



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년02월22일
(11) 등록번호 10-1235484
(24) 등록일자 2013년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7025644
(22) 출원일자(국제) 2006년04월05일
심사청구일자 2011년03월31일
(85) 번역문제출일자 2007년11월05일
(65) 공개번호 10-2007-0119728
(43) 공개일자 2007년12월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/012648
(87) 국제공개번호 WO 2006/108035
국제공개일자 2006년10월12일
(30) 우선권주장
60/668,774 2005년04월06일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2003088991 A1
전체 청구항 수 : 총 25 항

(73) 특허권자
브리스틀-마이어스 스쿼프 컴퍼니
미합중국 뉴저지주 08540 프린스턴 루트 206 앤드
프로빈스 라인 로드
(72) 발명자
해거티, 데이비드
미국 08534 뉴저지주 펜닝톤 노바디어 드라이브 3
러스넥, 제임스
미국 18940 펜실베이니아주 뉴타운 파인빌 로드 640
(74) 대리인
이귀동, 양영준

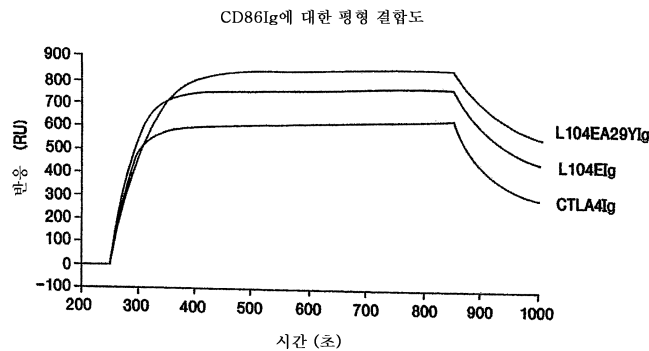
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 **가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 이용하여 이식편이식과 연관된 면역 장애를 치료하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료하는데 있어서의, 야생형 CTLA4 또는 돌연변이되지 않은 CTLA4Ig 보다 더 큰 결합 친화력으로 CD80 및/또는 CD86 항원과 결합하는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자의 용도를 제공한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

위치 26에서의 알라닌 또는 위치 27에서의 메티오닌으로 시작하고 위치 150에서의 아스파르트산으로 종결되는 서열 8에 제시된 CTLA4의 세포외 도메인에서 위치 55에서의 알라닌은 티로신으로 치환되고, 위치 130에서의 루이신은 글루탐산으로 치환된 세포외 도메인을 갖는 CTLA4 돌연변이체 분자의 유효 용량을 포함하며, 상기 CTLA4 돌연변이체 분자는 초기 단계 레지멘을 포함하는 투여 레지멘 (administration regimen)으로 투여되고, 이러한 초기 단계 레지멘은 이식 후 처음 3 내지 6개월 내이고 1일째, 2주차 방문, 4주차 방문, 8주차 방문 및 12주차 방문에 투여하는 것을 포함하며, 상기 투여 레지멘은 유지 단계 레지멘을 추가로 포함하고, 이러한 유지 단계 레지멘은 초기 단계 레지멘이 끝난 후에 시작하고 매달 1회보다 더 빈번하지 않은 CTLA4 돌연변이체 분자의 투여를 포함하는 것인, 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 2

(a) 위치 27에서의 메티오닌으로 시작하고 위치 150에서의 아스파르트산으로 종결되는 서열 4의 아미노산 서열; 또는

(b) 위치 26에서의 알라닌으로 시작하고 위치 150에서의 아스파르트산으로 종결되는 서열 4의 아미노산 서열을 갖는 CTLA4 돌연변이체 분자의 유효 용량을 포함하며, 여기서 상기 CTLA4 돌연변이체 분자는 초기 단계 레지멘을 포함하는 투여 레지멘으로 투여되고, 이러한 초기 단계 레지멘은 이식 후 처음 3 내지 6개월 내이고 1일째, 2주차 방문, 4주차 방문, 8주차 방문 및 12주차 방문에 투여하는 것을 포함하며, 상기 투여 레지멘은 유지 단계 레지멘을 추가로 포함하고, 이러한 유지 단계 레지멘은 초기 단계 레지멘이 끝난 후에 시작하고 매달 1회보다 더 빈번하지 않은 CTLA4 돌연변이체 분자의 투여를 포함하는 것인, 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 초기 단계 투여 레지멘이 5일째에 CTLA4 돌연변이체 분자를 투여하는 것을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 초기 단계 투여 레지멘이 6주차 방문, 10주차 방문, 4개월차 방문, 5개월차 방문 및 6개월차 방문에 CTLA4 돌연변이체 분자를 투여하는 것을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 초기 단계 동안 CTLA4 돌연변이체 분자의 유효 용량이 10 mg/대상체 체중 kg인 제약 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 유지 단계 동안 CTLA4 돌연변이체 분자의 유효 용량이 5 mg/체중 kg인 제약 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, CTLA4 돌연변이체 분자의 유효 용량이 1, 15, 29, 57, 85일째에 투여하는 것을 포함하는 투여 레지멘으로 10 mg/대상체 체중 kg 및 그후에 매달 5 mg/대상체 체중 kg인 제약 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, CTLA4 돌연변이체 분자의 유효 용량이 1, 5, 15, 29, 57, 85일째에 투여하는 것을 포함하는 투여 레지멘으로 10 mg/대상체 체중 kg 및 그후에 매달 5 mg/대상체 체중 kg인 제약 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, CTLA4 돌연변이체 분자의 유효 용량이 1, 5, 15, 29, 43, 57, 71, 85, 113, 141, 169일째에 투여하는 것을 포함하는 투여 레지멘으로 10 mg/대상체 체중 kg 및 그후에 매달 5 mg/대상체 체중 kg

인 제약 조성물.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 이식편 이식과 연관된 면역 장애가 고정 장기, 조직 및 세포 이식 거부로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 이식편 이식과 연관된 면역 장애가 신장 이식 거부를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, CTLA4 돌연변이체 분자가 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자의 용해도, 친화도 또는 원자가 중 하나 이상을 변경시키는 아미노산 서열을 추가로 갖는 것인 제약 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 용해도, 친화도 또는 원자가 중 하나 이상을 변경시키는 아미노산 서열이 면역글로불린 부분을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 면역글로불린 부분이 면역글로불린 불변 영역인 제약 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 면역글로불린 불변 영역이 돌연변이되어 이펙터 기능이 저하되는 것인 제약 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 면역글로불린 불변 영역이 인간 또는 원숭이 면역글로불린 분자의 힌지, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서, 면역글로불린 불변 영역이 인간 또는 원숭이 면역글로불린 분자의 힌지, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 18

제13항에 있어서, 면역글로불린이 서열 4에 제시된, 위치 +152에서의 글루탐산으로 시작하고 위치 +383에서의 리신으로 종결되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 19

제1항 또는 제2항에 있어서, 연결부 아미노산 잔기와 면역글로불린을 추가로 갖고, 이러한 연결부 아미노산 잔기는 서열 8의 세포외 도메인 또는 서열 4의 아미노산 서열에서 위치 +150에서의 아스파르트산으로 종결되는 아미노산 서열과 면역글로불린 사이에 위치하는 것인 제약 조성물.

청구항 20

제1항 또는 제2항에 있어서, CTLA4 돌연변이체 분자가 바실릭시마브, 다클리주마브, 항흉선세포 글로불린, 시클로스포린, 타크롤리무스, 미코페놀레이트 모페틸 (MMF), 미코페놀산, 아자티오프린, 무로모나브, 리툭시마브, 시클리무스, 에베롤리무스, 핑글리모드, Jak-3, 베타메타손, 부데소니드, 코르티솔, 코르티손, 텍사메타손, 히드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손 및 트리암시놀론으로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상의 작용제와 함께 공동-투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 21

제1항 또는 제2항에 있어서, 만성 동종이식편 신병증 (CAN), 고지질혈증, 고혈압, 당뇨병, 다모증, 탈모증, 치

은 증식증, 떨림, 신독성 및 골 손실로 이루어진 군 중에서 선택된 결과의 발생 또는 진행, 또는 발생 및 진행 둘 다를 저하시키기 위한 제약 조성물.

청구항 22

제1항 또는 제2항에 있어서, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 CTLA4 돌연변이체 분자의 표적 최저 혈청 농도를 추가로 포함하는 제약 조성물.

청구항 23

(a) 위치 27에서의 메티오닌으로 시작하고 위치 +357에서의 리신 또는 위치 +356에서의 글리신으로 종결되는 도 7의 아미노산 서열; 또는

(b) 위치 26에서의 알라닌으로 시작하고 위치 +357에서의 리신 또는 위치 +356에서의 글리신으로 종결되는 도 7의 아미노산 서열

을 갖는 CTLA4 돌연변이체 분자의 유효 용량을 포함하며, 여기서 상기 CTLA4 돌연변이체 분자는 초기 단계 레지멘을 포함하는 투여 레지멘으로 투여되고, 이러한 초기 단계 레지멘은 이식 후 처음 3 내지 6개월 내이고 1일제, 2주차 방문, 4주차 방문, 8주차 방문 및 12주차 방문에 투여하는 것을 포함하며, 상기 투여 레지멘은 유지 단계 레지멘을 추가로 포함하고, 이러한 유지 단계 레지멘은 초기 단계 레지멘이 끝난 후에 시작하고 매달 1회보다 더 빈번하지 않은 CTLA4 돌연변이체 분자의 투여를 포함하는 것인, 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 24

제1항, 제2항 및 제23항 중 어느 한 항에 있어서, CTLA4 돌연변이체 분자가 바실릭시마브 및 MMF를 포함하는 작용제와 동시에 또는 순차적으로 공동-투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 25

제1항, 제2항 및 제23항 중 어느 한 항에 있어서, CTLA4 돌연변이체 분자가 다클리주마브 및 시롤리무스를 포함하는 작용제와 동시에 또는 순차적으로 공동-투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

명세서

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 표제 35 § 119(e) 하에, 2005년 4월 6일자로 출원된 미국 가특허원 제60/668,774호 (이의 전문이 본원에 참고로 도입된다)를 우선권으로 청구하고 있다.

[0003] 본 출원 전반에 걸쳐 각종 공개 문헌이 참고된다. 이들 공개 문헌의 전문을 본원에 참고로 도입하여, 본 발명이 속하는 분야의 기술 상태를 보다 상세하게 기술하고자 한다.

기술 분야

[0004] 본 발명은 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료하는데 있어서의, 야생형 CTLA4과 비교해서 CD80 (B7-1) 및 CD86 (B7-2)에 대한 결합 친화력이 증가된 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 이식조직 거부에 있어서 T-세포가 중추적인 역할을 한다면, 현재 시술되고 있는 면역억제 요법들의 공통적인 목

표는 T-세포 활성화와 기능을 차단시키는 것이다 [참고: Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998;338(25):1813-21]. T-세포를 완전히 활성화시키기 위해서는 항원-특이적 신호 (신호 1)와 공동-자극성 신호 (신호 2) 둘 다 필요하다 [참고: Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233-58]. 가장 잘 성상 확인된 공동-자극성 경로 중의 하나는 CD28-CD80/86 (B7-1/2) 상호 작용과 관련이 있다 [참고: Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 1993;11:191-212]. 세포독성 T-림프구 항원 4 (CTLA4)는 CD28 보다 더 높은 결합 친화력으로 CD80/86과 결합하고, 활성화 후에 T-세포 상에 일시적으로 발현되는데, 여기서 상기 항원은 CD28과 CD80/86 간의 상호 작용을 차단시킨다 [참고: Oosterwegel MA, Greenwald RJ, Mandelbrot DA, Lorschach RB, Sharpe AH. CTLA-4 and T cell activation. *Curr Opin Immunol* 1999;11(3):294-300]. 이로써 T-세포 활성화에 대한 음성 피드백 신호가 창출된다.

[0006] 이러한 경로에 있어서의 개입은 기존에 CTLA4Ig를 사용하여 수행하여 왔다. CTLA4Ig는 T-세포 매개된 자가면역 질환, 예를 들어 류마티스성 관절염 [참고: Kremer JM, Westhovens R, Leon M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N Engl J Med* 2003;349(20):1907-15] 및 건선 [참고: Abrams JR, Lebwohl MG, Guzzo CA, et al. CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. *J Clin Invest* 1999;103(9):1243-52]을 치료하기 위한 전략으로서 성공적으로 사용되었다.

[0007] LEA29Y가 비-인간 영장류 이식조직 모델에서 단독으로 그리고 기타 면역억제제와 병용해서 연구되었다. 문헌 [참고: Christian Larsen et al (C. Larsen, T. Pearson, A. Adams, P. Tso, N. Shirasugi, E. Strobert, D. Anderson, S. Cowan, K. Price, J. Naemura, J. Emswiler, J. Greene, L.A. Turk, J. Bajorath, R. Townsend, D. Hagerty, P. Linsley and R. Peach; Rational Development of LEA29Y (belatacept), a High-Affinity Variant of CTLA4-Ig with Potent Immunosuppressive Properties; *American Journal of Transplantation*; Vol. 5, Issue 3, March 2005, p.443]에는, 신장 동종이식편 거부를 연구하기 위해 활용된 비-인간 영장류 모델에서 CTLA4-Ig와 비교해서 LEA29Y의 증강된 면역억제 활성이 보고되었다. LEA29Y는 수술 동안 (10 mg/kg 정맥내), 수술 후 4일째 (15 mg/kg) 및 수술 후 14, 28, 42, 56 및 70일째에 투여하였다 (20 mg/kg 정맥내). CTLA4Ig (16 mg/kg)은 수술 동안 및 수술 후 4, 8, 11 및 16일째에 투여하였다. 치료 레지멘 (regimen)에는 또한, MMF (15 mg/kg, 0 내지 14일째에는 1일 2회 피하 투여하고, 15 내지 180일째에는 1일 1회 투여함), 메틸 프레드니솔론 (다음 스케줄에 따라서 피하 주사한다: 0일째: 20 mg, 1일째: 16 mg, 3일째: 8 mg, 4일째: 4 mg, 5 내지 14일째: 3 mg, 15 내지 180일째: 1 mg) 및 바실릭시마브 (0.3 gm/kg, 0일 및 4일째에 정맥내 투여함)이 포함되었다. LEA29Y로 치료받은 신장 동종이식편 수용자의 생존률은 필적하는 혈청 농도에도 불구하고 CTLA4-Ig로 치료받은 치료군의 생존률 보다 명백하게 높았다. 알부민으로 치료받은 대조군 수용자는 CTLA4-Ig으로 치료받은 군과 유사한 평균 생존시간을 나타내었다. 그러나, LEA29Y를 이용한 치료가 진행되고 있음에도 불구하고, 모든 수용자는 신장 기능이 상당히 저하되었다 (혈청 크레아티닌 상승).

[0008] 문헌 [참고: Andrew Adams et al., A. Adams, N. Shirasugi, T. Jones, M. Durham, E. Strobert, S. Cowan, P. Rees, R. Hendrix, K. Price, N. Kenyon, D. Hagerty, R. Townsend, D. Hollenbaugh, T. Pearson and C. Larsen; Development of a Chimeric Anti-CD40 Monoclonal Antibody That Synergizes with LEA29Y to Prolong Islet Allograft Survival; *The Journal of Immunology*; Jan 2005; 174; p. 542]에는 LEA29Y와 Chi220 (키메라 항-인간 CD40 mab)의 조합물이 비-인간 영장류 췌장섬 이식 모델에서 상승적으로 작용하여 동종이식편 생존을 연장시켰다고 보고되었다. LEA29Y는 수술 동안 (20 mg/kg); 수술 후 4, 7 및 14일째; 이어서, 100일째까지 2주 마다 정맥내 투여하였다. 부가 용량 (20 mg/kg)을 6개월 동안 매달 1회 투여하였다. 4가지 프로토콜을 시험하였다: 1) LEA29Y 단독, 2) Chi220 (항-CD40), 3) LEA29Y를 Chi220과 병용함, 및 4) LEA29Y를 항-CD20과 병용함.

[0009] 문헌 [참고: Andrew Adams et al., A. Adams, N. Shirasugi, M. Durham, E. Strobert, D. Anderson, P. Rees, S. Cowan, H. Xu, Y. Blinder, M. Cheung, D. Hollenbaugh, N. Kenyon, T. Pearson and C. Larsen; Calcineurin Inhibitor-Free CD28 Blockade-Based Protocol Protects Allogeneic Islets in Nonhuman Primates; *Diabetes*, Vol. 51(2), February 2002, p. 265]에는 LEA29Y, 라파마이신 (rapamycin), 및 항-IL-2R mAb의 조합물이 비-인간 영장류 췌장섬 이식 모델에서 섬 동종이식편 생존을 상당히 연장시켰다고 보고되었다. LEA29Y는 수술 동안 (10 mg/kg) 그리고 수술 후 4일째에 (15 mg/kg) 정맥내 투여하였다. 부가 용량 20 mg/kg 을 수술 후 14일째에 그리고 수술 후 154일째까지 2주 마다 투여하였다.

- [0010] 2003년 동안 25,000개를 초과하는 장기가 미국에서 이식되었다. 신장 이식은 고품질 장기 이식조직의 대략 60%를 차지하였고, 그 다음으로는 간 이식이 21%, 심장 이식이 8%, 폐 이식이 4%를 차지하였으며, 나머지 7%는 췌장 및 소장과 같은 기타 장기 이식을 나타내었다 [참고: OPTN/SRTR Annual Report 2004 at www.optn.org].
- [0011] 신장 이식은 말기 신 질환에 가장 유효한 치료법이다. 이는 생존률과 삶의 질 (QoL)을 개선시켜 준다. 기능성 신장 이식조직을 유지하기 위해서는, 해당 이식편의 면역 파괴를 예방하기 위한 평생의 면역억제 요법이 요구된다. 현 면역억제 레지멘을 이용하게 되면, 사체 공여자 이식편의 경우에는 1년 생존률이 89%이고 생체-공여자 이식편의 경우에는 1년 생존률이 94%이다. 그러나, 시간이 경과함에 따라 대상체와 이식편 둘 다의 생존률은 점차적으로 감소한다. 사체 및 생체-관련 공여자 신장 이식조직에 대한 5년 생존률은 각각 66% 및 79%이다 [참고: United Network for Organ Sharing Renal Transplant Registry 2003 at www.unos.org].
- [0012] 장기간에 걸친 대상체 및 이식편 손실의 가장 통상적인 원인은 각각 심혈관계 질환 및 만성 동종이식편 신병증 (CAN)이다 [참고: L.C. Paul, Chronic allograft nephropathy - A model of impaired repair from injury? Nephrol Dial Transplant 2000; 15:149-151]. 역설적으로 말하면, 신장 이식에 대한 주요 요법인 칼시네우린 억제제 (CNI), CsA 및 타크롤리무스 (tacrolimus)는 장기간에 걸친 동종이식편 손실과 대상체 사망에 직접 일조하는데, 이는 이들 요법이 본질적으로 신독성이고 심혈관계 위험 (고혈압, 고콜레스테롤혈증 및 당뇨병 포함)을 유발시키거나 악화시키기 때문이다. 그럼에도 불구하고, 이들 작용제는 신장 이식에 대한 통상적인 모든 면역억제 레지멘의 토대를 형성하고 있다.
- [0013] 현재에는, 광범위한 대상체에게서 토대가 되는 유지 면역억제 요법으로서 CNI를 대체할 수 있는 것으로 승인된 작용제가 없다. 한 가지 작용제 시롤리무스 [라파마이신, 공급처 (Wyeth/Ayerst)로부터의 Rapamune®]가 CNI-보유성 레지멘에 사용할 수 있는 것으로 승인되었다. 그러나, CNI는 이식 후 적어도 3개월 동안은 반드시 시롤리무스와 함께 사용해야만 한다. 보다 중요하게는, 시롤리무스가 이식편 손실 위험 수준이 낮거나 중간 정도인 대상체에 대해서만 상기 환경 하의 CNI-보유성 작용제로서 승인되었다. 따라서, CNI의 신독성 효과를 회피하는 것이 가장 큰 이익이 될, 이식편 손실 위험이 보다 높은 대상체에 대해서는 CNI에 대한 대체제로서 승인된 것이 없다.
- [0014] 따라서, 장기간에 걸친 대상체 사망과 이식편 손실에 일조하는 독성을 수반하지 않는 요법 실시 기준에 필적하는 동종면역 반응을 허용 가능한 수준으로 제어해줄 수 있는 면역억제제에 대한 의학적 요구가 계속해서 대두되고 있다. 이상적으로는, 이러한 작용제가 저 위험 대상체에게 유용할 뿐만 아니라 보다 고 위험의 이식편 손실 대상체에게도 유용할 것이다.
- [0015] **발명의 요약**
- [0016] 본 발명은 야생형 CTLA4 또는 돌연변이되지 않은 CTLA4Ig 보다 높은 결합 친화력으로 CD80 및/또는 CD86 항원과 결합하는 CTLA4 돌연변이체 분자를 투여함으로써, 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 CTLA4 분자는 CTLA4의 세포의 도메인을 포함하는 제1 아미노산 서열을 갖고 있는데, S25-R33 영역 및 M97-G107 영역 내의 특정의 아미노산 잔기가 돌연변이된다. 본 발명의 돌연변이체 분자는 이러한 돌연변이체 분자의 용해도를 증가시키는 제2 아미노산 서열을 포함할 수도 있다.
- [0017] CTLA4 돌연변이체 분자의 한 가지 예는 본원에 기재된 바와 같은 L104EA29 YIg (도 7, 서열 3 및 4)이다. CTLA4 돌연변이체 분자의 또 다른 예는 본원에 기재된 바와 같은 L104EIG (도 8, 서열 5 및 6)이다. L104EA29YIg 및 L104EIG는 CTLA4Ig 보다 더 열심히 CD80 및 CD86과 결합한다.
- [0018] 본 발명의 CTLA4 돌연변이체 분자를 투여하는 것은 각종 시간에 걸쳐 수행할 수 있다. 전형적으로, 투여 레지멘에는 초기 단계 (면역학적 위험이 가장 큰 기간에는 용량이 보다 많고 투여 횟수가 증가한다)에 이어 유지 단계가 포함된다. 초기 단계는 이식 후 처음 3개월 내지 6개월 동안일 수 있다. 초기 단계 동안의 투여 레지멘은 수용자/이식편의 상태에 따라서 다양할 수 있다.
- [0019] 한 양태에서, 본 발명은 위치 26에서의 알라닌 또는 위치 27에서의 메티오닌으로 시작하고 위치 150에서의 아스파르트산으로 종결되는 서열 8에 제시된 바와 같은 CTLA4의 세포의 도메인 또는 그의 일부를 수반하는 CTLA4 돌연변이체 분자의 유효 용량을 대상체에게 투여함으로써, 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 부가적으로, 상기 세포의 도메인 또는 그의 일부에서 위치 55에서의 알라닌을 티로신으로 치환시키고, 위치 130에서의 루이신을 글루탐산으로 치환시킨다. 추가로 투여 레지멘은 초기 단계 레지멘 (이러한 초기 단계 레지멘은 이식 후 처음 3 내지 6개월일 수 있다)을 포함하고, 초기에는 매달 1회 투여하는 것 보다 더 빈번

하게 투여하는 것을 포함한다.

[0020] 또 다른 양태에서, 본 발명은 위치 27에서의 메티오닌으로 시작하고 위치 150에서의 아스파르트산으로 종결되는 서열 4의 아미노산 서열을 수반하거나, 또는 위치 26에서의 알라닌으로 시작하고 위치 150에서의 아스파르트산으로 종결되는 서열 4의 아미노산 서열을 수반하는 CTLA4 돌연변이체 분자의 유효 용량을 대상체에게 투여함으로써, 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 추가로 CTLA4 돌연변이체 분자 투여 레지멘은 초기 단계 레지멘 (이러한 초기 단계 레지멘은 이식 후 처음 3 내지 6개월일 수 있다)을 포함하고, 초기에는 매달 1회 투여하는 것 보다 더 빈번하게 투여하는 것을 포함한다.

발명의 상세한 설명

[0034] 정의

[0035] 본원에 사용된 모든 과학적 및 기술적 용어들은 달리 명시되지 않는 한 당해 분야에 통상적으로 사용된 의미를 갖는다. 본원에 사용된 바와 같은 다음 단어들은 명시된 의미를 갖는다.

[0036] 본원에 사용된 바와 같은 "리간드"는 또 다른 분자를 특이적으로 인식하고 이와 결합하는 분자를 지칭하는데, 예를 들어 CTLA4에 대한 리간드는 B7 분자이다.

[0037] 본원에 사용된 바와 같은 "야생형 CTLA4" 또는 "돌연변이되지 않은 CTLA4"는 B7를 인식하고 이와 결합하거나 또는 B7를 방해하여 CD28 및/또는 CTLA4 (예를 들어, 내인성 CD28 및/또는 CTLA4)와의 결합을 차단시키는, 도 13에 제시된 바와 같은 천연 발생적, 완전한 길이의 CTLA4의 아미노산 서열 (서열 9 및 10; 또한, 미국 특허 제 5,434,131호, 제5,844,095호, 제5,851,795호에 기재된 바와 같음), 또는 그의 일부 또는 유도체를 갖는다. 특정한 양태에서, 야생형 CTLA4의 세포외 도메인은 위치 +1에서의 메티오닌으로 시작하고 위치 +124에서의 아스파르트산으로 종결되거나, 또는 야생형 CTLA4의 세포외 도메인은 위치 -1에서의 알라닌으로 시작하고 위치 +124에서의 아스파르트산으로 종결된다. 야생형 CTLA4는 N-말단 세포외 도메인, 막관통 도메인, 및 C-말단 세포질성 도메인을 갖는 세포 표면 단백질이다. 이러한 세포외 도메인은 표적 분자, 예를 들어 B7 분자와 결합한다. 특정 세포에서 천연 발생적 야생형 CTLA4 단백질은 N-말단에 신호 펩티드를 포함하는 미성숙 폴리펩티드로서 해독된다. 이러한 미성숙 폴리펩티드는 해독 후 프로세싱을 진행하는데, 이에 신호 펩티드를 절단 및 제거하여 미성숙 형태에서의 N-말단과는 상이한 새로이 생성된 N-말단을 갖는 CTLA4 절단 생성물을 생성시키는 것이 포함된다. 당업자는 새로이 생성된 CTLA4 절단 생성물의 N-말단으로부터 1개 이상의 아미노산을 제거시키는, 부가의 해독 후 프로세싱이 일어날 수 있다는 것을 인지할 것이다. 또 다른 한편, 신호 펩티드는 완전히 제거할 수 없기 때문에, 통상의 출발 아미노산 메티오닌 앞에서 시작하는 분자가 생성된다. 따라서 성숙한 CTLA4 단백질은 위치 +1에서의 메티오닌으로 시작할 수 있거나 또는 위치 -1에서의 알라닌으로 시작할 수 있다. 성숙한 형태의 CTLA4 분자는 B7과 결합하는 세포외 도메인 또는 그의 일부를 포함한다.

[0038] "CTLA4Ig"는 B7과 결합하는, Ig 미부 (tail)와 연결된 야생형 CTLA4의 세포외 도메인 또는 그의 일부를 포함하는 가용성 융합 단백질이다. 특정한 양태는 위치 +1에서의 메티오닌으로 시작하고 위치 +124에서의 아스파르트산으로 종결되거나 또는 위치 -1에서의 알라닌으로 시작하고 위치 +124에서의 아스파르트산으로 종결되는, 야생형 CTLA4의 세포외 도메인 (도 9에 제시된 바와 같은 서열 7 및 8); 위치 +125에서의 연결부 아미노산 잔기 글루탐산; 및 위치 +126에서의 글루탐산부터 위치 +357에서의 리신까지 또는 위치 +356에서의 글리신까지를 포괄하는 면역글로불린 일부를 포함한다 [CTLA4Ig를 암호화하는 DNA는 1991년 5월 31일자로, 부다페스트 조약 규정 하에 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209)에 기탁되었고, ATCC 승인 번호 ATCC 68629를 수여받았다 (참고: Linsley, P., et al, 1994 *Immunity* 1:793-80). CTLA4Ig를 발현하는 중국산 햄스터 난소 (CHO) 세포주인 CTLA4Ig-24는 1991년 5월 31일자로 ATCC 확인 번호 CRL-10762로 기탁되었다]. 가용성 CTLA4Ig 분자는 신호 (리더) 펩티드 서열을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.

[0039] 본원에 사용된 바와 같은 "융합 단백질"은 당해 분야에 널리 공지되어 있고 미국 특허 제 5,434,131호 또는 제 5,637,481호에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 함께 연결시킨 하나 이상의 아미노산 서열로서 정의된다. 이로써, 이와 같이 연결된 아미노산 서열은 하나의 융합 단백질을 형성한다.

[0040] 본원에 사용된 바와 같은 "가용성"은 세포와 결합하지 않거나 세포와 부착되지 않은, 즉 순환성인 모든 분자, 또는 그의 단편 및 유도체를 지칭한다. 예를 들어, CTLA4, B7 또는 CD28은 면역글로불린 (Ig) 부분을 CTLA4, B7 또는 CD28의 세포외 도메인에 각각 부착시킴으로써 가용성으로 만들 수 있다. 또 다른 한편, CTLA4와 같은 분자는 그의 막관통 도메인을 제거함으로써 가용성으로 만들 수 있다.

- [0041] 본원에 사용된 바와 같은 "CTLA4의 세포외 도메인"은 CTLA4 리간드, 예를 들어 B7 분자를 인식하고 이와 결합하는 CTLA4의 일부이다. 예를 들어, CTLA4의 세포외 도메인은 위치 +1에서의 메티오닌부터 위치 +124에서의 아스파르트산까지를 포함한다 (도 13, 서열 9 및 10). 또 다른 한편, CTLA4의 세포외 도메인은 위치 -1에서의 알라닌부터 위치 +124에서의 아스파르트산까지를 포함한다 (도 13, 서열 9 및 10). 이러한 세포외 도메인에는 B7 분자와 결합하는 CTLA4의 단편 또는 유도체가 포함된다. 도 13에 제시된 바와 같은 CTLA4의 세포외 도메인 (서열 9 및 10)에는 또한, B7분자에 대한 CTLA4 분자의 결합 친화력을 변화시키는 돌연변이가 포함될 수 있다.
- [0042] 본원에 사용된 바와 같은 "CTLA4 돌연변이체 분자"는 (바람직하게는 야생형 CTLA4의 세포외 도메인 내에) 특정 돌연변이물 또는 다중 돌연변이물을 갖는, 서열 9 및 10에 제시된 바와 같은 야생형 CTLA4 또는 그의 일부 또는 유도체를 의미한다. CTLA4 돌연변이체 분자는 야생형 CTLA4 분자의 서열과 유사하긴 하지만 동일하지 않으며, 여전히 B7과 결합하는 서열을 갖는다. 상기 돌연변이물에는 보존적 (예를 들어, 루이신을 이소루이신으로 치환시킴) 또는 비-보존적 (예를 들어, 글리신을 트립토판으로 치환시킴) 구조 또는 화학적 특성을 지닌 아미노산으로 치환시킨 하나 이상의 아미노산 잔기, 아미노산 결실물, 부가물, 프레임시프트 또는 절단물이 포함될 수 있다. CTLA4 돌연변이체 분자에는 그 내부에 존재하거나 그에 부착된 비-CTLA4 분자가 포함될 수도 있다. 이러한 돌연변이체 분자는 가용성이거나 (즉, 순환성) 세포 표면과 결합할 수 있다. 부가의 CTLA4 돌연변이체 분자에는 미국 특허원 제09/865,321호, 제60/214,065호 및 제60/287,576호에 기재된 분자; 미국 특허 제6,090,914호, 제5,844,095호 및 제5,773,253호에 기재된 분자; 및 문헌 [참고: Peach, R. J., et al., in *J Exp Med* 180:2049-2058 (1994)]에 기재된 바와 같은 분자가 포함된다. CTLA4 돌연변이체 분자는 합성적으로 또는 재조합적으로 만들 수 있다.
- [0043] "L104EA29YIg"는 B7 분자와 결합하고 Ig 미부와 연결된, 아미노산 변화 A29Y (위치 29에서의 알라닌을 티로신 아미노산 잔기로 대체시킴) 및 L104E (위치 +104에서의 루이신을 글루탐산 아미노산 잔기로 대체시킴)을 수반하는 야생형 CTLA4의 세포외 도메인 또는 그의 일부를 포함하는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자인 융합 단백질이다 [도 7, 서열 3 및 4에 포함됨; L104EA29YIg를 암호화하는 DNA는 2000년 6월 20일자로 ATCC 번호 PTA-2104로 기탁하였다; 본원에 참고로 도입된 미국 특허원 제09/579,927호, 제60/287,576호 및 제60/214,065호에 계류중이다]. 본 발명의 방법 및/또는 키트에 사용된 가용성 L104EA29YIg 분자는 신호 (리더) 펩티드 서열을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 방법 및/또는 키트에서는 상기 분자가 신호 펩티드 서열을 포함하지 않는다.
- [0044] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "돌연변이"는 야생형 분자의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 상의 변화, 예를 들어 야생형 CTLA4 세포외 도메인의 DNA 및/또는 아미노산 서열 상의 변화를 의미한다. DNA 상의 돌연변이는 코돈을 변화시켜 아미노산 서열 상의 변화를 유발시킬 수 있다. DNA 변화에는 치환, 결실, 삽입, 대체 스플라이싱, 또는 절단이 포함될 수 있다. 아미노산 변화에는 치환, 결실, 삽입, 부가, 절단, 또는 해당 단백질의 프로세싱 또는 절단 오차가 포함될 수 있다. 또 다른 한편, 뉴클레오티드 서열 상의 돌연변이로 인해, 당해 분야에 널리 이해되고 있는 바와 같이 아미노산 서열 상의 침묵 돌연변이가 발생할 수도 있다. 이와 관련하여, 특정의 뉴클레오티드 코돈이 동일한 아미노산을 암호화한다. 그의 예에는 아미노산 아르기닌 (R)을 암호화하는 뉴클레오티드 코돈 CGU, CGG, CGC, 및 CGA; 또는 아미노산 아스파르트산 (D)을 암호화하는 코돈 GAU, 및 GAC가 포함된다. 따라서, 특정 단백질은 그들의 특이적 뉴클레오티드 서열 면에서는 상이하지만, 동일한 서열을 갖는 단백질 분자를 여전히 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자에 의해 암호화될 수 있다. 이러한 아미노산 암호화 서열은 다음과 같다:

아미노산	부호	1 문자 부호	코돈
알라닌	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
시스테인	Cys	C	UGU, UGC
아스파르트산	Asp	D	GAU, GAC
글루탐산	Glu	E	GAA, GAG
페닐알라닌	Phe	F	UUU, UUC
글리신	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
히스티딘	His	H	CAU, CAC
이소류이신	Ile	I	AUU, AUC, AUA
리신	Lys	K	AAA, AAG
류이신	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
메티오닌	Met	M	AUG
아스파라긴	Asn	N	AAU, AAC
프롤린	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
글루타민	Gln	Q	CAA, CAG
아르기닌	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
세린	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
트레오닌	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
발린	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
트립토판	Trp	W	UGG
티로신	Tyr	Y	UAU, UAC

[0045]

[0046]

본 발명의 돌연변이체 분자는 하나 이상의 돌연변이물을 가질 수 있다.

[0047]

본원에 사용된 바와 같은 "비-CTLA4 단백질 서열" 또는 "비-CTLA4 분자"는 B7과 결합하지 않고 CTLA4가 그의 표적과 결합하는 것을 방해하지 않는 모든 단백질 분자를 의미한다. 그의 예에는 면역글로불린 (Ig) 불변 영역 또는 그의 일부가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, Ig 불변 영역이 인간 또는 원숭이 Ig 불변 영역, 예를 들어 인간 C(감마)1 (힌지, CH2 및 CH3 영역 포함)이다. Ig 불변 영역을 돌연변이시켜 그의 이펙터 기능을 저하시킬 수 있다 [참고: 미국 특허 제5,637,481호, 제5,844,095호 및 제5,434,131호].

[0048]

본원에 사용된 바와 같은 "단편" 또는 "부분 (일부)"는 그의 표적 (예를 들어, B7 분자)를 인식하고 이와 결합하는, CTLA4 분자의 일부 또는 절편, 바람직하게는 CTLA4의 세포의 도메인 또는 그의 일부 또는 절편이다. CTLA4의 세포의 도메인에는 B7 분자에 대한 CTLA4 분자의 결합 친화력을 변화시키는 돌연변이가 포함될 수 있다.

[0049]

본원에 사용된 바와 같은 "B7"은 CTLA4 및/또는 CD28을 인식하고 이와 결합할 수 있는 B7 계열 분자, 예를 들어 B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) 및 B7-3 등을 지칭한다.

[0050]

본원에 사용된 바와 같은 "B7-양성 세포"는 세포 표면 상에 발현된 한 가지 이상 유형의 B7 분자를 수반한 모든 세포이다.

[0051]

본원에 사용된 바와 같은 "유도체"는 그의 모 분자의 서열 상동성과 활성을 공유하고 있는 분자이다. 예를 들어, CTLA4의 유도체에는 야생형 CTLA4의 세포의 도메인과의 아미노산 서열 유사율이 70% 이상이고, B7을 인식하고 이와 결합하는 가용성 CTLA4 분자, 예를 들어 CTLA4Ig 또는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자 L104EA29YIg가 포함된다.

[0052]

본원에 사용된 바와 같은, 면역 반응을 "조절한다"는 것은 이러한 면역 반응을 활성화, 자극, 상향 조절, 억제, 차단, 하향 조절 또는 변형시킨다는 것이다. 본원에 기재된 자가면역 질환은 면역 반응을 조절함으로써, 예를 들어 B7-양성 세포와의 기능적 CTLA4- 및/또는 CD28-양성 세포 상호 작용을 조절함으로써 치료할 수 있다. 예를 들어, 면역 반응을 조절하는 방법은 B7-양성 세포를 본 발명의 가용성 CTLA4 분자와 접촉시켜 가용성 CTLA4/B7 복합체를 형성시키는 것을 포함하는데, 이러한 가용성 CTLA4 분자는 내인성 CTLA4 및/또는 CD28 분자와 상기 B7 분자와의 반응을 방해한다.

[0053]

본원에 사용된 바와 같은, 특정 수용체, 신호 또는 분자를 "차단" 또는 "억제"한다는 것은 당해 분야에 인식되고 있는 시험에 의해 탐지된 바와 같이, 상기 수용체, 신호 또는 분자의 활성화를 방해하는 것을 의미한다. 차단 또는 억제는 부분적이거나 전체적일 수 있다. 예를 들어, 세포-매개된 면역 반응의 차단은 이식조직의 기능성을 결정함으로써, 예를 들어 신장 이식 후 혈청 크레아티닌 농도를 결정함으로써 탐지할 수 있다.

[0054]

본원에 사용된 바와 같은 "B7 상호 작용을 차단시키는" 것이란 B7이 그의 리간드, 예를 들어 CD28 및/또는 CTLA4와 결합하는 것을 방해함으로써, T-세포와 B7-양성 세포 상호 작용을 폐쇄시키는 것을 의미한다. B7 상호 작용을 차단시키는 작용제의 예에는 CTLA4, CD28 또는 B7 분자 (예: B7-1, B7-2)를 인식하고 이와 결합하는 분자, 예를 들어 항체 (또는 그의 일부 또는 유도체); 이러한 분자의 가용성 형태 (또는 그의 일부 또는 유도체),

예를 들어 가용성 CTLA4; CTLA4/CD28/B7-매개된 상호 작용을 통하여 세포 신호를 방해하도록 설계된 펩티드 단편 또는 기타 소분자가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 바람직한 양태에서, 차단제는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자, 예를 들어 L104EA29YIg (ATCC PTA-2104)이다.

[0055] 본원에 사용된 바와 같은 특정 장애 또는 질병을 "치료" 또는 "치료하는" 것이란, 특정 질병 또는 장애를 약물에 의해 또는 기타 요법에 의해 관리하는 것을 의미한다. 질병 또는 장애의 치료는 질병과 연관된 면역-매개성 사건을 저해할 수 있고/있거나, 질병 또는 장애의 증상을 개선시킬 수 있고/있거나, 질병 또는 장애의 중증도를 저하시킬 수 있고/있거나, 질병 또는 장애 진행 과정을 변경시킬 수 있고/있거나 기본 질병 또는 장애 문제를 개선 또는 치유할 수 있다. 예를 들어, 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료하는 것은 면역 반응을 조절함으로써, 예를 들어 B7-양성 세포와의 기능적 CTLA4- 및/또는 CD28-양성 세포 상호 작용을 조절함으로써 달성할 수 있다. 또 다른 한편, 면역 질환 또는 장애를 치료하는 것은 본원에 기재된 조성물을 사용하여, 발생하였거나 진행되고 있는 질병 또는 장애를 예방하거나 억제함으로써 달성할 수 있다. 예를 들어, 신장 이식조직 거부를 치료하는 것에는 사구체 여과율 (GFR)으로써 측정된 바와 같이 신장 이식조직 거부를 억제하는 것이 포함된다. 예를 들어, 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료하는 것에는 L104EA29YIg를 투여함으로써 장기 거부를 예방하는 것이 포함된다. 추가로, 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료하는 것은 숙주와 이식된 장기의 생존을 연장시킬 수 있다.

[0056] 본원에 사용된 바와 같은 "면역계 질환"에는 T-세포와 B7-양성 세포의 상호 작용에 의해 매개된 모든 질환이 포함되는데, 이에 자가면역 질환, 면역증식성 질환, 및 이식편 이식과 연관된 면역 장애가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

[0057] 본원에 사용된 바와 같은 "이식편 이식과 연관된 면역 장애"는 T-세포와 B7-양성 세포의 상호 작용에 의해 매개된 모든 이식조직 관련 질환을 의미하는데, 이에 이식편 이식 거부와 연관된 면역 장애, 이식편 관련 장애, 이식편 대 숙주 질병 (GVHD) (예를 들어, 골수 이식으로부터 비롯될 수 있거나, 또는 내성 유도를 야기시킬 수 있다), 이식편 또는 이식조직의 거부 (이식편 또는 이식조직의 급성 거부 및 이식편 또는 이식조직의 만성 거부 포함)가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 이식편은 고행 장기 동종이식편 또는 이종이식편, 조직 또는 세포 동종이식편 또는 이종이식편 또는 외부 생체구조 동종이식편 또는 이종이식편일 수 있는데, 이에 피부, 섬 세포 (섬으로서 공지되기도 함), 근육, 간세포, 신경세포, 심장, 간, 신장, 폐, 부속기, 사지, 코, 귀 또는 안면이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

[0058] 본원에 사용된 바와 같은 면역증식성 질환에는 T 세포 림프증; T 세포 급성 림프아구성 백혈병; 교환 혈관중심성 T 세포 림프증; 및 양성 림프구성 혈관염이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

[0059] 본원에 사용된 바와 같은 자가면역 질환에는 루푸스 (예: 홍반성 루푸스, 루푸스 신염), 건선; 하시모토 (Hashimoto) 갑상선염, 원발성 점액부종, 그레이브병 (Graves' disease), 악성 빈혈, 자가면역성 위축성 위염, 애디슨병 (Addison's disease), 당뇨병 (예: 인슐린 의존성 당뇨병, 유형 I 당뇨병, 유형 II 당뇨병), 구드패스츄어 (goodpasture) 증후군, 중증 근무력증, 천포창, 크론병 (Crohn's disease), 염증성 장 질환 (IBD), 교감성 안염, 자가면역성 포도막염, 다발성 경화증, 자가면역성 용혈성 빈혈, 특발성 혈소판감소증, 원발성 담즙성 간경변, 만성 활동성 간염, 췌양성 결장염, 쇼그렌 증후군 (Sjogren's syndrome), 류마티스 질환 (예: 류마티스성 관절염, 건선성 관절염), 다발성 근염, 피부 경화증, 및 혼합 결체 조직 질환이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

[0060] 본원에 기재된 본 발명을 보다 잘 이해할 수 있도록 하기 위해, 다음의 설명이 제시된다.

[0061] **본 발명의 조성물 및 방법**

[0062] 본 발명은 이식에 대한 신규한 부류의 면역억제 요법을 제공한다. 이는 T-세포 활성화를 위해 필요한 공-자극을 억제하는 항원 제시 세포 (APCs)의 표면 상에서 B7 분자와 결합하는 융합 단백질이다. 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 그의 분자상 표적의 분포도가 제한되고 그의 효과 특이성 측면에서 기존의 면역억제제와 상이하다. 본 발명은 CD80 및/또는 CD86을 인식하고 이와 결합하는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 제공한다. 몇몇 양태에서, 이러한 가용성 CTLA4 돌연변이체는 CD80 및/또는 CD86에 대한 결합 친화력이 CTLA4Ig 보다 더 높다. 예를 들어, L104EA29YIg는 야생형 CTLA4Ig (본원에서 CTLA4Ig로서 후술됨) 보다 대략 2배 정도 더 열심히 CD80과 결합하고, 대략 4배 정도 더 열심히 CD86과 결합한다. 이러한 보다 강력한 결합으로 인해, L104EA29YIg는 면역 반응을 차단시키는데 있어서 CTLA4Ig 보다 더 유효하다.

[0063] 본 발명의 한 양태는 면역계 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 본원에 기재된 가용성 CTLA4 돌

면연이체 분자를 포함하는 치료 조성물을, 면역계 질환과 연관된 증상들 중의 한 가지 이상을 경감시키는데 유효한 양으로 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 부가적으로, 본원에 기재된 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 T-세포/B7-양성 세포 상호 작용을 차단시킴으로써, 공-자극성 신호에 의한 T-세포 활성화/자극, 예를 들어 CD28 에 대한 B7 결합을 차단시켜 T-세포 아네르기 (무반응: anergy) 또는 내성을 유도시킴으로써 면역계 질환에 대한 장기간 요법을 제공할 수 있다. 면역계 질환에는 자가면역 질환, 면역중식성 질환, 및 상기 논의된 이식편 이식과 연관된 면역 장애가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

[0064] 또 다른 양태는 본원에 기재된 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 포함하는 치료 조성물을 투여함으로써, 이식편 이식과 연관된 면역 장애가 있는 대상체에게서 내성을 유도하는 방법을 제공한다.

[0065] 본원에 기재된 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 생체 내에서 억제 특성을 나타낸다. T-세포/B7-양성 세포 상호 작용, 예를 들어 T 세포/B 세포 상호 작용이 T 세포와 B7-양성 세포 간의 접촉에 따른 결과로서 발생하는 조건 하에서는, 반응하기 위해 도입된 CTLA4 돌연변이체 분자가 B7-양성 세포 (예: B 세포)와 결합하는 것이 T-세포/B7-양성 세포 상호 작용을 방해, 즉 억제할 수 있어 면역 반응을 조절시켜 준다.

[0066] 또 다른 양태는 면역 반응을 조절하는 방법을 제공한다. 본원에 기재된 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자에 의해 하향 조절된 (저하된) 면역 반응은 이미 진행하고 있는 면역 반응을 억제 또는 차단시키는 방식일 수 있거나, 또는 면역 반응 유도를 방지시키는 것을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 T 세포 반응을 저해하거나 T 세포에서 특이적 내성을 유도시킴으로써, 또는 이들 둘 다에 의해, 활성화 T 세포의 기능, 예를 들어 T 림프구 증식, 사이토킨 분비 및/또는 사이토킨 생성을 억제할 수 있다. 추가로, CTLA4/CD28/B7 경로를 방해하는 본원에 기재된 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 T-세포 증식 및/또는 사이토킨 분비를 억제할 수 있으므로, 조직 파괴가 저하되고 T 세포 무반응 또는 아네르기가 유도된다.

[0067] CTLA4 돌연변이체 분자는 CD80 및/또는 CD86과 결합하는, 적어도 CTLA4의 세포의 도메인 또는 그의 일부를 포함한다. CTLA4 돌연변이체 분자의 세포의 부분은 위치 +1에서의 메티오닌부터 위치 +124에서의 아스파르트산까지의 아미노산 서열을 포함한다 (도 7, 서열 3 및 4; 또는 도 8, 서열 5 및 6). 또 다른 한편, CTLA4의 세포의 부분은 위치 -1에서의 알라닌부터 위치 +124에서의 아스파르트산까지의 아미노산 서열을 포함할 수 있다 (도 7, 서열 3 및 4; 또는 도 8, 서열 5 및 6).

[0068] 한 양태에서, 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 위치 +25에서의 세린으로 시작하여 위치 +33에서의 아르기닌으로 종결되는 아미노산 서열 영역 (S25-R33) 내에 하나 이상의 돌연변이를 나타내는 CTLA4의 세포의 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 예를 들어, 야생형 CTLA4의 위치 +29에서의 알라닌을 티로신 (코돈: UAU, UAC)으로 치환시킬 수 있다. 또 다른 한편, 알라닌을 루이신 (코돈: UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG), 페닐알라닌 (코돈: UUU, UUC), 트립토판 (코돈: UGG), 또는 트레오닌 (코돈: ACU, ACC, ACA, ACG)으로 치환시킬 수 있다. 당업자가 용이하게 이해하는 바와 같이, RNA 서열의 우라실 (U) 뉴클레오티드는 DNA 서열의 티민 (T) 뉴클레오티드에 상응한다.

[0069] 또 다른 양태에서, 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 위치 +97에서의 메티오닌으로 시작하여 위치 +107에서의 글리신으로 종결되는 아미노산 서열 영역 (M97-G107) 내에 또는 근처에 하나 이상의 돌연변이를 나타내는 CTLA4의 세포의 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 예를 들어, 야생형 CTLA4의 위치 +104에서의 루이신을 글루탐산 (코돈: GAA, GAG)으로 치환시킬 수 있다. 이러한 치환을 수반한 CTLA4 돌연변이체 분자는 본원에서 L104EIG로서 지칭된다 (도 8, 서열 5 및 6).

[0070] 또 다른 양태에서, 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 S25-R33 및 M97-G107 영역 내에 하나 이상의 돌연변이를 나타내는 CTLA4의 세포의 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 예를 들어, 한 양태에서 CTLA4 돌연변이체 분자는 위치 +29에서 알라닌 대신 티로신을 포함하고; 위치 +104에서 루이신 대신 글루탐산을 포함한다. 이들 치환을 수반하는 CTLA4 돌연변이체 분자는 본원에서 L104EA29YIG로서 지칭된다 (도 7, 서열 3 및 4). L104EA29YIG를 암호화하는 핵산 분자가 pD16 L104EA29YIG에 함유되고, 이는 2000년 6월 19일자로 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209)에 기탁되었다 (ATCC No. PTA-2104). pD16 L104EA29YIG 벡터는 pcDNA3 벡터 (공급처: INVITROGEN)의 유도체이다.

[0071] 본 발명은 추가로, 도 7 (서열 3 및 4) 또는 도 8 (서열 5 및 6)에 제시된 바와 같은 CTLA4 돌연변이체의 세포 외 도메인 또는 그의 일부와, CTLA4 돌연변이체 분자의 용해도, 친화도 및/또는 원자가를 변경시키는 부분을 포함하는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 제공한다.

[0072] 본 발명의 실시예에 따라서, 상기 부분은 면역글로불린 불변 영역 또는 그의 일부, 예를 들어 CH1 도메인, 힌지,

CH2 도메인 또는 CH3 도메인 중의 하나 이상일 수 있다. 생체내 용도인 경우에는, 면역글로불린 불변 영역이 해당 대상체에게서 해로운 면역 반응을 유발시키지 않는 것이 바람직하다. 예를 들어, 임상 프로토콜에서는 돌연변이체 분자가 인간 또는 원숭이 면역글로불린 불변 영역 또는 그의 일부를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 적합한 면역글로불린 도메인의 예에는 IgC γ 1 (IgC감마1), IgC γ 2 (IgC감마2), IgC γ 3 (IgC감마3), IgC γ 4 (IgC감마4), IgC μ (IgC뮤), IgC α 1 (IgC알파1), IgC α 2 (IgC알파2), IgC δ (IgC델타) 또는 IgC ϵ (IgC엡실론)이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 기타 이소형도 가능하다. 추가로, 기타 면역글로불린 불변 영역 또는 그의 일부도 가능하다 (바람직하게는, 기타 약하거나 비-면역원성 면역글로불린 불변 영역 또는 그의 일부).

[0073] 임상 프로토콜의 경우, 면역글로불린 부분이 대상체에게서 해로운 면역 반응을 유발시키지 않는 것이 바람직하다. 바람직한 부분은 면역글로불린 불변 영역 또는 그의 일부 (이에는 인간 또는 원숭이 면역글로불린 불변 영역 또는 그의 일부가 포함된다)이다. 적합한 면역글로불린 영역의 한 가지 예는 인간 C γ 1, 예를 들어 힌지, CH2 및 CH3 영역인데, 이는 이펙터 기능, 예를 들어 Fc 수용체에 대한 결합성을 매개하여, 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 매개할 수 있거나, 또는 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC)을 매개할 수 있다. 돌연변이로 인해 Fc 수용체에 대한 면역글로불린의 결합 능력이 증가 또는 저하됨으로써, 그의 리간드에 대한 면역글로불린의 결합 능력이 조정되는 경우, 상기 면역글로불린 부분은 그 내부에 이러한 돌연변이 한 가지 이상을 수반할 수 있다 (예를 들어, CH2 도메인 내에서는, CDC 또는 ADCC와 같은 이펙터 기능을 저하시키기 위함). 예를 들어, 면역글로불린 부분 내에서의 돌연변이에는 힌지 도메인 내에서의 그의 모든 시스테인 잔기 상의 변화가 포함될 수 있는데, 예를 들어 위치 +130, +136, 및 +139에서의 시스테인이 세린으로 치환된다 (도 9, 서열 8). 면역글로불린 부분에는 도 9 (서열 8)에 제시된 바와 같이, 위치 +148에서의 프롤린을 세린으로 치환시킨 것이 포함될 수도 있다. 추가로, 면역글로불린 부분 내에서의 돌연변이에는 위치 +144에서의 루이신을 페닐알라닌으로 치환시킨 것, 위치 +145에서의 루이신을 글루탐산으로 치환시킨 것, 또는 위치 +147에서의 글리신을 알라닌으로 치환시킨 것이 포함될 수 있다. 면역글로불린 부분의 예에는 미국 공개특허공보 제2002/0114814 A1호 및 제2004/0151725 A1호, 미국 특허 제6,444,792호 및 제6,750,334호, 및 WO 97/28267에 기재된 것들이 포함된다.

[0074] 기타 부분에는 폴리펩티드 태그가 포함된다. 적합한 태그의 예에는 p97 분자, env gp120 분자, E7 분자, 및 ova 분자가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다 [참고: Dash, B., et al. (1994) *J. Gen. Virol.* 75:1389-97; Ikeda, T., et al. (1994) *Gene* 138:193-6; Falk, K., et al. (1993) *Cell. Immunol.* 150:447-52; Fujisaka, K. et al. (1994) *Virology* 204:789-93]. 태그로서 사용하기 위한 기타 분자도 가능하다 [참고: Gerard, C. et al. (1994) *Neuroscience* 62:721-739; Byrn, R. et al. *J Virol.* (1989) 63:4370-4375; Smith, D. et al., (1987) *Science* 238:1704-1707; Lasky, L. (1996) *Science* 233:209-212].

[0075] 본 발명은 추가로, 야생형 CTLA4과 비교해서 CD80 및/또는 CD86 항원과 우선적으로 보다 반응성인 가용성 돌연변이체 CTLA4Ig 융합 단백질을 제공한다. 한 가지 예가 도 7 (서열 3 및 4)에 제시된 바와 같은 L104EA29YIg이다.

[0076] 또 다른 양태에서, 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자에는 CTLA4 일부와 면역글로불린 일부 사이에 위치한 연결부 아미노산 잔기가 포함된다. 이러한 연결부 아미노산은 글루탐산을 포함한 모든 아미노산일 수 있다. 상기 연결부 아미노산은 당해 분야에 공지된 분자적 또는 화학적 합성 방법에 의해 도입할 수 있다.

[0077] 또 다른 양태에서, 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자에는, 면역글로불린 일부의 힌지 도메인 내의 모든 시스테인 잔기, 예를 들어 위치 +130, +136 또는 +139에서의 시스테인을 세린으로 치환시킨 면역글로불린 일부 (예: 힌지, CH2 및 CH3 도메인)이 포함된다 (도 7, 서열 3 및 4; 또는 도 8, 서열 5 및 6). 상기 돌연변이체 분자에는 도 7 (서열 3 및 4) 또는 도 8 (서열 5 및 6)에 제시된 바와 같이, 위치 +148에서의 프롤린을 세린으로 치환시킨 것이 포함될 수도 있다.

[0078] 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자에는 이러한 돌연변이체 분자의 CTLA4 일부의 세포외 도메인의 N-말단과 연결된 신호 펩티드 서열이 포함될 수 있다. 이러한 신호 펩티드는 상기 돌연변이체 분자의 분비를 허용해줄 모든 서열일 수 있는데, 이에는 온코스타틴 (oncostatin) M으로부터의 신호 펩티드 [참고: Malik, et al., (1989) *Molec. Cell. Biol.* 9: 2847-2853] 또는 CD5로부터의 신호 펩티드 [참고: Jones, N. H. et al., (1986) *Nature* 323:346-349], 또는 모든 세포외 단백질로부터의 신호 펩티드가 포함된다.

[0079] 본 발명의 돌연변이체 분자에는 CTLA4의 세포외 도메인의 N-말단에서 연결된 온코스타틴 M 신호 펩티드, 및 CTLA4의 세포외 도메인의 C-말단과 연결된 인간 면역글로불린 분자 (예: 힌지, CH2 및 CH3)이 포함될 수 있다. 상기 분자에는 위치 -26에서의 메티오닌부터 위치 -1에서의 알라닌까지의 아미노산 서열을 포괄하는 온코스타틴 M 신호 펩티드; 위치 +1에서의 메티오닌부터 위치 +124에서의 아스파르트산까지의 아미노산 서열을 포괄하는

CTLA4 일부; 위치 +125에서의 연결부 아미노산 잔기 글루타민; 및 위치 +126에서의 글루탐산부터 위치 +357에서의 리신 또는 위치 +356에서의 글리신까지의 아미노산 서열을 포괄하는 면역글로불린 일부가 포함된다.

[0080] 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 분자적 또는 화학적 합성 방법에 의해 수득할 수 있다. 분자적 방법에는 다음 단계들이 포함될 수 있다: 가용성 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 발현하고 암호화하는 핵산 분자를 적합한 숙주 세포에 도입하는 단계; 이와 같이 도입된 숙주 세포를, 이러한 숙주 세포가 상기 돌연변이체 분자를 발현할 수 있도록 해주는 조건 하에 배양하는 단계; 및 발현된 돌연변이체 분자를 분리하는 단계. 돌연변이체 분자의 신호 펩티드 일부는 해당 단백질 분자가 세포 표면 상에 발현될 수 있도록 해주고 숙주 세포에 의해 분비될 수 있도록 해준다. 해독된 돌연변이체 분자는 해독 후 변형을 진행할 수 있는데, 이는 신호 펩티드를 절단하여 CTLA4와 면역글로불린 일부를 갖는 성숙한 단백질을 생성시키는 것을 포함한다. 절단은 위치 -1에서의 알라닌 다음에서 일어날 수 있어, 제1 아미노산으로서 위치 +1에서의 메티오닌을 갖는 성숙한 돌연변이체 분자가 생성된다 (도 7, 서열 3 및 4; 또는 도 8, 서열 5 및 6). 또 다른 한편, 절단은 위치 -2에서의 메티오닌 다음에서 일어날 수 있어, 제1 아미노산으로서 위치 -1에서의 알라닌을 갖는 성숙한 돌연변이체 분자가 생성된다.

[0081] 당업자는 L104EA29YIg를 포유류 세포에서 발현시키면 N- 및 C-말단 변이체가 생성될 수 있고, 이로써 생성된 단백질은 다음 아미노산 잔기 서열을 가질 수 있다는 것을 잘 알고 있을 것이다: (i) +1에서부터 +357까지의 아미노산 서열, (ii) -1에서부터 +357까지의 아미노산 서열; (iii) +1에서부터 +356까지의 아미노산 서열, 또는 (iv) -1에서부터 356까지의 아미노산 서열 (도 7, 서열 3 및 4; 또는 도 8, 서열 5 및 6).

[0082] 바람직한 양태는 인간 면역글로불린 분자의 전부 또는 일부 (예: 힌지, CH2 및 CH3)와 연결된 인간 CTLA4의 세포외 도메인을 갖는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자이다. 이러한 바람직한 분자에는 위치 +1에서의 메티오닌부터 위치 +124에서의 아스파르트산까지의 아미노산 서열을 포괄하는 상기 가용성 분자의 CTLA4 일부; 위치 +125에서의 연결부 아미노산 잔기 글루타민; 및 위치 +126에서의 글루탐산부터 위치 +357에서의 리신 또는 위치 +356에서의 글리신까지의 아미노산 서열을 포괄하는 면역글로불린 일부가 포함된다. CTLA4의 세포외 도메인을 갖는 일부를 돌연변이시키는데, 이로써 위치 +29에서의 알라닌을 티로신으로 치환시키고 위치 +104에서의 루이신을 글루탐산으로 치환시킨다. 상기 돌연변이체 분자의 면역글로불린 일부를 돌연변이시킬 수 있는데, 이로써 위치 +130, +136, 및 +139에서의 시스테인을 세린으로 치환시키고, 위치 +148에서의 프롤린을 세린으로 치환시킨다. 이러한 돌연변이체 분자가 본원에서 L104EA29YIg로서 명명된다 (도 7, 서열 3 및 4).

[0083] L104EA29YIg의 또 다른 양태는 위치 -1에서의 알라닌부터 위치 +124에서의 아스파르트산까지의 아미노산 서열; 위치 +125에서의 연결부 아미노산 잔기 글루타민; 및 위치 +126에서의 글루탐산부터 위치 +357에서의 리신 또는 위치 +356에서의 글리신까지의 아미노산 서열을 포괄하는 면역글로불린 일부를 갖는 돌연변이체 분자이다. CTLA4의 세포외 도메인을 갖는 일부를 돌연변이시키는데, 이로써 위치 +29에서의 알라닌을 티로신으로 대체시키고 위치 +104에서의 루이신을 글루탐산으로 대체시킨다. 상기 돌연변이체 분자의 면역글로불린 일부를 돌연변이시키는데, 이로써 위치 +130, +136, 및 +139에서의 시스테인을 세린으로 대체시키고, 위치 +148에서의 프롤린을 세린으로 치환시킨다. 이러한 돌연변이체 분자가 본원에서 L104EA29YIg로서 명명된다 (도 7, 서열 3 및 4). 신호 서열을 절단시킨 후, L104EA29YIg는 위치 +1에서의 메티오닌으로 시작할 수 있거나, 또는 위치 -1에서의 알라닌으로 시작할 수 있다.

[0084] 본 발명의 또 다른 돌연변이체 분자는 인간 면역글로불린 분자 (예: 힌지, CH2 및 CH3)와 연결된 인간 CTLA4의 세포외 도메인을 갖는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자이다. 이러한 분자에는 위치 +1에서의 메티오닌부터 위치 +124에서의 아스파르트산까지의 아미노산 서열 암호화 CTLA4의 일부; 위치 +125에서의 연결부 아미노산 잔기 글루타민; 및 위치 +126에서의 글루탐산부터 위치 +357에서의 리신 또는 위치 +356에서의 글리신까지의 아미노산 서열을 포괄하는 면역글로불린 일부가 포함된다. CTLA4의 세포외 도메인을 갖는 일부를 돌연변이시키는데, 이로써 위치 +104에서의 루이신을 글루탐산으로 치환시킨다. 상기 돌연변이체 분자의 힌지 일부를 돌연변이시키는데, 이로써 위치 +130, +136, 및 +139에서의 시스테인을 세린으로 치환시키고, 위치 +148에서의 프롤린을 세린으로 치환시킨다. 이러한 돌연변이체 분자가 본원에서 L104EIg로서 명명된다 (도 8, 서열 5 및 6).

[0085] 또 다른 한편, L104EIg의 특정 양태는 인간 면역글로불린 분자 (예: 힌지, CH2 및 CH3)와 연결된 인간 CTLA4의 세포외 도메인을 갖는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자이다. 이러한 바람직한 분자에는 위치 -1에서의 알라닌부터 위치 +124에서의 아스파르트산까지의 아미노산 서열을 포괄하는 CTLA4 일부; 위치 +125에서의 연결부 아미노산 잔기 글루타민; 및 위치 +126에서의 글루탐산부터 위치 +357에서의 리신 또는 위치 +356에서의 글리신까지의 아미노산 서열을 포괄하는 면역글로불린 일부가 포함된다. CTLA4의 세포외 도메인을 갖는 일부를 돌연변이시키

는데, 이로써 위치 +104에서의 루이신을 글루탐산으로 치환시킨다. 상기 돌연변이체 분자의 힌지 일부를 돌연변이시키는데, 이로써 위치 +130, +136, 및 +139에서의 시스테인을 세린으로 치환시키고, 위치 +148에서의 프롤린을 세린으로 치환시킨다. 이러한 돌연변이체 분자가 본원에서 L104E Ig로서 명명된다 (도 8, 서열 5 및 6).

[0086] 추가로, 본 발명은 (a) 제2 아미노산 서열과 융합된, T 세포 증식을 차단시키는 막 당단백질 (예: CD28, CD86, CD80, CD40, 및 gp39)의 제1 아미노산 서열; (b) T 세포 증식을 차단시키는 돌연변이체 CTLA4의 세포의 도메인의 단편인 제2 아미노산 서열, 예를 들어 위치 +1에서의 메티오닌부터 위치 +124에서의 아스파르트산까지를 포함하는 아미노산 분자 (도 7, 서열 3 및 4; 또는 도 8, 서열 5 및 6); 및 (c) 식별 태그로서 작용하거나 해당 분자의 용해도를 증가시키는 제3 아미노산 서열을 갖는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 제공한다. 예를 들어, 제3 아미노산 서열은 비-면역원성 면역글로불린 분자의 힌지, CH2 및 CH3 영역의 아미노산 잔기들로 본질적으로 이루어질 수 있다. 적합한 면역글로불린 분자의 예에는 인간 또는 원숭이 면역글로불린 (예: IgC γ 1)이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 기타 이소형도 가능하다.

[0087] 본 발명은 또한, 위치 26에서의 알라닌 또는 위치 27에서의 메티오닌으로 시작하고 위치 150에서의 아스파르트산으로 종결되는 서열 8에 제시된 바와 같은 CTLA4의 세포의 도메인 또는 그의 일부를 수반하는 CTLA4 돌연변이체 분자의 유효 용량을 대상체에게 투여함으로써, 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 추가적으로, 상기 세포의 도메인 또는 그의 일부에서 위치 55에서의 알라닌을 티로신으로 치환시키고, 위치 130에서의 루이신을 글루탐산으로 치환시킨다. 추가로 투여 레지멘은 초기 단계 레지멘 (이러한 초기 단계 레지멘은 이식 후 처음 3 내지 6개월일 수 있다)을 포함하고, 초기에는 매달 1회 투여하는 것 보다 더 빈번하게 투여하는 것을 포함한다.

[0088] 추가적으로, 본 발명은 위치 27에서의 메티오닌으로 시작하고 위치 150에서의 아스파르트산으로 종결되는 서열 4의 아미노산 서열을 수반하거나, 또는 위치 26에서의 알라닌으로 시작하고 위치 150에서의 아스파르트산으로 종결되는 서열 4의 아미노산 서열을 수반하는 CTLA4 돌연변이체 분자의 유효 용량을 대상체에게 투여함으로써, 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 추가로 CTLA4 돌연변이체 분자 투여 레지멘은 초기 단계 레지멘 (이러한 초기 단계 레지멘은 이식 후 처음 3 내지 6개월일 수 있다)을 포함하고, 초기에는 매달 1회 투여하는 것 보다 더 빈번하게 투여하는 것을 포함한다.

[0089] 본 발명은 추가로, 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자에 상응하는 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다. 한 양태에서, 이러한 핵산 분자는 DNA (예: cDNA) 또는 그의 하이브리드이다. 또 다른 한편, 본 발명의 핵산 분자는 RNA 또는 그의 하이브리드이다.

[0090] 추가적으로, 본 발명은 본 발명의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 숙주 벡터 시스템이 또한 제공된다. 이러한 숙주 벡터 시스템은 적합한 숙주 세포에 본 발명의 벡터를 포함한다. 적합한 숙주 세포의 예에는 원핵성 및 진핵성 세포가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

[0091] 본 발명에는 제약상 유효 용량의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 포함하는, 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료하는데 사용하기 위한 제약 조성물이 포함된다. 특정 양태에서, 이식편 이식과 연관된 면역 장애는 CD28- 및/또는 CTLA4-양성 세포와 CD80 및/또는 CD86 양성 세포와의 상호 작용에 의해 매개된다. 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 바람직하게, CTLA4의 세포의 도메인 내에 하나 이상의 돌연변이를 수반한 CTLA4 분자이다. 본 발명의 제약 조성물은 가용성 CTLA4 돌연변이체 단백질 분자 및/또는 핵산 분자, 및/또는 이러한 분자를 암호화하는 벡터를 포함할 수 있다. 바람직한 양태에서, 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 도 7 (서열 3 및 4) 또는 도 8 (서열 5 및 6)에 제시된 바와 같은 CTLA4의 세포의 도메인의 아미노산 서열, L104EA29Y 또는 L104E를 각각 갖는다. 보다 더 바람직하게는, 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자가 본원에 기재된 바와 같은 L104EA29Y Ig이다. 상기 조성물은 기타 치료제, 예를 들어 약물 독소, 효소, 항체 또는 접합체를 추가적으로 포함할 수도 있다.

[0092] 제약 조성물은 또한 바람직하게, 적합한 담체와 아주반트 (adjuvant)를 포함하는데, 이에 본 발명의 분자 (예: 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자, 예를 들면 L104EA29Y 또는 L104E)와 조합된 경우에, 이러한 분자의 활성을 유지시켜 주고 대상체의 면역계와 비-반응성인 모든 물질이 포함된다. 적합한 담체 및 아주반트의 예에는 인간 혈청 알부민; 이온 교환제; 알루미늄; 레시틴; 완충제 물질, 예를 들어 인산염; 글리신; 소르브산; 칼륨 소르베이트; 및 염 또는 전해질, 예를 들어 프로타민 설페이트가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 기타 예에는 모든 표준 제약 담체, 예를 들어 인산염 완충 식염수; 물, 에멀션, 예를 들어 오일/수 에멀션; 및 각종 유형의 습윤제가 포함된다. 기타 담체에는 또한, 멸균성 용액; 정제 (제피정 포함) 및 캡슐이 포함될 수도 있다. 전형적으로 이러한 담체는 부형제, 예를 들어 전분, 우유, 당, 특정 유형의 점토, 젤라틴, 스테아르산 또는 그의 염, 마그네슘 또는 칼슘 스테아레이트, 탈크, 식물성 지방 또는 오일, 검, 글리콜, 또는 기타 공지된 부형제를

함유한다. 이러한 담체에는 또한, 향미제 또는 색상 부가제 또는 기타 성분이 포함될 수 있다. 이러한 담체를 포함하는 조성물은 널리 공지된 통상적인 방법에 의해 제형화한다. 이러한 조성물은 각종 지질 조성물, 예를 들어 리포솜 내에서 뿐만 아니라 각종 중합체성 조성물, 예를 들어 중합체 미소구 내에서 제형화할 수도 있다.

[0093] 본 발명의 제약 조성물은 통상적인 투여 방식을 이용하여, 예를 들어 정맥내 (i.v.) 투여, 복강내 (i.p.) 투여, 근육내 (i.m.) 투여, 피하 투여, 경구 투여, 좌제로서 투여, 또는 국소 접촉으로서 투여할 수 있거나, 또는 서방출 장치 (예; 미니삼투압 펌프)를 대상체에게 이식함으로써 투여할 수 있다.

[0094] 본 발명의 제약 조성물은 각종 투여 형태로 존재할 수 있는데, 이러한 투여 형태에는 액상 용제 또는 현탁제, 정제, 환제, 산제, 좌제, 중합체성 미소캡셀제 또는 미소소포, 리포솜, 및 주사용 또는 주입용 용제가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 바람직한 형태는 투여 방식과 치료적 적용에 좌우된다.

[0095] 정맥내 투여에 전형적인 본 발명의 제약 조성물이 다음에 열거된다:

[0096] **바이알당 동결건조된 L104EA29YIg 100mg 약물 생성물의 조성**

성분	양/바이알 (mg) ^a
L104EA29YIg	110 ^a
슈크로스	220
인산나트륨 1가 일수화물	15.18
염화나트륨	2.55
1N 수산화나트륨	pH 7.5가 되도록 조정함
1N 염산	pH 7.5가 되도록 조정함

[0098] ^a 각 바이알은 바이알당 10% 과충진물, 바늘 및 재구성된 용액의 주사기 홀드업을 함유한다.

[0099] 동결건조된 약물 생성물은 수성 담체와 함께 구성할 수 있다. 본원에 관심있는 수성 담체는 제약상 허용 가능하고 (인간에게 투여하기에 안전하며 무독성이다), 동결건조 후 액상 제형을 제조하는데 유용한 것이다. 전형적으로, 동결건조된 약물 생성물은 10 ml의 멸균성 주사용 수, USP (SWFI) 또는 0.9% 염화나트륨 주사제, USP를 이용하여 약 25 mg/ml이 되도록 구성한다. 이와 같이 구성된 용액은 0.9% 염화나트륨 주사제, USP를 사용하여 추가로 희석시켜 약물 생성물 농도가 1 내지 10 mg/ml가 되도록 한다. 이와 같이 희석시킨 주사용 약물 생성물은 등장성이고 정맥내 주입에 의한 투여에 적합하다.

[0100] 계면활성제를, 상기 구성된 약물 생성물과 실리콘 처리를 한 주사기와 상호 작용을 저하 또는 방지시키기 위해 충분한 양으로 해당 제형에 가할 수 있다.

[0101] 본 발명의 조성물에 대한 가장 유효한 투여 방식과 투여 레지멘은 질병의 중증도 및 과정, 치료하고자 하는 환자의 건강 상태와 반응, 및 담당의의 판단에 좌우된다. 따라서, 본 발명의 조성물의 투여량 (용량으로서 공지되기도 함)은 개개 환자에 대해 적정되어야 한다.

[0102] 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 대상체에게서 내인성 B7 (예를 들어, CD80 및/또는 CD86) 분자가 그들의 각각의 리간드와 결합하지 못하도록 하기에 충분한 양과 일정 시간에 걸친 투여 횟수 (예를 들어, 1회 및/또는 다수회)로 해당 대상체에게 투여할 수 있다. 내인성 B7/리간드 결합을 차단시키면, B7-양성 세포 (예: CD80- 및/또는 CD86-양성 세포)와 CD28- 및/또는 CTLA4-양성 세포와의 상호 작용이 억제된다. 치료제의 투여량은 병든 조직의 유형, 치료받고자 하는 이식편 이식과 연관된 면역 장애의 유형, 질병의 중증도, 대상체의 건강 상태, 및 해당 치료제로의 치료에 대한 대상체의 반응을 포함하지만, 그에 제한되지 않는 많은 요인들에 의해 좌우된다.

[0103] 본 발명의 분자 또는 제약 조성물의 용량은 체중을 기준으로 하며, 투여 레지멘은 표적 혈청 구 (trough) 프로파일에 의해 지시될 수 있다. 전형적으로, 이식 후 처음 3 내지 6개월에 걸친 본 발명의 CTLA4 돌연변이체 분자의 표적 최저 혈청 농도 약 3 µg/ml 내지 약 30 µg/ml은 동종이식편의 기능을 유지시키기 위해 충분한 것이며, 바람직한 농도는 약 5 µg/ml 내지 약 20 µg/ml이다. 전형적으로, 유지 단계 동안의 본 발명의 CTLA4 돌연변이체 분자의 표적 최저 혈청 농도는 약 0.2 µg/ml 내지 약 3 µg/ml, 바람직하게는 약 0.25 µg/ml 내지 약 2.5 µg/ml이다.

[0104] 본 발명의 CTLA4 돌연변이체 분자는 환자 체중 kg당 약 0.1 내지 약 20.0 mg, 전형적으로 약 1.0 내지 약 15.0

mg의 양으로 투여할 수 있다. 예를 들어, L104EA29Y는 이식 후 고 위험 기간인 초기 단계 동안에는 환자의 체중 kg당 10 mg으로 투여할 수 있고, 유지 단계 동안에는 환자 체중 kg당 5 mg으로 감소시킬 수 있다.

[0105] 본 발명의 분자 또는 제약 조성물의 투여는 각종 시간에 걸쳐 수행할 수 있다. 전형적으로, 투여 레지멘에는 초기 단계 (이때에는 용량이 보다 많고, 면역학적 위험이 가장 큰 동안에는 투여 횟수가 증가한다)에 이어 유지 단계가 포함된다. 초기 단계 레지멘은 이식 후 처음 3 내지 6개월일 수 있고, 초기에는 매달 1회 투여하는 것보다 더 빈번하게 투여하는데, 면역학적 위험 및/또는 표적 최저 혈청 농도에 따라서 매일, 매주 또는 2주 정도로 빈번하게 투여하는 것을 포함한다. 유지 단계는 초기 단계가 끝날 무렵에 시작하고, 매달 1회 보다 더 빈번하게 투여하지는 않는데, 필요한 기간 동안, 전형적으로는 환자가 이식조직을 보유하고 있는 동안에는 지속된다. 본원에 사용된 바와 같은 1일째는 이식 당일이거나 본 발명의 분자 또는 제약 조성물을 이용하여 치료한 첫째 날로서 정의된다.

[0106] 초기 단계에서의 본 발명의 CTLA4 돌연변이체 분자의 투여량은 환자 체중 kg당 약 8 내지 약 12 mg, 바람직하게는 약 10 mg/kg이다. 유지 단계에서의 본 발명의 CTLA4 돌연변이체 분자의 투여량은 환자 체중 kg당 약 3 내지 약 7 mg, 바람직하게는 약 5 mg/kg이다.

[0107] 초기 단계는 이식 후 처음 3개월 내지 6개월 내일 수 있다. 초기 단계 동안의 투여 레지멘은 수용자 및/또는 이식편의 상태에 따라서 다양할 수 있다. 예를 들어, 보다 집중적인 초기 단계 레지멘은 본 발명의 분자 또는 제약 조성물의 보다 고 용량을 1일, 5일, 2주차 방문 (예를 들어, 13일 내지 17일째)에 투여한 다음, 처음 3개월 동안은 2주 마다 (예를 들어, 4주차 방문, 6주차 방문, 8주차 방문, 10주차 방문 및 12주차 방문) 투여하고, 이어서 6개월차 방문 (예를 들어, 4개월차 방문, 5개월차 방문, 및 6개월차 방문)까지는 매달 1회 투여한다. 보다 집중적인 초기 단계 레지멘의 전형적인 예는 환자 체중 kg당 L104EA29YIg 10 mg을 1, 5, 15, 29, 43, 57, 71, 85, 113, 141 및 169일째에 투여하는 것이다. 보다 덜 집중적인 레지멘은, 예를 들어 본 발명의 분자 또는 제약 조성물을 1일, 2주차 방문, 4주차 방문시에 투여한 다음, 3개월차 방문까지는 매달 1회 투여한다. 덜 집중적인 초기 단계 레지멘의 전형적인 예는 환자 체중 kg당 L104EA29YIg 10 mg을 1, 15, 29, 57 및 85일째에 투여하는 것이다.

[0108] 전형적으로, 초기 단계에 이어 유지 단계가 오는데, 이때에는 필요한 기간 동안, 전형적으로는 환자가 이식조직을 보유하고 있는 기간 동안에는 1 내지 2개월 간격으로 본 발명의 분자 또는 제약 조성물의 보다 저 용량을 투여한다. 상기 언급된 보다 더 집중적인 레지멘에 대한 유지 단계의 예는 7개월차 방문부터 시작하여 환자 체중 kg당 L104EA29YIg 5 mg을 매달 1회 투여하는 것을 포함한다. 반면, 상기 언급된 보다 덜 집중적인 레지멘에 대한 유지 단계의 예는 4개월차 방문부터 시작하여 환자 체중 kg당 L104EA29YIg 5 mg을 매달 1회 투여하는 것을 포함한다.

[0109] 또 다른 한편, 당업자는 환자 위험 상태에 반응하고/하거나 이식 후 요법에 반응하여 투여 레지멘을 변형시킬 수 있을 것이다. 예를 들어, 상기 언급된 보다 덜 집중적인 레지멘의 초기 단계는 이러한 레지멘에 5일째 투여를 부가함으로써, 면역학적 위험이 가장 큰 기간 동안의 투여 횟수를 증가시킴으로써 변형시킬 수 있었다.

[0110] 본원에 사용된 바와 같은 "4주", "개월" 또는 "매달"은 28±5일을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 "2주"는 14±3일을 지칭한다.

[0111] 본 발명의 CTLA4 돌연변이체 분자의 표적 최저 프로파일은 유지하면서도, 이식조직 수용자의 생활에 있어 투여 스케줄을 용이하게 하기 위해서는 투여 레지멘에 있어서의 융통성이 필요하다. 해당 용량을 투여하도록 허용된 시간대는 다음과 같을 수 있다:

[0112]

방문	방문 시간대
1일 및 5일째	96시간 간격 ± 6시간
2주차	표적일 ± 2일
4주차부터 6개월차까지	표적일 ± 3일
그 후 7개월차부터	표적일 ± 5일

[0113] 표적일은 목적하는 기간을 기존의 실제 방문일에 부가한 결과이다. 2주차 방문에 대한 목적하는 기간은 10일이다. 기존의 방문으로부터 2주 후에 계획된 방문의 경우, 예를 들어 4주차 방문 후 6주차 방문의 경우에 목적하는 기간은 14일이다. 기존의 방문으로부터 1개월 또는 4주 후에 계획된 방문의 경우, 예를 들어 3개월차 방문

후 4개월차 방문의 경우에 목적하는 기간은 28일이다. 기존의 방문으로부터 2개월 후에 계획된 방문의 경우, 예를 들어 6개월차 방문 후 8개월차 방문의 경우에 목적하는 기간은 56일이다. 15일째 실제 방문일 + 14일은 29일의 4주 표적일이 된다. 상기 방문 시간대를 근거로 하면, 투여는 29±3일에 일어날 수 있다. 26일째에 투여한다면, 이러한 날이 그 다음 표적일 계산에 활용된 실제 방문일이 된다.

- [0114] 급성 거부 위험이 낮은 수용자에는 전형적으로, 생체 근친 공여자 및 잘 부합되는 수용자/공여자로부터의 이식 조직을 받은 수용자가 포함된다. 급성 거부 위험이 높은 수용자에는 전형적으로, 주변 공여자로부터의 이식조직 또는 재이식을 받거나, 고 패널 반응성 항체를 갖고 있거나 또는 아프리카계 미국인 (흑인)이 포함된다.
- [0115] 칼시네우린 억제제 및 스테로이드와 같은 유지 약물을 장기간에 걸쳐 사용하게 되면 즉각적 급성 이식 거부 위험 이외에도, 장기간에 걸친 성과 및 환자의 삶의 질에 불리한 영향을 미치는 독성이 생성된다. 예를 들어, 유지 약물의 부작용에는 신장 기능 저하 및/또는 이식편 손실을 야기시키는 신독성; 및 심혈관계 질환, 및 심혈관계 질환과 사망을 유발시키는 대사 질환, 예를 들어 고혈압, 고지질혈증 및 당뇨병이 포함된다. 부가의 부작용에는 치료 순응도를 보이지 않고 삶의 질을 저하시키는, 다모증, 탈모증, 치은 증식증, 떨림, 신독성 및 골 손실이 포함된다. 본 발명의 분자 또는 제약 조성물을 사용하여 이들 결과를 피할 수 있거나, 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료하는 경우에 이들 결과의 발병, 발생 및/또는 진행을 저하시킬 수 있거나, 또는 이들 결과를 나타낼 위험이 있는 대상체에게서 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료할 수 있다. 본 발명의 분자 또는 제약 조성물을 사용하여, GFR에 의해 측정된 바와 같은 신장 기능을 개선시킬 수도 있다.
- [0116] 본 발명의 분자 또는 제약 조성물은 30분 내지 1시간 이상 동안 정맥내 주입함으로써 투여할 수 있다. 또 다른 한편, 요구되는 투여량을 1회분 내지 수 회분으로 나누어 피하 주사할 수 있다. 전형적으로, 환자가 입원 중이고/이거나 모니터링을 위해 스케줄에 따라 의료 전문가를 방문하는 동안의 초기 치료 상 동안 활용되는 투여 경로는 30분 정맥내 주입이다. 피하 주사가 유지 단계 동안 활용되고 있는 전형적인 투여 방식이므로, 환자가 정맥내 주입을 위해 의료 전문가를 방문하는 횟수를 줄임으로써 그들의 정상적인 스케줄로 되돌아갈 수 있게 된다.
- [0117] 본 발명의 또 다른 양태는 이식 후 대체 면역억제 요법을 받은 적이 있는 대상체에게서 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 대체 제약 면역억제 요법을 받고 있는 대상체는 본 발명의 분자 또는 제약 조성물을 포함한 요법으로 변화시키거나 또는 전환시킴으로써, 대체 약물을 없앨 수 있다. 전형적으로, 제거시켜야 하는 제약은 해당 특이적 약물의 처방 지시에 기초하여 적당한 기간에 걸쳐 점진적으로 감소시키고, 이와 동시에 본 발명의 분자 또는 제약 조성물 매달 1회 보다는 더 빈번하게 투여한다. 일단 대상체에게서 대체 약물을 완전히 제거시키면, 대상체는 본 발명의 분자 또는 제약 조성물을 활용하는 표준 유지 레지멘으로 복귀될 수 있다. 예를 들어, CsA/MMF ± 코르티코스테로이드 레지멘이 적용된 대상체는 CsA를 L104EA29YIg으로 대체시켜 L104EA29YIg/MMF ± 코르티코스테로이드 레지멘으로 전환시킬 수 있다. 전환 투여 스케줄에는 CsA 용량을 2개월에 걸쳐 점진적으로 감소시키고, 이들 2개월 동안 2주 마다 5 mg/kg의 L104EA29YIg를 투여하는 것이 포함될 수 있다. 일단 CsA가 제거되면, 대상체를 대상으로 하여 유지 단계를 적용하여 CsA 부재 하의 치료 기간 동안 4주 또는 8주 마다 5 mg/kg을 지속적으로 투여한다.
- [0118] 한 양태는 B7과 그의 리간드와의 상호 작용을 차단하고/하거나 면역계 질환을 치료하는데 유효한 본원에 기재된 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자에 대한 적당한 투여량을 제공한다. 예를 들어, 이러한 투여량은 체중을 기준으로 할 수 있고, 투여 레지멘은 표적 혈청 구 프로파일에 의해 지시될 수 있다. 예를 들어, 면역계 질환을 치료하기 위해 본원에 기재된 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자의 유효한 표적 최저 혈청 농도는 약 0.2 µg/ml 내지 약 30 µg/ml일 수 있다. 또 다른 한편, 본원에 기재된 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 면역계 질환을 치료하기 위해 환자 체중 kg당 약 0.1 내지 약 20.0 mg의 양으로 투여할 수 있다.
- [0119] 본 발명은 추가로, 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 특정한 양태에서, 이식편 이식과 연관된 면역 장애는 CD28- 및/또는 CTLA4-양성 세포와 CD80/CD86-양성 세포와의 상호 작용에 의해 매개된다. 추가의 양태에서는, T 세포 상호 작용이 억제된다. 이들 방법은 대상체에게 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 투여하여 T 세포와 CD80- 및/또는 CD86-양성 세포와의 상호 작용을 조절하는 것을 포함한다. 이식편 이식과 연관된 면역 장애의 예가 상기 논의되어 있다.
- [0120] 본 발명은 추가로, 이식조직 고형 장기, 조직, 세포 및/또는 외부 생체구조의 수용자인 대상체에 의한 고형 장기, 조직, 세포 및/또는 외부 생체구조 이식 거부를 예방하거나 억제하는 방법을 제공한다. 전형적으로, 이식조직에서의 이식편 거부는 이러한 이식편을 수용자의 T 세포가 외래로서 인식한 다음, 이 이식편을 파괴시키는 면역 반응을 유도시킴으로써 개시된다. 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 T 림프구 증식 및/또는 사

이토킨 분비를 억제시킴으로써 조직 파괴와 항원-특이적 T 세포 무반응성 유도를 저하시킬 수 있으며, 이로써 장기간 동안 이식편이 허용될 수 있다.

- [0121] 실시예 3에 기재된 연구는 신장 이식 수용자에게서 바실렉시마브 (Simulect®; 공급처: Novartis) 유도, 미코페놀레이트 모페틸 (MMF; CellCept®; 공급처: Roche), 및 코르티코스테로이드로 이루어진 CNI-무함유 조합 레지멘의 일부로서 사용하는 경우에, 12개월에 걸쳐 유지 면역억제제로서의 L104EA29YIg의 효능 및 안전성을 시클로스포린A (CsA)와 비교하였다. 연구 목표에는 6개월 및 1년째의 급성 거부 발생률을 평가하고 (생검에 의해 확증되거나 추정됨); 1, 6 및 12개월째에 이오핵솔 청소율을 통하여 사구체 여과율 (GFR)을 측정하며; 혈청 콜레스테롤 및 트리글리세라이드를 포함한 고혈압 파라미터와 전반적인 안전성을 측정하는 것이 있다. 미리 명시된 기타 분석으로는 1년째의 환자 사망이나 이식편 손실; 급성 거부 중증도; 이식 후 당뇨병 발병률 [이는 이전에는 당뇨병이 있는 것으로 공지되지 않은 환자에게서 헤모글로빈 A1C (HbA1c) >7%, 또는 4주 이상 동안 고혈당증에 요구되는 모든 요법으로서 정의된다]; 신 질환에서의 식이 변형 [참고: MDRD, Levey AS, Bosch JP, Lewis JP, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Ann Intern Med 1999; 130:461-470], 젤리페 (Jelliffe) [참고: RW. Creatinine clearance: Bedside estimate. Ann Intern Med. 1973;79:604-605], 코크크로프트-가울트 (Cockcroft-Gault) [참고: Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron 1976;16:31-41], 및 낸키벨 (Nankivell) [참고: Nankivell BJ, Gruenewald SM, Allen RD, Chapman JR. Predicting glomerular filtration rate after kidney transplantation. Transplantation. 1995; 59(12):1683-1689] 처방을 이용하여 계산된 GFR; 약동학 및 면역원성이 있다. 급성 거부 (AR)의 진단과 치료는 밴프 (Banff) 97 기준 및 등급에 근거하였다 [참고: Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. Kidney Int 1999;55(2):713-23]. 만성 동종이식편 신병증 (CAN)의 발생에 관해서는 사후 분석을 수행하였다.
- [0122] 이러한 12개월 연구 결과, L104EA29YIg에 의거한 유지 요법이 CsA와 비교해서 AR을 예방하는데 있어 증가의 효능을 부여하였고 유사한 환자 및 이식편 생존을 제공한 것으로 입증되었다. 또한, L104EA29YIg는 CsA에 의거한 유지 면역억제제와 비교해서 CAN를 저하시켰고 신장 기능을 상당히 개선시킨 것으로 입증되었다. L104EA29YIg는 안전하고 널리 관용되었으며, 전형적인 CNI 관련 독성과 전혀 연관되지 않았다.
- [0123] 이식 후 처음 1년 동안의 개선된 신장 기능은 보다 우수한 장기간 성과와 상관이 있는 것으로 밝혀졌는데 [참고: Hariharan S, McBride MA, Cherikh WS, Tolleris CB, Bresnahan BA, Johnson CP. Post-transplant renal function in the first year predicts long-term kidney transplant survival. Kidney Int 2002;62(1):311-8], 이는 CNI를 장기간 사용하는 것이, 이식편 기능을 저하시키고 그의 모든 부수적 문제점을 수반하고 있는 신부전증을 유발시키는 그들의 신독성에 의해 제한되기 때문이다 [참고: Danovitch GM. Immunosuppressive medications for renal transplantation: a multiple choice question. Kidney Int 2001;59(1):388-402]. 따라서, 아마도 L104EA29YIg를 이용하여 치료한 경우에 관찰되는 가장 인지할 만한 발견은 CsA와 비교해서 CAN의 발생 및/또는 진행 저하를 나타내는 12개월 신장 조직학과 커플링된 탁월한 GFRs이다. 이는 놀라운 성과였고, 이러한 종류의 발견이 면역억제 요법의 무작위화 제II상 시험에서 밝혀진 것은 처음있는 일이었다. 면역학적, 심혈관계 및/또는 대사적 손상을 방지함으로써 네프론 질량을 보존하는 것이 환자 생존과 이식편 생존 둘 다에 대한 유익한 효과를 가져다 주기 때문에, L104EA29YIg이 보다 우수한 장기간 성과와 연관 이 있을 수 있다.
- [0124] 이들 쟁점은 확대된 기준의 공여자 또는 수용자로부터의 장기 사용이 증가함에 따라 특히 중요해지는데, 이는 이들이 CNI 관련 독성에 대해 특히 감수성이기 때문이다. 신장 이식을 진행한 환자에게서 CV와 대사적 사건의 발생을 저하시키는 것이 또한 장기간 성과를 개선시키는데 있어 중요하다.
- [0125] 본 발명의 분자 또는 제약 조성물을 사용하여, 확대된 기준 수용자인 대상체 및/또는 확대된 기준 공여자로부터 이식편을 받은 대상체에게서 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료할 수 있다. 전미 장기 분배 네트워크 (UNOS)에 의해 쟁점화된 기준을 일부 근거로 한 이들 기준에는 다음 중의 한 가지 이상이 포함될 수 있다: 10세 미만 또는 60세 이상 공여자 연령; 심장 사망 후 공여자; 공여자 장기의 예상되는 한랭-허혈성 시간이 24시간 이상인 대상체; 현재 PRA ≥50%으로 첫 번째 이식을 진행하거나 또는 PRA ≥30%으로 재이식을 진행하고 있는 대상체; 이식 후 처음 6개월 동안 급성 거부로 인해 기존에 이식편 손실을 경험한 대상체; 공여자 림프구 및 수용자 혈청을 사용하여 양성 T 세포 림프구독성 교차적합을 나타내는 대상체; HIV 감염된 대상체; 기존 3년 내에

치료를 요하는 급성 결핵을 앓은 대상체; 또는 전미 장기 분배 네트워크 (UNOS)에 의해 생점화된 기타 기준. 공여자 및/또는 공여자 신장에 대한 가능한 확대된 기준의 예에는 장기 기증에 대한 다음의 확대된 기준 중의 한 가지 이상이 포함된다: a) 공여자 연령 ≥ 60 세; 또는 b) 공여자 연령 50세 내지 59세 및 다음 중의 적어도 하나: (i) 뇌혈관 사고 (CVA) + 고혈압 + SCr > 1.5 mg/dL 또는 (ii) CVA + 고혈압 또는 (iii) CVA + SCr > 1.5 mg/dL 또는 (iv) 고혈압 + SCr > 1.5 mg/dL 또는 c) CIT ≥ 24 시간, 공여자 연령 > 10 세 또는 d) 심장 사망한 공여자 (심장 박동 중단 공여자).

[0126] 본 발명은 또한, 대상체에게서 이식편 대 숙주 질병을 억제하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 상기 대상체에게 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 단독으로 투여하거나, 또는 IL-2, IL-2R, IL-4 또는 γ -인터페론과 반응성인 추가의 부가 리간드와 함께, 동시에 또는 순차적으로 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 골수 이식 수용자에게 투여하여 공여자 T 세포의 동종반응성을 억제할 수 있다. 또 다른 한편, 골수 이식편 내의 공여자 T 세포를 이식에 앞서 생체외에서 수용자의 동종항원에 대해 관용화시킬 수 있다.

[0127] 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자, 예를 들어 L104EA29Y는 단독 활성 성분으로서 투여하거나, 또는 예를 들어, 동종이식편 또는 이종이식편 급성 또는 만성 거부의 치료, 예방 또는 억제를 위해 또는 내성을 유도시키기 위해 면역조정 레지멘 중의 한 가지 이상의 기타 약물, 면역억제제 및/또는 기타 소염제와 함께, 동시에 또는 순차적으로 투여할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 상기 분자를 갈시네우린 억제제 (예: 시클로스포린 A 또는 FK506); 면역억제성 매크롤리드 [예: 타코롤리무스, 라파마이신, 시롤리무스] 또는 그의 유도체 [예: 40-O-(2-히드록시)에틸-라파마이신, 시롤리무스, 센티칸]; 림프구 귀소제 (예: FTY720) 또는 그의 유사체 (FK778, Jak-3), 코르티코스테로이드; 시클로포스파미드; 아자티오프렌; 메토트렉세이트; 레플루노미드 또는 그의 유사체; 미조리빈; 미코페놀산; 미코페놀레이트 모페틸; 15-데옥시시페르구알린 또는 그의 유사체; 면역억제성 모노클로날 항체 (예: 바실릭시마브, 다클리주마브), 리간드, 백혈구 수용체 (예: MHC, CD2, CD3, CD4, CD11a/CD18, CD7, CD25, CD 27, B7, CD40, CD45, CD58, CD 137, ICOS, CD150 (SLAM), OX40, 4-1BB 또는 그들의 리간드)에 대한 모노클로날 항체 또는 그의 항체 단편; 또는 기타 면역조정성 화합물 (예: CTLA4/CD28-Ig), 또는 기타 부착 분자 억제제 (예: mAbs) 또는 저분자량 억제제, 예를 들어 LFA-1 길항제, 셀렉틴 (Selectin) 길항제 및 VLA-4 길항제와 병용해서 사용할 수 있다. 상기 화합물은, 예를 들어 상기 언급된 적응증에서, 예를 들어 내성 유도에서 CD40 및 그의 리간드를 방해하는 화합물 (예를 들어, CD40에 대한 항체 및 CD40-L에 대한 항체), 예를 들어 Chi220 [참고: 미국 특허 제6,051,228호]과 병용하는데 특히 유용하다.

[0128] 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를, 예를 들어 본원에 명시된 바와 같은 기타 면역억제/면역조정 요법과 연계해서 동시에 또는 순차적으로 투여하는 경우, 공동-투여되는 면역억제제 또는 면역조정 화합물의 투여량은 물론, 이용되는 공동-약물의 유형에 따라서, 예를 들어 스테로이드인지 아니면 시클로스포린인지에 따라서, 그리고 이용된 구체적 약물, 치료받고자 하는 질환 등에 따라서 다양할 것이다.

[0129] 전술 내용에 따르면 본 발명은 추가로, 면역억제제, 면역조정제 또는 소염제를 포함하는 하나 이상의 제약 조성물과 동시에 또는 순차적으로 사용될, 자유 형태 또는 제약상 허용 가능한 염 형태의 L104EA29YIg를 포함하는, 예를 들어 상기 규정된 바와 같은 모든 방법에 사용하기 위한 치료적 조합물, 예를 들어 키트를 제공한다. 이러한 키트는 그의 투여에 관한 지시 사항을 포함할 수 있다.

[0130] 전술 내용에 따라서 본 발명은 추가의 국면에서, 치료상 유효량의 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 면역억제제와 공동 투여, 예를 들어 동시에 또는 순차적으로 투여하는 것을 포함하는 상기 정의된 바와 같은 방법을 제공한다. 면역억제제에는 가용성 gp39 [CD40 리간드 (CD40L), CD154, T-BAM, TRAP로서 공지되기도 함], 가용성 CD29, 가용성 CD40, 가용성 CD80 (예: ATCC 68627), 가용성 CD86, 가용성 CD28 (예: 68628), 가용성 CD56, 가용성 Thy-1, 가용성 CD3, 가용성 TCR, 가용성 VLA-4, 가용성 VCAM-1, 가용성 LECAM-1, 가용성 ELAM-1, 가용성 CD44; gp39와 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편 (예: ATCC HB-10916, ATCC HB-12055 및 ATCC HB-12056); CD40과 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편 (예: ATCC HB-9110); B7과 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편 (예: ATCC HB-253, ATCC CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC HB-301, ATCC HB-11341 등); CD28과 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편 [예: ATCC HB-11944 또는 mAb 9.3 (참고: Martin et al., J. Clin. Immun. 4(1):18-22, 1980)]; LFA-1과 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편 (예: ATCC HB-9579 및 ATCC TIB-213); LFA-2와 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편; IL-2 또는 IL-2R과 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편; IL-12와 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편; IFN-감마와 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편; CD2와 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편; CD48과 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편; 모든 ICAM [예: ICAM-1 (ATCC CRL-2252), ICAM-2 및 ICAM-3]와 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편; CTLA4와 반응성인 리간드, 항

체 또는 항체 단편 (예: ATCC HB-304); Thy-1과 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편; CD56과 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편; CD3과 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편; CD29와 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편; TCR와 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편; VLA-4와 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편; VCAM-1과 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편; LECAM-1과 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편; ELAM-1과 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편; CD44와 반응성인 리간드, 항체 또는 항체 단편이 포함된다. 특정 양태에서는, 모노클로날 항체가 바람직하다. 기타 양태에서는, 항체 단편이 바람직하다. 항체 단편에는 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv 및 도메인 항체 (dAbs) [이에는 WO 2006/030220에 기재된 것이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다]가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 당업자는 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자와 기타 한 가지 면역억제제와의 조합물, 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자와 기타 2가지 면역억제제와의 조합물, 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자와 기타 3가지 면역억제제와의 조합물 등이 포함될 수 있다는 것을 용이하게 이해할 것이다. 최적의 조합물과 투여량의 결정은 당하 분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 결정하고 최적화할 수 있다.

[0131] 특히 유용한 조합물은 L104EA29YIg 또는 그의 제약 조성물과, IL-2 및 그의 리간드를 방해하는 화합물, 구체적으로는 활성화 T-림프구 표면 상에 선택적으로 발현되는 IL-2R (알파)에 대항하여 표적화된 길항제의 조합물이다. IL-2R (알파)와 결합하는 화합물은 동종이식편 거부에 관여하는 세포성 면역 반응에 있어 결정적인 경로인, 림프구의 IL-2 매개된 활성화를 경쟁적으로 억제한다.

[0132] 몇몇 구체적 조합물에는 다음이 포함된다: L104EA29YIg와 CD80 모노클로날 항체 (mAbs)의 조합물; L104EA29YIg와 CD86 mAbs의 조합물; L104EA29YIg, CD80 mAbs, 및 CD86 mAbs의 조합물; L104EA29YIg와 gp39 mAbs의 조합물; L104EA29YIg와 CD40 mAbs의 조합물; L104EA29YIg와 CD28 mAbs의 조합물; L104EA29YIg, CD80 및 CD86 mAbs, 및 gp39 mAbs의 조합물; L104EA29YIg, CD80 및 CD86 mAbs 및 CD40 mAbs의 조합물; 및 L104EA29YIg, 항-LFA1 mAb, 및 항-gp39 mAb의 조합물. gp39 mAb의 구체적 예는 MR1이다. 당업자는 기타 조합물도 용이하게 인지하고 이해할 것이다.

[0133] 전술 내용에 따라서 본 발명은 추가의 국면에서, 치료상 유효량의 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 보조제 및/또는 코르티코스테로이드와 공동 투여, 예를 들어 동시에 또는 순차적으로 투여하는 것을 포함하는 상기 정의된 바와 같은 방법을 제공한다. 목적은 독성이 있는 칼시네우린 억제제를 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자로 대체시키는 것이다. 그러나, 본 발명의 CTLA4 돌연변이체 분자는 CNI, 예를 들어 시클로스포린 (Neoral[®], Sandimmune[®]; 공급처: Novartis) 및 타크롤리무스 (FK506, Prograf[®]; 공급처: Fujisawa)와 동시에 또는 순차적으로 공동-투여할 수도 있다.

[0134] 보조제의 예에는 이노신 모노포스페이트 데히드로게나제 (IMPDH)의 억제제, 예를 들어 미코페놀레이트 모페닐 (MMF, Cellcept[®]; 공급처: Roche Laboratories) 및 미코페놀산 (Myfortic[®]; 공급처: Novartis); 라파마이신 (시롤리무스, Rapamune[®]; 공급처: Wyeth/Ayerst); 아자티오프린 (Azarsan[®]; 공급처: Salix, Imuran[®], 일반적); 림프구 귀소제, 예를 들어 FTY720 (공급처: Novartis); FK778 (공급처: Fujisawa); Jak-3 (공급처: Pfizer); 및 Certican[®] [에베롤리무스 (everolimus); 공급처: Novartis]가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

[0135] 코르티코스테로이드의 예에는 베타메타손, 부테소나이드, 코르티솔, 코르티손, 텍사메타손, 히드로코르티손, 메틸 프레드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손 및 트리암시놀론이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

[0136] 전형적인 공동-투여 조합물에는 L104EA29YIg와 상기 열거된 군 중에서 선택된 한 가지 이상의 보조제의 조합물; L104EA29YIg와 상기 열거된 군 중에서 선택된 하나 이상의 코르티코스테로이드의 조합물; L104EA29YIg, MMF (Cellcept[®]; 공급처: Roche) 및 상기 열거된 군 중에서 선택된 코르티코스테로이드의 조합물; 상기 열거된 군 중에서 선택된 코르티코스테로이드를 수반하거나 수반하지 않는, L104EA29YIg과 라파마이신 (시롤리무스, Rapamune[®]; 공급처: Wyeth/Ayerst)의 조합물이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

[0137] 상기 언급된 공동-투여 조합물은 유도제, 예를 들어 면역억제성 모노클로날 항체, 예를 들면 바실릭시마브 (Simulect[®]; 공급처: Novartis), 무로모나브 (muromonab) [오르토클론 (Orthoclone) OKT3[®]; 공급처: Ortho Biotech], 리툽시마브 (rituximab) (Rituxan[®]; 공급처: Genentech) 및 다클리주마브 (Zenapax[®]; 공급처: Roche Labs); 또는 항-흉선세포 글로불린 (Thymoglobulin[®]; 공급처: SangStat)과 함께 활용할 수도 있다. 예

를 들어, 적합한 조합물에는 바실릭시마브 (Simulect®; 공급처: Novartis)와 L104EA29YIg, MMF (Cellcept; 공급처: Roche) 및 프레드니솔론의 조합물; 또는 다클리주마브 (Zenapax®; 공급처: Roche), L104EA29YIg 및 라파마이신 (시롤리무스, Rapamune®; 공급처: Wyeth/Ayerst)의 조합물이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

[0138] 전형적으로, 상기 언급된 공동-투여되는 약물의 표준 투여량과 투여 레지멘은 본 발명의 CTLA4 돌연변이체 분자를 해당 치료 레지멘에 추가하는 것에 의해 영향을 받지 않는다. 그러나, 당업자는 덜 독성인 본 발명의 CTLA4 돌연변이체 분자를 치료 레지멘에 도입함으로써 인해, 보다 저 용량의 공동-투여 약물, 예를 들어 보조제 및/또는 코르티코스테로이드를 처방할 수 있다.

[0139] 처방에 관한 정보는 공동-투여되는 각 약물에 대한 패키지 삽입물에 근거할 수 있다. 코르티코스테로이드를 본 발명의 분자 또는 제약 조성물과 함께 공동-투여할 수 있다. 예를 들어, 대상체를 코르티코스테로이드로 매일 치료할 수도 있다. 하나의 스테로이드를 유지하면서 용량을 점점 감소시키는 전략에는 수술실 (OR) 도착일에는 메틸프레드니솔론 500 mg을 정맥내 투여하고, 2일째에는 메틸프레드니솔론 250 mg을 정맥내 투여한 다음, 3일째에는 프레드니손 (또는 프레드니솔론) 100 mg을 경구 투여한 후, 2주가 끝날 무렵까지 프레드니손 (또는 프레드니솔론) 용량을 1일 20 내지 30 mg으로 점점 감소시킨 다음, 6개월까지 프레드니손 (또는 프레드니솔론) 용량을 1일 2.5 mg 이상으로 점점 감소시키는 것이 포함될 수 있다. 치료 과정 내내 대상체는 1일 2.5 mg 이상으로 유지시킬 수 있다.

[0140] 부가의 공동-투여 약물에는 미코페놀레이트 모페틸 (MMF)이 포함될 수 있다. 전형적으로 MMF는 투여 일자 및 식사와 관련하여 일관된 스케줄로 2회분으로 나누어 투여한다. MMF에 대한 투여 레지멘의 예에는 1일 2 g 투여하는 것이 포함된다. 첫 번째 용량은 수술 전에 투여할 수 있다. 후속 용량은 대상체가 입으로 약물을 섭취할 수 있자마자 경구 투여할 수 있다. 용량과 스케줄은 실험실 값 (예를 들어, 감소된 WBC)과 대상체 관용성을 기준으로 하여 조정할 수 있다. 패키지 삽입물은 처방에 관한 상세한 정보를 제공한다.

[0141] 또 다른 공동-투여 약물에는 바실릭시마브가 포함될 수 있다. 재구성된 바실릭시마브 (5 ml 중의 20 mg)는 정상 식염수 또는 텍스트로스 5%를 이용하여 50 ml 용적이 되도록 희석시키고, 20 내지 30분에 걸쳐 정맥내 주입제로서 투여할 수 있다. 처음 20 mg 용량은 1일째에 (이식 당일) 투여할 수 있다. 두 번째 20 mg 용량은 5일째에 투여할 수 있다. 패키지 삽입물은 처방에 관한 상세한 정보를 제공한다.

[0142] 보조제 및 코르티코스테로이드를 포함하는 하나 이상의 제약 조성물과 동시에 또는 순차적으로 사용될, 자유 형태 또는 제약상 허용 가능한 염 형태의 L104EA29YIg를 포함하는, 예를 들어 상기 규정된 바와 같은 모든 방법에 사용하기 위한 치료적 조합물, 예를 들어 키트가 추가로 제공된다. 이러한 키트는 그의 투여에 관한 지시 사항을 포함할 수 있다.

[0143] 표지 및/또는 지시 사항은 해당 제약 조성물이 단독으로 사용되거나, 또는 선택 질환, 예를 들어 면역계 질환, 자가면역 질환, 면역억제성 질환, 상기 언급된 바와 같은 이식편 이식과 연관된 면역 장애를 치료하기 위해 제2 작용제와 병용해서, 동시에 또는 순차적으로 사용할 수 있다는 것을 표시할 수 있다.

[0144] 표지는 본원에 기재된 분자에 대한 적당한 투여량을 표시할 수 있다. 예를 들어, 표지는 B7과 그의 리간드와의 상호 작용을 차단시키고/시키거나 면역계 질환을 치료하는데 유효한 분자에 대한 투여량은 체중을 기준으로 할 수 있고, 투여 레지멘은 표적 혈청 구 프로파일에 의해 지시될 수 있다는 것을 표시할 수 있다. 예를 들어, 표지는 면역계 질환을 치료하기 위해 본원에 기재된 CTLA4 돌연변이체 분자의 유효한 표적 최저 혈청 농도가 약 0.2 µg/ml 내지 약 30 µg/ml일 수 있다는 것을 표시할 수 있다. 또 다른 한편, 표지는 본원에 기재된 CTLA4 돌연변이체 분자가 면역계 질환을 치료하기 위해 환자 체중 kg당 약 0.1 내지 약 20.0 mg의 양으로 투여될 수 있다는 것을 표시할 수 있다.

[0145] **본 발명의 분자의 생성 방법**

[0146] CTLA4 돌연변이체 분자의 발현은 원핵성 세포에서 일어날 수 있다. 가장 흔한 원핵생물은 각종 세균 균주로서 나타낸다. 세균은 그람 양성 또는 그람 음성일 수 있다. 전형적으로, 그람 음성 세균, 예를 들어 이. 콜라이 (*E. coli*)가 바람직하다. 기타 미생물 균주를 사용할 수도 있다.

[0147] CTLA4 돌연변이체 분자를 암호화하는 서열을, 원핵 세포 (예: 이. 콜라이)에서 외래 서열을 발현하도록 설계된 벡터 내로 삽입할 수 있다. 이들 벡터는 리보솜 결합 부위 서열을 따라 임의로 작동인자와 함께, 전사 개시를 위한 프로모터를 포함하도록 본원에서 규정되는 흔히 사용되는 원핵성 제어 서열을 포함할 수 있고, 베타-락타마제 (페니실리나제) 및 락토스 (lac) 프로모터 시스템 [참고: Chang, et al, (1977) *Nature* 198:1056], 트립

토관 (trp) 프로모터 시스템 [참고: Goeddel, et al., (1980) *Nucleic Acids Res.* 8:4057] 및 람다 유래된 P_L 프로모터 및 N-유전자 리보솜 결합 부위 [참고: Shimatake, et al., (1981) *Nature* 292:128]와 같이 흔히 사용되고 있는 프로모터를 포함한다.

- [0148] 이러한 발현 벡터는 또한, 복제 기점 및 선별성 마커, 예를 들어 항생제에 대한 내성을 부여하는 베타-락타마제 또는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 유전자를 포함할 것이므로, 상기 벡터는 세균에서 복제될 수 있고, 이러한 플라스미드를 수반하는 세포는 항생제 (예: 앵피실린 또는 카나마이신)의 존재 하에 성장시킨 경우에 선별할 수 있다.
- [0149] 발현 플라스미드는 각종 표준 방법, 예를 들어 CaCl₂-속 [참고: Cohen, (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110, and Sambrook et al. (eds.), "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, (1989)] 및 전기천공 등을 통하여 원핵 세포 내로 도입할 수 있다.
- [0150] 본 발명의 실시예에 따르면, 진핵 세포 또한 적합한 숙주 세포이다. 진핵 세포의 예에는 모든 동물 세포 (일차 세포든지 아니면 불멸화시킨 것이든지 간에), 효모 [예: 삭카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*), 슈조삭카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*), 및 피치아 파스토리스 (*Pichia pastoris*)], 및 식물 세포가 포함된다. 골수종, COS 및 CHO 세포가 숙주로서 사용될 수 있는 동물 세포의 예이다. 특정한 CHO 세포에는 DG44 [참고: Chasin, et al., 1986 *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555-556; Kolkekar 1997 *Biochemistry* 36:10901-10909], CHO-K1 (ATCC No. CCL-61), CHO-K1 Tet-On 세포주 (공급처: Clontech), ECACC 85050302로 명명된 CHO (공급처: CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), CHO 클론 13 (공급처: GEIMG, Genova, IT), CHO 클론 B (공급처: GEIMG, Genova, IT), ECACC 93061607로 명명된 CHO-K1/SF (공급처: CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), 및 ECACC 92052129로 명명된 RR-CHOK1 (공급처: CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK)가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 식물 세포의 예에는 담배 (완전 식물, 세포 배양액, 또는 칼루스), 옥수수, 대두, 및 벼 세포가 포함된다. 옥수수, 대두 및 벼 종자가 또한 허용 가능하다.
- [0151] CTLA4 돌연변이체 분자를 암호화하는 핵산 서열을, 진핵 숙주에서 외래 서열을 발현하도록 설계된 벡터 내로 삽입할 수 있다. 이러한 벡터의 조절성 요소는 특정한 진핵 숙주에 따라서 다양할 수 있다.
- [0152] 발현 벡터에 사용하기 위해 흔히 사용되고 있는 진핵성 제어 서열에는 포유류 세포와 화합성인 프로모터 및 제어 서열, 예를 들어 CMV 프로모터 (CDM8 벡터) 및 조류 육종 바이러스 (ASV) (π LN 벡터)가 포함된다. 흔히 사용되고 있는 기타 프로모터에는 원숭이 바이러스 40 (SV40)으로부터의 초기 및 말기 프로모터 [참고: Fiers, et al., (1973) *Nature* 273:113], 또는 기타 바이러스성 프로모터, 예를 들어 폴리오마, 아데노바이러스 2 및 소 유두종 바이러스로부터 유래된 프로모터가 포함된다. 유도성 프로모터, 예를 들어 hMTII [참고: Karin, et al., (1982) *Nature* 299:797-802]를 사용할 수도 있다.
- [0153] 진핵 생물에서 CTLA4 돌연변이체 분자를 발현하기 위한 벡터는 증강인자 영역으로 불리우는 서열을 수반할 수도 있다. 이들은 유전자 발현을 최적화하는데 중요하고, 프로모터 영역의 상단 또는 하단에 발견된다.
- [0154] 진핵 숙주 세포에 대한 발현 벡터의 예에는 포유류 숙주 세포에 대한 벡터 [예: BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (공급처: Maniatis); pIRES (공급처: Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (공급처: Life Technologies); pVPack 벡터, pCMV 벡터, pSG5 벡터 (공급처: Stratagene)], 레트로바이러스성 벡터 [예: pFB 벡터 (공급처: Stratagene)], pCDNA-3 (공급처: Invitrogen) 또는 그의 변형된 형태, 아데노바이러스성 벡터; 아데노 관련 바이러스 벡터, 바콜로바이러스 벡터, 효모 벡터 [예: pESC 벡터 (공급처: Stratagene)]가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.
- [0155] CTLA4 돌연변이체 분자를 암호화하는 핵산 분자를 진핵 숙주 세포의 게놈 내로 통합할 수 있고, 이러한 숙주 게놈이 복제함에 따라 복제할 수 있다. 또 다른 한편, CTLA4 돌연변이체 분자를 수반하는 벡터는 염색체의 복제를 허용해 주는 복제 기점을 함유할 수 있다.
- [0156] 상기 핵산 서열을 삭카로마이세스 세레비지애에서 발현하기 위해, 내인성 효모 플라스미드로부터의 복제 기점, 2 μ 서클을 사용할 수 있다 [참고: Broach, (1983) *Meth. Enz.* 101:307]. 또 다른 한편, 자기 복제를 증진시킬 수 있는 효모 게놈으로부터의 서열을 사용할 수 있다 [참고: 예를 들어, Stinchcomb et al., (1979) *Nature* 282:39; Tschemper et al., (1980) *Gene* 10:157; and Clarke et al., (1983) *Meth. Enz.* 101:300].
- [0157] 효모 벡터에 대한 전사 제어 서열에는 당분해 효소의 합성을 위한 프로모터가 포함된다 [참고: Hess et al., (1968) *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149; Holland et al., (1978) *Biochemistry* 17:4900]. 당해 분야에 공지된 부

가의 프로모터에는 CDM8 벡터 내에 제공된 CMV 프로모터 [참고: Toyama and Okayama, (1990) *FEBS* 268:217-221]; 3-포스포글리세레이트 키나제에 대한 프로모터 [참고: Hitzeman et al., (1980) *J Biol. Chem.* 255:2073], 및 기타 당분해 효소에 대한 프로모터가 포함된다.

- [0158] 기타 프로모터는 유도성인데, 이는 이들이 환경적 자극이나 세포의 성장 배지에 의해 조절될 수 있기 때문이다. 이들 유도성 프로모터의 예에는 열 속 단백질, 알코올 데히드로게나제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 이화 작용과 연관된 효소, 및 말토스 및 갈락토스 활용에 대해 책임이 있는 효소에 대한 유전자로부터의 프로모터가 포함된다.
- [0159] 조절성 서열을 암호화 서열의 3' 말단에 위치시킬 수도 있다. 이들 서열은 메신저 RNA를 안정화시키는 작용을 할 수 있다. 이러한 종결인자는 몇 가지 효모-유래된 및 포유류 유전자에서 암호화 서열 다음의 3' 비해독 영역에서 발견된다.
- [0160] 식물 및 식물 세포에 대한 벡터의 예에는 아그로박테륨 (*Agrobacterium*) T₁ 플라스미드, 콜리플라워 모자이크 바이러스 (CaMV), 및 토마토 골텐 모자이크 바이러스 (TGMV)가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.
- [0161] 포유류 세포 숙주 시스템 형질전환의 일반적 국면이 다음 문헌에 보고되었다 [참고: 1983년 8월 16일자로 허여된 미국 특허 제4,399,216호]. 포유류 세포는 인산칼슘의 존재 하에서의 형질감염, 미소주사, 전기천공, 또는 바이러스성 벡터를 이용한 형질도입을 포함하지만, 그에 제한되지 않는 방법에 의해 형질전환시킬 수 있다.
- [0162] 외래 DNA 서열을 식물 및 효모 계통 내로 도입하는 방법에는 (1) 기계적 방법, 예를 들어 DNA를 단일 세포 또는 원형질체 내로 미소주사하고, 세포를 DNA의 존재 하에 유리 비드와 함께 와동시키거나, 또는 DNA-피복된 텅스텐 또는 금 구 (gold sphere)를 세포 또는 원형질체 내로 쏘는 방법; (2) 고 전압 전기적 펄스를 적용하거나 (전기천공) 또는 폴리에틸렌 글리콜 처리를 통하여 거대분자에 침투 가능한 세포 막을 만듦으로써 DNA를 도입하는 방법; 또는 (3) 세포 막과 융합하는 리포솜 (cDNA 함유)을 사용하는 방법이 포함된다.
- [0163] CTLA4 돌연변이체 분자의 발현은 당해 분야에 공지된 방법에 의해 탐지할 수 있다. 예를 들어, 이러한 돌연변이체 분자는 SDS-PAGE 겔을 염색하는 쿠마시 (Coomassie) 및 CTLA4와 결합하는 항체를 사용하는 면역블롯팅에 의해 탐지할 수 있다. 표준 단백질 정제 수단, 예를 들어 친화 크로마토그래피 또는 이온-교환 크로마토그래피를 사용하여 단백질 회수를 수행하여 실질적으로 순수한 생성물을 수득할 수 있다 [참고: R. Scopes in: "*Protein Purification, Principles and Practice*", Third Edition, Springer-Verlag (1994)].
- [0164] 미국 공개공보 제2005/0019859호, 제2005/0084933호 및 WO 04/058944에는 동물 또는 포유류 세포 배양에 의해 본 발명의 단백질, 구체적으로는 재조합 당단백질 생성물을 생성하는 방법이 교시되어 있고, 이는 본원에 참고로 도입된다.
- [0165] 본 발명은 상기 본원에서 생성된 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 추가로 제공한다.
- [0166] **CTLA4Ig 코돈에 의거한 돌연변이 유발**
- [0167] 한 양태에서, 부위 지시된 돌연변이 유발 및 신규한 스크리닝 과정을 사용하여 CD86에 대한 결합 친화력을 개선시키는 CTLA4의 세포의 도메인에서 몇 가지 돌연변이를 확인하였다. 이러한 양태에서는, 돌연변이가 세린 25에서부터 아르기닌 33까지의 CTLA4의 세포의 도메인 영역, C 가닥 (알라닌 49 및 트레오닌 51), F 가닥 (리신 93, 글루탐산 95 및 루이신 96), 및 메티오닌 97에서부터 티로신 102까지의 영역, 티로신 103에서부터 글리신 107까지의 영역, 및 위치 글루타민 111, 티로신 113 및 이소루이신 115에서의 G 가닥 잔기에서 수행되었다. 이들 부위는 키메라 CD28/CTLA4 융합 단백질의 연구 [참고: Peach et al., *J. Exp. Med.*, 1994, 180:2049-2058], 및 어느 아미노산 잔기 측쇄가 용매 노출되었는지를 예측하고 CD28과 CTLA4 간의 특정 위치에서의 아미노산 잔기 동일성 또는 상동성 결여를 예측하는 모델에 기초하여 선택되었다. 또한, 공간적으로 상기 확인된 잔기와 아주 근접하여 위치한 (5 내지 20 옹스트롬 단위) 모든 잔기가 본 발명의 일부로서 간주된다.
- [0168] CD80 및/또는 CD86에 대한 변경된 친화도를 지닌 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 합성하고 스크리닝하기 위해, 2-단계 전략을 채택하였다. 이러한 실험은 먼저, CTLA4의 세포의 도메인의 특이적 코돈에서 돌연변이물 라이브러리를 생성시킨 다음, 비아코어 (BIAcore) 분석에 의해 이들을 스크리닝하여 CD80 또는 CD86에 대한 변경된 반응성을 지닌 돌연변이체를 확인하는 것을 수반한다. 비아코어 검정 시스템 (공급처: Pharmacia, Piscataway, NJ.)는 CD80Ig 또는 CD86Ig를, 탐지기 내에 위치한 텍스트란-피복된 센서 칩과 공유 결합시키는 것을 필수적으로 포함하는 표면 플라즈몬 공명 탐지기 시스템을 이용한다. 이어서, 시험 분자를 센서 칩 함유 챔버 내로 주사할 수 있고, 결합하는 상보성 단백질의 양은 센서 칩의 텍스트란-피복 측면과 물리적으로 연관이 있는 분자량

변화에 근거하여 평가할 수 있는데; 이러한 분자량 변화는 탐지기 시스템에 의해 측정할 수 있다.

[0169] 본 발명의 이점

[0170] CD80 및 CD86과 결합하는 CTLA4는 신속한 "작동" 속도와 신속한 해리 ("이탈") 속도를 특징으로 하고, CTLA4Ig-CD86 복합체는 CTLA4Ig-CD80 복합체 보다 대략 5 내지 8배 정도 더 신속하게 해리되기 때문에, CD80 및/또는 CD86으로부터의 CTLA4Ig의 해리 속도를 느리게 하면, 보다 강력한 면역억제 특성을 지닌 분자가 생성될 것으로 판단되었다. 따라서, 야생형 CTLA4, 또는 돌연변이되지 않은 형태의 CTLA4Ig와 비교해서 CD80- 또는 CD86-양성 세포에 대한 보다 높은 결합 친화력을 지닌 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 야생형 CTLA4, 또는 돌연변이되지 않은 형태의 CTLA4Ig 보다 더 높은 효율로 항원 특이적 활성화 세포의 프라이밍 (초회 항원자극)을 차단시키는 것으로 예상된다.

실시예

[0171] 다음 실시예는 본 발명을 예시하고 당업자가 이를 만들고 사용하는 것을 도와주기 위해 제시된다. 본 실시예는 본 발명의 범위를 어떠한 방식으로든 제한하지 않는다.

[0172] 실시예 1

[0173] 본 실시예는 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 생성시키기 위해 사용된 방법에 관한 설명을 제공한다. 단일 부위 돌연변이체 L104EIg를 생성시키고, 이를 대상으로 하여 CD80 및/또는 CD86에 대한 결합 역학을 시험하였다. L104EIg 뉴클레오티드 서열을 주형으로서 사용하여 이중-부위 돌연변이체 CTLA4 서열인 L104EA29YIg를 생성시켰는데, 이를 대상으로 하여 CD80 및/또는 CD86에 대한 결합 역학을 시험하였다.

[0174] CTLA4Ig 코돈에 의거한 돌연변이 유발

[0175] CD80 및/또는 CD86 분자로부터 보다 느린 해리 속도 ("이탈" 속도)를 나타내는 돌연변이체 CTLA4Ig 분자를 확인하기 위한 돌연변이 유발 및 스크리닝 전략을 개발하였다. 주형으로서 CTLA4Ig [참고: 미국 특허 제5,844,095호; 제5,851,795호; 및 제5,885,796호; ATCC 승인 번호 68629]를 사용하여 단일-부위 돌연변이체 뉴클레오티드 서열을 생성시켰다. 코돈의 위치 1 및 2에서 모든 잔기를 허용하긴 하지만, 위치 3에서는 구아닌 또는 티민 (XXG/T; NNG/T로서 공지되기도 함) 만을 허용함으로써 특이적 cDNA 코돈을 무작위 돌연변이 유발시키기 위한 돌연변이 유발성 올리고뉴클레오티드 PCR 프라이머를 설계하였다. 이러한 방식으로, 특정 아미노산을 암호화하는 특이적 코돈을 무작위로 돌연변이시켜 20개 아미노산 각각을 암호화할 수 있었다. 이와 관련하여, XXG/T 돌연변이 유발로 인해 20개 아미노산 각각을 암호화하는 32개의 잠재적 코돈이 산출되었다. CTLA4Ig의 -M97-G107에 아주 근접하여 위치한 돌연변이물을 암호화하는 PCR 생성물 [참고: 도 7, 서열 3 및 4; 또는 도 8, 서열 5 및 6]을 SacI/XbaI로 분해시키고, 유사하게 절단된 CTLA4Ig πLN (piLN으로서 공지되기도 함) 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다. 이 방법을 사용하여 단일-부위 CTLA4 돌연변이체 분자 L104EIg (도 8, 서열 5 및 6)를 생성시켰다.

[0176] CTLA4Ig의 S25-R33에 근접하여 돌연변이 유발시키기 위해, 칩목 NheI 제한 부위를 먼저, PCR 프라이머-지시된 돌연변이 유발에 의해 상기 루프에 대해 5'에 도입하였다. PCR 생성물을 NheI/XbaI로 분해시키고, 유사하게 절단된 CTLA4Ig 또는 L104EIg 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다. 이 방법을 사용하여 이중-부위 CTLA4 돌연변이체 분자 L104EA29YIg (도 7, 서열 3 및 4)를 생성시켰다. 특히, 단일-부위 CTLA4 돌연변이체 분자 L104EIg를 암호화하는 핵산 서열을 주형으로서 사용하여 이중-부위 CTLA4 돌연변이체 분자 L104EA29YIg를 생성시켰다. 이러한 L104EA29YIg를 갖는 piLN 벡터가 도 12에 도시되었다.

[0177] 실시예 2

[0178] 다음은 돌연변이되지 않은 CTLA4Ig 분자와 비교해서 CD80 및 CD86 항원에 대한 결합 친화력이 높은, 실시예 1에 기재된 구조물로부터 발현시킨 단일-부위 및 이중-부위 돌연변이체 CTLA4 폴리펩티드를 확인하기 위해 사용된 스크리닝 방법에 관한 설명을 제공한다.

[0179] 현 시험관내 및 생체내 연구는 CTLA4Ig가 단독으로는 항원 특이적 활성화 T 세포의 프라이밍을 완전히 차단시킬 수 없다는 것을 나타내었다. T 세포 증식 억제를 측정하는, CD80 또는 CD86에 대해 특이적인 모노클로날 항체와 CTLA4Ig를 이용한 시험관내 연구는 항-CD80 모노클로날 항체가 CTLA4Ig 억제를 증대시키지 않았다고 표시하였다. 그러나, 항-CD86 모노클로날 항체는 상기 억제를 증대시켰는데, 이는 CTLA4Ig가 CD86 상호 작용을 차단

시키는데 유효하지 않았다는 지표이다. 이들 데이터는 CD86-매개된 반응에 대한 것 보다 대략 100배 정도 더 낮은 CTLA4Ig 농도를 필요로 하는 CD80-매개된 세포성 반응의 억제를 나타내는, 문헌 [참고: Linsley et al. (*Immunity*, (1994), 1:793-801)]에 보고된 기존의 발견을 뒷받침 해준다. 이러한 발견을 근거로 하여, 야생형 CTLA4 보다 CD86에 대한 결합 친화력이 더 높은 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 CTLA4Ig 보다 항원 특이적 활성화 세포의 프라이밍을 보다 잘 차단시킬 수 있어야 하는 것으로 추측되었다.

[0180] 이를 위해, 상기 실시예 1에 기재된 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를, 신규 스크리닝 과정을 이용하여 스크리닝 하여 CD80 및 CD86에 대한 결합 친화력을 개선시키는 CTLA4의 세포외 도메인 내의 몇 가지 돌연변이물을 확인하였다. 이러한 스크리닝 전략은 단백질 정제 또는 정량화를 필요로 하지 않으면서도 외관상 보다 느린 "이탈" 속도를 나타내는 돌연변이체를 직접 확인하는데 유효한 방법을 제공하였는데, 이는 "이탈" 속도 결정이 농도와는 독립적 (비의존적)이기 때문이다 [참고: O'Shannessy et al., (1993) *Anal. Biochem.*, 212:457-468].

[0181] COS 세포를 개개의 미니프렙 (miniprep) 정제된 플라스미드 DNA로 형질감염시키고 수 일 동안 증식시켰다. 3일 적응용 배양 배지를, 가용성 CD80Ig 또는 CD86Ig로 피복시킨 비아코어 바이오센서 칩 (공급처: Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)에 적용하였다. 돌연변이체 단백질의 특이적 결합과 해리를 표면 플라스몬 공명에 의해 측정하였다 [참고: O'Shannessy, D. J., et al., (1993) *Anal. Biochem.* 212:457-468]. 모든 실험을 25°C 하에 비아코어™ 또는 비아코어™ 2000 바이오센서 상에서 수행하였다. 표준 N-에틸-N'-(디메틸아미노프로필) 카보디이미드N-히드록시석신이미드 커플링을 이용하여, 리간드를 조사 등급 NCM5 센서 칩 (공급처: Pharmacia) 상에 고정화시켰다 [참고: Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268-277; Khilko, S.N., et al.(1993) *J. Biol. Chem.* 268:5425-15434].

[0182] **스크리닝 방법**

[0183] 24 웰 조직 배양 판에서 성장시킨 COS 세포를, 돌연변이체 CTLA4Ig를 암호화하는 DNA로 일시적으로 형질감염시켰다. 분비된 가용성 돌연변이체 CTLA4Ig를 함유하는 배양 배지를 3일 후에 수집하였다.

[0184] 적응시킨 COS 세포 배양 배지를, CD86Ig 또는 CD80Ig로 유도체화시킨 비아코어 바이오센서 칩 상으로 유도시켰고 [참고: Greene et al., 1996 *J Biol. Chem.* 271:26762-26771], 야생형 CTLA4Ig에 대해 관찰된 것 보다 더 느린 "이탈" 속도를 나타내는 돌연변이체 분자를 확인하였다. 선별된 배지 샘플에 상응하는 cDNAs를 서열 분석하고 DNA를 준비하여 보다 큰 규모의 COS 세포 일시적 형질감염을 수행하였는데, 이로부터 배양 배지를 단백질 A 정제한 후에 돌연변이체 CTLA4Ig 단백질을 제조하였다.

[0185] 비아코어 분석 조건과 평형 결합 데이터 분석은 문헌 [참고: J. Greene et al. 1996 *J. Biol. Chem.* 271:26762-26771] 및 본원에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0186] **비아코어 데이터 분석**

[0187] 분석에 앞서 센서그램 기준선을 제로 반응 단위 (RU)로 표준화하였다. 샘플을 모의-유도체화 유도 세포 상에서 수행하여, 용액들 간의 벌크 굴절 지수 차이로 인한 배경 반응 단위 (RU) 값을 결정하였다. 평형 해리 상수 (K_d)를 R_{eq} 대 C의 플롯 (여기서, R_{eq} 는 정지 상태 반응 - 모의 유도체화 칩 상의 반응이고, C는 분석물의 몰 농도이다)으로부터 계산하였다. 시판용 비선형 곡선-피팅 소프트웨어 (공급처: Prism, GraphPAD Software)를 사용하여 결합 곡선을 분석하였다.

[0188] 실험 데이터를 먼저, 단일 수용체에 대한 단일 리간드 결합을 알아보기 위한 모델 [1-부위 모델, 즉 간단한 랑뮈르 (langmuir) 시스템, $A+B \leftrightarrow AB$]에 피팅하고, 평형 연합 상수 ($K_d = [A] \cdot [B] / [AB]$)를 방정식 $R = R_{max} \cdot C / (K_d + C)$ 로부터 계산하였다. 그 후, 데이터를 방정식 $R = R_{max1} \cdot C / (K_{d1} + C) + R_{max2} \cdot C / (K_{d2} + C)$ 로써 기재된 바와 같은 2개의 비-상호 작용성 독립적 결합 부위를 갖는 수용체에 대한 리간드 결합의 가장 간단한 2-부위 모델에 피팅하였다.

[0189] 이들 두 모델의 적합도는 실험 데이터와 비교함으로써 가시적으로 분석하였고, 평방합의 F 시험에 의해 통계적으로 분석하였다. 2-부위 모델이 상당히 더 우수하게 피팅되지 않는 한은, 보다 간단한 1-부위 모델을 최량 적합물로서 선택하였다 ($p < 0.1$).

[0190] BIA 평가 2.1 소프트웨어 (공급처: Pharmacia)를 사용하여 연합과 해리 분석을 수행하였다. 연합 속도 상수 k_{on} 을, 균질한 단일-부위 상호 작용과 나란한 2-부위 상호 작용 둘 다를 고려한 2가지 방식으로 계산하였다. 단일-부위 상호 작용의 경우에는, k_{on} 값을 방정식 $R_t = R_{eq}(1 - \exp^{-k_{on}(t-t_0)})$ [여기서, R_t 는 소정의 시간 t 에서의 반응이

고; R_{eq} 는 정지 상태 반응이며; t_0 는 주사 시작시의 시간이고; k_s 는 $dR/dt=k_{on} \cdot Ck_{off}$ 이며; C 는 단량체성 결합 부위 측면에서 계산된 분석물의 농도이다]에 따라서 계산하였다. 2-부위 상호 작용의 경우에는, k_{on} 값을 방정식 $R_t=R_{eq1}(1-\exp^{-k_{s1}(t-t_0)})+R_{eq2}(1-\exp^{-k_{s2}(t-t_0)})$ 에 따라서 계산하였다. 각 모델에 대한 k_{on} 값은 k_s 대 C 의 플롯의 계산된 기울기로부터 (약 70% 최대 연합까지) 결정하였다.

[0191] 해리 데이터를 1 부위 ($AB=A+B$) 또는 2 부위 ($AiBj=Ai+Bj$) 모델에 따라서 분석하였고, 속도 상수 (k_{off})를 최량 적합 곡선으로부터 계산하였다. 잔류물이 기계 배경 (기계에 따라서 2 내지 10 RU) 보다 큰 경우 (이러한 경우에는, 2-결합 부위 모델을 이용하였다)를 제외하고는 상기 결합 부위 모델을 사용하였다. 관계식 $t_{1/2}=0.693/k_{off}$ 을 사용하여, 수용체 점유의 하프 타임을 계산하였다.

[0192] **유동 세포계수법**

[0193] 무린 mAb L307.4 (항-CD80)는 공급처 [Becton Dickinson (San Jose, California)]로부터 구입하였고, IT2.2 [항-B7-0 (CD86로서 공지되기도 함)]는 공급처 [Pharmingen (San Diego, California)]로부터 구입하였다. 면역염색을 위해 CD80-양성 및/또는 CD86-양성 CHO 세포를, 10 mM EDTA를 함유하는 인산염 완충 식염수 (PBS)에서 항온 배양함으로써 그들의 배양 용기로부터 꺼냈다. CHO 세포 ($1-10 \times 10^5$)를 먼저, 10% 태아 소 혈청 (FBS)를 함유하는 DMEM에서 mAbs 또는 면역글로불린 용합 단백질과 함께 항온 배양한 다음, 세척하고 플루오레세인 이소티오시아네이트-접합된 염소 항-마우스 또는 항-인간 면역글로불린 제2 단계 시약 (공급처: Tago, Burlingame, California)과 함께 항온 배양하였다. 세포를 최종 세척하고 FACSscan (공급처: Becton Dickinson) 상에서 분석하였다.

[0194] **SDS-PAGE 및 크기 배제 크로마토그래피**

[0195] SDS-PAGE를 트리스 (Tris)/글리신 4-20% 아크릴아미드 겔 (공급처: Novex, San Diego, CA) 상에서 수행하였다. 분석용 겔을 쿠마시 블루 (Coomassie Blue)로 염색하고, 디지털 스캐닝함으로써 흡수 겔 영상을 획득하였다. CTLA4Ig (25 μ g) 및 L104EA29YIg (25 μ g)을, 1.0 ml/min의 유속으로 0.02% NAN_3 을 함유하는 인산염 완충 식염수에서 평형시킨 TSK-GEL G300 SW_{XL} 칼럼 (7.8 x 300 mm, 공급처: Tosohaas, Montgomeryville, PA)을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피함으로써 분석하였다.

[0196] **CTLA4X_{C120S} 및 L104EA29YX_{C120S}**

[0197] 단일쇄 CTLA4X_{C120S}을 기존 문헌 [참고: Linsley et al, (1995) J. Biol. Chem., 270:15417-15424]에 기재된 바와 같이 제조하였다. 간략하게 설명하면, 온코스타틴 M CTLA4 (OMCTLA4) 발현 플라스미드를 주형으로서 사용하였고, 정배향 프라이머

[0198] GAGGTGATAAAGCTTCACCAATGGGTGTACTGCTCACACAG를 선택하여 벡터 중의 서열과 매치시켰고, 역배향 프라이머

[0199] GTGGTGTATTGGTCTAGATCAATCAGAATCTGGGCACGGTTC는 CTLA4의 세포외 도메인 중의 마지막 7개 아미노산 (즉, 아미노산 118-124)에 상응하였으며, 제한 효소 부위와 정지 코돈 (TGA)을 함유하였다. 역배향 프라이머는 C120S (위치 120에서의 시스테인이 세린으로 전환됨) 돌연변이를 명시하였다. 특히, 상기 제시된 역배향 프라이머의 뉴클레오티드 서열 GCA (뉴클레오티드 34-36)를 다음 뉴클레오티드 서열들 중의 하나로 대체시켰다: AGA, GGA, TGA, CGA, ACT, 또는 GCT. 당업자는 뉴클레오티드 서열 GCA가 시스테인에 대한 코돈 TGC의 역배향 상보적 서열이라는 것을 이해할 것이다. 유사하게, 뉴클레오티드 서열 AGA, GGA, TGA, CGA, ACT, 또는 GCT는 세린에 대한 코돈의 역배향 상보적 서열이다. 폴리머라제 연쇄 반응 생성물을 *HindIII/XbaI*로 분해시키고, 발현 벡터 π LN (공급처; Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ) 내로 방향적으로 서브클로닝하였다. L104EA29YX_{C120S}을 동일한 방식으로 제조하였다. 각 구조물을 DNA 서열 분석함으로써 입증하였다.

[0200] **결합 친화력이 높은 돌연변이체의 확인 및 생화학적 성상 확인**

[0201] 돌연변이 유발을 위해 24개 아미노산을 선택하였고, 이로써 생성된 약 2300개 돌연변이체 단백질을 대상으로 하여 표면 플라즈몬 공명 (SPR; 상기 언급된 바와 같음)에 의해 CD86Ig 결합에 대해 검정하였다. 각 부위에서의 돌연변이 유발의 주요 효과가 표 II에 요약되었다. S25-R33 중의 몇몇 아미노산을 무작위 돌연변이 유발시키면, 외관상으로는 리간드 결합이 변경되지 않았다. E31 및 R33과 잔기 M97-Y102를 돌연변이 유발시키면, 외관상으로는 리간드 결합성이 저하되었다. 잔기 S25, A29, 및 T30, K93, L96, Y103, L104, 및 G105를 돌

연변이 유발시키면, 느린 "작동" 속도 및/또는 느린 "이탈" 속도를 나타내는 단백질이 생성되었다. 이들 결과는 S25-R33 영역 내의 잔기와, M97-Y102 내의 또는 근처의 잔기가 리간드 결합성에 영향을 미친다는 기존의 발견을 확증시켜 준다 [참고: Peach et al., (1994) J. Exp. Med., 180:2049-2058].

[0202] 부위 S25, T30, K93, L96, Y103, 및 G105를 돌연변이 유발시키면, CD86Ig로부터 보다 느린 "이탈" 속도를 나타내는 몇몇 돌연변이체 단백질이 확인되었다. 그러나, 이들 경우에는 느린 "이탈" 속도가 느린 "작동" 속도에 의해 보상되는데, 이로써 야생형 CTLA4Ig을 이용한 경우에 관찰된 바와 외관상 유사한 CD86Ig에 대한 전반적인 결합 친화력을 지닌 돌연변이체 단백질이 생성되었다. 또한, K93을 돌연변이 유발시키면 상당한 응집이 유발되었는데, 이것이 관찰된 역학 변화에 대해 책임이 있을 수 있다.

[0203] L104를 무작위 돌연변이 유발시킨 다음 COS 세포 형질감염시키고, 고정화 CD86Ig 상에서 배양 배지 샘플의 SPR에 의해 스크리닝하면, 야생형 CTLA4Ig 보다 대략 2배 정도 더 느린 "이탈" 속도를 나타내는 돌연변이체 단백질을 함유하는 6개 배지 샘플이 생성되었다. 이들 돌연변이체의 상응하는 cDNA를 서열 분석한 경우, 각각은 루이신이 글루탐산으로 돌연변이된 것 (L104E)을 암호화하는 것으로 밝혀졌다. 명백하게는, 루이신 104를 아스파르트산으로 치환시킨 것 (L104D)은 CD86Ig 결합성에 영향을 미치지 못하였다.

[0204] 이어서, 표 II에 열거된 각 부위에서 돌연변이 유발을 반복하였는데, 이때에는 상기 언급된 바와 같이, 야생형 CTLA4Ig 대신 PCR 주형으로서 L104E를 사용하였다. 고정화 CD86Ig를 사용하여 다시 SPR 분석한 결과, 야생형 CTLA4Ig 보다 대략 4배 정도 더 느린 "이탈" 속도를 나타내는 단백질을 수반한, 알라닌 29의 돌연변이 유발로부터의 6개 배양 배지 샘플을 확인하였다. 가장 느린 2개는 티로신 치환물 (L104EA29Y)이고, 2개는 루이신 치환물 (L104EA29L)이며, 1개는 트립토판 치환물 (L104EA29W)이고, 1개는 트레오닌 치환물 (L104EA29T)이었다. 외관상, 알라닌 29를 야생형 CTLA4Ig에서 단독으로 무작위 돌연변이시킨 경우에는, 느린 "이탈" 속도 변이체가 전혀 확인되지 않았다.

[0205] 정제된 L104E 및 L104EA29YIg의 응집 상태와 상대적 분자량을 SDS-PAGE 및 크기 배제 크로마토그래피에 의해 평가하였다. L104EA29YIg (약 1 µg; 레인 3) 및 L104EIg (약 1 µg; 레인 2)는 외관상, 환원적 조건 (약 50 kDa; +βME; + 2-머캅토에탄올) 및 비-환원적 조건 (약 100 kDa; -βME) 하에 CTLA4Ig (약 1 µg; 레인 1)과 동일한 전기영동적 이동도를 나타내었다 (도 10A). 크기 배제 크로마토그래피는 L104EA29YIg (도 10C)가 외관상 이량체성 CTLA4Ig (도 10B)와 동일한 이동도를 나타내었다는 것을 입증해 주었다. 주요 피크는 단백질 이량체를 나타내는 반면, 도 10B에서 보다 신속하게 용출되는 소수 피크는 보다 고분자량 응집체를 나타낸다. 대략 5.0%의 CTLA4Ig가 보다 고분자량 응집체로서 존재하였지만, L104EA29YIg이나 L104EIg가 응집되었다는 명백한 증거는 없었다. 따라서, L104EIg 및 L104EA29YIg를 이용한 경우에 관찰된 CD86Ig에 대한 보다 강력한 결합은 돌연변이 유발에 의해 유도된 응집에 일조할 수 없었다.

[0206] **평형 및 역학 결합 분석**

[0207] 평형 및 역학 결합 분석은 표면 플라즈몬 공명 (SPR)을 사용하여 단백질 A 정제된 CTLA4Ig, L104EIg, 및 L104EA29YIg 상에서 수행하였다. 그 결과가 다음 표 I에 제시되었다:

표 1

평형 및 결합 역학 상수

고정화 단백질	분석물	$k_{on} (x 10^5) M^{-1} S^{-1}$	$k_{off} (x 10^{-3}) S^{-1}$	$K_d nM$
CD80Ig	CTLA4Ig	3.44 ± 0.29	2.21 ± 0.18	6.51 ± 1.08
CD80Ig	L104EIg	3.02 ± 0.05	1.35 ± 0.08	4.47 ± 0.36
CD80Ig	L104EA29YIg	2.96 ± 0.20	1.08 ± 0.05	3.66 ± 0.41
CD80Ig	CTLA4X _{C120S}	12.0 ± 1.0	230 ± 10	195 ± 25
CD80Ig	L104EA29YX _{C120S}	8.3 ± 0.26	71 ± 5	85.0 ± 2.5
CD86Ig	CTLA4Ig	5.95 ± 0.57	8.16 ± 0.52	13.9 ± 2.27
CD86Ig	L104EIg	7.03 ± 0.22	4.26 ± 0.11	6.06 ± 0.05
CD86Ig	L104EA29YIg	6.42 ± 0.40	2.06 ± 0.03	3.21 ± 0.23
CD86Ig	CTLA4X _{C120S}	16.5 ± 0.5	840 ± 55	511 ± 17
CD86Ig	L104EA29YX _{C120S}	11.4 ± 1.6	300 ± 10	267 ± 29

[0208]

[0209] (상기 값은 3가지 상이한 실험으로부터의 평균 ± 표준 편차이다).

[0210] 관찰된 평형 해리 상수 (K_d ; 표 I)는 특정 농도 범위 (5.0-200 nM)에 걸쳐 생성된 결합 곡선으로부터 계산하였다. L104EA29YIg는 L104EIg 또는 CTLA4Ig 보다 CD86Ig와 더 강력하게 결합한다. L104EIg (6.06 nM) 또는

CTLA4Ig (13.9 nM) 보다 더 낮은 L104EA29YIg의 K_d (3.21 nM)는 CD86Ig에 대한 L104EA29YIg의 결합 친화력이 더 높다는 지표이다. L104EIg (4.47 nM) 또는 CTLA4Ig (6.51 nM) 보다 더 낮은 L104EA29YIg의 K_d (3.66 nM)는 CD80Ig에 대한 L104EA29YIg의 결합 친화력이 더 높다는 지표이다.

[0211] 역학 결합 분석 결과, CD80과 결합하는 CTLA4Ig, L104EIg, 및 L104EA29YIg에 대한 상대적 "작동" 속도는 CD86Ig에 대한 "작동" 속도와 마찬가지로 유사한 것으로 밝혀졌다 (표 I). 그러나, 이들 분자에 대한 "이탈" 속도는 동등하지 않았다 (표 I). CTLA4Ig와 비교하면, L104EA29YIg는 CD80Ig로부터의 "이탈" 속도가 대략 2배 정도 더 느렸고, CD86Ig로부터의 "이탈" 속도는 대략 4배 정도 더 느렸다. L104E는 L104EA29YIg와 CTLA4Ig 사이의 중간 정도의 "이탈" 속도를 나타내었다. 이들 돌연변이를 도입하는 것이 "작동" 속도에는 상당한 영향을 미치지 않았기 때문에, L104EA29YIg를 이용한 경우에 관찰된 CD80Ig 및 CD86Ig에 대한 결합 친화력 증가는 주로 "이탈" 속도 저하에 기인한 것으로 예상되었다.

[0212] CD86Ig 및 CD80Ig에 대한 L104EA29YIg의 결합 친화력 증가가, 각 단량체가 이량체로서 연합되는 방식에 영향을 미치는 돌연변이에 기인하였는지를 결정하거나, 또는 각 단량체 내로 도입된 결합 친화력 증강성 구조적 변화가 존재하였는지를 결정하기 위해, 상기 문헌 및 문헌 [참고: Linsley et al., (1995) J. Biol. Chem., 270:15417-15424]에 기재된 바와 같이 시스테인 120을 세린으로 돌연변이 유발시킨 후에 CTLA4 및 L104EA29Y 세포의 도메인의 단일 쇠 구조물을 제조하였다. 정제된 단백질 CTLA4X_{C120S} 및 L104EA29YX_{C120S}는 그들의 리간드 결합성을 SPR에 의해 분석하기 전에 겔 투과 크로마토그래피에 의해 단량체성인 것으로 밝혀졌다 [Linsley et al., (1995), 상기 참고]. 그 결과, CD86Ig에 대한 양 단량체성 단백질의 결합 친화력은 이들 각각의 이량체에 대해 관찰된 것 보다 대략 35 내지 80배 정도 떨어지는 것으로 밝혀졌다 (표 I). 이는 높은 결합 친화력으로 리간드 결합하기 위해서는 CTLA4를 이량체화하는 것이 필요하였다는 것을 확립시켜 주는 기존의 공개된 데이터를 뒷받침해준다 [참고: Greene et al., (1996) J. Biol. Chem., 271:26762-26771].

[0213] L104EA29YX_{C120S}는 CTLA4X_{C120S} 보다 대략 2배 정도 더 높은 친화도로 CD80Ig 및 CD86Ig 둘 다와 결합하였다. 이와 같이 증가된 친화도는 양 리간드로부터의 대략 3배 정도 더 느린 해리 속도 때문이었다. 따라서, L104EA29Y에 의한 보다 강력한 리간드 결합성은 분자를 이량체화시키는 변경이라기 보다는 각 단량체성 쇠 내로 도입된 결합 친화력 증강성 구조적 변화 때문인 것으로 대부분 예상되었다.

[0214] **결합 친화력 증강성 돌연변이의 위치 및 구조적 분석**

[0215] CTLA4의 세포의 IgV-유사 도메인의 용액 구조가 최근에 NMR 분광법에 의해 결정되었다 [참고: Metzler et al., (1997) Nature Struct. Biol., 4:527-531]. 이로써 루이신 104와 알라닌 29가 3차원적 폴드에 정확하게 위치할 수 있게 되었다 (도 11A-B). 루이신 104는 고도로 보존된 MYPPPY 아미노산 서열 근처에 위치하였다. 알라닌 29는 MYPPPY 영역에 공간적으로 인접한 S25-R33 영역의 C-말단 근처에 위치하였다. 이들 두 영역의 염기 잔기들 간에는 상당한 상호 작용이 있긴 하였지만, 외관상 L104와 A29 간의 직접적인 상호 작용은 없었으나, 이들 둘 다 해당 단백질 내에 연속되는 소수성 코어 일부를 포함하고 있다. 2개의 결합 친화력 증강성 돌연변이체의 구조적 중요성은 모델링에 의해 평가하였다. A29Y 돌연변이물은 S25-R33 영역과 MYPPPY 영역 사이의 갈라진 틈에 용이하게 수용될 수 있고, 이는 MYPPPY 영역의 입체 형태를 안정화시키는 작용을 할 수 있다. 야생형 CTLA4에서는, L104가 MYPPPY 영역 근처의 L96 및 V94와의 광범위한 소수성 상호 작용물을 형성한다. 글루탐산 돌연변이물이 다음 2가지 이유로 인해 L104와 유사한 입체 형태를 채택할 것으로 거의 예상되지 않는다. 첫째, S25-R33 영역에 대한 상당한 변동을 수반하지 않으면서 해당 구조 내에 보다 긴 글루탐산 측쇄를 수용하기에는 공간이 불충분하다. 둘째, 소수성 영역 내에 글루탐산 측쇄의 음 전하를 숨기는데 효과적인 비용이 너무 크다는 것이다. 대신, 모델링 연구는 글루탐산 측쇄가 해당 표면에 몰두하여 그의 전하가 용매화에 의해 안정화될 수 있다고 예측하고 있다. 이러한 입체 형태적 변화는 해당 영역에서 기타 잔기에 대한 비틀림 (왜곡)을 최소화하면서 G105에 의해 용이하게 수용될 수 있다.

[0216] **CD80 또는 CD86을 발현하는 CHO 세포에 대한 고 결합 친화력 돌연변이체의 결합**

[0217] 안정적으로 형질감염시킨 CD80+ 및 CD86+CHO 세포와 결합하는 CTLA4Ig 및 돌연변이체 분자의 FACS 분석 (도 2)을 본원에 기재된 바와 같이 수행하였다. CD80-양성 및 CD86-양성 CHO 세포를 증가 농도의 CTLA4Ig, L104EA29YIg, 또는 L104EIg와 함께 항온 배양한 다음, 세척하였다. 플루오레세인 이소티오시아네이트-접합된 염소 항-인간 면역글로불린을 사용하여, 결합된 면역글로불린 융합 단백질을 탐지하였다.

[0218] 도 2에 도시된 바와 같이, CD80-양성 또는 CD86-양성 CHO 세포 (1.5x10⁵)를 23°C에서 2시간 동안 표시된 농도의

CTLA4Ig (검정 사각형), L104EA29YIg (동그라미), 또는 L104EIg (삼각형)과 함께 항은 배양하고, 세척한 다음 플루오레세인 이소티오시아네이트-접합된 염소 항-인간 면역글로블린 항체와 함께 항은 배양하였다. 총 5,000 개의 생존 세포에 대한 결합성을 FACScan 상에서 분석하고 (단일 결정), PC-LYSYS를 사용하여 데이터 히스토그램으로부터 평균 형광 세기 (MFI)를 결정하였다. 데이터를 단지 제2 단계 시약과 함께 항은 배양한 세포 상에서 측정된 배경 형광에 대해 교정하였다 (MFI = 7). 대조군 L6 mAb (80 µg/ml)는 MFI < 30를 제공하였다. 이들 결과는 4가지 독립적인 실험을 대표한다.

[0219] 인간 CD80-형질감염시킨 CHO 세포에 대한 L104EA29YIg, L104EIg, 및 CTLA4Ig의 결합성은 대략 증가였다 (도 2A). L104EA29YIg 및 L104EIg는 CTLA4Ig 보다 더 강력하게, 인간 CD86으로 안정적으로 형질감염시킨 CHO 세포와 결합하였다 (도 2B).

[0220] **기능적 검정**

[0221] 인간 CD4-양성 T 세포를 면역자기 음성 선별에 의해 분리하였다 [참고: Linsley et al, (1992) J. Exp. Med. 176:1595-1604]. 분리된 CD4-양성 T 세포를 적정 농도의 억제제의 존재 하에 포르발 미리스테이트 아세테이트 (PMA) + CD80-양성 또는 CD86-양성 CHO 세포로 자극하였다. CD4-양성 T 세포 (8-10 x 10⁴/웰)을, 방사선 조사된 CHO 세포 자극인자를 수반하거나 수반하지 않으면서 1 nM PMA의 존재 하에 배양하였다. 72시간 배양의 마지막 7시간 동안 1 µCi/웰의 [3H]티미딘을 부가함으로써 증식성 반응을 측정하였다. L104EA29YIg 및 CTLA4Ig에 의한 PMA + CD80-양성 CHO, 또는 CD86-양성 CHO 자극된 T 세포의 억제를 수행하였다. 그 결과가 도 3에 도시되었다. L104EA29YIg는 CTLA4Ig 보다 더 많은 양의 CD80-양성 PMA 처리된 CHO 세포의 증식을 억제하였다 (도 3A). L104EA29YIg는 CD86-양성 PMA 처리된 CHO 세포의 증식을 억제하는데 있어서 CTLA4Ig 보다 더 유효하기도 하였다 (도 3B). 따라서, L104EA29YIg는 T 세포의 CD80- 및 CD86-매개된 공자극 둘 다의 보다 강력한 억제제이다.

[0222] 도 4는 L104EA29YIg 및 CTLA4Ig에 의한, 상기 제조된 동종자극된 인간 T 세포, 및 CD80과 CD86을 발현한 PM으로 불리우는 인간 B 림프아구성 세포주 (LCL)로 추가로 동종자극한 인간 T 세포의 억제를 도시하였다 (T 세포, 3.0x10⁴/웰; 및 PM, 8.0x10³/웰). 일차 동종자극은 6일 동안 일어났고, 이어서 세포를 7시간 동안 ³H-티미딘으로 펠싱한 후에, 방사성 표지의 혼입량을 결정하였다.

[0223] 이차 동종자극을 다음과 같이 수행하였다. 7일 일차 동종자극시킨 T 세포를 림프구 격리용 배지 (LSM) (공급처: ICN, Aurora, OH) 상으로 수거하고, 24시간 동안 정지시켰다. 이어서, PM을 상기와 동일한 비율로 부가함으로써, T 세포를 적정 량의 CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg의 존재 하에 재자극하였다 (이차). 자극은 3일 동안 일어났고, 이어서 세포를 방사성 표지로 펠싱한 다음, 상기와 같이 수거하였다. 일차 동종자극된 T 세포에 대한 L104EA29YIg의 효과는 도 4A에 도시되었다. 이차 동종자극된 T 세포에 대한 L104EA29YIg의 효과는 도 4B에 도시되었다. L104EA29YIg는 CTLA4Ig 보다 더 우수하게 일차 및 이차 T 세포 증식 반응 둘 다를 억제하였다.

[0224] 사이토킨 생성을 측정하기 위해 (도 5), 두번 되풀이한 이차 동종자극 판을 설정하였다. 3일 후, 제조업자가 권장하는 조건 하에 ELISA 키트 (공급처: Biosource, Camarillo, CA)를 사용하여 배양 배지를 검정하였다. L104EA29YIg는 이차 동종 자극 후 T 세포 IL-2, IL-4, 및 γ-IFN 사이토킨 생성을 차단시키는데 있어서 CTLA4Ig 보다 더 강력한 것으로 밝혀졌다 (도 5A-C).

[0225] 원숭이 혼합 림프구 반응 (MLR)에 대한 L104EA29YIg 및 CTLA4Ig의 효과가 도 6에 도시되었다. 2마리 원숭이로부터의 말초혈 단핵 세포 (PBMC'S; 각 원숭이로부터 3.5x10⁴개 세포/웰)를 림프구 격리용 배지 (LSM) 상으로 정제하고, 2 µg/ml 식물적혈구응집소 (PHA)와 혼합하였다. 상기 세포를 3일 동안 자극한 다음, 수거하기 16시간 전에 방사성 표지로 펠싱하였다. L104EA29YIg는 CTLA4Ig 보다 더 우수하게 원숭이 T 세포 증식을 억제하였다.

표 III

열거된 부위에서 CTLA4Ig의 돌연변이 유발에 의한 CD86Ig 결합성에 대한 효과

돌연변이 유발 부위	외견상 효과가 전혀 없음	돌연변이 유발 효과	
		느린 "작동" 속도/ 느린 "이탈" 속도	저하된 리간드 결합성
S25		+	
P26	+		
G27	+		
K28	+		
A29		+	
T30		+	
E31			+
R33			+
K93		+	
L96		+	
M97			+
Y98			+
P99			+
P100			+
P101			+
Y102			+
Y103		+	
L104		+	
G105		+	
I106	+		
G107	+		
Q111	+		
Y113	+		
I115	+		

[0226]

[0227] (우세한 효과는 "+" 부호로 표시되었다).

[0228] 실시예 3

[0229] 본 연구는 신장 이식 수용자에게서 바실릭시마브 (Simulect®; 공급처: Novartis) 유도, 미코페놀레이트 모페틸 (MMF; CellCept®; 공급처: Roche), 및 코르티코스테로이드로 이루어진 CNI-무함유 조합 레지멘의 일부로서 사용하는 경우에, 12개월에 걸쳐 유지 면역억제제로서 상기 언급된 바와 같은 L104EA29YIg의 효능 및 안전성을 CsA와 비교하였다.

[0230] 생체 공여자 또는 사체 공여자로부터의 비-HLA-동일 신장 동종이식편의 성인 수용자가 적격하였다. 기존에 신장 이식을 받은 대상체, >20%의 패널-반응성 항체 병력이 있는 대상체, 또는 연구자가 판단하기에 급성 거부 위험이 높을 것으로 예상되는 대상체는 연구 집단의 ≤10%로 제한하였다. 제외 기준에는 병소적 및 분절성 사구체경화증, 유형 I 또는 II 막증식성 사구체신염 또는 용혈성 요독 증후군/혈전성 혈소판감소성 자반증의 신 질환이 진행되고 있는 대상체; 활동성 B형 또는 C형 간염, 또는 HIV를 앓고 있는 대상체; 60세 초과 또는 6세 미만 공여자, 심장 사망 공여자, 또는 36시간 초과인 신장 한랭 허혈증 시간을 나타낸 공여자가 포함되었다.

[0231] 이는 미국, 유럽 및 캐나다에서 수행되어 온 개방-표지, 무작위화, 활성-제어형, 복수회 투여, 다시설 공동 연구였다. 신장 이식을 진행한 18세 이상의 적격환자 (사체 또는 생체 공여자, 단 공여자와 수용자가 HLA-동일한 경우는 제외되었다)를 대상으로 하여, L104EA29YIg 보다 집중적 (MI) 치료 레지멘, L104EA29YIg 덜 집중적 (LI) 치료 레지멘 또는 시클로스포린 A (CsA)를 이용하여 1:1:1 비율로 무작위 처치하였는데; 이들 모두는 바실릭시마브 (Simulect®; 공급처: Novartis)를 이용한 유도 요법, 미코페놀레이트 모페틸 (MMF; CellCept®; 공급처: Roche)을 이용한 보조 유지 요법, 및 코르티코스테로이드와 병용하였다. 양 L104EA29YIg 레지멘은 초기 단계 (여기서는, L104EA29YIg을 10 mg/kg 투여하였다), 및 유지 단계 (여기서는, L104EA29YIg을 4주 또는 8주 간격으로 5 mg/kg 투여하였다)을 포함하였다. 각 레지멘에 대한 용량은 체중을 기준으로 하였다. 이들 용량은 비-인간 영장류 연구 동안 유효한 것으로 밝혀진 표적 최저 프로파일에 의해 지시되었다. 이들 프로파일은 면역학적 위험이 가장 큰 기간 (0일 내지 90일째) 동안, 초기에 보다 높은 용량을 필요로 하였다. 초기 단계는 MI 레지멘에서 보다 길었고 (6개월 대 3개월), 보다 빈번하게 투여하였다.

[0232] L104EA29YIg 보다 집중적 (MI) 치료 레지멘은 1, 5, 15, 29, 43, 57, 71, 85, 113, 141 및 169일째에 10 mg/kg

을 투여한 다음, 4주 또는 8주 마다 5 mg/kg을 투여하는 것으로 이루어졌다. L104EA29YIg 덜 집중적 (LI) 치료 레지멘은 1, 15, 29, 57 및 85일째에 10 mg/kg을 투여한 다음, 4주 또는 8주 마다 5 mg/kg을 투여하는 것으로 이루어졌다. L104EA29YIg는 30분 정맥내 주입제로 투여하였다. 무작위로 CsA가 할당된 환자에게는 1일 2회 용량 (7 ± 3 mg/kg)을 투여하여, 처음 1개월 동안은 150-400 ng/ml의 예비-명시된 표적 혈청 농도 범위를 달성시키고, 2 내지 12개월 동안에는 150-300 ng/ml 농도 범위를 달성시켰는데, 이는 현 의료 행위와 일치하다.

[0233] 모든 환자에게 MMF 2g을 매일 투여하고, 바실릭시마브 20 mg을 4일 마다 투여하였다. 코르티코스테로이드 용량을 점점 감소시키는 레지멘은 또한, 1일째에 메틸프레드니솔론 거환제 500 mg을 정맥내 투여하고 2일째에는 250 mg을 정맥내 주사한 다음, 3일째에는 프레드니손 100 mg, 4일째에는 50 mg, 5 내지 30일째에는 25 mg, 31 내지 44일째에는 22.5 mg, 45 내지 58일째에는 20 mg, 59 내지 72일째에는 17.5 mg, 73 내지 86일째에는 15 mg, 87 내지 100일째에는 12.5 mg, 및 101 내지 114일째에는 10 mg을 경구 투여하는 것으로 이루어졌다. 114일 후에는, 프레드니손을 격월로 2.5 mg까지 감소시켰지만, 1일 5 mg 미만으로는 감소시키지 않았다.

[0234] 일차 목표는 L104EA29YIg가 6개월째에 급성 거부를 예방하는데 있어서 CsA 보다 열악하지 않다는 것을 입증하는 것이었다. 이차 목표로는 6개월 및 1년째의 급성 거부 발생률을 평가하고 (생검에 의해 입증되거나 추정됨); 1, 6 및 12개월째에 이오핵술 청소율을 통하여 사구체 여과율 (GFR)을 측정하며; 혈청 콜레스테롤 및 트리글리세라이드를 포함한 고혈압 파라미터와 전반적인 안전성을 측정하는 것이 있다. 예비-명시된 기타 분석으로는 1년째의 환자 사망이나 이식편 손실; 급성 거부 중증도; 이식 후 당뇨병 발생률 [이는 이전에는 당뇨병이 있는 것으로 공지되지 않은 환자에서 헤모글로빈 A1C (HbA1c) >7%, 또는 4주 이상 동안 고혈당증에 요구되는 모든 요법으로서 정의된다]; 신 질환에서의 식이 변형 [참고: MDRD, Levey AS, Bosch JP, Lewis JP, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Ann Intern Med 1999; 130:461-470], 젤리페 (Jelliffe) [참고: RW. Creatinine clearance: Bedside estimate. Ann Intern Med. 1973;79:604-605], 코크크로프트-가울트 (Cockcroft-Gault) [참고: Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron 1976;16:31-41], 및 낸키벨 (Nankivell) [참고: Nankivell BJ, Gruenewald SM, Allen RD, Chapman JR. Predicting glomerular filtration rate after kidney transplantation. Transplantation. 1995; 59(12):1683-1689] 처방을 이용하여 계산된 GFR; 약동학 및 면역원성이 있다. 급성 거부 (AR)의 진단과 치료는 밴프 97 기준 및 등급에 근거하였다 [참고: Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. Kidney Int 1999;55(2):713-23]. 만성 동종이식편 신병증 (CAN)의 발생에 관해서는 사후 분석을 수행하였다.

[0235] 급성 거부 (AR)의 진단과 치료는 밴프 97 기준 및 등급에 근거하였다 [참고: Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. Kidney Int 1999;55(2):713-23]. 수술 동안 신장 동종이식편 생검을 수행하여 기준선 조직학을 평가하였다. 생검 처리한 조직을 염색하고, 신장 이식 병리학에 관한 밴프 97 작업 분류에 따라서 등급을 매겼다. 치료 내용을 전혀 모르고 있는 독립적인 병리학자가 생검을 평가하여, AR 대한 치료에 앞서 임상적으로 의심되는 AR의 모든 에피소드를 확인하였다.

[0236] 부가의 종말점에는 12개월째에 임상적으로 의심되고 생검 입증된 급성 거부 (CSBPARG); 1년째의 사망 또는 이식편 손실; 중증의 AR 에피소드 (밴프 97 스케일을 이용하여 측정함); 치료 실패 (연구자의 견해; \geq 등급 IIB 거부; 재발 또는 스테로이드-내성 거부로서 정의된다); 1, 6 및 12개월째의 신장 기능 [이오핵술 청소율로써 평가된 사구체 여과율 (GFRs)] 및 만성 동종이식편 신병증 (CAN)의 명백한 증거 (간질성 섬유증 및 세뇨관 위축증); 고혈압 파라미터 [확장기 혈압 (BP) \geq 90 mm Hg 및/또는 수축기 BP \geq 140 mm Hg]; 혈청 지질; CsA로 치료받은 환자와 비교해서 L104EA29YIg로 치료받은 환자에서의 불리한 사건 (AE), 안정성 및 내용성이 포함되었다.

[0237] 안정성 및 내용성 평가를 위해, 정규 스케줄에 따른 임상 방문 동안에 AE, 실험실 측정 (혈액학, 생화학 및 뇨 분석) 및 생명 유지에 필요한 징후를 기록하였다.

[0238] **결과**

[0239] 총 218명의 환자에게 신장 이식을 행하였고, 이들을 무작위로 MI 군 (N=74), LI 군 (N=71), 또는 CsA (N=73)로 분류하였다. 기준선 인구학적 임상적 특징들은 상기 3가지 치료군 간에 유사하였다. 총 164명의 환자가 1년 내에 치료를 완료하였다. 1년이 되기 전에 치료를 중단한 환자들 중에서 ((N=16 대 16 대 20; MI 레지멘 대 LI 레지멘 대 CsA), 가장 흔한 이유는 AE (N=5 대 8 대 9)와 치료 실패 (N=7 대 5 대 3)였다.

- [0240] 모든 치료군에서는 CSBPAR의 발생이 빈번하게 일어나지 않았고, 치료군들 간에는 CSBPAR 또는 생검 입증된 급성 거부 (BPAR) 발생에 있어 통계상 유의적 차이가 전혀 없었다. 6개월 및 12개월째에는 CSBPAR 발생률이 MI, LI 및 CsA 치료군 각각에 대해 6.8%, 5.6% 및 8.2%였다.
- [0241] BPAR의 발생률 또한 6개월 및 12개월째에 군들 간에 유사하긴 하였지만, BPAR은 기타 두 군에서 보다 LI 군에서 약간 더 높았다 (MI, LI 및 CsA 치료군 각각에 대해 18.9%, 29.6% 및 17.8%). 생검 입증된 급성 거부는 모든 치료군에서 CSBPAR 보다 더 빈번하게 발생하였고, LI 군에서 가장 통상적이었다. 그러나, 이들 사건 중의 상당 수가 목적하는 최저 혈청 농도 아래에서 L104EA29YIg로 치료받은 환자에서 발생하는 것으로 밝혀졌다.
- [0242] 중증의 AR에 있어서는 치료군들 간의 통계상 유의적 차이가 전혀 관찰되지 않았지만, 그 수는 적고 이식편 손실을 야기시키지 않았다.
- [0243] 본 연구는 CsA 군 (N=144)과 비교해서 L104EA29YIg 군 (N=345)에서 취한 생검의 증가 수에 일조하는 것으로 추정되는, CsA에 대한 주의 기준을 허용하기 위해 연구 약물에 관한 내용을 알리지 않고 수행하였다. 이것이 이러한 방식으로 설계된 연구에 대해 흔히 예상되는 것이긴 하지만, L104EA29YIg 치료군에서 신장 조직학적 비정상 진단 속도를 증가시킬 수 있었다.
- [0244] 사망 및/또는 이식편 손실은 모든 치료군에서 드문 일이었는데, MI 군에서는 1명이 사망하였고, CsA 군에서는 4명이 사망하였으며 LI 군에서는 사망이 전혀 없었다고 보고되었다. 대부분의 이식편 손실은 면역학적 사건에 의해 야기되지 않았고, 단지 MI 군과 CsA 군에서는 3명의 이식편 손실이 발생하였고 LI 군에서는 1명에게서 발생하였다.
- [0245] CsA에 의거한 면역억제와 비교해서 L104EA29YIg에 의거한 치료의 경우에는 신장 기능의 상당한 개선이 관찰되었다. 이오핵술 청소율은 모든 시점에서 L104EA29YIg 치료의 경우에 훨씬 더 컸는데, 12개월째에 CsA와 비교해서 평균 개선율이 11 ml/min/1.73m² (약 20%)이었다.
- [0246] 12개월째에는, CsA로 치료받은 환자와 비교해서 L104EA29YIg로 치료받은 환자에서 만성 동종이식편 신병증 (CAN)이 30 내지 50% 정도 덜 발생하였다. 12개월째에 새로이 발병하거나 악화되는 CAN 비율은 MI, LI 및 CsA 군에 대해 각각 29%, 19% 및 44%였다.
- [0247] 1년째에, 평균 확장기 혈압은 MI (130 mmHg) 및 LI (129 mmHg) 치료군 환자에 비해 CsA (133 mmHg) 치료군 환자에게서 3 내지 4 mmHg 더 높았다. 이는 L104EA29YIg 군에서 항고혈압 약물을 더 적은 양으로 사용함에도 불구하고 나타난 결과였다 (MI: 87.5%; LI 84.1%; CsA 92.2%). 총 혈청 콜레스테롤은 CsA로 치료받은 환자 (212 mg/dL)에 비해 L104EA29YIg로 치료받은 환자 (MI: 198 mg/dL; LI: 201 mg/dL)에게서 약간 더 낮았지만, 지질-저하성 약물 사용량 또한 L104EA29YIg 의 경우에 더 낮았다 (MI: 36.1%; LI: 31.9%; CsA : 53.1%).
- [0248] CsA 치료군에서는 4명 (5.5%) 환자가 사망한 반면, L104EA29YIg 치료군에서는 1명이 사망하였다. 불리한 사건 (AE) 비율은 두 치료군 간에 거의 동등한 수준이었지만, 관련된 AE는 CsA 치료 후 보다는 L104EA29YIg 치료 후에 상당히 더 낮았다. L104EA29YIg의 정맥내 투여가 주입 반응을 전혀 일으키지 않으면서 잘 관용되었다. L104EA29YIg로 치료받은 환자는 전형적인 CsA-관련 부작용, 예를 들어 빈혈, 백혈구감소증, 다모증, 떨림 및 치은 증식증을 나타내지 않았다. L104EA29YIg에 의거한 요법은 CsA에 의거한 요법과 비교해서 감염이나 악성 종양의 위험 증가와 관련이 없었다.
- [0249] **결론**
- [0250] 이러한 12개월 연구는 L104EA29YIg에 의거한 유지 요법이 CsA에 의거한 요법과 비교해서 AR를 예방하는데 있어서 등가의 효능을 제공하였고 유사한 환자 및 이식편 생존을 부여하였다는 것을 입증해준다. 또한, L104EA29YIg는 CsA에 의거한 유지 면역억제와 비교해서 CAN의 저하와 상당한 신장 기능 개선을 나타내었다. L104EA29YIg는 안전하고 널리 관용되었으며, 전형적인 CNI-관련 독성과 연관이 없었다.
- [0251] CSBPAR 및 BPAR 비율은 상기 3가지 치료군들 간에 유사하였는데, 이는 CsA에 의거한 요법의 경우에 관찰된 낮은 AR 비율이 L104EA29YIg에 의거한 요법의 경우에도 또한 달성되었다는 것을 입증해준다. 대다수의 BPARs은 무증상으로서 분류되었는데, 이는 신장 기능이 손상되지 않았다는 것을 제안해준다. MI 군에서의 AR 비율이 LI 군에서 보다 수치상 더 낮다는 것은 L104EA29YIg을 이용한 경우에 용량-의존적 반응이 가능하다는 것을 제안하고 있다. L104EA29YIg 군에서의 보다 빈번한 생검은 잠재적으로, 이들 군에서 급성 거부와 만성 거부 둘 다에 대한 과-진단을 유발시킬 수 있었는데, 이는 L104EA29YIg 요법의 이점이 본 연구에서 이해될 수 있다는 것을 제안하고 있다.

[0252] 대다수의 BPAR 사건은 이식 후 처음 3개월 내에 발생하였는데, 이는 이식 후 초기 기간 동안에는 보다 고 용량의 면역억제제가 요구되는 것으로 밝혀진 다른 경우들에 비추어 보면 예상되는 일이다 [참고: Wiecek A, Nowicki M, Kokot F, Ritz E. Acute failure of the transplanted kidney-pathophysiology, diagnosis and prevention. Ann Transplant 1996; 1(4):5-9 and Bennett WM. Posttransplant acute renal failure. Ren Fail 1997;19(2):225-6]. 이들 사건의 대부분은 목적하는 최저 값 아래에서 발생하였기 때문에, 정상 상태에 도달하기에 앞서 처음 치료 1개월 내에 해당 레지멘을 변경시키는 것을 고려해야만 한다. 유지 단계 동안에 관찰된 대다수의 BPARs는 극히 낮거나 탐지 가능하지 않은 수준의 L104EA29YIg에서 발생하였는데, 이는 이들 기간 동안의 AR 발생이 불충분한 면역억제와 관련될 수 있다는 것을 제안하고 있는데, 이는 용량 레지멘을 변경시킴으로써 피할 수도 있다.

[0253] 본 연구는 L104EA29YIg이 CsA와 비교해서 유사한 전체 AE 비율과 연관이 있는데, 연구 약물과 관련된 AE는 거의 없다는 것을 입증해준다. 상기 3가지 치료군들 간에는 바이러스-관련 AE 수 측면에서는 실제적 차이가 전혀 없는 것으로 확인되었다.

[0254] 낮은 AR 비율이 존재하는 경우에, 유지 면역억제의 신규 목적은 고혈압, 고지질혈증, 약물 독성 및 흉터형성 예방을 포함한, 장기간 투여에 따른 합병증을 저하시키는 것이다. 자가면역 질환에서와 같이, 신형의 면역선택적 유지 면역억제제가 최근에 만들어졌다. L104EA29YIg을 이용한 면역선택적 공-자극 차단 (봉쇄)를 통하여 T-세포 공-자극을 억제하는 것은 새로운 패러다임을 나타내는데, 이는 신장 이식에 있어서 보다 선택적인 유지 면역억제를 제공할 수 있는 가망성과, 독성을 저하시키고 개선된 장기간 성과를 제공해줄 수 있다.

[0255] **실시예 4**

[0256] 장기간 신독성, 심혈관 및 대사성 효과를 전혀 나타내지 않으면서 CNI와 거의 동등한 수준의 단기간 대상체 및 이식편 생존을 제공해줄 수 있는 신장 이식에 있어서의 새로운 요법에 대한 채워지지 않은 의학적 요구가 상당히 대두되고 있다. 이러한 요구는 ECD 한정 신장 동종이식편 수용자들 간에 특히 큰데, 이러한 수용자의 장기간 대상체 및 이식편 생존률은 표준 적격성 기준을 충족시키는 공여자로부터 동종이식편을 이식받은 수용자 보다 현저하게 떨어졌다. 신규한 작용 기전을 수반하는 면역억제제인 L104EA29YIg는 ECD 동종이식편을 신장 이식한 수용자에게서 사용하기 위한 전도 유망한 비-신독성 후보 약물이다. L104EA29YIg는 지연 방식 (이는 특히 초기 손상된 신장 기능을 수반한 동종이식편에 있어서 CNI가 빈번하게 필요하다)이 아닌 이식시에 투여할 수 있기 때문에, 폴리클로날 항립프구 제제를 필요로 하지 않으면서도 시의 적절한 방식으로 면역억제를 제공해준다. 이는 유리한 안전성 프로파일을 수반하는 거의 동등한 수준의 급성 거부율로 해석될 수 있다. L104EA29YIg는 신독성인 것으로 예상되지 않기 때문에, 동종이식편 구조 (즉, CAN) 및 기능 (즉, GFR)에 관한 부가의 이점을 관찰해야만 한다. 최종적으로 CNI와는 달리, L104EA29YIg의 표적화 작용 기전은 심혈관/대사 프로파일에 불리한 영향을 미치지 않으면서 면역억제를 제공해야 한다. 이러한 대상체 집단에게서 L104EA29YIg를 사용하는 것에 관한 전반적인 유익-유해 평가가 다음에 제공되었다.

[0257] 2가지 용량 레지멘 (실시예 3에 기재된 바와 같은데, LI 레지멘에 대해 약간의 변형을 가하였고 4주 마다 유지 주입 스케줄을 사용하였다)이 연구될 것이다.

[0258] **일차 목표**

- [0259] 1) 12개월째에 대상체 및 이식편 생존의 종합에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0260] 2) 12개월째에 측정된 GFR < 60 mL/min/1.73 m²의 종합, 또는 3개월째부터 12개월째까지 측정된 GFR ≥10 mL/min/1.73 m²의 감소에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.

[0261] **이차 목표**

- [0262] 1) 12개월째에 측정된 GFR에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0263] 2) 12개월까지 생검-입증된 CAN에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0264] 3) 3개월째에 측정된 GFR, 및 기준선 (3개월)부터 12개월까지의 변화에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0265] 4) 12개월째에 측정된 GFR < 30 mL/min/1.73 m²을 나타내는 대상체의 비율에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0266] 5) 3, 12, 24 및 36개월째에 계산된 GFR, 및 기준선 (3개월)부터 12, 24 및 36개월까지의 변화에 대한, CsA와

비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.

- [0267] 6) 12, 24 및 36개월째에 PTDM에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0268] 7) 12, 24 및 36개월째에 고혈압 측정치 (SBP 및 DBP 포함), 고혈압 및 조절 (controlled) 고혈압의 발생률 및 우세율, 및 치료 레지멘 세기에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0269] 8) 12, 24 및 36개월째에 이상지질혈증 측정치 [총 혈청, 비-HDL, 저밀도 지단백질 (LDL) 및 HDL 콜레스테롤, 및 TGs 포함], 이상지질혈증 및 조절 이상지질혈증의 발생률 및 우세율, 및 치료 레지멘 세기에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0270] 9) 24 및 36개월째에 대상체 및 이식편 생존에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0271] 10) 6개월째에 급성 거부 측정치 [이에는 급성 거부의 발생 및 중증도, 손상된 신장 기능과 예상된 DGF에 대한 폴리클로날 항립프구 제제의 사용, 급성 거부를 치료하기 위한 림프구-고갈 요법의 초기 사용, 스테로이드-내성 급성 거부의 발생, 급성 거부 후 완전한 회복 (기준선으로 복귀하는 SCr) 발생, 무증상 거부의 발생, 및 조직학적 소견에 상관없이 치료받은 모든 급성 거부 에피소드의 발생이 포함된다]에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0272] 11) QoL에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0273] 12) CsA와 비교한 L104EA29YIg의 전반적인 안전성을 평가한다.
- [0274] **삼차 목표**
- [0275] 1) 기준선 (3개월)부터 12, 24 및 36개월까지 계산된 GFR의 기울기와 절편 (intercept)에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0276] 2) 12개월째에 측정된 GFR < 45 mL/min/1.73 m²을 나타내는 대상체의 비율에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0277] 3) 12개월째에 계산된 GFR < 75 mL/min/1.73 m²을 나타내는 대상체와, 3개월째부터 12개월째까지 계산된 GFR이 15 mL/min/1.73 m² 이상으로 감소된 대상체의 비율에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0278] 4) DGF의 발생에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0279] 5) 12, 24 및 36개월째에 급성 거부 측정치 [이에는 급성 거부의 발생 및 중증도, 손상된 신장 기능과 예상된 DGF에 대한 폴리클로날 항립프구 제제의 사용, 급성 거부를 치료하기 위한 림프구-고갈 요법의 초기 사용, 스테로이드-내성 급성 거부의 발생, 급성 거부 후 완전한 회복 (기준선으로 복귀하는 SCr) 발생, 무증상 거부의 발생, 및 조직학적 소견에 상관없이 치료받은 모든 급성 거부 에피소드의 발생이 포함된다]에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0280] 6) 12, 24 및 36개월째에 종합 심혈관계 질환 종말점 (판결 심혈관계 사망, 심근 경색, 허혈성 발작, 심혈관계 사유로 인한 비-예정 입원, 및 경피 관상 개입)에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0281] 7) 12, 24 및 36개월째에 종합 심신 질환 (cardiorenal disease) 종말점 (사망, 이식편 손실, 비-치명적 심근 경색, 및 발작)에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0282] 8) 12, 24 및 36개월째에 프래밍햄 (Framingham) 위험 스코어에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0283] 9) 연구 약물 중단 발생에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0284] 10) 항-공여자 인간 백혈구 항원 (HLA) 항체에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0285] 11) 생검 표본 중의 C4d 양성도에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0286] **연구 계획**
- [0287] 연구 기간은 3년이고, 안전성 평가를 위해 그 후 8주간 후처리 기간을 두었다. 3년 치료 기간이 끝날 무렵, 대상체는 장기간 연장 연구에 적격할 수 있다.
- [0288] 이는 부분적으로는 그 내용을 알리지 않고, 활성-제어형의 무작위화 병렬군 연구이다. 모든 대상체에게 다음에 규정된 바와 같은 확대된 기준을 수반하는 공여자로부터 신장을 이식하였다. 이들 기준은 부분적으로는, 전미

장기 분배 네트워크 (UNOS)에 의해 쟁점화된 기타 기준에 근거하는데, 이들 기준에는 또한, 잠재적으로 기능저 하된 장기를 확인하기 위해 광범위하게 사용되어 온 기타 특징들, 예를 들어 심장 사망한 공여자 (DCD, 심장 박 동 중단 공여자) 또는 장기간 한랭 허혈 시간 (CIT)을 나타낸 공여자로부터의 기타 특징이 포함된다.

[0289] 대략 540명의 대상체를 대상으로 하여 무작위로 L104EA29YIg (MI 레지멘), L104EA29YIg (LI 레지멘), 또는 CsA 를 이용한 치료를 1:1:1 비율로 수행하였다. 모든 대상체를 대상으로 하여 또한, 바실릭시마브를 이용한 유도, 및 MMF 및 코르티코스테로이드의 배경 유지 면역억제 레지멘을 수행하였다. 무작위로 MI 레지멘을 수행한 대상 체에게 1일 및 5일째, 그리고 3개월째까지 2주 마다 (2, 4, 6, 8, 10 및 12주째), 그리고 6개월째까지 4주 마다 (16, 20 및 24주째)에 L104EA29YIg (10 mg/kg)을 정맥내 투여할 것이다. 6개월 후에는, MI 치료군 대상체에게 L104EA29YIg 5 mg/kg의 유지 용량을 4주 마다 투여하였는데, 이는 36개월째에 본 시험을 완료할 때까지 지속되 었다. 무작위로 LI 레지멘을 수행한 대상체에게 1일 및 5일째, 그리고 1개월째까지 2주 마다 (2 및 4주째), 그 리고 3개월째까지 4주 마다 (8 및 12주째)에 L104EA29YIg (10 mg/kg)을 정맥내 투여할 것이다. 3개월 후에는, LI 치료군 대상체에게 L104EA29YIg 5 mg/kg의 유지 용량을 4주 마다 투여하였는데, 이는 36개월째에 본 시험을 완료할 때까지 지속되었다.

[0290] 6주 및 10주째에 LI 치료군에서 플라시보 주입제를 사용하면서 LI 군과 MI 군 간의 내용을 전혀 알리지 않을 것 이다. 무작위로 CsA를 투여한 대상체에게는 현 의료 행위와 일관되는 것으로 명시된 최저 혈청 농도를 달성하 기 위해 설계된 용량을 1일 2회 투여할 것이다.

[0291] 손상된 신장 동종이식편 기능과 예상된 DGF를 경험한, 무작위로 CsA 투여한 대상체에 대해 폴리클로날 항립프구 체제 (티모글로불린 또는 ATGAM)를 사용하는 것이 허용되긴 하지만, 반드시 요구되는 것은 아니다. 이들 작용 제는 CsA를 투여하기 위해 이식편 기능이 회복될 때까지 면역억제를 제공해줄 수 있는 능력 면에서 광범위하게 활용되고 있다. 이러한 임상 설정에 폴리클로날 항립프구 체제를 사용하고 투여하는 것에 관한 결정은 프로토 콜 지침 내에서 연구자의 재량에 따른다. L104EA29YIg의 안전성과 효능은 1, 2 및 3년째에 평가할 것이다.

[0292] **일차 성과 측정치**

[0293] L104EA29YIg에 의거한 각 레지멘을 다음 일차 효능 성과 측정치에 기초하여 CsA에 의거한 레지멘과 비교할 것이 다: (1) 12개월째에 대상체 및 이식편 생존의 종합; 2) 12개월째에 측정된 GFR < 60 mL/min/1.73 m²의 종합, 또는 3개월째부터 12개월째까지 측정된 GFR ≥10 mL/min/1.73 m²의 감소. 의도는 사망 및 이식편 손실에 대해 전혀 열세하지 않고 신장 기능이 탁월하다는 것을 입증하는 것이다. 대상체 및 이식편 생존의 종합점을 선택하 였는데, 이는 이들 측정치가 동종이식편 수용자에 대한 가장 중요한 임상 성과이기 때문이다. 동종이식편 손실 이 유효한 면역억제 요법에 의해 예방될 수 있긴 하지만, 동일한 요법은 감염으로 인한 사망, PTLD, 악성 종양, 신독성 또는 심혈관계 질환 위험을 증가시킬 수 있다. 따라서, 동종이식편 수용자에게서 면역억제 요법의 전체 이득에 관한 요약 측정치로서 대상체 및 이식편 생존의 종합 종합점을 조사하는 것이 적당하다. 이러한 종합 종합점은 데이터를 누락하거나 대상체를 잘못 분류하는 것으로 인한 편견없이 모든 대상체에게서 평가 가능하 다는 추가의 이점을 지니고 있다.

[0294] 종합점으로서 신장 기능을 선택하였는데, 이는 이식 후 신장 기능과 장기간 신장 성과 간의 상관 관계가 각종 환경 하에서 반복해서 입증되었기 때문이다. 이러한 연관성은 신장 기능을 이식 후 수일 내에 측정하든지, 병 원으로부터 퇴원시 측정하든지 아니면 이식 후 6개월 및 12개월째에 측정하든지 간에 존재한다. 이는 생체 및 사체 공여자로부터의 신장 수용자, 보다 어린 사체 공여자 및 보다 나이 많은 사체 공여자로부터의 신장 수용자, 두 번째 이식 수용자, 및 성인 및 소아 수용자에게서 관찰되었다.

[0295] 다시설 공동연구로부터의 결과는 SCr이 장기간 이식편 생존을 예측하는데 중요하다는 사실을 확인시켜 주었다. 신장 기능과 장기간 예후 간의 상관 관계는 강하고 재현 가능하지만, 엄격하게 말하면 일직선이진 않다. 성인 신장 이식 수용자를 분석하는데 있어서, 1년째의 SCr과 계획된 중간 이식편 반감기 간의 상관 관계를 조사한 결 과 SCr > 1.5 mg/dL에서 두드러진 변곡점이 나타났다. 유사하게, 6개월째부터 1년째까지의 SCr의 변화 (ΔSC r)와 계획된 중간 이식편 반감기 간의 상관 관계를 조사한 결과 ΔSCr ≥0.3 mg/dL에서 두드러진 변곡점이 나타 났다. 따라서, 1년째의 신장 기능의 절대 수준과 6개월째부터 (또는 유사한 안정한 초기 이식 후 시점) 1년째 까지의 신장 기능 상의 변화 둘 다는 성과 측정치로서 사용하기에 적합하다. 장기간 성과에 대한 신장 기능의 상관 관계에 있어 비-선형성이 존재하는 것은 신장 기능의 분류별 측정치가 치수적 측정치 보다 큰 임상적 관련 이 있다는 것을 제안하고 있다. 1년째에 신장 기능에 대한 > 1.5 mg/dL의 한계 값과 6개월째부터 1년째까지의 ≥0.3 mg/dL의 SCr 변화가 적당한 것으로 여겨진다.

[0296] 상기 언급된 연구에서는, 마커로서 SCr을 사용하여 신장 기능의 예후적 중요성을 입증하였다. 이들 연구는 일반적으로 너무 커서 사구체 여과율의 직접적인 측정치로서 사용할 수 없었다. 신장 기능의 마커로서의 SCr의 한계는 널리 공지되고 있다. SCr 수준은 주로 크레아티닌의 신장 배출과 크레아티닌의 내적 생성 간의 균형을 반영한다. 후자는 이식 집단에서 흔히 발생하는 근육량 변동, 감염, 염증 및 스테로이드 사용에 의해 상당한 영향을 받을 수 있다. 더우기, 크레아티닌의 신장 배출은 2가지 경로, 즉 사구체 여과 및 세뇨관 분비에 의해 일어날 수 있다. SCr에 대한 사구체 여과 손실의 강력한 영향력은 세뇨관 분비의 대상성 증가에 의해 통상은 폐되는데, 이로써 신장 장애의 마커로서 증가된 SCr의 활용성이 저하된다. GFR이 저하된 대상체의 40%가 정상이거나 낮은 SCr을 가질 것으로 추정되었다. 인구학적 및 생체측정 인자의 효과를 고려함으로써 SCr와 GFR 간의 상호 관련을 개선시키기 위해 수 많은 처방을 개발하였다. 각종 처방으로부터 추정된 GFR과 인슐린 청소율로써 측정된 진짜 GFR 간의 일치 수준을, 안정한 신장 기능을 지닌 294명의 이식 수용자에게서 연구하였다. 측정된 인슐린 청소율과 10 mL/min/1.73 m² 이상 정도로 상이한 예측 GFR 값의 비율은 젤리페 처방의 경우의 34%부터 네킨켈 처방의 경우의 53% 정도로 다양하였다. 레베이 (Levey) 등이 제안한 처방을 사용하여 본 연구에서 GFR를 계산할 것이다. 이러한 처방은 네킨켈과 같은 기타 처방 보다 예측값과 측정값 간의 가장 우수한 상호 관련을 나타내는, 이식 집단에서 GFR를 보다 정확하게 예측하는 것으로 밝혀졌다. 진짜 GFR와 계산된 GFR 간에 상당한 차이가 존재한다면, 진짜 사구체 여과 마커의 청소율을 사용하여 신장 기능의 일차 종말점을 평가할 것이다 (부록 1). 60 mL/min/1.73 m²의 GFR, 또는 10 mL/min/1.73 m² 이상의 GFR 상의 변화를, 큰 역학적 연구에서 확립된 1.5 mg/dL의 SCr의 한계 값 또는 0.3 mg/dL 이상의 SCr 상의 변화의 근사 등가치로서 사용할 것이다. 종합 종말점의 변화 구성분은 3개월째부터 12개월째까지 평가할 것인데, 이는 이식 후 신장 기능이 3개월째까지는 상당히 안정되기 때문이다.

[0297] 기타 성과 측정치

[0298] 주요 이차 목표는 12개월째에 측정된 GFR, 및 12개월째에 생검-입증된 CAN에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가하는 것이다. 이들 종말점은 L104EA29YIg를 평가하는데 있어서의 그들의 중요성을 강조하기 위해 기타 이차 종말점으로부터 분리시켰다. 상기 논의된 바와 같이, ECD 신장에서 기능적 네프론 질량 및 신장 보존은 공여자 특징 (예: 나이가 많고, 심혈관계 발병, 조달 과정 및 CIT)으로 인해 이식 시점에 저하될 것으로 예상되는데, 이에 따른 대상체 및 이식편 생존률은 표준 기준 공여자 장기의 경우에 관찰된 것 보다 훨씬 낮다. 신장 기능은 잠재적으로 이식 시점에 저하되기 때문에, 상당 비율의 대상체가 연구 시작 시기에 또는 기준선 신장 동종이식편 기능을 결정하는 시기에 공-일차 신장 기능 종말점에 대한 기준을 충족시킬 수 있다. 따라서, 본 프로토콜의 주요 이차 목표는 12개월째에 측정된 GFR 상의 차이에 있어서의, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가하는 것이다. 이러한 주요 이차 종말점은 상기 ECD 집단에서의 기존의 공여자 변동성에 상관없이, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 식별할 수 있게 해준다. 이는 또한, 신장 기능을 완전히 평가하는데 일조하고, L104EA29YIg가 신장 이식 수용자에게 상당한 의학적 이득을 제공한다는 결론을 추가로 강화시킨다. 나머지 주요 이차 목표는 12개월째에 생검-입증된 CAN에 대한 것이다. CAN은 후기 신장 동종이식편 손실의 제1 (주요) 원인으로서 기능성 이식편에 대응하는 것에 이어 2번째이다. 역설적으로, CNI는 직접적인 경로 (즉, 직접 신독성 효과) 및 간접적인 경로 (즉, 불리한 심혈관 및 대사 효과)를 통하여 CAN에 일조하는 것으로 여겨진다. 그의 특이적 작용 기전으로 인해, L104EA29YIg는 직접적으로 신독성이거나 심혈관 및 대사 파라미터를 불리하게 변경시키는 것으로 예상되지 않는다.

[0299] 상기 실시예에서는, L104EA29YIg로 치료받은 환자들 중에서 CAN 발생률이 저하되는 유리한 효과가 관찰되었다. 현 연구에서, CAN 발생 저하를 신장 기능 개선과 연계해서 확립시키는 것이, L104EA29YIg가 신장 이식 수용자에게서 상당한 의학적 이득을 제공한다는 결론을 강화시켜 줄 것이다. 급성 거부를 예방하는데 있어서의 L104EA29YIg의 효능은 각종 성과 측정치에 의해 평가될 것이다. 이에 그의 발생, 중증도, 요법에 대한 반응성 및 성과가 포함된다. 그러나 이들 측정치에 관한 해석은 L104EA29YIg와 CsA에 있어서의 본질적인 차이로 인해 복잡하다. L104EA29YIg는 이식 시점에 투여하는 반면, CsA는 초기 신장 기능의 명백한 증거가 존재한다면 투여를 개시한다. 이러한 연구에서 CsA를 무작위로 투여한 몇몇 대상체에게는 초기 신장 기능이 손상되고 DGF가 예상되는 경우에 면역억제 적용범위를 제공하기 위해 폴리클로날 항립프구 제제를 투여할 것으로 예상된다. 이러한 치료 행위는 CsA로 치료받은 대상체에게서 급성 거부 발생을 예방하거나 은폐시키고, 대대상체를 급성 거부의 성과 측정치에 대해 측정할 수 없게 만들 수도 있다. L104EA29YIg를 무작위로 이식 시점부터 투여하기 시작한 대상체에게는 유사한 행위를 취하는 것이 불필요하기 때문에, 급성 거부의 비교 평가는 동일하지 않다. 급성 거부를 예방하는데 있어서의 L104EA29YIg의 효능을 보다 정확하게 평가하기 위해, 이러한 능력의 폴리클로날 항립프구 제제를 기타 급성 거부 측정치와 연계해서 사용하는 것이 또한 보고될 것이다.

[0300] 연구 집단

[0301] 연구 집단에는 공여자 특징, 조달 과정, CIT 또는 기타 요인들로 인해 잠재적으로 최적 이하인 신장 동종이식편 수용자가 포함된다. 특이적 적격성 기준은 UNOS에 의해 정점화된 장기 기증에 관한 "확대된 기준"에 근거한 것이다. 장기간 CIT를 나타내는 공여자로부터 신장 수용자, 또는 DCDs로부터의 신장 공여자 또한 적격할 것이다. 일반적으로, 면역학적 기준은 대상체 선별에 있어 중요한 역할을 하지 않을 것이다. 면역학적 위험 수준이 다양한 대상체가 적격하다. 그러나, 본 연구는 가장 큰 면역학적 위험을 나타내는 대상체 [양성 교차-매치되거나, 30% 이상의 패널-반응성 항체 (PRA) 병력이 있거나, 또는 기준에 이식을 받은 대상체]는 제외할 것이다. 이들 대상체는 그들의 항체 부하를 저하시키기 위한 요법, 예를 들어 혈장분리반출술 (plasmapheresis) (이는 상기 프로토콜의 범주를 벗어난다)을 요구할 수도 있다. 대상체는 전세계적으로 대략 90개 장소에서 등록될 것이다.

[0302] 일차 효능 성과 측정치

[0303] 1) 12개월째에 대상체 및 이식편 생존의 종합에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
 [0304] 2) 12개월째에 측정된 $GFR < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ 의 종합, 또는 3개월째부터 12개월째까지 측정된 $GFR \geq 10 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ 의 감소에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.

[0305] 이차 효능 성과 측정치

- [0306] 1) 12개월째에 측정된 GFR에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0307] 2) 12개월까지 생검-입증된 CAN에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0308] 3) 3개월째에 측정된 GFR, 및 기준선 (3개월)부터 12개월째까지의 변화에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0309] 4) 12개월째에 측정된 $GFR < 30 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ 을 나타내는 대상체의 비율에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0310] 5) 3, 12, 24 및 36개월째에 계산된 GFR, 및 기준선 (3개월)부터 12, 24 및 36개월째까지의 변화에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0311] 6) 12, 24 및 36개월째에 PTDM에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0312] 7) 12, 24 및 36개월째에 고혈압 측정치 (SBP 및 DBP 포함), 고혈압 및 조절 고혈압의 발생률 및 우세율, 및 치료 레지멘 세기에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0313] 8) 12, 24 및 36개월째에 이상지질혈증 측정치 [총 혈청, 비-HDL, LDL 및 HDL 콜레스테롤, 및 TGs 포함], 이상지질혈증 및 조절 이상지질혈증의 발생률 및 우세율, 및 치료 레지멘 세기에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0314] 9) 24 및 36개월째에 대상체 및 이식편 생존에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0315] 10) 6개월째에 급성 거부 측정치 [이에는 급성 거부의 발생 및 중증도, 손상된 신장 기능과 예상되는 DGF에 대한 폴리클로날 항립프구 체계의 사용, 급성 거부를 치료하기 위한 림프구-고갈 요법의 초기 사용, 스테로이드-내성 급성 거부의 발생, 급성 거부 후 완전한 회복 (기준선으로 복귀하는 SCr) 발생, 무증상 거부의 발생, 및 조직학적 소견에 상관없이 치료받은 모든 급성 거부 에피소드의 발생이 포함된다]에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0316] 11) QoL에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0317] 12) CsA와 비교한 L104EA29YIg의 전반적인 안전성을 평가한다.

[0318] 삼차 성과 측정치

- [0319] 1) 기준선 (3개월)부터 12, 24 및 36개월째까지 계산된 GFR의 기울기와 절편에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0320] 2) 12개월째에 측정된 $GFR < 45 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ 을 나타내는 대상체의 비율에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.

- [0321] 3) 12개월째에 계산된 GFR < 75 mL/min/1.73 m²을 나타내는 대상체와, 3개월째부터 12개월째까지 계산된 GFR이 15 mL/min/1.73 m² 이상으로 감소된 대상체의 비율에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0322] 4) DGF의 발생에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0323] 5) 12, 24 및 36개월째에 급성 거부 측정치 [이에는 급성 거부의 발생 및 중증도, 손상된 신장 기능과 예상되는 DGF에 대한 폴리클로날 항립프구 제제의 사용, 급성 거부를 치료하기 위한 림프구-고갈 요법의 초기 사용, 스테로이드-내성 급성 거부의 발생, 급성 거부 후 완전한 회복 (기준선으로 복귀하는 SCr) 발생, 무증상 거부의 발생, 및 조직학적 소견에 상관없이 치료받은 모든 급성 거부 에피소드의 발생이 포함된다]에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0324] 6) 12, 24 및 36개월째에 종합 심혈관계 질환 종말점 (판결 심혈관계 사망, 심근 경색, 허혈성 발작, 심혈관계 사유로 인한 비-예정 입원, 및 경피 관상 개입)에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0325] 7) 12, 24 및 36개월째에 종합 심신 질환 종말점 (사망, 이식편 손실, 비-치명적 심근 경색, 및 발작)에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0326] 8) 12, 24 및 36개월째에 프래밍햄 위험 스코어에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0327] 9) 연구 약물 중단 발생에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0328] 10) 항-공여자 HLA 항체에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0329] 11) 생검 표본 중의 C4d 양성도에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.
- [0330] 이식편 손실의 정의 - 이식편 손실은 기능적 손실 또는 물리적 손실로서 정의된다. 기능적 손실은 중앙 실험실에서 4주 이상 동안 또는 56일 연속되는 투석일 동안 결정된 바와 같이 SCr ≥6.0 mg/dL (530 mol/L)의 지속 수준으로서, 또는 대상체에게 두 번째 이식을 해야할 정도로 신장 기능이 손상되는 것으로서 정의될 것이다. 이식편 손실의 모든 원인은 독립적 EAC가 판결을 내릴 것이다.
- [0331] 지연된 이식편 기능 (DGF)의 정의 - DGF는 연구 8일째까지 (수술 후 7일째)투석을 이용한 치료로서 정의된다.
- [0332] 만성 동종이식편 신병증 (CAN)의 정의 - 생검 입증된 CAN은 신장 이식 병리학에 관한 밴프 97 작동 분류법을 이용하여 그 내용을 잘 알지 못하는 중앙 조직병리학자가 결정할 것이다. CAN의 발생은 이식 후 1일째 생검 모두를 이식 시점에 수득한 기준선 생검과 비교함으로써 결정할 것이다. 이러한 비교는 나중에 CAN으로서 해석될 수도 있는 기존의 모든 조직병리학의 존재와 중증도를 확립시켜 준다.
- [0333] 이식 후 당뇨병 (PTDM)의 정의 - PTDM은 최근의 국제 컨센서스 지침.20에 기재된 정의에 따라서 정의될 것이다. 이들 기준은 다음과 같이 요약된다: a) 당뇨병 증상 + 원인이 되는 혈장 글루코스 (PG) 농도 ≥200 mg/dL (11.1 mmol/L) 또는 b) 공복시 혈장 글루코스 (FPG) ≥126 mg/dL (7.0 mmol/L) 또는 c) 경구 글루코스 내성 시험 동안 2-시간 PG ≥200 mg/dL (11.1 mmol/L) 및 d) 정맥 PG 측정에 기초한 확증적 실험실 시험은 급성 대사 대상 부전을 수반하는 명료한 고혈당증의 부재 하에 또 다른 날에 수행해야만 한다. 본 연구는 PTDM 평가를 위해 FPG를 활용할 것이지만, 이들 기타 방법을 사용하여 대상체를 평가한 결과 상기 기준을 충족시키는 것으로 밝혀진 경우에는, 이들이 PTDM을 갖고 있는 것으로 간주될 것이다.
- [0334] 고혈압 측정치의 정의 - 고혈압은 만성 신장 질환 대상체에 대한 고혈압21의 예방, 탐지, 평가 및 치료에 관한 관절 국립 위원회의 7번째 보고 내용에 따라서 본 연구에 정의될 것이다. 이러한 정의는 SBP ≥130 mm Hg 또는 DBP ≥80 mm Hg에 기초한다. 또한, 고혈압 적응증을 위해 항고혈압 약물을 투여하였거나 고혈압 병력이 있는, SBP < 130 mm Hg 및 DBP < 80 mm Hg를 갖는 모든 대상체가 상기 정의에 포함된다. 고혈압 발생률은 무작위로 분류하여 이식을 수행한 후에 고혈압이 발생한 대상체의 비율로서 정의된다. 고혈압 우세율은 상기 언급된 고혈압 정의를 충족시키는, 소정의 시점에서의 대상체의 비율로서 정의된다. 조절 고혈압은 고혈압 적응증을 위해 항고혈압 약물을 투여하거나 또는 고혈압 병력이 있는 또 다른 적응증을 위해 항고혈압 약물을 투여하는 동안 SBP < 130 mm Hg 및 DBP < 80 mm Hg로서 정의된다. 고혈압 병력이 전혀 없고 고혈압 이외의 적응증(들)을 위해 항고혈압 약물 (예: 편두통 예방을 위한 베타 차단제)를 처방받은, SBP < 130 mm Hg 및 DBP < 80 mm Hg 대상체는 고혈압이나 조절 고혈압이 있는 것으로 간주되지 않을 것이다. 치료 레지멘 세기는 고혈압을 억제하기 위해 사용되는 항고혈압 약물의 총 수로서 정의된다. 모든 항고혈압 약물은 고혈압 또는 조절 고혈압이 있는 대상체에게서 고혈압 적응증에 대해 가치가 있을 것인데, 이는 항고혈압 효과가 적응증에 상관없이 존재하기 때문이다.

[0335] 이상지질혈증 측정치의 정의 - 이상지질혈증은 다음 [National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF-K/DOQI).22]로부터의 최근의 지침에 따라서 정의된다. 이상지질혈증은 파트리글리세라이드혈증 [TGs \leq 500 mg/dL (5.65 mmol/L)], 고콜레스테롤혈증 [LDL \leq 100 mg/dL (2.59 mmol/L)], 또는 고 TGs [TGs \leq 200 mg/dL (2.26 mmol/L)]의 존재 하에서 상승된 비-HDL [비-HDL \leq 130 mg/dL (3.36 mmol/L)]로서 정의된다. 조절 이상지질혈증은 본 연구에서 성공적으로 치료받은 상기 언급된 이상지질혈증 중의 한 가지에 대해 약리학적 관리를 받고 있고, 그들의 지질 값이 앞서 문단에 기재된 한계치 보다 아래인 대상체로서 정의된다. 이들 작용제 중의 몇몇에 대해서는, CsA를 동시에 사용하는 경우의 출발 용량 또는 최대 권장 용량, 신부전증의 경우의 투여, 또는 CsA PK의 변경을 유발시킬 수도 있다는 것에 관한 구체적인 경고가 있다. 구체적인 권장 사항에 관해서는 적당한 패키지 삽입물을 참조할 수 있다. 항고지질혈증제로서 사용된 기타 모든 작용제 (즉, 비-스타틴 요법)는 수준 I 치료 세기로 간주될 것이다. 스타틴과 또 다른 부류의 작용제 [예: 에제티미베 (ezetimibe)]를 동시에 사용하는 것이 스타틴 요법의 세기 수준을 1 수준 정도 상승시킬 것이므로, 5 세기 수준 초과가 가능하다.

[0336] 급성 거부는 임상적 증거와 생검 확증을 요구하는 임상-병리적 사건으로서 정의될 것이다. 동종이식편 생검을 대상으로 하여, 실험 내용을 알지 못하는 중앙 조직병리학자가 신장 이식 병리학에 관한 밴프 97 작동 분류법을 이용하여 급성 거부의 존재 및 중증도에 관해 평가할 것이다. 급성 거부를 분석하는데 있어서, 중앙 병리학자에 의한 생검 해석과 등급화가 국소적 해석을 대체할 것이다. 해당 기준을 완전히 충족시키지는 못하지만, 중앙 병리학자가 급성 거부로서 해석하여 급성 거부에 대한 치료를 수행한, 급성 거부로서 의심되어 그 대상이 된 생검이 급성 거부로서 간주될 것이다. 무증상 거부는 급성 거부와 일치하긴 하지만 그의 임상적 상관성이 결여된다는 중앙 병리학자에 의한 조직학적 소견으로서 정의된다. 스테로이드-내성 급성 거부는 코르티코스테로이드를 이용한 치료 후 림프구-고갈 요법의 사용을 반드시 필요로 하는 조직학적 소견 및/또는 SCr 상의 개선 부족으로서 정의된다. 프래밍햄 위험 스코어 - 이러한 위험 스코어는 프래밍햄 심장 연구23으로부터의 데이터를 활용하여 '견디기 어려운' 관상 심장 질환 (심근 경색 및 관상 사망)에 대한 10년 위험을 평가한다. 이러한 계산에 포함된 위험 요인에는 연령, 성별, 총 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, SBP, 당뇨병, 고혈압 치료, 및 전달 (prior month)의 담배 사용 유무이다.

[0337] **샘플 크기 결정**

[0338] 일차 목표는 CsA와 비교해서, 12개월째에 대상체 및 이식편 생존률과 신장 기능에 대한 L104EA29YIg의 효과를 평가하는 것이다. 2가지 공-일차 종말점은 다음과 같다: (1) 이식 후 12개월째에 생존하는 이식편을 갖는 대상체의 비율 및 (2) 12개월째에 계산된 GFR이 $< 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ 인 대상체 및/또는 3개월째부터 12개월째까지 계산된 GFR이 $\geq 10 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ 으로 감소된 대상체의 비율. 치료군 당 180명 대상체의 샘플 크기는 12개월째에 진짜 대상체 및 이식편 생존률이 CsA 레지멘의 경우에는 80%이고 2가지 L104EA29YIg 레지멘 각각의 경우에는 83%라면, 첫 번째 공-일차 종말점 (대상체 및 이식편 생존)에 있어서 (각 L104EA29YIg 레지멘과 CsA 레지멘 간의) 절대적 차이에 대한 97.3% 2-측면 CIs의 상한 (upper bound)이 10%를 초과하지 않을 것이라 사실효를 규명하기 위해 83% 능력을 제공할 것이다. 신장 기능 종말점에 대해서는, 치료군 당 180명 대상체의 샘플 크기는 CsA 레지멘과 비교해서 각 L104EA29YIg 레지멘에 대한 측정된 GFR 종말점을 충족시키는 대상체 비율이 25% 감소되는 것을 탐지하도록 강화되었는데, CsA 대상체의 75%는 신장 기능 종말점을 충족시키고 치료군 당 25%는 탈락한 것으로 추정된다. 전반적으로, 치료군 당 180명 대상체는 0.05 유의성 수준에서 조절된 전체 유형 I 오차를 나타내는 양 공-일차 종말점을 충족시키는 1가지 L104EA29YIg 레지멘을 탐지할 수 있는 80% 이상 능력을 제공할 것이다 [던넛 (Dunnett) 조정].

[0339] **포함 기준**

[0340] **표적 집단:** 1) 대상체는 사체 공여자 신장 이식의 처음 수용자이다; 2) 공여자 및/또는 공여자 신장은 장기 기증에 대한 다음의 확대된 기준 중의 한 가지 이상을 충족시킨다: a) 공여자 연령 ≥ 60 세; 또는 b) 공여자 연령 50세 내지 59세 및 다음 중의 하나: (i) 뇌혈관 사고 (CVA) + 고혈압 + SCr $> 1.5 \text{ mg/dL}$ 또는 (ii) CVA + 고혈압 또는 (iii) CVA + SCr $> 1.5 \text{ mg/dL}$ 또는 (iv) 고혈압 + SCr $> 1.5 \text{ mg/dL}$ 또는 c) CIT ≥ 24 시간, 공여자 연령 > 10 세 또는 d) 심장 사망한 공여자 (심장 박동 중단 공여자); 3) 18세 이상 여성과 남성이 포함된다; 4) WOCBP는 연구 기간 내내 그리고 임신 위험을 최소화하는 방식으로 연구 후 8주 동안 임신을 피하기 위한 적절한 피임 방법을 사용해야만 한다. WOCBP에는 초경을 경험한 여성, 및 성공적인 불임 수술 (자궁적출술, 양측 난관 결찰술, 또는 양측 난소절제술)을 행하지 않았거나 폐경기 (이는 12개월 이상 동안 연속해서 무월경인 것으로 정의된다)가 아닌 여성, 또는 기록된 혈청 난포 자극 호르몬 수준 $> 35 \text{ mIU/mL}$ 를 이용하여 호르몬 대체 요법 중인 여성이 포함된다. 임신을 방지하기 위해 경구, 이식 또는 주사제 피임용 호르몬 또는 기계적 제품, 예를 들

어 자궁내 장치 또는 장벽 방법 (황경막, 콘돔, 살정자제)를 사용하고 있는 여성 또는 금속중이거나 배우자가 불임인 (예를 들어, 정관절제술) 여성일지라도 임신 가능성이 있는 것으로 간주해야 한다. WOCBP를 대상으로 하여, 연구용 약물 투여를 시작하기 전 72시간 내에 음성 혈청 임신 시험 [최소 민감도 25 IU/L 또는 등가 단위의 인간 용모성 성선자극호르몬 (HCG)]을 수행해야만 한다; 5) 남성은 연구 기간 내내 그리고 그의 배우자의 임신 위험을 최소화하기 위해 마지막 주입 후 8주 간은 적당한 피임 방법을 사용해야만 한다.

[0341] 제외 기준

[0342] 1) 연구 전기간 동안 그리고 마지막 주입 후 8주 동안 임신을 피하기 위해 허용 가능한 방법을 사용하고자 하는 의지가 없거나 사용할 수 없는 WOCBP; 2) 임신 중이거나 수유 중인 여성; 3) 연구용 약물 투여에 앞서 또는 연구를 시작할 때 양성 임신 시험을 나타내는 여성; 4) 전체 연구 기간 동안 그리고 연구용 약물을 마지막으로 주입한 후 8주 동안 적당한 피임 방법을 사용하고자 하는 의지가 없거나 사용할 수 없는 남성; 5) 연령이 10세 미만인 공여자; 6) a) 병소 분절성 사구체경화증 (생검 입증됨), b) 유형 I 또는 II 막증식성 사구체신염, c) 용혈성 요독 증후군/혈전성 혈소판감소성 자반증의 신 질환을 진행하고 있는 대상체; 7) 현 PRA $\geq 30\%$ 를 수반한 대상체; 8) 양성 T-세포 림프세포독성 교차를 나타내는 대상체; 9) 기존에 고형 장기 이식 (신장 포함)을 받은 대상체; 10) 동시에 고형 장기 (심장, 간, 췌장) 또는 세포 (섬, 골수, 줄기 세포) 이식을 받은 대상체; 11) 확대된 기준 공여자로부터 한 쌍의 신장을 이식받은 공여자 (이중 신장 이식); 12) C형 간염 항체-양성이거나 C형 간염에 대해 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)-양성인 대상체; 13) B형 간염 표면 항원-양성이거나 B형 간염에 대해 PCR-양성인 대상체; 14) 공지된 인간 면역결핍증 바이러스 (HIV) 감염된 대상체; 15) 기존 3년 내에 치료를 요하는 활동성 결핵 (TB)이 있는 대상체 또는 기존에 TB에 대한 삼중 (또는 그 이상) 병용 요법을 필요로 한 대상체. 공지된 양성 정제된 단백질 유도체 (PPD)가 있는 대상체는 잠복성 TB에 대한 치료를 완료하고 등록 시점에 음성 가슴 X선을 갖지 않는 한은 본 연구에 적격하지 않을 것이다. 마지막 12개월 내에 수행한 PPD 시험은 그 결과에 관한 문서가 존재하는 한은 허용 가능하다. 기존에 음성 결과를 나타낸, 마지막 12개월 내에 PPD를 수반하지 않는 대상체는 이들이 등록 시점에 음성 가슴 X선을 나타내고, TB를 표시하는 증상이 없으며, 공지된 TB 접촉이 없고, 현재 TB가 창궐한 지역에 거주하고 있지 않거나, 최근에 이러한 지역으로 여행한 적이 없거나 앞서 이러한 지역으로부터 이주한 적이 없는 경우에는 등록할 수 있다. ≥ 10 mm 경화이거나 비-바실레 칼메트-게랑 (비-BCG) 면역시킨 대상체에서의 Heaf 스코어 >1 또는 BCG 면역시킨 대상체에서의 Heaf 스코어 >2 인 PPD 반응은 양성 시험으로서 간주되어야 한다. 보다 보존적 기준은 의학 사회가 보증한 공개된 지침 및/또는 국소적 표준에 따라서 적용할 수도 있다; 16) 이식을 통상적으로 제외시킬 수 있는 활동성 감염이나 기타 금기 사항을 나타내는 대상체; 17) 기대 수명이 질병 상태 또는 기타 진행되고 있는 의학적 질환으로 인해 심하게 제한되는 대상체; 18) 최근 5년간 암 병력 (국소 절제에 의해 치유된 비-흑색종 피부 세포암 이외의 암)이 있는 대상체; 19) 과거 5년 내에 물질 중독 (약물 또는 알코올) 병력이 있었거나, 또는 적절한 연구 후처리와 화합되지 못하는 정신 장애가 있는 대상체; 20) 활동성 소화성 궤양 질병, 만성 설사, 또는 위장 흡수 장애가 있는 대상체; 21) 통상의 독성 기준 (CTC) 등급 II이거나 이 보다 더 큰 국소 실험실 값을 나타내는 대상체는 본 연구에 참여할 수 없다. 그러나, CTC 등급 II를 제외한 특정의 명시된 실험실 파라미터는 허용될 것이다. 다음을 참조한다: 혈액학: 헤모글로빈은 CTC 등급 II 아래 (그러나, 8 g/dL 이하는 아니다)일 수 있다. 혈소판은 CTC 등급 II 아래일 수 있지만, 80,000/ mm^3 (80 x 10⁹/L) 이하는 아니다. 총 백혈구 (WBC) 계수치는 CTC 등급 II 아래일 수 있지만, 3000/ mm^3 (3 x 10⁹/L) 이하는 아니다. 과립구 및 림프구 계수치는 어떠한 값일 수 있다. 화학: SCr 및 혈액 뇨 질소 (BUN) 값도 어떠한 값일 수 있다. 혈중 글루코스는 어떠한 값일 수도 있다. 뇨검사: 뇨검사 결과는 어떠한 값일 수도 있다; 22) 40세 이상 모든 여성, 및 제1도 친척 중에 유방 암종 병력이 있는 환자가 있거나 유방 암종의 기타 위험 요인을 지닌 모든 연령의 여성은 유방조영상 스크리닝을 해야만 하거나 등록 6개월 내에 수행된 유방조영상 스크리닝 결과를 제공해야만 한다. 양성 종양이 있는 것으로 의심되는 유방조영상을 나타내거나 양성 종양 가능성이 있는 대상체는 부가의 임상적, 실험적 또는 기타 진단적 평가가 배제된 후에는 합리적으로 제외될 수 없다. 유방조영상 스크리닝을 등록 6개월 이내에 수행하지 않았지만, 대상체가 국소적 기준에 의해 적합한 이식 후보인 것으로 간주되는 경우에는, 이식 후 4주 이내에 기준선 유방조영상을 획득할 수 있다; 23) 측정된 GFR의 공-일차 종말점 평가를 방해하는 것으로 예상되는 곤란한 정맥내 접근이나 기타 이유를 지닌 대상체, 또는 프로토콜 명시된 12개월 동종이식편 생검을 진행하고자 하는 의지가 없거나 진행할 것으로 예상되지 않는 (예를 들어, 기존의 응고 췌점에 기인함) 대상체; 24) 정맥내 요오드화 X선 조영제에 대한 진짜 알레르기 병력이 있는 대상체; 25) 1일째 방문에 앞서 30일 이내에 모든 조사 약물을 사용한 대상체; 26) L104EA29YIg로 미리 치료받은 대상체; 27) 정신과 질환이나 신체적 질환 (예: 감염성 질환) 치료를 위해 강제적으로 병원에 수용시킨 (본의 아니게 감금시킨) 죄수 또는 대상체는 본 연구에 등록하지 말아야 한다.

- [0343] **L104EA29YIg의 투여**
- [0344] 1일째는 이식 당일 (이식후 0일째)로서 정의된다. 1일째의 용량 주입은 외과위가 초기 수술중 평가를 한 후에 시작해야 하고, 대상체가 여전히 이식 후보라고 결론지으면, 이식을 진행할 것이며, 이식을 시작하기 전에 혈관을 문합시킨다. 주입 용량은 연구 1일째의 대상체의 실제 체중에 기준할 것이며, 체중 변화 $\pm 10\%$ 가 존재하지 않는 한은 연구 과정 동안 변형시키지 않을 것이다. 연구용 약물은 30분에 걸쳐 비교적 일정한 비율로 대상체에게 투여해야 한다. 1일째 및 5일째 (이식 후 4일째) 용량은 대략 96시간 간격 (± 6 시간)으로 투여해야 한다. 후속 방분과 주입 시간대가 다음에 제공되었다. 투석중인 대상체에 대해서는, 투석 처치 후에 L104EA29YIg를 주입하고 대상체의 체중을 결정해야 한다.
- [0345] **L104EA29YIg MI 레지멘:** 무작위로 MI 레지멘을 수행한 대상체에게 1일 및 5일째, 이어서 2개월 동안 격주로 (2, 4, 6, 8, 10 및 12주째), 그리고 6개월째까지 4주 마다 (16, 20 및 24주째) L104EA29YIg (10 mg/kg)을 정맥내 투여할 것이다. 6개월 후에는, MI 치료군 대상체에게 L104EA29YIg 5 mg/kg의 유지 용량을 4주 마다 투여하였는데, 이는 36개월째에 본 시험을 완료할 때까지 지속되었다.
- [0346] **L104EA29YIg LI 레지멘:** 무작위로 LI 레지멘을 수행한 대상체에게 1일 및 5일째, 이어서 2주 동안 격주로 (2 및 4주째), 그리고 2개월 동안 4주 마다 (8 및 12주째) L104EA29YIg (10 mg/kg)을 정맥내 투여할 것이다. 3개월 후에는, LI 치료군 대상체에게 L104EA29YIg 5 mg/kg의 유지 용량을 4주 마다 투여하였는데, 이는 36개월째에 본 시험을 완료할 때까지 지속되었다. LI 치료군에서 플라시보 주입제를 사용하면서 LI 군과 MI 군 간의 내용을 전혀 알리지 않을 것이다. 따라서, 무작위로 LI 레지멘을 수행한 대상체에게 6 및 10주째에 플라시보 [주사용수 중의 텍스트로스 5% (D5W)] 주입제를 투여할 것이다.
- [0347] **시클로스포린 (CsA)의 투여**
- [0348] CsA의 1일 용량은 투여 일자 및 식사와 관련하여 일관된 스케줄에 따라서 2회분으로 나누어 투여해야 한다. 연구 방문일에는, 최저 CsA 혈중 수준을 알아낸 후까지는 오전 CsA 용량을 보류해야만 한다. 연구 방문일에, 대상체를 대상으로 하여 표준화 BP 모니터링 및/또는 측정된 GFR 평가를 수행해야 하는 경우에는 CsA 투여 이전에 이들 조치를 완료해야 한다. 초기 1일 용량은 7 ± 3 mg/kg (즉, 4 - 10 mg/kg)이어야 한다. 후속 용량은 예정된 최저 혈청 농도 범위를 유지하도록 조정해야 한다: 1개월째: 표적 수준 150-300 ng/mL; 1개월 후: 표적 수준 100-250 ng/mL. 투여 후 2시간 내의 혈장 농도 (C2)를 이용하여 CsA 수준을 모니터링하는 것은 본 연구에 사용되지 말아야 한다. C2 모니터링에 의한 네오랄 (Neoral) 관리에 관한 최근의 국제 컨센서스 성명서는 C2 모니터링의 사용을 선호하였지만, 신장 기능, CAN 발생, 및 C2 모니터링과 연관된 총체적인 안전성 프로파일에 대한 장기간 효과에 관한 데이터가 없다고 명백히 언급하고 있다. 더우기, 당뇨병이 있거나 느린 위 공복을 나타내는 대상체 또는 CsA 청소율을 변경시키는 약물을 동시에 사용하는 대상체를 포함한 모든 대상체가 C2 모니터링에 적합하지 않다. 더우기, 낮은 C2 수준은 진짜 낮은 흡수 (이 경우에는 CsA 용량을 증가시켜야 한다) 또는 느린 흡수 (이 경우에는 지연된 최대 혈장 농도가 존재하고 용량 증가가 독성을 유발시킬 수도 있다)로부터 비롯될 수 있다. 최종적으로, 이러한 실시는 만능적이지 않고, 장애에 이러한 실시를 검증하는 것은 현 프로토콜의 범위를 벗어난다. 부가의 처방 정보에 대해서는 패키지 삽입물을 참고할 수 있다. CsA는 모든 대상체에게 7일째까지는 투여를 시작해야 한다. 연구자가 CsA 투여를 개시하기에 가장 관심있는 대상체가 아니라고 여겨져서 (예를 들어, 손상된 신장 기능 때문임), 대신 비-연구 약물 (예: 시롤리무스)의 사용을 선택하는 대상체에 대해서는, 이러한 행위가 연구 약물의 투여 중단으로 간주될 것이다.
- [0349] **즉각적 동종이식편 기능을 지닌 대상체의 경우:** CsA를 이용한 치료를 무작위로 수행한 대상체의 경우에는, CsA 제1 용량을 가능한 한 빨리 투여해야 하지만, 적당한 동종이식편 기능의 명백한 증거가 나타날 때까지는 투여하면 안된다. 적당한 동종이식편 기능은 초기 이식 후 값 또는 이식 후 12시간 (또는 그 미만) 내에 요 배출량 ≥ 250 mL과 비교해서 SCr이 1 mg/dL 이상으로 감소하는 것으로 정의된다.
- [0350] **손상된 신장 동종이식편 기능과 예상된 DGF를 나타내는 대상체의 경우:** 수술 후 손상된 동종이식편 기능과 예상된 DGF를 나타내는 대상체는 적격하긴 하지만, 폴리클로날 항립프구 제제 투여를 요구하지 않는다. 대상체에게 폴리클로날 항립프구 제제를 투여하든지 아니면 투여하지 않든지 간에, 동종이식편 기능 회복의 명백한 증거 (상기 정의된 바와 같음)가 존재하거나 7일째까지는 CsA 투여를 개시해야 한다.
- [0351] **코르티코스테로이드**
- [0352] 본 연구의 모든 대상체는 매일 코르티코스테로이드를 이용하여 치료할 것이다.

[0353] **스테로이드 유지 - 용량 감소:**

- [0354] 이식 당일 (1일째): 수술실 (OR) 도착시 메틸프레드니솔론 (나트륨 석시네이트로서) 500 mg을 정맥내 투여한다.
- [0355] 2일째: 메틸프레드니솔론 (나트륨 석시네이트로서) 250 mg을 정맥내 투여한다.
- [0356] 3일째: 프레드니손 (또는 프레드니솔론) 100 mg을 경구 투여한다.
- [0357] 4일째부터 14일째까지 (즉, 2주 끝날 무렵): 프레드니손 (또는 프레드니솔론) 용량을 20 - 30 mg까지 점점 감소시켜 매일 경구 투여한다.
- [0358] 15일째부터 6개월째까지: 프레드니손 (또는 프레드니솔론) 용량을 2.5 mg 이상까지 점점 감소시켜 매일 경구 투여한다.
- [0359] 대상체에게 3년째까지는 2.5 mg 이상을 매일 경구 투여해야 한다.

[0360] 처음 2회 용량 (이식 당일인 연구 1일째, 및 수술 후 1일째인 연구 2일째)은 정맥내 투여해야 한다. 나머지 용량은 경구 투여해야 한다. 그러나, 경구 투여가 가능하지 않은 경우에는 등가 용량의 메틸프레드니솔론을 적시에 정맥내 투여하는 것이 허용된다. 경구 투여 보다는 정맥내 투여하는 것에 대한 이유는 병발증, 수술 후 장폐색증, 또는 연구자의 재량에 따른 기타 원인들 때문이다. 메틸프레드니솔론이 입수 가능하지 않다면, 메틸프레드니솔론에 대해 용량 등가인 또 다른 정맥내 코르티코스테로이드 작용제를 사용하는 것이 허용된다.

[0361] **미코페놀레이트 모페틸 투여**

[0362] 본 연구에서는 모든 대상체를 MMF로 치료할 것이다. 1일 MMF는 투여 일자 및 식사와 관련하여 일관된 스케줄에 따라서 2회분으로 나누어 투여해야 한다. 용량은 1일 2 g이어야 하지만, 아프리카계 미국인에게는 연구자의 재량으로 1일 3 g을 투여할 수 있다. MMF는 경구 투여해야 한다. 병발증, 수술 후 장폐색증, 또는 연구자의 재량에 따른 기타 원인들로 인해 필요한 경우에는 정맥내 투여할 수 있다. 첫 번째 용량은 수술 전에 투여해야 한다. 후속 용량은 대상체가 입으로 약물을 섭취할 수 있자마자 경구 투여해야 한다. 용량과 스케줄은 실험실 값 (예를 들어, 감소된 WBC)과 대상체 내용성 (하기 참고)을 기준으로 하여 조정할 수 있다. 처방에 관한 상세한 정보는 패키지 삽입물을 참고할 수 있다.

[0363] 구토, 설사 또는 기타 MMF-관련 위장 부작용 (예를 들어, MMF에 대한 참을 수 없는 것 이외의 병인은 갖고 있지 않은 것으로 추정되고 상세히 평가된 증상)이 발생한 대상체에 대해서는, MMF 용량을 최대 내량까지 감소시킬 수 있다. 호중구 감소증 (절대 호중구 계수치 < 1.3 x 10³/L)이 발생한 대상체의 대해서는, MMF 투여를 중단하거나 패키지 삽입물에 따라서 용량을 감소시켜야 한다.

[0364] **바실릭시마브 투여**

[0365] 본 연구에서는 모든 대상체를 바실릭시마브의 권장된 투여 레지멘으로 치료할 것이다. 바실릭시마브는 말초 또는 중추 정맥 만을 통하여 투여해야 한다. 계구성된 바실릭시마브 (5 ml 중의 20 mg)는 정상 식염수 또는 텍스트로스 5%를 이용하여 50 ml 용적이 되도록 희석시키고, 20 내지 30분에 걸쳐 정맥내 주입제로서 투여해야 한다. 처음 20 mg 용량은 1일째에 (이식 당일; 이식 후 0일째) 투여해야 한다. 무작위로 L104EA29YIg을 투여한 대상체에 대해서는, 이러한 첫 번째 바실릭시마브 주입이 L104EA29YIg 주입을 완료하자마자 가능한 빨리 일어나야 한다. 두 번째 20 mg 용량은 5일째에 (수술 후 4일째) 투여해야 한다. 이러한 두 번째 바실릭시마브 용량은 대상체에게 림프구-고갈 치료를 수행하거나 수행하는 것으로 예상되는 경우에는 대상체에게 투여하지 말아야 한다. 부가의 정보에 관해서는 패키지 삽입물을 참고할 수 있다.

[0366] **손상된 신장 동종이식편 기능 및 예상된 DGF에 대한 폴리클로날 항림프구 제제**

[0367] 이식 후 손상된 신장 동종이식편 기능 및 예상된 DGF를 경험한, 무작위로 CsA 투여한 대상체에 대해 폴리클로날 항림프구 제제 (티모글로불린 또는 ATGAM)를 사용하는 것이 허용되긴 하지만, 반드시 요구되는 것은 아니다. 기타 폴리클로날 항림프구 제제 또는 폴리클로날 항흉선세포 글로불린의 사용은 의약품 판매 승인이 있는 영역에서 허용되고, 신장 이식에 있어서의 급성 거부 치료에 적응시킨 경우에 허용된다. 주목해야 할 것은 OKT3을 이러한 목적에 사용하지 말아야 하지만, 밴프 97 등급 IIb 또는 보다 큰 급성 거부 또는 스테로이드-내성 급성 거부를 치료하는데 사용할 수도 있다. 캄파트 (Campath) 1-H[®] (알렘투주마브)의 사용은 이러한 프로토콜에 허용되지 않는데, 이는 상기 제제가 신장 이식에 사용하도록 적응되지 않았기 때문이다. 이들 작용제는 CsA를 투여하기 위해 이식편 기능이 회복될 때까지 면역억제를 제공해줄 수 있는 능력 면에서 광범위하게 활용되고

있다. 따라서, 폴리클로날 항립프구 제제는 연구자의 재량에 따라서 이러한 임상 설정 하에, 이용 가능한 이식 조직 동맥 및 정맥의 존재 하에 관찰되고 초음파 영상 결과 수신증의 증거가 전혀 없는 다음 기준들 중의 한 가지 이상을 충족시키는 대상체에게 사용할 수 있다: a) 뇨 배출량 < 250 cc/12 시간; b) 이식 후 처음 24 내지 72시간에 걸쳐 기준선 값으로부터 SCr 상의 상당한 개선이 없음 (< 1 mg/dX); c) 투석 처치. 손상된 신장 동종 이식편 기능 및 예상된 DGF에 대해 이들 작용제를 사용하는 것은 L104EA29YIg로 치료받은 대상체에게는 허용되지 않는다.

[0368] **설파메톡사졸/트리메토프림 투여**

[0369] 금기를 전혀 나타내지 않는, 본 연구에 참여하는 모든 대상체에게 설파메톡사졸/트리메토프림 예방제를 투여하여 요로 및 뉴모시스티스 카리니이 (*Pneumocystis carinii*) 감염을 예방해야 한다. 투여 및 투여량은 패키지 삽입물과 일관된 신장 기능 수준에 의해 결정해야 한다. 설파 약물이나 트리메토프림에 대한 금기를 나타내거나 참을 수 없는 대상체는 연구자의 재량에 따라서 흡입용 펜타미딘을 이용한 예방적 요법을 수행할 수 있다. 처방에 관한 상세한 정보는 패키지 삽입물을 참고할 수 있다.

[0370] **발간시클로비르 / 간시클로비르, 아시클로비르 / 발라시클로비르 투여**

[0371] 발간시클로비르, 간시클로비르, 아시클로비르 및 발라시클로비르에 대한 금기를 전혀 나타내지 않는 모든 수용자에게 이들 약물을 이용하여 예방적으로 처치하여 CMV 및 헤르페스 심플렉스 (*Herpes simplex*)로 인한 감염증을 예방해야 한다. 다음은 예방적 처치의 투여 및 기간에 관한 지침이다:

[0372] **이식 후 처음 10일 동안 또는 T-세포-고갈 요법 동안의 예방:** 모든 이식 대상체에게 수술 후 10일 동안 프로토콜에 따라 발간시클로비르 또는 간시클로비르를 투여할 것이다. 유도 요법을 위해 또는 급성 거부를 치료하기 위해 T-세포-고갈 요법으로 치료한 경우에는, 대상체에게 T-세포-고갈 요법 기간 동안 발간시클로비르 또는 간시클로비르를 투여할 것이다. 대상체가 10일 이전에 퇴원하는 경우에는, 경구 발간시클로비르, 간시클로비르, 발라시클로비르 또는 아시클로비르를 다음에 기재된 바와 같은 CMV 면역 상태에 기초하여 투여하기 시작할 것이다.

[0373] 예방용 발간시클로비르: **크레아티닌 청소율** ≥ 60 mL/min, 용량 900 mg을 매일 투여함; **크레아티닌 청소율** 40 - 59 mL/min, 용량 450 mg을 매일 투여함; **크레아티닌 청소율** < 40 mL/min, 용량 450 mg을 격일로 투여함.

[0374] 예방용 간시클로비르: 대상체가 경구용 약물을 견디지 못하거나 (섭취할 수 없거나) 발간시클로비르가 입수 가능하지 않은 경우에는, 간시클로비르 현탁제 또는 캡슐제로 대체할 수 있다. **크레아티닌 청소율** ≥ 70 mL/min, 용량 1 g을 1일 3회 투여함; **크레아티닌 청소율** 50 - 69 mL/min, 용량 500 mg을 1일 3회 투여함; **크레아티닌 청소율** 25 - 49 mL/min, 용량 500 mg을 1일 2회 투여함; **크레아티닌 청소율** 10 - 24 mL/min, 용량 500 mg을 매일 투여함; **크레아티닌 청소율** < 10 mL/min, 혈액 투석 후 용량 500 mg을 주당 3회 투여함. 정맥내 간시클로비르가 필요한 경우에는, 투여에 관한 패키지 삽입물을 참고할 수 있다.

[0375] **이식 후 10일부터 적어도 3개월까지의 예방:** CMV 항체 혈청양성 공여자 대 CMV 항체 혈청음성 수용자: ≥ 3 개월 동안 상기 열거된 발간시클로비르 또는 간시클로비르 프로토콜을 지속한다.

[0376] CMV 항체 혈청양성 또는 혈청음성 공여자 대 CMV 항체 혈청음성 수용자: 이식 후 ≥ 3 개월 동안 경구 아시클로비르를 투여함: **혈청 크레아티닌** ≥ 50 mL/min, 용량 800 mg을 1일 4회 경구 투여함; **혈청 크레아티닌** 25 - 49 mL/min, 용량 800 mg을 1일 3회 경구 투여함; **혈청 크레아티닌** 11 - 24 mL/min, 용량 800 mg을 1일 2회 경구 투여함; **혈청 크레아티닌** < 10 mL/min, 용량 800 mg을 매일 경구 투여함; 혈액 투석시, 용량 800 mg을 혈액 투석 후 매일 투여함.

[0377] 대상체 편의상 퇴원하는 시점에 아시클로비르를 발라시클로비르로 대체할 수 있다. **혈청 크레아티닌** ≥ 50 mL/min, 용량 500 mg을 1일 2회 경구 투여함; **혈청 크레아티닌** 25 - 49 mL/min, 용량 500 mg을 매일 경구 투여함; **혈청 크레아티닌** 11 - 24 mL/min, 용량 500 mg을 매일 경구 투여함; **혈청 크레아티닌** < 10 mL/min, 용량 250 mg을 매일 경구 투여함; 혈액 투석시, 용량 250 mg을 혈액 투석 후 매일 투여함.

[0378] CMV 항체 혈청음성 공여자 대 CMV 항체 혈청음성 수용자: 단지 헤르페스 예방 만을 위해 필요한 경구 아시클로비르 프로토콜: 이식 후 ≥ 3 개월 동안 지속한다. 아시클로비르 400 mg을 1일 2회 경구 투여하거나, 또는 대상체 편의상 퇴원하는 시점에 아시클로비르를 발라시클로비르로 대체할 수 있다. 처방에 관한 상세한 정보는 패키지 삽입물을 참고할 수 있다.

[0379] **주입 만을 목적으로 한 방문 과정**

[0380] a) 무작위로 L104EA29YIg 치료를 수행한 대상체의 경우: L104EA29YIg 투여에 앞서 음성 임신 시험이 요구된다. 용량은 가장 최근에 연구 방문한 시점의 대상체 체중에 기초해야 한다. 대상체를 대상으로 하여 생명 유지에 필요한 징후 (주입전 및 주입후)에 관해 모니터링해야 하고 AE를 평가해야 한다. 몇몇 방문시에는 PK 샘플이 요구될 수도 있다.

[0381] b) 무작위로 CsA 치료를 수행한 대상체의 경우: 단지 AE에 관해 평가하기 위해서만 대상체와 접촉해야 할 것이다. 이러한 방문은 전화 접촉일 수 있고, 명시된 방문에 관한 지정된 방문 시간대 내에서 이루어져야 한다.

[0382] **방문 시간대**

[0383] a) 무작위로 L104EA29YIg 치료를 수행한 대상체의 경우: 대략 96시간 간격 (± 6 시간)으로 1일 및 5일째 용량을 투여해야 한다. 주입 만을 위한 방문 스케줄을 촉진시키기 위해서는, 후속 용량에 대한 다음 시간대가 허용된다: 방문 2주차, 방문 시간대 표적일 ± 2 일; 방문 4주차부터 6개월차까지, 방문 시간대 표적일 ± 3 일; 방문 7개월차부터 36개월차까지, 방문 시간대 표적일 ± 5 일; 그 후 방문 8주까지, 방문 시간대 표적일 ± 5 일.

[0384] b) 무작위로 CsA 치료를 수행한 대상체의 경우: 5일 후, 대상체는 단지 2, 4, 8 및 12주차에만 임상 방문하고, 그 다음부터는 3개월 간격으로 방문하면 된다. 3개월 간격 방문이 아닌 경우 (즉, 6, 10, 16, 20, 28, 32주 등)에는, 전화 접촉하여 AE 정보를 수집할 것이다. 임상 방문 및 접촉 (전화) 방문은 무작위로 L104EA29YIg 치료를 수행한 대상체에 대해 상기 명시된 바와 동일한 방문 시간대 내에서 이루어질 것이다. 3개월째 및 12개월째 GFR 평가에 대한 표적일은 12주 ± 14 일 및 52주 ± 14 일이다. 특정 상황 하에서, 그리고 의학적 모니터에 관한 기존의 승인을 이용하여, 3개월 및 12개월째에 측정된 GFR 평가를 각각 6개월 및 15개월째까지 수행할 수도 있다. 측정된 GFR 평가의 확대를 정당화할 수 있는 이러한 이유로는 동시에 발생한 급성 거부 에피소드가 존재하거나 또는 기술적 이유로 인해 평가를 반복해야 할 필요가 있다는 것이다.

[0385] 12개월째 동종이식편 생검을 위한 표적일은 52주 ± 14 일이다. 유사하게, 특정 상황 하에서, 그리고 의학적 모니터에 관한 기존의 승인을 이용하여, 동종이식편 생검을 15개월째까지 취득할 수 있다. 동종이식편 생검의 확대를 정당화할 수 있는 이러한 이유로는 항응고를 위한 시간이 필요하다는 것이다.

[0386] **실시예 5**

[0387] 당업자는 상이한 연구 집단, 공여자 기준 및/또는 목표를 포함하는 연구를 설계하기 위해 상기 실시예 4에 기재된 투여 스케줄을 활용할 수 있었다. 예를 들어, 이러한 이식 연구는 예상된 한랭-허혈성 시간이 <24시간인 사체 공여자 또는 생체 공여자로부터의 신장 이식조직을 이식한 대상체를 평가할 것이다. 면역학적 위험 수준이 다양한 대상체가 적격할 것이다. 그러나, 본 연구는 가장 큰 면역학적 위험을 나타내는 대상체는 제외할 것이다. 대상체를 대상으로 하여 상기 실시예 4에 기재된 바와 같이, 무작위로 MI, LI 및 CsA 레지멘을 수행할 것이다.

[0388] **일차 목표**

[0389] 12개월째에 대상체 및 이식편 생존의 종합에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 12개월째에 측정된 GFR < 60 mL/min/1.73 m²의 종합, 또는 3개월째부터 12개월째까지 측정된 GFR ≥ 10 mL/min/1.73 m²의 감소에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 12개월째까지 급성 거부 발생률에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.

[0390] **이차 목표**

[0391] 12개월째에 측정된 GFR에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 12개월째에 생검-입증된 CAN에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 12개월째에 측정된 GFR < 60 mL/min/1.73 m²의 일차 종합 종말점, 또는 3개월째부터 12개월째까지 측정된 GFR ≥ 10 mL/min/1.73 m²의 감소의 개별적 구성분에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 12, 24 및 36개월째까지 사망, 이식편 손실 및 급성 거부의 삼중 종합 종말점에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 24개월째에 측정된 GFR < 60 mL/min/1.73 m²을 나타내는 대상체의 비율에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 3개월 및 24개월째에 측정된 GFR, 및 기준선 (3개월)부터 12개월째까지 및 24개월째까지의 변화에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 12 및 24개월째에 측정된 GFR < 30 mL/min/1.73 m²을 나타내는 대상체의 비율에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 6, 12, 24 및 36개월째에 계산된 GFR, 및 6개월째부터 12, 24 및 36개월째까지의 변화에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 12, 24 및 36개

일째까지의 PTDM에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 12, 24 및 36개월째에 고혈압 측정치 (SBP 및 DBP 포함), 고혈압 및 조절 고혈압의 발생률 및 우세율, 및 치료 레지멘 세기에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 12, 24 및 36개월째에 이상지질혈증 측정치 [총 혈청, 비-HDL, 저밀도 지단백질 (LDL) 및 HDL 콜레스테롤, 및 TGs 포함], 이상지질혈증 및 조절 이상지질혈증의 발생률 및 우세율, 및 치료 레지멘 세기에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 24 및 36개월째에 대상체 및 이식편 생존에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 24 및 36개월째에 계산된 GFR < 60 mL/min/1.73 m²을 나타내는 대상체의 비율에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 6, 12, 24 및 36개월째에 급성 거부 측정치 [이에는 급성 거부의 발생 및 중증도, 손상된 신장 기능 및 예상되는 지연 이식편 기능 (DGF)에 대한 폴리클로날 항립프구 체제의 사용, 급성 거부를 치료하기 위한 림프구-고갈 요법의 초기 사용, 스테로이드-내성 급성 거부의 발생, 급성 거부 후 완전한 회복 (기준선으로 복귀하는 SCr) 발생, 무증상 거부의 발생, 조직학적 소견에 상관없이 치료받은 모든 급성 거부 에피소드의 발생, 및 급성 거부 발병 시간이 포함된다]에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. QoL에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. CsA와 비교한 L104EA29YIg의 전반적인 안전성을 평가한다. 3개월째부터 12, 24 및 36개월째까지 계산된 GFR의 기울기와 절편에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 12개월째에 계산된 GFR < 60 mL/min/1.73 m²을 나타내는 대상체, 또는 3개월째부터 12개월째까지 계산된 GFR이 10 mL/min/1.73 m² 이상으로 감소된 대상체의 비율에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. DGF의 발생에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 측정된 GFR로써 평가된 바와 같이 12 및 24개월째에 1기 내지 5기 만성 신장 질환이 있는 대상체의 비율에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 계산된 GFR로써 평가된 바와 같이 36개월째에 1기 내지 5기 만성 신장 질환이 있는 대상체의 비율에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 12, 24 및 36개월째까지 종합 심혈관계 질환 종말점 [관결 심혈관계 사망, 심근 경색, 허혈성 발작, 및 재혈관화 (외과적 또는 경피) 과정]에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 12, 24 및 36개월째까지 종합 심신 질환 종말점 (사망, 이식편 손실, 비-치명적 심근 경색, 및 발작)에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 12, 24 및 36개월째에 프래밍햄 위험 스코어에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 연구 약물 중단 발생에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 항-공여자 인간 백혈구 항원 (HLA) 항체에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 안지오텐신 (angiotensin) II 유형 1 (AT1)-수용체 항체에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다. 생검 표본 중의 C4d 양성도에 대한, CsA와 비교한 L104EA29YIg의 효과를 평가한다.

[0392] 연구 계획

[0393] 연구 기간은 3년이고, 안전성 평가를 위해 그 후 8주간 후처리 기간을 두었다. 이는 부분적으로는 그 내용을 알리지 않고, 활성-제어형의 무작위화 병렬군 연구이다. 모든 대상체에게 예상된 CIT가 <24시간인 사체 공여자 또는 생체 공여자로부터의 신장 이식조직을 이식할 것이다.

[0394] 대략 660명의 대상체를 대상으로 하여 무작위로 L104EA29YIg (MI 레지멘), L104EA29YIg (LI 레지멘), 또는 CsA를 이용한 치료를 1:1:1 비율로 수행하였다. 모든 대상체를 대상으로 하여 또한, 바실릭시마브를 이용한 유도, 및 MMF 및 코르티코스테로이드의 배경 유지 면역억제 레지멘을 수행하였다. 무작위로 MI 레지멘을 수행한 대상체에게 1일 및 5일째, 그리고 3개월째까지 2주 마다 (2, 4, 6, 8, 10 및 12주째), 그리고 6개월째까지 4주 마다 (16, 20 및 24주째)에 L104EA29YIg (10 mg/kg)을 정맥내 투여할 것이다. 6개월 후에는, MI 치료군 대상체에게 L104EA29YIg 5 mg/kg의 유지 용량을 4주 마다 투여하였는데, 이는 36개월째에 본 시험을 완료할 때까지 지속되었다. 무작위로 LI 레지멘을 수행한 대상체에게 1일 및 5일째, 그리고 1개월째까지 2주 마다 (2 및 4주째), 그리고 3개월째까지 4주 마다 (8 및 12주째) L104EA29YIg (10 mg/kg)을 정맥내 투여할 것이다. 3개월 후에는, LI 치료군 대상체에게 L104EA29YIg 5 mg/kg의 유지 용량을 4주 마다 투여하였는데, 이는 36개월째에 본 시험을 완료할 때까지 지속되었다. 6주 및 10주째에 LI 치료군에서 플라시보 주입제를 사용하면서 LI 군과 MI 군 간의 내용을 전혀 알리지 않을 것이다. 무작위로 CsA를 투여한 대상체에게는 현 의료 행위와 일관되는 것으로 명시된 최저 혈청 농도를 달성하기 위해 설계된 용량을 1일 2회 투여할 것이다. L104EA29YIg의 안전성과 효능은 1, 2 및 3년째에 평가할 것이다. 독립적 DSMB는 계속적으로 본 연구로부터의 데이터를 고찰할 것이며; 필요한 경우, 해당 시험 수행을 변경하도록 권장할 것이다.

[0395] 연구 집단

[0396] 연구 집단에는 예상된 CIT가 <24시간인 사체 공여자 또는 생체 공여자로부터의 신장 동종이식편 수용자가 포함된다. 일반적으로, 면역학적 기준은 대상체 선별에 있어 중요한 역할을 하지 않을 것이다. 면역학적 위험 수준이 다양한 대상체가 적격하다. 그러나, 본 연구는 가장 큰 면역학적 위험을 나타내는 대상체 [양성 교차-매

치되거나, 현재 50% 이상의 패널-반응성 항체 (PRA)가 있거나, 또는 현재 PRA가 30% 이상인 기준에 이식을 받은 대상체]는 제외할 것이다. 이들 대상체는 그들의 항체 부하를 저하시키기 위한 요법, 예를 들어 혈장분리관출술 (이는 상기 프로토콜의 범주를 벗어난다)을 요구할 수도 있다. 대상체는 전세계적으로 대략 100개 장소에서 등록될 것이다.

[0397] **포함 기준**

[0398] **표적 집단:** 1) 대상체는 예상된 CIT가 < 24시간인 생체 공여자 또는 사체 공여자 신장 이식조직 수용자이다; 2) 18세 이상 여성과 남성이 포함된다; 3) WOCBP는 연구 기간 내내 그리고 임신 위험을 최소화하는 방식으로 연구 후 8주 동안 임신을 피하기 위한 적절한 피임 방법을 사용해야만 한다. WOCBP에는 초경을 경험한 여성, 및 성공적인 불임 수술 (자궁적출술, 양측 난관 결찰술, 또는 양측 난소절제술)을 행하지 않았거나 폐경기 (이는 12개월 이상 동안 연속해서 무월경인 것으로 정의된다)가 아닌 여성, 또는 기록된 혈청 난포 자극 호르몬 (FSH) 수준 >35 mIU/mL를 이용하여 호르몬 대체 요법 중인 여성이 포함된다. 임신을 방지하기 위해 경구, 이식 또는 주사제 피임용 호르몬 또는 기계적 제품, 예를 들어 자궁내 장치 또는 장벽 방법 (황경막, 콘돔, 살정자제)를 사용하고 있는 여성 또는 금욕중이거나 배우자가 불임인 (예를 들어, 정관절제술) 여성일지라도 임신 가능성이 있는 것으로 간주해야 한다. WOCBP를 대상으로 하여, 연구용 약물 투여를 시작하기 전 72시간 내에 음성 혈청 임신 시험 [최소 민감도 25 IU/L 또는 등가 단위의 인간 융모성 성선자극호르몬 (HCG)]을 수행해야만 한다.

[0399] **제외 기준**

[0400] 1) 연구 전기간 동안 그리고 마지막 주입 후 8주 동안 임신을 피하기 위해 허용 가능한 방법을 사용하고자 하는 의지가 없거나 사용할 수 없는 WOCBP; 2) 임신 중이거나 수유 중인 여성; 3) 연구용 약물 투여에 앞서 또는 등록시 양성 임신 시험을 나타내는 여성; 4) 유전적으로 동일한 공여자 수용자 쌍 (즉, 동일한 쌍둥이); 5) 연령이 10세 미만인 공여자; 6) a) 공여자 연령 ≥60세; 또는 b) 공여자 연령 50세 내지 59세 및 다음 중의 하나: (i) 뇌혈관 사고 (CVA) + 고혈압 + SCr > 1.5 mg/dL 또는 (ii) CVA + 고혈압 또는 (iii) CVA + SCr > 1.5 mg/dL 또는 (iv) 고혈압 + SCr > 1.5 mg/dL 또는 c) 예상 CIT ≥24시간 또는 d) 심장 사망한 공여자 (심장 박동 중단 공여자)로써 정의된 바와 같은 확대된 기준 공여자 장기를 수여받은 대상체; 7) a) 원발성 병소 분절성 사구체경화증, b) 유형 I 또는 II 막증식성 사구체신염, c) 용혈성 요독 증후군 (HUS)/혈전성 혈소판감소성 자반증의 신 질환을 진행하고 있는 대상체. 대상체가 공지되지 않은 병인의 ESRD를 갖고/갖거나 조직학적으로 확증된 진단이 전혀 없는 경우에는, 연구자가 생각하기에 원발성 병소 분절성 사구체경화증, 유형 I 또는 II 막증식성 사구체신염, 또는 HUS의 임상 진단과 일관된 임상적 징후 또는 증상이 전혀 없는 한은 상기 대상체를 본 연구에 등록할 수 있다; 8) 현 PRA ≥50%를 수반하여 진행중인 원발성 (처음) 이식 대상체, 또는 PRA ≥30%를 수반하여 재이식을 진행하고 있는 대상체; 9) 급성 거부로 인해 기준에 이식편 손실을 경험한 대상체; 10) 양성 T-세포 림프세포독성 교차를 나타내는 대상체; 11) 기준에 비-신 고형 장기 이식을 받은 대상체 (신장 재이식을 진행하고 있는 대상체는 계류중인 기타 연구 기준이 충족되면 적격하다), 또는 다중-장기 이식 (예: 신장-췌장)을 진행하고 있는 대상체 또는 연구자가 생각하기에 앞으로 3년 내에 제2의 고형 장기 또는 세포 이식조직 (예: 췌장 또는 심 이식조직)을 가질 것으로 예상되는 대상체; 12) 동시에 고형 장기 (심장, 간, 췌장) 또는 세포 (심, 골수, 줄기 세포) 이식을 받은 대상체; 13) 한 쌍의 신장을 이식받은 공여자 (이중 또는 일괄 신장 이식); 14) 공지된 C형 간염 항체-양성이거나 C형 간염에 대해 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)-양성인 대상체; 15) 공지된 B형 간염 표면 항원-양성이거나 B형 간염에 대해 PCR-양성인 대상체; 16) 공지된 인간 면역결핍증 바이러스 (HIV) 감염된 대상체; 17) 기존 3년 내에 치료를 요하는 활동성 결핵 (TB)이 있는 대상체 또는 기준에 TB에 대한 삼중 (또는 그 이상) 병용 요법을 필요로 한 대상체. 공지된 양성 정제된 단백질 유도체 (PPD)가 있는 대상체는 잠복성 TB에 대한 치료를 완료하고 등록 시점에 음성 가슴 X선을 갖지 않는 한은 본 연구에 적격하지 않을 것이다. 마지막 12개월 내에 수행한 PPD 시험은 그 결과에 관한 문서가 존재하는 한은 허용 가능하다. 기준에 음성 결과를 나타낸, 마지막 12개월 내에 PPD를 수반하지 않는 대상체는 이들이 등록 시점에 음성 가슴 X선을 나타내고, TB를 표시하는 증상이 없으며, 공지된 TB 접촉이 없고, 현재 TB가 창궐한 지역에 거주하고 있지 않거나, 최근에 이러한 지역으로 여행한 적이 없거나 앞서 이러한 지역으로부터 이주한 적이 없는 경우에는 등록할 수 있다. ≤10 mm 경화이거나 비-바실레 칼메트-게랑 (비-BCG) 면역시킨 대상체에서의 Heaf 스코어 >1 또는 BCG 면역시킨 대상체에서의 Heaf 스코어 >2인 PPD 반응은 양성 시험으로서 간주되어야 한다. 보다 보존적 기준은 의학 사회가 보증한 공개된 지침 및/또는 국소적 표준에 따라서 적용할 수도 있다; 18) 이식을 통상적으로 제외시킬 수 있는 활동성 감염이나 기타 급기 사항을 나타내는 대상체; 19) 기대 수명이 질병 상태 또는 기타 진행되고 있는 의학적 질환으로 인해 심하게 제한되는 대상체; 20) 최근 5년간 암 병력 (국소 절제에 의해 치유된 비-흑색종 피부 세포암 이외의 암)이 있는 대상체; 21) 과거 5년 내에 물질 중독 (약물 또는 알코올) 병

력이 있었거나, 또는 적절한 연구 후처리와 화합되지 못하는 정신 장애가 있는 대상체; 22) 활동성 소화성 궤양 질병, 만성 설사, 또는 위장 흡수 장애가 있는 대상체는 본 연구에 참여할 수 없다.

[0401] L104EA29YIg MI 및 LI, 및 CsA 레지멘에 대한 투여 및 방문 시간대 (이에는 요구된 바와 같은 목록이 포함된다)는 상기 및 실시예 4에 기재된 바와 같을 것이다.

[0402] 본 발명이 속하는 분야의 당업자에게 명백한 바와 같이, 본 발명은 본 발명의 요지 또는 본질적 특징으로부터 벗어나지 않고서도 상기 구체적으로 언급된 것 이외의 형태로 구체화 (예시)될 수 있다. 따라서, 상기 언급된 본 발명의 특별한 양태는 예시적인 것으로 간주되고, 제한적이지 않은 것으로 간주되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술된 설명에 함유된 실시예들로 제한되는 것이 아니라, 첨부된 청구의 범위에 기재된 바와 같다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 CD86Ig에 대한 L104EA29YIg, L104EIg, 및 야생형 CTLA4Ig의 평형 결합 분석을 도시한 것이다.

[0022] 도 2A & 2B는 본원 실시예 2에 기재된 바와 같이, 인간 CD80- 또는 CD86-형질감염시킨 CHO 세포에 대한 L104EA29YIg, L104EIg, 및 CTLA4Ig의 결합을 나타내는 FACS 검정으로부터의 데이터를 예시한 것이다.

[0023] 도 3A & 3B는 본원 실시예 2에 기재된 바와 같이, CD80-양성 및 CD86-양성 CHO 세포의 증식 억제를 도시한 것이다.

[0024] 도 4A & 4B는 L104EA29YIg가 본원 실시예 2에 기재된 바와 같이, 일차 및 이차 동종자극된 T 세포의 증식을 억제하는데 있어서 CTLA4Ig 보다 더 유효하다는 것을 도시한 것이다.

[0025] 도 5A-C는 L104EA29YIg가 본원 실시예 2에 기재된 바와 같이, 동종자극된 인간 T 세포의 IL-2 (도 5A), IL-4 (도 5B), 및 γ -인터페론 (도 5C) 사이토킨 생성을 억제하는데 있어서 CTLA4Ig 보다 더 유효하다는 것을 도시한 것이다.

[0026] 도 6은 L104EA29YIg가 본원 실시예 2에 기재된 바와 같이, 식물적혈구응집소 (PHA)-자극된 원숭이 T 세포의 증식을 억제하는데 있어서 CTLA4Ig 보다 더 유효하다는 것을 도시한 것이다.

[0027] 도 7 (서열 3 및 4)는 본원 실시예 1에 기재된 바와 같은, 신호 펩티드; 위치 +1에서의 메티오닌으로 시작하고 위치 +124에서의 아스파르트산으로 종결되거나 또는 위치 -1에서의 알라닌으로 시작하고 위치 +124에서의 아스파르트산으로 종결되는, CTLA4의 돌연변이된 세포의 도메인; 및 Ig 영역을 포함하는 CTLA4 돌연변이체 분자 ("L104EA29YIg")의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도시한 것이다. 서열 3 및 4는 신호 펩티드; 위치 +27에서의 메티오닌으로 시작하고 위치 +150에서의 아스파르트산으로 종결되거나 또는 위치 +26에서의 알라닌으로 시작하고 위치 +150에서의 아스파르트산으로 종결되는, CTLA4의 돌연변이된 세포의 도메인; 및 Ig 영역을 포함하는 CTLA4 돌연변이체 분자 ("L104EA29YIg")의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 각각 도시한 것이다.

[0028] 도 8 (서열 5 및 6)은 본원 실시예 1에 기재된 바와 같은, 신호 펩티드; 위치 +1에서의 메티오닌으로 시작하고 위치 +124에서의 아스파르트산으로 종결되거나 또는 위치 -1에서의 알라닌으로 시작하고 위치 +124에서의 아스파르트산으로 종결되는, CTLA4의 돌연변이된 세포의 도메인; 및 Ig 영역을 포함하는 CTLA4 돌연변이체 분자 ("L104EIg")의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도시한 것이다. 서열 5 및 6은 신호 펩티드; 위치 +27에서의 메티오닌으로 시작하고 위치 +150에서의 아스파르트산으로 종결되거나 또는 위치 +26에서의 알라닌으로 시작하고 위치 +150에서의 아스파르트산으로 종결되는, CTLA4의 돌연변이된 세포의 도메인; 및 Ig 영역을 포함하는 CTLA4 돌연변이체 분자 ("L104EIg")의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 각각 도시한 것이다.

[0029] 도 9 (서열 7 및 8)는 신호 펩티드; 위치 +1에서의 메티오닌으로 시작하고 위치 +124에서의 아스파르트산으로 종결되거나 또는 위치 -1에서의 알라닌으로 시작하고 위치 +124에서의 아스파르트산으로 종결되는, CTLA4의 세포의 도메인의 야생형 아미노산 서열; 및 Ig 영역을 갖는 CTLA4Ig의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도시한 것이다. 서열 7 및 8은 신호 펩티드; 위치 +27에서의 메티오닌으로 시작하고 위치 +150에서의 아스파르트산으로 종결되거나 또는 위치 +26에서의 알라닌으로 시작하고 위치 +150에서의 아스파르트산으로 종결되는, CTLA4의 세포의 도메인의 야생형 아미노산 서열; 및 Ig 영역을 포함하는 CTLA4Ig의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 각각 도시한 것이다.

[0030] 도 10A-C는 CTLA4Ig (레인 1), L104EIg (레인 2), 및 L104EA29YIg (레인 3)에 대한 SDS 겔 (도 10A); 및 CTLA4Ig (도 10B) 및 L104EA29YIg (도 10C)의 크기 배제 크로마토그래프이다.

[0031] 도 11A 및 11B는 NMR 분광법에 의해 결정된 용액 구조로부터 생성된 CTLA4 세포의 IgV-유사 폴드의 리본 다이어

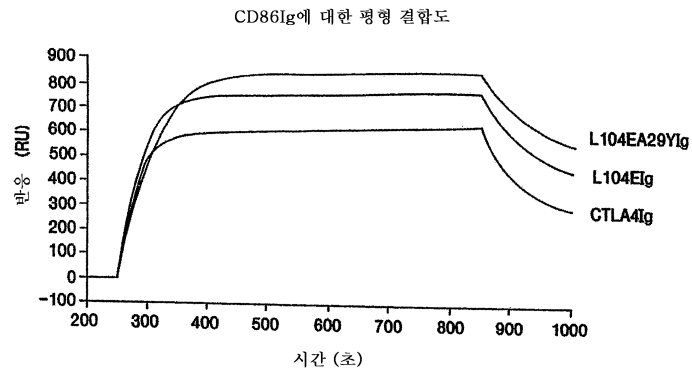
그램을 예시한 것이다. 도 11B는 결합 친화력 증강성 돌연변이 L104 및 A29의 위치와 측쇄 배향을 표시하는 S25-R33 영역 및 MYPPPY 영역의 확대도이다.

[0032] 도 12는 L104EA29YIg 삽입물을 갖는 벡터 piLN-L104EA29Y의 도식적 다이어그램이다.

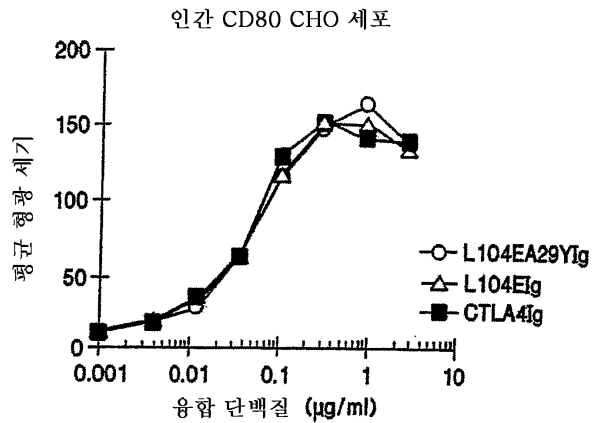
[0033] 도 13은 CTLA4 수용체의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열 (서열 9 및 10)을 도시한 것이다.

도면

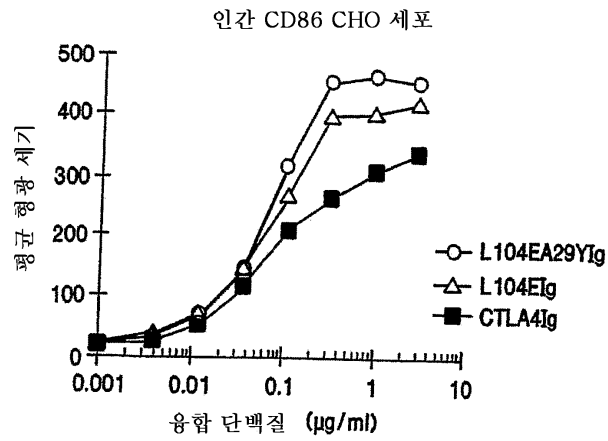
도면1



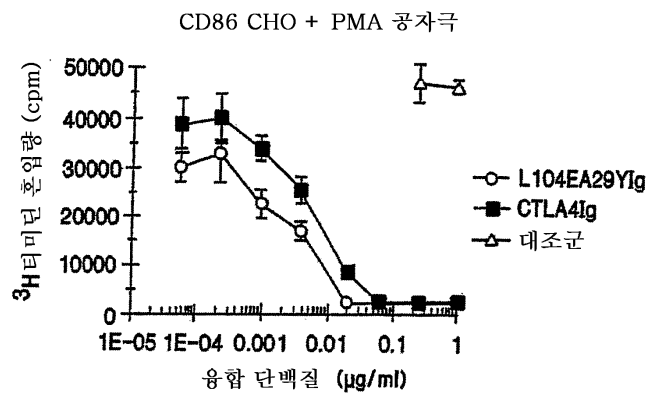
도면2A



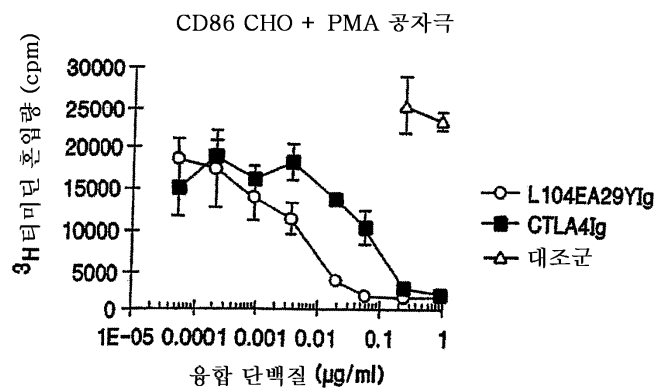
도면2B



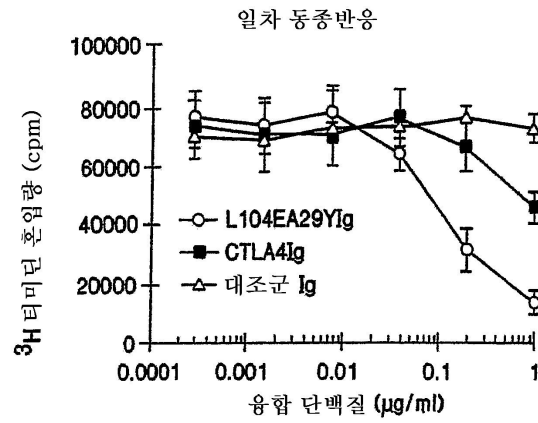
도면3A



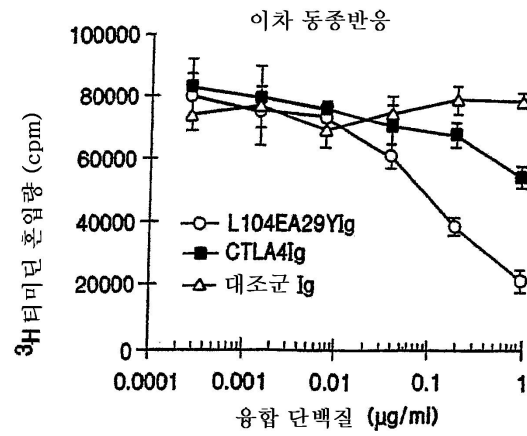
도면3B



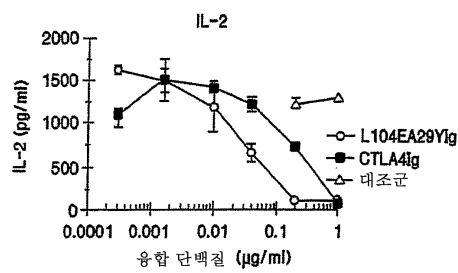
도면4A



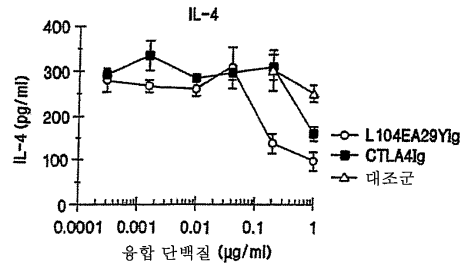
도면4B



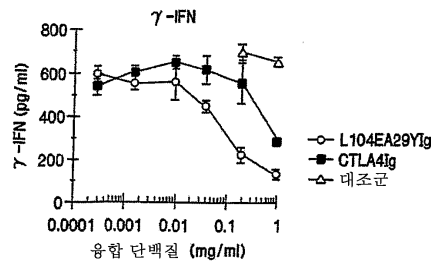
도면5A



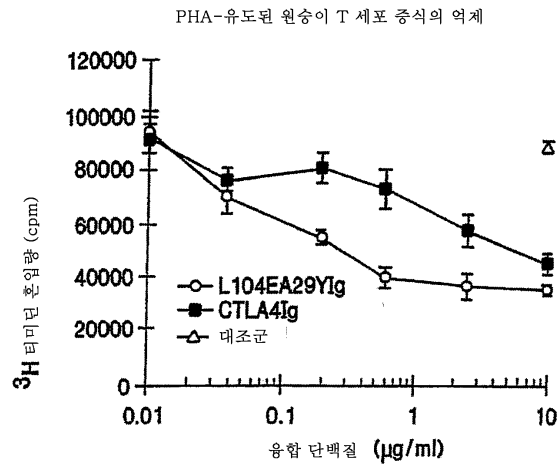
도면5B



도면5C



도면6



도면7

ATGGGTGTA CTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCTGCACTCCTGTTTCCA -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P-- -7

AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--E-- +14
+1

GGCAATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAATATACTGAGTCCGSGTG +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--Y--T--E--V--R--V-- +34

ACAGTGTCTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M-- +54

GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTOCATCTGCACGGGCACTCCAGTGGAAATCAA +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q-- +74

GTGAACCTCACTATCCAAAGSACTGAGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGSTG +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V-- +94

GAGCTCATGTATCCACCGCCATACTACGAGGCGATAGGCAACGGAAACCCAGATTTATGTA +342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--T--G--N--G--T--Q--I--Y--V-- +114

ATTGATCCAGAACCGTCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAATCTCTGACAAAATCAC +402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H-- +134

ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGATCGTCACTCTTCTCTTCCCC +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P-- +154

CCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACTGCGTGGTGGTG +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V-- +174

GACGTGAGCCACGACAGCCTGAGGTCLAGTTCAACTGGTACGTGGACGGGCTGGAGSTG +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V-- +194

CATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGC +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S-- +214

GTCCTCACCGTCCCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCC +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S-- +234

AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGCGAGCCCCGA +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R-- +254

GAAACCAAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAAGC +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S-- +274

CTGACCTGCTGCTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAAT +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--H--E--S--N-- +294

GGGCAAGCCGAGAACTACAAGACCAAGCCTCCCGTGGCTGACTCCGACGGCTCCTTC +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F-- +314

TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACTCTCTCA +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S-- +334

TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAGCAGAGAGCCCTCTCCCTGTCT +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S-- +354

CCGGTAAATGA
P--G--K--*

도면8

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGGCTGCTCAGTCTGGTCTTGCACCTCTGTTTCCA -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P-- -7

AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACCTGGCCAGCCTGCTGTGTAAGTGGCCAGCAGCCGA +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--R-- +14
+1

GGCATCCTAGCTTTGTGTGAGTATGCACTCTCCAGGCAAGCCACTGAGGTCCGGGTG +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V-- +34

ACAGTGTCTGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAAGTCTGTGGCCAACTACATGATG +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M-- +54

GGAAATGAGTTGACCTTCTAGATGATCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q-- +74

GTGAACCTCACTATCCAAGACTGAGGGCCATGGACACGGACTCTACATCTGCAAGGTG +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V-- +94

GAGCTCATGTACCCACGCCATACTAOCCTGGGCATAGGCAACGGAAACCAGATTTATGTA +342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--L--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V-- +114

ATTGATCCAGAAACCGTCCAGATTCGTATCAGGAGCCAAATCTTCTGACAAAATCAC +402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H-- +134

ACATCCCCACCGTCCCGACCACTGAACCTCCGGGTGGATCGTCAGTCTTCTCTTCCCC +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P-- +154

CCAAACCCAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTTCATGCGTGGTGGTGG +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V-- +174

GACGTGAGCCACGAAAGACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--H--W--Y--V--D--G--V--E--V-- +194

CATAATGCCAAGACAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCCAGC +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S-- +214

GTCCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCC +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S-- +234

AACAAGCCCTCCCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--L--S--K--A--K--G--Q--P--R-- +254

GAAACACAGGTGTACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTTCAGC +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--E--D--E--L--T--K--N--Q--V--S-- +274

CTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCEACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N-- +294

GGGAGCCGGGAGAACAACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCOGACGGCTCCTTC +942
G--Q--P--E--N--H--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F-- +314

TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGCAGGTTGGCAGCAGGGGAACGTCTCTCA +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S-- +334

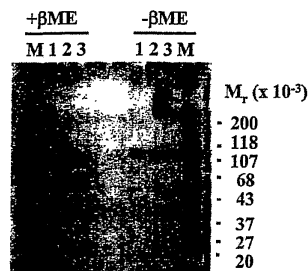
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAGAGCCTCTCCCTGTCT +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S-- +354

CCGGTAAATGA
P--G--K--*

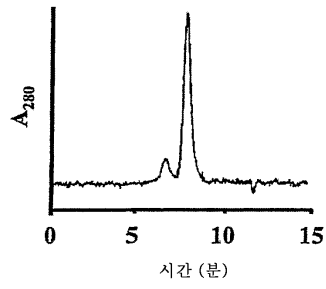
도면9

ATGGGTGZACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCTTGCACCTCCTGTTTCCA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--F--	-7
AGCATGGGAGCATGGCAATGCACGTTGGCCAGCCTGCTGTGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S--M--A--S--M--A--M--E--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATGCTAGCTTTGTGTGTGASTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGSTCCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGCITGSGCAGGCTGCACGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACTCCAGTGGAAATCAA	+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTACATCTGCAAGTGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTACCCACGGCCACTACTACGAGGOCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCGTCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCCACCGTCCCGCAGCCTGAACCTCTGGGGGATGTCAGTCTTCTCTTCCCC	+462
T--S--P--F--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAACCAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGGGTGGTGTG	+522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCACGAAAGACCCCTGAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCSTGTGGTCAGC	+642
H--N--A--X--T--X--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCCTCACCGTCTCSCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--N--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCCAGGTGAGC	+822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--	+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGGACATCGCCGTGGAGTGGGAGGCAAT	+882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--	+294
GGCAGCCGAGAACAACTACAGACCAAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G--Q--P--E--N--N--Y--X--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--	+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGACGTTCTTCTCA	+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--	+334
TGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACAGCAGAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C--S--V--M--E--E--A--L--H--N--E--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--	+354
COGGTAAATGA	
F--G--K--*	

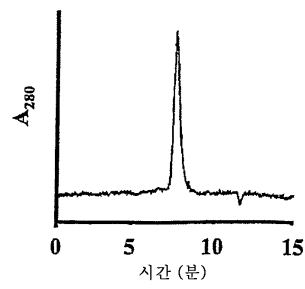
도면10A



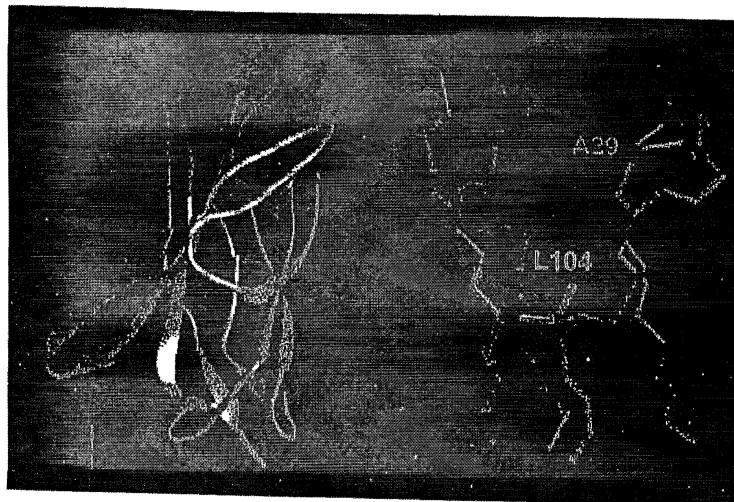
도면10B



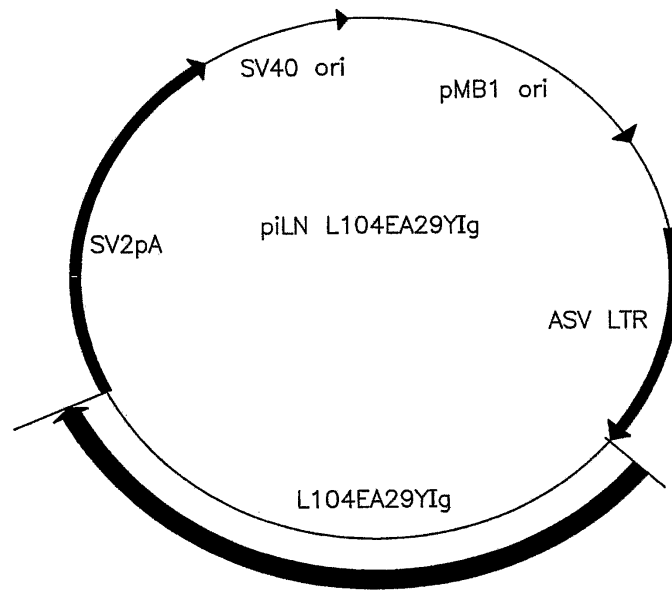
도면10C



도면11



도면12



도면13

은코스타틴 M 신호 펩티드

```

M G V L L T Q R T L L S L V L
ATG GGT GTA CTG CTC ACA CAG AGG ACG CTG CTC AGT CTG GTC CTT 45
                                     ← -1 +1
A L L F F S M A S M A M H V A
GCA CTC CTG TTT CCA AGC ATG GCG AGC ATG GCA ATG CAC GTG GCC 90

Q P A V V L A S S R G I A S F
CAG CCT GCT GTG GTA CTG GCC AGC AGC CGA GGC ATC GCC AGC TTT 135

V C E Y A S P G K A T E V R V
GTG TGT GAG TAT GCA TCT CCA GGC AAA GCC ACT GAG GTC CGG GTG 180

T V L R Q A D S Q V T E V C A
ACA GTG CTT CGG CAG GCT GAC AGC CAG GTG ACT GAA GTC TGT GCG 225

A T Y M H G N E L T F L D D S
GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC TTC CTA GAT GAT TCC 270

I C T G T S S G N Q V N L T I
ATC TGC ACG GGC ACC TCC AGT GGA AAT CAA GTG AAC CTC ACT ATC 315

Q G L R A M D T G L Y I C K V
CAA GCA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA CTG TAC ATC TGC AAG GTG 360
                                     클리코실화 부위
E L M Y P P P Y Y L G I G N G
GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA TAC TAC CTG GGC ATA GGC AAC GGA 405
←
T Q I Y V I D P E P C P D S D
ACC CAG ATT TAT GTA ATT GAT CCA GAA CCG TGC CCA GAT TCT GAC 450

F L L W I L A A V S S G L F F
TTC CTC CTC TGG ATC CTT GCA GCA GTT AGT TCG GGG TTG TTT TTT 495

Y S F L L T A V S L S K M L K
TAT AGC TTT CTC CTC ACA GCT GTT TCT TTG AGC AAA ATG CTA AAG 540

K R S P L T T G V Y V K M P P
AAA AGA AGC CCT CTT ACA ACA GGG GTC TAT GTG AAA ATG CCC CCA 585

T E P E C E K Q F Q P Y F I P
ACA GAG CCA GAA TGT GAA AAG CAA TTT CAG CCT TAT TTT ATT CCC 630

I N
ATC AAT 636
    
```

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Bristol-Myers Squibb Company
Hagerty, David
Rusnak, James
- <120> METHODS FOR TREATING IMMUNE DISORDERS ASSOCIATED WITH GRAFT
TRANSPLANTATION WITH SOLUBLE CTLA4 MUTANT MOLECULES
- <130> 10522A PCT
- <160> 10
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
- <211> 41

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oncostatin M CTLA4 (OMCTLA4) Forward Primer

<400> 1
 gaggtgataa agcttcacca atgggtgtac tgctcacaca g 41

<210> 2
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oncostatin M CTLA4 (OMCTLA4) Reverse Primer

<400> 2
 gtgggtgatt ggtctagatc aatcagaatc tgggcacggt tc 42

<210> 3
 <211> 1152
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> L104EA29YI_g

<400> 3
 atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcaagtctgg tccttgcaact cctgtttcca 60

agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggactgca cagcagccga 120

ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aatatactga ggtccgggtg 180

acagtgcttc ggcaggctga cagccaggctg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240

gggaatgagt tgaccttct agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300

gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaaggtg 360

gagctcatgt acccaccgcc atactacgag ggcataggca acggaacca gatttatgta 420

attgatccag aaccgtgcc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480

acatcccccac cgiccccage acctgaactc ctgggggat cgtcagtctt cctcttcccc 540

ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg 600

gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 660

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 720

gtcctcaccg tctgcaaca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780

aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840

gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900

ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1020

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080

tgctccgtga tgcgatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140

ccgggtaaat ga 1152

<210> 4
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> L104EA29YIg

<400> 4

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 35 40 45

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

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

195

200

205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 290 295 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 305 310 315 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380

<210> 5

<211> 1152

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> L104EIg

<400> 5
 atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtcctgg tctttgcaact cctgtttcca 60
 agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggactggc cagcagccga 120
 ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aagccactga ggtccgggtg 180
 acagtcttc ggcaggctga cagccaggctg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240
 gggaatgagt tgaccttctt agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300
 gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaaggtg 360
 gagctcatgt acccaccgcc atactacgag ggcataggca acggaacca gatttatgta 420
 attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480
 acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctggggggat cgtcagtctt cctcttcccc 540
 caaaaccca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg 600
 gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 660
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 720
 gtctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780
 aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840
 gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900
 ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatecc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga eggctccttc 1020
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080
 tgctcctga tgcattgagc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140
 ccgggtaaat ga 1152

<210> 6
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> L104EIg

<400> 6

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 35 40 45

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

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 290 295 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 305 310 315 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380

- <210> 7
- <211> 1152
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> CTLA4Ig

<400> 7
 atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtcctgg tccttgcaact cctgtttcca 60
 agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggtactggc cagcagccga 120
 ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aagccactga ggtccgggtg 180
 acagtgcttc ggcaggctga cagccaggtg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240
 gggaatgagt tgaccttctt agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300
 gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaaggtg 360
 gagctcatgt acccaccgcc atactacctg ggcataggca acggaacca gatttatgta 420

atgtatccag aaccgtgcc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480

acatcccccac cgccccagc acctgaactc ctgggtggat cgtcagtctt cctcttcccc 540

ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg 600

gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 660

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc 720

gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780

aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840

gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1020

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140

cgggtaaat ga 1152

<210> 8
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CTLA4Ig

<400> 8

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 35 40 45

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

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 290 295 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 305 310 315 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380

<210> 9
 <211> 636
 <212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(636)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (79)..()

<400> 9

atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca 48
 Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 -25 -20 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct 96
 Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 -10 -5 -1 1 5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag 144
 Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 10 15 20

tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg 192
 Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
 25 30 35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg 240
 Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 40 45 50

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc 288
 Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 55 60 65 70

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac 336
 Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 75 80 85

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac 384
 Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 90 95 100

tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa 432

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 40 45 50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 55 60 65 70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 75 80 85

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 90 95 100

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 105 110 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser
 120 125 130

Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser
 135 140 145 150

Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys
 155 160 165

Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
 170 175 180

Ile Pro Ile Asn
 185