



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월26일

(11) 등록번호 10-2825142

(24) 등록일자 2025년06월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) **A61K 45/06** (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2875 (2013.01)
A61K 39/39533 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7004571
 (22) 출원일자(국제) 2016년07월13일
 심사청구일자 2021년07월06일
 (85) 번역문제출일자 2018년02월14일
 (65) 공개번호 10-2018-0037984
 (43) 공개일자 2018년04월13일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2016/042074
 (87) 국제공개번호 WO 2017/011544
 국제공개일자 2017년01월19일
- (30) 우선권주장
 62/192,269 2015년07월14일 미국(US)
 (뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
 W02008118356 A1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 이뮤넥스트, 인크.
 미국 03756 뉴햄프셔주 레바논 메디컬 센터 드라이브 1
- (72) 발명자
 로스슈타인, 제이
 미국 05055 버몬트주 노리치 엘름 스트리트 18
 홀게이트, 로버트, 조지, 에드워드
 영국 에스취8 5디디 하트퍼드셔 로이스턴 스탬포드 애비뉴 22
 현, 아론
 영국 씨비6 3더블유티 캠브리지셔 일리 브룩 그로브 49
- (74) 대리인
 양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 홍성제

(54) 발명의 명칭 개선된 결합 특징, 기능적 특징 및 안전성 특징을 구비한 항-CD154 항체 및 인간 면역요법에
 서의 용도

(57) 요약

개선된 치료적 효능, 생체 내 반감기 및 제거된 FcR 결합 및/또는 보체 결합/활성화를 구비한 개선된 항-CD154 항체가 본 설명에 제공된다. 내성을 유도하고 자가면역, 염증, 이식 수용자, 섬유증 및 알레르기성 장애를 포함하는 면역 질환을 치료하기 위한 이들 항체의 용도가 본 설명에 개시된다.

대표도 - 도1a**중쇄**

가변 영역은 붉은 활자체로 나타냄
 CDR은 노란색으로 강조함
 친화도 성숙 돌연변이된 잔기는 밑줄
 Fc 돌연변이(E→R 및 K→R)는 적색

```

10      20      30      40      50      60
EVQLQESGP G LVKPSETLS L TCTVSGDSIT NGFWIWIRP PQNKLEYMGY ISYSGSTYYN

70      80      90      100     110     120
PSLKRISIS RDTSKNQFSL KLSVTAADT GVIYCAYRSY GRTPYFDYW GQGTTLTVSS

130     140     150     160     170     180
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPTVS WMSGALTSGV HTFPAVLQSS

190     200     210     220     230     240
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHPKPS NTKVDKKAEP KSCDKHTCP PCPAPELLGG

250     260     270     280     290     300
PSVFLPPPKP KDTLMISRTF EVTCVVVDVS HRDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN

310     320     330     340     350     360
STYRVVSVLT VLHQDWLNGR EYKCAVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE

370     380     390     400     410     420
LTQNQVSLTC LVKGFYPSTI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW

430     440     450
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

```

(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/71 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/197,966 2015년07월28일 미국(US)
 62/277,201 2016년01월11일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

- (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 폴리펩티드, 및
- (ii) 서열번호 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 및 31로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 폴리펩티드
- 를 포함하는, 항-인간 CD154 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 다음 중 적어도 하나를 포함하는 항-인간 CD154 항체:

- (i) C₁₀와 결합하는 능력이 결여되고, 추가로 Fc γ R2 및/또는 Fc γ R3과 결합하는 능력이 결여된 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 불변 영역;
- (ii) C₁₀와 결합하는 능력이 결여되고, 추가로 FcR γ 2 및/또는 FcR γ 3과 결합하는 능력이 결여된 인간 IgG1 불변 영역;
- (iii) E269R 및 K322A 돌연변이(여기서, 넘버링은 카밧에 따른 것임)를 포함하는 인간 IgG1 불변 영역;
- (iv) 서열번호 3 및 서열번호 4의 아미노산 서열을 각각 포함하는 IgG1 중쇄 및 경쇄 불변 영역 폴리펩티드;
- (v) FcRn 결합을 손상시키는 돌연변이, 글리코실화를 손상시키거나 제거하는 돌연변이, FcR과 결합하는 항체의 능력을 손상시키는 돌연변이, Fc γ R2 또는 Fc γ R3과 결합하는 항체의 능력을 손상시키는 돌연변이, 또는 항체의 보체와의 결합을 손상시키는 돌연변이일 수 있는 이펙터 기능에 영향을 미치는 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 IgG1 불변 영역;
- (vi) E233P 및/또는 D265A 돌연변이를 포함하거나, 다음 Fc 돌연변이들 중 임의의 돌연변이를 포함하는 IgG1 불변 영역: E269R, E233P, D265A, D265N, D270N, N297A, S298N, P329A, D270A, K326V, V369R, F405K, L410P, V427R, L234N, G237M, S239F, V262E, V264F, V266T, S267N, N268E, N297R, T299A, R301D, N325L, N325E 및 L328R(여기서, 넘버링은 카밧에 따른 것임);
- (vii) E233P 돌연변이(여기서, 넘버링은 카밧에 따른 것임)를 포함하는 IgG1 불변 영역;
- (viii) 생체 내 반감기를 개선하는 하나 이상의 돌연변이를 도입하도록 돌연변이되는 Fc 영역; 또는
- (ix) (i) 내지 (viii)에 언급된 서열 또는 돌연변이의 임의의 조합.

청구항 3

제1항에 있어서, 다음을 포함하는 항-인간 CD154 항체:

- (i) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 폴리펩티드, 및
- (ii) 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 폴리펩티드.

청구항 4

제3항에 있어서,

- (i) 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 IgG1 중쇄 불변 영역 폴리펩티드; 및
- (ii) 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 IgG1 경쇄 불변 영역 폴리펩티드
- 를 추가로 포함하는 항-인간 CD154 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항-인간 CD154 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 자가면역성 질환 또는 GVHD를 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 다음을 더 포함하는 약학적 조성물:

(i) 항원, 세포, 조직 또는 기관; 또는

(ii) 자가항원, 알레르기 유발 항원, 염증성 작용제, 약물, 또는 비-HLA 매치성 (동종) 또는 이종 (비-인간) 공여자 세포.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] <관련 출원>

[0002] 본 출원은 2015년 7월 14일 출원된 미국 가출원 일련번호 62/192,269, 2015년 7월 28일 출원된 미국 가출원 일련번호 62/197,966 및 2016년 1월 11일 출원된 미국 가출원 일련번호 62/277,201의 각각에 대해 우선권을 주장한다. 이들 가출원 각각의 내용은 그 전체가 참조로 포함된다.

[0003] <기술분야>

[0004] 본 발명은 감소된 독성 및 기능적 성질들을 구비한 개선된 항-CD154(CD154) 항체 및 그것들의 면역요법, 특히 염증성 장애, 알레르기, 자가면역, 이식 및 암의 치료에 있어서의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 생체 내에서 혈전 형성 반응 또는 응고 반응은 유도하지 않고, 면역 내성의 유도 및 체액성 면역의 차단과 같은 원하는 치료적 성질을 유도하는, 개선된 친화도 및 기능적 활성의, 고 친화도 항-CD154 항체를 제공한다.

[0005] <기술분야>

[0006] 본 발명은 감소된 독성 및 기능적 성질들을 구비한 개선된 항-CD154(CD154) 항체 및 그것들의 면역요법, 특히 염증성 장애, 알레르기, 자가면역, 이식 및 암의 치료에 있어서의 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 생체 내에서 혈전 형성 반응 또는 응고 반응은 유도하지 않고, 면역 내성의 유도 및 체액성 면역의 차단과 같은 원하는 치료적 성질을 유도하는, 개선된 친화도 및 기능적 활성의, 고 친화도 항-CD154 항체를 제공한다.

배경 기술

[0007] CD40L(CD154)은 마우스, 비 인간 영장류(NHP) 및 인간의 자가면역, 이식편 거부 및 기타 면역 관련 질병에 있어서 고도로 검증된, 가치 있는 치료적 표적이다. 다수의 II상 임상 시험에서, αCD154는 생체 내에서 CD154의 활성을 효과적으로 차단하고 질병을 개선하는 것으로 나타났다. αCD154는 면역 반응에 미치는 영향에 있어서 모든 기타 치료제와는 구별되며 αCD154는 마우스와 원숭이에서 증명된 바와 같이, 기능적 면역학적 내성을 유도할 수 있는 유일한 치료제 중 하나이다. 마우스에서는, 사실상 모든 자가면역 질병 모델들이 αCD154 치료법으로 효과적으로 개선될 수 있고(Noelle, R. J., Mackey, M., Foy, T., Buhlmann, J. and Burns, C., "CD40 and its ligand in autoimmunity". *Ann N Y Acad Sci* 1997. 815: 384~391; Mackey, M. F., Barth, R. J., Jr. and Noelle, R. J., "The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells", *J Leukoc Biol* 1998. 63: 418~428; Noelle, R. J., "CD40 and its ligand in cell-mediated immunity". *Agents Actions Suppl* 1998. 49: 17~22; 및 Quezada, S. A., Jarvinen, L. Z., Lind, E. F. and Noelle, R. J., "CD40/CD154 Interactions at the Interface of Tolerance and Immunity". *Annu Rev Immunol* 2004. 22: 307~328), 장기간의 경감이 관찰될 수 있다.

[0008] 비 인간 영장류에서는, αCD154로 구성된 짧은 치료 과정을 이용하여 영구적인 동종 이식편 내성이 달성될 수 있다(Kenyon, N. S., Chatzipetrou, M., Masetti, M., Ranuncoli, A., Oliveira, M., Wagner, J. L., Kirk, A. D., Harlan, D. M., Burkly, L. C. and Ricordi, C., "Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154". *Proc Natl Acad Sci., USA* 1999. 96: 8132~8137; Kirk, A. D., Burkly, L. C., Batty, D. S., Baumgartner, R. E., Berning, J. D., Buchanan, K., Fechner, J. H., Jr., Germond, R. L., Kampen, R. L., Patterson, N. B., Swanson, S. J., Tadaki, D.

K., TenHoor, C. N., White, L., Knechtle, S. J. and Harlan, D. M., "Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates". *Nat Med* 1999. 5: 686-693).

[0009] 또한, 인간에서의 II상 임상 시험은 αCD154가 SLE(Sidiropoulos, P. I. and Boumpas, D. T., "Lessons learned from anti-CD154 treatment in systemic lupus erythematosus patients", *Lupus* 2004. 13: 391-397), 다발경화증(예비 자료 참고) 및 특발성 혈소판 감소증(Sidiropoulos, P. I. and Boumpas, D. T., "Lessons learned from anti-CD154 treatment in systemic lupus erythematosus patients", *Lupus* 2004. 13: 391-397)에 효과적임을 보여주었다. 따라서, αCD154는 장기적인 임상적 이점이 있는 단기적 중재를 허용하는 독특한 약물이다. 그것은 효능에서 불충분하지는 않았으나, 예상치 못한 독성으로 인해 실패했다.

[0010] 1990년대 초에는 아이텍 파마큐티컬즈(IDEC Pharmaceuticals)와 바이오사(Biogen Inc.)(현재 바이오젠 아이텍(Biogen Idex))가 두 가지 상이한 αCD154 mAb를 다중 I/II상 임상 시험에 진출시켰다. 아이텍이 개발한 항체(IDEC-131)는 다투머스 대학에서 개발한 뮤린 항-인간 CD154 항체로부터 유래된 인간화 IgG1이었다. 이 항체와 인간화된 변이체들은 미국 특허 번호 6,001,358; 6,440,418; 6,506,383; 7,074,406; 및 7,122,187에 개시되어 있고, 이의 내용은 모두 본 설명에 참조로 포함된다. 초기 증거들은 이러한 약물이 매우 효과적임을 증명하였지만, 또 다른 항-CD154의 독성이 계속된 임상 개발을 못하게 했다. 이러한 임상 시험에서, 관찰된 독성은 환자에서의 혈전 색전성 사건의 유도를 포함했다. 독성에 대한 우려를 기반으로, 모든 시험은 중단되었고, 효능은 유지하되 독성을 감소시키기 위해 mAb를 다시 조작하는 방향으로 노력이 기울여졌다.

[0011] 독성 감소는 달성되었지만, αCD154 mAb의 효능 및 내성 유도 능력에 상당한 감소가 있었다(Ferrant, J. L., Benjamin, C. D., Cutler, A. H., Kalled, S. L., Hsu, Y. M., Garber, E. A., Hess, D. M., Shapiro, R. I., Kenyon, N. S., Harlan, D. M., Kirk, A. D., Burkly, L. C. and Taylor, F. R., "The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge". *Int Immunol* 2004. 16: 1583-1594).

[0012] 최근 바이오젠-아이텍과 UCB는 전하는 바에 따르면 개선된 안전성을 나타내는 항-CD154 항체를 개발했다고 보고했다. 구체적으로 그들은 CDP-7657 또는 루폴리주맙이라 지칭되는 폐길화된 항-인간 CD154 Fab 생산을 보고했다. Fab는 통상적으로 생체 내 반감기가 매우 짧기 때문에(즉, 약 4~8시간), 이 Fab는 그것의 약물동력학적 성질을 개선하기 위한 것이었다. 그러나 전하는 바에 따르면 임상적으로 효과적이긴 하지만, 이 항체는 전하는 바에 따르면 낮은 효능을 나타낸다고 한다. 또한, 브리스톨 마이어스 스쿼브(Bristol Myers Squibb)는 CD154에 대한 특이성을 포함하는 도메인 항체-Fc 융합 단백질의 개발을 보고했다. 보고에 따르면, 이 융합 단백질은 마우스 질병 모델, 특히 KLH 부하 모델 및 NZB × NZW SLE(루푸스) 모델에서 효능을 나타냈다.

[0013] 진술한 내용에도 불구하고, 당해 분야에는 개선된 항-CD154 항체, 즉, 안전하고도 효과적이며, 우수한 효능 및 약물동력학적 성질을 포함하는 항-CD154 항체에 대한 요구가 여전히 상당하다. 본 발명은 이러한 목표를 달성한다.

발명의 내용

[0014] 본 발명의 목적은 인간 치료법에 사용하기 위한 개선된 효능, 안전성 및 약물동력학을 구비한 항-CD154 항체를 제공하는 데에 있다.

[0015] 더욱 구체적으로, 본 발명의 목적은 (i) 도 2a 내지 도 2c에 도시된 서열번호 15, 17 및 18로부터 선택된 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하거나 이러한 폴리펩티드로 구성된 가변적인 무거운 폴리펩티드, 및 (ii) 도 2a 내지 도 2c에 도시된 서열번호 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 및 31로부터 선택된 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하거나 이러한 폴리펩티드로 구성된 가변적인 가벼운 폴리펩티드를 포함하는 인간화 항-인간 CD154 항체로서, 이러한 인간화 항-인간 CD154 항체는 서열번호 15의 가변적인 무거운 폴리펩티드 및 서열번호 20의 가변적인 가벼운 폴리펩티드를 포함하지 않는다는 조건이 따르는 인간화 항-인간 CD154 항체를 제공하는 데에 있다.

[0016] 또한, 본 발명의 목적은 (i) 도 1a 내지 도 1c에 도시된 서열번호 1의 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하거나 이러한 폴리펩티드로 구성된 가변적인 무거운 폴리펩티드, 및 (ii) 도 1a 내지 도 1c에 도시된 서열번호 2의 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하거나 이러한 폴리펩티드로 구성된 가변적인 가벼운 폴리펩티드를 포함하는 인간화 항-인간 CD154 항체를 제공하는 데에 있다.

- [0017] 또한, 본 발명의 목적은 C1Q와 결합하는 능력 및 Fc γ R2 및/또는 Fc γ R3과 결합하는 능력이 결여된 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 불변 영역을 포함하는 이전의 3개 단락에 기재된 항-인간 CD154 항체를 제공하는 데에 있다.
- [0018] 또한, 본 발명의 목적은 C1Q와 결합하는 능력 및 FcR γ 2 및/또는 FcR γ 3과 결합하는 능력이 결여된 인간 IgG1 불변 영역을 포함하는 이전의 4개 단락에 기재된 항-인간 CD154 항체를 제공하는 데에 있다.
- [0019] 또한, 본 발명의 목적은 E269R 및 K322A 돌연변이(카바트(Kabat)에 따른 넘버링)를 포함하는 인간 IgG1 불변 영역을 포함하는 이전의 5개 단락에 기재된 항-인간 CD154 항체를 제공하는 데에 있다.
- [0020] 또한, 본 발명의 목적은 도 1a 내지 도 1c에 도시된 서열번호 3 및 서열번호 2의 IgG1 가벼운 불변 영역 및 무거운 불변 영역을 포함하는 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 인간화 항-인간 CD154 항체를 제공하는 데에 있다.
- [0021] 또한, 본 발명의 목적은 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 인간화 항-인간 CD154 항체로서, 이때, 이러한 항체는 IgG1 이소형이고, 이러한 항체의 Fc 영역은 이펙터 기능에 영향을 미치는 적어도 하나의 다른 돌연변이, 예컨대, FcRn 결합을 손상시키는 돌연변이, 글리코실화를 손상시키거나 제거하는 돌연변이, 또는 이러한 항체가 FcR, 예컨대, Fc γ R2 또는 Fc γ R3 또는 또 다른 FcR과 결합하는 능력을 손상시키는 또 다른 돌연변이, 또는 보체와의 결합을 손상시키는 돌연변이를 도입하도록 더 돌연변이되는 것인 인간화 항-인간 CD154 항체를 제공하는 데에 있다.
- [0022] 또한, 본 발명의 목적은 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 인간화 항-인간 CD154 항체로서, 이때, 이러한 항체는 IgG1 이소형이고, 이러한 항체의 Fc 영역은 E233P 및/또는 D265A 돌연변이 또는 표 1, 2, 또는 3에서 확인된 Fc 돌연변이들 중 임의의 돌연변이를 더 도입하도록 돌연변이되는 것인 인간화 항-인간 CD154 항체를 제공하는 데에 있다.
- [0023] 또한, 본 발명의 목적은 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 인간화 항-인간 CD154 항체로서, 이때, 이러한 항체는 IgG1 이소형이고, 이러한 항체의 Fc 영역은 E233P 돌연변이를 도입하도록 돌연변이되는 것인 인간화 항-인간 CD154 항체를 제공하는 데에 있다.
- [0024] 또한, 본 발명의 목적은 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 인간화 항-인간 CD154 항체로서, 이때, 이러한 항체의 Fc 영역은 생체 내 반감기를 개선하는 하나 이상의 다른 돌연변이들을 도입하도록 더 돌연변이되는 것인 인간화 항-인간 CD154 항체를 제공하는 데에 있다.
- [0025] 또한, 본 발명의 목적은 치료적으로 또는 예방적으로 유효한 양의 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 적어도 하나의 인간화 항-인간 CD154 항체를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [0026] 또한, 본 발명의 목적은 항원, 세포, 조직, 또는 기관을 더 포함하는, 치료적으로 또는 예방적으로 유효한 양의 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 적어도 하나의 인간화 항-인간 CD154 항체를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [0027] 또한, 본 발명의 목적은 자가항원, 알레르기 유발 항원, 염증성 작용제, 약물, 또는 비-HLA 매치성(동종) 또는 이종(비-인간) 공여자 세포를 더 포함하는, 치료적으로 또는 예방적으로 유효한 양의 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 적어도 하나의 인간화 항-인간 CD154 항체를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [0028] 또한, 본 발명의 목적은 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 항체 또는 조성물을 이용하는 면역억제 또는 면역치료 방법을 제공하는 데에 있다.
- [0029] 또한, 본 발명의 목적은 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 항체 또는 조성물을 투여하여 알레르기성, 염증성, 또는 자가면역성 장애를 가진 대상체 또는 이식 수용자를 치료하는 방법을 제공하는 데에 있다.
- [0030] 또한, 본 발명의 목적은 선택적으로 유전자 조작될 수 있는 공여자 조직, 기관, 또는 세포, 예컨대, CAR-T(키메라 항원 수용체 T 세포) 또는 NK(자연 살해) 세포의 이식 전에, 이식과 동시에, 또는 이식 후에, 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 항체 또는 조성물을 투여하여, 대상체의 GVHD를 치료하거나 예방하는 방법을 제공하는 데에 있다.
- [0031] 또한, 본 발명의 목적은 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 항체 또는 조성물을 투여하여 내성 또는 장기적인 항원 특이적 면역억제를 유도하는 방법으로, 이때, 이러한 방법은 선택적으로, 내성 또는 장기적인 면역억제가 유도될 항원을 포함하는 세포, 항원, 조직, 또는 기관의 투여를 더 포함하는 것인, 내성 또는 장기적인 항원

특이적 면역억제를 유도하는 방법을 제공하는 데에 있다.

- [0032] 또한, 본 발명의 목적은 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 항체 또는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 유전자, 세포, 조직, 또는 기관 치료의 방법을 제공하는 데에 있다.
- [0033] 또한, 본 발명의 목적은 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 항체 또는 조성물을 투여하여 건선, 류마티스 관절염, 건선성 관절염, 난소염, 루푸스 또는 SLE, 당뇨병, IBD, 크론병, ITP, 갑상샘염, 류마티스 관절염, 중증 근육無力증, 전신성 홍반성 루푸스, 그레이브스병, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 용혈성 빈혈, 진성 당뇨병, 염증성 장 질환, 크론병, 다발경화증, 건선, 약물 유발성 자가면역성 질환, 또는 약물 유발성 루푸스로부터 선택된 병태를 치료하는 방법을 제공하는 데에 있다.
- [0034] 또한, 본 발명의 목적은 골수, 기관, 조직 또는 면역 세포를 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 항체 또는 조성물과 인큐베이션 하는 것을 포함하는, 세포 요법 또는 기관 또는 골수 이식에 사용하기 위한, 상기 골수, 기관 또는 면역 세포를 처리하는 방법으로, 예컨대, 이때, 처리된 골수, 조직, 기관 또는 면역 세포는 공여자 및/또는 수용자 T 세포를 포함하는 것인, 골수, 기관 또는 면역 세포를 처리하는 방법을 제공하는 데에 있다.
- [0035] 또한, 본 발명의 목적은 유효한 양의 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 항체 또는 을 환자에 투여하는 것을 포함하는, 필요로 하는 환자에서 혈전성 사건을 유발하지 않고 내성을 유도하는 방법으로, 이러한 방법은 선택적으로, 항원, 예컨대, 자가항원, 알레르기 유발 항원, 염증성 작용제, 약물, 또는 비-HLA 매치성 (동종) 공여자 세포의 투여를 더 포함하는 것인, 필요로 하는 환자에서 혈전성 사건을 유발하지 않고 내성을 유도하는 방법을 제공하는 데에 있다.
- [0036] 또한, 본 발명의 목적은 이식된 세포, 기관 또는 조직을 받을 환자 또는 받았던 환자에서 내성, 장기적인 면역 또는 T 또는 B 세포 억제제를 유도하는 방법으로, 예컨대, 이때, 이러한 약물은 생물체제, 예컨대, 치료적 항체, 수용체, 융합 단백질, 호르몬, 성장 인자 또는 사이토카인인 것인, 환자에서 내성, 장기적인 면역 또는 T 또는 B 세포 억제제를 유도하는 방법을 제공하는 데에 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 목적은 유효한 양의 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 항체 또는 조성물을 투여하여 T 세포 매개성 자가면역 장애를 치료하는 방법을 제공하는 데에 있다.
- [0038] 또한, 본 발명의 목적은 유효한 양의 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 항체 또는 조성물을 투여하여 B 세포 매개성 자가면역 장애를 치료하는 방법을 제공하는 데에 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 목적은 유효한 양의 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 항체 또는 조성물을 투여하여, 류마티스 관절염, 중증 근육無力증, 전신성 홍반성 루푸스, 그레이브스병, 헌팅턴병, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 용혈성 빈혈, 진성 당뇨병, 파킨슨병, 건선, 애디슨병, 다발경화증, 루푸스 및 약물 유발성 자가면역성 질환으로부터 선택된 자가면역성 질환, 예컨대, 약물 유발성 루푸스를 치료하는 방법을 제공하는 데에 있다.
- [0040] 또한, 본 발명의 목적은 항원의 투여를 포함하는, 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른, 치료방법을 제공하는 데에 있다.
- [0041] 또한, 본 발명의 목적은 유효한 양의 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 항체 또는 조성물을 투여하여, GVHD, 골수 이식(BMT), 다발경화증, 루푸스, ITP, 류마티스 관절염, 천식, IBD 또는 또 다른 염증성 장 장애를 치료하거나 예방하는 방법을 제공하는 데에 있다.
- [0042] 또한, 본 발명의 목적은 유효한 양의 이전의 단락들 중 임의의 단락에 따른 항체 또는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 전체로든 부분적으로든 CD40 신호 전달에 의해 매개되는 인간 병태, 장애 또는 질병, 또는 전술한 것들 중 임의의 것의 증상을 치료하는 방법으로, 예컨대, 이때, 이러한 인간 병태, 장애 또는 질병은 염증성, 알레르기성, 또는 자가면역성 반응 또는 섬유증이거나, 이러한 인간 병태, 장애, 또는 질병은 루푸스 신장염, 류마티스 관절염, 전신성 홍반성 루푸스, 척추관절염, 약물 유발성 홍반성 루푸스, 염증성 장 질환, 크론병, 건선 및 다발경화증으로부터 선택되거나, 이러한 인간 병태, 장애, 또는 질병은 알레르기 접촉 피부염, 전신탈모증, 아나필락시스 자색반 천식, 중증 천식, 대사 천식, 알레르기 천식, 아토피 피부염, 헤르페스모양 피부염, 지속 용기 홍반, 가장자리 홍반, 다형 홍반; 결절 홍반, 알레르기 육아종증, 고리 육아종, 과립백혈구 감소증, 과민성 폐렴, 각막염, 신장 증후군, 겹침 증후군, 비둘기사육자병, 특발성 다발신경염, 두드러기, 포도막염, 소아 피부근염 및 백반증으로부터 선택되거나, 이러한 인간 병태, 장애, 또는 질병은 알레르기 기관지폐 아스페르길루스증; 자가면역성 용혈성 빈혈; 흑색가시세포증; 알레르기 접촉 피부염; 애디슨병; 아토피 피부염; 원형탈모증; 전신탈모증; 아밀로이드증; 아나필락시스 자색반; 유사아나필락시스 반응; 재생불량성 빈혈; 맥관부종, 유

전성; 맥관부종, 특발성; 강직척추염; 동맥염, 두개; 동맥염, 거대세포; 동맥염, 타카야수; 동맥염, 관자; 천식; 모세혈관확장성 운동실조증; 자가면역성 난소염; 자가면역성 고환염; 자가면역성 다내분비선 부전; 베체트병; IgA 신증; 폐색성 혈전 혈관염; 물질 천포창; 캔디다증, 만성 점막 표피성; 카플란 증후군; 심근경색증 증후군; 심낭막절개술후 증후군; 심장염; 복강 스프루; 샤가스병; चेडीआक-हिगशी 증후군; 처그-스트라우스병; 코간증후군; 저온응집병; 크레스트 증후군; 크론병; 한랭글로불린혈증; 잠복성 섬유성 폐포염; 헤르페스모양 피부염; 피부근염; 진성 당뇨병; 다이아몬드 블랙판 증후군; 디조지증후군; 원반모양 홍반성 루푸스; 호산성 근막염; 공막바깥염; 지속 용기 홍반; 가장자리 홍반; 다형 홍반; 결절 홍반; 가족성 지중해열; 펠티증후군; 폐섬유증; 사구체신염, 아나필락시스모양; 사구체신염, 자가면역성; 사구체신염, 연쇄상구균감염후; 사구체신염, 이식후; 사구체병증, 막성; 굿파스처 증후군; 이식편대숙주병; 과립백혈구 감소증, 면역 매개성; 고리 육아종; 육아종증, 알레르기성; 육아종 근염; 그레이브스병; 하시모토 갑상샘염; 신생아 용혈성 질환; 혈색소 침착증, 특발성; 헤노흐-쾨라인 자반증; 간염, 만성 활동 및 만성 진행형; 히스토사이티시스 x; 과다호산구증후군; 특발성 혈소판감소성 자반증; 조브증후군; 소아 피부근염; 소아 류마티스 관절염(소아 만성 관절염); 가와사키병; 각막염; 건성 각막결막염; 란드리-길랑-바레-스트롤 증후군; 나병, 나중형; 괴돌러 증후군; 라이엘 증후군; 라임병; 림프종모양 육아종증; 비만세포증, 전신성; 혼합 결합조직병; 다발성 단일신경염; 머클-웰스 증후군; 점액피부 림프절 증후군; 점액피부 림프절 증후군; 다중심 그물조직구증; 다발경화증; 중증 근육 무력증; 군상 식육종; 괴사 혈관염, 전신성; 신장 증후군; 겹침 증후군; 지방층염; 발작성 한랭헤모글로빈뇨; 발작성 야간헤모글로빈뇨; 유사천포창; 천포창; 홍반 천포창; 낙엽 천포창; 보통 천포창; 비둘기사육자병; 폐렴, 과민성; 결절 다발동맥염; 류마티스성 다발성 근육통; 다발근육염; 다발신경염, 특발성; 포르투갈형 가족성 다발신경병; 자간전증/자간증; 원발 쓸개관 간경화; 진행 전신 경화증(피부 경화증); 건선; 건선성 관절염; 폐포단백증; 폐 섬유증, 레이노 현상/증후군; 리델 갑상샘염; 라이터 증후군, 재발성 다발성 연골염; 류마티스열; 류마티스 관절염; 사르코이드증; 공막염; 경화 쓸개관염; 혈청병; 세자리 증후군; 쇼그렌 증후군; 스티븐스-존슨 증후군; 스틸병; 아급성 경화 범농염; 교감 눈염증; 전신성 홍반성 루푸스; 이식 거부; 췌양성 대장염; 미분화 결합조직병; 두드러기, 만성; 두드러기, 한랭; 포도막염; 백반증; 웨버-크리스찬병; 베게너 육아종증; 및 비스코트-알드리치 증후군으로부터 선택되는 것인, 전체로든 부분적으로든 CD40 신호 전달에 의해 매개되는 인간 병태, 장애 또는 질병, 또는 전술한 것들 중 임의의 것의 증상을 치료하는 방법을 제공하는 데에 있다.

도면의 간단한 설명

[0043]

도 1a 내지 도 1c는 IDEC-131로부터 유래된 본 발명의 항-CD154 항체의 아미노산 서열을 포함한다. 도면에서, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 가변 영역 잔기는 굵은 활자체로 나타냈고, CDR은 노란색으로 강조했으며, 친화도 성숙 돌연변이된 잔기는 밑줄로 표시하였고, Fc 돌연변이(E→R 및 K→R)는 적색 및 밑줄로 나타냈다.

도 2a 내지 도 2c는 IDEC-131 및 그것의 무린 모항체로부터 유래된, 상이한 변경된 IgG1 불변 영역 및 변경된 경쇄 및 중쇄 서열들을 정렬한 것이다.

도 3은 CD154를 발현하는 저각 세포와 결합하는 능력에 대해 본 발명의 인간화 항-인간 CD154 항체(도면 및 본 출원에서 "INX021"로 지칭됨)의 결합을 IDEC-131과 비교하는 비아코어(BIAcore) 결합 분석 결과를 포함한다. 도 시된 바와 같이, 본 발명의 항체는 IDEC-131과 비교하여 (저각 세포 상에 발현된) CD154에 대하여 결합 친화도가 약 5배 증가하였다.

도 4는 본 발명의 항체("INX021")가 IDEC-131보다 T 세포 CD154에 의한 B 세포 활성화를 더욱 강력하게 추진함을 보여주는 실험 결과를 포함한다.

도 5는 INX021과 동일한 돌연변이를 함유하는 인간 IgG 항-무린 CD154 항체의 FcR 돌연변이체(K322A 및 E269R)가 피부 내성 모델에서 내성을 유도함을 보여주는 실험 결과를 포함한다.

도 6은 INX021의 면역 복합체가 시험관 내에서 마우스 또는 인간 혈소판의 집합 또는 활성화를 유도하지 않음을 보여주는 실험 결과를 포함한다.

도 7a 내지 도 7d는 INX021이 양성 대조 항체와 비교하여 혈소판 활성화 또는 혈소판에 대한 기타 영향을 유발하지 않음을 보여주는 실험 결과를 포함한다. 도 7a는 INX021이 혈전성 스트레스를 유발하지 않음을 보여주고, 도 7b는 관찰된 폐 색전 없음으로 증명된 바와 같이 INX021이 혈소판 응집 또는 응고를 초래하지 않음을 보여주고, 도 7c는 INX021이 순환하는 혈소판 수에 영향을 미치지 않음을 보여주고, 도 7d는 Fc γ RIIa Tg 마우스에서 관찰된 이 항체의 관찰된 장점들을 요약한 것이다.

도 8a 및 도 8b는 FcR 결합 및 보체 활성을 감소시키거나 제거하는 Fc 돌연변이(INX021에 함유된 E2669R 및

K322A 돌연변이)를 함유하는 항-마우스 CD154 IgG1 항체가 동물 모델에서 면역억제제임을 보여준다. 도 8a는 이들 돌연변이를 함유하는 항-CD154 항체가 EAE를 억제함을 보여주고, 도 8b는 이들 돌연변이를 함유하는 항-CD154 항체가 미엘린/최소돌기 아교세포 당단백질("MOG")에 대응하여 체액성 면역을 억제하고 내성을 유도함을 보여준다.

도 9는 CD86 발현을 기초로 한 T 세포 유도성 B 세포 활성화에 미치는 INX021을 포함한 IDEC-131의 상이한 항체 변이체들의 영향을 비교한 것이다. 이의 영향은 가변적이어서, 증가된 결합 친화도가 반드시 우수한 효능, 즉, 면역억제제 활성화와 관련이 있는 것은 아님을 의미한다.

도 10a 및 도 10b는 KLH 분석에서 IgG 및 IgM 항체의 생성에 미치는 INX021 및 키메라 5c8 항체의 영향을 비교한 것이다. 도 10a는 IgG에 미치는 영향을 비교한 것이고, 도 10b는 IgM에 미치는 영향을 비교한 것이다.

도 11a 및 도 11b는 배 중심 점수에 미치는 용제, INX021 및 5c8 항체의 영향을 비교한 것이다. 도 11a는 배 점수 비교를 나타낸 것이고, 도 11b는 처리된 동물의 비장 및 림프절(LN)에서의 배 중심의 수와 세포충실성 정도를 비교한 막대 그래프를 포함한다.

도 12는 또 다른 항-CD154 항체(바이오젠/UCB의 폐길화된 αCD154 Fab)를 이용한 공개된 결과에 대한 관찰된 병변 빈도를 요약한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 본 발명을 상세히 개시하기 전에, 다음의 정의가 제공된다. 달리 정의되지 않는 한, 본 설명에 사용된 모든 기술적 용어 및 과학적 용어는 이 발명이 속하는 분야의 당업자에게 흔히 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0045] 본 발명과 관련하여 본 설명에 사용된 용어 "항체"는 분리된, 재조합 또는 합성 항체, 항체 접합체 또는 항체 유도체를 포함한다. 용어 "항체"는 달리 지시되거나 문맥에 의해 달리 이해되지 않는 한, 종종 항원 결합 단편을 포함한, 항체 단편을 포함하고자 한 것이다. 항원 결합 단편은 특이적 결합에 대해 온전한 항체와 경쟁한다. 일반적으로, Fundamental Immunology, Ch. 7(Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) 참조. 항원 결합 단편은 재조합 DNA 기법에 의해 또는 온전한 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 항원 결합 단편은 Fab, F(ab)₂, Fab', F(ab')₂, F(ab')₃, Fd, Fv, 도메인 항체(dAb), 기타 1가 및 2가 단편, 상보성 결정 영역(CDR) 단편, 단일 사슬 항체(예컨대, scFv, scFab 및 scFab δC), 키메라 항체, 디아바디, 트리아바디, 미니바디, 나노바디, 및 폴리펩티드와의 특이적 항원 결합을 제공하기에 충분한 항체의 적어도 일부분을 함유하는 폴리펩티드; 및 전술한 것들의 융합체 및 유도체를 포함한다. 예컨대, Holliger and Hudson, Nature Biotechnology 23: 1126~1136 (2005) 및 Hust et al., BMC Biotech 7: 14 (2007) 참조.
- [0046] 달리 언급되지 않는 한, 또는 문맥에 의해 달리 시사되지 않는 한, 본 발명의 "항체"는 전체 항체 및 이의 임의의 항원 결합 단편, 항체 접합체(즉, 기능적 모이어티에 접합되거나 기능적 모이어티와 관련된 항체 또는 이의 항원 결합 단편)를 포함한, 하나 이상의 변형(예컨대, 아미노산 삽입, 결실, 치환, 번역후 변형 또는 이의 결여 등)을 함유할 수 있는 항체 유도체 또는 변이체를 포함한다. 항체 접합체를 포함한, 이러한 항체 유도체는 CD154와 특이적으로 결합하는 본 발명의 항원 결합 단편을 기반으로 할 수 있거나 CD154와 특이적으로 결합하는 본 발명의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 추가적으로, 전술된 항체 구현예는 무린, 햄스터, 염소, 토끼, 키메라, 인간화, 또는 완전 인간 항체, 단편, 유도체, 또는 접합체일 수 있다. 본 발명의 일부 양태에서, 용어 "항체"는 위에서 언급된 항체 구현예 중 하나 이상을 제외할 수 있음은 이해된다. 그러한 조건은 당업자에게 명백할 것이다.
- [0047] 용어 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 또는 불변 영역의 면역체계 단백질 및/또는 세포와 결합하는 기능적인 능력을 지칭한다. 감소된 이펙터 기능을 갖는 항체 및 그러한 항체를 조작하는 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있는데(예컨대, WO 05/18572, WO 05/03175, 및 미국 특허 번호 6,242,195 참조), 본 설명에서 더욱 상세히 설명한다. 전형적인 이펙터 기능으로는 보체 단백질(예컨대, 보체 단백질 C1q) 및/또는 Fc 수용체(FcR)(예컨대, FcγRI, FcγRII, FcγRIIa, FcγRIII, 및/또는 FcγRIIIb)와 결합하는 능력을 포함한다. 전술한 분자들 중 하나 이상과 결합할 수 있는 기능적인 결과로는, 제한 없이, 옵소닌화, 식세포작용, 항원 의존성 세포성 세포독성(ADCC), 보체 의존성 세포독성(CDC) 및/또는 이펙터 세포 조절을 포함한다. 이펙터 기능의 감소는, 비록 감소되거나, 비슷하거나, 동일하거나, 증가된 결합 친화도일지라도 항체(또는 이의 단편)의 가변 영역의 항원 결합 활성을 유지하는 한편, 적어도 부분적으로는 Fc가 그것의 동족 수용체(cognate receptor)와의 결합 또는 보체 단백질 또는 이펙터 세포와의 결합에 의해 유도된 생화학적 또는 세포적 활성 중 하나 이상의 감소를 지칭한다. 본 발명의

특정 항체들은 감소된 이펙터 기능을 나타낸다. 이펙터 기능의 감소, 예컨대, Fc 수용체 또는 보체 단백질과의 Fc 결합의 감소는 배(fold) 감소 면에서 표현될 수 있고(예컨대, 1.5배, 2배 등만큼 감소됨), 예컨대, 당해 분야에 공지된 결합 분석법(예를 들어, WO 05/18572 참조)을 이용해 결정된 결합 활성의 퍼센트 감소를 기초로 계산될 수 있다.

[0048] 문맥에 의해 달리 요구되지 않는 한, 단수형 용어는 복수를 포함할 것이고, 복수형 용어는 단수형을 포함할 것이다.

[0049] 본 명세서 및 청구범위 전체에 걸쳐, 단어 "포함하다(comprise)" 또는 변형, 예컨대, "포함한다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"은 언급된 정수 또는 정수 그룹을 포함하는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이나, 임의의 다른 정수 또는 정수 그룹의 배제를 의미하는 것으로 이해되지 않을 것이다.

[0050] 용어 "CD154"는 활성화된 T 세포 상에서 발현된 리간드를 지칭한다. CD154는 당해 분야에서 몇몇 다른 명칭, 예컨대, CD40 리간드(CD40L), CD40 반대 수용체(CD40CR), gp39, T-BAM, T 세포 활성화 분자, TRAF, TNF 관련 활성화 단백질(TRAP) 및 중앙 피사 인자 리간드 슈퍼패밀리 5번 구성원(TNFSF5)으로 알려져 있다(Gauchat et al., 1993 *FEBS Lett.* 315: 259~266; Graf et al. 1992, *Europ. J. Immun.* 22: 3191~3194; Hollenbaugh et al., 1992 *EMBO J.* 11: 4313~4321). 이들 용어는 본 출원 전체에 걸쳐 상호 교환적으로 사용된다. 본 발명의, 항체를 비롯한, CD154 결합 단백질은 인간 CD154와 특이적으로 결합하며, 다른 종의 CD154와 교차 반응하여 그에 따라 그것과 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의, 항체를 비롯한, CD154 결합 단백질은 인간 CD154, 마우스 CD154, 또는 비 인간 영장류 CD154와 특이적으로 결합한다.

[0051] 용어 "항-CD154 항체"는 합성 항체 또는 예를 들어, 박테리오파지에 의해 발현된 항체와 같은 재조합 DNA 기술을 이용하여 생성된 재조합 항체도 포괄한다. 용어 "항-CD154 항체"는 이러한 항체를 암호화하는 DNA 분자의 합성에 의해 생성되고 DNA 분자가 항체 단백질을 발현하는 항체, 또는 이러한 항체를 구체화하는 아미노산 서열을 포함하는 것으로도 해석되어야 하며, 이때, 이러한 DNA 또는 아미노산 서열은 당해 분야에서 이용 가능하고 잘 알려져 있는 합성 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 이용하여 획득된 것이다.

[0052] 본 설명의 "FcR 결합을 제거하거나 감소시키며, 독성을 제거하는 돌연변이"는 시험관 내 및/또는 생체 내에서 혈소판 감소증 또는 혈전증 또는 응고를 제거하거나 감소시키는 돌연변이를 지칭한다. FcR 결합을 제거하거나 감소시키고 다른 Fc 이펙터 기능들에 영향을 주도록 (손상시키거나 증진시키도록) 변형될 수 있는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하는 상이한 인간 항체 유형의 Fc 영역 또는 불변 영역 내의 자리는 당해 분야에 잘 알려져 있다. 인간 IgG1 Fc 영역 또는 불변 영역 내에서 변형될 수 있는 예시적인 돌연변이는 표 1 내지 3 및 아래의 실시예에서 확인된다.

[0053] "보체 기능을 제거하거나 감소시키고, 내성을 유도하는 성질을 유지하는 돌연변이"는 인간 불변 영역, 바람직하게는 인간 IgG1 또는 IgG3 불변 영역을 함유하는 인간, 키메라, 또는 인간화 항체에 있어서, 이의 Fc 영역이 보체 결합을 제거하거나 실질적으로 감소시키기 위해 하나 이상의 자리에서 돌연변이된 것인, 인간 불변 영역, 바람직하게는 인간 IgG1 또는 IgG3 불변 영역을 함유하는 인간, 키메라, 또는 인간화 항체 내의 돌연변이를 지칭한다. 바람직하게는 그러한 돌연변이는 이러한 항체가 생체 내에서 내성을 유도하는 능력에 주목할 만하게 영향을 미치지 않을 것이다. 이것은 피부 이식 모델과 같은 적절한 내성 모델을 이용하여 확립될 수 있다. 보체 결합을 제거하거나 감소시키도록 변경될 수 있고 다른 Fc 이펙터 기능에 영향을 미칠 (손상시키거나 증진시킬) 수 있는, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하는 상이한 인간 항체 유형의 Fc 영역 또는 불변 영역의 자리들은 당해 분야에 잘 알려져 있다. IgG1에서 변경될 수 있는 예시적인 자리들은 표 1 내지 3 및 아래의 실시예에서 확인된다.

[0054] "환자"는 인간 또는 비 인간 동물, 바람직하게는 포유동물을 의미할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 본 발명은 돌연변이된 IgG1 또는 IgG3 불변 영역을 함유하는, 인간 치료법에 적절한 항-인간 CD154 항체를 생성하는데, 이때, 이러한 돌연변이는 독성 또는 혈소판 감소증 또는 혈전증 또는 응고 반응과 같은 안전성 우려 또는 보체 반응과 관련된 독성을 제거하거나 실질적으로 억제하고, 바람직하게는 그러한 항체는 생체 내에서 내성 또는 장기적인 체액성 억제를 유도하는 능력을 보유한다.

[0055] 본 설명에 사용된 "대상체"는 유기체 또는 이로부터 유래된, 예를 들어, 배양된 세포주, 생검, 혈액 샘플, 또는 세포를 함유하는 체액 샘플을 포함하는, 세포 샘플, 조직 샘플 또는 기관 샘플을 지칭한다. 여러 사례에서, 이러한 대상체 또는 그로부터 유래된 샘플은 다수의 세포 유형을 포함한다. 일 구현예에서, 이러한 샘플은 예를 들어, 중앙 세포와 정상 세포의 혼합물을 포함한다. 일 구현예에서, 이러한 샘플은 적어도 10%, 15%, 20%, 그리

고 다음, 90%, 또는 95% 종양 세포를 포함한다. 이러한 유기체는 동물, 예컨대, 소, 돼지, 마우스, 랫트, 닭, 고양이, 개 등을 포함하나 이에 한정되지 않는 동물일 수 있고, 보통은 인간과 같은 포유동물이다.

[0056] 본 발명과 관련하여 다양한 문법적 형태의 용어 "치료하는(treating)"은 질병 상태, 질병 진행, 질병 원인 인자(예컨대, 세균 또는 바이러스), 또는 기타 비정상적인 상태의 유해한 영향의 예방(즉, 화학예방), 치유, 역전, 약화, 경감, 최소화, 억제, 또는 중단을 지칭한다. 예를 들어, 치료는 질병의 한 증상(즉, 반드시 질병의 모든 증상은 아님)을 경감시키거나 질병의 진행을 약화시키는 것을 수반할 수 있다.

[0057] "자가면역의 치료 또는 예방" 또는, 항-CD154 항체가 잠재적으로 본 설명에 사용된 바와 같이 치료적 이득이 되는, 암, 감염, 염증, 알레르기, 이식, 이식편대숙주병 및 기타 병태와 같은 또 다른 질병 상태의 "치료 또는 예방"은 이러한 질병의 진행을 부분적으로 또는 전체적으로 억제하거나, 지연시키거나, 방지함을 지칭한다. 암의 경우, 이것은 포유동물, 예를 들어, 인간에서, 암 전이의 치료 또는 억제; 암 전이를 포함한, 암 재발의 억제, 지연, 또는 방지; 또는 암(화학예방)의 개시 또는 발달의 방지를 의미한다. 또한, 본 발명의 방법은 인간 암 환자의 치료를 위해 실현될 수 있다. 그러나 이러한 방법은 다른 포유동물의 암 치료에도 효과가 있을 가능성도 높다. 바람직한 구현예에서, 이러한 대상 항체는 필요로 하는 대상체에서 자가면역, 알레르기, 염증, 이식, GVHD, 골수 이식(BMT)을 치료하기 위해, 그리고 항원 특이적 내성 또는 장기적인 항원 특이적인 면역억제, 특히 T 세포 및/또는 B 세포 분화, 활성화 및/또는 증식의 억제를 유도하기 위해 사용된다. 바람직한 징후로는 다발 경화증, 루푸스 또는 SLE, ITP, IBD, 크론병, 염증성 장 질환, 크론병, 건선, 포도막염, 류마티스 관절염, 천식, GVHD, 골수 이식, 당뇨병, 류마티스 관절염, 건선성 관절염, 건선, 세포 이식, 조직 이식, 기관 이식, 골수 이식, 세포 및 유전자 치료, 난소염 및 갑상샘염을 포함한다.

[0058] 본 설명에 사용된 용어 "치료적으로 유효한 양"은 병태, 예컨대, 자가면역, 알레르기, 염증, GVHD 또는 이식을 치료하거나 항원, 예컨대, 자가항원, 알레르기 유발 항원, 염증 유도제, 이식된 세포, 조직, 또는 기관, 또는 약물, 예컨대, 생물체제, 예를 들어, 치료적 항체, Ig 융합 단백질, 호르몬, 성장 인자, 또는 기타 치료적 단백질 또는 폴리펩티드에 대한 면역 반응, 특히 T 세포 또는 B 세포 항체 반응을 감소시키거나 제거하는 데 필요한 치료 계획에 있어서 치료의 양을 정량하고자 한 것이다.

[0059] 본 설명에 사용된 용어 "예방적으로 유효한 양"은 병태, 또는 질병, 예컨대, 자가면역, 알레르기, 염증, GVHD 또는 항-이식, 약물 또는 거부 반응의 진행 및 증상을 예방하는 데 필요한 치료 계획에 있어서 치료의 양을 정량하고자 한 것이다.

[0060] 본 발명은 아이텍 파마슈티컬즈(현재 바이오젠 아이텍)가 개발한 인간화 항체 IDEC-131로부터 유래된, 인간 치료법에 사용하기 위한 개선된 항-CD154 항체를 제공한다. IDEC-131은 151 pm의 K_D 로 인간 CD154와 결합하는, 25 °C에서 비아코어로 검출된, 고친화도 항체이다.

[0061] IDEC131은 미국 특허 번호 5,747,037에 개시되어 있는, 마우스 항-인간 CD154 항체(24-31)로부터 유래된 인간 IgG1 이소형의 인간화 항-CD154 항체이다. 상업적으로 이용 가능한 24-31을 분비하는 하이브리도마 세포주가 ATCC(American Type Tissue Collection)에 기탁되었고, 기탁된 세포주는 ATCC 수탁번호 HB1712로 지정되었다.

[0062] IDEC-131의 서열 및 다양한 알레르기성, 자가면역성 및 염증성 징후 치료에의 이의 용도 및 T 및 B 세포 매개성 면역 반응의 억제에의 이의 용도는 미국 특허 번호 6,001,358; 6,440,418; 6,506,383; 7,074,406 및 7,122,187에 개시되어 있다. T 및 B 세포 면역성 및 고친화도에 미치는 강력한 면역억제적인 효과를 포함하는 성질을 기반으로, IDEC-131은 인간 임상 시험으로 진출하였다. 특히, IDEC-131은 두 가지 자가면역성 징후, 즉, 특발성 혈소판 감소성 자반증("ITP") 및 경감/재발형 다발경화증("RR-MS")을 치료하기 위해 아이텍이 후원한 인간 임상 시험에 사용되었다. IDEC-131을 이용한 이러한 임상 시험은 (비록 매우 초기에 상대적으로 소수의 환자들에 대한 것이기는 하나) 일부 임상적인 효능 시험을 보여주었으나, 그것들은, 뮤린 항-인간 CD154 항체(컬럼비아 대학교의 세스 레더만(Seth Lederman)이 분리한 뮤린 5c8 항체)로부터 유래된, 바이오젠이 개발한 또 다른 IgG1 항-인간 CD154 항체가 인간 환자에서 부정적인 영향을 초래하였음이 보고된 후에 중단되었다. 특히, 바이오젠이 키메라화한 5c8 항체가 임상 시험에 사용되었을 때, 그것은 부정적인 혈전 형성 사건("TE's")을 초래하였고, 이는 임상 시험의 몇몇 환자에서 뇌졸중 및 사망을 유발했다. 본 발명은 IDEC-131에 대한 기타 약물동력학적 장점을 획득하는 것으로 이러한 문제점을 다룬다.

[0063] 이와 대조적으로, 본 발명은 IDEC-131처럼 인간 IgG1 이소형이지만 Fc 영역은 FcR 결합 및 보체 활성화 둘 다를 제거하도록 유전자 조작된, IDEC-131로부터 유래된 인간화 변이체인 항-인간 CD154 항체를 제공한다. 특히, 그것의 불변 영역은 E269R 및 K322A 돌연변이(이때, 이들 돌연변이된 잔기들은 카바트(Kabat) 항체 넘버링 체계에

따라 넘버링된다)를 함유하도록 유전자 조작된다. 이들 돌연변이들은 각각 감소된 Fc γ RIIa 및 C1q 결합을 초래한다. 특히, 이렇게 하여 변형된 항체는 제한된 FcR/C1q 결합을 갖는다, 즉 이렇게 변형된 항체는 혈소판 상에서 FcR γ 2 또는 FcR γ 3과 결합하지 않고, 보체와 결합하거나 보체를 활성화하지 않는다. 이와 대조적으로, FcRn과의 결합은 영향을 받지 않는다. 아래에 개시된 바와 같이, 그리고 본 설명에 개시된 실험 데이터에 의해 뒷받침되는 바와 같이, 이들 돌연변이를 함유하는 항-CD154 IgG1 항체들은, 상이한 실험 모델에서 분석될 때, 무린 또는 인간 혈소판 상에서 시험관 내에서 또는 생체 내에서 어떠한 검출 가능한 혈전 형성 전 활성을 나타내지 않는다.

[0064] 또한, IDEC-131의 가변적인 무거운 및 가벼운 서열들은 친화도 성숙에 의해 더 유전자 조작되었다. 친화도 성숙은 원하는 면역억제적인 성질은 여전히 유지하면서 IDEC-131과 비교하여 이러한 결과적인 항-인간 CD154 항체의 결합 친화도를 증진시키고자 하는 희망으로 수행되었다. 그러나, 이 결과는 언급된 바와 같이 IDEC-131이 이미 인간 CD154에 대해 강한 결합 친화도(161 pm)를 가지고 있고, 상이한 모델(EAE, 체액성 면역억제 및 동종특이적 내성 모델)에서 강력하게 면역억제적이므로 전혀 확신할 수 없었다.

[0065] 많은 실험과 계속적인 스크리닝 방법 후에, IDEC-131과 비교하여 개선된 친화도를 갖는 (INX021을 포함하는) 인간화 항체를 생산한, IDEC-131의 가변 중쇄 및 경쇄의 돌연변이된 버전이 수득되었다. 구체적으로, 12개의 다른 변이체뿐만 아니라 INX021이 수득되었다. 이러한 인간화 변이체들을 평가하였고, (IDEC-131에 비해 인간 CD154에 대해 대략 5배 더 큰 친화도의) 유익한 결합을 기초로 하여 INX021을 인간 치료법을 위한 주요 후보로 선택하였는데, INX021은 IDEC-131과 비교하여, 그리고 다른 변이체들과 비교해서도, 더 우수한 기능적 (면역억제적인) 성질도 보유한다.

[0066] (본 발명의 인간화 IgG1 항-인간 CD154 항체인 INX021의 서열들을 포함하는) 도 1a 내지 도 1c에 도시된 바와 같이, 이 항체는 (IDEC-131과 비교하여) 중쇄 CDR3에 두 개의 돌연변이를, 경쇄 CDR1에 세 개의 돌연변이를, 그리고 경쇄 CDR3에 두 개의 돌연변이를 함유한다. 따라서, 전체 7개의 CDR 잔기들이 변경되었다. 아래에 나타낸 바와 같이 뜻하지 않게도, 결과적인 인간화 항-인간 CD154 항체는, 이전에 주목된 바와 같이 그 자체가 인간 CD154와 매우 높은 친화도로 결합하는 모항체보다 약 5배 더 큰 친화도로 인간 CD154와 결합한다. 단일 CDR 변경조차 항체 결합 친화도에 극적인 효과를 나타낼 수 있기 때문에 이 점은 놀랍다. 또한, 이미 상대적으로 높은 친화도의 항체들의 친화도가 개선될 수 있음은 예상할 수 없다.

[0067] 이 변경된 인간화 항체는 상이한 시험관 내 및 생체 내 모델에서 분석 시 매우 강력한 면역억제적 성질을 보인다. 특히, INX021은 체액성 면역, EAE를 강력하게 억제하고, 동종 특이적 내성 또는 장기간의 항원 특이적인 T 세포 비 반응성을 유도한다. 아래에 나타난 바와 같이, INX021은 IDEC-131에 비해 T 세포 CD154에 의해 촉진된 B 세포 활성화의 더욱 강력한 억제를 초래한다.

[0068] 따라서, 본 발명의 항체는 (IDEC-131과 비교하여)

[0069] (i) IDEC-131보다 인간 CD154에 대해 5배 더 큰 결합 친화도를 보유하고,

[0070] (ii) IDEC-131과 비교하여 더욱 강력하게 면역억제적인 활성을 초래하며,

[0071] (iii) IDEC-131처럼 T 및 B (체액성) 면역을 억제하여, 예를 들어, EAE를 억제하고, 동종 특이적인 내성을 유도하며,

[0072] (iv) FcR 및 C1q 결합을 실질적으로 감소시키는 Fc 영역의 돌연변이 때문에 IDEC-131과 비교하여 개선된 안전성 프로파일을 나타내고, 그 결과, 무린 또는 인간 혈소판 상에서 시험관 내에서 또는 생체 내에서 어떠한 검출 가능한 혈전 형성 전 활성을 나타내지 않는다.

[0073] 이렇게 조합된 성질들을 기반으로, 이러한 대상 항-인간 CD154 항체는 환자에서 증진된 안전성 프로파일을 나타낼 것이고 IDEC-131 보다 더욱 강력할 것이며 따라서 더욱 효과가 있을 것이기 때문에 인간 치료법에 사용하기에 매우 적합하다. 이 항체의 증진된 결합 친화도는 피하 주입을 통한 투여를 촉진하리라 기대된다. 이는 만성 인간 징후의 치료에 있어서 잠재적인 사용을 위해 유익하다.

[0074] 또한, 이러한 대상 항체는 온전한 것이므로, 즉, 전체 길이의 IgG1을 포함하므로, 바이오젠/UCB가 개발 중인 폐길화 Fab와 브리스톨 마이어스 스쿼이 개발 중인 CD154 특이적인 디아바디에 비해 약물동력학적 및 안전성 이점을 제공할 수 있다.

[0075] 추가적으로, 이러한 대상 항체는 더 높은 효능을 보유하므로, 잠재적으로 이러한 항체는 덜 자주 투여될 수 있어서 투여를 더 증진시킬 수 있다. 이는 중요한데, 이러한 대상 항체의 대부분의 적용은, 임의의 효과적인 치료

계획을 위해 반복적인 투여가 필요할, 만성 인간 자가면역, 알레르기 또는 염증성 질환의 치료를 위한 것이기 때문이다. 특히, 본 발명의 항체는 B 또는 T 세포 면역억제가 치료적으로 바람직한 치료에 매우 적합할 것이다.

[0076] 따라서, 본 출원에서, 본 출원인은 개선된 친화도 및 인간 환자에서 독성을 초래하지 않을 기타 약물동력학적 성질을 갖는, 인간 면역치료법에 사용하기 위한, 신규하고도 개선된 인간화 항-인간 CD154 항체를 제공하며, 특히 이들 항체는 인간 대상체에서 혈소판 응집 또는 혈전 색전성 사건을 초래하지 않을 것이고, 나아가, 그것들은 보체와 결합하여 활성화할 수 있는 능력이 없다는 점을 근거로 하면, 이들 항체들은 추가적으로 ADCC 또는 CDC 매개성 세포독성을 매개하지 않을 것이다. 실시예에 나타난 바와 같이, 본 발명의 항체는 IDEC131에 대하여, 그리고 이전에 인간 치료법에 사용된 또 다른 CD154 항체와 비교하여 실질적으로 개선된 기능적 및 약물동력학적 성질을 보유한다. 따라서, 이 항체는 인간 치료법에 사용될 때 임상적인 이득을 제공할 것이다.

[0077] 본 발명의 항체 INX021은 각각 Fc γ 2 및 3 결합, 및 C1q 결합을 감소시키는 두 개의 돌연변이를 함유하고 있지만, 다른 Fc 수용체들 또는 보체와의 결합을 추가적으로 감소시키거나 다른 이펙터 기능을 바꿀 수 있는 Fc 영역의 다른 돌연변이들이 도입될 수 있음이 추가적으로 구상된다. 다른 가능성 있는 돌연변이의 예는 당해 분야에 공지되어 있으며, 예컨대, Shields RL, Namenuk AK, Hong K, 등("High resolution mapping of the binding site on Human IgG1 for Fc for Fc γ RI, Fc for Fc γ RII, Fc for Fc γ RIII, and FcRn")은 Fc γ R에 대한 Fc와의 손상된 결합을 나타내는 IgG1 변이체들의 설계를 보고하였다(J Biol. Chem. 2001; 276: 6591~604). 또한, US20070237767 및 US20100104564는 FcR 결합을 제거하기 위하여 Fc 돌연변이 유발을 기술하고 있다. 또한, 특이적인 Fc 돌연변이 및 이의 영향을 아래 표 1 내지 표 3에 열거하였다. 이들 돌연변이는 Fc 이펙터 기능을 촉진하거나 손상시키는 것으로 알려져 있는 다른 돌연변이 및 이의 조합, 예컨대, 다른 것들 중에서도 FcR 결합, 보체 결합, 글리코실화, ADCC 활성, CDC 활성, FcRN 결합을 예시하고자 한 것이지 빠짐없이 제시하고자 한 것은 아니다.

표 1

[0078] (출처: Shields et al., "High resolution mapping of the binding site on Human IgG1 for Fc for Fc γ RI, Fc for Fc γ RII, Fc for Fc γ RIII, and FcRn", *J Biol Chem* 2001; 276: 6591~604)

Fc 돌연변이	Fc γ RI	Fc γ RIIa	Fc γ RIIb	Fc γ RIIIa	FcRn
E233P	0.12	0.08	0.12	0.04	0.54
D265A	0.16	0.07	0.13	0.09	1.23
D265N		0.02	0.03	0.02	
D270N		0.03	0.05	0.04	
N297A	0.15	0.05	0.1	0.03	0.8
S298N		0.05	0.08	0.06	
P329A	0.48	0.08	0.12	0.21	0.8
D270A	0.76	0.06	0.1	0.14	1.05

표 2

[0079] (출처: US20100104564)

Fc 돌연변이	Fc γ RI	Fc γ RIIa (H131)	Fc γ RIIa (R131)	Fc γ RIIb	Fc γ RIIIa (V158)	Fc γ RIIIa (F158)
K326V	0.52	0.01	0.01	0.02	0.87	2.34
V369R	0.79	0.01	0.02	0.03	0.93	1.64
F405K	1.52	0.02	0.02	0.02	1.08	2.55
L410P	1.27	0.01	0.01	0.01	0.99	1.75
V427R	1.69	0.03	0.05	0.03	1.27	0.59

표 3

[0080]

(출처: US20070237767)

변이체 #	Fc 돌연변이	Fc γ RI	Fc γ RIIa	Fc γ RIIb	Fc γ RIIc	Fc γ RIIIa	Clq	FcRn
113	L234N	0.1	0.19	2.05		0.49	1.18	1.06
744	G237M	0.07	0.14	0.57	0.66	0.1	1.8	1.74
88	S239F	0.28	0.02	0.33		0.1	0.95	0.85
826	V262E	1.03	0.16	0.92	36.47		2.85	9.27
76	V264F	0.43	0.05	0.22		0.06	1.87	1.07
143	V266T	0.28	0.1	0.16	0.18		1.21	0.53
228	S267N	0.72	0.08			0.27	3.18	0.85
148	E269R	0.07	0.07	0.13	0.06	0.05	1.15	0.72
779	N286E		0.07	0.38	0.37	0.01	0	2.12
858	N297R	0.01	0.01	0.01	0.06	0.01		0.45
80	T299A	0.01	0.1	0.56	72.84	0.06	2.31	0.82
870	R301D	0.87	0.11	0.06	0.04	0.03	1.58	0.5
84	N325L	0.42	0.04	1.46		0.03	2.18	0.91
161	N325E	1.34	0.09	0.05	0.03	<0.02	0.86	0.55
473	L328R	0.07	0.1	0.88	0.37	0.11	1.21	1.82

[0081]

안전성, 기능적 및 약물동력학적 성질의 이러한 조합을 기반으로 하여, 본 발명의 인간화 항-인간 CD154 IgG1 항체는 T 및/또는 B 세포 활성화, 분화 및 증식의 억제가 치료적으로 바람직한 병태, 예컨대, 알레르기, 자가면역, 이식(동종 또는 이종 기관, 세포, 조직 이식) 및 염증성 병태를 치료하거나 예방하는 데에 사용될 수 있다. 이의 특정한 비 제한적인 예로는 예로써, 다발경화증, 전신성 홍반성 루푸스 (SLE), 기타 형태의 루푸스, 자가면역성 혈소판 감소증(ITP), 신장 이식, 피부 및 척도 이식, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 건선성 관절염, 크론병, 염증성 장 질환, 크론병, COPD, 천식, 당뇨병, 갑상샘염, 이식편대숙주병, 골수(BM) 또는 조혈 줄기세포 이식, 및 죽상 동맥경화증을 포함한다. 또한, INX021을 포함한 이들 변이체들 중 일부는 생체 내에서 내성을 유도하는 능력을 포함한다, 증가된 효능 효험을 보유한다.

[0082]

실험적 데이터에 의해 증명된 바와 같이, INX021을 포함하는 본 발명의 항체들의 특별히 고려된 응용은 항-약물 반응, 특히 생물제제 및 기타 약물, 예컨대, 치료적 항체, 융합 단백질, 호르몬, 성장 인자, 효소, 펩티드, 항생제, 항바이러스제 등에 대해 유발되는 항-약물 반응을 완화하거나 예방하기 위한 것이다. 이것은 이들 약물을 더 오랜 지속기간 동안 투여될 수 있게 할 수 있고/있거나, 약물에 반응하는 환자의 수를 증가시킬 수 있고/있거나, 치료된 환자에서 약물의 효능을 촉진할 수 있다.

[0083]

본 설명에서 논의된 바와 같이, 인간 IgG1 및 기타 인간 불변 영역들 내의 Fc 영역의 다른 자리들은 보체 결합 및/또는 활성화뿐만 아니라 FcR 결합과도 관련이 있다고 알려져 있다. 따라서, 기술된 돌연변이들은 보체 결합 및 FcR 결합 중 하나 또는 둘 다의 손실을 초래하는 IgG1 또는 IgG3 또는 기타 항체들의 Fc 영역 내의 적절한 돌연변이의 예시이다.

[0084]

보체 결합 돌연변이체 αCD154 변이체들 또는 이의 변이체들의 내성 유도성 또는 장기간의 (T 또는 B) 면역억제적 효과는 잘 연구된 반수체-미스매치된(haplo-mismatched) 피부 동종이식편 생존 모델에서 평가될 수 있는데, 여기서 장기적인 내성은 αCD154 및 동종 항원의 투여에 의해 유도된다. 그러나 (돌연변이된 Fc 영역을 함유하는) αCD154 보체 결핍형 및/또는 FcR 결핍형 변이체의 내성을 유도하는 능력을 평가하기 위해 다른 내성 모델이 대안적으로 이용될 수 있다.

[0085]

FcR 돌연변이된 αCD154의 혈전 색전성 활성화는 NHP에서 관찰된 사건들을 재현하는 인간 Fc γRIIA 수용체를 발현하는 뮌헨 모델에서 시험할 수 있다(Ferrant, J. L., Benjamin, C. D., Cutler, A. H., Kalled, S. L., Hsu, Y. M., Garber, E. A., Hess, D. M., Shapiro, R. I., Kenyon, N. S., Harlan, D. M., Kirk, A. D., Burkly, L. C. and Taylor, F. R., "The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge". *Int Immunol* 2004. 16: 1583-1594). 그러한 마우스에서, αCD154(항-마우스 CD154)로의 처리는 폐 혈전을 유도하므로, 돌연변이된 인간 Fc 영역들(돌연변이된 IgG1 불변 영역들)을 함유하는 항-CD154 항체들에서의 FcR 결합의 손실은 혈전의 생성을 제거하거나 눈에 띄게 감소시킨다. 이 모델 또는 비슷한 모델을 이용하여, αCD154 요법과 관련된 독성에 미치는 특정 Fc 돌연변이의 영향을 결정할 수 있다.

[0086] 다시, IDEC-131로부터 유래되는 본 발명의 돌연변이된 CD154 특이적 항체들은 CD154/CD40 신호 전달을 포함한 CD154의 효과를 상쇄화하거나 CD40에 대한 CD154 결합을 차단하거나 억제하는 것이 치료적으로 유효할 수 있는 임의의 병태의 치료 및 예방을 위해 사용될 수 있고, 이러한 질병의 증상들을 감소시킬 수 있다. 이의 예로는 알레르기, 자가면역, 암, 이식, GVHD, 염증성 및 기타 병태, 특히, 내성의 유도 및/또는 체액성 면역 또는 T 세포 면역의 억제가 치료적으로 바람직한 병태의 치료를 포함한다. 구체적인 예로는 다발경화증, 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 크론병, 갑상샘염, 홍반성 루푸스, 자가면역성 혈소판 감소증, 당뇨병, 이식편대숙주병, 세포 요법, 기관 및 조직 이식, 예컨대, 피부, 신장, 췌장, 골수, 죽상 동맥경화증, 및 체액성 또는 T 세포 억제가 바람직한 기타 병태를 포함한다.

[0087] CD154를 표적으로 하는 대상 항체들은 개선된 안전성을 보유하고 있고, CD154가 광범위한 자가면역 질환 및 이식편 관련된 질병에서 면역 개입을 위한 지극히 매력적인 표적이므로 CD154를 표적으로 하는 대상 항체들은 대단한 치료적 잠재력을 가지고 있다. 실제로 현재까지 시험한 마우스의 모든 자가면역 질환 모델들은 αCD154 치료에 의해 치료적으로 개선된다. CD154-CD40 상호 작용을 단순히 차단하는 것을 넘어서서, αCD154 치료법은 면역학적 내성의 유도를 초래한다(CD40-CD154 상호 작용 차단에 의한 이식 거부 예방은 피부(Gordon, E. J., Markees, T. G., Phillips, N. E., Noelle, R. J., Shultz, L. D., Mordes, J. P., Rossini, A. A. and Greiner, D. L., "Prolonged survival of rat islet and skin xenografts in mice treated with donor splenocytes and anti-CD154 monoclonal antibody", *Diabetes* 1998. 47: 1199~1206; Markees, T. G., Phillips, N. E., Noelle, R. J., Shultz, L. D., Mordes, J. P., Greiner, D. L. and Rossini, A. A., "Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand", *Transplantation* 1997. 64: 329~335; Jarvinen, L. Z., Blazar, B. R., Adeyi, O. A., Strom, T. B. and Noelle, R. J., "CD154 on the surface of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells contributes to skin transplant tolerance", *Transplantation* 2003. 76: 1375~1379; Quezada, S. A., Fuller, B., Jarvinen, L. Z., Gonzalez, M., Blazar, B. R., Rudensky, A. Y., Strom, T. B. and Noelle, R. J., "Mechanisms of donor-specific transfusion tolerance: preemptive induction of clonal T-cell exhaustion via indirect presentation", *Blood* 2003. 102: 1920~1926; Frleta, D., Lin, J. T., Quezada, S. A., Wade, T. K., Barth, R. J., Noelle, R. J. and Wade, W. F., "Distinctive maturation of in vitro versus in vivo anti-CD40 mAb-matured dendritic cells in mice", *J Immunother* 2003. 26: 72~84; Quezada, S., Eckert, M., Schned, A., Noelle, R. J. and Burns, C., "Distinct mechanisms of action of anti-CD154 in early versus late treatment of murine lupus nephritis", *Arth Rheum.* 2003.; Elster, E. A., Xu, H., Tadaki, D. K., Montgomery, S., Burkly, L. C., Berning, J. D., Baumgartner, R. E., Cruzata, F., Marx, R., Harlan, D. M. and Kirk, A. D., "Treatment with the humanized CD154-specific monoclonal antibody, hu5C8, prevents acute rejection of primary skin allografts in nonhuman primates", *Transplantation*, 2001. 72: 1473~1478), 웨도(Benda, B., Ljunggren, H. G., Peach, R., Sandberg, J. O. and Korsgren, O., "Co-stimulatory molecules in islet xenotransplantation: CTLA4Ig treatment in CD40 ligand-deficient mice", *Cell Transplantation* 2002. 11: 715~720) 골수(Wekerle, T. and Sykes, M., "Mixed chimerism and transplantation tolerance", *Annual Review of Medicine* 2001, 52: 353~370, 및 무수한 기타 이식된 기관(Camirand, G., Caron, N. J., Turgeon, N. A., Rossini, A. A. and Tremblay, J. P., "Treatment with anti-CD154 antibody and donor-specific transfusion prevents acute rejection of myoblast transplantation", *Transplantation* 2002. 73: 453~461; Tung, T. H., Mackinnon, S. E. and Mohanakumar, T., "Long-term limb allograft survival using anti-CD154 antibody in a murine model", *Transplantation* 2003. 75: 644~650)에 장기적인 내성을 유도하는 것에 대해 반복적으로 기록된 바 있다). 나아가, NHP에서 α인간 CD154는 동종 이계 피부 이식에 장기적인 내성을 유도하는 것으로 나타났다.

[0088] 본 발명의 항체를 생성하는 본 발명의 방법에 대한 일반적인 설명

[0089] **본 발명의 항체의 예시적인 합성 방법**

[0090] 햄스터 α뮤린 CD154의 V_H 및 V_L을 암호화하는 DNA 또는 IDEC-131 또는 본 설명에 개시된 변이체를 클로닝하고, 인간 γ 1 CH1, CH2, CH3 영역을 암호화하는 DNA 또는 본 설명에 개시된 IgG1 변이체에 융합시켰다. 메가베이스(Megabase™) 서열 분석기를 이용하여 뉴클레오타이드 서열을 확인하였다. MR1 변이체를 각각의 중쇄 및 경쇄를 함유하는 플라스미드 발현 벡터 pEE12를 NS0 세포 내로 형질감염시키고, 생성물을 단백질 A 크로마토그래피로 정제하였다.

[0091] **본 발명의 항체의 CD154와의 결합**

[0092] CD154 항체 변이체들의 결합 활성 비교는 마우스 CD154로 형질감염시킨 CHO 세포들에 대한 그것들의 결합으로 확인하였다. CD154를 발현하는 CHO 세포는 4℃에서 1시간 동안 표지되지 않은 αCD154 중쇄 변이체들 또는 이소형 매치된 항체들의 존재 하에 비오틴 표지된 αCD154와 인큐베이션될 것이다. 비오틴이 부착된 MR1의 결합은 스트렙타비딘이 접합된 형광 색소를 이용하여 검출될 것이고, 유동 세포계수법이 수행될 것이다. 변이체에 의한 억제 퍼센트는 MR1 염색된 세포의 평균 형광 강도의 감소를 기록하여 결정할 수 있다.

[0093] **ELISA를 이용한 항체 반감기**

[0094] α 인간 IgG1 변이체들의 생체 내 반감기를 결정하는 데에 ELISA 또는 비아코어(Biacore)가 이용될 수 있다. hIgG1의 혈청 농도는 설정된 시간, 예컨대, 투여 후 1개월에 측정될 수 있다.

[0095] **변이체들의 FcR과의 결합**

[0096] 변이체 IgG1 mAb의 FcR과의 결합은 고체상 분석법으로 결정할 수 있다. 간략하게 설명하자면, 맥시소브(Maxisorb) ELISA 플레이트를 마우스 또는 인간 FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, 또는 FcγRIIIA(R & D 시스템즈(Systems))로 코팅할 수 있다. 비오틴 결합된 버전의 변이체를 생성할 수 있다. 효소와 짝지어진 아비딘을 이용하여 비색 검출로 결합을 측정할 수 있다. WT 분자와 비교하여 변이체에 대해 결합의 감소를 결정한다.

[0097] **αCD154 mAb의 인간 C1q와의 결합**

[0098] 이것은 공지된 방법을 이용하여 또는 본 설명에 기술된 바와 같이 이루어질 수 있다. MR1의 IgG1 변이체 또는 IDEC-131이 맥시소브 ELISA 플레이트 상에 흡수된 웰 내로 정제된 인간 C1q를 적정할 수 있다. 결합된 C1q를 HRP-담 항-C1q로 검출할 것이다. 기술된 바와 같이, 모든 변이체들을 WT IgG1 MR1에 대한 C1q의 결합과 비교할 것이다(Ferrant, J. L., Benjamin, C. D., Cutler, A. H., Kalled, S. L., Hsu, Y. M., Garber, E. A., Hess, D. M., Shapiro, R. I., Kenyon, N. S., Harlan, D. M., Kirk, A. D., Burkly, L. C. and Taylor, F. R., "The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge", *Int Immunol* 2004. 16: 1583~1594.; and Taylor, P. A., Lees, C. J., Wilson, J. M., Ehrhardt, M. J., Campbell, M. T., Noelle, R. J. and Blazar, B. R., "Combined effects of calcineurin inhibitors or sirolimus with anti-CD40L mAb on alloengraftment under nonmyeloablative conditions", *Blood* 2002. 100: 3400~3407).

[0099] **돌연변이체 αCD154 mAb를 이용한 내성 유도**

[0100] 항-CD154 항체의 내성 또는 장기적인 면역억제를 초래하는 능력은 공지된 방법에 의해, 그리고 특히 본 설명에 기술된 바와 같이 결정될 수 있다. 본 출원인의 실험실에서 생산된 햄스터 항-뮤린 CD154 MR1은 밝혀진 바와 같이(Quezada, S. A., Fuller, B., Jarvinen, L. Z., Gonzalez, M., Blazar, B. R., Rudensky, A. Y., Strom, T. B. and Noelle, R. J., "Mechanisms of donor-specific transfusion tolerance: preemptive induction of clonal T-cell exhaustion via indirect presentation", *Blood* 2003. 102: 1920~1926; Quezada, S. A., Bennett, K., Blazar, B. R., Rudensky, A. Y., Sakaguchi, S. and Noelle, R. J., "Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154-induced graft tolerance: the interplay of clonal anergy and immune regulation", *J Immunol* 2005. 175: 771~779; Rossini, A. A., Parker, D. C., Phillips, N. E., Durie, F. H., Noelle, R. J., Mordes, J. P. and Greiner, D. L., "Induction of immunological tolerance to islet allografts", *Cell Transplant* 1996. 5: 49~52) 일상적으로 오래 지속되는 이식편 내성을 유도한다.

[0101] 내성은 (공여자 비장 세포 형태의) 동종 항원과 αCD154의 공동 투여로 유도된다. MR1의 인간화 IgG1 형태 또한 이식편 내성 24를 유도함이 밝혀진 바 있으므로, WT γ1 변이체는 내성 유도에 대한 양성 대조군으로 작용할 것이다. 보체와 결합하는 능력을 상실한 돌연변이체 버전의 MR1은 이식편 내성을 유도하는 능력에 대해 시험 받게 될 것이다.

[0102] 피부 이식은 Markees et al.(12)이 사용한 기법의 변형으로 수행한다. 간략히 말하자면, 연령을 일치시킨 수컷 CB6F1 마우스를 비장 세포(DST)와 피부 이식편을 위한 공여자로서 이용할 것이다. 수여자 C57BL/6 마우스에 -3일, -5일 및 -7일에 복강 내로 인산염 완충 식염수(PBS) 중의 500 μg의 WT 또는 돌연변이체 αCD154 또는 대조군 면역 글로불린, 햄스터 또는 인간, (hIgG1)을, 꼬리 정맥 주사로 (정맥 내로) 500 μL 헵크스 평형염액 중의 5 x 10⁷ DST 세포를 함께, 또는 이것 없이, 주사할 것이다. 마우스는 그 후 실험 지속기간 동안 1주일에 3회 적절한 항체(250 μg/주사)로 처리될 것이다. 0일에 수여자 마우스를 체중 그램당 복강 내로 주사된 50 μg의 각

각의 케타민과 자일라진(PBS 중 15 mg/mL)으로 마취시킬 것이고, 확립된 방법을 이용하여 CB6F1 피부 이식편을 준비할 것이다. 거부는 피부 이식편의 20% 미만이 남아 있는 날로 정의될 것이다. 100일 동안 피부 이식 거부에 대해 동물을 평가할 것이다. 또한, 내성군 각각에 대해, 피부 이식편을 100일에 취하여 백혈구 침윤물에 대해 조직화학으로 평가하고 세포 수/측정된 면적을 기초로 점수를 매길 것이다. 최종적으로, 돌연변이체 α CD154 mAb를 이용한 체액성 면역의 이 시스템에서 이전에 공개된 바와 같이(Markees, T. G., Phillips, N. E., Noelle, R. J., Shultz, L. D., Mordes, J. P., Greiner, D. L. and Rossini, A. A., "Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand", *Transplantation* 1997. 64: 329-335, Markees, T., Phillips, N., Gordon, E., Noelle, R. J., Mordes, J. P., Greiner, D. L. and Rossini, A. A., "Improved skin allograft tolerance induced by treatment with donor splenocytes and an extended course of anti-CD154 monoclonal antibody", *Transplant Proc* 1998. 30: 2444-2446; Markees, T. G., Appel, M. C., Noelle, R. J., Mordes, J. P., Greiner, D. L. and Rossini, A. A., "Tolerance to islet xenografts induced by dual manipulation of antigen presentation and co-stimulation", *Transplantation Proceedings* 1996. 28: 814-815), 제3의 이식물(H-2K 피부)을 (선택된 군의) 내성화된 마우스에 이식하여, 유도된 내성이 항원 특이적임을 확인할 것이다.

[0103] 내성에 미치는 보체 및 FcR 돌연변이의 영향력을 측정하는 것 이외에도, 1차 및 2차 체액성 면역 반응의 발달에 미치는 항체 처리의 영향 또한 이전에 기술된 바와 같이 분석될 것이다. 간략히 말하자면, 마우스(4마리/군)를 CFA 중 닭 오브알부민(200 μ g/마우스)으로 면역화하고, MR1 변이체로 처리할 것이다(200 μ /마우스 x 3회/주). 7일, 14일, 21일에 IgM 및 IgG 항-OVA를 표준화된 항-OVA ELISA로 측정하고, 항-OVA의 혈청 농도를 정량할 것이다.

[0104] 본 발명의 α CD154 mAb를 이용한 독성 연구

[0105] 인간 Fc γ RIIA를 발현하는 마우스를 이용하는 뮤린 모델에서 α CD154의 혈전 형성 활성이 증명된 바 있다. 이 모델은 항-인간 CD154의 온전한 형태와 아글리코실화 형태를 이용한 NHP에서의 독성 연구 결과와 유사하다. 간단히 말하자면, 마우스에 sCD154(R & D 시스템즈) 및 α CD154의 각각의 변이체의 사전 형성된 면역 복합체(IC)(1:3(mAb/Ag) 화학량 비율에서 500 nM IC에 가까운, 138 μ g mAb 및 50 μ g Ag)를 주사할 것이다. 주사 후, 이러한 혼합물이 혈전 용해성인 경우, 마우스는 장기간의 방향 감각 상실, 얇은 호흡 및 손상된 이동성을 나타낼 것이다. 이 활성을 나타내는 마우스는 혈소판 수의 현저한 감소를 나타낼 것으로 예상된다. 60분 후, 폐를 채취하여, 포르말린에 고정시키고, 박편을 만들어 H&E 염색을 할 것이다. (혈관 내 혈전으로 측정된 바에 따라) 혈전증의 증거를 위해 마우스 폐 박편을 평가하고, 혈전 수/박편을 계수할 것이다. 각각의 마우스에 대해, 10개의 박편을 계수하고, IgG1 MR1의 다양한 변이체들로 처리한 모든 군에 걸쳐 혈전의 총 수를 비교할 것이다. 또한, (안락사 시점에서 심장 천자로 채취된) 총 혈소판 수를 유동 세포계수법으로 평가할 것이며, 혈전을 형성하는 항체들을 이용하여 80%까지 감소될 것으로 예상된다. 이러한 결과는 MR1 변이체들(FcR 결합성 (N325L, K326V, E269R)) 중 어느 것이 혈전을 형성하는지, 그리고 FcR 결합의 변경이 이 활성을 바꾸는지를 결정할 것이다.

[0106] T 세포 매개성 자가면역 질환인 실험적 자가면역성 뇌척수염(EAE)의 발달 차단

[0107] 5~8주령의 암컷 C57BL/6 마우스를 5 mg/ml의 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)을 보충한 CFA에 유화시킨 200 μ g의 MOG35-55 펩티드로 피하 면역시킬 것이다. 마우스는 면역 시점 및 48시간 후에 250 ng 백일해 독소의 복강 내 주사를 받을 것이다. 7일 후, 마우스는 백일해 독소가 없이 MOG/CFA로 동일한 추가 면역화를 받게 될 것이다. 보통 면역화 후 16일 내지 20일 사이에 임상적인 질병이 시작된다. 마우스는 MR1 변이체, 인간 IgG(변이체에 대한 대조군으로), 햄스터 Ig(MI1에 대한 대조군으로) 또는 햄스터 MR1 각각을 실험 지속기간(50일) 동안 (200 μ g/마우스 3x/주) 투여 받게 될 것이다.

[0108] 임상 평가. 다음과 같이 주당 4회 마우스를 점수화할 것이다: 0, 검출 가능한 EAE 징후 없음; 0.5, 축 늘어진 말단 꼬리; 1, 완전히 축 늘어진 꼬리; 1.5, 축 늘어진 꼬리 및 뒷다리 허약; 2, 한쪽의 부분적인 뒷다리 마비; 2.5, 양쪽의 부분적인 뒷다리 마비; 3, 완전한 양쪽 뒷다리 마비; 3.5, 완전한 뒷다리 마비 및 한쪽 앞다리 마비; 4, 앞다리 및 뒷다리 전체 마비; 5, 사망. 4 초과 5 미만 점수의 마우스는 안락사 시킬 것이다.

[0109] 독성 결정

[0110] 본 발명에 따른 원하는 항체는 개시된 혈전증 동물 모델에서 독성이 크게 감소되었거나 전혀 없을 것이다. 위에 기술된 모델을 이용하여, 불변 영역의 중쇄가 (카바트 넘버링 형식에 따른) E269R 돌연변이 및 K322A 돌연변이를

함유하는 IgG1 항-CD154 항체들은 혈소판 응집을 초래하지 않음이 밝혀질 것이다.

[0111] **효능 결정**

[0112] 위에 기술된 바와 같이 피부 이식편 내성 모델에서 효능(내성 유도)이 평가될 수 있다.

[0113] **본 발명의 항-hCD154 항체의 약학적 및 진단적 용도**

[0114] 본 발명의 일 구현예에서, 항-CD154 항체 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 대상체의 면역 반응을 억제할 수 있다. 본 발명의 항체 또는 본 발명의 약학적 조성물은 유효한 억제적 양으로 대상체에 투여된다.

[0115] 일부 구현예에서, 항-CD154 항체 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물의 "유효한 억제적 양"은 항-CD154 항체 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물이 투여되는 대상체에서 CD154-CD40 상호 작용을 억제하기에 효과적인 임의의 양이다. "억제적 양"을 결정하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 관련된 대상체의 유형, 대상체의 사이즈 및 연령, 및 전달되는 특정 치료제의 약물동력학적 성질을 포함하나 이에 한정되지 않는 인자들에 따른다.

[0116] 본 발명의 또 다른 특정 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 CD154-CD40 상호 작용을 억제함으로써 면역 반응을 억제할 수 있다.

[0117] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 염증을 억제할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 염증성 반응은 부종 및 식균성 백혈구의 이동에 의한 모세관 확장의 결과로, 발적, 부기, 열 및 통증을 특징으로 한다. 염증성 반응의 일부 예로는 관절염, 접촉피부염, 과다IgE 증후군, 염증성 장 질환, 알레르기 천식 및 특발성 염증성 질병을 포함한다. 특발성 염증성 질병은 예를 들어, 건선 및 루푸스(예컨대, 전신성 홍반성 루푸스(SLE), 약물 유발성 홍반성 루푸스 및 루푸스 신장염)를 포함한다. 예컨대, Gallin 1989, *Fundamental Immunology*, Chapter 26, Raven Press, 2d Ed., pp. 721-733, New York 참조. 본 발명은 본 발명의 항-CD154 항체를 전신성 홍반성 루푸스(SLE)의 증상을 치료하거나 예방하는 데에 효과적인 양으로 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체의 SLE의 증상을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다.

[0118] 관절염의 일부 예에는 류마티스 관절염, 비 류마티스 염증성 관절염, 라임병과 관련된 관절염 및 염증성 골관절염이 포함된다. 특발성 염증성 질병의 일부 예에는 건선 및 전신성 루푸스가 포함된다. 본 발명의 일 구현예에서, 항-CD154 항체, 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 이식된 기관의 대상체에 의한 거부를 억제할 수 있다.

[0119] 본 발명의 더욱 구체적인 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체, 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 이식된 심장, 신장, 간, 피부, 췌장 췌도세포 또는 골수의 대상체에 의한 거부를 억제할 수 있다.

[0120] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체, 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 대상체의 이식편대숙주병을 억제할 수 있다.

[0121] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체, 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 대상체의 알레르기 반응, 예를 들어, 건초열 또는 페니실린 또는 기타 약물에 대한 알레르기를 억제할 수 있다.

[0122] 일 양태에서, INX021을 포함하는 이러한 대상 항-CD154 항체는 항-약물 반응, 특히 생물체제 및 기타 약물, 예컨대, 치료적 항체, 융합 단백질, 호르몬, 성장 인자, 효소, 펩티드, 항생제, 항바이러스제 등에 대한 항-약물 반응을 경감시키거나 예방하는 데 유용하다. 이것은 이들 약물이 좀 더 오랜 지속기간 동안 투여될 수 있게 할 수 있고/있거나, 이러한 약물에 반응하는 환자의 수를 증가시킬 수 있고/있거나, 치료된 환자에서 이러한 약물의 효능을 촉진할 수 있다. 이의 예는 당해 분야에 공지되어 있으며, 휴미라, 엔브렐, 리툭산, 졸레어(Xolair), 헤르셉틴 및 아바스틴을 포함한다.

[0123] 이러한 대상 항-CD154 항체들이 항-약물 반응을 예방하거나 경감시키는 데에 사용될 수 있는 치료적 항체의 기타 예로 다음이 포함된다: 3F8, 8H9, 아바고보맙, 압식시맙, 아비투주맙, 아브틸루맙, 악토주맙, 아달리무맙, 아데카툼주맙, 아두카누맙, 아파세비쿠맙(Afasevikumab), 아펠리모맙, 아프투주맙, 알라시주맙 페고(Alacizumab pego), ALD518, 알렘투주맙, 알리로쿠맙, 알투모맙 펜테테이트, 아마톡시맙, 아나투모맙 마페나톡스, 아네투맙 라브탄신, 아니프롤루맙, 안루킨주맙, 아폴리주맙, 아르시투모맙, 아스크린바쿠맙, 아셀리주맙, 아테졸리주맙, 아티누맙, 아틀리주맙(=토실리주맙), 아토콜리무맙, 아벨루맙, 바피네우주맙, 바실릭시맙, 바비톡시맙, 벡투모맙, 베겔로맙, 벨리무맙, 벤탈리주맙, 베르틸리무맙, 베실레소맙, 베바시주맙, 베즐로톡수맙, 비시로맙, 비마그

루맵, 비메키주맵, 비바투주맵 메르탄신, 블레셀루맵(Bleselumab), 블리나투모맵, 블론투벳맵(Blontuvetmab), 블로소주맵, 보코시주맵, 브렌톡시맵 베도틴, 브리아키누맵, 브로달루맵, 브롤루시주맵, 브론티투주맵, 카비칼리주맵 카나키누맵, 칸투주맵 메르탄신, 칸투주맵 라브탄신, 카플라시주맵, 카프로맵 펜데티드 카를루맵 카로톡시맵, 카투막소맵, CBR96-독소루비신 면역접합체, 세딜리주맵, 세르구투주맵 아뮤날류킨, 세르톨리주맵 페골, 세톡시맵, Ch.14.18, 시타투주맵 보가톡스, 식수투무맵, 클라자키주맵, 클레놀릭시맵, 클리바투주맵 테트라세탄, 코드리투주맵, 콜톡시맵 라브탄신, 코나투무맵, 콘시주맵, 크레네주맵, 크로테두맵, CR6261, 다세투주맵, 다클리주맵, 달로투주맵, 다피롤리주맵 페골, 다라투무맵, 텍트레쿠맵, 템시주맵, 데닌투주맵 마포도틴, 데노수맵, 델로톡시맵 비오틴, 데투모맵, 디누톡시맵, 디리다부맵, 다피롤리주맵 페골, 다라투무맵, 텍트레쿠맵, 템시주맵, 데닌투주맵 마포도틴, 데노수맵, 델로톡시맵 비오틴, 데투모맵, 디누톡시맵, 디라다부맵, 도마그로주맵, 도를리모맵 아리톡스, 드로지투맵, 둘리고투맵, 두필루맵 두르빌루맵, 두시기투맵, 에크로맥시맵, 에쿨리주맵, 에도바코맵, 에드레콜로맵, 에팔리주맵, 에폰구맵, 엘텔루맵, 엘젠티맵, 엘로투주맵, 엘실리모맵, 에막투주맵, 에미베투주맵, 에미시주맵, 에나바투주맵, 엔포르투맵 베도틴, 엔리모맵 페골, 에노블리투주맵, 에노키주맵, 엔시톡시맵, 에피투모맵 시톡세탄, 에프라투주맵, 예를리주맵, 예르투막소맵, 에타라시주맵, 에트롤리주맵, 에비나쿠맵, 에볼로쿠맵, 엑스비비루맵, 파놀레소맵, 파랄리모맵, 파를레투주맵, FBTA05, 펠비주맵, 페자키누맵, 피바투주맵, 피클라투주맵, 피기투무맵, 피리부맵, 플란보투맵, 플레티쿠맵, 폰톨리주맵, 포랄루맵, 포라비루맵, 프레솔리루맵, 폴라누맵, 푸톡시맵, 갈카네주맵, 갈릭시맵, 가니투맵, 간테네루맵, 가빌리모맵, 겐투주맵, 오조가미신, 게보키주맵, 기렌톡시맵, 글렘바투무맵, 베도틴, 골리무, 고밀릭시맵, 구셀쿠맵, 이발리주맵, 이브리투모맵 티옥세탄, 이크루쿠맵, 이다루시주맵, 이고보맵, IMAB362, 이말루맵, 임시로맵, 임가투주맵, 인클라쿠맵, 인다톡시맵 라브탄신, 인두사투맵 베도틴, 이네빌리주맵, 인플릭시맵, 인테투무맵, 이놀리모맵, 이노투주맵 오조가미신, 이필리루맵, 이라투무맵, 이사톡시맵, 이톨리주맵, 익세키주맵, 켈릭시맵, 라베투주맵, 람브롤리주맵, 람팔리주맵, 라나텔루맵, 라프리톡시맵 엠탄신, 레브리키주맵, 렌달리주맵, 렌질루맵, 레르텔리루맵, 렉사투무맵, 리비비루맵, 리파스투주맵 베도틴, 리젤리주맵, 릴로토맵 사테트라세탄, 린투주맵, 리틸루맵, 로텔시주맵, 로키베트맵, 로르보투주맵 메르탄신, 루카투무맵, 롤리주맵 페골, 루밀릭시맵, 롬레투주맵, 마파투무맵, 마르게톡시맵, 마슬리모맵, 마브릴리루맵, 마투주맵, 메폴리주맵, 메텔리루맵, 밀라투주맵, 민레투모맵, 미르베크시맵, 소라브탄신, 미투모맵, 모가롤리주맵, 모날리주맵, 모롤리루맵, 모타비주맵, 목세투모맵 파수도톡스, 무로모납-CD3, 나콜로맵 타페나톡스 나밀루맵, 남투모맵 에스타페나톡스, 나라톡시맵 엠탄신, 나르나투맵, 나탈리주맵, 나비식시주맵, 나비부맵, 네바쿠맵, 네시투무맵, 네몰리주맵, 네텔리모맵, 네스바쿠맵, 니모투주맵, 니모투주맵, 니모투주맵, 니볼루맵, 노페투모맵 메르펜탄, 오빌톡삭시맵, 오비누투주맵, 오카라투주맵, 오크렐리주맵, 오둘리모맵, 오파투무맵, 올라라투맵, 올로키주맵, 온톡시주맵, 오피시누맵, 오포르투주맵 모나톡스, 오레고보맵, 오르티쿠맵, 오텔릭시주맵, 오프레르투주맵, 옥셀루맵, 오자네주맵, 오조랄리주맵, 파기박시맵, 팔리비주맵, 팜레브루맵, 파니투무맵, 판코맵, 파노바쿠맵, 파르사투주맵, 파스콜리주맵, 파소톡시주맵, 파테클리주맵, 파트리투맵, 펠브롤리주맵, 펠투모맵, 페라키주맵, 페라키주맵, 페르투주맵, 펙셀리주맵, 피나투주맵 베도틴, 핀투모맵, 플라쿨루맵, 플로잘리주맵, 포갈리주맵, 폴라투주맵 베도틴, 포네주맵, 프레잘리주맵, 프릴릭시맵, 프리톡삭시맵, 프리투무맵, PRO 140, 켈리주맵, 라코투모맵, 라드레투맵, 라피비루맵, 랄파시주맵, 라무시루맵, 라니비주맵, 락시바쿠맵, 레파네주맵, 레가비루맵, 레슬리주맵, 릴로투무맵, 리누쿠맵, 리톡시맵, 리바바주맵 페골, 로바투무맵, 롤레두맵, 로모소주맵, 론탈리주맵, 로발피투주맵 테시리네, 로벨리주맵, 루폴리주맵, 사시투주맵 고비데칸, 사말리주맵, 사펠리주맵, 사릴루맵, 사투모맵 펜데티드, 세쿠키누맵, 세리반투맵, 세톡삭시맵, 세비루맵, 시브로투주맵, SGN-CD19A, SGN-CD33A, 시팔리루맵, 실톡시맵, 심투주맵, 시폴리주맵, 시루쿠맵, 소피투주맵 베도틴, 솔라네주맵, 솔리토맵, 소네프시주맵, 손투주맵, 스타몰루맵, 슬레소맵, 수비주맵, 타발루맵, 타카투주맵 테트라세탄, 타도시주맵, 탈리주맵, 탐투벳맵, 타네주맵, 타폴리투모맵 팜톡스, 타렉스투맵, 테피바주맵, 텔리모맵 아리톡스, 테나투모맵, 테넬릭시맵, 테폴리주맵, 테프로투무맵, 테프로투무맵, 테시돌루맵, 테틀로맵, 테제펠루맵, TGN1412, 티실리루맵(트레멜리루맵), 티드라키주맵, 티가투주맵, 티몰루맵, 티소투맵 베도틴, TNX-650, 토실리주맵(아틀리주맵), 토랄리주맵, 토사톡수맵, 토시투모맵, 토베투맵, 트랄로키누맵, 트라스투주맵, 트라스투주맵 엠탄신, TRBS07, 트레갈리주맵, 트레멜리루맵, 트레보그루맵, 투코투주맵 셀모류킨, 투비루맵, 우블리톡시맵, 울로쿠플루맵, 우렐루맵, 우르톡사주맵, 우스테키누맵, 바다스톡시맵 탈리린, 반도르투주맵, 베도틴, 반딧투맵, 바누시주맵, 바팔릭시맵, 바를릴루맵, 바텔리주맵, 베팔리모맵, 베센쿠맵, 비실리주맵, 보바릴리주맵, 볼로식시맵, 보르세투주맵, 마포도틴, 보투무맵, 쟈투주맵, 잘루투무맵, 자놀리루맵, 자톡시맵, 지랄리루맵 및 졸리모맵 아리톡스.

[0124] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체, 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 자가면역성

질병을 앓는 대상체에서 자가면역 반응을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 자가면역 반응은 류마티스 관절염, 중증 근육無力증, 전신성 홍반성 루푸스, 그레이브스병, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 용혈성 빈혈, 진성 당뇨병, 염증성 장 질환, 크론병, 다발경화증, 건선, 약물 유발성 자가면역성 질환, 또는 약물 유발성 루푸스로 구성된 군으로부터 선택된 병태와 관련이 있거나, 이들로 구성된 군으로부터 선택된 병태로부터 유래한다. 특정 구현예에서, 이러한 자가면역 반응은 전신성 홍반성 루푸스와 관련이 있거나, 이로부터 유래된다.

- [0125] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체, 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 감염성 질병으로부터 유래되는 자가면역 반응을 앓는 대상체에서 자가면역 반응을 억제할 수 있다.
- [0126] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체, 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 라이터 증후군, 척추관절염, 라임병, HIV 감염, 매독, 또는 결핵으로부터 유래되는 자가면역 반응을 앓는 대상체에서 자가면역 반응을 억제할 수 있다.
- [0127] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체, 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 대상체의 섬유증을 억제할 수 있다.
- [0128] 섬유증의 일부 예로 폐 섬유증 또는 섬유증 질환이 있다. 폐 섬유증의 일부 예로 성인 호흡 곤란 증후군에 대한 2차적인 폐 섬유증, 약물 유발성 폐 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 또는 과민성 폐렴이 있다. 섬유증 질환의 일부 예로 C형 간염; B형 간염; 간경화; 독성 상해에 대한 2차적인 간경화; 약물에 대한 2차적인 간경화; 바이러스 감염에 대한 2차적인 간경화; 및 자가면역 질환에 대해 2차적인 간경화가 있다.
- [0129] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체, 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 위장관 질환을 억제할 수 있다. 위장관 질환의 일부 예로 식도 운동장애, (크론병 및 궤양성 대장염을 포함하는) 염증성 장 질환, 위염, (림프성 대장염 및 미세 장염을 포함하는) 콜라겐성 대장염, (글루텐 장병증, 복강 스프루, 또는 글루텐 내성이라고도 지칭되는) 복강 질병 및 피부 경화증이 있다.
- [0130] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체, 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 혈관 질환을 억제할 수 있다. 혈관 질환의 일부 예로 죽상 동맥경화증, 신장 동맥 질환, 림프 부종, 허혈성 장애, 및 체관류 손상이 있다. 또한, 전신성 홍반성 루푸스 또는 한랭글로불린혈증과 같은 콜라겐 혈관/면역 복합체 질병이 포함된다.
- [0131] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체, 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 T 세포 암, 예컨대, T 세포 백혈병 또는 림프종을 앓고 있는 대상체에서 T 세포 종양 세포의 증식을 억제할 수 있다. 이러한 항-CD154 항체, 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 그 대상체에서 T 세포 종양 세포의 증식을 억제하기에 유효한 양으로 대상체에 투여될 수 있다.
- [0132] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체, 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 인간 T 세포 림프친화 바이러스 1형(HTLV I)에 의한 대상체의 T 세포의 바이러스 감염을 억제할 수 있다. 이러한 항-CD154 항체, 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 바이러스 감염을 억제하기에 유효한 양으로 대상체에 투여될 수 있다.
- [0133] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체, 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 본 발명의 항체와 특이적으로 결합하는 CD154 단백질을 발현하는, 대상체 내의 종양 세포 또는 신생 세포를 영상화할 수 있다. 대상체의 종양 세포 또는 신생 세포를 영상화하는 방법은 유효한 양의 본 발명의 항-CD154 항체, 또는 그것을 포함하는 조성물을 이러한 항체와 종양 세포 또는 신생 세포의 표면 상의 단백질 사이에서 복합체를 형성할 수 있게 하는 조건 하에서 대상체에 투여하는 단계; 및 형성된 임의의 항체/단백질 복합체를 영상화하여 대상체의 임의의 종양 세포 또는 신생 세포를 영상화하는 단계를 포함한다.
- [0134] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체, 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 본 발명의 항체와 특이적으로 결합하는 CD154 단백질을 발현하는, 대상체 내의 종양 세포 또는 신생 세포의 존재를 검출할 수 있다. 대상체 내의 종양 세포 또는 신생 세포의 존재를 검출하는 한 가지 그러한 방법은 유효한 양의 본 발명의 항-CD154 항체, 또는 그것을 포함하는 약학적 조성물을 이러한 항체와 단백질 사이에서 복합체를 형성할 수 있게 하는 조건 하에서 대상체에 투여하는 단계; 및 형성된 임의의 항체/단백질 복합체의 존재를 검출하되, 그러한 복합체의 존재는 대상체 내에 종양 세포 또는 신생 세포가 존재함을 나타내는 것인 단계를 포함한다.
- [0135] **약학적 조성물**
- [0136] 본 발명은 본 설명에 기술된 바와 같은, CD154 결합 단백질, 예컨대, 항-CD154 항체를 포함하는 약학적 조성물

을 제공한다.

- [0137] 본 발명의 일 구현예에서, 이러한 약학적 조성물은 본 발명의 적어도 하나의 항-CD154 항체를 포함한다.
- [0138] 본 발명의 항-CD154 항체 또는 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물은 혈전 색전성 사건을 포함한 혈전증을 유발하지 않으므로, 인간 치료법에 매우 적합하다.
- [0139] 이러한 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 보조제, 전달 용제, 완충액 및/또는 안정제 중 임의의 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 본 발명의 항체의 제형화 및 투여를 위한 예시적인 기법은 예를 들어, "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., 최신 판에서 찾아볼 수 있다.
- [0140] 본 발명의 더욱 구체적인 구현예에서, 약학적으로 허용 가능한 담체는 인산염 완충 식염수, 생리적 식염수, 물, 시트르산/수크로스/트윈(Tween) 제형 및 에멀전, 예컨대, 오일/물 에멀전이다.
- [0141] 본 발명의 일 구현예에서, 이러한 약학적 조성물은 이러한 조성물에 대한 숙주 면역 반응을 감소시키거나 방지하기 위하여 미세캡슐화 장치로 전달될 수 있다. 결합제, 예컨대, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 예를 들어, 리포솜 또는 기타 캡슐화된 또는 면역보호된 전달 용제와 같이, 막 내에 미세캡슐화되어 전달될 수도 있다.
- [0142] 본 발명의 일 구현예에서, 이러한 약학적 조성물은 멸균 주사형 제제, 예를 들어, 멸균 주사형 수성 또는 유지성 현탁액의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적절한 분산제, 습윤제 및 현탁화제를 이용하여 당해 분야에 공지된 기법에 따라 제형화될 수 있다.
- [0143] 본 발명의 일 구현예에서, 이러한 약학적 조성물은 경구로, 국소적으로 또는 정맥 내로 전달될 수 있다. 전신으로 투여될 때에는, 이러한 치료적 조성물은 멸균성이며, 실질적으로 발열원을 함유하지 않으며, pH, 등장성 및 안정성을 충분히 고려한 비 경구적으로 허용 가능한 용액으로 존재해야 한다. 예를 들어, 약학적 제제는 인간 치료제로 투여하기에 적합하도록 실질적으로 발열성 물질을 함유하지 않는다. 이들 조건은 당업자에 공지되어 있다.
- [0144] 본 발명의 더욱 구체적인 구현예에서, 경구 투여를 위해, 이러한 약학적 조성물은 적절한 캡슐, 정제, 수성 현탁액 또는 용액으로 제형화된다. 경구 투여를 위한 조성물의 고체 제형은 적절한 담체 또는 부형제, 예컨대, 옥수수 전분, 젤라틴, 락토스, 아카시아, 수크로스, 미세결정 셀룰로스, 카올린, 만니톨, 인산이칼슘, 탄산칼슘, 염화나트륨 또는 알긴산을 함유할 수 있다. 사용될 수 있는 봉해제에는 제한 없이, 미세결정 셀룰로스, 옥수수 전분, 전분 글리콜산 나트륨 및 알긴산이 포함된다. 사용될 수 있는 정제 결합제에는 아카시아, 메틸셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스 나트륨, 폴리비닐피롤리돈(포비돈(PovidoneTM)), 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 수크로스, 전분 및 에틸셀룰로스가 포함된다. 사용될 수 있는 윤활제에는 스테아르산 마그네슘, 스테아르산, 실리코액, 탈크, 왁스, 오일 및 콜로이드 실리카가 포함된다.
- [0145] 본 발명의 더욱 구체적인 구현예에서, 국소적 적용을 위해, 이러한 약학적 조성물은 적절한 연고 내에 제형화될 수 있다. 국소적 사용을 위한 조성물의 제형의 일부 예로는 활성 성분 및 다양한 지지체 및 용제를 함유하는 드롭스, 팅크제, 로션, 크림, 용액 및 연고가 포함된다.
- [0146] 본 발명의 일 구현예에서, 국소적 반고형 연고 제형은 전형적으로 담체, 예컨대, 약학적 크림 베이스 내에, 약 1 내지 20%, 예컨대, 5 내지 10% 농도의 활성 성분을 포함한다.
- [0147] 본 발명의 일 구현예에서, 흡입을 위한 약학적 조성물 및 경피 조성물이 또한 용이하게 제조될 수 있다. 이러한 치료적 조성물은 코 또는 폐를 통해, 예를 들어, 액체 또는 (동결 건조된) 분말 에어로졸로 투여될 수 있다.
- [0148] 본 발명의 일 구현예에서, 물 또는 기타 수성 용제 내에 제조된 경구 투여를 위한 약학적 조성물의 액체 제형은 다양한 현탁화제, 예컨대, 메틸셀룰로스, 알긴산염, 트래거칸트, 펙틴, 켈긴, 카라기난, 아카시아, 폴리비닐피롤리돈 및 폴리비닐 알코올을 함유할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 액체 제형은 또한 활성 화합물(들)과 함께, 습윤제, 감미제, 그리고 착색제 및 향미제를 함유하는 용액, 에멀전, 시럽 및 엘릭시르를 포함할 수 있다. 치료되는 포유동물의 폐로 흡입되도록 이러한 약학적 조성물의 다양한 액체 및 분말 제형이 전통적인 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0149] 본 발명의 일 구현예에서, 주사를 위한 액체 제형의 약학적 조성물은 다양한 담체, 예컨대, 식물성 오일, 디메틸아세트아미드, 디메틸포름아미드, 에틸 락테이트, 에틸 카보네이트, 이소프로필 미리스테이트, 에탄올, 폴리올, 즉, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 조성물은 시트르산염/수크로스/트윈 담체를 포함한다. 정맥 내 주사를 위해, 이러한 조성물의 수용성 버전이 드

립법에 의해 투여될 수 있는데, 이에 의해, 항진균제 및 생리적으로 허용 가능한 부형제를 함유하는 약학적 제형이 주입된다. 생리적으로 허용 가능한 부형제로는, 예를 들어, 5% 텍스트로스, 0.9% 식염수, 링거액 또는 기타 적절한 부형제가 포함될 수 있다. 이러한 조성물의 적절한 불용성 형태가 수성 베이스 또는 약학적으로 허용 가능한 오일 베이스, 예컨대, 장쇄 지방산, 예컨대, 에틸 올레산염의 에스테르 내의 현탁액으로 제조되고 투여될 수 있다.

[0150] 본 발명의 일 구현예에서, 이러한 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체 내에 본 발명의 항-CD154 항체를 중량 기준 약 0.1 내지 90%(예컨대, 1 내지 20% 또는 1 내지 10%) 포함한다.

[0151] 본 발명의 일 구현예에서, 각각의 약학적 조성물 내의 본 발명의 항-CD154 항체의 최적의 백분율은 제형 그 자체, 그리고 특정 병리학 및 관련된 치료 계획에서 원해지는 치료적 효과에 따라 달라진다. 약학적 제형은 당해 분야에 잘 확립되어 있다. 의학 분야의 당업자에게 공지된 종래의 방법은 이러한 약학적 조성물을 대상체에 투여하는 데에 사용될 수 있다.

[0152] 따라서, 본 발명의 약학적 조성물은 연장 방출성 제형에 관한 것이다. 연장 방출, 또는 제어 방출 또는 지속 방출은 대상체에 투여 후 일정 시간에 걸쳐 활성 약물, 예컨대, 폴리펩티드 또는 항체 약물을 방출하는 약물 제형을 지칭한다. 원하는 시간 범위(예컨대, 약물 제형에 따라 다른, 분, 시간, 일, 주 또는 그 이상)에 걸쳐 일어날 수 있는 폴리펩티드 약물의 연장 방출은 실질적으로 전체 투여 단위가 혈류를 통해 즉각적인 흡수 또는 즉각적인 분배에 이용 가능한 일반적인 제형과는 상이하다. 연장 방출성 제형은, 일부 구현예에서, 예를 들어, 8시간 이상, 12시간 이상, 24시간 이상, 36시간 이상, 48시간 이상, 60시간 이상, 72시간 이상, 84시간 이상, 96시간 이상, 또는 심지어, 예를 들어, 1주일 또는 2주일 이상, 예를 들어, 1개월 이상, 지속되는 단일 투여로부터 순환하는 약물 수준을 초래할 수 있다. 연장 방출성 조성물은 본 발명의 항-CD154 항체를 포함할 수 있다.

[0153] 본 발명의 일부 구현예에서, 이러한 약학적 조성물은 또 다른 면역억제 또는 면역조절 화합물을 더 포함한다. 예를 들어, 이러한 면역억제 또는 면역조절 화합물은 다음 중 하나일 수 있다: CD28을 통한 T 세포 동시자극 신호전달을 방해하는 작용제; 칼시뉴린 신호전달을 방해하는 작용제, 코르티코스테로이드, 항증식성 작용제 및 CD45, CD2, IL2R, CD4, CD8 및 RANK FcR, B7, CTLA4, TNF, LTβ 및 VLA-4를 포함하나 이에 한정되지 않는 면역세포의 표면 상에 발현된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체.

[0154] 본 발명의 일부 구현예에서, 면역억제 또는 면역조절 화합물은 타크로리무스, 시로리무스, 마이코페놀레이트 모페틸 또는 그것의 활성형인 마이코페놀산, 미조리빈, 데옥시시페루구알린, 브레퀴나르 나트륨, 레플루노미드, 라파마이신 또는 아자스피란이다.

[0155] 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명의 항체들 또는 그것들을 포함하는 약학적 조성물은 용기, 패키지 또는 디스펜서 내에 단독으로, 또는 라벨 및 투여 설명서가 있는 키트의 일부분으로, 포함될 수 있다.

[0156] 투여 및 전달 경로

[0157] 본 발명의 항-CD154 항체 및 본 발명의 약학적 조성물은 의학적으로 허용 가능한 임의의 방식으로 대상체에 투여될 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, "투여"는 당업자에게 공지된 항체, 항체 단편 또는 약학적 조성물을 투여하는 일반적인 방법들 중 임의의 것을 의미하며, 본 설명에 제공된 예에 제한되어서는 안 된다.

[0158] 본 발명의 일부 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체들 및 본 발명의 약학적 조성물들은 정맥 내, 피하, 복강 내, 근육 내, 골수 내, 심실 내, 경막외강 내, 동맥 내, 혈관 내, 관절 내, 활액낭 내, 흉골 내, 척추강 내, 간 내, 척수 내, 종양 내, 두개 내 주사에 의해; 장관 내(enteral), 폐 내, 점막 경유, 자궁 내, 또는 설하 투여 경로에 의해, 또는 국소적으로, 예컨대, 염증 또는 종양 성장 자리에서, 대상체에 투여될 수 있다.

[0159] 본 발명의 일부 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체들 및 본 발명의 약학적 조성물들은 경구로 또는 코로, 또는 흡입에 의해, 눈, 직장 또는 국소적 경로에 의해, 대상체에 투여될 수 있다.

[0160] 더욱 구체적인 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체들 및 본 발명의 약학적 조성물들은 캡슐, 정제, 수성 현탁액 또는 용액의 형태로 경구로 대상체에 투여될 수 있다.

[0161] 더욱 구체적인 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체들 및 본 발명의 약학적 조성물들은 크림, 연고 등의 도포에 의해 국소적으로 대상체에 투여될 수 있다.

[0162] 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체들 및 본 발명의 약학적 조성물들은 네블라이저, 건조 분말 흡입기 또는 정량 흡입기의 사용을 통해 흡입에 의해 투여될 수도 있다.

- [0163] 본 발명의 추가적인 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체들 및 본 발명의 약학적 조성물들은 지속 방출 투여에 의해, 수술 중에 직접적으로 적용된 침식 가능한 임플란트의 데포 주사와 같은 수단에 의해, 또는 주입 펌프 또는 생체적합성 지속 방출 임플란트의 대상체로의 이식에 의해 대상체에 투여될 수 있다.
- [0164] 더욱 구체적인 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체들 및 본 발명의 약학적 조성물들은 주사 가능한 데포 투여 경로에 의해, 예컨대, 1개월, 3개월 또는 6개월의 데포 주사형 또는 생분해성 물질 및 방법을 이용하여, 대상체에 투여될 수 있다.
- [0165] 더욱 구체적인 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체들 및 본 발명의 약학적 조성물들은 이러한 항체, 항체 유도체 또는 약학적 조성물을 함유하는 경피 패치를 대상체의 피부에 적용하여, 이러한 패치가 대상체의 피부와 일반적으로 패치당 1 내지 5시간 동안 접촉할 수 있게 됨으로써, 대상체에 투여될 수 있다.
- [0166] 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체들 및 본 발명의 약학적 조성물들은 의학적으로 허용 가능한, 체중당 임의의 용량 및 임의의 투여 빈도로 대상체에 투여될 수 있다. 허용 가능한 투여량은 약 0.01 내지 200 mg/kg 대상체 체중의 범위를 포함한다.
- [0167] 대상 항-CD154 항체는 면역에 미치는 원하는 효과, 즉, T 또는 B 세포 면역의 억제를 초래하기에 효과적인 양, 또는 B 또는 T 세포 면역의 억제가 치료적으로 바람직한 질병의 증상들을 예방하거나 치료하거나 경감시키기에 효과적인 양으로 대상체에 투여된다. 언급된 바와 같이, 이들 병태는 특정 자가면역, 염증 및 알레르기 징후를 포함한다.
- [0168] 이러한 항체의 총 투여된 투여량은 대안적으로 0.01로부터, 0.1, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100 이상 mg을 포함할 수 있거나, 전술한 mg 값들 사이에 있는 임의의 양을 포함할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 본 설명에 기술된 항-CD154 항체들, 또는 이의 결합 단편들뿐만 아니라, 상기 항체 단편들의 조합은 26주 이하에 1회, 예컨대, 16주 이하에 1회, 8주 이하에 1회, 또는 4주에 1회, 1개월에 1회, 2주에 1회 이하의 빈도로 수여 대상체에 투여될 수 있다.
- [0169] 본 발명의 항체들 또는 약학적 조성물들을 이용하는 이러한 방법들 중 임의의 것에서, 이러한 항체들 또는 약학적 조성물들은 매일, 2일, 3일, 4일, 5일 또는 6일마다, 매주, 매달 또는 이의 임의의 일부분 또는 배수마다, 단일 용량 또는 복수 용량으로 대상체에 투여될 수 있고, 나아가, 당업자가 결정한 바에 따라, 날마다 내지 두 달에 한 번 범위의 간격으로 반복하여 대상체에 투여될 수 있다.
- [0170] 본 발명의 항체들 또는 약학적 조성물들을 이용하는 이러한 방법들 중 임의의 것에서, 이러한 항체들 또는 그것들을 포함하는 약학적 조성물들은 수일 또는 수주 내지 대상체의 수명까지 범위에 이르는 의학적으로 지시된 시간만큼의 오랜 기간 동안 간격을 두고 필요로 하는 대상체에 투여될 수 있다. 추가적인 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체들 및 본 발명의 약학적 조성물들은 날마다 내지 두 달에 한 번 범위의 간격으로 반복하여 대상체에 투여될 수 있다.
- [0171] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 항-CD154 항체들 및 본 발명의 약학적 조성물들은 총 원하는 1일 용량을 달성하기 위해, 원하는 경우, 1일당 복수 회 용량으로 투여될 수 있다. 이러한 치료방법의 효과는 장애의 알려진 징후 또는 증상에 대해 대상체를 모니터링함으로써 평가할 수 있다.
- [0172] 본 발명의 모든 구현예의 경우, 원하는 효과를 생성하기에 효과적인 본 발명의 항-CD154 항체들 및 본 발명의 약학적 조성물들의 투여량 및 투여 비율은 다양한 인자들, 예컨대, 치료될 질병의 성질, 대상체의 사이즈 및 연령, 치료의 목표, 사용된 특정 약학적 조성물, 활성제의 약물동력학 및 치료하는 의사의 판단에 따라 달라질 것이다.
- [0173] 효과적인 투여량은 예를 들어, 연령, 성별, 임신 상태, 체질량 지수, 제지방 체중, 조성물이 제공되는 병태, 조성물의 대사 또는 내성에 영향을 미칠 수 있는 수여 대상체의 기타 건강 상태, 수여 대상체의 IL-6 수준 및 (예를 들어, 이러한 조성물에 대한 항체를 발달시키는 환자로부터 발생하는) 이러한 조성물에 대한 저항성과 같은 수여 대상체 속성에 따라 달라질 수 있음은 이해된다. 당업자라면 예를 들어, 본 설명의 개시 내용 및 Goodman, L. S., Gilman, A., Brunton, L. L., Lazo, J. S., & Parker, K. L. (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill; Howland, R. D., Mycek, M. J., Harvey, R. A., Champe, P. C., & Mycek, M. J. (2006). Pharmacology. Lippincott's illustrated reviews. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 및 Golan, D. E. (2008). Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy. Philadelphia, Pa., [etc.]: Lippincott Williams & Wilkins의 교

시가 안내한 통상적인 실험을 통해 효과적인 투여량 및 투여 빈도를 결정할 수 있다.

- [0174] 따라서, 본 발명의 항-CD154 항체들 및 본 발명의 약학적 조성물들은 그것들의 의도된 목적을 달성하기에 효과적인 양으로 투여될 것이다. 치료적으로 유효한 양은 질병의 증상들을 예방, 경감, 또는 개선하거나, 치료되는 대상체의 생존을 연장하기에 효과적인 항체의 양을 지칭할 수 있다. 치료적으로 유효한 양은 대상 항체 투여의 용량 및 투약 스케줄을 변경함으로써 달성될 수 있다.
- [0175] 본 발명의 항-CD154 항체들 및 본 발명의 약학적 조성물들은 예컨대, 어느 하루 치료일에 투여된 외인성 항원과 같은, 짧은 시간 동안 대상체가 노출되는 항원에 대한 면역 반응을 예방하는 특정 징후에 대한 단일 투여량으로 투여될 수 있다. 이러한 치료법의 예로 치료적 작용제, 예를 들어, 항원성 약제, 알레르기 유발 항원 또는 혈액 제품, 또는 유전자요법 벡터와 함께, 본 발명의 항체 단편을 공동 투여하는 것을 포함할 것이다. 항원이 만성적으로 존재하는 조직에서는, 예컨대, 이식된 조직 또는 만성적으로 투여된 항원성 약제에 대한 면역 반응을 조절하는 데 있어서, 본 발명의 항체 단편 또는 약학적 조성물은 수일 또는 수주 내지 대상체의 수명까지 범위에 이르는 의학적으로 지시된 시간만큼의 오랜 기간 동안 간격을 두고 투여된다.
- [0176] 본 설명에 기술된 방법들 중 임의의 것에서, 이러한 항체들 또는 약학적 조성물들은 제2의 작용제와 함께 대상체에 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 이러한 작용제는 예를 들어, 면역조절 또는 면역억제 작용제와 같은 치료적 작용제이다. 이러한 면역조절제 또는 면역억제제는 다음 중 임의의 것일 수 있다:
- [0177] (a) CD28을 통한 T 세포 동시자극 신호전달을 방해하는 작용제;
- [0178] (b) 칼시뉴린 신호전달을 방해하는 작용제,
- [0179] (c) 코르티코스테로이드,
- [0180] (d) 항증식성 작용제; 및
- [0181] (e) CD45, CD2, IL2R, CD4, CD8 및 RANK FcR, B7, CTLA4, TNF, LT β 및 VLA-4를 포함하나 이에 한정되지 않는 면역 세포의 표면 상에 발현된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체.
- [0182] 이러한 면역억제 또는 면역조절 화합물은 예를 들어, 타크로리무스, 시로리무스, 마이코페놀레이트 모페틸, 미조리빈, 테옥시스페르구알린, 브레퀴나르 나트륨, 레플루노미드, 라파마이신 또는 아자스피란일 수 있다. 이러한 항체와 제2의 작용제는 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 경우에 따라, 본 발명의 하나 이상의 핵산을 필요로 하는 대상체에 투여하는 것이 유리할 수 있다. 잘 알려져 있는 방법에 따라 본 발명의 적어도 하나의 핵산을 투여하는 단계를 포함하는 본 발명의 치료 및 진단방법은 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0183] 본 발명의 일 구현예에서, 위에 기술된 방법들에 의해 치료될 수 있는 대상체(들)은 동물이다. 바람직하게는 이러한 동물은 포유동물이다. 치료될 수 있는 포유동물의 예는 인간, 비 인간 영장류, (랫트, 마우스, 햄스터 및 기니 피그를 포함하는) 설치류, 소, 말, 양, 염소, 돼지, 개 및 고양이를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는, 이러한 포유동물은 인간이다.
- [0184] 본 발명은 이어지는 실시예를 기초로 하여 더 잘 이해될 수 있다. 그러나 당업자라면 논의된 특정 방법 및 결과가 본 설명에 기술된 발명을 단순히 예시하는 것임을 용이하게 인정할 것이다.
- [0185] 다음의 실시예들은 당업자에게 대상 발명을 제조하고 이용하는 방법에 대한 완전한 개시 및 설명을 제공하기 위하여 작성된 것으로, 이러한 발명으로 간주되는 것의 범위를 제한하고자 한 것이 아니다. 사용된 숫자(예컨대, 양, 온도, 농도 등)와 관련하여 정확성을 기하기 위해 노력했지만, 일부 실험 오류 및 편차는 허용될 것이다. 달리 언급되지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 평균 분자량이며, 온도는 섭씨 온도이고, 압력은 대기압이거나 대기압에 가깝다.
- [0186] **실시예:**
- [0187] **실시예 1: 인간 CD154에 대해 더 높은 친화도(더 낮은 K_D 값)를 갖는 항체 변이체의 설계**
- [0188] 본 출원에서 본 발명자들은 인간 치료법, 특히 T 및 B 세포 면역의 억제에 치료적으로 바람직한 치료적 징후들에 사용하기 위한 도 1a 내지 도 1c에 포함된 서열들을 갖는 신규한 인간화 항-인간 CD154 IgG1 항체를 기술한다. 위에 언급된 바와 같이, 이 항체는 친화도 성숙 및 돌연변이 유발 방법들을 조합한 사용 및 Fc γ RII 및 Fc γ RIII 및 C1q (보체 결합)을 제거하기 위해 IDEC-131의 IgG1 Fc 영역의 변경에 의해 IDEC131로부터 유래된 것이다.

- [0189] 특히, IDEC131의 무거운 가변 영역과 가벼운 가변 영역 내의 CDR 잔기들의 다양한 조합들이 인간 CD154에 대한 개선된 결합 친화도를 갖는 IDEC-131의 변이체 획득이라는 목적으로 돌연변이되었다. 이러한 실험들은 다수의 변이체들을 생성했다. 압도적인 수의 이러한 변이체들은 IDEC-131 보다 낮게 인간 CD154와 결합하지 않았고, 오히려 그것들은 인간 CD154에 대해 동일하거나 더 못한 결합 친화도를 나타냈다(결과 미도시).
- [0190] 이러한 실험은 도 2a 내지 도 2c 및 도 3에서 확인되고 도시된 가변 경쇄 및 중쇄 서열들을 함유하는 11개의 인간화 변이체들을 생성하였다. 그런 다음, 이들 변이체들 각각의 인간 CD154에 대한 결합 친화도를 비아코어(Biacore)로 스크리닝하였다. 비아코어 분석법은 아래에 나타낸 바와 같이 수행되었다.
- [0191] 비아코어 분석법:
- [0192] **장치:** 비아코어 3000
- [0193] **분석 완충액-** 10 nM HEPES 완충액(pH 7.4), 150 nM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% P20(폴리옥시에틸렌소르비탄)
- [0194] **재생 완충액-** 10 mM 글리신 HCl(pH 1.75)
- [0195] **접합 완충액-** 10 nM 아세트산 나트륨 완충액(pH 5)
- [0196] **유속-** 리간드 포획을 위한 유속은 5 μ l/분이다. 동역학 분석을 위한 유속은 30 μ l/분이다.
- [0197] **과정:**
- [0198] 25°C의 비아코어 300 상에서 결합 실험을 수행하였다. 항체들을 흐름 셀 2(1000 RU의 조합 #23) 및 흐름 셀 4(1000 RU의 EWT #131) 상에 직접적으로 고정시키고, CD154 항원을 칩 위로 유동시켰다. 시험한 항체들에 대한 항원의 결합을 실시간으로 모니터링하였다. 관찰된 k_{on} 으로부터, k_{off} 및 K_D 를 각각의 변이체에 대해 결정하였다.
- [0199] 특정 분석물질 농도를 이용하여 스코어링 분석을 수행하였다. 시험한 농도에서, 리간드 결합 친화도가 상대적으로 약하다 하더라도 결합은 관찰될 것이다. 공지된 방법에 의해 완전한 동역학이 수행될 수 있다. 빠른 해리 속도(off rate)의 분자 상호 작용의 경우, 정상 상태 동역학이 K_D 값을 결정하는 데 이용될 수 있다.
- [0200] 이러한 분석의 정확도를 결정하기 위해 카이 제곱(χ^2) 분석이 수행될 수 있다. 1~2 이내의 χ^2 는 유의미한 것으로 간주되고, 1 미만은 고도로 유의미한 것으로 간주된다. 이 스크리닝으로 상당히 개선된 결합 친화도, 즉, IDEC-131에 비해 4~5배 더 나은 결합 친화도를 나타내는 다수의 서열 변이체들을 확인할 수 있었다. 이전에 언급한 바와 같이, IDEC-131이 151 pm의 결합 친화도 또는 K_D 를 보유하고 있으므로 이러한 결과는 한참 예상하지 못한 것이었다. IDEC-131은 CD154에 대한 강력한 결합 친화도를 기초로 한 다수의 상이한 후보 인간화 서열들 중에서도 선두 임상 후보로 선택되었기 때문에 이 결과는 더욱 놀랍다.
- [0201] 아래에 나타낸 바와 같이, IDEC-131로부터 유래된, 26 pm 내지 57 pm 범위의 K_D 값을 갖는 인간화 항-CD154 항체들이 수득되었다. 본 출원에서 변이체 21, 변이체 22, 변이체 23, 변이체 24, 변이체 25, 변이체 26, 변이체 27, 변이체 28, 변이체 29, 변이체 30 및 변이체 31로 확인된, 이들 변이체들의 무거운 가변 서열 및 가벼운 가변 서열의 아미노산 서열은 도 2에 포함되어 있다.
- [0202] 도 4는 비아코어로 결정한 이들 변이체들의 상이한 결합 친화도를 요약한 것이다.

표 4

변이체*	$K_a(1/Ms)$	$K_d(1/s)$	K_D	카이^2	(IDEC131과 비교한) K_D 의 개선 배수(fold improvement)
IDEC-131	3.468E +06	5.25E -04	1.51E -10	0.097	1.0
21	4.42E +06	1.28E -04	2.89E -11	0.184	4.7
22	4.48E +06	1.17E -04	2.62E -11	0.222	5.2
23	3.35E +06	1.41E -04	4.21E -11	0.242	4.2
24	3.70E +06	1.35E -04	3.64E -11	0.265	4.9
25	4.11E +06	1.49E +04	3.62E -11	0.243	3.9
26	2.03E +06	1.17 +04	5.76E -11	0.201	2.5
27	3.58E +06	1.20E -04	3.36E -11	0.135	4.5
28	3.65E +06	1.15E -04	3.15E -11	0.108	4.8

29	3.86E +06	1.33E -04	3.44E -11	0.152	4.2
30	4.24E +06	1.40E -04	3.29E -11	0.171	4.4
31	3.61E +06	1.23E -04	3.41E -11	0.121	4.8

[0204] * (평균 n=6)

[0205] 실시예 2: 인간 CD154에 대해 더 높은 친화도(더 낮은 K_D 값)를 갖는 항체 변이체의 SC 투여를 위한 사용

[0206] 위의 표에 나타난 바와 같이, 선두 후보 #21로 선택된 변이체는 29 pM의 K_D 값을 갖는데, 이는 IDEC131보다 4.7 배 더 우수하다. 이 친화도 개선은 이 항체가 피하로 투여될 수 있게 할 것이므로 유의미하다. IDEC131을 이용한 이전의 연구결과는 10 mg/kg 이상에서, 또는 분석 목적의 경우 20 mg/kg의 상한에서 인간 임상 효능을 나타냈다. 그것을 기초로 하고, 약 80 kg의 평균 체중의 개인을 가정하면, 용량 효과적인 양은 다음과 같이 계산될 수 있다:

[0207] $10 \text{ mg/kg} \times 80 \text{ kg} = 800 \text{ mg}$ 용량.

[0208] 그러나 s 사용을 위한 항체 제형은 관습상 100 ng/ml을 초과하지 않는다. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X06000895>)

[0209] 더구나, 피하 투여를 위한 전형적인 내성 용량(tolerated dose) 부피는 약 0.5~5 ml 범위이다(3 mL을 초과하는 부피는 "대량"으로 간주된다). 따라서 IDEC-131의 유효한 투여량은 약 8 mL을 필요로 할 것이다(아래 계산 참조). 이 투여량은 피하 의학 규범을 쉽게 초과한다.

[0210] $(10 \text{ mg/kg} \times 80 \text{ kg}) / 100 \text{ mg/ml} = 8 \text{ mL}$.

[0211] 이와 대조적으로, 변이체 #21(INX021)은 약 5배 더 적은 K_D 를 가지므로(즉, CD154와 더 큰 친화도로 결합하므로), 이러한 변이체는 동일한 효능을 달성하기 위해 5배 더 적은 약물을 필요로 할 것이다. 아래에 나타난 바와 같이, 이는 약 1.6 ml의 투여량 부피로 바뀌며, 이는 환자를 위한 피하 주사에 대한 의학적 관습 수준과 잘 맞는다.

[0212] $(2 \text{ mg/kg} \times 80 \text{ kg}) / 100 \text{ mg/ml} = 1.6 \text{ mL}$.

[0213] 따라서 IDEC131과 달리, INX021은 피하 경로를 통한 투여를 위해 매우 적합할 것이다.

[0214] 실시예 3: 본 발명에 따른 항-CD154 항체들의 효능 비교

[0215] 도 4는 T 세포 C154에 의해 추진된 B 세포 활성화의 억제를 검출하는 실험의 결과를 개략적으로 도시한 것이다. 도면에 포함된 이들 결과는 IDEC-131과 비교하여 INX-021의 개선된 효능, 즉, T 세포 CD154에 의해 추진된 B 세포 활성화의 더 큰 억제를 증명한다.

[0216] 실시예 4: 본 발명의 항체의 내성 유도 능력

[0217] 도 5는 INX021에 함유된 것과 동일한 Fc 돌연변이(E269R 및 K322A)를 함유하는 항-마우스 CD154 IgG1 항체가 이전에 기술된 피부 시험에서 내성을 유도할 수 있음을 증명하는 실험 결과들을 보여준다. 따라서 이러한 돌연변이된 IgG1 불변 영역들을 함유하는 항-인간 CD154 항체들은 내성을 유도하여 인간 환자에서 CD154의 다른 효과들을 차단할 것이다.

[0218] 실시예 6: INX021은 시험관 내에서 혈소판 응집을 유도하지 않음

[0219] 도 6은 FcR 결합을 감소시키거나 제거하는 돌연변이들을 함유하는 INX021 항체가 대상 INX021 항체 및 콜라겐의 면역 복합체를 이용하는 분석법에서 시험관 내에서 혈소판 응집을 유도하지 않음을 드러낸 실험 결과들을 보여준다. 이러한 시험관 내 실험들은 16분 또는 20분의 시간에 걸쳐 FcR 돌연변이체들의 면역 복합체들이 격리된 마우스 또는 인간 혈소판의 활성화 또는 응집을 유도하지 않았음을 보여주었다. 이와 대조적으로, 동일한 분석법에서 대조군 5c8 항체는 혈소판 응집을 초래했다.

[0220] 실시예 7: 본 발명에 따른 항-CD154 항체는 생체 내에서 혈소판 응집을 유도하지 않음

[0221] 도 7a 내지 도 7d는 INX021은 혈소판을 활성화하지 않고, 혈소판 응집을 유도하지 않으며, 생체 내에서 혈소판 수에 영향을 미치지 않음(감소시키지 않음)을 증명하는 실험 결과들을 보여준다. 도 7a의 실험은 양성 대조군과 비교하여 INX021은 혈전성 스트레스를 유도하거나 혈소판을 활성화하지 않음을 보여준다. 도 7b의 실험은 양성

대조군과 비교하여 INX021은 순환하는 혈소판의 수에 영향을 미치지 않음을 보여준다. 도 7c의 실험은 양성 대조군과 비교하여 INX021은 폐에서 응혈(색전)의 형성을 유도하지 않음을 보여준다. 도 7d는 생체 내에서의 INX021의 이점을 요약한 것이다. 즉, INX021은 혈소판 수를 감소시키지 않고, 혈소판을 활성화하지 않으며, 혈소판 스트레스를 유발하지 않고, 응혈의 형성을 유도하지 않는다.

실시예 8: 본 발명에 따른 항-CD154 항체들의 자가면역 모델에서의 사용

도 8a 및 도 8b에 요약된 실험은 FcR 결합을 감소시키거나 제거하는 INX021 내의 Fc 돌연변이를 함유하는 항-인간화 항-CD154 IgG1 항체들이 상이한 자가면역 또는 염증 모델에서 활성임을 보여준다.

도 8a의 실험은 INX021 내에 Fc 돌연변이를 함유하는 인간 CD154 IgG1 항체들이 약 20일의 기간에 걸쳐 EAE를 강력하게 억제함을 보여준다. 도 8b의 실험은 INX021 내에 Fc 돌연변이를 함유하는 인간화 항-CD154 IgG1 항체들이 모항체와 비슷하게 미엘린 회소돌기 아교세포 당단백질("MOG")에 대하여 체액성 면역을 강력하게 억제함을 보여준다.

실시예 9: INX021을 포함하는 IDEC-121 변이체들의 T 세포 유도성 B 세포 활성화를 억제하는 능력에 대한 시험

도 9의 실험은 본 발명에 따른 상이한 항체 변이체들, 즉, 변이체 #21(INX021) ~ #31의 CD86 발현을 기초로 한 T 세포 유도성 B 세포 활성화를 억제하는 효과를 비교한 것이다. 이들 실험에서, 본 발명에 따른 항체 변이체들의 억제적 효과를 혼합 림프구 반응에서 비교하였다. 판독한 정보는 활성화된 B 세포에 의한 CD86 발현이었다. 도면에 나타난 바와 같이, 더 나은 K_D 값을 지닌 항체들이 반드시 MLR 반응에서의 개선된 기능적 효과와 관련이 있는 것은 아니었다. INX021은 다른 변이체들과 비교하여 우수한 면역억제적 성질을 나타냈다.

실시예 10: INX021 독성학 연구 및 T 세포 의존성 항체 반응(TDAR) 측정

인간 치료에 사용하기 위한 적절성을 평가하기 위해, CRL 및 하버드 시설의 레서스 원숭이에서의 8주의 비-GLP 독성학 연구에서 본 발명의 항체 INX021을 조사하였다. 연구 계획을 아래 표에 나타냈다. 이러한 연구의 목표는 비 인간 영장류(NHP)에서의 INX021의 안전성 및 효능을 평가하는 것이었다.

표 5

TDAR 실험 개요:

투약 개시	1일
1차 KLH 용량	29일
채혈	29일, 36일, 39일(KLH 용량 후 0일, 7일, 10일)
2차 KLH 용량	43일
채혈	43일, 50일, 53일, 57일(KLH 용량 후 14일, 21일, 24일, 28일)
IgG 및 IgM 측정	

표 6

TDAR NHP 군:

장소	처리	N	NHP 종
CRL	용제	4	레서스
CRL	INX021 50 mg/kg	8	레서스
CRL	5C8 20 mg/kg	8	레서스
하버드	용제	3	시노몰구스
하버드	INX021 1 mg/kg	3	시노몰구스
하버드	INX021 5 mg/kg	3	시노몰구스

도 10a 및 도 10b는 KLH 분석에서 IgG 및 IgM 항체의 생성에 미치는 INX021 및 키메라 5c8 항체의 영향을 비교한 것이다. 도 10a는 IgG에 대한 영향을 비교한 것이고, 도 10b는 IgM에 대한 영향을 비교한 것이다.

- [0232] 도 11a 및 도 11b는 배 중심 점수에 미치는 용제, INX021 및 5c8 항체의 영향을 비교한 것이다. 도 11a는 배 점수 비교를 나타낸 것이고, 도 11b는 처리된 동물의 비장 및 림프절(LN)에서의 배 중심의 수와 세포충실성 정도를 비교한 막대 그래프를 포함한다.
- [0233] 도 12는 또 다른 항-CD154 항체(바이오젠/UCB의 폐길화된 α CD154 Fab)를 이용한 공개된 결과에 대한 관찰된 병변 빈도를 요약한 것이다.
- [0234] 이들 결과는 INX021이 인간 치료에서 안전하고 효과적일 것임을 나타낸다.
- [0235] **실시예 11: INX021은 NHP에서 항-약물 항체(ADA) 반응을 억제함**
- [0236] 이전 실시예에서 논의된 INX021 독성/TDAR 실험 중에 본 발명자들은 모든 코호트 내의 ADA의 존재를 측정했다. 모든 동물에서 TDAR 반응은 억제되어, 가용성 항원에 대한 항체 반응이 INX021 처리된 동물에서 방지될 수 있음을 시사하였다. 이것을 조사하기 위해, 본 발명자들은 8주의 INX021 또는 5C8 주사 후에 레서스 원숭이에서 ADA 반응을 측정했다. INX021군의 최저 용량(1 mg/kg)의 한 마리를 제외한 모든 동물은 임의의 검출 가능한 ADA를 발달시키지 못했다.
- [0237] **방법:**
- [0238] *레서스에서 INX021 및 ch5C8에 대한 항체의 검출(ELISA)*
- [0239] *2N 황산(정지액)의 제조*
- [0240] 2N 황산 1000 mL씩을 제조하기 위해 4N 황산 500 mL과 증류수 500 mL을 혼합한다. 잘 섞는다. 개별 성분들 각각에 대한 제조일로부터 1년 또는 제조업체의 유효기간 중 먼저 오는 날짜의 유효기간이 지정될 것이다. 이러한 용액은 실온(17°C 내지 27°C)에 보관될 것이다.
- [0241] **코팅된 96웰 플레이트 준비**
- [0242] 이러한 프로토콜에서, 시험 물질은 레서스 또는 시노몰구스 원숭이 혈청을 함유하는 샘플, 양성 대조군을 함유하는 샘플, 및/또는 블랭크를 지칭한다.
- [0243] *프로토콜*
- [0244] 1. 희석제로 코팅 완충액(0.2 탄산염 중탄산염 완충액)을 이용하여 INX021 또는 ch5C8과 함께 1.0 pg/mL 코팅 용액을 제조한다.
- [0245] 2. 96웰의 투명한 폴리스티렌 플레이트(들)의 각각의 웰에 100 pL의 코팅 용액을 첨가하고 뚜껑을 덮는다.
- [0246] 3. 이러한 플레이트(들)를 12 내지 24시간 동안 2°C 내지 8°C에서 인큐베이션 한다.
- [0247] 4. 플레이트(들)의 각 웰로부터 코팅 용액을 빨아들인(제거한) 다음, 각 웰을 3 x 300 pL의 1X PBS-T로 세척한다.
- [0248] 5. 플레이트(들)의 각 웰에 블로커 카제인 200 pL를 첨가하고 뚜껑을 덮는다.
- [0249] 6. 플레이트를 1시간 $\pm$ 5분 동안 인큐베이션 한다.
- [0250] 7. 플레이트(들)의 각 웰로부터 블로커 카제인을 빨아들인 다음, 각 웰을 3 x 300 pL의 1X PBS-T로 세척한다.
- [0251] 8. 세척 직후 플레이트(들)를 사용한다(세척 완료로부터 2시간 이내에 플레이팅을 완료한다). 플레이트 준비가 완료된 날짜의 유효기간을 정한다.
- [0252] **INX021 또는 ch5C8에 대한 항체 검출을 위한 분석 절차**
- [0253] 이러한 실험 프로토콜에서 "시험 물질"은 레서스 또는 시노몰구스 원숭이 혈청을 함유하는 샘플, 양성 대조군을 함유하는 샘플, 및/또는 블랭크를 지칭한다. 실온/주위온도는 17°C 내지 27°C이다.
- [0254] *프로토콜*
- [0255] 1. INX021 또는 ch5C8이 코팅된 플레이트(들)의 적당한 웰(들)에 각각의 시험 물질 100 pL를 첨가하고 플레이트 밀봉기로 덮는다.
- [0256] 2. 플레이트 템플레이트를 이용하여 시험 물질의 위치를 기록한다.

- [0257] 3. 실온에서 1시간 $\pm$ 5분 동안 INX021 또는 ch5C8이 코팅된 플레이트(들)와 시험 물질을 인큐베이션 한다.
- [0258] 분석 절차
- [0259] 1. 플레이트(들)의 각 웰로부터 시험 물질을 빨아들인 다음, 플레이트(들)의 각 웰을 3 x 300 μ L의 1X PBS-T로 세척한다.
- [0260] 2. 플레이트(들)의 각 웰에 0.125 μ g/mL INX021-비오틴 또는 1.0 μ g/mL ch5C8-비오틴 100 μ L를 첨가하고 플레이트 밀봉기로 덮는다.
- [0261] 3. 플레이트(들)을 실온에서 1시간 $\pm$ 5분 동안 인큐베이션 한다.
- [0262] 4. 플레이트(들)의 각 웰로부터 INX021-비오틴 또는 ch5C8-비오틴을 빨아들인(제거한) 다음, 플레이트(들)의 각 웰을 3 x 300 μ L의 1X PBS-T로 세척한다.
- [0263] 5. 플레이트(들)의 각 웰에 0.1 μ g/mL SA-HRP 100 μ L를 첨가하고 뚜껑을 덮는다.
- [0264] 6. 플레이트(들)를 실온에서 30분 $\pm$ 5분 동안 인큐베이션 한다.
- [0265] 7. 플레이트(들)의 각 웰로부터 SA-HRP를 빨아들인(제거한) 다음, 플레이트(들)의 각 웰을 3 x 300 μ L의 1X PBS-T로 세척한다.
- [0266] 8. 플레이트(들)의 각 웰에 TMB 100 μ L를 첨가한다.
- [0267] 9. 플레이트(들)을 실온에서 20분 $\pm$ 5분 동안 인큐베이션 한다.
- [0268] 10. 플레이트(들)의 각 웰에 2N 황산 100 μ L를 첨가한다.
- [0269] 11. 분석 30분 이내에 마이크로플레이트 분광광도계를 이용하여 450 nm에서 플레이트(들)을 판독한다.
- [0270] 일반적인 데이터 정리
- [0271] 달리 언급되지 않는 한, 모든 시험 물질에 대해, 평균 A450, 표준 편차 및 % 차이($n=2$ 인 경우) 또는 CV%($n > 3$ 인 경우)를 계산하여 분산을 평가할 것이다. 모든 CV% 수용 기준은 CV% 대신에 % 차이가 계산되는 경우에 % 차이 값에 적용될 것이다. 시험 물질 중 세 개 이상의 웰이 분석되는 경우, CV%가 개설된 기준을 통과하지 못할 경우 한 개의 웰이 생략될 수 있다.
- [0272] % CV: r 표준 편차 $>$ 평균 값 $\times 100$
- [0273] % 차이: r 값 A - 값 B 대 평균 값 $\times 100$
- [0274] 최대한 두 개의 이상치 A450 블랭크 시험 샘플(TS) 값들을 제거하기 위해 블랭크 TS 상에서 5% 수준에서 분산을 평가하기 위해 최대 표준 잔차(Maximum Normed Residual, MNR) 분석이 수행될 것이다. 평균 A450은 이상치로 제거되지 않은 모든 값들로부터 계산될 것이다. 추가적인 웰은 기술 오차로 인해 생략될 수 있다.
- [0275] 플레이트 특이성 컷 포인트(plate specific cut point, PSCP)는 전체 컷 포인트(CP) x 블랭크 TS 평균 A450(이상치 없음) = PSCP로 계산될 것이다.
- [0276] 일반적인 수용 기준
- [0277] 블랭크 TS가 두 개를 초과하는 이상치를 갖는 경우, 이러한 플레이트는 실패한 것으로 다시 분석되어야 한다. 이상치 및 기술 오차로 인해 마스킹된 웰을 마스킹한 후 MNR 분석을 위해 적어도 5개의 블랭크 TS A450 값이 남아 있어야 한다. 다음 식이 MNR 값을 계산하는 데에 이용될 것이다: MNR 블랭크 TS 값 - 평균 블랭크 TS.
- [0278] 표준 편차 $\times \sqrt{n-1}$
- [0279] MNR 값이 임계값보다 큰 경우 이러한 값은 이상치로 결정될 것이다. 임계값은 $n=12=0.727$, $n=11=0.745$, $n=10=0.763$, $n=9=0.783$, $n=8=0.804$, $n=7=0.825$, $n=6=0.844$ 및 $n=5=0.858$ 으로 정의된다. 모든 이상치는 마스킹될 것이다.
- [0280] 이상치 제거 후 블로커 카제인 블랭크 및 블랭크 TS 평균 A450은 LPC $A \ll 0$ 미만이어야 한다. 플레이트 특이성 컷 포인트(PSCP)는 $PSCP = CF * \text{블랭크 TS 전체 평균(이상치 없음)}$ 으로 계산될 것이다. 보정 계수(CF)가 연구 파일에 추가될 것이다. LPC 평균 A450은 PSCP를 초과해야 한다. 그렇지 않으면, 그 세트에 대한 LPC는 실패한 것이다.

- [0281] 분석 완충액 블랭크 CV%는 < 30%이어야 한다. 분석 완충액 블랭크가 위에 열거된 기준을 통과하지 못할 경우, 이러한 데이터가 활용될 수 있는지를 결정하기 위하여 과학적 검토를 하는 중에 이러한 플레이트가 평가될 것이다.
- [0282] 각각의 PC 세트의 평균 A450에 대해 HPC > MPC > LPC이다. 이러한 PC 수준의 적어도 3분의 2는 이러한 수용 기준을 충족해야 하고, 각각의 PC 수준에서 적어도 하나의 PC는 수용 기준 내에 있어야 한다.
- [0283] 중복 웰들 사이의 시험 샘플 % 차이는 < 25%이어야 한다. 시험 샘플이 이들 기준을 통과하지 못하는 경우, 이러한 샘플은 다시 분석될 것이다.
- [0284] 양성 대조군, 블랭크 TS 및 분석 완충액 블랭크의 제조
- [0285] 양성 대조군은 100% 레서스 원숭이 혈청(RHS) 또는 시노물구스 원숭이 혈청에 대용 양성 대조군 항체를 첨가하여 제조할 것이다. 100% 기질 중의 양성 대조군은 블로커 카제인으로 10배 희석되어 적당한 작업 농도 및 10% 기질을 생성할 것이다. 각각의 PC 세트는 서로 독립적으로 제조될 것이며, 각각의 플레이트 상에서 분석될 것이다. 분석 당일, PC는 각각의 플레이트에서 분석될 것이다.
- [0286] 각각의 플레이트는 두 세트의 PC들을 LPC(50ng/mL), MPC(250 ng/mL) 및 HPC(1000 ng/mL)로 함유할 것이다. 블로커 카제인으로 희석된 최종 농도 10% 기질로 블랭크 TS도 제조될 것이다. 12개 웰의 블랭크 TS가 각각의 플레이트에서 실행될 것이다. 블로커 카제인은 각 플레이트 상에서 적어도 두 개 웰에서 실행될 것이다. 달리 언급되지 않는 한, 모든 시험 물질은 최소한 두 개의 웰에서 분석될 것이다.
- [0287] 스크리닝 분석
- [0288] 스크리닝을 위해, 블로커 카제인에 1/10으로 희석된 샘플을 섹션 7.0에 기술된 절차에 따라 분석한다. 샘플 분석 중에 연구 샘플의 평균 흡광도 값을 PSCP와 비교할 것이며, 평균 흡광도 값이 > PSCP인 경우 잠재적으로 양성, 또는 평균 흡광도 값이 < PSCP인 경우 음성으로 보고될 것이다.
- [0289] **결과**
- [0290] 모든 동물에서 TDAR 반응이 억제되어, 가용성 항원에 대한 항체 반응이 INX021 처리된 동물에서 예방될 수 있음을 시사한다. 이를 조사하기 위해, 본 발명자들은 8주의 INX021 또는 5C8 주사 후에 레서스 원숭이에서 ADA 반응을 측정했다. INX021군의 최저 용량(1 mg/kg)에서 한 마리를 제외한 모든 동물은 임의의 검출 가능한 ADA를 발달시키지 못했다. 따라서 본 발명의 항체 INX021은 생물제제, 예를 들어, 치료적 항체, 융합 단백질 등과 같은 면역원성 약물에 대한, 체액성 면역을 억제하는 데 사용될 수 있다.
- [0291] **출원에 인용된 참고문헌**
- [0292] 다음 참고문헌이 인용된다. 모든 내용은 본 설명에 참조로 포함된다.
- [0293] 1 Noelle, R. J., Mackey, M., Foy, T., Buhlmann, J. and Burns, C., CD40 and its ligand in autoimmunity. Ann N Y Acad Sci 1997. 815: 384~391.
- [0294] 2 Mackey, M. F., Barth, R. J., Jr. and Noelle, R. J., The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells. J Leukoc Biol 1998. 63: 418~428.
- [0295] 3 Noelle, R. J., CD40 and its ligand in cell-mediated immunity. Agents Actions Suppl 1998. 49: 17~22.
- [0296] 4 Quezada, S. A., Jarvinen, L. Z., Lind, E. F. and Noelle, R. J., CD40/CD154 Interactions at the Interface of Tolerance and Immunity. Annu Rev Immunol 2004. 22: 307~328.
- [0297] 5 Kenyon, N. S., Chatzipetrou, M., Masetti, M., Ranuncoli, A., Oliveira, M., Wagner, J. L., Kirk, A. D., Harlan, D. M., Burkly, L. C. and Ricordi, C., Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154. Proc Natl Acad Sci U S A 1999. 96: 8132~8137.
- [0298] 6 Kirk, A. D., Burkly, L. C., Batty, D. S., Baumgartner, R. E., Berning, J. D., Buchanan, K., Fechner, J. H., Jr., Germond, R. L., Kampen, R. L., Patterson, N. B., Swanson, S. J., Tadaki, D. K.,

TenHoor, C. N., White, L., Knechtle, S. J. and Harlan, D. M., Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med* 1999. 5: 686~693.

- [0299] 7 Sidiropoulos, P. I. and Boumpas, D. T., Lessons learned from anti-CD40L treatment in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2004. 13: 391~397.
- [0300] 8 Sidiropoulos, P. I. and Boumpas, D. T., Lessons learned from anti-CD40L treatment in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2004. 13: 391~397.
- [0301] 9 Ferrant, J. L., Benjamin, C. D., Cutler, A. H., Kalled, S. L., Hsu, Y. M., Garber, E. A., Hess, D. M., Shapiro, R. I., Kenyon, N. S., Harlan, D. M., Kirk, A. D., Burkly, L. C. and Taylor, F. R., The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge. *Int Immunol* 2004. 16: 1583~1594.
- [0302] 10 미국 특허 번호 6,444,018
- [0303] 11 Gordon, E. J., Markees, T. G., Phillips, N. E., Noelle, R. J., Shultz, L. D., Mordes, J. P., Rossini, A. A. and Greiner, D. L., Prolonged survival of rat islet and skin xenografts in mice treated with donor splenocytes and anti-CD154 monoclonal antibody. *Diabetes* 1998. 47: 1199~1206.
- [0304] 12 Markees, T. G., Phillips, N. E., Noelle, R. J., Shultz, L. D., Mordes, J. P., Greiner, D. L. and Rossini, A. A., Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand. *Transplantation* 1997. 64: 329~335.
- [0305] 13 Jarvinen, L. Z., Blazar, B. R., Adeyi, O. A., Strom, T. B. and Noelle, R. J., CD154 on the surface of CD4+CD25+ regulatory T cells contributes to skin transplant tolerance. *Transplantation* 2003. 76: 1375~1379.
- [0306] 14 Quezada, S. A., Fuller, B., Jarvinen, L. Z., Gonzalez, M., Blazar, B. R., Rudensky, A. Y., Strom, T. B. and Noelle, R. J., Mechanisms of donor-specific transfusion tolerance: preemptive induction of clonal T-cell exhaustion via indirect presentation. *Blood* 2003. 102: 1920~1926.
- [0307] 15 Frleta, D., Lin, J. T., Quezada, S. A., Wade, T. K., Barth, R. J., Noelle, R. J. and Wade, W. F., Distinctive maturation of in vitro versus in vivo anti-CD40 mAb-matured dendritic cells in mice. *J Immunother* 2003. 26: 72~84.
- [0308] 16 Quezada, S., Eckert, M., Schned, A., Noelle, R. J. and Burns, C., Distinct mechanisms of action of anti-CD154 in early versus late treatment of murine lupus nephritis. *Arth Rheum.* 2003. in press.
- [0309] 17 Elster, E. A., Xu, H., Tadaki, D. K., Montgomery, S., Burkly, L. C., Berning, J. D., Baumgartner, R. E., Cruzata, F., Marx, R., Harlan, D. M. and Kirk, A. D., Treatment with the humanized CD154-specific monoclonal antibody, hu5C8, prevents acute rejection of primary skin allografts in nonhuman primates. *Transplantation* 2001. 72: 1473~1478.
- [0310] 18 Benda, B., Ljunggren, H. G., Peach, R., Sandberg, J. O. and Korsgren, O., Co-stimulatory molecules in islet xenotransplantation: CTLA4Ig treatment in CD40 ligand-deficient mice. *Cell transplantation* 2002. 11: 715~720.
- [0311] 19 Wekerle, T. and Sykes, M., Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Annual review of medicine* 2001. 52: 353~370.
- [0312] 20 Camirand, G., Caron, N. J., Turgeon, N. A., Rossini, A. A. and Tremblay, J. P., Treatment with anti-CD154 antibody and donor-specific transfusion prevents acute rejection of myoblast transplantation. *Transplantation* 2002. 73: 453~461.
- [0313] 21 Tung, T. H., Mackinnon, S. E. and Mohanakumar, T., Long-term limb allograft survival using anti-CD40L antibody in a murine model. *Transplantation* 2003. 75: 644~650.

- [0314] 22 Koyama, I., Kawai, T., Andrews, D., Boskovic, S., Nadazdin, O., Wee, S. L., Sogawa, H., Wu, D. L., Smith, R. N., Colvin, R. B., Sachs, D. H. and Cosimi, A. B., Thrombophilia associated with anti-CD154 monoclonal antibody treatment and its prophylaxis in nonhuman primates. *Transplantation* 2004. 77: 460~462.
- [0315] 23 Kawai, T., Andrews, D., Colvin, R. B., Sachs, D. H. and Cosimi, A. B., Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat Med* 2000. 6: 114.
- [0316] 24 Daley, S. R., Cobbold, S. P. and Waldmann, H., Fc-disabled anti-mouse CD40L antibodies retain efficacy in promoting transplantation tolerance. *Am J Transplant* 2008. 8: 2265~2271.
- [0317] 25 Sanchez-Fueyo, A., Domenig, C., Strom, T. B. and Zheng, X. X., The complement dependent cytotoxicity (CDC) immune effector mechanism contributes to anti-CD154 induced immunosuppression. *Transplantation* 2002. 74: 898~900.
- [0318] 26 Monk, N. J., Hargreaves, R. E., Marsh, J. E., Farrar, C. A., Sacks, S. H., Millrain, M., Simpson, E., Dyson, J. and Jurcevic, S., Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade. *Nat Med* 2003. 9: 1275~1280.
- [0319] 27 Truscott, S. M., Abate, G., Price, J. D., Kemper, C., Atkinson, J. P. and Hoft, D. F., CD46 engagement on human CD4+ T cells produces T regulatory type 1-like regulation of antimycobacterial T cell responses. *Infection and immunity* 2010. 78: 5295~5306.
- [0320] 28 Cardone, J., Le Friec, G., Vantourout, P., Roberts, A., Fuchs, A., Jackson, I., Suddason, T., Lord, G., Atkinson, J. P., Cope, A., Hayday, A. and Kemper, C., Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells. *Nature immunology* 2010. 11: 862~871.
- [0321] 29 Fuchs, A., Atkinson, J. P., Fremeaux-Bacchi, V. and Kemper, C., CD46-induced human Treg enhance B-cell responses. *European journal of immunology* 2009. 39: 3097~3109.
- [0322] 30 Alford, S. K., Longmore, G. D., Stenson, W. F. and Kemper, C., CD46-induced immunomodulatory CD4+ T cells express the adhesion molecule and chemokine receptor pattern of intestinal T cells. *Journal of immunology* 2008. 181: 2544~2555.
- [0323] 31 Barchet, W., Price, J. D., Cella, M., Colonna, M., MacMillan, S. K., Cobb, J. P., Thompson, P. A., Murphy, K. M., Atkinson, J. P. and Kemper, C., Complement-induced regulatory T cells suppress T-cell responses but allow for dendritic-cell maturation. *Blood* 2006. 107: 1497~1504.
- [0324] 32 Liszewski, M. K., Kemper, C., Price, J. D. and Atkinson, J. P., Emerging roles and new functions of CD46. *Springer seminars in immunopathology* 2005. 27: 345~358.
- [0325] 33 Kawai, T., Andrews, D., Colvin, R. B., Sachs, D. H. and Cosimi, A. B., Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand [In Process Citation]. *Nat Med* 2000. 6: 114.
- [0326] 34 Langer, F., Ingersoll, S. B., Amirkhosravi, A., Meyer, T., Siddiqui, F. A., Ahmad, S., Walker, J. M., Amaya, M., Desai, H. and Francis, J. L., The role of CD40 in CD40L- and antibody-mediated platelet activation. *Thrombosis and haemostasis* 2005. 93: 1137~1146.
- [0327] 35 Robles-Carrillo, L., Meyer, T., Hatfield, M., Desai, H., Davila, M., Langer, F., Amaya, M., Garber, E., Francis, J. L., Hsu, Y. M. and Amirkhosravi, A., Anti-CD40L immune complexes potently activate platelets in vitro and cause thrombosis in FCGR2A transgenic mice. *J Immunol* 2010. 185: 1577~1583.
- [0328] 36 Couzin, J., Drug discovery. Magnificent obsession. *Science* 2005. 307: 1712~1715.
- [0329] 37 Hessel, A. J., Hangartner, L., Hunter, M., Havenith, C. E., Beurskens, F. J., Bakker, J. M., Lanigan, C. M., Landucci, G., Forthal, D. N., Parren, P. W., Marx, P. A. and Burton, D. R., Fc

receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* 2007. 449: 101~104.

- [0330] 38 Armour, K. L., Clark, M. R., Hadley, A. G. and Williamson, L. M., Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur J Immunol* 1999. 29: 2613~2624.
- [0331] 39 Taylor, P. A., Lees, C. J., Wilson, J. M., Ehrhardt, M. J., Campbell, M. T., Noelle, R. J. and Blazar, B. R., Combined effects of calcineurin inhibitors or sirolimus with anti-CD40L mAb on alloengraftment under nonmyeloablative conditions. *Blood* 2002. 100: 3400~3407.
- [0332] 40 Noelle, R. J., Roy, M., Shepherd, D. M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J. A. and Aruffo, A., A novel ligand on activated T helper cells binds CD40 and transduces the signal for the cognate activation of B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992. 89: 6550~6554.
- [0333] 41 Quezada, S. A., Bennett, K., Blazar, B. R., Rudensky, A. Y., Sakaguchi, S. and Noelle, R. J., Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154-induced graft tolerance: the interplay of clonal anergy and immune regulation. *J Immunol* 2005. 175: 771~779.
- [0334] 42 Rossini, A. A., Parker, D. C., Phillips, N. E., Durie, F. H., Noelle, R. J., Mordes, J. P. and Greiner, D. L., Induction of immunological tolerance to islet allografts. *Cell Transplant* 1996. 5: 49~52.
- [0335] 43 Markees, T., Phillips, N., Gordon, E., Noelle, R. J., Mordes, J. P., Greiner, D. L. and Rossini, A. A., Improved skin allograft tolerance induced by treatment with donor splenocytes and an extended course of anti-CD154 monoclonal antibody. *Transplant Proc* 1998. 30: 2444~2446.
- [0336] 44 Markees, T. G., Appel, M. C., Noelle, R. J., Mordes, J. P., Greiner, D. L. and Rossini, A. A., Tolerance to islet xenografts induced by dual manipulation of antigen presentation and co-stimulation. *Transplantation Proceedings* 1996. 28: 814~815.
- [0337] 45 van den Eertwegh, A. J., Van Meurs, M., Foy, T. M., Noelle, R. J., Boersma, W. J. and Claassen, E., In vivo gp39-CD40 interactions occur in the non-follicular compartments of the spleen and are essential for thymus dependent antibody responses and germinal center formation. *Adv Exp Med Biol* 1994. 355: 75~80.
- [0338] 46 van, den, Eertwegh, Aj, Van, M. M., Foy, T. M., Noelle, R. J., Boersma, W. J. and Claassen, E., In vivo gp39-CD40 interactions occur in the non-follicular compartments of the spleen and are essential for thymus dependent antibody responses and germinal center formation. *Advances in experimental medicine and biology* 1994. 355: 75~80.
- [0339] 47 Foy, T. M., Laman, J. D., Ledbetter, J. A., Aruffo, A., Claassen, E. and Noelle, R. J., gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *J. Exp. Med.* 1994. 180: 157~164.
- [0340] 48 Gerritse, K., Laman, J. D., Noelle, R. J., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., Boersma, W. J. and Claassen, E., CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *National Academy of Sciences, Washington, D.c, Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996. 93: 2499~2504.
- [0341] 49 Nagelkerken, L., Haspels, I., van Rijs, W., Blauw, B., Ferrant, J. L., Hess, D. M., Garber, E. A., Taylor, F. R. and Burkly, L. C., FcR interactions do not play a major role in inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by anti-CD154 monoclonal antibodies. *J Immunol* 2004. 173: 993~999.
- [0342] 50 Becher, B., Durell, B. G. and Noelle, R. J., Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest* 2002. 110: 493~497.
- [0343] 51 Becher, B., Durell, B. G., Miga, A. V., Hickey, W. F. and Noelle, R. J., The clinical course

of experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation is controlled by the expression of CD40 within the central nervous system. J Exp Med 2001. 193: 967~974.

[0344] 52 Howard, L. M., Miga, A. J., Vanderlugt, C. L., Dal Canto, M. C., Laman, J. D., Noelle, R. J. and Miller, S. D., Mechanisms of immunotherapeutic intervention by anti-CD40L (CD154) antibody in an animal model of multiple sclerosis. J Clin Invest 1999. 103: 281~290.

[0345] '배경기술', '발명의 상세한 설명' 및 '실시예'에 인용된 (특허, 특허 출원, 학술지 논문, 초록, 매뉴얼, 도서, 또는 기타 개시를 포함하는) 각각의 문헌의 전체적인 개시 내용은 그 전체가 참조로 본 설명에 포함된다.

[0346] 위의 상세한 설명을 고려하여 이러한 변경 및 기타 변경이 본 발명에 행해질 수 있다. 일반적으로, 다음의 청구 범위에서, 사용된 용어는 본 발명을 명세서 및 청구범위에 개시된 특정 구현예로 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 따라서, 본 발명은 이러한 개시에 의해 제한되지 않으며, 그 대신 본 발명의 범위는 다음의 청구범위에 의해 전적으로 결정될 것이다.

[0347] 본 발명은 위의 설명 및 실시예에서 특별히 설명된 방식 이외의 방식으로 실현될 수 있다. 본 발명의 다수의 수정 및 변경이 위의 교시에 비추어 가능하며, 따라서 첨부된 청구범위의 범위 내에 있다.

도면

도면1a

중쇄

가변 영역은 **붉은 활자체**로 나타냄

CDR은 **노란색**으로 강조함

친화도 성숙 돌연변이된 잔기는 **밑줄**

Fc 돌연변이(E→R 및 K→R)는 **적색**

```

      10      20      30      40      50      60
EVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGDSIT NGFWIWIRKP PGNKLEYMGY ISYSGSTYYN

      70      80      90     100     110     120
PSLKSRLSIS RDTSKNQFSL KLSSVTAADT GVIYCAYRSY GRTPYYFDYW GQGTTLTVSS

      130     140     150     160     170     180
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS

      190     200     210     220     230     240
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKAEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG

      250     260     270     280     290     300
PSVFLFPPKP KDTLMISRTF EVTCVVVDVS HSDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN

      310     320     330     340     350     360
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCAVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE

      370     380     390     400     410     420
LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW

      430     440     450
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
  
```

도면1b

경쇄

가변 영역은 붉은 활자체로 나타냄

CDR은 노란색으로 강조함

친화도 성숙 돌연변이된 잔기는 밑줄

```

      10      20      30      40      50      60
DIVMTQSPSF LSASVGDRVIT TCKASSNLG HAWAWYQQKPKSPKLLIYS ASNRYTGVPD

      70      80      90     100     110     120
RFGSGSGSTD FTLTISSLQPEDFADYFCQQYDDYPYTFGG GTKLEIKRTVAAPSVFIFPP

     130     140     150     160     170     180
SDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDTYSLSSLTLT

     190     200     210
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

```

도면1c

INX021 서열

가변 무거운 (서열번호 1)

EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSITNGFWIWIRKPPGNKLEYMGYISYSGSTYYNPSLKSRLSISR
DTSKNQFSLKLSSVTAADTGVIYCAIRSYGRTPYYFDYWGQGTTLTVSS

가변 가벼운 (서열번호 2)

DIIVMTQSPSFLSASVGDRTITCKASSNLGHAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFT
TLTISSLQPEDFADYFCQQYDDYPYTFGGGTKLEIK

불변 무거운 (서열번호 3)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVDVSHRDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

불변 가벼운 (서열번호 4)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

INX021 가변 무거운 CDR1 (서열번호 5)

GDSITNGFWI

INX021 가변 무거운 CDR2 (서열번호 6)

YISYSGSTY

INX021 가변 무거운 CDR3 (서열번호 7)

YRSYGRTPYYFDY

INX021 가변 가벼운 CDR1 (서열번호 8)

KASSNLGHAVA

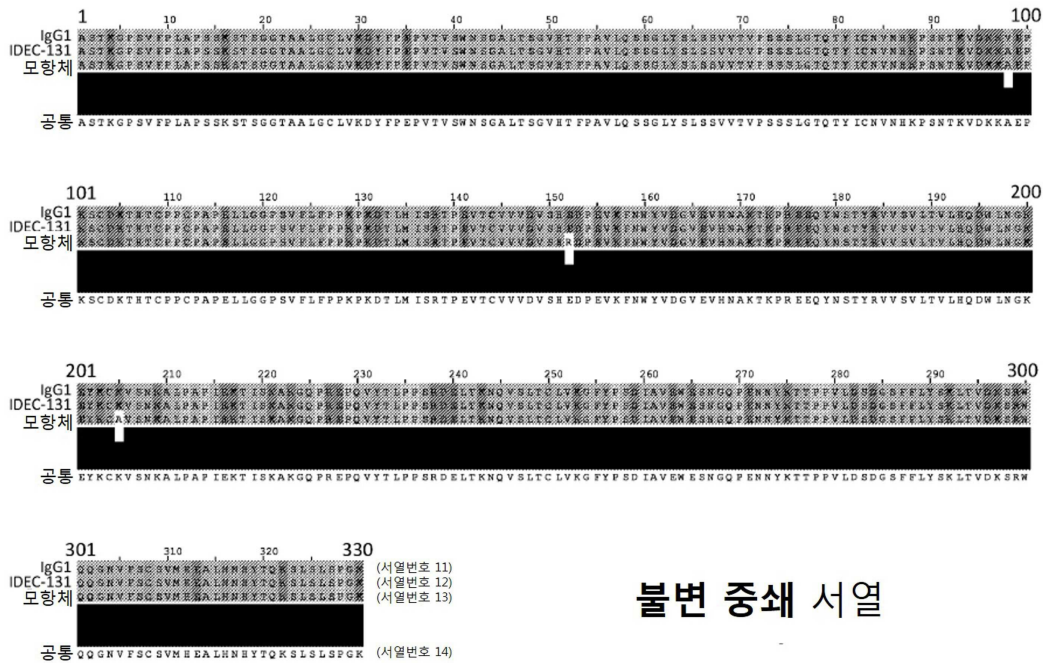
INX021 가변 가벼운 CDR2 (서열번호 9)

SASNRYT

INX021 가변 가벼운 CDR3 (서열번호 10)

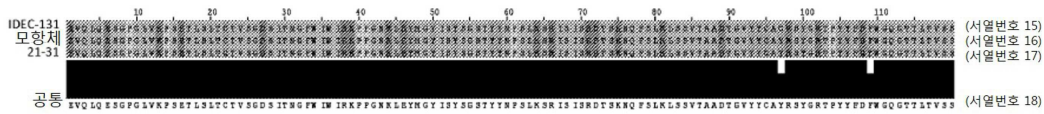
QQYDDYPYT

도면2a



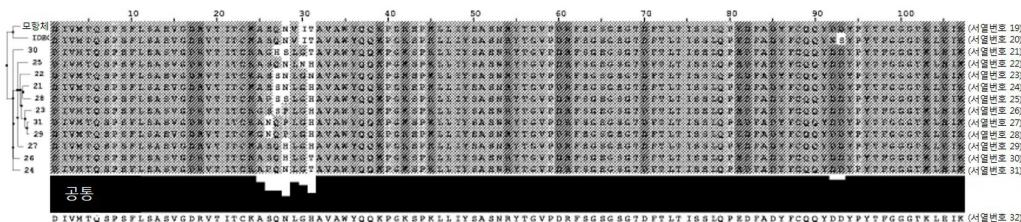
불변 중쇄 서열

도면2b

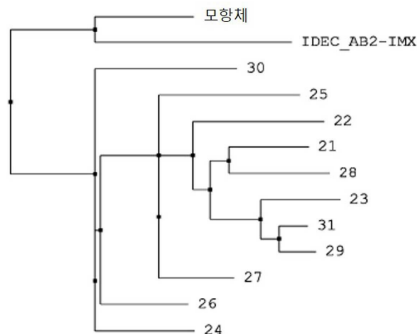


가변 중쇄 서열

도면2c



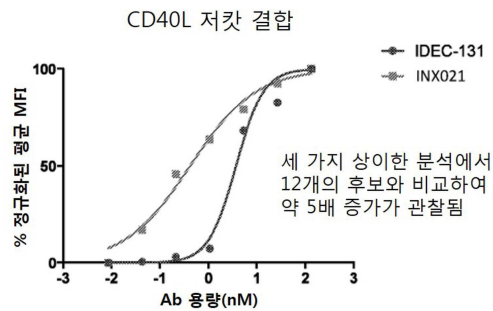
가변 경쇄 서열



도면3

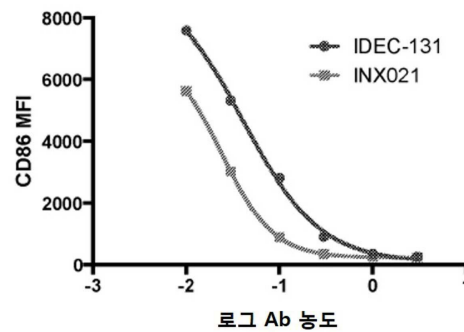
개선된 효능: IDEC 에피토프 이용

INX021은 T 세포 상의 CD40L에
대해 더 우수한 결합을 보여준다



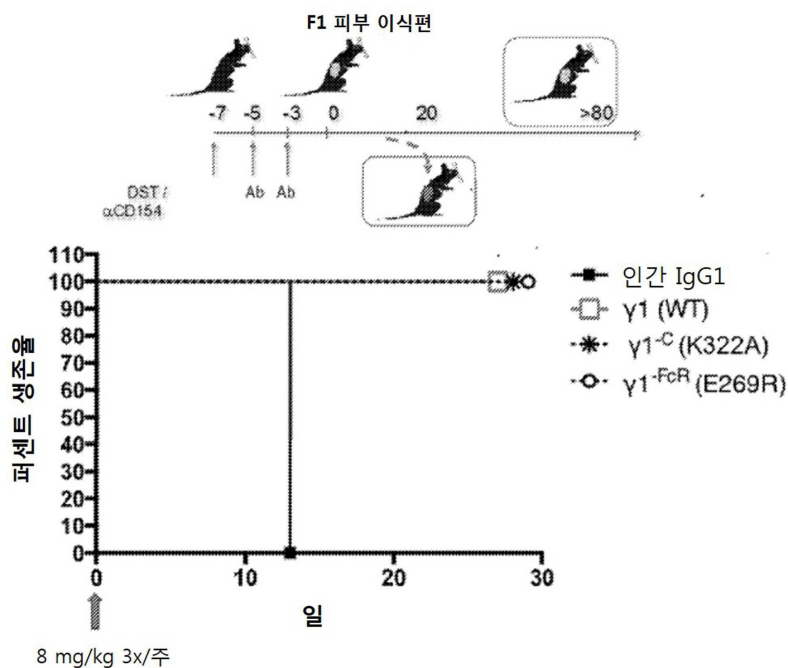
도면4

INX021은 T 세포 CD40L에 의해
추진된 B 세포 활성화를 더욱 강력
하게 억제함을 보여준다



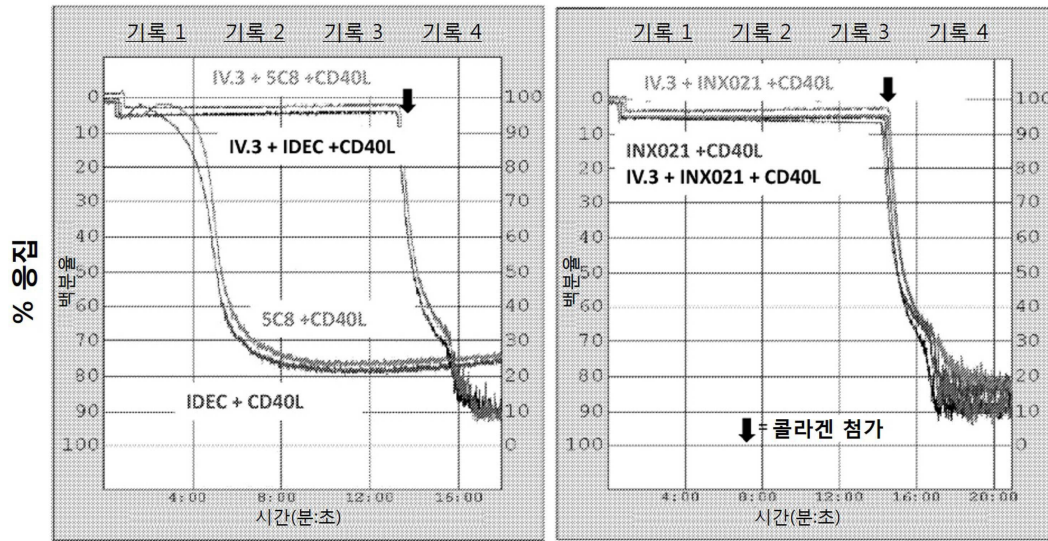
도면5

hIgG 항-mCD40L의 FcR 돌연변이체는 내성을 유도한다



도면6

hIgG1 항-CD40L의 FcR 돌연변이체는 혈소판 응집을 유도하지 않는다

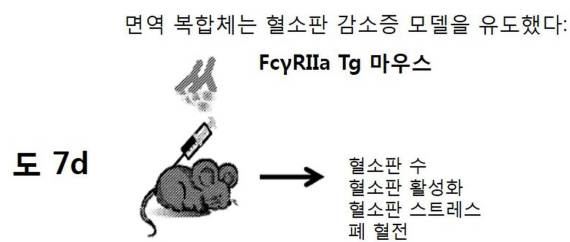
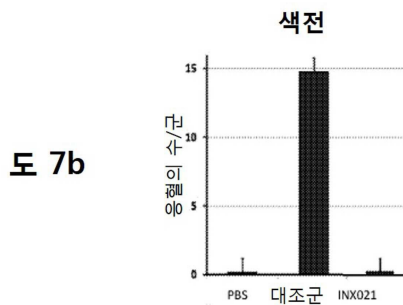
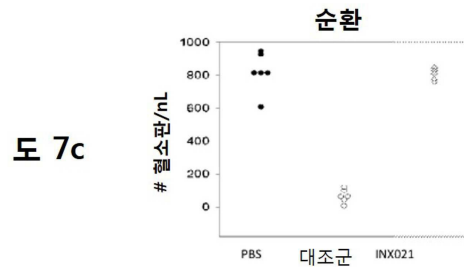
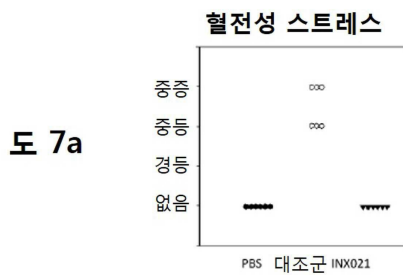


FcR 돌연변이체의 면역 복합체는 시험관 내에서 분리된 마우스 및 인간 혈소판 활성화를 유도하지 않았다

도면7

생체 내에서 hIgG1 항-인간 CD40L의 FcR 돌연변이체에 의한 혈소판 활성의 결핍

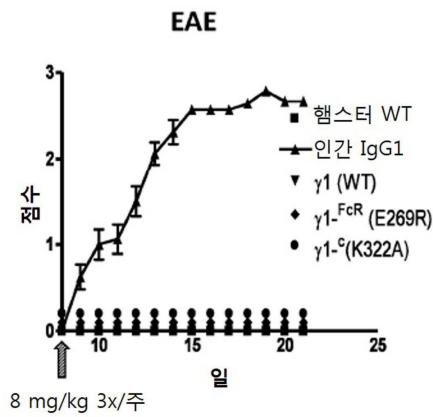
FcR 돌연변이체는 혈전성 스트레스, 감소된 혈소판 수, 또는 폐 내의 응혈을 유도하지 않았다.



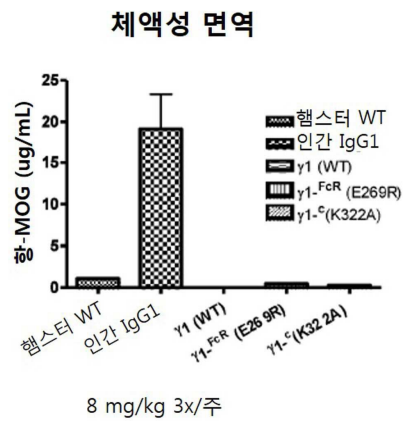
도면8

FcR/C1q 돌연변이체 항-mCD40L 항체의 활성

FcR/C1q 결합 돌연변이체는 EAE, 내성 및 MOG에 대한 면역 반응과 같은 관심 있는 모델에서 여전히 활성을 나타낸다.

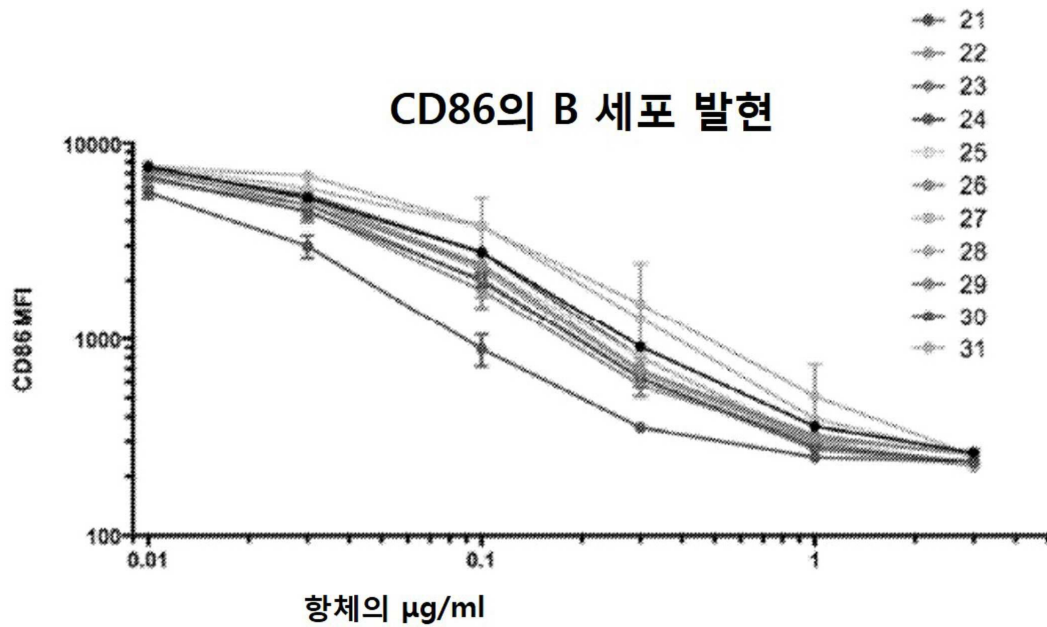


도 8a

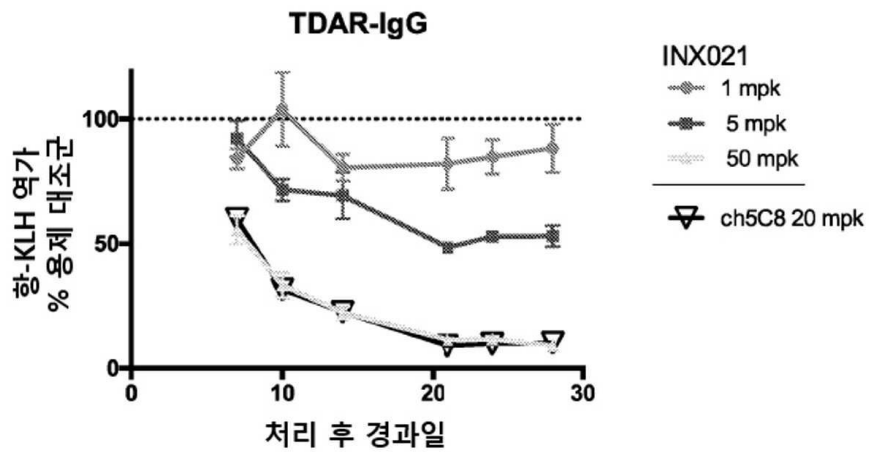


도 8b

도면9

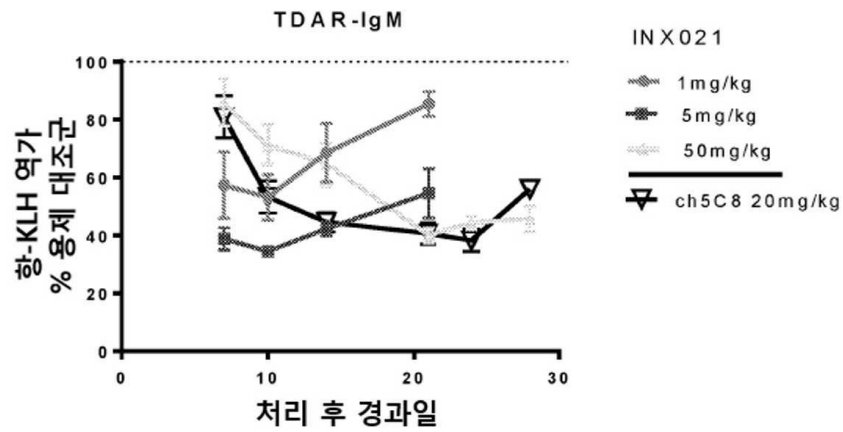


도면10a



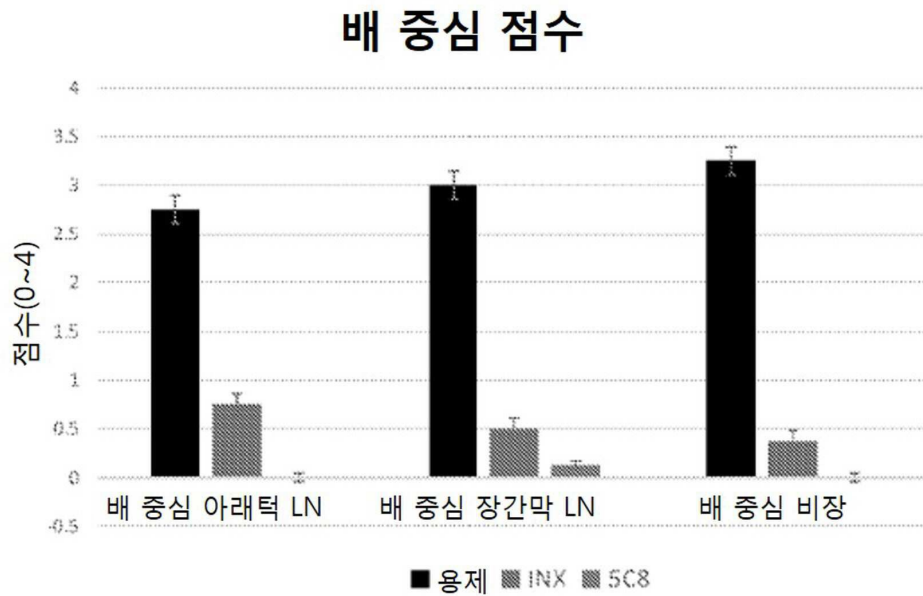
TDAR 결과: IgG TDAR을 식염수 대조군(점선)과 비교함

도면10b



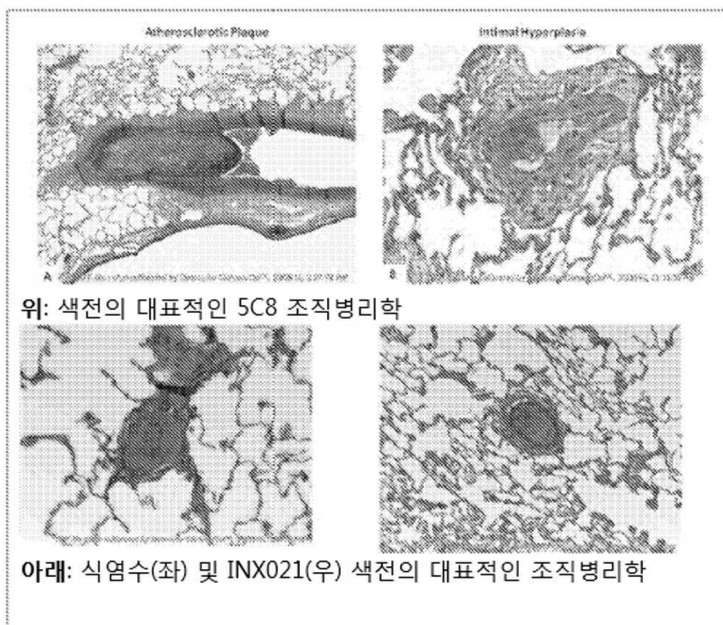
TDAR 결과: IgM TDAR을 식염수 대조군(점선)과 비교함.

도면11a



배 중심 점수(위): 처리된 동물의 비장 및 LN에서의 배 중심의 수와 세포충실성 정도

도면11b



도면12

공개된 UCB 색전 데이터와 비교한 병변 빈도 요약:

(Fc 도메인이 결합된 항-CD40L 항체, CDP7657은 혈전성 합병증 없이 CD40L 의존성 면역 반응을 억제함: 생체 내 연구 Arthritis Res Ther. 2015; 17(1): 234)

용량군	영향 받은 동물 (%)	조사된 총 폐 절편	영향 받은 폐 절편 (%)
역사적 대조군			
식염수	7 (50%)	406	2.5%
바이오젠/UCB 폐길화 Fab			
식염수	1 (25%)	116	0.9%
Peg-Fab CDP765	3 (37.5%)	203	2.0%
아글리코실 5C8	3 (37.5%)	232	1.3%
hu5C8	5 (62.5%)	232	17.6%
이뮤넥스트 INX021			
용제	2 (50%)	174	1.7%
INX021	3 (37.5%)	232	3.4%
ch5C8	6 (75%)	232	3.8%

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> ROTHSTEIN, Jay

<120> ANTI-CD154 ANTIBODY HAVING IMPROVED BINDING, FUNCTIONAL AND SAFETY CHARACTERISTICS AND USE IN HUMAN IMMUNOTHERAPY

<130> 43260.2613

<140> TBA

<141> 2016-07-13

<150> 62/192269

<151> 2015-07-14

<150> 62/197966

<151> 2015-07-28

<150> 62/277201

<151> 2016-01-11

<160> 32

<170> Patent In version 3.5

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> INX021 Variable Heavy

<400> 1

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

1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr Asn Gly

20 25 30
Phe Trp Ile Trp Ile Arg Lys Pro Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met

35 40 45
Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60
Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95
Tyr Arg Ser Tyr Gly Arg Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> INX021 Variable Light

<400> 2

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ser Asn Leu Gly His Ala
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 3

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> INX021 Constant Heavy

<400> 3

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

1 5 10 15

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

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

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

65 70 75 80

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

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

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

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

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

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

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

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> INX021 Constant Light

<400> 4

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

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

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

100 105
 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 5
 Gly Asp Ser Ile Thr Asn Gly Phe Trp Ile

1 5 10
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 6
 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr

1 5
 <210> 7
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 7
 Tyr Arg Ser Tyr Gly Arg Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Lys Ala Ser Ser Asn Leu Gly His Ala Val Ala

1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 11

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 12

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IDEC-131

<400> 12

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

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

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

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 13

<211> 330

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

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

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

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

35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Arg Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 14
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Constant Heavy-Chain Sequence Consensus Sequence
 <400> 14
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

 210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

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

<210> 15

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IDEC-131 Variable Heavy-Chain Sequence

<400> 15

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

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

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

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr Asn Gly

20

25

30

Phe Trp Ile Trp Ile Arg Lys Pro Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met

35

40

45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Tyr Arg Ser Tyr Gly Arg Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 18

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy-chain sequence consensus

<400> 18

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

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr Asn Gly

20 25 30
Phe Trp Ile Trp Ile Arg Lys Pro Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
35 40 45
Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60
Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Tyr Arg Ser Tyr Gly Arg Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

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

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

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IDEC_AB2-IMX variable light chain sequence

<400> 20

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Ile Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light-chain sequence 30

<400> 21

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly His Ser Leu Gly Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light-chain sequence 25

<400> 22

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Leu Asn His Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light-chain sequence 22

<400> 23

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ser Asn Leu Gly Asn Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light-chain sequence 21

<400> 24

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ser Asn Leu Gly His Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light-chain sequence 28

<400> 25

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Pro Ser Ser Leu Gly His Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light-chain sequence 23

<400> 26

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Gly Ser Ser Pro Leu Gly His Ala
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Variable light-chain sequence 31

<400> 27

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Asn Gln Pro Leu Gly His Ala
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light-chain sequence 29

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light-chain sequence 27

<400> 29

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln His Leu Gly His Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light-chain sequence 26

<400> 30

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln His Leu Gly Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light-chain sequence 24

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light-chain sequence consensus

<400> 32

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Leu Gly His Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105