



(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0028295

(43) 공개일자 2007년03월12일

(21) 출원번호 10-2006-7010901

(22) 출원일자 2006년06월02일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2006년06월02일

(86) 국제출원번호 PCT/US2004/036954

(87) 국제공개번호 WO 2005/044304

국제출원일자 2004년11월04일

국제공개일자 2005년05월19일

(30) 우선권주장 60/517,337 2003년11월04일 미국(US)  
60/525,579 2003년11월26일 미국(US)  
60/565,710 2004년04월27일 미국(US)  
60/611,794 2004년09월21일 미국(US)

(71) 출원인 노바티스 백신즈 앤드 다이아그노스틱스 인코포레이티드  
미합중국 캘리포니아 94608-2916 엠머리빌 호튼 스트리트 4560

(72) 발명자 룡 리  
미국 캘리포니아 94662-8097 엠머리빌 피.오. 박스 8097카이론 코포레  
이션  
루크먼 모하매드  
미국 캘리포니아 94662-8097 엠머리빌 피.오. 박스 8097카이론 코포레  
이션  
야반나바르 아샤  
미국 캘리포니아 94662-8097 엠머리빌 피.오. 박스 8097카이론 코포레  
이션  
자로르 이사벨  
미국 캘리포니아 94662-8097 엠머리빌 피.오. 박스 8097카이론 코포레  
이션  
아우커만 샤론 레아  
미국 캘리포니아 94662-8097 엠머리빌 피.오. 박스 8097카이론 코포레  
이션

(74) 대리인 정진상  
박종혁

전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 만성 임파세포성 백혈병의 치료에 사용되는 길항제항-C D 4 0 항체의 용도

## (57) 요약

본 발명에서는 만성 임파세포성 백혈병에 대하여 환자를 치료하기 위한 방법이 제공된다. 그 방법은 치료가 필요한 환자에게 치료적 유효량의 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 투여하는 것으로 이루어진다. 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 상당한 아고니스트 활성이 없지만, 항체가 사람 CD40-발현 세포상에서 CD40 항원에 결합할 때 길항제 활성을 나타낸다. 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 길항제 활성은 유익하게도 사람 CD40-발현 만성 임파세포성 백혈병 세포의 증식 및/또는 분화를 억제한다.

## 특허청구의 범위

## 청구항 1.

만성 임파세포성 백혈병 (CLL)에 대하여 사람 환자를 치료하는 방법으로서,

상기 방법이 상기 환자에게 사람 CD40-발현 세포의 표면에 발현된 사람 CD40 항원에 특이하게 결합할 수 있는 사람 항-CD40 단클론성 항체의 유효량을 투여하는 것으로 이루어지며, 상기 단클론성 항체는 상당한 아고니스트 활성이 없고, 그로써 상기 단클론성 항체가 상기 세포 표면에 발현된 CD40 항원에 결합할 때 상기 세포의 성장 또는 분화가 억제되고, 상기 사람 항-CD40 단클론성 항체는 다음의 항체들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법:

- a) 단클론성 항체 CHIR-5.9 또는 CHIR-12.12;
- b) 하이브리도마 셀라인 5.9 또는 12.12에 의해 생성된 단클론성 항체;
- c) SEQ ID NO:6에 도시된 서열, SEQ ID NO:7에 도시된 서열, SEQ ID NO:8에 도시된 서열, SEQ ID NO:6과 SEQ ID NO:7에 모두 도시된 서열, 및 SEQ ID NO:6과 SEQ ID NO:8에 모두 도시된 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단클론성 항체;
- d) SEQ ID NO:2에 도시된 서열, SEQ ID NO:4에 도시된 서열, SEQ ID NO:5에 도시된 서열, SEQ ID NO:2와 SEQ ID NO:4에 모두 도시된 서열, 및 SEQ ID NO:2와 SEQ ID NO:5에 모두 도시된 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단클론성 항체;
- e) SEQ ID NO:1에 도시된 서열, SEQ ID NO:3에 도시된 서열, SEQ ID NO:1과 SEQ ID NO:3에 모두 도시된 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 코드화된 아미노산 서열을 가지는 단클론성 항체;
- f) 하이브리도마 셀라인 5.9 또는 12.12에 의해 생성된 단클론성 항체에 결합할 수 있는 에피토프에 결합하는 단클론성 항체;
- g) SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:12에 도시된 사람 CD40 서열의 잔기 82-87을 포함하는 에피토프에 결합하는 단클론성 항체;
- h) SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:12에 도시된 사람 CD40 서열의 잔기 82-89를 포함하는 에피토프에 결합하는 단클론성 항체;
- i) 경합 결합 분석에서 단클론성 항체 CHIR-5.9 또는 CHIR-12.12와 경합하는 단클론성 항체;
- j) 상기 a)의 단클론성 항체 또는 상기 c) 내지 i)중 어느 하나의 단클론성 항체, 이때 상기 항체는 제조할 제조되며; 및
- k) 상기 a) 내지 j)중 어느 하나의 단클론성 항체의 항원-결합 단편인 단클론성 항체, 이때 상기 단편은 상기 사람 CD40 항원에 특이하게 결합할 수 있는 능력을 보유한다.

## 청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 단클론성 항체가 상기 사람 CD40 항원에 최소한 약  $10^{-6}$  M 내지 약  $10^{-12}$  M의 친화력 ( $K_D$ )으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 단편이 Fab 단편,  $F(ab')_2$  단편, Fv 단편, 및 단일-사슬 Fv 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 4.

만성 임파세포성 백혈병 (CLL)에 대하여 사람 환자를 치료하는 방법으로서,

상기 방법이 상기 환자에게 사람 CD40 항원의 도메인 2에 특이하게 결합하는 길항제 항-CD40 단클론성 항체의 유효량을 투여하는 것으로 이루어지고,

상기 항체가 사람 CD40 항원의 도메인 2에 결합했을 때 상당한 아고니스트 활성을 나타내지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 5.

제 4항에 있어서, 상기 항체가 사람 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 6.

제 4항에 있어서, 상기 항체가 재조합적으로 제조되는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 7.

제 4항에 있어서, 상기 항체가 하이브리도마 셀라인 5.9에 의해 제조된 항체와 하이브리도마 셀라인 12.12에 의해 제조된 항체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항체의 결합 특성을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 8.

제 4항에 있어서, 상기 항체가 특허 기탁 번호 PTA-5542로서 ATCC에 기탁된 하이브리도마 셀라인 및 특허 기탁 번호 PTA-5543으로서 ATCC에 기탁된 하이브리도마 셀라인에 의해 생성된 항체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 9.

제 4항에 있어서, 상기 항체가 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9의 결합 특이성을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 10.

제 4항에 있어서, 상기 항체가 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:12에 도시된 사람 CD40 서열의 잔기 82-87을 포함하는 에피토프에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 11.

제 4항에 있어서, 상기 항체가 다음의 항체들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법:

- a) SEQ ID NO:2에 도시된 서열, SEQ ID NO:4에 도시된 서열, SEQ ID NO:5에 도시된 서열, SEQ ID NO:2와 SEQ ID NO:4에 모두 도시된 서열, 및 SEQ ID NO:2와 SEQ ID NO:5에 모두 도시된 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단클론성 항체;
- b) SEQ ID NO:1에 도시된 서열, SEQ ID NO:3에 도시된 서열, SEQ ID NO:1과 SEQ ID NO:3에 모두 도시된 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 코드화된 아미노산 서열을 가지는 단클론성 항체;
- c) 하이브리도마 셀라인 12.12에 의해 생성된 단클론성 항체에 결합할 수 있는 에피토프에 결합하는 단클론성 항체;
- d) SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:12에 도시된 사람 CD40 서열의 잔기 82-87을 포함하는 에피토프에 결합하는 단클론성 항체;
- e) 경합 결합 분석에서 단클론성 항체 CHIR-12.12와 경합하는 단클론성 항체;
- f) 상기 a) 내지 e)의 어떠한 하나의 단클론성 항체, 이때 상기 항체는 재조합적으로 제조되며; 및
- g) CHIR-12.12 단클론성 항체의 항원-결합 단편 또는 상기 a) 내지 f)의 어느 하나의 단클론성 항체의 항원-결합 단편인 단클론성 항체, 이때 상기 단편은 상기 사람 CD40 항원에 특이하게 결합할 수 있는 능력을 보유한다.

## 청구항 12.

CD40 항원을 발현하는 만성 임파세포성 백혈병 (CLL) 세포의 성장을 억제하는 방법으로서,

상기 방법은 상기 세포와 상기 CD40 항원에 특이하게 결합할 수 있는 사람 항-CD40 단클론성 항체의 유효량을 접촉시키는 것으로 이루어지고, 상기 단클론성 항체는 CD40 항원에 결합했을 때 상당한 아고니스트 활성이 없으며, 상기 항체는 다음의 항체들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법:

- a) 단클론성 항체 CHIR-5.9 또는 CHIR-12.12;
- b) 하이브리도마 셀라인 5.9 또는 12.12에 의해 생성된 단클론성 항체;
- c) SEQ ID NO:6에 도시된 서열, SEQ ID NO:7에 도시된 서열, SEQ ID NO:8에 도시된 서열, SEQ ID NO:6과 SEQ ID NO:7에 모두 도시된 서열, 및 SEQ ID NO:6과 SEQ ID NO:8에 모두 도시된 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단클론성 항체;

- d) SEQ ID NO:2에 도시된 서열, SEQ ID NO:4에 도시된 서열, SEQ ID NO:5에 도시된 서열, SEQ ID NO:2와 SEQ ID NO:4에 모두 도시된 서열, 및 SEQ ID NO:2와 SEQ ID NO:5에 모두 도시된 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단클론성 항체;
- e) SEQ ID NO:1에 도시된 서열, SEQ ID NO:3에 도시된 서열, SEQ ID NO:1과 SEQ ID NO:3에 모두 도시된 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 코드화된 아미노산 서열을 가지는 단클론성 항체;
- f) 하이브리도마 셀라인 5.9 또는 12.12에 의해 생성된 단클론성 항체에 결합할 수 있는 에피토프에 결합하는 단클론성 항체;
- g) SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:12에 도시된 사람 CD40 서열의 잔기 82-87을 포함하는 에피토프에 결합하는 단클론성 항체;
- h) SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:12에 도시된 사람 CD40 서열의 잔기 82-89를 포함하는 에피토프에 결합하는 단클론성 항체;
- i) 경합 결합 분석에서 단클론성 항체 CHIR-5.9 또는 CHIR-12.12와 경합하는 단클론성 항체;
- j) 상기 a)의 단클론성 항체 또는 상기 c) 내지 i)중 어느 하나의 단클론성 항체, 이때 상기 항체는 재조합 제조되며; 및
- k) 상기 a) 내지 j)중 어느 하나의 단클론성 항체의 항원-결합 단편인 단클론성 항체, 이때 상기 단편은 상기 사람 CD40 항원에 특이하게 결합할 수 있는 능력을 보유한다.

### 청구항 13.

제 12항에 있어서, 상기 단클론성 항체가 상기 사람 CD40 항원에 최소한 약  $10^{-6}$  M 내지 약  $10^{-12}$  M의 친화력 ( $K_D$ )으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 14.

제 12항에 있어서, 상기 단편이 Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, Fv 단편, 및 단일-사슬 Fv 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 15.

CD40 항원을 발현하는 만성 임파세포성 백혈병 (CLL) 세포의 성장을 억제하는 방법으로서,

상기 방법이 상기 세포와 사람 CD40 항원의 도메인 2에 특이하게 결합하는 길항제 항-CD40 단클론성 항체의 유효량을 접촉시키는 것으로 이루어지고, 상기 항체가 사람 CD40 항원의 도메인 2에 결합했을 때 상당한 아고니스트 활성을 나타내지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 16.

제 15항에 있어서, 상기 항체가 사람 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 17.

제 15항에 있어서, 상기 항체가 재조합적으로 제조된 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 18.

제 15항에 있어서, 상기 항체가 하이브리도마 셀라인 5.9에 의해 제조된 항체와 하이브리도마 셀라인 12.12에 의해 제조된 항체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항체의 결합 특성을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 19.

제 15항에 있어서, 상기 항체가 특허 기탁 번호 PTA-5542로서 ATCC에 기탁된 하이브리도마 셀라인 및 특허 기탁 번호 PTA-5543으로서 ATCC에 기탁된 하이브리도마 셀라인에 의해 생성된 항체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 20.

제 15항에 있어서, 상기 항체가 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9의 결합 특이성을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 21.

제 15항에 있어서, 상기 항체가 SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:12에 도시된 사람 CD40 서열의 잔기 82-87을 포함하는 에피토프에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 22.

제 15항에 있어서, 상기 항체가 다음의 항체들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법:

- a) SEQ ID NO:2에 도시된 서열, SEQ ID NO:4에 도시된 서열, SEQ ID NO:5에 도시된 서열, SEQ ID NO:2와 SEQ ID NO:4에 모두 도시된 서열, 및 SEQ ID NO:2와 SEQ ID NO:5에 모두 도시된 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단클론성 항체;
- b) SEQ ID NO:1에 도시된 서열, SEQ ID NO:3에 도시된 서열, SEQ ID NO:1과 SEQ ID NO:3에 모두 도시된 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 코드화된 아미노산 서열을 가지는 단클론성 항체;
- c) 하이브리도마 셀라인 12.12에 의해 생성된 단클론성 항체에 결합할 수 있는 에피토프에 결합하는 단클론성 항체;
- d) SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:12에 도시된 사람 CD40 서열의 잔기 82-87을 포함하는 에피토프에 결합하는 단클론성 항체;
- e) 경합 결합 분석에서 단클론성 항체 CHIR-12.12와 경합하는 단클론성 항체;
- f) 상기 a) 내지 e)의 어떠한 하나의 단클론성 항체, 이때 상기 항체는 재조합적으로 제조되며; 및
- g) CHIR-12.12 단클론성 항체의 항원-결합 단편 또는 상기 a) 내지 f)의 어느 하나의 단클론성 항체의 항원-결합 단편인 단클론성 항체, 이때 상기 단편은 상기 사람 CD40 항원에 특이하게 결합할 수 있는 능력을 보유한다.

## 명세서

## 기술분야

본 발명은 길항제 항-CD40 단클론성 항체를 사용하여 만성 임파세포성 백혈병을 치료하는 방법에 관한 것이다.

## 배경기술

만성 임파세포성 백혈병 (CLL)은 골수, 혈액, 임파 결절, 및 비장에서의 신생 세포가 증식하고 축적되는 것을 특징으로 하는 B 세포 악성종양이다. CLL은 서반구에서는 가장 흔한 타입의 성인 백혈병이다. CLL의 발생은 노화 집단에서 증가하는데, 진단되는 평균 연령은 약 65세이다. 현재의 치료 프로토콜은 플루다라빈, 2-클로로데옥시아데노신 (클라드리빈), 클로람부실, 빈크리스틴, 펜토스타틴, 시클로포스파미드, 알렘투주맵(Campath-1H), 독소루비신, 및 프레드니손과 같은 화학요법제를 포함한다. 플루다라빈은 반응률이 17 내지 74 %인 가장 효과적인 화학요법제이지만, CLL은 때로 반복되는 약물 과정에 내성이 된다 (Rozman and Montserrat (1995) *NEJM* 2133: 1052).

CLL 환자의 평균 생존율은 9년이지만 돌연변이된 면역글로불린 유전자를 가지고 있는 일부 환자는 더 양호한 예후를 나타낸다 (Rozman and Montserrat (1995) *NEJM* 2133:1052 및 Keating et al.,(2003) *Hematol.* 2003:153). CLL이 큰-세포 임파종으로 전환되는 경우 평균 생존율은 1년 이하로 떨어지며; 유사하게 전임파세포성 백혈병의 경우에는 고전적인 CLL보다 빈약한 예후를 나타낸다 (Rozman and Montserrat (1995) *NEJM* 2133:1052). 오늘날까지 치료에 대한 증거는 얻을 수 없었다.

CD40은 정상 및 신생 사람 B 세포, 수지상 돌기 세포, 다른 항원 제공 세포 (APCs), 내피 세포, 단핵 세포 및 상피 세포의 표면에 나타나는 55 kDa의 세포-표면 항원이다. B 세포막 위에서 CD40 항원에 대한 CD40 리간드의 결합은 B 세포 활성화 및 증식을 자극하는 포지티브 공자극성 신호를 제공하여, 그 결과 B 세포가 고수준의 가용성 면역글로불린을 분비하는 혈장 세포로 성숙하게 된다. 초기 및 말기 B-세포 임파종, B-세포 급성 임파아세포성 백혈병, CLL, 골수아세포성 백혈병, 및 호지킨병에 걸린 환자로부터의 형질전환된 세포는 CD40을 발현한다. B-세포 계통의 여러 종양으로부터의 악성 B 세포는 고도의 CD40을 발현하고 생존 및 증식을 위해 CD40 신호화에 의존하는 것으로 여겨진다. 이것은 CD40 항원이 항암 치료법에 대한 강력한 표적이 되게 한다.

만성 임파세포성 백혈병에 걸린 환자에 대한 예후가 빈약하다면 대체 치료 프로토콜이 필요하다.

## 발명의 상세한 설명

본원에서는 만성 임파세포성 백혈병 (CLL)에 걸린 사람 환자를 치료하는 방법이 제공되는데, 그 방법은 환자에게 사람 CD40-발현 세포상에서 CD40 항원에 결합했을 때 상당한 아고니스트 활성이 없는 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 투여하는 것으로 이루어진다.

본 발명의 방법에 사용하기 위한 적당한 길항제 항-CD40 항체는 CD40에 대한 강력한 친화력을 가지고 있으며, 최소한  $10^{-6}$  M, 바람직하게는 최소한 약  $10^{-7}$  M 내지 약  $10^{-8}$  M, 보다 바람직하게는 최소한 약  $10^{-8}$  M 내지 약  $10^{-12}$  M의 해리 평형 상수 ( $K_D$ )를 가지는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 방법에 사용되기에 적당한 단클론성 항체 및 그것의 항원-결합 단편은 사람 세포 표면에 발현된 사람 CD40 항원에 특이하게 결합할 수 있다. 그것들은 상당한 아고니스트 활성을 갖지 않지만, 사람 세포 상에서 CD40 항원과 결합할 때 길항제 활성을 나타낸다. 한 구체예에서 항-CD40 항체 또는 그것의 단편은 정상적인 사람 B 세포 상에서 CD40 항원에 결합할 때 길항 활성을 나타낸다. 다른 구체예에서 항-CD40 항체 또는 그것의 단편은 악성 사람 B 세포에 결합할 때 길항제 활성을 나타낸다. 적당한 단클론성 항체는 사람 불변 영역을 가지며, 바람직하게는 또한 전체적으로 또는 부분적으로 인간화된 골격 영역을 가지고, 가장 바람직하게는 전체 사람 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 가지고 있다. 그런 단클론성 항체의 실례로는 다음과 같은 것들이 있다: 본원에서 CHIR-5.9 및 CHIR-12.12로 표시된 항체; 131.2F8.5.9 (이하 본원에서는 셀라인 5.9로 언급함) 및 153.8E2.D10.D6.12.12 (이하 본원에서는 셀라인 12.12로 언급함)로 표시되는 하이브리도마 셀라인에 의해 생성된 단클론성 항체; SEQ ID NO:6에 도시된 서열, SEQ ID NO:7에 도시된 서열, SEQ ID NO:8에 도시된 서열, SEQ ID NO:6과 SEQ ID NO:7에 모두 도시된 서열, 및 SEQ ID NO:6과 SEQ ID NO:8에 모두 도시된 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단클론성 항체; SEQ ID NO:2에 도시된 서열, SEQ ID NO:4에 도시된 서열, SEQ ID NO:5에 도시된 서열, SEQ ID NO:2와 SEQ ID NO:4에 모두 도시된 서열, 및 SEQ ID NO:2와 SEQ ID NO:5에 모두 도시된 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노

산 서열을 포함하는 단클론성 항체; SEQ ID NO:1에 도시된 서열, SEQ ID NO:3에 도시된 서열, SEQ ID NO:1과 SEQ ID NO:3에 모두 도시된 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 코드화된 아미노산 서열을 포함하는 단클론성 항체; 사람 CD40에 특이하게 결합할 수 있는 능력을 보유하면서, 상당한 아고니스트 활성은 없지만 사람 세포 상에서 CD40 항원에 결합했을 때 길항 활성을 나타내는 상기 단클론성 항체의 항원-결합 단편들. 그러한 단클론성 항체의 실례로는 또한 하이브리도마 셀라인 5.9 또는 12.12에 의해 생성된 단클론성 항체에 결합할 수 있는 에피토프에 결합하는 단클론성 항체; SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:12에 도시된 아미노산 서열의 잔기 82 내지 87을 포함하는 에피토프에 결합하는 단클론성 항체; 경합 결합 분석에서 단클론성 항체 CHIR-5.9 또는 CHIR-12.12와 경합하는 단클론성 항체; CHIR-5.9 또는 CHIR-12.12 단클론성 항체 또는 전술한 단클론성 항체들의 항원-결합 단편으로, 사람 CD40 항원에 특이하게 결합할 수 있는 능력을 보유하고 있는 단클론성 항체가 있다.

본 발명의 한 구체예에서, 치료 방법은 적당한 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 치료적으로 유효한 양으로 환자에게 투여하는 것으로 이루어진다. 항-CD40 항체 또는 그것의 단편의 치료적으로 유효한 양은 약 0.01 mg/kg 내지 약 40 mg/kg의 범위, 약 0.01 mg/kg 내지 약 30 mg/kg의 범위, 약 0.1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg의 범위, 약 1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg의 범위, 약 3 mg/kg 내지 약 30 mg/kg의 범위, 약 3 mg/kg 내지 약 25 mg/kg의 범위, 약 3 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 범위, 약 5 mg/kg 내지 약 15 mg/kg의 범위, 또는 약 7 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 범위 내에 있다. 치료 방법은 치료적으로 유효한 양의 1회 투여 또는 치료적으로 유효한 양의 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 여러 번 투여하는 것을 포함한다는 것이 인지될 것이다.

본원에서 본 발명의 방법에 사용하기에 적당한 것으로 확인된 길항제 항-CD40 항체는 변형될 수 있다. 이들 길항제 항-CD40 항체의 변형으로는, 그것들에 한정되지는 않지만, 면역학적으로 활성인 키메라 항-CD40 항체, 인간화된 항-CD40 항체, 및 면역학적으로 활성인 쥐과 항-CD40 항체가 있다.

본원에서 사용되는 용어 "종양"은 그것이 악성이든 양성이든, 또 모두 암-발생 이전이거나 현재 암 세포이거나 조직인 모든 신생 세포 성장 및 증식을 말한다.

용어 "암" 및 "암에 걸린"은 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는 포유류의 생리적 상태를 말하거나 나타내는 것이다. 암의 예로는 임파종과 백혈병이 있고, 이것들에 한정되는 것은 아니다.

"항체" 및 "면역글로불린"(Ig)은 동일한 구조적 특징을 가지는 당단백질들이다. 항체가 항원에 대한 결합 특이성을 나타내는 한편, 면역글로불린은 항체와 항원 특이성이 없는 다른 항체-유사 분자를 둘 다 포함한다. 면역글로불린 유형의 폴리펩티드는 예를 들면 임파 시스템에 의해 저수준으로, 및 골수종에 의해 상승된 수준으로 생성된다.

용어 "항체"는 넓은 의미로 사용되며, 완전히 어셈블된 항체, 항원과 결합할 수 있는 항체 단편(예컨대 Fab', F'(ab)<sub>2</sub>, Fv, 단일 사슬 항체, 디아체(diabodies), 및 전술한 것들을 포함하는 재조합 펩티드를 포함한다.

본원에서 사용되는 용어 "단클론성 항체"는 실질적으로 동종성인 다수의 항체, 즉 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외한 동일 집단을 포함하는 개별적인 항체들로부터 얻어진 항체를 말한다.

"천연 항체" 및 "천연 면역글로불린"은 보통 2개의 동일한 경쇄(L)와 2개의 동일한 중쇄(H)로 구성된, 약 150,000 달톤의, 서로 다른 4부분으로 이루어진 당단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 이황화 공유 결합에 의하여 중쇄에 연결되는 한편, 이황화 결합의 수는 상이한 면역글로불린 이소타입의 중쇄 중에서도 다르다. 각 중쇄와 경쇄는 또한 규칙적으로 공간배치된 사슬간 이황화 가교를 포함한다. 각각의 중쇄는 한 단부에 가변 도메인(V<sub>H</sub>)과 이어지는 많은 불변 도메인을 포함한다. 각각의 경쇄는 한 단부에 가변 도메인(V<sub>L</sub>)과 그것의 다른 단부에 불변 도메인을 포함하며; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인과 일렬 배열되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 일렬 배열된다. 특정한 아미노산 잔기는 경- 및 중-쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성하는 것으로 여겨진다.

용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분들이 항체들 간에 서열에 있어 광범위하게 상이한 것을 말하고, 그것의 특정 항원에 대하여 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다. 그러나 가변성은 항체의 다양한 도메인을 통하여 골고루 분포되지는 않는다. 가변성은 상보성 결정 영역(CDR) 또는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 초가변 영역으로 불리는 세 절편으로 집약된다. 가변 도메인의 보다 더 고도로 보존된 부분들은 프레임워크(FR) 영역으로 불린다. 천연의 중- 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 대개는 β-쉬트 형태를 취하고, β-쉬트 구조를 연결하고, 어떤 경우에는 β-쉬트 구조의 일부를 형성하는 루프를



형성하는 세 개의 CDR에 의해 연결된 4개의 FR 영역을 포함한다. 각 사슬의 CDR은 FR 영역에 의해 매우 가까운 곳에 함께 보유하고, 다른 사슬로부터의 CDR과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다 (Kabat et al. (1991) *NIH Publ. No. 91-3242*, Vol. I, pp647-669).

불변 도메인은 항원에 대한 항체의 결합에 직접 포함되지는 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 Fc 수용체 (FcR) 결합, 항체-의존성 세포 독성에 항체의 참여, 옵소닌처리, 보체 의존성 세포독성의 개시, 및 비만 세포 탈과립화를 나타낸다.

본원에 사용되는 용어 "초가변성 영역"은 항원 결합을 초래하는 항체의 아미노산 잔기를 말한다. 초가변성 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 잔기 (즉 경쇄 가변 도메인의 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2), 및 89-97 (L3) 및 중쇄 가변 도메인의 잔기 31-35 (H1), 50-65 (H2), 및 95-102 (H3) (Kabat et al (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (5th ed., Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD) 및/또는 "초가변성 루프"로부터의 잔기들 (즉 경쇄 가변 도메인의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 및 91-96 (L3) 및 중쇄 가변 도메인의 26-32 (H1), 53-55 (H2), 및 96-101 (H3); Clothia and Lesk (1987), *J. Mol. Biol.* 196:901-917)을 포함한다. "프레임 워크" 또는 "FR" 잔기는 초가변성 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기들이다.

"항체 단편"은 무상 항체의 일부, 바람직하게는 무상 항체의 항원-결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 실례는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 및 Fv 단편; 디아체; 선형 항체 (Zapata et al., (1995) *Protein Eng.* 8(10):1057-1062); 단일-사슬 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체이다. 항체의 파파인 소화로는, 각각 하나씩의 항원-결합 부위가 있는 "Fab" 단편으로 불리는 2개의 동일한 항원-결합 단편과, 쉽게 결정화되는 능력을 반응하는 이류인 잔류 "Fc" 단편으로 불리는 단편이 생성된다. 펩신으로 처리하면 두 개의 항원-결합 부위를 포함하는 F(ab')<sub>2</sub> 단편이 생성되며 여전히 항원과 교차-결합할 수 있다.

"Fv"는 완전한 항원 인지 및 결합 부위를 함유하는 최소한의 항체 단편이다. 2-사슬 Fv 중에서 이 영역은 빈틈없는 비-공유 결합으로 연결된 하나의 중- 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 구성된다. 단일-사슬 Fv 중에서는 하나의 중- 및 하나의 경쇄 가변 도메인이 구부러지기 쉬운 펩티드 링커에 의해 공유 결합될 수 있어서, 경- 및 중쇄가 상기 2-사슬 Fv 중에서도 유사한 "이량체" 구조로 결합할 수 있다. 각각의 가변 도메인의 세 개의 CDR이 V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> 이량체의 표면에 있는 항원-결합 부위를 규정하기 위해 상호작용하는 것은 바로 이 형태로서이다. 일괄적으로 6개의 CDR이 항체에 대한 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 단지 3개의 CDR을 포함하는 Fv의 절반)일지라도 전체 결합 부위보다 낮은 친화력에서이긴 하지만 항원을 인지하고 결합할 수 있는 능력을 가지고 있다.

Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인과 중쇄의 첫 번째 불변 도메인 (C<sub>H</sub>1)을 함유한다. Fab 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 또는 둘 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 C<sub>H</sub>1 도메인의 카르복시 말단에 몇 개의 잔기를 첨가하는 것이 Fab' 단편과는 다르다. Fab'-SH는 본원에서는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 자유 티올기를 내포하는 Fab'를 표시하는 것이다. F(ab')<sub>2</sub> 항체 단편은 원래 그것들 사이에 힌지 시스테인을 가지고 있는 Fab' 단편의 쌍으로서 생성된다. 항체 단편의 다른 화학적 결합도 또한 공지되어 있다.

모든 척추동물 종의 항체(면역글로불린)의 "경쇄"는 그것들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 토대로 하여 카파(κ) 및 람다(λ)로 불리는 2개의 뚜렷이 구별되는 유형 중 하나로 지정될 수 있다.

중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 면역글로불린은 상이한 부류로 지정될 수 있다. 사람 면역글로불린에는 5개의 주요 부류가 있는데, 각각 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이고, 이들 중 여러 개가 하위 부류 (이소타입), 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 및 IgA2로 한층 더 나누어질 수 있다. 면역글로불린의 상이한 부류에 해당하는 중쇄 불변 도메인은 각각 알파, 델타, 입실론, 감마, 및 뮤로 불린다. 면역글로불린의 상이한 부류의 서브유닛 구조와 3-차원 형태는 잘 알려져 있다. 상이한 이소타입은 상이한 이펙터 기능을 가진다. 예를 들어 사람 IgG1 및 IgG3 이소타입은 항체-의존성 세포-중재된 세포독성 (ADCC) 활성을 중재한다.

본원에서 사용되는 단어 "표지"는 "표지된" 항체를 생성하기 위하여 항체에 직접 또는 간접적으로 포함된 검출가능한 화합물 또는 조성물을 말한다. 표지는 그 자체로서 검출되거나 (예컨대 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소적 표지인 경우에는 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉진할 수 있다. 검출가능한 표지로서 사용될 수 있는 방사성 핵종으로는 예를 들면 I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, 및 Pd-109가 있다. 표지는 또한 독소와 같이 검출할 수 없는 것일 수도 있다.

용어 "길항제"는 광범위한 의미로 사용되는데, 본원에 개시된 천연 표적의 생물학적 활성 또는 그것의 전사 또는 번역을 부분적으로 또는 전체적으로 차단, 억제, 또는 중화시키는 모든 분자를 포함한다.

본원에서 사용되는 "담체"는 사용되는 단위용량 및 농도에서 그것에 노출되는 세포 또는 포유류에 비독성인 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정제를 포함한다. 보통 생리적으로 허용되는 담체로는 인산염, 시트르산염, 숙신산염, 및 다른 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산을 포함한 항산화제; 저분자량 (약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신; 당당류, 이당류, 및 다른 탄수화물, 이를테면 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린; 킬레이트 화제, 예컨대 EDTA; 당 알코올, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 카운터이온, 예컨대 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 및 플루로닉이 있다. 하나 또는 둘 이상의 추가의 치료제"와 연합하여" 투여한다는 것은 동시의 (부수적인) 및 어떤 순서로든지 연속적인 투여를 포함한다.

본원에서 사용되는 "숙주 세포"는 재조합 벡터 또는 다른 전달 폴리뉴클레오타이드에 대한 수용체로서 사용될 수 있거나 사용되었던 단세포 실체로서 배양된 미생물 또는 진핵 세포 또는 셀라인을 말하며, 형질전환된 원래 세포의 자손을 포함한다. 단일 세포의 자손은 자연적인, 우연한, 또는 계획적인 돌연변이로 인해, 형태나 계통 또는 총 DNA 보체에 있어서 원래의 모세포와 완전히 동일할 필요는 없다는 것이 명백하다.

"사람 이펙터 세포"는 하나 또는 둘 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게도 세포는 최소한 FcγRIII를 발현하고 항원-의존성 세포-중재된 세포독성 (ADCC) 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 중재하는 사람 백혈구의 실례로는 말초혈 단핵세포 (PBMC), 천연 킬러 (NK) 세포, 단핵세포, 대식세포, 호산성 백혈구, 및 호중구가 있으며, PBMC 및 NK 세포가 바람직하다. ADCC 활성을 가지는 항체는 전형적으로 IgG1 또는 IgG3 이소타입의 항체이다. IgG1 및 IgG3 항체를 분리하는 것 외에 그런 ADCC-중재 항체는 비-ADCC 항체로부터 가변 영역을 공학적으로 처리하거나 IgG1 또는 IgG3 이소타입 불변 영역에 가변 영역 단편을 공학 처리함으로써 제조될 수 있음이 명백하다.

용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 설명하기 위해 사용된다. 바람직한 FcR은 천연-서열 사람 FcR이다. 더욱이 바람직한 FcR은 IgG 항체에 결합하는 것이고 (감마 수용체) FcγRI, FcγRII, 및 FcγRIII 하위부류의 수용체를 포함하며, 대립형질 변이체 및 또는 달리 이들 수용체의 접합된 형태를 포함한다. FcγRII 수용체는 FcγRIIA ("활성화 수용체")와 FcγRIIB ("억제 수용체")를 포함하는데, 이것들은 주로 그것의 세포질성 도메인이 상이한 유사한 아미노산 서열을 가지고 있다. 활성화 수용체 FcγRIIA를 활성화하는 것은 그것의 세포질성 도메인에 면역수용체 티로신-토대 활성화 모티프 (ITAM)을 함유한다. 억제 수용체 FcγRIIB는 그것의 세포질성 도메인에 면역수용체 티로신-토대 억제 모티프 (ITIM)을 함유한다 (Daeron (1997) *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234). FcR은 문헌에 개괄적으로 검토되었다 (Ravetch and Kinet (1991) *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel et al. (1994) *Immunomethods* 4:25-34; 및 de Haas et al. (1995) *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-341). 미래에 확인될 것들을 포함하여 다른 FcR은 본원에서 용어 "FcR"에 포함된다. 이 용어는 또한 엄마의 IgG가 태아에게 전달되는 것에 책임이 있는 신생아 수용체, FcRn도 포함한다 (Guyer et al. (1976) *J. Immunol.* 117:587 및 Kim et al. (1994) *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

사람 항체를 제조하는 방법은 많이 있다. 예를 들어 분비 세포는 Epstein-Barr 바이러스 (EBV)로 감염됨으로써 불멸화될 수 있다. 그러나 EBV-감염된 세포는 클론하기 어렵고 보통은 단지 상대적으로 낮은 수율의 면역글로불린을 생성한다 (James and Bell (1987) *J. Immunol. Methods* 100:5-40). 미래에는 사람 B 세포의 불멸화는 아마도 규정된 조합의 형질 전환 유전자를 도입함으로써 이루어질 것이다. 그런 가능성은 텔로메라제(telomerase) 촉매활성을 나타내는 서브유닛을 SV40 큰 종양형성 단백질 및 H-ras의 종양형성 대립형질과 함께 발현시키는 것이 정상적인 사람 상피 및 섬유아세포의 종양형성 전환을 초래한다는 최근의 증거에 의해 강조된다 (Hahn et al. (1999) *Nature* 400:464-468). 현재 면역화될 때, 내인성 면역글로불린이 생성되지 않아도 일정한 목록의 사람 항체를 생성할 수 있는 유전자 도입 동물(예컨대 마우스)을 제조하는 것이 가능하다 (Jakobovits et al. (1993) *Nature* 362:255-258; Lonberg and Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93; Fishwild et al. (1996) *Nat. Biotechnol.* 14:845-851; Mendez et al. (1997) *Nat. Genet.* 15:146-156; Green (1999) *J. Immunol. Methods* 231:11-23; Tomizuka et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727; Little et al. (2000) *Immunol. Today* 21:364-370). 예를 들면 키메라 및 점-라인(germ-line) 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 결합 영역 (J<sub>H</sub>) 유전자의 동질접합성 결실은 내인성 항체 생성을 완전히 억제하는 결과를 초래한다고 설명되었다 (Jakobovits et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551-2555). 그런 점-라인 돌연변이 마우스에서 사람 점-라인 면역글로불린 유전자 배열의 전달은 항원 도전시 사람 항체를 생성하는 결과를 초래할 수 있다 (Jakobovits et al. (1993) *Nature* 362:255-258). 멘데즈 등은 항원으로 도전받을 때 고친화력의 전체 사람 항체를 생성하는 유전자 도입 마우스의 라인을 제조하였다 (Mendez et al. (1997), *Nature Genetics* 15:146-156). 이것은 메가 염기의 사람 중쇄 및 경

쇄 유전자좌를 상술된 바와 같이 내인성  $J_H$  절편에 결실이 있는 마우스에 점-라인 통합시킴으로써 이루어졌다. 이들 마우스 (XenoMouse<sup>R</sup> II 기법 (Abgenix; Fremont, California))는 대략 66  $V_H$  유전자, 완전한  $D_H$  및  $J_H$  영역, 및 3개의 상이한 불변 영역을 함유하는 1,020 kb의 사람 중쇄 유전자좌를 내포하며, 또한 32  $V_K$  유전자,  $J_K$  절편, 및  $C_K$  유전자를 함유하는 800 kb의 사람  $\kappa$  유전자를 내포하고 있다. 이들 마우스에서 생성된 항체는 모든 측면, 이를테면 유전자 재배열, 어셈블리, 및 일정한 목록에 이르기까지 사람에게서 볼 수 있는 것과 매우 닮아있다. 사람 항체는 쥐와 유전자좌에서 유전자 재배열을 방지하는 내인성 절편의 결실 때문에 내인성 항체보다 우선적으로 발현된다. 그런 마우스는 특정 관심의 항원으로 면역화될 수 있다.

그렇게 면역화된 동물의 혈청은 초기 항원에 대한 항체 반응성에 대해 스크린될 수 있다. 임파세포는 임파결절 또는 비장 세포로부터 분리될 수 있으며, 나아가서는 CD138-네가티브 및 CD19-포지티브 세포에 대하여 선택함으로써 B 세포에 대해 선택될 수 있다. 한 측면으로 그런 B 세포 배양물 (BCC)은 골수종 세포와 융합되어 상술된 바와 같은 하이브리도마가 생성될 수 있다.

다른 측면으로 그런 B 세포 배양물은 바람직하게도 추가로 초기 항원에 대한 반응성에 대해 스크린될 수 있다. 그런 스크리닝에는 표적/항원 단백질을 이용하는 ELISA, 관심의 항원에 결합하는 공지의 항체를 이용하는 경합 분석, 및 표적 항원을 발현하는 일시적으로 형질전환된 CHO 또는 다른 세포에 대한 시험관내 결합이 있다.

본 발명은 만성 임파세포성 백혈병 (CLL)에 걸린 사람 환자를 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 그 방법은 본원에 설명된 항-CD40 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편으로 치료하는 것을 포함하는데, 이때 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 투여는 이 치료법을 적용하는 환자에게서 포지티브한 치료적 반응을 촉진한다. 본 발명의 방법에 사용하기에 적당한 항-CD40 항체는 사람 세포의 표면에 발현되는 사람 CD40 항원에 특이하게 결합하며 상당한 아고니스트 활성을 보이지 않지만, 사람 CD40-발현 세포상의 CD40 항원에 결합했을 때에는 CD40-발현 정상 및 신생 사람 B세포, 이를테면 CLL 세포에 대해 증명되는 바와 같이, 길항제 활성을 나타낸다. 이들 항-CD40 항체 및 그것의 항원-결합 단편은 본원에서는 "길항제 항-CD40 항체"로 언급된다. 그런 항체로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만 아래에서 설명되는 전체 사람 단클론성 항체 CHIR-5.9 및 CHIR-12.12와 단클론성 항체 CHIR-5.9 및 CHIR-12.12의 결합 특성을 가지고 있는 단클론성 항체들이 있다. 재조합적으로 제조되는 이들 단클론성 항체들은 아래에서 논의되고, 현재 "Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use"라는 제목으로 2003. 11.4, 2003. 11. 26, 및 2004. 4. 27일에 출원되고 미국 특허 출원 번호 60/517,337 (Attorney Docket No. PP20107.001 (035784/258442)), 60/525,579 (Attorney Docket No. PP20107.002 (035784/271525)), 및 60/565,710 (Attorney Docket No. PP20107.003 (035784/277214))으로 승인된 공동계류중인 출원에서 각각 개시된다.

단클론성 항체 CHIR-5.9와 CHIR-12.12의 결합 특성을 가지는 항체는 CD40과의 결합을 경합적으로 간섭하거나 및/또는 CHIR-5.9 및 CHIR-12.12와 동일한 에피토프와 결합하는 항체를 포함한다. 당업자는 당해 기술 분야에 공지되어 있는 표준 방법을 사용하여 어떤 항체가 CHIR-5.9 또는 CHIR-12.12를 경합적으로 간섭하는 지를 측정할 수 있다.

이들 항체가 사람 B 세포와 같은 사람 세포 표면에 나타난 CD40에 결합할 때 항체는 상당한 아고니스트 활성이 없으며, 어떤 구체예에서는 사람 세포 표면에 나타난 CD40에 대한 결합으로 이들 사람 세포의 증식 및 분화를 억제시키는 결과를 유발하기도 한다. 그러므로, 본 발명의 방법에 사용하기에 적당한 길항제 항-CD40 항체는 세포-표면 CD40 항원을 발현하는 악성 사람 세포 및 정상 세포를 향하여 길항제 활성을 나타낼 수 있는 그런 단클론성 항체를 포함한다.

#### 길항제 항-CD40 항체

단클론성 항체 CHIR-5.9 및 CHIR-12.12는 본 발명의 방법에 사용하기에 적당한 길항제 항-CD40 항체를 나타낸다. CHIR-5.9 및 CHIR-12.12 항체는 하이브리도마 셀라인 131.2F8.5.9 (이하 셀라인 5.9로 언급한다) 및 153.8E2.D10.D6.12.12 (이하 셀라인 12.12로 언급한다)로부터 제조된 IgG<sub>1</sub> 이소타입의 전체 사람 항-CD40 단클론성 항체이다. 이들 셀라인은 사람 IgG<sub>1</sub> 중쇄 유전자좌 및 사람  $\kappa$  사슬 유전자좌를 함유하는 면역처리된 이중이식 마우스로부터의 비장 세포를 사용하여 생성되었다 (XenoMouse<sup>R</sup> technology; Abgenix; Fremont, California). 비장 세포는 마우스 골수종 SP2/0 세포 (Sierra BioSource)와 융합되었다. 그 결과의 하이브리도마는 안정한 단클론성 셀라인 5.9와 12.12를 생성하기 위하여 여러번 하위-클론되었다. 본 발명의 다른 항체들도 사람 면역글로불린 유전자좌에 대한 유전자도입 마우스를 사용하거나 당해 기술분야 및/또는 본원에 설명되는 공지된 다른 방법에 의해 유사하게 제조될 수 있다.

CHIR 12.12 항체의 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열, 및 CHIR-5.9 항체의 가변 영역의 아미노산 서열은 현재 "Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use"라는 제목으로 2003. 11.4, 2003. 11. 26, 및 2004. 4. 27일에 출원되고 미국 특허 출원 번호 60/517,337 (Attorney Docket No. PP20107.001 (035784/258442)), 60/525,579 (Attorney Docket No. PP20107.002 (035784/271525)), 및 60/565,710 (Attorney Docket No. PP20107.003 (035784/277214))으로 승인된 공동계류중인 출원에서 각각 개시된다. mAb CHIR-12.12에 대한 경쇄 및 중쇄에 대한 리더, 가변, 및 불변 영역에 대한 아미노산 서열은 각각 도 1A 및 도 1B에 도시되어 있다. 또한 SEQ ID NO:2 (mAb CHIR-12.12의 경쇄에 대한 완전한 서열), SEQ ID NO:4 (mAb CHIR-12.12에 대한 중쇄에 대한 완전한 서열), 및 SEQ ID NO:5 (SEQ ID NO:4에 도시된 mAb CHIR-12.12에 대한 중쇄의 변이체에 대한 완전한 서열, 변이체는 SEQ ID NO:4의 위치 153에서 알라닌 잔기에 대해 세린으로 치환된 것을 포함한다) 참조. mAb CHIR-12.12에 대한 경쇄 및 중쇄를 코드화하는 뉴클레오티드 서열은 도 11A 및 도 11B에 각각 도시된다. 또한 SEQ ID NO:1 (mAb CHIR-12.12의 경쇄에 대한 코딩 서열), 및 SEQ ID NO:3 (mAb CHIR-12.12에 대한 중쇄에 대한 코딩한 서열) 참조. CHIR-5.9의 경쇄 및 중쇄에 대한 리더, 가변, 및 불변 영역에 대한 아미노산 서열은 각각 도 2A 및 도 2B에 도시된다. 또한 SEQ ID NO:6 (mAb CHIR-5.9의 경쇄에 대한 완전한 서열), SEQ ID NO:7 (mAb CHIR-5.9의 중쇄에 대한 완전한 서열), 및 SEQ ID NO:8 (SEQ ID NO:7에 도시된 mAb CHIR-5.9의 중쇄의 변이체에 대한 완전한 서열, 변이체는 SEQ ID NO:7의 위치 158에서 알라닌 잔기에 대해 세린으로 치환된 것을 포함한다) 참조. 나아가, CHIR-5.9와 CHIR-12.12 항체를 발현하는 하이브리도마는 각각 PTA-5542와 PTA-5543의 특허 기탁 표시로 ATCC에 기탁되었다.

길항제 활성 외에 본 발명의 항-CD40 항체는 종양 세포에 대하여 다른 작용 메커니즘을 갖는다. 예를 들어 천연 CHIR-5.9 및 CHIR-12.12 항체는 ADCC 활성을 가지고 있다. 또는 달리 CHIR-5.9와 CHIR-12.12 항체의 가변 영역은 ADCC 활성을 가지는 다른 항체 이소타입 상에 발현될 수 있다. 또한 CHIR-5.9 또는 CHIR-12.12의 천연 형태, 재조합 형태, 또는 항원-결합 단편을 아래에서 주지되는 바와 같이 세포독소, 치료제, 또는 방사성 금속 이온 또는 방사성 동위원소에 포함하는 것도 가능하다.

CHIR-5.9 및 CHIR-12.12 단클론성 항체는 ELISA-형 분석에서 가용성 CD40에 결합하여, CD40-리간드가 세포 표면 CD40에 결합하는 것을 방지하고, 유동 혈구계산 분석에 의해 측정되는 바와 같이, 사전-결합된 CD40-리간드를 대체한다. 항체 CHIR-5.9 및 CHIR-12.12는 CD40에 대한 결합에 대해 상호 간에 경합하지만, 2000. 10. 2.에 "사람 항-CD40 항체(Human Anti-CD40 Antibodies)"라는 제목으로 출원된 미국 임시 출원 일련번호 60/237,556, 및 2001. 10. 2.에 또한 "사람 항-CD40 항체"라는 제목으로 출원된 PCT 국제 출원 번호 PCT/US01/30857 (Attorney Docket No. PP16092.003)에서 설명되는 항-CD40 단클론성 항체인 15B8과는 경합하지 않는다. 정상인 환자로부터의 B 세포의 증식에 미치는 효과에 대해 시험관내에서 시험될 때 CHIR-5.9와 CHIR-12.12는 길항제 항-CD40 항체로서 작용한다. 나아가 CHIR-5.9와 CHIR-12.12는 정상 환자로부터의 사람 임파세포의 강력한 증식을 유도하지는 못한다. 이들 항체는 항체의 존성 세포성 세포독성 (ADCC)에 의해서 CD40-발현 표적 세포를 죽일 수 있다. 사람 CD40에 대한 CHIR-5.9의 결합 친화력은 Biacore™ 분석에 의해 측정되는 바  $1.2 \times 10^{-8}$  M이고, CHIR-12.12의 결합 친화력은  $5 \times 10^{-10}$  M이다.

본 발명의 방법에 사용하기에 적당한 길항제 항-CD40 항체는 CD40 세포 표면 항원에 대하여 강력한 단일-부위 결합 친화력을 나타낸다. 본 발명의 단클론성 항체는 CD40에 대하여 Biacore™와 같은 표준 분석을 사용하여 측정되는 바, 최소한  $10^{-5}$  M, 최소한  $3 \times 10^{-5}$  M, 바람직하게는 최소한  $10^{-6}$  M 내지  $10^{-7}$  M, 보다 바람직하게는 최소한  $10^{-8}$  M 내지 약  $10^{-12}$  M의 해리 평형 상수 (KD)를 나타낸다. Biacore 분석은 당해 기술분야에 공지이고, 상세한 내용은 "BIAapplications handbook"을 참조한다. WO 01/27160에 설명된 방법은 결합 친화력을 조절하기 위해 사용될 수 있다.

"CD40 항원", "CD40 세포 표면 항원", "CD40 수용체", 또는 "CD40"은 종양 괴사 인자 (TNF) 수용체 패밀리에 속하는 경막 당단백질을 말한다 (예들 들어 미국 특허 제 5,674,492호 및 4,708,871호; Stamenkovic et al. (1989) *EMBO* 8:1403; Clark (1990) *Tissue Antigens* 36:33; Barclay et al. (1997) *The Leucocyte Antigen Facts Book* (2d ed.; Academic Press, San Diego)). 이 유전자의 다르게 접합된 전사물 변이체에 의해 코드화된 사람 CD40의 두 가지 이소형태가 확인되었다. 첫 번째 이소형태 (또는 "긴 이소형태" 또는 "이소형태 1"로 불림)는 SEQ ID NO:11 (GenBank Accession Nos. X60592 및 NM\_001250)에 의해 코드화된 277-아미노산 선구체 폴리펩티드 (SEQ ID NO:12 (처음에 GenBank Accession No. CAA43045로서 보고되고, GenBank Accession No. NP\_001241에서 이소형태 1로서 확인됨)로서 발현되고, 처음 19 잔기에 의해 표시된 신호 서열을 가진다. 두 번째 이소형태 ("짧은 이소형태" 또는 "이소형태 2")는 SEQ ID NO:9 (GenBank Accession No. NM\_152854)에 의해 코드화된 203-아미노산 선구체 폴리펩티드 (SEQ ID NO:10 (GenBank Accession No. NP\_690593)로서 발현되며, 또한 처음 19 잔기로 표시되는 신호 서열을 가진다. 사람 CD40의 이들 두 이소형태의 선구체 폴리펩티드는 공통적으로 그들의 처음 165 잔기 (즉 SEQ ID NO:10과 SEQ ID NO:12의 잔기

1-165)를 공유한다. 짧은 이소형태의 선구체 폴리펩티드 (SEQ ID NO:10에 도시된)는 번역 프레임 쉬프트를 유도하는 코딩 절편이 없는 전사물 변이체 (SEQ ID NO:9)에 의해 코드화되며, 그 결과의 CD40 이소형태는 더 짧고 분명한 C-말단 (SEQ ID NO:10의 잔기 166-203)을 함유하며, 그것으로부터 CD40의 긴 이소형태에 함유되었다 (SEQ ID NO:12의 잔기 166-277에 도시된 C-말단). 본 발명의 목적에 대하여 용어 "CD40 항원", "CD40 세포 표면 항원", "CD40 수용체", 또는 "CD40"은 CD40의 길고 짧은 이소형태 둘 다를 포함한다. 본 발명의 항-CD40 항체는 아래에서 주지되는 것과 같이 이 세포 표면 항원의 짧은 이소형태 또는 긴 이소형태 중 어느 하나에서 동일한 위치에 있는 사람 CD40의 에피토프에 결합한다.

CD40 항원은 본원에서 설명되는 것과 같이 다양한 세포 유형의 표면에 나타난다. "표면에 나타난" 및 "표면에 발현된"이란 용어는 CD40 항원의 모든 또는 일부가 세포의 외부에 노출되는 것을 의미한다. 나타나거나 발현된 CD40 항원은 전체적으로 또는 부분적으로 글리코실화될 수 있다.

"아고니스트 활성"은 물질이 아고니스트로서 기능하는 것을 의미한다. 아고니스트는 세포 상의 수용체와 결합하여 수용체의 천연 리간드에 의해 개시되는 것과 유사하거나 동일한 반응 또는 활성을 개시한다. CD40의 아고니스트는 그것에만 한정되는 것은 아니지만 다음 반응들의 어느 하나 또는 전부를 유도한다: B 세포 증식 및 분화, 항체 생성, 세포간 접촉, B 세포 기억 재생, 이소타입 스위칭, MHC 클래스 II 및 CD80/86의 세포-표면 발현의 상향 조절, 및 IL-8, IL-12, 및 TNF와 같은 선구-염증성 사이토킨의 분비. "길항제 활성"은 물질이 길항제로서 기능하는 것을 의미한다. CD40의 길항제는 아고니스트 리간드, 특히 CD40L에 대한 CD40 수용체의 결합에 의해 유도된 반응들 중 어느 하나의 유도를 방지하거나 감소시킨다. 길항제는 아고니스트 결합에 대하여 유도되는 반응들 중 어느 하나 또는 여러 개의 유도를 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 바람직하게는 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 보다 바람직하게는 70 %, 80 %, 85 %, 가장 바람직하게는 90 %, 95 %, 99 %, 또는 100 % 감소시킬 수 있다. 항-CD40 항체 및 CD40-리간드 결합 특이성 및 길항제 활성을 측정하는 방법은 당업자에게 공지이며, 예를 들면 표준 경합 결합 분석, B 세포에 의한 면역글로불린 분비의 모니터링 분석, B 세포 증식 분석, 반크로우-유사-B 세포 증식 분석, 항체 생성에 대한 T 세포 헬퍼 분석, B 세포 증식 분석의 공동-자극, 및 B 세포 활성화 마커의 상향 조절을 위한 분석이 있으며, 이것들에 한정되지는 않는다 (WO 00/75348 및 미국 특허 제 6,087,329호, 및 "Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use"라는 제목으로 2003. 11.4, 2003. 11. 26, 및 2004. 4. 27일에 출원되고 미국 특허 출원 번호 60/517,337 (Attorney Docket No. PP20107.001 (035784/258442)), 60/525,579 (Attorney Docket No. PP20107.002 (035784/271525)), 및 60/565,710 (Attorney Docket No. PP20107.003 (035784/277214))으로 승인된 공동계류중인 출원 참조).

"상당한" 아고니스트 활성이란 B 세포 반응의 분석에서 측정되는 바와 같이 중성 물질 또는 네가티브 대조군에 의해 유도된 아고니스트 활성보다 최소한 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 또는 100 % 더 큰 아고니스트 활성을 의미한다. 바람직하게도 "상당한" 아고니스트 활성은 B 세포 반응의 분석에서 측정되는 바와 같이 중성 물질 또는 네가티브 대조군에 의해 유도된 아고니스트 활성보다 최소한 2배 또는 최소한 3배 더 큰 아고니스트 활성이다. 그러므로 예를 들어 관심의 B 세포 반응이 B 세포 증식이라면, "상당한" 아고니스트 활성은 중성 물질 또는 네가티브 대조군에 의해 유도된 B 세포 증식 수준보다 최소한 2배 더 크거나 최소한 3배 더 큰 B 세포 증식 수준의 유도일 것이다. 한 구체예에서 비-특이적 면역글로불린, 예컨대 CD40에 결합하지 않는 IgG1은 네가티브 대조군으로서 작용한다. "상당한 아고니스트 활성이 없는" 물질은 중성 물질 또는 네가티브 대조군에 의해 유도된 아고니스트 활성보다 약 25 % 이하, 바람직하게는 B 세포 반응의 분석에서 측정되는 바와 같이 중성 물질 또는 네가티브 대조군에 의해 유도된 아고니스트 활성보다 약 20 % 이상 더 적게, 15 % 이상 더 적게, 10 % 이상 더 적게, 5 % 이상 더 적게, 1 % 이상 더 적게, 0.5 % 이상 더 적게, 심지어는 약 0.1 % 이상 더 적게 아고니스트 활성을 나타낼 것이다. 본 발명의 방법에 유용한 길항제 항-CD40 항체는 사람 세포 상의 CD40 항원에 결합했을 때 상기에서 주지된 바와 같이 상당한 아고니스트 활성을 갖지 않는다. 본 발명의 한 구체예에서 길항제 항-CD40 항체는 한 B 세포 반응에서 상당한 아고니스트 활성이 없다. 본 발명의 다른 구체예에서 길항제 항-CD40 항체는 하나 이상의 B 세포 반응 (예컨대 증식 및 분화, 또는 증식, 분화, 및 항체 생성)의 분석에서 상당한 아고니스트 활성을 나타내지 않는다.

본원에서 사용되는 "항-CD40 항체"는 다클론성 항체, 단클론성 항체, 단일-사슬 항체, 및 Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, 및 원래의 항-CD40 항체의 항원 결합 기능을 보유하고 있는 다른 단편들을 포함하여, CD40 B 세포 표면 항원을 특이하게 인지하는 모든 항체를 포함한다. 본 발명에 있어 특별히 관심있는 것은 상기 설명된 단클론성 항체 CHIR-5.9 및 CHIR-12.12의 결합 특성을 공유하는 본원에 개시된 길항제 항-CD40 항체이다.

그러므로 단클론성 항체 CHIR-5.9 및 CHIR-12.12 외에 본원에 개시된 본 발명의 방법의 실시예에 유용할 수 있는 다른 항체로는 다음과 같은 것들이 있으며, 그것들에 한정되지는 않는다: (1) ATCC에 각각 특허 기탁 번호 PTA-5542와 PTA-5543으로 기탁된, 131.2F8.5.9 (본원에서는 셀라인 5.9로 언급됨) 및 153.8E2.D10.D6. 12.12 (본원에서는 셀라인

12.12로 언급됨)로 표시된 하이브리도마 셀라인에 의해 생성된 단클론성 항체; (2) SEQ ID NO:2에 도식된 서열, SEQ ID NO:4에 도식된 서열, SEQ ID NO:5에 도식된 서열, SEQ ID NO:2와 SEQ ID NO:4에 모두 도식된 서열, 및 SEQ ID NO:2와 SEQ ID NO:5에 모두 도식된 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단클론성 항체; (3) SEQ ID NO:6에 도식된 서열, SEQ ID NO:7에 도식된 서열, SEQ ID NO:8에 도식된 서열, SEQ ID NO:6과 SEQ ID NO:7에 모두 도식된 서열, 및 SEQ ID NO:6과 SEQ ID NO:8에 모두 도식된 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 단클론성 항체; (4) SEQ ID NO:1에 도식된 뉴클레오티드 서열, SEQ ID NO:3에 도식된 뉴클레오티드 서열, SEQ ID NO:1과 SEQ ID NO:3에 모두 도식된 뉴클레오티드 서열로 이루어지는 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 코딩된 아미노산 서열을 가지는 단클론성 항체; (5) 하이브리도마 셀라인 5.9 또는 하이브리도마 셀라인 12.12에 의해 생성된 단클론성 항체에 결합할 수 있는 에피토프에 결합하는 단클론성 항체; (6) SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:12의 아미노산 서열의 잔기 82-87을 포함하는 에피토프에 결합하는 단클론성 항체; (7) 경합 결합 분석에서 단클론성 항체 CHIR-5.9 또는 CHIR-12.12와 경합하는 단클론성 항체; 및 (8) CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 단클론성 항체 또는 전술한 (1) 내지 (7)의 단클론성 항체의 항원-결합 단편인 단클론성 항체, 이때 단편은 사람 CD40 항원에 특이하게 결합할 수 있는 능력을 보유한다. 당업자들은 본원의 길항 항체 및 이들 항체의 항원-결합 단편들이 당해 기술분야에 잘 공지되어 있고 아래에서 설명되는 본원의 방법을 사용하여 재조합적으로 생성된 항체 및 그것의 항원-결합 단편, 예를 들면 재조합적으로 생성된 단클론성 항체 CHIR-5.9 및 CHIR-12.12를 포함한다는 것을 인지할 것이다.

### 길항제 항-CD40 항체의 제조

본원에 개시되고 본 발명의 방법에 사용하기 위한 길항제 항-CD40 항체는 당업자에 공지되어 있는 모든 항체 제조 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 다클론성 혈청은 종래 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로 CD40 항원을 함유하는 용액은 먼저 적당한 동물, 바람직하게는 마우스, 쥐, 토끼, 또는 염소를 면역화하기 위해 사용된다. 얻을 수 있는 혈청의 부피, 및 표지된 항-토끼 및 항-염소 항체의 활용성 때문에 다클론성 혈청의 제조를 위해서는 토끼나 염소가 바람직하다.

다클론성 혈청은 유전자 도입 동물, 바람직하게는 사람 면역글로불린 유전자좌를 내포하고 있는 마우스에서 제조될 수 있다. 바람직한 구체예에서 CD40을 발현하는 Sf9 세포가 면역원으로 사용된다. 면역화는 또한 식염수 중의, 바람직하게는 프로인트 완전 보조제와 같은 보조제 중의 항원-함유 용액을 혼합 또는 유화한 후, 그 혼합물 또는 에멀션을 비경구로 (일반적으로는 피하 또는 근육내로) 주사함으로써 수행될 수 있다. 전형적으로 50 내지 200  $\mu\text{g}/1\text{회}$  주사의 용량이면 충분하다. 면역화는 보통 2 내지 6주 후에 1회 또는 그 이상의 식염수 중의 단백질의 주사로 추가면역되며, 바람직하게는 프로인트 불완전 보조제를 사용한다. 또는 달리 당해 기술분야에 공지되어 있는 방법을 사용하여 시험관내 면역화함으로써 항체를 생성할 수도 있으며, 본 발명의 목적에 대해서는 그것은 생체내 면역화와 동등한 것으로 여겨진다. 다클론성 항혈청은 면역화된 동물을 유리 또는 플라스틱 용기 안으로 혈액을 흘러나오게 하고, 그 혈액을 25 °C에서 한 시간 동안 인큐베이션한 후 4 °C에서 2 내지 18시간 동안 인큐베이션함으로써 얻어진다. 혈청은 원심분리 (예컨대 1,000 $\times g$ , 10분)에 의해 회수된다. 1회 출혈 당 약 20 내지 50 ml이 토끼로부터 얻어졌다.

Sf9 (*Spodoptera frugiperda*)의 제조에 대해서는 미국 특허 제 6,004,552호에 개시되어 있다. 간단히 설명하면, 사람 CD40을 코딩하는 서열은 전달 벡터를 사용하여 배칼로바이러스에 재조합되었다. 플라스미드는 야생형 배칼로바이러스 DNA로 Sf9 세포 안에 형질전환되었다. Sf9 세포로 감염된 재조합 배칼로바이러스가 확인되었고, 클론 정제되었다.

바람직하게도 항체는 성질상 단클론성이다. "단클론성 항체"라는 것은 실질적으로 동종성인 항체 집단으로부터 얻어진 항체, 즉 집단을 포함하는 개별적인 항체가 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다는 것을 의미한다. 이 용어는 Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, 및 항체의 항원 결합 기능을 보유하고 있는 다른 것과 같은 단편 뿐만 아니라 전체 면역글로불린도 포함한다. 단클론성 항체는 매우 특이적이며, 단일 항원 부위, 즉 본 발명에서는 CD40 세포 표면 항원에 대하여 특정되어 있다. 나아가 전형적으로 상이한 결정기 (에피토프)에 대해 특정된 상이한 항체를 포함하는 종래의 (다클론성) 항체 제제와는 대조적으로, 각 단클론성 항체는 항원상의 단일 결정기에 대해서 특정된다. 변형제 "단클론성"은 실질적으로 동종성인 항체 집단으로부터 얻어지는 상태로서의 항체의 특성을 나타내는 것으로, 어떠한 특별한 방법에 의해서 항체의 제조를 필요로 하는 것으로 간주되지는 않는다. 예를 들어 본 발명에 따라 사용될 단클론성 항체는 켈러 등에 의해 처음 설명된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있고 (Kohler et al (1975) *Nature* 256:495), 또는 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다 (예컨대 미국 특허 제 4,816,567호). "단클론성 항체"는 또한 예컨대 문헌에 설명된 기법을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 분리될 수 있다 (Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597; 및 미국 특허 제 5,514,548호).

"에피토프"는 그것에 대해 항체가 제조되고 그것에 항체가 결합하게 될 항원성 분자의 일부를 말한다. 에피토프는 선형 아미노산 잔기 (즉 에피토프 내의 잔기들은 선형 방식으로 순차적으로 하나 뒤에 하나가 배열된다), 비선형 아미노산 잔기 (본원에서는 "비선형 에피토프"로 언급됨, 이들 에피토프는 순차적으로 배열되지 않는다), 또는 선형과 비선형 아미노산 잔기를 둘 다 포함할 수 있다.

본원에 사용된 용어 "CD40-항원 에피토프"는 본 발명의 항-CD40 단클론성 항체와 면역반응할 수 있는 분자를 말하며, CD40 항원 자체는 배제한다. CD40-항원 에피토프는 단백질, 단백질 단편, 펩티드, 탄수화물, 지질, 및 다른 분자들을 포함할 수 있지만, 본 발명의 목적에 대해서 가장 통상적인 것은 단백질, 짧은 올리고펩티드, 올리고펩티드 모방물 (즉, CD40 항원의 항체 결합 성질을 모방하는 유기 화합물), 또는 그것들의 조합이다. 적당한 올리고펩티드 모방물은 문헌에 소개되어 있으며, 그중에서도 PCT 출원 US 91/04282에 설명되어 있다.

단클론성 항체는 쾨러 등의 방법 (Kohler et al (1975) *Nature* 256:495-496)을 사용하여, 또는 그것의 변형방법을 사용하여 제조될 수 있다. 전형적으로 마우스는 항원을 함유하고 있는 용액으로 면역화된다. 면역화는 식염수, 바람직하게는 프로인트 완전 보조제와 같은 보조제 중의 항원-함유 용액을 혼합 또는 유화시키고, 그 혼합물 또는 에멀션을 비경구로 주사함으로써 수행될 수 있다. 당해 기술분야에 공지되어 있는 어떤 면역화 방법이든지 본 발명의 단클론성 항체를 얻기 위해 사용될 수 있다. 동물의 면역화 후에 비장 (및 임의로 여러 개의 큰 임파 결절)이 제거되고 단일 세포로 분해된다. 비장 세포는 세포 현탁액을 관심의 항원으로 코팅된 플레이트 또는 웰에 적용함으로써 스크린될 수 있다. 항원에 특이한 막 결합 면역글로불린을 발현하는 B 세포는 플레이트에 결합하고 세정으로 제거되지 않는다. 그런 다음 그 결과의 B 세포, 또는 분해된 모든 비장 세포는 골수종 세포와 융합되어 하이브리도마를 형성하도록 유도되고, 선택 배지 중에서 배양된다. 그 결과의 세포는 여러 배의 희석물로 플레이트되고, 관심의 항원에 특이하게 결합하는 (그리고 미관련 항원에는 결합하지 않는) 항체의 생성에 대하여 분석된다. 그런 다음 선택된 단클론성 항체 (mAb)-분비 하이브리도마가 시험관내에서 (예컨대 조직 배양 병에서 또는 중공 섬유 반응기에서) 또는 생체내에서 (마우스에서 복수로서) 배양된다.

하이브리도마의 사용에 대한 대안으로서 항체가 미국 특허 제 5,545,403호, 5,545,405호, 및 5,998,144호에서 개시되어 있는 것과 같이, CHO 셀라인과 같은 셀라인에서 제조될 수 있다. 간단히 설명하자면 셀라인은 각각 경쇄와 중쇄를 발현할 수 있는 벡터로 형질전환된다. 별도의 벡터 상에 2개의 단백질을 형질전환함으로써, 키메라 항체가 제조될 수 있다. 다른 장점은 항체의 정확한 글리코실화이다.

CD40에 대한 단클론성 항체는 당해 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들면 B-세포 항원에 대한 단원은 문헌에서 찾아볼 수 있다 (McMichael, ed. (1987; 1989) *Leukocyte Typing III and IV* (Oxford University Press, New York); 미국 특허 제 5,674,492호; 5,874,082호; 5,677,165호; 6,056,959호; WO 00/63395; 국제 공보 WO 02/28905 및 WO 02/28904; Gordon et al. (1988) *J. Immunol.* 140:1425; Valle et al. (1989) *Eur. J. Immunol.* 19:1463; Clark et al. (1986) *PNAS* 83:4494; Paulie et al. (1989) *J. Immunol.* 142:590; Gordon et al. (1987) *Eur. J. Immunol.* 17:1535; Jabara et al. (1990) *J. Exp. Med.* 172:1861; Zhang et al. (1991) *J. Immunol.* 146:1836; Gascan et al. (1991) *J. Immunol.* 147:8; Banchereau et al. (1991) *Clin. Immunol. Spectrum* 3:8; 및 Banchereau et al. (1991) *Science* 251:70). 본 발명과 관련하여 특히 관심있는 것은 위에서 설명된 단클론성 항체 CHIR-5.9 및 CHIR-12.12의 결합 특성을 공유하는 본원에 개시된 길항제 항-CD40 항체이다.

또한 본원에 사용되는 용어 "항-CD40 항체"는 키메라 항-CD40 항체를 포함하는데, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 그런 키메라 항-CD40 항체는 본원에서 설명되는 CHIR-5.9 및 CHIR-12.12 단클론성 항체의 결합 특성을 갖는다. "키메라" 항체라는 것은 재조합 데옥시리보핵산 기법을 사용하여 가장 바람직하게 유도된 것으로 사람 (면역학적으로 "관련된" 중, 예컨대 침팬지를 포함하여)과 비-사람 성분을 둘 다 포함하는 항체를 말하는 것으로 의도된다. 그러므로 키메라 항체의 불변 영역은 가장 바람직하게는 실질적으로 천연 사람 항체의 불변 영역과 동일하고; 키메라 항체의 가변 영역은 비-사람 공급원으로부터 가장 바람직하게 유도되며 CD40 세포 표면 항원에 대하여 바람직한 항원적 특이성을 갖는다. 비-사람 공급원은 사람 CD40 세포 표면 항원에 대한 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있는 모든 척추동물 공급원 또는 사람 CD40 세포 표면 항원을 포함하는 물질일 수 있다. 그러한 비-사람 공급원으로는 그것들에 한정되는 것은 아니지만 설치류 (예컨대 토끼, 쥐, 마우스 등; 예컨대 미국 특허 제 4,816,567호 참조) 및 비-사람 영장류 (예컨대 구세계 원숭이, 원숭이, 등; 미국 특허 제 5,750,105호 및 5,756,096호)가 있다. 키메라 항-CD40 항체와 관련하여 본원에서 사용되는 구절 "면역학적으로 활성"이라는 말은 사람 CD40에 결합하는 키메라 항체를 의미한다.

인간화된 항-CD40 항체는 본 발명의 방법에 사용하기에 적당한 추가의 항-CD40 항체를 대표한다. "인간화된"은 비-사람 면역글로불린 서열로부터 유도된 최소 서열을 함유하는 항-CD40 항체의 의도된 형태이다. 대부분의 경우에 인간화된 항체는 사람 면역글로불린(수용자의 항체)인데, 그 항체에서 수용자의 추가변 영역 (또는 상보성 결정 영역 또는 CDR)으



로부터 유도된 잔기는 희망하는 특이성, 친화력, 및 수용력을 가지고 있는 비-사람 중(기증자 항체), 예컨대 마우스, 쥐, 토끼, 또는 비사람 영장류의 초가변 영역으로부터의 잔기로 대체된다. "상보성 결정 영역"이라는 것은 천연 면역글로불린 결합 부위의 천연 Fv 영역의 결합 친화력과 특이성을 함께 결정하는 아미노산 서열을 말한다 (Chothia et al (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Kabat et al (1991) U. S. Dept. of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). "불변 영역"은 이펙터 기능을 부여하는 항체 분자의 부분을 말한다. 사람 질병의 치료에 사용하기 위한 비-면역원성 항체의 제조를 중점적으로 연구한 이전의 작업에서, 마우스 불변 영역은 사람 불변 영역에 의해 대체되었다. 대상이 되는 인간화된 항체의 불변 영역은 사람 면역글로불린으로부터 유도되었다. 그러나 이들 인간화된 항체는 여전히 사람에게서 바람직하지 못하고 잠재적으로는 위험한 면역 반응을 유도하며, 친화력도 낮아진다. 본 발명의 방법에 사용하기 위한 인간화된 항-CD40 항체는 본원에서 설명되는 CHIR-5.9와 CHIR-12.12 단클론성 항체에 의해 나타나는 것과 유사한 결합 특성을 갖는다.

인간화는 본질적으로 원터와 협력자들의 방법을 따라 설치류 또는 돌연변이 설치류의 CDR 또는 CDR 서열을 사람 항체의 상응하는 서열로 대체함으로써 수행될 수 있다 (Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven et al. (1988) *Science* 239:1534-1536; 또한 미국 특허 제 5,225,539호, 5,585,089호, 5,693,761호, 5,693,762호, 5,859,205호 참조). 어떤 경우에는 사람 면역글로불린의 하나 또는 그 이상의 가변 영역의 프레임워크 영역 내에 있는 잔기들이 상응하는 비-사람 잔기들로 대체되기도 한다 (예컨대 미국 특허 제 5,585,089호, 5,693,761호, 5,693,762호, 및 6,180,370호 참조). 나아가 인간화된 항체는 수용자의 항체나 기증자의 항체에서 발견되지 않는 잔기들을 포함하기도 한다. 이들 변형은 항체 성능을 한층 더 세밀하게 구분하기 위하여 (예컨대 희망하는 친화력을 얻기 위하여) 이루어진다. 일반적으로 인간화된 항체는 최소한 하나, 전형적으로는 두 개의 가변 도메인을 실질적으로 전부 포함할 것이며, 그때에 초가변 영역의 전부 또는 실질적으로 전부는 비-사람 면역글로불린의 그것과 상응하며, 프레임워크 영역의 전부 또는 실질적으로 전부는 사람 면역글로불린 서열과 같다. 인간화된 항체는 또한 임의적으로 최소한 부분적인 면역글로불린 불변 영역 (Fc), 전형적으로는 사람 면역글로불린의 불변 영역을 부분적으로 포함할 것이다 (Jones et al. (1986) *Nature* 331:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-329; 및 Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 참조). 따라서 그러한 "인간화된" 항체는 무상 사람 가변 도메인보다 실질적으로 적은 부분이 비-사람 종으로부터 유도된 상응하는 서열에 의해 치환되는 항체를 포함할 것이다. 실제로 인간화된 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기와 아마도 일부의 프레임워크 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 사람 항체이다 (예컨대 미국 특허 제 5,225,539호; 5,585,089호; 5,693,761호; 5,693,762호; 5,859,205호 참조). 또한 미국 특허 제 6,180,370호, 및 국제 공보 WO 01/27160에는 예정된 항원에 대하여 친화력이 개선된 인간화된 항체를 제조하기 위한 기법과 인간화된 항체가 개시되어 있다.

또한 항-CD40 항체는 비-사람 포유류 숙주, 보다 구체적으로는 유전자 도입 마우스에서 제조된 이종개체의 또는 변형된 항-CD40 항체를 포함하는데, 그것은 비활성화된 내인성 면역글로불린 (Ig) 유전자좌를 특징으로 한다. 그런 유전자 도입 동물에서 숙주 면역글로불린의 가볍고 무거운 서브유닛의 발현을 위해 경합하는 내인성 유전자들은 비-기능적이며, 유사한 사람 면역글로불린 유전자좌로 치환되려는 경향이 있다. 이들 유전자 도입 동물은 가볍거나 무거운 숙주 면역글로불린 서브유닛의 실질적인 부재시에 사람 항체를 생성한다 (예컨대 미국 특허 제 5,877,397호 및 5,939,598호 참조).

바람직하게도 CD40에 대한 전체 사람 항체는 유전자 도입 마우스를 면역화함으로써 얻어진다. 그런 마우스 중 하나는 XenoMouse<sup>®</sup> 기법 (Abgenix; Fremont, California)을 사용하여 얻어지고, 미국 특허 제 6,075,181호, 6,091,001호, 및 6,114,598호에 개시되어 있다. 본원에 개시된 항체를 제조하기 위하여 사람 IgG1 중쇄 유전자좌와 사람  $\kappa$  경쇄 유전자좌에 대해 유전자도입된 마우스를 사람 CD40을 발현하는 Sf9 세포로 면역화하였다. 마우스는 또한 다른 이소타입에 대해서도 유전자도입될 수 있다. 본 발명의 방법에 유용한 전체 사람 항체는 본원에 개시된 CHIR-5.9 및 CHIR-12.12 단클론성 항체에 의해 나타나는 것과 유사한 결합 특성을 가지는 것이 특징이다.

항-CD40 항체의 단편들은 그것들이 전체 길이의 항체의 희망하는 친화력을 보유하는 한 본 발명의 방법에 사용하기에 적당하다. 그러므로 항-CD40 항체의 단편은 CD40 B 세포 표면 항원에 결합하는 능력을 보유할 것이다. 그런 단편들은 상응하는 전체 길이의 길항제 항-CD40 항체와 유사한 특성을 특징으로 하며, 즉 단편들은 사람 세포의 표면에 발현된 사람 CD40 항원에 특이하게 결합할 것이고, 상당한 아고니스트 활성은 없지만 사람 CD40-발현 세포상의 CD40 항원과 결합했을 때 길항제 활성을 나타낸다. 그런 단편들은 본원에서 "항원-결합" 단편으로 언급된다.

항체의 적당한 항원-결합 단편들은 전체 길이의 항체의 일부, 대개는 그것의 항원-결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 실례로는 Fab, F(ab')<sub>2</sub>, 및 Fv 단편 및 단일-사슬 항체 분자가 있으며, 그것들에 한정되지는 않는다. "Fab"는 경쇄 및 일부분의 중쇄로 구성된 면역글로불린의 일가 항원-결합 단편을 말한다. F(ab')<sub>2</sub>는 경쇄와 일부분의 2개의 중쇄를 함유하



는 면역글로불린의 2가 항원-결합 단편을 말한다. "단일-사슬 Fv" 또는 "sFv" 항체 단편은 항체의  $V_H$  및  $V_L$  도메인을 포함하는 단편을 말하는데, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다 (미국 특허 제 4,946,778호, 제 5,260,203호, 제 5,455,030호, 및 제 5,856,456호). 일반적으로 Fv 폴리펩티드는 추가로 sFv가 항원 결합을 위해 희망하는 구조를 형성하는 것을 가능하게 하는,  $V_H$ 와  $V_L$  도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 포함한다. sFv의 개괄적인 검토는 문헌을 참조한다 (Pluckthun (1994) in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol.113, ed. Rosenberg and Moore (Springer-Verlag, New York), pp.269-315). 본원에 개시된 길항제 항-CD40 항체의 항원-결합 단편은 또한 아래에서 설명되는 것과 같이, 표적 암 세포를 죽이기 위하여 세포독소에 포함될 수 있다.

항체 또는 항체 단편은 문헌에 기재되어 있는 기법들을 사용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 분리될 수 있다 (예컨대 McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-554 (1990) 및 미국 특허 제 5,514,548호). 클락슨과 마르크스 등은 파지 라이브러리를 사용하여 각각 쥐와 사람의 항체를 분리하는 것에 대해 설명하였다 (Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628 및 Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597). 계속해서 발표된 공보들도 사슬 셔플링(chain shuffling)에 의해서 (Marks et al. (1992) *Bio/Technology* 10:779-783)뿐 아니라, 매우 큰 파지 라이브러리를 구성하기 위한 전략으로서 조합 감염 및 생체내 재조합에 의해 (Waterhouse et al. (1993) *Nucleic. Acids Res.* 21:2265-2266) 고친화력 (nM 범위)의 사람 항체를 제조하는 것에 대하여 설명하였다. 그러므로 이들 기법은 단클론성 항체를 분리하기 위하여 전통적인 단클론성 항체 하이브리도마 기법을 대신하여 실행할 수 있는 것들이다.

항체 단편을 제조하기 위하여 다양한 기법들이 개발되었다. 전통적으로 이들 단편은 무상 항체의 단백질 가수분해성 소화를 경유하여 유도되었다 (Morimoto et al. (1992) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) 및 Brennan et al. (1985) *Science* 229:81). 그러나 이들 단편은 현재 재조합 숙주 세포에 의해 직접 제조될 수 있다. 예를 들어 항체 단편은 상기에서 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 분리될 수 있다. 또는 달리 Fab'-SH 단편은 대장균으로부터 직접 회수하거나 화학적으로 F(ab')<sub>2</sub> 단편에 결합될 수 있다 (Carter et al. (1992) *BiolTechnology* 10:163-167). 다른 접근법에 따르면 F(ab')<sub>2</sub> 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 분리될 수 있다. 항체 단편을 제조하기 위한 다른 기법들은 당업자들에게도 명백할 것이다.

본 발명의 방법에 유용한 길항제 항-CD40 항체는 본원에 개시된 CHIR-5.9 및 CHIR-12.12 단클론성 항체뿐만 아니라, 이 항체와는 다르지만 CDR을 보유하고 있는 항체, 및 하나 또는 그 이상의 아미노산이 첨가, 결실, 또는 치환된 항체들을 포함하며, 길항제 활성은 B-세포 증식 및/또는 분화의 억제에 의해 측정된다. 본 발명은 또한 국제 공보 WO 98/52976 및 WO 0034317에 설명된 것과 같이 제조될 수 있는 탈-면역화된 길항제 항-CD40 항체도 포함한다. 이런 방식으로 본 발명의 길항제 항-CD40 항체 내에 있는 잔기들은 변형되어 사람에게 대한 면역원성을 전혀 또는 덜 나타내는 한편 사람 CD40-발현 세포를 향한 길항제 활성은 여전히 보유하고 있는 항체가 되려는 경향이 있으며, 그때 그런 활성은 본원에서 주지된 분석법들에 의해 측정된다. 또한 본 발명의 청구범위에 포함되는 것은 본 발명의 길항제 항-CD40 항체, 또는 그것의 단편을 포함하는 융합 단백질로서, 이 융합 단백질은 당해 기술 분야에 공지되어 있는 것과 같이 합성되거나 상응하는 폴리뉴클레오티드 벡터로부터 발현될 수 있다. 그러한 융합 단백질은 아래에서 거론되는 항체의 포함과도 관련하여 설명된다.

본 발명의 항체는 문헌, 예컨대 특허 공보 EP 0 983 303 A1, WO 00/34317, 및 WO 98/52976에 설명되어 있는 방법을 사용하여 제조된 서열 변이를 가질 수 있다. 예를 들어 CDR 내에 있는 서열은 항체가 MHC 클래스 II에 결합하도록 유도하여 원하지 않는 헬퍼 T-세포 반응을 야기할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 보존성 치환은 항체가 결합 활성을 보유하면서도 그것이 원하지 않는 T-세포 반응을 야기하는 능력을 잃어버리도록 할 수 있다. 그런 보존성 또는 비-보존성 치환들은 모두 당해 기술분야에서 인정된 방법, 예컨대 본원에서 주지되는 방법들을 사용하여 제조될 수 있고, 그 결과의 항체는 본 발명의 범주에 속할 것이다. 변이 항체는 기본적으로 본원에 설명된 방법을 사용하여 길항제 활성, 친화력, 및 특이성에 대하여 시험된다.

상기에서 설명된 방법들 중 어느 하나, 또는 본원에 기재되지 않은 어떠한 다른 방법에 의해 제조된 항체는 그것이 다음의 생물학적 활성 중 최소한 하나를 가진다면 본 발명의 범주에 속할 것이다: T 세포에 의해 자극된 정상인 말초 B 세포에 의한 면역글로불린 분비의 억제; Jurkat T 세포에 의해 자극된 정상인 말초 B 세포의 생존 및/또는 증식의 억제; CD40L-발현 세포 또는 가용성 CD40 리간드 (sCD40L)에 의해 자극된 정상인 말초 B 세포의 생존 및/또는 증식의 억제; sCD40L 또는 고체-상 CD40L에 의해 자극된 모든 세포에서의 "생존" 항-아도프틱 (anti-adoptotic) 세포내 신호의 억제; sCD40L 또는 고체-상 CD40L과의 결합시 어떠한 세포에서의 CD40 신호 형질 도입의 억제; 및 아래에서 주지되는 것과 같은 사람 악성 B 세포의 증식의 억제. 이들 분석은 현재 "Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use"라는 제목으로 2003. 11.4, 2003. 11. 26, 및 2004. 4. 27일에 출원되고 미국 특허 출원 번호 60/517,337 (Attorney Docket No. PP20107.001 (035784/258442)), 60/525,579 (Attorney Docket No. PP20107.002 (035784/271525)),

및 60/565,710 (Attorney Docket No. PP20107.003 (035784/277214))으로 승인된 공동계류중인 출원에서 각각 설명되는 것과 같이 수행될 수 있다. 또한 다음의 문헌을 참조한다: Schultze et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8200-8204; Denton et al. (1998) *Pediatr. Transplant.* 2:6-15; Evans et al. (2000) *J. Immunol.* 164:688-697; Noelle (1998) *Agents Actions Suppl.* 49:17-22; Lederman et al. (1996) *Curr Opin. Hematol.* 3:77-86; Coligan et al. (1991) *Current Protocols in Immunology* 13:12; Kwekkeboom et al. (1993) *Immunology* 79:439-444; 및 미국 특허 제 5,674,492호 및 5,847,082호.

본원에서 확인되는 CD40-항원 에피토프에 특이한 길항제 항-CD40 항체를 검출하기 위한 대표적인 분석법은 "경합 결합 분석"이다. 경합 결합 분석은 표지된 공지 리간드의 그것의 특이한 항체에 대한 결합을 억제하는 능력에 의해 미지의 것이 검출되고 정량되는 혈청학적 분석법이다. 이것은 또한 경합 억제 분석으로도 언급된다. 대표적인 경합 결합 분석에서 표지된 CD40 폴리펩티드는 샘플 중의, 예를 들면 본 발명의 단클론성 항체의 하나 또는 그 이상의 에피토프에 대하여 발생된 단클론성 항체와 결합된 후보 항체에 의해 침전된다. 관심의 에피토프와 특이하게 반응하는 항-CD40 항체는 CD40 단백질 또는 관심의 CD40 단백질의 특정 에피토프를 포함하는 단백질 단편에 대하여 제조된 일련의 항체를 스크린함으로써 확인될 수 있다. 예를 들어 사람 CD40의 경우, 관심의 에피토프는 도 12B에 도시되고 (SEQ ID NO:10) 도 12A에 도시된 서열 (SEQ ID NO:9, GenBank 승인 번호 NM\_152854)에 의해 코드화된 사람 CD40의 짧은 이소형태의 선형 및/또는 비선형 아미노산 잔기, 또는 도 12D에 도시되고 (SEQ ID NO: 12) 도 12C에 도시된 서열 (SEQ ID NO:11, GenBank 승인 번호 X60592 및 NM\_001250)에 의해 코드화된 사람 CD40의 긴 이소형태의 선형 및/또는 비선형 아미노산 잔기를 포함하는 에피토프를 포함한다. 또는 달리 사전에 확인된 적당한 길항제 항-CD40 항체를 사용하는 경합 결합 분석이 사전에 확인된 항체에 비교할만한 단클론성 항체를 선택하기 위해 사용될 수 있다.

그러한 면역 분석에 사용되는 항체는 표지되거나 표지되지 않을 수 있다. 표지되지 않은 항체는 응집에 사용될 수 있고, 표지된 항체는 광범위한 표지를 사용하여 광범위한 분석에 사용될 수 있다. 항-CD40 항체와 관심의 에피토프 사이의 항체-항원 복합체의 형성의 검출은 검출가능한 물질을 항체에 부착함으로써 용이해질 수 있다. 적당한 검출 수단으로는 방사성 핵종, 효소, 조효소, 형광 물질, 화학 발광제, 색원체, 효소 기질 또는 보조-인자, 효소 억제제, 인공 보철물 기 복합체, 유리 라디칼, 입자, 염료, 등과 같은 표지의 사용을 포함한다. 적당한 효소의 실례로는 양고추냉이 과산화효소, 알칼리성 포스포타제,  $\beta$ -갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제가 있고; 적당한 인공보철 기 복합체의 실례로는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴이 있으며; 적당한 형광 물질의 실례로는 움벨리페론, 플루오레신, 플루오레신 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레신, 덴실 클로라이드 또는 피코에리트린이 있고; 발광 물질로는 루미놀이 있으며; 생물학적 발광 물질의 실례로는 루시페라제, 루시페린, 및 에어쿠오린이 있고; 적당한 방사성 물질의 실례로는  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ , 또는  $^3\text{H}$ 가 있다. 그러한 표지된 시약은 잘 알려져 있는 다양한 분석법, 예컨대 방사성 면역분석, 효소 면역분석, 예컨대 ELISA, 형광 면역분석 등에 사용될 수 있다 (미국 특허 제 3,766,162호, 3,791,932호, 및 4,233,402호 참조).

앞에서 설명된 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항체 단편 중 어느 것이든지 본 발명의 방법에 사용되기 전에 포함될 수 있다. 포함된 항체를 생성하기 위한 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 그러므로 항-CD40 항체는 간접 표지화 또는 간접 표지화 접근법을 사용하여 표지될 수 있다. "간접 표지화" 또는 "간접 표지화 접근법"은 킬레이트화제가 항체에 공유 부착되고 최소한 하나의 방사성 핵종이 킬레이트화제 안에 삽입되는 것을 말한다. 킬레이트화제와 방사성 핵종에 대해서는 문헌을 참조한다 (Srivagta and Mease (1991) *Nucl. Med. Bio.* 18:589-603). 적당한 표지로는 플루오로포어, 크로모포어, 방사성 원자 (특히  $^{32}\text{P}$  및  $^{125}\text{I}$ ), 전자-집밀 시약, 효소, 및 특이한 결합 파트너를 가지고 있는 리간드가 있다. 효소는 전형적으로 그것의 활성화에 의해 검출된다. 예를 들어 양고추냉이 과산화효소는 보통 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB)을 분광광도기로 정량할 수 있는 푸른색 안료로 전환시키는 능력에 의해 검출된다. "특이한 결합 파트너"란 예를 들면 항원과 그것에 특이한 단클론성 항체의 경우에서처럼, 높은 친화력으로 리간드 분자에 결합할 수 있는 단백질을 말한다. 다른 특이한 결합 파트너로는 비오틴과 아비딘 또는 스트렙타비딘, IgG와 단백질 A, 및 당해 기술 분야에 공지되어 있는 수많은 수용체-리간드 커플이 있다. 상기의 설명은 동일한 표지가 여러 상이한 방식으로 사용될 수 있기 때문에, 다양한 표지를 명확한 부류 안에 범주화하는 것을 의미하는 것은 아니라는 것이 인지되어야 한다. 예를 들어  $^{125}\text{I}$ 는 방사성 표지로서 또는 전자-집밀 시약으로서 사용될 수 있다. HRP는 효소로서 또는 mAb에 대한 항원으로서 사용될 수 있다. 나아가 희망하는 효과를 위해 다양한 표지를 조합할 수 있다. 예를 들어 mAb와 아비딘은 또한 본 발명을 실시할 때 표지를 필요로 한다. 그러므로 mAb를 비오틴으로 표지할 수 있다면 그것의 존재는  $^{125}\text{I}$ 로 표지된 아비딘, 또는 HRP로 표지된 항-비오틴 mAb로 검출될 수 있다. 다른 변경 및 가능성도 당업자에게 쉽게 드러날 것이며, 그것 역시 본 발명의 범주에 속하는 것으로 간주된다.

또는 달리 항-CD40 항체는 "직접 표지화" 또는 "직접 표지화 접근법"을 사용하여 표지될 수 있는데, 여기서는 방사성 핵종이 직접 항체에 공유 부착된다 (전형적으로 아미노산 잔기를 경유하여). 바람직한 방사성핵종은 스리바그타바와 메세의 문

헌에 제시된다 (Srivagta and Mease (1991)). 간접 표지화 접근법이 특히 바람직하다. 또한 예를 들어 국제 공보 WO 00/52031 및 WO 00/52473에는 항체에 방사성 표지를 부착하기 위해 링커가 사용되는 것에 대하여 설명되어 있고, 항-CD40 항체의 표지된 형태에 대해서는 미국 특허 제 6,015,542호에 설명되어 있다.

나아가 항체 (또는 그것의 단편)는 세포독소, 치료제, 또는 방사성 금속 이온 또는 방사성 동위원소와 같은 치료 부분에 포함될 수 있다. 세포독소 또는 세포독성 제제는 세포에 해로운 것이면 어떤 제제라도 포함한다. 예를 들면 탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키친, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 미토크산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 퓨로마이신 및 그것의 유사체 또는 동족체가 있다. 치료제로는 대사길항물질 (예컨대 메토크세이트, 6-메르캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제 (예컨대 메클로레타민, 티오에파클로람부실, 펠팔란, 카르무스틴 (BSNU) 및 로무스틴 (CCNU), 시클로포스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 플라티늄 (II)(DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린 (예컨대 다우노루비신 (이전에는 다우노마이신이라 언급됨) 및 독소루비신), 항생물질 (예컨대 악티노마이신 (이전에는 악티노마이신으로 언급됨), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라아미신 (AMC)), 및 항-유사분열 촉진제 (예컨대 빈크리스틴 및 빈블라스틴)가 있다. 방사성 동위원소로는, 그것들에 한정되지는 않지만 I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111 등이 있다. 본 발명의 포함체는 주어진 생물학적 반응을 변형시키기 위해 사용될 수 있고; 약물 부분은 고전적인 화학적 치료제에 한정되는 것으로 간주되지 않는다. 예를 들어 약물 부분은 희망하는 생물학적 활성을 가지고 있는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 그러한 단백질로는 예를 들면 독소, 예컨대 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 또는 디프테리아 독소; 단백질, 예컨대 종양 괴사 인자, 인터페론-알파, 인터페론-베타, 신경 성장 인자, 혈소판 유도된 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성화제; 또는 생물학적 반응 변형제, 예컨대 림포카인, 인터류킨-1 ("IL-1"), 인터류킨-2 ("IL-2"), 인터류킨-6 ("IL-6"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 ("GM-CSF"), 과립구 콜로니 자극 인자 ("G-CSF"), 또는 다른 성장 인자들이 있다.

그러한 치료 부분을 항생물질에 포함시키는 기법들은 잘 알려져 있다 (Arnon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), pp.243-256; ed. Hellstrom et al. (1987) "Antibodies for Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery*, ed. Robinson et al. (2d ed; Marcel Dekker, Inc.), pp.623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, ed. Pinchera et al. pp.475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, ed. Baldwin et al. (Academic Press, New York, 1985), pp.303-316; 및 Thorpe et al. (1982) *Immunol. Rev.* 62:119-158).

또는 달리 항체는 제 2 항체에 포함되어 미국 특허 제 4,676,980호에 기재되어 있는 것과 같이 항체 헤테로포합체를 형성할 수 있다. 또한 표지와 본 발명의 항체 사이에 링커가 사용될 수 있다 (미국 특허 제 4,831,175호). 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편은 방사성 요오드, 인듐, 이트륨, 또는 당해 기술분야에 공지되어 있는 다른 방사성 입자로 직접 표지될 수 있다 (미국 특허 제 5,595,721호). 치료는 동시에 또는 계속해서 투여되는 포함되거나 포함되지 않은 항체를 이용한 치료의 결합으로 이루어질 수 있다 (WO 00/52031 및 WO 00/52473).

#### 길항제 항-CD40 항체의 변이체

길항제 항-CD40 항체의 적당한 생물학적 활성 변이체가 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 그러한 변이체는 원래의 길항제 항-CD40 항체의 희망하는 결합 특성을 보유할 것이다. 항체 변이체를 제조하는 방법은 일반적으로 당해 기술분야에서 사용될 수 있다.

예를 들어 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 본원에서 설명된 CHIR-5.9 또는 CHIR-12.12 단클론성 항체의 아미노산 서열 변이체는 관심의 항체를 코드화하는 클론된 DNA 서열에서 돌연변이에 의해 제조될 수 있다. 돌연변이 생성 및 뉴클레오티드 서열 변경 방법은 당해 기술 분야에 공지이다 (Walker and Gastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) *Methods Enzymol.* 154:367-382; Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York); 미국 특허 제 4,873,192호). 관심의 폴리펩티드의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않는 적절한 아미노산 치환에 대한 지침도 문헌에서 찾아볼 수 있다 (Dayhoff et al. (1978) in *Atlas of Protein*

*Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D. C.)). 보존성 치환, 예컨대 하나의 아미노산을 유사한 특성을 가지고 있는 다른 아미노산으로 교환하는 것이 바람직할 것이다. 보존성 치환의 실례로는 Gly $\leftrightarrow$ Ala, Val $\leftrightarrow$ Ile $\leftrightarrow$ Leu, Asp $\leftrightarrow$ Glu, Lys $\leftrightarrow$ Arg, Asn $\leftrightarrow$ Gln, 및 Phe $\leftrightarrow$ Trp $\leftrightarrow$ Tyr이 있으며, 이것들에 한정되지 않는다.

관심의 길항제 항-CD40 항체 폴리펩티드의 변이체를 제조함에 있어서, 변이체가 계속 희망하는 활성, 즉 유사한 결합 친화력을 가지도록 변형이 이루어질 수 있고, 변형은 사람 세포의 표면에 발현된 사람 CD40 항원에 특이하게 결합할 수 있으며, 상당한 아고니스트 활성은 없지만 사람 CD40-발현 세포상의 CD40 항원에 결합했을 때 길항제 활성을 나타낸다. 분명한 것은 변이체 폴리펩티드를 코드화하는 DNA에 이루어진 어떠한 변형이든지 리딩 프레임 밖에 있는 서열을 대체해서는 안되고, 바람직하게는 2차 mRNA 구조를 제조할 수 있는 상보 영역을 생성하지 못할 것이라는 것이다. (EP 특허 출원 공보 No. 75,444).

또한 길항제 항-CD40 항체의 불변 영역은 이펙터 기능을 변경시키기 위하여 많은 방법으로 돌연변이를 일으킬 수 있다 (미국 특허 제 6,737,056B1 및 미국 특허 출원 공보 2004/0132101A1, Fc 수용체에 대한 항체 결합을 최적화하는 Fc 돌연변이에 대해 개시되어 있다).

바람직하게도 길항제 항-CD40 항체의 변이체는 참조 길항제 항-CD40 항체 분자, 예컨대 본원에 설명된 CHIR-5.9 또는 CHIR-12.12 단클론성 항체에 대한 아미노산 서열에 대하여, 또는 참조 항체 분자의 더 짧은 부분에 대하여 최소한 70 % 또는 75 %의 서열 동일성, 바람직하게는 최소한 80 % 또는 85 %의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 최소한 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % 또는 95 %의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 갖는다. 보다 바람직한 것은 분자들은 최소한 96 %, 97 %, 98 % 또는 99 %의 서열 동일성을 공유한다. 본 발명의 목적에 대해서는, % 서열 동일성이 12의 갭 오픈 페널티 및 2의 갭 연장 페널티, 62의 BLOSUM 매트릭스를 이용한 유사 갭 연구를 사용한 스미스-워터맨 상동성 연구 알고리즘을 사용하여 측정된다. 스미스-워터맨 상동성 연구 알고리즘은 스미스와 워터맨에 의해 교시된다 (Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489). 변이체는 예를 들면 참조 길항제 항-CD40 항체와 1 내지 15 아미노산 잔기만큼 적게, 1 내지 10 아미노산 잔기만큼, 예컨대 6 내지 10 아미노산 정도, 5만큼 적게, 4, 3, 2, 또는 심지어 1 아미노산 잔기만큼 적게 다를 수 있다.

2 아미노산 서열의 최적 정렬과 관련하여, 변이체 아미노산 서열의 인접한 절편은 추가의 아미노산 잔기를 가지거나 참조 아미노산 서열과 관련하여 아미노산 잔기가 결실될 수 있다. 참조 아미노산 서열과 비교하기 위하여 사용된 인접한 절편은 최소한 20개의 인접한 아미노산 잔기를 포함할 것이고, 30, 40, 50, 또는 그 이상의 아미노산 잔기일 수 있다. 보존성 잔기 치환 또는 갭과 관련된 서열 동일성에 대한 보정이 이루어질 수 있다 (스미스-워터맨 상동성 연구 알고리즘 참고).

특히 악성 B 세포상의 CD40에 결합할 때 CD40에 특이하게 결합할 수 있고 아고니스트 활성을 보유할 수 있는 폴리펩티드의 정확한 화학적 구조는 많은 요인에 좌우된다. 이온화될 수 있는 아미노 및 카르복실기가 분자내에 존재하기 때문에, 특별한 폴리펩티드는 산성 또는 염기성 염으로서, 또는 중성 형태로 얻어질 수 있다. 적당한 환경적 조건에 놓이게 될 때 생물학적 활성을 보유하는 그런 모든 제제는 본원에서 사용된 길항제 항-CD40 항체의 정의에 포함된다. 나아가 폴리펩티드의 일차 아미노산 서열은 당 부분을 사용하여 유도체가 됨으로써 (글리코실화) 또는 지질, 포스페이트, 아세틸 기 등과 같은 다른 보충 분자에 의해 증대될 수 있다. 또한 당과의 포함에 의해서도 증대될 수 있다. 어떤 측면의 그런 증대는 생성 숙주의 후-번역 프로세싱 시스템을 통하여 이루어지고; 그러한 다른 변형은 시험관내에서 도입될 수 있다. 어떤 경우든지, 그러한 변형은 항-CD40 항체의 길항제 특성이 파괴되지 않는 한 본원에서 사용된 항-CD40 항체의 정의에 포함된다. 그러한 변형은 다양한 분석에서 폴리펩티드의 활성을 증가 또는 감소시킴으로써 정량적으로 또는 정성적으로 활성에 영향을 미칠 수 있을 것으로 예상된다. 나아가 사슬 내의 개별적인 아미노산 잔기는 산화, 환원, 또는 다른 유도체 생성에 의해 변형될 수 있고, 폴리펩티드는 활성을 보유하는 단편들을 얻기 위해 변형될 수 있다. 길항제 활성을 파괴하지 않는 그러한 변형은 본원에서 사용되는 것과 같은 관심의 항-CD40 항체의 정의로부터 폴리펩티드 서열을 제거하지 않는다.

당해 기술은 폴리펩티드 변이체의 제조 및 용도에 관하여 실질적인 지침을 제공한다. 항-CD40 항체 변이체의 제조에서 당업자는 천연 단백질 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열에 대한 어떤 변형이 본 발명의 방법에 사용된 약제학적 조성물의 치료적 활성 성분으로서 사용되기에 적당한 변이체를 초래할 것인지를 쉽게 결정할 수 있다.

#### 본 발명의 길항제 항-CD40 항체를 사용한 치료 방법

본 발명의 방법은 만성 임파세포성 백혈병 (CLL)에 걸린 대상 (즉 환자)을 치료하기 위하여 길항제 항-CD40 항체를 사용하는 것에 관한 것으로, 상기 암의 세포는 CD40 항원을 발현한다. "CD40-발현 만성 임파세포성 백혈병 세포"란 CD40 항원을 발현하는 CLL을 의미한다. CLL의 성공적인 치료는 진단시 암의 진전 정도, 및 환자가 항-CD40 항체 투여와 연합하

여 다른 치료 방법을 받고 있거나 받을 방법이 무엇인가에 좌우된다. 세포에서 CD40 발현을 검출하는 방법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들면 PCR 기법, 면역조직화학적 화학, 유동 혈구계산, 웨스턴 블롯, ELISA, 등이 있고, 이것들에 한정되지 않는다.

CLL의 단계를 분류하기 위해 많은 기준이 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 Rai-Binet 분류 시스템에 따라 분류된 CLL을 치료하기 위해 활용될 수 있다. Rai 시스템에서는 5 단계가 있다: 단계 0 - 임파구 증가증만이 존재한다; 단계 I - 임파종이 존재한다; 단계 II - 비장 비대증, 임파종, 또는 두 가지가 모두 존재한다; 단계 III - 빈혈증, 기관 비대증, 또는 두 가지가 모두 존재한다 (진행은 체중 손실, 피로, 열, 덩어리 모양의 기관 비대증, 및 급속하게 증가하는 임파 세포 수에 의해 규정된다); 및 단계 IV - 빈혈증, 혈소판 감소증, 기관 비대증, 또는 이것들의 조합이 존재한다). Binet 단계화 시스템에서는 단지 세 개의 범주가 있다: 단계 A - 임파구 증가증이 존재하며 세 개 이하의 임파 결절이 확대된다 (이 단계는 Rai 단계 0 환자, Rai 단계 I 환자의 1/2, 및 Rai 단계 II 환자의 1/3에 모두 포함된다); 단계 B - 셋 또는 그 이상의 임파 결절이 포함된다; 및 단계 C - 빈혈증 또는 혈소판 감소증, 또는 이 두 가지가 모두 존재한다. Rai-Binet 분류 시스템은 면역글로불린 유전자의 돌연변이의 측정과 연관되어 질병 상태를 보다 정확하게 특성지을 수 있다. 돌연변이 면역글로불린 유전자의 존재는 개선된 예후와 관련이 있다.

본 발명의 방법은 진술한 범주 중 어느 하나에 따라 분류되는 CLL을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 이들 기준과 같은 것들이 질병의 진전 단계를 확인하기 위하여 사용될 수 있고, 이들과 동일한 기준, 즉 빈혈증, 임파종, 기관 비대증, 혈소판 감소증, 및 면역글로불린 유전자 돌연변이가 치료 효능을 평가하기 위해 모니터될 수 있다.

"치료"는 본원에서 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 환자에게 적용 또는 투여하는 것으로서, 또는 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 단편을 환자로부터 분리된 조직 또는 셀라인에 적용 또는 투여하는 것으로서 규정되는 데, 이때 환자는 CLL, CLL과 관련된 징후, 또는 CLL로 전개될 소인을 가지고 있고, 치료의 목적은 CLL, CLL과 관련된 어떠한 징후, 또는 CLL로 전개될 조짐이 있는 소인을 돌봄, 치유, 경감, 완화, 변경, 치료, 개량, 개선, 또는 영향을 주는 것이다. "치료"는 또한 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 환자에게 적용 또는 투여하는 것, 또는 항-CD40 항체 또는 그것의 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 환자로부터 분리된 조직 또는 셀라인에 적용 또는 투여하는 것을 의미하며, 이때 환자는 CLL, CLL과 관련된 징후, 또는 CLL로 전개될 소인을 가지고 있고, 치료의 목적은 CLL, CLL과 관련된 어떠한 징후, 또는 CLL로 전개될 조짐이 있는 소인을 돌봄, 치유, 경감, 완화, 변경, 치료, 개량, 개선, 또는 영향을 주는 것이다.

"항-종양 활성"은 악성 CD40-발현 세포 증식 또는 축적의 속도를 감소시키는 것을 말하며, 따라서 기존의 종양의 성장 속도 또는 치료 중에 발생하는 종양의 감쇄, 및/또는 기존의 신생 (종양) 세포 또는 새롭게 형성된 신생 세포의 파괴, 따라서 치료 중에 종양의 전체 크기의 감소를 말한다. 최소한 하나의 항-CD40 항체 (또는 그것의 항원-결합 단편)를 사용한 치료는 CLL의 치료와 관련하여 유의한 생리적 반응을 유발하며, 이때 질병은 CD40 항원을 발현하는 세포를 포함한다. 본 발명의 방법은 치료 중에 발생하는 CLL 세포의 추가의 증식 및 파생물을 방지하는 데에도 유용할 것이다.

본 발명의 방법에 따라 본원에서 규정된 최소한 하나의 길항제 항-CD40 항체 (또는 그것의 항원-결합 단편)가 악성 사람 B 세포에 관련된 포지티브 치료 반응을 촉진하기 위해 사용된다. 암 치료와 관련하여 "포지티브 치료 반응"이란 이들 항체 또는 그것의 단편의 항-종양 활성과 관련된 질병의 개선, 및/또는 질병과 관련된 징후의 개선을 말한다. 그것은 항-증식 효과, 추가의 종양 파생물의 방지, 종양 크기의 감소, 암세포 수의 감소, 및/또는 CD40-발현 세포의 자극에 의해 중재된 하나 또는 그 이상의 징후의 감소가 관찰될 수 있다는 것이다. 그러므로 예를 들어 질병의 개선은 완료된 반응으로서 특징지어질 수 있다. "완료된 반응"이란 어떠한 이전의 비정상적인 방사선 사진술 연구, 골수, 및 뇌척수액 (CSF)의 표준화로 임상적으로 검출가능한 질병이 없다는 것을 의미한다. 그러한 반응은 본 발명의 방법에 따라 치료한 후 최소한 한 달 동안 지속되어야 한다. 또는 달리 질병의 개선은 부분적인 반응으로서 분류될 수 있다. "부분적인 반응"이란 새로운 병변이 없을 때 측정가능한 모든 종양 부담 (즉 환자에게 존재하는 종양 세포의 수)이 적어도 약 50 % 감소하고 최소한 한 달 동안 지속되는 것을 말한다. 그러한 반응은 측정가능한 종양에만 적용할 수 있다.

종양 반응은 자기 공명 영상화 (MRI) 스캔, x-방사선 사진 영상화, 컴퓨터 X선 단층 촬영 (CT) 스캔, 유동 혈구 측정 또는 형광-활성화 세포 분류기 (FACS) 분석, 생물 발광 영상화, 예를 들면 루시페라제 영상화, 뼈 스캔 영상화, 및 골수 흡출 (BMA)를 포함한 종양 생검 샘플링과 같은 스크리닝 기법을 사용하여 종양 형태 (즉 전체 종양 부담, 종양 크기, 등)의 변화에 대해 평가될 수 있다. 이들 포지티브 치료 반응 외에 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편으로 치료를 받고 있는 환자는 질병과 관련된 징후가 개선되는 유의한 효과를 경험할 것이다.

"치료적으로 유효한 단위 용량 또는 양" 또는 "유효량"은 투여되었을 때 CD40-발현 세포의 자극을 포함하는 질병에 걸린 환자의 치료와 관련하여 포지티브 치료 반응을 불러일으키는 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 양을

말한다. 본 발명의 어떤 구체예에서 항-CD40 항체 또는 그것의 단편의 치료적으로 유효한 단위용량은 약 0.01 mg/kg 내지 약 40 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 25 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 5 mg/kg 내지 약 15 mg/kg, 약 7 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 범위에 있다. 치료 방법은 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 치료적으로 유효한 용량을 한 번에 투여하거나 치료적으로 유효한 단위용량을 여러번 투여하는 것으로 이루어질 수 있다.

본 발명의 추가의 구체예는 임상적인 시험 과정의 일부로서 조직에서 단백질 수준을 진단적으로 모니터하기 위하여, 예를 들면 주어진 치료 처방계획의 효능을 측정하기 위하여 길항제 항-CD40 항체를 사용하는 것이다. 검출은 검출가능한 물질에 항체를 결합시킴으로써 용이해질 수 있다. 검출가능한 물질의 실례로는 다양한 효소, 인공 보철 기(group), 형광 물질, 발광 물질, 생물 발광 물질, 및 방사능 물질이 있다. 적당한 효소의 실례로는 양고추냉이 과산화효소, 알칼리성 포스포타제,  $\beta$ -갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제가 있고; 적당한 인공보철 기의 실례로는 스트렙트아비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴이 있으며; 적당한 형광 물질의 실례로는 옴벨리페론, 플루오레신, 플루오레신 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레신, 덴실 클로라이드 또는 피코에리트린이 있고; 발광 물질의 실례로는 루미놀이 있으며; 생물 발광 물질의 실례로는 루시페라제, 루시페린, 및 에어부오린이 있고; 적당한 방사능 물질의 실례로는  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ , 또는  $^3\text{H}$ 가 있다.

길항제 항-CD40 항체는 CLL의 치료를 위해 공지된 화학요법제와 공동으로, 단독으로 또는 수술 또는 수술적 과정 (예컨대 비장 절제술, 간 절제술, 임파 절제술, 류코포레시스(leukapheresis), 골수 이식, 등), 방사선 치료, 화학요법, 다른 항암 단클론성 항체 요법, 스테로이드, IL-2 치료법, 및 인터페론-알파와 연합으로 사용될 수 있다. 이런 방식으로, 본원에서 설명된 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 최소한 하나의 다른 암 치료법, 이를테면 그것들에 한정되는 것은 아니지만 다음과 같은 것들과 공동으로 투여된다: 수술, 방사선 치료, 화학요법, 다른 항암 단클론성 항체 치료법 (예를 들면 악성 B 세포상에서 CD52 세포 표면 항원을 표적으로 하는 alemtuzumab (Campath<sup>R</sup>); 악성 B 세포 상에서 CD20 세포 표면 항원을 표적으로 하는 리툭시맵 (Rituxan<sup>R</sup>), 또는 다른 치료적 항-CD20 항체, 예를 들면 전체 사람 항체 HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar<sup>R</sup>), ibritumomab tiuxetan (Zevalin<sup>R</sup>), 또는 악성 B 세포 상에서 CD23 항원을 표적으로 하는 항-CD23 항체); 인터페론-알파 치료법, 인터류킨-2 (IL-2) 치료법, IL-12, IL-15, 또는 IL-21을 사용하는 치료법, 또는 스테로이드 치료법, 이때 추가의 암 치료법은 항-CD40 항체 치료법 전에, 중에, 또는 후에 투여된다. 그러므로 연합된 치료법이 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 다른 치료제, 예컨대 화학요법, 방사선 요법, 또는 인터페론-알파, IL-2, 및/또는 스테로이드를 사용하는 치료법과 함께 공동으로 투여하는 것을 포함하는 경우에, 본 발명의 방법은 별도의 제형 또는 단일 약제학적 제형, 또는 어떤 순서로든 연속적인 투여 방식으로 공동투여하는 것을 포함한다. 본 발명의 방법이 연합된 치료 요법을 포함하는 경우에 이들 치료법은 동시에, 즉 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편이 다른 암 치료법과 동시적으로 또는 그것과 동일한 시간 틀 안에 투여될 수 있다 (즉 치료법이 동시에 진행되지만, 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 정확히 다른 암 치료법과 똑같은 시간에 투여되지는 않는다). 또는 달리 본 발명의 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 또한 다른 암 치료법 전에 또는 그 후에 투여될 수 있다. 상이한 암 치료법의 순차적인 투여는 치료된 환자가 첫 번째 치료 과정에 반응하여 완화 또는 재발의 가능성이 감소되는 지의 여부에 관계없이 수행될 수 있다. 연합된 치료법이 세포독성제의 투여와 공동으로 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 투여를 포함한다면, 바람직하게는 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 세포독성제의 투여보다 앞서 투여되는 것이 좋다.

본 발명의 어떤 구체예에서 본원에서 설명되는 길항제 항-CD40 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편은 화학요법, 및 임의로 자가 골수 이식과 결합되어 투여되는데, 이때 항체 및 화학요법제(들)은 어떤 순서로든, 또는 동시에 (즉 동시에 또는 동일한 시간 틀 안에) 투여될 수 있다. 적당한 화학요법제의 실례로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만 플루다라빈, 클로람부실, 빈크리스틴, 펜토스타틴, 2-클로로데옥시아데노신 (클라드리빈), 시클로포스파미드, 독소루비신, 및 프레드니손을 들 수 있다.

그러므로 예를 들어 어떤 구체예에서 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9, 또는 그것의 항원-결합 단편은 플루다라빈과 공동으로 투여된다. 그런 한 구체예에서 길항제 항-CD40 항체는 플루다라빈의 투여 전에 투여된다. 다른 구체예에서는 길항제 항-CD40 항체는 플루다라빈으로 치료된 후에 투여된다. 또 다른 구체예에서는 플루다라빈은 길항제 항-CD40 항체와 동시에 투여된다.

본 발명의 다른 구체예에서는 알킬화제인 클로람부실은 본원에서 설명된 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9, 또는 그것의 항원-결합 단편과 공동으로 투여된다. 그런 한 구체예에서 길항제 항-CD40 항체는 클로람부실의 투여 전에 투여된다. 다른 구체예에서는 길항제 항-CD40 항체는 클로람부실로 치료된 후에 투여된다. 또 다른 구체예에서는 클로람부실이 길항제 항-CD40 항체와 동시에 투여된다.

또 다른 구체예에서 안트라사이클린-함유 섭생법, 예컨대 CAP (시클로포스파미드, 독소루비신과 프레드니손) 및 CHOP (시클로포스파미드, 빈크리스틴, 프레드니손과 독소루비신)가 본원에서 설명된 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9, 또는 그것의 항원-결합 단편과 공동으로 투여된다. 그런 한 구체예에서 길항제 항-CD40 항체는 안트라사이클린-함유 섭생법의 투여 전에 투여된다. 다른 구체예에서는 길항제 항-CD40 항체는 안트라사이클린-함유 섭생법으로 치료된 후에 투여된다. 또 다른 구체예에서는 안트라사이클린-함유 섭생법이 길항제 항-CD40 항체와 동시에 투여된다.

또 다른 구체예에서 본원에서 설명된 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9, 또는 그것의 항원-결합 단편은 alemtuzumab (Campath<sup>®</sup>; Berlex Laboratories (Richmond, California)사에 의해 배급됨)와 공동으로 투여된다. Alemtuzumab는 악성 B 세포상에 발현된 CD52 항원을 표적으로 하는 재조합 인간화된 단클론성 항체 (Campath-1H)이다. 그런 하나의 구체예에서 길항제 항-CD40 항체는 alemtuzumab의 투여 전에 투여된다. 다른 구체예에서는 길항제 항-CD40 항체는 alemtuzumab로 치료된 후에 투여된다. 또 다른 구체예에서는 alemtuzumab은 길항제 항-CD40 항체와 동시에 투여된다.

다른 구체예에서 본원에서 설명되는 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9, 또는 그것의 항원-결합 단편은 항-맥관형성 특성을 가지는 다른 제제, 예컨대 티알리도미드, 또는 인터페론-알파와 공동으로 사용될 수 있다. 이들 후자의 제제는 환자가 앞의 치료법에 내성인 경우에 효과적일 수 있다. 또는 달리 길항제 항-CD40 항체는 대용량의 화학요법제와 공동으로, 단독으로 또는 자가 골수 이식과 함께 환자에게 투여될 수 있다.

또 다른 구체예에서 본원에서 설명되는 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9, 또는 그것의 항원-결합 단편은 다른 면역치료제, 예를 들면 IL-2와 공동으로 사용될 수 있다. 치료된 환자에게서 천연 킬러 (NK) 이펙터 세포의 수를 증가시키는 것으로 알려져 있는 제제인 IL-2는 본 발명의 길항제 항-CD40 항체보다 앞서, 또는 그것과 동시에 투여될 수 있다. 이 증가된 수의 NK 이펙터 세포는 투여된 길항제 항-CD40 항체의 증대된 ADCC 활성을 유도할 수 있다.

나아가 둘 또는 그 이상의 치료제 및 본원에서 설명되는 길항제 항-CD40 항체와의 연합 치료법이 또한 CLL의 치료에 사용될 수 있다. 한정되지 않는 그 실례로는 3중 연합 치료법이 있으며, 이 경우 두 개의 화학요법제가 본원에서 설명되는 길항제 항-CD40 항체와 공동으로 투여되며, 화학요법제 및 다른 항암 단클론성 항체 (예를 들면 alemtuzumab, 리투시맵, 또는 항-CD20 항체, 예컨대 전체 사람 항체 HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar<sup>®</sup>), ibritumomab tiuxetan (Zevalin<sup>®</sup>); 또는 항-CDC23 항체)가 본원에서 설명되는 길항제 항-CD40 항체와 공동으로 투여된다. 그런 조합의 실례로는 플루다라빈, 시클로포스파미드와 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 또는 그것의 항원-결합 단편과의 조합; 및 플루다라빈, 항-CD20 항체, 예컨대 리투시맵 (Rituxan<sup>®</sup>; IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California)과 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 또는 그것의 항원-결합 단편과의 조합이 있으며, 이것들에 한정되지는 않는다.

#### 약제학적 제형 및 투여 방식

본 발명의 길항제 항-CD40 항체는 만성 임파세포성 백혈병을 방지 또는 치료하기에 치료적으로 유효한 농도로 투여된다. 이 목표를 이루기 위해서 항체는 당해 기술분야에 공지되어 있는 다양한 허용되는 부형제를 사용하여 제형된다. 전형적으로 항체는 정맥내, 복강내, 또는 피하 주사 중 어느 하나에 의해 투여된다. 이 투여를 이루기 위한 방법은 당업자들에게 공지이다. 또한 국소적으로 또는 경구로 투여될 수 있거나 점막을 통해 전달할 수 있는 조성물을 얻는 것도 가능하다.

정맥내 투여는 투여될 항-CD40 항체에 따라 바람직하게는 약 1 내지 약 10시간, 보다 바람직하게는 약 1 내지 약 8시간, 더 바람직하게는 약 2 내지 약 7시간, 더욱 바람직하게는 약 4 내지 약 6시간에 걸쳐 주입에 의해 일어나는 것이 바람직하다. 약제학적 조성물을 사용한 초기 주입은 약 4 내지 약 6시간의 주기에 걸쳐 제공될 수 있으며, 이어지는 주입은 보다 빠르게 전달된다. 계속되는 주입은 약 1 내지 약 6시간에 걸쳐, 이를테면 예컨대 약 1 내지 약 4시간에 걸쳐, 약 1 내지 약 3시간에 걸쳐, 또는 약 1 내지 약 2시간에 걸쳐 투여될 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 그것의 의도된 투여 경로와 적합하도록 제형된다. 가능한 투여 경로의 예를 들면 비경구 (예컨대 정맥내 (IV), 근육내 (IM), 피부내, 피하 (SC), 또는 주입), 경구 및 폐 (예컨대 흡입), 비강, 경피 (국소적), 점막을 통하여, 그리고 직장 투여가 있다. 비경구, 피내, 또는 피하 적용을 위해 사용된 용액 또는 현탁액은 다음 성분들을 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예컨대 주사용 물, 식염수용액, 고정 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매; 항균제, 예컨대 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 이황화 나트륨; 킬레이트화제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충제, 예컨대 아세테이트, 시트레이트, 또는 포스페이트 및 염화 나트륨 또는 텍스트로스와 같은 등장성 조정제. pH는 산 또는 염기, 예컨대 염산 또는 수산화 나트륨을 사용하여 조정될 수 있다. 비경구용 제제는 유리 또는 플라스틱으로 만들어진 앰플, 일회용 주사바늘, 또는 다중 용량 바이알에 봉합될 수 있다.

길항제 항-CD40 항체는 전형적으로는 약제학적으로 허용되는 완충제, 예를 들면 멸균 식염수, 멸균 완충수, 프로필렌 글리콜, 이것들의 조합에 담겨 표준 기법에 의해 제공된다. 비경구로 투여될 수 있는 제제의 제조 방법에 대해서는 문헌을 참조한다 (*Remington's Pharmaceutical Sciences* (18th ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990)). 또한 WO 98/56418에는 본 발명의 방법에 사용하기에 적당한 안정화된 항체 약제학적 제형이 설명되어 있다.

투여된 최소한 하나의 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 단편의 양은 과도한 실험이 없이도 당업자에 의해 쉽게 결정된다. 최소한 하나의 길항제 항-CD40 항체 (또는 그것의 단편)의 투여 방식 및 각각의 양에 영향을 주는 요인들로는 질병의 심각성, 병력, 치료를 진행하게 될 개체의 연령, 신장, 체중, 건강 상태 및 신체 조건이 있으며, 이것들에 한정되지는 않는다. 마찬가지로 투여될 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 단편의 양도 투여 방식에 따라, 그리고 환자가 이 항-중양제를 1회 또는 여러 번 받을 것인지에 따라 좌우될 것이다. 일반적으로 더 많은 단위용량의 항-CD40 또는 그것의 단편이 치료를 진행하는 환자의 증가하는 체중에 따라 바람직하다. 투여될 항-CD40 또는 그것의 단편의 용량은 약 0.003 mg/kg 내지 약 50 mg/kg의 범위, 바람직하게는 0.01 mg/kg 내지 약 40 mg/kg의 범위로 투여된다. 그러므로 용량은 예를 들면 0.01 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2 mg/kg, 2.5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 또는 50 mg/kg일 수 있다.

본 발명의 다른 구체예에서 방법은 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 단편의 단위용량을 여러 번 투여하는 것을 포함한다. 방법은 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 단편을 포함하는 약제학적 조성물의 치료적으로 유효한 용량을 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 15회, 20회, 25회, 30회, 35회, 40회, 또는 그 이상 투여하는 것을 포함한다. 항-CD40 항체 또는 그것의 단편을 포함하는 약제학적 조성물의 다중 용량의 투여 빈도와 기간은 당업자에 의해 과도한 실험 없이도 쉽게 결정될 수 있다. 더욱이 치료적으로 유효한 양의 항체로 환자를 치료하는 것은 단일 치료를 포함하며, 또는 바람직하게는 일련의 치료를 포함할 수 있다. 바람직한 실험에서 환자는 약 0.1 내지 20 mg/kg 체중의 범위로, 약 1 내지 10주 동안, 바람직하게는 약 2 내지 8주 동안, 보다 바람직하게는 약 3 내지 7주 동안, 보다 더 바람직하게는 약 4, 5, 또는 6주 동안, 1주에 1회로 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편으로 치료된다. 치료는 재발을 방지하기 위해 또는 재발의 징후가 보일 때 해마다 실시될 수 있다. 또한 치료에 사용된 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 유효량은 특정 치료 과정에 대하여 증가 또는 감소할 수 있다. 단위용량의 변화는 본원에 설명되는 바와 같이 진단용 분석 결과로부터 유도되거나 분명해진다.

그러므로 한 구체예에서 투약 계획은 치료 기간의 제 1일, 7일, 14일 및 21일에 치료적으로 유효한 양의 최소한 하나의 항-CD40 항체 또는 그것의 단편을 첫 번째 투여하는 것을 포함한다. 다른 구체예에서 투약 계획은 치료 기간의 주마다 제 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 및 7일에 치료적으로 유효한 양의 최소한 하나의 항-CD40 항체 또는 그것의 단편을 첫 번째 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 구체예는 치료 기간의 주마다 제 1일, 3일, 5일 및 7일에 치료적으로 유효한 양의 최소한 하나의 항-CD40 항체 또는 그것의 단편을 첫 번째 투여하는 것을 포함하는 투약 계획; 치료 기간의 주마다 제 1일과 3일에 치료적으로 유효한 양의 최소한 하나의 항-CD40 항체 또는 그것의 단편을 첫 번째 투여하는 것을 포함하는 투약 계획; 및 치료 기간의 주마다 제 1일에 치료적으로 유효한 양의 최소한 하나의 항-CD40 항체 또는 그것의 단편을 첫 번째 투여하는 것을 포함하는 바람직한 투약 계획을 포함한다. 치료 기간은 1주, 2주, 3주, 1개월, 3개월, 6개월 또는 1년을 포함할 수 있다. 치료 기간은 하루, 1주일, 2주일, 1개월, 3개월, 6개월, 또는 1년 간격으로 연속적이거나 떨어질 수 있다.

어떤 구체예에서 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 치료적으로 유효한 양은 약 0.003 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 40 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 25 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 약 5 mg/kg 내지 약 15 mg/kg, 약 7 mg/kg 내지 약 12 mg/kg의 범위에 있다. 그러므로 예를 들어 어떠한 하나의 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 예컨대 항-CD40 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 또는 그것의 항원-결합 단편의 양은 0.003 mg/kg, 0.01 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg,



0.3 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2 mg/kg, 2.5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 또는 50 mg/kg일 수 있으며, 또는 약 0.003 mg/kg 내지 약 50 mg/kg의 범위에 속하는 그런 다른 용량일 수 있다. 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 동일한 치료적 유효량은 항체 투약의 각 주에 걸쳐 투여될 수 있다. 또는 달리 상이한 치료적 유효량의 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편이 치료 기간의 전 과정에 걸쳐 사용될 수 있다.

다른 구체예에서 본원에서 설명되는 것과 같은 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 초기 치료적 유효량은 더 낮은 용량 범위 (즉 약 0.003 mg/kg 내지 약 20 mg/kg)에 있을 수 있고, 후속되는 용량은 더 높은 용량 범위 (즉 약 20 mg/kg 내지 약 50 mg/kg)내에 있을 수 있다.

또 다른 구체예에서 본원에서 설명되는 것과 같은 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 초기 치료적 유효량은 더 높은 용량 범위 (즉 약 20 mg/kg 내지 약 50 mg/kg)내에 있을 수 있고, 후속되는 용량은 더 낮은 용량 범위 (즉 약 0.003 mg/kg 내지 약 20 mg/kg)에 있을 수 있다. 그러므로 한 구체예에서 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 초기 치료적 유효량은 약 20 mg/kg 내지 약 35 mg/kg, 이를테면 약 20 mg/kg, 약 25 mg/kg, 약 30 mg/kg, 및 약 35 mg/kg이고, 후속되는 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 치료적 유효량은 약 5 mg/kg 내지 약 15 mg/kg, 이를테면 약 5 mg/kg, 8 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg, 및 약 15 mg/kg이다.

본 발명의 어떤 구체예에서 길항제 항-CD40 항체 치료법은 길항제 항-CD40 항체 치료법이 필요한 환자에게 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 "로딩 용량"을 투여함으로써 개시된다. "로딩 용량"이란 환자에게 투여되는 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 초기 용량을 말하며, 이때 투여되는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 용량은 더 높은 용량 범위 (즉 약 20 mg/kg 내지 약 50 mg/kg)에 속한다. "로딩 용량"은 완전한 "로딩 용량"이 약 24시간 주기 안에 투여되지만 한다면 단일 투여로서, 예를 들면 항체 또는 그것의 항원-결합 단편이 IV로 투여되는 단일 주입으로서, 또는 다중 투여로서, 예를 들면 항체 또는 그것의 항원-결합 단편이 IV로 투여되는 다중 주입으로서 투여될 수 있다. "로딩 용량"이 투여된 후에 환자에게는 하나 또는 그 이상의 추가의 치료적 유효량의 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편이 투여된다. 계속되는 치료적 유효량은 예를 들면 주 간격 투약 스케줄에 따라, 또는 매 2주마다 1회씩, 매 3주마다 한 번씩, 또는 매 4주마다 한 번씩 투여될 수 있다. 그런 구체예에서 후속되는 치료적 유효량은 보통 더 적은 용량 범위 (즉 0.003 mg/kg 내지 약 20 mg/kg)에 속한다.

또는 달리 어떤 구체예에서는 "로딩 용량" 후에 계속되는 치료적 유효량의 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 "유지 스케줄"에 따라 투여되는데, 이때 치료적 유효량의 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 1 개월에 한 번, 매 6주마다 한 번, 매 2개월마다 한 번, 매 10주마다 한 번, 매 3개월마다 한 번, 매 14주마다 한 번, 매 4개월마다 한 번, 매 18주마다 한 번, 매 5개월마다 한 번, 매 22주마다 한 번, 매 6개월마다 한 번, 매 7개월마다 한 번, 매 8개월마다 한 번, 매 9개월마다 한 번, 매 10개월마다 한 번, 매 11개월마다 한 번, 또는 매 12개월마다 한 번씩 투여된다. 그런 구체예에서 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 치료적 유효량은, 특히 계속되는 용량이 보다 빈번한 간격으로 투여될 때, 예를 들면 매 2주에 한 번 내지는 매 1개월마다 한 번씩, 또는 보다 높은 용량 범위 (즉 약 20 mg/kg 내지 약 50 mg/kg)내의 양으로 투여될 때, 특히 덜 빈번한 간격으로 후속 용량이 투여될 때, 예를 들면 약 1개월 내지 약 12 개월 떨어져서 후속 용량이 투여될 때 낮은 용량 범위 (즉 0.003 mg/kg 내지 약 20 mg/kg)에 속한다.

본 발명의 방법에 사용하기 위하여 본원에서 설명되는 약제학적 조성물에 존재하는 길항제 항-CD40 항체는 천연의 것이거나 재조합 기법에 의해 얻을 수 있으며, 예컨대 마우스, 쥐, 토끼, 영장류, 돼지, 및 사람을 포함한 모든 공급원으로부터 얻을 수 있다. 바람직하게는 그러한 폴리펩티드는 사람 공급원으로부터 유도되는 것이고, 보다 바람직한 것은 하이브리도마 셀라인으로부터의 재조합, 사람 단백질이다.

본 발명의 방법에 유용한 약제학적 조성물은 본 발명의 길항제 항-CD40 항체의 생물학적 활성 변이체를 포함할 수 있다. 그러한 변이체는 변이체 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물이 환자에게 투여되었을 때 천연 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물과 동일한 치료적 효과를 가지도록 천연 폴리펩티드의 회망하는 생물학적 활성을 보유하여야 한다. 즉, 변이 항-CD40 항체는 천연 길항제 항체, 예를 들면 각각 하이브리도마 셀라인 5.9 또는 12.12에 의해 발현되는 것과 같은 CHIR-5.9 또는 CHIR-12.12에 대해 관찰되는 것과 유사한 방식으로 약제학적 조성물에서 치료적 활성 성분으로서 작용할 것이다. 방법은 변이 항-CD40 항체가 회망하는 생물학적 활성을 보유하는지의 여부를 결정하기 위해 당해 기술분야에서 활용할 수 있고, 따라서 약제학적 조성물의 치료적 활성 성분으로서 작용한다. 항체 변이체의 생물학적 활성은 본 발명에 설명된 분석을 포함하여, 천연 길항제 항체의 활성을 측정하기 위해 특별히 고안된 분석법을 사용하여 측정될 수 있다.

본원에서 설명된 결합 특성을 가지는 길항제 항-CD40 항체를 치료적 활성 성분으로서 포함하는 약제학적 조성물은 어느 것이든지 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 그러므로 본 발명의 하나 또는 그 이상의 길항제 항-CD40 항체를 포함하는 액체, 동결건조, 또는 분무-건조 조성물은 본 발명의 방법에 따라 환자에게 계속해서 투여하기 위한 수성 또는 비수성 용액 또는 현탁액으로서 제조될 수 있다. 이들 조성물 각각은 본 발명의 최소한 하나의 길항제 항-CD40 항체를 치료적 또는 예방학적 활성 성분으로서 포함할 것이다. "치료적 또는 예방학적 활성 성분"이란 항-CD40 항체가 조성물에 특이하게 혼입되어 약제학적 조성물이 환자에게 투여될 때 환자에게서 질병의 치료, 방지, 또는 진단과 관련하여 희망하는 치료적 또는 예방학적 반응이 생성되는 것을 의미한다. 바람직하게도 약제학적 조성물은 제조 및 보관 중에 단백질 안정성 및 생물학적 활성의 손실과 관련된 문제점을 최소화하기 위하여 적절한 안정화제, 벌크화제, 또는 둘 다를 포함한다.

제형화제(formulant)는 본 발명의 길항제 항-CD40 항체를 포함하는 약제학적 조성물에 첨가될 수 있다. 그러한 제형화제로는 오일, 중합체, 비타민, 탄수화물, 아민산, 염, 완충제, 알부민, 계면활성제, 또는 벌크화제가 있으며, 이것들에 한정되지는 않는다. 바람직하게도 탄수화물은 당 또는 당알코올, 예컨대 단일-, 이-, 또는 다당, 또는 수용성 글루칸을 포함한다. 당 또는 글루칸으로는 프룩토스, 글루코스, 만노스, 소르보스, 크실로스, 말토스, 슈크로스, 텍스트란, 폴룰란, 텍스트린,  $\alpha$  및  $\beta$  시클로덱스트린, 가용성 전분, 히드록시에틸 전분, 및 카르복시메틸셀룰로스, 또는 이것들의 혼합물이 있다. "당 알코올"은 히드록실기를 가지는  $C_4$  내지  $C_8$  탄화수소로서, 갈락티톨, 이노시톨, 만니톨, 크실리톨, 소르비톨, 글리세롤, 및 아라비톨이 있다. 이들 당 또는 당 알코올은 개별적으로 또는 공동으로 사용될 수 있다. 당 또는 당 알코올 농도는 1.0 % 내지 7 % w/v, 보다 바람직하게는 2.0 % 내지 6.0 % w/v이다. 바람직하게도 아미노산은 카르니틴, 아르기닌, 및 베타인의 좌선성 (L) 형태를 포함하지만, 다른 아미노산도 첨가될 수 있다. 바람직한 중합체로는 평균 분자량이 2,000 내지 3,000 사이인 폴리비닐피롤리돈 (PVP), 평균 분자량이 3,000과 5,000 사이인 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 있다. 제형에 첨가될 수 있는 계면활성제는 EP No. 270,799 및 268,110에 개시되어 있다.

또한 항체는 중합체에 공유 포함됨으로써 화학적으로 변형되어 예를 들면 그것들의 순환 반감기가 증가될 수 있다. 바람직한 중합체, 및 그것들을 펩티드에 부착하는 방법은 미국 특허 제 4,766,106호, 4,179,337호, 4,495,285호, 및 4,609,546호에 개시되어 있다. 바람직한 중합체는 폴리옥시에틸화된 폴리올 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이다. PEG는 실온에서 물에 녹을 수 있고, 일반식:  $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ 로 표시되는데, 이때 R은 수소이거나 알킬 또는 알칸올과 같은 보호기일 수 있다. 바람직하게도 보호기는 1 내지 8 탄소이며, 보다 바람직하게는 메틸이다. 기호 n은 양의 정수로, 바람직하게는 1 내지 1,000, 보다 바람직하게는 2 내지 500이다. PEG의 바람직한 평균 분자량은 1,000 내지 40,000이며, 보다 바람직하게는 2,000 내지 20,000이고, 가장 바람직하게는 3,000 내지 12,000이다. 바람직하게도 PEG는 최소한 하나의 히드록실기를 가지고, 보다 바람직하게는 말단 히드록시기이다. 바람직하게도 억제제 상의 유리 아미노기와 반응하기 위해 활성화되는 것은 바로 이 히드록시기이다. 그러나 반응성 기의 유형 및 양은 공유 결합된 PEG/본 발명의 항체를 이루기 위해 달라질 수 있다.

수용성 폴리옥시에틸화된 폴리올 또한 본 발명에 유용하다. 그것의 예로는 폴리옥시에틸화된 소르비톨, 폴리옥시에틸화된 글루코스, 폴리옥시에틸화된 글리세롤 (POG) 등이 있다. POG가 바람직하다. 그 이유 중 한 가지는 폴리옥시에틸화된 글리세롤의 글리세롤 골격이 천연적으로, 예를 들면 동물 및 사람에게서 모노-, 디-, 트리글리세리드로 천연적으로 발생하는 것과 동일한 골격이기 때문이다. 그러므로 이런 가지화는 반드시 신체의 외래 체제로서 찾아볼 수 있어야 하는 것은 아니다. POG는 PEG와 동일한 바람직한 평균 분자량 범위를 갖는다. POG에 대한 구조는 문헌에 있으며 (Knauf et al. (1988) *J. Bio. Chem.* 263:15064-15070), POG/IL-2 포함체에 대한 논의는 미국 특허 제 4,766,106호에서 찾아볼 수 있다.

순환성 반감기를 증가시키기 위한 다른 약물 전달 시스템은 리포솜이다. 리포솜 전달 시스템을 제조하는 방법은 문헌에서 논의되었다 (Gabizon et al. (1982) *Cancer Research* 42:4734; Cafiso (1981) *Biochem Biophys Acta* 649:129; 및 Szoka (1980) *Ann. Rev. Biophys. Eng.* 9:467). 다른 약물 전달 시스템도 당해 기술 분야에 공지이며 설명되어 있다 (Poznansky et al. (1980) *Drug Delivery Systems* (R. L. Juliano, ed., Oxford, N. Y.) pp.253-315; Poznansky (1984) *Pharm Revs* 36:277).

약제학적 조성물에 혼입될 제형화제는 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편에 안정성을 제공하여야 한다. 즉 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 그것의 물리적 및/또는 화학적 안정성을 보유하여야 하고, 희망하는 생물학적 활성, 즉 하나 또는 그 이상의 상기에서 규정된 것과 같은 길항제 활성, 이를테면 그것에 한정되지는 않지만, T 세포에 의해 자극된 정상인 말초 B 세포에 의한 면역글로불린 분비의 억제; 자켓 T 세포에 의해 자극된 정상인 B 세포의 생존 및/또는 증식의 억제; CD40-발현 세포 또는 가용성 CD40 리간드 (sCD40L)에 의해 자극된 정상인 말초 B 세포

의 생존 및/또는 증식의 억제; sCD40L 또는 고체 상 CD40L로 자극된 모든 세포에서 "생존" 항-아포토시스 세포내 신호의 억제; sCD40L 또는 고체 상 CD40L과의 결합시 모든 세포에서 CD40 신호 형질 도입의 억제; 및 본원에서 주지되는 것과 같이 사람 악성 B 세포의 증식의 억제 활성을 갖는다.

단백질 안정성을 모니터링하는 방법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있고 (Jones (1993) *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90; Lee, ed. (1991) *Peptide and Protein Drug Delivery* (Marcel Dekker, Inc., New York, New York), 하기에 설명되는 안정성 분석법을 참고한다. 일반적으로 단백질 안정성은 선택된 온도에서 특정 시간동안 측정된다. 바람직한 구체예에서 안정한 항체 약제학적 제형은 실온 (약 25 °C)에서 최소한 1개월, 최소한 3개월, 또는 최소한 6개월 동안 보관될 때 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 안정성을 제공하고, 및/또는 약 2 내지 8 °C에서 최소한 6개월, 최소한 9개월, 최소한 12개월, 최소한 18개월, 최소한 24개월 동안 안정하다.

항체와 같은 단백질은 약제학적 조성물로 제형될 때, 만약 그 약제학적 조성물의 침전, 응집, 및/또는 변성에 대해 육안으로 보이는 신호 (즉 변색 또는 투명도의 상실) 또는 측정가능한 신호 (예컨대 크기 측출 크로마토그래피 (SEC) 또는 UV 광산란을 사용하여)를 나타내지 않는다면 주어진 시간 지점에서 물리적 안정성을 보유하고 있는 것으로 간주된다. 화학적 안정성에 대해서는, 항체와 같은 단백질은 약제학적 조성물로 제형될 때, 만약 화학적 안정성의 측정이 단백질 (즉 항체)이 그 조성물에서 관심의 생물학적 활성을 보유하고 있음을 나타내는 것이라면, 주어진 시간 지점에서 화학적 안정성을 보유하고 있는 것으로 간주된다. 화학적 안정성의 변화를 모니터링하는 방법은 당해 기술분야에 공지이며, 예를 들면 그것들에 한정되지는 않지만 단백질의 화학적으로 변경된 형태, 예컨대 클리핑으로부터의 결과를, 예를 들어 SDS-PAGE, SEC, 및/또는 플라이트 질량 분광계의 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화/시간을 사용하여 검출하는 방법; 예를 들면 이온-교환 크로마토그래피를 사용한 분자 전하의 변화와 관련된 (예컨대 탈아미드화와 관련된) 분해 방법이 있다. 하기에 개시되는 방법을 참조한다.

길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 약제학적 조성물로 제형될 때, 만약 주어진 시간 지점에서 희망하는 생물학적 활성이, 약제학적 조성물이 희망하는 생물학적 활성에 대한 적당한 분석에서 측정되는 것과 같이 제조되었을 때 나타난 바람직한 생물학적 활성의 약 30 %, 바람직하게는 약 20 % 내에 있다면 그 시간점에서 희망하는 생물학적 활성을 보유하고 있는 것으로 간주된다. 본원에서 개시된 길항제 항-CD40 항체 및 그것의 항원-결합 단편의 희망하는 생물학적 활성을 측정하기 위한 분석은 하기의 실시예에서 설명되는 것과 같이 수행될 수 있다. 또한 문헌에서 설명되는 분석을 참조한다 (Schultze et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8200-8204; Denton et al. (1998) *Pediatr. Transplant.* 2:6-15; Evans et al. (2000) *J. Immunol.* 164:688-697; Noelle (1998) *Agents Actions Suppl.* 49:17-22; Lederman et al. (1996) *Curr. Opin. Hematol.* 3:77-86; Coligan et al. (1991) *Current Protocols in Immunology* 13:12; Kwekkeboom et al. (1993) *Immunology* 79:439-444; 및 미국 특허 제 5,674,492호 및 5,847,082호).

본 발명의 어떤 구체예에서는 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 단클론성 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편이 액체 약제학적 제형으로 제형된다. 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 당해 기술분야에 공지되어 있는 어떠한 방법, 이를테면 상기에서 언급된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 한 구체예에서 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 단클론성 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편 CHO 셀라인에서 재조합적으로 생성된다.

길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 제조 및 정제 후에 본원에서 설명되는 방식으로 액체 약제학적 제형으로서 제형될 수 있다. 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편이 그것의 제형 전에 저장되어야 한다면, 그것은 예컨대  $\leq -20$  °C에서 냉동되었다가, 추가의 제형을 위해 실온에서 해동된다. 액체 약제학적 제형은 치료적으로 유효한 양의 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함한다. 제형에 존재하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 양은 투여 경로와 희망하는 용량 부피를 고려하여야 한다.

이런 방식으로, 액체 약제학적 조성물은 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편을 약 0.1 mg/ml 내지 약 50.0 mg/ml, 약 0.5 mg/ml 내지 약 40.0 mg/ml, 약 1.0 mg/ml 내지 약 30.0 mg/ml, 약 5.0 mg/ml 내지 약 25.0 mg/ml, 약 5.0 mg/ml 내지 약 20.0 mg/ml, 또는 약 15.0 mg/ml 내지 약 25.0 mg/ml의 농도로 포함한다. 어떤 구체예에서 액체 약제학적 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 5.0 mg/ml, 약 5.0 mg/ml 내지 약 10.0 mg/ml, 약 10.0 mg/ml 내지 약 15.0 mg/ml, 약 15.0 mg/ml 내지 약 20.0 mg/ml, 약 20.0 mg/ml 내지 약 25.0 mg/ml, 약 25.0 mg/ml 내지 약 30.0 mg/ml, 약 30.0 mg/ml 내지 약 35.0 mg/ml, 약 35.0 mg/ml 내지 약 40.0 mg/ml, 약 40.0 mg/ml 내지 약 45.0 mg/ml, 또는 약 45.0 mg/ml 내지 약 50.0 mg/ml의 농도로 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함한다. 다른 구체예에서는 액체 약제학적 조성물은 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 약 15.0 mg/ml, 약 16.0 mg/ml, 약 17.0 mg/ml, 약 18.0 mg/ml, 약 19.0 mg/ml, 약 20.0 mg/ml, 약 21.0 mg/ml, 약 22.0 mg/ml, 약 23.0 mg/ml, 약 24.0 mg/ml, 또는 약 25.0 mg/ml의 농도로 포함한다. 액체 약제학적 조성물은 길항제

항-CD40 항체, 예컨대 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편과 제형의 pH를 유지하는 완충제를 약 pH 5.0 내지 약 pH 7.0의 범위, 이를테면 pH 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 및 약 pH 5.0과 약 pH 7.0 사이에 있는 다른 그런 값으로 포함한다. 어떤 구체예에서 완충제는 제형의 pH를 약 pH 5.0 내지 약 pH 6.5, 약 pH 5.0 내지 약 pH 6.0, 약 pH 5.0 내지 약 pH 5.5, 약 pH 5.5 내지 약 pH 7.0, 약 pH 5.5 내지 약 pH 6.5, 또는 약 pH 5.5 내지 약 pH 6.0의 범위로 유지한다.

액체 항-CD40 항체 제형의 pH를 약 pH 5.0 내지 약 pH 7.0의 범위로 유지하는 적당한 완충제라면 어느 것이든지, 상기에서 주지된 바와 같이 항체의 물리화학적 안정성과 희망하는 생물학적 활성이 보유되지만 한다면 제형에 사용될 수 있다. 적당한 완충제로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만 종래의 산 및 그것의 염이 있으며, 이때 카운터 이온은 예를 들면 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 또는 마그네슘이다. 약제학적 액체 제형을 완충하기 위하여 사용될 수 있는 종래의 산 및 그것의 염의 실례로는 숙신산 또는 숙신산염, 시트르산 또는 시트르산염, 아세트산 또는 아세트산염, 타르타르산 또는 타르타르산염, 인산 또는 인산염, 글루콘산 또는 글루콘산염, 글루탐산 또는 글루탐산염, 아스파르트산 또는 아스파르트산염, 말레산 또는 말레산염, 및 말산 또는 말산염 완충제가 있으며, 이것들에 한정되지는 않는다. 제형 내의 완충제 농도는 약 1 mM 내지 약 50 mM일 수 있는데, 이를테면 약 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 또는 약 1 mM 내지 약 50 mM 사이의 다른 어떤 값일 수 있다. 어떤 구체예에서 제형 내의 완충제 농도는 약 5 mM 내지 약 15 mM, 이를테면 약 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 15 mM 사이의 다른 어떤 값일 수 있다.

본 발명의 어떤 구체예에서 액체 약제학적 제형은 치료적 유효량의 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 단클론성 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편과 숙신산염 완충제 또는 시트르산염 완충제를, 약 pH 5.0 내지 약 pH 7.0, 바람직하게는 약 pH 5.0 내지 약 pH 6.5의 범위로 제형의 pH를 유지하는 농도로 포함한다. "숙신산염 완충제" 또는 "시트르산염 완충제"는 각각 숙신산의 염 또는 시트르산의 염을 포함하는 완충제를 말한다. 바람직한 구체예에서 숙신산염 또는 시트르산염 카운터이온은 나트륨 양이온이고, 따라서 완충제는 각각 숙신산 나트륨 또는 시트르산 나트륨이다. 그러나 어떠한 양이온이든지 사용할 수 있을 것으로 예상된다. 가능한 다른 숙신산염 또는 시트르산염 양이온으로는 칼륨, 암모늄, 칼슘, 및 마그네슘이 있고, 이것들에 한정되지는 않는다. 상기에서 주지된 바와 같이 제형 내의 숙신산염 또는 시트르산염 완충제 농도는 약 1 mM 내지 약 50 mM, 이를테면 약 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 또는 약 1 mM 내지 약 50 mM 사이의 다른 어떤 값일 수 있다. 어떤 구체예에서 제형 내의 완충제 농도는 약 5 mM 내지 약 15 mM, 이를테면 약 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 또는 약 15 mM이다. 다른 구체예에서 액체 약제학적 제형은 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 단클론성 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편을 약 0.1 mg/ml 내지 약 50.0 mg/ml, 또는 약 5.0 mg/ml 내지 약 25.0 mg/ml의 농도로 포함하고, 숙신산염 또는 시트르산염 완충제, 예를 들면 숙신산 나트륨 또는 시트르산 나트륨을 약 1 mM 내지 약 20 mM, 약 5 mM 내지 약 15 mM, 바람직하게는 약 10 mM의 농도로 포함한다.

액체 약제학적 제형이 등장성에 가까워야 할 필요가 있다면, 치료적 유효량의 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 단클론성 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편과, 제형의 pH를 약 pH 5.0 내지 약 pH 7.0의 범위내에서 유지하기 위한 완충제를 포함하고 있는 액체 약제학적 제형은 추가로 제형을 등장성에 가깝게 만들기에 충분한 양의 등장화제(isotonizing agent)를 포함할 수 있다. "거의 등장성"은 약 240 mmol/kg 내지 약 360 mmol/kg, 바람직하게는 약 240 내지 약 340 mmol/kg, 보다 바람직하게는 약 250 내지 약 330 mmol/kg, 더욱 바람직하게는 약 260 내지 약 320 mmol/kg, 더욱 더 바람직하게는 약 270 내지 약 310 mmol/kg의 삼투도를 갖는다. 용액의 등장성을 측정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다 (예컨대 Setnikar et al. (1959) J. Am. Pharm. Assoc. 48:628 참조).

당업자는 약제학적 조성물의 등장성을 제공하기에 유용한 약제학적으로 허용되는 다양한 용질에 친숙하다. 등장화제는 본 발명의 액체 약제학적 제형의 삼투압을 체액의 그것과 거의 같은 값으로 조정할 수 있는 시약이면 어떤 것이든지 될 수 있다. 생리적으로 허용되는 등장화제를 사용하는 것이 바람직하다. 그러므로 치료적 유효량의 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 단클론성 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편과, 제형의 pH를 약 pH 5.0 내지 약 pH 7.0의 범위내에서 유지하기 위한 완충제를 포함하고 있는 액체 약제학적 제형은 추가로 등장성을 제공하는 데 사용될 수 있는 성분, 예를 들면 염화 나트륨; 아미노산, 예컨대 알라닌, 발린, 및 글리신; 당 및 당 알코올 (폴리올), 이를테면 그것들에 한정되는 것은 아니지만 글루코스, 텍스트로스, 프룩토스, 슈크로스, 말토스, 만니톨, 트레할로스, 글리세롤, 소르비톨, 및 크실리톨; 아세트산, 다른 유기산 또는 그것의 염, 및 상대적으로 소량의 시트레이트 또는 포스페이트를 포함할 수 있다. 당업자는 액체 제형의 최적 등장성을 제공하기에 적당한 추가의 제제에 대해 알고 있을 것이다.

어떤 바람직한 구체예에서 치료적 유효량의 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 단클론성 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편과, 제형의 pH를 약 pH 5.0 내지 약 pH 7.0의 범위내에서 유지하기 위한 완충제를 포함하고 있는 액체 약제학적 제형은 추가로 등장화제로서 염화 나트륨을 포함한다. 제형 중의 염화 나트륨의 농도는 다른 성분들의

긴장성에 대한 기여도에 따라 좌우될 것이다. 어떤 구체예에서 염화나트륨의 농도는 약 50 mM 내지 약 300 mM, 약 50 mM 내지 약 250mM, 약 50 mM 내지 약 200 mM, 약 50 mM 내지 약 175 mM, 약 50 mM 내지 약 150mM, 약 75 mM 내지 약 175 mM, 약 75 mM 내지 약 150 mM, 약 100 mM 내지 약 175 mM, 약 100 mM 내지 약 200 mM, 약 100 mM 내지 약 150 mM, 약 125 mM 내지 약 175 mM, 약 125 mM 내지 약 150 mM, 약 130 mM 내지 약 170 mM, 약 130 mM 내지 약 160mM, 약 135 mM 내지 약 155 mM, 약 140 mM 내지 약 155 mM, 또는 약 145 mM 내지 약 155 mM이다. 그러한 한 구체예에서 염화나트륨의 농도는 약 150 mM이다. 그러한 다른 구체예에서 염화나트륨의 농도는 약 150 mM이고, 완충제는 약 5 mM 내지 약 15 mM 농도의 숙신산 나트륨 또는 시트르산 나트륨 완충제이며, 액체 약제학적 제형은 치료적 유효량의 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 단클론성 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하고, 제형은 약 pH 5.0 내지 약 pH 7.0, 약 pH 5.0 내지 약 pH 6.0, 또는 약 pH 5.5 내지 약 pH 6.5의 pH를 갖는다. 다른 구체예에서 액체 약제학적 제형은 약 0.1 mg/ml 내지 약 50.0 mg/ml 또는 약 5.0 mg/ml 내지 약 25.0 mg/ml의 농도의 치료적 유효량의 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 단클론성 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편과, 약 150 mM의 염화 나트륨, 및 약 10 mM의 숙신산 나트륨 또는 시트르산 나트륨을 약 pH 5.5의 pH로 포함한다.

본 발명의 액체 약제학적 제형의 프로세싱 중에 냉동 해동 또는 기계적 전단으로 인한 단백질 분해는 용액-공기 계면에서 표면 장력을 낮추기 위하여 제형에 계면활성제를 혼입시킴으로써 억제될 수 있다. 그러므로 어떤 구체예에서 액체 약제학적 제형은 치료적 유효량의 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 단클론성 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편과, 제형의 pH를 약 pH 5.0 내지 약 pH 7.0의 범위내에서 유지하기 위한 완충제를 포함하고, 추가로 계면활성제를 포함한다. 다른 구체예에서 액체 약제학적 제형은 치료적 유효량의 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 단클론성 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편과, 제형의 pH를 약 pH 5.0 내지 약 pH 7.0의 범위내에서 유지하기 위한 완충제, 약 50 mM 내지 약 300 mM 농도의 염화 나트륨과 같은 등장화제를 포함하고, 추가로 계면활성제를 포함한다.

사용된 전형적인 계면활성제는 비이온성 계면활성제로, 이를테면 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르, 예컨대 폴리소르베이트 80 (Tween 80) 및 폴리소르베이트 20 (Tween 20); 폴리옥시프로필렌-폴리옥시에틸렌 에스테르, 예컨대 플루로닉 F68; 폴리옥시에틸렌 알코올, 예컨대 Brij 35; 시메티콘; 폴리에틸렌 글리콜, 예컨대 PEG400; 리소포스파티딜콜린; 및 폴리옥시에틸렌-p-t-옥틸페놀, 예컨대 Triton X-100이 있다. 계면활성제 또는 유화제에 의한 약품의 고전적인 안정화는 문헌에 설명되어 있다 (Levine et al.(1991) *J. Parenteral Sci. Technol.* 45(3):160-165). 본 발명을 실시할 때 사용되는 바람직한 계면활성제는 폴리소르베이트 80이다. 계면활성제가 포함되는 경우 그것은 전형적으로 약 0.001 % 내지 약 1.0 % (w/v), 약 0.001 % 내지 약 0.5 %, 약 0.001 % 내지 약 0.4 %, 약 0.001 % 내지 약 0.3 %, 약 0.001 % 내지 약 0.2 %, 약 0.005 % 내지 약 0.5 %, 약 0.005 % 내지 약 0.2 %, 약 0.01 % 내지 약 0.5 %, 약 0.01 % 내지 약 0.2 %, 약 0.03 % 내지 약 0.5 %, 약 0.03 % 내지 약 0.3 %, 약 0.05 % 내지 약 0.5 %, 또는 약 0.05 % 내지 약 0.2 %의 양으로 첨가된다.

그러므로 어떤 구체예에서 액체 약제학적 제형은 치료적 유효량의 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 단클론성 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하고, 완충제는 약 1 mM 내지 약 50 mM, 약 5 mM 내지 약 25 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 15 mM 농도의 숙신산 나트륨 또는 시트르산 나트륨 완충제이며; 제형은 약 pH 5.0 내지 약 pH 7.0, 약 pH 5.0 내지 약 pH 6.0, 또는 약 pH 5.5 내지 약 pH 6.5의 pH를 가지고; 제형은 추가로 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트 80을 약 0.001 % 내지 약 1.0 % 또는 약 0.001 % 내지 약 0.5 %의 양으로 포함한다. 그러한 제형은 임의로 등장화제, 예컨대 염화나트륨을 약 50 mM 내지 약 300 mM, 약 50 mM 내지 약 200 mM, 또는 약 50 mM 내지 약 150 mM의 농도로 포함한다. 다른 구체예에서 액체 약제학적 제형은 약 0.1 mg/ml 내지 약 50.0 mg/ml 또는 약 5.0 mg/ml 내지 약 25.0 mg/ml의 농도, 이를테면 약 20.0 mg/ml 농도의 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9 단클론성 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편과; 약 50 mM 내지 약 200 mM의 염화나트륨, 이를테면 약 150 mM의 염화 나트륨; 약 5 mM 내지 약 20 mM의 숙신산 나트륨 또는 시트르산 나트륨, 이를테면 약 10 mM의 숙신산 나트륨 또는 시트르산 나트륨; 약 50 mM 내지 약 200 mM, 이를테면 약 150 mM의 농도의 염화나트륨; 및 임의로 약 0.001 % 내지 약 1.0 %, 이를테면 약 0.001 % 내지 약 0.5 %의 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트 80을 포함하며; 이때 액체 약제학적 제형은 약 pH 5.0 내지 약 pH 7.0, 약 pH 5.0 내지 약 pH 6.0, 약 pH 5.0 내지 약 pH 5.5, 약 pH 5.5 내지 약 pH 6.5, 또는 약 pH 5.5 내지 약 pH 6.0의 pH를 갖는다.

액체 약제학적 제형은 본질적으로 상기에서 주지된 어떠한 보존제 및 다른 담체, 부형제, 또는 안정화제가 없다. 또는 달리 제형은 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편의 물리화학적 안정성에 해로운 영향을 미치지 않는다면 상기에서 설명된 하나 또는 둘 이상의 보존제, 예를 들면 항균제, 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정화제를 포함할 수 있다. 허용되는 담체, 부형제, 및 안정화제의 실례로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만 추가의 완충제, 공-용매, 계면활성제, 항산화제, 이를테면 아스코르브산 및 메티오닌, 킬레이트화제, 예컨대 EDTA, 금속 복합체 (예컨대 Zn-단백

질 복합체), 및 생체내 분해가능한 중합체, 예컨대 폴리에스테르가 있다. 제형 및 약제학적으로 허용되는 담체, 안정화제, 및 이소몰라이트(isomolyte)에 대한 철저한 논의는 문헌에서 찾아볼 수 있다 (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18<sup>th</sup> ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990).

본원에서 설명된 액체 약제학적 제형 또는 다른 약제학적 조성물이 제조된 후에 그것은 분해를 방지하기 위해 동결건조될 수 있다. 액체 조성물을 동결건조시키는 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 사용 직전에 조성물은 추가의 성분들을 포함할 수 있는 멸균 희석제 (예컨대 링거액, 증류수, 또는 멸균 식염수)로 재구성될 수 있다. 재구성될 때 조성물은 바람직하게는 당업자에게 공지되어 있는 방법들을 사용하여 환자에게 투여된다.

#### 의약의 제조시 길항제 항-CD40 항체의 사용

본 발명은 또한 환자의 CLL을 치료하기 위한 의약을 제조하는 데 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편이 사용되는 용도를 제공하는데, 이때 의약은 최소한 하나의 다른 암 치료법을 이용한 치료와 조화를 이룬다. "조화를 이룬다"는 것은 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 의약이 최소한 하나의 다른 암 치료법으로 환자를 치료하기 전, 치료 중, 또는 후에 사용되는 것을 말한다. 다른 암 치료법의 실례로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만 다음과 같은 것들이 있다: 수술; 방사선 치료; 임의로 자가 골수 이식과 함께 이루어지는 화학요법, 이때 적당한 화학요법제로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만 플루다라빈 또는 플루다라빈 포스페이트, 클로람부실, 빈크리스틴, 펜토스타틴, 2-클로로데옥시아데노신 (클라드리빈), 시클로포스파미드, 독소루비신, 프레드니손, 및 그것들의 조합, 예를 들면 안트라사이클린-함유 섭생법, 예컨대 CAP (시클로포스파미드, 독소루비신과 프레드니손), CHOP (시클로포스파미드, 빈크리스틴, 프레드니손과 독소루비신), VAD (빈크리스틴, 독소루비신과 덱사메타손), MP (멜팔란과 프레드니손), 및 다른 세포독성 및/또는 화학요법에 사용되는 치료제, 예컨대 미토크산트론, 다우노루비신, 이다루비신, 아스파라기나제, 및 대사길항물질, 이를테면, 그것들에 한정되는 것은 아니지만 시타라빈, 메톡트렉세이트, 5-플루오로우라실 데카르바진, 6-티오구아닌, 6-메르캅토피린, 및 벨라라빈이 있으며; 다른 항암 단클론성 항체 요법 (예를 들면 alemtuzumab (Campath<sup>R</sup>) 또는 악성 B 세포상에서 CD52 세포 표면 당단백질을 표적으로 하는 다른 항-CD52 항체; 리툭시맵 (Rituxan<sup>R</sup>), 전체 사람 항체 HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar<sup>R</sup>),

ibritumomab tiuxetan (Zevalin<sup>R</sup>), 또는 악성 B 세포상에서 CD20 항원을 표적으로 하는 다른 어떠한 치료적 항-CD20 항체; 항-CD19 항체 (예컨대 MT103, 이중특이적 항체); 항-CD22 항체 (예컨대 인간화된 단클론성 항체 epratuzumab);

bevacizumab (Avastin<sup>R</sup>) 또는 사람 혈관 내피 성장 인자를 표적으로 하는 다른 항암 항체; 악성 B 세포상에서 CD22 항원을 표적으로 하는 항-CD22 항체 (예컨대 단클론성 항체 BL-22, 알파CD22 독소); 대식세포 콜로니 자극 인자를 표적으로 하는 α-M-CSF 항체; 다발성 골수종에서 과잉발현되는 핵 인자-카파B (RANK) 및 그것의 리간드 (RANKL)의 수용체 활성화제를 표적으로 하는 항체; 악성 B 세포상에서 CD23 항원을 표적으로 하는 항-CD23 항체 (예컨대 IDEC-152); 악성 B 세포상에서 CD38 항원을 표적으로 하는 항-CD38 항체; 악성 B 세포상에 발현된 주요 조직적합성 복합체 클래스 II 수용체를 표적으로 하는 항체 (항-MHC 항체); 악성 B 세포상에서 CD40 항원을 표적으로 하는 다른 항-CD40 항체 (예컨대 SGN-40); 및 종양 괴사 인자-관련 아포토시스-유도 리간드 수용체 1 (TRAIL-R1) (예컨대 아고니스트성 사람 단클론성 항체 HGS-ETR1) 및 많은 고체 종양 및 조혈 기원의 종양상에 발현된 TRAIL-R2; 작은 분자-기초 암 치료법, 이를테면 그것들에 한정되는 것은 아니지만 미소판 및/또는 토포이소메라제 억제제 (예를 들면 유사분열 억제제 돌라스타틴 및 돌라스타틴 유사체; 튜블린-결합제 T900607; XL119; 및 토포이소메라제 억제제 아미노캄프토테신), SDX-105 (벤다무스틴 염산염), 익사베필론 (에포틸론 유사체, BMS-247550으로도 언급됨), 단백질 키나제 C 억제제, 예를 들면 미도스타우린 (PKC-412, CGP 41251, N-벤조일스타우로스포르인), 피크산트론, 엘로크사틴 (항신생물제), 가니트 (질산 갈륨),

Thalomid<sup>R</sup> (티알리도미드), 티알리도미드의 면역조절 유도체 (예를 들면 revlimid (이전에는 revimid)), Affinitak<sup>TM</sup> (단백질 키나제 C-알파의 안티센스 억제제), SDX-101 (R-etodolac, 악성 임파세포의 아포토시스를 유도함), 클로파라빈과 같은 2차 생성 퓨린 뉴클레오시드 유사체, 암세포에 의한 단백질 Bcl-2의 생성 억제제 (예컨대 안티센스 제제 oblimersen 및 Genasense<sup>R</sup>), 프로테아좀 억제제 (예를 들면 Velcade<sup>TM</sup> (bortezomib)), 작은 분자 키나제 억제제 (예를 들면 CHIR-258), 작은 분자 VEGF 억제제 (예를 들면 ZD-6474), 열 쇼크 단백질 (HSP) 90의 작은 분자 억제제 (예를 들면 17-AAG), 히스톤 탈아세틸라제의 작은 분자 억제제 (예컨대 하이브리드/극성 세포분화 HPC) 제제, 예컨대 수베라닐로히드록시암산 (SAHA), 및 FR-901228 및 아포토시스 제제, 예컨대 Trisenox<sup>R</sup> (삼산화 비소) 및 Xcytrin<sup>R</sup> (모텍사핀 가돌리늄); 백신/면역치료법-기초 암 치료법, 이를테면, 그것들에 한정되는 것은 아니지만 백신 접근법 (예를 들면 Id-KLH, 발암성 파괴 (oncophage), vitaethine), 개인화된 면역요법 또는 활성화 이디오타입 면역요법 (예를 들면 MyVax<sup>R</sup> 개인화된 면역요법, 이전에는 GTOP-99로 표시됨), Promune<sup>R</sup> (CpG 7909, 톨(toll)-유사 수용체 9 (TLR9)에 대한 합성 아고니스트), 인

터페론-알파 치료법, 인터류킨-2 (IL-2) 치료법, IL-12 치료법, IL-15 치료법, 및 IL-21 치료법; 스테로이드 치료법; 또는 다른 암 치료법; 이때 추가의 암 치료법 또는 암 치료법들로 치료하는 것은 상기에서 주지된 바와 같이, 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 의약으로 치료하기 전, 치료하는 동안 또는 치료 후에 일어난다.

어떤 구체예에서 본 발명은 항-CD40 항체, 예컨대 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9, 또는 그것의 항원-결합 단편이 환자에게서 B 세포 임파종, 예를 들면 비-호지킨 임파종을 치료하기 위한 의약의 제조에 사용되는 용도를 제공하며, 이때 의약은 화학요법, 항암 항체 요법, 작은 분자-기초 암 치료법, 및 백신/면역치료법-기초 암 치료법으로 이루어지는 군으로부터 선택된 최소한 하나의 다른 암 치료법으로 치료하는 것과 조화를 이루는데, 이때 의약은 다른 암 치료법으로 환자를 치료하기 전에, 치료하는 중에, 또는 치료 후에 사용될 수 있거나, 또는 다중 연합 치료법의 경우에는 다른 암 치료법들로 환자를 치료하기 전에, 치료하는 중에 또는 치료 후에 사용될 수 있다.

그러므로 예를 들면 어떤 구체예에서 본 발명은 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9, 또는 그것의 항원-결합 단편이 환자에게서 CLL을 치료하기 위한 의약의 제조에 사용되는 용도를 제공하며, 이때 의약은 화학요법으로 치료하는 것과 조화를 이루고, 여기서 화학요법제는 플루다라빈, 클로람부실, 빈크리스틴, 펜토스타틴, 2-클로로데옥시아데노신 (클라드리빈), 시클로포스파미드, 독소루비신, 및 프레드니, 및 CAP (시클로포스파미드, 독소루비신과 프레드니손) 및 CHOP (시클로포스파미드, 빈크리스틴, 프레드니손과 독소루비신)와 같은 안트라사이클린-함유 섭생법, 및 그것들의 어떠한 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 의약은 다른 암 치료법으로 환자를 치료하기 전에, 중에, 또는 후에 사용되며, 또는 다중 연합 치료법의 경우에는 다른 암 치료법들로 환자를 치료하기 전에, 중에, 또는 후에 사용될 수 있다.

다른 구체예에서 본 발명은 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9, 또는 그것의 항원-결합 단편을 환자에게서 다발성 골수종을 치료하기 위한 의약의 제조에 사용되는 용도를 제공하는데, 이때 의약은 alemtuzumab (Campath<sup>R</sup>) 또는 악성 B 세포상에서 CD52 세포 표면 당단백질을 표적으로 하는 다른 항-CD52 항체; 리툭시맵 (Rituxan<sup>R</sup>), 전체 사람 항체 HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar<sup>R</sup>), ibritumomab tiuxetan (Zevalin<sup>R</sup>), 또는 악성 B 세포상에서 CD20 항원을 표적으로 하는 다른 어떠한 치료적 항-CD20 항체; 악성 B 세포상에서 CD23 항원을 표적으로 하는 항-CD23 항체 (예컨대 IDEC-152); 악성 B 세포상에서 CD22 항원을 표적으로 하는 항-CD22 항체 (예컨대 단클론성 항체 BL-22, 알파CD22 독소) 및 이것들의 어떠한 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된 최소한 하나의 다른 항-암 항체로 치료하는 것과 조화를 이루며; 이때 의약은 다른 암 치료법으로 환자를 치료하기 전에, 치료하는 중에, 또는 치료 후에 사용될 수 있거나, 또는 다중 연합 치료법의 경우에는 다른 암 치료법들로 환자를 치료하기 전에, 치료하는 중에 또는 치료 후에 사용될 수 있다.

또 다른 구체예에서 본 발명은 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9, 또는 그것의 항원-결합 단편이 환자에게서 CLL을 치료하기 위한 의약의 제조에 사용되는 용도를 제공하는데, 이때 의약은 SDX-101 (악성 임파세포의 아포토시스를 유도하는 R-etodolac), 클로파라빈과 같은 2차 생성 퓨린 뉴클레오시드 유사체, 암세포에 의한 단백질 Bcl-2의 생성 억제제 (예컨대 안티센스 제제인 oblimersen 및 Genasense<sup>R</sup>), 프로테아좀 억제제 (예컨대 Velcade<sup>TM</sup> (bortezomib)), 히스톤 탈아세틸화제의 작은 분자 억제제 (예컨대 하이브리드/극성 세포 분화 HPC) 제제, 예컨대 수베라닐로히드록삼산 (SAHA), 및 FR-901228), 및 이것들의 어떠한 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된 최소한 하나의 다른 작은 분자-기초 암 치료법; 또는 다른 암 치료법, 예를 들면 CD154 유전자 면역화 (예컨대 ISF-154)와 조화를 이루며, 이때 의약은 다른 암 치료법으로 환자를 치료하기 전에, 치료하는 중에, 또는 치료 후에 사용될 수 있거나, 또는 다중 연합 치료법의 경우에는 다른 암 치료법들로 환자를 치료하기 전에, 치료하는 중에 또는 치료 후에 사용될 수 있다.

또 다른 구체예에서 본원에 개시된 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9, 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 의약은 두 개의 다른 암 치료법과 조화를 이룬다. 제한되지 않는 그러한 실례로는 의약과 두 개의 화학요법제, 예컨대 플루다라빈과 시클로포스파미드를 사용하는 치료와의 조화; 및 의약과 화학요법제, 예컨대 플루다라빈, 및 다른 항암 단클론성 항체, 예를 들면 알렘투맵, 리툭시맵 또는 다른 항-CD20 항체, 이를테면 전체 사람 항체 HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar<sup>R</sup>), 및 ibritumomab tiuxetan (Zevalin<sup>R</sup>), 또는 항-CD23 항체와의 조화를 들 수 있다. 길항제 항-CD40 항체를 포함하는 의약이 두 개의 다른 암 치료법과 조화를 이루는 경우, 의약은 다른 암 치료법 중 하나 또는 둘 다를 환자를 치료하기 전에, 중에, 또는 후에 사용될 수 있다.

본 발명은 또한 길항제 항-CD40 항체, 예를 들면 본원에 개시된 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9, 또는 그것의 항원-결합 단편이 환자에게서 CLL을 치료하기 위한 의약의 제조에 사용되는 용도를 제공하는데, 이때 의약은 최소한 하나의 다른 암 치료법으로 사전 치료받은 적이 있었던 환자에게서 사용된다. "사전치료된" 또는 "사전치료"는 환자가 길항



제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 의약을 투여받기 전에 하나 또는 그 이상의 다른 암 치료법을 받았던 것을 말한다. "사전치료된" 또는 "사전치료"는 길항제 항-CD40 항체, 예를 들면 본원에 개시된 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9, 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 의약으로 치료를 개시하기 전 2년 내에, 18개월 내에, 1년 내에, 6개월 내에, 2개월 내에, 6주 내에, 1개월 내에, 4주 내에, 3주 내에, 2주 내에, 1주 내에, 6일 내에, 5일 내에, 4일 내에, 3일 내에, 2일 내에, 또는 심지어 1일 내에 환자가 최소한 하나의 다른 암 치료법으로 치료받은 것을 포함한다. 환자가 이전의 암 치료법, 또는 이전의 암 치료법들로 사전치료했을 때 반응을 한 것은 중요하지 않다. 그러므로 길항제 항-CD40 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 의약을 투여받은 환자는 사전치료가 다중 암 치료법, 예컨대 수술과 화학요법; 수술과 다른 항암 항체 치료법; 화학요법과 다른 항암 항체 치료법; 또는 수술, 화학요법, 및 다른 항암 항체 치료법을 포함하는 경우에 선행 암 치료법으로의 사전치료에 대해, 또는 이전의 하나 또는 둘 이상의 암 치료법에 대해 반응할 수 있었거나, 또는 반응하는 데 실패할 수 있었을 것이다.

그러므로 어떤 구체예에서 본 발명은 본원에 개시된 길항제 항-CD40 항체, 예컨대 단클론성 항체 CHIR-12.12 또는 CHIR-5.9, 또는 그것의 항원-결합 단편이 환자에게서 CLL을 치료하기 위한 의약의 제조에 사용되는 용도를 제공하는데, 이때 환자는 하나 또는 둘 이상의 다음의 다른 암 치료법으로 사전치료된 적이 있다: 수술; 방사선 치료; 임의로 자가 골수 이식과 연합된 화학요법, 이때 적당한 화학요법제로는 그것들에 한정되지는 않지만 플루다라빈, 클로람부실, 클라드라빈, 빈크리스틴, 펜토스타틴, 2-클로로데옥시아데노신, 시클로포스파미드, 독소루비신, 프레드니손, 및 이것들의 조합, 예컨대 안트라사이클린-함유 섭생법, 예를 들면 CAP (시클로포스파미드, 독소루비신과 프레드니손) 및 CHOP (시클로포스파미드, 빈크리스틴, 프레드니손과 독소루비신)이 있으며; 다른 항암 단클론성 항체 요법 (예컨대 알렘투주맵 (Campath<sup>R</sup>); 리툭시맵 (Rituxan<sup>R</sup>) 또는 다른 어떠한 치료적 항-CD20 항체; 또는 악성 B 세포상의 CD23 항원을 표적으로 하는 항-CD23 항체; 인터페론-알파 치료법; 인터류킨-2 (IL-2) 치료법; IL-12, IL-15, 또는 IL-21을 사용하는 치료법; 또는 스테로이드 치료법.

하나 또는 그 이상의 다른 암 치료법과 본원에서 설명된 의약의 조화로운 사용이라는 관점에서 "치료"는 본원에서 환자에 대한 의약 또는 다른 암 치료법의 적용 또는 투여로서, 또는 환자로부터 분리된 조직 또는 셀라인에 의약 또는 다른 암 치료법을 적용 또는 투여하는 것으로서 규정되며, 이때 환자는 만성 임파세포성 백혈병, 그러한 암과 관련된 징후, 또는 그런 암이 쉽게 발생하는 경향을 나타내고, 치료의 목적은 암, 암과 관련된 어떠한 징후, 또는 암이 쉽게 발생하는 경향을 돌봄, 치유, 경감, 완화, 변경, 치료, 개량, 개선, 또는 영향을 주는 것이다.

다음의 실시예를 본 발명을 제한함이 없이 예시하기 위하여 제공한다.

## 실시예

### 서론

하기 실시예에 사용되는 길항제 항-CD40 항체는 CHIR-5.9와 CHIR-12.12이다. CHIR-5.9 및 CHIR-12.12 항-CD40 항체는, 사람 IgG<sub>1</sub> 중쇄 유전자좌 및 사람  $\kappa$  사슬 유전자좌를 내포하고 있는 유전자 도입 마우스 (XenoMouse<sup>R</sup> technology; Abgenix; Fremont, California)을 면역화함으로써 생성된 사람 IgG<sub>1</sub> 하위타입 항-사람 CD40 단클론성 항체 (mAb)이다.

간단히 설명하면, 면역화된 마우스로부터의 비장세포를 앞서 설명한 바와 같이 50 % 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 10:1의 비율로 SP2/0 또는 P 3×63Ag8.653 쥐 골수종 세포와 융합하였다 (Boer et al.(1988) *J. Immunol. Meth.* 113:143). 융합된 세포를 히포크산틴 (0.1 mM), 아미토프테린 (0.01 mM), 티미딘 (0.016 mM), 및 0.5 ng/ml의 hIL-6 (Genzyme, Cambridge, Massachusetts)이 첨가된 완전 IMDM 배지에 재현탁하였다. 그런 다음 융합된 세포를 96-웰 조직 배양 플레이트의 웰에 각 웰이 평균 하나의 성장하는 하이브리도마를 함유하도록 분배하였다.

10 내지 14일 후에 하이브리도마 집단의 상층액을 특이한 항체 생성에 대해 스크린하였다. 하이브리도마 클론에 의한 특이한 항체 생성을 스크린하기 위해 각 웰로부터의 상층액을 모아서 먼저 ELISA에 의해 항-CD40 활성 특이성에 대해 시험하였다. 그런 다음 포지티브를 표준 FACS 분석법을 사용하여 EBV-형질전환된 B 세포의 형광 세포 염색에 사용하였다. 포지티브 하이브리도마 세포를 0.5 ng/ml의 hIL-6가 함유되어 있는 IMDM/FBS에서의 제한 희석에 의해 2회 클론하였다.

총 31개의 마우스 비장을 마우스 골수종 SP2/0 세포와 융합하여 ELISA에서 재조합 CD40을 인지하는 895개의 항체를 생성하였다. Abgenix XenoMouse<sup>R</sup> technology (Abgenix; Fremont, California)를 사용하여 평균 대략 10 %의 하이브리



도마는 사람 카파 사슬 대신 마우스 람다 경쇄를 함유할 수 있다. 마두스 경쇄 람다 사슬을 함유하는 항체를 선택하였다. 또한 세포 표면 CD40에 결합하는 것으로 나타난 260개 항체의 하위세트를 추가의 분석을 위해 선택하였다. 일련의 하위 클로닝 과정 중에 선택된 안정한 하이브리도마를 사용하여 결합 및 기능 분석에서 추가로 특성을 확인하였다. 선택 과정에 대한 보다 상세한 설명은 현재 "Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use"라는 제목으로 2003. 11.4 및 2003. 11. 26에 출원되고 미국 특허 출원 번호 60/517,337 (Attorney Docket No. PP20107.001 (035784/258442)) 및 60/525,579 (Attorney Docket No. PP20107.002 (035784/271525))로 승인된 공동계류중인 출원을 참조한다.

7개의 다른 하이브리도마로부터의 클론을 길항제 활성을 가지는 것으로서 확인하였다. 그것들의 상대적인 길항 능력 및 ADCC 활성을 토대로, 2개의 하이브리도마 클론을 추가의 평가를 위해 선택하였다(하기 표 1 참조). 그것들을 131.2F8.5.9 (5.9) 및 153.8E2.D10.D6.12.12 (12.12)로 명명하였다.

**[표 1]**

항-CD40 IgG1 항체 CHIR-5.9 및 CHIR-12.12를 사용한 초기 데이터 세트의 요약

모 하이브리도마	하이브리도마 클론	세포표면 결합	길항제	ADCC	CDC	CMCC#	V-영역 DNA 서열
131.2F5	131.2F5.8.5.9	+++	+++	++	-	12047	Yes
153.8E2	153.8E2.D10.D6.12.12	+++	+++	+++	-	12056	Yes

마우스 하이브리도마 라인 131.2F8.5.9 (CMCC#12047)와 하이브리도마 라인 153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC#12056)은 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 (USA))에 각각 특허 기탁 번호 PTA-5542와 PTA-5543으로 기탁하였다.

후보 항체들의 가변 영역을 코드화하는 cDNA를 PCR에 의해 증폭하고, 클론하여, 서열화하였다. CHIR-12.12 항체의 경쇄 및 중쇄에 대한 아미노산 서열을 각각 도 1A 및 1B에 나타낸다. 또한 SEQ ID NO:2 (mAb CHIR-12.12에 대한 경쇄) 및 SEQ ID NO:4 (mAb CHIR-12.12에 대한 중쇄)를 참조한다. mAb CHIR-12.12에 대한 중쇄의 변이체는 도 1B에 도시하는데 (SEQ ID NO:5), 그것은 SEQ ID NO:4의 위치 153에서 알라닌 잔기에 대해 치환된 세린 잔기를 가지고 있다는 점에서 SEQ ID NO:4와는 다르다. CHIR-12.12 항체의 경쇄 및 중쇄를 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 각각 도 2A 및 2B에 나타낸다. 또한 SEQ ID NO:1 (CHIR-12.12에 대한 경쇄에 대한 코딩 서열) 및 SEQ ID NO:3 (CHIR-12.12에 대한 중쇄에 대한 코딩 서열)을 참조한다. CHIR-5.9 항체의 경쇄 및 중쇄에 대한 아미노산 서열을 각각 도 3A 및 3B에 도시한다. 또한 SEQ ID NO:6 (CHIR-5.9에 대한 경쇄) 및 SEQ ID NO:7 (CHIR-5.9에 대한 중쇄)를 참조한다. mAb CHIR-5.9에 대한 중쇄의 변이체는 도 3B에 도시하는데 (SEQ ID NO:8), 그것은 SEQ ID NO:7의 위치 158에서 알라닌 잔기에 대해 치환된 세린 잔기를 가지고 있다는 점에서 SEQ ID NO:7과는 다르다.

독립적인 하이브리도마로부터 유도된 항체에 대해 예상했던 것과 같이, 상보성 결정 영역 (CDR)에 있는 뉴클레오티드 서열에는 실질적인 변이가 있다. V<sub>H</sub>의 CDR3 영역의 다양성이 가장 중요하게 항체 특이성을 결정하는 것으로 여겨진다.

FACS 분석에 의해 알 수 있는 바와 같이, CHIR-5.9 및 CHIR-12.12는 사람 CD40에 특이하게 결합하여 CD40-리간드 결합을 방지할 수 있다. 두 개의 mAb는 세포 표면 CD40에 사전 결합된 CD40-리간드와도 경쟁할 수 있다. 사람 CD40에 대한 CHIR-5.9의 결합 친화력은  $1.2 \times 10^{-8} \text{M}$ 이고, 사람 CD40에 대한 CHIR-12.12의 결합 친화력은  $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 이다.

CHIR-5.9 및 CHIR-12.12 단클론성 항체는 강력한 길항제로서, 정상적인 B 세포의 시험관내 CD40 리간드-중재된 증식을 억제할 뿐만 아니라, NHL 및 CLL 환자로부터의 암세포의 시험관내 CD40 리간드-중재된 증식도 억제한다. 시험관내에서, 두 가지 항체 모두 NHL 환자로부터의 일차 암세포를 ADCC에 의해 죽인다. 용량-의존성 항-종양 활성은 이중이식 사람 임파종 모델에서 찾아볼 수 있다. 이들 결과의 보다 상세한 설명, 및 그런 결과를 얻기 위해 사용한 분석법에 대해서는 현재 "Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use"라는 제목으로 2003. 11.4 및 2003. 11. 26에 출원되고 미국 특허 출원 번호 60/517,337 (Attorney Docket No. PP20107.001 (035784/258442)) 및 60/525,579 (Attorney Docket No. PP20107.002 (035784/271525))로 승인된 공동계류중인 출원을 참조한다.

B-세포 만성 임파세포성 백혈병 (CLL)은 생체내에서 장기간 살아있는 CD5<sup>+</sup> B 세포의 축적을 특징으로 한다. 그러나 시험관내에서 배양될 때 CLL 세포는 아포토시스에 의해 순식간에 죽는다. 생체내에서 아포토시스로부터 세포를 보호하는 것은 미소환경으로부터 생존 신호를 공급받는 결과일 것으로 여겨진다. CLL 세포의 CD40-리간드에 의한 CD40 자극은 그러한 생존 신호 중 하나인 것으로 확인된다.

다음의 연구들을 길항제 항-CD40 mAb CHIR-5.9 및 CHIR-12.12가 다음의 특성들: (1) 만성 임파세포성 백혈병 (CLL) 환자 세포에 결합하는 특성; (2) CLL 환자에서 CD40-리간드 유도된 생존 신호를 차단함으로써 세포 죽음을 촉진하는 특성; (3) 만성 임파세포성 백혈병 (CLL) 세포에 대하여 그들 스스로 어떠한 자극/억제 활성을 가지고 있는지의 특성; 및/또는 (4) 작용 방식으로서 ADCC를 중재하는 특성을 나타내는 지를 측정하기 위해 수행하였다.

실시예 1: CHIR-5.9와 CHIR-12.12는 CLL 환자로부터의 암세포의 CD40-중재된 생존 및 증식을 차단할 수 있다.

후보 항체들은 CLL 환자로부터의 암세포의 CD40-중재된 생존 및 증식을 차단할 수 있다. 환자로부터의 CLL 세포를 CD40을 발현하는 포름알데히드-고정된 CHO 세포를 통하여 현탁액 중에서 2가지 상이한 조건: 사람 이소타입 항체 IgG를 첨가하여 (대조군); 및 CHIR-5.9 또는 CHIR-12.12 단클론성 항체를 첨가하여 배양하였다. 모든 항체를 IL-4의 존재 하에 1, 10, 및 100 µg/ml의 농도에서 첨가하였다. 세포 계수를 24 및 48시간에 MTS 분석에 의해 수행하였다. 감소된 세포 수는 대조군에 비교하여 배양액으로 처리된 CHIR-5.9 (n=6) 및 CHIR-12.12 (n=2)로부터 회복되었다. 항-CD40 mAb-처리된 및 대조 항체-처리된 배양액 사이의 세포 수에 있어서 더 큰 차이는 48시간 지점에서 나타났다. 이들 데이터를 표 2에 요약한다.

**[표 2]**

배양 개시 후 48시간에 측정된 CLL 환자로부터의 암세포의  
CD40-유도된 생존 및 증식에 미치는 후보 항체들의 영향

환자 #	Ab 농도 (µg/ml)	상대적 세포수			세포수의 감소 % *	
		IgG1	CHIR-5.9/5.11	CHIR-12.12	CHIR-5.9/5.11	CHIR-12.12
1	1	269.31	25.27	ND	90.62	ND
	10	101.58	33.07	ND	67.44	ND
	100	130.71	40.16	ND	69.28	ND
2	1	265.55	75.8	ND	71.46	ND
	10	227.57	128.5	ND	43.53	ND
	100	265.99	6.4	ND	97.59	ND
3	1	85.9	35.39	ND	58.80	ND
	10	70.44	39.51	ND	43.91	ND
	100	77.65	20.95	ND	73.02	ND
4	1	80.48	15.03	ND	81.32	ND
	10	63.01	19.51	ND	69.04	ND
	100	55.69	3.65	ND	93.45	ND
5	1	90.63	91.66	89.59	-1.14	1.15
	10	78.13	82.28	60.41	-5.31	22.68
	100	63.53	86.47	39.59	-36.11	37.68
6	1	130.21	77.6	71.88	40.40	44.80
	10	131.77	78.13	73.96	40.71	43.87
	100	127.08	76.56	82.29	39.75	35.25

\* 대조 Ab와 비교한 감소 % = 100-(시험 Ab / 대조 Ab)\*100

두 번째 연구도 유사한 결과를 나타냈다. 이 연구에서 9명의 환자로부터의 일차 CLL 세포를 상기에서 설명된 방식으로 1, 10 또는 100 µg/ml의 항-CD40 mAb CHIR-12.12의 존재하에 또는 부재하에, 대조군으로서 비-이적 IgG를 사용하여 CD40L-발현 포름알데히드-고정된 CHO 세포 상에서 배양하였다. 48시간 및 72시간 후에 배양물의 증식을 상기에서 주지된 바와 같이 측정하였다. 항-CD40 mAb CHIR-12.12가 없을 때 일차 CLL 세포는 정지된 자발적 세포 죽음 상태이거나 증식되었다. 이런 효과는 mAb CHIR-12.12의 존재하에 억제되었고, 그것은 CLL 세포 죽음을 회복시켰다. 그러므로 이들 결과는 48시간 및 72시간 쯤에 항-CD40 mAb CHIR-12.12에 의한 CD40-유도된 CLL 세포 증식의 억제를 증명한다. 도 5A 및 5B를 참조한다.

유사한 실험을 mAb CHIR-12.12 만이 있을 때 자극되지 않은 CLL 세포에 대해 수행하였다. mAb CHIR-12.12 (10  $\mu$ g/ml)는 단독으로 CLL 증식을 유도하지 못하였고, 따라서 48시간 및 72시간째에 대조 IgG (10  $\mu$ g/ml)에 비교했을 때 CLL 세포에 자극 효과를 나타내지 못하였다. 도 6A 및 6B 참조.

실시예 2: 항체-의존성 세포 독성 (ADCC)에 의하여 만성 임파세포성 백혈병 (CLL) 셀라인을 용해하는, 항-CD40 mAb CHIR-12.12의 능력

CLL 셀라인 EHEB를 길항제 항-CD40 mAb CHIR-12.12 또는 항-CD20 항체 Rituxan<sup>R</sup> (IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California) 및 이펙터 세포로서 정상 지원자 혈액 기증자로부터 새롭게 분리한 사람 NK 세포와 함께 배양하였다. % 특이 용해를 표적 세포로부터 마커가 방출되는 것을 토대로 측정하였다.

항-CD40 mAb CHIR-12.12는 용량-의존성 방식으로 용해 활성을 나타냈고, 0.1  $\mu$ g/ml에서 최대 용해 수준에 도달하였다 (도 7). 도 7에서 알 수 있는 바와 같이, mAb CHIR-12.12는 Rituxan<sup>R</sup>보다 더 큰 ADCC-중재된 세포 용해를 유도하였다 (mAb CHIR-12.12를 사용한 최대 특이 용해 = 27.2 % 대 Rituxan<sup>R</sup>을 사용한 최대 특이 용해 = 16.2 %; p=0.007). 이들 결과를 토대로, 항-CD40 항체보다 항-CD20에 대하여 대략 10배 더 많은 결합 부위가 표적 세포에 존재하였고 (표 3 참조), 그것은 CD20 발현과 비교했을 때 CLL 셀라인상에 더 적은 수의 CD40 분자가 발현되었음을 나타낸다. 실제로 CLL 표적 셀라인은 48,416 $\pm$ 584 CD40 분자에 비해 509,053 $\pm$ 13,560의 CD20 분자를 발현하였다. 그러므로 mAb CHIR-12.12에 의해 중재된 더 큰 ADCC는 이 CLL 셀라인상의 CD20 분자에 비교하여 고밀도의 CD40 분자에 기인하는 것은 아니었다.

**[표 3]**

**EHEB 셀라인 표적 결합 부위 비율**

셀라인	최대 용해 %		최대 결합 부위의 비 CD20/CD40
	mAb CHIR-12.12	Rituxan <sup>®</sup>	
EHEB	27.19	16.21	10.51

실시예 3: CHIR-5.9 및 CHIR-12.12는 15B8보다 CD40 상의 상이한 에피토프에 결합한다

후보 단클론성 항체 CHIR-5.9 및 CHIR-12.12는 IgG2 항-CD40 mAb인 15B8과가 아니라 CD40에 대한 결합에 대해 상호간에 경쟁한다 (국제 공보 WO 02/28904). Biacore를 사용한 항체 경쟁 결합 연구를, 항-CD40, CHIR-12.12, 또는 15B8을 포획하기 위하여 사용되는, 아민 결합을 경유하여 단백질 A가 고정되어 있는 CM5 바이오센서 칩을 사용하여 디자인하였다. 정상적인 결합/해리 결합 곡선을 CD40-his의 농도를 달리해가며 관찰하였다 (데이터는 제시하지 않음). 경쟁 연구를 위해 CHIR-12.12 또는 15B8을 단백질 A 표면에 포획하였다. 계속해서 달라지는 농도에서의 CD40-his/CHIR-5.9 Fab 복합체 (100 nM CD40:1  $\mu$ M CHIR-5.9 Fab)는 변형된 표면을 가로질러 흘렀다. CHIR-12.12의 경우에 관찰된 복합체의 결합은 없었는데, 이것은 CHIR-5.9가 CHIR-12.12가 CD40-his에 결합하는 것을 차단하는 것을 가리킨다. 15B8에 대해서는, Fab CHIR-5.9 복합체의 결합이 관찰되었고, 그것은 CHIR-5.9가 15B8이 CD40 결합 부위에 결합하는 것을 차단하지 않은 것을 가리킨다. 그러나 복합체의 소멸 속도는 극적으로 증가하였다 (데이터는 제시하지 않음).

또한 15B8과 CHIR-12.12는 CD40-his 결합에 대하여 경쟁하지 않는 것으로 측정되었다. 이 실험은 CHIR-12.12를 단백질 A 바이오센서 칩상에 포획시키고, 잔류하는 단백질 A 부위를 대조 hIgG1으로 차단하고, CD40-his를 결합시킨 후 15B8을 변형된 표면 위로 흐르게 함으로써 설정하였다. 15B8은 이들 조건하에서 결합하지 않았고, 그것은 CHIR-12.12가 CD40에 대한 결합에서 15B8을 차단하지 않았음을 나타낸다.

실시예 4: CHIR-12.12와 CHIR-5.9 mAb의 결합 특성

단백질 A를 아민 결합을 통하여 CM5 바이오센서 칩상에 고정시켰다. 1.5  $\mu$ g/ml 농도의 사람 항-CC40 단클론성 항체를 변형된 바이오센서 표면에 1.5분 동안 10  $\mu$ l/분에서 포획시켰다. 재조합 가용성 CD40-his를 달라지는 농도로 바이오센

서 표면위를 흐르게 하였다. 항체와 항원을 0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % 계면활성제 P20 (HBS-EP)로 희석하였다. 역학 및 친화력 상수를 1:1 상호작용 모델/글로벌 피트로 Biaevaluation 소프트웨어를 사용하여 측정하였다.

하기 표 4에서 알 수 있는 것처럼 CHIR-5.9와 CHIR-12.12의 제거 속도에는 121배의 차이가 있었고, 그 결과 CHIR-12.12에 대한 친화력이 24배 더 높았다.

**[표 4]**

항체	ka (M <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> )	kd (sec <sup>-1</sup> )	KD (nM)
항-CD40, CHIR-5.9	(12.35 ± 0.64) × 10 <sup>5</sup>	(15.0 ± 1.3) × 10 <sup>-3</sup>	12.15 ± 0.35
항-CD40, CHIR-12.12	(2.41 ± 0.13) × 10 <sup>5</sup>	(1.24 ± 0.06) × 10 <sup>-4</sup>	0.51 ± 0.02

단클론성 항체 CHIR-12.12 및 CHIR-5.9에 의해 인지되는 CD40 상의 에피토프의 위치를 측정하기 위하여, SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 정제된 CD40 (0.5 µg)을 환원 및 비-환원 조건하에서 4 내지 12 % NUPAGE 겔 상에서 분리한 후, PVDF 막에 옮기고, 10 µg/ml 농도의 단클론성 항체로 프로브하였다. 블롯을 알칼리성 포스파타제 포함된 항-사람 IgG로 프로브하고, 알칼리성 포스파타제에 대한 웨스턴 블루R 안정화된 기질을 사용하여 전개하였다 (Promega).

그 결과는 항-CD40 단클론성 항체 CHIR-12.12가 비-환원 및 환원된 형태의 CD40 두 가지 상의 에피토프를 인지하고, 이때 비-환원 형태의 CD40이 환원된 형태의 CD40보다 더 큰 강도를 나타냈다 (표 5; 블롯은 제시하지 않음). 인지가 두 가지 형태의 CD40에 대하여 포지티브였다는 사실은 이 항체가 그것의 일부가 선형 서열인 구조적 에피토프와 상호작용하는 것을 가리킨다. 단클론성 항체 CHIR-5.9는 주로 비-환원 형태의 CD40을 인지하는데, 이것은 이 항체가 주로 구조적 에피토프와 상호작용한다는 것을 나타낸다 (표 5; 블롯은 제시하지 않음).

**[표 5]**

도메인 확인

	도메인 1	도메인 2	도메인 3	도메인 4
mAb CHIR-12.12	-	+	-	-
mAb CHIR-5.9	-	+	-	-
mAb 15B8	+	-	-	-

CD40 상의 항원성 영역을 지도화하기 위하여 CD40의 4개의 세포외재성 도메인을 클론하였고, 무상 세포에서 GST 융합 단백질로서 발현하도록 하였다. 4개의 도메인의 분비는 GP67 분비 신호로 확실하게 되었다. 무상 세포 상층액을 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석에 의해 분석하여 에피토프를 함유하는 도메인을 확인하였다.

단클론성 항체 CHIR-12.12는 환원 및 비-환원 조건하에서 도메인 2 상의 에피토프를 인지한다 (표 6; 블롯은 제시하지 않음). 대조적으로 단클론성 항체 CHIR-5.9는 도메인 2에 대해 매우 약하게 인지한다 (표 6; 블롯은 제시하지 않음). 이들 항체 중 어느 것도 이 분석에서 도메인 1, 3, 또는 4를 인지하지 못하였다.

[표 6]

도메인 2 분석

	환원	비-환원
mAb CHIR-12.12	++	+++
mAb CHIR-5.9	+	+

mAb CHIR-12.12에 의해 인지된 에피토프를 보다 더 정확하게 규정하기 위하여, 펩티드를 세포외재성 CD40의 도메인 2로부터 합성하였는데, 그것은 서열 PCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICT (SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:12에 도시된 서열의 잔기 61-104)에 상응한다. 1-아미노산 오프셋(offset)을 가지는 10량체 펩티드를 35개 함유하는 SPOT 막 (Sigma)을 생성하였다. mAb CHIR-12.12 및 2차 항체로서 항-사람 IgG 베타 갈락토시다제를 사용한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 블롯을 잘게 나누고 mAb CHIR-5.9로 재프로브하여 이 항체에 의해 인지된 영역을 측정하였다.

10 µg/ml의 항-CD40 단클론성 항체 CHIR-12.12로 프로브하는 SPOT 분석 결과, 반점 18 내지 22로 포지티브 반응이 유도되었다. 이들 펩티드에 의해 포함되는 서열 영역은 표 7에 제시된다.

[표 7]

항-CD40 단클론성 항체 CHIR-12.12로 프로브한 SPOT 분석의 결과

Spot 번호	서열 영역
18	HQHKYCDPNL (SEQ ID NO:10 또는 12의 잔기 78-87)
19	QHKYCDPNLG (SEQ ID NO:10 또는 12의 잔기 79-88)
20	HKYCDPNLGL (SEQ ID NO:10 또는 12의 잔기 80-89)
21	KYCDPNLGLR (SEQ ID NO:10 또는 12의 잔기 81-90)
22	YCDPNLGLRV (SEQ ID NO:10 또는 12의 잔기 82-91)

이들 결과는 YCDPNL (SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:12에 도시된 서열의 잔기 82-87)의 선형 에피토프에 상응한다. 이 에피토프는 Y82, D84, 및 N86을 함유하며, 그것들은 CD40-CD40 리간드 상호작용에 포함될 것으로 예상되었다.

mAb CHIR-5.9를 이용한 SPOT 분석은 표 8에 제시된 반점 20 내지 22로 표시되는 펩티드의 약한 인지를 나타냈고, 그것은 그것의 CD40에 대한 결합에서 영역 YCDPNLGL (SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:12에 도시된 잔기 82-89)의 포함을 시사한다. mAb CHIR-12.12 및 CHIR-5.9는 BIACORE 분석에서 CD40에 대한 결합에 대해 다른 것과 경합한다는 것이 주지되어야 한다.

[표 8]

항-CD40 단클론성 항체 CHIR-5.9로 프로브한 SPOT 분석의 결과

Spot 번호	서열 영역
20	HKYCDPNLGL (SEQ ID NO:10 또는 12의 잔기 80-89)
21	KYCDPNLGLR (SEQ ID NO:10 또는 12의 잔기 81-90)
22	YCDPNLGLRV (SEQ ID NO:10 또는 12의 잔기 82-91)

SPOT 분석에 의해 확인된 선형 에피토프는 CD40 B1 분자 내에 있다. CD40 B1 분자의 서열은 HKYCDPNLGLRVQQGTSETDTIC (SEQ ID NO:10 또는 SEQ ID NO:12의 잔기 80-103)이다.

CHIR-12.12에 대해 확인된 선형 에피토프 내에 C83이 있다. 이 스시테인 잔기는 C103과 이황화 결합을 형성하는 것으로 알려져 있다. CHIR-12.12 mAb의 구조적 에피토프는 이황화 결합 (C83-C103) 및/또는 C103에 구조적으로 밀접한 주변의 아미노산을 함유하는 것 같다.

#### 실시예 6: CHIR-12.12는 정상인 B 세포에서 CD40-중재된 CD40 생존 및 신호화 경로를 차단한다

가용성 CD40 리간드 (CD40L)는 B 세포를 활성화하고, 다양한 측면의 기능적 반응, 이를테면 생존 및 증식의 증대, 및 NFκB, ERK/MARK, PI3K/Akt, 및 p38 신호화 경로의 활성화를 유도한다. 또한 CD40L-중재된 자극은 정상 B 세포에서 절단된 PARP의 감소와 항-아포토시스 단백질, XIAP 및 Mcl-1의 유도에 의해 생존 신호를 제공한다. CD40L-중재된 CD40 자극은 또한 CD40 세포질성 도메인에 결합하기 위하여 TRAF2와 TRAF3를 보완한다.

이어지는 연구는 CHIR-12.12가 직접 정상인 B 세포에 대한 이들 자극 효과를 모두 억제하였음을 증명하였다. 예를 들어 CHIR-12.12 치료는 카스파제(caspase)-9, 카스파제-3, 및 PARP의 증가된 절단과 또한 시간- 및 용량-의존성 방식으로 XIAP 및 Mcl-1의 감소를 유발하여 B 세포 아포토시스를 회복시킨다. CHIR-12.12를 사용한 치료는 또한 CD40L-중재된 CD40 자극에 대한 반응으로 κB 키나제 (IKK) α 및 β (NFκB 경로), ERK, Akt, 및 p38의 인산화를 억제하였다. 나아가 CHIR-12.12는 초기의 CD40L-중재된 CD40 자극이 없이는 이들 아포토시스 효과를 야기하지 않았다.

*CHIR-12.12는 PARP의 절단을 유도함으로써 CD40 리간드에 의해 중재된 생존을 억제하였다.*

이 실험에서 건강한 기증자로부터의  $0.6 \times 10^6$ 의 정상인 B 세포 (% 순도는 85 내지 95 %)를 1 μg/ml의 sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK)로 자극하였다. 그런 다음 CHIR-12.12 (10 μg/ml) 및 대조 IgG를 첨가하였다. 세포를 0, 20분, 2시간, 6시간, 18시간, 및 26시간에 수집하였다. 절단된 카스파제-9, 절단된 카스파제-3, 절단된 PARP, 및 β-악틴 대조군을 웨스턴 블롯에 의해 세포 용해물에서 검출하였다.

간단히 설명하면, CD40L-중재된 CD40 자극은 그것이 절단된 카스파제-9, 절단된 카스파제-3, 또는 절단된 PARP의 시간의 경과에 따른 증가를 유발하지 않은 것처럼 생존 신호를 제공하는 것으로 관찰되었고, 그것은 세포가 아포토시스를 진행하지 않고 있음을 나타낸다. 그러나 CHIR-12.12로의 치료는 이들 절단 생성물의 증가를 유발하였고, 그것은 CHIR-12.12 치료가 sCD40L-자극된 정상 세포에서 sCD40L-자극된 정상 B 세포의 생존 신호화에 대한 CD40L의 효과를 방지하여 B 세포 아포토시스를 회복시켰음을 가리킨다.

*CHIR-12.12는 "생존" 항-아포토시스 단백질의 발현을 억제하였다.*

이 실험에서는 건강한 기증자로부터의  $0.6 \times 10^6$ 의 정상인 B 세포 (% 순도는 85 내지 95 %)를 1 μg/ml의 sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK)로 자극하였다. 그런 다음 CHIR-12.12 (10 μg/ml) 및 대조 IgG를 첨가하였다. 세포를 0, 20분, 2시간, 6시간, 18시간, 및 26시간에 수집하였다. Mcl-1, XIAP, CD40, 및 β-악틴 대조군을 웨스턴 블롯에 의하여 세포 용해물에서 검출하였다. 간단히 설명하면, sCD40L 자극은 시간이 흐름에 따라 Mcl-1과 XIAP의 지속적인 방출을 유발하였다. 그러나 sCD40L-자극된 세포를 CHIR-12.12로 처리한 결과 이들 단백질은 시간이 흐름에 따라 발현이 감소하였다 (데이터는 제시하지 않음). Mcl-1과 XIAP가 아포토시스 경로를 차단할 수 있는 "생존" 신호이기 때문에 이들 결과는 CHIR-12.12 처리가 sCD40L-자극된 정상 B 세포에서 아포토시스에 대한 봉쇄를 제거한다는 것을 증명한다.

*CHIR-12.12 처리는 정상 B 세포에서 IKKα (Ser180) 및 IKKβ (Ser181)의 인산화를 억제하였다.*

이 실험에서는 건강한 기증자로부터의  $1.0 \times 10^6$ 의 정상인 B 세포 (% 순도는 85 내지 95 %)를 1 μg/ml의 sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK)로 자극하였다. 그런 다음 CHIR-12.12 (10 μg/ml) 및 대조 IgG를 첨가하였다. 세포를 0분과 20분에 수집하였다. 인산화된 IKKα (Ser180) 및 IKKβ (Ser181)와 총 IKKβ 대조군을 웨스턴 블롯에 의하여 세포 용해물에서 검출하였다.

간단히 설명하면, sCD40L에 의한 자극은 시간이 흐름에 따라 IKKα (Ser180) 및 IKKβ (Ser181)의 인산화를 유발하였다; 그러나 CHIR-12.12로의 처리는 정상 B 세포에서 sCD40L 자극에 대한 이 반응을 방지하였다 (데이터는 제시하지 않음).



*CHIR-12.12 처리는 용량-의존성 방식으로 CD40 리간드에 의해 증재된 생존을 억제하였다.*

이 실험에서는 건강한 기증자로부터의  $0.6 \times 10^6$ 의 정상인 B 세포 (% 순도는 85 내지 95 %)를 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK)로 자극하였다. 그런 다음 CHIR-12.12 (0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0  $\mu\text{g/ml}$ ) 및 대조 IgG를 첨가하였다. 세포를 24시간에 수집하였다. 절단된 PARP, 및  $\beta$ -악틴 대조군을 웨스턴 블롯에 의하여 세포 용해물에서 검출하였다.

간단히 설명하면 CHIR-12.12 처리는 sCD40L 자극된 세포에서 용량-의존 방식으로 PARP 절단의 증가를 유발하였고, 따라서 sCD40L-자극된 정상 B 세포에서 생존 신호화 경로를 방지하였다 (데이터는 제시하지 않음).

*CHIR-12.12 처리는 용량-의존성 방식으로 "생존" 항-아포토시스 단백질의 발현을 억제하였다.*

이 실험에서는 건강한 기증자로부터의  $0.6 \times 10^6$ 의 정상인 B 세포 (% 순도는 85 내지 95 %)를 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK)로 자극하였다. 그런 다음 CHIR-12.12 (0.5, 2, 및 10  $\mu\text{g/ml}$ ) 및 대조 IgG를 첨가하였다. 세포를 22시간에 수집하였다. Mcl-1, XIAP, 절단된 PARP, 및  $\beta$ -악틴 대조군을 웨스턴 블롯에 의하여 세포 용해물에서 검출하였다.

간단히 설명하면 CHIR-12.12 처리는 sCD40L 자극된 세포에서 용량-의존 방식으로 Mcl-1과 XIAP 발현의 감소와, 절단된 PARP 발현의 증가를 유발하였고, 따라서 sCD40L-자극된 정상 B 세포에서 아포토시스 경로에 대한 봉쇄를 방지하였다 (데이터는 제시하지 않음).

*CHIR-12.12는 가용성 CD40L 신호화의 부재시에 항-아포토시스 단백질, 절단된-PARP, 및 XIAP의 발현에 영향을 미치지 않았다.*

이 실험에서는 건강한 기증자로부터의  $1.0 \times 10^6$ 의 정상인 B 세포 (% 순도는 85 내지 95 %)를 CHIR-12.12 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) 및 대조 IgG만 (즉 세포를 항체 첨가 전에 sCD40L로 사전 자극하지 않았다)으로 처리하였다. 세포를 0, 4, 14, 및 16시간에 수집하였다. XIAP, 절단된 PARP, 및  $\beta$ -악틴 대조군을 웨스턴 블롯에 의하여 세포 용해물에서 검출하였다.

간단히 설명하면 결과적으로, IgG 처리된 대조 세포와 CHIR-12.12 세포에서 모두, sCD40L 자극 없이 세포는 증가된 농도의 절단된 PARP를 발현한 반면, XIAP의 발현은 일정하게 유지하였다 (데이터는 제시하지 않음). 이들 데이터는 CHIR-12.12가 CD40L 자극 없이는 정상인 B 세포에서 아포토시스를 야기하지 않는다는 것을 나타낸다.

*CHIR-12.12는 정상 B 세포에서 IKK $\alpha$  (Ser180) 및 IKK $\beta$  (Ser181), Akt, ERK, 및 p38의 인산화를 억제한다.*

이 실험에서는 건강한 기증자로부터의  $1.0 \times 10^6$ 의 정상인 B 세포 (% 순도는 85 내지 95 %)를 1 % FBS-함유 배지 중에서 혈청이 굵주리게 하고 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK)로 자극하였다. 배양물을 CHIR-12.12 (1 및 10  $\mu\text{g/ml}$ ) 및 대조 IgG로 처리하였다. 세포를 0분과 20분에 수집하였다. 포스포(Phospho)-IKK $\alpha$ , 포스포-IKK $\beta$ , 총 IKK $\beta$ , 포스포-ERK, 총 ERK, 포스포-Akt, 총 Akt, 포스포-p38, 및 총 p38을 웨스턴 블롯에 의하여 세포 용해물에서 검출하였다.

간단히 설명하면, sCD40L 자극은 IKK $\alpha/\beta$  인산화, ERK 인산화, Akt 인산화, 및 p38 인산화의 증가를 유발하였고, 따라서 세포의 생존 및/또는 증식을 유도하였다. CHIR-12.12로 세포를 처리하는 것은 정상 B 세포에서 이들 신호화 경로에 대한 sCD40L 자극의 효과를 방지하였다 (데이터는 제시하지 않음).

*CHIR-12.12는 CD40 신호화 캐스케이드 반응에서 PI3K와 MEK/ERK와 같은 다중 신호화 경로를 억제한다.*

이 실험에서는 건강한 기증자로부터의  $1.0 \times 10^6$ 의 정상인 B 세포 (% 순도는 85 내지 95 %)를 1 % FBS-함유 배지 중에서 혈청이 굵주리게 하고 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK)로 자극하였다. 배양물을 또한 CHIR-12.12 (1 및 10  $\mu\text{g/ml}$ ), Wortmanin (PI3K/Akt 억제제; 1 및 10  $\mu\text{M}$ ), LY 294002 (PI3K/Akt 억제제; 10 및 30  $\mu\text{M}$ ), 및 PD 98095 (MEK 억제제; 10 및 30  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리하였다. 세포를 0분과 20분에 수집하였다. 포스포-ERK, 포스포-Akt, 총 Akt, 포스포-IKK $\alpha/\beta$ , 및 전체를 웨스턴 블롯에 의하여 세포 용해물에서 검출하였다.

간단히 설명하면, 결과적으로 CHIR-12.12가 이들 모든 신호 형질도입 분자의 인산화를 방지한 반면, 신호 형질도입 억제제는 신호화의 특이적인 방지만을 나타냈는데, 이것은 아마도 CHIR-12.12가 CD40L 자극에 의해 중재된 이들 신호 형질도입 분자의 상향 흐름을 억제하는 것을 나타낸다 (데이터는 제시하지 않음).

*CHIR-12.12는 정상 B 세포에서 CD40의 세포질성 도메인에 대한 신호화 분자 TRAF2 및 TRAF3의 결합을 억제한다.*

이 실험에서는 건강한 기증자로부터의  $4.0 \times 10^6$ 의 정상인 B 세포 (% 순도는 85 내지 95 %)를 1 % FBS-함유 배지 중에서 4시간 동안 혈청이 굵주리게 하고 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK)로 20분 동안 자극하였다. 세포를 0분과 20분에 수집하였다. CD40을 다클론성 항-CD40 (Santa Cruz Biotechnology, CA)를 사용하여 면역침전시키고, 웨스턴 블롯에서 항-TRAF2 mAb (Santa Cruz Biotechnology, CA), 항-TRAF3 mAb (Santa Cruz Biotechnology, CA), 및 항-CD40 mAb (Santa Cruz Biotechnology, CA)로 프로브하였다.

간단히 설명하면, 결과적으로 TRAF2와 TRAF3은 sCD40L 자극 후에 CD40으로 공동-침전되었다. 대조적으로 CHIR-12.12로 처리는 sCD40L-자극된 정상 B 세포에서 CD40-TRAF2/3 신호화 복합체의 형성을 방지하였다. CD40 발현에는 변화가 없었다 (데이터는 제시하지 않음).

이론에 구속됨이 없이, 이들 실험의 결과, 및 상기에서 개략적으로 설명한 실시예들의 결과는 CHIR-12.12 항체가 특성들이 독특하게 조합되어 있는 이중 작용 길항제 항-CD40 단클론성 항체라는 것을 나타낸다. 이 전체 사람 단클론성 항체는 B 세포의 생존 및 증식을 위한 CD40L-중재된 CD40 신호화 경로를 차단한다; 이 길항작용은 궁극적으로 세포 죽음을 유도한다. CHIR-12.12는 또한 이펙터 세포에 의한 인지 및 결합을 중재하고, 그것은 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 개시한다. 일단 CHIR-12.12가 이펙터 세포에 결합하면, 세포용해성 효소가 방출되어 B-세포 아포토시스 및 용해가 유발된다. CHIR-12.12는 예비-임상 종양 모델에서 비교했을 때 리툭시맵이 그러한 것보다 더 강력한 항-종양 항체이다.

#### 실시예 7: 길항제 항-CD40 항체에 대한 액체 약제학적 제형

이 연구의 목적은 길항제 항-CD40 항체 CHIR-12.12의 안정성에 미치는 용액 pH의 효과를, 이 항체에 대한 최적 용액 환경을 선택하기 위하여 생물물리학적 및 생화학적 방법 두 가지에 의해 연구조사하는 것이었다. 차등 주사 열량측정법 (DSC) 결과는 CHIR-12.12의 구조적 안정성이 5.5 내지 6.5의 pH를 가지는 제형에 최적임을 나타냈다. SDS-PAGE, 크기-축출 HPLC (SEC-HPLC), 및 양이온-교환 HPLC (CEX-HPLC) 분석의 조합을 토대로 하여, CHIR-12.12의 물리학적 안정성은 약 5.0 내지 5.5의 pH에서 최적이다. 이들 결과의 관점에서 볼 때 이 항체를 포함하는 액체 약제학적 제형은 약 10 mM의 숙신산 나트륨, 약 150 mM의 염화 나트륨으로 제형되고, 약 pH 5.5의 pH를 가지는, 약 20 mg/ml의 CHIR-12.12를 포함하는 제형이라고 말할 수 있다.

#### 물질 및 방법

제형 연구에 사용된 CHIR-12.12 항체는 CHO 세포 배양 과정에 의해 생성된 사람 단클론성 항체이다. 이 MAb는 150 kDa의 분자량을 가지고, 이황화 결합에 의해 함께 연결된 두 개의 경쇄와 두 개의 중쇄로 구성된다. 그것은 다양한 암 및 자가면역/염증성 질병의 치료를 위해 정상 및 악성 B 세포를 포함하여 CD40-발현 세포 상의 CD40 세포 표면 수용체에 대하여 표적으로 한다.

이 연구에 대해 사용된 항-CD40 약물 물질은 CHO-유도 정제된 항-CD40 (CHIR-12.12) 벌크 랫(bulk lot)이었다. 약물 물질의 조성은 10 mM의 시트르산 나트륨, 150 mM의 염화 나트륨, pH 6.5중의 9.7 mg/ml의 CHIR-12.12 항체였다. 연구의 대조 샘플에 약물 물질을 넣고, 이어서 -60 °C 이하에서 냉동한 후, RT에서 해동하여, 예정된 시간 지점에서 안정성 샘플과 함께 시험하였다. 안정성 샘플은 상이한 pH 용액에 대하여 약물 물질을 투석함으로써 제조하였고, 각 샘플 중의 CHIR-12.12 농도를 표 20에 나타낸 바와 같이 UV280에 의해 측정하였다.



[표 9]

CHIR-12.12 제형

원종제 조성	pH	CHIR-12.12 농도 (mg/ml)
10 mM 시트르산 나트륨, 150 mM 염화 나트륨	4.5	9.0
10 mM 숙신산 나트륨, 150 mM 염화 나트륨	5.0	9.3
10 mM 숙신산 나트륨, 150 mM 염화 나트륨	5.5	9.2
10 mM 시트르산 나트륨, 150 mM 염화 나트륨	6.0	9.7
10 mM 시트르산 나트륨, 150 mM 염화 나트륨	6.5	9.4
10 mM 인산 나트륨, 150 mM 염화 나트륨	7.0	9.4
10 mM 인산 나트륨, 150 mM 염화 나트륨	7.5	9.5
10 mM 글리신, 150 mM 염화 나트륨	9.0	9.5

다양한 제형에서 CHIR-12.12 항체의 물리화학적 안정성을 다음의 프로토콜을 사용하여 분석하였다.

#### 차등 주사 열량측정 (DSC)

상이한 제형 샘플의 구조적 안정성을 15 °C에서 90 °C로 1분에 1 °C씩 가열하면서 MicroCal VP-DSC를 사용하여 모니터링 하였다.

#### SDS-PAGE

단편화와 응집을 4 내지 20 % 트리스-글리신 겔을 비-환원 및 환원 조건 하에서 사용하여 평가하였다. 단백질을 쿠마찌 블루 염색에 의해 검출하였다.

#### 크기 축출 크로마토그래피 (SEC-HPLC)

단백질 단편화 및 응집을 또한 Tosohaas TSK-GEL 3000SWXL 칼럼, 100 mM의 인산나트륨, pH 7.0을 이동상으로서 사용하는 Water Alliance HPLC에 의해 0.7 ml/분의 유속에서 측정하였다.

#### 양이온 교환 크로마토그래피 (CEX-HPLC)

전하 변화 관련 분해는 Dionex Propac WCX-10 칼럼, 50 mM의 HEPES, pH 7.3D를 이동상 A로서, 500 mM의 NaCl을 함유하는 50 mM의 HEPES, pH 7.3을 이동상 B로서 사용하는 Waters 600s HPLC 시스템을 사용하여 0.5 °C/분의 유속으로 측정하였다.

#### 결과 및 논의

##### 구조적 안정성 연구

CHIR-12.12의 열에 의한 펼침은 아마도 각각 Fab와 Fc 도메인의 펼침 용융을 나타내는 최소한 두 가지 열 변화를 나타냈다. 보다 높은 온도에서는 단백질은 아마도 응집되어 DSC 신호를 잃게 되는 결과를 초래한다. 제형 스크리닝의 목적에 대해서는 가장 낮은 열 변화 온도를 이 연구에서는 용융 온도, T<sub>m</sub>으로서 규정하였다. 도 13은 제형 pH의 기능으로서 열 용융 온도를 나타낸다. pH 5.5 내지 6.5에서의 제형은 더 높은 열 용융 온도에 의해 증명되는 바 더 높은 구조적 안정성을 가지는 항-CD40을 제공하였다.

##### SDS-PAGE 분석

pH 4.5 내지 9.0에서의 CHIR-12.12 샘플을 40 °C에서 2개월 동안 인큐베이션하고, SDS-PAGE 분석을 수행하였다 (데이터는 제시하지 않음). 비-환원 조건하에서 분자량(MW)이 23 kDa 및 27 kDa인 종들을 pH 5.5 이상의 제형에서 관찰하였고, MW가 51 kDa인 종을 모든 제형에서 관찰하였지만, pH 5.0 내지 5.5에서는 덜 나타났다. MW가 100 kDa인 종은 pH 7.5와 pH 9.0에서 찾아볼 수 있었다.

환원 조건하에서는 CHIR-12.12는 MW가 각각 50 kDa와 24 kDa인 유리 중쇄 및 경쇄로 환원되었다. 100 kDa 종은 전체가 다 환원가능한 것으로 보이지는 않았고, 용액의 pH가 높아짐에 따라 증가하였는데, 그것은 분자에 비-이황화 공유 결

합이 있을 것이라는 것을 시사한다. SDS-PAGE 상에는 정체를 알 수 없는 다른 종들이 있기 때문에 각 제형의 안정성 비교는 CHIR-12.12의 잔류하는 순도를 토대로 한다. pH 5.0 내지 6.0에서의 제형은 CHIR-12.12에 대해서는 보다 안정한 환경을 제공하였다. SDS-PAGE에 의하여 약간의 응집체를 검출하였다 (데이터는 제시하지 않음).

#### SEC-HPLC 분석

SEC-HPLC 분석으로는 메인 피크 종으로서 무상 CHIR-12.12, 메인 피크 종으로부터 떨어져 있는 전면 피크 종으로서 응집 종, 메인 피크 종의 후면에 있는 쇼울더 피크로서 큰 단편 종, 그리고 후-메인 피크 종으로서 작은 단편 종을 검출하였다. 5 °C 및 25 °C에서 3개월 동안 인큐베이션한 후에 상기 제형에서 무시해도 좋을 정도의 양의 단백질 단편과 응집체 (<1.0 %)가 검출되었고, CHIR-12.12 메인피크 종은 99 % 이상의 순도로 유지되었다 (데이터는 제시하지 않음). 그러나 단백질 단편은 하기 표 10에서 알 수 있는 것과 같이, 40 °C에서 보관함에 따라 점차로 나타났고, 더 많은 단편이 pH 4.5와 pH 6.5 내지 9.0에서 형성되었다. CHIR-12.12 제형을 40 °C에서 3개월 동안 인큐베이션한 후에 약 2 내지 3 %의 응집체를 pH 7.5 및 pH 9.0에서 검출하였고, 다른 pH 제형에서는 1 % 미만의 응집체를 검출하였다 (데이터는 제시하지 않음). SEC-HPLC 결과는 CHIR-12.12가 약 pH 5.0 내지 6.0에서 더 안정하다는 것을 나타낸다.

[표 10]

실시간 및 가속화된 보관 조건 하에서 CHIR-12.12 안정성 샘플의 SEC-HPLC 결과

샘플	메인 피크 %				단편 %			
	t=0	40°C 1 m	40°C 2 m	40°C 3 m	t=0	40°C 1 m	40°C 2 m	40°C 3 m
대조군	99.4	99.2	99.9	99.5	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
pH 4.5	99.4	93.2	86.0	81.3	<1.0	6.4	13.2	18.1
pH 5.0	99.8	98.7	91.3	89.2	<1.0	<1.0	7.8	10.2
pH 5.5	99.8	98.9	91.4	90.6	<1.0	<1.0	7.6	8.8
pH 6.0	99.6	97.7	90.4	87.3	<1.0	1.9	8.2	11.7
pH 6.5	99.3	93.4	89.0	86.9	<1.0	5.6	9.9	12.4
pH 7.0	99.2	93.9	87.4	85.1	<1.0	5.5	11.1	13.5
pH 7.5	99.1	92.8	84.4	81.9	<1.0	6.4	12.9	16.2
pH 9.0	99.3	82.4	61.6	50.6	<1.0	15.4	36.2	47.6

#### CEX-HPLC 분석

CEX-HPLC 분석으로는 메인 피크 종으로서 무상 CHIR-12.12, 메인 피크 종보다 먼저 용출되는 산성 변이체, 및 메인 피크 종보다 나중에 용출되는 C-말단 라이신을 검출하였다. 하기 표 11은 잔류하는 메인 피크 CHIR-12.12 종과 산성 변이체의 백분율이 용액 pH에 따라 좌우되는 것을 보여준다. 대조 샘플은 이미 아마도 초기 단계의 발효 및 정제 처리과정으로 인하여 고도의 산성 종 (~ 33 %)을 함유하였다. 보다 높은 pH 용액에 대한 CHIR-12.12의 민감성은 두 가지 요인에 의해 증명된다. 첫째, pH 9.0의 초기 제형 샘플 (t=0)은 이미 12 %의 대조군보다 더 산성인 종을 생성하였다. 둘째, 산성 종의 백분율은 pH가 증가함에 따라 급격하게 증가하였다. 전하 변화-관련 분해는 탈아민화 때문인 것 같다. 상기 데이터는 이런 유형의 CHIR-12.12의 분해가 약 pH 5.0 내지 5.5에서 최소화되었음을 나타낸다.

[표 11]

실시간 및 가속화된 보관 조건하에서 상이한 pH 제형 중의 CHIR-12.12에 대한 CEX-HPLC에 의한 피크 영역의 백분율

샘플	메인 피크 %					산성 변이체 %				
	t=0	5°C 3m	25°C 3 m	40°C 1 m	40°C 2 m	t=0	5°C 3m	25°C 3 m	40°C 1 m	40°C 2 m
대조군	49.2	49.8	49.8	49.2	50.3	32.0	33.7	33.7	32.0	33.6
pH 4.5	48.5	49.7	43.7	39.7	30.0	32.5	32.6	38.0	44.2	56.4
pH 5.0	49.6	49.8	48.3	40.6	31.4	32.7	31.8	35.0	44.3	57.1
pH 5.5	50.7	50.3	48.1	40.0	30.2	32.6	31.8	37.8	48.9	63.3
pH 6.0	50.2	49.9	47.9	37.4	23.9	33.1	33.6	38.5	54.9	72.7
pH 6.5	49.4	49.9	42.3	29.7	14.6	33.3	33.6	47.7	65.2	84.6
pH 7.0	49.7	49.9	21.9	-	-	34.4	36.4	64.4	-	-
pH 7.5	49.3	48.3	12.7	-	-	35.5	40.1	79.2	-	-
pH 9.0	41.3	31.8	-	-	-	44.7	59.9	-	-	-

## 결론

pH는 CHIR-12.12의 구조적 및 물리화학적 안정성에 상당한 영향을 미친다. 전하 변화-관련 분해는 CHIR-12.12에 대한 메인 분해 경로인 것으로 측정되었는데, 그것은 pH 5.0 내지 5.5에서 최소화되었다. 전체적인 안정성 데이터를 토대로 하면, 이 항체를 포함하는 액체 약제학적 제형은 약 10 mM의 숙신산 나트륨, 약 150 mM의 염화 나트륨 중에 제형된 약 20 mg/ml의 CHIR-12.12를 포함하고, 약 pH 5.5를 가지는 제형이 바람직하다.

## 실시예 8: CHIR-5.9와 CHIR-12.12를 사용한 임상 연구

### 임상의 목적

전체적인 목적은 항-CD40 IgG1으로 만성 임파세포성 백혈병 (CLL)의 암세포를 표적으로 함으로써 CLL에 대한 효과적인 치료법을 제공하는 것이다. 이 질병에 대한 신호는 활성화에 대한 몇 가지 척도가 제 I 단계에서 얻어지긴 하지만 제 II 단계에서 측정된다. 초기에 제제는 단일 제제로서 연구되지만, 진행 과정에 따라 다른 제제, 화학요법제, 및 방사선 요법과 함께 조합될 것이다.

### 제 I 단계

- \* 만성 임파세포성 백혈병 (CLL)에 걸린 환자에게서 안전성 및 약물역학 - 용량의 단계적 증가를 평가한다.
- \* 안전성, 내성, 및 CD40의 혈청 마커의 변화를 토대로 용량을 선택한다. 일반적으로 MTD가 탐색되지만, 다른 효능의 징후 (CD40<sup>+</sup> CLL 세포의 고갈 등)도 용량발견에 적당할 수 있다.
- \* 일부 용량 발견은 제 II 단계에서 필요할 것이므로, 하나 이상의 용량을 고려한다.
- \* 환자들을 실시간 약물역학 (Pk) 샘플링으로 주마다 투여한다. 초기 4-주 사이클은 허용되는 최대 투약계획이다. Pk는 질병 상태, CD40의 밀도 등에 따라 매우 가변적이다.
- \* 이 시도(들)은 CLL에 걸린 환자에게 개방된다.
- \* 연구를 계속할 것인지 말 것인지는 안전성, 용량, 및 항-종양 활성의 예비 증거를 토대로 결정한다.
- \* 반응에 의해 측정되는 약물의 활성은 제 II 단계에서 측정한다.
- \* 제 II 단계에 대한 용량(들)을 확인한다.

### 제 II 단계

CLL에 걸린 환자에게서 여러 번의 시도를 개시할 것이다. 랜덤화된 제 II 단계 세팅에서는 하나 이상의 용량, 및 하나 이상의 스케줄이 시험될 수 있다.

\* 현재 표준 치료법이 듣지 않는 (화학요법 실패) CLL 집단을 표적으로 한다.

- 제 II 단계에서 치료적 개념의 증거를 토대로 연구를 계속할 것인지 그만둘 것인지를 결정한다.

- 대리 마커를 임상 효능의 초기 표시로서 사용할 수 있을 것인지를 결정한다.

- 제 III 단계에 대한 용량을 확인한다.

### 제 III 단계

제 III 단계는 신호가 제 II 단계에서 검출되는 지의 여부에 좌우될 것이며, 경합하는 어떤 치료법을 표준으로 고려할 것인지에 좌우될 것이다. 만약 신호가 표준 치료법이 없는 질병 상태에 있다면 단일 암(arm)의 잘-제어된 연구가 중추적인 시도로서 작용할 수 있을 것이다. 만약 표준으로 간주되는 제제가 경합한다면 접전적 연구가 수행된다.

본원에 설명된 본 발명의 많은 변형 및 다른 구체예들은 이들 발명이 속해있는 당업계의 숙련자들에 의해 전술한 설명과 관련된 도면에 제시된 교시내용의 유익을 가지는 것으로 인지될 것이다. 그러므로 본 발명은 개시된 특정 구체예에 한정되지 않고, 변형 및 다른 구체예들이 첨부되는 청구범위 및 본원에 개시된 구체예 목록의 범주에 포함되는 것으로 의도된다는 것이 인지될 것이다. 비록 특정 용어들이 본원에서 사용되었지만 그것들은 일반적으로 및 설명적 개념으로만 사용되며 제한하려는 목적은 아니다.

본 명세서에 언급된 모든 공보 및 특허 출원은 본 발명이 속하는 당해 기술분야의 숙련자 수준을 나타낸다. 본원에 참조로 인용된 모든 공보 및 특허 출원은 각각의 공보 또는 특허 출원이 구체적으로 그리고 개별적으로 참조로 언급된 것과 같은 의미이다.

### 산업상 이용 가능성

본 발명의 치료 방법에 의해 만성 임파세포성 백혈병 (CLL), 그 질병의 징후, 또는 그 질병의 예후를 가지고 있는 환자의 치료가 개선된다.



기탁된 미생물 또는 다른 생물학적 물질에 관한 표시

(PCT 제 13 bis 규칙)

A. 하기 표시는 상세한 설명 19페이지 20행에 언급된 기탁된 미생물 또는 다른 생물학적 물질에 관한 것이다.	
B. 기탁의 확인 <input type="checkbox"/> 또는 다른 기탁이 추가 장에서 확인됨 <input type="checkbox"/>	
기탁기관명칭 아메리칸 타입 컬처 콜렉션	
기탁기관주소 (우편번호와 국가명 포함) 미국 버지니아 20110-2209 매나사스 유니버시티 블러바드 10801	
기탁일 2003년 9월 17일	수탁번호 PTA-5543
C. 추가 표시 (적용되지 않을 경우 공란). 이 정보가 추가 장에서 계속됨 <input type="checkbox"/>	
25페이지 16행; 91페이지 14행; 121페이지 19행; 126페이지 10행	
D. 표시가 적용될 지정국 (모든 지정국에 대한 표시가 아닐 경우)	
E. 표시의 개별 제공 (적용되지 않을 경우 공란).	
이하에 기술된 표시가 이후에 국제사무국에 제출될 것임 (예를 들면, 기탁의 수탁번호와 같은 표시의 일반적 성질을 특정함).	
<p>본 용지는 국제출원이 출원될 때 국제출원과 함께 접수함 (수리관청이 점검함)</p> <p style="text-align: right;">----- (담당자)</p> <p>국제사무국에 의한 접수일(출원인으로부터)</p> <p style="text-align: right;">----- (담당자)</p>	

## 도면의 간단한 설명

도 1은 mAb CHIR-12.12의 경쇄 (light chain)와 중쇄 (heavy chain)에 대한 아미노산 서열을 도시한다. 경쇄의 리더 영역 (SEQ ID NO:2의 잔기 1-20), 가변 영역 (SEQ ID NO:2의 잔기 21-132), 및 불변 영역 (SEQ ID NO:2의 잔기 133-239)은 도 1A에 도시된다. 중쇄의 리더 영역 (SEQ ID NO:4의 잔기 1-19), 가변 영역 (SEQ ID NO:4의 잔기 20-139), 및 불변 영역 (SEQ ID NO:4의 잔기 140-469)은 도 1B에 도시된다. 도 1B에 도시된 mAb CHIR-12.12의 중쇄에 대한 또 다른 불변 영역은 SEQ ID NO:4의 위치 153에서 알라닌 잔기에 대한 세린 잔기로의 치환을 반영한다. mAb CHIR-12.12의 중쇄의 이 변이체에 대한 완전한 서열은 SEQ ID NO:5에 나타낸다.

도 2는 mAb CHIR-12.12에 대한 경쇄 (도 2A; SEQ ID NO:1) 및 중쇄 (도 2B; SEQ ID NO:3)에 대한 코딩 서열을 도시한다.

도 3은 mAb CHIR-5.9의 경쇄 및 중쇄에 대한 아미노산 서열을 도시한다. 경쇄의 리더 영역 (SEQ ID NO:6의 잔기 1-20), 가변 영역 (SEQ ID NO:6의 잔기 21-132), 및 불변 영역 (SEQ ID NO:6의 잔기 133-239)은 도 3A에 도시된다. 중쇄의 리더 영역 (SEQ ID NO:7의 잔기 1-19), 가변 영역 (SEQ ID NO:7의 잔기 20-144), 및 불변 영역 (SEQ ID NO:7의 잔기 145-474)은 도 3B에 도시된다. 도 3B에 도시된 mAb CHIR-5.9의 중쇄에 대한 또 다른 불변 영역은 SEQ ID NO:7의 위치 158에서 알라닌 잔기에 대한 세린 잔기로의 치환을 반영한다. mAb CHIR-5.9의 중쇄의 이 변이체에 대한 완전한 서열은 SEQ ID NO:8에 나타낸다.

도 4는 사람 CD40의 짧은 이소 형태 (도 4B에 도시된 아미노산 서열; SEQ ID NO:10)에 대한 코딩 서열 (도 4A; SEQ ID NO:9), 및 사람 CD40의 긴 이소 형태 (도 4D에 도시된 아미노산 서열)에 대한 코딩 서열 (도 4C; SEQ ID NO:11)을 도시한다.

도 5는 단클론성 항체 CHIR-12.12가 CLL에 걸린 환자들(n=9)로부터의 암세포의 CD40L-중재된 증식을 48시간째에 (도 5A) 및 72시간째에 (도 5B) 억제하는 것을 도시한다.

도 6은 단클론성 항체 CHIR-12.12가 CLL 환자 세포 (n=9)에 대하여 48시간째에 (도 6A) 및 72시간째에 (도 6B) 자극 효과를 나타내지 못하는 것을 도시한다.

도 7은 단클론성 항체 CHIR-12.12 대 단클론성 항체 Rituxan<sup>R</sup>에 의한 CLL 셀라인의 보다 효과적인 ADCC-중재된 세포 용해를 도시한다.

도 8은 차등 주사 열량측정법 (DSC)에 의해 측정된, 상이한 pH 제형 중의 CHIR-12.12의 열 용융 온도를 도시한다.

## 도면

### 도면1A

**CHIR 12.12 경쇄:**

리더:

**MALPAQLLGLLMLWVSGSSG**

가변:

**DIVMTQSPLSLTVPTEGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGS  
NRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPFTFGPGTKVDIR**

불변:

**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT  
EQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

### 도면1B

**CHIR-12.12 중쇄:**

리더:

**MEFGLSWVFLVAILRGVQC**

가변:

**QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEESN  
RYHADSVKGRFTISRDNKITYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGT  
LTVSS**

불변:

**ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPA  
PELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDG  
SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

또 다른 불변 영역:

**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPA  
PELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDG  
SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

## 도면2A

CHIR-12.12의 경쇄의 DNA 서열:

5'atggcgctccctgctcagctcctggggctgtaagtctctgggtctctggatccagtgaggatattgtgatgactcagctc  
cactctccctgaccgtcacccctggagagccggcctccatctctgcaggtccagtcagagccctctgtatagtaaggata  
caactatttgattggtacctcagaagccaggcagctccacaggtcctgatctcttgggttctaatcgggcctccgggg  
tcctgacaggttcagtgccagtggtcagcagacagattttacactgaaaatcagcagagtgaggctgaggatgttgggg  
tttattactgcatgcaagctcgacaactccattcactttcggccctgggaccaaagtggatagacagaaactgtggtgca  
ccatctgtctcatcttcccgcattctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgtgtaataacttctatcc  
cagagaggccaaagtacagtggaagtggtgataacgccctccaatcggttaactccaggagagtggtcacagagcagga  
cagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaagcagactacgagaaacacaaagctacgc  
ctcggaagtcacccatcaggcctgagctcgccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgtag3'

## 도면2B

CHIR-12.12의 중쇄의 DNA 서열 (인트론 포함):

5'atggagtttgggctgagctgggtttccttgttctattttaagaggtgtccagtgatgagtgagtggtggagctggggg  
aggcgtgtgctcagcctgggaggtccctgagactctctgtgcagcctctggttaccctcagtagctatggcatgactgg  
gtccgccaggctccaggcaagggtggagtggtggcagttatcatatgaggaagtaataagataccatgcagactc  
cgtgaaggggccgattcaccatctccagagacaattccaagatcacgctgtatctgcaaatgaacagcctcagaactgagga  
cacggctgtgtattactgtcgagagatgggggtatagcagcacctgggctgactactggggccagggaacctgtgca  
ccgtctcctcagcaagtaccagggccatccgtcttcccctggcgcccgtagcaagagcacctctgggggcacagc  
ggccctgggtgctgtgcaagactacttcccgaaccgtgtgacggtgtgtggaactcaggcgcctgaccagcggc  
gtgcacaccttccggctgtctacagctcctcagacttactcctcagcagcgtgtgtgaccgtgcccctcagcagcttgg  
gcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacagccagcaacaccaaggtggacaagagagttgtgagagccag  
cacaggaggagggtgtctgtggaagccaggctcagcgtcctgcctggacgcatcccggctatgcagctccagctcc  
agggcagcaaggcagggccccgtctgctcttccaccggagcctctgcccggcccatcagctcagggagagggtctt  
ctggctttttccaggctctgggcaggcacagggtagggtgcccctaaccaggccctgcacacaaaggggcaggtgtgtg  
ggctcagacctgccaaagccatctcgggagggacctgcccctgacctaaagccaccccaaggccaaactctccact  
ccctcagctcggacaccttctctctccagattccagtaactcccaatcttctctgcagagcccaatctgtgacaaaac  
tcacacatgccaccgtgccaggttaagccagccagcctcgcctcagctcaaggcgggacaggtgcccctagagta  
gcctgcatccaggagcagggccccagccgggtgtgacacgtccacctccatcttctcagcacctgaactcctggggg  
gacctgacgtcttctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctccggacctgaggtcacatgctgtgtgtgt  
ggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactgtgtacgtggacggcgtggagggtgcataatgccaagacaaag  
ccgggggagagcagfacacagcagctaccgtgtgtgtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggca  
aggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctccagccccatcgagaaacacatcctcaagccaaagggtgggac  
ccgtgggtgtgagggccacatggacagaggccggctcggccaccctctgcccgtgagagtgaccgctgtaccaacct  
ctgtccctacagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccgggagagatgaccaagaaccagg  
tcagcctgacctgctgtcaagggttctatccagcgacatcgccgtgagtgaggagagcaatgggcagccggagaa  
caactacaagaccacgctccgtgtgtgactccgacggctcttctctctatagcaagctcaccgtggacaagagcag  
gtggcagcaggggaacttctctcatgctcgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccct  
gtctccgggtaatga3'

## 도면3A

CHIR-5.9 경쇄:

리더:

MALLAQLLGLLMLWVPGSSG

가변:

AIVMTQPPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWLQQRPGQPPRLLIYKFF  
RRLSGVPRDRFSGSGAGTDFTLKI SRVEAEDVGYYCMQVTFPHFTFGQTRLEIK

불변:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
EQDSKDYSLSTLTLSKADYEHKRVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC



### 도면3B

CHIR-5.9 종래:

리더:

MGSTAILALLLAVLQGVCA

가변:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIPGDSD  
TRYSPSFQGGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYICARGTAAGRDYYYYYGMVDV  
WGQGTITVTVSS

불변:

ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA  
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG  
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

또 다른 불변 영역:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA  
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG  
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

### 도면4A

사람 CD40의 짧은 이소형태에 대한 코딩 서열:

```
1 atggttcgtc tgcctctgca gtgcgtcctc tggggctgct tgctgaccgc tgtccatcca
61 gaaccaccca ctgcatgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcatgt ctgtctttg
121 tggcagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcaactgaaac ggaatgcctt
181 ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc tggacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggcctggcac tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgct
361 ctgcaccgct catgctcgcc cggctttggg gtcaagcaga ttgctacagg ggtttctgat
421 accatctgcg agccctgccc agtcggcttc tctccaatg tgtcatctgc ttctgaaaaa
481 tgtcaccctt ggacaaggct cccagatcg gctgagagcc ctggtgtgta tccccatcat
541 cticgggata ctgtttgcca tcctcttggt gctggtcttt atcaaaaagg tggccaagaa
601 gccaaccaat aa
```

### 도면4B

사람 CD40의 코드화된 짧은 이소형태:

```
1 mvrplqcvl wgccltavhp epptacrekq ylinsqccsl cqpqqlvds cteftetecf
61 pcgesefldt wnrethchqh kyedpnlgrr vqqkgtsetd tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvds ticepcpvfg fsnvssafek chpwtrspgs aespggdphh
181 lrdpvchplg aglyqkggqe anq
```

#### 도면4C

사람 CD40의 긴 이소형태에 대한 코딩 서열:

```

1 atggttcgtc tgcctctgca gtgcgtcttc tggggctgct tgcagaccgc tgcctatcca
61 gaaccacca ctgcatgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcagtg ctgttctttg
121 tgcagccag gacagaaact ggtgagtac tgcacagagt tcaatgaaac ggaatgcctt
181 ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaaacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggcgtggcac tgtacagtg aggcctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct catgctgcc cggtttggg gtcaagcaga ttgctacagg ggtttctgat
421 accatctgcg agccctgccc agtcggcttc ttccaatg tgcctatgc ttccgaaaaa
481 tgcaccctt ggacaagctg tgagacaaa gacctggtg tgcaacaggc aggcacaaac
541 aagactgatg ttgtctgtg tccccaggat cggctgagag cctgtgtgtg gatccccatc
601 atctcggga tctgtttgc catcctctg gtgctggtct ttatcaaaaa ggtggccaag
661 aagccaacca ataaggcccc ccaccaaaag caggaacccc aggagatcaa ttttcccgac
721 gatcttctg gctccaacac tgcctgtcca gtgcaggaga cttatcatgg atgccaaccg
781 gtcaccagg aggatggcaa agagagtcgc atctcagtc aggagagaca gtga
    
```

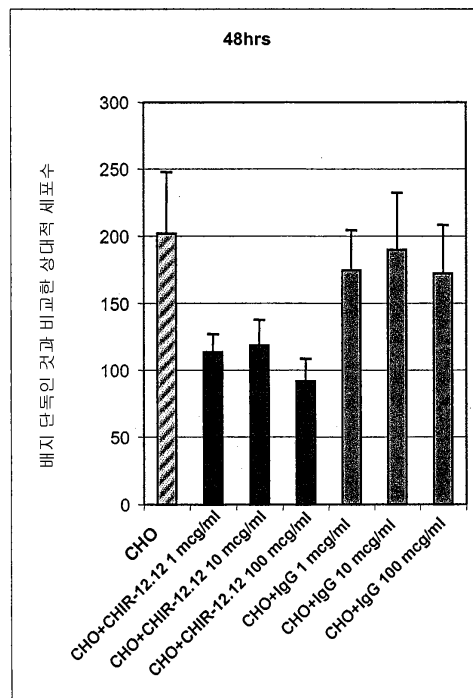
#### 도면4D

사람 CD40의 코드화된 긴 이소형태:

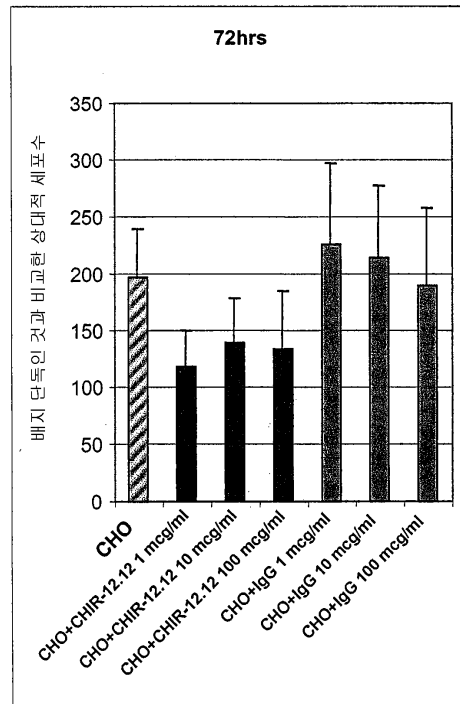
```

1 mvrplqlcvi wgclltavhp epptacreq ylinsqccsl cpggklvsd cteftetel
61 pcgesefldt wnrethchqh kyedpnlgr vqqkgtsetd tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvssafek chpwtsctk dlvvqqagtn
181 ktdvvcgpd rlravvipi ifgilfaill vlvfikkvak kptnkaphpk qepqeinfpd
241 dlpgsntaap vqetlhgcqp vtqedgkesr isvqerq
    
```

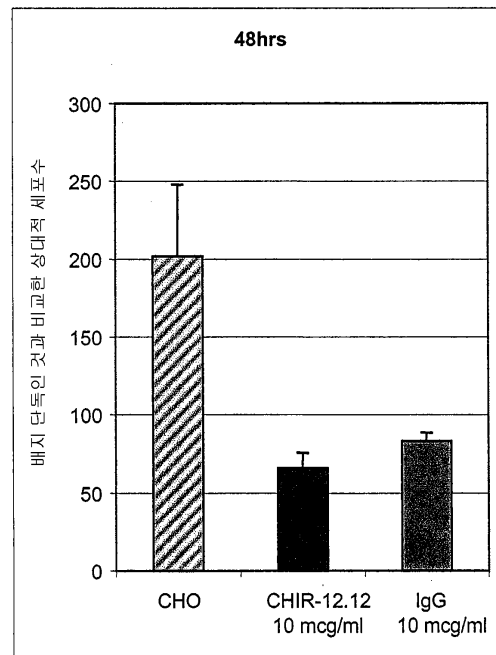
#### 도면5A



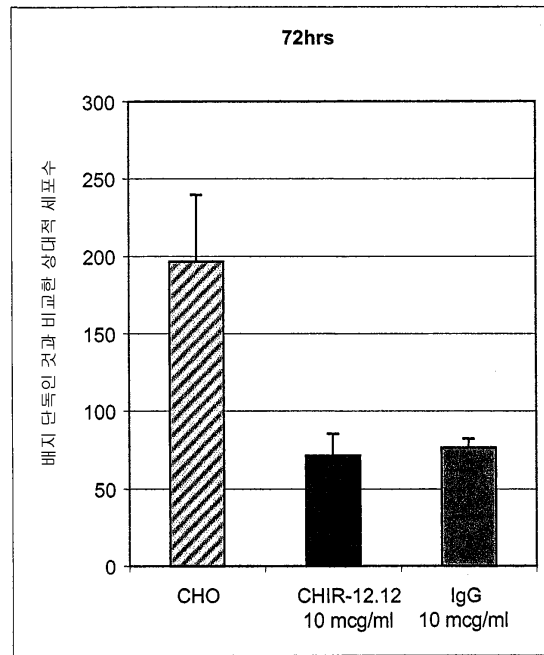
도면5B



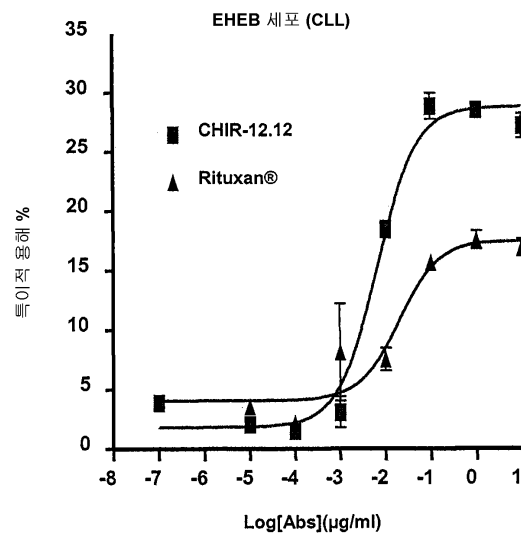
도면6A



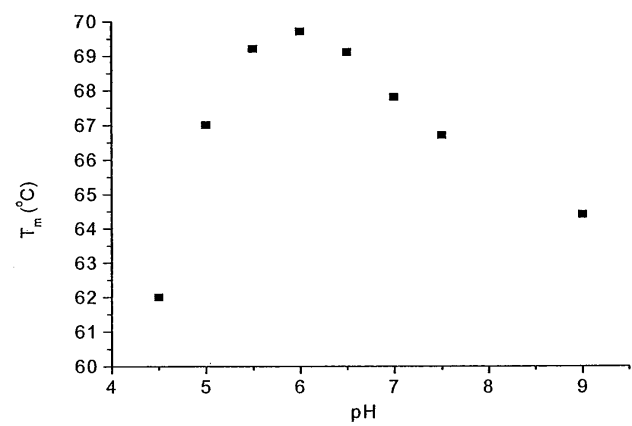
도면6B



도면7



도면8



서열목록

<110>	Chiron Corporation
<120>	Use of Antagonist Anti-CD40 Antibodies for Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia
<130>	PP22708.002 (284267)
<150>	60/611,794
<151>	2004-09-21
<150>	60/565,710
<151>	2004-04-27
<150>	60/525,579
<151>	2003-11-26
<150>	60/517,337
<151>	2003-11-04
<160>	12
<170>	FastSEQ for Windows Version 4.0
<210>	1
<211>	717
<212>	DNA
<213>	Artificial Sequence
<220>	
<223>	Coding sequence for light chain of CHIR-12.12 human anti-CD40 antibody
<220>	
<221>	CDS

<222> (1) .. (717)

<400> 1

atg gcg ctc cct gct cag ctc ctg ggg ctg cta atg ctc tgg gtc tct 48  
Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser  
1 5 10 15

gga tcc agt ggg gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg acc 96  
Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr  
20 25 30

gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tcc agt cag agc 144  
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser  
35 40 45

ctc ctg tat agt aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag 192  
Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys  
50 55 60

cca ggg cag tct cca cag gtc ctg atc tct ttg ggt tct aat cgg gcc 240  
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala  
65 70 75 80

tcc ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt 288  
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
85 90 95

aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac 336  
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr  
100 105 110

tgc atg caa gct cga caa act cca ttc act ttc ggc cct ggg acc aaa 384  
Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys  
115 120 125

gtg gat atc aga cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg 432  
Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
130 135 140

cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg 480  
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu  
145 150 155 160

ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat 528  
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp  
165 170 175

aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac 576  
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp  
180 185 190

agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa 624  
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys

195

200

205

gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag 672  
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln  
210 215 220

ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 717  
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230 235

<210> 2

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 2

Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser  
1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr  
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser  
35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys  
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala  
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr  
100 105 110

Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys  
115 120 125

Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu  
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp  
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp  
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys  
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln  
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230 235

<210> 3  
<211> 2016  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Coding sequence for heavy chain of CHIR-12.12 human anti-CD40  
antibody (with introns)

<400> 3  
atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgctatth taagaggtgt ccagtgtcag 60  
gtgcagttgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120  
tgtgcagcct ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180  
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tcatatgagg aaagtaatag ataccatgca 240  
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagatcac gctgtatctg 300  
caaatgaaca gcctcagaac tgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag agatgggggt 360  
atagcagcac ctgggcctga ctactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctctcagca 420  
agtaccaagg gcccatccgt cttccccctg ggcgccgcta gcaagagcac ctctgggggc 480  
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540  
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 600  
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 660  
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagagagt tggtagagag 720  
ccagcacagg gagggagggt gtctgctgga agccaggctc agcgctcctg cctggacgca 780  
tcccggctat gcagtcccag tccagggcag caaggcaggc cccgtctgcc tcttcacccg 840  
gaggcctctg cccgccccac tcatgctcag ggagaggggc ttctggcttt tccccaggc 900



tctgggcagc cacaggctag gtgcccctaa cccaggccct gcacacaaag gggcaggctg 960  
 tgggctcaga cctgccaaga gccatatccg ggaggaccct gccctgacc taagcccacc 1020  
 ccaaaggcca aactctccac tccctcagct cggacacctt ctctcctccc agattccagt 1080  
 aactcccaat cttctctctg cagagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc 1140  
 gtgcccaggt aagccagccc aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag 1200  
 agtagcctgc atccaggga aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt 1260  
 cctcagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttccccca aaaccaagg 1320  
 acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg 1380  
 aagaccctga ggtcaagtgc aactggtaag tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga 1440  
 caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc 1500  
 tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac aaagccctcc 1560  
 cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggtg gaccctggg gtgcgagggc 1620  
 cacatggaca gaggccggct cggccccacc tctgccctga gagtgaccgc tgtaccaacc 1680  
 tctgtcccta cagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atcccgggag 1740  
 gagatgacca agaaccaggc cagcctgacc tgccctggta aaggcttcta tcccagcgac 1800  
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1860  
 gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1920  
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1980  
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga 2016

<210> 4

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy chain of CHIR-12.12 human anti-CD40 antibody

<400> 4

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

1

5

10

15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln

20	25	30
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
35	40	45
Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
50	55	60
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala		
65	70	75
80		
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile		
85	90	95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val		
100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr		
115	120	125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly		
130	135	140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly		
145	150	155
160		
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val		
165	170	175
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
180	185	190
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		
195	200	205
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val		
210	215	220
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys		
225	230	235
240		
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		
245	250	255
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
260	265	270
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
275	280	285
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
290	295	300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys  
 465

<210> 5  
 <211> 469  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Heavy chain of variant of CHIR-12.12 human anti-CD40 antibody

<400> 5  
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Arg Gly  
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
 20 25 30

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

35	40	45	
Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
50	55	60	
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala			
65	70	75	80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile			
85	90	95	
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val			
100	105	110	
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr			
115	120	125	
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly			
130	135	140	
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly			
145	150	155	160
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val			
165	170	175	
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe			
180	185	190	
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val			
195	200	205	
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val			
210	215	220	
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys			
225	230	235	240
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu			
245	250	255	
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr			
260	265	270	
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val			
275	280	285	
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val			
290	295	300	
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser			
305	310	315	320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys  
465

<210> 6

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Light chain of CHIR-5.9 human anti-CD40 antibody

<400> 6

Met Ala Leu Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Pro  
1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly Ala Ile Val Met Thr Gln Pro Pro Leu Ser Ser Pro  
20 25 30

Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser  
35 40 45

Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg

```

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

```

```

<210>      7
<211>     474
<212>      PRT
<213>      Artificial Sequence

```

```

<220>
<223>      Heavy chain of CHIR-5.9 human anti-CD40 antibody

```

```

<400>      7
Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
1              5              10              15
Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20             25             30
Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe

```

35	40	45	
Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu			
50	55	60	
Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser			
65	70	75	80
Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser			
	85	90	95
Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met			
	100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Ala Ala Gly Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr			
	115	120	125
Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
	130	135	140
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Lys			
	145	150	155
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
	165	170	175
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
	180	185	190
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
	195	200	205
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
	210	215	220
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
	225	230	235
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
	245	250	255
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
	260	265	270
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
	275	280	285
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
	290	295	300
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	305	310	315
			320

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
370 375 380

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
420 425 430

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

<210> 8

<211> 474

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy chain of variant CHIR-5.9 human anti-CD40 antibody

<400> 8

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

Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe  
35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu



50		55		60	
Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser					
65		70		75	80
Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser					
	85		90		95
Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met					
	100		105		110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Ala Ala Gly Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr					
	115		120		125
Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser					
	130		135		140
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys					
145		150		155	160
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr					
	165		170		175
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser					
	180		185		190
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser					
	195		200		205
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr					
	210		215		220
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys					
225		230		235	240
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys					
	245		250		255
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro					
	260		265		270
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys					
	275		280		285
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp					
	290		295		300
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu					
305		310		315	320
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu					
	325		330		335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
370 375 380

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
420 425 430

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
465 470

<210> 9  
<211> 609  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(609)  
<223> Coding sequence for short isoform of human CD40

<400> 9  
atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc 48  
Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr  
1 5 10 15

gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta 96  
Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu  
20 25 30

ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg 144  
Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val  
35 40 45

agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa 192  
Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu  
50 55 60

agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac 240  
Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His  
65 70 75 80

aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc 288  
Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr  
85 90 95

tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg 336  
Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr  
100 105 110

agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg ccc ggc 384  
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly  
115 120 125

ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag 432  
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu  
130 135 140

ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa 480  
Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys  
145 150 155 160

tgt cac cct tgg aca agg tcc cca gga tcg gct gag agc cct ggt ggt 528  
Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly  
165 170 175

gat ccc cat cat ctt cgg gat cct gtt tgc cat cct ctt ggt gct ggt 576  
Asp Pro His His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly  
180 185 190

ctt tat caa aaa ggt ggc caa gaa gcc aac caa 609  
Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln  
195 200

<210> 10

<211> 203

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr  
1 5 10 15

Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu

20 25 30  
 Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val  
 35 40 45  
 Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu  
 50 55 60  
 Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His  
 65 70 75 80  
 Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr  
 85 90 95  
 Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr  
 100 105 110  
 Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly  
 115 120 125  
 Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu  
 130 135 140  
 Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys  
 145 150 155 160  
 Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly  
 165 170 175  
 Asp Pro His His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly  
 180 185 190  
 Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln  
 195 200

<210> 11  
 <211> 831  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (831)  
 <223> Coding sequence for long isoform of human CD40

<400> 11  
 atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc  
 Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr  
 1 5 10 15

48

gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta	96
Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu	
20 25 30	
ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg	144
Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val	
35 40 45	
agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa	192
Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu	
50 55 60	
agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac	240
Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His	
65 70 75 80	
aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc	288
Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr	
85 90 95	
tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg	336
Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr	
100 105 110	
agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg ccc ggc	384
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly	
115 120 125	
ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag	432
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu	
130 135 140	
ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa	480
Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys	
145 150 155 160	
tgt cac cct tgg aca agc tgt gag acc aaa gac ctg gtt gtg caa cag	528
Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln	
165 170 175	
gca ggc aca aac aag act gat gtt gtc tgt ggt ccc cag gat cgg ctg	576
Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu	
180 185 190	
aga gcc ctg gtg gtg atc ccc atc atc ttc ggg atc ctg ttt gcc atc	624
Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile	
195 200 205	
ctc ttg gtg ctg gtc ttt atc aaa aag gtg gcc aag aag cca acc aat	672
Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn	
210 215 220	

aag gcc ccc cac ccc aag cag gaa ccc cag gag atc aat ttt ccc gac 720  
Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp  
225 230 235 240

gat ctt cct ggc tcc aac act gct gct cca gtg cag gag act tta cat 768  
Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His  
245 250 255

gga tgc caa ccg gtc acc cag gag gat ggc aaa gag agt cgc atc tca 816  
Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser  
260 265 270

gtg cag gag aga cag 831  
Val Gln Glu Arg Gln  
275

<210> 12  
<211> 277  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 12  
Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr  
1 5 10 15

Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu  
20 25 30

Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val  
35 40 45

Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu  
50 55 60

Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His  
65 70 75 80

Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr  
85 90 95

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr  
100 105 110

Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly  
115 120 125

Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu  
130 135 140

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys  
145 150 155 160

Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln  
 165 170 175  
 Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu  
 180 185 190  
 Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile  
 195 200 205  
 Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn  
 210 215 220  
 Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp  
 225 230 235 240  
 Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His  
 245 250 255  
 Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser  
 260 265 270  
 Val Gln Glu Arg Gln  
 275