20% 이내, 15% 이내, 10% 이내, 9% 이내, 8% 이내, 7% 이내, 6% 이내, 5% 이내, 4% 이내, 3% 이내, 2% 이내, 1% 이내, 또는 그 미만을 의미한다.

[0140] 본 개시내용 및 청구범위에 사용되는 바와 같이, 단수형("a", "an" 및 "the")은 문맥상 명백히 달리 나타내지 않는 한 복수형을 포함한다.

[0141] 실시형태가 용어 "포함하는"으로 본원에 기재되는 경우에는 언제나, "~로 이루어진" 및/또는 "~로 본질적으로 이루어진"의 용어로 기재된 것 이외에는 유사한 실시형태가 또한 제공됨이 이해된다. 실시형태가 어구 "~로 본질적으로 이루어진"으로 본원에 기재되는 경우에는 언제나, "~로 이루어진"의 용어로 기재된 것 이외에는 유사한 실시형태가 또한 제공됨이 또한 이해된다.

[0142] "A와 B 사이의" 또는 "A-B 사이의"와 같은 어구에 사용되는 바와 같이, 용어 "사이의"는 A 및 B 둘 모두를 포함하는 범위를 지칭한다.

[0143] 본 명세서에서 "A 및/또는 B"와 같은 구문에 사용되는 바와 같이, 용어 "및/또는"은 A 및 B 둘 모두; A 또는 B; A(단독); 및 B(단독)를 포함하도록 의도된다. 마찬가지로, "A, B, 및/또는 C"와 같은 구문에 사용되는 바와 같이, 용어 "및/또는"은 하기 실시 형태 각각을 포함하도록 의도된다: A, B, 및 C; A, B, 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독)를 포함하도록 의도된다.

[0144] **5.2. IL-1 β 결핍 분자**

[0145] 5.2.1. IL-1 β 에 결합하는 항체

[0146] 일 태양에서 본 명세서에는, IL-1 β 에 결합할 수 있는 항체가 제공된다. IL-1 β 는 생리학적인 상태 및 병리학적인 상태 둘 모두에서 다수의 역할을 갖는 다면발현성 사이토카인이다. 암에서, IL-1 β 는 다양한 메커니즘을 통해 종양-지지 미세환경을 촉진한다. 또한, IL-1 경로는, 종양 진행의 홀마크이며 종양 침습성 및 전이에 필수적인, 모세혈관의 신생-형성으로 이어지는 2가지 주요 혈관신생 인자, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및 섬유아세포 성장 인자(FGF)의 발현을 촉진한다. IL-1 β 는 또한 시험관 내에서 상피로부터 중간엽으로의 전이(EMT)를 촉진하며, 이는 전이 캐스케이드의 초기 단계에서 중요한 단계이다. IL-1 β 는 다종의 세포 유형을 동원하고 재프로그래밍할 수 있으며; 예를 들어, IL-1 β 는 대식세포 및 호중구 침윤을 촉진하고, 면역억제성 골수성 집단(예를 들어, MDSC)을 이동시키고, 호중구 침윤을 향상시키고, T 세포 침윤 및 활성화를 악화시키는 것으로 나타났다. IL-1 β 의 핵산 및 아미노산 서열은 알려져 있다(GCID: GC02M112829, HGNC: 5992, NCBI Entrez Gene: 3553, Ensembl: ENSG00000125538, OMIM®: 147720, 및 UniProtKB/Swiss-Prot: P01584 참조). 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 인간 IL-1 β 에 결합한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항-IL-1 β 항체는 하나 이상의 IL-1 β 활성을 조절한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항-IL-1 β 항체는 길항제 항체이다.

[0147] 일 실시 형태에서, 본 개시내용에 따른 항체는 IL-1 β 길항제이다. 다른 실시 형태에서, 항원-결합 부분을 포함하는 항체 또는 기능성 단편은 표적 단백질 IL-1 β 에 결합하고, IL-1 β 의 인터루킨 유형 1 수용체(IL-1RI)에 대한 결합을 기저 수준으로 감소시킨다. 이러한 실시 형태의 일 태양에서, 항체 또는 기능성 단편은 IL-1RI에 결합하는 IL-1 β 의 양을 감소시킨다. 이러한 실시 형태의 추가의 태양에서, 항체 또는 기능성 단편은 IL-1 β 가 IL-1RI에 결합하는 것을 완전히 방지한다. 추가의 실시 형태에서, 항체 또는 기능성 단편은 IL-1 신호전달 활성화를 억제한다. 당업계에 알려져 있고 본 명세서에 기재된 방법론에 따라 결정된 바와 같은 이러한 IL-1 β 기능적 특성(예를 들어, 생화학적, 면역화학적, 세포, 생리학적인, 또는 다른 생물학적인 활성 등) 중 하나 이상을 억제하는 항체는 항체의 부재 하에(예를 들어, 또는 무관한 특이성의 대조군 항체가 존재할 때) 관찰되는 것에 비해 특정 활성의 통계적으로 유의한 감소와 관련되는 것으로 이해될 것이다. 일부 실시 형태에서, IL-1 β 활성을 억제하는 항체는 그러한 통계적으로 유의한 감소를 측정된 파라미터의 10% 이상 만큼, 50%, 80%, 또는 90% 이상 만큼 초래하고, 소정 실시 형태에서, 본 개시내용의 항체는 IL-1 β 기능적 활성의 95%, 98%, 또는 99% 초과를 억제할 수 있다.

[0148] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항-IL-1 β 항체는 1 μ M 이하, 200 nM 이하, 100 nM 이하, 50 nM 이하, 20 nM 이하, 10 nM 이하, 1 nM 이하, 0.1 nM 이하, 0.05 nM 이하, 0.02 nM 이하, 0.01 nM 이하, 0.001 nM 이하(예를 들어, 20 pM, 22 pM, 64 pM, 70 pM, 180 pM, 또는 1.7 nM, 예를 들어, 10^{-8} M 이하, 예를 들어, 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, 예를 들어, 10^{-9} M 내지 10^{-13} M, 예를 들어, 10^{-10} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수(KD)로 IL-1 β (예를 들어, 인간 IL-1 β)에 결합한다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 당업계에 알려져 있고, 본 개시내용의 목적을 위해 이들 중 임의의 것을 사용할 수 있으며, 이는, 예를 들어, 관심 항체 및 그의 항원의 Fab 버전으로 수행되는 RIA에 의한 것(문헌[Chen et al., 1999, J. Mol Biol 293:865-81]); 예를 들어, Octet®Red96 시스템을 사용하는 Octet®에 의하거나, 예를 들어, Biacore®TM-2000 또는 Biacore®TM-3000을 사용하는 Biacore®에 의한 생물층 간섭계(BLI) 또는 표면 플라즈몬 공명(SPR) 검정에 의한 것을 포함한다. "온-속도" 또는 "결합의 속도" 또는 "결합 속도" 또는 "kon"이 또한, 예를 들어 Octet®Red96, Biacore®TM-2000, 또는 Biacore®TM-3000 시스템을 사용하는 전술된 것과 동일한 생물층 간섭측정법(BLI) 또는 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기법으로 결정될 수 있다.

[0149] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항-IL-1 β 항체는 하기 섹션 7에 기재된 것들이다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 서열 번호 13 내지 102 중 어느 하나의 하나 이상의 CDR 서열을 포함한다. CDR 서열은 잘 알려진 넘버링 시스템에 따라 결정될 수 있다. 일부 실시 형태에서, CDR은 IMGT 넘버링에 따른다. 일부 실시 형태에서, CDR은 카뎃 넘버링에 따른다. 일부 실시 형태에서, CDR은 AbM 넘버링에 따른다. 다른 실시 형태에서, CDR은 초티아 넘버링에 따른다. 다른 실시 형태에서, CDR은 콘택트 넘버링에 따른다. 일부 실시 형태에서, 항-IL-1 β 항체는 인간화된다. 일부 실시 형태에서, 항-IL-1 β 항체는 수용자 인간 프레임워크, 예를 들어, 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크를 포함한다.

[0150] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항-IL-1 β 항체는 서열 번호 7에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항-IL-1 β 항체는 서열 번호 9에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항-IL-1 β 항체는 서열 번호

11에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3을 포함한다. CDR 서열은 잘 알려진 넘버링 시스템 또는 이들의 조합에 따라 결정될 수 있다. 일부 실시 형태에서, CDR은 IMGT 넘버링에 따른다. 일부 실시 형태에서, CDR은 카밧 넘버링에 따른다. 일부 실시 형태에서, CDR은 AbM 넘버링에 따른다. 다른 실시 형태에서, CDR은 초티아 넘버링에 따른다. 다른 실시 형태에서, CDR은 콘택트 넘버링에 따른다.

[0151] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항-IL-1 β 항체는 서열 번호 8에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항-IL-1 β 항체는 서열 번호 10에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항-IL-1 β 항체는 서열 번호 12에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다. CDR 서열은 잘 알려진 넘버링 시스템 또는 이들의 조합에 따라 결정될 수 있다. 일부 실시 형태에서, CDR은 IMGT 넘버링에 따른다. 일부 실시 형태에서, CDR은 카밧 넘버링에 따른다. 일부 실시 형태에서, CDR은 AbM 넘버링에 따른다. 다른 실시 형태에서, CDR은 초티아 넘버링에 따른다. 다른 실시 형태에서, CDR은 콘택트 넘버링에 따른다.

[0152] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 7에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3, 및 서열 번호 8에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 9에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3, 및 서열 번호 10에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 11에 제시된 바와 같은 HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3, 및 서열 번호 12에 제시된 바와 같은 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다. CDR 서열은 잘 알려진 넘버링 시스템 또는 이들의 조합에 따라 결정될 수 있다. 일부 실시 형태에서, CDR은 IMGT 넘버링에 따른다. 일부 실시 형태에서, CDR은 카밧 넘버링에 따른다. 일부 실시 형태에서, CDR은 AbM 넘버링에 따른다. 다른 실시 형태에서, CDR은 초티아 넘버링에 따른다. 다른 실시 형태에서, CDR은 콘택트 넘버링에 따른다.

[0153] 다른 실시 형태에서, 본 명세서에는 서열 번호 13, 19, 25, 31, 37, 43, 49, 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91, 및 97 중 임의의 것에 대해 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1; (ii) 서열 번호 14, 20, 26, 32, 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 및 98 중 임의의 것에 대해, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; (iii) 서열 번호 15, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 및 99에 대해 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3; (iv) 서열 번호 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 및 100 중 임의의 것에 대해 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1; (v) 서열 번호 17, 23, 29, 35, 41, 47, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 및 101 중 임의의 것에 대해, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및/또는 (vi) 서열 번호 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 및 102 중 임의의 것에 대해 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 IL-1 β 에 결합하는 항체가 제공된다. 일부 실시 형태에서, 항-IL-1 β 항체는 인간화된다. 일부 실시 형태에서, 항-IL-1 β 항체는 수용자 인간 프레임워크, 예를 들어, 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크를 포함한다.

[0154] 일부 특이적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편에서, HCDR1은 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 서열 번호 15의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 서열 번호 17의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 특이적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편에서, HCDR1은 서열 번호 31의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 서열 번호 32의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 서열 번호 33의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 서열 번호 34의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 서열 번호 35의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열 번호 36의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 특이적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편에서, HCDR1은 서열 번호 49의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 서열 번호 50의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 서열 번호 51의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 서열 번호 53의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열 번호 54의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 특이적 실시 형태에서,

본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편에서, HCDR1은 서열 번호 67의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 서열 번호 68의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 서열 번호 69의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 서열 번호 70의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 서열 번호 71의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열 번호 72의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 특이적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편에서, HCDR1은 서열 번호 85의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 서열 번호 86의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 서열 번호 87의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 서열 번호 88의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 서열 번호 89의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열 번호 90의 아미노산 서열을 포함한다.

[0155]

일부 특이적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편에서, HCDR1은 서열 번호 19의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 서열 번호 21의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 서열 번호 23의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 특이적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편에서, HCDR1은 서열 번호 37의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 서열 번호 38의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 서열 번호 39의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 서열 번호 40의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 서열 번호 41의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열 번호 42의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 특이적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편에서, HCDR1은 서열 번호 55의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 서열 번호 56의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 서열 번호 58의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 서열 번호 59의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열 번호 60의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 특이적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편에서, HCDR1은 서열 번호 73의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 서열 번호 74의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 서열 번호 75의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 서열 번호 76의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 서열 번호 77의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열 번호 78의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 특이적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편에서, HCDR1은 서열 번호 91의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 서열 번호 92의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 서열 번호 93의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 서열 번호 94의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 서열 번호 95의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열 번호 96의 아미노산 서열을 포함한다.

[0156]

일부 특이적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편에서, HCDR1은 서열 번호 25의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 서열 번호 26의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 서열 번호 27의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 서열 번호 29의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 특이적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편에서, HCDR1은 서열 번호 43의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 서열 번호 44의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 서열 번호 45의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 서열 번호 46의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 서열 번호 47의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열 번호 48의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 특이적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편에서, HCDR1은 서열 번호 61의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 서열 번호 62의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 서열 번호 63의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 서열 번호 64의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 서열 번호 65의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열 번호 66의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 특이적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편에서, HCDR1은 서열 번호 79의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 서열 번호 80의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 서열 번호 81의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 서열 번호 82의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 서열 번호 83의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열 번호 84의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 특이적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편에서, HCDR1은 서열 번호 97의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 서열 번호 98의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 서열 번호 99의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 서열 번호 100의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 서열 번호 101의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열 번호 102의 아미노산 서열을 포함한다.

[0157]

일부 실시 형태에서, 항체는 서열 번호 13 내지 102의 하나 이상의 프레임워크 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 인간화 항체이다. 본 명세서에 기재된 프레임워크 영역은 CDR 넘버링 체계의 경계에 기초하여 결정된다. 다시 말해서, 예를 들어, 카바트, IMGT, 또는 초티아에 의해 CDR이 결정된다면, 프레임워크 영역은, N-말단으로부터 C-말단으로, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4의 형식으로 가변 영역 내의 CDR을 둘러싸는 아미노산 잔기이다. 예를 들어, FR1은, 예를 들어, 카바트 넘버링 시스템, IMGT 넘버링 시스템, 또는 초티아 넘버링 시스템에 의해 정의되는 바와 같이 CDR1 아미노산 잔기에 대해 N-말단인 아미노

산 잔기로서 정의되고, FR2는, 예를 들어, 카바트 넘버링 시스템, IMGT 넘버링 시스템, 또는 초티아 넘버링 시스템에 의해 정의되는 바와 같이 CDR1 및 CDR2 아미노산 잔기 사이의 아미노산 잔기로서 정의되고, FR3은, 예를 들어, 카바트 넘버링 시스템, IMGT 넘버링 시스템, 또는 초티아 넘버링 시스템에 의해 정의되는 바와 같이 CDR2 및 CDR3 아미노산 잔기 사이의 아미노산 잔기로서 정의되고, FR4는, 예를 들어, 카바트 넘버링 시스템, IMGT 넘버링 시스템, 또는 초티아 넘버링 시스템에 의해 정의되는 바와 같이 CDR3 아미노산 잔기에 대해 C-말단인 아미노산 잔기로서 정의된다.

[0158] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다.

[0159] 소정 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 본 명세서에 제공된 임의의 항체, 예를 들어, 하기 섹션 6에 기재된 것들에 대해 소정의 퍼센트 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0160] 2개의 서열(예를 들어, 아미노산 서열 또는 핵산 서열) 사이의 퍼센트 동일성의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성할 수 있다. 2개의 서열의 비교에 이용되는 수학적 알고리즘의 비제한적인 예는 문헌[Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264 2268 (1990)]의 알고리즘이며, 문헌[Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873 5877 (1993)]에서와 같이 변형된다. 그러한 알고리즘은 문헌[Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990)]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램에 포함되어 있다. 예를 들어, 점수=100, 단어 길이=12에 대해 설정된 NBLAST 뉴클레오타이드 프로그램 파라미터로 BLAST 뉴클레오타이드 검색을 수행하여 본 명세서에 기재된 핵산 분자와 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 획득할 수 있다. 예를 들어, 점수 50, 단어 길이=3으로 설정된 XBLAST 프로그램 파라미터로 BLAST 단백질 검색을 수행하여 본 명세서에 기재된 단백질 분자와 상동성인 아미노산 서열을 획득할 수 있다. 비교 목적을 위한 갭 정렬을 획득하기 위해, 문헌[Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389 3402 (1997)]에 기재된 바와 같이 갭 BLAST를 이용할 수 있다. 대안적으로, PSI BLAST를 사용하여 분자 사이의 원거리 관계(Id.)를 검출하는 반복된 검색을 수행할 수 있다. BLAST, 갭 BLAST, 및 PSI Blast 프로그램을 이용할 경우, 각각의 프로그램(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터가 사용될 수 있다(예를 들어, 월드와이드 웹, ncbi.nlm.nih.gov 상의 미국 국립 생물 정보 센터(NCBI) 참조). 서열의 비교에 이용되는 수학적 알고리즘의 다른 바람직한 비제한적인 예는 문헌[Myers and Miller, CABIOS 4:11-17 (1998)]의 알고리즘이다. 그러한 알고리즘은 ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 포함되며, 이는 GCG 서열 정렬 소프트웨어 패키지의 일부이다. 아미노산 서열을 비교하기 위한 ALIGN 프로그램을 이용할 경우, PAM120 가중치 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티, 및 4의 갭 페널티가 사용될 수 있다. 갭을 허용하거나 허용하지 않으면서 상기 기재된 것들과 유사한 기법을 사용하여 2개의 서열 사이의 % 동일성을 결정할 수 있다. % 동일성의 계산에서는, 전형적으로 정확한 일치만이 계수된다.

[0161] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 참조 서열에 비해 치환(예를 들어, 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-IL-1 β 항체는 IL-1 β 에 결합하는 능력을 유지한다. 일부 실시 형태에서는, 참조 아미노산 서열에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입, 및/또는 결실되었다. 일부 실시 형태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서(즉, FR에서) 발생한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항-IL-1 β 항체는 참조 서열의 변역-후 변형을 포함한다.

[0162] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 7의 아미노산 서열에 대해 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 VH 도메인, 및 서열 번호 8의 아미노산 서열에 대해 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 9의 아미노산 서열에 대해 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 VH 도메인, 및 서열 번호 10의 아미노산 서열에 대해 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 11의 아미노산 서열에 대해 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 VH 도메인, 및 서열

번호 12의 아미노산 서열에 대해 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함한다. 상기 기재된 모든 실시 형태에서, 항체는 IL-1 β 에 결합한다.

[0163] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항-IL-1 β 항체와의 상호작용에 필요한 IL-1 β 단백질 내의 아미노산을 식별하기 위해, 예를 들어, 조합 알려진 스캐닝에 의해 기능성 에피토프를 맵핑할 수 있다. 일부 실시 형태에서, IL-1 β 에 결합된 항-IL-1 β 항체의 입체배치 및 결정 구조를 사용하여 에피토프를 식별할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 제공된 항-IL-1 β 항체 중 임의의 것과 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항-IL-1 β 항체와 동일한 에피토프에 결합한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항-IL-1 β 항체와 동일한 에피토프에 결합한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항-IL-1 β 항체와 동일한 에피토프에 결합한다.

[0164] 일부 실시 형태에서 본 명세서에는, 본 명세서에 기재된 항-IL-1 β 항체 중 어느 하나와 경쟁적으로 IL-1 β 에 특이적으로 결합하는 항-IL-1 β 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항-IL-1 β 항체와 경쟁적으로 IL-1 β 에 특이적으로 결합한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항-IL-1 β 항체와 경쟁적으로 IL-1 β 에 특이적으로 결합한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항-IL-1 β 항체와 경쟁적으로 IL-1 β 에 특이적으로 결합한다.

[0165] 일부 실시 형태에서 본 명세서에는, 상기 기재된 항-IL-1 β 항체 중 어느 하나를 포함하는 IL-1 β 결합 단백질이 제공된다. 일부 실시 형태에서, IL-1 β 결합 단백질은 마우스, 키메라, 인간화, 또는 인간 항체를 포함하는 단일클론 항체이다. 일부 실시 형태에서, 항-IL-1 β 항체는 항체 단편, 예를 들어, scFv이다. 일부 실시 형태에서, IL-1 β 결합 단백질은 본 명세서에 제공된 항-IL-1 β 항체를 포함하는 융합 단백질이다. 다른 실시 형태에서, IL-1 β 결합 단백질은 본 명세서에 제공된 항-IL-1 β 항체를 포함하는 다중특이성 항체이다. 다른 예시적인 IL-1 β 결합 분자는 하기 섹션에 더 상세히 기재된다.

[0166] 일부 실시 형태에서, 상기 실시 형태 중 임의의 것에 따른 항-IL-1 β 항체 또는 항원 결합 단백질은 하기 섹션 5.2.2 내지 5.2.7에 기재된 바와 같은 특징부 중 임의의 것을 단독으로 또는 조합하여 포함할 수 있다.

[0167] 5.2.2. 항체 단편

[0168] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 또한 이의 다양한 항체 단편을 포함한다. 본 명세서에 제공된 항체는 면역글로불린 분자, 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분을 포함하지만 이로 한정되지 않는다. 본 명세서에 제공된 면역글로불린 분자는 임의의 부류(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, 및 IgA), 또는 임의의 하위부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2)의 면역글로불린 분자일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 항체는 IgG 항체이다. 일부 실시 형태에서, IgG 항체는 IgG1 항체이다. 일부 실시 형태에서, IgG 항체는 IgG2, IgG3, 또는 IgG4 항체이다.

[0169] 항체의 변이체 및 유도체는 항원에 결합하는 능력을 유지하는 항체 기능성 단편을 포함한다. 예시적인 기능성 단편은, Fab 단편(예를 들어, 항원-결합 도메인을 함유하고, 이황화물 결합에 의해 가교된 중쇄의 일부와 경쇄를 포함하는 항체 단편); Fab'(예를 들어, Fab를 포함하는 단일 항원-결합 도메인 및 힌지 영역을 통해 중쇄의 추가 부분을 함유하는 항체 단편); F(ab')₂(예를 들어, 중쇄의 힌지 영역 내의 사슬간 이황화물 결합에 의해 연결된 2개의 Fab' 분자; Fab' 분자들은 동일하거나 상이한 에피토프를 향해 유도될 수 있음); 이중특이성 Fab(예를 들어, 2개의 항원 결합 도메인을 갖는 Fab 분자, 이들 각각은 상이한 에피토프에 지향될 수 있음); scFv로도 알려진, 가변 영역을 포함하는 단일쇄(예를 들어, 10 내지 25개의 아미노산의 사슬에 의해 함께 연결된 항체의 단일 경쇄 및 중쇄의 가변, 항원-결합 결정 영역); 이황화물-연결된 Fv, 또는 dsFv(예를 들어, 이황화물 결합에 의해 함께 연결된 항체의 단일 경쇄 및 중쇄의 가변, 항원-결합 결정 영역); 낙타화 VH(예를 들어, VH 계면에서의 일부 아미노산이 자연 발생 낙타 항체의 중쇄에서 발견되는 것들인 항체의 단일 중쇄의 가변, 항원-결합 결

정 영역); 이중특이성 scFv(예를 들어, 2개의 항원-결합 도메인을 갖는 scFv 또는 dsFv 분자, 이들 각각은 상이한 에피토프에 지향될 수 있음); 다이아바디(예를 들어, 제1 scFv의 VH 도메인이 제2 scFv의 VL 도메인과 조립되고 제1 scFv의 VL 도메인이 제2 scFv의 VH 도메인과 조립될 때 형성되는 이량체화된 scFv; 다이아바디의 2개의 항원-결합 영역은 동일하거나 상이한 에피토프를 향해 유도될 수 있음); 트라이아바디(예를 들어, 다이아바디와 유사한 방식으로 형성되지만, 여기서 3개의 항원-결합 도메인이 단일 복합체 내에 생성되는, 삼량체화된 scFv; 3개의 항원 결합 도메인은 동일하거나 상이한 에피토프를 향해 지향될 수 있음); 및 테트라바디(예를 들어, 다이아바디와 유사한 방식으로 형성되지만, 여기서 4개의 항원-결합 도메인이 단일 복합체 내에 생성되는, 사량체화된 scFv; 4개의 항원 결합 도메인은 동일하거나 상이한 에피토프를 향해 지향될 수 있음)를 포함한다.

[0170] 항체 단편의 생성을 위한 다양한 기법이 개발되어 있다. 전통적으로, 이러한 단편은 온전한 항체의 단백질을 통해 유도되었다(예를 들어, 문헌[Morimoto et al., 1992, J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-17]; 및 문헌[Brennan et al., 1985, Science 229:81-83] 참조). 그러나, 이들 단편은 이제 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생성될 수 있다. 예를 들어, Fab, Fv, 및 scFv 항체 단편은 모두 E. 콜라이(*E. coli*) 또는 효모 세포에서 발현되고 그로부터 분리될 수 있으며, 따라서 다량의 이러한 단편의 용이한 생성을 가능하게 한다. 항체 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 분리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편이 E. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다(문헌[Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-67]). 다른 접근법에 따르면, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 분리될 수 있다. 구제 수용체(salvage receptor) 결합 에피토프 잔기를 포함하는 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및 F(ab')₂ 단편이, 예를 들어, 미국 특허 제5,869,046호에 기재되어 있다. 항체 단편의 생성을 위한 다른 기법이 숙련된 실무자에게 명백할 것이다. 소정 실시 형태에서, 항체는 단일쇄 Fv 단편(scFv)이다(예를 들어, 제WO 93/16185호; 미국 특허 제5,571,894호 및 제5,587,458호 참조). Fv 및 scFv는 불변 영역이 없는 온전한 결합 부위를 가지며; 따라서, 이들은 생체내 사용 중에 감소된 비특이적 결합에 적합할 수 있다. scFv 융합 단백질은 scFv의 아미노 말단 또는 카르복시 말단 중 어느 하나에서 이펙터 단백질의 융합을 생성하도록 작제될 수 있다(예를 들어, 문헌[Borrebaeck ed., 상기 문헌] 참조). 항체 단편은 또한, 예를 들어 상기 인용된 참고 문헌에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 그러한 선형 항체는 단일특이성 또는 다중특이성, 예컨대 이중특이성일 수 있다.

[0171] 5.2.3. 인간화 항체

[0172] 본 명세서에 기재된 항체는 인간화 항체를 포함한다. 인간화 항체, 예컨대 본 명세서에 개시된 인간화 항체는, CDR-그래프팅(유럽 특허 제EP 239,400호; 국제 출원 공개 제WO 91/09967호; 및 미국 특허 제5,225,539호, 제5,530,101호, 및 제5,585,089호), 베니어링(veneering) 또는 재표면화(resurfacing)(유럽 특허 제EP 592,106호 및 제EP 519,596호; 문헌[Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991)]; 문헌[Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994)]; 및 문헌[Roguska et al., PNAS 91:969-973 (1994)]), 사슬 셔플링(chain shuffling)(미국 특허 제5,565,332호), 및 예를 들어, 미국 특허 제6,407,213호, 미국 특허 제5,766,886호, 제WO 9317105호, 문헌[Tan et al., J. Immunol. 169:1119-25 (2002)], 문헌[Caldas et al., Protein Eng. 13(5):353-60 (2000)], 문헌[Morea et al., Methods 20(3):267-79 (2000)], 문헌[Baca et al., J. Biol. Chem. 272(16):10678-84 (1997)], 문헌[Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895-904 (1996)], 문헌[Couto et al., Cancer Res. 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995)], 문헌[Couto et al., Cancer Res. 55(8):1717-22 (1995)], 문헌[Sandhu JS, Gene 150(2):409-10 (1994)], 및 문헌[Pedersen et al., J. Mol. Biol. 235(3):959-73 (1994)]에 개시된 기법을 포함하지만 이로 제한되지 않는 당업계에 알려진 다양한 기법을 사용하여 생성될 수 있다. 또한, 미국 특허 출원 공개 제US 2005/0042664 A1호(Feb. 24, 2005)를 또한 참조하며, 이들 각각은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0173] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 인간 IL-1 β 를 포함하는 IL-1 β 에 결합하는 인간화 항체일 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 인간화 항체는 서열 번호 13 내지 102에 제시된 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 비인간 항체를 인간화하기 위한 다양한 방법이 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 인간화 항체는 비인간 공급원으로부터의 하나 이상의 아미노산 잔기가 그 안으로 도입될 수 있다. 이들 비인간 아미노산 잔기는 종종 "유입" 잔기로 지칭되는데, 이는 전형적으로 "유입" 가변 도메인으로부터 받아들여진다. 예를 들어, 문헌[Jones et al., Nature 321:522-25 (1986)]; 문헌[Riechmann et al., Nature 332:323-27 (1988)]; 및 문헌[Verhoeyen et al., Science 239:1534-36 (1988)]의 방법에 따라, 인간 항체의 상응하는 서열을 추가변 영역 서열로 대체함으로써 인간화를 수행할 수 있다. 특이적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체의 인간화는 하기 섹션 6에 기재된 바와 같이 수행된다.

- [0174] 일부 경우에, 인간화 항체는 CDR 그래프팅에 의해 작제되며, 여기서 모 비-인간 항체의 CDR의 아미노산 서열은 인간 항체 프레임워크 상에 그래프팅된다. 예를 들어, 파들란(Padlan) 등은 CDR 내의 잔기의 약 1/3만이 항원과 실제로 접촉하는 것으로 결정하였으며, 이들을 "특이성 결정 잔기" 또는 SDR이라고 명명하였다(문헌[Padlan et al., FASEB J. 9:133-39 (1995)]). SDR 그래프팅의 기법에서는, SDR 잔기만이 인간 항체 프레임워크 상에 그래프팅된다(예를 들어, 문헌[Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005)] 참조).
- [0175] 인간화 항체를 제조하는 데 사용되는 인간 가변 도메인의 선택은 항원성(antigenicity)을 감소시키는 데 중요할 수 있다. 예를 들어, 이른바 "최적-적합(best-fit)" 방법에 따라, 비인간 항체의 가변 도메인의 서열이, 알려진 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝된다. 인간화 항체를 위한 인간 프레임워크로서 비-인간 항체의 것에 가장 가까운 인간 서열이 선택될 수 있다(문헌[Sims et al., J. Immunol. 151:2296-308 (1993)]; 및 문헌[Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-17 (1987)]). 다른 방법은 모든 인간 항체의 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위그룹의 컨센서스 서열로부터 유래되는 특정 프레임워크를 사용한다. 동일한 프레임워크가 몇몇 상이한 인간화 항체에 사용될 수 있다(문헌[Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-89 (1992)]; 및 문헌[Presta et al., J. Immunol. 151:2623-32 (1993)]). 일부 경우에, 프레임워크는 가장 풍부한 인간 하위부류인 V_L6 하위그룹 I(V_L6I) 및 V_H 하위그룹 III(V_HIII)의 컨센서스 서열로부터 유래된다. 다른 방법에서는, 인간 생식세포계열 유전자가 프레임워크 영역의 공급원으로서 사용된다.
- [0176] 초인간화로 불리는, CDR들의 비교에 기초한 대안적인 패러다임에서는, FR 상동성이 비관련되어 있다. 방법은 비인간 서열과 기능성 인간 생식세포계열 유전자 레퍼토리의 비교로 이루어진다. 이어서, 무린 서열과 동일하거나 밀접하게 관련된 표준 구조를 인코딩하는 유전자를 선택한다. 다음으로, 비인간 항체와 표준 구조를 공유하는 유전자 내에서, CDR 내에서 가장 높은 상동성을 갖는 것들이 FR 공여체로서 선택된다. 최종적으로, 비-인간 CDR을 이러한 FR 상에 그래프팅한다(예를 들어, 문헌[Tan et al., J. Immunol. 169:1119-25 (2002)] 참조).
- [0177] 항체는 항원에 대한 그들의 친화도를 유지하고 다른 유리한 생물학적 특성을 갖도록 인간화되는 것이 추가로 일반적으로 바람직하다. 이러한 목적을 달성하기 위하여, 한 가지 방법에 따르면, 인간화 항체는 모 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 사용하여 모 서열 및 다양한 개념적(conceptual) 인간화 생성물을 분석하는 과정에 의해 제조된다. 3차원 면역글로불린 모델은 일반적으로 이용가능하며 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 입체형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이들은, 예를 들어, WAM(문헌[Whitelegg and Rees, Protein Eng. 13:819-24 (2002)]), Modeller(문헌[Sali and Blundell, J. Mol. Biol. 234:779-815 (1993)]), 및 Swiss PDB Viewer(문헌[Guex and Peitsch, Electrophoresis 18:2714-23 (1997)])를 포함한다. 이러한 디스플레이의 조사는 후보 면역글로불린 서열의 기능에 있어서의 잔기의 가능한 역할의 분석, 예를 들어, 후보 면역글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 주는 잔기의 분석을 가능하게 한다. 이러한 방식으로, FR 잔기가 수용자 서열 및 유입 서열로부터 선택 및 조합되어, 원하는 항체 특성, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도가 달성되도록 할 수 있다. 일반적으로, 초가변 영역 잔기는 직접적이고 가장 실질적으로 항원 결합에 영향을 준다.
- [0178] 항체 인간화를 위한 다른 방법은 인간 스트링 함량(HSC: Human String Content)으로 불리는 항체 인간도(antibody humanness)의 메트릭에 기초한다. 이 방법은 마우스 서열을 인간 생식세포계열 유전자의 레퍼토리와 비교하고, 그 차이를 HSC로 점수 매긴다. 이어서, 다종의 다양한 인간화 변이체를 생성하기 위해 전반적 동일성 척도(global identity measure)를 사용하기보다는 그의 HSC를 최대화함으로써 표적 서열을 인간화한다(문헌[Lazar et al., Mol. Immunol. 44:1986-98 (2007)]).
- [0179] 전술된 방법에 더하여, 인간화 항체를 생성하고 선택하는 데 경험적 방법이 사용될 수 있다. 이들 방법은 인간화 변이체들의 큰 라이브러리의 생성 및 풍부화 기술 또는 고처리량 스크리닝 기법을 사용한 최상의 클론의 선택에 기초한 것들을 포함한다. 항체 변이체는 파지, 리보솜, 및 효모 디스플레이 라이브러리로부터 뿐만 아니라 박테리아 콜로니 스크리닝에 의해 단리될 수 있다(예를 들어, 문헌[Hoogenboom, Nat. Biotechnol. 23:1105-16 (2005)]; 문헌[Dufner et al., Trends Biotechnol. 24:523-29 (2006)]; 문헌[Feldhaus et al., Nat. Biotechnol. 21:163-70 (2003)]; 및 문헌[Schlapschy et al., Protein Eng. Des. Sel. 17:847-60 (2004)] 참조).
- [0180] FR 라이브러리 접근법에서는, 잔기 변이체들의 집합체(collection)를 FR 내의 특정 위치들에 도입시킨 후, 라이브러리를 스크리닝하여, 이식된 CDR을 최상으로 지지하는 FR을 선택한다. 치환될 잔기는 CDR 구조에 잠재적으로 기여하는 것으로 식별된 "베르니어(Vernier)" 잔기의 일부 또는 전부를 포함할 수 있거나(예를 들어, 문헌

[Foote and Winter, J. Mol. Biol. 224:487-99 (1992)] 참조), 문헌[Baca et al. J. Biol. Chem. 272:10678-84 (1997)]에 의해 식별된 더 제한된 표적 잔기 세트로부터의 것일 수 있다.

[0181] FR 서플링에서는, 선택된 잔기 변이체의 조합 라이브러리를 생성하는 대신에 비-인간 CDR과 전체 FR을 조합한다 (예를 들어, 문헌[Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005)] 참조). 1-단계 FR 서플링 공정이 사용될 수 있다. 생성되는 항체가 향상된 발현, 증가된 친화도, 및 열 안정성을 포함하는 개선된 생화학적 특성 및 물리 화학적 특성을 나타냈으므로, 그러한 공정은 효율적인 것으로 나타났다(예를 들어, 문헌[Damschroder et al., Mol. Immunol. 44:3049-60 (2007)] 참조).

[0182] 이러한 "인간조작(humaneering)" 방법은 필수적인 최소 특이성 결정인자(minimum specificity determinant, MSD)의 실험적 확인에 기초하고, 인간 FR의 라이브러리 내로의 비인간 단편의 순차적인 대체 및 결합의 평가에 기초한다. 이 방법은 전형적으로 별개의 인간 V-세그먼트 CDR을 갖는 다수의 하위클래스로부터 유래되는 항체들의 에피토프 유지 및 확인을 가져온다.

[0183] "인간 조작" 방법은 인간에서 감소된 면역원성을 갖는 변형된 항체를 생성하도록 항체의 아미노산 서열에 특이적인 변화를 일으킴으로써 비-인간 항체 또는 항체 단편을 변경하는 것을 포함하며, 이는 그림에도 불구하고 원래의 비-인간 항체의 바람직한 결합 특성을 유지한다. 일반적으로, 이러한 기법은 비인간 항체의 아미노산 잔기를 "저위험", "중간 위험", 또는 "고위험" 잔기로서 분류하는 것을 수반한다. 특정 치환을 실행하는 것의 예측된 이익(예를 들어, 인간에서의 면역원성에 대한)을, 생성되는 항체의 폴딩에 치환이 영향을 미칠 위험에 대해 평가하는 전반적인 위험/보상 계산을 사용하여 분류를 수행한다. 비-인간 항체의 가변 영역으로부터의 아미노산 서열을 특이적 또는 컨센서스 인간 항체 서열의 상응하는 영역과 정렬함으로써, 비-인간 항체 서열의 주어진 위치(예를 들어, 저위험 또는 중간 위험)에서 치환될 특정 인간 아미노산 잔기를 선택할 수 있다. 비인간 서열에서 저위험 또는 중간 위험 위치에 있는 아미노산 잔기는 정렬에 따라 인간 항체 서열 내의 상응하는 잔기로 치환될 수 있다. 인간 조작된 단백질을 제조하기 위한 기법은 문헌[Studnicka et al., Protein Engineering 7:805-14 (1994)]; 미국 특허 제5,766,886호; 제5,770,196호; 제5,821,123호; 및 제5,869,619호; 및 PCT 출원 공개 제WO 93/11794호에 더욱 상세하게 기재되어 있다.

[0184] 복합 인간 항체가, 예를 들어 Composite Human Antibody™ 기술(영국 케임브리지 소재의 Antitope Ltd.)을 사용하여 생성될 수 있다. 복합 인간 항체를 생성하기 위하여, T 세포 에피토프를 피함으로써, 생성되는 항체의 면역원성을 최소화하는 방식으로 다수의 인간 항체 가변 영역 서열의 단편으로부터 가변 영역 서열을 설계한다.

[0185] 탈면역화된 항체는 T-세포 에피토프가 제거된 항체이다. 탈면역화된 항체의 제조 방법이 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌[Jones et al., Methods Mol Biol. 525:405-23 (2009), xiv], 및 문헌[De Groot et al., Cell. Immunol. 244:148-153(2006)]을 참조한다. 탈면역화된 항체는 T-세포 에피토프-고갈된 가변 영역 및 인간 불변 영역을 포함한다. 간략하게 말하면, 항체의 가변 영역들을 클로닝하고, 후속으로 T 세포 증식 검정에서 항체의 가변 영역으로부터 유래되는 중첩 펩티드를 시험함으로써 T-세포 에피토프를 확인한다. 컴퓨터 모의실험(*in silico*) 방법을 통해 T 세포 에피토프를 확인하여 인간 MHC 클래스 II에 대한 펩티드 결합을 확인한다. 돌연변이를 가변 영역 내에 도입하여 인간 MHC 클래스 II에 대한 결합을 소실시킨다. 이어서, 돌연변이된 가변 영역을 이용하여 탈면역화된 항체를 생성한다.

[0186] 5.2.4. 항체 변이체

[0187] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 IL-1 β 에 결합하는 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 특이성, 열안정성, 발현 수준, 이펙터 기능, 글리코실화, 감소된 면역원성, 또는 용해도를 포함하지만 이로 제한되지 않는 항체의 결합 친화성 및/또는 다른 생물학적 특성을 최적화하는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 본 명세서에 기재된 IL-1 β 에 결합하는 항체에 더하여, 본 명세서에 기재된 IL-1 β 에 결합하는 항체의 변이체가 제조될 수 있음이 고려된다. 예를 들어, 적절한 뉴클레오티드 변화를 인코딩 DNA 내로 도입함으로써 그리고/또는 원하는 항체 또는 폴리펩티드의 합성에 의해 항체 변이체가 제조될 수 있다. 아미노산 변화가 항체의 번역후 과정을 변경할 수 있음을 당업자는 인정한다.

[0188] 화학적 변형

[0189] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는, 예를 들어, 항체에 대한 임의의 유형의 분자의 공유적 부착에 의해 화학적으로 변형된다. 항체 유도체는, 예를 들어, 글리코실화, 아세틸화, 페길화, 인산화, 아미드화, 알려진 보호기/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에 대한 연결, 또는 하나 이상의 면역글로불린 도메인(예를 들어, Fc 또는 Fc의 일부)에 대한 접합에 의해 화학적으로 변형된 항체를 포

함할 수 있다. 특이적 화학적 절단, 아세틸화, 제형화, 튜니카마이신의 대사 합성 등을 포함하지만 이로 제한되지 않는 알려진 기술에 의해 다수의 화학적 변형 중 임의의 것이 실행될 수 있다. 또한, 항체는 하나 이상의 비-고전적 아미노산을 함유할 수 있다.

[0190] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키기 위해 변경된다. 항체에 대한 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성될 수 있다.

[0191] 본 명세서에 제공된 항체가 Fc 영역에 융합되는 경우, 이에 부착된 탄수화물은 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생성된 천연 항체는 전형적으로 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에 대한 N-결합에 의해 일반적으로 부착되는 분지형, 바이안테너리 올리고당을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997)]을 참조한다. 올리고당은 바이안테너리 올리고당 구조의 "스텝" 내에 GlcNAc에 부착된 다양한 탄수화물, 예를 들어, 만노스, N-아세틸 글루코사민(GlcNAc), 갈락토스, 및 시알산 뿐만 아니라, 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 소정의 개선된 특성을 갖는 변이체를 생성하기 위해 본 명세서에 제공된 결합 분자 내의 올리고당의 변형이 실행될 수 있다.

[0192] 다른 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체가 Fc 영역에 융합되는 경우, 본 명세서에 제공된 항체 변이체는 상기 Fc 영역에 (직접적으로 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 결여된 탄수화물 구조를 가질 수 있다. 예를 들어, 그러한 항체 내의 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65%, 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 예를 들어, 제WO 2008/077546에 기재된 바와 같이, MALDI-TOF 질량 분석법에 의해 측정되는 바와 같이, Asn 297에 부착된 모든 당구조물(예를 들어, 복합체, 하이브리드, 및 고 만노스 구조물)의 합에 비해, Asn297에서 당쇄 내의 푸코스의 평균 양을 계산함으로써 푸코스의 양을 결정한다. Asn297은 Fc 영역 내의 약 위치 297(Fc 영역 잔기의 EU 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하지만; Asn297은 또한 항체 내의 사소한 서열 변이로 인해 위치 297의 약 ± 3개 아미노산 상류 또는 하류, 즉, 위치 294와 300 사이에 위치할 수 있다. 그러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제US 2003/0157108호 및 제US 2004/0093621호를 참조한다. "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체 변이체에 관한 간행물의 예는 제US 2003/0157108호; 제WO 2000/61739호; 제WO 2001/29246호; 제US 2003/0115614호; 제US 2002/0164328호; 제US 2004/0093621호; 제US 2004/0132140호; 제US 2004/0110704호; 제US 2004/0110282호; 제US 2004/0109865호; 제WO 2003/085119호; 제WO 2003/084570호; 제WO 2005/035586호; 제WO 2005/035778호; 제WO2005/053742호; 제WO2002/031140호; 문헌[Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004)]; 문헌[Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)]을 포함한다. 탈푸코실화 항체를 생성할 수 있는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포(문헌[Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)]; 미국 특허 출원 제US 2003/0157108호; 및 제WO 2004/056312호), 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실트랜스페라제 유전자, *FUT8*, 녹아웃 CHO 세포(예를 들어, 문헌[Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)]; 문헌[Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006)]; 및 제WO2003/085107호 참조)를 포함한다.

[0193] 본 명세서에 제공된 항체를 포함하는 결합 분자에는 이분된 올리고당이 추가로 제공되며, 예를 들어, 여기서 Fc 영역에 부착된 바이안테너리 올리고당은 GlcNAc에 의해 이분된다. 그러한 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 그러한 변이체의 예는, 예를 들어, 제WO 2003/011878호(Jean-Mairet 등); 미국 특허 제6,602,684호(Umana 등); 및 제US 2005/0123546호(Umana 등)에 기재되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고당에 하나 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 변이체가 또한 제공된다. 그러한 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 그러한 변이체는, 예를 들어, 제WO 1997/30087호; 제WO 1998/58964호; 및 제WO 1999/22764호에 기재되어 있다.

[0194] 본 항체 및 Fc 영역을 포함하는 분자에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 Fc 영역 내로 도입됨으로써, Fc 영역 변이체를 생성할 수 있다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에 아미노산 변형(예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열(예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0195] 일부 실시 형태에서 본 출원은, 생체내에서 결합 분자의 반감기가 중요하지만 소정의 이펙터 기능(예컨대 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 유해한 응용에 바람직한 후보가 되도록 하는, 일부이지만 전부는 아닌 이펙터 기능을 보유하는 변이체를 고려한다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정을 수행할 수 있다. 예를 들어, 결합 분자가 FcγR 결합을 하지 않지만(그러므로 ADCC 활성이 결여될 가능성이 있음) FcRn 결합 능력은 유지한다는 것을 보장하기 위해 Fc 수용체(FcR) 결합 검정을 수행할 수

있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 비제한적인 예는 미국 특허 제5,500,362호(예를 들어, 문헌[Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)] 참조) 및 문헌[Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985)]; 제5,821,337호(문헌[Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)] 참조)에 기재되어 있다. 대안적으로, 비-방사성 검정 방법이 사용될 수 있다(예를 들어, 유세포측정을 위한 ACTI™ 비-방사성 세포독성 검정(CellTechnology, Inc. 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재); 및 CytoTox 96® 비-방사성 세포독성 검정(Promega, 미국 위스콘신주 매디슨 소재) 참조). 그러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 자연 살해(NK) 세포를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어, 문헌[Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998)]에 개시된 것과 같은 동물 모델에서 평가될 수 있다. 항체가 C1q에 결합할 수 없고, 그러므로 CDC 활성이 결여되어 있음을 확인하기 위해 C1q 결합 검정을 또한 실행할 수 있다. 예를 들어, 제WO 2006/029879호 및 제WO 2005/100402호에서의 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 검정을 수행할 수 있다(예를 들어, 문헌[Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)]; 문헌[Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003)]; 및 문헌[Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)] 참조). FcRn 결합 및 생체내 청소율/반감기 결정을 또한 당업계에 알려진 방법을 사용하여 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌[Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)] 참조).

[0196] 감소된 이펙터 기능을 갖는 결합 분자는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327, 및 329 중 하나 이상의 치환을 갖는 것들을 포함한다(미국 특허 제6,737,056호). 그러한 Fc 돌연변이체는 아미노산 위치 265, 269, 270, 297, 및 327 중 2개 이상에서 치환을 갖는 Fc 돌연변이체를 포함하며, 이는 잔기 265 및 297이 알라닌으로 치환된 소위 "DANA" Fc 돌연변이체를 포함한다(미국 특허 제7,332,581호).

[0197] FcR에 대한 결합이 개선되거나 감소된 소정 변이체가 기재되어 있다. (예를 들어, 미국 특허 제6,737,056호; 제WO 2004/056312호, 및 문헌[Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)] 참조)

[0198] 일부 실시 형태에서, 변이체는 ADCC를 개선하는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어, Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334에서의 치환(잔기의 EU 넘버링)을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 예를 들어, 미국 특허 제6,194,551호, 제WO 99/51642호, 및 문헌[Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)]에 기재된 바와 같이, 변경된(즉, 개선되거나 감소됨) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC)을 유발하는 변경이 Fc 영역 내에 실행된다.

[0199] 산모 IgG의 태아로의 전달을 담당하는, 반감기가 증가되고 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 결합이 개선된 결합 분자(문헌[Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976)] 및 문헌[Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)])가 제US2005/0014934A1호(Hinton 등)에 기재되어 있다. 그러한 분자는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 개선하는 하나 이상의 치환을 그 안에 갖는 Fc 영역을 포함한다. 그러한 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 또는 434 중 하나 이상에서의 치환, 예를 들어, Fc 영역 잔기 434의 치환을 갖는 것들을 포함한다(미국 특허 제 7,371,826호). Fc 영역 변이체의 다른 예에 관하여, 문헌[Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 제5,648,260호; 미국 특허 제5,624,821호; 및 제WO 94/29351호를 또한 참조한다.

[0200] 일부 실시 형태에서, 항체의 하나 이상의 잔기가 시스템 잔기로 치환된, 시스템 조각된 항체를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 치환된 잔기는 항체의 접근가능한 부위에서 발생한다. 그러한 잔기를 시스템으로 치환함으로써, 반응성 티올 기는 이에 의해 항체의 접근가능한 부위에 위치되며, 본 명세서에 추가로 기재된 바와 같이, 항체를 다른 모이어티, 예컨대 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 접합시켜 면역접합체를 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0201] **치환, 결실, 또는 삽입**

[0202] 변이는 원래의 항체 또는 폴리펩티드와 비교하여 아미노산 서열의 변화를 유발하는 항체 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 하나 이상의 코돈의 치환, 결실, 또는 삽입일 수 있다. 치환 돌연변이유발을 위한 관심 부위는 CDR 및 FR을 포함한다.

[0203] 아미노산 치환은, 세린에 의한 류신의 대체, 예를 들어, 보존적 아미노산 대체와 같이, 하나의 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 대체한 결과일 수 있다. 예를 들어, 아미노산 치환을 가져오는 부위-지정 돌연변이생성 및 PCR-매개 돌연변이생성을 포함하는, 당업자에게 알려진 표준 기법을 사

용하여, 본 명세서에 제공된 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 돌연변이를 도입할 수 있다. 삽입 또는 결실은 선택적으로 약 1 내지 5개의 아미노산의 범위일 수 있다. 소정 실시 형태에서, 치환, 결실, 또는 삽입은 원래의 분자에 비해 25개 미만의 아미노산 치환, 20개 미만의 아미노산 치환, 15개 미만의 아미노산 치환, 10개 미만의 아미노산 치환, 5개 미만의 아미노산 치환, 4개 미만의 아미노산 치환, 3개 미만의 아미노산 치환, 또는 2개 미만의 아미노산 치환을 포함한다. 구체적인 실시 형태에서, 치환은 하나 이상의 예측된 비필수 아미노산 잔기에서 실행된 보존적 아미노산 치환이다. 허용되는 변이는 서열 내에 아미노산의 삽입, 결실, 또는 치환을 체계적으로 실행하고, 생성된 변이체를 모 항체에 의해 나타나는 활성에 대해 시험함으로써 결정될 수 있다.

[0204] 아미노산 서열 삽입은 길이가 1개의 잔기 내지 다중 잔기를 함유하는 폴리펩티드의 범위인 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다.

[0205] 보존적 아미노산 치환에 의해 생성된 항체는 본 개시내용에 포함된다. 보존적 아미노산 치환에서, 아미노산 잔기는 유사한 전하를 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된다. 상기 기재된 바와 같이, 유사한 전하를 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 아이소류신), 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)으로 정의되었다. 대안적으로, 예컨대 포화 돌연변이생성에 의해 코딩 서열의 전부 또는 일부를 따라 돌연변이가 무작위로 도입될 수 있고, 생성된 돌연변이체를 생물학적 활성에 대해 스크리닝하여 활성을 유지하는 돌연변이체를 확인할 수 있다. 돌연변이생성 후에, 인코딩된 단백질이 발현될 수 있고, 단백질의 활성이 결정될 수 있다. 특성을 유의하게 변화시키지 않거나 유지하도록 보존적(예를 들어, 유사한 특성 및/또는 측쇄를 갖는 아미노산 기 내의) 치환이 실행될 수 있다. 예시적인 치환을 하기 표 2에 나타낸다.

[표 2]

아미노산 치환			
원본 잔기	예시 치환	원본 잔기	예시 치환
Ala(A)	Val; Leu; Ile	Leu(L)	노트류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Arg(R)	Lys; Gln; Asn	Lys(K)	Arg; Gln; Asn
Asn(N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Met(M)	Leu; Phe; Ile
Asp(D)	Glu; Asn	Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Cys(C)	Ser; Ala	Pro(P)	Ala
Gln(Q)	Asn; Glu	Ser(S)	Thr
Glu(E)	Asp; Gln	Thr(T)	Val; Ser
Gly(G)	Ala	Trp(W)	Tyr; Phe
His(H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Ile(I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노트류신	Val(V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노트류신

[0207]

[0208] 아미노산은 이들의 측쇄의 특성의 유사성에 따라 그룹화될 수 있다(예를 들어, 문헌[Lehninger, *Biochemistry* 73-75 (2d ed. 1975)] 참조): (1) 비극성: Ala(A), Val(V), Leu(L), Ile(I), Pro(P), Phe(F), Trp(W), Met(M); (2) 비하전된 극성: Gly(G), Ser(S), Thr(T), Cys(C), Tyr(Y), Asn(N), Gln(Q); (3) 산성: Asp(D), Glu(E); 및 (4) 염기성: Lys(K), Arg(R), His(H). 대안적으로, 자연 발생 잔기를 일반적인 측쇄 특성에 기초하여 군으로 나눌 수 있다: (1) 소수성: 노트류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) 산성: Asp, Glu; (4) 염기성: His, Lys, Arg; (5) 사슬 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro; 및 (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe. 예를 들어, 항체의 적절한 입체형태를 유지하는 것에 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기는 또한, 분자의 산화 안정성을 개선하고 비정상적인 가교화를 방지하기 위해, 예를 들어, 알라닌 또는 세린과 같은 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 비-보존적 치환은 다른 부류를 이러한 부류 중 하나의 구성원으로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0209] 치환 변이체의 일 유형은 모 항체의 하나 이상의 추가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다(예를 들어, 인간

화 또는 인간 항체). 일반적으로, 추가 연구를 위해 선택된 생성된 변이체(들)은 모 항체에 비해 특정 생물학적 특성(예를 들어 증가된 친화성, 감소된 면역원성)의 변형(예를 들어 개선)을 가질 것이고/것이거나 모 항체의 특정 생물학적 특성을 실질적으로 유지할 것이다. 예시적인 치환 변이체는 예를 들어 파지 디스플레이-기반 친화성 성숙 기술, 예컨대 본 명세서에 기재된 것들을 사용하여 편리하게 생성될 수 있는 친화성 성숙 항체이다. 간략하게 말하면, 하나 이상의 CDR 잔기가 돌연변이되고, 변이체 항체는 파지 상에 디스플레이되고, 특정 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다.

[0210] 예를 들어 항체 친화성을 개선시키기 위해 CDR에서 변경(예를 들어 치환)이 이루어질 수 있다. 그러한 변경은 CDR "핫스팟", 즉, 체세포 성숙 과정 중에 높은 빈도로 돌연변이를 겪는 코돈에 의해 인코딩된 잔기(예를 들어, 문헌[Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)] 참조), 및/또는 SDR(a-CDR)에서 실행될 수 있으며, 생성되는 변이체 항체 또는 이의 단편은 결합 친화도에 대해 시험된다. 2차 라이브러리를 구성하고 재선택함으로써 친화성 성숙이 예를 들어 문헌[Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).)에 기술되었다. 친화성 성숙의 일부 실시 형태에서, 다양한 방법에 의한 성숙을 위해 선택된 가변 유전자 내로 다양성이 도입된다(예를 들어, 에러프론(error-prone) PCR, 사슬 서플링, 또는 올리고뉴클레오티드-지정 돌연변이유발). 이어서, 2차 라이브러리가 생성된다. 이어서, 라이브러리를 스크리닝하여 원하는 친화성을 갖는 임의의 항체 변이체를 식별한다. 다양성을 도입하는 또 다른 방법은 여러 CDR 잔기(예를 들어 한 번에 4 내지 6개의 잔기)가 있는 무작위로 지정하는 CDR-유도 접근법을 포함한다. 항원 결합에 관여하는 CDR 잔기를 예를 들어 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 사용하여 구체적으로 식별할 수 있다. 친화도 성숙에 관한 더 상세한 설명은 하기 섹션에서 제공된다.

[0211] 일부 실시 형태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 이러한 변경이 항원을 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한 하나 이상의 CDR 내에서 발생할 수 있다. 예를 들어, 결합 친화성을 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경(예를 들어 본 명세서에 제공된 바와 같은 보존적 치환)이 CDR에서 이루어질 수 있다. 본 명세서에 제공된 변이체 항체 서열의 일부 실시 형태에서, 각각의 CDR은 변경되지 않거나, 1, 2, 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 함유한다.

[0212] 돌연변이유발을 목표로 할 수 있는 항체의 잔기 또는 영역을 확인하는 유용한 방법은 문헌[Cunningham and Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989)]에 기재된 바와 같이 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"이라 한다. 이 방법에서, 잔기 또는 표적 잔기의 그룹(예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대 Arg, Asp, His, Lys, 및 Glu)을 식별하고 중성 또는 음으로 하전된 아미노산(예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체하여 항체와 항원의 상호작용이 영향을 받는지 여부를 결정한다. 초기 치환에 대한 기능적 민감성을 나타내는 아미노산 위치에서 추가 치환이 도입될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조는 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인한다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃 잔기는 치환을 위한 후보로서 표적화되거나 제거될 수 있다. 변이체는 그들이 원하는 특성을 함유하는지 여부를 결정하기 위해 스크리닝될 수 있다.

[0213] 아미노산 서열 삽입은 길이가 1개인 잔기부터 100개 이상인 잔기를 함유하는 폴리펩티드에까지 이르는 범위의 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합체뿐만 아니라, 단일 또는 다수의 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드 또는 효소(예를 들어, ADEPT의 경우)에 대한 항체의 N-말단 또는 C-말단에 대한 융합을 포함한다.

[0214] 올리고뉴클레오티드-매개(부위-지정) 돌연변이생성, 알라닌 스캐닝, 및 PCR 돌연변이생성과 같은 당업계에 알려진 방법을 사용하여 변이를 실행할 수 있다. 부위-지정 돌연변이 유발(예를 들어, 문헌[Carter, *Biochem J.* 237:1-7 (1986)]; 및 문헌[Zoller et al., *Nucl. Acids Res.* 10:6487-500 (1982)] 참조), 카세트 돌연변이유발(예를 들어, 문헌[Wells et al., *Gene* 34:315-23 (1985)] 참조), 또는 다른 알려진 기술을 클로닝된 DNA 상에서 수행하여 항체 변이체 DNA를 생성할 수 있다.

[0215] Fc 돌연변이

[0216] 2개의 중쇄(예를 들어, 하나는 항-IL-1 β 항체 또는 또는 이의 항원-결합 단편의 융합을 갖고 하나는 이를 갖지 않음, 또는 하나는 항-IL-1 β 아암에 대한 Fc를 함유하고 하나는 조직 표적 아암에 대한 Fc를 함유함) 사이의 이중이량체의 형성을 촉진하기 위해, 이중이량체 돌연변이가 2개의 중쇄의 Fc 내로 도입된다. 그러한 Fc 돌연변이의 예는 Zymeworks 돌연변이(예를 들어, 제US 10,457,742호 참조) 및 "노브 인 홀" 돌연변이(예를 들어, 문헌[Ridgway et al., *Protein Eng.*, 9(7): 617-621, 1996] 참조)를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 다른 이중이량체 돌연변이가 또한 본 개시내용에 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은

변형된 CH3은 2개의 중쇄 사이의 이중이량체의 형성을 촉진하기 위해 사용된다.

[0217] 특이적 실시 형태에서, 항체의 2개의 중쇄 각각은 하나 이상의 이중이량체 돌연변이(들) 또는 하나 이상의 노브 및 홀 돌연변이(들)를 포함한다. 특이적 실시 형태에서, 하나 이상의 이중이량체 돌연변이(들)는 CH3 도메인에 있다.

[0218] 소정 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 Fc 영역은 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합을 변경하는 치환을 함유한다. 소정 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 Fc 영역은 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합을 향상시키는 치환을 함유한다. 소정 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 Fc 영역은 약 pH 6에서 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합을 향상시키는 치환을 함유한다. 소정 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 Fc 영역은 약 pH 6에서 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합을 향상시키는 치환을 함유함으로써, FcRn-매개 엔도솜 재활용을 향상시킨다. 소정 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 Fc 영역은 약 pH 6에서 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합을 향상시키는 치환을 함유함으로써, 더 긴 혈청 노출로 이어진다. 소정 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 Fc 영역은 산성 pH에서 결합을 향상시키는 치환을 함유한다. 소정 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 Fc 영역은 M252Y/S254T/T256E(YTE)돌연변이를 가지며, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 EU 인덱스에 따른다.

[0219] 5.2.5. 시험관내 친화성 성숙

[0220] 일부 실시 형태에서, 모 항체와 대비하여 친화성, 안정성, 또는 발현 수준과 같은 개선된 특성을 갖는 항체 변이체는 시험관내 친화성 성숙에 의해 제조될 수 있다. 천연 프로토타입과 마찬가지로, 시험관내 친화성 성숙은 돌연변이 및 선택의 원리에 기초한다. 항체의 라이브러리는 유기체(예를 들어, 파지, 세균, 효모, 또는 포유류 세포)의 표면 상에 또는 이들의 인코딩 mRNA 또는 DNA와 회합되어(예를 들어, 공유적으로 또는 비공유적으로) 디스플레이된다. 디스플레이된 항체의 친화성 선택은 항체를 인코딩하는 유전자 정보를 운반하는 유기체 또는 복합체의 단리를 가능하게 한다. 파지 디스플레이와 같은 디스플레이 방법을 사용하는 2회 라운드 또는 3회 라운드의 돌연변이 및 선택은 통상 낮은 나노몰 범위의 친화도를 갖는 항체 단편을 가져온다. 친화성 성숙된 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화도를 가질 수 있다.

[0221] 파지 디스플레이는 항체의 디스플레이 및 선택을 위한 광범위한 방법이다. 항체는 박테리오파지 코트 단백질에 대한 융합으로서 Fd 또는 M13 박테리오파지의 표면 상에 디스플레이된다. 선택은, "패닝"으로 지칭되는 공정인, 파지-디스플레이된 항체가 이들의 표적에 결합하는 것이 가능하도록 항원에 노출시키는 것을 포함한다. 항원에 결합된 파지를 회수하고, 세균을 감염시켜 추가의 선택 라운드를 위해 파지를 생성하기 위해 사용한다. 검도를 위해, 예를 들어, 문헌[Hoogenboom, *Methods. Mol. Biol.* 178:1-37 (2002)]; 및 문헌[Bradbury and Marks, *J. Immunol. Methods* 290:29-49 (2004)]을 참조한다.

[0222] 효모 디스플레이 시스템(예를 들어, 문헌[Boder *et al.*, *Nat. Biotech.* 15:553-57 (1997)]; 및 문헌[Chao *et al.*, *Nat. Protocols* 1:755-68 (2006)] 참조)에서, 항체는 효모 아글루티닌 단백질 Aga2p의 접착 서브유닛에 융합될 수 있으며, 이는 Aga1p에 대한 이황화물 결합을 통해 효모 세포벽에 부착된다. Aga2p를 통한 단백질의 디스플레이는 단백질을 세포 표면으로부터 멀리 돌출시켜, 효모 세포벽 상의 다른 분자와의 잠재적인 상호작용을 최소화한다. 개선된 친화성 또는 안정성을 갖는 항체에 대해 선택하기 위해, 자성 분리 및 유세포분석을 사용하여 라이브러리를 스크리닝한다. 비오틴화된 항원 및 2차 시약, 예컨대 형광단에 접합된 스트렙타비딘을 이용한 효모의 표지화에 의해 관심 가용성 항원에 대한 결합이 결정된다. 항체의 표면 발현에서의 변이는 단일 사슬 항체(예를 들어, scFv)를 플랭킹하는 헤마글루티닌 또는 c-Myc 에피토프 태그의 면역형광 표지화를 통해 측정될 수 있다. 발현은 디스플레이된 단백질의 안정성과 상관관계가 있는 것으로 나타났으며, 따라서 항체는 개선된 안정성뿐만 아니라 친화도에 대해 선택될 수 있다(예를 들어, 문헌[Shusta *et al.*, *J. Mol. Biol.* 292:949-56 (1999)] 참조). 효모 디스플레이의 추가의 이점은 디스플레이된 단백질이 진행 효모 세포의 소포체 내에서 접혀서, 소포체 샤페론 및 품질-제어 기구를 이용한다는 점이다. 일단 성숙이 완료되면, 항체 친화성은 효모의 표면 상에 디스플레이되는 동안 편리하게 "적정"될 수 있어서, 각각의 클론의 발현 및 정제에 대한 필요성을 제거한다. 효모 표면 디스플레이의 이론적 제한은 다른 디스플레이 방법의 것보다 잠재적으로 더 작은 기능성 라이브러리 크기이지만; 최근의 접근법은 효모 세포의 교배 양식(mating system)을 사용하여 크기가 10^{14} 으로 추정되는 조합 다양성을 생성한다(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2003/0186374호; 및 문헌[Blaise *et al.*, *Gene* 342:211-18 (2004)] 참조).

- [0223] 리보솜 디스플레이에서는, 무세포 시스템에서의 선택을 위해 항체-리보솜-mRNA(ARM) 복합체가 생성된다. 항체의 특정 라이브러리를 코딩하는 DNA 라이브러리는 정지 코돈이 결여된 스페이스 서열에 유전자 융합된다. 이러한 스페이스 서열은, 번역될 경우에, 펩티드 tRNA에 여전히 부착되고 리보솜 터널을 점유하며, 따라서 관심 단백질이 리보솜으로부터 돌출되고 접히는 것을 가능하게 한다. mRNA, 리보솜, 및 단백질의 생성되는 복합체는 표면-결합 리간드에 결합하여, 리간드를 이용한 친화성 포획을 통한 항체 및 그의 인코딩 mRNA의 동시 단리를 가능하게 할 수 있다. 이어서, 리보솜-결합된 mRNA는 다시 cDNA로 역전사되며, 이는 이어서 돌연변이유발을 겪고 다음 선택 라운드에 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Fukuda *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 34:e127 (2006)] 참조). mRNA 디스플레이에서는, 어댑터 분자로서 퓨로마이신을 사용하여 항체와 mRNA 사이의 공유 결합을 확립한다(문헌[Wilson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3750-55 (2001)]).
- [0224] 이들 방법들은 완전히 시험관내에서 수행되므로, 이들은 다른 선택 기술에 비해 2가지 주요 이점을 제공한다. 첫째로, 라이브러리의 다양성은 세균 세포의 형질전환 효율에 의해 제한되는 것이 아니라, 시험관 내에 존재하는 상이한 mRNA 분자 및 리보솜의 개수에 의해서만 제한된다. 둘째로, 임의의 다양화 단계 후에 라이브러리가 형질전환되어야 하는 것이 아니므로, 각각의 선택 라운드 후에, 예를 들어, 비교정(non-proofreading) 폴리머라제에 의해 무작위 돌연변이가 용이하게 도입될 수 있다.
- [0225] 일부 실시 형태에서, 포유류 디스플레이 시스템이 사용될 수 있다.
- [0226] 다양성은 또한, 표적화된 방식으로 또는 무작위 도입을 통해 항체 라이브러리의 CDR 내로 도입될 수 있다. 전자의 접근법은 고수준 또는 저수준의 돌연변이유발을 통해 항체의 모든 CDR을 순차적으로 표적화하는 단계 또는 체세포 과돌연변이의 단리된 핫 스팟(예를 들어, 문헌[Ho *et al.*, *J. Biol. Chem.* 280:607-17 (2005)] 참조) 또는 실험적 기반 또는 구조적 이유로 친화도에 영향을 주는 것으로 의심되는 잔기를 표적화하는 단계를 포함한다. 다양성은 또한, DNA 서플링 또는 유사한 기법을 통해 천연적으로 다양한 영역의 대체에 의해 도입될 수 있다(예를 들어, 문헌[Lu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278:43496-507 (2003)]; 미국 특허 제5,565,332호 및 제6,989,250호 참조). 프레임워크-영역 잔기 내로 연장되는 추가변 루프를 표적으로 하는 대안적인 기법(예를 들어, 문헌[Bond *et al.*, *J. Mol. Biol.* 348:699-709 (2005)] 참조)은 CDR 내의 루프 결실 및 삽입을 사용하거나 혼성화-기반 다양화를 사용한다(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2004/0005709호 참조). CDR에서 다양성을 생성하는 추가의 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제7,985,840호에 개시되어 있다. 항체 라이브러리 및/또는 항체 친화성 성숙을 생성하기 위해 사용될 수 있는 추가의 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제8,685,897호 및 제8,603,930호, 및 미국 출원 공개 제2014/0170705호, 제2014/0094392호, 제2012/0028301호, 제2011/0183855호, 및 제2009/0075378호에 개시되어 있으며, 이들 각각은 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0227] 라이브러리의 스크리닝은 당업계에 알려진 다양한 기법에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 항체는 고체 지지체, 컬럼, 펄, 또는 셀룰로스/폴리(비닐리덴 플루오라이드) 막/다른 필터 상에 고정되거나, 흡착 플레이트에 고정된 숙주 세포 상에서 발현되거나, 세포 분류에 사용되거나, 스트렙타비딘-코팅된 비드를 이용한 포획을 위해 비오틴에 접합되거나, 디스플레이 라이브러리를 패닝하기 위한 임의의 다른 방법에 사용될 수 있다.
- [0228] 시험관내 친화도 성숙 방법의 검토를 위해, 예를 들어, 문헌[Hoogenboom, *Nature Biotechnology* 23:1105-16 (2005)]; 문헌[Quiroz and Sinclair, *Revista Ingenieria Biomedica* 4:39-51 (2010)]; 및 그 안의 참고문헌을 참조한다.
- [0229] **5.2.6. 항체의 변형**
- [0230] 항체의 공유적 변형은 본 개시내용의 범주 내에 포함된다. 공유적 변형은 항체의 표적화된 아미노산 잔기를 항체의 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C- 말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시키는 것을 포함한다. 다른 변형은, 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기의 각각 상응하는 글루타미닐 및 아스파르틸 잔기로의 탈아미드화, 프롤린 및 라이신의 하이드록실화, 세릴 또는 트레오닐 잔기의 하이드록실 기의 인산화, 라이신, 아르기닌, 및 히스티딘 측쇄의 α-아미노 기의 메틸화(예를 들어, 문헌[Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties* 79-86 (1983)] 참조), N-말단 아민의 아세틸화, 및 임의의 C-말단 카르복실 기의 아미드화를 포함한다.
- [0231] 본 개시내용의 범주 내에 포함된 항체의 공유적 변형의 다른 유형은 상기 기재된 바와 같은 항체 또는 폴리펩티드의 천연 글리코실화 패턴을 변경하는 단계(예를 들어, 문헌[Beck *et al.*, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:482-501 (2008)]; 및 문헌[Walsh, *Drug Discov. Today* 15:773-80 (2010)] 참조), 및 예를 들어, 미국 특허 제4,640,835호; 제4,496,689호; 제4,301,144호; 제4,670,417호; 제4,791,192호; 또는 제4,179,337호에 제시된

방식으로 다양한 비단백질성 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌 중 하나에 항체를 연결하는 단계를 포함한다. 본 개시내용의 IL-1 β 에 결합하는 항체는 또한, 반감기를 연장하고/하거나 알려진 Fc-매개 이펙터 기능을 부여하기 위해 하나 이상의 면역글로불린 불변 영역 또는 이의 부분(예를 들어, Fc)에 유전자 융합되거나 접합될 수 있다.

[0232] 본 개시내용의 IL-1 β 에 결합하는 항체는 또한, 다른 이중성 폴리펩티드 또는 아미노산 서열, 예를 들어, 에피토프 태그(예를 들어, 문헌[Terpe, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60:523-33 (2003)] 참조) 또는 IgG 분자의 Fc 영역(예를 들어, 문헌[Aruffo, *Antibody Fusion Proteins* 221-42 (Chamow and Ashkenazi eds., 1999)] 참조)에 융합된 IL-1 β 에 결합하는 항체를 포함하는 키메라 분자를 형성하도록 변형될 수 있다.

[0233] 본 개시내용의 IL-1 β 에 결합하는 항체 및 이중성 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질이 또한 본 명세서에 제공된다. 일부 실시 형태에서, 항체가 유전자 융합되거나 화학적으로 접합되는 이중성 폴리펩티드는 세포 표면-발현된 IL-1 β 를 갖는 세포에 항체를 표적화하기에 유용하다.

[0234] IL-1 β 항원에 결합하는 항체의 패널이 또한 본 명세서에 제공된다. 특이적 실시 형태에서, 항체들의 패널은 IL-1 β 항원에 대한 상이한 결합 속도, 상이한 해리 속도, 상이한 친화도, 및/또는 IL-1 β 항원에 대한 상이한 특이성을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 패널은 약 10 내지 약 1000개 이상의 항체를 포함하거나 이로 구성된다. 예를 들어, ELISA와 같은 검정을 위해, 96웰 또는 384웰 플레이트에서 항체의 패널이 사용될 수 있다.

[0235] 5.2.7. 항체를 포함하는 다른 결합 분자

[0236] 다른 태양에서 본 명세서에는, 본 명세서에 제공된 항-IL-1 β 항체를 포함하는 결합 분자가 제공된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 IL-1 β 에 대한 항체는 다른 결합 분자의 일부이다. 본 개시내용의 예시적인 결합 분자가 본 명세서에 기재된다.

[0237] 융합 단백질

[0238] 다양한 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 다른 제제, 예를 들어, 단백질-기반 물질에 유전자 융합되거나 화학적으로 접합될 수 있다. 항체는 제제에 화학적으로 접합될 수 있거나, 제제에 달리 비-공유적으로 접합될 수 있다. 제제는 펩티드 또는 항체(또는 이의 단편)일 수 있다.

[0239] 따라서, 일부 실시 형태에서 본 명세서에는, 이중성 단백질 또는 폴리펩티드에(또는 이의 단편, 예를 들어, 약 10, 약 20, 약 30, 약 40, 약 50, 약 60, 약 70, 약 80, 약 90, 약 100, 약 150, 약 200, 약 250, 약 300, 약 350, 약 400, 약 450, 또는 약 500개의 아미노산, 또는 500 개 초과 아미노산의 폴리펩티드에) 재조합적으로 융합되거나 화학적으로 접합(공유 또는 비-공유 접합)되어 융합 단백질을 생성하는 항체뿐만 아니라, 이들의 용도가 제공된다. 특히, 본 명세서에 제공된 항체의 항원 결합 단편(예를 들어, CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3) 및 이중성 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드를 포함하는 융합 단백질이 본 명세서에 제공된다.

[0240] 더욱이, 본 명세서에 제공된 항체는 정제를 용이하게 하기 위해 마커 또는 "태그" 서열, 예컨대 펩티드에 융합될 수 있다. 특이적 실시 형태에서, 마커 또는 태그 아미노산 서열은 헥사-히스티딘 펩티드, 헤마글루티닌 ("HA") 태그, 및 "FLAG" 태그이다.

[0241] 항체에 모이어티(폴리펩티드를 포함함)를 융합시키거나 접합시키는 방법이 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Arnon et al., *Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy*, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* 243-56 (Reisfeld et al. eds., 1985)]; 문헌[Hellstrom et al., *Antibodies for Drug Delivery*, in *Controlled Drug Delivery* 623-53 (Robinson et al. eds., 2d ed. 1987)]; 문헌[Thorpe, *Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review*, in *Monoclonal Antibodies: Biological and Clinical Applications* 475-506 (Pinchera et al. eds., 1985)]; 문헌[Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy, in *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy* 303-16 (Baldwin et al. eds., 1985)]; 문헌[Thorpe et al., *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982)]; 미국 특허 제5,336,603호; 제5,622,929호; 제5,359,046호; 제5,349,053호; 제5,447,851호; 제5,723,125호; 제5,783,181호; 제5,908,626호; 제5,844,095호; 및 제5,112,946호; 제EP 307,434호; 제EP 367,166호; 제EP 394,827호; PCT 공개 WO 91/06570호, WO 96/04388호, WO 96/22024호, WO 97/34631호, 및 WO 99/04813호; 문헌[Ashkenazi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 10535-39 (1991)]; 문헌[Traunecker et al., *Nature*, 331:84-86 (1988)]; 문헌[Zheng et al., *J. Immunol.* 154:5590-600 (1995)]; 및 문헌[Vil et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11337-41 (1992)]

참조).

- [0242] 융합 단백질은, 예를 들어 유전자-서플링, 모티프-서플링, 엑손-서플링, 및/또는 코돈-서플링(총칭하여 "DNA 서플링"으로 지칭됨)의 기법을 통해 생성될 수 있다. 예를 들어, 더 높은 친화도 및 더 낮은 해리 속도를 갖는 항체를 포함하는, 본 명세서에 제공된 바와 같은 항체의 활성을 변경하기 위해 DNA 서플링이 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,605,793호; 제5,811,238호; 제5,830,721호; 제5,834,252호; 및 제5,837,458호; 문헌[Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33 (1997)]; 문헌[Harayama, Trends Biotechnol. 16(2):76-82 (1998)]; 문헌[Hansson et al., J. Mol. Biol. 287:265-76 (1999)]; 및 문헌[Lorenzo and Blasco, Biotechniques 24(2):308-13 (1998)] 참조). 항체, 또는 인코딩된 항체는 재조합 전에 오류-유발(error-prone) PCR, 무작위 뉴클레오타이드 삽입, 또는 다른 방법에 의한 무작위 돌연변이생성을 적용함으로써 변경될 수 있다. 본 명세서에 제공된 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 이중성 분자의 하나 이상의 성분, 모티프, 섹션, 부분, 도메인, 단편 등과 재조합될 수 있다.
- [0243] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 제2 항체에 접합되어 항체 이중접합체를 형성한다.
- [0244] 다양한 실시 형태에서, 항체는 제제에 유전자 융합된다. 유전자 융합은 항체와 제제 사이에 링커(예를 들어, 폴리펩티드)를 배치함으로써 달성될 수 있다. 링커는 가요성 링커일 수 있다.
- [0245] 다양한 실시 형태에서, 항체를 치료 분자에 연결하는 힌지 영역으로, 항체를 치료 분자에 유전자 접합시킨다.
- [0246] 본 명세서에 제공된 다양한 융합 단백질의 제조 방법이 또한 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 제공된 융합 단백질을 제조하기 위해 섹션 5.4에 기재된 다양한 방법이 또한 이용될 수 있다.
- [0247] 특이적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 융합 단백질은 재조합적으로 발현된다. 본 명세서에 제공된 융합 단백질의 재조합 발현은 단백질 또는 이의 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 발현 벡터의 작제를 필요로 할 수 있다. 일단 본 명세서에 제공된 단백질 또는 이의 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 얻어졌으면, 분자의 생성을 위한 벡터가 당업계에 잘 알려진 기술을 사용하는 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있다. 따라서, 인코딩 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시킴으로써 단백질을 제조하는 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 당업자에게 잘 알려진 방법을 사용하여 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 제어 신호를 함유하는 발현 벡터를 작제할 수 있다. 이들 방법은, 예를 들어 시험관내 재조합 DNA 기법, 합성 기법, 및 생체내 유전자 재조합을 포함한다. 프로모터에 작동가능하게 연결된, 본 명세서에 제공된 융합 단백질 또는 이의 단편 또는 CDR을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 복제가능한 벡터가 또한 제공된다.
- [0248] 발현 벡터는 관용적인 기술에 의해 숙주 세포로 전달될 수 있고, 이어서 형질감염된 세포는 관용적인 기술에 의해 배양되어 본 명세서에 제공된 융합 단백질을 생성한다. 따라서, 이중성 프로모터에 작동가능하게 연결된 본 명세서에 제공된 융합 단백질 또는 이의 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 숙주 세포가 또한 본 명세서에 제공된다.
- [0249] 본 명세서에 제공된 융합 단백질을 발현시키기 위해 다양한 숙주-발현 벡터 시스템이 이용될 수 있다. 그러한 숙주-발현 시스템은 관심 코딩 서열이 생산되고 후속적으로 정제될 수 있는 비히클을 나타내지만, 또한 적절한 뉴클레오타이드 코딩 서열로 형질전환되거나 형질감염될 경우에 본 명세서에 제공된 융합 단백질을 원위치에서 발현할 수 있는 세포를 나타낸다. 이들은 코딩 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA, 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아(예를 들어, E. 콜라이(*E. coli*) 및 B. 서브틸리스(*B. subtilis*))와 같은 미생물; 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모(예를 들어, 사카로마이세스 피키아(*Saccharomyces Pichia*)); 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 바쿨로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV, 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염되거나 코딩 서열을 함유하는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 포유류 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유류 바이러스로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 함유하는 재조합 발현 작제물을 보유하는 포유류 세포 시스템(예를 들어, COS, CHO, BHK, 293, NS0, 및 3T3 세포)을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 특히 전체 재조합 항체 분자의 발현을 위한, 진핵 세포, 또는, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)와 같은 박테리아 세포가 재조합 융합 단백질의 발현에 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간 사이토메갈로바이러스로부터의 주요 중간 초기 유전자 프로모터 요소와 같은 벡터와 함께, 중국 햄스터 난소 세포(CHO)와 같은 포유동물 세포는 항체 또는 이의 변이체를 위한 효과적인 발현 시스템이다. 특이적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 융합 단백질을 인코딩하는

뉴클레오타이드 서열의 발현은 구성적 프로모터, 유도성 프로모터, 또는 조직 특이적 프로모터에 의해 조절된다.

[0250] 박테리아 시스템에서, 발현되는 융합 단백질에 대해 의도된 용도에 따라 다수의 발현 벡터가 유리하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질의 약제학적 조성물의 생성을 위해, 다량의 그러한 융합 단백질이 생성되어야 하는 경우, 용이하게 정제되는 융합 단백질 생성물의 고수준의 발현을 유도하는 벡터가 바람직할 수 있다. 그러한 벡터는, 융합 단백질이 생성되도록 코딩 서열이 lac Z 코딩 영역과 인 프레임(in frame)으로 벡터 내에 개별적으로 라이게이션될 수 있는, E. 콜라이 발현 벡터 pUR278(문헌[Ruther *et al.*, EMBO 12:1791 (1983)]); pIN 벡터(문헌[Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985)]; 문헌[Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)]) 등을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 글루타티온 5-트랜스페라제(GST)와의 융합 단백질로서 외래 폴리펩티드를 발현시키기 위해 pGEX 벡터가 또한 사용될 수 있다. 일반적으로, 그러한 융합 단백질은 가용성이고, 용해된 세포로부터 매트릭스 글루타티온 아가로스 비드에 대한 흡착 및 결합에 이어서 유리 글루타티온의 존재 하의 용리에 의해 용이하게 정제될 수 있다. pGEX 벡터는 클로닝된 표적 유전자 생성물이 GST 모이어티로부터 방출될 수 있도록 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 설계된다.

[0251] 포유류 숙주 세포에서는, 다수의 바이러스-기반 발현 시스템이 이용될 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용되는 경우, 관심 코딩 서열은 아데노바이러스 전사/번역 제어 복합체, 예를 들어, 후기 프로모터 및 삼부 리더 서열에 라이게이션될 수 있다. 이어서, 이러한 키메라 유전자는 시험관내 또는 생체내 재조합에 의해 아데노바이러스 게놈에 삽입될 수 있다. 바이러스 게놈의 비-필수 영역(예를 들어, 영역 E1 또는 E3)에서의 삽입은 생존가능하고 감염된 숙주에서 융합 단백질을 발현할 수 있는 재조합 바이러스를 유발할 것이다(예를 들어, 문헌[Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984)] 참조). 삽입된 코딩 서열의 효율적인 번역을 위해 특이적 개시 신호가 또한 필요할 수 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접 서열을 포함한다. 또한, 개시 코돈은 전체 삽입물의 번역을 보장하기 위해 소기의 코딩 서열의 판독 프레임과 동상이어야 한다. 이들 외인성 번역 제어 신호 및 개시 코돈은 천연 및 합성 둘 모두의 다양한 기원의 것일 수 있다. 적절한 전사 인핸서 요소, 전사 종결자 등의 포함에 의해 발현 효율이 향상될 수 있다(예를 들어, 문헌[Bittner *et al.*, Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987)] 참조).

[0252] 또한, 삽입된 서열의 발현을 조절하거나, 원하는 특이적 방식으로 유전자 생성물을 변형시키고 가공하는 숙주 세포 군주가 선택될 수 있다. 단백질 생성물의 그러한 변형(예를 들어, 글리코실화) 및 가공(예를 들어, 절단)은 단백질의 기능에 중요할 수 있다. 상이한 숙주 세포들은 단백질 및 유전자 산물의 번역후 가공 및 변형을 위한 특징적이고 특이적인 기전을 갖는다. 발현되는 외래 단백질의 올바른 변형 및 가공을 보장하도록 적절한 세포주 또는 숙주 시스템이 선택될 수 있다. 이 목적을 위해, 유전자 생성물의 1차 전사체, 글리코실화, 및 인산화의 적절한 가공을 위한 세포성 기구를 보유하는 진핵 숙주 세포가 사용될 수 있다. 그러한 포유류 숙주 세포는 CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, NS0(내인성으로 임의의 면역글로불린 사슬을 생성하지 않는 무린 골수종 세포주), CRL7030 및 HsS78Bst 세포를 포함하지만 이로 한정되지 않는다.

[0253] 재조합 단백질의 장기 고수율 생성을 위해, 안정한 발현이 이용될 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질을 안정적으로 발현하는 세포주가 조작될 수 있다. 바이러스 복제 기점을 함유하는 발현 벡터를 사용하기보다는, 적절한 발현 조절 요소(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위 등)에 의해 제어되는 DNA 및 선택가능한 마커로 숙주 세포를 형질전환할 수 있다. 외래 DNA의 도입 이후, 조작된 세포를 풍부화된 배지(enriched media) 중에서 1 내지 2일 동안 성장되게 할 수 있으며, 이어서 선택 배지로 교체한다. 재조합 플라스미드 내의 선택가능한 마커는 선택에 대한 저항성을 부여하고, 세포가 플라스미드를 이들의 염색체 내로 안정적으로 통합하고 성장하여 증식소(foci)를 형성하는 것을 가능하게 하며, 이는 결국 클로닝되고 세포주로 확장될 수 있다. 이러한 방법은 융합 단백질을 발현하는 세포주를 조작하기 위해 유리하게 사용될 수 있다. 그러한 조작된 세포주는 결합 분자와 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하는 조성물의 스크리닝 및 평가에 특히 유용할 수 있다.

[0254] 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제(문헌[Wigler *et al.*, Cell 11:223 (1977)]), 하이포잔틴구아닌 포스포리보실 트랜스페라제(문헌[Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)]), 및 아데닌 포스포리보실 트랜스페라제(문헌[Lowy *et al.*, Cell 22:8-17 (1980)]) 유전자를 포함하지만 이로 제한되지 않는 다수의 선택 시스템이 각각 tk-, hgpri-, 또는 apri-세포에 사용될 수 있다. 또한, 하기 유전자에 대한 선택의 기반으로서 대사길항물질 저항성이 사용될 수 있다: 메토폭레사이트에 대한 저항성을 부여하는 *dhfr*(문헌[Wigler *et al.*, Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980)]; 문헌[O'Hare *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA

78:1527 (1981)); 마이코페놀산에 대한 저항성을 부여하는 *gpt*(문헌[Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)]; 아미노글리코시드 G-418에 대한 저항성을 부여하는 *neo*(문헌[Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991)]; 문헌[Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993)]; 문헌[Mulligan, Science 260:926-932 (1993)]; 및 문헌[Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993)]; 문헌[May, TIB TECH 11(5):155-2 15 (1993)]; 및 하이그로마이신에 대한 저항성을 부여하는 *hygro*(문헌[Santerre *et al.*, Gene 30:147 (1984)]). 원하는 재조합 클론을 선택하기 위해 재조합 DNA 기술의 당업계에서 통상적으로 알려진 방법이 일상적으로 적용될 수 있으며, 그러한 방법은, 예를 들어, 문헌[Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993)]; 문헌[Kriegler, *Gene Transfer and Expression*, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)]; 및 문헌[Chapters 12 and 13, Dracopoli *et al.* (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994)]; 문헌[Colberre-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol. 150:1 (1981)]에 기재되어 있고, 이들은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0255] 융합 단백질의 발현 수준은 벡터 증폭에 의해 증가될 수 있다(검토를 위해, 문헌[Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)] 참조). 융합 단백질을 발현하는 벡터 시스템에서 마커가 증폭가능한 경우, 숙주 세포의 배양물 내에 존재하는 억제제의 수준의 증가는 마커 유전자의 카피 수를 증가시킬 것이다. 증폭되는 영역은 융합 단백질 유전자와 관련되므로, 융합 단백질의 생성이 또한 증가할 것이다(문헌[Crouse *et al.*, Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983)]).

[0256] 숙주 세포는 본 명세서에 제공된 다중 발현 벡터로 공동-형질감염될 수 있다. 벡터는 각각의 인코딩 폴리펩티드의 동일한 발현을 가능하게 하는 동일한 선택가능한 마커를 함유할 수 있다. 대안적으로, 다중 폴리펩티드를 인코딩하고 발현시킬 수 있는 단일 벡터가 사용될 수 있다. 코딩 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA를 포함할 수 있다.

[0257] 일단 본 명세서에 제공된 융합 단백질이 재조합 발현에 의해 생성되었으면, 폴리펩티드(예를 들어, 면역글로불린 분자)의 정제에 대해 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해, 예를 들어, 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환, 친화도(특히 단백질 A 후에 특이적 항원에 대한 친화도에 의함), 크기결정 컬럼 크로마토그래피, 및 카파 선택 친화도 크로마토그래피), 원심분리, 차등 용해도에 의해, 또는 단백질의 정제에 대한 임의의 다른 표준 기법에 의해 그것을 정제할 수 있다. 또한, 정제를 용이하게 하기 위해 본 명세서에 제공된 융합 단백질 분자는 본 명세서에 기재되거나 당업계에 달리 알려진 이중성 폴리펩티드 서열에 융합될 수 있다.

[0258] 면역접합체

[0259] 일부 실시 형태에서 본 개시내용은, 하나 이상의 세포독성제, 예컨대 화학요법제 또는 약물, 성장 억제제, 독소(예를 들어, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물, 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소, 또는 이의 단편), 또는 방사성 동위원소에 접합된 본 명세서에 기재된 항-IL-1 β 항체 중 임의의 것을 포함하는 면역접합체를 또한 제공한다.

[0260] 일부 실시 형태에서 면역접합체는, 메이탄시노이드(미국 특허 제5,208,020호, 제5,416,064호, 및 유럽 특허 제 EP 0 425 235 B1호 참조); 모노메틸아우리스타틴 약물 모이머티 DE 및 DF(MMAE 및 MMAF)와 같은 아우리스타틴(미국 특허 제5,635,483호 및 제5,780,588호, 및 제7,498,298호 참조) 둘라스타틴; 칼리케아마아신 또는 이의 유도체(미국 특허 제5,712,374호, 제5,714,586호, 제5,739,116호, 제5,767,285호, 제5,770,701호, 제5,770,710호, 제5,773,001호, 및 제5,877,296호; 문헌[Hinman *et al.*, *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993)]; 및 문헌[Lode *et al.*, *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)] 참조); 안트라사이클린, 예컨대 다우노마이신 또는 독소루비신(예를 들어, 문헌[Kratz *et al.*, *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006)]; 문헌[Jeffrey *et al.*, *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006)]; 문헌[Torgov *et al.*, *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005)]; 문헌[Nagy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000)]; 문헌[Dubowchik *et al.*, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002)]; 문헌[King *et al.*, *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002)]; 및 미국 특허 제6,630,579호 참조); 메토티렉세이트; 빈데신; 도세탁셀, 파클리탁셀, 라로타셀, 테세탁셀, 및 오르타탁셀과 같은 타산; 트라이코테센; 및 CC1065를 포함하지만 이로 제한되지 않는 하나 이상의 약물에 항체가 접합된 항체-약물 접합체(ADC)이다.

[0261] 일부 실시 형태에서, 면역접합체는 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄(슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레

우리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질(PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오프피시날리스(*Sapaonaria officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신, 및 트라이코테센을 포함하지만 이로 제한되지 않는 효소적으로 활성인 독소 또는 이의 단편에 접합된 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체를 포함한다.

[0262] 일부 실시 형태에서, 면역접합체는 방사성 원자에 접합되어 방사성 접합체를 형성하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체를 포함한다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성 접합체의 생성에 이용가능하다. 예는 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} , 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 방사성 접합체가 검출에 사용되는 경우, 그것은 섬광조영술 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 tc99m 또는 I123, 또는 핵 자기 공명(NMR) 영상(자기 공명 영상, mri로도 알려짐)을 위한 스핀 표지, 예컨대 다시 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간, 또는 철을 포함할 수 있다.

[0263] 항체와 세포독성제의 접합체는 다양한 이중기능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-석신이미딜-3-(2-피리딜다이티오) 프로피오네이트(SPDP), 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC), 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이중기능성 유도체(예컨대 다이메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르(예컨대 다이석신이미딜 수베레이트), 알데하이드(예컨대 글루타르알데하이드), 비스-아지도 화합물(예컨대 비스(p-아지도벤조일)헥사다이아민), 비스-다이아조늄 유도체(예컨대 비스-(p-다이아조늄벤조일)-에틸렌다이아민), 다이아이스시아네이트(예컨대 톨루엔 2,6-다이아이스시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물(예컨대 1,5-다이플루오로-2,4-다이니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌[Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지 1-아이소티오시아네이트벤질-3-메틸다이에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 항체에 대한 방사성 핵종의 접합을 위한 예시적인 킬레이팅제이다. 제W094/11026호를 참조한다.

[0264] 링커는 세포에서 접합된 작용제의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있지만, 절단 불가능한 링커도 본 명세서에서 고려된다. 본 개시내용의 접합체에 사용하기 위한 링커는, 다중약물 수송체-매개 저항성을 회피하도록 설계된 산 불안정성 링커(예를 들어, 하이드라존 링커), 이황화물-함유 링커, 펩티다제-민감성 링커(예를 들어, 아미노산, 예를 들어, 발린 및/또는 시트룰린을 포함하는 펩티드 링커, 예컨대 시트룰린-발린 또는 페닐알라닌-라이신), 광불안정성 링커, 다이메틸 링커, 티오에테르 링커, 또는 친수성 링커를 제한 없이 포함한다.

[0265] 본 명세서에서 면역접합체 또는 ADC는, 구매가능한(예를 들어, 미국 일리노이주 록포드 소재의 Pierce Biotechnology, Inc.로부터) BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 설폰-EMCS, 설폰-GMBS, 설폰-KMUS, 설폰-MBS, 설폰-SIAB, 설폰-SMCC, 및 설폰-SMPB, 및 SVSB(석신이미딜-(4-비닐설폰)벤조에이트)를 포함하지만 이로 제한되지 않는 가교결합 시약으로 제조된 접합체를 고려하지만 그러한 접합체로 제한되지 않는다.

[0266] 다른 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는, 예를 들어, 진단 분자에 접합되거나 재조합적으로 융합된다. 그러한 진단 및 검출은, 예를 들어, 항체를 검출가능한 물질에 커플링함으로써 달성될 수 있으며, 이러한 검출 가능한 물질에는 하기가 포함되지만 이로 한정되지 않는다: 다양한 효소, 예컨대 제한 없이, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제; 보결기(prosthetic group), 예컨대 제한 없이, 스트렙타비딘/비오틴 또는 아비딘/비오틴; 형광 물질, 예컨대 제한 없이, 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 아이소티오시네이트, 로다민, 다이클로로트라이아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드, 또는 피코에리트린; 발광 물질, 예컨대 제한 없이, 루미놀; 생물발광 물질, 예컨대 제한 없이, 루시페라제, 루시페린, 또는 에쿼린; 225Ac γ -방출, 오거(Auger)-방출, β -방출, 알파-방출, 또는 양전자-방출 방사성 동위원소와 같은 화학발광 재료를 포함하지만 이로 제한되지 않는 검출가능한 물질에 항체를 커플링함으로써 달성될 수 있다.

[0267] 5.3. 폴리뉴클레오티드

[0268] 소정 실시 형태에서, 본 개시내용은 IL-1 β 에 결합하는 본 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 본 명세서에 기재된 IL-1 β 에 결합하는 항체를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드는 RNA의 형태 또는 DNA의 형태일 수 있다. DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 및 합성 DNA를 포함하고; 이중-가닥 또는 단일-가닥일 수 있으며, 단일 가닥인 경우에는 코딩 가닥 또는 비-코딩(안티-센스) 가닥일 수 있다. 일부 실시형태에서,

폴리뉴클레오티드는 cDNA의 형태이다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드는 합성 폴리뉴클레오티드이다.

[0269] 본 개시내용은 추가로 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오티드의 변이체에 관한 것이며, 여기서 변이체는, 예를 들어, 본 개시내용의 IL-1 β 에 결합하는 항체의 단편, 유사체, 및/또는 유도체를 인코딩한다. 소정 실시 형태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 IL-1 β 에 결합하는 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드와 약 75% 이상 동일한, 약 80% 이상 동일한, 약 85% 이상 동일한, 약 90% 이상 동일한, 약 95% 이상 동일한, 그리고 일부 실시 형태에서는 약 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 어구 "예를 들어, 참조 뉴클레오티드 서열과 95% 이상 "동일한" 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드"는 폴리뉴클레오티드 서열이 참조 뉴클레오티드 서열의 각각의 100개 뉴클레오티드당 최대 5개의 점 돌연변이를 포함할 수 있다는 점을 제외하고는, 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열이 참조 서열과 동일함을 의미하도록 의도된다. 다시 말해서, 참조 뉴클레오티드 서열과 적어도 95% 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 얻기 위해, 참조 서열 내의 뉴클레오티드의 최대 5%가 결실되거나 다른 뉴클레오티드로 치환될 수 있거나, 참조 서열 내의 총 뉴클레오티드의 최대 5%의 뉴클레오티드 개수가 참조 서열 내로 삽입될 수 있다. 참조 서열의 이들 돌연변이는 참조 뉴클레오티드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치 또는 그러한 말단 위치들 사이의 임의의 곳에서 발생할 수 있으며, 참조 서열 내의 뉴클레오티드 사이에 개별적으로, 또는 참조 서열 내의 하나 이상의 인접한 군 내에서 산재된다.

[0270] 폴리뉴클레오티드 변이체는 코딩 영역, 비-코딩 영역, 또는 둘 모두의 변경을 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드 변이체는 침묵 치환, 부가, 또는 결실을 생성하지만, 인코딩된 폴리펩티드의 특성 또는 활성을 변경하지 않는 변경을 함유한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드 변이체는 (유전자 코드의 축퇴로 인해) 폴리펩티드의 아미노산 서열에 변화를 가져오지 않는 침묵 치환을 포함한다. 폴리뉴클레오티드 변이체는 다양한 이유로, 예를 들어, 특정 숙주에 대한 코돈 발현을 최적화하기 위해 생성될 수 있다(즉, 인간 mRNA에서의 코돈을 E. 콜라이와 같은 세균 숙주에 의해 선호되는 것들로 변화시킴). 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드 변이체는 서열의 비-코딩 또는 코딩 영역 내에 하나 이상의 침묵 돌연변이를 포함한다.

[0271] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드 변이체는 인코딩된 폴리펩티드의 발현(또는 발현 수준)을 조절하거나 변경시키기 위해 생성된다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드 변이체는 인코딩된 폴리펩티드의 발현을 증가시키기 위해 생성된다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드 변이체는 인코딩된 폴리펩티드의 발현을 감소시키기 위해 생성된다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드 변이체는 모 폴리뉴클레오티드 서열과 대비하여 인코딩된 폴리펩티드의 발현을 증가시켰다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드 변이체는 모 폴리뉴클레오티드 서열과 대비하여 인코딩된 폴리펩티드의 발현을 감소시켰다.

[0272] 본 명세서에 기재된 핵산 분자를 포함하는 벡터가 또한 제공된다. 일 실시 형태에서, 핵산 분자는 재조합 발현 벡터 내로 도입될 수 있다. 본 개시내용은 본 개시내용의 핵산 중 임의의 것을 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "재조합 발현 벡터"는 유전자 변형된 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 작제물을 의미하는 것으로서, 이러한 작제물이 mRNA, 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 이러한 벡터가 숙주 세포 내에서 발현되는 mRNA, 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드를 갖기에 충분한 조건 하에서 숙주 세포와 접촉될 때, 숙주 세포에 의한 mRNA, 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드의 발현을 가능하게 한다. 본 명세서에 기재된 벡터는 전체로서 천연 발생하지 않지만; 벡터의 부분은 천연 발생할 수 있다. 기재된 재조합 발현 벡터는 DNA 및 RNA를 포함하지만 이로 한정되지 않는 임의의 유형의 뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 이는 단일 가닥 또는 이중 가닥이거나, 합성되거나, 천연 공급원으로부터 부분적으로 획득될 수 있고, 천연, 비천연 또는 변경된 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 재조합 발현 벡터는 천연 발생 또는 천연 비발생 뉴클레오티드간 결합, 또는 두 결합 유형 모두를 포함할 수 있다. 비자연 발생 또는 변경된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드간 결합은 벡터의 전사 또는 복제를 방해하지 않는다.

[0273] 일 실시 형태에서, 본 개시내용의 재조합 발현 벡터는 임의의 적합한 재조합 발현 벡터일 수 있으며, 임의의 적합한 숙주를 형질전환시키거나 형질감염시키기 위해 사용될 수 있다. 적합한 벡터는 전파 및 증폭을 위해 또는 발현을 위해 또는 둘 모두를 위해 설계된 것들, 예컨대 플라스미드 및 바이러스를 포함한다. 벡터는 pUC 시리즈(미국 메릴랜드주 글렌 버니 소재의 Fermentas Life Sciences), pBluescript 시리즈(미국 캘리포니아주 라줄라 소재의 Stratagene), pET 시리즈(미국 위스콘신주 매디슨 소재의 Novagen), pGEX 시리즈(스웨덴 웁살라 소재의 Pharmacia Biotech), 및 pEX 시리즈(미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재의 Clontech)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 박테리오파지 벡터, 예컨대 λ GT10, λ GT11, λ EMBL4, 및 λ NM1149, λ ZapII(Stratagene)가 사용될 수 있다. 식물 발현 벡터의 예에는 pBI01, pBI01.2, pBI121, pBI101.3, 및 pBIN19(Clontech)가 포함된다. 동물 발현 벡터의 예에는 pEUK-C1, pMAM, 및 pMAMneo(Clontech)가 포함된다. 재조합 발현 벡터는 바이러

스 벡터, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터, 예를 들어, 감마 레트로바이러스 벡터일 수 있다.

[0274] 일 실시 형태에서, 재조합 발현 벡터는, 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., 상기 문헌], 및 문헌[Ausubel et al., 상기 문헌]에 기재된 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조된다. 원형 또는 선형인 발현 벡터의 작제물은 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포에서 기능적인 복제 시스템을 함유하도록 제조될 수 있다. 복제 시스템은 예를 들어, ColE1, SV40, 2 μ 플라스미드, λ , 소 유두종 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다.

[0275] 재조합 발현 벡터는, 적절한 경우에, 그리고 벡터가 DNA- 또는 RNA-기반인지의 여부를 고려하여, 벡터가 도입될 숙주(예를 들어, 박테리아, 식물, 진균, 또는 동물)의 유형에 특이적인 조절 서열, 예컨대 전사 및 번역 개시 및 종결 코돈을 포함할 수 있다.

[0276] 재조합 발현 벡터는 형질전환된 또는 형질감염된 숙주의 선택을 가능하게 하는 하나 이상의 마커 유전자를 포함할 수 있다. 마커 유전자는 살생물제 저항성, 예를 들어, 항생제, 중금속 등에 대한 저항성, 영양요구성 숙주에서 원영양성을 제공하기 위한 상보성 등을 포함한다. 기재된 발현 벡터에 적합한 마커 유전자는, 예를 들어 네오마이신/G418 저항성 유전자, 히스티딘올 x 저항성 유전자, 히스티딘올 저항성 유전자, 테트라사이클린 저항성 유전자, 및 암피실린 저항성 유전자를 포함한다.

[0277] 재조합 발현 벡터는 본 개시내용의 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 천연 또는 정규 프로모터를 포함할 수 있다. 예를 들어, 강한, 약한, 조직-특이적, 유도성, 및 발생-특이적 프로모터의 선택은 당업자의 통상적 기술 내에 속한다. 유사하게, 뉴클레오티드 서열을 프로모터와 조합하는 것이 또한 당업자의 기술 내에 있다. 프로모터는 비-바이러스 프로모터 또는 바이러스 프로모터, 예를 들어, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, RSV 프로모터, SV40 프로모터, 또는 뮤린 줄기 세포 바이러스의 긴 말단 반복부에서 발견되는 프로모터일 수 있다.

[0278] 재조합 발현 벡터는 일시적 발현을 위해, 안정한 발현을 위해, 또는 둘 모두를 위해 설계될 수 있다. 또한, 재조합 발현 벡터는 구성적 발현을 위해 또는 유도성 발현을 위해 제조될 수 있다.

[0279] 또한, 재조합 발현 벡터는 자살 유전자를 포함하도록 제조될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "자살 유전자"는 자살 유전자를 발현하는 세포가 죽게 하는 유전자를 지칭한다. 자살 유전자는, 유전자가 발현되는 세포 상에서 제제, 예를 들어, 약물에 대한 감수성을 부여하고, 세포가 제제와 접촉되거나 제제에 노출될 경우에 세포의 사멸을 야기하는 유전자일 수 있다. 자살 유전자는 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 티미딘 키나제(TK) 유전자, 시토신 데아미나제, 푸린 뉴클레오시드 포스포릴라제, 및 니트로리덕타제를 포함한다.

[0280] 소정 실시 형태에서, 폴리뉴클레오티드는 단리된 형태이다. 소정 실시 형태에서, 폴리뉴클레오티드는 실질적으로 순수하다.

[0281] 본 명세서에 기재된 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포가 또한 제공된다. 숙주 세포는 이중 핵산을 함유하는 임의의 세포일 수 있다. 이중성 핵산은 벡터(예를 들어, 발현 벡터)일 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포는 그 세포에 의한 물질의 생성, 예를 들어 그 세포에 의한 유전자, DNA 또는 RNA 서열, 단백질 또는 효소의 발현을 위하여 임의의 방식으로 선택되거나, 변형되거나, 형질전환되거나, 성장되거나, 사용되거나, 조작된 임의의 유기체로부터의 세포일 수 있다. 적절한 숙주가 결정될 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포는 벡터 골격 및 원하는 결과에 기초하여 선택될 수 있다. 예로서, 플라스미드 또는 코스미드가 몇몇 유형의 벡터의 복제를 위하여 원핵 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. DH5 α , JM109, 및 KCB, SURE $\circledR$ 컴피턴트 세포, 및 SOLOPACK 골드 세포와 같은 그러나 이로 한정되지 않는 세균 세포가 벡터 복제 및/또는 발현을 위한 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 추가적으로, 세균 세포, 예컨대 E. 콜라이(*E. coli*) LE392가 파지 바이러스를 위한 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 숙주 세포로서 사용될 수 있는 진핵 세포는 효모(예를 들어, YPH499, YPH500, 및 YPH501), 곤충, 및 포유동물을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 벡터의 복제 및/또는 발현을 위한 포유류 진핵생물 숙주 세포의 예에는 HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, COS, Saos, PC12, SP2/0(미국 버지니아주 머내서스 소재의 ATCC(American Type Culture Collection), CRL-1581), NS0(영국 윌트셔주 솔즈베리 소재의 ECACC(European Collection of Cell Cultures), ECACC No. 85110503), FO(ATCC CRL-1646) 및 Ag653(ATCC CRL-1580) 뮤린 세포주가 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 예시적인 인간 골수종 세포주는 U266(ATCC CRL-TIB-196)이다. 다른 유용한 세포주는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 예를 들어 CHO-K1SV(미국 메릴랜드주 위커스빌 소재의 Lonza Biologics), CHO-K1(ATCC CRL-61) 또는 DG44로부터 유래되는 것들을 포함한다.

[0282] 5.4. 항체의 제조 및 제조 방법

- [0283] 항체를 제조하는 방법이 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌[Els Pardon et al, *Nature Protocol*, 9(3): 674 (2014)]을 참조한다. 당업계에 알려진 방법을 사용하여, 예컨대 낙타과 종(예컨대 낙타 또는 라마)을 면역화하고 이로부터 하이브리도마를 수득함으로써, 또는 당업계에 알려진 분자 생물학 기술을 사용하여 항체의 라이브러리를 클로닝하고, 이어서 선택되지 않은 라이브러리의 개별 클론을 이용하는 ELISA에 의하거나 파지 디스플레이의 사용에 의해 선택함으로써 항체(예컨대 scFv 단편)가 수득될 수 있다.
- [0284] 본 명세서에 제공된 항체는 항체-인코딩 핵산을 함유하는 벡터로 형질전환되거나 형질감염된 세포를 배양함으로써 생성될 수 있다. 본 개시내용의 항체의 폴리펩티드 성분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 표준 재조합 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 하이브리도마 세포 또는 B 세포와 같은 항체 생성 세포로부터 원하는 폴리뉴클레오티드 서열이 단리되고 서열분석될 수 있다. 대안적으로, 뉴클레오티드 합성기 또는 PCR 기술을 사용하여 폴리뉴클레오티드를 합성할 수 있다. 일단 얻어지면, 숙주 세포에서 이중성 폴리뉴클레오티드를 복제하고 발현할 수 있는 재조합 벡터 내로 폴리펩티드를 인코딩하는 서열을 삽입한다. 이용가능하고 당업계에 알려진 다수의 벡터가 본 개시내용의 목적을 위해 사용될 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 주로 벡터 내로 삽입될 핵산의 크기 및 벡터로 형질전환될 특정 숙주 세포에 의존할 것이다. 본 개시내용의 항체를 발현하기에 적합한 숙주 세포는 그람-음성 또는 그람 양성 유기체를 포함하는 고세균 및 진정세균과 같은 원핵생물, 사상 진균 또는 효모와 같은 진핵 미생물, 곤충 또는 식물 세포와 같은 무척추동물 세포, 및 포유류 숙주 세포주와 같은 척추동물 세포를 포함한다. 숙주 세포는 상기-기재된 발현 벡터로 형질전환되고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 원하는 서열을 인코딩하는 유전자를 증폭하기 위해 적절한 바와 같이 변형된 관용적인 영양 배지 중에 배양된다. 숙주 세포에 의해 생성된 항체는 당업계에 알려진 바와 같이 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 정제된다.
- [0285] 벡터 작제, 발현, 및 정제를 포함하는 항체 생성을 위한 방법은, 문헌[Plückthun et al., *Antibody Engineering: Producing antibodies in Escherichia coli: From PCR to fermentation* 203-52 (McCafferty et al. eds., 1996)]; 문헌[Kwong and Rader, *E. coli Expression and Purification of Fab Antibody Fragments*, in *Current Protocols in Protein Science* (2009)]; 문헌[Tachibana and Takekoshi, *Production of Antibody Fab Fragments in Escherichia coli*, in *Antibody Expression and Production* (Al-Rubeai ed., 2011)]; 및 문헌[*Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic* (An ed., 2009)]에 추가로 기재되어 있다.
- [0286] 물론, 당업계에 잘 알려진 대안적인 방법이 항-IL-1 β 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있음이 고려된다. 예를 들어, 적절한 아미노산 서열 또는 이의 일부는 고체상 기법을 사용하는 직접 펩티드 합성에 의해 생성될 수 있다(예를 들어, 문헌[Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis* (1969)]; 및 문헌[Merrifield, J. *Am. Chem. Soc.* 85:2149-54 (1963)] 참조). 시험관내 단백질 합성은 수동 기술을 사용하거나 자동화에 의해 수행될 수 있다. 항-IL-1 β 항체의 다양한 부분을 별도로 화학적으로 합성하고 화학적 또는 효소적 방법을 사용하여 조합하여 원하는 항-IL-1 β 항체를 생성할 수 있다. 대안적으로, 항체는 예를 들어, 미국 특허 제5,545,807호 및 제5,827,690호에 개시된 바와 같이, 항체를 발현하도록 조작된 유전자이식 동물의 세포 또는 체액, 예컨대 유즙으로부터 정제될 수 있다.
- [0287] **다클론 항체**
- [0288] 다클론 항체는 일반적으로 동물에서 관련 항원 및 애주번트의 다중 피하(sc) 또는 복강내(ip) 주사에 의해 발생한다. 이중기능성 또는 유도체화 제제, 예를 들어, 말레이미도벤조일 설포석신이미드 에스테르(시스테인 잔기를 통한 접합), N-하이드록시석신이미드(라이신 잔기를 통한 접합), 글루타르알데하이드, 석신산 무수물, SOCl_2 , 또는 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (여기서 R 및 R^1 은 독립적으로 저급 알킬 기임)을 사용하여, 면역화될 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들어, 키홀 림프 헤모시아닌(KLH), 혈청 알부민, 소 티로글로불린, 또는 대두 트립신 억제제에 관련 항원을 접합시키는 것이 유용할 수 있다. 사용될 수 있는 애주번트의 예는 프로인트 완전 애주번트 및 MPL-TDM 애주번트(모노포스포릴 지질 A, 합성 트레할로스 다이코리노마이콜레이트)를 포함한다. 면역화 프로토콜은 부당한 실험 없이 당업자에 의해 선택될 수 있다.
- [0289] 예를 들어, 동물은, 예를 들어, 100 μg 또는 5 μg 의 단백질 또는 접합체(각각 토끼 또는 마우스에 대해)를 3 부피의 프로인트 완전 애주번트와 조합하고 용액을 다중 부위에서 피내 주사함으로써 항원, 면역원성 접합체, 또는 유도체에 대해 면역화된다. 1 개월 후에, 다중 부위에서 피하 주사에 의해 프로인트 완전 애주번트 중의 펩티드 또는 접합체의 원래 양의 1/5 내지 1/10로 동물을 부스팅한다. 7 내지 14 일 후에, 동물을 채혈하고 항

체 역가에 대해 혈청을 검정한다. 역가 평탄역까지 동물을 부스팅한다. 접합체는 또한 단백질 융합체로서 제조할 세포 배양에서 제조될 수 있다. 또한, 명반과 같은 응집제는 면역 반응을 향상시키기에 적합하다.

[0290] 단일클론 항체

[0291] 단일클론 항체는 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 획득되며, 즉, 집단을 구성하는 개별 항체는 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이 및/또는 번역-후 변형(예를 들어, 이성체화, 아미드화)을 제외하고는 동일하다. 따라서, 수식어 "단일클론"은 별개의 항체의 혼합물이 아닌 것으로 항체의 특징을 나타낸다.

[0292] 예를 들어, 단일클론 항체는 문헌[Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975)]에 의해 최초로 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조될 수 있거나, 제조할 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호)에 의해 제조될 수 있다.

[0293] 하이브리도마 방법에서는, 적절한 숙주 동물을 면역화하여 면역화에 사용되는 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생성하거나 생성할 수 있는 림프구를 유도한다. 대안적으로, 림프구는 시험관내에서 면역화될 수 있다. 이어서, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 융합제를 사용하여 림프구를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성한다(문헌[Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]).

[0294] 면역화제는 전형적으로 항원성 단백질 또는 이의 융합 변이체를 포함할 것이다. 문헌[Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59-103]. 불멸화 세포주는 통상적으로 형질전환된 포유동물 세포이다. 그렇게 제조된 하이브리도마 세포를, 바람직하게는 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지 중에 시딩하고 성장시킨다. 바람직한 불멸화 골수종 세포는, 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생성 세포에 의한 항체의 안정적인 고수준 생성을 지원하고, HAT 배지와 같은 배지에 민감한 것들이다.

[0295] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 항원에 대해 유도된 단일클론 항체의 생성에 대해 검정한다. 하이브리도마 세포가 배양되는 배양 배지를 원하는 항원에 대해 지향된 단일클론 항체의 존재에 대해 검정할 수 있다. 그러한 기법 및 검정은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 결합 친화도는 문헌[Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)]의 스캐차드(Scatchard) 분석에 의해 결정될 수 있다.

[0296] 원하는 특이성, 친화도, 및/또는 활성의 항체를 생성하는 하이브리도마 세포가 확인된 후에, 제한 희석 절차에 의해 클론을 서브클로닝하고 표준 방법(문헌[Goding, 상기 문헌])에 의해 성장시킬 수 있다. 이러한 목적에 적합한 배양 배지는, 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 포유동물에서 종양으로서 하이브리도마 세포를 생체내에서 성장시킬 수 있다.

[0297] 서브클론에 의해 분리된 단일클론 항체는, 예를 들어, 단백질 A-세파로스, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화도 크로마토그래피와 같은 통상적인 면역글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지, 복수 유체, 또는 혈청으로부터 적합하게 분리된다.

[0298] 단일클론 항체는 또한 제조할 DNA 방법, 예컨대 미국 특허 제4,816,567호에 기재되고 상기 기재된 바와 같은 것들에 의해 제조될 수 있다. 단일클론 항체를 인코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여(예를 들어, 무린 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리되고 서열분석된다. 하이브리도마 세포는 그러한 DNA의 바람직한 공급원으로서의 역할을 한다. 일단 단리되면, DNA를 발현 벡터에 넣을 수 있으며, 이어서 이는, 달리 면역글로불린 단백질을 생성하지 않는 숙주 세포, 예컨대 E. 콜라이 세포, 유인원 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 골수종 세포 내로 형질감염되어 그러한 제조할 숙주 세포에서 단일클론 항체를 합성한다. 항체를 인코딩하는 DNA의 박테리아 내에서의 제조할 발현에 대한 검토 논문은 문헌[Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993)] 및 문헌[Plickthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992)]을 포함한다.

[0299] 추가의 실시 형태에서, 항체는 문헌[McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990)], 문헌[Claackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991)], 및 문헌[Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]에 기재된 기법을 사용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 후속 간행물은 사슬 셔플링에 의한 고친화도(nM 범위) 인간 항체의 생성(문헌[Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)])뿐만 아니라 매우 큰 파지 라이브러리를 작제하기 위한 전략으로서 조합 감염 및 생체내 제조할(문헌[Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)])을 기재한다. 따라서, 이러한 기법은 단일클론 항체의 단리를 위한 전통적인 단일클론 항체 하이브리도마 기법에 대한 실행가능한 대안이다.

- [0300] 예를 들어, 코딩 서열을 치환함으로써(미국 특허 제4,816,567호; 문헌[Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)]), 또는 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 코딩 서열에 공유적으로 결합함으로써, DNA를 또한 변형시킬 수 있다. 항원에 대한 특이성을 갖는 하나의 항원-결합 부위 및 상이한 항원에 대한 특이성을 갖는 다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 2가 항체를 생성하도록 그러한 비-면역글로불린 폴리펩티드가 치환될 수 있다.
- [0301] 키메라 또는 하이브리드 항체는 또한, 가교결합제를 수반하는 것들을 포함하는, 합성 단백질 화학에서 알려진 방법을 사용하여 시험관내에서 제조될 수 있다. 예를 들어, 면역독소는 이황화물-교환 반응을 사용하거나 티오에테르 결합을 형성함으로써 작제될 수 있다. 이러한 목적을 위한 적합한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-4-메르캅토티리미데이트를 포함한다.
- [0302] **원핵 세포에서의 재조합체 생성**
- [0303] 본 개시내용의 항체를 인코딩하는 폴리핵산 서열은 표준 재조합 기법을 사용하여 수득할 수 있다. 하이브리도마 세포와 같은 항체 생성 세포로부터 원하는 폴리핵산 서열이 분리되고 서열분석될 수 있다. 대안적으로, 뉴클레오티드 합성기 또는 PCR 기술을 사용하여 폴리뉴클레오티드를 합성할 수 있다. 일단 얻어지면, 원핵생물 숙주에서 이중성 폴리뉴클레오티드를 복제하고 발현할 수 있는 재조합 벡터 내로 폴리펩티드를 인코딩하는 서열을 삽입한다. 이용가능하고 당업계에 알려진 다수의 벡터가 본 개시내용의 목적을 위해 사용될 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 주로 벡터 내로 삽입될 핵산의 크기 및 벡터로 형질전환될 특정 숙주 세포에 의존할 것이다. 각각의 벡터는 그의 기능(이중성 폴리뉴클레오티드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 모두) 및 그것이 상주하는 특정 숙주 세포와의 그의 상용성에 따라 다양한 성분들을 함유한다. 벡터 성분은 복제 기점, 선택 마커 유전자, 프로모터, 리보솜 결합 부위(RBS), 신호 서열, 이중성 핵산 삽입물, 및 전사 종결 서열을 일반적으로 포함하지만 이로 제한되지 않는다.
- [0304] 일반적으로, 숙주 세포와 상용성인 종으로부터 유래된 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 플라스미드 벡터가 이러한 숙주와 관련하여 사용된다. 벡터는 통상적으로 복제 사이트뿐만 아니라 형질전환된 세포에서 표현형 선택을 제공할 수 있는 마킹 서열을 담지한다. 예를 들어, E. 콜라이는 전형적으로 E. 콜라이 종으로부터 유래된 플라스미드인 pBR322를 사용하여 형질전환된다. 특정 항체의 발현에 사용되는 pBR322 유도체의 예는 카터(Carter) 등의 미국 특허 제5,648,237호에 상세히 기재되어 있다.
- [0305] 또한, 숙주 미생물과 상용성인 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 파지 벡터가 이러한 숙주와 관련하여 형질전환 벡터로서 사용될 수 있다. 예를 들어, GEM™-11과 같은 박테리오파지는 E. 콜라이 LE392와 같은 취약 숙주 세포를 형질전환하기 위해 사용될 수 있는 재조합 벡터를 제조하는 데 이용될 수 있다.
- [0306] 본 출원의 발현 벡터는 폴리펩티드 성분 각각을 인코딩하는 2개 이상의 프로모터-시스트론 쌍을 포함할 수 있다. 프로모터는 그의 발현을 조절하는 시스트론에 대해 상류(5')에 위치하는 비번역 조절 서열이다. 원핵생물 프로모터는 전형적으로 유도성과 구성성의 2가지 부류에 속한다. 유도성 프로모터는 배양 조건의 변화, 예를 들어, 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도의 변화에 대한 반응으로 그의 제어 하에 시스트론의 증가된 수준의 전사를 개시하는 프로모터이다.
- [0307] 다양한 잠재적 숙주 세포에 의해 인식되는 다수의 프로모터가 잘 알려져 있다. 제한 효소 분해를 통해 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고 분리된 프로모터 서열을 본 출원의 벡터 내로 삽입함으로써 본 항체를 인코딩하는 시스트론 DNA에 선택된 프로모터를 작동가능하게 연결할 수 있다. 천연 프로모터 서열 및 다수의 이중성 프로모터 둘 모두를 사용하여 표적 유전자의 증폭 및/또는 발현을 유도할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 이중성 프로모터는 천연 표적 폴리펩티드 프로모터에 비교하여 이들이 일반적으로 더 큰 전사 및 발현된 표적 유전자의 더 높은 수율을 가능하게 하기 때문에 이용된다.
- [0308] 원핵생물 숙주와 함께 사용하기에 적합한 프로모터는 PhoA 프로모터, -갈락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 트립토판(trp) 프로모터 시스템, 및 tac 또는 trc 프로모터와 같은 하이브리드 프로모터를 포함한다. 그러나, 박테리아에서 기능성인 다른 프로모터(예컨대 다른 알려진 박테리아 또는 파지 프로모터)도 적합하다. 이들의 핵산 서열이 공개되어 있으므로, 당업자는 임의의 필요한 제한 부위를 제공하기 위해 링커 또는 어댑터를 사용하여 표적 펩티드를 인코딩하는 시스트론에 이들을 작동가능하게 라이게이션할 수 있다(문헌[Siebenlist *et al. Cell* 20: 269 (1980)]).
- [0309] 일 태양에서, 재조합 벡터 내의 각각의 시스트론은 발현된 폴리펩티드의 막을 가로지르는 전좌(translocation)를 유도하는 분비 신호 서열 성분을 포함한다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나, 벡터 내로

삽입되는 표적 폴리펩티드 DNA의 일부일 수 있다. 본 발명의 목적을 위해 선택된 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 처리되는(즉, 신호 펩티다제에 의해 절단됨) 것이어야 한다. 이중성 폴리펩티드에 고유한 신호 서열을 인식하고 처리하지 않는 원핵생물 숙주 세포의 경우, 예를 들어, 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열-안정성 장독소 II(STII) 리더, LamB, PhoE, PelB, OmpA, 및 MBP로 이루어진 군으로부터 선택된 원핵생물 신호 서열에 의해 신호 서열이 치환될 수 있다.

[0310] 일부 실시 형태에서, 본 개시내용에 따른 항체의 생성은 숙주 세포의 세포질에서 발생할 수 있으며, 따라서 각각의 시스톤 내의 분비 신호 서열의 존재를 요구하지 않는다. 소정 숙주 균주(예를 들어, E. 콜라이 trxB-균주)는 이황화물 결합 형성에 유리한 세포질 조건을 제공함으로써, 발현된 단백질 서브유닛의 적절한 폴딩 및 조립을 가능하게 한다.

[0311] 본 개시내용의 항체를 발현하기에 적합한 원핵생물 숙주 세포는 고세균 및 진정세균, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체를 포함한다. 유용한 박테리아의 예는 에스케리키아(*Escherichia*)(예를 들어, E. 콜라이), 바실리(*Bacilli*)(예를 들어, B. 서브틸리스(*B. subtilis*)), 장내세균, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 중(예를 들어, P. 아에루기노사(*P. aeruginosa*)), 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 시겔라(*Shigella*), 리조비아(*Rhizobia*), 비트레오실라(*Vitreoscilla*), 또는 파라코쿠스(*Paracoccus*)를 포함한다. 일부 실시 형태에서는, 그람-음성 세포가 사용된다. 일 실시 형태에서는, E. 콜라이 세포가 숙주로서 사용된다. E. 콜라이 균주의 예는 균주 W3110(문헌[Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219]; ATCC 기탁 번호 27,325) 및 이의 유도체, 예를 들어 유전자형 W3110 AfhuA(AtonA) ptr3 lac Iq lacL8 AompT A(nmpc-fepE) degP41 kan^R을 갖는 균주 33D3(미국 특허 제 5,639,635호)를 포함한다. E. 콜라이 294(ATCC 31,446), E. 콜라이 B, E. 콜라이 1776(ATCC 31,537), 및 E. 콜라이 RV308(ATCC 31,608)과 같은 다른 균주 및 이의 유도체가 또한 적합하다. 이러한 예들은 제한적이기보다는 예시적이다. 정의된 유전자형을 갖는 상기 언급된 박테리아 중 임의의 것의 유도체를 작제하기 위한 방법은 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어, 문헌[Bass *et al.*, *Proteins*, 8:309-314 (1990)]에 기재되어 있다. 박테리아의 세포에서 레플리콘의 복제가능성을 고려하여 적절한 박테리아를 선택하는 것이 일반적으로 필요하다. 예를 들어, E. 콜라이, 세라티아, 또는 살모넬라 중은 잘 알려진 플라스미드, 예컨대 pBR322, pBR325, pACYC177, 또는 pKN410이 레플리콘을 공급하기 위해 사용될 경우에 숙주로서 적합하게 사용될 수 있다.

[0312] 전형적으로, 숙주 세포는 최소량의 단백질분해 효소를 분비해야 하고, 바람직하게는 추가의 프로테아제 억제제가 세포 배양물에 포함될 수 있다.

[0313] 숙주 세포는 상기-기재된 발현 벡터로 형질전환되고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 원하는 서열을 인코딩하는 유전자를 증폭하기 위해 적절한 바와 같이 변형된 관용적인 영양 배지 중에 배양된다. 형질전환은 DNA가 염색체의 요소로서 또는 염색체 통합체에 의해 복제가능하도록 원핵생물 숙주 내로 DNA를 도입하는 것을 의미한다. 사용된 숙주 세포에 따라, 형질전환은 그러한 세포에 적절한 표준 기법을 사용하여 실행된다. 실질적인 세포-벽 장벽을 함유하는 박테리아 세포의 경우, 칼슘 클로라이드를 사용하는 칼슘 처리가 일반적으로 사용된다. 형질전환을 위한 다른 방법은 폴리에틸렌 글리콜/DMSO를 사용한다. 사용되는 또 다른 기법은 전기천공이다.

[0314] 본 출원의 항체를 생성하기 위해 사용되는 원핵 세포는 당업계에 알려지고 선택된 숙주 세포의 배양에 적합한 배지 중에 성장시킨다. 적합한 배지의 예는 루리아 브로쓰(LB) + 필요한 영양소 보충제를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 배지는 또한 발현 벡터를 함유하는 원핵 세포의 성장을 선택적으로 가능하게 하기 위해, 발현 벡터의 작제에 기초하여 선택된 선택제를 함유한다. 예를 들어, 암피실린 저항성 유전자를 발현하는 세포의 성장을 위해 암피실린이 배지에 첨가된다.

[0315] 탄소, 질소, 및 무기 포스페이트 공급원 이외의 임의의 필요한 보충제가 단독으로 또는 복합 질소 공급원과 같은 다른 보충제 또는 배지와 혼용물로서 도입되는 적절한 농도로 또한 포함될 수 있다. 임의로, 배양 배지는 글루타민, 시스테인, 시스타민, 티오글리콜레이트, 다이티오에리트리트, 및 다이티오트레이톨로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 환원제를 함유할 수 있다. 원핵생물 숙주 세포는 적합한 온도 및 pH에서 배양된다.

[0316] 유도성 프로모터가 본 출원의 발현 벡터에 사용되는 경우, 단백질 발현은 프로모터의 활성화에 적합한 조건 하에 유도된다. 본 출원의 일 태양에서는, 폴리펩티드의 전사를 제어하기 위해 PhoA 프로모터가 사용된다. 따라서, 형질전환된 숙주 세포를 유도용 포스페이트-제한 배지 중에 배양한다. 바람직하게는, 포스페이트-제한 배

지는 C.R.A.P 배지이다(예를 들어, 문헌[Simmons *et al.*, *J. Immunol. Methods* 263:133-147 (2002)] 참조). 당업계에 알려진 바와 같이, 사용된 벡터 작제물에 따라 다양한 다른 유도제가 사용될 수 있다.

[0317] 본 개시내용의 발현된 항체는 숙주 세포의 주변세포질 내로 분비되고 이로부터 회수된다. 단백질 회수는, 일반적으로 삼투 충격, 초음파, 또는 용해와 같은 수단에 의해 미생물을 파괴하는 단계를 전형적으로 포함한다. 일단 세포가 파괴되면, 세포 잔해 또는 전세포는 원심분리 또는 여과에 의해 제거될 수 있다. 예를 들어, 친화도 수지 크로마토그래피에 의해 단백질이 추가로 정제될 수 있다. 대안적으로, 단백질은 배양 배지로 수송되고 그 안에서 단리될 수 있다. 세포는 배양물로부터 제거될 수 있으며, 생성된 단백질의 추가의 정제를 위해 배양 상청액을 여과하고 농축한다. 발현된 폴리펩티드는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE) 및 웨스턴 블롯 검정과 같은 통상적으로 알려진 방법을 사용하여 추가로 단리되고 식별될 수 있다.

[0318] 대안적으로, 단백질 생성은 발효 공정에 의해 대량으로 수행된다. 재조합 단백질의 생성을 위해 다양한 대규모 공급-배치 발효 절차가 이용가능하다. 본 개시내용의 항체의 생성 수율 및 품질을 개선하기 위해, 다양한 발효 조건을 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 사페론 단백질은 박테리아 숙주 세포에서 생성된 이중성 단백질의 적절한 폴딩 및 용해도를 촉진하는 것으로 입증되었다. 문헌[Chen *et al.* *J Bio Chem* 274:19601-19605 (1999)]; 미국 특허 제6,083,715호; 미국 특허 제6,027,888호; 문헌[Bothmann and Pluckthun, *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105 (2000)]; 문헌[Ramm and Pluckthun, *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113 (2000)]; 문헌[Arie *et al.*, *Mol. Microbiol.* 39:199-210 (2001)].

[0319] 예를 들어, 미국 특허 제5,264,365호; 미국 특허 제5,508,192호; 문헌[Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996)]에 기재된 바와 같이, 발현된 이중성 단백질(특히 단백질분해에 민감한 것들)의 단백질분해를 최소화하기 위해, 단백질분해 효소가 결핍된 소정의 숙주 균주가 본 발명에 사용될 수 있다. 본 출원의 항체를 인코딩하는 발현 시스템에서 숙주 세포로서, 단백질분해 효소가 결핍되고 하나 이상의 사페론 단백질을 과발현하는 플라스미드로 형질전환된 E. 콜라이 균주가 사용될 수 있다.

[0320] 본 명세서에서 생성된 항체를 추가로 정제하여 추가의 검정 및 용도를 위해 실질적으로 균질한 체제를 수득할 수 있다. 당업계에 알려진 표준 단백질 정제 방법이 사용될 수 있다. 하기 절차는 적합한 정제 절차의 예시이다: 면역친화도 또는 이온-교환 칼럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피 또는 DEAE와 같은 양이온-교환 수지 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 암모늄 설페이트 침전, 및 예를 들어, 세파텍스 G-75를 사용하는 겔 여과. 예를 들어, 본 개시내용의 결합 분자의 면역친화도 정제를 위해 일부 실시 형태에서는 고정상 상에 고정된 단백질 A가 사용될 수 있다. 단백질 A가 고정되는 고정상은, 바람직하게는 유리 또는 실리카 표면을 포함하는 컬럼, 더욱 바람직하게는 제어된 공극 유리 컬럼 또는 규산 컬럼이다. 일부 실시 형태에서는, 오염물의 비특이적 접착을 방지하기 위한 시도로, 글리세롤과 같은 시약으로 컬럼이 코팅되었다. 이어서, 고정상을 세척하여 고정상에 비특이적으로 결합된 오염물을 제거한다. 최종적으로, 고정상으로부터 용리에 의해 관심 항체를 회수한다.

[0321] 진핵 세포에서의 재조합체 생성

[0322] 진핵생물 발현의 경우, 벡터 성분은 일반적으로 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 및 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0323] 진핵생물 숙주에서 사용하기 위한 벡터는 또한 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 신호 서열 또는 다른 폴리펩티드를 인코딩하는 삽입물일 수 있다. 선택된 이중성 신호 서열은, 바람직하게는 숙주 세포에 의해 인식되고 처리되는(즉, 신호 펩티다제에 의해 절단됨) 것이다. 포유동물 세포 발현에서는, 포유동물 신호 서열뿐만 아니라 바이러스 분비 리더, 예를 들어, 단순 포진 gD 신호가 이용가능하다. 그러한 전구체 영역에 대한 DNA는 판독 프레임에서 본 출원의 항체를 인코딩하는 DNA에 라이게이션될 수 있다.

[0324] 일반적으로, 포유동물 발현 벡터의 경우에 복제 기점 성분은 필요하지 않다(SV40 기점은 단지 그것이 초기 프로모터를 함유하기 때문에 전형적으로 사용될 수 있음).

[0325] 발현 및 클로닝 벡터는 선택가능한 마커라고도 명명된 선택 유전자를 함유할 수 있다. 선택 유전자는 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어, 암피실린, 네오마이신, 메토포렉세이트, 또는 테트라사이클린에 대한 저항성을 부여하는 단백질을 인코딩하거나; 영양요구성 결핍을 보충하거나; 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요한 영양소를 공급할 수 있다.

[0326] 선택 계획의 일례는 숙주 세포의 성장을 정지시키는 약물을 이용한다. 이중성 유전자로 성공적으로 형질전환된

세포는 약물 저항성을 부여하는 단백질을 생성하며, 따라서 선택 체제(selection regimen)에서 생존한다. 그러한 우세 선택(dominant selection)의 예는 약물 네오마이신, 마이코페놀산, 및 하이그로마이신을 사용한다.

[0327] 포유동물 세포에 대한 적합한 선택가능한 마커의 다른 예는 본 출원의 항체를 인코딩하는 핵산을 흡수하는 능력이 있는 세포의 식별을 가능하게 하는 것들이다. 예를 들어, DHFR의 경쟁적 길항제인 메토틱렉세이트(Mtx)를 함유하는 배양 배지 중에 모든 형질전환체를 배양함으로써, DHFR 선택 유전자로 형질전환된 세포가 먼저 식별된다. 야생형 DHFR이 사용되는 경우에 예시적인 적절한 숙주 세포는 DHFR 활성이 결핍된 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주이다. 대안적으로, 폴리펩티드 인코딩-DNA 서열, 야생형 DHFR 단백질, 및 다른 선택가능한 마커, 예컨대 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스페라제(APH)로 형질전환되거나 공동-형질전환된 숙주 세포(특히 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)는 아미노글리코시드 항생제와 같은 선택가능한 마커에 대한 선택제를 함유하는 배지 중의 세포 성장에 의해 선택될 수 있다.

[0328] 발현 및 클로닝 벡터는 통상적으로 숙주 유기체에 의해 인식되고 원하는 폴리펩티드 서열을 인코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결되는 프로모터를 함유한다. 진핵생물 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30 개 염기 상류에 위치한 AT-풍부 영역을 갖는다. 다수의 유전자의 전사 시작으로부터 70 내지 80개 염기 상류에서 발견되는 다른 서열이 포함될 수 있다. 대부분의 진핵생물의 3' 말단은 코딩 서열의 3' 말단에 폴리 A 테일의 부가를 위한 신호일 수 있다. 이들 서열 모두가 진핵생물 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다.

[0329] 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터의 폴리펩티드 전사는, 예를 들어, 폴리오마 바이러스, 조류포크스 바이러스, 아데노바이러스(예컨대 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스, 및 유인원 바이러스 40(SV40)과 같은 바이러스의 게놈으로부터 수득된 프로모터, 이중성 포유동물 프로모터, 예를 들어, 액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터로부터 수득된 프로모터, 열-충격 프로모터로부터 수득된 프로모터에 의해 제어될 수 있으며, 단, 그러한 프로모터는 숙주 세포 시스템과 상용성이다.

[0330] 더 고등한 진핵생물에 의한 본 개시내용의 항체를 인코딩하는 DNA의 전사는 종종 인핸서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가된다. 포유동물 유전자(글로빈, 엘라스타제, 알부민, α-태아단백질, 및 인슐린)로부터 다수의 인핸서 서열이 현재 알려져 있다. 예는 복제 기점의 후측 상의 SV40 인핸서(bp 100 내지 270), 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점의 후측 상의 폴리오마 인핸서, 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 진핵생물 프로모터의 활성화를 위한 강화 요소에 대해서는 문헌[Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982)]을 또한 참조한다. 인핸서는 폴리펩티드 인코딩 서열에 대해 5' 또는 3'인 위치에서 벡터 내로 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 5'인 부위에 위치한다.

[0331] 진핵생물 숙주 세포(효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다세포 유기체로부터의 핵화된 세포)에서 사용되는 발현 벡터는 전사의 종결 및 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 또한 함유한다. 그러한 서열은 진핵생물 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 영역으로부터 통상적으로 이용가능하다. 이러한 영역은 폴리펩티드-인코딩 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사된 뉴클레오타이드 세그먼트를 함유한다. 하나의 유용한 전사 종결 성분은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다.

[0332] 본 명세서의 벡터에서 DNA를 클로닝하거나 발현시키기에 적합한 숙주 세포는 척추동물 숙주 세포를 포함하는 본 명세서에 기재된 더 고등한 진핵생물 세포를 포함한다. 배양(조직 배양)에서 척추동물 세포의 전파는 일상적인 절차가 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40(COS-7, ATCC CRL 1651)에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주; 인간 배아 신장 세포주(293 또는 현탁 배양에서의 성장을 위해 서브클로닝된 293 세포, 문헌[Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)]); 베이비 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 중국 햄스터 난소 세포/-DHFR(CHO, 문헌[Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포(TM4, 문헌[Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유선 종양(MMT 060562, ATCC CCL51); TR1 세포(문헌[Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간종양 세포주(Hep G2)이다.

[0333] 숙주 세포는 항체 생성을 위한 상기-기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환되고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 원하는 서열을 인코딩하는 유전자를 증폭하기에 적절한 바와 같이 변형된 통상적인 영양 배지 중에 배양될 수 있다.

- [0334] 본 출원의 항체를 생성하기 위해 사용되는 숙주 세포는 다양한 배지 중에 배양될 수 있다. 햄(Ham) F10(Sigma), 최소 필수 배지(MEM)(Sigma), RPMI-1640(Sigma), 및 둘베코 변형 이글 배지(DMEM)(Sigma)와 같은 구매가능한 배지가 숙주 세포를 배양하기에 적합하다. 추가로, 문헌[Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979)], 문헌[Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980)], 미국 특허 제4,767,704호; 제4,657,866호; 제4,927,762호; 제4,560,655호; 또는 제5,122,469호; 제WO 90/03430호; 제WO 87/00195호; 또는 미국 특허 Re. 제30,985호에 기재된 배지 중 임의의 것이 숙주 세포를 위한 배양 배지로 사용될 수 있다. 이러한 배지 중 임의의 것은 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자(예컨대 인슐린, 트랜스페린, 또는 표피 성장 인자), 염(예컨대 소듐 클로라이드, 칼슘, 마그네슘, 및 포스페이트), 완충제(예컨대 HEPES), 뉴클레오티드(예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제(예컨대 GENTAMYCIN™ 약물), 미량 원소(통상적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 및 글루코스 또는 등가의 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필요한 보충제가 또한 당업자에게 알려진 적절한 농도로 포함될 수 있다. 온도, pH 등과 같은 배양 조건은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것들이며, 당업자에게 명백할 것이다.
- [0335] 제조합 기법을 사용할 경우, 항체는 세포내에서, 세포주위 공간 내에서 생성되거나, 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포내에서 생성되는 경우, 제1 단계로서, 예를 들어, 원심분리 또는 한외여과에 의해, 숙주 세포 또는 용해된 단편인 미립자 잔해가 제거된다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우, 그러한 발현 시스템으로부터의 상청액은 일반적으로 구매가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어, Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 단위를 사용하여 먼저 농축한다. 단백질분해를 억제하기 위해 PMSF와 같은 프로테아제 억제제가 전기의 단계 중 임의의 것에 포함될 수 있고, 우발적 오염물의 성장을 방지하기 위해 항생제가 포함될 수 있다.
- [0336] 세포로부터 제조된 단백질 조성물은, 예를 들어, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 세포로부터 제조된 단백질 조성물은 AKTA 크로마토그래피 시스템을 사용하여 정제될 수 있다. 친화도 리간드가 부착된 매트릭스는 가장 흔히 아가로스이지만, 다른 매트릭스가 이용가능하다. 제어된 기공 유리 또는 폴리(스티렌-다이비닐) 벤젠과 같은 기계적으로 안정한 매트릭스는 아가로스로 달성될 수 있는 것보다 더 빠른 유속 및 더 짧은 처리 시간을 가능하게 한다. 단백질 정제를 위한 다른 기법들, 예컨대 이온-교환 칼럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지(예컨대 폴리아스파르트산 칼럼) 상의 헤파린 SEPHAROSE™ 크로마토그래피 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 암모늄 설페이트 침전이 또한 회수될 항체에 따라 이용가능하다. 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 관심 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물에 저 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피를 적용할 수 있다.
- [0337] **5.5. 약학적 조성물**
- [0338] 일 태양에서, 본 발명은 본 발명의 적어도 하나의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 추가로 제공한다. 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 유효량 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함한다.
- [0339] 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물은, 원하는 정도의 순도를 갖는 용합 단백질을 임의의 생리학적으로 허용가능한 부형제와 혼합함으로써(예를 들어, 문헌[Remington, *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18th ed. 1980)] 참조) 수용액 또는 동결건조된 형태 또는 다른 건조된 형태로 저장을 위해 제조된다.
- [0340] 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표적 세포/조직으로의 전달을 위한 임의의 적합한 형태로, 예를 들어, 마이크로캡슐 또는 마크로에멀전으로서(문헌[Remington, 상기 문헌]; 문헌[Park *et al.*, 2005, *Molecules* 10:146-61]; 문헌[Malik *et al.*, 2007, *Curr. Drug. Deliv.* 4:141-51]), 지속 방출 제형으로서(문헌[Putney and Burke, 1998, *Nature Biotechnol.* 16:153-57]), 또는 리포솜으로서(문헌[Maclean *et al.*, 1997, *Int. J. Oncol.* 11:325-32]; 문헌[Kontermann, 2006, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 8:39-45]) 제형화될 수 있다.
- [0341] 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 또한, 예를 들어 코아세르베이션 기법에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각, 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에, 콜로이드상 약물 전달 시스템(예를 들어, 리포솜, 알부민 미소구체, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐)에, 또는 매크로에멀전 내에 봉입될 수 있다. 그러한 기법들은, 예를 들어, 문헌[Remington, 상기 문헌]에 개시되어 있다.

- [0342] 다양한 조성물 및 전달 시스템이 알려져 있고, 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 함께 사용될 수 있으며, 이는 리포솜, 마이크로입자, 마이크로캡슐 내의 캡슐화, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체-매개 엔도사이토시스(예를 들어, 문헌[Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-32] 참조), 레트로바이러스 벡터 또는 다른 벡터 등의 일부로서의 핵산의 작제를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 다른 실시 형태에서, 조성물은 제어 방출 또는 지속 방출 시스템으로서 제공될 수 있다. 일 실시 형태에서는, 제어 방출 또는 지속 방출을 달성하기 위해 펌프가 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Langer, 상기 문헌]; 문헌[Sefton, 1987, Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201-40]; 문헌[Buchwald *et al.*, 1980, Surgery 88:507-16]; 및 문헌[Saudek *et al.*, 1989, N. Engl. J. Med. 321:569-74] 참조). 다른 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 예방제 또는 치료제(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원 결합 단편) 또는 조성물의 제어 방출 또는 지속 방출을 달성하기 위해 중합체성 재료를 사용할 수 있다(예를 들어, 문헌[Medical Applications of Controlled Release (Langer and Wise eds., 1974)]; 문헌[Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (Smolen and Ball eds., 1984)]; 문헌[Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61-126]; 문헌[Levy *et al.*, 1985, Science 228:190-92]; 문헌[During *et al.*, 1989, Ann. Neurol. 25:351-56]; 문헌[Howard *et al.*, 1989, J. Neurosurg. 71:105-12]; 미국 특허 제5,679,377호; 제5,916,597호; 제5,912,015호; 제5,989,463호; 및 제5,128,326호; PCT 출원 공개 제WO 99/15154호 및 제WO 99/20253호 참조). 지속-방출 제형에 사용되는 중합체의 예에는 폴리(2-하이드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜리드(PLG), 폴리언하이드라이드, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알코올), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락티드(PLA), 폴리(락티드-코-글리콜리드)(PLGA), 및 폴리오르토에스테르가 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 일 실시형태에서, 지속-방출 제형에 사용되는 중합체는 불활성이고, 침출가능한 불순물이 없고, 저장 시에 안정하고, 멸균 상태이고, 생분해성이다.
- [0343] 또 다른 실시 형태에서, 제어-방출 또는 지속-방출 시스템은 특정 표적 조직, 예를 들어, 비도(nasal passage) 또는 폐에 근접하여 배치될 수 있으며, 따라서 전신 용량의 소정 분율만을 필요로 한다(예를 들어, 문헌[Goodson, Medical Applications of Controlled Release Vol. 2, 115-38 (1984)] 참조). 제어-방출 시스템은, 예를 들어, 문헌[Langer, 1990, Science 249:1527-33]에 의해 논의되어 있다. 당업자에게 알려진 임의의 기법을 사용하여 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 지속 방출 제형을 생성할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,526,938호, PCT 출원 공개 제WO 91/05548호 및 제WO 96/20698호, 문헌[Ning *et al.*, 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-89]; 문헌[Song *et al.*, 1995, PDA J. of Pharma. Sci. & Tech. 50:372-97]; 문헌[Cleek *et al.*, 1997, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-54]; 및 문헌[Lam *et al.*, 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-60] 참조).
- [0344] **5.6 항체의 사용 방법**
- [0345] 일 태양에서 본 명세서에는, 본 명세서에 제공된 항체의 유효량에 세포를 노출시키는 단계를 포함하는, 세포에서 IL-1 β 의 활성을 약화시키는 방법이 제공된다.
- [0346] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1 β 신호전달 경로를 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1 β 생물활성을 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-6 생성을 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 CXCL5 생성을 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 G-CSF 생성을 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-6, CXCL5, 및 G-CSF 생성을 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 인간 섬유아세포에서 IL-1 β 생물활성을 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 인간 섬유아세포에서 IL-6, CXCL5, 및 G-CSF 생성을 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 샘플에서 IL-1 β 생물활성을 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 인간 전혈 샘플에서 IL-1 β 생물활성을 억제한다.
- [0347] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 사이토카인 IL-1 β 와 교차반응한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 사이토카인 원숭이 섬유아세포에서 IL-1 β 생물활성을 억제한다.
- [0348] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1 β 활성을 약 10% 이상만큼 약화시킨다. 일부 실시 형태

일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1R1에 대한 IL-1 β 의 결합을 약 98% 이상만큼 약화시킨다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1R1에 대한 IL-1 β 의 결합을 약 100%만큼 약화시킨다. 소정 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 IL-1R1에 대한 IL-1 β 의 결합을 약 15% 내지 약 65% 이상만큼 약화시킬 수 있다(예를 들어, 부분적으로 약화시킴). 소정 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 IL-1R1에 대한 IL-1 β 의 결합을 약 20% 내지 약 65% 이상만큼 약화시킬 수 있다(예를 들어, 부분적으로 약화시킴). 소정 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 IL-1R1에 대한 IL-1 β 의 결합을 약 30% 내지 약 65% 이상만큼 약화시킬 수 있다(예를 들어, 부분적으로 약화시킴).

[0357] IL-1 β 활성의 또 다른 비제한적인 예는 IL-1R1에 의해 매개되는 신호전달이다. 따라서, 소정 실시 형태에서 본 명세서에는, 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 유효량에 세포를 노출시키는 단계를 포함하는, 세포에서 IL-1R1 매개 신호전달을 약화시키는 방법이 제공된다(예를 들어, 부분적으로 약화시킴).

[0358] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1R1 매개 신호전달을 약 10% 이상만큼 약화시킨다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1R1 매개 신호전달을 약 20% 이상만큼 약화시킨다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1R1 매개 신호전달을 약 30% 이상만큼 약화시킨다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1R1 매개 신호전달을 약 40% 이상만큼 약화시킨다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1R1 매개 신호전달을 약 50% 이상만큼 약화시킨다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1R1 매개 신호전달을 약 60% 이상만큼 약화시킨다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1R1 매개 신호전달을 약 70% 이상만큼 약화시킨다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1R1 매개 신호전달을 약 80% 이상만큼 약화시킨다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1R1 매개 신호전달을 약 90% 이상만큼 약화시킨다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1R1 매개 신호전달을 약 95% 이상만큼 약화시킨다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1R1 매개 신호전달을 약 98% 이상만큼 약화시킨다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1R1 매개 신호전달을 약 100%만큼 약화시킨다. 소정 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 IL-1R1 매개 신호전달을 약 15% 내지 약 65% 이상만큼 약화시킬 수 있다(예를 들어, 부분적으로 약화시킴). 소정 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 IL-1R1 매개 신호전달을 약 20% 내지 약 65% 이상만큼 약화시킬 수 있다(예를 들어, 부분적으로 약화시킴). 소정 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 IL-1R1 매개 신호전달을 약 30% 내지 약 65% 이상만큼 약화시킬 수 있다(예를 들어, 부분적으로 약화시킴).

[0359] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1 신호전달 경로 개시 및 진행을 약 10% 이상만큼 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1 신호전달 경로 개시 및 진행을 약 20% 이상만큼 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1 신호전달 경로 개시 및 진행을 약 30% 이상만큼 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1 신호전달 경로 개시 및 진행을 약 40% 이상만큼 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1 신호전달 경로 개시 및 진행을 약 50% 이상만큼 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1 신호전달 경로 개시 및 진행을 약 60% 이상만큼 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1 신호전달 경로 개시 및 진행을 약 70% 이상만큼 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1 신호전달 경로 개시 및 진행을 약 80% 이상만큼 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1 신호전달 경로 개시 및 진행을 약 90% 이상만큼 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1 신호전달 경로 개시 및 진행을 약 95% 이상만큼 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1 신호전달 경로 개시 및 진행을 약 98% 이상만큼 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 IL-1 신호전달 경로 개시 및 진행을 약 100%만큼 억제한다. 소정 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 IL-1 신호전달 경로 개시 및 진행을 약 15% 내지 약 65% 이상만큼 약화시킬 수 있다(예를 들어, 부분적으로 약화시킴). 소정 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 IL-1 신호전달 경로 개시 및 진행을 약 20% 내지 약 65% 이상만큼 약화시킬 수 있다(예를 들어, 부분적으로 약화시킴). 소정 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 IL-1 신호전달 경로 개시 및 진행을 약 30% 내지 약 65% 이상만큼 약화시킬 수 있다(예를 들어, 부분적으로 약화시킴).

[0360] 다른 태양에서, 대상체에서 질병 또는 장애를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 IL-1 β -매개 질환 또는 장애이다. 일 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 IL-1R1-매개 질환 또는 장애이다. 질병 또는 장애의 치료 방법이 본 명세서에 또한 제공되며, 상기 방법에서는 상기 대상체에게 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 병용하여 하나 이상의 치료제가 투여된다.

[0361] 본 개시내용은 또한, IL-1 신호전달 경로 활성화를 억제하고 이에 의해 염증을 조절하여 암과 같은 병리학적 장

에의 치료를 유발하기 위해, 본 명세서에 제공된 항체를 사용하여 IL-1 β 의 기능을 억제하는, 즉, 길항작용하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시 형태에서, 암은 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 신세포암이다.

[0362] 일부 실시 형태에서 본 명세서에는, IL-1 β 매개 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 IL-1 β 매개 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법으로서, 본 명세서에 기재된 단리된 IL-1 β 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서 본 명세서에는, 염증성 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 염증성 매개 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법으로서, 본 명세서에 기재된 단리된 IL-1 β 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, IL-1 β 매개 질환 또는 장애는 암, 예컨대 폐암 또는 신장암이다.

[0363] 일부 실시 형태에서 본 명세서에는, 대상체에서 폐암을 치료하는 방법으로서, 본 명세서에 기재된 단리된 IL-1 β 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 투여는, 예를 들어, 전신 또는 국소 전달을 포함할 수 있다.

[0364] 일부 실시 형태에서, 대상체는 폐암(예를 들어, 비-소세포 폐암)으로 진단되었다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 0기 비-소세포 폐암(NSCLC)으로 진단되었다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 1기 NSCLC로 진단되었다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 2기 NSCLC로 진단되었다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 2기 NSCLC로 진단되었고 수술을 받았다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 3기 NSCLC로 진단되었다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 3기 NSCLC로 진단되었고 수술을 받았다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 4기 NSCLC로 진단되었다.

[0365] 일부 실시 형태에서 본 명세서에는, 대상체에서 신장암을 치료하는 방법으로서, 본 명세서에 기재된 단리된 IL-1 β 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0366] 일부 실시 형태에서, 대상체는 신장암, 예를 들어, 신세포 암종(RCC)으로 진단되었다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 1기로 진단되었다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 2기 RCC로 진단되었다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 3기 RCC로 진단되었다.

[0367] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 폐암의 차단을 위해 사용된다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 폐암이 발생할 위험이 있는 것으로 식별되었다. 일부 실시 형태에서 본 명세서에는, 대상체에서 폐암의 위험을 감소시키는 방법으로서, 본 명세서에 기재된 단리된 IL-1 β 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0368] 폐암이 발생할 위험이 있는 대상체는 당업계에 알려진 다양한 인자에 의해 식별될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 전암성 폐 결절과 같은 하나 이상의 폐 결절을 갖는 것으로 결정되었다(예를 들어, 컴퓨터 단층촬영 영상에 의해 식별된 바와 같음). 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 폐 결절은 전암성이다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 약 50세 내지 약 80세의 연령이고/이거나 대상체는 흡연 이력, 예를 들어, 20 갑년의 흡연 이력을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 상승된 수준의 C-반응성 단백질(CRP)을 갖는다.

[0369] 추가의 실시 형태에 따르면, 폐암이 발생할 위험이 있는 대상체는 본 명세서에 참고로 포함된 제W02021/146516호("미래의 폐암의 위험을 예측하기 위한 시스템 및 방법(SYSTEM AND METHOD FOR PREDICTING THE RISK OF FUTURE LUNG CANCER)")에 기재된 방법에 따라 식별되고, 위험 대상체는 본 명세서에 기재된 바와 같이 단리된 IL-1 β 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 유효량을 투여받는다. 예를 들어, 방법은 환자로부터 포획된 하나 이상의 영상(예를 들어, CT 스캔)을 수득함으로써 폐암이 발생할 위험이 있는 환자를 식별하는 단계; 하나 이상의 수득된 영상으로부터 특징부를 추출하는 단계(예를 들어, 추출된 특징부는 적어도 비-결절 특이적 특징부를 포함하며, 여기서 비-결절 특이 특징부는 폐 실질 특징부 또는 신체 조성 특징부 중 하나 또는 둘 모두를 포함함); 하나 이상의 훈련된 위험 예측 모델을 적용하여 하나 이상의 수득된 영상로부터 추출된 특징부를 분석함으로써 대상체에 대해 하나 이상의 미래의 폐암의 위험을 예측하는 단계; 및 환자가 폐암이 발생할 위험(예를 들어, 1년, 3년, 5년, 또는 10년 이내에 폐암이 발생할 위험)이 있는 것으로 식별되는 경우, 본 명세서에 기재된 바와 같은 단리된 IL-1 β 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0370] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 폐암의 예방을 위해 사용된다. 예방은 완전한, 예를 들어, IL-1 β -관련 병태 또는 장애의 전적인 부재일 수 있다. 예방은 또한 부분적일 수 있으며, 이에 의해 대상체에서 IL-1 β -관련 병태 또는 대사 장애의 발생 가능성은 대상체가 본 개시내용의 항체를 받지 않은 경우보다 낮을 가능성이 있다.

- [0371] 투여 및 투약 방법은 하기 섹션 5.7에 더 상세히 기재된다.
- [0372] 다른 태양에서, 대상체에서 질병 또는 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 용도가 본 명세서에 제공된다.
- [0373] 다른 태양에서, 대상체에서 질병 또는 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물의 용도가 본 명세서에 제공된다.
- [0374] 다른 태양에서 본 명세서에는, 의약의 제조에 있어서 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도가 제공되며, 여기서 의약은 생물학적 샘플에서 IL-1 β 의 존재를 검출하기 위한 방법에 사용하기 위한 것이고, 방법은 IL-1 β 단백질에 대한 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 생물학적 샘플을 항체와 접촉시키는 단계, 및 항체와 IL-1 β 단백질 사이에 복합체가 형성되는지 여부를 검출하는 단계를 포함한다.
- [0375] 다른 태양에서, 본 개시내용의 항체 및 이의 단편은 생물학적 샘플에서 IL-1 β 의 존재를 검출하기에 유용하다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "검출"은 정량적 또는 정성적 검출을 포함한다. 소정 실시 형태에서, 생물학적 샘플은 체액, 세포, 또는 조직을 포함한다. 진단 검정 및 방법은 하기 섹션 5.9에 더 상세히 기재되어 있다.
- [0376] **5.7 투여 및 투약 방법**
- [0377] 구체적인 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 질병 또는 질환의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 조성물이 본 명세서에 제공된다. 일 실시 형태에서, 질병 또는 질환의 예방에 사용하기 위한 조성물이 본 명세서에 제공되며, 상기 조성물은 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 일 실시 형태에서, 질병 또는 질환의 치료에 사용하기 위한 조성물이 본 명세서에 제공되며, 상기 조성물은 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 병태는 IL-1 β -매개 질환이다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 병태는 IL-1R1-매개 질환이다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 IL-1 β 와 관련된다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 IL-1 β 와 관련된다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 염증성 질환 또는 장애이다. 일부 실시 형태에서, 상기 질환 또는 장애는 암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 0기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 1기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 2기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 3기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 4기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 신장암이다. 일부 실시 형태에서, 신장암은 신세포암이다. 일부 실시 형태에서, 신세포암은 1기 신세포암이다. 일부 실시 형태에서, 신세포암은 2기 신세포암이다. 일부 실시 형태에서, 신세포암은 3기 신세포암이다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 이를 필요로 하는 대상체이다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 질병 또는 질환을 갖는다. 다른 실시 형태에서, 대상체는 질병 또는 질환을 가질 위험이 있다. 일부 실시 형태에서, 투여는 질환 또는 병태의 예방, 관리, 치료, 또는 개선을 유발한다.
- [0378] 일 실시 형태에서, 질병 또는 질환의 증상의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 조성물이 본 명세서에 제공되며, 상기 조성물은 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 일 실시 형태에서, 질병 또는 질환의 증상의 예방에 사용하기 위한 조성물이 본 명세서에 제공되며, 상기 조성물은 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 일 실시 형태에서, 질병 또는 질환의 증상의 치료에 사용하기 위한 조성물이 본 명세서에 제공되며, 상기 조성물은 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 병태는 IL-1 β -매개 질환이다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 병태는 IL-1R1-매개 질환이다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 IL-1 β 와 관련된다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 IL-1 β 와 관련된다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 염증성 질환 또는 장애이다. 일부 실시 형태에서, 상기 질환 또는 장애는 암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 0기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 1기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 2기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 3기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 4기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 신장암이다. 일부 실시 형태에서, 신장암은 신세포암이다. 일부 실시 형태에서, 신세포암은 1기 신세포암이다. 일부 실시 형태에서, 신세포암은 2기 신세포암이다. 일부 실시 형태에서, 신세포암은 3기 신세포암이다. 소정 실시 형태에서, 대상체는 이를 필요로 하는 대상체이다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 질병 또는 질환을 갖는다. 다른 실시 형태에서, 대상체는 질병 또는 질환을 가질 위험이 있다. 일부 실시 형태에서, 투여는 질병 또

는 질환의 증상의 예방 또는 치료를 가져온다.

[0379]

다른 실시 형태에서, 대상체에서 질병 또는 질환을 예방 및/또는 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시 형태에서, 대상체에서 질병 또는 질환을 예방하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시 형태에서, 대상체에서 질병 또는 질환을 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 병태는 IL-1 β -매개 질환이다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 병태는 IL-1R1-매개 질환이다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 IL-1 β 와 관련된다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 IL-1 β 와 관련된다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 염증성 질환 또는 장애이다. 일부 실시 형태에서, 상기 질환 또는 장애는 암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 0기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 1기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 2기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 3기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 4기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 신장암이다. 일부 실시 형태에서, 신장암은 신세포암이다. 일부 실시 형태에서, 신세포암은 1기 신세포암이다. 일부 실시 형태에서, 신세포암은 2기 신세포암이다. 일부 실시 형태에서, 신세포암은 3기 신세포암이다. 소정 실시 형태에서, 대상체는 이를 필요로 하는 대상체이다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 질병 또는 질환을 갖는다. 다른 실시 형태에서, 대상체는 질병 또는 질환을 가질 위험이 있다. 일부 실시 형태에서, 투여는 질병 또는 질환의 예방 또는 치료를 가져온다.

[0380]

다른 실시 형태에서, 대상체에서 질병 또는 질환의 증상을 예방 및/또는 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시 형태에서, 대상체에서 질병 또는 질환의 증상을 예방하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시 형태에서, 대상체에서 질병 또는 질환의 증상을 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 병태는 IL-1 β -매개 질환이다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 병태는 IL-1R1-매개 질환이다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 IL-1 β 와 관련된다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 IL-1 β 와 관련된다. 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 염증성 질환 또는 장애이다. 일부 실시 형태에서, 상기 질환 또는 장애는 암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 0기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 1기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 2기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 3기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 폐암은 4기 비-소세포 폐암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 신장암이다. 일부 실시 형태에서, 신장암은 신세포암이다. 일부 실시 형태에서, 신세포암은 1기 신세포암이다. 일부 실시 형태에서, 신세포암은 2기 신세포암이다. 일부 실시 형태에서, 신세포암은 3기 신세포암이다. 소정 실시 형태에서, 대상체는 이를 필요로 하는 대상체이다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 질병 또는 질환을 갖는다. 다른 실시 형태에서, 대상체는 질병 또는 질환을 가질 위험이 있다. 일부 실시 형태에서, 투여는 질병 또는 질환의 증상의 예방 또는 치료를 가져온다.

[0381]

본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여함으로써 질병 또는 질환을 예방 및/또는 치료하는 방법이 본 명세서에 또한 제공된다. 일 태양에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 실질적으로 정제된다(즉, 그의 효과를 제한하거나 원치 않는 부작용을 생성하는 물질이 실질적으로 없음). 요법을 투여받은 대상체는 포유동물, 예컨대 비영장류(예를 들어, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 등) 또는 영장류(예를 들어, 원숭이, 예컨대 사이노몰거스 마카크 원숭이, 또는 인간)일 수 있다. 일 실시 형태에서, 대상체는 인간이다. 다른 실시 형태에서, 대상체는 질병 또는 질환을 갖는 인간이다.

[0382]

다양한 전달 시스템이 알려져 있고, 예방제 또는 치료제(예를 들어, 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편)를 투여하기 위해 사용될 수 있다. 예방제 또는 치료제(예를 들어, 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편), 또는 약제학적 조성물을 투여하는 방법은 비경구 투여(예를 들어, 피내, 근육내, 복막내, 정맥내, 및 피하), 경막외, 및 점막(예를 들어, 비강내 및 경구 경로)을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 특이적 실시 형태에서, 예방제 또는 치료제(예를 들어, 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편), 또는 약제학적 조성물은 비강내, 근육내, 정맥내, 또는 피하 투여된다.

- [0383] 구체적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 예방제 또는 치료제, 또는 약제학적 조성물을 치료를 필요로 하는 영역에 국부적으로 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 국소 주입, 국부 투여(예를 들어, 비강 내 스프레이), 주사, 또는 임플란트에 의해 이를 달성할 수 있으며, 이로 제한되지 않는다.
- [0384] 구체적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 조성물은 1개, 2개, 또는 그 이상의 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 다른 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 조성물은 1개, 2개, 또는 그 이상의 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편 이외의 예방제 또는 치료제를 포함한다. 일 실시 형태에서, 작용제는 질병 또는 질환의 예방, 관리, 치료, 및/또는 호전에 유용한 것으로 알려져 있거나, 이를 위해 사용되었거나, 현재 사용된다. 예방제 또는 치료제에 추가하여, 본 명세서에 제공된 조성물은 또한 하나 이상의 부형제를 포함할 수 있다.
- [0385] 본 명세서에 제공된 조성물은 단위 투여 형태의 제조에 사용될 수 있는 약제학적 조성물(예를 들어, 대상체 또는 환자에게 투여하기에 적합한 조성물)의 제조에 유용한 벌크 약물 조성물을 포함한다. 일 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 조성물은 약제학적 조성물이다. 그러한 조성물은 하나 이상의 예방제 또는 치료제(예를 들어, 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 다른 예방제 또는 치료제)의 예방적 또는 치료적 유효량, 및 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다. 약제학적 조성물은 대상체에 대한 투여 경로에 적합하도록 제형화될 수 있다.
- [0386] 구체적 실시 형태에서, 용어 "부형제"는 또한 희석제, 애쥬번트(예를 들어, 프로인트 애쥬번트(완전 또는 불완전)), 또는 비히클을 지칭할 수 있다. 약제학적 부형제는 석유, 동물, 식물, 또는 합성 기원의 것들을 포함하는 물 및 오일과 같은 멸균 액체일 수 있다. 약제학적 조성물이 정맥내 투여되는 경우에 물이 예시적인 부형제이다. 식염수 용액, 및 텍스트로스 및 글리세롤 수용액이 또한, 특히 주사 용액을 위한 액체 부형제로서 사용될 수 있다. 조성물은, 필요하다면, 미량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 또한 함유할 수 있다. 이들 조성물은 용액, 현탁액, 에멀전, 정제, 알약, 캡슐, 분말, 지속-방출 제형 등의 형태를 취할 수 있다. 적합한 약제학적 부형제의 비제한적인 예는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA]에 기재되어 있다. 그러한 조성물은 환자에 대한 적절한 투여를 위한 형태를 제공하도록 부형제(들)의 적합한 양과 함께, 예컨대 정제된 형태의 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 예방적 또는 치료적 유효량을 함유할 것이다. 제형은 투여 방식에 적합해야 한다.
- [0387] 일 실시 형태에서, 조성물은 인간에 대한 정맥내 투여에 적당한 약제학적 조성물로서 절차에 따라 제형화된다.
- [0388] 일반적으로, 본 명세서에 제공된 조성물의 성분들은, 예를 들어, 활성제의 양을 표시하는 앰플 또는 사세와 같은 밀폐 용기 내에 건조 동결건조된 분말 또는 무수 농축물로서, 단위 투여 형태로 함께 혼합되거나 개별적으로 공급된다. 조성물이 주입에 의해 투여될 경우, 그것은 멸균 제약 등급의 물 또는 식염수가 담긴 주입 병으로 분배될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 투여 전에 성분들이 혼합될 수 있도록 주사용 멸균수 또는 식염수의 앰플이 제공될 수 있다.
- [0389] 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 항체의 양을 표시하는 앰플 또는 사세와 같은 밀폐 용기 내에 포장될 수 있다. 일 실시 형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 밀폐 용기 내에 건조 멸균 동결건조된 분말 또는 무수 농축물로서 공급되며, 예를 들어, 물 또는 식염수를 이용하여 대상체에게 투여하기에 적절한 농도로 재구성될 수 있다.
- [0390] 본 명세서에 제공된 조성물은 중성 또는 염 형태로서 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 염은 음이온으로 형성된 것들 및 양이온으로 형성된 것들을 포함한다.
- [0391] 질환 또는 병태의 예방 및/또는 치료에 효과적일 본 명세서에 제공된 예방제 또는 치료제(예를 들어, 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원 결합 단편), 또는 조성물의 양은 당업계에 알려진 임상 기법에 의해 결정될 수 있다. 제형에 사용되는 정확한 용량은 또한 투여 경로, 및 질병 또는 질환의 심각도에 좌우될 것이며, 전문의의 판단 및 각각의 환자의 상황에 따라 결정되어야 한다.
- [0392] 소정 실시 형태에서, 환자에 대한 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 용량에 대한 투여 경로는 비강내, 근육내, 정맥내, 피하, 또는 이들의 조합이지만, 본 명세서에 기재된 다른 경로가 또한 허용가능하다. 각각의 용량은 동일한 투여 경로에 의해 투여될 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 본 명세서에 제공된 동일한 또는 상이한 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 다른 용량에 대해 후속으로 또는 동시에 다수의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다.

- [0393] 소정 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 항체는 대상체에게 예방적으로 또는 치료적으로 투여된다. 본 명세서에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 질병 또는 이의 증상을 예방, 감소, 또는 호전시키도록 대상체에게 예방적으로 또는 치료적으로 투여될 수 있다.
- [0394] **5.8 유전자 요법**
- [0395] 특이적 실시 형태에서, 항체 또는 이의 기능성 유도체를 인코딩하는 서열을 포함하는 핵산은 본 명세서에 제공된 방법에 사용하기 위해, 예를 들어, 유전자 요법에 의해 IL-1 β -매개 질환, 장애, 또는 병태를 예방, 관리, 치료, 및/또는 개선하기 위해 대상체에게 투여된다. 그러한 요법은 발현된 또는 발현가능한 핵산을 대상체에게 투여함으로써 수행되는 것을 포함한다. 일 실시 형태에서, 핵산은 그의 인코딩된 항체를 생성하고, 항체는 예방적 또는 치료적 효과를 매개한다.
- [0396] 당업계에서 이용가능한 재조합 유전자 발현(또는 유전자 요법)을 위한 임의의 방법이 사용될 수 있다.
- [0397] 유전자 요법의 방법의 일반적인 검토에 대해서는 문헌[Goldspiel *et al.*, 1993, Clinical Pharmacy 12:488-505]; 문헌[Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95]; 문헌[Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596]; 문헌[Mulligan, 1993, Science 260:926-932]; 및 문헌[Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217]; 문헌[May, 1993, TIBTECH 11(5):155-215]을 참조한다. 사용될 수 있는, 재조합 DNA 기법의 당업계에 통상적으로 알려진 방법은 문헌[Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993)]; 및 문헌[Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)]에 기재되어 있다.
- [0398] 구체적인 실시 형태에서, 조성물은 본 명세서에 제공된 항체를 인코딩하는 핵산을 포함하며, 상기 핵산은 적합한 숙주 내에서 상기 항체 또는 이의 키메라 단백질 또는 중쇄 또는 경쇄를 발현하는 발현 벡터의 일부이다. 특히, 그러한 핵산은 항체 코딩 영역에 작동가능하게 연결된 프로모터, 예컨대 이종성 프로모터를 가지며, 상기 프로모터는 유도성 또는 구성적, 및 선택적으로, 조직-특이적이다. 다른 특정 실시 형태에서, 항체 코딩 서열 및 임의의 다른 원하는 서열이 게놈 내의 원하는 부위에서 상동성 재조합을 촉진하는 영역에 의해 플랭킹되어, 항체 인코딩 핵산의 염색체내 발현을 제공하는 핵산 분자가 사용된다(문헌[Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935]; 문헌[Zijlstra *et al.*, 1989, Nature 342:435-438]).
- [0399] 대상체 내로의 핵산의 전달은 직접적(이 경우에는 대상체를 핵산 또는 핵산-담지 벡터에 직접 노출시킴)이거나 간접적(이 경우에는 세포를 먼저 시험관내에서 핵산으로 형질전환시킨 후, 대상체 내로 이식함)일 수 있다. 이러한 2가지 접근법은 생체내 또는 생체외(*ex vivo*) 유전자 요법으로서 각각 알려져 있다.
- [0400] 특이적 실시 형태에서, 핵산 서열(예를 들어, DNA 또는 mRNA 서열)은 생체내에 직접 투여되며, 여기서 서열이 발현되어 인코딩된 생성물을 생성한다. 이는 당업계에 알려진 다양한 방법 중 임의의 것에 의해, 예를 들어, 이들을 적절한 핵산 발현 벡터의 일부로서 작제하고 서열이 세포내가 되도록 벡터를 투여함으로써, 예를 들어, 결합이 있거나 약독화된 레트로바이러스 또는 다른 바이러스 벡터를 사용하는 감염에 의해(미국 특허 제 4,980,286호 참조), 또는 네이키드 DNA 또는 mRNA의 직접 주사에 의해, 또는 마이크로입자 충격(예를 들어, 유전자 총; Biolistic, Dupont)의 사용에 의해, 또는 지질 또는 세포 표면 수용체 또는 형질감염제로 코팅하거나, 리포솜, 마이크로입자, 또는 마이크로캡슐 내에 캡슐화하거나, 핵에 진입하는 것으로 알려진 펩티드에 연결하여 이를 투여함으로써, 수용체-매개 엔도사이토시스를 받는 리간드에 연결하여 그것을 투여함으로써(예를 들어, 문헌[Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432] 참조)(이는 수용체를 특이적으로 발현하는 표적 세포 유형에 사용될 수 있음) 달성될 수 있다. 다른 실시 형태에서는, 리간드가 엔도솜을 파괴하기 위해 융합성 바이러스 펩티드를 포함하는 핵산-리간드 복합체가 형성될 수 있으며, 이는 핵산이 리소솜 분해를 피하는 것을 가능하게 한다. 또 다른 실시 형태에서, 핵산은, 특이적 수용체를 표적화함으로써, 세포 특이적 흡수 및 발현을 위해 생체내에서 표적화될 수 있다(예를 들어, PCT 출원 공개 제WO 92/06180호; 제WO 92/22635호; 제WO 92/20316호; 제WO93/14188호, 제WO 93/20221호 참조). 대안적으로, 상동성 재조합에 의해, 발현을 위해 핵산이 세포내로 도입되고 숙주 세포 DNA 내에 포함될 수 있다(문헌[Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935]; 및 문헌[Zijlstra *et al.*, 1989, Nature 342:435-438]).
- [0401] 구체적인 실시 형태에서, 항체를 인코딩하는 핵산 서열을 함유하는 바이러스 벡터가 사용된다. 예를 들어, 레트로바이러스 벡터가 사용될 수 있다(문헌[Miller *et al.*, 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599] 참조). 이들 레트로바이러스 벡터는 바이러스 게놈의 올바른 패키징 및 숙주 세포 DNA 내로의 통합에 필요한 성분을 함유한다. 유전자 요법에 사용될 항체를 인코딩하는 핵산 서열은 대상체 내로의 유전자의 전달을 용이하게 하는 하나

이상의 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 레트로바이러스 벡터에 대한 더 상세한 내용은 문헌[Boesen *et al.*, 1994, *Biotherapy* 6:291-302]에서 확인할 수 있으며, 이는 줄기 세포를 화학요법에 대해 더 저항성이 되게 하기 위해 MDR1 유전자를 조혈 줄기 세포에 전달하기 위한 레트로바이러스 벡터의 용도를 기재한다. 유전자 요법에서 레트로바이러스 벡터의 용도를 예시하는 다른 참고문헌은 문헌[Clowes *et al.*, 1994, *J. Clin. Invest.* 93:644-651]; 문헌[Klein *et al.*, 1994, *Blood* 83:1467-1473]; 문헌[Salmons and Gunzberg, 1993, *Human Gene Therapy* 4:129-141]; 및 문헌[Grossman and Wilson, 1993, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114]이다.

[0402] 아데노바이러스는 항체의 제조합 생성에 사용될 수 있는 다른 바이러스 벡터이다. 아데노바이러스는 호흡기 상피에 유전자를 전달하기 위한 특히 매력적인 비히클이다. 아데노바이러스는 자연적으로 호흡기 상피를 감염시키며, 여기서 이들은 경도의 질병을 야기한다. 아데노바이러스-기반 전달 시스템에 대한 다른 표적은 간, 중추 신경계, 내피 세포, 및 근육이다. 아데노바이러스는 비분열성 세포를 감염시킬 수 있다는 이점을 갖는다. 문헌[Kozarsky and Wilson, 1993, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503]은 아데노바이러스-기반 유전자 요법에 대한 검토를 제시한다. 문헌[Bout *et al.*, 1994, *Human Gene Therapy* 5:3-10]은 레서스 원숭이의 호흡기 상피에 유전자를 전달하기 위한 아데노바이러스 벡터의 용도를 입증하였다. 유전자 요법에서 아데노바이러스 용도의 다른 사례는 문헌[Rosenfeld *et al.*, 1991, *Science* 252:431-434]; 문헌[Rosenfeld *et al.*, 1992, *Cell* 68:143-155]; 문헌[Mastrangeli *et al.*, 1993, *J. Clin. Invest.* 91:225-23]; PCT 출원 공개 제W094/12649호; 및 문헌[Wang *et al.*, 1995, *Gene Therapy* 2:775-783]에서 확인할 수 있다. 구체적인 실시 형태에서, 아데노바이러스 벡터가 사용된다.

[0403] 아데노-관련 바이러스(AAV)가 또한 이용될 수 있다(문헌[Walsh *et al.*, 1993, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300]; 및 미국 특허 제5,436,146호). 특이적 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 바와 같은 항-IL-1 β 항체를 발현시키기 위해 AAV 벡터가 사용된다. 소정 실시 형태에서, AAV는 VH 도메인을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 다른 실시 형태에서, AAV는 VL 도메인을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 소정 실시 형태에서, AAV는 VH 도메인 및 VL 도메인을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 본 명세서에 제공된 방법의 일부 실시 형태에서, VH 도메인을 인코딩하는 핵산을 포함하는 AAV 및 VL 도메인을 인코딩하는 핵산을 포함하는 AAV가 대상체에게 투여된다. 다른 실시 형태에서, VH 도메인 및 VL 도메인을 인코딩하는 핵산을 포함하는 AAV가 대상체에게 투여된다. 소정 실시 형태에서, VH 및 VL 도메인은 과발현된다.

[0404] 유전자 요법에 대한 다른 접근법은 전기천공, 리포펙션, 인산칼슘 매개 형질감염, 또는 바이러스성 감염과 같은 방법에 의해 유전자를 조직 배양 중인 세포에 전달하는 것을 포함한다. 통상적으로, 전달 방법은 세포에 대한 선택가능한 마커의 전달을 포함한다. 이어서, 세포를 선택 하에 두어서, 전달된 유전자를 흡수하여 이를 발현하고 있는 세포를 분리한다. 이어서, 이들 세포를 대상체에게 전달한다.

[0405] 이러한 실시 형태에서는, 생성되는 제조합 세포의 생체내 투여 전에 세포 내로 핵산이 도입된다. 그러한 도입은 형질감염, 전기천공, 현미주사(microinjection), 핵산 서열을 함유하는 바이러스 벡터 또는 박테리오파지 벡터를 이용한 감염, 세포 융합, 염색체-매개 유전자 전달, 마이크로세포-매개 유전자 전달, 스페로플라스트(spheroplast) 융합 등을 포함하지만 이로 제한되지 않는 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 실행될 수 있다. 세포 내로 외래 유전자를 도입하기 위한 다수의 기법이 당업계에 알려져 있으며(예를 들어, 문헌[Loeffler and Behr, 1993, *Meth. Enzymol.* 217:599-618]; 문헌[Cohen *et al.*, 1993, *Meth. Enzymol.* 217:618-644]; 문헌[Clin. Pharma. Ther. 29:69-92 (1985)]), 수용자 세포의 필요한 발달적 기능 및 생리학적 기능이 파괴되지 않는다면, 본 명세서에 제공된 방법에 따라 사용될 수 있다. 이러한 기법은, 핵산이 세포에 의해 발현가능하도록, 이를 테면 유전성을 나타내고 그의 세포 자손에 의해 발현가능하도록, 세포에 대한 핵산의 안정한 전달을 제공해야 한다.

[0406] 생성되는 제조합 세포는 당업계에 알려진 다양한 방법에 의해 대상체로 전달될 수 있다. 제조합 혈액 세포(예를 들어, 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포)가 정맥내 투여될 수 있다. 사용을 위해 고려되는 세포의 양은 원하는 효과, 환자 상태 등에 좌우되며, 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0407] 유전자 요법의 목적을 위해 핵산을 도입할 수 있는 세포는 임의의 원하는 이용가능한 세포 유형을 포함하며, 상피 세포, 내피 세포, 각질세포, 섬유아세포, 근육 세포, 간세포; 혈액 세포, 예컨대 T 림프구, B 림프구, 단핵구, 대식세포, 호중구, 호산구, 거핵구, 과립구; 다양한 줄기 세포 또는 선조 세포, 특히 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포, 예를 들어, 골수, 제대혈, 말초 혈액, 태아 간 등으로부터 수득되는 바와 같은 것을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

- [0408] 구체적 실시 형태에서, 유전자 요법을 위해 사용되는 세포는 대상체에 대해 자가(*autologous*)이다.
- [0409] 재조합 세포가 유전자 요법에 사용되는 일 실시 형태에서는, 항체를 인코딩하는 핵산 서열을 세포 내로 도입하여, 이들을 세포 또는 이들의 자손에 의해 발현가능하게 되도록 하고, 이어서 재조합 세포를 치료 효과를 위해 생체내 투여한다. 구체적 실시 형태에서, 줄기 세포 또는 선조 세포가 사용된다. 시험관 내에서 단리되고 유지될 수 있는 임의의 줄기 및/또는 선조 세포는 잠재적으로 본 명세서에 제공된 방법의 이러한 실시 형태에 따라 사용될 수 있다(예를 들어, PCT 출원 공개 제WO 94/08598호; 문헌[Stemple and Anderson, 1992, Cell 71:973-985]; 문헌[Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229]; 및 문헌[Pittelkow and Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771] 참조).
- [0410] 구체적 실시 형태에서, 유전자 요법을 목적으로 도입되는 핵산은 코딩 영역에 작동가능하게 연결된 유도성 프로모터를 포함하며, 이로써 전사의 적절한 유도인자의 존재 또는 부재를 제어함으로써 핵산의 발현이 제어가능하게 한다.
- [0411] **5.9. 진단 검정 및 방법**
- [0412] IL-1 β 항원에 면역특이적으로 결합하는 표지된 항체 및 이의 유도체 및 유사체는 IL-1 β -매개 질환을 검출, 진단, 또는 모니터링하기 위한 진단 목적으로 사용될 수 있다. 따라서 본 명세서에는, IL-1 β -매개 질환의 검출 방법으로서, (a) IL-1 β 항원에 면역특이적으로 결합하는 본 명세서에 제공된 하나 이상의 항체를 사용하여 대상체의 세포 또는 조직 샘플에서 IL-1 β 항원의 발현을 검정하는 단계; 및 (b) IL-1 β 항원의 수준을 대조군 수준, 예를 들어, 정상 조직 샘플(예를 들어, IL-1 β -매개 질환을 갖지 않는 환자로부터의, 또는 질환 발병 전의 동일한 환자로부터의)에서의 수준과 비교하는 단계를 포함하며, 이에 의해 IL-1 β 항원의 대조군 수준에 비교하여 IL-1 β 항원의 검정된 수준의 증가는 IL-1 β -매개 질환을 나타내는 방법이 제공된다.
- [0413] 또한 본 명세서에는, IL-1 β -매개 질환을 진단하기 위한 진단 검정으로서, (a) IL-1 β 항원에 면역특이적으로 결합하는 본 명세서에 제공된 하나 이상의 항체를 사용하여 개체의 세포 또는 조직 샘플에서 IL-1 β 항원의 수준을 검정하는 단계; 및 (b) IL-1 β 항원의 수준을 대조군 수준, 예를 들어, 정상 조직 샘플에서의 수준과 비교하는 단계를 포함하며, 이에 의해 IL-1 β 항원의 대조군 수준에 비교하여 검정된 IL-1 β 항원 수준의 증가는 IL-1 β -매개 질환을 나타내는 진단 검정이 제공된다. 소정 실시 형태에서 본 명세서에는, 대상체에서 IL-1 β -매개 질환을 치료하는 방법으로서, (a) IL-1 β 항원에 면역특이적으로 결합하는 본 명세서에 제공된 하나 이상의 항체를 사용하여 대상체의 세포 또는 조직 샘플에서 IL-1 β 항원의 수준을 검정하는 단계; 및 (b) IL-1 β 항원의 수준을 대조군 수준, 예를 들어, 정상 조직 샘플에서의 수준과 비교하는 단계를 포함하며, 이에 의해 IL-1 β 항원의 대조군 수준에 비교하여 검정된 IL-1 β 항원 수준의 증가는 IL-1 β -매개 질환을 나타내는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 본 방법은 (c) IL-1 β -매개 질환을 갖는 것으로 식별된 대상체에게 본 명세서에 제공된 항체의 유효량을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. IL-1 β -매개 질환의 더 확정적인 진단은 보건 전문가들이 더 조기에 예방 조치 또는 공격적인 치료를 사용함으로써 IL-1 β -매개 질환의 발생 또는 추가의 진행을 예방하는 것을 가능하게 할 수 있다.
- [0414] 본 명세서에 제공된 항체는 본 명세서에 기재된 바와 같거나 당업자에게 알려진 바와 같은 고전적인 면역조직화적 방법을 사용하여 생물학적 샘플에서 IL-1 β 항원 수준을 검정하기 위해 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Jalkanen *et al.*, 1985, J. Cell. Biol. 101:976-985]; 및 문헌[Jalkanen *et al.*, 1987, J. Cell. Biol. 105:3087-3096] 참조). 단백질 유전자 발현을 검출하는 데 유용한 다른 항체-기반 방법은 면역검정, 예컨대 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA) 및 방사면역검정(RIA)을 포함한다. 적합한 항체 검정 표지는 당업계에 알려져 있으며, 효소 표지, 예컨대 글루코스 옥시다제; 방사성 동위원소, 예컨대 요오드(¹²⁵I, ¹²¹I), 탄소(¹⁴C), 황(³⁵S), 삼중수소(³H), 인듐(¹²¹In), 및 테크네튬(⁹⁹Tc); 발광 표지, 예컨대 루미놀; 및 형광 표지, 예컨대 플루오레세인 및 로다민, 및 비오틴을 포함한다.
- [0415] 본 명세서에 제공된 일 태양은 인간에서의 IL-1 β -매개 질환의 검출 및 진단이다. 일 실시 형태에서, 진단은 a) IL-1 β 항원에 면역특이적으로 결합하는 표지된 항체의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계(예를 들어, 비경구, 피하, 또는 복강내); b) IL-1 β 항원이 발현되는 대상체 내의 부위에 표지된 항체가 농축되는 것을 가능하게 하도록(그리고 결합되지 않은 표지된 분자가 배경 수준으로 제거되도록) 투여 후에 소정 시간 간격 동안 대기하는 단계; c) 배경 수준을 결정하는 단계; 및 d) 배경 수준을 초과하는 표지된 항체의 검출은 대상체가 IL-1 β -매개 질환을 가지고 있음을 나타내도록, 대상체에서 표지된 항체를 검출하는 단계를 포함한다. 검출된 표지된 분자의 양을 특정 시스템에 대해 이전에 결정된 표준 값에 비교하는 단계를 포함하는 다양한 방법에 의해 배

경 수준이 결정될 수 있다.

- [0416] 사용되는 이미징 시스템 및 대상체의 크기는 진단적 이미지를 생성하는 데 필요한 이미징 모이어티의 양을 결정할 것임이 당업계에 이해되어 있을 것이다. 인간 대상체에 대한 방사성 동위원소 모이어티의 경우, 주사되는 방사능의 양은 통상적으로 약 5 내지 20 밀리퀴리 범위의 ⁹⁹Tc일 것이다. 이어서, 표지된 항체는 특정 단백질을 함유하는 세포의 위치에 축적될 것이다. 생체내 중앙 영상은 문헌[S.W. Burchiel *et al.*, "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel and B.A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982))]에 기재되어 있다.
- [0417] 사용된 표지의 유형 및 투여 방식을 포함한 몇몇 변수에 따라, 표지된 항체가 대상체에서 부위에 농축될 수 있게 하고 결합되지 않은 표지된 항체가 백그라운드 수준으로 제거될 수 있게 하기 위한 투여 후의 시간 간격은 6 내지 48시간 또는 6 내지 24시간 또는 6 내지 12시간이다. 다른 실시 형태에서, 투여 후의 시간 간격은 5 내지 20일 또는 5 내지 10일이다.
- [0418] 일 실시 형태에서는, IL-1 β -매개 질환을 진단하기 위한 방법을, 예를 들어, 초기 진단 후 1 개월, 초기 진단 후 6 개월, 초기 진단 후 1 년 등에 반복함으로써 IL-1 β -매개 질환의 모니터링이 실행된다.
- [0419] 표지된 분자의 존재는 생체내 스캐닝을 위해 당업계에 알려진 방법을 사용하여 대상체에서 검출될 수 있다. 이들 방법은 사용되는 표지의 유형에 따라 좌우된다. 숙련된 기술자는 특정 표지를 검출하기에 적절한 방법을 결정할 수 있을 것이다. 본 명세서에 제공된 진단 방법에 사용될 수 있는 방법 및 장치는 컴퓨터 단층촬영(CT), 전신 스캔, 예컨대 양전자 방출 단층촬영(PET), 자기 공명 영상(MRI), 및 초음파 검사(sonography)를 포함하지만 이로 한정되지 않는다.
- [0420] 특이적 실시 형태에서, 분자는 방사성 동위원소로 표지되고, 방사선 반응성 외과용 기기를 사용하여 환자에서 검출된다(Thurston 등의 미국 특허 제5,441,050호). 다른 실시 형태에서, 분자는 형광 화합물로 표지되고, 형광 반응성 스캐닝 기기를 사용하여 환자에서 검출된다. 다른 실시 형태에서, 분자는 양전자 방출 금속으로 표지되고, 양전자 방출 단층촬영을 사용하여 환자에서 검출된다. 또 다른 실시 형태에서, 분자는 상자성 표지로 표지되고, 자기 공명 영상(MRI)을 사용하여 환자에서 검출된다.
- [0421] **5.10 키트**
- [0422] 적합한 패키징 재료 내에 패키징된 본 명세서에 제공된 항체(예를 들어, 항-IL-1 β 항체), 또는 이의 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)을 포함하는 키트가 또한 본 명세서에 제공된다. 키트는 임의로 라벨 또는 패키징 삽입물(packaging insert)을 포함하며, 이는 성분들의 설명 또는 그 안의 성분들의 시험관내, 생체내, 또는 생체외에서의 사용을 위한 설명서를 포함한다.
- [0423] 용어 "패키징 재료"는 키트의 성분들을 하우징하는 물리적 구조물을 지칭한다. 패키징 재료는 성분들을 멸균 상태로 유지할 수 있으며, 그러한 목적을 위해 통상적으로 사용되는 재료(예를 들어, 종이, 골판 섬유(corrugated fiber), 유리, 플라스틱, 포일, 앰폴, 바이알, 튜브 등)로 제조될 수 있다.
- [0424] 본 명세서에 제공된 키트는 라벨 또는 삽입물을 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 성분, 키트, 또는 패키징 재료(예를 들어, 상자)와는 별도의 또는 이에 고정된, 또는, 예를 들어, 키트 성분을 함유하는 앰폴, 튜브, 또는 바이알에 부착된 "인쇄물", 예를 들어, 종이 또는 판지를 포함한다. 라벨 또는 삽입물은 컴퓨터 판독가능 매체, 예컨대 디스크(예를 들어, 하드 디스크, 카드, 메모리 디스크), 광학 디스크, 예컨대 CD- 또는 DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, 자기 테이프, 또는 전기적 저장 매체, 예컨대 RAM 및 ROM 또는 이들의 하이브리드, 예컨대 자기/광학 저장 매체, FLASH 매체, 또는 메모리 유형 카드를 추가로 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 제조자 정보, 로트 번호, 제조자 소재지, 및 날짜를 확인시켜 주는 정보를 포함할 수 있다.
- [0425] 본 명세서에 제공된 키트는 다른 성분들을 추가로 포함할 수 있다. 키트의 각각의 성분은 개별 용기 내에 봉입될 수 있고, 다양한 용기 모두가 단일 패키지 내에 있을 수 있다. 키트는 또한 저온 저장을 위해 설계될 수 있다. 키트는 추가로 본 명세서에 제공된 항체, 또는 본 명세서에 제공된 항체를 인코딩하는 핵산을 함유하는 세포를 수용하도록 설계될 수 있다. 키트 내의 세포는 즉시 사용가능할 때까지 적절한 저장 조건 하에서 유지될 수 있다.
- [0426] IL-1 β 항원에 면역특이적으로 결합하는 항체의 패널이 또한 본 명세서에 제공된다. 특이적 실시 형태에서, IL-1 β 항원에 대한 상이한 결합 속도 상수, 상이한 해리 속도 상수, 상이한 친화도, 및/또는 IL-1 β 항원에 대

한 상이한 특이성을 갖는 항체들의 패널이 본 명세서에 제공된다. 소정 실시 형태에서, 약 10, 바람직하게는 약 25, 약 50, 약 75, 약 100, 약 125, 약 150, 약 175, 약 200, 약 250, 약 300, 약 350, 약 400, 약 450, 약 500, 약 550, 약 600, 약 650, 약 700, 약 750, 약 800, 약 850, 약 900, 약 950, 또는 약 1000개 또는 그 이상의 항체의 패널이 본 명세서에 제공된다. 예를 들어, 96웰 또는 384웰 플레이트, 예컨대 ELISA와 같은 검정을 위한 것에 항체의 패널이 사용될 수 있다.

[0427] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용되는 모든 기술 과학 용어는 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료가 본 명세서에 기재되어 있다.

[0428] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 수치 값이 종종 본 명세서 전체에 걸쳐 범위 형식으로 제시된다. 범위 형식의 사용은 단지 편의상 및 간결성을 위한 것이며, 문맥상 명백히 달리 나타내지 않는 한 본 발명의 범주에 대한 완강한 제한으로서 해석되어서는 안 된다. 따라서, 범위의 사용은, 문맥상 명백히 달리 나타내지 않는 한, 모든 가능한 하위범위, 그 범위 내의 모든 개별 수치 값, 및 모든 수치 값 또는 수치 범위 - 이에 는 그러한 범위 내의 정수, 및 범위 내의 값 또는 정수의 분수가 포함됨 - 를 명시적으로 포함한다. 이러한 구성은 본 특허 문헌 전체에 걸쳐 범위의 폭에 관계없이 그리고 모든 문맥상 적용된다. 따라서, 예를 들어, 90 내지 100%의 범위에 대한 언급은 91 내지 99%, 92 내지 98%, 93 내지 95%, 91 내지 98%, 91 내지 97%, 91 내지 96%, 91 내지 95%, 91 내지 94%, 91 내지 93% 등을 포함한다. 90 내지 100%의 범위에 대한 언급은 또한 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 97% 등뿐만 아니라, 91.1%, 91.2%, 91.3%, 91.4%, 91.5% 등, 92.1%, 92.2%, 92.3%, 92.4%, 92.5% 등, 및 기타 등등을 포함한다.

[0429] 또한, 1 내지 3, 3 내지 5, 5 내지 10, 10 내지 20, 20 내지 30, 30 내지 40, 40 내지 50, 50 내지 60, 60 내지 70, 70 내지 80, 80 내지 90, 90 내지 100, 100 내지 110, 110 내지 120, 120 내지 130, 130 내지 140, 140 내지 150, 150 내지 160, 160 내지 170, 170 내지 180, 180 내지 190, 190 내지 200, 200 내지 225, 225 내지 250의 범위에 대한 언급은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 등을 포함한다. 추가의 예에서, 25 내지 250, 250 내지 500, 500 내지 1,000, 1,000 내지 2,500, 2,500 내지 5,000, 5,000 내지 25,000, 25,000 내지 50,000의 범위에 대한 언급은 그러한 값 이내에 있거나 이를 포함하는 임의의 수치 값 또는 범위, 예를 들어, 25, 26, 27, 28, 29...250, 251, 252, 253, 254...500, 501, 502, 503, 504... 등을 포함한다.

[0430] 본 명세서에 또한 사용되는 바와 같이, 일련의 범위가 본 명세서 전체에 걸쳐 개시된다. 일련의 범위의 사용은 더 높은 범위와 더 낮은 범위의 조합을 포함하여 다른 범위를 제공한다. 이러한 구성은 본 특허 문헌 전체에 걸쳐 범위의 폭에 관계없이 그리고 모든 문맥상 적용된다. 따라서, 예를 들어, 5 내지 10, 10 내지 20, 20 내지 30, 30 내지 40, 40 내지 50, 50 내지 75, 75 내지 100, 100 내지 150과 같은 일련의 범위에 대한 언급은 5 내지 20, 5 내지 30, 5 내지 40, 5 내지 50, 5 내지 75, 5 내지 100, 5 내지 150, 및 10 내지 30, 10 내지 40, 10 내지 50, 10 내지 75, 10 내지 100, 10 내지 150, 및 20 내지 40, 20 내지 50, 20 내지 75, 20 내지 100, 20 내지 150 등과 같은 범위를 포함한다.

[0431] 간결성을 위해, 소정 약어가 본원에 사용된다. 하나의 예는 아미노산 잔기를 나타내는 1-문자 약어이다. 아미노산 및 이의 상응하는 3-문자 및 1-문자 약어는 하기와 같다:

알라닌	Ala	(A)
아르기닌	Arg	(R)
아스파라긴	Asn	(N)
아스파르트산	Asp	(D)
시스테인	Cys	(C)
글루탐산	Glu	(E)
글루타민	Gln	(Q)
글리신	Gly	(G)
히스티딘	His	(H)
아이소류신	Ile	(I)
류신	Leu	(L)
라이신	Lys	(K)
메티오닌	Met	(M)
페닐알라닌	Phe	(F)
프롤린	Pro	(P)
세린	Ser	(S)
트레오닌	Thr	(T)
트립토판	Trp	(W)
티로신	Tyr	(Y)
발린	Val	(V)

[0432]

[0433]

본 발명은 다수의 실시 형태를 기재하기 위해 긍정 언어를 사용하여 일반적으로 본 명세서에 개시된다. 본 발명은 또한 물질 또는 재료, 방법 단계 및 조건, 프로토콜, 절차, 검정, 또는 분석과 같은 특정 주제가 전체적으로 또는 부분적으로 배제되는 실시 형태를 구체적으로 포함한다. 따라서, 본 발명이 포함하지 않는 것의 관점에서 본 발명이 본 명세서에 일반적으로 표현되지 않더라도, 그럼에도 불구하고 본 발명에 명시적으로 포함되지 않은 태양들이 본 명세서에 개시된다.

[0434]

본 발명의 다수의 실시 형태가 기재되었다. 그럼에도 불구하고, 다양한 변경이 본 발명의 사상 및 범주로부터 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 따라서, 하기 실시예는 청구범위에 기재된 본 발명의 범주를 예시하지만 이를 제한하고자 하지 않는다.

[0435]

6. 실시 형태

[0436]

본 발명은 하기의 비제한적인 실시 형태를 제공한다.

[0437]

일 세트의 실시 형태에서, 하기가 제공된다:

[0438]

1.

[0439]

(1) (i) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는 VH의, VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3의 아미노산 서열을 각각 갖는 VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3을 포함하는 VH; 및 (ii) 서열 번호 8의 아미노산 서열을 갖는 VL의, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3의 아미노산 서열을 각각 갖는 VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는 VL;

[0440]

(2) (i) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 VH의, VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3의 아미노산 서열을 각각 갖는 VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3을 포함하는 VH; 및 (ii) 서열 번호 10의 아미노산 서열을 갖는 VL의, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3의 아미노산 서열을 각각 갖는 VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는 VL; 또는

[0441]

(3) (i) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 갖는 VH의, VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3의 아미노산 서열을 각각 갖는 VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3을 포함하는 VH; 및 (ii) 서열 번호 12의 아미노산 서열을 갖는 VL의, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3의 아미노산 서열을 각각 갖는 VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는 VL을 포함하는, IL-1 β 에 결합하는 항체.

[0442]

2. 실시 형태 1에 있어서, (i) VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3 아미노산 서열

은 카바트 넘버링 시스템에 따르고/따르거나; (ii) VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3 아미노산 서열은 초티아 넘버링 시스템에 따르고/따르거나; (iii) VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3 아미노산 서열은 AbM 넘버링 시스템에 따르고/따르거나; (iv) VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3 아미노산 서열은 콘택트 넘버링 시스템에 따르고/따르거나; (v) VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3 아미노산 서열은 IMGT 넘버링 시스템에 따르는, 항체.

3.

(1) (i) 서열 번호 13, 서열 번호 31, 서열 번호 49, 서열 번호 67, 및 서열 번호 85로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 14, 서열 번호 32, 서열 번호 50, 서열 번호 68, 및 서열 번호 86으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 15, 서열 번호 33, 서열 번호 51, 서열 번호 69, 및 서열 번호 87로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 16, 서열 번호 34, 서열 번호 52, 서열 번호 70, 및 서열 번호 88로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 17, 서열 번호 35, 서열 번호 53, 서열 번호 71, 및 서열 번호 89로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 18, 서열 번호 36, 서열 번호 54, 서열 번호 72, 및 서열 번호 90으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

(2) (i) 서열 번호 19, 서열 번호 37, 서열 번호 55, 서열 번호 73, 및 서열 번호 91로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 20, 서열 번호 38, 서열 번호 56, 서열 번호 74, 및 서열 번호 92로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 21, 서열 번호 39, 서열 번호 57, 서열 번호 75, 및 서열 번호 93으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 22, 서열 번호 40, 서열 번호 58, 서열 번호 76, 및 서열 번호 94로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 23, 서열 번호 41, 서열 번호 59, 서열 번호 77, 및 서열 번호 95로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 24, 서열 번호 42, 서열 번호 60, 서열 번호 78, 및 서열 번호 96으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL; 또는

(3) (i) 서열 번호 25, 서열 번호 43, 서열 번호 61, 서열 번호 79, 및 서열 번호 97로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 26, 서열 번호 44, 서열 번호 62, 서열 번호 80, 및 서열 번호 98로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 27, 서열 번호 45, 서열 번호 63, 서열 번호 81, 및 서열 번호 99로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 28, 서열 번호 46, 서열 번호 64, 서열 번호 82, 및 서열 번호 100으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 29, 서열 번호 47, 서열 번호 65, 서열 번호 83, 및 서열 번호 101로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 30, 서열 번호 48, 서열 번호 66, 서열 번호 84, 및 서열 번호 102로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL을 포함하는, IL-1 β 에 결합하는 항체.

4.

(1) (i) 서열 번호 13의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 14의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 15의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 16의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 17의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 18의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

(2) (i) 서열 번호 19의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 20의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 21의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 22의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 23의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 24의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

(3) (i) 서열 번호 25의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 26의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 27의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

(ii) 서열 번호 28의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 29의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 30의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL;

(4) (i) 서열 번호 31의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 32의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서

열 번호 96의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL; 또는

[0479] (15) (i) 서열 번호 97의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 서열 번호 98의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 서열 번호 99의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH; 및

[0480] (ii) 서열 번호 100의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 서열 번호 101의 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 서열 번호 102의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL을 포함하는, IL-1 β 에 결합하는 항체.

[0481] 5. 실시 형태 1 내지 실시 형태 4 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 7, 서열 번호 8, 서열 번호 9, 서열 번호 10, 서열 번호 11, 및/또는 서열 번호 12에 제시된 바와 같은 하나 이상의 프레임워크 영역을 추가로 포함하는, 항체.

[0482] 6. 실시 형태 1 내지 실시 형태 5 중 어느 하나에 있어서,

[0483] (i) 서열 번호 7의 아미노산 서열을 갖는 VH, 및 서열 번호 8의 아미노산 서열을 갖는 VL을 포함하거나;

[0484] (ii) 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 VH, 및 서열 번호 10의 아미노산 서열을 갖는 VL을 포함하거나;

[0485] (iii) 서열 번호 11의 아미노산 서열을 갖는 VH, 및 서열 번호 12의 아미노산 서열을 갖는 VL을 포함하는, 항체.

[0486] 7. 실시 형태 1 내지 실시 형태 6 중 어느 하나에 있어서, 인간화 항체인, 항체.

[0487] 8. 실시 형태 1 내지 실시 형태 7 중 어느 하나에 있어서, IgG 항체인, 항체.

[0488] 9. 실시 형태 8에 있어서, IgG 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 항체인, 항체.

[0489] 10. 실시 형태 1 내지 실시 형태 9 중 어느 하나에 있어서, 카파 경쇄를 포함하는, 항체.

[0490] 11. 실시 형태 1 내지 실시 형태 9 중 어느 하나에 있어서, 람다 경쇄를 포함하는, 항체.

[0491] 12. 실시 형태 1 내지 실시 형태 11 중 어느 하나에 있어서, 돌연변이체 Fc 영역을 포함하는, 항체.

[0492] 13. 실시 형태 12에 있어서, 돌연변이체 Fc 영역은 M252Y/S254T/T256E(YTE) 돌연변이를 포함하는, 항체.

[0493] 14. 실시 형태 1 내지 실시 형태 13 중 어느 하나에 있어서, 단일클론 항체인, 항체.

[0494] 15. 실시 형태 1 내지 실시 형태 14 중 어느 하나에 있어서, IL-1 β 항원에 결합하는, 항체.

[0495] 16. 실시 형태 1 내지 실시 형태 14 중 어느 하나에 있어서, IL-1 β 에피토프에 결합하는, 항체.

[0496] 17. 실시 형태 1 내지 실시 형태 14 중 어느 하나에 있어서, IL-1 β 에 특이적으로 결합하는, 항체.

[0497] 18. 실시 형태 1 내지 실시 형태 17 중 어느 하나에 있어서, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3은 IL-1 β 의 항원에 대한 결합 부위를 형성하는, 항체.

[0498] 19. 실시 형태 1 내지 실시 형태 15 중 어느 하나에 있어서, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3은 IL-1 β 의 에피토프에 대한 결합 부위를 형성하는, 항체.

[0499] 20. 실시 형태 1 내지 실시 형태 19 중 어느 하나에 있어서, 다중특이성인, 항체.

[0500] 21. 실시 형태 20에 있어서, 2개 이상의 항원에 결합할 수 있는, 항체.

[0501] 22. 실시 형태 20에 있어서, 3개 이상의 항원에 결합할 수 있는, 항체.

[0502] 23. 실시 형태 20에 있어서, 4개 이상의 항원에 결합할 수 있는, 항체.

[0503] 24. 실시 형태 20에 있어서, 5개 이상의 항원에 결합할 수 있는, 항체.

[0504] 25. 실시 형태 1 내지 실시 형태 24 중 어느 하나의 항체를 포함하며, 여기서 항체는 체제에 유전자 융합되거나 화학적으로 접합되는, 결합 분자.

[0505] 26. 실시 형태 1 내지 실시 형태 24 중 어느 하나의 항체를 인코딩하는, 핵산.

[0506] 27. 실시 형태 26의 핵산을 포함하는, 벡터.

[0507] 28. 실시 형태 27의 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

- [0508] 29. 실시 형태 27의 백터 및 이를 위한 패키징을 포함하는, 키트.
- [0509] 30. 실시 형태 1 내지 실시 형태 24 중 어느 하나의 항체 및 이를 위한 패키징을 포함하는, 키트.
- [0510] 31. 실시 형태 1 내지 실시 형태 24 중 어느 하나의 항체 및 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0511] 32. 실시 형태 31의 약제학적 조성물을 생성하는 방법으로서, 항체를 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제와 조합하여 약제학적 조성물을 수득하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0512] 33. 세포에서 IL-1 β 또는 IL-1 β 매개 신호전달을 억제하는 방법으로서, 세포를 실시 형태 1 내지 실시 형태 24 중 어느 하나의 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0513] 34. 세포에서 IL-6, ENA-78(CXCL5), 및/또는 G-CSF의 IL-1 β 유도 생성을 억제하는 방법으로서, 세포를 실시 형태 1 내지 실시 형태 24 중 어느 하나의 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0514] 35. 세포에서 IL-6, ENA-78(CXCL5), 및/또는 G-CSF의 생성을 감소시키는 방법으로서, 세포를 실시 형태 1 내지 실시 형태 24 중 어느 하나의 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0515] 36. IL-1 β 발현 세포의 성장 또는 증식을 억제하는 방법으로서,
- [0516] 세포를 실시 형태 1 내지 실시 형태 24 중 어느 하나의 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0517] 37. 실시 형태 33 내지 실시 형태 36 중 어느 하나에 있어서, 세포 또는 세포들은 질환 또는 장애를 갖는 대상체에 존재하는, 방법.
- [0518] 38. 대상체에서 IL-1 β 를 억제하는 방법으로서, 실시 형태 1 내지 실시 형태 24 중 어느 하나의 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0519] 39. 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법으로서, 실시 형태 1 내지 실시 형태 24 중 어느 하나의 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0520] 40. 실시 형태 37 또는 실시 형태 39에 있어서, 질환 또는 장애는 IL-1 β 관련 질환 또는 장애인, 방법.
- [0521] 41. 실시 형태 40에 있어서, IL-1 β 관련 질환 또는 장애는 염증성 질환 또는 장애인, 방법.
- [0522] 42. 실시 형태 40에 있어서, IL-1 β 관련 질환 또는 장애는 암인, 방법.
- [0523] 43. 실시 형태 42에 있어서, 암은 폐암인, 방법.
- [0524] 44. 실시 형태 43에 있어서, 폐암은 비-소세포 폐암이며, 여기서 임의로 비-소세포 폐암은 0기, 1기, 2기, 3기, 또는 4기에 도달한, 방법.
- [0525] 45. 실시 형태 42에 있어서, 암은 신장암인, 방법.
- [0526] 46. 실시 형태 45에 있어서, 신장암은 신세포암인, 방법.
- [0527] 47. 실시 형태 46에 있어서, 신세포암은 1기, 2기, 또는 3기에 도달한, 방법.
- [0528] 48. hIL-1 β 에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 단리된 단백질로서, 상기 항원 결합 도메인은 도 1에서 식별된 에피토프로부터 선택된 서열을 갖는 hIL-1 β 상의 에피토프에 결합하는, 단리된 단백질.
- [0529] 49. 실시 형태 48에 있어서, 05H21A의 동일한 에피토프(들)에 결합하는, 단리된 단백질.
- [0530] 50. 실시 형태 48에 있어서, 15N14A의 동일한 에피토프(들)에 결합하는, 단리된 단백질.
- [0531] 51. 실시 형태 48에 있어서, 08F17A의 동일한 에피토프(들)에 결합하는, 단리된 단백질.
- [0532] 본 발명의 특정 실시형태가 본 명세서에 기재되어 있다. 전술한 설명의 해석 시, 개시된 실시 형태들의 변형이 당업자에게 명백해질 수 있으며, 당업자는 적절한 이러한 변형을 이용할 수 있음이 예상된다. 따라서, 본 발명은 본원에 구체적으로 기재된 것과 다른 방식으로 실시될 수 있으며, 본 발명은 적용 가능한 법에 의해 허용되는 본원에 첨부된 청구범위에 나열된 기술 요지의 모든 변경 및 등가물을 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 본원에서 달리 명시되거나, 문맥 상 명백하게 모순되지 않는 한, 이의 모든 가능한 변형에서 상기 기재된 요소의 임의의 조합이 본 발명에 의해 포함된다. 본 발명의 다수의 실시 형태가 기재되었다. 그럼에도 불구하고, 다양한 변경이 본 발명의 사상 및 범주로부터 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 따라서, 실

시에 부분에서의 설명은 청구범위에 기재된 본 발명의 범위를 예시하려는 것이지 제한하려는 것은 아니다.

7. 실시예

하기는 연구에 사용된 다양한 방법 및 재료의 설명이며, 당업자에게 본 개시내용을 실행하고 사용하는 방법에 대한 완전한 개시내용 및 설명을 제공하도록 제시되고, 본 발명자들이 이들의 개시내용으로 간주하는 것의 범주를 제한하도록 의도되는 것도 아니고 하기 실험이 수행되었고 수행될 수 있는 실험의 전부임을 이들이 나타내도록 의도되는 것도 아니다. 현재 시제로 작성된 예시적인 설명은 반드시 수행된 것은 아니지만 본 개시내용의 교시와 관련된 데이터 등을 생성하기 위해 설명이 수행될 수 있음이 이해되어야 한다. 사용된 숫자(예를 들어, 양, 백분율 등)에 관련하여 정확도를 보장하기 위해 노력하였지만, 일부 실험 오차 및 편차가 고려되어야 한다.

7.1 실시예 1: IL-1 β mAb 분자 설계, 서열, 및 구조

IL-1 β 신호전달 경로를 중화시킬 수 있는 고친화도 및 강력한 항-IL-1 β 항체 분자를 생성하였다. 감소된 생물 활성을 갖는 인간 IL-1 β 의 변이체(D145K)를 인코딩하는 DNA 번역화 캠페인을 Alivamab 유전자이식 마우스 플랫폼에서 실행하였다. 항체 반감기를 향상시키기 위해YTE 돌연변이(M252Y/S254T/T256E)를 포함하도록, 본 명세서에 기재된 3개의 선도(클론: 05H21A, 15N14A, 및 08F17A)를 Fc 조작하였다.

선도 후보의 HC 및 LC에 대한 아미노산 서열은 하기 표 3에 나타난다. 선도 후보의 VL 및 VH 아미노산 서열은 표 4에 나타난다. 선도 후보의 각각의 사슬 내의 3개의 상보성-결정 영역(CDR)은 표 5 내지 표 9에 나타난다.

[0538] [표 3]

선도 항-IL-1 β mAb 의 HC 및 LC AA 서열

명칭	HC AA Seq	LC AA Seq
05H21A 중쇄 동종형: IgG1-YTE 경쇄 동종형: 람다	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSG MWVSWIRQPPGKALEWLALIDWGDDKYTTTS LKTRLTISKDTSKNQVVLTMNMDPVDATY YCARMREGSRAFDIWGGQTVTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL YIIR E PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK(서열 번호 1)	QSVLTQPPSVSEAPRQRTVISCSSSSNIGDNAV NWYQQLPGKAPKLLIYNDLLSSGVSDRFSGS KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNG PVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS(서열 번호 2)
15N14A 중쇄 동종형: IgG1-YTE 경쇄 동종형: 람다	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYY WTWIRQAPAGKLEWIGRIDSSGSSKYNPTLKS RVTMSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCA RGDSGYDWAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL YIIR E PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK(서열 번호 3)	QAVLTQPSSLSASPGASASLTCTLRSGINVGTY RIYWYQKPGSPQYLLSYKSDSDKQGGSGVP SRFSGSKDASANVGILLISGLQSEDEADYYCMI WHSSAWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPS SEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS(서열 번호 4)
08F17A 중쇄 동종형: IgG1-YTE 경쇄 동종형: 카파	EVQLVESGGGLVTPGGSLRLSCAASGFTFSGY SMNWVRQAPGKLEWVSSISSSGYIYYADSV KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CAREYWGSGFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL YIIR E PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK(서열 번호 5)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISYYLA WYQKPGKVPKLLISAEFTLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYNTAPRTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC(서열 번호 6)

[0539]

[0540] [표 4]

선도 항-IL-1 β mAb 의 VH 및 VL AA 서열

명칭	VH AA Seq	VL AA Seq
05H21A	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSL STSGMWVSWIRQPPGKALEWLALIDWG DDKYTTTSLKTRLTISKDTSKNQVVLTM TNMDPVDATYYCARMREGSRAFDIWG QGTVTTVSS(서열 번호 7)	QSVLTQPPSVSEAPRQRTVISCSSSSNI GDNAVNWYQQLPGKAPKLLIYNDLL SSGVSDRFSGSKSGTSASLAISGLQSED EADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLT VL(서열 번호 8)
15N14A	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSI SSYYWTWIRQAPAGKLEWIGRIDSSGSS KYNPTLKSRTVMSVDTSKNQFSLKLSV TAADTAVYYCARGDSGYDWAFDYWGQ GTLTVTVSS(서열 번호 9)	QAVLTQPSSLSASPGASASLTCTLRSGI NVGTYRIYWYQKPGSPQYLLSYKS DSDKQGGSGVPSRFSGSKDASANVGIL LISGLQSEDEADYYCMIWHSSAWVFG GGTKLTVL(서열 번호 10)
08F17A	EVQLVESGGGLVTPGGSLRLSCAASGFT FSGYSMNWVRQAPGKLEWVSSISSSG YIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREYWGSGFDYWGQ GTLTVTVSS(서열 번호 11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ GISYYLAWYQKPGKVPKLLISAEFTL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED VATYYCQKYNTAPRTFGQGTKVEIK(서열 번호 12)

[0541]

[0542] [표 5]

선도 항-IL-1 β mAb 의 카바트 CDR AA 서열

명칭	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
05H21A	TSGMWVS (서열 번호 13)	LIDWGD DKY TSLKT (서열 번호 14)	MREGSRAFD I(서열 번호 15)	SGSSSNIGDNA VN (서열 번호 16)	NDDLSS (서열 번호 17)	AAWDDSLNGP V(서열 번호 18)
15N14A	SYWT (서열 번호 19)	RIDSSGSKYN PILKS (서열 번호 20)	GDSGYDWAFD Y(서열 번호 21)	TLRSGINVTY RIY (서열 번호 22)	YKSDSKQGG S(서열 번호 23)	MIWHSSAWV (서열 번호 24)
08F17A	GYSMN (서열 번호 25)	SISSSGYTYA DSVKG (서열 번호 26)	EYWGS GFDY (서열 번호 27)	RASQGISYLA (서열 번호 28)	AEFTLQS (서열 번호 29)	QKYNTAPRT (서열 번호 30)

[0543]

[0544] [표 6]

선도 항-IL-1 β mAb 의 초티아 CDR AA 서열

명칭	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
05H21A	GFSLSTSGM (서열 번호 31)	DWGDD (서열 번호 32)	MREGSRAFD I (서열 번호 33)	SGSSSNIGDN AVN (서열 번호 34)	NDDLSS (서열 번호 35)	AAWDDSLN GPV (서열 번호 36)
15N14A	GGSISY (서열 번호 37)	DSSGS (서열 번호 38)	GDSGYDWA FDY (서열 번호 39)	TLRSGINVTY RIY (서열 번호 40)	YKSDSKQGG S (서열 번호 41)	MIWHSSAW V (서열 번호 42)
08F17A	GFIFSGY (서열 번호 43)	SSSGY (서열 번호 44)	EYWGS GFDY (서열 번호 45)	RASQGISY LA (서열 번호 46)	AEFTLQS (서열 번호 47)	QKYNTAPRT (서열 번호 48)

[0545]

[0546] [표 7]

선도 항-IL-1 β mAb 의 AbM CDR AA 서열

명칭	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
05H21A	GFSLSTSGM WVS (서열 번호 49)	LIDWGD DKY (서열 번호 50)	MREGSRAFD I (서열 번호 51)	SGSSSNIGDN AVN (서열 번호 52)	NDDLSS (서열 번호 53)	AAWDDSLN GPV (서열 번호 54)
15N14A	GGSISYYW T (서열 번호 55)	RIDSSGSK (서열 번호 56)	GDSGYDWA FDY (서열 번호 57)	TLRSGINVTY RIY (서열 번호 58)	YKSDSKQGG S (서열 번호 59)	MIWHSSAW V (서열 번호 60)
08F17A	GFIFSGYSM N (서열 번호 61)	SISSSGYTY (서열 번호 62)	EYWGS GFDY (서열 번호 63)	RASQGISY LA (서열 번호 64)	AEFTLQS (서열 번호 65)	QKYNTAPRT (서열 번호 66)

[0547]

[0548] [표 8]

선도 항-IL-1 β mAb 의 콘택트 CDR AA 서열

명칭	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
05H21A	STSGMWVS (서열 번호 67)	WLALIDWG DDKY (서열 번호 68)	ARMREGSR AFD (서열 번호 69)	IGDNAVNW Y (서열 번호 70)	LLIYNDDLSS (서열 번호 71)	AAWDDSLN GP (서열 번호 72)
15N14A	SSYYWT (서열 번호 73)	WIGRIDSSGS SK (서열 번호 74)	ARGDSGYD WAFD (서열 번호 75)	NVGTYRIW Y (서열 번호 76)	YLLSYKSDS DKQGG (서열 번호 77)	MIWHSSAW (서열 번호 78)
08F17A	SGYSMN (서열 번호 79)	WVSSISSSG YTY (서열 번호 80)	AREYWGS GFD (서열 번호 81)	SYLAWY (서열 번호 82)	LLISAEFTLQ (서열 번호 83)	QKYNTAPR (서열 번호 84)

[0549]

[0550] [표 9]

선도 항-IL-1 β mAb의 IMGT CDR AA 서열

명칭	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
05H21A	GFSLSTSGMW (서열 번호 85)	IDWGDDK (서열 번호 86)	ARMREGSRAFDI (서열 번호 87)	SSNIGDNA (서열 번호 88)	NDD (서열 번호 89)	AAWDDSLNGPV (서열 번호 90)
15N14A	GGSSISYY (서열 번호 91)	IDSSGSS (서열 번호 92)	ARGDSGYDWAFFDY (서열 번호 93)	SGINVGTYR (서열 번호 94)	YKSDSDK (서열 번호 95)	MIWHSSAWV (서열 번호 96)
08F17A	GFTIFSGYS (서열 번호 97)	ISSSSGYI (서열 번호 98)	AREYWGSGF DY (서열 번호 99)	QGISYY (서열 번호 100)	AEF (서열 번호 101)	QKYNTAPRT (서열 번호 102)

[0551]

[0552] 7.1.1 05H21A, 15N14A, 및 08F17A의 분자 설계

[0553] 05H21A, 15N14A, 및 08F17A는 인간 IL-1 β 에 결합하는 면역글로불린 G1(IgG1) 단일클론 항체(mAb)이다. 항체는 약 pH 6에서 신생아 Fc 수용체(FcRn)와의 상호작용을 향상시키기 위해 불변 영역에서 M252Y, S254T, 및 T256E(YTE, EU 넘버링)의 돌연변이를 특징으로 하며, 이에 의해 FcRn-매개 엔도솜 재활용을 향상시켜 더 긴 혈청 노출로 이어진다(문헌[Dall'Acqua et al., J Biol Chem, 2006. 281(33): 23514-241]; 문헌[Dall'Acqua et al., J Immunol, 2002. 169(9): 5171-80]). 이러한 mAb는 인간 IL-1 β 를 표적화하고, IL-1R1에 대한 그의 결합을 차단하고, IL-1 β 신호전달을 억제하기 위해 개발되었으며, 이는 암에 연결된 염증 경로이다(문헌[Ridker, P.M. et al., Lancet, 2017. 390(10105): 1833-1842]).

[0554] 7.1.2 코딩 서열의 공급원

[0555] 05H21A, 15N14A, 및 08F17A는 hIL-1 β D145K를 인코딩하는 재조합 DNA를 갖는 인간 항체 레퍼토리를 보유하는 형질전환 마우스(Ablexis®)를 면역화함으로써 획득하였다. 이러한 3개의 선도 항체를 인간 IgG1-YTE 불변 영역 내로 서브클로닝하고 재조합적으로 발현시켰다.

[0556] 7.1.3 서열 및 구조

[0557] 7.1.3.1 05H21A, 15N14A, 및 08F17A의 아미노산 서열

[0558] 05H21A, 15N14A, 및 08F17A HC 및 LC에 대한 아미노산 서열을, 이들의 cDNA 서열로부터 추론되고 펩티드 맵핑 및 질량 분석에 의해 확인된 바와 같이 표 3에 나타낸다. 각각의 사슬 내의 3개의 상보성-결정 영역(CDR)을 표 5 내지 표 9에 나타낸다. 05H21A, 15N14A, 및 08F17A의 VL 및 VH 아미노산 서열을 표 4에 나타낸다. HC의 위치 1에서의 글루타민(Q) 잔기 및 LC의 위치 1에서의 글루타민(Q)은 05H21A 및 15N14A의 성숙 사슬의 N-말단을 구성한다. HC의 위치 1에서의 글루탐산(E) 잔기 및 LC의 위치 1에서의 아스파르트산(D)은 08F17A의 성숙 사슬의 N-말단을 구성한다. 05H21A, 15N14A, 및 08F17A의 중쇄 불변 도메인에서의 YTE 돌연변이를 표 1에서 굵은체 및 밑줄로 나타낸다.

[0559] 7.1.3.2 05H21A, 15N14A, 및 08F17A 가변 도메인에 대한 EpiVax EpiMatrix에 의한 컴퓨터 모의실험 면역원성 위험 평가

[0560] EpiVax EpiMatrix 컴퓨터 모의실험 면역원성 예측 프로그램으로부터의 T-조절(T_{reg}) 조정된 점수를 사용하여 잠재적인 면역원성에 대해 mAb 가변 영역 서열을 분석하였다(문헌[De Groot et al., Clin Immunol, 2009. 131(2): 189-201]). EpiVax Epimatrix 프로그램은 각각의 "수퍼유형" 또는 그룹화 내의 가장 통상적인 HLA 분자에 대한 결합 잠재력을 계산한다. 보고서는 각각의 일배체형을 개별적으로 시험할 필요 없이 전세계 인구의 90% 초과를 대표하는 결과를 제공한다. EpiVax 점수는 주어진 단백질 서열 내에 함유된 모든 예측 T-세포 에피토프의 EpiMatrix 점수를 중합하고, 예상 T-세포 에피토프 함량 및 단백질 길이에 대해 조정함으로써 계산된다. EpiVax 점수 및 EpiVax 해석을 표 10에 하기와 같이 나타낸다.

[0561] [표 10]

05H21A(항-hu IL-1 β)에 대한 면역원성 평가

Ab 명칭	사슬 정보	EpiVax 점수
05H21A	경쇄 VL	-61.54
	중쇄 VH	-35.07
15N14A	경쇄 VL	3.31
	중쇄 VH	14.84
08F17A	경쇄 VL	-42.83
	중쇄 VH	-37.91

[0562]

[0563] 7.2 실시예 2: 05H21A, 15N14A, 및 08F17A의 발현 작제물의 생성

[0564] 05H21A, 15N14A, 및 08F17A 항체를 인코딩하는 cDNA를 합성하고, ATUM(미국 캘리포니아주 소재)에서 Leap-In Transposase[®] 글루타민 합성효소 발현 벡터 골격 내로 서브클로닝하였다. 이어서, 이중-유전자 발현 플라스미드를 JRD(미국 펜실베이니아주 소재)의 Manufacturing Plasmid Generation Group에 전달하였고, 이들의 서열은 NeoGenomics Laboratories(미국 캘리포니아주 소재)에서 확인되었다.

[0565] 중쇄 및 경쇄 유전자에 대한 1차 전사체 뉴클레오티드 서열은 표 11에 열거된다.

[0566] [표 11]

05H21A, 15N14A, 및 08F17A 의 HC 및 LC 뉴클레오타이드 서열

명칭	LC 뉴클레오타이드 Seq	HC 뉴클레오타이드 Seq
05H21A	CAGTCTGTGCTGACCCAGCCTCCATCT GTGTCTGAGGCCCCTAGACAGAGAGTG ACCATCTCCTGCTCCGGCTCCTCCTCTA ACATCGGCGATAACGCCGTGAAGTGGT ATCAGCAGCTGCCTGGCAAGGCCCTA AACTGCTGATCTACAACGACGACCTGC TGTCTCTGGCGTGTCGACAGATTCT CCGGCTCTAAGTCTGGCACCTCCGCCA GCCTGGCTATCTCTGGATTGCAGTCTG AGGACGAGGCCGACTACTACTGTGCCG CCTGGGACGATTCTCTGAACGGCCCTG TTTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACAG TCCTGGGTGAGCCCAAGGCTGCACCCA GTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGA GGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACT GGTGTGTCTCATAAGTGAAGTCTACCC GGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGG CCGATAGCAGCCCGTCAAGGCGGGA GTCGAAACCACCACACCCTCCAAACAA AGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAG CTATCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTG GAAGTCCACAGAAAGCTACAGCTGCCA GGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGG AGAAGACAGTGGCCCTACAGAAATGTT CA(서열 번호 103)	CAAGTGACCCTGAGAGAGTCTGGACC CGCTCTGGTCAAGCCCACACAGACCCCT GACACTGACCTGCACCTTCTCCGGCTT CTCCCTGTCCACCTCTGGAATGTGGGT GTCCTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAA GGCACTGGAATGGCTGGCTCTGATCGA TTGGGGCGACGACAAGTACTACACCA CCAGCCTGAAAACCCGGCTGACCATCT CCAAGGACACCTCCAAGAACCAGGTG GTGCTGACCATGACCAACATGGACCCCT GTGGACACCGCCACCTACTACTGCGCC AGAATGAGAGAGGGATCCAGAGCCTT CGATATCTGGGGCCAGGGAACCGTGG TCACCGTTTCTTCTGCCTCCACCAAGG GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCT CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT GTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA GCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCT TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATC TTGTGACAAAACCTACACATGCCACCC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG GACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCACA AACCCAAGGACACCCTCTACATCACCC GGGAGCCTGAGGTACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCA ACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACG CTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA

[0567]

명칭	LC 뉴클레오타이드 Seq	HC 뉴클레오타이드 Seq
		AGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA(서열 번호 104)
15N14A	CAGGCTGTCTGACCCAGCCTAGCTCTCTGTCTGCTTCTCCTGGCGCTTCCGCCTCTCTGACCTGCACACTGAGATCCGGCA TCAACGTGGGCACCTACCGGATCTACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAGCCCTCCTCAGTACCTGCTGTCTACAAGTCCG ACTCCGACAAGCAGCAAGGCTCTGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTAAGGACGCCTCCGCCAATGTGGGCATCCTGCTGATCTCTGGCCTGCAGTCTGAGGACG AGGCCGACTACTACTGCATGATCTGGCCTCCTCCGCTGGGTTTTTCGGAGGCGGAACAAAGCTGACAGTCTCTGGGTCAGC CCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCTCCGCTCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCA TAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTCGAAACCAC CACACCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCA GAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGCCCCCTACAGAATGTTCA(서열 번호 105)	CAGGTTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCCGGCCTGGTCAAGCCTTCCGAGACACTGTCTCTGACCTGCACCGTGTCTGGCGGCTCCATCTCCTCTTACTATTGGACCTGGATCAGACAGCCTGCCGGCAAAGGCCTGGAATGGATCGGCAGAATCGACTCCTCCGGCTCCTCCAAGTACAACCCACAC TGAAGTCCAGAGTGACCATGTCCGTGGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCGTGTACTACTGTGCCAGAGGCG ACTCTGGATACGACTGGGCTTTGACTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTCTGTGCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCC AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAAAGTTGAGCCCAATCTGTGACAAAACTACACATGCCACCGTGCC CAGCACCTGAACCTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCC AAGGACACCCTCTACATCACCCGGA GCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACA AAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAA ACCATCTCAAAGCCAAAGGCGAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACGCC GGAGAACAACATAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGTCT

[0568]

명칭	LC 뉴클레오타이드 Seq	HC 뉴클레오타이드 Seq
		CTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA(서열 번호 106)
08F17A	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCC TCTCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACAGA GTGACCATCACCTGTAGAGCCTCTCAG GGCATCTCCTACTACCTGGCCTGGTAT CAGCAGAAACCCGGCAAGGTGCCAA GCTGCTGATCTCTGCTGAGTTCACCT GCAGTCTGGCGTGCCCTCTAGATTCTC CGGCTCTGGCTCTGGCACCAGCTTAC CCTGACAATCTCCAGCCTGCAGCCTGA GGATGTGGCCACCTACTACTGCCAGAA GTACAACACCGCTCCTCGACCTTTGG CCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGC GTACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT CTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA ATCTGGAATGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACG CCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGA GTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAC CCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT(서열 번호 107)	GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGG AGGACTGGTTACCCCTGGCGGATCTCT GAGACTGTCTTGTGCCGCTCTGGCTT CACCTTCTCCGGCTACTCTATGAACTG GGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAGGCC TGGAATGGGTGTCTCCATCTCCTCCA GCAGCGGTACATCTACTACGCCGACT CCGTGAAGGGCAGATTACCATCTCCA GAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAG AGAGTATTGGGGCTCCGGCTTCGATTA TTGGGGCCAAGGAACACTGGTCACCG TGTCTCTGCCTCCACCAAGGGGCCAT CGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCA AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC CCCGAACCCTGACGCGTGTCTGGGAA CTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGC ACACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTCT CAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGG TGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTA CAAAACTCACACATGCCACCGTGCCC AGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT CAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCA AGGACACCTCTACATCACCCGGGAG CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAA GCCCTCCAGCCCCCCTCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCTTGCCCCC ATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACC AGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGAATCCGACGGCTCCTTCTCTCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA GCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGAGAAGTCTCTC TCCCTGTCTCCGGGAAAA(서열 번호 108)

[0569]

[0570]

05H21A, 15N14A, 및 08F17A에 대한 성숙 아미노산 서열을, cDNA 서열로부터 추론되고 펩티드 맵핑 및 질량 분석에 의해 확인된 바와 같이 상기 표 3에 나타낸다.

[0571]

7.3 실시예 3: 05H21A, 15N14A, 및 08F17A의 생물리학적 평가

[0572]

7.3.1 SPR에 의한 인간 IL-1 β 에 대한 05H21A, 15N14A, 및 08F17A의 결합 친화도

[0573]

Biacore 8k를 사용하는 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 인간 IL-1 β 에 대한 05H21A, 15N14A, 및 08F17A의 친화도 평가를 수행하였다. 사이노, 마우스, 래트, 및 돼지 IL-1 β 에 대해 동일한 항체 패널의 교차-반응성을 또한 평가하였다.

[0574]

SPR은 복합체 형성 및 해리 시에 질량의 변화를 측정함으로써 2개의 결합 파트너 사이의 상호작용의 강도를 연구하기 위한 무표지 기법이다. 간략하게 말하면, 염소 항-인간 Fc와 커플링된 센서 칩(GAH-Fc C1 센서 칩) 상에 항체를 고정시켰다. 가용성 IL-1 β 를 고정된 항체 위로 유동시키고, 회합/해리 반응을 모니터링하였다. 센서 그래프를 1:1 랭뮤어(Langmuir) 모델에 피팅함으로써 속도론 정보(결합 속도(on-rate) 및 해리 속도(off-rate) 상수)를 추출하였다. 결합 친화도(K_D)를 속도 상수의 비(k_{off}/k_{on})로서 보고하였다. 결합 평가 결과는 표 12에

나타낸다.

[0575] 05H21A, 15N14A, 및 08F17A는 각각 약 20 pM, 약 64 pM, 및 약 180 pM의 높은 친화도로 인간 IL-1 β 에 결합한다. 05H21A, 15N14A, 및 08F17A는 또한 약 22 pM, 약 70 pM, 및 약 1.7 nM의 친화도로 사이노 IL-1 β 에 대한 교차 반응성을 갖는다. 3개 모두의 Ab는 마우스, 래트, 및 돼지 IL-1 β 에 대해 약한 교차 반응성을 나타냈거나 교차 반응성을 나타내지 않았다.

[0576] [표 12]

05H21A, 15N14A, 및 08F17A의 결합 평가

mAb 특징	05H21A	15N14A	08F17A
인간 IL- β 에 대한 결합 친화도	KD(M) = 1.97E-11 ka(1/Ms) = 2.14E+07 kd(1/s) = 4.22E-04	KD(M) = 6.4E-11 ka(1/Ms) = 2.20E+06 kd(1/s) = 1.41E-04	KD(M) = 1.8E-10 ka(1/Ms) = 8.55E-05 kd(1/s) = 1.82E-10
사이노 IL- β 에 대한 결합 친화도	KD(M) = 2.20E-11 M ka(1/Ms) = 1.58E+07 kd(1/s) = 3.48E-04	KD = 7.0E-11 ka(1/Ms) = 3.01E+06 kd(1/s) = 2.09E-04	KD(M) = 1.71E-09 ka(1/Ms) = 1.72E+05 kd(1/s) = 2.95E-04
마우스 IL- β 에 대한 결합 친화도	약한 결합 KD >100 nM	결합 없음	결합 없음
래트 IL- β 에 대한 결합 친화도	약한 결합, KD >100 nM	KD = 7.45E-08 ka(1/Ms) = 7.71E+05 kd(1/s) = 5.74E-02	결합 없음
돼지 IL- β 에 대한 결합 친화도	결합 없음	결합 없음	결합 없음

[0577]

[0578] 7.3.2 HDX에 의한 05H21A, 15N14A, 및 08F17A에 대한 에피토프 식별

[0579] 수소-중수소 교환 질량 분석법(HDX-MS)에 의해 IL-1 β 상의 에피토프를 결정하였다. 수소-중수소 교환-기반 LC-MS를 사용하는 IL-1 β 상의 선택된 항체들의 에피토프 맵핑을 도 1에 나타낸다.

[0580] HDX-MS에 대한 온-교환(On-Exchange) 실험. hIL-1 β 의 잔기 117 내지 269(Uniprot ID P01584;서열 번호: 109)인, 10 μ L의 10 μ M IL-1 β (R&D Systems)를, 30 μ L의 H₂O 또는 중수소화된 완충액(95% D₂O 중의 20 mM MES, pH 6.4, 150 mM NaCl 또는 95% D₂O 중의 20 mM Tris, pH 8.4, 150 mM NaCl) 및 1.2 몰-과량의 리간드의 존재 또는 부재 하에 혼합함으로써 온-교환 반응을 개시하였다. 반응 혼합물을 1.2°C에서 15, 50, 150, 500 또는 1,500초 동안 인큐베이션하였다. 온-교환된 용액을 냉각된 40 μ L의 1.6 M 구아니딘 하이드로클로라이드, 0.8% 포름산의 첨가에 의해 채칭(quenching)하고 즉시 분석하였다.

[0581] IL-1 β (Uniprot ID P01584)(서열 번호 109):

[0582] MAEVP ELASEMMAYSGNEDDLFF EADGPKQMKCSFQDL DLCP LDGGIQLRISDHYSKGFRAASVVVAMD KLRKMLVPCPQTFQENDLSTFFPPIFEEEP
IFFD TDWNEAYVHDAPVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGQDMEQQVVFMSFSVQGEESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPK
NYPKKMEKRFVFNKIEINNKLFEFSAQFPNWI STSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS

[0583] HDX-MS 데이터 획득을 위한 일반적인 절차. HDX-MS 샘플 준비를 자동 HDx 시스템(미국 노스캐롤라이나주 모리스빌 소재의 LEAP Technologies)을 사용하여 수행하였다. 컬럼 및 펌프는 프로테아제, 프로테아제 유형 XIII(아스페르길루스 사이토이(*Aspergillus saitoi*))로부터의 프로테아제, 유형 XIII) / 펩신 컬럼(w/w, 1:1; 2.1 x 30 mm)(NovaBioAssays Inc., 미국 매사추세츠주 워번 소재); 트랩, ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard 프리-컬럼(2.1 x 5 mm)(Waters, 미국 매사추세츠주 밀포드 소재), 분석용, Accucore C18(2.1 x 100 mm)(Thermo Fisher Scientific, 미국 매사추세츠주 월섬 소재); 및 LC 펌프, VH-P10-A(Thermo Fisher Scientific)였다. 로딩 펌프(프로테아제 컬럼으로부터 트랩 컬럼까지)는 0.1% 수성 포름산을 갖는 600 μ L/분으로 설정되었다. 구배 펌

프(트랩 컬럼으로부터 분석용 컬럼까지)는 100 μ L/분에서 20 분만에 0.1% 수성 포름산 중의 9% 내지 33% 아세트나이트릴로 설정되었다.

[0584] MS 데이터 획득. 질량 분석법적 분석은 275°C의 모세관 온도, 분해능 120,000, 및 질량 범위(m/z) 300 내지 1,500으로 LTQ™ Orbitrap Fusion Lumos 질량 분석기(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 실행하였다.

[0585] HDX-MS 데이터 추출. HDX 실험 전에 비-중수소화된 샘플의 펩티드 확인을 위해 BioPharma Finder 2.0(Thermo Fisher Scientific)을 사용하였다. HDExaminer 버전 2.5(Sierra Analytics, 미국 캘리포니아주 모데스토 소재)를 사용하여, HDX 실험을 위해 MS 원시 데이터 파일로부터 중심값(centroid value)을 추출하였다.

[0586] HDX-MS 데이터 분석. 추출된 HDX-MS 데이터를 Excel에서 추가로 분석하였다. 모든 교환 시점(23°C에서 pH 6.4 또는 pH 8.4에서)을 pH 7.4 및 23°C에서의 등가의 시점으로 변환하였다(예를 들어, 23°C에서 pH 6.4에서의 15 초는 23°C에서 pH 7.4에서의 1.5 초와 등가임)(표 13).

[0587] [표 13]

HDX 반응 조건 및 교환 시간 vs. pH 7.4 및 23 °C로 보정된 교환 시간.

pH 7.4, 23 °C 에 대해 조정된 시간(초)	pH 6.4 23 °C(s)	pH 8.4 23 °C(s)
0.15	-----	-----
0.5	-----	-----
1.5	15	-----
5	50	-----
15	150	-----
50	500	-----
150	1,500	15
500	-----	50
1,500	-----	150
5,000	-----	500
15,000	-----	1,500

[0588]

[0589] 결과. 05H21A에 대한 IL-1 β 의 강한 에피토프(결합 시의 $\Delta \Delta G$ 가 -2 kcal/mol 이하임)는 잔기 119(V), 161 내지 162(SF), 및 164 내지 169(QGEESN)였다. 약한 에피토프(결합 시의 $\Delta \Delta G$ 가 -2 kcal/mol 초과이고 -1 kcal/mol 이하임)는 잔기 120 내지 123(RSLN) 및 157 내지 160(VFSM)이었다.

[0590] 08F17A에 대한 IL-1 β 의 강한 에피토프는 잔기 147 내지 156(LQGQDMEQQV) 및 264 내지 267(MQFV)이었다.

[0591] 15N14A에 대한 IL-1 β 의 강한 에피토프는 잔기 164 내지 169(QGEESN)였다. 약한 에피토프는 잔기 158 내지 162(FSMSF)였다.

[0592] 7.3.3 DSC에 의한 05H21A, 15N14A, 및 08F17A의 입체배좌 안정성

[0593] 05H21A, 15N14A, 및 08F17A의 입체배좌 안정성을 시차 주사 열량법(DSC)에 의해 결정하였다. 시차 주사 열량법 실험은 Microcal VP-DSC Malvern 기기(미국 매사추세츠주 노샘프턴 소재)를 사용하여 10 mM 소듐 아세테이트 pH 5.5 중에 1 mg/mL에서 실행되었다. 15 분 프리스캔 서모스탯으로 60°C/h 스캔 속도를 사용하여 25 °C로부터 95 °C까지 열 스캔을 수행하였다. 각각의 항체는 각각의 샘플 런 사이의 완충액/완충액 블랭크 런과 함께 이중실험으로 측정되었다. 데이터 분석은 MicroCal Origin Version 7 소프트웨어를 사용하여 수행되었고, 전이 온도(T_m)는 표 14에 보고되었다.

[0594] 05H21A 서모그램은 62.2 °C(T_{m1}), 77.9 °C(T_{m2}), 및 84.0 °C(T_{m3})에서 3개의 전이 온도를 규명하였다. 15N14A 서모그램은 64.7 °C(T_{m1}), 68.0 °C(T_{m2}), 76.9 °C(T_{m3}), 및 83.3 °C(T_{m4})에서 4개의 전이 온도를 규명하였다. 08F17A 서모그램은 62.8 °C(T_{m1}), 75.5 °C(T_{m2}), 및 83.3 °C(T_{m3})에서 3개의 전이 온도를 규명하였다.

[0595] [표 14]

05H21A, 15N14A, 및 08F17A에 대한 전이 온도

mAb 특징	05H21A	15N14A	08F17A	주석
시차 주사 열량측정법(DSC)	T _{m1} = 62.2 °C T _{m2} = 77.9 °C T _{m3} = 84.0 °C	T _{m1} = 63.2 °C T _{m2} = 68.0 °C T _{m3} = 76.9 °C T _{m4} = 83.3 °C	T _{m1} = 62.8 °C T _{m2} = 75.5 °C T _{m3} = 83.3 °C	10 mM 소듐 아세테이트 pH 5.5에서 측정됨

[0596]

[0597] 7.3.4 HIC에 의한 05H21A, 15N14A, 및 08F17A의 소수성

[0598] 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)에 의해 05H21A, 15N14A, 및 08F17A의 상대적 소수성을 평가하였다. 간략하게 말하면, 샘플을 높은 염 완충액(100 mM 소듐 포스페이트, 1.5 M (NH₄)₂SO₄, pH 6.5) 중에 1:5로 희석하고, 대략 10 ug의 각각의 샘플을 Agilent HPLC 기기 상의 TOSOH TSKgel 부틸-NPR 컬럼 상에 주입하였다. 8 분에 걸쳐 1.1 M로부터 0 M까지의 선형 암모늄-SO₄ 구배 하에 HIC를 실행하였다. UV280 및 형광(280 nm에서의 여기 및 340 nm에서의 방출) 신호를 수집하였다. 상대 소수성은 내부 소수성 표준에 대한 체류 시간(CNT0607)으로서 평가되었고, 소수성 지수(HI=rtAb/rtCNT0607)로서 보고되었다. IL-1β 항체의 체류 시간 및 소수성 지수를 표 15에 나타낸다.

[0599] 상대 소수성은 05H21A 및 15N14A에 대해서는 낮았지만(각각 HI 0.37 및 0.49), 08F17A에 대해서는 중간이었다(HI 0.80).

[0600] [표 15]

HIC에 의한 상대 소수성

mAb 특징	05H21A	15N14A	08F17A	CNT0607
상대 소수성(aHIC)	낮은 표면 소수성: HI = 0.37 Rt = 1.74 분	낮은 표면 소수성: HI = 0.49 Rt = 2.32 분	중간의 표면 소수성: HI = 0.80 Rt = 3.77	높은 표면 소수성: HI = 1 rt = 4.72 분

[0601]

[0602] 7.4 실시예 4: 단백질 생성 및 정제

[0603] 7.4.1 05H21A, 15N14A, 및 08F17A의 제조

[0604] 안정적으로 형질감염된 CHO 세포에서 05H21A, 15N14A, 및 08F17A를 발현시키고 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다.

[0605] 7.4.2 단백질 발현 및 세포 배양

[0606] MaxCyte STx 전기천공기를 사용하여 05H21A, 15N14A, 또는 08F17A(중쇄 및 경쇄) 및 Leap-In transposase mRNA(ATUM, 카탈로그 번호 LPN-1R)를 인코딩하는 정제된 플라스미드 DNA로 전기천공함으로써 생성된, 안정적으로 형질감염된 Horizon CHO 비-클론 풀에서 05H21A, 15N14A, 및 08F17A가 발현되었다. 전기천공 후에, 공급-배치의 생성을 위해 표준 발현 프로토콜에 따랐다. 각각의 공급-배치를 수확하고 원심분리에 이어서 여과에 의해 청정화하였다.

[0607] 7.4.3 단백질 정제

[0608] 여과된 세포 배양 상청액을 표준 정제 프로토콜을 사용하여 정제하였다. 간략하게 말하면, AKTA 크로마토그래피 시스템을 사용하여 사전-평형화된 단백질 A 컬럼(GE Healthcare) 상에 각각의 상청액을 로딩하였다. 로딩 후에, 컬럼을 7 컬럼 부피의 1×DPBS, pH 7.2로 세척하였다. 단백질을 2.5 컬럼 부피의 0.1 M 소듐 아세테이트, pH 3.5로 용리시켰다. 용리 분획 부피의 8%(v/v)까지 2.5 M Tris HCl, pH 7.5를 첨가함으로써 단백질 분획을 즉시 중화시키고 피크 분획을 풀링하였다.

[0609] Capto S Impact 수지(GE Healthcare)를 사용하여 양이온 교환 크로마토그래피(CEX)에 의해 ProA-후 용리 풀을 추가로 정제하였다. 20 mM MES pH 6.5 중의 증가하는 NaCl 구배로 컬럼으로부터 단백질을 용리시켰다. 단량체 단백질을 함유하는 피크 분획만을 풀링하였다. Pierce 투석 카세트(ThermoFisher)를 사용하여 CEX-후 용리 풀을 10 mM 소듐 아세테이트 pH 5.5 내로 투석한 후에 여과하였다(0.2 μm).

[0610] 7.4.4 품질 관리

[0611] 계산된 흡광 계수를 사용하여 Dropsense 분광광도계 상에서 280 nm에서의 흡광도에 의해 정제된 단백질의 농도를 결정하였다(표 16). 정제된 단백질의 품질을 SDS-PAGE 및 분석용 크기 배제 HPLC(Agilent HPLC 시스템)에 의해 평가하였다. 비탁 LAL 검정(Pyrotest®-T, Associates of Cape Cod; 미국 매사추세츠주 팰머스 소재)을 사용하여 내독소 수준을 측정하였다. QC 데이터 요약은 표 16에서 확인된다.

[0612] [표 16]

단백질 방출 데이터 요약

GDB 배치 ID#	단백질 설명	농도 (mg/mL)	부피 (mL)	총 수득량 (mg)	단량체 % (SE-HPLC)	내독소 (Eu/mg)	측정된 질량 G0F/G0F[Da]	오차 [ppm]	완충제
05H21A	05H21A (항-IL-1β) mAb[IgG1 : YTE]	19.33	109	2107	>99	<1	147216.4	51.8	10 mM 소듐 아세트레이트 pH5.5
15N14A	15N14A (항-IL-1β) mAb[IgG1 : YTE]	15.06	79.0	1190	97.1	<1	147842.9	39.0	10 mM 아세트레이트 pH5.5
08F17A	08F17A (항-IL-1β) mAb[IgG1 : YTE]	18.12	58.9	1067	97.3	<1	147368.5	26.3	10 mM 아세트레이트 pH5.5

[0613]

[0614] 7.5 실시예 5: 항-IL-1β 항체에 대한 기능성 검정

[0615] 7.5.1 실험 방법

[0616] 7.5.1.1 HEK-Blue IL-1β 리포터 세포주에서의 IL-1β 신호전달의 억제

[0617] IL-1β HEK-Blue 세포(10% 열-불활성화된 소 태아 혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신, 및 100 μg/ml 노르모신을 갖는 DMEM 중에 배양됨)를 수집하고 PBS 중에 2회 세척하였다. 세포를 330,000 세포/mL의 농도로 배지에 재현탁시키고 플레이트 레이아웃에 따라 웰당 150 μl를 플레이팅하였다. 최종 세포 계수는 웰당 50,000 개이다.

[0618] 시험 항체를 40 nM의 출발 농도(5 nM의 최종 농도)로 희석하고 배지 중에 3-배 연속 희석함으로써 시험하였다. 제조합 인간 IL-1β(rhIL-1β)를 배지 중에 0.8 ng/mL(0.1 ng/mL 또는 6 pM의 최종 농도)로 희석하였다. 100 μl의 제조합 인간 IL-1β(rhIL-1β) 및 항-IL-1β 선도 항체를 5% CO₂ 중에 37 °C에서 30 분 동안 공동-인큐베이션하였다. 이어서, 50 μl의 rhIL-1β/항체 복합체를 세포에 첨가하고 생물학적 반복실험을 설정하였다. 이어서, 5% CO₂와 함께 37 °C에서 18 내지 20 시간 동안 복합체를 세포와 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, QuantiBlue 용액을 제조하고 180 μl를 96-웰 비-결합 플레이트에 첨가하였다. 각각의 세포 웰로부터의 20 μl를 QuantiBlue 용액에 첨가하고, 5% CO₂와 함께 37 °C에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 655 nm의 광학 밀도에서 판독하고, GraphPad에서 log(억제제) 대 반응(가변 기울기) 함수를 사용하여 항-IL-1β 선도 항체 절반-최대 억제 농도(IC₅₀)를 계산하였다.

[0619] 7.5.1.2 MRC5 세포에서의 IL-1β-유도 IL-6 생성의 억제

[0620] 이전에 기재된 바와 같이 MRC5 폐 섬유아세포에서의 IL-6 생성을 평가하였다(문헌[Goh AX *et al.*, MAbs. 2014;6(3):765-773]). MRC5 섬유아세포(ATCC #CCL-171)(10% 열-불활성화 소 태아 혈청(FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 갖는 EMEM 중에 배양됨)를 트립신 처리하고 계수하였다. 세포를 30,000 세포/mL의 농도로 배지에 재현탁시키고 96-웰 플레이트에 웰당 3000개의 세포를 플레이팅하였다. 세포를 37°C/5% CO₂에서 밤새 16 시간 동안 회복시켰다. 시험 항체를 10 nM의 출발 농도로 희석하고, 3-배 단계를 사용하여 96-웰 플레이트에 이중실험으로(완전 배지 중에) 연속 희석하였다. 100 μL의 각각의 항체 희석액을 새로운 96-웰 플레이트에 이전하였다. 제조합 IL-1β 단백질은 배지 중에 110 pg/mL로 희석되었고, 11 μL를 각각의 항체 웰에 첨가하였다(11 pg/mL의 최종 IL-1β 농도; 이 농도는 IL-6 방출을 판독으로서 사용하여 4 시간에 3000개의 세포에 대한 EC₅₀으로서 이전에 결정되었음). rhIL-1β 및 항-IL-1β 항체 연속 희석액을 37 °C에서 5% CO₂와 함께 30 분 동안 공동-인큐베이션하였다. 이어서, 100 μL의 공동-인큐베이션된 복합체를 플레이트 레이아웃에 따라 세포에 첨가하였다. 세포를 5% CO₂와 함께 37 °C에서 4 시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 80 μL의 배지를 제거

하고, 새로운 96 웰 플레이트에 이전하고, -80°C 에서 냉동시켰다.

[0621] 배지 샘플을 얼음 상에서 해동시키고 ELISA에 의해 평가하였다. 포획 항체를 각각의 웰에 첨가하고 제품 프로토콜(R&D IL-6 DuoSet ELISA 키트; 카탈로그 번호 Dy206-05)에 따라 밤새 인큐베이션함으로써 높은 결합 ELISA 플레이트를 제조하였다. 제조사의 프로토콜에 따른 모든 단계를 이용하여, 이러한 키트를 사용하여 50 μL 의 수집된 세포 배지를 평가하였다. 키트는 양성 대조군으로서 재조합 hIL-6을 제공하였다. 실온에서 5 분 동안 SureBlue TMB(KPL; #52-00-03)를 사용하여 ELISA를 전개하였다. 반응을 중지시키고(TMB 정지 용액) 450 nm 및 540 nm에 대해 흡광도를 측정하였다. GraphPad Prism에서 분석을 수행하였다. 각각의 웰에 대해, OD450으로부터 OD540을 차감하여 각각의 웰의 광학적 불완전성에 대해 정규화하였다. 플레이트 배경을 감안하기 위해 각각의 플레이트의 하단 행(회색제 단독)을 평균하고 각각의 샘플로부터 차감하였다. IL-6 표준 곡선을 사용하여 각각의 샘플에서 IL-6을 계산하였다. GraphPad에서 4-파라미터 가변 기울기 분석(log(작용제) 대 반응)을 사용하여 각각의 항체에 대한 IC50을 결정하였다.

[0622] 7.5.1.3 NHDF에서의 IL-1 β -유도 IL-6, ENA-78(CXCL5), 및 G-CSF 생성의 억제

[0623] 공여자 인간 진피 섬유아세포(Lonza, 카탈로그 번호 CC-2509; 공여자 29073 및 29114)를 5,000 세포/ml (FGM-2 배지 중의 최종 1,000 세포/웰)로 희석하고, 96 웰 편평-바닥 플레이트의 각각의 웰에 200 μL 를 첨가하고, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO2에서 밤새 인큐베이션하였다. FGM-2에서 10 nM 내지 0.001 nM의 최종 농도로 4X 항체의 3-배 용량 적정에서 시험 항체를 제조하였다.

[0624] 41.4 μL 의 rhIL-1 β 의 1:1000 희석액 + 49.959 ml FGM-2를 첨가함으로써 4X rhIL-1 β 를 제조하였다(최종 검정 농도 10 pM rhIL-1 β). 200 μL 의 4X 항체 적정 및 200 μL 의 4X rhIL-1 β 를 조합하고 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트팅된 섬유아세포를 200 μL 의 FBM 배지로 세척하였다. 플레이트를 플리킹(flicking)함으로써 과량의 FBM을 제거하고 웰당 100 μL 의 FGM-2 배지를 첨가하였다. 이어서, 100 μL 의 2X 항체/rhIL-1 β 혼합물을 첨가하고, 플레이트를 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO2에서 18 내지 20 시간 동안 인큐베이션하였다. 총 125 μL 의 상청액을 제거하고, 새로운 96-웰 둥근-바닥 플레이트에 이전하고, 하류 MSD 판독을 위해 -20°C 에서 저장하였다.

[0625] MSD U-Plex(Lonza, 카탈로그 번호 K15067L-4)를 사용하여 시험 상청액에서 IL-6, ENA-78(CXCL5), 및 G-CSF를 정량화하였다. 중간에 세척 없이 검출 항체를 샘플에 직접 첨가하는, 제조사의 대안적 프로토콜에 따라 정량화를 수행하였다. $1/(\text{SD})^2$ 가중을 갖는 4P 선형 회귀 곡선 적합을 사용하여 Workbench에서 표준 곡선 적합을 생성하였고, 가중이 없는 GraphPad PRISM의 4P 선형 회귀 곡선 적합을 사용하여 퍼센트 억제(IC50)를 계산하였다 [퍼센트 억제 = $100 * (\text{양성 대조군} - \text{음성 대조군}) - (\text{샘플} - \text{음성 대조군}) / (\text{양성 대조군} - \text{음성 대조군})$]. LLOD(검출의 하한) 미만의 임의의 데이터 점의 경우, 표준 곡선으로부터 계산된 분석물에 대한 LLOD의 값이 치환되었다. ULOD(검출의 상한) 초과 임의의 데이터 점의 경우, 값은 배제되었다.

[0626] 7.5.1.4 NHLF에서의 IL-1 β -유도 IL-6, ENA-78(CXCL5), 및 G-CSF 생성의 억제

[0627] 공여자 인간 폐 섬유아세포(Lonza, 카탈로그 번호 CC-2512; 공여자 34325 및 35234)를 10,000 세포/ml (FGM-2 배지 중의 최종 2,000 세포/웰)로 희석하고, 96 웰 편평-바닥 플레이트의 각각의 웰에 200 μL 를 첨가하고, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO2에서 밤새 인큐베이션하였다. FGM-2에서 10 nM 내지 0.001 nM의 최종 농도로 4X 항체의 3-배 용량 적정에서 시험 항체를 제조하였다(시험 항체 ID 및 배지 농도는 하기 표 상에 열거됨).

[0628] 24.8 μL 의 rhIL-1 β 의 1:1000 희석액 + 29.975ml FGM-2를 첨가함으로써 4X rhIL-1 β 를 제조하였다(최종 검정 농도 10 pM rhIL-1 β). 350 μL 의 4X 항체 적정 및 350 μL 의 4X rhIL-1 β 를 조합하고 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트팅된 섬유아세포를 200 μL 의 FBM 배지로 세척했다. 플레이트를 플리킹함으로써 과량의 FBM을 제거하고 웰당 100 μL 의 FGM-2 배지를 첨가하였다. 이어서, 100 μL 의 2X 항체/rhIL-1 β 혼합물을 첨가하고, 플레이트를 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO2에서 18 내지 20 시간 동안 인큐베이션하였다. 총 125 μL 의 상청액을 제거하고, 새로운 96-웰 둥근-바닥 플레이트에 이전하고, 하류 MSD 판독을 위해 -20°C 에서 저장하였다.

[0629] 중간에 세척 없이 검출 항체를 샘플에 직접 첨가하는, 제조사의 대안적 프로토콜에 따라 MSD U-Plex(Lonza, 카탈로그 번호 K15067L-4)를 사용하여 IL-6, ENA-78(CXCL5), 및 G-CSF를 정량화하였다. $1/(\text{SD})^2$ 가중을 갖는 4P 선형 회귀 곡선 적합을 사용하여 Workbench에서 표준 곡선 적합을 생성하였고, 가중이 없는 GraphPad PRISM의 4P 선형 회귀 곡선 적합을 사용하여 퍼센트 억제(IC50)를 계산하였다 [퍼센트 억제 = $100 * (\text{양성 대조군} - \text{음성 대조군}) - (\text{샘플} - \text{음성 대조군}) / (\text{양성 대조군} - \text{음성 대조군})$]. LLOD(검출의 하한) 미만의 임의의 데이터 점의 경우, 표준 곡선으로부터 계산된 분석물에 대한 LLOD의 값이 치환되었다. ULOD(검출의 상한) 초과 임의의

의 데이터 점의 경우, 값은 배제되었다.

[0630] 7.5.1.5 인간 PBMC에서의 IL-1 β 유도 곡선의 결정

[0631] rhIL-1 β 를 이용한 PBMC(말초 혈액 단핵 세포)의 처리는 상청액 내로의 IL-6의 방출을 유도한다. 인간 PBMC에 대한 IL-1 β 의 적정을 시험하여 시험 항체의 후속 평가를 위한 EC50 및 EC90 값을 결정하고 설정하였다.

[0632] 건강한 공여자로부터 혈액을 수득하고, 표준 방법을 사용하여 Ficoll-Hypaque에 의해 PBMC를 분리하고, 사용할 때까지 냉동시켰다. 예열된 RPMI 완전(10% 열 불활성화(HI), 1% 페니실린, 1% 스트렙토마이신, 및 1% 글루타민을 함유하는 RPMI) 내에 PBMC를 해동시키고 2회 세척하였다. 세포를 계수하고 ml당 100만개로 재현탁시켰다. 100 μ l의 세포를 편평-바닥, TC 처리 플레이트에 첨가하였다. rhIL-1 β (201-LB/CF, R&D Systems)를 원하는 출발 농도보다 3X 더 높은 농도에서 시작하여 연속 희석하고 연속 희석을 수행하였다. 50 μ l의 희석액을 세포에 이중시험 또는 삼중시험으로 첨가하고 플레이트를 5% CO₂와 함께 37°C에서 18 내지 20 시간 동안 인큐베이션하였다.

[0633] 인간 IL-6 ELISA 키트(DY206, R&D Systems, 절반-면적 ELISA 플레이트, Conning 3690에 적응)를 사용하여 상청액에서 IL-6을 측정하였다. 각각의 생물학적 반복실험으로부터 웰당 50 μ l의 상청액을 시험하고 제조사의 설명서에 따라 ELISA를 수행하였다. Graphpad Prism을 사용하여 데이터를 그래프화하고 분석하였고/하였거나 생물통계학자에 의해 모델링된 값이 결정되었다.

[0634] [표 17]

시험된 공여자에 걸친 모델링된 IL-1 β EC50 및 EC90 유도 값

공여자	EC50	EC90
AC5684	4.419(3.231, 6.042)	12.445(8.443, 18.344)
TS078.5	18.673(13.656, 25.532)	71.474(48.49, 105.351)
TS083	17.935(13.117, 24.524)	69.250(46.982, 102.073)
TS235	8.335(6.096, 11.397)	29.074(19.725, 42.855)
TS274	9.418(6.888, 12.877)	22.148(15.026, 32.645)
TS294	11.762(8.602, 16.082)	43.364(29.42, 63.918)
TS301	7.347(5.373, 10.046)	25.794(17.5, 38.02)
TS319	6.056(4.429, 8.281)	26.520(17.992, 39.09)
TS320	8.472(6.196, 11.584)	34.077(23.119, 50.229)
모델	9.289(6.794, 12.702)	32.468(22.028, 47.857)
중앙값	8.472	29.074
평균	10.268	37.127
공여자 범위	[4.419, 18.673]	[12.445, 71.474]

[0635]

[0636] 7.5.1.6 인간 PBMC에서의 IL-1 β -유도 IL-6 생성의 억제

[0637] 10 pM 또는 30 pM 농도의 rhIL-1 β 에 대해 시험 항체를 시험하였고(섹션 7.5.1.5에서 결정된 바와 같음), 인간 PBMC에서 ELISA에 의해 IL-6 생성을 정량화하였다.

[0638] 시험 항체를 3X 농도(5 nM)로 제조하고, 3-배 연속 희석하고, 사전결정된 10 pM(약 EC50) 및 30 pM(약 EC90) 농도로 동일한 부피의 rhIL-1 β 와 혼합하였다. 37°C에서 5% CO₂와 함께 60-분 배양 후에, 100 μ l의 각각의 혼합물을 편평 바닥 TC 처리 플레이트에 첨가하였다. 대조군은 기준선 반응을 확립하기 위한 배지 단독, rhIL-1 β (최대 반응을 측정하기 위해), 및 항체 단독에 의해 IL-6 유도가 없었음을 보장하기 위한 항체 단독을 포함하였다. 이러한 인큐베이션 기간 중에, 인간 PBMC를 상기와 같이 제조하고, ml당 200만개의 농도가 되게 하고, 50 μ l를 각각의 웰에 첨가하였다. 세포를 37°C에서 5% CO₂와 함께 18 내지 20 시간 동안 인큐베이션하였다. 웰당 50 μ l의 상청액을 사용하여 IL-6(카탈로그 번호 DY206, R&D Systems, 절반-면적 ELISA 플레이트, Corning3690에 적응)을 측정하였다. IC50을 결정하기 위해 GraphPad Prism을 사용하여 데이터를 그래프화하고 분석하였다.

[0639] 7.5.1.7 인간 전혈 검정에서의 IL-1 β -유도 IL-6, ENA-78(CXCL5), 및 G-CSF 생성의 억제

[0640] 공여자 인간 전혈을 ACD 튜브에 수집하고 즉시 사용을 위해 시험 현장에 배송했다. 시험 항-IL-1 β 항체를 1%

BSA를 함유하는 PBS 중에 96-웰 U 바닥 플레이트에서 10X 농도로 연속 희석하였으며, 최고 최종 농도는 10 nM이고 희석 시리즈에 "항체 없음" 대조군이 포함되었다. rhIL-1 β (R&D 시스템)는 1% BSA를 함유하는 PBS 중의 1000 pM로 제조되었고, 100 pM의 최종 검정 농도가 사용되었다. 10X 항체 희석액 및 10X rhIL-1 β 희석액을 1:1로 조합하고 실온에서 60 분 동안 인큐베이션하였다. 인간 공여자 혈액 샘플을 온화하게 혼합하고 웰당 80 μ l의 전혈을 96 웰 U-바닥 조직 배양 플레이트에 플레이팅하였다. 웰당 20 μ l의 항체 + rhIL-1 β 혼합물을 첨가하고, 1% PBS/BSA를 rhIL-1 β 및/또는 항체가 없는 대조군 웰에 첨가하였다. 환자 샘플에 걸쳐 IL-1 β 용량 반응의 확인을 위해 rhIL-1 β 희석 시리즈를 또한 제조하였다. 이어서, 처리된 세포를 22 $\pm$ 2 시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션하였다. 밤새 인큐베이션 후에, 100 μ l의 PBS를 모든 웰에 첨가하고, 혼합하고, 실온에서 10 분 동안 300xG에서 96-웰 검정 플레이트 내에서 회전 침강시켰다. 100 μ l의 상청액을 새로운 96-웰 플레이트에 이전하고, 25 μ l의 검정 상청액을 MSD 검정에 직접 사용하고, 하기 예외를 제외하고는 제조사의 설명서에 따라 IL-6, G-CSF, 및 CXCL5(ENA-78)의 분석을 실행하였다: (i) 2개의 바이알을 각각 125 μ l에 희석하고 이들을 함께 조합하는 단계에 의해 캘리브레이터 #1(IL-6)의 농도가 2배가 되었고, (ii) 11 pt 표준 곡선(지시대로 4-배 희석) + 블랭크 총 12 점에 대해 수행하였다. MSD Workbench 소프트웨어에서 미지를 계산하였고, 4P 선형 회귀 곡선 적합을 사용하는 GraphPad prism을 사용하여 EC 값(rhIL-1 β 자극) 및 IC 값(항체 억제)을 계산하였다.

[0641] **7.5.1.8 중 관련성 확립: 사이노물구스 폐 및 진피 섬유아세포에서의 IL-1 β 유도 IL-6 및 G-CSF 생성의 억제**

[0642] 사이노물구스 진피 및 폐 섬유아세포를 CFM 배지(완전 섬유아세포 배지, Cell Biologics, 카탈로그 번호 M32267) 중에 15,000 세포/ml로 희석하고(최종 3,000 세포/웰), 200 μ l를 96 웰 편평-바닥 플레이트의 개별 웰에 첨가하였다. 플레이트를 밤새 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. CFM 중의 100 nM 내지 0.01 nM의 용량 범위를 가진, 08F17A를 제외하고는, 10 nM 내지 0.001 nM의 최종 농도로 4X 시험 항체의 3-배 용량 적정을 제조하였다. CFM 중에 4X rcyno-IL-1 β (사이노 진피 섬유아세포 및 사이노 폐 섬유아세포에 대해 각각 5 pM 및 15 pM rcyno-IL-1 β 의 최종 검정 농도)를 제조하고, 200 μ l의 4X rcynoIL-1 β 를 200 μ l의 4X 시험 항체 적정과 조합한 후, RT에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이팅된 진피 및 폐 섬유아세포를 200 μ l의 FBM 배지로 세척하고, 웰당 100 μ l의 CFM 배지를 첨가하였다. 이어서, 100 μ l의 2X 항체/rcynoIL-1 β 혼합물을 상응하는 시험 웰에 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 18 내지 20 시간 동안 인큐베이션하였다. 총 125 μ l의 상청액을 제거하고, 새로운 96-웰 둥근-바닥 플레이트에 이전하고, 하류 MSD 판독을 위해 -20 $^{\circ}$ C에서 저장하였다.

[0643] 중간에 세척 없이 검출 항체를 샘플에 직접 첨가하는, 제조사의 대안적 프로토콜에 따라 MSD U-Plex(Lonza, 카탈로그 번호. K15067L-4)를 사용하여 IL-6 및 G-CSF를 정량화하였다. 1/(SD)² 가중을 갖는 4P 선형 회귀 곡선 적합을 사용하여 Workbench에서 표준 곡선 적합을 생성하였고, 가중이 없는 GraphPad PRISM의 4P 선형 회귀 곡선 적합을 사용하여 퍼센트 억제(IC₅₀)를 계산하였다[퍼센트 억제 = 100* (양성 대조군 - 음성 대조군) - (샘플 - 음성 대조군)/(양성 대조군 - 음성 대조군)]. LLOD(검출의 하한) 미만의 임의의 데이터 점의 경우, 표준 곡선으로부터 계산된 분석물에 대한 LLOD의 값이 치환되었다. ULOD(검출의 상한) 초과 임의의 데이터 점의 경우, 값은 배제되었다.

[0644] **결과**

[0645] **7.5.2-항-IL-1 β mAb는 리포터 세포주에서 IL-1 신호전달을 억제한다**

[0646] IL-1 경로를 억제하는 항-IL-1 β 선도 패닐의 능력을 HEK-Blue™ IL-1 β 리포터 세포주(Invivogen)에서 평가하였다. 이러한 리포터 세포주는 NF- κ B 및 AP-1 유도성 분비 배아 알칼리성 포스파타제(SEAP) 리포터의 활성화를 통해 생물활성 IL-1 β 를 검출하기 위해 인간 배아 신장 HEK 293 세포로부터 조작되었다. 세포주는 인간 IL-1 β 및 IL-1 α 둘 모두에 대해 반응성인데, 이는 동일한 수용체인 IL-1RI를 통해 이들이 신호를 전달하기 때문이다. 또한, NF- κ B 및 AP-1 경로를 통해 신호를 전달하는 TNFR1, TLR3, 및 TLR5를 인코딩하는 유전자는 간섭을 피하기 위해 이러한 리포터 세포주에서 녹아아웃되었다. 본 연구에서는 유전자 리포터의 중화 활성에 대해 05H21A, 15N14A, 및 08F17A를 평가하였다. 모든 mAb는 용량-의존적 억제를 나타냈다(도 2). 모든 선도 mAb의 IC₅₀ 값을 도 2에 나타낸다.

[0647] **7.5.3 폐 섬유아세포 세포주에서 항-IL-1 β mAb는 IL-1 β -유도 IL-6 생성을 억제한다.**

[0648] 항-IL-1 β 선도 mAb의 중화 활성을 추가로 평가하기 위해, MRC5 폐 섬유아세포에서 IL-6 방출-기반 검정을 확립하였다. IL-6은 NF- κ B 및 AP-1의 활성화를 통해 IL-1 경로에 의해 주로 조절되는 다면발현성 염증성 사이토카인이다. 이와 같이, rhIL-1 β 에 대한 MRC5 세포의 노출 시에 IL-1 β 활성은 IL-6의 생성을 통해 용이하게 측정

될 수 있다. 15N14A, 08F17A, 및 05H21A는 용량-의존적 방식으로 IL-6 방출을 억제하였다(도 3). 시험된 3개의 mAb에 대한 IC50 효력 값은 도 3에 보고된다.

7.5.4 1차 인간 섬유아세포에서 항-IL-1 β mAb는 IL-1 β 생물활성을 억제한다

1차 인간 폐 섬유아세포(공여자 #34325 및 #35234)에서 05H21A, 15N14A, 및 08F17A의 억제 활성이 평가되었다. IL-1 β 경로 활성의 측정으로서, MSD를 통해 배양 상청액으로부터 IL-6, ENA-78(CXCL5), 및 G-CSF 사이토카인 생성 및 분비를 정량화하였다. 이러한 공여자 샘플에서 IL-1 경로의 완전한 활성화를 보장하기 위해 10 pM의 rhIL-1 β 의 최종량을 사용하였다. 모든 시험 mAb는 농도-의존적 중화 활성을 나타냈으며, 이는 IL-6 및 CXCL5(ENA-78) 방출 측정(각각 도 4 파트 A 및 파트 B)에 기초하였다. 시험된 3개의 mAb에 대한 IC50 효력 값은 도 4 상에 포획된다. 1차 진피 인간 섬유아세포에서의 평가(공여자 #29114)는 인간 폐 섬유아세포 샘플에서와 유사한 효력을 나타냈으며, 모델링된 IC30, IC50, 및 IC90 값은 인간 폐 섬유아세포 샘플에서 결정된 모델링된 IC30, IC50, 및 IC90 값에 비교하여 표 18에 보고되었다.

[표 18]

인간 폐 및 진피 섬유아세포에서의 IL-1 β 선도 항체 패널에 대한 억제 값

세포	화합물	공여자	IC30(95% CI)	IC50(95% CI)	IC90(95% CI)
NHLF	05H21A	34325	0.071(0.046, 0.11)	0.167(0.11, 0.254)	1.510(0.893, 2.555)
		35234	0.042(0.027, 0.065)	0.098(0.065, 0.149)	0.890(0.526, 1.505)
	15N14A	34325	0.128(0.095, 0.173)	0.253(0.189, 0.339)	1.479(1, 2.186)
		35234	0.090(0.067, 0.122)	0.178(0.133, 0.239)	1.043(0.705, 1.542)
	08F17A	34325	0.127(0.093, 0.175)	0.293(0.216, 0.398)	2.552(1.613, 4.038)
		35234	0.090(0.065, 0.123)	0.207(0.152, 0.281)	1.803(1.139, 2.852)
NHDF	05H21A	29114	0.039(0.030, 0.050)	0.078(0.065, 0.095)	0.490(0.323, 0.743)
	15N14A		0.069(0.049, 0.095)	0.127(0.098, 0.165)	0.626(0.349, 1.123)
	08F17A		0.087(0.061, 0.124)	0.174(0.130, 0.234)	1.073(0.541, 2.129)

인간 진피 섬유아세포(NHDF 공여자 # 29114) 및 인간 폐 섬유아세포(NHLF 공여자 #34325 및 #35234)에서

모델링된 IC30, IC50, 및 IC90 값은 nM 단위로 보고되고 CI는 신뢰 구간을 나타낸다.

7.5.5 인간 공여자 PBMC 샘플에서 항-IL-1 β mAb는 IL-1 β 생물활성을 억제한다

건강한 인간 PBMC 공여자의 패널에 걸쳐 rhIL-1 β 를 사용하는 유도 실험을 수행하였다. 모델링된 EC50 및 EC90 유도 추정치는 비선형 혼합 효과 모델을 사용하는 rhIL-1 β -유도 IL-6 사이토카인 방출 측정에 기초하여 결정되었다(표 17). 공여자에 걸친 rhIL-1 β EC50 유도 값은 4.42 내지 18.67 pM의 범위였으며, 중앙 값은 8.4 pM이었으며; rhIL-1 β EC90 값은 12.45 내지 71.47 pM의 범위였으며, 중앙 값은 29.1 pM이었다. 이러한 연구로부터, 공여자 PBMC 검정에서 후속 효력 연구에 사용될 대표적인 EC50 및 EC90 값으로서 10 pM 및 30 pM의 rhIL-1 β 가 선택되었다.

이어서, 2개의 사전결정된 rhIL-1 β 유도 농도를 사용하여 5개의 PBMC 공여체의 패널에서 항-IL-1 β mAb, 15N14A, 05H21A, 및 08F17A의 기능적 활성을 평가하였다. 모든 항-IL-1 β mAb는 대표적인 공여자 PBMC 샘플에서 나타난 바와 같이 용량-의존적 억제를 나타냈다(도 5). 모델링된 IC30, IC50, 및 IC90 추정 평균(n=5 공여자 PBMC)은 표 19에 보고된다.

[0656] [표 19]

인간 PBMC 샘플에서의 IL-1 β 선도 항체 패널에 대한 억제 값

처리	IC	05H21A	08F17A	15N14A
10 pM IL1 β	30	0.043(0.028, 0.067)	0.052(0.034, 0.082)	0.032(0.018, 0.059)
	50	0.070(0.045, 0.107)	0.092(0.060, 0.142)	0.056(0.031, 0.099)
	90	0.244(0.146, 0.407)	0.402(0.212, 0.765)	0.226(0.108, 0.474)
30 pM IL1 β	30	0.104(0.075, 0.144)	0.156(0.115, 0.212)	0.075(0.056, 0.099)
	50	0.164(0.120, 0.223)	0.241(0.178, 0.328)	0.120(0.092, 0.155)
	90	0.533(0.294, 0.969)	0.744(0.487, 1.136)	0.409(0.228, 0.734)

*5 개의 PBMC 공여자 샘플에서 수행된 대표적인 IL-6 방출 검정으로부터의 퍼센트 억제의 용량-반응 분석에 기초하는, 모델링된 IC30, IC50, 및 IC90 추정 평균. 값은 nM 단위로 보고된다.

[0657]

[0658] 7.5.6 인간 전혈 샘플에서 항-IL-1 β mAb는 IL-1 β 생물활성을 억제한다

[0659] 효력의 최종 측정으로서, 인간 전혈 공여자 샘플에서 항-IL-1 β mAb 패널의 중화 활성을 평가하였다. 혈청 단백질의 존재를 고려할 때 전혈 샘플에서의 효력 평가는 PBMC 샘플에서의 평가에 비교하여 생리학적으로 더 관련된 환경을 제공한다. 5개의 공여자 샘플에서 15N14A, 08F17A, 및 05H21A의 효력을 평가하였으며, 이는 IL-6, CXCL-5, 및 G-CSF 사이토카인 방출 측정에 기초하였다(도 6). 5개의 혈액 공여자 샘플로부터의 모델링된 IC30, IC50, 및 IC90 추정 평균은 퍼센트 억제의 용량-반응 분석에 기초하였고 표 20에 보고되었다.

[0660] [표 20]

인간 전혈 검정에서의 IL-1 β 선도 항체 패널에 대한 억제 값

사이토카인	화합물	IC30(95% CI)	IC50(95% CI)	IC90(95% CI)
IL-6	15N14A	0.360(0.263, 0.493)	0.595(0.450, 0.786)	2.183(1.200, 3.974)
	05H21A	0.393(0.280, 0.552)	0.631(0.465, 0.857)	2.156(1.064, 4.368)
	08F17A	0.872(0.513, 1.483)	1.529(0.853, 2.743)	6.559(1.895, 22.703)
G-CSF	15N14A	0.299(0.183, 0.488)	0.520(0.329, 0.820)	2.179(0.813, 5.840)
	05H21A	0.364(0.221, 0.600)	0.632(0.394, 1.016)	2.643(1.026, 6.807)
	08F17A	0.704(0.398, 1.246)	1.311(0.683, 2.516)	6.576(1.549, 27.909)
CXCL5	15N14A	0.364(0.244, 0.542)	0.603(0.420, 0.867)	2.236(0.981, 5.098)
	05H21A	0.400(0.249, 0.642)	0.622(0.403, 0.961)	1.953(0.757, 5.035)
	08F17A	1.330(0.437, 4.049)	2.859(0.646, 12.642)	20.797(0.860, 502.943)

*5 개의 건강한 인간 혈액 샘플(공여자 CC00448, M3767, M5988, M7286, 및 M7370)에서 수행된 IL-6, CXCL5, 및 G-CSF 방출 검정으로부터의 퍼센트 억제의 용량-반응 분석에 기초하는, 모델링된 IC30, IC50, 및 IC90 추정 평균. 데이터는 nM 단위로 보고되고 CI는 신뢰 구간을 나타낸다.

[0661]

[0662] 7.5.7 NHP 관련성: 사이노몰구스 원숭이 섬유아세포에서 항-IL-1 β mAb는 IL-1 β 생물활성을 억제한다

[0663] 영장류에서의 독성학 연구를 가능하게 하기 위해, 15N14A, 08F17A, 및 05H21A의 교차-반응성을 사이노몰구스 마카크에서 평가하였다. 아미노산 수준에서, 인간 및 사이노몰구스 마카크 IL-1 β 의 성숙 형태는 95% 상동성이다. BIAcore를 통한 친화도 결정은 3개의 선도 mAb에 대해 사이노몰구스 원숭이로부터의 IL-1 β 에 대한 높은 친화도를 나타냈으며, 이는 사이노몰구스 마카크 내의 보존된 에피토프를 제시한다(표 12). 대조적으로, 카나키누맙은 사이노몰구스 IL-1 β 와 교차-반응하지 않는데, 이는 그의 항원성 에피토프가 사이노몰구스 IL-1 β 서열에 부재하는 항체의 인식을 위한 핵심인 인간 서열 내의 Glu64를 포함하기 때문이다. (문헌 [Dhimolea E. Canakinumab. *MAbs*. 2010;2(1):3-13]). 실제로, 마모셋은 Glu64를 담지하는 유일한 비-인간 영장류 종으로서 식별되었으므로, 이 종에서의 카나키누맙에 대한 독성학적 연구를 가능하게 하였다. (문헌 [Rondeau JM, Ramage P, Zurini M, Gram H. The molecular mode of action and species specificity of canakinumab, a human monoclonal antibody neutralizing IL-1beta. *MAbs*. 2015;7(6):1151-1160]).

[0664] 사이노물구스 IL-1 β 에 대한 높은 친화도 및 중수소 교환에 의한 에피토프 맵핑 데이터를 고려할 때, 본 발명자들은 본 발명자들의 선도 패널이 사이노물구스 세포-기반 검정에서 기능적 활성을 나타낼 것으로 예측하였다. 본 발명자들의 예측을 확인하기 위해, 본 발명자들은 1차 진피 및 폐 사이노물구스 섬유아세포 둘 모두에서 사이노물구스 재조합 IL-1 β 를 이용한 IL-6 및 G-CSF 방출-기반 검정을 확립했다. 이어서, 둘 모두의 사이노물구스 1차 섬유아세포에서 05H21A, 15N14A, 및 08F17A의 중화 활성을 평가하였다. 모든 선도 항-IL-1 β mAb는 진피 및 폐 사이노물구스 섬유아세포에서 용량-의존적 중화 활성을 나타냈다(도 7). 사이노물구스 진피 섬유아세포(CDF) 및 사이노물구스 폐 섬유아세포(CLF)는 각각 5 pM 및 15 pM의 재조합 사이노물구스 IL-1 β 로 활성화되었다. 표 21은 사이노물구스 진피(CDF) 및 폐 섬유아세포(CLF)에서의 모델링된 IC30, IC50, 및 IC90 추정치를 포괄한다. 여기에 나타난 결과는 사이노물구스 마카크에서 3개 모두의 mAb의 기능적 활성을 확인함으로써, 하류 독성학 연구를 가능하게 하기 위한 이 종의 관련성을 확립하였다.

[0665] [표 21]

1 차 사이노물구스 섬유아세포에서의 IL-1 β 선도 항체 패널에 대한 억제 값

용량	화합물	IC30(95% CI)	IC50(95% CI)	IC90(95% CI)
IL-6				
5 pM IL1 β (CDF)	15N14A	0.093(0.051, 0.171)	0.156(0.095, 0.257)	0.594(0.193, 1.833)
	05H21A	0.089(0.055, 0.145)	0.175(0.117, 0.260)	0.997(0.396, 2.510)
	08F17A	2.722(1.981, 3.741)	5.096(3.766, 6.895)	25.904(12.420, 54.030)
15 pM IL1 β (CLF)	15N14A	0.192(0.095, 0.391)	0.376(0.197, 0.718)	2.140(0.443, 10.335)
	05H21A	0.214(0.124, 0.367)	0.306(0.207, 0.453)	0.779(0.324, 1.874)
	08F17A	3.435(1.585, 7.448)	6.969(3.064, 15.851)	43.624(5.649, 336.854)
G-CSF				
5 pM IL1 β (CDF)	05H21A	0.046(0.031, 0.069)	0.059(0.037, 0.095)	0.110(0.041, 0.299)
	08F17A	1.923(1.453, 2.544)	3.236(2.555, 4.099)	12.480(7.193, 21.651)
15 pM IL1 β (CLF)	15N14A	0.129(0.063, 0.264)	0.261(0.140, 0.487)	1.629(0.363, 7.302)
	05H21A	0.195(0.108, 0.353)	0.270(0.174, 0.421)	0.630(0.283, 1.400)
	08F17A	3.584(1.519, 8.456)	6.106(2.722, 13.695)	24.308(3.671, 160.959)
사이토카인 G-CSF에 대한 5 pM의 IL1 β (CDF)에 대한 15N14A 모델은 수렴하지 못했다.				

*각각 사이노물구스 진피(CDF) 및 폐 섬유아세포(CLF)에서 5 pM 및 15 pM의 rcynoIL-1 β 로 자극한 후에 측정된 IL-6 및 G-CSF 방출에 대한 모델링된 IC30, IC50, 및 IC90 추정치. 데이터는 nM 단위로 보고되고 CI는 신뢰 구간을 나타낸다.

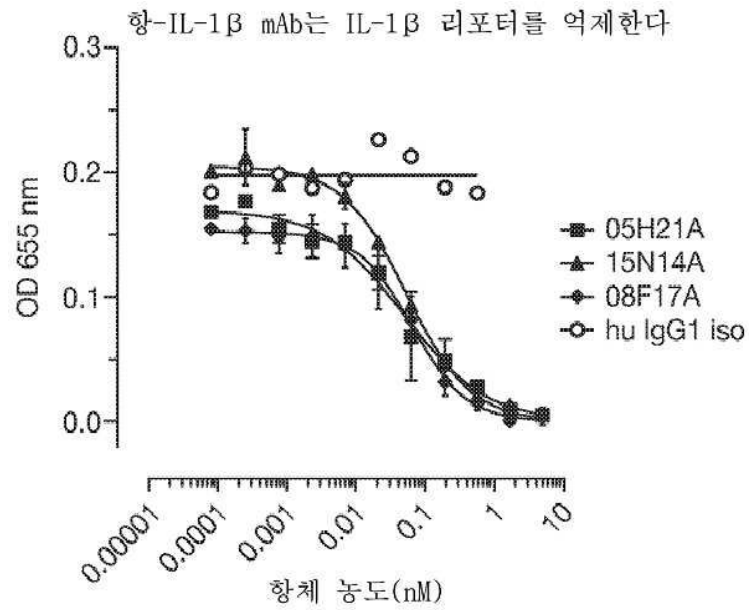
[0666]

도면

도면1

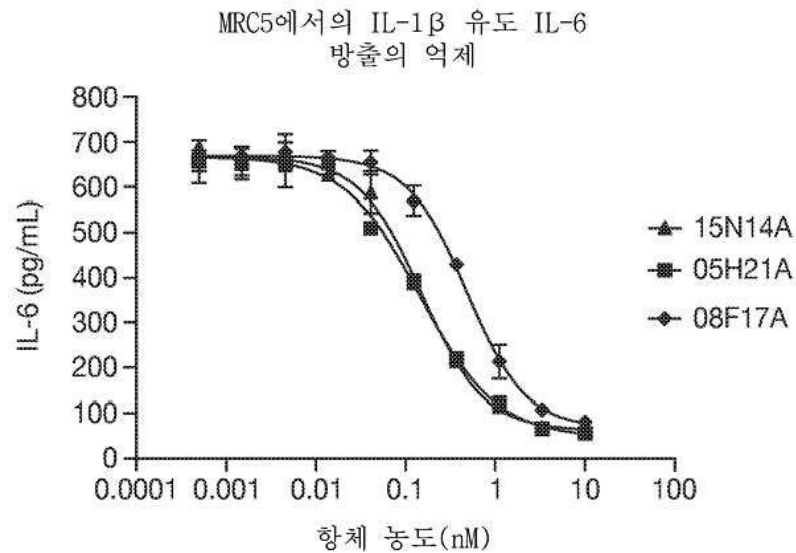
120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
APTSLNCTLDSSQKSLVNSGPEYKRALHQQIQDEQVWFMSFTVQEESSNKKIPVALGLKXNLYISCVLNDKRPITQLSVDFFKNIFFYTHKRRFVFNKIEINWKLRFSSAQFFNWIISTSQAEINQVFLGCTGGQDITDFTNQFVSS														
APTSLNCTLDSSQKSLVNSGPEYKRALHQQIQDEQVWFMSFTVQEESSNKKIPVALGLKXNLYISCVLNDKRPITQLSVDFFKNIFFYTHKRRFVFNKIEINWKLRFSSAQFFNWIISTSQAEINQVFLGCTGGQDITDFTNQFVSS														
APTSLNCTLDSSQKSLVNSGPEYKRALHQQIQDEQVWFMSFTVQEESSNKKIPVALGLKXNLYISCVLNDKRPITQLSVDFFKNIFFYTHKRRFVFNKIEINWKLRFSSAQFFNWIISTSQAEINQVFLGCTGGQDITDFTNQFVSS														
05H21A					08F17A					15N14A				
														

도면2



IL-1 β mAb	IC50 (pM)
08F17A	65
05H21A	50
15N14A	53

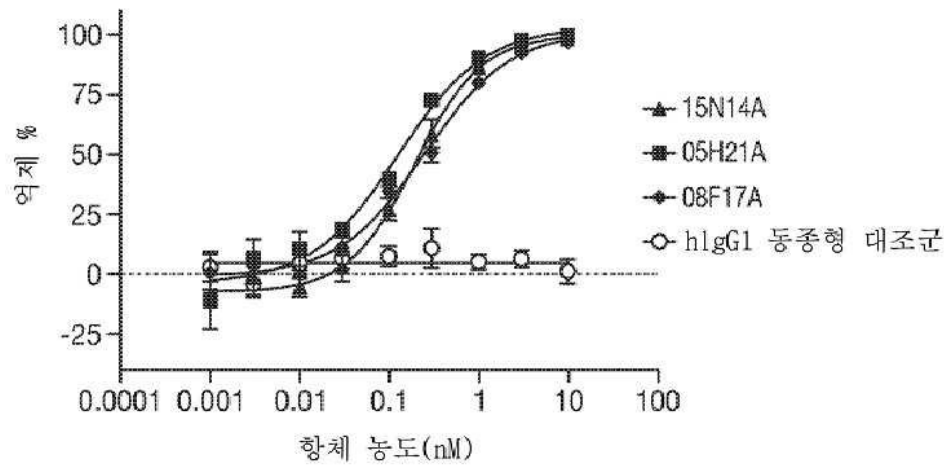
도면3



IL-1 β mAb	IC50 (pM)
08F17A	485
05H21A	146
15N14A	152

도면4a

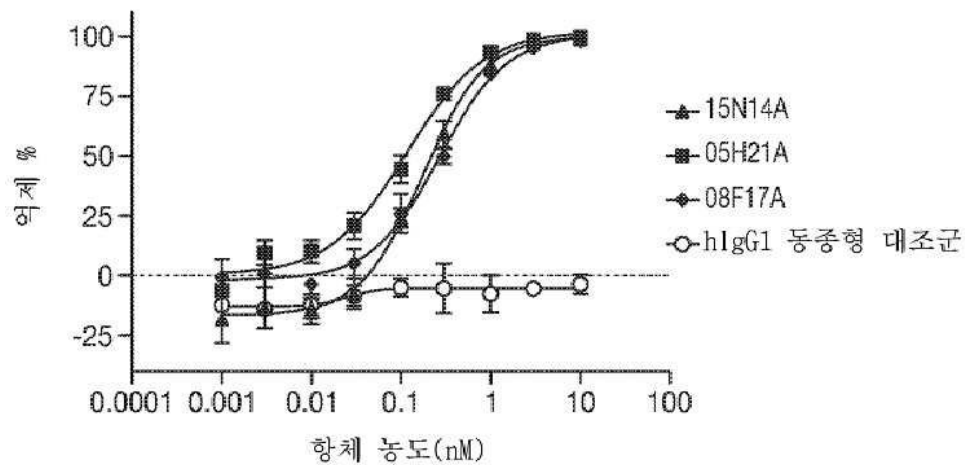
NHLF에서의 IL-6 방출



IL-1 β mAb	IC50 (pM)
08F17A	248
05H21A	127
15N14A	195

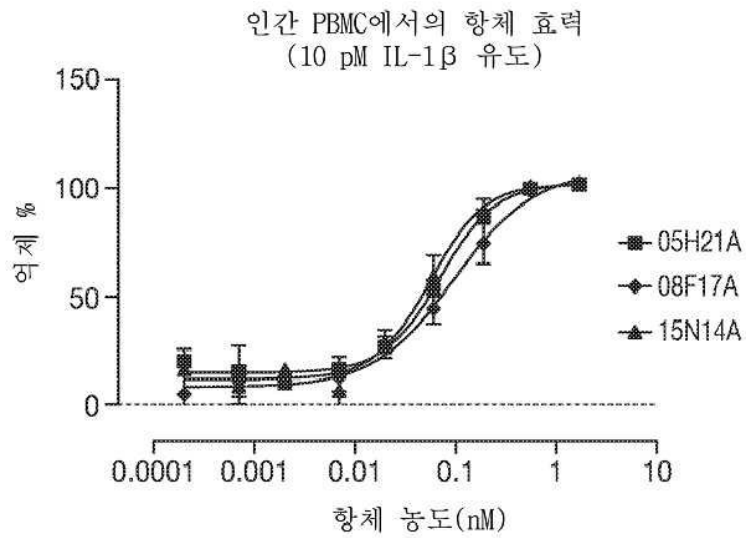
도면4b

NHLF에서의 CXCL5 방출



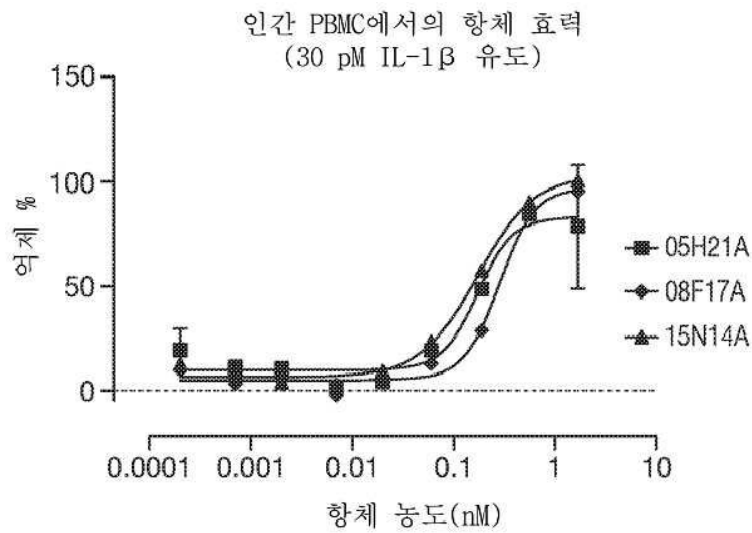
IL-1 β mAb	IC50 (pM)
08F17A	269
05H21A	116
15N14A	175

도면5a



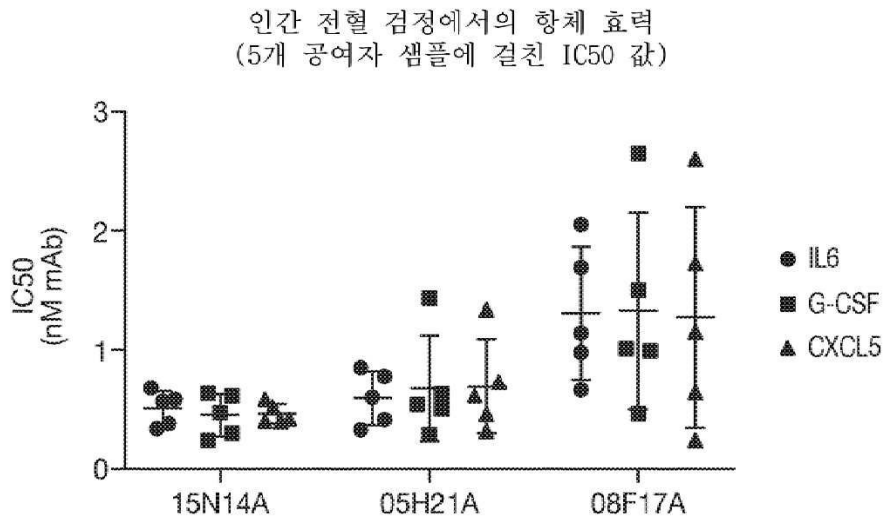
IL-1 β mAb	IC50 (pM)
08F17A	98
05H21A	70
15N14A	55

도면5b

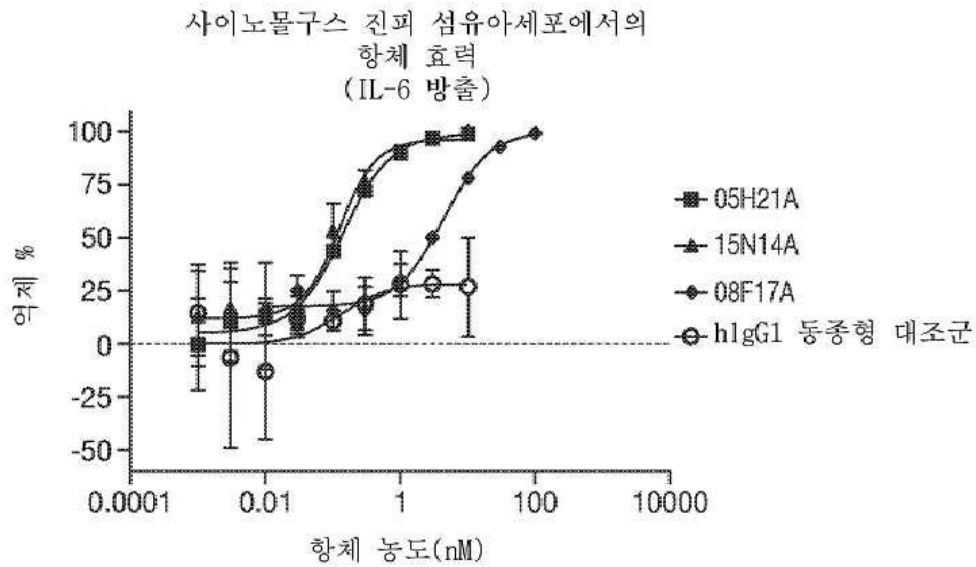


IL-1 β mAb	IC50 (pM)
08F17A	283
05H21A	174
15N14A	173

도면6

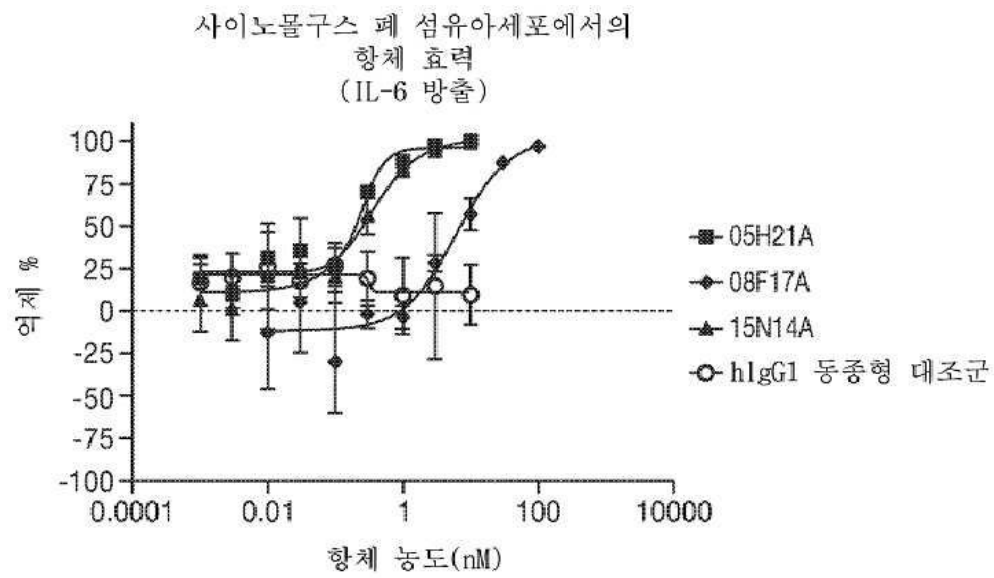


도면7a



IL-1 β mAb	IC ₅₀ (pM)
08F17A	4311
05H21A	140
15N14A	125

도면7b



IL-1 β mAb	IC50 (pM)
08F17A	6090
05H21A	248
15N14A	316

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.